

# 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

## (第2報)

苔庵泰志<sup>\*</sup> , 栗田 修<sup>\*</sup>

### Effect of the Extracts from Bunashimeji (*Hypsizigus marmoreus*) Hard Tip on the Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes (Part2)

Yasushi KOKEAN and Osamu KURITA

The inhibition of triacylglycerol (TG) accumulation in the 3T3-L1 preadipocytes by the 65% ethanol extracts of Bunashimeji (*Hypsizigus marmoreus*) hard tip was evaluated in this study. These cells were cultured in the presence of the bunashimeji extracts, and then the amounts of TG in intracellular lipid droplets were determined to stain with oil red O. The amounts in intracellular TG content in presence of the extracts (25 $\mu$ g of dry matter/mL of media) from the dry matter and from the raw matter were each of about 70.0% and 93.3% against control respectively. The extracts were analyzed by reverse phase chromatography. It seemed that the ingredients related to anti-obese effects were amphiphilicity in the extracts of bunashimeji. These results suggest that the 65% ethanol extracts from bunashimeji hard tip are available of the application to the remedy for metabolic syndrome.

Key word: Bunashimeji, 3T3-L1, TG, Metabolic Syndrome

#### 1. はじめに

近年、食品の生理機能についての研究が幅広く進められており、これを健康維持、疾病予防・改善に役立てようとする試みが盛んに行われている。なかでもきのこは、おいしく、しかも低カロリーで、食物繊維やミネラルなどの栄養素が豊富に含まれていることが、明らかになっている<sup>1)</sup>。最近では、一次機能や二次機能だけでなく三次機能、つまりきのこの生理機能についての研究も盛んに行われてきている<sup>2)-7)</sup>。

食用きのこの種類としては、シイタケ (*Lentinus edodes*)、ヒラタケ (*Pleurotes ostreatus*)、ナメコ (*Pholiota nameko*)等古くから広く食されている

<sup>\*</sup> 医薬品・食品研究課

のこに加え、栽培技術の進歩により、マイタケ (*Grifola frondosa*)、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*)、ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)等近年になって食卓に定着したきのこも多い。ブナシメジは、三重県においても栽培されている主要な食用きのこの一つである。ブナシメジの生理機能は、これまでに抗腫瘍効果等<sup>8)-10)</sup>についての報告はなされているが、脂質代謝亢進等、メタボリック症候群の予防に関わる生理機能は報告されていない。当研究所では、昨年度までの研究により、子実体及び石づき部は、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にしている<sup>10)-12)</sup> (図1)。本研究では、ブナシメジの素材化を目的として、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた細胞

内中性脂肪 (TG: トリアシルグリセロール) 蓄積量の評価により, ブナシメジ石づきに含まれる有効成分の抽出条件を検討した。

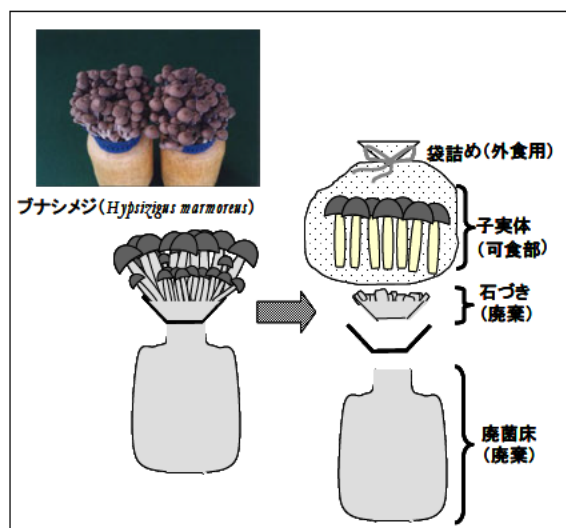


図1 ブナシメジ石づき部の利用

## 2. 原材料

ブナシメジ石づき部は, (農)三重きこの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(ブナシメジ生石づき), 50°Cで24時間乾燥後に粉碎した粉末を, 有効成分抽出用の材料として用いた(ブナシメジ石づき乾燥粉末)。抽出は, 生石づき及び石づき乾燥粉末について, 固形分重量に対してそれぞれの溶媒を10倍容加えた。65%エタノール抽出は, 60°Cで3時間抽出後に60メッシュ, 続いてφ1μmろ紙でろ過後に40°Cで真空乾燥して粉末化したものを動物細胞評価試料とした。用い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°C, 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日間前培養した後, 24ウェルプレートに細胞を1×10<sup>5</sup>個/ウェルの密度で同培地に播種し, 2日間培養後, 2.5μM デキ

サメタゾン, 0.5mM 3-イソブチルキサンチン, 10μM インシュリンを含有する培地で, 脂肪細胞への分化誘導処理を前培養と同様の条件下で2日間行った。誘導処理後, 培地を10%FBS, Pen, Str及び10μM 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。ブナシメジ石づき65%エタノール抽出物(生石づき粉碎ペースト, 乾燥粉末から抽出)の乾燥粉末各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TG蓄積量を測定した<sup>13)</sup>。ブナシメジ抽出物の添加量は, 乾物当たりとして換算した。

### 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, 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蓄積量を測定した。

### 3.3 ブナシメジ石づき抽出物のプロナーゼ処理

ブナシメジ石づき乾燥粉末及び生石づき粉碎ペースト中に含まれる, タンパク質及び糖タンパク質等の脂質蓄積阻害効果への影響を排除するため, 基質特性が低く, タンパク質をランダムに分解する特性を有するプロナーゼを用いてタンパク質を酵素分解した。ブナシメジ石づき乾燥粉1g及びブナシメジ生石づき粉碎ペーストを乾物として1gとなるように蒸留水50mlに懸濁した後, 酵素濃度10mg/mLとなるようにプロナーゼを加え, 40°C, 2時間処理後, 90°C, 30分間失活処理後に凍結乾燥した。

### 3.4 ブナシメジ抽出物の疎水度測定

高速液体クロマトグラフ (HPLC, 島津製作所 LC10) を用い, 逆相クロマトグラフィーによりブナシメジ石づき (乾燥粉末及び生粉砕ペースト) 65%エタノール抽出物に含まれる成分の分離を行った。分析カラムは Shiseido CAPCELL PAK MG(4.6×250mm) を用い, 40°Cで, 分析はカラムを0.05%TFA(トリフルオロ酢酸)を含む超純水で平衡化した後に, 0.05%TFA(トリフルオロ酢酸)を含むアセトニトリルの直線濃度勾配で行った。アセトニト

リル濃度は0~45分→0~100%とし、紫外分光検出器 (UV) により 214nm 及び 280nm での吸光度を測定した。

## 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

ブナシメジ石づき（乾燥粉末および生粉碎ペースト）65%エタノール抽出物に関して、その抽出法の違いやプロナーゼ処理の有無による脂肪蓄積能の変化を検討した。細胞内脂質蓄積阻害効果は、未添加の対照に比べて、乾燥粉末の65%抽出物のほうが生石づき粉碎ペーストからの抽出物よりも活性は強かった。また、プロナーゼ処理により、乾燥粉末からの抽出物の活性は低下したが、生石づき粉碎ペーストからの抽出物では、明確な活性変化が認められなかった（図2）。

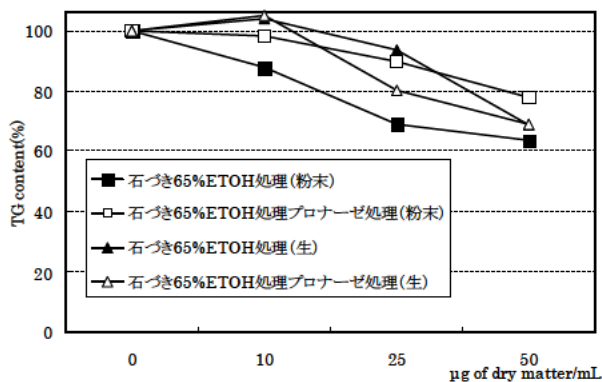
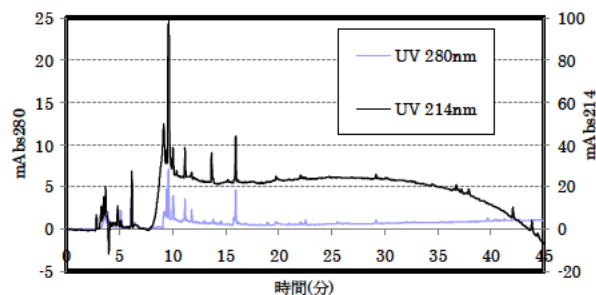


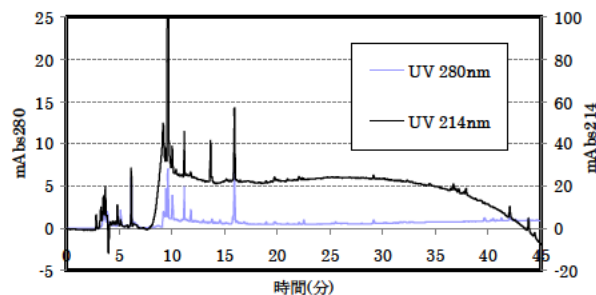
図2 ブナシメジ抽出物による細胞内脂質蓄積抑制効果

### 4. 2 ブナシメジ抽出物の疎水度測定

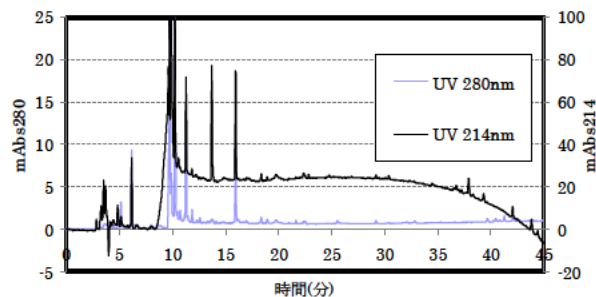
逆相クロマトグラフィーでの65%エタノール抽出物の分析では、プロナーゼ処理により（溶出時間17分付近）の増加が確認できた（図3）。このため、この画分が、プロナーゼ処理した乾燥粉末の細胞内脂肪蓄積のマイナス因子として考えられる。クロマトグラム後半の疎水性の高い溶出画分は少ないことから、抽出物には疎水性の高い成分は少ないと思われる。



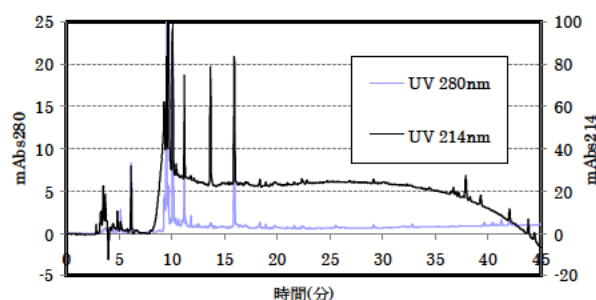
a) 石づき乾燥粉末



b) 石づき乾燥粉末プロナーゼ処理



c) 生石づき粉碎ペースト



d) 生石づき粉碎ペーストプロナーゼ処理

図3 逆相クロマトグラフィーによるブナシメジ石づき65%エタノール抽出物の分析

## 5. まとめ

マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた細胞評価系により、細胞内中性脂肪 (TG) 蓄積量の測定を行い、ブナシメジ石づきの65%エタノール抽出物が有する細胞内 TG 蓄積抑制効果および逆相クロマトグラフ

ィーによる分析を行った。その結果、主な活性成分は、65%エタノール抽出画分中の比較的水に溶出しやすい成分であることが明らかとなった。また、生石づき粉碎ペースト及び乾燥粉末の65%エタノール抽出の細胞内脂質蓄積予防効果は、乾燥粉末のほうが優れていた。今後、素材の応用のためには、大量調製法等の検討が必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) 菅原龍幸編：“キノコの科学”，朝倉書店（1997）
- 2) 江口文陽：“きのこを利用する”，キノコの生活，地人書館，p24-25(2006)
- 3) 川岸舜朗編著：“生化学実験法 38 食品中の生体機能調節物質研究法 第2版”，食品の三次機能，学会出版センター，p1-2(1997)
- 4) 大賀祥治：“キノコを科学する”，キノコの化学成分，檜垣宮都監修，江口文陽，渡辺泰雄編著，地人書館，p22-24(2001)
- 5) 卯川裕一ほか：“ハタケシメジのアンジオテンシン変換酵素阻害活性および抗腫瘍活性”，日本食品科学工学会誌，48(1)，p58-63（2001）
- 6) 卯川裕一ほか：“ハタケシメジの血漿コレステロール上昇抑制作用”，日本食品科学工学会，48，p520-525（2001）
- 7) 苔庵泰志ほか：“ハタケシメジの投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響”，日本食

- 品科学工学会誌，49(2)，p126-129(2002)
- 8) 水谷滋利ほか：“ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*) から分離されたテルペンの腫瘍成長抑制作用”，日本食品科学工学会誌，53(1)，p55-61(2006)
- 9) 水元裕子ほか：“ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)由来ポリテルペンの HL-60 白血病細胞におけるアポトーシス誘導機構”，日本食品科学工学会誌，55(12)，p612-618(2008)
- 10) 苔庵泰志ほか：“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)
- 11) 大槻 誠：“ブナシメジの脂肪肝予防作用”，Foodstyle 21(11)，p57-59(2007)
- 12) 苔庵泰志ほか：“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”，三重県工業研究所 研究報告，34，p141-143(2010)
- 13) 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)

（本研究の一部は、平成 22 年度科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業（ニーズ即応事業）の支援を受けて実施されました。）