

令和元年6月14日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18596

研究課題名(和文)「エサの喰い方」の多様化から見た木材腐朽性キノコ類の進化の解明

研究課題名(英文) Study of evolution of wood decay macro-fungi focusing on their diversity of wood decomposing ability.

研究代表者

早乙女 梢 (SOTOME, Kozue)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：90611806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究により、木材腐朽性きのこ類(担子菌類)の進化と多様化には、木材分解という「エサの喰い方」が関与している可能性が示唆されている。本研究では、白色腐朽菌の進化を理解するステップとして、タマチョレイタケ科の分子系統関係を明らかにし、また、生理学的・組織学的な特徴から材分解に関わる特性の多様性を検討した。本研究の結果、タマチョレイタケ科菌類では、木材腐朽に関する特性は、菌種や菌株よりも樹種の性質に影響されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材腐朽菌のうち、難分解性の木材成分であるリグニンを分解する菌類は白色腐朽菌と呼ばれる。本菌群は他の微生物が持たない機能を有する生物であるが故に、様々な分野での応用利用が期待される。本研究で行った分子系統関係の解明により、応用利用性が高い菌類である白色腐朽菌を含むタマチョレイタケ科の新規種が検出された他、既知の属の見直しに繋がる新たな知見が得られた。本研究では、これらの菌類の木材分解に関わる特性を多面的に検討し、酵素活性や木材分解パターンを明らかにした。これらの特性は本菌群の系統や進化の理解だけでなく、本菌群の利活用の際の重要な基本情報としても有用である。

研究成果の概要(英文)：Recent studies on wood decaying fungi (Basidiomycota) suggested that characteristics of the wood decomposing would have affect their evolution and diversity. Present study focusing on Polyporaceae investigated their detailed phylogenetic relationships and decay characteristics by physiology and anatomical techniques as a next step for understating evolution of white wood decaying fungi. As a result of this study, it was suggested that characteristics of the wood decomposing of Polyporaceae were more affected by characteristics on species of trees as substrate than species and strain of fungi.

研究分野：生物多様性・分類

キーワード：白色腐朽菌 きのこ 木材分解 分子系統解析

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

1. 研究開始当初の背景

「きのこ」と呼ばれる担子菌類の分子系統学的検討の結果、木材腐朽菌では、従来、軽視されてきた腐朽型（主にセルロース・ヘミセルロースのみを分解する褐色腐朽とリグニン分解能を持つ白色腐朽とに大別される）等が目や科の高次分類群を規定する上で重要であることが明らかになった。真菌類31種のゲノム情報による解析の結果、白色腐朽菌は進化の過程でリグニン分解酵素であるペルオキシダーゼ遺伝子のコピー数が増加し、一方、褐色腐朽菌では上記遺伝子が欠落したことが示された。白色腐朽は広葉樹、褐色腐朽は針葉樹に対する基質嗜好性を大まかに反映していることから、木材腐朽性きのこ類の進化と多様化には、木材分解という「エサの喰い方」が密接に関与していると考えられる。

担子菌類タマチョレイタケ目 (Polyporales) では、リグニン分解酵素遺伝子のコピー数や酵素構造が種によって異なる事が示されている。これまでは、腐朽材の見た目から容易に判別可能な白色/褐色という大まかな腐朽型が着目されてきたが、実際には、白色腐朽の中にも、リグニンを選択的に分解する「選択的褐色腐朽」や孔状に腐朽する「白色孔腐れ」等、様々な腐朽タイプが含まれている。このことから、白色腐朽菌の進化を理解する次のステップとして、実際に生産される木材分解酵素種や木材組織の分解様式など、生理学的・組織学的な特徴に着目し、材分解の多様性を明らかにすることが不可欠と考えられるが、木材腐朽性担子菌における基礎研究は遅れており、種多様性や樹種嗜好性等は十分に検討されていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、下記を実施し、(1)と(2)で得た結果より「エサの喰い方」の多様化のメカニズム(原動力)を考察することを目的とした。

(1) 白色腐朽菌種で構成されるタマチョレイタケ科を材料とし、未記載種・未検討種を含めた分子系統解析を行う。

(2) 各種の生態情報や菌株を用いた室内実験に基づく木材分解特性の特徴づけを行う。

特に、(2)では、文献や野外採集にて、樹種嗜好性などの自然環境下での腐朽特性に関する特性を調査し、また、リグニン分解酵素生産酵素種および酵素活性の調査、そして、腐朽試験と腐朽材の組織変化による分解パターン解明を室内実験として実施した。

3. 研究の方法

(1) タマチョレイタケ科の分子系統関係の解明

国内を中心にタマチョレイタケ科菌種の採集を行い、子実体を収集すると共に、子実体あるいは腐朽材から菌株の確立を行った。国内に分布していない菌種については、海外(アメリカ・オランダ)の菌株保存機関より入手した。上記より得られた標本(子実体)あるいは培養菌体からDNAを抽出し、核リボソームRNAのLSU領域およびITS領域、RPB2領域を中心にDNA塩基配列を決定した。分子系統樹の作成は最大節約法(PAUPもしくはMEGA)、ベイズ法(MrBayes)、最尤法(MEGA)を用いた。なお、菌種の同定は、形態的特徴に基づき実施した。新規分類群の可能性から菌名を同定できない種や属については、詳細な形態観察と培養性状に加え、海外の標本庫から取り寄せた海外産近縁種との比較に基づき、更なる分類学的検証を実施した。

(2) タマチョレイタケ科菌種の木材分解特性の調査

自然環境下での木材分解に関する特性調査

(1)で実施した野外調査の中で、各菌種の木材分解に関する生態的情報を収集した。野外での観察では、基質樹種、腐朽部(心材/辺材)、材の腐朽度などに主に着目した。また、文献を利用し、本菌群が基質として利用可能な樹種や分解特性等を調査した。

リグニン分解酵素種の生産能と活性調査

木材分解に関わる酵素として、リグニン分解酵素(ラッカーゼ、マンガンペルオキシダーゼ)およびリグニンペルオキシダーゼを対象とした。リグニン分解酵素活性測定では、前培養として、麦芽寒天培地で培養した菌体を高栄養液体培地に接種し、3日間、振とう培養した。その後、前培養した菌体をリグニン分解酵素生産のための液体培地に移植し、25℃で静置培養し、その培養液を遠心分離した上澄みを粗酵素液とした。各リグニン分解酵素

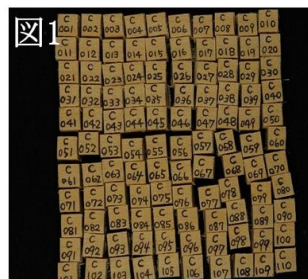


図1. 作成した角材

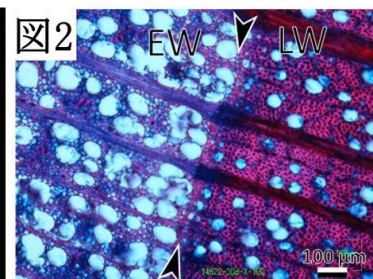


図2. 埋込み後30日目のブナ材 (*Ganoderma tsunodaе*)。EW: 早材, LW: 晩材, 矢尻間は年輪を表す

(ラッカーゼ, マンガンペルオキシダーゼおよびリグニンペルオキシダーゼ)は菌体接種後, 3日間毎に28日もしくは30日に渡って活性を計測した。それぞれの活性測定には, 基質として, ABTS, Mn³⁺およびベラトリルアルコールを利用した。

4. 研究成果

(1) タマチョレイタケ科の分子系統関係の解明

国内および海外産のタマチョレイタケ科を用い3遺伝子領域に基づく分子系統解析を実施し, 系統関係を明らかにすることができた(図3)。また, 得られた標本の形態観察の特徴を詳細に検討した結果, 一部の系統群では, 傘表面の菌糸構造により特徴づけが可能であることが明らかとなり, 属レベルの分類形質として, 有用であることも明らかとなった。本研究に供試した菌種には系統のおよび形態的に既知種と一致せず, 新規分類群であると考えられるものや日本新産種も含まれた。これらのうち, 小笠原産の1菌種を新種とし, また, それ以外については, 現在, 論文を作成中である。また, 本研究で明らかとなった新たな分類形質による既知属の再定義や新属設立の発表準備も進めており, 種名や属名の決定に努めている。

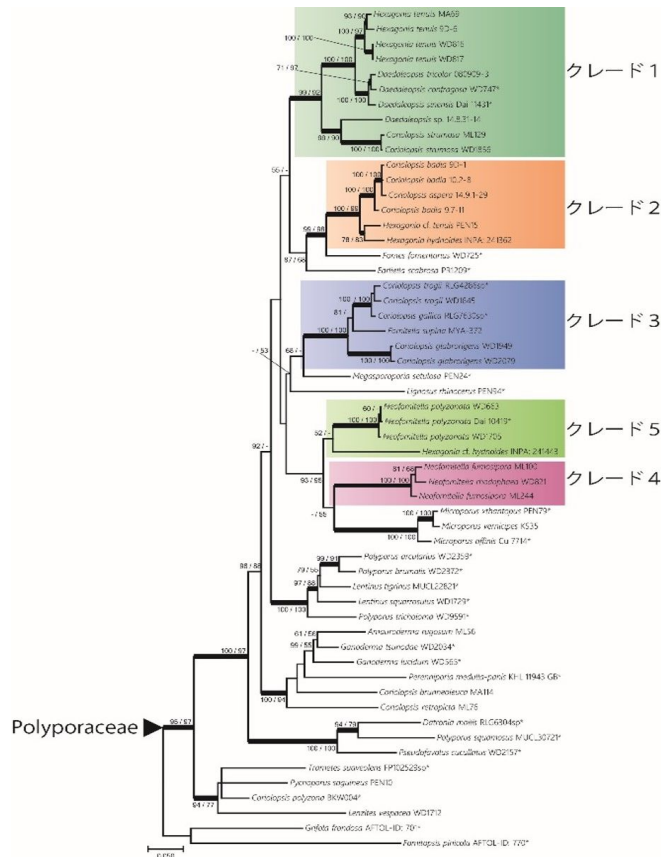


図3. ITS, nrLSUおよびRPB2領域に基づく最尤法系統樹。

22属45種56サンプルを使用した。枝状の数値はブートストラップ値 (ML/MP) を示す。太線の枝はブートストラップ値がML/MP共に70以上の枝を表す。系統樹上のサンプル番号の*は GenBankから引用した配列を表す。

(2) タマチョレイタケ科菌種の木材分解特性の調査

自然環境下での木材腐朽特性を野外観察や文献で調査し, タマチョレイタケ科菌種の各種の基質となる樹種や腐朽部を把握した。次に(1)で明らかにした分子系統関係と基質とする樹種を考慮し, タマチョレイタケ科11属19種35菌株を選抜した。これらの菌株のリグニン分解酵素の生産性の有無および活性値を調査した結果, リグニンペルオキシダーゼは, 1属1種1株のみで活性が認められ, また, ラッカーゼおよびマンガンペルオキシダーゼ活性は全ての菌株で確認された。ラッカーゼおよびマンガンペルオキシダーゼの活性値の高さは同種であっても株毎に異なっているものがあった(図4)。

リグニン分解酵素活性を調査した菌株を主に使用し, 重量減少率を調査した結果, これらの菌株は埋め込み後, 60日目のブナ木材片では, 重量減少率の平均値が約26~42%と顕著に分解が進む菌株と平均値が約5%であり, ほとんど木材を分解しない菌株に二分した。埋め込み後120日目のブナ木材においても同様の傾向が確認された。一方, 埋め込み後60日目のスダジイ材片については1種1株を除き, いずれも菌株も重量減少率は6%を示し腐朽は進行していなかった。また, 埋め込み後120日目のスダジイ材片では, いずれも重量減少率は高まるものの, 埋め込み後60日後と同様の傾向であった。各樹種の埋め込み後120日目の重量減少率の分散分析を行った結果, いずれの樹種においても菌株の違いが重量減少率に影響していることが示され, t検定の結果では, 同一菌株であっても, ブナとスダジイの材片に対する重量

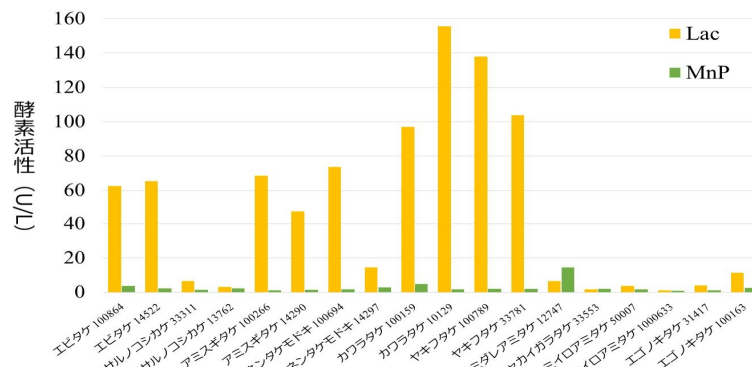


図4. リグニン分解酵素の活性値

減少率には、有意差が認められた(図5)。

腐朽過程における木材組織の変化を観察した結果、腐朽過程の木材組織の変化を観察した結果、両樹種ともに、まず、最初に木部繊維の二次壁が分解されたが、ブナ材では、その後に木部繊維および軸方向柔組織の壁孔拡大と放射柔組織における細胞間層の分解と壁孔拡大が同調的に進行した。一方、スダジイ材では、木部繊維と軸方向柔組織の壁孔の拡大後に、放射柔組織における細胞間層の分解と壁孔拡大が起きた。上記の木材組織の変化は、ブナ材では重量減少率が高い菌株ほど早期に開始する者が多く、一方、スダジイ材では、菌株の重量減少率の差に関わらず埋め込み後 30-60 日目に開始した。

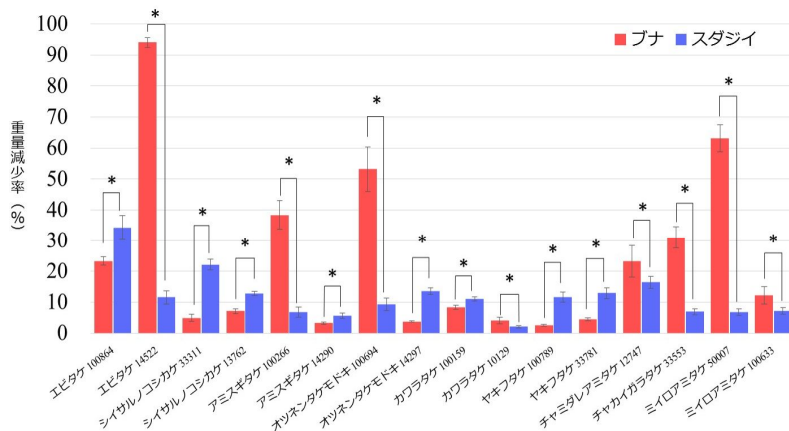


図5. ブナとスダジイの重量減少率の比較(埋込み後120日目)

(3) まとめ

本研究では、「エサ」である木材の喰い方の多様化の解明を多角的手法にて試みたが、タマチョレイタケ科に属する白色腐朽菌の酵素生産能は菌株によって異なり、系統群や菌種との相関がみられなかった。また、室内実験の結果から、重量減少率や木材組織の分解パターンなどの木材腐朽に関する特性は、菌種や菌株よりも樹種の性質に影響されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Sotome, K., Hattori, T., Maekawa, N. and Matozaki, T.: *Melanoderma boninense*, a new species of *Melanoderma* (Polyporales, Agaricomycota) from the Bonin Islands in Japan. *Mycoscience*, 査読有 (in press, online)
doi: 10.1016/j.myc.2019.02.006

[学会発表](計10件)

的崎利規、服部力、中桐昭、前川二太郎、遠藤直樹、早乙女梢、リグニンの分解時期に着目したタマチョレイタケ科菌種による腐朽材の経時変化、日本きのこ学会第22回大会、2018

的崎利規、服部力、中桐昭、前川二太郎、遠藤直樹、早乙女梢、*Corioloropsis aspera* と類似種の分類学的研究、日本菌学会第62回大会、2018

早乙女梢、桑原知弘、的崎利規、服部力、前川二太郎、中桐昭、遠藤直樹、日本新産の *Polyporus ciliatus* について(新称: エゾノアミスギタケ タマチョレイタケ目タマチョレイタケ科)、日本菌学会第62回大会、2018

武部祐也、高野麻理子、前川二太郎、中桐昭、早乙女梢: 色素の脱色を利用した白色腐朽菌のリグニン分解酵素類の分析、日本きのこ学会第21回大会、2017

早乙女梢、弓岡祐輔、前川二太郎、中桐昭、服部力、小笠原産 *Melanoderma* 属未同定種1種の分類学的検討、環境微生物系学会合同大会 2017、2017

的崎利規、服部力、中桐昭、前川二太郎、早乙女梢、ウラギンタケの分類学的研究、環境微生物系学会合同大会 2017、2017

Takebe, Y., Takano, M., Maekawa, N., Nakagiri, A., Sotome K.: Analysis of the lignin degrading enzymes of white rot fungi using the decolorization of dyes, The 13th International Joint Symposium between Korea and Japan (AFELiSA 2016), 2016

Matozaki, T., Hattori, T., Maekawa, N., Nakagiri, A., Lee, S.S., Sotome, K.: Molecular phylogeny of *Corioloropsis* and its allied genera based on three genetic regions, The 13th International Joint Symposium between Korea and Japan (AFELiSA 2016), 2016

的崎利規、服部力、前川二太郎、中桐昭・Lee SS、早乙女梢、核の3 遺伝子領域に基づく *Corioloopsis* 属および類似属の分子系統関係について、日本菌学会第 60 回大会、2016

的崎利規、服部力、前川二太郎、中桐昭、太田祐子、早乙女梢、*Corioloopsis* 属と類似属の分子系統関係について、日本菌学会第 59 回大会、2015

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。