

学位論文題名

Analysis of microbial dynamics in the rhizosphere of white lupin

(ホワイトルーピン根圏における微生物動態の解析)

学位論文内容の要旨

持続発展可能な環境保全型農業に対する社会的指向が増す昨今、農地生態系機能を活用した農法に寄せる期待が高まりつつある。しかし環境保全にあたる土壌生態系機能の重要性が指摘される一方で、土壌生態系に関する知見は不十分な現状にある。前世紀初頭、植物根近傍の土壌において、微生物活動に著しい変化が生じる「根圏効果」と呼ばれる現象が報告され、以来その生態的意義と応用に関する研究が行われてきた。この過程において「植物生育促進根圏細菌」と呼ばれる、植物の生育を促進する効果を持つ細菌の存在が見出され、その活用が試みられてきた。本研究では、土壌生態系機能の高度利用による新規環境保全型農法の確立を目指し、植物生育促進根圏細菌と、その機能に着目した植物-根圏細菌間相互作用の解析を行った。

食糧生産に不可欠なリン肥料は、原料である「リン資源の枯渇」が憂慮されており、植物によるリン利用効率の向上は、農学における最重要課題の一つである。生体内リン蓄積形態の一つである「フィチン酸」は、土壌中で難溶性の塩を形成し、高い安定性を示す。このため土壌蓄積有機態リンの50%をも占め、陸圏生態系におけるリン循環を妨げる要因の一つにあげられている。植物体が土壌フィチン酸を利用するためには、これを可溶化しかつ分解し、植物体が吸収可能な無機リン酸を遊離させる必要がある。しかし一般に、植物体はフィチン酸分解酵素「フィターゼ」の分泌活性を示さないため、土壌中のフィチン酸を直接利用することができない。これまでにもこの問題の解決を目指し、分泌型フィターゼを導入した遺伝子組み換え植物の利用などが試みられた。しかし、こうした手法では、植物は土壌中のフィチン酸をリン栄養源として利用することができなかった。この結果は、これまで発酵目的や動物用試料などに利用されてきた既存のフィチン酸利用法が、土壌中では有効に機能し得ないことを明らかにした。

近年、マメ科植物「ホワイトルーピン」が、土壌中のフィチン酸をリン栄養源として利用可能であることが明らかとなった。ホワイトルーピンは、クラスター根と呼ばれる側根が高密度に発生したブラシ状の組織を構築し、キレート物質である有機酸を、クラスター根の成熟期に集中して分泌することで、フィチン酸を可溶化する能力を持つ。しかし過去の研究から、ホワイトルーピンは、フィチン酸を分解するために必要なフィターゼの分泌活性を示さないことがわかった。そのため本研究では、キレート物質を多量に放出する植物の根圏において可溶化されたフィチン酸が、根圏微生物に由来するフィターゼによって分解されるという仮説のもと、①ホワイトルーピン根圏に

棲むフィチン酸資化性細菌のスクリーニングと②植物への接種効果の解析を行った。

①フィチン酸資化性細菌のスクリーニング：1914年より施肥制限処理をおこなっている北海道大学長期連用圃場にホワイトルーピンを栽培し、水溶性のフィチン酸ナトリウム塩を単一のリンおよび炭素栄養源として増殖可能であることを指標に、300菌株を超えるフィチン酸資化性細菌を、ホワイトルーピンの根圏外土壌・根圏土壌・根面から単離した。単離菌株全体の89%の菌株は16S rDNA 配列から系統学的に*Burkholderia* 属として同定され、AFLP解析からこれらの細菌が異なる遺伝型を示すことを確認した。さらに単離菌株は水溶性のフィチン酸ナトリウム塩を与えた場合と比べ、フィチン酸アルミニウム塩や鉄塩といった難溶性のフィチン酸塩を与えた場合、その増殖速度は明確に低下した。この結果はフィチン酸資化性細菌単独では、土壌中に存在する難溶性のフィチン酸塩を利用することが困難であることを示唆している。さらにフィチン酸に対する炭素およびリン栄養源としての要求度を解析した結果、開花期に獲得された菌において、フィターゼ活性に対して根面採取菌が根圏土壌採取菌よりも高いリン吸収能を示す傾向が明らかとなった。

②植物体への接種効果：マメ科モデル植物「ミヤコグサ」は無菌条件下ではフィチン酸をリン栄養源として利用することが困難である。そこで、ミヤコグサを用いて植物体にフィチン酸からリンを供給し得る菌株のスクリーニングを行い、無菌的な栽培を続けた対照区と比べ、植物体の生育を有意に促進する15菌株を獲得した。特に*Burkholderia* sp. FpRpG4 株は非接種区に対して乾物重とリン吸収量において対照区と比べ3倍以上の生育促進効果を示すとともに、ミヤコグサの側根形成を誘導した。さらに*Burkholderia* sp. FpRpG4 株をホワイトルーピンに接種したところ、側根が高密度に発生するクラスター根の形成誘導が確認された。ノトバイオート型水耕栽培法とマイクロアレイ法を用いた植物体遺伝子発現網羅的解析の結果、*Burkholderia* sp. FpRpG4 株によるクラスター根形成誘導は、*Burkholderia* sp. FpRpG4 株の産生する物質の影響によることが明らかとなった。植物体によるリン吸収量と根量との間には正の相関があり、さらにホワイトルーピンの持つ土壌中のフィチン酸利用能力に、クラスター根が大きく寄与することが指摘されている。これらのことから、フィチン酸を分解する能力を持つ*Burkholderia* sp. FpRpG4 株がホワイトルーピンのクラスター根形成を誘導し、ホワイトルーピンに多量の有機酸を分泌させることで土壌に蓄積している難溶性フィチン酸を可溶化させたのち、これを分解しホワイトルーピンと協同的にフィチン酸を利用していることが示唆された。

近年、肥料学の分野において、土壌中に存在する化合物、特に投入された有機物（肥料）の分解・利用に関わる圃場生態系機能を制御可能な次世代循環型農業技術の開発が求められている。本研究の対象であるフィチン酸は、生体におけるリン蓄積形態の1つであり、植物遺体や有機肥料の構成成分などとして圃場に持ち込まれる。一方でフィチン酸は土壌中で高い安定性を示し蓄積する傾向があるため、植物体による土壌中に存在するリンの利用を妨げる要因の一つとされており、これを効率的に利用することが可能な農法の開発が望まれている。本研究は、土壌フィチン酸の利用可能な植物種とその根圏に存在するフィチン酸資化性細菌との間に、土壌フィチン酸の利用に関して強い相互依存関係が存在することを明らかにした。このことは、根圏細菌叢を制御することによって、フィチン酸資化性根圏細菌の分解したフィチン酸を植物へ効率的に供給する経路を構築できる可能性を示している。本研究の成果は、土壌フィチン酸を効率的に利用することを可能とする農法の開発の基盤となるものであり、土壌リン利用効率改善の観点から鑑みて重要な知見を獲得したことにある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大崎	満
副査	准教授	信濃	卓郎
副査	教授	横田	篤
副査	准教授	和崎	淳 (広島大学生物圏科学

研究科)

学位論文題名

Analysis of microbial dynamics in the rhizosphere of white lupin

(ホワイトルーピン根圏における微生物動態の解析)

当論文は 5 章からなり、図 14、表 6、引用文献 101 を含む、総頁数 70 の英文論文であり、別に 3 編の参考論文が添えられている。本論文の目的は、リン利用効率の向上に向けて土壌蓄積有機態リンの主要形態であるフィチン酸を、植物のリン栄養源として活用するために、マメ科植物ホワイトルーピンの持つ土壌フィチン酸利用機構を解明することにある。

植物が土壌中で難溶性の塩を形成しているフィチン酸を利用するためには、これを土壌より可溶化し、フィターゼで分解して無機リン酸を遊離させる必要がある。一般にフィチン酸を利用できる植物は少ないが、ホワイトルーピンは土壌中のフィチン酸を利用することができることが知られている。ホワイトルーピンは、有機酸を分泌することで難溶性リンを土壌から流離させて可溶化する能力を持つが、しかし過去の研究からフィチン酸を分解するために必要なフィターゼの分泌活性を示さないことがわかっている。そこで本論文では、有機酸を多量に放出する植物の根圏において土壌からフィチン酸が流離し、可溶化したフィチン酸が根圏微生物に由来するフィターゼによって分解されるという仮説のもと、以下の研究を行い仮説の有効性を実証した。

1) ホワイトルーピン根圏におけるフィチン酸資化性根圏細菌の単離・

同定：水溶性のフィチン酸ナトリウム塩を単一のリンおよび炭素栄養源として増殖可能であることを指標に、300 菌株を超えるフィチン酸資化性細菌を、ホワイトループンの根圏土壌・根面・根圏外土壌から単離した。単離菌株全体の 89% の菌株は 16S rDNA 配列から系統学的に *Burkholderia* 属として同定され、AFLP 解析からこれらの細菌が異なる遺伝型を示すことを確認した。さらに単離菌株は水溶性のフィチン酸ナトリウム塩を与えた場合と比べ、フィチン酸アルミニウム塩や鉄塩といった難溶性のフィチン酸塩を与えた場合、その増殖速度が明確に低下した。この結果はフィチン酸資化性細菌単独では、土壌中に存在する難溶性のフィチン酸塩を利用することが困難であることを示唆している。

2) フィチン酸資化性細菌と植物間における相互作用の解析：無菌条件下ではフィチン酸をリン栄養源として利用することが困難であるミヤコグサを用いて、植物体にフィチン酸からリンを供給し得る菌株のスクリーニングを行い、無菌的な栽培を続けた対照区と比べ、植物体の生育を有意に促進する細菌を 15 菌株を獲得した。特に *Burkholderia* sp. FpRpG4 株は乾物重とリン吸収量において非接種区に対して 3 倍以上の生育促進効果を示すとともに、ミヤコグサの側根形成を誘導した。また *Burkholderia* sp. FpRpG4 株をホワイトループンの根に接種したところ、クラスター根の形成誘導が確認された。ノトバイオート型水耕栽培法とマイクロアレイ法を用いた植物体遺伝子発現網羅的解析の結果、*Burkholderia* sp. FpRpG4 株によるクラスター根形成誘導は、培養液中に存在する未同定物質によることが明らかとなった。

以上の結果から、多様なフィチン酸資化性細菌がフィチン酸利用能を示すホワイトループン根圏に存在することを明らかになり、特に *Burkholderia* sp. FpRpG4 株では、ホワイトループンのクラスター根の形成誘導能を有することが明らかとなった。また、土壌に蓄積しているフィチン酸の利用戦略として、ある種のフィチン酸資化性細菌がクラスター根を誘導することでクラスター根から多量の有機酸が分泌され、土壌からフィチン酸は可溶化されると、根圏微生物がフィターゼを分泌してフィチン酸を分解利用するという機構が初めて明らかとなった。つまり、植物とその根圏細菌との間に土壌フィチン酸の利用に関して強い相互依存関係が存在することを解明した。これは学術的に新たな知

見であり、将来、持続的農業技術の開発にも貢献できると期待される。

よって、審査員一同は、海野佑介が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。