

論文の内容の要旨

生物・環境工学 専攻
平成 19 年度博士課程 入学
氏 名 高西 伊吹
指導教員 八木 一行

論文題目 アーバスキュラー菌根共生系におけるリン・窒素の輸送

菌根 (Mycorrhiza) とは菌類と植物根の共生系のことで、陸上植物の 8 割以上の種が菌根共生を形成している。アーバスキュラー菌根菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi、以下、AM 菌) は、Glomeromycota 門に属する菌類で、草本植物を中心に幅広い分類群の植物種と菌根共生を形成する。AM 菌は植物根よりも広範囲の土壤中に伸長する外生菌糸から養分を吸収し、植物に供給する働きがある。特に土壤中での移動性が低いリン酸を供給することによる植物生育促進効果は顕著である。そのため、枯渇が危惧されているリン資源を効率的に利用するために農業分野での利用が期待されている。

AM 菌から植物へのリン酸供給機構は次のように考えられている。AM 菌は土壤中に伸長した外生菌糸から吸収したリン酸を、リン酸重合体であるポリリン酸に変換し菌糸内に蓄積する。ポリリン酸は植物根内の内生菌糸まで輸送された後、加水分解され無機リン酸として植物に供給される。リン酸供給機構の背景にある生化学的な特性は AM 菌の種類により異なると考えられるが、その違いが AM 菌から植物へのリン酸供給に及ぼす影響については十分な情報が得られていない。

また、AM 菌はリンだけでなく窒素など他の元素についても、土壤中から吸収し植物に供給することが知られている。窒素は植物生育を制限する最も重要な養分であり、AM 菌の窒素供給が植物の生育を促進するならば、これまで考えられていた以上に AM 菌が植物の養分獲得に影響を及ぼしている可能性が高い。しかし、リンに比べ土壤中での窒素の移動性

は高く、AM 菌による窒素供給が植物の生育にどの程度寄与しているのかに関してはほとんど分かっていない。

近年、AM 菌から植物への窒素供給に関わる代謝過程が明らかにされている。すなわち、AM 菌は土壌中の無機態窒素を吸収し、アルギニンに変換する。アルギニンは内生菌糸まで輸送された後、尿素サイクルを経てアンモニアとして植物に供給されると考えられている。アルギニンはポリリン酸のカウンターイオンとしての機能を持つのではないかと推測されており、AM 菌においてリンと窒素が互いに関連している可能性が考えられるが、これまでそのような情報は得られていない。

本研究では、AM 菌のリン貯蔵物質であるポリリン酸に着目して植物へのリン酸供給との関係を明らかにするために、1) 異なる AM 菌感染根におけるポリリン酸蓄積の比較、2) AM 菌感染根内のポリリン酸代謝速度の推定、3) ポリリン酸の蓄積様式と植物の生育との関係の検討を試みた。また窒素に関しては、AM 菌による窒素供給が植物の生育に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、AM 菌におけるリン吸収と窒素吸収の関連性を明らかにするために、AM 菌のリン吸収に及ぼす土壌中の無機態窒素の影響を評価した。

1. アーバスキュラー菌根におけるポリリン酸

1-1. 数種のアーバスキュラー菌根菌感染根におけるポリリン酸蓄積の比較

AM 菌のリン酸供給における生化学的な特性を比較するため、AM 菌感染根内のポリリン酸に着目し、その蓄積様式の違いを数種の AM 菌間で比較した。AM 菌体内には、数リン酸残基からなる短鎖ポリリン酸から千残基を越える長鎖ポリリン酸まで存在することが知られている。そこで、ポリリン酸を定量するために、ポリリン酸に特異的な PPK (ポリリン酸キナーゼ) 法と PPX (ポリリン酸ホスファターゼ) 法を用いることとした。PPK 法は、測定感度が高いが短鎖のポリリン酸に対する定量性が低い。その一方で PPX 法は、短鎖のポリリン酸に対する定量性が PPK 法より高いが感度が低い。これらの方法を同時に用いることによって、全ポリリン酸 (PPX 法)、長鎖ポリリン酸 (PPK 法)、両者の差を短鎖ポリリン酸と分別定量することができた。

系統的に異なる *Archaespora leptoticha*, *Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* および農業資材として利用されている *Glomus* sp. R10 をそれぞれタマネギに接種して栽培し、栽培期間中の AM 菌感染根におけるポリリン酸の蓄積を、植物の生育や AM 菌感染率と合わせて比較した。

AM 菌感染根におけるポリリン酸の蓄積は菌の種類によって異なり、必ずしも植物に対する生育促進効果や AM 菌感染率が高いほどポリリン酸が蓄積しているわけではなかった。また、栽培期間が長くなるにつれて感染根内のポリリン酸が減少し、それにともない生育促進効果が大きくなる傾向が認められた。このことは、根内の AM 菌菌糸内に蓄積したポリリン酸が加水分解されて植物に供給される代謝回転の重要性を示唆するものである。

1-2. アーバスキュラー菌根菌感染根におけるポリリン酸代謝速度

AM 菌から植物へのリン酸供給速度は、根内の AM 菌菌糸に蓄積するポリリン酸が加水分解され、無機リン酸として放出する過程で律速されていると想定し、AM 菌感染根におけるポリリン酸消失速度から AM 菌から植物へのリン酸供給速度を推定しようと試みた。すなわち、*Glomus* sp. R10 を接種してポット栽培した植物（タマネギ）を培地より分離し、根外の AM 菌を取り除いた後、水耕液中で培養し、根内におけるポリリン酸の消失を調べた。

その結果、AM 菌感染根内のポリリン酸は培養 6 時間で約 50% 減少した。このことは、植物根内の AM 菌菌糸におけるポリリン酸代謝速度がかなり速いことを示唆するものである。しかし、実験系の制御が難しく、植物へのリン酸供給速度の推定にはいたらなかった。

1-3. *Glomus* 属感染根における短鎖ポリリン酸量と植物の生育との関係

植物の生育や AM 菌のリン酸供給に人為的に差を生じさせることができれば、AM 菌感染根内のポリリン酸の蓄積と植物の生育との関係を推測できるのではないかと考えられる。そこで、植物生育量に差を生じさせるために、培地のリン酸濃度を 4 段階に設定した条件で、長ネギを用いて栽培試験を行った。供試菌株には、生化学的な特性が比較的類似すると考えられる、同じ *Glomus* 属の 2 菌株 (*Glomus* sp. R10 および *G. etunicatum*) を用い、根内のポリリン酸蓄積様式と植物の生育との関係を検討した。

両 AM 菌とも、培地のリン酸水準に関わらず比較的高い感染率を示し、植物の生育は培地のリン酸水準に従い増加した。AM 菌感染根内の長鎖ポリリン酸量と地上部乾物重との関係は菌の種類によって異なった。その一方で、AM 菌感染根内の短鎖ポリリン酸量と地上部乾物重の間には、菌の種類によらず高い正の相関関係が認められた。このことから、*Glomus* 属感染根においては、短鎖ポリリン酸が植物に供給されるリン酸プールとして機能していると考えられた。

2. アーバスキュラー菌根菌による宿主植物への窒素供給

AM 菌がリンだけでなく窒素に関しても土壤中から吸収し植物へ供給することは ^{15}N トレーサーを用いた実験により 1980 年代より知られていた。しかし、土壤中の無機態窒素（硝酸イオン）は水分の移動とともに容易に移動するため、植物自身による窒素吸収と AM 菌を通じた窒素供給を区別して定量的に評価されてこなかった。そこで、植物根と外生菌糸のコンパートメントに分けた根箱において、両コンパートメントの間に空隙を設けることによって、コンパートメント間を菌糸は通過できるが水分は移動できない装置を作成した。

この根箱の片側あるいは両側に ^{15}N 標識 NH_4NO_3 を加えて、AM 菌 *Glomus* sp. R10 を接種して植物（長ネギ）を栽培した。菌糸側に ^{15}N を添加した場合、植物体に検出される ^{15}N 量および植物乾物重が有意に増加することを確認した。このことから、少なくとも根圏への窒素供給が制限される条件では、AM 菌の窒素供給により植物の生育が促進されること

が明らかとなり、AM 菌の窒素供給が植物の生育を促進することを初めて示した。また菌糸側への窒素添加により、植物体のリン濃度および根内のポリリン酸濃度も有意に増加することが示され、AM 菌の窒素吸収とリン吸収の間に関連がある可能性が示唆された。

3. アーバスキュラー菌根菌のリン吸収に及ぼす窒素の影響

上記の結果から、土壌中の窒素の存在によって AM 菌のリン吸収が影響を受ける可能性が示唆された。また、AM 菌菌糸内の窒素輸送態と考えられているアルギニンはポリリン酸のカウンターイオンとしての機能を有するのではないかと推測されていることから、AM 菌においてリンと窒素の関連性が予想される。そこで、ポリリン酸を AM 菌のリン酸吸収の指標として、AM 菌のリン吸収に及ぼす土壌中無機態窒素の影響を調べた。すなわち、AM 菌を共生させた植物（長ネギ）を砂耕で栽培し、途中で培地中の窒素養分を洗い流し窒素飢餓条件にさらした後、窒素添加（窒素濃度 2 水準）または無添加の処理を行い、その後の AM 菌感染根内および外生菌糸のポリリン酸蓄積を調べた。

その結果、AM 菌感染根内および外生菌糸におけるポリリン酸蓄積は窒素添加により有意に促進されることが明らかとなった。また植物根リン濃度も窒素添加により高く維持されており、土壌中の無機態窒素濃度の上昇によって AM 菌のリン酸吸収および植物へのリン酸供給が促進されたと考えられた。このことは、AM 菌のリン吸収は土壌中の無機態窒素濃度によって制限され得ることを示唆するものである。

以上、本研究によって、AM 菌感染根内のポリリン酸蓄積の菌株による違いと植物の生育との関係を明らかにした。また AM 菌による窒素供給は植物の生育を促進する効果があることを明らかにした。さらに、AM 菌のリン吸収には窒素が必要であり、土壌中の窒素が AM 菌のリン吸収の制限因子となり得ることを明らかにした。これらの成果は、AM 菌のリン酸供給機構のさらなる理解を助け、また土壌圏の物質循環において AM 菌がリンだけでなく窒素に関しても影響を及ぼしていることを示唆させるものである。さらに、AM 菌を農業分野などの応用面で効果的に利用するために有益な知見であることが予想される。