

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380083

研究課題名(和文) マツタケ菌根のケミカルエコロジー

研究課題名(英文) Chemical Ecology of Mycorrhizal Matsutake

研究代表者

平井 伸博 (Hirai, Nobuhiro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00165151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：マツタケはアカマツの菌根菌であり、その子実体は環状に形成される。このフェアリーリングの土壌は密度の高いマツタケ菌糸を含みシロと呼ばれている。シロはグラム陰性菌や枯草菌に対して抗菌活性を示す。本研究では、シロに含まれる抗菌活性物質を単離、同定することを目的とした。シロの20% MeOH 抽出物をODSならびにアニオン交換樹脂により精製した。活性画分から得られた結晶のX線解析により、主成分はシュウ酸と同定した。しかし抗菌活性画分の活性は、そこに含まれるシュウ酸よりも明らかに強かった。抗菌物質はシュウ酸そのものではなく、その抗菌活性を増強する無機物質が共存している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Matsutake is a typical ectomycorrhizal fungus associated with roots of red pine, and forms a fairy ring of fruiting bodies. The area of the fairy ring contains active mycorrhizas, and called as shiro. The previous study reported that the shiro contained an antimicrobial substance. The antimicrobial substance has been remained unknown for 47 years. Our objective is isolation and identification of the antimicrobial substance from the shiro.

The shiro was extracted with 20% methanol, and the extract was purified with ODS and anion exchange resin to give an active fraction. The active fraction gave a crystalline, which was identified as oxalic acid by an X-ray analysis. However, the antimicrobial activity of the active fraction was clearly higher than that of oxalic acid. This means that the active fraction contains another substance which increases the activity of oxalic acid. The NMR and elemental analysis suggested that the substance was an inorganic compound.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：森林生態 保護 保全 菌根

## 1. 研究開始当初の背景

樹木が健全に生長するためには器官としての根だけでは不十分であり、菌類との共生体である「菌根」を形成することが極めて重要である。菌根形成により、樹木は菌糸を通して土壌から効率よく広範囲から水分や無機リン酸などを吸収することができる。一方、菌根菌は樹木から糖類などの栄養有機物を得るだけでなく、その多くは植物の根と共生してはじめて生育することができる。植物にとって菌根菌は生存のための重要なパートナーである。

アカマツは、生育場所として日当たりのよい山間部稜線や海岸砂地を好む。このような場所の土壌は通気性がよく乾燥しがちで貧栄養である。したがって、アカマツは菌根菌と共生しなければ健全に生長することが難しい。アカマツの典型的な菌根菌はマツタケである。他にもアカマツ菌根菌としてハツタケやケロウジ、アマタケ、キシメジなどが知られているが、食材としてマツタケの有用性は群を抜いている。

マツタケ菌根が旺盛に生育している領域は、菌根と菌糸が密集した「シロ」と呼ばれる白いマットを形成する。マツタケの子実体はシロの周縁部に環状に並んで生え、フェアリーリングを形成する(写真1)。シロは徐々に生長拡大していくので、マツタケ子実体によるフェアリーリングの直径も毎年大きくなっていく。マツタケ子実体を



写真1 マツタケのフェアリーリング  
伊藤・岩瀬ら(1997)

発生させるにはシロの維持と拡大が極めて重要であり、マツタケの人工栽培においても、シロの維持と育成が最大の課題となっている。

シロ外側の土壌には細菌や放線菌、糸状菌など多くの微生物が存在しているのに対して、シロには *Mortierella* 属以外の微生物はほとんど存在しない(小原, 浜田, 1967)。この理由としてシロを形成する菌根が抗菌物質を有することが示唆されている。すなわち、シロから採取した菌根はシロ周辺の土壌細菌に対して顕著な抗菌活性を示すのに対して(写真2)、シロ外部の根やその年新しく伸びたばかりの根、樹齢2年のアカマツの根は抗菌活性を示さない。また、マツタケの菌糸と子実体、胞子も抗菌活性を示さない。したがってこの抗菌物質はシロを形成している菌根に特有であり、雑菌や有害菌を駆逐することによってシロを維持し拡大する重要な役割を果たしていると推定される。この抗菌物質の単離同定は1970年代に試みられ、マツ類に多く含まれているピネンやリモネンなどのモノテルペンが活性本体と報告されている(鶴田, 川合, 1979)。このため、抗菌物質の同定は解決したとするマツタケ研究者が多く、それ以上の追求は全くなされてこなかった。この背景には1980年代以降マツタケ価格が高騰し、マツタケシロを入手することが極めて困難になったこともあると思われる。

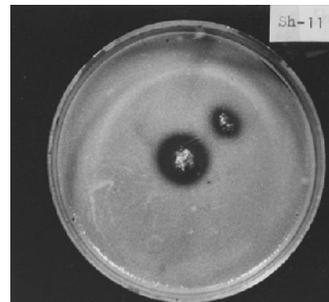


写真2 マツタケシロ菌根の抗菌活性  
小原(1968)

本研究代表者はかねてよりこのシロの抗菌物質に関心を有しており、数年前から研究を開始した。先ずモノテルペンの抗菌活性を追試したところ、報告に反してそれらの抗菌活性は極めて弱く、モノテルペンが活性本体ではないことを確信した。さらに、マツタケ以外の菌が感染した野生アカマツ菌根を入手し、その抗菌物質を調べた結果、ジテルペンのトタロールが菌根の主要な抗菌物質であることを初めて見出した。しかし、本来の研究対象であるマツタケシロは入手が極めて困難で、その抗菌物質研究を進めることはできなかった。しかるに最近、京都府の研究協力者のおかげでようやくマツタケシロを入手できる道が開け、マツタケシロを対象として本格的に研究を開始できる準備が整った。予備試験によると、マツタケシロが実際に抗菌活性を示すこと、抗菌物質はトタロールよりも高極性で紫外吸収を持たない物質であることが示唆されている。そこで本研究は以下を目的として研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) マツタケシロが生産する抗菌物質を単離同定するとともに、2) 菌根における抗菌物質の生成機構ならびに 3) シロの維持と拡大における抗菌物質の生態的役割を解明し、4) 抗菌物質の応用によるシロの保護と育成を通してマツタケ人工栽培に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) マツタケシロ採取地の選定と採取

京都府下の山林においてマツタケ子実体の発生やシロの生育状況を観察し、生育の旺盛なシロを選定し、マツタケ菌根を含むシロを採取する。

### 2) 抗菌試験

抗菌試験の被験菌として *Bacillus subtilis* を用いる抗菌活性試験には菌寒天ペーパードイスク法を用いる。

### 3) シロの抽出と抗菌物質の単離・構造決定

シロの抽出物から抗菌物質を抗菌試験で活性をモニターしながら、各種クロマトグラフィーを利用して単離し、各種機器分析により構造決定する。

### 4) 抗菌物質の検出定量法の確立と含量分析

マツタケシロの抗菌物質の検出定量法を、高速液体クロマトグラフやガスクロマトグラフなどを利用して確立する。その方法を用いて、マツタケシロにおける抗菌物質含量の周年変化を定量分析し、シロの拡大速度との相関を考察する。

### 5) 抗菌物質の抗菌スペクトル測定

マツタケシロ抗菌物質の、シロ内外の土壤微生物に対する抗菌活性を調べ、抗菌スペクトルを明らかにし、マツタケシロ内外の抗菌物質濃度と微生物相との相関を考察する。

### 6) 抗菌物質の生態的役割の総合考察

抗菌物質の含量と抗菌スペクトルに基づいて、菌根の維持と拡大さらには子実体形成における抗菌物質の生態学上の役割を総合的に考察する。

### 7) 抗菌物質のマツタケシロ育成への応用

アカマツ苗を植えた土壌をあらかじめ抗菌物質処理し、そこにマツタケ菌を接種することにより、抗菌物質のシロ育成促進効果を調べる。野外で育成中のシロにも抗菌物質処理を行いシロ拡大に対する効果を調べる。

## 4. 研究成果

### 1) シロの採取

マツタケシロの試料は京都府森林技術センター坂井研究林ならびに長野県上伊那郡中川村と同県下伊那郡大鹿村で採取した

### 2) シロの抗菌活性

マツタケシロの試料を直接菌寒天培地に置床して抗菌活性を評価したところ、坂井研究林（写真3 左）と長野県のいずれの菌根、シロ土壌ともに抗菌活性が認められた。また、菌根を形成していない根と子実体には活性が認められず、抗菌活性物質が菌根特異的に生産されることが示された。

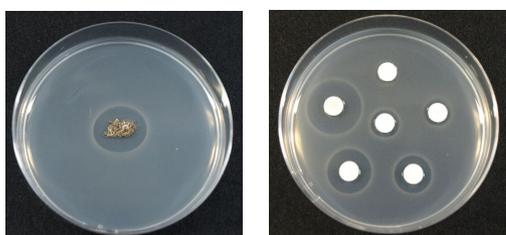


写真3 シロ（左）およびシロ土壌抽出物（ペーパーディスクに含有）の抗菌活性菌寒天法（被験菌：*Bacillus subtilis*）

抽出物の抗菌活性試験はペーパーディスク法により行った。長野県と坂井研究林のマツタケシロの20% MeOH 水溶液抽出物はいずれも、0.1-0.3 mg で活性を示し、同じ抗菌物質が含まれていることが強く示唆された（写真3 右）。

### 3) シロにおける抗菌活性の分布

抗菌活性のシロ内外における分布を確かめるために、坂井研究林の No.11 マツタケシロにて活性菌根帯ならびにフェアリーリング中心部および活性菌根帯外側より土壌を採取し、20% MeOH 抽出物の活性を比較した。その結果、抗菌活性はフェアリーリング中心部、外部土壌に比べて活性菌根帯のほうが明らかに強かった。

### 4) 抗菌物質の精製

坂井研究林マツタケシロの 20% MeOH 抽出物を ODS カラムにより精製したところ、0% MeOH 溶出物に抗菌活性成分が溶出した。長野県アカマツのマツタケ菌根、ツガのマツタケ菌根の抗菌物質も同様に ODS カラムから0% MeOHで溶出した。坂井研究林マツタケシロ抽出物の ODS 0% MeOH 溶出物に含まれる主成分はグルコース等の糖類であった。

抗菌活性画分のHPLC分析を行ったところ、単糖類のピークは認められるものの、活性物質に相当するピークを検出することはできなかった。ゲルろ過やポリアミンカラムなどによる精製も試みたが、いずれも糖類と活性成分を分離することはできなかった。唯一、陰イオン交換樹脂のDEAEには保持され、活性物質が0.03-0.3 Mの塩酸水溶液で溶出することが分かった。

### 5) 活性成分のスペクトルによる構造解析

DEAEカラム由来の抗菌活性画分は、<sup>1</sup>H NMRスペクトルでは顕著なシグナルを示さなかったが、<sup>13</sup>C NMRスペクトルでは弱いながらも有意なシグナルが検出され、シュウ酸と推定された。抗菌活性画分の水溶液から無色桿状結晶が得られ、そのX線結晶解析よりシュウ酸一水和物であることが分かった。しかしシュウ酸の抗菌活性は弱く、活性画分の抗菌活性はそれに含まれるシュウ酸より明らかに強かった。抗菌活性画分には、シュウ酸の抗菌活性を増強する無機物が含まれている可能性が強く示唆された。

無機物分析の結果、フッ素イオン、リン酸、塩素イオン、臭素イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、カリウム、カルシウム、マグネシウムはどれも有意に含まれていなかった。シュウ酸は金属と錯体を形成しやすいことが知られているので、抗菌物質はシュウ酸の金属錯体であると推定している。

## 6) まとめ

土壌中の酸性物質としてこれまでにシュウ酸、コハク酸をなどの有機酸や硫酸アルミニウムなどが知られているが、マツタケシロの抗菌物質はそれらのどれにも該当しない。マツタケシロの抗菌物質は新規物質の可能性がある。今後、X線結晶構造解析などによって化学構造を明らかにする必要がある。抗菌物質の検出方法を確立することができれば、抗菌物質の分布を測定することも可能になる。現時点では、この抗菌物質の生成機構は全く分かっていない。抗菌物質の分布やその由来、生態学的役割などが分かれば、マツタケの人工栽培に役に立つ可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)すべて査読あり

1. Endo, N., Kawamura, F., Kitahara, R., Sakuma, D., Fukuda, M., Yamada, A., Synthesis of Japanese Boletus edulis ectomycorrhizae with Japanese red pine. *Mycoscience*, in press (2014).
2. Hatoh, K., Izumitsu, K., Morita, A., Shimizu, K., Ohta, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H., Ota, Y., Tanaka, C. Transformation of the mushroom species *Hypsizigus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola rondosa* by an Agrobacterium-mediated method using a universal transformation plasmid. *Mycoscience*, **54**, 8-12 (2013). DOI:10.1016/j.myc.2012.08.00215.
3. Yamada, A., Endo, N., Murata, H., Ohta, A., Fukuda, M. *Trichoroma matsutake* Y1 strain associated with *Pinus densiflorae* shows a gradient of in vitro ectomycorrhizal specificity with *Pinaceae* and oak hosts. *Mycoscience*, **55**, 27-34 (2013). DOI:org/10.1016/j.myc.2-13.05.004
4. Ota, Y., Yamanaka, T., Murata, H., Neda, H., Ohta, A., Kawai, M., Yamada, A., Konno, M., Tanaka, C. Phylogenetic relationship and species delimitation of matsutake and allied species based on multilocus phylogeny and haplotype analyses. *Mycologia*, **104**, 1369-1380 (2012). DOI:10.3852/12-068
5. Phan, NDH., Yamada, A., Shimizu, K., Noda, K., Dang, LAT., Suzuki, A. A sheathing mycorrhiza between the tropical bolete *Phlebopus spongiosus* and *Citrus maxima*. *Mycoscience*, **52**, 347-353 (2012). DOI:10.1007/s10267-011-0177-5
6. Yamanaka, T., Maruyama, T., Yamada, A., Miyazaki, Y., Kikuchi, T. Ectomycorrhizal formation on regenerated somatic pine plants after inoculation with *Tricholoma matsutake*. *Mushroom Science and Biotechnology*, **20**, 93-97 (2012).
7. Kondo, S., Sugaya, S., Sugawa, S., Ninomiya, M., Kittikorn, M., Okawa, K., Ohara H., Ueno, K., Todoroki, Y., Mizutani, M., Hirai, N. Dehydration tolerance in apple seedlings is affected by an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. Dehydration tolerance in apple seedlings is affected by an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *J. Plant Physiol.*, **169**, 234-24 (2012). DOI:10.1016/j.jplph.2011.09.007
8. Todoroki, Y., Narita, K., Muramatsu, T., Shimomura, H., Ohnishi, T., Mizutani, M., Ueno, K., Hirai, N. Synthesis and biological activity of amino acid conjugates of abscisic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **19**, 1743-1750 (2011). DOI:10.1016/j.bmc.2011.01.019
9. Okada, K., Okada, S., Yasue, K., Fukuda, M., Yamada, A. Six-year monitoring of pine ectomycorrhizal biomass under a temperate monsoon climate indicates significant annual

fluctuations in relation to climatic factors.

*Ecological Research*, **26**, 411-419 (2011).

DOI:10.1007/s11284-011-0800-0

10. Morita, A., Saitoh, Y., Izumitsu, K., Tanaka, C. Molecular organization of the mating type (Mat) locus of *Exserohilum monoceras* (*Setosphaeria monoceras*), a bioherbicide agent for *Echinochloa* weeds. *Mycoscience*, **53**, 92-101 (2011).

DOI:10.1007/s10267-011-0141-4

〔学会発表〕(計6件)

1. 西野勝俊, 城美沙緒, 大泉一也, 藤田徹, 山田明義, 田中千尋, 笹森貴裕, 時任宣博, 平井伸博. アカマツ菌根圏土壌の抗菌活性物質、日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 30 日, 明治大学(生田キャンパス).
2. 住田卓也, 泉津弘佑, 田中千尋. 灰色かび病菌のオートファジー関連遺伝子 BcAtg1 の機能解析, 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2013 年 11 月 20 日-11 月 21 日, つくば国際会議場.
3. Ogawa, W., Endo, N., Yamada, A. Fruit-body formation of edible mycorrhizal *Cantharellus* from Japan in pot culture with pine host. 7th International Workshop of Edible Ectomycorrhizal Mushroom. 2013 年 7 月 31 日,
4. 早川記央, 村田仁, 山田明義. マツタケ単一子実体由来の孢子分離株集団の選抜と培養特性, 日本菌学会第 57 回大会, 2013 年 6 月 7 日-9 日, 東京農業大学.
5. 小林 久泰, 山田明義. 植木鉢を用いたマツタケ菌根苗順化の試み, 日本きのこ学会, 2012 年 9 月 6 日, 東京都, 東京農業大学.
6. 山田明義. マツタケ研究における菌根合成法の展開, 日本きのこ学会(招待講演), 2011 年 9 月 2 日, 信州大学農学部.

〔図書〕(計1件)

1. 大園享司、田中千尋, 菌類の事典 基礎編 VI 生態 15.3.3 菌類間の共生、朝倉書店 2013

年.

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 伸博 (HIRAI Nobuhiro)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：00165151

(2) 研究分担者

山田 明義 (YAMADA Akiyoshi)  
信州大学・農学部・准教授  
研究者番号：10324237

田中 千尋 (TANAKA Chihiro)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：60263133

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

藤田 徹 (FUJITA Thoru)  
京都府農林水産技術センター

吉川 正巳 (YOSHIKAWA Masami)  
京都府農林水産技術センター