

メシマコブに含まれる抗腫瘍活性物質の精製

中嶋加代子 岸本律子*

Purification of the Substance Exerting an Antitumor Activity in Mesimakobu

Kayoko NAKASHIMA Ritsuko KISHIMOTO*

緒 言

ガンは日本人の死因の第1位であり、早急な対策が求められている。ガン予防対策として食品の三次機能成分を利活用することは有効な手段の1つであると思われる。海藻や植物などから抽出される天然の物質には、ヒトの免疫能力を高めたり、抗腫瘍効果を示すものがあり、ニンニクについてはレクチンタンパク質のガン細胞増殖抑制効果が報告されている¹⁾。実際にキノコは、ガン予防の食品として伝統的に用いられており²⁾、現在では種々のキノコ加工食品が市販されている³⁾。キノコ加工食品に含まれる生理活性物質である β -グルカン⁴⁾は免疫力を増強する作用を有すると報告されている^{2)~4)}。

メシマコブ(茸)に関する研究では、近年、抗腫瘍効果が報告されており¹⁾⁵⁾⁶⁾、*Phellinus linteus* (Mesimakobu; キノコ) から抽出されるエキス成分が、ヒトリンパ球系ガン細胞U937の増殖を抑制し、ニンニクのレクチンと相乗的にU937細胞の増殖を強く抑制したことが確認されている¹⁾。しかし、この報告で用いられたメシマコブのエキスは、精製されていない複数の成分の混合物であり、ガン細胞の増殖抑制作用がエキス中のどの成分による効果である

のか確認できていない。したがって、精製された単一成分を用いた研究が早急に求められている。メシマコブ(茸)は現在、液状、粉末状、顆粒状などのキノコ加工食品として市販されており、血糖値上昇抑制作用が報告されている⁷⁾。この場合も実際どの成分が血糖値の上昇抑制に対して関与しているのか分かっていない。メシマコブ(茸)は、ポリフェノールや水溶性食物繊維の含量が高いことは確認されているが、生理機能に関する研究報告は非常に少ない。

本研究は、メシマコブ(茸)のタンパク質に着目してニンニクのレクチンタンパク質の精製法⁸⁾に準じ、カラムクロマトグラフィーによってメシマコブ(茸)に含まれるガン細胞増殖抑制成分を部分精製することを目的とした。

実験方法

1. 試料

精製の材料として用いたメシマコブは、熱水で抽出された成分を乾燥した後、粉末状に加工された市販品であり、乾燥状態を保持して実験直前まで冷蔵庫(7℃)で保存した。

2. 試薬

メシマコブの細胞壁を破壊する目的で、セルラーゼ(和光純薬工業株式会社製)を使用した。

* 神戸学院大学

ゲル濾過のためのセファデックス G-75は、ファーマシアファインケミカルズの製品を用い、イオン交換クロマトグラフィーのための DEAE-トヨパール650M は東ソー株式会社のもを用いた。DEAE-トヨパール650M は、親水性ビニルポリマーを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用充てん剤（タンパク質排除限界分子量 5×10^6 ）にイオン交換基を導入した充てん剤である。

3. 測定方法

1) タンパク質量の測定

タンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準として、ローリー法⁹⁾（DC プロテインアッセイ）または280nm の吸光度によって測定した。

2) 糖質量の測定

糖質量は、ブドウ糖を標準として、フェノール硫酸法¹⁰⁾によって測定した。

3) 生物活性の測定

ガン細胞増殖抑制試験は、ヒトリンパ球系ガン細胞 U937 を37℃で培養し、メシマコブ画分で時間依存的に細胞処理し、細胞の数を顕微鏡下で測定することにより非処理コントロール

群細胞との比較から細胞増殖抑制効果を観察した。

結果および考察

1. メシマコブ（茸）の特徴

メシマコブ（茸）は、学名が *Phellinus linteus*（フェリナス リンテウス）であり、選択的に桑の木に生育するタバコウロコタケ科、キコブタケ属の黄色い多年生のキノコ；木材腐朽菌である。図1はメシマコブ（茸）が桑の木に生育している状態を示しており、図2は収穫して乾燥した状態のメシマコブ（茸）である。このキノコは、長崎県の西方沖に浮かぶ男女群島の女島（めしま）に自生する野生の桑の古木にコブ状に生育していたことから「メシマコブ」と命名されたといわれている。中国では古くより桑黄（そうおう）と呼ばれ、煎じ薬の漢方薬として利用されている。現在では、女島における天然メシマコブ（茸）の採取はほとんどできない状況になっているが、同種または近縁種のメシマコブ（茸）が日本・中国・オーストラリア・北アメリカなどのごく限られた場所（長崎県の女島に似た環境）に自生している。しかし、養蚕業の減少とともに、桑の木が減り、子実体を

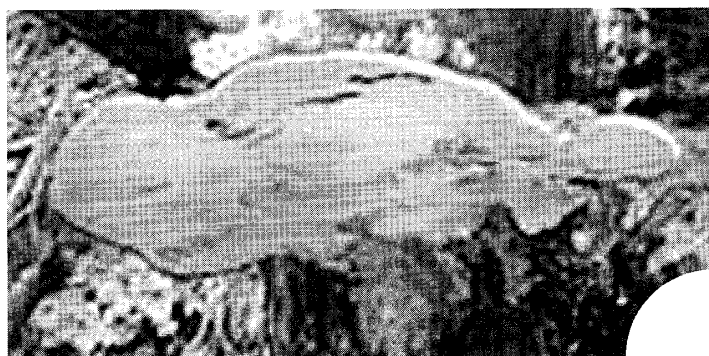


図1. メシマコブ（生）

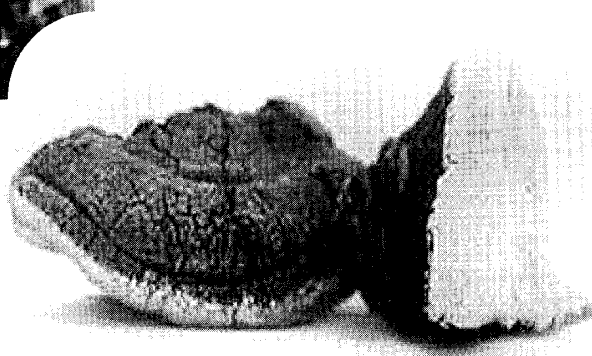


図2. メシマコブ（乾燥）

表1. メシマコブ画分の糖質及びタンパク質含有量

試料 ¹⁾	糖質 (mg)	タンパク質 (mg)
メシマコブ (M) ²⁾	25.0	17.5
セルラーゼ (C) ³⁾	35.0	27.5
M+C 反応液 ⁴⁾	82.0	48.0
DEAE-トヨパール処理画分 ⁵⁾	3.4	22.0

¹⁾ 13,000rpmで5分間、遠心分離を行い、上清を試料とした。

²⁾ 粉末20mgを0.02Mリン酸緩衝液 (pH6.0) で溶かした。

³⁾ 26mgを0.02M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で溶かした。

⁴⁾ メシマコブにセルラーゼを添加し、55℃で12時間反応させた。

⁵⁾ DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーのフラクションナンバー10~13番である。

入手することが困難になってきた。そこで近年では、菌糸体（根っこの部分）が培養され、有効成分が濃縮されたものが生産されている。

日本国内では、国立がんセンターが各種キノコの腫瘍阻止率を調べた結果、メシマコブ（煎じ汁）は96.7%という高い阻止率を示したと報告されている¹⁾。

2. 抗腫瘍活性物質の精製について

1) セルラーゼによる処理

細胞壁成分を分解するため、粉末状のメシマコブ加工品を20mMリン酸緩衝液 (pH6) で溶かしたものにセルラーゼ (20mM酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 pH5に溶かしたもの) を添加した。反応条件は、55℃で12時間とした。

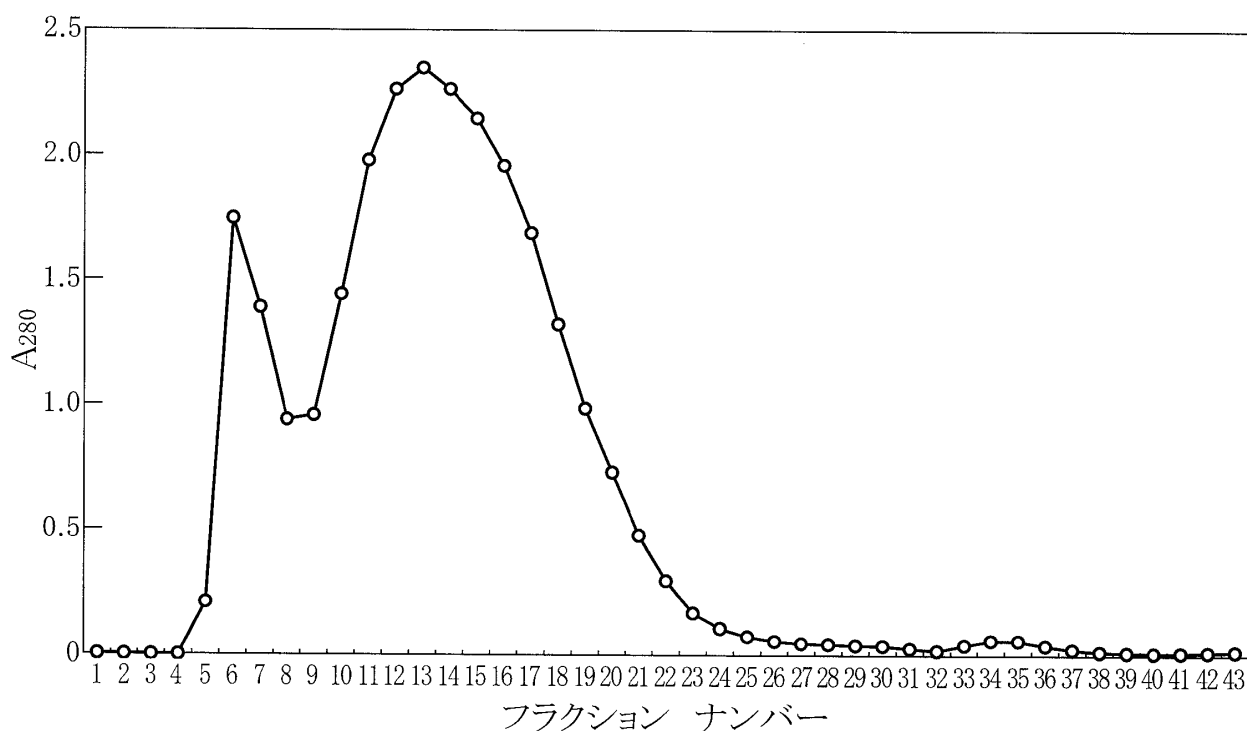


図3. セルラーゼ処理画分の SephadexG-75カラムによるゲル濾過 (1) カラムサイズは1.0×8.8cm。0.02Mリン酸緩衝液 (pH6.0) を用いた。

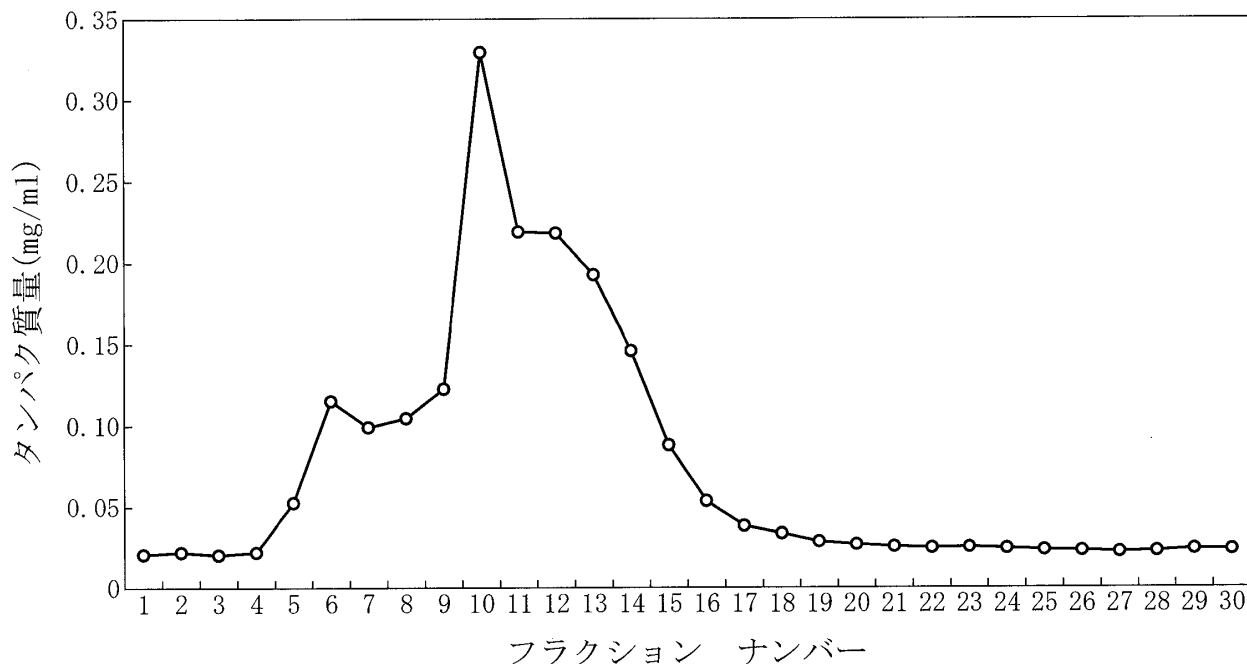


図4. セルラーゼ処理画分の SephadexG-75カラムによるゲル濾過 (2)
カラムサイズは1.0×8.8cm。0.02M リン酸緩衝液 (pH6.0) を用いた。

その結果を表1に示した。メシマコブ単独の糖質含有量は25.0mg, セルラーゼの糖質含有量は35.0mgであった。この両者を単純に合計すると60.0mgになるが, 反応液の糖質含有量は82.0mgであり22.0mg増加していた。これは, セルラーゼ処理によって細胞壁が破壊され, 細胞壁に存在していた糖質が測定値に反映されたものと考えられる。タンパク質量は, ほとんど変化しなかった。

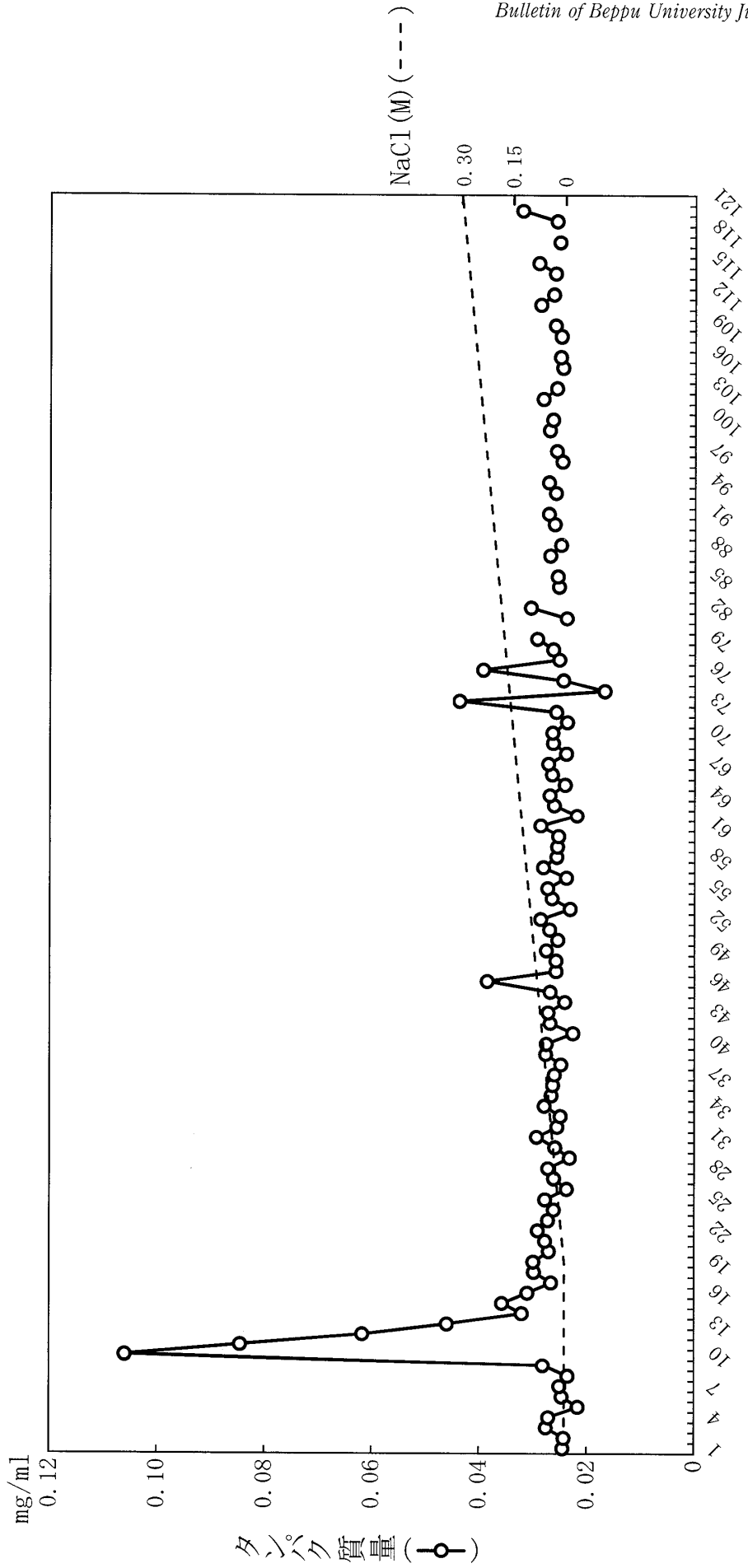
2) セファデックスG-75カラムクロマトグラフィーによる精製

セルラーゼ処理後の溶液を減圧で濃縮し, リン酸緩衝液で平衡化したセファデックスG-75カラム (1.0×8.8cm) に向け, リン酸緩衝液で溶出した。その結果を図3, 図4に示した。図3は280nmの吸光度によってタンパク質量を測定したものであり, 図4はローリー法(DCプロテインアッセイ)によって測定したものである。タンパク質溶出曲線は, 図3, 図4ともに2個のピークが存在した。精製の際には, 図

4のピークの2番目画分 (フラクションナンバー9~18番) を精製の目的とした。

3) DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーによる精製

図4に示したセファデックスG-75カラムクロマトグラフィーの2番目の画分 (フラクションナンバー9~18番) を減圧で濃縮した後, リン酸緩衝液で平衡化したDEAE-トヨパールカラム (1.0×9.0cm) に吸着させた。フラクションナンバー13番までは, 溶出液としてリン酸緩衝液のみを使用し, フラクションナンバー14番以降はNaClの直線濃度勾配で溶出した。その結果を図5に示した。タンパク質溶出曲線に大きなピーク (フラクションナンバー10~13番) と小さなピーク (フラクションナンバー46番, フラクションナンバー73番, フラクションナンバー76番) が存在した。フラクションナンバー10~13番は, リン酸緩衝液のみで溶出されたピークであるため糖質を含有しているものと推察された。実際に糖質定



フラクションナンバー

図5. SephadexG-75処理画分ピーク2のDEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィー
カラムサイズは1.0×9.0cm。0.02Mリン酸緩衝液 (pH6.0) を用いた。

量を行った結果、糖質含有量は3.4mgであることが分かった(表1)。したがって、フラクションナンバー10~13番のタンパク質は糖結合している可能性が示唆された。さらに、ガン細胞増殖抑制試験を行った結果、どの画分もU937細胞の増殖抑制効果が観察された。メシマコブ画分の生物活性および純度については今後、さらに検討する予定である。

要 約

メシマコブに含まれるタンパク質に着目してガン細胞増殖抑制成分をカラムクロマトグラフィーによって部分精製し、次の結果を得た。

1. メシマコブにセルラーゼを添加し、55℃で12時間反応させると糖質含有量が増加した。
2. セルラーゼ処理後の溶液を減圧で濃縮し、リン酸緩衝液で平衡化したセファデックスG-75カラムにかけ、リン酸緩衝液で溶出した結果、タンパク質溶出曲線に2個のピークが存在した。
3. セファデックスG-75カラムクロマトグラフィーの2番目の画分を減圧で濃縮した後、DEAE-トヨパールカラムに吸着させた。フラクションナンバー13番まではリン酸緩衝液のみ、フラクションナンバー14番以降はNaClの直線濃度勾配で溶出した結果、タンパク質溶出曲線に大きなピーク(リン酸緩衝液のみで溶出)と小さなピーク(NaClの直線濃度勾配で溶出)が存在した。

謝 辞

ガン細胞増殖抑制試験を実施していただきました産業医科大学唐崎裕治教授に心より御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Karasaki Y, Tsukamoto S, Mizusaki K,

- Sugiura T, Gotoh S (2001), A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells, *Food Research International*, 34, 7-13.
- 2) 田島眞編著(2004), 食品学Ⅱ, 同文書院, 東京, 103.
- 3) 谷村顕雄監修(1999), 植物資源の生理活性物質ハンドブック, サイエンスフォーラム, 東京, 348-350.
- 4) 永川祐三(2004), 抗がん食品事典, 主婦と生活社, 東京, 20.
- 5) Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F (1968), Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*, *Gann*, 59, 155-157.
- 6) Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Yoo ID, Kim HM (1999), The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis, *Immunopharmacol*, 41, 157-164.
- 7) 石原伸治, 渡辺敏郎, Mazumder Tapan Kumar, 永井史郎, 辻啓介(2005), ラットにおけるメシマコブ菌糸体の血糖値上昇抑制作用, *日本栄養・食糧学会誌*, 58(4), 225-229.
- 8) 塚本貞次, 水崎幸一, 吉田紀夫, 石本陽子, 坂田良子, 唐崎裕治(1998), ニンニクのレクチンの精製と性質, *九州女子大学紀要*, 34, 11-21.
- 9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R.J.(1951), *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275.
- 10) 福井作蔵(1985), 生物化学実験法1, 学会出版センター, 東京, 45-47.
- 11) 主婦と生活社編(2005), 健康食品バイブル, 主婦と生活社, 東京, 235.