

## キノコとあやしい培地、そして培養菌糸のこと

林 智絵

新鮮で汚れの少ないキノコの子実体を選び、内部組織に指が触れないよう注意しながらその子実体を縦に裂き、内部組織の菌体断片を小さく切り出す。そして、それを滅菌した寒天培地の上にそっと置く。何日かするとその菌体断片からうっすら菌糸が伸びてくる。このような操作を分離培養とよぶ<sup>1)</sup>。

わたしは、当初、キノコは菌類であるといわれてもピンとこなかったものだが、キノコを分離し菌体断片からの菌糸の出現をみるたびに、改めて菌類であると実感する。

微生物とは？との問いに、目に見えない微小な生き物と回答している文献が多いが、細菌学者であるスタニア (1978) は、「微生物学的手法で取り扱わなければならない生き物のこと」<sup>2)</sup>と答えている。また、放送大学の菌類ゼミにてご指導くださっている鈴木彰先生は、著書の中で「ミクロの世界の生物のことは、ミクロの世界を見る目を養う必要がある」<sup>3)</sup>と述べている。

分離培養という観点で見れば、まさに菌類であるキノコも微生物的な側面を有しており、種子を蒔けば芽が出てくる植物とは扱いも考え方もまったく違う。

その意味することがいかに奥深いか、キノコを分離培養しているとよくわかる。

このキノコの分離培養がとても面白く、わたしは野外でキノコを見つけるたび挑戦してきた。

しかし、いつも分離培養に成功するわけでは

ない。わたしの場合、ひとつのキノコの分離に5枚ほどの培地入りのシャーレを使うが半数でも分離培養が成功すればよしといえよう。

分離培養が失敗する一番の原因は、(わたしの分離技術が未熟なためといわれそうだが) 雑菌の混入である。

細菌や分離対象以外の真菌類などの雑菌は、キノコの表面だけでなく土壌中や空気中、器具を扱う手のひらなど、ありとあらゆるところに存在している。そして、どんなに細心の注意を払って無菌的に作業をしているつもりでも、わずかな隙をついてそれらは混入してくる。

もし雑菌がシャーレの中で繁殖をはじめたら、もうキノコの菌糸だけを分離することが難しくなる。キノコの菌糸よりも混入した雑菌の繁殖力のほうがより旺盛で、しかもその成長がおそろしく速いことが多いためである。

それともうひとつ、分離培養自体が難しい菌種がとても多い。中でも菌根菌といわれるキノコの分離培養は難しい。たとえ雑菌の混入がなくても菌体断片から全く菌糸が伸びてこない。

表1 PDA培地の培養基組成

ジャガイモ	200g
ブドウ糖 (グルコース)	10g
寒天	15g
水	1L

衣川堅二郎 (1988年)<sup>4)</sup>

\*現在は、自作のジャガイモの抽出液の代わりに Potato brothなど精製されたものを使う場合が多い。

特にわたしはタマゴタケの分離を成功させてくてもう何十回ともなく挑戦しているが、いまだに菌体断片から菌糸の発生が見られず分離培養に成功できないでいる。

何度も分離培養に失敗しているうちに、どうにか分離培養の成功率をあげることはできないだろうか、分離の難しいキノコも簡単に分離できる方法はないのだろうか、ならば分離培養する培地を工夫してみたらどうか、と考えるようになった。

キノコの菌糸の培養に、PDA培地(表1)を使用している研究は多い。わたしもこのPDA培地を使って分離培養をしていたのだが、考えてみると菌糸の生育する土壌や朽木にはそれほど高濃度で糖質が存在しているとは思えない。もっとそのキノコが生育している環境に近づけてみたらどうなるのだろうか。

さっそく、ブナやコナラなどの落葉広葉樹の多い公園で落ち葉を集め、それをオートクレーブで滅菌処理し、そのまま寒天で固め、そこに、落ち葉を分解するホウライタケ (*Marasmius* sp.) を植菌してみた。

単純に、生育している環境に近づければ菌糸の成長も良くなるはずと予想していたが、やってみるとほとんど菌糸は成長しなかった。落ち葉を分解しそこで生息する菌のはずなのに、なぜこんなにも成長が悪いのか。

あとでわかったのだが、落ち葉をオートクレーブで、高圧蒸気滅菌する過程で、落ち葉に含まれる成分が変質してしまったようだ。それらの成分が、成長を妨げる要因のひとつになっていたと考えられる。

この実験は、培養環境を、その菌が生育する自然環境に近づけることは容易でなく、それには知識や経験、工夫がもっと必要だと、いい教訓になった。

それでも誰も思いつかないような培地を試してみることは面白い。お蔵入りになった

培地も多いが、思わぬ成果をあげた培地もある。そのひとつを紹介したい。

表2 クヌギのドングリの一般成分 (%)

水分	37.4
蛋白質	3.8
脂質	2.7
灰分	1.3
糖質	54.8
タンニン	3.4

松本道夫他(1999年)<sup>5)</sup>

前述したようにタマゴタケの分離培養がうまくいかず、なんとか分離培養が成功する培地はないものかと考えていた。

タマゴタケはクヌギと共生し、菌根を形成することがよく知られている。もしやそのクヌギの果実であるドングリを使った培地であれば、分離培養できるのではないかと思いついた。

さっそく気持ちのいい秋空の下、たくさんのドングリを集めたが、さてこのクヌギのドングリをどう加工して培地にしようか、ここからが試行錯誤を要した。

まずそのまま煮出してみたが、得られた抽出液は薄いコーヒーの様で、すべての栄養成分(表2)を利用できそうもない。なんとかクヌギの種子部分を細かい粒子状にし、そのまま培地に使えないか思案した。そこで帽子部分の殻斗、厚くて硬い殻の部分である果皮部分を取り除き、残った種皮に包まれた種子部分を自然乾燥させ、それをミルで粉碎してみた。ところが思った以上に硬く、ミルが壊れてしまった。仕方がないので手作業でそれを細かく砕いてみたりもしたが、その方法だとどうしても粒子が粗く、水を加えると沈殿してしまい、均一に混ざらなかった。いろいろ試した結果、ようやく表3に記載した作製方法に落ち着いた。(以下、クヌギ培地とする。)

さて、クヌギ培地が完成したところで、大きな期待に胸を膨らませ、さっそくタマゴタ

ケの分離に挑戦した。しかし、またもやすべて失敗に終わった。どんなに待っても菌体断片からまったく菌糸が伸びてこないのだ。

ところが、ブナシメジ、ヒラタケ、ヤマブシタケなど白色腐朽菌といわれるキノコの分離培養は、すべて成功した。しかも、PDA培地と比べると明らかに菌糸の成長が良い。

それに加えて、分離培養が成功し、なおかつ菌糸の成長が良い菌種の菌糸体の周辺が褐変化する現象がすべてにおいて認められた。

調べてみると、この結果はバーベンダム反応<sup>6)</sup>の結果と一致した。おそらく菌糸体から生成されるリグニン分解酵素によって、クヌギの堅果に含まれるタンニンが分解され、バーベンダム反応と同様に、菌糸体周辺に褐変反応を起こしたのだろう。

このバーベンダム反応による試験は、白色腐朽菌の分解能を調べるためよく使われているが、その試験培地を作製するためには、没食子酸などの特殊な薬剤を用い、しかもその薬剤の酸性が強いため寒天が固まりにくく作製に手間がかかる。それに比べこのクヌギ培地は、その手間はなく簡単に作製できる。おまけに菌糸の成長がすこぶる良い。

リグニンの分解能を試験するならこれは大きな利点になるのではないか。簡易的にバーベンダム反応を確認できる培地として、こ

れから有効利用できる可能性はあると思う。

もうひとつこのクヌギ培地が持つ大きな利点に、雑菌に対する静菌作用があげられる。

野外で採取したキノコを、PDA培地とクヌギ培地を使い、同時にそれぞれに分離培養してみたところ、PDA培地は多くの雑菌が混入し、それが繁殖することにより失敗するケースが多かったが、クヌギ培地においては、雑菌の混入が認められても、明らかにそれらの繁殖が抑えられていた。

さらに、クヌギ培地とPDA培地の入ったシャーレの蓋を室内で同時に10分間開放し、どれだけ雑菌が繁殖するのか比較実験を行った。この実験でも、PDA培地に比べクヌギ培地は、明らかに雑菌の繁殖を抑制させることが認められるという結果を得た。

ただ、リグニン分解能を持たないキノコを分離培養した場合、雑菌の繁殖と同様にそのキノコの菌の成長も抑制してしまうということもわかっている。しかし、リグニン分解能を持つ白色腐朽菌などでは、クヌギ培地が持つ静菌作用はまったく影響せず、菌糸は元気に成長するので問題がないようだ。

クヌギ培地を利用するこれらの利点は大きく、わたしは今でも日常的に使っている。もしリグニンの分解能を持つキノコを分離培養するのであれば、このクヌギ培地をぜひお勧めしたい。

表3 クヌギ培地の培養基組成および作製方法

クヌギのドングリの種子部分*	100g
寒天	20g
水	1L

\*穀斗、果皮を取り除き、種子部分を種皮に包まれたままの状態ですべて自然乾燥させたものを使用した。

(調製方法) クヌギの果実の種子部分\*を30分間、水で煮て軟らかくし、そのまま粗熱を取り、ミキサーで攪拌、粉碎する。塊がすべてなくなり、泥水状になったところで、粗目のガーゼで濾し、その濾した液体に総量1リットルになるように水を足す。規定量の寒天を混ぜ、オートクレーブで滅菌処理をしたのち、適当な温度まで冷まし、滅菌シャーレに分注する。

さて、ここからは培地から少し視線を上げて、多様で驚きに満ちた培養菌糸について少し触れたいと思う。

寒天培地に生育した菌糸体 (colony) は一見みな同じような菌糸の集合に見えるが、培地の中にもぐったり培地上をはったりして栄養素を吸収し、伸長・分岐する基底菌糸と、培地から立ち上がって新たな付着点を求めたり、蒸散や呼吸を行う気中菌糸に分化して<sup>3)</sup>、菌糸体全体でそれぞれの役割を担い成長している。

また、目視でもはっきりと区別できる菌糸束や根状菌糸束などの複雑な構造を持つ菌糸に分化することもある。それだけでなく、キノコの種によっては、菌糸から分生子や厚壁胞子に分化するなど、多彩で多様な変化に富み、培養菌糸を顕微鏡で観察していると、つい時間が経つのを忘れてしまう。

このように地味で形態の差異が少ないと思われがちな菌糸でもよく観察するとバリエーションに富んでおり、1900年代では、培養菌糸における生理学のおよび形態学的特性が、同定の診断価値となり得るとして、その詳細な研究が行われ、多く報告されている。

わたしは、分離培養が成功すると、カナダの菌学者 Nobles (1948) の “Identification of cultures of wood-rotting fungi”<sup>7)</sup> を参考に、苦手な英語と格闘しながら、菌糸体レベルで分離培養した菌の同定の確認も行っている。

その文献における菌糸体の生理学のおよび形態学的知見は、バーベンダム反応の強弱をはじめ、菌糸の隔壁形成、厚壁胞子、分生子、分裂子、シスチジアや剛毛体のような特別な構造の形成、子実体形成にまでおよぶ。

なにより素晴らしいのは、精密な設備や機器を使わずに、生理学のおよび形態学的な知見で同定するという前提で記載されている点だ。そのため、わたしでも分離培養菌株の確認が容易に行える。

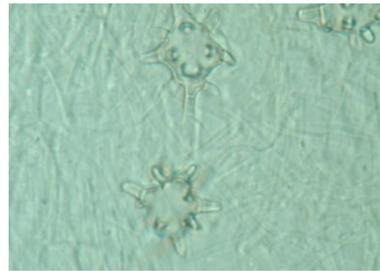
そして、今までわたしが分離培養したすべてのキノコの種の分離培養物の培養所見は、この文献の記述と見事に一致した。半世紀以上経った今でも、ピタリと一致する記述の正確さに驚嘆を覚え、この時代の科学者たちに心からの尊敬の念を感じずにはいられない。

ただ、残念なことに、この研究は倒木から菌糸を分離した場合においてその菌糸がどんな種であるのかを同定することが真の目的であるため、科学が発展し、その目的をより簡単に遺伝子解析の技術が担うようになった現在において、このような研究はどんどん下火

となってきたと言わざるを得ない。

たしかに精密で複雑な設備や機器が、謎の多いキノコの生態の解明を飛躍的に進めているのは事実だと思うが、このような基礎研究の積み重ねがあってこそだとわたしは思っている。

科学技術の発展にともない、注目されなくなりつつある古典的な基礎研究の重要性が再認識され、そして培養菌糸の生理学のおよび形態学的特性の研究が再評価されることを願っている。



ヤグラタケ (*Asterophora lycoperdoides*)

培養菌糸に形成された厚壁胞子の顕微鏡写真

(2014. 12. 30 林 撮影)

- 1) 「分離」とは、培養したい菌糸だけを選んで試験管の中にとりあげること。分離した菌糸を、人為的に繁殖させることを「培養」という。
- 2) Stanier, R. Y.: "What is microbiology?", Essays in Microbiology, John Wiley & Sons, p. 1, (1978)
- 3) 堀越孝雄・鈴木彰: 「きのこの一生」, 築地書館, (1990)
- 4) 衣川堅二郎: 「きのこの実験法」, 築地書館, (1988)
- 5) 松本道夫他: 「ドングリ澱粉の加工利用」, 鳥取県産業技術センター研究報告, No. 2, 60-67, (1999)
- 6) タンニン酸または没食子酸を含んだ培地で、リグニンの分解に関与する酵素であるラッカーゼなどを産生する木材腐朽菌を培養した場合、そのコロニー周辺に暗褐色帯を生ずる反応。1923年にドイツのBavendammによって報告された。
- 7) Nobles, M. K.: Studies in forest pathology, VI. "Identification of cultures of wood-rotting fungi", Canadian Journal of Research. Sect. C, 26:, 281-431, (1948)