

氏名	いまむらあきお 今村彰生
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人博第199号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科人間・環境学専攻
学位論文題目	Dynamics of Ammonia Fungus Community Viewed from Fruitbody Production and Mycorrhiza Formation (子実体形成と菌根形成からみたアンモニア菌群集の動態)
論文調査委員	(主査) 教授 加藤 真 教授 松井正文 助教授 瀬戸口浩彰 助教授 湯本貴和(生態学研究センター) 相良直彦(京都工芸繊維大学・非常勤講師)

### 論文内容の要旨

世界の多くの温帯林の優占樹種は根圏において、根のまわりに真菌類が密にまとわりついた菌根(外生菌根)を形成しており、植物は同化産物を菌根菌に、菌根菌は吸収した無機塩類を植物に与えるという共生関係がそこに成り立っている。これらの森林には、土壌に尿素を施与するとそこから特異的に子実体が発生する真菌類、すなわちアンモニア菌が分布している。本論文は、尿素施与後のアンモニア菌の子実体形成と菌根形成を追跡することによって、森林生態系におけるアンモニア菌群集の動態を明らかにしようとしたものである。

本論文は8章よりなっている。第1章では、これまでの真菌類の群集研究を概観し、菌糸による種の同定の困難さが真菌類の生態研究を遅らせてきたことを紹介し、菌糸の同定にDNAの分析を援用することによって生態研究が飛躍的に進展するであろうという展望を示している。

第2章では、尿素施与の実験を行った京都近郊の森林の植生を記述し、優占樹種が外生菌根性のブナ科であることを報告している。第3章では、コナラ林への尿素施与実験をもとに、一般に稀なキノコとして知られていたウラムラサキが、尿素施与区に発生するアンモニア菌であることを明らかにした。

第4章では、尿素の施与時期や植生の違いがアンモニア菌の遷移に与える影響を明らかにするため、シイが優占する照葉樹林とコナラが優占する落葉広葉樹林において、春、夏、冬に尿素施与をおこない、アンモニア菌の子実体形成を追跡した。その結果、冬以外であれば、施与時期や植生の違いにかかわらず、施与後約1カ月で腐生性のアンモニア菌(遷移前期菌)が子実体を形成した。その後、決まった季節(6月および10月)に、菌根性のアンモニア菌(遷移後期菌)が子実体形成を行った。雨量は遷移前期菌の子実体形成時期に影響を与えたが、遷移後期菌の子実体形成時期にはほとんど影響を与えなかった。

第5章では、土壌中の尿素加水分解酵素ウレアーゼの活性を、異なる植生間で比較した。林床に施与された尿素がどのようにアンモニアに分解されていくかは、アンモニア菌にとっての土壌環境を理解するうえで重要である。分析の結果、ウレアーゼ活性は鉅質土壌層よりも粗腐植層で高く、植生間でほとんど差がなかった。このことは、遷移前期菌の子実体形成がどの植生でも同調するという前章の観察結果を補強するだけでなく、土壌中のアンモニア量が遷移前期菌の子実体形成の開始に影響していることを示唆している。

第6章では、尿素施与土壌から取り出した菌根の形態識別とPCR-RFLP法を使ったDNA分析によって、アンモニア菌の菌根の同定と定量を行い、菌根菌群集の遷移を追跡した。菌根から取り出したrDNAをポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によって増幅し、4つの制限酵素を使ってrDNAのITS領域の制限酵素断片長(RFLP)の変異を見ることによって、菌根菌の種が識別されることを確認したのち、菌根を形成している菌糸と子実体のRFLPを比較して菌根菌の種を同定していった。調査地で子実体が最も優占的だったアカヒダワカフサタケモドキとアカヒダワカフサタケは、子実体の形態では区

別することができたが、菌根の形態だけでは区別することがこれまで困難だった。今回、PCR-RFLP法を使うことによって、両者の菌根を識別することが可能になり、さらにその情報を形態観察に援用することによって菌根の微細形態だけでも両種を区別することが可能になった。こうして、根圏に生活しているアンモニア菌群集を定量的に分析することが可能となったわけである。この手法を用いることによって、春の尿素施与後1カ月ほどでアンモニア菌の菌根が形成され、菌根量は2カ月後に上限に達すること、子実体形成時には菌根量が半分以下になるが、その1カ月後には回復することが明らかになった。またこの分析により、多くの真菌類が子実体を形成することなく菌根としてアンモニア施与区に存在していることが明らかになった。こうして、これまで子実体の発生からしか推測できなかった根圏におけるアンモニア菌群集の遷移過程が初めて解明された。

第7章では、世界の温帯林に遍在する不完全菌 *Cenococcum geophilum* の菌根量を追跡することによって、尿素施与後の根圏環境の回復過程を調査した。この菌の菌糸は非常に特徴的な形態を持っているために識別が容易であり、また非常に普遍的な菌なので、非アンモニア菌の指標種として適している。その結果、*C. geophilum* は、遷移後期菌が子実体を形成する時期（早くて施与後6カ月）にすでに回復しつつあることが明らかになった。

本研究は、形態識別に加えて、DNA分析を用いた菌根菌の同定と定量を行うことによって、尿素施与後に地下の根圏で進行するアンモニア菌群集の動態を初めて明らかにした。尿素施与によっていつでも子実体形成を誘導できるアンモニア菌は、真菌類の群集研究のモデルシステムとなりうるもので、本研究のようにアンモニア菌の子実体形成と菌根形成を同時に調査することにより、真菌類群集の構造や動態の理解がいつそう進むと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

真菌類は森林生態系の中で、落葉・落枝の分解者として、また植物の菌根共生者として、生態系の維持に非常に大きな貢献をしている。しかし真菌類は、キノコに代表されるような子実体を形成する時以外は、菌糸という微小でかつ識別困難な形態で隠蔽的な生活しているため、その生態研究はこれまで困難が付きまっていた。また、その子実体すらも、短命で、しかも予兆なく地上に出現するために、その追跡は困難を極めていたのである。

本学位申請論文は、森林土壌に尿素を施与することによって一群の真菌類（アンモニア菌）の子実体形成を誘導し、DNAの分析を援用しつつ菌糸の同定と定量を行うことによって、真菌類群集の動態を明らかにしようとしたものである。

本論文は8章から成り、第1章では、菌糸の同定と定量の困難さが真菌類の生態研究を遅らせてきたことを概観し、DNAの分析を援用することによって生態研究が飛躍的に進展するであろうという展望を示している。第2章では、アンモニア菌の実験を行った森林の植生を記述し、優占樹種が外生菌根性のブナ科の2種（シイとコナラ）であることを報告している。第3章では、京都近郊のコナラ林への尿素施与実験をもとに、一般に稀なキノコとして知られていたウラムラサキが、尿素施与区に発生するアンモニア菌であることを明らかにした。

第4章では、尿素の施与時期や植生の違いがアンモニア菌の遷移に与える影響を明らかにするため、シイが優占する照葉樹林とコナラが優占する落葉広葉樹林において、春、夏、冬に尿素施与を行い、アンモニア菌の子実体形成を追跡した。その結果、冬以外であれば、処理時期や植生の違いにかかわらず、遷移前期菌は尿素施与後約1カ月で、遷移後期菌は決まった季節に子実体形成を行うことを見いだした。この結果は、アンモニア菌の子実体形成を誘導する刺激の解明につながる成果だといえる。

第5章では、アンモニア菌群集の遷移にとって重要な尿素の分解速度が植生間で違うのかどうかを調べるため、土壌中の尿素加水分解酵素ウレアーゼの活性を、シイ林とコナラ林で比較した。その結果、ウレアーゼ活性は植生間でほとんど差がないことが明らかになった。この結果は、土壌中のアンモニア量が遷移前期菌の子実体形成の開始に影響していることを示唆した点で意義深い。

第6章では、尿素施与区の土壌から取り出した菌根の形態識別とPCR-RFLP法を使ったDNA分析によって、アンモニア菌の菌根の同定と定量を行い、菌根菌群集の遷移を追跡している。菌根から取り出したrDNAをポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によって増幅し、制限酵素を使ってrDNAのITS領域の制限酵素断片長（RFLP）の変異を見ることによって、菌根菌の種が識別されることをまず確認している。この結果をふまえ、菌根を形成している菌糸と子実体のRFLPを比較

しながら、菌根菌の種を同定していったのである。この方法を使うことによって、菌根形態だけでは識別困難だった菌根菌の種を DNA から識別することが可能になり、さらにその情報を形態観察に援用することによって菌根の微細形態だけからもそれらを同定することが可能になった。その結果、本研究は、春の尿素施与後一カ月ほどでアンモニア菌の菌根が形成され、菌根量は2カ月後に上限に達すること、子実体形成時には菌根量が半分以下になるが、その1カ月後には回復することを明らかにした。この成果は、これまで子実体の発生からしか推測できなかった根圏におけるアンモニア菌群集の遷移過程を初めて定量的に追跡したものとして高く評価できる。またこの分析は、多くの真菌類が子実体を形成することなく菌根としてアンモニア施与区に存在していることを明らかにした。現在、多くの真菌類が、記載されるのを待たずに絶滅しつつあるが、生態系の中での真菌類の多様性を評価するためにも、本論文で試みられた手法は有用であると考えられる。

第7章では、世界の温帯林土壌に遍在する不完全菌 *Cenococcum geophilum* の菌根量を追跡することによって、尿素施与後の根圏環境の回復過程を調査した。その結果、遷移後期菌が子実体形成をする時期（早くて施与後6カ月）に、この菌根菌がすでに回復しつつあることが明らかになった。

本研究は、形態識別に加えて DNA 分析を用いた菌根菌の同定と定量を行うことによって、尿素施与後に地下の根圏で進行するアンモニア菌群集の動態を初めて明らかにしたものと言える。尿素施与によっていつでも子実体形成を誘導できるアンモニア菌は、真菌類の菌群研究のモデルシステムとなりうるものであり、本研究のようにアンモニア菌の子実体形成と菌根形成を同時に調査することにより、真菌菌群集の構造や動態の理解がいつそう進むと考えられる。

以上、本研究の成果は、アンモニア菌群集の動態を、地上における子実体形成と地下での菌根形成の二つの側面から初めて明らかにしたものであり、今後のこの分野の研究に新たな展開を与えるものであると言える。

本申請者が所属する人間・環境学専攻自然・人間共生基礎論講座の目的の1つは、生態系の中に無数に存在する生物どうしの共生関係の動態と維持機構を探究することであり、本研究は、この目的に沿ったものと言える。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年1月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。