

ブナシメジ石づき部抽出物による 3T3-L1 脂肪細胞の分化に対する効果

苔庵泰志* , 栗田 修*

Effect of the Extracts from Bunashimeji (*Hypsizigus marmoreus*) Hard Tip on the Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes

Yasushi KOKEAN and Osamu KURITA

1. はじめに

ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*) は、三重県では松阪および南勢地域を中心に生産される主要な食用きのこの 1 つであり、県内での年間生産量は約 400 t (平成 18 年度) である (図 1)。これまでの検討により、ブナシメジ子実体は、有望なメタボリック症候群予防素材の原料となる可能性が高いことが明らかとなっている^{1) 2)}。また、生産量の約 1 割にあたる量の奇形や採り遅れ等による規格外品や子実体収穫残滓 (石づき部) が産業廃棄物として処理されており処理が問題となっている。これらブナシメジ未利用部には、子実体同様の機能性成分が含まれる可能性があり、有効利用することにより、環境への負荷軽減も可能となる。

一方、メタボリック症候群の増加により、消費者の関心は健康維持・増進に集まっている。メタボリック症候群の予防には、運動と食事の管理が重要な要素であるが、「おいしいものを食べたい」という本能や欲求を抑えてその予防に取り組むことは苦痛を伴う。このため、日常の食生活に密着している食素材を用いて病気予防・改善することが注目され、様々な素材やサプリメントが開発されている³⁾。日常の (美味しい) 食事にブナシメジ由来成分を積極的に導入することにより、脂肪肝予防を始めとしたメタボリック症候群の発症予防が可能となる。また、素材成分を商品化し提供することで、消費者ニーズにもマッチした商品開発が期待できる。

*医薬品・食品研究課

天然物および天然物由来物質を用いた脂質代謝改善の研究に関しては、近年、様々な動物培養細胞系を用いた研究が多く報告されている⁴⁻⁸⁾。そこで本研究でも、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いてブナシメジ石づき部の脂肪肝への効果について検討した。



図 1 ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)

2. 原材料

ブナシメジ石づき部は、(農)三重きのこ園で栽培したブナシメジ収穫残滓から採取した。石づき部から培地等の不要部を除去し、50℃で 24 時間乾燥後に粉碎した粉末を、溶媒抽出用の材料として用いた。溶媒抽出は、乾燥粉末重量に対して溶媒を 10 倍容加え、熱水抽出は 90℃で 3 時間、65%エタノール抽出は 60℃で 3 時間それぞれ抽出後に 60 メッシュろ過、続いて 1 μm ろ紙でろ過後に 40℃で真空乾燥し

て粉末化したものを脂質代謝評価用試料とした。マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 は、(財)ヒューマンサイエンス振興財団から購入した。

3. 実験方法

3.1 脂肪前駆細胞の培養及び脂肪細胞への分化誘導

マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用い、37℃、5%二酸化炭素ガス濃度で、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS)、100u/mL ペニシリン (Pen)、100u/mL ストレプトマイシン (Str) を含有する Dulbecco's modified Eagle's 培地 (DMEM) で 2 日間予備培養した後、24 ウェルプレートに細胞を 1×10^5 / ウェルの密度で同培地に播種し、2 日間培養後、2.5 μ M デキサメタゾン、0.5mM 3-イソブチルキサンチン、10 μ M インシュリンを含有する上記培地で、2 日間脂肪細胞への分化誘導処理を上記と同様の培養条件下で行った。誘導処理後、培地を 10%FBS、Pen、Str 及び 10 μ M インシュリンを含む DMEM 培地に交換し、2~3 日毎に培地を交換しつつ、6 日間培養した。ブナシメジ抽出物は各 2g を超純水 100mL に懸濁し、分化誘導開始時に、培地中に異なる濃度で添加し、細胞内中性脂肪 (TG: トリアシルグリセロール) 蓄積量を測定した⁴⁾。ブナシメジ抽出物の添加は、フェノール硫酸法により測定し⁹⁾、全糖量として換算した。

3.2 細胞内 TG 蓄積量の評価

24 ウェルプレート上の細胞をリン酸緩衝液生理食塩水 (pH7.2, PBS: phosphate buffer saline) で洗浄後、10%ホルマリン液で一晩固定した後に 60% イソプロパノール (v/v) に溶解したオイルレッド O 液に 15 分間浸漬して細胞内 TG を染色した。染色後、細胞を PBS で洗浄し、100%イソプロパノールを添加してオイルレッド O を溶出させ、プレートリーダーを用いて 540nm での吸光度を測定し、細胞内 TG 蓄積量を評価した。

3.3 ブナシメジ抽出物の分子量測定

高速液体クロマトグラフ (HPLC、島津製作所 LC10) を用い、排除限界クロマトグラフィー (SEC: Size Exclusion Chromatography) によりブナシメジ熱水抽出物及び 65%エタノール抽出物の水溶性画分に含まれる成分の分子量測定を行った。分析カラムは Shodex OHpak SB-804 + HQ SUGAR KS-806 を用い、カラム温度 60℃ で、溶離

液は 100mM NaCl を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2)、流速 1.0mL/min で示差屈折計 (RID)、紫外分光検出器 (UV) により分析を実施した。

4. 結果と考察

4.1 ブナシメジ抽出物の 3T3-L1 細胞による評価

結果を図 2 に示す。ブナシメジ石づき熱水抽出物あるいは 65%エタノール抽出物を細胞に添加したところ、細胞内 TG の蓄積が、濃度依存的に抑制されることを確認した。未添加の対照に比べ、熱水抽出物及び 65%エタノール抽出物を添加したときの細胞内 TG 蓄積量 (培地中の全糖濃度: 60 μ g/mL) はそれぞれ約 83%、約 30%となり、65%エタノール抽出物の方が優れていることが明らかとなった。65%エタノール抽出では、高分子の多糖やタンパク質は沈殿する。このため、低分子化合物が熱水よりも 65%エタノールにより高収率で抽出され、活性が高くなったと考えられる。この様に、ブナシメジ由来の脂肪肝予防効果を示す成分は子実体と同様に²⁾、未利用部である石づき部にも含まれることが明らかとなった。

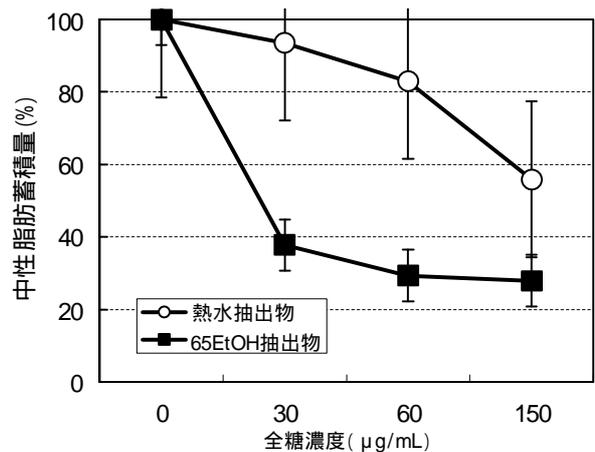


図 2 ブナシメジ抽出物による細胞内脂質蓄積抑制効果

4.2 ブナシメジ抽出物の分子量測定

ゲルろ過により 65%エタノール抽出物の水可溶性画分の分子量を検討したところ、分子量 10kDa 以下の低分子物質であることが示唆された (図 3, 図 4)。これまでの研究では、ブナシメジが有する脂肪肝予防効果を示す成分に関しては明らかにされていなかったが、今回の検討により、その成分は親水性で比

較的低分子量であると考えられ、4.1 での細胞内中性脂肪蓄積抑制に関する知見を支持する結果が得られた。

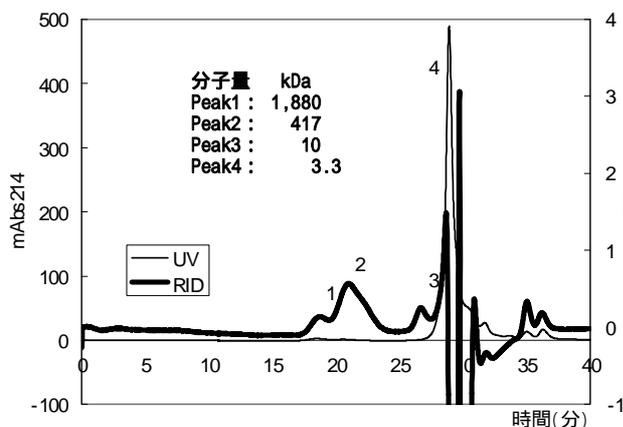


図 3 排除限界クロマトグラフィー (SEC) による
ブナシメジ熱水抽出物の分析

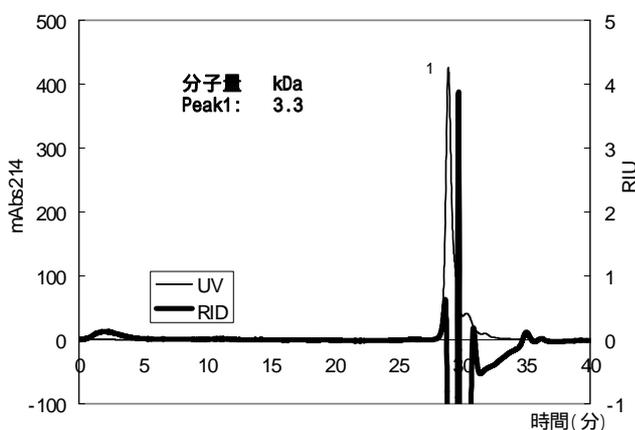


図 4 排除限界クロマトグラフィー (SEC) による
65%ETOH 抽出物の分析

5. まとめ

ブナシメジ抽出物について、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた細胞評価系で細胞内 TG 蓄積抑制効果を検討した。ブナシメジ石づき熱水抽出物及び 65%エタノール抽出物を細胞評価系に添加したところ、細胞内 TG 蓄積量(培地中の全糖濃度:60 μ g/mL)は、抽出物未添加の対照に比べ、それぞれ約 83%、約 30%となり、65%エタノール抽出物の方が細胞内 TG 蓄積抑制効果が優れていることが明らかとなっ

た。また、ゲルろ過により、65%エタノール抽出物に含まれる水溶性画分の分子量を検討したところ、分子量 10kDa 以下の低分子物質であることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 荅庵泰志ほか：“担子菌由来物質による生活習慣病予防に関する研究”。三重県科学技術振興センター工業研究部研究報告, 27, p105-109(2003)
- 2) 大槻 誠：“ブナシメジの脂肪肝予防作用”。Foodstyle 21(11), p57-59(2007)
- 3) 食品と開発編集部：“健康食品の市場動向と素材・技術研究”，食品と開発, 45(3), p25-75(2010)
- 4) 織谷幸太ほか：“「べにふうき」緑茶による脂肪蓄積抑制の作用機序”。日本食品科学工学会誌, 56(7), p412-418(2009)
- 5) Inoue et al: “The sulfated polysaccharide porphyran reduces apolipoprotein B100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells”. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(2), p447-449(2009)
- 6) Miwa et al: “Suppression of apolipoprotein B secretion from HepG2 cells by glucosyl hesperidin”. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 52, p223-231(2006)
- 7) Iwashita et al: “Effect of flavonoids on the differentiation of 3T3-L1 adipocytes”. Food Sci. Technol. Res., 7(2), p154-160(2001)
- 8) 新本洋士：“マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用”，日本食品科学工学会誌, 52(11), P535-537(2005)
- 9) 目黒熙ほか：“フェノール硫酸法”，日本食品科学工学会編纂, 新・食品分析法, 光琳, p531(1996)

(本研究の一部は、平成 21 年度科学技術振興機構重点地域研究開発推進プログラム(ニーズ即応事業)の支援を受けて実施されました)