

ゲーム的關係における白色腐朽菌の成長

宮内香那* ゲムグイオトゴンニヤム* 浅井一行* 越智敬太* 西川絵里子* 山本美穂*

堂満竜明** 早瀬伸樹* 橋本千尋*

Growth of White-Rot Fungi in a Multi-players Game Situation

Kana MIYAUCHI* Gemgui OTGONNYAM* Kazuyuki ASAI* Keita OCHI* Eriko NISHIKAWA*
Miho YAMAMOTO* Tatsuaki DOMITSU** Nobuki HAYASE* Chihiro HASHIMOTO*

The growth process of 5 white-rot fungi: UH-1 (U, supplied by Hayase), Hiratake (H, *Pleurotus ostreatus*), Shiitake (S, *Lentinula edode*), Eringi (E, *Pleurotus eryngii*), and Kuritake (K, *Hypholoma sublateritium*) in PDA and PDA + lignin (PDA-L) media in the 1-4 players game situation was studied and its multi-players interaction was extracted by a principal component analysis (PCA). The order of the growth rate deduced by PCA is $H > S > U > E > K$ in the 1-4 players game, and the order of S, U, E and K is often changed mainly due to the fact that the fungi except U grow faster by adding lignin. The PCA shows that the coexistence with H makes the growth rates of U, E, and K in PDA medium and U in PDA-L medium slower. On the other hand, the order of the invasion strength is $H, S, K > E > U$ in the 1-4 players games, and the growth rate and the bleach one have no relationship; the order of the decomposition rate is $K > H > U$, while that of the growth rate is $H > U > K$.

1. はじめに

複数のプレイヤーが自分の利益を大きくしようと互いに影響を及ぼしあう関係のことをゲーム的關係という^[1]。勝敗を決めるためのルールや他者との相互作用をもとにして行われる活動の具体的な事例としては、プレイヤーの人数より1人ゲーム(F1レース)、2人ゲーム(チェス、将棋)、4人ゲーム(麻雀)、n人ゲーム(経済市場、生物の生存競争)などがある。3人以上のゲームの結果を2人ゲームの1対1の關係から推測することは定石といえるが、正しく推測できないことも多い。例えば、ホワイトらの実験では3種の菌 *Pp*、*Cm*、*Pv* をモザイク状に植菌したところ、その成長パターンは2種類の強さ $Pp > Cm$ 、 $Cm > Pv$ 、 $Pp \sim Pv$ をもとにした単純な成長結果とはならなかった^[2]。ホワイトらは最終的な成長パターンを決める要素として植菌位置を挙げ、成長がランダムでも完全な決定論でもないことを述べた。このように2人ゲームの關係に加え、他に

どのような要素が n 人ゲームの關係を決めているのかを明らかにすることは現実の多体間相互作用による現象を考える上で大変重要な課題であるといえる。

本研究では、一般にきのこと呼ばれる白色腐朽菌が木材中で競合的に成長することを想定し、1~4人ゲームの關係にある白色腐朽菌の成長過程とこれに対するリグニン添加の影響を明らかにすることを目的とする。白色腐朽菌は木材中で難分解性のリグニンと結合して存在するセルロースを主食としており、リグニンを唯一分解できる生物として、木材への利用が期待されている。本研究では白色腐朽菌2種の關係を明らかにし、主成分分析により微細な多体間相互作用を求めた。

2. 実験と方法

白色腐朽菌として UH-1 (U, 早瀬研究室より提供^[3])、ヒラタケ

平成 28 年 9 月 20 日受付 (Received Sep.20, 2016)

* 新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology, Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan)

**東京農工大学連合農学研究科、府中市 (The United Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and

Technology, Fuchu, 183-8509 Japan)

Pleurotus ostreatus (H, 森産業株式会社)、シイタケ *Lentinula edodes* (S, 森産業株式会社)、エリンギ *Pleurotus eryngii* (E, 株式会社キノックス)、クリタケ *Hypholoma sublateritium* (K, 株式会社キノックス) の 5 種を使用した。培地は Potato Dextrose Broth (SIGMA) 0.6g±0.005g, Agar Powder 2.0g±0.005g, 蒸留水 200ml からなる培地 (PDA 培地)、さらにバニレックス RN(日本製紙ケミカル株式会社) 0.2g±0.005g を加えた培地 (PDA-L 培地) の 2 種を使用し、いずれも 85mm のシャーレに厚み約 3mm で作成した。図 1 のような位置に植菌後、25±0.5°C のインキュベータ内で静置し、一日ごとにカメラで撮影して成長過程を観察した。画像ビューアには Irfan View、データの解析には統計ソフトウェア R を使用した^[4]。

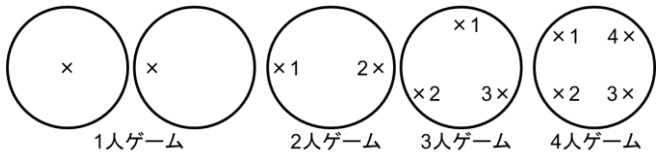


図 1. 1-4 人ゲームの植菌位置

3. 結果と考察

5 種の白色腐朽菌 U, H, S, E, K の典型的な成長の様子を図 2 に示す。U は薄く均一であったが、H は波紋状で綿埃のように立体的に成長した。S は少し立体的で樹状に成長し、E は最初均一の密度で広がったが、途中から枝分かれを繰り返しながら成長した。K は最初薄く均一であったが、途中から濃くなり平らに成長した。いずれの菌糸も植菌位置がシャーレの中心でも端でも図 2, 3 のように植菌位置から円状に広がるように成長し、成長の特徴に違いはなかった。また、培地にリグニンを追加しても図 3 に示すように成長の特徴に変化はなかった。培地の固さと栄養量を変えて菌の成長を調べた松浦の研究によれば、樹状に成長した S, E にとって培地は柔らかく、栄養量が低いことが示唆される^[5]。

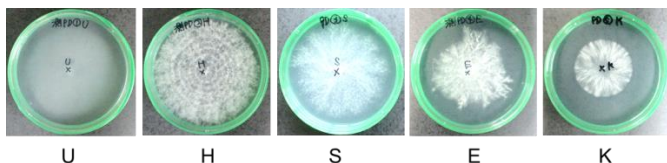


図 2. 白色腐朽菌のモルフォロジー (植菌位置は中央)

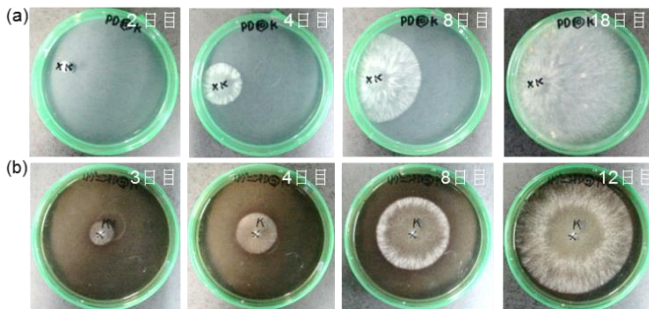


図 3. K の PDA 培地 (a) と PDA-L 培地 (b) における成長過程

2~4 人ゲームでは、同一シャーレ内に複数の菌が植菌されており、成長した菌は互いに接触した後、そのまま拮抗して成長が止まったり、境界で密度の濃い壁を作ったり、境界を越えて侵入したり侵入されたりした。例えば、図 4 の U, K, S, H の 4 人ゲームの成長過程においては、K は接触後、U と H に対して

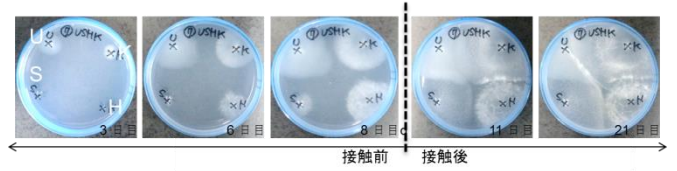


図 4. PDA 培地における 4 人ゲーム (U, S, H, K) の成長過程

自身の密度の濃い菌糸の壁を作った。このような接触後の菌同士の相互作用は、リグニンを培地に添加しても同様に観測されており、図 5 においては E と K が H に対して壁を作っている。

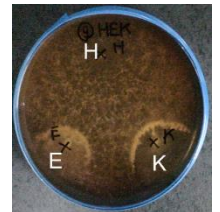
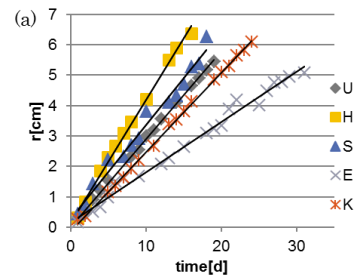


図 5. PDA-L 培地における 3 人ゲーム (H, E, K) の成長 (11 日目)

本報告では、1~4 人ゲームにおける実験結果について①接触までの成長速度、②接触後の菌同士の相互関係、③リグニン分解について以下のように詳細な議論を行った。

3-1 接触までの成長過程

1 人ゲームにおける 5 種の菌のコロニー半径の時間変化は図 6 のように単調に増加した^[6]。近似直線の傾きから求めた各菌の成長速度は表 1 のようになった。H は PDA, PDA-L 培地いずれも最も成長が速く、U 以外の菌は PDA 培地より PDA-L 培地において成長速度が速くなった。リグニンを添加することで菌の成長が早まることについては、松浦の研究によればリグニン添加が貧栄養化に相当することが示唆される^[5]。平均した成長速度から順位をつ



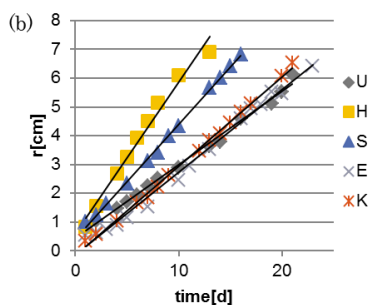


図 6. 1 人ゲーム (U, H, S, E, K) の PDA 培地 (a) および PDA-L 培地 (b) におけるコロニー半径 r の時間変化 (植菌位置は端) けると、成長速度の速い順から PDA 培地では $H > S > U > K > E$ 、PDA-L 培地では $H > S > K > E > U$ となった。

表 1. 1 人ゲームの成長速度

菌	成長速度 [cm/d]			
	PDA 培地		PDA-L 培地	
	中心に植菌	端に植菌	中心に植菌	端に植菌
U	0.28	0.29	0.20	0.25
H	0.35	0.41	0.56	0.53
S	0.29	0.31	0.34	0.40
E	0.16	0.16	0.29	0.29
K	0.26	0.26	0.29	0.31

2~4 人ゲームにおける成長速度については、1 人ゲームの成長速度と共に図 7 に示したところ、1 人ゲームよりも 2~4 人ゲームにおいて、S, K は PDA, PDA-L 培地ともに遅くなり、U はいずれもあまり変化せず、H, E は PDA 培地ではやや速くなるが、PDA-L 培地では速くなったり遅くなったりするようになることがわかった。PDA-L 培地の H, E が 1 人ゲームよりも 2~4 人ゲームで速くなったり遅くなったりしている要因は、H, E の 1 人ゲームの成長速度が PDA 培地よりも PDA-L 培地でかなり速くなるのに比べ、2~4 人ゲームの成長速度は PDA 培地と PDA-L 培地であまり変わらないためと考えられる。培地にリグニンを添加した影響についてまとめると、以下ようになる。① 1 人ゲームではリグニンを添加すると U 以外の H, S, E, K 4 種の菌の成長が速くなった。② 2~4 人ゲームにおいてはリグニンを添加すると H, S, E で成長が速くなったが、その速度の増加は特に H で顕著である。

平均の成長速度を順位付けすると表 2 のようになり、1 位 H, 2 位 S は変わらないが 3~5 位が変化していることがわかる。

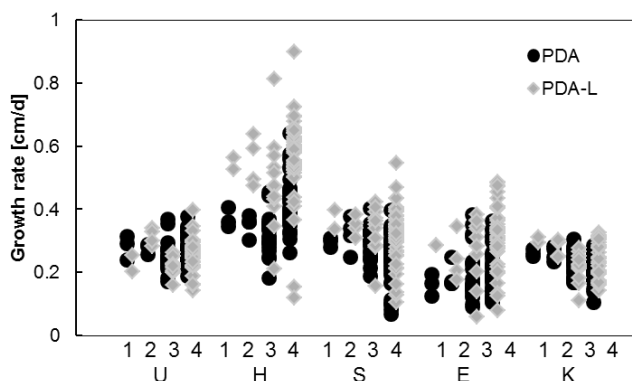


図 7. 1-4 人ゲームにおける U, H, S, E, K の PDA 及び PDA-L 培地の成長速度

表 2. 1~4 人ゲームにおける接触前の成長速度の順位

菌	順位							
	PDA 培地				PDA-L 培地			
	1人	2人	3人	4人	1人	2人	3人	4人
U	3	3	3	2	5	3	4	5
H	1	1	1	1	1	1	1	1
S	2	2	2	3	2	2	2	2
E	5	5	5	5	4	5	3	3
K	4	4	4	4	3	4	5	4

接触前の成長速度についての主成分分析を行ったところ、図 8

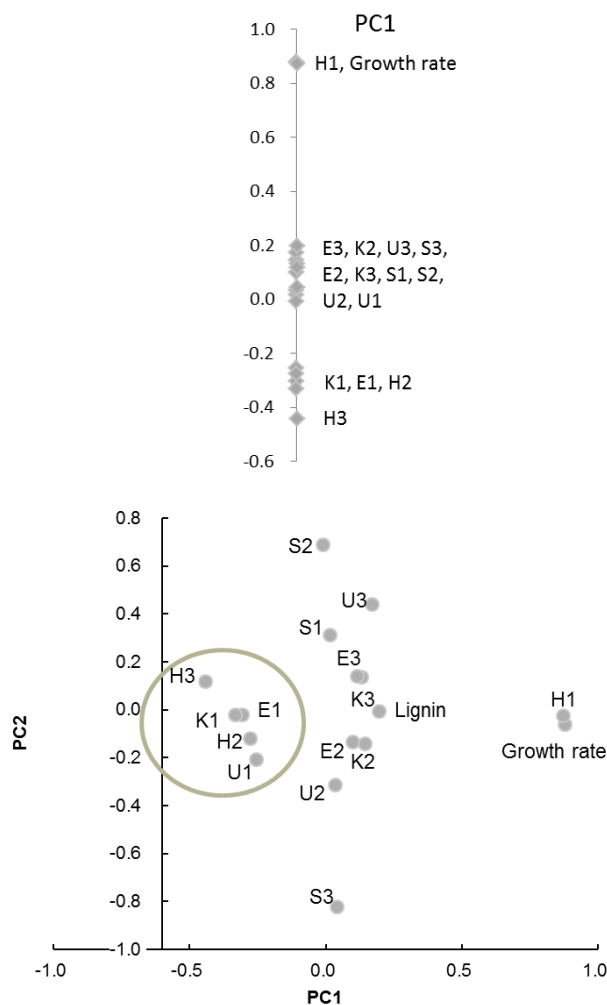


図 8. 接触前の成長速度についての主成分分析

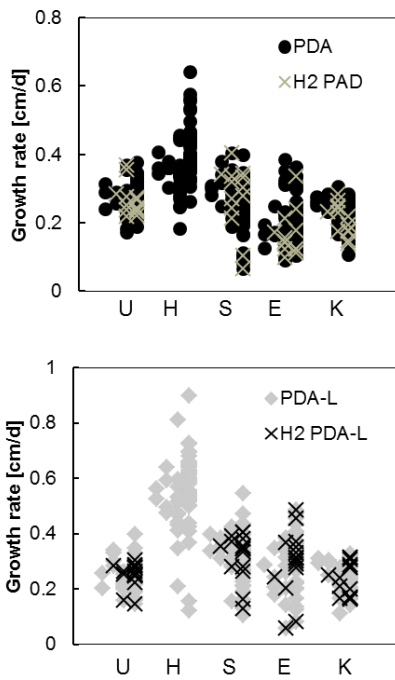


図 9. 1-4 人ゲームにおける U, H, S, E, K の PDA 培地 (a) と PDA-L 培地 (b) の成長速度と H に対する成長速度 (×)

のようになった。ここで、H1 は H 自身の速度、H2 は H に対する成長速度、H3 は H が同じシャーレ内に居るときの成長速度を意味している。第一主成分 (PC1) は速度に相当しており、これをもとに 1 ~ 4 人ゲーム全体の成長速度の順位を求めたところ、 $H > S > U > E > K$ となった。また、PC1 と第二主成分 (PC2) のパイプロットにおいては、成長の速い H1 と成長速度の位置が近く、一方 H2 と H3 は成長の遅い E1、K1、U1 と位置が近いことから、H に対する、あるいは H と同居する菌の成長速度が遅くなるという傾向が読み取れる。これを確かめるため、図 7 の 1~4 人ゲームにおける成長速度に H に対する成長速度のデータを重ねたところ図 9 のようになった。H に対する菌の成長速度は、PDA 培地では U、E、K において、PDA-L 培地では U において遅くなる傾向があることが確認された。

3-2 接触後の成長過程

2~4 人ゲームにおいて接触後の成長過程における勝敗の相関図を PDA 培地については図 10、PDA-L 培地については図 11 に示した。勝敗は、菌糸が重なったときに乗り込み侵入してきた菌を+ (勝ち)、乗り込まれた菌を- (負け)、乗り込みが見られなければ 0 (引き分け) とした。勝敗の結果から順位を求めたところ、表

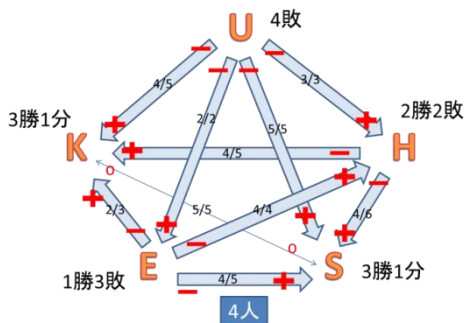
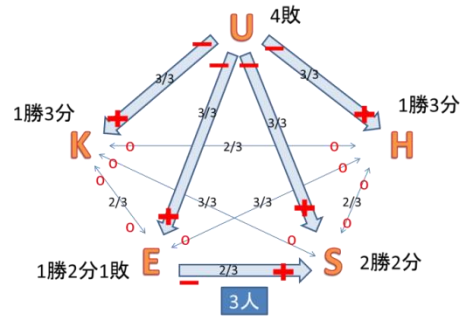
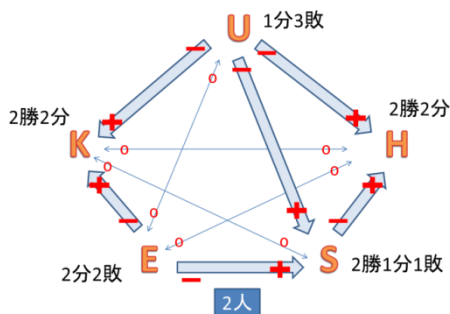


図 10. 2-4 人ゲームにおける PDA 培地の U, H, S, E, K の接触後の成長における相関図 (菌糸が重なった場合 侵入した菌→+ 侵入された菌→-)

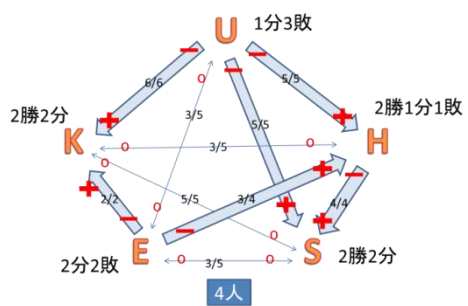
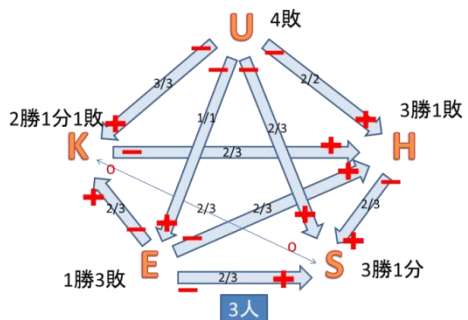
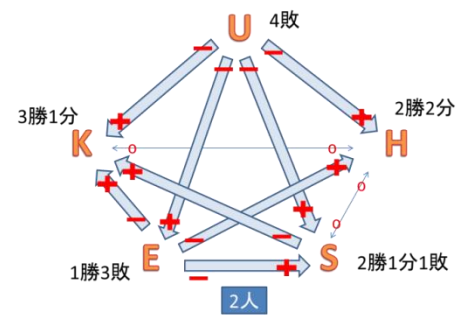


図 11. 2-4 人ゲームにおける PDA-L 培地の U, H, S, E, K の

接触後の成長における相関図（菌糸が重なった場合 侵入した菌→+ 侵入された菌→-）

3に示すように全体として順位は H, S, K > E > U となった。1~3位の H, S, K は互いの勝敗に傾向は見られず順位は変化したが、4位 E, 5位 U は順位の変化はなく、E、特に U は常に侵入されやすかったといえる。この順位は表 2 の接触前の成長速度の順位とは異なっており、例えば、U は成長速度は比較的速かったが、接触後他菌に侵入されやすく、K は成長速度は遅い方だったが、接触後は他菌を侵入することが多かった。また、4人ゲームにおいて植菌位置を入れ替えて成長をさせたところ、同じ組み合わせでも位置を入れ替えると成長速度が変化することが多かつ

表 3. 1-4 人ゲームにおける衝突後の相互作用の順位

菌	順位					
	PDA 培地			PDA-L 培地		
	2人	3人	4人	2人	3人	4人
U	5	5	5	5	5	5
H	1	2	2	2	1	3
S	3	1	1	3	1	1
E	4	4	4	4	4	4
K	1	2	3	1	2	1

た。本報告ではその傾向まで明らかにすることはできなかったが、植菌位置によって相互作用のしかたが変わるとい同様なことが White らによって述べられている^[2]。

3-3 リグニン分解による脱色

リグニンの分解は図 12 の K のように培地の脱色により観測された。成長速度は H > U > K の順に遅くなっているが、脱色は K > H > U の順で遅くなっており、成長速度と脱色速度に相関はないと考えられたが、菌の密度が濃いほどリグニンの分解能力が高いようだった。リグニンの脱色速度は K > H の順で遅くなったが、この 2 種類の菌はリグニンをよく分解した。

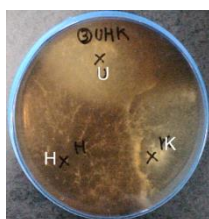


図 12. PDA-L 培地における 3 人ゲームの成長 (H, U, K) (23 日目)

4. 結論

5種(U, H, S, E, K)の白色腐朽菌を1~4人のゲーム的環境で成長させたところ、以下の知見が得られた。

- 1人ゲームにおける成長速度の順位は PDA 培地では H > S > U > K > E、PDA-L 培地では H > S > K > E > U となった。リグニン添加により U 以外の菌は早くなり、そのため順位が変動したと考えられる。
- 1人ゲームに比べ2~4人ゲームになると、S, K は成長速度が遅くなり、U は変化せず、H, E は PDA 培地で早くなったり遅くなったりした。接触前にも菌は相互作用しているといえる。

3. 主成分分析より1~4人ゲームにける成長速度の順位は H > S > U > E > K となり H の成長速度が常に速いこと、また、同じシャーレ内に H と同居する菌の成長速度が遅くなる傾向が得られた。
4. 1~4人ゲームにける接触後の強さの順位は H, S, K > E > U となった。
5. リグニンの分解は K, H で顕著であり、成長速度の速さと関係はなかった。

各菌の特徴は以下のようにまとめられた。H: 成長が速く、他菌に侵入されにくい。U: 菌糸が薄く、他菌に侵入されやすい。K: 成長が遅いが、他菌に侵入されにくい。菌糸が濃く、リグニンをよく分解する。E: K に準ずる。S: 平均的であり特徴は見られない。

参考文献

- [1] 中丸麻由子「格子モデル上の生物個体間やコロニー間の競争と進化」生物物理 48, 272-278 (2008)
- [2] N. A. White, C. Sturrock, K. Ritz, W. B. Samson, J. Brown, H. J. Staines, J. W. Palfreyman, J. Crawford, 'Interspecific fungal interactions in spatially heterogeneous systems', FEMS Microbiol. Ecol., 27, 21-32, (1998)
- [3] 早瀬伸樹, 金丸健司, 堤主計, 中川克彦「白色腐朽菌による合成染料の脱色」新居浜工業高等専門学校紀要第 49 巻, pp23-28 (2013)
- [4] R version Development Core Team©2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- [5] S. Matsuura, 'Colony patterning of Aspergillus oryzae on agar media' Mycoscience 39, 379-390 (1998); S. Matsuura, 'Colony patterning and collective hyphal growth of filamentous fungi' Physica A 315, 125-136 (2002)
- [6] S. Marín, D. Cuevas, A. J. Ramos, V. Sanchis, 'Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium', International Journal of Food Microbiology 121, 139-149 (2008)

