

	サトウ タクミ
氏 名	佐藤 匠
本籍（国籍）	宮城県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第632号
学位授与年月日	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸による酸性ホスファターゼの浸出機構の解明 (Mechanism of release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi)
学位審査委員	主査 教授 俵谷 圭太郎 副査 准教授 程 為国 副査 教授 河合 成直 副査 教授 青山 正和

論文の内容の要旨

リンは土壌中では拡散係数が低く、根の周囲の土壌にはリン欠乏領域が存在している。加えて、土壌中の全リン酸中 20–80 %は有機態リン酸の形態となっていて、植物が利用できない不可給態リン酸として存在している。リン酸質肥料の原料であるリン鉱石の採掘は 2030 年頃にピークを迎え、50–100 年後には枯渇するだろうと見積もられている。したがって、有機態リン酸の利用は農業において極めて重要な課題であると考えられる。一部の植物は土壌中の有機態リン酸を分解するために根から酸性ホスファターゼ (ACP) を分泌し、ACP の分泌はリン欠乏条件下で上昇する。陸上植物の 80 % はアーバスキュラー菌根 (AM) 菌と共生関係を結ぶ。AM 菌は土壌中に外生菌糸を伸長させることによりリン酸吸収の表面積を増加させ、植物のリン酸吸収を促進する。一方で AM 菌が土壌中の有機態リン酸を利用できるかどうかは、知られていない。したがって、本研究の目的は (1) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の検出、(2) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の菌種間差、(3) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の低リン条件への応答の解明である。

ネギ (*Allium fistulosum* L.) に AM 菌 *Rhizophagus clarus* Nicolson & Schenck CK001 を接種して 2 コンパートメントポットで生育させた。菌根区画および菌糸区画から土壌溶液を得た。また植物から根の抽出物を得た。また水耕でネギを生育させ、根の浸出物を得た。*R. clarus* CK001 をネギおよびアマ (*Linum usitatissimum* L.) 毛状根に接種し、それぞれ砂耕および *in vitro* で培養し、外生菌糸を回収して、外生菌糸の抽出物を得た。これらの土壌溶液、根の抽出物、根の浸出物、および外生菌糸の抽出物を SDS-PAGE で解析し、活性染色によって ACP 活性を検出した。継代されていた AM 菌 11 種およびインドネシア土壌からトラップ培養した AM 菌 10 種をネギに接種し、土壌溶液中の ACP

活性を測定した。ネギに *R. clarus* CK001、*R. irregularis* Schenck & Smith DAOM197198、および *Paraglomus* sp. 19-a をそれぞれ接種し、2 コンパートメントポットで生育させ、土壤溶液を SDS-PAGE で解析し、活性染色によって ACP 活性を検出した。ネギに AM 菌 *R. clarus* CK001 を接種し、2 コンパートメントポットで異なる 4 段階のリン濃度 (0、0.15、0.30、および 0.50 g P₂O₅ kg⁻¹) の土壤で生育させ、菌糸区画から土壤溶液を得た。その土壤溶液中の ACP 活性を測定した。アマ毛状根に *R. clarus* CK001 を接種し、5 段階のリン濃度 (0.3、1.0、3.0、15.0、および 30.0 μM) の培地を含む 2 コンパートメントペトリ皿で生育させた。菌糸区画の外生菌糸を回収し、外生菌糸表面および浸出された ACP 活性を測定した。

播種後 55 日目のネギは接種区では菌根形成しており、非接種区ではしていなかった。また、接種区の地上部リン吸収量および地上部乾物重は非接種区に比べて高かった。*R. clarus* CK001 接種区の菌根区画および菌糸区画の土壤溶液と、砂耕および *in vitro* 培養から得られた外生菌糸の抽出物から 187 kDa の ACP 活性を検出した。11 菌株全てがネギに菌根形成した。50 mL 容プラスチックポットから得られた、土壤溶液中の ACP 活性は接種された菌種によって非接種区と同じかあるいは高かった。インドネシア土壤からトラップ培養した 10 菌株は全てネギに菌根形成した。そのうちの 6 菌株で、50 mL 容プラスチックポットから得られた土壤溶液中の ACP 活性は、非接種区に比べて低かった。*R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp* 19-a をそれぞれ接種した播種後 55 日目のネギは、地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重が非接種区のネギより高かった。それらの 3 菌株の接種区の菌根区画および菌糸区画の土壤溶液中から、187 kDa の ACP を検出した。播種後 40 および 45 日目において、*R. clarus* CK001 接種区のネギが生育した菌糸区画の土壤溶液中の ACP 活性は、0 g P₂O₅ 区で、0.50 g P₂O₅ 区より高かった。2 コンパートメントペトリ皿の菌糸区画で生育した外生菌糸表面および浸出された ACP 活性は、3 μM 区で、30 μM 区より高かった。

本論文の結果は (1) AM 菌は外生菌糸から ACP を浸出し、(2) ACP の浸出には菌種間差があり、(3) ACP の浸出は低リン条件で上昇することを明らかにした。これらの結果は AM 菌による土壤中有機態リン酸の利用の可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

リンは土壤中では拡散係数が低く、根の周囲の土壤にはリン欠乏領域が存在している。加えて、土壤中の全リン酸中 20~80 % は有機態リン酸の形態となっていて、植物が利用できない不可給態として存在している。リン酸質肥料の原料であるリン鉱石の採掘は 2030 年頃にピークを迎え、50-100 年後には枯渇するだろうと見積もられている。したがって、有機態リン酸の利用は農業において極めて重要な課題であると考えられる。一部の植物は土壤中の有機態リン酸を分解するために根から酸性ホスファターゼ (ACP) を分泌し、ACP の分泌はリン欠乏条件下で上昇する。陸上植物の 80 % はアーバスキュラー菌根 (AM) 菌と共生関係を結ぶ。AM 菌は土壤中に外生菌糸を伸長させることによりリン酸吸収の表面積を増加させ、植物のリン酸吸収を促進する。一方で AM 菌が土壤中の有機態リン酸を利用できるかどうかは、知られていない。

本論文は、(1) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の検出、(2) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の菌種間差、(3) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の低リン条件への応答の解明を行ない、以下の知見を得た。

Rhizophagus clarus CK001 接種区の菌根区画および菌糸区画の土壤溶液と、砂耕および *Linum usitatissimum* の *in vitro* 培養から得られた外生菌糸の抽出物から 187 kDa の ACP 活性を検出した。インドネシア土壌からトラップ培養した 10 菌株は全てネギに菌根形成した。そのうちの 6 菌株で、土壤溶液中の ACP 活性は、非接種区に比べて低かった。*R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp* 19-a をそれぞれ接種した播種後 55 日目のネギは、地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重が非接種区のネギより高かった。それらの 3 菌株の接種区の菌根区画および菌糸区画の土壤溶液中から、187 kDa の ACP を検出した。播種後 40 および 45 日目において、*R. clarus* CK001 接種区のネギが生育した菌糸区画の土壤溶液中の ACP 活性は、0 g P₂O₅ 区で、0.50 g P₂O₅ 区より高かった。2 コンパートメントペトリ皿の菌糸区画で生育した外生菌糸表面および浸出された ACP 活性は、3 μM 区で、30 μM 区より高かった。

本論文の結果は (1) AM 菌 *Rhizophagus clarus* は外生菌糸から ACP を浸出し、(2) ACP の浸出には菌種間差があり、(3) *Rhizophagus clarus* の外生菌糸からの ACP の浸出は低リン条件で上昇することを明らかにした。これらの結果は AM 菌による土壌中の有機態リン酸の利用の可能性を示唆する。

これらの知見は植物栄養学・土壌学に基礎的知見を与えるものであるのみならず、有機態リン酸の利用に貢献する可能性がある。本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Sato T, Ezawa T, Cheng W, Tawarayama K. (2015) Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Soil Science and Plant Nutrition* (掲載証明付き)