

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560054

研究課題名(和文)希少糖を利用する高保健機能性食用キノコの創成

研究課題名(英文) Cultivation of the edible mushrooms having enhanced health-promoting activities by use of rare sugars

研究代表者

麻田 恭彦 (ASADA, Yasuhiko)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70151032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：各種希少糖を添加した菌床培地を用いるエノキタケとヒラタケの栽培が可能であることが判明した。得られた食用キノコの各子実体を示す種々の保健機能性を解析した結果、希少糖であるD-アロースあるいはアリトールを添加した菌床培地で栽培したエノキタケの免疫賦活化活性が非添加栽培のものと比較して顕著に上昇することが明らかとなった。この効果は一般糖であるD-グルコースとD-フルクトースには見られないものであった。また、上記食用キノコの菌糸体を用いる単糖類変換反応の解析により、これらの菌糸体にはケトヘキソースのC2位を還元してヘキシトールを生産する活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that the edible mushrooms, *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus* produce fruit bodies on a sawdust medium supplemented with various kinds of monosaccharides including rare sugars. As a result of having analyzed various kinds of health-promoting activities that each fruit body showed, it was found that immunostimulatory activity of *Flammulina velutipes* which was cultivated on the medium supplemented with D-allose or allitol (both are rare sugar) was markedly higher than that of *Flammulina velutipes* cultivated on the medium without the added rare sugars. Such effect was not detected in natural sugars, D-glucose and D-fructose. The analysis of the monosaccharide-converting reactions using vegetative mycelia of the above edible mushrooms demonstrated that these vegetative mycelia have the activity to reduce keto-hexoses at C2 position producing hexitols.

研究分野：応用微生物学

キーワード：保健機能食品 食用キノコ 希少糖

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会の進行や食生活の高カロリー化などに伴って、いわゆる生活習慣病が増加の一途をたどる傾向にあり、食品や食品成分による健康増進や疾病予防・治療に対する社会的関心が高まってきている。このような背景のもと、様々な保健機能(免疫賦活化活性、抗腫瘍活性、抗酸化活性、血糖値上昇抑制活性、高血圧抑制作用、など多岐に亘る)を有するキノコ類は、保健機能性食品の素材としての利用が大いに期待されている。しかしながら、キノコ類の保健機能性を高める研究は、キノコ菌株の選抜レベルでしか行われておらず、大きな成果は認められていない現状にある。一方、本研究で用いた希少糖は、報告者が所属する香川大学を中心とするプロジェクト研究において研究が行われてきており、幾種類かの希少糖に関しては大量生産システムが確立されている。また、希少糖である D-アロースと D-プシコースに関しては特に生理機能の解明が進んでおり、前者では抗腫瘍活性、抗酸化活性、高血圧抑制作用が、後者では糖尿病予防・改善効果、抗酸化活性、抗高脂血症作用など、キノコ類と同様な保健機能性を有すること、並びに、安全性が確認されている。報告者は上記の理由から、希少糖を添加した培地で栽培した食用キノコ類ではその保健機能性が増強している可能性に期待を持ち、本研究課題を遂行するに至った。

2. 研究の目的

キノコ類は古来その味と香りが嗜好されてきたが、今日ではその多岐に亘る保健機能性が相まって、改めて健康食品素材として大きな注目を集めている。生活習慣病予防の観点から、保健機能食品素材としてのキノコ類の重要性は今後益々増していくことが考えられる。一方、希少糖(自然界に微量にしか存在しない各種単糖類)は香川大学を中心とするプロジェクト研究により、その幾つかの生産システムが確立され、それに伴い、種々の保健機能性が次々と発見されてきている。キノコ類の機能性には各種多糖類や糖脂質などの糖質関連物質が深く関与していることや、低分子化合物である希少糖はキノコ菌系細胞に取り込まれることが予想されることから、希少糖を添加した培地で栽培した食用キノコ類では、その保健機能性の増強が大いに期待される。そこで本研究では、「希少糖を利用する高保健機能性食用キノコの創成に関する基盤的知見」を得て、「食生活におけるキノコのさらなる有用性を開発すること」を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、代表的な食用キノコであるエノキタケ、ヒラタケ、およびマイタケを研究対象とした。また、希少糖には、主としてD-アロース、D-プシコース、およびアリトール

を用いて研究を行った。その他の研究方法の詳細については、研究成果の項に併記した。

4. 研究成果

(1) 食用キノコにおける単糖資化性の解析

3種類の食用キノコ(エノキタケ、ヒラタケ、マイタケ)を対象として、16種類の単糖類(六単糖のアルドース、ケトース、アルジトール、うち9種類が希少糖)に対する資化性を検討した。培養には液体培地(3%の各単糖類と0.1%の酵母エキスを含む)を用いた。上記の食用キノコの菌糸体懸濁液を各液体培地に接種した後、28・暗所にて静置培養を行った。エノキタケは15日後、ヒラタケは17日後、マイタケは28日後に、生育した菌糸体の乾燥重量を測定し、単糖資化性を判定した。その結果、図1に示すように、上記の食用キノコに共通して、最も生育に適した単糖はD-マンノースであり、希少糖に対する資化性は総じて顕著に低いことが判明した。この結果は、食用キノコの子実体に取り込まれた希少糖が、代謝されずに存在する可能性を示唆するものであり、希少糖を添加した培地で栽培した食用キノコ類における保健機能性の増強が期待できるものと判断した。

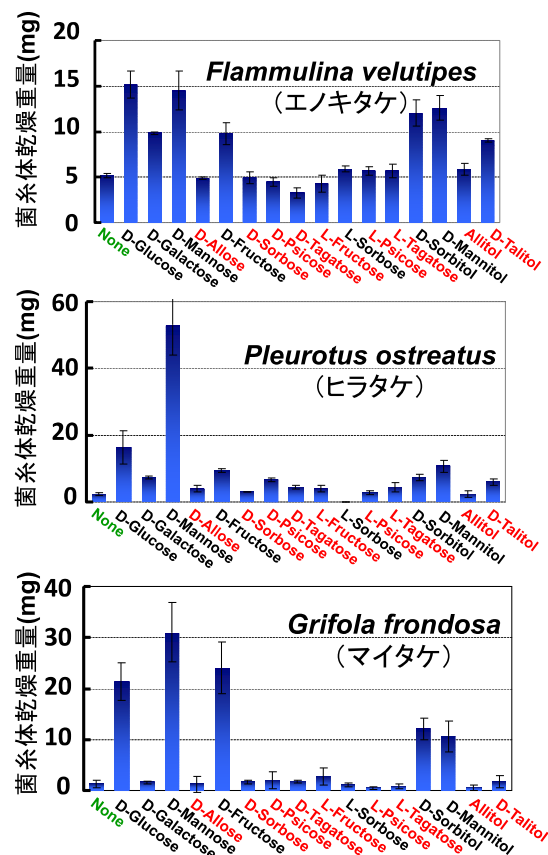


図1 食用キノコが示す単糖資化性
赤字：希少糖

(2) 食用キノコが示す単糖変換反応の解析

エノキタケ、ヒラタケ、およびマイタケを市販のポテト-デキストロース培地を用いて

静置培養した。得られた菌糸体を用いて、各種単糖を基質とする洗浄菌糸体反応を行い、反応液のHPLC分析（カラム：GL-C611、日立化成工業）により、上記食用キノコによる単糖変換反応を解析した。紙面の都合上、結果の概略のみを述べると、上記の食用キノコに共通して、ケトヘキソースのC2位を還元して、ヘキシトールを生産する能力が高いことが判明した。この反応性を利用することにより、L-ソルボース（天然糖）から希少糖であるL-イディトールを、また、希少糖ではあるが大量生産系が確立されているD-プシコースから希少糖であるアリトールの生産が可能となる（図2）。この反応の詳細な解析は今後の課題と位置付けている。また、D-アロースを基質とする反応では、アリトールへの酸化反応が起こり、さらにアリトールからD-プシコースへの還元反応が起こることが明らかとなった。

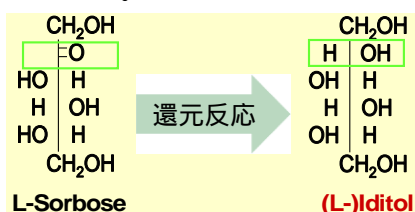


図2 食用キノコを利用する希少糖（イディトール）の生産

(3) 希少糖を添加した菌床培地を用いる食用キノコの栽培試験

エノキタケとヒラタケを対象として、各種単糖類を添加した菌床培地を用いる栽培試験を行った。上記の食用キノコを菌床培地（広葉樹オガ粉・米ぬか・小麦フスマ・水＝20g・10g・10g・60mlを300ml容円筒型ガラスビンに詰める）に接種して、菌回り（培地全体に菌糸体が蔓延すること）が完了するまで、23・暗所で培養した。その後、菌掻き処理（培地表面の菌糸体を削り取る）を施すとともに、5mlの10%に調整した各種単糖水溶液（一般糖であるD-グルコース：以下、図中ではGと表記、D-フルクトース：F、並びに、希少糖であるD-アロース：Ao、D-プシコース：P、アリトール：Ai）を培地表面上から添加して、成熟子実体が形成されるまで13・湿度80%以上・明所において培養を継続した。単糖水溶液の代わりに水を添加したものをコントロール（C）とした。その結果、何れの培地においても、エノキタケとヒラタケは正常に子実体を形成することが認められた。子実体収穫までに要する日数と収量（湿重量）について解析した。キノコの栽培試験では、どうしても実験結果に大きな個体間の変動が生じるが、エノキタケにおいては各種単糖を添加した培地ではコントロールよりも若干栽培期間が長くなるものの、収量は増加する傾向が認められた（図3）。一方、ヒラタケにおいては各種単糖を添加した培地では、栽培期間はコントロール

とほぼ同様であったが、収量は低下する傾向が認められた（図4）。

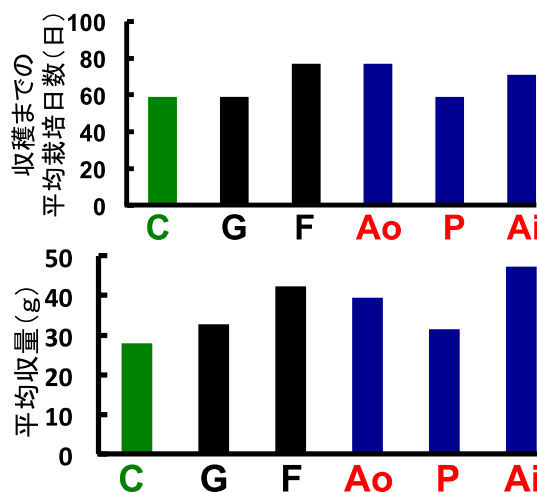


図3 希少糖を添加した培地におけるエノキタケの栽培試験
上段：栽培日数 下段：収量

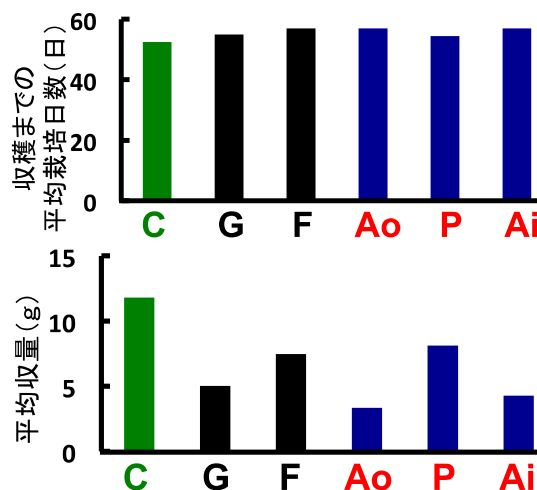


図4 希少糖を添加した培地におけるヒラタケの栽培試験
上段：栽培日数 下段：収量

(4) 食用キノコの栄養菌糸体と子実体への希少糖の取込み試験

概略のみを述べる。D-アロースあるいはD-プシコースを添加した培地で培養・栽培したエノキタケとヒラタケの栄養菌糸体と子実体を凍結乾燥した後、これらの熱水抽出液を調製し、HPLC解析を行った。その結果、上記の食用キノコの栄養菌糸体および子実体がD-アロースとD-プシコースを培地から取り込むことが判明した。しかしながら、菌糸体あるいは子実体への取込み量と培地における残存量の総和が、添加した上記希少糖の量よりも顕著に少なかったため、栄養菌糸体および子実体に取り込まれた上記希少糖は単糖以外の成分（オリゴ糖や多糖類など）に変換されていることが示唆され、今後の研究課題となった。

(5) 希少糖を添加した培地を用いて栽培したエノキタケおよびヒラタケ子実体の保健機能性の解析

上記(3)の栽培試験で得られた各子実体が示す各種保健機能性を解析して、希少糖がもたらす有効性を検定した。各子実体の凍結乾燥粉末 20 mg に超純水 4 ml を加え、沸騰水中で 30 分間加熱処理して得られた熱水抽出液を用いて、以下の保健機能性の解析を行った。

抗酸化活性

本研究では、AB-2970 クレスタ-S キット(アトー)を用いて、化学発光に基づくスーパーオキシドラジカルに対する抗酸化(活性酸素ラジカル消去)活性を測定した。その結果、エノキタケとヒラタケ子実体の熱水抽出液が抗酸化活性を有することが明らかとなった。また、エノキタケにおいては、D-アロースとアリトールを添加した培地で栽培した子実体に比較的高い抗酸化活性が認められた(図5)。一方、ヒラタケにおいては培地に添加した全ての単糖において抗酸化活性の増強効果が認められたが、特にD-グルコース、D-アロース、およびアリトールによる効果が大きいことが認められた(図5)。

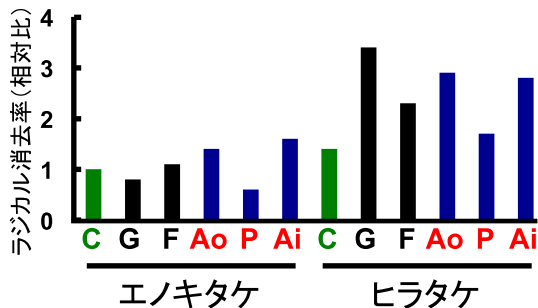


図5 各種単糖類を添加した培地で栽培したエノキタケとヒラタケ子実体の抗酸化活性

水を添加した培地で栽培したエノキタケ子実体(C)の抗酸化活性を1として相対比を求めた

-グルコシダーゼ阻害活性(血糖値上昇抑制活性)

-グルコシダーゼは小腸に存在する酵素であり、生体では多糖類の分解産物である二糖類を本酵素によりグルコース等の単糖類に分解して小腸から吸収する。本酵素活性を阻害することにより、食後血糖値の上昇を抑制することができるため、本酵素阻害活性は血糖値上昇抑制活性の指標とされている。本研究では、-グルコシダーゼにはラット腸管アセトンパウダー(シグマ)の抽出液を、基質にはp-ニトリロフェニル-D-グルコピラノシド(和光純薬)を用いた。-グルコシダーゼ活性を各子実体の熱水抽出液存在下および非存在下で測定して、活性の比率から各子実体の熱水抽出液が有する阻害活性を算出した。その結果、エノキタケとヒラタケ子実体の熱水抽出液が -グルコシダーゼ阻

害活性を有することが明らかとなった。また、エノキタケとヒラタケに共通して、培地へのアルドース(D-グルコースとD-アロース)の添加において、-グルコシダーゼ阻害活性の増強に大きな効果が認められることが判明した(図6)。

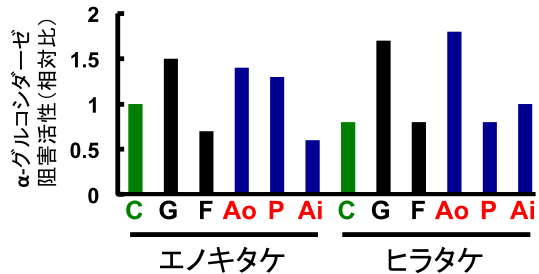


図6 各種単糖類を添加した培地で栽培したエノキタケとヒラタケ子実体の -グルコシダーゼ阻害活性

水を添加した培地で栽培したエノキタケ子実体(C)の -グルコシダーゼ阻害活性を1として相対比を求めた

チロシナーゼ阻害活性(メラニン生成抑制効果・美白効果)

チロシナーゼはメラノソーム内でのメラニン合成の初発・律速酵素であり、L-チロシンの酸化反応を触媒する。そのため、チロシナーゼ阻害活性はメラニン生成抑制効果・美白効果の指標とされている。本研究では、マッシュルーム由来チロシナーゼ(シグマ)および基質としてL-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA)(和光純薬)を用いて、反応生成物であるDOPAクロムに由来する475nmの吸光度を経時的に測定することによりチロシナーゼ活性を求めた。チロシナーゼ活性を各子実体の熱水抽出液存在下および非存在下で測定して、活性の比率から各子実体の熱水抽出液が有する阻害活性を算出した。その結果、エノキタケとヒラタケ子実体の熱水抽出液がチロシナーゼ阻害活性を有することが明らかとなった。しかしながら、図7に示すように、希少糖を添加することによる阻害活性の増強効果は、エノキタケとヒラタケともに認められなかった。

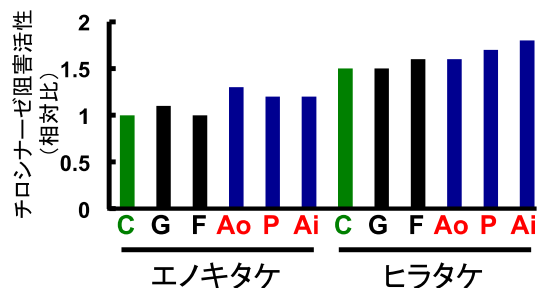


図7 各種単糖類を添加した培地で栽培したエノキタケとヒラタケ子実体のチロシナーゼ阻害活性

水を添加した培地で栽培したエノキタケ子実体(C)のチロシナーゼ阻害活性を1として相対比を求めた

アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性（高血圧抑制効果）

ACE は血圧上昇に大きく関与している酵素である。そのため、ACE 阻害活性は高血圧抑制効果の指標となっている。本研究では、市販のキット（ACE-Kit-WST、同仁化学）を用いて ACE 活性を測定した。ACE 活性を各子実体の熱水抽出液存在下および非存在下で測定して、活性の比率から各子実体の熱水抽出液が有する阻害活性を算出した。その結果、エノキタケとヒラタケ子実体の熱水抽出液が ACE 阻害活性を有することが明らかとなった。また、図 8 に示すように、ヒラタケの熱水抽出液がエノキタケの熱水抽出液よりも高い ACE 阻害活性を示すことが判明した。エノキタケとヒラタケに共通して、培地への各単糖類の添加により ACE 阻害活性が増強する傾向が見られたが、希少糖に特有の効果は認められなかった。

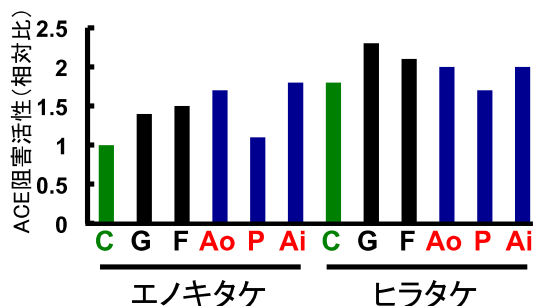


図 8 各種単糖類を添加した培地で栽培したエノキタケとヒラタケ子実体の ACE 阻害活性

水を添加した培地で栽培したエノキタケ子実体（C）の ACE 阻害活性を 1 として相対比を求めた

免疫賦活化活性

食用キノコの子実体には、 β -グルカンなどの免疫賦活化活性を有する物質の存在が一般に認められている。そこで、各子実体の熱水抽出液が示す免疫賦活化活性をマクロファージ活性化試験に基づいて解析した。マクロファージは免疫系の中心に位置しており、自然および獲得免疫を活性化。そこで、マウスマクロファージ系培養細胞 J774.1（免疫賦活化物質の検定に多用されている）を各子実体の熱水抽出液存在下で培養し、培養上清中に産生誘導されるインターロイキン-12（IL-12、サイトカインの 1 種で NK 細胞を活性化するとともに Th1 型ヘルパー T 細胞を誘導して細胞性免疫を高める）をエライザ法（IL-12（p70）、Mouse、ELISA Kit、R&D Systems）を用いて測定することにより、各食用キノコ子実体の免疫賦活化活性を求めた。ポジティブコントロールには熱水抽出液の代わりに、強力な IL-12 産生促進活性が知られている大腸菌のリポポリサッカライド（LPS）を添加した。その結果、図 9 に示すように、D-アロースあるいはアリトールを添加した培地で栽培したエノキタケ子実体

の熱水抽出液が顕著に高い IL-12 産生促進活性を有することが明らかとなった（D-アロース：コントロールの約 2.7 倍、アリトール：3.7 倍）。このように、エノキタケ栽培における D-アロースとアリトールの有効性を示す結果が得られた。

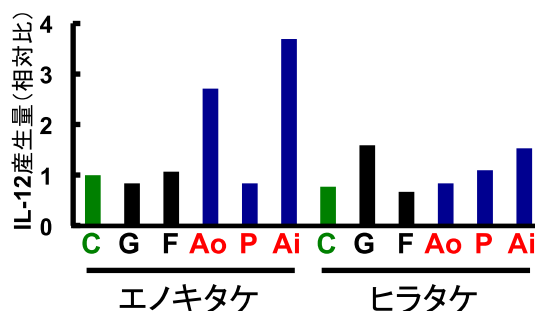


図 9 各種単糖類を添加した培地で栽培したエノキタケとヒラタケ子実体の免疫賦活化活性

水を添加した培地で栽培したエノキタケ子実体（C）の熱水抽出液を添加して培養した J774.1 細胞の培養上清における IL-12 産生量を 1 として相対比を求めた

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

Shompoonsang, S., Yoshihara, A., Uechi K., Asada Y., and Morimoto, K., Novel Process for Producing 6-Deoxy Monosaccharides from L-Fucose by Coupling and Sequential Enzymatic Method, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol.121, No.1, 2016, pp.1-6
DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.04.017

Shompoonsang, S., Yoshihara, A., Uechi K., Asada Y., and Morimoto, K., Enzymatic production of three 6-deoxy-aldohexoses from L-rhamnose, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, Vol.78, No.2, 2014, pp. 317-325
DOI: 10.1080/09168451.2014.878217

〔学会発表〕（計 8 件）

余卓尔、吉野一晴、渡邊彰、伊藤智和、邊見 久、麻田恭彦、吉村徹、キノコに存在する D-アミノ酸の同定と定量、第 11 回 D-アミノ酸学会学術講演会、2015 年 8 月、シティーホールプラザアオーレ長岡（新潟県長岡市）

川手亮、吉野一晴、渡邊彰、何森健、麻田恭彦、オガ粉を使用しない食用キノコの栽培、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学津島キャンパス（岡山県岡山市）

余卓尔, 吉野一晴, 渡邊彰, 伊藤智和,
邊見久, 麻田恭彦, 吉村 徹, キノコに存在
する D-アミノ酸の同定と定量、日本農芸化学
会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山
大学津島キャンパス（岡山県岡山市）

川手亮、渡邊彰、何森健、麻田恭彦、希少
糖が担子菌キノコにおよぼす生理的影響、
日本農芸化学会中四国支部第 40 回講演会、
2014 年 9 月 27 日、徳島大学常三島キャン
パス（徳島県徳島市）

川手亮、渡邊彰、麻田恭彦、食用キノコ
の新規栽培方法の開発、日本農芸化学会中四
国支部第 38 回講演会、2014 年 1 月 25 日、香
川大学農学部（香川県三木町）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

麻田 恭彦 (ASADA YASUHIKO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70151032