

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 熊倉 慧

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

担子菌の子実体の中には、食用きのこや薬用きのことして人間生活と深い関わり合いを持ってきているものが少なくない。この中で、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) の子実体は和漢薬あるいは民間薬として古くから利用されてきたきのこであり、その薬効としては子実体の水抽出物の血圧上昇抑制作用などが知られている。また、近年、マンネンタケの人工栽培法も確立されたことなどもあって、このような薬効をベースとするマンネンタケ子実体利用の市場拡大への産業界の期待も少なくない。マンネンタケ水抽出物の血圧抑制効果については、レニン・アンギオテンシン系との関わり、その中でも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: Angiotensin Converting Enzyme)活性の阻害についてすでに報告があるが、その原因物質に関する知見は乏しい。そこで、本研究では、マンネンタケ水抽出物の ACE 活性阻害成分ならびにその発現機構について知見を得ることを目的とした。本論文は、第 1 章の序論に引き続き、本論の研究として第 2 章から第 4 章、さらに第 5 章の総括によって構成されている。

第 2 章では、ACE 活性阻害におけるマンネンタケ子実体の水抽出物の特徴を明らかにすることを目的に、子実体の水抽出物のモデル動物における血圧抑制効果、ACE 活性阻害の定量評価、ACE 活性阻害の温度ならびに pH 安定性、さらに菌株や生育条件の違いが ACE 活性阻害に与える影響などについて調べた。マンネンタケ子実体の水抽出物の投与によるモデル動物試験では、当初は 216mmHg あった血圧が投与 1 時間後には 194mmHg、さらに 6 時間後には 188mmHg まで低下し、この効果は投与後、24 時間継続されることを示した。以上のことから、水抽出物には十分な血圧抑制効果が認められることを確認した。また、25°C、24 時間抽出におけるマンネンタケ子実体の水抽出物の ACE 活性阻害 IC₅₀ 値は 197 μg/ml であり、モデル動物実験における血圧抑制効果の一因として十分に評価できる値であった。さらに、水抽出物の ACE 活性阻害は、温度範囲 25-120°C および pH 範囲 3.0—9.0 の条件下において安定であること、水抽出物による ACE 活性阻害は拮抗型であることを明らかにした。また、供試した 4 菌株での子実体の水抽出物における ACE 活性阻害の比較では、生育条件よりも菌株による差異が大きいことを示した。

第 3 章では、マンネンタケ子実体の水抽出物中に存在する ACE 活性阻害成分の探索を目的として、抽出物の分画を試みた。まずエタノール添加による高分子量のタンパク質や親水性の高い糖成分などの不溶化を目的とする分画では、ACE 活性阻害の大部分は 80%エタノール可溶部に分画されることを明らかにした。次に限外濾過による分子量分画を行い

ACE 活性阻害物質が分子量 3kDa 以下の物質であることを確認し、さらに ACE 活性阻害物質が陽イオン交換体に吸着される物質であることを明らかにした。しかしながら、陽イオン交換体に吸着された画分を逆相クロマトグラフィーに供したところ、ACE 活性阻害物質がいくつかの画分に分離された。このことから、原因物質は単一の成分ではないことが示唆された。また、逆相クロマトグラフィーによって分離した ACE 活性阻害を有する画分を構成する化合物について同定を試みた結果、主要な成分としてシチジン、グアノシン、イノシンなどの核酸が同定された。さらに、これら核酸成分について ACE 活性阻害を調べたが、いずれもその効果は非常に弱く、このことから各画分の ACE 活性阻害については他の成分の寄与が大きいことが示唆された。以上の一連の結果に加えて、ACE 活性阻害を示した各画分の TLC 分析ではニンヒドリン反応を示す物質が存在すること、また抽出物による阻害が拮抗型であること、さらに ACE 自身がプロテアーゼであること等の理由から、水抽出物中に存在する複数のペプチドが ACE 活性阻害の原因になっていることが予想された。このようなことから、マンネンタケ子実体の水抽出物による ACE 活性阻害については、マンネンタケ自身が生産するプロテアーゼが共存する他のタンパク質を消化することによって生成した低分子量ペプチドが関与しているのではないかという着想に至った。

第 4 章では、前章で得た着想を実証するために、ACE 活性阻害成分の生成へのプロテアーゼの関与を明らかにすることを試みた。まず、水抽出物の ACE 活性阻害については、抽出時の温度および pH いずれもが酵素反応特有の温度依存性ならびに pH 依存性を示し、温度 37℃、pH5.0 で抽出したのものにもっとも高い活性阻害が得られる至適条件が存在することを明らかにした。また、第 2 章の結果では ACE 活性阻害物質は温度 100℃、pH9.0 でも安定であるにも関わらず、抽出時にこれらの条件を適用すると ACE 活性阻害がほとんど得られないことを示した。さらに、ACE 活性阻害をもたない高分子量タンパク質であるカゼインを基質として水抽出物とともにインキュベートすると、カゼインの分解によると考えられる ACE 活性阻害の上昇が認められた。以上のことから、水抽出物中に存在するプロテアーゼが ACE 活性阻害能をもつペプチドを生成すると判断された。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章までの実験結果に基づき、マンネンタケ子実体における ACE 活性阻害の発現はマンネンタケ子実体の水抽出によって得られたプロテアーゼが抽出液中に共存する他のタンパク質を自己消化することで生成した低分子量ペプチドが阻害物質として作用すると総括した。

以上、本研究によって、マンネンタケ子実体の水抽出物における ACE 活性阻害の本質ならびにその発現機構について基礎学として新しい知見が得られた。また、それに基づき、高力価の ACE 活性阻害を得るために必要なマンネンタケ菌株選択ならびに子実体取得の条件、さらにマンネンタケ子実体を薬用きのことして利用して行く上での水抽出条件の設定のための指針が得られた。よって、審査委員一同は、本論文が学術上ならびに応用上において博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。