

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04935

研究課題名(和文) 抗菌物質シュウ酸アルミニウムを利用したマツタケシロの生長戦略

研究課題名(英文) The Growth Strategy of Tricholoma matsutake colony with an antimicrobial complex, (oxalato)aluminium

研究代表者

平井 伸博 (Hirai, Nobuhiro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：00165151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：マツタケの菌根領域はシロと呼ばれており、子実体はその周縁部で発生する。シロの先端(活性菌根帯)が抗菌物質を生産していることは1960年代より知られていたが、本体は不明のままであったが、最近申請者はその本体がシュウ酸アルミニウム錯体であることを解明した。本研究では、同錯体の抗菌活性の作用メカニズムならびにシロにおける分布と含量の季節変化、土壤微生物の分布、各地のシロにおける存在を確認し、それがシロの生長に重要な機能を果たしていることを明らかにした。マツタケ菌によるシュウ酸生合成遺伝子の同定も試み、候補遺伝子を見出した。これらの成果はマツタケシロの化学生態学を大きく発展させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツタケの生産量は里山林の活用が低下した1960年代以降急激に減少している。マツタケの菌根領域はシロと呼ばれており、子実体はその周縁部で発生する。シロの先端が抗菌物質を生産していることは1960年代より知られていたが、本体は不明のままであった。申請者はその本体がシュウ酸アルミニウム錯体であることを解明し、同錯体はその生理・生態学的機能を通じてシロの成長に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。従来のマツタケ研究は人工栽培など応用的なものが多かったが、本研究はシュウ酸アルミニウムに関する基礎研究であり、マツタケシロの育成技術への貢献が改めて期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：The mycorrhizal region of Tricholoma matsutake is called shiro, and fruiting bodies occur at the periphery. It has been known from the 1960s that the front of shiro (active mycorrhizal zone) produced an antibacterial substance, but the substance remained unknown. The applicant has recently found that the substance is an aluminum oxalate complex. In this study, we confirmed the distribution and the seasonal changes in content of the complex in shiro, the distribution of soil microbes in shiro, and the occurrence of the complex in shiro of various places, and revealed that it plays an important strategy for the growth of shiro. In addition, identification of oxalic acid biosynthesis genes by *T. matsutake* was also attempted, and candidate genes were found. These results contribute to the conservation and vitality maintenance of village forest through the application to the cultivation technology of *T. matsutake* shiro.

研究分野：天然物化学

キーワード：マツタケ 抗菌物質 シュウ酸アルミニウム 菌根 アカマツ リン酸

1. 研究開始当初の背景

マツタケは日本の食文化に欠かせない重要な食材のひとつである。しかしマツタケの生産量は 1941 年の 1 万 2 千トンピークとして 1960 年代以降急激に減少し、現在ではわずか 30 トン程度である。その主な原因は薪炭の供給源として活用されていた里山林が放置され、落葉などによって土壌が富栄養化したためとされている。本研究はマツタケのシロに含まれる抗菌物質の解明から始まったが、抗菌物質の生理・生態学的役割が明らかになるにしたがって、シュウ酸分泌による不溶性リン酸の可溶化を中心としたアカマツとマツタケの共生関係の新たな側面が明らかになってきた。

マツタケ菌根の生育領域は「シロ」と呼ばれる。特にシロの先端は活性菌根帯であり、菌糸が密集し深さ約 10 cm の土壌が白く見える。マツタケ子実体は他の菌根菌と同様、シロの周縁部に環状に並んで生え、フェアリーリング（菌環）を形成する。シロは徐々に生長するためフェアリーリングの直径も毎年 10-15 cm ずつ大きくなっていく。マツタケ子実体を発生させるにはシロの育成と拡大が極めて重要であり、マツタケの人工栽培においても多大の努力がなされている。しかしながらシロの育成は成功しているとはいいがたい。

マツタケシロの形成と拡大にとって重要と思われる大変興味深い現象が小原らによって 1960 年代に報告されている。それによると、シロ圏外の土壌には細菌や放線菌、糸状菌など多くの微生物が存在しているのに対して、活性菌根帯には藻菌類以外の微生物はほとんど存在しない。この理由として菌根が抗菌物質を産生することが示唆されている。この抗菌物質は、マツタケ菌にとっての雑菌や有害菌を駆逐することによってシロの生長に重要な役割を果たしている可能性が高い。申請者は平成 17 年からその研究に着手し、マツタケシロの菌根が実際に強い抗菌活性を示すことを確認した。抗菌物質画分の結晶化に成功し、それがシュウ酸が配位したアルミニウム錯体であることが判明した。シュウ酸アルミニウム錯体は既知物質であるが、その抗菌活性を見出したのはこれが初めてである。

2. 研究の目的

シュウ酸は植物の根から分泌されることが知られており、その分泌には植物栄養学的に二つの役割があるとされていた。一つは土壌中の不溶性リン酸アルミニウムと反応して可溶性リン酸とシュウ酸アルミニウムを生成することであり、二つ目は酸性土壌におけるアルミニウムの毒性をシュウ酸と錯体形成することにより解毒することである。これに今回見出されたシュウ酸アルミニウムの抗菌作用を加えると、シュウ酸の分泌には「一石三鳥」の効果があると言っても過言ではない。現時点でマツタケ菌根から分泌されるシュウ酸の生産者あるいは分泌者は不明である。しかしシュウ酸アルミニウムが抗菌活性を有することから、マツタケシロはその活性菌根帯においてシュウ酸を分泌してリン酸アルミニウムからリン酸を可溶化しアカマツとマツタケに供給するとともに、生じたシュウ酸アルミニウムの抗菌活性によって周辺の有害菌を駆逐しつつその領域を拡大するという巧妙な生長メカニズムを有している可能性が高い。ただし、現時点で判明しているのはシュウ酸アルミニウムが抗菌活性を有することだけであり、その生理・生態学的機能の解明は進んでいない。本研究はこれらの課題に取り組み、土壌中へのシュウ酸分泌の結果生じるシュウ酸アルミニウムの多面的な生理・生態学的機能を明らかにするものである。

本研究は、これまでシュウ酸分泌によるリン酸可溶化およびアルミニウム解毒の際に生じる不要な副産物としてしか認識されていなかったシュウ酸アルミニウムの多面的機能に注目するものであり、シュウ酸、リン酸、アルミニウムの密接な関係を明らかにする研究は他に例をみない。本研究は菌根に関するものだけでなく、シュウ酸分泌と不溶性リン酸の可溶化に関係する森林生態学ならびに土壌生態学の分野にも新たな展開をもたらすものである。さらに実用面においても、マツタケシロの効果的な育成法開発に応用することによってマツタケの増産、さらには里山林の保全方法の改善につながることも期待している。

3. 研究の方法

1) **マツタケシロ土壌の選定** これまでの抗菌物質研究に用いてきた京都府坂井研究林のシロ群のうち、生育が旺盛なシロを対象とした。

2) **シュウ酸アルミニウムの構造活性相関** シュウ酸と塩化アルミニウムの比率および pH を変えた溶液を調製し、シュウ酸分子の配位数と抗菌活性を調べる。シュウ酸のアルミニウムへの配位数は ^{27}Al NMR により、抗菌活性は被験物質を添加した液体培地で *Bacillus subtilis* を培養し菌体量を 630 nm における濁度で評価した。アルミニウムと錯体を形成する低分子有機酸として乳酸、リンゴ酸、コハク酸、マロン酸、クエン酸を用い、抗菌活性をペーパーディスク法で測定した。

3) **シュウ酸アルミニウムのマツタケ菌の生育への影響** 寒天ブロックのマツタケ菌糸を 30, 100, 300 ppm のシュウ酸アルミニウム含有 1/2 浜田培地で培養し、そのコロニー面積を測定した。

4) **シュウ酸アルミニウムの抗菌スペクトル** バクテリア 7 種 (*Bacillus subtilis* FKU101、*B. subtilis* JCM1465、*Arthrobacter chlorophenolicus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Rhizobium radiobacter*、*Escherichia coli* JCM 18426、*E. coli* JCM 20135)、酵母 1 種 (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌

4 種 (*Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus oryzae*) に対する抗菌活性を 30, 100, 300 ppm で調べた。

5) **土壤中におけるシュウ酸アルミニウムの生成モデル** 5.5 mM のリン酸アルミニウムを懸濁した *B. subtilis* 菌寒天プレート上に 1 μ mol のシュウ酸を含ませたペーパーディスクを置きインキュベーション後、その抗菌ゾーンの大きさを対照の菌寒天プレートのもものと比較した。

6) **シロにおけるシュウ酸アルミニウム含量、マツタケ菌体量、抗菌活性、微生物密度、シュウ酸、pH、可溶性リン酸濃度の分布分析** シロの活性菌根帯 (SF) とそこから直線上で内側へ 30 cm (SI)、外側へ 30 cm 離れた場所 (SO) の深さ約 10 cm の土壌を採取し分析した。マツタケ菌体量はその DNA 抽出物のマツタケ特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法により、シュウ酸アルミニウム含量は ^{27}Al -NMR スペクトル、抗菌活性は *B. subtilis* 菌寒天プレートを用いたペーパーディスク法、微生物密度は希釈平板培養法、シュウ酸は HPLC、pH は pH メータ、可溶性リン酸濃度はブレイ第二法によってそれぞれ分析した。

7) **シロのマツタケ菌体量、シュウ酸アルミニウム含量、抗菌活性の季節変化** 隔月に 1 度、シロから SF、SI、SO の土壌を採取し分析した。分析方法は上に同じ。

8) **シロ内外の土壤微生物の単離と同定など** シロの SF、SI、SO の土壤試料の希釈懸濁液をシュウ酸アルミニウム 300 ppm 含有培地と非含有培地に塗布し、インキュベーション後コロニーをカウントした。各培地中 20 コロニーのバクテリアを 16s rRNA 遺伝子配列解析法により同定した。これらをシュウ酸アルミニウムの抗菌試験用の被験菌とした。シュウ酸アルミニウムに対する感受性は、30, 100, 300 ppm のシュウ酸アルミニウム含有培地上での生育阻害試験により評価した。

9) **シュウ酸アルミニウムの生成機構** マツタケ菌を接種したアカマツ苗をリン酸欠乏やアルミニウム過剰の土壌で栽培したときのシュウ酸分泌量とシュウ酸アルミニウム含量を分析した。本試験では、天然鉱物質土壌を用いた培養系のもとでのシュウ酸アルミニウムの生成機構について検討した (土壌への化合物添加条件については下記 10) 参照)。

10) **マツタケ菌根形成に対するシュウ酸などの効果** マツタケ菌系を接種したアカマツ苗の培地にシュウ酸アルミニウムあるいはシュウ酸を添加し、それらを添加していない培地と比べることにより、菌根形成速度や形成量、苗の生長量に対する両化合物の影響を調べた。菌根形成量については、洗浄した根系の重量 (乾燥重量) を直接計測するとともに、格子交差法により根系の長さを計測した。

11) **マツタケ菌のシュウ酸生成候補遺伝子のクローニング** マツタケ菌のゲノム情報からグリオキシル酸脱水素酵素 *FpGLOXDH* ならびにオキサロ酢酸加水分解酵素 *FpOAH* と相同性が高い遺伝子を見出し、cDNA を取得する。取得した cDNA の組換えタンパク質を調製し、活性の確認を試みる。一つはフラボヘムタンパク質であると強く示唆されるため *Pichia pastoris* を、もう一つの加水分解酵素は大腸菌を用いて発現させる。別途、マツタケ培養菌系の培地でのシュウ酸蓄積量を増大させる培養条件を検討し、その条件下、シュウ酸生成候補遺伝子の発現量を比較する。自然状態のマツタケ菌のシュウ酸生成関連遺伝子を特定するために、無菌的に培養した菌根と野外で発生した子実体直下の菌根を採取し RNA を抽出する。抽出した RNA より cDNA を合成し、上記に記載した遺伝子について、PCR により発現を確認する。また、マツタケが発生する前の季節において採取した菌根と子実体が発生した時期の菌根においても同様に PCR による比較を行い、野外でシュウ酸アルミニウムが検出される時期に発現するシュウ酸関連遺伝子を特定する。

12) **シュウ酸アルミニウムの普遍的存在の確認** 京都府研究林に加えて岩手県岩手町と長野県塩尻市および北海道西興部と長野県大鹿村の各試験地におけるマツタケシロの SI、SF、SO の各土壌におけるマツタケ菌体量、シュウ酸アルミニウム含量などの分析を行った。分析方法は上に同じ。

4. 研究成果

1) **シュウ酸アルミニウムの構造活性相関** シュウ酸と塩化アルミニウムの濃度比と溶液の pH を変化させて調べた結果、最も抗菌活性が強いのはシュウ酸 1 配位体、次いで 2 配位体であり、3 配位体はほとんど不活性であり、pH は 4.3, 4.9, 5.5 と増加するにつれ抗菌活性は低下した。金属アルミニウムには全く活性がなかった。シュウ酸アルミニウム錯体の抗菌活性メカニズムとして、アルミニウムの空き配位にバクテリアの生体成分が配位してその機能を妨害している可能性がある。乳酸、リンゴ酸、コハク酸は元の抗菌活性がリン酸アルミニウム存在下でより強くなったが、マロン酸はリン酸アルミニウムの有無に関わらず不活性、クエン酸はリン酸アルミニウムの有無に関わらず活性は変わらなかった。低分子ながら有機酸の構造もアルミニウム錯体の抗菌活性に関係しているようだ。

2) **シュウ酸アルミニウムのマツタケ菌の生育への影響** シュウ酸アルミニウムのマツタケ菌に対する生育阻害活性は認められず、逆にどの濃度でも生育促進が認められ 100 ppm 以上で約 1.4 倍コロニー面積の増大が観察された。この結果はシュウ酸アルミニウムがマツタケ菌の生育を促進することも示している。

3) **シュウ酸アルミニウムの抗菌スペクトル** 代表的な微生物を用いてシュウ酸アルミニウムの抗菌スペクトルを調べた結果、同錯体は複数のグラム陽性と陰性のバクテリア、酵母に対して 30-300 ppm

で抗菌活性を示した。ただしカビに対する生育阻害活性はバクテリアよりは弱かった。したがってシュウ酸アルミニウム錯体は抗菌物質として決して強くはないが、特にバクテリアに対して非選択的な抗菌活性を示すことが分かった。

4) **土壤中におけるシュウ酸アルミニウムの生成モデル** リン酸アルミニウムを懸濁した菌寒天プレート上に置いたシュウ酸含有ペーパーディスクの抗菌ゾーンは、リン酸アルミニウムを含まないものより明らかに大きかった。この結果より土壤中でも同様のメカニズムでシュウ酸アルミニウムが生成していることが強く示唆された。

5) **シロにおけるシュウ酸アルミニウム含量、マツタケ菌体密度、抗菌活性、微生物密度、シュウ酸、pH、可溶性リン酸含量の分布分析** シロ No. 7 の子実体発生期におけるシロ先端部 (SF) と内部 (SI)、外部 (SO) の土壤中のシュウ酸アルミニウム含量の分布はマツタケ菌体量ならびに抗菌活性、シュウ酸含量、可溶性リン酸含量と正の相関を示し、微生物密度および pH と負の相関を示した。これらの結果は、シロ先端部において菌根から分泌されたシュウ酸が不溶性リン酸アルミニウムを溶解し可溶性リン酸を遊離するとともにシュウ酸アルミニウムを生成して、土壤微生物の生育を抑制していることを強く示唆している。

6) **シロのマツタケ菌体量、シュウ酸アルミニウム含量、抗菌活性の季節変化** 傾向としてマツタケ菌体量は子実体発生時期の 10 月に最大になり冬期に減少した後、4 月から 10 月にかけて増加した。この季節変化からもシュウ酸アルミニウム含量は概ね活性菌根帯の盛衰と相関しており、シュウ酸アルミニウムがシロの成長と密接に関係していることが伺える。

7) **シロ内外の土壤微生物の単離と同定、シュウ酸アルミニウム感受性試験など** 子実体発生時期に生息しているバクテリアは密度の多い順に、シロ先端部には *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia* sp. 2 - sp. 4 が、シロの外側には *B. cenocepacia*, *B. phytofirmans*, *B. xenovorans*, *Collimonas fungivorans*, *B. cepacia*, *Burkholderia* sp. 5, *B. arboris* が、シロの内側には *B. ambifaria*, *B. arboris*, *B. xenovorans*, *Burkholderia* sp. 1, *B. cepacia*, *Dyella terrae* が検出された。これらのうちシロ先端部のバクテリアは全てシュウ酸アルミニウム耐性、シロ外側の *C. fungivorans* とシロ内側の *Burkholderia* sp. 1 がシュウ酸アルミニウム感受性であった。バクテリアの種類はシロ先端部に生息するバクテリアの種類が少なく、その両側で多かった。これらの結果も、マツタケシロがシュウ酸アルミニウム錯体を生成しつつその領域を拡大していることと一致している。

8) **シュウ酸アルミニウムの生成機構** 風化花崗岩土壌を用いて菌根合成を行った結果、マツタケ培養株 #84 を用いた場合、全ての化合物添加区で菌根形成が認められた。各添加区において菌根形成量の多い苗 3 本を中心に土壤中のシュウ酸アルミニウム生成について分析した結果、対照区、シュウ酸 2,165 $\mu\text{g/g}$ 添加区、シュウ酸 433 $\mu\text{g/g}$ ・リン酸アルミニウム 776 $\mu\text{g/g}$ 添加区で $\text{Al}(\text{oxalate})_2$ が検出された。しかし、いずれの場合も検出濃度が 5 - 7 $\mu\text{g/g}$ で大差がないことから、これらのシュウ酸アルミニウムは試薬の投与処理によって生成したものとは考えにくく、菌根から分泌されたシュウ酸が培養土中の不溶性リン酸アルミニウムを溶かして生成した可能性が推察された。すなわち、自然条件と同じような生理反応が起こったのではないかと推察された。

9) **マツタケ菌根形成に対するシュウ酸およびシュウ酸アルミニウムの効果** マツタケ培養株 #84 の菌根形成量を比較すると、対照区 (無添加区) に対してシュウ酸 433 $\mu\text{g/g}$ ・リン酸アルミニウム 776 $\mu\text{g/g}$ 添加区とリン酸カリウム 996 $\mu\text{g/g}$ 添加区で有意に菌根量が増加した。その他の添加区の多くでは対照区と同程度かやや増加傾向にあり、シュウ酸 2,165 $\mu\text{g/g}$ 添加区とリン酸カリウム 4,980 $\mu\text{g/g}$ 添加区でやや減少傾向にあった。植物体の重量では、リン酸を添加したすべての区で、地下部の重量が有意に大きくなり、地上部についてもほぼ同じ傾向だった。したがって、菌根苗の生育に対しては、シュウ酸とアルミニウムの添加は影響せず、リン酸添加が促進作用を示すことが明らかになった。また、シュウ酸やリン酸アルミニウムが適量添加されると菌根量も増加することから、マツタケ菌根形成とシュウ酸アルミニウム形成の関係をさらに検証するためには、シュウ酸 433 $\mu\text{g/g}$ ・リン酸アルミニウム 776 $\mu\text{g/g}$ 添加条件が興味深いと考えられた。

10) **マツタケ菌のシュウ酸生合成候補遺伝子のクローニング** (服部) シュウ酸生合成酵素をコードする候補遺伝子の内、木材腐朽菌オオズラタケの FpOAH に相同性が高い cDNA 2 種を、研究分担者服部所有のマツタケ菌株より取得した。これらの組換え粗酵素の活性を確認することにより、取得した cDNA が目的物であることを確認した。一方、同様にグリオキシル酸脱水素酵素をコードする候補遺伝子 cDNA 2 種を取得し、バキュロウィルス、酵母の発現系を用い、組換え酵素を調製し活性の確認を試みた。しかし、活性の確認までは至らなかった。そこで、マツタケ培養菌系の培地に、通常の数倍シュウ酸蓄積量を増加させる培養条件を見出し、その条件下で、シュウ酸生合成候補遺伝子の発現量を比較した。その結果、本培養条件下のシュウ酸生合成に、主体的な働きをしていると強く示唆されるシュウ酸生合成候補遺伝子を特定した。(坂本) マツタケゲノム情報より、シュウ酸合成に関連する遺伝子と推定される遺伝子として、オキサロ酢酸加水分解酵素 (OXAH) 、グリオキシル酸脱水素酵素 (GLOXDH) 、イソクエン酸リアーゼ (ICL) 及び、シュウ酸トランスポーター遺伝子と推定される遺伝子配列を特定した。実験室内で無菌的に育成した菌根から抽出した RNA とマツタケ子実体直下のシ

口からサンプリングした菌根から抽出した RNA を用い、PCR により遺伝子発現を確認したところ、それらすべての遺伝子は野外のシロからサンプリングした菌根で強い発現が認められた。野外のシロでは 7-9 月で強く発現する遺伝子を特定できたことから、野外におけるシュウ酸合成と強い関連があることが示唆された。

11) シュウ酸アルミニウムの普遍的存在の確認 シュウ酸アルミニウムは調査した全ての試験地のシロ先端部に存在することから、シュウ酸アルミニウムは全国のマツタケシロに普遍的に存在し、その抗菌作用により土壤中の微生物環境を制御することによってマツタケシロの維持、拡大に重要な役割を担っていることが強く示唆された。

12) 総括 シュウ酸は酸性土壌でのアルミニウム毒性も軽減するので、シュウ酸の分泌は「一石三鳥」の効果があると言って良い。このようなマツタケシロの生理学的、生態学的メカニズムを明らかにしたのは本研究が初めてである。従来マツタケの研究は人工栽培を目的とした応用的なものや子実体の香り、機能性成分に関するものがほとんどである。これに対して本研究はシロ先端部の抗菌物質がシュウ酸アルミニウムであることに基づき、その生理機能や生態学的役割を主に天然物化学の立場から追求したものであり、抗菌物質・シュウ酸アルミニウムの役割と重要性が初めて明らかにした。今後ともマツタケの研究がさらに発展することを願っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Katsutoshi Nishino, Misako Shiro, Ryuki Okura, Kazuya Oizumi, Toru Fujita, Takahiro Sasamori, Norihiro Tokitoh, Akiyoshi Yamada, Chihiro Tanaka, Muneyoshi Yamaguchi, Shuntaro Hiradate, and Nobuhiro Hirai. The (oxalato)aluminate complex as an antimicrobial substance protecting the “shiro” of *Tricholoma matsutake* from soil microorganisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **81**, 102-111 (2017). 査読有. 2017年優秀論文賞受賞.
DOI <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1238298>
2. Katsutoshi Nishino, Kaya Matsubara, Chihiro Tanaka, Muneyoshi Yamaguchi, Toru Fujita, Akiyoshi Yamada, and Nobuhiro Hirai. Seasonal change in the content of the (oxalato)aluminate complex, an antimicrobial substance of the shiro of *Tricholoma matsutake*, and the bacterial community structure in the shiro area. *Mushroom Science and Biotechnology*, **25**, 9-16 (2017). 査読有.
3. 西野勝俊, 山口宗義, 藤田 徹, 東 智則, 宜寿次盛, 成松真樹, 山田明義, 平井伸博. 抗菌物質・シュウ酸アルミニウムのマツタケシロにおける普遍的存在. *きのこ学会誌*, **26**, 24-27 (2018). 査読有.
4. 西野勝俊, 久保中央, 福永晃士, 平井伸博. 茶葉および茶畑土壌中のアルミニウム錯体濃度. *茶業研究報告*, **126**, 17-23 (2019). 査読有.
5. Nakao Kubo, Yutaka Mimura, Tomohiro Matsuda, Atsushi J. Nagano, Nobuhiro Hirai, Shigekazu Higashimoto, Hiromi Yoshida, Norihiro Uemura, and Takao Fujii. Classification of tea (*Camellia sinensis*) landraces and cultivars in Kyoto, Japan and other regions, based on simple sequence repeat markers and restriction site-associated DNA sequencing analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **66**, 441-451 (2019). 査読有.
DOI <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0722-6>
6. Muneyoshi Yamaguchi, Maki Narimatsu, Toru Fujita, Masataka Kawai, Hisayasu Kobayashi, Akira Ohta, Akiyoshi Yamada, Norihisa Matsushita, Hitoshi Neda, Tomoko Shimokawa, and Hitoshi Murata. A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. *Mycorrhiza*, **26**, 847-861 (2016). 査読有.
DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-016-0718-z>
7. Kohei Yamamoto, Yosuke Degawa, Yusuke Takashima, Masaki Fukuda, and Akiyoshi Yamada. *Endogone corticioides* sp. Nov. from subalpine conifer forests in Japan and China, and its multi-locus phylogeny. *Mycoscience*, **58**, 23-29 (2017). 査読有.
DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2016.08.001>
8. Kohei Yamamoto, Yosuke Degawa, Yusuke Takashima, Masaki Fukuda, and Akiyoshi Yamada. First detection of *Endogone* ectomycorrhizas in natural oak forests. *Mycorrhiza*, **27**, 295-301 (2017). 査読有.
DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-016-0740-1>
9. Chika Saito, Wakana Ogawa, Hisayasu Kobayashi, Takashi Yamanaka, Masaki Fukuda, and Akiyoshi Yamada. In vitro ectomycorrhization of *Tricholoma matsutake* strains is differentially affected by soil type. *Mycoscience*, **59**, 89-97 (2018). 査読有.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.09.002>
10. Akiyoshi Yamada, Norio Hayakawa, Chika Saito, Yuka Horimai, Hiroki Misawa, Takashi Yamanaka, and Masaki Fukuda. Physiological variation among *Tricholoma matsutake* isolates generated from basidiospores obtained from one basidioma. *Mycoscience*, **60**, 102-110 (2019). 査読有.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.12.001>

〔学会発表〕(計 8 件)

〔図書〕(計 2 件)

山田明義．きのこ - 食べられる菌類，菌根性の食用きのこ (北本勝ひこ・春田伸・丸山潤一・後藤慶一・尾花望・齋藤勝晴編，食と微生物の事典)，朝倉書店，2017．pp. 430-437．

山田明義・遠藤直樹・小川和香奈．外生菌根 (日本菌学会編，驚きの菌ワールド：菌類の知られざる世界)，2017，東海大学出版，pp. 38-39．

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田明義

ローマ字氏名：Yamada, Akiyoshi

所属研究機関名：信州大学学術研究院

部局名：農学系

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：10324237

研究分担者氏名：山口宗義

ローマ字氏名：Yamaguchi, Muneyoshi

所属研究機関名：国立研究開発法人森林研究

部局名：整備機構

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：20353899

研究分担者氏名：服部武文

ローマ字氏名：Hattori, Takefumi

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院社会産業理工学研究部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：60212148

研究分担者氏名：田中千尋

ローマ字氏名：Tanaka, Chihiro

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：60263133

(2)研究協力者

研究協力者氏名：藤田 徹

ローマ字氏名：Fujita, Toru

研究協力者氏名：坂本裕一

ローマ字氏名：Sakamoto, Yuichi

研究協力者氏名：成松眞樹

ローマ字氏名：Narimatsu, Masaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。