

## 論 文

*Lentinus edodes* に与える交流定電圧の作用

工 藤 行 蔵\*, 水 戸 部 一 孝\*\*, 吉 村 昇\*\*

(1999年4月21日受付, 1999年6月16日受理)

Electrical Stimulated Multiplication of *Lentinus edodes*

Kozo KUDO,\* Kazutaka MUTOBE\*\* and Noboru YOSHIMURA\*\*

(Received April 21, 1999; Accepted June 16, 1999)

The synthesis of clump, as well as the multiplication of *Lentinus edodes* in a growing medium was sensitive to AC voltage. When AC voltage at various levels was each applied to different strains at zero time, mycelial growth and clump synthesis were hastened at 95 and 190 V, but did not at 300 V. However, addition of etylenediaminetetraacetic acid and sodium dodecyl sulfate in the same medium did not have any stimulative effect on either mycelial growth or clump synthesis.

## 1. はじめに

1989年、それまで原木で栽培されていたシイタケは、人工的な条件—菌床<sup>1)</sup>—で通年の栽培が可能となった。菌床栽培とは、滅菌したチップやバカスなどの培地基材から成る菌床にシイタケ菌 *Lentinus (L.) edodes* の胞子を接種して、培養することである<sup>1)</sup>。その際、胞子から発芽後生育した一次菌糸体の増殖を促すため、菌床にコメヌカ、フスマや水などの化学的な養分の添加ならびに光の照射、湿度の調整や温度管理などの物理的な処理がとられる<sup>2)</sup>。本菌は増殖した一次菌糸体が互いにからみ合う2核をもつ栄養菌糸体に生育後、そこにつくられる子実体原基に子実体を產生し、その成熟にともない胞子を形成する生育サイクルをもつ。従って、シイタケの高収穫のためには経験にもとづく化学的ないし物理的な処理が栽培者に要求される。コメヌカなど以外の種々な化学的処理に関する報告<sup>3)-5)</sup>は多いが、物理的処理の一つとして、大森<sup>2)</sup>や吉村ら<sup>6)</sup>はシイタケ原木に対する1.5 kV 高電圧パルス(50 Hz)や8~16 kV 衝撃電圧(波長頭 2,500 μ s)の有効性を報告している。また、本菌の一次菌糸体への交流定電圧(50 Hz)の好影響を木田ら<sup>7)</sup>は述べている。更に、菌床へ交流電圧(50 Hz)を印加し、シイタケ子実体の高発生に至適な電気

効果のパラメータの存在を水戸部ら<sup>8)</sup>は推察している。しかし、*L. edodes*に対する電気刺激の作用は明らかでない。生体に対する高電圧パルス(500 V/cm)の効果は明らかにされており、新しい機能をもつ細胞をつくる方法は確立している<sup>9,10)</sup>。そこで、我々はそれらの知見にもとづいて、*L. edodes* の一次菌糸体に及ぼす交流定電圧の作用を考えた。

## 2. 実験材料と方法

2.1 *L.edodes* の一次菌糸体の調製

*L. edodes* (松原椎茸(株))はペトリ皿(直径 9 cm, 日水(株))にとった 15 mL SMY 寒天培地(1% sucrose, 1% malt-extract, 0.4% yeast-extract や 1.5% 寒天)に接種し、25°C, 暗所で培養した。培養時間に比例し、本菌の菌糸体は接種部から培地表面に薄膜をつくるように同心円状に増殖した。8日後、菌糸体は直径 8 mm のコルクボーラーで寒天培地ごと打ち抜き、種菌糸体とした。更に、種菌糸体は新鮮な同培地の表面に敷いたガーゼ(イワッキ(株))上に接種し、同様に培養した。この条件下でも、本菌はガーゼのない対照と同じく上述のように増殖した。8日目に、菌糸体が付着したガーゼは培地表面から剥ぎとり、1.5 × 2.0 cm の大きさにメスで切った。それらは培地成分を除去するため、100 mL 生理的食塩水(生食水)に2時間浸し、一次菌糸体とした。浸漬中、ガーゼから菌糸体の可視的な剥離はみられなかった。なお、SMY 寒天培地、生食水、ガーゼや実験器材などは 121°C、15 分間高圧蒸気滅菌した。

キーワード：電気刺激, *Lentinus edodes*, 一次菌糸体, クラムプ, 増殖

\*秋田大学医学部微生物学教室(010 秋田市本道 1-1-1)  
Department of Microbiology, Akita University School of Medicine, 1-1-1, Hondo, Akita 010, Japan  
\*\*秋田大学工学資源学部電気電子学科(010 秋田市手形学園町 1-1)  
Department of Electrical and Electronic Engineering, Faculty of Engineering and Resource Science, Akita University, 1-1, Tegatagakuen-machi, Akita 010, Japan

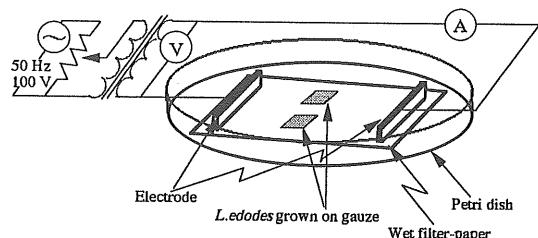


図1 *L. edodes* へのAC定電圧印加装置の概略  
Fig. 1 Experimental setup of application for AC voltage on *L. edodes*.

## 2.2 交流定電圧の印加、界面活性剤での処理及び栄養菌糸体の調整

印加装置は生食水を浸した  $4.0 \times 8.0$  cm 濾紙(No. 2, 東洋濾紙(株))をペトリ皿に敷き, その両端に  $1.2 \times 7.0$  cm ステンレス製電極(SUS 304, ニコラ(株))を平行に配した(電極間距離 5.0 cm)もので, その概略は図1に示す。一次菌糸体は電極間に置き, スライダックで調整した交流定電圧(50 Hz)を30秒間, 室温で印加した。印加の有無の一次菌糸体は SMY 寒天培地から寒天を除いた100 mL SMY 液体培地に入れ, 室温で振盪(振盪数, 30 rpm)した。1時間後, ガーゼを取り除いた同培地は菌糸体培養液とし, 25°C, 暗所で静置培養した。また, 界面活性剤の影響を見るため, 一次菌糸体は 0.1% エチレンジアミン四酢酸塩(ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH7.2)なし  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  ドデシル硫酸塩(sodium dodecyl sulfate (SDA))を加えた100 mL 同培地で上述の様に処理後, 静置培養した。なお, 全ての操作はクリーンベンチで行い, EDTA や SDA は別に高圧蒸気滅菌して所定の濃度になるよう液体培地に加えた。

## 2.3 栄養菌糸体量の測定

静置培養後, 菌糸体培養液は遠心分離(3,000 rpm, 15分)し, 得られた栄養菌糸体分画は生食水で3回遠心洗浄後, 100 mL 同水に懸濁した。懸濁液中の栄養菌糸体はオムニミキサー(17200, サーバル(株))で破碎し, その40 mL 破碎液は 105°C で乾燥後, 秤量した。なお, 100 mL 破碎液から二つの乾燥菌糸体を作製した。この実験は3回行い, 交流定電圧の効果の判定は ANOVA で行った。

## 2.4 栄養菌糸体の観察

2.3 で得た種々な懸濁液の少量はガラス片に塗抹, 乾燥, 固定した。それらは 2.5 % グルタルアルデヒド液で前固定し, 1 % 酸化オスミウム液で後固定した。更に, 40 ~ 99.5% 段階的に希釈したエチルアルコール液で脱水

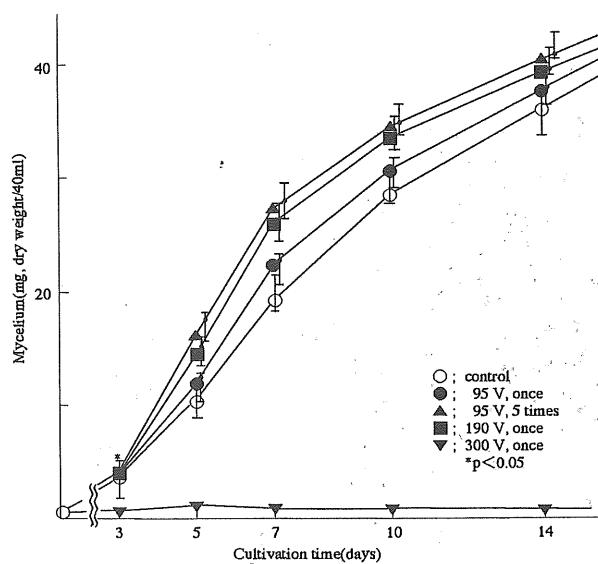


図2 *L. edodes* に及ぼす交流定電圧の効果

Fig. 2 Effect of AC application on the multiplication of *L. edodes*.

したそれらは乾燥後に金を蒸着後, 走査型電子顕微鏡(S 700, 日立(株))で観察した。

## 3. 結 果

### 3.1 *L.edodes* に対する交流定電圧の影響

*L.edodes* に及ぼす交流定電圧の効果を見るため, 95 V, 1と5回, 190 V, 1回および300 V, 1回の交流定電圧を印加の有無の一次菌糸体は各々液体培養し, 菌糸体を秤量した。なお, 30秒間の印加, 30秒間の無印加を1回の印加とした。細菌学的に, *L.edodes* は真菌に属し, その一次菌糸体は出芽増殖形式により個々の細胞が連結した糸状に伸長するように増殖後, 他の菌糸体と接合(結合)により栄養菌糸体に生育する<sup>2)</sup>。培養後, 本菌は培養初期(約7日目)で可視的な糸状を呈し, ほぼ10日(種菌糸体からの培養期間を含めて26日目)以降それらは接合により凝集塊のような栄養菌糸体に生育した。図2に示すように, 対照の菌糸体量は3日目で3.4 mg/40 mL, 5日で10.6 mg/40 mL, 7日 19.2 mg/40 mL, 10日 24.8 mg/40 mL および14日 36.5 mg/40 mL で, 培養時間とともに増加した。一方, 95 V, 5回の印加のそれは3.6, 16.4, 25.6, 33.8 および39.6 mg/40 mL と対照より高値で, 190 V, 1回でもほぼ同じ傾向を示した。また, 95 V, 1回での増殖は対照をやや上回ったが, 300 V, 1回のそれは完全に抑制された。図示しないが, 95, 190 および300 V, 1回の印加での電流値は各々 14.5 ~ 16.5, 34.0 ~ 37.0 お

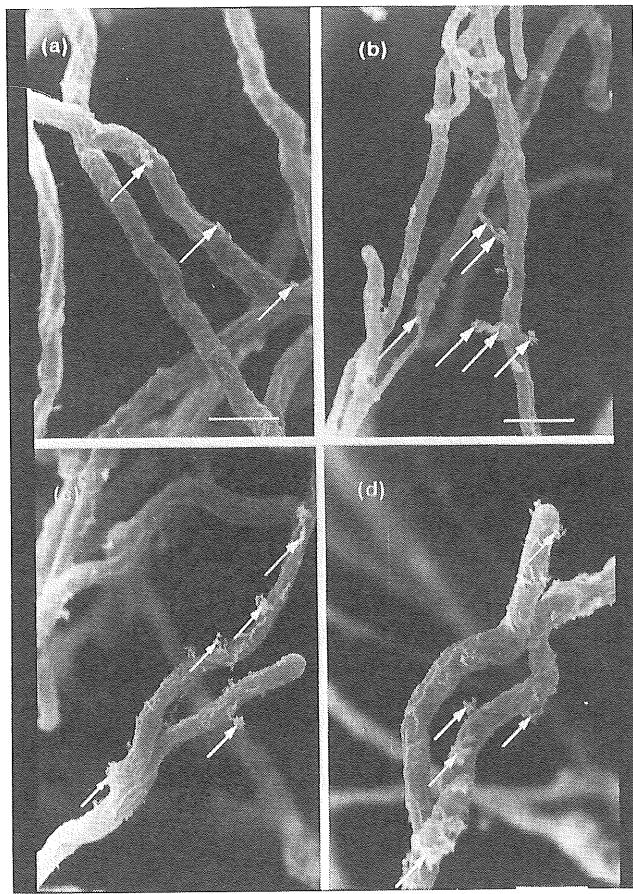


図3 交流定電圧印加した*L. edodes* の菌糸体(培養10日目)

a, 対照; b, 95 V, 1回; c, 95 V, 5回; d, 190 V, 1回。矢印はクランプを示す。白線は5 μm。

Fig. 3 Scanning electron micrographs showing *L. edodes* applied AC voltage(cultivation for 10 days). Arrow expresses the clump. Abbreviations: a, control; b, 95 V, once; c, 95 V, 5 times and d, 190 V, once. White bar is 5 μm.

より79～80 mAであった。これらの結果は、交流定電圧を印加後SMY寒天培地で菌糸体の伸長をみた木田らの報告<sup>7)</sup>とほぼ一致した。これらのことから、95および190 Vの交流定電圧は本菌の機能—蛋白合成、DNA合成や細胞膜透過性などに影響し、特に一次菌糸体の増殖を促進し、栄養菌糸体への生育を促すように作用するが、300 Vの電場は誘電体である本菌の細胞膜の一部に損傷を与え、原形質分離を招くと考えた。

### 3.2 交流定電圧による*L. edodes* の菌糸体の形態学的な変化

交流定電圧が*L. edodes* の機能を促進させる作用について、形態学的な面から検討した。そのために、95 V, 1ならびに5回、190 V, 1回を印加した一次菌糸体は液

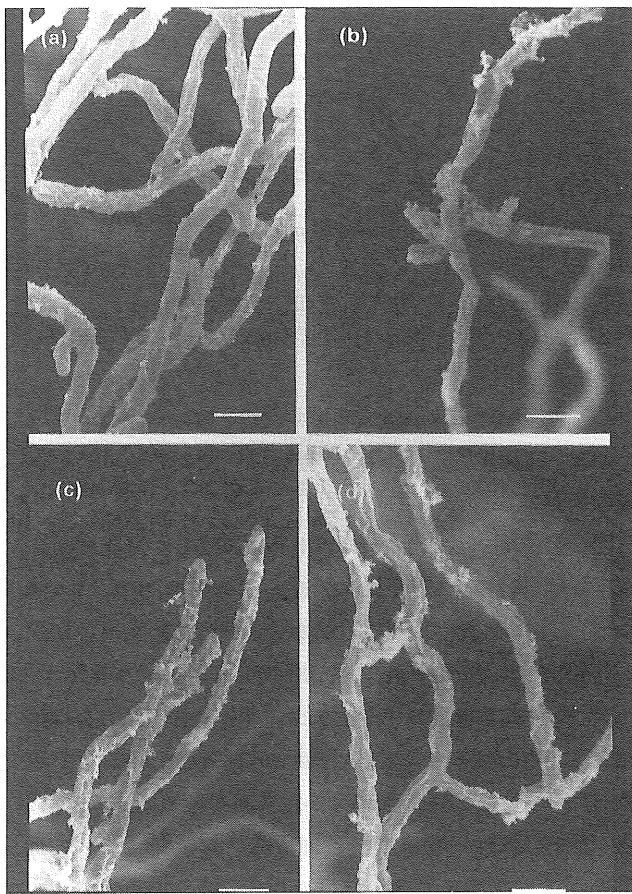


図4 交流定電圧による*L. edodes* の菌糸体(培養14日目)

a, b, c, dや白線は図3を参照。

Fig. 4 Micrographs of *L. edodes* applied AC voltage (cultivation for 14 days).

Abbreviations; See footnote in Fig. 3.

体培養し、生育した栄養菌糸体は電顕試料とした。形態学的に、栄養菌糸体はクランプ—他の菌糸体と接合(結合)する部位—と称する突起物を菌糸体の細胞間の表層につくる特徴をもち、一次菌糸体とみわけられる<sup>2)</sup>。培養10日目(種菌糸体からの全培養期間26日目)の結果を図3に示す。95 V, 1回(図3b), 5回(図3c)および190 V, 1回(図3d)の印加ないし対照(図3a)のいずれでも糸状に伸びた菌糸体の表層にクランプの形成がみられ、特に印加によるその形成は対照と比べて顕著で、僅かな栄養菌糸体も観察された。更に培養14日後、95 V, 1回(図4b), 5回(図4c)および190 V, 1回(図4d)でのクランプの形成や栄養菌糸体への生育は対照(図4a)ないし10日目のそれら(図3b, cとd)よりも多く、電圧に比例した。これらの条件下で、本菌は培養後約10日目にクランプの形成や栄養菌糸体に生育すると共に、それらの交流定電圧は一次菌糸体の細胞の機能、特に細胞の物質代謝を刺激する

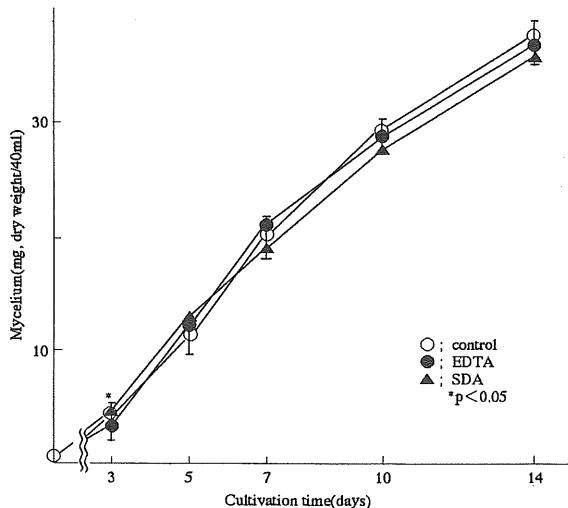


図5 *L. edodes* に及ぼすキレート剤の効果  
Fig. 5 Effect of chelating agent added at zero time on *L. edodes* growth in SMY broth.

ように作用し、クランプの形成や栄養菌糸への生育を促すと考えた。

### 3.3 *L. edodes* に与える界面活性剤の影響

交流定電圧が *L. edodes* の一次菌糸体の機能を促進させる作用と比較するために、大腸菌や黄色ぶどう球菌などの細胞表層の成分に影響を与える界面活性剤の効果について検討した。EDTA や SDA などの界面活性剤は特異的に細菌の細胞膜の合成に変化を与え、透過性に影響を及ぼすと共に細胞表層にリポ多糖体とリポ蛋白複合体から成る突起物—クランプ様の物質—をつくり、最終的に致死的に作用する。しかし、蔗糖などの浸透圧調整剤の存在下では細胞壁を消失したスフェロプラストや L-型菌に変わることが明らかにされている<sup>11, 12)</sup>。そこで、一次菌糸体は EDTA ないし SDA の界面活性剤を添加した SMY 液体培地で培養し、図2と同様に処理した。その結果を図5に示すが、本菌の増殖は EDTA や SDA によりなんらの影響を受けず、対照のそれと同様に培養時間に比例し、培養後ほぼ 10 日目に栄養菌糸に生育したが、両剤は培養後 14 日目でも殺菌的に作用しなかった。図に電顕観察の結果を示さないが、両剤で処理した本菌のクランプの形成や栄養菌糸への生育は 培養全期間対照のそれらに酷似した。両界面活性剤の効果はより高濃度での検討が必要だが、それらは細菌と異なる真菌に対して非感受性と考えた。

### 4. 考 察

2 電極間に置いた細胞に与える低電圧電場(<500 V)の効果は明らかでないが、細胞の機能—DNA 合成、蛋白合

成、膜透過性、細胞増殖、神経細胞の軸索伸長など—が変化し、その作用は細胞膜につくられた荷電の分極のため膜成分が変性して透過性が変わるとされている<sup>9, 10, 13, 14)</sup>。図2, 3と4のように、95ないし190Vの交流定電圧は *L. edodes* の機能を促進させるように作用し、クランプの形成や栄養菌糸への成長を促した。これらのことから、交流定電圧は細胞膜の構成成分に荷電の分極をつくり物質の透過性に影響を与えるのか、または細胞膜に荷電の分極をつくりその一部の損傷により細胞外の物質を取り込み、損傷部の修復後に形質が変化すると考えられた。しかし、後者の考え方は印加後の一次菌糸体の増殖、クランプの形成や栄養菌糸への生育が対照のそれ以上であること、または本菌の世代時間が細菌のそれとくらべて大きいので、損傷部に修復機構が作動する前に原形質分離を招き易いと推察されることなどから妥当性を欠くと考えた。そこで、界面活性剤について検討したが、EDTA や SDA の存在下で、一次菌糸体の増殖、クランプの形成や栄養菌糸への成長は対照のそれらと同様であった(図5)。この結果はさらなる検討を要しようが、細胞壁にムレインなどを欠き、真核細胞群に属する *L. edodes* の生理学的性状が原核細胞群に入る細菌のそれと異なるためと考えた。従って、当結果と共にそれらの知見から、95ないし190Vの交流定電圧は本菌の細胞膜の構成成分に微少な荷電の分極をつくり、膜のイオンチャネルに異常をもたらし物質透過性を向上させる結果、クランプの形成や栄養菌糸への生育を促すが、300 V の電場は細胞の荷電の分極の拡大により細胞膜の一部を誘電破壊し、致死的に作用すると考えた。シイタケの原木<sup>6)</sup> や菌床<sup>8)</sup>の報告ではいかなる生育環の本菌に電気刺激を与えたのか明らかでないが、交流定電圧は確かに *L. edodes* の一次菌糸体の機能に影響を及ぼした。

### 5. おわりに

*L. edodes* に与える交流定電圧の作用について基礎的に考察した。当結果は、電気刺激が本菌の機能を促す物理的な処理としての妥当性を示すだろう。しかし、電気刺激はシイタケ子実体の形質に変化を与えないのか、菌床栽培が可能な他の食用キノコにも同じ効果もたらすのかなど検討を要するだろう。

本実験に助力して頂いた本学医学部・佐々木仁倫君、本原稿作製に協力して頂いたに本学医学部・伊藤玲悦君に深謝します。本実験は東北インテリジェント・コスモス協議会のシーズ研究の一部で行った。

## 参考文献

- 1) 大森清寿：菌床シイタケのつくり方，p 31，農村漁村文化協会(1993)
- 2) 大森清寿：植物生産システム実用事典，p 1385，フジテクノシステム(1989)
- 3) 村尾沢夫：日本農芸化学会誌，63(1989)874
- 4) 青柳康夫，春日敦子，佐々木弘子，松沢睦子，伝川祐子，川井英雄：日本食品工業学会誌，40(1993)771
- 5) H. Yoshida, S. Fujimoto and J. Hayashi : Trans. Mycol. Soc. Jpn., 32(1991) 439
- 6) 吉村 昇，高橋繁喜，高橋重雄：電気学会誌，11 (1987) 44
- 7) 木田正彦，宮城栄二郎，鈴木雅史，吉村 昇，鈴木隆広，工藤行蔵：平成7年電気学会全国大会講演論文集 3, p. 3-197(1995)
- 8) 水戸部一孝，佐藤忠雄，鈴木隆広，吉村 昇：静電気学会誌，21(1997) 275
- 9) U. Zimmermann : Biochem. Biophys. Acta., 694(1982) 227
- 10) A. Kurischiko and H. Berg : Bioelectrochem. Bioenerg., 15(1986) 513
- 11) K. Nakajima and J. Kawamata : Biken J., 11 (1968) 149
- 12) K. Kudo, T. Suto and Y. Amano : Agric. Biol. Chem., 398(1975) 729
- 13) E. K. Onuma : J. Cell Biol., 106(1988) 2067
- 14) H. Gross, E. Bauer and H. Berg : Bioelectrochem. Bioenerg., 20(1988) 279