

# 菌根形成食用担子菌，ホンシメジおよびマツタケの 子実体形成研究の現状

寺下 隆夫・永井 勝・坂井 拓夫

近畿大学農学部食品栄養学科

## The Present Situation of Studies on the Fruit-body Formation of the Mycorrhizal Edible Mushroom Fungi, *Lyophyllum shimeji* and *Tricholoma matsutake*

Takao TERASHITA, Masaru NAGAI and Takuo SAKAI

*Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, Kin-ki University,  
Nakamachi 3327-204, Nara 631-8505, Japan*

### Synopsis

The ectomycorrhizal fungi *Tricholoma matsutake* and *Lyophyllum shimeji* are famous and delicious edible mushrooms from Japan. Since they form mycorrhiza on the fine roots of living plants, their growth depends facultatively on living plants. To cultivate these fungi for in a pure culture, glucose and a few other monosaccharides must be used as carbon sources. In 1994, it was reported that *L. shimeji* can form mature fruit-bodies on a medium that consists mainly of barley grains; in addition, they form without a host plant. These observations indicate that some mycorrhizal mushroom fungi have the ability to utilize barley starch. When fungi form fruit-bodies, large amounts of mycelia may be needed either to store nutrients or to transport nutrients to the fruit-bodies, or for both purposes. However, it is very difficult to cultivate large amounts of mycelia using monosaccharides in a pure culture. The addition of low molecular weight substances in high concentrations increases the osmotic pressures of a medium, which in this case would suppress the growth of the mycelium. Then, amylase productions during the vegetative mycelial growth of *T. matsutake* (No. 114 and Z-1 strain), which hydrolyze starch as a substrate for the growth of the fungi were examined using a somewhat modified matsutake liquid medium. Amylase activity ( $\alpha$ - and gluco-amylase) in the culture filtrates had relatively high values at 40 days after the inoculation. Maximum activity was attained 80 days after inoculation.  $\alpha$ -Amylase showed more activity than glucoamylase in both strains. Amylase activity in the culture filtrate of *T. matsutake* was assayed by using several kinds of starch as the substrate; the starches were purified from barley (5 kinds), corn, sweet potato, and potato. The enzyme was most active in the presence of the starch prepared from the "Amagi" and "Ichibanboshi" strains in the "Nonwaxy" barley group among the starches. This activity was observed at a circa 2.0-fold higher value than that of the control (potato). The addition of potato and yam to the culture medium increased the dry weight of mycelia 4.8-5.6 times, as compared to the control (without addition); moreover, the value of amylase activity was 1.9-2.6 times that of the control. A positive correlation between vegetative mycelial growth and amylase activity was detected. To elucidate the properties of extracellular amylases in the *T. matsutake* Z-1 strain, the amylase fractions obtained from the DEAE-Toyaparel column chromatography were identified. One type of  $\alpha$ -amylase, glucoamylases and  $\alpha$ -glucosidases showed activity upon analysis by thin layer chromatography using hydrolyzates.

## 1. 緒言

“香りマツタケ、味シメジ”は秋の味覚を代表する食用きのこを言い表した見事な表現で、これには滅多に口に出来ないささやかな庶民の願望さえ感じられる。

ところで、これらのきのこ類は、つい最近まで人工栽培が不可能であった。これは両きのこが、寄主植物と菌根を形成する菌根形成菌に属し、寄主植物から生長のための養分供給を受け子実体を形成するため、寄主植物なしにはきのこを形成することが極めて難しかったことが原因である<sup>1)</sup>。

ところが、近年になってこのうちのホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*)<sup>\*1)</sup>を寄主植物なしで栽培できる人工栽培法が開発され<sup>2-4)</sup>、今や商業生産ベースに近い実用的な栽培法が本格化しようとしている。また、この成功を受け、同じような条件下でマツタケ (*Tricholoma matsutake*)の子実体形成(人工栽培法)についても“もしや可能では”と再び研究が開始されはじめた。

本総説では、まず菌根形成きのこ類が人工栽培が難しい理由についてその一端を説明し、つぎに、ホンシメジが人工栽培化に至った過程、つづいてマツタケの人工的な子実体形成研究の現状を、主に著者らが検討中の菌根菌類の生育生理の面か

ら、成育基質として重要なデンプンの利用性について、生成酵素と関連づけて記述する。最後に、今後におけるマツタケ研究の方向について考察したい。

## 2. 菌根形成きのこ菌類の生育生理

一般的なきこの生活環 (Life-cycle) は大きく二つの世代に分けられる。すなわち、二核化した栄養菌糸生長世代を栄養生長期 (Vegetative stage) と呼び、子実体原基が形成され、それが成熟する生殖生長期 (Reproductive stage) と区別される。両世代間では生長に必要な養分も違い、代謝のプロセスも異なると考えられている。しかし、今なお栄養菌糸から子実体原基への転換のからくり、さらに、原基から子実体生育への機構など、ほとんど明らかにされていないのが現状である<sup>5)</sup>。

ところで、きのこ類の子実体は、栄養分を十分に蓄えた菌糸体に、温度や光などの物理的刺激や子実体形成誘導物質、ストレス化合物などを与えると形成される場合が多い。

担子菌の栄養菌糸は<sup>6)</sup>単糖ではそのままの形で、オリゴ糖や多糖類(セルロースやデンプン)では酵素による分解の後、これらを炭素源として

表 1 きこの類の生育に必要な炭水化物基質分解酵素類の生産性

生育に必要な栄養分		酵素名	酵素生産性	
多糖類	分解物		菌根形成きのこ類	木材腐朽性きのこ類 腐生性きのこ類
セルロース	グルコース	セルラーゼ	±, -	++
ヘミセルロース (キシランなど)	キシロース	ヘミセルラーゼ (キシラナーゼなど)	±, -	++
リグニン	フェルラ酸 シナピン酸 桂皮酸	ラッカーゼ ペルオキシターゼ	-	+, ±, - <sup>a)</sup>
デンプン	グルコース	アミラーゼ	+, ±, - <sup>b)</sup>	++

++ : 良く分解する, + : 分解する, ± : 少しは分解する, - : 分解しない

a) 白色腐朽菌と褐色腐朽菌とで大きく異なる。

b) マツタケ菌と比較するとホンシメジ菌では強く、人工培地上でほとんど菌糸生育の出来ないマツタケ菌ではアミラーゼ活性もほとんど無いと考えられる。

\*1) 現在、シメジの商品名で市場に出廻っている食用きのこは本来のホンシメジではなく、木材腐朽菌の仲間の人工シメジ (*Pleurotus ostreatus*, 和名ヒラタケ)、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) などである。ホンシメジは味が良く、高級きのこのイメージがあり、商品性が高まるため、このようなきのこ名で販売されている。

菌糸を生長させ、やがて子実体を形成する。栄養生長期にコロニーにより吸収された炭水化物は菌糸細胞により増殖と代謝機能の維持に利用され、その一部は子実体発育に要する素材として菌糸中に貯蔵され、利用されると考えられる。

一方、窒素化合物は、木材腐朽菌や腐生菌では木材やわら、堆肥、腐植質中の有機窒素であり、それらは主にアミノ酸混合物や蛋白質である。

きのこ生育時の養分動態については比較的多くの研究がある。それらを総括すると炭水化物ではセルロースやキシラン、デンプン、グリコーゲン、トレハロースやその分解物、糖アルコールが<sup>7)</sup>、窒素化合物としては蛋白質、ペプチド化合物およびその分解物のアミノ酸、硝酸態やアンモニア態の窒素化合物などがきのこの成長のための基質として重要である。

ここに記述する菌根形成菌類についても、これらの点では木材腐朽菌や腐生菌と何ら変わることはない。では、この両者のどこが違うかという点、上述の炭水化物や窒素化合物を分解し、消化しやすい形にするための酵素類の生産性である<sup>8)</sup>。

表1はマツタケやホンシメジなどの菌根形成きのこ類とシイタケ (*Lentinula edodes*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) のような木材腐朽性あるいはマッシュルーム (*Agaricus bisporus*) に代表される腐生性きのこ類の炭水化物基質の分解酵素の生産性を、現在までの報告に基づいて比較した結果である。

シイタケなど人工栽培が行われているきのこ類ではセルロースやヘミセルロースを、きのこ自身が作る酵素によって分解し、生育のための主要基質として利用するが<sup>9)</sup>、菌根形成菌類ではこの種の酵素をほとんど、ないしは全く作り出す能力が無いため、生育のために利用可能な基質は低分子のグルコースやフラクトース、アラビノース、キシロースなど極く限られている<sup>10)</sup>。

図1はマツタケおよびホンシメジの栄養菌糸生育への炭素源の影響を調べた川合・阿部 (1976)<sup>11)</sup> と山中・太田 (1998)<sup>12)</sup> らの結果をまとめたものである。両菌間での生育速度には大きな差が認められる (マツタケ: 40日培養, ホンシメジ: 20日培養) が、いずれのきのこでもグルコースおよびフラクトースはよく利用され、キシロースはほとんど利用されない。二糖類では、ホンシメジはトレハロースが最良で、シュクロースもかなりよく利用され、マルトースはトレハロースの約50%程度の菌糸生育を示す。一方、マツタケ菌糸はマルトースでの菌糸生育はかなり良いが、シュクロースでの生育は悪く、両菌間でシュクロースの利用性に大きな差が認められる (インベルターゼの生成に大きな差のあることが想定される)。また、多糖類のデンプンの利用については、ホンシメジではグルコースと同程度の生育を示し、極めて良好であることがわかる。これに対して、マツタケではグルコースの約1/2~1/3の菌糸生育を示すのみであるが、デンプン基質に少量のグルコースをスターターとして加えた培地で培養

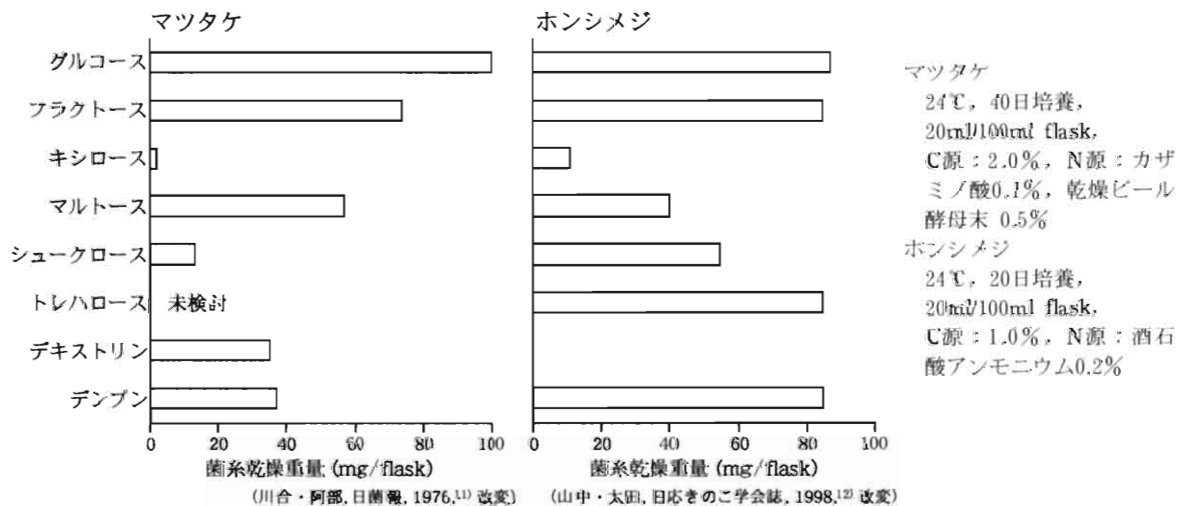


図1 マツタケ (*Tricholoma matsutake*) およびホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) の栄養菌糸生育に対する炭素源の影響

すると、グルコース単用に近い良好な菌糸生育を示すことが報告<sup>4, 13, 14)</sup>されている。

これらの結果は、マツタケ菌が、マルターゼ ( $\alpha$ -グルコシターゼ) および  $\alpha$ -アミラーゼを生成することを示唆している。また、ホンシメジではこれらの酵素に加え、インベルターゼおよびトレハラーゼの生成が想定される。なお、マツタケのトレハラーゼ生成については現在のところ明確ではない。しかし、ホンシメジが大麥デンプンを基質に人工培地上で子実体を形成した事実および、マツタケもデンプン培地で培養可能なことから、マツタケ菌が生産するアミラーゼの基質特異性、デンプンの分解特性などを検討することにより、本菌の人工栽培上の問題点がより明確になるものと考えられる。

マツタケの人工栽培を考える上では、まず菌体を大量に増殖させることが前提になるが、そのためには生育基質としてのデンプンは重要で、強力なアミラーゼ分解力を備えたマツタケ菌を遺伝子工学の技術によって育種することなどを含め今後の展開が期待されることである。

### 3. ホンシメジ人工栽培化の過程

ホンシメジは生育に必要な栄養分を菌根を通して樹木から摂取し、きのこを形成する菌根形成食用担子菌の一種で、寄主植物なしに人工栽培で子実体を形成させることは極めて難しいとされてきた。

本菌の栄養菌糸生育に対する炭素源の要求性については比較的多くの報告がある。山中・太田<sup>12)</sup>はグルコース、トレハロース、フラクトースおよび可溶性デンプンが栄養菌糸の生育に最適としており、マルトースおよびシュークロースでもかなりの生育を示すことを報告している。吉田ら<sup>15, 16)</sup>は炭素源としてシュークロースを用い、良好な菌糸生育の得られること、この事実から菌体外にインベルターゼの生成を示唆しているが酵素の確認には至っていない。また、彼らは別の報告でグリコーゲンや可溶性デンプン、ペクチン、デキストリンなどの多糖類基質でも菌糸生育は良好で、グルコアミラーゼおよび  $\alpha$ -グルコシターゼの生成を示唆しており、可溶性デンプンを13%という高濃度で使用しても菌糸生育速度は低下しないとしている<sup>16)</sup>。

このような永年にわたる菌根菌の栄養要求性の検討の末、ついに、1994年人工栽培による子実体の形成に成功した。子実体発生はOhta<sup>2)</sup>を初め、Watanabe et al.<sup>3)</sup>、吉田・藤本<sup>1)</sup>によって、それぞれほぼ同時期に報告された。一方、Kawai は園芸分野でクローン苗を得る方法として知られる“取り木法”によって接種用苗木作りを行い、この苗木にホンシメジの菌糸を接種する方法で人工的な子実体の発生をみている。

いずれの場合も子実体発生に至った要因として、子実体の形成とその生長に浸透圧を高めることなく、炭素源として十分量のデンプンを供給できたことが大きかったと報告<sup>2-4, 17)</sup>している。ま

表 2 菌根形成きのこ類および木材腐朽性きのこ類の加水分解酵素類の生産性

	活性 ( unh/ml )						
	プロテアーゼ		キチナーゼ	$\beta$ -1,3 グルカナーゼ	セルラーゼ		キシリナーゼ
	酸性	中性			CM-セルラーゼ	アピセララーゼ	
菌根形成菌							
ホンシメジ1	3.64	3.66	3.75	4.32	9.66	7.05	4.47
ホンシメジ2	4.93	6.95	3.91	1.88	4.32	10.4	3.50
アミタケ	0.72	0.48	0.90	3.40	4.66	5.16	4.91
ハツダケ	2.87	0.66	1.08	0.60	2.20	9.89	0.45
木材腐朽菌							
シイタケ	3.43	0	6.85	1.74	2.11	9.55	19.6
エノキタケ	2.50	7.24	3.03	2.56	4.81	39.7	22.1
ヒラタケ	2.98	2.52	5.02	4.95	9.27	79.4	11.0

菌根形成きのこ類はポテトグルコース液体培地で24℃、75日間、木材腐朽性きのこ類は同培地で24℃、25日間培養し、いずれもその培養ろ液を酵素活性測定用試料として用いた。

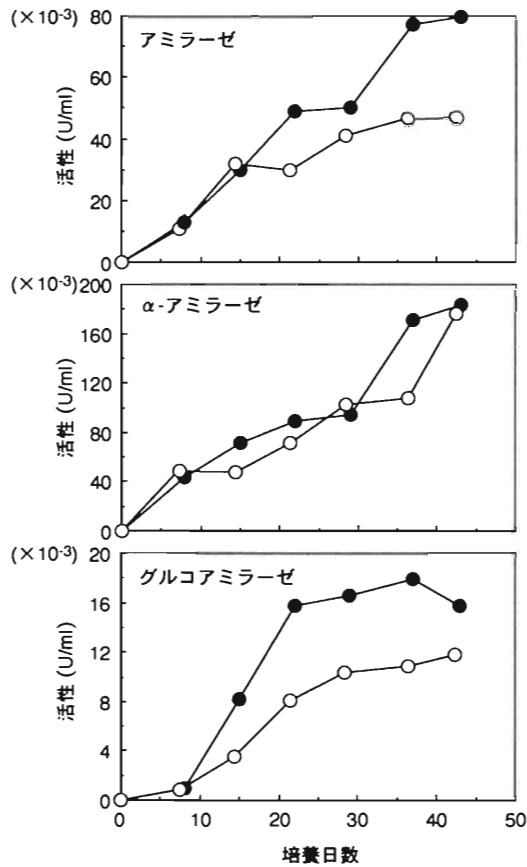


図 2 マツタケ改良液体培地での静置培養でホンシメジの栄養菌糸生長期に生成される菌体外アミラーゼ活性

●: 子実体形成菌株[4株 (MHO 1709, MHO 1710, MHO 1713, MHO 1721) の平均値], ○: 子実体非形成菌株[4株 (ISL1, OK2L, SF-Ls3, SF-Ls11) の平均値]  
 アミラーゼ活性: ソモギー・ネルソン法, α-アミラーゼ: ヨウ素・ヨウ化カリウム法, グルコアミラーゼ活性: F-キットグルコース法

た、本菌が高いデンプンの資化能力を有していることも述べられている。とくに、Ohta<sup>18)</sup> は多数の外生菌根形成きのこの類のデンプンとアミロースの資化性を調査し、アミロースでの生長の良い菌株の多くが、大麦培地上で良好な生育を示すことを報告している。すなわち、本菌の人工栽培を可能にした最大の要因は大麦添加による培地内の物理的な環境改善効果に加え、大麦デンプンの利用が大きかったことが挙げられる。

著者らも菌根形成菌における基質利用性の観点から、ホンシメジの菌体外加水分解酵素の生成について調査している<sup>19-21)</sup>。表 2 がその結果で、ホンシメジなどの菌根形成きのこの類とシイタケなど木材腐朽性きのこの類の酵素生産性を比較したも

のであるが、培養日数の著しい違いにも拘わらず (菌根形成菌: 75日培養, 木材腐朽菌: 25日培養), 菌根菌での活性の低いことが明らかである。とくに、その差はキシラナーゼやアビセラナーゼで著しい結果を得た。しかし、この結果からホンシメジといえどもこれらの酵素活性を全く示さないというわけではなく、弱いながらも当初予想された以上の種類の分解酵素類を菌体外に生成する事が判明した<sup>22)</sup>。

そこで、菌根性の本菌が生育する上で、最も重要と思われるアミラーゼについて調べた<sup>22)</sup>。その結果、ホンシメジは菌糸生育期に本酵素を生成し、菌糸の生長と共に酵素活性が上昇する結果を得た。図 2 は大麦培地で子実体の形成が可能な菌株と形成しない菌株のそれぞれ 4 株を供試し、培養に伴う両者の活性をその平均値で示した結果である。形成株と非形成株の各活性を比較すると、α-アミラーゼ活性には殆ど差が無いが、総アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性には両菌株間において比較的明確な差が認められた。また、アミラーゼ活性は菌糸生育量の増加に伴って直線的な上昇を示したが、グルコアミラーゼ活性は培養 22 日目では既に最大値に達し、培養終了時の 43 日目ではむしろ活性の低下が観察された。そこで、基質特異性を含めた酵素の性質を明らかにするため、現在これら酵素の精製を試みている。

ともかく前述のように、本菌の人工栽培が可能になったわけである。太田<sup>23, 24)</sup> は、最近本菌の実用栽培のための栽培条件について検討を加え、商業生産が可能なレベルの子実体収量を得るための栽培法を確立した。

表 3 には、太田がホンシメジの子実体発生のために考案した純粋培養用培養基および実用栽培用培養基の組成、ならびにその栽培条件を示した。この方法によると、650 ml の培地を用いたビン栽培法で平均 123 g/ビンの子実体収量が得られ、実用性も高い。しかし、培地に大麦を使用するため、得られたきのこの価格の高いことが残された問題である。また、一般の消費者がこれまでホンシメジと称して店頭で販売されてきた多くの“ニセモノのシメジ”と、今回やっと人工栽培が可能になった“ホンモノのホンシメジ”の区別が出来、ホンシメジの価値を正當に評価できるかどうか、はなはだ疑問である。今後、格段に安価な培地材料の開発が望まれる。また、実際的には林地での

表 3 ホンシメジの子実体形成用培養基の組成と培養法

純粋培養基 <sup>a)</sup>		実用栽培用培地 <sup>b)</sup>
オオムギ粒	80 g	1/10 希釈した左記の液体合成培地を培地含水率が70%になるようにオオムギ粒（市販精麦おし麦）に加えて一夜膨潤後、気乾状態のおが屑（混合比 1:1.5, v/v）と混合する。これを広口の栽培ビンに容量の1/4~1/2になるように軽く詰めて殺菌後、菌を接種し、培養する。培養30~35日頃にピートまたは鹿沼土を培地上に被覆する。菌糸培養は22℃前後、湿度約60%で行い、十分な菌糸増殖の後、15℃前後の低温にし、加温状態におくと、やがて子実体が発生・成熟する。
ブナ木粉	8 g	
1/10 希釈液体合成培地	140 ml	
組成 グルコース	10 g	
citric acid	1 g	
ammonium tartrate	2 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.5 g	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg	
Acetylacetone	0.03 ml	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100 mg	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 mg	
MnSO <sub>4</sub> · 4~7H <sub>2</sub> O	0.3 mg	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	15 mg	
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3 mg	
NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1 mg	
Thiamine · HCl	3mg	
Nicotinic acid	0.3 mg	
Folic acid	0.2 mg	
Biotin	0.03 mg	
Pyridoxine- HCl	0.03 mg	
Carnitin chloride	0.01 mg	
Adenine	0.03 mg	
HCl · 2H <sub>2</sub> O		
Choline chloride	0.03 mg	
HEPES	7 g	
Distilled water	1000 ml	

a) Ohta, A.: Mycoscience 35, 147-151 (1994).

b) 太田 明: 日菌報 39, 13-20 (1998)

栽培法や増産法<sup>25-28)</sup> がより有利な点もあり、上述の施設栽培に加え、近い将来、林地での栽培法も実用化され、ホンシメジが我々に身近な食用きのことして店頭に並ぶ日も近い。

#### 4. マツタケの子実体形成研究の現状

マツタケは貴重な秋の味覚として珍重される高価な食用きのこで、その人工栽培法については古くから研究が行われて来た<sup>29-32)</sup>。著者の知る限り、現在までに実験室での人工栽培で子実体の発生（子実体原基までの生長も含む）を認めたとする報告は三報ある<sup>33-35)</sup>。しかし、そのいずれの報告においても再現性のある結果とは言い難いのが現状である。

本菌はシイタケやエノキタケなどの木材腐朽性

きのこと比較すると、菌糸の生長速度が極端に遅く、また、栄養基質の分解能力も著しく劣る<sup>21)</sup>。さらに、生成される基質分解酵素の種類および生育に利用される低分子炭水化物の種類も少なく、高分子基質に至ってはほとんど利用出来ないとされている<sup>11)</sup>。

図1に示したように、マツタケ菌はその生育にグルコースと他の数種の単糖類のみが利用可能である。本菌が子実体を形成するためには、呼吸や細胞構成成分として利用できる十分量の栄養を蓄えた相当量の菌糸体が必要であるが、単糖類を基質とした培養では浸透圧などの問題もあり、大量の菌糸体を得ることは極めて難しい<sup>2, 36)</sup>。

Norkrans<sup>19)</sup> はデンプンにスターターとして少量のグルコースを加えて培養するとある種の *Tricholoma* は良好な生育の得られることを報告

表 4 マツタケ改変液体培地（寒天）の組成

液体培地		寒天培地	
ジャガイモ煎汁（男爵）	77 g	グルコース	15 g
グルコース	22.7 g	PDA <sup>*)</sup>	15 g
エビオス抽出液	5 g	エビオス粉末	5 g
サンパール CP(菌糸活力剤)	5 g	サンパール CP	5 g
チアミン-HCl	100 μg	寒天末	7.5 g
蒸留水で 1000 ml に調製 (pH 5.1)		チアミン-HCl	100 μg
		蒸留水で 1000 ml に調製 (pH 5.1)	

<sup>\*)</sup>PDA: 日本製ポテトデキストロス市販寒天培地粉末

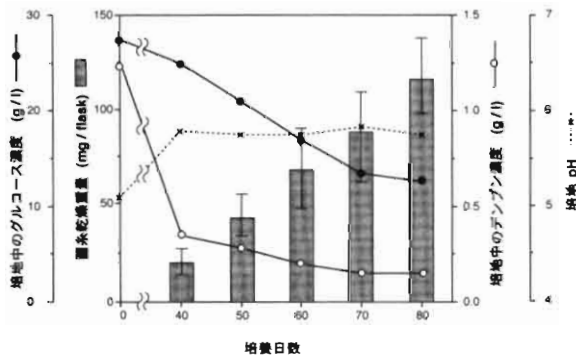


図 3 マツタケ改変液体培地での静置培養に伴うマツタケ菌 (No.114株) の菌糸生育と培地中のグルコースおよびデンプン消費量

マツタケ菌は100ml容マイエルフラスコに培地20mlを入れ、24℃で80日間培養した。

している。また、吉田ら<sup>4)</sup>は同種の菌根形成きのこであるホンシメジでこのことを述べており、Ohta<sup>18)</sup>は菌の系統によって利用能力に差は認められるが、マツタケを初めとする外生菌根菌がデンプンなど、その種類は極く限定されるものの多糖を利用する能力を持っていること、この利用能力を駆使すれば寄主植物の介在なしに、子実体形成の可能性があること、マツタケではないが粒状の麦類を主成分とする純粋培養培地で同じ菌根菌の仲間であるホンシメジの成熟子実体を得たことを報告<sup>2)</sup>している。また、マツタケ菌が直鎖状の構造をとるアミロースで比較的良く生育すると報告から推察して $\alpha$ -1, 4グルコシド結合を切断するアミラーゼを生産していることが想定される。

### 1) 生育のタイムコース

著者らはまず、マツタケの菌糸生育を速めるための培地組成について検討し、表4のマツタケ改変液体（寒天）培地を新たに調製した<sup>22, 37)</sup>。この培地にマツタケ菌 (No.114) を接種して80日間静置培養を行い、菌糸生育に伴う培地pHの変化、

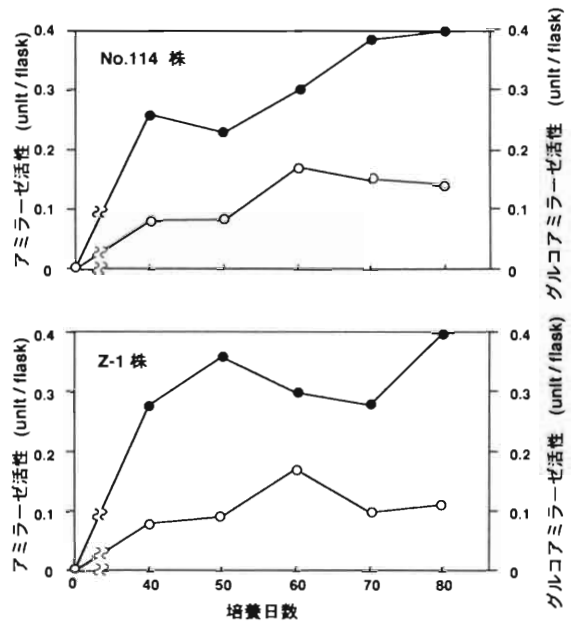


図 4 マツタケ菌の栄養菌糸生育に伴う菌体外アミラーゼ活性の変動

●: アミラーゼ活性, ○: グルコアミラーゼ活性  
マツタケ菌は100ml容マイエルフラスコにマツタケ改変液体培地20mlを入れ、24℃で80日間培養した。また、アミラーゼは基質に可溶性デンプンを用いて一定時間反応後、遊離する還元糖量をソモギー・ネルソン法で、グルコアミラーゼ活性は酵素反応で遊離するグルコースをF-キット

培地中のグルコースおよびデンプンの消費について検討した。図3がその結果であるが栄養菌糸の生育はほぼ直線的に増加し、培養80日目で120 mg dry weight/flaskを示した。一方、培地のグルコース濃度は培養40日目頃から著しく減少し、培養70日目で初発グルコース量の53%が消費された。本培地のデンプン濃度は1.25 g/lと低い、培養40日目で既にその72%が培地から消失した。本デンプン濃度はヨウ素法で検討したが、ヨウ素法では極く僅かなデンプン分子の内部切断によって発色率が著しく低下する(3.6%で呈色率は50%低下する)ため、他の定量法を併用しての再検討が必要と考えられる<sup>38)</sup>。しかし、この期間におけるヨウ素呈色の低下はマツタケ菌による液化型アミラーゼ( $\alpha$ -アミラーゼ)の生成を示唆している。

### 2) 生育に伴うアミラーゼの生成

きのこ起源のアミラーゼに関する研究は極めて少なく、現在までに8報のみが報告されている<sup>39-46)</sup>。図4はマツタケ2菌株の栄養菌糸生育

表 5 マツタケ(No.114)の菌体外アミラーゼの基質特異性

精製デンプンの種類	系統 (デンプン粒子のサイズ)	活性 (Unit/ml)	分解比率 (%)	
オオムギ 「うるち」	甘木	0.18	224	
	一番星	大顆粒	0.17	212
		小顆粒	0.13	162
	「もち」	米沢2号 全体	0.07	87
米沢2号 大顆粒		0.10	124	
トウモロコシ		0.03	38	
サツマイモ		0.11	137	
ジャガイモ (対照区)		0.08	100	

酵素反応はそれぞれの精製デンプンを基質にして、50℃で60~180分反応させた。酵素活性の検出はソモギー・ネルソン法で測定した。

に伴う菌体外アミラーゼの生産性を調べた結果である。アミラーゼ(液化型)活性は培養40日目でかなりの上昇を示し、以後わずかつづの上昇を伴い培養終了時の80日目まで推移した。一方、グルコアミラーゼ活性は両菌とも液化型アミラーゼの1/2程度の活性で、全体としては液化型アミラーゼ活性に類似した変動を示した<sup>37)</sup>。このグルコアミラーゼ活性をきのこ起源で報告のあるスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) 由来の菌体外酵素<sup>43)</sup> ( $\alpha$ -アミラーゼの報告はない)と比較すると、マツタケ菌の活性はスエヒロタケの1/3882と極端に弱いものであった。

### 3) マツタケアミラーゼのデンプン分解特性

マツタケ菌の菌体外アミラーゼのデンプン分解に対する一端を調べる目的で、大麦など数種の精製デンプンを基質にして酵素反応を行い、分解性の比較を試みた。

表5はその結果<sup>37)</sup>であるが、通常基質として用いる可溶性デンプン(関東化学製)の原料のジャガイモに対する活性を100として、それぞれの分解比率を算出すると、大麦六条種の「うるち」、品種「甘木」および「一番星」での活性が212-224と最も高く、対照区の約2倍強の活性を示した。また、「もち」(アミロース含量が約7%で、アミロペクチンが主体)に比べ、「うるち」(アミロース含量が約30%)での活性が高く、本菌の菌体外アミラーゼが $\alpha$ -1,4グルコシド結合を切断することが想定された。なお、トウモロコシ由来のデンプンは最も低い活性であったが、本デンプンはアミロースが27%、アミロペクチンが73%(品種によってはアミロペクチンが100%)と報告されているが、今回使用した品種は不明である<sup>47,48)</sup>。

本結果はマツタケの生育基質としてアミロース

表 6 各種のイモ類添加培地におけるマツタケ菌糸体の重量および菌体外アミラーゼ活性

イモ類 (学名)	菌糸体重量 (mg/flask)	アミラーゼ活性 (unit/flask)
サツマイモ(金時) ( <i>Ipomoea batatas</i> )	81.7 (220)	0.14 (100)
サツマイモ ( <i>Ipomoea</i> sp.)	81.2 (218)	0.12 (86)
サトイモ ( <i>Colocasia antiquorum</i> )	88.9 (239)	0.17 (121)
ヤマノイモ (ナガイモ) ( <i>Discorea japonica</i> )	179.5 (483)	0.36 (257)
ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> )	222.4 (598)	0.26 (186)
対照区 (イモ類無添加)	37.2 (100)	0.14 (100)

マツタケ菌は50ml容マイエルフラスコに培地10.5mlを入れ、24℃で60日培養した。酵素反応は50℃で60分間行った。酵素活性の検出はソモギー・ネルソン法で定量した。

含量の高いデンプンが良いことを示しており、ホンシメジの人工栽培を成功に導いた大麦デンプンもその一つと考えられる<sup>2-4)</sup>。

ところで、1999年、菅原・田中<sup>49)</sup>はナガイモ、ジャガイモなどをすりおろし、液体培地に添加してマツタケ菌糸の大量増殖を試み、イモ無添加区の30倍の菌糸体量が得られたことを報告した。そこで、この結果についても著者らはアミラーゼとの関連で若干の検討を試みた。

得られた結果を表6に示した。60日目の菌糸の生育量は対照区のマツタケ改変液体培地に比較し、ヤマノイモ(ナガイモ)およびジャガイモを添加した区ではそれぞれ4.83倍、5.98倍を示した。サツマイモやサトイモでも促進は認められたが、いずれも2倍程度であった。また、この時のアミラーゼ活性を測定したところ、ヤマノイモが最も高く、続いてジャガイモでイモ無添加対照区のそれぞれ2.57倍、1.86倍を示し、菌糸生育量とアミラーゼ活性の間に正の相関が認められた<sup>37)</sup>。しかし、サツマイモでは対照区と同等か、若干低い活性値しか得られなかった。したがって、サツマイモ添加による菌糸生育の促進はイモに含まれる低分子の炭水化物(サツマイモにはグルコース、フラクトースおよびシュークロースが数%含まれ、他のイモ類では少ない<sup>47)</sup>)の効果と考えられる。また、菌糸生育へのこれらのデンプンの利用にはそれぞれのイモ類由来のデンプンのアミロース含量が大きな影響を及ぼしていると推定される。

唐<sup>48)</sup>は $\beta$ -アミラーゼに対するこれらのデンプン粒の構造と分解性の関係を調べ、外部優先型(ジャガイモなど、表面侵食と同時にデンプン粒が内部からも崩壊する)と内部優先型(サツマイ



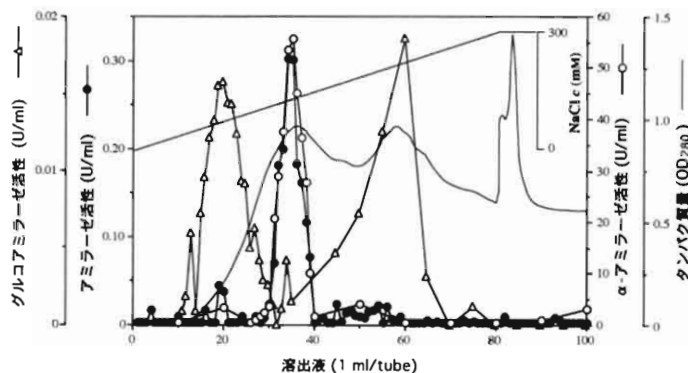


図5 DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーによるマツタケ(Z-1株)の菌体外アミラーゼの溶出パターン  
 カラム: DEAE-Toyopearl 650M (Tosoh, 1.0 x 1.0), 溶出速度: 0.75ml/min, フラグション: 1ml/tube, 溶出液: 塩化ナトリウム(0-300mM in 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)による傾斜溶離法

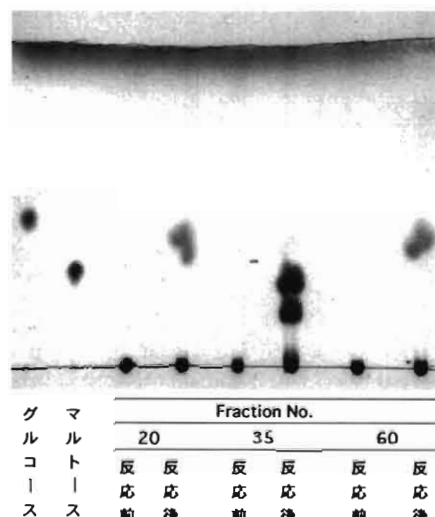


図6 DEAE-Toyopearl によって分画されたマツタケ菌体外アミラーゼ活性画分による可溶性デンプン分解産物のTLC解析  
 反応時間: 24時間, 展開溶媒: クロロホルム: 酢酸: 水=5:7:1

モなど、酵素の侵食でデンプン粒が中空の球のような崩れやすい構造に変化する)の二つのタイプの存在することを示しているが、 $\alpha$ -アミラーゼに対する挙動は明確ではない。

4) 菌体外アミラーゼの分離精製とその性質

100 ml容三角フラスコ100個にマツタケ改変液体培地をそれぞれ20 mlずつ分注して殺菌後、マツタケZ-1株を接種し、60日間の静置培養で得た培養ろ液に40% 飽和硫酸を加えて塩析を行い、一夜静置後、その沈殿部分を集めた。これを少量の緩衝液に溶解させ、透析・脱塩処理して得た粗酵素をDEAE-Toyopearlカラムクロマトグラフィーにかけ、酵素の部分精製を試みた。

図5が得られた結果であるが、フラクションNo. 20 付近, 35 付近および60付近の三カ所にアミラーゼの活性画分が確認された。いずれも、可溶性デンプンを基質として酵素反応させた結果であるが、フラクションNo.20 および60付近の活性画分は反応によって遊離したグルコースをF-キットグルコース法で検出した。また、フラクションNo. 35 付近のピークは還元糖量をソモギー・ネルソン法で検出した場合と、酵素で分解を受けた後、残存するデンプンをヨード・ヨードカリウム法で検出した場合に得られた活性ピークでこの両者のピークはほぼ一致した。

図6はこれらのそれぞれの画分と、可溶性デンプンを反応させ、得られた反応生成物を薄層クロマトグラフィーによって解析した結果で、フラクションNo.20および60付近のものではグルコースのみが、フラクションNo.35付近のピーク部分ではごく薄いグルコースのスポットのほか、マルトースおよびマルトトリオースと推定されるスポットを得た。なお、前者(フラクションNo.20, 60)はマルトースを基質にして反応させても、極少量のグルコースが検出された。

以上の結果から、マツタケは菌体外に液化型の $\alpha$ -アミラーゼ一種と二種のグルコアミラーゼもしくは $\alpha$ -グルコシターゼを生成することが示された。現在、さらに精製を進めている段階で、基質特異性を含めたこれら生成酵素の諸性質がまもなく明らかになるものと思われる。

5) まとめ

今回の著者らの検討<sup>37,50)</sup>で、マツタケが菌体外にアミラーゼを生成し、そのアミラーゼがアミロース含量の高い大麦デンプンを良く分解することから、これが $\alpha$ 型(液化型)のアミラーゼであることを示唆した。また、ヤマノイモやジャガイモが本菌の著しい菌糸生育促進作用を示し、これらイモ類の添加区では対照区に比べてアミラーゼ活性も高くなることから、両者に正の相関が認め

られることを明らかにした。

さらに、カラムクロマトグラフィーによって酵素を分画し、それぞれの酵素の基質特異性を調べた結果、本菌が $\alpha$ -アミラーゼ一種類のほかにもグルコアミラーゼまたは $\alpha$ -グルコシターゼと考えられる二種類の活性を確認した<sup>50)</sup>。

現在、スターターに少量のグルコースを加えた高濃度デンプン(7-13%)培地で本菌を培養し、その際の菌糸生育とアミラーゼ活性の変動を検討中である。また生成される上述のアミラーゼを高度に精製し、その諸性質(とくに、基質特異性)を明らかにするため、検討を進めている。

## 5. 最後に

本報告ではマツタケ菌の子実体形成研究を中心に、生長に最も適した基質と考えられるデンプンに焦点を当て、その利用性を菌が生成するアミラーゼと関連づけて紹介した。

我々が研究に用いているマツタケ菌は自然界から採集した子実体組織から純粋分離によって分離出来た菌株のみである。これらの菌は、菌糸生育は遅いが、人工培地上で生育可能な菌株である。従って、より寄生性が強く、純粋分離さえ不可能な菌株は研究のスタート地点で除外されていることを認識しておく必要がある。また、今回は触れなかったが、人工栽培研究では、研究に用いる菌株の選択もまた重要で、菌糸の生育は良好であっても、必ず子実体を形成するかどうかははなはだ疑問である。林地ではマツタケ菌は赤松の根と菌根を形成し、地温が19℃以下になり、雨が降って水分が補給されると子実体を発生するとされている。マツタケ“シロ”中に果たしてどれ程のデンプンが含まれ、マツタケ菌がアミラーゼを生成し、そのデンプンをどの程度利用しているのか、またその際、マツタケ菌がアミラーゼを生成するのかどうか、今後解明すべき疑問点が多い。再現性のある子実体発生を実現するためには、基礎データの蓄積が必須である。今後、この分野への多くの研究者の参加が望まれる。

## 引用文献

- 1) 伊藤一雄：日林誌23, 124-132 (1941)
- 2) Ohta, A.: *Mycoscience* 35, 147-151 (1994)
- 3) Watanabe, K., Kawai, M. and Obatake, Y.: *Mokuzai Gakkaishi* 40, 879-882 (1994)
- 4) 吉田 博・藤本水石：日菌報35, 192-195 (1994)
- 5) 寺下隆夫：「きのこの生化学と利用」(改訂版, 寺下編), 応用技術出版, 東京, pp. 151-175 (1989)
- 6) 北本 豊：日本応用きのこ学会誌5, 5-11 (1997)
- 7) 北本 豊・寺下隆夫・松田末広・小畑勝義・細井 登・河野又四・市川吉夫：日菌報19, 273-281 (1978)
- 8) 寺下隆夫・北本 豊・松本晃幸・細井 登・市川吉夫・河野又四：日菌報25, 187-198 (1984)
- 9) 北本 豊：「きのこ学」古川編, 共立出版, 東京, pp. 79-115 (1992)
- 10) 岩瀬剛二：「きのこの生化学と利用」(改訂版, 寺下編), 応用技術出版, 東京, pp. 206-220 (1989)
- 11) 川合正允・阿部重雄：日菌報17, 159-167 (1976)
- 12) 山中勝次・太田千絵：日本応用きのこ学会誌6, 159-165 (1998)
- 13) Norkrans, B.: *Symb. Bot. Upsal.* 11, 1-125 (1959)
- 14) Ohta, A.: *Mycoscience* 38, 403-408 (1997)
- 15) 吉田 博・藤本水石・林 純三：日菌報35, 3-10 (1994)
- 16) 吉田 博・藤本水石・林 純三：日菌報35, 173-180 (1994)
- 17) Kawai, M.: *Mycologia* 89, 228-232 (1997)
- 18) Ohta, A.: *Mycoscience* 38, 403-408 (1997)
- 19) 寺下隆夫・河野又四：日菌報28, 245-256 (1987)
- 20) 寺下隆夫・河野又四：近畿大農紀要22, 5-12 (1989)
- 21) Terashita, T., Kono, M., Yoshikawa, K. and Shishiyama, J.: *Mycoscience* 36, 221-225 (1995)
- 22) 寺下隆夫・北尾忠嗣・永井 勝・吉川賢太郎・坂井拓夫：日本応用きのこ学会誌8, 61-69 (2000)
- 23) 太田 明：日菌報39, 13-20 (1998)
- 24) 太田 明・岩瀬忠雄・古川政伯：滋賀県森林

- センター業務報告書33, 11-14 (2000)
- 25) 太田 明: 日菌報39, 111-112 (1998)
- 26) 鳥越 茂: 日菌報39, 113-116 (1998)
- 27) 川合昌孝: 日菌報39, 117-120 (1998)
- 28) 太田 明: 日菌報39, 121-124 (1998)
- 29) 小川 眞: 「マツタケ (研究と増産)」, マツタケ研究懇話会, 京都, p.101-111 (1964)
- 30) 浜田 稔: 「マツタケ日記」, 浜田稔先生定年退官記念事業会, 京都 (1974)
- 31) 枯木熊人・川上嘉章: 広島県林試研報告20, 13-16 (1985)
- 32) 寺下隆夫: 「キノコの化学・生化学」(水野・川合編), 学会出版センター, 東京, p.130-133 (1992)
- 33) 小川 眞・浜田 稔: 日菌報16, 406-415 (1975)
- 34) 川合正允・小川 眞: 日菌報17, 499-505 (1976)
- 35) Inaba, K., Yoshida, T., Takano, Y., Mayuzumi, Y., Mitsunaga, T. and Koshijima, T.: *Environ. Control in Biol.* 33, 59-64 (1995)
- 36) 平戸博之・北本 豊: きのこの科学2, 67-72 (1995)
- 37) 寺下隆夫・楠田瑞穂・松川祥子・永井 勝・吉川賢太郎・坂井拓夫: 日本応用きのこ学会誌8, 115-120 (2000)
- 38) 坂井拓夫・阪本龍司: 繊維機械学会誌45, 19-32 (1992)
- 39) Schwalb, M. N.: *J. Bacteriol.* 108, 1205-1209 (1971)
- 40) 川合正允: 農化47, 529-534 (1973)
- 41) 寺下隆夫・山田陽子・吉川賢太郎・獅山慈孝: 近畿大農紀要30, 33-40 (1997)
- 42) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y.: *Agric. Biol. Chem.* 42, 971-980 (1978)
- 43) Shimazaki, T., Hara, S. and Sato, H.: *J. Ferment. Technol.* 62, 165-170 (1984)
- 44) Sasaki, H., Kurosawa, K. and Takao, S.: *Agric. Biol. Chem.* 50, 1661-1664 (1986)
- 45) Takao, S., Sasaki, H., Kurosawa, K., Tanida, M. and Komagata, Y.: *Agric. Biol. Chem.* 50, 1979-1987 (1986)
- 46) Kadiri, M. and Fasidi, I. O.: *Biologia Plantarum* 36, 607-611 (1994)
- 47) 高宮和彦: 「食品材料ハンドブック」, 培風館, 東京, pp. 25-52 (1988)
- 48) 唐 漢軍・吉田豊和・渡辺克美・光永俊郎: 近畿大農総研報6, 83-89 (1998)
- 49) 菅原冬樹・田中 修: 日本菌学会第43回大会講要集p. 55 (1999)
- 50) 楠田瑞穂・永井 勝・吉川賢太郎・坂井拓夫・寺下隆夫: 未発表