

キノコがトドマツを嫌うわけ

米 山 彰 造

はじめに

昭和30年代にきのこの菌床栽培技術が実用化されて以来、年々その培地原料としてののこ屑の需要は増加傾向にあります。それにともない従来から主に使われてきた広葉樹ののこ屑が不足し、針葉樹のものを利用する機運も高まりました。一方、道内では、トドマツ、カラマツの森林蓄積が多く全体の約30%余りを占め、今後も安定した供給が見込めます。したがって、食用菌の菌床栽培でも、原料不足に悩む広葉樹より、資源豊富な針葉樹の方が手に入りやすい状況にあります。

しかし、トドマツやカラマツなどの針葉樹ののこ屑を用いて食用キノコを栽培する場合、散水処理（堆積したのこ屑に水をかけて有害物質を洗い流す処理）を長期間行うか、培地に消石灰を添加しなければ、広葉樹と比較して菌糸の伸びの遅れや、子実体収量の減少などの弊害が生じることが知られています。また、これらの処理を施したとしても、マイタケの栽培には使えません。

ところで、キノコの生理と木材成分の関係について考えてみると、キノコの菌糸は、木粉中の大部分を占めるセルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解する酵素を持っています。しかし、木材中の微量成分である抽出成分は樹種によって特異的であり、微生物の生育を抑制するという報告が数多くあります。そこで、私たちは、まず道内で最も蓄積の多いトドマツ（20%）に着目して、抽出成分に含まれると思われる阻害物質の検索を行いました。

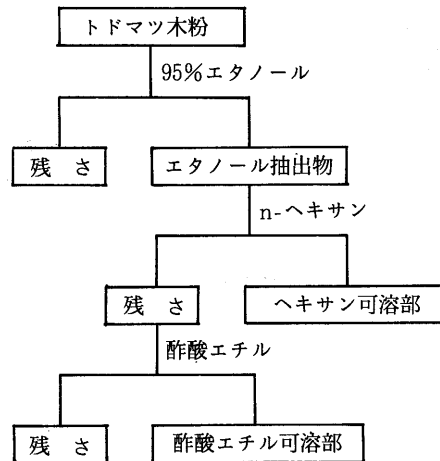


図1 抽出物の分画

阻害成分の抽出と分画

阻害物質を抽出するために、当麻町の道有林で1986年5月に伐採した40年生のトドマツ材から16～60メッシュの粒度ののこ屑を調製し、95%エタノールに約1か月常温で浸せきしました。それから、ろ過して濃縮し、水に懸濁しました。そしてそれを、ヘキサン、酢酸エチルなどの有機溶剤を用い、逐次抽出し、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部および、抽出残さに分画しました（図1）。得られたアルコール抽出物、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部および、抽出残さについて、以下に述べる生物検定法で、食用菌菌糸に対する阻害の有無を調べました。

生物検定法

生物検定法としては、川合らのペーパーディスク

表1 寒天培地の組成

組 成	1 ℓ 当たりの添加量
でんぷん	20 g
ポリペプトン	1.5 g
粉末酵母エキス	3 g
寒天	20 g
塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
硫酸第一鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	2 mg
硫酸マンガン ($\text{MnSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	2 mg
硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	2 mg
硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	0.04 mg
モリブデン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.02 mg
リン酸緩衝液 (リン酸一カリウムとリン酸二カリウムを加えてpH 5 に調整する)	100 ml

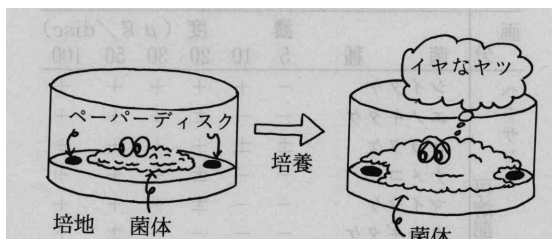


図2 ペーパーディスク法による生物検定

クを用いる方法（以後ペーパーディスク法と呼びます）と、抽出成分を拡散させた寒天培地上で生育した菌糸の重量を測定し、定量的に生育を比較する方法（以後寒天培地拡散法と呼びます）の2つを用いました。

ペーパーディスク法では、まず表1に示す寒天培地をシャーレに流します。翌日、培地中央に、食用菌（シイタケ、ヒラタケ、エノキタケ、マイタケ、タモギタケ、ナメコの6種類）を接種し、菌糸先端がシャーレの縁から2cm程度に達するまで培養します。この時点で、菌糸先端より5mmのところから抽出成分をしみこませた直径8mmのディスク（円形のろ紙）を置き、数日間培養し、菌糸に対する影響を観察しました（図2）。シャーレ1枚につき抽出成分をしみこませたディスク2枚と無処理のディスク2枚を置き、1水準につき5枚のシャーレを用いました。

評価にあたっては、抽出成分をしみこませた1水準10枚のディスクのうち、6枚以上の阻害が認

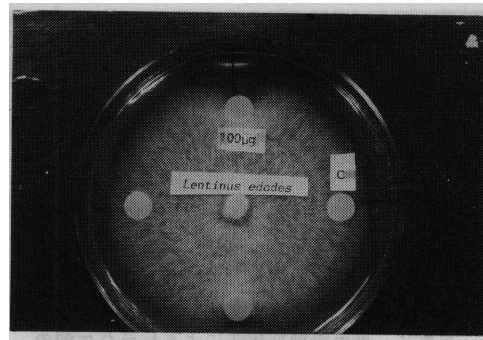


写真1 ペーパーディスク法によるシイタケ菌の生物検定

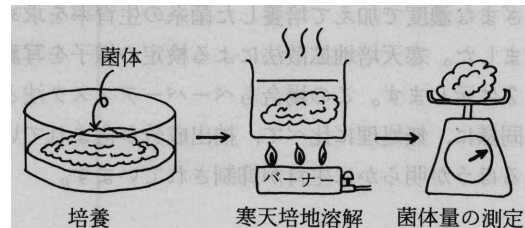


図3 寒天培地拡散法による生物検定

められた区を+、1枚から5枚のディスクに阻害が認められた区を±、阻害が全く認められなかった区を-としました。ペーパーディスク法によるシイタケ菌の検定の様子を写真1に示します。上下のディスクの上の菌糸が、無処理のそれに比べて伸長が抑制されているのが分かります。

寒天培地拡散法でもペーパーディスク法と同様に表1に示す寒天培地を用います。ただし、抽出成分をエタノールに溶かして寒天培地によくまぜこれをシャーレに流し込みます。翌日、培地中央に食用菌を接種し、培養します（菌糸は、直接培地中の抽出成分に接触することになります）。比較のために抽出成分をいれない培地についても同様に培養します。そして、抽出成分を入れない培地で培養した菌糸の先端がシャーレの縁に到達した時点をもって、培養終了とします。培養終了したシャーレは、寒天と菌糸をかきとって沸騰水中で寒天を溶かした後、菌体だけをろ過して1晩乾燥後、重量を測定します（図3）。抽出成分を含まず、エタノールだけを含む培地（無処理）で生育した菌糸の重量を100として、抽出成分をさま

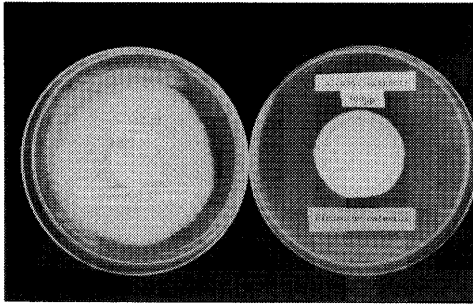


写真2 寒天培地拡散法によるヒラタケ菌の生物検定（左側が無処理）

さまざまな濃度で加えて培養した菌糸の生育率を求めました。寒天培地拡散法による検定の様子を写真2に示します。この場合もペーパーディスク法と同様に、無処理に比べて、抽出成分が含まれているほうが明らかに生育が抑制されています。

各抽出成分の生物検定による評価

(1) アルコール抽出物による生育阻害

まず、図1のように分画したアルコール抽出物の阻害について検討しました。

木粉に対するアルコール抽出物の収率を考慮すると、ペーパーディスク法では54 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 、寒天培地拡散法では4,500ppmが、未抽出の木粉の抽出成分濃度に相当します。したがって、これらの濃度より低い濃度で阻害が観察されれば、アルコール抽出物に阻害要因が含まれると判断できます。

表2を見て分かるようにペーパーディスク法では、40 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ですべての菌種に阻害が観察されました。一方、寒天培地拡散法においても、500ppmの濃度で生育した場合、最高でも生育率54%であり、すべての菌種に生育阻害が認められました。

これらの結果から、アルコール抽出物中に明らかに阻害の原因があることが分かりました。

(2) アルコール抽出物の分画成分による生育阻害

アルコール抽出物をさらに細かく分析するために図1に示すように、有機溶媒のヘキサンや酢酸

表2 アルコール抽出物の生物検定結果

菌 種	ペーパーディスク法					寒天培地拡散法			
	抗 菌 性					生 育 率 (%)			
	濃度 ($\mu\text{g}/\text{disc}$)					濃 度 (ppm)			
	20	40	60	80	100	100	300	500	1,000
シイタケ	±	+	+	+	+	83	48	45	44
エノキタケ	±	+	+	+	+	59	32	31	31
ヒラタケ	—	+	+	+	+	66	37	29	31
ナメコ	+	+	+	+	+	70	63	54	54
マイタケ	—	+	+	+	+	70	43	40	37
タモギタケ	—	±	+	+	+	46	28	27	29

表3 ペーパーディスク法によるアルコール抽出物の分画フラクションの生物検定結果

画 分	菌 種	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{disc}$)					
		5	10	20	30	50	100
ヘキサン可溶部	シイタケ	—	+	+	+	+	+
	エノキタケ	—	—	±	+	+	+
	ヒラタケ	±	±	+	+	+	+
	ナメコ	—	—	±	+	+	+
	マイタケ	—	—	±	+	+	+
	タモギタケ	—	—	—	—	±	+
酢酸エチル可溶部	シイタケ	—	—	—	—	±	+
	エノキタケ	—	—	—	—	—	—
	ヒラタケ	—	—	±	+	+	+
	ナメコ	—	—	—	—	±	+
	マイタケ	—	—	—	—	—	—
	タモギタケ	—	—	—	—	—	—
抽出残渣	シイタケ	—	—	—	—	—	—
	エノキタケ	—	—	—	—	—	—
	ヒラタケ	—	—	—	—	—	—
	ナメコ	—	—	—	—	—	—
	マイタケ	—	—	—	—	—	—
	タモギタケ	—	—	—	—	—	—

エチルを用いて分画しました。それらの分画成分のペーパーディスク法による生物検定結果を表3に、寒天培地拡散法による結果を表4に示しました。

まず、ペーパーディスク法による結果について詳しく見てみます。表3からも分かるように、ヘキサン可溶部は50 $\mu\text{g}/\text{disc}$ の濃度ですべての菌種に阻害が観察されましたが、酢酸エチル可溶部では、100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ でも、エノキタケ、マイタケ、タモギタケに阻害が観察されませんでした。

また、抽出残さについては、100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で

表4 寒天培地拡散法によるアルコール抽出物の分画フラクションの生物検定結果

画 分	生 育 率 (%)									
	ヘキサン可溶部						酢酸エチル可溶部		抽出残さ	
濃度(ppm)	50	100	300	450	900	1,800	390	1,560	275	1,100
菌 種										
シイタケ	62	53	35	22	12	1	95	94	111	121
エノキタケ	—	—	—	44	30	19	88	82	109	121
ヒラタケ	—	—	—	53	38	33	123	113	107	116
ナメコ	—	—	—	34	23	16	70	77	89	83
マイタケ	61	51	25	16	6	4	82	115	109	134
タモギタケ	—	—	—	22	19	12	110	158	107	106

も全く阻害は観察されませんでした。

このことから、3つの分画成分のうち、特にヘキサン可溶部に大きな阻害があることが分かりました。

つぎに寒天培地拡散法の結果についてみてみます。その供試濃度は、ヘキサン可溶部については、1,800, 900, 450ppm（それぞれ、木材中に存在するのと同等の濃度、その1/2, 1/4に相当）とし、酢酸エチル可溶部、および抽出残さについては、それぞれ木材中の濃度、その1/4に相当する1,560と390、および1,100と275ppmとしました。なお、ヘキサン可溶部については、さらにシイタケ、マイタケについて、より低濃度の300, 100, 50ppmでも検定しました。

ヘキサン可溶部については木材中の濃度に相当する1,800ppmで、シイタケ、マイタケはほとんど生育せず、他のエノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、タモギタケも生育率が低いことが分かりました。酢酸エチル可溶部、抽出残さについては若干低い生育率を示す菌種（ナメコ）も見られましたが、概して、顕著な阻害はみられませんでした。

これらのことから、寒天培地拡散法においてもヘキサン可溶部が大きな阻害を示すことが分かりました。2つの生物検定の結果から、アルコール可溶部に認められた阻害成分の大部分はヘキサン可溶部に存在していると思われます。

阻害成分がヘキサンのような非極性の溶媒で抽出されることから、阻害成分の性質も極性が低いと思われます。というのは、似たもの同士は良く

混ざるといふ化学的性質があるからです。

極性の低い有機物として考えられるものは、高級脂肪酸、油脂類、ロウ、テルペノイドなどです。これらの物質は、ちょっと耳慣れないかもしれませんが、かみくだいていえば、油やヤニのたぐいになります。実際にこれまでは、スギや、ヒノキ、ヒバといった針葉樹から前述したテルペノイド系の

阻害物質が発見されています。そこでテルペノイド系の物質を主に含む精油という成分をトドマツから抽出し、その阻害の有無を調べてみました。精油というのは、揮発しやすいさまざまな物質が集まった油状の物です。

ところで、テルペノイドという言葉は聞き慣れないと思いますが、別名テルペンとも言い、イソ

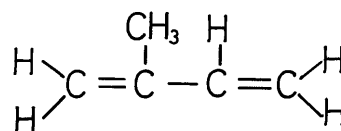


図4 イソプレンの構造

ブレン（ C_5H_8 ，図4）単位2個以上が鎖状または、環状に結合した複雑な化合物です。 C_5 単位の数によってモノテルペン（ C_{10} ）、セスキテルペン（ C_{15} ）、ジテルペン（ C_{20} ）のように分けられ、植物生理学上重要な化合物です。

（3）精油による生育阻害

精油を抽出するために、トドマツ生材を写真3のような装置で水蒸気蒸留しました。すなわち、トドマツ木粉に水を入れて加熱しました。すると材の精油は水蒸気とともに揮発してきますので、これを冷却して、水の上に溜まった精油を分取しました。収率は0.17%でした。次にこの生育阻害の有無をペーパーディスク法および寒天培地拡散法で生物検定しました。

ペーパーディスク法については、比較のために

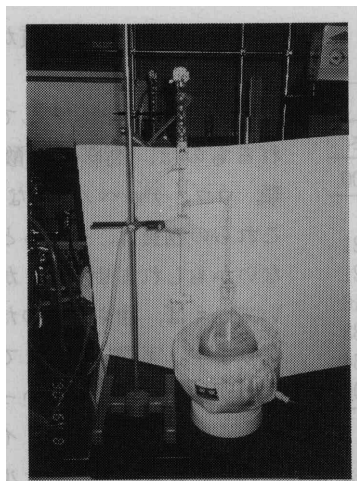


写真3 水蒸気蒸留装置

表5 ペーパーディスク法による精油の生物検定結果

部位	菌 種	濃度 (μg/disc)			
		5	10	15	20
材	シイタケ	±	+	+	+
	エノキタケ	—	±	+	+
	ヒラタケ	—	+	+	+
	ナメコ	+	+	+	+
	マイタケ	—	—	±	±
	タモギタケ	—	+	+	+
樹皮	シイタケ	—	—	—	—
	エノキタケ	—	—	—	—
	ヒラタケ	—	—	—	—
	ナメコ	—	—	—	—
	マイタケ	—	—	—	—
	タモギタケ	—	—	—	—
葉	シイタケ	—	—	—	—
	エノキタケ	—	—	—	—
	ヒラタケ	—	—	—	—
	ナメコ	—	—	—	—
	マイタケ	—	—	—	—
	タモギタケ	—	—	—	—

葉および樹皮の精油についても生物検定しました。その結果を表5に示します。材精油については木材中の濃度に相当する20 μg/discおよびそれ以下の15 μg/discでも全供試菌に阻害が観察されました。しかし葉および樹皮の精油には阻害がまったく観察されませんでした。

つぎに、寒天培地拡散法の結果を図5に示します。供試濃度は、木材中の濃度、その1/2および1/4にそれぞれに相当する560, 280, 140 ppmとしました。菌種による差はありますが、最も低濃度の140ppmで全供試菌が50%以下の生育率となりました。このことから、アルコール抽出物のヘキサン可溶部と同様に、材の精油中にも阻害成分が存在することが明らかになりました。

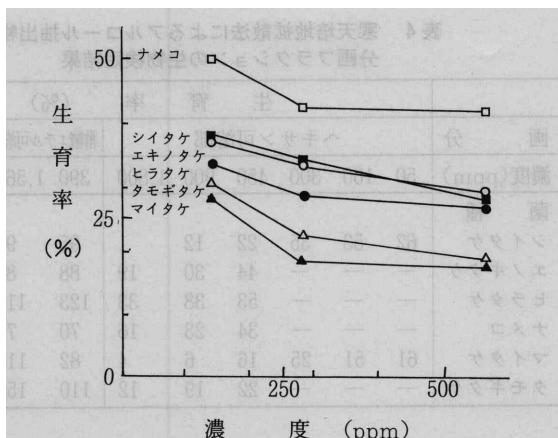


図5 トドマツ材精油に対する食用菌の生育率

ガスクロマトグラフィー (GC) による精油成分の分析

上記の結果から考えて、材、葉、樹皮のそれぞれの精油成分は、菌糸に与える影響がまったく違うことが分かりました。そこで、それぞれの精油の化学組成についてGCで調べてみました。その結果を図6に示します。

ここで、GCについて簡単に説明しますと、揮発性の多成分混合物を沸点や極性の違いを利用して分離し、チャート(記録紙)に記録される保持時間(分離時間)と面積比を利用して定性、定量を行う装置です(写真4)。

標準品との比較から、葉にみられる主要なピーク1~3はそれぞれα - ピネン, β - ピネン, β - フェランドレン, 樹皮のピーク4はボルニルアセテートであることが分かりました。α - ピネン, β - ピネンを含むモノテルペン類は、シイタケに対しては100ppmの濃度でもあまり阻害しないという報告がありますが、これはペーパーディスク法の結果とよく一致しています。

阻害を示した材の精油のチャートでは、モノテルペン類はほとんど認められず、より保持時間の長い部分に、大きなピーク（No.5, 面積比70%）が存在していました。一方、阻害を示さなかった葉および樹皮の精油については逆に保持時間の短いモノテルペンが主成分であり、材の精油に特徴的に見られる保持時間の長いピークは認められませんでした。これまでの研究から、スギやヒノキ中に含まれる食用菌阻害物質がそれぞれジテルペ

ンやセスキテルペン類であることが知られています。このことを考慮すると、ピーク5の化合物はより保持時間の長いセスキテルペンやジテルペンであり、阻害に関連する化合物だということが推定されます。

阻害成分の単離と生物検定

つぎに、上記のピーク5の化合物を分取用薄層クロマトグラフ（写真5）というシリカゲル（吸着剤）のプレートを用い、無色油状物として単離しました。この分取用薄層クロマトグラフというのは極性の違いを利用して目的物を単離することができるものです。

この単離した化合物を再びガスクロマトグラムで確認したところ、前述のピーク5と一致しました。そこでこれ以後はこの化合物に着目して寒天培地拡散法で生物検定しました。検定濃度は50, 100, 300, 500ppmです。結果は図7のとおりで、シイタケ、マイタケ、タモギタケは特に生育

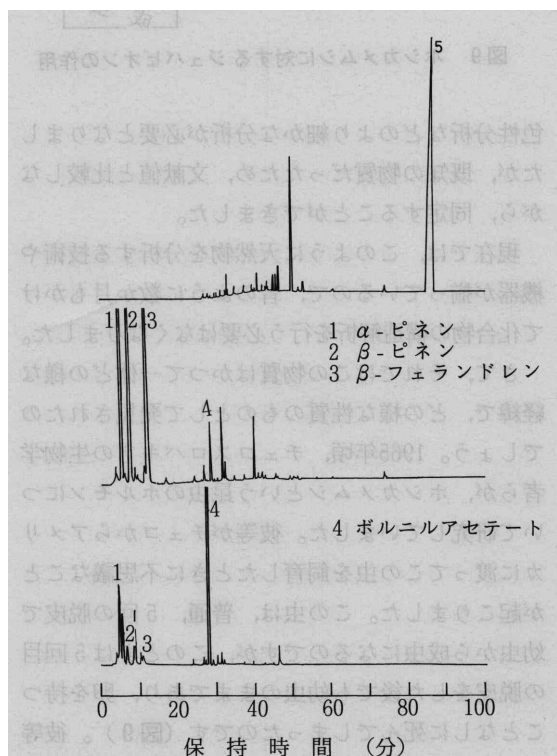


図6 ガスクロマトグラフィーのチャート

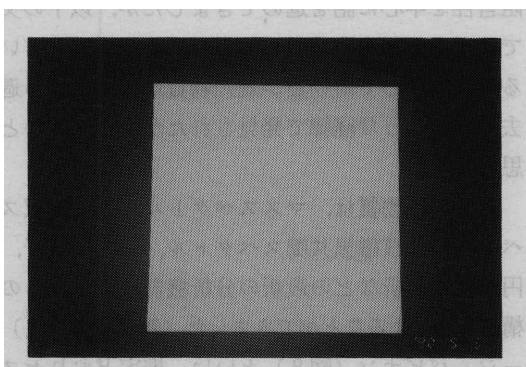


写真5 分取用薄層クロマトグラフィー用のプレート

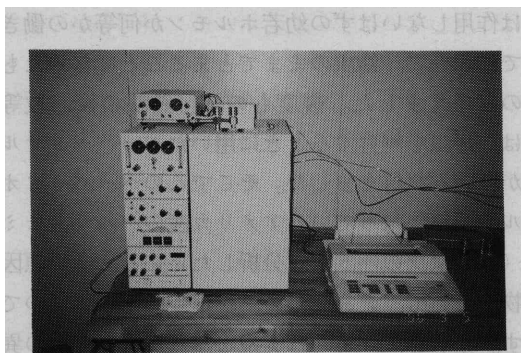


写真4 ガスクロマトグラフィーの装置

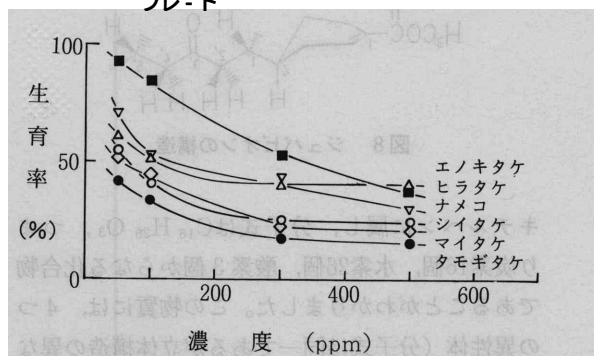


図7 化合物 5 に対する食用菌の生育率

率が悪く、他の菌種も阻害されていることが分かります。また、この化合物の収率から、材中の濃度を推定すると390ppmとなるのですが、この濃度では図7から、全菌種が50%以下の生育率になると推定されます。さらに、ガスクロマトグラフィーの分析ではこの物質が材精油の70%を占めていることから、精油の菌糸生育阻害性の主要因といえるでしょう。

化合物5と、阻害が強く現れたアルコール抽出物のヘキサン可溶部（図1）とを薄層クロマトグラムで比較したところ、化合物5と同一のスポットがヘキサン可溶部のスポットの中にも存在することが分かりました。したがって、精油の主成分である化合物5がアルコール抽出物のヘキサン可溶部中にも存在し、その阻害の一因を成しているのは明らかと思われます。

阻害物質の正体

今までは、阻害物質の食用菌の菌糸にたいする阻害性を中心に話を進めてきましたが、以下の文では、この阻害成分は一体どのような形をしているのか、そして新物質か既知物質か、既知なら過去にどのような経緯で発見されたかを述べたいと思います。

この阻害物質は、マススペクトル、赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、旋光度分析、円二色性分析などの最新の分析機器により、その構造を解析することができました。物質名は(+) - ジュバピオン（図8）といい、推定どおりセス

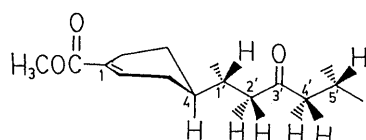


図8 ジュバピオンの構造

キテルペンに属し、分子式はC₁₆H₂₆O₃、つまり炭素16個、水素26個、酸素3個からなる化合物であることがわかりました。この物質には、4つの異性体（分子式は同一であるが立体構造の異なるもの）が存在していたため、旋光度分析、円二

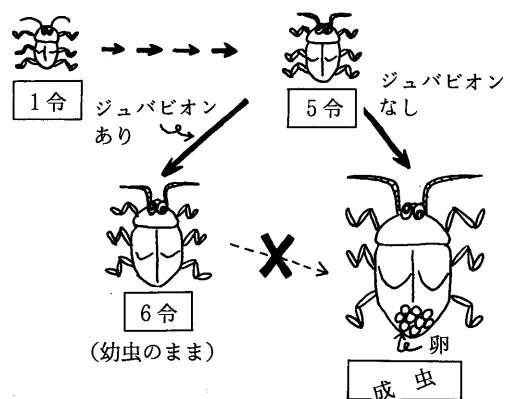


図9 ホシカメムシに対するジュバピオンの作用

色性分析などのより細かな分析が必要となりましたが、既知の物質だったため、文献値と比較しながら、同定することができました。

現在では、このように天然物を分析する技術や機器が揃っているので、昔のように数か月もかけて化合物の構造解析を行う必要はなくなりました。

さて、それではこの物質はかつて一体どのような経緯で、どのような性質のものとして発見されたのでしょうか。1965年頃、チェコスロバキアの生物学者らが、ホシカメムシという昆虫のホルモンについて研究していました。彼等がチェコからアメリカに渡ってこの虫を飼育したときに不思議なことが起こりました。この虫は、普通、5回の脱皮で幼虫から成虫になるのですが、このときは5回目の脱皮をした後も幼虫のままであり、卵を持つことなく死んでしまったのです（図9）。彼等はこの様子を見て、明らかに昆虫の変態を制御する幼若ホルモンの異常と考えました。つまり本来は作用しないはずの幼若ホルモンが何等かの働きで作用して、幼虫のままでとまることになったものと考えました。幾度もの試行錯誤の後、彼等は、昆虫を飼育するときに用いたペーパータオルが原因と気付きました。そこでこのペーパータオルの原料となっているアメリカ産のバルサムモミ（トドマツの仲間）を分析したところ、その原因物質として、ジュバピオンが単離同定されたのです。しかし、この時は尖鋭な機器がなく4つの異性体のどれかということまでは議論されませんで

した。その後幾人かの研究者によって検討され、1977年頃カナダのマンビーレらによって(+) - ジュバビオンの構造が決定されました。

このようにこの物質は20年以上も前から、昆虫の幼若ホルモンとして知られてきましたが、今回のようにキノコの生育を阻害する物質として認識されたのは初めてのことです。

おわりに

今回の研究でトドマツ木粉中の食用菌の菌糸生長を阻害する要因を物質レベルまで掘り下げて追求しました。その結果、トドマツ材の精油中に存在する(+) - ジュバビオンという物質が主な要因であることが分かりました。この物質は昆虫の

幼若ホルモンとしてすでに良く知られている物質でした。

今後は、菌糸生長だけでなく子実体(キノコ)形成にどの程度影響を与えるか、さらには、菌糸の生長が遅れることを改善するためにはどのような方法が良いかなど、検討すべきことが数多く残されていますので、これらの問題を1つ1つ解決していくつもりです。

また、この物質が昆虫のホルモンであるという性質を利用して、天然の無害な農薬を開発することや、キノコの生育を抑制する性質を利用して防腐剤の開発の可能性を探るなど、新たな方向への展開も興味深いものと考えています。

(林産試験場 微生物利用科)

木になる話

チャタテムシ、アリガタバチ、シミ、カツオブシムシ……。何かおわかりでしょうか？

この4、5年の間に林産試験場に技術相談で持ち込まれた虫の名前です。住宅メーカーや製材業を営む方々がユーザーからの苦情として持ち込んできたものです。

これらの虫は木に関係がないのです。実際のところ、こうした虫は食べ物や衣類など住宅の素材と関係のないところで繁殖する場合がほとんどです。木材、それも住宅に使われている木材につく虫は、北海道の場合ほとんどがナラ材やラワン材など、乾燥した広葉樹材につくヒラタキクイムシです。その他には、皮付きの針葉樹材丸太に産卵されたクイムシやカミキリムシなどの幼虫が、製材され建築に利用された木材からでてくる場合があるに過ぎません。

では、なぜ最初に列挙したような木と関係のない虫が持ち込まれるのでしょうか。これには多分木材の性質が密接に絡んでいると思います。木は腐る、燃える、虫に食われるという認識が一般的になっているからです。一方で、住宅の中には木のにプラスティック、金属、ガラスあるいはコンク

リートなど多くの素材が使われていますが、これらの素材は虫に食われないということをだれでも知っているからでしょう。もちろん畳のような木材に近い素材もあるのですが、木造住宅=木材という認識が虫の発生源を木に求めることになるのだと思います。

このようなことがおこるのは、木材に携わるものの宣伝不足であると自省しています。

木材を扱うものにとっては虫害も避けて通ることができません。この種のクレームに対処する上で、木材に害を与える虫と家庭内でよく見受けられるその他の害虫とを区別できるように、日ごろから情報を収集し、ユーザーの方々の理解を得る努力が必要でしょう。虫の生態やおおよその対策を知っておけば、ユーザーの信頼を増すことにもつながります。虫に関する簡単な図鑑とルーペがあれば、特殊なものでない限りおおよその判断がつかますので常備されることをお勧めします。

木材に限らず、住宅には二百以上の業種が関わっていると言えますから、素材の種類も相当数にのぼるでしょう。人が住むようになれば、衣食と虫の関係もできます。そのへんの勉強も怠りなくしておきたいものです。

(S. D.)