

低分子化リグニンの新機能開発



研究ノート

八木清仁*

New function development of low-molecular-weight lignin

Key Words : *Lentinula edodes mycelia*, lignin, hepatoprotective effect, anti-HCV activity

はじめに

シイタケは古来「薬茸」として珍重され、わが国では健康食品として欠かせないものである。食用としているシイタケ子実体からは多糖体であるレンチナンなど薬理活性物質が見出され、抗腫瘍、抗菌、抗ウイルス活性を有することが報告されている。シイタケは子実体とは異なる部位に糸状の菌糸体と呼ばれる組織が存在し、子実体形成に重要な役割を果たす有用成分が含まれている。このシイタケ菌糸体 (*Lentinula edodes mycelia* : LEM) は固体培地を用いて大量培養が可能であり、培養物から温水循環により様々な薬理作用を有する物質が抽出されている。筆者らはこれまでシイタケ菌糸体培養抽出物 (LEMCE) の肝臓に対する効果を検討し、動物実験により肝保護作用を有することを見出し報告してきた^{1,2)}。LEMCE は様々な物質の混合物であることから有効成分の特定を行っており、現在までに得られた知見を本総説で紹介する。

LEMCE の作成と生理活性

バガス、米糠を主成分とする固体培地に純水を含ませたのち、LEM を接種し一定の環境下で4~6か月培養を行い、固体培地全体にLEMが増殖した段階で培地ごと破碎し、タンクに充てんして温水を循環させる。LEM特有の酵素が菌糸体および培養

基を分解消化して有効成分が代謝物と共に抽出される。この抽出液を濾過、殺菌、濃縮、凍結乾燥することにより粉末状のLEMCEが得られる。上記の手法で自然環境に影響されことなくLEMCEは工業的生産が可能であり、現在では栄養補助食品として市販されている。構成成分として糖質(約50%)、タンパク質(約25%)、抗酸化活性を有するフェノール性化合物(約3%)のほか、リグニン分解物、微量の繊維質、脂質などを含んでいる。

これまで臨床の場で検討がなされ、がん患者に対してLEMCEを経口投与した際の有効性が報告されている。進行した消化器がんの患者に対して化学療法と共にLEMCEを経口投与すると、化学療法による副作用が軽減されること³⁾、乳がん、消化器がん患者に対して化学療法とLEMCEを併用した場合、QOL、免疫機能が改善したことが示され⁴⁾、がん治療への応用が期待されている。

筆者らはこれまで種々の肝障害モデル動物を用いてLEMCEの肝保護効果を検討してきた。D-ガラクトサミン(GalN)を投与する急性肝障害ラットを用いた検討ではLEMCEの経口あるいは腹腔内投与により非投与群に比べ有意な肝障害マーカーの減少が観察された²⁾。GalNは肝細胞内で過酸化水素を産生するなど酸化的ストレスにより細胞死を惹起することが知られており、LEMCEは非常に強いラジカル消去活性を有することから抗酸化活性が寄与しているものと考えられる。免疫系の活性化を介して肝障害を惹起するコンカナバリンA(ConA)を投与する肝障害マウスを用いた検討ではLEMCEの腹腔内投与により肝障害マーカー、炎症性サイトカイン産生量が有意に低下することが示された⁵⁾。したがってLEMCEは酸化的ストレス、免疫系活性化に由来する急性肝障害に有効であることが示唆された。次に慢性的な炎症による肝障害に対する



* Kiyohito YAGI

1952年11月生
大阪大学大学院 薬学研究科 (1981年)
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 生
体機能分子化学分野 教授 薬学博士
生物薬学
TEL : 06-6879-8195
FAX : 06-6879-8195
E-mail : yagi@phs.osaka-u.ac.jp

LEMCE の効果について検討を行った。四塩化炭素をマウス腹腔に週2回、4週間投与を行い肝障害を惹起する慢性モデルを用いて、肝障害マーカー、線維化の程度を評価した。LEMCE 投与により ALT、AST、脂質過酸化生成物で酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド量の上昇が顕著に抑制され、さらに血管周囲の線維化が抑えられることが示された⁶⁾。In vitro の検討で、肝線維化において中心的な役割を演じている肝星細胞の活性化を LEMCE は阻害することを見出し⁷⁾、慢性肝障害モデルにおいて LEMCE は肝細胞を酸化ストレスから保護し、さらに肝星細胞の活性化を防ぐことにより肝線維化抑制に寄与しているものと思われる。肝炎ウイルスの感染により肝臓で慢性的な炎症が持続すると、肝線維化、肝硬変を経て肝がんに至ることが知られている。LEMCE の摂取により炎症を軽減することができれば肝線維化を抑制し肝がんの発生を抑えることが期待できる。

薬理活性の本体物質

LEMCE は種々の化合物を構成成分として含有しており、現在肝保護効果をもたらす有効成分の同定を試みている。LEMCE の分画を行って得られた高濃度のフェノール類が含まれる (15.8%) 画分が、低濃度でより強い抗酸化作用や肝細胞に対する保護効果を有し、肝星細胞と肝癌細胞株の apoptosis 誘導効果を示すことも報告している。そこで LEMCE に含まれる抗酸化活性を持つフェノール類が肝保護効果に関与しているのではないかと考え、LEMCE の抗酸化成分の分析を行ったところ、シリング酸、バニリン酸という2種類のフェノール類が高い抗酸化活性を持つことを見出した。四塩化炭素を用いた慢性肝障害マウスに対するバニリン酸、シリング酸の効果を検討した結果、LEMCE と同様に肝障害マーカーの低下および肝線維化抑制など、肝保護効果が示された。両物質は強いラジカル消去活性を有しているため四塩化炭素の酸化的ストレスに対して抗酸化作用を発現したと考えられる⁶⁾。また免疫活性化を介する ConA 誘発肝障害を抑制することも明らかとなった⁵⁾。同じくフェノール性化合物であるカフェイン酸やクルクミンは免疫制御及び抗炎症作用を有している。免疫活性化を介する ConA 誘発肝障害を抑制するメカニズムは明らかではないが、その

シイタケ菌糸体 (*Lentinula edodes mycelia*: LEM)
固体培地 (バガス、米糠を含む) で培養

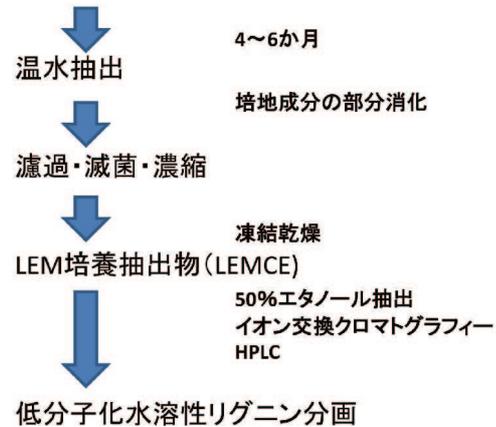


図1 シイタケ菌糸体培養抽出物 (LEMCE) の作成と有効成分の分画

機構としては TNF- α によって活性化される NF- κ B 依存の遺伝子発現をカフェイン酸やクルクミンが抑制するためと考えられている。カフェイン酸、クルクミンは NF- κ B の SH 基をアルキル化することにより阻害することが示唆されており、バニリン酸、シリング酸の *O*-メトキシ基がアルキル化に関与している可能性が考えられる。

バニリン酸、シリング酸が肝保護効果を有することは明らかとなったが LEMCE 中の含量がそれぞれ 378、450 μ g/g LEMCE と微量であることから他の有効成分の存在を想定して新たに分画操作を行った。図1に示すようにエタノール抽出、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC による分画の結果、リグニン由来物質 49%、糖質 36% を含む画分にラット初代肝細胞に対する保護効果があることを見出した⁷⁾。本分画に含まれる物質の平均分子量は 2753 であり非常に高いスーパーオキシドディスムターゼ活性を有し抗酸化活性を示すことが明らかとなった。バニリン酸、シリング酸は固形培地に含まれる難溶性高分子リグニンが温水抽出の際 LEM から分泌されるリグニン分解酵素によってモノマーまで分解されたものと考えられる。したがって LEMCE 中には低分子化された水溶性リグニンが豊富に存在し肝保護効果を発揮していることが示唆された。

低分子化リグニンの効果

リグニンは地球上でセルロースに次いで豊富に存在するバイオマス資源であるが、難分解性高分子で

あるためその利用が制限されている。しかし上述のようにシイタケなど担子菌がリグニンを分解する酵素を分泌することが知られており⁸⁾、LEMCE中に低分子化した水溶性リグニンが濃縮されていると考えられる。筆者らは低分子化したリグニンの機能開発を目的とし、市販の低分子化リグニンを用いて新たな生理活性の検討を行った。近年、植物由来化合物に抗C型肝炎ウイルス(HCV)効果、炎症性腸疾患に対する治癒効果に関する報告がなされていることから、加水分解によって得られる低分子化リグニンを用いて両効果について解析を行った。

低分子化リグニンの抗HCV活性をHCVの細胞侵入に焦点を当て評価を行った。HCVの細胞内への侵入解析において汎用されているHCVシェードウイルスを用いて抗HCV活性を評価したところ、非常に強いHCV侵入効果を有することが明らかとなった。作用濃度の10倍以上の濃度でも細胞毒性が観察されなかったことから安全性は高く、実際のHCV粒子を用いた検討においても同様の侵入阻害効果を示した。これらの結果より低分子化リグニンがHCVの侵入を効果的に阻害する薬物としての可能性を提示できるものと思われる。

次に炎症性腸疾患治療への応用の可能性を検討するため低分子化リグニンのタイトジャンクション(TJ)バリア機能に対する作用を検討した。腸管粘膜上皮モデルとして汎用されている大腸癌由来細胞株caco-2細胞単層膜の膜電気抵抗値(Trans epithelial

electric resistance : TEER)を指標としてTJバリア機能を評価した。低分子化リグニンは有意にTEERを上昇させバリア機能を強化する機能を有することが示された。さらにTNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカインを添加するin vitro潰瘍性大腸炎モデルにおいて、低分子化リグニンはTJバリア機能の低下を有意に抑制することを示した。したがって低分子化リグニンは腸管において物質透過バリア破綻を抑制し潰瘍性大腸炎を鎮める薬物として可能性を提示できるものと思われる。

おわりに

リグニンは病原体や腐生菌の攻撃から植物体を保護する生体バリアとしての役割を演じている。天然のリグニンは芳香族化合物が三次元的に連なった難分解性の高分子であり、生理活性はほとんど報告されていない。筆者らはLEMの分泌するリグニンペルオキシダーゼによる分解やアルカリ加水分解等で低分子化したリグニンが肝保護効果、HCV侵入阻害効果、上皮バリア機能促進効果を示すことを見出した。リグニンを低分子化することにより植物体における本来のバリア機能をホ乳類の組織、細胞に対して再現し適用できたと捉えている。リグニンは地球上に豊富に存在し、その分解物は化学修飾可能な官能基を有していることから非常に魅力的な医薬品の原材料として注目している。

参考文献

1. Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Hayashi S, Kodama D, Kawase M, Yagi K. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosoamine-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2004;**27**:1957-1960.
2. Watanabe A, Kobayashi M, Tamesada M, Hayashi S, Kodama D, Isoda K, Kondoh M, et al. Protection against D-galactosamine-induced acute liver injury by oral administration of extracts from *Lentinus edodes* mycelia *Biol Pharm Bull* 2006;**29**:1651-1654.
3. Okuno K, Uno K. Efficacy of Orally Administered *Lentinula edodes* Mycelia Extract for Advanced Gastrointestinal Cancer Patients Undergoing Cancer Chemotherapy: a Pilot Study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;**12**:1671-1674.

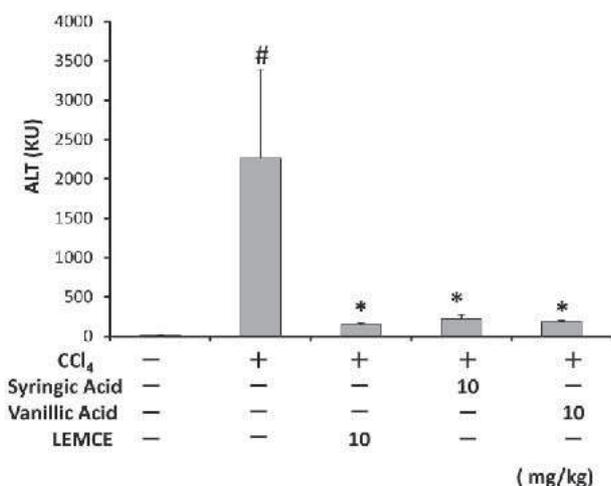


図2 バニリン酸、シリンガ酸、LEMCEの四塩化炭素による慢性肝障害に対する保護効果 (参考文献6から改変)

: $p < 0.05$ vs CCl₄(-)control, * : $p < 0.05$ vs CCl₄(+)control

4. Yamaguchi Y, Miyahara E, Hihara J. Efficacy and safety of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Am J Chin Med* 2011;**39**:451-459.
5. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic and vanillic acid contained in culture extracts of *Lentinula edodes* mycelia on concanavalin A-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2009;**32**:1215-1219.
6. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Tamesada M, Kobayashi M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2010;**33**:983-987.
7. Yoshioka Y, Kojima H, S. T, Tsuji K, Tamesada M, Yagi K, Murakami N. Low-molecular-weight Lignin-rich Fraction in the Extract of Cultured *Lentinula edodes* Mycelia Attenuates Carbon Tetrachloride -Induced Toxicity in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *J Nat Med* 2012;**66**: 185-191.
8. Ruiz-Duenas FJ, Martinez AT. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb Biotechnol* 2009;**2**:164-177.

