

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：33921

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02305

研究課題名（和文）キノコを食生活へ普及するための科学的アプローチ

研究課題名（英文）A scientific approach to promoting mushrooms into the diet

研究代表者

菅野 友美（Kanno, Tomomi）

愛知淑徳大学・健康医療科学部・教授

研究者番号：10298482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、キノコの異なる部位を電子スピン共鳴（ESR）で分析すると共にその抗酸化活性を検討した。すべての試料のESRスペクトルは、有機フリーラジカルおよび遷移金属に由来する信号が観測された。供試したキノコの中でササクレヒトヨタケが最も高い抗酸化活性を示し、キノコの部位によって異なる値を示した。抗酸化活性と銅含量との間に正の相関関係がみられたことから、銅がキノコの抗酸化活性に影響を与える可能性が示唆された。部位の中で傘が最も高い鉄含量を示したため、分画した結果、鉄結合タンパク質の可能性のある画分を見出した。またアンニンコウの水抽出物から芳香族化合物の一つであるアデノシンが同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコは古くから食用のみならず薬用としても利用されており、機能性食品であるにもかかわらず、その知名度は低い。本研究ではこれまで食品分野では殆ど用いられていなかった電子スピン共鳴（ESR）を用いたキノコのラジカル解析を行い、科学的成分とその機能性などを解明した。この研究により、キノコのみならず抗酸化能を有する様々な食品への応用も可能であり、機能性食品を活用した健康増進に寄与することができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, different parts of mushrooms were analyzed by ESR to identify radical species, and furthermore, their antioxidant activities were examined. ESR spectra of all the specimens consisted of signals from organic free radicals, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. Coprinus comatus showed the highest antioxidant activity. Cap showed the highest Fe content. To purify the iron-binding proteins having antioxidant activities, we subjected the cap of Grifola frondosa to size-separation gel-filtration chromatography. A protein fraction was detected from the obtained chromatogram. This fraction was speculated to represent the iron-binding proteins. We isolated and purified aromatic compounds from water extracts of Grifola gargal, and we elucidated their structures by the instrumental analysis. The results indicated that adenosine was one of the aromatic compounds.

研究分野：食品科学

キーワード：キノコ 電子スピン共鳴 ラジカル消去活性 遷移金属

## 1. 研究開始当初の背景

近年、健康志向の高まりから食品の機能性(生体調節機能)に注目が集まっている。食品の機能性は抗酸化能、抗変異原作用、中性脂肪低下作用などが知られており、中でも抗酸化能は生活習慣病など種々の疾病に対して予防効果があると示唆されている。つまり、抗酸化能を有する食品を上手く日々の食生活に取り入れることで、健康維持効果が期待できる。

キノコは様々な薬理成分を有し、種々の疾患を予防することが期待できる食品であるにもかかわらず、認知度が低い。キノコ中の新規機能性成分の発見とその機能を活用したキノコ食品の開発、さらにそれを普及させることが必要である。これまで *Grifola garga* (アンニンコウ) から抗酸化物質のエルゴチオネインを単離同定した<sup>1)</sup>。また *Coprinus comatus* (ササクレヒトヨタケ) には抗酸化物質であるエルゴチオネインを多く含量することを解明するとともに抗炎症物質を含有する可能性を示唆した<sup>2)</sup>。さらに *Grifola frondosa* (マイタケ) の菌さん部位に鉄イオンタンパク酵素が存在することをつきとめ、それがヒト血漿中に存在する鉄イオン輸送酵素であるトランスフェリンであることを見出した<sup>3)</sup>。トランスフェリンは抗酸化活性があると報告されている<sup>4)</sup>ことから、マイタケの新たな抗酸化活性を有する機能性物質としての可能性が示唆された。

食品中の成分を分析する方法として、分子レベルでの分析法が一般的であるが、電子スピン共鳴 (Electron spin resonance ; ESR) は不対電子を直接観測し、それが属する分子の化学構造・反応を、定性的かつ定量的に調べる高感度高分解能分析機器である。ESR を使用することで、食品に含まれる微量の有機ラジカルと微量の金属(遷移金属イオン錯体や酵素タンパク)が検出できる。また、抗酸化能の評価には様々な方法があり、代表的な活性酸素吸収能力(Oxygen radical absorbance capacity; ORAC)法や測定が容易な 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 法などがある。ESR スピントラップ法はヒドロキシルラジカルなど個々のラジカルを特異的に検出できる方法であるため、生体内にどのようなラジカルがあり、どのような機能をもつものであるのかを評価できる。

キノコの機能性成分を探究し、キノコが健康維持効果を有する食材であることを証明し、それを広めることが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記のようにこれまで食品分野では殆ど用いられていなかった ESR を用いたキノコのラジカル解析を行い、科学的成分とその機能性などを解明する。そして、得られたキノコの機能性成分を活かしたキノコの調理や食生活へ普及させるためのツールの開発を目的とした。ただし、コロナ禍でアンケート調査の実施が困難になったため、機能性成分の探求にとどまった。

## 3. 研究の方法

### (1) 数種のキノコの部位における ESR 解析とラジカル消去活性

試料に供したキノコは *Agrocybe cylindracea* (ヤナギマツタケ) の 2 品種(しゃきっこ 1 号, 2 号)、アンニンコウ、ササクレヒトヨタケの計 4 種類を用いた。生キノコを傘、柄、石づきの部位に分けて凍結乾燥粉末にし、ESR 解析を行った。この粉末試料を蒸留水で抽出し、5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolidine-N-oxide (CYPMPPO) をスピントラップ剤として ESR スピントラップ法によりヒドロキシルラジカル消去活性を測定した。遷移金属含量は粉末試料を塩酸抽出後、鉄 ( $Fe^{3+}$ )、銅 ( $Cu^{2+}$ )、マンガン ( $Mn^{2+}$ ) 含量を測定した。

### (2) マイタケ部位の抗酸化活性と鉄結合たんぱく質の分画

マイタケを菌さん、柄、根、根元に分画し、部位および培地を試料とした。抗酸化活性と遷移金属 ( $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) 含量を測定した。抗酸化活性は ORAC 法と DPPH 法を用いた。菌さんの粉末試料のゲルろ過クロマトグラフィーは、20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で抽出し、Sephacryl S-200 カラムを用いて分画した。各フラクションの  $Fe^{3+}$  含量 (メタロアッセイ鉄測定キット) と抗酸化活性 (ORAC 法) を測定した。

### (3) アンニンコウ水抽出物中の芳香族化合物の単離と構造決定

実験材料にアンニンコウを用い、熱風乾燥粉末を水抽出し、逆相樹脂カラムに供して 15% メタノール画分を得た。移動相に水とメタノール、検出波長 280 nm、逆相カラムを用いた分取 HPLC にて同画分から特徴的な物質を単離し、NMR を用いて構造解析を行い、物質同定した。逆相カラムを用いた HPLC 分析によりササクレヒトヨタケなど 17 種類およびマイタケ各部位に含まれる単離物質の定量を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 数種のキノコの部位における ESR 解析とラジカル消去活性

キノコ部位の ESR スペクトルは、いずれのキノコも  $g$  値が約 2.0 の位置に 1 本線の  $P_1$  信号が

有機フリーラジカルに由来する信号が観察された。また、 $g$  値が 4.0 の位置の  $P_2$  信号は  $Fe^{3+}$  に由来する信号であると考えられた。 $P_1$  信号の近傍の弱い  $P_4$  信号は 6 本線を示し、超微細構造定数 (Hyper fine constant; hfc) が約 8 mT であることから  $Mn^{2+}$  に由来する信号と推察され、 $P_3$  信号は  $Mn^{2+}$  とほぼ同じ位置に見えるが 6 本線ではなく、 $g$  値が約 2.2 の位置であったことから  $Cu^{2+}$  に由来する信号と推察した。これらの ESR スペクトルはキノコ部位によって違いが見られた (Fig.1)。

ヒドロキシルラジカル消去活性はササクレヒトヨタケが最も高い活性を示した。また、キノコの種類により活性の高い部位が異なった。

キノコの遷移金属含量についても部位によって異なり、 $Fe^{3+}$  含量はいずれのキノコにおいても傘に最も多く含有していた。キノコの  $Cu^{2+}$  含量はアンニンコウ以外、傘に多く存在し、 $Mn^{2+}$  含量もアンニンコウ以外は石づきに多かった。

ヒドロキシルラジカル消去活性は、 $Fe^{3+}$  の含量と相関しなかったが、 $Mn^{2+}$  の含量と負の相関を示した。一方、ヒドロキシルラジカル消去活性と  $Cu^{2+}$  含量との間に正の相関関係がみられた (Fig.2)。このことから、 $Cu^{2+}$  がキノコのラジカル消去活性に影響を与える可能性が示唆された。今後、抗酸化活性と遷移金属含量との関連について、さらなる研究が進むことにより、食品中の新たな機能性成分の開発が期待された。

## (2) マイタケ部位の抗酸化活性と鉄結合たんぱく質の分画

マイタケ部位および培地の遷移金属 ( $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) 含量を子実体の 3 画分で比較すると、 $Fe^{3+}$  含量は基部が有意に高い値を示し、逆に  $Cu^{2+}$  含量は基部が有意に低い値を示した。 $Mn^{2+}$  含量は有意差がみられなかったが、柄に多く含有していた。培地の遷移金属含量は子実体に比べて有意に高い値を示したが、 $Cu^{2+}$  含量は有意な差がみられなかった。菌糸体を含む培地と子実体の成分についての報告は見当たらないことから、本研究の結果は新しい知見といえる。

マイタケの部位別および培地を DPPH 法と ORAC 法の 2 種類の抗酸化活性で測定した結果、子実体の部位では、いずれの方法においても菌さん部位が他の部位に比べて有意に高い抗酸化活性を示した。マイタケにはフェノール類、フラボノイド、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールなどの抗酸化物質を含有することを報告している<sup>5)</sup>ことから、抗酸化活性の高かった菌さん部位にこれらの抗酸化物質が多く含有する可能性が示唆された。今後はマイタケ菌さん部位中の抗酸化物質についても検討する必要がある。一方、培地の抗酸化活性は、どちらの抗酸化活性測定においても子実体よりも低い値を示した。

マイタケ菌さん部位に高い抗酸化活性が得られたことから、抗酸化活性をもつタンパク質の精製を進めるため、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した (Fig.3)。

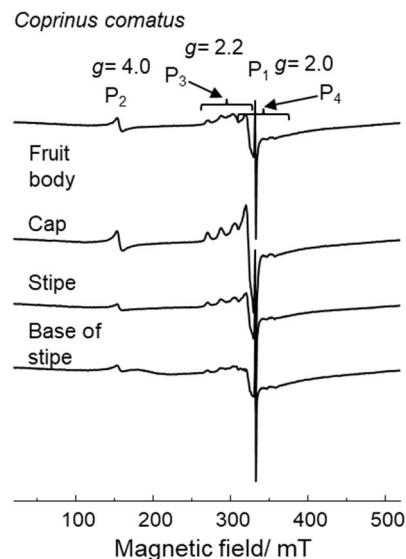


Fig. 1 ESR spectra for each part of the mushroom fruit bodies.

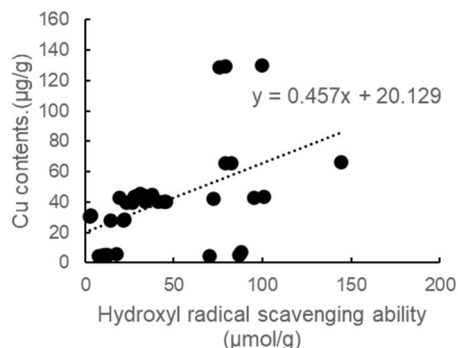


Fig. 2 Comparison of the hydroxyl radical scavenging activity with the transition element contents.

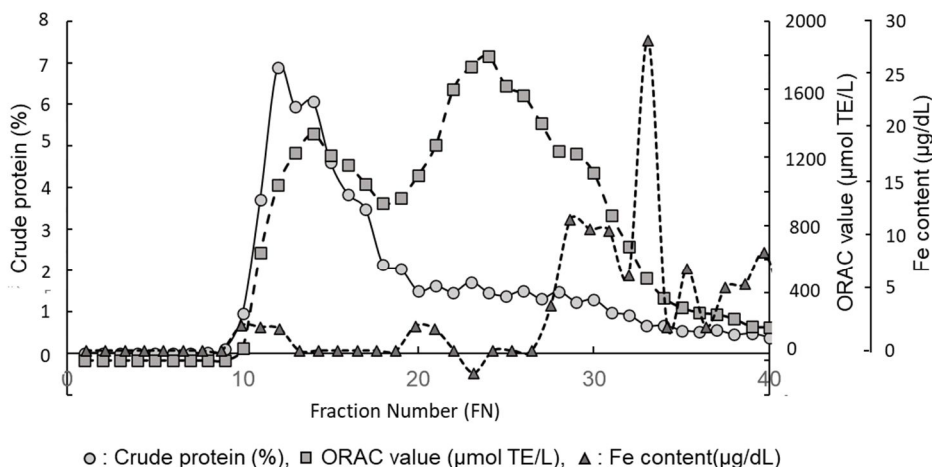


Fig.3 Gel filtration chromatography of cap of *Grifola frondosa*

フラクション 14 (Fig.3, FN 14) は抗酸化活性 (Fig.3, ORAC value) が高く、粗タンパク質 (Fig.3, Crude protein) のピークと重なることから、抗酸化活性をもつタンパク質の存在が示唆された。この付近に含まれるタンパク質の分子量は SDS-PAGE を行い、確認したところ 6.5~200 Da であった (データ未公表)。複合タンパク質であるため、どのようなタンパク質が抗酸化活性に関与しているのか、今後検討する必要がある。一方、フラクション 24 (Fig.3, FN 24) 付近は、高い抗酸化活性を示したが、粗タンパク質量が低いことから、280 nm の吸光度を吸収しない水溶性の抗酸化物質が混在すると示唆された。フラクション 30 (Fig.3, FN 30) は Fe<sup>3+</sup> (Fig.3, Fe content) を最も多く含有していたことから、鉄結合タンパク質画分の可能性が示唆された。今後はさらに分画して鉄結合タンパク質を分離精製する必要がある。

### (3) アンニンコウ水抽出物中の芳香族化合物の単離と構造決定

アンニンコウを水抽出し、得られた粗抽出液を樹脂処理により 15%メタノール画分を得た。これを HPLC 分析したところ、複数のピークが認められた。このうち精製度の高い単一の芳香族化合物である可能性の高い、リテンションタイム (RT) 15.1 のピークを分取 HPLC にて分取して精製、単離した。これを NMR などで構造決定したところ、血小板凝集阻害効果のあるアデノシンと同定された<sup>6)</sup>。さらに HPLC 分析チャートのピークとヌクレオシド標品のピークの RT を検討した結果、ヌクレオシドのシチジン、ウリジン、グアノシン、チミジンが同定された。これらヌクレオシドを HPLC にて定量したところ、アンニンコウ中のヌクレオシドのうち、アデノシンが最も高含有に存在していた。

17 種のキノコ粉末水抽出からヌクレオシド (5 種類) を測定した結果、ヒラタケが最も高いアデノシン含量を示した。また他のヌクレオシド含量はキノコの種類、乾燥方法、部位などにより異なることが明らかとなった。またキノコ類のヌクレオシド含量を主成分分析にて解析した。主成分得点散布図のキノコ類と主成分負荷量散布図のヌクレオシドの位置関係から、キノコ類の特徴物質を推察することができる。この結果から、キノコ類はヌクレオシドの主成分分析により、各ヌクレオシド含量を反映すると示唆された。

### <参考文献>

- 1) Ito T, Kato M, Tsuchida H, Harada E, Niwa T, Osawa T (2011), Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms, *Food Sci. Technol. Res.* 17, 103-110
- 2) Kanno, T, Kazumura, K, Niwa, T, Harada, E, Miyake, Y and Osawa, T (2020), Evaluation of anti-inflammatory properties of hot water extract from *Coprinus comatus* using HL-60 and 3T3-L1 cells using HL-60 and 3T3-L1 cells, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 27, 53-59
- 3) Nakazawa, S, Kanno, T, Sugisakia, K, Kameya, H, Matsui, M, Ukai, M, Sato, K and Takui, T (2018), Fe-transferrins or their homologues in ex-vivo mushrooms as identified by ESR spectroscopy and quantum chemical calculations: A full spin-Hamiltonian approach for the ferric sextet state with intermediate zero-field splitting parameters, *Food Chemistry*, 266, 24-30
- 4) Kim, B Y, Lee, K S, Choo, Y M, Kim, I, Je, Y H, Woo, S D, Lee, S M, Park, H C, Sohn, H D and Jin, B R (2008), Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 150, 161-169
- 5) Yeh, J-Y, Hsieh, L-H, Wu, K-T and Tsai, C-F (2011), Antioxidant properties and antioxidant compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola Frondosa* (Maitake), *Molecules*, 16, 3197-3211
- 6) Ciuffreda, P, Casati, S and Manzocchi, A (2007), Spectral assignments and reference data, *Magn. Reson. Chem.*, 45, 781-784

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tomomi Kanno, Kimiko Kazumura, Toshio Niwa, Etsuko Harada, Yoshiaki Miyake, Toshihiko Osawa	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluation of anti-Inflammatory properties of hot water extract from Coprinus comatus using HL-60 and 3T3-L1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18891/jjfcs.27.2_53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomomi KANNO, Shigeaki NAKAZAWA, Etsuko HARADA, Hiromi KAMEYA, Yoshiaki MIYAKE, Kazunobu SATO, Takeji TAKUI and Toshihiko OSAWA	4. 巻 27
2. 論文標題 Electron spin resonance analysis of different mushroom parts and their hydroxyl radical scavenging activities assessed by spin trapping method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 529-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.27.529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 菅野友美・三宅義明	4. 巻 32
2. 論文標題 数種の食用キノコの構造部位における抗酸化活性とミネラル含量	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本食生活学会誌	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2740/jisdh.32.1_31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 菅野友美・奥村裕樹・三宅義明	4. 巻 29
2. 論文標題 マイタケ部位の抗酸化活性と鉄結合タンパク質の分画	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本きのこ学会誌	6. 最初と最後の頁 149-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24465/msb.29.4_149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 菅野友美・菅本和寛・亀井一郎・三宅義明	4. 巻 30
2. 論文標題 Grifola garga水抽出物に含まれるヌクレオシドの組成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本きのこ学会誌	6. 最初と最後の頁 150-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24465/msb.30.4_150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菅野友美、亀谷宏美、三宅義明、韓順子、大橋かすみ、大澤俊彦
2. 発表標題 キノコの抗酸化活性とミネラル含量
3. 学会等名 日本調理科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Kanno, Shigeaki Nakazawa, Etsuko Harada, Hiroki Okumura, Yoshiaki Miyake, Kazunobu Sato, Takeji Takui, Toshihiko Osawa
2. 発表標題 Analysis of ESR spectra in different parts of mushrooms and their hydroxyl radical scavenging activities
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) at Kobe Convention Center
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野友美・原田栄津子・亀谷宏美・三宅義明
2. 発表標題 数種のキノコのラジカル捕捉活性とミネラル含量に及ぼす部位の影響
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野友美・奥村裕紀・三宅義明
2. 発表標題 マイタケ部位の抗酸化活性とミネラル含量
3. 学会等名 日本調理科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野友美・荒居沙弥香・生野めぐみ・原田栄津子・菅本和寛・亀井一郎・三宅義明
2. 発表標題 Grifola gargal(アンニンコウ)水抽出物中の芳香族化合物の単離と構造決定
3. 学会等名 日本食品科学工学会第69回大会
4. 発表年 2022年

〔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	三宅 義明  (Miyake Yoshiaki)  (20369581)	愛知淑徳大学・健康医療科学部・教授   (33921)	

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
---------	---------