

研究論文

## トウチュウカソウ (冬虫夏草) 属セミタケの菌糸体培養特性

吉井真也<sup>1)</sup>・河内進策<sup>2)</sup>・目黒貞利

宮崎大学農学部森林科学講座 <sup>1)</sup> 現在所属：吉井菌学研究所, <sup>2)</sup> 宮崎大学名誉教授

(2007年10月16日 受理)

### Physiological factors affecting mycelial growth of *Cordyceps sobolifera*

Shinya YOSHII<sup>1)</sup>, Shinsaku KAWACHI<sup>2)</sup>, Sadatoshi MEGURO

Department of Forest Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

<sup>1)</sup> Yoshii Mycological Institute

<sup>2)</sup> Emeritus Professor, University of Miyazaki

**Summary :** Recently, the pharmaceutical effect of Vegetable caterpillar, "Toucyu-kaso" have attracted considerable attention. The fundamental culture conditions affecting the mycelial growth of *Cordyceps sobolifera*, a kind of Vegetable caterpillar, were investigated with the aim at culturing the mycelia in a liquid media.

*C. sobolifera* could grow in a range of 10-30 °C, but the optimal temperature was around 25 °C. Czapek media were the most suitable for incubating *C. sobolifera* in chemically defined media, natural media as potato extract were also good. Disaccharides, maltose and sucrose effectively accelerated the mycelial growth, hexose was not bad. Potassium nitrate in nitrate nitrogen was more effective for growing than ammonium nitrogen. Light irradiation inhibited the mycelial growth of *C. sobolifera*. The optimal pH was 6-7 in liquid media.

**Key words :** *Cordyceps sobolifera*, Czapek media, Liquid media, Mycelial growth, Vegetable caterpillar

#### 緒言

一般にキノコとして知られているのは植物や土壌から発生するものが大半であるが、昆虫から発生するものもあり、その中で最も有名なのが冬虫夏草である。冬虫夏草とはもともとコウモリガの幼虫に寄生する *Cordyceps sinensis* に与えられたものであるが、現在では昆虫や蜘蛛のほか、菌類や一部高等植物の果実に生じるものも合わせて、このグループの総称として用いられている。冬虫夏草は相手となる昆虫の種類によりそれぞれ種類も異なり、極端な例では同一種の昆虫でも、成虫と幼虫で種が異なる例もあり、宿主選択性がはっ

きりしているのが特徴である (清水 1997)。

ニイニイゼミの幼虫に寄生するセミタケ [*Cordyceps sobolifera* (Fill.) Ber.et Br.] は分類学的には子囊菌門、核菌綱、バツカクキン (麦角菌) 目、バツカクキン科、トウチュウカソウ (冬虫夏草) 属に属する (今関他 1988)。その生態は土中のニイニイゼミの幼虫に寄生し、その体内に菌核を形成し、セミが羽化するために地上に上がってくる時点で宿主を殺し、その後宿主の頭部から1本か2~3本に分岐した子実体を発生させる。そして、胞子の放出が終われば、宿主と共に朽ち果てて行く。セミタケは国内では人家の庭

または寺社の境内，低山帯の林内に5月～8月ごろ発生するが，世界的にも広く分布している（清水1997）。

セミタケの薬理作用や代謝産物または培養特性などに関する研究は十分には行われておらず，詳しいことはまだ解明されていない。しかし，その他の冬虫夏草の仲間では，鱗翅目のさなぎに寄生するサナギタケからはその代謝産物中に枯草菌の生育を選択的に抑制すコルジセピンが見出され，抽出物にはモルモットからの摘出器官に対する薬理作用がある等の報告がなされている（金城他1996）。また，アブラセミの幼虫に寄生するキアシオオゼミタケからの水溶性多糖類に抗腫瘍活性，血糖降下作用のあることが明らかにされている（木方他1992）。これらのようにトウチュウカソウ属には何らかの薬効効果があることが多く，セミタケもまた，同様な作用があるものと思われる。

そこで本研究ではこのセミタケが今後種々の医薬品，強壮治療剤や健康食品等として用いられることを想定し，セミタケの菌糸体を人工培地で生育させるための培養特性について検討した。

## 材料と方法

### 供試菌

大分県豊後高田市にある人家のカシの木の根元に発生していたセミタケを採集し，子座（虫体から発生した子実体）の内部から接種片を切り取り，PDA（ポテト・グルコース・寒天）培地で継代培養しておいた吉井菌学研究所の保有株YM-0302

を使用した。採集したセミタケの発生状態を図1に，採集後のセミタケを図2にそれぞれ示す。

### 温度の菌糸成長への影響

PDA培地を用いて暗黒下で14日間，10℃から35℃の範囲で検討した。

### 各種培地での菌糸成長の比較

表1に示す15種類の培地（金城他1979）に寒天2%を加えて滅菌した後，ペトリ皿に分注した。予めPDA培地で培養しておいた種菌のコロニーから内径5mmのコルクボーラーで打ち抜いたディスクを培地のほぼ中央に接種し，25℃，湿度60%，暗黒下で14日間培養しコロニーの直径を測定した。

### 糖類の菌糸成長への影響

五炭糖のアラビノース，キシロース，リボース，六炭糖のグルコース，マンノース，ガラクトース，フルクトースの4種類，二糖類のマルトース，ラクトース，トレハロースの3種類，さらに多糖類のキシランとコーンスターチを加え合計12種類の糖類（いずれも和光純薬製）をCzapek培地のスクロースの代わりにそれぞれ3%ずつ加え，さらに寒天2%を加えて培地を調製し，上記と同様の方法でセミタケを14日間培養し，コロニー直径を測定した。



図1. セミタケの発生状況



図2. 採取したセミタケ

表 1. 各種人工培地の組成

培地	Czapek	Peeffer	Richards	Hennerberg	Tochinai	Sucrose-asparagin	Currie	Hoppkins	Myer	Meyr-Smith	Naegel	Pepton	Malt extract	Onion	Potato
Glucose				50				10							
Sucrose	30	50	50		30	10	150		50	50	10	25	20	20	20
KNO <sub>3</sub>			10	2	2			2	1						
NaNO <sub>3</sub>	2														
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		10					2.5			1.5	1.5	0.5			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			2												
Asparagin						2.5									
Pepton												10			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	2.5	2.5	0.5		0.2	0.3	0.5	2.5	10	0.2	0.2			
KCl	0.5														
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.2	5	1	0.5		1	0.1	5			0.5			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					0.5	5				5	1				
CaHPO <sub>4</sub>									0.1	2.5					
CaCl <sub>2</sub>				0.1	0.1						0.1				
pH	5.6	5.1	6.9	4.5	6.2	7.9	4.4	4.9	4.8	6.4	7.5	6.2	5.6	5.4	6.2

窒素化合物の菌糸成長への影響

アンモニア態窒素として酢酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸一水素アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酒石酸アンモニウムおよびシュウ酸アンモニウムの8種類、硝酸態窒素として硝酸カリウム、亜硝酸カリウムおよび亜硝酸ナトリウムの3種類に尿素とペプトンを加えた合計13種類の窒素化合物（いずれも和光純薬製）を、硝酸ナトリウムを除いたCzapek培地にそれぞれ0.2%となるように加え、さらに寒天2%を加えて培地を調製し、上記と同様の方法でセミタケを14日間培養し、コロニー直径を測定した。

光の菌糸成長への影響

Czapek寒天培地にセミタケ菌を接種した後、25℃、湿度60%で600 luxの光照射下と暗黒下でセミタケをそれぞれ14日間培養し、コロニー直径を測定し菌糸成長を比較した。

pHの菌糸成長への影響

寒天を除いたCzapek液体培地を0.1NHClまたは0.1NNaOHを用いて2.0から8.0までの種々のpHに調整後、上記と同様の条件でセミタケを培養した。14日間培養後、培養物を吸引ろ過し、得られた菌体を105℃で乾燥し、重量を測定した。

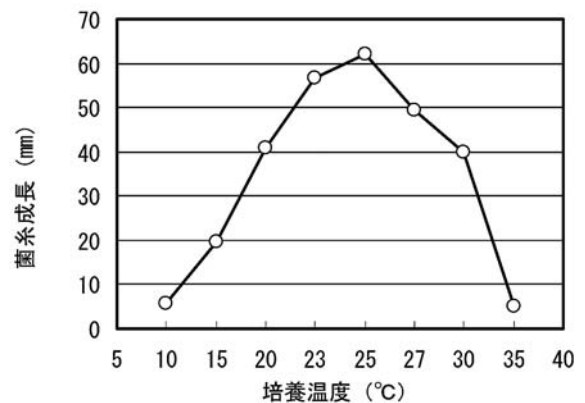


図 3. 培養温度の菌糸成長に及ぼす影響

結果と考察

1. 培養温度の菌糸成長に及ぼす影響

培養温度と菌糸成長との関係を図3に示す。10℃ではセミタケの菌糸成長は著しく劣り、25℃で菌糸成長が最大となった。しかし、25℃以上では菌糸成長は抑制され、35℃で菌糸成長は見られなかった。担子菌のシイタケの最適成長温度は25℃とされており、子囊菌のハナサナギタケでは約24℃、同じトウチウカソウ属のサナギタケも25℃であることから (Yamanaka et al. 1998, 小川他 1983)、セミタケもこれらの菌類とほぼ同じ最適成長温度を示すことが明らかとなった。

## 2. 各種培地での菌糸成長の比較

セミタケの各種培地における菌糸成長を表2に示す。合成培地中で最も菌糸成長が良好だったのはCzapek培地であり、目視による菌糸の密度は平均的であった。ついでTochinai培地での成長が良かったが、菌糸密度は薄く見えた。Pepton培地では菌糸の伸長成長は劣るものの、密度は非常に濃く、気中菌糸の成長が最も良かった。天然培地では、Czapek培地ほどではないが、ポテトエキス培地の菌糸成長が良く、菌糸密度も非常に

表2. 各種培地でのセミタケの菌糸成長

培地	コロニー直径 (mm)	菌糸の密度
Czapek	60.5	**
Peeffer	36.0	**
Richards	34.3	***
Hennerberg	43.8	**
Tochinai	50.8	*
Sucrose-asparagin	35.2	**
Curri	10.8	**
Sucrose-asparagin	35.2	**
Hopkins	39.1	**
Myer	35.9	**
Myer-Smith	30.5	***
Naegel	35.6	***
Pepton	47.2	***
Malt extraction	51.1	*
Onion decoction	33.3	***
Potato decoction	56.9	***

菌糸の密度：\*；薄い \*\*；中間 \*\*\*；濃い  
各培地で3回実験を繰り返し、その平均値で示した。

表3. 糖類添加による菌糸成長への影響

糖類	コロニー直径 (mm)	
五炭糖	Arabinose	33.7
	Xylose	19.1
	Ribose	41.9
六炭糖	Glucose	51.7
	Mannose	51.1
	Galactose	50.7
	Fructose	43.5
二糖類	Sucrose*	52.8
	Maltose	54.0
	Lactose	32.2
	Trehalose	53.8
多糖類	Xylan	18.6
	Corn Starch	36.3
無添加	12.4	

\* Czapek培地  
各条件で3回実験を繰り返し、その平均値で示した。

高いと思われた。また、糖類の添加濃度が3%以上の培地では菌糸成長がむしろ悪くなるように思われた。

## 3. 糖類による菌糸成長促進効果

各種糖類によるセミタケ菌糸成長への影響を表3に示す。糖類を添加するといずれも菌糸成長が促進されたが、中でも二糖類のマルトース、トレハロース、スクロースの成長が良好であった。しかし、ラクトースの効果は小さかった。このように二糖類によって菌糸成長が促進されたのは、昆虫の血糖中の主な糖類が二糖類のトレハロースであるということと関係するのではないかと思われたが、そのトレハロースを添加した培地では気中菌糸がほとんど観察されなかった。また、六炭糖も菌糸成長が比較的良く、その中でもグルコースが良好なのは担子菌の場合と同様である。一方、多糖類はセミタケにとっては資化し難いものと思われた。このように二糖類に加え、六炭糖、五炭糖、や多糖類も菌糸成長を促進したことから、セミタケの炭水化物要求性は広範囲にわたることが分かった。その中でも、二糖類の要求度が大きいのはセミタケ菌の特徴と思われた。

## 4. 窒素化合物添加による菌糸成長

表4に窒素化合物のセミタケ菌糸成長へ及ぼす影響を示す。炭酸アンモニウムと尿素は菌糸成長がみられなかった。アンモニア態窒素はコントロールに比べると菌糸成長は劣るが、目視による菌糸密度はコントロールより濃く見えた。硝酸態窒素は菌糸成長も良く、菌糸密度もアンモニア態窒素よりも濃く見えた。一般に無機態窒素では硝酸態よりもアンモニア態の方が好まれるらしく、ヒメマツタケやクロアワビタケ、シイタケなどはアンモニア態窒素で良い結果を示している(江口他1994, 金城他1992, 石川1967)。これらのことからセミタケ菌にとって窒素源は菌糸の密度に関わり、アンモニア態より硝酸態の方が菌糸成長を促進することが明らかになった。また、サナギタケの菌糸成長にも硝酸カリウムが最も良いとされていることから(小川他1983)、硝酸態窒素を利用できることはトウチウカソウ属の特徴ではないかと思われた。

表4. 窒素化合物添加による菌糸成長への影響

窒素化合物	コロニー直径 (mm)
アンモニア態窒素	
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	35.4
(NH <sub>4</sub> )CO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	5.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	43.6
NH <sub>4</sub> Cl	17.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	41.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	42.3
硝酸態窒素	
KNO <sub>3</sub>	66.7
NaNO <sub>3</sub> *	65.8
KNO <sub>2</sub>	58.9
NaNO <sub>2</sub>	44.8
有機態窒素	
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	5.0
Pepton	34.4
無添加	56.4

\* Czapek培地 (コントロール)  
各条件で3回実験を繰り返し、その平均値で示した。

表5. 光による菌糸成長への影響

条件	コロニー直径 (mm)	菌糸密度
光照射 (600ルクス)	55.9	*
暗黒下	52.6	***

菌糸の密度は表2と同様に表した。

## 5. 光による菌糸成長への影響

光によるセミタケ菌糸成長への影響を表5に示す。コロニー直径で比較すると、光照射下で培養した方の成長がわずかに速いが、菌糸密度は暗黒下に比べて明らかに薄く見えた。ヒメマツタケの菌糸成長には光は促進的に働き、菌糸の密度も濃くなるとされているが、代表的な担子菌シイタケなどでは抑制的に働くと報告されている(江口他1994)。セミタケの場合は菌糸密度を重視すると暗黒下での培養の方がむしろ適しているものと思われた。

## 6. pHによる菌糸成長

培地pHとセミタケ菌糸成長との関係を図4に示す。液体培地での菌体重量はpH 6~7の範囲で最大であり、pH 5以下またはpH 8ではその半分以下であった。サナギタケでは寒天培地上ではpH 4~9の範囲で菌糸成長の差は認められておらず、一方ハナサナギタケの最適pHは7で、pH 6以下では極端に菌糸成長が劣ると報告されている

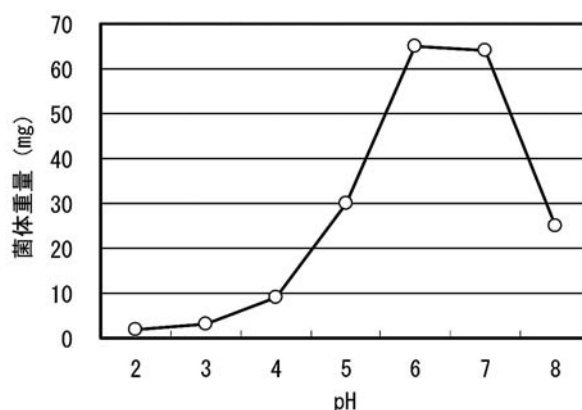


図4. pHの菌糸成長に及ぼす影響

(小川他 1983, 江口他 1994)。したがって、液体培地で検討した結果では、セミタケの菌糸成長に及ぼすpHの影響はハナサナギタケと同様の傾向となった。またシイタケはpH 4.5~6.0の弱酸性で最も良く成長するとされており、セミタケなどのトウチウカソウ属はシイタケよりも最適pH値がやや中性よりであることが明らかとなった。

## 要約

セミタケの菌糸成長に対する温度、各種の天然および合成培地、糖類および窒素化合物添加、光照射、pHの影響について検討した。その結果は次の通りである。

- 1) 培養温度では、セミタケは10から30°Cの範囲で成長可能であったが、最適温度は約25°Cであった。
- 2) 各種培地における菌糸成長は合成培地ではCzapek培地が最も良く成長した。天然培地でも菌糸成長は良好で、Malt extractを除いて菌糸密度は非常に高かった。
- 3) 検討した糖類の中では、マルトース、スクロースなどの二糖類が菌糸成長を促進したが、六炭糖類も比較的良好だった。
- 4) 窒素化合物では、硝酸態窒素に菌糸成長の促進がみられ、硝酸カリウムが良好であった。
- 5) 光照射はセミタケの菌糸成長(菌糸密度)を抑制した。
- 6) Czapek液体培地でpH 2.0から8.0の範囲で検討した結果、セミタケ菌糸成長に対する最適pHは6~7であった。

キーワード：菌糸成長，セミタケ，トウチュウカソウ，Czapek液体培地

#### 引用文献

石川春彦（1967）シイタケ菌の生理生態的研究．農電研究所研究報告 8, 1-67.

今関六也・大谷吉雄・本郷次雄（1988）日本のきのこ．山と溪流社．東京．pp. 576-577.

江口文陽・吉本博明・吉本高明・檜垣宮都（1994）ヒメマツタケの菌糸成長に及ぼす要因．木材学会誌 40, 666-671.

小川睦・山家敏雄・横沢良憲（1983）ブナアオシヤチホコに寄生するサナギタケ（*Cordyceps militaris* LINK）の生理的性質．日本林学会東北支部会誌 35, 122-125.

木方 正・鵜飼茂夫（1992）セミタケ．キノコの化学・生化学（水野卓・川合正允編著）．学会

出版センター．東京．pp. 285-287.

清水大典（1997）冬虫夏草図鑑．家の光協会．東京．pp. 24, 137.

金城一彦・近藤民雄（1979）担子菌栽培培地に関する研究（第3報）アラゲキクラゲの培養特性について．木材学会誌 25, 799-803.

金城一彦・屋我嗣良・砂川政英・林弘也・赤尾真一（1992）担子菌栽培地に関する研究（第7報）クロアビタケの培養特性．木材学会誌 38, 393-399.

金城典子・貝津好孝・作友直生・角尾彰信（1996）冬虫夏草の生理活性 サナギタケの培養菌糸体抽出物について．Bull. Gen. Educ. Tokyo Med. Dent. Univ. 26, 7-14.

K. Yamanaka, S. Inatomi, M. Hamaoka（1998）Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. Mycoscience 39, 43-48.