

課題名	RF-086 葉圏菌類の多様性プロファイルに基づく環境変動評価・予測手法の開発		
課題代表者名	升屋勇人（独立行政法人森林総合研究所森林微生物研究領域森林病理研究室）		
研究期間	平成20-21年度	合計予算額	17,818千円（うち21年度 8,809千円） ※予算額は、間接経費を含む。
研究体制	<p>（1）葉圏菌類相の多様性プロファイルの作成とそれに基づく環境変動評価・予測手法の開発（独法森林総合研究所）</p> <p>（2）葉圏菌類の機能評価（京都大学）</p>		
研究概要	<p>1. 序</p> <p>生物多様性評価に関する研究の多くは昆虫を含む動物、植物で行なわれており、世界各地で一定の成果を収めてきた。一方で微生物の多様性に関する調査は十分に行なわれているとはいえない。その原因は、肉眼で識別できない、分類が遅れている、等様々である。しかし、調査があまり行われていないとしても、その生物群の多様性評価が無意味なものというわけではない。実際に多くの微生物が極地から熱帯域に至るまで様々な生物圏に存在し、生態系に重要な役割を果たしているのは周知の事実である。例えば、菌根菌は宿主植物の生育を助け、昆虫寄生菌は特定昆虫の大発生終息の要因として重要である。また、正常な天然更新が進む上で、病害による間引効果が重要な役割を果たしている。こうした微生物の多様性を評価することは、その生態系における恒常性が維持されていることを示す指標にもなり得ることから、様々なハビタットにおける微生物の多様性評価に関する研究は今後更に進めていく必要がある。</p> <p>様々な生物圏のうち、植物の葉の表面積は、温帯林だけでも常緑、落葉樹合わせて推計95,000,000平方キロメートルに及び、これは地球の陸地の約6割に匹敵する。このような広大な葉圏にも様々な微生物が存在することが知られており、多様性の隠れた源である。しかし、その多様性を厳密に評価している研究例は少ない。</p> <p>一方で、葉圏微生物のうち、特に菌類は植物の葉の初期分解過程に重要な役割を果たし、物質循環の重要な要素となっている。また一部の葉圏菌類は亜硫酸ガスに対して感受性が強く、大気汚染地域では生息できないことも知られている。このように葉圏菌類の多様性は物質循環に影響すると同時に、その土地の環境状況を反映していると考えられる。よって、葉圏菌類の多様性評価を行うことは、森林の生物多様性の解明はもとより、環境変動による影響評価、遺伝資源保護や利用などに様々な意義がある。</p> <p>しかし、この隠れた多様性の構成要素の評価は、従来の多様性評価で欠けていた視点であるが、これを行うことは、2010年の生物多様性条約締結国会議に向けて我が国がより幅広い多様性の評価・保全に取り組んでいることのアピールにもなる。</p> <p>ブナ林は冷温帯林の代表であると同時に、温暖化等環境変動で衰退が危惧されている森林もあり、こうした森林の多様性を評価し、保全していくことはわが国の責務である。葉圏菌類相について大域的な多様性評価は行われていない。また、葉圏菌類の多様性に基づく環境変動評価・予測を目的とした研究は行われていない。</p> <p>2. 研究目的</p> <p>本研究ではブナ葉圏菌類を対象に、日本全国のブナ林における葉圏菌類相の多様性評価とそれに基づく環境変動評価・予測手法を開発する。特に多様性を評価するために分子生物学的手法を導入し、遺伝的多様性のプロファイルに基づく多様性評価手法を開発する。本研究は温暖化、大気汚染などの環境変動が葉圏菌類相の多様性へ及ぼす影響を明らかにするための予備的研究に位置づけられ、葉圏菌類相の多様性プロファイルを用いた環境変動評価・予測モデルを考案する重要な基礎となる。本研究では、DGGE、T-RFLP法で用いる菌類特異的プライマーを選択、特定の採集地における季節ごとの遺伝的多様性プロファイルを作成し、その有効性を確認する。そして主要な種については塩基配列を決定する。葉圏菌類の定量的評価を行い、優占種を解明する。また、ブナ健全葉から糸状菌を分離、同定する。各地の多様性プロファイルを多変量解析により明らかにし、葉圏菌類に影響を及ぼし得る環境要因を明らかにすると同時に、環境変動の指標になり得る種類を特定する。</p>		

### 3. 研究の方法

(1) 葉圏菌類相の多様性プロファイルの作成とそれに基づく環境変動評価・予測手法の開発  
菌類の多様性評価のために複数種の遺伝子を同時に検出、評価を行った。ブナ葉各1枚を13mLチューブに入れ、液体窒素中で粉末になるまで破碎した後、DNAeasy Plant mini kit (キアゲン)により抽出した。得られたDNAは、プライマーNS1とEF4の組み合わせによるsemi-nested PCRによりSSU r DNAの増幅を行なった。増幅産物2μlを鋳型として、DGGE解析用に、3つの菌類特異的プライマー (NS1とCG-fung、NS1とCG-FR1、NL1とCG-NL4) を用いてDNAを増幅した。DGGEにより検出したバンドのうち、いくつかを切り出し、プライマーNS1とfungで増幅し、シーケンスを決定した。また、T-RFLP解析用に、NS1とFAM-FR1で増幅させ、制限酵素Alu I、Mbo I で処理し、ABI3100 (Applied biosystems) で解析した。

菌類の分離は、100m lの滅菌水中で10枚のブナ葉を2mm以下に破碎し、十分攪拌したあと、そこから0.1m lをとり、0.9m lの滅菌水を加え、ローズベンガル入り1%麦芽エキス寒天培地に塗布した。そこから生育してきた菌類の菌糸体を火炎滅菌した柄付き針で切り取り、2%麦芽エキス寒天培地に移植し、純粋培養菌株を確立した。確立した培養菌株は形態、LSU r DNAの部分塩基配列により同定するとともに、CFU (コロニー形成単位) を数え、その出現頻度を算出した。

環境要因との関連を調査するために気象庁の気候値データを元に、各調査地の気温、降雨等6つのパラメーターと葉圏菌類の多様性との相関を解析した。

#### (2) 葉圏菌類の機能評価

主要葉圏菌の温度特性、葉の分解能力を評価するために、健全葉から糸状菌の分離を行なった。見かけ上健全な生葉を10枚ずつ採取した。生葉の中央部から火炎滅菌後に放熱した滅菌済みコルクボーラー (直径5.5cm) で葉1枚あたり1葉片を打ち抜き、分離に供試した。主要菌種の温度特性を5、10、15、20、25、30、35℃の条件で培養し、菌糸生長速度は、1%麦芽寒天培地上でのコロニー直径生長速度として測定した。また、総当たりで二員培養を行い、拮抗能力や腐生条件下での優占能力を調査した。

分解能力試験では、2009年5月に京都府北東部の冷温帯ブナ林で林床より採取したブナ落葉を実験に用いた。落葉は約1cm幅に切り、300mgずつを計り取ってからエチレンオキサイドガスにより60℃で6時間滅菌した。滅菌後の落葉は直径9cmのシャーレに入れた2%水寒天培地20mlを含む平板培地の表面に置き、その横に上述の方法で作成した接種源を1つずつ接種した。シャーレは2重のパラフィルムで封じたのち、5、10、15、20、25、30、35℃の7温度条件下の暗黒下で12週間にわたって培養した。培養後に回収した落葉は40℃で1週間乾燥後の重量を測定した。ガス滅菌した直後の落葉試料 (初期試料)、菌類を接種せずに培養した試料 (コントロール試料) についても同様に、40℃で1週間乾燥後の重量を測定した。各処理についてくりかえしを4とした。培養期間中に各菌株が引き起こした落葉の重量減少率 (%) は次の式により求めた: 重量減少率 = (コントロール試料の重量 - 菌株を接種した試料の重量) / 初期試料の重量 × 100。3菌株の20℃、25℃、30℃における接種試料のうち、重量減少率が3.0%以上であった8点を化学分析に供試した。4反復分の試料をあわせて1つとし、粉碎ののち、リグニン濃度を硫酸法で、全炭水化物濃度をフェノール硫酸法で、それぞれ測定した。初期試料およびコントロール試料についても同様の分析を行うことで、培養期間中に各菌株が引き起こしたリグニンと全炭水化物の重量減少率を上述の式により求めた。

### 4. 結果及び考察

#### (1) 葉圏菌類相の多様性プロファイルの作成とそれに基づく環境変動評価・予測手法の開発

DGGEにより解析した結果、採取時期により検出される菌類の多様性が異なることが明らかになった。採取時期間で共通して検出されたバンドは*Cladosporium*属菌と*Mycosphaerella*属菌であった。またブナ葉そのもののDNAが検出される場合があった。各サンプルからは20~35個のバンドが検出され、採取時期によっては、より顕著に現れるバンドも存在した。この傾向はT-RFLPでも同様であった。

実際の菌の分離試験でも*Cladosporium*など普遍的に存在する菌のほか、*Pestalotiopsis*、*Ramularia*、*Mycosphaerella*、*Didymella*といった、従来から知られている主要な葉圏菌類が分離された。この中には内生菌として知られる種類も存在した。すべての時期、場所を通して最も高頻度に分離されたのは*Pestalotiopsis*属菌であった。*Mycosphaerella*属菌は5月と9月に多く出現したが、7月にはほとんど検出されなかった。

DGGEによる解析結果とあわせると、DNAで検出した菌類の多様性と分離により得た菌類の多様

性には違いが見られた。分離により検出された種類の中には*Lecanicillium*といった昆虫寄生菌や*Pestalotiopsis*といった生理活性物質を産生する糸状菌が検出できた。これらは生物防除資材や有用化合物産生菌として知られている。葉上は他生物との相互作用の場として重要であるにもかかわらず、こうした機能性微生物の探索は十分には行われてこなかった場所である。有用微生物探索の場としても葉圏は重要であると考えられる。今回優占的に分離された*Mycosphaerella*属菌は植物寄生菌としても知られるが、内生菌として既にブナで報告がある。これらの相互作用についても詳細な調査が必要である。

全国でのブナ葉のサンプリングとそれらからの菌の分離試験、およびDGGE、T-RFLPといったDNA解析から、各地で検出される葉圏菌類の種類を明らかにした。採集場所や時期により出現する葉圏菌の種類や多様性は異なる傾向にあった。調査を通して頻繁に検出されたのは*Pestalotiopsis*、*Didymella*、*Cladosporium*、*Mycosphaerella*、*Colletotrichum*、*Penicillium*であった。T-RFLPにより解析した結果と各菌の出現傾向を環境パラメーターと合わせて解析したところ、特に大きな傾向は認められなかったが、夏の降雨量と微かな相関が認められた。また、*Xylaria* sp. 1のみが寒冷地では検出されない傾向にあった。種特異的プローブを作成しリアルタイムPCRで*Pestalotiopsis*と*Didymella*の検出を試みたところ、*Pestalotiopsis*は*Didymella*よりも複数個所から検出されたが、逆にその頻度は低かった。また、*Didymella*の頻度は積雪深と負の相関があった。一方で、腐生条件で優占する*Xylaria* sp. 1は葉からは検出されなかった。このことから場所によって葉圏菌類の種類相が異なること、その違いは周辺環境が関与していることが考えられた。

## (2) 葉圏菌類の機能評価

生葉890葉片と落葉650葉片から、ブナの主要な内生菌類として知られるクロサイワイタケ科菌類を中心に、*Xylaria*属112菌株、*Nemania*属106株、*Biscogniauxia*属32株の合計250菌株を分離した。落葉の主要構成成分であるリグニンの分解の指標となる落葉の漂白部からも、これらのクロサイワイタケ科菌株が分離された。特に広範囲の宿主樹木から*Xylaria* sp. 1が検出された。

本研究で*Xylaria* sp. 1は樹種特異性が低く、生葉と落葉に共通して出現し、落葉の漂白部からも出現することが示された。*Xylaria* sp. 1が落葉の漂白部から分離され、リグニン分解活性を有することはブナですでに示されており、今回の結果から、*Xylaria* sp. 1がブナ林の広範な樹種を宿主とするエンドファイトであり、多様な樹種の落葉に分解者として定着して、一部の樹種の落葉では漂白に関与していることが実証的に示された。

サブテーマ1において得られた主要な葉圏菌類について温度特性と拮抗作用を調査してみたところ、各菌で19~28℃の間で生育速度にピークが認められた。一方で大きく4つの拮抗パターンが認められだが、*Xylaria* sp. 1が実験に供試した様々な菌種に対して拮抗関係では優勢であることが明らかとなった。この結果は、分離試験において本菌が優占的に分離されることと矛盾しない。

*Xylaria* sp. 1について、落葉中のリグニン・全炭水化物の分解についてみると、20℃と25℃ではいずれの菌株でもほとんどリグニンの重量減少が認められず、-1.1~1.9%（初期重量に対する%、以下同様）の範囲であった。その一方で、いずれの菌株でも、20℃と25℃では、全炭水化物の重量減少率が15.3~25.6%であり、落葉の重量減少は主にセルロースやヘミセルロースの分解によることがわかった。30℃でのリグニン分解を調べたQs1-1とCr1-2の2菌株では、リグニンの重量減少率はそれぞれ3.3%と4.6%であり、20℃・25℃に比べてリグニン分解が促進されていた。その一方で、30℃では全炭水化物の重量減少率がそれぞれ14.4%と16.4%であり、20℃・25℃に比べて分解が抑制されていた。*Xylaria* sp. 1は、分解の最適温度である25℃以下ではセルロースを選択的に分解するが、30℃では落葉全体の分解は抑制されるものの、20℃・25℃に比べてリグニン分解活性が増加した。

以上の結果から、*Xylaria* sp. 1は菌糸生長と落葉分解活性の最適温度が25~30℃にあること、最適温度以下の温度条件では温度にともなって分解活性は増加するが、このとき炭水化物であるセルロースやヘミセルロースを選択的に分解すること、最適温度より上の温度条件では菌糸生長が抑制されるがリグニンの分解活性が増加すること、35℃では菌糸生長が認められなくなり落葉を分解しなくなることが明らかとなった。

## (3) まとめ

ブナ葉圏菌類の多様性を形成するメカニズムには様々な要因が複雑に関係していると考えられるが、種類や頻度は、夏の降雨、冬の積雪、気温と相関関係が認められた。特に*Xylaria* sp. 1の分布は冬の気温に影響される可能性が示された。さらにこの種類は葉分解に重要な役割を果たす種類であると同時に、25℃以上ではリグニンを選択的に分解するという性質をもっていた。以上のことから気候変動が葉圏菌類の種類相や機能に影響を与えることで、生態系におけるカーボンサイク

ルに影響が生じる可能性が考えられた。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

ブナ葉圏菌類のDNAを検出するための適切なプライマーを選択し、ブナ葉圏菌類の多様性を遺伝子と直接分離から明らかにする手法を確立した。この手法は広く、その他の葉圏菌類の多様性解析に用いることができる。また、分離による結果とDNA解析による結果の違いを比較し、両者の長所と短所を明らかにした。これにより、双方を組み合わせたより正確な多様性評価が可能になる。また、本研究ではブナ林を構成する93樹種を対象とした研究により、エンドファイトが落葉分解にも関与しており、一部の樹種の落葉ではリグニン分解により漂白を引き起こしていることを実証的に示した。これらの成果は当該研究分野における新知見である。

葉圏菌類であるエンドファイトが落葉からも出現することは以前からよく知られていた。ブナ落葉からはさまざまな葉圏菌類が出現するが、同科エンドファイトは *Ascochyta fagi*, *Pestalotiopsis* 属菌、*Cladosporium cladosporioides* などブナの主要な他の葉圏菌類に比べて分解力が高く、ブナ落葉の分解プロセスにおいて中心的な役割を担っている。よって環境変動と落葉分解との関連性という観点からは、同科エンドファイトの出現や挙動が重要であるといえる。

本研究ではもっとも高頻度で出現した *Xylaria* sp. 1 を材料に、同種の落葉分解活性が培養温度や落葉中のリグニン濃度にもなって変動することを定量的に明らかにし、エンドファイトによる落葉分解の律速要因を解明した。これらの成果は当該研究分野における新知見である。葉圏菌類の多様性プロファイルを分解機能の観点から実証的に示した新規性、独創性の高い成果といえる。

### (2) 環境政策への貢献

本研究では葉圏菌類の多様性の一端を明らかにしたが、こうした研究はCOP10において日本が幅広い生物多様性研究を行なっていることへのアピールに繋がる。また葉圏菌類の中には経済的に利用されているものもあり、類縁種を検出していることから、それらの利用可能性、多様性の価値を評価することができると考えられる。さらに、本研究ではブナ林の主要な葉圏菌類であるクロサイワイタケ科エンドファイトが亜高山帯から亜熱帯までの幅広い気候帯に広域的に分布することを示した。この結果は、葉圏菌類の多様性プロファイルが環境変化にもなってどのように応答するのかを、異なる気候帯をも含めた広域的な視点から理解する上で、有用な情報を与えてくれることが期待される。

葉圏菌類の多様性プロファイルが環境変化にもなってどのように応答するのかを、葉圏菌類の機能的な側面から考えるとき、将来的な温度変化が菌類の分解活性に及ぼす直接的な影響と、環境変化にもなう宿主樹種組成の変化という間接的な影響の2点を考慮する必要がある。本研究の結果から、25℃までの温度環境下では葉圏菌類の落葉分解活性は温度にもなって変化するが、セルロースの選択的分解という分解様式は変化しないこと、25℃以上の温度環境下では葉圏菌類の落葉分解活性は低下するが、リグニンの分解活性が相対的に増加し分解様式が質的に変化することがわかった。このことは、将来的な温度変化、特に気温が25℃を上回る夏期の温度環境の変化にもなって、葉圏菌類の分解機能がどのように変化し、それが土壌分解系における植物遺体の集積や分解にどのような影響を及ぼすのかを予測する上で、不可欠の情報といえる。例えば、25℃までの温度範囲では、温度上昇にもなって炭水化物の分解が促進されるため、短期的には落葉からの二酸化炭素放出は促進される。しかしリグニンが未分解で落葉中に残留するため、落葉中に含まれる未分解の炭素は難分解性の土壌有機物として土壌中に長期的に集積すると予想される。ところが25℃より高い温度条件下では、短期的には落葉からの二酸化炭素放出は抑制されるものの、リグニン分解の活発化により難分解性の土壌炭素が二酸化炭素にまで分解されるため、地球温暖化に正のフィードバックを引き起こすかもしれない。

さらにこのような温度環境の変化は、長期的には、気候帯の移動や、森林構成樹種の地理的な分布パターンの変化を引き起こし、ひいては林分レベルでの樹種組成を変化させる可能性がある。樹種組成の変化にもなって、葉圏菌類の分解機能がどのように変化するのかを予測する上で、落葉のリグニン・全炭水化物濃度が葉圏菌類による分解を律速することを示した本研究の成果は重要である。例えば、温暖化にもなって生長速度が早くリグニン濃度の低い先駆樹種が増加したとする。このような落葉の化学組成の変化は、葉圏菌類による落葉分解を促進するため、地球温暖化に正のフィードバックを引き起こす可能性がある。本研究の成果は、葉圏菌類の多様性プロファイルが地球環境変動の指標として有用であることを示すとともに、地球環境変動にもなう多様性プロファイルとその機能面での変化が地球環境にどのようにフィードバックするのかを理解する上で、有用な情報を与えてくれるものである。

## 6. 研究者略歴

課題代表者：升屋 勇人

1971年生まれ、筑波大学大学院農学研究科修了、博士（農学）、現在森林総合研究所森林微生物研究領域森林病理研究室主任研究員

主要参画研究者

(1) 1) : 升屋 勇人 (同上)

2) : 山口 宗義

1973年生まれ、大阪大学工学部卒業、森林総合研究所きのこ・微生物研究領域微生物工学研究室主任研究員

(2) : 大園 享司

1974年生まれ、京都大学農学部卒業、京都大学生態学研究センター准教授

## 7. 成果発表状況（本研究課題に係る論文発表状況。）

(1) 査読付き論文

大園 享司：日本菌学会報，50，1，1-20（2009）

“わが国における樹木の葉圏菌類（エンドファイト・エピファイト）の生態学的研究”

(2) 査読付論文に準ずる成果発表（社会科学系の課題のみ記載可）

なし

## RF-086 葉圏菌類の多様性プロファイルに基づく環境変動評価・予測手法の開発

## (1) 葉圏菌類相の多様性プロファイルの作成とそれに基づく環境変動評価・予測手法の開発

独立行政法人森林総合研究所

森林微生物研究領域森林病理研究室	升屋 勇人
きのこ・微生物研究領域微生物工学研究室	山口 宗義

〈研究協力者〉	森林総合研究所東北支所	市原 優
	森林総合研究所九州支所	石原 誠

平成20～21年度合計予算額 11,879千円  
 (うち、平成21年度予算額 5,873千円)  
 ※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 日本全国のブナ林における葉圏菌類相の多様性評価とそれに基づく環境変動評価・予測手法を開発することを目的に、ブナ葉圏菌類(葉面菌+葉内生菌)の多様性を比較、評価した。従来の分離・培養による手法と分子生物学的手法で葉圏菌類の多様性プロファイルを作成し、葉圏菌類の生息実態解明のために調査を行った。全国71か所からブナ葉を各20枚採取し、10枚を分離・培養に、残り10枚をDNA解析に用いた。分離培養には破砕機で100mlの滅菌蒸留水とともに葉を約2mm<sup>3</sup>以下に破砕し、ローズベンガル入り1%MAに懸濁液1mlを塗布した。20℃で3ヶ月間培養し、その間に生育してきた菌糸を2%MAに移植し、培養菌株を得た。同定は形態、DNAにより行なった。一方、残りの10枚は1枚ごとに液体窒素で破砕し、抽出・精製した。その後、菌類のSSUrDNA特異的プライマーを用いてDGGE、T-RFLPにより葉圏菌類の多様性を遺伝的に解析した。その結果、分離・培養による手法で、ブナ葉圏菌類のうち最も優占して存在したグループはCapnodiales、Xylarialesであった。また採取場所ごとの違い、季節的な違いがあることが明らかになった。DGGE、T-RFLPの結果でも、採取場所、季節による菌類相の違いが確認された。DGGEにより得られたバンドを切り出して得られたシーケンスデータでも同じ種類が検出されたが、分離・培養による手法と比較して検出される種数は限られていた。T-RFLPの結果を各種環境要因とともに多変量解析を行ったところ、夏の降雨と若干の相関が見られたものの、大きな傾向は認められなかった。このことから葉圏菌類の多様性は環境要因以外にも様々な影響を受けると考えられた。一方、*Xylaria* sp.1は特に冬の最低気温が-5℃以下では分離されていないこと、*Didymella* sp.が冬の積雪量と負の相関があったことから、冬期の気候条件がいくつかの種類の出現と相関関係にあると考えられた。

[キーワード] 葉圏、ブナ、環境変動、糸状菌、多様性

## 1. はじめに

植物の葉の表面積は温帯林だけでも常緑、落葉樹合わせて推計9億5千万平方キロメートルに

及び (Whittaker and Likens 1975)、これは地球の陸地の約6割に匹敵する。このような広大な葉圏には様々な微生物が存在することが知られており、これらを総称して葉圏微生物と呼ぶ。最近の報告では葉圏微生物は非常に多様であることが明らかとなっており (Yang et al. 2001)、潜在的に多様性の隠れた源であると言われている。しかし、その多様性を厳密に評価している研究例は少ない。葉圏細菌の研究が比較的進んでおり、葉上の細菌同士の相互作用などに着目した細菌生態学的な研究が進んでいる。一方で、葉圏微生物のうち、特に菌類は植物の葉の初期分解過程に重要な役割を果たし、物質循環の重要な要素となっている。葉圏菌類に関する報告は特に内生菌類に関する研究に偏っており、その多様性に関する調査が進んでいるが、その役割や生態的機能については未だ不明な点が多い。葉表面の菌類に関する報告は農業上の応用可能性の観点から調査されているが、森林生態系においてはあまり研究がされていない。

一般的に菌類は環境変動に対する反応性が高いことが知られている。一部の葉圏菌類は亜硫酸ガスに対して感受性が強く、大気汚染地域では生息できないことが知られている。

このように葉圏菌類の多様性は物質循環に影響すると同時に、その土地の環境状況を反映していると考えられる。よって、葉圏菌類の多様性評価を行うことは、森林の生物多様性の解明はもとより、環境変動による影響評価、遺伝資源保護や利用などに様々な意義がある。この隠れた多様性の構成要素の評価は、従来の多様性評価で欠けていた視点であるが、これを行うことは、2010年の生物多様性条約締結国会議に向けて我が国がより幅広い多様性の評価・保全に取り組んでいることのアピールにもなる。

ブナ林は冷温帯林の代表であると同時に、温暖化等環境変動で衰退が危惧されている森林もある。100年後には日本のブナの多くは消失するという予測があり (Matsui et al 2004)、早急にその生態系全体の保護を行なう必要がある。しかし、この衰退が危惧されている生態系における多様性の評価は十分には行なわれていない。こうした森林の多様性を評価し、保全していくことはわが国の責務である。ブナ葉の葉圏菌類のうち、葉内の内生菌に関する調査はいくつか報告がある (Sahashi et al 1991、Osono and Mori 2003、Kaneko et al 2001)。しかし、それらの報告では手法、調査場所に違いがあり、厳密な比較はできていない。また、葉表面に生息する菌を含む葉圏菌類相について大域的な多様性評価は行われていない。更には葉圏菌類の多様性に基づく環境変動評価・予測を目的とした研究も行われていない。

## 2. 研究目的

本研究ではブナ葉圏菌類を対象に、日本全国のブナ林における葉圏菌類相の多様性評価とそれに基づく環境変動評価・予測手法を開発する。特に多様性を評価するために分子生物学的手法を導入し、遺伝的多様性のプロファイルに基づく多様性評価手法を開発する。本研究は温暖化、大気汚染などの環境変動が葉圏菌類相の多様性へ及ぼす影響を明らかにするための予備的研究に位置づけられ、葉圏菌類相の多様性プロファイルを用いた環境変動評価・予測モデルを考案する重要な基礎となる。

本サブテーマでは、特にDGGE、T-RFLP法で用いる菌類特異的プライマーを選択、特定の採集地における季節ごとの遺伝的多様性プロファイルを作成する。主要な種については塩基配列を決定する。また、葉圏菌類の定量的評価を行い、優占種を解明する。また、各地域のブナ葉の分解と葉圏菌類の多様性との相関を調査する。

### 3. 研究方法

岩手県八幡平市安比高原、茨城県北茨城郡、京都府南丹市美山町の3箇所からブナ葉を採集した。採集は各調査地につき5月、7月、9月の3回行なった。また、全国71か所のブナ林から、8~10月の間で各20枚のブナ葉を採集し、分離及びDNA抽出に供試した。

ブナ葉から全DNAを抽出した。まず、各1枚を13mlチューブに入れ、液体窒素中で粉末になるまで破碎した後、DNAeasy Plant mini kit (キアゲン)により抽出した。得られたDNAは、プライマーNS1とEF4の組み合わせによるsemi-nested PCRによりSSU r DNAの増幅を行なった。増幅産物2μLを鋳型として、DGGE解析用に、3つの菌類特異的プライマー (NS1とCG-fung、NS1とCG-FR1、NL1とCG-NL4) を用いてDNAを増幅した。PCR条件はMay et al (2001)、Vainio and Hantula (2000)、Oros-Sichler et al. (2006)に従った。DGGEにより検出したバンドのうち、いくつかを切り出し、プライマーNS1とfungで増幅し、シーケンスを決定した。また、T-RFLP解析用に、NS1とFAM-FR1で増幅させ、制限酵素Alu I、Mbo Iで処理し、ABI3100 (Applied biosystems)で解析した。

菌類の分離は、100mlの滅菌水中で10枚のブナ葉を2mm以下に破碎し、十分攪拌したあと、そこから0.1mlをとり、0.9mlの滅菌水を加え、ローズベンガル入り1%麦芽エキス寒天培地に塗布した。そこから生育してきた菌類の菌糸体を火炎滅菌した柄付き針で切り取り、2%麦芽エキス寒天培地に移植し、純粋培養菌株を確立した。確立した培養菌株は形態、LSU r DNAの部分塩基配列により同定するとともに、CFU (コロニー形成単位)を数え、その出現頻度を算出した。

出現した主要菌に特異的な遺伝子領域をBLASTで検索し、それに基づき特異的なプライマーを作成した。特に広域で検出された*Pestalotiopsis maculiformis*と*Didymella* sp.についてlight cycler (ロシュ、USA)を用いた特異的なPCRにより定量的な検出を試みた。

各種環境パラメーターとの相関を解析するため、特に植生に影響すると言われている暖かさの指数 (WI)、夏の降水量 (PRS)、冬の降水量 (PRW)、冬の最低気温月の最低平均気温 (TMC)、夏の最高気温月の平均最高気温 (TMH)を気象庁の気象データ (メッシュ2000)から抽出し、解析に用いた。また、採集した日の前日の各地の気象条件 (温度と湿度)も考慮して解析した。解析はマイクロソフトエクセルを主に用いた。

高頻度に検出された主要葉圏菌類を総当たりで対峙培養を行い、各菌の競合関係の解明を試みた。試験には*Pestalotiopsis maculiformis*、*Didymella* sp.、*Xylaria* sp. 1、*Colletotrichum acuta*、*Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium cladosporioides*、*Discula* sp.、そして未同定菌1種の計8種を使用した。MA培地上で2cm離して、各菌の含菌寒天 (直径6mm)を置き、20℃暗黒条件下で培養し、1週間後から1カ月後までの生育を観察し、各菌の菌糸生長の抑制の程度を定性的に評価した。

### 4. 結果・考察

2008年度の研究ではDGGE解析の際、最も多くのサンプルで増幅に成功したのがプライマーNS1とCG-fungの組み合わせであったため、以後、これらのプライマーを用いてDGGE解析を行なうこととした。T-RFLPの場合、うまく増幅されないサンプルも存在したことから、一部のサンプルは解析対象から除外した。

DGGEにより解析した結果、採取時期により検出される菌類の多様性が異なることが明らかにな



った。採取時期間で共通して検出されたバンドは *Cladosporium* 属菌と *Mycosphaerella* 属菌であった。またブナ葉そのもののDNAが検出される場合があった。各サンプルからは20~35個のバンドが検出され、採取時期によっては、より顕著に現れるバンドも存在した。この傾向はT-RFLPでも同様であった。

実際の菌の分離試験でも *Cladosporium* など普遍的に存在する菌のほか、*Pestalotiopsis*、*Ramularia*、*Mycosphaerella*、*Didymella* といった、従来から知られている主要な葉圏菌類が分離された。この中には内生菌として知られる種類も存在した。すべての時期、場所を通して最も高頻度に分離されたのは *Pestalotiopsis* 属菌であった。*Mycosphaerella* 属菌は5月と9月に多く出現したが、7月にはほとんど検出されなかった。DGGEによる解析結果とあわせると、DNAで検出した菌類の多様性と分離により得た菌類の多様性には違いが見られた。分離により検出された種類の中には *Lecanicillium* といった昆虫寄生菌や *Pestalotiopsis* といった生理活性物質を産生する糸状菌が検出できた。これらは生物防除資材や有用化合物産生菌として知られている。葉上は他生物との相互作用の場として重要であるにもかかわらず、こうした機能性微生物の探索は十分には行われてこなかった場所である。有用微生物探索の場としても葉圏は重要であると考えられる。今回優占的に分離された *Mycosphaerella* 属菌は植物寄生菌としても知られるが、内生菌として既にブナで報告がある。これらの相互作用についても詳細な調査が必要である。

DGGE、T-RFLPにより検出された種数は20~35であったが、DGGEにより検出されたバンドの中にはブナ葉そのものや、ダニ類のものと思われるDNAのバンドも検出された。一方、分離による手法では合計で89種類の菌が検出され、DGGEによる検出数を上回った。分離による手法の場合、1つでも活性をもった胞子が存在すれば、培地上に生育することから検出が可能となる。しかし、DNAによる手法では検出限界があり、非常に少数でしか存在しない種類を検出できないと考えられる。また菌類以外のDNAを検出していることから、DGGE、T-RFLPによる手法では種類数という意味では正確性に問題がある。しかし、実際の現状を反映する意味では、分離による手法とは異なる利点があるといえる。分離による利点は遺伝子の検出による評価よりもより多くの菌類を検出できることになることが、今回明らかになった。しかし一方で、培地で培養できない種類の存在や、優占種が必ずしも基質上で優占しているとはいえない点など欠点も存在する。よって、葉上の菌類の多様性を正確に評価するためには、分離による手法とDNAによる手法の併用が望ましいと思われる。また目的によってはDNAによる手法で評価し、場所、時期による違いを表しているバンドを示す種類を決定するというアプローチも有効と思われた。

2009年度に行った研究で、全国71箇所より採取したブナ葉のDGGEの結果検出されたバンド数は3~16程度であった。各調査地で共通したメジャーバンドを解析したところ、*Mycosphaerella* 属菌の1種が共通して検出された。それ以外では地域ごとに検出されるバンドがあり、大きな傾向は認められなかった。T-RFLPの結果、地域により検出されたT-RFLPのピークは3~169あった。その感度はDGGEよりも高かったことから、以後の解析をT-RFLPの結果で行うこととした。PCAにより解析したところ、冬の降水量（PRW）が葉圏菌の多様性に最も影響していると考えられた（図1）。その次に夏の降水量であった。ただし、eigen-valueはともに0.2以下で低いものであった。T-RFLPにより検出された各地の種数と各種環境パラメーターとの相関を見たところ、ほとんどの環境パラメーターと相関が認められなかった。僅かに夏の降水量との相関が認められた（図2）。

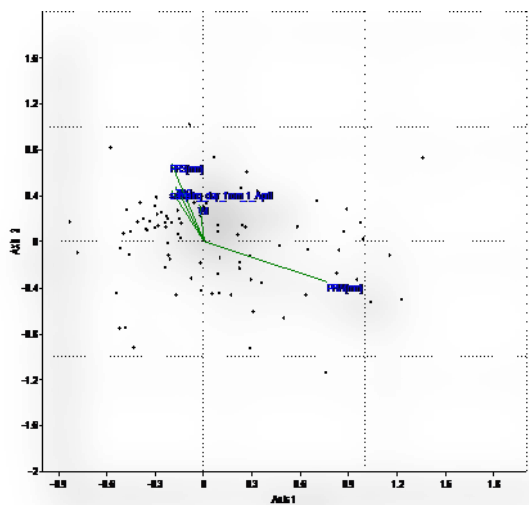


図1. T-RFLPの結果に基づくPCA

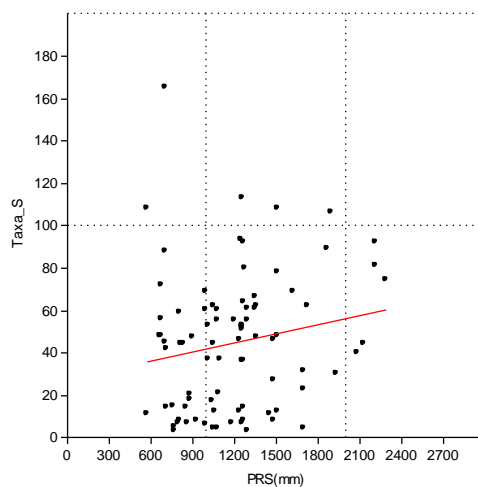


図2. 種数と夏の降水量との関係

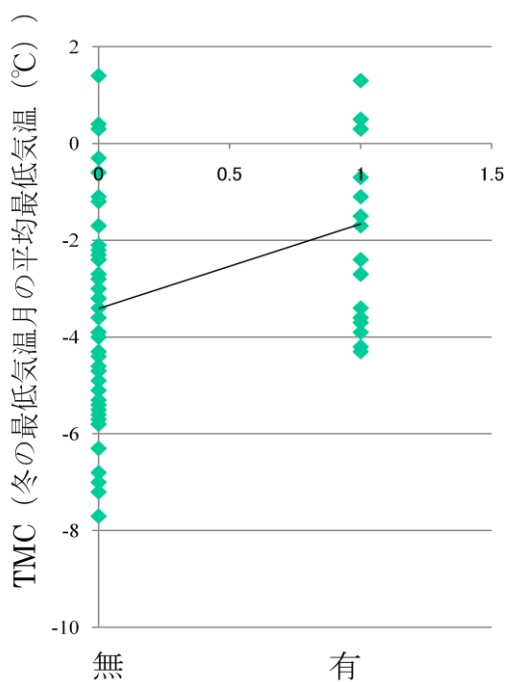


図3. *Xylaria* sp. 1の有無とTMCの関係

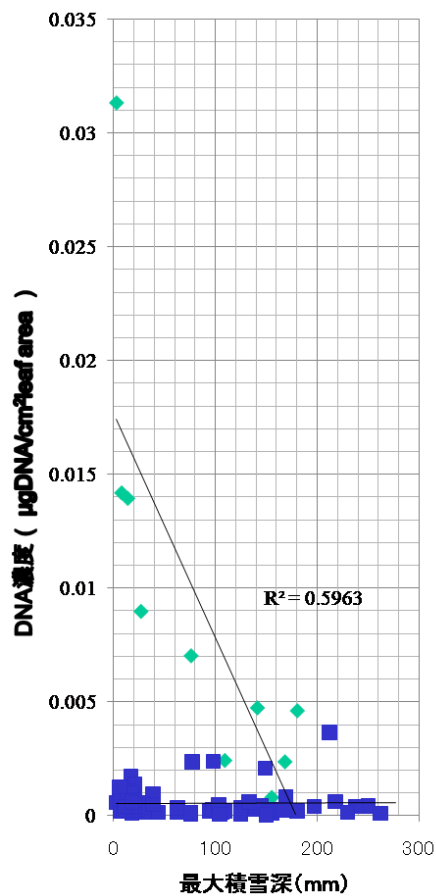


図4. DNA検出量と積雪深との関係

◆: *Didymella*、■: *Pestalotiopsis*

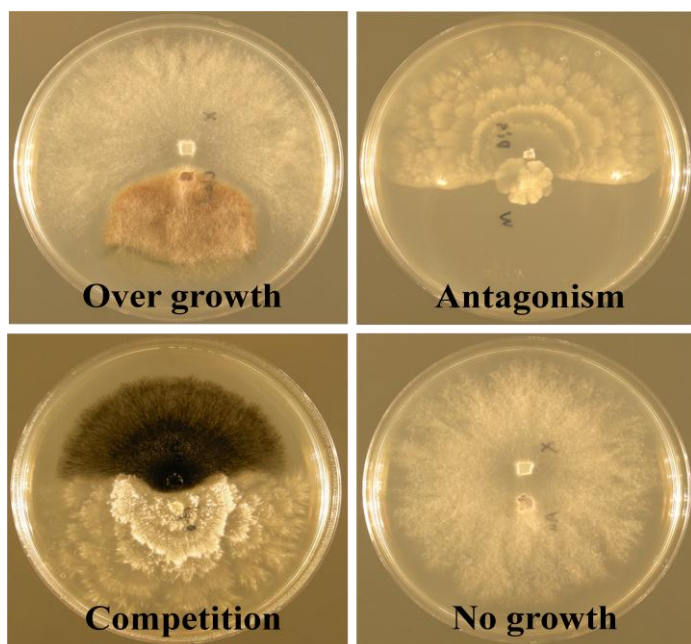


図5. 対峙培養の結果

検出された各種主要葉圏菌の検出の有無と環境パラメーターとの関係を見たところ、最も顕著だったのは *Xylaria* sp. 1 であり、TMCが $-4.5^{\circ}\text{C}$ 以下の地域では検出されなかった（図3）。それ以外の菌で広範な地域で検出された種類で環境因子との相関は認められなかった。

*Pestalotiopsis*と*Didymella*の遺伝子を定量的に検出した結果、*Pestalotiopsis*はより広範な地域から検出されたものの、低頻度であり、*Didymella*は比較的限定された地域から高頻度に検出される傾向にあった（図4）。さらに*Didymella*のDNA検出量は冬の積雪深と負の相関が認められ

た（図4）。積雪深は雪解け時期に影響する。*Didymella*はブナ葉の寄生菌であり、次世代分散体は雪解け後に拡散すると考えられることから、雪解け後の気温が分散、繁殖に影響しているのかもしれない。一方、*Pestalotiopsis*は様々な植物基質上で生育するが病原力は弱い。この性質が低頻度ながら広範囲に分布する要因である可能性がある。

対峙培養の結果、大きく分けて4つの反応が認められた（図5）。片方の菌がもう片方の菌のコロニーを覆い、生育を阻害するパターン（over growth）、コロニー同士が拮抗するパターン（competition）、他の菌の生育を抑制するパターン（antagonism）、他の菌の生育を停止させるパターン（no growth）があった。その中で*Xylaria* sp. 1のみがover growthのパターンを示し、かつ使用した全ての菌の生育を阻害した。このことは腐生的な条件下では優占できる可能性を持っていることを示している。

以上の結果をまとめると、1、ブナ葉圏菌類の多様性は複雑な因子の相互作用から成立するため、特定の環境因子には大きく依存して決定されるということはないと考えられるが、特に夏の降水量が若干影響する可能性がある。2、*Didymella*、*Xylaria* sp. 1は特定の環境因子との相関関係が認められた。特に*Xylaria* sp. 1は人工培地上で高い拮抗能力を有していたことから、腐生条件下では優占する可能性が高く、また野外では葉分解に重要な役割を果たしていることが知られている。よって、気候変動により分布が変化すれば、ブナ林のカーボンサイクルに葉圏菌を介して影響が生じる可能性がある。

## 5. 本研究により得られた成果

### （1）科学的意義

ブナ葉圏菌類のDNAを検出するための適切なプライマーを選択し、ブナ葉圏菌類の多様性を遺伝子と直接分離から明らかにする手法を確立した。この手法は広く、その他の葉圏菌類の多様性解析に用いることができる。また、分離による結果とDNA解析による結果の違いを比較し、両者の長

所と短所を明らかにした。これにより、双方を組み合わせたより正確な多様性評価が可能になる。本研究は特に全国70か所以上からの広域的なサンプリングと、同じ条件で分離培養、DNA解析を行い、各地の葉圏菌類の多様性プロファイルの比較を行った点は、世界的にもほとんど行われていないものである。また、主要葉圏菌は様々な種類が検出されたが、実際の腐生条件下では *Xylaria* sp. 1が優勢であることを明らかにした点は、各研究者で報告された主要葉内生菌の違いの原因であることを示唆している。こうした実証的な研究は分離やDNA解析のみでは明らかにできない重要な知見である。本研究で特に強調できる点は、広範なサンプリングと環境因子との相関解析により、重要な葉分解菌である *Xylaria* sp. 1が寒冷地では検出されないことを明らかにした点である。これは本菌が重要な指標となる可能性を示唆するとともに、気候変動により気温が上昇した場合に *Xylaria* sp. 1の分布が変化すると葉分解にも影響する可能性を示唆している。

## (2) 地球環境政策への貢献

本研究では葉圏菌類の多様性の一端を明らかにしたが、こうした研究はCOP10において日本が幅広い生物多様性研究を行なっていることへのアピールに繋がる。また葉圏菌類の中には経済的に利用されているものもあり、類縁種を検出していることから、それらの利用可能性、多様性の価値を評価することができると考えられる。今後、国内外の学会、インターネットを通じ、成果の広報、普及に努める。

## 6. 引用文献

- Kaneko R, Kakishima M. 2001. *Mycosphaerella buna* sp. nov. with a *Pseudocercospora* anamorph isolated from the leaves of Japanese beech. *Mycoscience* 42: 59-66.
- Matsui T, Yagihashi T, Nakaya T, Taoda H, Yoshinaga S, Daimaru H, Tanaka N. 2004. Probability distributions, vulnerability and sensitivity in *Fagus crenata* forests following predicted climate changes in Japan. *J Veg Sci* 15: 605-614.
- May LA, Smiley B, Schmidt MG. 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can J Microbiol* 47: 829-841.
- Osono T, Mori A. 2003. Colonization of Japanese beech leaves by phyllosphere fungi. *Mycoscience* 44: 437-441.
- Oros-Sichler M, Gomes NCM, Neuber G, Smalla K. 2006. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *J Microbiol Meth* 65: 63-75.
- Sahashi N, Kubono T, Miyasawa Y, Ito S. 1999. Temporal variations in isolation frequency of endophytic fungi of Japanese beech. *Can J Bot* 77: 197-202.
- Vainio EJ, Hantula J. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res* 104: 927-936.
- Whittaker, R.H. and Likens, G.E. 1975. The biosphere and man. In: Leith, H. and Whittaker, R.H. (Eds.), *Primary Productivity and the Biosphere*, Ecological Studies 14, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 305-328

Yang CH, Crowley DE, Borneman J, Keen NT. 2001 Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. PNAS 98: 3889-3894.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会)

- 1) 升屋勇人、山口宗義、大園享司：第53回日本菌学会年次大会(2009)

「ブナ葉圏菌類の多様性プロファイルに関する予備調査」

- 2) 升屋勇人、大園享司、山口宗義：樹木病害研究会(2010)

「ブナ葉圏菌類と気候変動」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

## RF-086 葉圏菌類相の多様性プロファイルに基づく環境変動評価・予測手法の開発

## (2) 葉圏菌類の機能評価

国立大学法人京都大学

生態学研究センター 生態学研究部門 大園享司

平成20～21年度合計予算額 5,939千円

(うち、平成21年度予算額 2,936千円)

※予算額には、間接経費を含む

[要旨] 葉圏菌類であるエンドファイトがブナ林において落葉分解に関与することを実証的に明らかにした。ブナ林を構成する93樹種の生葉と落葉を対象に、クロサイワイタケ科のエンドファイトの分離を行い、そのDNA塩基配列の比較を行った。分離された289菌株のうち、DNA塩基配列の検討から243菌株がクロサイワイタケ科に属することがわかった。この243菌株は15のoperational taxonomic unit (OTU) に区分された。もっとも菌株数が多かったのは*Xylaria* sp. 1であり、*Nemania* sp.、*Biscogniauxia* sp. 1がそれに続いた。これらのOTUは一般に樹種特異性が低く、リグニン分解により落葉の漂白を引き起こしていることが実証的に示され、調査地のブナ林においてクロサイワイタケ科エンドファイトは分解初期段階にある落葉の主要なリグニン分解者であることが明らかになった。また、ブナ林の主要構成樹種であるカバノキ科の4属11樹種を材料としたエンドファイトの多様性調査から、ブナ林の主要な葉圏菌類であるクロサイワイタケ科エンドファイトが亜高山帯から亜熱帯までの幅広い気候帯に広域的に分布することを示した。*Xylaria* sp. 1の菌糸生長の最適温度は25～30℃であり、5℃から25℃までの範囲では温度にともなって増加したが、35℃では菌糸生長が認められなかった。*Xylaria* sp. 1によるブナ落葉の分解の最適温度は25℃であり、5℃から25℃までの範囲では温度にともなって分解活性が増加したが、30℃では活性の低減が認められ、35℃では分解がほとんど認められなかった。*Xylaria* sp. 1は20℃・25℃ではセルロースの選択的分解を行っており、30℃ではリグニンの分解活性が増加した。続いて、培養温度20℃で行った15樹種の落葉への接種培養試験では、*Xylaria* sp. 1が引き起こした落葉の重量減少率は6.7～26.4% (初期重量に対する%) の範囲にあった。ブナ葉圏菌類の中で分解に関与する*Xylaria* sp. 1は落葉分解に重要な役割を果たすとともに、環境変動によりその機能が変化する可能性がある。

[キーワード] エンドファイト、落葉分解、クロサイワイタケ属菌類、培養温度、化学組成

## 1. はじめに

葉圏菌類が葉の死後も葉に定着して、落葉の分解に関与することは知られている (Osuno 2006)。最近では、分子生物学的な手法を用いて、生葉のエンドファイトが落葉にも定着していることを示す報告がある (Promputtha et al 2007)。しかし多様な樹種からなるブナ林において、エンドファイトによる落葉分解が一般的に認められるのかどうか、またエンドファイトによる落葉分解が環境条件の変化にともなってどのような反応を示すのかに関する実証的なデータがない。これ

が、葉圏菌類の多様性プロファイルに基づいて環境変動を評価し予測する上での障壁となっている。

わが国における葉圏菌類の多様性と環境条件との関連を明らかにする上で、ブナ林の分布する冷温帯を対象とした研究だけでは日本全土をカバーすることはできない。冷温帯よりも高緯度、高標高の寒冷地に分布する針広混交林や亜高山帯林や、冷温帯以南の暖温帯や亜熱帯における葉圏菌類の多様性に関する予備的な情報が不可欠である。しかしわが国における葉圏菌類の調査報告例は冷温帯ブナ林に集中しており、それ以外の気候帯までも含んだ比較研究例はほとんどない。広域的な分布を持つ樹種グループを対象とした葉圏菌類の種多様性研究が必要である。また、温度環境の変化や、気候帯ごとの樹種組成の違いに対して、エンドファイトの落葉分解活性がどのように変化するかについては、これまでの野外観察の結果からは明らかではない。温度条件や落葉の樹種をコントロールした培養条件下における葉圏菌類の菌糸生長速度の評価、および落葉分解活性の評価が必要である。

## 2. 研究目的

本研究の目的は、1) ブナ林においてエンドファイトが落葉分解に関与することを実証的に明らかにし、それをふまえて環境条件の変化がエンドファイトによる落葉分解に及ぼす影響を明らかにすることである。研究プロジェクトの1年目にあたる平成20年度には、活発なリグニン分解力を持つことが知られるクロサイワイタケ科のエンドファイトを研究対象とした。ブナ林を構成する93樹種の生葉と落葉を対象に、クロサイワイタケ科のエンドファイトの分離を行い、そのDNA塩基配列の比較を行う。これにより、ブナ林の広範な樹種において、エンドファイトが落葉分解に実際に関与することを実証的に明らかにした。そして、2) わが国の亜高山帯林、冷温帯ブナ林、亜熱帯林を対象としたエンドファイトの多様性に関する予備調査を行った。いずれの気候帯にも共通して出現するカバノキ科樹木を対象として、エンドファイトの種多様性と地理的分布について検討を行った。そして、ブナ林の主要なエンドファイトである *Xylaria* sp. 1 を材料として、培養温度が菌糸生長と落葉分解活性に及ぼす影響と、樹種ごとの化学組成が落葉分解活性に及ぼす影響を、培養系での接種試験により明らかにした。3) 5°Cから35°Cまでの7温度条件下において、栄養培地上における *Xylaria* sp. 1 の菌糸生長速度と、滅菌したブナ落葉への接種による落葉分解活性を測定し、培養温度がエンドファイトによる落葉分解に及ぼす影響を定量的に明らかにした。接種後の落葉について化学分析を行い、培養温度が落葉中の主要な構成成分であるリグニンと全炭水化物（主にセルロースとヘミセルロースからなる）の分解に及ぼす影響を調べた。4) 化学組成が異なる15樹種の落葉を滅菌して *Xylaria* sp. 1 を接種し培養する実験を行い、落葉の化学組成がエンドファイトによる落葉分解に及ぼす影響を定量的に明らかにした。

## 3. 研究方法

(1) クロサイワイタケ科エンドファイトによる落葉分解 京都府北東部の冷温帯ブナ林に天然分布する、ないし植栽された落葉広葉樹、常緑広葉樹、落葉針葉樹、常緑針葉樹のあわせて93樹種の葉を対象とした。2008年5、6、7、8、11月に樹冠内の見かけ上健全な生葉（88樹種）、リグニン分解菌の定着を受けて白色化が顕著に認められる漂白落葉 (Osono and Takeda 2002) (15樹種)、そして漂白を受けていない落葉（ここでは非漂白落葉とよぶ、62樹種）の3タイプの葉を採取した。

葉はいずれの樹種、いずれの葉タイプについても10枚を単位として採取した。生葉の中央部、ないし漂白落葉の漂白部、非漂白落葉の中央部から火炎滅菌後に放熱した滅菌済みコルクボーラー（直径5.5cm）で葉1枚あたり1葉片を打ち抜き、分離に供試した。生葉940片、漂白落葉150片、非漂白落葉740片のあわせて1830葉片を菌類の分離に供試した。葉片からの菌類の分離は表面殺菌法に従った（畑 1997）。表面殺菌後の葉片はLCA培地上（三浦・工藤 1970）にシャーレあたり2葉片ずつ置床し、20℃の暗黒条件下で1ヶ月間培養した。葉片から出現した菌糸は別のLCA培地に分離し、室温、自然光下でさらに1~2ヶ月間培養した。分離菌株について、実体顕微鏡によるシンネマや黒色のpseudosclerotinal plateの確認と、光学顕微鏡によるクロサイウタケ科アナモルフの形成（*Geniculosporium*様、*Nodulisporium*様の分生子形成様式）の確認などの培養性状の観察に基づいて、クロサイウタケ科類似菌株を判定した。このようにして得られたクロサイウタケ科類似菌株のDNA塩基配列を解析した。プライマーはLSUrDNAのD1/D2領域をターゲットとするNL1とNL4を用いた（White et al. 1990。PCR産物を精製後、それらをテンプレートとしたシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。配列データを基に、NCBIのBLAST検索を行い、菌株の分類群を特定した。

(2) カバノキ科エンドファイトの種多様性 岐阜県高山市の御岳山、標高2050mに位置する亜高山帯針葉樹林、京都府北東部の冷温帯ブナ林（クロサイウタケ科エンドファイトと同じ採取地）、および沖縄県沖縄本島北部の亜熱帯林の3ヶ所で採取を行った。2008年5月から11月までの期間に、で記した時期に4属11樹種の生葉を採取した。毎回、樹種ごとに見かけ上健全な生葉を10枚ずつ採取した。生葉の中央部から火炎滅菌後に放熱した滅菌済みコルクボーラー（直径5.5cm）で葉1枚あたり1葉片を打ち抜き、分離に供試した。調査期間を通じて、190葉片を菌類の分離に供試した。葉片からの菌類の分離は表面殺菌法に従った。分離手順と分離菌株のDNA塩基配列、分類群の検討は上述の方法に従った。

(3) 培養温度が*Xylaria* sp. 1の菌糸生長とブナ落葉分解に及ぼす影響 2008年11月に京都府北東部の冷温帯ブナ林で採取した新規落葉から、表面殺菌法により分離した3菌株（コードはQs1-1、Bc2-2、Cr1-2）を実験に用いた。それぞれコナラ、ヤマボウシ、スギの漂白を受けていない落葉から分離された菌株である。分離した菌株は、1%麦芽寒天培地を含むスラントに入れて、20℃の恒温培養器内で保管した。

菌糸生長速度は、1%麦芽寒天培地上でのコロニー直径生長速度として測定した。1%麦芽寒天培地上で14日間前培養したコロニーの周縁部から、滅菌済み5.5mmコルクボーラーを用いて接種源を打ち抜いた。その接種源を直径9cmのシャーレに入れた1%麦芽寒天培地20mlを含む平板培地の中央に接種した。シャーレは2重のパラフィルムで封したのち、5、10、15、20、25、30、35℃の7温度条件下の暗黒下で培養した。コロニー直径の測定は菌株ごと・温度条件ごとの生長速度に応じて適当な間隔で2~5回実施した。生長速度はコロニー直径を従属変数、培養日数を独立変数とする回帰直線の傾き（1日あたりのコロニー直径生長量、単位はmm/日）として求め、くりかえし4平板の平均値で表した。

ブナ落葉の分解試験は、Osono and Hirose (2009) の方法に従って行った。2009年5月に京都府北東部の冷温帯ブナ林で林床より採取したブナ落葉を実験に用いた。落葉は約1cm幅に切り、300mg



ずつを計り取ってからエチレンオキサイドガスにより60°Cで6時間滅菌した。滅菌後の落葉は直径9cmのシャーレに入れた2%水寒天培地20mlを含む平板培地の表面に置き、その横に上述の方法で作成した接種源を1つずつ接種した。シャーレは2重のパラフィルムで封じたのち、5、10、15、20、25、30、35°Cの7温度条件下の暗黒下で12週間にわたって培養した。培養後に回収した落葉は40°Cで1週間乾燥後の重量を測定した。ガス滅菌した直後の落葉試料（初期試料）、菌類を接種せずに培養した試料（コントロール試料）についても同様に、40°Cで1週間乾燥後の重量を測定した。各処理についてくりかえしを4とした。培養期間中に各菌株が引き起こした落葉の重量減少率（%）は次の式により求めた：重量減少率 = (コントロール試料の重量 - 菌株を接種した試料の重量) / 初期試料の重量 × 100。3菌株の20°C、25°C、30°Cにおける接種試料のうち、重量減少率が3.0%以上であった8点を化学分析に供試した。4反復分の試料をあわせて1つとし、粉碎ののち、リグニン濃度を硫酸法で、全炭水化物濃度をフェノール硫酸法で、それぞれ測定した。初期試料およびコントロール試料についても同様の分析を行うことで、培養期間中に各菌株が引き起こしたリグニンと全炭水化物の重量減少率を上述の式により求めた。本実験に用いたブナ初期試料のリグニン濃度は454mg/g、全炭水化物濃度は286mg/gであった。

(4) 樹種が *Xylaria* sp. 1の落葉分解に及ぼす影響 1996年10月に京都府北東部の冷温帯ブナ林で採取したブナ生葉から、表面殺菌法により分離した1菌株（コードはGS19-1）を実験に用いた。分離した菌株は、1%麦芽寒天培地を含むスラントに入れて、20°Cの恒温培養器内で保管した。接種試験には表2に示した15樹種の新規落葉を用いた。これらの落葉は、京都府北東部の冷温帯ブナ林で林床より採取した。分解試験は上述の方法にしたがって行ったが、培養温度は20°Cとした。それぞれの樹種の落葉について、培養期間での重量減少率（初期重量に対する%）を求めた。15樹種の落葉の初期試料について、リグニン、全炭水化物の各濃度を上述の方法により、また窒素濃度をNCアナライザー（NC-900、住友化学）を用いて燃焼法により、それぞれ測定した。

#### 4. 結果・考察

(1) クロサイワイタケ科エンドファイト 調査期間中に採取した93樹種の生葉、漂白落葉、非漂白落葉の1830葉片から、あわせて289菌株のクロサイワイタケ科類似菌類が分離された。これら菌株のDNA塩基配列の検討から、243菌株がクロサイワイタケ科に属することがわかった。この243菌株は15のoperational taxonomic unit (OTU) に区分された。もっとも菌株数が多かったのは *Xylaria* sp. 1であり、*Nemania* sp.、*Biscogniauxia* sp. 1がそれに続いた。*Xylaria* sp. 1はLCA寒天培地上で白色～黒色のシンネマをしばしば多数形成し、いくつかの株ではシンネマ上で分生子の形成が認められた。*Nemania* sp. はLCA寒天培地上で *Geniculosporium* アナモルフをしばしば形成した。*Biscogniauxia* sp. 1はLCA寒天培地上で *Nodulisporium* アナモルフをしばしば形成した。これら3のOTU以外の13のOTU (*Xylaria* spp.、*Annulohypoxylohi* spp.、*Biscogniauxia* sp. 2、*Nodulisporium* sp.、*Rosellinia* sp.、*Xylariaceae* sp.) では菌株数が1ないし2であり、出現頻度が低かった。木材腐朽菌として知られ、本調査地でも木質リター上で子実体の発生が確認されている *Xylaria hypoxylohi* が、8月に採取したミズナラ生葉から1菌株が分離された。以上の結果から、本調査地において出現するクロサイワイタケ科エンドファイトは大部分（全菌株の94%）が *Xylaria* sp. 1、*Nemania* sp.、*Biscogniauxia* sp. 1の3のOTUであることが明らかとなった。

*Xylaria* sp. 1は生葉、漂白落葉、非漂白落葉から出現した。生葉にはブナなどの落葉広葉樹、

ウラジロガシ、クロソゴなどの常緑広葉樹、ドイツトウヒ、メタセコイヤなどの常緑・落葉針葉樹の外来植栽木のあわせて42樹種が含まれた。漂白落葉にはブナ、ミズナラなどのあわせて12樹種が含まれた。非漂白落葉にはアズキナシ、ヤマグルマ、スギなどの5樹種が含まれた。このように、*Xylaria* sp. 1は樹種特異性が低い、生葉と落葉に共通して出現する、落葉の漂白部からも出現することが示された。*Xylaria* sp. 1が落葉の漂白部から分離され、リグニン分解活性を有することはブナですでに示されている (Osono and Takeda, 2002)。今回の結果から、*Xylaria* sp. 1がブナ林の広範な樹種を宿主とするエンドファイトであり、多様な樹種の落葉に分解者として定着して、一部の樹種の落葉では漂白に関与していることが実証的に示された。

*Nemania* sp. はミズナラ、トチノキなどの落葉広葉樹、ウラジロガシ、ソゴなどの常緑広葉樹、および常緑・落葉針葉樹 (スギ、ヒノキ、アカマツ、メタセコイヤ) などを含む51樹種の生葉と、タムシバの非漂白落葉から出現した。*Nemania* sp. は多様な樹種の生葉から出現しており、樹種特異性が低いといえる。落葉からの出現樹種が少ないが、2001年に行った予備調査ではこのOTUが広範な樹種の非漂白落葉から出現することを確認している。本研究のなかで、2008年度の11月に実施した多様な樹種の非漂白落葉からの分離結果が得られれば、このOTUの落葉における出現パターンがより詳細に明らかになると期待される。漂白落葉からも分離されており、野外におけるリグニン分解活性が示唆された。

*Biscogniauxia* sp. 1はブナ、ミズナラなどの落葉広葉樹、常緑広葉樹 (エゾユズリハ) を含む20樹種の生葉、ホオノキの漂白落葉、常緑・落葉針葉樹 (アカマツ、ドイツトウヒ、グイマツ) の非漂白落葉から出現した。このOTUについても *Nemania* sp. と同様に、生葉における樹種特異性は低いといえる。また落葉における出現パターンは11月の調査でより詳細に明らかになると期待される。

以上の結果から、調査を行ったブナ林に生息するクロサイワイタケ科エンドファイトは主に3つのOTUからなり、これらは樹種特異性が一般に低い。また落葉分解にも関与しており、一部の樹種の落葉ではリグニン分解により漂白を引き起こしていることが実証的に示された。調査地で、落葉において漂白の認められた17樹種のうち、クロサイワイタケ科エンドファイトが漂白部から分離されたのは71%にあたる12樹種であった。調査地のブナ林においてクロサイワイタケ科エンドファイトは分解初期段階にある落葉の主要なリグニン分解者であると考えられる。

(2) カバノキ科エンドファイト 分離に供試した190葉片から、あわせて141菌株が分離された。分離菌株数は展葉直後 (御岳の6月、芦生の5月) に少なく、生育期なかばにかけて増加する傾向が認められた。これらの菌株は分子系統解析から37のOTUに区分された。もっとも菌株数が多かったのは *Gnomonia* sp. であり、*Nemania* sp.、*Glomerella acutata*、*Biscogniauxia* sp. 1が10菌株以上でそれに続いた。*Gnomonia* sp. は御岳で8月と10月に採取したダケカンバ、シラカンバの葉においてのみ高頻度で分離された。*Nemania* sp. は先の結果と同様に、樹種特異性が低く7樹種から分離された。このOTUは御岳、芦生、沖縄のいずれのサイトでも分離された。*Glomerella acutata*も樹種特異性が低く御岳の1樹種と芦生の4樹種で分離された。*Biscogniauxia* sp. 1も同様に御岳の1樹種と芦生の5樹種から分離された。

サイトごとにみると、御岳のヤマハンノキでは *Mycosphaerella* sp. 1が、ダケカンバとシラカンバでは *Gnomonia* sp. が高頻度で分離された。芦生では樹種ごとにエンドファイトの種組成は異な

ったが、ヤシャブシとイヌシデ、クマシデでは*Biscogniauxia* sp.1が、ミズメとツノハシバミ、アカシデ、サワシバでは*Glomerella acutata*が高頻度で分離された。加えてクマシデでは*Nemania* sp.1が、ツノハシバミでは*Pestalotiopsis* sp.1が高頻度で分離された。沖縄のハンノキでは*Nemania* sp.1が高頻度で分離された。

以上の結果から、カバノキ科のエンドファイトには樹種ないし地域に特異的なOTUと、樹種特異性が低く広域的に分布するOTUの両方が存在する可能性が示唆された。特に、ブナや冷温帯ブナ林で広範な樹種から分離されたクロサイワイタケ科エンドファイトが、ブナの分布域である冷温帯だけではなく、より寒冷的な亜高山帯や、より温暖な亜熱帯の樹木で検出されたことは興味深い。7～10月のデータを用いて、各月・各樹種で得られた分離菌株数に対するクロサイワイタケ科の菌株数の割合を算出したところ、平均値は御岳で18% (N=4)、芦生で46% (N=7)、沖縄で62% (N=1)と温暖な地域ほど高い傾向が認められた。クロサイワイタケ科エンドファイトは異なる気候帯にまたがった広域的な分布を持つ一方で、その分布パターンは温度といった環境傾度の影響を受けている可能性が考えられた。

(3) 培養温度が*Xylaria* sp.1の菌糸生長とブナ落葉分解に及ぼす影響 *Xylaria* sp.1の菌糸生長は、5℃から25℃までの範囲で、温度にともなって指数的に増加した(図1)。菌糸生長の最適温度は25℃(Qs1-1、Bc2-2)ないし30℃(Cr1-2)であった。35℃ではいずれの菌株でも菌糸生長は認められなかった。

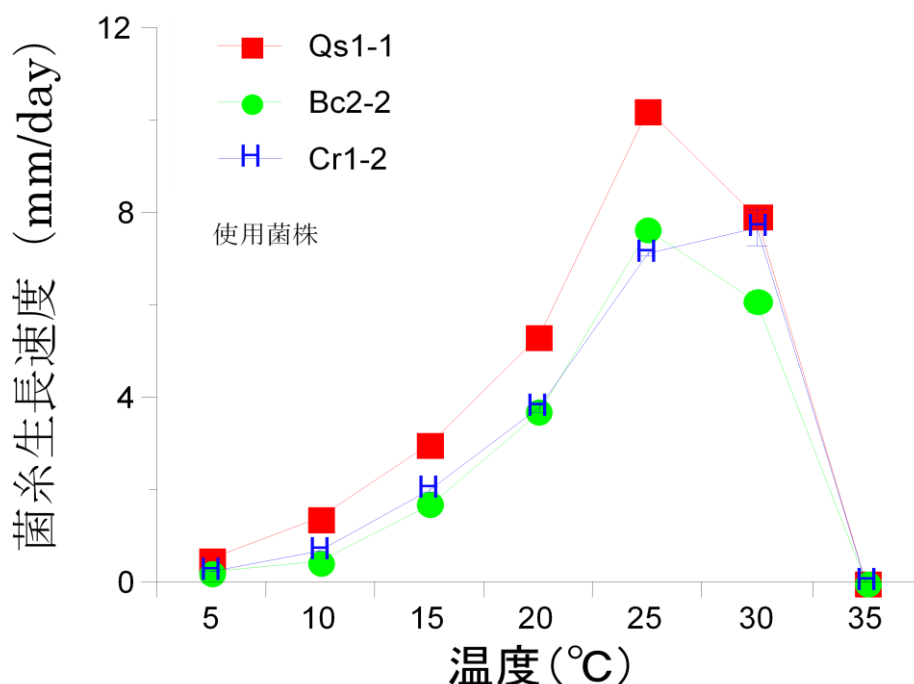


図1. 培養温度にともなう*Xylaria* sp.の3菌株の菌糸生長速度の変化

ブナ落葉の重量減少率は、Bc2-2とCr1-2では、5℃から25℃までの範囲で、温度にともなって直線的に増加した(図2)。Qs1-1では、5～15℃でほとんど変化が認められず、15～25℃の範囲で温

度にもなってブナ落葉の重量減少率が増加した。これら3菌株では、25℃以上では重量減少率の低減が認められ、35℃では落葉の重量減少がほとんど認められなかった。

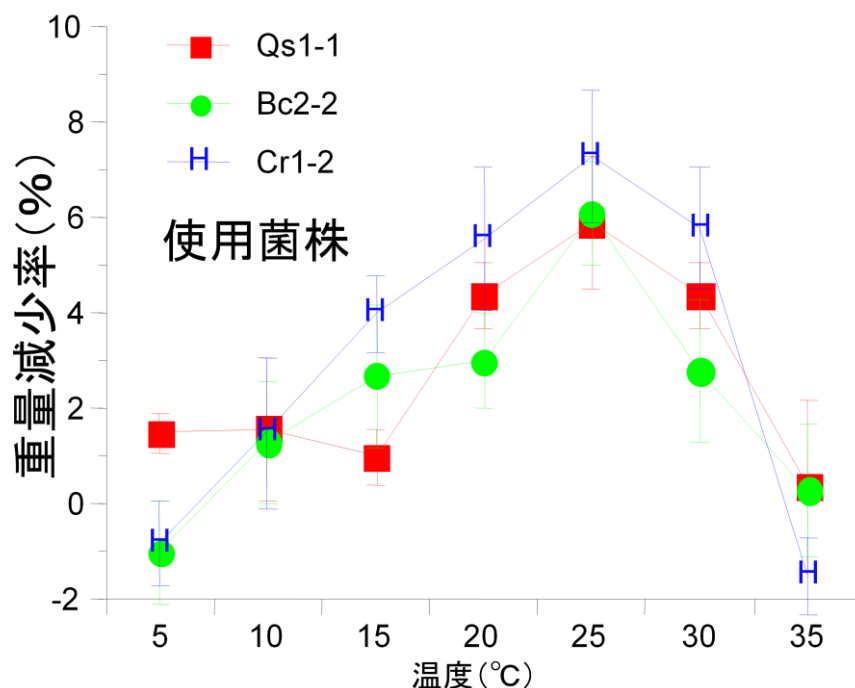


図2. 培養温度にともなう *Xylaria* sp. 1 の3菌株の落葉分解力の変化

表1. 培養温度にともなう *Xylaria* sp. 1 の3菌株のリグニン・全炭水化物の重量減少率の変化

菌株	温度	重量減少率 (初期重量に対する%)		
		落葉	リグニン	全炭水化物
Qs1-1	20℃	4.4	-1.1	15.3
	25℃	5.9	0.4	20.7
	30℃	4.4	3.3	14.4
Bc2-2	20℃	3.0	0.2	21.6
	25℃	6.1	1.9	25.6
Cr1-2	20℃	5.6	1	23.5
	25℃	7.3	-1.1	21.6
	30℃	5.8	4.6	16.4

落葉中のリグニン・全炭水化物の分解についてみると、20℃と25℃ではいずれの菌株でもほとんどリグニンの重量減少が認められず、-1.1~1.9% (初期重量に対する%、以下同様) の範囲であった (表1)。その一方で、いずれの菌株でも、20℃と25℃では、全炭水化物の重量減少率が15.3~25.6%であり、落葉の重量減少は主にセルロースやヘミセルロースの分解によることがわかった。30℃でのリグニン分解を調べたQs1-1とCr1-2の2菌株では、リグニンの重量減少率はそれぞれ3.3%と4.6%であり、20℃・25℃に比べてリグニン分解が促進されていた。その一方で、30℃で

は全炭水化物の重量減少率がそれぞれ14.4%と16.4%であり、20℃・25℃に比べて分解が抑制されていた。*Xylaria* sp. 1は、分解の最適温度である25℃以下ではセルロースを選択的に分解するが、30℃では落葉全体の分解は抑制されるものの、20℃・25℃に比べてリグニン分解活性が増加した。

以上の結果から、*Xylaria* sp. 1は菌糸生長と落葉分解活性の最適温度が25～30℃にあること、最適温度以下の温度条件では温度にともなって分解活性は増加するが、このとき炭水化物であるセルロースやヘミセルロースを選択的に分解すること、最適温度より上の温度条件では菌糸生長が抑制されるがリグニンの分解活性が増加すること、35℃では菌糸生長が認められなくなり落葉を分解しなくなることが明らかとなった。

(4) 樹種が*Xylaria* sp. 1の落葉分解に及ぼす影響 実験に用いた15樹種のリグニン濃度はヤマボウシの88mg/gからブナの415mg/gの範囲に、全炭水化物濃度はトチの235mg/gからオオウラジロの376mg/gの範囲に、窒素濃度はウリハダカエデの8mg/gからサワグルミの1.8mg/gの範囲にあった(表2)。これら14樹種の落葉について、*Xylaria* sp. 1 (GS19-1) が引き起こした重量減少率はミズナラの6.7%からヤマボウシの26.4%の範囲にあった(図3)。*Xylaria* sp. 1による落葉の重量減少率と、落葉の初期リグニン濃度とのあいだに有意な負の相関関係が(図3、 $R=-0.75$ 、 $P<0.01$ )、また落葉の初期全炭水化物濃度とのあいだに有意な正の相関関係が( $R=0.57$ 、 $P<0.05$ )、それぞれ認められた。落葉の重量減少率と、落葉の初期窒素濃度とのあいだに有意な関係は認められなかった( $P=0.38$ 、 $P>0.05$ )。

表2. 接種試験に用いた15樹種の落葉のリグニン・全炭水化物・窒素の各濃度

和名	学名	コード	濃度 (mg/g)		
			リグニン	全炭水化物	窒素
ブナ	<i>Fagus crenata</i>	Fc	415	289	17
ミズナラ	<i>Quercus crispula</i>	Qm	356	296	10
コナラ	<i>Quercus serrata</i>	Qs	374	263	9
コミネ	<i>Acer micranthum</i>	Am	153	323	8
ウリハダ	<i>Acer micranthum</i>	Ar	337	270	8
ヤマボウシ	<i>Cornus kousa</i>	Cy	88	328	10
ミズメ	<i>Betula grossa</i>	Bg	362	267	11
アカメガシワ	<i>Malotus japonicus</i>	Mj	154	271	12
クリ	<i>Castanea crenata</i>	Ck	322	296	11
アカシデ	<i>Carpinus laxiflora</i>	Cl	178	326	13
ホオノキ	<i>Magnolia obovata</i>	Mo	310	314	10
タニウツギ	<i>Weigela hortensis</i>	Wh	355	286	10
トチ	<i>Aesculus turbinata</i>	At	380	235	9
サワグルミ	<i>Pterocarya rhoifolia</i>	Pr	359	250	18
オオウラジロ	<i>Malus tschonoskii</i>	Mt	251	376	8

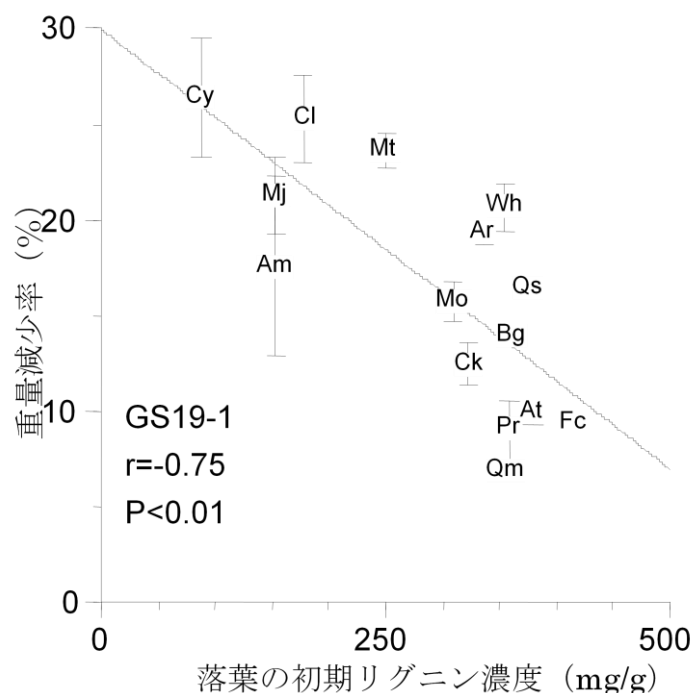


図3. 15樹種の落葉の初期リグニン濃度と *Xylaria* sp. 1が引き起こした落葉の重量減少率との関係。

以上の結果から、*Xylaria* sp. 1の分解力は落葉の樹種ごとに変化すること、落葉の化学組成、特にリグニンと全炭水化物の濃度が *Xylaria* sp. 1による落葉分解に影響を及ぼすことが明らかとなった。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

葉圏菌類であるエンドファイトが落葉からも出現することは以前からよく知られていた。ブナ落葉からはさまざまな葉圏菌類が出現するが、同科エンドファイトは *Ascochyta fagi*, *Pestalotiopsis*属菌、*Cladosporium cladosporioides*などブナの主要な他の葉圏菌類に比べて分解力が高く、ブナ落葉の分解プロセスにおいて中心的な役割を担っている。よって環境変動と落葉分解との関連性という観点からは、同科エンドファイトの出現や挙動が重要であるといえる。

昨年度、ブナ林を構成する94樹種を対象とした研究を実施し、クロサイワイタケ科エンドファイトが広範な樹種から出現することと、落葉分解に関与することを実証的に示し、同科エンドファイトが群落レベルで優占的なエンドファイトであることがわかった。またカバノキ科樹種を対象とした広域的な比較調査から、同科エンドファイトが亜高山帯から亜熱帯までの幅広い気候帯に分布することを明らかにした。このような気候帯および樹種の変化にともなう同科エンドファイトの分解活性の変化を、培養系における接種試験から実証的に明らかにしたことが本研究の成果である。

それをふまえて本研究では、同科エンドファイトのなかでもっとも高頻度で出現した *Xylaria* sp. 1を材料に、同種の落葉分解活性が培養温度や落葉中のリグニン濃度にもなって変動することを定量的に明らかにし、エンドファイトによる落葉分解の律速要因を解明した。これらの成果

は当該研究分野における新知見である。葉圏菌類の多様性プロファイルを分解機能の観点から実証的に示した新規性、独創性の高い成果といえる。

## (2) 地球環境政策への貢献

本研究の結果から、25℃までの温度環境下では葉圏菌類の落葉分解活性は温度にともなって変化するが、セルロースの選択的分解という分解様式は変化しないこと、25℃以上の温度環境下では葉圏菌類の落葉分解活性は低下するが、リグニンの分解活性が相対的に増加し分解様式が質的に変化することがわかった。このことは、将来的な温度変化、特に気温が25℃を上回る夏期の温度環境の変化にともなって、葉圏菌類の分解機能がどのように変化し、それが土壌分解系における植物遺体の集積や分解にどのような影響を及ぼすのかを予測する上で、不可欠の情報である。例えば、25℃までの温度範囲では、温度上昇にともなって炭水化物の分解が促進されるため、短期的には落葉からの二酸化炭素放出は促進される。しかしリグニンが未分解で落葉中に残留するため、落葉中に含まれる未分解の炭素は難分解性の土壌有機物として土壌中に長期的に集積すると予想される。ところが25℃より高い温度条件下では、短期的には落葉からの二酸化炭素放出は抑制されるものの、リグニン分解の活発化により難分解性の土壌炭素が二酸化炭素にまで分解されるため、地球温暖化に正のフィードバックを引き起こすかもしれない。

このような温度環境の変化は、長期的には、気候帯の移動や、森林構成樹種の地理的な分布パターンの変化を引き起こし、ひいては林分レベルでの樹種組成を変化させる可能性がある。地球環境政策において、温暖化の多様性や物理化学的な環境への影響予測が盛んに行われているが、カーボンサイクルの変化が実際にどのように生じるかを正確に予測する上で、本研究の知見を考慮することで、より正確な予測が可能になると思われる。

本研究の成果は、葉圏菌類の多様性プロファイルが地球環境変動の指標として有用であることを示すとともに、地球環境変動にともなう多様性プロファイルとその機能面での変化が地球環境にどのようにフィードバックするのかを理解する上で、有用な情報を与えてくれるものであり、環境変動評価、予測の精度を上げるための基礎知見を提供する。

## 6. 引用文献

- Osono T. 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 701-716.
- Osono T. and Hirose D. 2009. Effects of delignification of *Camellia japonica* leaf litter by an endophytic fungus on the subsequent decomposition by fungal colonizers. *Mycoscience* 50: 52-55.
- Osono T. and Takeda H. 2002. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia* 94: 421-427.
- Promptutha I., Lumyong S., Dhanasekaran V., McKenzie E. H. C., Hyde K. D. and Jeewon R. 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Molecular Ecology* 53: 579-590.
- 三浦宏一郎・工藤光代. 1970. 水生不完全菌のための一寒天培地. *日菌報* 11: 116-118.
- White T. J., Bruns, T., Lee S. and Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing

of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications (eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J.) Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.

#### 7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

#### 8. 研究成果の発表状況

##### (1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) 大園享司: 日本菌学会報, 50, 1, 1-20 (2009)

“わが国における樹木の葉圏菌類(エンドファイト・エピファイト)の生態学的研究”

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

##### (2) 口頭発表(学会)

- 1) T. Osono: China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun 2008, Changchun, China, 2008

“Ecology of endophytic and epiphytic phyllosphere fungi on deciduous and evergreen trees in Japan”

- 2) 升屋勇人・山口宗義・大園享司: 日本菌学会第53回大会(2009)

“ブナ葉圏菌類の多様性プロファイルに関する予備調査”

- 3) 升屋勇人、大園享司、山口宗義: 樹木病害研究会(2010)

「ブナ葉圏菌類と気候変動」

##### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

##### (4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

##### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

##### (6) その他

特に記載すべき事項はない。