

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K20473

研究課題名（和文）鉱山跡地の先駆植物が樹木実生に提供する、機能性微生物感染のためのセーフサイト

研究課題名（英文）Pioneer plant growing at an old mine site could provide a safe site for tree seedlings via enhancing infection of functional microbes

研究代表者

春間 俊克（Haruma, Toshikatsu）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・任期付研究員

研究者番号：40836417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：調査地とした鉱山跡地にはススキやアカマツの定着が確認され、緑化に有用だと考えられた。ススキの株の内側ではアカマツ芽生え（実生）が健全に生育していた一方、外側では葉が褐色になっており、生育が阻害されていることが確認された。植物の重金属ストレス耐性には根に生育する微生物が寄与するため、ススキとアカマツ実生の根から微生物を分離したところ、共通の微生物が分離された。また、地温を測定したところ、ススキの株内では株外と比較して1日の地温変動（日較差）が小さいことが確認された。以上から、ススキは微生物の共有や地温の日較差を低減することで、鉱山跡地におけるアカマツ実生の定着を促進すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の高度成長を支えた鉱山の多くは、現在操業が停止している。そのため、国内には多くの鉱山跡地があり、付近住民の安全の他に環境・景観などの観点から、その緑化が強く望まれている。従来ススキなどの草本はアカマツ等樹木の侵入・定着を妨げるとされてきた。しかし本研究は、鉱山跡地のような強い環境ストレス下では、ススキがアカマツ実生の生育を促進し、定着に寄与する可能性を示唆した。これらの結果は、特定の条件下では草本が樹木の定着を促進することを示しており、今後の鉱山や荒廃地などの緑化技術という社会的ニーズの高い技術に対して基礎的な知見を提供すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：At an old mine site, *Miscanthus sinensis* and *Pinus densiflora* can grow naturally, showing that they are useful for revegetation. Although *P. densiflora* sprouts (seedlings) were growing healthily inside *M. sinensis*, the leaves of *P. densiflora* outside *M. sinensis* were brown, indicating that the growth of the plants had been inhibited. Because microorganisms growing in roots contribute to heavy metal stress tolerance in plants, microorganisms were isolated from roots of *M. sinensis* and *P. densiflora* seedlings. As the results, common microorganisms were isolated. In addition, measurement of soil temperature showed that daily soil temperature change (diurnal range) were smaller inside *M. sinensis* than outside. These results suggest that *M. sinensis* could promote establishment of *P. densiflora* seedlings in old mine sites by sharing microorganisms and reducing diurnal range in soil temperature.

研究分野：環境生態化学

キーワード：ススキ アカマツ 内生菌 重金属 鉱山跡地

1. 研究開始当初の背景

鉱山開発は日本の経済発展に貢献した一方、周辺の森林には多大な被害を及ぼし、現在でも森林植生が回復していない場所が存在する。鉱山跡地の土壌にはアルミニウムや重金属といった有害金属が高濃度に含まれ、植物の生育を阻害する。そのため鉱山跡地に自生する植物は有害金属耐性を有すると考えられる (Brooks, 1998)。このように植物が定着しにくい環境である鉱山跡地の緑化では、有害金属の飛散防止や雨水による流亡を防止するために植物の生えていない裸地に侵入しやすい植物 (先駆植物) の定着が重要視されてきた (金属鉱業事業団, 1983)。鉱山跡地にはススキが定着していることが多く、緑化に有用な先駆植物だと考えられた。鉱山跡地に自生するススキは根に生育する微生物によって有害金属耐性を増強することが知られている (Haruma et al., 2018)。また、調査地ではススキの株の内側でアカマツが健全に生育していることが確認された。そのため、ススキは先駆種として早期に鉱山跡地に定着すると共に、樹木実生に機能的な微生物を提供することで樹木実生の定着も促進すると考えられた。植物の有害金属耐性には解毒物質の産生や、細胞壁での有害金属の吸着など (Larcher, 2004) に加え、機能的な微生物による環境ストレスの低減が知られている。しかし、ススキやススキに由来する機能的な微生物の樹木実生への影響は評価されていない。

2. 研究の目的

本研究では、鉱山跡地に自生するススキが樹木実生に機能的な自身の内生菌を提供し、生育初期における樹木実生の定着を促進する機構の解明を目的とした。まず、調査地におけるアカマツ実生の生残調査を行い、ススキの株の内外におけるアカマツ実生の生残率を測定した。また、調査地における環境ストレスを明らかにするために、土壌の体積含水率、重金属濃度、地温を測定した。次に、アカマツ実生の有害金属耐性を確認するために、根に含まれる有害金属および有害金属解毒物質の濃度を測定した。また、根に生育する機能的微生物を分離した。同様にススキの根からも微生物を分離し、アカマツ実生の微生物と比較することで、微生物の提供が生じるか確認した。

3. 研究の方法

(1) アカマツ実生の生残率の算出と土壌環境の測定

2019年から2022年の7月と9月に、調査地とした鉱山跡地に10 m x 35 mの調査区を設置し、ススキの株内外に生育するアカマツ実生の生残率を算出した。また、調査区内のススキの株を20株ランダムに選択し、その内外の体積含水率を測定した。2022年7月から9月の2か月間、1時間ごとに地温の測定を行った。測定に際し、アカマツ実生の根の生育が確認された土壌5 cmの深度における地温を測定した。

(2) 土壌とアカマツ実生に含まれる有害金属濃度の測定

2019年9月に採取した土壌を風乾後、硝酸-過塩素酸で分解後、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)を用いて有害金属(Al、Cu、Fe、MnおよびZn)濃度の測定を行った。2019年9月に採取したアカマツ実生を洗浄後、80°Cで48時間乾燥した。乾燥した植物体を硝酸で分解した後、得られた分解液をICP-OESに供し、有害金属濃度を分析した。

(3) 有害金属解毒物質の分析

2019年9月に採取したアカマツ実生の根をメタノールおよび80%エタノールを用いて5日間、23°C暗所で抽出した。得られた抽出液を、それぞれ種々のクロマトグラフィーを用いてフェノール性化合物と有機酸の分析を行った。また、メタノール抽出物の一部は紫外-可視分光検出器を用いて縮合タンニン濃度を測定した。なお、縮合タンニンはシアニジンクロライド換算とした。

(4) 内生菌の分離

2020年9月に、ススキおよびススキの株の内外のアカマツ実生をそれぞれ5個体ずつ採取した。採取した植物体の根から微生物の分離を行った。根の表面滅菌は70%エタノールと15%過酸化水素水で処理した。滅菌水で洗浄後、滅菌済みのメスを用いて10mm程度に切断した。切断した根を無作為に選び、1% malt extract (MA)培地上で2週間培養した。各植物体につき100切片、それぞれ500切片ずつ培養した。

4. 研究成果

(1) アカマツ実生の生残率の算出と土壌環境の測定

2019年9月から2020年7月にかけて、ススキの外側で生育するアカマツ実生の生残率は30%まで低下した。一方、内側では65%程度の低下となった(図1)。アカマツ実生の生残率は2022年9月まで、外側と比較して内側で高い傾向が維持された(図1)。これらの結果から、ススキがアカマツ実生の初期定着に寄与している可能性が示唆された。

ススキの株内外の土壌の体積含水率は外側より内側で有意に低いことが確認された。しかし、いずれでも植物の生育を阻害する値ではなかった。地温を測定した結果、ススキの株の外側では内側と比較して、有意に日較差が大きいたことが確認された。大きな日較差は植物の生育を阻害する(Al-Kayssi et al., 1990)ことから、ススキは日較差を低減することでアカマツ実生の定着を促進している可能性が示唆された。

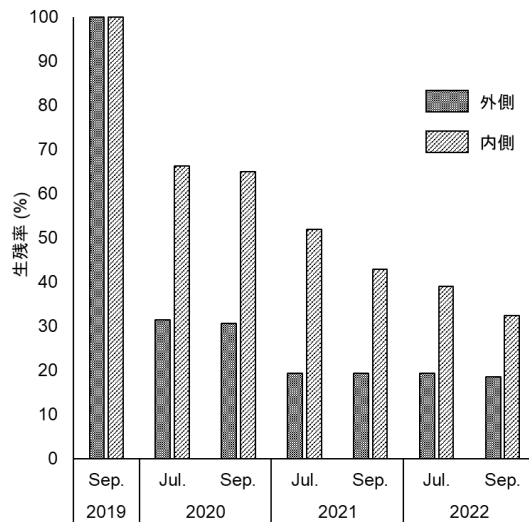


図 1 . アカマツ実生の生残率

(2) アカマツ実生および土壌に含まれる有害金属濃度の測定

土壌には比較的高濃度の Fe が含まれることが確認されたが、ススキの株の内外において有意な差は確認されなかった。また、ススキの株の内外で生育するアカマツ実生も根に高濃度の Fe を蓄積していたが、内外における有意差は確認されなかった。このことから、ススキはアカマツ実生の有害金属の吸収抑制には寄与しないと考えられた。

(3) 有害金属解毒物質の分析

アカマツ実生の根には Fe 解毒物質としてカテキン、縮合タンニンおよびリンゴ酸が含まれていた。これらの化合物は Fe を解毒する (Tiffin et al., 1962; Chobot et al., 2009 ; Karamac et al., 2009) ことから、アカマツ実生の Fe 耐性に寄与していると考えられた。

(4) 内生菌の分離

ススキの株の内外に生育するアカマツ実生の根から、*Aquapteridospora* spp.および *Ceratobasidium bicorne* が分離された。*Aquapteridospora* spp.は内生菌としての報告がないが、黒色の菌糸をもつ微生物の一種と考えられるため、アカマツ実生の Fe 耐性に寄与している可能性が示唆された。また、*Aquapteridospora* spp.はススキからも分離されたことから、ススキが接種源となり、内生菌の感染を促進していると考えられた。*Ceratobasidium bicorne* は内生菌として機能する一方、アカマツ実生が弱ると病原性を示す。そのため、ススキはアカマツ実生に対する環境ストレスを緩和すると、*C. bicorne* の病原性の発現を抑制し、アカマツ実生の定着に寄与していると考えられた。

< 引用文献 >

金属鉱業事業団 . 捨て石・鉱さいたい積場緑化の手引き , 金属鉱業事業団 , 1983 , 東京 .

Al-Kayssi AW, Al-Karaghoul AA, Hasson AM, Beker SA. Influence of soil moisture content on soil temperature and heat storage under greenhouse conditions. *J Agric Eng Res.* 1990; 45: 241–252.

Brooks RR, Chambers MF, Nicks LJ, Robinson BH. Phytomining. *Trends Plant Sci.* 1998; 3: 359–362.

Chobot V, Huber C, Trettenhahn G, Hadacek F. (+/-)-catechin: chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? *J Chem Ecol.* 2009; 35: 980–996.

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

Karamac M. Chelation of Cu (II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. *Int J Mol Sci.* 2009; 10: 5485–5497.

Larcher W. *Physiological plant ecology.* Germaned. "Ökophysiologie der pflanzen, 6. auflage", published in. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2003. Translated version in 2001 by Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.

Tiffin LO, Brown JC. Iron chelates in soybean exudate. *Science.* 1962;135: 311–313.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 T. Haruma, K. Yamaji, H. Masuya	4. 巻 73
2. 論文標題 Phialocephala fortinii increases aluminum tolerance in Miscanthus sinensis growing in acidic mine soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 300-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/lam.13514	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 黒澤陽子, 王莫非, 森茂太, 春間俊克, 野路建太, 土山紘平, 山路恵子, 富山眞吾	4. 巻 67
2. 論文標題 鉱山集積場の緑化のための多様な植物の初期成長と呼吸特性の評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 環境資源工学会誌	6. 最初と最後の頁 122-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4144/rpsj.67.122	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Lu X., Yamaji K., Haruma T., Yachi M., Doyama K., Tomiyama S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Metal Accumulation and Tolerance in Artemisia indica var. maximowiczii (Nakai) H. Hara. and Fallopia sachalinensis (F. Schmidt) Ronse Decr., a Naturally Growing Plant Species at Mine Site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Minerals	6. 最初と最後の頁 806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/min11080806	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Doyama K., Yamaji K., Haruma T., Ishida A., Mori S., Kurosawa Y.	4. 巻 16
2. 論文標題 Zn tolerance in the evergreen shrub, Aucuba japonica, naturally growing at a mine site: Cell wall immobilization, aucubin production, and Zn adsorption on fungal mycelia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0257690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0257690	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nakamoto Y., Doyama K., Haruma T., Lu X., Tanaka K., Kozai N., Fukuyama K., Fukushima S., Ohara Y. and Yamaji K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Mn and 238U Accumulations in Phragmites Australis Naturally Growing at the Mill Tailings Pond; Iron Plaque Formation Possibly Related to Root-Endophytic Bacteria Producing Siderophores.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Minerals	6. 最初と最後の頁 1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/min11121337	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yuta Matsushiro, Keiko Yamaji, Xingyan Lu, Kohei Doyama, Toshikatsu Haruma, Hayato Masuya, Shingo Tomiyama.
2. 発表標題 The Effect of Root-endophytic Aquapteridospora sp. on Metal-tolerance of Miscanthus sinensis, Naturally Growing at a Storage Site.
3. 学会等名 INTECOL 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Doyama, Keiko Yamaji, Toshikatsu Haruma, Hayato Masuya, Shojiro Hishiyama, Atsushi Kato.
2. 発表標題 Functions of Metabolites Produced by the Root Endophyte, Pezicula ericae, infecting Aucuba japonica, naturally growing at a mine site.
3. 学会等名 INTECOL 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsuki Yachi, Kohei Doyama, Toshikatsu Haruma, Keiko Yamaji.
2. 発表標題 Clarification of Heavy-metal Tolerance Mechanism in Polygonum thunbergii Growing Naturally in Mine Pond via Seasonal Field Analysis.
3. 学会等名 INTECOL 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xingyan Lu, Kohei Doyama, Toshikatsu Haruma, Shingo Tomiyama, Hayato Masuya, Keiko Yamaji.
2. 発表標題 Elucidation of Heavy Metal Tolerance in <i>Artemisia indica</i> var. <i>maximowiczii</i> Growing at a Mine Site, Considering Root Endophytic Fungi.
3. 学会等名 INTECOL 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshikatsu Haruma, Kenta Noji, Kohei Doyama, Lu Xingyan, Hayato Masuya, Saburo Yamagata, Shingo Tomiyama, Keiko Yamaji.
2. 発表標題 A dark-septa endophyte might enhance survival rate of <i>Pinus densiflora</i> seedlings in <i>Miscanthus sinensis</i> patches at a storage site.
3. 学会等名 INTECOL 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshikatsu Haruma, Yosuke Yamamoto, Naoto Nishimoto, Shingo Tomiyama.
2. 発表標題 Heavy metal tolerance mechanisms in <i>Abies sachalinensis</i> growing at an old mine site.
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan, 2023, March. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春間俊克、西本直人、山本耀介、富山眞吾
2. 発表標題 緑化研究の最前線～鉱山跡地をいかに緑化するか～
3. 学会等名 グリーンレメディエーション研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春間俊克
2. 発表標題 鉱山跡地に自生する植物の重金属ストレス耐性機構の解明
3. 学会等名 土質基礎研究委員会環境地 盤分科会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春間俊克, 土山紘平, 田中万也, 高橋嘉夫, 福山賢仁, 小原義之, 山路恵子
2. 発表標題 ヨシの根におけるウラン吸着能および鉄ブランク形成機構の解明
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷内美月, 土山紘平, 春間俊克, 山路恵子
2. 発表標題 鉱山跡地に生育するミゾソバの重金属蓄積能の経時的解析
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中本幸弘, 山路恵子, 春間俊克, 土山紘平, 盧星燕, 田中万也, 香西直文, 福山賢仁, 福嶋繁, 小原義之
2. 発表標題 鉱さいたい積場のヨシにおける重金属元素の蓄積及び鉄ブランク形成へ関与する内生細菌
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xingyan LU, Kohei DOYAMA, Toshikatsu HARUMA, Shingo TOMIYAMA, Hayato MASUYA, Keiko YAMAJI
2. 発表標題 Elucidation of heavy metal tolerance in <i>Artemisia indica</i> var. <i>maximowiczii</i> growing at a mine site, considering root endophytic fungi interaction
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouhei DOYAMA, Keiko YAMAJI, Toshikatsu HARUMA
2. 発表標題 Functions of compound produced by the endophyte, <i>Pezicula ericae</i> , infecting <i>Aucuba japonica</i> roots
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土山紘平, 山路恵子, 春間俊克
2. 発表標題 鉱山跡地に自生するアオキと内生菌 <i>Pezicula ericae</i> の機能
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春間俊克, 野路建太, 松代雄太, 土山紘平, 盧星燕, 升屋勇人, 富山眞吾, 山路恵子
2. 発表標題 鉱山跡地に自生するススキが関与したアカマツの有害金属耐性機構の解明
3. 学会等名 環境資源工学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春間俊克、山路恵子、野路建太、土山紘平、盧星燕、升屋勇人、黒澤陽子、森茂太
2. 発表標題 鉦山集積場に自生するススキが関与したアカマツ実生の生残要因の解明
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春間俊克
2. 発表標題 内生菌 <i>Phialocephala fortinii</i> が増強するススキの AI 耐性機構
3. 学会等名 第67回日本生体学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山路恵子、春間俊克	4. 発行年 2022年
2. 出版社 経済産業省	5. 総ページ数 81
3. 書名 自生植物利用による緑化方法. In 休廃止鉦山の新たな緑化対策等に関するガイダンス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関