

森林総合研究所

交付金プロジェクト研究 成果集 19

機能性を強化したきのこの成分育種
及び栽培技術の開発

独立行政法人 森林総合研究所

2007. 12

序 文

日本の食用栽培きのこの2005年の総生産量は39万4千トン、生産額は2,164億円であり、農林水産省統計部の生産林業所得統計によれば、きのこは林業の粗生産額の5割近くを占める。中山間地の農林家の複合経営の基幹作物として取り入れられたきのこ栽培は、種菌の不活着や病虫害の発生など困難な問題もあったが、農山村の貴重な収入源となって定着し、これが間接的に里山林の整備や森林の公益的機能の維持にも重要な役割を果たしてきた。しかし、近年、大規模生産企業の参入や中国産シイタケの輸入増加によってきのこの市場価格が低迷し、中小のきのこ生産者の経営を脅かしている。培地基材の転換、栽培期間の短縮化、収穫の効率化などの経営の合理化に取り組むだけでは、きのこ栽培の存続が困難な状況になっている。

中山間地のきのこ栽培の存続、安定生産を維持するためには、低価格の外国産や大手企業産との差別化を図り、消費者に納得して貰える安全で良質なきのこを安定供給できる地産地消の体制づくりが必要と考えられる。きのこは食物繊維のほか、種類によって血圧降下、認知症の防止、抗腫瘍などの機能性成分を含有することが認められている。これらの機能性を強化したきのこを摂取することは生活習慣病やがんの予防になり、医療費の削減に繋がる。きのこ特有の機能性成分を高含有する育種素材の選抜や成分育種を行い、中山間地のきのこ栽培品種・系統を、健康増進機能を持つ、高付加価値の品種・系統へシフトを進め、また地方独自の新規栽培きのこを導入することにより、競争力を有する産業構造へ転換を図っていくことが必要である。

これまで、きのこの野生株や品種で機能性を分析した研究は行われているが、きのこの機能性・嗜好性成分を高める成分育種や栽培技術の開発に関しては、シイタケのエリタデニン含量を高める栽培・育種技術の開発が行われているに過ぎない。本研究「機能性を強化したきのこの成分育種及び栽培技術の開発」は、平成16年から平成18年までの3カ年にわたり、北海道立林産試験場、長野県林業総合センター、三重県科学技術振興センター林業研究部、福岡県森林林業技術センター、静岡大学農学部、九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門の参加を得て、以下の3課題について森林総合研究所が実施したものである。

- (1) 機能性を強化したきのこの成分育種
- (2) きんこの機能性を高める栽培技術の開発
- (3) きんこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発

この研究成果は、きのこ類等の特用林産物生産の持続・安定化による中山間地域の活性化を図る上で、貴重な知見を与えるものと考え、ここに本書を刊行し、広く関係者に供する次第である。

平成19年 12月

独立行政法人 森林総合研究所
理事長 鈴木 和夫

研究課題：機能性を強化したきのこの成分育種及び栽培技術の開発

目 次

研究の要約 - - - - -

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

- a. 血圧降下作用をより高めたブナシメジの育種 - - - - -
- b. ヤマブシタケの成分育種 - - - - -
- c. 血圧降下作用をより高めたハタケシメジの育種 - - - - -
- d. エストロゲン様活性をより高めたマンネンタケの成分育種 - - - - -
- e. マンネンタケのエストロゲン様活性成分の機能性探索 - - - - -

第2章 きのこの機能性を高める栽培技術の開発 - - - - -

第3章 きのこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発 - - - - -

研 究 の 要 約

I 研究年次及び予算区分

研究年次：平成 16～18 年（3 カ年）

予算区分：運営費交付金（交付金プロジェクト）

II 主任研究者

主査：きのこ・微生物研究領域長

石原 光朗（平成 16 年 4 月 1 日～平成 19 年 3 月 31 日）

副主査：

取りまとめ責任者：微生物工学研究室長 関谷 敦

III 研究場所

森林総合研究所、本所・九州支所

北海道立林産試験場

長野県林業総合センター

三重県科学技術振興センター林業研究部

福岡県森林林業技術センター

静岡大学農学部

九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門

IV 研究目的

ブナシメジ、ハタケシメジ、ヤマブシタケ、マンネンタケのきのこ特有の各種機能性成分を高める成分育種及び栽培技術の開発、生シイタケの免疫多糖（レンチナン）含量を高める栽培技術の開発、及び嗜好に応じて乾シイタケのニオイ成分量を制御できる栽培技術の開発を行う。

機能性成分を高含有するきのこ交配親菌株と子実体収量や形質の優れた系統等との交配株について、菌糸体生長量、子実体の収量と形質、機能性成分量等进行分析して優良菌株・新規交配親菌株の選抜を行う。きのこの機能性成分として、ブナシメジとハタケシメジはアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性、ヤマブシタケはヘリセノン類、マンネンタケはエストロゲン様活性を対象とし、北海道がブナシメジ、三重県がハタケシメジ、長野県と静岡大学がヤマブシタケ、福岡県と九州大学がマンネンタケの各きのこの成分育種と栽培技術の開発をそれぞれ分担する。レンチナン含量の高いシイタケ菌株を選抜し、レンチナン含量を高める栽培技術を明らかにする。森林総合研究所・微生物工学研究室がシイタケ菌株の選抜と栽培技術の開発を、静岡大学が子実体のレンチナン含量の分析を担当する。森林総合研究所・九州支所はシイタケの担子孢子菌株世代の量的形質遺伝子座の評価のため、菌糸生長速度による順位検定を行う。森林総合研究所・きのこ研究室は乾シイタケのニオイ成分量に影響を与えるアミノ酸の付与や時期について検討を行う。

V 研究方法

第 1 章 機能性を強化したきのこの成分育種

ブナシメジやハタケシメジのACE阻害活性、ヤマブシタケのヘリセノン類、マンネンタケのエストロゲン様活性など栽培きのこの機能性成分を高含有する新規交配親菌株を選抜するため、選抜した交配親菌株と子実体収量、形質の優れた系統等との交配株を得た。各交配菌株の栽培試験を行い、菌糸体生長量、子実体の収量や形質、子実体中の機能性成分量等の分析をし、優良菌株を選抜した。

第2章 きこの機能性を高める栽培技術の開発

生シイタケのレンチナン高含量菌株を選抜し、子実体の生育期のレンチナン含量の変動を分析した。レンチナン含量の分析は、凍結乾燥後の子実体を熱水抽出し、抽出液についてコンゴーレッド法により行った。シイタケ菌床栽培でレンチナン含量を高めるための子実体形成時の温度条件を検討した。担子孢子菌株世代の菌糸生長速度のQTL解析により菌株の特性評価を行った。

第3章 きこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発

乾シイタケのニオイ成分を対象に官能評価及び嗜好調査を行った。ニオイ成分量に影響を与えるアミノ酸として、システイン及びメチオニン以外にグルタミン酸を添加した菌床（木粉米糠培地）で得られた乾シイタケに含まれるニオイ成分量を調べた。乾燥子実体のニオイ成分量を高めるためのホダ木へのシステイン及びグルタミン酸の付与方法や時期について栽培方法を検討した。

VI 研究結果

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

高血圧症（ブナシメジ、ハタケシメジ）、認知症・アルツハイマー症（ヤマブシタケ）、骨粗鬆症（マンネンタケ）などの生活習慣病を予防できる機能性成分の高含有量菌株の評価手法、交配菌株から優良菌株の選抜、優良菌株の種菌の維持法などの検討を行った。ブナシメジでは、対照菌株（HFPRI-Hm 219）に比べて、収量は低いがACE阻害活性の最も高いHm612株と収量が対照菌株と同レベルでACE阻害活性がより高いHm468株の2菌株を選抜した。ヤマブシタケでは自殖系交配株について栽培試験を行った結果、ヘリセノン類含有量が多く、子実体収量の優れた菌株を交配親菌株として選抜した。ハタケシメジでは、交配菌株から選抜のLD96-47株は、栽培系統である亀山1号と比較してACE阻害活性が同等で食味がよく、継代培養を続けても子実体発生が安定していることが分かった。マンネンタケでは、野生株を中心に約80株を収集し、優良系統の交配株の栽培試験を行った。その結果、交配株すべての子実体が傘を形成しない奇形であり、収量で両親株を上回ったのは1系統にとどまった。また交配株の子実体は、骨粗鬆症予防の機能性成分の指標としたトリテルペン類の含有量においても低含有であった。

第2章 きこの機能性を高める栽培技術の開発

免疫多糖を高含有する生シイタケの栽培技術の開発では、中国産との差別化を目標に、レンチナン高含有の優良菌株の選抜を行い、子実体生育期の栽培条件によるレンチナン含量の変動を調べた。通常の発生温度（15℃）より低温の発生温度（11℃）でレンチナン含量が高くなった。シイタケ交配菌株の量的形質遺伝子座（QTL）の解析により、孢子菌株の違いが安定的に反映されるものと判断された。シイタケの菌糸成長を制御する遺伝子座の1つ（Legrpd1）を連鎖地図の連鎖群2に載せた。

第3章 きこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発

ニオイは食品の価値を左右する重要なものであるが、官能試験により消費者の年令の違いによる乾シ

イタケの嗜好性分布は5年前に比べて変化のないことが分かった。乾シイタケを好む人(全体の約67%)が20代以上で顕著に増加することを認め、一般消費者のうち10代の乾シイタケに関心の低い若年層をとくに問題にする必要はないと推測した。子実体発生1ヶ月前に、培地中にシステインとグルタミン酸の混合液を菌床に塗布または注入処理することにより、乾シイタケのニオイ成分量を増強できることが分かった。原木へのシステインおよびグルタミン酸の混合液の注入処理により、コントロールに比べて約3倍のレンチニン酸(ニオイ成分の出発物質)を含有する子実体を得た。

VII 今後の問題点

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

ブナシメジやハタケシメジでACE阻害活性の高い菌株を選抜することができたが、きのこのACE阻害活性にペプチド(きのこのタンパク質やプロテアーゼ)が関与しているかどうか、活性の原因成分の特定は未解明である。きのこの消費拡大を図る上で機能性成分の生体調節機能に関する情報は重要であり、今後、医学・薬学の専門家との連携で、活性物質の特定や作用機構の解明を行うことが必要である。ヤマブシタケの交配作業を効率的に行うためには、交配系の検討や孢子発芽率の向上など育種技術の検討が残されている。マンネンタケはこれまで生活習慣病を防止する漢方薬として伝統的に利用されてきたが、さらに骨粗鬆症の予防や改善に機能する健康補助食品あるいは特定保健用食品として商品化するためには、上記と同じく医学・薬学の専門家との連携で、薬効成分の特定と作用機構を明確にする必要がある。

第2章 きこの機能性を高める栽培技術の開発

森林総研が保有する生シイタケ栽培用の各菌株のレンチナン含量を網羅的に調べたが、IGS1領域のクラスター解析による品種系統とレンチナン含量の間に相関があるのかどうかを調べる必要がある。シイタケ菌糸生長に関わる遺伝子座の位置を決定することができたが、さらに機能性成分の生成等に関わる遺伝子座のQTL解析を行い、成分育種に繋げていく必要がある。

第3章 きこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発

原木乾シイタケのニオイ成分量を高めるためのアミノ酸注入効果は認められたが、注入液を原木中に均一に添加する技術の開発が残されている。林野庁が策定の原木シイタケ再生プラン・行動計画に沿って、輸出産業としての乾シイタケの復活を目標に、国内外での嗜好に合った乾シイタケの香りやニオイの調製技術の開発を進めていく必要がある。

VIII 研究発表

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

〈論文〉

1. 谷藤真紀、松田陽介、伊藤進一郎、西井孝文、板倉元(2005) ハタケシメジ野生株の交配による優良菌株の開発 中部森林研究 53, 83-84
2. 西井孝文(2005) ハタケシメジの育種と栽培方法についてII 日本きのこ学会第9回大会講演要旨 A-5
3. Liu, J. *et al.* (2005) The effect of strain, growth stage, and cultivating condition of *Ganoderma lucidum* on 5- α reductase inhibition, J. Wood Sci. 51: 189-192

4. Fujita, R. *et al.* (2005) Anti-androgeneic activities of *Ganoderma lucidum*, Journal of Ethnopharmacology 102: 107-112
5. 宜寿次盛生、米山彰造、森三千雄 (2006) 官能評価を用いたブナシメジ菌株間の苦味の比較、日本きのこ学会第 10 回大会講演要旨集、秋田、P.62
6. 宜寿次盛生、原田陽、米山彰造、森 三千雄、佐藤真由美 (2006) ACE 阻害活性を指標としたブナシメジの育種、日本木材学会北海道支部講演集、38、札幌、13-15
7. 村尾安香、松田陽介、中西健一、伊藤進一郎、西井孝文 (2006) ハタケシメジ優良菌株の開発ー野生株 LD99-3 と LD99-6 との交配試験ー 中部森林研究 54, 91-92
8. 増野和彦、河岸洋和 (2006) ヤマブシタケの栽培条件とヘリセノン含有量、日本きのこ学会第 10 回大会講演要旨集 65
9. 河岸洋和 (2006) きのこの生理活性物質とその利用、日本きのこ学会第 10 回大会シンポジウム「きのこの機能性と食品としての安全性」講演要旨
10. 河岸洋和 (2006) キノコの生体機能の化学、日本農芸化学会東北支部シンポジウム「天然物化学 最近の話題から」講演要旨
11. 河岸洋和 (2006) キノコの化学、IUPAC2006 市民公開講座「文化としての天然物化学」講演要旨
12. Kawagishi, H. (2006) Body-function regulating substances from the mushroom *Hericium erinaceum*, Advanced Basic Research Symposium for Drug Discovery in Asia
13. Nagai, K., Chiba, A., Nishino, T., Kubota, K., Kawagishi, H. (2006) Dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine from *Hericium erinaceum* protects against ER stress-dependent Neuro2a cell death via protein kinase C pathway, J. Nutr. Biochem 17, 525-530
14. 清水 邦義、劉 潔、宮本 以智子、近藤 隆一郎 (2006) 霊芝の前立腺肥大・骨粗鬆症改善効果、FFI ジャーナル(Foods & Food Ingredients Journal of Japan) 211(2), 124- 133
15. 宜寿次盛生、原田陽、米山彰造、佐藤真由美、森三千雄 (2007) ブナシメジの ACE 阻害活性に与える要因についてー冷水抽出と熱水抽出、および保存処理の検討ー、日本きのこ学会第 10 回大会講演要旨集、旭川、(予定)
16. Miyamoto I. *et al.* (submitting) Prevention effect of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats and regulation of osteoclastogenesis by *Ganoderma lucidum*, Bioorg. Med. Chem.
(特許)
1. 近藤隆一郎、清水邦義、金子周平、隈本正一郎、小西史子：エストロゲン様活性剤、特願 2003-084493、特開 2004-292330

第 2 章 きのこの機能性を高める栽培技術の開発

〈論文〉

1. 宮崎和弘、町田誠司、川端良夫、金子周平 (2005) シイタケの生長量に関わる遺伝子要因の評価方法の検討について、九州森林研究 58 : 225-227
2. Miyazaki, K., *et al.* (投稿中) Genetic map constructed by tetrad analysis and quantitative trait loci (QTL) analysis of the vegetative growth rate on potato dextrose agar of *Lentinula edodes* (shiitake mushroom), Breeding Science

第3章 きのこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発

〈論文〉

1. Hiraide, M., Miyazaki, Y., Shibata, Y. (2004) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* I: relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components, J Wood Sci 50: 358-364
2. Hiraide, M., Yokoyama, I., Miyazaki, Y. (2005) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* II: sensory evaluation by ordinary people, J. Wood Sci. 51: 628-633
3. Hiraide, M.: The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* III: substances that increases the odorous compound content, J. Wood Sci. 52: 265-269 (2006)
4. 平出政和、横山一郎 (2006) 乾シイタケに対する消費者の嗜好動向調査 木材学会大会研究発表要旨集 56, 126
5. Hiraide, M., Yokoyama, I. (in press) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* IV: survey of trends in consumer preferences and changes in sensory evaluation, J. Wood Sci., DOI 10.1007/s10086-006-0874-4

IX 研究担当者

- 第1章 宜寿次盛生（北海道立林産試験場）、原田陽（北海道立林産試験場）、増野和彦（長野県林業総合センター）、河岸洋和（静岡大学農学部）、西井孝文（三重県科学技術振興センター林業研究部）、板倉元（三重県科学技術振興センター林業研究部）、金子周平（福岡県森林林業技術センター）、近藤隆一郎（九州大学大学院農学研究院）、清水邦義（九州大学大学院農学研究院）
- 第2章 関谷敦、宮崎和弘、河岸洋和（静岡大学農学部）
- 第3章 平出政和

研究課題一覧（平成16年から平成18年まで）

(1)機能性を強化したきのこの成分育種	北海道立林産試験場	16～18
	長野県林業総合センター・静岡大学農学部	16～18
	三重県科学技術振興センター林業研究部	16～18
	福岡県森林林業技術センター・九州大学大学院農学研究院	16～18
(2)きのこの機能性を高める栽培技術の開発	森林総合研究所きのこ・微生物研究領域・微工研、九州支所・森林微生物管理研究G、静岡大学農学部	16～18
(3)きのこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発	森林総合研究所きのこ・微生物研究領域・きのこ研	16～18

第1章 機能性成分を強化したきのこの成分育種

a. 血圧降下作用をより高めたブナシメジの育種

ア 研究目的

ブナシメジの国内生産量は年間8~9万トンでエノキタケの次に多く、北海道内における生産量もエノキタケ、シイタケについて3番目に多い¹⁾。しかし、売価が低迷していることから、中小規模の生産者は生産コストの削減だけでは、生産を継続することが困難になりつつある。一方、ブナシメジは、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素（ACE）の阻害活性が比較的高いことが確認されている²⁾。そこで、ブナシメジの付加価値を高めるために、ACE阻害活性が高い品種の育成を目的として試験を行った。また、このように機能性を高めた品種を育成した場合、品種ごとに栽培方法が異なることから、育成品種に適した栽培技術の開発を行った。

イ 研究方法

① 栽培試験およびACE阻害活性の評価

①-1 供試菌株

育種素材（交配親菌株）の選抜では、野生菌株を主体とする北海道立林産試験場保存のブナシメジ（*Hypsizygus marmoreus*）41菌株を用いた。ACE阻害活性が高いブナシメジの開発においては、②-1で示すように新たに作出した238菌株を用いた。また、比較のため北海道立林産試験場保存のブナシメジ市販品種を適宜用いた。これら菌株をカンバ類（*Betula* sp.）おが粉とフスマを混合した培地で培養して種菌とした。

①-2 栽培試験

基本培地として、おが粉23%（絶乾重量換算）、米ぬか14%（同）になるように混合し、水道水を加えて培地水分63%に調整した³⁾。基本培地を850 ml容ポリプロピレン製の栽培ビンに600 g充填し、高圧殺菌（121℃、30分間）した。栽培方法は原田ら⁴⁾に準じた。すなわち、培地を殺菌後、各ビンに約10 gの種菌を接種して、温度22±1℃、相対湿度70±10%、暗条件下で75日間あるいは90日間培養後、菌かき操作を行った。菌かき操作は種菌の中央部をまんじゅう型に残す方法で行い、その後注水して2時間吸水させた。菌かき操作後は、芽出し工程において温度16±1℃、相対湿度85±10%、照度約50 luxで管理し、子実体原基形成後、柄が1.5 cm程度に伸び傘が分化し始めるまで続けた。生育工程は温度16±1℃、相対湿度85±10%、照度約350 luxで行った。各ビンの子実体総発生数の10%以上の菌傘が2.5 cm以上になった時点で子実体を採取し、収穫した子実体の形態を観察し、生重量を測定して子実体収量とした。

また三次選抜では、原田らの増収培地⁵⁾を改変した「針葉樹増収培地」を用い検討した。針葉樹増収培地は、道内の生産者が用いる培地に近い組成で、850 ml容栽培ビンに560 g充填し、カラマツ（*Larix leptolepis*）おが粉（83 g/ビン、絶乾重量換算、以下同）、米ぬか（64 g/ビン）、コーンコブ（24 g/ビン）、大豆皮（21 g/ビン）、オルガK-1（15 g/ビン、かつらぎ産業製）、水（353 g/ビン、培地水分63%）である。

①-3 ACE阻害活性の評価

収穫したブナシメジ子実体の可食部を凍結乾燥後、粉碎した子実体粉末 2 g を 80 ml の蒸留水に懸濁し、5℃、20 時間、100 rpm で振とうした。これを遠心分離（5000×*g*、30 分間）し、上清液を濾過後、凍結乾燥して冷水抽出物を得た。ACE はウシ肺製（和光純薬工業製）、またはウサギ肺製（シグマ社製）を用いた。基質は Bz-Gly-His-Leu・H₂O（ペプチド研究所製）を、ACE 阻害剤はカプトプリル（和光純薬工業製）を、ウシ血清アルブミン（BSA）は和光純薬工業製を用いた。ACE 阻害活性の測定は、津田らの方法^{2, 6)}を改変して行った。すなわち、試験管に 0.5 M ホウ酸緩衝液（pH 8.3）を 0.1 ml、1.6 M NaCl を含有する BSA 溶液（2 mg / ml）を 0.25 ml 入れ、酵素溶液（0.1 unit / ml）を 0.05 ml、試料溶液または蒸留水を加えて全量を 0.475 ml とし、反応混液とした。基質溶液 0.025 ml を添加して、37℃ で 60 分間、酵素反応後、10 μg / ml カプトプリル溶液 1 ml を添加して反応を停止した。反応液中の馬尿酸を HPLC 法で定量し、試料溶液の阻害度は、蒸留水のみを添加したものを対照として求めた。また、試料溶液を順次希釈して阻害活性を求め、得られた阻害曲線から ACE 活性を 50% 阻害する濃度（IC₅₀ 値）を求めた。IC₅₀ 値（μg / ml）は反応液（ml）中に添加された被検試料の乾燥重量（μg）で示した⁶⁾。

② ACE 阻害活性がより高いブナシメジの開発

②-1 育種素材（交配親菌株）の選抜および交配菌株の作出

①-1 で述べたブナシメジ 41 菌株を用い、①-2 で示した基本培地、90 日間培養の条件で栽培試験を行った。ACE 阻害活性は、①-3 で述べたように子実体粉末からの冷水抽出物を、ウシ肺製 ACE（和光純薬工業製）を用い測定した。子実体収量または ACE 阻害活性の均一性を考慮して 2 菌株を選抜し、それぞれの子実体から単離した単孢子系統を交配し 238 菌株を作出した。

②-2 交配菌株からの優良品種選抜

①-2 で示した基本培地を用い、試験効率を重視して培養 75 日間の条件で栽培試験を行った。交配親菌株である Hm219 を対照とし、最初の栽培試験（一次選抜）では繰り返しビン数を 8 本ずつ、二次選抜では 16 本ずつとした。また、比較のため北海道立林産試験場保存の市販品種（HmC1～C3）も同条件で栽培試験を行った。

二次選抜に用いた 41 菌株の子実体の冷水抽出物を ACE 阻害活性測定用の試料とした。試料の調製および測定は、基本的に①-3 と同様に行ったが、1 回目はウシ肺製 ACE（和光純薬工業製）を、2 回目はウサギ肺製 ACE（シグマ社製）をそれぞれ用い、試料はそれぞれ異なる栽培ビンから収穫した子実体から調製した冷水抽出物を用いた。結果の②-2 に後述するように、活性は偏差値に換算して比較した。

二次選抜された 10 菌株を、①-2 で示した基本培地および針葉樹増収培地、75 日間培養の条件で栽培試験を行った（三次選抜）。三次選抜では、交配親菌株である Hm219 を対照とし、繰り返しビン数を 64 本ずつとした。また、食味評価として官能評価を行い、選抜されたブナシメジ 10 菌株間の苦味を比較した。

②-3 官能評価による菌株間の食味比較

交配親菌株である Hm219 および市販品種を含む合計 12 菌株の子実体を用い、電子レンジで加熱調理した。パネルの感度による影響が小さく、比較的容易に行える 2 点比較法⁷⁾を用い、苦味の強弱を評価した。菌株名は 3 桁または 4 桁のランダムな数字をつけ、12 菌株中 2 菌株ずつの組み合わせ全てを、同じ菌株同士は除き、先に食する方を入れ替え、計 132 通り評価した。パネルは、特別な訓練を受けていない北海道立林産試験場の職員で構成し、基本培地で栽培し

た子実体について同じ試験を2ブロック（AおよびB）行った。先に食する方を指示し、どちらが苦いか、あるいは差が認められないかを回答させた。試験は2日間の午前および午後の4回に分けて行い、各パネルは毎試験につき2回以下、のべ最小で1回、最大で8回試食し、各パネルがどの組み合わせを評価するかは無作為とした。具体的には、**図1**に示した評価シートをクジにして引いてもらい、無作為な組み合わせになるようにした。菌株ごとに、苦味ポイントを以下のように定義し集計した。その菌株が、もう一方の菌株よりも苦く感じた場合を2ポイント、両菌株の苦味に差が認められない場合は1ポイント、もう一方の菌株を苦く感じた場合を0ポイントとした。また、針葉樹増収培地で同様に実施した（CおよびDブロック）。

③ ACE 阻害活性に与える要因の検討

三次選抜試験の結果から、交配菌株 Hm612 と Hm468、および交配親菌株 Hm219 を用いた。

③-1 子実体部位別の ACE 阻害活性

栽培ビン 1 本から収穫した子実体を大きさに偏りがないように、傘部と柄部および全部の3種類に分けて、それぞれの凍結乾燥粉末を調製⁸⁾し、その冷水抽出物のACE阻害活性を測定した。針葉樹増収培地で栽培した子実体を用い、繰り返しビン数は1〜3とした。

③-2 子実体熱水抽出物の ACE 阻害活性

熱水抽出物は、冷水抽出物と同じ子実体の凍結乾燥粉末 1 g を 40 mlの沸騰した蒸留水で30分間、還流抽出して得た⁹⁾。基本培地で栽培した子実体を用い、繰り返しビン数は3とした。

③-3 収穫直後と保存処理後の ACE 阻害活性

子実体冷水抽出物のACE阻害活性を、収穫直後と保存処理（10℃暗所、7日間）後^{10,11)}で比較検討した。基本培地で栽培した子実体を用い、繰り返しビン数は3とした。

こちらを先に食べて下さい。

▼

72492063

▲

▲

苦(にが)い方にチェック[レ]して下さい。

同じくらいの苦さなら両方に[レ][レ]して下さい。

▼まる○で囲んでください。

お名前 _____今日1・2・3・4 回目試験

図1 ブナシメジ食味評価に用いた「評価シート」

パネルにクジとして引いてもらうことで、無作為な組合せとして評価した。

ウ 結果

① 育種素材（交配親菌株）の選抜および交配菌株の作出

①-1 育種素材一次選抜

基本培地（カンバおが粉と米ぬかの混合）を用い、野生菌株を主体とする 41 菌株の栽培試験を行った結果、40 菌株で子実体が発生した。発生した菌株の栽培日数は 108～127 日、子実体収量は 21.8～163.2 g / 850 ml ビンとなった。また、子実体冷水抽出物の ACE 阻害活性は、29.7～72.7% となり、菌株間差がみられた（図 2）。ACE 阻害活性と栽培特性を考慮して、10 菌株を選抜した。

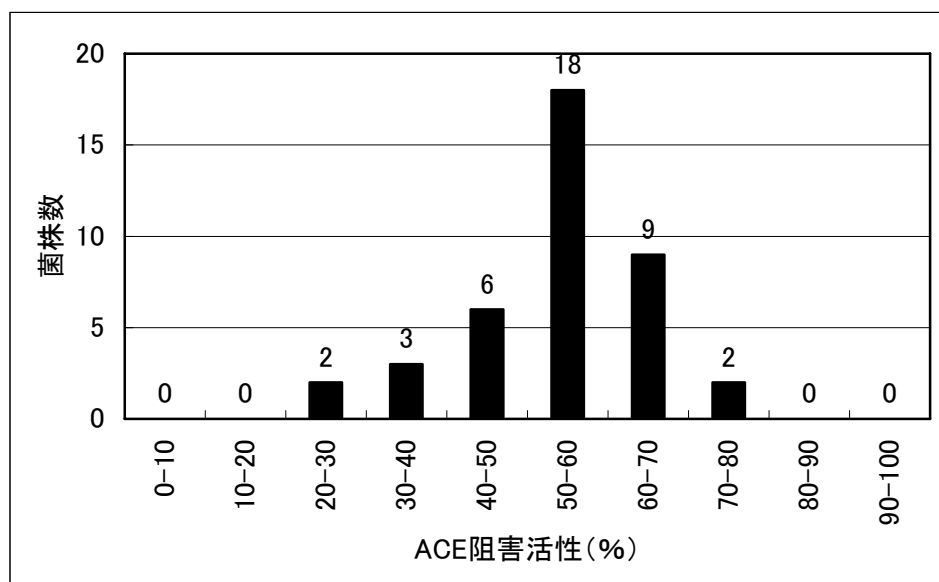


図 2 育種素材として検討したブナシメジ菌株の ACE 阻害活性値(%)分布

①-2 育種素材二次選抜

選抜した 10 菌株の栽培試験を行った結果、ACE 阻害活性は 30.6～65.5% となった。野生菌株中、Hm03-2 は 2 回の試験で ACE 阻害活性が 65% 以上と安定して高く、また交配菌株 Hm219 は子実体収量が高いなど栽培特性に優れ、ACE 阻害活性も比較的高く 2 回の試験で 55% を越えた（図 3）ため、この 2 菌株（Hm03-2 および Hm219）を育種素材として選抜した。

①-3 ACE 阻害活性の均一性

ACE 阻害活性の高い Hm03-2 と栽培特性の優れた Hm219 の栽培試験を行い、栽培特性や子実体冷水抽出物の ACE 阻害活性について均一性を評価した。ACE 阻害活性が 50% になる冷水抽出物濃度 IC_{50} は、Hm03-2 が $510 \pm 32.1 \mu g / ml$ (平均値 $\pm$ 標準偏差)、Hm219 が $612 \pm 53.3 \mu g / ml$ となり、均一性が比較的高いことが示された。

①-4 交配菌株の作出

育種素材として選抜した 2 菌株（Hm03-2 および Hm219）それぞれの子実体から単孢子系統を単離し、菌叢の成長度および形態から各 15 系統を選抜した。これらを、総当たりの群間交配、および Hm219 二核菌糸とのダイモン交配により合計 238 菌株を作出した。

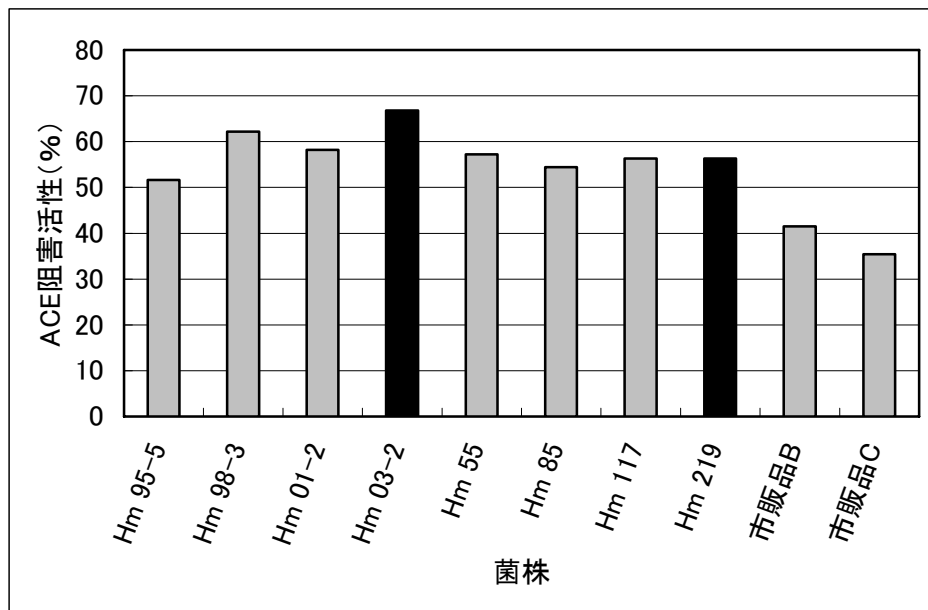


図3 育種素材として検討したブナシメジ菌株の ACE 阻害活性(%)
黒棒で示した Hm03-2 と Hm219 を育種素材として選抜した。

② ACE 阻害活性が高いブナシメジの開発

②-1 栽培特性による一次選抜

交配親菌株 Hm219 を対照菌株として、新たに作出した 238 菌株の栽培試験を行った結果、菌糸蔓延日数は 43～70 日（対照：51～59 日）となり、238 菌株中 134 菌株で子実体が発生した（図 4）。菌かきから収穫までの日数は 21～42 日（対照：21～24 日）、発生した子実体の収量は 1.9～103.7 g / ビン（対照との収量比：0.03～1.22）となった。この中から、子実体収量、形質を指標に 41 菌株を選抜した。

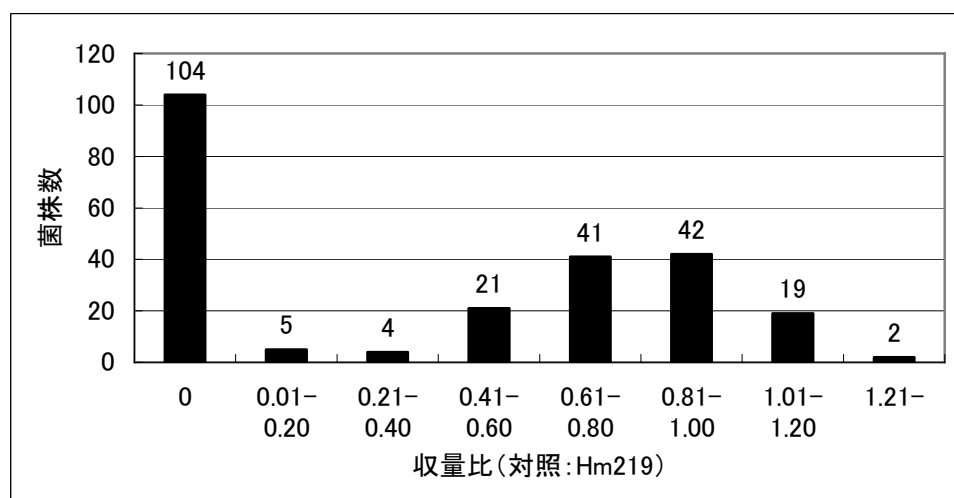


図4 一次選抜試験における子実体収量比の分布

②-2 栽培特性および ACE 阻害活性による二次選抜

一次選抜と同様の条件でビン数を 16 本ずつに増やし、再度 41 菌株の栽培試験を行った。菌糸蔓延日数は 36～50 日（対照：46～53 日）で、41 菌株のすべてに子実体が発生し、菌かきから収穫までの日数は 22～30 日（対照：23～25 日）、収量は 60.3～149.2 g / ビン（対照との収量比：0.49～1.21）となった（図 5）。

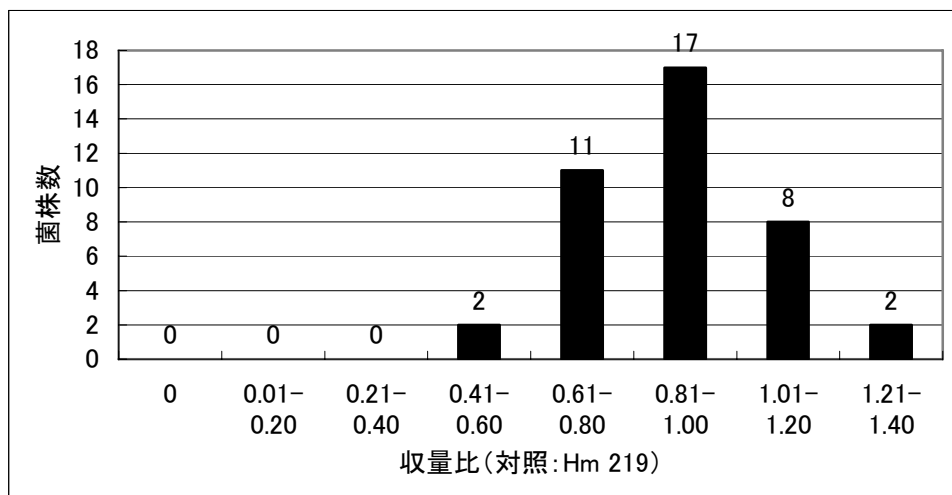


図 5 二次選抜試験における子実体収量比の分布

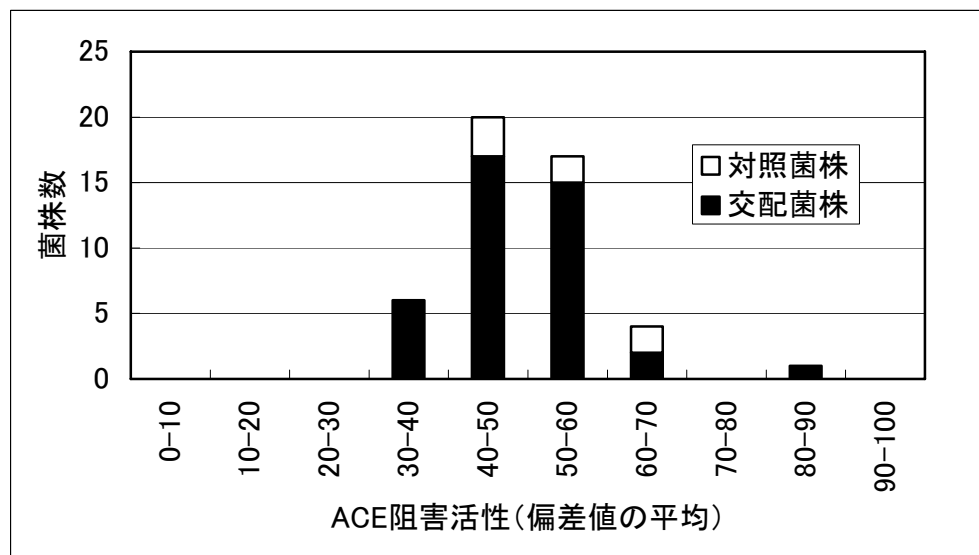


図 6 交配作出したブナシメジ菌株と両親および市販菌株の ACE 阻害活性(偏差値)分布

図 6 に交配菌株 41 菌株、対照として用いた両親菌株および市販菌株計 46 菌株の ACE 阻害活性（偏差値の平均）分布を示した。用いた ACE が異なるためと考えられるが、ACE 阻害活性値（％）は、全般的に 2 回目（シグマ社、ウサギ肺製 ACE）の結果が高くなり、また、ACE 阻害活性値（％）の菌株間の順位は 1 回目と 2 回目で完全には一致しなかった。そこで、2 種類の ACE を用いた測定結果に関して菌株間の相対的位置関係の信頼性を確認するため、スピアマン

の順位相関係数¹²⁾ を求めると、0.737 となり、1%の危険率で二変数には有意に正の相関があった。そこで、ACE阻害活性の「偏差値」を 1 回目と 2 回目についてそれぞれ算出し、偏差値の平均で各菌株のACE阻害活性を評価した。

表 1 に ACE 阻害活性の高かった 3 菌株と対照菌株のデータを示した。育種素材として用いた Hm03-2 の ACE 阻害活性は高く、Hm219 の ACE 阻害活性は相対的に低かった。市販品種も菌株によって ACE 阻害活性に違いがみられ、阻害活性が高い菌株 C1 から低い菌株 C3 まで大きな差が認められた。交配菌株の Hm612 は、親菌株である Hm03-2 および全市販品種の ACE 阻害活性を越え最も高い値を示し、交配菌株の Hm515 および Hm468 は、全ての市販品種よりも高い値を示した。この 41 菌株の中から、ACE 阻害活性を考慮して 10 菌株を選抜した。

表 1 交配菌株と対照菌株の ACE 阻害活性および栽培特性(平均値±標準偏差)

		ACE 阻害活性 (偏差値)			子実体収量 (g / ビン)			生育日数		
Hm 612	交配株	80.3	±	6.92	81.9	±	12.31	28	±	1.1
Hm 03-2	親菌株	68.9	±	6.29	29.3	±	14.39	30	±	1.5
Hm 515	交配株	63.3	±	1.95	78.6	±	13.80	25	±	1.8
Hm 468	交配株	62.7	±	9.70	131.2	±	12.84	27	±	1.1
Hm C1	市販株	60.7	±	2.62	63.1	±	17.27	21	±	0.5
Hm C2	市販株	48.3	±	1.87	99.6	±	11.30	21	±	0.7
Hm 219	親菌株	44.7	±	4.35	123.0	±	20.59	25	±	0.6
Hm C3	市販株	43.0	±	0.68	113.6	±	17.28	22	±	1.3

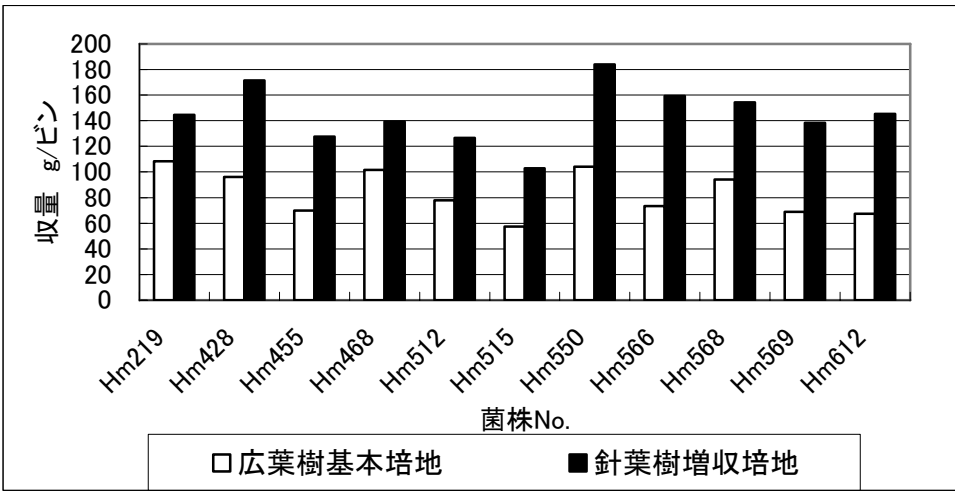


図 7 ブナシメジ三次選抜試験(培地による増収効果)

②-3 三次選抜試験における培地の影響

収量の改善を目的に、これまで原田らが改良を行い³⁻⁵⁾ 道内の生産者が活用している針葉樹増

収培地で栽培試験を行った。その結果、全ての菌株において、基本培地に比べ針葉樹増収培地で増収が認められた（図 7）。また、両培地から収穫した子実体冷水抽出物のACE阻害活性を測定、比較したところ、Hm612 およびHm468 は針葉樹増収培地よりも基本培地での活性が高く、Hm219 は差が認められなかった。

②-4 官能評価による食味比較

基本培地から収穫した子実体を用い、繰り返しを 2 として行ったA、B両ブロックにおける各菌株の苦味ポイントについて、スピアマンの順位相関係数を求めた。その結果、順位相関係数は 0.60 となり、5%の危険率で二変数には有意に正の相関があると認められた。次に、苦味ポイントの平均値を、菌株間と食べた順番（先に食べたか、あとに食べたか）の 2 つの要因で、二元配置の分散分析を行った。その結果、交互作用は認められず、また順序効果、すなわち食べた順番による差は認められなかったが、菌株間には有意差が認められた。そこで、各菌株間をチューキー法¹³⁾により多重比較を行ったところ、苦い菌株のグループと苦くないグループに分かれた（図 8 上）。親菌株Hm219 はほぼ真ん中に位置しており、交配菌株Hm550、Hm428 は苦い菌株、市販品種HmC2 は苦くない菌株と考えられた。

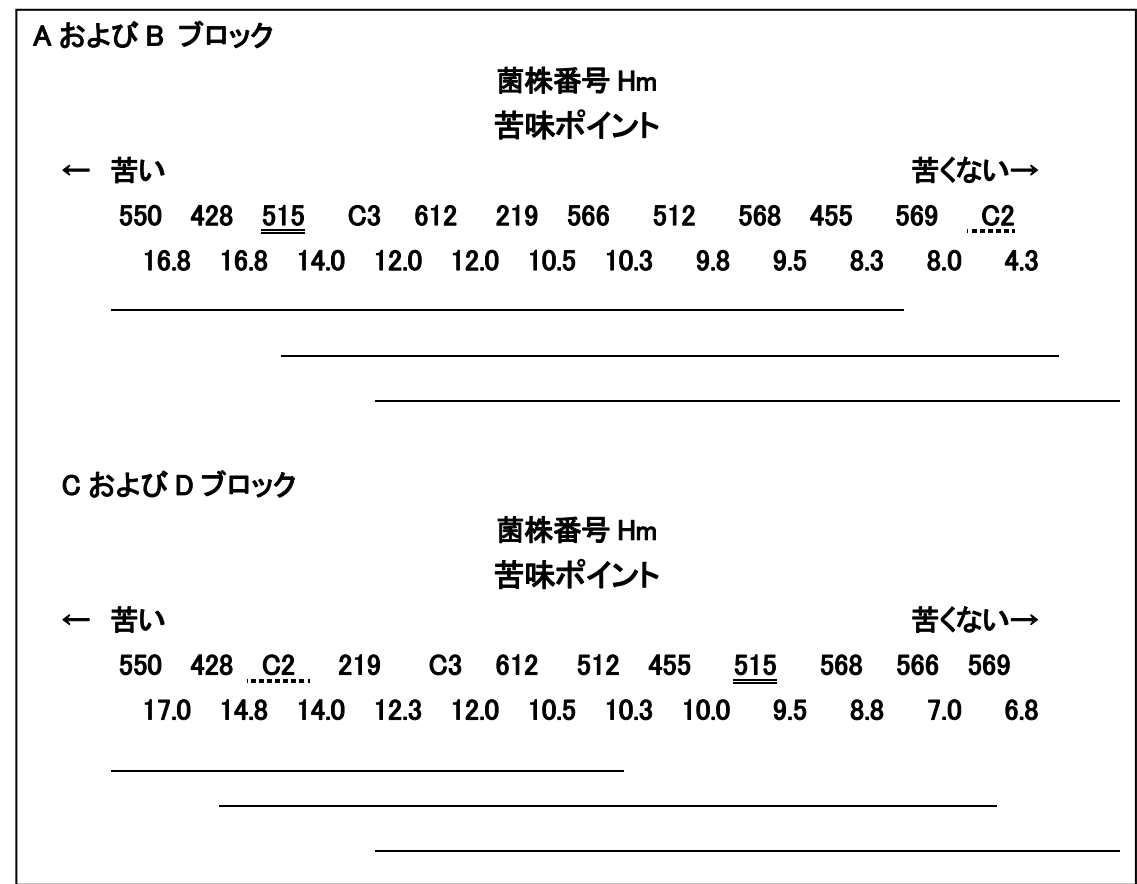


図 8 ブナシメジ菌株の苦味ポイント

上(AおよびB):基本培地で栽培した子実体の場合

下(CおよびD):針葉樹増収培地で栽培した子実体の場合

下線は有意差のないグループを示す(Tukey 法、 $p < 0.05$)。

次に、針葉樹増収培地で収穫した子実体を用いた C、D ブロックにおける各菌株について同様の比較を行った。苦味ポイントの順位相関係数は 0.66 となり、5 % の危険率で二変数には有意な正の相関が認められた。苦味ポイントの平均値を二元配置で分散分析をしたところ、菌株間にのみ有意差が認められた。そこで、各菌株間をチューキー法により多重比較を行ったところ図 8 下のようになり、12 菌株中 10 菌株は両培地で苦みの順位が変わらないと考えられた。苦味の順位が変わった Hm515 と HmC2 について見ると、Hm515 は基本培地では苦いグループに入るが針葉樹増収培地では比較的苦くないグループに、HmC2 は基本培地では苦くないグループに入るが針葉樹増収培地では苦いグループに、それぞれ変わった。

ところで、子実体の収穫時期が合わなかったため、2 つの栽培試験で共通のサンプルは 12 菌株である。Hm468 は基本培地では試験に供することが出来なかったが、針葉樹増収培地でのデータから 13 菌株で集計した場合、苦味ポイントが Hm512 と Hm455 の間に入った（データは示していない）。

これらの結果と②-2 の ACE 阻害活性、収量を考慮し、Hm612 と Hm468 の 2 菌株を選抜した。

③ ACE 阻害活性の変動要因について

③-1 子実体部位別の ACE 阻害活性

図 9 に三次選抜した交配菌株 Hm612 と Hm468、および交配親菌株 Hm219、3 菌株の子実体の全部、傘部、柄部それぞれの ACE 阻害活性 (IC_{50} 値) を示した。ACE 阻害活性の高い Hm612 と Hm468、親菌株 Hm219 の 3 菌株ともに部位別の差は認められなかった。

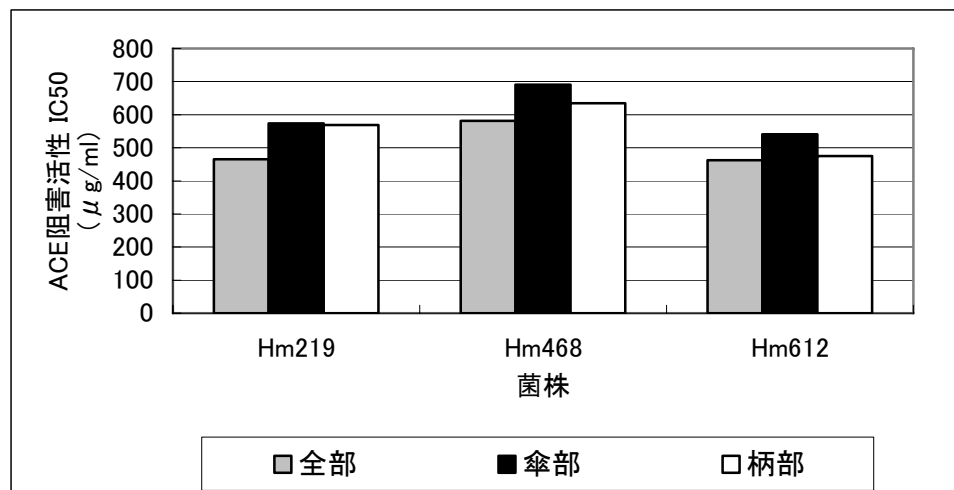


図 9 ブナシメジ子実体の部位別 ACE 阻害活性 IC_{50} (μ /ml)
各菌株とも全部、傘部、柄部の間に有意差は認められない。

③-2 子実体熱水抽出物の ACE 阻害活性

データは示していないが、熱水抽出物の収率は、3 菌株とも冷水抽出物に比べ減少した。図 10 に 3 菌株の子実体熱水抽出物と冷水抽出物における ACE 阻害活性 (IC_{50} 値) を示した。3 菌株とも ACE 阻害活性は熱水抽出物と冷水抽出物との間に有意な差は認められなかった。また、ACE 阻害活性の菌株間差は、冷水抽出物では Hm612 および Hm468 が対照菌株 Hm219 よりも

有意に高いのに対し、熱水抽出物では 3 菌株間に有意差は認められなかった。

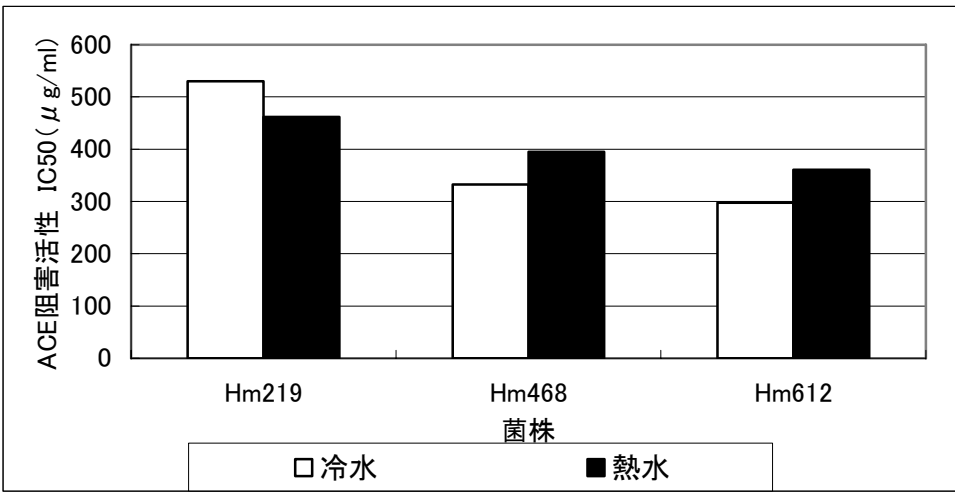


図 10 ブナシメジ子実体の冷水抽出物と熱水抽出物の ACE 阻害活性 IC50 ($\mu\text{/ml}$)
各菌株とも冷水抽出物と熱水抽出物の間に有意差は認められない。

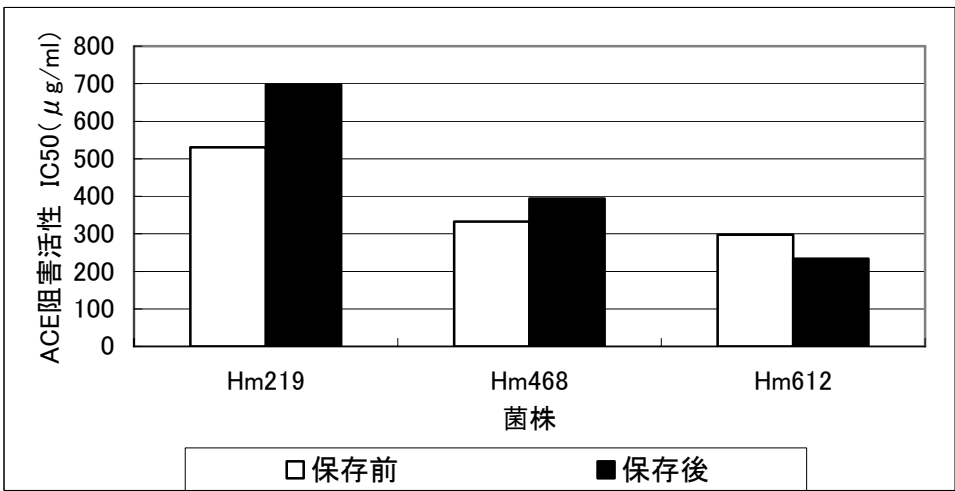


図 11 ブナシメジ子実体の保存処理前後の ACE 阻害活性 IC50 ($\mu\text{/ml}$)
Hm219 は、1%の危険率で有意差あり。
Hm468 は、有意差なし。

Hm612 は、5%の危険率で有意差あり。

③-3 収穫直後と保存処理後の ACE 阻害活性

ここではデータは示していないが、保存処理後の冷水抽出物収率は、3 菌株とも収穫直後に比べ若干増加した。図 11 に 3 菌株の子実体冷水抽出物の収穫直後と 10℃で 7 日間保存後の ACE 阻害活性 (IC₅₀値) を示した。各菌株の保存前後の ACE 阻害活性を比較すると、対照菌株 Hm219 では保存により活性が低下したのに対し、Hm468 は有意差がなく、Hm612 では保存後の活性が高くなり、各菌株で挙動が異なった。また、菌株間の ACE 阻害活性は、収穫直後では Hm612 および Hm468 が同程度で対照菌株 Hm219 よりも高いのに対し、保存後は Hm612 が Hm468 に対して有意に活性が高くなった。

エ 考察

ブナシメジは、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性が比較的高いことが確認されている²⁾。ACE を阻害することで、血管収縮物質のアンジオテンシン-II 生成と血管拡張物質のブラジキニン分解が抑えられ、血圧低下をもたらすことが明らかとなっている¹⁴⁾。高付加価値化を念頭に置き、ACE 阻害活性がより高いブナシメジ開発を検討した。

育種素材の選抜、続く交配菌株の選抜においても同様であるが、ACE 阻害活性について菌株間でバラツキが見られ (図 2 および図 6)、選抜育種の有効性が再確認された。ACE 阻害活性の高い野生菌株 Hm03-2、子実体収量および形質に優れた交配菌株 Hm219 を育種素材として選抜し、両親菌株より優れた菌株を期待し 238 菌株を作出した。育種素材の選抜では培養日数を 90 日間としたのに対し、交配菌株の選抜では試験効率を重視して栽培条件の培養日数を 75 日間と設定したため、多数の菌株が子実体発生に至らなかったと考えられる (図 4)。しかし、商業生産では培養期間の短縮など生産効率も重要である⁴⁾ ことから、子実体発生に至らなかった菌株は除外した。なお当初使用していたウシ肺製 ACE の入手が不可能となり、二次選抜試験の途中以後はウサギ肺製 ACE で検討した。2 種類の ACE を用いた測定結果を比較検討した結果、ACE 阻害活性値 (%) は全般的にウサギ肺製 ACE の結果が高くなり、ACE の違いが原因と考えられた。しかし、2 種類の ACE を用いた測定結果には有意な相関が認められ、ACE 阻害活性評価法が妥当であることを再確認できた。

一次選抜試験の収量比を、両親菌株の単核系統 (Hm03-2 の 15 系統 × Hm219 の 15 系統および親菌株) を因子に二元配置の分散分析で検討したところ、両親菌株ともそれぞれの単核系統間に (収量比平均値の) 差が認められた (データは示していない)。このことから単核系統によって交配菌株の収量に影響を与える (因子を持つ) 可能性があるが、両親菌株の単核系統間に交互作用があるためこれ以上の推論は不可能であった。また、予想されたことではあるが、ACE 阻害活性偏差値の平均と、二次選抜試験の収量比 (対照菌株 Hm219) には相関が認められなかった (相関係数; -0.26)。単胞子分離によって両親菌株の遺伝形質が分散され、それらをランダムに組み合わせる交配菌株の作出によって、遺伝形質の変異は大きく広がる。収量等栽培特性や ACE 阻害活性成分のマーカーがまだ存在しないことから、交雑育種によって目的とする形質の評価を行いながら選抜を繰り返す方法は、現時点での育種方法として妥当であると考えられる。

二次選抜では ACE 阻害活性が高いことを優先した結果、基本培地で収量性の低い菌株を含む

10 菌株を選抜した。そこで、これまで原田らが改良を行ってきた^{3,5)} 針葉樹増収培地で収量性の改善を試みた結果、全ての菌株で収量が増加した。これまで早生品種での増収が認められていた増収培地^{3,5)} が多くのブナシメジ菌株に有効であることが示された。

ところで、ブナシメジには苦味があり、嗜好性に影響を与えることがある。原田らはブナシメジで、主にうま味や甘味に関する成分、いわゆる「呈味成分」含量がブナシメジの品種間で異なることや⁵⁾、それに伴って官能評価も変化することを報告している^{15,16)}。しかし、苦味に関しては成分と官能評価の関係についての結論は出ていない。これは、アルギニンとオルニチン含量¹⁶⁾ のほかに、沢辺らが報告している¹⁷⁾ ポリイソプレネポリオール (hypsiziprenol) などの影響が考えられるからである。そこで、現時点で最も信頼性が高いと考えられる、直接ヒトの感覚を用いた官能評価法で苦味を比較した。また、専門の訓練を受けてないパネルで評価を行ったが、訓練を受けていない人でも2つのものの比較であれば「どちらが苦い」あるいは「同じくらい」と容易に判断はつく(2点比較法)⁷⁾。分析の結果菌株間に差が認められ、ブナシメジ菌株間の苦味の差を検出することが出来た。一般にきのこ栽培では、栽培条件(培地組成)を変えると、子実体収量や収穫までの日数、いわゆる栽培特性が変わることが分かっている。そこで、培地組成を変えて収穫した子実体の官能評価を比較した結果、菌株の順序が入れ替わる事例を見出した。原田らは、ブナシメジで培地組成によって呈味成分含量が変化すること⁵⁾ やそれに伴って官能評価も変化すること^{15,16)} を報告している。しかし、それは一つの菌株での結果であり、それがどの菌株にも当てはまるのかについては明らかになっていない。今回、培地組成が変わると「苦味」が大きく変わる菌株があるが、それは全ての菌株に当てはまるのではないということが示された。培地組成によって、子実体の苦味成分が変化するが、その変化は菌株によって異なり一様ではないということが示唆される。

食味評価の結果と ACE 阻害活性、収量を考慮し、Hm612(対照菌株 Hm219 に比べ基本培地での収量が低い、ACE 阻害活性が最も高い)と Hm468(比較的 ACE 阻害活性が高く、基本培地での収量が対照菌株 Hm219 と同程度)の2菌株を最終選抜した。選抜した Hm612 と Hm468、および親菌株 Hm219 を用いて培地の違いによる ACE 阻害活性を検討した結果、増収培地では ACE 阻害活性に変化がみられ、培地組成が活性に影響することが明らかになった。

原田はブナシメジに含まれる遊離アミノ酸は傘部に多く、主要な可溶性糖であるマンニトールとトレハロースは柄部に多いことを明らかにしている^{8,15)}。しかし、今回ブナシメジ子実体の ACE 阻害活性に関しては、傘部と柄部では差は認められなかった。

また、ブナシメジは加熱して食されることから、選抜した菌株について子実体熱水抽出物と冷水抽出物における ACE 阻害活性の差異を検証した結果、差は認められず熱安定性が高いことが示唆された。3 菌株の保存処理前後の ACE 阻害活性は、Hm219 では保存前>保存後と低下したのに対し、Hm468 では保存前≒保存後、Hm612 では保存前<保存後となり、菌株によって保存処理に対する ACE 阻害活性の挙動が異なった。また、菌株間の ACE 阻害活性を比較すると、保存前が Hm612≒Hm468>Hm219 であるのに対し、保存後は Hm612>Hm468>Hm219 となり、菌株間の差が大きくなった。以上の結果から、親菌株 Hm219 は保存すると ACE 阻害活性が低下したのに対し、選抜菌株 Hm612 と Hm468 は熱水抽出や保存による ACE 阻害活性の低下が認められず、熱や保存に対しても安定していることが示唆された。津田らは²⁾、ブナシメジの ACE 阻害活性物質は数種のオリゴペプチドと推定しており、マイタケでもオリゴペプチドが

ACE阻害活性物質として報告されている¹⁸⁾。またタモギタケのD-マンニトールが降圧活性を示すこと¹⁹⁾、オリゴペプチドのほかに数種の糖アルコールが温和なACE阻害活性を示す²⁰⁾ことが明らかになっている。今回、ブナシメジ 3 菌株のACE阻害活性が熱水抽出や保存処理により異なる挙動を示したのは、オリゴペプチドや糖アルコールなどのACE阻害活性物質の含有量とその変動によるものと推察され、これら物質の組成をより詳細に検討することでACE阻害活性の変動要因が明らかになるであろう。

オ 今後の問題点

ACE 阻害活性の高いブナシメジ菌株を得ることが出来たことから、今後、機能性成分の解明や動物実験による効能の立証等を行い、より高いレベルで商品の差別化や高付加価値化を図る必要がある。また、選抜した菌株を利用してもらうためには、品種登録で法的に保護する必要がある。

カ 要約

1. 基本培地（広葉樹おが粉と米ぬかの混合）で、野生菌株を主体とするブナシメジ 41 菌株の栽培試験を行い、子実体冷水抽出物の ACE 阻害活性の高さと栽培特性を考慮して、有望な 10 菌株を選抜し再試験を行った。野生菌株のひとつ（Hm03-2）は、ACE 阻害活性が安定して高く、交配菌株のひとつ（Hm219）は、栽培特性に優れており、ACE 阻害活性も低くはなかった。さらに、分析サンプル数を増やして、ACE 阻害活性の均一性を評価し、育種素材として選抜した。
2. 育種素材として選抜した Hm03-2、Hm219 それぞれの子実体から単孢子系統を単離し、総当たりの群間交配、および Hm219 二核菌糸とのダイモン交配を行い、計 238 菌株を作出した。Hm219 を対照菌株として、基本培地で 238 菌株の栽培試験を行い、子実体収量、形質を指標に 41 菌株を選抜した（一次選抜）。一次選抜と同様の条件で 41 菌株の栽培試験を行い、子実体冷水抽出物の ACE 阻害活性を測定し、子実体収量および ACE 阻害活性を考慮して 10 菌株を選抜した（二次選抜）。
3. 二次選抜したブナシメジ 10 菌株の苦味を比較するため、官能評価の手法を用いて検討した結果、ブナシメジ菌株間の苦味の差を明らかにした。これらの結果を考慮して、ACE 阻害活性が最も高い Hm612、比較的 ACE 阻害活性が高く、基本培地での収量も高い Hm468 の 2 菌株を選抜した。
4. 収量の改善を目的に、針葉樹増収培地を用いて栽培試験を行った結果、全ての菌株で増収効果が認められた。また、針葉樹増収培地で栽培した子実体冷水抽出物の ACE 阻害活性は菌株によって挙動が異なった。
5. ACE 阻害活性の変動要因について Hm219、Hm468 および Hm612 を用いて検討した。子実体部位別の ACE 阻害活性では、3 菌株ともに子実体の全部、傘部、柄部それぞれの間で ACE 阻害活性の差は認められなかった。子実体の熱水抽出（100℃、30 分間）物と冷水抽出物の ACE 阻害活性を比較した結果、差は認められず熱に安定していることが示唆された。子実体収穫直後および保存処理（10℃、7 日間）後の冷水抽出物の ACE 阻害活性を比較した結果、菌株によって挙動が異なり菌株間の差が大きいことが示唆された。

キ 引用文献

- 1) 北海道水産林務部 (2006) 平成 17 年度北海道林業統計、H 生産：
<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/sum/kcs/rin-toukei/17rtk>
- 2) 津田真由美、原田陽、青山政和、斎藤直人、関一人、兼俊明夫、林隆章 (2000) 北海道産野生キノコのアンジオテンシン変換酵素阻害活性、林産試験場報、14(2)、10-15
- 3) 原田陽、宜寿次盛生、森三千雄、米山彰造 (2003) ブナシメジ早生品種の子実体成熟に及ぼす炭酸カルシウム材料添加の効果、日菌報、44、3-8
- 4) 原田陽、宜寿次盛生、米山彰造、中谷誠、伊藤清 (2001) ブナシメジ早生品種の短期栽培における栄養剤添加の効果、日本応用きのこ学会誌、9(2)、67-72
- 5) A. Harada, S. Gisusi, S. Yoneyama, M. Aoyama (2004) Effects of strain and cultivation medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypsizygus marmoreus*, *Food Chemistry*, 84, 265-270
- 6) 兼俊明夫、林隆章、姉帯正樹、金島弘恭、尾谷賢、蓑嶋裕典、内山智幸、畠山好雄、飯田修 (1993) アンジオテンシン変換酵素阻害活性を指標とした北海当帰の調製加工法の検討、道衛研所報、43、1-5
- 7) 古川秀子 (1994) おいしさを測る、幸書房、東京、140pp
- 8) A. Harada, S. Yoneyama, S. Doi, M. Aoyama (2003) Changes in contents of free amino acids and soluble carbohydrates during fruit-body development of *Hypsizygus marmoreus*, *Food Chemistry*, 83, 343-347
- 9) H. S. Choi, H. Y. Cho, H. C. Yang, K. S. Ra, H. J. Suh (2001) Angiotensin I -converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*, *Food Research International*, 34, 177-182
- 10) 小城明子、鈴木亜夕帆、鈴木彰、鄭鍾千、西澤光輝、渡邊智子 (2004) ブナシメジの収穫後子実体の形態・色および物性に及ぼす貯蔵期間の影響、日本きのこ学会誌、12、119-124
- 11) 米山彰造、宜寿次盛生、原田陽、森三千雄、豊島琴恵 (2005) 官能評価によるマイタケ子実体収穫後の食味の変化、日本きのこ学会第 9 回大会講演要旨集、広島、34
- 12) 新城明久 (1986) 生物統計学入門、朝倉書店、東京、140pp
- 13) 永田靖、吉田道弘 (1997) 統計的多重比較法の基礎、サイエンティスト社、東京、187pp
- 14) キリンビールHP : http://www.kirin-foodresearch.jp/R&D/b_page_2.html
- 15) 原田陽 (2003) ブナシメジの栽培期間を短縮した品種とその食味評価、APAST - 森と木の先端技術情報 - 、13(5)、100-104
- 16) 原田陽、宜寿次盛生、米山彰造 (2005) ブナシメジの食味に影響を及ぼす呈味成分の品種間差異、林産試験場報、19(1)、25-30
- 17) 沢辺昭義、森田全律、稲葉和功、大内成志、岡本忠 (1999) 質量分析計によるきのこに含まれる苦味成分前駆体新規ポリイソブレンポリオール構造解析、日本応用きのこ学会誌、7、49-56
- 18) M. Ohtsuru, H. Horio, H. Masui (2000) Angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from pepsin digest of maitake (*Grifola frondosa*) , *Food Sci. Technol. Res.* , 6(1), 9-11
- 19) S. Hagiwara, M. Takahashi, Y. Shen, S. Kaihou, T. Tomiyama, M. Yazawa, Y. Tamai, Y. Sin, A. Kazusaka, M. Terazawa (2005) A phytochemical in the edible tamogi-take

mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 69, 1603-1605

20) 鈴木浩之、齋藤伸吾、青山政和、原高明、八木勇三（2006）タモギタケの降圧成分、日本木材学会北海道支部講演集、38、札幌、16-17

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

b. ヤマブシタケの成分育種

ア 研究目的

ヤマブシタケ子実体には、神経成長因子（nerve growth factor, NGF）誘導促進物質の一つであるヘリセノン類が存在することが明らかにされている¹⁻³⁾。さらに、臨床試験において、半年間乾燥ヤマブシタケを摂取することによって老年認知症患者の病状改善が認められている⁴⁾。

本研究では、ヤマブシタケについてヘリセノン類の含有量の高い品種を育成するとともに、育成した品種に適した栽培技術の開発を行う。

また、抗認知症に関わる新しい機能性成分（神経細胞保護物質）を探索した。すなわち、アルツハイマー病患者の脳には、病気の特異的な症状として老人斑が観察される。アミロイド斑とも呼ばれるこの斑は、神経毒性を持つアミロイド β タンパク質（ $A\beta$ ）を主成分として凝集したものである。ヤマブシタケにこの $A\beta$ の毒性を抑制する活性を見出し、活性本体の探索を目的とした。

イ 研究方法

(1) 供試菌株

長野県林業総合センター保存の野生株 11 系統（Y1～Y11）。

(2) 栽培方法

培地は、ブナオガコと栄養材を容積比で 10：2 の比率で配合し、含水率 63%、培地重量 600g とした。培養は 20℃18 日間、発生は湿度 95%以上で行った。

(3) ヘリセノン類の定量方法

収穫したそれぞれの子実体は目的に応じて、凍結真空乾燥あるいは熱風乾燥した。凍結乾燥は、採取した子実体を-35℃で予備凍結後、-45℃において 4 日間凍結真空乾燥器を用いて行った。子実体の熱風乾燥は、送風式乾燥機を用いて、40℃、50℃、および 60℃で各々 24 時間行った。

静岡大学におけるヘリセノン類の抽出および定量の手順は以下のとおりである。

《抽出方法》試料（乾燥粉末ヤマブシタケ） 1g をクロロホルム 10ml 中でスターラーを用いて 1 時間攪拌し、吸引ろ過した。次に、抽出液にシリカゲル（関東化学：シリカゲル 60N（球状、中性）） 1g を加えスターラーを用いて 30 分間攪拌し、吸引ろ過して、Hericenone 抽出液を得た。HPLC に供する際は、メンブランフィルター（0.50 μ m）で抽出液をろ過し、エバポレーターで濃縮乾固させ重量を測定した後で、クロロホルム 1ml に溶解した。

《検量線の作成》Hericenone C、D、E、F および G をメタノールに溶解し、0.02、0.01、0.005、0.0025、0.00125 mg/ml の希釈系列を作り、各濃度を HPLC に供した。得られた各濃度の Hericenone C、D、E、F および G のピーク面積から、検量線を作成した。

(4) 系統、栄養材、乾燥方法とヘリセノン類含有量

野生株 11 系統について、栄養材に 3 種類（スーパーブラン、コーンブラン、フスマ）を用いて栽培試験を行った。収穫したそれぞれの子実体を凍結真空乾燥した場合と熱風乾燥

した場合した場合について、ヘリセノン類の定量を行った。

(5) 子実体の発生ステージとヘリセノン類含有量

野生株3系統（Y1、Y5、Y6）について、子実体の発生ステージを4段階（表1、写真1）に分け、発生ステージ別のヘリセノン類含有量の定量を行った。収穫したそれぞれの子実体を凍結真空乾燥した後、定量に供した。栄養材には、スーパーブランを用いた。

表1 発生ステージの基準

発生ステージ	状態
1	ビンロより上に菌塊が生長し、針の形成が始まった状態
2	針が伸長してきたが、針の長さが15mm未満の状態
3	針の長さが15mm以上22mm未満、胞子の落下前の状態
4	針の長さが22mm以上で、胞子の落下が始まっている状態



ステージ1



ステージ2



ステージ3



ステージ4

写真1 発生ステージ

(6) 子実体発生温度とヘリセノン類含有量

野生株3系統（Y1、Y5、Y6）について、子実体の発生温度を10℃、14℃、18℃の3段階に分け、発生温度別のヘリセノン類含有量の定量を行った。収穫したそれぞれの子実体を凍結真空乾燥した後、定量に供した。栄養材には、スーパーブランを用いた。

(7) 交配による系統の作出と交配株のヘリセノン類含有量

栽培試験及びヘリセノン類の定量結果から野生株4系統（Y1、Y5、Y6、Y9）を選定し

て、単孢子分離により一核菌糸体を取得した。取得した一核菌糸体の交配により系統を作出した。

交配株について、栽培条件とヘリセノン類含有量の検討結果により、ヘリセノン類含有量評価の標準的な方法として妥当と判断された栽培条件を用いて栽培試験を行い、収量調査と採取した子実体の系統別のヘリセノン類含有量の定量を行った。収穫したそれぞれの子実体を凍結真空乾燥した後、定量に供した。

(8) 神経細胞保護物質の単離

8-1 ヤマブシタケ子実体の抽出及び抽出物の溶媒分画

ヤマブシタケ子実体 4.0 kg を粉砕機で粉砕し、15 L の 85% エタノールに浸して放置し、抽出した。抽出液を吸引濾過し、エバポレーターで減圧濃縮した。濾過後の残渣を再び 85% エタノールに浸し、同様の操作を 4 回繰り返した後に、15 L のアセトンで抽出し、減圧濃縮した。このようにして得られた抽出物をクロロホルムと水で溶媒分画し、クロロホルム可溶部と水可溶部を得た。このうち得られた水可溶部を酢酸エチルで溶媒分画し、酢酸エチル可溶部を得た。

8-2 活性物質の単離，精製

ヤマブシタケ子実体のクロロホルム層 65.7 g をシリカゲルカラムにより、クロロホルム：アセトン＝9：1、7：3、クロロホルム：メタノール＝9：1、7：3、5：5、3：7、0：10 の溶媒で順次極性を上げながら溶出し、画分 1～14 を得た。続いて画分 10 をシリカゲルカラムによりクロロホルム：メタノール：水＝14：6：1、6：4：1、5：5：1、0：10：0 の溶媒で分画し、画分 10-1～10-12 を得た。画分 10-5 を調製用 TLC によりクロロホルム：メタノール：水＝6：4：1 で分画し、画分 10-5-1～10-5-14 を得た。画分 10-5-5 を順相 HPLC に供し 10-5-5-4 を 8.2 g 得、これを逆相 HPLC に供してさらに精製し、化合物 1 を 2.0 mg 得た。

8-3 細胞の培養

この活性試験にはラットの褐色細胞種由来の細胞株 PC-12 細胞を用いた。これを 96 穴プレートに PC-12 細胞が 7.0×10^3 個になるように播種した。これを 10% の馬血清、5% の牛胎児血清、100 U/ml のペニシリン、10 μ g/ml のストレプトマイシンを含む D-MEM 培地で一晚培養した。

8-4 検体の添加

検体であるヤマブシタケ抽出物を加え、その直後にアミロイド β を 10 μ M 添加し、室温にてアミロイド β を加えたものは 48 時間、SNP またはツニカマイシンを加えたものは 24 時間培養した後、プレートの穴から培地を除いた。

8-5 活性評価

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (250 mg/ml) を 100 μ l 加えて、37°C で 3 時間インキュベートし、20% (w/v) SDS, 50% (v/v) dimethylformamide を含んだ水を加えて 24 時間室温で放置した。これを 570 nm にて吸光度を計り、生存細胞数を測定した。

生存率 (%) = {(化合物, 毒性物質を加えたときの細胞生存数) / (コントロールの細胞生存数)} $\times$ 100

ウ・エ 結果と考察

(1) ヤマブシタケ栽培条件とヘリセノン類含有量について

系統、栄養材、乾燥方法、発生ステージ、発生温度と子実体のヘリセノン類含有量の関係についてそれぞれ検討した結果、これらの条件の相違により、ヘリセノン類含有量に差が生じることを確認した（図1～4）。

ヤマブシタケの菌床栽培条件については、長野県林業総合センターにおける既往の成果⁵⁾として、栄養材はスーパーブランを用いると収量性に優れ、発生温度は10～12℃の低温域が子実体の形状を整えるのによいことが明らかにされている。当該研究における目的であるヘリセノン類を高含有する系統の育成にとって、有効成分含有量の安定性を確保することが重要な課題である。栽培条件によってヘリセノン類含有量に差が生じるものの、これまでに検討した栽培条件とヘリセノン類含有量の関係を総合的にみて、既往の栽培技術をヘリセノン類含有量評価の標準的な栽培方法として採用しても大きな問題のないことが示唆された。そこで、作出したヤマブシタケのヘリセノン類含有量を定量する際の標準的な栽培方法として以下の条件を採用することとした。

培地組成；ブナオガコ：スーパーブラン=10：2（容積比）、含水率 63%、培養；20℃18日間、発生；12℃、収穫；発生ステージ3。

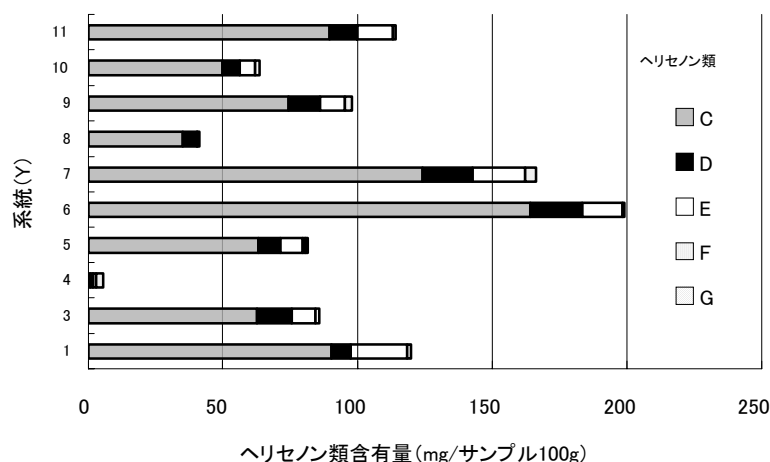


図1 系統とヘリセノン類含有量(スーパーブラン・凍結乾燥)

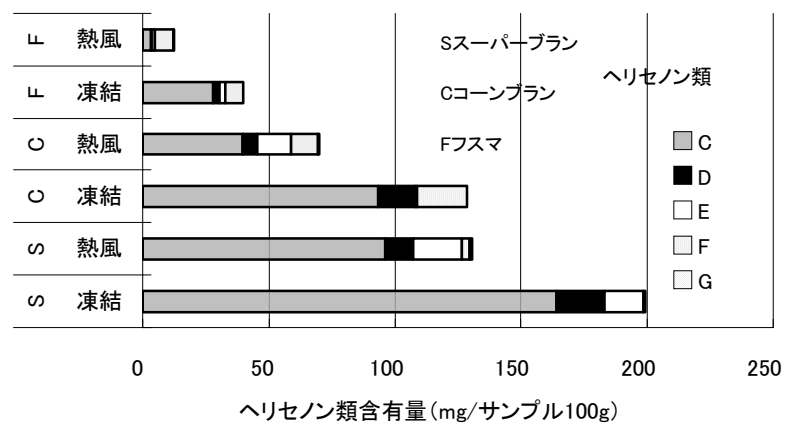


図2 栄養材、乾燥方法とヘリセノン類含有量(系統Y6)

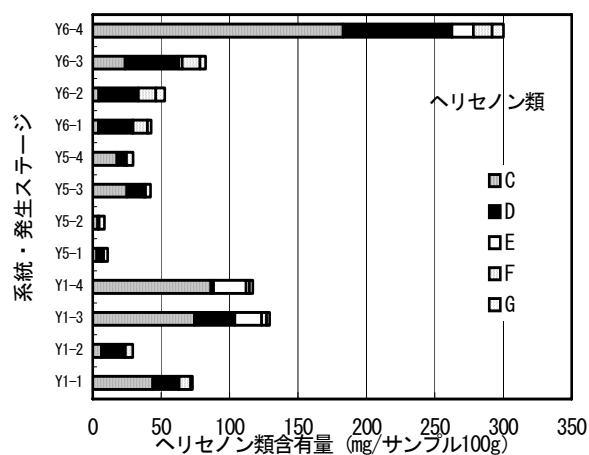


図-3 発生ステージとヘリセノン類含有量

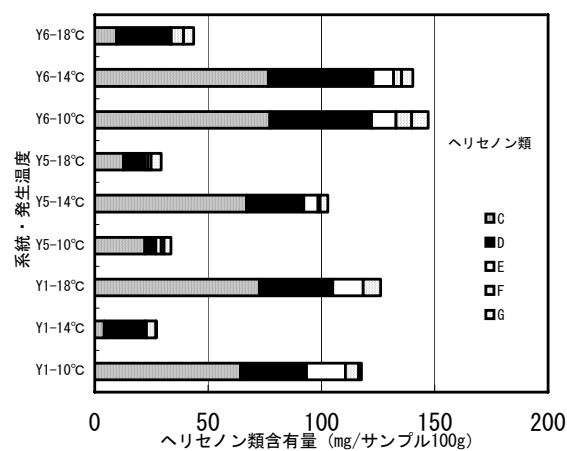


図-4 発生温度とヘリセノン類含有量

(2) 交配による系統の作出と交配株のヘリセノン類含有量の定量

選定した野生株4系統について単孢子分離を行い、それぞれ一核菌糸体を取得した。これらの一核菌糸体の交配により、各系統内の自殖系統、各系統間の他殖系統を分離し系統を作出した。

表2に単孢子分離の際の孢子発芽率を示したが、最大の系統でも0.283%と低かった。

自殖系交配株について栽培試験を行い、収量を調査するとともに、収穫した子実体についてヘリセノン類含有量を定量した。結果を図5～6に示した。菌株名「Y6④-4」は、子実体中のヘリセノン類含有量がサンプル100g当り744.3mg有り、栽培条件とヘリセノン類含有量の検討結果で、最もヘリセノン類の多かった野生株の含有量サンプル100g当り199.1mgの3.7倍であった。また、この菌株は1ビン当り127gの収量があり、現在実用化して使用されている菌株と同等の収量性を持っていた。これらの結果から、交配株1系統を優良育種素材として選抜した。

表2 ヤマブシタケ孢子発芽率

系統	孢子発芽率 (%)
Y 1	0.014
Y 5	0.283
Y 6	0.014
Y 9	0.167

孢子液塗布後14日間

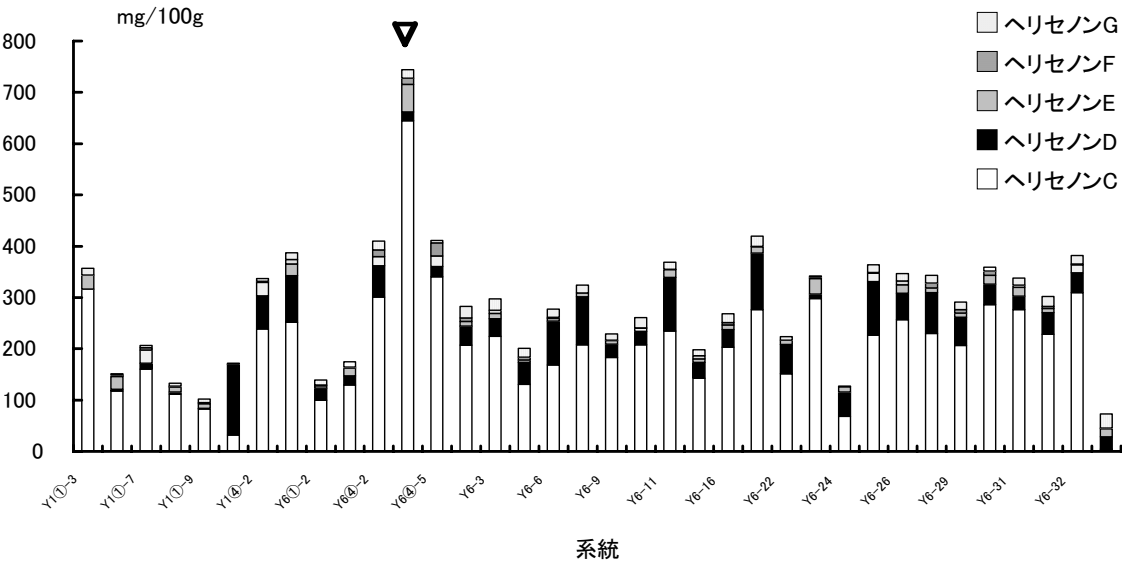


図5 ヤマブシタケ交配系のヘリセノン類含有量

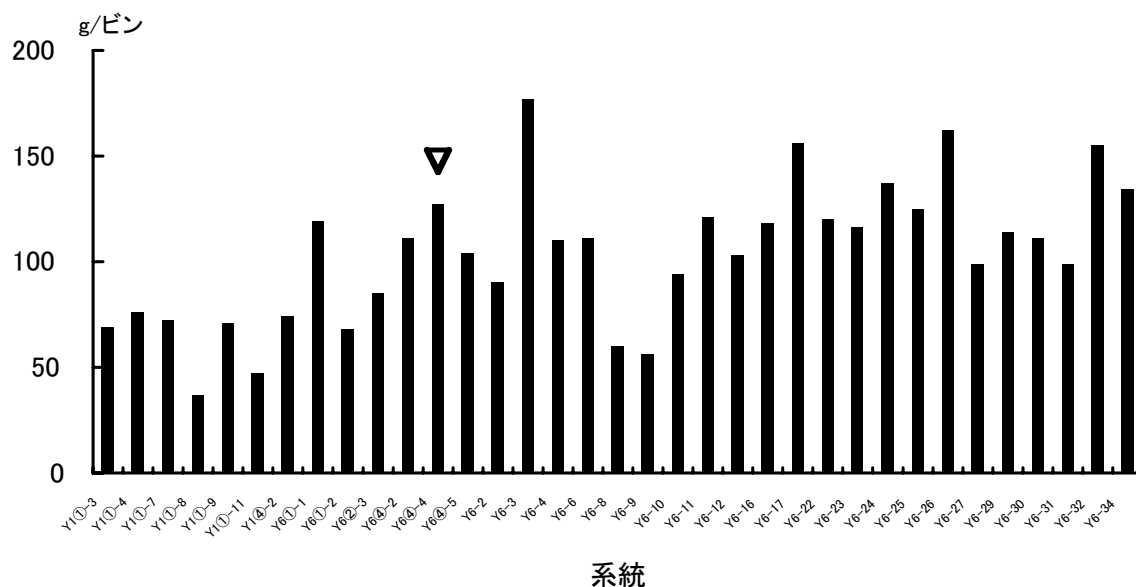


図6 ヤマブシタケ交配株の収量

(3) 神経細胞保護物質

乾燥ヤマブシタケ子実体を 85% エタノール、アセトンで抽出後、クロロホルム可溶部、酢酸エチル可溶部、水可溶部に溶媒分画した。アミロイド β による神経細胞死を抑制する効果がクロロホルム可溶部に見られたため、活性試験の結果を指標に、この画分をシリカゲルカラム、順層 HPLC などを用いて、精製し、化合物 1 を精製した。構造(図 7)と活性(図 8, 縦軸はA β の存在下で活性物質の活性を細胞生存率で示した)を以下に示した。⁶⁾

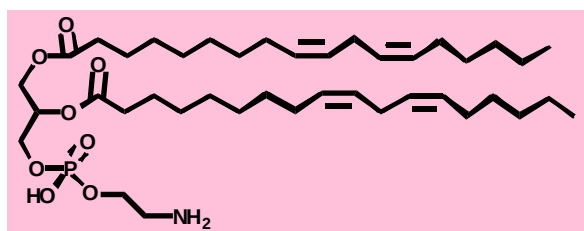


図 7 活性物質 1 の構造

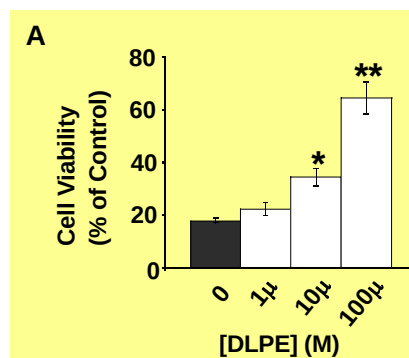


図 8 活性物質 1 の神経細胞保護活性

オ 今後の問題点

ヤマブシタケ胞子の発芽率が低く、採取した子実体の取り扱いによっては胞子の発芽がほとんどみられなくなる。効率的な交配作業を行うためには、交配系の検討や胞子発芽率の向上など育種技術の検討が必要である。

カ 要約

(1) ヤマブシタケ栽培条件とヘリセノン類含有量の関係

系統、栄養材、乾燥方法、発生ステージ、発生温度の栽培条件の違いと子実体ヘリセノン含有量の関係について検討した結果、これらの条件の相違によりヘリセノン含有量に差が生じることを確認した。長野県林業総合センターの既往の成果により、栄養材にスーパーブランを用いると収量性が向上し、子実体の形状を整えるには 10～12℃の低温域の発生温度が適していることが分かっている。本研究の目的は、有効成分含有量の安定性を確保することと次項のヘリセノン類を高含有する系統の育成である。栽培条件によってヘリセノン類含有量に差が生じるものの、これまでに検討した栽培条件とヘリセノン含有量の関係を総合的に判断して、既往の栽培技術をヘリセノン類含有量評価の標準的な栽培方法として採用しても大きな問題のないことが示唆された。

(2) 交配による系統の作出と交配株のヘリセノン類含有量の定量

選定した育種素材の野生株 3 系統について単孢子分離を行い、それぞれ一核菌糸体を取得した。これらの一核菌糸体の交配により、各系統内の自殖系統、各系統間他殖系統を分離し系統を作出した。

自殖系交配株について栽培試験を行い、収量を調査するとともに、収穫した子実体についてヘリセノン類含有量を定量した。その結果、含有量が多く収量の優れた菌株を優良素材として選抜した。

キ 引用文献

- 1) 河岸洋和 (2005) ヤマブシタケ、「きのこの生理活性と機能」、河岸洋和 (編). 東京: シーエムシー出版、240-247.
- 2) Kawagishi, H. *et al.* (1991) Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericum erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* 32, 4561-4564
- 3) Kawagishi, H. *et al.* (1993) Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericum erinaceum*. *Phytochemistry* 32, 175-178
- 4) 笠原浩一郎ら (2001) ヤマブシタケの高齢障害者への効用. 群馬医学、別冊 77-81.
- 5) 増野和彦 (2002) ヤマブシタケの特性とその栽培法、日本応用きのこ学会第 6 回大会講演要旨集 17-20
- 6) Nagai, K. *et al.* (2006) Dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine from *Hericum erinaceum* protects against ER stress-dependent Neuro2a cell death via protein kinase C pathway. *J. Nutr. Biochem.* 17, 525 – 530

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

c. 血圧降下作用をより高めたハタケシメジの育種

ア 研究目的

三重県では、ヒラタケを中心としたきのこの人工栽培が盛んに行われてきたが、ブナシメジの進出とともに需要が低迷し、生産量が年々減少し続けている。ヒラタケ生産者の一部は、ブナシメジやエリンギ等他のきのこ栽培に転換したが、依然として経営は厳しい状況にある。そこで低迷するきのこ産業の活性化を図るため、ヒラタケに続く新しいきのことして、ハタケシメジの栽培技術の開発に力を入れてきた。しかしながら、ハタケシメジは形状において、ブナシメジ等他の栽培きのこの差別化が図りにくいことから高価格の維持が困難で、生産量が伸び悩んでいる。こうした中ハタケシメジの機能性に着目し調査を行ったところ、他の栽培きのこと比較して血圧降下作用が高いことが判明した。そこで、現在の栽培系統より血圧降下作用の高いハタケシメジ菌株を探索し、これらを育種素材に利用することにより、さらに商品性、機能性の高いハタケシメジを作出し生産現場に普及する必要がある。

イ 研究方法

当研究部において収集、保存しているハタケシメジ野生菌株の栽培試験を行い、良好な子実体の得られた系統について、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を調査し、血圧降下作用の高い菌株を探索する。さらに、選抜された優良な菌株同士を交配し、栽培試験を行うことにより血圧降下作用、商品性いずれにおいても優れた菌株を見出し、安定した栽培方法を検討する。

ウ 結果

当研究部において1998、1999年に収集保存したハタケシメジ野生菌株16系統について、PDA平板培地上で菌糸伸長、菌糸形態の良好なものの9系統を選抜した。これらの系統について、バーク堆肥を主体とした培地を用いて、PPビンによる栽培試験を行ったところ、LD98-3、98-6、98-7、99-3の4系統で比較的良好な子実体の発生が認められた。これらの菌株と、今までに良好な発生が確認されている、LD96-4、96-5、96-8および栽培系統2系統の合計9系統についてACE阻害活性を測定したところ、LD99-3が、栽培系統である亀山1号と比較して血圧降下作用が高いことが判明した。また、このLD99-3を用いて動物実験を行ったところ、血圧降下作用が認められた。

次に、LD99-3と発生の良好な菌株LD99-6を用いて交配試験を行い、菌糸形態の良好なものについて、先と同様に栽培試験を行ったところ、E、F、G、Jの4系統で良好な子実体の発生が認められた。これらの菌株についてACE阻害活性を測定したところ、E、F系統の血圧降下作用が高いことが分かった。

また、当研究部において育種したハタケシメジ菌株と他県の栽培品種、亀山1号の計9系統とオオイチョウタケ、カンゾウタケについて、ACE阻害活性を調査したところ、ハタケシメジではいずれの菌株においても高い阻害活性が認められた（表－1）。そこで、ビン栽培で発生の良好である亀山1号、波賀のめぐみ、野生株LD99-3、選抜したLD99-3とLD99-6の交配株であるF系統、当研究部で育種選抜したLD96-4⑦についてバーク堆肥を主体とした培地を用いて、2.5kg菌床による袋栽培を行ったところ、LD96-4⑦の発生が良好であった（表－2）。なお、優良株として選抜したLD99-3とLD99-6の交配株は、継代培養を続ける間に発生量が低下し、また、発生ロスが増加したが、LD96-4⑦は2年間PPビンによる継代培養を続けても発生が安定していた。

表－１ 菌株別のACE阻害率

菌株の種類	阻害率 (%)
亀山 1 号	88.8
LD99-3	94.0
LD99-6	93.6
LD99-3×LD99-6E	91.7
LD99-3×LD99-6F	93.4
LD96-4⑦	89.8
波賀のめぐみ	91.1
宮城LD-1	87.4
宮城LD-2	84.3
オオイチョウタケ	89.2
カンゾウタケ	32.1

表－２ 菌株別の子実体発生量

菌株の種類	平均発生量(g)
亀山 1 号	452.5±44.53
LD99-3	490.0±41.40
LD99-3×LD99-6F	485.0±44.53
LD96-4⑦	583.0±49.45
波賀のめぐみ	410.0±31.27

エ 考察

ハタケシメジの人工栽培にあたっては、よい種菌を作出してもその菌株の維持が難しく、特に雑菌汚染や活力低下により発生量、形状等が著しく低下する恐れがある。本研究において、血圧降下作用の高い菌株として選抜したハタケシメジLD99-3およびLD99-3とLD99-6の交配株について、1年以上継代培養を続けてきたところ、種菌のロットにより発生量ならびにロス率の差が認められた。このことから、優良種菌の開発にあたっては、種菌選抜だけでなく、安定した種菌の維持および製造方法の探索もあわせて行う必要がある。

本研究で選抜したハタケシメジLD99-3およびLD99-3とLD99-6の交配株F系統については、従来品と比較して食感が悪いなど商品化にあたって問題が生じた。特にハタケシメジは系統による食感の違いが大きく、形状、収量、機能性ともに良くても、食感が悪いと消費者には好まれない。今後、ハタケシメジ優良品種の開発を行っていく上で、機能性、多収量性、形状の調査だけでなく、食味の評価も行う必要がある。

選抜した交配株LD96-4⑦株については、三重県で生産されている亀山 1 号と比較して血圧降下作用も同等で食味が良く、継代培養を続けても、発生が安定していることから、今後は品種登録に向けた特性調査を行う。また、ビンおよび袋栽培いずれにおいても生産現場へ移転可能な安定した栽培技術を確認し、現地への普及を図る。さらに、選抜したLD99-3、LD99-6株についても発生が比較的安定していることから今後も継代培養を続け安定性を確認するとともに、袋栽培における安定した発生技術を開発する。

また、今までに工業研究部と連携して、ハタケシメジの加工食品への利用の検討を行い、練り製品や麺類等への利用法を開発してきたことから、今後はより機能性の高い食品素材として、

特にハタケシメジ未利用部、規格外品の有効利用法の開発を行う予定である。

オ 今後の問題点

現在三重県内において生産に使用されている亀山1号菌においても、開発から年月が経過し、種菌の劣化が原因と考えられる発生不良が生じている。今回育種選抜したハタケシメジ菌株の中にも、保存、継代培養を続けるうちに、菌株が劣化してしまうものが認められており、安定した菌株の維持方法ならびに優良種菌の製造条件の確立が急務である。

今後は、栽培品種および今回選抜した菌株について、種菌メーカーや生産者らと連携して、安定した種菌の製造条件の確立ならびに良好種菌の早期判定技術の開発を行い、生産現場への普及を目指す予定である。

カ 要約

ハタケシメジ野生菌株の中から、菌糸伸長、菌糸形態の良好なもの9系統を選び、バーク堆肥を主体とした培地を用いて栽培試験を行ったところ、4系統で比較的良好な子実体の発生を認めた。これらの菌株と、これまで良好な発生を確認している既存の系統についてACE阻害活性を比較したところ、LD99-3が優れた血圧降下作用をもつことが判明した。動物実験でも、LD99-3の血圧降下作用を確認した。

血圧降下作用の高いLD99-3と発生の良好な菌株LD99-6を用いて交配試験を行い、菌糸形態の良好なものについて栽培試験を行い、子実体のACE阻害活性を測定したところ、E、Fの2系統の血圧降下作用が高いことが分かった。

ビン栽培で発生の良好な亀山1号、波賀のめぐみ、野生株LD99-3、本研究で選抜したLD99-3とLD99-6の交配株であるF系統、当研究部で育種選抜したLD96-4⑦についてバーク堆肥を主体とした2.5kg菌床による袋栽培を行ったところ、LD96-4⑦の発生が良好であった。本研究で優良株として選抜したLD99-3とLD99-6の交配株は、継代培養を続ける間に発生量が低下し、また発生ロスが増加したが、LD96-4⑦は2年間PPビンによる継代培養を続けても発生が安定していた。

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

d. 課題名：エストロゲン様活性をより高めたマンネンタケの成分育種

ア 研究目的

マンネンタケは伝承的に漢方薬の原料等に用いられ、その機能性について期待されてきた。九州大学グループはこれまでの研究で、マンネンタケの女性ホルモン補助作用に着目し、動物実験の結果を踏まえて、骨粗鬆症に対する予防効果を示唆している。さらに、本きのこ抽出物が高い抗男性ホルモン活性を有し、動物実験等で前立腺肥大改善効果があることも確認している。現在、本病の治療剤に用いられている抗男性ホルモン剤は骨粗鬆症を引き起こす副作用の懸念がある。これらのことから、前立腺肥大症の抑制の効果がありしかも骨粗鬆症予防の機能性を持つ多機能のマンネンタケを創出することにより社会貢献ができると考える。そのために、これらの機能性成分を明らかにし、さらにその成分を多く含有する系統を育種することにより優良なマンネンタケ品種を創出することを目的として本研究を行う。このことにより当該品種を農林業上の特産作物として効率的に生産し、産業振興に寄与する。

イ 研究方法

1) マンネンタケ菌株収集

我が国各地で採取された野生株、海外産株を、譲渡・購入により収集した。

2) 収集株の培養特性調査及び栽培試験

各菌株について、適正培養温度等の変異把握と一定温度下での菌糸体成長の変異を調査した。優良株選抜の基礎資料とするため、各菌株について空調施設内での菌床栽培試験を行い、子実体収量を比較した。

収量性に優れた系統について原木、菌床ブロック、菌床びんでの栽培を行い、比較した。また、菌床びん栽培における収穫可能回数を求めた。

びん栽培で収量性の高い13系統について、子実体中の機能性成分（トリテルペノイド）含有量の比較を行った。

3) 優良系統交配株の創出とびん栽培試験

供試種菌 機能性成分含有量において優良と考えられる BMC9049 と、子実体収量と形状において良好な FPF-030622B の2系統株について、原木栽培子実体（殺菌短木法）から担子胞子を単離し、培養した両系統1核菌糸体による交配株 450 株のうち、菌糸体成長により選抜した優良交配株 22 菌株を供試した。

栽培試験 菌床びん培地（スギ：ブナ：綿実殻：コーンコブ：米糠＝1:1:1:1 V/V を850ml びんに500g 詰め）に種菌を接種し、22.5℃±2℃で約80日間培養後24℃±1℃、>90% RH で子実体を形成させた。最も収量の高かった系統について、トリテルペン類含有を調べるためにHPLC分析に供試した。

4) 栽培培地の材料別子実体含有成分評価

供試種菌 絞り込んだ優良株2菌株（BMC9049、FPF-030709B）

培地材料 米ぬかを栄養材（20%）として、①ブナ ②クヌギ ③ユリノキ ④サクラ ⑤ブナ＋スギ ⑥ブナ＋ヒノキ の6種の培地。鋸屑4（2種類の場合2:2）：米ぬか1を混合し850ml びんに550g 詰め。含水率65%前後。

栽培方法 前述と同様

トリテルペン含有量評価

供試子実体：2)、3)、4) で発生させたマンネンタケ各系統の子実体

定量成分：女性ホルモン補助作用に関与していると考えられるトリテルペン類

定量：各子実体の30%エタノール抽出物についてHPLC分析を行った。

ウ 結果

1) マンネンタケ菌株収集

野生株を中心に約 80 株を収集し、菌糸体成長が良好（スムーズ、コロニー正円）な 77 株を栽培試験に供試した。

2) 収集株の培養特性調査及び栽培試験

菌糸体成長に対する培養温度の影響について一部の例を図 1 に示すが、殆どの系統の至適温度が 30℃前後にあり、一般的な食用きのこに比べ高いと考えられた。また、各系統の 25℃における二核菌糸体成長速度については、培養中期 7 日間の平均で 9.7～88.3mm（平均 42.2mm）と系統間に大きな差がみられた（図 2 にコロニー直径の頻度分布で示す）。

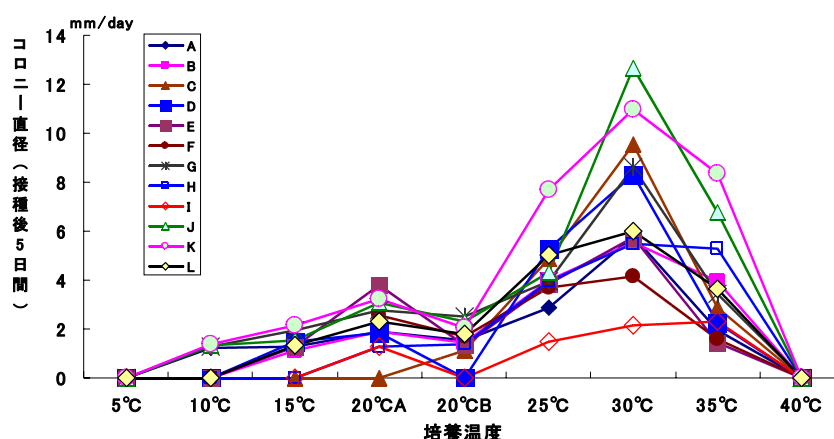


図1 マンネンタケ野生株の菌糸体成長に対する培養温度の影響

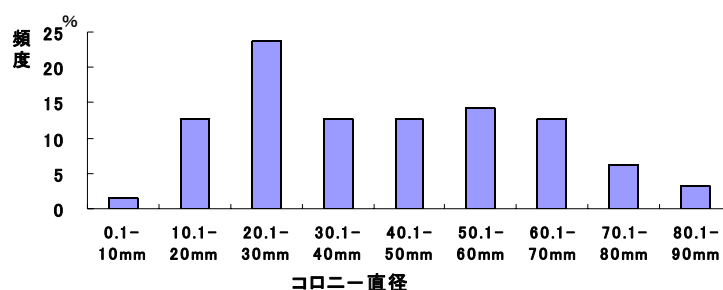


図2 25℃における菌糸体成長速度

菌床びん栽培では子実体形成が見られないものもあったが、得られた子実体収量についてもびんあたり 3.5 ～ 76.5g（平均 44.9g）と大きな差がみられ、育種効果が高いと考えられた。

子実体の形態分類では、傘型が 54.4 % と多く、鹿角型が 29.4 %、中間型が 16.2 % であった。ただし、びん栽培で鹿角型あるいは中間型のものが原木栽培で傘型となるものもみられた。

また、収穫回数についてのびん栽培試験では、多い系統では 5 回収穫でき、総収量（生重）では 300g/びんを超える系統もみられた。

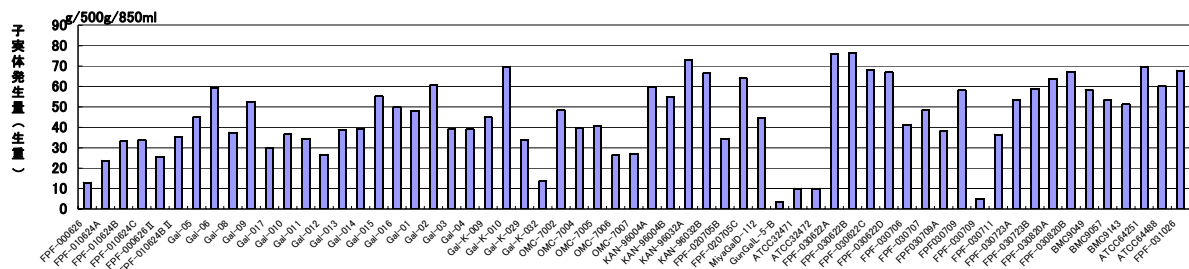


図3 マンネタケ系統別子実体収穫量(菌床びん栽培:ブナ+スギ+綿実殻+コーンコブ+米ぬか)



写真1 栽培した野生系統の子実体形態分類

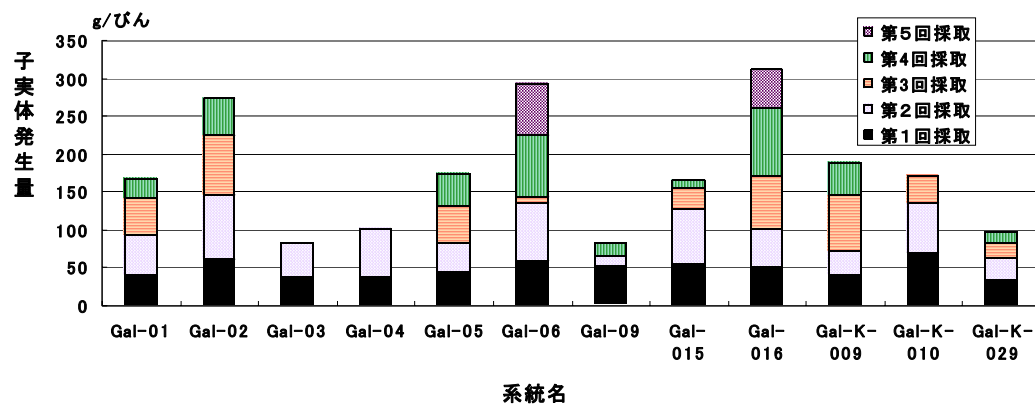


図4 菌糸体成長優良系統の子実体発生量(累積、菌床びん栽培:500g/850ml)

子実体収量について培地重量 1 kg あたりで、びん栽培、原木栽培、袋栽培を比較した結果、系統別に異なるが、全体的にびん栽培＞原木栽培、あるいはびん栽培＞袋栽培といった傾向がみられた。FPF-030622B が安定して高収量であった。



原木栽培



菌床袋栽培



菌床ビン栽培

写真2 マンネンタケ栽培方式

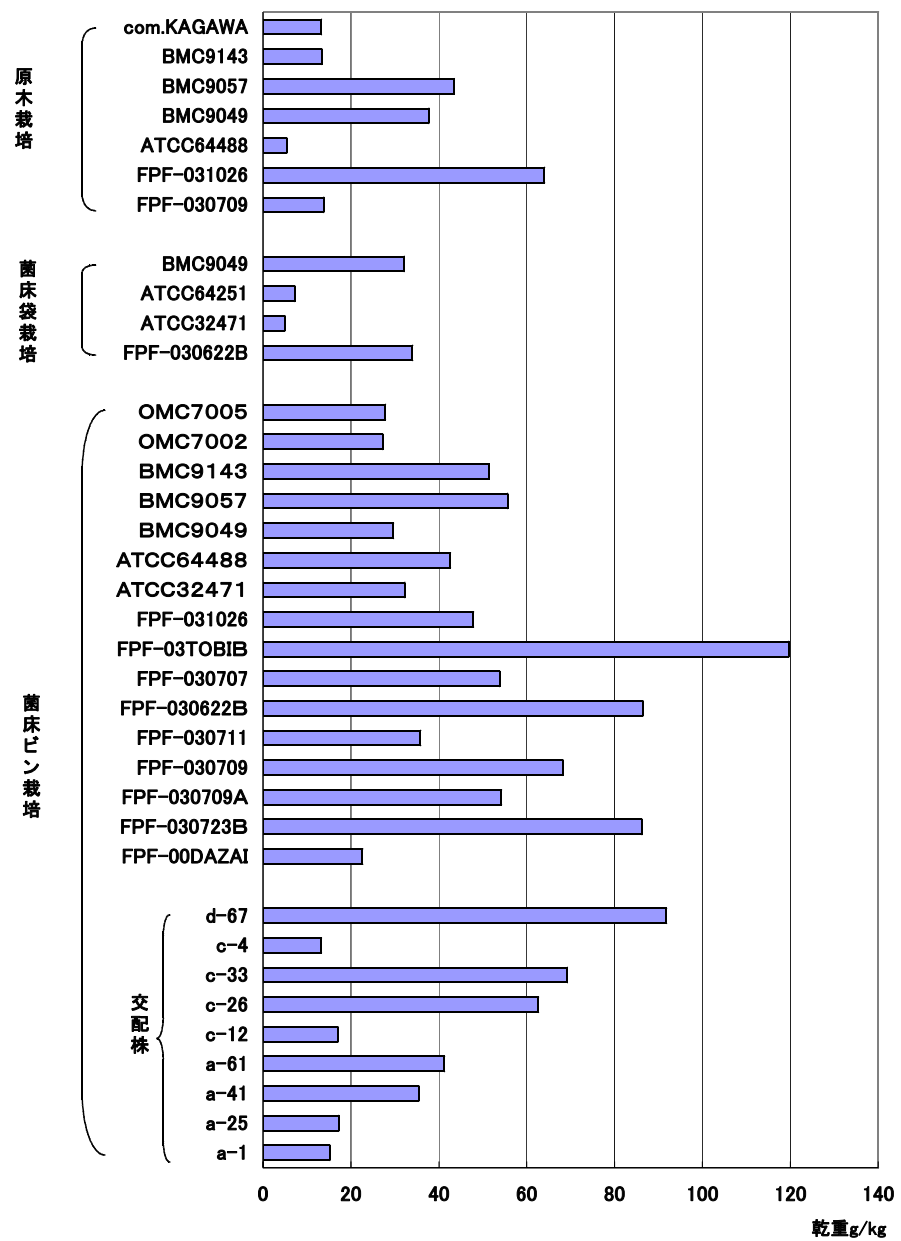


図5 栽培方式別収量(単位培地量当たり)

表1 マンネンタケ系統別30%EtOH抽出物中のトリテルペン量

	Ganoderiol A (μ g/mg)	Ganoderiol F (μ g/mg)	Ganodermanontriol (μ g/mg)
BMC9049	0.69$\pm$0.02	0.54$\pm$0.03	5.15$\pm$0.05
BMC9143	—	—	0.36 $\pm$ 0.01
ATCC64488	—	1.13 $\pm$ 0.01	2.71 $\pm$ 0.01
ATCC64488	—	—	2.73 $\pm$ 0.05
FPF-030622B	—	0.18$\pm$0.01	1.97$\pm$0.02
Com.Kagawa	—	—	0.25 $\pm$ 0.00
BMC9057	—	—	0.46 $\pm$ 0.01
FPF-030723A	—	—	1.08 $\pm$ 0.03
FPF-031026	—	—	—
FPF-030707	—	—	—
FPF-030820B	—	—	0.35 $\pm$ 0.01
FPF-030709A	—	—	0.65 $\pm$ 0.01
FPF-030709	0.55$\pm$0.03	1.10$\pm$0.02	8.20$\pm$0.13

子実体中のトリテルペン含有量は系統別に差がみられ、BMC9049 および FPF-030709 が高含有であった。

3) 優良系統交配株の創出とびん栽培試験

交配株の菌糸体成長速度、コロニーの正円性のいずれにも大きな変異がみられた。

成長に優れ正円性のもの 22 系統について栽培試験を行った結果、すべての子実体が傘を形成しない奇形であった。繰り返しの栽培試験でも同様の結果であった。収量において両親株を上回ったのは1系統のみであった。

トリテルペン類含有量においては低含有であった。

4) 栽培培地の材料別子実体含有成分評価

FPF-030709B 株が比較的トリテルペン類含有量が高く、特に、ブナ+スギ培地が最も高かった。次いでサクラ培地が高い値であった。全体的には ganoderma acids の含有量が高かった。

BMC9049 株は低極性の ganoderma alcohols の含有量が比較的高く、これは、ブナ+ヒノキ培地で最も高かった。

栽培培地の材料別にトリテルペン類の含有量に変異がみられ、培地材料により高含有にできる可能性が示唆された。

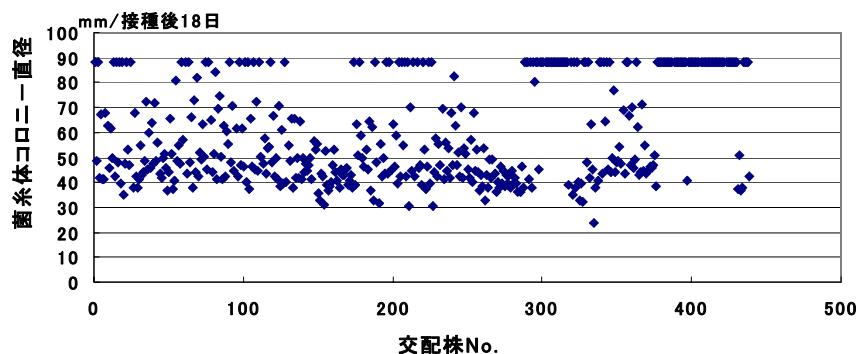


図6 マンネンタケ交配株の菌糸体成長変異

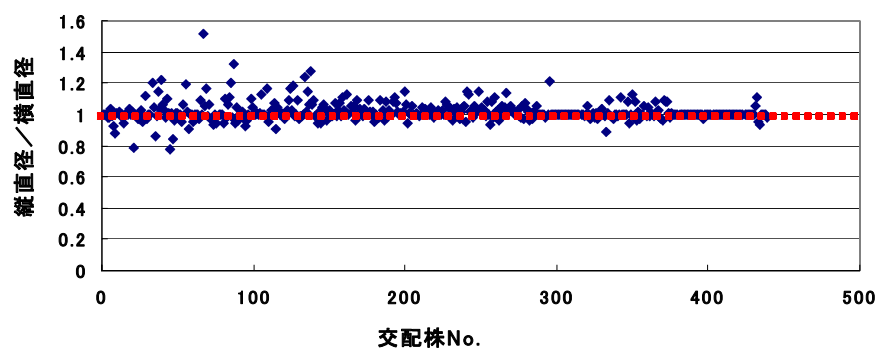


図7 マンネンタケ交配株菌糸体コロニーの正円性



写真3 マンネンタケ交配株の奇形子実体

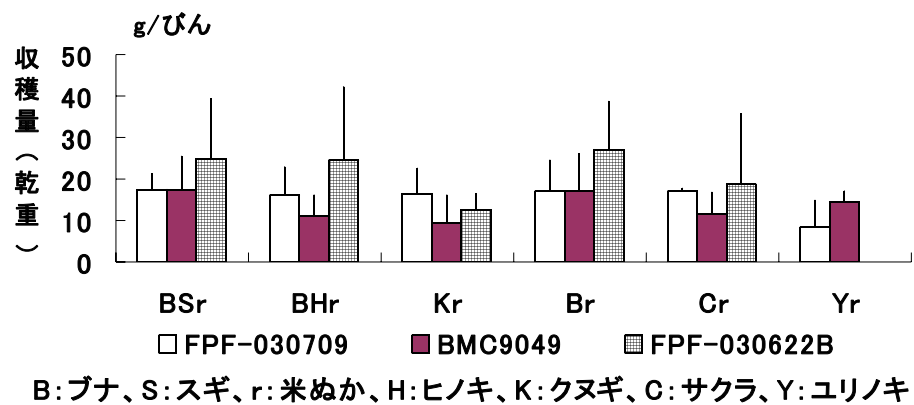
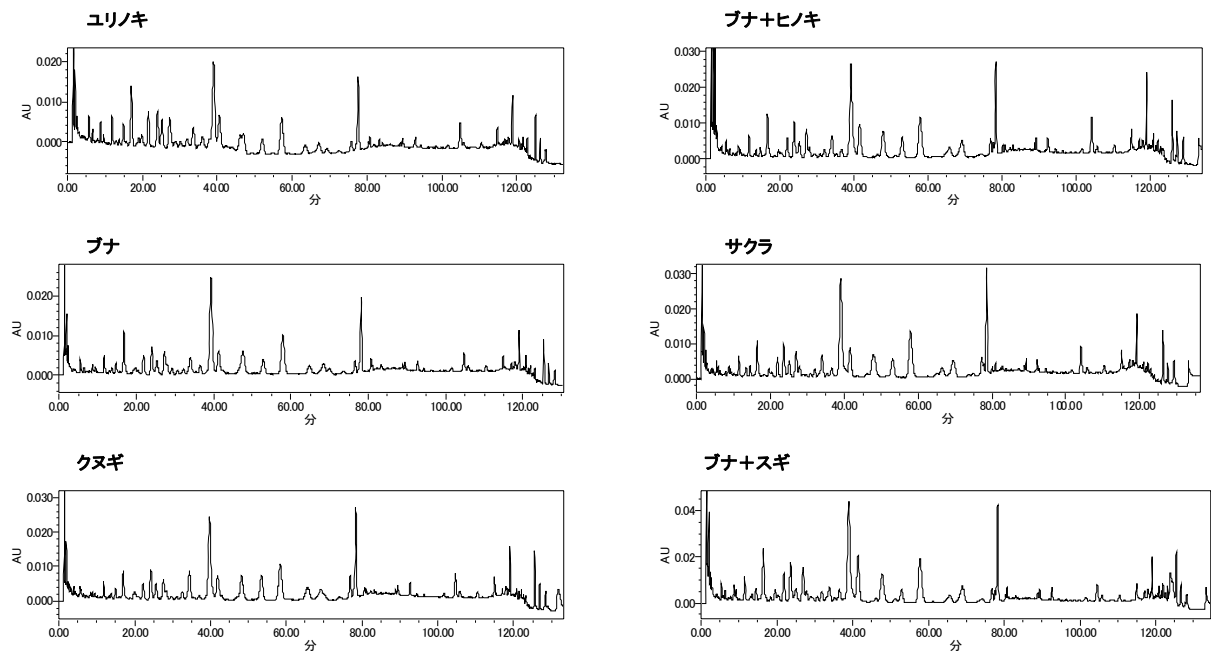


図8 培地材料別マンネンタケ収量比較

系統名: FPF-030709



系統名: BMC9049

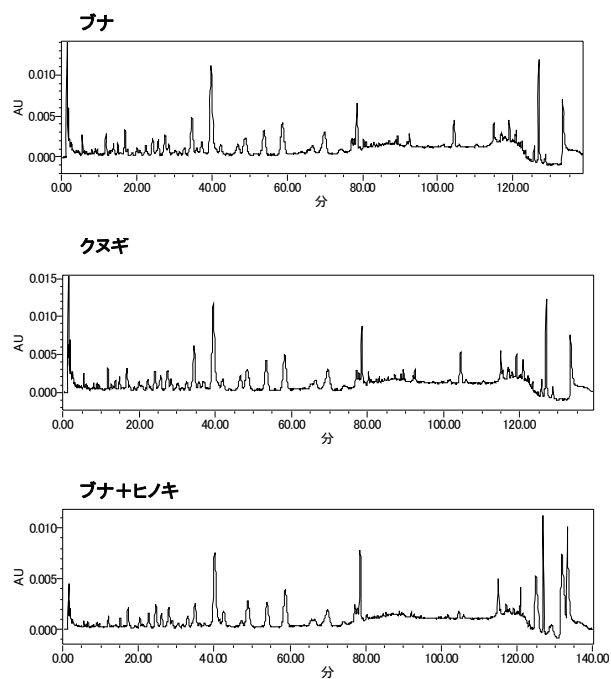


図9 培地材料別発生子実体のHPLC分析
(系統名 FPF-030709, BMC9049)

エ 考察

本研究ではできるだけたくさんの菌株収集を行い、選抜によって有効成分含有量の多い優良株を選抜することを目標にしていた。系統によって成分含有量に変異が認められ、育種効果が期待できることを確認し、数種の優良な野生系統、市販系統を選抜できた。さらに優良系統の単孢子の分離と発芽成長、それらによる交配技術確立することができた。これによって菌糸体の成長に変異のある交配株群を創出することができた。しかしながら予期せぬことに、これら交配株すべてが栽培によって傘を形成しない奇形子実体を生じた。2回の再現試験でも同じ結果を得た。また交配株子実体のトリテルペン含有量は親株より少なかった。

その後、栽培培地の材料を変えることによってよりトリテルペン含有量の多い子実体を得る技術開発を目標に検討を行った結果、野生株の中に優良株を見出すことができ、培地材料が成分含有量に影響を及ぼすことも見出すことができた。

トリテルペン含有量の高いマンネンタケ系統および栽培培地材料の選抜結果については、今後の本きのこ生産の基本となり、健康食品の材料供給として産地化を進めるに当たり有効に活用できる。

また、栽培は従来原木栽培が主であったが、安定供給のためには空調を利用した菌床栽培が適しており、その点で本研究におけるびん栽培技術開発は実用化できる。

成果の活用については、マンネンタケの商品化（健康補助食品、特定保健用食品等）に向けて天候に左右されず安定供給できる菌床びん栽培の実用化試験と、コストダウン、収量増のための栽培技術改善を行う余地があると考えられる。

オ 今後の問題点

健康補助食品あるいは特定保健用食品として商品化するために、さらに有効成分の特定と骨粗鬆症予防・改善のメカニズムを明確にする必要があり、取り組んでいく。

マンネンタケ子実体生産についてはすでに福岡県内で実用化試験に取り組んでいるが、今後、コストダウン、収量増を図っていく。

カ 要約

1) マンネンタケ菌株収集

野生株を中心に約 80 株を収集し、菌糸体成長が良好な 77 菌株を栽培試験に供試した。

2) 収集株の栽培試験

77 系統のうち 68 系統で子実体形成がみられ、形態特性分類では、傘型が 54.4 % と多く、鹿角型が 29.4 %、中間型が 16.2 % であった。ただし、びん栽培で鹿角型あるいは中間型のものが原木栽培で傘型になるのものもみられた。

子実体収量について培地重量 1kg あたりで、びん栽培、原木栽培、袋栽培を比較した結果、系統別に異なるが、全体的にびん栽培 > 原木栽培、あるいはびん栽培 > 袋栽培といった傾向がみられた。FPF-030622B が安定して高収量であった。

子実体中のトリテルペン含有量は系統別に差がみられ、BMC9049 および FPF-030709B が高含有であった。

3) 優良系統交配株の創出とびん栽培試験

交配株の菌糸体成長速度、コロニーの正円性のいずれにも大きな変異がみられた。

成長に優れ正円性のもの 22 系統について栽培試験を行った結果、すべての子実体が傘を形成しない奇形であり、繰り返しの栽培試験でも同様の結果であった。収量において両親株を上回ったのは 1 系統のみであった。

トリテルペン類含有量においては低含有であった。

4) 栽培培地の材料別子実体含有成分の評価

FPF-030709B 株が比較的トリテルペン類含有量が高く、特に、ブナ＋スギ培地において最も高

かった。次いでサクラ培地で高い値であった。全体的な含有分量をみるとganoderma acidsが高かった。

BMC9049 株は低極性の ganoderma alcohols の含有量が比較的高く、これはブナ+ヒノキ培地で最も高かった。

栽培培地の材料別にトリテルペン類の含有量の変異がみられ、培地材料の選抜により機能分量を高含有にできる可能性が示唆された。

第1章 機能性を強化したきのこの成分育種

e. マンネンタケのエストロゲン様活性成分の機能性探索

ア 研究目的

マンネンタケ（学名：*Ganoderma lucidum* (Fr.) Krast）はヒダナシタケ目サルノコシカケ科に属する担子菌であり、その子実体を「靈芝」という。古くから、和漢薬、民間薬（生薬、煎薬）の上薬（神薬、仙薬）にランクされ、その煎薬（エキス）には、数々の薬効が伝承されてきている¹⁾。我々はすでに、食用・薬用キノコから、抗男性ホルモン活性を指標にスクリーニングを行い、当該マンネンタケ抽出物が最も高い抗男性ホルモン活性を有することを見出している²⁾。さらに動物ならびに臨床試験において、前立腺肥大症の改善効果が示されている。一方、臨床の場合において、前立腺肥大症や前立腺ガンの治療に、抗男性ホルモン剤が投与されているが、その副作用として、骨密度の低下、すなわち骨粗鬆症を引き起こすことが懸念されている。したがって、マンネンタケに、前立腺肥大症や前立腺ガンの治療に有効な薬理活性である抗男性ホルモン活性のみならず、骨密度低下抑制効果を見出すことができたならば、安全性の高い多機能性天然素材として、更なる市場の拡大が期待できる。特に、マンネンタケに関しては、古来より多機能性効能が示唆されていることにも着目し、骨密度改善効果を期待して、研究を開始した。すでに、骨粗鬆症に有効なエストロゲン様活性をマンネンタケが有していることを見出している。しかしながら、どの株が、または、どの成長段階のマンネンタケが、骨粗鬆症に有効であるかは、明らかとなっていない。また、動物実験での効果も未検証であった。本研究では、前立腺肥大症ならびに前立腺ガンに有効な抗男性ホルモン活性を有するマンネンタケに着目し、さらに、抗男性ホルモン剤を投与した際の副作用として懸念される骨粗鬆症にも有効な優れた多機能性マンネンタケ素材を見出すとともに、含有される有効成分の同定ならびに、それらの成分の作用機構を明確にすることによって、成分育種のための基礎データを蓄積することを目的とした。

イ 研究方法

① アンタゴニストを用いたエストロゲン様活性確認試験

①-1 目的

これまでマンネンタケが、エストロゲン様活性を有することは、エストロゲン依存的に増殖するMCF-7細胞を用いた細胞増殖促進活性を指標に検討してきた。しかしながら、この結果は、間接的であり、エストロゲン様活性以外の活性（たとえば、成長因子様活性など）を反映している懸念もある。したがって、当該活性を確認するために、既知のエストロゲン受容体アンタゴニストであるICI182,780を用いて、マンネンタケの効果が消失するかどうかを検討した。

①-2 供試材料

前立腺肥大症の治療に有効である抗男性ホルモン活性の優れた大分県玖珠町で栽培されたマンネンタケ（有微創研多胞子株9049株）15kgを95% EtOHで抽出後、凍結乾燥させた。これをdimethylsulfoxide (DMSO)に溶解させ、実験に供した。

①-3 実験方法

10% FBS (fetal bovine serum) PRF DMEMで90 mm組織培養シャーレで培養したMCF-7細胞を、培地を除去した後、0.2% trypsin/PBSを1 ml添加し剥離した。CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)で約1分間インキュベートした後、培地を添加して細胞を回収し、遠心処理を行い、培地を除去して沈殿した細胞を回収した。培地(1% FBS添加PRF DMEM)で 4×10^4 cells/mlに調製し、1ml/wellで24 well plate (FALCON)に播種した。24時間培養後、血清無添加の培地で培地wellを1回洗浄し、1% cFBS (charcoal treated FBS) PRF DMEMで培地交換すると共に試料(溶媒はDMSO,系内0.1%添加)を添加した。さらに48時間もしくは96時間培養後、血球計算盤を用いた細胞数測定を行った。コントロールにはDMSOを用いた。ポジティブコントロールとして17 β -エストラジオール(E2)を用いた。エストロゲン受容体アンタゴニストとしては、ICI182,780を用いた。

② 卵巣摘出ラットを用いた骨密度改善効果

②-1 目的

マンネンタケの抽出物に*in vitro*でエストロゲン様活性を有することが確認された。そこで、動物実験にてその効果を検証した。

②-2 実験方法

骨粗鬆症モデル動物として生後11週齢のSD系卵巣摘出ラット(OVX)を購入し、2日間予備飼育後、マンネンタケ投与群には、マンネンタケEtOH抽出物を0.3% (MH群)、0.03% (ML群)の濃度にそれぞれ調製した飼料を摂食させた。ポジティブコントロールとして用いたE2投与群にはE2を週に2回の皮内注射によって60 μ g/Kg body weight/week投与した。投与期間は75日間とした。これらの投与を行った後、骨密度及び骨代謝マーカーへの影響を評価した。

③ 破骨細胞分化抑制試験系の構築

③-1 目的

動物実験の結果から、マンネンタケ抽出物投与群では、E2投与群と比較して、子宮重量に及ぼす影響が小さく、かつ、骨密度改善効果が観察されたことから、マンネンタケ抽出物の骨密度改善効果は、エストロゲン様活性のみならず、もしくは、それに加えて骨代謝関連細胞に影響を及

ぼすことが予想された。そこで、骨を作る骨芽細胞ならびに、骨を吸収する破骨細胞に着目した。骨芽細胞への影響を検討したところ、変化が観察されなかった。そこで、破骨細胞に着目し、特に、その分化抑制が、骨粗鬆症に有効であることが示唆されていることから、破骨細胞分化抑制効果について検討した。

③－２ 実験方法

5週齢のオスSD系ラットの大腿骨と頸骨から骨髓細胞を取り出し、15% FBS α -MEM培地(10% heated ROS culture medium、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含有)で 2×10^4 cells/wellに調製した後、24 well plateに播種し、エタノールに溶解させたサンプルを系内に1%添加した。培養4日目に培地交換を行い、サンプルを同様に添加した。さらに2日間培養後、TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)染色を行い、位相差顕微鏡で成熟破骨細胞数をカウントした。

④ 破骨細胞分化抑制活性を指標にした活性成分の探索ならびにメカニズム解析

④－１ 目的

閉経を迎える前の健康な成人女性は骨形成と骨吸収がバランスよく保たれ、骨量が維持されている。しかしながら、閉経後、卵巣機能の低下により女性の体内ではエストロゲンが急激に減少し、骨形成を骨吸収が著しく上回るために骨密度が低下する。マンネンタケのエタノール抽出物に、破骨細胞の分化抑制活性が観察された。そこで破骨細胞の分化抑制活性を評価可能な、下記の実験系にて、活性成分の追跡を行った。

④－２ 実験方法

活性成分の追跡：マンネンタケの95%EtOH抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取逆相HPLCにより分画した。破骨細胞について：破骨細胞は造血幹細胞に由来し、骨組織においてRANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)などのサイトカインの刺激を受け成熟した破骨細胞に分化する。活性化された成熟破骨細胞は盛んに骨吸収を行う。破骨細胞のマーカー分子としてTRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)が利用されている。以下の実験系を構築し検討した。ラット骨髓培養系を用いた検討：5週齢のオスSD系ラットの大腿骨と頸骨から骨髓細胞を取り出し、15% FBS α -MEM培地(10% heated ROS culture medium、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含有)で 2×10^6 cells/wellに調製した後、24 well plateに播種し、サンプルを溶解させたエタノールを系内に1%添加した。培養3日目に培地交換を行い、サンプルを同様に添加した。さらに2日間培養後、TRAP染色を行い、位相差顕微鏡で成熟破骨細胞数をカウントした。マウス由来前破骨細胞(RAW-D)を用いた検討：前培養したシャーレから培地を除去し、10% FBS α -MEMを3 ml加え、ディスポーザルピペットでwellの底を優しく洗い細胞を剥離させた。12000 rpm 5 min遠心し、細胞を回収した。これを10% FBS α -MEM (final 1ng/ml TNF- α , 20 ng/ml RANKL)を用いて 4.5×10^4 cells/mlの細胞懸濁液とし、系内1%となるようにそれぞれサンプルを添加した。サンプルは全てエタノールに溶解させた。また、エタノールのみを添加した系をコントロールとし、細胞懸濁液のみのものをブランクとした。それぞれサンプルを添加した細胞懸濁液を96 wellに150 μ lずつ播種した。培養3日目にTRAP染色を行い、細胞を位相差顕微鏡により観察し、その細胞数を計測した。

ウ 結果

①エストロゲンアンタゴニストを用いたエストロゲン様活性

前立腺肥大症抑制効果が動物実験で明確にされているマンネンタケ9049株のエタノール抽出物を、エストロゲン依存的に増殖するMCF-7細胞を用いてエストロゲン様活性を検討したところ、顕著な細胞増殖促進効果が観察された（図1）。その細胞増殖促進効果は、選択的エストロゲン受容体アンタゴニストであるICI182,780により阻害された（図1）。したがって、マンネンタケ9049株のエタノール抽出物は、エストロゲン受容体を介した機構で、細胞増殖促進効果を有していることが示唆された。また、水抽出物で検討したところ、活性は観察されなかった。したがって、活性成分は、エタノールに可溶性脂溶性成分であることが示唆された。

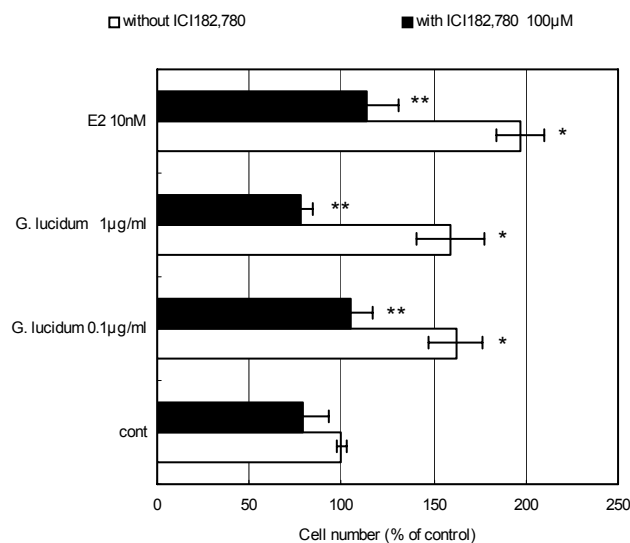


図1 MCF-7細胞におけるエストロゲンレセプターアンタゴニスト ICI 182780 のマンネンタケエタノール抽出物の細胞増殖促進活性に対する影響

MCF7 cells were treated with 0.1, 1.0 µg/ml ethanol extract of *G. lucidum* or 10 nM 17β-estradiol (E2) with or without 100 µM of the ER antagonist ICI 182780. Data are means ± SD (n=3). *, The treatment of the ethanol extract of *G. lucidum* and E2 significantly increase the proliferation of MCF-7 cells. (vs. control, p<0.05). **, The actions of the ethanol extract of *G. lucidum* and E2 in MCF7 cells were significantly inhibited by ICI 182780 (P<0.05)

②卵巣摘出ラットを用いた骨密度改善効果

マンネンタケEtOH抽出物が、エストロゲン欠乏により引き起こされる骨密度低下に対して、抑制活性を有するかどうかを検討するために、卵巣摘出ラットを用いた摂食試験を行った。その結果、顕著な骨密度低下改善効果が観察された（図2）。興味深いことに、子宮重量は、増加傾向が観察されたものの、有意な増加ではなかったことから、選択的に骨代謝に影響を与える機能を有することが示唆された（表1）。

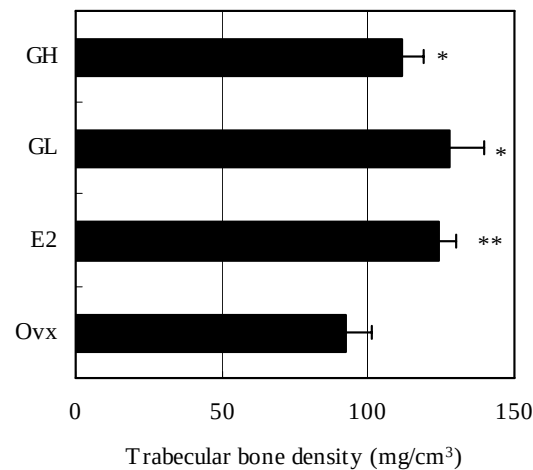


図2 卵巣摘出ラットの海綿骨密度に及ぼすマンネンタケエタノール抽出物の影響
Trabecular bone density determined by pQCT in Ovx controls, and Ovx rats treated with 17 β -estradiol (E2) and the ethanol extract of *Ganoderma lucidum* (GH, GL) (mean $\pm$ SE, Ovx : n=10, E2 : n=11, GL : n=8, GH : n=9, * <0.05, **<0.01 vs Ovx) Ovx, ovariectomized; E2, injected with 17 β -estradiol; GH, 0.3% EtOH extracts of *G. lucidum* in diet; GL, 0.03% EtOH extracts of *G. lucidum* in diet.

表1 体重及び子宮重量

	Ovx	Ovx + E2	Ovx + GH	Ovx + GL
Initial BW, g	244.2 $\pm$ 11.4	243.9 $\pm$ 10.4	247.3 $\pm$ 7.2	249.0 $\pm$ 6.7
Final BW, g	400.3 $\pm$ 28.3	354.7 $\pm$ 23.8*	402.1 $\pm$ 19.5	383.9 $\pm$ 8.6
Uterus wt, mg	60.6 $\pm$ 23.5	180.3 $\pm$ 35.0**	75.8 $\pm$ 9.9	85.1 $\pm$ 12.9
N	8	9	8	7

Results are given as the mean $\pm$ SEM. Ovx, ovariectomized; E2, injected with 17 β -estradiol; GH, 0.3% EtOH extracts of *G. lucidum* in diet; GL, 0.03% EtOH extracts of *G. lucidum* in diet. Ovx : n=8, E2 : n=9, GH : n=8, GL : n=7, * <0.05, **<0.01 vs Ovx

③破骨細胞分化抑制試験系の構築

MCF-7細胞系での検討では、至適濃度が存在するために、今後の研究を進展させるには、他の評価系を見出す必要がある。動物実験により、骨代謝に及ぼす影響が示唆されたので、骨細胞への影響を検討した（図3）。マンネンタケのエタノール抽出物は、骨芽細胞には有意な影響を及ぼさなかった。そこで、破骨細胞について検討したところ、その分化を顕著に抑制することが示された。

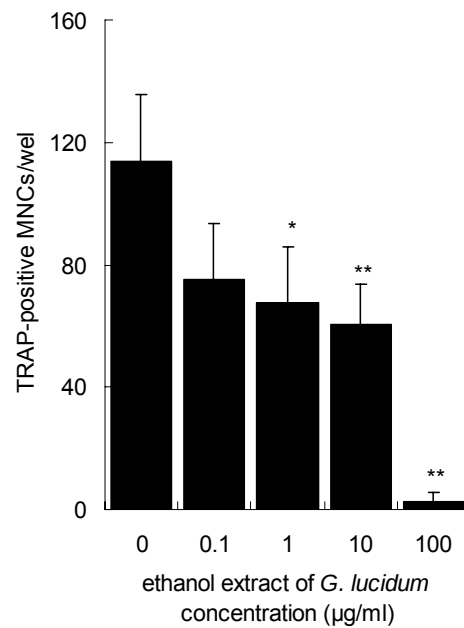


図3 マンネンタケ EtOH 抽出物がラット骨髄細胞培養系 (whole bone marrow culture) に及ぼす影響 (n=4, mean±SD, *p<0.05, **p<0.01 vs control ;t-test)

④破骨細胞分化抑制成分ならびにメカニズム解析

ラット骨髓培養系を用いた検討においては、マンネンタケ抽出物を添加することによってTRAP陽性破骨細胞様多核細胞の形成が抑制された。このことからマンネンタケ抽出物には破骨細胞分化抑制効果があり、これによって骨吸収が抑制される可能性が考えられる。さらに、マウス由来前破骨細胞(RAW-D)を用いた検討においても、破骨細胞への分化抑制効果があることが示された。破骨細胞に直接的に作用し、分化抑制することが示唆された(図4)。そこで、その活性成分を明らかにするため、RAW-D培養系を用いて破骨細胞分化抑制効果を指標として、マンネンタケ抽出物の分画を行った。その結果、活性成分の一つとして、ganoderic acid DMを見出した。さらに、ganodermatriol, ganodermanontriol, ganoderiol A, ganoderic acid B, ganoderic acid C2, ganoderic acid D, ganoderic acid F, ganoderic acid G, ganoderic acid H, ganoderic acid I, ganoderiol Fについて検討した。その結果、ganodermanontriol, ganodermatriol, ganoderiol A, ganoderiol Fに強い分化抑制効果が観察された(表2)。

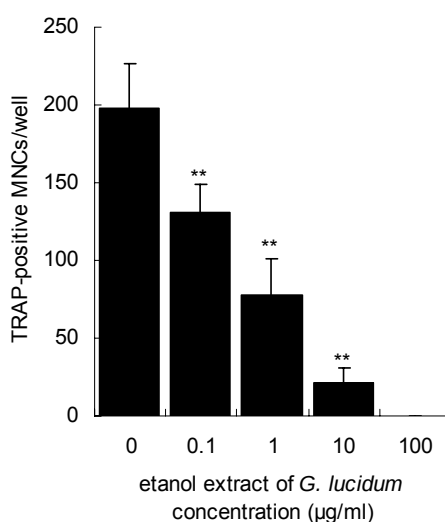


図4 マンネンタケ EtOH 抽出物が前破骨細胞株 (RAW 264 D クローン) の分化に及ぼす影響 (n=4, mean±SD, *p<0.05, **p<0.01 vs control ;t-test)

表2 単離トリテルペノイド類の破骨細胞分化に及ぼす影響

	Concentration (μ M)				
	0.01	0.1	1	10	100
Ganoderic acid B	n	—	—	—	n
Ganoceric acid C2	n	—	—	—	n
Ganoderic acid G	n	—	—	—	n
Ganoderic acid H	n	—	—	—	n
Ganoderic acid I	n	—	—	—	n
Ganoderic acid F	n	n	—	*	n
Ganoderic acid DM	—	—	—	*****	n
Ganodermanontriol	n	*	**	n	n
Ganoderiol F	—	**	**	**	***
Ganoderiol A	**	**	***	***	*****
Ganodermatriol	n	**	*****	n	n

n: not tested

— :no activity

*: 20～40 % inhibition

**: 40～60% inhibition

***: 60～80% inhibition

*****: 80～100% inhibition

エ 考察

本成果により、霊芝由来の特徴的なラノスタン型トリテルペノイドが、活性成分群を形成していることが示された。また、本事業により、それぞれのトリテルペノイドの種類と、破骨細胞の分化抑制活性に関する知見が集積されつつある。本成果を基にした、破骨細胞分化抑制活性を有するトリテルペノイド含量を指標とした、機能性を強化したマンネンタケの成分育種の可能性が示唆された。今後、さらに、どの構造のトリテルペノイドが、どのような活性を有しているかの、分子レベルの生理活性データならびに動物実験データの蓄積、また、それらの組み合わせによる活性変化についてのデータ蓄積により、骨粗鬆症などの高齢性疾患に対して有望なマンネンタケの開発が可能となろう。

オ 今後の問題点

成分育種の過程で、優れたマンネンタケ株もしくは、栽培方法を見出すためには、判断するための指標が必要である。指標としては、次の二つが考えられる。①活性成分を見出し、その活性成分の量を育種の指標にする。②生理活性を指標にする。我々は別途、マンネンタケに含まれるトリテルペノイドのHPLCによる分析方法を確立している。したがって、含有するトリテルペノイドの化学構造と破骨細胞の分化抑制に関する知見が集積し、構造活性相関を明確にできれば、有望なマンネンタケをHPLC分析により選抜することが可能である。また、一方では、生理活性を指標としたマンネンタケ抽出物の評価も重要である。なぜなら、個々の成分同士の相互作用による生理活性発現が考えられるからである。ただし、今回検討した破骨細胞系での検討では、染色後の細胞数のカウントに時間を要するために、別途簡便な生理活性指標の確立が必要である。もしくは、HPLCプロファイルと、破骨細胞の分化抑制活性との間の多変量解析を行い、相関を見出せれば、その指標を基に、成分育種を行うことも可能であると考えられる。加えて、*in vitro*の知見で得られた有効なマンネンタケ株抽出物を、動物実験において、検証することも必要であろう。今後、今回得られた知見を基とした、成分育種研究を、上記の課題に着目し、推進していく必要がある。

カ 要約

マンネンタケのエストロゲン様活性：マンネンタケは、古来より更年期障害に有効であるとされている。更年期障害とは、閉経後の急激な体内エストロゲンの低下により引き起こされることに着目し、マンネンタケがエストロゲン様活性を有するかどうかについて検討した。その結果、*in vitro*でエストロゲン様効果が観察され、卵巣摘出ラットを用いた動物実験においても、骨密度低下抑制活性が観察された。以上の結果より、マンネンタケは、骨粗鬆症などの更年期障害への有効性が示唆された。

マンネンタケの骨代謝系細胞に及ぼす影響：卵巣摘出ラットにマンネンタケ抽出物を投与した実験において、興味深いことに、子宮重量は、増加傾向が観察されたものの、有意な増加ではなかったことから、選択的に骨代謝に影響を与える機能を有することが示唆された。そこで、骨代謝系細胞である破骨細胞に対する影響を検討した。その結果、顕著な破骨細胞分化抑制効果が観察された。さらに活性成分として、その結果、ganoderic acid DM, ganodermanontriol, ganoderatriol, ganoderiol A, ganoderiol Fに強い分化抑制効果が観察された。

今後、有効成分に関する知見を集積することによって、機能性成分育種の道が開けることを期待したい。

キ 引用文献

- 1) 水野卓, 藤原弘, “キノコの化学・生化学” 水野卓, 川合正充編, 学会出版センター, 東京, 1995, pp 214.

- 2) J. Liu, R. Fujita, M. Sato, et al : The effect of strain, growth stage and cultivation condition of *Ganoderma lucidum* on 5 α -reductase inhibition. J. Wood Sci.. 51(2), 189-192 (2005)

第2章 きのこの機能性を高めるための栽培技術の開発

ア 研究目的

生シイタケは、きのこの主要品目である。しかし、近年輸入の増加により、消費量に対する国内生産量は平成12年62%に減少し¹⁾、平成13年に暫定セーフガードが発動された。輸入生シイタケのほとんどは中国産であり、中国産生シイタケに対抗するため、国内産の生シイタケの差別化が必要となっている。

今回、シイタケ中のレンチナンに注目した。レンチナンは免疫賦活作用があり、シイタケ子実体から単離され、医薬品として販売されている²⁾。これまで、レンチナンを高含有するシイタケ品種開発の試みがあるが、栽培条件が異なるとレンチナン含量も異なった³⁾。本研究では、生シイタケのレンチナン含量を高める栽培技術の開発を行う。

イ 研究方法

① 供試シイタケ菌株

森林総研保有国内産83菌株、国内市販品種22品種、全国食用きのこ種菌協会より提供された中国産シイタケ12菌株を使用した。

② シイタケ栽培方法

ブナおがこ：ふすま（乾燥重量比3:1）に混合し、水道水を加えて含水率65%に調製後、1.2 kgのP.P.袋の詰め、1時間高压殺菌後、あらかじめ培養したシイタケ菌株を接種した。培養は、温度22℃、湿度70%、暗所の培養室で行い、培養後、袋から培養菌床を取り出し、発生室で子実体発生させた。発生室は特に断りのない限り、温度15℃、湿度95%、明所とした。成熟子実体を収穫後、凍結乾燥した。

③ レンチナン分析

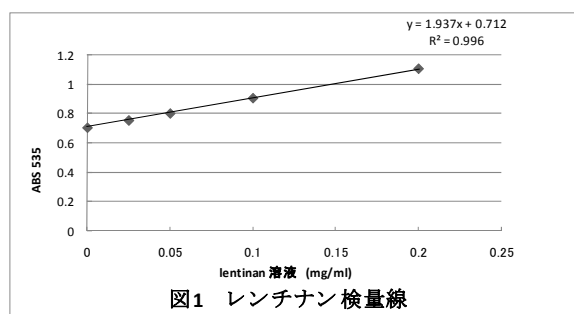
③-1 レンチナン抽出方法

乾燥粉末シイタケ試料（200mg）を100℃で1時間熱水抽出した後、吸引濾過したものを、レンチナン抽出液とした。

③-2 レンチナン分析方法⁴⁾

レンチナン抽出液(200μl)を2% NaOHになるように希釈し(合計2ml)、10mg/dl コンゴレッド溶液を400μl添加後、2.13%リン酸を6ml添加し、吸光度Abs535nmを測定し、分析値を算出した。算出方法は、次のとおりで、図1はレンチナン標準試料による検量線である。

レンチナン濃度 (mg/g) = {(サンプル Abs535 値 - モヤ Abs535 値 - 検量線切片) ÷ 検量線傾き} ÷ {サンプリング量 (Xg) × 100/2}



ウ 結果

① レンチナン高含量菌株の選抜

中国産、市販菌株、森林総研保有菌株における子実体中のレンチナン含量の結果をそれぞれ図2、図3、図4に示す。中国産シイタケのレンチナン含量の最高値は13.9mg/100g 乾燥重で、最低値7.3mg、平均値9.5mgであった。市販菌株では、最高値は14.4mg/100g 乾燥重で、最低値6.3mg、平均値10.0mgであり、森林総研保有菌株では、最高値は21.9mg/100g 乾燥重で、最低値4.5mg、平均値9.3mgであった。中国産シイタケが15mgに達しないのに対し、森林総研保有菌株で、約20mgを超える菌株が存在し、中国産シイタケより高い含量の国内産シイタケ菌株が選抜できた。

② レンチナン含量を高める栽培技術の開発

②-1 子実体生育過程におけるレンチナン含量の変動

収穫適期のレンチナン含量が中程度(8mg/100g 乾燥重)の菌株を使用して、原基、傘が1-2cm時、同2-3cm時、同3-4cm時、傘が開く前、傘が開いた直後、7分開き時、10分開き時での子実体を収穫し、レンチナン含量を調査した。その結果を図5に示す。原基形成時から傘が開く直後までレンチナン含量は減少し、7分開き時に増加し、後ほぼ一定であった。成熟子実体になる過程でレンチナン含量が増加することが明らかになった。

②-2 レンチナン含量を高める栽培技術の開発

子実体形成時での発生温度を変えた菌床栽培試験を行い、試験区ごとの子実体のレンチナン含量を検討した。まず、収穫適期のレンチナン含量が中程度(8mg/100g 乾燥重)の菌株を使用して、発生温度を高め栽培を行った。その結果を表1に示す。通常の発生温度(15℃)より高い温度(28℃)に高めた場合、レンチナン含量を高くすることができなかった。レンチナン含量が高い菌株(21mg)を使用しても同様な結果であった(表2)。次に、発生温度(11℃)を低くして栽培試験を行った。その結果、表3に示すように、通常栽培温度での子実体中のレンチナン含量より高い値(25mg)となり、栽培温度を低くすることによりレンチナン含量を高まることが明らかになった。

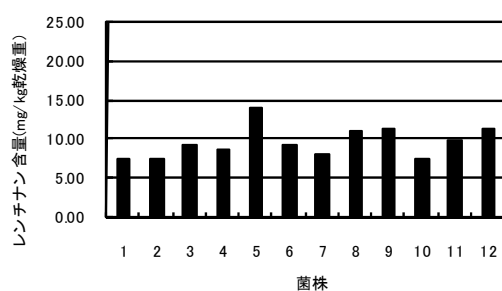


図2 中国株のレンチナン含量

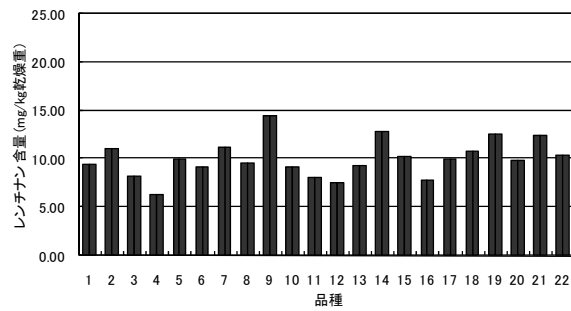


図3 市販品種のレンチナン含量

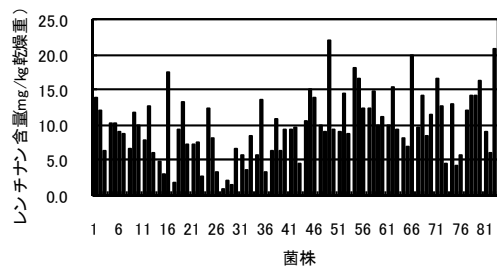


図4 森林総研保有菌株のレンチナン含量

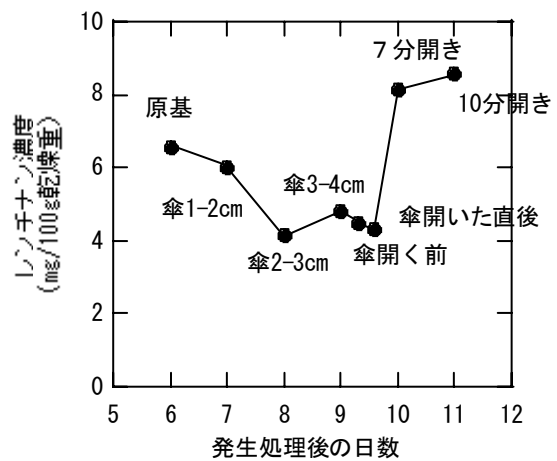


図5 子実体の生育時における子実体中のレンチナン濃度

表1 発生温度がレンチナン含量に及ぼす影響

試験区	温度 発生処理からの日数	レンチナン含量 (mg/100g乾燥重)
1	15℃ 6 → 11 5日	8.1
2	28℃ 6 → 9 3日	7.4
3	15℃ 28℃ 6 → 7 → 11 1 4日	12.0
4	15℃ 28℃ 6 → 8 → 11 2 3日	8.5
5	15℃ 28℃ 6 → 9 → 11 3 2日	9.2
6	28℃ 15℃ 6 → 7 → 10 1 3日	11.1
7	28℃ 15℃ 6 → 8 → 10 2 2日	10.5

注:原基形成は、発生処理から6日後で、その後発生温度を変動

表2 発生温度がレンチナン含量に及ぼす影響
(高含量菌株)

試験区	温度 発生処理からの日数	レンチナン含量 (mg/100g乾燥重)
1	15℃ 7日 → 16日 9日	20.9
2	15℃ 28℃ 7 → 15 → 16 8日 1日	14.6
3	15℃ 28℃ 7 → 11 → 14 5日 3日	5.1

注:原基形成は、発生処理から7日後で、その後発生温度を変動

表3 発生温度がレンチナン含量に及ぼす影響(高含量菌株)

試験区	温度 発生処理からの日数	レンチナン含量 (mg/100g乾燥重)
1	15℃ 7日 → 16日 9日	20.9
2	11℃ 7 → 19 12日	25.4

注:原基形成は、発生処理から7日後で、その後発生温度を変動

エ 考察

レンチナンはエノキタケ、マイタケ等にも存在し、シイタケ特有ではないが、シイタケに多く含まれている⁵⁾。本研究で、中国産、国内市販品種、森林総研保有国内産シイタケ菌株中のレンチナン含量を分析し、中国産よりレンチナン含量の高い森林総研保有菌株を選抜した。この選抜菌を使用して、よりレンチナン含量が高くなる栽培方法を検討した結果、発生温度を下げるによりレンチナン含量が高まることが明らかになった。レンチナンの合成機構は不明であるが、時本ら⁶⁾はレンチナン合成遺伝子を単離しており、合成機構の解明にこの合成遺伝子を解析することが重要であると思われる。しかし、合成遺伝子の詳細なデータは公表されてい

いため、今後の公表が望まれる。

シイタケに特有な機能成分として、コレステロール低下作用を示すエリタデニンがある⁷⁾。発生温度を高くすると、エリタデニン含量の増加することが明らかになっている⁸⁾。本研究の栽培方法の検討において、発生温度を高くすることも試みたが、レンチナン含量を高くすることはできなかった。

本研究でエリタデニン含量の高い菌株も選抜したが⁸⁾、エリタデニン含量の高い菌株とレンチナン含量の高い菌株は異なっていた。エリタデニン含量あるいはレンチナン含量を高める栽培方法の異なることも明らかになった。

レンチナンは β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-グルコース残基 5 個に対し β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-グルコピラノシド 2 個の側鎖を持つ化学構造で、その分子量は 40-80 万である²⁾。レンチナンの投与は静脈あるいは腹腔内注射により行われている。そのため、高分子状態のままでの経口投与により実際に効果があるのかという議論がある。レンチナンは高分子のため腸管から吸収されず、そのまま排出されるので効果がないとも考えられている。梶浦らのグループは、レンチナンを超微粒子化して、経口投与においてその効用を見いだした⁴⁾。一方、高分子のままでの経口投与により、人結腸ガンを移植したマウスでガン抑制効果を認めた報告もある⁹⁾。高分子状態で効用が認められるなら食事を通してシイタケを摂取すればよく、また高分子状態のままでも十分効用が認められない場合は、シイタケを超微粒子化加工する等の処理が必要となる。いずれにせよ、今後の高齢化社会に向け、免疫賦活作用をもつレンチナンの含量の高いシイタケ品種の育成やレンチナン含量を高める栽培技術の開発が必要である。

生シイタケ保存時におけるレンチナン含量の変動は、保存温度が20℃では3日目から減少するが、5℃では7日経過してもレンチナン含量は減少しない⁵⁾。生シイタケ中のレンチナン含量を減少させないためには、収穫後、冷蔵庫に保管することが重要となる。また、レンチナン含量の減少に伴い、腫瘍壊死因子 (TNF- α) 産生量も減少することが明らかになっている⁵⁾。一方、乾シイタケ中の個体あたりのレンチナン含量は生シイタケと比較して同じで、保存していても減少しない¹⁰⁾。

オ 今後の問題点

本研究では栽培方法により含量を高めることに着目したが、高含量レンチナン品種の育成には取り組んでいない。今後、レンチナン高含有シイタケの育成を行うことが必要である。

カ 要約

中国産よりレンチナン含量の高い菌株を選抜した。この菌株を使用して、レンチナン含量がさらに高くなる栽培方法を明らかにした。

キ 引用文献

- 1) 林野庁 (1993) 平成15年特用林産基礎資料、林野庁特用林産対策室、2
- 2) 千原呉郎 (1992) レンチナン、キノコの化学・生化学、東京、323-333
- 3) 時本景亮、長谷部公三郎、川上佐知子、水野雅史、松本景幸、児玉基一郎 (2003) シイタケの生活環におけるレンチナン含量の変化、日本菌学会第47回大会講演要旨集、75
- 4) 梶浦正俊、寿賀哲也 (2003) テクノロジーによる機能性食品の開発、FREGRANCE JOURNAL、2003 (8)、87-96
- 5) 水野雅史 (2001) 食用キノコ中に含まれる機能性多糖の免疫学的測定法の確立とその応用、日

本食品科学会誌、48(11)、793-797

6) 農林水産技術会議(2004)抗腫瘍性多糖レンチナン高含有シイタケ品種の開発とその利用、民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業(研究課題評価)、30

7) 金田尚志(1992) コレステロール減少効果物質、キノコの化学・生化学、東京、55-60

8) 関谷敦、河岸洋和(2005) 機能成分を高めるシイタケの栽培方法の検討、第55回日本木材学会大会要旨集、144

9) M. L.Ng, A. T.Yap, (2002) Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*), J. Altern. Complement Med., 8(5), 581-589

10) 時本景亮(2007)シイタケの食味と健康機能性、菌草、2007(2)、18-25

第3章 きのこの嗜好性を高めるための栽培技術の開発

ア 研究目的

2005年におけるシイタケの国内生産量は生鮮品が約6万5千トン、乾燥品が約4千トンであり、両者を合わせた生産額は823億円に達している¹⁾。この金額はマツタケを含めたきのこ類の総生産額の38%を占めており、シイタケは国内におけるきのこの最重要栽培品目である。しかし国内産乾シイタケの近年の自給率は輸入品の増加により約3割まで落ちていることから、輸入品と競合できる価格のための経営努力及び付加価値の付与等により消費者の健康食品や自然産物に対するニーズに答えることが必要となっている。

食品の評価には食品のもつニオイが多大な影響を与える²⁾。2000年に行った乾シイタケの嗜好調査の結果でも、消費者の乾シイタケに対する評価はその独特のニオイと密接に関係していることを示している³⁾。すなわち、乾シイタケが好きな人及び好きでも嫌いでもない人（合計で全消費者の約70%）のニオイに対する感覚強度は「やや強いニオイ」から「強いニオイ」の範囲で最も香ばしく感じるという結果を得た。但し、最も香ばしく感じるニオイの濃度は、年齢及び嗜好度により最高10倍の開きがある。以上から、平出らは乾シイタケの嗜好性を高める一つの方法としてニオイの強弱調整の有効性を示唆した。

嗜好は時代と共に変化することが知られており、乾シイタケのニオイに対しても嗜好の変化はあり得る。2000年の調査で20代以上の嗜好が概ね「好き」であったのに対して、10代の嗜好の主体は「どちらでもない」であり、10代の嗜好がその後も維持されれば、消費量の減少に繋がると推測される。更に、輸入乾シイタケのほとんどが菌床栽培で生産されているのに対し、国産乾シイタケの生産は原木栽培でのみで行われていることから、輸入品との差別化を図るため原木栽培によるニオイ成分量の調整方法の開発が必要である。

本研究では乾シイタケに対する嗜好調査を再度行い、嗜好の変化を調査すると共に、消費者の嗜好に合致したニオイ成分量に調製するための原木栽培技術の開発を行った。

イ 研究方法

① 乾シイタケのニオイに対する嗜好調査

10代以上を対象としてアンケート調査と官能評価を組み合わせた嗜好調査を行った。アンケート調査の評価項目は前回の調査と同様、「年代(AC)」、「性別」及び「乾シイタケの好き嫌い(OP)」に設定した³⁾。OPの尺度は、「非常に嫌い」を-3、「嫌い」を-2、「やや嫌い」を-1、「どちらでもない」を0、「やや好き」を+1、「好き」を+2そして「非常に好き」を+3に設定した。官能評価もまた前回の調査と同様、サンプルを封入した200ml容のプラスチックボトル3種類を作製し、各被験者に順不同で、「ニオイの感覚強度(SI)」及び「そのニオイの好き嫌い(HP)」を評価してもらった。SIの尺度は、「無臭」を0、「かすかに感じるニオイ」を2、「弱いニオイ」を4、「楽に感じるニオイ」を6、「強いニオイ」を8そして「耐えられないほど強いニオイ」を10に設定した。また、HPはOPと同様に尺度を設定した。なお、プラスチックボトルに封入したサンプル量は、前回の調査時と同量のニオイ成分量を含むように調整した。

② 乾シイタケのニオイ成分量に影響を与える成分の解明

ブナ木粉及びコメヌカに添加物を加えた培地(ブナ木粉:コメヌカ=95:5、含水率 65% w/w)を調製し、定法に従って滅菌、培養及び発生操作を行った。得られた子実体は乾燥(60℃、24 時間)後粉碎し、試料約 1gに対して水 10mlを加え、60℃30 分の条件で抽出を行った。抽出液 5mlを塩化ナトリウム 3gと共にバイアルに封入し、ヘッドスペースサンプラー(Perkin Elmer HS40XL)を備えたGC-MSを用いてニオイ成分の同定及び定量を行った。ヘッドスペースサンプラー部についてはオープン温度 100℃、保温時間 60 分およびヘッドスペース圧力 140kPa、GC部についてはカラムDB-1701(0.25mm φ x30m)、キャリアーガスHe、注入高圧 55kPa、クライオフォーカス 1 分、プレクライオ 5 分および昇温 40℃+6℃/min~260℃、MS部についてはイオン化EI法およびイオン化電圧 70eVに設定した⁴⁾。

③ 原木栽培によるニオイ成分調整技術の開発

原木栽培のモデルとして木粉及びコメヌカを混合した菌床(95:5、含水率 65%、w/w)に、種々の濃度に調整した添加物を 2 種類の付与方法にて 1 ヶ月毎に添加した。得られた乾燥子実体中のニオイ成分量を上記方法に従って測定した。

約 1 年間培養したシイタケホダ木に種々の濃度に調整した添加物を注入し、1 ヶ月後定法に従って発生操作を行った。得られた子実体を粉碎後、試料 100mgに対して 0.1N HCl 1mlを加え、レンチニン酸(ニオイ成分の出発物質)を抽出した。抽出液 4 μlに誘導体化用緩衝液

表 1 HPLC グラジエント条件

Time(min)	溶出液 A	溶出液 B
0	88	12
10	80	20
20	72	28
25	70	30
35	45	55
40	0	100

(0.4 M H₃BO₄/NaOH pH7.7) 20 μl、6mM 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl- chloride (FMOC-Cl) 60 μlを添加してFMOC誘導体とした後、過剰の FMOC-Clは 150mM Adamantanamine 20 μlを添加して除去した。反応溶液には更に酢酸緩衝液(100mM、pH 4.6) 1150 μlを添加し、その 20 μlを HPLCに注入してレンチニン酸の定量を行った。カラムにはSuperspher 60 RP-8(e) (4mm φ x 250mm) を用い、溶離液 A (0.1M CH₃COOH/Na pH4.6+5%THF) および溶離液 B (Acetonitrile) を表 1 に示したグラジエント条件に設定した。

表 2 被験者内訳

年代	男	女	合計
10	52	50	102
20	25	23	48
30	21	28	49
40	23	23	46
50	20	21	41
60~	22	23	45
合計	163	168	331

ウ 結果

① 乾シイタケのニオイに対する嗜好調査

横須賀市立長井小学校、横須賀市立岩戸中学校、神奈川県立岩戸高等学校、東京都立園芸高等学校、横浜国立大学、森林総合研究所、つくば市及び近隣市民の協力により、合計 331 名の被験者(表 2)により調査を行った。

2000 年及び 2005 年に行ったアンケート調査から、両年共に乾しいたけが「嫌いな人」約 15% に対して、「どちらでもない人」約 18%、「好きな人」約 67%という結果が得られた(図 1)。更に、両年の分布に対して χ^2 検定を行ったところ、 $p=0.225$ であり 5%の危険率にて有意差は認められなかった。

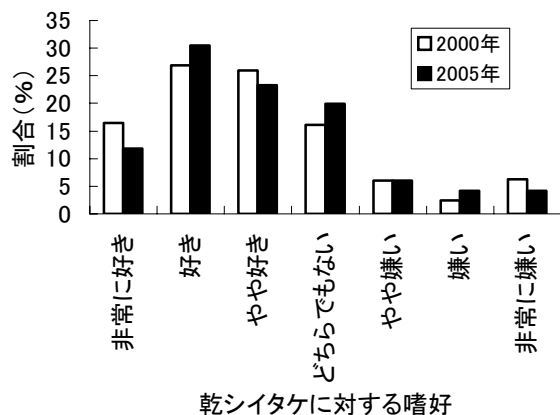


図 1 2000年及び2005年における乾シイタケに対する嗜好の比較

図 2 2000年及び2005年における乾シイタケに対する嗜好の比較

分母: 要因間の組合せ数
分子: 5%の危険率にて有意差が認められた組合せ数

2000 年および 2005 年における「乾シイタケに対する嗜好」を年代毎に分割し、両年の分布に対して χ^2 検定を行ったところ、10 代の p 値は 0.545、20 代は 0.076、30 代は 0.338、40 代は 0.734、50 代は 0.232 および 60 代以降は 0.480 であった。以上の結果から 2000 年と 2005 年における年代毎の OP には 5%の危険率にて有意差は認められなかった。

2000 年に行った調査から、HP-SI 間を除いて図 2 の両矢印で示した要因間に相関関係があることが明らかとなっている。今回の調査においても各要因間のスぺアマンの順位相関係数を求めたところ、表 3 に示すように、前回の調査と同様の結果が得られた。また、HP と SI 間には前回の調査から、HP を最大にする SI が存在していたが、図 3 に示すように、今回も前回と同様な結果が得られた。なお、今回の調査では男女間の SI に 5%の危険率にて有意差が認められたため男女別に表示している。

以上の結果から、2000 年および 2005 年における各要因間の分布に対して χ^2 検定を

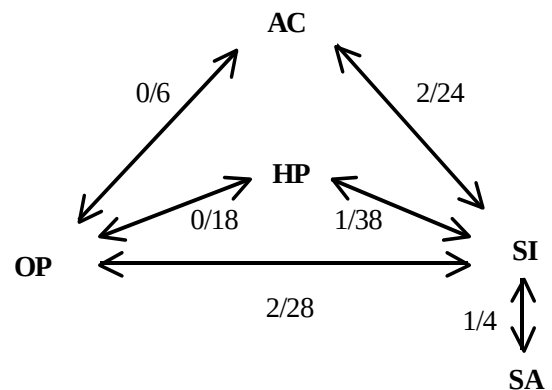


図 2 2000年及び2005年における乾シイタケに対する嗜好の比較

分母: 要因間の組合せ数
分子: 5%の危険率にて有意差が認められた組合せ数

表 3 各要因間のスぺアマンの順位相関係数

	OP	SI	HP	SA
AC	0.487**	-0.289**		
OP		-0.205**	0.441**	
SI				0.438**

** : 1%の危険率にて有意

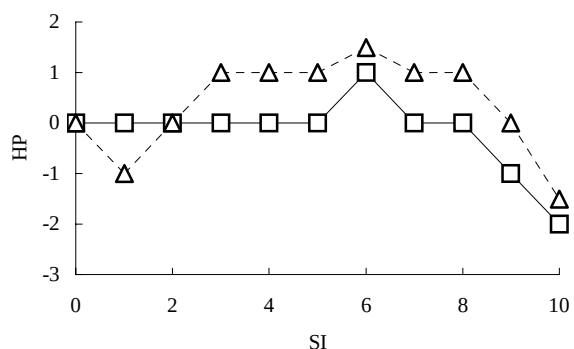


図3 HPとSIの関係
□男 △女

行ったところ、全要因間の組合せ 118 に対して 6 組に 5% の危険率で有意差が認められた (図 2)。

② 乾シイタケのニオイ成分量に影響を与える成分の解明

これまでの研究の結果、システイン(Cys)及びメチオニン(Met)の添加によりニオイ成分量が増加することが明らかとなっている。そこで、アミノ酸が関係する窒素代謝の要であるグルタミン酸を添加した培地を調製し、ニオイの強さの指標となる 1,2,4-trithiolane 量の変化について検討した⁴⁾。その結果、システイン及びメチオニンの添加に加えグルタミン酸を添加することにより 1,2,4-trithiolane 量が増加することが明らかとなった (図 4⁵⁾)。

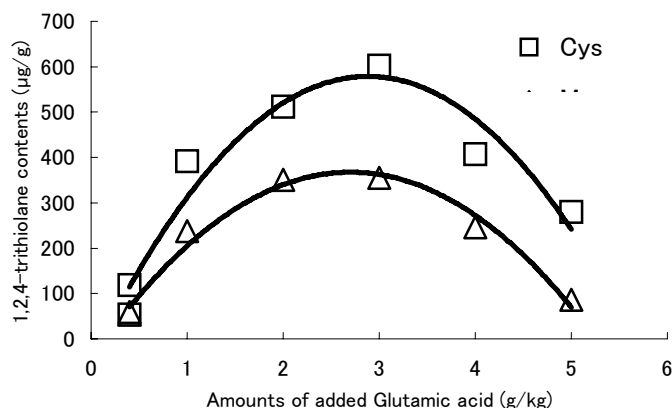


図 4 1,2,4-トリチオラン含有量とグルタミン酸添加量の関係

③ 原木栽培によるニオイ成分量調整技術の開発

Cys(0.4g/kg)及び Glu(3g/kg)に調整したアミノ酸混合液を基準とし、その倍濃度の混液 4 種類を用いて菌床表面への塗布及び菌床内への注入処理を行った。塗布した際は、培養開始 2 ヶ月間は添加効果が認められたが、3 ヶ月以降は認められなかった。注入した際は、培養初期の高濃度混液注入による効果と培養後期における添加した混液の濃度に比例した添加効果が認められた (図 5)。

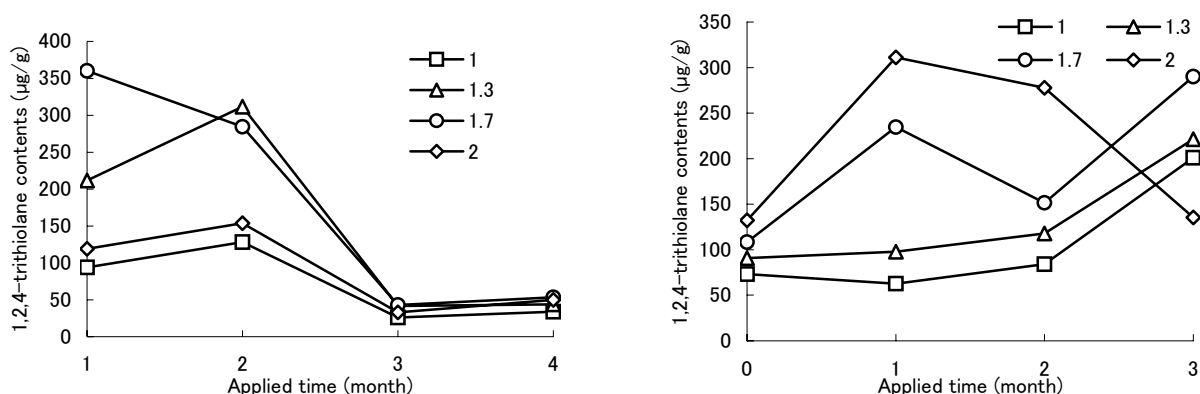


図 5 アミノ酸類を付与した際のニオイ成分量
(左：塗布処理、右：注入処理)

注：凡例の数字は、基準となるアミノ酸混合液 (Cys 0.4g/kg及びGlu 3.0g/kg) の濃度を 1 とした際の相対濃度を表す。

システイン(2.3g/l)及びグルタミン酸(17g/l)に調整したアミノ酸混合液0.9lを発生1ヶ月前のホダ木に注入したところ、コントロールに対して最大約3倍のレンチニン酸を含む子実体が得られた(図6)。また、副次的に旨味成分であるグルタミン酸量も増加することが明らかとなった。

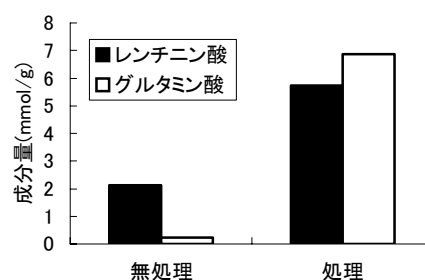


図6 アミノ酸混液を注入した際の各種成分量

エ 考察

① 乾シイタケのニオイに対する嗜好調査

2000年および2005年における各要因間の分布に対して χ^2 検定を行ったところ、全要因間の組合せ118に対して6組に5%の危険率で有意差が認められたが、有意差が認められた組合せには全てSIが関係している。食品に対する嗜好は多くの場合デモグラフィックファクターによって決定されることが知られていることから⁶⁻⁸⁾、OP・AC間には差が出にくいと推測される。その一方、SIは個人の体調等により大きく左右されることも知られている⁹⁾。更に、好きなニオイおよび嫌いなニオイに対する脳の反応部位は異なっていることも明らかにも示されるように¹⁰⁻¹²⁾、好き嫌いとは神経ネットワークから生じる様々な情報の高次処理によって決定されていると推測される。にもかかわらず、SIおよびHPに直接関わる112組のうち、6組にしか有意差が認められないことから2000年と2005年では嗜好に変化がないと結論づけた。以上のことから、通常10代から20代にかけて乾シイタケに対する嗜好は「どちらでもない」から「好き」に変化することが明らかとなった。食品の嗜好には上記デモグラフィックファクター以外に食する頻度も関与していると報告されている⁷⁾。概して20代から30代にかけて和食が好きになる傾向が報告されており⁶⁾、乾シイタケは和食の食材の一つであることから、他の和食食材に比較して早い時期から慣れ親しんでいると推測される。

また、これまでニオイの強弱と好き嫌いとの関係については、弱いと物足りなく強すぎると逆に嫌悪感が生じ、最適濃度が存在することを経験として認識されていたが、今回の実験ではそれが明確に示された。ただし、上記事象は「好きでも嫌いでもない人」および「好きな人」についてのみであり、「嫌いな人」にとってはニオイ強度が増すにつれて、嫌悪感も増加している。

2000年と2005年の乾シイタケに対する嗜好が一致したことから、2000年に行った調査結果から得られた最も好ましく感じる香り成分量を与える乾シイタケの量を成分量から市販品について計算したところ、最も少ない10代「好きな人」は0.6gだったが、20代以降は概ね2gを超え、50代以降の「非常に好きな人」は8.7gであり、一般に一回に食する量は1gとされていることから、市販品では香りが弱いことも明らかになった。

② 乾シイタケのニオイ成分量に影響を与える成分の解明

ニオイ成分の出発物質はレンチニン酸であり、レンチニン酸の主要骨格はグルタミン酸とシステインから構成されていることから¹³⁾、構成物質を培地へ添加したことにより子実体中のレンチニン酸量が増加し、結果としてニオイ成分量が増加したと推測される。しかし、最もニオイ成分量が多くなる組合せをモル数で比較すると、Cys 3.3 mmol/kgに対してGluは20.4 mmol/kgであり、レンチニン酸分子内におけるCys: Gluの構成比は1:1であるのに添加量はCys:

Glu=1:6.2 であり、ニオイ成分量を増加させるためには多量のGluを必要としている。Gluは高等生物における窒素代謝の要であり、ニオイ成分だけでなく他の代謝経路にも形を変えて供給されていると考えられ、実際添加量に応じて有る程度までは菌床 1 個当たりの収穫量も増加している。

③ 原木栽培によるニオイ成分調整技術の開発

ニオイ成分量の調整には現状より減少させる方向と増加させる方法がある。嗜好調査の結果から、「嫌いな人」にはほとんど無臭の物を提供する必要があるが、好き嫌いはニオイだけでなくテクスチャー等も関与してくるため、それらを全て含めた改良は今のところ不可能と思われる。また、その数も全体の 15%にしかないため、ニオイ成分量を減少させるような改良は今のところ無用と思われる。一方、エ①で考察したように、市販品ではニオイ成分量は少なく、ニオイ成分量を増加させる改良が現時点では望ましいと考えられることから、以下ニオイ成分量を増加させる栽培方法の開発を行うことにする。

培地調整時にアミノ酸類を添加した場合、高濃度のアミノ酸類添加はニオイ成分量の減少を引き起こしており⁵⁾、今回の実験においても培養初期における注入処理を除き、同様の傾向が認められた。塗布処理した際の3ヶ月目以降におけるニオイ成分量に変化がないのは、菌床表面に被膜が形成されアミノ酸類の吸収が低下したためと推測される。3ヶ月目の注入処理は、1及び2ヶ月目の処理と比較して、低濃度でも添加効果が認められ、また添加濃度に比例してニオイ成分量は増加していた。3ヶ月目の注入処理によるニオイ成分量の増加は、菌糸体が菌床内に蔓延し、直ちに利用できる栄養源としてアミノ酸類が速やかに吸収されたためと推測される。しかし、ニオイ成分量の増加は初期における高濃度での添加でも認められており、栄養状態によるアミノ酸類の取込量とニオイ成分の前駆体であるレンチニン酸への変換及びその蓄積が密接に関与していると推測されるが、今現在その詳細は不明である。これらの結果から、ニオイ成分量をアミノ酸添加量により調製するためには、子実体発生1ヶ月前の注入が効果的であると推測される。

ニオイ成分を分析するためには今のところ乾燥子実体が1回の分析当たり 1g 必要である。菌床栽培の場合培地が比較的均一のため、一度の分析に複数個使用しても問題なく、実際同じ培地で栽培した子実体からは比較的小さい標準偏差のデータが得られていた。一方、原木栽培の場合には培地の不均一性から成分分析は子実体1個毎に行う必要があった。しかし、乾燥重量で1個の固体が 1g を満たす物が原木栽培品では少なかったことから、ニオイ成分を直接分析せずニオイ成分の出発物質であるレンチニン酸の分析を行った。その結果、無処理と比較して最大 3 倍レンチニン酸量を増加させることに成功したが、個々のバラツキが非常に大きかった。色素を使った注入試験から、注入された試薬類はほだ木の軸方向には素早く移動するが、接線方向への移動は遅いことが明らかとなった。そのため、レンチニン酸量のバラツキは注入した試薬類の不均一な注入によるものと推測される。

オ 今後の問題点

アンケート調査時に乾シイタケに対する不満についても聞き取り調査をしたところ、聞き取り調査に協力した多くの人が水戻し時間の長さ指摘していた。約 80%の人が夕食の調理に費やす時間は 60 分以下との調査結果も出ていることから、需要を伸ばすためには、ニオイ成分量の調整の他にも水戻し時間の短縮についても検討が必要である。

原木栽培して得られた乾シイタケについても Cys 及び Glu の添加によるニオイ成分量の増加効果は認められたが、子実体間のバラツキが大きいと、試薬類を均一に注入する技術の作出が必要である。

カ 要約

2000 年と 2005 年に行ったアンケート調査結果を比較したところ、両年に差は認められなかった。そのため、全体として「乾シイタケが好き」という傾向は変化せず、特に 10 代から 20 代にかけて「嫌いな人」は減少し、「好きな人」は増加することから、大きな問題が生じなければ乾シイタケに対する嗜好は変化しないことが明らかとなった。また、最も好ましく感じる香り成分量を与える乾シイタケの量を市販品について計算したところ、一般に 1 回に食する量 1g より 20 代以降は概ね 2g を超え、特に 50 代以降の「非常に好きな人」は 8.7g であり、市販品では香りが弱いことも明らかになった。

日本で製造されている乾シイタケは全て原木栽培品であることから、菌床栽培でニオイ成分量を増加させる効果のあったシステインおよびグルタミン酸を発生 1 ヶ月前のホダ木に注入したところ、ニオイ成分量は最大 3 倍、また副次的に旨味成分であるグルタミン酸の含量は最大 30 倍に増加した。しかし、原木という培地の特性上固体間のバラツキが大きかったため、実用化するためには均一にホダ木へ試薬類を注入する技術の開発が必要である。

キ 引用文献

- 1) 林野庁(2007) 平成 17 年の特用林産物の生産動向について
- 2) Kalviainen, N., Roininen, K., Tuorila, H. (2003) The Relative importance of texture, taste and aroma on a yogurt-type snack food preference in the young and the elderly. Food Qual. Prefer., 14, 177-186.
- 3) Hiraide, M., Yokoyama, I., Miyazaki, Y. (2005) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* II: sensory evaluation by ordinary people. J. Wood Sci., 51, 628-633.
- 4) Hiraide M, Miyazaki Y, Shibata Y (2004) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* I: Relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components. J. Wood. Sci., 50, 358-364.
- 5) Hiraide, M. (2006) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* III: Substances that increase the odorous compound content. J. Wood Sci., DOI 10.1007/s10086-005-0758-z.
- 6) Yamaguchi, K., Takahashi, C. (1980) Studies on the preference for foods (Part 1) On the structure of the food preference (in Japanese). J. Cookery Sci. Japan, 13, 289-295.
- 7) Yamaguchi, K., Takahashi, C. (1982) Studies on the preference for foods (Part 2) Relationship between the attribute and the preference of food (in Japanese). J. Cookery Sci. Japan, 15, 104-113.
- 8) Takahashi, C., Yamaguchi, K. (1985) Studies on the preference for foods (Part 3) Effects of age and area characteristics on food preference (in Japanese). J. Cookery Sci. Japan, 18,

259-268.

- 9) Shusterman, D. (2002) Individual factors in nasal chemesthesis. *Chem. Senses*, 27, 551-564.
- 10) Rolls, E. T., Kringelbach, M. L., de Araujo, I. E. T. (2003) Different representations of pleasant and unpleasant odours in the Human Brain. *Eur. J. Neurosci.* 18, 695-703.
- 11) Royet, J. P., Plailly, J., Delon-Martin, C., Kareken, D. A., Segebarth, C. (2003) fMRI of emotional responses to odors: influence of hedonic valence and judgment, handedness, and gender. *NeuroImage*, 20, 713-728.
- 12) Small, D. M., Voss, J., Mak, Y. E., Simmons, K. B., Parrish, T., Gitelman, D. (2004) Experience-dependent neural integration of taste and smell in the human brain. *J. Neurophysiol.*, 92, 1892-1903.
- 13) Yasumoto, K., Iwami, K., Mitsuda, H. (1971) A new sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine. *Agr. Biol. Chem.* 35, 2059-2069.

「交付金プロジェクト」は、平成１３年度に森林総合研究所が独立行政法人となるにあたり、これまで推進してきた農林水産技術会議によるプロジェクト研究（特別研究など）の一部、および森林総合研究所の経費による特別研究調査費（特定研究）を統合し、研究所の運営費交付金により運営する新たな行政ニーズへの対応、中期計画の推進、所の研究基盤高揚のためのプロジェクト研究として設立・運営するものである。

この冊子は、交付金プロジェクト研究の終了課題について、研究の成果を研究開発や、行政等の関係者に総合的且つ体系的に報告することにより、今後の研究と行政の連携協力に基づいた効率的施策推進等に資することを目的に、「森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集」として刊行するものである。
