

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660147

研究課題名(和文) 霊芝トリテルペノイドの標的生体分子同定

研究課題名(英文) Identification of the target molecule of Ganoderma triterpenoid

研究代表者

清水 邦義 (shimizu, kuniyoshi)

九州大学・(連合)農学研究科(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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：霊芝はマンネンタケ科のキノコで、一般的に万年茸(マンネンタケ)と呼ばれている。霊芝から特徴的な成分としてさまざまな多糖類やトリテルペノイドが単離されている。霊芝に含有されるトリテルペノイド類の、特に活性成分の一つとして見いだされたganoderic acid DMは高い抗男性ホルモン活性ならびに破骨細胞分化抑制活性を示した。本化合物の標的生体分子を明らかにすることにより、メカニズム解明の切り口とすべく、本化合物を結合させたナノ磁性ビーズを用いて、標的タンパク質の探索を行い、 β -tublinと特異的に相互作用することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The fungus *Ganoderma lingzhi* (Reishi, Mannentake, or Lingzhi) has been used for centuries in East Asia to treat various human diseases. Up to now, over 120 kinds of triterpenoids have been isolated from the genus *Ganoderma*. We have investigated anti-androgen effect and the inhibitory effects of osteoclastic differentiation of triterpenoids isolated from this mushroom in vitro. Ganoderic acid DM showed anti-androgenic activity which showed potent 5 α -reductase inhibiting effect. Also, ganoderic acid DM inhibited the osteoclastic differentiation, which responding to receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and a tumor necrosis factor (TNF- α). These results led us to investigate the target molecule of ganoderic acid DM by using affinity bead method. In this study, beta-tublin is identified as one of the target molecule of ganoderic acid DM in LNCaP cells. This result should be very helpful in elucidating the unsolved function of *Ganoderma* mushroom.

研究分野：森林圏生理活性科学、林産学、木材化学

キーワード：霊芝 *Ganoderma* トリテルペノイド 標的タンパク質 チューブリン ケミカルバイオロジー ganoderic acid DM マンネンタケ

1. 研究開始当初の背景

日本は、超高齢化社会の到来とともに、医療費自己負担率増、日本経済状態の悪化に加えて高価な医薬品による医療経済の崩壊が懸念されている。さらに、新型インフルエンザの流行のみならず、精神疾患・ガン・HIV・感染症等複雑かつ難病の増大に加えて、合成医薬品の副作用が問題となっている。現在ほど、安価で安全な効果を有する天然素材による治療・予防法（セルフメディケーション）の開発が望まれている時代は過去にはないように思える。さらに、2015年度より消費者庁へ届け出を行うことにより、機能性を部分的に表示できる機能性表示制度も開始され、天然素材による健康増進の機運が一段と高まっているのが現状である。

霊芝（レイシ）(*Ganoderma lingzhi*) はマンネンタケ科のキノコである（図1）。霊芝は一般的にマンネンタケ科の万年茸（マンネンタケ）を指し、他に門出茸、仙草、吉祥茸、



図1 霊芝の子実体

赤芝、紫芝、黒芝、青芝、白芝、黄芝などと呼ばれている。天然品は希少であるが、最近では、人工栽培も可能となってきた。古くから、和漢薬、民間薬（生薬、煎薬）の上薬（神薬、仙薬）にランクされ、その煎薬（エキス）には、数々の薬効が伝承されてきている。特に癌に効くキノコとして珍重されてきた。中国の後漢の時代（25-220）にまとめられた『神農本草経』に命を養う延命の霊薬として記載されて以来、中国ではさまざまな目的で薬用に用いられてきた。その効能を裏付けようと多くの基礎研究が実施されており、世界中で霊芝の薬理活性に関する研究は、近年、劇的に増大している（Web of Science 検索では、2000年時点では、本キノコの薬理活性に関する論文は、年間僅か20報であるが、2015年は年間140報）。薬理活性について、培養細胞や実験動物を用いた研究では抗癌作用、免疫賦活作用、血小板抗凝固作用などが報告されている。まさに、名実共に、多機能性天然素材としての地位を確立しつつある。しかしながら、「なぜかくも様々な効能があるのだろうか」という問いについては、我々を含め、誰も、明確に答えることができない。その疑問への問いかけこそが、我々を、霊芝研究に駆り立てるのである。なお、本プロジェクト遂行に至るこれまでの結果の詳細については、既報の総説を参照願いたい¹⁻³⁾。

霊芝の子実体は木質で食用には適さないた

め、古来より、子実体を適当な大きさに切り、熱水もしくはアルコールで抽出した液が服用されてきた。熱水およびアルコールで抽出する際に、ほのかな霊芝特有の香りを感じるが、その際の主な揮発性物質は様々な低分子ケトン類とラクトン類、テルペノイド類であることが知られている。特に、主要成分としては、*trans*-anethol, *R*-(-)-linalool, *S*-(+)-carvone and -bisabololなどが報告されている⁴⁾。しかし、それらのモノテルペノイド系の化合物ではなく、さらに分子量が大きく、酸素置換されているラノスタン骨格を有するトリテルペノイド類を有することが霊芝の大きな特徴である。

霊芝を化学成分的に見ると特徴的な成分としてさまざまな多糖類（ β -グルカンなど）やトリテルペノイドが単離されている⁵⁾。 β -グルカンは、免疫を高める成分として抗腫瘍作用の報告は多い。 β -グルカンにはマクロファージ・T細胞・ナチュラルキラー（NK）細胞・補体系などの免疫増強にかかわる種々の免疫細胞を活性化する作用が証明されている。動物実験では、経口投与で β -グルカンが免疫増強作用を示し、 β -グルカンの分子量や構造がその活性に影響することが知られている。霊芝の子実体から単離されたトリテルペノイドは120種を超え、薬理研究から肝臓保護、解毒、抗酸化、抗菌、血糖降下、抗HIVとヘルペスウイルス、腫瘍細胞抑制、前立腺肥大改善効果、骨密度低下抑制効果¹⁻³⁾などの作用があることが示されている。

2. 研究の目的

上記背景で述べたように、霊芝は、前立腺肥大抑制効果ならびに骨密度低下抑制効果を示す。その活性成分として霊芝特有の含有成分であるラノスタン型トリテルペノイドが関与していることが示唆され、一連の単離化合物を用いた検討により、ganoderic acid DMが、鍵化合物として機能していると考えられた。霊芝には、120種以上のラノスタン型トリテルペノイドが報告されており、それらが様々な機能を有している。それらのトリテルペノイドが総体として、様々な薬理活性に関与していることは間違いないが、まずは、その中の一つ一つのトリテルペノイドの標的生体分子の同定をドライビングフォースとした薬理活性発現メカニズムの解明を目指すことにした。まずは、ganoderic acid DMに着目し、本化合物の標的生体分子同定への挑戦から、メカニズム全貌解明への切り口とした。

3. 研究の方法

3-1 Ganoderic acid DM 誘導体の前立腺ガン LNCaP 細胞の増殖に及ぼす影響

3-2 Ganoderic acid DM 固定化FG ピースの作製

3-3 Ganoderic acid DM の標的生体分子の同定

の流れで研究を実施した。方法の詳細も含めて、結果及び考察を下記に示す。

4. 研究成果

4-1 Ganoderic acid DM 誘導体の前立腺ガン LNCaP 細胞の増殖に及ぼす影響

我々は既に、霊芝からは、20 種以上のトリテルペノイドを単離し、前立腺ガン細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。興味深いことに、ganoderic acid DM は、強い細胞増殖抑制効果を示した。他のトリテルペノイドは、ganoderic acid DM の構造に類似しているにもかかわらず、ganoderic acid DM のような

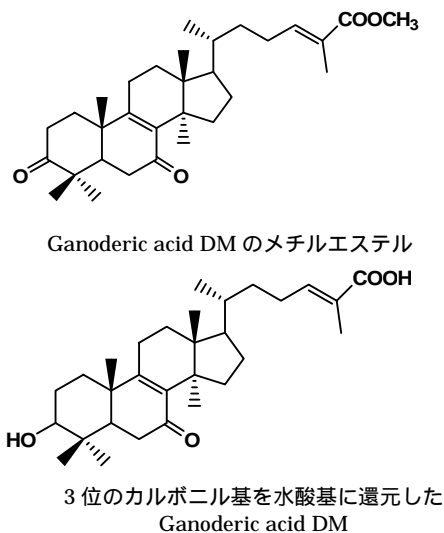


図 2 Ganoderic acid DM 誘導体

強い前立腺ガン細胞の増殖抑制効果を示さなかった。構造活性相関を確認するために、ganoderic acid DM から、構造が類似した化合物を調製した (図 2)。これらの化合物を前立腺ガン細胞の増殖抑制効果を確認したところ、ganoderic acid DM と ganoderic acid DM のメチルエステルは顕著な細胞増殖抑制効果を示した。26 位のカルボニル基を水酸基に還元した化合物は、前立腺ガン細胞の増殖抑制が若干低下したものの、3 位のカルボニル基を水酸基に還元した化合物には、前立腺ガン細胞の増殖抑制を示さなかった。これらの結果から、26 位のカルボキシル基以外の構造が前立腺ガン細胞の増殖抑制活性に関与している可能性が示された。このことは、以下に述べるプローブ設計において極めて有利な知見であった。即ち、カルボキシル基をリンカーとして何らかに結合して、本官能基をブロックしたとしても、標的分子探索プローブとして機能することを示している。

しかしながら、二点確認する必要がある。一つは、なぜ、ganoderic acid DM のメチルエステルが強い細胞増殖抑制活性を示したか、そして、もう一つは、ganoderic acid DM はその構造のまま、標的分子と相互作用

しているかどうかである。そこで、ganoderic acid DM ならびにメチルエステルの細胞培養系での動的挙動を HPLC 分析によって検討することとした。

そこで、前立腺ガン LNCaP 細胞を用いて、HPLC による細胞内の ganoderic acid DM メチルエステルと ganoderic acid DM の定量分析を行った。

種々の濃度において、ganoderic acid DM を LNCaP 細胞培養系で培養し、培地と細胞を分けそれぞれを逆相 HPLC 分析に供した。さらに、培地のみでの添加化合物の安定性についても検討した (図 3)。各添加濃度において、ganoderic acid DM (Rt : 6.1 分) は培地、細胞の培養液と細胞から検出され、ganoderic acid DM 以外の代謝物は検出されなかった。即ち、ganoderic acid DM は、本構造を保持したまま細胞培養系内に存在し、

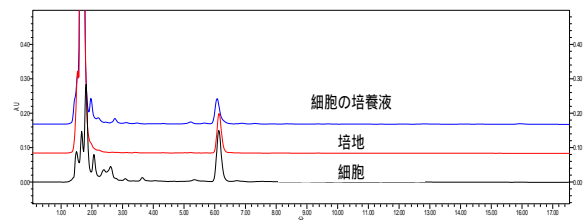


図 3 Ganoderic acid DM を LNCaP 細胞培養系に添加した際の挙動

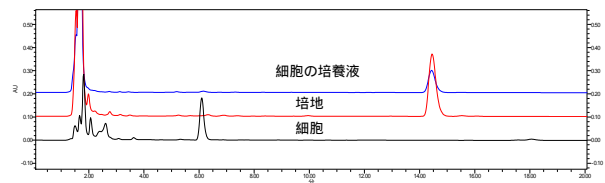


図 4 Ganoderic acid DM メチルエステルを LNCaP 細胞培養系に添加した際の挙動

細胞内の何らかの分子と相互作用していることが示唆された。さらに、ganoderic acid DM メチルエステルにおける逆相 HPLC 分析結果を図 4 に示した。各添加濃度において、培地と細胞培養液から ganoderic acid DM メチルエステル (Rt : 14.5 分) が検出された。しかし、興味深いことに、細胞からは、ganoderic acid DM メチルエステル由来のピークは検出されなかった。Ganoderic acid DM メチルエステルの代わりに、Rt = 6.1 分の新たなピークが検出された。本ピークは、標品と Rt ならびに UV 吸収スペクトルとの比較から ganoderic acid DM であることが確認された。これらの結果から、ganoderic acid DM メチルエステルは前立腺ガン細胞に取り込まれ、加水分解され、細胞内で ganoderic acid DM に変換され、前立腺ガン細胞の増殖抑制活性に関与していることが示唆された。前立腺ガン細胞増殖抑制の結果から、ganoderic acid DM メチルエステルの IC₅₀ は 5 μM であったのに対して ganoderic acid DM の IC₅₀ は 40 μM であった。よって、

ganoderic acid DM をメチルエステル化したことにより疎水性の化合物へと物性が変化し細胞内に取り込まれやすくなったことで効率的に標的タンパク質に結合し、活性発現が誘導されたことを考えられた。さらに、他の細胞においても同様な挙動が観察されるかを検討したところ、B16 細胞と破骨細胞での実験で、同様な結果を得られた。以上の ganoderic acid DM ならびに誘導体を用いた動的挙動解析検討によって、ganoderic acid DM は側鎖構造以外の構造、すなわちラノスタン骨格由来多環構造を介して、細胞中の特定の分子と特異的に結合していることが予想された。そこで、さらに、ganoderic acid DM の細胞増殖抑制機構を解明するために、ganoderic acid DM と結合する標的分子の同定を試みた。

4-2 Ganoderic acid DM 固定化 FG ビーズの作製

FG ビーズ表面はポリグリシジルメタクリレート (ポリ GMA) で被覆され、GMA は官能基であるエポキシ基を持っている。したがって、エポキシ基を介して ganoderic acid DM を FG ビーズに固定化できる。ただし、ganoderic acid DM は低分子化合物であるた

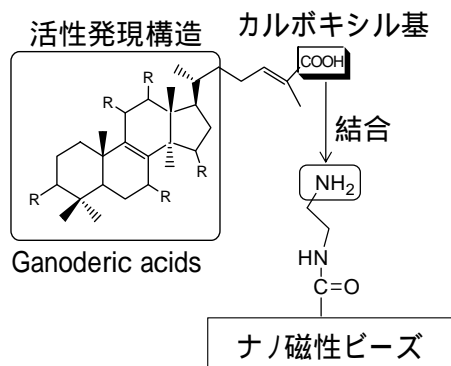


図5 ナノ磁性ビーズへの ganoderic acid DM の結合による標的タンパク質探索プローブの調製

め、ビーズに直接固定化すると、両者の間隔がきわめて狭いので立体障害が起こり、目的とするタンパク質が回収されない場合がある。それを防ぐために、両者間のスペースを確保するためのリンカーとして EGDE (エチレングリコールジグリシジルエーテル) を用いた。固定化の際は、ganoderic acid DM の活性発現に関与しない官能基を介してリンカーに固定化する必要がある。上記 3-1 から、ganoderic acid DM の 26 位のカルボキシル基以外の構造が、活性発現構造として機能し、前立腺ガン細胞の増殖抑制活性に関与していることが示されたため、26 位のカルボキシル基を利用して NH₂ ビーズへの固定化を行った (図 18)。Ganoderic acid DM を固定化した FG ビーズはアフィニティ FG ビーズとして、ganoderic acid DM に対する標的

タンパク質の探索に用いることとした。

4-3 Ganoderic acid DM の標的タンパク質の同定

Calbiochem ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit を用いて、前立腺ガン LNCaP 細胞を細胞質、細胞膜、細胞核に分画した。上述の ganoderic acid DM をアフィニティ FG ビーズに結合させプローブとし、前立腺ガン細胞の各画分と混合し、FG ビーズと結合する ganoderic acid DM と結合するタンパク質を回収した後、磁石を用いて ganoderic acid DM と結合する FG 磁性ビ

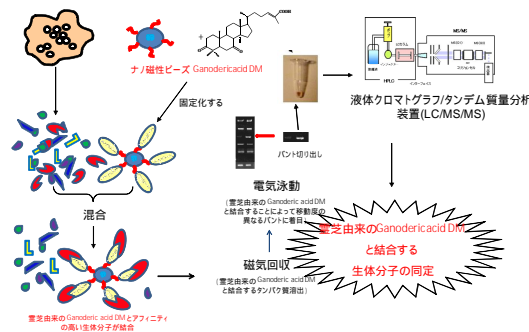


図6 ナノ磁性ビーズへの ganoderic acid DM の結合による標的タンパク質同定スキーム

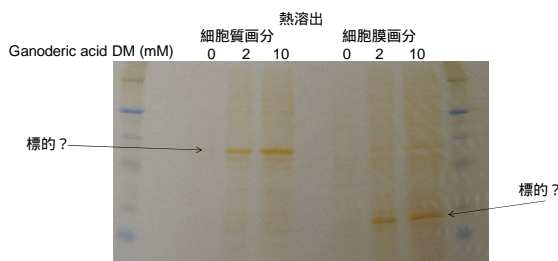


図7 電気泳動による標的タンパク質の検出。回収されたタンパク質を一次元ゲル電気泳動に供し、分画後、特異的スポットを切り出した。LC-MS 分析によりタンパク質を解析し、ライブラリー検索を行い、ganoderic acid DM のターゲット生体分子の同定を試みた。

具体的には、図6に示したように ganoderic acid DM のカルボキシル基を介して固定化した FG ビーズを用いて、前立腺ガン細胞由来のタンパク質画分から標的タンパク質の分離を行った。

前立腺ガン細胞由来の細胞核と細胞骨格分画は、構造活性相関結果を勘案し、26 位を介する ganoderic acid DM 固定化 FG ビーズと混合した。細胞核と細胞骨格分画から標的タンパク質の結合は検出されなかった (データ未掲載)。一方、細胞質と細胞膜分画の熱溶

出で、ganoderic acid DM 固定化量を、0、2、10 mM と増加させることで特異的と思われるタンパク質のバンドが増加していることが判明した(図7)。

熱溶出の細胞質画分と細胞膜画分から特異的なタンパク質のバンドを切り出し、LC-MS/MS で分析を行った。LC-MS/MS で得た MS/MS スペクトルのすべてのプロダクトイオン測定データを用いて、Mascot データベース検索を行った。細胞質画分から微小管の主要タンパク質である α -チューブリンが検出された(Total score 1253)。細胞膜画分からは、数多くのタンパク質が検出され、非特異的結合タンパク質の存在も示唆されるために、本検討においては、標的タンパク質の同定には至らなかった。

チューブリンは、分子量約5万の α -チューブリンと β -チューブリンがあり、これらが1個ずつ結合したチューブリンダイマーが直線上に重合し、微小管のプロトフィラメントを構成する。このプロトフィラメントが管状に11-16本程度結合したものが微小管である。チューブリンはGTP結合タンパク質であり、GTPの結合・加水分解により微小管の伸長と短縮が調節される。また中心体には γ -チューブリンがあって微小管形成において重要な役割を演じている。Ganoderic acid DM は前立腺ガン細胞のチューブリンに結合して重合を阻害し微小管の形成を妨げ、細胞分裂を阻害することにより、前立腺ガン細胞の細胞増殖を抑制していることを示唆された。これまでに、チューブリンを標的とする分子としては、コルヒチンやタキソールが知られている。コルヒチンは、ピンカアルカロイドの一種であり、痛風に用いられる。本化合物は、チューブリンに結合して重合を阻害し、微小管の形成を妨げることが分かっている。また、タキソールは、逆に、微小管が重合した状態により安定にすることで細胞の有糸分裂を停止させアポトーシスへ導くことが知られている。

本プロジェクトにおいて、今回、新たに、ganoderic acid DM が、 α -チューブリンを標的分子とすることが判明し、霊芝の多機能性薬理活性発現機構解明に繋がるのみならず、これまでに報告されていない新しいタイプのチューブリン作用物質として、創薬リードになることも期待される。

(引用文献)

- 1) 清水邦義、劉潔、宮本以智子、近藤隆一郎：FFIジャーナル(Foods & Food Ingredients Journal of Japan) 211(2) 124-133 (2006)
- 2) 劉潔、清水邦義、近藤隆一郎：Green Spirits 3 (3), 3-9 (2007)
- 3) 清水邦義、宮本以智子、塩野順、劉潔、近藤隆一郎：Green Spirits 3 (4), 3-10 (2008)
- 4) Ziegenbein, F.C., Hanssen, H.-P.,

König, W.A. Phytochemistry, 67 (2), 202-211(2006).

- 5) Paterson, R.R.M. Phytochemistry, 67, 1985-2001(2006)

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8件)

Hypotensive effects of Reishi (*Ganoderma lingzhi*)'s auto-digested extract and its potent peptides for Angiotensin-Converting Enzyme inhibition.

Molecules 2014, 19, 13473-13485; doi:10.3390/molecules190913473

T. H. Bang, A. Yamamoto, S. Matsumoto, H. Ito, K. Igami, T. Miyazaki, R. Kondo, K. Shimizu

Structure-Activity Relationship and Inhibition Pattern of Reishi-derived (*Ganoderma lingzhi*) Triterpenoids against Angiotensin-Converting Enzyme

Phytochemistry Letters, 12, 243-247, 2015
T. H. Bang, K. Shimizu

Inhibition of neuraminidase by *Ganoderma* triterpenoids and implications for neuraminidase inhibitor design
Scientific Reports

DOI: 10.1038/srep13194.

Q. Zhu, T. H. Bang, K. Ohnuki, T. Sawai, K. Sawai, K. Shimizu

Lucidumol C, a new lanostanoid triterpene from *Ganoderma lingzhi* with potential activity against colon cancer
Journal of Natural Medicines (2016) in press

Yhiya M. Amen, Amira Mira, Hai-Bang Tran, Mohamed S. Afifi, Ahmed F. Halim, Ahmed Ashour, Kuniyoshi Shimizu

Methoxyflavones from *Ganoderma lingzhi*
International Journal of Medicinal Mushrooms (2016) in press

Yhiya M. Amen, Satoru Kaifuchi, Kuniyoshi Shimizu.

Detection of ganoderic acid A in *Ganoderma lingzhi* by an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay

Planta Med.(2016) in press.

Sakamoto, S., Kohno, T., Shimizu, K., Tanaka, H., Morimoto, S.

清水邦義、河野俊亨

多機能性キノコ「靈芝」(Ganoderma lingzhi)の更年期症状改善効果
更年期と加齢のヘルスケア、13(1)1-7(2014)

清水 邦義、朱 欽昌、吉村 友里、海淵 覚、桑原 李佳、大貫 宏一郎
靈芝の多機能性薬理効果に関する近年の科学的検証
FFI ジャーナル, in press(2016)

〔学会発表〕(計6件)

The Multi-functional effects of triterpenoids isolated from Ganoderma lingzhi
The 55th Anniversary of National Institute of Medicinal Materials (NIMM) conference, La Thanh Hotel, 226 Van Phuc Street, Ba Dinh District, Hanoi, 13 April, 2016
Kuniyoshi SHIMIZU (Invited lecture)

Multi-functional effects of triterpenoids isolated from Ganoderma mushroom
The First Chinese Lingzhi Conference
9-12, August, 2015 (Longquan, China)
Kuniyoshi SHIMIZU (Invited Keynote lecture)

Multi-medicinal effects of triterpenoids isolated from Ganoderma lingzhi
International Seminar on Chemistry (ISoC) 2014
28-29, October, 2014 (Senur Paradise Plaza Hotel, Bali, Indonesia)
Kuniyoshi SHIMIZU (Key note speaker, invited)

Influenza neuraminidase inhibitory activity of triterpenoids from Ganoderma lingzhi and their structure-activity relationships
The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy
(Fukuoka University, Fukuoka, Japan)
September 13, 2014.
Qinchang ZHU, Tran Hai BANG, Koichiro OHNUKI, Takashi SAWAI, Ken SAWAI, Kuniyoshi SHIMIZU
Department of Agro-environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan

Inhibition of angiotensin converting enzyme by lanostanoids from reishi (Ganoderma lingzhi): structure-activity relationship and inhibition pattern
The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy

(Fukuoka University, Fukuoka, Japan)
September 13, 2014.
Hai Bang TRAN, Kuniyoshi SHIMIZU
Laboratory of Systematic Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan

Methoxyflavones from Ganoderma lingzhi
第66回日本木材学会大会
場所：名古屋大学
2016年3月27日～29日
(Grad. Sch. Agr., Kyushu Univ.) Yhiya Amen, Satoru Kaifuchi, Kuniyoshi SHIMIZU

〔産業財産権〕
出願状況(計3件)

名称：ノイラミニダーゼ阻害剤、これを含む抗インフルエンザ剤、食品および薬剤、並びにそれらの製造方法
発明者：清水邦義、澤井健
出願人：国立大学法人九州大学、株式会社東洋丹芝園
種類：特許
番号：特願 2014-170877
出願年月日：2014年8月25日
国内外の別：国内

名称：アンギオテンシン変換酵素(ACE)の阻害剤、これを含む食品および薬剤、並びにそれらの製造方法
発明者：清水邦義、澤井健
出願人：国立大学法人九州大学、株式会社東洋丹芝園
種類：特許
番号：特願 2014-170876
出願年月日：2014年8月25日
国内外の別：国内

名称：チューブリン重合活性調節剤、これを含む食品および薬剤、並びにチューブリン重合活性調節剤の製造方法
発明者：清水邦義、澤井健
出願人：国立大学法人九州大学、株式会社東洋丹芝園
種類：特許
番号：特願 2014-135844
出願年月日：2014年7月1日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<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