

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440198

研究課題名(和文) 積雪下でのリグニン分解活性を備えたリター分解菌類の分子系統および生態生理

研究課題名(英文) Phylogeny and ecophysiology of fungi possessing ligninolytic activity under snow cover.

研究代表者

宮本 敏澄 (MIYAMOTO, Toshizumi)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：00343012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：積雪下で分解されつつあるリターよりリグニン分解能をもつ菌類を分離し、帰属する分類群やその生態、リグニン分解酵素の同定と温度特性を調べた。さらに積雪下のリター分解過程でのリグニン分解の正確な定量技術の検証を行なった。その結果、積雪下でリグニン分解に関わると考えられる菌類は多様な分類群に属する菌類により構成され、多様な植物種の落葉に生息していた。リグニン分解酵素については検討した5菌株のいずれにおいても、4℃で活性のあるLac、LiP、MnPが認められた。また、新たなリグニン定量法により積雪下のリグニン分解は従来考えられていたよりも速い速度で進行することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We isolated litter-decomposing fungi capable of producing active extracellular phenoloxidases at 0 °C from decomposing litter under snow cover in the forests. Molecular phylogenetic analysis and identification of extracellular enzymes of these fungi were conducted. It was revealed that the fungi involved in lignin decomposition under snow cover were consisted of various taxonomic groups inhabiting in litter of various plant species. These fungi were isolated from beginning of snow cover period to snow melting season. Lac, LiP, and MnP active at 4 °C were produced from the mycelia of these fungi. A new method to determine lignin content of decomposing leaf litter was also developed. Loss of lignin in litter during the snow cover period was monitored by the new method. Lignin was lost at higher rate than previously reported.

研究分野：菌類生態学

キーワード：積雪下 落葉 分解 菌類 リグニン 分子系統 酵素

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 積雪期間には低温のため土壌微生物の活性は低下すると考えられてきた。ところが、積雪下でのリター分解や CO<sub>2</sub> の放出が測定され、分解者の活性が積雪下でも高いことが明らかにされてきている。これは、断熱材として外気温を遮断するのに十分な積雪深があれば雪の下の地表面は凍結せずにはほぼ 0 °C で湿潤な状態が維持されるため、こうした条件でも分解活動を行う菌類が存在することを示唆している。

(2) 落葉の主要成分の一つであるリグニンは難分解性の化合物であり、分解しやすい他の成分（セルロースやヘミセルロース）の分解を妨げる。このためリグニンが分解されることでリターの分解は大きく進むこととなる。北海道の積雪下から採集したリターから分離された菌類は 0 °C でもリグニン分解酵素（フェノールオキシダーゼ）を産生することが申請者らの研究で初めて確認され、積雪下でのリグニン分解によりリター分解に大きく貢献している可能性が示された。また、冬季積雪下、0°C においてもミズナラ落葉の分解が進み、クラソン法によって硫酸不溶性残渣として定量される「リグニン」量の減少が観察された。しかしながら、木材中のリグニンの定量に古くから用いられているクラソン法を、共存成分が異なる様々な種類の植物体の特定の組織、あるいはその分解物に対して広く適用することについては、批判的な議論が多く、リター分解過程において、リグニン量の変化を妥当な根拠に基づいて、議論している例は少ない。そのため、リター分解にともなうリグニンの分解について明らかにするためにはクラソン法などの欠点を克服したリグニン量の推定方法について検討する必要がある。

(3) 積雪下でのリグニン分解に関わる菌類はこれまで知られている雪のない環境で活動する菌類とは異なり、独特な分類群に属し、低温環境に適応した生態、生理特性を有する菌類である可能性がある。しかし、これまでに積雪下のリターから採集され、リグニン分解酵素（フェノールオキシダーゼ）を産生することが確認されたのは北海道のミズナラ落葉から採集された事例のみである。こうした菌類は積雪地域に広く分布するのか、ミズナラの落葉以外のリターにも生息するのか、など積雪下でのリター分解過程における生態とともに、どのような分類群に属する菌類なのかについて明らかにする必要がある。さらに、こうした菌類は、0°C という特殊な環境下においてどのようにリグニン分解を達成しているのだろうか。一般にリグニンの分解には、ラッカーゼやマンガンペルオキシダーゼなど、いくつかの酵素が単独、もしくは複合的に関与することが知られている。また、それぞれの分解酵素は多数のアイソザイム

を持ち、その生産は培養条件や基質に大きく影響を受けることも知られている。低温下でリグニン分解を行なう菌類はこれまで知られてきたリグニン分解菌とは異なり、低温に適応した酵素系を持つ可能性がある。こうした菌類の生物学的戦略を解明するためにも酵素系の詳細を明らかにしてゆく必要がある。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では北海道と本州（長野県）の森林において、複数の植物種のリターから得られた、「積雪下でリグニン分解に関わる菌類群」について分子系統学的な位置を解明する。また、積雪期間中のリター分解過程においてどのタイミングでこうした菌類が出現するのかについて明らかにする。

(2) こうした菌類の生物学的戦略を解明するために、低温条件と室温条件におけるリグニン分解酵素の同定と比較、力価評価を行う。

(3) 本研究では、リグニンの構造に着目し、葉のリグニン含有量を従来法よりも妥当な根拠に基づいて見積もる方法を開発することを第一の目的とした。次に、その方法を用いて積雪下でのリグニン分解の進行を、定性・定量的に実証することを第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 北海道雨竜郡北海道大学雨龍研究林と長野県菅平において、5月の融雪期に積雪下の地表から落葉（ミズナラ、カバノキ属 2 種、カラマツ、ササ、モミ属 2 種、アカエゾマツ、アカマツ）を収集した。これらの落葉について広葉樹は直径 2mm、針葉樹は長さ 3cm の葉片に切り取り、表面殺菌の後に MA 培地上に設置し、5°C の培養条件で伸長した菌糸を分離した。得られた分離菌株を菌叢形態によりグループ分けした後、代表菌株（合計 170 株）による 0°C におけるプレート培地上でのリグニン分解酵素（フェノールオキシダーゼ）の産生能を調べ、rDNA の 5.8s を含む ITS 領域の塩基配列により 98% の相同性を閾値として操作的分類群 (OTU) に区分した。その結果、フェノールオキシダーゼの産生能が認められた 36 の OTU について GenBank のデータベースから帰属する分類群の推定を試みた。

(2) 0°C でフェノールオキシダーゼの産生能を備えた菌類は積雪下でのリター分解過程のどの時期に出現するのか明らかにするために、北海道雨竜郡北海道大学雨龍研究林において調査を行った。2013 年 11 月（積雪開始の直前）にミズナラ落葉を封入したリターバッグを設置した。2013 年 12 月（積雪開始から 1 ヶ月後、積雪深 70cm）と 2014 年 5 月（積雪開始から約 6 ヶ月後、積雪深 80cm）にリターバッグを各時期に 5 個ずつ回収した。1 枚

の落葉から約8カ所ずつ直径2mmの葉片を切り取り、合計100葉片を表面殺菌後5°C条件のMA培地上で2ヶ月間培養し、菌の分離を行った。菌叢形態からグループ分けした後に菌体から抽出したDNAよりrDNAの5.8sを含むITS領域の塩基配列を解析した後、塩基配列が同一性が98%の閾値でOTUに分けた。

(3) フェノールオキシダーゼの産生能が認められたOTUのなかから、子のう菌を4菌株、担子菌を1菌株、代表として選択し、それぞれの室温、低温下における分泌酵素活性について検討した。スラント培養物からPDA培地に菌糸を接種し、23°Cで菌糸が蔓延するまで30日間、前培養を行った。次いでPD培地に植え継ぎを行った後、23もしくは4°C条件下で45日間培養を行った。得られた培養物から菌体を除き、培養液に含まれる菌体外酵素活性を評価した。対象とした酵素はラッカーゼ(Lac)、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)であり、それぞれABTS法、ペラトリルアルコール法、Mn(III)-酒石酸錯体の定量を用いた。

(4) 夏季にミズナラ緑葉を採取した。また、秋季に新鮮落葉を採取した。緑葉・落葉は風乾後、冷暗所に保存した。本研究で積雪下のリター分解にともなうリグニンの分解量の定量には以下のように2009年から2010年に行なった先行研究で用いて、保存されていたサンプルを用いた。風乾落葉をリターバック(20袋)につめ、積雪期直前の10月下旬に北海道雨竜郡北海道大学雨龍研究林の林床に設置し、落葉分解の進行度が異なる時期、すなわち2009年12月中旬、2010年3月下旬、同6月上旬、同7月下旬、同10月下旬に4袋ずつ回収した。回収した落葉は風乾後、冷暗所に保存した。採取ならびに回収した緑葉・落葉は、全重量ならびにリグニン量を測定した。リグニン量については、従来法であるクラークソン法、アセチルブロミド法に加え、本研究で開発した手法(以下、改良法)でも定量した。すなわち、メトキシ基ならびにニトロベンゼン酸化生成物の定量値からリグニン量を計算する手法である。

#### 4. 研究成果

(1) 調査を行なった北海道と長野県のいずれにおいても、また、分離を試みた落葉の植物種全てより0°Cでフェノールオキシダーゼの産生能を有する菌が認められた。得られた菌の36のOTUのなかで子のう菌と担子菌のOTU数はそれぞれ23、13で子のう菌が比較的多く認められた。子のう菌は全てチャワタケ亜門に属し18がズキンタケ綱、次いでクロイボタケ綱3、フンタマカビ綱1、不明1であった。ズキンタケ綱のうちビョウタケ目に属するものが最も多く14、次いでリティズマ目が3であった。担子菌は全てハラタケ亜

門、ハラタケ綱に属し、ハラタケ目が8、アンズタケ目が4、アテリア目が1、サルノコシカケ目が1であった。これらの結果から0°Cでフェノールオキシダーゼの産生能を備え、積雪下のリター中のリグニン分解に関与すると考えられる菌類は、日本の北海道と本州中部の積雪地域の多様な植物種の落葉に出現し、子のう菌類から担子菌類にかけて多様な分類群に所属する菌類によって構成されることが明らかになった。

(2) 積雪初期と融雪期に出現したOTUの数はそれぞれ33、35で大きな変化は無かった。しかし、菌類群集の組成は大きくなった。そのなかでリグニン分解能を備えると推定された菌類のOTU数は、積雪初期と融雪期で等しかったが、組成はやや異なった。リグニン分解能を備えると推定された菌類の出現頻度の合計は積雪初期と融雪期に20%から40%へ増加した。積雪初期と約半年後の融雪期に出現した菌類群集の組成は大きく異なったことから、積雪下の環境においてリター分解に関わる菌類群集は変化すると考えられるが、リグニン分解能を備えた菌類群は積雪初期から落葉に出現し、積雪期の間に種組成は変化しつつも生息範囲を拡大するものと推察された。

(3) 検討した5菌株のいずれにおいても、4°Cならびに23°Cの両条件でLac、LiP、MnP全ての活性が認められた。このことは、積雪下のリグニン分解においても、既知のリグニン分解系酵素が強く関与していることを示唆している。一方、いずれの株も4°C条件下では23°C条件に比べ生育量の低下が見られた。酵素活性についても、多くの場合において23°C培養物に高い傾向が認められた。

(4) メトキシ基はリグニンに特徴的な官能基であり、一部のヘミセルロースや抽出成分にも含まれるが、リグニン由来のものに比べて寄与率は極めて小さい。他方、アルカリ性ニトロベンゼン酸化生成物はリグニンの非縮合型構造から生じるが、リグニンの*p*-ヒドロキシフェニル核(H核)、グアイアシル核(G核)、シリギル核(S核)の比に関する重要な情報を与える。ニトロベンゼン酸化生成物におけるH核、G核、S核由来の芳香族アルデヒドと芳香族酸の収量の和をそれぞれ $P_H$ 、 $P_G$ 、 $P_S$  (mol/g sample)とし、それぞれの元となるリグニンのフェニルプロパン構造単位(単位間結合は $\beta$ -0-4構造で代表させる)のユニット分子量を166、196、226 (g/mol)とすると、その平均値 $MM_L$  (g/mol)は、 $MM_L = (166P_H + 196P_G + 226P_S) / (P_H + P_G + P_S)$ で表される。次に、サンプル1gあたりのメトキシ基の定量値を $X_{MeO}$  (mol/g sample)とすると、サンプル1gに含まれるリグニンのフェニルプロパン単位の数 $N_{PPU}$  (mol)は、 $N_{PPU} = X_{MeO} (P_H + P_G + P_S) / (P_G + 2P_S)$

と表すことができる。リグニン含有率 LC (% of sample) は、(1) 式と (2) 式から、  

$$LC = 100N_{\text{ppT}}MM_L$$

$$= 100X_{\text{MeO}}(166P_H+196P_G+226P_S) / (P_G+2P_S)$$
と計算できる。

まず、緑葉サンプルに関し3つの方法でリグニンを定量した結果を示す(図1)。抽出処理前の緑葉の重量ベースで比較したところ、改良法では、従来法とは異なり、溶媒抽出による影響をあまり受けず、10.3~12.3%の範囲で安定した定量結果が得られた。

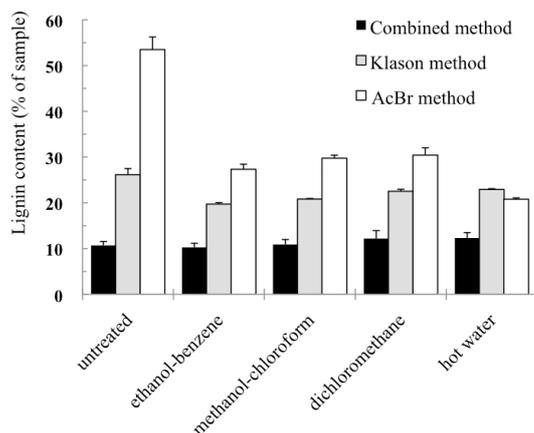


図1. 3つの異なる方法によるリグニンの定量値

次に、この改良法を用いて野外での落葉分解過程を追跡した(図2)。落葉全体の重量は全期間を通じて着実に減少しており、冬季積雪下の非凍結条件(〜0℃)においても落葉分解菌の活動により落葉の分解が進行していることがわかる。また、リグニン含有量について、クラソン法では特に初期の減少傾向が明確でなかったが、改良法では全体を通じてリグニンの減少傾向が明確であり、リグニンの生分解が冬季積雪下においても、従来考えられていた以上に進行していることがわかる。さらに、落葉全体の重量減少の進行とリグニンの分解挙動とが、どのサンプリング時期でもほぼ一致したことから、ミズナラ落葉のリグニンは他の構成成分と比べて特に難分解性であるとは言えないことが示唆された。

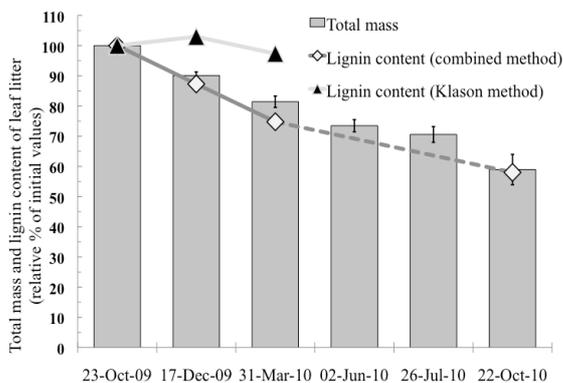


図2. 野外分解実験における落葉残渣の全体重量ならびにリグニン量の推移

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

① 宮本敏澄、積雪初期と融雪期のリター分解菌群集の比較、日本菌学会第59回大会講演要旨集、査読無し、2015、76

② 幸田圭一、川口 新、宮本敏澄、浦木康光、ミズナラ落葉の冬季生分解過程におけるリグニンの挙動、第59回リグニン討論会講演集、査読無し、2014、10-13

[学会発表] (計 2件)

① 宮本敏澄、積雪初期と融雪期のリター分解菌群集の比較、日本菌学会第59回大会、2015年5月16日~5月17日、那覇市ぶんかテンブス館(沖縄県那覇市)

② 幸田圭一、川口 新、宮本敏澄、浦木康光、ミズナラ落葉の冬季生分解過程におけるリグニンの挙動、リグニン討論会、2014年9月11日、福井工業大学(福井県福井市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 敏澄 (MIYAMOTO, Toshizumi)  
 北海道大学・大学院農学研究院・講師  
 研究者番号：00343012

(2) 研究分担者

幸田 圭一 (KODA, Keiichi)

北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号：80322840

重富 顕吾 (SHIGETOMI, Kengo)  
北海道大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：20547202

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：