

# アミスギタケの子実体形成における 窒素源添加の影響\*

寺下隆夫\*\*・河野又四\*\*・上田茂登子\*\*\*

## Effects of Feeding of Nitrogen Sources on the Fruit-body

### Formation of *Favolus arcularius*.

Takao TERASHITA\*\*, Matashi KŌNO\*\* and Motoko UEDA\*\*\*

#### Synopsis

The effect of feeding of nitrogen sources on the fruit-body formation of *F. arcularius* was studied. The feeding of peptone to the culture medium at the stage of primordium formation of fruit-body remarkably increased the number and the dry weight of fruit-body per flask. The range of added peptone concentration of 0.03 – 0.07% to the culture medium most effectively induced the fruit-body formation in *F. arcularius*.

Furthermore, from an analysis of peptone by a liquid chromatography for clearing promotive substances in the peptone for the fruit-body formation, 16 free amino acids and 6 nitrogen compounds having unknown peaks were detected.

It was found that lysine and leucine were the major amino acid components, but aspartic acid and glycine were minor components as the promotive substances. These amino acids were feeded in the culture medium. Consequently, aspartic acid, glycine, phenylalanine and leucine effectively induced the fruit-body formation. On the other hand, the effect of feeding of 0.05% in the same way as mentioned above of various amino acids in the culture medium were investigated. Alanine, tryptophan, arginine and glycine effectively induced the fruit-body formation. The possible role of these nitrogen sources on the fruit-body formation of *F. arcularius* is discussed.

#### I 緒 言

アミスギタケ (*Favolus arcularius*) は担子菌のうちで最も子実体形成が早いキノコの一つである。本菌は光誘導により子実体形成を容易に同調化出来る<sup>1,2)</sup>ことから、担子菌の形態形成の生化学的研究の好適材料とされている。そのため、子実体形成の生理化学については北本らにより、かなり詳細な検討が加えられている<sup>3-9)</sup>。しかしながら、子実体形成の機構については、今なを不明の点が多い。

アミスギタケの培養は通常、北本らのアミスギタ

ケ子実体形成用液体培地<sup>10)</sup>に栄養菌糸を接種して、25°C、6日間、暗所で前培養ののち、光照射下(500 Lux)に移すと、約2.5日目に子実体原基が形成され、その後の3日間で成熟子実体となる。この場合、子実体成育のための炭素源は栄養菌糸中に蓄積されたトレハロースおよびグリコーゲンばかりでなく、直接培地中から相当量の糖が栄養菌糸を通過して子実体に吸収利用されることが報告<sup>11)</sup>されている。また窒素源は置換培養を用いて検討した北本らの報告<sup>9)</sup>から、栄養菌糸中に蓄積された窒素化合物が子実体

\*本報告の要旨は昭和53年度第22回日本菌学会大会(筑波大学)において発表した。本学助成研究費による研究。

\*\*食品栄養学科食品微生物学研究室(Lab. of Food Microbiology, Dept. of Food and Nutrition, Kinki Univ., Higashiosaka, Osaka 577, Japan)

\*\*\*食品栄養学科(Dept. of Food and Nutrition, Kinki Univ., Higashiosaka, Osaka 577, Japan)

形成に利用され、培地中の窒素源は、その後はほとんど利用されず、さらに、子実体原基形成期での窒素源添加は子実体形成を阻害することが述べられている。

著者らは、本菌の窒素代謝を検討する過程で、子実体原基形成期に培地中へ、ペプトンを添加したところ、子実体本数および子実体重量の顕著な増加が認められた。そこで著者らは本菌の窒素代謝解明のための予備的知見を得るため、窒素源の添加時期および濃度、ペプトン中各遊離アミノ酸が子実体形成に及ぼす影響などについて一連の検討を行なったので報告する。

## II 実験材料および方法

### 供試菌株と培養方法

本研究にはアミスギタケ *Favolus arcularius* (Fr) AMES, 69B/ATCC24461) 株を用いた。既報<sup>10)</sup>の組成の液体培地を100 ml 容三角フラスコに20 ml 分注して110°Cで5分間滅菌した。つぎに、寒天平板培地であらかじめ培養したアミスギタケの栄養菌糸を2×2×2 mm の菌糸片に切り出し、この1片を培地に接種した。培養はまず6日間暗所で行なって栄養菌糸を生長させ、つぎに、500Luxの蛍光灯照射下に移して子実体を形成させた。培養はすべて25°Cで行なった。

### 添加試薬の調製

ペプトンは大五栄養化学(株)製ポリペプトンを、トレハロースは和光純薬(株)製特級、各アミノ酸類は協和醗酵(株)製および和光純薬(株)製特級試薬を用いた。培地へのこれら試薬の添加は0.1mlの無菌水に溶解し培地底面に静かに注入した。

### 液体クロマトグラフィー用試料の調製

ペプトン中遊離アミノ酸の同定、定量は蒸留水溶解試料を陽イオン交換樹脂、アンバーライト IR-120 で処理してアミノ酸画分を得た。総アミノ酸をニンヒドリン法<sup>12)</sup>で定量し、次に試料をpH2.2のクエン酸緩衝液に溶解し、日立液体クロマトグラフィー034型により分析を行なった。

### 生長と子実体形成の表示法

成熟子実体形成日数は光誘導後から本北らの報告<sup>7)</sup>した stage 4 に達するまでの日数で示し、その時に子実体乾燥重量(収量)を測定した。また子実体本数は子実体成熟時での stage 3A 以上の本数で示した。なを実験はすべて1区5連で3回くりかえして行ない、その結果を平均値で示した。

## III 結 果

アミスギタケは菌糸を接種後、6日間、暗所で前培養ののち光照射下に移して約5.5日経過すると成熟子実体となる。この場合、子実体の生育は、栄養菌糸の生育および培地中に存在するマルトースと窒素化合物の影響が大きい。そこで本菌の子実体原基形成期にこれら栄養源を培地に添加した場合の影響について検討した。Fig. 1 はポリペプトンおよびト

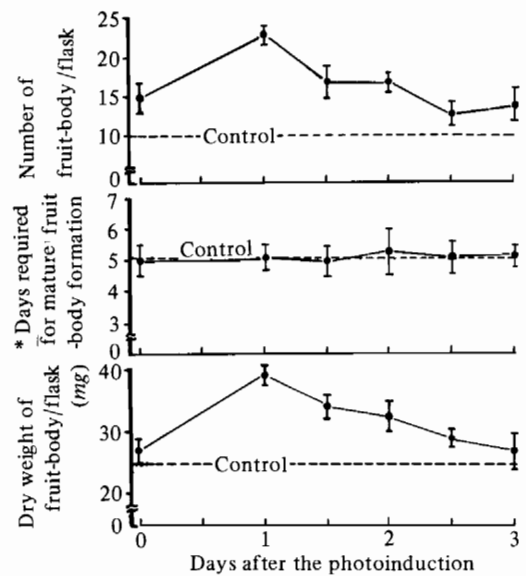


Fig. 1 Effects of feeding time of polypeptone and trehalose on the fruit-body formation of *F. arcularius*.

\* The time is expressed as days after the photoinduction. Polypeptone: 10 mg/flask, Trehalose: 400 mg/flask.

レハロースを光誘導時から、原基形成をほぼ完了する光誘導3日後までの種々の期間に培地に添加した場合の影響について検討したものである。この結果、光誘導1日後に添加すると、その影響が最も顕著で、子実体本数が無添加標準区の10本に対して23本と約2倍に増加し、子実体収量も標準の25 mg/flask に比較し、39 mg/flask と約1.6倍に増加した。

一方原基形成後期の添加では添加時間がおそくなるに従い影響が少なくなった。子実体完熟日数はいずれの添加時期でも、また、添加、無添加にかかわらず、ほとんど差は見られなかった。

次に炭素源と窒素源をそれぞれ単独に添加した時

の子実体形成に及ぼす影響をみた。Fig. 2はその内、

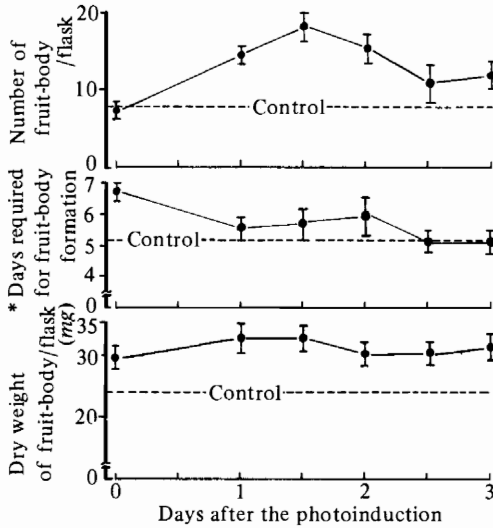


Fig. 2 Effects of feeding time of polypeptone on the fruit-body formation of *F. arcularius*.

\* The time is expressed as days after the photoinduction. Polypeptone: 10 mg/flask.

窒素源のみを添加した場合の結果であるが、子実体原基形成中期の添加で子実体本数が約2倍、重量は約1.4倍に増加した。

また子実体重量（収量）はポリペプトンのみの添

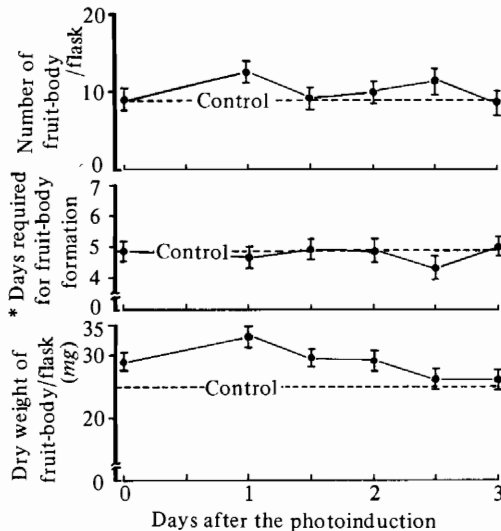


Fig. 3 Effects of feeding time of trehalose on the fruit-body formation of *F. arcularius*.

\* The time is expressed as days after the photoinduction. Trehalose: 400 mg/flask.

加ではいずれの時期でも本実験の範囲では増加を示した。しかし炭素源との混合添加と比較して、窒素源のみの添加では子実体の成熟日数が光誘導時で、かなり遅くなる結果を得た。これに対し、トレハロースを用いた炭素源のみの添加ではFig. 3に示すように、原基形成中期の添加で、子実体重量が約1.3倍に増加したが窒素源添加ほど大きな変化は認められなかった。

そこで、このように本菌の子実体形成に大きな影響を及ぼす窒素源について、ポリペプトンを用い若干の検討を行なった。まず培地に対し0.015から0.3%まで7区および無添加標準区の8区に分けてポリペプトンを添加し、子実体形成に及ぼす添加濃度の影響について調査した。その結果はFig. 4に示したよう

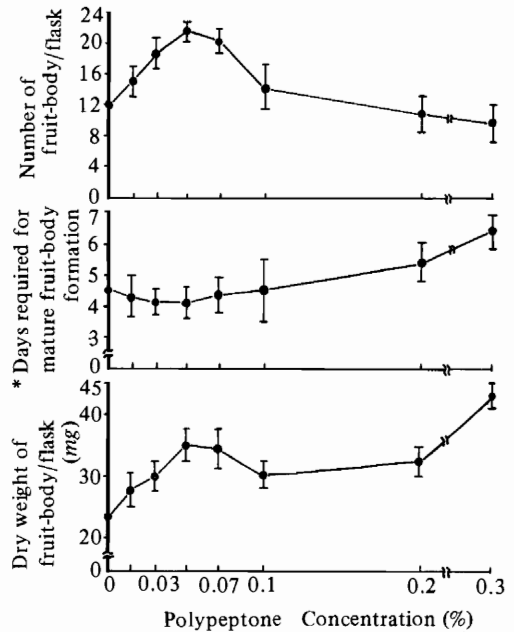


Fig. 4 Effects of feeding concentrations of polypeptone on the fruit-body formation of *F. arcularius*.

\* The time is expressed as days after the photoinduction. Polypeptone was added at 1.5 days after the photoinduction.

に、0.03~0.07%の添加で子実体本数が約2倍、収量は1.5倍に増加し、子実体の成熟日数が0.5日程度短縮される結果を得た。しかし、0.3%の添加では子実体成熟日数の大幅なおくれが見られた。

そこで、ペプトン中の子実体形成を促進する有効

**Table 1** Free amino acids component of polypeptone

Amino acids	$\mu\text{g}/10\text{mg}$
Aspartic acid	29
Threonine	126
Serine	127
Glutamic acid	227
Glycine	25
Alanine	160
Valine	309
Methionine	211
Isoleucine	215
Leucine	919
Tyrosine	148
Phenylalanine	460
Tryptophan	106
Lysine	1372
Histidine	152
Arginine	590

成分を検索するため、まず遊離アミノ酸部分について液体クロマトグラフィーにより同定、定量を行なった結果、16種類のアミノ酸と、6種類のアミノ態窒素化合物と考えられる未同定ピークを認めた。こ

れらの分析結果は Table 1 に示した通りであるが、同定したアミノ酸では、リジンおよびロイシンが圧倒的に多く、アルギニン、フェニールアラニン、バリンがつづいて多い成分であった。またアスパラギン酸、グリシンは極くわずかであった。

次に、これらの同定アミノ酸について、ポリペプトン中のアミノ酸量に相当するアミノ酸試薬標品を、それぞれ、原基形成中期に培地へ添加し、子実体形成に及ぼす影響を検討した。結果は Table 2 のように子実体の乾燥重量 (収量)、子実体形成日数および子実体本数で示した。これらの内ではアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸、グリシン、フェニールアラニン、アルギニンなどでの子実体収量が無添加の標準区に比較し増加を示した。また、子実体本数はセリン、ロイシン、フェニールアラニン添加で増加した。一方、子実体成熟に要する日数はアスパラギン酸、メチオニン、ロイシンおよびチロシンで若干短縮された。また、メチオニン、イソロイシン、リジン添加区で子実体収量が、バリン、イソロイシン添加区では子実体本数が減少した。

**Table 2** Effects of feeding of free amino acids in polypeptone on the fruit-body formation of *F. arcularius*.

Amino acids	Dry weight of fruit-body/flask (mg)	Days required for mature fruit-body formation	Number of fruit-body/flask
Control*	24.24 $\pm$ 1.55	5.34	9.32
Aspartic acid	29.52 $\pm$ 2.11	4.62	13.05
Threonine	22.80 $\pm$ 1.58	6.01	12.15
Serine	24.24 $\pm$ 2.55	5.67	15.45
Glutamic acid	29.88 $\pm$ 1.33	5.00	11.70
Glycine	27.96 $\pm$ 2.23	5.17	14.25
Alanine	20.40 $\pm$ 1.87	5.50	13.80
Valine	20.40 $\pm$ 2.13	5.83	6.72
Methionine	17.16 $\pm$ 1.22	4.82	11.55
Isoleucine	16.32 $\pm$ 2.00	5.58	5.85
Leucine	26.64 $\pm$ 1.38	4.75	15.30
Tyrosine	24.36 $\pm$ 2.22	4.75	9.91
Phenylalanine	29.16 $\pm$ 1.59	5.33	17.13
Tryptophan	23.16 $\pm$ 2.03	5.25	12.45
Lysine	14.64 $\pm$ 0.98	5.83	9.00
Histidine	20.40 $\pm$ 1.44	5.58	12.60
Arginine	28.44 $\pm$ 2.25	4.93	10.95

\*: without feeding of amino acid.

Quantity of various amino acids for feeding is as follows.

Aspartic acid 29  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Threonine 126  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Serine 127  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Glutamic acid 227  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Glycine 25  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Alanine 160  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Valine 309  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Methionine 211  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Isoleucine 215  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Leucine 919  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Tyrosine 148  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Phenylalanine 460  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Tryptophan 106  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Lysine 1372  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Histidine 152  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , Arginine 590  $\mu\text{g}/\text{flask}$ .

これらの結果はホリペプトンを10mg/flask添加した場合に含まれる各アミノ酸を、個々に、添加した影響を示したものであるが、さらに、比較的子実体形成が良好と思われるアミノ酸10種類について、培地に対しそれぞれ0.05%になるように添加し、子実体形成に及ぼす影響を調査した。結果は Table 3 に示した如く、子実体収量はアラニン、トリプトファン、アルギニンが標準の23.43mg/flaskに比較して、それぞれ33.9mg, 31.57mgおよび29.04mgと良く、一

定の子実体本数の形成はグリシン、トリプトファン添加区で約半日早くなった。

以上の結果、アミノ酸の添加による子実体形成促進効果は添加するアミノ酸の総量にも大きく影響された。また単独アミノ酸の添加はアスパラギン酸、フェニールアラニン、ロイシン、トリプトファンおよびアルギニン区で子実体形成促進効果が見られた。

**Table 3** Effects of feeding of various amino acids on the fruit-body formation of *F. arcularius*.

Amino acids*	Dry weight of fruit-body/flask (mg)	Days required for mature fruit-body formation	Number of fruit-body/flask
Control**	23.43 ± 2.52	5.25	9.90
Aspartic acid	20.90 ± 1.85	5.83	9.91
Glutamic acid	23.76 ± 1.44	4.42	12.90
Glycine	26.29 ± 3.01	5.00	19.20
Alanine	33.90 ± 3.52	5.67	9.31
Cystine	18.26 ± 3.00	5.67	16.83
Methionine	27.39 ± 2.41	5.67	10.83
Tyrosine	21.45 ± 2.67	6.75	10.85
Phenylalanine	20.68 ± 2.11	7.33	9.00
Tryptophan	31.57 ± 1.38	4.58	24.23
Arginine	29.04 ± 1.03	4.92	8.44

\*: 10 mg/flask,

\*\* : without feeding of amino acid.

#### IV 考 察

著者らは、アミスギタケの子実体形成に関する窒素代謝を検討する過程で、その予備的知見を得るため、子実体形成に対する窒素源の添加効果について検討した。

そこで、子実体原基形成期に窒素源としてペプトン、炭素源は最も子実体形成良好なトレハロース<sup>9,10)</sup>を培地へ同時に添加して、子実体形成に及ぼす影響を検討した。その結果、これらの栄養源を、原基形成中期に添加すると、子実体本数および子実体重量の顕著な増加が認められた。炭素源単独の添加ではこのような効果は、さほど大きくはなかった。しかし、窒素源単独添加区では両者の同時添加に相当する顕著な促進を示した。添加時期はいずれの場合も原基形成期中期が良く、光誘導開始直後や原基形成後期では効果は少ない。

担子菌の子実体形成は、培地のC/N比<sup>1,4)</sup>にかな

り左右され、本実験でも両者の同時添加が最も効果的であったが、添加時期の影響は窒素添加区で特に大きかったことから、子実体形成における窒素代謝の重要性が示唆された。そこで、窒素源の添加効果について、さらに検討し、ペプトン添加濃度は0.03~0.07%が子実体形成に最も効果的なことを示した。しかし、これ以上の濃度では子実体形成のおくれが明らかで、置換培養で検討された北本らの報告<sup>9)</sup>と一致する。

ペプトン中の遊離アミノ酸は、リジンおよびロイシンが圧倒的に多く全アミノ酸の44%を占め、アルギニン、フェニールアラニン、バリン等がこれに次いで多い成分であった。

これらのアミノ酸を個々に添加して、子実体形成に及ぼす影響を比較すると、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸、グリシン、フェニールアラニン、ロイシンなどの中性アミノ酸および塩

基性のアルギニンに子実体形成促進効果があり、メチオニン、イソロイシン、リジンは逆に子実体収量が減少した。これらのうちリジンは添加量が特に多いために減少したもので、一般に阻害を示すアミノ酸ではない。また培地に対し、アミノ酸を0.05% (10 mg/flask) 均等に添加した実験の結果では、アラニン、トリプトファン、グリシン、アルギニンに効果が認められた。

北本ら<sup>1)</sup>は、本菌の子実体形成に適するアミノ酸として、アラニン、アスパラギン酸、グリシンをあげ、メチオニン、ヒスチジンは不適であると述べている。また、栄養生長と生殖生長では要求するアミノ酸も異なり、グルタミン酸やセリンは栄養生長には適するが、子実体生長には不適であると報告している。

橋本<sup>13)</sup>もヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用いた栄養要求性に関する実験で、セリン、ロイシン、アラニン、アルギニン、グリシンが栄養生長に適し、生殖生長にはアスパラギンが良好であると述べている。また、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の切離柄を用いた GRUEN と WU<sup>14)</sup> は子実体の伸長にアスパラギン酸、アラニン、スレオニン、アルギニンおよびイミノ酸などが適することを報告した。これらの結果と著者らの結果とでは添加するアミノ酸量で問題が残るが、かなりの部分でよく一致している。最近の著者らのアミノ酸代謝に関する実験で、アミスギタケの栄養菌糸および子実体中には、アラニンおよびグルタミン酸が最も *Predominant* であるという結果を得た<sup>15)</sup>。この事實は、本菌の生育におけるアミノ酸代謝が、これらのアミノ酸を中心として回転することを意味するものと考えられるが、現在までのところ、外部に添加したアミノ酸と菌体内で中心的に働くアミノ酸との関連は、本菌の子実体形成におけるアミノ酸代謝の詳細が不明であるため、明確ではない。

次に、アミノ酸は添加する量により、窒素源として働くほかに、生育促進のための微量物質、いわゆる *Growth-factor* として働く場合が考えられる<sup>16)</sup> ため、結果の考察には慎重さが要求される。

ペプトンの添加効果については、本菌の子実体形成における化学的環境条件—栄養条件を置換培養により検討した北本ら<sup>9)</sup>の報告では、ペプトンを光誘導開始直後に添加した場合、高濃度ほど原基形成以後の子実体発育の阻害が強くあらわれ、子実体収量も低下すると述べ、置換培養では窒素源の添加は不要であると結論している。さらに、その後の北本や著

者らの検討<sup>17)</sup> から、培養液液中の窒素は菌糸の初期成長過程で急激に吸収利用され、初発の約20%にまで減少し、子実体の発育開始後はほとんど消長がみられないことを認め、子実体形成における窒素化合物の養分代謝は、栄養生長期に栄養菌糸中に盛んに吸収された窒素化合物、主に蛋白質とキチンが子実体発育の主要基質として分解、再構成を受けて子実体に移送され、子実体の発育に利用されるものと推論した。しかし、培地中の養分をすべて洗浄、除去した置換培養の結果と、著者らが検討した本研究における培養方法での結果とでは、主に培地中に残存する糖、窒素および種々の酵素系<sup>18)</sup>などの点で、かなり異なる結果を得ると考えられる。しかしながら、光誘導開始後における窒素の培地から栄養菌糸への吸収は、極くわずかであると思われる<sup>17)</sup> ため、本実験におけるペプトン添加の効果は、牛乳カゼインをすい臓酵素により加水分解した供試ポリペプトン成分<sup>19)</sup>のうち、遊離アミノ酸か、未同定アミノ態窒素化合物中のいずれかの単独成分か、あるいは、ペプチドが示す効果ではないかと思われるが、この点に関しては、さらに今後の検討が必要である。

## V 要 約

アミスギタケの子実体形成における窒素源添加の影響について、ペプトンを用いて検討した。

1. 子実体原基形成中期にペプトンを培地に添加すると、本菌の子実体形成は顕著に促進されたが、原基形成初期や後期では、さほど影響が見られなかった。

2. 子実体形成促進は窒素源と炭素源を同時に添加した場合が最も顕著であったが、単独添加でも、窒素源は、その添加時期により、子実体形成に大きな影響を与えた。

3. 窒素源添加による子実体形成促進は、ペプトンを用いた場合、培地に対し0.03~0.07%濃度になるように添加した時が最も顕著であった。

4. 次に、ポリペプトン添加による子実体形成促進が、ペプトン中のいかなる成分によるものかについて検討するため、液体クロマトグラフィーによるアミノ態窒素化合物の分析を行なった。この結果、16種類のアミノ酸と6種類の未同定ピークを認めた。この内では特にリジン、ロイシンが多量含まれ、アルギニン、フェニールアラニン、およびバリンが次に多い成分であった。

5. そこで、これらの同定アミノ酸について、分

析値に相当する量をそれぞれ、原基形成中期に培地に添加して、子実体形成に及ぼす影響を調査した。この結果、アスパラギン酸、グリシン、フェニールアラニン、ロイシンなどが子実体形成を促進した。

6. 一方、10種類のアミノ酸について、その一定量(10mg/flask)を培地に添加した場合には、アラニン、トリプトファン、アルギニン、グリシンに子実体形成促進効果が見られた。

7. 以上の結果から、子実体形成における窒素源の役割りについて考察した。

本研究中、御懇切な御教示をいただいた、鳥取大学農学部北本豊博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究に協力された食品栄養学科食品微生物学研究室尺田昭治、喜佐上保正、木村洋二郎、中井敬子、森井祐子その他のかた達に感謝致します。

### 引用文献

- 1) 北本豊・葛西善三郎：農化，**42**，260～266 (1968)
- 2) Y. KITAMOTO, M. TAKAHASHI and Z. KASAI: *Plant and Cell physiol.*, **9**, 797～805 (1968)
- 3) 北本豊・堀越孝雄・鈴木彰：蛋白質核酸酵素，**16**，267～278 (1971)
- 4) 北本豊・葛西善三郎：農化，**42**，255～259 (1968)
- 5) T. HORIKOSHI and Z. KASAI: *Trans. mycol. Soc. Japan.*, **15**，42～46 (1974)
- 6) T. HORIKOSHI, Y. KITAMOTO and Z. KASAI: *ibid.*, **14**，307～309 (1973)
- 7) Y. KITAMOTO, T. HORIKOSHI and Z. KASAI: *Bot. Mag. Tokyo*, **87**，41～49 (1974)
- 8) 北本豊：化学と生物，**8**，444～449 (1970)
- 9) 北本豊・山根延夫・細井登・市川吉夫：日菌報，**15**，60～71 (1974)
- 10) Y. KITAMOTO, T. HORIKOSHI and A. SUZUKI: *Plant Physiol.*, **49**，338～340 (1972)
- 11) 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，投稿中
- 12) 日本化学会(編)：実験化学講座23，126，丸善書店，東京 (1970)
- 13) 橋本一哉：東洋食品短大・東洋食品研究所研究報告，**9**，334～339 (1970)
- 14) H. E. GRUEN and S. H. WU: *Canadian J. Botany*, **50**，803～818 (1972)
- 15) 寺下隆夫・北本豊・松本晃幸・細井登・市川吉夫・河野又四：日本菌学会第22回大会講演要旨集，72～73 (1978)
- 16) 脇田正二：農化，**28**，707～711 (1954)
- 17) 北本豊・松本晃幸・寺下隆夫・細井登・河野又四・市川吉夫：日本菌学会第22回大会講演要旨集，70～71 (1978)
- 18) 寺下隆夫・河野又四・村尾沢夫：醗工，**56**，175～181 (1978)
- 19) 野上寿他：日本薬局方注解，860，南江堂，東京 (1973)

(昭和53年10月16日受理)