

## シイタケ菌の子実体形成と酵素

(株) 河村式椎茸研究所  
池ヶ谷のり子

現在、我が国の生シイタケ栽培は栄養剤を添加した菌床栽培に移行しつつあるが、現段階では培地成分、培養条件、発生操作等、品種の問題も含めて技術的に完成されているとはいえない。シイタケ菌は *in vitro* で極めて子実体を形成しにくく、形態形成研究の大きな障害となっていた。本講は *in vitro* において短期間に、かつ確実に子実体を形成する菌株と子実体形成に有効な培地成分を検討し、その結果に基づいて菌糸体生長と子実体形成に伴う各種酵素活性の変化を調べ、形態形成の生理的背景を明らかにした結果を取りまとめたものである。

《方法》 供試菌株は静岡大学農学部植物病理学研究室保存のシイタケ菌73菌株を用いた。子実体形成実験には主に変温処理なしで子実体を形成するNo.68菌株を用いた。

基本培地としてペプトン・グルコース(PG)培地 (Table 1) を用いた。市販リグニン、ウロン酸、カルボキシメチルセルロース(CMC)およびセロビオースは基本培地とは別に高圧滅菌し、0.2%濃度に添加した。フェルラ酸およびバニリンは99%エタノールに溶解したのち50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に培地に添加した。

培養は約400ルクスの白色蛍光灯下、温度 25°C、湿度 60%の恒温室で静置培養した。

粗酵素液は、濾別した菌糸体を蒸留水でよく洗浄したのち、等量のリン酸緩衝液(pH 7.4)を加えて氷冷下ガラスホモジナイザーおよび超音波細胞破壊器で処理し、遠心分離(20,000 g, 30分)したものをを用いた。

カルボキシメチルセルラーゼ(CMCase)の活性は1.0%CMC添加リン酸緩衝液(pH 6.8)に培養濾液を反応させ、オストワルド粘度計を用いて粘度を測定することにより求めた。

ラッカーゼ活性は1.0%フェニレンジアミン溶液 0.1 ml, 酢酸緩衝液(pH 6.0) 1.0mlおよび培養濾液 1.0 mlを25°Cで1時間反応させたのち470 nmの吸光度測定により求めた。

グルタミン酸脱水素酵素(GDH)の活性は 1mMのNADHまたはNADPH 0.02 ml, 0.3M  $\alpha$ -ケトグルタル酸 0.02 ml, 0.8M塩化アンモニウム 0.06 ml, 50mMメルカプトエタノール 0.05 ml, トリス緩衝液(pH 8.3) 0.4 mlおよび粗酵素液 0.02 mlを分光光度計内で反応させて340 nmにおける吸光度の変化により測定した。

《結果および考察》 供試シイタケ菌 73菌株を0.2%市販リグニン添加PG培地(PGL)で培養したところ、PG培地培養菌糸体の平均 2.3倍の菌糸体乾燥重量を示し

た。さらに、PG培地では子実体を形成しないNo.68菌株を用いて市販リグニンの子実体形成に及ぼす影響を調べたところ、顕著な子実体形成促進効果がみられた。シイタケ菌に対する菌糸体生長および子実体形成促進効果は、市販リグニンのほか、スギおよびブナから抽出したジオキサンリグニン、リグノスルホン酸においてもみられた。さらに同様の効果はコーヒー酸、フェルラ酸、シナピン酸、バニリンなどのフェノール化合物においても認められた。フェノール化合物では、10~50  $\mu\text{g/ml}$ 濃度の添加で最も効果が大きかった。

ガラクトン酸並びにグルクロン酸は炭素源としてグルコースとほぼ同等の効果を示したが、これらを0.2%濃度にPG培地に添加すると、No.68菌株の菌糸体生長および子実体形成を促進した。フェノール化合物とウロン酸を同時に添加すると相乗効果がみられ、子実体発生までの期間が短縮された。セロビオースは炭素源として最も効果が高く、栄養生長を促進したが、それ自体には子実体形成促進効果はみられなかった。セロビオースはバニリン培地(PGV)では子実体形成に効果的に働かなかったが、バニリン・グルクロン酸培地(PGVGlc)に0.2%濃度に添加することにより子実体形成までの日数の短縮、発生数の増加に効果があった。

以上のことからフェノール化合物とウロン酸はそれぞれ単独でも子実体形成促進効果をもつが、両者が同時に存在すると相乗効果があり、さらにセロビオースの存在により栄養生長が促進されることが明かとなった。

フェノール化合物の菌糸体生長および子実体形成促進効果は、培養開始時に添加した場合が最も著しく、10日目では半減し、15日目以降では消失した。一方、フェノール化合物添加PG培地(PGV)で30日以上培養したのち、PG培地に置換培養した場合には対照区と同等の子実体形成がみられたが、フェノール化合物添加培地(PGV)における前培養日数が20日以内の場合は子実体形成はみられなかった。しかし、対照区としてPGVからPGV培地に置換した場合にはいずれも子実体形成はみられ、PGVにおける前培養日数が20日以内の区で子実体形成がみられなかったことは、置換の影響ではなく培地中のフェノール化合物の有無と関係するものと考えられた。また、PG培地培養15日目に4℃の低温に移して2日間生育を停止し、そののちフェノール化合物を添加した場合には、子実体形成がみられたが、処理温度を15℃にした場合には子実体は発生しなかった。

以上のことから市販リグニンおよびフェノール化合物の栄養生長および子実体形成促進効果は培養開始時の添加が最も効果があり、接種源培地のフェノール化合物の有無は無関係であることから、菌糸体が新しい培地中に生長を開始する時にフェノール化合物を吸収することにより菌糸体内部で子実体形成に向けての生長を開始し、その準備が完了したのちはフェノール化合物の存在は無関係になるものと考えられた。

培養に伴う培地pHの変化を調べた結果、子実体を形成する場合はpH4.0~4.5となった。始発pHが4.5~5.0の場合は良好な子実体形成がみられたが、4.0では抑えられ、3.5ではみられなくなった。

子実体形成に伴う菌糸体乾燥重量を測定した結果、培養20日目頃より急激に増加しはじめ、子実体形成直前に最大となった(Fig. 1)。この時期にはCMCaseお

よびラッカーゼも高い活性を示した (Fig. 2, 3)。菌糸体乾燥重量, CMCaseおよびラッカーゼのいずれも幼子実体が生長を始める頃にはその値は低下し始めた。フェノール化合物をPG培地培養12日目に培地に添加すると, CMCase活性およびラッカーゼ活性が最大を示す時期および子実体形成時期もPGV培地に比較して平行的に遅れた。ラッカーゼの阻害剤であるジエチルジチオカーバメイト (DETC) を培地に添加したところ, 培養14日目以前の添加で著しく子実体形成が阻害され, 特に7日目添加で阻害が大きかった。しかし, 21日目以降の添加では阻害はみられなかった。子実体形成の阻害されたDETC添加PGV培地におけるラッカーゼ活性はPG培地のそれと同様の変化を示した。これに対して, 子実体が形成された培養20日目以降のDETC添加培地では対照区のPGV培地と同様の変化を示した。

子実体形成がみられないPG培地および子実体形成の阻害されたDETC添加培地では培養に伴うCMCase活性, ラッカーゼ活性および菌糸体乾燥重量に変化がみられなかったことから, これら酵素活性の増大は子実体形成に伴う変化, すなわち菌糸体が生殖生長に向けて変化した結果現れたものであり, 子実体形成時に多量に必要な炭素源確保のために高活性を示したと考えられた。

一方, GDHの高活性は培養10日目以前の培養初期にみられる点で特徴があった。GDHの高活性は子実体形成直前にもみられた (Fig. 4)。しかし, 子実体形成のみられないPG培地ではこのような変化はみられなかった。GDHはフェノール化合物の存在で活性が増大した。また, GDHの高活性時期はDETC添加による子実体形成阻害効果の最も大きい時期と重なり, DETCは培養初期のGDHの高活性を抑えた。

以上のことから, 菌糸体が新たに生長を開始するときリグニンが存在すると, シイタケ菌はまずグルコースなどを吸収して生長し, そののち菌体外酵素を分泌してリグニンを分解・吸収し, その結果, GDH活性が上昇して子実体形成に直接関与する酵素の誘導が始まるという連鎖の可能性が考えられた。本実験では酵素の生成は培養20日目くらいには完了し, 菌糸体は生殖生長に向けて動きだし, 菌糸体を増加させ, CMCase, ラッカーゼなどの活性を高めたものと推察された。

シイタケ菌のリグニン分解能はセルロースやヘミセルロースの利用を容易にする栄養的役割のみではなく, 栄養生長から生殖生長への転換に重要な役割を持っているものと考えられた。

Table 1. Composition of peptone-glucose (PG) medium.

Peptone	8.0g/l
Glucose	20.0g/l
$\text{KN}_2\text{PO}_4$	0.5g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0mg/l
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.0mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0mg/l
$\text{MnCl}_2$	3.0mg/l
$\text{ZnCl}_2$	3.0mg/l
Thiamine hydrochloride	10.0mg/l
pH	4.7

pH was adjusted with 1N-HCl

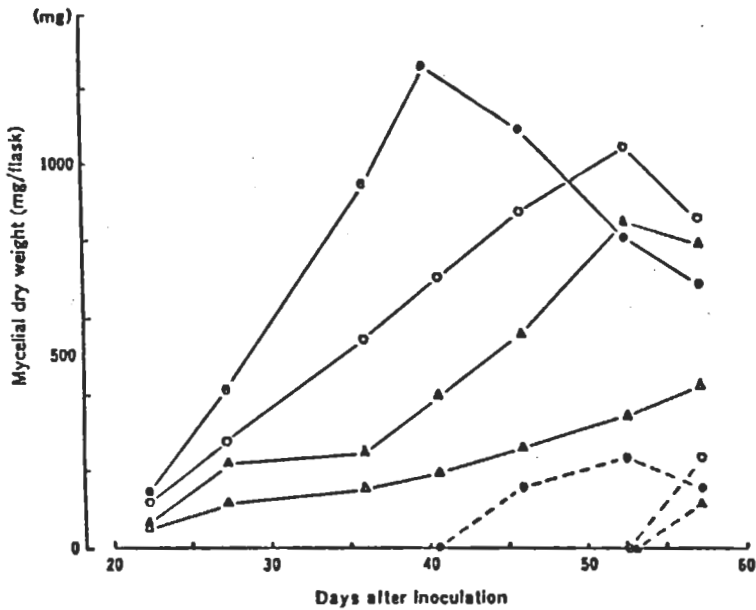


Fig. 1. Growth of *L. edodes* in peptone-glucose (PG) medium, peptone-glucose-vanillin (PGV) medium, peptone-glucose-galacturonate (PGGaU) medium and peptone-glucose-vanillin-galacturonate (PGVGaU) medium.

- Mycelial dry weight in PGV.
- Mycelial dry weight in PGVGaU.
- ▲—▲ Mycelial dry weight in PG.
- △—△ Mycelial dry weight in PGGaU.
- Dry weight of fruit-bodies in PGV.
- Dry weight of fruit-bodies in PGVGaU.
- ▲····▲ Dry weight of fruit-bodies in PGGaU.

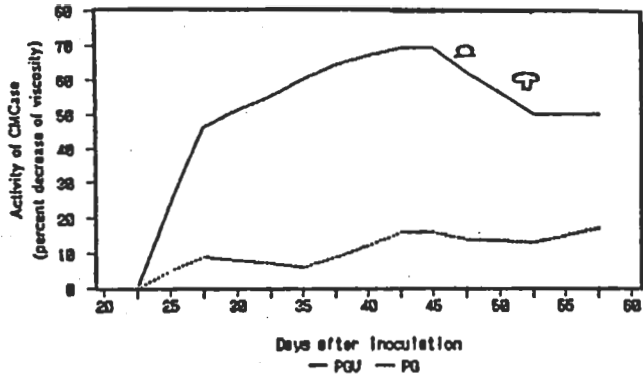


Fig. 2. Changes in activities of ChCase during fruit-body formation in liquid medium of PGU and PG.

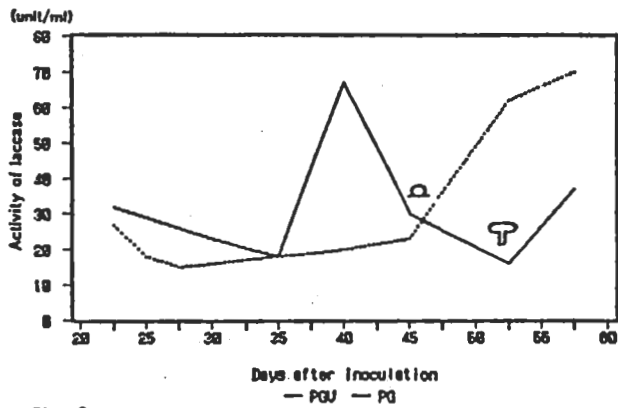


Fig. 3. Changes in activities of laccase  $\alpha$ -phenylenediamine during fruit-body formation in medium of PGU and PG.

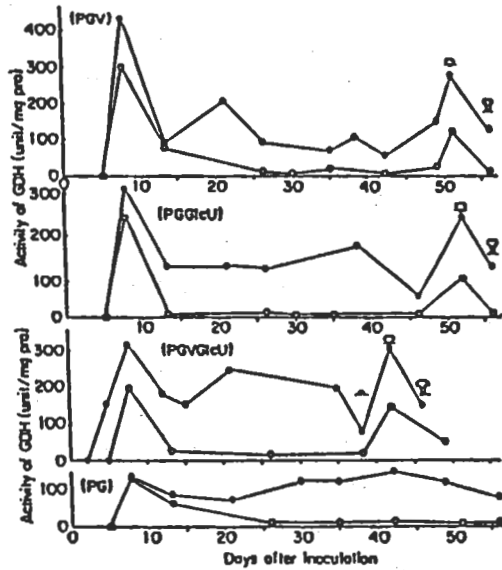


Fig. 4. Changes in activities of NAD-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GDH) and NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) during fruit-body formation of *L. edodes* strain No. 68 in liquid media, PGV, PGGlcU, PGVGlcU and PG.  
 ●—● NAD-GDH.  
 ○—○ NADP-GDH.