



キノコの生理活性成分の評価：シイタケの抗酸化成分に関する研究

農学部 西山和夫

はじめに

我が国では種々のキノコが食用として利用されているが、中でもシイタケは我々に最も身近なキノコである。

シイタケは古くから、原木を用いて生産されてきたが、近年、原木用木材や労働力の不足などの理由から、菌床栽培がさかんに行われるようになってきている。菌床栽培では原木栽培のような森の気候環境を栽培に直接利用することはなくなったが、菌床の主成分であるオガクズは木材由来であるので、原木栽培シイタケのみならず、菌床栽培されたシイタケも貴重な森の恵みとすることができる。

食品としてのキノコは嗜好的特性のみならず、健康面での機能が注目されている。これまでもキノコ類には抗変異原活性、抗腫瘍活性、免疫増強作用、血糖降下作用、血圧降下作用、血中コレステロール低下作用、抗血栓作用等の生理活性を示す成分が存在することが報告されている。このようなキノコの生理活性が関心を集めている大きな理由は、がん、循環器系疾患、肥満、アレルギー等の生活習慣病が増加していることによるが、疫学的な調査結果はこれらの生活習慣病の発症への食生活の影響の大きさを示唆している。

一方、生活習慣病の発症に活性酸素が関与していることが明らかにされつつある。活性酸素にはスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素などがあり、これらは通常の酸素より反応性の高い分子種である。細胞内ではミトコンドリア、ミクロソーム、ペルオキシソーム、核等におけるエネルギー生産や薬物代謝にもなって活性酸素が生成する。好中球やマクロファージ等の白血球は積極的に活性酸素をつくり、生体防御に利用しているが、これらの白血球が生成する活性酸素の攻撃が我々の体におよぶと有害となる。また、がんの原因となる放射線や紫外線の照射によっても活性酸素が生成する。我々の体はこれらの活性酸素に対する防御機構をもっているが、この防御機構の能力を越えた活性酸素が生体内で生成するとDNA、タンパク質、脂質などの生体成分に損傷が生じ、いろいろな病気の原因になると考えられている。

食品中には活性酸素による酸化ストレスを抑制する抗酸化作用を示す成分が数多く存在している。発がん抑制や抗動脈硬化等の生理機能が明らかにされている緑茶カテキンやワインのプロアントシアニジン等である。シイタケについては呈味成分、香気成分やいくつかの生理活性物質に関する報告があるが、抗酸化活性に関する研究はほとんど行われていない。

本研究はシイタケ中の抗酸化活性と活性成分の特性を明らかにすることを目的として行った。

材料と方法

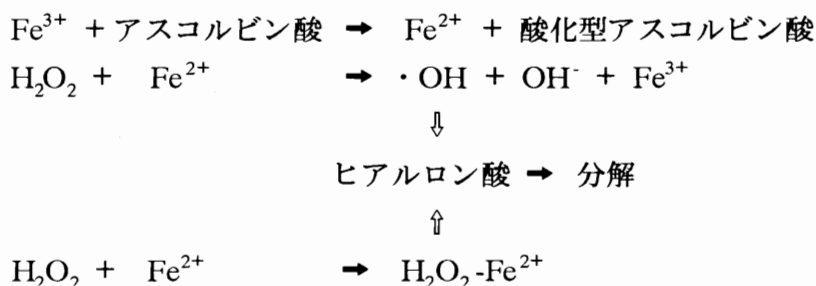
1) シイタケ抽出液の調製

シイタケは宮崎市、えびの市、日向市、小林市、および椎葉村産の市販の生シイタケを使用した。購入した時期は1998年11月16日～12月1日である。シイタケの冷凍は -40°C で24

時間行い、解凍は25°Cで行った。2時間で完全に解凍したが、その後24時間まで25°Cでインキュベートし、抗酸化活性への影響を調べた。シイタケの乾燥は送風加熱乾燥機を用いて行った。まず、45°Cで1時間予備乾燥を行い、本乾燥として3時間毎に2°Cずつ昇温し、最後に60°Cで1時間仕上げを行った。生の状態のシイタケ重量の10倍量の水を加えてホモジナイズした後、10,000gで15分間遠心分離し、遠心上清に残存する浮遊物をろ別してシイタケ抽出液を調製した。

2) 活性酸素によるヒアルロン酸の分解の抑制を指標とした抗酸化性の測定

D-NアセチルグルコサミンとD-グルクロン酸が交互に結合してできた直鎖上の高分子多糖であるヒアルロン酸は、関節、眼の硝子体、皮膚、腱、筋肉、軟骨、血管、脳など広範に存在する。分子量がきわめて大きく、100万以上の標品が関節液や鶏冠（とさか）から得られている。コラーゲンなどとともに細胞外マトリックスを構築しており、細胞接着や細胞の移動などを制御している。水溶液は粘度が高く、関節の潤滑油としても機能している。過酸化水素-アスコルビン酸-鉄系（フェントン系）で生成するヒドロキシルラジカル等の活性酸素によって容易に分解され、粘度が急激に低下する。水溶液の粘度を測定することにより分解の程度を知ることができる。



本研究では鶏冠由来のヒアルロン酸をpH7.4のリン酸緩衝液中で1mMの過酸化水素および0.1mMのアスコルビン酸と30分間反応させ、反応液の粘度の変化をキャノンフェンスケ粘度計で測定した。この反応液にシイタケ抽出液を添加し、粘度低下に対する抑制効果を調べた。特に記述しない限り、シイタケ抽出液は水で5倍に希釈したものを使用した。反応液には特に鉄イオンを添加していないが、ヒアルロン酸標品中の鉄含量を定量した結果、反応液中に約0.5 μMの鉄イオンが存在していた。

結果と考察

生シイタケ抽出液中に過酸化水素-アスコルビン酸によるヒアルロン酸の分解を抑制する活性が認められた。この抗酸化活性はシイタケの産地によって大きく異なっており、最大57%から最小29%と2倍の差が認められた（図1）。今回は、シイタケが原木栽培と菌床栽培のどちらの栽培法によって栽培されたものであるかという点については、明確に表示されていた1種類を除いて区別することができなかった。シイタケ試料Cが、5種類のシイタケ試料の中で平均的な抗酸化活性を示したので、以下の実験にはシイタケ試料Cを使用した。

次に、この活性に対する加工の影響を調べた（図2）。冷凍したシイタケでは生状態のシイタケより抗酸化活性が若干強くなり、2時間程度の解凍では抗酸化活性が維持されて

いたが、解凍後、25℃でインキュベートするとインキュベート時間が長くなるにつれて活性が徐々に低下した。筆者らは解凍後のインキュベーションによって遊離アミノ酸含量が顕著に増加することを観察しているため、この活性の低下はシイタケのタンパク質の分解によるものと推定された。

生シイタケの活性がタンパク質由来のものである可能性が示唆されたので、次に生シイタケ抽出液の抗酸化活性の熱安定性を調べた。100℃、10分間の加熱により生シイタケの抽出液の抗酸化活性は44%から20%へ約半分に低下したが、熱に安定な活性が残存していた。さらに分画分子量10,000の限外ろ過ユニットを用いて生シイタケ抽出液をろ過し、ろ液の活性を調べた結果、加熱処理と同様に抗酸化活性が約半分に低下した(図3)。

また、前述の方法で製造した乾燥シイタケの抗酸化活性について調べた結果、生シイタケの約半分の活性が認められ、この活性は限外ろ過による影響を受けなかった(図4)。

このようにシイタケ中には熱に比較的安定な分子量10,000以下の抗酸化物質が存在していることが明らかとなった。なお、熱に不安定な高分子量成分は過酸化水素分解活性を示したので、カタラーゼであることが示唆された。

次にこの比較的熱に安定な分子量10,000以下の抗酸化活性成分の特性を明らかにするために限外ろ過した生シイタケ抽出液の抗酸化活性について検討した。表1に示したように限外ろ過した抽出液は濃度依存的な抗酸化活性を示した。さらにフェントン系によるヒアルロン酸の分解に対する鉄キレート剤とヒドロキシルラジカル捕捉剤の影響を調べた結果、鉄キレート剤がヒドロキシルラジカル捕捉剤に比べて、低濃度で強い抗酸化活性を示すことが明らかとなった(表2)。また、フェントン系のアスコルビン酸の代わりに6-ヒドロキシドーパミンを用いた系やヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系においても抗酸化活性が認められた。

以上の結果、シイタケにはカタラーゼ様の高分子性および比較的熱に安定な分子量10,000以下の抗酸化物質が存在し、後者の主な作用機構は鉄とのキレート形成であることが示唆された。

ヘムタンパク質の構成成分としてよく知られている鉄は、これまで主に欠乏症が問題視されてきたが、近年、体内の過剰な鉄と肝臓疾患やガンのような病気との関連が注目されている。鉄は条件によって活性酸素生成を促進し、酸化ストレスの原因となる。また、多くの酸化還元酵素や抗酸化酵素にヘム鉄や非ヘム鉄の形で存在しており、細胞の増殖に深く関与している。たとえば、DNA合成のキー酵素であるリボヌクレオチドレダクターゼは細胞内の遊離鉄濃度によって活性が変化することが明らかにされている。

筆者らはこれまで、ポリフェノール化合物の殺細胞作用に注目して銅や鉄の存在下におけるDNAの切断等のプロオキシダント活性について研究してきたが、近年、フェントン反応による生体成分の損傷に対するポリフェノール化合物の影響を調べる過程でポリフェノールと鉄イオンのキレート形成に関する知見を得ている。生シイタケは貯蔵中に顕著な褐変反応が認められるので、何らかのポリフェノール化合物が存在しているものと思われる。今後、この成分の同定を行う予定である。

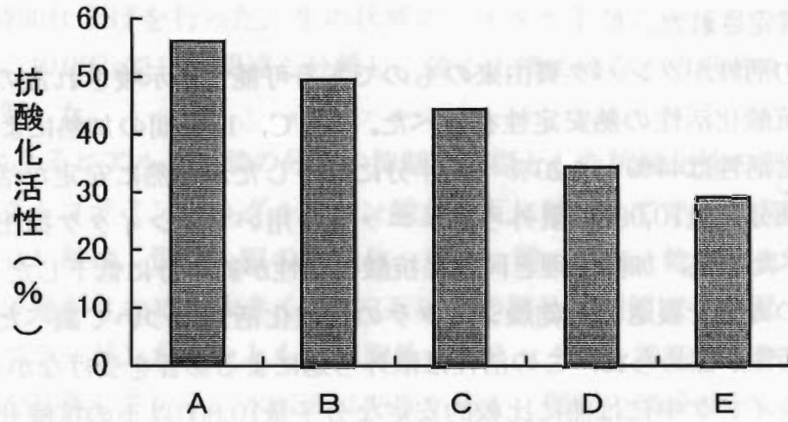


図.1 シイタケの産地別による抗酸化活性の比較

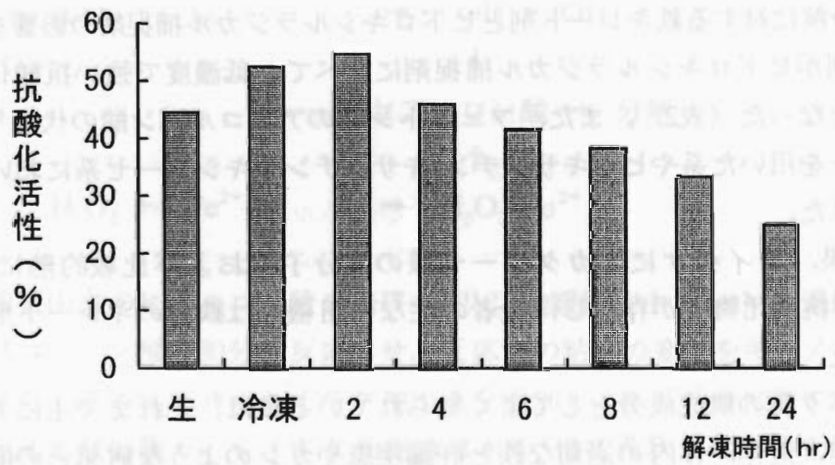


図.2 冷凍および解凍時のインキュベートによる抗酸化活性の変化

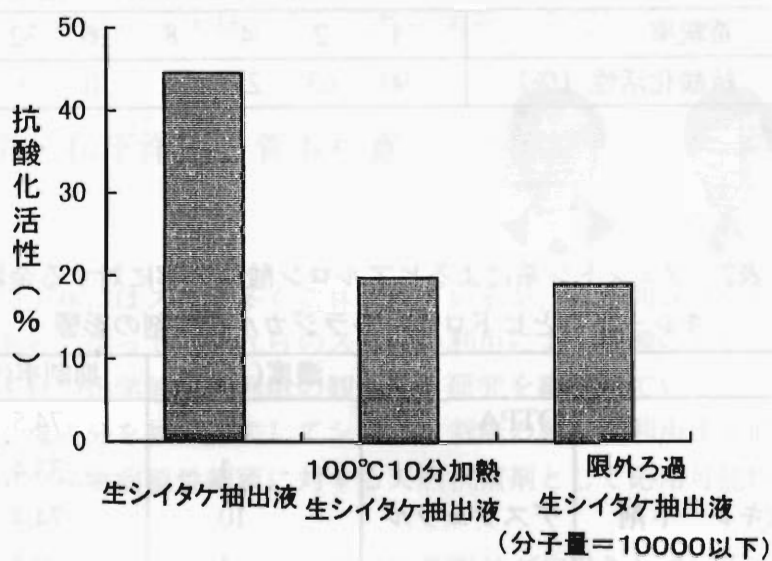


図.3 生シイタケの加熱・限外ろ過による抗酸化活性の変化

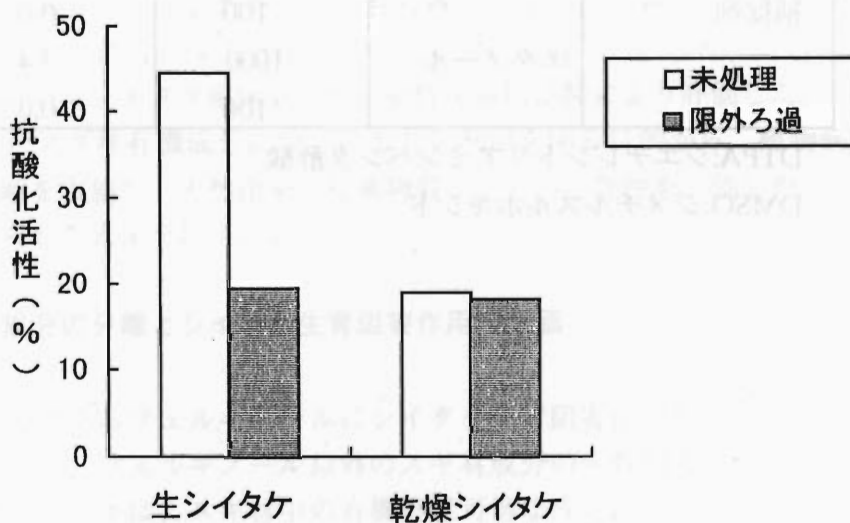


図.4 生シイタケと乾燥シイタケの限外ろ過による抗酸化活性の変化

表1 限外ろ過した生シイタケ抽出液の抗酸化活性の濃度依存性

希釈率	1	2	4	8	16	32
抗酸化活性 (%)	90	63	25	16	10	3

表2 フェントン系によるヒアルロン酸の分解に対する金属キレート剤とヒドロキシルラジカル捕捉剤の影響

		濃度(μ M)	抑制率(%)
鉄キレート剤	DTPA	10	74.5
		1	33.4
	デスフェラル	10	74.4
		1	30.3
ヒドロキシルラジカル捕捉剤	DMSO	1000	15.5
		100	5.5
	マンニトール	1000	0.0
		100	0.0
	エタノール	1000	3.4
		100	0.0

DTPA:ジエチレントリアミンペンタ酢酸

DMSO:ジメチルスルホキシド