

|          |                                                                                                                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名      | 高 津 文 人                                                                                                                                              |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (理 学)                                                                                                                                            |
| 学位記番号    | 理 博 第 2220 号                                                                                                                                         |
| 学位授与の日付  | 平 成 12 年 3 月 23 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   | 理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻                                                                                                                                |
| 学位論文題目   | $^{13}\text{C}$ and $^{15}\text{N}$ natural abundances in the fungal body and their ecophysiological implications<br>(菌体の炭素・窒素安定同位体自然存在比とその生理生態学的意味) |

論文調査委員 (主 査) 教 授 和田英太郎 教 授 浅野 透 助教授 村上 哲明

### 論 文 内 容 の 要 旨

陸上植物と高等菌類の相互作用は陸上生態系の生産と分解という重要な2つのプロセスに深く関係している。しかし、木材腐朽や菌根共生系における物質の動態またそれを担う生物体の空間構造の把握は困難を極める。木材や土壌といった物質的に不均一な3次元構造の中に侵入した菌糸と基質や宿主との接触部位における物質の動態を高感度で検出する解析法が適用されなかったことによる。本研究では不均一場における菌類の物質代謝の変化を解析する新たな手法として、安定同位体自然存在比精密測定法という高感度・高精度の測定法を用い、物質動態や反応機構を解析した。

研究1) 多様な生態の担子菌類の子実体の炭素、窒素安定同位体比を測定し、その基質もしくは宿主植物の同位体比と比較し、パターン化した。88属115種におよぶ解析の結果、木材腐朽菌で炭素安定同位体比が高く、外生菌根菌では窒素安定同位体比が高くなり、両者を $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ 二次元グラフ上で区別できることが明らかとなった。木材腐朽菌は基質木材に比べて2.0-5.0 per milほど $^{13}\text{C}$ を濃縮し、外生菌根菌が表層土壌や宿主植物に比べて平均で6.1 per milほど $^{15}\text{N}$ を濃縮することも明らかになった。

研究2) 木材の分解過程で起こる腐朽菌菌体への $^{13}\text{C}$ の濃縮現象を明らかにするため、ブナ材の腐朽実験を行った。その結果、すべての腐朽菌で1.0-6.0 per milほど菌体に $^{13}\text{C}$ が濃縮すること、腐朽の程度に関わらず、腐朽材や菌体の炭素同位体比の一定であることから濃縮は菌体中に吸収された後の代謝過程で起こる同位体分別によると考えられた。また、グルコースを単一炭素源とする液体培地での培養実験の結果から、解糖系における同位体分別が菌体の炭素同位体比を上昇させたと考えられた。材の分解では菌体の炭素同位体比を上昇させる自己消化をくり返しながらか基質律速の取り込みをしていると考えられ、それが他の生物では見られないような $^{13}\text{C}$ の濃縮を引き起こしたと推測された。

研究3) 菌根菌から宿主植物への窒素フローは野外での宿主植物の窒素吸収の主要な経路である。にもかかわらず、野外では宿主植物は外生菌根菌と比べ $\delta^{15}\text{N}$ が低い。これは外生菌根菌から供給されるグルタミンの $\delta^{15}\text{N}$ が低いことを示唆している。無菌根アカマツと菌根アカマツの $\delta^{15}\text{N}$ を比較した結果、菌根アカマツの針葉の $\delta^{15}\text{N}$ は無菌根アカマツより低くなり、共生菌菌体の $\delta^{15}\text{N}$ は窒素源の肥料の $\delta^{15}\text{N}$ より高くなった。以上の現象は菌根菌から宿主植物に輸送されるグルタミンの低い $\delta^{15}\text{N}$ で説明でき、菌根共生の発達したトレイのアカマツ針葉ほど $\delta^{15}\text{N}$ が低下したため、宿主植物の $\delta^{15}\text{N}$ は菌根共生の強弱の指標になることも示唆された。

研究4) 木材腐朽菌は窒素をほとんど含まない培地上で生育することができるが、菌体中の窒素の再分配、維持については不明な点が多い。腐朽実験の結果、どの菌でも分解初期に菌体の $\delta^{15}\text{N}$ の著しい低下がみられ、系全体の窒素量は増大した。このことは菌による $\delta^{15}\text{N}$ の低い外来性窒素ガス( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_x$ )の吸収を意味している。分解初期の外来性窒素ガスの吸収がなければ材の分解の遅れることが推察された。

以上の結果から、炭素・窒素安定同位体比測定法を応用したことで、菌の基質の違いに加え、速度論的同位体効果を検出

することで、菌の成育段階にともなう菌体内の代謝経路の変化を解析することが可能となった。菌が炭素飢餓状態の時に菌体内、代謝産物中に $^{13}\text{C}$ をより濃縮すること、また材腐朽の分解初期に菌のガス状窒素の吸収能力が高いことが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は陸上生態系の生産と分解という重要なプロセスに深く関係した陸上植物と高等菌類の相互作用を物質代謝の側面から解析している。木材腐朽や菌根共生系における物質の動態またそれを担う生物体の空間構造の把握は従来の方法では困難を極め、木材や土壌といった物質的に不均一な3次元構造の中に侵入した菌糸と基質や宿主との接触部位における物質の動態を高感度で検出する解析法の適用が待たれていた。本研究では不均一場における菌類の物質代謝の変化を解析する新たな手法として、高感度・高精度な安定同位体自然存在比精密測定法を用い、物質動態や反応機構を解析した点が独創的と評価できる。

研究1)では多様な生態の担子菌類の子実体の炭素、窒素安定同位体比を測定し、その基質もしくは宿主植物の同位体比と比較している。88属115種におよぶ解析の結果、木材腐朽菌は炭素安定同位体比が高く、外生菌根菌は窒素安定同位体比が高くなり、両者を $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ 二次元グラフ上で区別できることを示した。木材腐朽菌が木材基質に比べて $^{13}\text{C}$ を濃縮し、外生菌根菌は表層土壌や宿主植物に比べて $^{15}\text{N}$ を濃縮することも明らかにした。

研究2)木材の分解過程で起こる腐朽菌菌体への $^{13}\text{C}$ の濃縮現象を明らかにするため、ブナ材の腐朽実験を行っている。その結果、すべての腐朽菌で1.0-6.0 per milほど菌体に $^{13}\text{C}$ が濃縮すること、腐朽の程度に関わらず、腐朽材や菌体の炭素同位体比の一定であることから濃縮は菌体中に吸収された後の代謝過程で起こる同位体分別によることを示した。また、グルコースを単一炭素源とする液体培地での培養実験の結果から、解糖系における同位体分別が菌体の炭素同位体比を上昇させたことと指摘し、材の分解での菌体の $^{13}\text{C}$ が濃縮が大きいのは自己消化と基質律速の取り込みによると解析した点が評価できる。

研究3)野外で宿主植物は外生菌根菌と比べ $\delta^{15}\text{N}$ が低いとの研究1)の結果から、外生菌根菌から供給されるグルタミンの $\delta^{15}\text{N}$ の低いことが示唆された。半自然条件下での共生実験では、菌根アカマツの針葉の $\delta^{15}\text{N}$ は無菌根アカマツより低くなり、共生菌菌体の $\delta^{15}\text{N}$ は窒素源の肥料の $\delta^{15}\text{N}$ より高くなった。以上の現象は菌根菌から宿主植物に輸送されるグルタミンの低い $\delta^{15}\text{N}$ で説明でき、菌根共生の発達したトレイのアカマツ針葉ほど $\delta^{15}\text{N}$ が低下したため、宿主植物の $\delta^{15}\text{N}$ は菌根共生の強弱の指標になることを明らかにした。

研究4)木材腐朽菌は窒素欠乏の培地で生育することができるが、菌体中の窒素の再分配、維持には不明な点が多い。腐朽実験の $\delta^{15}\text{N}$ の変動を解析した結果、どの菌でも分解初期に菌体の $\delta^{15}\text{N}$ が著しく低下し、系全体の窒素量が増大した。この事実は菌による $\delta^{15}\text{N}$ の低い外来性窒素ガス( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_x$ )の吸収を意味し、分解初期の外来性窒素ガスの吸収が材の分解を促進することを指摘した。

以上の4研究から、炭素・窒素安定同位体比測定法は、菌の基質の違いを解析できる上に、速度論的同位体効果を検出することで、菌の成育段階にともなう菌体内の代謝経路の変化を検出できたことを初めて示した点で今後の菌類生態学の進展に大きく寄与した研究であると評価できる。また、6篇の参考論文では湿原植物体の $\delta^{15}\text{N}$ が種間で利用する泥炭中の窒素の垂直的食分けを示すことや選択的呼吸阻害法によるブナ種子の腐朽微生物フロアの解析など、申請者の問題意識の広さと分析的な研究能力を示すものである。

よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。平成12年1月19日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。