

エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の チアミンとその分解因子について

栄井 明*・飯島 隆志

信州大学農学部 食品化学研究室

諸 言

担子菌類は、一般にチアミンを必須因子としており¹⁾、子実体における器官形成とチアミンとの関係については、アミスギタケの報告^{2,3)}があるが、エノキタケ (*Flammulina velutipes* Curt. ex Fr.) については、筆者らは未だにその報告を見ていない。

チアミンは、生体内で遊離型及びピロリン酸エステル型として存在し、後者は、細胞内に取り込まれた遊離型チアミンと ATP から合成され⁴⁾、クエン酸サイクルを中心とするエネルギー転換系を代表として、幾つかの重要な生体内物質代謝系に関与する酵素の補酵素として、生化学的役割を果たすことはよく知られている⁵⁾。

したがって、エノキタケの生活史とチアミンとの間に何らかの関連が存在するのではないかの期待があり、本実験では、エノキタケの生育過程における形態形成に着目して、チアミンとの関連を検討した。

又、生物界には、チアミンを分解する因子の存在が確認されており、一つは分解酵素チアミンナーゼ (アノイリナーゼ) であり^{6~7)}、他方は、チアミン分解耐熱性因子である^{8~10)}。

筆者らは、これらの面についても、エノキタケの生活史と関連させて検討したので、ここに結果を報告する。

材料及び方法

1 エノキタケの調製

(1) エノキタケの生育段階と調製 エノキタケの生育段階を、担子孢子 (stage 1)、一次菌糸 (stage 2)、二次菌糸 (stage 3)、原基形成 (stage 4~5)、子実体 (stage 6~10) に分け、それぞれの生育日数及び子実体の大きさを Table 1 に示した。

(2) 担子孢子 子実体に5°C前後の低温処理を施すことによって落下を促進し、これを集めた。

(3) 一次菌糸 子実体から分離して得た担子孢子を、Czapeck 液体培地により、20°Cで4週間振盪培養して得た。

(4) 二次菌糸 採取した担子孢子を Czapeck 液体培地に直接懸濁して、30°Cで2週間振盪培養して得た。

1981年4月2日受付

* 現在、科研薬化工業株式会社。本研究は栄井明が本学大学院農学研究科に在籍中に飯島と共同で行ったものの一部である。

Table 1. Growth of *Flammulina velutipes*

Stage No.	Days of Cultivation	Size of basidiocarps		
		Diameter (cm)	Length (cm)	
1				basidiospore
2				primary mycelium
3				secondary mycelium
4	45			rudiment
5	47			rudiment
6	49	0.1	2.5	} basidiocarps
7	52	0.2	5.0	
8	60	0.8	12.0	
9	68	2.5	16.0	
10	75	3.0	20.0	

2 チアミンの定量法

0.1N 硫酸酸性下で抽出し、パームチット吸着、フェロシヤン化カリウム酸化によるチオクローム法¹¹⁾で行った。日立 203 型蛍光光度計を用い、硫酸キニーネ 0.1N 硫酸水溶液を標準物質に用いて測定した。

3 チアミナーゼ活性測定法

藤田の方法¹¹⁾に準拠し、エノキタケと同量の0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて磨砕した後、遠心分離した上澄液を粗酵素液として使用した。

チアミナーゼ II は、粗酵素液 1 ml に 0.2M McIlvaine 緩衝液 2 ml, チアミン塩酸塩 1 ~ 4 μg を加えて所定の温度で一定時間反応させた後、10%メタリン酸 2 ml を添加し、10分間の沸騰浴で反応を停止させた。Blank 実験は、抽出液の10分間沸騰浴を行い、同様の反応を試みた。

チアミナーゼ I は、II の反応混合液に、最終濃度 10^{-3}M となるようにアニリン塩酸水溶液 0.5ml を加え、以下上記同様に反応させ、Blank 実験結果との差により、チアミンの損耗率を計算し、チアミナーゼ I 及び II の活性度とした。

4 チアミン分解耐熱性因子活性測定法^{8~12)}

抽出液は、チアミナーゼ活性測定の場合と同様にして得た。10分間の沸騰浴によって酵素を失活させた抽出液 1 ml に 0.2M McIlvaine 緩衝液 (pH7.0) 2 ml, チアミン塩酸塩 4 ~ 10 μg を加え、80°C で一定時間反応させた後、10%メタリン酸 2 ml を加えて反応を停止させた。

Blank 実験は、80°C で反応させなかったもの及び蒸留水で同様に反応させたものを用いた。分解活性は、加えたチアミンの分解率で示した。

5 SSB₁ 測定法

Murata の方法¹²⁾に準拠した。まず、抽出液は、チアミナーゼ粗酵素液と同様にして得た。抽出液 1 ml に 0.2M McIlvaine 緩衝液 (pH2.0) 2 ml, チアミン塩酸塩 5 μ g (A) を加え、80°C で 1 時間反応させた。この反応後、一方は 10% メタリン酸 2 ml を加えて反応を停止させ (B), 他方は、システイン 2 mg/ml を加えて、さらに 80°C で 1 時間反応させた後、10% メタリン酸 2 ml を加えて反応を停止させた (C)。

両者のチアミン量を定量して、 $(C-B)/(A-B) \times 100$ の計算結果を SSB₁ とした。Blank 実験は、抽出液のかわりに蒸留水を用いて同様に反応させて実施した。

実験結果

1 エノキタケの生育に伴うチアミンの量的・質的变化

Fig. 1 に示すように、担子胞子中に最も多量のチアミンが含まれ、しかも大部分がエステル型であった。次いで多かったのは、傘の組織中であった。

一次、二次菌糸では、エステル型、遊離型ともに僅かに存在するに過ぎなかった。

原基形成からチアミン含量は増加し、特に、最も生育の盛んな時期、すなわち、stage 4 から 6 にかけて傘に急激に増加し、stage 6 では傘に二次菌糸中に含有されるチアミンの 6 倍以上の量に達した。

傘で形成された担子胞子は、stage 7 から 8 にかけて落下が始まり、以後エノキタケの生育速度は衰え、同時にチアミン含量も減少したが、stage 9 以後では、チアミン含量に大きな変化がなかった。

どの生育段階でもエステル型が遊離型を上まわったが、担子胞子において特に著しかっ

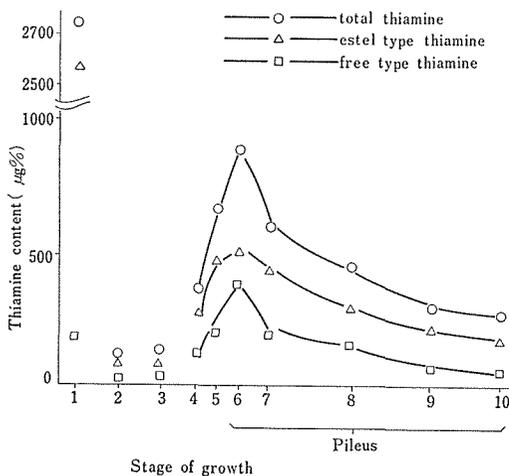


Fig. 1. Quantitative and qualitative changes of thiamine in *Flammulina velutipes*.

The stage of growth was depicted in Table 1.

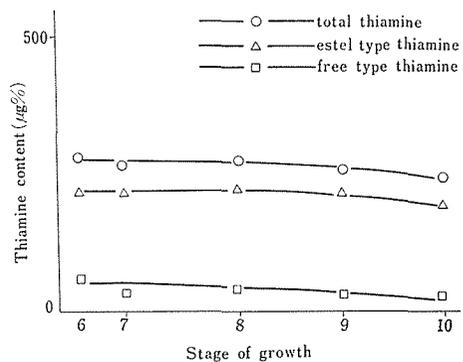


Fig. 2. Quantitative and qualitative changes of thiamine in the stalk of *Flammulina velutipes*.

The stage of growth was depicted in Table 1.

た。

茎部位のみについて同様の実験を行ったが、その結果を Fig. 2 に示した。茎として採取可能な stage 6 以後を測定した結果、各生育段階を通してチアミン含量に大きな変化がなく、又、エステル型と遊離型との比率にも変化が認められなかった。

なお、茎で示されたチアミン含量は、担子胞子の落下した stage 9 以後の傘のチアミン含量とはほぼ一致した。

2 チアミナーゼの検索

エノキタケ子実体、担子胞子、一次菌糸、二次菌糸におけるチアミナーゼ I 及び II は、藤田の方法¹¹⁾で繰返し検討した結果、いずれもその存在が確認されなかった。

3 チアミン分解耐熱性因子の検索

エノキタケに耐熱性のチアミン分解因子の存在することを確認した。

まず、傘部位について、分解活性の経時的変化を測定した結果を Fig. 3 に示した。これによると、反応時間60分までは直線的にチアミンを分解し、50分の反応で、加えたチアミンの半分を分解した。

各器官の組織中に含まれる汁液について、pH を変えて分解活性を測定した結果を Fig. 4 に示した。これによると、pH 6 以上で活性が認められ、pH の増加とともに活性を増大した。

温度を変えて行った同様の実験結果を Fig. 5 に示した。これによると、40°C 以上で分解

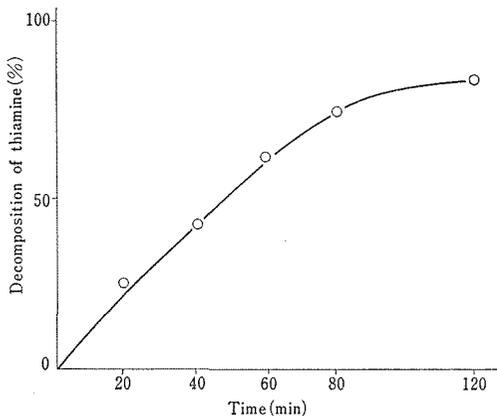


Fig. 3. Time course of the thermostable anti-thiamine activity in the pileus of *Flammulina velutipes*.

Reaction mixture, containing 2 ml of thiamine solution ($4\mu\text{g}$), 2 ml of 0.2 M McIlvaine buffer solution (pH 7.0) and 1 ml of solution containing thermostable anti-thiamine factor, was incubated at 80°C for various times.

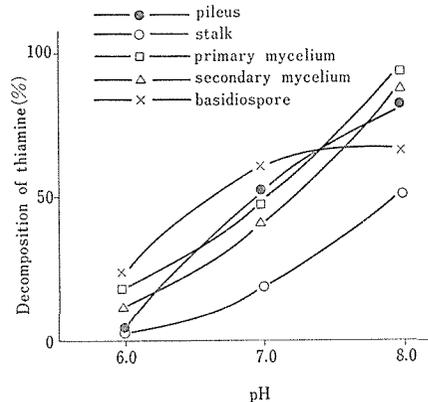


Fig. 4. Effect of pH on the anti-thiamine activity at each growth stage of *Flammulina velutipes*.

Reaction mixture, containing 2 ml of thiamine solution ($4\mu\text{g}$), 2 ml of 0.2 M McIlvaine buffer solution at various pH and 1 ml of solution containing thermostable anti-thiamine factor at each stage, was incubated at 80°C for 40 min.

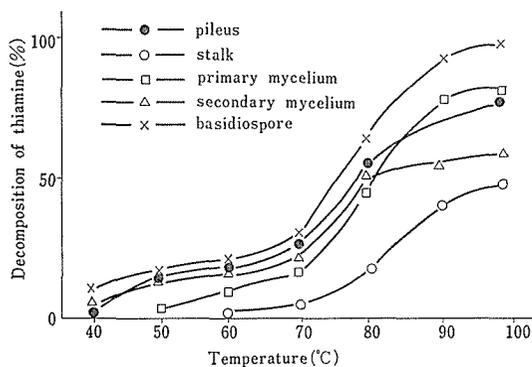


Fig. 5. Effect of temperature on the anti-thiamine activity at each growth stage of *Flammulina velutipes*.

Reaction mixture, containing 2 ml of thiamine solution (4μg), 2 ml of 0.2 M McIlvaine buffer solution (pH 7.0) and 1 ml of solution containing thermostable anti-thiamine factor at each stage, was incubated at various temperatures for 40 min.

活性を示し、以後温度の上昇と共に活性を増大した。

二価の金属イオン及び2, 3の化合物の影響に関する実験結果を Table 2 に示した。これによると、エノキタケに存在するチアミン分解耐熱性因子は、Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ag²⁺ によって活性化され、著しい阻害金属イオンは認められなかった。

一方、EDTA、システインによって阻害された。

4 エノキタケの生育段階における各器官中のチアミン分解耐熱性因子の活性比較
耐熱性因子によるチアミンの分解活性を、エノキタケの各器官について、それぞれ比較した結果を Table 3 に示した。

これによると、傘を100とした場合、茎で52、一次菌糸で71、二次菌糸で66、担子胞子は最高で150を示した。すなわち、分解活性は担子胞子、傘のものが大であった。

次に、この分解因子の活性が、エノキタケの生育段階中の各器官で異なる原因を知るために以下の実験を行った。

Table 2. Effect of several compounds on the thermostable anti-thiamine activity in the pileus of *Flammulina velutipes*.

Additive	Final conc. (M)	Activity remaining (%)
None		100
AgNO ₃	10 ⁻³	171
NiSO ₄	10 ⁻³	100
CuSO ₄	10 ⁻³	199
CaCl ₂	10 ⁻³	88
MgCl ₂	10 ⁻³	120
CoCl ₂	10 ⁻³	145
FeSO ₄	10 ⁻³	90
MnCl ₂	10 ⁻³	133
EDTA	10 ⁻³	30
Cysteine	10 ⁻³	0
Aniline	10 ⁻³	89

Reaction mixture, containing 2 ml of thiamine solution (4μg), 1.5 ml of 0.2 M McIlvaine buffer solution, 0.5 ml of 0.01 M solution containing several compounds and 1 ml of solution containing thermostable anti-thiamine factor, was incubated at 80°C for 40 min.

Table 3. The thermostable anti-thiamine activity at each growth stage of *Flammulina velutipes*.

Stage	Activity index
Pileus	100
Stalk	52
Primary mycelium	71
Secondary mycelium	66
Basidiospore	150

The thermostable anti-thiamine activity was measured at pH 7.0, 80°C for 40 min.

Table 4. Effect of several compounds on the thermostable anti-thiamine activity at each growth stage of *Flammulina velutipes*.

Additive	Final conc. (M)	Activity remaining (%)			
		stalk	primary mycelium	secondary mycelium	basidiospore
None		100	100	100	100
CuSO ₄	10 ⁻³	226	163	206	374
MnCl ₂	10 ⁻³	53	25	67	155
EDTA	10 ⁻³	40	10	10	0
Cysteine	10 ⁻³	0	0	0	0

Reaction mixture, containing 2.0 ml of thiamine solution (4 μ g), 1.5 ml of 0.2 M McIlvaine buffer solution (pH 7.0), 0.5 ml of 0.01 M solution containing several compounds and 1.0 ml of solution containing thermostable anti-thiamine factor at each stage, was incubated at 80°C for 40 min.

pHの影響: Fig. 4 に示すように茎と傘では pH 6 以上のみで活性が認められたが, 担子胞子, 一次菌糸, 二次菌糸では pH 6 以下でも活性が認められた。

温度の影響: Fig. 5 で示すように, 茎では 70°C 以上, 一次菌糸は 60°C 以上, 傘では 50°C 以上, 担子胞子, 二次菌糸では 40°C 以上で活性が認められた。

二価金属イオン及び 2, 3 の化合物の影響: 傘で影響の大きかった二価の金属イオン及び EDTA, システインの影響について比較した結果を Table 4 に示した。

これによると, 無添加区の活性を 100 とした場合, Cu²⁺区では, 担子胞子374, 茎226, 二次菌糸206, 一次菌糸163と, 傘と同様に著しく活性を促進した。

これに対し, M²⁺は担子胞子のみ 155 と促進したが, 二次菌糸67, 茎53, 一次菌糸25と逆に阻害した。又, EDTA, システインでは一様に阻害した。

SSB₁ への転換: 耐熱性因子によるチアミン分解反応により, チオクローム反応が陰性化した量のうち, システイン添加によるチオクローム反応の陽性化した量を, チアミンへの戻り量として, これを SSB₁ 量とし¹²⁾, その比率を表示したのが Table 5 である。

これによると, チアミン分解耐熱性因子によりチオクローム反応が陰性化した量のうち, 担子胞子では65.2%, 茎部位で47.7%, 傘部位41.2%, 一次菌糸39.5%, 二次菌糸34.1%の

Table 5. The compounds which have negative reaction of thiochrome and SSB₁ due to the thermostable thiamine decomposition factors in *Flammulina velutipes*.

Materials	Compounds which have negative reaction of thiochrome (%)	SSB ₁ (%)
Pileus	58.3	41.2
Stalk	48.2	47.7
Primary mycelium	58.9	39.5
Secondary mycelium	51.1	34.1
Basidiospore	68.5	65.2

戻り量が認められた。

考 察

まず、エノキタケの担子胞子から、一次、二次菌糸を培養し、さらに子実体を形成させて、この過程における各器官中に含有されるチアミンの量的、質的变化を検討し、エノキタケのライフサイクル、すなわち、器官形成とチアミンとの関連を明らかにしようと考えた。

本実験の結果、担子胞子中に最大量のチアミンが含まれ、次いで傘に多く、又、担子胞子中のチアミンの90%以上がエステル型であった。このことは、担子胞子の発芽に備えての合目的性を示唆した。

又、傘では、その形態が大になるにつれてチアミン含量が増加し、担子胞子が形成される時期に最大となり、担子胞子が落下するとともに、チアミン含量が減少したことは、菌糸や茎にチアミン含量が比較的少なく、しかも変動の少ないことと対比して、きわめて興味深いものがある。このことは、傘と茎が異った機能を有し、茎に比して傘が生理的に活発な動的組織を有することを示すものと考えられる。

担子胞子にチアミンを最大に含有することは、高等植物において種子にチアミンを多く含む¹³⁾こととよく似ている。ただし、高等植物の種子においては遊離型で蓄積され、発芽時にエステル型となるとの報告¹⁴⁾が多いが、エノキタケの場合の担子胞子が、常にエステル型の方が多いうことは、常に発芽し得る状態にあるものと推測され、高等植物におけるより、さらに動的であると考えられる。

次に、チアミナーゼ I, II について検索を行ったが、本実験では、傘、茎、一次菌糸、二次菌糸、担子胞子のいずれにも、それらの存在は確認できなかった。

しかし、チアミン分解耐熱性因子の存在は確認できた。この因子の活性は、傘にあるものを100とすると、担子胞子で150、茎、一次菌糸、二次菌糸で52~66で、前述のチアミン含量の多い器官に大であることがわかり、興味深いものがあるが、この分解因子の存在と、チアミンの存在との間の因果関係については不明である。

又、各器官で活性が異なることは、その因子の分布濃度の差によるものか、分解因子の本体が異なることによるものかを明らかにするために、pH、温度、二価金属イオン及び2, 3の化合物の影響を検討した所、共通点は多いものの、一部にばらつきがあり、特に、 Mg^{2+} が無添加区の活性を100とした場合、担子胞子のみ155と促進し、他は67~25と阻害した。

これらのことから、エノキタケに存在するチアミン分解耐熱性因子は、その濃度が各器官で異なることの他に、因子本体も複数ではないかとも推測された。この本体は、フラボノイド系なのか、フェノール類なのか、あるいは、その他の化合物なのか^{8~10)}についての検討は、今後に残された。

しかし、傘に存在するものを代表として、その性質を検討した所、経時的変化で、本実験の条件下では、60分まで直線的にチアミンを分解し、50分で50%の分解能力があった。

pHでは、6以上で活性が認められ、pHの増加で増大した。二価の金属イオンでは、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ag^{2+} で活性化され、著しい阻害金属は認められなかった。

又、EDTA、システインによって阻害された。これらのことから、この分解反応には金属

イオン及び酸化反応が要求されるものと考えられた。

なお、温度では、40°C以上で分解活性を示し、温度の上昇とともに活性を増加した。

次に、この分解因子によるチオクローム陰性化が、チアミンからSSB₁へ転換するものかどうかを検討するために、システイン添加によりチオクローム陽性化した比率を比較した所、最大の担子胞子で65.2%、最少は二次菌糸で34.1%であった。したがって、SSB₁への転換は30~60%ぐらいあると見て良いと思われる。

おわりに、人体への影響であるが、前述のように、人体温の37°C附近では、その分解活性は殆んど見られないので体内での分解は心配ない。且つ、かりに調理加熱により分解があっても、最大で50%までであり、しかもそのうちの30~60%はシステインによるチアミンへの戻りが考えられるため、栄養上の障害は考えられない。

エノキタケは、傘に多量のチアミンを含有する高チアミン含有食品であることに着目したい。

要 約

エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の生活史を、担子胞子、一次菌糸、二次菌糸、子実体として、それぞれに含まれるチアミンの量的、質的变化及び酵素的、非酵素的チアミン分解因子について検討を行った。

(1) エノキタケは、多くのチアミンを含むが、生育段階によって著しい差があった。含量は、担子胞子に最も多く、次いで子実体、この中で特に傘に多く、一次、二次菌糸に少なかった。

なお、子実体のチアミンは、生育につれて増加したが、担子胞子の落下に伴って減少した。又、遊離型チアミンに比して、エステル型がいずれの段階においても多かった。

(2) 本実験の条件下では、エノキタケにチアミンナーゼI、IIともに、それらの存在が確認できなかった。

(3) エノキタケにチアミン分解耐熱性因子の存在を確認した。この因子は、pH 6.0、40°C以上で活性が認められ、さらにCu²⁺、Mn²⁺などで活性が促進されたが、検討範囲では、著しい阻害金属イオンは認められなかった。一方EDTA及びシステインによって阻害された。

(4) エノキタケの傘、茎、一次菌糸、二次菌糸、担子胞子に含まれるチアミン分解耐熱性因子は、その分解活性及びその性質にやや差異が認められた。

本報告の一部は、昭和50年度日本農芸化学会で報告した。本研究に対し、御援助を戴いた食品化学研究室黒沢辰一助教授、建石耕一教官に対し厚く謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) 脇田正二：農化，28，707 (1954)
- 2) 北本 豊，堀越考雄，鈴木 彰：蛋白質核酸酵素，16，267 (1971)

- 3) 北本 豊, 葛西善三郎: 農化, **42**, 255 (1968)
- 4) H. MITSUDA, Y. TAKII, K. IWAMI, K. YASUMOTO, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **21**, 19, 189 (1975)
- 5) 能勢善嗣: ビタミン, **49**, 465 (1975)
- 6) 藤田秋治, 沼田 勇: 医学生物, **5**, 230 (1944), 日生他誌, **18**, 325, 339 (1944)
- 7) A. FUJITA: *J. Vitaminol.*, **18**, 67 (1972)
- 8) 川上 正: ビタミン, **7**, 1069 (1954), *J. Vitaminol.* **7**, 208 (1955)
- 9) 中林敏郎: ビタミン **8**, 410 (1955), **12**, 20 (1957), *J. Vitaminol.* **3**, 129 (1957)
- 10) 長谷川栄一: ビタミン **8**, 415, 421 (1955), *J. Vitaminol.* **2**, 31 (1956)
- 11) 藤田秋治: ビタミン定量法, 南江堂 pp.215~251. (1955)
- 12) K. MURATA, R. TANAKA, M. YAMAOKA: *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **20**, 351 (1974)
- 13) 茶珍俊夫: 阪生研報, **16**(2), 51 (1944)
- 14) 四元啓二, 堀井 聡: 食糧科学, **1**, 390 (1947)

**On the Thiamine in *Flammulina velutipes*
and its Decomposition Factors**

By Akira SAKAI* and Takashi IJIMA

Laboratory of Food Chemistry, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

In this report, we investigated the quantitative and qualitative relations of thiamine among the basidiospore, the basidiocarps, the primary and secondary mycelia in *Flammulina velutipes*, and its decomposition factors.

The largest amount of thiamine was found in the basidiospore, the next one was found in the basidiocarps.

The primary and secondary mycelia, however, contained very little amount of thiamine.

Further, the content of thiamine in the basidiocarps increased with a growth of it, but decreased after the dropping of the basidiospore.

The large amounts of ester-type thiamine rather than free-type one were detected in each growth stage of the basidiocarps.

Thiaminase I and II in *Flammulina velutipes* were not detected in our limited experimental conditions.

Finally, we observed the presence of the thermostable factors of thiamine decomposition in *Flammulina velutipes* at each stage.

The anti-thiamine activities of the thermostable factors in the basidiocarps were accelerated under the condition of pH 6.0, temperature above 40°C, addition of Cu^{2+} , Mg^{2+} , but were prevented by addition of EDTA and cysteine.

* Present address : Kaken Yakuka Kogyo Co., Ltd. Yamashina, Kyoto