

マスタケが生産する糖質分解酵素について

兼西 暢代, 加藤 圭子, 近藤陽太郎

Studies on the Extracellular Carbohydrate Lytic Enzymes of *Laetiporus sulphureus*

Nobuyo Kanenishi, Takako Kato and Yōtaro Kondo

I. はじめに

一般にわれわれがキノコと呼ぶのは、菌類の形成する有性生殖器官のうちで、肉眼で十分認めうる大きさの子実体のことである。このような子実体を形成するのが子嚢菌の一部と多くの担子菌であり、これらの菌類をキノコ類と呼んでいるのである。小川¹⁾によれば、担子菌は進化的に遅く出現した菌類であり、分解しやすい有機物はすでに先住菌類に占有されていたため、分解しにくい有機物を利用するか、樹木の根と共生関係を結ぶかして、生き延びざるをえなかった菌類だとされている。キノコ類は食用から薬用に至るまで人間に役立つ存在であり、日本は生態的にも気候的にもキノコの種類に恵まれた国であり、また栽培キノコの種類の多さや栽培技術の高さでも世界有数の国である。キノコ類は、その用途によって薬用キノコ(約50種)、毒キノコ(約50種)、鑑賞キノコ(約10数種)に分けられる。キノコ類は薬用として古くから用いられてきたが、それらの薬効本体が何であるのかが解明されたものは少なく、1970年代になって、主に日本の研究者によってキノコの抗腫瘍性成分の本体が β -D-グルカンであり、従来の制癌剤(化学療法剤)とは異なり、宿主の免疫機能賦活に基づくもの(免疫療法剤)であることが明らかにされた。その後、にわかにキノコからの薬品開発が脚光を浴びようになり、クレスチン(カワラタケ)、レンチナン(シイタケ)、ジゾフィラン(スエヒロタケ)の3種の制癌剤が開発されるに至った。また近年発達してきた細胞融合や組換えDNAなどといったバイオテクノロジーの技

術を利用したキノコ類の細胞融合により、現在では60種を越える新しいバイオキノコ類が誕生している²⁾。

マスタケ(*Laetiporus sulphureus*)はサルノコシカケ科・オシロイタケ亜族・マスタケ属のキノコであり、肉の色が淡いマス肉色なのでマスタケという。またヨーロッパ産のものは、その全体が鮮黄色なのでイオウ(硫黄)茸と呼ばれる³⁾。サルノコシカケ科に属するキノコの多くに、胃癌、食道癌、前立腺癌や肺癌などに対する服用効果が認められており、マスタケも癌に有効との伝承があるキノコのひとつであるが、現在まで詳しい研究報告はなされおらず、また人工栽培の報告もない。そこで本研究ではマスタケ菌糸の生産と、マスタケが菌体外に産出する糖質分解酵素の生産性についての検討をおこなったので報告する。

II. 実験方法

1. 菌株

マスタケ(*Laetiporus sulphureus*)は、小松秀人氏(鳥取大学農学部、現在東洋水産)が大山寺(鳥取県大山)付近にて採集し、子実体組織から純粋分離した菌糸を用いた。菌株は使用直前までPDA培地⁴⁾上、4℃で冷蔵保存した。

2. 培地および培養条件

マスタケ菌糸の培養にはYM培地(1%グルコース, 0.25%酵母エキス, 0.7% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.015% NH_4Cl , 0.002% NaCl , 0.006% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8×10^{-4} % $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1×10^{-5} % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), YEPD培地(0.5%グルコース, 1%酵母エキス, 2%ポリペプトン), PD培地⁴⁾(1.5%グルコース, ジャガイモ抽出液), PDL培地(1.5

%グルコース, 0.4%ラミナリン, ジャガイモ抽出液)の4種類を用いた。冷蔵保存菌を1白金耳取り, 300 ml 容三角フラスコ(培地100 ml)に植菌し, 25℃で20日間暗所で静置培養した。

3. 乾燥菌体と粗酵素液の調製

培養液は4℃, 30,000×gで30分間遠心分離し, 上清と沈殿物に分けた。得られた沈殿物は蒸留水, エタノール, 次いでエーテルでそれぞれ3回づつ洗浄後風乾し, 乾燥菌体とした。上清はロータリーエバポレーターを使用して, 40℃以下で最初の容量の10分の1まで減圧濃縮した後, 0.1 M クエン酸緩衝液(pH 5.5)で透析し, 粗酵素液とした。

4. 酵素活性の測定

β -1,3-グルカナーゼの活性の測定は, 0.1 M クエン酸緩衝液(pH 5.5)中で, ラミナリンを基質に30℃で行い, 酵素量1 unitを1分間に1 nmolのグルコースに相当する還元力を遊離するものとした。遊離した還元糖はSomogyi⁵⁾とNelson⁶⁾の方法で定量した。また β -グルコシダーゼ活性の測定は, 0.1 M クエン酸緩衝液(pH 5.5)中で, *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシド(PNPG)を基質に30℃で行い, 1 unitを1分間に1 nmolの*p*-ニトロフェノールを遊離する酵素量とした。*p*-ニトロフェノールは3% Na₂CO₃を加え酵素反応を止めてから, Santosら⁷⁾の方法に従って415 nmの吸光度で比色定量した。タンパク質の定量は, Lowryら⁸⁾とFolinら⁹⁾の方法を使用した。

III. 実験結果と考察

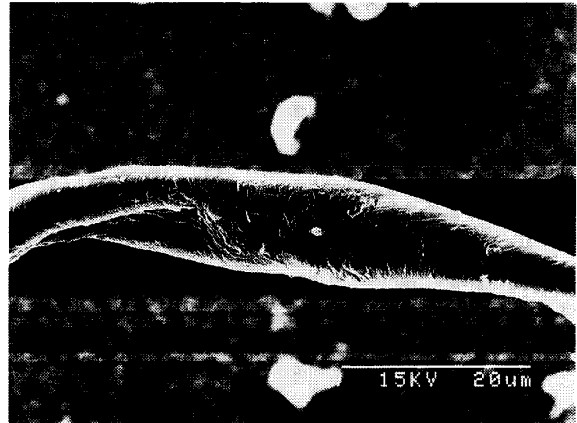
1. 培養条件の検討

マスタケの培養法について, 振とう培養と静置培養を比較するため, PD培地(pH 5.5)上暗所で25℃, 3日間培養した。菌体回収量については, 培地100 ml 当り, 振とう培養 66 mg, 静置培養 71 mg

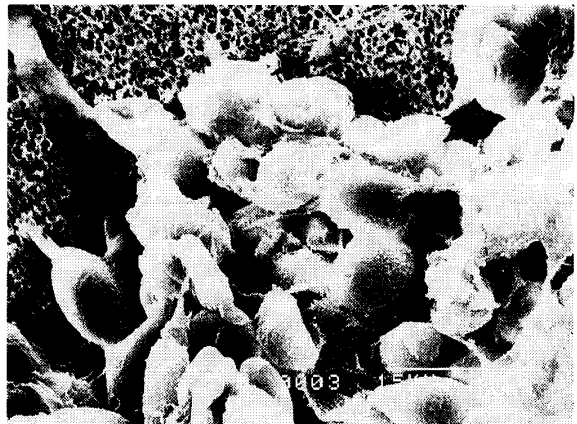
表1 マスタケ菌体生産量に対する培地組成と pH の影響 (培養条件: 25℃, 20日間)

培地	菌体量 (mg)			
	pH			
	2.5	4.0	5.5	7.0
YM	102	71	21	成育せず
YEPD	148	143	111	成育せず
PD	137	128	70	43

と静置培養が僅かに多い結果となった。振とう培養すると菌の性状が変化する危険性があるため¹⁰⁾, 静置培養法を採用することとし, さらに四種の pH (2.5, 4.0, 5.5, 7.0) 条件下, 三種の培地 (YM



1a



1b



1c

図1 マスタケ成長菌糸の走査電子顕微鏡写真 (a, クランプコネクション部, 2,000倍; b, 胞子嚢, 3,000倍; c, 胞子, 8,000倍)

表2 マスタケが菌体外に産出する糖質分解酵素の基質特異性 (1%基質溶液 0.2 ml を酵素液 0.2 ml と混合し, 30℃で30分間反応させた)

基 質	活性 (Kunit/l)	酵 素 活 性
ラミナリン	214	β -1,3-グルカナーゼ
カードラン	194	β -1,3-グルカナーゼ
パスツラン	48.0	β -1,6-グルカナーゼ
セルロース	検出せず	β -1,4-グルカナーゼ
プルラン	7.4	α -1,4-グルカナーゼ
可溶性でんぷん	210	{ α -1,4-グルカナーゼ α -1,6-グルカナーゼ
ポリガラクトチュロン酸	0.8	β -ガラクトチュロナーゼ
こんにゃくマンナン	4.7	β -マンナナーゼ
グリコールキトサン	0.7	β -キトサナーゼ
赤色酵母細胞壁	1.3	α -マンナナーゼ
ラミナリビオース	検出せず	ラミナリビアーゼ
ゲンチオビオース	0.9	β -1,6-グルコシダーゼ
セロビオース	検出せず	β -1,4-グルコシダーゼ
ラクトース	検出せず	β -グルコシダーゼ
マルトース	検出せず	α -1,4-グルコシダーゼ
サリシン	6.3	β -グルコシダーゼ
メチル α -D-マンノシド	1.1	α -マンノシダーゼ
p-ニトロフェニル β -D-グルコシド	19.4	β -グルコシダーゼ
p-ニトロフェニル β -D-ガラクトシド	2.5	β -ガラクトシダーゼ

培地, YEPD 培地, PD 培地) 上で菌の育成条件を比較検討した。培養条件25℃, 20日間の育成では, 表1に示すように, マスタケは三種の培地とも pH 2.5 で最もよく育成し, 酸性条件下での培養が適すると思われる。なかでも YEPD 培地と PD 培地では pH 2.5~5.5 で幅広く育成し, 菌体生産量は YEPD 培地で良好で, 111~148 mg であった。しかし, pH 7.0 の中性付近で PD 培地で育成がみられるが, YM 培地, YEPD 培地上ではともに育成が認められなかった。

2. 走査型電子顕微鏡による観察

マスタケの育成している先端部分から, 菌糸を白金耳でかきとり採取した。菌糸を10%ホルマリンで処理し, 走査型電子顕微鏡 (日立 S-530) で観察した。菌糸の太さは約 5 μ m であり, 約10 μ m の太さのクランプコネクションを持つ (図1a)。その先端部には胞子嚢 (図1b) があり, 胞子の大きさは 7 \times 4 μ m 程度であった (図1c)。

3. マスタケの生産する糖質分解粗酵素

マスタケ菌糸を最適条件と思われる YEPD 培地, pH 2.5 で20日間培養した。培養液を遠心ろ過

後, ろ液を10分の1まで濃縮, 透析後, 表2に示したように, 19種の基質に対して分解活性を測定した。ラミナリン, カードラン, 可溶性でんぷんに強い活性を示し, パスツラン, p-ニトロフェニル- β -D-グルコシドに中程度の活性を示した。しかし, ラミナリビオース, ゲンチオビオース, セロビオース, ラクトース, マルトースに対しては全く活性がなく, ポリガラクトチュロン酸, グリコールキトサン, メチルマンノシドに対しては, ほとんど活性を示さなかった。このことから, マスタケ培養ろ液中には, β -1,3-グルカナーゼ, β -1,6-グルカナーゼ, α -1,4-グルカナーゼと β -グルコシダーゼの存在が示唆された。しかし β -1,4-グルカナーゼの活性は認められなかった。

4. 糖質分解粗酵素の部分精製

マスタケ菌培養液より前述の方法で得た粗酵素の硫酸による分別沈殿による粗精製を行い, 40%, 60%, 80%の3つの画分に分けた。上の粗酵素の基質特異性についての基礎実験より, 比較的高活性であった, ラミナリンとパスツランに対する分解活性について調べた。表3より, ラミナリン分解活性の約81%が, 60%から80%硫酸飽和画分に現われた。一方,

表3 マスタケが菌体外に産出するグルカナーゼ活性 (培養条件: 25°C, 20日間 YEPD 培地)

酵素活性	40% 硫安飽和画分活性		60% 硫安飽和画分活性		80% 硫安飽和画分活性	
	(Kunit/ℓ)	(Kunit/g 菌体)	(Kunit/ℓ)	(Kunit/g 菌体)	(Kunit/ℓ)	(Kunit/g 菌体)
β-1,3-グルカナーゼ†	55	37	147	99	300	201
β-1,6-グルカナーゼ†	88	60	130	88	67	45
β-1,3-グルカナーゼ‡	36	24	83	56	161	108
β-1,6-グルカナーゼ‡	14	9	8	5	3	2

† エンド型+エキソ型

‡ エキソ型

パスツラン分解活性の約85%が、40%から60%硫安飽和画分に回収された。ラミナリン分解活性画分とパスツラン分解活性画分中にグルコースを高濃度で検出したこと、また硫安画分にβ-グルコシダーゼ活性がほとんど検出されなかったことから、これらの糖分解酵素はラミナリナーゼ(β-1,3-グルカナーゼ)とパスツラナーゼ(β-1,6-グルカナーゼ)であり、糖分解型はエンド型とエキソ型を含むものと思われる。エンド型に対するエキソ型の活性割合は概ね1:1であった。

ラミナリナーゼの単離を試みるため、安価に入手できるので大量培養に適し、比較的広範囲のpHでマスタケ菌糸が成育したPD培地を使用し、pH 2.5で20日間の培養を行った。またPD培地に0.4%になるようラミナリンを添加し、同様の条件下で培養し、ラミナリナーゼが誘導されるかどうかを調べた。菌体の収量はPD培地では、培地100mlあたり105mgであり、PD培地にラミナリンを添加したもので、菌体の収量は培地100mlあたり57mgであり、成育阻害が見られ、収量はPD培地比べて約半分であった。また表4に示したように、

80%硫安飽和画分におけるラミナリナーゼ活性はPD培地上においてYEPD培地より高く、ラミナリン添加培地(PLD培地)では80%硫安飽和画分におけるラミナリナーゼ活性は、菌体量の生産が半分であったが無添加培地より高かった。添加培地での活性は菌体1g当りでは無添加培地の約2倍であった。全ラミナリナーゼ活性と全パスツラナーゼ活性の比をとると、YEPD培地では1.8:1、PD培地では2.2:1、PDL培地では3.1:1であり、先の結果とあわせて考えると、ラミナリナーゼの生産は培地にラミナリンを添加することで賦活(誘導)されるものと考えられる。

IV. おわりに

マスタケ菌糸の成育には好氣的条件が良く、振とう培養でも静置培養でも育った。マスタケ菌糸のフラスコによる液体静置培養では子実体は形成されなかったが、外観はマスタケ子実体と区別できず、成育は中性条件よりも酸性条件でのほうが良かった。菌体外に生産される糖質分解酵素のスクリーニングを行ったところ、β-1,3-グルカナーゼ、β-1,6-グル

表4 マスタケが菌体外に産出するグルカナーゼ活性への培地組成の影響 (培養条件: 25°C, 20日間)

培地	酵素活性	40% 硫安飽和画分活性		80% 硫安飽和画分活性	
		(Kunit/ℓ)	(Kunit/g 菌体)	(Kunit/ℓ)	(Kunit/g 菌体)
YEPD	β-1,3-グルカナーゼ†	55	37	447	300
	β-1,6-グルカナーゼ†	88	60	197	45
PD	β-1,3-グルカナーゼ†	85	81	586	558
	β-1,6-グルカナーゼ†	104	99	197	301
PDL	β-1,3-グルカナーゼ†	38	67	688	1207
	β-1,6-グルカナーゼ†	8	140	126	391

† エンド型+エキソ型

カナーゼ, α -1,4-グルカナーゼ (または α -1,6-グルカナーゼ) 活性が高く, 弱い β -グルコシダーゼ活性も認められた。しかし β -1,4-グルカナーゼ活性は認められなかった。そこで細菌細胞壁の研究に良く用いられ重要と思われる β -1,3-グルカナーゼと β -1,6-グルカナーゼの単離を目的として大量培養を行った。培地はじゃがいも煮汁にグルコースを加えた天然培地 (PD 培地) が良く, β -1,3-グルカナーゼの産出には PD 培地にラミナリンを添加したものが最も良い結果を示し, β -1,3-グルカナーゼの産出がラミナリンの培地添加で誘導されることが示唆された。

V. 謝 辞

マスタケ菌糸を譲っていただいた小松秀人氏 (鳥取大学農学部, 現在東洋水産) に感謝するとともに, 電子顕微鏡の使用の便宜を計っていただき, 適切なご教示を賜りました岩城操教授 (京都女子大学家政学部) に深謝いたします。

文 献

- 1) 小川 真: 微生物, **2**, 42 (1986)
- 2) 水野 卓, 川合正 (編著): キノコの化学・生化学, 学会出版センター, 東京 (1992)
- 3) 今関六也, 本郷次雄 (編著): 原色日本新菌類図鑑 (II), 保育社, 大阪 (1987)
- 4) C. Booth: *Methods in Microbiol.*, **4**, 49 (1971)
- 5) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
- 6) N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 357 (1944)
- 7) T. Santos, F. del Rey, J. Conde, J. R. Villanueva and C. Nombela: *J. Bacteriol.*, **139**, 333 (1979)
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 9) O. Folin and V. Ciocalteu: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927)
- 10) 善如寺 厚, 渡辺直明: きのこと実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1994)