

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：37201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K02265

研究課題名(和文) ムキタケの新規栄養機能性成分の探索およびその調理・加工特性に関する研究

研究課題名(英文) Search for novel nutritive and functional components of Mukitake mushroom and study on their cooking and processing characteristics.

研究代表者

四元 博晃 (Yotsumoto, Hiroaki)

西九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：50321310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ムキタケ(Panellus serotinus)の機能成分の探索とその作用機序について検討した。その結果、ムキタケの可食部には、豊富なアミノ酸類や必須脂肪酸を含有するリン脂質、スフィンゴ脂質が認められた。ムキタケは抗アレルギー作用を示した。さらに、ムキタケ成分はHepG2細胞において、老化(miRNA34a)や細胞増殖(miRNA125b)に関与するマイクロRNA(miRNA)発現を修飾する機能も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ムキタケ(Panellus serotinus)には特異な脂肪酸10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸が微量含まれていることを明らかにした。また、ムキタケは抗アレルギー作用やマイクロRNA(miRNA)発現を修飾する作用を見出した。とくに老化に関与するmiRNA34a発現の低下、腫瘍細胞の増殖に関与するmiRNA125b発現の低下作用など細胞機能に影響するmiRNA発現を修飾した。したがって、ムキタケは先進国で問題となっているメタボリックシンドローム、アレルギー、老化やガンなどの疾病予防に有効活用できる多機能な食材であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The search for functional components of Mukitake mushroom (Panellus serotinus) and the mechanisms of action were investigated. Mukitake mushroom contains abundant amino acids and phospholipids and sphingolipids 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid was also identified. It was suggested that Mukitake mushroom has antiallergic action via suppression of degranulation reaction as a novel functionality. Furthermore, it was found that of Mukitake mushroom extracts have a modulatory effect on microRNA (miRNA) expression in HepG2 cells, which is involved in senescence (miRNA34a) and cell proliferation (miRNA125b).

研究分野：栄養化学、生化学

キーワード：ムキタケ キノコ類 抗メタボリックシンドローム作用 栄養機能性成分 特殊脂肪酸 抗アレルギー作用 新規機能性 老化予防作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、日本を含む先進国ではメタボリックシンドロームの増加が大きな社会問題となっている。飽食と車社会、つまり過栄養や運動不足の生活習慣はメタボリックシンドローム発症の危険性を増大させ、さらに国民医療費の増加を招いている。したがって、メタボリックシンドロームを予防・改善することは非常に重要であり、その方策の1つとして日常的に摂取する食事への機能性成分の導入が有効であると考えられている。

キノコとは、担子菌類・子のう菌類のつくる大きな子実体の通称で、山野の樹陰、朽木などに生じ、多くは傘状をなし裏に多数の胞子が着生するものをいう。キノコは“メディカルマッシュルーム”という言葉が知られている通り、さまざまな生理機能を有する食材として注目を集めている。しかしながら、これまでに研究されているキノコ類は、その全体のわずか数%であり、依然として未開拓な機能性食材の宝庫である。

ムキタケ (*Panellus serotinus*) は、シイタケなどと同じキシメジ科に属し、その中のワサビタケ属に分類されるキノコである。野生のムキタケは、ブナやミズナラなどの倒木に群生し、全国で採取が可能である。近年、ムキタケの菌床栽培技術の確立と優良株の選抜などにより、市場への安定的な供給が可能になった。

これまでに、ムキタケの生理機能として、*in vitro*系での実験では活性酸素消去作用やグリケーション阻害作用などが報告されている。また、我々は肥満モデルマウスを用いた *in vivo*系での実験で、ムキタケには脂肪肝・肝障害改善作用や抗メタボリックシンドローム作用があることを明らかにしている¹⁾。しかしながら、ムキタケ中のどの成分がこれらの作用に対して有効に機能しているかは不明である。

2. 研究の目的

これまでに、我々はムキタケの栄養生理機能として、脂肪肝・肝障害改善作用や抗メタボリックシンドローム作用があることを報告してきた¹⁾。しかしながら、ムキタケの栄養生理機能の責任成分やそれらの作用機序に関する研究は十分でない。本研究では、ムキタケ成分の解析と細胞で生理機能に關与するマイクロRNA(miRNA)発現への影響について、ヒト肝臓由来培養細胞HepG2を用いて検討した。また、HPLC-TOF/MSを用いて、ムキタケと同じキシメジ科に属し機能性が多く報告されているシイタケの成分と比較した。その結果、すでにコレステロール低下作用や抗腫瘍作用などの生理作用が知られているシイタケとは異なる化合物が含まれていることを認めた。すなわち、ムキタケには他のキノコ類で報告されているものとは明らかに異なる新規成分を含有することを示唆した。そこで本研究では、ムキタケ中の機能性成分の探索とその作用機序を検討した。ムキタケ成分の調理・加工による変動についても検討した。

3. 研究の方法

(1) ムキタケ可食部に含まれる成分の解析

ムキタケ可食部に含まれている様々な化合物について LC-TOFMS 及び CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。

(2) ムキタケの脂肪酸組成の分析

ムキタケ (10mg/mL) を 500 μ L サンプルングし、乾固させたのちにケン化した。ケン化後、内部標準 (C17:0) を添加して、4%塩酸メタノールでメチル化し、TC70 及び SPB1 カラムを用いて GC/MS でムキタケの脂肪酸組成を分析した。

(3) ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 を用いた脱顆粒反応試験

5×10^5 個のラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 (JCRB) は、Tyrode 緩衝液 (Sigma) で洗浄後、10 μ M のカルシウムイオノフォア及びムキタケ熱水抽出物あるいはエタノール (Et-OH) 抽出物 (添加濃度はそれぞれ 1mg/mL あるいは 100 μ g/mL) を含む Tyrode 緩衝液で懸濁し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応後、5 分間氷冷して反応を停止させ、遠心分離により上清を回収した。この上清に 2mM の p-nitrophenyl-N-2-acetyl-L-D-glucosamine/citrate 緩衝液 (pH4.5) (Sigma) を加え、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。30 分間静置後、carbonate 緩衝液 (pH10) を添加して反応を停止させ、吸光度 405nm で β -ヘキソサミンダーゼを検出、定量し、これを脱顆粒反応の指標としてアレルギー反応及び炎症反応への影響を評価した。

(4) マイクロRNA (miRNA) プロファイリング解析

ヒト肝由来培養細胞 HepG2 を用いて、ムキタケの熱水抽出物及び Et-OH 抽出物が miRNA 発現に及ぼす影響について検討した。方法は、HepG2 細胞を 10cm Dish に 5×10^6 個播種して 48 時間前培養した。前培養後、ムキタケ熱水抽出物混合培地あるいはムキタケ Et-OH 混合培地 (添加濃度はそれぞれ 1mg/mL) に交換し、24 時間培養した。培養後、HepG2 細胞を回収して、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) によって total RNA を精製した。200ng の total RNA から miScript RT Kit と miScript HiSpec Buffer (QIAGEN) によって cDNA を作成し、mature miRNA 発現プロファ

イルを miScript miRNA PCR Array (QIAGEN) を用いて Real-time PCR にて解析を行った。

4. 研究成果

(1) メタボローム解析によるムキタケ可食部の成分分析

これまでに、ムキタケに含まれる成分についての報告がなかったため、はじめに、ムキタケ可食部に含まれる化合物についてメタボローム解析を行った。まず、LC-TOFMA を用いた解析の結果、ムキタケ可食部には 91 種類の化合物が含まれていることが確認された。この中で、脂肪酸類ではステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 リノレン酸などが含まれていることが明らかとなった。さらに、その他の化合物として、リン脂質類やアシルカルニチン類、フィトステロール類、スフィンゴ脂質類なども含まれていることが認められた。次に、CE-TOFMS を用いたメタボローム解析の結果、ムキタケ可食部には 267 種類の成分が含まれていることが分かった。これらの成分の中には、グルタミン酸やアスパラギン酸、オルニチンなどのアミノ酸類や核酸関連物質、糖代謝関連物質などが含まれていた。

(2) GC/MS 分析によるムキタケ中の脂肪酸組成

メタボローム解析の結果、ムキタケにはオレイン酸やリノール酸などの脂肪酸類が含まれていることが明らかとなったために、次に、GC/MS を用いてムキタケ中の脂肪酸組成について解析を行った。その結果、ムキタケの脂肪酸組成で最も多かった脂肪酸は必須脂肪酸であるリノール酸が約 74% を占めていた。また、他の脂肪酸ではパルミチン酸が約 12%、 リノレン酸が約 7%、オレイン酸が約 2% であった。さらに、今回の脂肪酸組成の分析の結果、ムキタケにはこれまでに血糖値改善作用や脂肪酸合成抑制作用があることが知られている特殊脂肪酸の 10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸 が含まれていることが確認された。

(3) ムキタケ熱水抽出物及び Et-OH 抽出物の RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応

これまでに、キノコ類の中でマツタケやチョレイマツタケには免疫賦活作用があることが知られている。しかしながら、ムキタケの免疫反応への影響に関する報告はない。そこで、ムキタケの新規機能性を探索する目的で、ムキタケの免疫反応への影響について検討した。方法として、ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 から脱顆粒反応により放出される γ -ヘキソサミノダーゼを測定して評価した。その結果、コントロール群と比較して、ムキタケの熱水抽出物添加群及び Et-OH 添加群 (添加濃度はそれぞれ 1mg/mL あるいは 100 μ g/mL の 2 点) では RBL-2H3 細胞からの γ -ヘキソサミノダーゼ放出の有意な低下が認められた。すなわち、ムキタケには免疫反応での炎症反応に関与する脱顆粒反応を抑制する作用があることが認められた。また、この影響はムキタケの Et-OH 抽出物添加群 (約 40% の放出低下) と比べて、熱水抽出物添加群の方が顕著であり、さらに添加濃度依存的に γ -ヘキソサミノダーゼの放出を抑制していた (100 μ g/mL 添加群; 51% の低下、1mg/mL 添加群; 63% の低下)。以上のことより、ムキタケには新規機能性として脱顆粒反応抑制を介した抗アレルギー作用をもつことが示唆され、またその機能性をもつ化合物が複数存在している可能性が考えられた。

(4) マイクロ RNA (miRNA) プロファイリング解析

これまでに、ムキタケと同じキシメジ科に属するシイタケやその他のキノコとしてハナビラタケやブナシメジ、エノキタケなどには抗腫瘍作用があることが知られている。近年、多くのガンの発症にはマイクロ RNA の発現が関与していることが報告されている。そこでムキタケの熱水抽出物及び Et-OH 抽出物が miRNA 発現に及ぼす影響についてヒト肝由来培養細胞 HepG2 を用いて検討した。その結果、ムキタケの熱水抽出物添加群ではガン抑制性の miR-16 の発現量が増加し、一方、Et-OH 添加群では肝ガン特異的なガン抑制性の miR-122 の発現量が増加した。また、熱水抽出物添加群では細胞増殖を阻害しアポトーシスを誘導させる作用が報告されている miR-125b-5p 発現量が増加していた。また、今回の miRNA プロファイリング解析により、老化により発現が上昇することが知られている miR-34a-3p は、ムキタケ Et-OH 抽出物により発現量が減少していた。以上のことより、ムキタケにはさらなる新規機能性として抗腫瘍作用や老化抑制作用を持つ可能性が示唆された。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

近年、さまざまな生理機能を有する食材として注目を集めているものの 1 つにキノコがある。代表的なキノコであるシイタケには、コレステロール低下作用や抗腫瘍作用などの生理作用が知られており、椎茸特有の機能性成分としてエリタデニンがある。しかしながら、これまでにシイタケと同じキシメジ科に属するムキタケにはエリタデニンは微量しか存在していないことが認められた。本研究の結果は、ムキタケには栄養成分として必須脂肪酸リノール酸や リノレン酸などが旨味成分であるグルタミン酸やアスパラギン酸などのアミノ酸が多く含まれていることが明らかとなった。また、ムキタケには血糖値改善作用や脂肪酸合成抑制作用をもつ 10-

ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸が微量含まれていた。申請時には、ムキタケの脂肪肝・肝障害改善作用や抗メタボリックシンドローム作用の有効成分を同定しその作用機序を解明する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の影響により実験動物を用いた研究を遂行できない状況となった。そこで、培養細胞を用いてムキタケの新規機能性の探索を行った。その結果、ムキタケには新規機能性として抗アレルギー作用や抗腫瘍作用、老化抑制作用などの生理機能に關与する成分の存在が示唆された。すなわち、ムキタケは日本をはじめとする先進国で問題となっているメタボリックシンドローム、アレルギー、炎症やガンなどの生活習慣病に対して有効活用できる多機能な食材であることを明らかにした。今後は、ムキタケで認められた保健機能に対する責任成分の同定とその作用機序について研究を進める予定である。

<引用文献>

河岸洋和、きのこの生理活性と機能、シーエムシー出版（2005）

T. Yanagita, H. Yotsumoto, K. Nagao, N. Inoue, M. Inafuku, Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) alleviates nonalcoholic fatty liver disease and inflammation in db/db mice., 12th Asian congress of Nutrition and 69th Annual Meeting of Japan Society of Nutrition and Food science, 421 (2015)

T. Yanagita, N. Inoue, M. Inafuku et al, et al., Effect of Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) on the pathogenesis of lipid abnormalities in obese, diabetic ob/ob mice., *Lipid Health Dis.*, 12, 18 (2013)

T. Yanagita, M. Inafuku, K. Nagao et al, Protective effects of fractional extracts from *Panellus serotinus* on nonalcoholic fatty liver disease in obese, diabetic db/db mice., *Br. J. Nutr.*, 107, 639-646 (2012)

柳田晃良, 永尾晃治, ムキタケ(*Panellus serotinus*)の抗メタボリックシンドローム作用, *New Food Industry*, 52, 13-17 (2010)

T. Yanagita, K. Nagao, N. Inoue, et al, Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) alleviates nonalcoholic fatty liver disease through the suppression of monocyte chemoattractant protein 1 production in db/db mice., *J. Nutr. Biochem.*, 21, 418-423 (2010)

小川順、岸野重信、食と健康をつなぐ腸内細菌の脂肪酸代謝と代謝産物の生理機能、日本生化学学会誌、91巻(4) 492-499 (2019)

Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Ochiya T., Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity., *Sci Rep.*, 2, 314. (2012)

Yamada S, Tsukamoto S, Huang Y, Makio A, Kumazoe M, Yamashita S, Tachibana H., Epigallocatechin-3-O-gallate up-regulates microRNA-let-7b expression by activating 67-kDa laminin receptor signaling in melanoma cells., *Sci Rep.*, 6, 19225. (2016)

Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH, Kurzrock R., Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells., *Mol Cancer Ther.*, 7, 464-73. (2008)

Wang Y, Jiang L, Ji X, Yang B, Zhang Y, Fu XD., Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes., *J Biol Chem.*, 288, 18484-93. (2013)

Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS., Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties., *Oncogene.*, 28, 3526-36 (2009)

Yang D, Yuan Q, Balakrishnan A, Bantel H, Klusmann JH, Manns MP, Ott M, Cantz T, Sharma AD., MicroRNA-125b-5p mimic inhibits acute liver failure., *Nat Commun.*, 7, 11916. (2016)

Smith-Vikos T, Slack FJ., MicroRNAs and their roles in aging., *J Cell Sci.*, 125, 7-17. (2012)

Li N, Muthusamy S, Liang R, Sarojini H, Wang E., Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1., *Mech Ageing Dev.*, 132, 75-85. (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柳田 晃良 (Yanagita Teruyoshi) (00093980)	西九州大学・健康栄養学部・教授 (37201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関