



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 [全文の要約]
Author(s)	小山, 正登
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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	https://hdl.handle.net/2115/94928
Type	doctoral thesis
File Information	KOYAMA_Masato_summary.pdf



【課程博士】

博士論文の要約

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

1. 論文構成

本論文は、図 26、表 13 を含む計 101 頁、4 章構成の和文論文である。他に参考論文 2 編が添えられている。

2. 研究の背景と目的（第1章）

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2章）。その培養系では、樹皮試料の前処理として γ 線滅菌が必要であるが、 γ 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 γ 線線量で滅菌することが望まれる。そこで、樹皮片を滅菌するのに必要な γ 線の線量についても検討した（第2章）。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（第3章）。具体的には、抗菌活性に寄与する可能性のある成分の検出およびカワラタケに対する抗菌活性評価試験を実施した。また、ナナカマドの樹皮組織から内生菌を単離し、シーケンス解析で種推定を行うことで内生菌相を明らかにし、内生菌がナナカマド内樹皮のカワラタケに対する抗菌活性に寄与する可能性についても検討した（第3章）。

3. 実験方法

第2章：樹皮組織の抗菌活性

＜抗菌活性評価試験＞北海道大学研究林・構内にて、針葉樹 5 樹種、広葉樹 20 樹種から樹皮を採取した。外樹皮と内樹皮に分け、小片（3 cm × 3 cm）に切り分け凍結乾燥した後、15 kGy の線量で γ 線滅菌を行った。これをカワラタケの接種片とともに寒天培地上で培養した。また、コントロールとしてカワラタケのみを置いた培地も作り、同様に経過を観察した。ナナカマドとエゾマツについては、それらの樹皮に含まれる抗菌活性成分が揮発性か否かを確かめるため、カワラタ

ケと樹皮片との間の培地を溝状に除去する実験も行った。＜樹皮片の γ 線滅菌の条件検討＞抗菌活性評価試験に用いた25樹種の中から16樹種を用いて、各樹種の樹皮片を3 kGy刻みで γ 線照射を行い、寒天培地の中央に置き、10日間培養した。樹皮片より微生物が出現したシャーレの数を数え、各 γ 線線量における微生物が出現しなかった樹皮片の割合を算出した。

第3章：ナナカマド樹皮の抗菌活性発揮メカニズムの解析

＜抗菌活性評価試験＞ナナカマドの樹皮には、シアノゲン配糖体である amygdalin が含まれ、これが酵素的に分解されるとシアン化水素 (HCN) が発生することが知られているため、HCN がカワラタケに対する抗菌活性に寄与する可能性が考えられた。そこで、まずはナナカマド内樹皮における amygdalin の存否を調べた。内樹皮片を破碎し、ソニケーション (30 min×4) で水抽出物を得た。水抽出物を遠心分離 (1800×g, 4°C, 10 min) し、上清を回収した後、LC-MS 分析に供した。260 nm の吸収に基づき amygdalin を定量した。次に、HCN がカワラタケの成長を阻害するかどうかを検証するために、ペーパーディスク法を用いた抗菌活性評価試験を行った。まず、定量した amygdalin の値を用いて、培地に置いた内樹皮片に含まれる amygdalin 量 (mol) を求め、それと等モル、1/2 倍量、1/4 倍量の amygdalin + β -glucosidase 溶液、amygdalin 溶液、 β -glucosidase 溶液、KCN + benzaldehyde 溶液、KCN 溶液、および benzaldehyde 溶液を寒天培地上に置いた 10 mm 径のペーパーディスクに浸み込ませた。上記の樹皮組織の抗菌活性評価試験と同様に、カワラタケに対する抗菌活性を評価した。＜内樹皮片からの抗菌成分の検出＞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、内樹皮からの HCN の発生の有無を検証した。上記の抗菌活性評価試験で用いたものと同状態の内樹皮片を寒天培地上の中央に溝を設けたことで分断された一方の培地上に置き、他方の培地側のシャーレの蓋の内側に両面テープでピクリン酸紙を貼り付け、蓋を閉めてピクリン酸紙の変色の様子を観察した。＜立木からの抗菌成分の検出＞北海道大学札幌実験苗畑のナナカマド3個体を用いた。樹幹の胸高部に 4.5 cm×2 cm (樹軸方向×接線方向) の範囲で外樹皮を剥いだ。すぐさま特注の蓋つき密閉型チャンバーで傷口を覆い、チャンバーと樹皮表面の間の隙間をパテで充てんし、ナイロンバンドで幹に括り付けた。チャンバーの扉を開けて、内部にピクリン酸紙 (4 cm×1 cm) を針金で吊り下げてから密封し、ピクリン酸紙の変色の様子を観察した。また、コントロールとして、外樹皮を剥がしていない部分も同様にチャンバーで覆い、ピクリン酸紙の変色の様子を観察した。＜HCN の定量＞ピクリン酸紙から 50% ethanol 水溶液により赤褐色の成分を抽出し、分光光度計を用いて抽出物の吸光度を測定した。標品 KCN の検量線を用いて、赤褐色の成分の吸光度から HCN 量を算出した。＜樹皮の内生菌相解析＞札幌実験苗畑にて採取し、約4か月間の冷凍保存 (−80°C) していたナナカマドの樹皮を 5 mm×5 mm (樹軸方向×接線方向) に切り分け、「樹皮全体」、「外樹皮のみ」、内樹皮のみ (「内樹皮Ⅰ」：外樹皮との境界付近を含むもの、「内樹皮Ⅱ」：外樹皮との境界付近を含まないもの) の4種のサンプルを用意した。続いて、表面殺菌を行い、寒天培地に置床した。樹皮片の周りに伸張した菌叢が適当な大きさになるまで培養した後、新たな寒天培地に植え継いで純化を行った。単離後に、冷凍保存しておいた内生菌の菌叢から、ISOPLANT を用いて DNA を抽出した。PCR 増幅を行い、得られた PCR 産物を精製した後、rDNA の 5.8S 領域を含む ITS 領域のシーケンス解析から菌種を推定した。

4. 結果と考察

第2章：樹皮組織の抗菌活性

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 γ 線 (線量：15 kGy) 滅菌した樹皮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出すのに有用であると考えられる。

樹皮片を滅菌するのに必要な γ 線の線量について検証した結果、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ほとんどの樹種、特に広葉樹の樹皮組織の滅菌には 15 kGy で十分であるが、針葉樹の樹皮組織の完全な滅菌には 18 kGy がより望ましいと考えられる。

第 3 章：ナナカマド樹皮の抗菌活性発揮メカニズムの解析

ナナカマド内樹皮の水抽出物から amygdalin が検出され、その濃度は 11.4 mg/内樹皮片(生材重量 4.44 g)であった。また、ペーパーディスク法を用いた抗菌活性評価試験の結果、amygdalin + β -glucosidase 溶液、KCN + benzaldehyde 溶液、および KCN 溶液（等モル量）でカワラタケの菌糸成長が強く阻害された。一方、amygdalin、 β -glucosidase、および benzaldehyde 溶液単独では、抗菌活性はほとんど認められなかった。また、ピクリン酸紙試験の結果、内樹皮片および立木の露出した内樹皮表面から HCN の発生が確認された。内樹皮より発生した HCN を定量したところ、シアン発生植物に相当する量の HCN が発生すると考えられた。さらに、内生菌相解析の結果、「内樹皮 I・II」から内生菌は検出されず、「樹皮全体」および「外樹皮のみ」から内生菌が検出されたことから、内樹皮に存在する内生菌が抗菌活性に寄与する可能性は低いと考えられた。加えて、内生菌の検出頻度は「樹皮全体」より「外樹皮のみ」の方が高く、「樹皮全体」と「外樹皮のみ」で菌類の種構成が異なっていた。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、amygdalin 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、amygdalin と β -glucosidase が接触したと考えられる。

5. 総合考察と結論（第 4 章）

以前の研究では、ナナカマドの樹皮にシアノゲン配糖体 (amygdalin, prunasin) が含まれること、およびシアノゲン配糖体が β -glucosidase によって加水分解されると HCN が生じることが知られていた。本研究では、ナナカマドの内樹皮から実際に HCN が発生し、その HCN は木材腐朽菌（カワラタケ）の菌糸成長を阻害することを明らかにした。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 amygdalin が β -glucosidase と接触し、amygdalin の加水分解によって放出される HCN が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。ナナカマドは、道内に多く植栽されている樹種であるが、胴枯れや枝枯れをおこしているものが多いとされている。本研究で得られた知見を基に、ナナカマドを含むシアン発生植物の樹皮における HCN の防御機能を実証し、amygdalin をはじめとするシアノゲン配糖体のバイオマーカーとしての有用性を検証していくことで、樹木病害対策への貢献が期待できる。

6. 参考論文（2 編）

- 1) Koyama M, Tamai Y, Shigetomi K, Sano Y. 2024. Evaluation of antifungal activities of woody plant barks using an incubation system with *Trametes versicolor*. *Trees- Structure and Function*, **38**: 37–47.
- 2) Koyama M, Shigetomi K, Tamai Y, Arakawa K, Sano Y. 2025. Constitutive chemical defense mechanisms of inner bark of *Sorbus commixta* against *Trametes versicolor*. *Tree Physiology*, **45**: tpaf006.