

鉾山跡地に自生するアオキ (*Aucuba japonica* Thunb.) の
重金属耐性と内生菌 *Pezicula ericae* の機能に関する研究

2022年1月

土山紘平

鉦山跡地に自生するアオキ (*Aucuba japonica* Thunb.) の
重金属耐性と内生菌 *Pezicula ericae* の機能に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

持続環境学専攻

博士(環境学)学位論文

土山紘平

要旨

日本には約 5000 箇所の休廃止鉱山が存在し、中でも約 450 箇所の鉱山では現在も鉱害防止対策が必要とされている。一部の鉱山跡地では、現在も土壌の酸性化及び高濃度の重金属が原因で植生が回復していない土地が存在しており、重金属ストレス環境で生育が可能な植物種、及びその耐性機構に関して、基礎的知見の蓄積が必要とされている。近年、植物組織内に無病徴で感染する微生物（内生菌）が、植物の金属ストレス耐性を増強することが知られている。しかし、鉱山跡地に生育する植物種に内生菌が与える影響について、野外調査を基に解明した研究例は少ない。本研究では、土壌が酸性を呈し重金属元素を含有する日立鉱山跡地を調査地とし、遷移中期樹種として自生するアオキ (*Aucuba japonica* Thunb.) の重金属耐性機構を解明するとともに、内生菌がアオキの重金属耐性に与える影響を解明することを目的とした。

アオキの根域土壌の pH (H₂O) 及び重金属元素濃度を測定した結果、根域土壌は一般的な日本の森林土壌に比べ、高濃度の重金属を含有し、酸性を呈していた (pH 4.7)。アオキの葉、枝、細根における重金属元素濃度を測定したところ、細根に高濃度の重金属元素 (Cd, Cu, Pb, Zn) を蓄積しており、中でも Zn 濃度は植物が毒性を示すとされる濃度を超過していた。このことから、アオキは何らかの Zn 解毒機構を有していると考えられた。Zn の解毒に関与する代謝産物 (フェノール性化合物, 有機酸等) を分析した結果、細根には高濃度の aucubin 及び citric acid が含有されていたことから、これらの解毒物質がアオキの Zn 耐性に寄与していることが示唆された。Zn の蓄積が確認された細根から切片を作製し、Zn の局在観察を実施したところ、Zn は表皮と皮層の細胞壁に局在していた。したがって、細胞壁での吸着隔離 (物理的防御) が Zn の解毒に寄与していると考えられた。また、Zn の局在は細胞内部でも確認されたため、アオキが産生する aucubin 及び citric acid 等による解毒 (化学的防御) が寄与していると考えられた。切片を trypan blue 染色後に観察したところ、皮層細胞内部への内生菌の感染と、Zn の蓄積が確認されたことから、内生菌の感染がアオキへの Zn 毒性を軽減していることが考えられた。アオキは、リョウブやクマノミズキが上層木として存在する落葉混交林の林床に自生しており、気温と光強度が異なる夏季と冬季で、Zn 耐性機構に変化が生じる可能性があった。しかし、夏季と冬季で光合成速度を実測し、上記の分析及び観察を両時期で実施した結果、光合成速度は維持されており、Zn 濃度、解毒物質濃度、及び Zn の局在に大きな変化は確認されなかった。以上から、アオキは気温と光強度が異なる夏季と冬季でも、上記の Zn 解毒機構を維持することで、調査地への定着を可能としていると考えられた。遷移中期樹種としてのアオキの性質に着目すると、アオキは 1 年を通して極めて高濃度の aucubin 産生していた。これは、林床でも光合成を可能にし、かつ 1 年を通して生長量が小さく、解毒物質産生に炭素を投資する、遷移中期樹種としての性質が要因であると考えられた。

重金属ストレス環境における内生菌の機能を解明するため、アオキの細根に感染する糸状菌の観察、及び内生菌の分離を実施した。その結果、細根には内生菌と AM 菌の感染が確認され、表面滅菌した細根からは内生菌である *Pezizula* 属糸状菌が高頻度で分離された。分離された *Pezizula* 属糸状菌のうち、8 菌株について siderophore (重金属解毒物質) 産生活性を評価したところ、8 菌株全てが siderophore 産生活性を示した。これら 8 菌株は遺伝子同定により *Pezizula ericae* であることが判明した。活性が最も高かった *P. ericae* の w12-25 株が産生する siderophore を分離後、同定した結果、新規化合物である avenaciol であることが明らかとなった。さらに、avenaciol の生理活性を調べたところ、TLC バイオオートグ

ラフィーにより *avenaciol* が抗菌活性を示すことが確認された。以上から、*P. ericae* は、siderophore である *avenaciol* を産生することで、Zn 毒性を軽減するとともに、アオキの病原菌抵抗性の向上に寄与することが示唆された。

P. ericae の感染がアオキの重金属耐性に与える影響を詳細に解明するため、*P. ericae* の w12-25 株及び滅菌したアオキ実生を用いて、接種試験を実施した。その結果、*P. ericae* 接種区及び対照区でのアオキ実生の重金属元素濃度は低く、植物が生育阻害を示すとされる濃度の上限値を下回っていた。本結果は、調査地に自生する実生の重金属元素濃度と同様であったことから、アオキ実生は成木と異なる元素蓄積特性を有しており、体内の重金属元素濃度を低く維持することで、実生自身が重金属耐性を獲得していると考えられた。一方で、*P. ericae* 接種区では根の分岐数の減少が確認されたが、側根形成時は病原菌の感染を受け易いことを踏まえると、*P. ericae* の感染は土壌病原菌の感染抑制効果があると示唆された。*P. ericae* が産生する *avenaciol* が抗菌活性を示すこと、また調査地に自生する当年生実生高い生残率であったことを踏まえると、*P. ericae* は、アオキ実生への病原菌感染を抑制し、野外におけるアオキ実生の初期定着に寄与していることが示唆された。

以上から、アオキ成木は、細根に蓄積した高濃度の Zn に対して、1) 細胞壁での隔離、2) *aucubin* 及び *citric acid* の産生等の Zn 解毒機構を有し、気温や光環境が変化する落葉混交林の林床でも解毒機構を維持することで、Zn 耐性を示していると考えられた。アオキ成木においては、内生菌の Zn 吸着と、*P. ericae* の *avenaciol* 産生により Zn 毒性が軽減され、内生菌がアオキ成木の重金属耐性を高めていると考えられた。一方で、アオキ実生では、実生自身が体内の重金属元素を低濃度に維持することで、重金属耐性を獲得していることが明らかとなった。実生に高頻度に感染していた *Pezicula* 属糸状菌の機能としては、根の発達抑制、及び抗菌活性を示す二次代謝産物の産生により、実生への病原菌感染を抑制することで、野外におけるアオキ実生の初期定着に寄与していると推測された。このように、生育段階で異なる重金属蓄積特性を有するアオキに対して、*P. ericae* は、成木では Zn 毒性の軽減、実生では病原菌の感染抑制の機能を果たすことで、アオキの調査地への定着を促進していると考えられた。本研究においてアオキと内生菌の *P. ericae* で見られた関係性が、今後の鉱山跡地における緑化事業に基礎的知見を提供することを期待する。

キーワード： 鉱山跡地, 重金属ストレス, 遷移中期樹種, アオキ, *Pezicula ericae*