

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23686

研究課題名（和文）キノシロアリを模倣したオオシロアリタケ栽培化への挑戦

研究課題名（英文）The challenge to artificial cultivation imitated termites of *Termitomyces* sp. subtropical edible mushroom

研究代表者

原田 栄津子（石井栄津子）（Harada, Etsuko）

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：00576514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：石垣島、西表島、沖縄本島に分布しているオオシロアリタケ子実体を採取し分子生物学的検討を行なった結果、日本国内に自生するオオシロアリタケ属菌は2種類であることが判明した。人工栽培化に向けての基礎研究として、固体培地での特性に関しては、木粉培地よりパーク堆肥を主体とした培地にて菌糸体成長が良い傾向にあった。菌糸体成長において二酸化炭素の影響は認められなかった。シロアリの巣である菌菌の微生物菌叢解析を行ったところ、真菌類では、*Xylaria escharoidea* の存在が確認された。細菌類では、放線菌や根粒菌などの細菌類が多く存在することが判明した。菌糸体の機能性研究として、抗ガン活性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アジアやアフリカに自生し濃厚な旨味を持つ高級食材である亜熱帯性食用担子菌オオシロアリタケ属菌（*Termitomyces* sp.）は、昆虫のパートナーとなり生活環を維持している共生菌であり、近年生理活性化合物の学術報告が相次いで発表されている注目の薬食用きのこである。本研究成果により、この世界中で人工栽培化が望まれているオオシロアリタケの子実体形成メカニズムの解明において、第一歩を踏み出すことができた。さらに、新たな機能性研究が見出された点からも、学術的、社会的意義がある。これまで謎に満ちたオオシロアリタケの人工栽培研究や機能性研究の道を拓き、産業、社会に与えるインパクトは極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：As a result of collecting the fruiting bodies of *Termitomyces* sp. distributed on Ishigaki Island, Iriomote Island, and the main island of Okinawa, and conducting phylogenetic analysis, it was found that there are two types of *Termitomyces* sp. that grow naturally in Japan. As a basic study for artificial cultivation, mycelial growth tended to be better in a medium mainly composed of bark compost than in a wood sawdust medium. No effect of carbon dioxide was observed on mycelial growth. Microbial flora analysis of termite nests (the fungus comb), confirmed the presence of *Xylaria escharoidea* in fungi. Among the bacteria, it was found that there are many bacteria such as actinomycetes and rhizobia. The anti-cancer activity was confirmed as a functional study of mycelium.

研究分野：きのこ学、森林微生物学、菌学

キーワード：オオシロアリタケ *Termitomyces* sp 培養特性 人工栽培 分子生物学的検討 菌菌 機能性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アジアやアフリカに自生し濃厚な旨味を持つ高級食材である亜熱帯性食用担子菌オオシロアリタケ属菌 (*Termitomyces* sp.) は、昆虫のパートナーとなり生活環を維持している共生菌であり、近年生理活性化合物の学術報告が相次いで発表されている注目の薬食用きのこである。共生パートナーであるタイワンシロアリの巣 (菌菌) から子実体が発生する。シロアリは菌菌の外で、落ち葉や枝を食べシロアリの体内である程度分解されるが、未消化の液体状の糞として菌菌に積み重ねられる。それが、オオシロアリタケの培地として形成され、そこにオオシロアリタケ菌糸を培養する。このように、シロアリは、菌菌の中に有機物を運び培地を調整しきのこを栽培することにより、栄養分を確保する。一方、きのこはシロアリに培養されることにより、生きる場所を確保すると推測されている。この菌類と昆虫との関係は、絶対相利共生で独自に進化した生態系を形成する生物としてよく知られているが、この絶対相利共生関係の生態系は未だ謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究のアジアやアフリカ大陸の広い範囲で自生し人工栽培化が望まれているオオシロアリタケの子実体形成メカニズムを解明すると共に、新たな機能性研究の学術基盤を構築することにある。菌類と昆虫との相利共生関係の本質に迫ることができる独創的な研究課題である。さらに、オオシロアリタケの民間療法で伝わっている薬理効果の科学的根拠を示すことは、新たな創薬シーズとなり得るため、申請者の研究スタートとして世界に先駆けてデータベースを構築する。本研究の最初のステップとして、石垣島、西表島、沖縄本島に分布しているオオシロアリタケ子実体と菌菌を採取し、それらの分子生物学的検討と生態的特徴の把握を推進すると共に、菌菌の微生物群叢を解析した。さらに、日本産オオシロアリタケの抗ガン活性メカニズムの解明に挑んだ。

3. 研究の方法

- (1) 供試菌株：石垣島、西表島、沖縄本土の *Termitomyces* sp. 子実体から分離した 45 株。
- (2) 菌糸伸長試験：供試菌株 45 菌株を PDA (ポテト抽出液、デキストロース、寒天) 培地に接種し、菌糸伸長を測定した (n=9)。
- (3) バーベンダム反応試験：3.5mM α -ナフトールを溶解したエタノール溶液を PDA に添加した培地に菌糸伸長試験にて成長が良好で、菌糸の形態が異なる 5 菌株 (TM14, 26, 76, 108, 120) を接種し、バーベンダム反応の有無を観察した。
- (4) 抗菌活性試験：5 菌株の菌糸体、および菌菌のメタノール抽出液において、大腸菌と黄色ブドウ球菌の増殖に対する阻害活性を測定した。それぞれを加えたマイクロプレート (96 ウェル) を 37°C、500 rpm で 18 時間培養し、その後 600nm での吸光度を測定した。ソルビン酸を陽性対照として使用した。
- (5) 菌糸成長における二酸化炭素の影響：5 菌株を PDA 培地上に接種した後、5%CO₂ インキュベーターに入れ培養した (温度 25°C)。
- (6) 固形培養試験：3 種類の固形培地 (木粉、ピートモス、バーク堆肥) を使用して、試験管内に接種した 5 菌株菌糸体の成長を測定した (温度 25°C)。
- (7) 菌菌の真菌叢解析、および細菌叢解析：菌菌の 18s rRNA 配列 (ITS 領域)、およびバクテリアの 16S rRNA 領域 (V3-V4) を増幅・シーケンスを行い、OTU 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 菌糸伸長試験

供試菌株 *Termitomyces* sp. 45 菌株を用いて、菌糸伸長試験を行った結果を Fig.1 に示した。その結果、比較的菌糸伸長が良好で、菌糸形態も異なる TM14, 26, 76, 108, 120 の 5 菌株を選択した。

(2) *Termitomyces* sp の分子生物学的検討

菌糸伸長試験により選択した 5 菌株の詳細を Table 1 に、系統樹を Fig. 2 に示した。その結果、TM14, 26, 76, 120 の 4 菌株は、沖縄由来の菌株である *Termitomyces* sp. YO198 (AB968241) と 99% の相同性を示し TM108 株は、ベトナム由来の菌株である *Termitomyces* sp. BD4 (MF163149) と 99% の相同性を示すことが判明した。こ

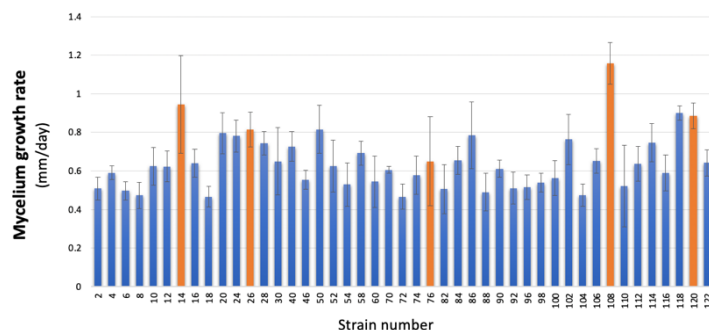


Fig.1 *Termitomyces* sp. 45株の菌糸伸長試験 (n=9) 平均値 ± SD.

Table 1 *Termitomyces* sp. 5菌株におけるITS領域塩基配列の決定とBlast検索による相同性検索

Strain No.	Base pairs	Geographic origin	Identified as	Identity	GenBank ID
14	570	Iriomote, Oohara, Okinawa, Japan	<i>Termitomyces</i> sp. YO198	99 %	AB968241
26	570	Iriomote, komi, Okinawa, Japan	<i>Termitomyces</i> sp. YO198	100 %	AB968241
76	570	Naha, syuri, Okinawa, Japan	<i>Termitomyces</i> sp. YO198	99 %	AB968241
108	638	Iriomote, Oomijiya, Okinawa, Japan	<i>Termitomyces</i> sp. strain BD4	99 %	MF163149
120	570	Ishigaki, banna, Okinawa, Japan	<i>Termitomyces</i> sp. YO198	99 %	AB968241

の結果より、沖縄には2種の *Termitomyces* sp. が存在し、TM14, 26, 76, 120 は、100%のブートストラップ値で、タイ由来の *Termitomyces radicans*(LC068787)、*Termitomyces clypeatus*(HQ702547)、および *Termitomyces bulbothizus*(HM230663) と同一のクレードを形成し、TM108 株は、100%のブートストラップ値で *Termitomyces* sp. BD4 (MF163149) と同一のクレードを形成することが判明した。

(3) 生態的特徴

バーベンダム反応: 結果を Fig. 3 に示した。TM14, 26, 76, 120 の4菌株は、反応液が菌糸成長を阻害しているが、紫色に変色していた。しかしながら、TM108 のみは、菌糸成長が認められたが、変色が認められなかった。このことから、TM108 はラッカーゼを持っていない可能性が示唆された。このバーベンダム反応でも、TM108 は、他の菌株とは性質が異なる種であることが確認できた。

二酸化炭素濃度の影響: 試験を行った5菌株で、二酸化炭素濃度の影響は認められなかった。

抗菌活性試験: 抗菌活性の結果は、0.1~3mg/ml の範囲において、菌糸体および菌菌のメタノール抽出液では、大腸菌および黄色ブドウ球菌の増殖を抑えることは確認できなかった。

(4) 固形培地での成長試験

Termitomyces sp. 5 菌株の木粉、ピートモス、バーク堆肥を加えた固形培地での成長を比較検討した (Fig. 4)。5菌株で平均的に成長が最も良かったのが、バーク堆肥の培地であり、ピートモスでは成長にばらつきが見られ、木粉培地では成長が認められない菌株もあった。このことから、現時点では、バーク培地での菌糸成長が最も良好であると考えられるが、菌糸成長は全体的にとっても遅かった。

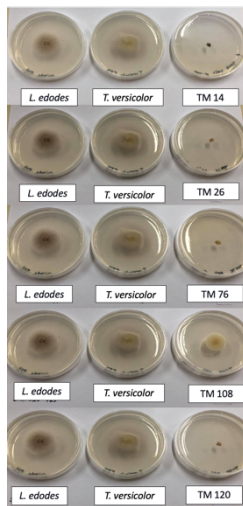


Fig. 3 *Termitomyces* sp. 5 菌株のバーベンダム反応

(5) 菌菌の菌叢解析

シロアリの巣である菌菌の菌叢解析の結果を Fig. 5 に示した。菌菌内には、子嚢菌 (*Xylaria escharoidea*) の存在が確認されたが、その割合は極微量であり、担子菌類は、ほぼ *Termitomyces* sp. 属菌のみであった。一方、菌菌内の細菌叢解析では、放線菌ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) や根粒菌 (*Burkholderiaceae*) が非常に高い割合で発現していた。

これら菌菌内に存在する放線菌を始めとする共生微生物群が特殊の抗生物質を分泌し、*Termitomyces* sp. の菌糸を害菌から防御している可能性が示唆された。例えば、菌菌を害菌から守っている放線菌が同定され、その共生系を再現できれば、特殊な二次代謝物の存在を知ることができる。これまで謎であったシロアリと *Termitomyces* sp. 属菌との絶対相利共生関係を成り立たせるには、菌菌内に共生する微生物群の影響は大きいのではないかと考えている。

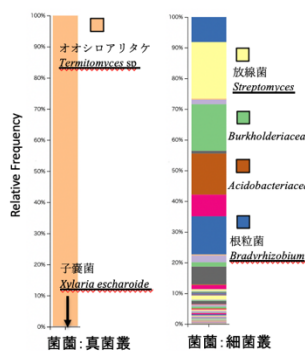


Fig.5 菌菌の菌叢解析

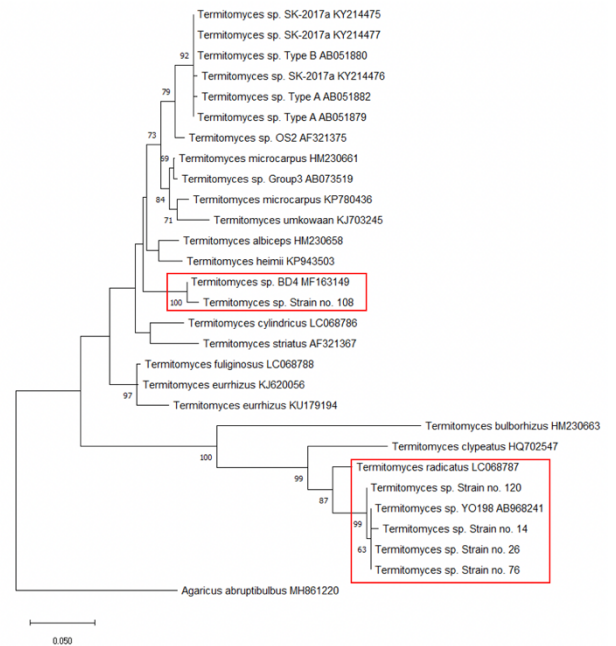


Fig. 2 *Termitomyces* sp. のITS領域に基づく最尤法 (Maximum likelihood analyses, ML) による系統樹。外群として、*Agaricus abruptibubus* を使用した。←

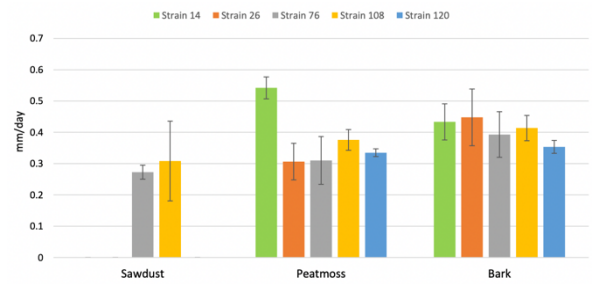


Fig. 4 木粉、ピートモス、バーク堆肥の固形培地による菌糸成長試験

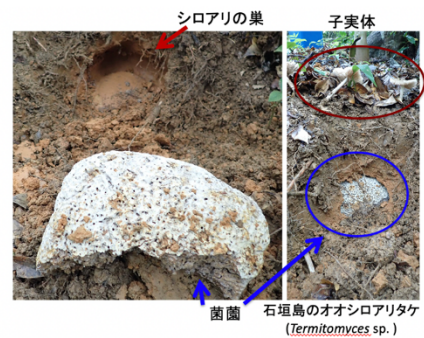


Fig.5 菌菌の菌叢解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Suphachai Tharavecharak, Ichiro Kamei, Etsuko Harada.
2. 発表標題 Culture characteristics and functional properties of Termitomyces sp. subtropical edible mushroom
3. 学会等名 令和2年度DOL/LSF共同利用・共同研究成果発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	スパチャイ タラヴェーシャラック (Suphachai Tharavecharak)	宮崎大学・農学研究科・学生 (17601)	
連携研究者	亀井一郎 (Kamei Ichiro) (90526526)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------