

報 文

## 道央圏に自生するキノコの同定と機能性成分の含有量

菅原諒太<sup>1</sup>, 山田さゆみ<sup>1</sup>, 涂 志豪<sup>1</sup>, 菅原明子<sup>1</sup>,  
干場敏博<sup>1</sup>, 山内正仁<sup>2</sup>, 山口昭弘<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 酪農学園大学農食環境学群食と健康学類  
<sup>2</sup> 鹿児島工業高等専門学校都市環境デザイン工学科

### Species Identification and Functional Components of Wild Mushrooms from Rakuno Gakuen University, Hokkaido

Ryota Sugawara<sup>1</sup>, Sayumi Yamada<sup>1</sup>, Zhihao Tu<sup>1</sup>, Akiko Sugawara<sup>1</sup>, Toshihiro Hoshiba<sup>1</sup>,  
Masahito Yamauchi<sup>2</sup> and Akihiro Yamaguchi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Human Wellness, Rakuno Gakuen University,  
Midorimachi 582, Bunkyo-dai, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-8501

<sup>2</sup> Department of Civil and Environmental Engineering, National Institute of Technology, Kagoshima College,  
Mataka 1460-1, Hayatomachi, Kirishima-shi, Kagoshima 899-5193

This study focuses on the identification and characterization of wild mushrooms grown on the campus of Rakuno Gakuen University, using DNA sequencing and analysis of functional metabolites. Forty-eight samples of fruiting bodies were collected between June 2012 and November 2014. The samples were hot-air dried and powdered, and subsequently extracted with alkaline hot water to obtain beta-glucans, or 50% ethanol for total polyphenols (TPP) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. Functional metabolites were assessed by colorimetric assays, using Congo Red reagent for beta-glucans, Folin-Denis reagent for TPP level, and DPPH radical scavenging for antioxidant activity. Total DNA was extracted from each sample and subjected to DNA sequencing for the inter spacer regions of ribosomal RNA gene. Sequencing analysis identified 27 independent species or genus of mushrooms. Beta-glucan contents showed clear differences between species. The TPP levels and DPPH radical scavenging activity showed similar tendencies and were significantly correlated ( $p < 0.0001$ ).

(Received Apr. 14, 2015; Accepted Jun. 10, 2015)

**Keywords** : wild mushroom, species identification, genetic analysis, beta-glucan, food function

**キーワード** : 野生キノコ, 品種鑑定, 遺伝子解析,  $\beta$ -グルカン, 機能性

キノコはその高い嗜好性から世界の国々で食されている代表的な菌類である。主に担子菌門に属する菌類で、肉眼で確認可能な大型の子実体を形成するものがキノコと呼ばれる<sup>1)</sup>。我々が一般的に食しているのはこの子実体であるが、近年、生活習慣病の高リスク化や高齢化社会などの時代背景を反映して健康志向の機運が高まっており、キノコはその機能性についても注目を集めている<sup>2)</sup>。中でもキノコの代表的な機能性成分として $\beta$ -グルカンの研究が広く進んでおり、免疫賦活作用や抗癌作用などが報告されている<sup>3,4)</sup>。また植物性食材の機能性成分として良く知られるポリフェノールがキノコにも多く含まれているとの報告がある<sup>3,5)</sup>。

キノコは世界で5万種以上存在するとされており<sup>6)</sup>、我が国においても南北に広く伸びた国土による多様な気候と先進国でもトップクラスの森林面積(7割)を持つことから

数多くの自生キノコの生育が確認されている。キノコは食用として広く親しまれている一方で、強い毒性を持つ種あるいは食毒が不明な種も多く、行政機関から注意喚起はなされるものの、食用キノコとの誤食による食中毒事例が毎年発生している現状がある<sup>7)</sup>。実際の食中毒発生時には、被害拡大防止のために原因食材・原因物質の同定が不可欠であり、キノコ種の正確な同定が食の安全の面からも必要である。

自生キノコは自然環境の中の多種多様な相互作用を受けて生育しており、そのライフサイクルの大半を菌糸体・胞子の形で存在し、一時を子実体として過ごすのみである。その多くは人工栽培法が確立されておらず、子実体の入手は自然の恩恵に頼っている。北海道の中央部に位置し自然環境に恵まれた酪農学園大学キャンパスには多くの自生キノコ

<sup>1</sup> 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582, <sup>2</sup> 〒899-5193 鹿児島県霧島市隼人町真孝 1460-1

\*連絡先 (Corresponding author), yama-aki@rakuno.ac.jp

ノコが生育しており、天然の貴重な資源ライブラリーとしてキノコ子実体を入手することが可能である。そこで本研究ではキャンパス自生キノコを採取し、形態鑑定およびrRNA 遺伝子スペーサー (ITS) 領域の DNA 塩基配列解析によりキノコ種を同定<sup>8)9)</sup>した後、 $\beta$ -グルカン濃度を Congo Red 法により<sup>10)11)</sup>、total polyphenol (TPP) 濃度を Folin-Denis 法により測定し<sup>12)</sup>、合わせて抗酸化能として 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を測定した<sup>13)</sup>。これらの機能性指標について、採取したキノコの科あるいは種ごとの傾向を比較評価した。

## 実験方法

### 1. 材料と方法

#### (1) 試料

酪農学園大学キャンパス内で 2012 年 6 月から 2014 年 11 月にかけて採取した自生キノコ 48 試料を用いた(表 1)。また  $\beta$ -グルカン測定法の検討用に培地条件が異なる栽培アラゲキクラゲ 5 試料を使用した<sup>14)15)</sup>。キノコ試料は全て石突きを除いた子実体可食部を測定対象とした。

#### (2) 試料の前処理法

採取したキノコは、表面を水道水で軽く洗浄し付着物を除去した後、ペーパータオルで水分を除去した。ドライフードメーカー AFD-550 ((株)アピックスインターナショナル)を用いて 8 時間の温風乾燥処理の後、乳鉢・乳棒あるいは粉砕機 620DG (岩谷産業(株))を用いて粉砕し、常温保存したものを乾燥粉末試料とした。この時、ドライフードメーカー内の温度は約 70°C であり、一部の試料(10 種類)で確認したところ、いずれのキノコも乾重量は湿重量の 1/10 程度であった。

#### (3) 遺伝子解析による自生キノコ種の同定

##### i) DNA 抽出

乾燥粉末試料約 20 mg から ISOIL for Beads Beating kit ((株)ニッポンジーン)を用いて、以下の操作にしたがい DNA を抽出した。付属のビーズ入りチューブに各試料、Lysis Solution BB 950  $\mu$ L および Lysis Solution 20s 50  $\mu$ L を加えて混合し、細胞破碎装置 BC-20 ((株)セントラル科学貿易)を用いて粉砕(2000 r/min-3 min)した。遠心分離(13000  $\times$  g-1 min-25°C)により得られた上清を新たなチューブに移し、Purification Solution 400  $\mu$ L を混合した。クロロホルム 600  $\mu$ L を加え 15 秒間激しく混合後、遠心分離(20600  $\times$  g-15 min-4°C)を行った。上清 800  $\mu$ L を新たなチューブに移し、Precipitation Solution 800  $\mu$ L を混合し、再度、遠心分離(20600  $\times$  g-15 min-4°C)を行った。上清を除き、沈殿に Wash Solution 1 mL を加え転倒混和後、20600  $\times$  g-10 min-4°C で遠心分離した。再度、上清を除き、沈殿に 70% エタノール 1 mL, Ethathinmate 2  $\mu$ L を加え混合後、遠心分離(20600  $\times$  g-5 min-4°C)を行った。上清を除き、沈殿に TE Buffer (pH 8.0) 100  $\mu$ L を加え混合溶解

したものをキノコ DNA 溶液とした。

##### ii) PCR 反応

得られた DNA 溶液を鋳型とし、キノコの ITS 領域に対するプライマー<sup>8)</sup> ITS 1/2 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G / 5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) and/or ITS 3/4 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC / 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 反応液は注射水(大塚製薬(株)) 14.1  $\mu$ L,  $\times 10$  Ex Taq Buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 1.6  $\mu$ L, ExTaq 0.1  $\mu$ L (以上、タカラバイオ(株)), 各 50  $\mu$ mol/L Primer Mix (Forward+Reverse, (株)ファスマック) 0.2  $\mu$ L を混合し、DNA 溶液 2  $\mu$ L を加え全量を 20  $\mu$ L とした。PCR 反応は初期熱変性を 94°C-10 分間、サイクリングは熱変性を 94°C-30 秒間、アニーリングを 55°C-30 秒間、伸長反応を 72°C-30 秒間とし、サイクル数 30 とした。サーマルサイクラーは iCycler (Bio Rad Laboratories, Inc.) を用いた。

##### iii) アガロースゲル電気泳動

PCR による増幅の程度とそのバンドサイズの確認をアガロースゲル電気泳動により行った。電気泳動には 0.5 mg/mL のエチジウムブロマイドを含む 2% (w/v) アガロースゲル (関東化学(株)), 同じく 0.5 mg/mL のエチジウムブロマイドを含む  $\times 1$  Tris Acetate EDTA Buffer (TAE) ((株)ニッポンジーン) 泳動液を使用した。泳動に用いる  $\times 6$  Loading Buffer は、グリセリン 15 g, プロモフェノールブルー 15 mg を蒸留水に溶解し、0.5 mol/L EDTA, pH 8.0 ((株)ニッポンジーン) 3 mL を加えた後、全量 50 mL とした。PCR 産物 10  $\mu$ L に  $\times 6$  Loading Buffer 2  $\mu$ L を混合し、0.5 mg/mL の 100 bp DNA Ladder (GeneDireX, Inc.) をそれぞれ 10  $\mu$ L づつゲル内のウェルへアプライし、Mupid-2Plus ((株)ミューピッド) を用いて 100 V で 30 分間、電気泳動を行った。泳動終了後、UV ゲル撮影装置 FAS-201 (東洋紡(株)) を用いて増幅バンドを確認した。

##### iv) PCR 産物の精製

DNA 塩基配列解析に使用する PCR 産物の精製は、PCR Clean up Kit (タカラバイオ(株)) を用いて以下の操作により行った。PCR 産物 10  $\mu$ L を注射水で 10 倍に希釈し、Buffer NT1 200  $\mu$ L を加え混合後、チューブにセットしたスピнкаラムに全量に移した。遠心分離(13000  $\times$  g-1 min-25°C)を行い、チューブ内のカラム透過液を除いた。Buffer NT3 650  $\mu$ L をスピнкаラムにアプライし、再度、遠心分離(13000  $\times$  g-1 min-25°C)後、透過液を除き、この操作をもう一度繰り返した。スピнкаラム中の溶液を完全に取り除くため、遠心分離(13000  $\times$  g-1 min-25°C)を行い、カラムを新たなチューブにセットした。Buffer NE 30  $\mu$ L をカラムに加え、遠心分離(13000  $\times$  g-1 min-25°C)し、得られた溶出液を精製 PCR 産物とした。

##### v) DNA 塩基配列解析

PCR 増幅時に用いた Forward あるいは Reverse プライ

マーを、1.6 pmol/ $\mu$ L となるように TE Buffer (pH 8.0) で希釈調製した。電気泳動で確認したバンドの濃さに基づき 5 倍から 20 倍に注射水で希釈した精製 PCR 産物 10  $\mu$ L および 1.6 pmol/ $\mu$ L プライマー 4  $\mu$ L を 8 連チューブに入れて混合し、塩基配列解析を (株)ファスマックに依頼した。得られた塩基配列データを確認後、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST により相同性検索を行いキノコ種を同定した。97% 以上の一致率を示した場合、同種であると判断した。

#### (4) $\beta$ -グルカン測定<sup>10)</sup>

##### i) 試薬

Congo Red (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 74 mg および Tris base (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 40 g を蒸留水 400 mL に溶解し、6 mol/L HCl 約 33 mL を加え pH 8.0 に調整後、全量を 500 mL として 0.2 mmol/L Congo Red 溶液を調製した。 $\beta$ -グルカン標準品として大麦由来の Beta Glucan CFA Std : (1,3 : 1,4)- $\beta$ -D-グルカン (Megazyme) を用いた。蒸留水 20 mL を 1 瓶に加え 70~80°C で加熱攪拌し溶解させた後、全量を 100 mL として 400  $\mu$ g/mL 標準保存溶液を調製した。保存溶液から 400, 200, 100 および 50  $\mu$ g/mL の標準溶液希釈系列を用時調製し、検量線を作成した。

##### ii) $\beta$ -グルカン抽出液の調製

乾燥粉末試料 0.5 g に 2% KOH 10 mL を加え、ホモジナイザー ULTRA-TURRAX T-10 (IKA Japan K.K.) を用いて均質化した。次にオートクレーブを用いて 100°C -60 min 加熱抽出を行い、遠心分離 (16 200  $\times$  g-10 min-25°C) 後の上清をデカンテーションで分取した。続いて、エタノール沈殿による  $\beta$ -グルカンの精製を以下にしたがい行った。分取した上清 200  $\mu$ L を 1.5 mL チューブに採り 99.5% エタノール 800  $\mu$ L を加え遠心分離 (20 600  $\times$  g-10 min-25°C) を行い、上清を取り除いた。次に 80% エタノール 1 mL を加え転倒混和にて沈殿を洗浄後、再度、遠心分離 (20 600  $\times$  g-10 min-25°C) し上清を除いた。この洗浄工程をもう一度繰り返し、スピンドウン (20 600  $\times$  g-1 min-25°C) によりチューブ底部に残った上清をマイクロピペットで丁寧に取り除いた。得られた沈殿に蒸留水 1 mL を加えウォーターバスを用いて 55°C -30 min 加温溶解した。溶けにくい場合には激しく混合して可溶化した。

##### iii) 測定操作

$\beta$ -グルカン抽出液 150  $\mu$ L を 96 well マイクロプレートに採り ( $n=2$ )、Congo Red 溶液 100  $\mu$ L を加え、30 分間放置した後に 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー Emax (Molecular Devices LLC.) を用いて測定した。また各抽出液について Congo Red 溶液を 0.66 mol/L Tris buffer (pH 8.0) に置き換えたサンプルブランクの吸光度を差し引くことにより、抽出液の着色の影響を除いた。検量線から粉末試料の乾物重量 (Dry weight : DW) あたりの  $\beta$ -グルカン濃度 (mg/100 g DW) を求めた。

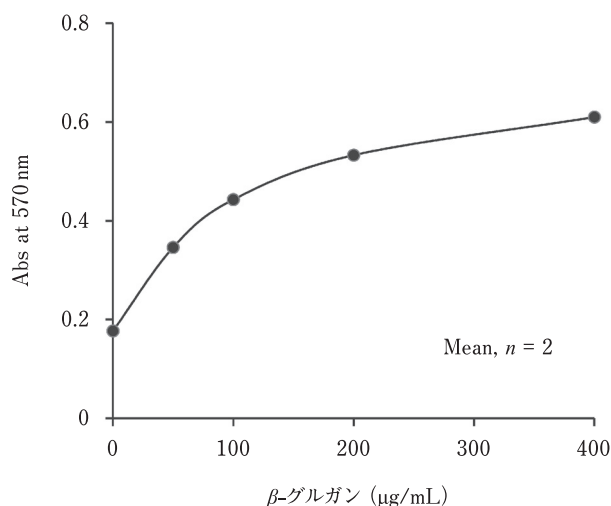


図 1 Congo Red 法による  $\beta$ -グルカンの検量線

##### iv) 酵素法

アラゲキクラゲ 5 試料について、酵素法による  $\beta$ -グルカンの測定<sup>16)</sup> を (一財)日本食品分析センターに依頼した。

#### (5) TPP 測定<sup>12)</sup>

##### i) 試薬

Folin-Denis 試薬 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) に蒸留水を加え、用時 5 倍希釈して比色定量に用いた。TPP 測定のポリフェノール標準品としてケルセチン (Cayman Chemical) を用いた。

##### ii) TPP 測定用試料液の調製

乾燥粉末試料 0.5 g に対し 50% エタノール 10 mL を加え、10 分間激しく振とう (SA-31, ヤマト(株)) した後、遠心分離 (16 200  $\times$  g-10 min-25°C) した上清をデカンテーションで分取した。得られた上清に蒸留水を加え、用時 10 倍希釈して測定に用いた (試料 10 倍希釈液)。

##### iii) 測定操作

試料 10 倍希釈液 50  $\mu$ L を 96 well マイクロプレートに採り ( $n=2$ )、Folin-Denis 試薬の 5 倍希釈液 50  $\mu$ L を加え混合した。さらに 4%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100  $\mu$ L を加え混合し、室温で 10 分間放置した後、650 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。また各試料について Folin-Denis 試薬を蒸留水で置き換えたサンプルブランクの吸光度を差し引き、検量線から粉末試料の乾物重量あたりのケルセチン相当量 (mg QE/100 g DW) としてポリフェノール濃度を求めた。

#### (6) DPPH ラジカル消去活性測定<sup>13)</sup>

##### i) 試薬

DPPH (和光純薬) 4.0 mg に 99.5% エタノール 10 mL を加え、アルミホイルで遮光した後、10 分間振とうし 1 mmol/L DPPH 反応試液を用時調製した。抗酸化能標準品にはトロロックス (Sigma-Aldrich Co. LLC.) を用いた。

表 1 遺伝子解析による自生キノコ種の同定結果

No.	学名 <sup>1</sup>	一致率(%) <sup>2</sup>	和名	科	形態からの推定種
1	<i>Inocybe lanatodisca</i>	100	—	アセタケ	オオキヌハダトマヤタケ
	<i>I. maculata</i>	100	シラゲアセタケ	—	—
2	<i>Inocybe geophylla</i>	99	シロトマヤタケ	アセタケ	コオトメノカサ
3	<i>Stereum hirsutum</i>	100	キウロコタケ	ウロコタケ	不明
4	<i>Sarcomyxa serotina</i>	100	ムキタケ	ガマノホタケ	ムキタケ
5	<i>Sarcomyxa serotina</i>	100	ムキタケ	ガマノホタケ	ムキタケ
6	<i>Sarcomyxa serotina</i>	100	ムキタケ	ガマノホタケ	ムキタケ
7	<i>Rhodocollybia butyracea</i>	100	エセオリミキ	キシメジ	ハタケシメジ
8	<i>Mycena galericulata</i>	96	クヌギタケ	キシメジ	不明
9	<i>Armillaria sinapina</i>	100	ワタゲナラタケクログナラタケ	キシメジ	ナラタケ
	<i>A. cepistipes</i>	100	—	—	—
10	<i>Armillaria sinapina</i>	100	ワタゲナラタケクログナラタケ	キシメジ	ナラタケ
	<i>A. cepistipes</i>	—	—	—	—
11	<i>Lyophyllum decastes</i>	100	ハタケシメジ	シメジ	ハタケシメジ
12	<i>Lyophyllum decastes</i>	100	ハタケシメジ	シメジ	ハタケシメジ 成菌
13	<i>Lyophyllum decastes</i>	100	ハタケシメジ	シメジ	ハタケシメジ 幼菌
14	<i>Trametes versicolor</i>	99	カワラタケ	タマチョレイタケ	ミダレアミタケ
15	<i>Trametes versicolor</i>	100	カワラタケ	タマチョレイタケ	カワラタケ
	<i>T. velutina</i>	100	—	—	—
16	<i>Amanita caesareoides</i>	100	タマゴタケ	テングタケ	タマゴタケ
17	<i>Amanita rubescens</i>	97	ガンタケ	テングタケ	不明
18	<i>Amanita muscaria</i>	100	ベニテングタケ	テングタケ	ベニテングタケ
19	<i>Amanita spissa</i>	100	ヘビキノコキリントケ	テングタケ	コテングタケモドキ
	—	100	—	—	—
20	<i>Amanita muscaria</i>	100	ベニテングタケ	テングタケ	ベニテングタケ
21	<i>Amanita ibotengutake</i>	100	イボテングタケ	テングタケ	テングタケ
22	<i>Amanita ibotengutake</i>	100	イボテングタケ	テングタケ	テングタケ
23	<i>Agaricus augustus</i>	99	—	ハラタケ	ハラタケ科
	<i>A. macrocarpus</i>	99	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	99	—	—	—
	—	99	—	—	—
24	<i>Agaricus nivescens</i>	98	—	ハラタケ	シロフクロタケ
	<i>A. macrocarpus</i>	98	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	98	—	—	—
	<i>A. arvensis</i>	98	シロオオハラタケ	—	—
	<i>A. silvicola</i>	98	—	—	—
25	<i>Agaricus nivescens</i>	98	—	ハラタケ	ハラタケモドキ
	<i>A. macrocarpus</i>	98	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	98	—	—	—
	<i>A. albolutescens</i>	98	—	—	—
	<i>A. arvensis</i>	98	シロオオハラタケ	—	—

1: 同一 No. における複数の学名の記載は、遺伝子解析の結果、単一のキノコ種に同定できなかったことを示す

2: BLAST 検索結果

ii) DPPH ラジカル消去活性測定用試料液の調製  
「(5)-ii) TPP 測定液の調製」と同様の操作で行った。

iii) 測定操作

DPPH 反応試液は 1 mmol/L DPPH 3 mL に 0.3 mol/L MES Buffer, pH 6.1 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 3 mL を加え用時調製した。試料 10 倍希釈液 50  $\mu$ L を 96 well マイクロプレートに採り ( $n=2$ ), DPPH 反応試薬 100  $\mu$ L を加え混合した。アルミホイルで遮光し 10 分間放置した後、550 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

また DPPH 反応試液を蒸留水に置き換えたサンプルブランクを差し引き、トロロックス検量線から、粉末試料の乾物重量あたりのトロロックス相当量 ( $\mu$ mol TE/100 g DW) として DPPH ラジカル消去活性を求めた。

(7) 統計処理

統計処理には Prism 6 (Graph Pad Software, Inc.) を用いた。

表 1 遺伝子解析による自生キノコ種の同定結果 (続き)

No.	学名 <sup>1</sup>	一致率(%) <sup>2</sup>	和名	科	形態からの推定種
26	<i>Bovistella radicata</i>	99	—	ハラタケ	ツブホコリタケ
	<i>Lycoperdon lambinonii</i>	99	—	—	—
	<i>L. umbrinum</i>	99	ツブホコリタケ	—	—
27	<i>Morganella pyriformis</i>	99	タヌキノチャブクロ	ハラタケ	ホコリタケ
28	<i>Morganella pyriformis</i>	99	タヌキノチャブクロ	ハラタケ	ホコリタケ
29	<i>Agaricus augustus</i>	99	—	ハラタケ	ハラタケ科
	<i>A. macrocarpus</i>	—	—	—	—
	<i>A. excellens</i>	—	—	—	—
30	<i>Morganella pyriformis</i>	100	タヌキノチャブクロ	ハラタケ	ホコリタケ
31	<i>Morganella pyriformis</i>	100	タヌキノチャブクロ	ハラタケ	ニカワシヨウロタケ
32	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	100	—	フウセンタケ	カワムラフウセンタケ
	<i>C. baltetus</i>	99	—	—	—
	<i>C. badiolatus</i>	98	—	—	—
33	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	100	—	フウセンタケ	バカマツタケ
	<i>C. balteatus</i>	99	—	—	—
34	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	99	—	フウセンタケ	不明
	<i>C. cycneus</i>	99	—	—	—
	<i>C. nemorensis</i>	98	モリノフジイロタケ	—	—
	<i>C. langei</i>	98	—	—	—
	<i>C. clelandii</i>	98	—	—	—
35	<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	100	—	フウセンタケ	ホンシメジ
	<i>C. balteatus</i>	99	—	—	—
	<i>C. badiolatus</i>	98	—	—	—
36	<i>Cortinarius triumphans</i>	100	チャオビフウセンタケ	フウセンタケ	フウセンタケ科
37	<i>Cortinarius triumphans</i>	99	チャオビフウセンタケ	フウセンタケ	不明
38	<i>Lactarius necator</i>	100	ウグイスチャチタケ	ベニタケ	ウグイスチャチタケ
39	<i>Lactarius hatsudake</i>	99	ハツタケ	ベニタケ	不明
	<i>L. quieticolor</i>	99	—	—	—
40	<i>Russulaceae sp.</i>	99	ベニタケ属	ベニタケ	ヤブレベニタケ
41	<i>Pholiota lundbergii</i>	97	—	モエギタケ	不明
	<i>P. squarrosa</i>	97	—	—	—
42	<i>Pholiota mixta</i>	98	—	モエギタケ	キナメツムタケ
43	<i>Hypholoma fasciculare</i>	100	ニガクリタケ	モエギタケ	ニガクリタケ
44	<i>Hypholoma fasciculare</i>	99	ニガクリタケ	モエギタケ	ニガクリタケ
45	<i>Hypholoma fasciculare</i>	99	ニガクリタケ	モエギタケ	ニガクリタケ
46	<i>Hypholoma fasciculare</i>	99	ニガクリタケ	モエギタケ	ニガクリタケ
47	不明	—	—	—	キシメリイグチ
48	不明	—	—	—	タマゴタケ

1: 同一 No. における複数の学名の記載は、遺伝子解析の結果、単一のキノコ種に同定できなかったことを示す

2: BLAST 検索結果

## 実験結果

### 1. DNA 塩基配列解析結果

全 48 試料に対する塩基配列解析の結果、46 試料が種あるいは属レベルでの同定が可能であった (表 1)。不明の 2 試料は、形態からはキシメリイグチ (No. 47) およびタマゴタケ (No. 48) と推定されたが、塩基配列解析において良好なシグナルが得られず、BLAST による相同性検索が不可能であった。遺伝子解析の結果、48 試料の内訳は重複した同種 (同属) を除くと 27 種 (属) であった。

### 2. Congo Red 法による $\beta$ -グルカン測定結果

#### (1) $\beta$ -グルカン検量線

代表的な検量線の例を図 1 に示した。回帰式は二次曲線であり定量範囲は 10 から 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

#### (2) セルロース ( $\beta$ -1,4-グルカン) の影響

キノコに乾燥重量あたり 10% 程度存在するとされる直鎖状の  $\beta$ -グルカンであるセルロース ( $\beta$ -1,4-グルカン) の影響<sup>16)17)</sup>を確認するために、透析用セルロースチューブ (和光純薬工業(株)) およびカラムクロマト用担体の Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) を用いてアルカリ熱水抽出液を同様に調製し測定した。その結果、吸光度値はブラン

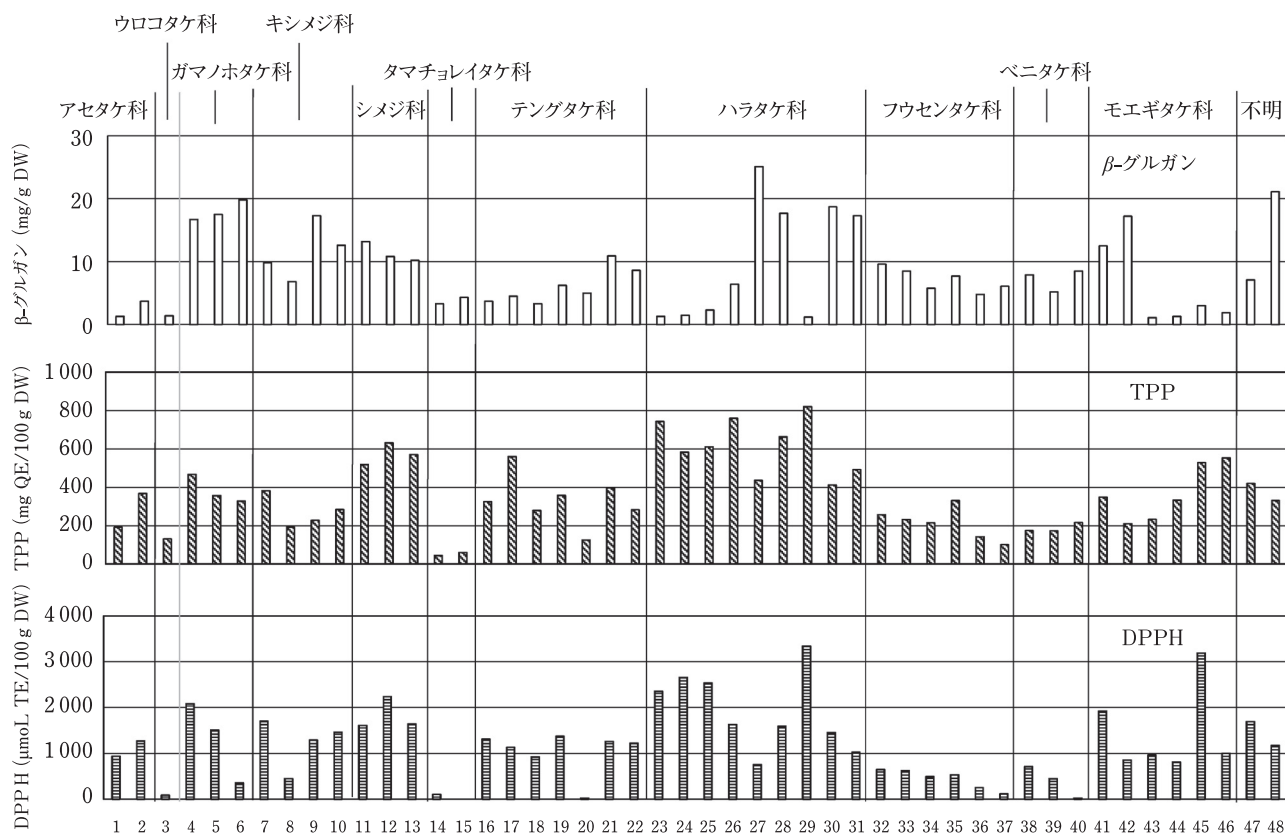


図2 自生キノコのβ-グルカン，TPPおよびDPPH測定結果

横軸の番号は表1の試料No.に相当し，各測定値は試料の乾物重量あたりを示す。

クと差がなくβ-グルカン測定値へのセルロースの影響がないことを確認した。

### (3) 自生キノコのβ-グルカン量

全48試料のβ-グルカン定量値(平均±標準偏差)は $8.6 \pm 6.3 \text{ mg/g DW}$ であった(図2)。最も高い値を示したのはNo.27タヌキノチャブクロの $25.1 \text{ mg/g DW}$ であり，最も低い値を示したのはNo.43ニガクリタケの $1.1 \text{ mg/g DW}$ であった。種ごとの比較では分散分析によりβ-グルカン量は有意差を認め( $p < 0.0001$ )，ニガクリタケ $2.0 \pm 1.0 \text{ mg/g DW}$  ( $n=4$ )，*Cortinarius balteatocumatis*  $8.5 \pm 1.0 \text{ mg/g DW}$  ( $n=4$ )，ハタケシメジ $11.4 \pm 1.6 \text{ mg/g DW}$  ( $n=3$ )および{ムキタケ $19.5 \pm 1.8 \text{ mg/g DW}$  ( $n=3$ )，タヌキノチャブクロ $19.7 \pm 3.6 \text{ mg/g DW}$  ( $n=4$ )}の3群間でTukey検定による有意差( $p < 0.05$ )を示した(図3)。

### (4) 酵素法との比較

栽培時の培地が異なるアラゲキクラゲ5試料についてCongo Red法と酵素法によるβ-グルカンの定量結果(平均±標準偏差)を比較したところ，酵素法の測定値は $372 \pm 36 \text{ mg/g DW}$ とセルロースを含むことからCongo Red法の $6.4 \pm 1.4 \text{ mg/g DW}$ の約50倍高い結果となったが，有意の相関関係( $p=0.0127$ )が認められた(図4)。

### 3. TPP測定結果

全48試料のTPP定量値(平均±標準偏差)は $362 \pm 190$

$\text{mg QE/100 g DW}$ であった(図2)。最も高い値を示したのはNo.29ハラタケ属キノコの $820 \text{ mg QE/100 g DW}$ であり，最も低い値を示したのはNo.14カワラタケの $44 \text{ mg QE/100 g DW}$ であった。種ごとの比較では，ニガクリタケ $412 \pm 134 \text{ mg QE/100 g DW}$ ，*C. balteatocumatis*  $259 \pm 51 \text{ mg QE/100 g DW}$ ，ハタケシメジ $574 \pm 57 \text{ mg QE/100 g DW}$ ，ムキタケ $384 \pm 73 \text{ mg QE/100 g DW}$ およびタヌキノチャブクロ $500 \pm 113 \text{ mg QE/100 g DW}$ と分散分析により有意差を認め( $p=0.0122$ )，*C. balteatocumatis*と{ハタケシメジおよびタヌキノチャブクロ}の2群間のみで，Tukey検定による有意差( $p < 0.05$ )を示した(図3)。

### 4. DPPHラジカル消去活性測定結果

全48試料の測定値(平均±標準偏差)は $1170 \pm 776 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ であった(図2)。最も高い値を示したのはNo.29ハラタケ属キノコの $3340 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ でTPP測定値と同様の結果であった。一方，最も低かったのもNo.15カワラタケで唯一検量線の定量範囲外であった。種ごとの比較では分散分析による有意差は認められなかった( $p=0.118$ )，ニガクリタケが $1320 \pm 676 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ ，*C. balteatocumatis*が $576 \pm 74 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ ，ハタケシメジが $1830 \pm 355 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ ，ムキタケが $1320 \pm 876 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ およびタヌキノチャブクロが $1200 \pm 384 \mu\text{mol TE/100 g DW}$ と，

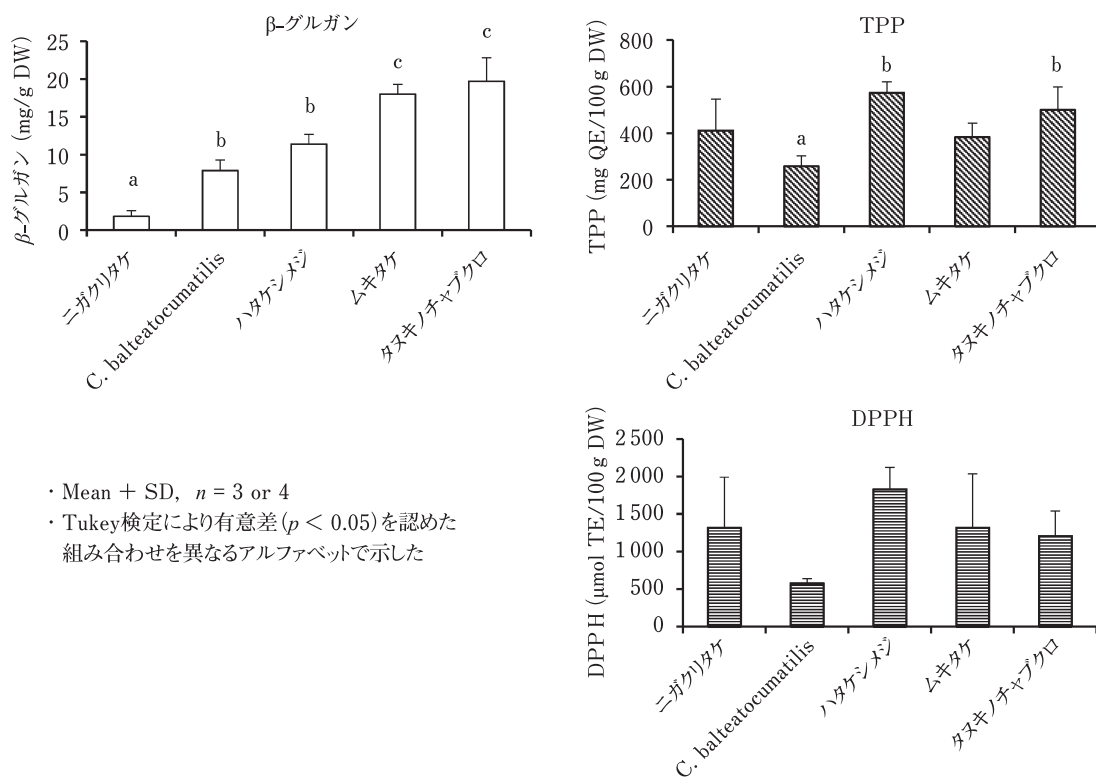


図 3 キノコ種間のβ-グルカン濃度、TPP濃度およびDPPHラジカル消去活性の比較  
 各測定値は試料の乾物重量あたりを示す。

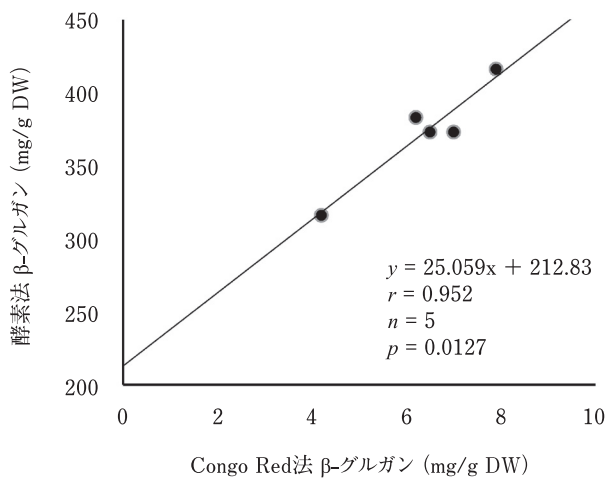


図 4 アラゲキクラゲにおけるCongo Red法と酵素法によるβ-グルカン濃度の相関  
 各測定値は試料の乾物重量あたりを示す。

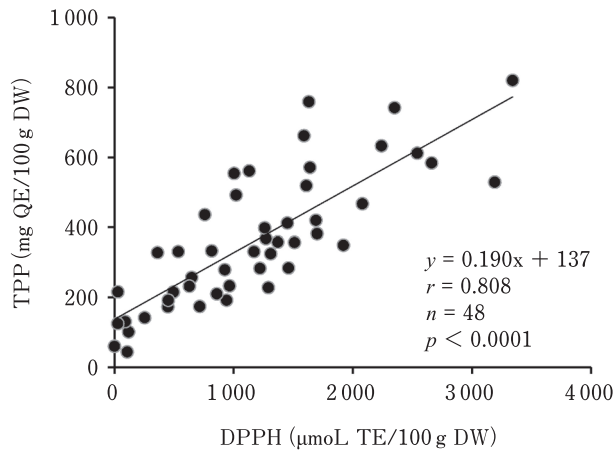


図 5 TPP濃度とDPPHラジカル消去活性の相関  
 各測定値は試料の乾物重量あたりを示す。

TPP同様に *C. balteatocumatilis* は低値傾向を示した (図 3)。

5. TPPおよびDPPHラジカル消去活性の相関

TPPとラジカル消去活性の間には強い正の相関関係が認められた ( $r=0.8079, p<0.0001$ ) (図 5)。

考 察

キノコ子実体の形態による鑑定結果を遺伝子解析により

確認した (表 1)。特徴的な形状から形態による鑑定が容易なムキタケやベニテングタケなどでは、ほぼ遺伝子解析結果と一致した。一方、生長段階での形状変化や形態が類似した種が多いフウセンタケ科などでは塩基配列解析によって初めて正確な同定が可能であった。一部、属レベルの同定にとどまるが ITS 領域の塩基配列解析により、今回用いた、ほとんどの自生キノコ種の同定が可能であった。形態からキヌメリイグチ (No. 47) およびタマゴタケ (No. 48)

と推定された2試料(表1)で遺伝子解析による同定結果が得られなかった。これは塩基の種類に対応するシグナルに重複が見られたためであるが、他種キノコあるいはカビなどの真菌類の混在による影響、あるいは試料がヘテロカリオン(同一細胞に2個以上の核を有する異核共存体が含まれていた特殊ケース)であった可能性<sup>9)</sup>も考えられる。

本研究において $\beta$ -グルカンの測定に用いたCongo Red法は元々、大麦由来の $\beta$ -グルカンを定量する簡便法として報告<sup>10)11)</sup>されており、より一般的な方法としては総グルカン量から $\alpha$ -グルカン量を差し引く酵素法<sup>16)</sup>が用いられている。酵素法と比較してCongo Red法は、はるかに簡便な操作で $\beta$ -グルカンを測定することができ、多試料のスクリーニングに有用であると考えられるが、現在、キノコを含めた食品への適用例は報告されていない。Congo Red法での $\beta$ -グルカン定量値はアラゲキクラゲの $6.4 \pm 1.4$  mg/100 g DW と、酵素法の $372 \pm 36$  mg/100 g DW と比較して、はるかに低い値となったが有意の正の相関は認められている(図4)。これは測定原理が全く異なることによると考えられる。Congo Red試薬による $\beta$ -グルカンの測定原理は、分岐構造を持つ $\beta$ -1,3/1,6-グルカンおよび $\beta$ -1,3/1,4-グルカンがつくる三次元立体構造にCongo Red分子が会合して起こる吸収波長のシフトを利用したものであるのに対して<sup>11)</sup>、酵素法では直鎖の $\beta$ -グルカンも測定値に含まれる。従って植物体の構成成分として存在しているセルロースなどの直鎖状の $\beta$ -グルカンは、酵素法の測定値には含まれるが、Congo Red法の測定値には影響を与えない。本研究においても実際にセルロースが測定値に影響しないことを確認できた。しかし、元々、Congo Red法により測定したセルロース試料は前処理の抽出段階でエタノールによる沈殿生成が目視できなかったことから、今回の条件では抽出されていない可能性が高い。いずれにせよCongo Red法では一般に免疫賦活などの機能性成分としては捉えられていないセルロースが測定には含まれないことも大きな利点である。単一の分子構造を持たない $\beta$ -グルカンはその分子量や立体構造などが生体内での生理活性に大きく影響を及ぼすため<sup>3)~5)</sup>、機能性という観点から多様な $\beta$ -グルカンの高次構造を反映したCongo Red法の測定値は有用性が高いものと考えられる。

全48試料のCongo Red法による自生キノコの $\beta$ -グルカン量は $8.6 \pm 6.3$  mg/100 g DW、範囲は1.1 mg/100 g DW から25.1 mg/100 g DW と種ごとに大きな変動が見られた。科内の比較ではハラタケ科のNo. 28 タヌキノチャブクロが25.1 mg/100 g DW と高い値を示した一方、No. 30 ハラタケ属のキノコは1.3 mg/100 g DW と低い値であった(図2)。分散分析-Tukey検定による種間の比較では*C. balteatocumatis* vs ハタケシメジおよびムキタケ vs タヌキノチャブクロの組合せを除き有意差を認めた。以上のことからキノコの $\beta$ -グルカンは種内での変動は小さく、生

育環境や個体差による影響よりも種間の差が大きいことから種固有の値を持つものと考えられる。

従来の酵素法による $\beta$ -グルカン濃度としては、乾燥キクラゲの450 mg/g DW および乾燥シイタケの388 mg/g DW が報告されており<sup>18)</sup>、アラゲキクラゲの酵素法測定値316~416 mg/g DW (図4)とほぼ同じ濃度レベルである。間接的ではあるが、Congo Red法によるアラゲキクラゲの測定値6.4 mg/g DW (平均値)と比較したとき、同法によるタヌキノチャブクロの25.1 mg/100 g DW は、かなり高値であるといえる。

一方、シイタケのレンチナンやスエヒロタケのジゾフィランなどのように $\beta$ -グルカンの免疫賦活作用を利用した抗がん剤が実用化されている<sup>4)</sup>。 $\beta$ -1,6結合の位置に依存する分岐構造が重要とされており、 $\beta$ -グルカン濃度の高さや機能性が必ずしも相関する訳ではない。したがってCongo Red法の測定値が酵素法の測定値に比べ、より良く*in vivo*での免疫系への作用を反映するかどうかについては、今後の検証が必要である。

全48試料の、TPP測定結果 $412 \pm 134$  mg QE/100 g DW およびDPPHラジカル消去活性測定結果 $1315 \pm 776$   $\mu$ mol TE/100 g DW とともに大きな変動が見られ、科レベルで一定の傾向は確認できなかった(図2)。TPPの種間の比較においては*C. balteatocumatis* vs (ハタケシメジ、タヌキノチャブクロ)の間に有意差を認めたが、DPPHラジカル消去活性においては種間の有意差は認められなかった。このことはムキタケをはじめ全体的にDPPHラジカル消去活性の標準偏差が大きいことが影響していると考えられ、粉末試料としたときにTPPに比べDPPHラジカル消去活性は酸化の影響をより受けやすいためと考えられる。また、TPPとDPPHラジカル消去活性の間に正の相関が見られたことから、キノコの抗酸化性についてもポリフェノールの寄与が大きいと考えられる(図5)。

以上、道央圏に限られた地域に自生するキノコ子実体を試料として、 $\beta$ -グルカン濃度、TPP濃度およびDPPHラジカル消去活性について比較検討を行ったところ、それぞれ種ごとに多様性が認められた。キノコは従来から知られているように、魅力的な天然の機能性食材であり、今回認められた種ごとの特徴が、地域や時期的な影響をどの程度受けるのか興味深いところである。

## 要 約

酪農学園大学キャンパス内の自生キノコ48試料について遺伝子解析による同定を行ったところ46試料が種あるいは属レベルで同定された。Congo Red法による $\beta$ -グルカンの定量結果は、測定値にセルロースなどの直鎖状 $\beta$ -グルカンを含まないことから、酵素法と比べて小さい値となったが $\beta$ -グルカンの高次構造を反映した機能性を評価する上ではむしろ有用であると考えられた。また食材の機



能性評価に汎用される TPP および DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、両測定値間には強い正の相関が認められ、キノコの抗酸化性にはポリフェノールが関与していることが示唆された。β-グルカン、TPP および DPPH ラジカル消去活性のいずれの機能性指標においても科ごとに一定の傾向は見られず、種ごとに特徴的な値を示すことが確認された。

本研究を進めるにあたり貴重なご助言をいただきました。酪農学園大学 横田博教授、小野寺秀一教授および村松圭准教授に心より感謝を申し上げます。また本研究の一部は、文科省科研省私立大学戦略拠点事業（酪農学園大学大学院 2013 年～2017 年）の一環として実施された。

## 文 献

- 1) 長澤栄史, キノコの同定, 「菌類の事典」, 第 1 版, 日本菌学会編, (朝倉書店, 東京), pp.406-411 (2013).
- 2) Feeney, M.J., Dwyer, J., Hasler-Lewis, C.M., Milner, J.A., Noakes, M., Rowe, S., Wach, M., Beelman, R.B., Caldwell, J., Cantorna, M.T., Castlebury, L.A., Chang, S.T., Cheskin, L.J., Clemens, R., Drescher, G., Fulgoni, V.L. 3rd., Haytowitz, D.B., Hubbard, V. S., Law, D., Myrdal Miller, A., Minor, B., Percival, S.S., Riscuta, G., Schneeman, B., Thornsbury, S., Toner, C.D., Woteki, C.E. and Wu, D., Mushrooms and health summit proceedings. *J. Nutr.*, **144**, 1128s-1136s (2014).
- 3) Kalac, P., A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 209-218 (2013).
- 4) 水野 卓, 抗腫瘍物質, 「キノコの化学・生化学」, 第 1 版, 水野 卓, 川合正允編, (学会出版センター, 東京), pp. 37-40 (1992).
- 5) Finimundy, T.C., Gambato G., Fontana, R., Camassola, M., Salvador, M., Moura, S., Hess, J., Henriques, J.A. P., Dillon, A. J. P. and Roesch-Ely, M., Aqueous of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor. *Nutr. Res.*, **33**, 76-84 (2013).
- 6) 高橋邦雄, 森林ときのかかわり, 「北海道きのこ図鑑」, 新装改版 (亜細亜社, 札幌), pp.344-345 (2012).
- 7) 山浦由郎, 日本における最近のキノコ中毒発生状況, 中毒研究, **26**, 39-43 (2013).
- 8) 畠山 敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀 雅美, 山野哲夫, 清水 充, 食中毒究明のための遺伝子解析によるキノコ鑑別, 食品衛生学雑誌, **53**, 237-242 (2012).
- 9) 保坂健太郎, 遺伝子解析によるキノコの同定, 中毒研究, **26**, 205-209 (2013).
- 10) 石川直幸, 大塚 勝, 小玉雅晴, 加島典子, 大麦育成のためのβ-グルカン簡易定量法 (Congo Red 法) の改良, 栃木県農業試験場研究報告, **47**, 57-64 (1998).
- 11) Anderson, B.I.W., The effect of β-glucan molecular weight on the sensitivity of dye binding assay procedures for β-glucan estimation. *J. Inst. Brew.*, **96**, 323-326 (1990).
- 12) 津志田藤二郎, 機能性食品成分の分離・構造決定, 「食品機能研究法」, 篠原和毅, 上野川修一, 鈴木建夫編, (光琳, 東京), pp.318-322 (2000).
- 13) 須田郁夫, 機能性研究, 「食品機能研究法」, 篠原和毅, 上野川修一, 鈴木建夫編, (光琳, 東京), pp.218-220 (2000).
- 14) 木村栄一, 施設空調型キクラゲ栽培の最新技術, 「最新きのこ栽培技術」, 2010 年度版, (特産情報, 東京), pp.212-216 (2010).
- 15) 福山一世, 池田匠児, 杉 元直, 渡 慶彦, 山口隆司, 山田真義, 山内正仁, バガス・黒糖焼酎粕を利用したアラゲキクラゲの栽培, 平成 26 年度土木学会西部支部研究発表会講演概要集, pp.769-770 (2015).
- 16) McCleary, B.V., Determination of β-glucan in barley and oats by streamlined enzymatic method: Summary of collaborative study. *J. AOAC Int.*, **80**, 580-581 (1997).
- 17) 倉沢新一, 菅原龍幸, 林 淳三, キノコ類中の一般成分および食物繊維の分析, 日本食品工業学会誌, **29**, 400-406 (1982).
- 18) 田村 章, 笹原浩幸, 乾燥キクラゲのβ-グルカン, 「機能性成分分析マニュアル」, 細川 純編, (四国地域イノベーション創出協議会, 高松), (2010).

(平成 27 年 4 月 14 日受付, 平成 27 年 6 月 10 日受理)