

キチナーゼ酵素系の作用ときのこの発生

近畿大学農学部 寺下隆夫

1. きのこのキチン

キチンは、カニ、エビなどの甲殻類、蚕など昆虫の表皮、菌類などに存在し(表1)、未利用資源としてはセルロースに次いで豊富である。近年、キチンの有用機能が開発され、

「機能性多糖類」

として注目される

ようになり、

脱アセチル化された

キトサンと共に、コレステ

ロール降下作用

などの生理活性

物質として、また、

キチン繊維

の生体親和作用

を応用した生体

適合材料、低う

蝕性を応用した虫歯

予防、酵素固定化

基材への利用、

制ガン・抗感染症

薬の開発、

さらに水質浄化に

と多方面に渡る

研究が進められて

いる。

ところで、きのこの

中のキチン含有量

は数%程度である。

本成分はR-グルカ

ン(グルコース残基が

$\beta-1, 3$ 結合と $\beta-1, 6$ 結合

によって連なっており、

多くの分枝を有する)

とからまって菌糸壁

の内層を形成し、

また隔壁の中心成分

として、きのこ菌の

形態を保つ上で重

表1 各種生物の残渣中のキチン成分含有量

| Origin of Waste | Dry-Weight Composition | | |
|-----------------|------------------------|------------------|------------|
| | Inorganic (%) | Protein/Fats (%) | Chitin (%) |
| Shellfish | 25 - 50 | 25 - 50 | 14 - 35 |
| Krill | 24 | 61 | 7 |
| Clams/Oysters | 85 - 90 | negligible | 3 - 6 |
| Squid | negligible | 76 - 95 | 1 - 2 |
| Fungi | negligible | 25 - 50 | 10 - 25 |
| Insects | negligible | 60 - 80 | 0 - 8 |

G.C.Allan et al., Proceeding of First International Conference on Chitin/Chitosan (1978).

さらに水質浄化にと多方面に渡る研究が進められている。

ところで、きのこの中のキチン含有量は数%程度である。本成分はR-グルカン(グルコース残基が $\beta-1, 3$ 結合と $\beta-1, 6$ 結合によって連なっており、多くの分枝を有する)とからまって菌糸壁の内層を形成し、また隔壁の中心成分として、きのこ菌の形態を保つ上で重要な物質である。しかし、一部はまた子実体成長の基質として、分解・利用されることが数種のきのこ(アミスギタケ、エノキタケ、ヒラタケ)で明らかにされている。このことからキチンは子実体成長においても、また大切な物質であるといえる。本成分はキチナーゼとキトビアーゼ($\beta-N$ -アセチルグルコサミニターゼ)により、キトビオースを経て、単糖のN-アセチル-D-グルコサミンにまで分解される。従ってこれらの酵素は、子実体形成にとって大切なことは言うまでもない。

そこで、本講演では、子実体の形成に伴ってキチン含量がどのように変動するか、その際、キチナーゼやキトビアーゼ活性はどうか、などについて最近の研究成果を中心に述べ、キチン分解酵素系の役割ときのこの発生について考察する。また、キチンやキトサンおよびそれらの分解物がきのこの子実体形成にどのような影響を及ぼすかについても、演者らが行った2~3の研究結果を紹介する。

2. 子実体の成長とキチン含量の変化

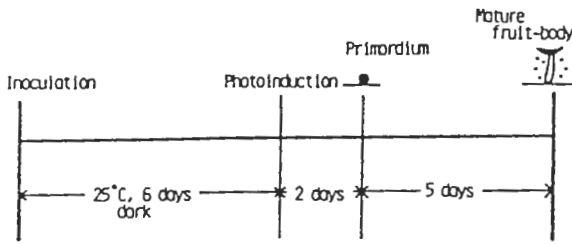


図1 アミスギタケの培養方法

始まると、その40~45%が栄養菌糸から消失した。一方、子実体成熟時には、ほぼ同量のキチンが子実体に蓄積された(図2、3)。また、ザラミノヒトヨタケ

では、子実体成長の開始直前に栄養菌糸中でキチン含量の著しい増加がみられたが、子実体の成長と共に、その量を減じ、それと対応して子実体傘部と柄部のキチン含量が大きく増加した。さらに、これらのキノコほどではないが、エノキタケでも同様なキチン含量の変動が認められた。また、本菌では培養液と栄養菌糸および子実体中のN-

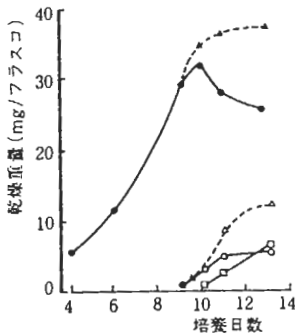


図2 アミスギタケの子実体形成時における栄養菌糸と子実体の乾燥重量の変化
 ▲---▲ : コロニー全体(菌糸+子実体)
 ●---● : 菌糸, ▲---▲ : 子実体全体
 ○---○ : 菌柄, □---□ : 菌傘
 (北本ら, 日産報, 1978)

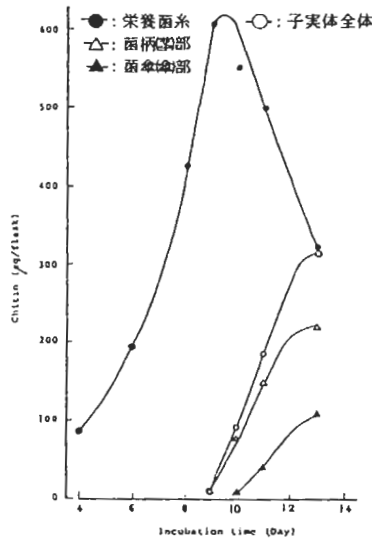


図3 アミスギタケの子実体成長に伴う栄養菌糸と子実体(茎, 傘部)のキチン含量の変動

アセチルグルコサミン量の変動についても測定した。

3. キチナーゼ酵素系の活性と子実体形成

エノキタケを用い、子実体成育期間中の培養液、栄養菌糸および子実体各部のキチナーゼ、キトビアーゼ活性を調べた(図4)。栄養菌糸中のキチナーゼ活性は培養10日目頃から急激に上昇し、子実体原基形成期から子実体の成育・成熟期にかけて高レベルを維持した。一方、培養液中の本活性は培養15日目頃から高くなり、子実体の成熟時まで上昇を続けた。子実体では柄部で高い活性を示したが、傘部での活性は弱かった。また、キトビアーゼ活性を見ると、栄養菌糸では子実

体原基形成期に最大になり、以後下降した。培養液中の活性は原基形成期以後急激に上昇し、子実体成熟期に最大となった。これらのことから、キチナーゼとキトビアーゼは、栄養菌糸中のキチンを分解し、子実体のキチン合成の素材あるいはエネルギー源としてのN-アセチルグルコサミンを供給する働きをもつと推察される。

ところで、この点に関して、岩本ら(醸酵工学、68、1990)はヒラタケを使っていくつかの検討を行っている。彼らは糸状菌を用いた検討で、キトビアーゼが隔壁を作るカビに見られること、隔壁

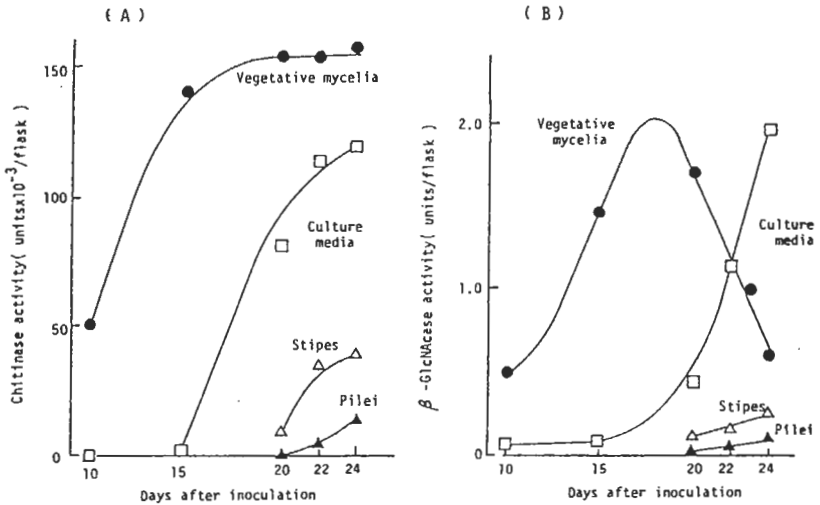


図4 Changes in chitinase activity (A) and β -GlcNAcase activity (B) of the culture media, and the vegetative mycelia, and the stipes and pilei of fruit-bodies during development of *F. velutipes*

形成部分で本酵素が生産されることなどから、本酵素は隔壁形成に関与し、生理的に重要な酵素ではないかと推察している。そこで、岩本らはヒラタケの成育に伴うキチナーゼとキトビアーゼの活性を調べ、栄養菌糸に低温刺激を与えず、子実体が形成されない条件では、栄養菌糸中のこれら酵素の活性が上昇しないことを明らかにした。しかし、先述の隔壁形成にキトビアーゼが関与するかどうかについては、その可能性の薄いことを述べ、むしろ菌糸の先端成長に関係しているのではないかと推察している。そして、ヒラタケにおけるこれら酵素の主要な働きは子実体のキチン合成素材とエネルギー源としてのN-アセチルグルコサミンの供給にあると結論した。

4. キチン、キトサンおよびそれら分解物のきのこ成長に及ぼす影響

最近、キトサンのオリゴ糖が微生物に対して、かなり強い抗菌性を有することが大室らにより報告され、植物病原菌の防除や食品の保存への応用研究が進められている。そこで演者らは、キチンやキトサン、さらにそれらの分解物がきのこの栄養菌糸成育や子実体の形成にどのような影響を及ぼすかを検討した。まず、図5に示したような物質のそれぞれについて、エノキタケの栄養菌糸成長に及ぼす影響を調べた。その結果、キトサンの加水分解物にかなりはっきりした菌糸成育抑制効果が認められた。一方、キチン分解物の効果は極く弱いもので、D-グルコサミンには全く見られなかった(図6)。さらに、キトサン分解物に対する数種きのこ菌の菌糸成長阻止濃度を調べたところ、250~1,000ppmが最小発育阻

図6 キチン関連化合物のエノキタケ菌糸生育抑制効果

| Sample ¹⁾ | Control | Chitin hydrolysate (a) | Chitin hydrolysate (b) | | Chitosan hydrolysate | Chitosan citrate | D-glucosamine HCl | |
|-----------------------|---------|------------------------|------------------------|------|----------------------|------------------|-------------------|------|
| mg/tube ²⁾ | 25 | 25 | 25 | 50 | 25 | 25 | 25 | 50 |
| Mycelial growth | +++ | ++ | ++ | ++ | - | + | ++++ | +++ |
| pH of medium | 6.60 | - | 5.70 | 5.85 | 5.20 | 4.30 | 5.00 | 4.50 |

++++ ← accelerated +++ → inhibited -

図5 エノキタケの菌糸生長実験に用いたキチン関連化合物の組成

| Sample | Composition |
|--------------------------|---|
| (1) Chitin hydrolysate | |
| (a) | Tetra(11%), Penta(45.7%), Hexa(39.1%), Hepta(4.1%) |
| (b) | Mono(5.8%), Di(19.4%), Tri(41.4%), Tetra(25.4%), Penta(7.9%) |
| (2) Chitosan hydrolysate | Di(30.6%), Tri(41.7%), Tetra(10.2%), Penta(7.6%), Hexa(7.4%), Hepta(1.2%), Octa(1.2%) |
| (3) Chitosan citrate | |
| (4) D-glucosamine-HCl | |

止濃度であった。また、キトサンクエン酸塩の子実体形成に及ぼす影響をエノキタケを用いて調べたところ、子実体の形成を著しく促進することが分かった。本効果はアミスギタケやザラミノヒトヨタケでも見られた。