T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	森林土壌中の菌核における微生物相の解析と微生物担体としての有効性評価に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	野々山弥
Author(English)	Yaya Nonoyama
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第8025号, 授与年月日:2010年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:渡邊 眞紀子,石川 忠晴
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第8025号, Conferred date:2010/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

森林土壌中の菌核における微生物相の解析と微生物担体としての有効性評価に関する研究

東京工業大学大学院　総合理工学研究科
環境理工学創造専攻　渡邊・石川研究室

野々山　弥

目次

第 1 章　序論　1

1-1. 菌核とは ……1

1-1-1. 一般的な菌核とは ……1

1-1-2. 森林土壌に形成される菌核に関する既存の研究 ……6

1-2. 微生物担体とは ……11

1-3. 研究の目的 ……14

第 2 章　菌核内部の菌類相　16

2-1. 緒言 ……16

2-1-1. 菌類の同定 ……16

2-1-2. 微生物相の解析 ……16

2-1-3. 本章の目的 ……18

2-2. 土壌サンプリングと菌核採取 ……21

2-2-1. サンプリング地点 ……21

2-2-2. 菌核の採取 ……21

2-2-3. 供試菌核の粒径および質量 ……22

2-3. 非培養法による菌類群集構造解析 ……27

2-3-1. 実験方法(クローンライブラリー法) ……27

2-3-2. 実験結果および考察 ……34

2-4. 培養法による菌類の分離 ……38

2-4-1. 実験方法(培養法) ……38

2-4-2. 実験結果および考察 ……41

2-5. 結語 ……46

第 3 章　DSE 分離株の特徴と菌核形成　47

3-1. 緒言 ……47

3-1-1. DSE とは ……47

3-1-2. 菌核形成条件 ……49

3-1-2. 本章の目的 ……49

3-1-3. 菌核形成条件の設定 ……50

3-2. DSE の特徴確認 ……53

3-2-1. 実験方法 ……53

3-2-2. 実験結果および考察 ……53

3-3. 培養条件による菌核形成条件試験 ……57

3-3-1. 実験方法 ……57

3-3-2. 実験結果および考察 ……58

3-4. 結語 ……68

第 4 章　菌核内部の細菌相　69

4-1. 緒言 ……69

4-2. 非培養法による細菌群集構造解析 ……71

4-2-1. 実験方法（クローンライブラリー法） ……71

4-2-2. 実験結果および考察 ……71

4-3. 培養法による細菌群集構造解析 ……78

4-3-1. 実験方法（DNB 培養法） ……78

4-3-2. 実験結果および考察 ……78

4-4. 結語 ……82

第 5 章　菌核の微生物担体としての有効性評価　83

5-1. 緒言 ……83

5-1-1. 細菌の定着実験 ……83

5-1-2. 既存の微生物担体との比較 ……83

5-1-3. 本章の目的 ……84

5-2. 細菌培養液を用いた定着実験 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・85
5-2-1. 実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・85
5-2-2. 結果および考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・87
5-3. 既存の微生物担体との比較 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・93
5-3-1. 方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・93
5-3-2. 結果及び考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・96
5-4. 結語 ・・106

第 6 章 結論 107

6-1. まとめと結論 ・・107
6-2. 今後の課題 ・・・112

引用文献 ・・115
謝辞 ・・・124
本研究に関わる研究業績一覧 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・126

第 1 章　序論

1-1. 菌核とは

1-1-1. 一般的な菌核とは

菌核（sclerotium）は、菌類により形成される菌糸組織から成る休眠体である。いくつかの菌類は、乾燥や低温など生息に不利な環境において耐久体である菌核を形成し、増殖に適した環境になると、菌糸伸長、胞子、子実体形成などの方法で発芽する（Willetts 1971）。菌核の多くは、菌糸の色に依存せず黒褐色など暗色を呈し、硬化した構造物を形成する(Ulloa and Hanlin 2000)。これは、菌核の細胞壁にメラニン様色素が沈着し、肥厚が著しくなるためである（Naiki and Ui 1975）。菌核は、通常内部や表面に胞子（生殖細胞）を形成しないが、菌核を形成したホスト菌が発芽して増殖を再開する能力を持つ（Kirk et al. (eds) 2001）。

菌核を形成する菌類には、イネなどの作物に菌核病を生じる植物病原菌 *Rhizoctnia solani* や *Sclerotium rolfsii*、アカマツなどの針葉樹の外生菌根菌として知られている *Cenococcum geophillum* や植物根と共生関係を持つ *Phialocephala fortinii*、古くから味噌などの発酵食品に利用されてきた麹菌 *Aspergillus oryzae* などが挙げられる。しかし、菌核に関する研究の多くは、植物病理学分野で農業被害を与える菌核病菌の感染抑制に関するものである（斎藤 1977; Moromizato et al. 1996; Hausner and Reid 1999）。

菌核形成が報告されている菌類の菌核を Fig. 1-1 にまとめた。菌類の

種類によって形成する菌核の大きさや形態が異なっている。また、同種の菌類でも、菌核を形成する季節や環境によって菌核の粒径や色、形態が異なることが報告されている(松本 2005; Okabe et al. 1998)。さらに、Coley-Smith and Cooke (1971)は、菌類の種類によって、1 ヶ月～13 年と菌核の生存期間も異なることを報告している。

一般的な菌核の構造は、Fig. 1-2 に示すように、球体の外側には硬化した皮質を持ち、内部の菌糸から外側方向へ菌糸の変質の度合いが徐々に大きくなる。菌核の外側はセル構造になっており、中には中心が空洞化した中空のものもある。菌核の構造形態は菌の種類によって異なり、*Paxillus involutus*、*Sclerotinia minoe* Jagger、*Rhizoctonia solani* KÜHN などの病原菌の菌核の構造については詳細な研究がなされている（Grenville et al. 1985; Bullock et al. 1980, 1983; Moromizato et al. 1997)。

一般的な菌核の発達は、①第一段階期、②サイズ増大期、③成熟期の 3 段階からなる（Butler 1966; Willetts 1978)。①初期段階では、小さな原基(核)を形成するために菌糸が集まり、隔壁のある菌糸が配列し、ぎっしりと詰まった菌糸の塊を形成する段階である。この際、複数の菌糸が束となった菌糸束の形成、菌糸の凝集などが見られる。次の②サイズの増大では、形成された菌糸束や菌糸凝集を核として菌糸が外側方向へ菌糸伸長したり、短い間隔で分枝したり、養分の貯留による菌糸幅の広い短い太った細胞に変化したりする現象が見られる。この段階で、最終的な大きさまでサイズが増大する。最終段階である③成熟では、隣り合った菌糸細胞が吻合、接合により結合する。この際、厚く接合した壁（外皮）が形成されることで菌糸マットから独立することにより、成熟が完了する。

病原菌のような増殖の速い菌類は、菌核の形成時間も速いことが知られている。トマト小粒菌核病の病原菌である *Sclerotinia minor* Jagger は、菌核の初期段階が起こった後 12-24 時間で菌核の形成過程である菌糸とは異なる構造を作り始める（Bullock et al. 1980）。さらに、イネ紋枯病菌である *Rhizoctonia solani* においては、形成開始後約 15 日で成熟が完了することが報告されている（羽柴 1983）。そのため、病原菌の菌核においては、菌糸がゆるく絡まっただけの外皮が無い構造のものも多い。また、*Sclerotinia sclerotiorum* の菌核（Fig. 1-1 G）のように、形成が早い菌核は、球形ではなく、いびつな形を持つものが多い。

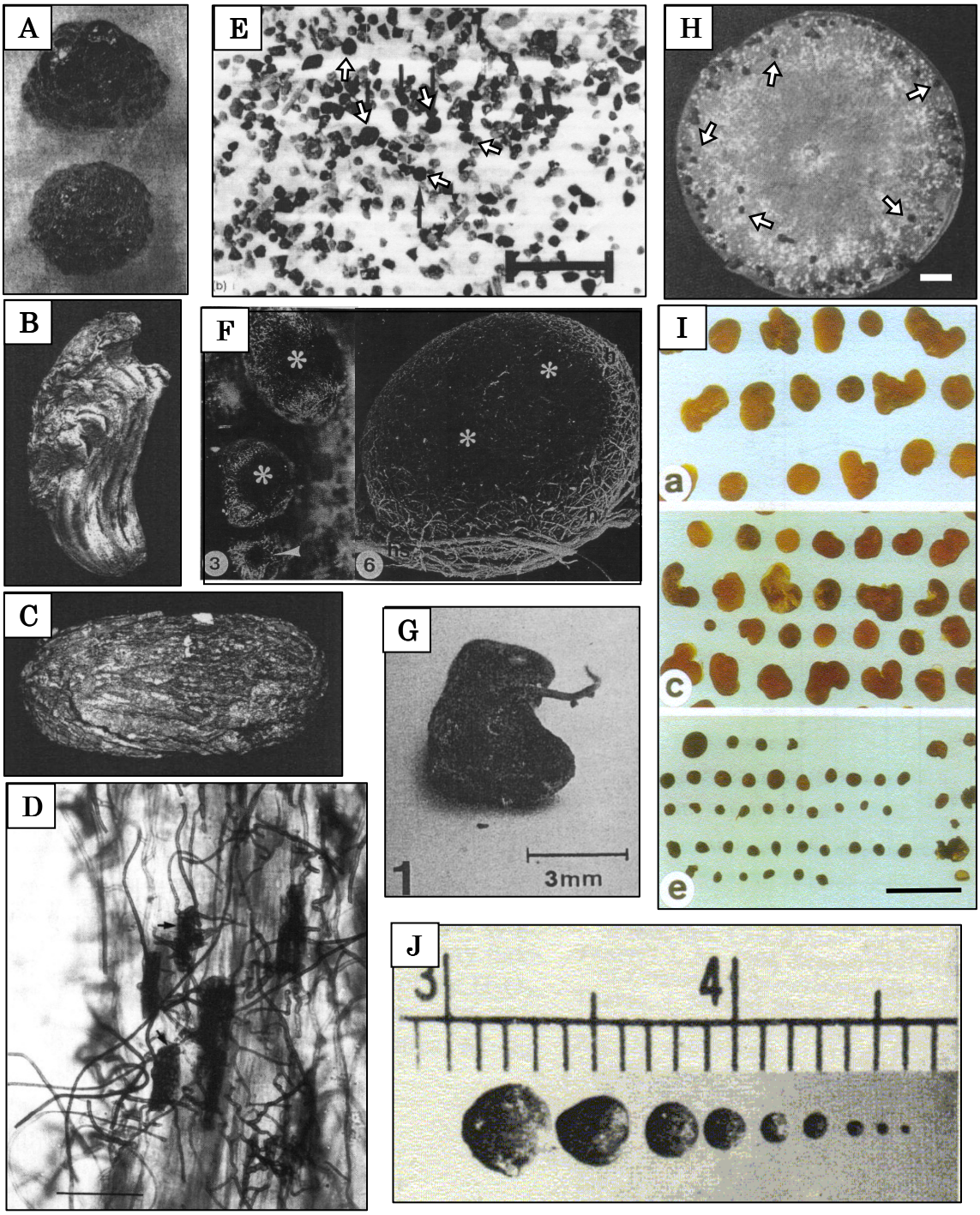


Fig. 1-1　菌類が形成する菌核（形成菌 [文献]）

（A. *Sclerotinia* sp.(1.6×); B. *Claviceps gigantea*; C. *Wolfiporia cocos* [Ulloa and Hanlin 2000] ;
D. 植物根細胞内の *Phialocephala fortinii* の菌核（Scale=50μm）[O'Dell et al. 1993];
E. *Sclerotium cepivorum*（矢印）Scale=3mm[Harper and Stewart 2000];
F. *Paxillus involutus*（③19×、⑥160×）[Grenville et al. 1985];
G. *Sclerotinia sclerotiorum*（Scale=3mm）[斎藤　1977];
H. プレート上の *Rhizoctonia solani* の菌核（矢印）Scale =1cm[Moromizato et al. 1991];
I. 23,28,33℃で形成された *Sclerotium rolfsii* の菌核（Scale=1cm）[Okabe et al. 1998];
J. *Cenococcum graniforme*, Scale =1mm[Trappe 1969]）

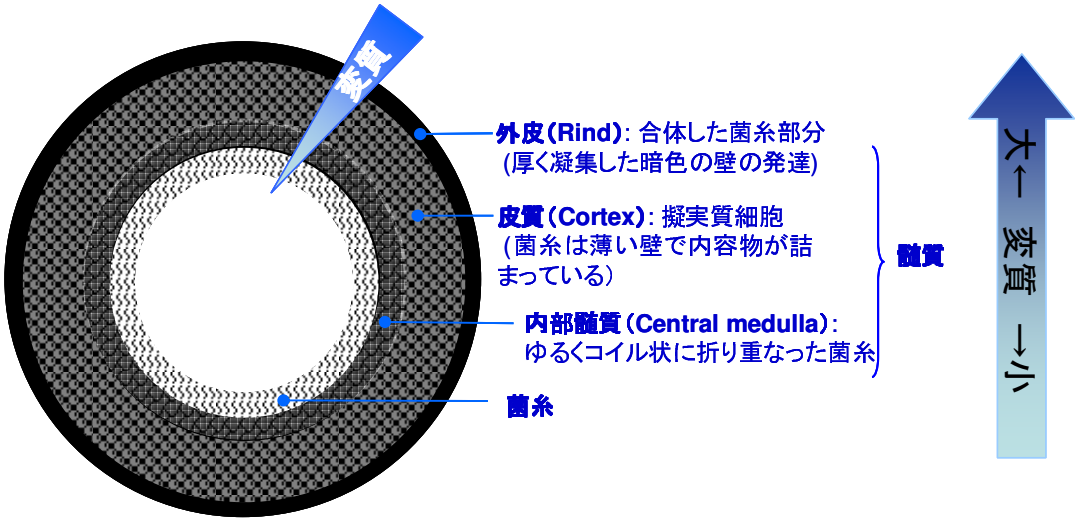


Fig. 1-2　一般的な菌核の構造形態

（Butler 1966; Willetts 1978 をもとに作成）

1-1-2. 森林土壌に形成される菌核に関する既存の研究

本研究で対象とする菌核を、Fig. 1-3に示す。主に冷温帯の森林土壌中に形成される粒径約 0.2-4 mm 程度の黒色球体の菌核は、形態的特徴から外生菌根菌 *Cenococcum geophillum* により形成されたものと考えられている(Kumada and Hurst 1967, Trappe, 1969)。森林土壌に見られる菌核は、きれいな球体で、外皮を持つ（Fig. 1-3 b, c)。Fig. 1-3 f に示すように、セル構造の中には、細菌の定着が見られ、隣り合ったセルは菌糸由来の0.5～2μm程度の隔壁孔によりつながっている。

森林土壌から採集された *C. geophillum* が形成したと推定される菌核の研究としては、Watanabe et al. (2001)によって、土壌から検出された菌核は、高い炭素量と低レベルのケイ素、高濃度のアルミニウムという特徴的な元素組成を持つことが報告されている。菌核の成分は、Fig. 1-4 に示すように、炭素が 48%、水素が 3%、酸素が 30%を占め、その他金属元素が 7%程度含まれる（Watanabe et al. 2007b)。参考として、菌類 *Mucor rouxii* の細胞壁組成（細胞壁乾燥重量に対する%）を Table 1-1 に示す。菌核は、菌体から成るため、菌糸の主成分であるキチン・キトサン由来と思われる炭素が多くの割合を占めることがわかるが、菌糸に約 22%含まれるリン酸やキチン・キトサンの構成元素である窒素が、極端に少ないことが特徴であると言える。しかし、Moore et al. (1991) は、*Paxillus involutus* の菌核の貯留物質、リンが形成時に菌核内部に取り込まれることを報告している。また、*Claviceps purpurea* の菌核において、低温活性化が貯留した脂質の利用と同時に呼吸数の増加と水分吸収能力を促進させると報告されている（Mitchell and Cooke 1968)。これらの報告から、低温環境に残存していた菌核は、徐々に脂質やリン酸・窒素などの栄養素が減少したと考えられる。

菌核の分布については、菌核が形成される土壌の特徴として非アロフェン土壌であることが挙げられ、菌核の密度はA層で比較的高いことが明らかとなっている（Watanabe et al. 2002)。さらに、坂上ら(2004)は、土壌から検出される菌核の分布と土壌化学性の関係を報告しており、土壌中の交換性アルミニウム量、全炭素量、全窒素量の増加に伴い、菌核の平均質量が大きくなることを報告している。

Trappe(1969）は、土壌から採取された*C. geophillum*菌核において、菌核は発芽機能を失っても長期間土壌中に残留するということも報告している。Watanabe et al (2007a)は、妙高山の土壌から採取した菌核のAMS^{14}C年代を測定し、modern～1800年であることを確認しており、菌核が長期間土壌中に残存することを確認している。さらに、同地点の菌核から培養法により分離される細菌は、*Sphingomonas*属が52%と高い割合で優先したことが報告されている（Ohta et al. 2003)。菌核内部に細菌が生息するにもかかわらず、長期間土壌の残存できるのは、菌核に沈着したメラニン色素により微生物の分解に対して耐性を持つ（内記,宇井 1980）ためであると考えられる。

しかしながら、森林土壌に見られる菌核に関する研究は、病原菌の菌核に比べて少ない。また、こうした菌核の特質を新しい技術の開発に結びつけようとする試みは、まだなされていない。

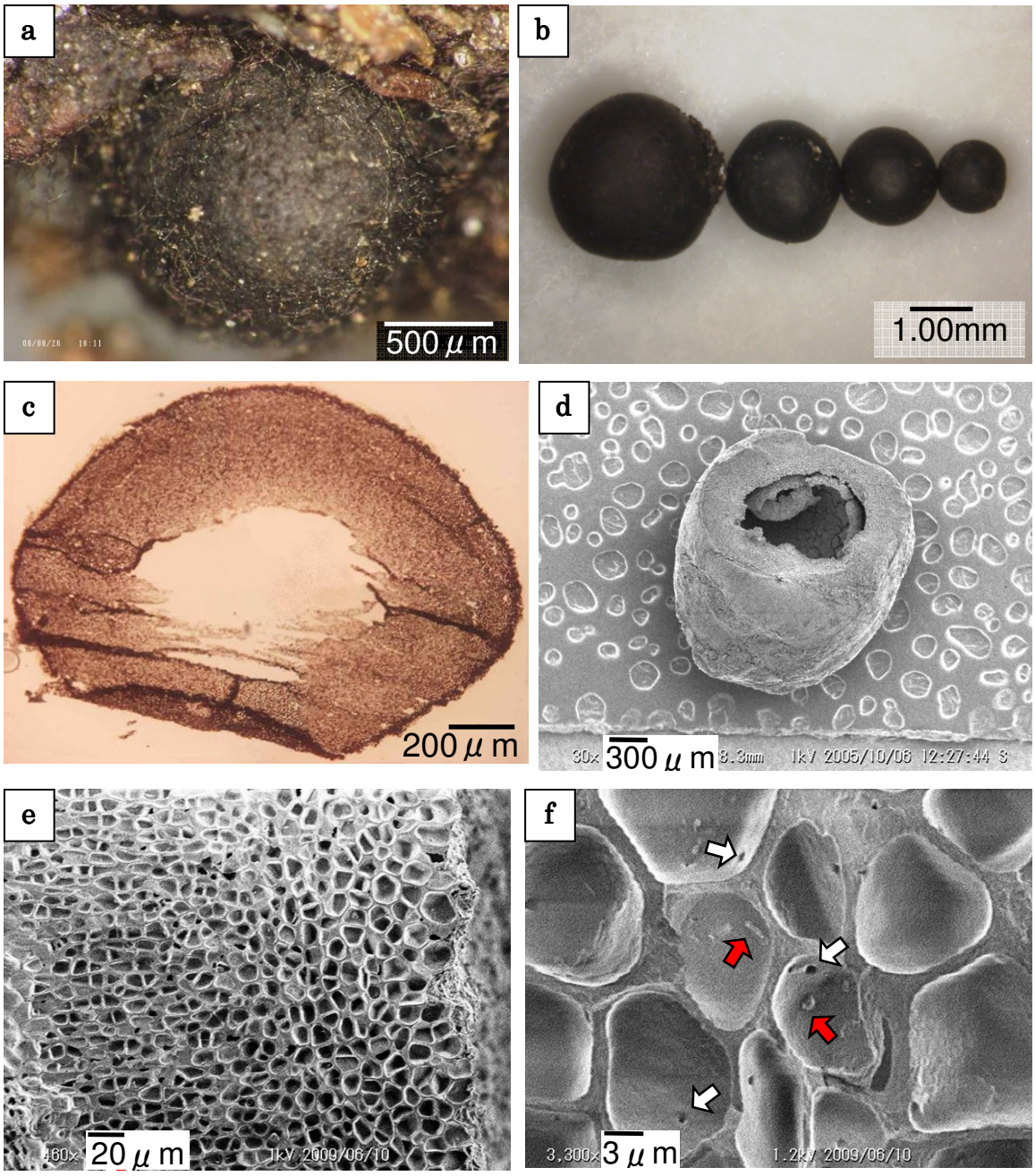


Fig. 1-3　岐阜県御嶽山土壌から採取した菌核の顕微鏡写真

（a. 土壌中の菌核； b. 様々な大きさの菌核； c. 凍結ミクロトームによりスライスした菌核； d. 上部を切り取った菌核（SEM）； e. 菌核のセル構造（SEM）； f. 菌核のセル構造に見られる細菌[赤矢印]と隔壁孔[矢印]）

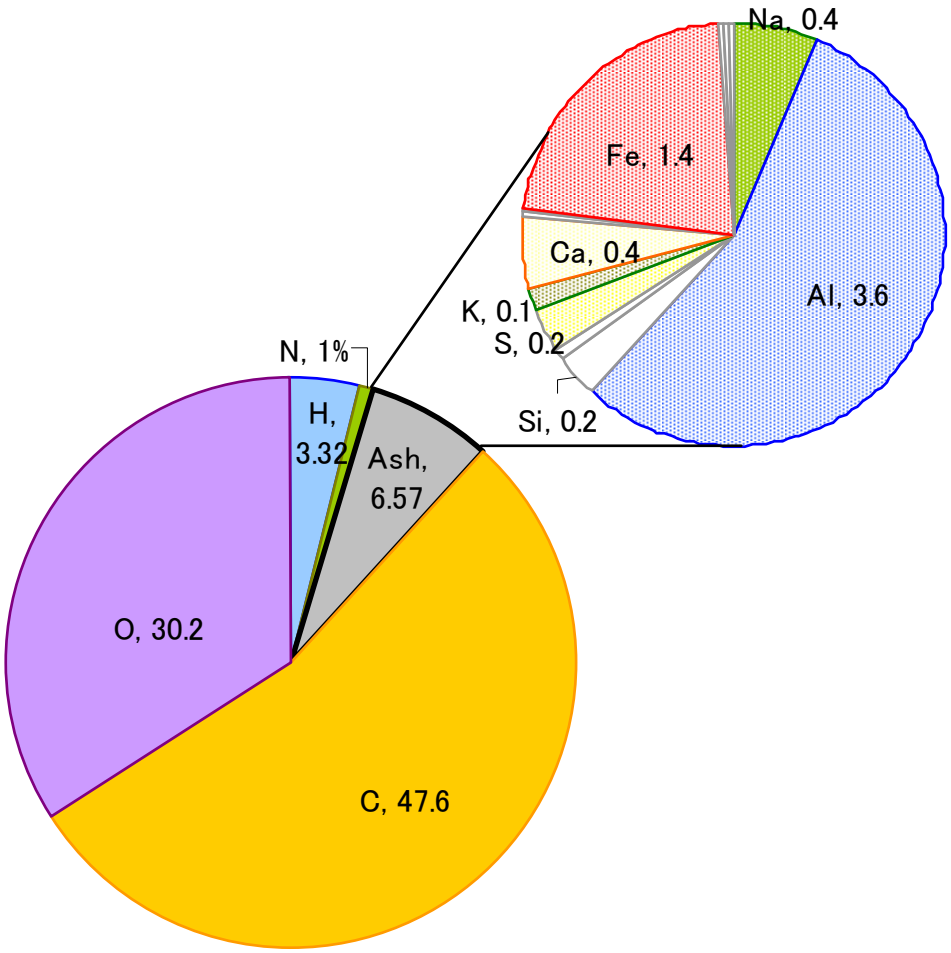
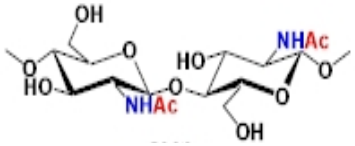
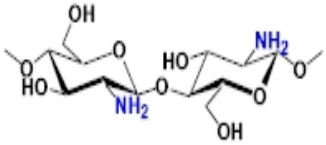
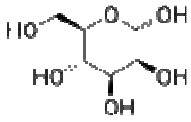
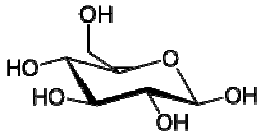


Fig. 1-4　森林土壌から採取された菌核の元素組成［%］

（Watanabe et al. 2007b を基に作成）

Table 1-1　**Mucor rouxii**の細胞壁組成（細胞壁乾燥重量に対する%）

J.W.ディーコン．1989．現代真菌学入門．pp.37をもとに作成

成分	化学構造	割合　%
キチン		9.4
キトサン		32.7
マンノース		1.6
タンパク質		10.3
リン酸	H_3PO_4	22.1
その他	ー	22.4

1-2. 微生物担体とは

微生物担体とは、微生物がすみかとして利用できる構造物で、内部に微生物を保持することのできるキャリアーであり、微生物資材とも呼ばれる（野々山 1996)。微生物担体の多くは、水処理に利用されている。プラスチック担体やセラミックスなどの微生物担体は、排水の浄化に用いられており、有害物質分解菌を保持した担体に水を通すことで水中の有害物質の分解や COD の低下に対する効果がみられることが報告されている（Kariminiaae-hamedaani et al. 2003; 藤井ら 2003)。

土壌中においても、微生物担体が有効であることは、既に報告されている。土壌の場合、有用菌を直接土壌に投入しても、もともと土壌に生息している土着の微生物が多いために、有用菌は機能する前に死滅してしまう。しかし、微生物担体に有用菌を保持した後に土壌に投入すると、効率的に機能を発揮することが知られている（岩間 1999)。木嶋（1994）は、菌類による病害（白絹病や根こぶ病、菌核病）などに対する拮抗微生物である *Pseudomonas*、*Bacillus* 属細菌や乳酸菌などを担体に保持して利用する病害防除を報告している。野口（1997）は、微生物資材に対する研究の状況として、その多くが病害防除や脱臭・堆肥化・有機物分解、微生物資材の評価であり、それに関連する特許の出願数も多いことを報告している。このように、土壌においては、担体に定着させる有用菌のほとんどは、植物病害菌に対する拮抗微生物であることが多く、有害物質の分解菌に関する報告は少ない。

土壌に使用される微生物担体としては、ゼオライト、木炭、籾殻、カニ殻、バーミキュライト、樹皮、キトサンビーズなどが知られている。Table 1-2 に土壌で使用されている微生物担体の種類と効果をまとめた。

微生物担体には、ゼオライト、木炭のように土着の微生物の栄養とならない低栄養担体と、カニ殻、籾殻などの有用微生物には栄養源となるが土着の微生物には利用されにくい選択的栄養担体がある（岩間 1999)。前者は、低栄養なことから本来は微生物が増殖する場とならないが、pH や孔隙径が適当であれば吸着された微生物が再び活動を開始するまでの期間格好のすみかとなる。また、土壌の物理性を改善することで微生物活性を上げるものとも考えられている。担体に用いられている物質の SEM 画像を見ると、細孔を持つものが多いことがわかる。微生物の生息空間としては、ミクロ団粒とマクロ団粒の表面および空間が階層的に共存する土壌団粒構造の孔隙や、微生物の増殖に適した大きさの細孔を多く持つ木炭が、適していることが報告されている（磯部　2001; 大平ら 1992)。

これら微生物担体に用いられている物質の共通点は、微生物のすみかに適した細孔を持ち、難分解性であることである。これらは、Fig. 1-3 e に示すような多数の細孔を持ち、長期間土壌中に残存することが報告されている森林土壌に見られる菌核の特徴と一致する。さらに、Ohta et al (2003)により、菌核内部から細菌が分離されたことが報告されていることから、菌核は、微生物が利用可能な生息空間であることが推測できる。

Table 1- 2　現在土壌で使用されている微生物担体の種類とその特徴・使用例

（岩間 1999; 木嶋 1994 を基に作成）

担体の種類	使用例（効果）
ゼオライト	土壌の保肥力、保水力の改善。 イチゴ萎黄病の防除。 VA菌根菌を保持させる。
木炭	土壌の物性（透水）性の改良により、根粒菌（マメ類）、菌根菌（トマト、VA菌根）の活性化
カニ殻	キチン質が、フザリウム由来の土壌病害を軽減。 インゲン根腐病、ダイコン萎黄病、キャベツ萎黄病の抑制効果。
籾殻	保水性、保肥力が低いが、炭化することで、内部に多数の細孔ができ、微生物の生息空間として適している。

1-3. 研究の目的

森林土壌に見られる菌核は、これまでに成分や存在量、発芽に関する研究がなされているが、植物病原菌の菌核に比べてその研究例は少ない。特に、菌核は、菌類により形成されたものであり、多くの微生物が生息する土壌から検出されることから、土壌微生物の生態を知る上で、重要な位置にあると考えられる。それと同時に、菌核は、微生物が生息可能な空間を持つことから、微生物を用いた環境修復技術（バイオレメディエーション）への応用が期待される。

そこで、本研究では、菌核の微生物相を解析すると共に、菌核の微生物担体としての有効性評価を行う。最終的には、土壌で使用可能な新しい微生物担体を提案することを目的とする。

Fig. 1-5 に、論文の構成を示す。第 1 章では、本研究に関わる既往研究をまとめ、本研究の目的を述べる。　第 2 章では、菌核の菌類相を非培養法および培養法で解析することで、菌核形成菌を推定する。第 3 章では、第 2 章で得られた分離株を用いて菌核形成をコントロールする要因を検討する。第 4 章では、菌核内部の細菌相を非培養法および培養法で明らかにすることで、内部を利用できる細菌の検討と細菌の生息空間としての評価を行う。第 5 章では、第 4 章で分離された細菌の菌核への定着を確認すると共に、微生物の生息空間として重要な構成成分、細孔構造の確認と水分保持能力を既存の担体と比較することで、微生物担体としての有効性評価を行う。第 6 章では、本研究の結論と今後の課題を述べる。

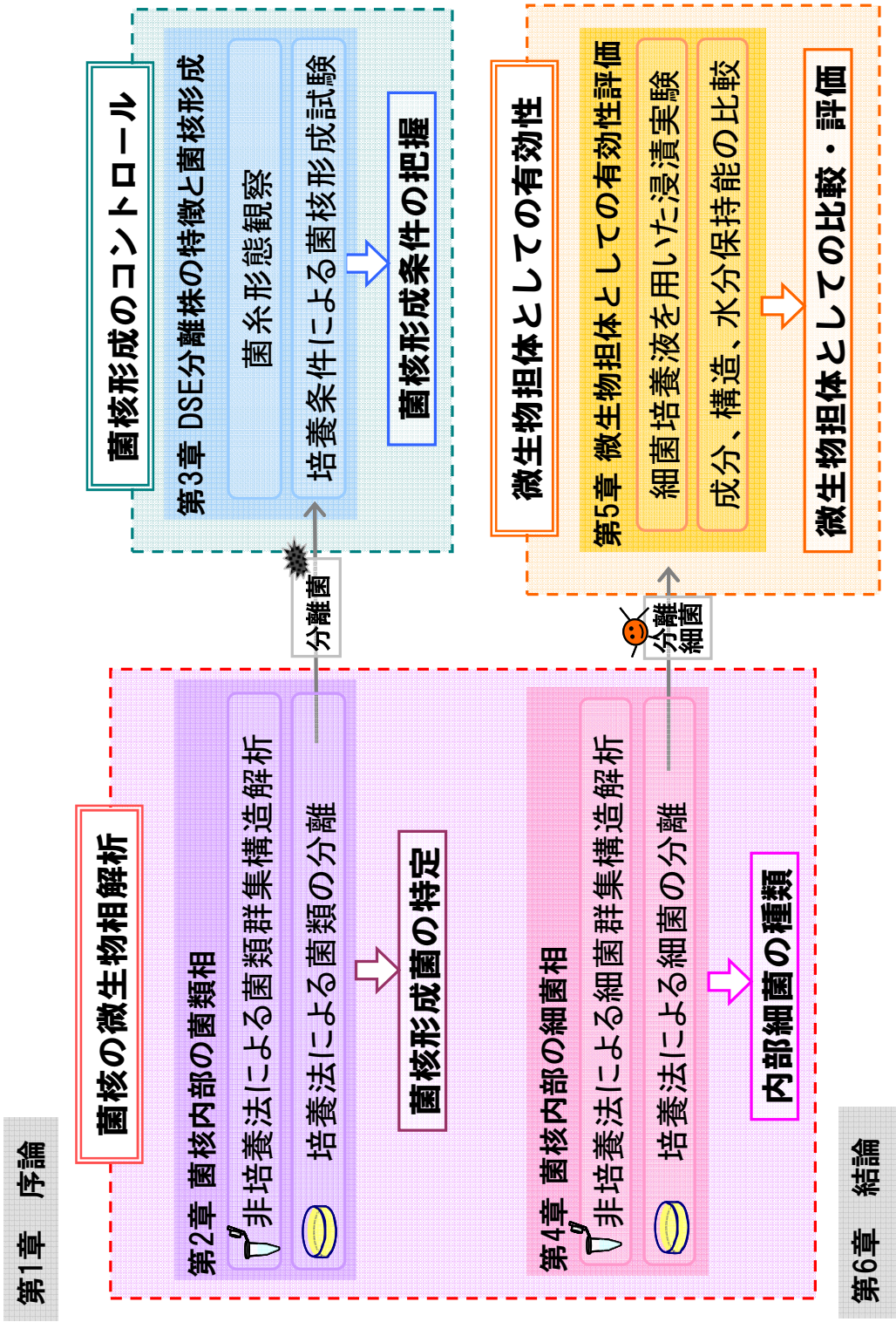

第1章　序論
菌核の微生物相解析
第2章 菌核内部の菌類相
非培養法による菌類群集構造解析
培養法による菌類の分離
菌核形成菌の特定
分離菌
菌核形成のコントロール
第3章 DSE分離株の特徴と菌核形成
菌糸形態観察
培養条件による菌核形成試験
菌核形成条件の把握
微生物担体としての有効性
第5章 微生物担体としての有効性評価
細菌培養液を用いた浸漬実験
成分、構造、水分保持能の比較
微生物担体としての比較・評価
分離細菌
第4章 菌核内部の細菌相
非培養法による細菌群集構造解析
培養法による細菌の分離
内部細菌の種類
第6章　結論

Fig. 1-5　論文の構成

第 2 章　菌核内部の菌類相

2-1. 緒言

2-1-1. 菌類の同定

真核生物における rDNA の構造を Fig. 2-1a に示す。菌類の種レベルの同定には、rDNA 遺伝子の 18S 領域、ITS (Internal transcribed spacer)領域の塩基配列がしばしば使用される。rDNA 遺伝子の 4 つのサブユニット（18S, 5.8S, 26S (large subunit), 5S）の長さは、菌種にかかわらずほぼ同等であるが、ITS は菌種により長さが著しく異なる。杉田、西川(2004)は、一般的に ITS 領域の方が 18S 領域より詳細な同定が可能であると報告している（Fig. 2-1b)。また、18S 及び ITS 領域で検討した結果においても、ITS 領域の方がより詳細な同定を得られることから、本章における菌類の同定には、ITS 領域を採用した。

2-1-2. 微生物相の解析

Table 2-1 に、微生物相の解析方法である非培養法と培養法それぞれの特徴をまとめた。

自然環境中に常在する微生物の多くは、生きているが培養できない VBNC（viable but nonculturable）状態にある（Gauthier 2004)。平板培養法でコロニーとして検出できる土壌中の微生物は、顕微鏡による直接計数法で得られる生菌数の 0.001～4%にすぎないと言われている（Kieft 2004)。そのため、培養法により得られた微生物相は、実際の多

様性を反映していない可能性が高い。それに対し、非培養法による解析は、環境中のサンプルから直接 DNA を取り出すことで、培養できない菌、培養されにくい菌に左右されずに、微生物の多様性を見ることができるため、より実際に近い生態系を把握することができる。このような理由から、環境中の微生物相の解析によく利用される（Watanabe and Baker 2000)。しかし、非培養法はサンプル中の DNA を全て抽出するため、生菌と死菌の区別ができず、死菌の DNA も抽出されてしまう。さらに、DNA の情報だけしか得られないため、本来は自然生態系には存在しない人工的な PCR 増幅産物（人工キメラ産物）が一定割合で発生する PCR artifact という問題もある(日本微生物生態学会編著, 2004)。また、同定したその菌の菌株を実際には得ることができないため、それらの活性試験をすることができないという欠点もある。そのため、蛍光顕微鏡による蛍光染色・直接観察法（生菌・死菌数、分布の把握)、FISH 法（特定の菌の有無と分布)、培養法（分離株の取得と活性試験）などの他の方法を組み合わせることで、より実際の生態系に近い群集構造解析結果やそれら微生物の情報が得られる（Watanabe and Baker, 2000)。このように、注意すべき点はあるが、非培養法は、菌核及び周辺土壌における微生物相の解析において有効な方法であると言える。

また、非培養法では直接 DNA を抽出するために遺伝子情報しか得られないのに対し、培養法は実際に分離菌株を得ることができる。菌株を入手することで、形態観察や活性試験を行うことができ、菌株に関する詳細な情報が得られる。さらに、培地を複数使用することで、多種の菌株を分離することができる。

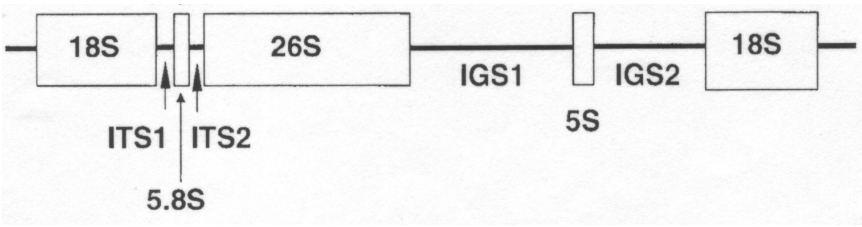
2-1-3. 本章の目的

今までに、Trappe（1969）は土壌から採取した菌核からの *C. geophillum* の分離に成功している。また、Massicotte et al.（1992）は、人工培地上での *C. geophillum* の菌核の発芽と分離菌株による菌核形成を報告している。菌核は、菌核形成菌の休眠体であるが、その内部には他の菌類が共存、寄生しているものもあり、特に発芽能力を失った菌核を生息空間として利用している菌類が存在していると考えられる。土壌中の菌核における菌類相を把握することは、菌核を微生物担体として利用する上での基本的な情報となる。

また、菌核を環境修復技術に利用する上で自然界の菌核を利用することはできないため、菌核を人工的に形成させなければならない。そのためには、供試菌核の菌核形成菌を特定し、その分離株を得る必要がある。

そこで、本章では、①非培養法であるクローンライブラリー法、および ②培養法 の 2 つの方法で、菌核内部の菌類相を確認することで、菌核形成菌を推定すると共に、培養法により分離株を得ることを目的とした。

a)



b)

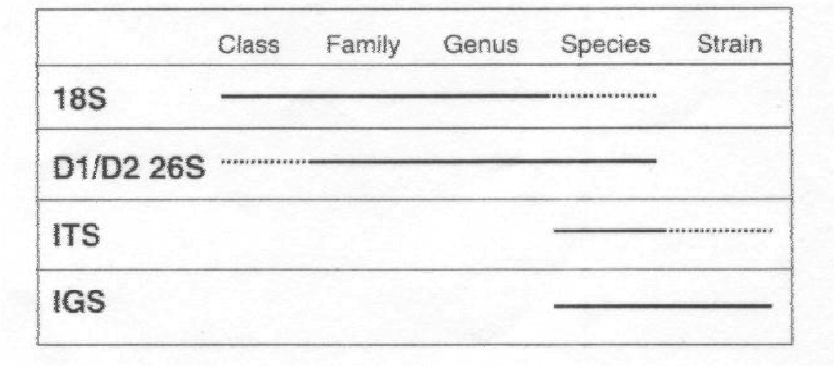


Fig. 2-1　a）真核生物における rDNA の模式図、

b）rDNA の各領域の同定上の位置づけ

（杉田，西川．2004.から抜粋）

Table 2-1.　微生物相解析に用いられる方法と特徴

	培養法	非培養法
方法	・非選択培地による菌株の分離 ・選択培地による菌株の分離	・クローンライブライブラリー法 ・T-RFLP 法 ・PCR-DGGE 法
操作の流れ	菌核から菌株を分離 →種の同定	複数の菌核から DNA 抽出 →混合した DNA を分離 →種の同定
特徴		
正確な群集構造の把握	× 分離される菌は数%。	○ 難培養菌も検出される。
分離菌株の取得	○	× DNA しか得られない。
菌核個々の群集構造の比較	○ 菌核個々で比較可能。	△ 1 個の菌核は困難。
存在しない菌（死菌や人工 PCR 産物）の検出	×	○ DNA からは判定できない。

2-2. 土壌サンプリングと菌核採取

2-2-1. サンプリング地点

2007 年および 2008 年 8 月に岐阜県御嶽山の湯の花峠（標高 2103 m、コメツガ林）でサンプリングを行った（Fig. 2-2）。Fig. 2-3に、土壌断面調査票を示した。

Watanabe et al.（2002）は、森林土壌における菌核の分布密度は、A層で比較的高いことを報告している。また、*Sclerotinia sclerotiorum*の菌核を12ヵ月間土壌に埋めた結果、表層ほど菌核の生存が認められたことが報告されている（Duncan et al. 2006)）。これらのことから、菌核の存在量が多く、生存率が高いと思われる表土 A1,A2 層の土壌を供試土壌とした。

採取した土壌はポリエチレンの袋に密封し、土壌中の微生物の活性を最小限に止めるため4℃で保存した。

2-2-2. 菌核の採取

菌核は、4℃で保存した供試土壌から、胞子などの微小構造物を採取する方法である wet sieving 法（Brundrett et al. eds. 1996）を改変した方法により採取した。この方法は、篩を細かい目に変えることで、目視で採取不可能な微小菌核や胞子の採取が可能であるが、粒径 0.5mm 以上の菌核を供試菌核とするために、篩は 0.5, 1.0, 2.0 mm を用いた。

Fig. 2-4 に、改変 wet sieving 法を示した。まず、0.5mm の篩で土壌の粘土画分を水でよく洗い流した後、目の粗い順に篩を重ね、上から土壌を水と共に流し入れ、水でよく洗い流してふるい分けした。その後、水を入れたプレートに移して菌核をピンセットで採取した。

また、この方法は、粘土画分を取り除くことで水の濁りがなくなるため、浮遊法では採取不可能な沈む菌核も採取することができる。Trappe(1969)は、水に浮く菌核を“dead sclerotia”と記しており、発芽機能が失われているとした。供試した湿土壌においては、約 8 割は沈む菌核であったことから、湿土壌からの菌核採取に有効な方法であると言える。

以下、実験に用いた全ての菌核は、この方法で供試土壌から採取したものを用いた。

2-2-3. 供試菌核の粒径および質量

岐阜県御嶽山の土壌から wet sieving 法により採取された菌核は、デジタルマイクロスコープ VH-7000 [KEYENCE]により粒径を計測し、マイクロ天秤 AX26 DeltaRange [METER TOREDO]により重量を計量した。粒径から算出した仮の体積と重量の関係を示す（Fig. 2-5a)。粒径 0.5mm 以上の菌核は、約 2kg の土壌から約 330 個採取された。対照として Fig. 2-5b,c に示したドイツ・エレンデおよび秋田県田沢湖の土壌約 2kg から採取した菌核と比較すると、御嶽山の菌核は、量、粒径ともに平均的であることがわかる。また、御嶽山の菌核の近似曲線の傾きが最も大きいことから、密度が比較的高い菌核であることが明らかとなった。

Fig. 2-2　サンプリング地点

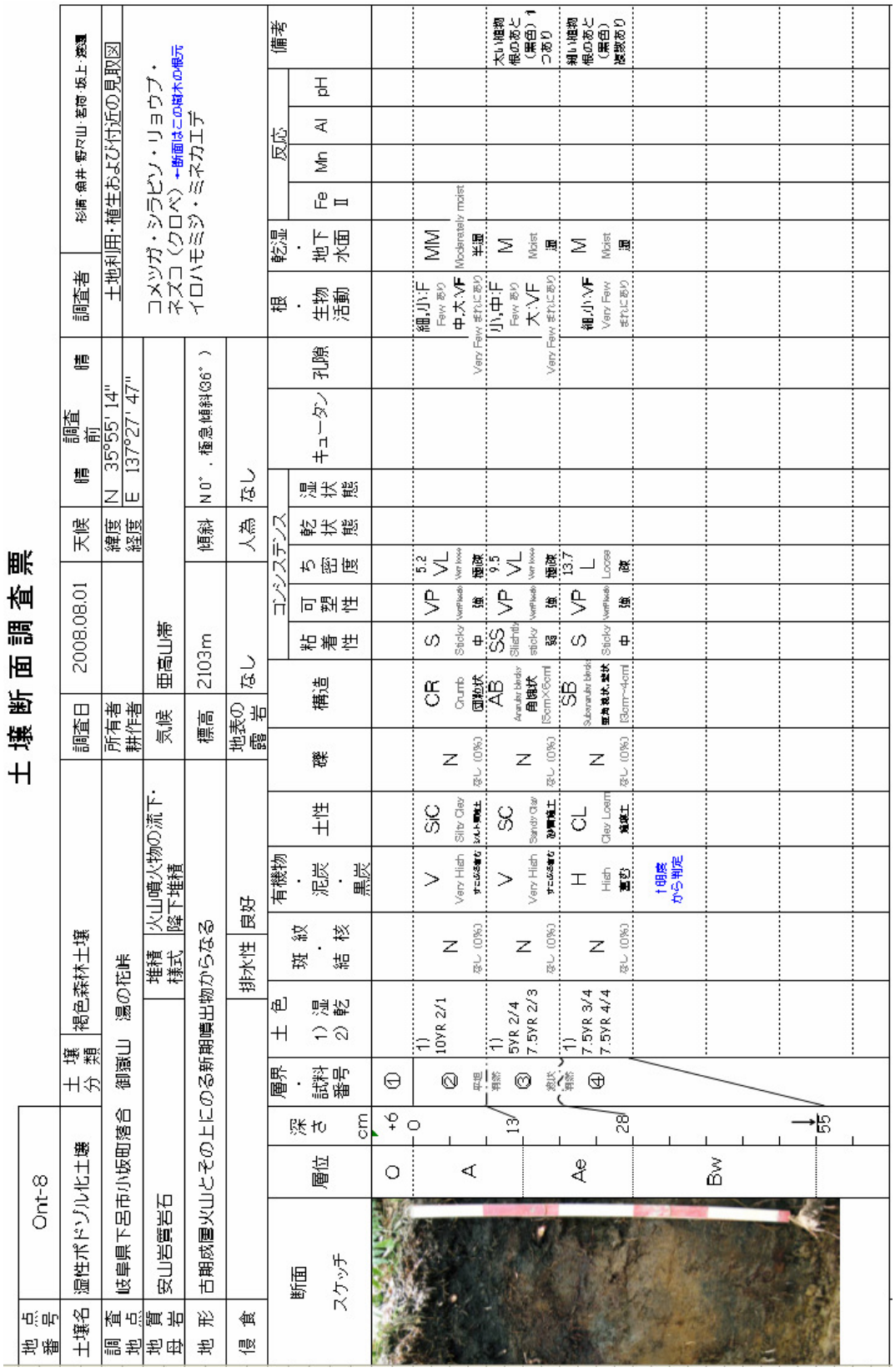


Fig. 2-3　土壌断面調査票

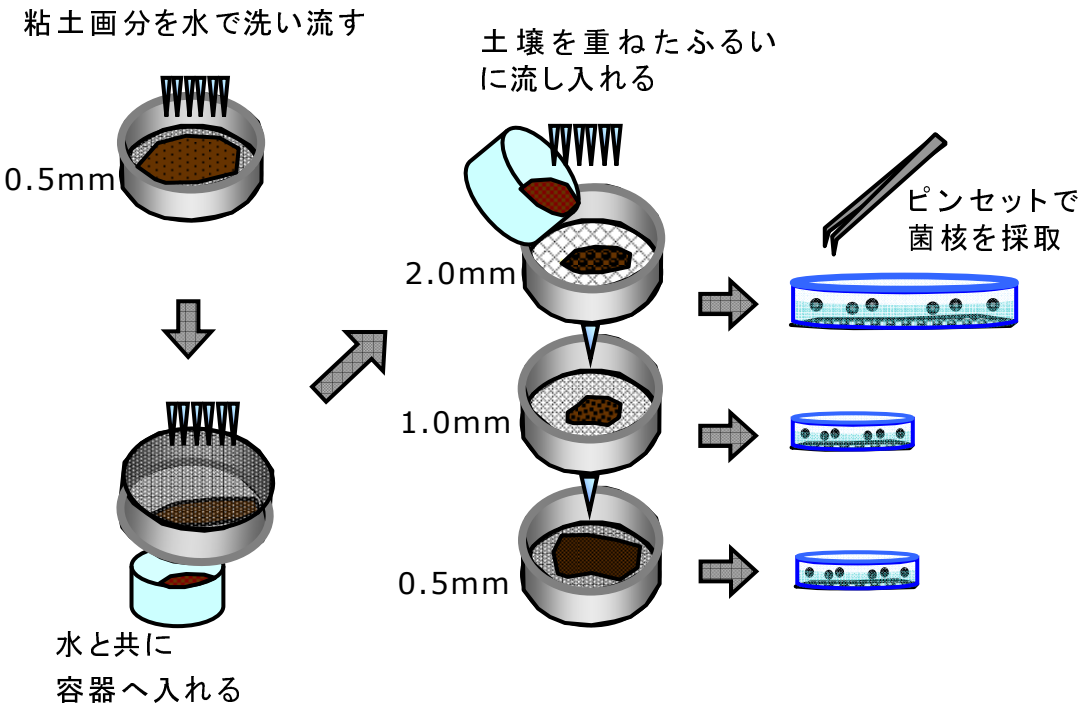


Fig. 2-4　改変 wet sieving 法

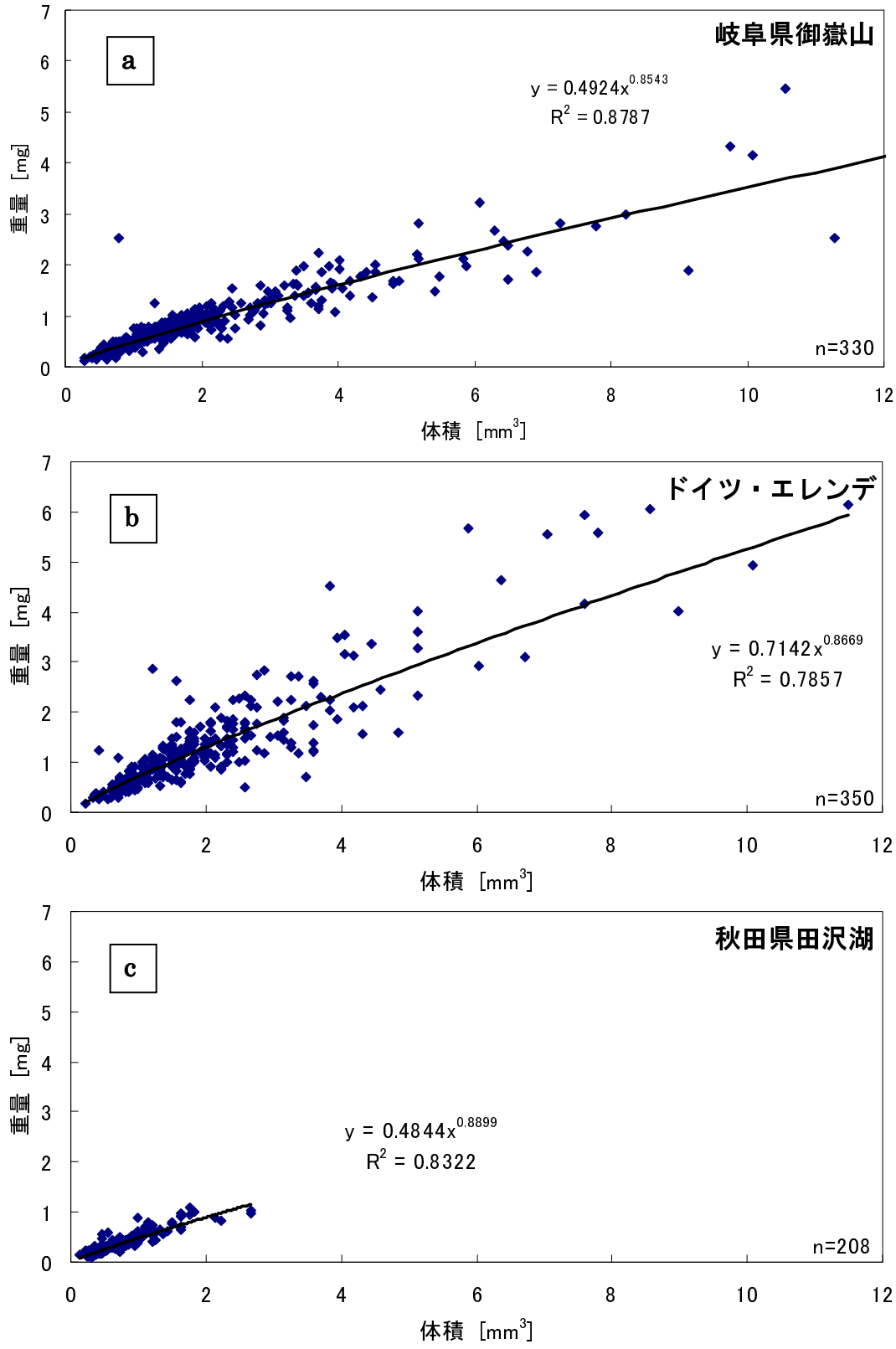


Fig. 2-5　森林土壌から採取された菌核の体積と重量の関係
（a. 岐阜県御嶽山; b. ドイツ・エレンデ; c. 秋田県田沢湖）

2-3. 非培養法による菌類群集構造解析

2-3-1. 実験方法（クローンライブラリー法）

a）菌核の洗浄と DNA 抽出

土壌より採取した菌核約 1g は、Ohta et al. 2003 の滅菌水による菌核の洗浄方法に従い、滅菌水を加え 1 分間ボルテックスする操作を 10 回繰り返し、菌核表面に付着している菌類・細菌類等を洗い落とした。

菌核の DNA 抽出には、土壌用 DNA 抽出キット ISOIL for Beads Beating（ニッポンジーン）を用い、そのプロトコルの一部を改変して DNA を抽出した(Fig. 2-6)。以下に、詳しい方法を示す。

洗浄した菌核約 1g を遠心管に入れ、ISOIL for Beads Beating のビーズ、Lysis solution BB 950µL を加え、冷却しながら超音波破砕機(URTRASONIC DISRUPTOR MODEL UR-200P [TOMY SEIKO CO., LTD.]）により、2 分間(10 秒×12 セット)粉砕した。滅菌したガラス棒で完全に破砕した後、2mL スクリューキャップチューブ 2 本に、Lysis solution BB 950µL ですすぎながら分注した。Lysis solution 20S を 50µL ずつ加えて、30 秒ボルテックスし、遠心分離（12,000×g, 1min., 室温）した。その後の操作は、プロトコルに従った。ただし、最終的に DNA の溶解に使用する TE (pH8.0) は 50µL とし、これを菌核 DNA 抽出液とした。

b）PCR 反応とゲル切り・精製

PCR チューブ(0.5mL)に、10×EXTaq buffer 10µL, dNTP Mix 8µL, F プライマー(10µM) 5µL, R プライマー(10µM) 5µL, EX Taq 0.25µL, 滅菌 Mili Q 71.45µL, DNA 抽出溶液 0.3µL を加え、ボルテックスで混合し、PCR Thermal Cycler Dice®（タカラバイオ）により、PCR 反応

を行った。プライマーには、ITS rDNA 領域のプライマーITS-1F（ 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3’ ）、 ITS-4 （ 5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3’)を用い、増幅条件は、94℃, 4min; [94℃, 35sec- 52℃, 55sec- 72℃, 2min] 35cycle; 72℃, 10min で行った。

PCR 反応物（500μL）は、Microcon™-100（タカラバイオ）で精製した後、1%アガロースゲルで 20 分電気泳動しエチジウムブロマイドで 30 分染色した後、UV 照射下で増幅したバンドの部分のゲルを切り出した。ゲルを取り除き PCR 産物を精製するために、QIAEX Ⅱ Gel Extraction Kit (QIAGEN) のプロトコルに従い、精製 PCR 産物を得た。

c）ライゲーション（Fig. 2-7）

精製 PCR 産物 10μL, pT7 blue vector 1μL,ライゲーション I 液 10μL を優しく混ぜ、16℃で 30 分インキュベートし、ライゲーション反応液を得た。大腸菌（E. coli DH5α）にライゲーション反応液 10μL, 0.5M メルカプトエタノール 2μL を加え、氷上 30 分、ヒートショック（42℃）30 秒、氷上 2 分間、インキュベートしたものを、SOC 培地に加え、37℃で 1 時間振とう培養した。アンピシリンを加えた LB 寒天培地（トリプトン 10.0g, 酵母エキス 5.0g, 塩化ナトリウム 10.0g, アンピシリン 50g･L^{-1} [pH7.0]）に、X-gal, IPTG を 40μL ずつ塗布した直後、ライゲーションした大腸菌を 100μL ずつプレーティングし、37℃で 20h 培養した。発現したコロニーの内、約 100 個を LB 液体培地にそれぞれ接種し、30℃で 20h 培養した。

d）プラスミド抽出（Fig. 2-8）

培養した LB 液体培地はそれぞれ遠心分離した後、TENS（TE 45mL, 10% SDS 2.5mL, 2N NaOH 2.5mL）と 3.0M 酢酸ナトリウム(pH5.5)を混和してプラスミドを抽出した。遠心分離後、デカンテーションした

ものをエタノールで精製し、TE + RNAse A (10μg/mL)に溶解してプラスミド抽出液を得た。プラスミド抽出液は、電気泳動で DNA が組み込まれていることを確認した。

e）シークエンス反応と精製･塩基配列決定

得られたそれぞれのプラスミド抽出液は、ITS rDNA 領域でシークエンス反応を行った。0.2mL PCR チューブに滅菌 Mili Q 7.18μL, プライマー(10μM)　0.32μL, プレミックス（Big Dye） 0.5μL, 5×Sequencing buffer 1.5μL, プラスミド抽出液 0.5μL を混和し、96℃, 2min; [96℃, 10min. - 50℃, 5sec - 60℃, 4min] 25cycle の条件で､PCR 反応を行った。

エタノール沈殿法（Fig. 2-9）により精製した後、キャピラリー型シークエンサー Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザーにより塩基配列を解析した。

得られた塩基配列は、DDBJ[DNA Data Bank of Japan]Homepage 内の BLAST WWW System (http://www. ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j. html) による相同性検索を行い、クローンを推定した。

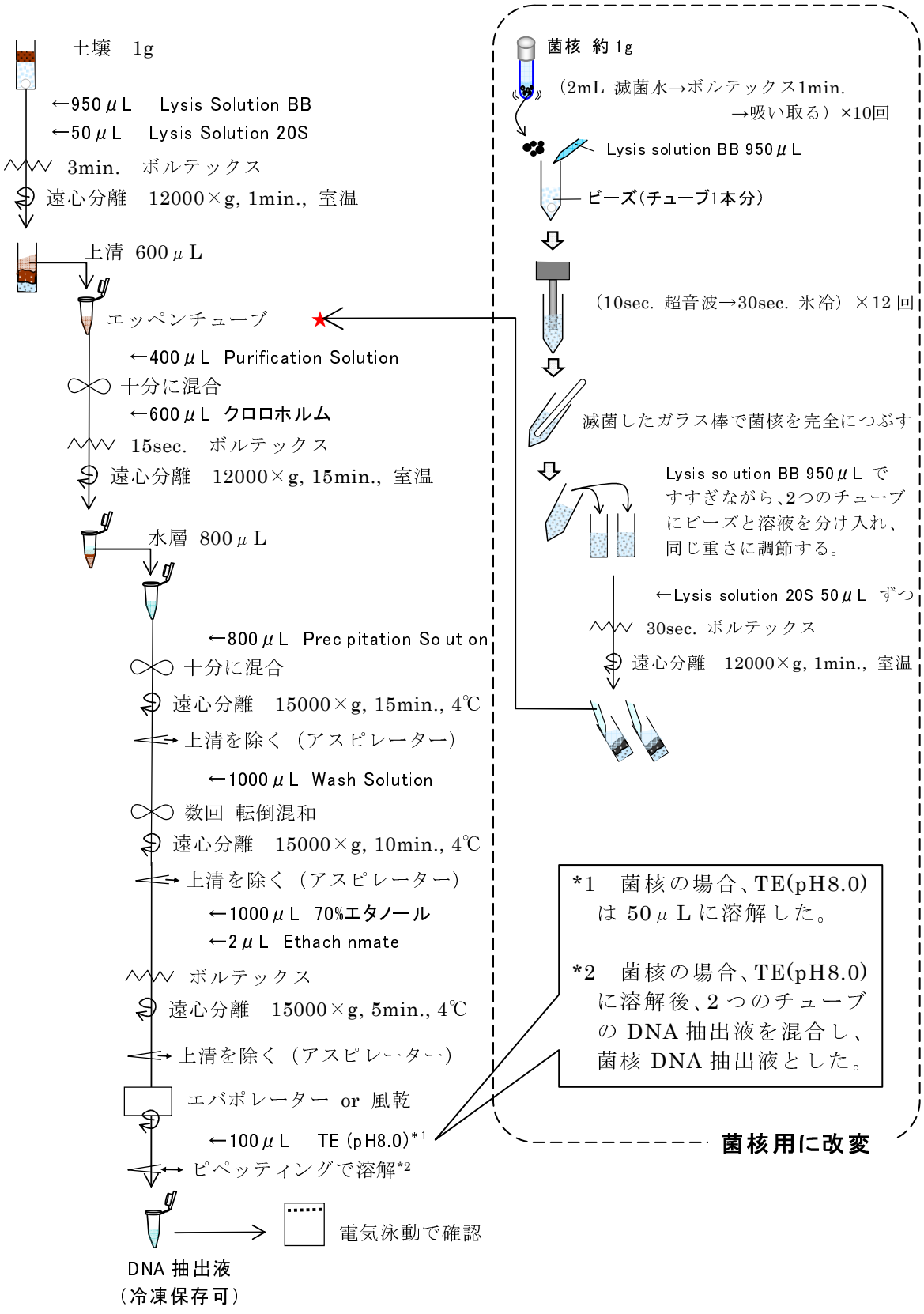


Fig. 2-6 ISOIL for Beads Beating キットのプロトコル

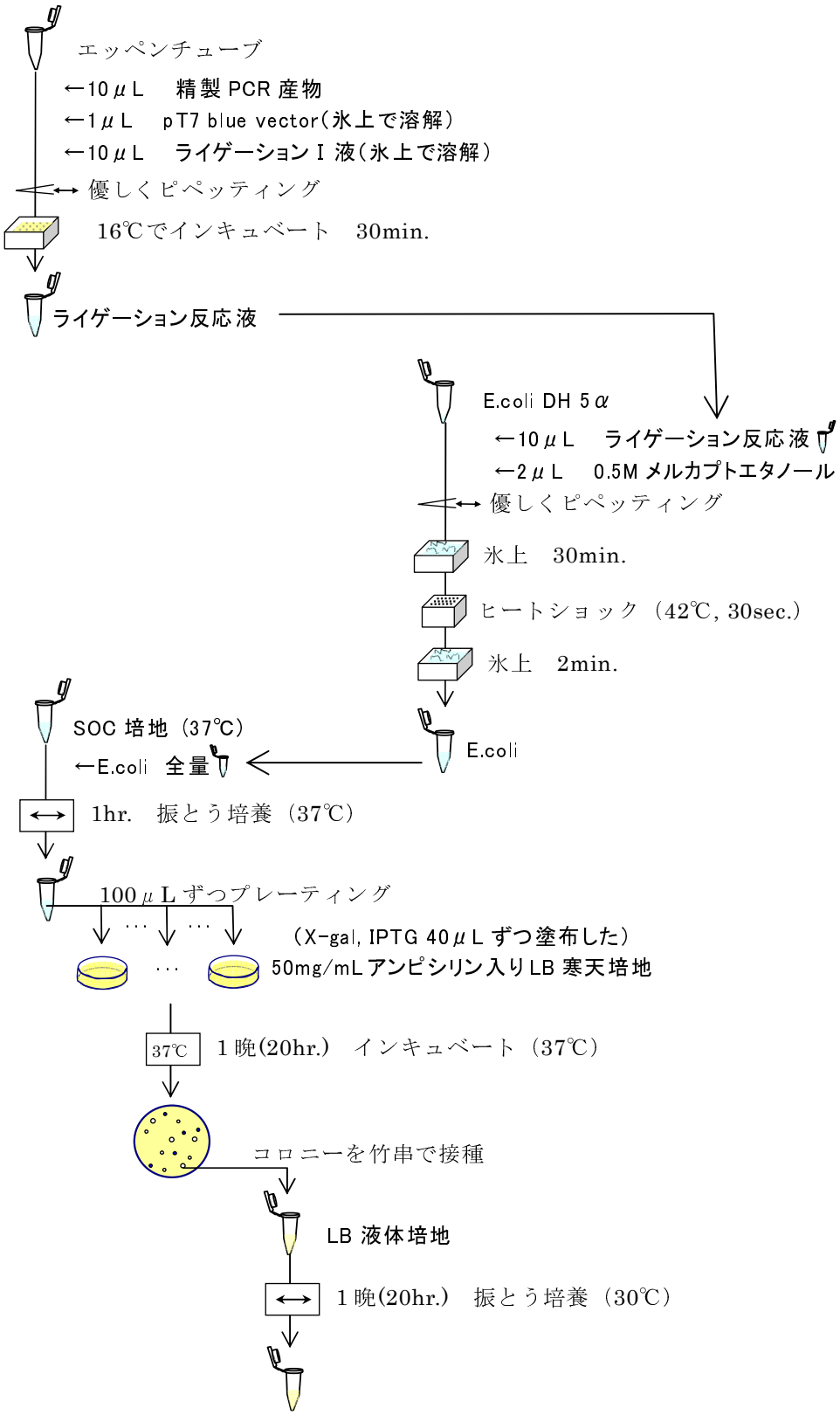


Fig. 2-7　クローンライブラリー法（ライゲーション）

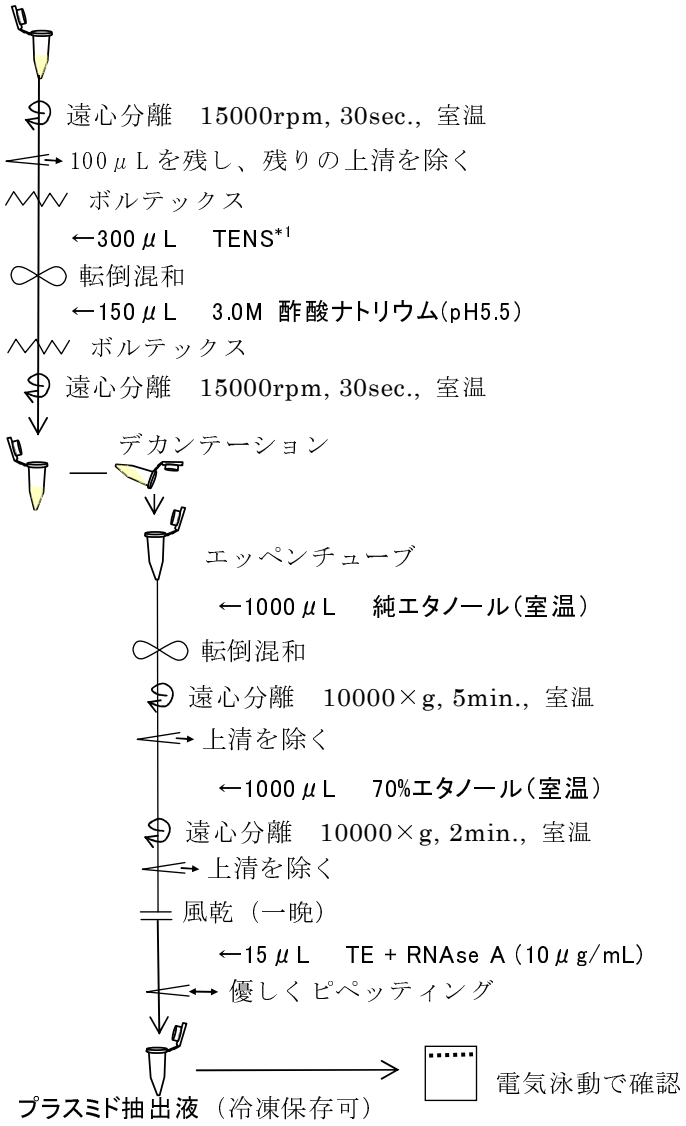


Fig. 2-8 クローンライブラリー法（プラスミド抽出）

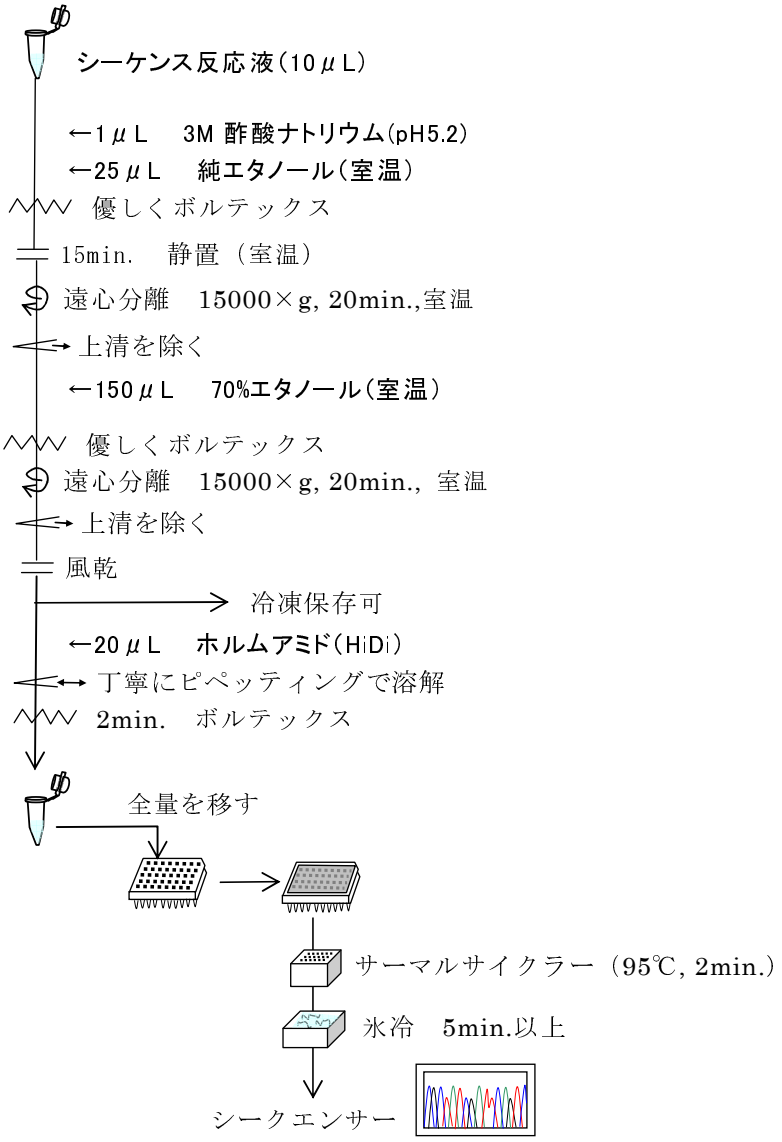


Fig. 2-9 エタノール沈殿法

2-3-2. 実験結果および考察

Table 2-2 に、菌核 DNA 抽出液を用いて ITS rDNA クローンライブラリー法により検出された菌類クローンの近縁種をまとめた。菌類相解析の結果を Fig. 2-10 に示す。クローンライブラリー法により、合計で 17 種類 の菌類クローンが検出された。

検出された菌類クローンの内、最も多い 33%を占めた *Leohumicola minima* は、隔壁のある灰色の菌糸を持つことが報告されている（Hambleton et al. 2005a)。しかし、この菌類の菌核形成の報告はないことから、菌核形成菌と共存していた、または発芽能力を失った菌核を生息空間として利用していた菌であると考えられる。このクローンが多く検出されたことは、菌核と何らかの関係がある菌類であると考えられる。

検出された菌類クローンの 81%が *Ascomycota*（子のう菌門）であった。菌核形成菌または菌核内に共存・寄生している菌類は、分類学的に近い菌類が多いと考えられる。

森林土壌中に認められる菌核の形成菌として報告されている *C. geophillum* および未同定菌根菌（Vouchered mycorrhizae）のクローンが 8%検出された。Vouchered mycorrhizae は、*C. geophilum* との高い相同性から *C. geophilum* であると考えられる。このことから、供試菌核には *Cg* 菌核が含まれていることが示唆された。

今回検出された菌類には、*C. geophillum* 以外に菌核形成が報告されている菌類は認められなかった。しかし、条件によって菌核を形成する菌類も含まれている可能性もあることから、供試菌核には複数の菌核形成菌により形成された菌核が含まれていたとも考えられる。特に、*C. geophillum* を含め菌根菌は 14%、Ascomycete sp.などの未同定菌は 20%

と比較的高い割合で見られたことから、これらの中に菌核形成菌が含まれている可能性が高いと思われる。

多種の菌類のクローンが検出されたのは、DNA 抽出法に 1g のサンプルが必要だったために、土壌から検出された大小様々な菌核を数百個使用したためと考えられる。菌核は、菌核形成菌の菌糸組織から成るため、菌核 1 個での DNA 抽出にも期待できるが、まだ成功していない。更なる検討により、菌核 1 個からの DNA 抽出ができれば、菌核個々の菌核形成菌の特定が可能となるだろう。

また、今回検出された菌類のクローンは、あくまで遺伝子情報しか得られていないため、実際に現在生息していない死菌や人工的に作られた PCR 産物が含まれている可能性がある(日本土壌微生物学会編, 2000)。さらに、ISOIL for Beads Beating キットを使用したことで、抽出されやすい菌類が多く検出され、菌類相が偏ってしまうこともある。そのため、他の方法を組み合わせて議論することで、より正確な結果が得られるだろう。

Table 2-2　クローンライブラリー法により検出された菌類クローンの近縁種

近縁種	クローン数
Gyoerffyella rotula	1
Vouchered mycorrhizae (*Dothideomycetes*)	3
Cenococcum geophilum isolate Ve-95-12	1
Trichoglossum hirsutum isolate AFTOL-ID 64	1
Helotiales sp. Bjelland 61	3
Leohumicola minima strain DAOM 232587	17
Cudonia lutea strain wz139	1
Lophodermium sp. C1	2
Anthostomella eucalyptorum strain CBS 120036	1
Ascomycete sp. Olrim401	7
Mycorrhizal ascomycete of Rhododendron type	2
Ascomycete sp. BC15	1
Lactarius piperatus	6
Lepista personata strain IFO 7717	1
Clavicorona taxophila	2
Tomentella sublilacina	1
Fungal sp. TRN36	1

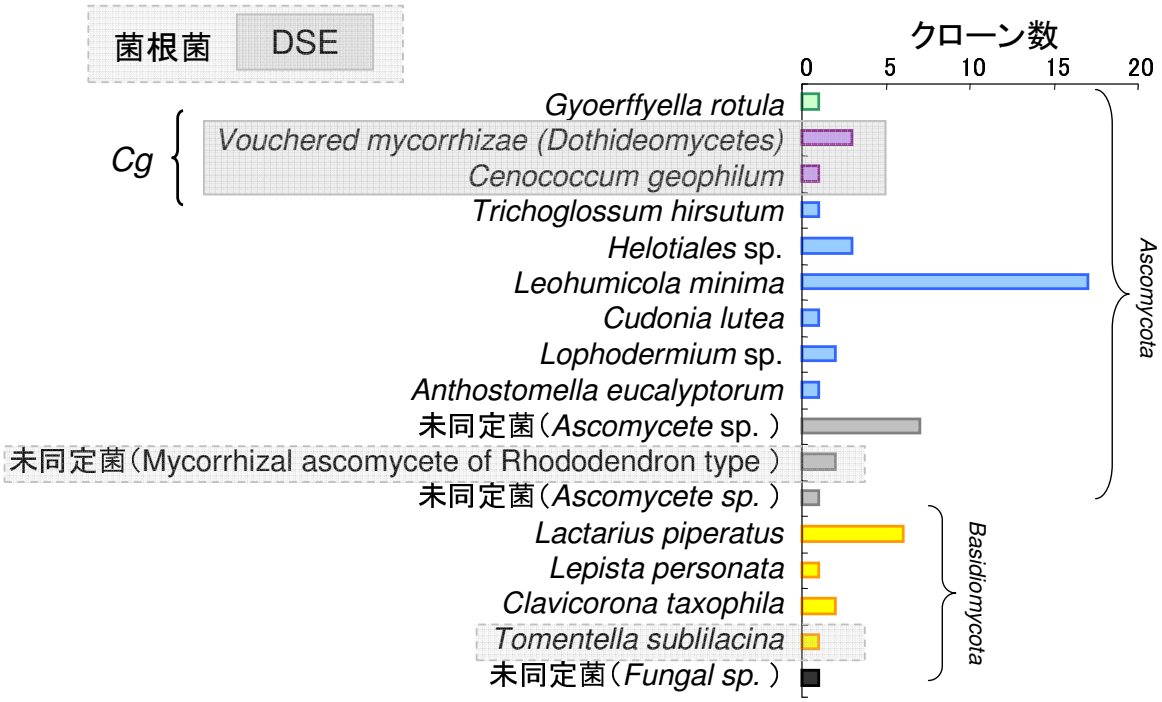


Fig. 2-10　クローンライブラリー法により検出された菌類

2-4. 培養法による菌類の分離

2-4-1. 実験方法（培養法）

a） 菌核の洗浄

土壌から検出された菌核の洗浄は、Narisawa et al.(1998)の洗浄方法を菌核洗浄用に改変して使用した。これは、界面活性剤(Tween20)を使用して洗浄することで、サンプル表面に付着した菌類を除去する方法である。詳しい方法は、以下の通りである。

滅菌した試験管に菌核と 1mL の滅菌した 0.005% Tween20 を加えアルミキャップをして 1 分間ボルテックスし、洗浄液を除いた。この操作を 3 回行った後、滅菌水 1mL でも同様の操作を 3 回行った。浮遊するものと沈降するものを分けるために滅菌水を加えた。それぞれの菌核を滅菌したプレート内のろ紙の上に置き、プレートのふたをして一晩乾燥させ、菌核に付着している細菌を減少させた。

b） 菌類の分離

菌類の分離には、菌核形成菌の他にも、共生・寄生している菌類まで、幅広く分離できるために直接接種法により行った。さらに、培地選択による分離株の偏りが出ないように、コーンミールアガー (CMA)培地(Corn meal Agar (Difco), 17 g·L^{-1})以外に、酸性土壌から菌核が採取されることから硫酸により pH を 5.0 に調整した CMA 培地、Cg を始めとする外生菌根菌の増殖に適している 50%グルコース濃度 Modified Melin-Norkrans (MMN) 培地（塩化カルシウム・二水和物 0.050g, 塩化ナトリウム 0.025g, リン酸二水素カリウム 0.50g, リン酸水素二アンモニウム 0.25g, 硫酸マグネシウム・七水和物 0.15g, 塩化鉄（1%水溶液）1.2mL, チアミン塩酸塩（100ppm 水溶液）1.0mL, 麦芽抽出物

3.0g, グルコース 5g·L^{-1}〈0.1M H_2SO_4 で pH5.8 に調整〉) を使用した。

菌核は、人工培地上に静置し、菌類を分離した。それぞれの培地に洗浄した菌核を静置して 室温条件 (24℃) で培養した。菌核から伸長した菌糸は、菌糸の先端を寒天ごとメスで切り出し、1/2CMMY 培地 (Corn meal Agar (Difco), 8.5 g; malt extract (Difco), 10.0 g; yeast extract (Difco), 2.0 g; Bacto agar (Difco), 7.5 g·L^{-1}) に移植し菌株として確立した。

c) 菌類の同定

菌核から分離された菌類を同定するため、コロニーの一部を掻き取り、PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent (アプライド・バイオシステムズジャパン) を使用し、そのプロトコルに従って DNA 抽出液を得た。その後、 2-3-2.c)の PCR 反応と同条件で PCR 反応させた。PEG による精製 (Fig. 2-11) 後、2-3-2.e)のシークエンス反応・エタノール沈殿法による精製したものをシークエンサーにより塩基配列を解析し、種を同定した。

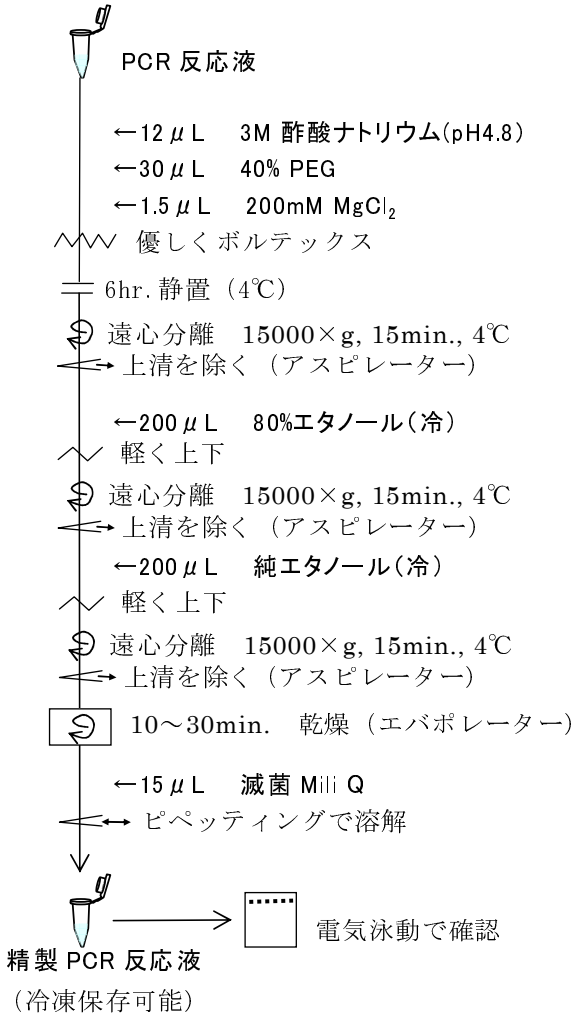


Fig. 2-11 PEG による PCR 産物の精製

2-4-2. 実験結果および考察

岐阜県御嶽山の土壌から採取した菌核から、CMA (pH6.2)、CMA (pH 5.0)、および MMN (pH5.8) 培地により分離された菌類種と分離数を Fig. 2-12に示した。合計 37 株 18 種類の菌類が分離された。非培養法、培養法共に検出された菌類は、*Gyoerffyella rotula* と未同定菌 (*Mycorrhizal ascomycete* of *Rhododendron* type)の1種1タイプであった。クローンで最も多く検出された*Leohumicola minima* が分離されなかったのは、この菌は寒天上での生育が遅いためであると考えられる（Hambleton et al. 2005a)。

pH 5.0 に調整した CMA 培地において菌類が最も分離された。供試土壌が pH 4.86 の酸性土壌であったことがその主な理由であると考えられた。最も多く分離され同定できたのは、*Oidiodendron pilicola*であった。同菌は、pH 5.0 の CMA 培地と pH 5.8 の MMN 培地から 7 菌株分離された。*Oidiodendron* spp. は、土壌が酸性化することで、増加することが報告されている (Bååth et al. 1984) が、菌核を形成する報告は認められていない。一方、菌核内部には低 pH 環境に生息する細菌 *Acidobacteria* が優先することも16S rDNAクローンライブラリー法により明らかになっており、今後詳細な研究が必要であるが、酸性環境を好む*O. pilicola* が菌核内をすみかとしていると考えられる。

菌核形成菌として知られている菌核病の病原菌類は分離されなかったことから、供試菌核には病原菌の菌核が含まれていないことが確認された。

根部エンドファイトDark septate endophytic (DSE) に類別される *Phialophora finlandica* (Jumpponen 2001)、*Meliniomyces variabilis* (Ohtaka and Narisawa 2008)、が分離され、全体の 16% を占めた。エ

ンドファイトとは、植物根に共生し植物の病気を防除するために研究されている菌類である（Hambleton and Sigler, 2005b）。さらに、DSEを含む菌根菌種は、34% と多く分離されたことから、菌核の菌類相は植物と関係を有する菌類が多いことが明らかとなった。DSEに類別されるいくつかの菌種は、菌核、微小菌核、または皮質内菌核の形成が報告されている(O'dell et al. 1993; Stoyke and Currah 1993; Wagg et al. 2008)。また、 *C. geophillum* は、クローンライブラリー法で検出されたにもかかわらず、培養法では分離されなかった。これは、*C. geophillum* は人工培地上での増殖速度が遅く、他の菌類と共存していると優先することが困難となるために、分離できなかったと考えられる。また、供試した菌核の形成菌が死滅していたために、死菌も検出される非培養法では*C. geophillum*が検出されたが、生菌のみが分離される培養法では、*C. geophillum*が分離されなかったとも考えられる。また、*C. geophilum*群の遺伝子は、異なるブナ林間で大きな差があることが明らかとなっている（Jany et al. 2002）。さらに、*C. geophilum*は、分離株についてrDNAによる系統解析を行った結果、相同性44-100%と広い範囲のクラスターにグループ化されたため、非常に雑多な種であり、遺伝子的な同定が困難であるとも報告されている（Lobuglio et al. 1991）。そのため、Shinohara et al.（1999）は、*C. geophilum*の分類や系統発生的起源は、近年でも不明確な部分が残っていると報告している。このように、*C. geophilum*は、非常に雑多な種で遺伝子解析による同定が困難であることから、未同定菌の中には*C. geophilum*が含まれていた可能性も考えられる。

これらの結果から、培養法による菌類相の解析を行った結果、主な菌核形成菌はDSEであることが示唆された。

分離された菌株の内、未同定菌 *Mycelium radicis atrovirens* complex (*MRA*)と同定された 3 株は、培地上で菌核の形成が見られた（Fig. 2-13）。*MRA* とは、雑多な菌類群の総称である。*MRA* は、特徴的なコロニー形態から分類されることが多く、様々な菌類が含まれ（山田 2004）、DSE に含まれると報告されている（Jumpponen and Trappe 1998）。*MRA* 分離株は、分離した菌類の菌糸を伸長させるために使用した高栄養な 1/2CMMY 培地でも菌核の形成が見られたが、特に低栄養な CMA 培地で多く菌核が形成された。また、培地が乾燥するにつれて菌核が増加、成長したことからも、菌核が過酷な環境下でより多く形成されると推測できる。このことから、乾燥に強く、内部に栄養を保持する構造である菌核が、種を残す目的で形成されることが確認された。

培養法により、菌核を形成し、休眠していた菌核形成菌である可能性が高い *MRA* 分離株が得られた。

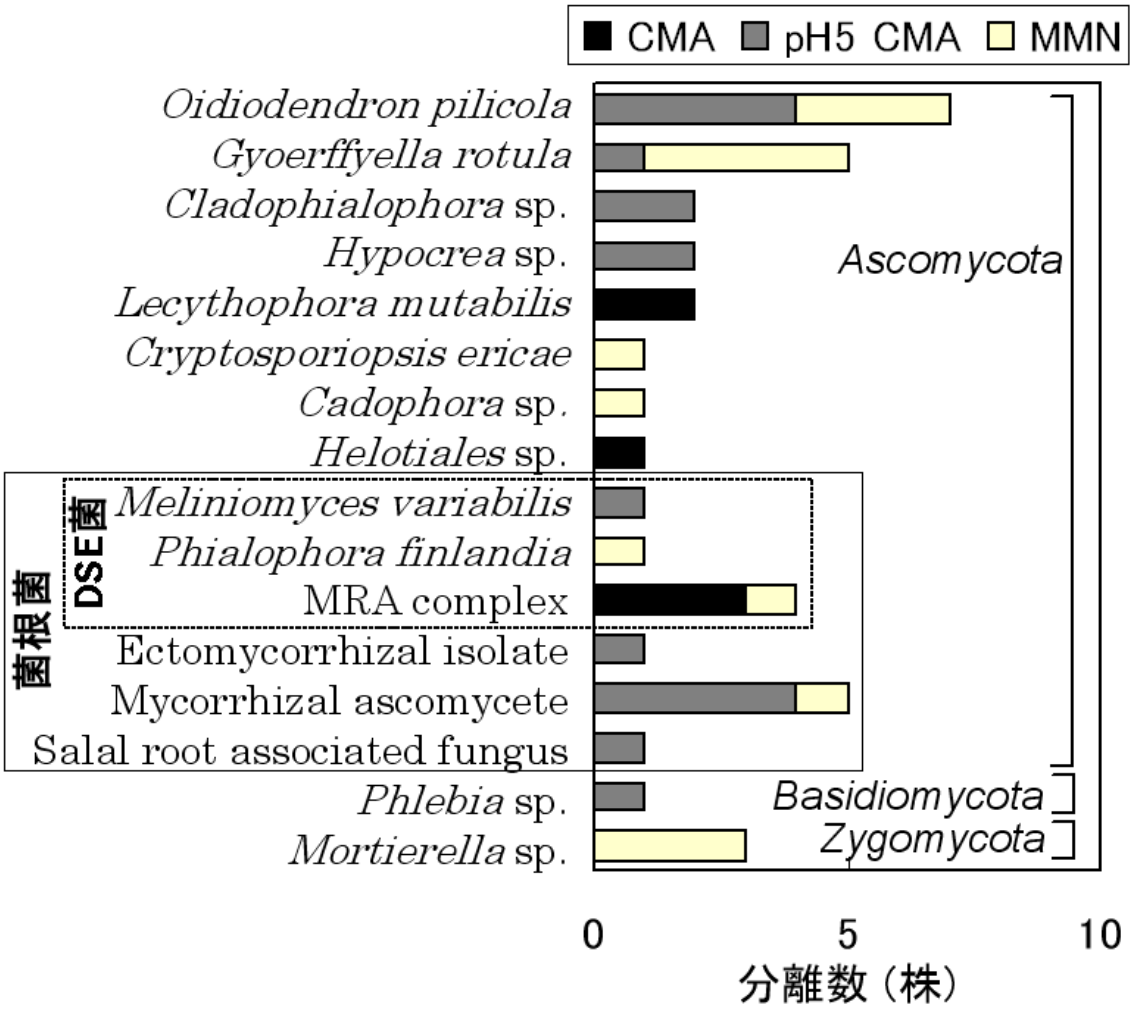


Fig. 2-12　菌核から分離された菌類種と分離数

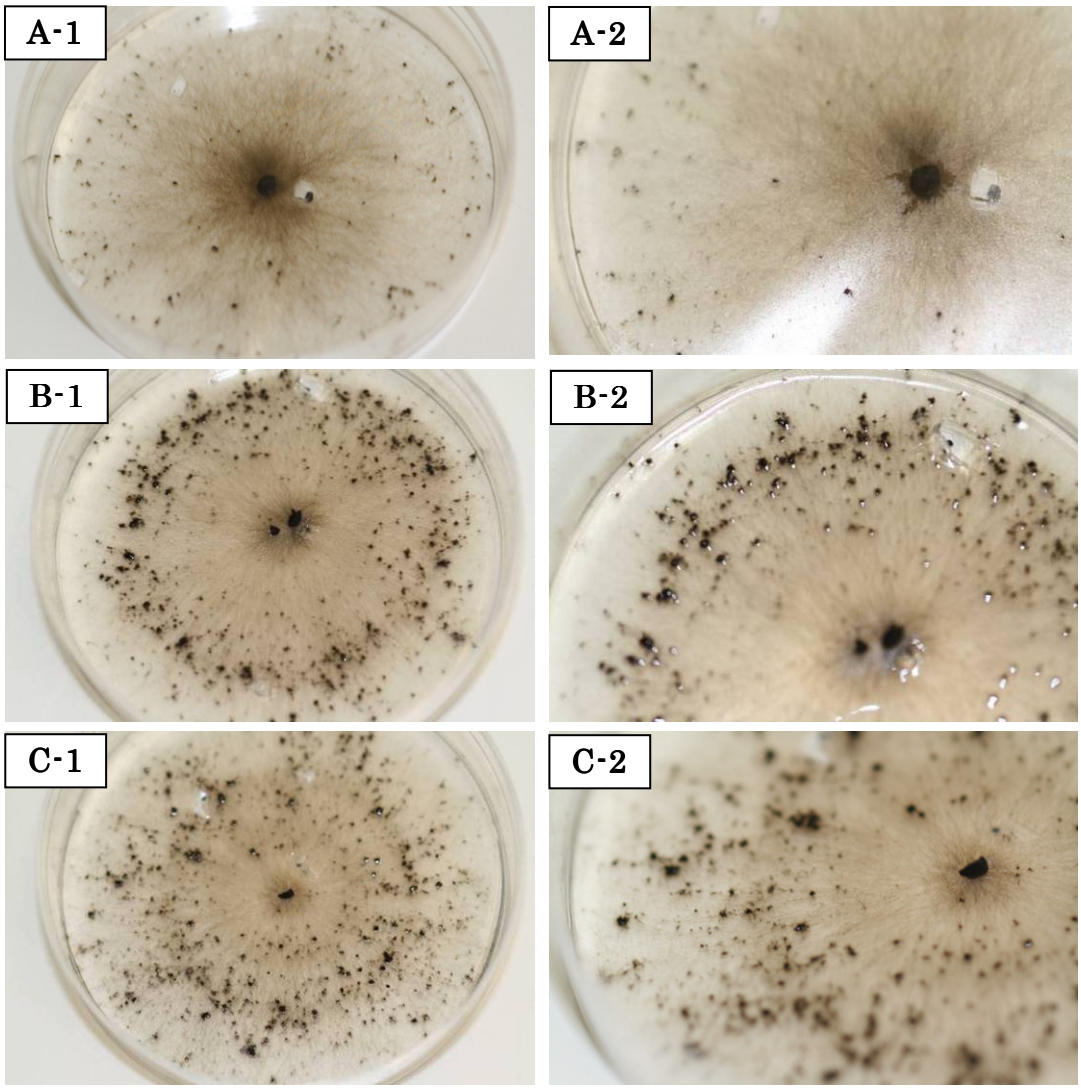


Fig. 2-13　CMA 培地上に形成された菌核

（A-1,A-2. *MRA* 分離株 1; B-1,B-2. *MRA* 分離株 2; C-1,C-2. *MRA* 分離株 3）

2-5. 結語

本章では、菌核形成菌を明らかにし、その分離株を得るために、非培養法であるクローンライブラリー法、および培養法 の 2 つの方法で、菌核内部の菌類相を解析した結果、以下のことが明らかとなった。

1) クローンライブラリー法による菌類相の解析を行った結果、合計で 17 種類 の菌類が確認され、菌根菌に分類される菌類が比較的多く検出された。検出された菌の内、菌核形成が報告されている菌は、*Cenococcum geophilum* のみであったことから、供試菌核には *C. geophillum* 菌核が含まれていることが示唆された。
2) 培養法により分離された菌類は、合計 37 株 18 種類であった。*C. geophillum* は分離されなかったが、クローンライブラリーと同様に、根部エンドファイト Dark septate endophytic (DSE)を含む菌根菌種が 34% と多く分離された。
3) 分離株の内、DSE に含まれる未同定菌 *Mycelium radicis atrovirens* complex (*MRA*)と同定された 3 株は、培地上で菌核の形成が見られたことから、菌核形成菌である可能性が高い。

以上より、クローンライブラリー法および培養法による菌類相の解析を行った結果、菌核形成菌は DSE であることが示唆された。また、人工培地上で菌核形成が確認された DSE 分離菌株（*MRA*）が 3 株得られた。

第 3 章　DSE 分離株の特徴と菌核形成

3-1. 緒言

3-1-1. DSE とは

第 2 章で得られた菌株の内、人工培地上で菌核を形成した分離株 *Mycelium radicis atrovirens* complex （*MRA*）は、根部エンドファイト Dark Septate Endophytic Fungi（以下、DSE）の一つとされている（Jumpponen and Trappe 1998)。エンドファイトとは、植物根の組織内（または外）で増殖する菌類である。また、病害防除にも利用されている（Narisawa　et al. 2002)。DSE は名前の通り、暗色（Dark）の節のある（Septate）菌糸を持ち、植物の成育を助ける内生菌（Endophyte）である。

植物根に菌根を形成して共生する菌根菌は、エンドファイトの一つとして挙げられる。菌根の種類と特徴を Table 3-1 にまとめ、Fig. 3-1 に外生菌根菌の構造とその役割を示す。植物病原菌は植物に寄生し植物の生育を阻害するのに対し、菌根菌は植物と共生し植物の生育を助ける。菌根菌は、宿主植物の根に菌根を形成し、植物の細根が届かない微小空間から栄養分であるリン酸を吸収したり、植物が直接利用できない不溶性リン酸や有機態リン酸を可溶化して吸収したりすることで、植物のリン酸の吸収を促進し、植物の生育をサポートする。さらに、同種または異種の植物根にまたがって菌根を形成し、植物間の養分の受け渡しのネットワークを作ることでも、植物の生育を助けることが明らかとなって

いる（宝月 1998)。代わりに、植物からは、菌根菌の増殖に必要な栄養分である光合成由来の糖類を供与される相利共生の関係を持つ（山田 2004)。

本研究で対象とする菌核の形成菌と考えられている *Cenococcum geophilum* は、針葉樹に対して外生菌根を形成する外生菌根菌として知られている。*C. geophilum* は、北極圏から熱帯まで生息が確認されており、極めて広い生息領域を持つことが知られている。*C. geophillum* は、乾燥耐性を持ち、低い含水量の土壌で多くの場合優勢な菌である。一方、水分の多い地点でも確認されていることから、気温や乾燥・多湿に関係なく、世界中に分布している（LoBuglio, 1999)。砂丘、火山灰、軽石の様な新しく形成する土壌においてもいち早く優先するため、富士山の不毛な領域においても、その菌糸と菌核の存在が報告されている（Wu et al. 2005)。このように、過酷な環境下でも生息できる能力を持った菌類であることが、広い領域で生息できる理由である。また、*C. geophilum* は、多くの宿主植物を持つ外生菌根菌であり、マツ、モミ、ツガ、トウヒなどの針葉樹に対して外生菌根を形成することが確認されている。

その他 DSE として報告されている菌類には、*Phialocephala fortinii*（Nassuth and Peterson 2001)、*Acephala applanata*（Grünig and Sieber 2005)、*Phialophora finlandica*（Jumpponen 2001）などが挙げられる。これら DSE の菌類の中には、菌核または微小菌核の形成が報告されているものがいくつかある（O'dell et al. 1993; Mandyam and Jumpponen 2008)。

菌根共生の観察には、一般的な被子植物の菌根を観察するためのユーカリや裸子植物のアカマツが使用される(Brundrett et al. eds. 1996)。

3-1-2. 菌核形成条件

植物病理学の分野では、病原菌により形成される初期の感染源としての菌核を扱った研究が多くなされており、感染を抑制するために菌核形成因子や発芽因子についての研究が多くされている。例えば、Townsend, B. B. and Willetts, H.J. (1953)は、タマネギ灰色腐敗病の病原菌 *Botrytis allii* を含む 6 種の菌類の菌核の発達と形成について報告している。*Rhizoctonia solani* の菌核は、リン・マグネシウム欠乏状態で形成が抑制されることが明らかとなっている（Moromizato et al. 1991）。Hausner and Reid 1999 は、病原菌 *Sclerotium hydrophilum* において、培地へのグルコースやビタミンの添加および明・暗条件と菌核形成の関係について報告している。*Sclerotium rolfsii* の菌核の分化は菌の抗酸化防御によって、制御されていることが報告されている（Georgiou et al. 2003）。本田、水村(1991)は、*Botrytis* 属菌の菌核形成と至適温度および光条件の関係を確認している。しかし、エンドファイトなどの植物との共生菌の菌核形成因子に関する研究はほとんどない。

3-1-2. 本章の目的

第 2 章で得られた菌核からの分離菌株の内、培地上で菌核を形成した *MRA*3 株は、供試菌核の菌核形成菌である可能性が高いと考えられる。本章では、*C. geophilum* および菌核分離菌株 *MRA* が根部エンドファイト DSE であることを確かめるために、DSE（Dark Septate Endophytic Fungi）の特徴を確認することを目的とした。菌糸の形態観察では、DSE の特徴である、暗色（Dark）の節のある（Septate）菌糸を確認し、植物の成育を助ける内生菌エンドファイトであることを確認するために、菌を増殖させた培地でのユーカリの苗の成長を観察した。

一方、菌核を微生物担体として利用する上で、自然界の菌核を使用することはできないため、分離株の菌核形成をコントロールすることが必要となる。そのため、*MRA* および *C. geophillum* 分離株について、培養条件を組み合わせて、菌核形成をコントロールすることを目的とした。

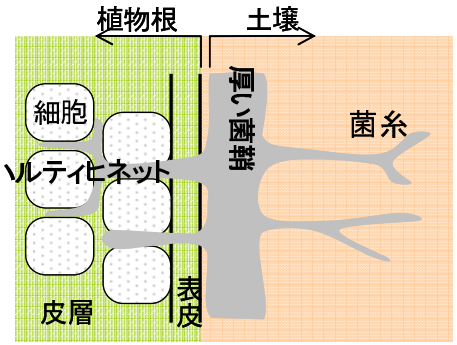
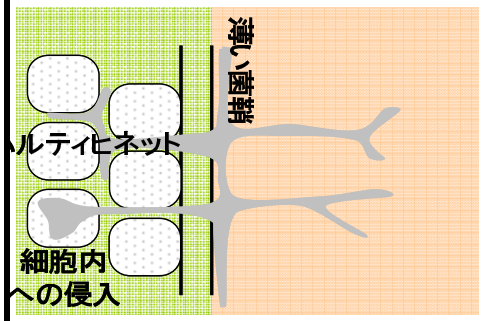
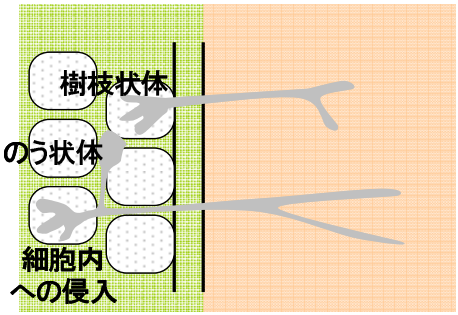
3-1-3. 菌核形成条件の設定

形成条件は、菌核の形成される環境をヒントに設定した。Watanabe et al. (2002)は、菌核が低 pH 土壌で多く検出されると報告している。アルミニウムは、低 pH 土壌で Al^{3+}となり土壌中に溶け出し、植物の生育を阻害することが知られている（三枝 1994)。また、土壌中の交換性アルミニウムと菌核の平均質量に高い相関関係が見られることが報告されている（Watanabe et al. 2002; 坂上ら 2004)。供試土壌は森林土壌であり、土壌 pH(H_2O)は 5 付近である(Fig. 2-3)。これらのことから、菌核形成菌は、酸･アルミニウム耐性を持ち、この条件下で菌核を形成する可能性が高いと推測できる。そこで、菌核形成菌と思われる菌核から分離された *MRA* および *C. geophilum* について、低 pH・Al 耐性および菌核形成を観察した。

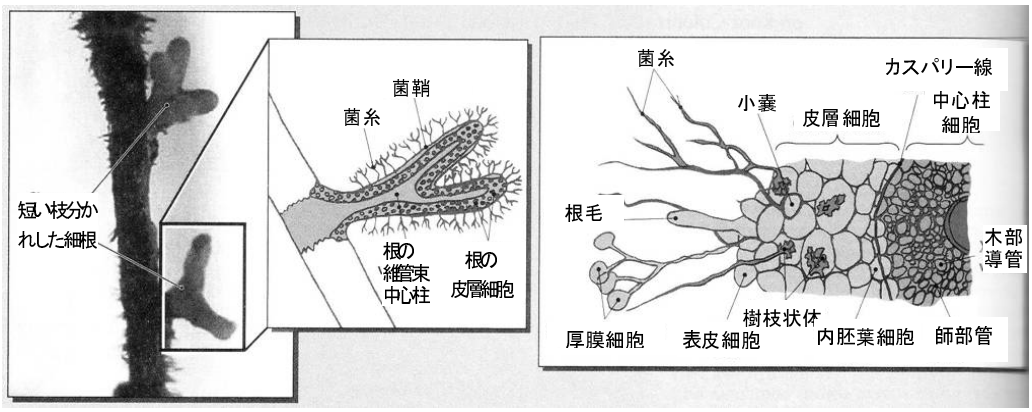
その他の培養条件として、病原菌の菌核形成に関与すると報告されている因子（Hausner and Reid 1999; Moromizato et al. 1991,1996; 斎藤 1977; Okabe et al. 1998; 本田、水村 1991）を参考とし、培養温度、明暗条件、培地の種類を組み合わせ、それぞれの条件下での菌核形成を確認し、菌核形成をコントロールすることを目的とした。

Table 3- 1　菌根の種類と特徴

（山田　2003 を基に作成）

菌根の種類	外生菌根 (ectomycorrhiza)	内外生菌根 (ectendomycorrhiza)	VA菌根 (Vesicular-Arbuscular mycorrhiza)
菌根菌 （菌類分類群）	担子菌門（*Paxillus involutus*, *Laccaria*属など）、 子のう菌門（*Cenococcum geophilum*など）、 接合菌門	子のう菌門系不完全菌類 (MRAと総称されるPhialocephora finlandia, P. fortinii, Chloridium paucisporumなど)	接合菌門*Glomales*目 (Glomus属, Sclerocystis属, Acaurospora属, Entrophosphora属, Scutellospora属など)
主な宿主植物 （分類群）	樹木植物 （裸子植物、被子植物）	マツ属の実生苗 （裸子植物、被子植物）	草類などを含む多くの植物 （コケ、シダ、裸子植物、被子植物）
特徴	・植物細根表面を覆う菌糸組織（菌鞘） ・根の皮層細胞間隙を縫って薄層状に発達する菌糸（ハルティヒネット） 	・薄層または表面的な菌鞘 ・ハルティヒネット ・植物皮層細胞内部への菌糸の侵入 	・植物皮層細胞内部への侵入菌糸（樹枝状体） ・細胞間隙に形成されるのう状体 

A



B

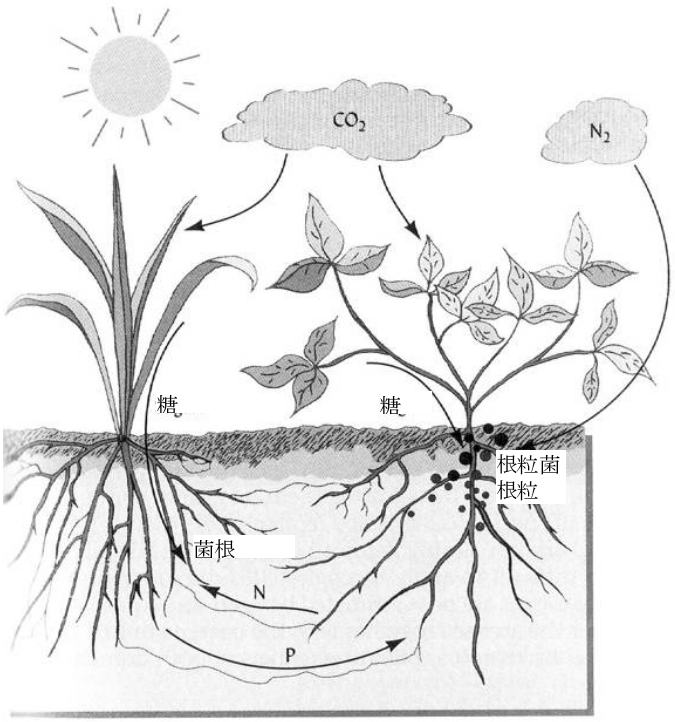


Fig. 3-1　A.菌根の構造、B.菌根の役割

（Brady and Weil 2008 の Figure 11.24 一部改変）

3-2. DSE の特徴確認

3-2-1. 実験方法

第 2 章で得られた分離菌株の内、人工培地上で菌核形成が見られた *MRA*3 株と対照として外生菌根由来の *C. geophillum* AT353 を供試した。分離菌株は、スライドカルチャーを作成し、その形態的特徴を光学顕微鏡で観察した。詳細を以下に示す。

菌類の形態観察は､スライドガラス培養法によりサンプルを調整した。1.5%素寒天にカバーガラスを置き、4-8mm 角の Pablum Cereal Agar 培地をその中心に置いた。分離した菌類の培地から約 2mm 角の菌糸を切り出し、Pablum 培地の横の切片 2-4 箇所に植菌した。上からもカバーガラスで覆い、プレートのふたをして 1-3 週間培養した。菌糸が伸びたら、カバーガラスをスライドガラス上のマウント液に乗せ、顕微鏡観察用のサンプルとし、光学顕微鏡（OLYMPUS BX51, DP50）を使用して、顕微鏡観察を行った。

エンドファイトであるかを明らかにするために、植物と共生関係を確認した。植物は、ユーカリを用い、界面活性剤(Tween20)を使用した洗浄方法（Narisawa et al. 1998）により種子を洗浄した後、2%の素寒天培地上に撒き、発芽させた。同等程度に生育したユーカリの苗は、分離株を培養した MMN 培地とコントロールとして MMN 培地にそれぞれ 2 株ずつ移植し、24℃培養を行い、ユーカリの成長を確認した。

3-2-2. 実験結果および考察

Table3-2 に菌核からの分離株 *MRA*3 株および北海道のアカマツ菌根から分離された *C. geophillum* 分離株の顕微鏡写真を示す。どの菌株も

DSE の特徴である黒く節がある菌糸形態を持つことが明らかとなった。

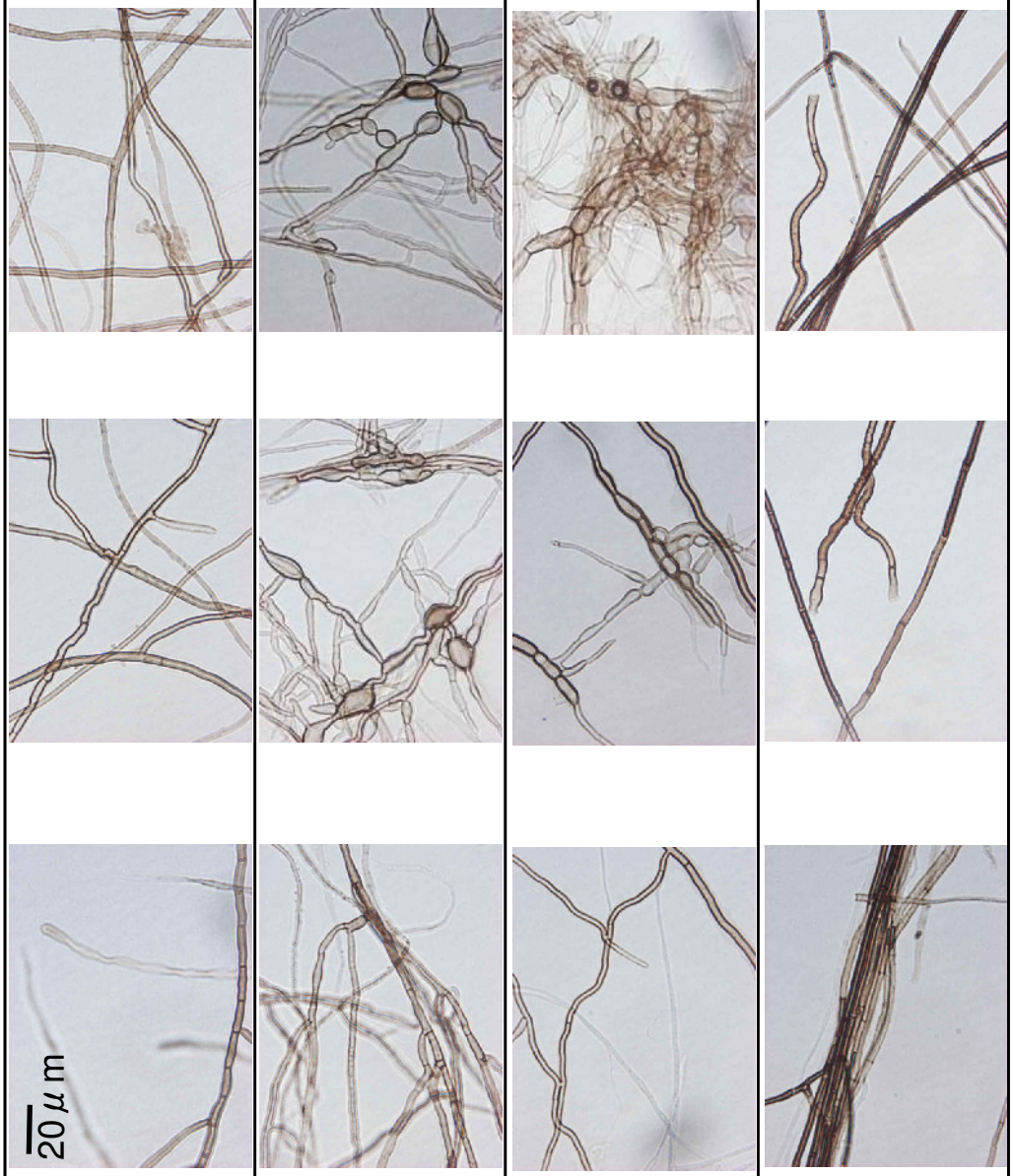
さらに、一般的な菌核形成の初期段階（Butler 1966; Willetts 1978）に見られる以下の特徴が観察された。菌糸が集まって太い菌糸を形成した菌糸束が見られ、太い菌糸と細い菌糸、分岐した菌糸が様々な方向に伸長した様子が確認された。さらに、2 本の菌糸が接合した菌糸融合が見られた。菌糸融合は、異種の菌糸の場合、2 種間で遺伝子組み換えを行うことが知られている。菌糸融合が見られたことは、様々な能力を併せ持つ可能性があると言える。また、遺伝子解析で *MRA* と雑多な群までしか特定できなかったのは、菌糸融合による遺伝子組み換えが関与している可能性もある。菌糸が短い間隔で枝分かれし、養分の貯留による幅の広い短い太った細胞が確認された。このような細胞の膨らみは、種を残す際に見られる特徴である。膨らんだ菌糸が絡まっている構造は、菌核形成の初期段階で見られる原基であると考えられる。

MRA は *C. geophillum* に比べ、菌糸の伸長が早く、スライドカルチャーは 2～3 週間程度で観察できる状態になった。培地上において早い段階で菌核形成の初期段階が見られたことから、菌核形成は比較的早い期間で始まることが明らかとなった。

植物と共生関係を確認するために、分離株を増殖させた培地にユーカリを移植した結果を Fig.3-2 に示した。培地のみのコントロールに比べ、同等かそれ以上の成長が見られたことから、共生関係を持つことが推定された。

これらの結果から、*MRA* 分離株および *C. geophillum* は DSE の特徴である黒色の隔壁のある菌糸を持ち、植物の生育を助けることから、根部エンドファイト DSE であることが確認された。

Table3-2　菌核からの分離株 MRA3 株およびアカマツ菌根由来の *C. geophillum* 分離株の菌糸形態観察

MRA1	
MRA2	
MRA3	
Cg AT353	

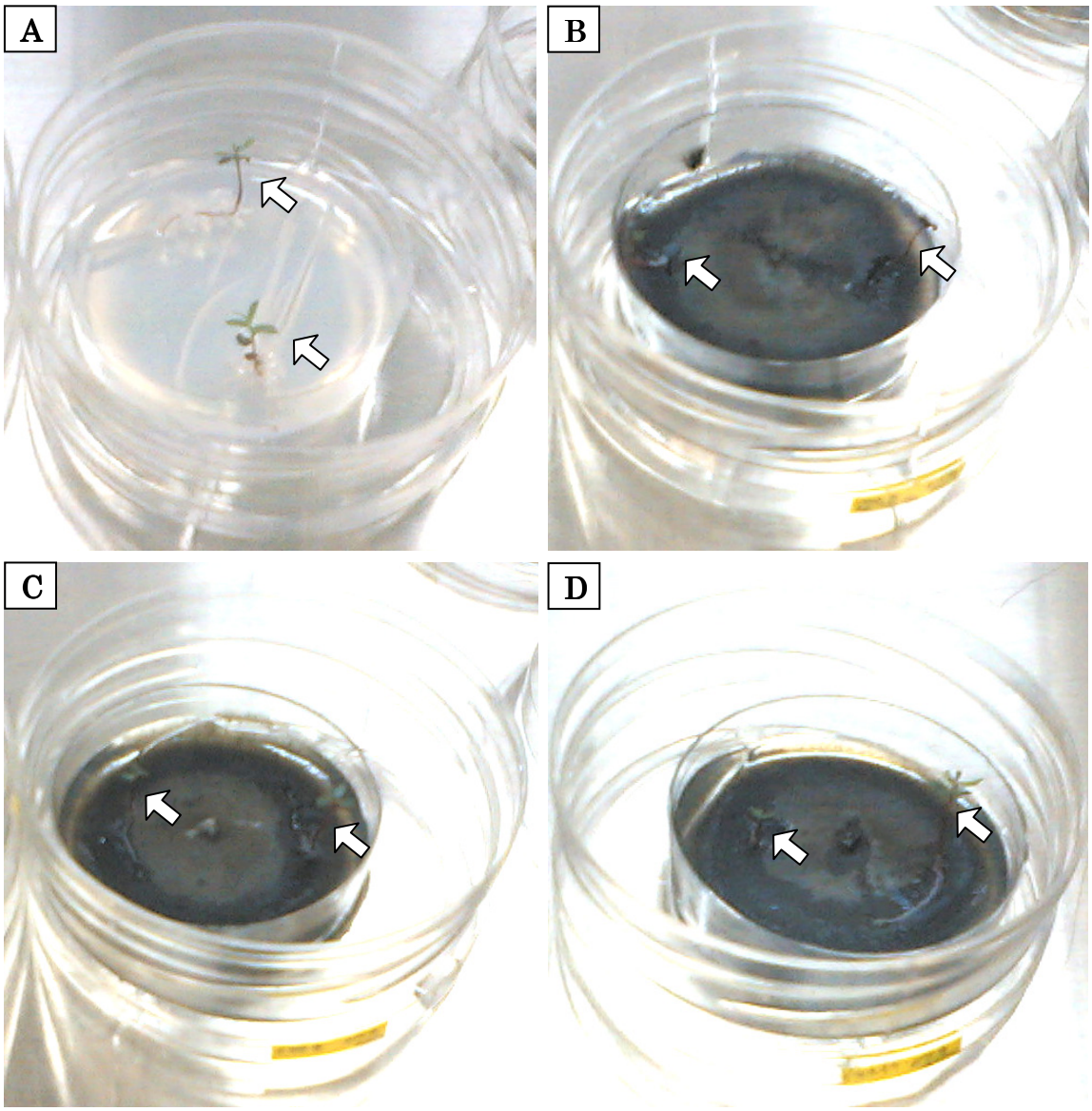


Fig. 3-2　植物との共生試験［矢印:ユーカリの苗］

（A. コントロール; B. *MRA*1; C. *MRA*2; D. *MRA*3）

3-3. 培養条件による菌核形成条件試験

3-3-1. 実験方法

a) 低 pH・アルミニウム添加に対する応答

MMN 培地（2-4-1.b）を 0.1M H_2SO_4 で pH3,4,5,6,7 に調整し、1.5% 寒天を添加した後オートクレーブ(110℃、20 分)し、プレートに分注した。pH4-7 の MMN 培地に *MRA*3 株と、比較として *C. geophillum* 分離株を 2 株ずつ植菌し、増殖を確認した。

菌類のアルミニウム耐性を調べるために、Al^{3+}濃度 0～50mM の寒天培地を 2 連ずつ調整した。Al による影響を明白に見るために、最低限の栄養（グルコース 5g･L^{-1}）の寒天培地を選んだ。また、アルミニウムは pH3.5 以下でイオン化するため、培地を pH3 に調整した。寒天は、pH4 以下では凝固しないため、それぞれ調整した溶液をオートクレーブした後混合する方法を使用した（金沢 1994)。

$Al_2(SO_4)_3$ を蒸留水に溶解し、pH3 に調整した。Al の最終濃度が 0,5,10,20,50mM になるように pH3 の蒸留水で調整したもの、pH3 の 5g･L^{-1} グルコース溶液、蒸留水に寒天(最終濃度が 2.0%)を加えたものを用意した。それぞれ別の容器でオートクレーブした後、混合しプレートに分注した。菌核からの分離株 *MRA*3 株と *C. geophillum* を 2 株ずつ植菌し、増殖を観察した。

b) 培養条件に対する応答

培養条件を組み合わせて、分離株 *MRA*3 株および *C. geophillum* 分離株を培養し、菌核形成を確認した。

人工培地には、グルコース寒天培地（グルコース 5g, 寒天 20g･L^{-1}）

を pH3.5 または pH6.5 に硫酸で調整した培地、CMA 培地を供試した。

人工培地に分離株を移植し、培養条件として、培養温度をは 15℃または 24℃、培養環境の明るさは明所または暗所で培養した。

さらに、液体培地において、菌核形成を促進させるために、核となる物質を添加し、培養を行った。添加物として、菌核の主成分であることから相性のいいと思われるキチンパウダー、キトサンフレーク、ガラスビーズをそれぞれ 1g 添加した 5g･L^{-1} グルコース液体培地を用意した。土壌抽出液は、土壌微生物研究会（1997）の方法に従った。それぞれの液体培地に、分離株を移植し、24℃で培養した。形成された構造物は、凍結ミクロトーム（CM1900 [LEICA]）でスライスし顕微鏡で観察した。

3-3-2. 実験結果および考察

a） 低 pH･アルミニウム添加に対する応答

Table 3-3 に、pH を調整した培地に植菌して 65 日目の写真を示す。*C. geophillum* 分離株は、pH4～7 の培地で増殖が確認された。*C. geophillum* 分離株の pH と増殖の関係を調べ、pH4～5 で最大の増殖を示し、強酸性、強アルカリ性になるに従い増殖が抑えられたことを確認している（吉原 未発表）。異なる *C. geophillum* 分離株を使用しているが、同様の結果が得られたと言える。菌核から分離した菌類分離株 *MRA*3 株においても、pH4-7 全ての培地で増殖が見られた。また、14 日程度で、写真と同等の大きさにまで増殖しており、*C. geophillum* よりも早い増殖を示した。菌核からの分離株および *C. geophillum* は、酸性土壌でも十分に生息できる酸耐性を持つことが明らかとなった。また、低 pH の培地では、分離株の増殖が著しく、菌核形成が確認されなかった。

Al^{3+}濃度が 0, 5, 10, 20, 50mM の培地に分離株を移植して 60 日目の増殖を観察した。*C. geophillum* 分離株は、増殖は遅いが Al^{3+}濃度 20mM までは増殖が見られた。分離株 3 株は、50mM-Al の培地においてもコントロール(Al^{3+}：0mM)と変わらない増殖が見られた。森林土壌は比較的 Al 耐性菌が多いが、培地中のアルミニウム濃度が 10mM 以上になると全菌数が急激に減少することが報告されている（金沢 1994)。これらのことから、*MRA* および *C. geophillum* は、Al に対しても耐性があることが確認された。菌核は、アルミニウムがイオン化しやすい低 pH 土壌で検出されることがわかっている（Watanabe et al. 2004)。分離株が酸及び Al 耐性を持つことは、菌核の検出される環境と一致することから、*MRA* および *C. geophillum* が供試した菌核の菌核形成菌であることが示唆された。

また、菌核からの分離株 3 株の培養開始約 180 日後の培地を Fig. 3-3 に示す。どの培地においても菌核の形成が確認された。菌核の形成は、培地の表面の乾燥が進行すると共に増加した。コントロールは、微小菌核が多く形成されていたのに対し、Al を添加した培地では菌核の数は少ないが、粒径が大きいものが多く見られた。これは、土壌中の交換性アルミニウムの増加に伴い、菌核の平均質量が大きくなるという報告（Watanabe et al. 2002）と一致する。

さらに、CMY, 1/2CMMY, MMN 培地では *C. geophillum* の菌核形成が確認されていなかったが、0mM-Al の培地、つまり低 pH でグルコース $5g \cdot L^{-1}$ のみの低栄養培地において、*C. geophillum* 菌核の形成が確認された。このことから、*C. geophillum* も低栄養・低 pH という過酷な環境下で菌核を形成すると考えられる。

この結果から、pH 耐性試験においても、グルコース $5g \cdot L^{-1}$ の低栄養

培地を用いることで、菌核形成が確認できたと思われる。今後は、グルコースの量や pH を変えて試験することで、菌核形成条件を見出すことができると思われる。

b) 培養条件に対する応答

分離株 *MRA*3 株および *C. geophillum* 分離株をそれぞれの培養条件の組み合わせで培養した結果を Fig. 3-4 にまとめた。

MRA 分離株においては、3 株とも CMA 培地を用いて 24℃で培養した時、最も菌核の形成が確認された。明所、暗所どちらでも菌核を形成したが、菌株の増殖および菌核形成の仕方が異なった。明所では、中心から外側に向かって菌糸が高密度で伸長し、その中に菌核を形成したのに対し、暗所では薄く広く菌糸を伸ばし、菌糸の制限されるプレートの端の少し内側に菌核を多く形成した。

それに対し、*C. geophillum* 分離株は、暗所での増殖が著しく、特に pH3.5 のグルコース培地で菌糸の増殖および菌核形成が多く見られた。Moromizato et al. (1996)は、*Rhizoctonia solani* の菌糸の生育と菌核形成は、グルコースの濃度に比例し、ほとんどの炭素源が菌核の成熟期までに消費されたことを報告している。 このことからも、グルコースが菌核形成に関与している可能性が示唆された。*C. geophillum* の増殖には、15℃、暗所が適していることが明らかとなり、菌核からの菌類を分離する際も、15℃、暗所という条件で行うことにより、*C. geophillum* が分離される可能性もある。

培養条件により菌核の形成が確認されたが、粒径の大きな菌核形成のコントロールは困難であることが明らかとなった。菌核形成には、培地の CN 比が重要であり、N 源が過剰であると形成が抑制されることが報

告されている（柳田 1982）ことから、CN 比に注目して培地の組成を検討するべきであった。

液体培地にキトサンフレークを加え、培養した結果を Table 3-5 に、液体培地に添加物を加え、培養した結果と形成された構造物のスライスを Table 3-6 に示した。

脱アセチル化度の違うキトサンフレーク CTA1～4 を用いた場合、脱アセチル化度が低いキトサンフレークで培養した分離株ほど、構造物が発達し、1-2cm 程度の構造物を形成した。しかし、形成された構造物は硬度を持たず、球体のものはほとんど見られなかった。スライスして断面を観察すると、キトサンフレーク CTA3 で培養した分離株が最も菌核に近い構造を形成していた。それに対し、増殖の遅い *C. geophillum* は、より球体に近い構造物が見られた。

土壌溶液を使用した培養では、目視できる大きな構造物は形成されなかったが、スライスし微小構造を確認すると、菌核に似た構造が見られた。

ガラスビーズにおいては、菌糸がガラスビーズを巻き込むことはなかったが、試験管の底への貼りつきを軽減し、より菌糸の凝集が見られた。

キチンパウダーにおいては、菌糸が細かい粒末状のキチンを巻き込み、球体の構造物を形成したが、スライスすると菌核のもつセル同士の結合した構造は確認されなかった。

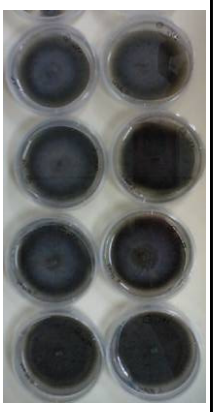
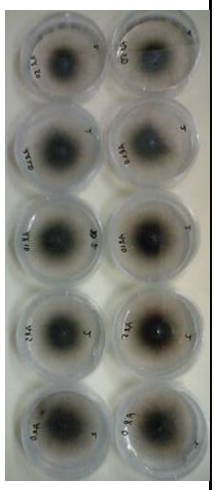
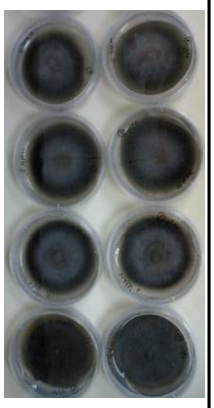
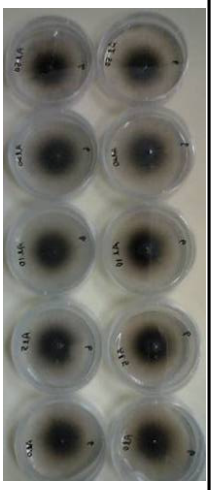
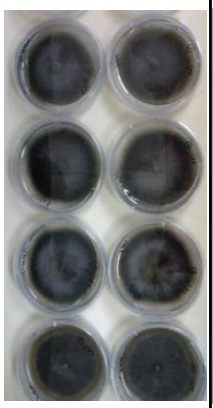
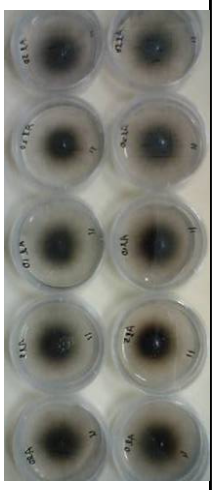
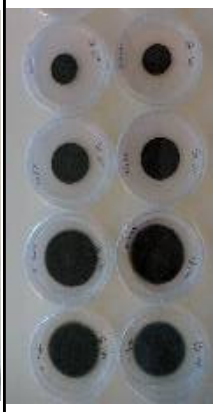
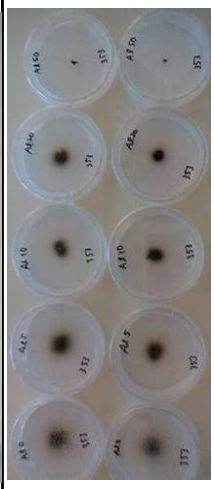
菌核の発達の内、①初期段階、②サイズの増大の段階を確認することができたが、全ての段階を経た菌核のコントロールはできなかった。乾燥時に硬い菌核が形成されたことから、 ③成熟は乾燥が関係している可能性が高い。

いくつかの培養条件において、菌核に似た構造物の形成が見られたが、

粒径の大きな菌核様構造物を形成することはできなかった。これは、菌株の増殖の遅さが、菌核形成コントロールを困難にさせていると思われる。

さらに、菌核形成には、栄養濃度が高いほど多数の原基を形成するが、その後の肥大成長には適さないことが明らかとなっている(柳田 1982)。このことから、培養条件の変化が必要である可能性が高いと考えられる。

Table 3-3　pH および Al 耐性試験の結果（培地に植菌して 65 日目）

	pH7　6　5　4	Al^{3+}: 0　5　10　20　50 mM
MRA1		
MRA2		
MRA3		
***Cg* AT353**		

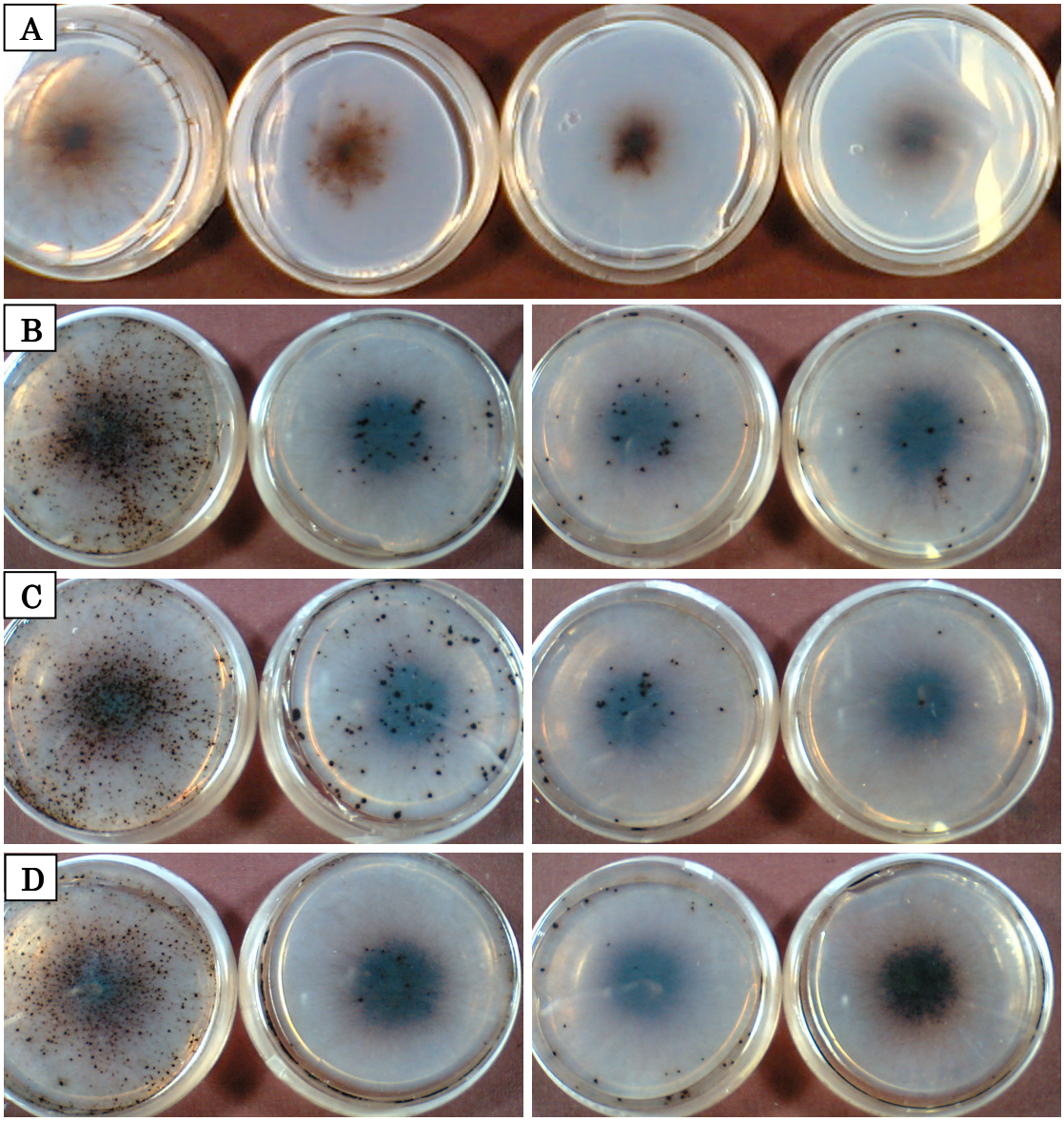


Fig. 3-3　約 180 日培養後の Al 添加培地［左から、Al^{3+}濃度: 0, 5, 10, 20mM］

（A. *C. geophilum* 分離株； B. *MRA*1； C.*MRA*2； D. *MRA*3）

Table 3-4　培養条件と菌核形成

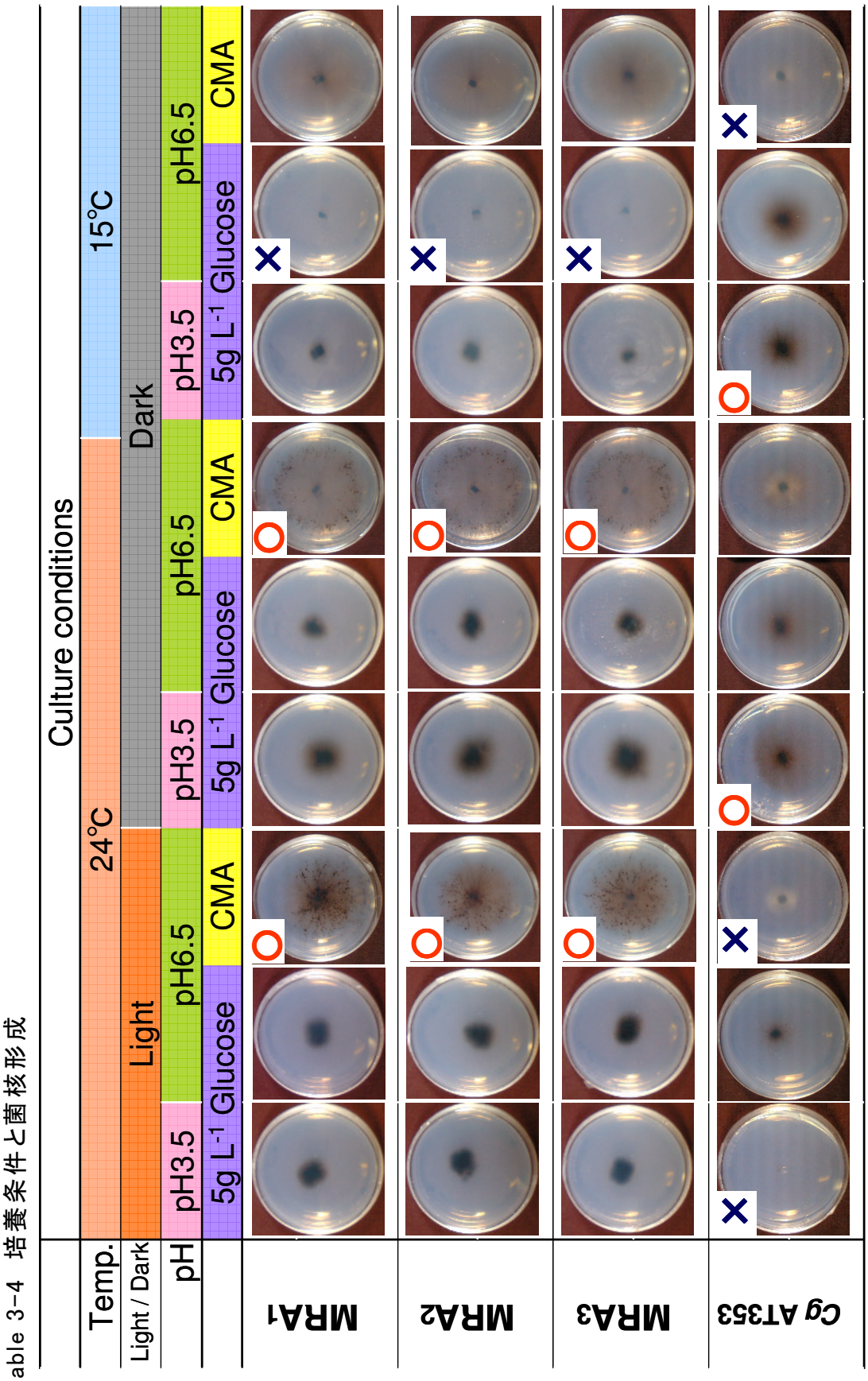


Table 3-5　液体培地にキトサンフレークを加え、培養した結果

（試験管 φ 17mm）

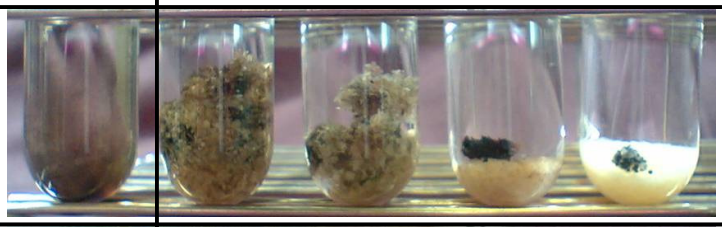
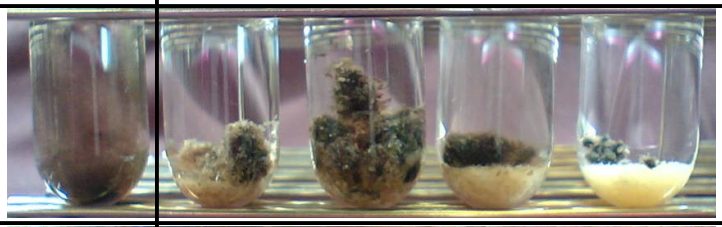
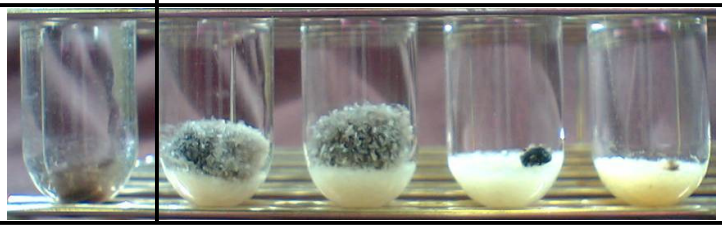
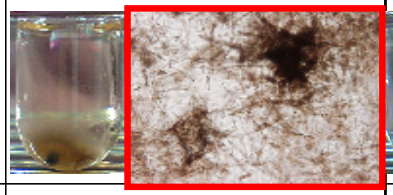
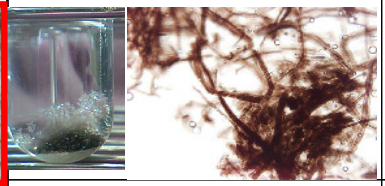
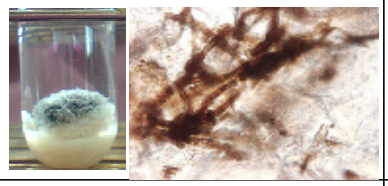
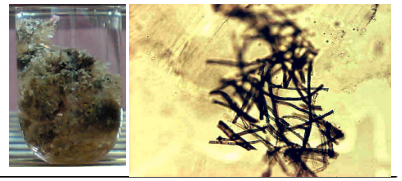
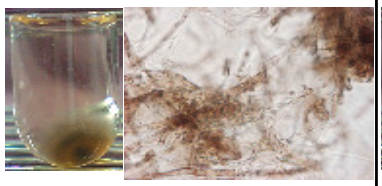
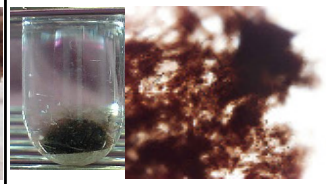
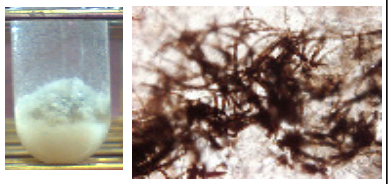
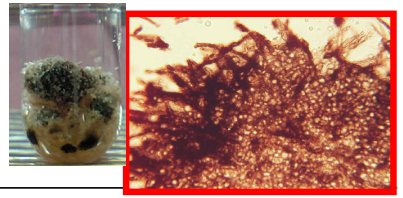
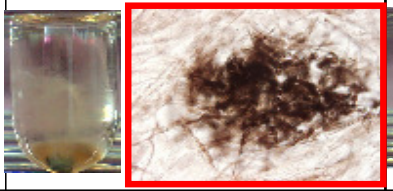
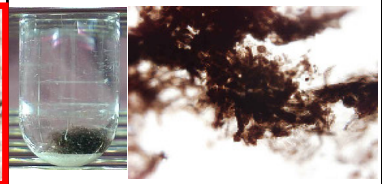
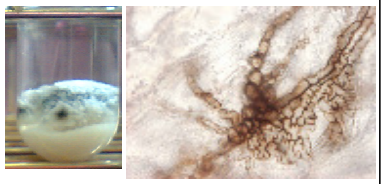
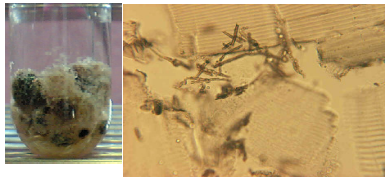
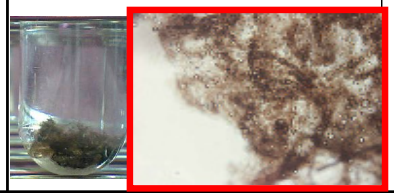
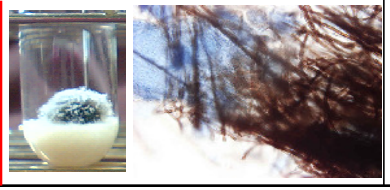
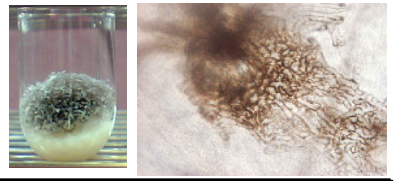
	コントロール	キトサンフレーク入り液体培地 CTA1, CTA2, CTA3, CTA4
MRA1		
MRA2		
MRA3		
***Cg* AT353**		

Table 3-6　液体培地に添加物を加えて培養した結果と形成された構造物の断面

試験管 ϕ 17mm

20 μm

	土壌抽出液	5g L^{-1} Glucose		
		ガラスビーズ	キチンパウダー	キトサンフレーク
MRA1				
MRA2				
MRA3				
Cg AT353	-			

3-4. 結語

本章では、*C. geophilum* および菌核分離菌株 *MRA* が根部エンドファイト DSE であることを確かめるために、DSE（Dark Septate Endophytic Fungi）の特徴である菌糸形態と植物との相互作用を確認した。さらに、これらの菌核形成をコントロールするために、培養条件を組み合わせて培養を行った結果、以下のことが明らかとなった。

1) *MRA*3 株およびアカマツ菌根から分離された *C. geophillum* 分離株は、DSE の特徴である黒く節がある菌糸形態が観察され、菌核形成の初期段階に見られる菌糸束、菌糸の接合・吻合、菌糸融合、養分の貯留が見られた。*MRA* 分離株は、ユーカリへの生育促進が確認された。

2) *MRA*3 株および *C. geophillum* 分離株は、酸・アルミニウム耐性を持つことが明らかとなった。低 pH の培地に Al を添加することで、数は少ないが、粒径が大きい菌核が多く形成された。*MRA* 分離株は、CMA 培地で 24℃、*C. geophillum* 分離株は、暗所、15℃、pH3.5 の培地で最も菌核の形成が見られた。

3) 液体培地に添加物を加えることで、構造物が発達し、1-2cm 程度の構造物を形成したが、硬度をもつ球体は見られなかった。スライスして断面を観察すると、菌核に近い構造が確認されたが、成熟は見られなかった。

以上より、*MRA*3 株および *C. geophillum* は、DSE の特徴である黒色の隔壁のある菌糸を持ち、植物の生育を助けることから、DSE であることが明らかとなった。いくつかの培養条件において、菌核に似た構造物の形成が見られた。

第 4 章　菌核内部の細菌相

4-1. 緒言

菌核と細菌に関する研究は、病原菌において多く研究されている。Mathumoto and Tajimi (1987)は、雪腐病菌*Typhula incarnata*、*T. ishikariensis*の菌核から分離された拮抗細菌が蛍光性の*Pseudomonads*であったことを報告している。*Sclerotinia*属菌の 菌核は、拮抗細菌による分解の防御応答としての揮発性物質の放出することが明らかとなっている（Fravel et al. 2002)。 Duncan et al. (2006)は、*Sclerotinia sclerotiorum*の菌核を12ヵ月間土壌に埋めた後、菌核から268株の細菌が分離され、下層の菌核ほど拮抗細菌が多く検出されたことを報告している。また、*R. solani*、*S. rolfsii*の菌核おいて、土壌に菌核を入れると、菌核表面に微生物が増殖することが確認されており、この微生物活性の増加は“菌圏（菌核周囲の土壌）効果”と定義されている（内記,宇井 1969; Gilbert and Linderman 1971)。

このように、菌圏の微生物活性は高く、それら細菌の定着に対して防御のために抗生物質を生成することがわかっているにもかかわらず、Ohta et al.(2003)は、妙高山土壌に見られる菌核内からの細菌分離を報告している。このことから、菌核内部は菌核形成菌以外の土壌微生物が生息空間として利用していると考えられる。これは、菌核の構造だけでなく生物学的な因子も含めた菌核の特殊性が関係していると考えられる。菌核は、内部にセル構造を持ち、菌核内部に細菌が分布する担体の

ような役割を担っていると推察される。土壌中から採取された菌核内部の細菌相を明らかにすることで、自然環境中の菌核と細菌の関係を解析することができる。さらに、内部から検出された細菌の特徴から、菌核内部の構造を考察できる。

また、菌核内部から検出される細菌は、菌核内部を生息空間として利用できる可能性が高いことから、微生物担体としての使用で利用可能な細菌の選別の基礎情報になるとも考えられる。

本章では、菌核における細菌相の解析を非培養法及び培養法で行うことを目的とした。非培養法については、細菌の非培養法による群集構造解析と同様の理由から、クローンライブラリー法を使用した。また、周囲土壌の細菌相との比較を行った。培養法は、Ohta et al.(2003)に従い、DNB 培地を用いた分離を行い、菌核個々の細菌相の比較を行った。

4-2. 非培養法による細菌群集構造解析

4-2-1. 実験方法（クローンライブラリー法）

菌核 DNA 抽出液は、2-3-2. a.菌核の洗浄と DNA 抽出で得られた DNA 抽出液を使用した。土壌は、湿重量約 0.5g を使用し、ISOIL for Beads Beating のプロトコルに従い、土壌 DNA 抽出液を得た。

DNA 抽出液は、16S rDNA 領域のプライマー10F（5'-AGTTTGATGCTGGCTCAG-3'）、1541R（5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-3'）を用いて PCR 反応による増幅を行った。PCR の増幅条件は、96℃, 5min.; [96℃, 30sec.-60℃, 1min.- 72℃, 1min.] 25cycle で行った。

その後、第 2 章　2-3-2.b のゲル切り・精製、c.ライゲーション、d.プラスミド抽出と同様の操作を行い、得られたクローンのプラスミド抽出液は、16S rDNA の塩基配列解析による同定を行った。

4-2-2. 実験結果および考察

Table 4-1, 4-2 に菌核および土壌から検出されたクローンの近縁種とその分類学的特徴、クローン数をまとめ、Fig. 4-1 に菌核及び周辺土壌の細菌相解析の結果を示す。検出された細菌クローンの種数を比較すると、土壌では 16 種であったのに対し、菌核では 36 種と約 2 倍であった。土壌、菌核共に検出された共通の細菌は 3 種であった。

菌核および土壌は、それぞれ *Acidobacteria* 属のクローンが全クローンの 66%、58%検出された。*Acidobacteria* は、環境中に存在していることはわかっているが、培養が難しくその活性はほとんど明らかになっていない(Sabree et al. 2006)。*Acidobacteria* の内、分離された *Acidobacterium capsulat* は、pH6.5 では増殖が見られないが pH3.0 で

の増殖が見られると報告されており（Kishimoto et al. 1991a)、低 pH に生息する細菌であることがわかっている。*Acidobacteria* が多く検出されたのは、サンプリング地点が、低温で蒸発量が少なく、降水量の多い森林土壌の特徴である低 pH 土壌であることに寄与していると考えられる。また、この細菌は、森林土壌から多く検出されることがわかっており、低 pH であるマツの根元から採取した土壌から特に高い割合で *Acidobacteria* のクローンが検出されたという結果とも一致した（Whang K. S., 未発表)。また、ISOIL for Beads Beating キットは、0.5～1g と少量のサンプル量で、腐植の多いサンプルでも DNA を抽出できるために採用したが、その他の直接 DNA 抽出法よりも細菌多様性が減少し、*Acidobacteria* の割合が増加するということがわかっている（Whang K. S., 未発表)。今回、土壌 5g を使用する直接 DNA 抽出法である CTAB 法による土壌からの DNA 抽出も検討したが、腐植が多い A1,A2 層の土壌を使用しているため、腐植が PCR 反応を阻害し、PCR 産物を得ることができなかった。そのため、腐植が多い土壌の抽出法をさらに検討することで、より正確な細菌相の解明が可能となるだろう。

クローンライブラリー法では、プラスミドへの組み込まれやすさがクローンの検出量を左右するため、検出量が環境中の存在量と言うことはできない。しかし、多く検出された *Acidobacteria* は、菌核及び周辺土壌で何らかの役割を果たしていると推測できる。

また、Ohta et al. (2003)は、菌核から分離された *Shingomonas* 分離株には pH4-5 以下での増殖が見られないことを報告している。これらのことから、菌核内部には、様々な pH 環境が存在する複雑な構造を持っていると考えられる。

菌核から、還元的脱塩素化が報告されている *Dehalococcoides* sp.のク

ローンが検出された。*Dehalococcoides* sp.は、塩素系多環芳香族化合物からの還元的脱塩素化が報告されている細菌で、ダイオキシン類の脱塩素化などバイオレメディエーションへの利用に関する研究が多く行われている（Duhamela et al. 2002, Aulenta et al. 2005）。さらに、菌核の EDX, EPMA による元素分析において、塩素はしばしば検出される元素の一つである（Watanabe et al. 2001）。また、Cameron and Sidell(1978)は、キノン系土壌色素である緑色色素 Pg の構造として、質量測定により $C_{21}H_7Cl_5O_6$ という化学組成を持つ塩素系多環芳香族化合物が考えられるということを報告している。Kumada and Hurst (1967)は、Pg の起源の一つが *Cg* 菌核としている。これらのことから、*Dehalococcoides* sp. の存在は *Cg* 菌核由来の Pg が塩素系多環方向族化合物であるという報告と整合性があり、菌核内部に塩素または塩素系多環芳香族化合物があることを示唆している。

Desulfuromonas 属菌のクローンが検出された。この菌は、*Dehalococcoides* sp.と同様にクロロエチレン類などの有害物質の分解が報告されている（陶山ら, 2003）。さらに、*Dehalococcoides* sp.、*Desulfuromonas* 属菌共に、嫌気的な環境で脱ハロゲン化呼吸する細菌である。Watanabe et al.(2004)は、御嶽山の菌核内からベーマイト(γ-AlOOH)が検出されたと報告している。ベーマイトは、嫌気的な環境で生成されることが知られていることから、菌核の一部には嫌気的な環境が存在すると考えられる。

周辺土壌と比較すると、菌核からのみ *Planctomycetes*、*γ－proteobacteria* が検出された。これらの細菌の多くは、水圏を主要な生息環境としており、*γ－proteobacteria* は土壌圏からも検出されているものもいるが比較的少数であることが知られている（豊田 2000）。菌核は、水分の保持

能力が優れていると考えられるために、水圏に生息する細菌が菌核からのみ検出されたと考えられる。

しかし、菌類相の解析と同様に、クローンライブラリー法による細菌相は、遺伝子情報だけで判断しているため、人工 PCR 産物等の実際には存在しない細菌も検出している可能性がある。さらに、実際に活性試験をして確かめる必要もあるため、他の方法を組み合わせて考察するべきである。

本実験結果より、培養法（Ohta et al. 2003）と同様に、非培養法でも菌核内と周囲の土壌では異なった細菌相を持つことが明らかとなり、菌核内部の環境が特異的であることが示唆された。

菌核の内部細菌相は、特異的であるため、バイオレメディエーションに利用可能な有用細菌のスクリーニング作業が、土壌から探すよりも簡単にできると考えられる。また、難培養細菌も多く生息するため、菌核の構造や環境をヒントに新しい分離法を確立したり、バイオリアクターとして利用したりすることが期待できる。

Table 4-1　クローンライブラリー法により検出された菌核内部の細菌クローンの近縁種

近縁種	クローン数
Acidobacteria bacterium Ellin7184	41
Acidobacteria bacterium Ellin7137	11
Acidobacteria bacterium Ellin7246	2
Bacterium Ellin5121	5
Bacterium Ellin634	1
Bacterium Ellin644	1
Acidobacteriaceae bacterium CH1	1
Bacterium Ellin371	1
Bacterium Ellin6099	1
Candidatus Koribacter versatilis Ellin345	2
Bacterium Ellin5080	2
Bacterium Ellin5299	1
Rhodoplanes elegans strain OK5R2b	1
Roseomonas aquatica	1
Stella vacuolata train DSM5901	1
Skermanella sp. 5416T-32	1
Cupriavidus taiwanensis	1
Desulfuromonas palmitatis	1
Chondromyces lanuginosus	1
Archangium gephyra	3
Syntrophus sp.	1
Bacterium Ellin5260	1
Bacterium Ellin5264	1
Thialkalivibrio nitratreducens	1
Serratia sp. B-2002	1
Acidimicrobidae bacterium Ellin7143	4
Acidimicrobidae bacterium Ellin7133	1
Frankia sp. symbiont in root nodule FE37	1
Symbiobacterium sp. HN15 gene	1
Planctomycetales bacterium Ellin7244	2
G.obscuriglobus	3
Planctomyces maris	1
Planctomyces sp.	1
Dehalococcoides sp. BHI80-15	1
Synechococcus sp. LS0588	1
Ktedobacter racemifer	5

Table 4-2　クローンライブラリー法により検出された土壌の細菌クローンの近縁種

菌名	クローン数
Acidobacteria bacterium Ellin7184	43
Bacterium Ellin5121	9
Acidobacteria bacterium Ellin7137	2
Bacterium Ellin6074	1
Bacterium Ellin327	1
Bacterium Ellin613	1
Terriglobus roseus strain KBS 112	1
Rhodocista xerospirillum	1
Bacterium Ellin6095	2
Burkholderia sp. SE-10	1
Desulfuromonadales bacterium JN18_A94_J	1
Methylococcus sp. SVUB7	1
Corynebacterium sp.	1
Clostridium sp.	1
Moorella thermoacetica strain AMP	1
Nitrospira sp. clone b30	2

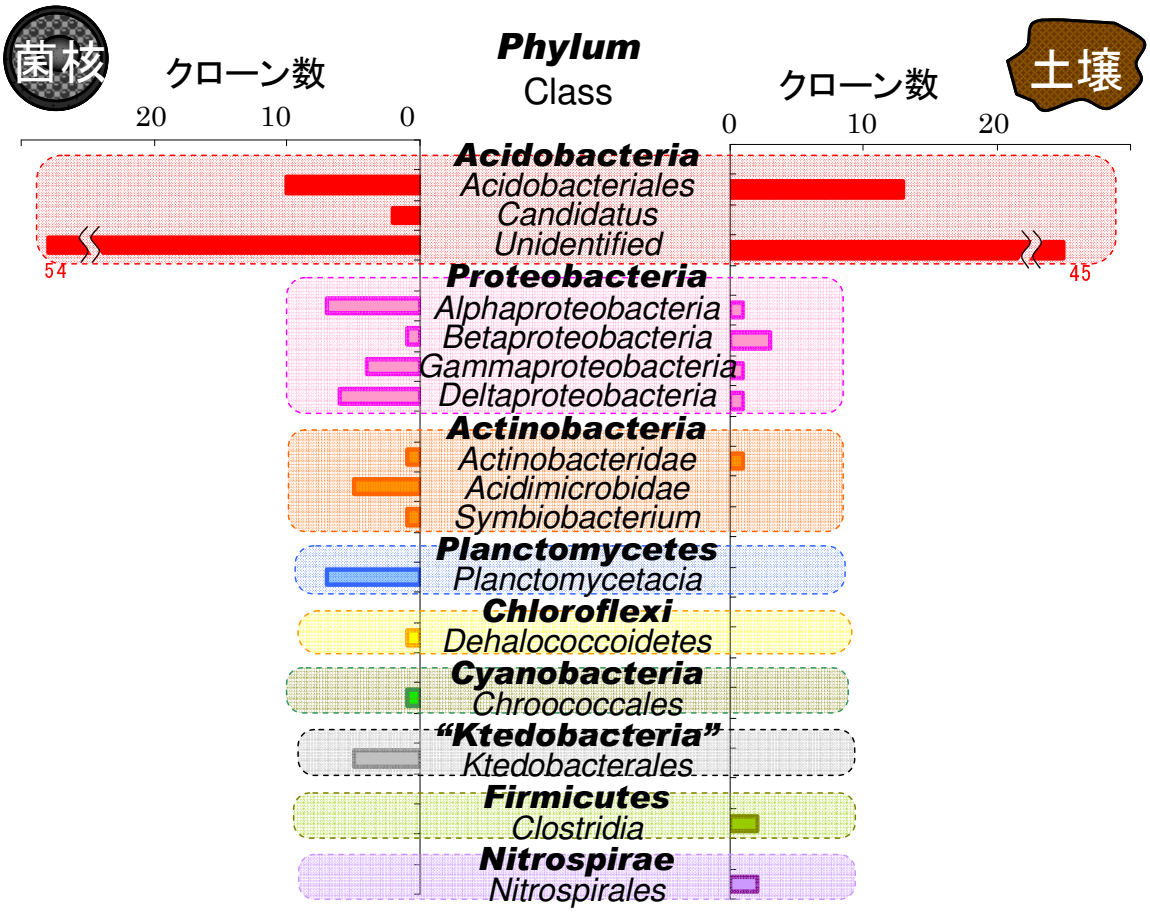


Fig. 4-1　菌核及び周辺土壌の細菌相

4-3. 培養法による細菌群集構造解析

4-3-1. 実験方法（DNB 培養法）

菌核内部の細菌相の分析は、採取した菌核の中で、4つの菌核（粒径約 2.7、 2.2、1.6、および 1.2 mm）を選んで供試した。それぞれの湿重量は、9.2 （Sc1)、6.4 （Sc2)、2.4 （Sc3)、および 1.7 mg （Sc4)であった。この4個の菌核について、Ohta et al. (2003)の方法に従い、100 倍希釈肉エキス（DNB; カツオエキス 10g, ポリペプトン 10g, 塩化ナトリウム 5g·L^{-1} [pH7.2]）寒天培地で培養して菌核内部の細菌を分離し、分離株の16S rRNA遺伝子（16S rDNA）を解析した。

4-3-2. 実験結果および考察

Fig. 4-2に、御嶽山の土壌から採取した供試した 4 つの菌核内部からそれぞれ分離された細菌を示した。合計17 種類の細菌が検出され、内部細菌相は菌核個々で異なる結果を示した。 比較的大きな菌核Sc1からは *Proteobacteria*、 Sc2からは *Actinobacteria* の細菌のみが分離された。一方、比較的小さい菌核Sc3 と Sc4 からは、多種類の細菌が検出された。分離された細菌相の中で優先する細菌と分離された割合は、それぞれ Sc1, *Ralstonia* 属（71 %）; Sc2, *Arthrobacter* 属（45 %）; Sc3, *Bacillus* 属（69 %）; Sc4, *Nocardioides* 属（50 %）であった。 どの菌核においても 45-71% と比較的高い割合で優先する細菌が存在することは、新潟県妙高山の土壌から採取された菌核において、*Sphingomonas* 属細菌が 52 %と高い割合で優先した（Ohta et al. 2003）ことと一致した。

土壌中の菌圏の微生物活性が高いにもかかわらず、菌核が分解されず

に土壌中に長期間安定して残存できるのは、自然環境の中では全ての細菌に利用されにくいためであると考えられる。しかしながら、本実験結果より、土壌中の菌核内部には、多種の細菌が定着していることが示唆された。 以上より、菌核は、細菌が定着できる長期間使用可能な微生物担体の役割を担っていると考えられる。

Fig. 4-3に、菌核から検出された細菌クローンおよび分離された細菌を一つの系統樹にまとめた。非培養法および培養法において、共通して検出された細菌は見られなかった。しかし、系統的に比較的近い細菌がいくつか見られた。

今後は他の方法を組み合わせて検討していくことで、より正確な細菌相が解明し、土壌中における菌核の微生物担体としての特徴を把握することができるだろう。

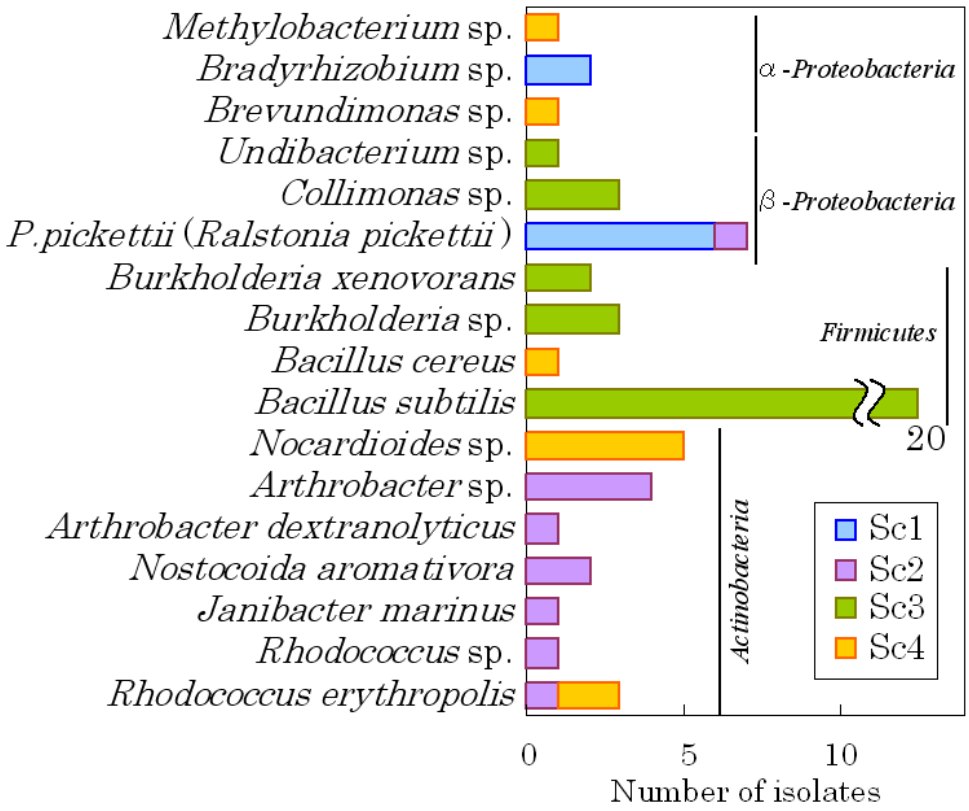


Fig. 4-2　菌核から分離された細菌

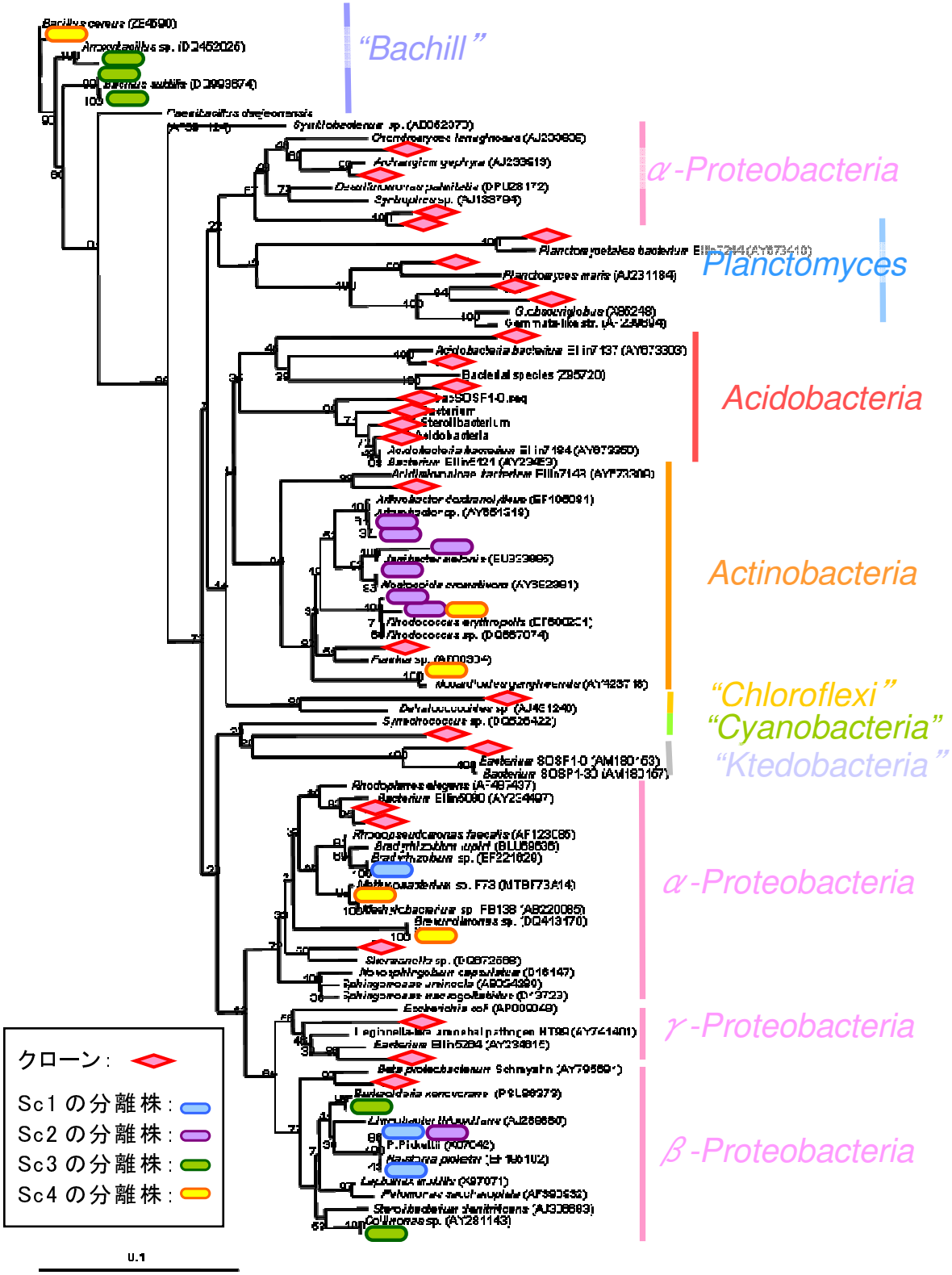


Fig. 4-3　菌核から検出された細菌クローン(◆)および

分離された細菌(▬, ▬, ▬, ▬)の系統樹

4-4. 結語

本章では、菌核における細菌相を明らかにするために、非培養法及び培養法により細菌相を解析した結果、以下のことが明らかとなった。

1)　クローンライブラリー法により検出された細菌クローンは、菌核で 36 種、周辺土壌では 16 種であり、細菌相は異なった。菌核および周囲土壌共に、低 pH に生息する細菌である *Acidobacteria* のクローンが多く検出された。菌核からのみγ-proteo bacteria、*Dehalococcoides* sp.が検出された。検出された細菌の特徴から、菌核内部には、塩素系多環芳香族化合物の存在と、菌核の一部には嫌気的な環境が存在することが示唆された。

2)　培養法においては、4 つの菌核内部からは 17 種類の細菌が検出され、内部細菌相は菌核個々で異なる結果を示した。菌核の細菌相には、優先する細菌が見られ、それぞれ Sc1, Ralstonia 属（71 %）; Sc2, Arthrobacter 属（45 %）; Sc3, Bacillus 属（69 %）; Sc4, Nocardioides 属（50 %）であった。

以上の結果から、土壌中の菌核は、多種の細菌が共存できる環境・構造を持ち、多くの細菌が定着していることが示唆された。

第 5 章　菌核の微生物担体としての有効性評価

5-1. 緒言

5-1-1. 細菌の定着実験

微生物担体としての利用する際、DSE 菌核に細菌が定着可能であるかを確認する必要がある。オートクレーブ処理した菌核への細菌の定着を調べることで、生物学的な因子を除いて単純化した菌核への細菌の定着を考察することができ、新たな微生物担体を設計するヒントを得ることにつながる。また、担体として使用する上で、菌核の最大保持細菌数を調べることは、細菌の封入をコントロールする際に必要な担体としての基本情報となる。

5-1-2. 既存の微生物担体との比較

微生物の生息空間としては、微生物担体の成分、微小構造や水分保持能力が重要であることが知られている。現在、ゼオライト、木炭、籾殻、カニ殻、バーミキュライト、樹皮などが土壌の微生物担体として使用されている。微生物担体には、土着の微生物の栄養とならない低栄養担体と、有用微生物には栄養源となるが土着の微生物には利用されにくい選択的栄養担体がある（岩間 1999)。また、微生物の生息空間としては、木炭や土壌の団粒構造などの孔隙が適していることが報告されている（磯部 2001; 服部 1995)。これらのことから、微生物担体の物理化学性、構造、水分保持能力を確認することは、微生物の生息空間としての

有効性を評価する上で、重要である。

5-1-3. 本章の目的

第4章の結果から、土壌中の菌核は、多様な細菌の生息空間として機能しており、微生物担体としての利用に期待できることが明らかとなった。本章では、実際に菌核が微生物担体として利用可能であるのか、その有効性を①細菌の定着実験、②既存の微生物担体との比較の2つの方法で評価することを目的とした。

細菌の定着実験では、オートクレーブ処理した菌核を細菌培養液に浸し、細菌の定着を調べることで、担体としての基本情報を得ることを目的とした。

また、既存の微生物担体であるゼオライト、木炭、カニ殻を対照として、菌核の元素組成や成分構造の分析、微小構造の観察、水分保持能力を比較することで、菌核の微生物担体としての有効性を評価することを目的とした。

5-2. 細菌培養液を用いた定着実験

5-2-1.　実験方法

a）滅菌方法

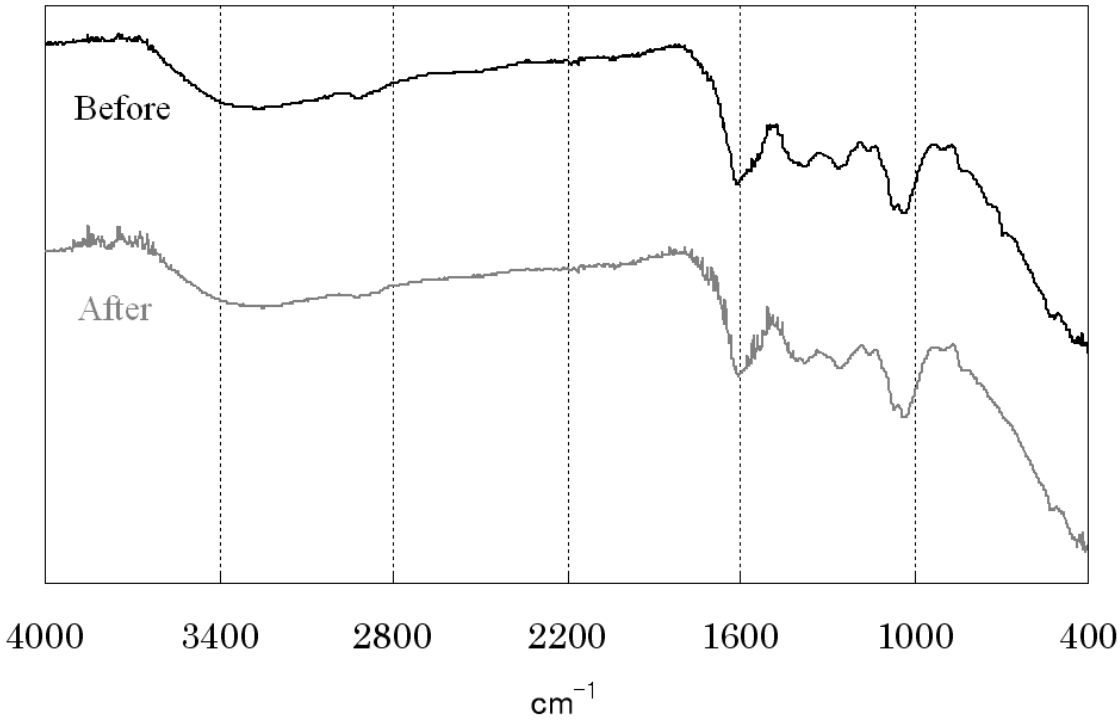
土壌から採取した菌核は、オートクレーブ(KTS-2322 [ALP]) により121 ℃, 20分滅菌処理した。

Fig.5-1に示した様にオートクレーブによる菌核の処理は、電子顕微鏡（VE-7000 [KEYENCE]）による構造観察、フーリエ変換赤外分光光度計FT-IR（IRPrestige-21 [SHIMADZU]） による化学構造の確認を行った結果、菌核の構造は処理前後で物理的、化学的に大きな変化が確認されず、細菌は全く検出されなかったことから、オートクレーブ処理法を採用した。

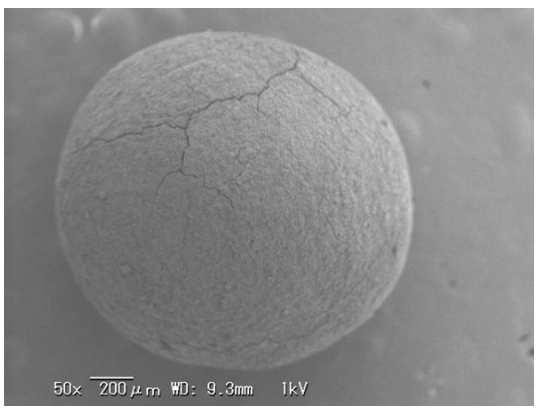
b）定着実験方法

菌核内部から分離した細菌のなかから、無作為に分離株 8 株を選んで、それぞれ DNB 液体培地で純粋培養し、培地の影響を減らす木嶋(1994)ために培養液を 1000 倍希釈した溶液（10^9～10^{10}CFU/mL）にオートクレーブ処理した菌核を浸した。一定の浸漬時間（1、5、10、15、24、48、および 80 h）毎に菌核を取り出し、滅菌水で 10 回洗浄した後、滅菌水を加えてガラス棒ですり潰して調製した菌核懸濁液中の細菌数を DNB 寒天培地による希釈平板法により測定し、最大菌数を算出した。

A



B



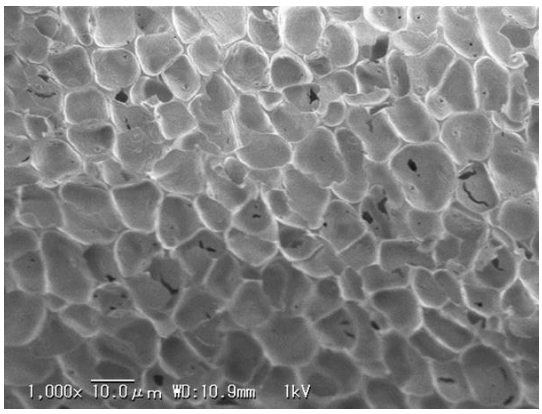


Fig. 5-1　A. オートクレーブ処理前後の FT-IR による化学構造の比較；

B. SEM によるオートクレーブ処理後の構造観察

5-2-2. 結果および考察

定着実験に使用した菌核から分離した細菌分離株について Table 5-1 にまとめた。1000 倍希釈 DNB 培地で *Ralstnia pickettii* Sc-iso-06 株を培養した培養液にオートクレーブ処理した菌核を浸し、浸漬時間毎の内部細菌数の変化を確認した結果を Fig.5-2 と Table 5-1 に示した。その他の細菌分離株における結果を Fig.5-3 にまとめた。実験に用いた細菌分離株は、*Bacillus* sp. Sc-iso-25 株を除いてすべて培養液に浸す時間と共に菌核内部細菌数が増加し、24 時間以降はほぼ一定の値を保つ傾向が見られた。*Ralstnia pickettii* Sc-iso-06 株の最大菌数は 8.7×10^{7} CFU･g^{-1} であり、8 株の中で最大菌数が最も多かった。供試細菌 7 株は、*R. pickettii* Sc-iso-06 株を使用した実験と同様に菌核内から細菌が検出され、最大菌数は 10^{5}～10^{7} CFU･g^{-1} であった。それに対し、*Bacillus* sp. Sc-iso-25 株における菌核への定着は、異なる傾向を示した。*Bacillus* sp. Sc-iso-25 株については、他の細菌分離株と同様に、浸漬後の菌核の洗浄液からは細菌が検出されたにもかかわらず、純粋培養液に浸漬した菌核からは内部細菌がほぼ検出されなかった。細菌の種類によって、菌核内部への定着の最大菌数は、それぞれ固有の値を持つが、供試細菌のほぼ全てが菌核内部に定着した。

オートクレーブ処理した菌核を 1000 倍希釈した細菌分離株の純粋培養液に浸し、浸漬時間毎の内部細菌数の変化を確認した結果、ほとんどの細菌分離株は、菌核内部細菌数が培養液に浸す時間と共に増加し、24 時間以降はほぼ一定の値を保つ傾向が見られた。このことから、オートクレーブ処理した菌核においては、細菌の移動が比較的速い時間で起こることが示唆された。本実験結果より、15 時間までは細菌数の標準偏差が大きいことから、菌核個々の構造の違いやオートクレーブ処理

による破損の状態などで内部への定着速度が変わることがわかる。また、24 時間以降の細菌数の標準偏差が小さいことから、24 時間の値が内部に定着できる細菌の最大菌数であると考えられる。菌核の構造に着目した定着試験を行った結果、培養液に 24 時間浸漬することで十分に細菌が定着することが明らかとなった。このことから、菌核は微生物封入のコントロールが容易であり、微生物担体の構造に適していることが示唆された。

菌核に定着した *Ralstnia pickettii* Sc-iso-06 株の最大菌数は約 10^8 CFU･g^{-1}であり、供試細菌の中で最も菌核内部に定着した。この細菌は、菌核 Sc1 から分離された細菌の71% を占め、他の細菌より優先していたことからも、菌核内部に定着しやすい細菌であったと考察できる。*Bradyrhizobium* sp. Sc-iso-05 株、*Arthrobacter* sp. Sc-iso-19 株、*Methylobacterium* sp. Sc-iso-28 株、*Janibacter* sp. Sc-iso-10 株、および *Nostocida* sp. Sc-iso-45 株の 5 株は *R. pickettii* Sc-iso-06 株を使用した実験と同様に菌核内から細菌が検出され、最大菌数は 10^5～10^7 CFU･g^{-1}と同等の細菌数であった。さらに、土壌からの分離株 1 株についても同様の結果が得られたが、分離源との関係については今後土壌からのみ分離された細菌の定着を確認することで菌核を利用できる細菌の特徴やメカニズムを明らかにした上で、有効性について明らかにしていく予定である。それに対し、*Bacillus* sp. Sc-iso-25株については純粋培養液に浸漬しても菌核内部から細菌がほぼ検出されなかった。最も近縁な *Bacillas cereus* は、低栄養な培地への移動により休眠細胞を形成する能力を持つ芽胞形成菌である（Claus and Berkeley 1986）ために、液体培地を1000倍希釈した際、芽胞形成を行い休眠してしまったために、菌核内部に定着できなかった可能性が高いと考えられる。以上

の結果から、オートクレーブ処理した菌核からは、生物学的な因子を除いて単純化した菌核の構造に着目した結果が得られ、ほぼ全ての供試細菌の定着に適していることが明らかとなった。

土壌から採取された菌核の細菌相の解析及びオートクレーブ処理した菌核への細菌の定着測定の結果から、菌核は細菌の定着が可能であり、微生物封入のコントロールが容易であることが明らかとなり、微生物担体の構造として有効であることが示唆された。菌核の構造をヒントに微生物担体を設計することで、細菌の定着に適した新たな微生物担体の提案が可能であると考えられる。

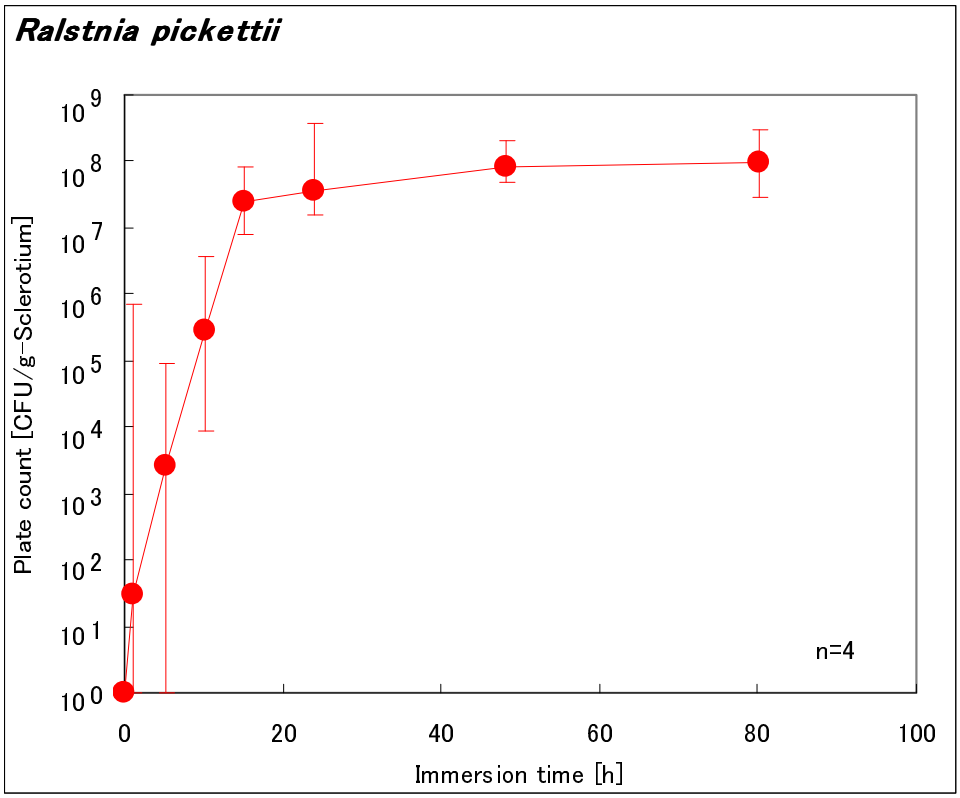


Fig. 5-2　Ralstonia pickettii 純粋培養液への浸漬時間と内部細菌数

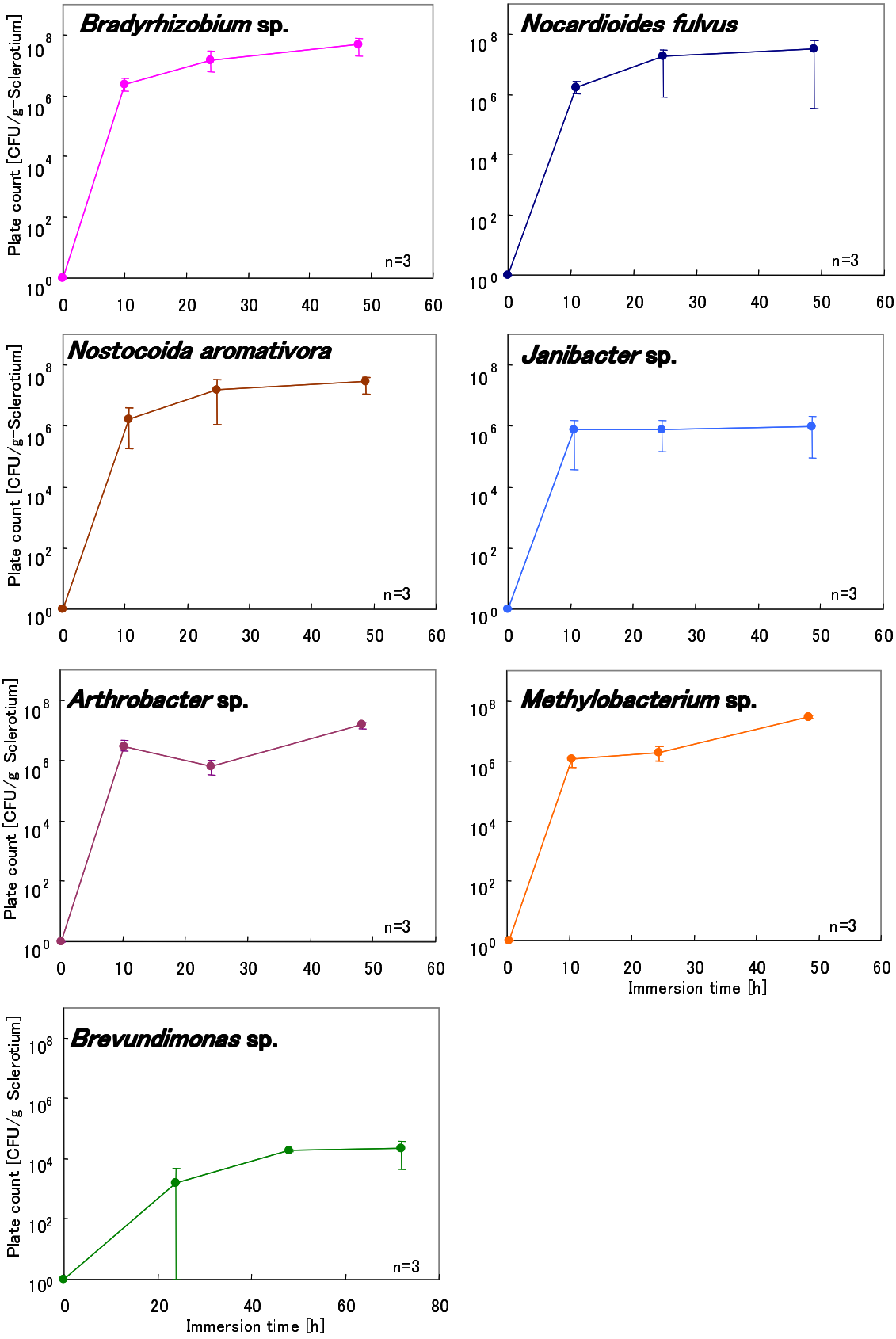


Fig. 5-3　純粋培養液への浸漬時間と内部細菌数

Table 5-1　浸漬実験に用いた細菌分離株とその最大菌数

Strain	Closest relatives 〔homology %〕	Viable cell counts found in sclerotium (CFU・g^{-1})
Sc-iso-05	*Bradyrhizobium* sp. JR016〔100〕	4.8×10^{7}
Sc-iso-06	*Ralstonia pickettii* ATCC 27512〔100〕	8.7×10^{7}
Sc-iso-10	*Janibacter melonis* C6〔99〕	8.3×10^{5}
Sc-iso-19	*Arthrobacter dextranolyticus* DiSz〔99〕	1.6×10^{7}
Sc-iso-25	*Bacillus cereus* KSC_UV5b〔99〕	0
Sc-iso-28	*Methylobacterium* sp. PB138〔100〕	2.9×10^{7}
Sc-iso-30	*Brevundimonas* sp. EMB 340〔99〕	1.9×10^{5}
Sc-iso-45	*Nostocoida aromativora* NC1-4〔99〕	2.1×10^{7}

5-3. 既存の微生物担体との比較

5-3-1.　方法

a）構成成分の分析

菌核および既存の微生物担体であるゼオライト、木炭、カニ殻（Fig. 5-4. a-c）は、NC アナライザー（SUMIGRAPH NC-22A [SCAS]）により窒素・炭素量を測定した。さらに、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置（EDX-700HS [SHIMADZU]）による元素組成の半定量分析を行った。

さらに、粉末にした菌核および木炭、カニ殻は、元素の結合状態を比較するために、フーリエ変換赤外分光光度計 FT-IR（IRPrestige-21 [SHIMADZU]）を測定した。構成成分の対照としてキチン・キトサンについても測定し、比較した。

b）SEM による構造観察

菌核および既存の微生物担体であるゼオライト、木炭、カニ殻において、電子顕微鏡（VE-7000 [KEYENCE]）により微小構造を観察し、比較した。

c）密度・空隙率測定

土粒子の密度試験（土質工学会基準 JSF T 111-1990）に従い、25mL, 50mL 容量のゲーリュサック型ピクノメーターを用いて、ゼオライト、木炭、カニ殻それぞれの担体の密度を 2 連で測定した。菌核は、5mL 容量のゲーリュサック型ピクノメーターを用いて、2 連で測定した。

空隙率は、25mL 容量のゲーリュサック型ピクノメーターを使用し、サンプルの体積と脱気によりサンプルに水を満たした際の体積をそれぞれ測り、算出した。

d）水分保持試験

ゼオライト、木炭、カニ殻は、条件をそろえるために、ハンマーやブレンダーにより砕いた。菌核および砕いたゼオライト、木炭、カニ殻は、1-2mm に篩分けし、0.100g ずつラボランスクリュー管瓶（2.2mL 容量、φ10mm×40mm）に入れた（Fig. 5-4.d)。表面構造の違いを緩和させるために、石英砂 1.000g を混ぜ（Fig. 5-4.e)、蒸留水を 1mL 加えた。真空ポンプにより約 1 時間脱気し、サンプル内部まで十分に水分を含ませたものを用意した（Fig. 5-4.f)。

室温（22.5-24.5℃)、湿度（41-65%[アスマン通風乾湿計]）の同条件にフタをはずして静置し、経過時間毎の重量変化をマイクロ天秤 AX26 DeltaRange [METER TOREDO]により測定した。水分量が一定の値を保ち続けたら、110℃で 24 時間絶乾し、デシケーターで冷却後、マイクロ天秤で水分の含まれていないサンプル重量を測定した。

e）　細菌定着実験

内部に定着可能な細菌数を比較するために、1000 倍希釈DNB培地で *Ralstnia pickettii* Sc-iso-06 株を培養した培養液（10^9～10^{10}CFU/mL）にオートクレーブ処理した木炭および菌核を浸し、24～48時間後に木炭および菌核を取り出した。未洗浄、または洗浄（滅菌水で 10 回洗浄）後、それぞれに滅菌水を加えてガラス棒ですり潰して調製した菌核懸濁液中の細菌数を DNB 寒天培地による希釈平板法により測定し、定着菌数を算出した。

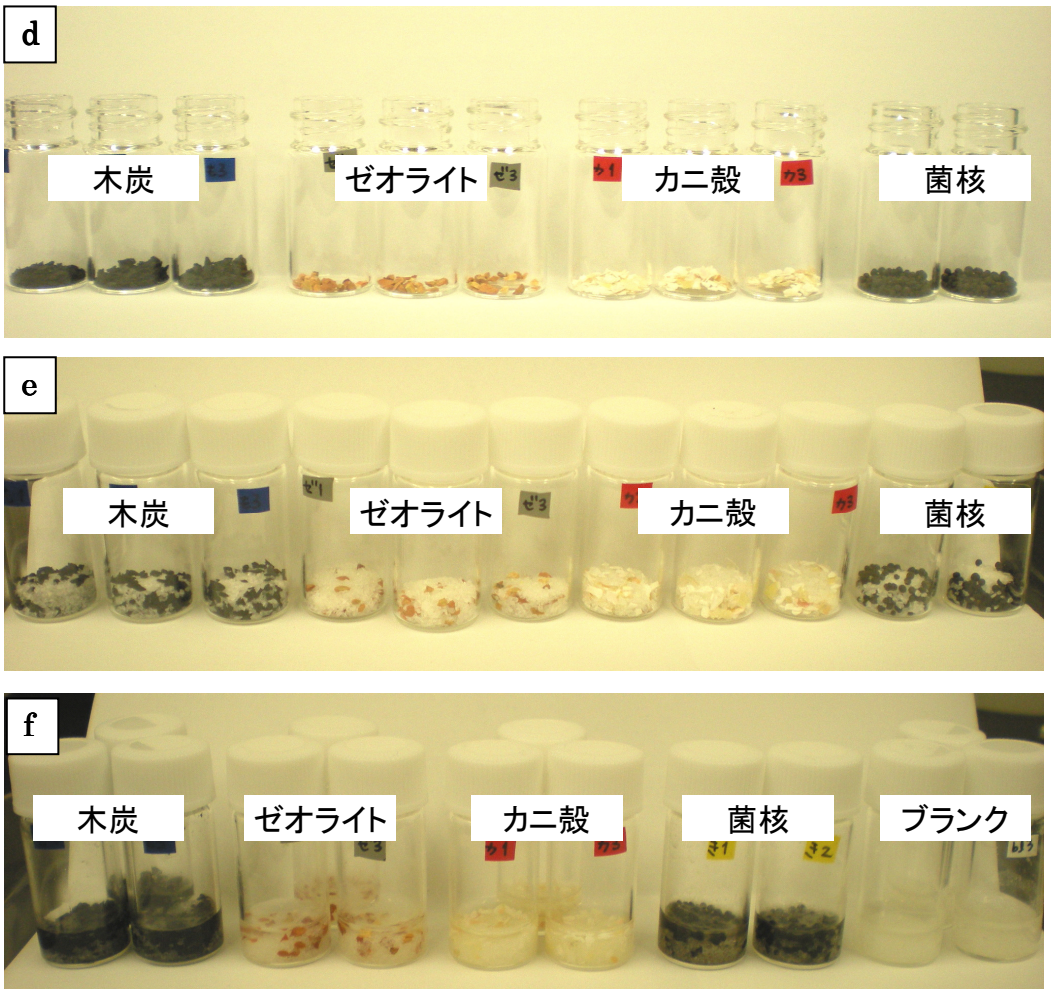


Fig. 5-4　a-c. 比較に使用した担体（a. 木炭; b. ゼオライト; c. カニ殻）;
e-f. 水分保持試験の様子
（d. 担体 1g; e.石英砂 1g を混合; f. 水 1mL を加え脱気）

5-3-2. 結果及び考察

菌核およびゼオライト、木炭、カニ殻の密度、空隙率および元素組成、を Table 5-2、Fig.　5-5 に示した。

ゼオライトおよびカニ殻は、密度が約 2.5 g/cm^3 と高かった。それに対し、木炭と菌核の密度は、1.5 g/cm^3 付近であった。木炭、菌核、カニ殻、ゼオライトの空隙率は、それぞれ 64.82、41.67、17.47、9.28%であった。空隙率は、高いほど内部に空間を持ち、物質の吸着や細菌の定着に適した構造物であると言える。菌核は、約 40%と比較的高い空隙率を持つことから、内部に空間を持つ担体に適した構造物であると考えられる。

ゼオライトは、炭素・窒素・酸素・水素などがほぼ検出されなかったことから、微生物の利用できる有機物はほとんどないことがわかる。また、カニ殻は、微生物の栄養となるリン、窒素なども含まれていることが確認された。Fig.1-4 に示したように菌核にはリンがほとんど含まれていない。しかし、菌核を形成する菌糸にはリンが多く含まれており、形成初期の菌核はリン濃度が高いことが報告されている（Lussenhop and Fogel 1999)。このことから、形成初期の菌核は、比較的栄養がある担体である可能性が高い。

FT-IR により得られたスペクトルを Fig. 5-6 に示した。菌核およびカニ殻には、1250, 1600cm^{-1} 付近にカルボニル基（C=O）が見られ、有機物の存在が確認された。キチン・キトサンに見られる 2900, 1400cm^{-1} のアセチル基（－CH_2-(C=O)）、900、1100 cm^{-1} のピークが菌核、カニ殻でも見られた。キチン・キトサンを含む有機態炭素は、微生物が利用できるエネルギー源であり、その増殖と生き残りに対する最も大きな制限因子とされている（Kieft 2004)。カニ殻が選択的栄養担体であると

されているのは、有機態炭素を多く含むためと考えられる。木炭は、炭素を多く含むが、有機物のピークがほぼみられないことから、微生物の栄養となる成分をほとんど含まないことが確認された。一方、菌核は微生物がエネルギー源として利用可能な成分で構成されていることが示唆された。

既存の担体の SEM 画像を、Table 5-3 にまとめた。ゼオライトは、表面がごつごつとしているが、内部細孔が少ないことが確認された。カニ殻は、細孔がほとんど確認されず、層構造になっていることがわかった。木炭と菌核の断面構造は非常に類似しており、内部には同じ様なセル構造を持つことが確認された。木炭は、微生物の生息空間に適した構造を持つことが報告されていることから、そのセル構造に似た菌核も微生物の生息空間に適した構造を持つことが明らかとなった。

Fig. 5-7 に、担体と石英砂を混合した容器中の水分量（初期の蒸留水量を 100%とした時の水の割合）の経時変化を示した。約 170 時間で、ブランクは 0%となり、その他全てのサンプルは一定の水分量を保ち続けた。この一定の水分量については、3 連で行った実験の誤差がほぼなかったことから、物質固有の値であると考えられる。室温（22.5-24.5℃）、湿度（41-65%）の条件下で保持され続ける担体中の水分含有量は、物質の重量%に換算すると、木炭:3.86%, ゼオライト:0.12%, カニ殻:7.05%, 菌核:16.27%であった。ブランクとゼオライトは、水分がほぼ保持されないことが明らかとなった。次いで、木炭、カニ殻、菌核の順で、水分保持率が多かった。カニ殻においては、脱気初期に細かい泡がたくさん出たことから、孔径の小さい細孔が開いており、薄膜が重なった層構造を持つために、質量の 7%程度の水分が保持され続けたと考えられる。また、木炭と菌核は、SEM による観察で内部セル構造の類

似が確認され、脱気においても長時間にわたり泡が出続けたが、菌核の方が質量の 16.3%と木炭（3.9%）の倍以上の水分保持能力を示した。大平ら（1992）は、恒温恒湿室（20℃±2℃、65±2%）に 24 時間放置したコナラ木炭（比重 0.33）およびアカマツ木炭（比重 0.21）の水分含有量は、それぞれ 9.73、11.38%であったことを報告している。このことから、木炭の種類にも依存すると思われるが、どの木炭よりも菌核の方が水分を保持する能力が高いことがわかる。これは、菌核特有のセル構造の周りを取り囲む外皮の存在が原因と挙げられ、外皮があるために水分の蒸発が抑制されたためと考えられる。

Fig. 5-8に、1000 倍希釈した*Ralstnia pickettii*培養液に浸した木炭および菌核に定着した細菌数（未洗浄・洗浄）を示した。洗浄したサンプルは、未洗浄に比べて菌数が減少し、表面に付着していた細菌が洗い落とされたことがわかる。培養液に浸漬後、洗浄した木炭および菌核の内部細菌数は、それぞれ6.28×10^{7} CFU/g、1.14×10^{8} CFU/gであった。この結果から、菌核内部に定着可能な細菌数は、木炭と同等程度であることが明らかとなった。未洗浄と洗浄の菌核の細菌数には、あまり違いがないのに対し、未洗浄の木炭は細菌数が多く、洗浄により多くの細菌が洗い落とされることが確認された。これは、菌核の表面は細菌が吸着しにくいなめらかな球体であり、ある程度閉鎖系であるのに対し、木炭の表面は細菌が吸着しやすい凹凸があり、開放系であることが原因として考えられる。土壌中で微生物担体として使用する際に土着の微生物の影響を受けにくい表面の形態を持ち、木炭と同等程度の細菌保持能力がある菌核は、微生物担体として優れた構造物であると言える。

これらの結果から、菌核は、選択的栄養担体であるカニ殻の成分に似た化学構造を持ち、その内部構造には微生物の生息空間に適した木炭に

似たセル構造を持つことが確認された。さらに、既存の微生物担体に比べ、水分の保持能力も高く、木炭と同等程度の細菌保持能力があることから、菌核は栄養性、構造性で優れた構造物であることが明らかとなった。

Table 5-2　微生物担体の密度、空隙率及び N,C, O＋H, 灰分量

	ゼオライト	木炭	カニ殻	菌核	キチン	キトサン
密度 [g/cm^3]	2.360±0.015	1.680±0.052	2.108±0.039	1.459±0.165	ー	ー
空隙率 [%]	9.279	64.82	25.30	41.67	ー	ー
N	0.001	0.590	3.40	0.905	6.505	7.471
C	0.021	76.15	17.47	46.59	44.32	40.61
O+H	0.391	15.73	19.29	46.00	49.17	51.92
Ash	99.59	7.53	59.84	6.50	0	0

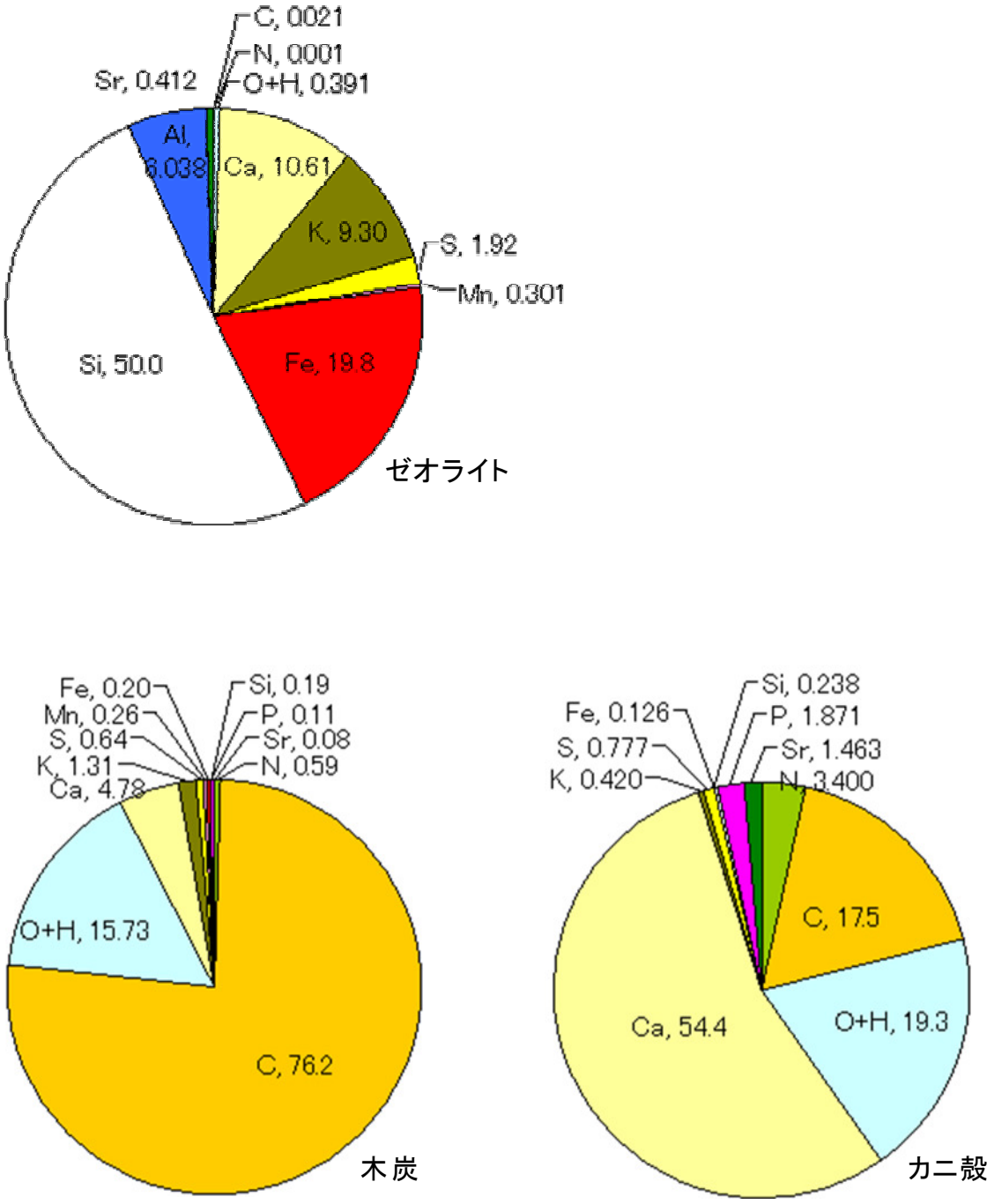


Fig. 5-5　EDX によるゼオライト、カニ殻、木炭の元素組成

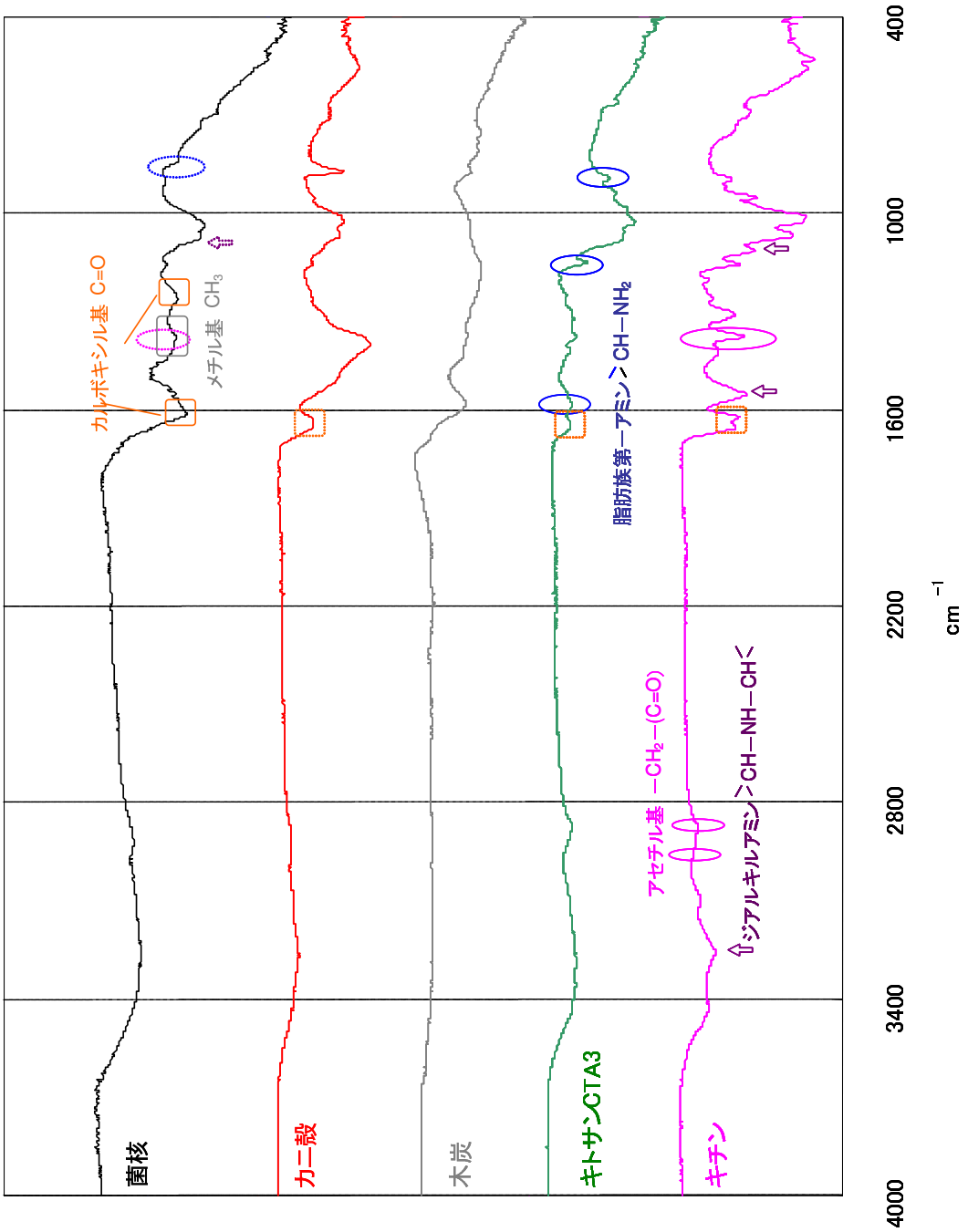
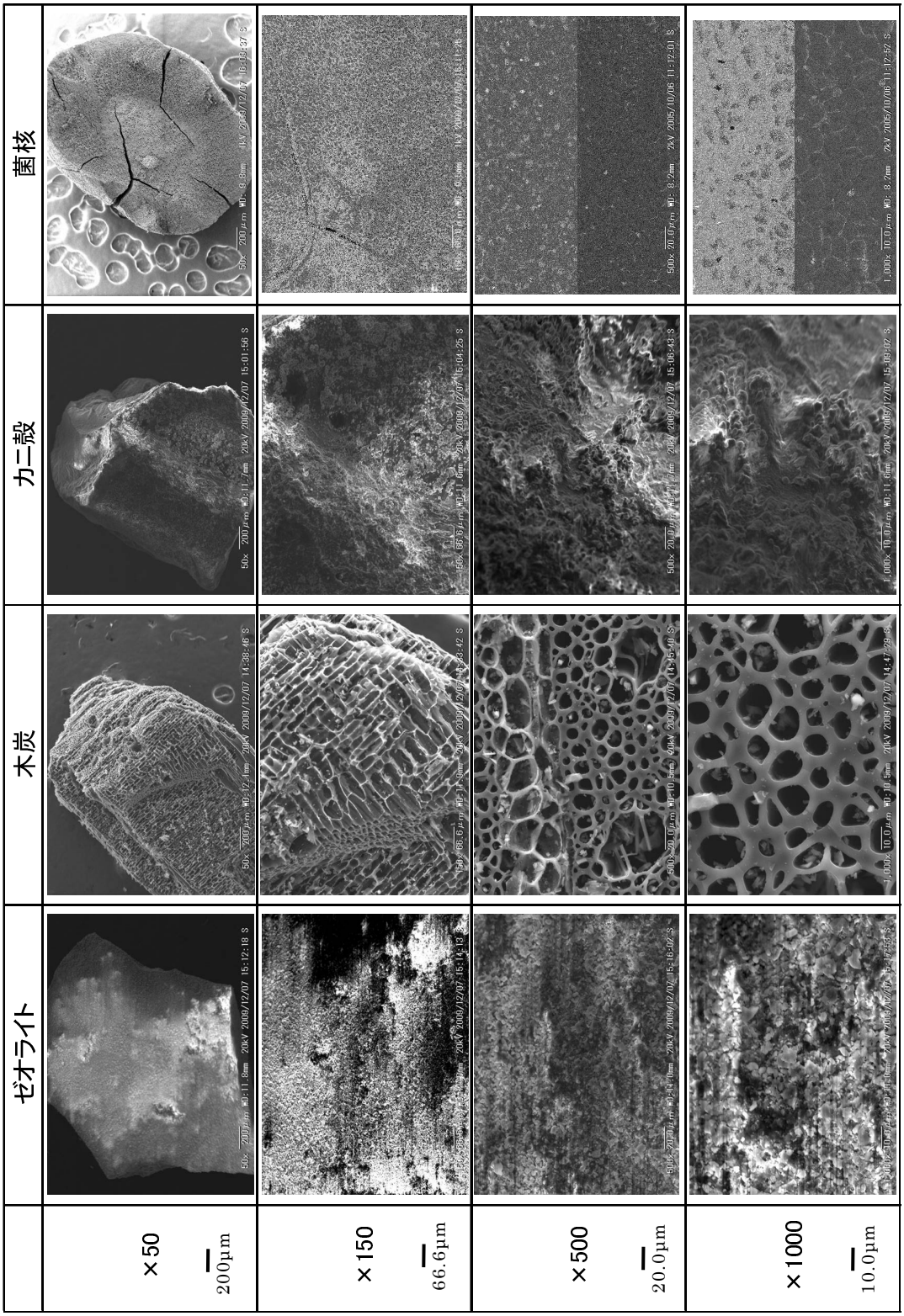


Fig. 5-6　FT-IR により得られたスペクトル

Table 5-3　微生物担体の SEM による構造観察



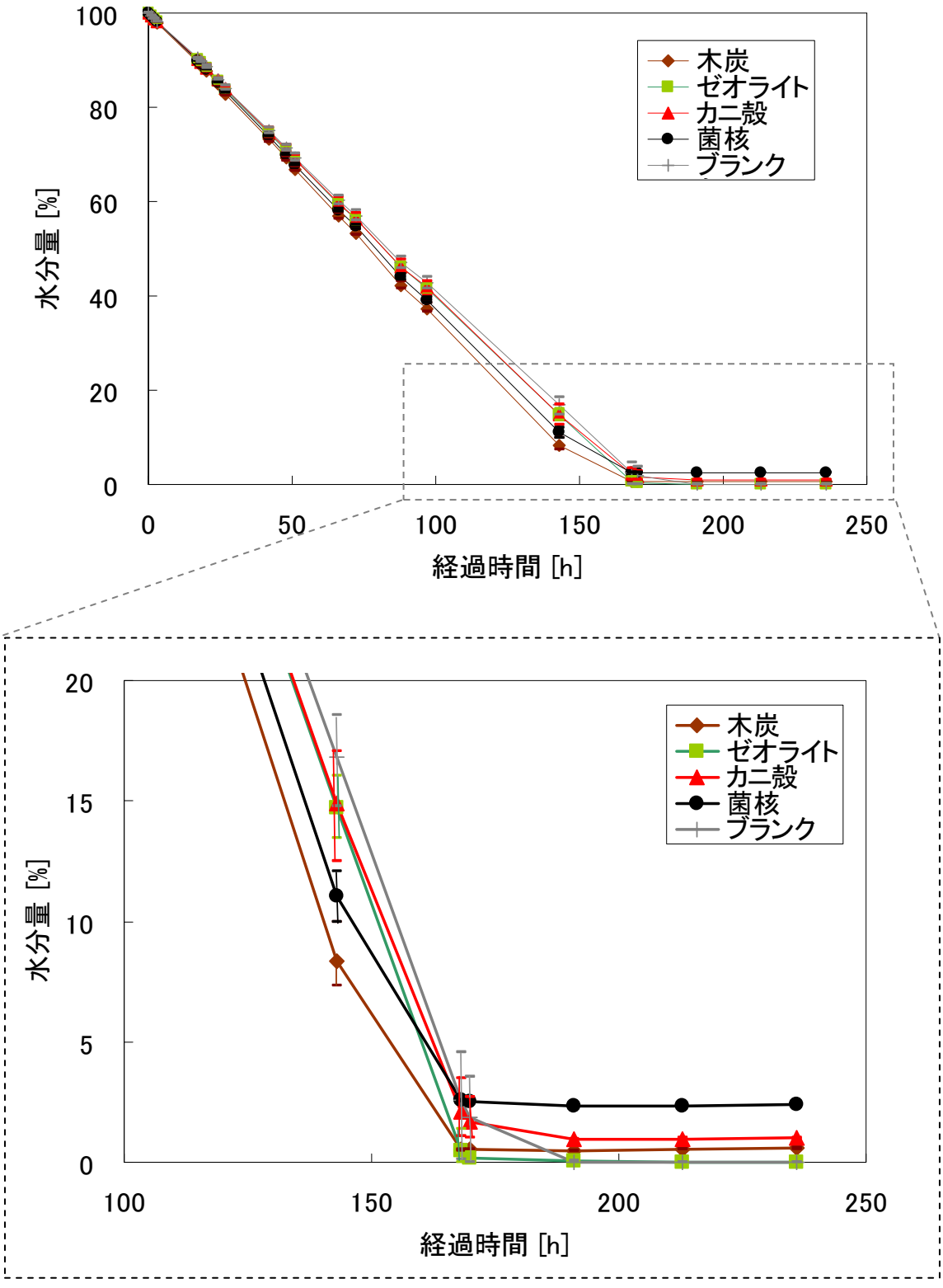


Fig.5-7　微生物担体と菌核の水分量の変化

（初期の水分量を 100%とした場合）

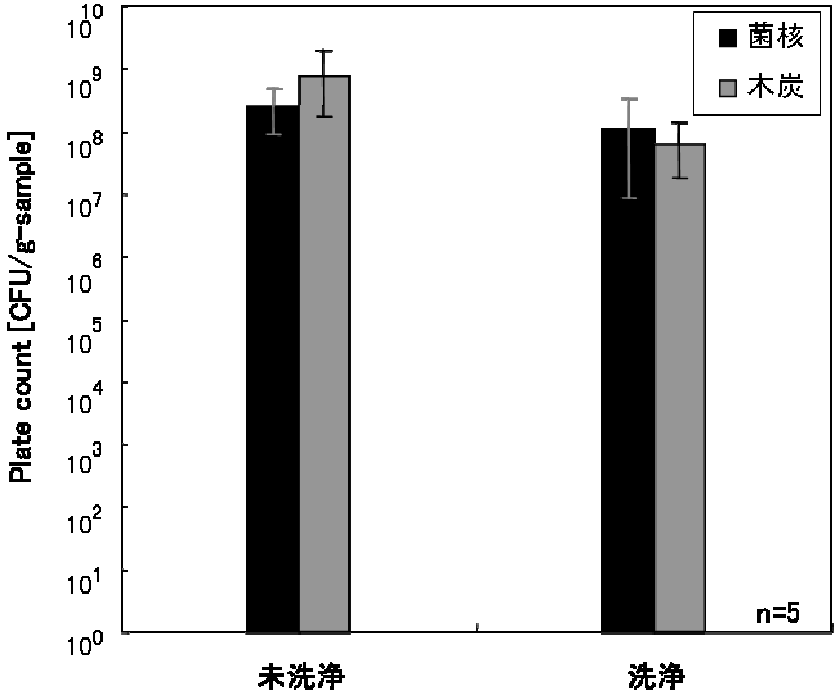


Fig.5-8　1000 倍希釈した *Ralstnia pickettii* 培養液に浸した木炭および菌核に定着した細菌数（未洗浄・洗浄）

5-4. 結語

本章では、菌核の微生物担体としての有効性を評価するために、第 4 章で得られた細菌分離株を用いてオートクレーブ処理した菌核への細菌の定着を調べた。また、既存の微生物担体であるゼオライト、木炭、カニ殻を対照として、菌核の SEM による微小構造の観察、元素組成や成分構造の分析、水分保持能力の比較を行った結果、以下のことが明らかとなった。

1) オートクレーブ処理した菌核内部に定着した細菌数は、細菌培養液に浸す時間と共に増加し、24 時間で最大値に達することが明らかとなった。最大定着菌数は、細菌により固有の値をもった。菌核には、ほぼ全ての供試細菌が内部に定着した。

2) 菌核は、微生物の利用できる有機態炭素を含む選択的栄養担体であるカニ殻と似た化学組成を持ち、微生物の生息空間に適したセル構造を持つ木炭似た微小構造を持つことが確認された。

3) 室温における担体中の水分量を調べた結果、菌核は重量あたり 16.3%と最も高い値を示し、高い水分保持能力を持つことが明らかとなった。

4) 菌核は、木炭と同等程度の細菌が定着可能であることが確認された。

菌核には、多くの細菌の定着が可能であり、栄養性、構造性において担体の長所を持ち合わせる優れた構造物であることから、微生物担体として有効であることが明らかとなった。

第 6 章　結論

6-1. まとめと結論

本研究では、森林土壌中に広く分布し、植物との共生菌によって形成される菌核内部の微生物相の解析を踏まえて、菌核の微生物担体としての有効性評価を行った。研究結果の総括図を Fig. 6-1 に示す。

第 2 章において、岐阜県御嶽山土壌から採取した菌核内部の菌類相を解析した結果、クローンライブラリー法により合計で 17 種類 の菌類が確認された。森林土壌に見られる菌核の形成菌であるとされている *Cenococcum geophilum* および未同定菌根菌（Vouchered mycorrhizae）のクローンが 8%検出されたことから、供試菌核には *C. geophillum* 菌核が含まれていることが示唆された。*C. geophillum* を含め、菌根菌に分類される菌類が 12%と比較的多く検出された。*C. geophillum* 以外に菌核形成が報告されている菌類は認められなかった。このことから、菌核形成菌は、*C. geophillum* を含む根部エンドファイト Dark septate endophytic（DSE）であることが推定された。

一方、培養法により分離された菌類は、合計 37 株 18 種類であった。これによれば、Dark septate endophytic (DSE) に類別される *Phialophora finlandica*、*Meliniomyces variabilis* が分離され、全体の 16% を占め、DSE を含む菌根菌種は 34% と多く分離された。菌核病などの病原菌類は分離されなかった。DSE に含まれる *Mycelium radicis atrovirens* complex (*MRA*)3 株は、培地上で菌核の形成が見られたこと

から、菌核形成菌である可能性が高い。非培養法および培養法による菌類相の解析結果から、供試菌核は、DSE により形成されたことが推測された。

第 3 章では、第 2 章で得られた *MRA*3 株および北海道のアカマツ菌根から分離された *C. geophillum* 分離株について、DSE の特徴を観察した。その結果、どの菌株も黒く節がある菌糸形態が観察され、菌核形成の初期段階に見られる菌糸束、菌糸の接合・吻合、菌糸融合、養分の貯留が見られた。さらに、*MRA* は植物の生育促進を示すことが確認された。これらのことから、*MRA*3 株および *C. geophillum* 分離株は、DSE の特徴である黒色の隔壁のある菌糸を持ち、植物の生育を助けることから、根部エンドファイト DSE であることが確認された。

また、これら DSE の菌核形成をコントロールするために、菌核形成条件を検討した。その結果、*MRA*3 株および *C. geophillum* 分離株は、pH4～7 の培地および Al 添加培地での増殖が、培養約 180 日後の Al 添加培地では、菌核の形成が確認された。菌核形成は、培地の表面の乾燥が進行すると共に増加した。また、Al 添加により形成される菌核の数は少ないが、粒径が大きいものが多く見られた。温度や光などの培養条件を検討した結果、*MRA* 分離株においては、3 株とも CMA 培地を用いて 24℃で培養した時、最も菌核の形成が確認された。*C. geophillum* 分離株は、暗所、15℃での増殖が著しく、特に pH3.5 の培地で菌糸の増殖および菌核形成が多く見られた。液体培地においては、添加物を加えることで構造物が発達し、その断面は菌核に近い構造が確認された。しかし、人工培地上では粒径の大きな菌核の形成をコントロールすることは困難であることが明らかとなった。

第 4 章では、菌核内部の細菌相を解析した。クローンライブラリー法

により検出された菌核の細菌クローンの種類は 36 種、周辺土壌の細菌の種類は 16 種であった。菌核および周囲土壌から、低 pH に生息する細菌である *Acidobacteria* のクローンが多く検出された。菌核内と周囲の土壌では異なった細菌群集構造を持つことが明らかとなった。特徴的な活性を持つと思われる細菌のクローン検出されたことから、菌核内部が多様な微生物の生息空間となり得る構造、組成を持つことが考えられた。

培養法においては､御嶽山の土壌から採取した供試した 4 つの菌核内部からは 17 種類の細菌が検出され、内部細菌相は菌核個々で異なる結果を示した。クローンで検出された細菌は分離されなかった。それぞれの菌核には、優先する細菌種が存在することが明らかとなった。

第 5 章では、菌核の微生物担体としての評価を行った。第 4 章において分離された細菌株を用いて、オートクレーブ処理した菌核への細菌の定着を確認した結果、菌核内部の細菌数は純粋培養液に浸す時間と共に増加した｡24 時間で菌核内部への細菌の定着は最大値に達することが明らかとなった。最大定着菌数は、細菌により固有の値を持つことが確認された。抗生物質や細菌の相互作用などの生物学的要因をオートクレーブ処理により除いた結果として、菌核の構造はほぼ全ての供試細菌が内部に定着可能であることが明らかとなった。

菌核と既存の微生物担体を用いて、物理化学性、構造および水分保持能力について比較を行った。その結果、ゼオライトおよびカニ殻の密度は、約 2.5g/cm^3 と高く、木炭と菌核の密度は、1.5g/cm^3 付近であった。FT-IR による化学構造解析に基づき、カニ殻に含まれる微生物の栄養となるキチン・キトサンなどの有機態炭素が菌核にも含まれること明らかとなった。SEM による構造観察を行った結果、木炭と菌核の断面の微

小構造は極めて類似しており、微生物の生息空間に適した数マイクロのセル構造を持つことが確認された。また、脱気・含水処理を行った菌核を室内環境で乾燥させた後の水分含有量は、菌核重量の 16.3%であり、比較実験を行った微生物担体の中で最も高い値を持つことが明らかとなった。さらに、1000 倍希釈した *Ralstnia pickettii* 培養液に浸した後洗浄した木炭および菌核の細菌数は、同等程度であることが明らかとなった。以上の結果から、菌核は、選択的栄養担体であるカニ殻の成分に似た化学構造を持ち、その内部には、微生物の生息空間に適した木炭に似たセル構造を持つことが確認され、既存の微生物担体に比べて水分の保持能力が高く、木炭と同等程度の細菌保持能力があることが明らかとなった。このことから、菌核は、既存の微生物担体と比較して担体として優れた構造物であることが示唆された。

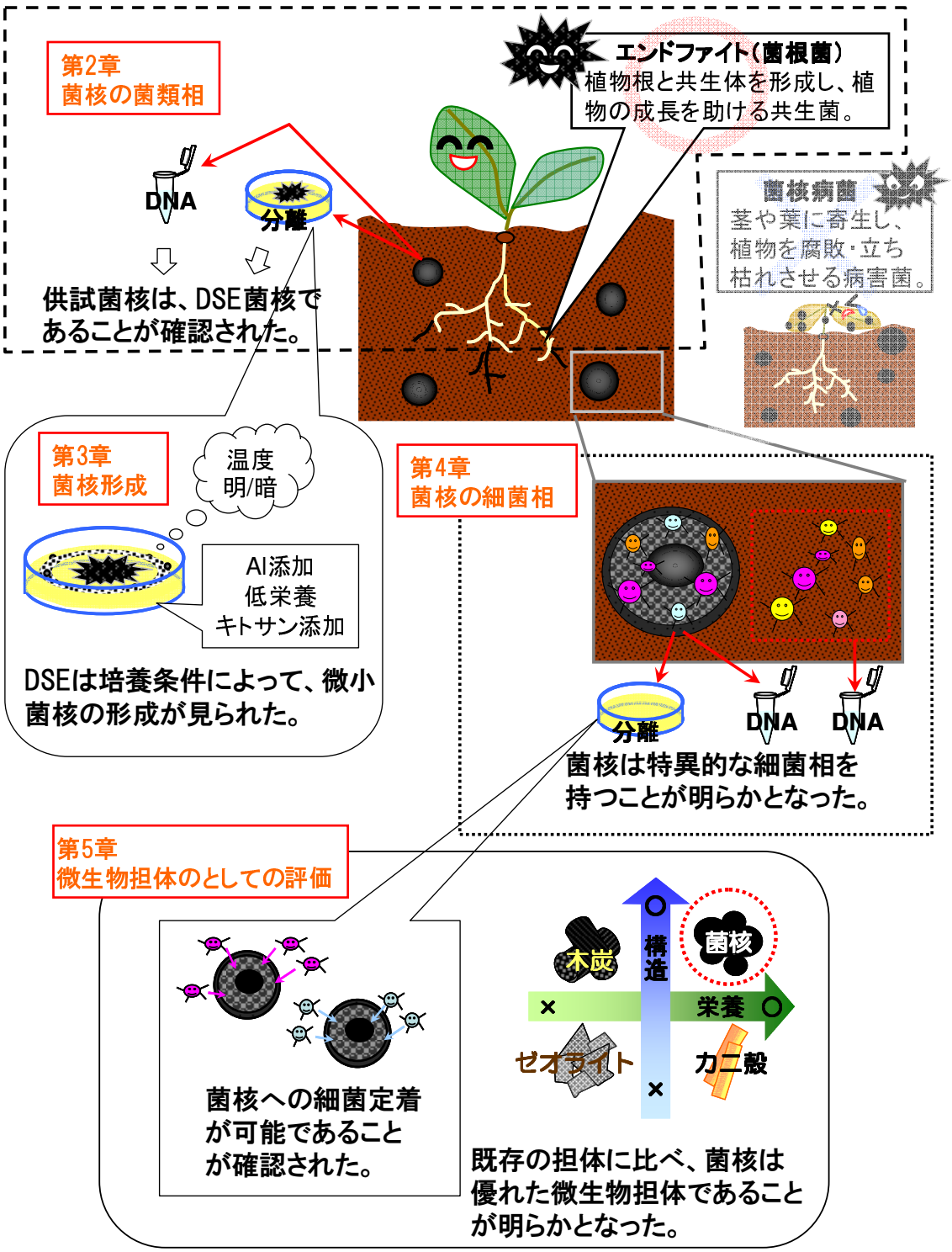


Fig. 6-1　本研究結果の総括図

6-2. 今後の課題

本研究により、菌核の微生物担体としての有効性が明らかとなったが、自然界で植物と共生する天然の菌核を森林土壌から大量に回収して利用することは困難である。工学的利用のためには、菌核形成をコントロールするか人工的に製造するかの２つの方法が考えられる。本研究では、分離菌株による菌核形成については課題が残されたが、形成条件をさらに検討することにより、菌核形成をコントロールする方法を見出すことは、可能であると考えられる。また、本研究で明らかになった菌核の持つ構造や成分をヒントに、新しい菌核様構造物を人工的に製造する方法を検討することも今後の重要な課題である。

既往技術の一つで水処理用の微生物担体として使用されているキトサンビーズは、菌核の主成分であるキトサンから成り、菌核に似たセル構造を持つ（Fig. 6-2）。キトサンビーズは、安息香酸や銅などの重金属を吸着することが報告されている（Mitani et al. 1992; Mitani et al. 2003）。しかし、約 97%が水分であるキトサンビーズは、水分が蒸発してしまうと縮み、構造がつぶれてしまうため土壌中で使用することができない。また、酸性条件下で溶解してしまうことから、グルタルアルデヒドなどの有害な薬品で架橋処理を行う必要がある（キチン、キトサン研究会編 1990）。人工的な菌核様構造物の一つとして、キトサンビーズの土壌中での使用を可能にするために、有害物質を使用しない安全な架橋処理、形を保つための硬化処理の方法について検討を進めていく。本研究による菌核に関する基礎データを有効利用することにより、土壌においてキトサンビーズの使用が可能になれば、微生物担体だけでなく、吸着剤としての効果にも期待でき、より優れた微生物担体としての機能が期待さ

れる。

同様に、菌核形成菌により形成された菌核においても、金属の吸着剤としての使用に期待できる。一般的に天然のキチンには大量の金属イオンが含まれており、周囲の金属濃度に伴う濃縮が確認されている（高分子学会 1991）。菌核に含まれる金属は、約 7%と比較的少ないため（Watanabe et al. 2007）、十分な吸着サイトが残存している可能性が高く、土壌中で金属吸着が可能であると考えられる。そのため、微生物担体としての有害物質の分解という目的だけでなく、吸着による浄化にも期待できる。実際の利用には、土壌で使用されている既存の微生物担体のように①有用菌を定着させてから土壌に混合、②土壌の物理性を向上して土壌中の微生物の活性を上げるために、そのまま土壌に混合の 2 つの方法を想定している。また、菌核は、既存の微生物担体ではほとんど報告のないバイオレメディエーション技術への応用に向けて研究を進めていきたい。

なお、菌核の高い水分保持能力により、内部細菌の長期間の生存を可能にすると考えられるが、今後、菌核内部に定着した細菌の生存期間を実験的に明らかにするなど、微生物担体としての有効性を多面的に評価することで、より実用化に近づくだろう。また、本研究では、クローンライブラリー法および培養法による細菌相の解析を行ったが、PCR-DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis：変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）法などの方法を組み合わせて、より正確な細菌相を明らかにすることで、微生物担体としての機能をより正確に評価するための情報が得られると考えられる。

最終的には、新しい微生物担体としての提案に向けて、実際の土壌中での微生物担体としての有効性の評価を進める。具体的には、汚染土壌に人工的に形成させた菌核または菌核様構造物を混合し、有害物質の分

解を確認する実際のスケールでバイオレメディエーション試験を行うことで有効性を確認し、菌核の構造の優位性をさらに立証すると共に、実用化に向けた検討を行っていきたい。

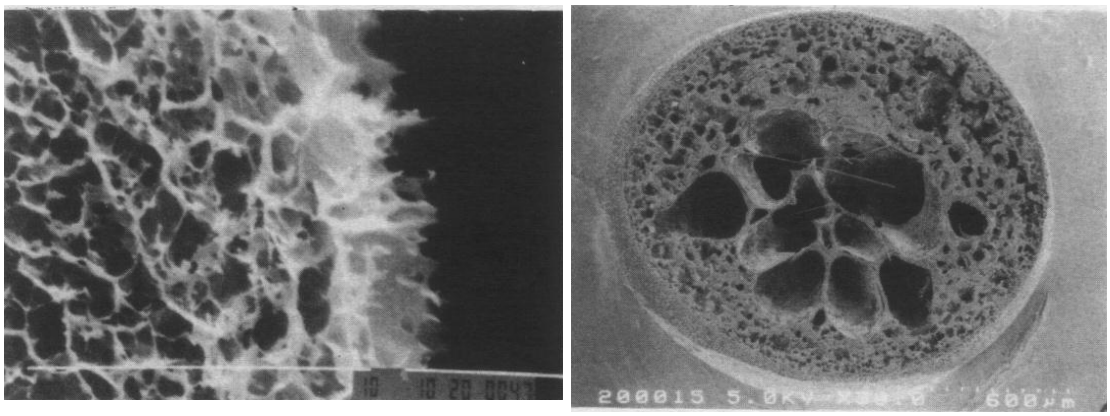


Fig. 6-2　キトサンビーズの SEM 写真

（川村　1991 より抜粋）

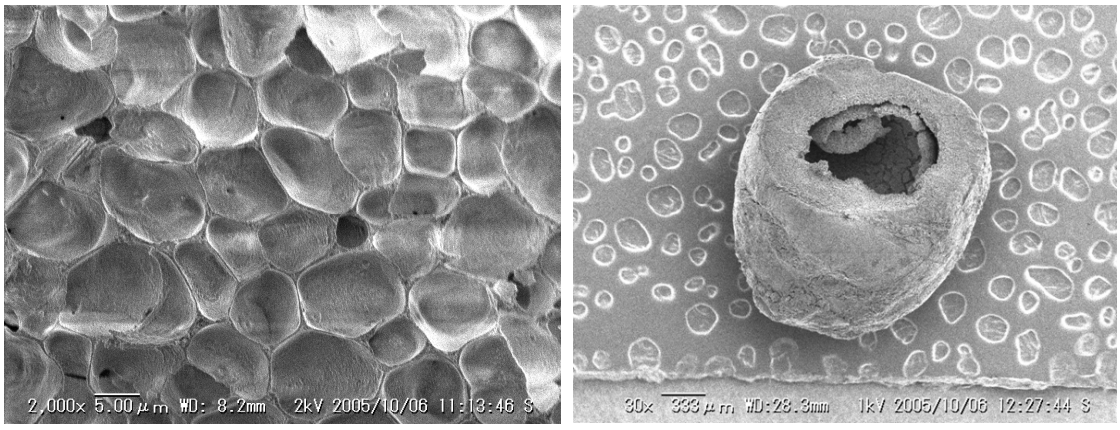


Fig. 6-3　菌核の SEM 写真

引用文献

Aulenta, F., Bianchi, A., Majone, M., Papini, M. P., Potalivo, M. and Tandoi, V. 2005. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. Environment International 31(2): 185-190.

Bååth, E., Lundgren, B., and Söderström, B. 1984. Fungal Populations in Podzolic Soil Experimentally Acidified to Simulate Acid Rain. Microbial Ecolgy 10: 197-203.

Bullock, S., Willetts, H. J., and Ashford, A. E. 1980. The Structure and Histochemistry of Sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger I. Light and Electron Microscope Studies on Sclerotial Development. Protoplasma 104: 315-331.

Bullock, S., Ashford, A. E., and Willetts, H. J. 1980. The Structure and Histochemistry of Sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger II. Histochemistry of Extracellar Substances and Cytoplasmic Reserves. Protoplasma 104: 333-351.

Bullock, S., Willetts, H. J., and Ashford, A. E. 1983. The Structure and Histochemistry of Sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger III. Changes in Ultrastructure and Loss of Reserve Materials During Carpogenic Germination. Protoplasma 117: 214-225.

Butler, G. M. 1966. Vegetative Structure. In: The Fungi -An Advanced Treatise II. Ainsworth, G. C. and Sussman, A. S. (eds.) Academic press, New York.

Brady, N. and Weil, R. 2008. The Nature and Properties of Soils 14th ed. pp.474. Pearson Education, New Jersey.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., and Malajczuk, N. (eds.). 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research.

Cameron, D. W. and Sidell, M. D. 1978. 1,3,6,8,11,13-Hexachloro-4,10-dihydroxy-dinaphtho [2.1-b:1',1'-d] furan-5,9-dione A polychloro quinone from green soils. Australian journal of chemistry 31: 1323-1333.

Coley-Smith, J. R. and Cooke, R. C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. Annual Review of Phytopathology 9: 65-92.

Duhamela, M., Wehra, S. D., Yua, L., Rizvia, H. , Seepersada, D., Dworatzeka, S., Coxb, E. E., and Edwards, E. A. 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. Water Research 36: 4193-4202.

Duncan, R. W., Fernando, W. G. D., and Rashid, K. Y. 2006. Time and burilal depth influencing the viability and bacterial colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Soil Biology & Biochemistry 38: 275-284.

Fravel, D. R., Connick, Jr. W. J., Grimm, C. C., and Lloyd, S.W. 2002. Volatile Compounds Emitted by Sclerotia of *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Sclerotium rolfsii*. Journal of agricultural and food chemistry 50: 3761-3764.

Gauthier、M. J. 2004. 生きているが培養できない状態と環境特性. In: 培養できない微生物たちー自然環境中での微生物の姿ー. Colwell, R.R. and Grimes, D. J.編、遠藤圭子訳. 学会出版センター.

Georgiou, C. D., Zervoudakis, G., and Petropoulou, K. P. 2003. Ascorbic acid might play a role in the sclerotial diffrtrntiation of *Sclerotium rolfsii*. Mycologia 95: 308-316.

Gilbert, R. G. and Linderman, R. G. 1971. Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. Canadian journal of microbiology 17: 557-562.

Grenville, D. J., Peterson, R. L., and Piche Y. 1985. The development, structure, and histochemistry of sclerotia of ectomycorrhizal fungi. II. *Paxillus involutus*. Canadian journal of botany 63: 1412-1417.

Grünig, C. R. and Sieber, T. N. 2005. Molecular and phenotypic description of the widespread root symbiont *Acephala applanata* gen. et sp. nov., formerly known as dark-septate endophyte Type 1. Mycologia 97: 628-640.

Hambleton, S., Nickerson, N. L., and Seifert, K. A. 2005a. *Leohumicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. Studies in Mycology 53: 29-52.

Hambleton, S. and Sigler, L. 2005b. *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* (= *Hymenoscyphus ericae*), *Leotiomycetes*. Studies in Mycology 53: 1-27.

Hausner, G. and Reid, J. 1999. Factors influencing the production of sclerotia in the wild rice (*Zizania aquatica*) pathogen *Sclerotium hydrophilum*. Mycoscience 40: 393-400.

Harper, G. E. and Setwart, A. 2000. Magnetic separation technique for the isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from iron-rich soil particles. Soil Biology & Biochemistry 32: 135-137.

Jany, J. L., Garbaye, J., and Martin, F. 2002. *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. New Phytologist 154: 651-659.

Jumpponen, A. and Trappe, J. M. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. New Phytologist 140: 295-310.

Jumpponen, A. 2001. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal?. Mycorrhiza 11: 207-211.

Kariminiaae-Hamedaani, H.-R., Kanda, K., and Kato, F. 2003. Wastewater Treatment with Bacteria Immobilized onto a Ceramic Carrier in an Aerated System. Journal of Bioscience and Bioengineering 95 (2): 128-132.

Kieft, T. L. 2004. 細胞の大きさ－土壌および陸上地下環境の矮小細胞. In: 培養できない微生物たち－自然環境中での微生物の姿－. Colwell, R.R. and Grimes, D. J.編、遠藤圭子訳. 学会出版センター.

Kishimoto, N., Kosako, Y., and Tano, T. 1991a. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. Nov.: An Acidophilic Chemoorgano- trophic Bacterium Containing Menaquinone from Acidic Mineral Environment. Current Microbiology 22: 1-7.

Kumada, K. and Hurst, H. M. 1967. Green Humic Acid and its Possible Origin as a Fungal Metabolite. NATURE 214: 631-633.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., and Stalpers, J.A. 2001. Dictionary of the Fungi 9th Edition. CABI Publishing. 469-470.

LoBuglio, K. F., Rogers, S. O., and Wang, C. J. K. 1991. Variation in ribosomal DNA among isolates of the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. Canadian journal of botany 69: 2331-2343.

LoBuglio, K. F. 1999. *Cenococcum*. In: Ectomycorrhizal Fungi –Key Genera in Profile-. Cairney, J. W. G., Chambers, S. M. (eds.). Springer. pp.287-309.

Lussenhop, J. and Fogel, R. 1999. Seasonal change in phosphorus content of Pinus strobus- *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizae. Mycologia 91: 742-746.

Mandyam, K., and Jumpponen, A. 2008. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. Mycorrhiza 18: 145-155.

Matsumoto, N. and Tajimi, A. 1987. Bacterial Flora Associated with the Snow Mold Fungi, *Typhula incarnata* and *T. ishikariensis*. 日植病報 Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 250-253.

Massicotte, H. B., Trappe, J. M., Peterson, R. L., and MelVille, L. H. 1992. Studies in *Cenococcum geophilum*. II. Sclerotium morphology, germination, and formation in pure culture and growth pouches. Canadian journal of botany 70: 125-132.

Mitani, T., Kawakami, T., Morishita, M., Adachi, Y., and Ishii, H. 2003. Effect of Copper Adsorption on the Mechanical Properties of Chitosan Beads. Journal of Applied Polymer Science 88: 2988-2991.

Mitani, T., Yamashita, T., Okumura, C. 1995. Adsorption of Benzoic Acid and Its Derivatives to Swollen Chitosan Beads. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 59: 927-928.

Mitchell, D. T. and Cooke, R. C., and Ishii, H. 1968. Water Uptake, Respiration Pattern and Lipid Utilization in Sclerotia of *Claviceps Purpurea* during Germination. Transactions British Mycological Society 51: 731-736.

Moore, A. E. P., Ashford, A. E., and Peterson, R. L. 1991. Reserve substances in *Paxillus involutus* sclerotia Determination by histochemistry and X-ray microanalysis. Protoplasma 163: 67-81.

Moromizato, Z., Ishizaki, F., Takara, K., and Tamori, M. 1991. The effects of Phosphorus and Magnesium on Sclerotium Formation in *Rhizoctonia solani* Kuehn. 日植病報 Ann. Phytopath. Soc. Japan 57: 649-656.

Moromizato, Z, Koyamada, K., and Tamori, M. 1996. Carbohydrate Utilization during the Sclerotium Formation of *Rhizoctonia solani* Kuehn (IA). 日植病報 Ann. Phytopath. Soc. Japan 62: 23-29.

Moromizato, Z. 1997. Mycological and Phytopathological Studies on *Rhizoctonia solani* Kuehn. Sci. Bull. Fac. Agr. Univ. Ryukyus 44: 1-79.

Naiki, T. and Ui T. 1975. Ultrastructure of sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kuhn invaded and decayed by soil microorganisms. Soil Biology and Biochemistry 7: 301-304.

Nassuth, T. Y. A. and Peterson, R.L. 2001. Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. Canadian journal of microbiology 47: 741-753.

Narisawa, K., Tokumasu, S., and Hashiba, T. 1998. Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*. Plant Pathology 47: 206-210.

Narisawa, K., Kawamata, H., Currah, R. S., and Hashiba, T. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. European Journal of Plant Pathology 108: 103-109.

O'dell, T. E., Massicotte, H. B., and Trappe, J. M. 1993. Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. New Phytol. 124: 93-100.

Ohta, H., Yagi, M., Suzuki, J., Fujitake, N., and Watanabe, M. 2003. Characterization of *Sphongomonas* Species Found as Predominant Members in the Culturable Bacterial Community of a Green Pigment-Containing Sclerotium Grain from Mt. Myoko(Japan) Volcanic Ash Soil. Microbes and environments 18: 126-132.

Ohtaka, N. and Narisawa, K. 2008. Molecular characterization and endophytic nature of the root-associated fungus *Meliniomyces variabilis* (LtVB3). J Gen Plant Pathol 74: 24-31.

Okabe, I., Morikawa, C., Matsumoto, N., and Yokoyama, K. 1998. Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. Mycoscience 39: 399-407.

Sabree, Z. L., Bergendahl, V., Liles, M. R., Burgess, R. R., Goodman, R. M., and Handelsman, J. 2006. Identification and characterization of the gene encoding the *Acidobacterium capsulatum* major sigma factor. Gene 376: 144-151.

Shinohara, M. L., LoBuglio, K. F., and Roger, S. O. 1999. Comparison of ribosomal DNA ITS region among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. Current genetics 35: 527-535.

Stoyke, G. and Currah, R. S. 1993. Resynthesis in Pure Culture of Common Subalpine Fungus-Root Association Using *Phialocephala fortinii* and *Menziesia ferruginea* (*Ericaceae*). Arctic and Alpine Research 25: 189-193.

Suzuki, S., Hirahara, T., Shim, J. K., Horinouchi, S., and Beppu, T. 1992. Purification and Properties of Thermostable ß-Tyrosinase from an Obligately Symbiotic Thermophile, *Symbiobacterium thermophilum*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 56: 84-89.

Townsend, B. B. and Willetts, H.J. 1953. The Development of Sclerotia of Certain Fungi. Transactions British Mycological Society 37: 213-221.

Trappe, J. M. 1969 Studies on *Cenococcum graniforme*. I. An efficient method for isolation from sclerotia. Canadian journal of botany 47: 1389-1390.

Ulloa, M. and Hanlin, R. T. (eds.). 2000. Illustrated Dictionary of Mycology. APS Press. 344-345.

Wagg, C., Pautler, M., Massicotte, H. B., and Peterson, R. L. 2008. The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the *Pinaceae*. Mycorrhiza 18: 103-110.

Watanabe, K. and Baker, P. W. 2000. Review -Environmentally Relevant Microorganisms-. Journal of Bioscience and Bioengineering 89: 1-11.

Watanabe, M., Fujitake, N., Ohta, H., and Yokoyama, T. 2001 . Aluminum Concentrations in Sclerotia form a Buried Humic Horizon of Volcanic Ash Soils in Mt. Myoko, Central Japan. Soil science and plant nutrition 47: 411-418.

Watanabe, M., Genseki, A. , Sakagami, N., Inoue, Y., Ohta, H., and Fujitake, N. 2004. Aluminum Oxyhydroxide Polymorphs and Some Micromorphological Characteristics in Sclerotium Grains. Soil science and plant nutrition 50: 1205-1210.

Watanabe, M., Sato, H., Matsuzaki, H., Kobayashi, T., Sakagami, N., Maejima, Y., Ohta, H., Fujitake, N., and Hiradate, S. 2007a. ^{14}C ages and $\delta^{13}C$ of sclerotium grains found in forest soils. Soil science and plant nutrition 53: 125-131.

Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagami, N., Bolormaa, O., Kawasaki, K., Hiradate, S., Fujitake, N., and Ohta, H. 2007b. Characterization of major and trace elements in sclerotium grains. European Journal of Soil Science 58: 786-793.

Willetts, H. J. 1971. The Survival of Fungal Sclerotia under Adverse Environmental Conditions. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 46: 387-407.

Willetts, H. J. 1978. Sclerotium Formation. In: The Filamentous Fungi Volume 3 Developmental Mycology. Smith, J. E. and Berry, D. R. (eds). Edward Arnold.

Wu, B., Nara, K., and Hogetsu, T. 2005. Genetic structure of *Cenococcum geophilum* populations in primary successional volcanic deserts on Mount Fuji as revealed by microsatellite markers. New Phytologist 165: 285-293.

磯部賢治. 2001. 微生物の生存戦略－固体表面への付着－. 表面科学 22: 652-662.

岩間秀矩. 1999. 農業・園芸への応用. In: 多孔質体の性質とその応用技術. 竹内 雍 監修. フジ・テクノシステム, 東京. pp1001-1026.

内記隆 , 宇井格生. 1969. 土壌中における *Rhizoctonia solani* KUEHM 菌核の生存について. 北海道大学農学部邦文紀要 6: 430-436.

内記隆 , 宇井格生. 1971. 土壌中の *Rhizoctonia solani* Kuhn の菌核から分離された微生物とその作用. 北海道大学農学部邦文紀要 8: 252-265.

内記隆 , 宇井格生. 1980. 土壌における植物病原菌類の菌核の識別. In: 微生物の生態 7 －技術論をめぐって＜識別＞. 微生物生態研究会　編.学会出版センター.

大平辰朗, 谷田貝光克, 廣居忠量, 雲林院源治. 1992. 木炭の土壌中における微生物担体としての機能. 防菌防黴 20: 511-517.

金沢晋二郎. 1994. アルミニウム耐性土壌菌の選抜. In: 低 pH 土壌と植物. 日本土壌肥料学会編. 博友社.

川村佳秀. 1991. キトサン多孔性ビーズ製造とその応用. 化学工業 42: 774-780.

木嶋利男. 1994. 拮抗微生物による病害防除. 農山漁村文化協会, 東京.

キチン、キトサン研究会編. 1990. キチン、キトサンの応用. 技報堂出版.

高分子学会,高分子錯体研究会編. 1991. 生体と金属イオン（「高分子錯体」 7）. 学会出版センター.

斎藤泉. 1977. 豆類菌核病菌, *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY の菌核成熟と発芽に関する研究. 北海道立中央農場試験場 26

三枝正彦. 1994. 酸性土壌におけるアルミニウムの化学. In: 低 pH 土壌と植物. 日本土壌肥料学会編. 博友社.

坂上伸生, 渡邊眞紀子, 太田寛行, 藤嶽暢英. 2004. 非アロフェン黒ぼく土における土壌菌核粒子の分布と土壌化学性との関係. ペドロジスト 48: 24-32.

杉田隆 , 西川朱實. 2004. DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. Japanese journal of medical mycology 45: 55-58.

宝月岱造. 1998. 森林生態系の隠れた役者－樹木と外生菌根菌の共生系－. 蛋白質 核酸 酵素 43: 1246-1253.

陶山明子, 李泰鍋, 古川謙介. 2003. クロロエチレン類の嫌気的微生物分解. 土壌環境センター技術ニュース 7: 57-63.

土壌微生物研究会. 1997. 土壌微生物実験法. 養賢堂.
豊田剛己. 2000. γ－プロテオバクテリア. In: 新・土の微生物（５）系統分類からみた土の細菌. 日本土壌微生物学会編. 博友社.
日本微生物生態学会 教育研究部会 編著. 2004. 微生物生態学入門－地球環境を支えるミクロの生物圏－. 日科技連出版社: 117-122.
野口勝憲. 1997. 微生物資材開発の現状と課題. 土と微生物 49: 51-67.
野々山芳夫. 1996. 微生物機能活用技術の展開方向. 日本土壌肥料学雑誌 67: 726-730.
羽柴輝良. 1983. イネ紋枯病菌核の形態形成－菌核形成開始から発芽能力消失まで. 化学と生物 21: 147-149.
服部勉 . 1995. 微生物生態入門. 東京大学出版会
藤井克彦, 武者一宏, 菊池愼太郎. 2003. 微生物研究と環境バイオ産業・産業界への技術応用の視点から. 室工大紀要 53: 41-46.
本田雄一, 水村洋介. 1991. Light and Temperature Dependent Conidium and Sclerotium Formation in *Botrytis* spp. 島根大農研報 25: 27-35.
松本直幸. 2005. 多様な冬期気象条件に対する雪腐小粒菌核病菌の適応.日本微生物生態学会誌 20(1),13-19.
柳田友道. 1982. 形態形成（微生物科学３）. 学会出版センター.
山田明義. 2004. 菌根共生. In: 土壌微生物生態学 堀越孝雄、二井一禎 編. 朝倉書店. pp44-61.
西尾道徳. 1992. 土壌微生物の基礎知識. 農山魚村文化協会.

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂きました指導教員である渡邊眞紀子教授に、心よりお礼申し上げます。有意義な研究生活や充実した学校生活を送るためのサポートをしてくださいました。また、やりたい実験を自由に研究させてくださいました。そして、何よりも「菌核」という興味深いおもしろい研究対象・テーマを与えてくださったことに、大変感謝しております。これからも、研究に勉強に日々精進していきたいと思います。

途中から指導教員を引き受けてくださった東京工業大学大学院 総合理工学研究科 環境理工学創造専攻の石川忠晴教授には、指導教員の異動に伴う問題を解決してくださり、研究が継続できる状態を与えてくれたことに深くお礼申し上げます。また、論文をまとめるにあたり、アドバイスをくださったことに、心より感謝しております。また、同専攻の吉川邦夫教授ならびに吉田尚弘教授には、中間発表会や最終発表会での質疑応答の際、貴重なご質問やアドバイスを頂いたことで、研究の方向性が明確になり、新しい実験を追加することもでき、より充実した内容の論文を仕上げることができました。心からお礼申し上げます。同大学院 生命理工学研究科 生物プロセス専攻の丹治保典教授には、微生物実験に関するアドバイスをくださっただけでなく、その実験をするために必要な研究する場を提供してくださるというお話までいただき、大変感謝しております。深くお礼申し上げます。

茨城大学農学部の太田寛行教授には、大変お世話になりました。2 年半もの長い期間、微生物に関する知識も実験法もほとんど知らない私を特別研究生として迎えてくださり、この研究を行う場を提供してくださいました。また、本論文の第 2 章、第 4 章としてまとめた実験は、ほぼ茨城大学・太田研究室でさせていただいた実験の結果です。本研究の主要な微生物に関する実験させていただいたことに、大変感謝しております。また、忙しい中、論文の投稿に関してご助言をいただいたことにも、心からお礼申し上げます。また、同学部の成澤才彦准教授には、第 2 章、第 3 章の菌類に関する実験をする際、丁寧に実験方法をご教授いただいたり、結果について度々相談にのっていただいたりと大変お世話になりました。また、お忙しい中、投稿論文に対して丁寧にご教授いただき、心からお礼申し上げます。同学部太田研究室の ICAS 特任研究員の佐藤嘉則さんにも、大変お世話になりました。基礎知識のない私に細菌に関する実験を丁寧にご指導くださり、質問にもわかりやすく丁寧に答えてくださいました。ならびに、太田研究室と成澤研究室のみなさんには、研究はもちろんのこと、研究室生活においても、大変お世話になりました。みなさんのおかげで充実した研究室生活を楽しく過ごすことができました。心から感謝しております。

毎年行われる菌核研究会の発表の際、有益なアドバイスやご意見をくださった神戸大学農学部の藤嶽暢英准教授、名城大学農学部の村山重俊教授にも心よりお礼申し上

げます。
指導教員の異動に伴い、連携大学院生として受け入れていただき、研究する場を与えてくださった首都大学東京地理学教室の皆様にも心から感謝しております。
SEM を快く使用させてくださった創造エネルギー専攻の脇慶子准教授には、深くお礼申し上げます。
首都大学東京 地理学教室 特任助教の坂上伸生さんには、渡邊研究室の時から長い間大変お世話になりました。菌核研究の先輩として、多くのアドバイスや相談にのっていただきました。研究生活を円滑に進める上でサポートしてくださり、心から感謝しております。ならびに、元渡邊研究室の皆様には、同じ菌核を研究対象とし、ゼミを一緒にさせていただいたり、アドバイスをしていただいたりとお世話になりました。心よりお礼申し上げます。
東京工業高等専門学校 物質工学科の三谷知世教授には、大変お世話になりました。高専と専攻科での 3 年間の三谷研での研究生活は、研究の楽しさや発表の仕方などの基礎を学び、身につけることができ、この研究を進める上で大きな支えとなりました。学位論文の方向性が徐々に工学へとシフトしたのは、高専での研究が根底にあるためだと思っています。専攻科卒業後も、研究や学校生活の相談にのっていただいたり、アドバイスしていただいたりと、サポートしてくださいました。目標とする三谷先生にお会いする度に元気づけられ、学位論文を仕上げることができました。心よりお礼申し上げます。ならびに、同校でお世話になりました先生方、同期、先輩・後輩の皆様にも、大変感謝しております。楽しかった高専生活が支えとなり、長い学生・研究生活を乗り越えることができました。ありがとうございました。
最後に、長い学生生活を支えてくれた父と母には、多くの心配と苦労をかけました。ここまで来ることができたのは、父と母、姉と義兄、甥と姪、家族みんなのおかげだと思っています。心から感謝しています。いつも応援してくださり、ありがとうございました。

この研究を通して、多くの皆様に大変お世話になりました。心からの感謝の念を表して謝辞とさせていただきます。

本研究に関わる研究業績一覧

Ⅰ. 査読付学術論文

1) 野々山弥, 太田寛行, 成澤才彦, 渡邊眞紀子. 森林土壌に形成される菌核の微生物担体としての有効性評価. 生物工学会誌 87,518-522(2009) [第 5 章]

2) 野々山弥, 成澤才彦, 太田寛行, 渡邊眞紀子. 岐阜県御嶽山の森林土壌中から採取した菌核より分離された菌類について. 日本菌学会会報 (審査中) [第 2 章]

3) 野々山弥, 成澤才彦, 太田寛行, 渡邊眞紀子. 菌核から分離された DSE による菌核形成の環境条件. 日本菌学会会報 (投稿予定) [第 3 章]

4) Y. Nonoyama, H. Ohta, K. Narisawa, M. Watanabe. Bacterial flora in sclerotia found in sub-alpine forest soil, Mt. Ontake, Gifu prefecture, central Japan. Microbes and Environments(投稿予定) [第 4 章]

Ⅱ. 国際会議発表

1) Y. Nonoyama, K. Narisawa, H. Ohta, and M. Watanabe. Bacterial community in sclerotia of *Cenococcum* species and soil in sub-alpine forest, central Japan. Geophysical Research Abstracts, Vol. 11, EGU General Assembly 2009, April, Vienna [第 4 章]

Ⅲ. 国内学会発表

1) 野々山弥, 成澤才彦, 太田寛行, 渡邊眞紀子. *Cenococcum* 属菌の菌核から分離される菌類及び細菌相について. 第 22 回日本微生物生態学会, 東京(2006 年 10 月) [第 2 章および第 4 章]

2) Y. Nonoyama, K. Narisawa, H. Ohta, and M. Watanabe. Developing factors of sclerotia-like structures formed by some dark septate fungal isolates from sclerotium grain and acid forest soil. 第 23 回日本微生物生態学会, 松山 (2007 年 10 月) [第 3 章]

3) 野々山弥, 成澤才彦, 太田寛行, 渡邊眞紀子. 土壌から検出される菌核の微生物担体としての機能. 第 24 回日本微生物生態学会, 札幌 (2008 年 11 月) [第 5 章]