

西南暖地において収集した落葉漂白菌類の リグニン分解特性の評価

大園 享司

京都大学 生態学研究センター

[〒520-2113 大津市平野 2-509-3]

Evaluation of ligninolytic properties of litter bleaching fungi collected in the southwest subtropics in Japan

Takashi OSONO

Center for Ecological Research, Kyoto University

1. 目的

生態系における植物遺体の分解者として重要な役割を担っている微生物の中でも、菌類は難分解性の高分子化合物であるリグニンを強力に分解できる点で独特の位置を占めている (Osono, 2007). 菌類によるリグニン分解は森林や農耕地の土壌の機能維持に深く関わっており、最近では、その分解活性を利用した毒性の高い多環芳香族炭化水素等の汚染物質の分解・除去にも期待が寄せられている (Rosenbrock et al., 1997; Novotny et al., 2004). 菌類の有するリグニン分解特性を定量的に評価し、強力なリグニン分解菌をスクリーニングし遺伝資源として保存・利用することは基礎・応用面での意義が大きい。

従来、リグニン分解菌類の探索・収集や分解特性の評価は、主に温帯域において、木材の白色腐朽菌を中心に進められてきた。一方、落葉でも菌類によるリグニン分解が認められるが、その分解特性については不明な点が多い。熱帯・亜熱帯域では落葉に含まれるリグニンが活発に分解されており、それとともに落葉が白色化（漂白）することが知られているものの、漂白に関わるリグニン分解菌類の機能的な多様性を評価した例はこれまでにない。

亜熱帯域に位置する沖縄本島では、菌類によるリグニン分解の結果、落葉の漂白現象が認められる。本研究では、落葉の漂白部から分離・収集した菌類のリグニン分解特性を、培養系における滅菌落葉への接種試験により定量的に評価した。また、農業生物資源ジーンバンクに登録されている、これら落葉漂白菌類の近縁種の菌株についても、リグニン分解特性の評価と比較を行った。

2. 材料と方法

1) 供試菌株

沖縄本島北部の沖縄県国頭郡国頭村に位置する琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研

究センター内の亜熱帯常緑広葉樹林において 2007 年 3 月～2008 年 5 月に採取した分離源由来の 49 菌株を用いた。うち 47 菌株は、農業生物資源ジーンバンクに新規登録した (MAFF 241586～241597, 241599～241616, 241618～241634; 表 1)。残る 2 菌株 [菌株番号 07061021 (*Xylaria*), 07110219b (*Mycena*)] は、実験供試後に菌糸生長が認められなくなったため登録を断念した。供試 49 菌株は、落葉の漂白部上の菌類子実体の組織 (図 1), ないし子実体から形成された複数胞子を直接 1%麦芽寒天培地に移植することにより, あるいは 1%麦芽寒天培地上に置床した表面殺菌処理後の落葉漂白部から伸長した単菌糸を分離することにより得た。49 菌株の内訳は、担子菌類 6 属 [*Crinipellis* 3 菌株, *Gymnopus* 5 菌株, ラクノクラジア科の未同定属 (a lachnocladiaceous genus) 2 菌株, *Marasmiellus* 3 菌株, *Marasmius* 5 菌株, *Mycena* 16 菌株] および子囊菌類 3 属 (*Coccomyces* 4 菌株, *Lophodermium* 7 菌株, *Xylaria* 4 菌株) のあわせて 9 属である。なお、これらと同属の農業生物資源ジーンバンク保存 7 菌株 [*Lophodermium* sp. (MAFF 239561), *Marasmius aukubae* (MAFF 435088), *Marasmiellus candidus* (MAFF 460144), *Mycena chlorophos* (MAFF 305759), *Mycena luteopallens* (MAFF 430287), *Mycena sanguinolenta* (MAFF 430360), *Xylaria polymorpha* (MAFF 305713)] についてもリグニン分解特性の評価と比較を行った。

表 1. 供試した沖縄本島北部産の新規登録 47 菌株

菌類・属	MAFF 番号
担子菌類	
<i>Crinipellis</i>	241588, 241601, 241605
<i>Gymnopus</i>	241609, 241611, 241612, 241614, 241616
a lachnocladiaceous genus	241630, 241631
<i>Marasmiellus</i>	241610, 241613, 241615
<i>Marasmius</i>	241587, 241591, 241602, 241603, 241632
<i>Mycena</i>	241586, 241589, 241590, 241592, 241593, 241594, 241595, 241596, 241597, 241604, 241606, 241625, 241626, 241627, 241628
子囊菌類	
<i>Coccomyces</i>	241607, 241608, 241618, 241633
<i>Lophodermium</i>	241619, 241620, 241621, 241622, 241623, 241624, 241634
<i>Xylaria</i>	241599, 241600, 241629



図 1. 分離に用いた菌類子実体の例

(*Marasmius*, スケール : 1cm)

2) 接種試験

リターフォール時期の 2008 年 3 月に同調査地の林床から採取したイタジイ (*Castanopsis sieboldii*) とイジュ (*Schima wallichii*) の新規落葉を接種試験に用いた。葉は幅 2～3 cm 程度に

切り分け、送風乾燥機内 40℃下で 1 週間乾燥後、エチレンオキサイドガスを用いて 60℃、6 時間滅菌した。各菌株を 1%麦芽エキス寒天平板で 14~21 日間培養し、生育した菌叢周縁部から滅菌済みコルクボーラー（直径 6 mm）により打ち抜いた寒天プラグを接種源とした。2%素寒天培地 20 ml を含む直径 9 cm の深皿シャーレに滅菌した落葉片 300 mg と接種源を置床し、暗黒条件の恒温培養庫内で 12 週間培養した（図 2）。分離源の採取地点の年平均気温が約 22℃であることと、過去の同様の接種試験が 20℃で行われていることから（Osono and Takeda, 2002; Osono et al., 2003）、本接種試験においても培養温度は 20℃とした。培養後に落葉を回収し、上記と同様に乾燥重量を測定した（以下、接種区とよぶ）。菌株を接種せず培養した対照区、培養前の初期区の落葉（300 mg）についても同様に乾燥重量を測定した。4 反復の試験により、培養期間における落葉の重量減少率を次の式で求めた：重量減少率（%）=（対照区の落葉重量-接種区の落葉重量）×100/初期区の落葉重量（300 mg）×100。

イタジイ・イジュのいずれかの樹種で落葉の重量減少率が 4.9%以上であった 44 菌株について、4 反復分の重量測定後落葉試料を混合粉碎した後、硫酸法によりリグニン含有量を測定した（King and Heath, 1967）。接種区、対照区、初期区のそれぞれの落葉に含まれるリグニン量を求め、上述の式により培養期間におけるリグニンの重量減少率（%）を求めた。菌株ごとの選択的リグニン分解の指標として、リグニン-落葉重量減少比（Lignin to weight loss ratio, L/W）を次の式により計算した：L/W=リグニンの重量減少率/落葉の重量減少率。



図 2. 培養系で MAFF 241604 (*Mycena*) による分解と漂白を受けたイタジイ落葉

3) DNA 塩基配列による分離菌株の分類群の推定

2%麦芽培地で 1 週間程度培養して得た各菌株の菌体から改変 CTAB 法により DNA を抽出し、28S rDNA の D1-D2 領域を PCR により増幅した。プライマーは D1 と NL4 を用いた。一部の菌株については、rDNA の ITS 領域も解析対象とし、プライマーは ITS1F と ITS4 を用いた。PCR 産物を精製後、それらをテンプレートとしてシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。実験の手順は大園・広瀬（2009）に従った。分類群の推定は、配列データをもとに NCBI の BLAST 検索により行った。

3. 結果

供試した全 49 菌株がイタジイ・イジュ落葉に漂白を引き起こした（図 2）。落葉の重量減少率（初期重量に対する%）の平均値（最小値-最大値）は、イタジイで 14.2%（2.3-34.3%）、イジュで 13.4%（-0.4-32.0%）であった。イタジイ・イジュ落葉の重量減少を最も大幅に引き起こしたのは、イタジイ落葉の漂白部上に発生した子実体から分離した *Mycena* 属 4 菌株（MAFF 241604, 241594,

241586, 241590) であった。イタジイとイジュの間で、菌株による落葉の重量減少率に有意差はなかった (対応のある t 検定, $t=0.89$, $p>0.05$)。

リグニン分析を行った 44 菌株の接種区で求めたリグニン重量減少率の平均値 (最小値–最大値) は、イタジイで 24.7% (0.7–62.6%), イジュで 22.6% (0.5–55.9%) であった。イタジイ落葉中のリグニン重量減少率が最も高かったのは *Crinipellis* 属の 1 菌株 (MAFF 241601) であり, *Mycena* 属の 3 菌株 (MAFF 241589, 241590, 241586) とラクノクラジア科未同定属の 1 菌株 (MAFF 241630) がそれに続いた。イジュ落葉中のリグニン重量減少率が最も高かったのは *Lophodermium* 属の 1 菌株 (MAFF 241619) であり, ラクノクラジア科未同定属の 2 菌株 (MAFF 241630, 241631) がそれに続いた。イタジイとイジュの落葉の間で, 44 菌株によるリグニンの重量減少率に有意差はなかった (対応のある t 検定, $t=1.29$, $p>0.05$)。

選択的リグニン分解の指標である L/W の平均値 (最小値–最大値) は、イタジイで 1.6 (0.04–3.2), イジュで 1.6 (0.04–2.9) であった。イタジイ落葉では, *Crinipellis* 属の 1 菌株 (MAFF 241601), *Mycena* 属の 1 菌株 (MAFF 241592), *Gymnopus* 属の 2 菌株 (MAFF 241609, 241611) で L/W が高かった。イジュ落葉では, *Gymnopus* 属の 2 菌株 (MAFF 241614, 241609), *Coccomyces* 属の 1 菌株 (MAFF 241618), *Mycena* 属の 1 菌株 (MAFF 241727) で L/W が高かった。イタジイとイジュの落葉の間で, 44 菌株の L/W に有意差はなかった (対応のある t 検定, $t=0.46$, $p>0.05$)。

表 2. 供試菌の接種による落葉の重量減少率

学名[菌株数] (MAFF 番号 ; 菌株番号)	イタジイ			イジュ		
	平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値
<i>Crinipellis</i> [3] (MAFF 241588, 241601, 241605)	17.1	15.6	19.7	12.9	9.9	16.4
<i>Gymnopus</i> [5] (MAFF 241609, 241611, 241612, 241614, 241616)	13.9	10.0	20.1	9.3	2.4	17.4
a lachnocladiaceous genus [2] (MAFF 241630, 241631)	20.3	19.6	20.9	30.0	29.9	30.1
<i>Marasmiellus</i> [3] (MAFF 241610, 241613, 241615)	15.1	11.5	20.0	15.9	13.4	19.9
<i>Marasmius</i> [5] (MAFF 241587, 241591, 241602, 241603, 241632)	8.1	4.3	10.6	4.1	1.1	7.7
<i>Mycena</i> [16] (MAFF 241586, 241589, 241590, 241592, 241593, 241594, 241595, 241596, 241597, 241604, 241606, 241625, 241626, 241627, 241628; 07110219b)	18.5	2.3	34.3	14.6	-0.4	30.3
<i>Coccomyces</i> [4] (MAFF 241607, 241608, 241618, 241633)	7.8	3.2	12.9	9.0	0.6	19.8
<i>Lophodermium</i> [7] (MAFF 241619, 241620, 241621, 241622, 241623, 241624, 241634)	11.5	4.2	15.9	17.5	0.7	32.0
<i>Xylaria</i> [4] (MAFF 241599, 241600, 241629; 07061021)	10.3	5.7	17.7	13.3	4.9	22.5

表 3. 供試菌の接種によるリグニンの重量減少率

学名[菌株数] (MAFF 番号 ; 菌株番号)	イタジイ			イジユ		
	平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値
<i>Crinipellis</i> [3] (MAFF 241588, 241601, 241605)	39.5	27.7	62.6	19.8	16.1	25.2
<i>Gymnopus</i> [5] (MAFF 241609, 241611, 241612, 241614, 241616)	25.9	14.3	32.5	18.7	3.1	37.6
a lachnocladiaceous genus [2] (MAFF 241630, 241631)	41.2	40.7	41.8	52.4	50.4	54.4
<i>Marasmiellus</i> [3] (MAFF 241610, 241613, 241615)	28.8	22.4	33.0	31.0	25.7	39.4
<i>Marasmius</i> [4] (MAFF 241591, 241602, 241603, 241632)	16.6	4.9	21.9	9.0	3.3	13.7
<i>Mycena</i> [15] (MAFF 241586, 241589, 241590, 241592, 241593, 241594, 241595, 241596, 241604, 241606, 241625, 241626, 241627, 241628; 07110219b)	26.5	0.7	49.2	21.5	2.5	41.0
<i>Coccomyces</i> [3] (MAFF 241607, 241618, 241633)	16.7	8.0	24.1	21.0	14.2	29.5
<i>Lophodermium</i> [6] (MAFF 241619, 241620, 241621, 241623, 241624, 241634)	24.1	6.9	33.0	32.9	12.2	55.9
<i>Xylaria</i> [3] (MAFF 241599, 241629; 07061021)	3.9	0.8	6.9	7.9	0.5	15.8

表 4. 供試菌の選択的リグニン分解の指標 (LW)

学名[菌株数] (MAFF 番号 ; 菌株番号)	イタジイ			イジユ		
	平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値
<i>Crinipellis</i> [3] (MAFF 241588, 241601, 241605)	2.2	1.7	3.2	1.5	1.5	1.6
<i>Gymnopus</i> [5] (MAFF 241609, 241611, 241612, 241614, 241616)	1.9	1.3	2.3	1.9	1.3	2.2
a lachnocladiaceous genus [2] (MAFF 241630, 241631)	2.0	1.9	2.1	1.7	1.7	1.8
<i>Marasmiellus</i> [3] (MAFF 241610, 241613, 241615)	2.0	1.6	2.3	1.9	1.9	2.0
<i>Marasmius</i> [4] (MAFF 241591, 241602, 241603, 241632)	1.7	1.0	2.1	2.1	1.8	2.9
<i>Mycena</i> [15] (MAFF 241586, 241589, 241590, 241592, 241593, 241594, 241595, 241596, 241604, 241606, 241625, 241626, 241627, 241628; 07110219b)	1.3	0.1	2.3	1.4	0.9	2.1
<i>Coccomyces</i> [3] (MAFF 241607, 241618, 241633)	1.9	1.6	2.3	1.9	1.5	2.2
<i>Lophodermium</i> [6] (MAFF 241619, 241620, 241621, 241623, 241624, 241634)	1.8	1.2	2.1	1.6	1.4	1.7
<i>Xylaria</i> [3] (MAFF 241599, 241629; 07061021)	0.4	0.0	0.7	0.4	0.0	0.7

表 5. 農業生物資源ジーンバンク保存菌株の接種による落葉およびリグニンの重量減少率, 選択的リグニン分解の指標(L/W) (落葉の重量減少率の値は 4 反復の平均値)

MAFF 番号 (学 名)	\重量減少率		リグニン		L/W	
	イタジイ	イジュ	イタジイ	イジュ	イタジイ	イジュ
MAFF 460144 (<i>Marasmiellus candidus</i>)	35.5	31.6	38.0	26.9	1.1	0.9
MAFF 239561 (<i>Lophodermium</i> sp.)	10.7	4.0	4.5	-0.6	0.4	-0.1
MAFF 305713 (<i>Xylaria polymorpha</i>)	9.4	4.2	2.1	2.8	0.2	0.7
MAFF 430287 (<i>Mycena luteopallens</i>)	6.2	6.8	5.6	3.5	0.9	0.5
MAFF 305759 (<i>Mycena chlorophos</i>)	4.9	3.0	0.1	0.1	0.0	0.0
MAFF 430360 (<i>Mycena sanguinolenta</i>)	2.9	5.3	0.4	3.9	0.1	0.7
MAFF 435088 (<i>Marasmius aukubae</i>)	0.5	-0.9	nd	nd	nd	nd

nd : 分析を行わなかった.

属別にみると、イタジイ落葉の重量減少率はラクノクラジア科未同定属、*Mycena*, *Crinipellis* などの担子菌類で、子囊菌類よりも高い傾向が認められたが、イジュ落葉では担子菌類と子囊菌類の間の差は比較的小さかった (表 2). *Crinipellis* と *Marasmius*, *Mycena* では落葉の重量減少率がイジュよりもイタジイで有意に高かった (対応のある t 検定, *Crinipellis* $t=4.62$, $P<0.05$; *Marasmius* $t=6.06$, $P<0.01$; *Mycena* $t=7.00$, $P<0.001$). リグニン重量減少率はイタジイ落葉ではラクノクラジア科未同定属、*Crinipellis* で高く、*Xylaria* で低い傾向が認められ、イジュ落葉ではラクノクラジア科未同定属で高く、*Marasmius*, *Xylaria* で低い傾向が認められた (表 3). *Mycena* では、イタジイ落葉でのリグニン重量減少率がイジュ落葉のそれよりも有意に高かった (対応のある t 検定, $t=3.24$, $P<0.01$). L/W は *Xylaria* を除く 8 属ではイタジイで 1.3–2.2, イジュで 1.4–2.1 となった (表 4). *Xylaria* の L/W はいずれの落葉でも 0.4 であり、他の属に比べて低かった.

49 菌株の 28S rDNA の D1-D2 領域シーケンスデータの相同性に基づいて分類学的所属を検討した結果、ほとんどの菌株について属ないし科が推定されたが (図 3), 種が特定された菌株はない. 分離源として用いた子実体の形態観察によっても種を特定することは困難であり、現時点では種同定に至っていない.

農業生物資源ジーンバンクに保存されていた 7 供試菌株では、MAFF 460144 (*Marasmiellus candidus*) がもっとも大幅な落葉の重量減少を起した (表 5). その一方で、MAFF 435088 (*Marasmius aukubae*) は落葉分解力をほとんど示さなかった. リグニン分解の点からみても、MAFF 460144 (*M. candidus*) は大幅なリグニンの重量減少率を示し、L/W (選択的リグニン分解の指標) はイタジイで 1.1, イジュで 0.9 であった. これ以外の 6 菌株では、顕著なリグニン分解活性は認められなかった. MAFF 460144 (*Marasmiellus candidus*) によるリグニンの重量減少

率は、沖縄本島産の同属の3菌株（イタジイで22.4–33.0%，イジュで25.7–39.4%，表3）と同程度であったが，L/Wは沖縄本島産の3菌株（イタジイで1.6–2.3，イジュで1.9–2.0，表4）に比べると低かった。

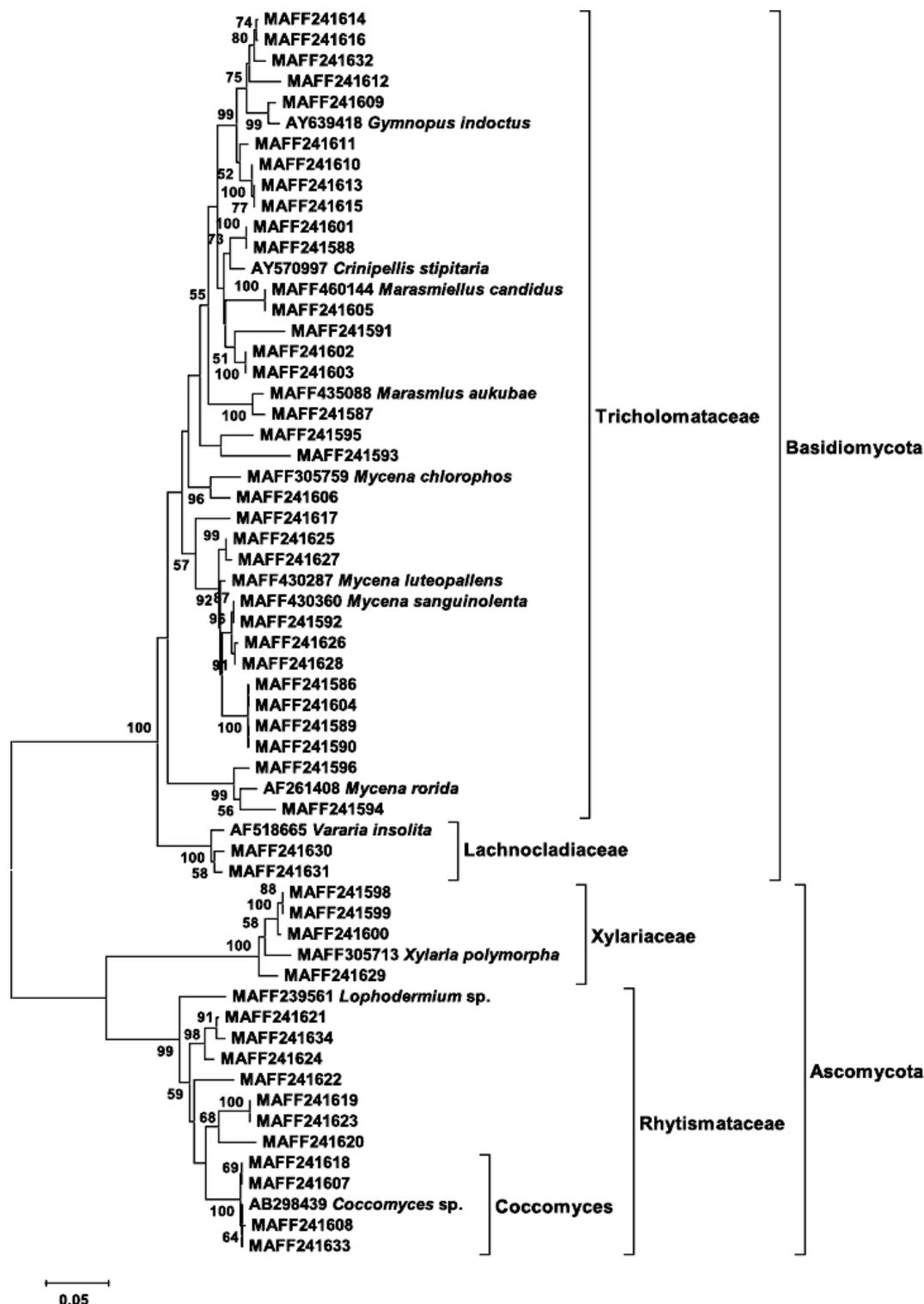


図3. 接種試験に用いた新規登録菌株の28S rDNA部分塩基配列に基づく近隣結合系統樹
50%以上のブートストラップ値を枝上に示す。

4. 考察

本研究では、沖縄本島において収集した菌株を用い、落葉漂白菌類が高いリグニン分解力を持つことを定量的に示した。このことから、落葉漂白菌類は野外において活発にリグニン分解に関与しているものと考えられる。また、本研究に用いた菌株は選択的リグニン分解の活性も高いといえる。例えばわが国の冷温帯で採取された落葉分解菌 9 菌株をブナ落葉に接種した同様の実験では (Osono and Takeda, 2002), リグニンの重量減少率は 3.9–33.2%, L/W (選択的リグニン分解の指標)は 0.1–1.5 であった。またカラマツ落葉に 9 菌株を接種した実験では (Osono et al., 2003), リグニンの重量減少率は 3.7–39.6%, L/W は 0.5–3.3 であった。亜熱帯産の落葉分解菌類を対象としたリグニン分解活性のスクリーニングはこれまでほとんど行われていないことから、本研究で得た知見の新規性は高い。なお、農業生物資源ジーンバンクに登録されている落葉漂白菌類の近縁種 7 菌株のうち、MAFF 460144 (*Marasmiellus candidus*) が比較的高いリグニン分解活性を示した。本菌株によるリグニンの重量減少率は、沖縄本島産の同属菌株と同程度であったが、L/W は 0.9–1.1 と低かった。

本研究では、種同定には至らなかったものの、高いリグニン分解活性を持ち、またより選択的にリグニンを分解する活性を示す新たな菌株を数多くスクリーニングできた。今後、これらの遺伝資源としての活用が期待される。なお、種同定については、引き続き検討する予定である。

5. 謝辞

日本大学薬学部助教の広瀬大博士に野外調査、菌株の分離および分子系統学的検討に際して多大なご協力をいただいた。京都大学大学院農学研究科の萩原佑亮君には落葉試料の化学分析にご協力をいただいた。琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センターの皆様には菌株分離源の採取にご協力をいただいた。ここに記して、深く感謝の意を表す。

6. 参考文献

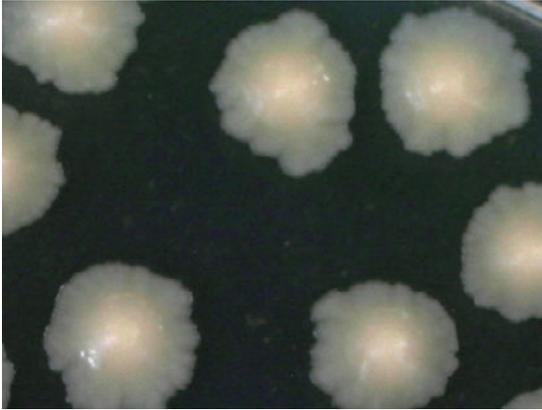
- 1) King, H.G.C. and Heath, G.W. (1967) The chemical analysis of small samples of leaf material and the relationship between the disappearance and composition of leaves. *Pedobiologia* 7: 192-197.
- 2) Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. and Sasek, V. (2004) Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1545-1551.
- 3) Osono, T. (2007) Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecol. Res.* 22: 955-974.
- 4) Osono, T., Fukasawa, Y., and Takeda, H. (2003) Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition. *Mycologia* 95: 820-826.
- 5) 大園享司・広瀬大 (2009) 利尻島においてミズナラ落葉の漂白に関わる子囊菌類. *利尻研究* 28: 51-56.

- 6) Osono, T. and Takeda, H. (2002) Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia* 94: 421-427.
- 7) Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F., Zadrazil, F. and Munch, J.C. (1997) Enhancing the mineralization of [U-¹⁴C]dibenzo-*p*-dioxin in three different soils by addition of organic substrate or inoculation with white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 665-670.

Summary

Ligninolytic activity of 49 fungal isolates each identified into 6 basidiomycetous or 3 ascomycetous genera was assessed with the litterdecomposition test in pure culture. The isolates were obtained from bleached parts of fallen leaves collected from a subtropical forest in Okinawa Island, Japan. Weight loss of sterilized fresh litter of *Castanopsis sieboldii* and *Schima wallichii* was determined after 12-week incubation at 20 °C for individual fungal isolates. All of the isolates showed bleaching activity. Most of the isolates caused significant mass loss of lignin in litter, and the greatest mass loss of lignin was caused by isolates of an unidentified genus of the Lachnocladiaceae. Isolates of the eight genera except *Xylaria* caused selective delignification, with lignin to weight loss ratio of 1.3-2.2. Most of the subtropical isolates showed comparative mass loss of lignin and greater activity of selective delignification than MAFF strains of related genera examined in this study. The 47 isolates were deposited to NIAS Genebank with accessions of MAFF 241586-241597, 241599-241616, 241618-241634.

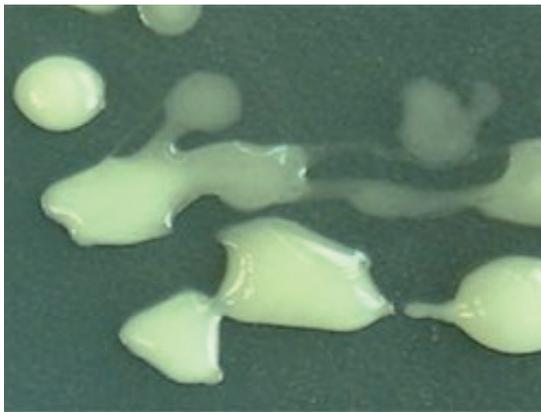
微生物遺伝資源の調査プロフィール



タイモ立枯細菌病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) のコロニー (土屋)



落葉漂白菌類を採集した沖縄本島の亜熱帯常緑広葉樹林 (大園)



左: *Ralstonia solanacearum* OE1-1 株の PS 培地上でのコロニー
右: 植物育成室における接種試験 (曳地)



Pestalotiopsis adusta が分離されたユリの斑点症状 (渡辺)