

学位論文題名

Roles of polyphosphate in phosphorus acquisition and translocation in arbuscular mycorrhizal symbiosis

(アーバスキュラー菌根共生におけるリン獲得および
輸送におけるポリリン酸の役割)

学位論文内容の要旨

アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) は、陸上植物の 80%と共生関係を築き、土壤中から効率よくリン酸を吸収して宿主植物に供給することから、陸域生態系のリン循環において重要な役割を果たす微生物であると考えられている。しかしながら、本菌は宿主植物の光合成産物を唯一の炭素源とする絶対共生菌であるため、そのリン獲得や輸送のメカニズムには不明な点が多い。これまでに、AM 菌は菌糸内にリン酸の直鎖重合体であるポリリン酸を蓄積することが知られており、この化合物が AM 菌のリンの貯蔵および輸送形態である可能性が示唆されているものの、ポリリン酸蓄積・輸送の生理メカニズムはよくわかっていない。一方、培養困難な AM 菌の生理・生化学・分子生物学的研究を行う手段として、植物を用いたコンパートメント培養法による菌糸の大量培養法が確立されている。本研究は、このコンパートメント培養法を応用して、AM 菌のリン獲得および輸送におけるポリリン酸の役割および重要性を明らかにすることを目的として行った。

1. リン獲得および輸送におけるポリリン酸の役割

これまで、AM 菌の蓄積できるポリリン酸は生体リン全体の 3-17%程度であると報告されており、ポリリン酸以外のリン化合物やオルトリン酸がリン蓄積や輸送に関与する可能性が考えられた。しかし一方で、AM 菌のポリリン酸蓄積速度は活性汚泥から単離されたポリリン酸超集積細菌のそれに匹敵することも報告されており、AM 菌のポリリン酸蓄積能力は潜在的には極めて高いことが予想された。菌糸のみが通過できる 37 μm ナイロンメッシュバッグの内側(根+菌糸コンパートメント)に AM 菌 *Glomus* sp. HR1 を接種したミヤコグサ (*Lotus japonicus*) をリン酸制限下で栽培後、収穫直前に 1 mM リン酸溶

液をメッシュバッグ外側の菌糸コンパートメントに添加した。その後、根+菌糸および菌糸コンパートメントより経時的に根および菌糸を回収し、全リン、オルトリン酸、ポリリン酸含量を測定した。菌糸コンパートメントから回収した菌糸では、リン酸添加直後からポリリン酸は増加し、5 時間後に初期値の 25 倍に増加した後、減少に転じた。この時のポリリン酸の存在比は、最大で全生体リンの 64%に達した。ポリリン酸と全リンは同調的に増加・減少したのに対し、オルトリン酸濃度は低いレベルで一定に保たれていた。メッシュバッグ内側（根+菌糸コンパートメント）から回収した根と菌糸のポリリン酸含量は、菌糸コンパートメントにリン酸を添加してから 5-6 時間後に増加し始めた。以上の結果より、AM 菌はこれまで考えられていた以上に多量のポリリン酸を蓄積する能力があること、ポリリン酸は最大のリン蓄積形態であると共に菌糸内のリンの長距離輸送を仲介することなどが示唆された。

2. ポリリン酸蓄積と同調的なカチオン吸収

ポリリン酸はリン酸 1 残基あたり 1 価の負電荷をもつため、ポリリン酸の蓄積の際には、細胞内の電気的中性を保つための機構が存在すると考えられた。これまで、AM 菌の液胞内にはリンと共にいくつかの無機カチオンが共存していることが X 線解析により示唆されていたことに加え、菌体内に多量に存在する有機カチオンであるアルギニンがポリリン酸と共存していることが推定されていたものの、これら無機および有機カチオンとポリリン酸の量的関係については分かっていなかった。同様のコンパートメント培養法により *Glomus* sp. HR1 を接種したミヤコグサを栽培し、リン酸溶液添加後に菌糸コンパートメントより回収した菌糸のポリリン酸、無機カチオンおよび遊離アミノ酸含量を測定した。リン酸添加 2 時間目以降、菌糸内ポリリン酸増加に伴って有意に増加した無機カチオンは Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} であった。それに対し、アルギニン含量はポリリン酸の蓄積時にも変化せず、ポリリン酸最大蓄積時のアルギニン/ポリリン酸のモル比は 1/15 程度であった。さらに、リン酸添加 0-24 時間後まで測定を続けたところ、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の電荷の合計は、ポリリン酸の電荷とほぼ同調的に増加および減少した。以上の結果より、ポリリン酸蓄積中には Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} がほぼ同調的に取り込まれ、これらの無機カチオンが細胞内の電荷バランスの維持に貢献していることが示唆された。

本研究では、ポリリン酸は AM 菌のリン獲得および輸送において中心的な役割を果たす最大のリン貯蔵形態であること、ポリリン酸蓄積の際には電荷バランスを保つために無機カチオンが同調的に取り込まれることなどを明らかにした。今後、AM 菌から植物へのリン供給メカニズムの全体像を明らかにする

ためには、ポリリン酸合成／代謝や輸送、カチオン吸収などに関連した遺伝子群の単離とその制御メカニズムの解析が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 江 澤 辰 広
副 査 教 授 大 崎 満
副 査 教 授 横 田 篤

学位論文題名

Roles of polyphosphate in phosphorus acquisition and translocation in arbuscular mycorrhizal symbiosis

(アーバスキュラー菌根共生におけるリン獲得および
輸送におけるポリリン酸の役割)

本論文は英文 63 頁、図 13、表 2、引用文献 73、緒言、2 章、総括からなり、ほかに参考論文 3 編が付されている。

アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) は、陸上植物の 80% と共生関係を築き、土壤中から効率よくリン酸を吸収して宿主植物に供給することから、陸域生態系のリン循環において重要な役割を果たす微生物であると考えられている。しかしながら、本菌は宿主植物の光合成産物を唯一の炭素源とする絶対共生菌であるため、そのリン獲得や輸送のメカニズムには不明な点が多い。これまでに、AM 菌は菌糸内にリン酸の直鎖重合体であるポリリン酸を蓄積することが知られており、この化合物が AM 菌のリンの貯蔵および輸送形態である可能性が示唆されているものの、ポリリン酸蓄積・輸送の生理メカニズムはよくわかっていない。一方、培養困難な AM 菌の生理・生化学・分子生物学的研究を行う手段として、植物を用いたコンパートメント培養法による菌糸の大量培養法が確立されている。本研究は、このコンパートメント培養法を応用して、AM 菌のリン獲得および輸送におけるポリリン酸の役割および重要性を明らかにすることを目的として行った。

1. リン獲得および輸送におけるポリリン酸の役割

これまで、AM 菌の蓄積できるポリリン酸は生体リン全体の 3 - 17% 程度であると報告されており、ポリリン酸以外のリン化合物質やオルトリン酸がリン蓄積や輸送に関与する可能性が考えられた。しかし一方で、AM 菌のポリリン酸蓄積速度は活性汚泥から単離されたポリリン酸超集積細菌

のそれに匹敵することも報告されており、AM 菌のポリリン酸蓄積能力は潜在的には極めて高いことが予想された。菌糸のみが通過できる 37 μm ナイロンメッシュバッグの内側（根＋菌糸コンパートメント）に AM 菌 *Glomus* sp. HR1 を接種したミヤコグサ (*Lotus japonicus*) をリン酸制限下で栽培後、収穫直前に 1 mM リン酸溶液をメッシュバッグ外側の菌糸コンパートメントに添加した。この後、根＋菌糸および菌糸コンパートメントより経時的に根および菌糸を回収し、全リン、オルトリン酸、ポリリン酸含量を測定した。菌糸コンパートメントから回収した菌糸では、リン酸添加直後からポリリン酸は増加し、5 時間後に初期値の 25 倍に増加した後、減少に転じた。この時のポリリン酸の存在比は、最大で全生体リンの 64% に達した。ポリリン酸と全リンは同調的に増加・減少したのに対し、オルトリン酸濃度は低いレベルで一定に保たれていた。メッシュバッグ内側（根＋菌糸コンパートメント）から回収した根と菌糸のポリリン酸含量は、菌糸コンパートメントにリン酸を添加してから 5－6 時間後に増加し始めた。以上の結果より、AM 菌はこれまで考えられていた以上に多量のポリリン酸を蓄積する能力があること、ポリリン酸は最大のリン蓄積形態であると共に菌糸内のリンの長距離輸送に関与することなどが示唆された。

2. ポリリン酸蓄積と同調的なカチオン吸収

ポリリン酸はリン酸 1 残基あたり 1 価の負電荷をもつため、ポリリン酸の蓄積の際には、細胞内の電気的中性を保つための機構が存在すると考えられた。これまで、AM 菌の液胞内にはリンと共にいくつかの無機カチオンが共存していることが X 線解析により示唆されていたことに加え、菌体内に多量に存在する有機カチオンであるアルギニンがポリリン酸と共存していることが推定されていたものの、これら無機および有機カチオンとポリリン酸の量的関係については分かっていなかった。同様のコンパートメント培養法により *Glomus* sp. HR1 を接種したミヤコグサを栽培し、リン酸溶液添加後に菌糸コンパートメントより回収した菌糸のポリリン酸、無機カチオンおよび遊離アミノ酸含量を測定した。リン酸添加 2 時間目以降、菌糸内ポリリン酸増加に伴って有意に増加した無機カチオンは Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} であった。それに対し、アルギニン含量はポリリン酸の蓄積時にも変化せず、ポリリン酸最大蓄積時のアルギニン／ポリリン酸のモル比は 1/15 程度であった。さらに、リン酸添加 0－24 時間後まで測定を続けたところ、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の電荷の合計は、ポリリン酸の電荷とほぼ同調的に増加および減少した。以上の結果より、ポリリン酸蓄積中には Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} がほぼ同調的に取り込まれ、これらの無機カチオンが細胞内の電荷バランスの維持に貢献していることが示唆された。

本研究では、ポリリン酸が AM 菌のリン獲得および輸送において中心的な役割を果たす最大のリン貯蔵形態であること、ポリリン酸蓄積の際には電荷バランスを保つために無機カチオンが同調的に取り込まれることなどを明らかにした。

よって審査員一同は、土方野分が博士（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。