

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02232

研究課題名(和文) 微生物群集機能に基づく樹木の材腐朽進展プロセスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of wood decay process of trees based on microbial community function

研究代表者

山田 利博 (Yamada, Toshihiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30332571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：主にナミダタケモドキによるサワラ心材腐朽を事例とし、生立木腐朽の進展と菌類群集の変化との関係解明を試みた。日本産ナミダタケモドキは海外産菌とは異なる隠蔽種であることが明らかとなった。材内における本菌の存在量は腐朽の進行とともに増加した後に減少し、それに伴って他の菌類の種類や量にも変動が認められた。被害侵入部と考えられる根株、被害林および被害林以外の土壌からも本属菌が検出され、感染から進展した腐朽の間における動態が示された。腐朽部では材構成成分としてリグニンの非縮合型構造の減少、抽出成分の減少と質的变化が認められ、腐朽菌との相互作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで知られていなかった生立木腐朽における菌類の動態の詳細をDNAレベルで明らかにした意義は大きいと考えられ、今後の菌類間および被害樹木との相互作用の研究の立ち上げに貢献できる。

社会的にも、腐朽の進行と腐朽菌の動態との関連はグリーンインフラとしての森林林業や都市樹木の管理に適用することが可能である。特に従来型の腐朽診断や対策の参考になる他、DNAを活用した診断技術開発にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：We tried to elucidate the relationship between the progress of the decay of living trees and the change of the fungal community, mainly in the case of the heartrot of *Chamaecyparis pisifera* caused by *Serpula himantioides*.

It has become clear that Japanese *S. himantioides* is a new cryptic species. The abundance of this fungus in the wood increased and then decreased as the heartwood decay progressed, and the variations and amounts of other fungi also fluctuated accordingly. This genus was also detected from soils in both damaged and undamaged forests, and from the damaged butt, showing the dynamics of fungi during infection and the progress of decay.

In decayed wood, the non-condensed structure of lignin decreased, the extracted component decreased and the qualitative change was observed as the wood constituents, suggesting the interaction with the decay fungi.

研究分野：樹木医学

キーワード：腐朽 微生物 群集組成 群集機能 樹木

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生立木の材質腐朽被害は、森林林業および都市樹木のいずれにおいても高齢化が進み、幹の腐朽や根腐れによる木材生産量の減少、また倒木や根部における腐朽の進展による衰退・枯死が増加する傾向にある。そのため、林業経営面の問題のほか、人命や車両・構造物、社会的インフラへの被害を招いており、正確な腐朽診断や的確な対策が求められる。そこで、生態学、樹木医学の両面で樹木腐朽の進展に関する知見の蓄積、腐朽被害の診断において現状だけでなく今後の被害進行を予測する必要性、腐朽被害を予防する必要性がある。

生立木材腐朽の材内での進展拡大については、古典的な分離・培養を基本とした手法で先駆微生物、腐朽菌、後期の雑多な微生物の順に遷移すること、初期の腐朽菌の急激な拡大に内生的な菌類が関与する可能性が示されてきたが、古典的な手法には限界がある。近年、メタゲノミクス手法で分離・培養なしに微生物相を調べる方法が発達してきており、生態学的な関心から枯死木の材腐朽において微生物の遷移自体の研究に利用されているが、材成分の変化との関連についての知見は少ない。さらに、林業や都市樹木といった管理上重要な生立木の腐朽への適用も必要とされる。

2. 研究の目的

生立木の材腐朽被害について、健全部から腐朽への進展に伴う材内菌類群集の変化を調べ、材の腐朽分解の化学的分析と組み合わせて、それらの相互関係を材内において空間的に解析することで、腐朽の進展プロセスを明らかにすることを目的とする。

(1) 腐朽進行に伴う菌類相の遷移を明らかにする

腐朽被害木における菌類群集組成と材成分との相互作用の空間的分布の実態を調べる。また、併せて感染経路となる土壌や根株における菌類群集組成も調べる。それにより、先駆微生物の腐朽進展における役割、腐朽菌の感染経路や材内での拡大過程、内生的な微生物の分布と腐朽進展における意義を明らかにする。

(2) 腐朽進行に伴う木材の成分変化と分解過程を明らかにする

分解対象の材細胞壁構成成分や抽出成分など抗菌的な成分の修飾・分解といった化学的变化を調べ、強度に反映する段階より前の初期腐朽から始まる腐朽進行過程における材質や成分の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

典型的な心材腐朽であるナミダタケモドキを原因菌としたサワラの根株心材腐朽被害を主な対象とし、他にクマ剥ぎ被害を受けたヒノキ辺材腐朽についても菌類相の解析を行った。

(1) ナミダタケモドキの分類学的検討

ナミダタケモドキについては、海外産菌には5つの隠蔽種があることから、日本産菌と海外の既知の5系統との系統関係を明らかにするため分子系統解析を行った。国内3か所から分離されたナミダタケモドキ菌株の28S rDNA領域の一部(LSU)と5.8S rDNAを含むITS全領域(ITS)、 β -チューブリン領域の一部(tub)、熱ショックタンパク質領域の一部(hsp)の塩基配列と海外産ナミダタケモドキの塩基配列データベース登録配列を用いて、最大節約法、最尤法、ベイズ法により系統樹を作成した。

(2) 腐朽の進行と菌類相の変化

腐朽被害程度の異なるサワラ生立木を伐採、解体し、幹下部の腐朽が進んだ部位からその上部の腐朽程度の軽い部位まで一定間隔に材試料を採取し、腐朽程度の指標として材密度を測定した。また、全DNAを抽出、菌ITS領域のアンプリコンシーケンスによる菌類群集組成解析を行った。ヒノキの辺材腐朽についても、材密度測定、菌の分離と菌ITS領域のアンプリコンシーケンスによる菌類群集組成解析を行った。

(3) ナミダタケモドキの種特異的プライマーの開発と絶対定量

ナミダタケモドキのrDNAのITS領域の塩基配列から種特異的プライマーを設計し、ナミダタケモドキ、ナミダダケ(同属)、イダタケ(同科)、その他3種の木材腐朽菌に対して、種特異的プライマーを用いてPCRを行い、その特異性を検討した。

採取した材片や土壌サンプルからゲノムDNAを抽出ナミダタケモドキのrDNAのITS領域の配列を挿入したプラスミドを段階希釈したものから絶対定量のための検量線を作成し、インターカレーター法を用いたリアルタイムPCRによりナミダタケモドキの絶対定量を実施した。

(4) 材構成成分の分析

材構成成分については主にリグニンに着目し、酸不溶性リグニン量測定、アルジトール・アセ

テート法での中性糖分析、アルコール-ベンゼン抽出物量測定を行った。また腐朽後に残存するリグニンに対して、ニトロベンゼン酸化分析を行った

(5) 抽出成分の分析

腐朽材の抽出成分の分析心材部のメタノール抽出物について、HPLC、¹H-NMR および ¹³C-NMR 分析にそれぞれ供した。また、腐朽度の異なる材における抽出成分の定性分析では、HPTLC および ¹H-NMR を用いた。

4. 研究成果

(1) 腐朽原因菌ナミダタケモドキの分類学的検討

DNA を用いた菌類相解析の基礎として、腐朽原因菌ナミダタケモドキの分類学的な位置づけを明らかにすることを試みた。その結果、日本産3菌株は、いずれの方法による系統樹においても、既知の5系統とは独立した1つのクレードを形成したことから、日本産ナミダタケモドキは海外産とは異なる新たな隠蔽種に属するものと考えられた。菌類相の調査での相同性の評価においても考慮が必要である。

(2) 腐朽の進行と菌類相の変化

菌類 DNA 解析では、アンプリコンシーケンスによって菌類の群集組成をみることで、腐朽の進行に伴う菌類の遷移が示された。

サワラ生立木材では被害程度に関わらず、菌類量は腐朽ごく初期や腐朽進行後の材で低く、腐朽の進行、つまり空間的密度変化が顕著な部位で高かった(図2)。特にナミダタケモドキの密度でその傾向が著しく、ナミダタケモドキ以外の菌の比率は腐朽ごく初期や腐朽進行後の材で高くなる傾向があり、腐朽の進行により菌類の優占率が大きく変動した。

サワラ以外の腐朽被害では、ヒノキの辺材腐朽の進展と菌類群集との関係を調査した。クマ剥ぎによる傷害後、時間経過とともに腐朽が進展したが、それに伴い腐朽菌の種類が変化し、また部位による腐朽の進展程度の違いによって腐朽菌の存在頻度が変わることが分かった。

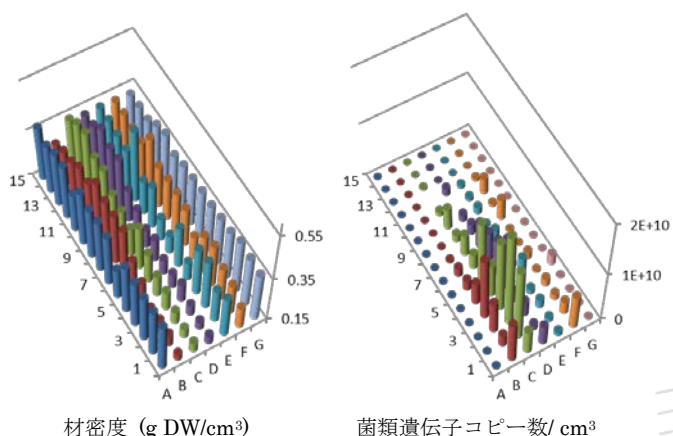


図2 サワラ心材腐朽の進行(材密度)と菌類量の関係
サワラ心材腐朽被害木の柱目断面上の分布を示す。A~G列は放射方向、1~15列は軸方向。

(3) 原因菌の絶対定量と環境から樹体内までの分布

ナミダタケモドキの rDNA ITS 領域の種特異的プライマーを設計し、リアルタイム PCR によりサワラ腐朽材中およびサワラ林の土壌中のナミダタケモドキの絶対定量を行った結果、サワラ腐朽材中のナミダタケモドキの rDNA コピー数は、腐朽が進行した部位に隣接した腐朽程度が低い部位で多かった(図4)。また、サワラ林および被害がみられないヒノキ林のどちらの土

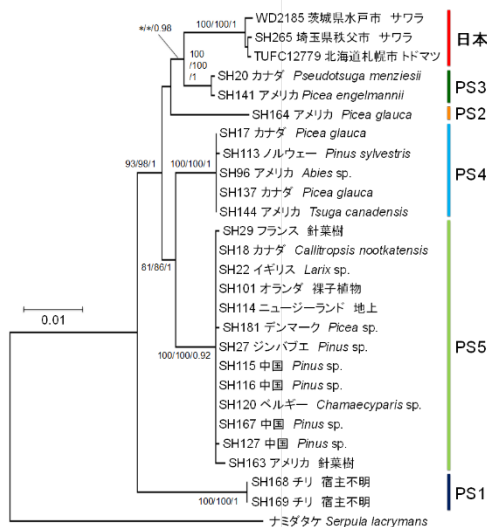


図1 ITS, LSU, tub, hsp の4領域の結合配列に基づくナミダタケモドキの最尤法系統樹

最尤法と最節約法のブートストラップ値のうち80%以上のものと、ベイズ法的事後確率のうちの0.9以上のものを各枝に示した(最尤法/最節約法/ベイズ法)。

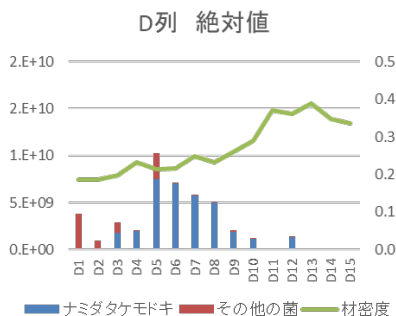


図3 列ごとのナミダタケモドキと他の菌の分布、材密度の関係
横軸が軸方向の位置(図2参照)。

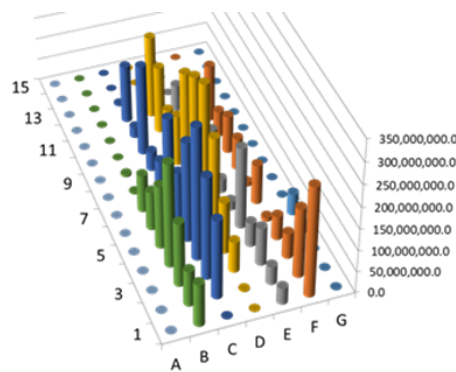


図4 リアルタイム PCR によるナミダタケモドキの絶対定量
位置は図2参照。

壤からも頻度は高くないがナミダタケモドキが検出された。また、サワラ高齢林の土壌では、ナミダタケモドキ被害確認林分で未確認林分に比べ腐朽菌の割合が比較的高く、さらに全菌類中におけるナミダタケモドキの割合も高かった。

ナミダタケモドキによるサワラ被害侵入部と考えられる根株試料からのナミダタケモドキの検出と菌 ITS 領域のアンプリコンシーケンスによる菌類群集組成解析を行った結果、全伐採根から *Serpula* 属菌が検出され、腐朽部は根を通じて土壌と接していたことから、根を通じて感染する可能性が示された。

(4) 腐朽の進行に伴う材構成成分の変化

ナミダタケモドキによるサワラの腐朽が進行するに伴い、これまで被害が確認困難であった腐朽のごく初期と考えられる材の化学成分と、未腐朽材の化学成分に差異が生じているのことに注目して、検討を行った。

その結果、腐朽のごく初期と考えられる試料間に、本課題で行った化学成分分析結果には明確な違いは見いだせなかった(図の試料番号7と9との比較)。但し、全体的として、腐朽の進行に伴うリグニン量、エタノール/ベンゼン抽出物量の増加が確認され、アルジトール・アセテート法で定量される構成糖は少なくなった。これは、原因菌とされるナミダタケモドキによる腐朽の特徴を示している。また腐朽後に残存するリグニンに対して、ニトロベンゼン酸化分析を行ったところ、腐朽の進行と共に、対酸不溶残渣リグニン量あたりのバニリン収率が減少する結果が得られ、腐朽後に残存するリグニンの非縮合型構造が減少していることも示された。

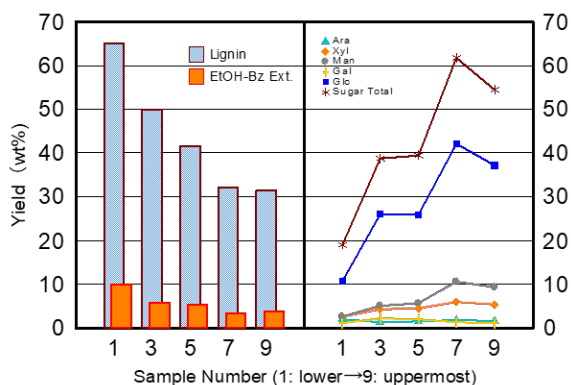


図5 腐朽材試料の化学成分分析(1が最も腐朽が進行した試料で、9が未腐朽相当材)

(5) 腐朽の進行に伴う材抽出成分の変化

抽出成分では、HPLC クロマトグラムにおいて、腐朽材では健全材と比較してピークの数、面積ともに減少し、ナミダタケモドキによって代謝・分解されたものと考えられた(図6)。NMR スペクトルからはサワラ健全心材に存在するサワラニンの腐朽材における残存が示された。

HPTLC 分析の結果、腐朽木心材では抽出物量が多く、極性の高い化合物が多い可能性が示唆され、また、腐朽により心材にのみ代謝・分解された可能性のある化合物が認められた(図7)。NMR 測定の結果、腐朽木心材では低磁場域のピークが減少した一方、高磁場域のピークは相対割合が増加したことから、腐朽によって芳香族化合物が分解され、脂肪族化合物が生成された可能性が考えられた。ナミダタケモドキの侵入に抵抗するため、サワラ心材でのみ生成された化合物が存在する可能性が示唆される。

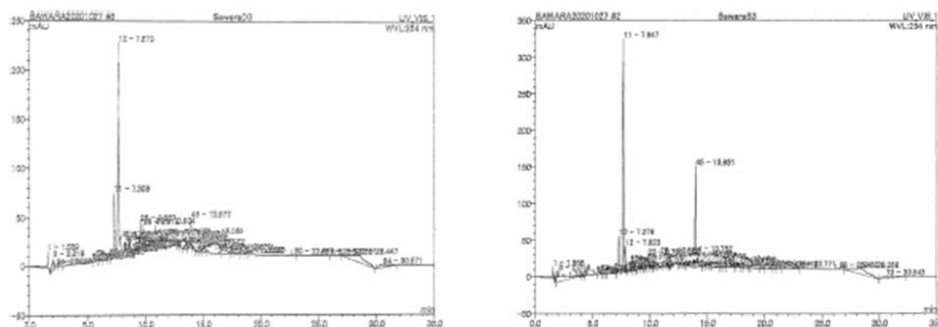


図6 サワラ腐朽材(左)および健全材(右)におけるメタノール抽出物のHPLCクロマトグラム



図7 サワラのメタノール抽出物のHPTLCクロマトグラム

左から1, 2番目:健全木地上高1.1 m辺材; 3, 4番目:健全木地上高1.2 m辺材; 5, 6番目:腐朽木の辺材; 7, 8番目:腐朽木の心材; スケールバー=1cm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山田利博	4. 巻 1627
2. 論文標題 樹木腐朽を客観的に診断する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 山林	6. 最初と最後の頁 10-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 山田利博	4. 巻 27
2. 論文標題 街路樹の機器診断の精度を高めるための課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 TREE DOCTOR	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 山田利博	4. 巻 938
2. 論文標題 これからの樹木の診断と管理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 森林技術	6. 最初と最後の頁 2-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 山田利博	4. 巻 564
2. 論文標題 樹木精密診断技術の進歩と課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 グリーン・エージ	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 原口竜成・平尾聡秀・山田利博	4. 巻 73
2. 論文標題 東京大学秩父演習林におけるナミダタケモドキによる根株心腐の感染経路の検討 - 支障木伐採根の解体による予備的調査結果 -	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 関東森林研究	6. 最初と最後の頁 137-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 橋谷拓武・太田祐子・井道裕史・山下香菜・服部 力・山田利博・柳澤賢一・戸田堅一郎・西岡泰久	4. 巻 24
2. 論文標題 カラマツカタワタケにより腐朽したカラマツ心材の生材状態における曲げ強度特性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 樹木医学研究	6. 最初と最後の頁 168-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18938/treeforesthealth.24.3_168	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 橋谷拓武・太田祐子・井道裕史・山下香菜・服部 力・山田利博・柳澤賢一・戸田堅一郎・西岡泰久	4. 巻 25
2. 論文標題 カラマツカタワタケにより腐朽したカラマツ心材の生材状態における強度特性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 樹木医学研究	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 山下香菜・小林 明・梶野 健・石澤伸彰・徳江 泉・関 敏之・山田利博	4. 巻 25
2. 論文標題 町田市におけるサクラ類街路樹の診断結果の検証 - 腐朽材密度との関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 樹木医学研究	6. 最初と最後の頁 61-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sugimoto T, Sakai Y, Haraguchi R, Hirao T & Yamada T
2. 発表標題 Evaluation of the chemical composition of Chamaecyparis pisifera rotten wood --focusing the changes including the very early stage of rotting--
3. 学会等名 The 20th International Symposium on Wood, Fiber, and Pulping Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umebayashi T, Haraguchi R, Hirao T & Yamada T
2. 発表標題 The spatial distribution of Serpula spp. in the decayed woods of Sawara cypress and the decay development process
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haraguchi R, Hirao T, Yamada T & Umebayashi T
2. 発表標題 Detection and absolute quantification of Serpula himantioides in wood of Chamaecyparis pisifera and soil of C. pisifera plantation by real-time PCR
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口竜成・平尾聡秀・梅林利弘・山田利博
2. 発表標題 サワラ根株心腐被害林における腐朽材中と土壌中の菌類群集組成
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田利博・原口竜成・平尾聡秀
2. 発表標題 森林マイクロバイームによる樹木腐朽病害の検出可能性の検討
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haraguchi R, Hirao T & Yamada T
2. 発表標題 Detection and absolute quantification of <i>Serpula himantoides</i> in decayed wood of <i>Chamaecyparis pisifera</i> by real-time PCR method
3. 学会等名 Symposium of Asian University Forest Consortium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 瞳・松下範久・原口竜成・山田利博・福田健二
2. 発表標題 サワラから分離されたナミダタケモドキの分子系統学的位置
3. 学会等名 第23回樹木医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉元倫子・酒井佳美・原口竜成・平尾聡秀・山田利博
2. 発表標題 ナミダタケモドキによるサワラ材腐朽初期における材成分の変化
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 瞳・松下範久・原口竜成・山田利博・福田健二
2. 発表標題 日本で発見されたナミダタケモドキの新たな隠蔽種
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口竜成・平尾聡秀・山田利博
2. 発表標題 サワラ腐朽材中および土壌中のナミダタケモドキの検出および絶対定量
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋尚也・高野 昶・根津郁実・石栗 太・横田信三・山田利博
2. 発表標題 サワラ腐朽材の抽出成分の分析
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口竜成・平尾聡秀・山田利博
2. 発表標題 サワラ高齡級林分における溝腐の発生状況と患部の菌類相の解析
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口竜成・平尾聡秀・山田利博
2. 発表標題 東京大学秩父演習林におけるナミダタケモドキによる根株心腐の感染経路の検討 - 支障木伐採根の解体による予備的調査結果 -
3. 学会等名 関東森林学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戴 健平・原口竜成・平尾聡秀・山田利博
2. 発表標題 クマ剥ぎによるヒノキ被害部の腐朽程度と菌類組成
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福田 健二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 210
3. 書名 樹木医学入門	

〔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
研究 分担者	松下 範久 (Matsushita Norihisa) (00282567)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	杉元 倫子 (Sugimoto Tomoko) (20353732)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	横田 信三 (Yokota Shinso) (60210613)	宇都宮大学・農学部・教授 (12201)	
研究分担者	平尾 聡秀 (Hirao Toshihide) (90598210)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・講師 (12601)	

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