

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 楠田 瑞穂

学位授与の日付 平成19年9月20日

論文名 「Study of saccharide substrate hydrolyzing enzymes from *Tricholoma matsutake* and the application for artificial cultivation of this fungus (マツタケ菌の生産する糖質基質分解酵素の研究と人工栽培への応用)」

論文審査委員
主査 宮武 和孝
副査 林 英雄
副査 川口 剛司
副査 上田 光宏

論文要旨

背景

一般にきのこの多くは木材腐朽菌や腐生菌に分類される。これらのきのこ類は倒木や落ち葉などの腐植質の成分であるセルロース、ヘミセルロース、デンプンなどの炭水化物、タンパク質やアミノ酸のような窒素化合物をきのこ自身の生産する加水分解酵素によって分解し、低分子化したのち、生長の為の栄養として利用する。一方、菌根菌に分類されるマツタケやホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) は菌自身がこの種の分解酵素をほとんど生産できないことから、生きた植物の根に菌根を形成し、菌根を通して宿主植物から生育に必要な炭素源の多くをもらい受けて生育すると考えられている。外生菌根形成菌類は腐生菌や木材腐朽菌とは生理学的、栄養学的な特性を異にすると考えられている。菌根菌としてのこのような性質から、これまで多くの人工栽培法が検討されてきたが成功に至った例はなかった。ところが、1994年太田はマツタケと同種の菌根菌ホンシメジを宿主植物の介在なしに、大麦粒を用いたビン栽培法によって人工栽培に成功した。成功の要因は、デンプンをグルコースに分解できる強力な *amylase* 様生産菌株を自然界から見出し、培地中の浸透圧の上昇を抑えながら、炭素源として十分量のデンプンが供給できたためと考えられている。ホンシメジの人工栽培成功のこの報告は、マツタケの人工栽培研究に一層の拍車がかかる結果となったが、今日まで依然として成功していないのが実状である。マツタケの人工栽培で問題となるのは、以下の点である。1) 子実体の形成メカニズム、2) 菌糸体の量産、3) 培養期間の短縮である。本研究ではマツタケの人工栽培法を探る目的で、まず子実体発生に成功した先のホンシメジの *amylase* 系の分類と同定を行い、子実体生産の成功に至った生理学的要因を解析した。続いてその成果からマツタケ菌の糖質基質分解酵素

の生産性と生産酵素の単離・精製および諸性質の解明を試みた。得られた成果からマツタケ人工栽培の新たな方法を提案し、その可能性について考察した。

ホンシメジ人工栽培成功の要因解明を目的とした **amylase** 系の解析

子実体発生に成功したホンシメジについて、大麦粒培養基を用いたビン栽培で子実体を発生させ、その間の **amylase** 様活性の変動を追跡した。その結果、他の **amylase** 活性 (α -**amylase**、 α -**glucosidase** など) に比較し、**glucoamylase** と考えられる酵素の活性が著しく上昇する結果を得た。本活性は栄養菌糸生育期に比べ子実体形成期に 4.6 倍に増加した。ホンシメジの生育を支える主要な **amylase** は **glucoamylase** であったことを初めて明らかにすることができた。

マツタケ菌の生産する **amylase** 系の検討と酵素の精製、諸性質の解明

マツタケは生育に必要な多糖類分解能力が極めて低く、人工培地での生育も極端に遅く、約 2cm/月である。マツタケ菌はグルコースと数種の低分子糖類しか利用できず、多糖類ではデンプンのみが生育に利用されるとされている。そこで、マツタケ Z-1 株を供試し、**amylase** 生産系について検索した。本菌の静置培養液中には α -**amylase** および α -**glucosidase** 活性が認められた。 α -**amylase** は大量の静置培養ろ液 (培養 80 日) から各種クロマト操作より、均一な標品にまで精製した。精製酵素の分子量はゲルろ過で 34,000、SDS-PAGE で 46,000 であった。粘度測定結果とアミロース加水分解物の TLC および HPLC 分析から、マツタケ Z-1 株の **amylase** がエンド型の α -**amylase** であることを明らかにした。本酵素は可溶性デンプンやアミロース A (MW 2,900) の α -1,4 グルコサイド結合を容易に分解したが、 α -1,6 結合や α -および β -サイクロデキストリンのような環状多糖類は分解しなかった。なお、 α -**glucosidase** については極めて活性が弱かったため、部分精製酵素を用いてその性質を調べるとどまった。一方、ホンシメジに見られた **glucoamylase** については極めて活性が弱いことが分かった。この結果から、マツタケとホンシメジでは、子実体形成に及ぼす酵素に違いがあることが示唆された。

マツタケの β -**glucosidase** の発見と酵素の単離・精製および諸性質の解明とその生理的役割

マツタケの生育基質として、デンプンを含む糖質の利用能力と、本菌の腐生的側面を明らかにするため、さらに検討を加えた。その結果、本菌の静置培養ろ液 (2.1L) から初めて強い β -**glucosidase** 活性を見出し、精製後の酵素を用いて性質の検討を行った。精製酵素の分子量は約 160,000 で、活性最適温度 60°C、最適 pH 5.0、37°C、30min では pH 4.0~8.0 の広い範囲で安定性を示した。精製酵素は Ca^{2+} 、 Mn^{2+} によって活性が上昇した (2~3 倍)。本酵素はセロビオースやセロトリオースのような β -1,4 グルコサイド結合を持つオリゴ糖を容易に分解した。しかし、アビセルや CM-セルロースおよび α -グルコサイド結合のオリゴ糖には作用しなかった。さらに、種々の分解時間でセロトリオース基質に本酵素を作用させ、反応生成物を TLC 分析した結果、長時間の酵素反応 (24hr) でグルコースにまで完全分解したことから、 β -**glucosidase** であると結論した。この結果は、マツタケが生理学的に腐生菌的な能力を持っていることを示唆するものであった。

宿主の異なるマツタケ菌株間での栄養生理学的相違の検討

前章での生理学的役割を確認するため、最近、発見された広葉樹 *Quercus* 属樹木の根に菌根を形成する新規なマツタケ菌 J-1 株（中国、東チベットで採集）の糖質基質の利用性と糖質分解酵素生産性を、針葉樹アカマツ由来のマツタケ菌 Z-1 株と比較した。栄養菌糸生育に及ぼすデンプン濃度(5~15%)の影響では、J-1 株では 15%が最良の生育を示したが、Z-1 株では 10%が最良で、15%では生育抑制が認められた。ただ、*amylase* 生産系については両菌株間で著しい差異は発見できなかった。*β-glucosidase* 生産系については、生産性に差はあるが、両菌株ともに*β-glucosidase* を生産し、いずれの菌種においても腐生性があると結論した。

マツタケ菌類の糖質基質分解酵素類の生産性の特徴と人工栽培への応用

本章では、研究室保存のマツタケ菌 18 菌株を供試し、生産される糖質基質分解酵素の種類および菌株間比較を行うことで、外生菌根菌マツタケによる糖質分解酵素の生理的役割を解明し、人工栽培への可能性について検討した。同時に木材腐朽菌のシイタケ (*L. edodes*) やヒラタケ (*P. ostreatus*)などを供試し、*β-glucosidase* の生産能力を菌根菌と比較した。

その結果、供試 18 菌株のマツタケ菌のいずれもが比較的強い*α-amylase* 活性と活性の弱い*α-glucosidase* を生産し、ホンシメジのような *glucoamylase* 活性は生産されないことが判明した。さらに、活性に差はあるものの、供試マツタケ菌株のすべてが強い*β-glucosidase* を生産することも明らかにできた。

以上の結果、マツタケではホンシメジのような *glucoamylase* の産生は見られず、*α-amylase* は生産されるものの、*α-glucosidase* 活性は微弱であることから、デンプンからのグルコース供給が制限を受けることが示唆された。一方、エンド型 *cellulase* 活性は弱いものの、本菌が強い*β-glucosidase* を生産することから、腐生的な性質により、セルロース、セロオリゴ糖からグルコースを得て生育していることが推察された。しかし、酵素群の発現と調節などについては、分子学的研究を待たねばならないが、強い*β-glucosidase* 活性を利用したセロオリゴ糖基質を用いた人工栽培が可能になることが初めて示唆された。

審査結果の要旨

一般にきのこの多くは木材腐朽菌や腐生菌に分類される。これらのきのこ類は倒木や落ち葉などの腐植質の成分であるセルロース、ヘミセルロース、デンプンなどの炭水化物、タンパク質やペプチドなどの窒素含有物を、きのこ自身の生産する加水分解酵素によって分解し、低分子化したのち、生長の栄養素として利用する。

一方、菌根菌に分類されるマツタケやホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) は菌根を通して共生関係にある宿主植物から生育に必要な炭素源の多くをもらい受けて生育すると考えられている。外生菌根形成菌類は腐生菌や木材腐朽菌とは生理学的、栄養学的な特性を異にすると考えられている。菌根菌としてのこのような性質から、これまで多くの人工栽培法が検討されてきたが成功に至った例はなかった。

本研究は、完全なマツタケの人工栽培を可能にするために行なわれたものである。マツ

タケの人工栽培における問題点としては、1) 子実体の形成メカニズム、2) 菌糸体の量産、3) 培養期間の短縮である。本研究ではマツタケの人工栽培法を確立するため、子実体発生に成功したホンシメジ糖資化酵素に着目し、**amylase** 系の分類と同定を行い、生理学的要因を解析した。その成果からマツタケ菌の糖質基質分解酵素の生産性と生産酵素の単離・精製および諸性質の解明を試み、得られた成果から第 1 段階として、菌糸の大量供給することによりマツタケ人工栽培の新たな可能性について解明したものである。

子実体発生に成功したホンシメジについて、大麦粒培養基を用いたビン栽培で子実体を発生させ、菌糸生育に伴う糖資化酵素活性変動を追跡した。その結果、他の **amylase** 活性 (α -**amylase**、 α -**glucosidase** など) に比較し、**glucoamylase** と考えられる酵素の活性が著しく上昇する結果を得た。本活性は栄養菌糸生育期に比べ子実体形成期に 4.6 倍に増加することから、ホンシメジの生育を支える主要な **amylase** は **glucoamylase** であったことを初めて明らかにした。一方マツタケは生育に必要な多糖類分解能力が極めて低く、人工培地での生育も極端に遅く、約 2cm/月である。マツタケ菌はグルコースと数種の低分子糖類しか利用できず、多糖類ではデンプンのみが生育に利用されるとされている。このような現象は、糖の資化と浸透圧調節による生理学的意義も考えられる。そこで、ホンシメジとの対比のため、マツタケ Z-1 株を供試し、**amylase** 生産系について検索した。本菌の静置培養液中には α -**amylase** および α -**glucosidase** 活性が認められた。 α -**amylase** は大量の静置培養ろ液 (培養 80 日) から各種クロマト操作より、均一な標品にまで精製した。精製酵素の分子量はゲルろ過 で 34,000、SDS-PAGE で 46,000 であった。粘度測定結果とアミロース加水分解物の TLC および HPLC 分析から、本酵素がエンド型の α -**amylase** であることを明らかにした。可溶性デンプンやアミロース A (MW 2,900) の α -1,4 グルコサイド結合を容易に分解したが、 α -1,6 結合や α -および β -サイクロデキストリンのような環状多糖類は分解しなかった。一方、ホンシメジに見られた **glucoamylase** については極めて活性が弱いことが分かった。この結果から、マツタケとホンシメジでは、子実体形成に及ぼす酵素に違いがあると結論した。

上記結果をもとに、マツタケの生育基質として、デンプンを含む糖質の利用能力と、本菌の腐生的側面から検討を加えた。その結果、本菌の静置培養ろ液 (2.1L) から初めて強い β -**glucosidase** 活性を見出し、精製後の酵素を用いて性質の検討を行った。精製酵素の分子量は約 160,000 で、活性最適温度 60°C、最適 pH 5.0、37°C、30min では pH 4.0~8.0 の広い範囲で安定性を示した。精製酵素は Ca^{2+} 、 Mn^{2+} によって活性が上昇した (2~3 倍)。本酵素はセロビオースやセロトリオースのような β -1,4 グルコサイド結合を持つオリゴ糖を容易に分解した。しかし、アビセルや CM-セルロースおよび α -グルコサイド結合のオリゴ糖には作用しなかった。さらに、種々の分解時間でセロトリオース基質に本酵素を作用させ、反応生成物を TLC 分析した結果、長時間の酵素反応 (24hr) でグルコースにまで完全分解したことから、 β -**glucosidase** であると結論した。この結果は、マツタケが生理学的に腐生菌的な能力を持っていることを示唆した。そこで、研究室保存のマツタケ菌 18 菌株を供試し、生産される糖質基質分解酵素の種類および菌株間比較を行うことで、外生菌根菌マツタケによる糖質分解酵素の生理的役割を解明し、人工栽培への可能性について検討した。同時に木材腐朽菌のシイタケ (*L. edodes*) やヒラタケ (*P. ostreatus*) などを供試し、 β -**glucosidase** の生産能力を菌根菌と比較した。これらの結果、供試 18 菌株のマツタケ菌のいずれもが比較的強い α -**amylase** 活性と活性の弱い α -**glucosidase** を生産し、ホンシメジ

のようなglucoamylase活性は生産されないことが判明した。供試マツタケ菌株のすべてが強い β -glucosidaseを生産することも明らかにした。

以上の結果、マツタケでは生理学的には、ホンシメジのような glucoamylase の産生は見られず、 α -amylase は生産されるが、 α -glucosidase 活性は微弱であることから、デンプンからのグルコース供給が制限を受けること、また一方で、エンド型 cellulase 活性は弱く、本菌が強い β -glucosidase を生産することから、腐生的な性質により、セルロース、セロオリゴ糖からグルコースを得て生育していることが推察された。しかし、酵素群の発現と調節などについては、分子学的研究を待たねばならないが、強い β -glucosidase 活性を利用したセロオリゴ糖基質を用いた菌糸の培養を通して、人工栽培が可能になることが初めて示唆された。

以上の成果は、応用微生物学、応用菌学、比較生物学だけでなく、食品産業としてキノコ栽培の応用、農学にも貢献するものであり、本論文の審査ならびに学力確認結果と合わせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。