

第27回麻布環境科学研究会 一般講演5

食用茸中のエルゴチオネインに関する基礎研究

慶林坊健太¹, 堂ヶ崎知格²¹麻布大学大学院環境保健学研究科生, ²麻布大学環境保健学部

【はじめに】

茸類は古くから日本人になじみが深く、身近な食材の一つとして、また薬用としても広く用いられてきている。近年、これらの茸類に生活習慣病予防や抗がん効果のあることがわかり、昨今の健康志向を反映し、ヒトの健康維持・増進との関連から高い関心が持たれるようになった。生理活性物質として、子実体あるいは菌糸体の細胞壁に由来する多糖体やその類縁物質、脂肪酸・トリテルペン類・ステロイド類などの低分子脂溶性成分をはじめとした多くの研究成果が報告されている。当研究室においても、これまで、食用茸の一種であるヒトヨタケ科（ハラタケ目）に属するササクレヒトヨタケ（*Coprinus comatus*）について、生理活性物質の検索と構造解析を検討していて、含有する多糖成分のリンパ細胞幼若化能（免疫賦活作用）などについて報告してきた。

今回は、ササクレヒトヨタケにおけるその他の生理活性成分の検索を目的として、その機能性が国内外で注目され、期待を集める抗酸化物質について取り組むことにした。なお、抗酸化物質は、喫煙・紫外線・ストレスなどにより発生する過剰のフリーラジカルを含む活性酸素が体組織や細胞に傷害を与え、蛋白質の変性や脂質の過酸化を引き起こし、動脈硬化やそれに伴う脳血管疾患、癌、糖尿病の誘発、老化促進などを引き起こすことを防止する重要な働きをもつ。

また、抗酸化物質の一つとして、活性能がビタミンCの豊富なレモン汁をはるかにしのぎ、ビタミンEの20倍ともいわれ、天然アミノ酸の一種であって安全性も高い「エルゴチオネイン」に着目した。エルゴチオネインは、1925年にブタの血液の中から、

1927年にヒトの血液中からはじめて単離されている。生体ではヒスチジンより生合成され、生体調節に深く関わる物質である。強い抗酸化作用を持つことが報告されているものの、その他の生理活性については不明な点が多く、自然界における存在および含有量等についても詳細な報告例は少ない。

本研究では、ササクレヒトヨタケにおけるエルゴチオネイン含有の有無およびその含有量を、分析条件の検討とともにHPLCを用いて定量した。また、日常的に食べられている数種の市販食用茸についても、同条件により分析し、含有量を測定したので報告する。

【材料および方法】

(1) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析試料の調製

材料として10種（キクラゲ、エリンギ、エノキ、ブナシメジ、マイタケ、シイタケ、タモギタケ、アガリクス、ハナビラタケおよびササクレヒトヨタケ）の食用茸を用いた。茸は乾燥粉末とし、抽出溶液（10 mM dithiothreitol, 100 μM betaine, 100 μM 1-mercapto-2-methyl imidazole 加70%エタノール）で抽出した後、遠心分離した。この上清を窒素気流下で乾固した後、残渣を2 mlの超純水に再溶解して試料液を調製した。また、標準溶液として、精秤したエルゴチオネイン4 mgを超純水で溶解して100 mlとし、検量線作成に用いた。

(2) HPLC) による分析条件の検討

カラムはMightysil RP-18 GP 250-10 (5 μm)、流量1.0 ml/min。検出器はMD-1510型UV/VISフォトダイオードアレイ。移動相は、既報（Dubostら, J. Medicinal Mushrooms, 8, 215-222, 2006.）に従って調

製した、50 mMリン酸緩衝液（3%アセトニトリル 0.1%トリエチルアミン加）の他、良好な分離を得るための移動相としていくつかの組成を検討した。

(3) エルゴチオネインの定量

標準溶液として、0.008～0.04 mg/mlの範囲で4段階濃度を調製した。HPLCに100 μ l注入し、測定波長260 nmで測定して得られたピーク高から検量線を作成した。また、各茸の抽出試料は同様の条件でHPLC分析に供した。

【結果および考察】

(1) 分析に適した溶離液の組成

Dubostらによる50 mMリン酸緩衝液（3%アセトニトリル、0.1%トリエチルアミン加）を溶離液として用いた場合、標準品のみ分析には支障はなかったものの、いくつかの茸試料においては共存物質との良好な分離結果が得られなかったことから、移動相について、さらに検討した。Mudaら（*J. Chromatogr.* 434, 191-195, 1988.）による溶離液H₂O（0.5 ml/L TFA, 2 mMドデシル硫酸サトリウム, 2 mM塩化ナトリウム）・アセトニトリル・メタノール（200：50：25）のH₂O部分を8 mMリン酸水素ナトリウム, 19 mMリン酸二水素カリウム（pH 7.2）に変換した溶離液を用いたときに、比較的良好的な分離結果が得られた。

ール（200：50：25）のH₂O部分を8 mMリン酸水素ナトリウム, 19 mMリン酸二水素カリウム（pH 7.2）に変換した溶離液を用いたときに、比較的良好的な分離結果が得られた。

(2) 各種茸のエルゴチオネイン含量

HPLCクロマトグラムから得られたピーク高をもとに、シグナルノイズ（S/N）比を10以上で求めたところ、定量限界は0.001 mg/mlであった。検量線の相関係数は $r = 0.999$ 以上で直線性が認められ、 $y = 1.43 \times 10^6 x - 9.8 \times 10^2$ の回帰式が得られた。また、同分析条件によるエルゴチオネインの添加回収試験を行った結果、回収率の平均は100.8%であった。

各試料におけるエルゴチオネイン含量を算出したところ、キクラゲ、エリンギ、ハナビラタケ、アガリクスおよびシイタケでは乾燥重量1 g当たり1.0 mg前後、ブナシメジ、エノキ、マイタケおよびタモギタケは約2～3 mgの範囲であったが、ササクレヒトヨタケにおいては、これらと比較して約3～10倍以上のきわめて高い含有が認められた。