

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580145

研究課題名(和文) レンチオニンの血小板凝集抑制作用機序と
そのシクロデキストリン包接物の生理活性研究課題名(英文) Inhibitory mechanism of lenthionine against platelet aggregation
and biological activity of its inclusion complex in α -cyclodextrin研究代表者 熊谷 日登美 (KUMAGAI HITOMI)
日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20225220

研究成果の概要(和文)：シイタケ中の環状硫黄フレーバー成分であるレンチオニンの血小板凝集抑制作用機序の解明を行った。また、レンチオニンを α -シクロデキストリンに包接することにより、そのにおいの低減化と水溶性化を試みた。レンチオニンは、血小板内のタリンのリン酸化、形態変化およびインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を抑制した。また、レンチオニンを α -シクロデキストリンに包接することにより、においが低減化し、水への溶解性が高まった。さらに、 α -シクロデキストリン包接レンチオニンは、*ex vivo*で血小板凝集を抑制した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of the inhibitory effect of lenthionine, cyclic sulfuric flavor component in shiitake, against platelet aggregation. In addition, we attempted to reduce its odor and enhance its solubility in water by the inclusion of lenthionine in α -cyclodextrin. Lenthionine suppressed phospholoylation of talin, morphological change in platelets, and activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Inclusion of lenthionine by α -cyclodextrin reduced its characteristic odor and enhanced its solubility in water. Lenthionine included in α -cyclodextrin inhibited platelet aggregation *ex vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2009年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
2010年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
年度			
年度			
総計	3,700,000円	1,110,000円	4,810,000円

研究分野：食品機能学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：レンチオニン、血小板凝集抑制、リン酸化、膜タンパク質、シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡の三大主原因は、癌、脳血管疾患、心疾患である。このうち、脳血管疾患および心疾患は、血栓症が基盤となり引き起こされるため、これらを予防するには、血小板凝集を抑制する食品の摂取が有効である。ニンニクのフレーバー成分であるスルフィド類などの直鎖状含硫化合物に関しては、これらが血

小板の凝集を抑制し、その作用機序は、アスピリンと同様に、アラキドン酸カスケード内シクロオキシゲナーゼの阻害であることが、既に明らかとなっている。ニンニクのフレーバー成分であるスルフィド類は、細胞が破壊されることにより、フレーバー前駆体であるアリルあるいはメチルシステインスルフォキシドにC-Sリアーゼが作用することにより生

成する。

一方、シイタケのフレーバー成分であるレンチオニンなどの環状硫黄化合物は、細胞破壊により、フレーバー前駆体であるレンチニン酸に、 γ -グルタミルトランスフェラーゼおよびC-Sリアーゼが作用することにより生成する。我々は、レンチオニンが、構造中にジスルフィドとトリスルフィド結合を有すること、および、その生成過程にC-Sリアーゼが関与していることから、ニンニクのフレーバー成分と同様の生理作用を有する可能性があると考え、シイタケフレーバー成分の血小板凝集抑制作用について検討してきた。その結果、シイタケ精油が血小板凝集抑制作用を有し、その活性物質がレンチオニンであること、また、レンチオニンの血小板内での作用部位が、スルフィド類等の直鎖状含硫化合物とは異なり、血小板内アラキドン酸カスケード以降を阻害する可能性が高いことを示してきた。

血小板は、コラーゲン等の惹起物質の刺激により、膜からアラキドン酸を遊離し、シクロオキシゲナーゼ等の酵素反応により、トロンボキサン A_2 を生成する。トロンボキサン A_2 は、膜表面の受容体に結合し、この刺激により、濃染顆粒からADP、カルシウム等が放出され、タンパク質のリン酸化が起こる。 α 顆粒細胞表面への移動、 α 顆粒からのフィブリノーゲン、フォン・ウィルブランド因子、P-セレクチン等の放出、形態変化、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を経て、フィブリノーゲンやフォン・ウィルブランド因子を介して、血小板同士の接着が起こる。レンチオニンは、この情報伝達の中で、カルシウムの放出以降を阻害している可能性が高いが、その作用機序は、明らかにはなっていない。また、レンチオニンは、独特のフレーバーを有する脂溶性物質であるため、食品への利用用途が限られている。

2. 研究の目的

本研究では、レンチオニンの作用部位を明らかにするため、レンチオニンが、血小板細胞内のタンパク質リン酸化、血小板の形態変化、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化に及ぼす影響について検討した。さらに、レンチオニンの食品への利用の幅を広げるため、これを α -シクロデキストリンに包接し、においの低減と水溶性化を試みた。さらに、 α -シクロデキストリン包接レンチオニンが、未包接のものと同様に、*ex vivo*で血小板凝集抑制作用を示すか否かについても検討した。

3. 研究の方法

(1) レンチオニンの血小板形態変化およびインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化に及ぼす影響

2週間以上服薬していない健常人の血液から調製した多血小板血漿を希釈し、レンチオニン存在下・非存在下において、惹起物質添加・無添加の際の血小板の形態変化およびインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の有無を調べた。血小板の特定は、インテグリン β_3 サブユニットを認識する Peridinin chlorophyll protein (PerCP) 標識モノクローナル抗体 CD-61、血小板の形態変化は、血小板活性化により血小板表面に出現する α 顆粒糖タンパクである P-セレクチンを認識する Phycoerythrin (PE) 標識モノクローナル抗体 CD-62P、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化は、このフィブリノーゲンレセプターを認識する Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識モノクローナル抗体 PAC-1 を用いて、フローサイトメーターにより測定した。

(2) レンチオニンの血小板内タンパク質リン酸化に及ぼす影響

2週間以上服薬していない健常人の血液から、多血小板血漿を調製した。さらに、フィブリノーゲン等の血漿成分を除去し、洗浄血小板を得た。この洗浄血小板に、レンチオニン存在下および非存在下で、アラキドン酸により血小板凝集を惹起後、経時的に反応を停止し、抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロッティングを行った。アラキドン酸惹起によりリン酸化されたタンパク質のうち、レンチオニン添加によりリン酸化が抑制されたタンパク質を切り出し、N末端側アミノ酸シーケンシングにより同定を行った。同定されたタンパク質の抗体を用いて、免疫沈降法により、目的タンパク質を分離し、レンチオニンがアラキドン酸惹起によるリン酸化を抑制するか否かを調べた。

(3) レンチオニンの α -シクロデキストリンによる包接

種々の濃度のレンチオニンを α -シクロデキストリン溶液とインキュベートすることにより包接した。包接物を分離後、上清に残存している α -シクロデキストリン量をフェノール-硫酸法により定量した。添加した α -シクロデキストリン量から残存している α -シクロデキストリン量を差し引くことにより、包接に使われた α -シクロデキストリン量を算出した。また、得られた α -シクロデキストリン包接レンチオニンの水に対する分散性も調べた。さらに、 α -シクロデキストリン包接レンチオ

ニンから揮発性するレンチオニン量を、経時的にガスクロマトグラフィーにより測定した。

(4) α-シクロデキストリン包接レンチオニンの ex vivo における血小板凝集抑制作用

α-シクロデキストリンで包接したレンチオニン溶液を胃ゾンデでラットに経口胃内投与した。経口胃内投与後、経時的に採血をし、多血小板血漿を調製した。得られた多血小板血漿をADPにより惹起し、血小板凝集率 A_1 をアグレゴメータにより測定した。レンチオニン無添加の時の血小板凝集率 A_n の値から以下の式により、凝集阻害率を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left[1 - \frac{A_1}{A_n} \right] \times 100$$

この結果を、未包接のレンチオニンを用いた同様の実験結果と比較した。

4. 研究成果

(1) レンチオニンの血小板形態変化およびインテグリン $\alpha_{IIB}\beta_3$ 活性化に及ぼす影響

惹起物質として、ADP 受容体に作用しカルシウム放出を促進すると共に cAMP を低下させる ADP、トロンボキサン A_2 の安定アナログであり、その受容体に作用する U-46619、カルシウムイオノファーであり血小板内へのカルシウム流入を促進する A23187、プロテインキナーゼ C を活性化しタンパク質のリン酸化を促進する PMA を用いた。その結果、いずれの惹起物質においても、血小板惹起により、血小板は、CD-62P および PAC-1 と結合するようになったが、レンチオニンの存在下では、いずれとの結合も著しく低下した。このことから、レンチオニンは、血小板の形態変化もインテグリン $\alpha_{IIB}\beta_3$ の活性化も抑制すると考えられる。

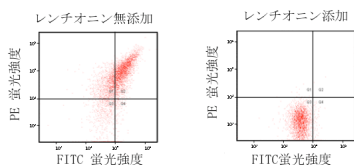


Fig. 1 レンチオニンが血小板の形態変化およびインテグリン $\alpha_{IIB}\beta_3$ 活性化に及ぼす影響

(2) レンチオニンの血小板内タンパク質リン酸化に及ぼす影響

抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロッティングの結果、アラキドン酸惹起によりリン酸化されたタンパク質のうち、約 50 kDa のタンパク質がレンチオニン添加により、リン酸化が抑制された。

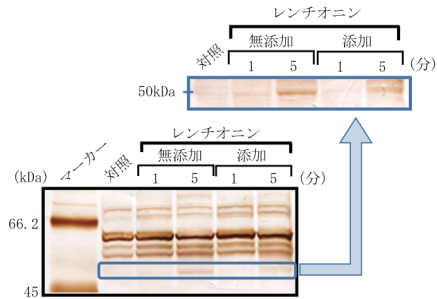


Fig. 2 レンチオニンが血小板内タンパク質のリン酸化に及ぼす影響

このタンパク質の N 末端 17 残基のシーケンスは、タリンと 93% の相同性を示し

```

50 kDa
タンパク質  VALSLKISIGNVVDTMFFE
タリン 1    VALSLKISIGNVVKTMQFE
    
```

Fig. 3 レンチオニンによりリン酸化抑制されたタンパク質の amino acid 配列とタリン 1 の配列との比較

た。抗タリン抗体を用いた免疫沈降により分離したタンパク質は、約 50 および 190 kDa のバンドが経時的に濃くなり、約 240 kDa のバンドが経時的に薄くなった。これは、約 240 kDa のタリンがカルパインにより 50 kDa の頭部と 190 kDa の尾部に分解され、頭部がインテグリン $\alpha_{IIB}\beta_3$ と結合し、活性化したためと考えられる。レンチオニンは、このタリンの分解を抑制した。

(3) レンチオニンの α-シクロデキストリンによる包接

レンチオニン溶液を α-シクロデキストリンに添加すると、レンチオニン濃度の増加と共に、上清に残存している α-シクロデキストリン量は減少した。添加したレンチオニン 1 mol に対して α-シクロデキストリンは 2 mol 減少したことから、レンチオニンは α-シクロデキストリンに対して 1:2 のモル比で包接されていると考えられる。

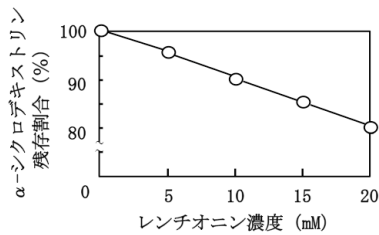


Fig. 4 レンチオニン添加に伴う未包接 α-シクロデキストリンの残存割合の変化

α-シクロデキストリンに包接することにより、レンチオニンの水への分散性は、著しく向上した。また、包接直後は、揮発性のレンチオニンはほとんど検出されなかった。しかし、保存期間の増加と共に、徐々に気散した。

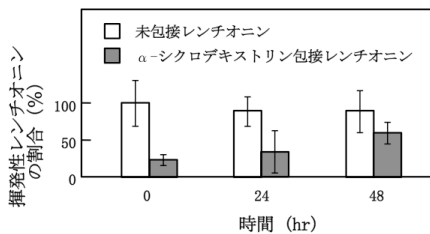


Fig. 5 α-シクロデキストリン包接レンチオニンの気散性の経時変化

- (4) α-シクロデキストリン包接レンチオニンの ex vivoにおける血小板凝集抑制作用
α-シクロデキストリンで包接したレンチオニンは、経口胃内投与4~8時間後において、コントロールに対し有意に血小板凝集を抑制した。以前の研究により、未包接のレンチオニンは、経口投与8~20時間後に血小板凝集抑制作用を示したことから、α-シクロデキストリンでの包接により、レンチオニンの吸収速度が速まったことが推察される。

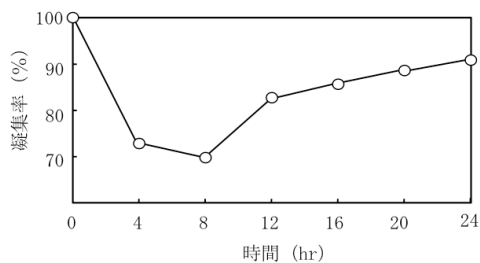


Fig. 6 α-シクロデキストリン包接レンチオニンの血小板凝集抑制作用の経時変化

また、α-シクロデキストリンで包接したレンチオニンは、投与量依存的に、血小板凝集を抑制した。

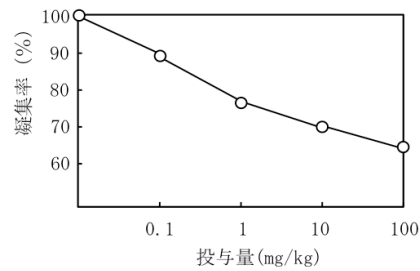


Fig. 7 α-シクロデキストリン包接レンチオニンの血小板凝集抑制作用の投与量依存性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Shimada, S., Kumagai, H., Akao, M., Sakurai, H., Inhibition of Platelet Aggregation by Orally-Administered Lenthionine, a Key Flavor Compound in Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*), *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 査読あり, 43巻, 505-507 (2008)

[学会発表] (計4件)

- ① Watanabe, T., Shimada, S., Akao, M., Kumagai, H., Inclusion of lenthionine, a shiitake flavor component, in α-cyclodextrin and inhibitory activity of the inclusion complex against platelet aggregation in vivo, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), December 18, 2010, Kamehameha Halls II and III, Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA
- ② 熊谷日登美, 島田正一郎, 渡部円, 赤尾真, 櫻井英敏, 環状硫黄化合物レンチオニンの血小板凝集抑制作用, 第6回日本大学バイオフィオーラム, 平成22年2月23日, 日本大学会館(東京)
- ③ 渡部円, 島田正一郎, 赤尾真, 熊谷日登美, 櫻井英敏, シイタケフレーバー成分レンチオニンのシクロデキストリンによる包接とその血小板凝集抑制作用, 第19回日本フードサイエンスフォーラム, 平成21年9月1日, ヤクルト伊東研修センター(静岡)

- ④ 赤尾真，島田正一郎，渡部円，熊谷日登美，櫻井英敏，シイタケフレーバーであるレンチオニンの α -シクロデキストリンによる包接とその血小板凝集抑制作用，第63回日本栄養・食糧学会大会，平成21年5月21日，長崎市茂里町ブリックホール（長崎）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 日登美 (KUMAGAI HITOMI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20225220