きのこ類が生産する糖質加水分解酵素

金 野 尚 武*

はじめに

近年の循環型社会構築の観点から、木材をはじめとする生物資源の有効利用法の開発が活発化している。住宅、燃料、バイオエタノール、グルコース生産、ナノファイバー化など木材利用法に関する研究は多岐にわたる。一方で、自然の中ではどのように木材がリサイクルされているのか考えてみると、主役は森の分解者たち、きのこ類を始めとする木材腐朽菌である。木材保存を考える上で木材腐朽菌は難敵であるとも言えるが、彼らがどのように木材を分解・資化し自身の生命活動に活かしているのか知ることは、我々が木材の保存または利用を考える上で重要なヒントとなる可能性がある。また視点を変えると、木材を直接的に栄養源として生きているきのこ類を有効利用することは、もとを辿れば木材の有効利用である。

きのこ類は糖質分解酵素群を用いて、木材の細胞壁多糖成分を分解して体内に取り込みエネルギーとする。また、きのこ類の細胞壁も多糖類で構成されており、これらを自身の酵素で分解・再構成することで、形態を変化させている。このように、きのこ類の生活環において糖質分解酵素群は重要な役割を担っている。本総説では、主にシイタケをはじめとする食用きのこに焦点を当てながら、きのこ類が生産する糖質分解酵素について述べる。

1. 生物としてのきのこ

菌類はカビ、きのこ、酵母と称される生物が存在するグループで、原核生物である細菌類と区別

するために真菌類とも呼ばれる。生物学的分類では、現在菌界は7つの門（担子菌門、子囊菌門、グロムス門、ツボカビ門、コウマクノウキン門、ネオカリマスティクス門、微孢子虫門）と4つの亜門（ケカビ亜門、ハエカビ亜門、キクセラ亜門、トリモチカビ亜門）から成り立っている¹⁾。即ち、カビ、きのこというのはその見た目から判断される区別で、厳密な定義があるわけではない。菌類のうち、カビときのこは菌糸と呼ばれる細い糸状の細胞から構成され、有機物を体表から吸収して栄養源とし、胞子によって繁殖するという共通点がある。ではカビ・きのこの区別はというと、胞子を形成する際に繁殖のために形成される器官を、「子実体」というが、この子実体が比較的大型である菌類を「きのこ類」と呼ぶ。スーパーで陳列している、いわゆる「きのこ」はこの大型の子実体である。また、きのこ類の多くは担子菌門に属する。一方で子実体を作らない菌類、もしくは子実体が小さな菌類は総じてカビ類と呼ばれる。こちらは、子のう菌門に属するものが多い。子実体は胞子を散布するための器官であるため、その役割から言えば植物でいう花に近い。一般的にはこの大型の子実体自体をきのこと呼ぶことが多いが、きのこの生物としての本体はむしろ木材や地中に広がっている菌糸体であるため、本稿では大型の子実体を作る真菌類に対する総称として「きのこ」という用語を用いる。

2. きのこによる木材腐朽と子実体形成

菌類であるきのこは従属栄養生物である。菌糸

*公益財団法人岩手生物工学研究センター

Corresponding author : Naotake Konno (naotake-k@ibrc.or.jp)

を張り巡らせながら、体外に分泌する酵素で有機物を分解吸収することで生長し、胞子を作り繁殖を繰り返す。きのこ類は栄養の吸収の仕方から、動植物の遺骸を栄養源とする腐生菌、植物の生きた根との共生が必要な菌根菌、昆虫類に寄生する冬虫夏草菌に分類される。木材腐朽菌はこの分類において腐生菌に含まれ、さらに腐朽材の性状により褐色腐朽菌と白色腐朽菌に分けられる。オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*)、ブクリョウ (*Wolfiporia cocos*) などの褐色腐朽菌はセルロースとヘミセルロースは分解できるが、リグニンは分解しないため、腐朽材が褐色となることを特徴とする。一方の白色腐朽菌はセルロースとヘミセルロースに加え、リグニンも同時に分解でき、腐朽材は残ったセルロースとヘミセルロースの色である白色となる。シイタケ、マイタケ、エノキタケ、ブナシメジ、ナメコといった食用きのことして栽培される有名なきのこ類の多くは白色腐朽菌の仲間である。白色腐朽菌はリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼなどの酵素群を生産してリグニンを分解する。上記きのこ類の栽培には主にクヌギ、シイ、カキ、クリ、ナラなどの落葉広葉樹が使われる²⁾。

木材内においてきのこ菌糸は、セルロース、ヘミセルロースをそのまま取り込むわけではなく、糖質分解酵素であるセルラーゼ、ヘミセルラーゼといった酵素によって分解し、低分子化することで栄養成分として利用する。一方で、菌糸生長は細胞伸長と細胞数増加によるが、菌糸の細胞壁構成成分もキチンや β -1,3および β -1,6グルカンなどの多糖類であるため、この過程においても糖質分解酵素が関与することが報告されている^{3, 4)}。きのこ類のような菌類は菌糸生長する際に、キチナーゼ、 β -1,3グルカナーゼ、 β -1,6グルカナーゼ等で一度自身を分解し、その後に合成酵素により細胞壁を再構成している。十分に生育した栄養菌糸は、温度、光、物理的刺激、栄養分の枯渇などによって栄養生長から生殖生長に切り替わり、子実体のひだの部分に担子胞子を形成する。この子実体中の菌糸の細胞壁も栄養菌糸と同様にキチンや β -1,3および1,6グルカンであるため、子実体の生長や自己消化に上記の多糖分解酵素が関与する⁵⁾。このように、きのこ類にとって糖質分解酵素の合

成は生きていく上での必須要素となっている。

3. 糖質関連酵素群の分類

セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、キチナーゼ、 β -1,3グルカナーゼ、 β -1,6グルカナーゼといった糖質分解酵素群は、加水分解反応を触媒して糖質分子内のグリコシド結合を分解するため、糖質加水分解酵素、Glycoside Hydrolase と呼ばれ、その頭文字から GH と略されることも多い。古くはその機能や分解する基質をもとにした分類もされてきたが、現在は主に酵素のアミノ酸配列の相同性によって、進化的に近い関係にある酵素どうしがファミリーとして分類されている⁶⁾。この情報についてはインターネット上に公開されており、2012年までに131種類のファミリーが存在する (CAZy, <http://www.cazy.org/>)。アミノ酸配列の相同性により、概ね酵素の機能についても予想することができる。しかしながら、同ファミリー内に異なる機能を持った酵素が属することがある。例えば、GHファミリー1には、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼをはじめとした19種類もの異なる機能を持った酵素群が分類されている。このことは、ちょっとした分子構造の違いが酵素の機能を決めていることを意味している。また、機能が同じだからといって、同じファミリーに属するとは限らない。例えば、セルロースを分解するエンド β -1,4-グルカナーゼと称される酵素は、17種類のファミリーに分かれて存在している。なぜ同じ糖質を分解するために多様な構造の、進化的に遠い酵素分子群が存在するかについては不明であるが、ここから生物による糖質分解の複雑さと多様性を感じる。個々の糖質分解酵素の性質を解明しながら、生物がどのようにこれら酵素群を使い分けているのか、または自然界で糖質がどのように分解されているのかの全体像を理解することが重要であると筆者は考えている。

4. きんこの遺伝子情報

現在ゲノム (全遺伝子情報) 解析技術が大きく進歩し、様々な生物のゲノム配列が解析されている。多くのきのこ類を含む白色腐朽菌のゲノム情報は *Phanerochaete chrysosporium* において最初に解読された⁷⁾。 *P. chrysosporium* は背着性の子

実体を作る担子菌であるが、その後スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) (<http://genome.jgi-psf.org/Schcol/Schcol.home.html>) やウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/coprinus_cinereus/MultiHome.html) といったきのこの型の担子菌でもゲノム配列が解読され、これらがモデル系として研究が進められてきた。さらに近年では次世代シーケンサーと呼ばれるゲノム配列を解読する装置が身近なものとなり、ゲノム配列が安価かつ短時間で解読できるようになった。担子菌ゲノム配列解読についても米国ジョイントゲノム研究所 (JGI) を含む大型のプロジェクトも組まれたことから、多くの担子菌ゲノム配列が解読された。2012年現在、65種類の担子菌ゲノム配列が JGI のホームページ内で利用できる (<http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>)。今年、米国クラーク大学、JGI、東京大学を含むグループは、これらゲノム配列の比較から木材腐朽に関与する糖質関連酵素を、白色腐朽菌では61~148 (平均87) 種類、14~17の GH ファミリーにわたって保持していること、褐色腐朽菌では白色腐朽菌より少ない32~68 (平均46) 種類、9~12の GH ファミリーにわたって保持していることを報告した。さらに本論文では、リグニン分解酵素であるペルオキシダーゼが白色腐朽

菌に特有のものであること、石炭紀の終わりに出現し、その結果、有機炭素貯蔵量が急激に減少したという興味深い知見を報告している⁸⁾。

食用きのこでは、ツクリタケ (マッシュルーム, *Agaricus bisporus*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) といったきのこでゲノム解読が終了している。また、ごく最近シイタケについても森林総合研究所で解読され、公開された (http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/ja/info_le.html)。シイタケのゲノムサイズは他の担子菌類と同程度の3,000万~4,000万塩基対で、遺伝子数は約13,000であると推定された。

5. 栄養摂取に関与する糖質加水分解酵素 (木材腐朽およびデンプン分解に関与する酵素群)

木材の細胞壁にはセルロース、ヘミセルロース、ペクチンといった多糖が含まれている。よって森林に生息する木材腐朽菌の場合 (栽培きのこで言うならば原木栽培する場合)、これら多糖類の分解がきのこの栄養摂取に不可欠である。また、栽培きのこの場合は、培地 (菌床) 中に木屑のみならずデンプンも含まれるため、これらを分解する酵素も使って栄養摂取を行う (図1)。以下にきのこの栄養摂取に関与する糖質分解酵素群を分解する基質ごとに分けて紹介する。

図1 シイタケの原木栽培および菌床栽培と栄養摂取に関与する糖質加水分解酵素

5.1 セルロース分解酵素

セルロース (β -1,4グルカン) は木材の主成分であり、乾燥重量の約50%含まれている。菌類によるセルロース分解は子の菌類の *Trichoderma reesei* で詳しく研究されている⁹⁻¹³⁾。担子菌においては *P. chrysosporium* において先行して検討が進められ、基本的には *T. reesei* 由来の酵素とその触媒機構については大差がないと認識されている¹⁴⁻¹⁷⁾。セルロース分解酵素はセルラーゼと総称され、その触媒機能によってセロビオヒドロラーゼ (CBH と略称) と、エンド- β -1,4-グルカナーゼ (EG と略称) の2種類に大きく分けられる。CBH はセルロースの結晶部位を加水分解することができ、セルロース鎖の末端付近から持続的加水分解 (プロセッシブ型分解) を開始し、セロビオースを放出する¹¹⁻¹⁵⁾。CBH の多くは糖結合性モジュール (CBM) と呼ばれる小さなタンパク質と結合しており¹²⁾、このドメインが結晶セルロースに結合することでプロセッシブ型分解を可能にする¹³⁾。CBH はさらにセルロース分解の向きによって、還元末端から分解する CBH I と非還元末端付近から分解する CBH II の2つに分類される¹⁸⁾。尚、CBH I は GH ファミリー7に属するため Cel7A、CBH II は GH ファミリーの6に属するため Cel6A とも呼ばれる。結晶性セルロースは自然界の中で最も生物によって分解され難い多糖の1つである。Igarashi らは CBH がセルロース表面で渋滞してしまうことが効率的にセルロース鎖を分解できない原因であること、Cel7A と Cel6A が協調作用することでこの渋滞を解消できることを高速原子間力顕微鏡による観察で明らかにした¹⁹⁾。他方、EG は主にセルロースの非結晶部位に作用し、セルロース鎖をランダムに加水分解 (エンド型分解) することでセルロース分子の重合度を低下させる¹⁶⁾。CBH とは異なり1回の分解反応ごとにセルロース鎖から離れるため、非プロセッシブ型分解を行うと考えられている¹³⁾。また、CBH が作用可能なセルロース鎖の末端数を増加させることができることから、2つの酵素が協調作用することでセルロースが分解されていると考えられている¹⁰⁾。分解生成物として得られるセロビオースは β -グルコシダーゼの作用によりグルコースまで分解される。または、

セロビオース脱水素酵素と呼ばれる酸化還元酵素によってセロビオノラクトンに変換されると推定されている¹⁷⁾。

CBH と EG のような主要なセルラーゼ群は GH ファミリー5, 6, 7, 12, 45に分類されている。特にCBH は GH ファミリーの6と7のみに存在する。所有する GH ファミリー6および7遺伝子の数は種ごとに異なり、白色腐朽菌ゲノム情報の分析から、1~2種の GH ファミリー6遺伝子、1~8種の GH ファミリー7遺伝子を有することが明らかになった⁸⁾。また、白色腐朽菌は多くの GH ファミリー6L遺伝子を有することが明らかになった⁸⁾。本ファミリーの酵素群については不明な点が多いが、近年、*P. chrysosporium* 由来の GH ファミリー6L酵素がセルロースを分解し、酸化された分解物を生成すること、結晶セルロースの分解においてCBH と相乗効果を示すことなどが報告されている²⁰⁾。

多くのきのこ類が含まれる白色腐朽菌類では、上述したようなセルラーゼによる木材腐朽機構が想定される。一方の褐色腐朽菌類では、その殆どがCBH が分類される GH ファミリー6と7の遺伝子を持たない⁸⁾。現在、いくつかの褐色腐朽菌類からEGが見つかっているが²¹⁾、ヒドロキシラジカルによる結晶性セルロースの低分子化が通説となっている²²⁾。このように褐色腐朽菌類と白色腐朽菌とは異なる機構でセルロース分解を行っていると思定される。一方で、イドタケ (*Coniophora puteana*) は褐色腐朽菌に分類されるが、GH ファミリー6と7に属する遺伝子を有している²³⁾。よって、セルロース分解系の観点で言えば、イドタケは褐色腐朽菌類と白色腐朽菌の中間に位置すると考えられる。

5.2 ヘミセルロースおよびペクチン分解酵素

広葉樹と針葉樹ではヘミセルロースの種類が異なるが、本稿ではきのこ類 (白色腐朽菌) が好む広葉樹におけるヘミセルロース分解について中心に述べる。広葉樹のヘミセルロースの主体はグルクロノキシランであることが知られている。グルクロノキシランの分解には、その構造の複雑さから、 β -キシラナーゼ、 α -アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼといった異なる種類の酵素がそれぞれ作用する。その低分子化に最も寄

与するのは、グルクロノキシランの主鎖をランダム(エンド型)に分解する β -キシラナーゼである。シイタケ²⁴⁾、スエヒロタケ²⁵⁾、ツガルサルノコシカケ(*Fomitopsis pinicola*)²⁶⁾などで酵素単離の報告例がある。また、Terashita らはシイタケ、エノキタケ、ヒラタケ等のきのこ類が栄養菌糸の生長とともに本酵素群を生産し、菌体外に分泌することを報告している²⁷⁾。菌類 β -キシラナーゼの多くは主に GH ファミリー10と11に属する。*P. chrysosporium* においては GH ファミリー10が6種類、GH ファミリー11が1種類存在している⁸⁾。

その他のヘミセルラーゼとして、 α -アラビノフラノシダーゼは、GH ファミリー62に属する酵素がウシグソヒトヨタケなどで²⁸⁾、GH ファミリー51に属する酵素がヒラタケなどで報告されている²⁹⁾。 α -グルクロニダーゼでは GH ファミリー115に属するスエヒロタケ由来の酵素が詳細に調べられている³⁰⁾。また、担子菌類のゲノム情報分析から、GH ファミリー28に属する酵素が多いことが確認されている⁸⁾。既存の情報ではこれらの多くはペクチン分解酵素であると考えられるが、なぜこのファミリーの酵素が際立って数が多いのかは不明のため、今後の酵素解析の進展が期待される。

5.3 アミロース分解酵素

シイタケ、エノキタケ、ブナシメジ、マイタケ、ヒラタケ等のきのこは人工栽培が行われている。シイタケにおける菌床栽培では、培地成分としておが屑の他に米ぬか、ふすま、コーンブランなどをデンプン源として5~10%加えている。人工栽培ではこれらデンプンも菌糸の栄養源として使われていると考えられる。デンプンは α -1,4グルカンであるアミロースと、 α -1,4/1,6グルカンであるアミロペクチンからなる。デンプンの分解には主に α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼが関与し、GH ファミリー13, 15, 31などに属する。シイタケではグルコアミラーゼの報告があり、本遺伝子はデンプンにより生産が誘導された³¹⁾。また子実体形成過程でも発現が上昇したことから、貯蔵多糖として菌体内に蓄積するグリコーゲン(α -1,4/1,6グルカン)を、このグルコアミラーゼで分解し、子実体形成のためのエネルギーにしていることも示唆された³¹⁾。白色腐

朽菌スエヒロタケでは、 α -アミラーゼと予想される GH ファミリー13遺伝子が8種類、 α -グルコシダーゼと予想される GH ファミリー13遺伝子が1種類、GH ファミリー15遺伝子が3種類、GH ファミリー31遺伝子が3種類ゲノム上に存在すると報告されている³²⁾。

6. 菌類細胞壁分解に関与する糖質加水分解酵素(自身の形態変化に関与する酵素群)

菌類細胞壁の80~90%(乾燥重量)が多糖であり、キチン、 β -1,3グルカン、 β -1,6グルカンが架橋結合した複雑な構造をしている。その構造や各種多糖の含有率は菌種によって異なる。きのこでは栄養菌糸の細胞壁のみならず子実体の細胞壁もこれら多糖類から構築される。Shida らはシイタケ子実体の細胞壁構造について、3つのタイプの β -1,3/1,6グルカン分子が絡み合っていること、外側から β -1,3グルカン、 β -1,6グルカン、キチンの順にその割合が高い傾向にあることを報告している³³⁾。シイタケ、カワラタケ、マイタケ等のきのこに含まれる β -グルカンは、免疫を活性化する作用³⁴⁾、アレルギーを抑制する作用等が報告されており³⁵⁾、付加価値の高い多糖として多くの研究が進められている。

きのこ類を含む菌類は、これら細胞壁多糖を分解する酵素群を生産する。一部のトリコデルマ属糸状菌は菌寄生菌として知られ、宿主の細胞壁を分解するためにこれら分解酵素群を分泌する³⁶⁾。植物寄生菌も感染する際に β -1,6グルカナーゼ等を分泌することが知られているが、植物細胞壁には β -1,6グルカンは含まれないので、自身の細胞壁を分解していると考えられる³⁷⁾。筆者らはきのこ類が形成する子実体に豊富に菌類細胞壁分解酵素が含まれ、これらが子実体の形態変化に関与することを明らかにした^{5, 38-44)}。シイタケ子実体は収穫後に自己消化することが知られており、この時に特に多くの糖質加水分解酵素が作られる(図2)。以下にシイタケを中心に、自身の細胞壁分解に関与する糖質分解酵素群について述べる。

6.1 キチン分解酵素

きのこ子実体の細胞壁中には約2~8%(乾燥重量)のキチンが含まれている⁴⁵⁾。一般的に、キ

図2 収穫後にシイタケ子実体で起こる自己消化と関与する糖質加水分解酵素

チン分解酵素はキチナーゼと β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの2つに大別される。キチナーゼはキチン長鎖をランダムに切る酵素でキチンオリゴ糖を生成することから、エンドキチナーゼとも呼ばれる。生成したキチンオリゴ糖はさらに β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼによって単糖で

ある β -*N*-アセチルグルコサミンにまで分解される。岩本らは、シイタケが子実体形成期に上記酵素を生産し、栄養菌糸中のキチンを β -*N*-アセチルグルコサミンにまで分解することで、子実体キチン合成の素材またはエネルギー源にすると述べている⁴⁶⁾。また、図3に示すように、収穫後すぐ

図3 収穫後のシイタケ子実体中における糖質加水分解活性の変化。シイタケ H600株を収穫後、0日目 (D0)、2日目 (D2)、4日目 (D4) において抽出液を調製し、菌類細胞壁関連の糖質に対する加水分解酵素活性を測定した。*pNP：パラニトロフェニル

(D0) のシイタケ子実体よりも収穫4日後 (D4)の方がキチン分解活性が高い。菌類のキチナーゼの多くはGHファミリー18に、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの多くはGHファミリー20に属するが、Sakamotoらは収穫4日後のシイタケ子実体において、3種類のGHファミリー18に属する遺伝子が収穫直後よりも多量に発現していることを報告している^{5, 41)}。筆者らはGHファミリー20に属する β -N-アセチルヘキソサミニダーゼをシイタケ子実体から単離・同定することに成功した⁴⁴⁾。これらの知見はキチン分解酵素がきのこ子実体の形成および自己消化に寄与することを示唆する。

6.2 β -1,3/1,6グルカン分解酵素

上述したようにきのこ類を含む菌類の細胞壁は β -1,3および β -1,6グルカンから構成され、これらの含有量が全ての成分(有機物)の中で最も多い。図3に示すように、シイタケ子実体中には β -1,3グルカナーゼおよび β -1,6グルカナーゼ活性が存在し、この活性は収穫後に増加する。著者らは、シイタケ子実体の水抽出液から分解酵素の精製を行い、エキソ型 β -1,3グルカナーゼを2種(EXG1, EXG2)^{38, 39)}、エンド型 β -1,3グルカナーゼを2種(TLG1, GLU1)^{40, 42)}、エンド型 β -1,6グルカナーゼを1種(LePus30A)⁴³⁾単離した。エキソ型 β -1,3グルカナーゼのうち、EXG1は生長中の子実体の柄で強く発現し、収穫後は殆ど発現しない。一方のEXG2は、生長中の子実体において強く発現するものの、収穫後の子実体でも発現量が大きく増加する。また、基質特異性も異なり、 β -1,3/1,6グルカンを分解する時、EXG1が β -1,6結合したグルコース側鎖によって分解活性が阻害されるのに対し、EXG2は側鎖構造があっても阻害されず、側鎖をバイパスして β -1,3/1,6グルカン主鎖を分解する⁴⁷⁾。このように同じエキソ型 β -1,3グルカナーゼでもきのこ類は使い分けを行っていると思定される。エンド型 β -1,3グルカナーゼであるTLG1, GLU1はシイタケ子実体収穫後でのみ強く発現する。酵素的性質に大きな違いはないものの、発現時期が似ていることから協調的に子実体の自己消化に寄与すると考えられる。LePus30Aはきのこ類で初めて見つかったエンド型 β -1,6グルカナーゼである。本酵素もシイタケ

子実体収穫後に強く発現する。一方で液体培養した菌糸でも発現が確認されていることから栄養菌糸の生長にも寄与している可能性がある。本酵素は β -1,6グルカンに対して高い基質特異性を示すが、ある程度低分子化された β -1,3/1,6グルカンの側鎖構造であれば解離できることも確認された。このように、複雑な構造を有する菌類細胞壁 β -グルカンを様々な β -グルカナーゼ群が共同作用することで急激に低分子化する機構が予想されている⁵⁾。

酵素群のアミノ酸配列を分析したところ、EXG1はGHファミリー5、EXG2はGHファミリー55、LePus30AはGHファミリー30に属することが明らかとなった。一方で、GLU1とTLG1については他の既存の糖質関連酵素群とはアミノ酸配列において相同性を示さない新規の酵素であることが判明した。GLU1については、2011年に新規のGHファミリー(GHファミリー128)と認定された。また、TLG1はソーマチンと呼ばれる植物性のタンパク質甘味料と似た構造を有していた。他の菌類でもソーマチン類似タンパク質が β -1,3グルカナーゼ活性を持つことが報告されているため⁴⁸⁾、本酵素についても近日中に新規GHファミリーに認定されると思われる。このように、きのこ類、特に子実体からはこれまで他の生物から見つかっていないユニークな糖質関連酵素群が得られている。

7. きのか糖質関連酵素研究の応用

ここまで述べてきたきのこ類が生産する糖質関連酵素群のうち、最も研究されているのはセルラーゼである。木材腐朽菌であるきのこのセルラーゼ群を利用して、木材を効率的にグルコースまで分解する手法の開発が精力的に進められている。実際に担子菌ウスバタケ(*Irpex lacteus*)由来のセルラーゼなどが市販されている⁴⁹⁾。木材の分解によって得たグルコースを使ってエネルギー製品または化学製品を生み出すことができれば、化石資源に頼らない持続可能な社会を実現できる。きのこが自然界でどのように木材を資化しているのか深く研究することで、木材を有効利用する上で重要な知見が得られるのではないかと著者は考えている。一方で、きのこ子実体に含まれる

多糖分解酵素の応用例は殆どない。しかしながら、上述したようにシイタケ子実体中には β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ、 β -1,3グルカナーゼ、 β -1,6グルカナーゼといった糖質分解酵素が豊富に含まれている。著者らはシイタケ β -N-アセチルヘキソサミニダーゼを用いたキチンの低分子化およびN-アセチルグルコサミン生産法を開発し特許申請している。シイタケのような食用きのこ由来の酵素は食品添加物として使用し易いため、安心・安全な機能性素材開発を進める上で優位である。

シイタケに含まれる水溶性 β -1,3/1,6グルカンはレンチナンと呼ばれ、免疫活性化機能、アレルギー抑制（抗炎症）機能等を持つことから、医薬品または健康補助食品として市販されている。しかしながら、レンチナンは収穫直後には0.5-1.0mg/g新鮮重含まれているが、その後上述したようなシイタケ自身が分泌する糖質分解酵素群により急速に低分子化（自己消化）されるため、その含有量は常温下3-4日間貯蔵において10%程度にまで減少する（ひだ部位において測定⁵⁰⁾。よって、レンチナンを安定に得るためには、自己消化しにくい品種を育成することが最も重要であると考えられる。我々はこれまで得られているレンチナン分解酵素に関する知見をもとにレンチナンが分解され難い、即ちEXG2, GLU1, TLG1といったレンチナン分解酵素の発現が抑えられたシイタケの育種に取り組んでいる。近年、きのこ類は大規模に工場生産され、収穫されてから市場に出回るまで貯蔵される傾向にある。この貯蔵期間も延びてきていることから、日持ちするきのこ品種を育成することは重要な課題である。

おわりに

本稿ではきのこ類による木材腐朽と自身の形態変化を、それに関与する多糖分解酵素について解説しながら述べた。炭素の流れから見ると、きのこ子実体は木材成分を再構成した産物とも言い換えられる。よって、きのこ子実体を有効利用することは木材の有効利用であると考えられる。きのこは現在世界では1年間に約800万tが食べられているが、筆者は上記のような視点から食品以外の用途も開発していきたいと考えている。食用きのこ

には「食べられる菌」であるという大きなメリットがある。きのこは時に野菜として扱われることもあるが、菌類であるきのこには植物にはない特有の機能性成分が含まれる。そして、多くの菌類はその安全性が確保されていないが、食用きのこは摂取する上での安心・安全が保証されている。本稿ではシイタケ機能性成分であるレンチナンを紹介したが、コレステロール低下作用があるエリタデニンや、骨粗しょう症予防効果があるエルゴステロールなど多くの付加価値の高い成分がきのこには含まれる。きのこがもつ無限の可能性を探り、高付加価値化および新規用途開発を目指した研究をさらに進めていきたい。

本総説を寄稿するにあたり、岩手生物工学研究センター 坂本裕一主任研究員、宇都宮大学農学部 羽生直人教授に様々なご助言をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。本総説で紹介した研究結果の一部は岩手生物工学研究センター 小原あゆみ氏に実験補助いただきました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J. and Zhang, N.: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi, *Mycological Research*, **111** (5), 509-547 (2007).
- 2) 穴戸和夫 編：“キノコとカビの基礎科学とバイオ技術, (株)アイピーシー, 2002, pp.29-

- 44.
- 3) 宍戸和夫 編：“キノコとカビの基礎科学とバイオ技術, (株)アイピーシー, 2002, pp.109-125.
- 4) 水野卓, 川合正允 編：“キノコの化学・生化学, 学会出版センター, 1992, pp.175-182.
- 5) Sakamoto, Y., Nakade, K., Konno N., and Sato, T. : Senescence of the *Lentinula edodes* fruiting body after harvesting, *Food Quality*, chapter 6 (2012).
- 6) Henrissat, B. : A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, **280**, 309-316 (1991).
- 7) Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. and Rokhsar, D. : Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78, *Nature Biotechnology*, **22**, 695-700 (2004).
- 8) Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martinez, A. T., Otiillar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J. A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kües, U., Kumar, T. K., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L. F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D. J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L. G., Nolan, M., Ohm, R. A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J. C., St John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D. C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I. V. and Hibbett, D. S. : The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes, *Science*, **336**, 1715-1719 (2012).
- 9) Reese, E. T., Siu, R. G. and Levinson, H. S. : The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, *Journal of Bacteriology*, **59** (4), 485-497 (1950).
- 10) Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C., and Schulein, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose, *Nature BioTechnology*, **3**, 722-726 (1985).
- 11) Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K., Teeri, T. T. and Jones, T. A. : The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*, *Science*, **265**, 524-528 (1994).
- 12) Mattinen, M. L., Linder, M., Teleman, A. and Annala, A. : Interaction between cellohexaose and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases, *FEBS Letter*, **407** (3), 291-296 (1997).
- 13) Kipper, K., Våljamäe, P. and Johansson, G. : Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as ‘burst’ kinetics on fluorescent polymeric model substrates, *Biochemical Journal*, **385**, 527-535 (2005).
- 14) Streamer, M., Eriksson, K. E. and Pettersson, B. : Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Functional characterization of five endo-1,4- β -glucanases and one exo-1,4- β -glucanase, *European Journal of Biochemistry*, **59**, 607-613 (1975).
- 15) Uzcategui, E., Ruiz, A., Montesino, R., Johansson, G. and Pettersson, G. : The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*, *Journal of Biotechnology*, **19**, 271-285 (1991).
- 16) Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Stahlberg, J., Johansson, G. and Pettersson, G. : Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase, *European Journal of Biochemistry*, **259**, 88-95 (1999).
- 17) Baldrian, P. and Valášková, V. : Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi, *FEMS Microbiology Reviews*, **32** (3), 501-521 (2008).
- 18) Sugiyama, J. and Imai, T. : Aspects of Native Cellulose Microfibrils at Molecular Resolution, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **11**, 23-31 (1999).
- 19) Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando,

- T. and Samejima, M. : Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface, *Science*, **333**, 1279–1282 (2011).
- 20) Wymelenberg, A. V., Denman, S., Dietrich, D., Bassett, J., Yu, X., Atalla, R., Predki, P., Rudsander, U., Teeri, T. T. and Cullen, D. : Transcript analysis of genes encoding a family 61 endoglucanase and a putative membrane-anchored family 9 glycosyl hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied Environmental Microbiology*, **68** (11), 5765–5768 (2002).
 - 21) Shimokawa, T., Shibuya, H., Nojiri, M., Yoshida, S. and Ishihara, M. : Purification, molecular cloning, and enzymatic properties of a family 12 endoglucanase (EG-II) from *Fomitopsis palustris* : role of EG-II in larch holocellulose hydrolysis, *Applied Environmental Microbiology*, **74** (18), 5857–5861 (2008).
 - 22) Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubátová, E. and Halada, P. : Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood, *Applied Environmental Microbiology*, **73** (19), 6241–6253 (2007).
 - 23) Kajisa, T., Igarashi, K. and Samejima, M. : The genes encoding glycoside hydrolase family 6 and 7 cellulases from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*, *Journal of Wood Science*, **55** (5), 376–380 (2009).
 - 24) Lee, J. W., Gwak, K. S., Kim, S. I., Kim, M., Choi, D. H. and Choi, I. G. : Characterization of xylanase from *Lentinus edodes* M290 cultured on waste mushroom logs, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17** (11), 1811–1817 (2007).
 - 25) Paice, M. G., Jurasek, L., Carpenter, M. R. and Smillie, L. B. : Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase A from *Schizophyllum commune*, *Applied Environmental Microbiology*, **36** (6), 802–808 (1978).
 - 26) Shin, K., Jeya, M., Lee, J. K. and Kim, Y. S. : Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Fomitopsis pinicola*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(10), 1415–1423 (2010).
 - 27) Terashita, T., Kono, M., Yoshikawa, K. and Shishiyama, J. : Productivity of hydrolytic enzymes by mycorrhizal mushrooms, *Mycoscience*, **36** (2), 221–225 (1995).
 - 28) Hashimoto, K., Yoshida, M. and Hasumi, K. : Isolation and characterization of CcAbf62A, a GH62 α -L-arabinofuranosidase, from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75** (2), 342–345 (2011).
 - 29) Amore, A., Amoresano, A., Birolo, L., Henrissat, B., Leo, G., Palmese, A. and Faraco, V. : A family GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus* : identification, recombinant expression and characterization, *Applied Environmental Microbiology*, **94** (4), 995–1006 (2012).
 - 30) Chong, S. L., Battaglia, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Tenkanen, M. and de Vries, R. P. : The α -glucuronidase Agul from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115), *Applied Environmental Microbiology*, **90** (4), 1323–32 (2011).
 - 31) Zhao, J., Chen, Y. H. and Kwan, H. S. : Molecular cloning, characterization, and differential expression of a glucoamylase gene from the basidiomycetous fungus *Lentinula edodes*, *Applied Environmental Microbiology*, **66** (6), 2531–2535 (2000).
 - 32) Chen, W., Xie, T., Shao, Y. and Chen, F. : Phylogenomic Relationships between Amyolytic Enzymes from 85 Strains of Fungi, *PLoS One*, **7** (11), e49679 (2012).
 - 33) Shida, M., Ushioda, Y., Nakajima, T. and Matsuda, K. : Structure of the alkali-insoluble skeltetal glucan of *Lentinus edodes*, *The Journal of Biochemistry*, **90**, 1093–1100 (1981).
 - 34) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. : Inhibition of mouse srcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, *Nature*, **222**, 687–688 (1969).
 - 35) Xu, X., Yasuda, M., Nakamura-Tsuruta, S., Mizuno, M. and Ashida, H. : β -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- α production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7 macrophages, *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 871–878 (2012).
 - 36) Djonović, S., Pozo, M. J. and Kenerley, C. M. : Tvbg3, a β -1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*, *Applied Environmental Microbiology*, **72**

- (12), 7661-7670 (2006).
- 37) Moy, M., Li, H. M., Sullivan, R., White, J. F. Jr and Belanger, F. C. : Endophytic fungal β -1,6-glucanase expression in the infected host grass, *Plant Physiology*, **13**, 1298-1308 (2002).
 - 38) Sakamoto, Y., Irie, T. and Sato, T. : Isolation and characterization of a fruiting body-specific exo- β -1,3-glucanase-encoding gene, *exg1*, from *Lentinula edodes*, *Current Genetics*, **47**, 244-252 (2005).
 - 39) Sakamoto, Y., Minato, K., Nagai, M., Kawakami, S., Mizuno, M. and Sato, T. Characterization of the *Lentinula edodes* *exg2* gene encoding a lentinan-degrading exo- β -1,3-glucanase, *Current Genetics*, **48**, 195-203 (2005).
 - 40) Sakamoto, Y., Watanabe, H., Nagai, M., Nakade, K., Takahashi, M. and Sato, T. *Lentinula edodes* *tlg1* encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence, *Plant Physiology*, **141**, 793-801 (2006).
 - 41) Sakamoto, Y., Nakade, K. and Sato, T. : Characterization of the post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinula edodes* fruiting body, *Current Genetics*, **55**, 409-423 (2009).
 - 42) Sakamoto, Y., Nakade, K. and Konno, N. : Endo- β -1,3-glucanase GLU1, from the fruiting body of *Lentinula edodes*, belongs to a new glycoside hydrolase family, *Applied Environmental Microbiology*, **77**, 8350-8354 (2011).
 - 43) Konno, N. and Sakamoto, Y. : An endo- β -1,6-glucanase involved in *Lentinula edodes* fruiting body autolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**, 1365-1373 (2011).
 - 44) Konno, N., Takahashi, H., Nakajima, M., Takeda, T. and Sakamoto, Y. : Characterization of β -N-acetylhexosaminidase (LeHex20A), a member of glycoside hydrolase family 20, from *Lentinula edodes* (shiitake mushroom), *AMB Express*, **2**, 29 (2012).
 - 45) Janos, Vetter. : Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*, *Food Chemistry*, **102**, 6-9 (2007).
 - 46) 岩本徹, 中井誠, 佐々木毅, 中英幸 : 担子菌による β -N-アセチルグルコサミニダーゼの生産とその生理作用, 醗酵工学会誌, **68** (2), 197-115 (1990).
 - 47) Ishida, T., Fushinobu, S., Kawai, R., Kitaoka, M., Igarashi, K. and Samejima, M. : Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 10100-10109 (2009).
 - 48) Grenier, J., Potvin, C. and Asselin, A. : Some fungi express, β -1,3-glucanases similar to thaumatin-like proteins, *Mycologia*, **92**(5), 841-848 (2000).
 - 49) Kanda, T., Yatomi, H., Makishima, S., Amano, Y. and Nisizawa, K. : Substrate specificities of exo- and endo-type cellulases in the hydrolysis of β -(1 $\rightarrow$ 3)- and beta-(1 $\rightarrow$ 4)-mixed D-glucans, *The Journal of Biochemistry*, **105** (1), 127-132 (1989).
 - 50) Minato, K., Kakawami, S., Nomura, K., Tsuchida, H. and Mizuno, M. : An exo- β -1,3 glucanase synthesized de novo dgrades lentinan during storage of *Lentinula edodes* and diminishes immunomodulating activity of the mushroom, *Carbohydrate Polymers*, **56**, 279-286 (2004).

(2012.12.28受付)
(2013.2.4受理)