J. Jpn. Soc. Soil Phys.
土壌の物理性
No. 144 p.33 ~ 37 (2020)

機能性微生物が関与した鉱山跡地・自生植物の金属耐性機構

山路恵子[1]・春間俊克[2]

Metal tolerance of plants naturally growing at mine sites is enhanced by functional root endophytes

Keiko YAMAJI[1] and Toshikatsu HARUMA[2]

Abstract: Mine soil contains high concentrations of heavy metals and shows acidity; these environmental factors would generally inhibit plant growth. Recently, several researches have clarified that functional microbes, such as root endophytes, could enhance heavy-metal tolerance in plants naturally growing at mine sites. For example, heavy-metal tolerance in *Clethra barbinervis* growing at mine site, could be enhanced by root endophytes; without root endophytes, *C. barbinervis* might not survive at mine soil, showing terrestrial and root growth inhibitions. Aluminium in acidic soil is known to show toxicity to plants and Al tolerance in *Miscanthus sinensis* might be enhanced by root endophytes, which could detoxify Al in the plant. From the above, native species at mine site, such as *C. barbinervis* and *M. sinensis*, seem to develop symbiotic interaction with root endophytes, which could enhance metal tolerance in both plants, and these plants could adapt to severe mine environment, due to microbial support.
Key Words : mine site, metal tolerance, native plant, root endophytes

1. はじめに

鉱山跡地土壌は, 重金属を高濃度含有し，酸性であることが多い．酸性環境は土壌からの重金属やアルミニウム（Al）の溶出を促進するため，植物にとって吸収しやすい形態の重金属や Al 量が増加し，植物体内への吸収量が増加すると考えられる（Larcher, 2004）．重金属の一部は植物にとって生育に必須な微量必須栄養元素でもあるが，過剰な重金属の存在は生育阻害（葉のクロロシスや根の伸長阻害等）を引き起こし，植物に障害を与えることが知られている（Påhlsson, 1989）．また Al は，酸性土壌環境で植物根の生育阻害を引き起こす毒性元素としても知られる（Kochian et al., 2005）．以上のことから，鉱山跡地の土壌環境は植物にとって生育に過酷な環境と言え，一般的に植物が定着するのに困難であると考えられる．鉱山跡地での緑化を行うことは，1）植物が根で土壌を固定することによる土壌粒子の飛散防止が可能，2）植物保水・蒸発散機能による降雨の浸透防止が生じるため鉱廃水量の削減が可能，などへの貢献が期待でき，重要な課題と言える（金属鉱業事業団, 1983）．

以前より, 鉱脈沿いに自生する植物は高濃度の金属元素に対して生理的にも生態的にも適応していると考えられてきた（Brooks et al., 1998）．つまり, 鉱山跡地のような環境下で生育する植物が金属元素を過剰吸収した場合, 体内での毒性を軽減させる何らかの耐性機構を獲得した植物種のみが生き残ることが可能であると推測される．著者らの研究グループは, 緑化に成功した鉱山跡地を対象とし, 重金属や Al を体内に多く含有するのにも関わらず自生を可能とした植物の重金属耐性機構について生態化学的手法により研究を遂行してきた．その結果, 鉱山跡地に自生する植物の中には, 1）植物自身が有する能力により, 重金属耐性を獲得している種，2）根の組織内部に生息する微生物（内生微生物）によって重金属耐性を獲得している種, が存在することを明らかにしてきた（Nagata et al., 2015; Yamaji et al., 2016; Haruma et al., 2018, 2019）．また，上記 1）のように植物自身が重金属耐性を獲得している場合においても，内生菌が体内に存在するとその耐性が増強されることも明らかとなり，鉱山跡地における植物と内生菌の相互作用を考慮することは重要であると考えている．本解説では，鉱山跡地に自生する植物種として，落葉小高木であるリョウブ，多年生草本であるススキを例として取り上げ，両植物が内生菌との相互作用を介して獲得する重金属耐性について述べる．

2. 機能性微生物が関与する自生植物の重金属耐性機構

2.1 内生微生物（内生菌, エンドファイト）

近年，植物のストレス耐性を増強させる機能性微生物として内生微生物（以下, 内生菌）が注目されてい

[1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba. Corresponding author: 山路恵子, 筑波大学生命環境系.
[2]Japan Atomic Energy Agency.
2020 年 1 月 2 日受稿　2020 年 3 月 31 日受理

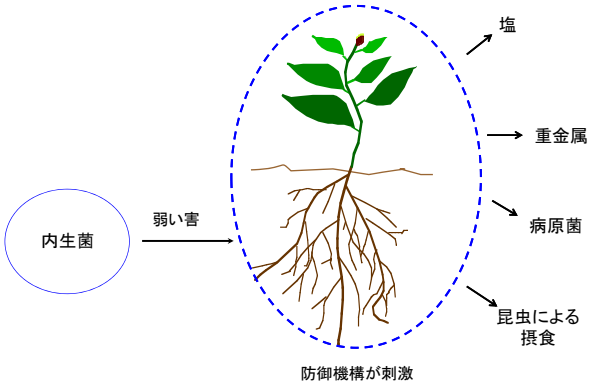


Fig. 1 内生菌による植物のストレス耐性の増強のイメージ図．内生菌は弱い病原性を示すことにより，植物の防御反応を刺激することができる．刺激された植物の反応は様々な環境ストレスに対する防御として機能することが報告されている．

る．植物は内生菌と共存することによって，非生物学的ストレス（熱，塩害，乾燥および重金属）や生物学的ストレス（昆虫などの植食者および病原菌）に対する耐性を高めていると考えられている（Mandyam and Jumpponen, 2005; Rodriguez et al., 2009）．内生菌が，多様な環境ストレスに対する植物の防御反応を刺激することが可能である理由については，共生菌や病原菌と比較すると理解しやすい．

内生菌は「植物組織に害を与えることなく，生きた植物組織内に生息する微生物」（Stone et al., 2000）と定義される菌類であり，共生菌や病原菌の中間に位置する菌としても定義されている．共生菌の植物への影響は「有益（benefit）」，病原菌の植物への影響は「有害（harm）」と定義されるが，内生菌の植物への影響は「弱い害と有益（weak harm and benefit）」とされている（Brundrett, 2006）．内生菌は植物に感染することで弱い害を植物に与えるが，その弱い害は植物の防御反応を活性化させるという仮説がある（Schulz and Boyle, 2006）．また活性化した防御反応は，環境ストレスに対する防御反応と共通性が高いことから，結果として植物の環境ストレス耐性を増強させていると考えられている（Fig. 1）．例えば，内生菌 *Piriformospora indica* は環境ストレス（塩，重金属，紫外線，病原菌，昆虫など）下における重要な防御系であるアスコルビン酸–グルタチオンサイクルを活性化し，オオムギの塩ストレス耐性や病原菌感染ストレス耐性を高めたという報告がある（Waller et al., 2005）．内生菌が関与した重金属ストレス耐性に関する報告例としては，一般的に共通性の高い現象としての報告例はまだなく，種々のメカニズムが報告されている．例えば，代表的なエンドファイトである Dark-septa endophyte（DSE）は重金属の植物体内での蓄積部位を変化させ，重金属を無毒化することで，植物の重金属耐性を高めている（Wang et al., 2016）．また，DSE は重金属を菌糸内に隔離することで，トウモロコシの重金属耐性を高めているという報告（Li et al., 2011）もある．野外で生育する植物は単体で生きているのではなく，体内に微生物を共存させていることから，鉱山跡地で生育する植物の金属耐性について内生菌の関与を考慮することは重要と言える．

2.2 鉱山跡地の自生植物リョウブの重金属耐性

リョウブ（*Clethra barbinervis* Sieb. et Zucc.）は，遷移初期種として知られる日本固有の落葉小高木で，鉱山跡地に自生する植物（広井, 1974）としても知られる．本研究の調査地である A 鉱山跡地周辺森林においても自生が確認されている．調査地に生育するリョウブの根域土壌は pH 3.5 と酸性であり Cu，Zn，Pb，Cd を高濃度で含有していたことから，本植物にとって重金属を過剰に吸収しやすい環境と判断された．以上を踏まえ本研究では，リョウブの重金属耐性機構を内生菌との相互作用を考慮して解明することとした．

1 年間に渡り，リョウブの葉，枝，細根を採取し，重金属の含有量を定量した．その結果，リョウブは，季節変動はあるものの，植物が通常含有する濃度と比較して高濃度の Cu，Zn，Pb を細根に蓄積していることが明らかとなった．本結果からリョウブは，細根において何らかの重金属耐性を獲得していると推察された．次に，以下の操作に従い細根から内生菌の分離を試みた．細根を 70 % エタノール，15 % 過酸化水素水で表面殺菌した後，クリーンベンチ内で根を 10 mm に切り出し，1 % malt extract agar（1MA）に置床し，23 °C 暗黒下 · 1 ヶ月培養した．その結果， 3 種類の内生菌（*Phialocephala fortinii*，*Rhizodermea veluwensis*，*Rhizoscyphus ericae*）が高頻度で分離された．

次に，リョウブ実生への内生菌接種試験を行った．内生菌は 1 % malt extract 液体培地で 23 °C 暗黒下 · 3 週間静置培養した後，無菌条件下でホモジナイザーにより破砕したものを菌液として使用した．調査地より採取したリョウブ種子は低温処理後，過酸化水素水で滅菌し，ホーグランド培地で無菌的に発芽させ前培養した．同程度の生育段階の実生を選択し，ガンマー線滅菌した調査地土壌へ移植した．移植と同時に，実生の根元に菌糸液を添加し，人工気象器内で 40 日間培養した（light; 25 °C · 14 hrs，dark; 20 °C · 10 hrs）．接種条件は，1）内生菌 *P. fortinii* 接種区，2）内生菌 *R. veluwensis* 接種区，3）内生菌 *R. ericae* 接種区，4）3 種の内生菌混合接種区，5）非接種区（対照区）とした．その結果，内生菌の接種により地上部（Fig. 2）と地下部の生長が顕著に促進されることが明らかとなった．非接種区のリョウブ実生は，葉部でクロロシス（クロロフィルが分解されている症状），根部では根端の生育抑制が確認され，生育が著しく阻害された．また，リョウブ実生体内の元素濃度の分析結果，非接種区に比べて内生菌接種区のリョウブ実生では，1）地上部に



Fig. 2　内生菌によるリョウブ生長促進．内生菌の接種によりリョウブの地上部生長が促進されている様子を示した． ガンマー線滅菌した鉱山跡地土壌を試験に使用した．本成果は Yamaji et al.（2016）に掲載されている．

おける必須栄養元素 K 濃度の増加，2）細根における重金属濃度の低減，が統計学的に有意な差として確認された．2）については，内生菌による実生の顕著な生長促進が，結果として重金属濃度を低下させた（希釈効果：Larcher, 2004）と推測された．以上の結果から鉱山跡地で自生するリョウブは，内生菌による K の吸収促進や重金属濃度低減の結果，生育を良好に保っていると推測された．非接種区において実生の地上部及び地下部が健全に生育できなかったことから，内生菌との相互作用なしではリョウブは重金属環境では生残することが困難であると推測された．

なお，本研究成果は Yamaji et al.（2016）に掲載されている．

2.3 鉱山跡地の自生植物ススキの Al 耐性

ススキ（*Miscanthus sinensis* Andersson）はイネ科ススキ属の植物であり遷移上では先駆種として知られ多数の鉱山跡地に自生することが知られている（広井, 1974）が，本研究の調査地である A 鉱山跡地周辺森林においても自生が確認されている．ススキは，酸性土壌で溶出する Al に対する生育阻害を受けにくく，Al 耐性を有する（堀江・根本, 1990）と考えられているが耐性機構は不明である．調査地に生育するススキの根域土壌は年間を通じて pH 4.5 未満と弱酸性であり交換態 Al が高濃度であったことから，鉱山跡地でのススキの Al 耐性機構を内生菌との相互作用を考慮して解明することとした．

1 年間に渡り，ススキの地上部，枯死部，根茎，不定根，穂を採取し，重金属及び Al の含有濃度を分析した．その結果，根域土壌に高濃度で検出された Cu, Pb, Zn をススキは不定根に含有していたが，それらの濃度は土壌存在量に比べて比較的低かった．一方，植物が通常含有する濃度と比較して高濃度の Al や Fe を不定根に蓄積していることが判明した．特に高濃度の蓄積が確認された Al についてススキの部位別に Al 濃度を比較すると，他部位に比べ不定根において高濃度であることが判明した．Al は根の伸長生長を阻害し Ca の吸収阻害や吸水阻害を引き起こす毒性元素である（Kochian et al., 2005）ことから，Al を過剰に蓄積できるススキは Al に対して何らかの耐性機構を獲得していると考えられた．

ススキの成長期の 8 月に，不定根から内生菌の分離を試みた．不定根を 70 % エタノール，2.25 % 過酸化水素水で表面殺菌した後，クリーンベンチ内で根を 10 mm に切り出し，1MA に置き 23 °C 暗黒下で 2 週間培養した．次に分離した内生菌の化学的機能である「Al と錯体形成するシデロフォア（金属と錯体形成する有機化合物）産生能」を調べた．シデロフォアは金属元素と錯体形成をすることで，元素の毒性を軽減する能力がある（Rajkumar et al., 2012）ことから，内生菌が Al と錯体形成するシデロフォアを産生することが植物において Al を解毒することにつながると考えた．分離した内生菌のシデロフォア産生能を精査した結果，*Chaetomium* 属糸状菌に産生能が確認され，特に産生能力が高かった菌株は *C. cupreum* と同定された．また内生菌 *C. cupreum* が産生する Al 解毒物質を HPLC/MS および粉末 X 線回折装置で分析し，oosporein と同定した．Al の解毒に関与すると考えられる錯安定度定数を pH 滴定法によって算出した結果，oosporein と Al の錯安定度定数は 12.1 と算出され比較的高い値であることが明らかとなった．

次に，ススキ実生への内生菌 *C. cupreum* 接種試験を行った．滅菌ススキ実生をガンマー線滅菌した調査地土壌に移植した後，根元に菌糸液を添加し，人工気象器内で 36 日間培養した（light; 25 °C · 14 hrs，dark; 20 °C · 10 hrs）．接種条件は，1）*C. cupreum* 接種区，2）非接種区，とした．その結果，内生菌 *C. cupreum* がススキの地上部および地下部の生長を促進することが明らかとなった．この生長促進には，*C. cupreum* が植物ホルモンである IAA 様化合物を産生する性質によると考えられた．また，内生菌の接種区，非接種区ともにススキは毒性を示すのに十分な高濃度の Al を根に蓄積していたのにも関わらず，ススキには重金属や Al の毒性の症状である根の先端の生育阻害は確認されなかった．さらに，内生菌の接種区のススキ根の Al 濃度は非

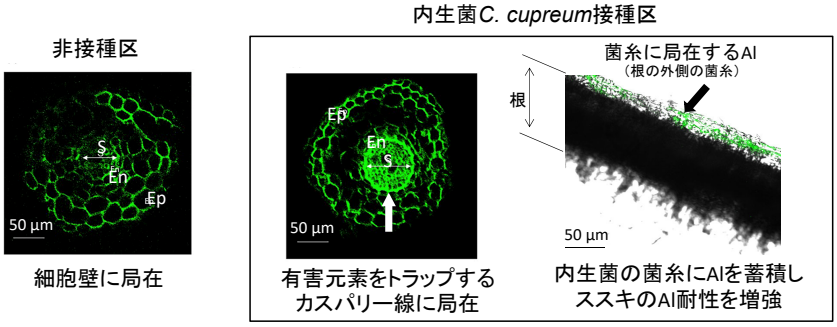


Fig. 3 内生菌接種試験で確認されたススキ根における Al 局在．ススキ自身も細胞壁に Al を隔離することによる Al 耐性機構を示した．内生菌 *C. cupreum* は Al の局在を表皮細胞, カスパリー線や中心柱に局在させることによりススキの解毒を効率化することが明らかになった． また, 根周囲に生育する菌糸へ Al を蓄積することで, ススキの物理的 Al 耐性を増強させていると考えられた．本成果は Haruma et al.（2018）に掲載されている．

接種区に比べて 1.5 倍近く増加していた．以上のことから，ススキ自身も調査地土壌環境において耐性を獲得しており，その耐性は，生長及び Al 濃度を考慮すると，内生菌の存在下で増強されると推測された．次に，共焦点レーザー顕微鏡を用いてススキにおける Al 解毒機構を解析したところ，Al はススキ実生の根の細胞壁に蓄積されており，細胞壁に Al を隔離することがススキ自身の有する耐性機構と考えられた．さらに，内生菌の存在下では，Al の蓄積部位は大きく変化し，根の中心柱と表皮細胞の細胞壁，カスパリー線での局在が集中し，効率的に Al を蓄積することで体内での Al 解毒が効率的に行われていることが明らかとなった．また *C. cupreum* を接種した根においては，根の周囲に菌糸が生育し，菌糸内に Al が蓄積されていることが確認された（Fig. 3）．本結果により，*C. cupreum* が Al とキレート結合するシデロフォアを産生することで菌糸内に Al をトラップさせ，ススキの Al 耐性に寄与している可能性が示唆された．以上のことから，鉱山跡地に自生するススキは，自身も Al 耐性機構を有しているが，内生菌 *C. cupreum* と共生することで自身の Al 耐性機構を増強させ，酸性土壌環境である鉱山跡地での生育を可能にしていると考えられた．

なお, 本研究成果は Haruma et al.（2018）及び Haruma et al.（2019）に掲載されている．

3. おわりに

近年，修復 · 浄化対策，自然回帰などを目指したグリーンレメディエーション技術に注目が集まっているが，鉱山跡地の自生植物を利用しようとする試みはなされていない．著者らは実際に日本国内の鉱山跡地を見学する機会を得たが，緑化が良好に遂行されている場所がある一方で，緑化がうまくいかない等の問題を抱えている場所も存在することを知った．また，各鉱山跡地には共通性の高い遷移植物であるススキやリョウブなどの定着が確認された．著者らの研究グループでは「鉱山跡地で自生する植物種が重金属環境に適応出来る要因」に注目しているが，そういった基礎研究を通じて鉱山跡地に適した自生植物や，内生菌を利用した自生植物の初期緑化を提案することが可能になるのではないかと考えている．金属鉱業事業団（1983）は，鉱山跡地での緑化方法（工法や適切な植物種の選択など）に関して詳細に述べているが，本報告のあとがきにおいても「自然の生態遷移」の重要性が指摘されている．しかし，自然の生態遷移を意識した持続的な緑化には長期間要するため，短期間で答えが出るようなものではない．従来の緑化方法では困難な場所においては自然の生態遷移を担う自生植物の力を利用した初期緑化を導入することで土壌が肥沃になり植生が安定化すれば，各鉱山の事業者 · 周辺住民の要望する樹種を用いた持続的な緑化がより効率的に実施可能となるのではないかと推測する．基礎的知見の獲得を通じて鉱山跡地の現場に少しでも貢献できることができれば幸いに思っている．

謝辞

本解説をまとめるにあたり，データの一部は科学研究費助成金課題（課題 19H01161 及び 19H01158）の支援によって取得した．ここに記して謝意を表す．

引用文献

Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J. and Robinson, B.H. (1998): Phytomining. Trends in Plant Science, 9: 359–362.

Brundrett, M.C. (2006): Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In Schulz, B.J.E.,

Boyle, C.J.C. and Sieber, T. (ed.) Microbial root endophytes, pp. 281–298. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Haruma, T., Yamaji, K., Masuya, H. and Hanyu, K. (2018): Root endophytic *Chaetomium cupreum* promotes plant growth and detoxifies aluminum in *Miscanthus sinensis* Andersson growing at the acidic mine site. Plant Species Biology, 33: 109–122.

Haruma, T., Yamaji, K., Ogawa, K., Masuya, H., Sekine, Y. and Kozai, N. (2019): Root-endophytic *Chaetomium cupreum* chemically enhances aluminium tolerance in *Miscanthus sinensis* via increasing the aluminium detoxicants, chlorogenic acid and oosporein. PLoS ONE, 14(2): e0212644.

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.

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.

金属鉱業事業団 (1983): 捨石・鉱さいたい積場緑化の手引. 金属鉱業事業団, 東京.

Kochian, L.V., Pineros M.A. and Hoekenga, O.A. (2005): The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. Plant Soil, 274: 175–195.

Larcher, W. (2004): 佐伯敏郎・舘野正樹訳 植物生態生理学. シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京.

Li, T., Liu, M.J., Zhang, X.T., Zhang, H.B., Sha, T. and Zhao, Z.W. (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.

Mandyam, K. and Jumpponen, A. (2005): Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. Studies in Mycology, 53: 173–189.

Nagata, S., Yamaji, K., Nomura, N. and 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.

Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad M.N.V. and Freitas, H. (2012): Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Biotechnology Advances, 30: 1562–1574.

Påhlsson, A.M.B. (1989) Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. Water, Air, and Soil Pollution, 47: 287–319.

Rodriguez, R.J., White J.F.Jr., Arnold A.E. and Redman R.S. (2009): Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist, 182: 314–330.

Schulz, B. and Boyle, C. (2006): Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In Schulz, B., Boyle, C. and Sieber, T. (ed.) Microbial root endophytes, pp. 1–14. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, Jr.J.F. (2000): An overview of endophytic microbes: endophytism defind. In Bacon, C.W. and White, Jr.J.F. (ed.) Microbial endophytes, pp. 3–30. Marcel dekker, New York.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.-H. (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. PNAS, 102: 13386–13391.

Wang, J.L., Li, T. Liu, G.Y., Smith, J.M. and Zhao Z.W. (2016): Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. Scientific Reports, 6: 22028.

Yamaji, K., Watanabe, Y., Masuya, H., Shigeto, A., Yui, H. and 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.

要　　旨

鉱山跡地土壌は重金属を高濃度含有し酸性環境であることが多く，植物にとってストレスを与える環境である．近年，機能性微生物である内生菌の関与した，鉱山跡地の自生植物の重金属耐性機構が解明されている．リョウブは内生菌が存在すると生育が促進され体内の重金属濃度を低減できるが，内生菌が存在しないと根の伸長阻害等の毒性を発現し，重金属環境で生育が困難であることが推測された．また，ススキは Al を解毒する能力を示す内生菌の共生により，酸性土壌環境での毒性元素である Al に対する耐性が増強されることが推測された．以上のことから，鉱山跡地の自生植物であるリョウブやススキは内生菌と共生的な相互作用を発達させ，鉱山環境に適応していると考えられた．

キーワード：鉱山, 金属耐性, 自生植物, 内生微生物