

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07848

研究課題名(和文) シイタケの木材分解能力に与える環境ストレスの影響評価

研究課題名(英文) Environmental controls on wood decomposition rate of *Lentinula edodes*

研究代表者

上村 真由子 (JOMURA, Mayuko)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：60444569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境ストレスが生態系の機能を支える分解者微生物に与える影響を調べるため、シイタケをターゲットとして研究を行った。シイタケの現存量を定量するためにqPCRを用いた手法を開発した。室内での培養実験により、最も影響の大きい環境ストレスが高温処理であることがわかった。野外での栽培実験でも、酷暑の後には、菌の現存量の著しい低下が観測された。一方で、生理活性の低下は顕著でなく、高温環境に強い他の微生物による補完が行われたと考えられた。また、台風後の海塩による一時的な低下も観測された。環境ストレスの種類や大きさや分解者微生物の耐性の強さの組み合わせによって、野外における木材の分解が進むことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食用キノコとして世界で2番目に多く栽培されているシイタケの、木材中の現存量を明らかにする手法を開発した。菌床やホダ木を用いたシイタケ栽培において、菌の現存量は菌の成長やストレス応答を調べるための重要な指標となり得ることから、社会的な意義は大きい。また、分解に携わる主要な分解者の現存量を調べることで、木材分解の季節変化やストレス応答に対する生物的な要因の影響を明らかにすることができたことから、生態系機能における木質分解の寄与や学術的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the effect of environmental stresses on decomposer microbes that have a significant role in ecosystem functions, incubation and field studies were carried out using shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). We developed a biomass quantification procedure for *L. edodes* using qPCR. High temperature showed the greatest damage to the biomass and physiological activity of *L. edodes* compared to other stresses in incubation experiments. Field experiments revealed that the biomass of *L. edodes* intensively decreased after a hot summer in spite of the fact that its physiological activity remained at a high level, probably due to coverage by other decomposer microbes tolerant to high temperatures. Salt deposits brought by a typhoon also caused a temporary decrease in both biomass and physiological activity. The combination of the type and strength of environmental stresses and the tolerance of microbes to these stresses seemed to control the wood decomposition rate in field conditions.

研究分野：森林生態学

キーワード：シイタケ 木材腐朽 バイオマス 呼吸 環境ストレス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化によって高温・乾燥・豪雨の頻度や強度が増すことが示されており、これらの環境ストレスが生態系の機能に与える影響を調べる研究が増えている (Berard et al. 2015)。有機物分解は光合成とともに、物質・エネルギー循環や生物多様性といった生態系の機能を支える過程である。特に、森林に存在する枯死木は炭素や養分を貯蔵する場として機能し、分解者微生物であるバクテリアや腐朽菌の食料となり、昆虫や土壌動物、さらに上位の食者へ繋がることで、生態系の物質循環を駆動している。したがって、今後増大する環境ストレスが枯死木の分解者微生物に与える影響をよりよく理解することは、森林生態系の持つ物質・エネルギー循環や生物多様性といった機能を保全する場合に不可欠である。

申請者は、ここ 10 年の間に、枯死木分解者による呼吸 (以後、枯死木呼吸という) やその制御要因についての研究手法を確立し (例えば、Jomura et al. 2015) 中でも、枯死木呼吸を自動的に測定するシステムを用いた野外観測に成功している (上村ら 2005)。その結果、枯死木呼吸の日単位での温度依存性 ( $Q_{10}$ ) が夏季に低下することが観測された。また、降雨中の呼吸速度は降雨前の 20% 程度まで減少した。これらのストレス応答を詳細にモデル化したものを用いた場合と、従来の  $Q_{10}$  を一定としたモデルを用いた場合では年間の分解量の推定値が 20% 以上異なった。これらの結果は、分解者微生物が野外において高温や酸素欠乏のストレスに曝されており、その応答が短期だけでなく長期の枯死木の分解速度に影響することを示している。しかし、ストレスによって分解者微生物が死滅したのか、活性が低下したのか、ストレスを受けた後に現存量や活性がどのように復活したのかについては、分解者の現存量データがないと明らかにできない。そこで本研究では、菌現存量の定量を呼吸測定と合わせて行うことで、木材腐朽菌のストレス応答メカニズムを明らかにすることを着想した。

近年の分子生物学的な手法の発達により、定量 PCR 法によって得られる DNA コピー数から菌の現存量を知ることができるようになった (Yamaguchi et al. 2009)。申請者は 2017 年から 2 年に渡り共同研究者の支援の元に、シイタケに特異的なプライマーの開発と、定量 PCR 法を行うための条件を決定した。対象をシイタケに限ったのは、木材腐朽菌、特に白色腐朽菌として、また林産物として有用な種であるため多くの遺伝子情報が公開されていたことや、ホダ木 (直径 6 センチ、長さ 90 センチの丸太) を用いた野外栽培手法が確立されていたためである。また、近年の菌群集解析結果から、枯死木内に優占する菌種数は 1 から数種と極めて限られることも示されている (Baldrian et al. 2016)。定量 PCR 法を用いた真菌やバクテリア全体の定量法も存在するが、ターゲットとする種をシイタケに限ることで、ストレス応答をより詳細に明らかにできると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、環境ストレスが分解者の分解能力に与える影響を、炭素収支の観点から明らかにする。木材腐朽菌であり林産物としても重要なシイタケを接種した木材を用いて、菌の呼吸測定により得られる生理活性と、これまで軽視されてきた菌の現存量や生息範囲が、高温・乾燥・豪雨といった環境ストレスによってどのように変化するかを調べることで、木材腐朽菌の分解能力と環境ストレスとの関係を明らかにする。特に、夏季にみられる生理活性の低下、降雨時やその後の乾燥過程における生理活性の低下が、菌の現存量の変化を伴いながらどのように生じるのかを明らかにする。また、室内だけでなく野外でも実験を行うことで、より実際の環境に即した結果を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 定量 PCR 法を用いたシイタケの定量手法の確立

申請者は、シイタケのリグニン分解酵素を生産する DNA 領域の遺伝子情報を用いて、シイタケに特異的なプライマーの選定と定量 PCR 法の条件設定をすでに完了している。このプライマーを用いて、人為的に菌の含有率を変化させたサンプルを対象に定量 PCR を行って、既知の DNA 濃度に対する CT 値 (定量 PCR の結果として示される、増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数) のキャリブレーションを行う。さらに、土壌や落葉、枯死木といった菌の生息場所である基質と混合した場合の菌現存量に対する CT 値のキャリブレーションを得る。

#### (2) 木材片を用いた室内培養実験

コナラの木材片に種駒の入る穴を開けた後、オートクレーブ処理をして 24 時間浸水させ、シイタケの種駒を打ち込み、ガラス瓶へ入れて 25 度の温度環境で 4 ヶ月間の室内培養を行った。この間、週に 1 度の頻度で、木材片の呼吸速度を測定し、DNA 抽出のためのサンプルを得た。サンプルは種駒を中心に、円盤の 4 箇所から採取し、凍結乾燥を行った。CTAB 法によって DNA を抽出し、1 で得られたプライマーを用いてシイタケの現存量を定量した。呼吸速度が安定し、木材片内の菌の分布が一樣になったことを確認した後、残りの木材片を 3 つに分け、高温条件 (40 度で 4 時間)、乾燥条件 (木材重量含水率で 0.1 程度)、湛水条件 (浸水させて 4 時間) の処理を行い、その後も同様に現存量と呼吸速度の測定を続けた。これらの測定結果から、木材片内でシイタケが蔓延するに従い、シイタケの現存量や、現存量あたりの呼吸速度 (呼吸活性) がどのように変化するか、高温・乾燥・湛水ストレスに対してどのように応答するかを明らかにした。

#### (3) シイタケホダ木を用いた野外栽培実験

コナラのホダ木 (直径 5 センチ、長さ 90 センチ、 $n=200$ ) に種駒の入る穴を開けた後、24 時間浸水させ、シイタケの種駒を打ち込み、野外環境でシイタケの栽培を行った。この間、月に 2 度の頻度で、ホダ木 ( $n=5$ ) の呼吸速度を測定し、DNA 抽出のためのサンプルを得た。ホダ木の栽

培は大学構内の苗圃園で行った。ホダ木の栽培管理はそのノウハウを持つ申請者の所属大学の演習林職員の協力を得るので実行可能性は極めて高い。供試するホダ木の本数を増やすことで、シイタケの定着がうまくいかない場合に対応した。

#### (4) 自然環境ストレスへの応答観測

特定のホダ木を対象に、5台の自動呼吸測定装置を稼働させ、呼吸速度の連続測定と定期的なサンプリングを行った。同時に、ホダ木の温度や含水率の測定も行った。特に、ホダ木温度が高温になる夏季や、乾燥する冬季、梅雨期のような連続降雨を観測した場合にサンプリングを密に行い、環境ストレスに対する応答を頻度高く得るようにした。同時に、ホダ木からサンプルを採取し、(2)と同様に凍結乾燥を行い、DNAを抽出し、(1)で得られたプライマーを用いてシイタケの現存量を定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 定量PCR法を用いたシイタケの定量手法の確立

人為的にシイタケ菌体の含有率を変化させたサンプルからDNAを抽出し、定量PCRを行って、既知のDNA濃度に対するCT値のキャリブレーションを行った。特に、樹木に含まれるPCRの阻害物質の希釈のため、DNA抽出方法や希釈倍率の検討を行い、未知試料の定量を可能にした。この研究成果は科学雑誌PLOS ONEに発表した(Jomura et al. 2020)。

##### (2) 木材片と木粉を用いた室内培養実験

木材片を用いた室内培養実験を行い、シイタケ菌体の増殖に伴う呼吸速度の変化や、培養した木材片に高温、乾燥、湛水条件の処理を行い、シイタケ菌体バイオマスと呼吸速度の環境ストレスへの応答を明らかにした。これにより、一時的な高温、湛水、乾燥の環境ストレスは、いずれもシイタケの呼吸活性を有意に低下させるが、シイタケバイオマスの減少を生じさせるのは高温ストレスのみであることが明らかになり、環境ストレスのシイタケへの影響を示すことができた。この研究成果は科学雑誌関東森林研究に発表した(兼山ら, 2018)。一方で、木材片を用いた室内培養実験では、シイタケの木材中の蔓延が不均質なため、シイタケ菌体バイオマスの代表値を得るのが難しいことが明らかになったため、新たに木粉を用いた室内培養実験を行った。木粉にシイタケ植菌して培養して得られたシイタケ菌体バイオマスと呼吸速度から、菌体バイオマスと呼吸速度との間には相関が見られなかったが、菌体バイオマスの成長率と呼吸速度との間に相関が見られ、呼吸速度は菌の成長段階を知る上で重要な指標であることを示した。この研究成果は(1)の成果とともに科学雑誌PLOS ONEに発表した(Jomura et al. 2020)。

##### (3) シイタケホダ木を用いた野外栽培実験

シイタケを植菌してから2年間のホダ木内のシイタケバイオマスは、年変化はほとんど無く、春期、秋期における増加と、夏期、冬期における低下という季節変化を示した。2017年8月は冷夏、2018年8月は酷暑と平年からの偏差が大きかったことから、夏期のバイオマス低下が異常気象によるものなのか、菌の生理的な特性なのかを明らかにできなかった。呼吸速度とホダ木の温度、含水率、シイタケバイオマスとの間には有意な相関が見られた。2018年10月は、台風によって海塩が供給された直後に呼吸速度の大幅な減少がみられ、シイタケバイオマスも低下した。野外におけるホダ木を用いた栽培実験により、シイタケバイオマスの季節変化や夏期の環境ストレスによる影響だけでなく、台風によってもたらされた海塩による影響をも捉えることができた。一方で、これらの環境ストレスの影響の定量化が難しく、シイタケの木材分解のモデル化のためには、室内での追加実験やホダ木に存在していると思われる他の微生物の挙動も含めた解析が必要であることが明らかになった。

#### 引用文献

- Baldrian, P., Zrůstová, P., Tláškal, V., Davidová, A., Merhautová, V., & Vrška, T. (2016). Fungi associated with decomposing deadwood in a natural beech-dominated forest. *Fungal Ecology*, 23, 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.07.001>
- Bérard, A., Sassi, M. Ben, Kaisermann, A., & Renault, P. (2015). Soil microbial community responses to heat wave components: Drought and high temperature. *Climate Research*, 66(3), 243-264. <https://doi.org/10.3354/cr01343>
- Jomura, M., Akashi, Y., Itoh, H., Yuki, R., Sakai, Y., & Maruyama, Y. (2015). Biotic and abiotic factors controlling respiration rates of above- and belowground woody debris of *Fagus crenata* and *Quercus crispula* in Japan. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145113>
- Jomura, Mayuko, Kuwayama, T., Soma, Y., & Yamaguchi, M. (2020). Mycelial biomass estimation and metabolic quotient of *Lentinula edodes* using species-specific qPCR. *Plos One*, 15, 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232049>
- Yamaguchi, M., Narimatsu, M., Fujita, T., Kawai, M., Kobayashi, H., Ohta, A., Yamada, A., Matsushita, N., Neda, H., Shimokawa, T., & Murata, H. (2016). A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. *Mycorrhiza*, 26(8), 847-861. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0718-z>
- 兼山知子, 上村真由子, 松室諒, 丸山温, 山口宗義, & 小松雅史. (2018). シイタケ (*Lentinula edodes*) を植菌した木材の分解呼吸速度と環境ストレスへの応答. 関東森林研究, 69(1), 1-4. <https://doi.org/10.7868/s0555109913040132>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>栗山 知子, 松室 諒, 上村 真由子, 丸山 温, 小松 雅史, 山口 宗義                     | 4. 巻<br>69        |
| 2. 論文標題<br>シイタケ ( <i>Lentinula edodes</i> ) を植菌した木材の分解呼吸速度と環境ストレスへの応答 | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>関東森林研究  | 6. 最初と最後の頁<br>1-4 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                | 国際共著<br>-         |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Jomura Mayuko, Kuwayama Tomoko, Soma Yuto, Yamaguchi Muneyoshi, Komatsu Masabumi, Maruyama Yutaka                         | 4. 巻<br>15             |
| 2. 論文標題<br>Mycelial biomass estimation and metabolic quotient of <i>Lentinula edodes</i> using species-specific qPCR                | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE  | 6. 最初と最後の頁<br>e0232049 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232049">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232049</a> | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-              |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>上村真由子 石井恵 小泉優太 丸山温         |
| 2. 発表標題<br>枯死木の分解速度における窒素と微生物バイオマスの影響 |
| 3. 学会等名<br>第66回日本生態学会大会               |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Jomura M., Kuwayama T., Matsumuro R., Inose A., Chiba N., Terasaki T., Maruyama Y., Komatsu M., Yamaguchi M.                                 |
| 2. 発表標題<br>Response to environmental stresses of decomposition respiration and microbial biomass of dead wood inoculated with <i>Lentinula edodes</i> . |
| 3. 学会等名<br>Ecology of Soil Microorganisms (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>栗山 知子, 松室 諒, 上村 真由子, 小松 雅史, 山口 宗義, 丸山 温                     |
| 2. 発表標題<br>定量PCRを用いたシイタケ ( <i>Lentinula edodes</i> ) のバイオマスと分解呼吸速度との関係 |
| 3. 学会等名<br>第128回日本森林学会大会   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>栗山 知子, 上村 真由子, 小松 雅史, 山口 宗義, 丸山 温                        |
| 2. 発表標題<br>シイタケ ( <i>Lentinula edodes</i> ) ホダ木内の菌体バイオマスと分解呼吸速度との関係 |
| 3. 学会等名<br>第2回環境微生物系学会合同大会  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>栗山 知子, 松室 諒, 上村 真由子, 丸山 温, 小松 雅史, 山口 宗義                       |
| 2. 発表標題<br>定量PCRを用いたシイタケ ( <i>Lentinula edodes</i> ) を植菌した木材中の菌体バイオマスの定量 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本生物工学会大会   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>栗山 知子, 松室 諒, 上村 真由子, 丸山 温, 小松 雅史, 山口 宗義                    |
| 2. 発表標題<br>シイタケ ( <i>Lentinula edodes</i> ) を植菌した木材の分解呼吸速度と環境ストレスへの応答 |
| 3. 学会等名<br>第7回関東森林学会大会  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>28. 兼山 知子, 松室 諒, 上村 真由子, 猪瀬 安希子, 千葉 奈緒子, 寺崎 巧, 丸山 温, 小松 雅史, 山口 宗義 |
| 2. 発表標題<br>木材中のシイタケ ( <i>Lentinula edodes</i> ) の菌体バイオマスと分解呼吸速度に及ぼす環境ストレスの影響 |
| 3. 学会等名<br>第65回日本生態学会大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|