

マツタケの定着促進技術の研究

藤原 直哉

Study of fixing skill for *Tricholoma Matsutake*

Naoya FUJIWARA

要 旨

藤原直哉：マツタケの定着促進技術の研究 岡山県農林水産総合センター森林研究所研報29：53 - 60 (2013) マツタケが宿主アカマツの細根に感染し、定着するために不可欠な宿主の誘引物質について検討を行った。マメ科植物とAM菌の相互作用を参考に、マツタケ菌の培地に微量のフラボノイドを添加したところ、菌糸成長が促進された。アカマツの抽出液中には、このフラボノイドの他にも、菌糸の成長に必要な糖質や芳香族アミノ酸が含まれることが判明した。

そこで、アカマツの抽出液を培地として用いたところ、マツタケのコロニーが形成され、マツタケ菌の定着にはアカマツの根に含まれる化合物の存在が重要であることが判った。

キーワード：菌根性きのこ、マツタケ、シロ、根、アカマツ

I はじめに

これまでのマツタケに関する報告によって、マツタケの流通量は、宿主であるマツ林面積と深く関係していることが示唆された。このうち特に、樹齢30年前後のマツ林が重要な因子であり、県内のマツ林の高樹齢化が進行中であることを述べ、マツタケが唯一感染する部位であるマツの細根量の変化が子実体の発生に関与することを推測した。その結果、マツタケが森林に安定した状態で定着するためには、マツの細根が豊富に存在する条件が揃うことを提起し、さらに細根に含まれる何らかの化合物を明らかにする必要があることを結びとした(藤原 2010)。

樹木の根についての分析事例は殆ど無く、特に針葉樹についての報告は皆無であり、近年やっとバイオマス量の推定が始まった段階に過ぎない(木下 2007)。これは、土壤中に存在する根系の経済的な価値がこれまでに見いだされることが無く、特筆する利用方法が考案されなかったことに起因すると思われる。

国内におけるマツタケの宿主は、アカマツ、クロマツ、ツガ、コメツガ、エゾマツなど数種の樹種に限定されていて、宿主選択性があると考えられているが(小川a 1978)、このことについて特に踏み込んだ報告は無い。マツタケのこの性質は、栄養取得形態に関連する重要な性質と考えられ、特に糖質を始めとする栄養源の正体、つまり基質と、それに対応する酵素反応を明らかにする必要がある。これまでの研究では、グルコースに対して強い酵素反応を示すグルコシダーゼが確認されていて(Kusuda 2008)、その基質の探索が課題となっている。

宿主の選択性について、最も先進的な研究事例を調べると、同じ菌根菌である *Arbuscular Mycorrhiza*

(以下、AM菌)と宿主植物との相互作用に関する研究がある(Buée *et al.* 2000, Chabot *et al.* 1992, Scervino *et al.*)。AM菌は、菌根菌の中で最も先進的な研究が進められているグループであり、数多くの知見が蓄積されつつある。国内の主要な林産物であるスギやヒノキの根にもAM菌が感染することが知られている(松田 2001)。また嚢状体こそ形成しないが、マツタケの菌根内部に観察される菌糸の形状は、AM菌が宿主の内部組織に感染する過程で形成する樹枝状体に酷似していて、両者に共通性がある可能性を伺わせる。

そこで、マツタケとマツの細根との関連を研究する上で最初の手がかりとして、AM菌と宿主植物との知見を応用してみることにした。過去のマツタケ研究において、古くから糖、デンプン、アミノ酸などの資化能力が調べられてきた(小川 1978)。しかしながら、宿主側がマツタケ菌に供与している栄養成分については、明快な分析結果が得られておらず、さらに一歩踏み込んだ研究が望まれている。

菌根菌の菌糸は、宿主の細胞間隙に侵入した状態でよく観察され、マツタケの菌糸もこの部位で観察されやすい。ここは上記成分のうち、ヘミセルロースとリグニンが充満している部位であり、マツタケはここから栄養を得ていると考えられる。そこでまず、マツタケが森林の土壤中に定着するための重要な要素である栄養源を明らかにすることを目的とし、細胞間隙に存在する成分を把握することにした。

樹木の成分は多様であり、例えばブナ科植物のコナラ、クヌギ等は抗菌性を持つタンニンを多く含有する(大原 2005)。おそらく害菌の感染を防ぐため、抗菌性を持つ多数の化合物を生合成するなど、それぞれ

の樹種特有の感染防御システムを備えていて、それが宿主と菌根菌の親和性を左右すると考えられる。

近年最も注目されている化合物として、AM菌が宿主に感染する時に、宿主の細根から放出されるフラボノイドがある。この化合物の作用については、多方面から研究されており、AM菌の誘引、成長促進、共生促進、胞子の発芽促進、菌糸の枝分かれの促進などの報告がある (Buée 2000, 足立・加瀬谷 2013)。こうした様々な反応は、マツタケを含む菌根菌にとって、周辺環境に定着するために不可欠な役割を担っていると考えられる。菌根性きのことフラボノイドに関する研究については、アマタケの胞子発芽促進効果が報告されている (Kikuchi *et al.* 2007)。このフラボノイドは、これまでのところ7,000~8,000種類が知られており、アントシアニンの前駆体として、主に被子植物の花の液胞などに含まれている (Tanaka *et al.* 2008)。マツタケの宿主はアカマツ等針葉樹であるので花に相当する器官として球花があるが、これらの抽出物に関する報告は見当たらず、アカマツの根にフラボノイドが存在するのか確認樹木の樹皮に関する研究では、アカマツには、カフェイン、ナリンジン、カテキン、ミリセチンの5種類のフラボノイドが検出されている (平松ら 2008)。そこで本研究では、植物に広く存在すると考えられるナリンゲニンとその誘導体を対象として、マツタケと宿主アカマツを繋ぐフラボノイドとの関連性を調べることにした。

この研究は、主に2010~2012年の単県課題「マツタケの定着促進技術の研究」で実施した。

II 材料と方法

1. 樹木細根中のフェニルプロパノイドの観察

これまでの観察によりマツタケの菌糸は、宿主の根の表皮細胞や細胞間隙に侵入することが確認されている (富永 1964)、仮導管もしくはその周辺が該当すると考えられている。ここには、リグノイドと呼ばれるフェニルプロパノイドが蓄積する部位として、例えばカラマツの菌根中にも存在することが明らかにされている (Parasain *et al.* 2004)。フェニルプロパノイドは、アミノ酸であるフェニルアラニンを始原とするフェノール性物質の総称で、多数のフラボノイド、アントシアニンが含まれる。そこで種子を表面殺菌後、1/2 MS培地に無菌播種して試験管内で6か月間育成したアカマツ幼苗の主根を切断し、フェニルプロパノイドを蛍光染色することにより、根中の存在部位を観察した。比較として、植木鉢で育成したコナラの5年生苗木の細根を用い、0.1Mアンモニア水溶液 (Hariss and Hartley 1976) を細根に滴下し、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS製 BX51) で観察した。

2. 樹木の細根に含まれるナリンゲニンの計測 (吸光度分析)

マツタケの宿主の細根に含まれるフラボノイドの含有量を推定するために、食品分野で開発されたナリンゲニンの分析方法 (Habelt and Pittner 1983) によって、マツタケの宿主と考えられているアカマツ、クロマツ、ツガ、コメツガのほか、シロマツ、ヒノキ、モミを含む7種の針葉樹と、コナラ、シラカシの2種の広葉樹の細根 (直径1 mm未満の新根) を採取して供試した。フラボノイドの構造、特に側鎖は変化しやすいため、分析の対象はアグリコンであるナリンゲニンとした。

試料は、苗畑、純林、混交林、崩壊地など様々な環境からそれぞれ収集し、また樹種や樹齢もそれぞれ異なった。試料は、主根の周辺を掘削し、主根から伸長している細根を採取した (図-1, 2)。細根は、105℃で3時間乾燥後、デシケーター内で乾燥させ、うち1 gを細断した後に試験管に入れ、40%メタノールを20ml添加して、90℃で30分間還流抽出を行った。この抽出液に、4 M NaOH溶液を添加してよく攪拌し、分光光度計 (Hitachi製 U-1900) で、生成するフェノールイオンの吸光度 (310nm) を計測した。試験は3反復で行い、検量線を作成して反応液中のナリンゲニンの濃度を推定した。



図-1 ツガの細根 (静岡大学上阿多古演習林)



図-2 アカマツの細根 (所内展示林)

3. 樹木の細根に含まれるフラボノイドの計測 (HPLC)

これまでの根の成分に関する分析例では、詳細な知見は見当たらないため、Biesaga *et al.* (2009) の分析例を参考にHPLCを実施した。前項と同じ試料に、40%メタノール10mlを加え、90℃、30分間抽出し、滅菌フィルター(0.45 μ M)でろ過した。この抽出液の一部を3回HPLC分析し、出現したピークのリテンションタイム(R.T)の基準として、濃度の平均値を求めた。この時、ルチン、ケルセチン、ナリングニン、プルニン、ナリンジン、ミリセチン、ケンフェロールの標品(Shigma-Aldrich Japan, HPLC品質)を用いて検量線を作成し、この検量線に基づいて濃度を算出した。なお、HPLC分析については、静岡大学農学部にて実施した。

HPLCの分析条件

機器

Shimadzu Prominence
Binary pumps : LC-9A
Degasser : DGU-4A
Column oven : CTO-20AC
Autosampler : SIL-20AC
Detector : UV SPD 20AV (254 nm)
データ処理 : クロマトバックC-R4A

移動相 : 50mMリン酸バッファー (pH 2.2) /ACN
(75 : 25 V / V)

流速 : 1 ml / min .

カラム : Chromolith Performance RP-18e
(100 mm \times 4.6 mm id , Merck)

カラム温度, サンプル温度 : 25℃一定

サンプル注入量 : 20 μ l , 15分間/回

4. フラボノイド添加培養試験

PDA培地(日水製)を基本培地(control)として、ナリングニンと、ナリングニンの配糖体であるナリンジン10 μ Mを添加し、それぞれ30ml/枚を9cm滅菌シャーレ15枚に分注した。この培地に、予め前培養したマツタケ菌(系統:美星77)をコルクボーラーで打ち抜いて中央部分に接種し、24℃一定の暗黒下で10週間培養し、菌糸の成長量を調査した。

5. アカマツの抽出物を基材とした培養試験

2012年12月に所内の10年生アカマツから当年枝を伐倒し、剪定鋏で細断した。この枝に蒸留水5ml/g添加

し、80℃、105℃、120℃で抽出温度を変えながら60分間抽出した。この抽出液を滅菌フィルター(0.22 μ m)でろ過し、滅菌抽出液を得た。この滅菌抽出液を乾熱滅菌した100ml三角フラスコに30ml分注し、フラボノイド添加培養試験と同様にマツタケ菌を接種し、気温24度で30日間培養した。

また、抽出液の糖度を糖度計(ATAGO製 PAL-1)と水素イオン濃度をpHメーター(YOKOGAWA製 PH 82)で測定し、分光光度計(ビーエム製 e-spect)を用いて紫外吸光光度法(A280)により、波長280nmにおける芳香族アミノ酸の濃度を求めた。

III 結果と考察

1. 樹木細根中のフェニルプロパノイドの観察

アカマツの細根断面では、切片全体が自家蛍光し、特に内樹皮周辺の部位の蛍光が強く(図-3)、フェニルプロパノイドの特異的な蛍光を識別することができなかった。細胞の拡大写真では特に細胞壁が蛍光し、自家蛍光しやすいリグニンが細胞壁の内部に充満した状態で存在すると考えられた(図-4)。

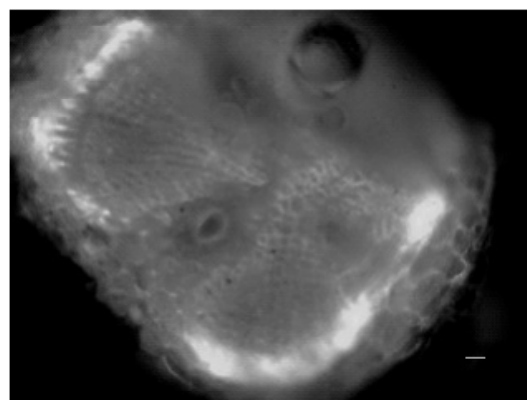


図-3 アカマツ細根の横断面(自家蛍光)
スケールバーは、100 μ m(以下同じ)

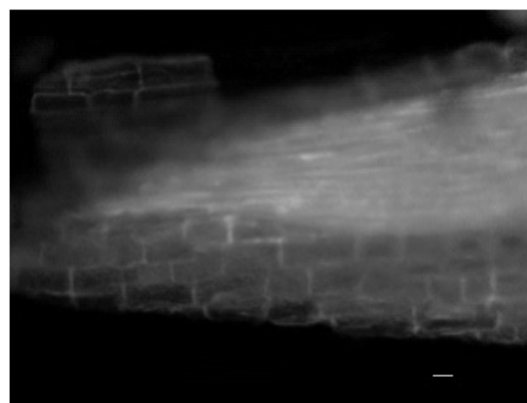


図-4 アカマツ細根の縦断面(自家蛍光)

またコナラの蛍光染色では、根の表皮組織が自家蛍光によって格子状に強く蛍光し（図-5）、拡大写真では、特に細胞壁が鮮明に蛍光した（図-6）。

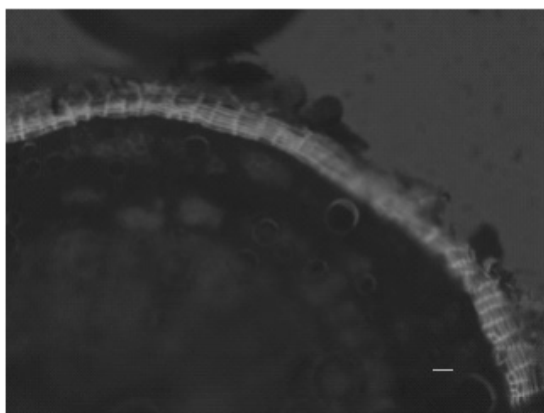


図-5 コナラ細根（横断面）

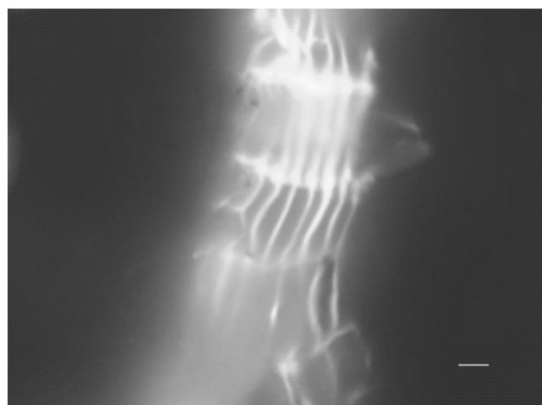


図-6 コナラ細根（表皮拡大）

2. 樹木の細根に含まれるナリンゲニンの計測

計測の結果、樹木の細根に含まれるナリンゲニンの検量線と含有量を図-8、9に示す。今回作成した検量線は、当初n=10で計測したものの、吸光度3.50を超えると直線性を示さなくなったため、n=7までのデータにより直線性を確保し（ $r = 0.99$ ）、濃度調整した。

所内で採取したアカマツ細根の測定では、2年生苗木は未検出であったにも関わらず、10年生、20年生、30年生と樹齢が高くなるのに従って、より多くのナリンゲニンが検出された。一方、同じ樹齢30年生のアカマツであっても、静岡県阿多古演習林（浜松市天竜区）と静岡県浜北森林公園（浜松市浜北区）で採取した細根のナリンゲニンは、長野県の約半分程度の含有量を示し、採取場所によって濃度に差が認められた。

ナリンゲニンは、アカマツと同様にクロマツの2年生では検出されず、5年生で検出され、稚樹では濃度が低いために検出されにくい可能性があった。また、

国内でマツタケの宿主であるツガ、コメツガにも検出された一方で、宿主とされていないモミ、コナラ、シラカシ、ヒノキにも同等量検出された。このことは、ナリンゲニンが一般的な樹木の根にも含まれているフラボノイドであることを示している。今回測定した9種類の樹木については、フェノールイオンとして検出したナリンゲニンの濃度が、細根1g当たり数mg程度であることが明らかになった。

3. 樹木の細根に含まれるフラボノイドの計測 (HPLC)

個々のフラボノイドについて、標品を用いた時のクロマトグラムを図-10に、また、2年生アカマツの細根抽出物の分析結果を図-11に示す。

ピークは針葉樹で多く検出され、フェノール誘導体が数多く含まれていると考えられた。特にコメツガ、アカマツの2年生、クロマツの2年生苗木で20~30ものピークが検出された。全てのサンプルで分離能が低く、多くのピークが重なり、定量は不可能であったが、細根中に20~60mg/g含有されると推定される単一のピークに、複数のピークが含まれると考えられた。特に対象としたフラボノイドのルチン、ナリンジン、プルニンのピークはいずれも重なり、明確に分離することはできなかった。

これは、カラムの変更、移動相の流速の調整、サンプル注入量の希釈処理を行った場合でも同様であった。定量のため算出された面積の信頼性は非常に低いと考えられた。そのため今回のHPLC分析は、ナリンゲニンの有無を示す定性試験として評価した。また、前項の吸光分析の結果については、ナリンゲニン類似物の混合物の総量として検出されたものと考えられた。

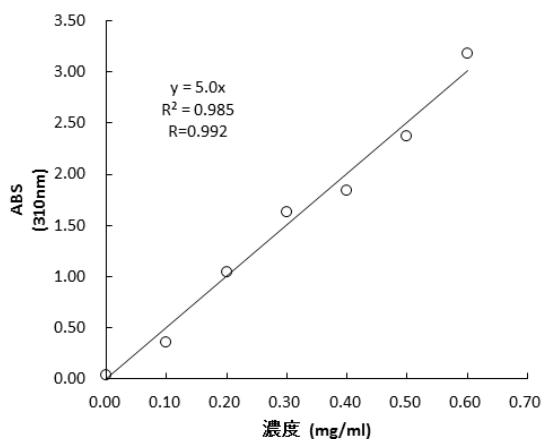
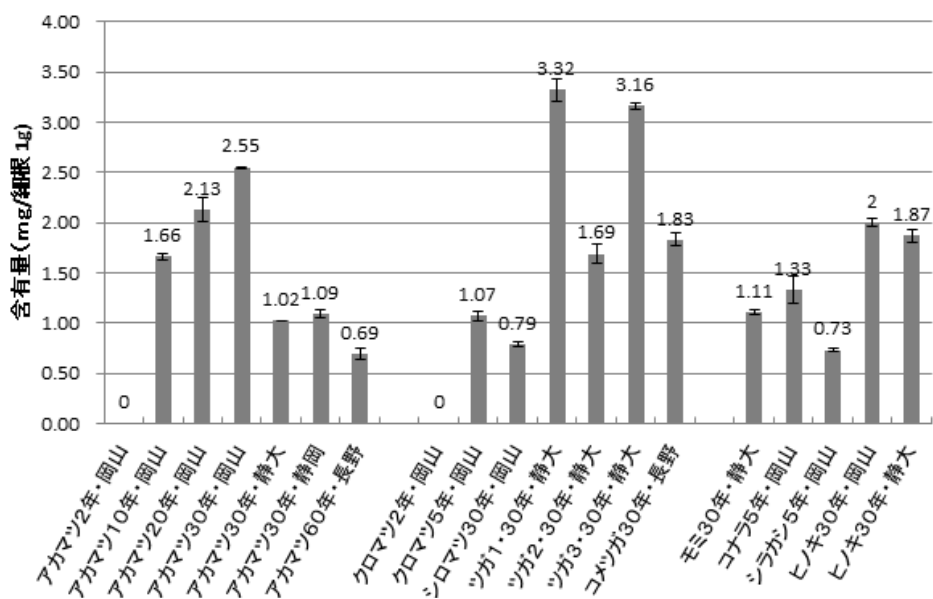


図-8 吸光度とナリンゲニン濃度の相関 (n=7)



※ 値は、分光光度計で3回測定した平均値と標準偏差を示す

図-9 ナリンゲニンの含有量

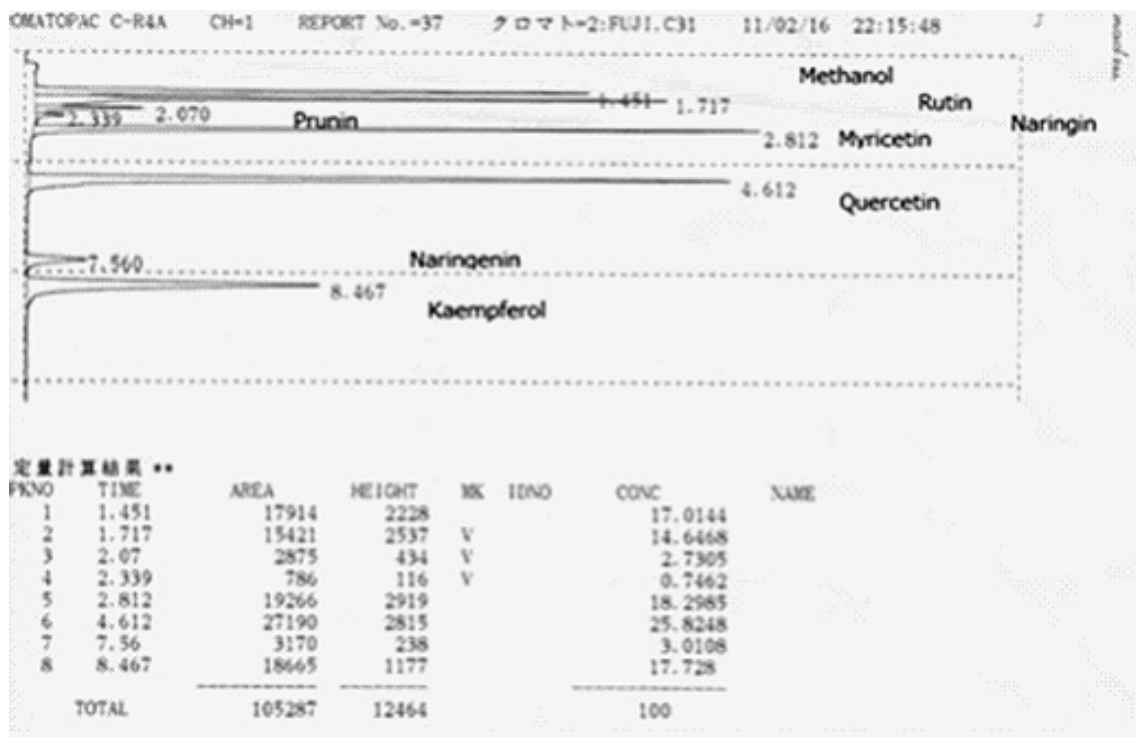


図-10 標品のクロマトグラム

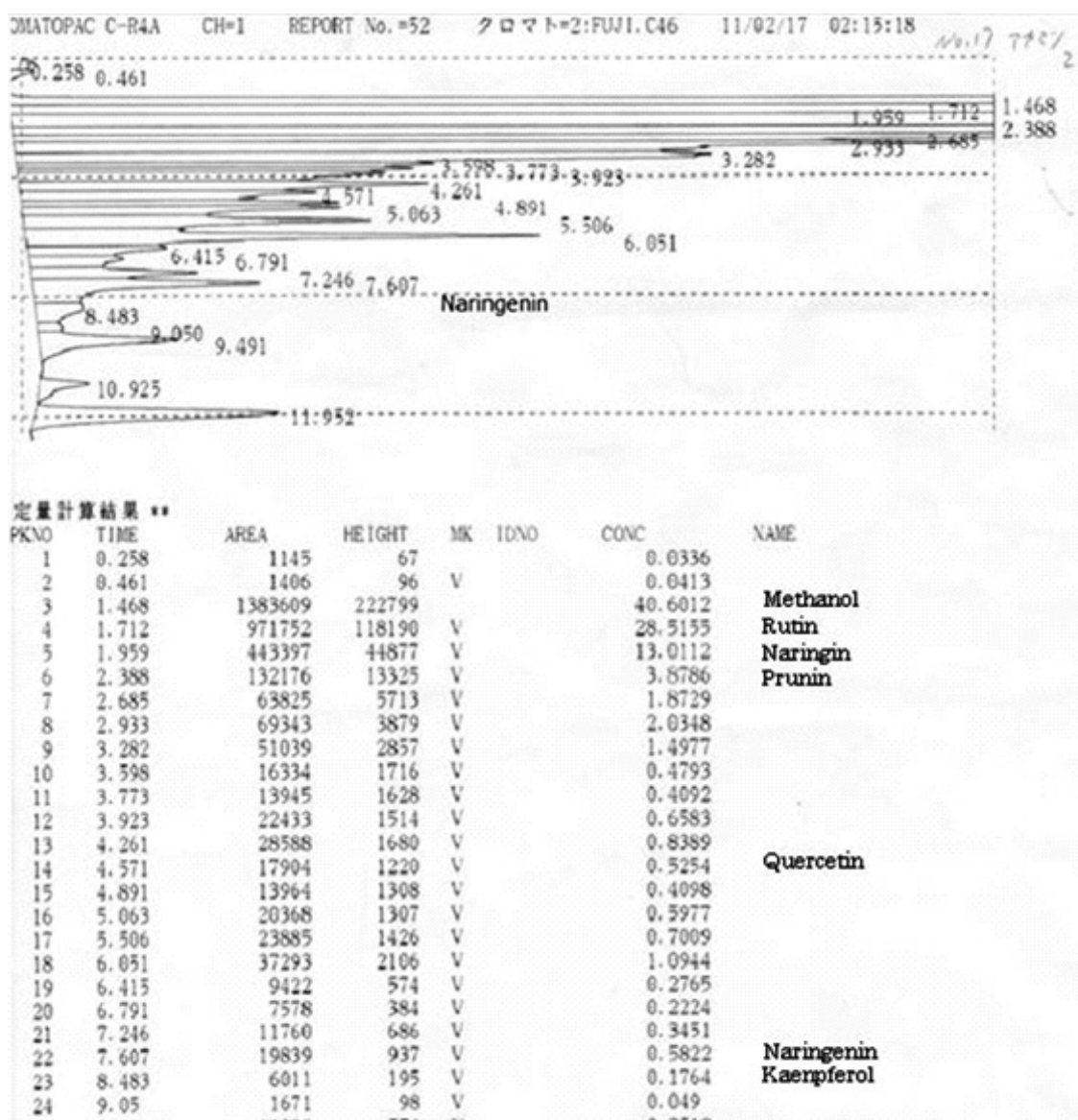


図-11 2年生アカマツの細根抽出物のクロマトグラム

4.フラボノイド添加培養試験

培地にナリンゲニンとナリンジンを追加して10週間培養した時の菌糸成長量を図-12に、菌糸成長率を図-13に示す。

今回の10週間の培養期間の菌糸成長量の比較では、標準偏差が重複し、有意な差を認めていない。しかしながら、コントロール（PDAのみ）と比較し、ナリンゲニンとナリンジンの添加区は、104.2%と、菌糸成長の促進傾向を示していた。ナリンジンは、構造上、ナリンゲニンの側鎖にルチノースが付随した化合物で、菌糸成長率が104.2%とほぼ同値であったことは、共通の構造であるナリンゲニンの効果と考えられた。今回の試験では、統計による有意性を示すことができなかったものの（ $p > 0.05$ ）、同じ骨格構造を持つ2種類のフラボノイドが、マツタケ菌糸の成長を促進する傾向が

あることが判ったが、統計で有意差を認めなかったことについては、培養条件を再検討する必要があると考えられた。

AM菌の研究では、ナリンゲニンは宿主の根から放出され、AM菌の感染を促すシグナル性の化合物として知られている。今回、ごく低濃度のフラボノイドでマツタケの菌糸が反応を示したことは、菌根菌グループに属する両者の間に、一定の共通性が存在することを示唆している。このことは、例えば土壌中に存在するマツタケの菌糸が、宿主の根に含まれるフラボノイドを感知することによって、近隣に存在する植物の存在を認識し、その方向に菌糸を成長させることで、効率良く宿主に感染しようとする性質を持っているためと思われる。国内のマツタケは、マツ科樹木など限定された樹種にしか発生しないことから、マツ科樹木に特有のフラボノイドが存在する可能性もある。

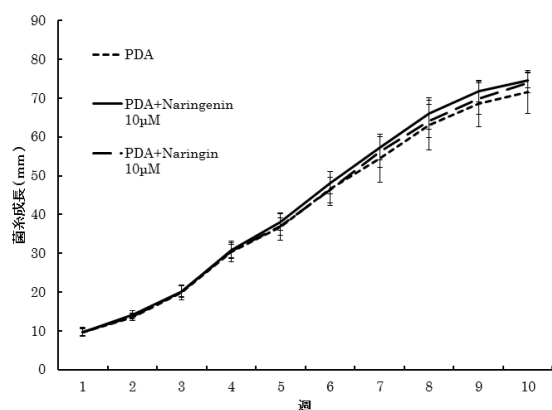


図-12 フラボノイドの添加効果 (菌糸成長量)

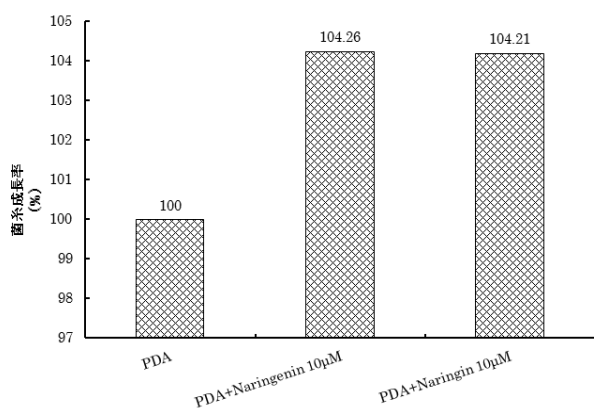


図-13 フラボノイドの添加効果 (菌糸成長率)

5.アカマツの抽出物を基材とした培養試験

培養試験では、抽出温度80℃で60分間抽出した試験区でマツタケの菌糸が伸長し、直径2 cm程度のコロニーに成長した。抽出液の糖度は0.3~0.5 (Brix値)を示し、新梢に何らかの糖分が含まれていることが明らかとなった。また、水素イオン濃度は4.2~4.6を示し、マツタケが棲息する弱酸性土壌の値とほぼ同値であった。比較した105℃、120℃の試験区では菌糸の成長は確認できず、抽出温度によって菌糸の成長が異なり、加温によって抽出液成分の構造が変化した可能性があった。また、アカマツの新梢に含まれる芳香族アミノ酸の含有量は、新梢1 g当たり、 $49.58 \pm 2.03\text{mg}$ (80℃)、 $74.97 \pm 1.73\text{mg}$ (105℃)、 $73.45 \pm 0.63\text{mg}$ (120℃)と計算され、100℃を超えると抽出量が多くなるなど、マツタケ菌の成長に不可欠である炭素源と窒素源の抽出量に抽出温度が影響することが判った。これらの成分は、新梢や葉の成長のほか、結実や落葉など、季節の変化によるアカマツの生理的な反応によって大きく変動する可能性があると考えられた。今回は、マツタケ菌

の感染部位である細根の代用品として、入手しやすい新梢を用いたが、光合成によって生成された代謝物は、アカマツの様々な部位に存在すると思われた。

IV まとめ

菌根菌が細胞間隙に侵入する性質に着目し、マツタケ菌が定着する原因について検討を行った。その結果アカマツの細根中に、菌根菌の感染シグナルとして機能するフラボノイドが含まれることが、簡易的な吸光度測定と、より高感度なHPLC分析の両方によって確認された。特にHPLC分析では、ナリゲニン以外の複数のフラボノイド成分の存在が示唆された。これらの化合物の構造は類似性が高いため、今回のHPLC分析では明確に区別することはできなかったが、複数の樹木の細根に多くの化合物が含まれることが明らかになった。また、アカマツの根に存在するフラボノイドがマツタケ菌糸の成長を促進することが判明した。このことは、宿主植物アカマツとマツタケの間に、フラボノイドを介したやりとりが存在する可能性を示唆しており、これまで根粒菌に特有のものと考えられていた宿主特異性が、アカマツとマツタケの間にも成立する可能性を示し、マツタケ菌が土壌中で宿主アカマツの根の存在を感知し、定着するための反応の一つと考えられた。

そしてアカマツ新梢の抽出物中にも、炭素源となる糖やチッ素源となるアミノ酸が含まれていることが明らかになり、マツタケ菌の成長に必要な栄養源が存在することが確認できた。今後は、これらの炭素源とチッ素源の解明と抽出方法について研究を行う予定である。

なお、試料の採取、HPLC分析に多大なご協力を頂きました静岡大学農学部造林学研究室の水永教授、楢本助教、長野県林業総合センターの竹内主任研究員、フラボノイドに関する様々な知見を教えてくださいました県立広島大学の森永教授に、感謝を申し上げます。

引用文献

- 足立亜衣・加瀬谷泰介 (2013) 外生菌根菌の菌糸成長促進物質の探索. 東洋食品研究所研究報告書 29 : 21 - 29
- Bécard G, Doude DD, Pfeffer PE (1992) Extensive *in vivo* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. Appl Environ Microbiol 68 : 1260 - 1264
- Biesaga M, Ochnik U, Pyrznska K (2009) Fast analysis of prominent flavonoids in tomato using a monolithic column and isocratic HPLC. Journal of Separation Science 32 : 2835 - 2840
- Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G (2000) The pre-symbiotic growth of

- arbuscular mycorrhizal fungi is induced by branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 : 693 - 698
- Chabot S, Bel-Rhliid R, Chênevert R, Piché Y (1992) Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoids compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytol* 122 : 461 - 467
- 藤原直哉 (2010) 菌根性きのこのシロ形成技術の開発. 岡山県林業試験場研究報告2 : 3pp.
- Habelt K and Pittner F (1983) A rapid method for the determination of naringin, prunin, and naringenin applied to the assay of naringinase. *Analytical Biochemistry* 134 : 393 - 397
- Harris PJ and Hartley RD (1976) Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259 : 508 - 510
- 平松緑・大江知生・高橋知子 (2008) 樹皮のフリーラジカル消去作用とフラボノイド成分について. 東北公益文科大学総合研究論集21 : pp.43 - 55
- 岩出亥之助 (1937) 菌蕈類の特殊成分に関する研究 其の一 “まつたけ” の香気成分に就て (第3報). 日本林学会誌 19 : 414 - 420
- 木下晃彦 (2007) 外生菌根の共生菌バイオマスの定量. 広島大学紀要 2 : pp.73 - 75.
- Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K, Hogetsu T (2007) Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza* 17 : 563-570
- Kusuda M, Ueda M, Miyatake K, Terashita T (2008) Characterization of the carbohydrase productions of an ectmycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 49 : 291 - 297
- 松田陽介 (2001) 外生菌根菌の群衆構造. 根の研究 10 -1 : 25 - 29
- 小川真a (1978) いろいろなマツタケ. [マツタケ] の生物学: 231 - 246. 築地書館, 東京.
- 小川真b (1978) マツタケの食べ物. [マツタケ] の生物学 : 191 - 202. 築地書館, 東京.
- 大原誠資 (2005) 工業原料としての新展開. 木質系有機資源の有効利用技術 : 241 - 242
- Prasain JK, Wang CC, Barnes S (2004) Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine* 37 : 1324 - 1350
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassels R, Vierheilig H, Ocampo Ja, Godeas A (2006) Glycosidation of apigenin results in a loss of activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. *Soil Biol Biochem* 38 : 2919 - 2922
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) A biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54 : 733 - 749
- 富永保人 (1964) マツタケの生活史. マツタケ—研究と増産— : pp. 90 - 95. マツタケ研究懇話会, 京都.