

ACE阻害活性を指標としたブナシメジの育種

宜寿次盛生 原田 陽 米山 彰造*¹
森 三千雄*² 佐藤真由美*³

Breeding of *Hypsizygus marmoreus* by ACE-Inhibitory Activity

Seiki GISUSI Akira HARADA Shozo YONEYAMA
Michio MORI Mayumi SATO

We obtained 238 strains of *Hypsizygus marmoreus* by crossing two strains, Hm03-2, which has high Angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and Hm219, which has good characteristics for cultivation. Two strains were selected by screening. One strain, Hm612, had the highest ACE-inhibitory activity, and the another one, Hm468, had high ACE-inhibitory activity and good characteristics for cultivation.

key words: angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, *Hypsizygus marmoreus*, breeding, screening test, characteristics for cultivation
アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性, ブナシメジ, 育種, 選抜試験, 栽培特性

子実体冷水抽出物のアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性が高いブナシメジ菌株Hm03-2と栽培特性に優れた菌株Hm219を交配し, 238菌株を作出した。子実体の収量・形質を考慮し, ACE阻害活性が最も高いHm612, ACE阻害活性が高く栽培特性の優れたHm468の2菌株を選抜した。

1. はじめに

ブナシメジ(*Hypsizygus marmoreus*)の国内生産量は年間8~10万トンで推移し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と消費量が頭打ちとなっていることから, 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。

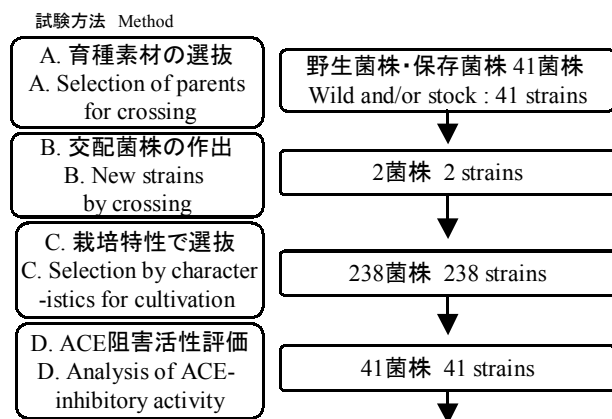
一方, 近年きのこの機能性が注目され, ブナシメジについては血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害活性が他のきのこに比べ比較的高いことが確認されている²⁾。ACEの阻害により, 血管収縮物質であるアンジオテンシン-IIの生成および血管拡張物質であるブラジキニンの分解が抑えられ, 血圧低下をもたらすことが明らかとなっている³⁾。そこで, 本研究は, ACE阻害活性を指標に

ブナシメジ品種の育成を目的とした。

なお、本研究は(独)森林総合研究所交付金プロジェクトの一環として行った。

2. 試験方法

第1図にACE阻害活性を指標としたブナシメジ育種の流れを示す。育種工程は、育種素材の選抜からACE阻害活性の評価まで大きく4つの工程からなる。



第1図 ACE阻害活性を指標にしたブナシメジ育種の流れ

Fig. 1. Flow chart of breeding of *H. marmoreus* by ACE-inhibitory activity.

2.1 育種素材(交配親菌株)の選抜

育種素材の選抜では、子実体冷水抽出物のACE阻害活性および収量等の栽培特性を指標に交配親菌株となる2菌株の選抜を行った(第1図のA)。

2.1.1 供試菌株

野生菌株を主とする当场保存のブナシメジ41菌株を用いた。これらの菌株をカンバ類(*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。

2.1.2 栽培試験

試験は850mL容ポリプロピレン製の栽培ビンを用いて行った。基本培地として、カンバ類おが粉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⁴⁾。基本培地を栽培ビンに600g充填し、高压殺菌(121℃, 30分間)した。栽培方法は原田ら⁵⁾に準じた。すなわち、培地を殺菌後、各ビンに約10gの種菌を

接種して、温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $70 \pm 10\%$ 、暗条件下で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 $16 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $85 \pm 10\%$ 、照度約50 luxで管理し、子実体原基形成後、柄が1.5cm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 $16 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $85 \pm 10\%$ 、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2.5cm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後、生重量を測定して子実体収量とした。

2.1.3 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、粉碎した粉末2gを80mLの蒸留水に懸濁し、5℃で20時間、100rpmで振とうした。この懸濁液を遠心分離($5000 \times g$, 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)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0.5Mホウ酸緩衝液(pH8.3)を0.1mL、1.6M NaClを含有するBSA溶液(2mg/mL)を0.25mL入れ、酵素溶液(0.1unit/mL)を0.05mL、試料溶液(5mg/mL)を加えて全量を0.475mLとした。基質溶液(4.3mg/mL)を0.025mL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1mLを添加して反応を停止した。反応液中の馬尿酸を高速液体クロマトグラフィー(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。HPLCはSHIMADZU LC10システム(SPD-M10AVフォトダイオードアレイ検出器とカラムMightysil RP-18 GP 250-4.6mm (5μm), 関東化学)を使用した。分析条件は、移動相にアセトニトリル/10mMリン酸緩衝液(pH2.8) = 1:4 (v/v)を用い、流速1mL/分、カラム温度40℃、検出波長240nmとした。

2.2 一次選抜試験(栽培特性によるスクリーニング)

2.1において選抜した2菌株から新たに菌株を作出し(第1図のB)、それらの栽培試験を行い収量等の

栽培特性で41菌株を選抜した(第1図のC)。

2.2.1 供試菌株

2.1において選抜した2菌株それぞれの子実体から単離した単胞子系統を交配し238菌株を作出し、一次選抜試験に用いた。また、比較のため当场保存のブナシメジ市販品種(HmC1~C3)を用いた。

2.2.2 栽培試験

2.1.2で示した基本培地を用い、培養期間75日で栽培試験を行った。繰り返しビン数を8本とした。

2.3 二次選抜試験(栽培特性およびACE阻害活性によるスクリーニング)

2.2において選抜した菌株の栽培試験を再度行い、子実体冷水抽出物のACE阻害活性および収量等の栽培特性を評価した(第1図のD)。

2.3.1 供試菌株および栽培試験

二次選抜試験の供試菌株は、一次選抜した41菌株を用いた。また、比較のため当场保存のブナシメジ市販品種(HmC1~C3)を用いた。2.2.2と同条件で栽培試験を行った。ただし、供試本数は16本とした。

2.3.2 ACE阻害活性の評価

2.1.3と同様の条件でACE阻害活性の評価を行った。ただし、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。繰り返し数は各回2とした。

3. 結果

3.1 育種素材の選抜および交配菌株の作出

3.1.1 育種素材の選抜

41菌株中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21.8~163.2g/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(第2図)。ACE阻害活性と栽培特性を考慮して10菌株を選抜し、再度、栽培試験を行った結果、ACE阻害活性は30.6~65.5%となった。2回の試験結果から、野生菌株Hm03-2はACE阻害活性が65%以上と安定して高いこと、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55%以上と比較的高い(第3図)ことから、この2菌株(Hm03-

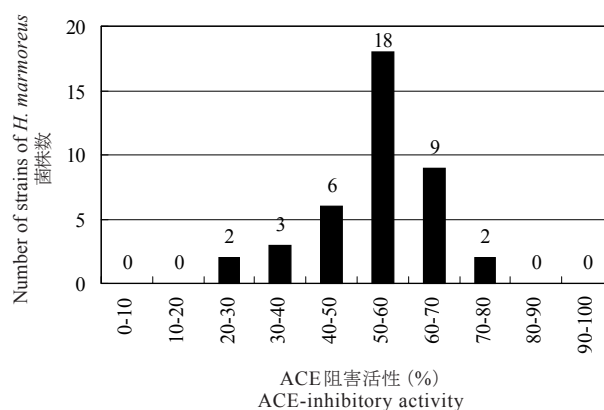
2およびHm219)を育種素材として選抜した(第1図参照)。

3.1.2 交配菌株の作出

育種素材として選抜した2菌株それぞれの子実体から単胞子系統を単離し、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(第1図参照)。

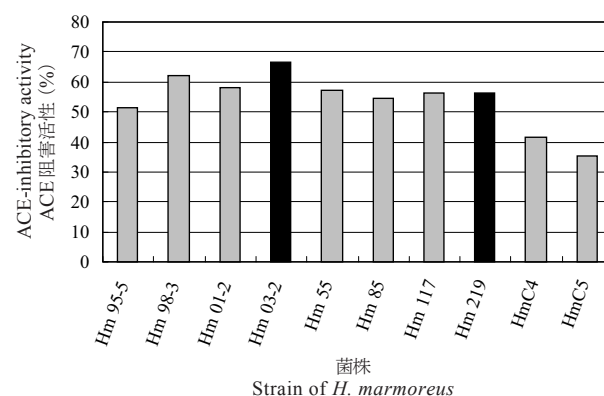
3.2 栽培特性による一次選抜

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



第2図 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

Fig. 2. Distribution of ACE-inhibitory activity (%) of strains of *H. marmoreus* for crossing parent.



第3図 育種素材として検討したブナシメジ菌株のACE阻害活性(%)

試験2回の平均値。繰り返し数は4。

黒棒で示したHm03-2とHm219を育種素材として選抜した。

Fig. 3. ACE-inhibitory activity (%) of strains of *H. marmoreus* for crossing parent.

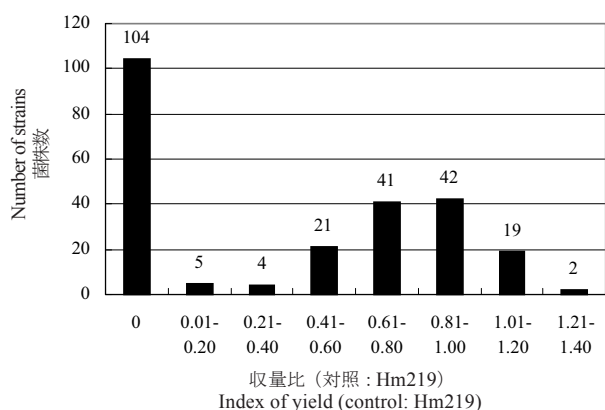
Means of 2 tests. N=4.

Two strains, Hm03-2 and Hm219, were selected for crossing parents.

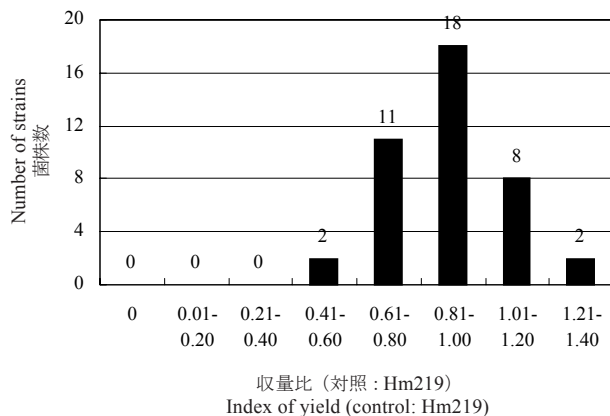
数は43～70日(対照:51～59日)となった。75日間培養後、子実体発生操作を行い、238菌株中134菌株で子実体が発生した(第4図)。菌かきから収穫までの日数は21～42日(対照:21～24日)となった。発生した子実体の収量は1.9～103.7g/ビン(対照との収量比:0.03～1.22)であった。この中から、子実体収量、形質を指標に、41菌株を選抜した(第1図参照)。

3.3 栽培特性およびACE阻害活性による二次選抜

栽培試験を行った結果、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60.3～149.2g/ビン(対照との収量比:0.49～1.21)となった(第5図)。



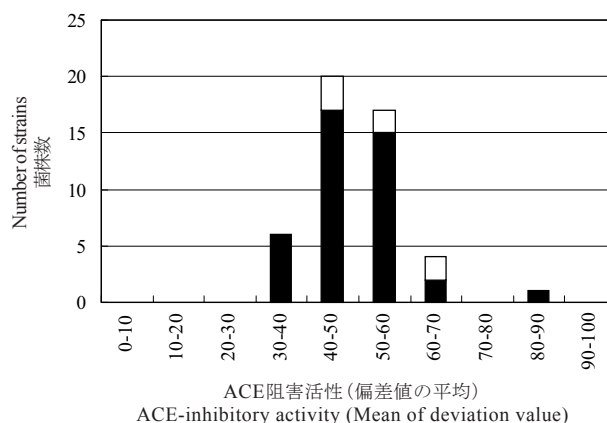
第4図 一次選抜試験における子実体収量比の分布
Fig. 4. Distribution of index of yield of strains of *H. marmoreus* at the 1st screening test.



第5図 二次選抜試験における子実体収量比の分布
Fig. 5. Distribution of index of yield of strains of *H. marmoreus* at the 2nd screening test.

第6図に交配菌株41菌株、対照として両親菌株および市販菌株の計48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、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を確認するため、スピアマンの順位相関係数⁷⁾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認められた。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。

第1表に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HmC1から低い菌株HmC3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中で最も高いACE阻害活性を示し、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。



第6図 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
□: 対照菌株, ■: 交配菌株
Fig. 6. Distribution of ACE-inhibitory activity (deviation values) of *H. marmoreus*.
□: Control strain, ■: Hybrid strain

第1表 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)
 Table 1. ACE-inhibitory activity and characteristics for cultivation of some strains of *H. marmoreus*. (Mean ± S.D.)

菌株 Strain #	ACE阻害活性(偏差値) ACE-inhibitory activity (Deviation value)	収量(g/ビン) Yield (g/bottle)	生育日数 Days to harvest
Hm 612 交配株 Hybrid strain	80.3 ± 6.92	82 ± 12.3	28 ± 1.1
Hm 515 交配株 Hybrid strain	63.3 ± 1.95	79 ± 13.8	25 ± 1.8
Hm 468 交配株 Hybrid strain	62.7 ± 9.70	131 ± 12.8	27 ± 1.1
Hm 03-2 親菌株 Parent for crossing	68.9 ± 6.29	29 ± 14.4	30 ± 1.5
Hm 219 親菌株 Parent for crossing	44.7 ± 4.35	123 ± 20.6	25 ± 0.6
Hm C1 市販株 Commercial strain	60.7 ± 2.62	63 ± 17.3	21 ± 0.5
Hm C2 市販株 Commercial strain	48.3 ± 1.87	100 ± 11.3	21 ± 0.7
Hm C3 市販株 Commercial strain	43.0 ± 0.68	114 ± 17.3	22 ± 1.3

4. 考察

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差が見られ(第2図および第6図), 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(第4図)。しかし, 商業生産では培養期間など生産効率も重要である⁵⁾ことから, 子実体発生に至らなかった菌株は除外した。

一次選抜試験の収量比を, 両菌株の単核系統(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, 交互作用が認められた。単胞子分離によって両親菌株の遺伝形質が分散されるため, 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。

食味評価の結果⁸⁾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が, 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。今後は, ACE阻害活性を高め, かつ栽培特性を向上させる培地組成の検討が必要である。

津田らは²⁾, ブナシメジのACE阻害活性物質は数種類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⁹⁾。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¹⁰⁾, 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¹¹⁾ことが明らかになっている。上述のACE阻害活性を向上させる検討を進めるには, 活性成分(群)を定量的に推定し, その機序を明らかにすることが重要であると考えられる。

文 献

- 1) 北海道水産林務部: “平成18年北海道特用林産統計”, 2006, pp.1-4.

- <http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/rrm/H18tokuyourinsantoukei.htm>
- 2) 津田真由美, 原田陽, 青山政和, 齋藤直人, 関一人, 兼俊明夫, 林隆章: 林産試験場報 **14**(2), 10-15 (2000).
 - 3) キリンビールホールディングス: “ブナハリタケの血圧降下作用”, http://kirin-foodresearch.jp/R&D/b_page_2.html, 2008.
 - 4) 原田陽, 宜寿次盛生, 森三千雄, 米山彰造: 日菌報 **44**, 3-8 (2003).
 - 5) 原田陽, 宜寿次盛生, 米山彰造, 中谷誠, 伊藤清: 日本応用きのこ学会誌 **9**(2), 67-72 (2001).
 - 6) 兼俊明夫, 林隆章, 姉帯正樹, 金島弘恭, 尾谷賢, 菟嶋裕典, 内山智幸, 畠山好雄, 飯田修: 道衛研所報 No.43, 1-5 (1993).
 - 7) 新城明久: “生物統計学入門”, 朝倉書店, 東京, 1986, pp.106-108.
 - 8) 宜寿次盛生, 米山彰造, 森三千雄: 日本きのこ学会第10回大会講演要旨集, 秋田, 2006, p.62.
 - 9) M. Ohtsuru, H. Horio, H. Masui: *Food Sci. Technol. Res.* **6** (1), 9-11 (2000).
 - 10) S. Hagiwara, M. Takahashi, Y. Shen, S. Kaihou, T. Tomiyama, M. Yazawa, Y. Tamai, Y. Sin, A. Kazusaka, M. Terazawa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1603-1605 (2005).
 - 11) 鈴木浩之, 齋藤伸吾, 青山政和, 原高明, 八木勇三: 日本木材学会北海道支部講演集 第38号, 札幌, 2006, pp.16-17.
- きのこ部 品種開発科—
—*1:きのこ部 生産技術科—
—*2:網走西部森づくりセンター遠軽事務所—
—*3:利用部 成分利用科—
(原稿受理: 08.4.15)