

マンネンタケ水抽出物のアンギオテンシン変換酵素

阻害成分に関する研究

熊倉 慧

目次

第1章 序論	1
1-1 きのこと	2
1-1-1 きのごとは	2
1-1-2 きのごの分類	3
1-1-3 きのごの栽培	4
1-1-4 きのごの食品機能	6
1-2 マンネンタケ	11
1-2-1 マンネンタケの形態	11
1-2-2 マンネンタケの栽培	13
1-2-3 マンネンタケの利用	14
1-2-4 マンネンタケの成分と薬理効果	15
1-3 高血圧	19
1-3-1 血圧の定義と高血圧	19
1-3-2 昇圧因子	19
1-3-3 高血圧治療	21
1-3-4 アンギオテンシン変換酵素 (ACE)	23
1-3-5 ACE 阻害剤	26
1-4 本研究の目的	30
引用文献	32
第2章 ACE 阻害活性におけるマンネンタケ水抽出物の特徴	38
2-1 緒言	39
2-2 実験方法	40
2-2-1 モデル動物を用いた血圧測定	40
2-2-2 水抽出物の ACE 阻害活性測定	41
2-2-3 水温の違いによる抽出物の ACE 阻害活性測定	43
2-2-4 様々なきの子実体水抽出物の ACE 阻害活性測定	44
2-2-5 菌株採取	45
2-2-6 木粉を利用したマンネンタケ子実体人工栽培	45
2-2-7 菌株と培地基材の異なる水抽出物の ACE 阻害活性測定	45
2-2-8 水抽出物の熱および pH 処理	46
2-2-9 阻害様式の解析	47

2-3 結果	48
2-3-1 水抽出物単回経口投与による血圧値の変動	48
2-3-2 水抽出物の ACE 阻害活性	49
2-3-3 水抽出温度と ACE 阻害活性	50
2-3-4 様々なきの子実体水抽出物の ACE 阻害活性	51
2-3-5 ACE 阻害活性における菌株および培地基材依存性	53
2-3-6 水抽出物の熱および pH 安定性	54
2-3-7 水抽出物の阻害様式と K_i 値	55
2-4 考察	57
引用文献	61
第 3 章 マンネンタケ水抽出物中に存在する ACE 阻害成分の探索	63
3-1 緒言	64
3-2 実験方法	65
3-2-1 水抽出物の調製	65
3-2-2 ACE 阻害活性測定	65
3-2-3 水抽出物のエタノール分画	65
3-2-4 限外ろ過分画	66
3-2-5 陽イオン交換カラムを用いた分画	66
3-2-6 逆相クロマトグラフィーによる分画	67
3-2-7 精製画分の構成成分の分析	68
3-3 結果	72
3-3-1 水抽出物 ACE 阻害成分の精製	72
3-3-2 精製段階における阻害様式、 K_i および IC_{50} 値の決定	77
3-3-3 イノシン、グアノシン、シチジン、L-ロイシンの同定	79
3-3-4 同定成分の ACE 阻害活性	84
3-3-5 水抽出精製物 (EU3C) におけるペプチドの存在	86
3-4 考察	88
引用文献	91
第 4 章 ACE 阻害活性発現機構に関する実証	93
4-1 緒言	94

4-2 実験方法	95
4-2-1 ACE 阻害活性測定	95
4-2-2 各温度条件における水抽出	95
4-2-3 各 pH 条件における水抽出	95
4-2-4 抽出時間と ACE 阻害活性	95
4-2-5 37°C抽出物と 80°C抽出残渣による ACE 阻害活性	96
4-2-6 37°C抽出物とカゼインによる ACE 阻害活性	96
4-3 結果	97
4-3-1 ACE 阻害活性の抽出温度依存性	97
4-3-2 ACE 阻害活性の抽出時 pH 依存性	98
4-3-3 抽出時間と ACE 阻害活性	99
4-3-4 37°C抽出物と 80°C抽出残渣による ACE 阻害活性の発現	100
4-3-5 37°C抽出物とカゼインによる ACE 阻害活性の発現	101
4-4 考察	102
引用文献	105
第 5 章 総括	106
謝辞	111

第 1 章

序論

1-1 きのこと

1-1-1 きんことは

きのことは、菌類の中で胞子を形成する際、子実体 (Fruiting body) という大型の繁殖器官を示すものであり、これらを形成する菌類を総称してきのこあるいはきのこ類と呼んでいる。きのこは、樹木や稲わら、動物の糞や昆虫などを栄養源として生育している。植物や動物と共生関係を築き、生育しているきのこも確認されている。人類のきのこ利用の歴史は古く、きのこは主に食品として利用されてきた。数種類の食用きのこは栽培方法が確立し、ほだ木と呼ばれる原木を用いた栽培やオガコを用いた菌床栽培、稲わらや堆肥を用いた栽培などが行われ、簡易で小規模な栽培施設から温度湿度管理能力を備えた大型施設での通年栽培まで存在する。きのこは特用林産物であり、林野庁の主要な特用林産物生産動向によると、2008年のシイタケ (*Lentinula edodes*) やナメコ (*Pholiota nameko*) など食用きのこの総生産量は、428,100 トンであり、総生産額は、2,640 億円であった。もっとも生産量の多い食用きのこは、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) で、131,107 トンであった。次いでブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) の 108,104 トンであった¹⁾。一方、食用以外のきのこ利用は、リグニン分解に着目したバイオパルピングやセルロース分解に着目したバイオマス変換、汚染物質を分解、無毒化によるバイオレメディエーション、そして、染料など²⁾、多方面で期待されている。

1-1-2 きのかこの分類

生物界でのきのかこの位置付けは、ホイタッカーによって提案されたモネラ界、原生生物界、植物界、菌界、動物界の5界系統図分類 (Fig.1-1) によれば、菌界に属する³⁾。一般的にきのかこの大部分は、分類学上、真核菌類の中の子囊菌門 (Ascomycota) および担子菌門 (Basidiomycota) に分類される⁴⁾。さらに、きのかこの大半は、帽菌亜綱のハラタケ目、ヒダナシタケ目に属する菌類である⁵⁾。ハラタケ目のきのかこは、一般に傘、ひだあるいは管孔、柄の3部を備えている。日本では、1000種あまりが報告されており、実在数は3000種を超えるものと推定されている。ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、シイタケ (*Lentinula edodes*)、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) などはこの目である。ヒダナシタケ目は、名前の通り、ひだを持たないきのかこの一群である。マイタケ (*Grifola frondosa*)、ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*)、ブナハリタケ (*Mycoleptodonoides aitchsonii*)、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) などはこの目のきのかこである。生態系自然観に基づけば、生物は、無機物から有機物を合成する生産者、有機物を体内に取り入れて消化吸収することによって生育する消費者、そして、有機物を無機物に還元する還元者(分解者)にわけられる⁶⁾。きのかこは、その中で還元者に分類される。そして、栄養摂取方法により、それらは腐生菌、寄生菌、共生菌に分類できる。さらに腐生菌は、木材腐朽菌、落葉分解菌、堆肥分解菌、菌分解菌、糞生菌に分けられる²⁾。

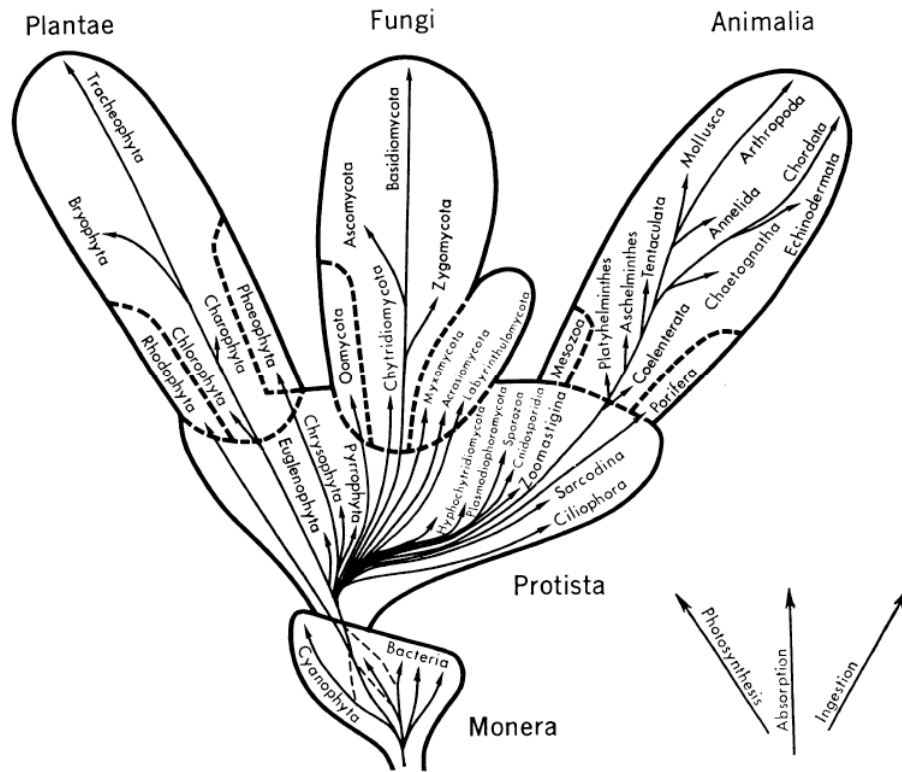


Fig. 1-1 The five-kingdom system of Whittaker³⁾.

1-1-3 きのこの栽培

1) きのこの生活環

きのこの生活環を多くの種が含まれる担子菌について見てみると (Fig.1-2)、きのこは子実体と呼ばれる生殖器官の担子器において減数分裂により単核 (n) の担子胞子を形成する。胞子 (n) は担子器から離れ、適当な環境下において発芽し、単核の菌糸 (一核菌糸) となる。一核菌糸同士は、お互いに和合性であれば菌糸融合をおこし、2つの核 (n+n) をもつ複核の菌糸 (二核菌糸) を形成する。これらの二核菌糸は、細胞隔壁にクランプコネクションと呼ばれる突起をもつことが特徴である。二核菌糸は栄養を吸収し (栄養菌糸体)、胞子形成のために、原基形成をおこない子実体を形成する。

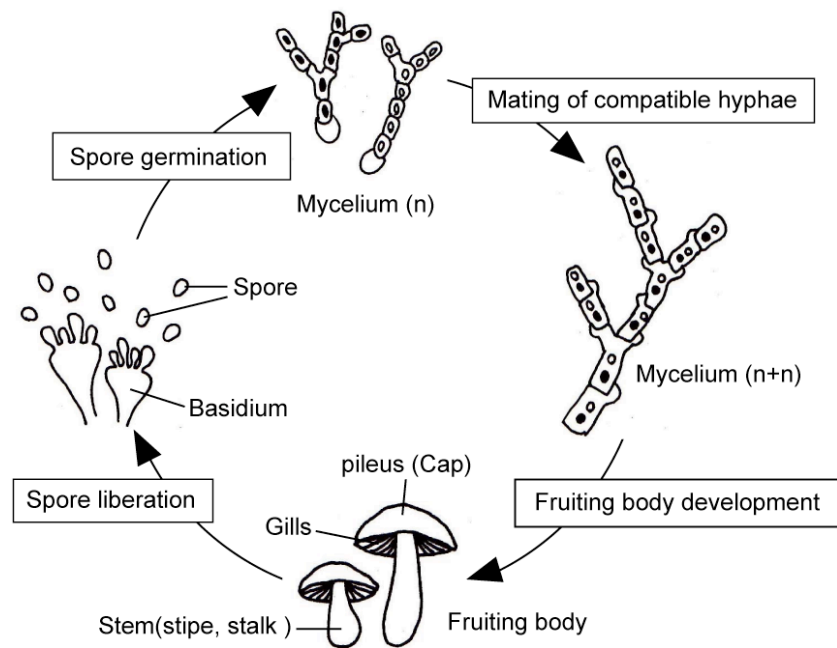


Fig. 1-2 Life cycle of basidiomycete.

2) きのこと栽培方法

食用として用いられるきのこは、栽培の対象となり、栽培方法が確立してきた。現在、栽培化されているきのこの大部分は腐生菌に属する。日本において、人工栽培が行われ始めたのは、今から 300 年以上前であり、伐倒した広葉樹に、シイタケ胞子を自然感染させる方法により栽培がおこなわれていた。その後、明治時代の後期になり、胞子を水に混ぜて樹皮の表面に散布する胞子接種法が考案され、大正時代中期には、ほだ木(種菌を接種した原木)の一部を削りとったものを原木に埋め込む菌糸接種方法が用いられた⁶⁾。昭和に入ると純粋培養菌種接種法が開発され、森喜作による種駒と称する木片種菌の発明、森本彦三郎によるおがくずと米糠などを利用した菌床栽培法の確立により、飛躍的にその生産量が増加した⁷⁾。現在、きのこの栽培方法として用いられているものは、原木栽培、菌床栽培、堆肥栽培などがある⁸⁾。原木栽培は、シイタケ (*Lentinula edodes*) などでおこなわれている栽培方法であり、伐採されクヌギやコナラなど原木に種菌を接種し、ほだ木は林地内やハウスなどで伏せ込み、生育、子

実体発生を行う。菌床栽培は、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) やブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) など多くの品目で行われている。オガクズやチップ、バカスなどに米糠やふすまなどの栄養源を加えて菌床を作成し、種菌を接種し、培養、芽だし、生育をハウスや温度湿度管理能力を備えた施設でおこない、通年栽培されている。堆肥栽培は、ツクリタケ (*Agaricus bisporus*) に代表される栽培方法で、主にイネ科植物を発酵させた堆肥を用いて、子実体を生産する方法である。マツタケ (*Tricholoma matsutake*) やホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) など菌根性のきのこも、感染苗木法などによりその栽培が試みられており、人工栽培法の確立が期待されている。

1-1-4 きこの食品機能

食用きのこといっても、それらは調理や加工によってその子実体を直接的に食し、特に栄養特性（一次機能）、嗜好特性（二次機能）が期待される食用のいわゆる食用きのこ、硬質きのこと呼ばれ、子実体そのものを食することは稀であるが、その抽出物を食し、その薬理効果、すなわち生理特性（三次機能）を期待する、いわゆる薬用きのこが存在する。

1) 栄養特性（一次機能）

五訂増補日本食品標準成分表 (Table.1-1) によると、生鮮きのこは水分が 90%を占め、次いで糖質、蛋白質、灰分、脂質である。糖質は、トレハロース、マンニトール、アラビトールなど、ヒトの腸管から利用されにくい低分子と β -グルカン、ヘテログリカン、キチン質など不消化性のものが主体である。このほかビタミン B₁、B₂、ナイアシンを含み、ミネラルについては、カリウムを多く含み、ナトリウム、リン、カルシウム、鉄などを含む⁹⁾。

Table.1-1 Chemical composition of mushroom.

Mushroom	Water	Protein	Lipid	Cardohydrate	Ash
<i>Flammulina velutipes</i>	88.6	2.7	0.2	7.6	0.9
<i>Lentinula edodes</i>	91.0	3.0	0.4	4.9	0.7
<i>Lyophyllum decastes</i>	90.3	3.1	0.2	5.6	0.8
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	90.8	2.7	0.6	5.0	0.9
<i>Pholiota nameko</i>	92.4	1.7	0.2	5.2	0.5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	89.4	3.3	0.3	6.2	0.8
<i>Grifola frondosa</i>	92.3	3.7	0.7	2.7	0.6
<i>Agaricus bisporus</i>	93.9	2.9	0.3	2.1	0.8

g/100g (edible portion)

2) 嗜好特性 (二次機能)

きのこの嗜好特性 (二次機能) としては、歯切れの良さ、旨味、苦味そして香りがある。歯切れの良さは、細胞壁や細胞質を構成する α -グルカン、 β -グルカン、ヘテロ多糖、キチン質などの多糖や蛋白質の物性に影響される¹⁰⁾。旨味成分としては、シイタケ (*Lentinula edodes*) の 5'-グアニル酸に代表される核酸成分、グルタミン酸などの遊離アミノ酸、有機酸などがその役割を担っている¹¹⁾。苦味成分としては、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) に代表されるラノスタン骨格を基本とするトリテルペノイドである¹²⁾。辛味成分は、子実体が傷付けられると生成されるベニタケ属やチチタケ属に見られるセスキテルペンに属するシクロフムラノイドのアルデヒドである¹³⁾。香気成分としては、C₈系アルコールや芳香族アルコール、マツタケの *trans*-ケイ皮酸メチルや1-オクテン-3-オール、シイタケのレンチオニンなどである¹⁴⁾。

3) 生理特性 (三次機能)

生理特性 (三次機能) は、様々な機能性が知られており、古来より和漢薬、民間薬として注目されてきた。中国最古の薬物書である「神農本草経」や伝統医薬学の名著で

ある「本草綱目」にも記されており、古来より長い体験に基づき、薬物として用いられてきた。近年の研究により、きのこにおける薬理効果は、抗腫瘍作用¹⁵⁻¹⁸⁾をはじめ、血圧降下作用¹⁹⁾、免疫活性作用²⁰⁾、血小板凝集抑制作用²¹⁾、脂質低下作用²²⁾などが明らかとなっている。実際に、シイタケ (*Lentinula edodes*) からレンチナン (Fig.1-2)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) からクレスチン、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) からシゾフィラン (Fig.1-2) が免疫治療医薬品として商品化されている。レンチナンは、シイタケ子実体の熱水抽出物から単離生成された高分子多糖である。レンチナンは、Swissマウス皮下に移植したSarcoma 180の成長を強く抑制することから抗腫瘍活性が確認された²³⁾。それ以来多くの研究がなされ、抗腫瘍効果、転移抑制効果、発癌抑制効果などが知られている。クレスチンは、カワラタケの1系統である101株の培養菌糸体の熱水抽出物から得られたものであり、単一の物質ではなく、一連の多糖およびタンパク質-多糖複合体の混合物である。クレスチンは各種悪性腫瘍に対する免疫化学療法剤ないしは、生体防御療法剤として臨床的に使用され、様々な研究が報告されている²⁴⁾。シゾフィランは、スエヒロタケをグルコース液体培地で培養することで菌体外に生産される多糖である。 β -1,3-グルコシド結合からなる直鎖に、 β -1,6-グルコシド結合で分岐した単一のグルコース側鎖をもち、その分岐は主鎖のグルコース残基の3個に1個の割合である。シゾフィランは分子量 5×10^4 以上の三重らせん構造をもつことが抗腫瘍作用を示す必要条件である²⁵⁾。

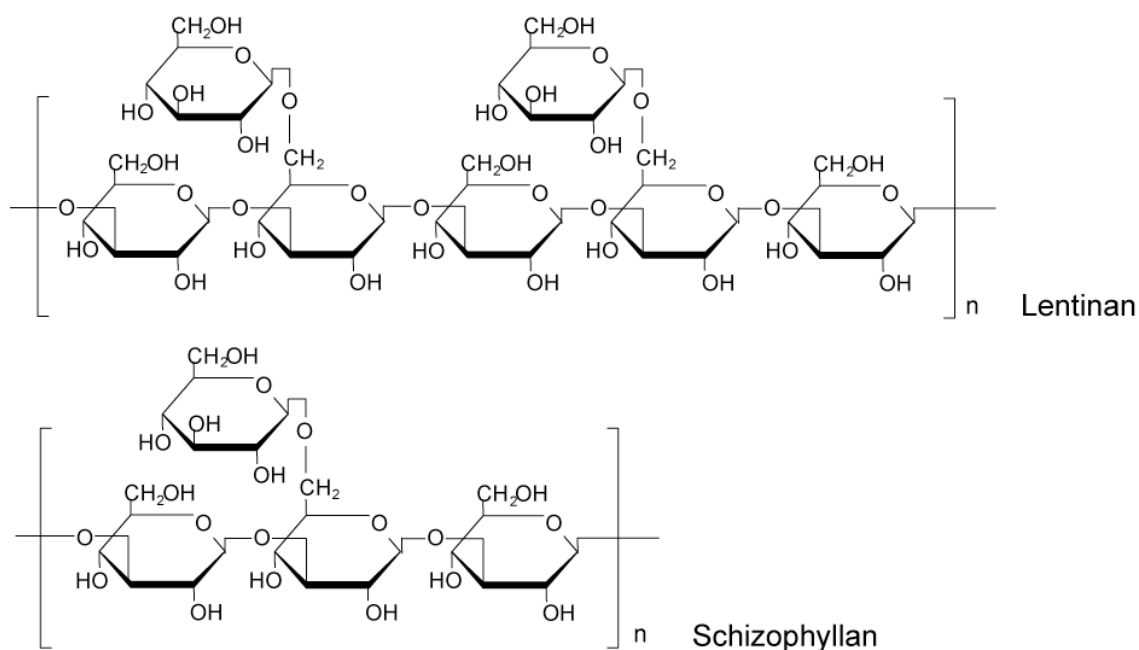


Fig.1-3 Primary structures of Lentinan and Schizophyllan.

このようにきのこは食品としてそれぞれの機能が報告されている。そして、近年の生活習慣病の増大や医療費の高騰、さらなるきのこ利用拡大の面から、特に生理特性(三次機能)が着目されている。多くのきのこ類において、様々な薬理効果が報告されているが、商品化されているものは一部であり、それらは伝承的な面を多く持ち、有効成分の同定や安全性の確認、商品化に必要な医療科学的解析はまだ十分とは言いがたい。一方、漢方薬として利用されてきた薬用きのこの一部をTable.1-2に示す。これらのきのこはその効果は知られるものの、利用、市場の拡大が課題となっている。

そこで本論文では、和漢薬、民間薬として効能効果が知られていること、近年、その効果と活性成分が研究されていること、長い食経験や安全性試験により安全性が確認されていること、そして、栽培方法が確立され、利用拡大が期待されていることなどから、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) に着目した。

Table. 1-2 List of medicinal mushroom²⁶⁾.

Mushroom	Herbal medicine	Pharmacological effect
<i>Cordyceps sinensis</i>	冬虫夏草	Bronchodilation, Antihypertensive effect
<i>Coriolus versicolor</i>	雲芝	Antitumor, Antiinflammatory
<i>Ganoderma lucidum</i>	靈芝	Antitumor, Antiinflammatory, Antihypertensive effect
<i>Elfvigina applanata</i>	梅寄生	Antitumor
<i>Fomitopsis officinalis</i>	苦白蹄	Diuresis, Antiperspirant
<i>Hericiium erinaceus</i>	猴頭	Relief of indigestion and neurasthenia
<i>Morchella esculenta</i>	羊肚菜	Relief of indigestion
<i>Phellinus linteus</i>	桑黃	Diuresis, Stomachic
<i>Poria cocos</i>	茯苓	Diuresis, Cardiotonic effect
<i>Polyporus umbellatus</i>	豬苓	Antitumor, Diuresis, Antipyretic effect
<i>Tremella fuciformis</i>	銀耳	Relief of pneumonia and gastritis
<i>Tricholoma nudum</i>	紫晶蘑	Prevention of beriberi

1-2 マンネンタケ

1-2-1 マンネンタケの形態

マンネンタケ (*Ganoderma lucidum* Karst) は、分類学上、ヒダナシタケ目マンネンタケ科マンネンタケ属に属するきのこで、広葉樹に生える白色腐朽菌である²⁷⁾。日本をはじめ、東アジアではなじみの深いきのこであり、日本では“靈芝 (れいし)”、中国では“Lingzhi”、韓国では“Yeongji”と呼ばれる。マンネンタケは、梅雨から夏にかけて子実体を形成し、有柄、傘はコルク質、上下二層からなり、上層は白色に近く、下層は淡いニッケル色で上層よりやや硬く、さらに表面は黒褐色の殻皮で覆われている。形状は腎臓形もしくは円形、半円形で、傘の径は、5-15cm、厚さ1-3cmのものが多く、表面は環溝を備え、時に細かな放射状のしわを表し、表面に漆のような光沢がある (Fig. 1-4)。色は生育初期において、黄白色、次第の赤褐色、さらに栗褐色から黒褐色となる。裏面は、黄白色、管孔の口は円形である。柄は、傘に側生、または中央付近に付き、表面には凹凸があり、不規則に屈曲している。長さは5-15cm (おもに傘の直径より少々長い程度)、太さ0.5-2cmである。色は傘とほぼ同色であるが、肉質は傘のそれよりも堅く、直立、中空である。担子胞子は、褐色、卵形で、9-11×5.5-7.0 μ mである。北半球の温帯に広く分布し、北米およびアジアの太平洋沿岸、ヨーロッパ、中央アフリカの山地などに見られる²⁸⁾。クヌギ、コナラ、ミズナラ、ニセアカシア、ウメなどの各種広葉樹の枯木や切り株、成立木の樹幹や根元に発生する。マンネンタケは、種菌が同じであっても、光、温度、湿度などの生育条件の違いにより、また、菌株の産地や系統の違いによってその子実体の形状、色合い、肉質、苦味などが微妙に変化してくる。それらは、形状的差異によって、鹿角芝、牛角芝、肉芝と呼ばれ分類され、色合いの差異によって、青芝、赤芝、黄芝、白芝、黒芝、紫芝などに区分さ

れる。そして、それらの品質や内容成分にも差が見られることが知られている²⁹⁾。



Fig. 1-4 *Ganoderma lucidum* Karst

a: Fruiting bodies grown in plum tree. b: Mycelia cultured on sawdust (*Quercus serrata*) medium. c and d: Cultivated fruiting body.

1-2-2 マンネンタケの栽培

マンネンタケは、天然での採取は希少であったが、現在では人工栽培法が確立している。日本においては、1937年に逸見武雄らによってはじめて人工栽培が試みられ、1971年には直井幸雄により、おがくずを用いたポット栽培による量産に成功した³⁰⁾。その後、多くの研究によりほだ木あるいはおがくずを用いる栽培方法が確立した。栽培は菌糸の繁殖力が旺盛なことから比較的容易におこなえる。現在では、広葉樹を利用した普通原木栽培、単木断面栽培、殺菌原木栽培および菌床栽培が広く用いられている³¹⁾。それら栽培は夏を中心とした季節栽培が多く、空調施設による周年栽培は少ない。植菌は、3月から4月に行い、培養、伏せ込みをおこなう。原木を用いた栽培では培養、伏せ込み期間は1年間と長く、菌床栽培では2ヶ月程度で原基形成が確認される。原基形成から収穫までは、1-2ヶ月程度である。つまり、原木栽培では、菌を接種してから、子実体発生まで1年以上かかるのに対して、菌床栽培では2、3ヶ月で子実体発生が可能である。また、マンネンタケは種菌が同じであっても、温度、湿度、光などの栽培条件によって、子実体の形状、色合い、肉質、苦味などが微妙に変化してくる。栽培樹種の違いによっても、その機能性が異なることが知られている。マンネンタケの抗酸化能は、ブドウを栽培基材として用いたものに高い活性が確認されている³²⁾。近年ではコナラなどの培地基材の価格高騰や未利用バイオマスの利用の観点から、果樹林から発生する剪定枝による人工栽培が注目されている。果樹剪定枝利用では、クワ、ブドウ、リンゴ、ウメ、カキなどの木材が培地基材として、利用が検討されている³²⁻³⁴⁾。このように廃棄物である剪定枝利用の点からもマンネンタケは生産量の拡大が予想される。

1-2-3 マンネンタケの利用

マンネンタケの利用として、まず挙げられるのは和漢薬、民間薬である。中国最古の薬物書「神農本草経」の上品120種の中に6種(青芝、赤芝、黄芝、白芝、黒芝、紫芝)の霊芝が記載されている。上品とは、長期間食しても副作用がなく、長年摂取すれば老化を防ぎ、長寿となるとされるものである。また、中国伝統医薬学の名著である「本草綱目」にも、6種の霊芝の効能について記されている。日本においてもその歴史は古く、「日本書紀」において「天武八年(679年)、この年紀伊国伊刀郡、芝草を貢ぐ。其の状菌に似て茎の長さ一尺其の蓋二圍」と記載があり、松岡玄達の「草本一家言」にも「芝、即ち霊芝也。世に芝と霊芝を二物となすが非なり。今の人芝を門出蕈と称す。また、幸蕈と名づけるのがこれである」と記されている²⁶⁾。縁起物としての意味合いも強く、贈答品としても用いられてきた。サイワイタケ、カドゲタケ、福草、三枝、神芝、玉来、吉祥茸、三茎、不死草、端芝などめでたい名称でよばれている。マンネンタケは、野山で天然ものを採取することは稀であったことから、貴重品として扱われてきた。マンネンタケ子実体は硬質であることから、盆栽などとともに観賞用として用いられることもある。一方、食品としても注目されており、近年では乾燥子実体やその粉碎物、さらには抽出物を顆粒にしたものなどが健康食品として販売されている。マンネンタケは、上記のように「上品」に分類され、長期間食しても安全であることが、長い年月をかけて確認されている。近年では無作為二重盲検試験において、マンネンタケ抽出物を連続で4週間服用した際の状態を、血液分析(抗酸化状態、冠動脈疾患のリスク、DNA損傷、肝機能、脂質代謝、免疫状態、炎症などを指標として)と肝臓、腎臓などの臓器検査を行い、マンネンタケによる副作用、毒性、臓器異常がないことが確認されており³⁵⁾、食品利用における安全性も確立している。

1-2-4 マンネンタケの成分と薬理効果

Mauらによって報告されたマンネンタケの一般化学成分をTable. 1-2に示す³⁶⁾。低分子成分としては、単糖、オリゴ糖、糖アルコール、アミノ酸、脂質、トリテルペノイド、ステロイド、アデノシン誘導体、タンニン質などが、高分子成分としては、グルカンをはじめとする多糖類、糖タンパク質などが報告されている。

Table. 1-2 Chemical composition of *G.lucidum* mushroom ³⁶⁾.

Component	Content (%)
Ash	1.77 ± 0.05
Carbohydrate	26.02 ± 1.58
Crude fat	5.13 ± 0.19
Crude fiber	59.16 ± 0.85
Crude protein	7.92 ± 0.54

*Components were presented based on dry weight. Each value is expressed as mean±S.E. (n=3).

マンネンタケは古来より様々な効能効果が伝えられてきた。本草綱目では、マンネンタケ (霊芝) は6種 (青芝、赤芝、黄芝、白芝、黒芝、紫芝) に分類され、それぞれの効果が記載されている。青芝は視力低下、肝機能障害、神経衰弱など、赤芝は心筋梗塞、心臓虚弱、健忘症など、黄芝は高血圧、心不全、胃炎、消化不良、腸炎、精神不安定など、白芝は肺炎、喘息、精神不振など、黒芝は前立腺炎、膀胱炎、腎炎、高血圧など、そして、紫芝は難聴、関節炎、リウマチ、神経衰弱、吹き出物等に効果を有することが記載されている³⁷⁾。近年では生化学的、薬理学的研究により、様々な効果が報告されている。

1) 抗腫瘍効果

マンネンタケの薬理効果のなかでもっとも知られているのは抗腫瘍作用³⁸⁻⁴⁴⁾である。Soneらは、マンネンタケ子実体熱水抽出物および菌糸体培養ろ液中の β -D-グルカンに抗腫瘍活性があることを見出している⁴⁵⁾。水野らは、Sarcoma 180 細胞を移植したマウスを用いて、マンネンタケ子実体由来の β -D-グルカン、酸性ヘテログルカンが抗腫瘍活性を示すことを報告している⁴⁶⁾。そして、多糖における抗腫瘍効果は、免疫担当細胞を活性化し、サイトカイン生産の促進する、アポトーシスを誘導するなど、その作用機序についての研究も進んでいる^{47, 48)}。Minらは、マンネンタケ胞子からトリテルペンを単離、同定し、Meth-AとLLC腫瘍細胞に対して、細胞毒性によりその活性を示すことを報告している⁴⁹⁾。Gaoらは、子実体から単離、同定したトリテルペンアルデヒドであるルシアルデヒドA, B, Cにも細胞毒性による抗腫瘍活性があることを報告している⁴⁴⁾。このように抗腫瘍効果に関する研究は多く報告され、それらは効果だけでなく、活性成分や作用機序も明らかとなっている。

2) 高血圧抑制効果

マンネンタケの高血圧抑制効果は、前臨床試験や臨床試験でその効果が報告されている。前臨床試験において、有地らは、マンネンタケ子実体熱水抽出エキスは、Wistar系ラットおよび自然発症高血圧ラット (Spontaneously hypertensive rat: SHR) において緩和な血圧降下作用を示すことを確認されている⁵⁰⁾。マンネンタケの血圧降下作用は、抽出エキスの分子量10万以上の画分に持続性が高く、作用成分は糖やアミノ酸などを含む高分子化合物であると報告している。さらに分類学上、同一種であると同定されたマンネンタケであっても、菌株や栽培条件などにより、血圧降下作用が異なることや菌傘のほうが、菌柄よりも血圧降下作用が強いことが確認されている。Kabirらは、液体培地 (グルコース、大豆粉、甘藷粉、無機塩) で培養した菌糸5%含む飼料、0.5%

食塩水を与えた自然発症高血圧ラット (SHR) は、4週間後には血圧を有意に抑制することを確認している⁵¹⁾。これらは同時に血漿および肝臓中のコレステロール低下を引き起こしているが、詳細なメカニズムの解明には至っていない。Leeらはウサギやラットを用いた実験で、菌糸水抽出物は心拍数を低下させることなく、交感神経の活動を抑えることで降圧効果を示していると報告している⁵²⁾。

臨床においてもその効果が報告されている。上松瀬らは、子実体熱水抽出物から作成した錠剤を6ヶ月間、本態性高血圧患者および正常、軽高血圧者に投与したところ、約半数例において、高血圧患者の血圧は降下し、正常、軽高血圧者は大部分で正常であり、臨床的な副作用、肝機能、腎機能などに対する副作用もみられなかったと報告している⁵³⁾。この結果は、高血圧抑制作用のみならず、臨床におけるマンネンタケ抽出物の安全性の面からも重要である。有地らも、子実体熱水抽出物は、本態性高血圧患者に対して、降圧効果、血圧安定作用が認められたことを報告している⁵⁴⁾。このように高血圧抑制効果は報告されており、臨床試験もおこなわれているにも関わらず、その活性成分の同定や詳細な機能性メカニズムに関する研究は十分とは言いがたい。

3) その他の薬理効果

上記以外の薬理効果としては、抗炎症作用^{43, 55, 56)}、肝機能の改善効果⁵⁷⁾、抗HIV^{58, 59)}、血糖降下作用⁶⁰⁾、そして、前立腺肥大に対する改善効果⁶¹⁻⁶⁶⁾など様々なものが報告され、その効果と活性成分、作用機序が解明されつつある。Zhang, Gらは、肝障害におけるマンネンタケ多糖の肝臓保護作用をマウスを用いた実験で確認している⁵⁷⁾。Zhang, Hらは、マンネンタケ多糖が、膵臓β細胞へのカルシウムイオンの流入により、インスリン放出が活発になることで、血糖降下作用を有することを報告している⁶⁰⁾。Liuらは、子実体エタノール抽出物から同定されたガノデリン酸DMなどのトリテルペノイドが前立腺肥大の発達に関与する5α-リダクターゼを阻害することを報告している⁶²⁾。El-Mekkawyらは、

子実体メタノール抽出物から同定されたガノデリオールFなどが抗HIV1剤として働くことを示した⁵⁸⁾。

このようにマンネンタケの薬理効果において、抗腫瘍効果の研究は多く報告され、それらは効果だけでなく、活性成分や作用機序も明らかとなっている。しかし、古来知られている高血圧抑制効果において、活性成分や作用機序についての研究は十分とはいえない。そこで本論文では、マンネンタケのもつ高血圧抑制効果に着目した。

1-3 高血圧

1-3-1 血圧の定義と高血圧

高血圧とは血管の内圧が一定基準を超えている状態である。血圧は心拍出量と末梢血管抵抗により規定される。心拍出量は心臓の収縮力と循環血液量の 2 つの因子により、末梢血管抵抗は血管の弾力性や血管径などの因子により規定される。高血圧は、大きく 2 種類にわけることができる。ひとつは本態性高血圧と呼ばれるもので、高血圧の 90%以上はこれにあたる。本態性高血圧は原因が明確ではなく、遺伝的要因と環境要因が関与すると考えられ、生活習慣病の一つである⁶⁷⁾。もうひとつは、二次性高血圧と呼ばれ、原因が明らかな高血圧を指す。二次性高血圧には、腎動脈の一部が狭窄することによって発症する腎血管性高血圧、糸球体腎炎を原因とする腎性高血圧、副腎の腫瘍や糖質コルチコイドホルモンの過剰分泌による内分泌性高血圧がある⁶⁸⁾。高血圧は、自覚症状としてあまり顕著な変化はないが、病的に高い動脈内圧が持続することにより、心臓血管系に高血圧性の臓器障害を引き起こす疾患である。高血圧により引き起こされる臓器疾患としては、心臓左室肥大、左室予備能低下、左室不全、中枢神経系の脳出血、腎臓における腎細動脈障害による腎硬化症などが挙げられる⁶⁹⁾。さらに高血圧に複数の因子が関与することで、脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患を引き起こす。

1-3-2 昇圧因子

上記のように本態性高血圧の発症原因は明らかではないが、心拍出量や末梢血管抵抗の上昇に関与する昇圧因子は解明されつつある (Fig. 1-5)。昇圧因子には、交感神経系、レニン-アンジオテンシン (RA) 系、ナトリウムなどがある。交感神経系

(sympathetic nervous system) は、心身の働きによって、血圧および心臓機能を調節する血圧調節機構である。交感神経機能の亢進は、末梢交感神経末端からノルアドレナリン、副腎髄質からアドレナリンを分泌し、ノルアドレナリンは、細動脈 (arteriole) 収縮を引き起こし、腎臓におけるナトリウムの排出を抑制、アドレナリンは、心拍数 (heart rate)、心拍出量 (cardiac output) の増加、レニン分泌を促進し、血圧を上昇させる⁶⁹⁾。

レニン-アンギオテンシン (RA) 系は、腎臓の傍糸球体細胞で産生されたレニンにより、肝臓由来のアンギオテンシノーゲンがアンギオテンシン I に変換される。アンギオテンシン I は、肺や血管内皮細胞の膜表面に存在するアンギオテンシン変換酵素 (ACE) の働きにより、アンギオテンシン II に変換される。アンギオテンシン II は、血管収縮 (vasoconstriction) 、副腎皮質におけるアルドステロンの分泌や輸出細動脈 (efferent arteriole) 収縮などを促すことにより血圧上昇を引き起こす。

ナトリウムは、体内において体液量を増加させ、心臓から拍出される血液量が増加することで血圧が上昇する。さらに末梢動脈壁の細胞内にナトリウムが増えることで、血管壁にむくみが生じ、末梢血管抵抗が増大することで血圧の上昇を招く。そのほか、腎臓に対して、近位から遠位尿細管からのナトリウム再吸収を増加させるインスリン、血管平滑筋細胞の収縮性を有するエンドセリンやトロンボキサンなどのほかにも様々な因子が関係している⁶⁹⁾。

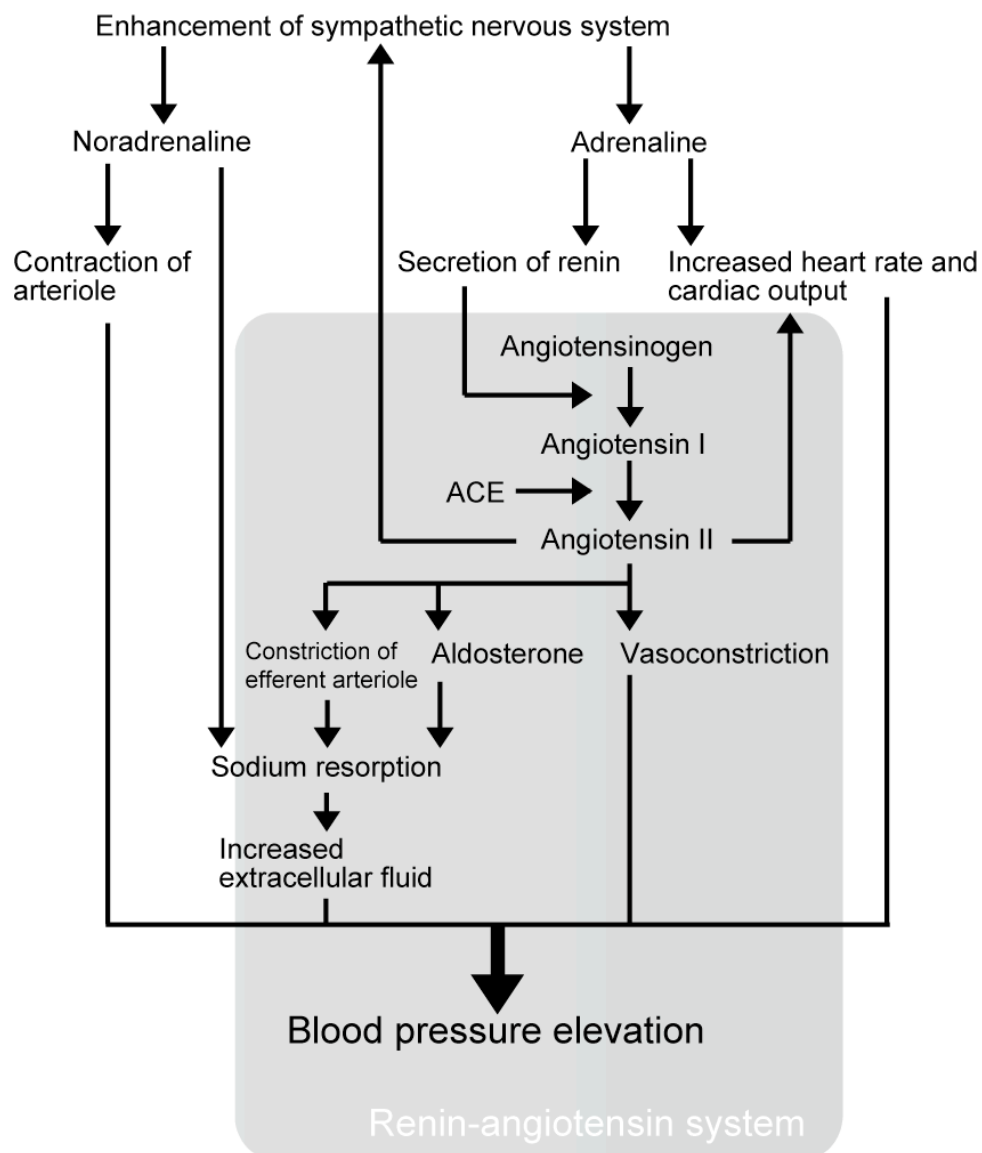


Fig. 1-5 Mechanism of blood pressure elevation by sympathetic nervous system and rennin-angiotensin system.

*Gray area indicate rennin-angiotensin system.

1-3-3 高血圧治療

高血圧治療には、一般療法と薬物療法とがある。一般療法とは、降圧薬を用いない高血圧治療法であり、減量や運動療法など生活習慣の変容によるものが主体となる⁶⁹⁾。高血圧療法は長期にわたるため、医療費や薬剤に対する副作用等の問題が生じる。そ

の点、一般療法は、多額の費用や副作用への心配は少ない。しかし、長期の生活習慣の是正と継続が必要であり、周囲の協力体制も必要となる。また、一般療法を継続した場合でも、その効果が見られない場合もある。

薬物療法では、利尿薬、 β 遮断薬、 α 遮断薬、カルシウム拮抗薬、ACE阻害薬、アンギオテンシンII受容体拮抗薬、中枢作動性降圧薬などがある。利尿薬は、腎ネフロン⁶⁷⁾の遠位曲尿細管でのNa-Clの共輸送によるNaClの再吸収を抑制し、ナトリウム利尿作用により、血圧降下させる⁶⁹⁾。 β 遮断薬および α 遮断薬は、交感神経系に作用し、 β 遮断薬は心臓が血液を拍出する力を抑え、脈拍数を抑制する、 α 遮断薬は、血管拡張作用により、血圧降下作用を示す⁶⁸⁾。カルシウム拮抗薬は、血管平滑筋での細胞内へのカルシウムの流入を防ぐことで、血管拡張を生じ、血圧降下作用を示す⁶⁹⁾。ACE阻害薬およびアンギオテンシンII受容体拮抗薬は、レニン-アンギオテンシン系に作用し、血管収縮やアルドステロンの分泌を抑制することで血圧降下作用を示す⁶⁹⁾。中枢作動性降圧薬は、脳の中核に作用し、末梢血管の拡張を引き起こすことで降圧効果を発揮する⁶⁸⁾。薬物療法のなかでもレニン-アンギオテンシン系薬剤であるACE阻害薬、アンギオテンシンII受容体拮抗薬は第一選択薬として用いられ、日本高血圧学会が示している高血圧治療ガイドライン2009年度において、主要降圧薬のなかで、頻脈、狭心症を除く、すべてにおいて積極的適応が示されている。しかし、これら薬剤は、明確な降圧効果が期待できるものの、副作用や長期間にわたる処方による医療費の負担などを考慮しなくてはならない。

このように一般療法、薬物療法ともにそれぞれの長所、短所があり、臨床において、その優劣を比較することは難しく、患者に応じた治療法の選択が求められている。さらに降圧薬として認可されていない漢方療法や民間療法は、一般療法に含めないほうがよいとされており、マンネンタケをはじめ機能性食品を用いたこれら治療法も高血圧治療の選択肢として注目が集まっている。そして、これら高血圧抑制効果が報告さ

れている食品や食品由来の成分の多くは、ACE阻害活性を有し、高血圧抑制効果を示している。そこで、本研究においても、マンネンタケのACE阻害活性に着目した。

1-3-4 アンギオテンシン変換酵素 (ACE)

アンギオテンシン変換酵素 (ACE) は、血圧上昇因子であるレニン-アンギオテンシン(RA)系において、重要な役割を担う酵素である。ACEは、デカペプチドであるアンギオテンシン I のカルボキシ末端のヒスチジン-ロイシンを切断し、オクタペプチドであるアンギオテンシン II に変換する。アンギオテンシン II は、血管収縮、副腎皮質におけるアルドステロンの分泌を促すことにより血圧上昇を引き起こす (Fig. 1-5)。また、ACEは、血管拡張作用を有するブラジキニンを不活性化することにより、血管拡張を防ぎ血圧上昇を引き起こす⁷⁰⁻⁷³⁾。

ACEは、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼであり、ほ乳類の組織に広く分布し、血管内皮細胞、吸収上皮細胞、神経上皮細胞、雄性胚細胞などに存在する膜結合型の表面酵素である⁷³⁾。活性中心に亜鉛 (Zn) を有し、それらは特異的なHEXXH Zn結合モチーフをもち、グルジンシンファミリーに分類される⁷⁴⁾。塩化物イオンによって活性化されるメタロペプチダーゼであり、広い基質特異性を示すことが知られている⁷⁵⁾。ACEは体細胞型と精巣型の2つのアイソホームを有し、オルタナティブな転写開始部位をもつ単一の遺伝子から転写される^{76, 77)}。体細胞型のACEは、糖タンパク質として存在し、1277アミノ酸からなる単一のポリペプチド鎖で構成され、2つの相同性ドメイン (Cドメイン、Nドメイン) からなり、それぞれ亜鉛触媒部位を持つ⁷⁸⁾。一方、精巣型のACEは、701アミノ酸の低分子グリコフォームからなり、体細胞型と同一のC末端領域 (665残基) を含む⁷⁸⁾。つまり、体細胞型ACEは、N末端に相同性の高い触媒部位を余分に1つ持っている。C、N両ドメインは、*in vitro*において、アンギオテンシンIに対す

る活性を有するものの、*in vivo*において、CドメインがアンギオテンシンIの変換に関与するメインサイトであることが確認されている^{79, 80)}。

ACEと基質の相互作用に着目すると、ACEは、S1、S'1そしてS'2と呼ばれるサブサイトを持ち、これらサブサイトとアミノ酸残基の側鎖が特異的相互すると想定されている⁸¹⁾。アンギオテンシンIのC末端、フェニルアラニンはサブサイトS1に、ヒスチジンはサブサイトS'1に、ロイシンはサブサイトS'2に対応する (Fig. 1-6)。人工基質であるヒプリル-ヒスチジル-ロイシン (HHL) やヘビ毒由来の阻害ペプチド、合成薬剤であるカプトプリルやリシノプリルとACEサブサイトとの関係をFig. 1-6に示す。また、近年では、ヒト由来のACEと阻害剤を用いて、X線結晶構造解析がおこなわれ、立体構造に関する知見が得られている⁷⁸⁾。

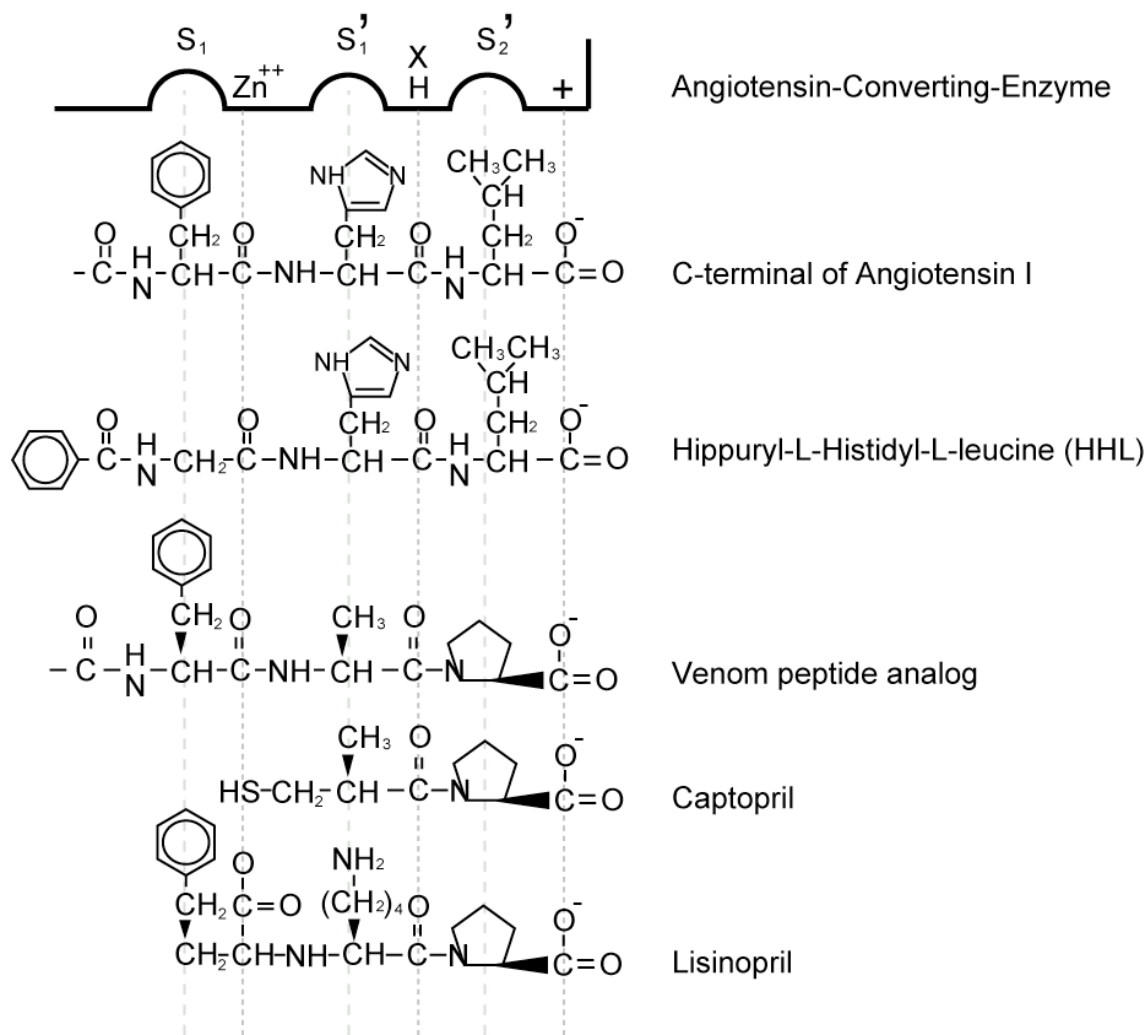


Fig.1-6 Proposed binding model for interaction between substrates or inhibitors and active site of angiotensin converting enzyme (ACE).

This model referred Ondetti and Cushman^{81, 82}. Structure-activity studies with original substrate angiotensin I and artificial substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine, synthetic venom peptide analog and antihypertensive drug (captopril, lisinopril) designed to bind to the active site of ACE.

1-3-5 ACE 阻害剤

前述のように ACE は血圧上昇において、重要な意味を持ち、この働きを阻害することで高血圧抑制作用を示す。ACE 阻害剤に関する研究は、1971 年に南米に生息するヘビ (*Bothrops jararaca*) の毒からはじまり、ヘビ毒から単離された ACE 阻害成分はペプチドであった⁸³⁾。その構造をもとに、カプトプリル、エナラプリル、リシノプリルなどの合成薬剤が開発された。現在、臨床において、ACE 阻害薬として利用されているものである。しかし、これら合成阻害剤は空咳、味覚障害、発疹、アレルギー反応などの副作用を伴うことから、穏和な降圧作用を有し、副作用の少ない食品に注目が集まっている⁸⁴⁾。

これまでに食品からは多くの ACE 阻害剤が報告されている。それらの多くは、プロテアーゼによる加水分解物や微生物による発酵食品^{73, 85)}である。その素材としては、魚^{86, 87)}、ミルク⁸⁸⁾、貝⁸⁹⁾、チーズ⁹⁰⁾、ワカメ⁹¹⁾、アマランス⁹²⁾などがある。また、蝶タンパク質由来のもの⁹³⁾やブタのヘモグロビン由来のペプチド⁹⁴⁾も知られている。一方、非ペプチド性阻害剤としては、非タンパク質構成アミノ酸であるニコチアミン⁹⁵⁻⁹⁹⁾や、メイラード反応生成物¹⁰⁰⁾、茶のカテキン、テアフラビン¹⁰¹⁾、米糠のフィチン¹⁰²⁾などが報告されている。

きのこに着目すると、抽出物の ACE 阻害活性は多くの種のきのこで知られている¹⁰³⁾。また、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の菌糸体培養液にも阻害活性があることが知られている¹⁰⁴⁾。しかし、きのこから単離された ACE 阻害剤は少ない。きのこ由来の ACE 阻害剤を Table. 1-4 に示す。また、その化学構造を Fig. 1-8 に示す。マイタケ (*Grifola frondosa*)^{105, 106)}、ニオウシメジ (*Tricholoma giganteum*)⁸⁴⁾、そして、ブナハリタケ (*Mycoleptonoides aitchisonii*)¹⁰⁷⁾由来のペプチド、タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) およびコウタケ (*Sarcodon aspratus*) 由来の D-マンニトールなどの糖アルコール^{108, 109)}

やL-ピペコリン酸¹¹⁰⁾、シメジモドキ (*Rhodophyllus clypeatus*) やホウキタケ (*Ramaria botrytis*) から確認されたニコチアナミンなどがある。きのこ由来の阻害剤には、様々なものがあり、その活性の強弱も様々である。マンネンタケにおいても、津田らが、子実体70%アセトン抽出物にACE阻害活性があること報告している¹¹¹⁾。Choiらは、子実体の水抽出物、メタノール抽出物、エタノール抽出物にACE阻害活性を確認している¹⁰⁵⁾。また、Kimらはマンネンタケを含むライスワインでもACE阻害活性を報告している¹¹²⁾。マンネンタケに含まれるACE阻害活性成分としては、Morigiwaらによって、70%メタノール抽出物中のガノデリン酸B、D、F、H、K、S、Y、ガノデロールA、B、そしてガノデラルールAである¹¹³⁾、水溶性成分としては、青山らによって、水抽出物中のD-マンニトール、D-アラビトールなど糖アルコールが報告されている¹¹⁴⁾。

これらの食品由来のACE阻害剤は、薬剤のもつ高血圧抑制効果よりは弱いものの、温和な効果を示すことで副作用の軽減が期待され、合成薬剤に比べて安価であるなどの利点がある。そして、一般療法や薬物療法との併用による効果も期待されている。一方、マンネンタケのACE阻害効果は知られているものの、食品利用に適していると考えられる水抽出により単離されている活性成分は少なく、他の活性成分の存在も示唆されており、高血圧抑制効果が多く報告されている水抽出物のACE阻害活性の詳細および活性成分の同定が望まれている。

Table.1-4 List of ACE inhibitors from mushroom.

Mushroom	ACE inhibitor	IC ₅₀	Inhibition pattern	Reference
<i>Ganoderma lucidum</i>	D-Mannitol	184mM	Competitive	114)
	D-Arabitol	227mM	Competitive	114)
	Ganoderic acid B	29μM	-	113)
	Ganoderic acid D	30μM	-	
	Ganoderic acid F	4.7μM	-	
	Ganoderic acid H	20μM	-	
	Ganoderic acid K	26μM	-	
	Ganoderic acid S	95μM	-	
	Ganoderic acid Y	43μM	-	
	Ganoderol A	10 ⁻⁴ <M	-	
	Ganoderol B	220μM	-	
Ganoderol A	10 ⁻⁵ <M	-		
<i>Grifola frondosa</i>	Val-Ile-Glu-lys-Tyr-Pro	97μg	Competitive	105)
	Lys-Tyr-Thr-Phe-Ala-Val-Thr-Thr-Val-Lys-Thr-Trp-Val*	2.6μM	-	106)
	Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ser-Gly*	2160μM	-	
	Tyr-Pro-Ser*	570μM	-	
<i>Mycleptodonoides aitchisonii</i>	Ile-Tyr	3.1μM	-	107)
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	D-Mannitol	184mM	Competitive	108)
<i>Sarcodon aspratus</i>	D-Mannitol	184mM	Competitive	109)
	D-Arabitol	227mM	Competitive	
	L-Pipecolic acid	183mM	Competitive	110)
<i>Tricholoma giganteum</i>	Gly-Glu-Pro	40μg	Competitive	84)
<i>Rhodophyllus clypeatus</i>	Nicotianamine	0.11μM	Mixed	99, 115)
<i>Ramaria botrytis</i>	Nicotianamine	0.11μM	Mixed	99, 115)
<i>Ramaria aurea</i>	Nicotianamine	0.11μM	Mixed	99, 115)

* Water extract digested by pepsin.

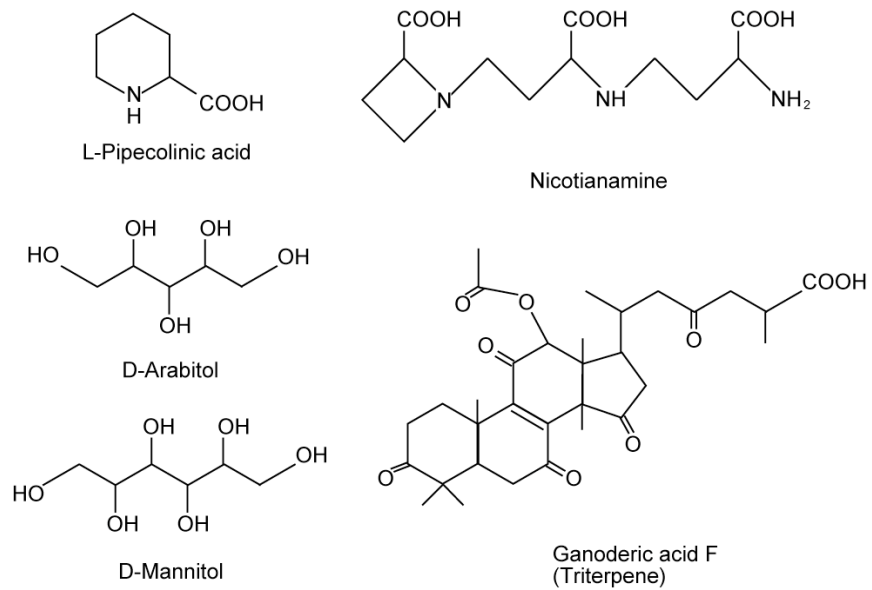


Fig.1-8 Chemical structures of ACE inhibitors from mushroom.

1-4 本研究の目的

きのこは食品としてそれぞれの機能が報告され、近年、生活習慣病の増大や医療費の高騰、さらなるきのこ利用拡大の面から、特に生理特性が着目されている。一方、薬用きのこと呼ばれる硬質きのこは、食用でないことから、市場拡大が課題となっており、これら薬用きのこは生理特性における高付加価値化が利用拡大に繋がると考えられる。

そこで、和漢薬、民間薬として用いられ、効能効果が確認されていること、長い食経験によりその安全性が確認されていること、栽培方法が確立され、利用拡大が期待されていることなどから、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) に着目した。マンネンタケの薬理効果において、古来知られている高血圧抑制効果は、その活性成分や作用機序についての研究は十分とはいえない。一方、血圧上昇機構の1つであるレニン-アンギオテンシン系の主要酵素であるACEは、その合成阻害剤が高血圧症治療の第一選択薬として利用されてきたが、副作用の観点から温和な効果を有し、副作用の少ない食品に注目が集まっている。そこで、マンネンタケのACE阻害活性に着目した。マンネンタケのACE阻害効果は知られているものの、食品利用に適していると考えられる水抽出より単離された活性成分は少なく、他の活性成分の存在も示唆されており、高血圧抑制効果が多く報告されている水抽出物のACE阻害活性の詳細および活性成分の探索が望まれている。

本論文では、マンネンタケの生理特性における高付加価値化による利用拡大を目指し、水抽出物のACE阻害活性に着目し、マンネンタケ水抽出物のACE阻害作用の特徴を明らかにし、阻害成分とその発現メカニズムに関する知見を得ることを目的とした。その目的に対して、本研究は3つの部分から構成されている。第1部 (第2章) では、マンネンタケ水抽出物のもつACE阻害活性能に着目し、その特徴を明らかにした。第2部 (第3章) で

は、水抽出物中に含まれるACE阻害成分に着目し、その探索をおこなった。そして、第3部（第4章）では、ACE阻害活性発現機構に関する実証をおこない、マンネンタケ水抽出物におけるACE阻害活性発現機構の解明を試みた。

引用文献

- 1) 林野庁, "平成 20 年の主要な特用林産物の生産動向," 2009.
- 2) 関谷敦, "きのこの生理活性と機能," シーエムシー出版, 東京, 2005.
- 3) R. H. Whittaker, *Science*, **163**, 150-60 (1969).
- 4) 長沢栄史, "キノコとカビの基礎科学とバイオ技術," アイピーシー, 東京, 2002.
- 5) 今関六也, "原色日本新菌類図鑑(I)," 保育社, 東大阪, 1987.
- 6) 古川久彦, "きのこ学," 共立出版, 東京, 1992.
- 7) 衣川堅二郎と小川眞, "きのこハンドブック," 朝倉書店, 東京, 2000.
- 8) 中沢武, "キノコの科学," 朝倉書店, 東京, 1997.
- 9) 女子栄養大学出版部, "五訂増補食品成分 2006," 女子栄養大学出版部, 東京, 2005.
- 10) 水野卓, "キノコの化学・生化学," 学会出版センター, 東京, 2000.
- 11) 中島宣郎, 市川恒平, 鎌田政喜, 藤田栄一郎, *日本農芸化学会誌*, **35**, 797-803 (1961).
- 12) T. Nishitoba, H. Sato, T. Kasai, H. Kawagishi and S. Sakamura, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2905-2907 (1984).
- 13) 早野清治と白濱晴久, "キノコの化学・生化学," 学会出版センター, 東京, 2000.
- 14) 岩見公和, "キノコの化学・生化学," 学会出版センター, 東京, 2000.
- 15) T. Ikekawa, M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka, *Gann*, **59**, 155-7 (1968).
- 16) C. Zhuang, T. Mizuno, A. Shimada, H. Ito, C. Suzuki, Y. Mayuzumi, H. Okamoto, Y. Ma and J. Li, *Biosci Biotechnol Biochem*, **57**, 901-6 (1993).
- 17) N. Ohno, N. N. Miura, M. Nakajima and T. Yadomae, *Biol Pharm Bull*, **23**, 866-72 (2000).
- 18) H. Kawagishi, R. Inagaki, T. Kanao, T. Mizuno, K. Shimura, H. Ito, T. Hagiwara and T. Nakamura, *Carbohydr Res*, **186**, 267-73 (1989).
- 19) 江口文陽, 渡辺泰雄, 張俊, 宮本康嗣, 吉本博明, 福原富男, 桧垣宮都, *和漢医薬学雑誌*, **16**, 201-7 (1999).
- 20) 桧垣宮都, 江口文陽, 渡辺泰雄, *日本薬理学雑誌*, **110**, 98-103 (1997).
- 21) 須見洋行, 矢田貝智恵子, 松原主典 *日本食品科学工学会誌*, **43**, 318-321 (1996).
- 22) B. K. Yang, J. B. Park and C. H. Song, *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 1292-8 (2003).
- 23) G. Chihara, Y. Maeda, J. Hamuro, T. Sasaki and F. Fukuoka, *Nature*, **222**, 687-8 (1969).
- 24) 平瀬進, "キノコの化学・生化学," 学会出版センター, 東京, 2000.

- 25) T. Kojima, K. Tabata, W. Itoh and T. Yanaki, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 231-232 (1986).
- 26) 難波恒雄, "キノコの化学・生化学," 学会出版センター, 東京, 1992.
- 27) 今関六也と本郷次雄, "原色日本新菌類図鑑(Ⅱ)," 保育社, 東大阪, 1998.
- 28) 庄司當, "きのこハンドブック," 朝倉書店, 東京, 2000.
- 29) 水野卓と藤原弘, "キノコの化学・生化学," 学会出版センター, 東京, 2000.
- 30) 水野卓と坂村貞雄, *化学と生物*, **23**, 797-802 (1985).
- 31) 小出博志, "キノコ栽培全科," 社団法人農山漁村文化協会, 東京, 2001.
- 32) Y. Takai, H. Kikuzaki, K. Akiyama, B. Kohno, T. Tujita, M. Nakazawa, M. Ueda, N. Nakatani and K. Miyatake, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **12**, 113-8 (2004).
- 33) 齋藤三季, 戸羽隆宏, 井澤弘美, 柴田浩夫, 長田恭一, *日本食品科学工学会誌*, **56**, 79-84 (2009).
- 34) 齋藤三季, 戸羽隆宏, 柴田浩夫, 長田恭一, *日本食品科学工学会誌*, **55**, 373-378 (2008).
- 35) S. Wachtel-Galor, B. Tomlinson and I. F. Benzie, *Br J Nutr*, **91**, 263-9 (2004).
- 36) J. L. Mau, H. C. Lin and C. C. Chen, *Food Research International*, **34**, 521-526 (2001).
- 37) 庄邨と河岸洋和, "きのこの生理活性と機能," シーエムシー出版, 東京, 2005.
- 38) Z. B. Lin and H. N. Zhang, *Acta Pharmacol Sin*, **25**, 1387-95 (2004).
- 39) Q. Z. Cao and Z. B. Lin, *Acta Pharmacol Sin*, **25**, 833-8 (2004).
- 40) M. Fukuzawa, R. Yamaguchi, I. Hide, Z. Chen, Y. Hirai, A. Sugimoto, T. Yasuhara and Y. Nakata, *Biol Pharm Bull*, **31**, 1933-7 (2008).
- 41) N. H. Chen, J. W. Liu and J. J. Zhong, *Pharmacol Rep*, **62**, 150-63 (2010).
- 42) Y. Nonaka, H. Ishibashi, M. Nakai, H. Shibata, Y. Kiso and S. Abe, *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**, 1399-408 (2008).
- 43) T. Akihisa, Y. Nakamura, M. Tagata, H. Tokuda, K. Yasukawa, E. Uchiyama, T. Suzuki and Y. Kimura, *Chem Biodivers*, **4**, 224-31 (2007).
- 44) J. J. Gao, B. S. Min, E. M. Ahn, N. Nakamura, H. K. Lee and M. Hattori, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **50**, 837-40 (2002).
- 45) Y. Sone, R. Okuda, N. wada, E. Kishida and A. Misaki, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2641-2653 (1985).
- 46) 水野卓, 加藤尚美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子, *日本農芸化学会誌*, **58**, 871-880 (1984).
- 47) M. J. Hsu, S. S. Lee, S. T. Lee and W. W. Lin, *Br J Pharmacol*, **139**, 289-98 (2003).
- 48) S. Y. Wang, M. L. Hsu, H. C. Hsu, C. H. Tzeng, S. S. Lee, M. S. Shiao and C. K. Ho, *Int J Cancer*, **70**, 699-705 (1997).

- 49) B. S. Min, J. J. Gao, N. Nakamura and M. Hattori, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **48**, 1026-33 (2000).
- 50) 有地滋, 谿忠人, 久保道德, 松田秀秋, 吉村成年, 桐ヶ谷紀昌, *基礎と臨床*, **13** 4239-44 (1979).
- 51) Y. Kabir, S. Kimura and T. Tamura, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **34**, 433-8 (1988).
- 52) S. Y. Lee and H. M. Rhee, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **38**, 1359-64 (1990).
- 53) K. Kanmatsuse, N. Kajiwara, K. Hayashi, S. Shimogaichi, I. Fukinbara, H. Ishikawa and T. Tamura, *Yakugaku Zasshi*, **105**, 942-7 (1985).
- 54) 有地滋, 上原清史, 上野隆, 河井洋, 谷勲, 長谷初恵, 仕垣勝治, 谿忠人, 久保道德, 桐ヶ谷紀昌, *基礎と臨床*, **13**, 4245-53 (1979).
- 55) K. J. Hong, D. M. Dunn, C. L. Shen and B. C. Pence, *Phytother Res*, **18**, 768-70 (2004).
- 56) S. Dudhgaonkar, A. Thyagarajan and D. Sliva, *Int Immunopharmacol*, **9**, 1272-80 (2009).
- 57) G. L. Zhang, Y. H. Wang, W. Ni, H. L. Teng and Z. B. Lin, *World J Gastroenterol*, **8**, 728-33 (2002).
- 58) S. El-Mekawy, M. R. Meselhy, N. Nakamura, Y. Tezuka, M. Hattori, N. Kakiuchi, K. Shimotohno, T. Kawahata and T. Otake, *Phytochemistry*, **49**, 1651-7 (1998).
- 59) B. S. Min, N. Nakamura, H. Miyashiro, K. W. Bae and M. Hattori, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **46**, 1607-12 (1998).
- 60) H. N. Zhang and Z. B. Lin, *Acta Pharmacol Sin*, **25**, 191-5 (2004).
- 61) R. Fujita, J. Liu, K. Shimizu, F. Konishi, K. Noda, S. Kumamoto, C. Ueda, H. Tajiri, S. Kaneko, Y. Suimi and R. Kondo, *J Ethnopharmacol*, **102**, 107-12 (2005).
- 62) J. Liu, K. Kurashiki, K. Shimizu and R. Kondo, *Biol Pharm Bull*, **29**, 392-5 (2006).
- 63) J. Liu, K. Kurashiki, K. Shimizu and R. Kondo, *Bioorg Med Chem*, **14**, 8654-60 (2006).
- 64) J. Liu, K. Shimizu, F. Konishi, S. Kumamoto and R. Kondo, *Bioorg Med Chem*, **15**, 4966-72 (2007).
- 65) M. Noguchi, T. Kakuma, K. Tomiyasu, Y. Kurita, H. Kukihara, F. Konishi, S. Kumamoto, K. Shimizu, R. Kondo and K. Matsuoka, *Asian J Androl*, **10**, 651-8 (2008).
- 66) M. Noguchi, T. Kakuma, K. Tomiyasu, A. Yamada, K. Itoh, F. Konishi, S. Kumamoto, K. Shimizu, R. Kondo and K. Matsuoka, *Asian J Androl*, **10**, 777-85 (2008).
- 67) 本間健, "エッセンシャル臨床栄養学第4版," 医歯薬出版株式会社, 東京, 2007.
- 68) 桑島巖, "新編 高血圧の生活ガイド," 医歯薬出版, 東京, 2002.

- 69) 久代登志男, 齊藤郁夫, 上原譽志夫, "一目でわかる高血圧," メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 1998.
- 70) L. T. Skeggs, Jr., J. R. Kahn and N. P. Shumway, *J Exp Med*, **103**, 295-9 (1956).
- 71) H. Y. Yang, E. G. Erdos and Y. Levin, *J Pharmacol Exp Ther*, **177**, 291-300 (1971).
- 72) H. Y. Yang, E. G. Erdos and Y. Levin, *Biochim Biophys Acta*, **214**, 374-6 (1970).
- 73) G. H. Li, G. W. Le, Y. H. Shi and S. Shrestha, *Nutr. Res.*, **24**, 469-86 (2004).
- 74) N. M. Hooper, *FEBS Lett*, **354**, 1-6 (1994).
- 75) E. G. Erdos and R. A. Skidgel, *Lab Invest*, **56**, 345-8 (1987).
- 76) M. Sibony, J. M. Gasc, F. Soubrier, F. Alhenc-Gelas and P. Corvol, *Hypertension*, **21**, 827-35 (1993).
- 77) R. S. Kumar, T. J. Thekkumkara and G. C. Sen, *J Biol Chem*, **266**, 3854-62 (1991).
- 78) R. Natesh, S. L. Schwager, E. D. Sturrock and K. R. Acharya, *Nature*, **421**, 551-4 (2003).
- 79) C. Junot, M. F. Gonzales, E. Ezan, J. Cotton, G. Vazeux, A. Michaud, M. Azizi, S. Vassiliou, A. Yiotakis, P. Corvol and V. Dive, *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 606-11 (2001).
- 80) S. Fuchs, H. D. Xiao, C. Hubert, A. Michaud, D. J. Campbell, J. W. Adams, M. R. Capecchi, P. Corvol and K. E. Bernstein, *Hypertension*, **51**, 267-74 (2008).
- 81) M. A. Ondetti and D. W. Cushman, *nature medicine*, **5**, 1110-1112 (1999).
- 82) M. A. Ondetti and D. W. Cushman, *Annu Rev Biochem*, **51**, 283-308 (1982).
- 83) M. A. Ondetti, N. J. Williams, E. F. Sabo, J. Pluscec, E. R. Weaver and O. Kocy, *Biochemistry*, **10**, 4033-9 (1971).
- 84) D. H. Lee, J. H. Kim, J. S. Park, Y. J. Choi and J. S. Lee, *Peptides*, **25**, 621-7 (2004).
- 85) F. Hong, L. Ming, S. Yi, L. Zhanxia, W. Yongquan and L. Chi, *Peptides*, **29**, 1062-71 (2008).
- 86) H. Fujita and M. Yoshikawa, *Immunopharmacology*, **44**, 123-7 (1999).
- 87) T. Ichimura, J. Hu, D. Q. Aita and S. Maruyama, *J Biosci Bioeng*, **96**, 496-9 (2003).
- 88) A. Geerlings, I. C. Villar, F. Hidalgo Zarco, M. Sanchez, R. Vera, A. Zafra Gomez, J. Boza and J. Duarte, *J Dairy Sci*, **89**, 3326-35 (2006).
- 89) J. Y. Je, P. J. Park, H. G. Byun, W. K. Jung and S. K. Kim, *Bioresour Technol*, **96**, 1624-9 (2005).
- 90) T. Saito, T. Nakamura, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh, *J Dairy Sci*, **83**, 1434-40 (2000).
- 91) K. Suetsuna and T. Nakano, *J Nutr Biochem*, **11**, 450-4 (2000).
- 92) A. Tiengo, M. Faria and F. M. Netto, *J Food Sci*, **74**, H121-6 (2009).

- 93) L. Vercruyse, J. Van Camp, N. Morel, P. Rouge, G. Herregods and G. Smagghe, *Peptides*, **31**, 482-8 (2010).
- 94) Y. Yu, J. Hu, Y. Miyaguchi, X. Bai, Y. Du and B. Lin, *Peptides*, **27**, 2950-6 (2006).
- 95) E. Kinoshita, J. Yamakoshi and M. Kikuchi, *Biosci Biotechnol Biochem*, **57**, 1107-10 (1993).
- 96) Y. Aoyagi, *Phytochemistry*, **67**, 618-21 (2006).
- 97) 竹中 哲夫, 村山 崇志, 竹中 陽子, *日本食品科学工学会誌*, **56**, 6-13 (2009).
- 98) 伊澤華子, 吉田望, 白貝紀江, 青柳康夫, *日本食品科学工学会誌*, **55**, 253-357 (2008).
- 99) A. Hayashi and K. Kimoto, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **53**, 331-6 (2007).
- 100) 横尾聖子, 三浦理代, 五明紀春, *女子栄養大学栄養科学研究所年報*, **6**, 73-83 (1998).
- 101) 原 征彦, 松崎 妙子, 鈴木 建夫, *日本農芸化学会誌*, **61**, 803-808 (1987).
- 102) 斉藤 義幸, 中村 圭子, 川戸 章嗣, 今安 聰, *日本農芸化学会誌*, **66**, 1081-1087 (1992).
- 103) 卯川裕一, 安藤雅之, 古市幸生, 久松真, 苔庵泰志, 西井孝文, *日本食品科学工学会誌*, **48**, 58-63 (2001).
- 104) J. M. Kim, K. S. Ra, D. O. Noh and H. J. Suh, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **29**, 292-5 (2002).
- 105) H. Choi, S., H. Cho, Y., H. Yang, C., K. Ra, S. and H. Suh, J., *Food Research International*, **34**, 177-82 (2001).
- 106) M. Ohtsuru, H. Horio and H. Masui, *Food Sci Technol Res*, **6**, 9-11 (2000).
- 107) Y. Sakamoto, A. Takeuchi, T. Sato, K. Obara, K. Takai, K. Fujino, T. Hirose and Y. Inagaki, *Pharmacometrics*, **61**, 221-9 (2001).
- 108) S. Y. Hagiwara, M. Takahashi, Y. Shen, S. Kaihou, T. Tomiyama, M. Yazawa, Y. Tamai, Y. Sin, A. Kazusaka and M. Terazawa, *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 1603-5 (2005).
- 109) M. Kiyoto, H. Suzuki, T. Hara, Y. Yagi, N. Cho, S. and M. Aoyama, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **13**, 189-94 (2005).
- 110) M. Kiyoto, S. Saito, K. Hattori, N. Cho, S., T. Hara, Y. Yagi and M. Aoyama, *J Wood Sci*, **54**, 179-181 (2008).
- 111) 津田真由美, 原田陽, 青山政和, 斉藤直人, 関一人, 兼俊明夫, 林隆章, *J. Hokkaido For Prod. Res. Inst.*, **14**, 10-5 (2000).
- 112) J. H. Kim, D. H. Lee, S. H. Lee, S. Y. Choi and J. S. Lee, *J Biosci Bioeng*, **97**, 24-8 (2004).

- 113) A. Morigiwa, K. Kitabatake, Y. Fujimoto and N. Ikekawa, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **34**, 3025-8 (1986).
- 114) M. Aoyama, S. Saito, M. Kiyoto, I. Togashi, T. Hara, Y. Yagi, T. Kimura and S. Yoneyama, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **15**, 91-6 (2007).
- 115) 伊澤華子と青柳康夫, *日本食品科学工学会誌*, **53**, 459-465 (2006).

第 2 章

ACE 阻害活性におけるマンネンタケ水抽出物の特徴

2-1 緒言

前章において、マンネンタケ抽出物が ACE 阻害活性を有することを述べてきたが、これら既往の研究は、抽出方法や活性測定条件が異なることから一概に比較することはできない。また、マンネンタケにおいても各種抽出方法の比較や熱、pH に対する安定性などその詳細に関する研究は乏しい。そこで本章では、ACE 阻害活性におけるマンネンタケ水抽出物の特徴を明らかにすることを目的とした。マンネンタケ子実体水抽出物を用いて、モデル動物における血圧変動、ACE 阻害活性、抽出温度の違いによる ACE 阻害活性、様々なきのこ子実体水抽出物との ACE 阻害活性を比較した。さらにマンネンタケは菌株や生育条件の違いにより、その機能性が異なることが知られている。菌糸体および子実体のメタノール抽出物は菌株により、5 α -リダクターゼ阻害活性が異なること¹⁾や培地基材の違いにより総フェノール含量に差が生じること²⁾などが報告されている。そこで菌株および培地基材の違いが ACE 阻害活性に与える影響について調べた。さらに水抽出物の熱および pH 安定性、ACE に対する阻害様式の解明をおこなった。

2-2 実験方法

2-2-1 モデル動物を用いた血圧測定

本態性高血圧症におけるマンネンタケ子実体水抽出物の影響を検討するために、雄性 15 週齢の自然発症高血圧ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR/NCrlCrlj 日本チャールズリバー (株)) を用いて単回ゾンデ投与による血圧の変動を測定した。SHR の生育条件は、温度 $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\%\pm 10\%$ 、明期 (7:00-19:00)、暗期 (19:00-7:00) とした。環境条件に適応させるために予備飼育期間として、5 週齢からすべての実験動物に市販飼料 (MF 粉末、オリエンタル酵母工業 (株)) と水道水を自由摂取させた。予備飼育後、15 週齢まで血圧上昇を促進するため、MF 粉末に対して塩化ナトリウムを 8% (w/w) 添加した飼料を与えた。実験開始前に、収縮期血圧の平均値がほぼ一定になるように群分けをおこなった。

子実体乾燥粉碎物 4 g を水 200ml で 80°C 、1 時間抽出し、抽出液を凍結乾燥させたもの水道水に再溶解し、ゾンデ針を用いて 1ml (0.4g / 100ml) 強制経口投与した。血圧測定は、非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A (株) ソフトロン) を使用し、各試験動物を 38°C の加温機中で数分間加温して順応させて後、測定をおこなった。測定時間ごとに 3 回測定をおこない、収縮期血圧 (最大血圧) の平均値を記録した。なお血圧の測定は一定温度と湿度が保たれた室内でおこなった。

2-2-2 水抽出物の ACE 阻害活性測定

1) 試料調製

(有) 村田産業において栽培されたマンネンタケ乾燥子実体を、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎し、得られた子実体粉碎物 5g を超純水 100ml に浸漬し、80°C で 2 時間抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たる液を凍結乾燥し、水抽出物とした。水抽出物を 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解したものを試料とした。

2) HPLC を用いた ACE 阻害活性測定

ACE 阻害活性測定法は、Cushman と Cheung が開発した酵素反応条件³⁾に、Horiuchi らが設定した HPLC を用いた生成物定量法⁴⁾を組み合わせおこなった (Scheme. 2-1) 。100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解したウサギ肺由来 ACE (最終濃度 10mU/ml) に試料および NaCl 水溶液 (最終濃度 250 mM) を添加し、混合液とした。混合液を 37°C で 5 分間予備加温し、基質のヒプリルーヒスチジルローイシン (HHL 最終濃度 3mM) を加え、酵素反応をスタートさせた。HHL の最終濃度は、HHL に対する $K_m=1.3\text{mM}$ であることから酵素反応速度が最大速度 V_{max} となる 3mM とした。反応液を 37°C で 60 分間インキュベートした後、1 M HCl を加え、反応を停止させた。反応液中に遊離した馬尿酸 (HA) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した (Fig. 2-1) 。定量に用いた HPLC の条件を以下に示す。カラムは INERTSIL ODS-3 culum (ジールサイエンス (株)) を使用し、カラム温度は室温とした。移動相はメタノールおよび 10mM KH_2PO_4 の 1:1 混合液とし、溶出は流速 0.5ml/min でおこなった。また、生成物の定量は 228nm の吸光度で検出をおこなった。さらに ACE 阻害率の算出は以下の式でおこなった。

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A: 試料溶液を用いたときの馬尿酸ピーク面積値、 B: 試料溶液の代わりに 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) を添加したときの HA ピーク面積値とした。つまり、試料溶液の代わりに 100mM ホウ酸緩衝液を用いたものを阻害率 0%として、実験ごとに測定をおこない、ピーク面積値の減少率を阻害活性率とした。

Sample(10 μ l)

60mU/ml ACE from rabbit lung * (20 μ l)

1M NaCl (30 μ l)



37°C for 5min

Addition of substrate (6mM HHL* 60 μ l)



37°C for 60min

Addition of 1M HCl (60 μ l)



detection of product (HA)
by reversed-phase-HPLC analysis

HPLC analysis

Analytical column...INERTSIL ODS-3 culum (GL Sciences Inc.)

Mobile phase... methanol : 10mM KH₂PO₄=1:1

Adjust to pH 3.0 with phosphoric acid

Flow-rate...0.5ml/min

Detection method...absorbance at 228nm

*dilute 100mM Boate Buffer pH8.3

Scheme. 2-1 Assay of ACE inhibitory activity.

A mixture containing NaCl (final concentration of 250mM), ACE from rabbit lung(final concentration of 10mU/ml) and the sample solution was preincubated for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by adding Hip–His–Leu (final concentration of 3mM), and terminated after 60 min of incubation by adding 1M HCl. Liberated hippuric acid (HA) was determined by High Performance Liquid Chromatography.

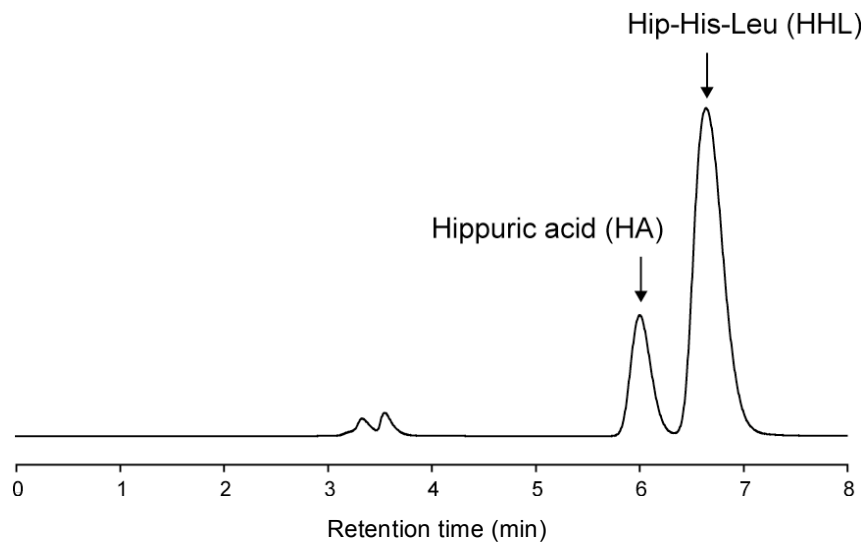


Fig. 2-1 Chromatogram of hippuric acid by RP-HPLC analysis.

Chromatogram was recorded at 228nm. Hippuric acid eluted at 6min. It could be clearly separated from the other peaks. ACE inhibitory activity determined by peak area of hippuric acid.

2-2-3 水温の違いによる抽出物の ACE 阻害活性測定

1) 試料調製

(有) 村田産業において栽培されたマンネンタケ乾燥子実体を、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎し、得られた子実体粉碎物 5g を超純水 100ml に浸漬し、25℃で 24 時間、80℃で 2 時間、そして 4℃で 24 時間、それぞれ抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たる液を凍結乾燥し、水抽出物とした。水抽出物を 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解したものを試料とした。

2) HPLC を用いた ACE 阻害活性測定

ACE 阻害活性は、2-2-2 の方法を用いて測定した。また、得られた阻害率と試料濃度の関係から近似曲線を作成し、阻害率 50%の濃度 (IC₅₀ 値) を求めた。

2-2-4 様々なきのこ子実体水抽出物の ACE 阻害活性測定

1) 供試菌株

マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*)、タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*)、トキイロヒラタケ (*Pleurotus djamor*)、ヤナギマツタケ (*Agrocybe cylindracea*)、ヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*) は、(有) 村田産業において栽培された子実体を用いた。カワラタケ (*Coriolus versicolor*) は、(株) 日健総本社において栽培された乾燥子実体を用いた。ヒメマツタケ (*Agaricus blazei*) は、(株) 日本バイオにおいて栽培された乾燥子実体を用いた。アワビタケ (*Tyromyces zonatus*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*)、キクラゲ (*Auricularia auricula*)、シイタケ (*Lentinula edodes*)、ツクリタケ (*Agaricus bisporus*)、ナメコ (*Pholiota nameko*)、バイリング (*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*)、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) そしてブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) は、市販の子実体を用いた。

2) 試料調製

生子実体は 40-60℃で熱風乾燥し、乾燥子実体 (40-60℃熱風乾燥処理済み) はそのまま、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎した。得られた子実体粉碎物 5g を超純水 100ml に浸漬し、室温で 24 時間抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たろ液を凍結乾燥し、水抽出物とした。水抽出物を 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解したものを試料とした。

3) ACE 阻害活性測定

ACE 阻害活性は、2-2-2 の方法を用いて測定した。

2-2-5 菌株採取

菌株の違いによる ACE 阻害活性を測定するために、マンネンタケを群馬県高崎市内より 3 菌株 (M-0601, M-0602, M-0604) 、京都府京都市内より 1 菌株 (E-8401) 採取し、供試菌株とした。

2-2-6 木粉を利用したマンネンタケ子実体人工栽培

コナラ (*Quercus serrata*) 木粉またはウメ (*Prunus mume*) 木粉および栄養剤 (フスマ) を重量比で 5:1 の割合で混合し、含水率 65% に調整した培地をポリプロピレン (PP) ビン (850ml) に約 650g 充填し、滅菌、放冷した後、種菌を接種し人工栽培を試みた (n=40) 。種菌を接種した菌床は、室内温度 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、室内湿度 45-90% 環境下で直射日光を遮断し、42 日間培養した。その後、野外の栽培施設において、ビン上部を解放、覆土し、発茸操作をおこなった。菌床には直射日光を遮断するために寒冷紗 (80% 遮光) を設置し、解放系による栽培をおこなった。収穫時期は種菌を播種後、76 日目とした。

2-2-7 菌株と培地基材の異なる水抽出物の ACE 阻害活性測定

人工栽培初回の収穫で得られたマンネンタケ子実体を $40-60^{\circ}\text{C}$ で熱風乾燥した後、ワンドーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎し、マンネンタケ乾燥子実体粉末 5g を超純水 100ml に浸漬し、室温で 24 時間抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たる液を凍結乾燥したものを水抽出物とした。水抽出物を 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解したものを試料とした。ACE 阻害活性は 2-2-2 の方法を用いて測定した。

2-2-8 水抽出物の熱および pH 処理

1) 試料調製

(有) 村田産業において栽培されたマンネンタケ乾燥子実体を、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎し、得られた子実体粉碎物 5g を超純水 100ml に浸漬し、室温で 24 時間振とう抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たる液を凍結乾燥し、水抽出物とした。

2) 水抽出物の熱処理

0.5% (w/v) 水抽出物溶液 (水抽出物 1mg を 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) 200ml に溶解) を、IWAKI Thermo Alumi Bath ALB-121 (旭テクノガラス (株)) を用いて、60、80、100、120、140°C で 1 時間インキュベートした。ACE 阻害活性は 2-2-2 の方法に従い測定し、25°C で 1 時間インキュベートした処理区の阻害活性を 100% として、相対活性として結果を評価した。

3) 水抽出物の pH 処理

水抽出物を各種緩衝液に溶解し、1 時間室温で処理した。本実験に用いた各種緩衝液を Table. 2-1 に示す。処理後、3 倍量の 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) を加え、HCl および NaOH を用いて pH を 8.3 に調整した。そして、調整した 1.0% (w/v) 水抽出物水溶液を用いて ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害活性は 2-2-2 の方法に従い測定し、100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解し、1 時間室温で処理した区の阻害活性を 100% として、相対活性として評価した。

Table. 2-1 List of treatment buffer system for pH test of the water extracts.

Buffer system	Concentration	pH
Na-Citrate	100mM	3.0
Na-Citrate	100mM	4.0
Na-Acetate	100mM	5.0
Na-Acetate	100mM	6.0
HEPES	100mM	7.0
EPPS	100mM	8.0
Na-Borate	100mM	8.3
CHES	100mM	9.0

2-2-9 阻害様式の解析

1) 試料調製

(有) 村田産業において栽培されたマンネンタケ乾燥子実体を、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎し、得られた子実体粉碎物 5g を超純水 100ml に浸漬し、室温で 24 時間振とう抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たる液を凍結乾燥し、水抽出物とした。水抽出物を 100mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に溶解したものを試料とした。

2) 阻害様式の解析

水抽出物の阻害様式は、基質濃度と反応速度の Lineweaver-Burk プロットにより解析した。マンネンタケ水抽出物の最終濃度を 0、83.3、166.7、416.7 $\mu\text{g/ml}$ 、基質最終濃度を 0.5、1、2、3mM とし、それぞれを組み合わせた反応試験区を用いて、2-2-2 の方法に従い、ACE 阻害活性を測定した。反応速度は、1 秒間に生成される馬尿酸量とし、絶対検量線法を用いて馬尿酸の定量をおこなった。それぞれの濃度において、2 回ずつ測定したピーク面積値を求め、その平均値から近似直線を求め、検量線とした。 K_i 値は、Lineweaver-Burk 二次プロットより導いた。

2-3 結果

2-3-1 水抽出物単回経口投与による血圧値の変動

マンネンタケ子実体水抽出物を用いて、自然発症高血圧ラット (SHR) への単回強制経口投与をおこなった。その結果を Fig. 2-2 に示す。収縮期血圧 (最大血圧) は、投与前では 216mmHg を示している。30 分後には 210mmHg、1 時間後には 194mmHg、2 時間後には 197mmHg、3 時間後には 193mmHg と血圧値の低下を示している。さらに 6 時間後には 188mmHg と最も低い値を示した。12 時間後には、193mmHg と上昇が確認され、24 時間後には 209mmHg、48 時間後には 215mmHg となった。血圧値の変動幅がもっとも大きかったのは、投与後 30 分から 1 時間の間で、血圧値は 16mmHg 低下した。

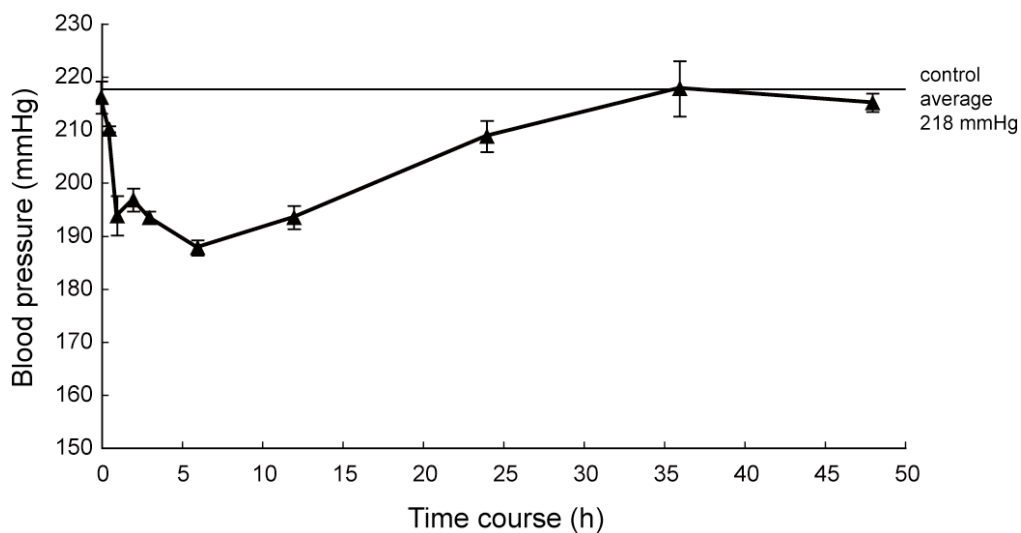


Fig. 2-2 Effect of water extract from *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure in spontaneous hypertension rat (SHR).

Effects of *G.lucidum* dried fruit bodies extract on hypertension were examined. Dried fruit bodies (4 g) was extracted with 200ml of hot water (80-90°C) for 1h. The extracts were concentrated to dryness. The concentrated extracts (4mg) were dissolved in distilled water (1ml). The extracts were used to treat 15-week-old SHR. Blood pressure in untreated SHR is shown as the control average (218 mmHg). Bar=S.E. (n=3).

2-3-2 水抽出物の ACE 阻害活性

きのこ抽出物の高血圧抑制作用に広く用いられている水抽出方法⁵⁻⁹⁾を用いて、マンネンタケ子実体水抽出物の ACE 阻害活性を測定した。その結果を Fig. 2-3 に示す。その結果、すべての濃度で ACE 阻害活性が確認された。ACE 阻害活性は、水抽出物濃度 83 μ g/ml で 20.8%、417 μ g/ml で 48.0%、そして、833 μ g/ml で 66.3%と濃度依存的であった。

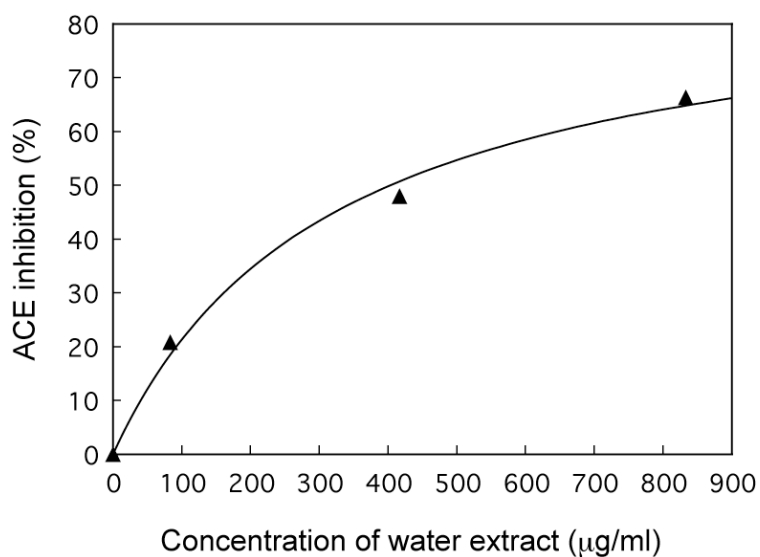


Fig. 2-3 ACE inhibitory activity of water extract from *Ganoderma lucidum*.

Increase of ACE inhibitory activity depend on the concentration of water extract from *G.lucidum* dried fruit bodies.

2-3-3 水抽出温度と ACE 阻害活性

水抽出温度を検討し、抽出温度の決定をおこなった。抽出温度および時間条件は、実用性の観点およびこの機能性試験に多く利用されている条件とした。水抽出物における ACE 阻害活性が Fig.2-3 より、濃度依存的であることから、阻害濃度 50%となる IC₅₀ 値を求めた。IC₅₀ 値は、薬理学研究において、阻害効果が 50%となる実験系内での阻害剤濃度である。本研究において、IC₅₀ 値は水抽出物が ACE の酵素反応を半数阻害するために必要な水抽出物の濃度を示しており、より低い値を示すものは阻害剤としての活性がより強いことを示す。その結果を Table.2-2 に示す。ACE 阻害活性の IC₅₀ 値は、4°C抽出物で 421 μ g/ml、25°C抽出で 197 μ g/ml、そして、80°C水抽出では、404 μ g/ml であり、25°C抽出物においてもっとも高い ACE 阻害活性が確認された。また、合成薬剤であるカプトプリルの IC₅₀ 値は、4.9nM であった。一方、それぞれの温度条件での抽出物収量 (重量) は、抽出に用いた子実体粉碎物重量を 100%として、4°C抽出 3.98 \pm 0.44%、25°C抽出 3.99 \pm 0.15%、80°C抽出 3.51 \pm 0.61%であり、抽出物収量に 3 種の抽出温度間で大きな差はなかった。これらの結果から、マンネンタケ子実体水抽出物の抽出温度を 25°Cと定めた。

Table. 2-2 Effects of extraction temperature and time on ACE inhibitory activity of water extract.

Extraction		ACE inhibition IC ₅₀ (μ g/ml)	Extracts yield % (w/w)
Temperature($^{\circ}$ C)	Time(h)		
4	24	421	3.98 \pm 0.44
25	24	197	3.99 \pm 0.15
80	2	404	3.51 \pm 0.61

\pm =S.E. n=3

2-3-4 様々なきのこ子実体水抽出物の ACE 阻害活性

前述の条件で得た様々なきのこ乾燥子実体の水抽出物 ACE 阻害活性を比較した。その結果を Fig. 2-4 に示す。最も高い阻害活性を示したのは、ハタケシメジ(*L. decastes*)で 71.9%あった。ついでキクラゲ(*A. auricula*)で 69.6%、マンネンタケ(*G. lucidum*)で 57.4%の順であった。以下、カワラタケ(*C. versicolor*)で 45.2%、シイタケ(*L. edodes*)で 44.3%、バイリング(*P. nebrodensis*)で 33.8%、マイタケ(*G. frondosa*)で 32.7%、ヤナギマツタケ(*A. cylindracea*)で 29.7%と続いた。最も阻害活性が低いものは、ツクリタケ(*A. bisporus*)で 14.7%あった。次いでブナシメジ(*H. marmoreus*)で 16.0%、ヒメマツタケ(*A. blazei*)で 18.9%あった。マンネンタケは、他のきのここと比較しても、高い阻害活性を保持していることが明らかとなった。

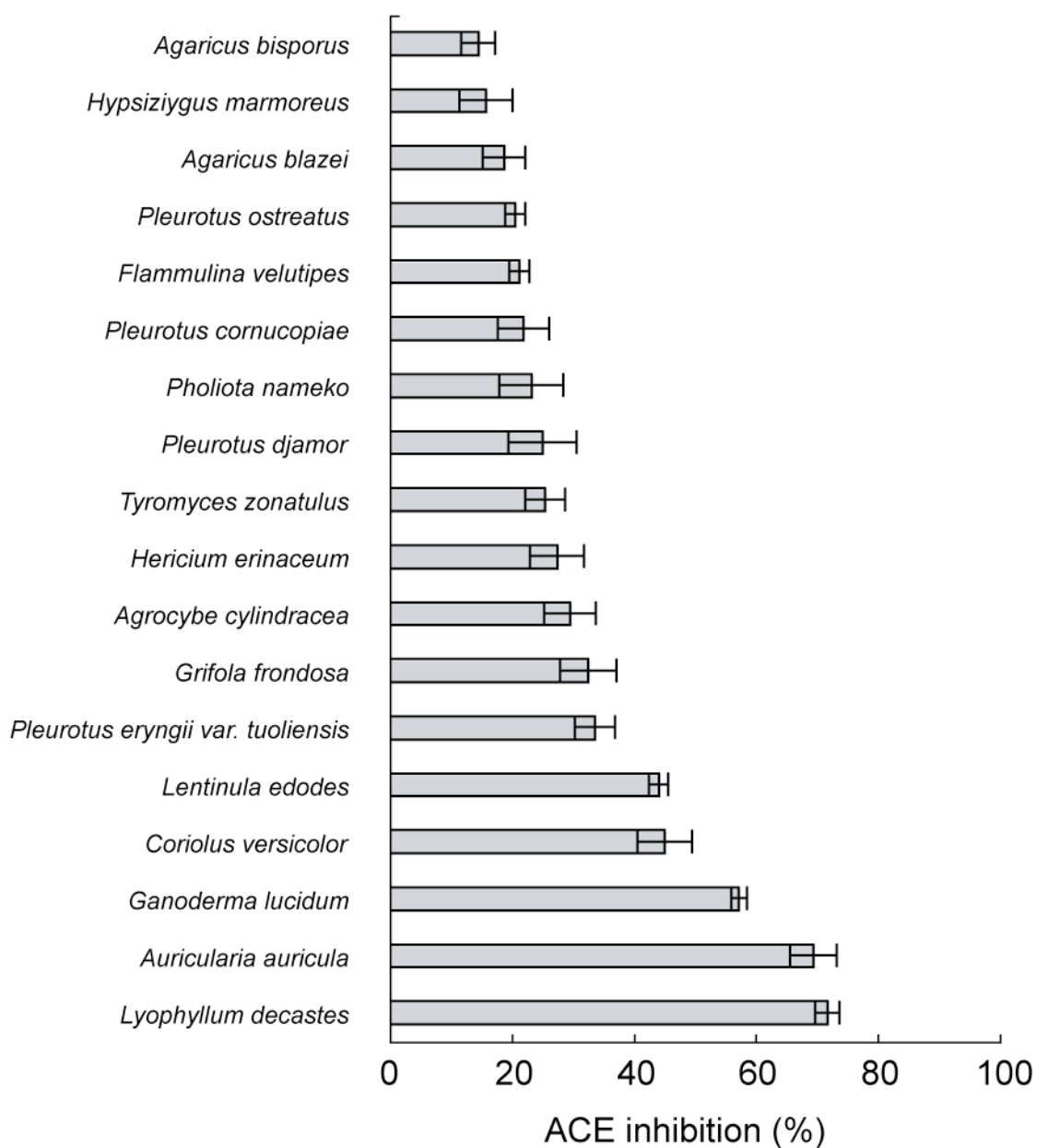


Fig. 2-4 ACE inhibitory activities of water extracts from mushroom of various fungal species.

ACE inhibitory activity for various mushrooms were measured by using these fruiting bodies on the market. Dried and crushed fruiting bodies were extracted with water (25°C) for 24h. The extracts were freeze-dried as water extracts. The water extracts were dissolved in 100mM borate buffer. Final concentration of each water extract for detection of ACE inhibitory activity is 417µg/ml. Bar=S.E. (n=3).

2-3-5 ACE 阻害活性における菌株および培地基材依存性

4 菌株、2 種類の木粉培地を用いて人工栽培し、得られたマンネンタケ子実体水抽出物の ACE 阻害活性を測定した。その結果を Table. 2-3 に示す。ウメ木粉を培地基材として栽培したマンネンタケの IC₅₀ 値は、795µg/ml (E-8401 株)、547µg/ml (M-0601 株)、1250µg/ml (M-0602 株)、279µg/ml (M-0604 株) であった。この結果より、M-0604 株は、ACE 阻害活性性能のもっとも高い菌株であることが明らかとなり、M-0601 株がこれに続いた。このことから菌株により ACE 阻害活性性能に差が生じることが確認された。一方、コナラ木粉を培地基材として栽培したマンネンタケ E-8401 株および M-0601 株由来の子実体抽出物の ACE 阻害活性 IC₅₀ 値は、943µg/ml (E-8401 株)、436µg/ml (M-0601 株) であった。この両菌株においては、ウメ、コナラ間で ACE 阻害活性性能は同程度であり、大きな差異は確認されなかった。

Table. 2-3 Comparison of ACE inhibitory activities of water extracts from several different strains cultivated in *Quercus serrata* or *Prunus mume* wood medium.

Basal culture	Strain	ACE inhibitory activity IC ₅₀ (µg/ml)*	Yield (%)
<i>Quercus serrata</i>	E-8401	943	9.28
	M-0601	436	7.32
<i>Prunus mume</i>	E-8401	795	11.82
	M-0601	547	8.35
	M-0602	1250	9.46
	M-0604	279	8.31

*The concentration of ACE inhibitor required to inhibit 50% of the ACE activity under the assay conditions was defined as IC₅₀.

2-3-6 水抽出物の熱および pH 安定性

マンネンタケ子実体水抽出物の熱および pH 安定性を確認した。熱に対する安定性を知るために水抽出物を各温度条件で 1 時間処理した。その結果を Fig.2-5 (A) に示す。25°Cでの ACE 阻害活性を 100%としたとき、60°Cでは 93.6%、100°Cでは 88.7%、140°Cでも、87.7%の相対活性が保持された。次に pH 条件に対する安定性を知るために水抽出物を 25°C、各 pH 条件で 1 時間処理した。その結果を Fig.2-5 (B) に示す。pH8.3 における阻害活性を 100%としたとき、pH3.0 では 95.4%、pH6.0 では 100%そして pH9.0 では 94.1%の相対活性を保持された。以上のことから、マンネンタケ水抽出物中に存在する ACE 阻害活性成分は、熱ならびに pH に対して安定な物質であることが示された。

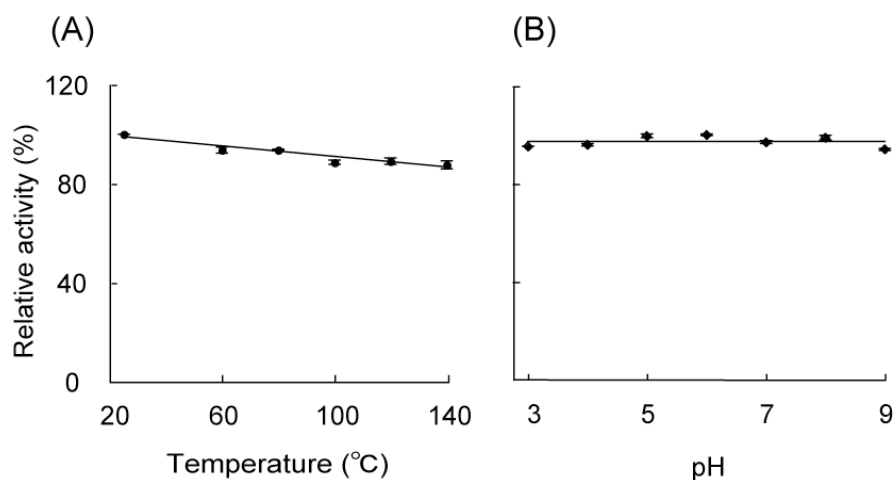


Fig. 2-5 Temperature and pH stability of water extract on ACE inhibitory activity.

Water extract was incubated for 1 hour in individual conditions. (A) Temperature stability; (B) pH stability. Bar=S.E. (n=3).

2-3-7 水抽出物の阻害様式と K_i 値

水抽出物の阻害様式を Lineweaver-Burk プロットにより解析した。その結果、Fig. 2-6 に示す。Lineweaver-Burk プロットにより得られた近似直線と Y 軸との交点は $1/V_{\max}$ を示し、X 軸との交点は $-1/K_m$ を示す¹⁰⁾。添加した水抽出物の濃度上昇において、それぞれの近似直線と Y 軸との交点 ($1/V_{\max}$) の値はほとんど変化がないが、 K_m は増大している。この見かけの K_m を、 K_m^{app} として整理すると、水抽出物の濃度上昇にともない V_{\max} の値は変化しないが、 K_m^{app} は増加することがわかる。この変化は、拮抗阻害剤の特徴であり、このことからマンネンタケ水抽出物が ACE に対して拮抗阻害を示すことが明らかとなった。さらに Lineweaver-Burk プロットのそれぞれ水抽出物濃度の傾きを 2 次プロットし、近似直線を作成し、 K_i を求めた。IC₅₀ 値は、前述のように阻害濃度 50%となる水抽出物 (阻害剤) 濃度であるが、この値は基質濃度条件に依存した値であり、生体内での薬理効果に用いられる値である。本研究で対象としている ACE は酵素であり、水抽出物の阻害作用は酵素阻害反応であることから、酵素-阻害剤複合体から阻害剤が解離するときの定数である阻害定数 K_i ¹⁰⁾ を求めた。 K_i は、 $K_i = [E][I] / [EI]$ で表され、酵素に対する阻害剤の親和性を表すものである¹¹⁾。 K_i の値が小さいほど、酵素と基質との結合を効果的に阻害する。Lineweaver-Burk 二次プロットにより得られた近似直線と X 軸の交点は $-K_i$ を示す。その結果、マンネンタケ水抽出物の ACE 阻害に対する K_i 値は 121 $\mu\text{g/ml}$ であった。

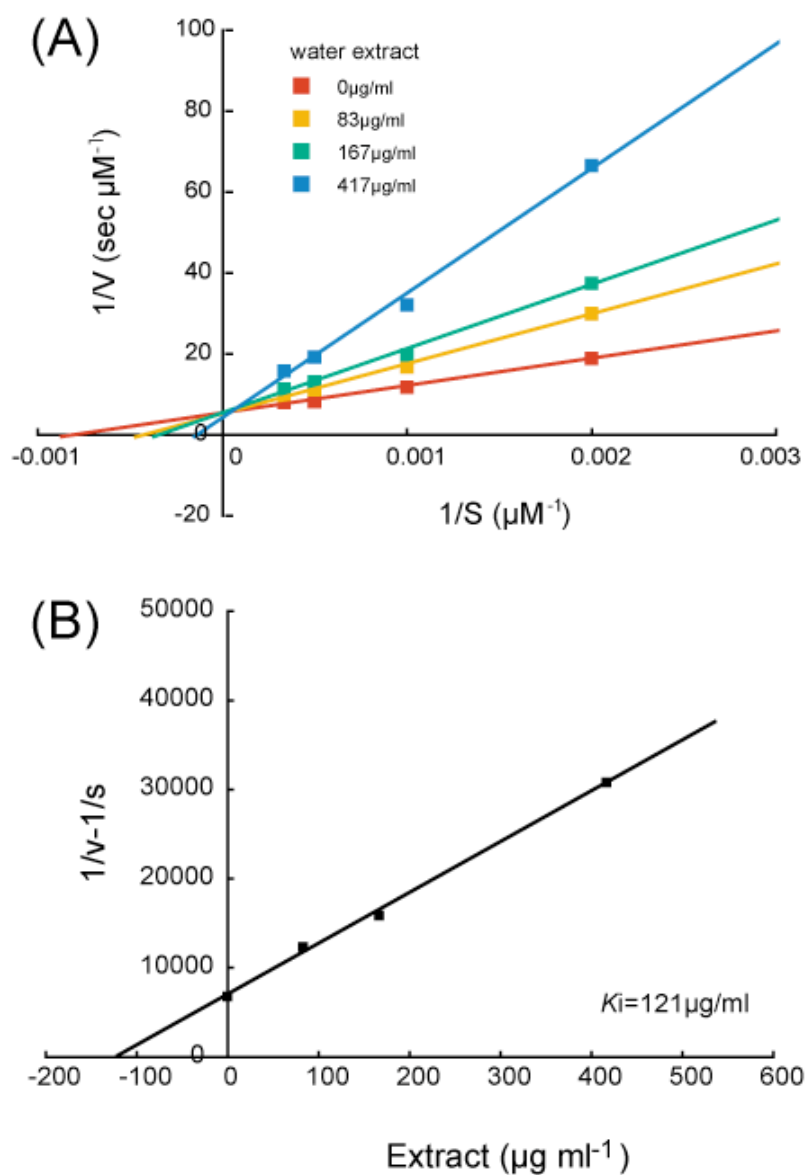


Fig. 2-6 Lineweaver-Burk plot of ACE activity in the presence of water extract.

The Lineweaver–Burk plots at varying concentrations of water extract were straight lines of different slope intersecting at common intercept on the y-axis that indicates competitive inhibition. (A) Lineweaver-Burk plot. (B) Secondary plot of Lineweaver-Burk plot. These plots indicated slope of each lines from Lineweaver-Burk plots.

2-4 考察

モデル動物を用いた単回強制経口投与による血圧降下作用の結果 (Fig. 2-2)、収縮期血圧 (最大血圧) における血圧値の低下が確認された。投与方法が、強制経口投与方法によるものであることから、水抽出物は胃や腸での消化を受け、おもに腸管から吸収されたものと考えられた。血圧値の低下には、ACE 活性の阻害をはじめ、血管拡張作用や利尿作用、血管平滑筋のカルシウム依存性の収縮抑制、交感神経系の α 、 β 受容体の遮断など複数の作用機序が考えられる¹²⁾。

モデル動物を用いたマンネンタケ血圧降下作用に着目すると、有地らが子実体熱水抽出エキスの単回投与により、Wistar 系ラットおよび自然発症高血圧ラット (SHR) おいて緩和な血圧降下作用を示すことを報告しているが、その作用機序の解明には至っていない⁷⁾。Kabir らは、液体培地で培養した菌糸 5% 含む飼料を与えた自然発症高血圧ラット (SHR) の血圧が 4 週間後には有意に抑制されることを確認し、同時に血漿および肝臓中のコレステロール低下を引き起こすことを確認しているが、詳細なメカニズムの解明には至っていない¹³⁾。Lee らはウサギやラットを用いた実験で、菌糸体水抽出物は心拍数を低下させることなく、交感神経の活動を抑えることで降圧効果を示していると報告している¹⁴⁾。本研究における血圧降下作用は数時間で発生しており、Kabir らの長期投与による血圧降下作用とは異なるものと考えられた。また、Lee らの報告も菌糸体抽出物によるものであることから、同様の作用機序であるのかは判断できない。

マンネンタケ以外のきのこ抽出物の単回経口投与による *in vivo* での血圧降下作用に着目すると、苔庵らはハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*) 子実体熱水抽出物が、自然発症高血圧ラット (SHR) の血圧降下を引き起こし、血圧値は投与前に比べ、1.5 時間後には 23mmHg 降下し、4 時間後には 50mmHg の降下することを確認している¹⁵⁾。

この抽出物は、ACE 阻害活性を有することから¹⁶⁾、これらの降下作用が ACE 阻害活性によるものであると推察している。坂元らは、ブナハリタケ (*Mycoleptodonoides aitchsonii*) 子実体水抽出物が投与後 6 時間の点において、自然発症高血圧ラット (SHR) の血圧降下を引き起こし、抽出物から同定されたイソロイシルチロシンは ACE 阻害活性を示し、さらにそれらは血圧降下作用を示すことから、降下作用が ACE 阻害活性によるものであるとしている¹⁷⁾。本研究結果 (Fig. 2-2) においても、投与開始から数時間で血圧が低下している。この結果は、上記のハタケシメジ、ブナハリタケ抽出物と同様の傾向を示しており、マンネンタケ水抽出物が大動脈中の ACE 活性の低下を招き、その結果として血圧低下を引き起こした可能性が考えられる。

マンネンタケ子実体水抽出物の ACE 阻害活性 (Fig. 2-3) の結果から、水抽出物は濃度依存的に ACE を阻害することが明らかとなり、水抽出物には、血圧上昇機構に関係する ACE 阻害活性とモデル動物の血圧降下の双方において、その効果が確認された。

抽出温度を検討した結果 (Table. 2-2)、25°C抽出物にもっとも高い ACE 阻害活性が確認された。この結果から、ACE 阻害活性においては、常温抽出が適していることが明らかとなった。抽出時の温度が低温 (4°C) や高温 (80°C) において、ACE 阻害活性が低いことは、タンパク質や酵素など熱による影響を受けやすい物質が ACE 阻害活性に関与していることが考えられた。また、各温度での抽出物収量 (重量) に差がないことから、ACE 阻害活性を示す抽出液中の親水性溶質が温度条件によって、過分解し、その活性を変化させていることも考えられた。本研究の結果は、Choi らのマンネンタケ子実体水抽出物は、100°Cよりも 25°Cでの抽出物のほうが、ACE に対する阻害活性が高い¹⁸⁾との報告と同様であり、水抽出においては、菌株間を超えて常温での抽出が有効であることを示している。

様々なきのこ子実体水抽出物の ACE 阻害活性の結果 (Fig. 2-4) から、マンネンタケは、他のきのここと比較しても、高い阻害活性を示した。ただし、この結果は、本研究

で利用した子実体での結果であり、生活環、菌株、生育条件や培地基材により、活性に変化が生じる可能性はある。しかしながら、最も高い阻害活性を示したハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*) 子実体は、水抽出物、エタノール抽出物^{16,19)}や70%アセトン抽出物²⁰⁾でも高い阻害活性が報告されており、ハタケシメジ子実体水抽出物およびエタノール抽出物中の ACE 阻害成分は、蛋白質もしくはペプチドであること報告されている。マンネンタケ子実体においても、水抽出¹⁸⁾や70%アセトン抽出物²⁰⁾で高い阻害活性を示すことが報告されていることから、マンネンタケがきのこ子実体間において、比較的 ACE 阻害活性の高いきのこであることが明らかとなった。

マンネンタケ菌株が ACE 阻害活性に与える影響を確認するために菌株を採取し、人工栽培により子実体を得た。それら子実体水抽出物を用いて菌株の違いによる ACE 阻害活性を測定した結果 (Table. 2-3)、マンネンタケ子実体水抽出物の ACE 阻害活性は、菌株依存性が高いことが明らかとなった。この結果は、2 種の異なる菌株の栽培により得られた子実体水抽出物での ACE 阻害活性の差異²¹⁾と同様、マンネンタケ水抽出物の ACE 阻害活性は、菌株依存性が高いことが示唆された。マンネンタケ以外のきのこにおいても、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) は、菌株の違いが ACE 阻害活性に影響することが知られている²²⁾。しかし、ACE 阻害活性を菌株間で比較した報告の中には、その栽培条件まで統一されているかは不明なことが多く、菌株間での薬理効果の比較は、本研究同様、同一条件下における栽培と機能性試験による評価が必要不可欠であると考えられた。

一方、培地基材の違いにおける ACE 阻害活性の結果から、子実体水抽出物の ACE 阻害活性にウメ、コナラ間での培地基材依存性は確認されなかった。これはマンネンタケと同じヒダナシタケ目に属するツガサルノコシカケ (*Fomes pinicola*) において、ウメ、ケヤキ間で降圧降下に差がないことと類似した結果であった⁸⁾。

水抽出物の熱および pH 安定性の結果 (Fig. 2-5) から、マンネンタケ水抽出物中に含

まれる ACE 阻害成分は広範囲の熱や pH 条件に対して安定した物質であると考えられる。しかしながら、抽出温度を検討した結果 (Table. 2-2) では、抽出時の温度により阻害活性が大きくことになっており、これらの結果から抽出において、酵素反応などの作用により、生成された生成物が ACE 阻害活性を示し、一度生成された生成物は熱や pH に対して安定的であることが考えられた。

水抽出物の阻害様式を解析した結果 (Fig. 2-6)、マンネンタケ水抽出物は、ACE に対して拮抗阻害を示すことが明らかとなった。酵素阻害の様式には、拮抗型、非拮抗型、不拮抗型、そして、それらの混合型に分類される¹¹⁾。拮抗阻害は、基質と結合していない遊離の酵素にのみ阻害剤が反応し、酵素の活性部位に阻害剤が結合することで基質の結合を妨げる阻害の様式である。阻害剤の多くは、アロステリック酵素の場合を除き、基質に類似した構造をもつ基質アナログである¹⁰⁾。ACE はペプチドを基質としており、きのこ子実体水抽出物由来の ACE 阻害ペプチド^{18, 22)}や食品由来の ACE 阻害ペプチドの多くは拮抗阻害であることが知られている²³⁻²⁵⁾ことから、マンネンタケ水抽出物の場合においても、ペプチドが関与している可能性が考えられる。また、本研究の結果は、マンネンタケ子実体 n-ヘキサン抽出物残渣水抽出物が拮抗阻害を示すことと同様であり²¹⁾、マンネンタケ子実体に含まれる親水性画分が菌株や生育条件に関わらず拮抗阻害を示すことが明らかとなった。

本章の結果から、マンネンタケ水抽出物は、単回投与により、モデル動物の血圧を降下させ (Fig. 2-2)、さらに ACE 阻害活性を示すこと (Fig. 2-3)、他のきのこ抽出物間でも高い ACE 阻害活性を示すこと (Fig. 2-4)、ACE 阻害活性は菌株依存性が高いこと (Table. 2-3)、水抽出物は、ACE 阻害活性において広範囲の熱および pH 条件で安定的であること (Fig. 2-5)、阻害様式は拮抗阻害を示すこと (Fig. 2-6) が明らかとなった。

引用文献

- 1) J. Liu, R. Fujita, M. Sato, K. Shimizu, F. Konishi, K. Noda, S. Kumamoto, C. Ueda, H. Tajiri, S. Kaneko, Y. Suimi and R. Kondo, *J Wood Sci*, **51**, 189-92 (2005).
- 2) Y. Takai, H. Kikuzaki, K. Akiyama, B. Kohno, T. Tujita, M. Nakazawa, M. Ueda, N. Nakatani and K. Miyatake, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **12**, 113-8 (2004).
- 3) D. W. Cushman and H. S. Cheung, *Biochem Pharmacol*, **20**, 1637-48 (1971).
- 4) M. Horiuchi, K. Fujimura, T. Terashima and T. Iso, *J Chromatogr*, **233**, 123-30 (1982).
- 5) 宮澤紀子, 江口文陽, 大賀祥治, 須藤賢一, *日本きのこ学会誌*, **13**, 181-187 (2005).
- 6) 有地滋, 上原清史, 上野隆, 河井洋, 谷勲, 長谷初恵, 仕垣勝治, 谿忠人, 久保道德, 桐ヶ谷紀昌, *基礎と臨床*, **13**, 4245-53 (1979).
- 7) 有地滋, 谿忠人, 久保道德, 松田秀秋, 吉村成年, 桐ヶ谷紀昌, *基礎と臨床*, **13**, 4239-44 (1979).
- 8) 本田進, 掛樋一晃, 岡本耕造, 三宅英夫, 飯塚義富, 村上哲男, *近大医誌*, **4**, 93-96 (1979).
- 9) 江口文陽, 渡辺泰雄, 張俊, 宮本康嗣, 吉本博明, 福原富男, 桧垣宮都, *和漢医薬学雑誌*, **16**, 201-7 (1999).
- 10) H. R. Horton, L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn and K. G. Scrimgeour, "ホートン 生化学 (原著第2版)," 東京化学同人, 東京, 1998.
- 11) 高河原勇, "蛋白質・酵素の基礎実験法," 南江堂, 東京, 1981.
- 12) 日和田邦男, *からだの科学*, **211**, 79-83 (2000).
- 13) Y. Kabir, S. Kimura and T. Tamura, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **34**, 433-8 (1988).
- 14) S. Y. Lee and H. M. Rhee, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **38**, 1359-64 (1990).
- 15) 苔庵泰志, 西井孝文, 古市幸生, *日本食品科学工学会誌*, **49**, 126-129 (2002).
- 16) 卯川裕一, 安藤雅之, 古市幸生, 久松真, 苔庵泰志, 西井孝文, *日本食品科学工学会誌*, **48**, 58-63 (2001).
- 17) Y. Sakamoto, A. Takeuchi, T. Sato, K. Obara, K. Takai, K. Fujino, T. Hirose and Y. Inagaki, *Pharmacometrics*, **61**, 221-9 (2001).
- 18) H. Choi, S., H. Cho, Y., H. Yang, C., K. Ra, S. and H. Suh, J., *Food Research International*, **34**, 177-82 (2001).
- 19) 伊澤華子と青柳康夫, *日本食品科学工学会誌*, **53**, 459-465 (2006).
- 20) 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, *J. Hokkaido For Prod. Res. Inst.*, **14**, 10-5 (2000).

- 21) M. Aoyama, S. Saito, M. Kiyoto, I. Togashi, T. Hara, Y. Yagi, T. Kimura and S. Yoneyama, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **15**, 91-6 (2007).
- 22) D. H. Lee, J. H. Kim, J. S. Park, Y. J. Choi and J. S. Lee, *Peptides*, **25**, 621-7 (2004).
- 23) K. Katayama, H. E. Anggraeni, T. Mori, A. M. Ahhmed, S. Kawahara, M. Sugiyama, T. Nakayama, M. Maruyama and M. Muguruma, *J Agric Food Chem*, **56**, 355-60 (2008).
- 24) A. Quiros, M. del Mar Contreras, M. Ramos, L. Amigo and I. Recio, *Peptides*, **30**, 1848-53 (2009).
- 25) C. D. Cinq-Mars, C. Hu, D. D. Kitts and E. C. Li-Chan, *J Agric Food Chem*, **56**, 410-9 (2008).

第 3 章

マンネンタケ水抽出物中に存在する ACE 阻害成分の探索

3-1 緒言

前章により、マンネンタケ水抽出物は、常温 (25°C) 抽出において高い ACE 阻害活性を示し、他種のきのこ子実体抽出物のなかでも比較的高い阻害活性を有すること、菌株依存性を示すこと、さらに ACE 活性に対して拮抗阻害を示し、広範囲での熱および pH 条件下においても安定であることが明らかとなった。一方、既知のマンネンタケ水抽出物由来の ACE 阻害成分は、D-マンニトールなど糖アルコールである。しかし、水抽出物中に含まれる糖アルコールの阻害活性は、水抽出物のもつ阻害活性より大きく劣っており、より阻害活性の高い成分の存在が示唆されている¹⁾。そこで本章では、これら特徴を与えるマンネンタケ水抽出物阻害成分の探索をおこなった。はじめに溶媒への溶解性ならびに分子量分画に着目し、エタノール分画および限外ろ過をおこなった。次いで陽イオン交換カラム、逆相クロマトグラフィーを用いて精製をおこなった。精製物は、¹H-NMR 分析、LCMS 分析、HPLC 分析および TLC 分析により、主要構成成分同定をおこなった。

3-2 実験方法

3-2-1 水抽出物の調製

(有) 村田産業において栽培されたマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) 乾燥子実体を、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル (株)) を用いて粉碎し、得られた子実体粉碎物 5g を超純水 100ml に浸漬し、室温で 24 時間振とう抽出をおこなった。抽出液をろ別により得たる液を凍結乾燥し、水抽出物とした。

3-2-2 ACE 阻害活性測定

1) ACE 阻害活性測定

2-2-2 の方法に従い、ACE 阻害活性を測定した。また、得られた阻害率と試料濃度の関係から近似曲線を作成し、阻害率 50% の濃度 (IC_{50} 値) を求めた。

2) 阻害様式の解析および K_i の決定

2-2-9 の方法に従い、阻害様式を基質濃度と反応速度の Lineweaver-Burk プロットにより解析した。Lineweaver-Burk 二次プロットより K_i 値を導いた。

3-2-3 水抽出物のエタノール分画

水抽出物を超純水に溶解し、1% (w/v) 水抽出物溶液とした。4°C 条件下において 1% (w/v) 水抽出物水溶液に 99.5% エタノールを加え、エタノール濃度が 80% となるよう調製し、分画をおこなった。これを遠心分離により、可溶部と不溶部に分画した。さら

に遠心濃縮により、溶媒を除去した後、それぞれ画分を等量の100mMホウ酸緩衝液に溶解し、ACE阻害活性を測定した。コントロールは、水抽出物をホウ酸緩衝液に溶解した1% (w/v) 水抽出物溶液 (反応液中の水抽出物濃度は833 μ g/ml) とし、このACE阻害活性値を阻害率100%として相対活性を決定した。それぞれの分画画分のACE反応液中の濃度は、水抽出物 833 μ g/mlに相当する。

3-2-4 限外ろ過分画

限外ろ過遠心フィルターを用いて、分子量分画をおこなった。水抽出物を超純水に溶解した 0.5% (w/v) 水抽出物溶液を試料とし、はじめに分画分子量 10kDa の限外ろ過ユニットにより分画した。さらにろ液 (分子量 10kDa 以下のもの) を分子量分画 3kDa の限外ろ過ユニットにより分画した。限外ろ過ユニットは、アミコンウルトラ-15 (日本ミリポア (株)) を、大量分画にはジャンボセップ遠心ろ過デバイス(日本ポール(株))を用いた。それぞれの画分を回収、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を限外ろ過に供試した量の 100mM ホウ酸緩衝液に溶解し、ACE 阻害活性を測定した。コントロールは 0.5% (w/v) 水抽出物溶液 (反応液中の水抽出物濃度は 417 μ g/ml) とし、この ACE 阻害活性値を阻害率 100%として相対活性を決定した。それぞれの限外ろ過画分の ACE 反応液中の濃度は、水抽出物 417 μ g/ml に相当する。また、水抽出物の精製においては、0.5% (w/v) 水抽出物水溶液を 80%エタノール分画したエタノール可溶部を用いた。

3-2-5 陽イオン交換カラムを用いた分画

陽イオン交換樹脂を用いて、活性成分の分画をおこなった。強酸性陽イオン交換樹脂Amberlite IR-120 H型 (Rohm & Haas) を用いた。80%エタノール分画、限外ろ過によ

り分子量3kDa以下となったサンプル (EU3) を超純水に溶解し、1% (w/v) EU3C溶液とし、Amberlite IR-120を充填した陽イオン交換カラム 2.5cmI.D.×38cmに供試した。溶出は2Mアンモニア水でおこなった。非吸着部および吸着部を回収し、エバポレーターで濃縮した後、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を等量の100mMホウ酸バッファーに溶解し、ACE阻害活性を測定した。コントロールはホウ酸緩衝液に溶解した1% (w/v) EU3C溶液とし、このACE阻害活性値を阻害率100%として相対活性を決定した。それぞれの陽イオン交換画分のACE反応液中の濃度は、EU3 833 μ g/mlに相当する。

3-2-6 逆相クロマトグラフィーによる分画

1) スモールスケールの分画

HPLCを用いて逆相クロマトグラフィーにより活性成分を分画した。HPLCは、UV検出器を備えたSHIMADZU LC-6システム ((株) 島津製作所) を用いた。80%エタノール分画、限外ろ過、陽イオン交換カラムにより精製したサンプル (EU3C) を供試した。カラムは、Inertsil ODS-3 column 4.6 mmI.D.×150mm (ジーエルサイエンス (株)) を用いた。移動相は、10%アセトニトリルを用いた。流速は0.5ml/min、検出は、215nmの吸光度でおこなった。EU3Cを超純水に溶解した1% (w/v) EU3C溶液をHPLCに供試し、それぞれの画分を凍結乾燥させた。凍結乾燥試料を等量の超純水に溶解し、ACE阻害活性を測定した。コントロールは超純水に溶解した1% (w/v) EU3C溶液とした。このACE阻害活性値を阻害率100%としてそれぞれの画分 (EU3CR-1-4) の相対活性を決定した。それぞれの画分 (EU3CR-1-4) のACE反応液中の濃度は、EU3C 833 μ g/mlに相当する。

2) ラージスケールの分画

逆相クロマトグラフィーにより阻害活性が確認された画分を大量分取した。HPLCは、UV 検出器を備えた SHIMADZU LC-20 システム ((株) 島津製作所) を用いた。分取および精製は 4 回おこなった。カラムは、初回は TSK-Gel ODS-120A 7.8 mmI.D.×300mm (東ソー (株)) および 2-4 回目までは Mightysil RP-18GP 250 mmI.D.×200mm (関東化学 (株)) を用いた。移動相は、10%アセトニトリルを用いた。流速は初回 1.0ml/min、2 回目 3.0ml/min、3-4 回目 2.0ml/min とした。検出は、215nm の吸光度でおこなった。分画した後、エバポレーターで濃縮、凍結乾燥した。初回の精製で EU3CR-1 を、2 回目の精製で EU3CR-2 を、4 回目で EU3CR-4 を精製した。それらを用いて、阻害様式、 K_i 値、 IC_{50} 値を算出した。

3-2-7 精製画分の主要構成成分の分析

逆相クロマトグラフィーにより高度に精製された EU3CR-4 を、 1H -NMR、HPLC 分析、により、成分同定をおこなった。さらに EU3C を、再び陽イオン交換クロマトグラフィーに供試し、分画し、阻害活性値の高い画分を、LCMS-IT-TOF および HPLC により成分同定をおこなった。EU3C および EU3CR 画分に対して、TLC 分析をおこなった。

1) 1H -NMR 分析

溶媒に重水置換メタノール (CD_3OD) を用いて、JEOL Delta 600 NMR Spectrometer (600MHz) により 1H -NMR スペクトルを測定した。試料は EU3CR-4 として、また、標品として、イノシン、グアノシン、L-ロイシン、そして、それらの混合物 (重量比 1:1:1) を測定した。

2) HPLC 分析 -グアノシン、イノシンの定性-

HPLC は、UV 検出器を備えた SHIMADZU LC-6 システム ((株) 島津製作所) を用いた。サイズ排除クロマトグラフィーを用いて EU3CR-4 に含まれるイノシン、グアノシンの同定をおこなった。カラムは Shodex Asahipak GS-320 HQ 7.5 mmI.D.× 300mm (昭光通商 (株)) を用いた。移動相は 10mM NaH₂PO₄ (pH 4.0) を用いた。流速は 0.5ml/min、検出は、UV260nm の吸光度でおこなった。カラム温度は室温でおこなった。

3) 陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製

ÄKTApurifier™ (GEヘルスケア ジャパン (株)) により、EU3Cをサンプルとして、さらなる精製をおこなった。カラムは強陽イオン交換カラム SP sepharose Fast Flow (GEヘルスケア ジャパン (株)) を用いた。EU3Cをサンプルとして、さらなる精製をおこなった。カラムボリュームは 1 ml、溶出液は、A: 10mM ギ酸 B: 2 M アンモニア水を、0-48分はA:100%、B:0%、48-54分はA:0%、B:100%で溶出した。流速: 1ml/minでおこなった。2minずつ分取し、SPFF1-27とし、ACE阻害活性を測定した。コントロールは超純水に溶解した1% (w/v) EU3C溶液とし、このACE阻害活性値を阻害率100%として相対活性を決定した。それぞれの画分 (SPFF-1-27) のACE反応液中の濃度は、EU3C 833µg/mlに相当する。

4) LCMS 分析

SHIMADZU LCMS-IT-TOF システム ((株) 島津製作所) を用いて、質量分析による同定をおこなった。カラムは、COSMOSIL₅C₁₈-MS-II I.D 2mmI.D×150mm (ナカライテスク (株))、カラム温度は 40℃とした。移動相は、5%アセトニトリルを用いて、流速 0.2ml/min でおこなった。

5) HPLC 分析 -シチジンの定性-

HPLC は、UV 検出器を備えた SHIMADZU LC-6 システム((株)島津製作所)を用いた。カラムは、Inertsil ODS-3 culum (ジールサイエンス(株)) を用いた。移動相は、10%アセトニトリルを用いた。流速は 0.5ml/min、検出は、215nm の吸光度でおこなった。

6) 同定成分の ACE 阻害活性測定

シチジン、イノシン、グアノシンそしてL-ロイシンの標品を用いて、ACE阻害活性を測定した。各種標品の1% (w/v) 水溶液を試料として、ACE阻害活性を測定した。コントロールとして、EU3C 1% (w/v) 水溶液、既知のマンネンタケ由来ACE阻害物質であるD-マンニトール1% (w/v) 水溶液、そして、その他のヌクレオシド (アデノシン、チミジン、ウリジン) 1% (w/v) 水溶液を用いた。すべてのサンプルの濃度はACE反応液中では、833 μ g/mlとなるように設定した。

7) グアノシン、イノシン、L-ロイシン混合物の ACE 阻害活性

グアノシン、イノシン、そしてL-ロイシンの標品を重量として等量ずつ混合したものをを用いて、ACE 阻害活性を測定した。グアノシン+イノシン (重量比 1:1) 、グアノシン + L-ロイシン (1:1) 、イノシン + L-ロイシン (1:1) 、そして、グアノシン + イノシン + L-ロイシン (1:1:1) とした。十分に混合したものを超純水に溶解し、2% (w/v) 水溶液を試料として、ACE 阻害活性を測定した。コントロールとして、EU3C 2% (w/v) 水溶液を用いた。すべてのサンプルの濃度は ACE 反応液中では、1667 μ g/ml となるように設定した。

8) ペプチドの検出

薄相クロマトグラフィー (TLC) により分画し、ニンヒドリン溶液を噴霧し、呈色させた。担体は蛍光指示薬を含有したシリカゲル (Merck silica gel 60 F₂₅₄) を用い、展開溶媒は、ブタノール：メタノール：水を2：1：1の割合で混合したものをを用いた。検出は、ニンヒドリン試薬を用いた。

3-3 結果

3-3-1 水抽出物 ACE 阻害成分の精製

1) エタノールによる分画

溶媒への溶解性に着目し、エタノール分画を試みた。その結果をFig. 3-1に示す。水抽出物の阻害活性を100%としたとき、80%エタノール可溶部では87.7%、不溶部では12.2%の活性が確認された。収量 (w/w) は、水抽出物に対して、80%エタノール可溶部では64.3%であった。主要な活性成分は、エタノール可溶部に含まれることが明らかとなった。

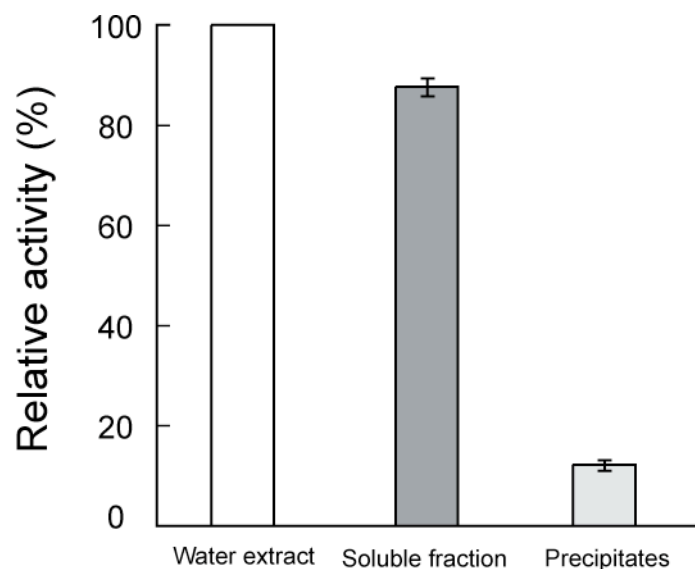


Fig. 3-1 ACE inhibitory activities on the fractions by ethanol fractionation.

ACE inhibitory activity indicated relative activity as ACE inhibition of water extract was 100%. Concentration of the water extract was 833 μ g/ml. Bar=S.E. (n=3).

2) 限外ろ過による分子量分画

分子量に着目し、限外ろ過による分画を試みた。その結果をFig.3-2に示す。水抽出物の阻害活性を100%としたとき、10kDa以上の画分では5.4%、10-3kDaの画分では7.9%、3 kDa以下では92.3%の相対活性が確認された。この結果から、水抽出物中の主要な活性成分は分子量3kDa以下の低分子成分であることが明らかとなった。分子量3kDa以下の収量 (w/w) は、水抽出物に対して50.9%であった。

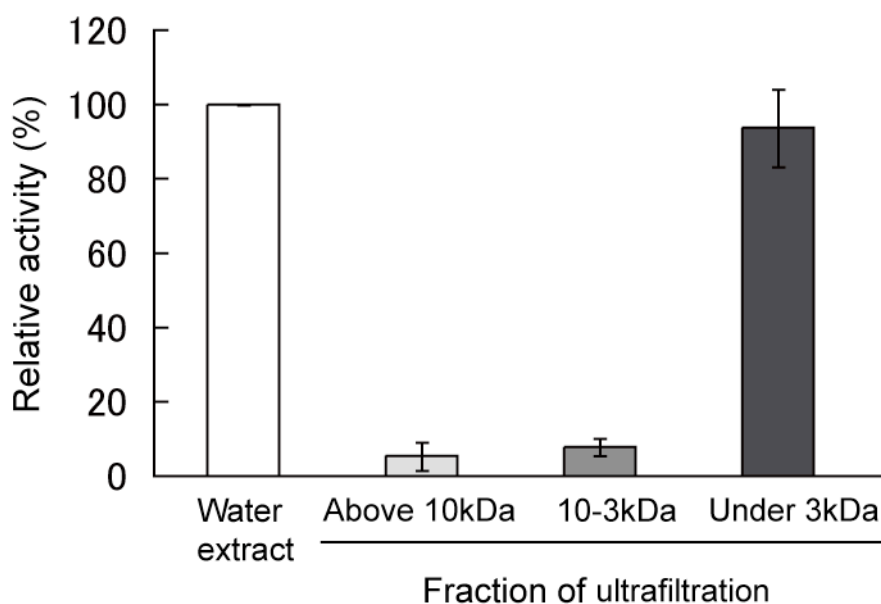


Fig. 3-2 ACE inhibitory activities on the fractions by ultrafiltration.

ACE inhibitory activity indicated relative activity as ACE inhibition of water extract was 100%. Concentration of the water extract was 417 μ g/ml Bar=S.E. (n=3).

3) 陽イオン交換カラムによる分画

水抽出物を80%エタノール分画したエタノール可溶部をさらに限外ろ過により分子量3kDa以下とした画分 (EU3) を陽イオン交換カラムに供試し、分画した。その結果、Fig.3-3に示す。EU3の阻害活性を100%としたとき、陽イオンカラム吸着部には98.9%、非吸着部には、7.0%の相対活性が確認された。陽イオンカラム吸着部の収量 (w/w) は、水抽出物に対して、14.1%であった。このことから、水抽出物中の主要なACE阻害活性成分はエタノールに可溶し、分子量3k以下の陽イオン性物質であることが明らかとなった。

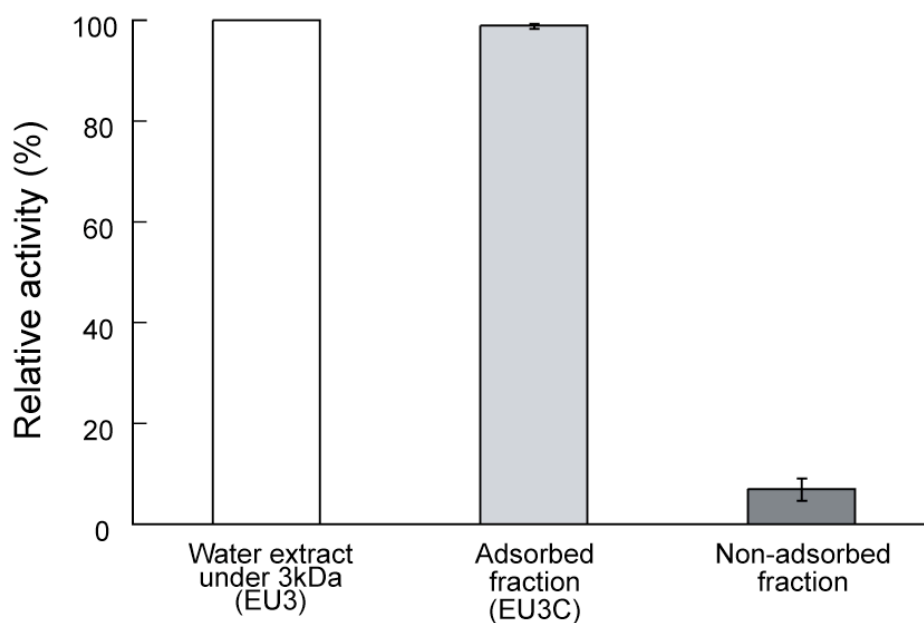
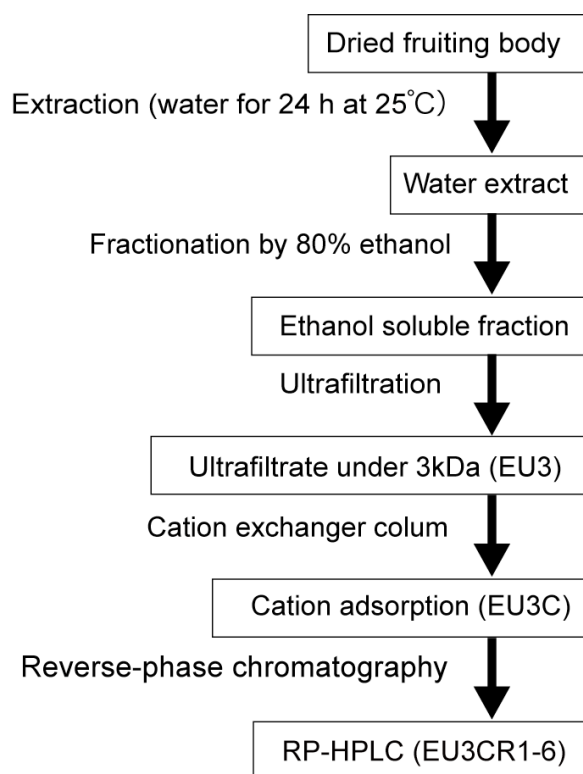


Fig. 3-3 ACE inhibitory activities on the fractions by cation exchanger .

ACE inhibitory activity indicated relative activity as ACE inhibition of EU3 was 100%. Concentration of EU3 was 833 μ g/ml. Bar=S.E. (n=3).

4) 逆相クロマトグラフィーにより分画

エタノール分画、限外ろ過、そして陽イオン交換カラムにより精製されたサンプル (EU3C) を逆相クロマトグラフィーにより分画した。分画のスキームを Scheme. 3-1 に示す。UV215nmにより検出された逆相クロマトグラフィーのクロマトグラムを Fig. 3-4 に示す。その結果、6 つの主要なピーク (EU3CR1-6) が確認された。そこで6 つのピークを分画し、ACE 阻害活性を測定した。それぞれの阻害活性値を Fig. 3-5 に示す。EU3C の阻害活性を 100%としたとき、もっとも阻害活性が高い画分は、EU3CR-1 で 71.7%、ついで EU3CR-4 で 51.1%、EU3CR-2 で 42.2%であった。この結果、ACE 阻害活性は複数のピークで確認され、活性の分散が示唆された。



Scheme. 3-1 Scheme for purification of water extract.

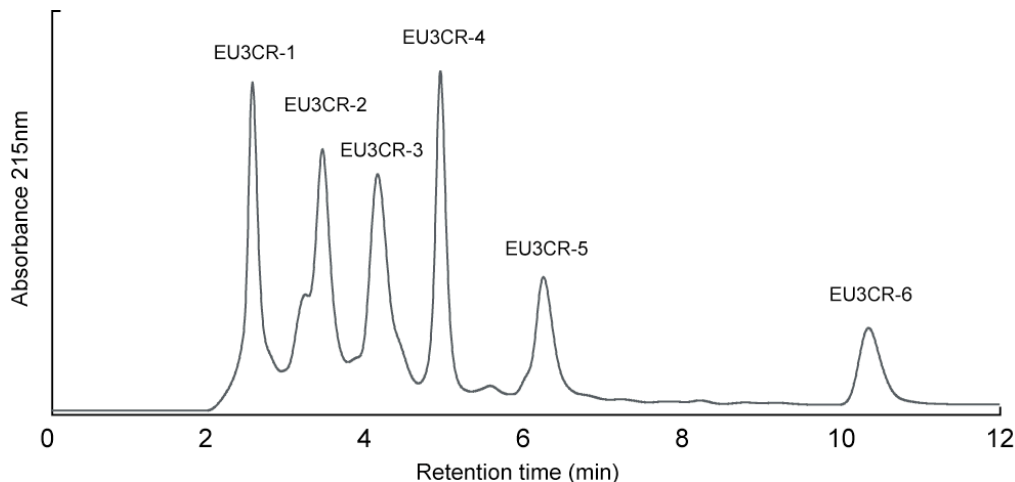


Fig. 3-4 Reverse-phase high-performance liquid chromatography of EU3C.

EU3C was applied to Inertsil ODS-3 column and eluted with a 10% acetonitrile at a flow rate of 0.5ml/min. Peaks labeled EU3CR-1 to 6. Eluted peaks were collected and measured for their ACE inhibitory activities.

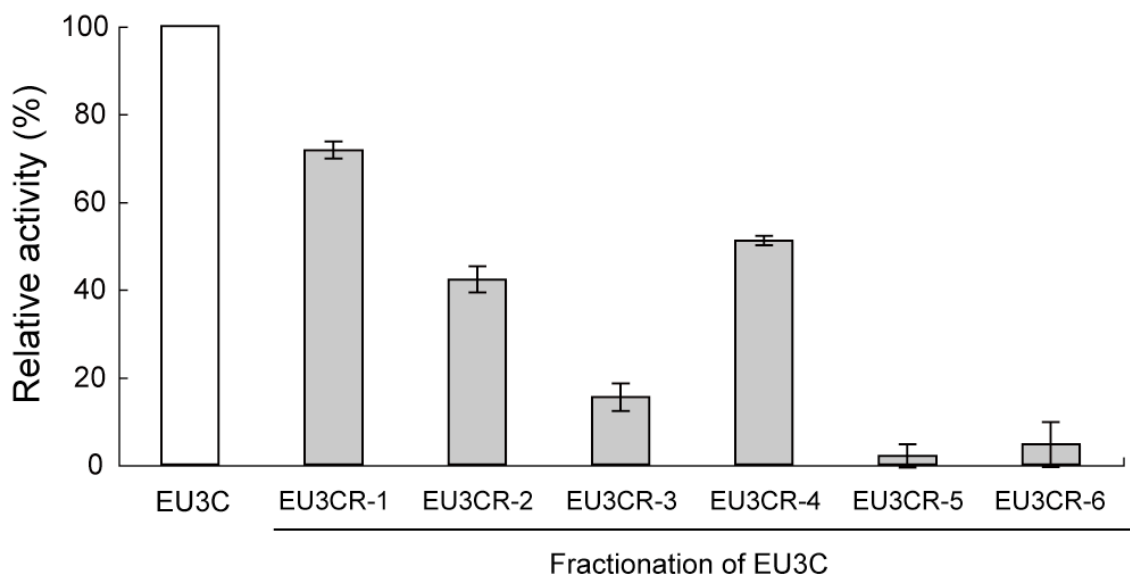


Fig. 3-5 ACE inhibitory activities of the EU3CR1-6 fractions by RP-HPLC.

ACE inhibitory activity indicated relative activity as ACE inhibition of EU3C was 100%. Concentration of EU3C was 833 μ g/ml. Bar=S.E. (n=3).

3-3-2 精製段階における阻害様式、 K_i および IC_{50} 値の決定

そこで高い阻害活性が確認された3つのピーク EU3CR-1、EU3CR-2 そして EU3CR-4 を大量分画し、阻害様式を Lineweaver-Burk プロットにより解析した。その結果、Fig. 3-6 に示す。Lineweaver-Burk プロットにより得られた近似直線と Y 軸との交点は $1/V_{max}$ を示し、X 軸との交点は $-1/K_m$ を示す。添加したすべての精製段階の水抽出物の濃度上昇において、それぞれの近似直線と Y 軸との交点 ($1/V_{max}$) の値はほとんど変化がないが、 K_m は増大している。この見かけの K_m を、 K_m^{app} として整理すると、すべての精製段階の水抽出物の濃度上昇にともない V_{max} の値は変化しないが、 K_m^{app} は増加することがわかる。この変化は、拮抗阻害剤の特徴であり、このことからマンネンタケ水抽出物はすべての精製段階において、ACE に対して拮抗阻害を示すことが明らかとなった。さらに Lineweaver-Burk プロットのそれぞれ水抽出物濃度の傾きを 2 次プロットし、近似直線を作成し、 K_i を求めた。 K_i 値、 IC_{50} 値、そして重量としての抽出収量を Table.3-1 に示す。 K_i 値は、水抽出物 121 μ g/ml、EU3 132 μ g/ml、EU3C 49 μ g/ml、EU3CR-1 82 μ g/ml、EU3CR-2 66 μ g/ml、そして、EU3CR-4 79 μ g/ml であった。 IC_{50} 値は、水抽出物 404 μ g/ml、EU3 325 μ g/ml、EU3C 89 μ g/ml、EU3CR-1 172 μ g/ml、EU3CR-2 107 μ g/ml、そして、EU3CR-4 209 μ g/ml であった。 K_i 値および IC_{50} 値とも、EU3C がもっとも低く、阻害効果が強力であることが明らかとなった。逆相クロマトグラフィーにより分画した EU3CR-1、EU3CR-2、EU3CR-4 の K_i 値、 IC_{50} 値は、EU3C よりも大きく、ACE 阻害活性は EU3C よりも弱いことが確認され、阻害活性の分散を確認した。

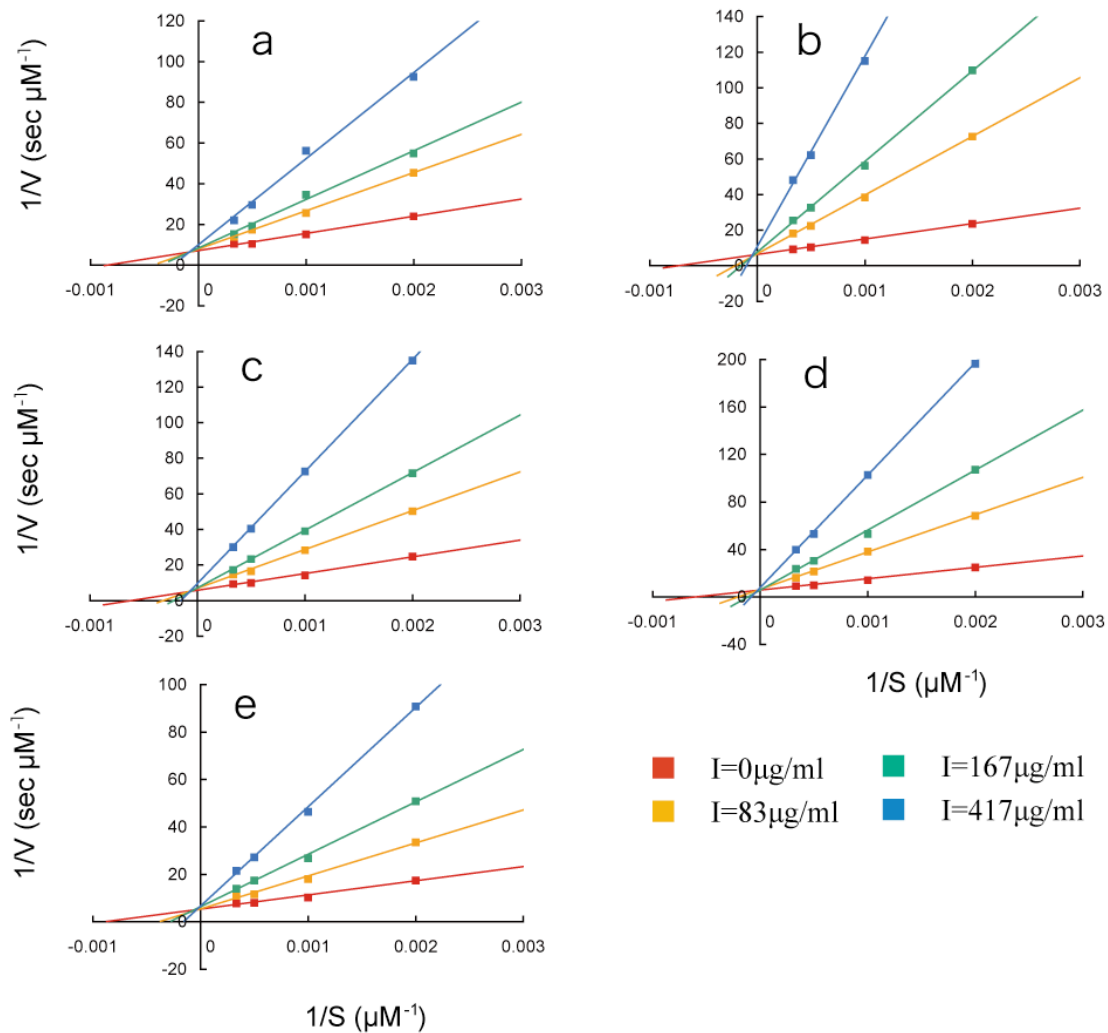


Fig. 3-6 Lineweaver-Burk plot of ACE inhibitory activity by fractions from the water extract.

The Lineweaver-Burk plots at varying concentrations of inhibitors were straight lines of different slope intersecting at common intercept on the y-axis that indicates competitive inhibition. a: EU3, b: EU3C, c: EU3CR-1, d: EU3CR-2, e: EU3CR-4.

Table. 3-1 Kinetic constants for ACE inhibition by water extract on purification steps.

Purification steps	Yield (%)	IC ₅₀ (μg/ml)	K _i (μg/ml)	Inhibition pattern
Water extract	100	404	121	Competitive
Ultrafiltration Under3kDa (EU3)	47.9	325	132	Competitive
Cation adsorption (EU3C)	14.1	89	49	Competitive
RP-HPLC (EU3CR-1)	6.32	172	82	Competitive
RP-HPLC (EU3CR-2)	0.76	107	66	Competitive
RP-HPLC (EU3CR-4)	0.74	209	79	Competitive

3-3-3 イノシン、グアノシン、シチジン、L-ロイシンの同定

1) イノシン、グアノシン、L-ロイシンの同定

逆相クロマトグラフィーを用いた分画により、生成した EU3CR-4 の主要構成成分同定をおこなった。¹H-NMR により得られたスペクトルから、EU3CR-4 中に、ヌクレオシドであるイノシン、グアノシン、そして、アミノ酸である L-ロイシンの存在が示唆された。そこで、標品を用いて、再度、¹H-NMR によりスペクトルを比較した。その結果を、Fig.3-7 に示す。さらにサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、イノシンおよびグアノシンの標品と EU3CR-4 を比較した。その結果、それぞれの標品のピークと EU3CR-4 が一致した (Fig. 3-8)。これらの結果から、EU3CR-4 の主要構成成分は、イノシン、グアノシン、そして、L-ロイシンであることを確認した。

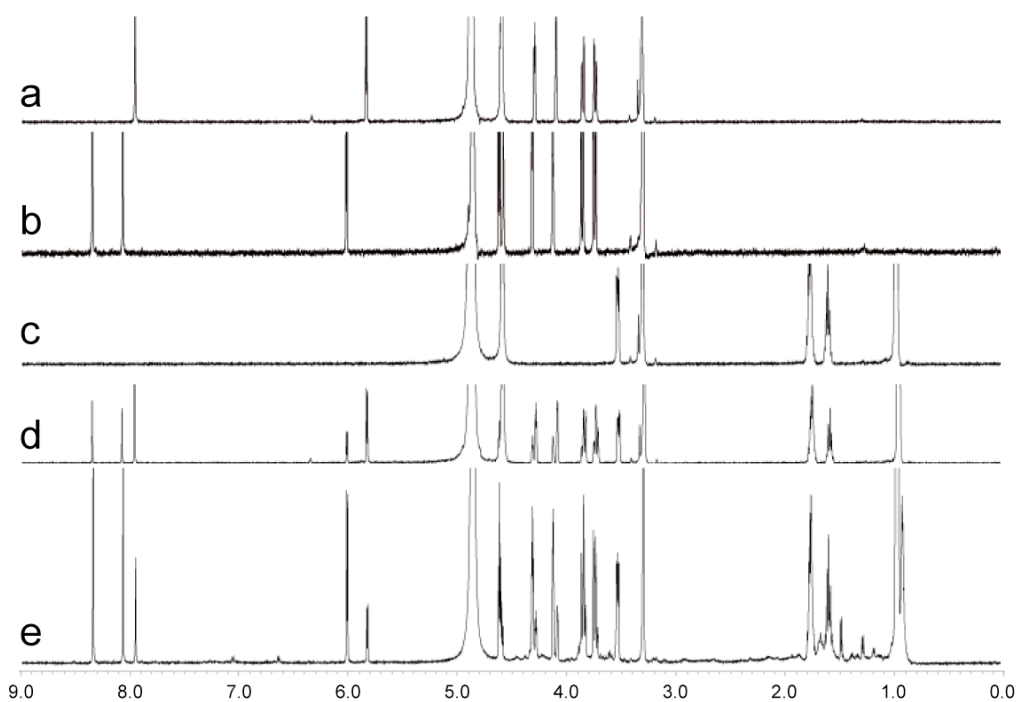


Fig. 3-7 ^1H -NMR Spectrum of EU3CR-4.

a: Guanosine, b: Inosine, c: L-leucine, d: Mixture of guanosine, inosine and L-leucine, and e: EU3CR-4 in CD_3OD .

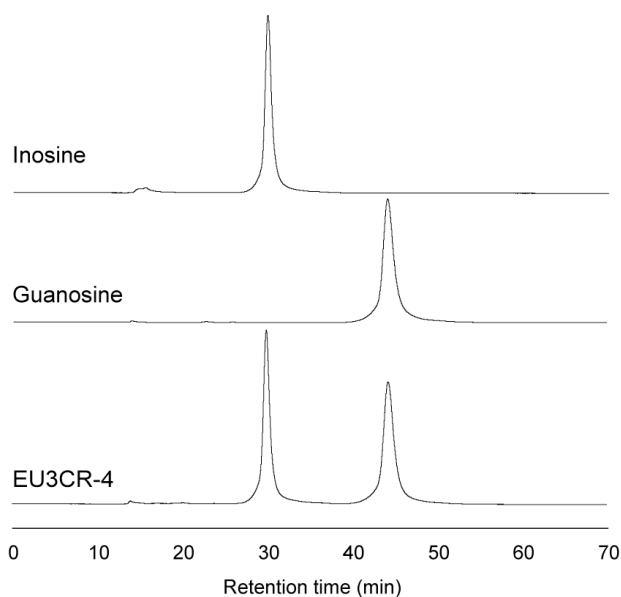


Fig. 3-8 Reverse-phase high-performance liquid chromatography chromatogram of inosine, guanosine and EU3CR-4.

Samples were applied to Shodex Asahipak GS-320 HQ culum and eluted with a 10mM NaH_2PO_4 (pH 4.0) at a flow rate of 0.5ml/min. Detection was by spectrophotometry at 260nm.

2) シチジンの同定

これまでの研究で、精製段階において EU3C がもっとも高い阻害活性を保持していることから、再度を陽イオン交換クロマトグラフィーに供試し、再度精製を試みた。UV260nm、UV215nm の吸光度クロマトグラムおよび各フラクションの ACE 阻害活性を Fig. 3-9 に示す。その結果、フラクションナンバー25 (SPFF-25) にもっとも高い ACE 阻害活性が確認された。EU3C の ACE 阻害活性を 100%として、SPFF-25 には、88.7%の相対活性が確認された。そこで SPFF-25 画分を用いて LCMS 分析をおこなった。その結果、 m/z 244、487、509 にピークが確認され、シチジンの存在が示唆された。シチジンの標品を用いて、再度、LCMS 分析おこなった結果、シチジンの MS ピークとの一致を確認した (Fig. 3-10)。さらに HPLC による定性分析の結果を Fig. 3-11 に示す。定性分析条件は、Fig. 3-4 と同条件であることから、シチジンのピークは、EU3CR-2 と一致し、EU3CR-2 の構成成分の一つはシチジンであることが明らかとなった。

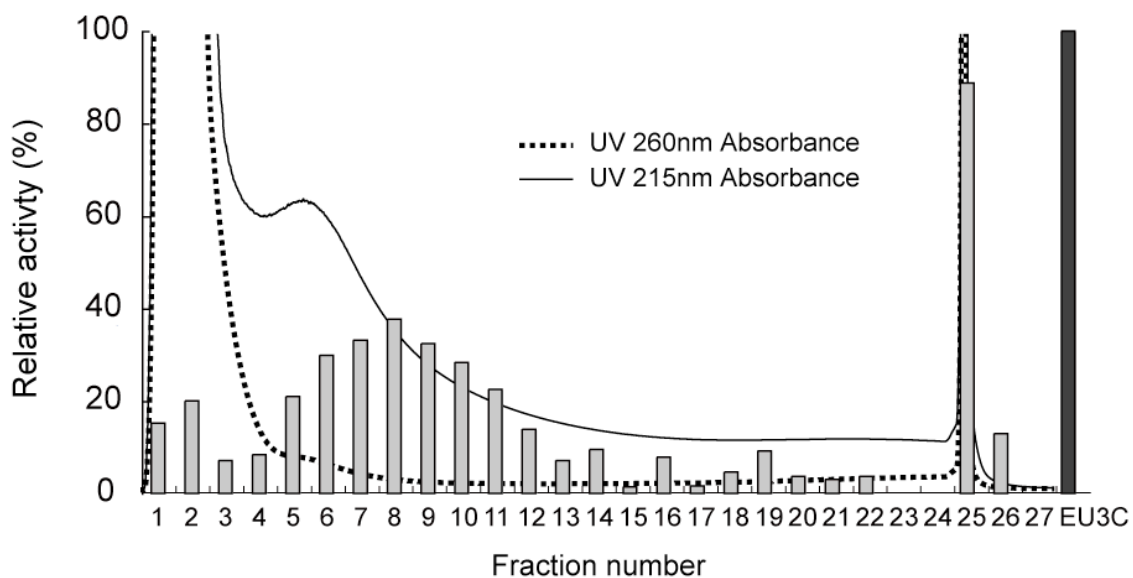


Fig. 3-9 Fractionation of EU3C with cation exchange chromatography and ACE inhibitory activity.

EU3C was applied to SP sepharose Fast Flow culum and eluted with 10mM formic acid (0-48min) and 2M ammonia water (48-54min) at a flow rate of 1ml/min. Detection was by absorbance at 215 or 260nm. ACE inhibitory activity indicated relative activity as ACE inhibition of EU3C was 100%. Concentration of EU3C was 833 μ g/ml.

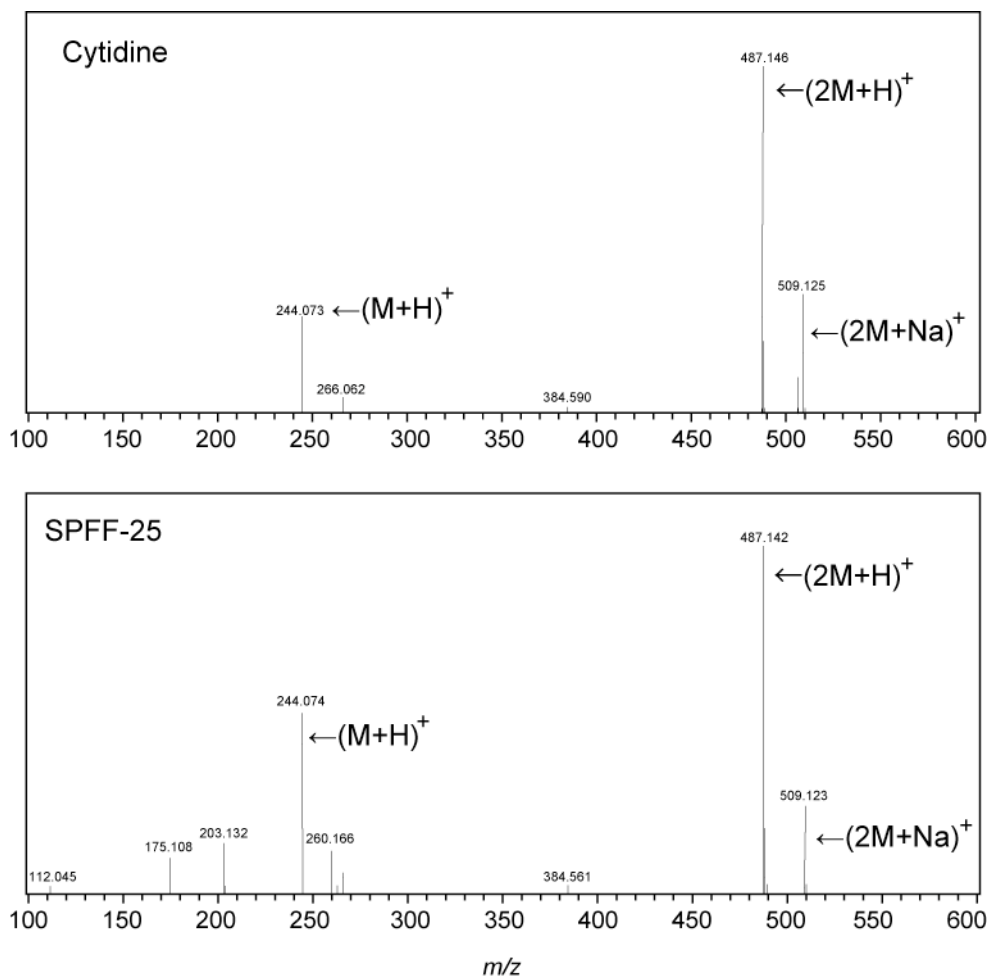


Fig. 3-10 Mass spectra of cytidine and SPFF-25 purified by cation exchange chromatography.

Mass spectra of cytidine and SPFF-25 were obtained by using the mass spectrometer of LC-IT-TOF/MS equipped with an ESI source in positive ion mode. Scan ranges were set at m/z 100–600.

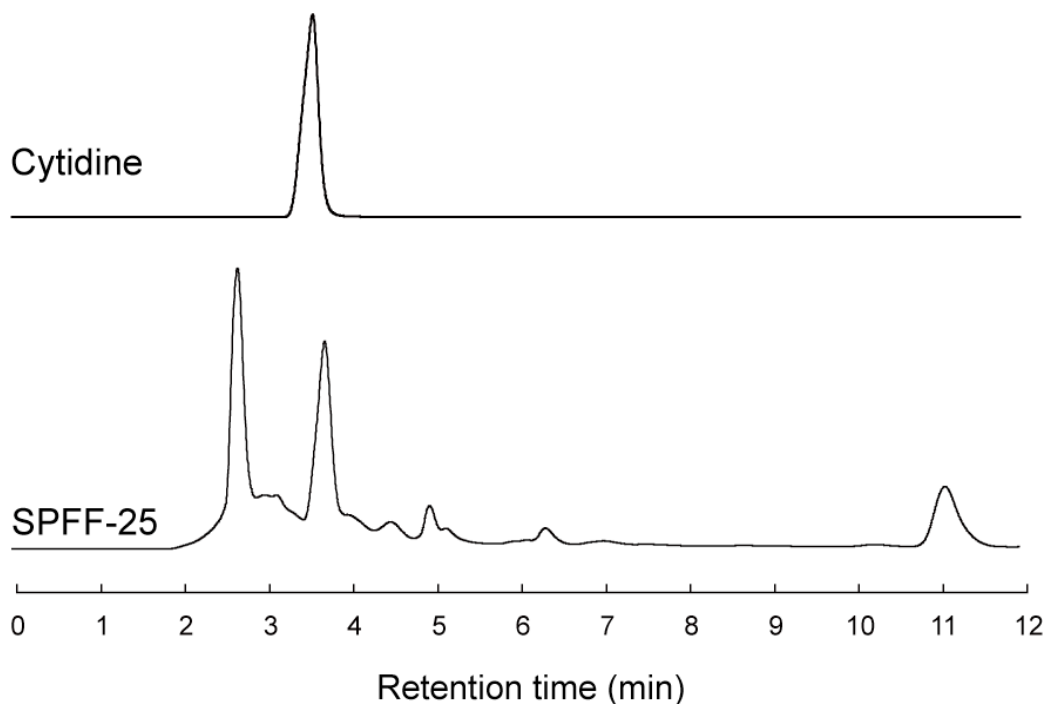


Fig. 3-11 Reverse phase high performance liquid chromatography chromatogram of SPFF-25.

Cytidine and SPFF-25 were applied to Inertsil ODS-3 column and eluted with a 10% acetonitrile at a flow rate of 0.5ml/min.

3-3-4 同定成分のACE阻害活性

EU3C中に存在が確認されたイノシン、グアノシン、シチジン、そしてL-ロイシンのACE阻害活性を確認した。その結果をFig. 3-12に示す。シチジン、イノシン、グアノシン、L-ロイシンの標品を用いて、阻害活性を測定した。その結果、シチジンは3.6%、イノシンは1.5%、グアノシンは2.0%、そして、L-ロイシンには阻害活性が確認されなかった。この結果、EU3Cの86.3%と比較して、その阻害活性は非常に弱いことが明らかとなった。

イノシン、グアノシン、そしてL-ロイシンは、逆相クロマトグラフィーによる分画において同一のピークEU3CR-4から同定されたことから、これら混合物におけるACE

阻害活性を確認した。その結果、EU3CR-4は86.0%、グアノシン + イノシン (1:1) は16.2%、グアノシン + L-ロイシン (1:1) は1.3%、イノシン + L-ロイシン (1:1) は4.9%、そして、グアノシン + イノシン + L-ロイシン (1:1:1) では7.3%であった。これらの結果から、同定された成分は、ACE阻害活性の主要原因物質ではないことが明らかとなった。さらにそれら混合物にもEU3CR-4と同等のACE阻害活性は確認されなかった。したがって、他の成分の関与について調べる必要性がある。

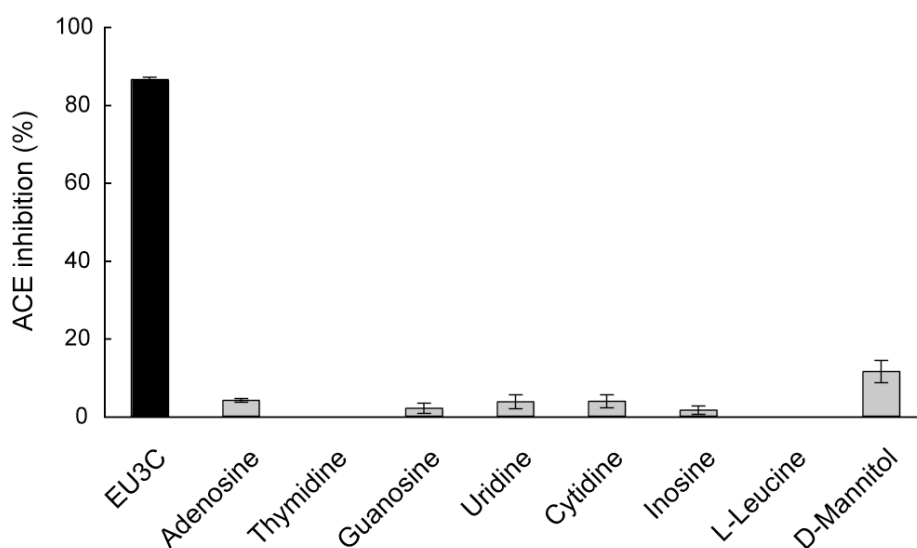


Fig. 3-12 ACE inhibitory activities of nucleosides, L-leucine and D-mannitol.

Final concentration of each sample for detection of ACE inhibitory activity is 833 μ g/ml. HA was not completely produced indicated 100% of ACE inhibitory activity. Bar=S.E. (n=3).

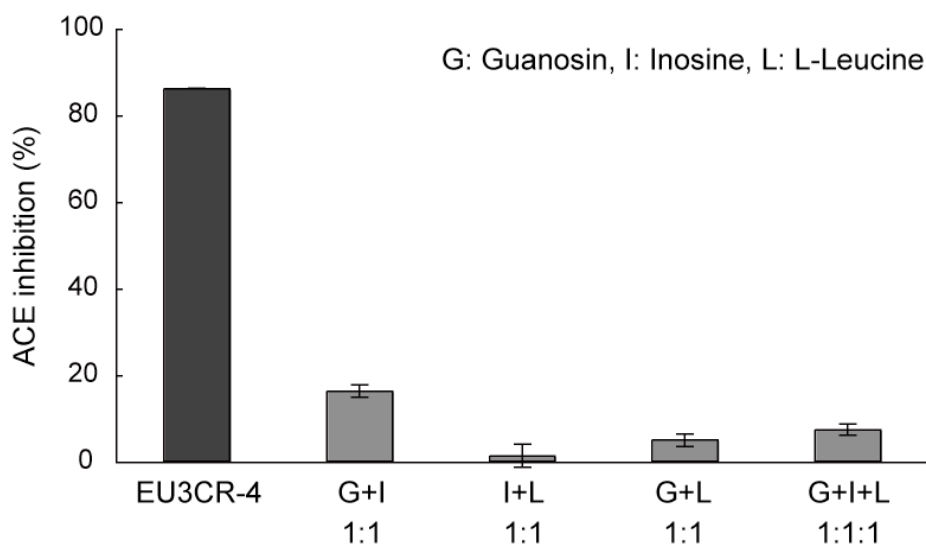


Fig. 3-13 ACE inhibitory activities of Mixture of guanosine, inosine and L-leucine.

Samples were guanosine+inosine (1:1), guanosine+leucine (1:1), inosine+leucine (1:1) and guanosine+inosine+leucine (1:1:1). Final concentration of each sample for detection of ACE inhibitory activity is 1667 μ g/ml. HA was not completely produced indicated 100% of ACE inhibitory activity. Bar=S.E. (n=3).

3-3-5 水抽出物精製物 (EU3C) におけるペプチドの存在

同定されたヌクレオシドおよびアミノ酸成分は、ACE阻害活性の主要原因物質ではないことが明らかとなった。したがって、他の成分の関与について調べる必要がある。そこで、もっとも活性の高い精製画分EU3Cおよび、それらを逆相クロマトグラフィーにより分画したEU3CR画分を用いてニンヒドリン反応によるペプチドの存在を確認した。TLC分析の結果を、Fig. 3-14に示す。EU3CやEU3CR画分において、ニンヒドリン反応による呈色が確認された。とくに阻害活性の高いEU3CR-1、EU3CR-2では複数のスポットが検出された。このことから、活性の強い画分についてはペプチドが含まれる可能性が示唆された。

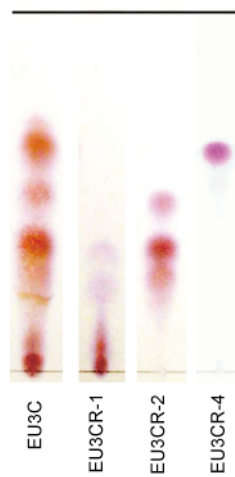


Fig. 3-14 Ninhydrin reactions of EU3CR on thin-layer chromatography.

For chromatography on the silica gel TLC plates, the chromatographic solvent consisted of butanol:methanol:water (2:1:1). Dried chromatograms were sprayed with a ninhydrin solution for detection.

3-4 考察

水抽出物の溶媒への溶解性に着目し、エタノール分画により、高分子タンパク質や親水性の高い糖質などを取り除いた結果、主要な活性成分は、エタノール可溶部に含まれることが明らかとなった (Fig. 3-1)。さらに分子量に着目し、限外ろ過による分画を試みた結果、水抽出物中の主要な活性成分は分子量 3kDa 以下の低分子化合物であることが明らかとなった (Fig.3-2)。そこでこれらの分画方法により分画した EU3 を陽イオン交換カラムに供試した結果、その活性の大部分は陽イオン交換樹脂に吸着することから、水抽出物中の主要な ACE 阻害活性成分はエタノールに可溶し、分子量 3kDa 以下の陽イオン性物質であることが明らかとなった (Fig.3-3)。陽イオンカラムに吸着することから、既知のマンネンタケ由来 ACE 阻害剤であるガノデリン酸をはじめとするトリテルペノイドとは異なる成分であることが示唆された。そこでエタノール分画、限外ろ過、そして陽イオン交換カラムにより精製されたサンプル (EU3C) を逆相クロマトグラフィーにより分画した。その結果、クロマトグラムから、6 つの主要なピーク (EU3CR1-6) が確認された (Fig. 3-4)。それぞれのピークに対して、ACE 阻害活性を確認したところ、それぞれのピークで活性が確認された (Fig. 3-5)。そこで ACE 阻害活性の高い 3 つのピーク EU3CR-1、EU3CR-2 そして EU3CR-4 を大量分画し、阻害様式を明らかにした。その結果、阻害様式はすべての精製段階で拮抗阻害を示した (Fig.3-6)。拮抗阻害は、基質と結合していない遊離の酵素にのみ阻害剤が反応し、酵素の活性部位に阻害剤が結合することで基質の結合を妨げる阻害の様式である。阻害剤の多くは、基質に類似した構造をもつ基質アナログである。ACE はペプチドを基質としており、きのこ子実体水抽出物由来の ACE 阻害ペプチド^{2,3)}や食品由来の ACE 阻害ペプチド^{4,6)}の多くは拮抗阻害であることが知られていることから、マンネンタケ子実体水抽出物に含まれる活性成分も、ペプチドが関与している可能性がある。

さらに精製段階での IC₅₀ 値および K_i 値を求めた結果、IC₅₀ 値、K_i 値ともに逆相クロマトグラフィーに供試する前段階の精製物である EU3C がもっとも低い値となった (Table. 3-1)。このことは逆相クロマトグラフィーにより分画した EU3CR-1、EU3CR-2、EU3CR-4 の阻害活性は EU3C よりも弱いことを意味し、ACE 阻害活性の分散と複数の阻害活性成分の存在を明らかにした。マンネンタケ子実体水抽出からの既知の ACE 阻害成分は、D-マンニトールや D-アラビトールなど糖アルコールである。それぞれの IC₅₀ 値は、D-マンニトールで 33.4mg/ml⁷⁾、D-アラビトールでも 34.5mg/ml⁷⁾であり、EU3C のものと大きく異なっている。これらの結果から、新規阻害成分の可能性が示唆された。次に精製物に含まれる構成成分の同定をおこなった。その結果、精製物中に含まれる成分はイノシン、グアノシン、シチジン、そして L-ロイシンであることが明らかとなった。しかし、これらの成分の ACE 阻害活性は EU3C と比較して、その阻害比活性は非常に弱いことが明らかとなった (Fig.3-12)。しかし、イノシン、グアノシン、そして L-ロイシンは、逆相クロマトグラフィーによる分画において同一のピーク EU3CR-4 から同定されたことから、それぞれの成分単独では、ACE 阻害活性は非常に弱い、混合することでその活性を得ている可能性が考えられた。そこで、これら 3 成分の混合物を用いて ACE 阻害活性を確認した。様々な組み合わせを試みた結果、混合物の阻害活性は EU3CR-4 のそれに比べ、弱いことが明らかとなった (Fig.3-13)。これらの結果から、同定された成分は、いずれの成分とも ACE 阻害活性の主要原因物質ではないことが明らかとなり、他の成分の寄与が大きいことが示唆された。

そこで既往の研究において、ACE 阻害剤として多様なペプチドが関与していることに着目した。ACE 阻害成分としては、多くのペプチドが報告されており、それらペプチドは拮抗阻害を示すことが明らかとなっている^{4,6)}。また、きのこ子実体由来の ACE 阻害ペプチドは、マイタケ (*Grifola frondosa*)^{2,8)}、ニオウシメジ (*Tricholoma giganteum*)³⁾やブナハリタケ (*Mycoleptodonoides aitchisonii*)⁹⁾などから報告されている。本研究で

活性の高い EU3C 画分において、ニンヒドリン反応を示す物質が存在すること (Fig.3-14) や各精製段階で ACE 活性に対して拮抗阻害を示すこと (Fig.3-6) はペプチドがその活性に関与している可能性を支持しており、ヌクレオシドやアミノ酸に隠れて検出が困難であった水抽出物中に存在する複数のペプチドが阻害活性を与えていることが考えられた。検出が困難であることから、それぞれのペプチドは微量であること、そして、精製物自体の量が少ないことからペプチドの同定には至らなかった。また、阻害活性が分散し、既知のペプチドも含め多種のペプチドが阻害活性を有することは、ペプチドの ACE に対する阻害剤としての特異性が低いこと示している。

これまでの本研究結果を整理すると、第2章より、マンネンタケ子実体水抽出物は抽出温度25℃抽出物に高いACE阻害活性が確認され、4℃や80℃において、ACE阻害活性が低いことが明らかとなり、この結果から、タンパク質や酵素など熱による影響を受けやすい物質の関与が示唆された。一方、抽出された25℃水抽出物は、ACE阻害活性において、熱やpHに対して、安定的であった。第3章より、ニンヒドリン反応、阻害様式から、ACE阻害活性へのペプチドの関与が示唆された。一方、既往のACE阻害ペプチドの多くは、発酵食品など微生物の利用によって生成されたもの¹⁰⁻¹⁶⁾や食品由来のタンパク質を加水分解したもの¹⁷⁻²⁴⁾である。以上のことから、マンネンタケ子実体水抽出物のACE阻害活性は、マンネンタケが生産するプロテアーゼにより、水抽出中に存在するタンパク質が自己消化され、それによって生成された低分子ペプチドが関与しているというACE阻害活性発現機構を着想した。

引用文献

- 1) M. Aoyama, S. Saito, M. Kiyoto, I. Togashi, T. Hara, Y. Yagi, T. Kimura and S. Yoneyama, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **15**, 91-6 (2007).
- 2) H. Choi, S., H. Cho, Y., H. Yang, C., K. Ra, S. and H. Suh, J., *Food Research International*, **34**, 177-82 (2001).
- 3) D. H. Lee, J. H. Kim, J. S. Park, Y. J. Choi and J. S. Lee, *Peptides*, **25**, 621-7 (2004).
- 4) C. D. Cinq-Mars, C. Hu, D. D. Kitts and E. C. Li-Chan, *J Agric Food Chem*, **56**, 410-9 (2008).
- 5) A. Quiros, M. del Mar Contreras, M. Ramos, L. Amigo and I. Recio, *Peptides*, **30**, 1848-53 (2009).
- 6) K. Katayama, H. E. Anggraeni, T. Mori, A. M. Ahhmed, S. Kawahara, M. Sugiyama, T. Nakayama, M. Maruyama and M. Muguruma, *J Agric Food Chem*, **56**, 355-60 (2008).
- 7) M. Kiyoto, H. Suzuki, T. Hara, Y. Yagi, N. Cho, S. and M. Aoyama, *Mushroom Sci. Biotechnol*, **13**, 189-94 (2005).
- 8) M. Ohtsuru, H. Horio and H. Masui, *Food Sci Technol Res*, **6**, 9-11 (2000).
- 9) Y. Sakamoto, A. Takeuchi, T. Sato, K. Obara, K. Takai, K. Fujino, T. Hirose and Y. Inagaki, *Pharmacometrics*, **61**, 221-9 (2001).
- 10) T. Saito, T. Nakamura, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh, *J Dairy Sci*, **83**, 1434-40 (2000).
- 11) A. Abubakar, T. Saito, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh, *J Dairy Sci*, **81**, 3131-8 (1998).
- 12) H. Fujita and M. Yoshikawa, *Immunopharmacology*, **44**, 123-7 (1999).
- 13) T. Ichimura, J. Hu, D. Q. Aita and S. Maruyama, *J Biosci Bioeng*, **96**, 496-9 (2003).
- 14) J. Y. Je, P. J. Park, H. G. Byun, W. K. Jung and S. K. Kim, *Bioresour Technol*, **96**, 1624-9 (2005).
- 15) M. Kuba, K. Tanaka, S. Tawata, Y. Takeda and M. Yasuda, *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 1278-83 (2003).
- 16) N. Yamamoto, M. Maeno and T. Takano, *J Dairy Sci*, **82**, 1388-93 (1999).
- 17) S. V. Silva, A. Pihlanto and F. X. Malcata, *J Dairy Sci*, **89**, 3336-44 (2006).
- 18) A. Geerlings, I. C. Villar, F. Hidalgo Zarco, M. Sanchez, R. Vera, A. Zafra Gomez, J. Boza and J. Duarte, *J Dairy Sci*, **89**, 3326-35 (2006).
- 19) M. Maeno, N. Yamamoto and T. Takano, *J Dairy Sci*, **79**, 1316-21 (1996).

- 20) J. A. Gomez-Ruiz, M. Ramos and I. Recio, *Electrophoresis*, **28**, 4202-11 (2007).
- 21) M. Astawan, M. Wahyuni, T. Yasuhara, K. Yamada, T. Tadokoro and A. Maekawa, *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 425-9 (1995).
- 22) Z. J. Qian, J. Y. Je and S. K. Kim, *J Agric Food Chem*, **55**, 8398-403 (2007).
- 23) M. Terashima, T. Baba, N. Ikemoto, M. Katayama, T. Morimoto and S. Matsumura, *J Agric Food Chem*, **58**, 7432-6 (2010).
- 24) M. Miguel, M. A. Manso, P. J. Martin-Alvarez, A. Aleixandre and R. Lopez-Fandino, *Mol Nutr Food Res*, **51**, 555-63 (2007).

第 4 章

ACE 阻害活性発現機構に関する実証

4-1 緒言

これまでの本研究により、マンネンタケ子実体水抽出物は抽出温度25℃抽出物に高いACE阻害活性が確認され、4℃や80℃において、ACE阻害活性が低いことが明らかとなった。この結果から、タンパク質や酵素など熱による影響を受けやすい物質の関与が示唆された。一方、抽出された25℃水抽出物は、ACE阻害活性において、熱やpHに対して、安定的であった。そして、マンネンタケ水抽出物中に存在するACE阻害成分の探索により、ニンヒドリン反応、阻害様式から、ACE阻害活性へのペプチドの関与が示唆された。既往のACE阻害ペプチドの多くは、発酵食品など微生物の利用によって生成されたや食品由来のタンパク質を加水分解したものであることから、マンネンタケ子実体水抽出物のACE阻害活性は、マンネンタケが生産するプロテアーゼにより、水抽出中に存在するタンパク質が自己消化され、それによって生成された低分子ペプチドが関与しているというACE阻害活性発現機構に関する着想を得た。そこで本章では、これらを実証するために、ACE阻害活性能向上のための抽出方法の検討とACE阻害成分へのプロテアーゼ反応の関与を明らかにすることを試みた。

4-2 実験方法

4-2-1 ACE 阻害活性測定

2-2-2 の方法に従い、ACE 阻害活性を測定した。

4-2-2 各温度条件における水抽出

マンネンタケ子実体粉砕物 1.5g を、温度調整した (4°C、25°C、37°C、50°C、80°C、沸騰) 超純水 30ml に添加し、2 時間抽出した。ろ別により得たる液を凍結乾燥し、凍結乾燥された抽出物 3mg を再度、超純水 1ml に溶解、0.3% (w/v) 試料溶液とした。

4-2-3 各 pH 条件における水抽出

マンネンタケ子実体粉砕物 2g を超純水 40mL に添加し、1M HCl もしくは 1M NaOH を用いて抽出液の pH を 3.0、4.0、5.0、7.0、9.0、11.0 とし、37°C で 24 時間抽出した。ろ別により得たる液を pH7.0 に調整し、凍結乾燥した。凍結乾燥された抽出物 3mg を再度、超純水 1ml に溶解し、0.3% (w/v) 試料溶液とした。

4-2-4 抽出時間と ACE 阻害活性

マンネンタケ子実体粉砕物 1.5g を超純水 30ml に添加し、1 M NaOH を用いて抽出液の pH 5.0 とし、37°C で抽出した。抽出時間を 10 分、30 分、1 時間、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間とし、ろ別により得たる液を pH7.0 に調整し、凍結乾燥した。凍結乾燥した抽出物 3mg を再度、超純水 1ml に溶解し、0.3% (w/v) 試料溶液とした。

4-2-5 37℃抽出物と 80℃抽出残渣による ACE 阻害活性

マンネンタケ子実体粉碎物 1.5g を、加温した超純水 30ml (80℃、37℃) に添加し、2 時間抽出した後、ろ過し、ろ液と残渣に分離した。80℃抽出残渣に、37℃抽出物(ろ液)15ml を添加、全量が 40ml になるよう超純水でメスアップし、反応液とした。コントロールは、80℃抽出物残渣のみの区、37℃抽出物のみを用いた区、37℃抽出物の代わりに 10 分間煮沸した 37℃抽出物を用いた区とした。反応液を 1M NaOH で pH5.0 とし、37℃でインキュベート (6 時間、24 時間) した。その後、ろ別により得たろ液を pH7.0 に調整し、ろ液を試料とし、ACE 阻害活性を測定した。

4-2-6 37℃抽出物とカゼインによる ACE 阻害活性

マンネンタケ子実体粉末 1.5g を、加温した超純水 30ml (37℃) に添加し、2 時間抽出した後、ろ過し、37℃抽出物を得た。37℃抽出物 15ml にミルク由来の 1% (w/v) カゼイン水溶液を 20ml 添加、全量が 40ml になるよう超純水でメスアップし、反応液とした。コントロールは、カゼインのみの区、37℃抽出物のみの区、10 分間煮沸した 37℃抽出物のみの区、37℃抽出物の代わりに 10 分間煮沸した 37℃抽出物を用いた区とした。そして、各反応液を 1M NaOH で pH5.0 とし、37℃で 24 時間インキュベートした。その後、ろ別により得たろ液を pH7.0 に調整し、ろ液を試料とし、ACE 阻害活性を測定した。

4-3 結果

4-3-1 ACE 阻害活性の抽出温度依存性

抽出温度の違いによる ACE 阻害活性を確認した。その結果を Fig.4-1 に示す。37°C において、34.6%と最も高い阻害活性が確認された。ついで 50°Cで 33.6%、25°Cで 23.5%であった。そして、4°Cで 10.5%、80°Cでは 6.9%であった。沸騰水中での抽出では 2.7%ともっとも低い値を示した。80°C以上の高温域での抽出物は、ほとんど活性を示さなかった。

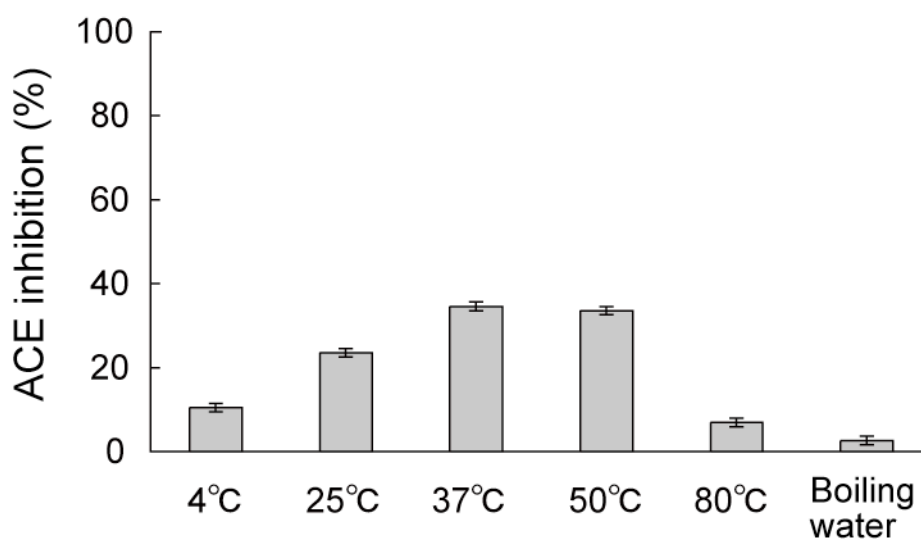


Fig.4-1 Effects of extraction temperature on ACE inhibitory activity of water extract.

Extraction with water was carried out at each condition for 2h. The extracts were freeze-dried as water extracts. The water extracts were dissolved in water. Final concentration of each water for detection of ACE inhibitory activity is 250 μ g/ml. Bar=S.E. (n=3).

4-3-2 ACE 阻害活性の抽出時 pH 依存性

抽出液 pH の違いによる ACE 阻害活性を確認した。その結果を、Fig.4-2 に示す。pH5.0 において、42.4%ともっとも高い阻害活性が確認された。ついで pH4.0 で 42.3%、pH7.0 で 37.5%であった。アルカリ領域の pH9.0 および pH11.0 では、それぞれ 4.6%、1.5%であった。弱酸性で抽出されたものにもっとも高い阻害活性が確認され、アルカリ領域で抽出されたものの阻害活性は低かった。

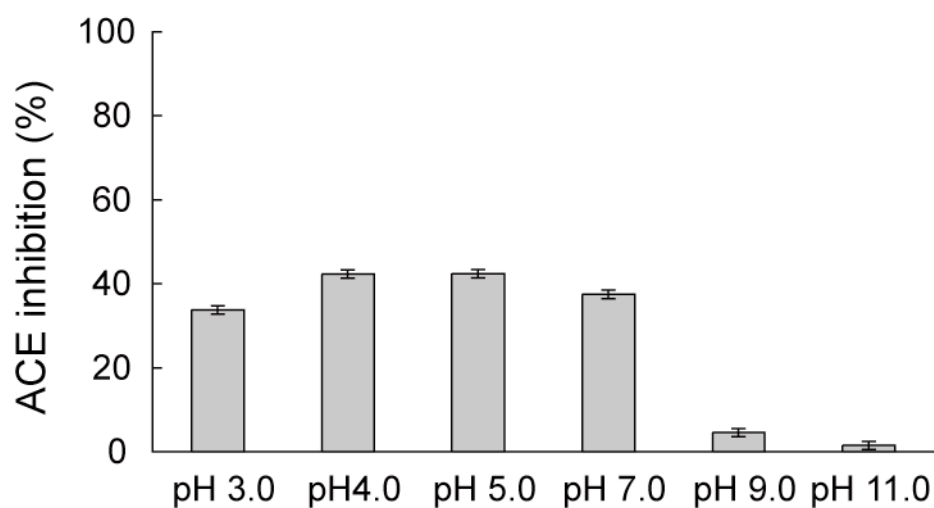


Fig.4-2 Effects of extraction pH on ACE inhibitory activity of water extract.

Extraction with water was carried out at 37°C for 24h. The extracts were freeze-dried as water extracts. The water extracts were dissolved in water. Final concentration of each water for detection of ACE inhibitory activity is 250µg/ml. Bar=S.E. (n=3).

4-3-3 抽出時間と ACE 阻害活性

抽出時間と ACE 阻害活性を検討した。その結果を Fig.4-3 に示す。抽出時間 10 分で 10.8%、1 時間で 22.9%、6 時間で 38.3%と阻害活性の増加が確認された。その後、24 時間抽出までは一定の阻害活性を保っていた。

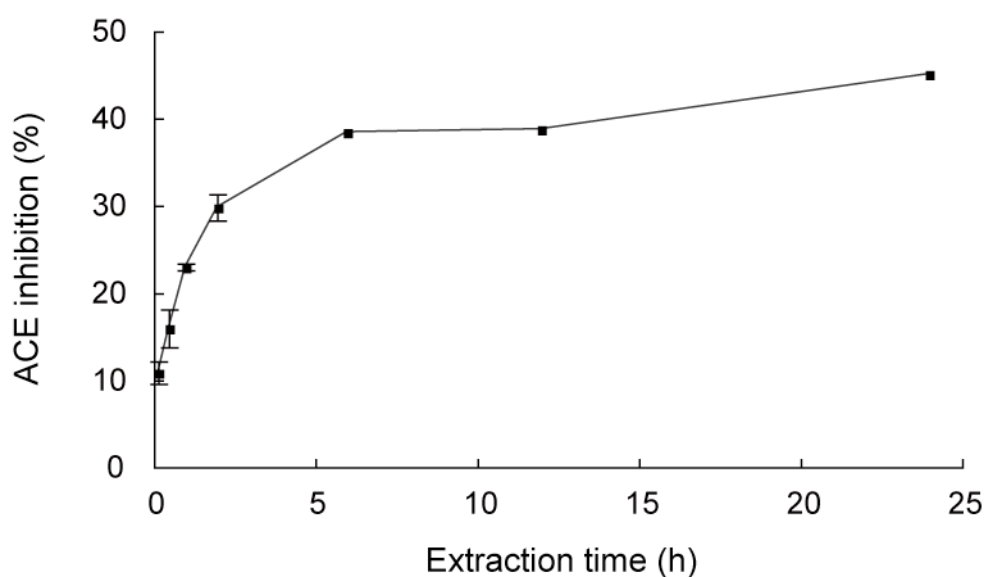


Fig.4-3 Effects of extraction time on ACE inhibitory activity of water extract.

Increase of ACE inhibitory activity depends on the time for extraction. Extraction were carried out at pH5.0, 37°C. The extracts were freeze-dried as water extracts. The water extracts were dissolved in water. Final concentration of each water extract for detection of ACE inhibitory activity is 250 μ g/ml. Bar=S.E. (n=3).

4-3-4 37°C抽出物と80°C抽出残渣によるACE阻害活性の発現

80°C抽出残渣と37°C抽出物をともにインキュベートした結果をFig.4-4に示す。80°C抽出残渣と37°C抽出物をインキュベートした区の阻害活性は、6時間では17.9%、24時間では25.0%であった。煮沸した37°C抽出物と80°C抽出残渣を用いた区では、6時間では14.5%、24時間では14.1%であった。80°C抽出残渣と37°C抽出物をインキュベートすることで、阻害活性値の上昇が確認された。また、インキュベーション時間を長くすることで阻害活性の向上が見られた。37°C抽出物のみを用いた区において、6時間の区では、阻害活性は17.6%、24時間の区では10.2%であった。インキュベーション時間を長くすることにより活性の低下が確認された。

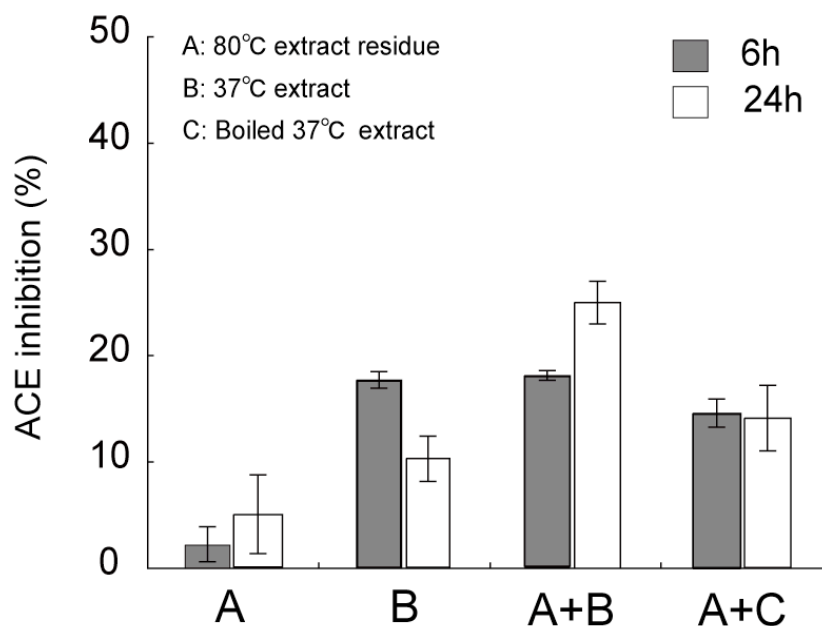


Fig.4-4 Effect of incubation of the 37°C extract on ACE inhibitory activity with the 80°C extract residue.

Increase of ACE inhibitory activity by the incubation of 37°C extract with 80°C extract residue. 37°C extract and 80°C extract residue were obtained water extraction for 2h at individual temperature. Incubation was carried out at pH5.0, 37°C. Bar=S.E. (n=3).

4-3-5 37°C抽出物とカゼインによる ACE 阻害活性の発現

プロテアーゼによる加水分解で ACE 阻害活性を発現することが知られるカゼインと 37°C抽出物 (ろ液) を用いて、37°C抽出物中のプロテアーゼの存在を確認した。37°C抽出物とカゼインをインキュベートした結果を Fig.4-5 に示す。ACE 阻害活性をもたないカゼインを基質として、37°C水抽出物とともにインキュベートし、ACE 阻害活性を測定した結果、37°C抽出物とカゼインを含む区では、阻害活性値は 34.2%、カゼインのみの区では、1.8%、37°C抽出物のみ含む区では、22.4%であった。これらの結果から、カゼインの分解に基づくと考えられる ACE 阻害活性値の上昇が確認された。一方、煮沸処理した 37°C水抽出物にカゼインを入れた区では、その活性は 21.2%と 37°C水抽出物のみの区と差がなく、このような効果は認められなかった。

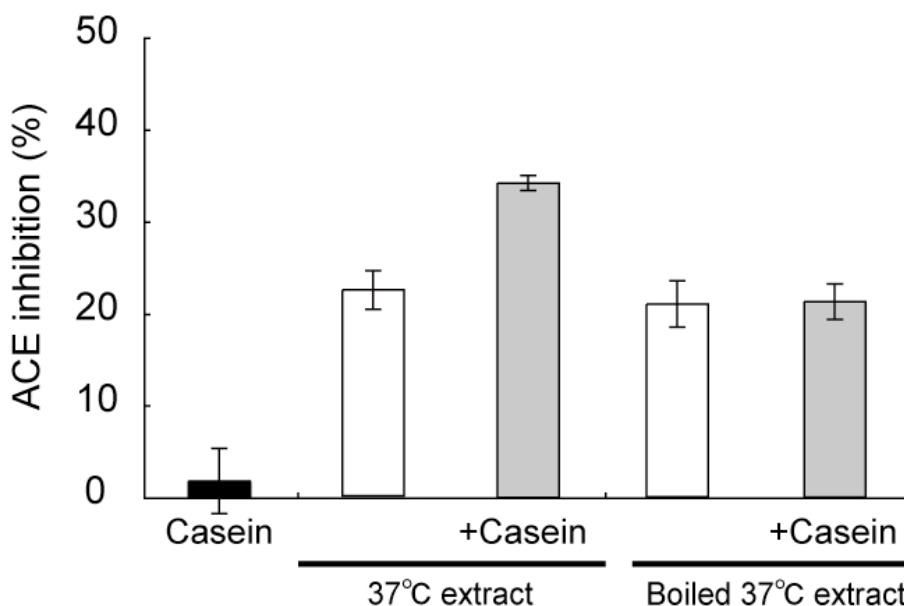


Fig.4-5 Effect of incubation of the 37°C extract on ACE inhibitory activity with casein.

Increase of ACE inhibitory activity by the incubation of 37°C extract with casein. 37°C extract was obtained water extraction for 2h. Incubation was carried out at pH5.0, 37°C for 24h. Bar=S.E. (n=3).

4-4 考察

ACE 阻害活性におけるマンネンタケ子実体水抽出温度依存性を確認した結果、37°C において、34.6%ともっとも高い阻害活性を示し、沸騰水中での抽出では 2.7%ともっとも低い値を示した。80°C以上の高温域での抽出物は、ほとんど ACE 阻害活性を示さなかった (Fig. 4-1)。この結果は、第 2 章の 2-3 水抽出温度の検討 (Table. 2-2) と同様のものである。低温域や高温域では阻害活性が低く、温度依存的に抽出物の ACE 阻害活性が変化することは、溶媒の性質により子実体粉碎物から阻害活性を与える成分が抽出されているだけではなく、温度依存的な反応により、阻害活性を与える成分量が変化していることを示している。一方、これまでにマンネンタケからは寺下らによりカルボキシプロテアーゼやメタルプロテアーゼが同定されている。栄養菌糸体の培養液から得られたカルボキシプロテアーゼは、カゼインおよびヘモグロビンを基質とした場合、最適温度が 52°C、至適 pH は、2.0-3.2 であり、基質特異性としては、Phe-Phe のペプチド結合を、全分解量の 49%で分解することが知られている¹⁾。栄養菌糸体から得られたメタルプロテアーゼの最適温度は 43°C、至適 pH6.7-7.0 である²⁾。さらにシイタケ (*Lentinula edodes*)^{3, 4)}、ヒイロタケ (*Trametes sanguinea* 現在は *Pycnoporus coccineus*)^{5, 6)}など菌糸体や菌体外液から精製されたプロテアーゼの至適温度は、50°C 前後であることが報告されており、これらの点から、本研究の阻害活性の発現が酵素反応、特にプロテアーゼによるものであると考えると、沸騰水、80°C、4°Cという温度帯では、酵素の活性が低い、もしくは失活してしまっていると考えられる。そのことにより、生成物が得られず、阻害活性値の低下を招いていると考えられる。そして、50°Cにおいて高い阻害活性を示していることとも相関がとれる。

ACE 阻害活性の抽出時 pH 依存性を確認した結果、酸性領域から中性領域において高い阻害活性が確認された (Fig. 4-2)。pH9.0 および pH11.0 のアルカリ領域では、ほ

とんど阻害活性は確認されなかった。マンネンタケの属するヒダナシタケ目のきのこは、至適 pH の低い酸性プロテアーゼを生成することが報告されており⁷⁾、寺下らの報告したマンネンタケ由来プロテアーゼに関しても、酸性領域に活性を示している。さらにエノキタケ (*Flammulina velutipes*) において過熟子実体で、酸性プロテアーゼの活性が高いことが報告されている⁸⁾。これらの点は、本研究で高い阻害活性が見られた酸性領域と一致し、マンネンタケ子実体抽出液中に含まれるプロテアーゼによりその活性を得ていることが考えられた。

一方、第2章より、25°Cで抽出された抽出物は、100°C以上の高温域においても、その活性は安定的であり、アルカリ領域においても、その活性は安定的であった (Fig.2-6)。これらの結果から、マンネンタケ水抽出物中の ACE 阻害成分は、抽出時において、熱や pH の影響を受けやすいものが関与しており、抽出後は、熱や pH に対して安定的であることがわかる。既知の ACE 阻害活性を示すペプチドは熱や pH に対して広範囲で耐性を示していること⁹⁾からも、これらの結果は本仮説を実証するもののひとつであると考えられる。

さらに抽出時間と ACE 阻害活性を検討した結果、2時間までは、急激に阻害活性が向上しているのに対して、その後、6時間後から24時間までは一定の阻害活性を保っていた (Fig. 4-3)。この結果は、ヤクのミルクカゼインをパパインなどのプロテアーゼで処理した際の時間経過と ACE 阻害活性との関係¹⁰⁾やチキンの肉のペプシン処理時のそれ¹¹⁾と類似しており、酵素反応による阻害成分の生成が示唆された。

上記のように、水抽出物の ACE 阻害活性発現に酵素反応の関与が考えられたため、37°C抽出物、80°C抽出残渣、そして、カゼインを用いて、プロテアーゼの関与を確認した。80°C抽出残渣と37°C抽出物(ろ液)をともにインキュベートすることで、阻害活性値の上昇が確認された (Fig. 4-4)。さらにインキュベーション時間を長くすることで阻害活性の向上が見られた。これらの結果から、37°C抽出物中には酵素が、80°C

抽出残渣中に基質が存在することが示唆された。さらに煮沸した 37℃抽出物と 80℃抽出残渣を用いた区では、阻害活性値が 37℃抽出物のみの区とほとんど差がなく、煮沸したことで酵素が失活したことが考えられる。37℃抽出物のみを用いた区において、インキュベーション時間の増加により活性の低下が確認された。この結果は、酵素により活性成分のさらなる分解が進み、その活性を低下させた可能性を示している。

これまでにカゼイン分解物の ACE 阻害活性に関する報告は多い¹²⁻¹⁹⁾。そこでカゼインを基質として、37℃抽出物中のプロテアーゼの存在と ACE 阻害活性の発現を確認した。37℃抽出物とカゼインをともにインキュベートした結果、ACE 阻害活性の向上が確認された (Fig. 4-5)。この結果から、37℃水抽出中にはプロテアーゼが存在し、このプロテアーゼが ACE 阻害活性能をもつペプチドを生成することが明らかとなった。以上に基づき、マンネンタケの ACE 阻害活性の発現は、抽出という加水加温処理により、マンネンタケ自身の持つプロテアーゼが抽出液中に存在する他のタンパク質を自己消化し、それにより生成した低分子ペプチドが阻害物質として作用することを実証した。

引用文献

- 1) T. Terashita, K. Oda, M. Kono and S. Murao, *Agric. Biol. Chern.*, **48**, 1029-1035 (1984).
- 2) T. Terashita, K. Oda, M. Kono and S. Murao, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2293-2300 (1985).
- 3) T. Terashita, K. Oda, M. Kono and S. Murao, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1929-1935 (1981).
- 4) T. Terashita, K. Oda, M. Kono and S. Murao, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1937-1943 (1981).
- 5) K. Tomoda, *Agric. Biol. Chern.*, **28**, 774-778 (1964).
- 6) K. Tomoda and H. Shimazono, *Agric. Biol. Chern.*, **28**, 770-773 (1964).
- 7) 川合正允, *発酵と工業*, **34**, 834-842 (1976).
- 8) 寺下 隆夫, 縄間 誠, 吉川 賢太郎, 獅山 慈孝, *日本食品科学工学会誌*, **42**, 907-912 (1995).
- 9) Y. Chen, Z. Wang, X. Chen, Y. Liu, H. Zhang and T. Sun, *J Dairy Sci*, **93**, 884-92 (2010).
- 10) J. Jiang, S. Chen, F. Ren, Z. Luo and S. S. Zeng, *J Dairy Res*, **74**, 18-25 (2007).
- 11) M. Terashima, T. Baba, N. Ikemoto, M. Katayama, T. Morimoto and S. Matsumura, *J Agric Food Chem*, **58**, 7432-6 (2010).
- 12) J. Tauzin, L. Miclo and J. L. Gaillard, *FEBS Lett*, **531**, 369-74 (2002).
- 13) M. Maeno, N. Yamamoto and T. Takano, *J Dairy Sci*, **79**, 1316-21 (1996).
- 14) M. C. Robert, A. Razaname, M. Mutter and M. A. Juillerat, *J Agric Food Chem*, **52**, 6923-31 (2004).
- 15) M. Gobbetti, P. Ferranti, E. Smacchi, F. Goffredi and F. Addeo, *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3898-904 (2000).
- 16) T. Saito, T. Nakamura, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh, *J Dairy Sci*, **83**, 1434-40 (2000).
- 17) F. Minervini, F. Algaron, C. G. Rizzello, P. F. Fox, V. Monnet and M. Gobbetti, *Appl Environ Microbiol*, **69**, 5297-305 (2003).
- 18) A. Quiros, B. Hernandez-Ledesma, M. Ramos, L. Amigo and I. Recio, *J Dairy Sci*, **88**, 3480-7 (2005).
- 19) J. A. Gomez-Ruiz, M. Ramos and I. Recio, *Electrophoresis*, **28**, 4202-11 (2007).

第 5 章

総括

きのこは食品として様々な機能が報告され、近年、生活習慣病の増大や医療費の高騰、さらなるきのこ利用拡大の面から、特に生理特性が着目されている。一方、薬用きのこと呼ばれる硬質きのこは、生食用でないことから、市場拡大が課題となっており、これら薬用きのこは生理特性における高付加価値化が利用拡大に繋がると考えられる。本論文では、和漢薬、民間薬として用いられ、栽培方法が確立しているマンネンタケ(*Ganoderma lucidum*) に着目した。マンネンタケの生理特性における高付加価値化による利用拡大を目指し、水抽出物のACE阻害活性に着目し、マンネンタケ水抽出物のACE阻害作用の特徴を明らかにし、阻害成分とその発現メカニズムに関する知見を得ることを目的とした。

第2章では、ACE阻害活性におけるマンネンタケ水抽出物の特徴を明らかにした。マンネンタケ子実体水抽出物を自然発症高血圧ラットに単回投与した結果、血圧の低下を引き起こした。水抽出物は濃度依存的にACE阻害活性を示し、抽出温度を検討した結果、25℃抽出物にもっとも高いACE阻害活性が確認された。抽出温度4℃や80℃において、ACE阻害活性が低いことは、タンパク質や酵素など熱による影響を受けやすい物質がACE阻害活性に関与していることを示唆している。一方、水抽出物の熱およびpH安定性の結果から、マンネンタケ水抽出物中に含まれるACE阻害成分は広範囲の熱やpH条件に対して安定的であった。これらの結果から、抽出時において、酵素反応などの作用により生成された生成物がACE阻害活性を示し、一度生成された生成物は熱やpHに対して安定的であることが考えられた。また、様々なきのこ子実体水抽出物のACE阻害活性の結果から、マンネンタケは、他のきのこと比較しても、高い阻害活性を示した。さらにマンネンタケ水抽出物のACE阻害活性は、菌株依存性が高いことが明らかとなった。一方、ウメ、コナラ間での培地基材依存性は確認されなかった。水抽出物の阻害様式を解析した結果、マンネンタケ水抽出物は、ACEに対して拮抗阻害を示すことが明らかとなった。このことから阻害成分は、基質に類似した

構造を持つ物質であると考えられた。そこでこれらの特徴を与えている水抽出物中の ACE 阻害活性成分の探索をおこなった。

第3章では、マンネンタケ水抽出中に存在する ACE 阻害成分の探索をおこなった。はじめに、溶媒への溶解性ならびに分子量分画に着目し、エタノール分画および限外ろ過をおこなった。次いで陽イオン交換カラムを用いて分画をおこなった。その結果、精製物は、エタノールに溶解し、分子量 3kDa 以下の陽イオン性物質であることを確認した。陽イオンカラムに吸着することから、既知のマンネンタケ由来 ACE 阻害剤であるガノデリン酸をはじめとするトリテルペノイドとは異なる成分であることが示唆された。さらに精製物を逆相クロマトグラフィーにより分画したところ、活性は分散し、いくつかの画分において ACE 阻害活性が認められた。そこで精製物中に含まれる各分画の構成成分の同定を試みた。¹H-NMR 分析、LCMS 分析、HPLC 分析および TLC 分析により、構成成分としてシチジン、グアノシン、イノシンそして L-ロイシンの存在を確認した。これら構成成分の ACE 阻害活性を調べたが、これらの成分の阻害比活性は対応する画分のそれに比べると非常に弱く、他の成分の寄与が大きいことが示唆された。そこで、既往の研究において、ACE 阻害物質として多様なペプチドが関与していることに着目した。実際、マンネンタケ子実体の水抽出物の場合においても、ニンヒドリン反応を示す物質が存在すること、抽出物が拮抗阻害を示すことなどの結果はペプチドがその活性に関与している可能性を支持しており、水抽出物中に存在する複数のペプチドが阻害活性を与えていることが考えられた。

第2章および第3章より、マンネンタケ子実体水抽出物は抽出時に ACE 阻害活性を発現している可能性があり、一度生成された ACE 阻害活性成分は熱や pH で安定的である。そして、それらの成分は複数存在し、ペプチドである可能性が示された。以上のことから、マンネンタケ子実体水抽出物の ACE 阻害活性は、マンネンタケが生産するプロテアーゼにより、水抽出中に存在するタンパク質が自己消化され、それによって生成

された低分子ペプチドが関与しているというACE阻害活性発現機構に関する着想を得た。

第4章では、得られた着想を実証するために、ACE阻害活性能向上のための抽出方法の検討とACE阻害成分へのプロテアーゼ反応の関与を明らかにすることを試みた。抽出時の温度およびpHを検討した結果、いずれも酵素反応特有の温度依存性ならびにpH依存性を示し、抽出温度においては37℃、抽出液のpHにおいてはpH5.0のものにもっとも高い阻害活性が確認された。

水抽出物のACE阻害活性発現に酵素反応の関与が考えられたため、37℃抽出物、80℃抽出残渣、そして、カゼインを用いて、プロテアーゼの関与を確認した。80℃抽出残渣と37℃抽出物をともにインキュベートすることで、阻害活性値の上昇が確認された。これらの結果から、37℃抽出物中には酵素が、80℃抽出残渣中には基質が存在することが示唆された。さらに、ACE阻害活性をもたないカゼインを基質として、37℃水抽出物とともにインキュベートし、ACE阻害活性を測定した。その結果、カゼインの分解に基づくと考えられるACE阻害活性値の上昇が確認された。一方、煮沸処理した37℃水抽出物にはカゼインに対するこのような効果は認められなかった。この結果から、37℃水抽出物中にプロテアーゼが存在し、このプロテアーゼがACE阻害活性能をもつペプチドを生成することが明らかとなった。

以上に基づき、マンネンタケのACE阻害活性の発現は、抽出という加水加温処理により、マンネンタケ自身の持つプロテアーゼが抽出液中に存在する他のタンパク質を自己消化し、それにより生成した低分子ペプチドが阻害物質として作用することを実証した。このことからマンネンタケ子実体水抽出物において高いACE阻害活性を得るためには、抽出という処理が重要であり、その活性は酵素反応であることから温度やpH、時間に依存することが示された。

本研究は、マンネンタケ水抽出物のもつACE阻害活性に着目し、その活性成分は複

数存在し、それら阻害成分の本体はペプチドである可能性を示した。さらに、ACE 阻害活性発現機構が、抽出過程におけるプロテアーゼの酵素反応によるものであることを明らかにした。そして、マンネンタケは、酵素反応のもととなる基質と酵素を自ら所持し、水を加え、加温することではじめてその反応が進行することが明らかとなった。これらのことから、きのこの持つ機能性は、きのこが生育やその代謝の過程で生成したもののみでなく、きのこが持つ成分やその性質を利用した処理によって、はじめて発揮されるというひとつの考え方を構築した。さらに、マンネンタケ水抽出物の ACE 阻害活性発現機構を実証し、抽出条件により、ACE 阻害活性向上方法を確立することは、社会的実用面において、マンネンタケのもつ薬理効果の力価を上げ、マンネンタケの高付加価値化をもたらし、結果として、利用拡大に繋がると考えられる。

上記のように ACE 阻害活性の発現は、酵素反応によるものであることが明らかとなった。しかし、その原因となる基質と酵素に関する情報は少ない。既往の研究により、ACE 阻害活性を示すペプチドソースは、多様性に富むことから、分解により ACE 阻害活性を発現するタンパク質の特異性は低いと考えられる。一方、既往のマンネンタケ由来プロテアーゼは、栄養菌糸体および菌体外液から精製されたものであり、マンネンタケをはじめきのこ子実体からのプロテアーゼに関する研究は十分とはいえない。マンネンタケ子実体水抽出物における ACE 阻害活性発現機構を解明するためには、今後、水抽出物中からの ACE 阻害活性を与えるプロテアーゼの単離、同定が必要であり、これらの酵素情報をもとに、基質の同定、さらには、阻害活性を与えているペプチドの同定が今後の課題として重要と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、親身になって、終始ご指導、ご鞭撻賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 鮫島正浩 教授に深く感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり実験方法から博士としての姿勢まで終始ご指導、ご助言いただきました東京大学大学院 農学生命科学研究科 五十嵐圭日子 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究に対してご助言、ご指導いただき、温かくお声をかけていただいた東京大学大学院 農学生命科学研究科 寺田珠実 助教に感謝致します。

きのこ研究へ導き、社会人博士としての立場を与えていただき、研究全般にわたりご指導ご鞭撻賜りました高崎健康福祉大学 健康福祉学部 江口文陽 教授に深く感謝致します。

成分精製に関して、懇切丁寧なご指導をいただきました高崎健康福祉大学 健康福祉学部 小澤好夫 教授、阿部雅子 助教、宮澤紀子 助教に感謝致します。

成分同定に関して、懇切丁寧なご指導をいただきました東京大学大学院 農学生命科学研究科 松永茂樹 教授に感謝申し上げます。実験に関して、ご助力いただきました水圏天然物化学研究室 秋山拓哉 氏、成瀬将人 氏に御礼申し上げます。

質量分析に関して、ご指導、ご鞭撻いただきました高崎健康福祉大学 薬学部 金子雅文 准教授に深く感謝致します。

マンネンタケをはじめ、きのこをご提供いただきました有限会社村田産業 吉留高志 氏に厚く御礼申し上げます。

そして、東京大学 森林化学研究室の皆様、高崎健康福祉大学 江口研究室の皆様にご心より感謝致します。

最後に、心身ともに支えてくれた家族に心から感謝致します。