

バナナ培地産生ブナシメジのプロテアーゼ活性および抗酸化力

武 智 稔 恵

Activities of Proteases and Anti-oxidants of
Bunashimeji Mushroom, *Lyophyllum ulmarium*, cultivated
on the Medium using Freeze-dried Treated Banana Fruit Bodies

Toshie TAKECHI

緒 言

飽食時代と言われる現代において、栄養価は低いが、嗜好性に優れ、種々の生理特性を持つキノコが、健康食として注目を集めている。キノコの持つ生理特性としては、生体防御（免疫賦活）、生体恒常性の維持、体調リズムの調節、疾病回復能、さらに成人病に対する予防と改善効果などがあげられる¹⁾。キノコは、その生理特性により、薬用としても古くから用いられており、近年、キノコからの薬品開発も積極的におこなわれている。

キノコを含む担子菌のプロテアーゼについては、さまざまな研究がなされており、酸性プロテアーゼ、金属プロテアーゼ、セリンプロテアーゼおよびアミノペプチダーゼなどの酵素的性質や子実体形成への関連についての報告があるが²⁾、キノコの種類によって、プロテアーゼ活性の強さや性質に違いがあることも明らかになっている³⁾。

また、近年、体内で細胞やDNA・RNAなどを傷つけるなどして、老化やがん、動脈硬化などの生活習慣病の原因となる活性酸素が問題視されている。何らかの理由で活性酸素の排除機能が低下した細胞では、種々の生体物質がその標的となって酸化障害を受け、老化や疾病が引き起こされるのである⁴⁾。

一方、食べ物の中に含まれるポリフェノール類やカロテン類などの成分は、活性酸素の酸化反応を抑える抗酸化作用を持ち、老化や生活習慣病の予防に有効であると言われている。それらの抗酸化機能を持つ食品を毎日の食生活に、上手に取り入れていくことは、健康維持の観点からも大切である。

前報⁵⁾では、凍結乾燥バナナ培地においてブナシメジ子実体の形成が良好におこなわれることを確認した。一般的に、子実体の形質は、培地素材や生育環境条件などによって影響されると言われている。そこで、今回は、バナナ培地産生のブナシメジと市販ブナシメジの子実体を試料としてプロテアーゼ活性、カゼイン溶解性および抗酸化力を調べ、それぞれの結果について検討をおこなった。

方 法

I. 試 料

凍結乾燥バナナ培地で培養したブナシメジ (*Lyophyllum ulmarium*) および市販ブナシメジ (広島県産) の子実体を使用した。

II. 試料溶液の調製方法

バナナ培地産生ブナシメジの子実体を使用した試料溶液は、次のように調製した。

凍結乾燥バナナ培地に形成された子実体 (2.6g) を細断し、0.05Mリン酸緩衝液pH7.0 (米山薬品工業株式会社, 一級) を20.0ml加えてバーミックス (BRAUN Multiquick MR430CA) を用いて冷却下 (4℃以下) で破碎した。次に破碎した子実体溶液を、凍結・融解を繰り返すことにより、細胞を破壊して、その後、高速冷却遠心器 (クボタKR-200, ロータRA-7) にて4℃, 4000rpmで15分間遠心分離して、得られた上清液を試料溶液とした。

市販ブナシメジ試料溶液も同様に調製した。市販ブナシメジ子実体 (20.0g) を細断し、重量の5倍量の0.05Mリン酸緩衝液pH7.0を加えて同様に処理した。

III. プロテアーゼ活性, カゼイン溶解性および抗酸化力の測定方法

凍結保存していた各試料溶液は水浴中にて解凍して使用した。

1. 全プロテアーゼ活性

1.0%カゼイン溶液 (和光純薬工業株式会社, 0.1Mリン酸緩衝液pH7.0に溶解したもの) 1.00mlに各試料溶液0.25mlを加え30℃で、20分間インキュベートした。次に0.4Mトリクロロ酢酸溶液 (ナカライテスク株式会社, 特級) 1.25mlを加え30℃で、30分間放置した後、3000rpm, 5分間遠心分離した。得られた上清0.5mlに0.4M炭酸ナトリウム溶液 (米山薬品工業株式会社, 一級) 2.5ml, 2倍希釈フェノール試薬 (SIGMA-ALDRICH) 0.5mlを加え、30℃で、20分間放置した後、660nmで吸光度を測定し、基質であるカゼインから遊離したアミノ酸量を測定することで全プロテアーゼ活性 (ΔOD_{660}) とした。ブランクは試料溶液の代わりに蒸留水を加えたもの、また、コントロールとして、各試料溶液を沸騰水浴中で3分間加熱し、酵素を失活させたものを使用した。

2. 抗酸化力測定法

ブナシメジの抗酸化力は、フリーラジカル評価システム (WISMERLL研究所製, 以下F.R.E.E.と称する) を使用し、OXY-Adsorbentテスト法⁶⁾により、測定した。各試料溶液は、蒸留水で21倍に希釈したものを被験液とした。各被験液10.0 μ lをHClO溶液1.0mlに入れ、混和し、37℃で保温した。10分後、呈色液クロモゲン10.0 μ lを加えた後、546nmの吸光度を測定した。ブランク値と比較して消去されたHClO濃度 (μ mol HClO/ml) をもって各被験液の抗酸化力とした。各被験液の抗酸化力に希釈倍率を乗じて、各試料溶液の抗酸化力とした。

3. カゼイン溶解性テスト

カゼイン溶解性テストは次のように操作した。カゼイン (ミルク由来, 和光純薬工業株式会社) を最終濃度0.75%になるように蒸留水に加えて懸濁させた。その溶液に、最終濃度2.0%になるよ

うに寒天を溶解し、ペトリ皿に10mlずつ流し固めたものを使用した。

寒天上に試験用ディスク（ ϕ 8mm）を置き、各試料溶液を100 μ lずつ染み込ませ、40℃で30分間反応させた。肉眼でカゼインの溶解性を確認し、写真撮影した。

IV. 一般分析法

1. タンパク質

タンパク質は、ローリー法により定量した。各試料溶液は、0.05Mリン酸緩衝液pH7.0で5倍希釈したものを被験液とした。タンパク質標準液は、牛血清アルブミン（和光純薬工業株式会社、一級）を段階的に希釈して調製した溶液を用いて検量線を作成し、その検量線より各被験液のタンパク質濃度を求めた。その各被験液のタンパク質濃度に、希釈倍率を乗じて、各試料溶液のタンパク質濃度とした。

結 果

1. 各試料溶液のタンパク質濃度

各試料溶液のタンパク質濃度を表1に示した。

表1 試料溶液のタンパク質濃度

試 料	吸光度 (ΔOD_{750})	被験液* タンパク質濃度 (μ g/ml)	試料溶液 タンパク質濃度 (μ g/ml)
バナナ培地産生ブナシメジ（子実体）	0.551	215.4	1077.0
市販ブナシメジ（子実体）	0.617	242.9	1214.5

*被験液：試料溶液を0.05Mリン酸緩衝液で5倍希釈したもの

各試料溶液は、調製段階での溶媒の割合が異なるため、表1のように、タンパク質濃度は、市販ブナシメジの試料溶液の方が高い。したがって、全プロテアーゼ活性や抗酸化力の測定では、このタンパク質濃度を基に補正をおこなった。

2. 全プロテアーゼ活性

各試料溶液の全プロテアーゼ活性の測定結果を表2に示した。

表2の結果を基に、使用した試料溶液の調製誤差を正すために、各試料溶液のタンパク質濃度で除して、タンパク質mg/ml当りの比活性として補正した。その結果を表3に示した。

表2 試料溶液の全プロテアーゼ活性

試 料	試料溶液 全プロテアーゼ活性 (ΔOD_{660})
バナナ培地産生ブナシメジ（子実体）	0.151
市販ブナシメジ（子実体）	0.149

表3 試料溶液のタンパク質量当りに換算した全プロテアーゼ活性

試 料	全プロテアーゼ活性 (ΔOD_{660})	タンパク質濃度 (mg/ml)	全プロテアーゼ活性 ／タンパク質濃度 ($\Delta OD_{660}/\text{mg/ml}$)
バナナ培地産生ブナシメジ (子実体)	0.151	1.077	0.140
市販ブナシメジ (子実体)	0.149	1.215	0.123

表2のように、バナナ培地および市販ブナシメジ由来の試料溶液は共に、全プロテアーゼ活性の存在が認められた。

また、タンパク質量当りの比活性に補正すると、表3に示すように、バナナ培地産生ブナシメジが、 $0.140 \Delta OD_{660}/\text{mg/ml}$ 、市販ブナシメジが、 $0.123 \Delta OD_{660}/\text{mg/ml}$ となり、バナナ培地産生ブナシメジの方が、1.13倍高い値となったが、大きな差は認められなかった。

3. カゼイン溶解性

全プロテアーゼ活性の存在が確認されたため、次に実際に、カゼインへの溶解性テストを実施してみた。その結果を写真1に示した。

カゼイン溶解性は、バナナ培地および市販ブナシメジ由来の試料溶液共に、写真1のように確認された。ただし、両者間に明確な差は認められなかった。

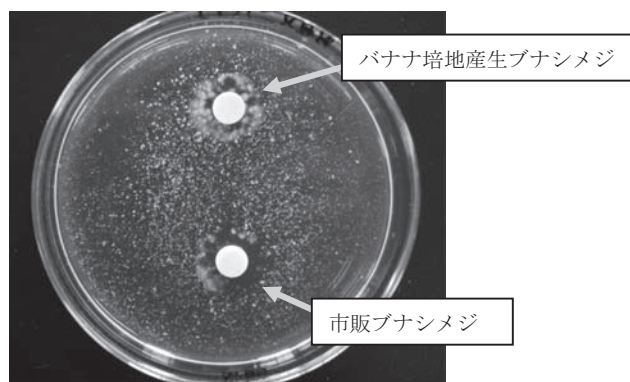


写真1 試料溶液のカゼイン溶解性テスト

4. 抗酸化力

各試料溶液の抗酸化力を、F.R.E.E.で測定した結果を表4に、また、タンパク質 $\mu\text{g/ml}$ 当りに換算した抗酸化力を表5に示した。

表4 試料溶液の抗酸化力

試 料	被験液* 抗酸化力 (546nm) ($\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$)	試料溶液 抗酸化力 (546nm) ($\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$)
バナナ培地産生ブナシメジ (子実体)	119	2499
市販ブナシメジ (子実体)	308	6468

*被験液：試料溶液を蒸留水で21倍希釈したもの

表5 試料溶液のタンパク質量当りに換算した抗酸化力

試料	試料溶液 抗酸化力 (546nm) ($\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$)	試料溶液 タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	抗酸化力 (546nm) ／タンパク質濃度 ($\mu\text{mol HClO}/\mu\text{g}/\text{ml}$)
バナナ培地産生ブナシメジ (子実体)	2499	1077.0	2.32
市販ブナシメジ (子実体)	6468	1214.5	5.33

表5より明らかなように、バナナ培地および市販ブナシメジ由来の試料溶液の抗酸化力は、それぞれ $2.32\mu\text{mol HClO}/\mu\text{g}/\text{ml}$ と $5.33\mu\text{mol HClO}/\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、市販ブナシメジの方が高い値を示した。

考 察

凍結乾燥バナナ培地で培養したブナシメジと市販ブナシメジの子実体におけるプロテアーゼ活性、カゼイン溶解性および抗酸化力を調べた。プロテアーゼ活性とカゼイン溶解性では、バナナ培地産生ブナシメジと市販ブナシメジに、ほぼ同等の活性が認められた。キノコ類のプロテアーゼに関しては、さまざまな研究がなされており、ブナシメジの子実体については、リジンアミノペプチダーゼの存在が明らかにされ、その分子量や酵素学的性質なども報告されている⁷⁾。本実験においても、酵素の同定までには至っていないが、ブナシメジ子実体にプロテアーゼが存在することは確認できた。また、カゼイン溶解性についても同様であった。しかしながら、バナナ培地のプロテアーゼ活性への影響はないものと思われる。

一方、抗酸化力については、市販ブナシメジが、バナナ培地産生ブナシメジと比較して、約2倍以上の高い値を示した。これは、収穫した際のバナナ培地産生のブナシメジ子実体が、子実体熟成まで1カ月以上経過しているなど、生育期間やその他の条件の影響が大であると考えられるので、詳細な検討が必要である。バナナ培地のブナシメジ子実体産生への影響については、培地組成以外の条件をさらに検討して培養をおこなう必要があるなど、今後の検討課題が生じた。

要 約

凍結乾燥バナナ培地産生のブナシメジと市販ブナシメジの子実体におけるプロテアーゼ活性、カゼイン溶解性および抗酸化力を調べた結果、プロテアーゼ活性、カゼイン溶解性および抗酸化力が認められた。

謝 辞

本研究において、ご指導いただきました、比治山大学短期大学部総合生活デザイン学科 古川真一教授に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 水野卓・川合正允「キノコの化学・生化学」学会出版センター, 2000, p.4
- 2) 前出「キノコの化学・生化学」p.197
- 3) 菅原龍幸「キノコの化学」朝倉書店, 2000, p.183.
- 4) 中村良・川岸舜朗他「食品機能化学」三共出版, 2004, p.34

- 5) 武智稔恵・古川真一「安田大学紀要 第37号」2009, p.325-331
- 6) 鈴木慎太郎・中村陽一他「日本呼吸器学会雑誌, 第45巻増刊号」2007, p.181
- 7) 前出「キノコの化学・生化学」p.199

Abstract

In this experiments, the activities of proteases and anti-oxidants of Bunashimeji Mushroom, *Lyophyllum ulmarium*, cultivated on the medium using freeze-dried treated banana fruit bodies, were examined. The following evidences were obtained. The activities of proteases and anti-oxidants against a hypochlorous acid were clearly shown in the extracts of the mushroom fruit bodies.

[2009. 9. 28 受理]