

バイリングの菌糸生長および薬理効果に及ぼす 核酸関連物質の影響*1

宮澤紀子*2,3, 大賀祥治*3

Influence of a Nucleic Acid-related Substance on the Mycelial Growth and the Pharmacological Effects of *Pleurotus nebrodensis**1

Noriko MIYAZAWA *2,3 and Shoji OHGA *3

The influence of a nucleic acid-related substance on *Pleurotus nebrodensis* cultivation was assessed in terms of mycelial growth and pharmacological effects. The addition of the nucleic acid-related substance facilitated the growth of mycelia in all culture media, i.e., liquid, agar and sawdust. The growth-facilitating effect of the nucleic acid-related substance was highest at 0.1% concentration in liquid and agar media. The results of tests for anti-platelet aggregation and chemokine gene expression inhibition demonstrated that mycelia tended to be active when cultured with addition of the nucleic acid-related substance to the medium. Pharmacological effects were absolutely attributed to the additive.

Keywords: *Pleurotus nebrodensis*, pharmacological effect, nucleic acid-related substance.

バイリング (*Pleurotus nebrodensis*) の生育において、培地への核酸関連物質の添加が菌糸生長および薬理効果に及ぼす影響を検討した。核酸関連物質は、液体、寒天、木粉の全ての培地で菌糸体の生長を促進させた。その促進効果は、液体および寒天培地では核酸関連物質の添加濃度が0.1%の試験区において最も高くなった。血小板凝集抑制試験およびケモカイン遺伝子発現抑制試験では、核酸関連物質の添加培地で培養した菌糸体は、抑制効果が高くなる傾向にあった。薬理効果は、添加物濃度によって影響をうけることが明らかになった。

1. 緒 言

きのこには、これまでに数多くの生理活性物質が見出されている。代表的なものには抗腫瘍活性成分としてカワラタケ (*Coriolus versicolor*) のクレスチン、シイタケ (*Lentinula edodes*) のレンチナン、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) のシヅフィランが単離され、この他にも血圧降下作用を示すマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) のトリテルペンやコレステロール低下作用を示すシイタケのエリタデニンなどがある^{1,2)}。近年わが国における生活習慣病は増

加傾向にあり、きのこは健康の維持増進と疾病の予防・治療・回復に期待できるものと考えられる。

一方、栽培に用いられる栄養剤の種類は、菌糸生長だけではなく得られる子実体の成分にも影響を及ぼすことが知られている³⁻⁶⁾。従って、安定的で高い薬理効果をもつきのこが得られる培地を検討する必要があると考えられる。近年、吉本らは、血小板凝集抑制作用やケモカイン遺伝子発現抑制作用を指標としたヒメマツタケ (*Agaricus blazei*) の薬理効果が、堆肥培地の種類によって異なることを明らかにした⁷⁾。きのこの血小板凝集抑制作用は、これまでにADPやコラーゲン、トロンビンを惹起剤としてシイタケ^{8,9)}やヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)⁹⁻¹¹⁾、キクラゲ (*Auricularia auricular*)¹²⁾、カバノアナタケ (*Inonotus obliquus*)¹³⁾、アラキドン酸ナトリウムやPAFを用いた研究がヒメマツタケ^{7,14)}で報告されている。またTNF- α で惹起したケモカイン (IL-8) の発現抑制作用については、吉本らのヒメマツタケ⁷⁾だけであるが、ケモカインに関する研究はヒメ

*1 Received April 19, 2007; accepted November 7, 2007. 本報告の一部は、第54回日本木材学会大会(2004年8月、札幌)において発表した。

*2 高崎健康福祉大学健康福祉学部 Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare, Takasaki 370-0033, Japan

*3 九州大学大学院農学研究院 Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 811-2415, Japan

マツタケ^{15, 16)}の他にもツガノマンネンタケ (*Ganoderma tsugae*)¹⁷⁾ やマンネンタケ^{18, 19)} でなされている。しかし、培地の種類が薬理効果に及ぼす影響を検討した報告は、ヒメマツタケ⁷⁾のみである。また、収量の増加を期待できる添加剤を培地に加えて培養したきのこの薬理効果に関する研究はなされていない。

大賀らは、ネギ煎汁からシイタケ菌糸の生長に対し有効な添加物として核酸関連物質²⁰⁾を見出している。また、数種類のきのこに対してトルラ酵母を熱水抽出し調製した核酸関連物質による菌糸体の生長促進効果を報告している^{21, 22)}。

そこで、抗高血圧症や抗高脂血症、抗炎症効果²³⁻²⁵⁾が明らかにされているヒラタケ属 (*Pleurotus*) のバイリング (*Pleurotus nebrodensis*) を用いて、既報の核酸関連物質^{21, 22)}が菌糸体の生長と薬理活性に及ぼす影響を検討した。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

高崎健康福祉大学保有のバイリング (*Pleurotus nebrodensis*: FERM P-19370) を供試菌株とした。SMY 寒天培地 (Saccharose (和光純薬工業株式会社製) 10, Malt extract (ナカライテクス株式会社製) 10, Yeast extract 4, agar (以上、関東化学株式会社製) 20 g/L) で28℃、6日培養して用いた。

2.2 添加剤

木材キシロースを主糖源として、窒素およびリンを添加し培養したトルラ酵母を熱水抽出して調製したりボ核酸 (RNA-M)²¹⁾ を添加剤とした。

2.3 菌糸生長試験

2.3.1 液体培地

Henneberg 培地 (glucose (和光純薬工業株式会社製) 50.0, KNO₃ 2.0, NH₄H₂PO₄ 2.0, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCl₂ (以上、関東化学株式会社製) 0.1 g/L) 30 ml を100 ml 容三角フラスコに入れ、RNA-M を培地濃度で0.1, 0.5, 1.0, 2.0%になるよう添加した。120℃、1.2 kg/cm² で15分蒸気滅菌し、冷却後、種菌としてあらかじめSMY 寒天培地で28℃、6日間、暗所で前培養した菌そうを5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、液体培地表面に接種した。これを28℃で11日間暗所で静置培養し、生長した菌糸体を1G3 ガラスフィルターでろ別し、加熱乾燥法により乾燥菌体量を求めた。コントロールには、RNA-M を添加していない Henneberg 培地で同条件下において培養したものをを用いた。

2.3.2 寒天培地

Henneberg 培地にRNA-M を培地濃度で0.1, 0.5, 1.0, 2.0%になるよう添加し、寒天を1.5%加えた。これを120℃、1.2 kg/cm² で15分蒸気滅菌し、直径90 mm のペトリ皿に分注した。冷却後、種菌としてあらかじめSMY 寒天培地で28℃、6日間、暗所で前培養した菌そうから5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、ペトリ皿の中央に同様に種菌を接種した。28℃で9日間暗所で培養し、菌そう直径をノギスで測定した。

2.3.3 木粉培地

スギ (*Cryptomeria japonica*) オガ屑とフスマを風乾重量比で5:1に混合し、含水率が65%になるように0.1, 0.5, 1.0, 2.0%のRNA-M 溶液を加えた培地をガラスのペトリ皿に詰め、120℃、1.2 kg/cm² で30分間蒸気滅菌した。放冷後、あらかじめ前培養した供試菌を寒天培養と同じように接種した。28℃で21日間暗所で培養し、菌そう直径をノギスで測定した。

2.4 薬理効果の評価

2.4.1 試料の調製

液体培地で培養した菌糸体を蒸留水で3回洗浄した後、凍結乾燥粉末化した。Hyun ら¹⁴⁾の方法に準じて得られた菌糸体乾燥粉末30 mg を1 ml の蒸留水を加えて85℃の温浴中で1時間抽出したものを熱水抽出物とした。70%エタノール抽出物とメタノール抽出物は、菌糸体乾燥粉末30 mg に1 ml の70%エタノールあるいはメタノールを1 ml 加えて室温 (20℃) で1時間抽出した。これらを20分間遠心分離 (5400×g) した後、上清を凍結乾燥した。得られた各抽出物は、0.5 ml の生理食塩水に溶かし、タンパク質含有量を等しくするため270 nm における吸光値が同じになるように希釈したものを血漿板凝集抑制試験およびケモカイン遺伝子発現抑制試験に使用した。

2.4.2 血小板凝集抑制試験

薬剤投与を2週間受けていない健康成人の血液を、正肘静脈から採取して遠心分離 (190×g, 20 min, 室温) し、上層の多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を分取した後、さらに下層を遠心分離 (1400×g, 5 min, 室温) して乏血小板血漿 (platelet-poor plasma: PPP) を分取した。PRP および PPP 223 μl を37℃にて予備加温した後、各試料を2%ジメチルスルフォキシド (DMSO) 溶液 2 μl に添加し、さらに3分間37℃で培養した。これに、アラキドン酸ナトリウム水溶液 (500 nM) を25 μl、あるいは PAF (platelet activating factor) 水溶液 (500

nM) を25 μ l 添加して血小板凝集を惹起した。対照にはイオン交換水を用いた。惹起された凝集はアグリゴメーター (MCMヘマトレーサー313 M, エムシーメディカル株式会社製) を用いて測定し, 被験試料の最大凝集率 (PPPの値を100として被験試料の凝集曲線より求められた最大値) を対照例の最大凝集率と比較することにより, 被験物質の血小板凝集に対する抑制率を算出した²⁶⁾。

2.4.3 ケモカイン遺伝子発現抑制試験

ヒト皮膚線維芽細胞を直径6 cmの培養皿で, 10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地で十分に発育するまで培養し被験培地とした。被験培地に試料あるいは陽性対照としてヒドロコルチゾン (10^{-7} M) を添加した。陰性対照にはイオン交換水を用いた。さらにケモカイン遺伝子発現を促進する腫瘍壊死因子 (TNF- α) 1 ng/ml を添加して6時間, 37°Cで培養した。培養後, 細胞からRNAを単離し, cDNAを調製したのち, 定量的PCR法 (TaqMan PCR法) によりIL-8遺伝子の発現量を測定した²⁷⁾。内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子を用いて, 得られたデータを補正した。

3. 結 果

3.1 菌糸生長

核酸関連物質を添加した液体培地での菌糸生長試験結果を Fig. 1 に示す。無添加区および0.1, 0.5, 1.0, 2.0%添加区の菌糸体重量は, それぞれ77.98 \pm 9.46, 183.55 \pm 60.06, 85.70 \pm 35.61, 132.16 \pm 32.10, 143.3 \pm 22.89 μ gであった。寒天培地の無添加区および0.1, 0.5, 1.0, 2.0%添加区の菌糸直径は, それぞれ5.99 \pm 0.35, 7.55 \pm 0.26, 6.28 \pm 0.23, 6.58 \pm 0.27,

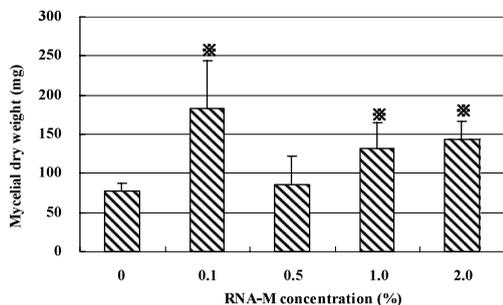


Fig. 1. Effect of RNA-M on mycelial growth of *P. nebrodensis* on liquid medium.

* : Significant differences from 0% of RNA-M concentration, $p < 0.05$. ** : Significant differences from 0% of RNA-M concentration, $p < 0.01$.

6.59 \pm 0.24 cm となった (Fig. 2)。バイリングの菌糸生長は, 液体培地および寒天培地共に0.1%で最大値を示し, その後一旦低下するが, さらに濃度を上げると再び生長量が増える傾向にあった。しかし, 木粉培地では, 添加による生長促進効果および添加濃度の違いによる生長の差は明確ではなかった (Fig. 3)。

3.2 薬理効果の評価

バイリングによる疾患の改善は, これまでに高血圧自然発症モデルラット, 高脂血症モデルラットや自己免疫疾患モデルマウスで確認されている。そこで薬理効果の評価には, 血管の収縮, 血液の凝固や炎症の指標として血小板凝集抑制試験とケモカイン遺伝子発現抑制試験を用いた。試験試料は, 核酸関連物質の添加濃度が異なる5種類の液体培地で培養して得られた菌糸体の各種抽出物とした。

アラキドン酸で惹起された血小板の凝集を試験試料が抑制する割合を Fig. 4 に示す。アラキドン酸は, 血管収縮および血小板凝集を引き起こすトロンボキサン A_2 の生合成系で働く物質の1つである²⁸⁾。アラキドン酸によって惹起された血小板凝集に対する

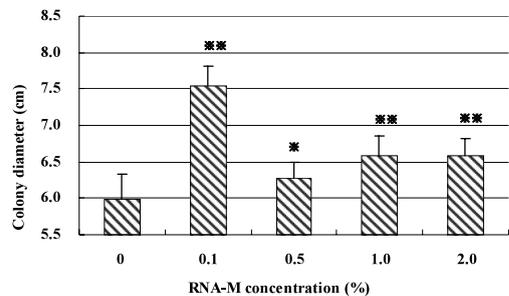


Fig. 2. Effect of RNA-M on mycelial growth of *P. nebrodensis* on agar medium.

Error bars indicate standard error. Legends are the same as in Fig. 1.

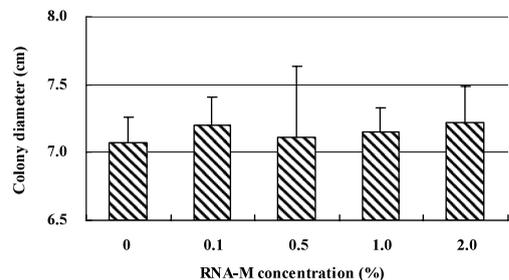


Fig. 3. Effect of RNA-M on mycelial growth of *P. nebrodensis* on sawdust-based substrate.

Legends are the same as in Fig. 1.

抑制率は、熱水抽出物で最も高く、70%エタノール抽出物とメタノール抽出物はほぼ同程度であった。熱水抽出物の抑制率は、核酸関連物質を添加していない無添加区で62.8%であった。しかしそれ以上の抑制効果が、添加区全てに認められた。その極大値は、0.5%添加区で68.9%となった。70%エタノール抽出物およびメタノール抽出物でも、抑制率の極大値は0.5%添加区であった。炎症および血小板の活性化作用をもつPAFで惹起された血小板凝集のバイリング成分の抑制率をFig. 5に示す。熱水抽出物の抑制率は、他の抽出物よりも高かった。熱水抽出物では、添加区全てにおいて無添加区よりも高い抑制効果がみられた。しかし、PAFによる血小板凝集抑制率は、核酸関連物質の添加濃度が高いほど大きくなり、熱水抽出物においては2.0%添加区で71.2%

となった。

ケモカイン遺伝子発現抑制効果は、IL-8の遺伝子発現量から評価をした。IL-8は、好中球、単球、リンパ球などの白血球に対して走化活性を有する炎症性メディエーターの1つである^{29,30)}。陽性対照であるヒドロコルチゾンでの発現量は0.12 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であり、陰性対照のイオン交換水に比べて抑制作用は明らかであった。無添加区は、メタノール抽出物が0.20 $\mu\text{g}/\text{dl}$ で最も抑制効果が高く、70%エタノールおよび熱水抽出物がそれぞれ0.21, 0.24 $\mu\text{g}/\text{dl}$ となった。メタノール抽出物の0.1, 0.5, 1.0, 2.0%添加区はそれぞれ0.18, 0.19, 0.18, 0.17 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であった。血小板凝集抑制試験結果と類似して、ケモカイン遺伝子発現抑制試験についても、無添加区より添加区で高い抑制効果がみられた (Fig. 6)。

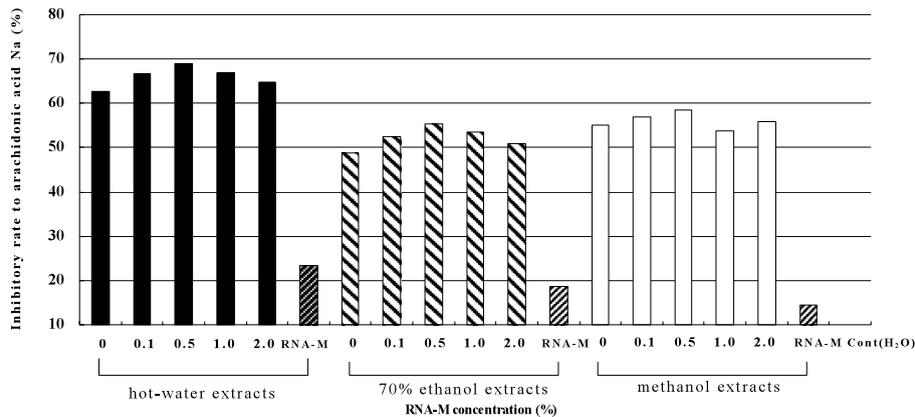


Fig. 4. Effect of *P. nebrodensis* on Anti platelet aggregation test by Arachidonic acid Na. Cont (H₂O) : the ion exchanged water.

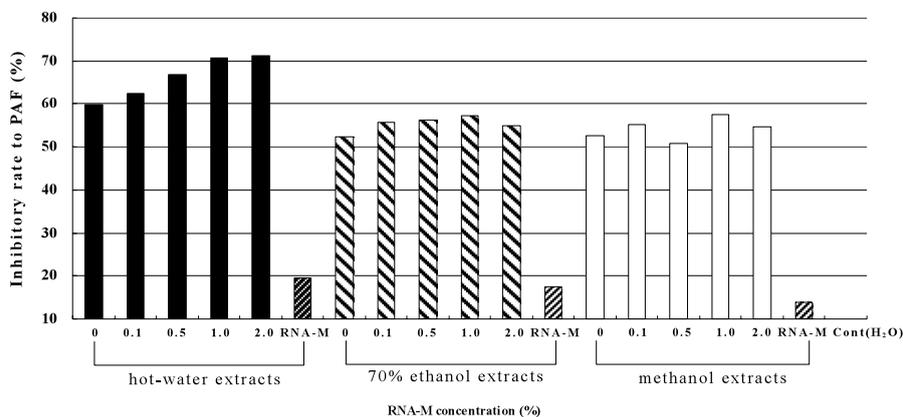


Fig. 5. Effect of *P. nebrodensis* on Anti platelet aggregation test by PAF. Legends are the same as in Fig. 4.

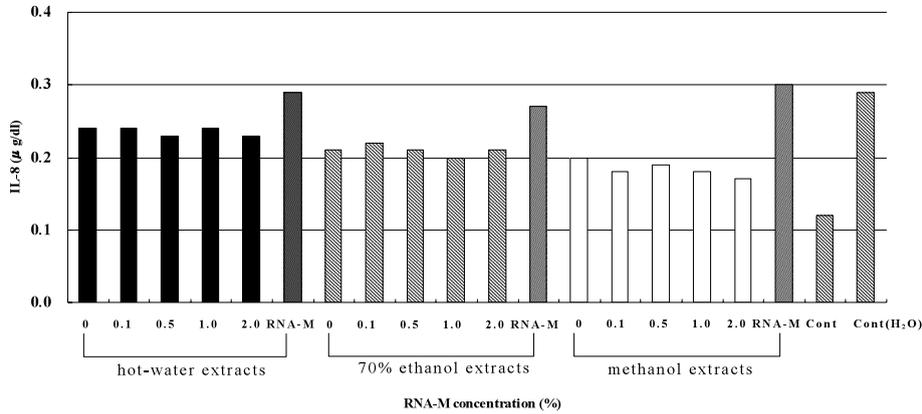


Fig. 6. Effect of *P. nebrodensis* on IL-8 gene expression test by TNF- α on the human fibro blasts.
Cont : hydrocortisone as a positive control, Cont (H₂O) : the ion exchanged water as a negative control.

4. 考 察

4.1 菌糸生長

核酸関連物質による菌糸体の生長促進効果は、既にシイタケ、マイタケ (*Grifola frondosa*), ナメコ (*Pholiota nameko*), ブナシメジ (*Hypsizigum marmoreus*), エリンギ (*Pleurotus eryngii*) で報告されている^{21, 22}。本試験と同じ核酸関連物質であるリボ核酸とそれを酵素分解した5'-ヌクレオチドの混合物を添加物としたそれらの報告では、液体培地での菌糸生長は、核酸関連物質の添加率の増加につれて促進効果が高くなり、本試験の極大値である0.1%より高い濃度で生長促進効果が認められている。また、既報では寒天培地における菌糸生長は0.5%で極大値を示し、その後4倍の2.0%まで濃度を上げて生長は促進されていない。しかし、本試験では極大値を示した濃度の10倍、20倍に濃度を上げることによって、再び生長量が増加する傾向がみられている。本試験結果と極大値の異なる既報との比較は困難であるが、本試験から核酸関連物質は最適濃度の異なる少なくとも2つの作用を有するのではないかと考えられる。一方、本試験の核酸関連物質は、81.7%のリボ核酸、10.7%のリグニンと蛋白質、7.6%の水分からなり、これらを酵素分解した場合に全体の1割程度をアデニル酸が占める。これまでにシイタケ菌糸の生長に対し有効な添加物としてネギ煎汁が見出されており、その活性の中心はアデノシン、アデニン等のアデニン誘導体を中心とする核酸関連物質とシスチン、システイン等の含硫アミノ酸であることが報告されている²⁰。従って、本試験における核酸関連物質に含まれる生長促進効果を有する物質として、アデノシン、アデニン等のアデニン誘導

体が示唆される。

4.2 薬理効果の評価

アラキドン酸やPAFによって惹起された血小板の凝集を抑制する作用は、これまでにヒメマツタケやWood garlicやハーブ、天草などで報告されている^{7, 31-33}。アラキドン酸およびPAF前駆体のLyso-PAFは、細胞膜リン脂質にホスホリパーゼA₂が作用して遊離されるが別々の経路で血小板の凝集を促進する物質である。ヒメマツタケは、アラキドン酸とPAFの両方を抑制することから、関与する作用機序として両者の上流に位置するホスホリパーゼA₂の阻害を示唆している。一方、Wood garlicやハーブ、天草は、いずれもアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼの阻害によるトロンボキサンA₂の生産抑制にあると報告している。本試験では、アラキドン酸とPAFの両方で抑制効果を示したが、抑制率の極大値が異なることから、アラキドン酸とPAFによって惹起される血小板の凝集を抑制する作用はバイリングに含まれる異なる成分であると考えられる。

本試験において、核酸関連物質の添加によるバイリングの菌糸生長の極大値は0.1%添加区にあった。しかし薬理効果はそれ以上の高濃度の添加区で高くなった。添加物による菌糸生長について、培地中へのビタミンB₁の添加は、菌糸生長を促進させるが、一定量を超えて加えた場合においては増加が鈍ることが報告されている³⁴。その一方で、シイタケの菌床培地にビタミンB₁を添加した試験では、子実体の収量には影響を及ぼさなかったが、一定量まで子実体の成分としてビタミンB₁の増加を促すことが報告されている⁶。このように添加物による生長促進あるいは特定成分の増加は、きのこの増収と薬理

効果の向上につながり今後の検討が期待される。

5. 結 論

バイリンクの生長と薬理効果に及ぼす核酸関連物質の影響を検討し、以下の結論を得た。

- 1) 核酸関連物質の添加効果は、液体、寒天および木粉培地と異なる生育環境においても菌糸生長を促進する効果があった。さらに、核酸関連物質の添加濃度が0.1%で最も効果が表れた。
- 2) 各々の培地で生長した菌糸体の血小板凝集抑制やケモカイン遺伝子発現抑制効果は、菌糸の生長促進効果が認められた添加濃度とは、一致しないことが明らかになった。

謝 辞

核酸関連物質の試料を提供して頂きました、日本製紙株式会社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 川合正允：“キノコの化学・生化学”，水野 卓編，学会出版センター，東京，2000，pp. 315-340.
- 2) 申 有秀：“キノコ学への誘い”，大賀祥治編，海青社，大津，2004，pp. 85-87.
- 3) Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M.: *Bioresour Technol.* **78**(3), 293-300 (2001).
- 4) 関谷 敦：日本食生活学会誌 **10**(1), 67-71 (1999).
- 5) 田畑武夫，篠原寿子：日本食品科学工学会誌 **42**(9), 682-686 (1995).
- 6) 寺嶋芳江，渡辺智子：日本きのこ学会誌 **12**(2), 91-97 (2004).
- 7) 吉本博明，江口文陽，桧垣宮都，大賀祥治：木材学会誌 **51**(6), 387-393 (2005).
- 8) Hokama, Y., Hokama, J. L.: *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **31**(1), 177-180 (1981).
- 9) 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**(3), 318-321 (1996).
- 10) 須見洋行：日本家政学会誌 **50**(7), 683-688 (1999).
- 11) Jose, N., Ajith, T. A., Janardhanan, K. K.: *Phytother Res.* **18**(1), 43-46 (2004).
- 12) 村田 信，只野 武，佐藤 進，岡 修昭，大久保聡子，佐藤ゆかり，舟守雅子，中畑則道，菊池晴久，谷津正晃，大島吉輝，古城健太郎：応用薬理学会誌 **67**(3), 359-364 (2004).
- 13) Hyun, K. W., Jeong, S. C., Lee, D. H., Park, J. S., Lee, J. S.: *Peptides* **27**(6), 1173-1178 (2006).
- 14) 吉本博明，大賀祥治，江口文陽，桧垣宮都：日本応用きのこ学会誌 **14**(3), 135-143 (2006).
- 15) Bernardshaw, S., Hetland, G., Ellertsen, L. K., Tryggestad, A. M., Johnson, E.: *Inflammation* **29**(4), 147-153 (2005).
- 16) Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A., Yamazaki, S.: *Cell Struct Funct.* **26**(2), 103-108 (2001).
- 17) Lin, J. Y., Chen, M. L., Chiang, B. L., Lin, B. F.: *Int. Immunopharmacol.* **6**(2), 241-251 (2006).
- 18) Lin, Y. L., Lee, S. S., Hou, S. M., Chiang, B. L.: *Mol. Pharmacol.* **70**(2), 637-644 (2006).
- 19) Thyagarajan, A., Jiang, J., Hopf, A., Adamec, J., Sliva, D.: *Int. J. Mol. Med.* **18**(4), 657-664 (2006).
- 20) 大賀祥治：木材学会誌 **34**(9), 745-752 (1988).
- 21) 大賀祥治，阿部正範，眞許勝弘，寺下隆夫：日本応用きのこ学会誌 **11**(3), 119-122 (2003).
- 22) 阿部正範，眞許勝弘，飯田 繁，大賀祥治：日本応用きのこ学会誌 **11**(3), 107-112 (2003).
- 23) 宮澤紀子，江口文陽，北島良信，北本 豊：第7回日本応用きのこ学会大会講演要旨集，群馬，2003，p. 37.
- 24) 江口文陽，宮澤紀子，須藤賢一，北島良信，北本豊：第7回日本応用きのこ学会大会講演要旨集，群馬，2003，p. 36.
- 25) 佐藤美穂，江口文陽，北島良信，北本 豊：第8回日本きのこ学会大会講演要旨集，奈良，2004，p. 56.
- 26) Born, G. V. R.: *Nature* **194**, 927-929 (1962).
- 27) Leutenegger, C. M., Alluwaimi, A. M., Smith, W. L., Perani, L., Cullor, J. S.: *Vet. Immunol. Immunopathol.* **77**, 275-287 (2000).
- 28) 野澤義則：“図説医化学”，香川靖雄編，南山堂，東京，1997，pp. 87-89.
- 29) 柳 梨娜：肥満研究 **10**(1), 84-88 (2004).
- 30) 南 雅文：薬学雑誌 **121**(12), 875-885 (2001).
- 31) Lim, H., Kubota, K., Kobayashi, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**(2), 298-301 (1999).
- 32) 茅原 紘，中川賢司，只左弘治，林 俊英，米田公生，武藤紀生，中川博司：信州大学農学部紀要 **33**, 1-8 (1996).
- 33) 多和田真人，野口寿一，尾崎由基男，久米章司，女屋敏正，佐々木 博，陳 正雄：和漢医薬学会誌 **6**(3), 372-373 (1989).
- 34) Gramss, G.: *Basic Microbiol.* **30**(6), 393-400 (1990).