

内生菌 *Chaetomium cupreum* が関与するススキ  
(*Miscanthus sinensis* Andersson) の Al 耐性機構の解明

2018 年 1 月

春 間 俊 克

内生菌 *Chaetomium cupreum* が関与するススキ  
(*Miscanthus sinensis* Andersson) の Al 耐性機構の解明

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生物圏資源科学専攻  
博士（農学）学位論文

春 間 俊 克

## 要旨

近年、植物を利用した環境浄化（ファイトレメディエーション）が注目されつつあり、特に鉱山跡地では、たい積物の流出防止や風による飛散防止および荒廃裸地の植生による安定化に対して遷移初期種を利用した緑化技術が重要であるとされる。緑化に用いられる植物は鉱山跡地のような酸性環境において毒性を発現する重金属や Al に対する耐性機構を有し、在来の遷移初期種であることが重要である。そこで本研究では、日本に在来する遷移初期種であり、調査地の鉱山跡地にも自生し、Al 耐性を有すると考えられているススキを対象植物とし、ススキ-内生菌相互作用による Al および重金属耐性機構の解明を目的とした。

調査地における根域土壌およびススキの元素分析を行ったところ、土壌には一般的な褐色森林土と比較して高濃度の Al および Cu, Pb, Zn が含まれていた。また土壌 pH (H<sub>2</sub>O) は調査期間を通して 4.5 以下の酸性を示した。酸性土壌においては Al や重金属がイオン化しやすく、植物に毒性を示していると考えられた。しかし、ススキの Cu, Pb および Zn 濃度は低濃度であり、重金属吸収抑制機構を有する可能性が示唆された。一方、根の Al 濃度は調査期間を通して 2,000 mg/kg と高濃度であり、Al 解毒機構を有すると考えられた。根の化合物を分析したところ主に citric acid, malic acid, chlorogenic acid, および *trans*-aconitic acid が検出された。いずれの化合物も Al を解毒するため、調査地に自生するススキは Al 解毒物質を産生することで Al 耐性を獲得していると考えられた。

ススキの根から内生菌を分離し、高い siderophore 産生能を有する株の遺伝子解析を行ったところ *Chaetomium cupreum* と同定された。分離された *C. cupreum* と滅菌ススキ実生を用いた土壌接種試験の結果、ススキの根の Al および Fe は高濃度であったが、Cu, Pb および Zn は比較的低濃度に保たれており、現地のススキと同様の傾向が確認された。Al や Fe は Cu や Zn と吸収競合するため、ススキは根に蓄積した Al や Fe によって Cu や Zn の排除機構を獲得していると考えられた。接種による栄養元素の吸収促進は確認されなかったが、*C. cupreum* は IAA 様化合物を産生することでススキの成長を促進すると考えられた。接種区、対照区のススキの根には現地のススキと同様に、chlorogenic acid, malic acid, citric acid が共通して含まれていた。検出された chlorogenic acid, malic acid, citric acid によって解毒される乾燥重量 (Dry Weight ; DW) 当たりの Al 濃度を算出したところ、接種区では 280 mg/kg DW, 対照区では 1,400 mg/kg DW の Al が解毒されることが明らかとなった。しかし、ススキの根には解毒できるよりも高濃度の Al が蓄積されており、ススキが産生する化合物による Al 解毒機構以外の機構を有すると考えられた。次にススキの根の細胞における Al の局在を観察するため水耕接種試験を行ったところ、対照区のススキの根の細胞壁に Al の局在が確認された。ススキは Al を細胞壁に隔離することで Al の細胞質への侵入を防ぎ、Al 毒性を軽減していると考えられた。接種区のススキでは、根の表皮と内皮の細胞壁および維管束に Al を局在させることが明らかとなった。内皮にはカスパリー線が存在し、有害な化合物や元素などの吸収移行を抑制することから、内皮への Al 蓄積はカスパリー線が毒性軽減に機能することを示すと考えられた。また根の周囲の菌糸には Al が局在しており、*C. cupreum* は Al を菌糸内に蓄積することでススキの Al 耐性を増強していると考えられた。*Chaetomium cupreum* が増強した Al

耐性機構によって、ススキはより高濃度の Al を蓄積し、重金属の排除機構を増強していると推察された。

*Chaetomium cupreum* は根における Al の局在部位の変化や菌糸内隔離による Al 解毒の効率化、siderophore による Al の解毒によってススキの Al 耐性機構を増強すると考えられた。また高濃度に蓄積された Al や Fe は、Cu や Zn の吸収抑制をすると推察された。このような *C. cupreum* によって増強された Al 耐性機構や重金属排除機構は、ススキが調査地の鉱山跡地で繁茂できる一因であると考えられた。

## 目次

第1章 緒論	1
1.1. 鉱山跡地における土壌環境と緑化	1
1.2. 鉱山跡地に生育する植物に対する元素の毒性・吸収および解毒機構	2
1.3. 内生菌の関与した植物の Al および重金属耐性	3
1.4. 日立鉱山および調査地に自生するススキ	4
1.5. 本研究の目的	5
第2章 鉱山跡地の根域土壌および自生するススキの元素・代謝産物の分析	7
2.1. はじめに	7
2.2. 根域土壌およびススキの採取	7
2.3. 根域土壌分析とススキの含有金属元素の測定	8
2.3.1. 材料および方法	8
2.3.1.1. 根域土壌の pH (H <sub>2</sub> O)および pH (KCl)の測定	8
2.3.1.2. 根域土壌の全量分析	8
2.3.1.3. 根域土壌の交換性 Al の測定	8
2.3.1.4. ススキの含有金属元素	8
2.3.2. 結果	9
2.4. ススキの代謝産物の分析	9
2.4.1. 材料および方法	9
2.4.1.1. 抽出方法	9
2.4.1.2. 分析方法	10
2.4.2. 結果	11
2.5. 考察	12
2.6. 要約	13
第3章 内生菌の siderophore 産生能の評価	23
3.1. はじめに	23
3.2. 内生菌の分離, 内生菌および AM 菌の感染率の算出	23
3.2.1. 材料および方法	23
3.2.2. 結果	24
3.3. CAS アッセイによる内生菌の siderophore 産生能の評価	24
3.3.1. 材料および方法	24
3.3.2. 結果	25
3.4. 考察	25
3.5. 要約	26

第4章	<i>Chaetomium cupreum</i> が増強するススキの Al 耐性機構の解明	34
4.1.	はじめに	34
4.2.	<i>Chaetomium cupreum</i> の培養期間の決定	34
4.2.1.	材料および方法	34
4.2.2.	結果	35
4.3.	土壌接種試験	35
4.3.1.	材料および方法	35
4.3.1.1.	土壌の滅菌および滅菌前後の土壌特性の評価	35
4.3.1.1.1.	交換性 Al の測定	35
4.3.1.1.2.	交換態 Pb の測定	35
4.3.1.1.3.	交換態重金属 (Cu, Pb, Zn) の測定	36
4.3.1.1.4.	交換態陽イオン (Ca <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> ) の測定	36
4.3.1.1.5.	有効態 P の測定	36
4.3.1.1.6.	pH (H <sub>2</sub> O) および pH (KCl) の測定	36
4.3.1.2.	滅菌実生の作製	36
4.3.1.3.	<i>Chaetomium cupreum</i> の培養	36
4.3.1.4.	<i>Chaetomium cupreum</i> の接種	37
4.3.1.5.	成長量の評価	37
4.3.1.6.	ICP-OES による元素分析	37
4.3.1.7.	HPLC によるフェノール性化合物の分析	38
4.3.1.8.	GC/MS による有機酸の分析	38
4.3.1.9.	内生菌の再分離	38
4.3.1.10.	内生菌の菌糸の確認	39
4.3.1.11.	内生菌による IAA 産生能試験	39
4.3.2.	結果	39
4.3.3.	考察	40
4.4.	水耕接種試験	41
4.4.1.	材料および方法	41
4.4.1.1.	<i>Chaetomium cupreum</i> の接種	41
4.4.1.2.	ススキ実生の成長量の評価	41
4.4.1.3.	ICP-OES による元素分析	42
4.4.1.4.	内生菌の再分離	42
4.4.1.5.	根における菌糸および Al の局在部位の観察	42
4.4.2.	結果	42
4.4.3.	考察	43
4.5.	要約	43

第5章 総合考察.....	62
謝辞.....	66
参考文献.....	67

## 図表目次

### 1) 表

表 2-1	根域土壌の pH (H <sub>2</sub> O) および pH (KCl) .....	14
表 2-2	根域土壌の全量無機元素濃度および交換性 Al 濃度 .....	15
表 2-3	ススキの含有無機元素濃度 .....	16-17
表 2-4	2013 年 9 月に採取したススキ根の有機酸およびフェノール性化合物含有濃度 ..	18
表 3-1	1% Malt extract 培地の組成 .....	27
表 3-2	Trypan blue 染色液の組成 .....	28
表 3-3	CAS 培地の組成 .....	29
表 3-4	内生菌による Al および Fe との錯体形成試験 .....	30
表 3-5	<i>Chaetomium</i> による Al および Fe との錯体形成試験 .....	31-32
表 4-1	1% Malt extract 培養液の組成 .....	45
表 4-2	1/3 Hoagland 寒天培地の組成 .....	46
表 4-3	Czapek 液体培地の組成 .....	47
表 4-4	Salkowski 試薬の組成 .....	48
表 4-5	$\gamma$ 線滅菌前後の交換態および有効態元素濃度と pH .....	49
表 4-6	各接種区におけるススキの成長量 .....	50
表 4-7	土壌接種試験におけるススキ実生根部の Al 解毒物質の濃度 .....	51
表 4-8	1/10 Hoagland 液体培地の組成 .....	52
表 4-9	水耕接種試験におけるススキ実生の成長量 .....	53

### 2) 図

図 2-1	2013 年 9 月に採取したススキ根部 MeOH 抽出物の水層および chlorogenic acid 標品の HPLC クロマトグラム (320 nm) .....	19
図 2-2	2013 年 9 月に採取したススキ根部 MeOH 抽出物の水層から確認された 主要ピーク (RT 11.04 分) および chlorogenic acid 標品の UV スペクトラム ..	20
図 2-3	2013 年 9 月に採取したススキ根部 80% EtOH 抽出物・水層の 弱陰イオン交換樹脂吸着画分における EI/MS スペクトル .....	21
図 2-4	Malic acid, <i>trans</i> -aconitic acid, citric acid 標品および 2013 年 9 月に採取した ススキ根部の 80% EtOH 抽出物・水層の弱陰イオン交換樹脂吸着画分を SIM で測定した GC/MS クロマトグラム .....	22
図 3-1	内生菌の感染構造 (microsclerotia) と AM 菌の感染構造 ( <i>Paris</i> -type) .....	33
図 4-1	<i>Chaetomium cupreum</i> (5R7 株) の液体培養試験 .....	54
図 4-2	土壌接種試験に用いたススキ実生 .....	55
図 4-3	土壌接種試験におけるススキ実生の栄養元素濃度 .....	56
図 4-4	土壌接種試験におけるススキ実生の Al および重金属濃度 .....	57



図 4-5	水耕接種試験の接種時の様子.....	58
図 4-6	水耕接種試験に用いたススキ実生.....	59
図 4-7	水耕接種試験に用いたススキ実生の根断面における Al の局在部位.....	60
図 4-8	水耕接種試験において trypan blue 染色および lumogallion 染色した 接種区のススキ実生の根 .....	61
図 5-1	<i>Chaetomium cupreum</i> によって増強されるススキの Al および重金属耐性機構.....	65

## 略語

AM	Arbuscular mycorrhiza
CAS	Chrome azurol S
DSE	Dark septate endophyte
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
GC/MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HDTMA	Hexadecyltrimethylammonium bromide
HPLC	High performance liquid chromatography
ICP-OES	Inductively coupled plasma emission spectrometry- Optical emission spectrometry
i.d.	Inner diameter
1MA	1% Malt extract agar
1ME	1% Malt extract
MeOH	Methanol
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
PIPES	1,4-piperazinediethanesulfonic acid
PTFE	Polytetrafluoroethylene
RT	Retention time
SIM	Selected ion mode
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Trimethylsilyl
UFLC	Ultra fast liquid chromatography
UV-VIS	Ultraviolet-visible absorption spectroscopy

## 第1章 緒論

### 1.1. 鉱山跡地における土壤環境と緑化

重金属とは比重4-5以上の金属元素を指し、古くは青銅や鉄器として、武器や祭器、耕作具として利用され、現代ではCdやPbが電池に、パソコンなどの集積回路にCuなどが用いられており、人間の生活にとって重要不可欠な存在となっている。日本は環太平洋火山地帯に位置するため多くの鉱脈を有し、鉱山開発も古くから行われてきた(畑, 2011)。日本各地では多数の鉱山開発が行われ、長年に渡り日本の経済発展に貢献してきたが、高度経済成長期に次々と閉山した。鉱水や製錬時に排出される硫酸化物や重金属ばい煙を含む排煙は周辺の森林に多大な被害を発生させたため、鉱山が閉山した現在においても周辺の森林植生が完全に回復していない場所も数多く存在する。鉱山跡地の植生が回復しにくい原因として、土壤環境が挙げられる。鉱山跡地の土壤に高濃度に含まれるCdやCu, PbおよびZnといった様々な重金属は植物の生長を著しく阻害する(松本, 1997)。また、硫酸化物などを含んだばい煙によって土壤pHは酸性であることが多い。通常、土壤の重金属やAlは土壤粒子に強く吸着されており、植物にとって低毒性の形態をとっているが、酸性環境下においては重金属やAlは土壤溶液にイオンとして溶脱し、強い植物毒性を示す形態となる(Kabata-Pendias, 2011)。そのため、鉱山跡地は植物が侵入しにくい環境となっていると考えられる。

重金属を高濃度を含む土壤への対策技術として、大きく分けて以下の2つの技術がある(藤原, 2002)。1つ目は重金属の封じ込め技術であり、セメントなどを用いた固化や、硫化ナトリウムや次亜塩素酸ナトリウムによる化学的な不溶化がある。このような封じ込め技術は安価な反面、長期的な安全性には懸念が残る。2つ目は重金属の除去あるいは無毒化技術であり、洗浄水を用いた重金属の除去や1,600°Cから2,000°Cの高温で土壤を熔融し、ガラス状の固形物に固めて無毒化する技術(ガラス固化)がある。しかし、土壤洗浄の場合、シルト分が50%以上の土壤では除去が困難であり、さらに10%未満でないとは経済的に成立しない。またガラス固化においても汎用性が極めて高い反面、経済的な理由から利用できる場面は制限される。これらの技術は、洗浄法を除いて重金属の溶出量を低下させる技術であるが、現在、重金属を除去・固定化する技術が注目されている。その中でも、植物を利用したものを特にファイトレメディエーションという。ファイトレメディエーションは、重金属の吸収・蓄積機構を有する植物を利用して行われる環境浄化である。ファイトレメディエーションには浄化期間が長期間にわたるといったデメリットがあるが、コストが非常に低く比較的低濃度の重金属が複合的に含まれる土壤の広範囲にわたる浄化が期待されている(長谷川, 2007)。1980年代から重金属高蓄積植物の研究が盛んになり、CuやCd, NiおよびPbなどの重金属の浄化が行われ、実用化された例もある(王ら, 2004)。ファイトレメディエーションの中には、重金属を高濃度に蓄積した植物体を刈り取ることで重金属を除去するファイトエクストラクションや、根域において重金属を固定することで系外への流出を防ぐファイトスタビライゼーションなどがあり、ファイトスタビライゼーションは「鉱山跡地での緑化」に分類することができる。日本の鉱山跡地における緑化は、たい積物の流出防止や風による飛散防止(金属鉱業事業団, 1983)および荒廃裸地の植生による安定化(湯浅ら, 1995a)を目的とし

ている。自然放置された鉱山跡地においては、パッチ状に陽性低木が侵入することがあるが、植生の構造的にはコケ層や草本層を欠如した極めて不安定な植生となってしまうため、正常な生態遷移の発展には、緑化の初期段階にあたる裸地から草本の侵入までの段階が重要である（金属鉱業事業団，1983）。客土や種子の吹付工などの人為的緑化が積極的に行われた場合は速やかに遷移が進むが、適切な植物種を導入しなかった場合、植生の衰退・破壊が進行する（湯浅ら，1995b）。そのため緑化に用いられる植物は、植生遷移を妨げず、鉱山跡地のような酸性環境において毒性を発現する重金属や Al に対する耐性機構を有し、正常に生育できる遷移初期種である必要があると考えられる。

## 1.2. 鉱山跡地に生育する植物に対する元素の毒性・吸収および解毒機構

重金属はほとんどすべての岩石に微量に含まれているが、特殊な岩石に由来する土壌や著しく風化が進行した土壌あるいは、著しく低 pH の土壌を除き、過剰害は生じない（松本，1997）。しかし、鉱山跡地は前述した通り、高濃度の重金属を含む酸性土壌環境であるため、過剰障害が生じる。土壌 pH や Fe および Mn 酸化物あるいは炭酸塩が重金属の挙動に影響を与えるが、その中でも特に pH の影響が大きいとされており、pH 5 以下では Cu や Ni, Zn といった重金属の移動性が高くなる（Kabata-Pendias, 2011）。そのため、植物に吸収されやすくなり、強い毒性を発現する。重金属の吸収は、細胞膜上のトランスポーターによって行われていると考えられている。各元素を輸送するトランスポーターは特定の重金属吸収を行うものもあれば、複数の重金属の吸収に関わるものもある（小山，2001；関本，2001）。

一般に、過剰の重金属吸収はまず根の伸長を阻害し、さらに代謝反応の阻害や、地上部におけるクロロシスを引き起こす（長谷川，2010a）。また、Kabata-Pendias (2011) によれば、Cu はイネ科植物の分げつの抑制やリン脂質の酸化などを引き起こし、Pb は古葉の萎れや落葉を引き起こす。また、Zn は葉のクロロシスやネクロシスを引き起こす。Cu および Zn は、Fe の吸収・移行を阻害することも知られており、Fe 欠乏によるクロロシスを引き起こす（長谷川，2010a）。重金属の耐性機構としては、細胞壁における不動化や細胞膜の透過の抑制、含硫タンパク質による解毒、あるいは液胞への隔離などが知られている（Larcher, 2001）。液胞への輸送は液胞細胞膜上に発現した輸送体によると考えられているが、輸送体の多くはまだ同定されていない（長谷川，2010b）。耐性機構の中でも、重金属の無毒化は主に錯体形成によって行われると考えられている（長谷川，2010a）。体内に吸収された重金属は malic acid や citric acid などの有機酸や、cysteine などのアミノ酸と錯体形成し、無毒化される。必須微量元素として重金属を恒常的に維持する場合、glutathione や phytochelatin, metallothionein などに含まれる cysteine 残基と重金属が安定なチオール結合複合体を形成することで無毒化されると考えられている（長谷川，2010a）。

鉱山跡地で植物に顕著な影響をもたらす可能性のある金属元素として、重金属の他に Al がある。Al は土壌構成元素として約 7% を占め、O, Si に次ぐ主要な土壌構成元素であり、金属元素としては最も多く含まれている。Al の土壌における存在形態を大別すると、土壌溶液に溶解したイオン、土壌コロイド表面に吸着された交換態、一次鉱物や粘土鉱物などの構成成分のいずれかの形態で存在する。土壌 pH などの環境条件によってその存在比が異なるが、

自然界に存在し、植物に過剰害を及ぼす形態は土壤溶液に溶解した 3 価の Al イオンである。Al イオンは pH 5 以下から発現し、pH 4.5 以下で急激に増加することから、pH 4.5 以下の酸性土壌における Al の過剰害は、一義的に Al イオンによると考えられている (三枝, 1994)。Al 障害は根端細胞に現れ、その伸長を著しく阻害する。Al の蓄積に対する初期反応は伸長阻害および callose の分泌であり、根端の表層細胞に Al が蓄積すると短時間のうちに縦方向への伸長が阻害され、横に膨らんだ状態となる (松本・山本, 2001)。

Al の耐性機構は排除機構と細胞内抵抗性機構の 2 つに大別できる (松本, 2003)。排除機構には、根圏の pH を上昇させることで毒性の強い Al を不溶化する機構および、citric acid や malic acid などの有機酸や多糖類である mucilage の分泌によって根への取り込みを抑制する機構がある (Yang et al., 2000 ; Archambault et al., 1996)。分泌される有機酸は植物種によって様々で、コムギ (*Triticum aestivum*) は malic acid を、スナップエンドウ (*Phaseolus vulgaris*) やトウモロコシ (*Zea mays*) は citric acid を、ソバ (*Fagopyrum esculentum*) は oxalic acid を根から分泌することが明らかになっている。その他にエンバク (*Avena sativa*) のように malic acid と citric acid の 2 種類の有機酸を分泌する種もある (Ma et al., 2001)。

細胞内抵抗性機構は細胞内に侵入した Al に直接的に作用する、あるいは Al によって引き起こされた代謝異常などを修復する機構である。細胞内に侵入した Al などの金属元素は液胞隔離されたり、citric acid などの有機酸、sulfide などの無機酸および錯体形成するタンパク質 (metallothioneins) などと錯体が形成されることで無毒化される (Tomsett and Thurman, 1988)。Ma et al. (1997) はソバでは細胞内の Al : oxalic acid が 1 : 3 の割合で結合することで、Al を解毒していることを明らかにした。また、フェノール性化合物や pectate, 内生菌の産生する siderophore にも金属と錯体形成する能力があり (Barceló and Poschenrieder, 2002), チャ (*Camellia sinensis*) においては flavonoid 類や catechin といったフェノール性化合物が Al と錯体形成し、解毒している (Nagata et al., 1992)。

### 1.3. 内生菌の関与した植物の Al および重金属耐性

重金属が多く含まれる土壌においては菌類と植物は共に適応・進化してきたと考えられており、アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) やエリコイド菌根菌あるいは外生菌根菌と共生することで、植物は重金属の毒性を緩和していると考えられている (Jentschke and Godbold, 2000 ; Martino et al., 2003)。近年、内生菌も植物の重金属耐性を増強することが報告されており (Li et al., 2011 ; Nagata et al., 2015 ; Yamaji et al., 2016), 内生菌の関与した植物の有害金属耐性に関心が向けられている。

内生菌の定義は、細菌、糸状菌、藻類などに細かく分割されているが、主に糸状菌に限っては「内生菌」と呼ばれ、「十分な増殖期あるいは潜伏期間の後に病原性を引き起こす可能性があるが、植物の生活環のうち全期間あるいは一時期において生きた植物組織内に病徴を示すことなく感染し、増殖できる菌類」と定義される (Stone et al., 2000)。植物体内に潜伏する微生物の発見は古く、1879 年に De Bary が述べた “the living together of dissimilar organisms” という記述が初出とされ、現在では宿主選択性や感染部位、その働きなどによって Class 1~4 の 4 種類に大別されている (Rodriguez et al., 2008)。最も初期に着目されたのは植物体内で

動物に有害な物質を産生する Class 1 の内生菌であり、Bacon et al. (1977) は牧草に *Epichloe typhina* が感染することで perloline を産生し、家畜に毒性をもたらすようになることを明らかにした。また根に生息し、黒い隔壁を有する内生菌は、特に dark septate endophyte (DSE) と分類されており、熱帯から南極・高山に普遍的に分布し、約 114 科 320 属 600 種もの植物と菌根を形成する (Jumpponen and Trappe, 1998)。植物への影響も多岐にわたるが (Jumpponen, 2001)、内生菌は植物へ弱い害を与えつつ、有益な作用をもたらす (Brundrett, 2006) ことが特徴である。内生菌の感染によって植物の防御反応が活性化され (Schultz and Boyle, 2006)、結果として内生菌は植物の熱、塩害、乾燥および重金属などの環境ストレスに対する耐性を増強する (Rodriguez et al., 2009) と考えられる。環境ストレスの一つである重金属に関する報告もある。トウモロコシに DSE の一種の *Exophiala pisciphila* H93 を接種すると Pb, Zn, Cd の毒性が軽減され、さらに地下部および地上部の生長量が有意に増加する (Li et al., 2011) ことから、内生菌の感染は植物に重金属ストレスなどの環境ストレス耐性を付与していると考えられる。鉱山跡地に自生するリョウブ (*Clethra barbinervis*) の根から分離された内生菌 *Phialocephala fortinii*, *Rhizoderma veluwensis* および *Rhizoscyphus* sp. をそれぞれリョウブの滅菌実生に接種すると、リョウブ実生の成長が促進されて体内の重金属濃度が低下する希釈効果が生じることで、重金属環境下でも重金属毒性を示すことなく生残できる (Yamaji et al., 2016) という報告がある。内生微生物による植物への重金属耐性付与の他の機構として siderophore などの産生が注目されており、siderophore が金属イオンと錯体形成を行う (Reichard et al., 2007; Maestri et al., 2010; Rajkumar et al., 2012) ことで有害元素の毒性を軽減できる可能性がある。Siderophore は Fe 欠乏時に産生される Fe キレーターであり、微量必須栄養元素である Fe の獲得に大きく貢献していることが知られているが、近年では Fe 以外の重金属との錯体形成も着目され、植物-微生物相互作用を利用したファイトレメディエーションへの応用も研究されている (Rajkumar et al., 2010)。また 500 種類以上の化合物が siderophore として知られており、重金属の蓄積や解毒に対する植物-内生菌相互作用の関与を検討する研究もなされている (Sheng et al., 2008)。一方、内生菌による植物の Al 耐性の増強に関する研究は現時点ではない。

#### 1.4. 日立鉱山および調査地に自生するススキ

調査地とした日立鉱山はかつて日本有数の銅鉱山であり、古くは江戸時代の寛永通宝を鑄造していたと考えられている。ジャパンエナジー・日鉱金属 (1994) はその歴史を以下のようにまとめている。明治 40 年以降、近代的な製錬所の導入や大型化などによる本格的な開発が進められたがそれと並行して煙害が発生し、クリ (*Castanea crenata*) やアカマツ (*Pinus densiflora*) などの枯死や生長阻害が見られた。その対策として尾根に沿って神峰煙道が造られ、空気との自然混和・希釈が期待されたが、比重の重い排煙は谷部に集まりむしろ逆効果となった。さらに政府から排煙ガス濃度規制命令が発令されたことでだるま煙突が建設されたが、これも煙害の解決には至らなかった。これらの建設期間にも山肌は多量の亜硫酸ガスに晒され、植生は破壊されて付近は山肌野面を晒すようになった。このような事実を受け、1915 年 3 月に当時世界最高の 155.7 m の大煙突が建設され、はるか上空で排煙を希釈するこ

とで煙害被害の解決をみた。さらに農事試験場などを設け、周辺農地への亜硫酸ガスに対する耐性品種のムギの配布や肥料の配布を行い、山肌の緑化を行う際には、煙害に強い樹種であるオオシマザクラ (*Prunus speciosa*)、クロマツ (*Pinus thunbergii*) などの苗 500 万本余りを植林した。現在では植生が回復しており、植林された樹種の他に、リョウブ (渡部, 2008; Yamaji et al., 2016)、クサレダマ (*Lysimachia vulgaris*; 中村, 2013)、ドクゼリ (*Cicuta virosa*; Nagata et al., 2015)、ヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense*; 宇山, 2014)、ツルウメモドキ (*Celastrus orbiculatus*; 江並, 2014) およびススキ (*Miscanthus sinensis*) などが自生種として侵入している。しかし、現在でも土壌には高濃度の Cu, Zn, Pb, Cd を含有する土壌が存在し (久保田ら, 1986)、かつての亜硫酸ガスの影響によると考えられる強酸性土壌も存在する (渡部, 2008)。酸性土壌では H<sup>+</sup>の直接的な障害に加え、Ca, Mg, K, P などの必須栄養元素の欠乏や (Larcher, 2001)、Al, Fe, Cu, Pb, Zn などの有害金属元素の生物利用性の増加 (Kabata-Pendias, 2011) が生じる。鉾山周辺に自生するヘビノネゴザ (広井, 1974) や蛇紋岩地帯に自生するヒバ (*Thujopsis dolabrata*; Okimura et al., 2015) やタカネグンバイ (*Thlaspi japonicum*; Mizuno et al., 2003) は土壌の有害金属に対する耐性を獲得していると考えられており、このような過酷な環境に自生する植物は有害金属に対する何らかの耐性機構を有すると考えられた。

本研究の調査地である鉾山跡地の土壌は未だに高濃度の重金属を含む酸性土壌であるが、そのような環境でもススキは自生しており、ススキは重金属や Al に対して耐性を有していると考えられた。そこで、本研究ではススキを調査対象植物とした。ススキは日本の代表的な C4 植物であり (Naidu et al., 2003)、貧栄養環境下でも生育できる (Lewandowski et al., 2003)。生態学的には、攪乱直後に侵入する先駆種として知られており (Hirata et al., 2007)、さらに火山地帯などの硫酸酸性土壌 (An et al., 2008) や伐採直後の森林 (Inoue, 2003) にも優占的に侵入できる。ススキは本鉾山の農事試験場でも煙害耐性が比較的強いことが確認されており (ジャパンエナジー・日鉾金属, 1994)、堀江・根本 (1990) は、ススキが土壌 pH 4.5 の条件下でも生長量を減少させず、高い耐酸性および Al 耐性を有していることを確認している。ススキは遷移初期の貧栄養かつ酸性土壌に生育することから、P などの吸収を促進するアーバスキュラー菌根菌に関する研究がなされているが (Kawahara and Ezawa, 2013) Al 耐性に関するススキ自身の代謝産物に関する研究は少なく (Kayama, 2001)、内生菌が関与したススキの Al 耐性機構の研究はなされていない。

#### 1.5. 本研究の目的

鉾山跡地で自生するススキの代謝産物や内生菌との相互作用を考慮した研究はなく、酸性土壌環境で植物に有害な影響を与える可能性がある Al や重金属耐性機構は未だ明確にされていない。試験管内の実験に留まらず、実際の現地環境を考慮した上で実験室実験を行い植物-内生菌相互作用を解明することは、植物の本来有する耐性機構を理解する上で重要である。そこで本研究では、現地でのススキ-内生菌相互作用を考慮し、ススキの重金属・Al 耐性機構を明らかにすることを目的とした。研究の結果、ススキは Al を過剰に含有することが明らかとなったので、Al については化学的・植物組織学的な面から Al 耐性機構を明らかにすることとした。ススキは日本全土に分布する在来種であることから、鉾山跡地などの土砂流亡な

どを抑制する緑化に用いても在来種に被害を与える可能性は少ない。またススキは遷移初期種であり、ススキ優占群落は森林へと遷移することから、緑化植物として有用だと考えられる。本研究で解明される基礎的知見は鉱山跡地など、一般的に植物が侵入しにくい場所の緑化技術に寄与できると考えられる。

## 第2章 鉱山跡地の根域土壌および自生するススキの元素・代謝産物の分析

### 2.1. はじめに

ススキは酸性土壌環境下でもよく生育することが知られている。堀江・根本（1990）の研究によって、pH 4.5 という酸性条件下でも生長することが可能であり、加えて、高いAl耐性を有することが明らかにされた。調査地とした鉱山跡地にもススキの群生が確認されているが、かつての鉱山開発により、その土壌は未だ強い酸性であり高濃度の重金属（Cu, Ni, Zn, Cd, Pb）を含有する（渡部, 2008 ; 富沢, 2009）。Alや重金属は、土壌pHによってその形態を変化させ、低pH土壌においては生物利用性が増すことが知られている（三枝, 1994 ; Kabata-Pendias, 2011）。Alや重金属は生体内に吸収されると、活性酸素種の発生、酸化ストレスや根の伸長阻害を生じさせる（長谷川, 2010b）が、植物体に含まれるフェノール性化合物や有機酸、タンパク質などの中にはAlや重金属と錯体形成や、発生した活性酸素種を除去することでAlや重金属の解毒を行う化合物がある。以上のことから、鉱山跡地で生育するススキには、Alや重金属に対する耐性機構として、解毒物質を産生している可能性が考えられた。そこで本章では、調査地における根域土壌およびススキの元素分析を行うことで、野外環境においてススキが含有するAlや重金属の濃度を明らかにした上で、ススキの代謝産物の分析を行い、Alあるいは重金属の解毒物質を同定することを目的とした。

### 2.2. 根域土壌およびススキの採取

調査地の中でもススキの群生している地点（N36° 37' 36.60", E140° 38' 9.78"）を採取地とした。無機元素分析に供するススキは2012年7, 8, 9, 10, 11月に5個体ずつ採取し、同時にpH(H<sub>2</sub>O), pH(KCl)を測定するための根域土壌を採取した。また、2012年8月にススキと共に採取した根域土壌を全量分析および交換性Alの測定に供した。採取に当たってはリター層を除去した後、200×200×200 mmの範囲内のススキおよび根域土壌を採取した。ススキは地上部、枯死部、地下茎、根、花期には穂の4あるいは5部位に分割し、流水で洗浄後、脱塩水で再度洗浄して土壌を除去した。洗浄したススキを送風定温乾燥機（FC-610, Advantec, Tokyo, Japan）内で、80°Cで48時間乾燥した後、ハサミで切断した。さらに粉碎機（IMF-650, Iwantani, Tokyo, Japan）で摩砕し、再度80°Cで24時間乾燥した後、使用するまでデシケーター内に保存した。元素分析には、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-OES; Optima 7300 DV, PerkinElmer, Waltham, USA）を用いた。各分析に供する根域土壌は屋内で2週間風乾後、2 mmメッシュの篩を通過させて得られた風乾細土を用いた。

代謝産物の同定には2013年9月に採取したススキを用いた。採取したススキの根を流水で洗浄して土壌を洗い流した。その後脱塩水ですすぎ、軽く水気を取り除いてから新鮮重量（Fresh Weight ; FW）を測定した後、有機溶媒を用いて抽出を行った。



## 2.3. 根域土壌分析とススキの含有金属元素の測定

### 2.3.1. 材料および方法

#### 2.3.1.1. 根域土壌の pH (H<sub>2</sub>O) および pH (KCl) の測定 (土壌環境分析法, 1997)

以下の方法を用いて pH (H<sub>2</sub>O) の測定を行った。風乾細土 2 g を 15 mL 容プラスチックチューブに入れ、脱塩水 5 mL を加えて振とうし、1 時間以上放置した。その後軽く攪拌し、pH メーター (F-22, Horiba, Kyoto, Japan) で pH (H<sub>2</sub>O) を測定した。pH (KCl) の測定は風乾細土 2 g を 15 mL 容プラスチックチューブに入れ、NaOH (Wako, Osaka, Japan) を用いて pH 7.0 に調整した 1 M の KCl 5 mL を加えて振とうし、pH (H<sub>2</sub>O) と同様の操作で測定を行った。結果には月ごとの値を平均値±標準誤差 (SE) で示した。各月において 5 反復を行った。

#### 2.3.1.2. 根域土壌の全量分析 (土壌環境分析法, 1997)

風乾細土 1 g を 50 mL 容ビーカーに入れ、有害金属測定用 HNO<sub>3</sub> (Wako) を 10 mL 加え時計皿をのせて還流させ、140°C に設定したホットプレート上で有機物の分解を行った。分解の際に発生した茶色の煙は適宜時計皿を外して除去し、有機物が完全に分解されて白色の煙が生じ始めてから放冷した。放冷後、有害金属測定用 HNO<sub>3</sub> 1 mL と有害金属測定用 HClO<sub>4</sub> (Wako) 4 mL を加え、時計皿をのせて 140°C に設定したホットプレート上で分解した。HClO<sub>4</sub> 溶液は強い酸化力を有し、その塩は加熱や衝撃で容易に発火するため、液量が減少した際は有害金属測定用 HNO<sub>3</sub> をパスツールピペットで数滴加えることで HClO<sub>4</sub> のみの加熱および乾固を防いだ。土壌分解液の色が黄色または緑色になったら時計皿を除き、シロップ状になるまで濃縮を行った。放冷後、1 M の有害金属測定用 HCl (Wako) 5 mL および熱水 10 mL を加え、沸騰寸前まで急速に加熱し、No.6 濾紙 (Advantec, Tokyo, Japan) で濾過した。残渣は 1 M の有害金属測定用 HCl および熱水で洗浄し、濾液と混合した。放冷後 50 mL にメスアップし、0.2 μm PTFE フィルター (Advantec) で分析直前に濾過した。ICP-OES を用いた分析により Ca, K, Cu, Fe, Mn, Zn, Pb, Al の測定を行った。なお、久保田ら (1986) が高濃度に含まれるとした Cd は、検出限界以下であったため分析元素から除外した。5 地点のススキの根域土壌から 3 反復ずつ分析し、合計 15 反復とした。結果を平均値±SE で示した。

#### 2.3.1.3. 根域土壌の交換性 Al の測定 (土壌養分分析法, 1970)

風乾細土 4.0 g を 50 mL 容ビーカーに入れ、ホールピペットを用いて 1 M KCl (Wako) を 10 mL 加え、ガラス棒で 2 分間攪拌後、30 分間放置した。No.6 濾紙を用いて吸引濾過し、吸引しつつ 10 mL の 1 M KCl で 3 回洗浄した。洗浄の際は 1 回ごとに完全に濾液を落とし切り、全て同じ 200 mL 容三角フラスコで受けた。得られた抽出液は 0.2 μm PTFE フィルターで分析直前に濾過し、ICP-OES を用いた分析により Al を測定した。5 地点のススキの根域土壌から 3 反復ずつ分析し、合計 15 反復とした。結果を平均値±SE で示した。

#### 2.3.1.4. ススキの含有金属元素 (植物栄養実験法, 1990)

摩砕した各部位を 100 mg 量りとり 50 mL 容ビーカーに入れ、有害金属測定用 HNO<sub>3</sub> を 10 mL 加え時計皿をのせて 1 晩静置した。その後 140°C に設定したホットプレート上で、有害金属

測定用 HNO<sub>3</sub> を還流させながら有機物の分解を行った。分解液が透明になり有機物が完全に分解される、あるいは 12 時間分解を行った後、時計皿を除いて濃縮し、放冷した。少量の脱塩水を加え No.6 濾紙で濾過し、さらにビーカーの壁面を脱塩水で数回洗浄してその都度濾過し、25 mL にメスアップした。得られた分解液を 0.2 μm PTFE フィルターで分析直前に濾過し、ICP-OES を用いた分析により Ca, K, Cu, Fe, Mn, Zn, Pb, Al の測定を行った。各月の反復は 5 回とし、結果には月ごとの値を平均値±SE で示した。

### 2.3.2. 結果

根域土壌の pH (H<sub>2</sub>O)および pH (KCl)の結果を表 2-1 に、全量分析および交換性 Al 濃度の結果を表 2-2 に示した。また、ススキの含有無機元素濃度の結果を表 2-3 に示した。

根域土壌の pH (H<sub>2</sub>O)は調査期間の間、常に 4.5 を下回り、酸性土壌であることが確認された。pH (KCl)は調査期間を通して、pH (H<sub>2</sub>O)より低 pH を示した。全量分析の結果、土壌の Cu 濃度は 439.07 ± 9.62 mg/kg, Zn 濃度は 83.02 ± 5.99 mg/kg, Pb 含有濃度は 415.10 ± 21.50 mg/kg であった。また、交換性 Al 濃度は 356.42 ± 15.80 mg/kg であった。

ススキの含有無機元素については、調査期間を通して、根で高濃度の Al および Fe が検出された。また、ほとんどの無機元素は根、地下茎、枯死部、地上部、穂の順に高濃度に含有されていた。

## 2.4. ススキの代謝産物の分析

### 2.4.1. 材料および方法

#### 2.4.1.1. 抽出方法

2013 年 9 月に大量抽出を目的として、ススキの根 45 g FW を採取した。採取した根に含まれるフェノール性化合物および有機酸の定性・定量を行うために、採取した根を 2 等分し、それぞれ 100% methanol (MeOH ; Wako) あるいは 80% ethanol (EtOH ; Wako) 中でハサミを用いて摩砕し、室温暗所で 1 週間抽出した。抽出後、吸引濾過によって残渣を取り除き、それぞれの抽出液を以下の操作に供した。ロータリーエバポレーター (REN-1000, Iwaki, Shizuoka, Japan) を用いて抽出液の濃縮を行った後、抽出液の 1/3 量の ethyl acetate (EtOAc ; Wako) を加えて 3 回分液操作を行い、EtOAc 層および水層を得た。EtOAc 層に含まれる水を除去するために 1/3 量の飽和 NaCl (Wako) 溶液を用いて 3 回脱水した後、得られた EtOAc 層に無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Wako) を適当量加えて 1 晩室温暗所で脱水した。得られた EtOAc 層および水層はロータリーエバポレーターを用いて濃縮した後、-20°C に一時的に保存した。

予備試験の結果、80% EtOH 抽出物の分液操作で得られた水層には、多量の糖類が含まれていたため、弱陰イオン交換樹脂 (TOYOPEARL DEAE-650M, Tosoh, Tokyo, Japan) を用いて糖類の除去を行った。使用するガラス製カラムに少量の脱脂綿を平らになるように詰め、カラム内壁および脱脂綿を MeOH で洗浄した。MeOH をドライヤーで乾燥・除去した後、20% EtOH に保存していた樹脂を内径 14 mm のカラムに高さ約 100 mm になるように駒込ピペットを使って充填した。この際樹脂の間隙に気泡が入らないようにするためにカラムを軽くたたきながら充填した。充填後、EtOH を完全に洗い流すために約 100 mL の脱塩水で樹脂を洗浄

した。樹脂の平衡化は、カラム法を用いて行った。まず解離基を全て Cl<sup>-</sup> に置換するために 100 mL の 1 M NaCl 水溶液で洗浄した。次に置換した Cl<sup>-</sup> を HCOO<sup>-</sup> に置換するために 100 mL の 1 M formic acid (Wako) を用いて平衡化した。樹脂内の pH を中性にするために 100 mL の脱塩水で洗浄後、100 mg FW 相当量の水層をチャージした。その後、100 mL の脱塩水で溶出し、非吸着画分を得た。続いて 100 mL の 6 M formic acid で溶出し、吸着画分を得た。各画分をロータリーエバポレーターで濃縮後、吸着画分には多量の formic acid が含まれるため、凍結乾燥機 (VD-250F, Taitec, Saitama, Japan) を用いて formic acid を除去した。得られた吸着画分を以下の 2.4.1.2.B の分析に供した。

#### 2.4.1.2. 分析方法

##### A) フェノール性化合物の同定および定量

Yamaji et al. (2003) に従ってフェノール性化合物の同定および定量を行った。100% MeOH で抽出して得られた EtOAc 層および水層から 200 mg FW 相当量をフラコレチューブ (100 mm × 13 mm i.d.) に移し、遠心エバポレーター (CVE-2000, Eyela, Tokyo, Japan) で濃縮乾固し、1 mL の 50% MeOH で再溶解した。この際沈殿が生じたものは 0.2 μm PTFE フィルターで濾過し、沈殿を取り除いた。試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて、フェノール性化合物の同定および定量を行った。検出されたフェノール性化合物については標品を 1 mL の 50% MeOH に溶解し、検量線を作成して定量した。なお、HPLC による分析条件を以下に示す。環式有機化合物および酸性化合物の分離を良好にするために水に 1.5% tetrahydrofuran (THF; Wako) および 0.25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Wako) を加えた。分析条件を下記に示す。

分析システム : HPLC ; Prominence UFLC series (Shimadzu)

検出器 : Diode array detector ; SPD-M20A (Shimadzu)

Fluorescence detector ; RF-20A xs (Shimadzu)

カラム : Mightysil RP-18 GP (i.d. 4.6 mm × 75 mm) (Kanto, Tokyo, Japan)

カラムオーブン : 40°C

サンプルクーラー : 15°C

検出波長 : 200-400 nm

流速 : 1 mL/分

試料導入力 : 10 μL

分析時間 : 100 分

溶媒条件 : binary gradient

移動相 : (A) 1.5% THF, 0.25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (in water)

移動相 : (B) 100% MeOH

## B) 有機酸の同定および定量

80% EtOH で抽出して得られた水層の弱陰イオン交換樹脂吸着画分と EtOAc 層から 100 mg FW 相当量をフラコレチューブにそれぞれ移し、遠心エバポレーターで濃縮乾固した後、50  $\mu$ L の pyridine に再溶解させた。100  $\mu$ L の N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を加え、Dry Thermo Unit (DTU-2C, Taitec) にて 37°C で 30 分間反応させて trimethylsilyl 化 (TMS 化) した。TMS 化した試料をバイアル瓶に移し、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS 分析) に供した。検出された有機酸-TMS については標品を同様に TMS 化し、selected ion mode (SIM) で測定して検量線を作成することで定量を行った。SIM の分析時には、各有機酸の同定時に共通して検出された  $m/z$ ; 73, 147, 207 の 3 つのフラグメントイオンを選択した。GC/MS 分析の分析条件を以下に示す。

### GC 条件

分析システム : GC/MS-QP2010 (Shimadzu)

カラム : InertCap5 MS/Sil, 30 m  $\times$  25 mm i.d., 固定相 ; 0.25  $\mu$ m (GL Science, Tokyo, Japan)

カラムオープン温度 : 80°C (2 分保持) -250°C (昇温速度 : 5°C /分, 250°C で 5 分保持)

試料導入量 : 1  $\mu$ L

スプリット比 : 25

キャリアーガス : He (純度 : 99.999%)

気化室温度 : 250°C

検出器電圧 : 1.5 keV

### MS 条件

インターフェース温度 : 250°C

イオン源温度 : 200°C

溶媒溶出時間 : 2.5 分

検出  $m/z$  : 50-500

分析時間 : 41 分

使用ライブラリー : Wiley Registry<sup>TM</sup> of Mass spectral library, 9th Edition (Wiley, Hoboken, USA)

## 2.4.2. 結果

フェノール性化合物に着目して HPLC による分析を行ったところ、水層から retention time (RT) 11.04 分に主要なピークが確認された。図 2-1 および図 2-2 には、水層と標品である chlorogenic acid (Wako) の分析により得られた HPLC クロマトグラムおよび UV スペクトラムを示した。標品である chlorogenic acid を同条件で分析したところ、RT 11.04 分に検出され、水層の RT 11.04 分のピークとの UV スペクトルの形状および  $\lambda_{\max}$  が一致した (図 2-1)。このことから、ススキの主要なフェノール性化合物を chlorogenic acid と同定した。定量の結果、根部に含まれる chlorogenic acid 濃度は  $0.13 \pm 0.00$  mg/g FW であった (表 2-4)。

GC/MS 分析に供した試料のうち EtOAc 層からは palmitic acid-TMS や linoleic acid-TMS などの脂肪酸の TMS 化物が検出された。弱陰イオン交換樹脂吸着画分からは malic acid-TMS, *trans*-aconitic acid-TMS, citric acid-TMS の 3 種類の有機酸の TMS 化物が検出された(図 2-3)。Al の解毒に寄与すると考えられるこれらの有機酸の定量を SIM で測定した(図 2-4)ところ、各有機酸の濃度は  $0.14 \pm 0.00$  mg/g FW,  $0.11 \pm 0.01$  mg/g FW,  $0.16 \pm 0.00$  mg/g FW であった(表 2-4)。

## 2.5. 考察

浅見(2001)によると一般的な森林土壌の表層では, Cu : 21.4 mg/kg, Mn : 418 mg/kg, Zn : 50.2 mg/kg, Pb : 16.4 mg/kg を含有すると報告されており, ススキの根域土壌においては重金属のうち Cu, Zn, Pb が特に高濃度に含まれていることが明らかとなった(表 2-2)。全量 Al 濃度は Bowen (1979) が報告した一般土壌に含まれるとされる 71,000 mg/kg よりも低い値を示したが, 根域土壌の pH (H<sub>2</sub>O)は調査期間を通して 4.5 以下と強い酸性を示すことが確認され, 交換性 Al の含有濃度は  $356.42 \pm 15.80$  mg/kg であった。交換性 Al 濃度は環境庁(1999)によって報告されている 340 mg/kg よりもわずかに高い濃度であった。以上から調査地では, Al や Cu, Zn, Pb が比較的高濃度に存在し, その毒性を発現させていると考えられた。

ススキが含有する無機元素は一般的に根, 地下茎, 枯死部, 地上部, 穂の順に高濃度であり, 特に根における Al 濃度は調査期間を通して 2,000 mg/kg 前後と高い値であった。一方, 土壌に比較的高濃度に含まれていた Cu, Zn, Pb は低濃度に保たれており, 重金属の排除機構を有する可能性が示唆された。Jansen et al. (2002) は, 地上部に 1,000 mg/kg 以上の濃度で Al を蓄積する植物を Al の超蓄積植物と定義している。地上部において高濃度の Al の蓄積は確認されなかったためススキは Al の超蓄積植物ではないと考えられたが, 一般的な植物が蓄積するとされる 200 mg/kg (Hutchinson, 1945) 以上の濃度を根に蓄積していたことから, 細胞内抵抗性機構を有するものと考えられた。細胞内抵抗性機構を有する植物としてソバが知られており, Al の有無に関わらず植物体内に大量の oxalic acid を蓄積し, 吸収された Al と錯体を形成することで Al を解毒する(松本, 2003)。Oxalic acid の他に, Al の解毒物質としては malic acid や citric acid などの有機酸, catechol や catechin などのフェノール性化合物(Barceló and Poschenrieder, 2002) が知られている。そこで, ススキ根部に含まれる有機酸およびフェノール性化合物の分析を行ったところ, ススキの根には有機酸として citric acid, malic acid, *trans*-aconitic acid の 3 種類の有機酸が, フェノール性化合物として chlorogenic acid が検出された。Citric acid や malic acid (Barceló and Poschenrieder, 2002), chlorogenic acid (Adams et al., 2002) は Al と 1 : 1 のモル比で Al と錯体形成し, Al を解毒すると考えられている。また, *trans*-aconitic acid は Al の解毒物質としてトウモロコシの根から分泌される(Suhayda and Haug, 1986) という報告がある。以上のことからススキの根における Al 耐性機構には citric acid, malic acid, *trans*-aconitic acid および chlorogenic acid が寄与していると考えられた。

一般的な植物は単独で生育し, 環境ストレスに対応するのではなく, 内生菌と相互作用しながら生育している(Schulz and Boyle, 2006)。また, 内生菌は Al などの有害金属を解毒するために, それらと錯形成する有機化合物(siderophore)を産生することが知られている

(Rogers et al., 2001 ; Rajkumar et al., 2012). そこで次章では, 調査地に自生するススキの根から内生菌を分離し, siderophore 産生能の評価および産生される siderophore の同定を行うこととした.

## 2.6. 要約

調査地の根域土壌は pH (H<sub>2</sub>O)が 4.5 以下の酸性土壌であり, Al や重金属 (Cu, Zn, Pb) が高濃度に含有されていることが明らかとなった. また, そこに生育するススキは, 根に Al を高濃度に蓄積していた. 一方, 土壌に高濃度に含有されていた Cu, Zn や Pb などの重金属はススキ体内では低濃度に保たれており, 重金属の排除機構を有する可能性が示唆された. ススキは根で Al 耐性機構を獲得していると考えられたため, Al を高濃度に蓄積していた根の抽出物を分析したところ, 有機酸として, malic acid, *trans*-aconitic acid, citric acid が, フェノール性化合物として chlorogenic acid が検出された. これらの化合物は Al の解毒物質としての報告があるためことから, ススキの Al 耐性機構に寄与していると考えられた.

表 2-1 根域土壌の pH (H<sub>2</sub>O)および pH (KCl)

	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCl)
2012 年 7 月	4.34 ± 0.08	3.73 ± 0.06
2012 年 8 月	4.40 ± 0.05	3.77 ± 0.06
2012 年 9 月	4.31 ± 0.06	3.83 ± 0.03
2012 年 10 月	4.36 ± 0.08	3.83 ± 0.04
2012 年 11 月	4.32 ± 0.07	3.75 ± 0.06

根域土壌の pH (H<sub>2</sub>O)および pH (KCl)の値は平均値±SE で示した (n=5).

表 2-2 根域土壌の全量無機元素濃度および交換性 Al 濃度

元素	濃度
全量 Ca	2,320.35 ± 78.03
全量 K	1,766.06 ± 28.40
全量 Cu	439.07 ± 9.62
全量 Fe	38,569.09 ± 1013.92
全量 Mn	401.60 ± 15.32
全量 Zn	83.02 ± 5.99
全量 Pb	415.10 ± 21.50
全量 Al	54,374.51 ± 1682.06
交換性 Al	356.42 ± 15.80

全量無機元素については乾燥土壌重量当たりの平均 (mg/kg) ±SE で示した (n=15).



表 2-3 ススキの含有無機元素濃度

(a) 2012 年 7 月

	地上部	枯死部	地下茎	根
Ca	1,513.78 ± 121.83	2,004.32 ± 191.05	1,798.35 ± 346.03	2,976.34 ± 483.59
K	18,846.86 ± 1209.67	8,324.46 ± 2183.04	3,796.00 ± 776.65	4,456.84 ± 838.97
Cu	4.85 ± 0.41	19.28 ± 1.67	40.13 ± 4.59	84.78 ± 17.61
Fe	140.99 ± 39.90	643.47 ± 103.59	1,279.46 ± 277.73	1,053.52 ± 252.21
Mn	195.21 ± 21.31	202.35 ± 16.34	126.69 ± 66.19	161.42 ± 68.25
Zn	58.54 ± 20.35	71.21 ± 21.20	261.05 ± 194.37	134.28 ± 61.27
Pb	3.39 ± 0.26	23.36 ± 1.34	89.16 ± 25.32	170.75 ± 32.92
Al	284.26 ± 39.12	989.64 ± 147.60	1,852.14 ± 262.86	2,099.32 ± 418.59

(b) 2012 年 8 月

	地上部	枯死部	地下茎	根
Ca	1,662.04 ± 251.23	2,668.69 ± 315.23	1,250.16 ± 173.67	3,638.85 ± 399.98
K	12,849.65 ± 1072.64	7,791.36 ± 1131.52	7,329.69 ± 785.26	5,257.55 ± 717.75
Cu	7.72 ± 0.72	27.18 ± 4.27	21.43 ± 4.88	107.57 ± 6.98
Fe	ND	665.14 ± 183.86	474.18 ± 222.20	1183.12 ± 269.73
Mn	175.94 ± 22.48	239.91 ± 38.28	50.80 ± 10.57	98.40 ± 22.78
Zn	15.80 ± 6.03	14.56 ± 3.66	27.76 ± 5.47	81.48 ± 14.52
Pb	1.49 ± 0.49	21.63 ± 4.50	16.06 ± 5.25	103.31 ± 7.23
Al	83.31 ± 5.13	1,025.48 ± 256.74	893.45 ± 296.66	2,336.39 ± 451.08

各含有無機元素濃度は、乾燥重量当たりの平均値 (mg/kg) ±SE で示した (n=5).

ND は検出限界以下を示す.

表 2-3 (続き) ススキの含有無機元素濃度

(c) 2012 年 9 月

	地上部	枯死部	地下茎	根	穂
Ca	1,436.71 ± 154.53	1,894.06 ± 191.29	1,107.81 ± 186.27	1,066.87 ± 49.79	1,458.77 ± 122.98
K	16,115.54 ± 1367.54	5,428.35 ± 1314.25	6,537.73 ± 1440.15	7,460.88 ± 2334.25	7,590.57 ± 619.65
Cu	8.66 ± 0.12	18.75 ± 3.57	27.39 ± 3.60	78.10 ± 6.85	9.49 ± 1.24
Fe	64.83 ± 4.65	256.41 ± 43.76	857.34 ± 215.41	1,402.68 ± 247.49	46.02 ± 5.73
Mn	218.03 ± 37.86	252.88 ± 41.14	80.71 ± 19.29	63.67 ± 9.32	226.81 ± 18.96
Zn	44.03 ± 9.56	36.29 ± 9.05	55.90 ± 10.25	32.95 ± 5.31	55.14 ± 10.56
Pb	5.70 ± 0.59	13.31 ± 0.98	32.23 ± 4.94	50.56 ± 6.09	1.83 ± 0.23
Al	95.39 ± 9.96	439.85 ± 191.29	1,482.80 ± 272.10	2,675.14 ± 417.17	69.31 ± 17.31

(d) 2012 年 10 月

	地上部	枯死部	地下茎	根	穂
Ca	1,730.18 ± 130.16	1,924.70 ± 138.04	878.76 ± 109.16	1,586.19 ± 228.53	1,258.66 ± 182.23
K	11,422.85 ± 441.13	11,671.40 ± 1462.54	8,766.75 ± 1373.85	3,663.28 ± 125.04	3,680.87 ± 244.74
Cu	5.17 ± 0.91	11.16 ± 1.05	13.71 ± 3.28	74.07 ± 13.38	14.17 ± 1.95
Fe	44.06 ± 6.68	167.87 ± 9.71	300.79 ± 52.41	902.63 ± 87.70	13.02 ± 7.11
Mn	173.32 ± 9.48	186.62 ± 23.86	77.96 ± 13.69	87.86 ± 9.91	190.12 ± 17.36
Zn	26.50 ± 4.41	27.09 ± 3.20	40.38 ± 3.16	33.60 ± 4.33	35.27 ± 5.31
Pb	0.8 ± 0.4	3.35 ± 0.49	4.94 ± 1.71	35.83 ± 6.79	4.72 ± 0.92
Al	89.64 ± 6.33	292.57 ± 17.02	559.91 ± 119.35	1,742.32 ± 182.56	61.11 ± 4.36

(e) 2012 年 11 月

	地上部	枯死部	地下茎	根	穂
Ca	908.23 ± 195.34	1,931.01 ± 235.30	697.86 ± 77.01	1,062.03 ± 137.96	918.57 ± 131.47
K	11,980.80 ± 1139.22	7,298.20 ± 1207.52	9,237.17 ± 841.30	3,102.78 ± 207.41	4,205.78 ± 468.72
Cu	4.54 ± 0.64	9.59 ± 0.57	16.38 ± 2.24	78.07 ± 9.26	18.76 ± 1.37
Fe	20.49 ± 3.75	109.68 ± 17.18	263.97 ± 60.73	1,335.44 ± 329.82	83.40 ± 9.59
Mn	283.86 ± 50.35	358.26 ± 37.08	105.67 ± 15.81	143.07 ± 24.48	332.88 ± 26.05
Zn	77.75 ± 19.19	30.32 ± 2.93	51.29 ± 3.75	38.63 ± 6.73	47.33 ± 10.18
Pb	3.87 ± 0.66	9.47 ± 0.60	17.51 ± 2.43	87.33 ± 10.96	17.08 ± 1.17
Al	70.02 ± 8.41	207.71 ± 22.73	448.13 ± 90.55	2,288.62 ± 483.98	133.65 ± 55.46

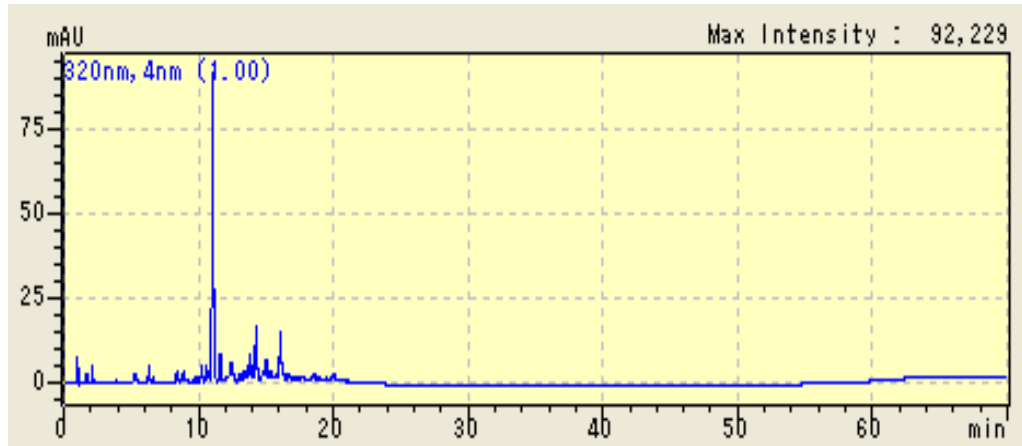
各含有無機元素濃度は、乾燥重量当たりの平均値 (mg/kg) ±SE で示した (n=5)。

表 2-4 2013 年 9 月に採取したススキ根の有機酸およびフェノール性化合物含有濃度

	Malic acid	<i>Trans</i> -aconitic acid	Citric acid	Chlorogenic acid
濃度	0.14 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.13 ± 0.00

各化合物濃度は平均値 (mg/g FW) ±SE で示した (n=3).

(a)



(b)



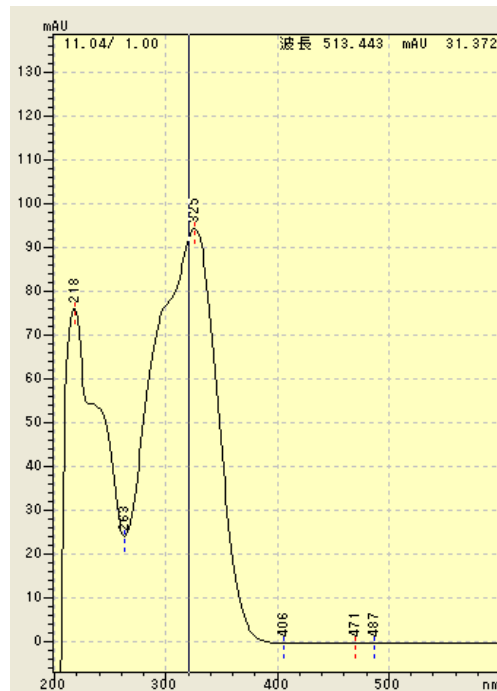
図 2-1 2013 年 9 月に採取したススキ根部 MeOH 抽出物の水層  
および chlorogenic acid 標品の HPLC クロマトグラム (320 nm)

(a) MeOH 抽出物の水層の HPLC クロマトグラム (主要ピーク RT 11.04 分)

(b) Chlorogenic acid 標品の HPLC クロマトグラム (RT 11.04 分)

なお (a) において注入した絶対量は 2.00 mg FW とした.

(a)



(b)

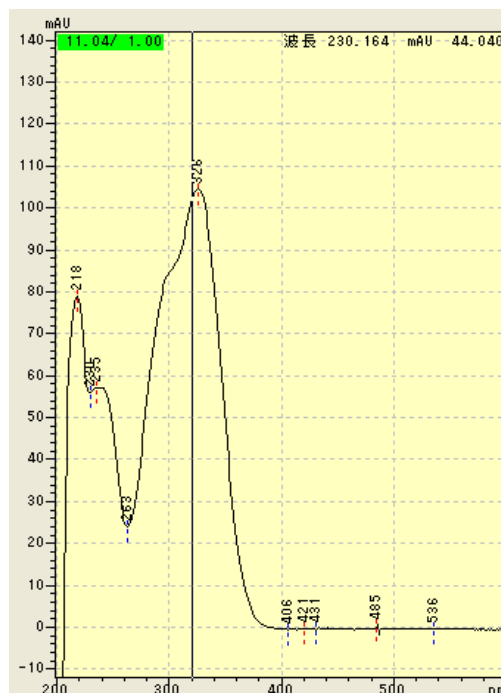


図 2-2 2013 年 9 月に採取したススキ根部 MeOH 抽出物の水層から確認された  
主要ピーク (RT 11.04 分) および chlorogenic acid 標品の UV スペクトラム

(a) 2013 年 9 月に採取したススキの MeOH 抽出物の水層の UV スペクトラム

(b) Chlorogenic acid 標品の UV スペクトラム

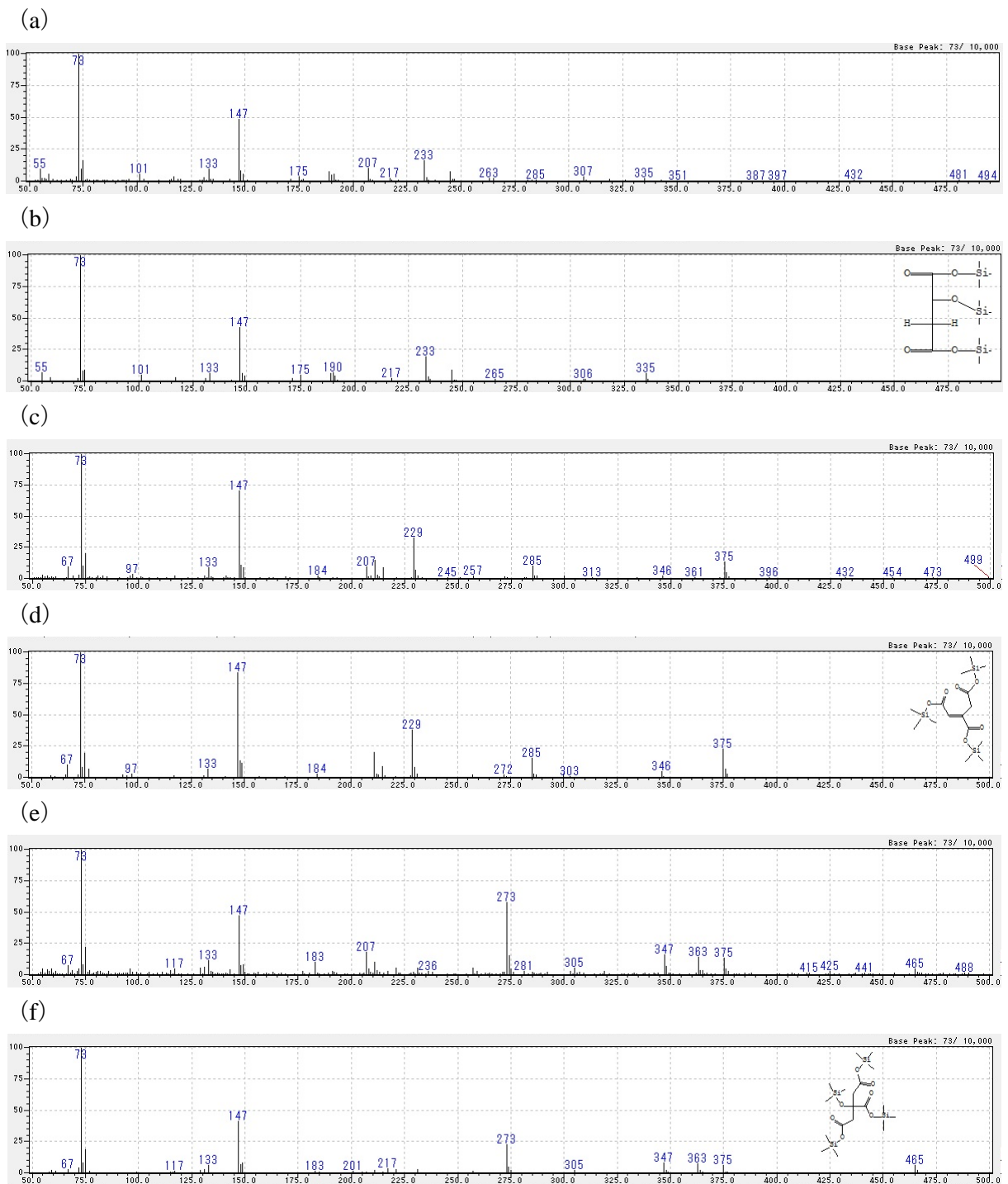
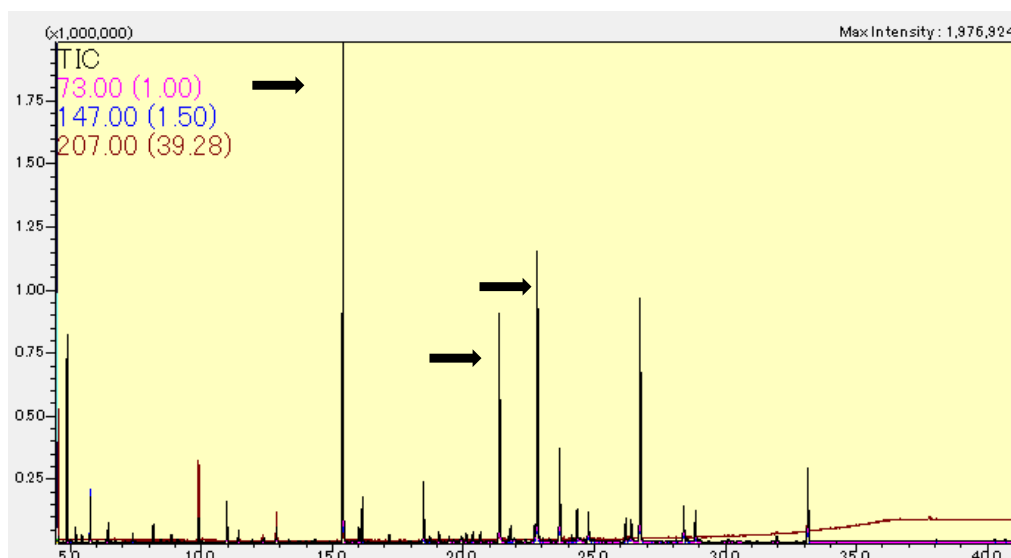


図 2-3 2013 年 9 月に採取したススキ根部 80% EtOH 抽出物・水層の弱陰イオン交換樹脂吸着画分における EI/MS スペクトル

(a), (b) 化合物 (RT 15.4 分) の EI/MS スペクトルとシミラリティー検索の結果  
 (c), (d) 化合物 (RT 21.4 分) の EI/MS スペクトルとシミラリティー検索の結果  
 (e), (f) 化合物 (RT 22.8 分) の EI/MS スペクトルとシミラリティー検索の結果  
 それぞれ malic acid, *trans*-aconitic acid, citric acid の TMS 化物のピークと考えられた。

(a)



(b)

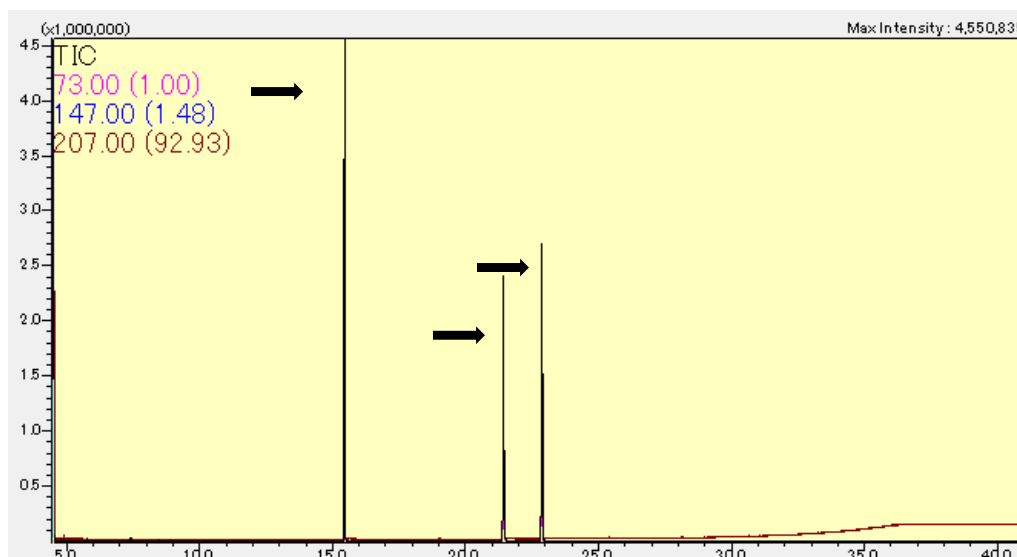


図 2-4 Malic acid, *trans*-aconitic acid, citric acid 標品および 2013 年 9 月に採取した ススキ根部の 80% EtOH 抽出物・水層の弱陰イオン交換樹脂吸着画分を SIM で測定した GC/MS クロマトグラム

(a) 80% EtOH 抽出物の吸着画分の TMS 化物の GC/MS クロマトグラム

矢印は吸着画分における malic acid (RT 15.42 分), *trans*-aconitic acid (RT 21.38 分), citric acid (RT 22.82 分) の TMS 化物と考えられるピーク。RT 26.75 は糖の TMS 化物のピークと考えられた。

(b) 各有機酸の標品の TMS 化物の GC/MS クロマトグラム

矢印は malic acid (RT 15.40 分), *trans*-aconitic acid (RT 21.38 分), citric acid (RT 22.82 分) の TMS 化物のピーク。

なお, (a) において注入した絶対量は 0.67 mg FW とした。

## 第3章 内生菌の siderophore 産生能の評価

### 3.1. はじめに

植物の体内に病徴を示すことなく微生物が共生していることは古くから知られている。その中でも Frank が 1885 年に外生菌根菌について記載したものが最初であり、その後 Gallaud が 1905 年に、Peyronal が 1922 年にそれぞれ、隔壁を有し、細胞内に感染する全く別種の菌根菌を見出した。特に Peyronal が発見した菌根菌は植物細胞の内部に感染することから内生菌と呼ばれるようになった (Jumpponen and Trappe, 1998)。内生菌の研究は様々な研究者によって行われてきたが、その働きは多岐にわたり (Jumpponen and Trappe, 1998)、P の吸収促進 (Jumpponen et al., 1998) や siderophore の産生 (Bartholdy et al., 2001)、成長促進による重金属耐性の付与 (Yamaji et al., 2016) などの報告がある。Bartholdy et al. (2001) は内生菌の一種である dark septate endophyte (DSE) に分類される *Phialocephala fortinii* が、Fe などと錯体を形成する siderophore を産生することで、微量必須元素の吸収を促進する可能性を述べている。AM 菌 (Arriagada et al., 2007) や内生細菌 (Rajkumar et al., 2012) も重金属解毒能がある siderophore を産生することで植物の重金属ストレスを緩和するという報告がある。第2章において、ススキは根に高濃度の Al を蓄積していることが明らかとなった。内生菌は siderophore の産生することで Al を解毒し、ススキの Al 耐性を増強する可能性が考えられた。そこで本章では、trypan blue 染色した根において感染構造が確認された内生糸状菌に着目して分離を行った。分離株のうち、特に出現率が高い内生菌が産生する化合物について Al および Fe との錯体形成試験 (CAS アッセイ) を行うことで、内生菌の siderophore 産生能を評価した。

### 3.2. 内生菌の分離、内生菌および AM 菌の感染率の算出

#### 3.2.1. 材料および方法

2012 年 8 月に採取した 5 個体のススキの根を用いて内生菌の分離を行った。採取したススキの根に付着した土壌を流水中で落とし、さらに脱塩水ですすいで洗浄した。根の表面滅菌はクリーンベンチ内で以下の操作に従い行った。70% EtOH に 1 分間浸し、2.25% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に浸して 5 分間攪拌しながら滅菌し、再度 70% EtOH に 1 分間浸して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を洗浄し、さらに滅菌水に 5 分間、2 回浸して洗浄した。その後、滅菌済みの濾紙上で余分な水分を除去してから、滅菌メスを用いて 10 mm の根切片を作製し、1% malt extract agar 培地 (1MA) (表 3-1) に 5 切片ずつ置床した。根切片は 1 個体あたり 100 切片作製し、合計 500 切片を 23°C 暗黒下で 2 週間培養して内生菌の出現率を算出した。出現した内生菌は光学顕微鏡 (CX21, Olympus, Tokyo, Japan) で形態観察を行うとともに、分離を行った。分離した内生菌の出現率の算出は以下の式を用いて算出した。

$$\text{内生菌の出現率(\%)} = \frac{\text{内生菌が出現した切片数}}{\text{分離に用いた切片数}} \times 100$$



また、大場ら (2006) に従い、採取・洗浄した根について trypan blue 染色を行った。まず、洗浄した根を適当な長さに切り、脱塩水に入れてオートクレーブ (121°C , 30 分) で根の組織の軟化を行った。次に 10% KOH (Wako) 水溶液に浸し、オートクレーブ (121°C , 30 分) で根の脱色を行った。さらに、5% HCl (Wako) で 5 分間処理した後、脱塩水に移し替えて 1 晩室温で静置した。脱塩水を捨て、trypan blue 染色液{lactoglycerin (表 3-2A) に 0.05% (w/v) になるよう trypan blue を加えて調製した (表 3-2B) }に根を入れて 10 分間煮沸し、染色した。その後、lactoglycerin に入れ替え 5 分間煮沸した。放冷後、アルミ箔で覆ったプラスチックチューブに入れ、室温暗所下で保存した。スライドガラスの短辺に垂直になるように 4 本程度の染色根を並べ、カバーガラスで封入し、プレパラートを作製した。根の幅が全て検鏡出来るよう倍率を調整し、1 個体の根に対して 150 交点を光学顕微鏡下で観察した。感染率の算出は、内生菌の感染構造である microsclerotia (Read and Haselwandter, 1981 ; Jumpponen and Trappe, 1998) および AM 菌の感染構造 (*Paris-type* あるいは *Arum-type*) (Smith and Smith, 1997) を確認することで行った。5 反復の結果を平均し、ススキ根部における内生菌および AM 菌の感染率とした。

### 3. 2. 2. 結果

内生菌および AM 菌の感染率はそれぞれ  $44.1 \pm 7.7\%$  ,  $23.7 \pm 5.6\%$  であり、顕微鏡観察の結果、内生菌の感染構造 (microsclerotia) と AM 菌の感染構造 (*Paris-type*) を確認した (図 3-1)。分離の結果、内生菌の出現率は 75.9% であった。出現率の上位であった内生菌は、*Chaetomium* (出現率 : 9.2%) , *Phialocephala* (8.2%) , *Lachnum* (6.3%) , *Colletotrichum* (6.0%) 属糸状菌であった。これらの内生菌に関して、ススキの Al 耐性機構への寄与を解析するため、Al および Fe との錯体形成試験 (CAS アッセイ) に供し、内生菌の siderophore の産生能を評価した。

### 3. 3. CAS アッセイによる内生菌の siderophore 産生能の評価

#### 3. 3. 1. 材料および方法

ススキの Al 耐性機構への内生菌の寄与を解析するため、Chrome azurol S (CAS ; TCI, Tokyo, Japan) と Al を含有した培地 (CAS-Al 培地 ; Alexander and Zuberer, 1991 を改変) に内生菌を培養することで、Al と錯体形成する siderophore の産生能を評価した。通常、CAS 培地は Fe を含有した培地 (CAS-Fe 培地) として使用され (Alexander and Zuberer, 1991) , Fe と錯体形成する化合物の検定に用いられるため、CAS-Fe 培地における試験も同時に行うこととした。CAS 培地の組成を表 3-3 に示した。溶液 1 における「for Al」および「for Fe」はそれぞれ CAS-Al 培地、CAS-Fe 培地の溶液 1 とした。CAS-Al 培地および CAS-Fe 培地の作製手順を以下に示す。Al あるいは Fe 溶液を CAS 溶液と混合し、その後ゆっくりと攪拌しながら Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA ; Wako) 溶液に加え、溶液 1 を調製した。溶液 2 は各試薬を脱塩水 750 mL に溶解し、50% KOH を用いて pH を 6.8 に調整後、800 mL にメスアップしてから agar を加えることで調製した。溶液 3 および 4 は各組成を規定量の脱塩水に溶解して調製した。各溶液を別々にオートクレーブ滅菌 (121°C , 20 分) し、50°C 程

度まで放冷した。クリーンベンチ内で以下の順に各溶液を混合した。まず溶液 3 と溶液 4 を混合してから、溶液 2 に加えて混合溶液を調製した。その後、十分に攪拌した溶液 1 を、気泡が生じないようにしながら先の混合溶液に加えた。以上の培地を 90 mm 径滅菌済みプラスチックシャーレ (As-One) に 10 mL ずつ分注し、それぞれ CAS-Al 培地, CAS-Fe 培地とした。

3. 2 において出現頻度の高かった 4 種の内生菌について 4 株ずつ CAS-Al 培地, CAS-Fe 培地で培養し、各菌の siderophore 産生能を評価した。23°C 暗黒下で 7 日間、1 MA 上で生育させた内生菌のコロニーの生育先端をコルクボーラー (5.5 mm i.d.) で打ち抜き、菌糸の面が下になるようにして CAS-Al 培地, CAS-Fe 培地に置床し、23°C 暗黒下で 7 日間培養した。その後、菌糸の周囲に形成される黄色の部分 (halo) とコロニーの直径を計測し、halo とコロニー径の差をコロニー径で除した値を用いて siderophore 産生能を評価した。なお反復は 3 とした。特に高い活性を示した菌株 (5R7 株) の菌糸から DNA を採取し、ITS 領域を ITS5 および ITS4 を用いて PCR 法で増幅させた (White et al. 1990)。得られた ITS 配列は ABI3100 遺伝子分析装置 (Applied Biosystems, California, USA) で分析した。なお、得られた ITS 配列は DNA Data Bank of Japan に寄託した (取得番号 : LC188887)。

### 3. 3. 2. 結果

各内生菌株の CAS アッセイの結果を表 3-4 に示した。*Chaetomium* はほぼ全ての株で halo を形成し、特に 5R7 株は CAS-Al 培地では  $3.97 \pm 0.35$ , CAS-Fe 培地では  $2.96 \pm 0.54$  と高い活性を示した。他の内生菌は halo を形成するものもあったが、極めて小さな halo の形成にとどまるか、あるいは形成しなかった。そこで、*Chaetomium* に焦点を絞り、分離された全 38 株について同様の試験を行ったところ、5R7 株が最大の活性を示した (表 3-5)。形態観察と遺伝子解析の結果、5R7 株は *Chaetomium cupreum* と同定された。

### 3. 4. 考察

ススキの根からは 75.9% と高い確率で内生菌が分離されたが、内生菌の感染率は 44% 前後と比較的低かったことから、感染構造を形成しないが根に内生している菌も多く存在する可能性が示唆された。出現率の高い 4 種の内生菌に対して Al および Fe と錯体形成する siderophore の産生能を解析した結果、*Chaetomium* 属糸状菌の siderophore 産生能が特に高かった。Al はイオンの形態で存在すると、細胞死や活性酸素種の発生を引き起こす (Kochian et al., 2005)。内生細菌は siderophore を産生し、重金属など有害金属イオンと錯体を形成することで、その毒性を軽減する (Rajkumar et al., 2012) ことが知られている。*Chaetomium* 属糸状菌は、siderophore を産生し Al を解毒することで、ススキの Al 耐性を増強していると考えられた。

*Chaetomium* 属糸状菌は、様々な植物種の茎、枝、葉および根などに内生しておりその機能も多岐にわたる (Fatima et al., 2016)。トウガラシ属の根から分離された *C. globosum* は gibberellin や indole acetic acid などの植物ホルモンを産生することで、植物の成長を促進する (Khan et al., 2012)。また *Oryza sativa* L. の根や葉 (Naik et al., 2009) や *Brassica napus* の根、葉および茎 (Zhang et al., 2014) から分離された *C. globosum* は抗菌活性物質を産生し、植物を病原菌から防御することが知られている。*Chaetomium* 属糸状菌は、chaetomin, chaetoglobosin

類, chaetoquadrin 類, oxaspirodion, chaetospiro, orsellide 類, chaetocyclinone 類など多様な polyketide 系の二次代謝産物を産生する (Lösger et al., 2007). 既報の化合物は低分子から高分子化合物と多岐にわたる化合物群であるが, siderophore としての報告はない. しかし, いずれの化合物もヒドロキシ基やカルボキシ基といった Al や Fe などの重金属と錯体形成をするために必要な官能基 (Engelmann et al., 2005) を複数有することから, Al および Fe と錯体形成すると推察された.

内生菌とその宿主である植物の生育環境や生育段階, 栄養状態など様々な要因が複雑に関与することで, 植物-内生菌相互作用に変化が生じる (Robertson, 1954; Schulz and Boyle, 2006) と考えられている. 鉦山跡地における *C. cupreum* の関与したススキの Al 耐性機構を明らかにするためには, 可能な限り野外環境に近い状態で実験を行う必要があると考えられた. そこで次章では調査地のススキの根域土壌を用いてススキへの *C. cupreum* 接種試験を行い, 接種によるススキの成長量や代謝産物およびその量の変化を確認することとした. さらに水耕液を用いた接種試験からススキ根部における Al の局在を解析することとした. これらの接種試験から, *C. cupreum* が関与したススキの Al 耐性機構を解明する.

### 3.5. 要約

調査地に自生するススキの根から主に *Chaetomium*, *Phialocephala*, *Lachnum*, *Colletotrichum* 属糸状菌が内生菌として分離された. CAS アッセイを用いて各菌種の siderophore 産生能を評価したところ, *C. cupreum* の siderophore 産生能が最も高いことが明らかとなった. *Chaetomium cupreum* は Al と錯体を形成する siderophore を産生することで, Al 毒性を緩和し, ススキの Al 耐性機構に寄与していると考えられた. *Chaetomium* 属糸状菌は様々な二次代謝産物を産生することが知られているが, 多くは抗菌活性物質として報告されており, siderophore としての報告はない. しかし, 既報の化合物は複数のヒドロキシ基やカルボキシ基を有することから, Al や Fe などと錯体形成する可能性が示唆された.

表 3-1 1% Malt extract 培地の組成

Malt extract (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)	10 g
Agar (Wako)	20 g
脱塩水	1,000 mL

表 3-2 Trypan blue 染色液の組成

(a) Lactoglycerin		
Lactic acid (Wako)		100 mL
Glycerin (Wako)		100 mL
脱塩水		120 mL
(b) Trypan blue 染色液		
Lactoglycerin		100 mL
Trypan blue (Wako)		50 mg

表 3-3 CAS 培地の組成

(a) 溶液 1 (for Al)	
1 mM AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (10 mM HCl)	10 mL
CAS (1.21 mg/mL)	50 mL
HDTMA (1.82 mg/mL)	40 mL
(b) 溶液 1 (for Fe)	
1 mM FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (10 mM HCl)	10 mL
CAS (1.21 mg/mL)	50 mL
HDTMA (1.82 mg/mL)	40 mL
(c) 溶液 2	
1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) (DOJINDO, Kumamoto, Japan)	30.24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
脱塩水	750 mL
Agar	15 g
(d) 溶液 3	
Glucose	2 g
Mannitol	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	493 mg
CaCl <sub>2</sub>	11 mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.54 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.4 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.04 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 mg
脱塩水	70 mL
(e) 溶液 4	
10% Casamino acid (w/v)	30 mL

表 3-4 内生菌による Al および Fe との錯体形成試験

分離した菌種	菌株	Al	Fe
<i>Chaetomium</i>	7R-1	1.97 ± 0.43	1.30 ± 0.17
	3R-1	1.36 ± 0.08	0.71 ± 0.08
	8R-5	1.77 ± 0.14	1.37 ± 0.11
	5R-7	3.97 ± 0.35	2.96 ± 0.54
<i>Phialocephala</i>	3BLS-1	+	-
	3BLS-4	-	-
	2BLS-1	-	-
	7B-W-3	+	+
<i>Lachnum</i>	2WM2-1	-	-
	2WM2-2	-	-
	7WS-5	-	-
	5WS-8	-	-
<i>Colletotrichum</i>	3WCBR1-0	-	-
	3WCBR1-4	-	-
	8WCBR1	-	-
	5WCBR1	-	-

表中の-は halo が未形成であったことを示す. +は halo を形成したものの、極めて小さかったことを示す. 結果は平均 (mm) ±SE で示し, 反復を 3 とした.

表 3-5 *Chaetomium* による Al および Fe との錯体形成試験

菌株	Al 錯体形成試験	Fe 錯体形成試験
7R-1	1.97 ± 0.43	1.30 ± 0.17
7R-2	-	1.10 ± 0.61
7R-3	-	+
7R-4	0.30 ± 0.16	-
7R-5	-	-
7R-6	+	+
7R-7	0.88 ± 0.48	0.63 ± 0.33
7R-8	0.20 ± 0.11	+
7R-9	+	+
3R-1	1.36 ± 0.08	0.71 ± 0.08
3R-2	0.56 ± 0.37	1.04 ± 0.27
3R-3	0.37 ± 0.08	0.55 ± 0.07
3R-4	-	-
3R-5	-	+
3R-6	+	0.42 ± 0.21
3R-7	0.43 ± 0.14	0.44 ± 0.25
8R-1	1.78 ± 0.97	-
8R-2	2.99 ± 0.27	1.87 ± 0.14
8R-3	3.60 ± 0.87	2.90 ± 0.41
8R-4	2.70 ± 0.14	1.50 ± 0.08
8R-5	1.77 ± 0.14	1.37 ± 0.11
8R-6	1.89 ± 0.21	-
8R-7	-	-
8R-8	0.59 ± 0.17	0.62 ± 0.12
8R-9	1.83 ± 0.57	1.07 ± 0.10
8R-10	-	0.86 ± 0.43
8R-11	0.59 ± 0.16	0.58 ± 0.14
8R-12	0.28 ± 0.05	+
8R-13	0.92 ± 0.53	-
8R-14	0.51 ± 0.11	0.66 ± 0.17
8R-15	0.76 ± 0.34	0.81 ± 0.45

表中の-は halo が未形成であったことを示す.+は halo を形成したものの、極めて小さかったことを示す。結果は平均 (mm) ±SE で示し反復を 3 とした。

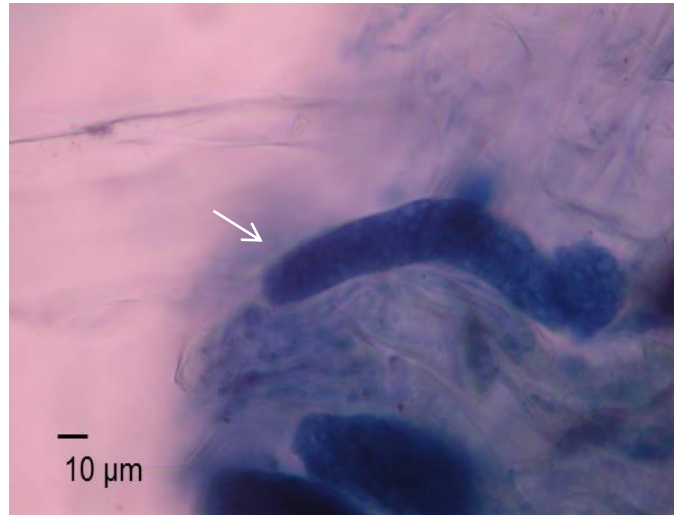


表 3-5 (続き) 内生菌による Al および Fe との錯体形成試験

菌株	Al 錯体形成試験	Fe 錯体形成試験
5R-1	+	+
5R-2	1.67 ± 0.84	1.38 ± 0.70
5R-3	-	+
5R-4	2.31 ± 0.15	2.17 ± 0.13
5R-5	+	+
5R-6	2.09 ± 0.31	2.63 ± 0.24
5R-7	3.97 ± 0.35	2.96 ± 0.54

表中の-は halo が未形成であったことを示す.+は halo を形成したものの、極めて小さかったことを示す. 結果は平均 (mm) ±SE で示し反復を 3 とした.

(a)



(b)

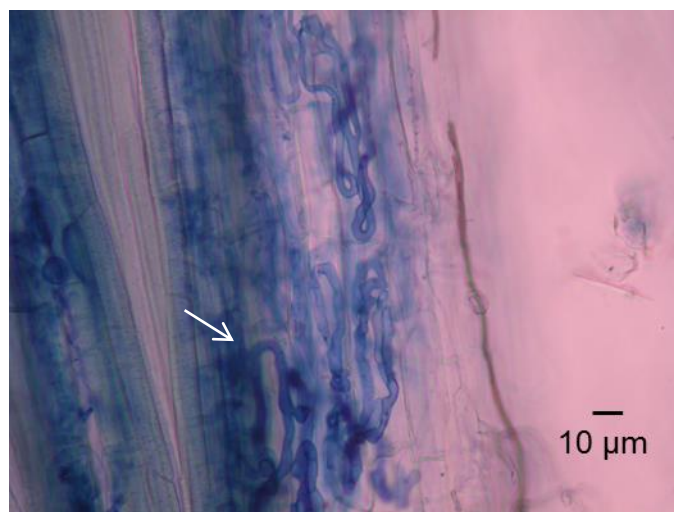


図 3-1 内生菌の感染構造 (microsclerotia) と AM 菌の感染構造 (*Paris-type*)  
(a) 内生菌の感染構造 (microsclerotia) (b) AM 菌の感染構造 (*Paris-type*)  
(a) の矢印は粒状の感染構造を, (b) の矢印はコイル状の感染構造を示している. 各図のバーは 10 μm を示す.

## 第4章 *Chaetomium cupreum* が増強するススキの Al 耐性機構の解明

### 4.1. はじめに

植物と糸状菌の共生は自然界に広く見られる関係で、両者の関係性は相利共生から寄生まで幅広く知られている (Kogel et al., 2006). 植物-内生菌相互作用は一義的に決定しているものではなく、宿主植物の生育している環境や成長段階によって決定されると考えられている (Brundrett, 2004 ; Schulz and Boyle, 2006). 第3章において、調査地に自生するススキ根部から、高い siderophore 産生能を有する内生菌 *C. cupreum* (5R7 株) を分離した. 本章では、*C. cupreum* (5R7 株) を用いた土壌接種試験および水耕接種試験を行うことで、*C. cupreum* の関与したススキの Al 耐性機構を解明することを目的とした. まず、実際の環境下における植物-内生菌相互作用による Al 耐性機構を解明するために、 $\gamma$  線滅菌した調査地のススキ根域土壌を用いた土壌接種試験を行った. さらに水耕接種試験を行い、ススキ根部における Al の局在部位を観察することで、植物組織学的な観点からもススキの Al 耐性機構を明らかにすることを目的とした.

### 4.2. *Chaetomium cupreum* の培養期間の決定

#### 4.2.1. 材料および方法

50 mL 容三角フラスコに入った 15 mL の 1% malt extract 培養液 (1 ME) (表 4-1) に、1 MA 上で 23°C 暗黒下 7 日間培養した *C. cupreum* の菌糸先端を 5.5 mm disk として打ち抜き、その disk 3 枚を接種した. 110 rpm に設定した振とう培養器 (SI-600R, As-One) 内にて、23°C 暗黒下で 3, 6, 9, 12, 15, 18 日間振とう培養した. 各日数につき 3 本の三角フラスコを反復として準備した. 培養後、80°C で 4 時間乾燥させ乾燥重量を測定した No.6 濾紙を用いて培養液を濾過し、菌体を脱塩水で洗浄しながら濾別した. 菌体を、濾紙ごと 80°C で 24 時間乾燥させ、乾燥重量を測定した. 濾紙の乾燥重量を差し引くことで菌体の DW を算出し、成長曲線を得た. 得られた培養濾液を用いて pH の測定を行った.

カップ法 (上杉, 1981) に従い、培養濾液の Al および Fe 錯体形成能を評価した. 乾熱滅菌したステンレス製カップ (内径 6 mm × 高さ 10 mm) を CAS-Al 培地、CAS-Fe 培地の上に置き、滅菌 cellulose acetate フィルター (孔径 0.22  $\mu$ m, Waters, Milford, MA, USA) で濾過滅菌した培養濾液を 250  $\mu$ L チャージした. 検定用シャーレは 23°C 暗黒下で 24 時間保持し、カップ周囲に形成された halo の直径を測定した. 検定用カップはシャーレ 1 枚当たり 3 個までとした. 本試験については各培養濾液につき 3 反復行い、培養日数につき合計 9 反復とした.

#### 4.2.2. 結果

菌体の DW は 3 日目から 6 日目にかけて大きく増加し、培養開始から 12 日目に、 $10.6 \pm 0.2$  mg とほぼ一定となった。培養濾液の pH は培養開始から徐々に低下し、15 日目に最も低くなり (pH 3.2), 18 日目に pH 3.3 となった (図 4-1a)。CAS-Al 培地において、培養濾液の Al 錯体形成能は 12 日目まで徐々に増加し、12 日目に halo の直径が  $25.6 \pm 0.79$  mm と最大となり、12 日目以降はほぼ一定となった。CAS-Fe 培地においては、培養濾液の Fe 錯体形成能は徐々に増加し、12 日～18 日目にかけてはほぼ一定であったが、15 日目に halo の直径が  $26.67 \pm 0.64$  mm と最大となった (図 4-1b)。成長量や pH が 12 日目ではほぼ一定となり、12 日目の培養濾液が CAS-Al 培地において最も大きい halo を形成したことから、12 日間を *C. cupreum* の最適な培養期間とした。

#### 4.3. 土壌接種試験

##### 4.3.1. 材料および方法

##### 4.3.1.1. 土壌の滅菌および滅菌前後の交換態および有効態元素と pH の評価

2013 年 11 月に採取した土壌およびススキの種子を実験に供した。土壌は採取後、室温で 2 週間風乾し、2 mm メッシュの篩を用いて得られた風乾細土とした。さらに接種試験に用いる際には  $\gamma$  線で滅菌した。 $\gamma$  線滅菌は 30 kGy の  $\gamma$  線を 200 時間照射することで行い、100 時間経過時に照射角度を 180 度変え、裏から照射するようにして滅菌にむらがないようにした。使用する前に 1 MA に  $\gamma$  線滅菌土壌を少量撒き、滅菌されていることを確認した。また  $\gamma$  線滅菌前後の風乾細土の交換性 Al, 交換態 Pb, 交換態重金属 (Cu, Pb, Zn), 交換態陽イオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ), 有効態 P, pH ( $\text{H}_2\text{O}$ ), pH (KCl) の測定を行い比較した。各測定は 3 反復行った。統計処理は SPSS (ver. 22.0.0.0, IBM, Armonk, NY, USA) を用いて行い、Student's *t*-test (有意水準 5%) によって解析した。

##### 4.3.1.1.1. 交換性 Al の測定 (土壌養分分析法, 1970)

風乾細土 4.0 g を 50 mL 容ビーカーに入れ、ホールピペットを用いて 1 M KCl 10 mL を加え、ガラス棒で 2 分間攪拌後、30 分間放置した。No.6 濾紙を用いて吸引濾過し、吸引しつつ 1 M KCl 10 mL で 3 回洗浄した。洗浄の際は 1 回ごとに完全に濾液を落とし切り、全て同じ 200 mL 容三角フラスコで受けた。得られた抽出液は 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE フィルターで分析直前に濾過し、ICP-OES に供した。

##### 4.3.1.1.2. 交換態 Pb の測定 (土壌環境分析法, 1997)

風乾細土 2.0 g を入れた 50 mL 容プラスチックチューブに 0.05 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  溶液 20 mL を加えて 30°C に温度を保ち、1 時間 100 rpm で振とうし、No. 6 濾紙で濾過した。得られた抽出液は 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE フィルターで分析直前に濾過し、ICP-OES に供した。

#### 4.3.1.1.3. 交換態重金属 (Cu, Pb, Zn) の測定 (土壤環境分析法, 1997)

風乾細土 2.0 g を入れた 15 mL 容プラスチックチューブに 0.1 M HCl 溶液 10 mL を加えて 30°C に温度を保ち, 1 時間 100 rpm で振とうし, No. 6 濾紙で濾過した. 得られた抽出液は 0.2 μm PTFE フィルターで分析直前に濾過し, ICP-OES に供した.

#### 4.3.1.1.4. 交換態陽イオン (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) の測定 (土壤環境分析法, 1997)

風乾細土 0.1 g を入れた 50 mL 容プラスチックチューブに, 1 M ammonium acetate 溶液 20 mL (pH 7.0) を加えて 1 時間 100 rpm で振とうし, No. 6 濾紙で濾過を行った. 得られた抽出液は 0.2 μm PTFE フィルターで分析直前に濾過し, ICP-OES に供した.

#### 4.3.1.1.5. 有効態 P の測定 (土壤環境分析法, 1997)

風乾細土 0.1 g を入れた 50 mL 容プラスチックチューブに 0.001 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 20 mL を加えて 1 時間 100 rpm で振とうし, No. 6 濾紙で濾過した. 得られた抽出液は 0.2 μm PTFE フィルターで分析直前に濾過し, ICP-OES に供した.

#### 4.3.1.1.6. pH (H<sub>2</sub>O) および pH (KCl) の測定 (土壤環境分析法, 1997)

いずれの測定も, 2.3.1.1 に準じて行った. pH (H<sub>2</sub>O) の測定は, 風乾細土 2 g を 15 mL 容プラスチックチューブに入れ, 脱塩水 5 mL を加えて振とうし, 1 時間以上放置した. その後, 軽く攪拌し, pH メーター (F-22) で pH を測定した. pH (KCl) の測定は, 風乾細土 2 g を 15 mL 容プラスチックチューブに入れ, 0.1 M NaOH 溶液を用いて pH 7.0 に調整した 1 M KCl 5 mL を加えて振とうし, 1 時間以上放置した. その後, 軽く攪拌し, pH メーター (F-22) で pH を測定した.

#### 4.3.1.2. 滅菌実生の作製

種子の滅菌はクリーンベンチ内で以下のように行った. まず脱塩水に 5 分間浸した種子を, 70% EtOH に 2 分間浸し, 7.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に浸して 5 分間攪拌しながら滅菌した. その後 70% EtOH に 2 分間浸して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を除去し, さらに滅菌水で 5 分間ずつ 2 回洗浄した. 洗浄の度に滅菌水を交換した. その後, 滅菌済みの濾紙上で余分な水分を除去し, 1/3 Hoagland 寒天培地 (表 4-2) 上に 7 粒ずつ播種し, 人工気象器内 (昼/夜: 14 時間/10 時間: 25°C/20°C) (LH-120S, Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Japan) で生育させた. 2 週間生育させた後, 第 2 葉が出葉した実生を接種試験に供した.

#### 4.3.1.3. *Chaetomium cupreum* の培養

100 mL の 1 ME の入った 300 mL 容三角フラスコ 10 本それぞれに, 1 MA 上に増殖させた *C. cupreum* の菌糸先端を 5.5 mm disk に打ち抜き, 20 枚ずつ接種した. 23°C 暗黒下, 110 rpm で 12 日間振とう培養した.

#### 4.3.1.4. *Chaetomium cupreum* の接種

オートクレーブ滅菌 (121°C , 20 分) した茶こしを用いて, 4.3.1.3 で得られた培養液を濾過し, 菌体を得た. 滅菌水で十分に培養液を洗い流してから, 得られた菌体を 50 mL 容滅菌済みプラスチックチューブ (Labcon North America, Petaluma, CA, USA) に移した. 少量の滅菌水を加えてミキサー (HG-200, As-One) で菌糸を摩砕し, 菌摩砕液を得た. 80°C で4時間乾燥させ DW を測定した濾紙片に摩砕液 500  $\mu$ L をのせた後, 再度 80°C で4時間乾燥させた. 摩砕液と濾紙片を合わせた DW から濾紙片のみの DW を差し引くことで, 菌体の DW を算出した. 測定は3反復行い, その平均値から菌体濃度を算出し, 菌体の DW が 6.0 mg/mL となるように調製した. また少量の菌摩砕液を 1 MA 上に撒き, 菌糸が摩砕によって生育阻害を受けていないことを確認した.

接種試験には, 植物培養試験管 (Iwaki, Shizuoka, Japan, 120 mm $\times$ 27.6 mm i.d.) とそれに合うポリプロピレン製のキャップを使用した. キャップをした植物培養試験管をアルミ箔で覆い, オートクレーブ (121°C , 20 分) で滅菌した. クリーンベンチ内で  $\gamma$  線滅菌土壌 8 g を植物培養試験管に入れ, 滅菌水 8 mL を加えた. 土壌の水分を均一にするために, 滅菌ピンセットで土壌全体を攪拌し, 1 晩静置した. 植物培養試験管 1 本につき 1 個のススキ実生を移植した. 試験区は対照区と接種区を設けた. 対照区には滅菌水 400  $\mu$ L を, 接種区には菌液 400  $\mu$ L (菌体の DW 2.4 mg) を実生の根元に添加することで内生菌を接種した. 接種後はキャップをし, さらにパラフィルムを巻いて滅菌状態を維持し, 人工気象器 (昼/夜:14 時間/10 時間:25°C /20°C ) 内で 36 日間栽培した. 栽培期間中は乾燥が見られなかったことから滅菌水の追加は行わなかった. 各処理区の 1 反復につき, 3 個体を元素分析用, 2 個体をフェノール性化合物分析用, 2 個体を有機酸分析用, 2 個体を内生菌の再分離用, 2 個体を内生菌の菌糸観察用として合計 11 個体を栽培した. 各処理区で 4 反復行った.

#### 4.3.1.5. 成長量の評価

接種試験に用いた実生の成長量の評価するために, 各処理区の 11 個体, 計 44 個体の根長, 全体・地上部および根の FW を測定した. 根長は root box counting 法 (宇治橋, 2008) に従い測定した. 各実生の DW については, 地上部は各処理区 11 個体, 計 44 個体の DW を測定した. 根においては, 元素分析用の実生 (各処理区 3 個体, 計 12 個体) のみの DW を測定した. 測定した根の FW および DW を含水率の算出に用いた. 統計処理は SPSS を用いて Student's *t*-test (5% 有意水準) によって解析した.

#### 4.3.1.6. ICP-OES による元素分析

根表面の Al を 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> に 20 分間ずつ 3 回浸して洗浄し, その後, 脱塩水で洗浄した (Zheng et al., 2005). 送風定温乾燥機を用いて, 各実生の地上部および根を 80°C で 48 時間乾燥させた後, 湿式灰化法に従い植物体の有機物分解を行った (植物栄養実

験法, 1990). 植物体全量を粉碎してフラコレチューブ内に移し, 1 mL の有害金属測定用  $\text{HNO}_3$  を加え, ビー玉でふたをして 1 晩静置した. その後,  $130^\circ\text{C}$  に設定した Dry Thermo Unit を用いて  $\text{HNO}_3$  を還流させながら有機物の分解を行った. 分解液が透明になり有機物が完全に分解される, あるいは 12 時間分解を行った後, ビー玉を除いて濃縮し, 放冷した. 地上部は脱塩水で 5 mL に, 根は脱塩水で 3 mL にメスアップした. 得られた分解液を  $0.2\ \mu\text{m}$  PTFE フィルターで分析直前に濾過し, ICP-OES により Al, Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Fe, Pb, Zn の測定を行った. 各処理区 3 個体の実生について元素分析を行い, 計 12 反復とした. 統計処理は SPSS を用いて Student's *t*-test (5% 有意水準) によって解析した.

#### 4.3.1.7. HPLC によるフェノール性化合物の分析

実生根を 100% MeOH 中でハサミを用いて摩砕後, 48 時間室温暗黒下で抽出し, 一時的に  $-20^\circ\text{C}$  で冷凍保存した. 抽出液を減圧濃縮後, 試料を  $200\ \mu\text{L}$  の 50% MeOH に再溶解し, HPLC 分析に供した. 分析条件は 2.4.1.2.A に準じた. 各処理区 2 個体について実生のフェノール性化合物の分析を行い, 計 8 反復とした. 統計処理は SPSS を用いて Student's *t*-test (5% 有意水準) によって解析した.

#### 4.3.1.8. GC/MS による有機酸の分析

実生根を 80% EtOH 中でハサミを用いて摩砕後, 48 時間室温暗黒下で抽出し, 一時的に  $-20^\circ\text{C}$  で冷凍保存した. 抽出液を減圧濃縮後,  $50\ \mu\text{L}$  の pyridine に再溶解させた. その後,  $100\ \mu\text{L}$  の MSTFA を加え,  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させて TMS 化し, GC/MS 分析に供した. 検出された有機酸-TMS 化物については標品を同様に TMS 化し, SIM で測定して検量線を作成し, 定量を行った. 分析条件は 2.4.1.2.B に準じた. 各処理区 2 個体の実生について有機酸の分析を行い, 計 8 反復とした. 統計処理は SPSS を用いて Student's *t*-test (5% 有意水準) によって解析した.

#### 4.3.1.9. 内生菌の再分離

内生菌の分離用とした根の表面滅菌をクリーンベンチ内で以下のように行い, 内生菌の再分離を行った. 70% EtOH に 1 分間浸し, 3.75%  $\text{H}_2\text{O}_2$  に浸して 10 分間攪拌しながら滅菌し, 再度 70% EtOH に 1 分間浸して  $\text{H}_2\text{O}_2$  を除去し, さらに滅菌水で 5 分間ずつ 2 回洗浄した. 洗浄の度に滅菌水を交換した. その後, 滅菌済みの濾紙上で余分な水分を除去してから, 滅菌メスを用いて 10 mm の根切片を作製し, 1MA に置床した. 根が少なかったため, 各個体の根をすべて用いて根切片を作製した.  $23^\circ\text{C}$  暗黒下で 14 日間培養し, 内生菌が再分離されることを確認した.

#### 4.3.1.10. 内生菌の菌糸の確認

大場ら (2006) に従い、以下のように 0.05% trypan blue 染色液で染色し、*C. cupreum* の菌糸を確認した。実生根をフラコレチューブに入れ、脱塩水を加えてオートクレーブ (121°C, 30 分) で根の組織の軟化を行った。次に 10% KOH 水溶液に浸し、オートクレーブ (121°C, 30 分) で根の脱色を行った。その後、5% HCl で 5 分間中和させ、脱塩水に移し替えて 1 晩室温で静置した。脱塩水を捨て、根を trypan blue 染色液に浸漬し、10 分間穏やかに煮沸した。Trypan blue 染色液を除去した後、lactoglycerin を加え、5 分間煮沸した。放冷後、アルミ箔で覆ったプラスチックチューブに入れ、室温暗黒下で保存した。スライドガラスの短辺に垂直になるように 4 本程度の染色根を並べ、カバーガラスで封入したプレパラートを作製し検鏡した。

#### 4.3.1.11. 内生菌による IAA 産生能試験 (Gordon and Weber, 1951)

Tryptophan の終濃度が 0.1% になるように添加した Czapek 液体培地 (表 4-3) を調製し、1 M HCl を用いて pH を 6.5 とした。50 mL 容三角フラスコに入った 15 mL の Czapek 液体培地に、1 MA 上で 23°C 暗黒下 7 日間培養した *C. cupreum* の菌糸先端を 5.5 mm disk として打ち抜き 3 枚接種し、23°C 暗黒下、110 rpm で 12 日間振とう培養した。また、tryptophan 未添加の Czapek 液体培地に同様に菌糸 disk を接種したものを対照区とした。培養後、フィルター濾過を行い、菌糸を取り除いた。得られた濾液 2 mL と Salkowski 試薬 (表 4-4) 4 mL とを混合し、室温で 25 分間反応させた。得られた反応液の 530 nm の吸光度を、紫外可視分光光度計 (UV-2450, Shimadzu) を用いて測定し、*C. cupreum* が産生した IAA 様化合物を定量した。検量線の作成には 3-indoleacetic acid (Wako) を用いた。測定は 3 反復行った。

#### 4.3.2. 結果

$\gamma$  線滅菌前後の土壌分析の結果、有効態 P, 交換態 Pb, Zn, および pH (H<sub>2</sub>O) に有意な変動が確認されたが、P 以外ではその変化はわずかであり (表 4-5)、生物利用性が高い Al や重金属に関して、交換態元素濃度の大きな変動はないと結論した。

接種試験において、内生菌の再分離の結果、処理に用いた接種区の全ての実生から *C. cupreum* が再分離され、対照区の実生からは何も分離されなかった。また trypan blue で染色した根において、表皮の細胞外に伸長する菌糸が確認されたが、感染構造である microsclerotia の形成は確認されなかった。以上のことから、本接種試験は無菌状態を維持でき、接種区では *C. cupreum* が感染したと判断した。

接種区、対照区ともに根の褐変や葉のクロロシスなどの Al・重金属毒性は確認されず (図 4-2)、根の含水率にも有意な差は確認されなかった (表 4-6)。一方で、接種区のススキ実生の根長、地上部および根部の FW と DW は有意に増加した (表 4-6)。元素分析の結果、*C. cupreum* の接種による栄養元素の吸収促進は、地上部、根部共に確認



されなかった (図 4-3). 地上部においては, 接種区のススキ実生の Cu および Pb の濃度は有意に減少したが, Fe の濃度は増加した (図 4-4a). 根部においては, 接種区において Al, Cu, Fe, Pb の濃度の増加が確認された (図 4-4b).

Al を特に高濃度に含有していた根部からは, chlorogenic acid, malic acid, citric acid および chlorogenic acid 類縁体が検出された (表 4-7). 接種区における malic acid, citric acid 濃度は対照区と比較して有意に低濃度であった (表 4-7). *C. cupreum* が産生した IAA 様化合物の濃度は,  $3.81 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$  であった.

#### 4.3.3. 考察

土壤接種試験で用いた  $\gamma$  線滅菌土壌は一般的な褐色森林土と比較して, Al (環境庁, 1999) や Cu, Pb, Zn (浅見, 2001) が高濃度に含まれていた. また, pH 4.23 の酸性土壌であった (表 4-5) ことから, Al や Cu, Pb, Zn といった重金属は植物に利用されやすい形態になっており, 植物が障害を示しやすいストレス環境と考えられた (三枝, 1994; Kabata-Pendias, 2011). 土壤接種試験の結果, *C. cupreum* はススキ実生の成長を促進させることが確認された (表 4-6, 図 4-2). *Chaetomium cupreum* の接種による栄養元素の吸収促進は確認されなかった (図 4-3) が, *C. cupreum* は IAA 様化合物を産生していたことから, IAA 様化合物の産生によってススキ実生の成長を促進したと考えられた. 接種区, 対照区のいずれのススキ実生の根にも, 高濃度の Al が蓄積されていた (図 4-4) が, 根の褐変や伸長阻害などの Al による障害 (Ryan et al., 1993; Kochian et al., 2005) は確認されなかった (図 4-2). 根に含まれる有機酸およびフェノール性化合物の分析を行ったところ, 接種区, 対照区のススキ実生の根には chlorogenic acid, malic acid, citric acid が共通して含まれていることが明らかとなった (表 4-7). Chlorogenic acid (Adams et al., 2002) や malic acid および citric acid (Barceló and Poschenrieder, 2002) は, それぞれ 1:1 のモル比で Al と錯体形成し, 解毒すると考えられている. 土壤接種試験で検出された chlorogenic acid, malic acid, citric acid によって解毒される Al 濃度を算出したところ, 対照区では 1,400 mg/kg DW, 接種区では 280 mg/kg DW の Al が解毒されることが明らかとなった. しかし, ススキ実生の根には解毒できるよりも高濃度の Al が蓄積されており (図 4-4b), chlorogenic acid, malic acid および citric acid による Al の解毒以外の Al 耐性機構も有すると考えられた. 内生菌の接種効果の 1 つに, 植物の二次代謝産物の産生促進が知られている (Schulz and Boyle, 2006) が, 本実験では二次代謝産物の chlorogenic acid や一次代謝産物の malic acid および citric acid の産生促進は確認されなかった.

接種区, 対照区いずれのススキ実生も, Al や Fe を高濃度に蓄積していたが, 土壌に高濃度に含まれていた Cu, Pb および Zn は低濃度に保たれていた (図 4-4b). 植物の重金属耐性機構として, 体内へ重金属を吸収しない「排除機構」と, 吸収した重金属を解毒する「解毒機構」の 2 つが知られている (Larcher, 2001) が, ススキは重金属の排除

機構を有すると推察された。また、本接種試験におけるススキ体内の重金属や Al, Fe 濃度の傾向は、野外で採取したススキの結果と同様であった。Al や Fe は、Cu や Zn の吸収と拮抗する (Kabata-Pendias, 2011) ことが知られており、ススキは Al や Fe を高濃度に根に蓄積することで、Cu や Zn の過剰吸収を抑制している可能性が示唆された。

#### 4.4. 水耕接種試験

##### 4.4.1. 材料および方法

###### 4.4.1.1. *Chaetomium cupreum* の接種

*Chaetomium cupreum* を 1 MA 上で 23°C 暗黒下 7 日間生育させ、生育先端をコルクボーラー (5.5 mm i.d.) で打ち抜き、接種源として用いた。滅菌実生の作製は、4.3.1.2 に準じた。No. 51B 濾紙 (Advantec) を 30 mm × 100 mm に切断し、植物培養試験管の底に一方の長辺が接するように入れ、30 mm の帯状になるように整えた (図 4-5)。濾紙の入った植物培養試験管にポリプロピレン製のキャップをし、アルミ箔で覆い、オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した。以下の操作は全てクリーンベンチ内で行った。Al を終濃度 100 μM となるように添加した滅菌済み 1/10 Hoagland 液体培地 (pH 4.0) (表 4-8) を、植物培養試験管 1 本当たり 8 mL 加えた。その後、濾紙と植物培養試験管の壁との間に、第 2 葉が出葉した滅菌ススキ実生を移植した (図 4-5)。植物培養試験管 1 本につき、1 個体のススキ実生を移植した。試験区は、接種区および対照区とした。接種区においては、1 MA 上で 23°C 暗黒下 7 日間培養した *C. cupreum* の菌糸先端を 5.5 mm disk として打ち抜き、ススキ実生の根の近傍に 1 枚接種した。対照区においては、1 MA を 5.5 mm disk として打ち抜き、根の近傍に同様に 1 枚静置した。処理後、植物培養試験管にキャップをし、パラフィルムを巻いて滅菌状態を維持した。さらに、実生根部をアルミ箔で覆い、光を遮断した。ススキ実生は人工気象器 (昼/夜: 14 時間/10 時間: 25°C / 20°C) 内で 36 日間栽培した。各処理区で 4 反復行った。各処理区の 1 反復につき、2 個体 (計 8 個体) を元素分析用、1 個体 (計 4 個体) を内生菌の再分離用、1 個体 (計 4 個体) を菌糸および、Al 局在の観察用として用いた。

###### 4.4.1.2. ススキ実生の成長量の評価

各試験区とも、元素分析に用いた 8 個体の実生の根長、全体・地上部および根の FW を測定した。なお、根長は root box counting 法 (宇治橋, 2008) に従い、測定した。元素分析に供する個体は、0.5 mM CaCl<sub>2</sub> に 20 分間ずつ 3 回浸し、根表面の Al を洗浄し、その後脱塩水で十分に洗浄した (Zheng et al., 2005)。各試験区につき、全 16 個体について送風定温乾燥機内で、80°C で 48 時間乾燥させ、DW を測定した。元素分析に用いた個体の根については、FW と DW の測定値を含水率の算出に用いた。統計処理は SPSS を用いて Student's *t*-test (5% 有意水準) によって解析した。

#### 4.4.1.3. ICP-OES による元素分析

分析の方法は 4.3.1.6 に準じた。

#### 4.4.1.4. 内生菌の再分離

再分離の方法は 4.3.1.9 に準じた。

#### 4.4.1.5. 根における菌糸および Al の局在部位の観察

Al の染色は、lumogallion 染色法 (Kataoka et al., 1997) に従った。根の断面切片を作製するために以下の操作を行った。4% agar に包埋した根から、ミクロトーム (REM-710, Yamato Kohki, Saitama, Japan) を用いて、100  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。0.1 M の sodium acetate 緩衝液 (pH 5.2) に lumogallion (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) を終濃度 10  $\mu\text{M}$  となるように添加し調製した lumogallion 染色液に切片を入れ Dry Thermo Unit を用いて 50°C で 60 分間浸漬した。その後、前述の sodium acetate 緩衝液で 15 分間、2 回洗浄した。染色切片は sodium acetate 緩衝液で封入してプレパラートを作製後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Fluoview FV1000-D, Olympus) にて、lumogallion-Al 錯体による蛍光 (520 nm) を検出し、蛍光 XY 画像を得た (励起波長 : 473 nm, 使用フィルター : Alexa fluor 488)。

菌糸の染色には 0.05% trypan blue 染色液を用いた。染色の過程における根表面上の菌糸の脱落を防ぐため、根を 0.05% trypan blue 染色液に室温で 30 分間浸漬することで菌糸の染色を行った。また、根周囲の *C. cupreum* の菌糸における Al の局在を観察するため、前述の lumogallion 染色法に従い根の染色を行った。

#### 4.4.2. 結果

内生菌の接種により、根長および根の DW が有意に増加した (表 4-9)。対照区および接種区の根部には、それぞれ  $1,770.6 \pm 265.0 \text{ mg/kg DW}$  および  $962.20 \pm 153.09 \text{ mg/kg DW}$  と高濃度の Al が含有されていた。根の褐変や葉のクロロシスなどの Al による毒性は確認されなかった (図 4-6)。

根切片における lumogallion-Al 錯体の蛍光を確認したところ、Al の局在部位が対照区と接種区とで異なっていた (図 4-7)。対照区において、Al は根全体の細胞壁に蓄積されていることが確認された (図 4-7b)。一方、接種区においては、Al は根の表皮と内皮の細胞壁および維管束に局在していることが確認された (図 4-7d)。根の周囲には *C. cupreum* の菌糸が生息しており (図 4-8a)、菌糸には lumogallion-Al 錯体の蛍光が観察された (図 4-8b)。

#### 4.4.3. 考察

有害金属は、液胞や細胞壁などへの局在 (Larcher, 2001 ; Fernández et al., 2014), あるいは菌糸内隔離 (Jentschke and Godbold, 2000) などによって解毒されることが知られている。そこで、水耕試験を行うことで、ススキ根部内における Al の局在および根周囲の菌糸における Al の局在を観察した。対照区のススキ根部において、Al は根全体の細胞壁に局在していることが確認された (図 4-7)。Al の細胞壁への局在は植物が有する Al の細胞質内への侵入を阻害する機構として知られており (Vögeli-Lange and Wagner, 1990), ススキも Al を細胞壁へ局在させることで Al 毒性を軽減していると考えられた。一方、*C. cupreum* を接種したススキ根部では、細胞内の Al の局在は確認されなかったが、*C. cupreum* はススキの根において、表皮と内皮の細胞壁および維管束に Al を局在させることが明らかとなった (図 4-7)。内皮にはカスパリー線が存在し、有害な化合物や元素などの吸収移行を抑制する (MacFarlane and Burchett, 2000) ことから、内皮への Al 蓄積はカスパリー線が毒性軽減に機能していることを示している。微生物が植物における元素の局在変化を引き起こしたという報告例はほとんどないが、AM 菌の報告例として、*Medicago sativa* の根の細胞内や細胞膜上の Cd を減少させ、細胞壁に存在する Cd を増加させることで、植物の重金属耐性を増強した (Wang et al., 2012) というものがある。*Chaetomium cupreum* も Al を表皮と内皮の細胞壁および維管束に局在させることで、ススキの Al 耐性機構を増強していると考えられた。また、根の周囲の菌糸には Al が局在していることが確認された (図 4-8b) ことから、*C. cupreum* は Al を菌糸に隔離することで、ススキの Al 耐性を増強していると推察された。

内生菌の1つである DSE の *Phialocephala fortinii* は siderophore を産生することが知られている (Bartholdy et al., 2001)。Siderophore は、Al などの有害金属と錯体形成することで、植物への有害金属の吸収を抑制していると考えられている (Rajkumar et al., 2010)。一方、siderophore は微量必須栄養元素などと錯体形成することで、吸収促進も行うことが報告されている (Takagi et al., 1984)。

#### 4.5. 要約

現地の土壌を用いた接種試験において、*C. cupreum* はススキ実生の成長を著しく促進させた。*Chaetomium cupreum* による栄養元素の吸収促進は確認されなかったが、*C. cupreum* は IAA 様化合物を産生することでススキの成長を促進していると考えられた。接種区および対照区のススキ根部の Al および Fe は高濃度であった。一方、土壌に高濃度に含まれていた Cu, Pb および Zn は、ススキ根部においては比較的 low 濃度に保たれていた。Al および Fe はそれぞれ、Cu および Zn の吸収と拮抗することが知られている。ススキは Al や Fe を高濃度に蓄積することで、Cu および Zn の過剰吸収を抑制している可能性が示唆された。ススキは Al 解毒物質として報告されている chlorogenic acid, malic acid および citric acid を産生しており、元々 Al 耐性機構を有すると考えられた。しかし、

検出された chlorogenic acid, malic acid および citric acid が解毒できる AI 濃度を算出したところ、ススキ実生が蓄積している AI の一部しか解毒できないことが明らかとなった。そこで水耕接種試験において、*C. cupreum* 接種区および対照区のススキ根部における AI の局在を観察したところ、対照区のススキは根全体の細胞壁に AI を局在させていたことから、AI を細胞壁に隔離することで解毒していると考えられた。一方、*C. cupreum* 接種区のススキ根部における AI は表皮と内皮の細胞壁および維管束に局在することが明らかとなった。内皮にあるカスパリー線は、有害な化合物や元素の吸収移行を抑制するため、内皮への AI 蓄積はカスパリー線が毒性軽減に機能していることを示していると考えられた。また、根周囲の菌糸にも AI が蓄積されていることが確認された。*Chaetomium cupreum* は表皮と内皮の細胞壁および維管束に AI を局在させ、根周囲の菌糸に AI を隔離することで、ススキの AI 耐性機構を増強している可能性が示唆された。

表 4-1 1% Malt extract 培養液の組成

Malt extract	10 g
脱塩水	1,000 mL

表 4-2 1/3 Hoagland 寒天培地の組成

KNO <sub>3</sub>	168.5 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	45.4 mg
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	393.6 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	164.3 mg
脱塩水	1,000 mL
Agar	15 g

表 4-3 Czapek 液体培地の組成

Sucrose (Wako)	30 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaNO <sub>3</sub>	2.0 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
KCl	0.5 g
脱塩水	1,000 mL



表 4-4 Salkowski 試薬の組成

0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mL
35% $\text{HClO}_4$	98 mL

表 4-5  $\gamma$  線滅菌前後の交換態および有効態元素濃度と pH

	$\gamma$ 線滅菌前の土壌	$\gamma$ 線滅菌後の土壌
pH (H <sub>2</sub> O)	4.27 ± 0.01	4.23 ± 0.01*
Al (mg/kg)	416.35 ± 17.25	445.12 ± 9.34
Ca (mg/kg)	330.35 ± 5.65	336.14 ± 4.28
K (mg/kg)	156.97 ± 5.54	157.51 ± 1.42
Mg (mg/kg)	44.93 ± 0.82	46.57 ± 0.70
Na (mg/kg)	19.86 ± 4.54	15.43 ± 0.41
P (mg/kg)	8.34 ± 2.56	19.84 ± 2.03*
Cu (mg/kg)	81.49 ± 2.11	81.44 ± 1.39
Pb (mg/kg)	177.15 ± 1.51	185.38 ± 0.74**
Zn (mg/kg)	13.35 ± 0.03	14.72 ± 0.38*

交換態あるいは有効態は乾燥重量当たりの平均 (mg/kg) ±SE で示した。3 反復行い, 統計処理は Student's *t*-test を用いた (\*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ )。.

表 4-6 各接種区におけるススキの成長量

	根長 (cm)	地上部 FW (mg)	根部 FW (mg)	地上部 DW (mg)	根部 DW (mg)	根部含水率 (%)
対照区	10.6 ± 0.8	24.2 ± 1.1	8.9 ± 0.5	4.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1	85.8 ± 1.4
接種区	43.9 ± 3.2***	36.0 ± 1.8***	22.0 ± 1.7***	7.3 ± 0.4***	2.7 ± 0.2**	89.5 ± 0.4

FW, 新鮮重量 ; DW, 乾燥重量. 結果は平均±SE で示した. 根長, 地上部および根部 FW, 地上部 DW は 44 反復, 根部 DW および根部含水率は 12 反復とした. 統計処理は Student's *t*-test を用いた (\*\*\*,  $P < 0.001$  ; \*\*,  $P < 0.01$ ) .

表 4-7 土壌接種試験におけるススキ実生根部の AI 解毒物質の濃度

	Chlorogenic acid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW)	Chlorogenic acid derivative ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW)	Malic acid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW)	Citric acid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW)
対照区	$0.34 \pm 0.16$	ND	$0.30 \pm 0.07^{***}$	$0.47 \pm 0.15^{**}$
接種区	$0.02 \pm 0.00$	$0.03 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$

FW, 新鮮重量 ; DW, 乾燥重量. 結果は平均 $\pm$ SE で示した. 8 反復行い, 統計処理は Student's *t*-test を用いた (\*\*\*,  $P < 0.001$  ; \*\*,  $P < 0.01$ ) . なお, ND は検出限界以下を示す.

表 4-8 1/10 Hoagland 液体培地の組成

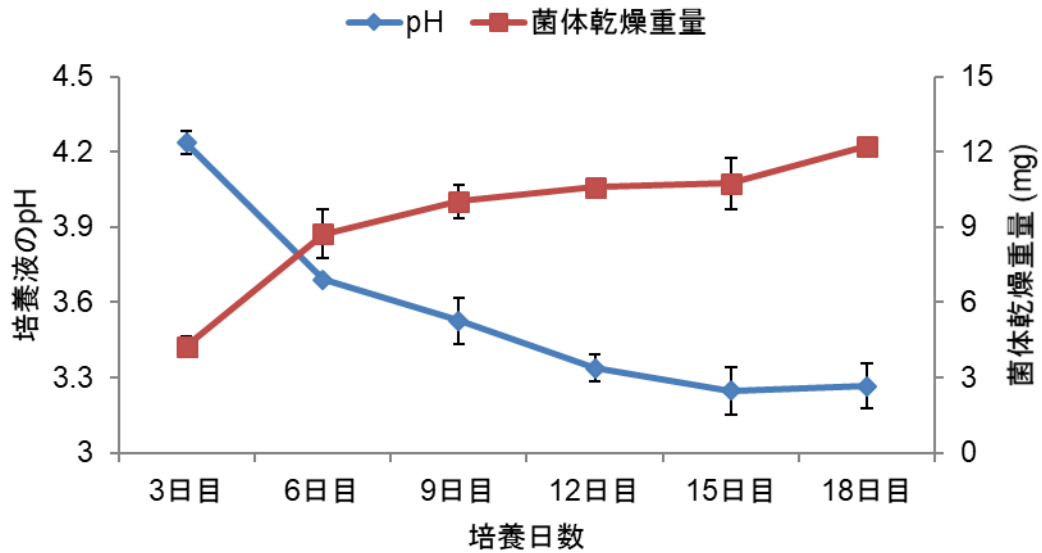
$K_2HPO_4$	17.44 mg
$K_2SO_4$	35.41 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	49.30 mg
$CaCl_2$	44.44 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.90 mg
Fe(III)-EDTA	3.77 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.07 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.04 mg
$H_3BO_3$	0.14 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.06 mg
$NH_4NO_3$	7.14 mg
脱塩水	1,000 mL

表 4-9 水耕接種試験におけるススキ実生の成長量

	根長(cm)	地上部 FW (mg)	根部 FW (mg)	地上部 DW (mg)	根部 DW (mg)
対照区	21.1 ± 6.7	12.7 ± 1.6	10.1 ± 3.1	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.3
接種区	50.5 ± 4.5**	14.2 ± 1.2	14.4 ± 1.3	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1**

FW, 新鮮重量 ; DW, 乾燥重量. 結果は平均±SE で示した. 8 反復行い, 統計処理は Student's *t*-test を用いた (\*\*,  $P < 0.01$ ) .

(a)



(b)

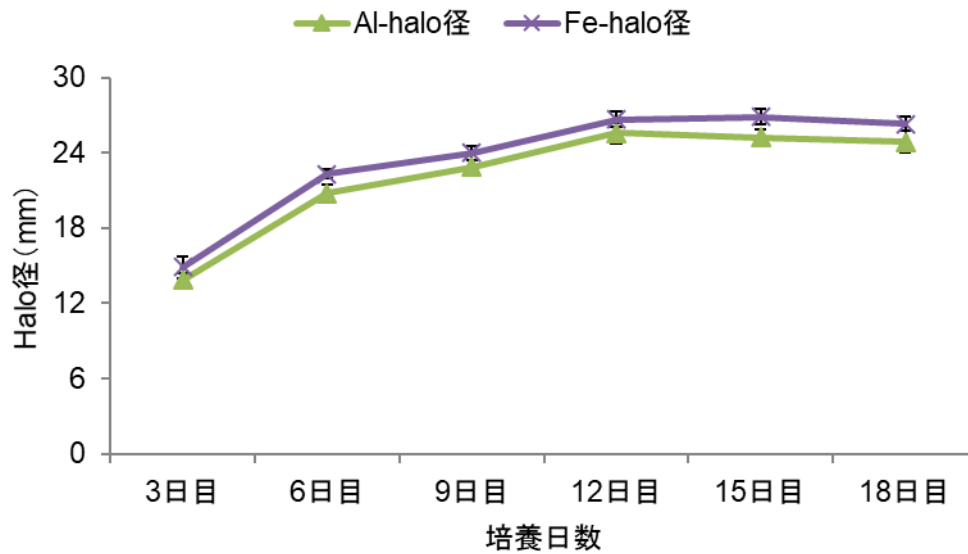


図 4-1 *Chaetomium cupreum* (5R7 株) の液体培養試験

(a) 培養濾液の pH および菌体の DW (mg)

(b) CAS-Al, CAS-Fe 培地で各培養濾液の形成した halo 径 (mm)

図中におけるエラーバーは標準誤差を示す。(a) については各日数につき 3 反復行い, (b) については各日数につき 9 反復行った。



図 4-2 土壌接種試験に用いたススキ実生  
(a) 対照区の実生 (b) 接種区の実生  
図中のバーは 1 cm を示す.



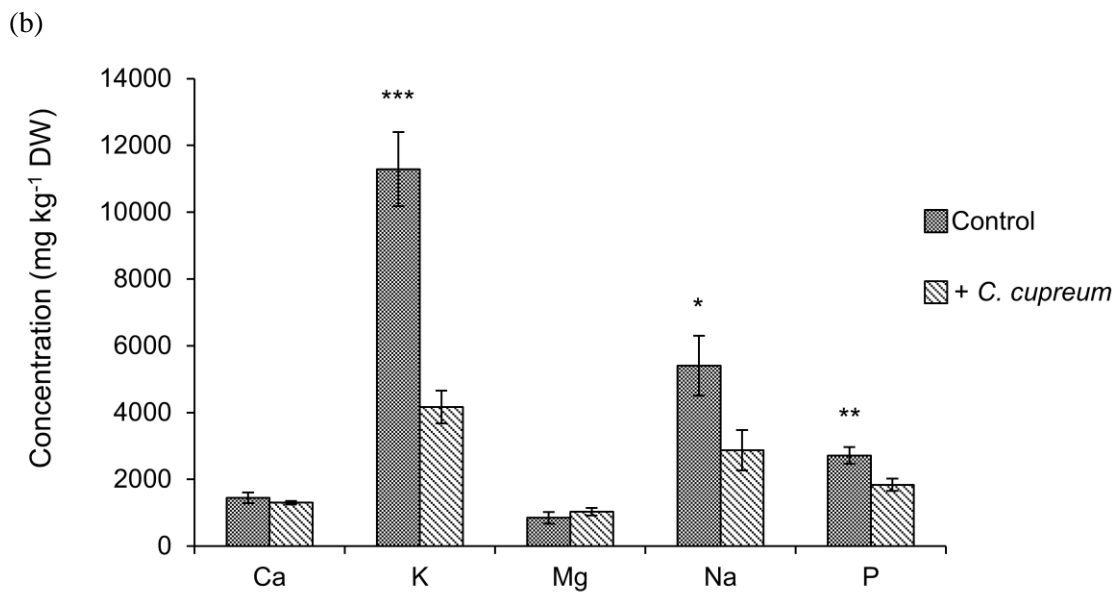
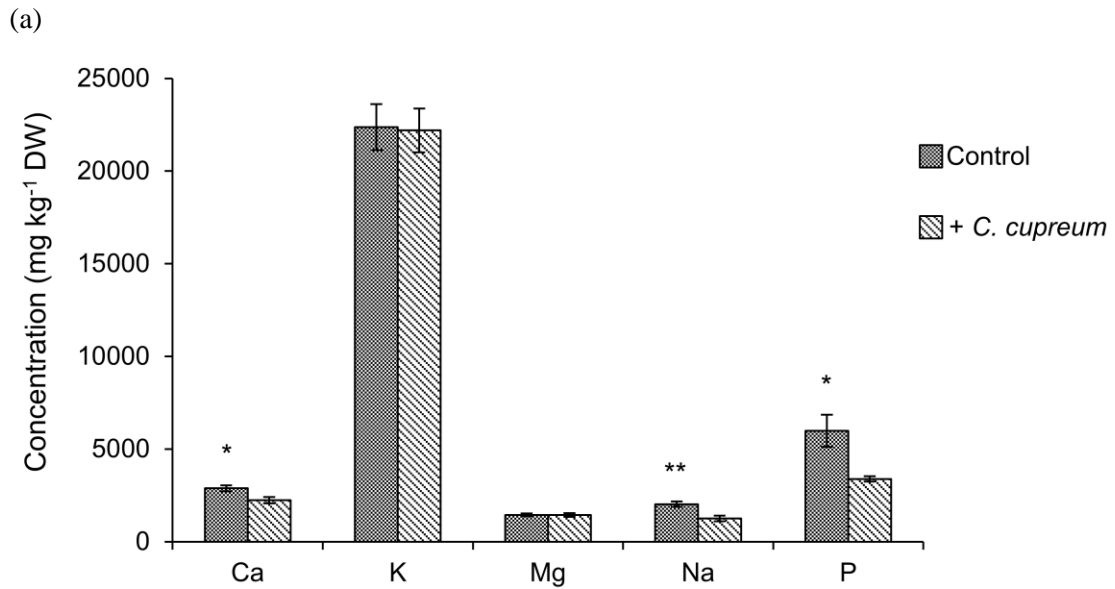


図 4-3 土壌接種試験におけるススキ実生の栄養元素濃度

(a) 地上部における栄養元素濃度 (b) 根部における栄養元素濃度

12 反復行い，統計処理は Student's *t*-test を用いた (\*\*,  $P < 0.01$  ; \*,  $P < 0.05$ ).

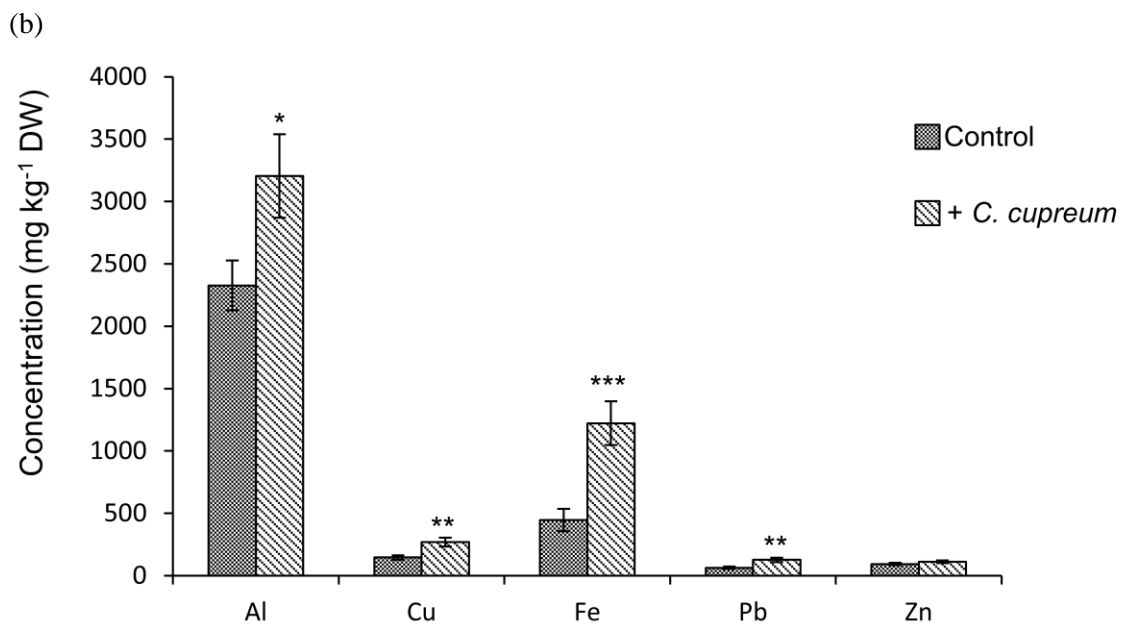
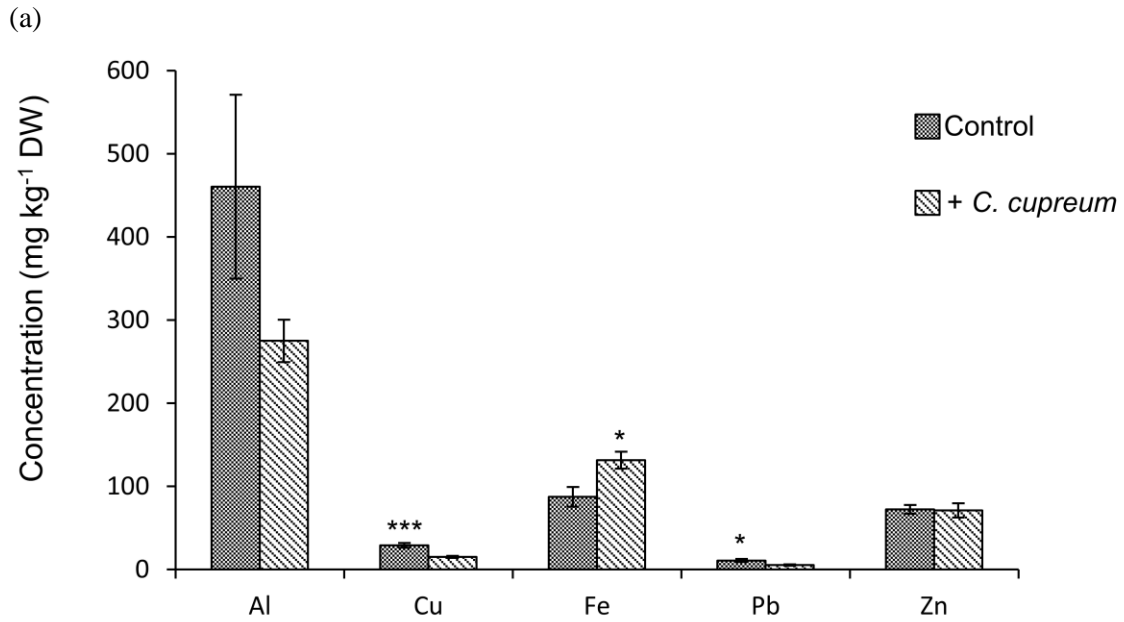


図 4-4 土壌接種試験におけるススキ実生の Al および重金属濃度

(a) 地上部における Al および重金属濃度 (b) 根部における Al および重金属濃度  
 12 反復行い，統計処理は Student's *t*-test を用いた (\*\*\*,  $P < 0.001$  ; \*\*,  $P < 0.01$  ;  
 \*,  $P < 0.05$ ).



図 4-5 水耕接種試験の接種時の様子

ススキは壁面と濾紙の間に移植し，図中の赤丸のように，根の近傍に菌糸 disk を接種，あるいは 1MA の disk を静置した．



図 4-6 水耕接種試験に用いたススキ実生  
(a) 対照区の実生 (b) 接種区の実生  
図中のバーは 1 cm を示す.

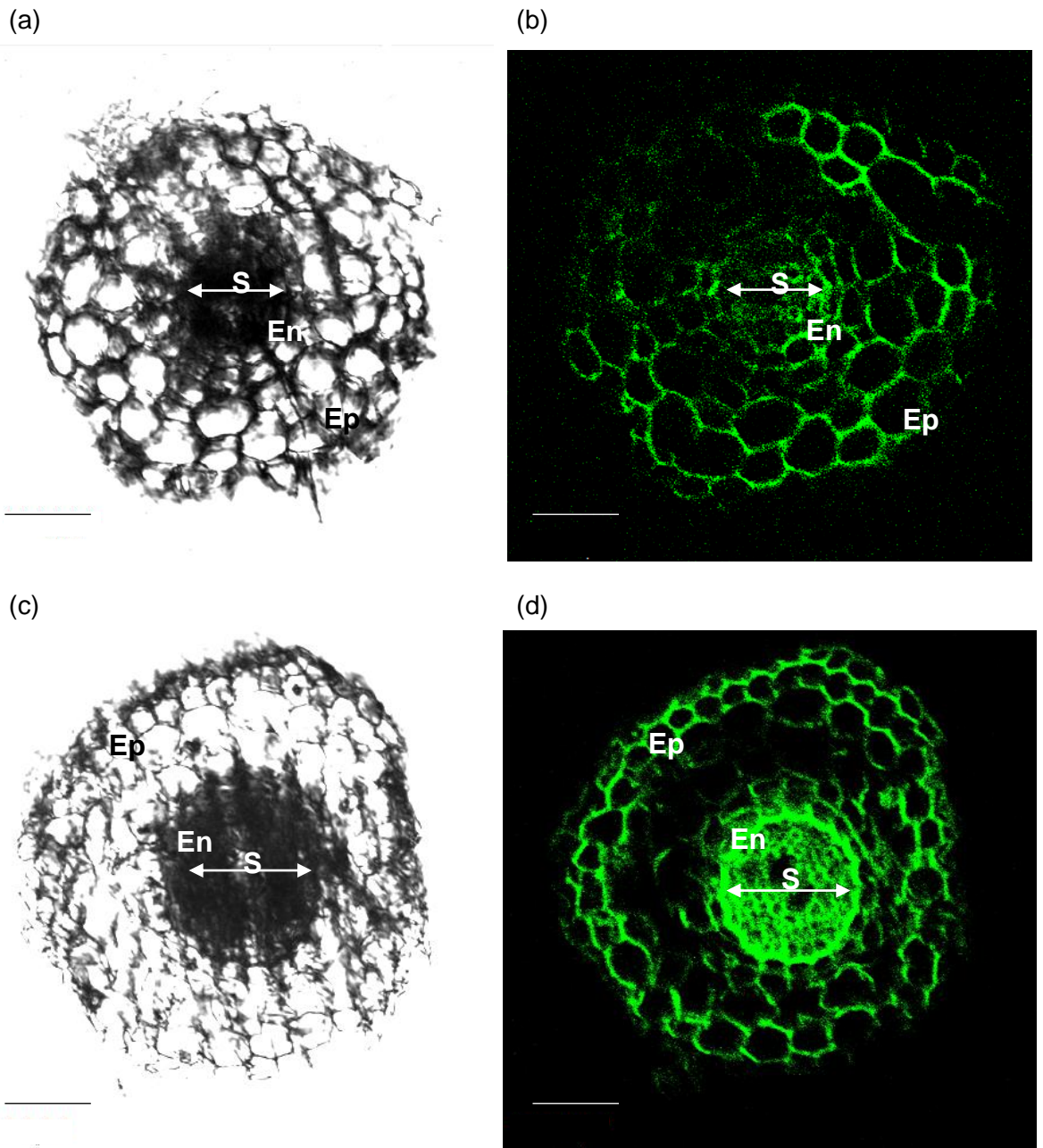


図 4-7 水耕接種試験に用いたススキ実生の根断面における AI の局在部位

- (a) 光学顕微鏡で観察した対照区のススキ実生の根断面
- (b) 対照区のススキ実生の根断面における AI の局在部位
- (c) 光学顕微鏡で観察した接種区のススキ実生の根断面
- (d) 接種区のススキ実生の根断面における AI の局在部位

(b) および (d) における緑色は lumogallion-AI 錯体の局在部位を示す。S, 維管束; En, 内皮; Ep, 表皮を示す。各図におけるバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

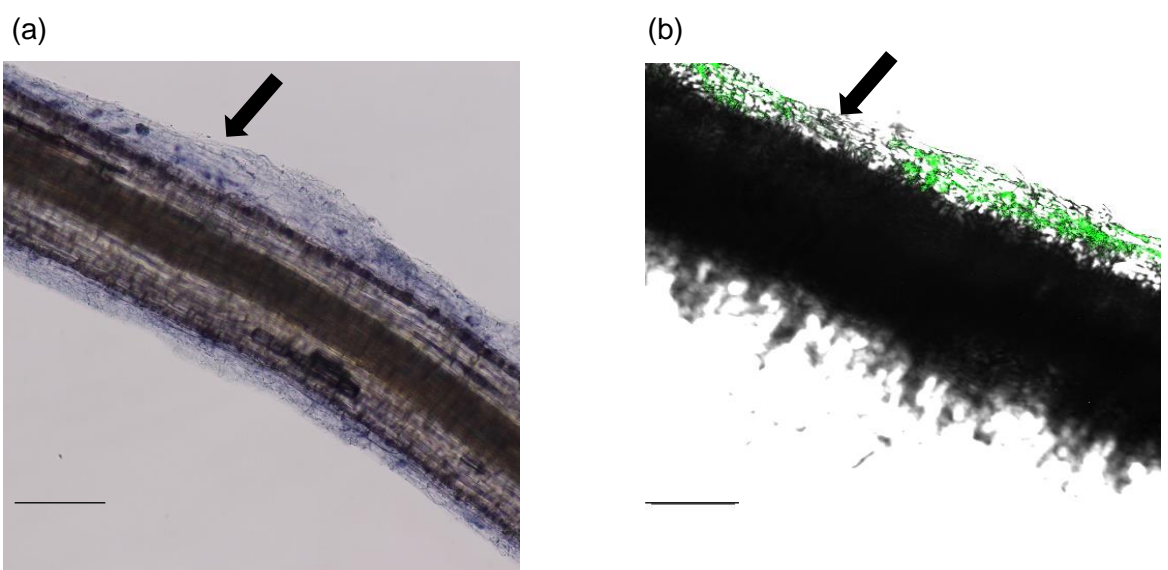


図 4-8 水耕接種試験において trypan blue 染色および lumogallion 染色した接種区のススキ実生の根

(a) Trypan blue 染色したススキ実生の根

(b) Lumogallion 染色したススキ実生の根

(a)における矢印は *C. cupreum* の菌糸を示す。(b)における矢印は根の周囲の *C. cupreum* の菌糸を示しており、緑色は lumogallion-Al 錯体の局在を示す。各写真におけるバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

## 第5章 総合考察

近年、重金属浄化には植物を利用した環境浄化（ファイトレメディエーション）が注目されつつある。経済的には土壤に含まれる重金属を回収し、再利用できるファイトエクストラクションが着目される一方で、たい積物の流出防止や風による飛散防止（金属鉱業事業団、1983）および荒廃裸地の植生による安定化（湯浅ら、1995a）には、直接的に遷移を進めることが出来る緑化（ファイトスタビライゼーションに相当）技術も重要であると考えられている。裸地からの緑化の際には遷移初期種の定着が重要であり（金属鉱業事業団、1983）、生態系への影響から、在来種を用いることが望ましいと考えられている。そのため緑化に用いられる植物は、植生遷移を妨げず、鉱山跡地のような酸性環境において毒性を発現する重金属やAlに対する耐性機構を有し、正常に生育できる在来の遷移初期種であることが必要だと考えられた。過酷な環境において生育している植物は、内生菌と共存することで、環境ストレス耐性を高めていると考えられている（Rodriguez et al., 2009）。鉱山跡地に自生するリョウブ（Yamaji et al., 2016）やドクゼリ（Nagata et al., 2015）は内生菌と共存することで生存を可能にしていると考えられている。そこで、本研究では、日本に在来する遷移初期種であり、調査地の鉱山跡地にも自生し、従来からAl耐性を有すると考えられている（堀江・根本、1990；Kayama, 2001）ススキを対象植物とし、ススキ-内生菌相互作用によるススキのAlおよび重金属耐性機構を明らかとすることを目的とした。

調査地における根域土壤およびススキの元素分析を行ったところ、調査地土壤には、一般的な褐色森林土と比較して高濃度のAl（環境庁、1999）およびCu, Pb, Zn（浅見、2001）が含まれていた。また、土壤pH（H<sub>2</sub>O）は調査期間を通して4.5以下の酸性を示した。このような酸性土壤においてはAlや重金属がイオン化しやすく、調査地に自生する植物に毒性を示していると考えられた。特にAlは酸性土壤環境下で3価のAlイオンとなり、植物に対する毒性が急増する（三枝、1994）ため、本調査地においてAl毒性は無視できないと考えられた。また、このような酸性土壤環境下では、植物はAlや重金属を吸収しやすくなる（Kabata-Pendias, 2011）が、調査地に自生するススキが蓄積しているCu, PbおよびZn濃度は低濃度であった。植物の有害金属耐性機構として、体内の蓄積濃度を低濃度に維持する「排除機構」と、吸収した重金属を解毒する「解毒機構」の2つがある（Larcher, 2001）。ススキが蓄積しているCu, PbおよびZnは低濃度であったことから、重金属耐性機構として、排除機構に相当する競合元素による重金属吸収抑制機構を有している可能性が示唆された。一方、ススキ根が含有するAl濃度は調査期間を通して、2,000 mg/kgと高濃度であった。Alの超蓄積種は地上部に1,000 mg/kg以上のAlを蓄積する植物種（Jansen et al., 2002）と定義されており、ススキはAlの超蓄積種ではなかったが、根に高濃度のAlを蓄積していたことから、根においてAl解毒機構を有すると考えられた。体内に吸収されたAlの解毒機構（細胞内抵抗性機構）を有する植物としてソバが知られており、Alの有無に関わらず植物体内に大量のoxalic acidを蓄積し、Alが吸収されると錯体を形成することで解毒する（松本、2003）。Oxalic acidの他に、Alの解毒物質としてはmalic acidやcitric acidなどの有機酸、catecholやcatechinなどのフェノール性化合物（Barceló and Poschenrieder, 2002）が知られている。そこで、ススキの根に含

まれるフェノール性化合物および有機酸の分析を行ったところ、主要な化合物として citric acid, malic acid, chlorogenic acid, および *trans*-aconitic acid が検出された。Citric acid や malic acid (Barceló and Poschenrieder, 2002), chlorogenic acid (Adams et al., 2002) は Al と 1 : 1 のモル比で Al と錯体形成し、Al を解毒すると考えられている。また、*trans*-aconitic acid は Al の解毒物質としてトウモロコシの根から分泌される (Suhayda and Haug, 1986)。以上のことから、調査地に自生するススキは Al 解毒物質を産生することで、Al 耐性を獲得していると考えられた。

調査地に自生するススキ根から内生菌を分離したところ、*Chaetomium* (出現率 : 9.2%), *Phialocephala* (8.2%), *Lachnum* (6.3%), *Colletotrichum* (6.0%) 属糸状菌が主に分離された。内生菌の植物に対する機能は多岐にわたり (Jumpponen and Trappe, 1998), 栄養元素の吸収促進 (Jumpponen et al., 1998) や siderophore の産生による微量必須元素の吸収促進 (Bartholdy et al., 2001) などがある。Siderophore は AM 菌 (Arriagada et al., 2007) や内生細菌 (Rajkumar et al., 2010) によっても産生され、植物の重金属ストレスを緩和するという報告がある。そこで、分離された内生菌の siderophore 産生能を評価したところ、*C. cupreum* が最も高い活性を示したことから、*C. cupreum* が siderophore を産生することにより、ススキにおける Al の解毒能力を高めている可能性が示唆された。

次に滅菌した調査地土壌を用いた接種試験を行い、*C. cupreum* の関与したススキにおける Al 耐性機構を考察することとした。土壌接種試験において、Al および Fe は高濃度に蓄積される一方、Cu, Pb および Zn の濃度は低く保たれており、野外で採取したススキと同様の傾向が確認された。内生菌の作用として報告のある栄養元素の吸収促進 (Jumpponen et al., 1998) は、*C. cupreum* の接種では確認されなかったが、Gordon and Weber (1951) に従い、IAA 様化合物産生能試験を行ったところ、*C. cupreum* は IAA 様化合物を産生することが明らかとなった。*C. cupreum* は IAA 様化合物を産生することでススキ実生の成長を促進すると考えられた。接種区、対照区のいずれのススキ実生も根に高濃度の Al を蓄積していたが、根の褐変や葉のクロロシスなどの Al による障害は確認されなかった。根において Al が解毒されていると考えられたため、根の有機酸およびフェノール性化合物の分析を行ったところ、接種区、対照区のススキ実生の根には現地のススキの結果と同様に、chlorogenic acid, malic acid, citric acid が共通して含まれていることが明らかとなった。土壌接種試験で検出された chlorogenic acid, malic acid, citric acid によって解毒される Al 濃度を算出したところ、対照区では 1,400 mg/kg DW, 接種区では 280 mg/kg DW の Al が解毒されることが明らかとなった。しかし、ススキ実生の根には解毒できるよりも高濃度の Al が蓄積されており、ススキ自身が産生する化合物による Al の解毒以外の機構も有すると考えられた。

有害金属は、液胞や細胞壁などへの局在 (Larcher, 2001 ; Fernández et al., 2014), あるいは菌糸内隔離 (Jentschke and Godbold, 2000) などによって解毒されることが知られている。そこで水耕試験を行い、ススキ根部内における Al の局在および根周囲の菌糸における Al の局在を観察した。対照区のススキ根部において、Al は根全体の細胞壁に局在していることが確認された。Al の細胞壁への局在は植物が有する Al の細胞質内への侵入を阻害する機構として知られており (Vögeli-Lange and Wagner, 1990), ススキも Al を細胞壁へ局在させること



で Al 毒性を軽減していると考えられた。一方、*C. cupreum* はススキの根において、表皮と内皮の細胞壁および維管束に Al を局在させることが明らかとなった。内皮にはカスパリー線が存在し、有害な化合物や元素などの吸収移行を抑制する (MacFarlane and Burchett, 2000) ことから、内皮への Al 蓄積はカスパリー線が毒性軽減に機能することを示していると考えられた。微生物による植物体内の元素の局在変化の報告例はほとんどないが、Wang et al. (2012) は、AM 菌が *M. sativa* の根の細胞内や細胞膜上の Cd を減少させ、細胞壁に存在する Cd を増加させることで、植物の重金属耐性を増強したと報告している。*Chaetomium cupreum* は Al を表皮と内皮の細胞壁および維管束に局在させることで、ススキの Al 耐性機構を増強していると考えられた。また、根の周囲の菌糸には Al が局在しており、*C. cupreum* は Al を菌糸内に蓄積することで、ススキの Al 耐性を増強していると考えられた。*Chaetomium cupreum* が増強した Al 耐性機構によって、ススキはより高濃度の Al を蓄積し、重金属の排除機構を促進させている可能性が示唆された。このような環境ストレス耐性の増強は、ススキが鉱山跡地のように重金属や Al を高濃度に含む環境においても、正常に生育できる一因であると考えられた。

図 5-1 に本研究の概略図を示した。ススキは Al 解毒物質の産生や細胞壁隔離による Al 耐性機構を獲得していると推察された。また、高濃度の Al や Fe を蓄積することで、Cu や Zn の吸収を抑制している可能性が示唆された。*Chaetomium cupreum* は、根における Al の局在部位の変化による Al 解毒の効率化や siderophore による Al の解毒によって、ススキの Al 耐性機構を増強していると考えられた。また、Al や Fe を高濃度に蓄積することで、Cu や Zn の吸収を抑制し、重金属排除機構の増強に寄与していると考えられた。ススキは日本に在来する先駆種であり、Al や重金属に対する耐性を有すると考えられたため、鉱山跡地や火山の噴火後の緑化植物としての活躍が期待される。一方、緑化現場の環境は一様ではなく、植物-内生菌相互作用は各環境によって変化する (Brundrett, 2004 ; Schulz and Boyle, 2006) ため、現地を注意深く観察し、現地環境に適した植物種および内生菌を選ぶことが重要であると考えられた。本研究は、実際の野外環境において、内生菌がススキ実生に対して共生的に機能することを示唆したものである。本研究で解明された植物-内生菌相互作用が、今後の植物と内生菌との相互作用を利用した応用研究への基礎的知見を提供できるものと期待する。

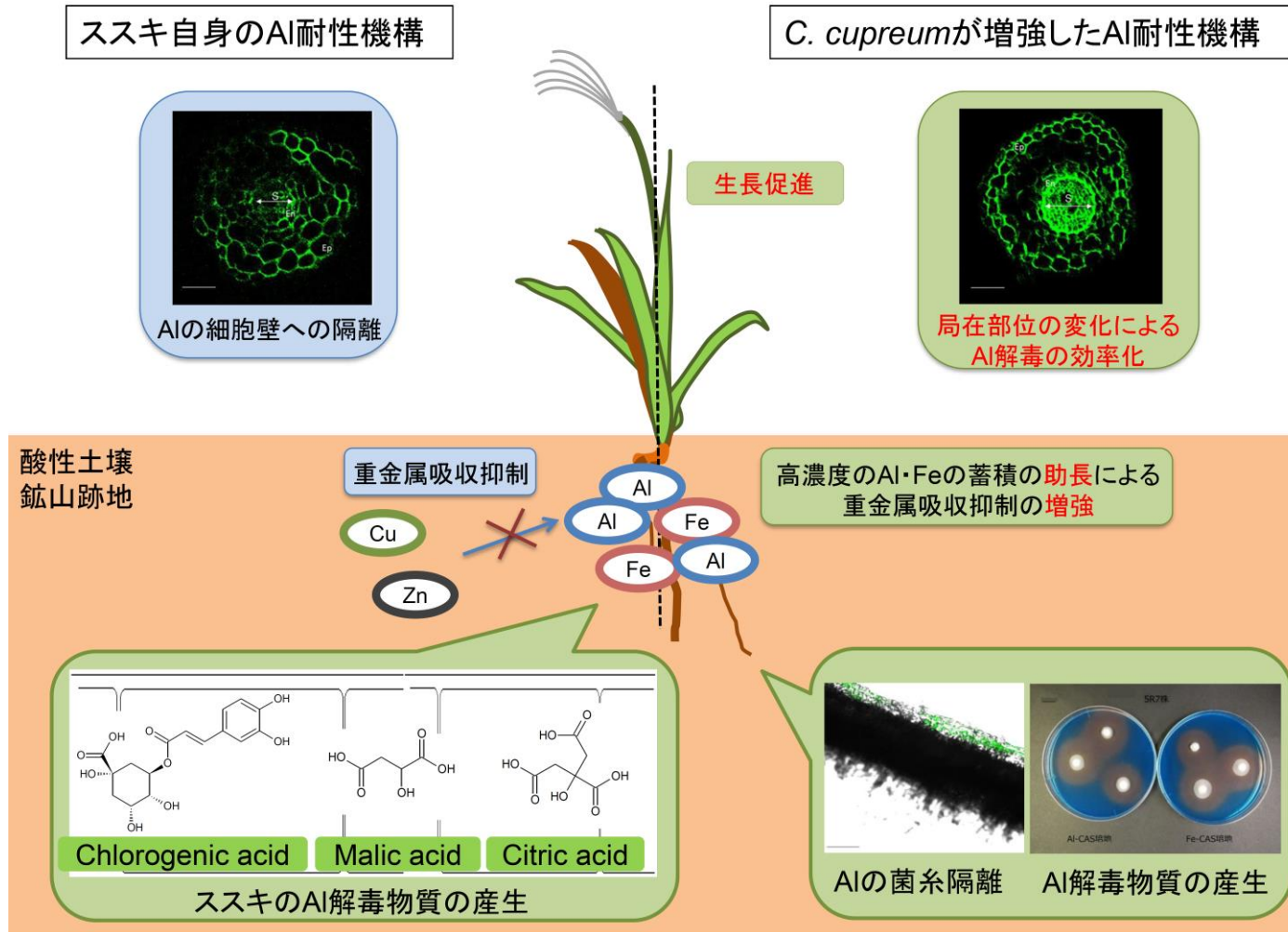


図 5-1 *Chaetomium cupreum* によって増強されるススキの Al および重金属耐性機構

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、現地調査や実験操作をはじめとする研究活動、論文執筆において懇切丁寧なご指導をして下さり、また日々の様々な面において励ましのお言葉をかけて下さった、筑波大学生命環境系・生物圏資源科学専攻准教授の山路恵子先生に篤くお礼申し上げます。先生から現地を見ることの大切さ、化学分析や研究に対する考え方などを学べたことは、とても幸せでした。

本論文の作成にあたり土壌学の視点から多くの貴重なご指導およびご助言を賜りました、筑波大学生命環境系・生物圏資源科学専攻教授の田村憲司先生、植生調査など生態学の視点から大変有益なご助言を賜りました、筑波大学生命環境系・生物圏資源科学専攻教授の上條隆志先生、修士時代からご指導いただき、心より感謝申し上げます。また、本論文の作成にあたり夜遅くまで詳細なご指導およびご助言を賜りました、筑波大学生命環境系・生物機能科学専攻助教の小川和義先生に深く感謝申し上げます。

本研究に用いた内生菌の同定を快く引き受けて下さり、現地においてもご指導ご助言を賜りました森林総合研究所東北支所の升屋勇人博士に篤く感謝申し上げます。また、土壌分析に際し、細やかなご指導を頂きました羽生一予博士に深く感謝申し上げます。

円滑な研究の遂行にあたって様々な面でご尽力頂きました、筑波大学技術専門職員の山末亜貴様、竹川雅実様に深く感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、機器の使用法などのご指導を頂きました分析センターの先生方に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、一部研究支援を日本科学協会の笹川科学研究助成により頂きました。深く感謝いたします。

そして環境生態化学研究室の諸先輩方、後輩緒氏ならびに他研究室の同輩には、終始暖かい励ましとご助言をかけて頂いたことに、心より感謝申し上げます。

最後に、博士進学を後押しして頂き、様々な面で支援して下さった家族に篤く感謝いたします。

## 参考文献

- Adams ML, O'Sullivan B, Downard AJ, Powell KJ (2002) Stability constants for aluminum (III) complexes with the 1, 2-dihydroxyaryl ligands caffeic acid, chlorogenic acid, DHB, and DASA in aqueous solution. *Journal of Chemical & Engineering Data* 47:289-296.
- Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12:39-45.
- An GH, Miyakawa S, Kawahara A, Osaki M, Ezawa T (2008) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pioneer grass species *Miscanthus sinensis* in acid sulfate soils: Habitat segregation along pH gradients. *Soil Science and Plant Nutrition* 54:517-528.
- Archambault DJ, Zhang G, Taylor GJ (1996) Accumulation of Al in root mucilage of an Al-resistant and an Al-sensitive cultivar of wheat. *Plant physiology* 112:1471-1478.
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA (2007) Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management* 84:93-99.
- Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES (1977) *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 34:576-581.
- Barceló J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48:75-92.
- Bartholdy BA, Berreck M, Haselwandter K (2001) Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *Biometals* 14:33-42.
- Bowen HJM (1979) 環境無機化学-元素の循環と生化学-. 浅見輝男, 茅野充男 訳 (1983), 博友社, 東京.
- Brundrett M (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473-495.
- Brundrett MC (2006) Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber T, (eds). *Microbial root endophytes*: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 281-298.
- Engelmann MD, Hutcheson R, Cheng IF (2005) Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5, 7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3', 4'-dihydroxyflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2953-2960.
- Fatima N, Muhammad SA, Khan I, Qazi MA, Shahzadi I, Mumtaz A, Hashm MA, Khan AK, Ismail T (2016) *Chaetomium* endophytes: a repository of pharmacologically active metabolites. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:136.
- Fernández R, Fernández-Fuego D, Bertrand A, González A (2014) Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry* 78:63-70.

- Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.
- Hirata M, Hasegawa N, Nogami K, Sonoda T (2007) Evaluation of forest grazing as a management practice to utilize and control *Miscanthus sinensis* in a young tree plantation in southern Kyushu, Japan. *Grassland Science* 53:181-191.
- Hutchinson GE (1945) Aluminum in soils, plants, and animals. *Soil Science* 60: 29-40.
- Inoue T (2003) Chronosequential change in a butterfly community after clear-cutting of deciduous forests in a cool temperate region of central Japan. *Entomological Science* 6:151-163.
- Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review* 68:235-269.
- Jentschke G, Godbold DL (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum*, 109:107-116.
- Jumpponen A, Trappe JM (1998) Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140:295-310.
- Jumpponen A, Mattson KG, Trappe JM (1998) Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* 7:261-265.
- Jumpponen A (2001) Dark septate endophytes-are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11:207-211.
- Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in plants In: Kabata-Pendias A (ed). Trace elements in soils and plants, Fourth edition. CRC press, Boca Raton, FL, USA. 505 pp.
- Kataoka T, Mori M, Nakanisi TM, Matsumoto S, Uchiyumi A (1997) Highly sensitive analytical method for aluminum movement in soybean root through lumogallion staining. *Journal of Plant Research* 110:305-309.
- Kawahara A, Ezawa T (2013) Characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities with respect to zonal vegetation in a coastal dune ecosystem. *Oecologia* 173:533-543.
- Kayama M (2001) Comparison of the aluminum tolerance of *Miscanthus sinensis* Anderss. and *Miscanthus sacchariflorus* Bentham in hydroculture. *International Journal of Plant Sciences* 162:1025-1031.
- Khan AL, Shinwari ZK, Kim Y, Waqas M, Hamayun M, Kamran M, & Lee I (2012) Role of endophyte *Chaetomium globosum* LK4 in growth of *Capisum annuum* by production of gibberellins and indole acetic acid. *Pakistan Journal of Botany* 44:1601-1607.
- Kochian LV, Pineros MA, Hoekenga OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* 274:175-195.
- Kogel KH, Franken P, Hüchelhoven R (2006) Endophyte or parasite—what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9:358-363.
- Larcher W (2001) 植物生態生理学, 第 2 版. 佐伯敏郎, 舘野正樹 監訳 (2004), シュプリンガー・フェアラーク東京.
- Lewandowski I, Scurlock JM, Lindvall E, Christou M (2003) The development and current status of

- perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 25:335-361.
- Li T, Liu MJ, Zhang XT, Zhang HB, Sha T, Zhao ZW (2011) Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment* 409:1069-1074.
- Lösgen S, Schlörke O, Meindl K, Herbst-Irmer R, Zeeck A (2007) Structure and biosynthesis of chaetocyclinones, new polyketides produced by an endosymbiotic fungus. *European Journal of Organic Chemistry* 2007:2191-2196.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6:273-278.
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H, Hiradate S (1997) Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390:569-570.
- MacFarlane GR, Burchett MD (2000) Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquatic Botany* 68:45-59.
- Maestri E, Marmiroli M, Visioli G, Marmiroli N (2010) Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany* 68:1-13.
- Martino E, Perotto S, Parsons R, Gadd GM (2003) Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. *Soil Biology and Biochemistry* 35:133-141.
- Mizuno N, Nosaka S, Mizuno T, Horie K, Obata H (2003) Distribution of Ni and Zn in the leaves of *Thlaspi japonicum* growing on ultramafic soil. *Soil Science and Plant Nutrition* 49:93-97.
- Nagata T, Hayatsu M, Kosuge N (1992) Identification of aluminium forms in tea leaves by <sup>27</sup>Al NMR. *Phytochemistry* 31:1215-1218.
- Nagata S, Yamaji K, Nomura N, Ishimoto H (2015) Root endophytes enhance stress-tolerance of *Cicuta virosa* L. growing in a mining pond of eastern Japan. *Plant Species Biology* 30:116-125.
- Naidu SL, Moose SP, Al-Shoaibi AK, Raines CA, Long SP (2003) Cold tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes. *Plant Physiology* 132:1688-1697.
- Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy YL (2009) Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. *Microbiological Research* 164:290-296.
- Okimura S, Yamaji K, Hitsuma G, Mori S (2015) Catechin production in roots of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* in soils on Mt. Hayachine with high Ni concentrations. *Plant Root* 9:70-78.
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* 28:142-149.
- Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 30:1562-1574.
- Read DJ, Haselwandter K (1981) Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant

- communities. *New Phytologist* 88:341-352.
- Reichard PU, Kretzschmar R, Kraemer SM (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71:5635-5650.
- Robertson NF (1954) Studies on the mycorrhiza of *Pinus sylvestris*. *New Phytologist* 53:253-283.
- Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y, Redman RS (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal* 2:404-416.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182:314-330.
- Rogers NJ, Carson KC, Glenn AR, Dilworth MJ, Hughes MN, Poole RK (2001) Alleviation of aluminum toxicity to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* by the hydroxamate siderophore vicibactin. *Biometals* 14:59-66.
- Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV (1993) Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* 44:437-446.
- Schulz B, Boyle C (2006) Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In: Schulz B, Boyle C, Sieber T (eds). *Microbial root endophytes*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 1-14.
- Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M (2008) Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* 156:1164-1170.
- Smith FA, Smith SE (1997) Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 137:373-388.
- Stone JK, Bacon CW, White Jr JF (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White Jr JF (eds). *Microbial endophyte*. Marcel dekker, NY, USA. pp. 3-30.
- Suhayda CG, Haug A (1986) Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. *Physiologia Plantarum* 68:189-195.
- Takagi S, Nomoto K, Takemoto T (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of Plant Nutrition* 7:469-477.
- Tomsett AB, Thurman DA (1988) Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant, Cell & Environment* 11:383-394.
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiology* 92:1086-1093.
- Wang Y, Huang J, Gao Y (2012) Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PloS one* 7:e48669.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, NY, USA. pp. 315-322.
- Yamaji K, Julkunen-Tiitto R, Rousi M, Freiwald V, Oksanen E (2003) Ozone exposure over two

- growing seasons alters root-to-shoot ratio and chemical composition of birch (*Betula pendula* Roth). *Global Change Biology* 9:1363-1377.
- Yamaji K, Watanabe Y, Masuya H, Shigeto A, Yui H, Haruma T (2016) Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. *PloS one* 11:e0169089.
- Yang ZM, Sivaguru M, Horst WJ, Matsumoto H (2000) Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 110:72-77.
- Zhang Q, Zhang J, Yang L, Zhang L, Jiang D, Chen D, Li G (2014) Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* 72:98-108.
- Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF, Matsumoto H (2005) Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology* 138:297-303.
- 浅見輝男 (2001) データで示す-日本土壌の有害金属汚染. アグネ技術センター, 東京.
- 上杉康彦 (1981) 抗菌活性測定法. 深見順一 編, 農薬実験法 2 殺菌剤編, ソフトサイエンス社, 東京, pp. 37-60.
- 宇治橋龍一 (2008) ヒバ実生の根の強度および形態に及ぼす土壌の影響. 修士論文. 東京工業大学大学院理工学研究科.
- 宇山生朗 (2014) 鉾山環境に自生するヘビノネゴザ (*Athyrium yokoscense* (Franch. et Sav.) H.Christ) における 金属元素 (Cu, Pb, Al) 及び放射性 Cs 蓄積への内生細菌の関与. 修士論文. 筑波大学大学院環境科学研究科.
- 江並一成 (2014) 日立鉾山に生育するツルウメモドキ (*Celastrus orbiculatus* Thunb.) 実生の Fe, Al 耐性に対する内生菌の影響. 修士論文. 筑波大学大学院環境科学研究科.
- 大場広輔, 斎藤勝晴, 藤吉正明 (2006) アーバスキュラー菌根実験法 (2) アーバスキュラー菌根の観察. *土と微生物* 60:57-61.
- 環境庁 (1999) 第3次酸性雨対策調査取りまとめ報告書, 環境庁酸性雨対策検討会.
- 金属鉾業事業団 (1983) 捨石・鉾さいたい積場緑化の手引. 金属鉾業事業団, 東京.
- 久保田正亜, 折笠清人, 浅見輝男 (1986) 日立市および日立市周辺市町村の道路わき粉じんおよび土壌の重金属分布. *日本土壌肥料学雑誌* 57:142-148.
- 小山博之 (2001) 植物の必須元素, 栄養元素. 5. 2. 銅. 間藤徹, 馬建峰, 藤原徹 編, 植物栄養学, 第2版, 文永堂出版, 東京, pp. 143-148.
- 三枝正彦 (1994) 酸性土壌におけるアルミニウムの化学. 日本土壌肥料学会 編, 低 pH 土壌と植物, 博友社, 東京, pp. 7-42.
- ジャパンエナジー, 日鉾金属 (1994) 大煙突の記録-日立鉾山煙害対策史-. ジャパンエナジー, 日鉾金属, 東京.
- 植物栄養実験法編集委員会 (1990) 植物栄養学実験法. 博友社, 東京.



- 関本均 (2001) 植物の必須元素, 栄養元素. 6. 1. 亜鉛. 間藤徹, 馬建峰, 藤原徹 編, 植物栄養学, 第2版, 文永堂出版, 東京, pp. 160-164.
- 土壤環境分析法編集委員会 (1997) 土壤環境分析法. 博友社, 東京.
- 土壤養分測定法委員会 (1970) 肥沃度測定のための土壤養分分析法. 養賢堂, 東京.
- 富沢美紀 (2009) 日立鉾山周辺の森林土壌における重金属汚染について. 修士論文. 筑波大学大学院環境科学研究科.
- 中村隼人 (2013) 日立鉾山に生育するクサレダマにおける Cd および放射性 Cs の蓄積への内生細菌の影響. 修士論文. 筑波大学大学院環境科学研究科.
- 長谷川功 (2007) 植物による環境浄化 -ファイトレメディエーション技術開発の現状と今後の課題-. 農業および園芸 82:1053-1061.
- 長谷川功 (2010a) 不良土壌に対する植物の応答. 3. 重金属汚染土壌. 間藤徹, 馬建峰, 藤原徹 編, 植物栄養学, 第2版, 文永堂出版, 東京, pp. 224-234.
- 長谷川功 (2010b) 微量元素の獲得と機能. 米山忠克, 編, 新植物栄養・肥料学, 初版. 朝倉書店, 東京, pp. 147-177.
- 畑明郎 (2011) 金属工業の公害. 畑明郎 編, 深刻化する土壌汚染, 世界思想社, 京都.
- 広井敏男 (1974) わが国における銅山植生の植物社会学的研究. 東京経済大学人文自然科学論集 38:177-226.
- 藤原靖 (2002) 土壌汚染対策法と重金属汚染土壌の浄化技術の現状と課題. 環境バイオテクノロジー学会誌 2:117-126.
- 堀江秀樹, 根本正之 (1990) ススキの生育に対する土壌 pH とアルミニウムの影響. 雑草研究 35:292-295.
- 松本總 (1997) 環境問題と土壌. 久馬一剛 編, 最新土壌学, 朝倉書店, 東京, pp. 197-210.
- 松本英明 (2003) 酸性土壌とアルミニウムストレス. 根の研究 12:149-162.
- 松本英明, 山本洋子 (2001) 植物の成育と有用元素 3. アルミニウム (Al). 森敏, 前忠彦, 米山忠克 編, 植物栄養学, 第1版, 文永堂出版, 東京, pp. 196-200.
- 湯浅保雄, 澤田一憲, 村井宏, 井上克弘 (1995a) 旧松尾鉾山露天掘跡地における緑化工施工地の植生変遷. 日本土壌肥料学雑誌 66:646-654.
- 湯浅保雄, 村井宏, 濱浦尚生, 井上克弘 (1995b) 旧松尾鉾山露天掘跡地における緑化工施工地の土壌特性. 日本土壌肥料学雑誌 66:520-526.
- 渡部裕美子 (2008) 日立鉾山に自生するリョウブの成長と重金属吸収に対する内生菌の影響. 修士論文. 筑波大学大学院環境科学研究科.
- 王効挙, 李法雲, 杉崎三男 (2004) ファイトレメディエーションによる汚染土壌修復の現状と展望. 全国環境研会誌 29:85-94.