

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07808

研究課題名(和文) ヒノキ落枝分解菌の分離培養と特性解明

研究課題名(英文) Isolation and characterization of wood-rotting fungi for logs of Hinoki cypress (*Chamaechyparis obtuse*)

研究代表者

服部 武文 (Hattori, Takefumi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：60212148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒノキ枝を、徳島県内のヒノキ林に749日間設置した。定期的に回収したヒノキ落枝の材、ホロセルロース、リグニンの各密度を測定し、設置前の値と比較した。ここで密度とは、設置前ヒノキ枝の一定体積に占める、回収されたヒノキ枝の材、ホロセルロース、リグニンの各重量である。749日間で、材、ホロセルロース、リグニンの各密度は設置前の87%、74%、94%に変化した。しかし、リグニン密度の変化は統計的に有意ではなかった。腐朽材から、木材腐朽菌と考えられる、*Neantrodieiaceae* (2菌株)、*Microporus* (1菌株)を得た。これらはヒノキ人工林で、ヒノキ落枝を分解する役割を担うと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒノキ人工林は、日本の森林面積の約10%を占める。これまで、樹病防止の観点から、ヒノキ心材部を腐朽する菌類は明らかにされてきた。しかし、ヒノキ人工林の物質循環の中で、ヒノキ落枝を腐朽し、腐植形成の初発段階に携わる菌類については、未報告であった。本研究では、ヒノキ落枝が約2年の腐朽期間において、材密度が減少し、細胞壁の高分子多糖類であるホロセルロースが有意に分解されていくことが示された。これらの腐朽を受けた材から、腐朽に関わると考えられる木材腐朽菌3菌株を明らかにした。日本の森林面積の約10%を占めるヒノキ人工林における、腐植形成の初発段階の機構の解明に繋がる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Each of eighty four logs (c.a. 20 cm in length, c.a. 5-10 cm in diameter) was separately set in a litter bag, that had been set in artificial Hinoki cypress forest in Tokushima prefecture from July 5, 2016 for 749 days. Before the setting, densities of wood, holocellulose and lignin were determined for the original logs and the changes of these were determined for the logs periodically recovered. The densities are defined as the dry weight of the corresponding components in logs recovered, per unit volume of the original logs. During 749 days, densities of wood, holocellulose and lignin were changed to 87%, 74% and 94% of the original values. However, decrease in lignin density was not significant statistically. From these decayed logs, we have identified two strains and one strain of probably white-rot fungi belonging to *Neantrodieiaceae*, and *Microporus*. These fungi probably play an important role in an early period of the logs degradation in Hinoki cypress artificial forest.

研究分野：林産学、森林微生物代謝化学

キーワード：ヒノキ 木材腐朽菌 ホロセルロース リグニン *Chamaechyparis obtuse* *Neantrodieiaceae* *Microporus*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)人工林は、日本の森林面積の約 10%を占めると見積られる。ヒノキ林において、ヒノキ落葉、落枝、倒木、切株は、微生物により分解され、窒素、リン、カリウムなどの元素がヒノキ樹木に再び吸収されその生長に寄与している。

一方、*in vitro* では、ヒノキは高い抗菌作用を示す事が報告されている。例えば、ヒノキ枝および幹心材からのヘキサノール抽出物は、白色腐朽菌カワラタケ、褐色腐朽菌オオウズラタケ、軟腐朽菌 *Trichoderma virens*、カビ菌 *Rhizopus oryzae* の生育阻害効果(最大でオオウズラタケ 50%成長阻害)を示す(Morikawa et al., 2012)。各抽出化合物ごと、各菌に対して生育阻害活性の違いも見いだされている。(Morikawa et al. 2012)

さらに日本に生息するヒノキ科樹木即ち、ヒノキ属、ビャクシン属、ネズコ属、アスナロ属には広く、ヒノキチオールが量の多少はあるが検出されている。本化合物についても、抗菌活性を含む多岐にわたる活性が報告されている(Haluk and Roussel, 2000)。

しかし、ヒノキ人工林に生息し、ヒノキの抗菌物質に耐性を持ちながら分解し、物質循環に寄与している微生物の種類とその腐朽力に関しては、明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、ヒノキ林に生息する木材腐朽菌を分離培養し、特性および機能を解明することを目的とする。ヒノキの抗菌成分に耐性を持ち落枝を腐朽し、土壌をつくる初発反応を司る腐朽菌を分離培養出来れば、日本の森林の約 10%の面積に相当するヒノキ人工林の森林土壌の初発段階を司る菌類に関する、学術的知見が初めて得られる事となる。

3. 研究の方法

(1) 調査地

徳島県阿波市日開谷県有林

(2) ヒノキ枝の採集場所と時期

徳島県県有林鷲敷にて、2015 年末に伐採したヒノキ枝を、2016 年春に回収した。

(3) ヒノキ枝の設置前の処理

ヒノキ枝(直径約 5-10 cm)を所定の長さ(長さ約 20 cm)に切り、60、72 時間乾燥した。

(4) 調査地でのヒノキ落枝の腐朽試験

樹皮よりドリルで直径 1 cm の穴を 3 か所開け、ドリル屑を合して回収した。穴の深さを測定した。以下、全てのドリル屑からは、樹皮を除き使用した。

ドリル屑は、60、72 時間乾燥し、乾燥重量を測定した。ドリル屑は、材密度(ドリルにより除かれた材の単位体積当たり乾燥重量)、ホロセルロース量、リグニン量の測定に用いた。

で用いた材を、メッシュバッグに一本ずつ入れ、都合 84 本を 2016 年 7 月 5 日に徳島県日開谷県有ヒノキ林の林床に設置した。2016 年 11 月 21 日に 27 本、2017 年 7 月 11 日と 2018 年 7 月 24 日に 28 本ずつ回収し、に記載の方法でドリル屑を得た。ドリル屑からに基づき、材密度を算出した。

(5) ホロセルロース、リグニン定量

(4)-、で得たドリル屑をさらに粉碎し、500 μm ついで 250 μm のメッシュを通過した微粉碎精製木粉のみを、ホロセルロース定量、リグニン定量の測定に用いた。

クラフソンリグニン定量の際、硫酸で溶解した糖を、フェノール硫酸法にて定量し、ホロセルロース量を求めた。

定法に基づき、クラフソンリグニンを定量した。

(6) 腐朽菌の分離培養

(4)- で得た各材にドリルで直径 1 cm の穴を 2 か所あけ、合したドリル屑をクリーンベンチ内でフレームにより短時間あぶり、メスで裂いて、あぶられていない内部面を露わにした。

Potato Dextrose Agar (Becton, Dickinson and Company, 39 g), GF ベンレート (100 mg), テトラサイクリン塩酸塩 (50 mg)を 1 L に含有する培地で、で得たドリル屑を 20 で静置培養した。

数回菌糸部分を、上記培地組成の別のシャーレにて培養した。

(7) ITS 領域のクローニング

(6)- で得た表面の菌糸を三角形に Agar と共に切り出し、Agar 部分を更に切断により取り除き、菌糸部分を得た。

菌糸部を Phire Plant Direct PCR Kit (FINZYMES, Finland) の Dilution buffer (20 μ l) に入れ、えつき針で菌糸をつぶし、懸濁液を調製した。その後、常温で遠沈させ、上澄みを得た。

Phire Plant Direct PCR Kit にて、ITS 領域の増幅断片を得た。

1% Agarose S, 0.5 \times TBE にて電気泳動し、増幅断片を精製。

Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen) にて、pCR-Blunt にクローニング。One Shot TOP10 *E. coli* を形質転換し、Zeocin (25 μ g/L) で形質転換 *E. coli* を選抜した。

定法により増幅断片が挿入されたプラスミドを抽出し、シーケンスした。

シーケンスされた塩基配列を、BLASTn で検索することにより相同性が高い配列を得た。

検索により得られた相同性が高い配列と共に、既報で比較された ITS の配列を併せて、近隣結合法により系統樹を作製し、得た菌の科、または、属に関し考察した。

4. 研究成果

(1) 得られた菌について

749 日間ヒノキ林地にヒノキ枝を曝したことにより、Neoantrodiaellaceae, Hymenochaetales (2 菌株)、*Microporus*, Polyporaceae (1 菌株) を得た。

(2) Neoantrodiaellaceae について

得られた菌株が Blastn で最も高い total score を示し、かつ、菌株名が記載されている結果は、以下の通りである。(2019 年 2 月 3 日(日) 検索結果)

Select seq KU726857.1

Diplomitoporus rimosus isolate MG294 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Max score: 1072

Total score: 1072

Query cover: 98%

E value: 0

Identity: 98%

Accession number: KU726857.1

上記に続き、6 位に、以下の結果を得た。

Select seq KT203291.1 Neoantrodiaella gypsea voucher Li 1688 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Max score: 974

Total score: 974

Query cover: 84%

E value: 0.0

Identity: 99%

Accession number: KT203291.1

上記の通り、相同性が高い菌の分類学上の位置について、検討したところ、相同性が高い菌としてヒットした、*Diplomitoporus rimosus* は Ghobad-Nejhad et al., 2010 では、分子系統解析の結果、新たに *Cyanotrampa rimosus* の学名を冠することが提案された。本菌は、これまで、Ethiopia, Iran, USA に、分布が確認されている。

さらに、Ariyawansa et al. 2015 は、*Hymenochaetales* において、*Neoantrodiaella*, *Cyanotrampa*, *Porodontia* and *Fibrificium* を含む Neoantrodiaellaceae を導入した。

一方、相同性が高い菌として、ヒットした、*Neoantrodiaella gypsea* に関しては、吹春ら 2017 は、東京大学千葉演習林より採取し、和名シクイタケを記載している。

従って、この度得られた菌に関し、さらなる同定を行うことは興味深いことと思われる。尚、相同性が高い菌は、白色腐朽菌と既に報告されている。しかしながら、特徴であるリグニン分解のメカニズムに関しては、報告例が見当たらなかった。従って、本菌のリグニン分解機構の解明も必要とされる。

(3) *Microporus*, Polyporaceae (1 菌株) について

得た菌株が Blastn で最も高い total score を示し、かつ、菌株名が記載されている結果は、以下の通りである。(2019 年 2 月 4 日(月) 検索結果)

Select seq KU863045.1 *Microporus vernicipes* voucher ZJ1003DKJ03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Max score: 1129
Total score: 1129
Query cover: 98%
E value: 0.0
Identity: 98%
Accession number: KU863045.1

その他、*M. xanthopus*, *M. affinis*, *M. subaffinis* 他も相同性が高い菌として、ヒットした。

Hattori 2005 では、茨城県内の温帯林において、*M. affinis* はシイ林によく見られるがスギ、ヒノキ林では認められていないと報告されている。また、*M. vernicipes* は、広葉樹林によく見られるが、針葉樹（スギ、ヒノキ林）では認められていないと報告されている。その点に関し、この度ヒノキ腐朽材から単離された菌株が、*Microporus* 属であると強く示唆されている。従って、得た菌を確実に同定できれば、*Microporus* 属の生息林に関し新たな提案ができる可能性もあり、興味深い。

一方、文献検索の結果、*Microporus* 属の菌が白色腐朽菌であるとの記述は有るが、リグニン分解の様相、リグニン分解酵素等機構に関する報告は見つけることは出来なかった。従って、本菌のリグニン分解機構の解明も必要とされる。

(4) 腐朽経過について

材密度の変化

749 日で材密度(Wood density)は腐朽前の 87% (0.45 g/cm³)に減少した。

ホロセルロース密度の変化

749 日でホロセルロース密度 (Holocellulose density) は腐朽前の 74% (0.23 g/cm³)に減少した。設置時間に伴う減少が統計的に認められた。

リグニン密度の変化

749 日でリグニン密度 (lignin density) は腐朽前の 94% (0.09 g/cm³)に変化した。しかしながら、設置時間に伴う変化は統計的に有意ではなかった。

ヒノキ樹木の自然界の分解に関しては、根株心腐病を引き起こす菌の同定 (*Tinctoporellus epimiltinus* に関しては, Kubayashi et al., 2001; *Phlebia brevispora* に関しては, Suhara et al., 2005; *Perenniporia subacida* に関しては, Tabata et al., 2002) に関し報告されている。さらに、日本の森林におけるヒノキ落枝の材密度が、腐朽の進行に伴い、386 kg m⁻³ から 188 kg m⁻³ に渡っている、と報告されている (Sakai et al., 2012)。

しかしながら、腐朽の期間を示し、その期間でヒノキ落枝の腐朽を行っていると考えられる菌類の同定は、我々が知る限りでは未報告と考えられる。

総括すると、得られた菌の同定を更に進めると共に、これらの菌のヒノキ材の腐朽力に関し、さらなる研究が必要とされる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

山下聡、井本朗暢、張西郁男、阿部正範、服部武文：徳島県北部のヒノキ林におけるヒノキ材の分解過程、第 130 回日本森林学会大会、2019 年

服部武文、井本朗暢、張西郁男、阿部正範、山下聡：ヒノキ落枝分解菌の分離培養 (第 2 報)、第 69 回日本木材学会大会、2019 年

山下聡、井本朗暢、張西郁男、藤井良光、阿部正範、服部武文：ヒノキ材の分解過程と分解菌の関係 徳島県のヒノキ林における事例 (予報)、第 129 回日本森林学会大会、2018 年

服部武文、井本朗暢、張西郁男、藤井良光、阿部正範、山下聡：ヒノキ林におけるヒノキ材腐朽過程の観察、第 68 回日本木材学会大会、2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山下 聡

ローマ字氏名：YAMASHITA, Satoshi

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（生物資源産業学域）

職名：講師

研究者番号（8桁）：70450210

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。