

研究材料としての「シイタケ」の魅力

坂本 裕一

はじめに

シイタケ(図1左)は日本において古くから食されてきたきのこであり、スーパーなどでも気軽に購入できる、日本人にとってはなじみの深い食材である。また食用としての生シイタケだけでなく、出汁用の乾シイタケとしても利用されている。しかしながら、どのように栽培されているのか理解している人は意外と少ないのではないと思う。また、食品として消費される、いわゆる“きのこ”の部分以外のことはあまり知られていないのではないと思う。本稿では食材としてのシイタケの姿を含め、それだけではないシイタケの研究材料としての魅力と可能性について紹介したいと思う。

シイタケはいわゆる“きのこ”の仲間である。食用としている部分は胞子を作る器官である子実体(この部分が一般的にきのこと呼ばれる)であり、普段は菌糸で生活しているいわゆる“カビ”の仲間である。多くのカビは子実体であるが、シイタケを含むきのこ類の多くは担子菌である。シイタケは系統学的な位置が意外と定まっておらず、学名も *Lentinus edodes* から *Lentinula edodes* に変更されている。現在の *Lentinus* 属は *Lentinula* 属とは目のレベルで異なる分類群となっている。また、*Lentinula* 属になってからも科の再編が起こっており、最近もツキヨタケ科(Omphalotaceae)からホウライタケ科(Marasmiaceae)へと変更されている。*Lentinula* 属は日本にはシイタケ一種しかいないが、世界中では他に *L. raphanica*, *boryana*, *lateritia* などが知られている。また、ツキヨタケ科だっ

たことから分かる通り、有毒かつ発光性のツキヨタケと比較的近縁のきのこである。シイタケの菌糸は木材を分解して成長する。特に木材中のリグニンを分解できることから、白色腐朽菌と呼ばれている。木材を分解することで、ホダ木や菌床を用いた人工栽培が可能になっている。

国菌である麴菌同様、シイタケと日本人の関わりは古く、現在栽培されているきのこの中でも、もっとも古くから栽培されているきのこである。特にホダ木を用いたシイタケの栽培は千年以上の歴史があるとされている。初期には主に中国に輸出するために栽培されていたらしく、日本人が日常的に食用にするようになったのは、15世紀くらいからだと言われている。初期のシイタケ栽培は、鉋で傷つけた原木を野生のシイタケの胞子がかかる場所に置いておくことで植菌し、その後自然に発生するのを待つというやり方で栽培していたようである。森喜作氏が菌を培養して種駒と呼ばれる種菌を開発し、原木に打ち込んで培養することで安定的に栽培できるようになった(原木栽培:図2左)。種駒による栽培方法の開発にまつわる話は教科書にも載ったそうである¹⁾。現在は、木粉と栄養剤(米ぬかやふすまなど)を整形した菌床に植菌培養し、温度や湿度を制御した人工的な環境で子実体を発生させる菌床栽培が主流である(図2右)。それでも、エノキタケやエリンギなどと比較すると、栽培に時間がかかるうえ、生産者の経験や勘に頼る部分も多い。現在ホダ木で栽培されたシイ



図1. 明所で育てたシイタケ(左)と暗所で育てたシイタケ(右)

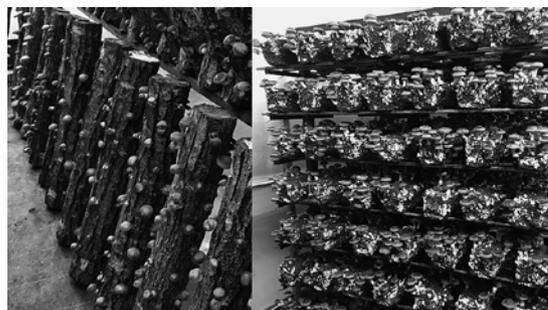


図2. シイタケの栽培方法の違い。(左)原木栽培(右)菌床栽培。

著者紹介 岩手生物工学研究センター生物資源研究部(主席研究員) E-mail: sakamoto@ibrc.or.jp

タケのほとんどは乾シイタケとして販売されて、生シイタケとして流通しているもののほとんどは菌床栽培のシイタケである。

シイタケの研究材料としての利点

研究材料としてのシイタケの特徴としてまずあげられるのは、食品としての魅力である。特に原木栽培で作られる乾シイタケは和食の出汁には欠かせない。乾シイタケには旨味成分としてグアニル酸が豊富に含まれている。一方、シイタケにはレンチオニンという香り成分が含まれており、独特の風味を持っているのが特徴である。また、シイタケは薬用としても利用されており、 β -1,3-グルカンであるレンチナン、ビタミンDやエルゴチオネンなどの機能性成分が含まれている。 β -1,3-グルカンであるレンチナンは β -1,3結合と β -1,6-結合の割合が5:2となっているシイタケ特有の β -グルカンである。レンチナンは免疫賦活活性があることから、胃がんの治療における化学療法において抗がん剤であるテガフルと併用されていた。現在では他に有効な治療法が進んだこともあり、レンチナンとしての販売は中止されている。一方近年では、レンチナンに大腸炎の抑制効果があることなども報告されている²⁾。シイタケの β -1,3-グルカンの機能性に関する研究は近年も多数報告されており、現在ではそれらの機能性成分に着目したシイタケの育種も行われている。

レンチナンはシイタケ収穫後に自己消化の過程で分解され含有量が減少することから、工場でのレンチナン原材料の生産が安定しなかったことと、生シイタケの流通の過程で品質が落ちることが問題になっていた。そこで、我々はレンチナン分解酵素を特定し、その遺伝子に変異が生じた菌株を選抜することによって、レンチナン分解が抑制された菌株を作出した。その過程で、シイタケが

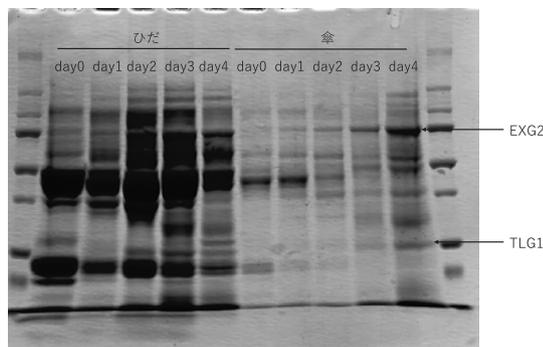


図3. 収穫後ひだと傘で分泌されるタンパク質のSDS-PAGE. 日には収穫後の日数。

糖質関連酵素 (CAZyme) の研究を行ううえで大きなアドバンテージがあることがわかった。その利点の一つが大きな子実体を作ることである。以前に紹介されていたウシグソヒトヨタケ³⁾のようなきのこ類では子実体が小さく子実体中の酵素を大量に調製することは比較的困難である。一方、シイタケは大量に栽培しやすく、酵素源として扱いやすい。さらに、収穫後に自己分解酵素を質、量共に大量に分泌する (図3)。そのお陰で、10種類以上の糖質分解酵素の精製および遺伝子の単離を行うことができた⁴⁾。それらの酵素のほとんどが担子菌類では初めて報告された酵素であった。特に新規のCAZymeとして、2種類のendo-glucanaseであるGH128 (GLU1)⁵⁾およびGH152 (TLG1)⁶⁾を明らかにすることができた。さらに、収穫後に大量に発現し、レンチナンを強力に分解する酵素であるGH55 (EXG2)を見いだした⁷⁾。また、収穫後に発現が上昇するキチン分解酵素の単離精製にも成功した⁸⁾。しかしながら、ゲノム上にはまだ多数のCAZymesがあることが明らかになっており⁹⁾、新規酵素の探索材料としての魅力は尽きない。

きのこ類においても植物と同様に交配育種が行われている。植物の場合は受粉による交配作業を行う訳であるが、きのこの場合は孢子由来の菌糸を用いて交配を行う。単孢子分離を行って単核の菌糸を得た後、交配型の異なる単核菌糸同士を対峙培養することで菌糸が接触したところから交配が起こり、子実体発生が可能な二核菌糸が得られる¹⁰⁾。菌でありながら交配によって育種が可能ところが麹菌とは異なり有利な点である。一方、古典的な交配技術が浸透しているせいも、麹菌のように分子生物学的なツールが普及しているとはいえない状況である。そこで、遺伝子組換え手法やゲノム情報を利用した育種手法を確立することが必要であった。シイタケにおいてRNAi法を確立し¹¹⁾、レンチナン分解酵素であるexg2遺伝子の発現抑制を行い、収穫後のレンチナン残存量が高まることを明らかにした¹²⁾。次にプロトプラストにUVを照射し、多数の変異株集団を作出した。変異株集団の中から、TILLING法を用いてexg2遺伝子に変異が生じた変異株を選抜した¹³⁾。TILLING法は目的の遺伝子に変異が生じた変異株を効率よく選抜する手法である。これまでUVや重イオンビーム照射などにより多数の変異株を取得しており、現在はそれらの中から目的の遺伝子を選抜することが可能となっている。一方、きのこ類の遺伝子は機能未知なものがほとんどであることから、今後は遺伝子機能の解明を目的とした基礎研究の発展が望まれる。

シイタケにおいてもゲノム情報が整備されつつあるこ

とから、連鎖解析や連鎖解析を用いることで育種に用いるマーカー開発や原因遺伝子を特定することが可能になっている。我々は長らく農林水産省のプロジェクトにおいて育種に利用可能なシイタケゲノムの整備に取り組んできた。育種に用いるゲノム配列の整備においては *de novo* アセンブルを行うだけでなく、連鎖解析手法によるミスアセンブルの特定や contig の整列化などを行っている。現在染色体ごとに整列化した contig 情報を整理しているところである。これまでに、シイタケの発生温度特性を決める QTL (量的形質: Quantitative trait locus) の解析を進めており、すでに一部の遺伝子領域についてマーカー化を行っている。また座乗する遺伝子の解析も進めており、今後は育種に利用するだけでなく、温度変化による発生誘導機構に関する基礎的情報が得られるのではないかと期待して研究を進めているところである。

日本においては、各メーカーにおいて長い育種の歴史があることが、他国と比較して有利な点ではないかと考えられる。すなわち、これまでの育種過程において蓄積された遺伝資源とゲノム情報を利用することにより、高度に選抜された栽培形質に寄与してきた遺伝子座を明らかにすることができるのではないかと考えられる。また、それらをマーカー化することにより、容易に栽培形質の優れた菌株を選抜することが可能になると考えられる。また、今後は上記で示したような変異株からの選抜を通して新たな形質を付与することも重要な課題であると考えられる。さらに、遺伝学的手法が洗練されることで、栽培形質などに関わる遺伝子などの解析が可能になり、モデル生物では解析しづらい生命現象を明らかにできるのではないかと期待している。

先に研究材料としてのシイタケの魅力の一つとして、子実体の大きさが酵素探索に有利だという話を書いたが、その大きさから研究対象として他にも興味を持たれることとして、ひだ形成と着色現象があげられる。シイタケの子実体原基は約 5 mm 程度の菌糸塊として菌床内に形成される (図 4a)。その状態ではまったく組織分化は起きていない (図 4b)。その後成長する過程で傘細胞の形成、表皮の着色、ひだ形成が起きる。特にひだの形成は原基内空洞ができ (図 4c)、そこにひだが形成されると同時に空隙が拡大し、最終的にひだが露出する。他のきのこ種よりも大型で観察しやすいことから形態形成の研究に用いるのに好適な材料であると考えられる。また、光照射により傘の着色が制御できることから、きのこの着色メカニズムの研究に利用できるのではないかと考えられる。シイタケを暗黒下で発生させると白色の子

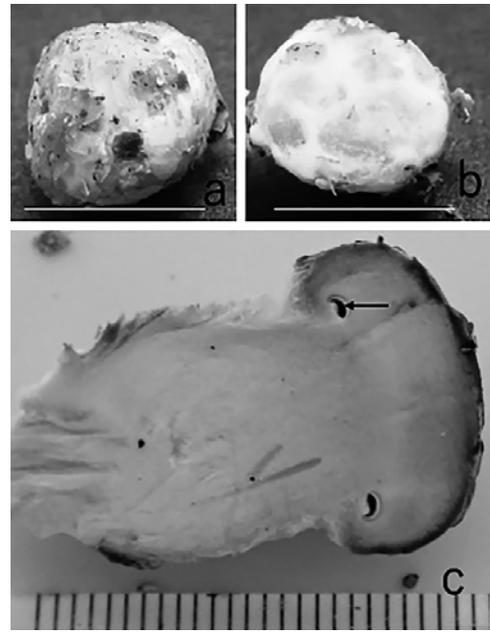


図4. (a) 子実体原基, (b) 原基断面, (c) 幼子実体断面 (矢印はひだになる空隙)

実体が形成され (図 1 右)、その後光を照射することで着色を誘導することができる¹⁴⁾。48時間程度で着色が完了することから、色素の解析や関連酵素の単離、制御メカニズムなどの解析が他のきのこよりも容易であると考えられる。

シイタケの研究材料としての難点

シイタケ研究の難しい点としては、子実体発生が他の栽培きのこ種と比較しても時間がかかること、および形質転換効率が悪いことから、遺伝子組換え実験が行いにくい点などがあげられる。また、ゲノム情報も十分に整備されているとは言い難い。そのためシイタケは他の栽培きのこ種と比較しても基礎研究が行いづらい菌種であると言える。

第一の難しさとして、シイタケは木粉を用いた菌床栽培かホダ木を用いた原木栽培でないとは基本的に子実体を発生させることができないことがあげられる。また他の栽培きのこ種の多くが1か月程度で子実体が発生させられるところ、シイタケの場合は3か月程度かかる (図 5)。このことはシイタケの強い風味などに影響を及ぼしていると考えられるが、研究を行ううえでは制約が多くなる。子実体発生までの培養日数がかかる原因の一つは菌糸蔓延から子実体発生までにかかる成熟期間が長いことがあげられる。一般的なシイタケ菌床では1か月程度で菌糸が全体的に蔓延するが、その後、子実体発生まで成熟期

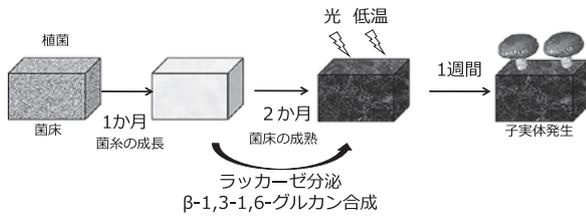


図5. シイタケ栽培における管理工程

間を2か月程度要する(図5)。その期間何が起きているかは明確になっていないが、一つはラッカーゼ分泌によるリグニン分解が起きていることがあげられる。シイタケは多くの木材腐朽菌が有するリグニンペルオキシダーゼを持っておらず、マンガンペルオキシダーゼ活性も高くない^{8,15)}。一方、ラッカーゼは10種類以上持っているが、ラッカーゼが分泌されるのは菌糸蔓延後となる¹⁶⁾。つまりリグニン分解過程で菌床の成熟が起こると考えられる。また、菌糸蔓延後に分泌されるラッカーゼ(Lcc1)の発現を抑制すると菌糸伸長に異常が起こるとともに、子実体発生も抑制される¹⁷⁾。また、ラッカーゼ抑制菌株では細胞壁中のβ-1,3-グルカンが合成されないことも明らかになっている¹⁷⁾。以上のことから、リグニン分解と子実体発生には重要な関わりがあり、シイタケは木材腐朽菌の子実体発生を考えるうえで重要なモデルになりうると考えている。基礎研究の対象としてのシイタケの難しさとして、基本的に寒天培地などで子実体発生ができない点もあげられる。菌株によっては寒天培地上で培養でき¹⁸⁾、かつ、その形質が遺伝することから、特定の遺伝子に起因していると考えられるが、現状ではその原因遺伝子は不明である。寒天培地上で子実体発生を誘導できれば、RNAなどの解析が容易になるうえ、基礎研究のテーマとしても興味深いと考えている。

第二の難点として、形質転換効率の悪さがあげられる。近年ウシグソヒトヨタケでゲノム編集が可能になり¹⁹⁾、その他栽培きのこ種や菌根菌などでもRNAiなどを用いた遺伝子発現抑制を用いた研究が進んできている。シイタケにおいてもRNAiによる発現抑制は可能であるが、実際には形質転換効率が良くないために、なかなか研究が進まない。また目的遺伝子にGFPなどの蛍光タンパク質を結合させて発現させることによるタンパク質の局在解析などもほとんど行われていない。今後はゲノム編集技術が多くのかきのこ種にも応用され、研究の発展が見込まれることから、シイタケにおいても形質転換効率を上げるための研究の重要性が高まってきていると考えている。

第三の難点として、異種発現による酵素生産が難しい点があげられる。近年きのか種を含む担子菌類の酵素解析において、メタノール資化酵母である*Pichia pastoris*や麴菌など用いた酵素の異種発現解析が行われるようになってきた。特にウシグソヒトヨタケにおいては、*P. pastoris*を用いた細胞壁関連酵素の解析が盛んである^{20,21)}。しかしながら、シイタケにおいては、なかなか異種発現がうまくいかないのが現状である。我々の研究室では、酵素ごとに最適な異種発現系を模索し、*P. pastoris*、麴菌、植物BY-2細胞など使い分けるため、研究に時間を要している。現在のところ、麴菌がもっとも成功率が高いと感じているが、今後改善していきたい点である。

第四の難点として、ゲノム情報が十分ではないことがあげられる。これまで複数の論文でシイタケゲノム情報に関する論文が発表されている^{22,23)}。また、森林総合研究所のHPにおいてゲノム配列情報が公開されている(ForestGEN)²⁴⁾。さらに、JGI (Joint Genome Institute)のプロジェクトで複数のシイタケゲノム配列情報が公開されている(MycCosm)²⁵⁾。一方、これまでの連鎖解析情報と既報のシイタケゲノム配列情報の整合性を確認したところ、明らかに別の染色体由来の配列が1本のcontigとしてつながるなどのアセンブルエラーが存在することが確認されている。すなわち、機械的なde novoアセンブルの情報のみで構築されたゲノム情報では育種に利用するうえで正確な情報が得られない可能性が考えられる。現在、RAD-seqを用いた網羅的な連鎖解析情報とde novoアセンブル配列情報を組み合わせ、より正確なシイタケゲノム配列構築を目指した研究を進めているところである。並行して、QTL解析やGWAS(genome wide association study)解析技術により、栽培形質に関わる遺伝子座を特定し、マーカーアシスト選抜ができるような基盤を構築しているところである。

第五の難点として、日本国内におけるシイタケの遺伝的多様性が低い可能性があげられる。シイタケにおいては栽培品種の遺伝的多様性が限定的である一方、中国では広い国土に多様なシイタケの系統が存在することが明らかになっている²⁶⁾。狭い日本国土で自生するシイタケの遺伝的多様性は低いのではないかと考えられる。また、日本では野生のシイタケと栽培品種との交雑も懸念されており、現在解析が進められているところである。以上のことから、従来の交配育種のみでは得られる形質に限界がある可能性が考えられる。そこで今後は遺伝子汚染の可能性も含めた国内野生シイタケ系統解析を行うとともに、変異株を利用した育種などを進めていく必要があると考えられる。また、併せて遺伝子情報を基にした品

種識別技術の必要性も感じている。

本稿の趣旨とは少し外れるが、現在日本におけるシイタケ栽培に大きな問題があり、ここに記載させていただきたい。現在原産地表記のルールとして、栽培全期間において管理されている時間が一番長い場所を原産地として表記できることになっている（長いところルール）。すなわち、中国をはじめとする外国で安く、かつ外国産の資材を利用して菌床を作製したのち日本に輸送し、日本で栽培すれば収穫されたシイタケは国産として表示できるということである（県内産として販売される事例もあるらしい）。現在国産材料を用いて作られた菌床により栽培されるシイタケについて、どんぐりマーク²⁷⁾をつけて消費者に伝えるような取組みが行われている。

おわりに

これまで記載してきたように、シイタケには特有の困難さも残っているが、可能性の大きい研究対象であると感じている（図6）。筆者らはさまざまな条件で変異処理を施したシイタケ菌株をストックしており、その中から特定の遺伝子に変異を生じた菌株を選抜し、品種まで育成することができている。今後は整備されたゲノム情報を用いることで、さらに加速的に育種を進めることができると考えている。また、シイタケは形質転換効率が低いながらも可能であり、他のきのこ種でゲノム編集が可能になっていることから、近い将来はシイタケでもゲノム編集が可能になると考えられる。そうすると、ターゲットとなる遺伝子の表現型をゲノム編集で確認し、変異株の中からターゲット遺伝子に変異が生じた菌株を選抜、栽培品種と効率よく交配育種を進め、新品種を育成する流れができる。そのためには今まで以上に基礎研究を重点的に行うことが必要となることが予想される。また、今後は企業のニーズにマッチした育種を進めていくため

に、企業と共同で基礎研究のテーマを探していく必要性を感じている。

シイタケの栽培技術の向上も今後の課題となると考えている。現在シイタケ栽培は主に企業からの指導のもと、生産者ごとのノウハウや経験に基づいて行われている。そのため同じ品種を用いても生産者間で収穫できるシイタケの発生量が大きく異なっている。そこで、今後は各種センサーやIoT技術を用いた栽培技術の向上が求められていると感じている。これまで培ってきた基礎的な知見を生かせるのではないかと期待している。

育種や生産技術の向上と並行して、消費者のニーズについても喚起していくことが重要だと考えられる。上述したように、シイタケにはβ-1,3-グルカンを含む機能性成分が含まれるうえ、まだ未解析の新規酵素が含まれている。今後は食品としてだけでなく、機能性成分や酵素源としてシイタケの利用を目指した研究も進めていきたい。

文 献

- 1) 森喜美男：われ農夫の祈りに開眼す，森産業 (2019).
- 2) Nishitani, Y. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e62441 (2013).
- 3) 村口 元：生物工学, **97**, 773 (2019).
- 4) 坂本裕一：日本きのこ学会誌, **19**, 73 (2011).
- 5) Sakamoto, Y. *et al.*: *Appl. Environ., Microbiol.*, **77**, 8350 (2011).
- 6) Sakamoto, Y. *et al.*: *Plant Physiol.*, **141**, 793 (2006).
- 7) Sakamoto, Y. *et al.*: *Curr. Genet.*, **48**, 195 (2005).
- 8) 坂本裕一ら：化学と生物, **55**, 6 (2017).
- 9) Sakamoto, Y. *et al.*: *Appl. Environ., Microbiol.*, **83**, AEM.02990-16 (2017).
- 10) 高木浩一ら 編著：実践的技術者のための電気電子系教科書シリーズ 工業技術者のための農学概論, p. 314, 理工図書株式会社 (2018).
- 11) Nakade, K. *et al.*: *Microbiol. Res.*, **166**, 484 (2011).
- 12) Konno, N. *et al.*: *J. Agricu. Food Chem.*, **62**, 8153 (2014).

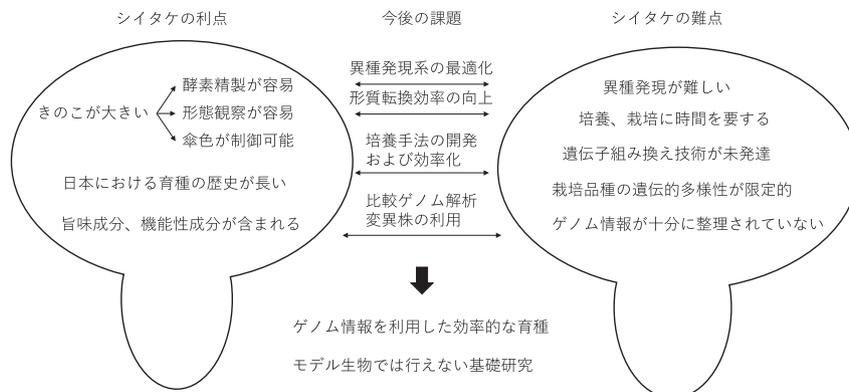


図6. 研究材料としてのシイタケの利点と難点、今後の課題

- 13) 坂本裕一ら：特許第6579862号 (2019).
- 14) Sakamoto, Y. *et al.*: *Fungal Biol. Rev.*, **32**, 236 (2018).
- 15) Sakamoto, Y. *et al.*: *Mycoscience*, **50**, 116 (2009).
- 16) Sakamoto, Y. *et al.*: *AMB Express*, **5**, 63 (2015).
- 17) Sakamoto, Y. *et al.*: *Fungal Biol.*, **122**, 1192 (2018).
- 18) 辻 智大ら：日本きのこ学会大会講演要旨集 **14**, 93 (2010).
- 19) Sugano, S. S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 1260 (2017).
- 20) Niu, X. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 6958 (2016).
- 21) Liu, Z. *et al.*: *Carbohydr. Polym.*, **194**, 339 (2018).
- 22) Chen, L. *et al.*: *PLOS One*, **11**, e0160336 (2016).
- 23) Shim, D. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **223**, 24 (2016).
- 24) ForestGEN: <http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/jp/index.html> (2020/04/06).
- 25) JGI MycoCosm: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home> (2020/04/06).
- 26) Xiao, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 36789 (2016).
- 27) 株式会社北研： <http://www.hokken.co.jp/acorn.html> (2020/04/06).