

菌類の構成糖に関する生化学的研究 II

—ねながのひとよたけの子実体発育時の構成糖に変化について—

藤井昭治・松田久行・松本正男

SHOJI FUJII, HISAYUKI MATSUDA and MASAO MATSUMOTO

Biochemical studies on carbohydrates of fungi II.

Changes in carbohydrates in the elongation
of fruitbodies of *Coprinus cinereus*

要旨 : ねながのひとよたけ *Coprinus cinereus* の子実体成長時の糖質の変化を検討した。

遊離の glucose は Stalk では Stalk の急伸長に先立って、Cap では少しおくれて増加する。多糖については、Stalk では Cap の自己隔解がはじまる段階まで glucan が増加しつづけ、chitin は胞子の成熟期迄増加するが以後減少する。Cap では glucan も chitin も減少の一途をたどる。

緒 言

第 I 報¹⁾ にのべたごとく、かびや酵母の多糖について数多くの研究があるが担子菌については組織的な研究は少い。又いわゆる“きのこ”と称される担子菌、子囊菌の中に子実体の発育様式、胞子の形成方法、散布方法などの点で極めて生物学的に興味ある菌が知られている。子実体形成因子、子実体発育の外的、内的要因などについて生理学的な見地からのアプローチも数多く試みられている²⁾ が本質的にはまだ未解決の問題が山積している状態である。

本報では短時間に子実体を成長させ、胞子の散布と同時に Cap に自己融解現象のみられる特徴的な担子菌、ひとよたけの内“ねながのひとよたけ” *Coprinus cinereus* についてその子実体成長時の糖質の変化を検討した。

材料ならびに方法

実験材料として用いた“ねながのひとよたけ” *Coprinus cinereus*. (Fr.) S. F. Gray f. *microsporus*

(Hongo) Hongo は滋賀大学教育学部生物学教室横山和正氏より供与されたものである。寒天3.0g, glucose 3.2g, 酵母エキス0.3g, 水道水200mlの培養液を用いて10mlの試験管斜面培養をおこなう。(25°C, 3~5日) ついで500mlの三角フラスコに古畳わら約8gと水道水50mlを入れオートクレーブで加圧殺菌後前培養の菌糸を白金耳で移植する。植菌後25°Cで培養すると5~10日で菌糸が一面に広がる。次に室温(20°C)で放置すると10~20日で最初の子実体原基を発生し始める。原基発生後、子実体が成長し胞子を散布しながら Cap が溶解するまでの時間は子実体によって多少異なるので時間を単位とせず、子実体発育の Stage により、同一 Stage のものを集めて分析に供した。Stage は次の7段階とした。Stage I は子実体原基、Stalk と Cap は未分化。Stage II は Stage I より2日後で Stalk と Cap の分化がはじまる。胞子は未成熟で Cap の外見は白い。Stage III は Stage II より約5時間後。胞子が成熟中で Cap の外見は黒くなり始める。Stalk は急伸長の直前。Stage IV は Stage III より約6時間後。Stalk が急伸長中。

Stage V は Stage VI の約6時間後。Stalk の伸長が停止直前で Cap が開きはじめる。Stage VI は Stage V の約1時間後。Stalk の伸長は停止し Cap は完全に開いて自己融解がはじまる状態。Stage VII は Stage VI の約4時間後で Cap は完全に融け終り Stalk が萎れはじめる状態。

各 Stageの子実体をピンセットで培養フラスコから取出し、Cap と Stalk に分けて重量を測定し、サンプル瓶に入れて分析可能な量になるまで冷凍保存した。(−20°C)。分析に使用した子実体の数は5~9個である。

菌体試料は最初 40ml の水で、ついで 50°C の温水 40ml を加えてホモジナイザー処理し、夫々12000rpm で10分遠心分離して水溶性部分と水不溶性部分にわけける。水可溶性画分は 40°C 以下で減圧濃縮し、水不溶性画分はアミノ糖定量の場合は 4N-塩酸で3時間、中性糖の定量の場合は 2N-塩酸 2時間加水分解後夫々水酸化ナトリウム粒と共にデシケーター中で減圧乾燥する。加水分解は試料 10~20mg に対して塩酸 0.1ml を用い封管中で水解した。

中性糖の定性定量は加水分解後の乾燥試料約 10mg をさらに無水磷酸と共に 50°C で減圧乾燥し Sweeley の方法³⁾により TMS 化する。予備的な試験の結果、どの Stage の水溶性画分或は水不溶性画分の加水分解物にも mannitol は確認出来なかつたので mannitol を内部標準として中性糖を定量した。ガスクロマトグラフィーは島津 GC-3AF, カラムは5% SE-30 on Shimadex, 内径 3mm 長さ 3m のステンレスカラム, 197°C で窒素ガスを Carrier Gas とし水素炎検出器で検出, 分析する。

アミノ糖の定量は Elson-Morgan 法により D-glucosamine 塩酸塩を標準として定量した。発色法は Blix の変法⁴⁾で 535m μ の吸光度を測定した。塩酸加水分解後の試料は水に溶解後 Dowex 50WX8 (H⁺型) に吸着させ 1N-塩酸で溶出後減圧濃縮し水酸化ナトリウム粒と共に減圧で乾燥してアミノ糖定量用試料とした。この操作で中性糖が完全に除去される。

Chitosan 調製法とゲル透過については、Stage III およびIV, Stage VIおよびVIIの Stalk を材料とし D. Horton⁵⁾の方法に従って chitosan を得、Sephadex G 100, G200 を用いてゲル透過を試みた。各分画の chitosan 約0.1mg を10%酢酸に溶解し Sephadex G100, および G200 のカラムを10%酢酸で溶出, フラクションコレクターで 1ml づつ試料をとり phenol-硫酸法⁶⁾で溶出されてくる chitosan を D-glucose を標準として定量した。

結果と考察

試料の一部をとり、70°C で3時間減圧乾燥して重量を測定し、各 Stage での乾燥重量と水分含有量を調べた結果が第1図である。Cap の乾燥重量の減少がは

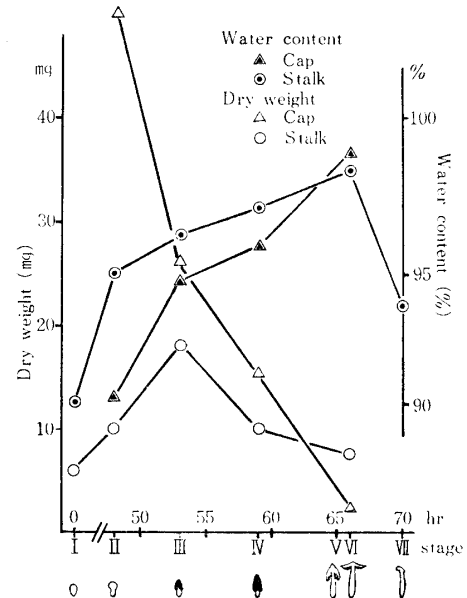


Fig. 1. Changes in dry weight and water content of cap and stalk during fruiting.

じまるのは Cap 中で胞子の成熟が開始される頃からであり Cap が開かないで Stalk が急伸長している間も一方的に減少を続け Cap が完全に開いた状態で乾燥重量が最低となる。この段階では後に述べる如く chitin 含有量も殆んど 0 に等しい。乾燥重量の減少とは逆に Cap での水分含有量が増加しているのがみられ、Cap が完全に開いた状態で水分含有量が最大であることは、水の存在が Cap の形の維持に重要な役割をしめていることを暗示している。又 Stalk においてもその急伸長に伴って水分含有量が増加しているのが見られる。Gooday⁷⁾が水の外的な供給のない場合でも *Coprinus cinereus* の子実体の elongation がおけると述べていることから水分は菌糸から動員されると考えられ、Cap や Stalk におけるその生長、形態維持に対する水の存在の意義は無視出来ない。Cap から急激に減少する固体成分、chitin などの多糖や蛋白がどういった目的に動員されていくのかは又興味ある事実である。

水溶性の単糖については、Stalk においては glucose が1.3~3.8%と主成分でありその他 xylose (0.01%程度) mannose (0.01~0.03%) fructose (0.03~0.23%) がガスクロマトグラフィーで検出されたがこれら

はいずれも glucose の約1/100程度の量にすぎない。Cap においてもこの elongation 現象下、含有率は glucose が1.6~2.3%と主成分であり mannose (0.05~0.002%), fructose (0.02~0.08%) いずれも約1/100程度の少量である。なおこれらの糖以外少量の数種の未同定糖成分が検出されている。

第2図は主成分である glucose の変化を乾燥重量に対する%で示したものである。

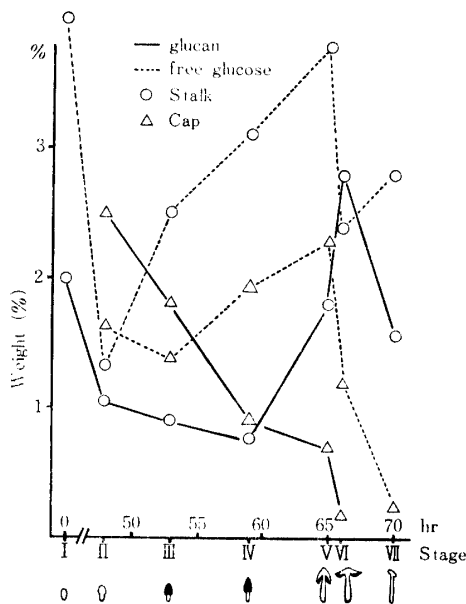


Fig. 2. Glucose content of developing fruit bodies.

まず遊離の glucose についてみれば Stalk では Stalk の急伸長に先立って、Cap では少しおくれていずれも含有量が増大し続け Cap が開いて自己融解が始まると共に急激に減少している。mannitol は Stalk でも Cap にも見出されなかったがこの遊離の glucose が子実体の elongation に対してエネルギー供給源の1つとなっていると考えられる。

少量ではあるが glucose との相関で興味があるのが fructose である。遊離の fructose は Cap では Stage II での0.1%から以後 Stage VI (0.02%) まで一方的に減少しているのに対し Stalk では Stage IVまで0.1%から0.2%と一たん増加し、glucose の減少に先立って以後減少の一途をたどっている。

水不溶性の分画は Wessel のいわゆる S-glucan⁸⁾ (アルカリ可溶性多糖) をも含む分画である。この場合も水可溶性単糖と同様 Cap においても Stalk においても glucose (0.2~2.8%) に対し、Stalk では、mannose (0.01~0.24%), fructose (0.02~0.10%), xylose (0.01~0.07%), Cap では mannose (0.01~0.10%), fructose (0.01~0.11%), xylose (0.01~

0.11%) と1/10以下の量であった。

水不溶性多糖 glukan は第2図が示す如く非常に興味ある結果を示す。Cap においては Cap, Stalk の分化 (Stage II) 後、胞子の成熟、Cap が開きはじめてついに自己融解が始まろうとする段階 (Stage VI) までその外見上の大きさが増大するのに反して不溶性多糖である glukan が急激な減少線をたどる。少量の成分なので図示していないが同じ現象が不溶性多糖成分の xylose, fructose についても見られる。即ち xylose は Stage II の0.11%から Stage VII の0.01%へ、fructose は Stage III の0.11%から Stage VII の0.01%へと減少し glukan と共に xylose, fructose を含むヘテログルカンの減少が考えられる。

Stalk における水不溶性多糖の変化の様相は Cap と全く異なっている。elongation において水分が増加するのみならず (第1図) 実質的な構成多糖 glukan の増加がみられる (第2図)。この現象は先行する遊離の glucose が Stalk 内で急激に増加しているのと無関係ではないと思われる。同様の現象がこれも少量であるが xylose において Stage IV (0.02%) から Stage VI (0.07%) と増加し、fructose が Stage IV (0.06%) から Stage VI (0.14%) へ又 mannose が Stage VI (0.02%) から Stage VI (0.17%) と増加しているのが検出された。fructose, xylose glucose は Stage VII で何れも激減しているが mannose は0.20%と増加し、不溶性多糖中の galactose が Stage II の0.02%から Stage VII の0.17%へと一方的に増加している。これらの点を要約すれば Stalk において elongation にもなって glukan および xylose, fructose, mannose, galactose を含むヘテロ多糖も増加し Cap が自己融解後も Stalk には galactose, mannose を含む多糖が残留していることになる。これらの点から Stalk を構成している多糖は少なくとも3種類はあり予想より複雑な構成を暗示している。

更に興味あるのは Cap における不溶性多糖の構成である。前述のごとく Cap においては glucose, 又少量ながら fructose, xylose もこれらを含む不溶性多糖は Stage II 以後減少するばかりであるが一方ただ1つ増加する糖がある。それは mannose であり Stage III の0.05%から Stage V の0.09%と増加している。Stage V 以後は急激に減少しているがこの mannose を含む多糖が増加している間中は Cap が開かない事から、Cap を開かせる事に対する抑制的な機構に関係のある多糖かもしれない。

第3図はアミノ糖の変化について子実体1個における総量で示した。Cap においては glucose, xylose,

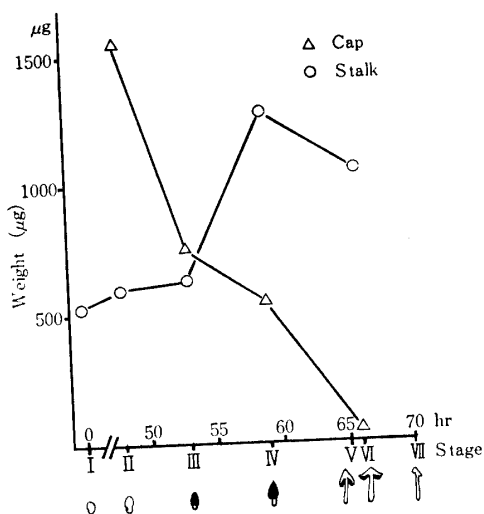


Fig. 3. Changes in hexosamine content of cap and stalk during fruiting.

fructose を含む不溶性多糖が胞子の未成熟の時代からすでに減少にかかっているのと同じくアミノ糖を含む多糖についても Stage II の $1560\mu\text{g}$ から Cap が開いて自己融解のはじまる Stage VI の $10\mu\text{g}$ まで一方的に減少し、融解直前では殆んど chitin が含まれていないような状態である。Stalk においては Stage III から Stage IV の急伸長時に増加し、以後減少しはじめる。Cap および Stalk の水不溶性画分をアルカリ処理してえられた多糖は、かに甲殻よりえられた chitosan と類似した赤外線吸収スペクトルを示した。さらにこの水不溶性多糖画分の加水分解物をアミノ酸アナライザーで検討した結果、アミノ糖は標準の D-glucosamine と全く一致した。従ってこれらのアミノ糖の分析結果は chitin の消長を示していると考えられる。なお、全 glucosamine の 2.5% はアミノ酸アナライザーによる分析の結果 galactosamine である事が確認された。Goody⁷⁾ は stalk の急伸長時 Stalk に非常に高レベルの chitin synthetase 活性がみられると報告しているが、chitin synthetase により合成されてその結果、chitin が増加してゆく状態が第 3 図に示され、Goody の結果と一致する。この急伸長時の Stalk の chitin と Cap が自己融解を終った時の Stalk の chitin との分子量の比較が第 4 図である。

Stage III, IV からの chitosan と Stage VI, VII の chitosan を Sephadex G100 で検討した結果、明らかに Stage VI, VII からの chitosan が低分子化され、Cap が開き自己融解のはじまると同時に Stalk で chitinase の作用によって Stalk の core と考えられる chitin が分解されていることが明らかになった。(第 4 図) Item, Matile によれば⁹⁾ *Coprinus logopus* に

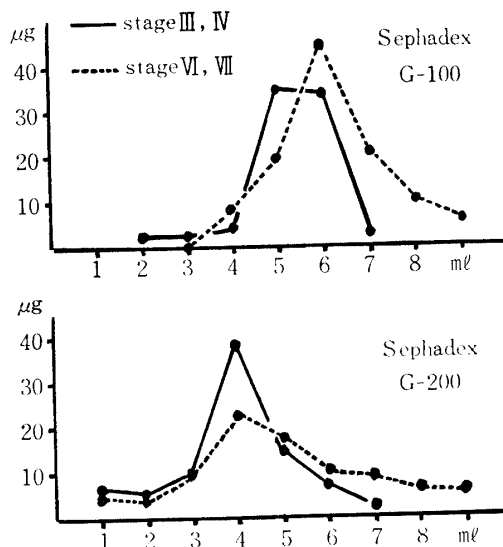


Fig. 4. Gel-filtration of chitosan preparations.

ついでの実験では chitinase は胞子の散布と Cap の Autolysis がはじまると同時にその活性が急増しているがこれらの事実とよく一致する結果である。

以上主として構成糖の主要部分をしめる glucan と chitin について子実体成長時における変動を検討した。その他オリゴ糖の問題特に菌類に比較的普遍的に存在する trehalose について、*Coprinus logopus* では¹⁰⁾ 遊離の glucose の 2 倍以上存在し、子実体の成長に伴って増加するとの報告もあり、さらに又微量であり目立った変動を示さなかったが glucose, fructose, mannose galactose などを含む水溶性多糖も存在し、又未同定の糖の変動の問題など本論文ではこれらの問題についてふれなかった。

1 個の小さな子実体原基がその成長段階への準備として 50 時間あまりの間 (Stage I と Stage II の間) に何がなされているのか、又それに対して糖がどの様に関係しているのか。又たとへば Cap だけについて考えてみても Cap はどの様にして開きはじめるのか、Cap が開くに当って、たての方向へは殆んどのびないが横の方向へは Cap の端程大きく開く必要があり、このたてと横の機構に構成多糖はどの様に関係しているのか又その構成多糖の分解酵素との関係、その時間的推移⁹⁾ 等々、どの問題 1 つとっても未解決であり、興味はつきない。

菌の培養法その他いろいろと御教示をいただき又菌株を供与された滋賀大学教育学部生物学教室横山和正助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 藤井昭治 (1970): 菌類の構成糖に関する生化学

- 的研究 I ガスクロマトグラフィーによる構成糖の検討, 京都府大学報・農, 22号, 95-100.
- 2) 萩本 宏 (1963) : 帽菌類子実体の発育の生理, 日本菌学会会報, **4**, 103-110.
 - 3) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells (1963) : Gas-Liquid chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugar and Related Substances, J. Amer. Chem. Soc., **85**, 2497-2507.
 - 4) 阿武喜美子, 瀬野信子 (1968) : “糖質実験法”, 蛋白質核酸酵素編集部編, 共立出版, p. 21.
 - 5) D. Horton and D. R. Lineback (1965) : “Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. V”, Academic Press, p. 403-406.
 - 6) 福井作蔵 (1971) : “生物化学実験法一還元糖の定量”, 東京大学出版会, p. 45-47.
 - 7) G. W. Gooday (1972) : The Role of Chitin Synthetase in the elongation of Fruit Bodies of *Coprinus cinereus*, J. Gen. Microbiol., **73**, xxi.
 - 8) J. G. H. Wessels (1965) : Biochemical Processes in *Schizophyllum commune*, Wentia, **13**, 1-113.
 - 9) W. Item and P. Matile (1970) : Role of Chitinase and Other Lysosomal Enzymes of *Coprinus lagopus* in the Autolysis of Fruiting Bodies, J. Gen. Microbiol., **61**, 301-309.
 - 10) P. S. Rao and D. J. Niederpruem (1969) : Carbohydrate Metabolism During Morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller), J. Bacteriol., **100**, 1222-1228.

Summary

The changes of carbohydrates were studied during fruiting of mushroom *Coprinus cinereus*.

Glucan and chitin contents were markedly reduced in the cap, and increased temporarily in the

stalk during the development of fruit body. The stalk had a high level of glucan content particularly at the stage of maximum elongation.