

平成30年 5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02449

研究課題名(和文) 絶滅危惧樹木と共生微生物の生態的相互作用の解明

研究課題名(英文) Ecological interaction between endangered trees and symbiotic microbes

研究代表者

奈良 一秀 (Nara, Kazuhide)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60270899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,500,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧樹種に指定されているトガサワラとヤクタネゴヨウの外生菌根菌を調べたところ、それぞれの樹種と共進化した固有のショウロ属菌(トガサワラショウロとヤクタネショウロ)を発見し、いずれも土壤中の埋土胞子として最も優占していることを明らかにした。これらの菌種は他の自生樹種とは共生できないことから、対象樹種の実生定着を優先的に促進すると考えられ、今後の保全活動への利用が期待される。またいずれの菌種も、現地樹木に菌根を形成して活動中の個体は極めて少なく、宿主樹木と同じく限られた分布域において主に休眠状態の胞子で存在していたことから、発見した菌種自体も絶滅の危機に瀕していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied ectomycorrhizal fungi associated with endangered tree species, *Pseudotsuga japonica* and *Pinus amamiana*, and found two new host specific fungal species (*Rhizopogon togasawariana* and *Rhizopogon yakushimensis* sp. nov.) that were most dominant in soil spore banks. These ectomycorrhizal fungi were not compatible with other local tree species, indicating they would selectively facilitate seedling establishment of the endangered tree species and may potentially contribute to the conservation of these trees. Both *Rhizopogon* species were rare in ectomycorrhizal roots of resident trees and mainly existed as dormant spores in small geographical areas comparable to their endangered hosts. Thus, the *Rhizopogon* species we found may also be on the verge of extinction.

研究分野：森林微生物

キーワード：絶滅危惧樹木 外生菌根菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境変動や人間活動によって絶滅に瀕している樹木は多く、今後もその数は増えるであろう。稀少樹種が絶滅することは生物多様性の損失だけでなく、地域固有の森林資源の消失によって経済的損失にもつながる。また、一つの樹木の絶滅が多くの動植物の絶滅を引き起こす可能性もある。このため、絶滅危惧樹木を保全することは重要である。

(2) マツ科、ブナ科、カバノキ科、ヤナギ科など、森林の主要樹木はキノコをつくる担子菌類などと外生菌根（以下、菌根）共生をしている。これらの樹木は養分吸収の大部分を菌根菌に依存しており、その共生がなければほとんど成長しない。このため、野外の樹木実生の定着が菌根菌によって主に決定されることもある。

(3) 森林では多くの樹木と共生できる菌根菌が優占するものの、限られた宿主とのみ共生する菌根菌も知られる。そして、後者のような宿主選好性の高い菌根菌はマツ科樹木の森林の更新に決定的な役割を果たすことが知られている。例えば北米西岸のダグラスファー（米マツ）にはこの樹種にしか共生しないショウロ属菌が知られている。その胞子は土壤中で他の菌種よりも休眠期間が長く、耐熱性もあることから、山火事などの攪乱のあとでも生存している。他の菌根菌が死滅しているため、多くの樹種は共生相手を得られず実生の定着も難しい。しかしダグラスファーは生存している埋土胞子によって容易に菌根共生を構築できるため、優先的に実生更新が行われる。

(4) 絶滅危惧樹木の菌根菌に関する知見はほとんど無く、不明な点が多い。しかし、ごく最近、絶滅危惧種に指定されているトガサワラに特異的な可能性のあるショウロ属の新種（トガサワラショウロ：和名は新提案）が発表された。その生態は全く不明であるが、一部のマツ科樹木とショウロ属で明らかにされているように、絶滅危惧樹木の更新に重要な役割を果たしている可能性もある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、マツ科の絶滅危惧種であるトガサワラとヤクタネゴヨウをモデルケースとして、これら絶滅危惧樹木の菌根菌に関する基礎的な学術知見を得ることを目的とする。特に各樹種にのみ共生する菌根菌の系統進化や生態に関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) トガサワラの調査地：トガサワラはマツ科トガサワラ属の日本固有種で、北米の

ダグラスファーと同属である。その祖先が約 3400 万年前に北米からアジアに渡って以降、独自の進化を遂げた固有種である。高知県東部と紀伊半島の一部のみに生息し、残存個体は約 2000 と推定されており、絶滅危惧種に指定されている（環境省、国際自然保護連合(IUCN)）。本研究では高知県の安田川山林木遺伝資源保存林と西ノ川山林木遺伝資源保存林、三重県の大又トガサワラ植物群落保護林、奈良県の三ノ公川トガサワラ原始林、和歌山県の川又観音社寺林の 5ヶ所において行った。

(2) ヤクタネゴヨウの調査地：マツ科マツ属の日本固有種（中国南部のカザンマツの亜種とされる場合もある）で屋久島と種子島の一部地域にのみ生育している。残存個体は約 3000 と推定されており、絶滅危惧種に指定されている（環境省、IUCN）。調査はヤクタネゴヨウが比較的集中して分布している屋久島の 2ヶ所（平内、万里）と種子島の 2ヶ所（早稲田川、犬城）の計 4ヶ所において行った。

(3) それぞれの調査地において 20～30 程度（調査地の対象樹木の残存数による）の土壌サンプル（各 5cm×5cm×深さ 10cm）を採取した。また、埋土胞子の水平分布範囲などを調べるため、各調査地から周辺の森林（おもにスギ・ヒノキの人工林）にかけて 6本のライントランセクトを平行に設置し、残存林分から決められた距離区分毎（最大 500m まで）に土壌サンプルを採取した。一部の調査地では、埋土胞子の垂直分布を調べるため、地下 20cm まで深さ 5cm ごとに土壌試料を採取した。

(4) 残存林分内で採取した各土壌に含まれる菌根は、実体顕微鏡下で形態分類したのち、DNA 解析に供した（各土壌サンプルの菌根形態タイプ毎に 3 反復）。CTAB 法によって DNA を抽出し、菌特異的プライマーで rDNA の ITS 領域を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。97%の相同性を基準にして得られた配列をグルーピングし、NCBI の塩基配列データベース上の登録配列と Blast 比較検索を行い、菌種の同定を行なった。

(5) 採取した土壌サンプル（トランセクトを含む）中の埋土胞子を調べるため、バイオアッセイ試験を行なった。この試験は、樹木苗を植えることで土壌中の胞子を発芽させて根に菌根菌を感染させる試験である。トガサワラの種子は発芽率が極めて低く、十分な苗が得られなかったため、同属のダグラスファーで代用した。なお、一部トガサワラ林の土壌については、埋土胞子の耐熱性を調べるために、土壌を加熱処理（45、60、70、120（滅菌区）で 1 時間）して、

同様のバイオアッセイを行なった。埋土胞子の宿主選好性を評価するため、トガサワラではアカマツを、ヤクタネゴヨウではゴヨウマツ、アカマツ、スタジイを用いて同様のバイオアッセイを行なった。それぞれのバイオアッセイ苗に形成された菌根を上記の(4)と同様の DNA 解析によって菌種を同定した。

(6) ヤクタネゴヨウ林で菌根菌の子実体探索を行い、本樹種に特異的な可能性のある菌種の分子系統解析と胞子等の形態観察を行い、分類学的考察を行なった。

(7) トガサワラショウロとヤクタネゴヨウのマイクロサテライトマーカーを新規に開発し、集団遺伝解析を行なった。比較のため、宿主樹木であるトガサワラとヤクタネゴヨウにおいても同様のマイクロサテライト解析を行なった。

4. 研究成果

(1) トガサワラ残存林の菌根菌埋土胞子群集は、先行研究で調べた成木に共生している菌根菌群集と比べて少数の菌種しか見られないこと、トガサワラに特異的な菌根菌であるトガサワラショウロが最も優占することが明らかとなった。また、トガサワラショウロの埋土胞子は、広葉樹とは親和性が全くないことは系統的に明らかだが、潜在的な競合先駆種であるアカマツにも全く感染しないことが確認された。埋土胞子で優占する菌種は攪乱後に実生の定着を促進する重要な機能を持つことが知られている。今回得られた結果から、トガサワラショウロはトガサワラ実生の定着のみを促進する菌種であると考えられる。

(2) トガサワラ残存林の埋土胞子の耐熱性を調べたところ、優占種のトガサワラショウロは対照区(温度処理なし)、45、60、70の順に感染率が単調増加した。70の処理区においては、約70%の土壤サンプルにおいて感染が確認された。この結果から、残存林の大部分の土壤にはトガサワラショウロの埋土胞子が含まれていること、その感染性は熱処理によって向上することが明らかにされた。同様の耐熱性は北米の同属樹木ダグラスファーに共生するショウロ類にも見られる特徴であり、現地で多発する山火事への適応進化であるとされている。一方、トガサワラ林は紀伊半島や高知の多雨地域に存在し、山火事はほとんどない。祖先種が北米で進化させた胞子の耐熱性をいまだにトガサワラショウロが保持している理由は不明だが、耐熱性に関与する形質が他の機能(埋土胞子の耐候性や寿命)とリンクしているのかもしれない。

(3) ヤクタネゴヨウの残存林において、成木の菌根群集と埋土胞子群集を調べたところ、両者の種組成は大きく異なっていた。ヤクタネゴヨウに菌根共生が可能な埋土胞子群集では、ショウロ属の1種(後にヤクタネショウロと命名、下記参照)が最も優占していることが明らかとなった。本菌は、ゴヨウマツとアカマツにも感染したものの、その頻度はヤクタネゴヨウに比べて明らかに低かった。これらの現地に自生しないマツ類は、共進化してきた本来の宿主であるヤクタネゴヨウに比べて親和性が低いものと考えられる。ヤクタネショウロの感染によってヤクタネゴヨウの成長は促進されたほか、移植耐性も著しく向上した。これらの結果から、ヤクタネショウロは自生地におけるヤクタネゴヨウの実生更新に重要な役割を果たしているだけでなく、育苗などの保全活動に活用できる有望な菌種であると考えられる。

(4) ヤクタネゴヨウに感染可能な埋土胞子で最も優占していた菌種の子実体を発見し、その形態観察に基づき *Rhizopogon yakushimensis* (和名:ヤクタネショウロ)として新種発表した。分子系統解析の結果、本菌はこれまで提唱されていたショウロ属のどの亜属にも属さないことが判明した。ヤクタネショウロと近縁な塩基配列は、いずれも環境 DNA としてアジア地域から得られていることから、アジアで進化した系統群であると示唆される。

(5) トガサワラとヤクタネゴヨウのいずれにおいても、樹種固有のショウロ属菌が存在し、主に埋土胞子として優占していることが明らかとなった。そこで、その埋土胞子の分布をライントランセクトで調べたところ、いずれも残存林から約300m以内に限られることが判明した。これはショウロ属の子実体が地中に形成されるため長距離移動が可能な風散布が行われなためであり、動物、しかも移動距離の短い小動物が孢子散布に関与していることが示唆される。トガサワラショウロについては、埋土胞子の垂直分布も調べたところ、深い層により多く存在していることが判明した。これらの結果から、対象とした絶滅危惧樹木では、現在の残存林とその周囲のわずかな範囲において、深い土層が露出するような規模の大きい攪乱が発生した際に天然更新が行われる可能性が高いと考えられる。

(6) トガサワラショウロとヤクタネショウロにおいて多型性のあるマイクロサテライトマーカーを開発した。これらのマーカーを用いて集団遺伝解析を行なったところ、どちらの菌根菌も宿主樹種以上に集団の遺伝的分化が進行していることが明らかとなった。これは、対象樹木がいずれも風媒花

であり長距離の遺伝子流動が可能であるのに対し、2種の菌根菌は動物散布種で遺伝子流動が大きく制限されているためであると考えられる。今後、解析マーカー数を増やすことで集団分化の歴史や集団内の近親交配の進行について、より詳しい知見が得られるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

- Sugiyama Y, Murata M, Nara K (2018) A new *Rhizopogon* species associated with *Pinus amamiana* from Japan. *Mycoscience* 59: 176-180. 査読有, doi: 10.1016/j.myc.2017.10.001
- Murata M, Kanetani S, Nara K (2017) Ectomycorrhizal fungal communities in endangered *Pinus amamiana* forests. *Plos One* 12(12): e0189957. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0189957
- Wen Z, Shi L, Chen Y, Nara K (2017) Soil spore bank communities of ectomycorrhizal fungi in endangered Chinese Douglas fir forests. *Mycorrhiza* 28: 49-58. 査読有, doi: 10.1007/s00572-017-0800-1
- 村田政穂・奈良一秀 (2017) 絶滅危惧種トガサワラの優占林分における土壌深度別の外生菌根菌群集. *日本森林学会誌* 99: 195-201. 査読有, doi: 10.4005/jjfs.99.195
- Murata M, Nagata Y, Nara K (2017) Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered Japanese Douglas-fir forests. *Ecological Research* 32: 469-479. 査読有, DOI: 10.1007/s11284-017-1456-1.
- 金谷整一・秋庭満輝・中村克典・池亀寛治・手塚賢至 (2017) 絶滅危惧種ヤクタネゴヨウ枯死木に対するマツノザイセンチュウ検出キットを用いた遡及的解析. *樹木医学研究* 21: 65 - 70. 査読有, <http://www.thrs.jp/journal/journal11-20.html>
- Abe H, Tabuchi A, Okuda Y, Matsumoto T, Nara K (2016) Population genetics and fine-scale genetic structure of *Rhizopogon roseolus* in Tottori sand dune. *Mycoscience* 58: 14-22. 査読有, DOI: 10.1016/j.myc.2016.07.009.
- Miyamoto Y, Nara K (2016) Soil propagule banks of ectomycorrhizal fungi share many common species along an elevational gradient. *Mycorrhiza* 26: 189-197. 査読有, DOI: 10.1007/s00572-015-0658-z

- Koizumi T, Nara K (2016) Two new species of *Rhizopogon* associated with *Pinus pumila* from Japan. *Mycoscience* 57: 287-294. 査読有, doi:10.1016/j.myc.2016.04.002
- Miyamoto Y, Sakai A, Hattori M, Nara K (2015) Strong effect of climate on ectomycorrhizal fungal composition: evidence from range overlap between two mountains. *The ISME Journal* 9: 1870-1879. 査読有, doi: 10.1038/ismej.2015.8
- 岩泉正和・磯田圭哉・榎木野俊昭・笹島芳信・祐延邦資 (2015) 関西西育種基本区内の稀少樹種における平成 26 年の大量結実とジーンバンク収集 - トガサワラとシコクシラベ - .平成 27 年版林木育種センター年報: 152-155. 査読無, <https://www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/business/issue/nenpou/2015/documents/kansaiuji-nbanku.pdf>

[学会発表] (計 27 件)

- 杉山賢子・村田政穂・奈良一秀 (2018) ヤクタネゴヨウ林の縮小と菌根菌: ヤクタネショウロは絶滅危惧種? . 第 65 回日本生態学会大会 (北海道大学, 3/14-18)
- 岡田経太・松田陽介 (2018) 和歌山県・奈良県のトガサワラ林における外生菌根菌埋土胞子の空間分布. 第 129 回日本森林学会大会 (3/26-29, 高知大学)
- 阿部寛史・村田政穂・酒井敦・岩泉正和・奈良一秀 (2017) 絶滅危惧種トガサワラおよび共生する外生菌根菌トガサワラショウロの集団遺伝構造. 第 128 回日本森林学会大会 (鹿児島大学, 3/26-29)
- 岡田経太・松田陽介 (2017) 三重県大又トガサワラ林における外生菌根菌埋土胞子の分布. 第 128 回日本森林学会大会 (鹿児島大学, 3/26-29)
- 村田政穂・金谷整一・奈良一秀 (2016) ヤクタネゴヨウ林分における外生菌根菌の埋土胞子群集. 第 63 回日本生態学会大会 (仙台国際センター, 3/20-24)
- 酒井敦・岩泉正和・松田陽介・奈良一秀 (2016) 絶滅危惧樹木トガサワラの人工ギャップによる更新試験. 第 127 回日本森林学会大会 (日本大学, 3/27-30)
- 奈良一秀 (2016) 木を育て森を育む菌根菌: 菌根共生の基礎から応用まで. 第 127 回日本森林学会大会 (日本大学, 3/27-30)
- 阿部寛史・村田政穂・奈良一秀 (2016) 絶滅危惧種トガサワラと共生するショウロ属菌のマイクロサテライトマーカー. 第 127 回日本森林学会大会 (日

本大学, 3/27-30)
阿部寛史・村田政穂・奈良一秀 (2016)
絶滅危惧種トガサワラに共生するショウロ属菌の集団遺伝構造. 第60回日本菌学会大会 (京都大学, 9/16-18)
阿部寛史・村田政穂・奈良一秀 (2016)
絶滅危惧種トガサワラに共生する菌根菌トガサワラショウロの胞子分散範囲と近距離遺伝構造. 菌根研究会 2016大会 (千葉大学, 12/10)
金谷整一・満永大二郎・作田耕太郎・手塚賢至 (2016) 屋久島におけるヤクタネゴヨウの球果および種子の生産量の変動. 第127回日本森林学会大会 (日本大学, 3/27-30)

〔図書〕(計 3件)

奈良一秀 (2018) キノコが森を作る!? 不毛の大地で助け合う樹木と菌. In 生き物ワンダーランド - 深海から宇宙まで - 生物学者のフィールドノート (小林・工藤 編). 文一総合出版. pp. 96-103. ISBN: 978-4-8299-7107-9
Nara K (2015) The role of ectomycorrhizal networks in seedling establishment and primary succession. In: Mycorrhizal Network, Ecological studies series, Tom Horton ed., Springer, New York. pp.177-201.

〔その他〕

ホームページ

トガサワラの研究成果

http://www.edu.k.u-tokyo.ac.jp/nara_lab/home/research/endangered_trees

ヤクタネゴヨウの研究成果

http://www.edu.k.u-tokyo.ac.jp/nara_lab/home/research/yakutane

6. 研究組織

(1)研究代表者

奈良 一秀 (NARA, Kazuhide)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号: 60270899

(2)研究分担者

松田 陽介 (MATSUDA, Yosuke)
三重大学・生物資源学研究科・教授
研究者番号: 30324552

金谷 整一 (KANETANI, Seiichi)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所九州支所・主任研究員
研究者番号: 90353648

酒井 敦 (SAKAI, Atsushi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所四国支所・チーム長
研究者番号: 70353696

岩泉 正和 (IWAIZUMI, Masakazu)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・林木育種センター関西育種場・主任研究員
研究者番号: 50391701

(3)連携研究者

村田 政穂 (MURATA, Masao)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員
研究者番号: 20582381