

マツタケの人工培養を目指して

4年C組 結崎 祈
2年B組 加藤 大翔
指導教員 櫻井 昭

1. 要約

私たちの班は、マツタケの人工培養を目指し、マツタケ菌の純粋培養を試み、なぜマツタケ菌の人工培養が困難であるのか、培養するにはどのような培地条件が必要なのか検討を行っている。昨年はマツタケ菌の菌糸を維持することに成功し、今年は培地の形や成分を変えて成長速度を早める研究を行った。また、私たちが培養している菌糸がマツタケの菌糸であることを証明するために、DNA キットを用いた鑑定を行った。

キーワード マツタケ、クエン酸回路、DNA、菌糸の立体化

2. 研究の背景と目的

マツタケの人工培養の成功例はいまだ報告されていない。私たちは、なぜマツタケは人工培養が困難なのか興味をもち、マツタケの人工培養を目指して研究を平成 23 年度から始めた。1 年目はシイタケの人工培養を成功させ、2 年目からマツタケの人工培養をめざして研究を始め、3 年目にマツタケ菌糸の維持に成功した。今年も昨年維持することができるようになったマツタケ菌糸を用いて成長速度を早めるための培地の検討を行うことにした。また、私たちが培養している菌糸がマツタケであるという証明をするために、DNA キットを使用した鑑定を行った。

マツタケの菌糸は、通常の培地では横方向へ広がっている。しかしマツタケの子実体は、平面的ではなく立体的である。マツタケの菌糸を平面的ではなく立体的に伸び広げれば、子実体形成へと近づくのではないかと考え、今回の実験を行った。

<実験仮説>

マツタケが本来生育する環境である土壌にできるだけ近づけた形状の培地を用いれば、立体的に菌糸が広がる。

<事前準備>

実験を行う場をビニールカーテンで区切り、その中でプラズマクラスターを約 24 時間つけ放しにすることで、できるだけ菌の少ない状態を作る。また、マツタケ菌を扱うときは、クリーンベンチ内で行う。

以下のすべての実験において、この無菌操作は共通で行う。

3. 実験内容

3. 1 マツタケ菌糸の立体化

3.1.1 クラッシュ培地の作成

<研究目的>

<マツタケ培地>

IFO-7 培地と浜田培地の 2 種類の培地を採用している (結崎祈 2014)。培地の組成は以下の通りである。

IFO-7 培地

乾燥酵母	1.5 g
グルコース	6.0 g
寒天	5.4 g
蒸留水	Σ 300ml

浜田培地

乾燥酵母	1.5 g
グルコース	6.0 g
寒天	5.4 g
磷酸カリウム	0.6 g
硫酸マグネシウム	0.3 g
蒸留水	Σ 300ml

<実験方法>

●クラッシュ培地の作成

メスを使用して、シャーレ内の培地を約 5 mm 角にきざみ、クラッシュ状にする。インキュベータ内で、28 度で約 7 ヶ月間培養した。マツタケ菌の培地には今回は 2 種類の培地においてクラッシュ状のものと、通常のをそれぞれ 1 枚ずつ使用した。

●菌糸の広がった面積の算出法

菌糸の広がった所を円と考え、その円に 5mm 方眼の円に外接する正方形を重ねる。円の中に含まれたマス目を数え、その数をクラッシュ培地の菌糸が殖えた培地のかけらの個数とする。このとき、マス目に円の境界がある場合、円内の面積が広ければ円に含まれ、円外の面積が広ければ円に含まれないものとする。クラッシュ培地のかけらはすべて 5mm 角の立方体と考え、菌糸

が広がった範囲内のかけらの表面は全面均等に菌糸が広がっているものとする。

かけらの個数とかけらの表面積の積が菌糸の広がった面積となる。計算の際、円周率 π は 3.14 とする。

			1	2	3	4			
	5	6	7	8	9	10	11	12	
	13	14	15	16	17	18	19	20	
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	61	62	63	64	65	66	67	68	
	69	70	71	72	73	74	75	76	
			77	78	79	80			

<実験結果>

通常のもは培地の表面上にしか菌糸が広がらなかったが、クラッシュ培地では培地の隙間に菌糸が入り込み、表面上だけでなく下方向にも伸びた。表面上の広がり、クラッシュ培地の場合、通常のものよりも 1 cm ほどせまくなっていた。算出法に従って面積を算出したところ、通常のものが 3846.5mm²、クラッシュしたもののが 12000mm² となった。

なお、計算式は以下のとおりである。

- 通常の培地
 $35(\text{mm}) \times 35(\text{mm}) \times 3.14 = 3846.5(\text{mm}^2)$
- クラッシュ培地
 $5(\text{mm}) \times 5(\text{mm}) \times 6 = 150(\text{mm}^2)$
 $150(\text{mm}^2) \times 80(\text{個}) = 12000(\text{mm}^2)$

<実験考察>

この実験により、培地をクラッシュ状にするとマツタケ菌糸は横だけでなく下方にも広がるということがわかった。また、クラッシュ培地で広がった菌糸の総面積は通常の培地の約4倍になっていたことから、菌糸の成長速度は培地をクラッシュすることで上げることができるといえる。以上のことから、さらに厚みのある培地を作成し、菌糸を植え継げば上下左右に菌糸が広がり、さらに立体的に菌糸を広げられる可能性が考えられた。そこで、次により厚みのあるクラッシュ培地を作り、培養することにした。

3.1.2 フラスコクラッシュ培地の作成

<実験仮説>

より厚みのあるクラッシュ培地を作成し、菌糸を埋め込めばより立体的に菌糸が広がるのではないかと考えた。

<実験方法>

3.1.1 で用いた組成の培地をシャーレよりも深さのある200mlの三角フラスコに作成し、薬匙を使用して約5mm角にクラッシュする。この時メスを使用すると、メスの柄が短く作業がしづらいため、柄の長い薬匙を使用した。表面から約1cmの深さのところに菌糸を植え継ぎ、フラスコにパラフィルムを二重に巻いた後、28℃のインキュベータ内で約7ヵ月間培養した。

<実験結果>

植え継いだ周辺の培地が白っぽくなり、菌糸の広がりが確認できた。

<実験考察>

培地をクラッシュし、その中に菌糸を埋め込んだため、フラスコの外側から菌糸の広がりを観察することが困難になり、全方向に増えたかどうかを確認できなかった。固体の培地では、クラッシュされた培地の隙間をぬって立体的に菌糸が広がると考え、実験を行ったが、この方法では培地が不透明なため菌糸の観察が困難である。菌糸の広がりを正確に観察するためには、何らかの工夫が必要と考えられる。

3.1.3 液体培地

<実験仮説>

液体培地を使用すれば菌糸の伸びを妨げず、なおかつ菌糸の観察が可能になるのではないかと考えた。

<実験方法>

3.1.1 で用いた培地の組成から寒天を抜き、IFO-7 培地と浜田培地の液体培地を500mlの三角フラスコに作成し、植え継ぎを行う。28℃のインキュベータ内で、約5ヵ月間培養した。

<実験結果>

植え継いだ菌糸の塊を核として、放射状に菌糸が伸びたが、半径1.5cmほどにしかなかった。

<実験考察>

液体培地では固形培地と比べてあまり菌糸の広がりが見られなかった。このことから菌糸が伸び広がるためには、つたい広がるための地盤が必要だと考えられる。

3. 2 新規培地の検討

3.2.1 クエン酸およびフマル酸培地

<実験目的>

マツタケ菌の成長速度は非常に遅く、現在実験に使用している浜田培地と IFO-7 培地では成長に多くの時間がかかってしまう。そこで 3 年前「グルコースの代わりにクエン酸回路で作られる有機酸を培地に直接加えれば、マツタケ菌の成長速度が上がるのではないか」という仮説を立て実験を試みたが、実験環境が整っていなかったこと、pH 調整をしなかったため培地が固まらなかったことなどが原因でマツタケ菌が殖えなかった。

今回は実験環境を整え pH 調整を行い、再度実験を行った。

<実験仮説>

グルコースの代わりにクエン酸回路で作られる有機酸を培地に直接加えれば、マツタケ菌の成長速度が上がるのではないか。

<実験方法>

IFO-7 培地のグルコースの代わりに、それぞれクエン酸、フマル酸を加え、pH を 7 にできるだけ近づけた培地を作成し植え継ぎを行う。

クエン酸とフマル酸は 250ml の IFO-7 培地に含まれているグルコース 5g の分子量と、同じ分子量になるように加えた。

植え継ぎ後、シャーレにパラフィルムを二重に巻き、28℃のインキュベータ内で約 9 ヶ月間培養した。

<実験結果>

クエン酸を加えた培地は菌糸が枯れてし

まい殖えなかった。フマル酸を加えた培地は殖えたが、浜田培地や IFO-7 培地に比べて菌糸の成長速度が非常に遅かった。

<実験考察>

問題点を解決したが仮説は証明されなかった。今回の培地は pH を 7 にしたが、通常の培地は pH を 5.5 にしているため、この pH の差が、菌糸が殖えにくい原因の 1 つだと考えられる。今回の結果がクエン酸とフマル酸のみで見られるものなのかを確認するために、他の有機酸の場合も実験する必要があると考えられる。

3.2.2 おがくず培地

<実験目的>

3.1.1 での実験では寒天培地をクラッシュし、本来生育する環境である土壤に近づけた。新規培地の検討にあたり、シイタケの培養に使われているおがくず培地を使用すれば寒天培地よりも土壤に近い培地になると考え、実験を行った。

<実験仮説>

おがくず培地を使用すれば寒天培地よりもより立体的に菌糸が広がる。

<実験方法>

材料をすべて混ぜた後ポットに入れ、滅菌のためにオートクレーブにかけて培地を作成する。表面から約 2cm の深さの所に菌糸を植え継ぎ、28℃のインキュベータ内で 7 ヶ月間培養した。培地の組成をまとめると以下のようなになる。

おがくず培地

おがくず(シラカバ)	900ml
米ぬか	300ml
水	715ml

<実験結果>

培地を 5 つ作成したが、3 つはカビに汚染されてしまった。残った 2 つの培地もポットの外側からは菌糸の広がりを確認できなかった。1 つだけポットを開け、中を観察したが、菌糸の広がりは見られなかった。

<実験考察>

寒天培地作成時と同環境で行ったのにもかかわらず、カビに汚染されてしまったため、この原因を突き止める必要がある。また、おがくずに使用されている木材の種類によって違いが生じるかどうかも検討したい。

3. 3 マツタケの DNA を用いた判別法

3.3.1 実験目的

私たちは植え継ぎを繰り返し、マツタケ菌を増やしている。培養している菌糸が本当にマツタケの菌糸であるのかを確認するために DNA 抽出キットを使用し、判別を行った

3.3.2 実験仮説

現在培養している菌糸はマツタケの菌糸である。

3.3.3 実験方法

DNA 抽出キット (DNeasy® Plant Mini Kit (50)) に記されている操作手順に従い DNA を抽出する。その後、分光器で抽出で

きた DNA と濃度を計測する。計測の結果は以下のとおりである。

	抽出量	純度 260um/280um
サンプル 1	8.5µg/µL	1.25
サンプル 2	6.4µg/µL	1.25
サンプル 3	26.7µg/µL	25.8

これらのサンプルのうち、今回はサンプル 1 とサンプル 2 を PCR 法に用いた。PCR reaction mix の組成は以下のとおりである。

• 12.5n g のゲノミック DNA	
サンプル A	0.085 µ g / µ L
サンプル B	0.064 µ g / µ L
• TmF	10nm / µ L
• TmR	10nm / µ L
• PCRbuffer(×10)	2.5 µ L
• dNTP	2.5 µ L
• Tug polymerase	0.625U
• DW	Σ25 µ L

使用したプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

TmF CATTTTATTATACACTCGGT

TmR GACGATTAGAAGCCCGACCTA

また、サーマルサイクラーの reaction program は以下のとおりである。

①	95°C	10 分
②	95°C	30 秒
③	55°C	30 秒
④	72°C	1.5 分
②~④を 35 サイクル		
⑤	72°C	8.5 分
⑥	4°C	∞

その後、1.5% の agarose gel を使用して電気泳動を行った。

3.3.4 実験結果

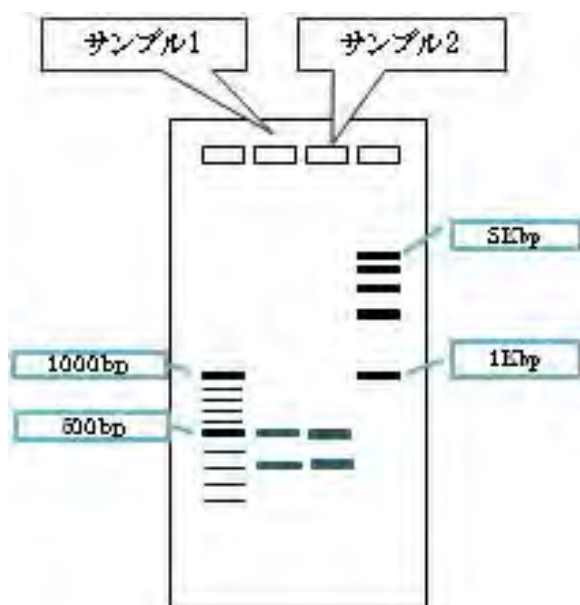
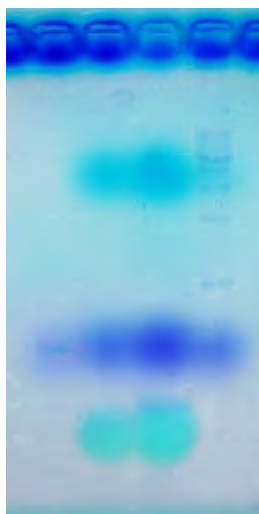


図 1

サンプルがマツタケである場合、図 1 の楕円の位置にバンドが現れる。しかし、今回の実験では 300bp の位置(図下側の楕円)にしかバンドが見られなかった。500bp の位置(図上側の楕円)にも現れていたかもし

れないが、loading buffer と重なってしまい確認ができなかった。

3.3.5 実験考察

電気泳動のとき、agarose gel にある穴にマーカーとサンプルをマイクロピペットを使用して入れるのだが、これがうまく穴に入らず、バッファーへ流れ出てしまったことが、バンドが出なかった原因と考えられる。しかし、300bp の位置には印が出ているため、サンプルがマツタケである可能性が高いと考えられる。

4. 考察

今回の研究で、マツタケの菌糸は培地をクラッシュすれば培地の隙間をぬって広がるが、液体の培地では広がらなかった。このことからマツタケ菌糸が広がるためには、培地に強度が必要だと考えられる。しかし、マツタケは液体中でも菌糸を広げられるということから、酸素の少ない状態でも生育できると考えられる。

5. 今後の課題

今回の実験はいずれも大きな成果を得ることはできなかった。しかし、今回の実験からマツタケの菌糸が広がるためには培地に強度が必要だと考察できたので、どのぐらいの強度があれば菌糸は広がることのできるのかを調べるために固体と液体の間であるゲル状の培地を作成し、実験を行いたい。また、マツタケはアカマツの木の付近に生育するため、現在アカマツとマツタケ菌の関係性を調べるためのアカマツを育成している。このアカマツを利用した新規培地の検討も行いたいと考えている。3.3

節の実験が操作ミス等によりうまくいかなかったため、再度実験を行いたい。

6. 謝辞

本研究活動において、顧問の櫻井先生に、多大なご指導を受け賜りました。また、DNA の抽出、PCR 法、電気泳動法について、DNA 班の米田さんにご指導を受け賜りました。この場をかりて、深く感謝申し上げます。