

鹿角霊芝子実体の水溶性多糖に及ぼす菌床の影響

Influence of culture medium on the composition of water-soluble polysaccharides in *Ganoderma lucidum* fruit body

高坂 陽寿*・加藤 陽治**

Akihisa KOSAKA*・Yoji KATO**

論文要旨

リンゴ剪定枝を菌床に用いて栽培した鹿角霊芝（1次栽培鹿角霊芝）と、1次栽培で使用した菌床を再利用して栽培した鹿角霊芝（2次栽培鹿角霊芝）それぞれの子実体に含まれる多糖について調べた。①子実体乾燥単位重量あたりの全糖量は1次が2次の1.8倍であった。また、子実体含有多糖を水溶性、熱水可溶性、不溶性の三つに分けて割合を求めると、1次で3.2：8.5：88.3、2次で18.4：18.6：63.0と1次の方が不溶性の割合が多かった。②1次、2次ともに子実体を構成する多糖に部位（上部、中部、下部）間での大きな違いはなかった。しかし、③1次栽培の水溶性高分子多糖の大部分はヘテロガラクトン、2次栽培ではアラビノースやウロン酸等を側鎖に有するキシラン系多糖であった。④子実体の電子顕微鏡観察では、1次栽培のものは組織が密であったが、2次栽培のものは粗かった。菌床（培地）組成は、子実体を構成する多糖の種類と量、組織形態にまで深く影響を与えることが明らかとなった。

キーワード：鹿角霊芝，子実体，水溶性多糖，培地組成

I. 緒言

多くの食用キノコは食物繊維が豊富であると同時に、含まれる個々の多糖に多くの健康機能（抗腫瘍活性、免疫機能増強効果、血糖降下作用など）があることが知られている¹⁻¹⁵⁾。鹿角霊芝 (*Ganoderma lucidum*) はサルノコシカケ科に属する担子菌のマンネンタケというキノコである霊芝の一種であり、鹿の角の様な独特な子実体を形成し、成分的には特にβ-グルカンが他のキノコ類より多く含まれているとされる。我々は鹿角霊芝子実体構成多糖の生理機能を明らかにするために、特に水溶性多糖に注目して研究を進めてきた。これまで、鹿角霊芝栽培時に菌床に用いるオガ粉の種類（カキ、クワ、サクラ、ウメ、ナラ、ブドウおよびリンゴの剪定材）が異なると、子実体から得られる水溶性多糖成分に違いが見られることを明らかにした¹⁶⁾。また、鹿角霊芝子実体水溶性多糖の一種であるヘテロガラクトンの構造を明らかにした¹⁷⁾。一

方、鹿角霊芝に用いた菌床は栽培終了後畑に戻し肥料として活用されるが、まだ有効成分を含んでいるので、再度鹿角霊芝栽培に有効活用することもなされている。本研究では、菌床組成の違いと水溶性多糖の違いの関係をより明らかにするために、リンゴ剪定枝を用いて通常通り栽培した鹿角霊芝（1次栽培鹿角霊芝）と、1次栽培を終えた培地を再利用して栽培された鹿角霊芝（2次栽培鹿角霊芝）それぞれに含まれる多糖の違いを調べた。

II. 実験方法

1. 実験材料

1次栽培霊芝および2次栽培霊芝の栽培法は前報に従った¹⁶⁾。

2. 鹿角霊芝子実体からの糖の抽出

鹿角霊芝子実体を凍結乾燥後、ミキサーにて粉碎した。粉末1g（乾燥重量）あたり、蒸留水を30ml加

* 青森県立五所川原高等学校
Aomori Prefectural Goshogawara High School

** 弘前大学教育学部家政教育講座食物学研究室
Laboratory of Food Science, Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University

え、常温で3時間振とうした後、吸引ろ過し、上清と残渣とに分けた。この操作を5回繰り返した。得られた上清を「水溶性画分 (WS)」とした。これを減圧濃縮し、4倍量のメタノールを加えた後、遠心操作 (3,000rpm, 30分) を行った。得られた上清を「水溶性低分子画分 (WS-L)」、沈殿を「水溶性高分子画分 (WS-H)」とした。水抽出残渣に蒸留水を同量加え、オートクレーブにて121°Cで60分間処理し、オートクレーブ処理物を吸引ろ過した。この操作を5回繰り返した。得られたろ液を「熱水抽出画分 (HWS)」とし、WSと同様の手順で「熱水低分子画分 (HWS-L)」と「熱水高分子画分 (HWS-H)」を得た。オートクレーブ抽出後の残渣は凍結乾燥し「不溶性画分 (IS)」とした。

3. 各画分の全糖量と構成糖の分析

WS-L、WS-H、HWS-L、HWS-Hの全糖量をフェノール・硫酸法¹⁸⁾にてグルコース相当量として求めた。酸性糖量はカルバゾール・硫酸法¹⁹⁾でガラクトン酸相当量として求めた。但し、本法では中性糖も反応するので、下記加水分解物の陰イオンクロマトグラフィーで求めた中性糖量からその影響を算出、カルバゾール・硫酸法で求めた値から差し引いた値〔真の酸性糖量 = カルバゾール・硫酸法にて求めた値 - (陰イオンクロマトグラフィー法で求めた中性糖量 × 0.23)〕を酸性糖量とした²⁰⁾。

各試料100 μgを栓つき試験管に取り、1mlの2Mトリフルオロ酢酸 (TFA) で3時間、100°Cで加水分解した後、減圧下で濃縮乾固させた。これに適量の超純水を加え、2-デオキシグルコース (2-DG) を内部標準として加え構成糖分析試料とした。ISの場合は10 mg (乾燥重量) を栓つき試験管に取り、72% 硫酸0.5mlに懸濁、ソニックバス中で1時間処理し、溶解した。その後、硫酸濃度が1.5Mとなるように4mlの蒸留水で希釈し、100°Cで3時間加水分解した。加水分解物の一部を用いて全糖量を測定した。残りの加水分解物は炭酸バリウムで中和した後、2-DGを加え、よく攪拌し濾過した。ろ液をAmberlite IR-120 (H⁺型) で処理し減圧下で乾固した。これを超純水に溶解させ、構成糖分析試料とした³⁾。

構成糖分析はパルスドアンペロメトリ検出器 (金電極) 付きの日本ダイオネクス社のイオンクロマト DX-300による陰イオンクロマトグラフィーにて行った。分離カラムはCarboPac PA1を、ガードカラムはCarboPac PA1 GUARDを用いた²¹⁾。分析は溶離液として超純水を用い、1.0 mL/分の流速で行った。標準単

糖としてフコース (Fuc)、アラビノース (Ara)、ラムノース (Rha)、ガラクトース (Gal)、グルコース (Glc)、キシロース (Xyl)、マンノース (Man) を用いた³⁰⁾。

4. DEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーによる多糖画分の分画

1次栽培 WS-H 73mg、2次栽培 WS-H 84mg (どちらも Glc 相当量) を適量の20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) に溶解し、遠心操作 (3,000rpm, 20分) にて不溶物を除去後、上清を同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-25カラム (2.5×20cm) にのせた。溶出は20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5)、0.2M 塩化ナトリウム (NaCl)、0.4M NaCl、および1.0M NaClを含む同緩衝液それぞれ300mlを用い、順次溶出した。溶出液は7.5ml ずつフラクションコレクターで集め、全糖量をフェノール・硫酸法にて測定した。それぞれ糖の存在が認められた部分を回収し、減圧濃縮した。脱塩はBio-Gel P-2カラム (2.5×18cm) を使用しボイドボリューム (Vo) 画分を集めた。

5. ウロン酸の分析

1次および2次栽培の WS-H-III ~ WS-H-VI (各々 0.1mg) を栓付き試験管にとり、1mlの2M TFAで3時間100°Cで加水分解後、減圧下で濃縮乾固させ、0.1mlの蒸留水に溶解し、イオンクロマト DX-300 (日本ダイオネクス社) で分析した。分離カラムはCarboPac PA1を、ガードカラムはCarboPac PA1 GUARDを用いた²¹⁾。溶離液は150mM 酢酸ナトリウム / 100 mM 水酸化ナトリウムを用い、1.0 mL/分の流速で行った。標準糖としてガラクトン酸 (GalA) とグルクロン酸 (GlcA) を用いた。

6. 2次栽培 WS-H-IV の分析

6-1. 糖結合様式の分析 (メチル化分析)

2次栽培 WS-H-IV (2.4mg) を箱守法²²⁾にてメチル化した。メチル化多糖は酸で加水分解後、水素化ホウ素ナトリウムで還元してアルジトールにし、ピリジンと無水酢酸でアセチル化し、ガスクロマトグラフィーによる分析を行った²³⁾。ガスクロマトグラフは日立製のG-5000を用い、カラムはJ&W社のヒューズドシリカキャピラリーカラム DB-225 (0.32 mm X 15m) を用い、140°Cから200°Cまで1分あたり2°Cの昇温で分析した²⁴⁾。

6-2. 酵素による部分加水分解

① 2次栽培 WS-H-IV (4.3mg/2ml 20mM 酢酸緩衝液 pH5.5) にβ-(1→4)-キシラナーゼ (*H.insolens* 由来) を加え、40°Cで24時間反応後、100°Cで5分間加熱し

た。得られた加水分解物を Bio-Gel P-2カラム (1×20 cm) にのせ、蒸留水で溶出した。0.6ml ずつ集め、全糖量と酸性糖量を測定した。

② 2次栽培 WS-H-IV (1.5mg /2ml 20mM 酢酸緩衝液 pH5.5) にポリガラクトナーゼを加え、40℃で24時間反応後、100℃で5分間加熱した。得られた加水分解物を0.1M NaCl を含む20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で平衡化した Bio-Gel P-10カラム (1×20cm) にのせ、0.1M NaCl を含む20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で溶出し、1ml ずつ集め、全糖量と酸性糖量を測定した。また、同様の条件でペクテトリアーゼ処理も行った⁸⁾。

6-3. TFAによる加水分解

① 2次栽培 WS-H-IV (1mg) を栓つき試験管にとり、0.1M TFA を用いて100℃で15分、30分、45分、90分、加水分解した後、減圧濃縮した。加水分解物を Bio-Gel P-2カラム (1×20cm) にのせ、蒸留水で溶出し0.6ml ずつ集め、全糖量と酸性糖量を測定した。単糖画分を陰イオンクロマトグラフィーに供し、構成糖分析を行った。

② 2次栽培 WS-H-IV (2.6mg) を栓つき試験管にとり、0.1M TFA にて30分間100℃で加水分解した後、減圧濃縮した。得られた加水分解物を20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で平衡化した DEAE-Sephadex A-25カラム (0.5×5cm) にのせ、20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で溶出した後、1.0M NaCl を含む同緩衝液にて溶出した。溶出液は0.5ml ずつ集め、全糖量と酸性糖量を測定した。非吸着画分 (中性オリゴ糖) を減圧濃縮後 Bio-Gel P-2で脱塩した。得られた中性オリゴ糖画分の一部に β -(1→4)-キシロシダーゼを作用させ、加水分解物前後のオリゴ糖分析をイオンクロマト DX-300で行った。

7. 不溶性画分 (IS) のメチル化分析

1次と2次栽培の不溶性画分 IS のメチル化分析は上述方法 6-1 に従って行った。

8. 子実体の部位による違い

1次、2次栽培子実体を上部と下部に分け、さらに上部を二分し先端部、上部、下部とした。それぞれの部位について上述の実験方法 2 および 3 に準じて糖の抽出と構成糖分析を行った。また、1次と2次栽培の子実体の上部、中部、下部をカミソリで縦に切り切片を作成した。この切片を日立製 S-2460N 型走査電子顕微鏡を用いて6.0kV、1000倍で観察した。

III. 結果と考察

青森県のリンゴ生産量は日本一で、リンゴ栽培の際

に大量の剪定枝 (年間約16万トン) が出る。現在、この剪定枝を有効利用しようと様々な取組みがなされているが、鹿角霊芝の栽培においてもリンゴ剪定枝が用いられている。リンゴ剪定枝を用いた鹿角霊芝栽培は、回収した剪定枝を粉碎し、これをふるいにかけて後、小麦フスマ等、他の培地の材料と混ぜ合わせ、霊芝の菌を植え付け、栽培が行われている。栽培終了後の培地はリンゴ園に戻し、肥料として活用されている。しかし、鹿角霊芝の栽培に有効な成分を含んだまま、培地を肥料にするのはもったいないということで培地を回収し、再度、鹿角霊芝栽培に利用した後、肥料としてリンゴ園に戻す作業も行われている。そこで、リンゴ剪定枝を用いて通常通り栽培した鹿角霊芝 (1次栽培鹿角霊芝) と1次栽培を終えた培地を再利用して栽培された鹿角霊芝 (2次栽培鹿角霊芝) を、今回の実験材料とした (図1)。

1次及び2次栽培で得られた子実体の多糖類を比較するために、構成多糖の抽出・分画を行った (図2)。それぞれの霊芝から得られた5つの画分の構成糖を分析し、全糖量を求めた (表1)。1次栽培では全糖量の約12% が水と熱水で抽出されたのに対し、2次栽培では約37% であった。次に構成糖を比較してみると1次栽培、2次栽培共に主要な構成糖は WS-H を除いて、Glc、或いはウロン酸であったのに対し、WS-H では1次栽培で、Man、Gal の割合が、2次栽培では Ara の割合が高かった。可溶性多糖の先行研究として はヘテログラクタンやキシロマンナンの研究²⁵⁻²⁷⁾ があ



図1. 1次栽培 (左) および2次栽培 (右) 鹿角霊芝子実体

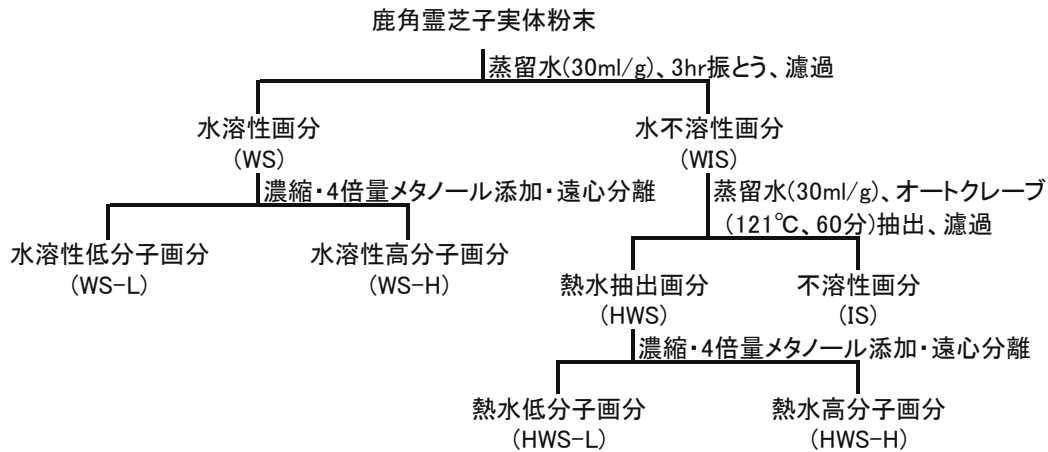


図2. 鹿角霊芝子実体に含まれる糖質の分画手順

表1. 1次栽培および2次栽培鹿角霊芝子実体から得られた水溶性低分子 (WS-L)、水溶性高分子 (WS-H)、熱水低分子 (HW-L)、熱水高分子 (HW-H)、不溶性 (IS) 各画分の収量と構成糖組成

		全糖量		構成糖 (%)							
		(mg)	(%)	Fuc.	Ara.	Rha.	Gal.	Glc.	Xyl.	Man.	U.A.
1次栽培	WS-L	97.35	2.0	0.13	1.82	-	4.22	39.67	0.94	-	53.21
	WS-H	60.28	1.2	3.82	0.59	trace	13.79	24.61	6.39	14.14	36.66
	HWS-L	223.00	4.5	3.19	0.15	-	0.20	45.63	0.11	-	50.72
	HWS-H	196.50	4.0	0.39	0.03	-	1.16	74.30	0.06	-	23.83
	IS	4352.74	88.3	0.30	0.21	-	0.02	56.70	0.36	0.07	42.33
	Total	4929.87									
2次栽培	WS-L	292.21	10.7	0.93	6.23	1.33	4.35	31.35	5.88	0.98	48.96
	WS-H	208.46	7.7	1.53	11.66	2.20	10.01	11.82	9.30	0.81	52.68
	HWS-L	216.64	8.0	3.00	1.26	0.17	0.43	49.76	0.76	-	44.49
	HWS-H	289.11	10.6	0.30	0.60	-	0.99	90.01	0.35	-	7.75
	IS	1715.75	63.0	0.19	0.54	-	0.02	52.50	0.17	-	46.58
	Total	2722.17									

るが、Araを含むキノコ多糖は知られていないこと、また、2次栽培でAraが多くなった原因を探るため、WS-Hをさらに分析した。

1次と2次栽培のWS-HをDEAE Sephadex A-25のイオン交換クロマトグラフィーに供した。図3にその溶出パターンを示す。溶出は20mM酢酸緩衝液、並びに0.2M、0.4M、1.0MのNaClを含む同緩衝液を用い、ステップワイズにて行い、両者共にFr. I～Fr. VIを得た。表2は各画分の収量と構成糖組成を示す。全糖量を比較すると1次栽培は53%が素通り画分に溶出したのに対し、2次栽培では12.3%しか溶出せず、そのほとんどが吸着画分に溶出したことがわかった。また、1次栽培、2次栽培共に素通り画分の主要構成糖はGal、Fuc、Manであるが、吸着画分では1次栽培でウロン酸、Glcが、2次栽培ではウロン酸、Ara、Xyl

が主な構成糖であることがわかった。また、Fr. III～Fr. VIのウロン酸 (U.A.) の分析の結果 (表3) から、WS-Hに含まれているU.A.はどの画分でも主にグルクロン酸 (GlcA) とガラクトuron酸 (GalA) であることがわかった。

次に、このウロン酸、Ara、Xylから主に構成される2次栽培のWS-H-IVの構造について検討した。メチル化分析の結果 (表4) を見ると、非還元末端Ara (T-Ara) と4-結合Xyl (4-Xyl) の存在が確認された。また、分岐を示す3,6-Glc等も検出されたことから、これらの糖が複雑に結合した状態のアラビノキシラン系多糖が存在していると考えられた⁹⁾。一方で、他にも3-結合Glc (3-Glc) や6-結合Glc (6-Glc) も検出されたことから、2次栽培WS-H-IVはアラビノキシラン系多糖以外のヘテロ多糖も混在していると考え

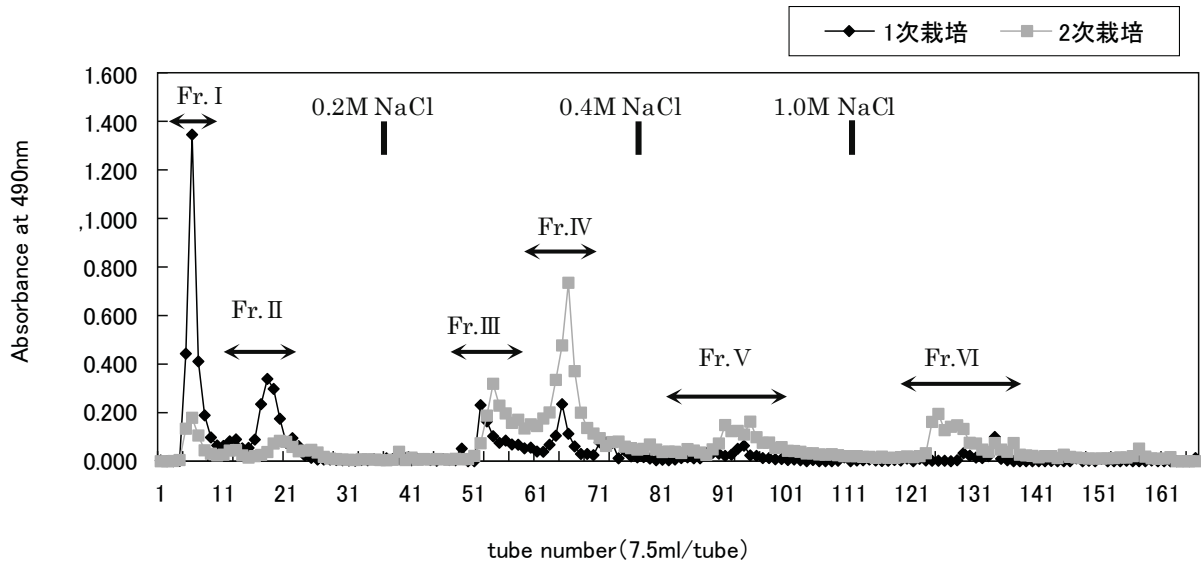


図3. 1次栽培および2次栽培鹿角霊芝子実体から得られた水溶性高分子画分 (WS-H) の DEAE-Sephadex A-25による分画
1次栽培は試験管番号3~16 (Fr. I)、17~26 (Fr. II)、48~62 (Fr. III)、63~77 (Fr. IV)、87~97 (Fr. V)、128~136 (Fr. VI) を、2次栽培は試験管番号3~14 (Fr. I)、15~29 (Fr. II)、48~59 (Fr. III)、60~75 (Fr. IV)、88~108 (Fr. V)、121~144 (Fr. VI) をそれぞれ回収し、減圧濃縮した。

表2. 1次栽培および2次栽培鹿角霊芝子実体から得られた水溶性高分子 (WS-H) 画分の DEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィー分画 (図3) で得られた各画分の収量と構成糖組成

	全糖量		構成糖 (wt%)							
	(mg)	(%)	Fuc.	Ara.	Rha.	Gal.	Glc.	Xyl.	Man.	U.A.
1次栽培										
Fr. I	22.61	38.7	15.38	-	-	72.38	0.29	-	11.95	-
Fr. II	8.38	14.3	11.71	0.18	-	43.10	35.37	0.23	9.42	-
Fr. III	7.14	12.2	0.52	2.16	1.13	6.36	28.49	1.68	12.08	47.58
Fr. IV	8.82	15.1	0.30	2.15	0.20	1.69	17.60	1.29	5.78	71.00
Fr. V	6.03	10.3	0.28	0.96	0.79	1.36	5.26	0.73	3.95	86.68
Fr. VI	5.45	9.3	0.11	0.39	0.24	0.42	0.72	0.31	2.24	95.56
2次栽培										
Fr. I	4.42	6.6	13.21	0.29	0.02	79.05	0.77	0.30	6.36	-
Fr. II	3.82	5.7	10.27	1.89	0.44	37.66	30.46	1.07	18.20	-
Fr. III	10.98	16.5	1.25	34.30	1.11	16.07	8.26	30.43	3.73	4.84
Fr. IV	23.88	35.9	0.72	18.72	3.10	5.33	3.53	15.70	2.16	50.74
Fr. V	12.45	18.7	0.99	10.42	6.31	7.34	1.97	8.19	2.24	62.55
Fr. VI	10.92	16.4	0.52	9.45	7.52	5.70	2.47	8.09	0.86	65.36

られた。そこで、 β -(1 \rightarrow 4)-キシラナーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、およびペクチリアーゼによる部分加水分解を試みたが、有効な知見は得られなかった。そこで更に0.1M TFAを用いた部分加水分解で経時的に得られる遊離単糖の変化を見たところ、15分で構成糖の中で一番先にAraが遊離し始め、45分で最大に達していた (図4)。このことからAraが非還元末端に結合していると考えられた。また、0.1M TFAを用いた部分加水分解物をイオン交換クロマトグラフィーに供

し、非吸着画分である中性オリゴ糖を陰イオンクロマトグラフィーで分析したところ、キシロピオースと同一溶出位置にピークが得られた。次に、中性オリゴ糖画分に β -(1 \rightarrow 4)-キシロシダーゼを作用させ、得られた加水分解物を同様に陰イオンクロマトグラフィーによるオリゴ糖分析を行った結果、キシロピオースの位置にあったピークが消失していた (データ略)。このことから2次栽培 WS-H-IVには β -1,4-結合 Xyl残基が存在することが明らかになった。以上より、2次裁

表3. 鹿角霊芝子実体から得られた水溶性高分子 (WS-H) 画分の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィー分画 (図3) で得られた Fr. III ~ VI に含まれるグルクロン酸 (GlcA) とガラクトロン酸 (GalA) の割合

	1次栽培	2次栽培
	Gal.A : Glc.A	Gal.A : Glc.A
Fr. III	1.0 : 11.0	3.0 : 5.0
Fr. IV	1.0 : 2.0	10.0 : 7.0
Fr. V	1.0 : 2.9	5.0 : 3.0
Fr. VI	1.0 : 8.0	10.0 : 3.0

表4. 鹿角霊芝子実体から得られた水溶性高分子 (WS-H) 画分の DEAE-Sephadex A-25 クロマトグラフィー分画 (図3) で得られた Fr. III (WS-H-IV) のメチル化分析

Peak No.	Methylated sugar linkage	Deduced glycosidic linkage	Deduced glycosidic (%)	
			Fr. IV	Xylan
1	2,3,5-Me3-Ara.	T-Ara.	5.5	2.3
2	2,3,4-Me3-Xyl.	T-Xyl.	0.8	0.7
3	2,3,4-Me3-Fuc.	T-Fuc.	4.4	1.7
4	3,4-Me2-Rha.	2-Rha.	3.8	-
5	Unidentified		3.5	-
6	2,3,4,6-Me4-Glc.	T-Glc.	0.7	-
7	Unidentified		2.1	-
8	2,3-Me2-Xyl.	4-Xyl.	4.4	64.4
9	Unidentified		20.6	2.2
10	Unidentified		20.2	-
11	2,4,6-Me3-Glc.	3-Glc.	3.3	0.3
12	2,3,4-Me3-Glc.	6-Glc.	5.3	9.7
13	2,3,6-Me3-Glc.	4-Glc.	0.3	6.5
14	Ara.	2,3,5-Ara.	0.8	1.0
15	2,3,4-Me3-Gal.	6-Gal.	3.4	-
16	2,4-Me2-Glc.	3,6-Glc.	4.7	10.8
17	2,3-Me2-Glc.	4,6-Glc.	0.8	0.5
18	Unidentified		4.4	-
19	2,4-Me2-Gal.	3,6-Gal.	3.6	-
20	Unidentified		5.2	-
21	Unidentified		2.1	-

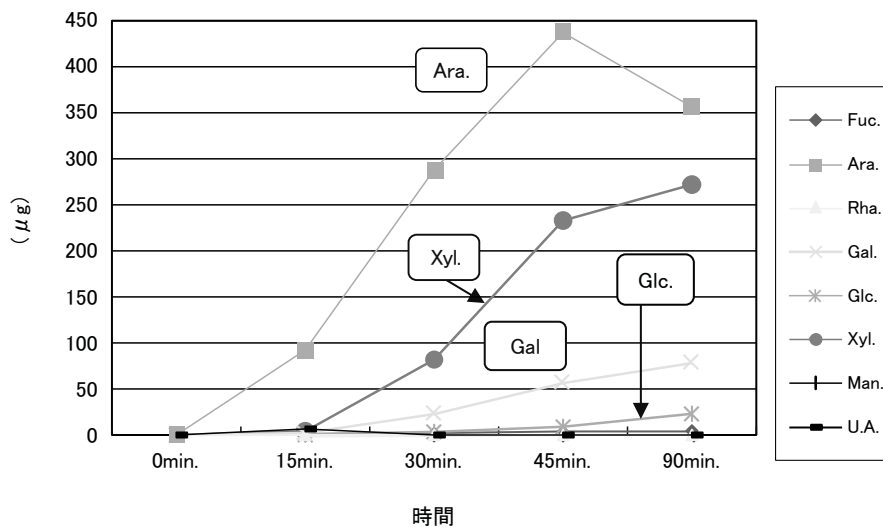


図4. 2次栽培鹿角霊芝 WS-H-IV の0.1M トリフルオロ酢酸での加水分解により遊離する単糖量の経時的変化

培 WS-H には Ara やウロン酸等を側鎖に有するキシラン系多糖の存在が示唆された。

これまでの報告によると、鹿角靈芝子実体の基本的な骨格は β -(1 \rightarrow 3)-グルカンであるとされている²⁸⁻³¹⁾。構成糖分析の結果(表1)から1次栽培、2次栽培を問わず、不溶性(IS)画分の主な構成糖はGlcであり、グルカンの存在が考えられた。そこで、基本骨格となる β -(1 \rightarrow 3)-グルカンの存在の有無を糖結合様式(メチル化)分析にて検討した。非還元末端 Glc : 3-結合 Glc : 6-結合 Glc : 4-結合 Glc : 3,6-結合 Glc : 4,6-結合 Glc の比は、1次栽培 IS で 5.6 : 30.0 : 1.0 : 9.8 : 8.5 : 4.0、2次栽培 IS で 5.6 : 37.6 : 1.0 : 8.6 : 8.3 : 4.0 であった。このことから1次栽培、2次栽培ともに IS に存在する多糖の主鎖は β -(1 \rightarrow 3)-グルカンであると考えられ、基本的には似た構造をしており、1次栽培、2次栽培の大きな違いは WS-H にあると考えた。また、他に4-結合 Glc や4,6-結合 Glc も検出されていることから β -(1 \rightarrow 4)-グルカン或いはグリコーゲン様多糖の存在も考えられた。

以上を踏まえ、最後に、子実体の部位により構成多糖に違いがあるか否かについて、1次栽培のものとは2次栽培のものについて比較した。図5に示すとおり、それぞれの子実体を先端部、上部、下部に分けた。1次栽培、2次栽培の鹿角靈芝子実体各部位から実験方法2に従い、水溶性低分子画分(WS-L)、水溶性高分子画分(WS-H)、熱水低分子画分(HWS-L)、熱水高分子画分(HWS-H)を調製し構成糖を調べた。表5は収量と構成糖組成を示している。1次栽培の先

端部、上部、下部を比較すると、可溶性多糖類と不溶性多糖類の比率、構成糖に大きな差がないことがわかった。また、構成糖は WS-H がいずれの部位においても Gal, Man が多いことがわかった。一方、2次栽培を見てみるとやはり、先端部、上部、下部で、可溶性多糖と不溶性多糖の割合、構成糖に違いがないが、1次栽培のものと比較すると、可溶性多糖と不溶性多糖の比率が逆になっていること、また、WS-H の構成糖はいずれの部位においても Ara と Xyl が多いことがわかった。これらの違いは、組織学的なものと同関係するか、子実体の電子顕微鏡観察を行うことにした。

1次及び2次栽培の靈芝の上部、中部、下部から組織を切り取り(図6)、走査型電子顕微鏡で1000倍の倍率で観察した(図7)。1次栽培で子実体組織を構成する繊維(菌糸)は細かく、かつ、密に構成されていることがわかった。一方、2次栽培では子実体を構成する繊維が太く、その組織は1次栽培に比べて粗く構成されていた。

これらのことから、鹿角靈芝栽培時の培地組成は、子実体を構成する多糖類さらには、組織形態にまで深く影響を与えることが明確となった。このことは最終的に靈芝子実体の形体にまで影響する可能性を示している。また、複雑な構造を有すると思われる2次栽培子実体の水可溶性高分子多糖(WS-H : Ara やウロン酸等を側鎖に有するキシラン系多糖)が1次栽培ではほとんどなく、2次栽培で多く生成されるのか大変興味のあるところで、更なる研究が必要である。

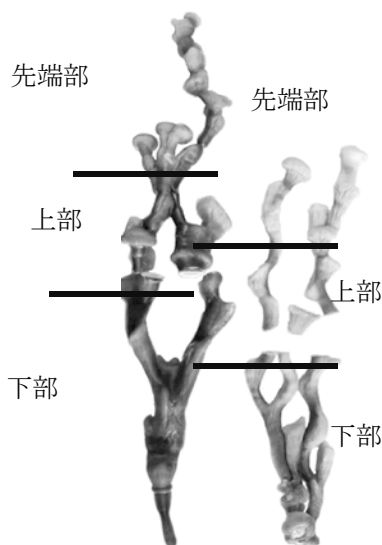


図5. 1次栽培(左)および2次栽培(右)鹿角靈芝子実体の分割

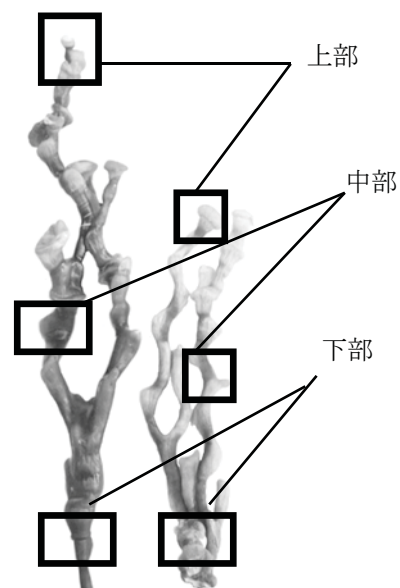


図6. 1次栽培(左)および2次栽培(右)鹿角靈芝子実体の電子顕微鏡観察部位

表5. 1次栽培および2次栽培鹿角霊芝子実体の先端部, 上部, 下部から得られた水溶性低分子 (WS-L)、水溶性高分子 (WS-H)、熱水低分子 (HW-L)、熱水高分子 (HW-H)、不溶性 (IS) 各画分の収量と構成糖組成

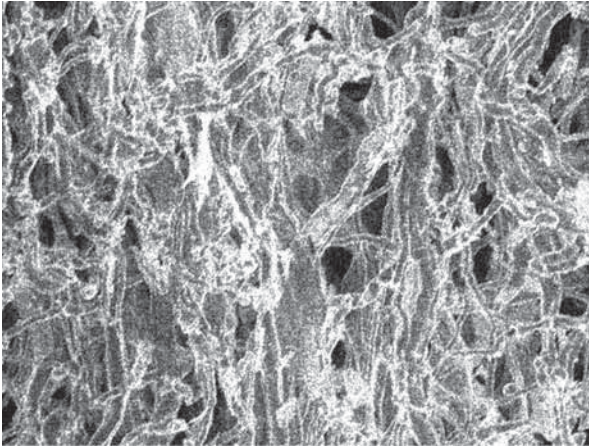
1次栽培	全糖量(1gあたり)			構成糖 (wt%)							
	(mg)	(%)	Fuc.	Ara.	Rha.	Gal.	Glc.	Xyl.	Man.	U.A.	
先端	WS-L	13.41	6.0	0.5	1.8	-	2.2	42.6	-	2.7	50.3
	WS-H	5.46	2.4	4.1	Trace	-	24.8	21.9	1.2	12.3	35.7
	HWS-L	26.81	12.0	2.8	0.1	-	0.4	44.0	0.7	1.6	50.4
	HWS-H	30.82	13.8	0.3	-	-	1.1	85.1	0.2	1.8	11.4
	IS	147.63	65.9	0.8	1.6	-	0.5	90.0	2.7	-	4.4
合計	224.13										
上部	WS-L	12.06	5.2	0.6	0.5	-	1.7	49.8	0.1	1.7	45.5
	WS-H	4.70	2.0	4.3	0.2	-	24.5	21.1	1.5	10.3	38.1
	HWS-L	31.23	13.5	5.2	Trace	-	2.1	53.5	0.7	1.8	36.7
	HWS-H	35.33	15.3	0.4	-	-	1.3	91.7	-	1.7	4.8
	IS	147.57	63.9	0.3	1.6	-	1.0	88.0	2.7	-	6.5
合計	230.89										
下部	WS-L	7.91	3.1	1.1	0.2	-	1.5	35.3	0.2	1.6	60.2
	WS-H	3.70	1.5	4.9	0.3	-	28.3	23.7	1.9	9.0	31.9
	HWS-L	33.71	13.2	5.3	0.1	-	0.7	54.1	1.3	1.7	36.8
	HWS-H	35.45	13.9	0.5	-	-	1.7	93.3	Trace	1.6	2.9
	IS	173.79	68.3	0.7	1.4	-	0.7	90.0	2.4	-	4.9
合計	254.56										
2次栽培	全糖量(1gあたり)			構成糖 (wt%)							
	(mg)	(%)	Fuc.	Ara.	Rha.	Gal.	Glc.	Xyl.	Man.	U.A.	
先端	WS-L	41.04	20.0	1.6	5.6	1.1	5.5	38.3	6.1	4.6	37.2
	WS-H	23.17	11.3	1.6	19.1	2.7	15.9	10.3	15.9	4.6	29.9
	HWS-L	33.85	16.5	3.6	5.9	0.7	1.7	49.7	5.3	1.3	31.8
	HWS-H	34.53	16.8	0.4	2.3	-	1.1	85.8	2.9	1.5	6.0
	IS	72.50	35.4	0.6	1.7	-	1.0	83.3	2.5	-	10.9
合計	205.09										
上部	WS-L	39.17	13.8	0.8	12.7	1.4	4.6	17.5	14.4	4.6	43.9
	WS-H	31.49	11.1	1.2	22.4	3.2	12.4	6.0	18.9	3.6	32.3
	HWS-L	32.58	11.5	5.0	4.5	0.4	1.4	51.5	4.6	1.2	31.4
	HWS-H	43.03	15.1	0.3	1.4	-	0.9	92.7	1.6	1.2	1.9
	IS	138.14	48.6	0.6	1.5	-	0.6	90.2	2.4	-	4.8
合計	284.41										
下部	WS-L	46.26	21.7	1.0	15.2	2.1	5.6	17.3	16.3	2.6	39.9
	WS-H	36.03	16.9	1.1	22.9	3.3	11.7	5.1	18.9	3.4	33.8
	HWS-L	20.92	9.8	5.4	2.6	0.2	0.7	25.0	2.1	0.4	63.6
	HWS-H	45.73	21.4	0.3	1.2	-	0.7	93.9	1.4	0.6	1.9
	IS	64.73	30.3	0.5	1.3	-	0.9	88.2	1.7	-	7.4
合計	213.67										

本研究を進めるにあたり、鹿角霊芝子実体を提供して下さいました農事組合法人耕精の長内宏之氏に感謝申し上げます。

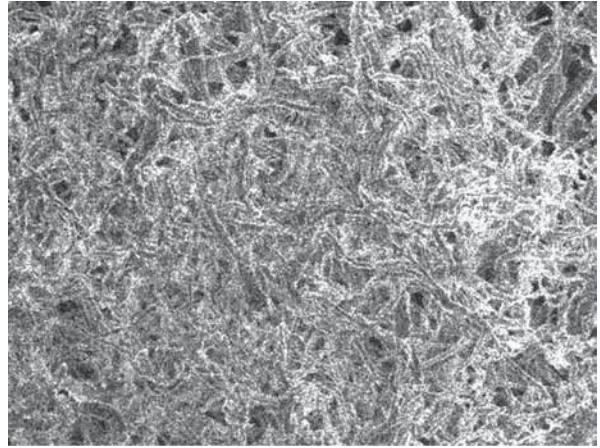
引用文献

- 1) Wasser, S. P., Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharide, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 258-274 (2002).
- 2) Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K. and Tsuchida, H.,

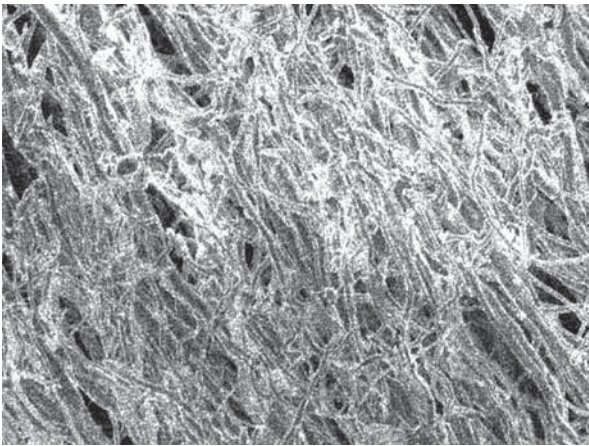
1次栽培上部



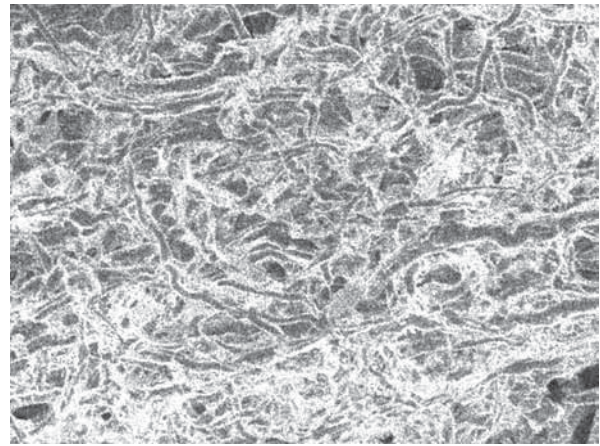
2次栽培上部



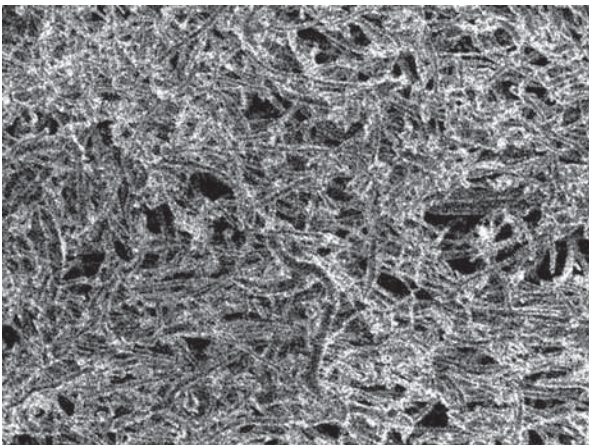
1次栽培中部



2次栽培中部



1次栽培下部



2次栽培下部

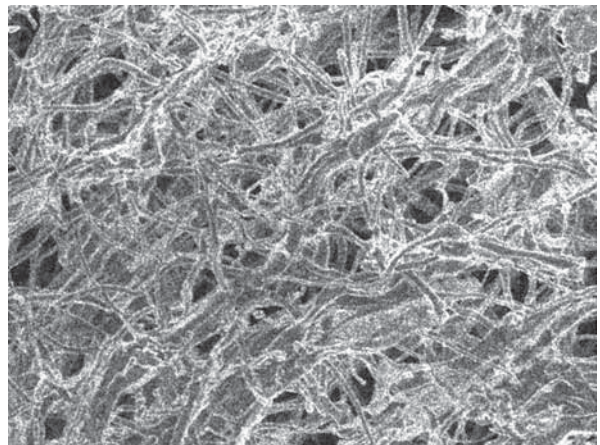


図7. 1次栽培（左）および2次栽培（右）鹿角靈芝子実体の電子顕微鏡観察

Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, 434-437 (1998).

- 3) Minato, K., Mizuno, M., Terai, H. and Tsuchida, H., Autolysis of lentinan, an antitumor polysaccharide, during

storage of *Lentinus edodes*, shiitake mushroom, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1530-1532 (1999).

- 4) Kubo, K, Aoki H, Nanba H., Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake), I., *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1106-1110 (1994).

- 5) Horio, H. and Ohtsuru, M., Maitake (*Grifola frondosa*) improve glucose tolerance of experimental diabetic rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47, 57-63 (2001).
- 6) Kidd, P. M., The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment, *Alter. Med. Rev.*, 5, 4-27 (2002).
- 7) Zhu, X.L. and Lin, Z.B., Effects of *Ganoerma lucidum* polysaccharide on proliferation and cytotoxicity of cytokine-induced killer cell, *Acta Pharmacologica Sinica*, 26, 1130-1137 (2005).
- 8) Weng, C.J., Chau, C.F., Chen, K.D., Chen, D.H. and Yen, G.C., The anti-invasive effect of lucidenic acids isolated from a new *Ganoderma lucidum* strain, *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 1472-1477 (2007).
- 9) Hua, K.F., Hsu, H.Y., Chao, L.K., Chen, S.T., Yang, W.B., Hsu, J. and Wong, C.H., *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance CD14 endocytosis of LPS and promote TLR4 signal transduction of cytokine expression, *J. Cell Physiol.*, 212, 537-550 (2007).
- 10) Jiang, J., Slivova, V., Haarvey, K., Valachovicova, T. and Sliva, D., *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF- κ B signaling, *Nutr. Cancer*, 49, 209-216 (2004).
- 11) Liu, J., Yang, F., Ye, L.B., Yang, X.J., Timani, K.A., Zheng, Y. and Wang, Y.H., Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro, *J. Ethnopharmacol.*, 95, 265-272 (2004).
- 12) Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C., Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies, *Planta Medica*, 55, 423-428 (1989).
- 13) Hajjai, H., Mace, C., Roberts, M., Niederberger, P. and Fay, L.B., Effects of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors, *App. Environ. Microbiol.*, 71, 3653-3658 (2005).
- 14) 齋藤三季, 戸羽隆宏, 柴田浩夫, 長田恭一, りんご枝おがくずを培地とした鹿角霊芝の肝機能保護作用, 食科工, 55, 373-378 (2008).
- 15) 齋藤三季, 井澤弘美, 戸羽隆宏, 柴田浩夫, 長田恭一, りんご枝おがくずを利用した鹿角霊芝の脂質代謝調節作用, 食科工, 56, 79-84 (2009).
- 16) 奈良一寛, 鳥潟諭, 長内宏之, 河野武平, 加藤陽治, 異なる剪定材を用いて栽培した鹿角霊芝子実体の水溶性多糖類, 食科工, 58, 216-221 (2011).
- 17) Nara, K. and Kato, Y., Structural characterization of a heterogalactan from antler-shaped *Ganoderma lucidum*, *J. Appl. Glycosci.*, 62, 149-151 (2015).
- 18) Dubios, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., Colorimetric method for determination of the sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956).
- 19) Bitter, T. and Muir, H. M., A modified uronic acid carbazole reaction, *Anal. Biochem.*, 4, 330-334 (1962).
- 20) 加藤陽治, 松倉純子, 主要葉菜類の炭水化物組成, 弘前大学教育学部紀要, 71, 61-71 (1994).
- 21) 加藤陽治, 伊藤聖子, 渡邊敏幸, 植物細胞壁多糖構成中性糖及び各種グルコ二糖類の陰イオンクロマトによる分析, 弘前大学教育学部紀要, 94, 47-52 (2005).
- 22) Hakomori, S., A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methsulfanyl carbanion in dimethyl sulfoxide, *J. Biochem.*, 55, 205-208 (1964).
- 23) Lindberg, B., Methylation analysis of polysaccharides, *Meth. In Enzymol.*, 28, 178-195 (1972).
- 24) Kato, Y., Konishi, T., Hidano, Y. and Mitsuishi, Y., Structural analysis of the eggplant xyloglucan by xyloglucanase, *J. Appl. Glycosci.*, 51, 93-99 (2004).
- 25) 志田万里子, 酒井望美, 食用きのこ類子実体のヘテロガラクトタン, 食科工, 51, 559-562 (2004).
- 26) Usui, T., Hosokawa, S., Mizuno, T., Suzuki, Y., Meguro, Investigation of the heterogeneity of heterogalactan from the fryit bodies of *Fomitopsis pinicola*, by employing concanavalin A-Sepharose affinity chromatography, *J. Biochem.*, 89, 1029-1037 (1981).
- 27) Ruthes, A.C., Carbonera, E.R., Cordova, M.M., Baggio, C.H., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Santos, A.R.S., Iacomini, M., Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition, *Carbohydr. Polym.*, 98, 761-769 (2013).
- 28) Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., and Asakura, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Mill, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2889-2896 (1990).
- 29) Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G., and Sasaki, S. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*, *Gann*, 60, 137-144 (1969).
- 30) Chihara, G., Maeda, Y., Hamura, J., Sasaki, T., and Fukuoka, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), *Cancer Research*, 30, 2776-2781 (1970).
- 31) Kohguchi, M., Kunikata, T., Watanabe, H., Kudo, N., Shibuya, T., Ishihara, T., Iwaki, K., Ikeda, M., Fukuda, S. and Kurimoto, M., Immuno-potentiating effects of the antker-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 68, 881-887 (2004).

(2018. 8. 8 受理)