

## 論文の内容の要旨

生物材料科学専攻  
平成 19 年度博士課程 入学  
氏 名 熊倉 慧  
指導教員名 鮫島 正浩 教授

論文題目 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

### 第一章 序論

近年、生活習慣病やそれら疾病に伴う医療費の高騰、健康食品ブームにより、機能性食品に対する期待は高まっている。高血圧症においても、合成薬剤の持つ副作用の観点から、穏和な効果を有し、副作用の少ない食品に注目が集まっている。

マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) は、古来より和漢薬、民間薬として利用されてきたキノコであり、乾燥粉末や抽出物が血圧上昇抑制効果を有することが知られている。しかし、マンネンタケ水抽出物の血圧上昇抑制効果に関する研究報告はあるものの、その原因に関する知見は乏しい。一方、血圧上昇作用には、レニン・アンギオテンシン系において、血圧コントロールに重要な役割を担っているジペプチジルカルボキシペプチダーゼであるアンギオテンシン変換酵素(ACE)が深く関係していることが知られている。

そこで本研究では、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。

### 第二章 マンネンタケ水抽出物の ACE 阻害作用の特徴

本章では、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た。

マンネンタケ子実体を水で抽出した結果、その抽出物において阻害活性が確認され、血圧の低下も引き起こした。また、マンネンタケ水抽出物は、他種のキノコ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を明らかにした。さらにマンネンタケ抽出物は ACE 活性に対して拮抗阻害を示した。そして、水抽出物の ACE 阻害活性は、熱(25-140℃)および pH(3.0-9.0)条件下においても安定であることを確認し、広範囲での熱および pH 安定性を有し

ていることを明らかにした。

一方、キノコの機能性は菌株や生育条件の違いによりその活性が異なることが知られている。そこで、マンネンタケ 4 菌株をウメおよびコナラ木粉を用いて人工栽培し、子実体水抽出物の ACE 阻害活性を比較検討した。その結果、子実体抽出物の ACE 阻害活性は、菌株依存性が高いことが明らかとなった。さらに、培地基材の差異による ACE 阻害活性を比較した結果、ACE 阻害活性については、ウメ、コナラ間での培地基材依存性は確認されなかった。

### **第三章 マンネンタケ水抽出物中に存在する ACE 阻害成分の探索**

本章では、マンネンタケ水抽出物成分の分画を試みた。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濾過をおこなった。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 3k 以下の陽イオン性物質であることを確認した。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。H-NMR 分析、LCMS 分析、HPLC 分析および TLC 分析により、主要な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。さらに、これら主要成分の 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が知られ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、また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相加的に阻害活性を与えていることが考えられた。さらに ACE 阻害活性の低い水抽出物 80%エタノール不溶画分をペプシン消化したところ、阻害活性の上昇が確認された。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、水抽出物中に存在するタンパク質の自己消化によって生成し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仮説を打ち立てた。

### **第四章 ACE 阻害活性発現機構に関する実証**

前章で打ち立てた仮説を実証するために、本章では、ACE 阻害活性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°C、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。さらに、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。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°C 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°C 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、抽出によって得られた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。

### **第五章 総括**

本研究では、まずマンネンタケ子実体の水抽出物には顕著な ACE 阻害活性が存在すること、さらにこの性質を与える物質は広範囲での熱および pH 安定性を有していることを明らかにした。また、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、機能性に基づく菌株選抜が重要であることを示している。さらに水抽出物中の阻害成分の探索により、マンネンタケ水抽出物中の ACE 阻害活性は、単一成分によるものではなく、複数の低分子ペプチドに由来する阻害活性が相加されたものであると考えられた。そして、これらのペプチドは、マンネンタケ由来のプロテアーゼにより、抽出液中に存在する他のタンパク質を自己消化し、生成されていることが示された。以上の結果により、マンネンタケ子実体の水抽出液中には酵素と基質が共存し、その酵素作用により生成した低分子ペプチドが ACE 阻害活性の発現するものと結論した。さらに、このことからマンネンタケ子実体抽出物において高い ACE 阻害活性を得るためには、抽出温度や抽出時間などの条件が非常に重要であることが示された。これらの知見は、今後、マンネンタケ子実体抽出物をはじめ、多くの食用キノコ健康食品の機能向上につながる技術開発に利用可能であると考えている。