

論文の内容の要旨

森 林 科 学 専 攻

平成 21 年度博士課程進学

氏 名 寺本 宗正
指導教員名 宝月 岱造

論文題目 経時的オートラジオグラフィを用いた外生菌根共生系における炭素転流の解析

外生菌根菌は森林生態系において大きなバイオマスを占めるとともに、宿主樹木の細根に菌鞘を有する菌根を形成する共生菌である。菌根からは根外菌糸体が土壤中に発達し、リン酸や窒素を吸収して宿主に供給する。栄養供給によって樹木の成長が促進されるが、このような共生機能を通して、菌根菌は森林の発達に大きく寄与している。一方、宿主樹木からは外生菌根菌に多量の光合成産物が転流される。宿主樹木から外生菌根菌に転流する炭素量は純一次生産量の 15 %とも推定されているが、その後それらの多くは土壤へと供給される。従って、樹木から土壤への炭素の流れを介する事で、外生菌根菌は森林生態系の炭素循環においても重要な役割を果たしている。しかし、外生菌根共生系の重要な機能を支える炭素転流の詳細は不明な点が多く、依然今後の研究課題として残されている。

外生菌根共生系における炭素転流を理解する上で、まずは、根外菌糸体内の転流を経時的に追跡し、その一般的特徴を明らかにすることが必要である。そして、外生菌根菌は根外菌糸体内に子実体を形成するが、森林生態系におけるそのバイオマスは非常に大きなものである。そのため、子実体への炭素転流についても検討する必要があるだろう。また、根外菌糸体は隣り合う樹木の根に感染することにより、地下に菌糸体のネットワークを形成するが、それらは断片化と再結合をくり返し、ダイナミックに変動していると考えられる。従って、これらの変動に応じて炭素転流がどのように変化するかも明らかにする必要がある。さらに、ネットワーク内の炭素転流は、様々な要因によって影響を受けると考えられるが、それらの影響要因の研究も進んでいない。一方、外生菌根菌は炭素源として、宿主樹木からの光合成産物だけでなく、土壤から吸収したアミ

ノ酸等の有機物も利用することが知られている。従って、外生菌根共生系全体の炭素転流を理解するためには、土壌から吸収した有機物の転流も合わせて明らかにする必要がある。

共生系内における詳細な栄養転流過程をとらえるためには、同一サンプルを用いた直接的かつ経時的、定量的実験が必要である。直接的な解析手法としては、古くから放射性同位体 (RI) によるトレーサー実験が行われてきたが、従来の X 線フィルムによるオートラジオグラフィーを用いる方法は、経時的かつ定量的な解析には不向きなものであった。しかし現在では、表面に輝尽性蛍光体を塗布したイメージプレートが開発され、それを用いたオートラジオグラフィーによって、サンプル内の RI の分布を経時的かつ定量的に追跡する事が可能になっている。

そこで本研究では、樹木-外生菌根共生系における炭素転流に焦点を合わせ、①根外菌糸体内の炭素転流の基本的特徴、②根外菌糸体中に発生する子実体への炭素転流の特徴、③菌糸体の再結合後の炭素転流の変化、④宿主の光環境が根外菌糸体内における炭素転流へ及ぼす影響、⑤根外菌糸体が吸収したアミノ酸の転流の特徴を、経時的定量オートラジオグラフィーを根箱実験系に適用して明らかにした。

まず二章では、根外菌糸体内における炭素転流に関し、方向による転流能に違いがあるのかを検討した。コツブタケ属菌 (*Pisolithus* sp.) に感染したクロマツ (*Pinus thunbergii*) を根箱内のプレート上で栽培し、プレート一面に成長した根外菌糸体を部分的に切断する事で、菌根から放射方向への菌糸体の接続を遮断した。その上で宿主地上部から $^{14}\text{CO}_2$ を光合成によって取り込ませ、各部への ^{14}C 転流量を経時的に解析した。結果、切断の有無に関わらず、 ^{14}C は根外菌糸体全体にラベル後 1 日で転流し、いずれの部分においても、放射線量には有意な切断の影響は認められなかった。このことは、根外菌糸体内では方向に関わらず、宿主から供給された炭素源が比較的抵抗なく転流する事を示している。

十分に発達した根外菌糸体内には子実体が形成される。そこで三章においては、子実体の形成過程における炭素シンク能を検討した。ウラムラサキ (*Laccaria amethystina*) を接種したアカマツ (*Pinus densiflora*) を根箱中で栽培し、子実体を形成した根箱について、宿主地上部を $^{14}\text{CO}_2$ でラベルした。根箱には紫色を保った子実体と、白色、灰色、茶色に変色したものが存在したが、大きさに関わらず、紫色を保った子実体のみ ^{14}C の蓄積が見られた。また、蓄積は 3 日で頭打ちになった。一方、ラベルした後も子実体が成長を続けた二つの苗については、二度目のラベルを行った。結果、最初のラベル後頭打ちになった ^{14}C の蓄積は、二度目のラベル後再び増加し、全体として階段状に上昇した。これらの事から、生理活性が高い紫色の子実体のみ炭素シンク能を示すこと、子実体に供給される光合成産物は、宿主が直近に固定したものが主であることが分かった。

次に四章では、一度切断された根外菌糸体が再結合する際の炭素転流能の回復過程を検討した。コツブタケ属菌に感染したクロマツ苗二本を根箱内で栽培し、両苗を繋ぐ菌糸ネットワークを形成させた上で中央部から両断した後、左右の根外菌糸体を再び部分的に接触させた。接触当日、もしくは接触後 3 日、6 日、9 日、12 日に片方の宿主を $^{14}\text{CO}_2$ でラベルし、接触部を経て非ラベル側菌糸体へ転流した ^{14}C 量を経時的に解析した。結果、接触処理当日にラベルしたサンプルにおける非ラベル側菌糸体への ^{14}C 転流量はラベル後 3 日から緩やかに上昇し、7 日までは他処理

と比して低かったものの、ラベル後 14 日には接触処理後 3-9 日にラベルしたサンプルと同じ水準になった。一方、接触処理後 3 日以降にラベルしたサンプルでは、非ラベル側菌糸体への ^{14}C 転流量は、ラベル直後から上昇した。接触処理後 12 日にラベルしたサンプルにおける非ラベル側菌糸体への ^{14}C 転流量は、実験期間を通して最も高かった（ラベル後 14 日において他処理の 2.0-2.4 倍）。以上の事から、接触後 3 日程度で菌糸体は再結合し、炭素転流能も回復することが分かった。

五章では、根外菌糸体の再結合後、形成されたネットワーク内における炭素転流への光の影響をつかむべく実験を行った。菌糸ネットワーク内の炭素転流については、各宿主樹木の光合成が、根外菌糸体内の炭素転流量に影響を与えることが知られている。そこでまず第一節においては、菌糸成長に対する遮光の影響を把握するため、コツブタケ属菌に感染した宿主（クロマツ）に対して異なる強度（0%、50%、80%、100%）の遮光処理を行い、根外菌糸体の成長を経時観察した（処理後 28 日まで）。結果、80%以上の遮光によって根外菌糸体の成長は著しく阻害された。第二節においては、菌糸ネットワーク（コツブタケ属菌）で繋がった二本の宿主（クロマツ）の片方に $^{14}\text{CO}_2$ を固定させた後、両者をそれぞれ異なる光条件に置いた（ $^{14}\text{CO}_2$ ラベルに関してはラベル苗/非ラベル苗とし、遮光処理に関しては非遮光/非遮光：L/L、非遮光/遮光：L/D、遮光/非遮光：D/L、遮光/遮光：D/D とする）。 $^{14}\text{CO}_2$ ラベル後 14 日まで解析した結果、いずれのサンプルにおいても ^{14}C は非ラベル側菌糸体へ転流したものの、その転流量は D/L において最も低く、次いで L/L、D/D、L/D の順に多くなった。このことは、 $^{14}\text{CO}_2$ ラベル苗の光合成量が減少すると菌糸体への ^{14}C 転流量が減少すること、および非ラベル苗からの炭素供給量が減少するとラベル苗からの ^{14}C 転流量が増加することを示唆している。

土壌中にはアミノ酸が含まれており、外生菌根菌はアミノ酸を炭素源として吸収、利用できる事が示されているが、その詳細な転流、代謝過程は明らかにされていない。六章においてはそれらの点を解明すべく実験を行った。第一節では、コツブタケ属菌に感染したクロマツ苗を根箱内で栽培し、発達した根外菌糸体に対し、 ^{14}C -アラニン（Ala）もしくは ^{14}C -グルタミン（Gln）を添加してその転流を追った。結果、添加部と最寄りの菌根を繋ぐ帯状の根外菌糸体領域と菌根に、 ^{14}C が著しく蓄積した。このことは、外生菌根がアミノ酸に対して高いシンク能を持つことを示唆している。そこで第二節では、アミノ酸に対する菌根のシンク能を確認するために、片方の苗を除去する実験を行った。コツブタケ属菌に感染したクロマツ苗二本を根箱内で栽培し、菌糸ネットワークを形成させた後、片方の苗のみ根外菌糸体を残して除去した。菌糸ネットワークの中央部に ^{14}C -Ala を添加し、転流過程を経時的に解析したところ、片側の苗を除去したサンプルにおいては、苗がある側の根外菌糸体にのみ菌根と添加部を結ぶ高放射線帯が形成され、苗除去側の根外菌糸体には形成されなかった。苗を除去しない対照では、両側の苗における菌根までの高放射線帯が形成された。この事は、菌根が根外菌糸体内のアミノ酸転流のシンクになっている事を示している。

次にアミノ酸がどの様に代謝されるのかを調べるため、第三節では、第一節と同様の手法でラベルした菌根および根外菌糸体を 70%アルコール抽出し、薄層クロマトグラフィーにかけた。 ^{14}C -Ala、 ^{14}C -Gln いずれの場合も、添加後 1 日目の根外菌糸体からは多数の放射性スポットが確

認されたが、添加後 7 日には数スポットに減少した。いずれのアミノ酸の場合も強い放射活性を示すスポットは、LC/MS 解析により分子量 188 と同定された同一の物質であった。

以上本研究により、根外菌糸体内における光合成産物の転流は、菌糸のつながりがあれば方向を問わず一様であること、子実体には主に光合成直後の産物が転流すること、根外菌糸体は一旦分断されても数日で再結合し、両者間の炭素転流も同時に回復すること、これらの転流量が宿主の光合成量に依存することが明らかになった。一方根外菌糸体内におけるアミノ酸の転流に関しては、菌根が特に強いシンク能を示すことが明らかになった。