

# タモギタケから単離したエルゴチオネインの 生体内抗酸化性に関する研究

福田 絵里 山岸 和敏 知地 英 征

## Abstract

We investigated the serum antioxidative activity in the hepatic portal vein at 5, 15, 30, 60, and 90 minutes after the injection of 0.1% ergothioneine into the small intestine of rats using Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). Furthermore, we attempted to identify ergothioneine in the rat serum by electric spray ionization liquid chromatography mass spectrometry (ESI-LC-MS). No changes were observed in the ORAC values from the hepatic portal vein of rats administered and those not administered ergothioneine. Further, no molecular ion peaks were observed in the rat serum by the ESI-LC-MS.

## 1. はじめに

我々は、タモギタケから単離したエルゴチオネインが *in vitro* において加熱温度および各 pH 条件下で高い抗酸化性を有することを明らかにし、報告した<sup>1)</sup>。生体内においても、エルゴチオネインの存在が HSP70 の発現を導く細胞保護作用とともに肝臓での脂質過酸化を抑制し、虚血再灌流により引き起こされる肝臓障害の度合いを弱めること<sup>2)</sup>、酸化ダメージを付与したラットの腎臓および肝臓のエルゴチオネインの保護効果<sup>3)</sup>などが報告されている。しかし、生体内での抗酸化性そのものを測定した報告は少ない。そこで本研究では、精製エルゴチオネインの生体内機能性と吸収動態を明らかにすることを目的とし、ラットの消化管結紮ループにエルゴチオネインを注入後、経時的に門脈から採血し Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法による抗酸化性の測定と、LC-MS による血中エルゴチオネインの探索を行った。

## 2. 実験方法

### 1) 実験動物および飼育方法

実験動物は 7 週齢の Sprague Dawley 系雌性ラット 6 匹を三協ラボサービス(株)から購入した。動物飼育室は 12 時間の明暗周期 (明期 8:00-20:00) とし、室温  $23 \pm 1$  °C、湿度  $55 \pm 10\%$  に設定した。ラットは個別のステンレスケージに入れ、毎日体重と飼料摂取量を記録した。スクロースを 60% 含む基本飼料および給水は自由摂取とした。

### 2) 小腸結紮ループの作成と門脈血清の採取方法

実験の前日から 24 時間絶食後、ソムノペンチル (0.07 mL/100 g BW) 麻酔下で、生中線に沿って上腹部 3 cm を開腹した。小腸を綿棒で取り出し、回盲部を縫合糸 (No.4 FUTABA) で結紮後十二指腸側から眼科用鉗で切りこみを入れた。次に 0.1%エルゴチオネイン溶液 3 mL をシリコンチューブ (内径 2 mm) 付 5 mL テルモシリンジで吸い上げ、十二指腸側の切り込みにチューブの先端を入れ、縫合糸で緩く結紮し、エルゴチオネイン溶液を注入後にチューブを抜き出し、再度固く結紮した。再び腹腔内に小腸を戻し、0.9%NaCl を湿らせた脱脂綿を小腸側に乗せた。その後ラッ

Eri FUKUDA  
Kazutoshi YAMAGISHI  
Hideyuki CHIJI

藤女子大学人間生活学部食物栄養学科  
株式会社スリーピー  
藤女子大学人間生活学部食物栄養学科

藤女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

トを保温マットに乗せ、体温を保持した。エルゴチオネイン溶液を小腸内に注入5、15、30、60、90分後に門脈から約1 mLを採血した。採取した血液は4°C、10,000 rpm、3分間遠心分離し血清を得、分析まで-20°Cで保存した。

### 3) Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法による抗酸化活性

沖らの方法<sup>4)</sup>によってORAC値を測定した。血清はメタノール/水/アセトン(90:9.5:0.5、v/v/v、以下MWAと略す)溶液で10倍希釈し用いた。

各血清20  $\mu$ Lと94.4 mmol/L Fluorescein 溶液115  $\mu$ Lを96-Wellマイクロプレートに分注し、37°Cに加温後31.7 mmol/L AAPH溶液50  $\mu$ Lを加え、37°Cに保ったマイクロプレートリーダーでFluorescein 蛍光強度(励起波長485 $\pm$ 20 nm、検出波長530 $\pm$ 25 nm)を2分毎に90分間測定した。測定は3反復行い、その平均値で示した。抗酸化能はTrolox相当量( $\mu$ mol TE/mL)を用い、相対的に評価した。

### 4) LC/MSを用いた血中エルゴチオネインの分析

解凍した門脈血清100  $\mu$ Lと0.1%TFA水溶液(pH 1.2)100  $\mu$ Lをエッペンチューブに入れ、マイクロホモジナイザーで30秒間ホモジナイズ後にボルテックスミキサーで1分間攪拌した。4°C、10,000 rpm、3分間遠心分離し、上澄液100  $\mu$ Lを得、クロマトディスクフィルター(0.2  $\mu$ mクラボウ)でろ過後、20  $\mu$ Lをバイアルに移しElectric spray ionization liquid chromatography mass spectrometry (ESI-LC-MS, Waters Co.)を用いて分析した。検出条件はDubostらの方法を参考にした<sup>5)</sup>。溶離カラムはShiseido CAP CELLPAK C18( $\phi$ 4.6 $\times$ 250 mm)を使用した。溶離液のうち移動相Aには0.1%acetic acid、移動相Bにはacetonitrileを使用した。流速1.0 mL/minで、A:B=95.0:5.0(v/v)で送液し、カラムオープン30°C、分析時間30分間、UV検出器は波長254 nmに設定した。イオン化にはElectric spray ionizationを用いて、ポジティブイオンモード、Cone [V] 3.0で検出した。Select ion monitoringモード  $m/z$ [ESI<sup>+</sup>]のTotal MSおよび  $m/z$  230 および 252 をスキャンし、エルゴチオネイン(MW

229)の分子イオンピークの検出を行った。

## 3. 結果と考察

### 1) エルゴチオネイン投与後の門脈血清の抗酸化性

0.1%エルゴチオネイン溶液3 mLを小腸へ投与5、15、30、60、90分後の門脈血清および投与前0分時の尾静脈血清の抗酸化活性をORAC法で測定し、その経時的变化をFigure 1に示した。ORAC法は、血清などの生体試料の抗酸化能も食品と同様の手法で測定可能であり<sup>6)</sup>、抗酸化値の変動を確認できるとして近年利用が広がっている<sup>7)</sup>。エルゴチオネイン投与前と投与後の各時間における血清ORAC値に変化は認められなかった。

試験試料を投与していないラット血清ORAC値は、同系のラットを用いたKettawanらの測定結果と似た値を示した<sup>7)</sup>。ラットをはじめ多くの動物は酸化ストレスに対し酵素的および非酵素的な防御系を有している。細胞内に多量に含まれ、細胞における抗酸化防御に重要な役割をもつグルタチオン、酵素的機構における防御ではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、赤血球中にはグルタチオンペルオキシダーゼなどがあり、活性酸素種の除去や酸化損傷の広がりを抑える。このような防御メカニズムが存在するため、健常動物において、生体内に取り込まれた化合物の抗酸化性を確認することは容易ではなく、生体内に存在する抗酸化物質や抗酸化酵素との関係やバランスなどの検討が必要であろう。エルゴチオネインは、哺乳類の生体内では生合成されない化合物であり、菌類、マイコバクテリアから生

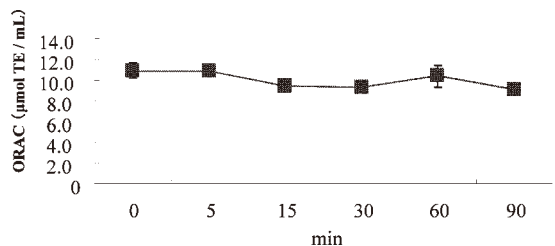


Figure 1 Change of ORAC value in serum from hepatic portal vein after the injection of 0.1% ergothioneine into the small intestine of rats.

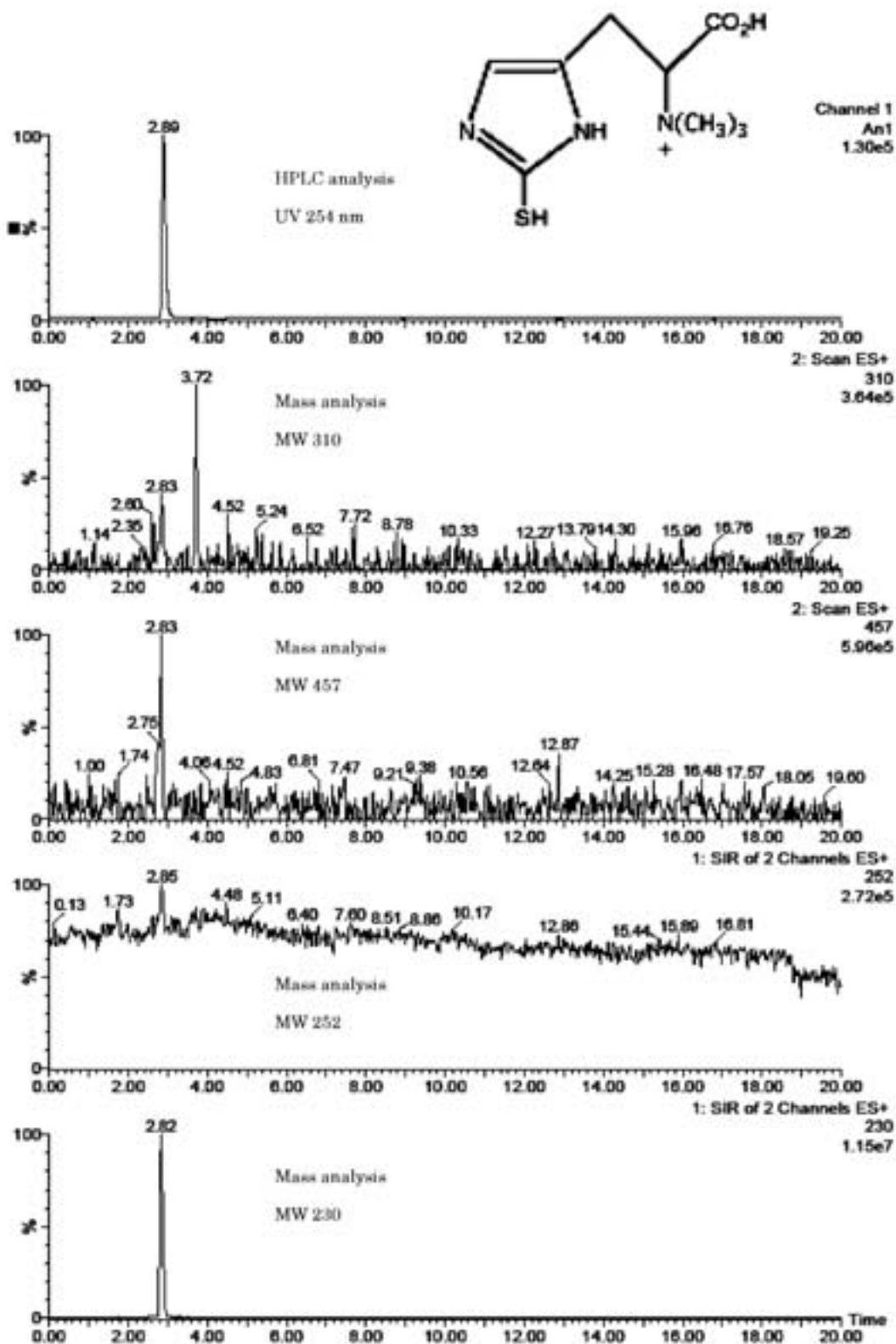


Figure 2 LC-MS chromatogram of ergothioneine.

合成<sup>9)</sup>され、きのこなど食事等を介して生体内に取り込まれる。エルゴチオネインの吸収、組織分布には有機カチオントランスポーター OCTN1 が関与しているとされ、小腸、肝臓、腎臓を含む多くの臓器に発現することが示されている<sup>9)</sup>。経時的にラットの血液を採取し、LC/MS 分析の手法を用いて血中エルゴチオネインの有無を確認出来れば、吸収動態および抗酸化活性について考察できると考え、腸管結紮ループと門脈カテーテル採血法を組み合わせる経時的に採血する手法で実験を行った。エルゴチオネインは溶液中ではケト型 (thione) とエノール型 (thioenol) の互変異性体の平衡混合物で、エノール型のチオール基の還元性により抗酸化力をもつ。チオール基は反応性に富む基で、酸化されてより安定なジスルフィドになりやすい。エルゴチオネインは生体内に入ると一部このジスルフィドの型をとるのではと考え、 $m/z$  457 の分子イオンピークの検出も行った<sup>10)</sup>。エルゴチオネインおよびエルゴチオネインジスルフィドの  $[M+H]^+$  に相当する分子量のクロマトグラムを Figure 2 に示した。液体クロマトグラフィー分析では、3 分付近に UV 254 nm で 1 ピークが得られ、分子量 230 と 457 に相当する分子量のピークが得られた。しかし、エルゴチオネイン投与 5、15、30、60、90 分後の門脈血清の LC/MS 分析では、これらに一致する分子量のピークは得られなかった。この原因は、試料濃度が薄かったのか、管腔内または吸収後に一部分解されたのかもしれない。

今後このエルゴチオネインの生体内機能性を明らかにするためには、フリーラジカル・活性酸素の発生する四塩化炭素やアセトアミノフェンなどの薬剤投与によって生体内抗酸化物質や抗酸化酵素が低下した条件での吸収動態や抗酸化性を検討する必要がある。

#### 4. 要約

エルゴチオネイン投与時のラットにおける血清抗酸化値を ORAC 分析法で調べた。さらに LC/MS を用いて血清中エルゴチオネインの同定を試みた。

- 1) 0.1%エルゴチオネイン溶液投与前、投与後の血清 ORAC 値に変化は認められなかった。
- 2) エルゴチオネイン投与 5、15、30、60、90 分

後の門脈血清の LC/MS 分析で、 $m/z$  230 および  $m/z$  457 の分子イオンピークは得られなかった。

#### 参考・引用文献

- 1) 福田絵里, 青柳幸恵, 山岸和敏, 賀佐伸省, 知地英征 (2012) タモギタケから単離したエルゴチオネインの加熱および各 pH における抗酸化性への影響, 藤女子大学紀要第 49 号第 II 部:51-55.
- 2) Abdulkadir Bedirli, Omer Sakrak, Sebahattin Muhtaroglu, Isin Soyuer, Ilkay Guler, Ali Riza Erdogan, Edogan M. Sozuer(2004)Ergothioneine Pretreatment Protects the Liver from Ischemia-Reperfusion Injury Caused by Increasing Hepatic Heat Shock Protein 70. *J. Surg. Res.*, 122: 96-102.
- 3) Monica Deiana, Antonella Rosa, Viviana Casu, Rosaria Piga, M. Assunta Dessi, Okezie I.Aruoma (2004) L-Ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats *in vivo*: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clin. Nutr.*, 23: 183-193.
- 4) 沖智之, 抗酸化評価法(2)ORAC 法, 「食品機能性評価マニュアル集第 II 集」, 食品機能性評価支援センター編, (社)日本食品科学工学会, 79-86 (2008).
- 5) N. Joy Dubost, Robert B. Beelman, Devin Peterson, & Daniel J. Royse (2006) Identification and Quantification of Ergothioneine in Cultivated Mushrooms by Lipid Chromatography-Mass Spectroscopy. *Int. J. Med. Mushr.*, 8: 215-222.
- 6) 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎光司, 津志田藤二郎 (2009) 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して——ORAC 法の有用性と他の測定法との相関性——*化学と生物*, 47, 237-243.
- 7) Aikkarach Kettawan, Somsri Charoenkiattakul, Thanaporn Rungruang, Salunya Tancharoen (2012) Bioactive Compounds of Thai Red Hot Chili Dip (Nam Prik Ta Dang) and Effects on Antioxidant Activities and Lipid Peroxidation in Rats (*in vitro* and *in vivo* models). *Siriraj Med. J.*, 64: (Suppl 1) S82-S85.
- 8) Dorothy S. Genghof (1970) Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Fungi and *Actinomycetales*. *J.Bacteriol.*, 103(2) 475-478.
- 9) 杉浦朋子, 加藤将夫 (2010) 有機カチオントランスポーター-OCTN1/SLC22A4 によるエルゴチオネイン輸送 *ビタミン*, 84(10) 465-471.
- 10) Janine Ey, Edgar Schoming, and Dirk

Taubert (2007) Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine. *J. Agric. Food*

*Chem.*, 55: 6466-6474.