

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田中 恵

---

本研究は、樹木と外生菌根菌との共生関係において、菌根圏に生息するバクテリアが一定の役割を果していることを想定し、その機能解明に有効な *in vitro* 実験系を確立し、菌根圏バクテリアの働き的一端を明らかにしたものである。

まず始めに、菌根圏環境におけるバクテリアの挙動を単純な実験環境下で調べる第一段階として、*in vitro* で植物と菌根菌とを同時に培養し菌根を合成させる方法を開発した。菌根と植物を同時に培養するのに適した培地として、植物組織培養に用いられる SH 培地を改変し、従来菌根菌の培養に用いられる MMN 培地よりもコツブタケとキツネタケで菌叢の直径成長が良好な Fungus-Host (FH) 培地を新たに開発した。この FH 培地を用いて、角シャーレ法と培養ポット法の 2 つの方法でモミとコツブタケとの菌根合成を、角シャーレ法でモミとシーノコッカムおよびアカマツとコツブタケあるいはシーノコッカムとの菌根合成を試みた。その結果、合成菌根様の短い根が形成されており、光学顕微鏡でハルティヒネットの形成を確認できた。すなわち、*in vitro* で植物と菌根菌とを同時に培養し、菌根を合成させることに成功した。

さらに、試験管内において効率的に菌根を合成するため、*in vitro* でアカマツ芽生えとコツブタケ菌糸を共存培養し、菌根の効率的合成法の確立を試みた。迅速な菌根の合成には液体培地を入れた試験管内のペーパーブリッジで培養するペーパーブリッジ法、菌根数では角シャーレ中の斜面培地で培養する角シャーレ法が優れていた。そこでまず始めにペーパーブリッジ法で両者を培養し、その後、角シャーレへと植え替える二段階培養法を開発し、この方法が有効であり、かつ角シャーレ法のみと比較し菌根数が大幅に増加することを明らかにした。ここで開発された二段階培養法は効率的な菌根合成が可能であり、また、後半に用いる角シャーレ法は植物体の観察が容易であるため、菌根の働きを調べる上でも有効な方法である。

次に植物、菌根菌、バクテリアの三者を同時に培養し、*in vitro* における菌根圏バクテリア研究法を確立するため、アカマツ芽生えとその外生菌根菌であるキツネタケの共存培養系に蛍光性シュードモナスを組み込んだモデル実験を構築し、バクテリアの添加がアカマツ芽生え及び菌根菌に及ぼす影響を検討した。まず、キツネタケ菌糸の成長に対するシュードモナスの影響について検討するため二者のみで培養を行なった。その結果、滅菌水に分散させたシュードモナスを培地表面に塗布して培養した場合とシュードモナスを培養した培養液を添加した場合はキツネタケ菌叢の直径成長は抑制され、一方、シュードモナス培養液をろ過して添加した場合は、菌叢の直径成長が促進されたことから、シュードモナス

やその培養液および培養ろ液がキツネタケ菌糸の成長に影響を与えることを示した。また、アカマツとキツネタケの二者間の菌根合成系により、キツネタケの接種がアカマツ側根の形成を促進することを示した。さらに三者培養として、アカマツにキツネタケを接種し、分散シュードモナスを添加した場合、キツネタケのみを接種した場合に比べ側根数が減少したことから、分散シュードモナスの添加がキツネタケ菌糸成長を阻害し、アカマツの側根形成を抑えた可能性を指摘した。

以上の結果を踏まえ、実際の野外で生育する菌根から分離・種同定したバクテリアを、開発した *in vitro* 同時培養系に導入し、バクテリアが植物根及び菌根菌に及ぼす影響についてそれぞれ検討した。まず、東京大学富士演習林のアカマツ林内において採取したアカマツ菌根から希釈平板法により、バクテリアの純粋分離を行った。分離したバクテリア 100 株について、培地試験を行い、培養可能なバクテリア計 40 株を得、形態から *Pseudomonas* 属に類似性の高い 1 株（以下 FB1 とする）を選択した。FB1 について、16S rDNA の塩基配列に基づく同定を行ったところ、*Paenibacillus* 属の種と 95% の相同性で一致したため、分離したバクテリアは *Paenibacillus* 属の新種と判断された。この菌根由来バクテリア FB1 について、共生関係における挙動を調べるため *in vitro* においてアカマツ芽生え、あるいはキツネタケ菌糸とそれぞれ別に共存培養し、相互の成長に及ぼす影響について調べた。その結果、FB1 がアカマツ根に及ぼす影響として、側根の形成および主根の伸長に促進効果を持つことを示した。これは菌根形成を促進するバクテリアである Mycorrhization helper bacteria の機能の一つとして仮定されている、根の感受性に対する影響に値するものと考察された。また、FB1 が培養系に与える影響は、添加するバクテリアの種類、添加方法及び培養時の栄養条件によって異なり、アカマツ根、キツネタケ菌糸のそれぞれに異なる局面でアプローチしていることが明らかとなった。

以上、本研究では、植物、菌根菌の二者を *in vitro* で同時に培養し、効率的に菌根合成を行なう方法を開発し、さらにそこにバクテリアを加え、三者で同時に培養する手法を確立した。また、その手法を応用し、野外菌根から採取、同定したバクテリアがアカマツ根、キツネタケ菌糸に与える影響を評価し、開発した手法がバクテリアの機能解明に有効であることを示した。さらに、その結果に基づいてバクテリアが、菌根圏において植物及び菌根菌にどのように関わっているかについての仮説を構築し、今後のヘルパーバクテリア研究展開の基礎を確立した。すなわち本研究の成果は、従来複雑な環境要因の中で研究されてきた菌根圏環境におけるバクテリアの機能解明研究に対して、植物、菌根菌、バクテリアの三者のみの系を用いることにより他の要因を排し、より明確にヘルパーバクテリアの機能解明を行なうのに幅広く応用できるものであり、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。