



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 木材腐朽菌に対する樹皮の恒常的防御機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                                 |
| Author(s)           | 小山, 正登                                                                                                  |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第16271号                                                                                                |
| Issue Date          | 2025-03-25                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/94926">https://hdl.handle.net/2115/94926</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | KOYAMA_Masato_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                     |



# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 小山 正登

## 学 位 論 文 題 名

### 木材腐朽菌に対する樹皮の恒常的防御機構に関する研究

樹皮は、樹木の枝・幹・根の最外層を構成し、病原菌の樹体内への侵入を防ぐ保護組織として重要な役割を担う。樹皮の防御機構を理解することで、病原菌の感染経路の解明や、樹木病害の防除法の開発につながる可能性がある。樹皮の防御機構は、菌の侵入を感知する前から常に存在する恒常的防御と、菌の侵入を感知した後に働く誘導防御から構成される。恒常的防御は、防御の第一線を担っているが、そのバリアが破られると、誘導防御が働く。その機構については、病害が大流行した樹種を対象に、生立木や苗木の樹皮に病原菌を接種し、その応答（保護組織の形成、二次代謝産物の蓄積）を解析することで調べられてきた。しかしながら、そのような接種試験では、感染前に存在する恒常的防御の影響を排除できていないという課題があり、防御機構の全容（両防御機構による複合的な影響）を解明するためには、まずは恒常的防御のみの影響を調べる必要がある。

樹皮の恒常的防御機構として、スベリン化したコルク組織によって病原菌の樹体内部への侵入を物理的に妨げること、あるいは毒性や抗菌活性を示す二次代謝産物によって病原菌の繁殖を化学的に抑制することが考えられる。コルク組織については、スベリンの局在、量、機能についての知見が蓄積されつつある。化学的な抑制については、健全な樹皮組織に蓄積する様々な抗菌成分に関する報告が多いが、その大半は薬効成分の探索を目的としており、恒常的防御にどのように寄与するのかを解析した報告例は限られる。そこで本研究では、樹皮組織の化学的な恒常的防御機構に関する知見を得ることを目的として、第一に樹皮組織の木材腐朽菌（カワラタケ）に対する抗菌活性を評価する手法（培養系）を考案し、北海道産 25 樹種について抗菌活性を調べた。第二に、25 樹種の中で際立って高い抗菌活性が見出されたナナカマドの樹皮の抗菌活性発揮メカニズムを解析した。

#### (1) 樹皮組織の抗菌活性評価試験

化学的防御に関する研究として、樹皮の抽出成分の抗菌活性を調べた研究が散見される。一方で、その手法では抽出過程で揮発性成分が失われる可能性や、抽出成分が樹皮のどの組織に蓄積するのか、その局在性が考慮されていないという課題があった。そこで、溶媒による抽出処理をせず、新鮮な含水状態から凍結乾燥のうえ  $\gamma$  線（線量：15 kGy）滅菌した樹皮組織片をカワラタケとともに寒天培地に置床した際のカワラタケの菌糸成長阻害により、樹皮組織の抗菌活性を評価する手法を考案した。この独自手法により 25 樹種について調べた結果、ナナカマドの内樹皮が

際立って高い抗菌活性を示した。カワラタケと樹皮片との間の培地を溝状に除去しても同じ活性が見られたことから、その抗菌成分は揮発性であることが示唆された。このほかにも、エゾヤマザクラの外樹皮、エゾマツの内樹皮、およびホオノキの内樹皮が、ナナカマドの内樹皮よりも低いレベルではあったものの、抗菌活性を示した。これに対して他の 21 樹種では、抗菌活性をほとんど示さなかった。本培養系で抗菌活性が見られたナナカマドおよびエゾヤマザクラについては、溶媒抽出物での評価による既往の研究においてカワラタケに対する抗菌活性が認められなかったことから、本培養系は、従来の抽出に基づく手法では検出され難い化学的防御機構を備える樹皮組織を持つ樹種を見い出すのに有用であると結論された。

また、本培養系は、樹皮試料の前処理として  $\gamma$  線滅菌が必要であるが、 $\gamma$  線照射による樹皮組織の含有成分への影響が懸念されるため、出来る限り低い  $\gamma$  線線量で滅菌することが望まれる。そこで、樹皮組織片を滅菌するのに必要な  $\gamma$  線の線量について北海道産 16 樹種を用いて検証した。16 樹種中 9 樹種で 6 kGy、4 樹種で 9 kGy、2 樹種で 12 kGy、1 樹種で 15 kGy の線量が必要であった。よって、温帯地域に生育する樹木の樹皮試料を滅菌するには、15 kGy の  $\gamma$  線線量が妥当であることが示唆された。

## (2) ナナカマドの樹皮の抗菌活性発揮メカニズムの解析

先行研究では、ナナカマドの樹皮にはシアノゲン配糖体であるアミグダリンが含まれており、それらが酵素 ( $\beta$ -グルコシダーゼ) によって加水分解されると、シアン化水素 (HCN) およびベンズアルデヒドが生成されることが報告されている。そこで、ナナカマドの内樹皮がカワラタケに対して示す高い抗菌活性に HCN が寄与しているか否かを明らかにするため、上記の加水分解の関連物質の定量分析、抗菌活性試験、生立木からの発生確認試験を行った。まず、液体クロマトグラフィー質量分析法により、ナナカマドの内樹皮にアミグダリンの存在が確認された。次に、ペーパーディスク法を用いて、アミグダリンがその加水分解酵素である  $\beta$ -グルコシダーゼと共存すると発生する HCN がカワラタケの菌糸成長を強く阻害することを示した。さらに、HCN の存在下で黄色から赤褐色に変色するピクリン酸紙を用いて、(1) の抗菌活性評価試験と同状態の ( $\gamma$  線滅菌処理した) ナナカマド内樹皮片から HCN を検出した。加えて、ナナカマド生立木の無傷の外樹皮表面からは HCN は検出されないが、外樹皮を剥ぎ内樹皮を露出させるとシアン発生植物に相当する量の HCN が放出されることを明らかにした。また、ナナカマドの樹皮組織からの内生菌の単離・同定を試みたところ、内樹皮からは内生菌が検出されず、ナナカマドの樹皮組織に内在する菌類が抗菌活性に関与する可能性は低いことが示された。以上の結果から、ナナカマドの内樹皮が寒天培地上でカワラタケに対して示した抗菌活性に、アミグダリン分解経路で発生する HCN が寄与していることが証明された。

シアン発生植物の健全な組織では、シアノゲン配糖体とその分解酵素は空間的に隔離されていることが知られている。本研究では、ナナカマドの樹皮の剥離および凍結乾燥の過程で内樹皮の細胞構造が破壊され、アミグダリンと  $\beta$ -グルコシダーゼが接触したと考えられる。ナナカマド樹皮の化学的な恒常的防御機構として、内樹皮が傷つくと、内樹皮に蓄積されているアミグダリンが  $\beta$ -グルコシダーゼと接触し、アミグダリンの加水分解によって放出される HCN が木材腐朽菌 (カワラタケ) の菌糸成長に好ましくない環境を速やかに作り出すと考えられる。