

生理活性物質を用いたマツタケの人工培養方法の研究 - アカマツデンプンの性状とマツタケの培養特性 -

藤原 直哉

Study of artificial culture method of Matsutake using a physiologically active substance

Naoya FUJIWARA

要 旨

藤原直哉：生理活性物質を用いたマツタケの人工培養方法の研究 岡山県農林水産総合センター森林研究所研報32：19-23（2016）アカマツの根の皮層細胞を観察し、特有のデンプンの蓄積を確認した。そこで、皮層細胞を破壊したところ、内部のアカマツデンプンを抽出することができたため、マツタケの糖質源として培地に添加して培養した。その結果、マツタケのコロニーを形成後、垂直方向に伸長する長い菌糸束が発生した。当所の実験で、従来から使用している培地では、この束状の気中菌糸の形成は、確認できなかったことから、マツタケの菌糸に、何らかの生理活性効果を持つ成分が、アカマツのデンプンに含まれている可能性が示唆された。また、非加熱殺菌したアカマツ細根の粉碎物で、マツタケ菌糸を培養した場合にもコロニーが形成され、菌糸束の形成が確認できた。そして培養後の培地に、デンプン分解酵素である、 α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの活性が確認され、マツタケ菌糸による糖化反応が起こっていることが示唆された。

これらのことから、マツタケの人工培養に関する、重要な手がかりが得られた可能性があると考えられた。

キーワード：アカマツ、デンプン、菌糸束、酵素、マツタケ

I はじめに

当所では、植物に含まれるフラボノイドの1種、ナリゲニンが、マツタケ菌糸の成長促進効果を示し、これが宿主アカマツの根に含まれていることを示した（藤原2013）。この実験結果から、アカマツの根に焦点を当てて研究を進めている。また自然界で、マツタケの糖質源が判明していないことから、アカマツの根の粉碎物と、その抽出物を、マツタケの培養に利用した。

この研究は、2013～2015年度に実施した単県課題「生理活性物質を用いたマツタケの人工培養方法の研究」で取り組んだ。

II 材料と方法

アカマツの細根粉碎物を培地として、マツタケ菌を培養した。次に、細根粉碎物からデンプンを分離し、同様に培養した。

1. アカマツの細根粉碎物によるマツタケ培養試験

2013年5月に、樹齢10年生のアカマツの根を掘り取り、水道水で洗浄後、自然乾燥し、15時間送風乾燥機（40℃に設定）で乾燥した後に、ハンマークラッシャー（三庄インダストリー製NH-34、2mmメッシュスクリーン使用）で、細根粉碎物に加工した。このアカマツの細根粉碎物10.0gを、9cmシャーレに入れ、その周囲をパ

ラフィルムで被覆後、非加熱滅菌法であるガンマ線滅菌処理（10kGy、コーガアイソトープ）を実施した。この細根粉碎物に、滅菌水20ml/個を添加し、培地とした（細根粉碎物A）。この培地には、乾燥を予防するため、適宜、滅菌水を補給した。コントロールとして、同じ細根粉碎物に滅菌水20ml/個を添加し、オートクレーブ滅菌（120℃、15分間）を行った（細根粉碎物B）。これらの培地に、コルクボーラーで打ち抜いたマツタケ種菌（菌株：美星77、直径5mm、以下、同様）を接種し、24℃、暗黒条件で6ヶ月間培養した。

2. マツタケのデンプン分解酵素の測定

マツタケ種菌を接種した細根粉碎物Aに形成されたコロニー（アカマツ+マツタケ）から培地を採取し、糖化力分別キット（キッコーマン製）で、デンプン分解酵素の糖化力を測定した。

なお、今回使用した細根粉碎物Aは、ガンマ線による非加熱殺菌処理を行っているため、細根粉碎物培地Aに含まれているアカマツ自身の酵素が不活性化されていない可能性があることから、同様に、細根粉碎物A自体の糖化力を測定した。この時の、基質の反応温度は45℃、反応時間を120分とした。

3. アカマツデンブンの観察

2013年3月と7月の2回、前述1の10年生アカマツの根を、カッターナイフで垂直に切断後、その断面をヨウ素染色液（ヨウ化カリウム 1.0g, ヨウ素 0.3g, 蒸留水 250ml）で染色し、微分干渉顕微鏡で観察した。

4. アカマツデンブンの抽出

前述1のアカマツの細根粉碎物に、蒸留水を10倍量（体積比）添加後、5分間振とうした。細根粉碎物の混合液を防虫ネット（0.4mm目）で粗ろ過後、ろ液を3時間静置し、沈殿物を得た。次に沈殿物を、ブッフナー漏斗で吸引ろ過（ADVANTEC製 5C）し、そのろ紙を冷蔵庫内で乾燥させた。ろ紙に付着した沈殿物は、スパーテルの柄ではく離させた後、茶こしで濾して粉末化し、アカマツのデンブンの粗精製物（以下、アカマツデンブン）として培養試験に供試した。

5. アカマツデンブンの測定

2013年12月から2014年5月まで、当研究所の苗畑で育成した2年生アカマツ苗木各3本の細根を採取し、粉末に加工後、粉末に含まれるデンブンの量と種類を、アミロース/アミロペクチン測定キット（日本バイオコン製）で、毎月の変化を測定した。

6. アカマツデンブンを利用したマツタケ培養試験

ハイポネックス寒天培地（ハイポネックス 0.5 g, イーストエキス 2.0 g, 寒天 15.0 g, 蒸留水 1,000 ml）に、グルコースの代わりに、前述4のアカマツデンブンを、40.0g/lの濃度で添加後、オートクレーブ滅菌（120℃, 10分間）した。この培地にマツタケの種菌を接種し、24℃, 暗黒下で6ヶ月間培養した。

コロニーの菌糸は、ファンギフローラY（トラストメディカル製）で染色し、蛍光観察した。

III 結果と考察

1. アカマツの細根粉碎物によるマツタケ培養試験

マツタケ菌糸の成長は非常に遅く、6ヶ月経過後に、直径3cm程度、白色のコロニーを形成した（図-1）。このコロニーは、培地の表層部に形成され、培地の底部には、菌糸は繁殖していなかった。また、培養開始から3ヶ月を経過した頃から、緑色のカビが発生した。これは、ガンマ線の照射による滅菌が充分ではないことを示唆し、培養期間を短縮するか、さらにガンマ線の照射量を増加する必要があるが、この場合でも完全滅菌には至らない懸念がある。またこのコロニーには、太さ27~70μmの菌糸束が形成され（図-2）、当所のこれまでの培養結果（藤原 2005）と異なる特徴を示した。この菌糸束は、周辺の多数の細い菌糸束と連結して

いた。従来の培養コロニーと異なり、マツタケの菌糸が集合性を示したことは、分化の兆候である可能性もあり（宍戸 1994）、重要な現象と思われた。なお、オートクレーブ滅菌した細根粉碎物Bでは、菌糸の伸長は確認できなかった。細根粉碎物を調べたところ、成長阻害作用を持つタンニンが検出されたが、特に細根粉碎物の溶出液に顕著であったことから、加熱滅菌によって細根粉碎物から溶出したタンニンが、マツタケ菌糸の成長に悪影響を与えていると考えられた。

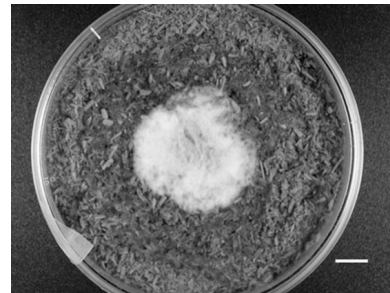


図-1 アカマツ細根粉碎物に形成されたコロニー
※ スケールバー（以下, SB）は、1 cm

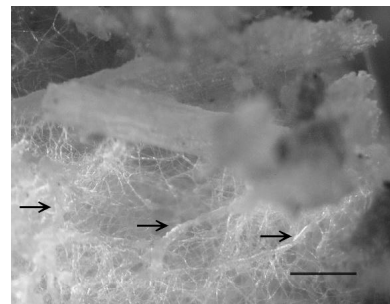


図-2 菌糸束の形成 SB:500μm
※ 黒矢印は、菌糸束を示す。

2. マツタケのデンブンの分解酵素の測定

マツタケの菌糸を含むアカマツの細根粉碎物Aの水抽出液には、二糖を単糖に分解するα-グルコシダーゼの活性が、41.0mU/ml程度認められた。また、微弱ではあるが、デンブンを直接グルコースに分解するグルコアミラーゼの活性が、8.0mU/ml程度認められ、細根粉碎物Aに、マツタケのデンブンの分解酵素の基質が存在することが示唆された。今回、前述の二つのデンブンの分解酵素の活性が確認できたことにより、細根粉碎物Aには、マツタケの重要な糖質であるグルコースや、二糖が存在することが示唆され、アカマツの根に、マツタケの糖質が存在していると考えられた。

一方、マツタケの菌糸を含まない細根粉碎物A培地には、α-グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、いずれの酵素活性も認められなかったため、測定された酵素活性は、アカマツではなく、マツタケ菌糸のものであること

が確認された。

3. アカマツデンプンの観察

アカマツの根の観察では、根の表皮、皮層、髓、いずれの細胞にもデンプンの蓄積が確認できたが、特に表皮の下にある皮層細胞の内部に、ヨウ素デンプン反応によって、青紫色に染色されたデンプンの顆粒として蓄積されている状況が観察された(図-3)。一方で、デンプンの蓄積が少ない皮層細胞も確認されるなど、デンプンの蓄積は不均一であった。このデンプンの蓄積は、所内の苗木では、11月から5月初旬頃まで、主に冬期間に限って確認され、特に5月下旬から9月初旬の期間は、デンプンの存在が確認できなかったことから、デンプンの消長は、苗木の栄養消費と関連性があると思われる。

また、アカマツの根から抽出したアカマツデンプンは、直径10~40 μm と、大小様々であった。代表的なアカマツのデンプン顆粒は、長辺30~40 μm 、短辺30 μm 、厚さ10~15 μm で、中央部に溝がある広楕円形であった(図-4)。堅果等が食用になる一部の樹木では、デンプンの形状が報告されているが(渋谷 2010)、非食用の樹木のデンプンの形状に着目した報告は無く、特にアカマツのデンプンを詳細に観察した報告としては、初めてと思われる。

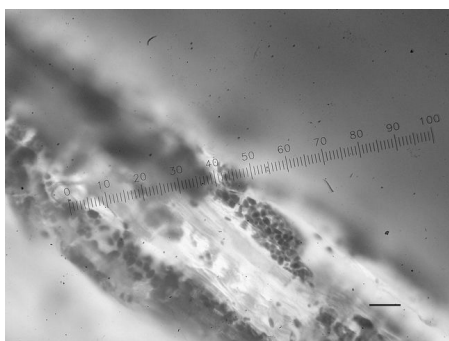


図-3 皮層細胞内のデンプン(顆粒)
SB:200 μm



図-4 アカマツのデンプン(拡大図)
SB:10 μm

一般的にデンプン分解酵素は、特定の糖基質に対して選択性を示すという基質特異性を持つことが知られ、マツタケのアミラーゼも基質デンプンによって分解性が異なる(寺下ら 2000)ことから、基質であるデンプンの形状(構造)は、マツタケのデンプン分解酵素の消化性にも影響することが予想された。

マツタケの感染部位である根に、アカマツ特有のデンプンが存在することから、アカマツデンプンは、マツタケの糖質源の一つと思われる。

4. アカマツデンプンの抽出

ハンマークラッシャーによって、アカマツ細根の破碎は可能であったが、直径が2~3mmの細根を除き、繊維状に剥離する場合が多く、細胞を完全に粉碎することは困難であった。木質化によって硬化した根も多く、細胞内に蓄積しているアカマツデンプンの抽出効率を向上させるには、木質化していない細根の利用が望ましいと考えられ、今後の課題となった。

5. アカマツデンプンの測定

アミロース/アミロペクチン測定キットによる総デンプン量の測定の結果、試料では、43.14 \pm 3.50mg/gと推定された。これは、アカマツ細根粉碎物の4.3%(重量比)に相当した。前述4で触れたが、硬質な樹木の根から、効率よくデンプンを抽出し、精製度の高いデンプンを作成するためには、さらに改良が必要と思われる。また、測定によるアミロースの平均的な割合は、14.8%と算定され、残りの85.2%が、アミロペクチンと推定された。このことから、今回抽出したアカマツの根に含まれるデンプンの過半数は、熱水非溶解性のアミロペクチンと考えられ、今後、マツタケの糖代謝を研究する上で、一つの参考値に成り得るとと思われる。

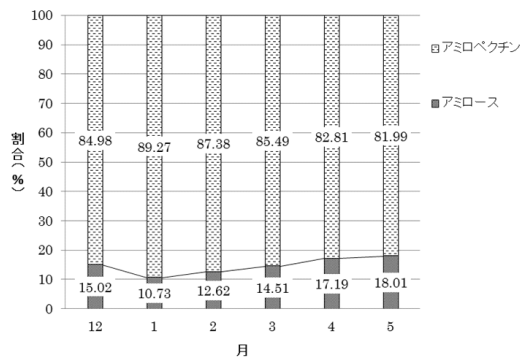


図-5 アミロースとアミロペクチンの月別変化

6. アカマツデンプンを利用したマツタケ培養試験

マツタケの種菌は、接種後7日から菌糸の伸長が確認

できた。本試験でのマツタケ菌糸は、30日を経過してから徐々にコロニーを形成し、さらに60日を経過後、直径 $3.82\pm 0.18\text{cm}$ に成長した。このコロニーの菌糸層の断面には、円柱状の菌糸が多数観察されたことから(図-6)、肉眼では確認しにくいものの、培地の内部には、マツタケ菌糸が繁殖していることが判明した。

このコロニーは、さらに培養期間が90日を経過すると、垂直方向に1cm以上伸びる束状の気中菌糸が形成された(図-7)。従来から用いられている太田寒天培地や、PDA培地で培養されたコロニーの菌糸は、主に、水平方向に伸長し、垂直に立ち上がる菌糸は発生しにくいため、今回の実験で形成されたコロニーは、形態が明確に異なっていた。小川(1978)は、気中菌糸の形成について、具体的な数値の記載が無いが、「空中菌糸は少なく、コロニーの古い部分で柔毛状の菌糸が立つ程度」と記載しており、コロニーの先端部でも束状の気中菌糸が形成された本研究の結果と異なっている。また別に、亜鉛の添加によって、短毛や気中菌糸が形成されることが報告されているが(ゼックフィールド 2013)、その長さは1mmに満たないものであるため、1cmを超える長い菌糸束を形成した本研究の結果と、顕著に異なっていた。アカマツの細根粉砕物を、そのまま培地とした、前述1の試験でも菌糸束の形成が確認されたが、本試験では、より長い菌糸束が形成され、それが気中に伸長した点で、顕著な差異があった。

アカマツデンプンを添加した培地から、菌糸が垂直方向に伸びたことについて考察すると、培養日数が長期化するにつれて、菌糸は集合しながら、垂直方向に徐々に菌糸束を形成した。また、さらに細い菌糸束が、この菌糸束同士を連結するように発達し、気中に伸長していた(図-8)。菌糸の集合や、気中菌糸の形成は、生理的にヒドロフォーピンなどのタンパク質や、菌糸の接着物質の生産が必要となる、大きな変化であることから(Wessels *et al.* 1991)、このコロニーの菌糸が、栄養成長から変化しつつある可能性があると思われた。

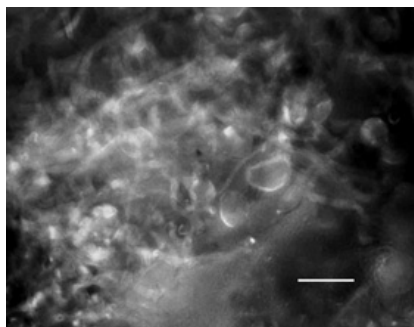


図-6 培地中に繁殖したマツタケの菌糸
SB:10 μm

このコロニーは、気中菌糸形成後も培養を継続したが、それ以上の変化は確認されなかった。



図-7 コロニー上に形成された束状の気中菌糸
SB:1cm

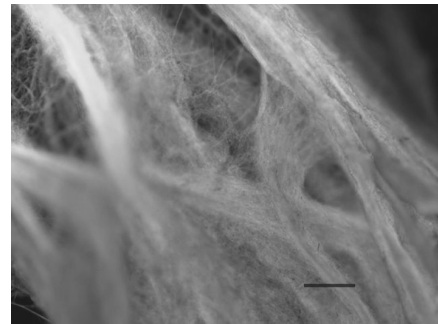


図-8 束状の気中菌糸の蛍光写真
SB:25 μm

IV おわりに

本研究では、マツタケの宿主であるアカマツの根に蓄積されているデンプンに着目し、偏在状況や形状を調べた。また、それを抽出し、マツタケの培養基質として利用した。その結果、長い気中菌糸束を形成するコロニーを、初めて得ることができた。現段階では、束状の気中菌糸の形成を確認したに過ぎないが、原基や子実体の形成につながる手がかりの可能性もあり、今後、重点的に研究を進めたい。

なお、アカマツデンプンの抽出方法とマツタケ培養技術については、特許出願後、公開されている(特開2015-159779、マツタケ菌糸体培地用添加剤及びマツタケ菌糸の培養方法)ので、付記する。

引用文献

- 藤原直哉(2005)マツタケ保存菌株の特性調査. 岡森研報 29, 87-88
- 藤原直哉(2013)マツタケ定着促進技術の開発. 岡森研報 29, 53-60
- 小川真(1978)マツタケの生物学, 70pp.
- 渋谷綾子(2010)日本列島における現生デンプン粒標本

- と日本考古学研究への応用－残存デンプン粒の形態分類を目指して, 植生史研究, Vol.18, 13-27
- 宍戸和夫 (1994) きこの分子生物学－最近の進歩－, 蛋白質核酸酵素 Vol.39, 917p
- 寺下隆夫・楠田瑞穂・松川祥子・永井勝・吉川賢太郎・坂井拓夫 (2000) マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌体外アミラーゼの生成と生成酵素のデンプン分解性. 日本きのこ学会誌 Vol.8, 115-120
- Wessels, J, G, H, Vries O, M, H, Ásgeirsdóttir, S, A, and Schuren, F, H, J (1991) Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*, USA, Plant Cell, 3, 793-799
- ゼックフィールド (2013) 菌体懸濁ゲル培養によるマツタケ子実体様菌糸塊の製造方法. 特開2013-59317