

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26304047

研究課題名(和文)ネパール野生キノコのライブラリーと健康機能を含むデータベースの構築

研究課題名(英文)Construction of the libraries and the database including health functions in Nepalese wild mushrooms

研究代表者

清水 邦義 (Shimizu, Kuniyoshi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：20346836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多種多様な代謝物を有するキノコ群の存在が期待されるネパールにおいて、野生キノコ150種以上を採集し、その抗酸化活性、メラニン生成抑制(促進)活性、抗アレルギー活性、抗菌活性について検討を行った。結果、数種の高い機能性を示す有望なキノコを発見し、中でも *Inonotus clemensiae* は高い抗酸化活性、抗アレルギー活性、抗菌活性を示した。我々はその活性成分である Hispidin の単離にも成功し、その体内での安定性の高さも明らかにした。同様に高い機能性を示した菌のデータを含め、本研究で得られた知見は、ネパール産キノコの基礎知見となり、今後、産業への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we collected over 150 species of wild mushrooms in Nepal. We examined its antioxidant activity, melanin production inhibitory (promoting) activity, antiallergic activity and antibacterial activity. As a result, we found promising mushrooms showing several high functionality. In particular, the extract of *Inonotus clemensiae* showed high antioxidant activity, antiallergic activity and antibacterial activity. We succeeded in isolating its active ingredient Hispidin. It is also highly stable in the body. The findings obtained in this study, including species data showing similarly high activity, will be the basic knowledge for advanced use of Nepalese mushrooms.

研究分野：天然化合物

キーワード：キノコ 生理活性 機能性成分 ネパール 健康食品 化粧品 *Inonotus hisidin*

### 1. 研究開始当初の背景

キノコは我が国ではなじみ深い食材であり、中国では漢方薬としても利用されており、近年では、有名な霊芝(レイシ)などをはじめ、キノコに含まれる機能性成分に注目が集まっている。しかし、現在 14 万種のキノコが存在しているとの試算があるものの、これまで記載された種はわずかその 1 割程度とされ、9 割以上が未知、未開拓の資源であると言える。

ネパールは標高約 9000m の極寒地域から海拔 50m 未満の亜熱帯地域にわたる急峻な土地に位置し、地理的变化に富むことから様々な気候帯が存在するため多様な植生や菌類相を有している。冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* に代表されるように経済的にも学術的にも重要な遺伝資源の宝庫であると考えられるが、これまでネパール産キノコにおける生理活性成分や薬理成分は未報告であり、研究はほとんど行われていなかった。さらに、キノコは同種であっても菌株や栽培方法、菌糸体と子実体によっても産生される成分も異なることが知られており、これらに伴い機能性も大きく変動する。すなわち、キノコの含有成分や特性は生育環境に依存し、その含有成分の多様性を生み出すことから、地理学的変化に富んだネパールに自生するキノコには新規な機能性を有するキノコ群が存在する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど明らかにされてこなかったネパール産の野生キノコ群について形態学および遺伝子学的情報から種を同定し、ライブラリーを作成すること(キノコデータベースの構築) また、それら子実体乾燥標本のエタノール抽出物および水抽出物を用いて、抗酸化活性試験、メラニン生成試験、抗菌活性試験等の有用な生理活性試験を行い、機能性キノコのデータベースを構築すること、さらに、それらのデータから機能性の高いキノコを見つけ、機能性関与成分の同定も行うことを目的とした。加えて、ネパールの研究機関(Nepal Agricultural Research Council (NARC))とも連携し、機能性キノコの栽培方法の最適化(機能性関与成分の含量を最も高める栽培方法の開発)も目指した。

### 3. 研究の方法

ネパールにてキノコを採集し、そのときの生育環境(標高、気温、湿度、基質等)を記録した。種の同定は、採集したキノコから DNA 抽出(改変 CTAB 法を用いた)を行い、PCR に供し、得られた PCR 産物の精製を行った後、DNA シーケンスを行い、得られた配列は ATGC ver.7 を用いて塩基配列の編集を行い、コンセンサス配列を得た。National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Blast 機能を用いて、既存のデータベースと

相同性検索を行い、未同定標本の分子情報から同定を行った。

採集したキノコサンプルの抽出物(水抽出物およびエタノール抽出)に対して、抗酸化活性、メラニン生成抑制(促進)活性、抗アレルギー活性、抗菌活性についての評価試験を行った。抗酸化活性の評価には ORAC 法を用いた。メラニン生成抑制活性については、B16 メラノーマ細胞のメラニン産生能に及ぼす影響評価試験を行い、はじめ幅広い濃度にて全サンプルを評価し、各サンプルの細胞生存率が 80%以上になるまでサンプル濃度を希釈して試験を行い、コントロールに対する細胞内のメラニン含有率および細胞生存率を各々算出した。また、アルブチンの結果を参考にし、サンプルが粗抽出物であることを考慮し、ランク分けした。抗菌活性に関しては、黄色ブドウ球菌ならびにアクネ菌を用いて検討した。

### 4. 研究成果

本研究ではネパールの野生キノコ 150 種以上の菌の収集に成功し、それらの抽出物について抗酸化活性、メラニン生成抑制(促進)活性、抗アレルギー活性、抗菌活性の検討を行い、次のような成果が得られた。

抗酸化活性について ORAC 法で検討したところ、特に高い活性を示した属は、*Inonotus* 属であり、その中でも、*Inonotus clemensiae* が最も高い活性を有することを明らかにした。本キノコのエタノール抽出物の総フェノール量は、643.2 mg GAE/g という極めて高い値を示し、さらに、還元力、DPPH ラジカル捕捉活性、ABTS ラジカル捕捉活性、いずれも高い値を示した。我々はこの活性成分に着目し、各種クロマトグラフィーを用いることで、活性成分 Hispidin を単離した。興味深いことに、本キノコの Hispidin 含量は、極めて高く、HPLC 分析においては、他の代謝物がほとんど検出されなかった。

メラニン生成抑制活性については、B16 メラノーマ細胞を用いた試験において、メラニンの生成を抑制しつつ、細胞生存率を高く維持するサンプルが全体の約 70%を占めることが明らかとなった。また、一方でメラニン合成を促進するサンプルも見られた。

抗アレルギー活性については、ラット好塩基球形白血病細胞 RBL-2H3 を用いて、型アレルギーに対する抗アレルギー作用を持つキノコのスクリーニングを行ったところ、数種の有望なキノコの発見に成功しており、それらのキノコ代謝物の解析を LC-MS や GC-MS により実施するとともに、活性成分の単離の検討を進めた。興味深いことに、タバコウロコタケ目やタマチョレイ目に属するキノコに高い活性が観察された。特に、*Phellinus adamantinus*、*Ganoderma lingzhi*、*Inonotus*

*clemensiae*の3種のキノコは高い活性を示した。*I. clemensiae*の活性成分である hispidin の IC50 値は、82.47 ならびに 181ug/mL であった。さらに、hispidin の生体内での安定性を検討するために、各種代謝酵素で処理したが、ほとんど、構造変化は見られなかった。これらの安定性の高さは、機能性食品原料としての応用可能性を示唆するものであった。

抗菌活性に関しては、黄色ブドウ球菌ならびにアクネ菌を用いて検討したところ、アクネ菌に対する強い抗菌活性が4種のきのこ抽出物で確認された。このうち、特に強力な抗菌活性を示したのは *Postia stipica* と *I. clemensiae* 抽出物であった。活性成分は、hispidin であり、黄色ブドウ球菌ならびにアクネ菌に対する MIC 及び MBC は、それぞれ、25 µg/mL 及び 100 µg/mL であった。ニキビ発症の主な理由としてはアクネ菌が放出するリパーゼや活性酸素による皮脂の過酸化脂質への変化であるため、これらのサンプルが有する静菌および作用や殺菌作用、高い抗酸化活性は抗ニキビ作用を有する化粧品や医薬品への応用が期待できると思われた。特に高い抗酸化活性も示す *I. clemensiae* は、健康食品や化粧品の原料として有望であると考えられた。

ネパールで採取したキノコのうち、日本国内でも採取できる種について比較を行ったところ、同じ種であっても、日本国内で採取されるものと比較して含有成分が量的質的に異なることが確認された。たとえば、薬理活性が高いことが知られる *Ganoderma* 属のキノコのいくつかは、我が国で栽培されている同属のキノコよりも、機能性成分として知られるラノスタン型トリテルペノイド類が豊富に含まれることも見いだした。この有望な *Ganoderma* 属キノコについては、ネパール現地の研究者と、栽培研究も開始し、機能性キノコの栽培方法の最適化(機能性関与成分の含量を最も高める栽培方法の開発)にも取り組んだ。

これらの本研究で得られた知見は、ネパール産キノコの高度利用のための基礎知見となり、今後、産業応用への検討が期待される。

#### 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 4 件)

Sonam Tamrakar, Katsuya Fukami, Kuniyoshi Shimizu, Nepal Mushroom Project、アレルギーの臨床、査読無、Vol. 37、2017、pp 889 - 891  
Sonam Tamrakar, Marina Nishida, Yhiya Amen, Hai Bang Tran, Hiroto Suhara,

Katsuya Fukami, Gopal Prasad Parajuli, Kuniyoshi Shimizu, Antibacterial activity of Nepalese wild mushrooms against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*、査読無、Vol. 63、2017、pp 379 - 387、<https://doi.org/10.1007/s10086-017-1636-1>

Sonam Tamrakar, Hai Bang Tran, Marina Nishida, Satoru Kaifuchi, Hiroto Suhara, Katsumi Doi, Katsuya Fukami, Gopal Prasad Parajuli, Kuniyoshi Shimizu, Antioxidant Activities of 62 Wild Mushrooms from the forests of Nepal and their phenolic profile by HPLC analysis、Journal of Natural Medicine、査読有、Vol.70、2016、pp769 - 779  
DOI:10.1007/s11418-016-1013-1

Tran Hai Bang, Hiroto Suhara, Katsumi Doi, Hiroya Ishikawa, Katsuya Fukami, Gopal Prasad Parajuli, Yoshinori Katakura, Shuntaro Yamashita, Kazuo Watanabe, Mahesh Kumar Adhikari, Hira Kaji Manandhar, Ryuichiro Kondo, and Kuniyoshi Shimizu, Wild Mushrooms in Nepal: Some Potential Candidates as Antioxidant and ACE-Inhibition Sources, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine、査読有、195305、2014、<http://dx.doi.org/10.1155/2014/195305>

#### [学会発表](計 5 件)

Sonam Tamrakar, Hai Bang Tran, Marina Nishida, Satoru Kaifuchi, Hiroto Suhara, Katsumi Doi, Katsuya Fukami, Gopal Prasad Parajuli, Kuniyoshi Shimizu, Nepalese Wild Mushrooms: A Treasure Trove of Various Biological Activities、19th International Society for Mushroom Science (ISMS)、2016  
Sonam TAMRAKAR, Hai Bang TRAN, Marina NISHIDA, Hiroto SUHARA, Katsumi DOI, Katsuya FUKAMI, Gopal Prasad PARAJULI, Kuniyoshi SHIMIZU、Bioactivity and Chemical Characterization of some Wild Mushrooms of Nepal、第 66 回日本木材学会大会、2016

TAMRAKAR, Marina NISHIDA, Hiroto SUHARA, Katsumi DOI, Katsuya FUKAMI, Gopal Prasad PARAJULI, Kazuo WATANABE, Mahesh Kumar ADHIKARI, Hira Kaji MANANDHAR, Kuniyoshi SHIMIZU、Investigation of the Antioxidant Activities of the Wild Mushrooms of Nepal、第 65 回日本木材学会大会、2015  
西田麻理奈、Tran Hai Bang, 須原弘登、

土居克実、深見克哉、Gopal Prasad Parajuli, 渡辺和夫、Mahesh Kumar Adhikari, Hira Kaji Manandhar, 清水邦義、ネパール原産きのこ抽出物がメラニン生合成に与える影響、日本きのこ学会第18回大会、2014  
西田麻理奈, Tran Hai Bang, 須原弘登、土居克実、深見克哉、Gopal Prasad Parajuli, 渡辺和夫, Mahesh Kumar Adhikari, Hira Kaji Manandhar, 清水邦義、ネパール原産キノコエタノール抽出物の生理活性評価、第58回日本菌学会、2014

なし

(4)研究協力者  
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：メラニン生成制御剤  
発明者：清水邦義、土居克実  
権利者：九州大学、NARC  
種類：特許  
番号：特願 2014-169034  
出願年月日：2014年08月22日  
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
森林圏環境資源科学研究室ホームページ  
<http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/sffps/results.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 邦義 (SHIMIZU, Kuniyoshi)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：20346836

### (2)研究分担者

土居 克実 (DOI, Katsumi)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：40253520

片倉 喜範 (KATAKUA, Yoshinori)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：50264106

### (3)連携研究者