

アイソザイム分析によるヒトヨタケ属担子菌の同定と識別

北本 豊*・立石貴浩*・香川郁子*
市川吉夫*

昭和61年5月31日受付

Analysis of Some Isozymes for Identification and Discrimination of Basidiomycetes Belonging to *Coprinaceae*

Yutaka KITAMOTO*・Takahiro TATEISHI*・Ikuko KAGAWA*
Yoshio ICHIKAWA*

Isozymes of phenol oxidase, acid phosphatase and esterase were analyzed against several stocks of *Coprinus* species and other genera of basidiomycetes by acrylamide gel electrophoresis. A number of stocks belonging to *Coprinii* showed a common Rf value of phenol oxidase bands on electrophoregrams, although the positions of the other bands were quite different among the species or their varieties. Acid phosphatase activity gave a broad single band on electrophoregrams. The active bands were detected at a particular Rf position from the same species of various stocks. The esterase activities could be separated into 4-16 bands for each stock, and total of more than 28 isozyme bands were detected from the stocks tested. The esterase electrophoregrams in the same species of *Coprinii* and their varieties showed close resemblance, though they could be clearly distinguished even from some varieties of the same species. Patterns of this isozyme from monokaryons could also be distinguished from their parental dikaryons. Further differences were observed between dikaryotic mycelia and their fruiting bodies.

From these results, we can conclude that the electrophoretic analysis of these three isozymes for dikaryotic mycelia may serve as an index for the identification and the classification in the genus *Coprinaceae*.

緒 言

同担子菌の分類学は子実体および担子胞子の形態学的特徴に準拠したものであり^{4,5)}、品種間の識別は対峙培養による判別や栽培特性の相違により行なわれている¹⁾。しかしながら、ヒトヨタケ属の分類では、形態学的観察から異種とされた菌株間で交配可能であった事例¹²⁾も知られ、食用担子菌の商業品種の分類でも品種の多様化により対峙培養では分別不可能な菌株が出現している。

アイソザイムは同一の反応基質に対して活性を有する分子種の異なる酵素の総称である。微生物では属、種あるいは異品種間でアイソザイム構成に明確な変異のみられることが知られており、同担子菌の分類において従来法に対する補助的手段としてアイソザイム分析の活用が期待される。Royleら (1982) は、ツクリタケ近縁種 (*Agaricus brunnescesn*) におけるアイソザイムを分析し、その泳動図にみられた変異からこの菌の商業品種をいくつかの遺伝子型に分類し¹⁶⁾、またシイタケにおいて

* 鳥取大学農学部農芸化学科農産製造学研究室
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University.

もアイソザイム分類への適用を意図した報告をしている¹⁷⁾。そこで、著者は、ヒトヨタケ属担子菌を実験系としてポリアクリルアミドスラブ電気泳動法によりフェノールオキシダーゼ、酸性ホスファターゼおよびエステラーゼアイソザイムを分析し、ヒトヨタケ属と他属、ヒトヨタケ属の異種間、さらに同一種内の異品種菌株におけるアイソザイム発現の相違・相関性を検討した。

実験方法

1. 供試菌株 本研究には、鳥取大学農学部農産製造学研究室保存の担子菌2核菌糸株、およびヒトヨタケ属担子菌ではそれらの親株から単孢子分離した1核系統株を用いた。

2. 培養方法⁷⁾ 担子菌栄養菌糸体の培養には、ポテト・デキストロース(PD)液体培地を100ml容三角スラスコに20ml分注し、115°Cで5分間高圧滅菌した。つぎにPDA培地上であらかじめ平板培養した供試菌の栄養菌糸体菌叢から3×3×3mmの菌糸体片を切り出し、これを前述の液体培地上に接種して25°C、暗黒下で2週間培養した。またヒトヨタケ属担子菌の子実体の収穫には、前述の液体培地上で暗黒下、2週間の培養を終えた菌糸体菌叢を、20°C、200~500luxの蛍光灯照射下に移して子実体を発生させた。これらの栄養菌糸体および子実体は、収穫後、蒸留水で十分に洗浄し、沓紙で脱水後、凍結保存した。

3. 粗酵素液の調製 栄養菌糸体あるいは子実体を1g秤量し、0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を5ml加えてガラスホモゲナイザーで5分間磨砕した。このホモジネートを15,000rpmで15分間遠心分離し、得られた上澄液を粗酵素液とした。

4. 電気泳動 粗酵素液に存在するアイソザイム成分の分析は、ポリアクリルアミドスラブ電気泳動法により行った。市販の電気泳動装置(ATTO, SJ-1060・SDH型)を用い、鈴木の方法¹⁸⁾に準じてpH9.5、7.5%ゲルを1mmの厚さに調製し、前述の粗酵素液5~40μlをチャージして、電流15~20mAで約4時間、5°C下で泳動した。

5. アイソザイムの活性染色 泳動を終了したポリアクリルアミドゲルシートは、下記の反応操作により、フェノールオキシダーゼ(PO)、酸性ホスファターゼ(AP)およびエステラーゼ(EST)に対する活性染色を行った。

a. フェノールオキシダーゼ L-3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA)を0.15%溶解させた0.05M Mcllvaine緩衝液(pH4.5)に、供試ゲルを浸漬して37°Cで2~4時間反応させた。

b. 酸性ホスファターゼ³⁾ ファーストブルーRR塩およびα-ナフチルホスフェート・2Na塩をそれぞれ0.1%溶解させた0.1M Mcllvaine緩衝液(pH4.5)を反応液として、供試ゲルを浸漬して室温下で1時間染色した。

c. エステラーゼ¹⁴⁾ ファーストブルーRR塩を0.1M Mcllvaine緩衝液(pH6.5)に0.1%溶解させ、不溶物を沓過除去した。この緩衝液100mlに対してα-およびβ-ナフチルアセテートをそれぞれ1%含有する50%アセトン水溶液2mlを添加して反応液とし、供試ゲルを浸漬して室温下で約2時間染色した。

染色を終了したゲルシートは7%酢酸で洗浄・固定し、乾燥して保存した。

実験結果

1. ヒトヨタケおよび他属の2核栄養菌糸体の泳動図分析 ヒトヨタケ属と他属の担子菌のアイソザイム分析

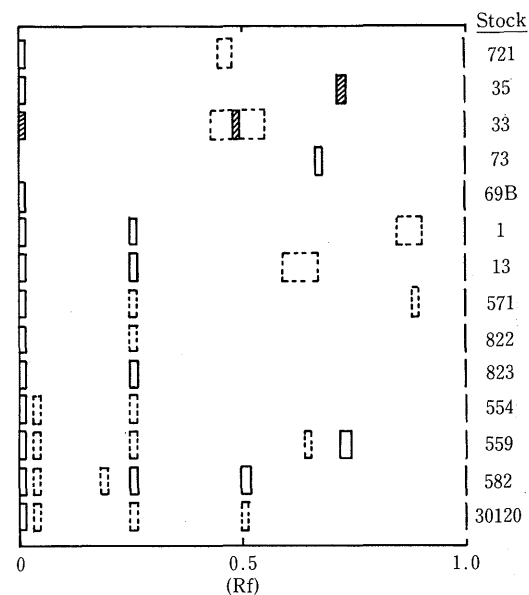


Fig. 1 Zymograms showing relative locations of phenol oxidase bands from dikaryotic mycelia of various basidiomycetes. Test stocks were *Flammulina velutipes* 721, *Lentinus edodes* 35, *Pleurotus ostreatus* 33, *Schizophyllum commune* 73, *Favolus arcularius* 69B, *Coprinus cinereus* 1, 13, 571, 822 and 823, *Coprinus phlyctidosporus* 554 and 559, *Coprinus echinosporus* 582 and *Coprinus lagopides* IFO 30120. Relative staining intensity: ■ > ▨ > □ > [---].

による分別の可否を検討するため、これらの担子菌の2核栄養菌系体から粗酵素液を抽出して電気泳動を行った。

a. フェノールオキシダーゼ活性 ヒトヨタケ属4種と他属5種の担子菌の2核栄養菌系体の泳動図をFig. 1に示す。いずれの菌株でもゲル上に2本以上のPO活性バンドが検出された。木材腐朽菌5種の菌系体はそれぞれ異なる泳動図を示し、ヒトヨタケ属供試菌の活性バンドではこれらの泳動位置と一致するものはみられなかった。ヒトヨタケ属菌では、Rf0.26付近にどの菌株にも共通の活性バンドが検出された。その他の活性バンドはヒトヨタケ属4種それぞれ明確に識別された。同一種内の泳動図の比較では、ネナガノヒトヨタケの5品種中4品種、ザラミノヒトヨタケの2品種間でアイソザイム構成に相違がみられた。

b. 酸性ホスファターゼ活性 前項で記述した14菌株について、AP活性を検出した結果をFig. 2に示す。本酵素の泳動図は分解能がやや低く、どの菌株でも単一の広がりのある活性バンドが検出された。木材腐朽菌5種と

ヒトヨタケ属4種の比較では、それぞれ異なる泳動位置にAP活性が検出され、ヒトヨタケ属のネナガノヒトヨタケおよびザラミノヒトヨタケのそれぞれの種内異品種間では同一の泳動位置に活性バンドが検出された。

c. エステラーゼ活性 14菌株のエステラーゼ活性泳動図をFig. 3に示す。EST活性泳動図は分解能が高く、また供試菌の合計で28の異なる泳動位置に活性バンドが検出された。各菌株に対するアイソザイムバンドの平均は8本であった。木材腐朽菌とヒトヨタケ属担子菌の比較では、いずれも類似性が低く、ヒトヨタケ属異品種間でも差異が大きかった。

ヒトヨタケ属担子菌の種内異品種間の比較では、ネナガノヒトヨタケの場合どの菌株にもRf0.33, 0.46および0.94の泳動位置のEST活性バンドが検出され、571, 822および823株においてはRf0.81の活性バンドが共通して検出されるなど、菌株間で著しい相同性がみられたが、各品種は容易に識別された。ザラミノヒトヨタケの2菌株でもRf0.40および0.58に両者に共通の活性バンドが存在したが、品種間に明確な差異が認められた。しかし、

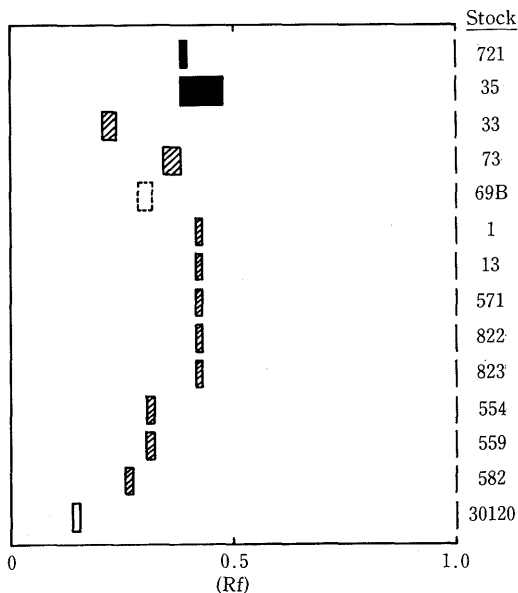


Fig. 2 Zymograms showing relative locations of acid phosphatase bands from dikaryotic mycelia of various basidiomycetes. Relative staining intensity: **■** > **▨** > **□** > **▤**. The name of species for each stock is given in Fig. 1.

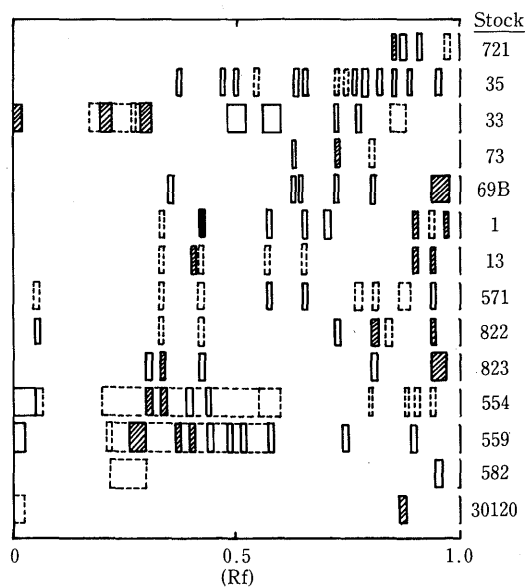


Fig. 3 Zymograms showing relative locations of esterase bands from dikaryotic mycelia of various basidiomycetes. Relative staining intensity: **■** > **▨** > **□** > **▤**. The name of species for each stock is given in Fig. 1.

ESTアイソザイムの検出では、同一菌株でも培養ロットや培養令の異なる菌糸体で活性バンドの消失あるいは染色強度の変化がみられ、微弱な活性バンドは菌糸体の培養条件によって検出の可否が変化することが示唆された。

2. ヒトヨタケ属担子菌の2核菌糸と1核系統株泳動図の比較 本属担子菌の2核菌糸保存株と単胞子分離により得られた1核系統株間のアイソザイム発現の相関性と差異を知るため、ヒトヨタケ属2種5品種の泳動図を比較した。

a. フェノールオキシダーゼ活性 ヒトヨタケ属5品種の2核の親株およびそれらの1核系統株のPO活性泳動図をFig. 4に示す。ヒトヨタケ属2核栄養菌糸体に共通して検出されたRf0.26のPO活性バンドは、供試した2品種のいずれの1核系統株にも検出可能であった。その他の活性バンド構成は、ネナガノヒトヨタケ571および823株の場合、2核と1核系統株でほぼ一致する泳動図が得られたが、822株およびザラミノヒトヨタケ554株では1核系統株に新規な活性バンドが検出されたなど、2核と1核系統株間で多少の相違がみられた。

b. 酸性ホスファターゼ活性 供試菌のAP活性は2核および1核系統株とも、Fig. 5に示すように、ブロードな単一バンドとして検出された。AP活性バンドの泳動位置は種特異的であり、いずれの品種でも2核と1核系統株間で泳動図が一致した。

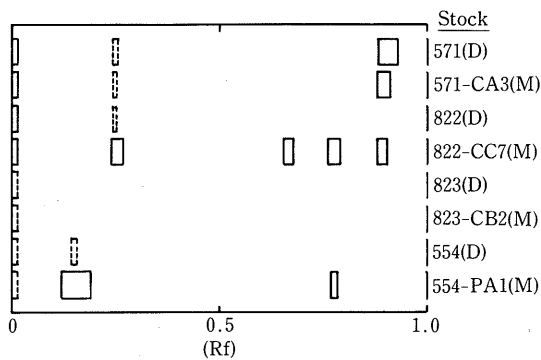


Fig. 4 Zymograms showing differences in relative locations of phenol oxidase bands between dikaryons and their lines of monokaryotic mycelia in *Coprinus cinereus* 571, 822 and 823, and *Coprinus phlyctidosporus* 554. D: Dikaryon, M: Monokaryon. Relative staining intensity: ■ > ▨ > □ > [] .

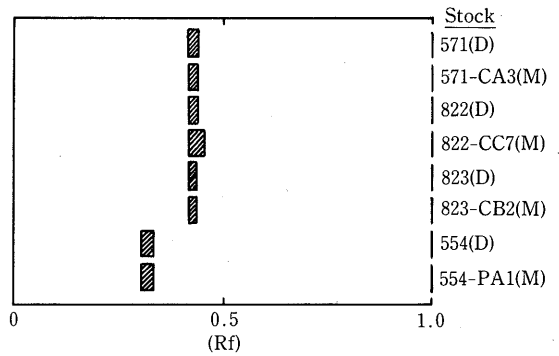


Fig. 5 Zymograms showing differences in relative locations of acid phosphatase bands between dikaryons and their lines of monokaryotic mycelia in *Coprinus cinereus* 571, 822 and 823, and *Coprinus phlyctidosporus* 554. D: Dikaryon, M: Monokaryon. Relative staining intensity: ■ > ▨ > □ > [] .

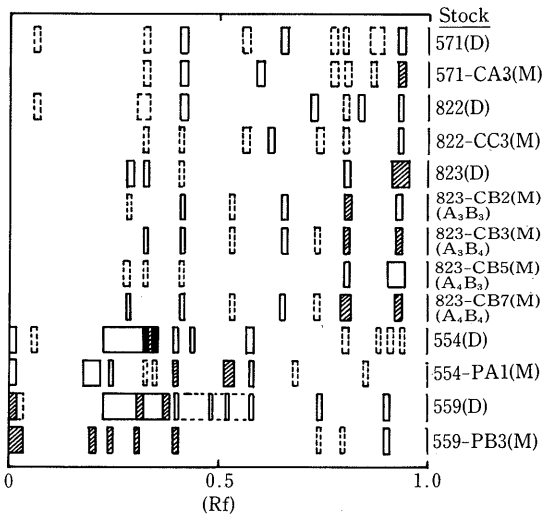


Fig. 6 Zymograms showing differences in relative locations of esterase bands between dikaryons and their lines of monokaryotic mycelia in *Coprinus cinereus* 571, 822 and 823, and *Coprinus phlyctidosporus* 554 and 559. D: Dikaryon, M: Monokaryon. Relative staining intensity: ■ > ▨ > □ > [] .

c. エステラーゼ活性 ヒトヨタケ属 2種 5品種のEST泳動図の比較をFig. 6に示す。ネナガノヒトヨタケでは供試した3品種ともRf 0.41, 0.81および0.94に2核と1核系統株に共通するEST活性バンドが検出された。その他の活性バンド構成にも高い相同性がみられたが、2核菌糸にはみられるが1核系統株では検出されなかった活性バンド、あるいは1核系統株で新規に検出された活性バンドなど2核と1核系統株間で相違があった。たがいに和合性因子を異にする823株由来の1核系統株4株では、相同性は高かったが、菌株間に微細な変異が認められた。ザラミノヒトヨタケでも2核菌糸と1核系統株の泳動図は高い相同性を示したが、各菌株の活性バンド構成に明確な差異がみられた。

3. 2核栄養菌糸体と子実体の泳動図の比較 発育分化段階の異なる組織細胞間でのアイソザイム構成の相違を観察するため、木材腐朽菌4種とヒトヨタケ属2種の

2核栄養菌糸体および子実体のEST泳動図を比較した。その結果をFig. 7に示す。

栄養菌糸と子実体の泳動図はいずれの菌株でも高い相同性を示したが、木材腐朽菌ではヒラタケとアミスギタケの子実体において栄養菌糸にみられない新規な活性バンドが検出され、ヒトヨタケ属供試菌でも子実体でアイソザイム構成数が増加し、染色強度の著しく高い活性バンドが検出された。一方、シイタケおよびエノキタケでは、栄養菌糸より子実体でEST活性バンド数が減少した。

考 察

ヒトヨタケ属担子菌の2核栄養菌糸体から抽出した3種のアイソザイムの電気泳動図の比較から、フェノールオキシダーゼはヒトヨタケ属と他属の識別、酸性ホスファターゼはヒトヨタケ属の種の同定と異種菌株の識別、またエステラーゼは同一種内の異品種菌株の識別に有用であることが示唆された。

フェノールオキシダーゼは、スエヒロタケ^{9,10}、アミスギタケ⁸およびツクリタケ²⁰において、栄養生長から子実体形成に移行する段階で比活性が上昇することから、子実体発生における本酵素の関与が指摘されている。また、その酵素活性が数種のアイソザイムにより構成されていることが、ツクリタケ^{2,6}やその他の担子菌^{8,11}で報告されている。著者らによるヒトヨタケ属担子菌のアイソザイム分析では、本属に特有のPOアイソザイムバンドの存在が観察され、この活性バンドの検出を本属の同定に利用しうる可能性が示唆された。POアイソザイムのその他の活性バンド構成は種あるいは品種間特異性が認められた。

ヒトヨタケ属担子菌の酸性ホスファターゼのアイソザイム構成について、MooreおよびJirjis (1981)¹³は、ネナガノヒトヨタケの場合、4本の活性バンドに分離すると報告している。しかし、著者らの泳動および活性染色条件では分離が十分でなく、ブロードな単一バンドとして検出された。ヒトヨタケ属における本酵素の活性バンドは種特異的な泳動位置に検出され、同一種の異品種間でも同一の泳動結果が得られた。

供試担子菌のエステラーゼ泳動図は分解能が高く、それぞれ泳動位置の異なる28本以上のESTアイソザイムバンドが検出可能であった。しかし、同一菌株でも培養ロットの異なる菌糸体の泳動図の比較では、活性バンド数および染色強度の変化が観察された。したがって、ESTアイソザイム泳動図の解析では、主要構成バンドあ



Fig. 7 Zymograms showing differences in relative locations of esterase bands between vegetative mycelia and their fruiting bodies in various basidiomycetes. VM: Vegetative mycelia, FB: Fruiting bodies. Relative staining intensity: ■ > ▨ > □. The name of species for each stock is referred as for Fig. 1.

るいは相同性率など、概略的な比較が限界であり、微弱な活性バンドは泳動図の異同を論ずる指標とすべきでないと思われる。ヒトヨタケ属における本酵素系の活性バンド構成は、異種菌株間では大きく相違し、同一種の異品種間では高い相同性がみられた。また、異品種菌株間の比較における微細な構成の差異は、その比較対象となる菌株間の系統的近縁関係を推測するのに有用と思われる。

WangおよびRaper (1970) は、スエヒロタケにおける2核菌糸と1核系統株のアイソザイム構成の差異を比較して、2核交配株で見出された活性バンドの減少を不和合性因子に起因する形質発現抑制によるものと説明した¹⁹⁾。Ross (1973) からもヒトヨタケ一種における同様な比較から、アイソザイム構成の差異と不和合性因子の挙動の相関性を指摘した¹⁵⁾。しかし、MooreおよびJirjis (1981) は、ネナガノヒトヨタケの場合、2核と1核系統株におけるアイソザイム発現の差異に何らの法則性も見い出せなかったと報告している¹³⁾。著者らのヒトヨタケ属2種における検討でも、2核化によって活性バンドが増減する両者の例が観察され、担子菌におけるアイソザイムの発現に対する不和合性因子の直接的関与を示唆する根拠は得られなかった。また、供試した1核系統株間の比較では、交配型の異同にかかわらずEST活性バンドの構成に微細な差異が認められた。

数種の供試担子菌の栄養菌糸体と子実体組織に見い出されたアイソザイム構成の差異は、子実体で活性バンドが増加するものと、減少する場合がみられた。MooreおよびJirjis (1981) も同様な観察から、菌株間における構成の相違の方が組織間にみられる差異よりも顕著である点を強調している¹³⁾。異種あるいは異品種菌株におけるアイソザイム泳動図の比較検討には2核栄養菌糸体を供試材料にすべきことが結論される。

摘 要

ヒトヨタケ属および数種の他属の担子菌のフェノールオキシダーゼ、酸性ホスファターゼおよびエステラーゼアイソザイムをアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。フェノールオキシダーゼアイソザイムの分析は、供試したヒトヨタケのいずれの種の菌株でも共通泳動位置の活性バンドが検出された。その他の活性バンドの構成は種あるいは品種間で特異性がみられた。酸性ホスファターゼはどの菌株でも広がりのある単一活性バンドが検出された。その泳動位置は種特異的で、品種間の差異はみられなかった。エステラーゼ活性は泳動ゲル上で4~16本の

活性バンドに分離され、供試菌の合計で28本のアイソザイムバンドが確認された。ヒトヨタケ属における本酵素の活性バンド構成は種あるいは同一種の異品種の順序で相同性が高くなったが、異品種間でもバンド構成の差異は明確であった。1核菌糸とその親株の2核菌糸にも活性バンド構成に微細な差異があり、2核栄養菌糸体と子実体の比較でも差異が観察された。これらの結果から、上記3種のアイソザイム泳動図の分析がヒトヨタケ属担子菌を同定あるいは識別する一手法として有用なものと結論された。

文 献

- 1) 青島清雄：日本林学会関東支部第32回大会講要集，105-106 (1980)
- 2) Bouchilloux, S., McMahill, P. & Mason, H.S. : J. Biol. Chem., **238** 1699-1707 (1963)
- 3) Cole, F. E., Blandin, J. & Temple, L. : Cell Tissue Kinet., **288** 281 (1968)
- 4) 今関六也，本郷次雄：原色日本菌類図鑑，保育社 大阪 (1957) pp. 1-181.
- 5) 今関六也，本郷次雄：続原色日本菌類図鑑 保育社 大阪 (1965) pp. 1-238.
- 6) Jolley, R. L., Jr., Robb, D.A. & Mason, H.S. : J. Biol. Chem., **244** 1593-1599 (1969)
- 7) 北本豊：実験生物学講座16，植物生理II。勝見允行，増田芳雄編 丸善 東京 (1983) pp.359-366.
- 8) 北本豊，細井登，市川吉夫：日本菌学会第19回大会講要集p.59 (1975)
- 9) Leonard, T. J. : J. Bacteriol., **106** 162-167 (1971)
- 10) Leonard, T. J. : J. Bacteriol., **111** 292-293 (1972)
- 11) Madhosingh, C. : Can. J. Microbiol., **16** 895-899 (1970)
- 12) Moore, D., Elhiti, M.M.Y. & Butler, R.D. : New Phytologist, **83** 695-722 (1979)
- 13) Moore, D. & Jirjis, R.I. : New Phytologist, **87** 101-103 (1981)
- 14) Rhaw, C.R. & Prasad, R. : Biochemical, Genetics, **4** 297 (1970)
- 15) Ross, I.K., Martini, E.M. & Thoman, M. : J. Bacteriol., **114** 1083-1089 (1973)
- 16) Royse, D.J. & May, B. : Mycologia, **74** 569-575 (1982)
- 17) Royse, D.J., Spear, M.C. & May, B. : J. Gen. Appl. Microbiol., **29** 205-216 (1983)

- 18) 鈴木勝彦：遺伝 **31** (11) 43-49 (1977)
- 19) Wang, C. & Raper, J.R. : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **66** 882-889 (1970)
- 20) Wood, D.A. : J. Gen. Microbiol., **117** 327-338 (1980)