

木材腐朽菌にとってタンパク質は有害か

静岡県立浜松西高等学校

科学研究部 自然科学班 2年 増井映介 他2名

1 動機

木材腐朽菌であるシイタケは、木材腐朽という言葉にある通り木材から難分解性の糖を分解することで知られており^[1]、私たちはシイタケの木材中の炭水化物や窒素の利用に興味を持った。また、先行研究より動物性の食材で作った培地では植物性の食材で作った培地よりも成長が抑制される^[2]ということが報告されている。私たちはその要因は動物性の食材に多く含まれるタンパク質によるものではないかとの仮説を立て、タンパク質や炭水化物がシイタケ菌糸の成長に与える影響を調べることにした。

2 実験方法

(1) 菌糸の調達

市販のシイタケの軸を半分に切り、内側からシイタケ片を採取した。

(2) 菌糸の継代維持

ジャガイモ片をもとに作られる菌糸培養における標準的な培地である PDA 培地をシャーレ ($\phi 90\text{mm}$) の中央に菌糸を静置し、菌糸がシャーレ端まで広がったら端と中央の中間地点からコルクボーラー ($\phi 4\text{mm}$) で培地ごとくりぬき新たな PDA 培地のシャーレ中央に静置した。以後、この作業を繰り返して菌糸を継代維持し、植え継ぎ前後での菌糸の性質変化がないことを確認した。

(3) 培地の調製

菌糸を培養させる培地として、主に PDA 培地、煮干し培地、ゼラチン、グルコース培地、片栗粉培地を使用した。PDA 培地は、皮をむいたジャガイモ(男爵いも)を薄く切ったものを恒温器(25°C)で約一日乾燥させ、ミキサーで粉末にしたものを利用した。その粉末を 100ml の水に 4g の割合で入れ、20 分間スターラーで攪拌し遠心分離(3,000rpm)後上澄み液をコーヒーフィルターでろ過し、ろ液に対しグルコース(0.5g/100ml)、寒天(1.25g/100ml)を加えて調製した。煮干し培地も同様に、煮干しを粉砕し 100ml の精製水に 16g を加え攪拌、遠心分離し、抽出液に PDA 培地と同様の割合でグルコースと寒天を加え調整した。これを標準煮干し培地とし、上澄み液を 4 倍希釈したものを 4 倍希釈煮干し培地とした。片栗粉やゼラチン、グルコースを用いた培地は遠心分離とろ過の過程を除き、結果に示した濃度になるように調製し、寒天粉末(1.25g/100ml)を加えた。これらの培地は、オートクレーブ(121°C、20 分)で加熱滅菌し、クリーンベンチ内でシャーレに分注した。使用するまでは冷蔵庫内で保管した。

(4) 各種条件における培養・計測

PDA 培地で維持している菌糸をコルクボーラー ($\phi 4\text{mm}$) でくり抜き、各種培地シャーレの中央に静置し、25°C で維持された恒温器内で培養した。計測は平日ほぼ毎日行い、培地での菌糸の直径を成長の指標として計測を行った。菌糸は、直径の最も長い部分を目視で測定し、シャーレ 3~4 枚の平均をとった。なお、コンタミネーションが起きた場合にはそのシャーレを計測の対象から外した。データはそれぞれの直径の長さをシャーレの枚数で割った平均の値である。なおグラフには標準偏差を付した。

3 結果

(1) 先行研究の再現、確認

先行研究の再現、確認のために表1に示した食材を用いたいくつかの培地で実験を行った。

表1

食材	濃度(水 100ml あたりに溶かした量)
ジャガイモ(PDA)	4g
標準煮干し培地	16g
4倍希釈煮干し培地	標準煮干し培地を4倍に希釈
片栗粉	4g

PDA 培地における成長が最も早く、次いで片栗粉、4倍希釈煮干し培地、標準煮干し培地となった。炭水化物を多く含む培地ほど菌糸の成長は早く、タンパク質を多く含む培地ほど菌糸の成長は遅いことが分かった。また、4倍希釈煮干し培地における菌糸の成長のほうが標準煮干し培地のものよりも早かった(図1)。

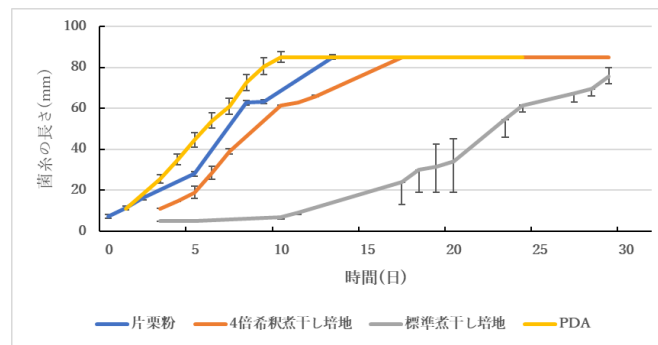


図1 各種培地によるシイタケ菌糸成長への影響

次に、煮干しの濃度を上げることによって菌糸の成長に影響が出るか確認するための実験を行った。

表2

煮干しの濃度(水 100ml あたりに溶かした量)		
標準煮干し培地	2倍希釈煮干し培地	4倍希釈煮干し培地

煮干しの濃度が高くなるほど菌糸の成長が抑制された(図2)。

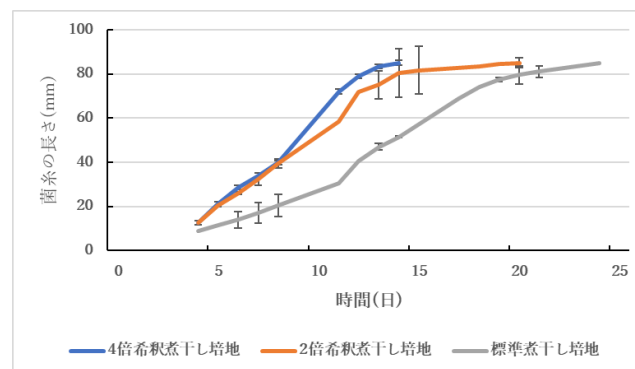


図2 シイタケ菌糸の成長における煮干し濃度の影響

続いて、PDA 培地からでなく濃度の異なる煮干し培地から植え継いだ際の菌糸の成長を確認するための実験を行った。

表3

煮干しの濃度 (水 100mL あたりに溶かした量)	
標準煮干し培地	→4 倍希釈煮干し培地
2 倍希釈煮干し培地	
4 倍希釈煮干し培地	
標準煮干し培地	→2 倍希釈煮干し培地
2 倍希釈煮干し培地	
4 倍希釈煮干し培地	
標準煮干し培地	→標準煮干し培地
2 倍希釈煮干し培地	
4 倍希釈煮干し培地	

濃度によって差があるものの煮干し培地から煮干し培地へ植え継いだほうが PDA 培地から植え継いだものより菌糸の成長が抑制されなかった(図3)。

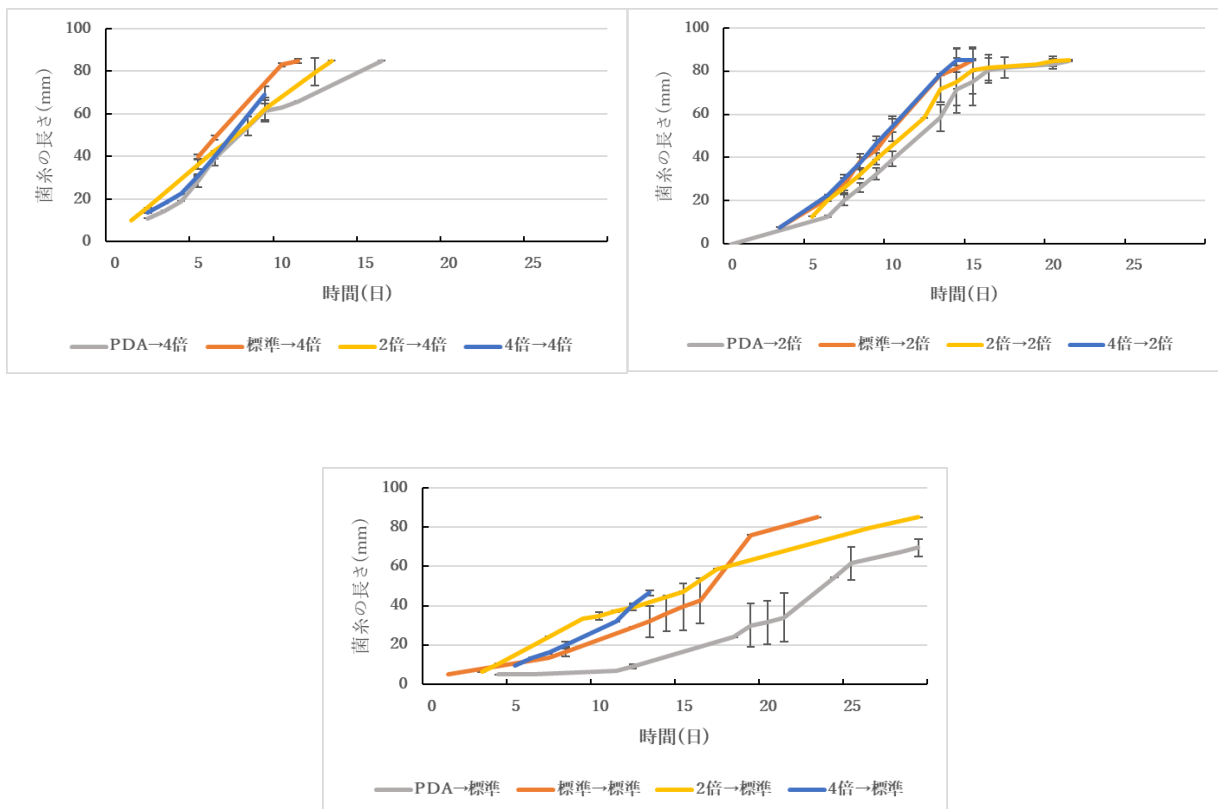


図3 煮干し培地から煮干し培地へ植え継いだ際のシイタケ菌糸への影響

(2) ゼラチン、グルコースを用いた培地による菌糸への影響

煮干し培地やPDA培地での結果がタンパク質、炭水化物によるものかを検討するために以下の実験を行った。

表4

ゼラチン濃度	グルコース濃度	ゼラチン濃度	グルコース濃度
1%	0%	0%	2%
2%		1%	
4%		2%	
1%	1%	4%	4%
2%		1%	
4%		2%	
		4%	

ゼラチン濃度が上がるほど菌糸の成長は抑制された。また、グルコース濃度が変化しても菌糸の成長速度は大きく変化しなかった。ただし、グルコース濃度0%の培地ではゼラチン濃度にかかわらず菌糸の成長が抑制された。(図4)

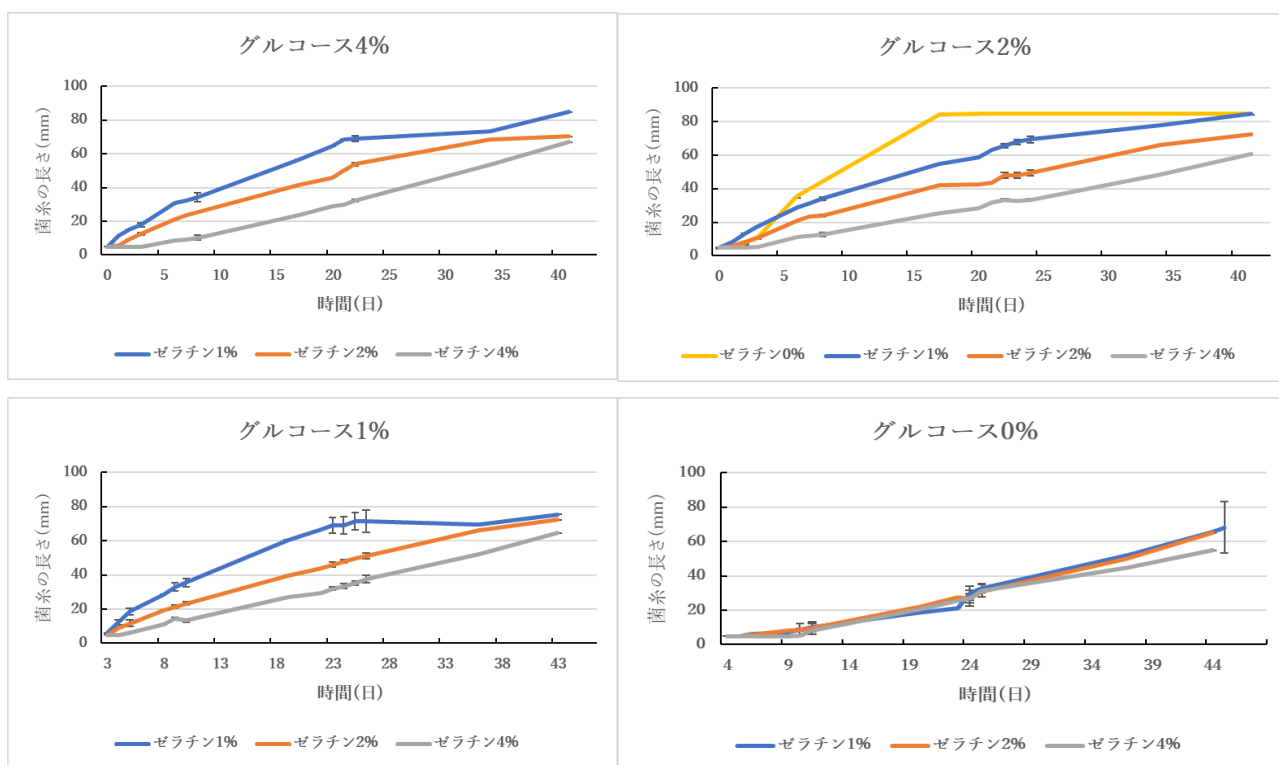


図4ゼラチン、グルコースを用いた培地による菌糸への影響

(3) 微量のタンパク質を用いた培地による菌糸への影響

さらにタンパク質濃度の低い培地における菌糸の成長を確かめるために行った。

表5

使用した煮干し培地		
32 倍希釈煮干し培地	1.6×10 ³ 倍希釈煮干し培地	

ゼラチン濃度 (グルコース濃度は2%)		
0.015%	0.03%	0.3%

1.6×10³倍希釈煮干し培地ではそれより高い濃度である 32 倍希釈煮干し培地や 16 倍希釈煮干し培地の培地よりも成長が抑制された。ゼラチンを用いた培地においても、ゼラチン濃度 0.015%の培地ではそれよりもゼラチン濃度の高い培地よりも菌糸の成長が抑制された(図5)。

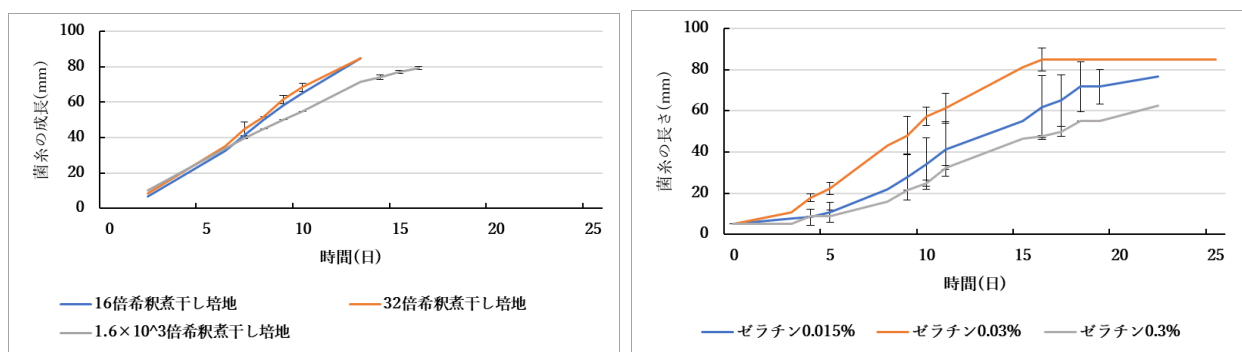


図5 微量のタンパク質を用いた培地による菌糸への影響

(4) 菌糸の密度について

ここまででは菌糸の成長する早さを評価してきたが、物質が菌糸に与える影響を考えるためにはそれ以外の観点も必要であると考えたため、成長した菌糸の密度に着目することにした。

A~Dの培地を比べるとDが最も密度が高くAが低かった。PDA培地における菌糸の密度はA~Dに比べてかなり高く見えた(図6)。

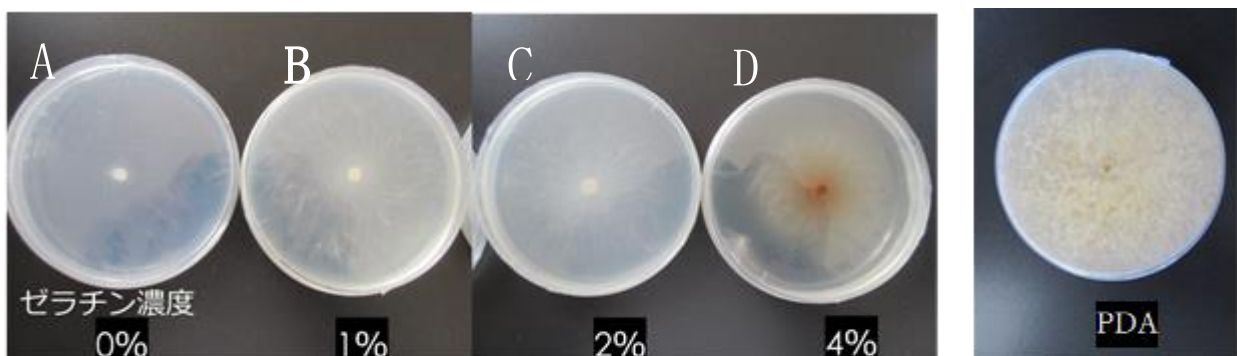


図6 菌糸の密度比較

4 考察

図1より炭水化物が菌糸の成長を促進し、タンパク質が抑制するのではないかと考えられる。また煮干しを用いた2種類の培地の結果より、タンパク質濃度の高いほうが菌糸の成長は抑制されると推測できる。

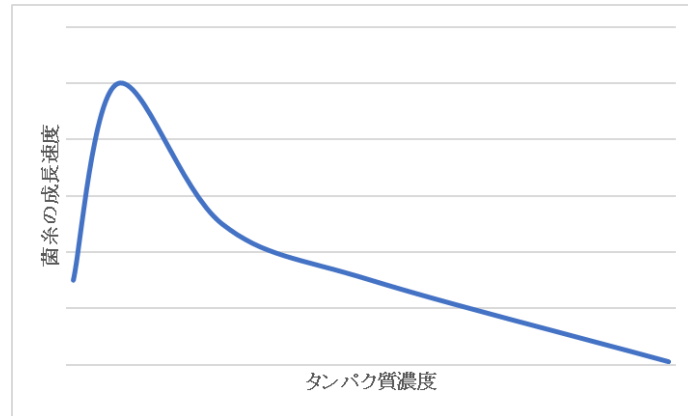


図7 菌糸の成長速度とタンパク質濃度の関係

図2、3よりタンパク質濃度が高い培地ほど菌糸の成長を抑制すると考えられる。また、煮干し培地から煮干し培地へ植え継いだほうが菌糸の成長が抑制されないのは、シイタケ菌糸が煮干し培地に適応した結果ではないかと思われる。

図4よりゼラチン濃度が高い培地ほど菌糸の成長を抑制していることから、タンパク質が菌糸の成長を抑制していることがわかる。しかし、PDA培地にも微量にタンパク質は存在すること、使用したタンパク質濃度はシイタケの生育環境を考慮するとかなり高いと考えられるため、ゼラチン濃度1%よりも低いところにシイタケ菌糸の成長における最適なタンパク質濃度があるのではないかと考えられる。一方、炭水化物は菌糸の成長に大きな影響は与えないが、グルコース濃度0%の培地では菌糸の成長が抑制されていることより、菌糸の成長に最低限必要な物質であると考えられる。

図5によるとタンパク質濃度が最も低い培地では、濃度の高い培地より菌糸の成長が抑制されている。そのため、タンパク質濃度にはシイタケ菌糸の成長における最適な濃度があると考えられる。ゼラチン濃度0.03%というのは推測したPDA培地のタンパク質濃度の値である。そして図5においてゼラチン濃度0.03%における菌糸の成長が最も早く、その前後の濃度の培地ではゼラチン濃度0.03%の培地に比べて菌糸の成長が抑制されている。このことからシイタケ菌糸の成長におけるタンパク質の最適な濃度はPDA培地のタンパク質濃度、あるいはその付近であると考えられる(図7)。これよりもタンパク質濃度が高いとタンパク質によって菌糸の成長が抑制されてしまい、逆に低いと細胞の材料となるタンパク質が培地中にあまり含まれていないため結果的に菌糸の成長が遅くなってしまう可能性がある。1.6×10³倍希釈煮干し培地においても菌糸の成長が抑制されているため、タンパク質以外の物質を含んだ培地でもタンパク質の最適な濃度が影響していると推測できる。

シイタケは木材腐朽菌であり本来の生育場所にはほとんどタンパク質が含まれていないため、多量のタンパク質に対応できないと考えられる。これは「シイタケは窒素の要求量が少なく過剰添加はかえって生育を阻害することが知られている」^[3]との知見とも一致する。タンパク質がシイタケの成長を阻害する原因としてタンパク質を分解する際に発生するアンモニアが関係している可能性も考えられる。

図6よりPDA培地以外の培地ではゼラチン濃度が上がるほど菌糸の密度が増しているように見える。タンパク質を分解して栄養を得られた部分では菌糸をより早くまた多くはやすことが出来るが、分解していない部分ではタンパク質を分解するのに時間がかかるため、菌糸の面積を増やしていくからだと考えられる。ただし、PDA培地のタンパク質含有量は微量であるにも関わらず菌糸の密度が高くなるのは、PDA培地に含まれる炭水化物やタンパク質以外の物質であるミネラルなどの影響も考えられる。

5 課題と反省

タンパク質がシイタケ菌糸の成長を抑制していることがわかったが、その原理まで明らかにすることはできなかった。タンパク質を分解する際に発生するアンモニア等の物質が原因である可能性があるので、今後はそれらの物質を用いた培地でのシイタケ菌糸の成長を調べるなどして明らかにしていきたい。また菌糸の密度について客観的な判断ができていないので、定量化する手段を考え菌糸の成長を多角的に評価したい。さらに、今後シイタケ以外の木材腐朽菌やゼラチン以外のタンパク質を用いて実験を行いタンパク質が木材腐朽菌に与える影響を調べたい。

6 結論

高濃度のタンパク質がシイタケ菌糸の成長を抑制することが本研究で分かった。またシイタケ菌糸の成長には最適なタンパク質濃度が存在し、その濃度はPDA培地のタンパク質濃度付近であることが推測できる。一方、過剰な炭水化物はシイタケ菌糸の成長を抑制しないことも分かった。

7 参考文献

[1] <https://www.rinya.maff.go.jp/j/tokuyou/kinoko/>
きのこのはなし：林野庁

[2] 大澤 他、「シイタケの菌糸成長を促進する食材の探索」
静岡県立科学技術高等学校 自然科学部静岡県小・中・高等学校児童生徒 理科研究発表論文集 p19-22、
2014

[3] 盛永宏太郎、「シイタケ菌糸のアミノ酸要求について」駒沢女子短期大学、研究紀要第9号 p140-
144、1975

謝辞

静岡県浜松西高等学校の科学研究部自然科学班顧問の鈴木満先生には研究方針などいろいろお世話になりました。この場を借りて、深く感謝申し上げます。