

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

福田 絵里 青柳 幸恵 山岸 和 敏
賀 佐 伸 省 知 地 英 征

Abstract

We investigated the effects of heat and pH on the antioxidative activity of ergothioneine from *Pleurotus cornucopiae* using Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and DPPH radical scavenging activity methods. The ORAC assayed showed that ergothioneine maintained high antioxidative activity at 25, 40, 60, 80, and 100 °C. Proportional decreases in the antioxidative activity of L-ascorbic acid and garlic acid were observed with increases in temperature. L-ascorbic acid, in particular, showed a large reduction in ORAC value, with the antioxidative activity at 100 °C only 23% that at 25 °C. Ergothioneine and garlic acid showed high antioxidative activity for 7 days under acidic or neutral conditions (pH 3.0, pH 5.0, and pH 7.0). Furthermore, ergothioneine maintained its antioxidative activity for 7 days under neutral and alkali conditions (pH 7.2 and pH 9.0), whereas that of garlic acid decreased to about 70% at day 3. The antioxidative activity of L-ascorbic acid decreased at every pH as time increased.

From these results, it appears that ergothioneine is an excellent antioxidant on which heat and pH have little effect. Further, we found that ergothioneine has the highest level of antioxidative activity of the four amino acids tested (ergothioneine, glutathione, L-methionine and L-cysteine).

1. はじめに

エルゴチオネインはヒスチジンの誘導体であり、分子中にチオカルボニル基 (C = S) を持つ水溶性の天然アミノ酸である。このアミノ酸は、きのこ類、なかでもハラタケ目ヒラタケ科タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) に多く含まれ、抗炎症作用など様々な機能が明らかとなっており¹⁾、古くより抗酸化性が高いことが知られている²⁾。エルゴチオネインは溶液中ではケト型とエノール型の互変異性体であり (Figure 1)、エルゴチオネインの抗酸化力はエノール型のチオール基の還元性によるものである。タモギタケは生きのことして販売されている他、水煮などの食材に加工され学



Figure 1 Structure of ergothioneine.

校給食等広く利用されており、さらに煮汁中には免疫賦活活性効果を持つ β グルカンが高濃度含まれていることから、健康食品としての活用が期待される。³⁾スリービーと賀佐らは、このタモギタケ抽出物 (煮汁) から効率的にエルゴチオネインを精製する方法を開発した³⁾。現在、我々はタモギタケ抽出物を使った機能性を持つ総合栄養食品

Eri FUKUDA
Yukie AOYANAGI
Kazutoshi YAMAGISHI
Shinsei GASA
Hideyuki CHIJI

藤女子大学人間生活学部食物栄養学科
藤女子大学人間生活学部食物栄養学科
株式会社スリービー
札幌医科大学医療人育成センター 教養教育研究部門化学教室
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

の開発と生体機能性の研究を進めている。そこで本研究では、この精製エルゴチオネインおよびエルゴチオネインを含む抽出物の抗酸化性について、加熱温度および各 pH の影響を調べ加工適正の基礎データを得ることを目的とした。評価は、抗酸化能測定法の統一指標として普及が期待される Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法および DPPH ラジカル消去活性評価法による測定法を用いた。

2. 実験方法

1) エルゴチオネインの精製および NMR スペクトル

エルゴチオネインは、以下に示す賀佐らの方法³⁾によってタモギタケエキスから精製した試料を用いた。

タモギタケ水煮抽出液(実子体 200 kg、熱水 200 L)を 10°C で 30 分間 5,000 rpm で遠心分離し、上清約 3.0 L を陽イオン交換樹脂 (IRB120B、H⁺-form) カラムに供した。糖質成分が陰性になるまでカラムを蒸留水で洗浄し、0.28% アンモニア水でエルゴチオネインを溶出した。さらに溶出液を活性炭カラム (φ 2.5×30 cm) に供し、糖類を水洗いして除去したのち、20% エタノールで溶出した。この溶出液を濃縮乾固後溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60, 100–210 μm φ 2.5×50 cm) に供した。溶離液は CHCl₃-CH₃OH-H₂O ((A) 40:60:6、(B) 30:70:7、(C) 20:80:8) を 1 L ずつ流し、TLC で確認しながらエルゴチオネインの溶出の多い画分を集めた。この濃縮液を少量の水で平衡化した C 18 逆相カラム (φ 2×15 cm) に供し、水溶出液を凍結乾燥し、精製エルゴチオネインを得た(収率 0.5~0.9%)。この NMR スペクトルの測定結果から、市販品の標準エルゴチオネインと同一物質であることを確認した (Figure 2)。

2) タモギタケから精製したエルゴチオネインの LC/MS 分析

検出条件は Dubost らの方法を参考とし⁴⁾、electric spray ionization liquid chromatography mass spectrometry (ESI-LC-MS, Waters) を用いて分析した。溶離カラムは Shiseido CAPCEL-LPAK C18 φ 4.6×250 mm を使用した。溶離液

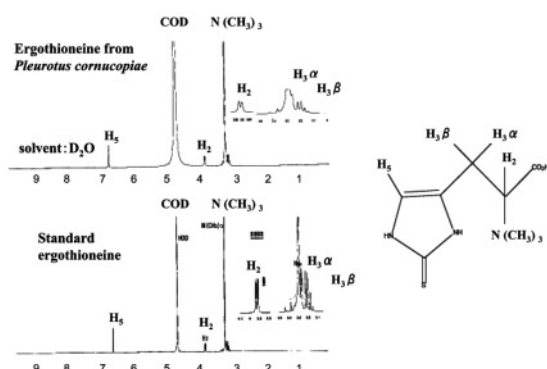


Figure 2 ¹H-NMR spectrum of ergothioneine.

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 : 100–500 [ESI⁺] 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 299) の分子イオンピークの検出を行った。

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

沖らの方法⁵⁾によって ORAC 値を測定した。各加熱温度における実験は、0.001% エルゴチオネイン含有溶液、L-アスコルビン酸および没食子酸を用いた。L-アスコルビン酸および没食子酸はメタノール/水/アセトン (90:9.5:0.5, v/v/v、以下 MWA と略す) 溶液に溶解し、100 ppm に調整した。各試料溶液を 25°C (常温)、40、60、80°C および 100°C で 30 分間加温した後、常温まで静置した。各 pH 条件下における実験は、精製エルゴチオネイン、L-アスコルビン酸、没食子酸を用い、10% MWA Assay buffer (75 mmol/L リン酸緩衝液、pH 7.4) で 1,000 ppm に調整した。各試料溶液 1 mL を、pH 3.0、pH 5.0 および pH 7.0 のクエン酸-リン酸緩衝液と、pH 7.2 および pH 9.0 のトリス-塩酸緩衝液 9 mL に加え、25°C で 7 日間静置した。グルタチオン、L-システイン、L-メチオニンも同様に 10% MWA Assay buffer で 1,000 ppm に調整した。各実験の試料溶液 20 μL と

94.4 mmol/L Fluorescein 溶液 115 μ 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 μ 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 ± 20 nm、検出波長 530 ± 25 nm) を 2 分毎に 90 分間測定した。測定は 2 ないし 1 反復行い、その平均値で示した。抗酸化能は Trolox 相当量 (μ mol TE/g) を用い、相対的に評価した。

4) DPPH ラジカル消去活性評価法による抗酸化活性

Uchiyama らの方法⁶⁾ によって DPPH ラジカル消去活性を測定した。試料には精製エルゴチオネイン、L-メチオニン、グルタチオン、タウリン、L-システインおよびタモギタケエキスをを用いた。各試料は 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) で 100 ppm に調整し、その 2 mL と 0.1 M 酢酸緩衝液 2 mL をネジふた付き試験管に分注し、攪拌した。続いて 200 μ M DPPH 70%エタノール溶液 1 mL を添加し、攪拌後ウォーターバス中で 25°C、30 分間インキュベートした。反応後、各試験管をボルテックスミキサーで十分に攪拌し、517 nm の吸光度減少から DPPH ラジカル消去活性を測定した。コントロールには試料の代わりに 70%エタノールを用い、DPPH 70%エタノール溶液の代わりに 70%エタノールを分注したものをブランクとした。なお、各 pH 条件下での抗酸化性変化の実験では、各試料を蒸留水で 1,000 ppm に調整し、以下 ORAC 法と同様の手順で抗酸化性を測定した。測定は 3 ないし 2 反復行い、その平均値で示した。

3. 結果と考察

1) LC/MS による精製エルゴチオネインの質量分析

タモギタケから精製したエルゴチオネインを LC/MS で分析し、そのクロマトグラムを Figure 3 に示した。液体クロマトグラフィー分析を上段、質量分析を下段に示した。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、質量分析で分子量 230 に相当する分子量のピークが得られた。以上の結果から、タモギタケから精製したこの化合物がエルゴチオネインであることを確認した。

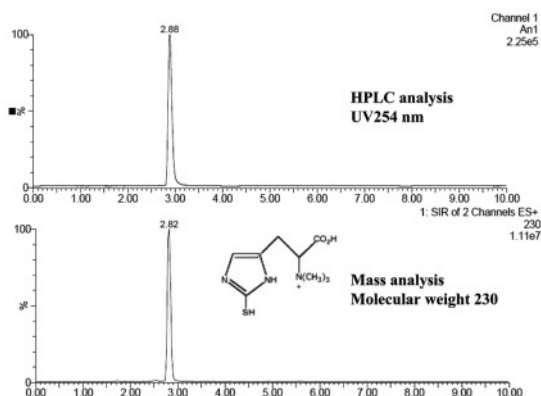


Figure 3 LC-MS spectrum of ergothioneine.

2) タモギタケから得た精製エルゴチオネインの抗酸化性

エルゴチオネインと、エルゴチオネインと同様に構造にチオール基を持つ代表的なアミノ酸の L-システイン、トリペプチドのグルタチオン、および含硫アミノ酸の L-メチオニンの抗酸化性を ORAC 法および DPPH ラジカル消去活性評価法で測定し、その結果を Figure 4、5 に示した。エルゴチオネインは、両測定法において全試料中最も抗酸化値が高かった。ORAC 法では L-メチオニンの高い抗酸化性が示された。ORAC 法でメチオニンの抗酸化性が高いことは、Davalos らの実験結果と一致⁷⁾ し、また、グルタチオンや L-システイン残基も高い抗酸化能を有することが報告されている⁸⁾。エルゴチオネインは、これらのアミノ酸およびペプチドよりも高い抗酸化活性を示した。抗酸化能の測定法は、本実験で用いた ORAC 法、

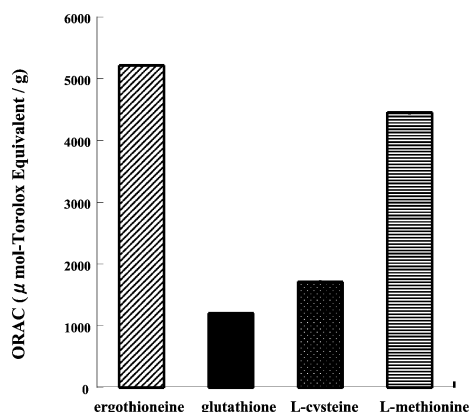


Figure 4 Antioxidative activity of ergothioneine, glutathione, L-cysteine, L-methionine.

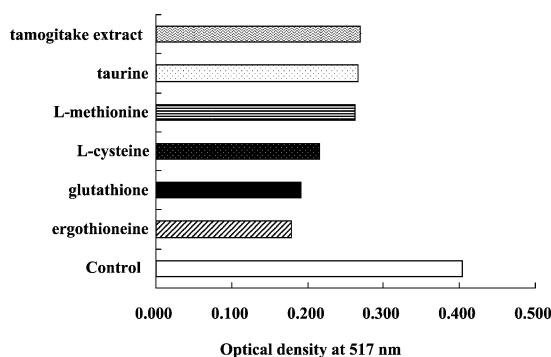


Figure 5 DPPH radical scavenging activity of ergothioneine, glutathione, L-cysteine, L-methionine, taurine, tamogitake extract.

DPPH ラジカル消去活性評価法のほか、TRAP 法、Folin-Ciocalteu 法など多数存在する⁹⁾。これらは反応機構が異なるため、測定値が相関しない場合も多い⁹⁾。しかし今回の実験では、エルゴチオネインの ORAC 法による抗酸化性と DPPH ラジカル消去活性はいずれにおいても試験試料中最も高値を示し、抗酸化活性が高いことが確認された。

3) タモギタケから得た精製エルゴチオネインの抗酸化性の加熱による影響

ORAC 法による各加熱温度時の抗酸化性の変化を、Figure 6 に示した。エルゴチオネインはどの温度条件下でも抗酸化能を維持した。没食子酸もエルゴチオネインほどではないが、抗酸化値の減少率は小さかった。L-アスコルビン酸は 100℃

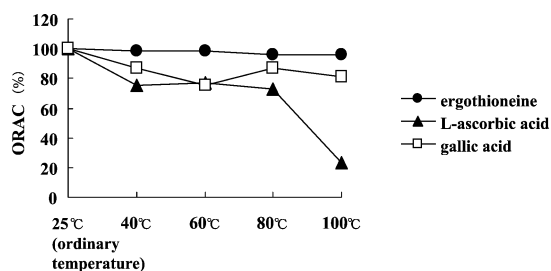


Figure 6 Effect of temperature on antioxidative activity of ergothioneine, L-ascorbic acid, gallic acid.

では 25℃と比べ約 77%ORAC 値が低下した。食品の加工工程において、加熱処理は食品の品質保持と安全性確保のために不可欠な処理法である¹⁰⁾。本実験では加熱 100℃においてもエルゴチオネインは抗酸化性を維持した。加熱殺菌など、100℃以上の加熱処理を施す工程は多く、今後さらなる検討も必要であろう。しかし、本実験結果からエルゴチオネインが耐熱性を持つことが考えられるため、エルゴチオネインそのもの、またはエルゴチオネインを含むタモギタケ抽出物の加工食品への利用は、有用であると考えられる。

4) タモギタケから得た精製エルゴチオネインの抗酸化性の pH による影響

ORAC 法による各 pH 条件での抗酸化性の変化を Figure 7 に示した。ORAC 法では、pH 3.0、pH 4.0 および pH 5.0 でエルゴチオネインおよび没食子酸の抗酸化能は 7 日間継続して維持され

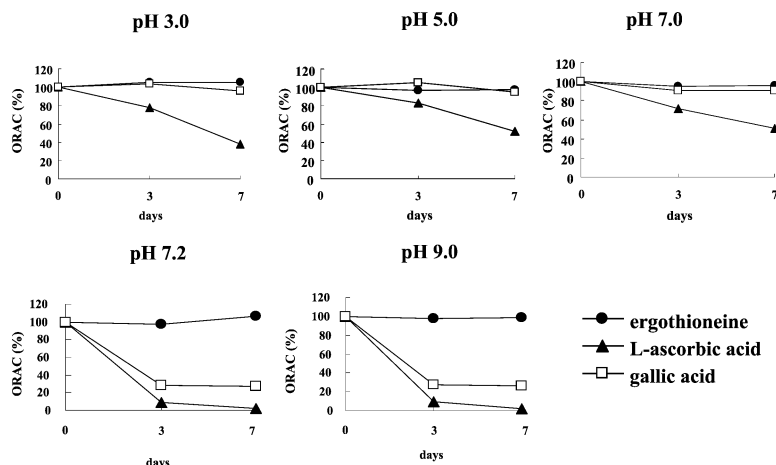


Figure 7 Effect of pH on antioxidative activity of ergothioneine, L-ascorbic acid, gallic acid.

た。エルゴチオネインは pH 7.2 および pH 9.0 の溶液中でも 7 日間継続して抗酸化能を維持したのに対し、没食子酸は 3 日目には 0 日目と比べ約 70% 抗酸化能が低下した。L-アスコルビン酸はどの pH 溶液中においても経日的に抗酸化能は低下した。

食品の貯蔵法として、酢漬けなど pH を低下させ保存効果を得る方法や、ピータンのようにアルカリ性にして保存性を高める方法がある¹⁰⁾。本実験では、ORAC 法で pH 3.0~pH 9.0 の範囲でエルゴチオネインは 7 日間抗酸化性を維持した。このことは、加工食品の幅広い用途にエルゴチオネインを活用できることを示した。

以上の結果から、エルゴチオネインは ORAC 法や DPPH ラジカル消去活性評価法で高い抗酸化活性を有することが認められた。さらに加熱や酸~アルカリの各 pH に耐性があることが認められ、食品の加工工程においても抗酸化性などの機能性を損なう可能性が小さいことが示された。エルゴチオネインの生体内での作用についても、トランスポーター OCTN1 を介して細胞内へ取り込まれることが明らかとなっており¹¹⁾、今後はエルゴチオネイン摂取時の血中の抗酸化性についても明らかにしていきたい。

4. 要約

エルゴチオネインの抗酸化性について加熱温度および各 pH の影響を ORAC 分析法で調べた。

- 1) タモギタケから得た精製エルゴチオネインは、ORAC 法においてグルタチオン、L-システイン、L-メチオニンなどのチオール基含有アミノ酸および含硫アミノ酸と比べ抗酸化活性が高かった。DPPH ラジカル消去活性評価法による測定においても同様の結果を示した。
- 2) 精製したエルゴチオネインおよびエルゴチオネインを含む抽出物は、加熱温度や各 pH で抗酸化性が変わらず、安定的に抗酸化能を有する化合物であることが、ORAC 法において確認された。

参考・引用文献

- 1) Tomomi Ito et. al. (2011) Ergothioneine as an Anti-Oxidative/Anti-Inflammatory Component in Several Edible Mushrooms. *Food Sci Tec Res*, 17: 103-110.
- 2) Barger G and Ewins AJ. (1911) CCLV II. -The constitution of ergothioneine: a betaine related to histidine. *J Chem Soc*, 41: 2336-2341.
- 3) 賀佐ら 札幌医科大学 医療人育成センター紀要 67-70 (2010).
- 4) 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.
- 5) 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).
- 6) Uchiyama M., Suzuki Y., Fukuzawa K., (1968) YAKUGAKU ZASSHI (in Japanese), 88: 678-683.
- 7) A. DAVALOS, M. MIGUEL, B. BARTOLOME, R. LOPEZ-FANDINO (2004) Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67: 1939-1944.
- 8) Ryan J. Elias, D. Julian McClements, Eric A. Decker (2005) Antioxidant Activity of Cysteine, Tryptophan, and Methionine Residues in Continuous Phase β -Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem*, 53: 10248-10253.
- 9) 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
- 10) 鮫島邦彦編著, (2006) 食べ物と健康Ⅲ—食品と加工・流通 三共出版株式会社 p.23-35.
- 11) Yukio Kato et. al. (2010) Gene Knockout and Metabolone Analysis of Carnitin/Organic Cation Transporter OCTN1. *Pharmaceutical Research*, 27: 832-840.