

タモギタケ由来エルゴチオネインの定量法と精製法の確立

賀佐伸省¹⁾、山岸和敏²⁾、富山隆広²⁾¹⁾ 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²⁾ 株式会社スリービーAn analysis and a purification of ergothioneine
from *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* (Tamogitake in Japanese)Shinsei GASA¹⁾ Kazutoshi YAMAGISHI²⁾ and Takahiro TOMIYAMA²⁾¹⁾ Division of Chemistry, Department of Liberal Arts and Education, Medical Center,Sapporo Medical University and ²⁾ Three B, Co-LTD

多くのキノコ類に広く分布する抗酸化物質、エルゴチオネインをタモギタケ (*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*) から精製し、その構造を核磁気共鳴スペクトルで同定した。更に、高速液体クロマト装置を用いてその定量法を確立し、各種クロマト担体を用いた簡便な精製法を確立した。

1. はじめに

エルゴチオネインは麦角 (ergot) から単離され¹⁾、その構造はイオウ原子を持つヒスチジンの誘導体であることが明らかにされた²⁾。その後、菌類などに豊富に含まれ、また哺乳動物の体液や組織に微量存在することが明らかにされた。その構造は溶液中ではケト型 (thione) とエノール型 (thioenol) の互変異性体の平衡混合物である。

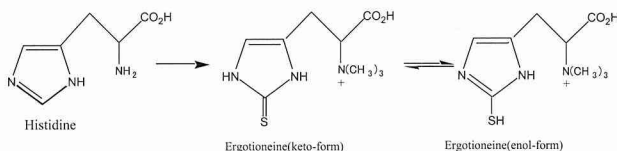


図1 Structure of ergothioneine.

一方、生理作用は古くからその抗酸化力が認められており、現在美容品などの添加物としてその利用が拡大しつつある。こ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り、ポリフェノール類の抗酸化反応とは基本的に同じであるが、ビタミンCとはそのメカニズムが異なる。更に、この物質は熱に極めて強い特徴を持つ。この特性を生かし、本物質の精製原料としてタモギタケの水煮画分を用い、各種クロマトグラフィーを組み合わせて簡便な精製法を確立した。

本報告は産学連携共同研究の一環として行われた。

2. 方 法

2・1 分析法

クロマトグラフィーによる各画分はシリカゲル薄相クロマトグラフィー (TLC, Silica gel 60, Merck 社製、展開溶媒 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}=50:50:10$) にて展開後、糖質はオルシンー硫酸法、エルゴチオネインはヨード蒸気、アミノ酸やペプチドはニンヒドリン試薬で検出した。エルゴチオネインの定量には高速液体クロマトグラフィー装置 (HPLC, pu-2089plus, 日本分光株式会社) に設置したカラム (Peptide column, $4\mu\text{m}$, $4.6 \times 25\text{cm}$, ガスクロ工業株式会社) を用い、溶出条件は H_2O , 3min, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1\% \text{ Acetonitrile in H}_2\text{O}$, 12 min の濃度勾配法を用い、流速 1 ml/min , 波長 250nm ($\epsilon = \text{ca } 9,000$) で検出した。エルゴチオネインは $3.5 \sim 3.8 \text{ min}$ で溶出された。

2・2 タモギタケからのエルゴチオネインの精製

タモギタケ水煮画分 (タモギタケ子実体 200kg を熱水 200 L に数分浸し、水煮画分約 $1.5 \sim 1.8 \text{ L}$ に分注した。その画分 (固形分 $3 \sim 3.5\text{g/L}$ 、エルゴチオネイン $0.5 \sim 0.6\text{g/L}$) を $5,000\text{rpm}$, 30min , 10°C にて遠心分離し、上清を各種クロマトグラフィーに供した。

2・3 各種カラムクロマトグラフィー

陽イオン交換樹脂 (IRB120B, H^+ -form, $5 \times 30\text{cm}$) に水煮の遠心上清約 3 L を自然落下にて添加した。糖質成分が陰性になるまで水でカラムを洗浄した後、 0.28% アンモニア水でエルゴチオネインを溶出した。

水煮画分あるいはイオン交換カラムの溶出液を活性炭カラム (2.5 x 30 cm, Charcoal 63 ~ 300 μ m, 和光純薬工業株式会社) に自然落下にて添加し、糖類を水洗で除去した。エルゴチオネインが HPLC 上ピーク強度 10,000 μ V 以上になるまで水で洗浄した後、20%-ethanol-H₂O にて溶出した。溶出液を濃縮乾固後、少量の H₂O に溶解してシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60, 100-210 μ m, 関東化学株式会社, 2.5 x 50 cm) に供した。溶出液は CHCl₃-CH₃OH-H₂O=40:60:6 (A), 30:70:7 (B), 20:80:8 (C) の各 1L を用いた。溶出液を約 10 ml ずつ分画し、約 1 ml に濃縮後、TLC にてエルゴチオネインの溶出を調べた。エルゴチオネインは B 液の後半から C 液にかけて溶出された。上記クロマトグラフィー後のエルゴチオネインの部分精製品を濃縮乾固し、C18 逆層カラム (C18, 50 ~ 60 μ m, 2 x 15 cm, 和光純薬工業株式会社) に少量の H₂O で添加した。カラムを水洗するとエルゴチオネインは未吸着画分に溶出された。シリカゲルクロマトグラフィー以外のエルゴチオネインの溶出の確認は HPLC を用いた。

2・4 エルゴチオネインの構造

エルゴチオネインの構造は、市販品 (Sigma) およびタモギタケからの精製品の核磁気共鳴スペクトル (NMR, Bruker AMX-500) および質量分析 (FAB-MS, JEOL JMS-AXX-500) で確かめた。

2・5 定量法の確立

定量は HPLC を用いた上記の条件により、市販品あるいは精製品を標準品として 0.001 ~ 1,000 μ g/mL の 10 μ L を HPLC に導入し、物質とピーク強度 (μ V) との相関による検量線を作成した。

2・6 簡便精製法

上記カラムクロマトグラフィーのうち、イオン交換カラムと活性炭カラムは連結することが可能であり、前者からのアンモニア水による溶出液は濃縮および脱アンモニアすることなく活性炭カラムにそのまま添加しても回収率や純度の向上に変わりがないか、あるいは向上していることを確かめた。すなわち、イオン交換カラムと活性炭カラムをチューブで連結し、途中に三方活栓をつけて水煮の遠心上清を添加し、イオン交換から夾雑物が除去されたことを確認してからアンモニア水で溶出して溶出液を活性炭カラムに直接導入した。活性炭カラムからの夾雑物が H₂O で除かれた後、イオン交換カラムを外し、エタノール水溶液で活性炭カラムからエルゴチオネインを溶出させた。

3 結果

3・1 タモギタケからエルゴチオネインの精製

クロマトグラフィーの前処理として遠心分離を行っ

たが、これはクロマト担体の劣化を防ぐためと粘濁物質であるムチン蛋白と思われる成分を除くためである。また、分子量 1 万までを分離する濾過膜を用いた限外濾過も有効であり、濾液にエルゴチオネインと小糖類が分離されたが操作に長時間を要し、実験室レベルで適した方法とはいえなかった (データ未発表)。

市販品およびタモギタケから精製したエルゴチオネインの TLC を水煮画分のそれと共に図 2 に示す。

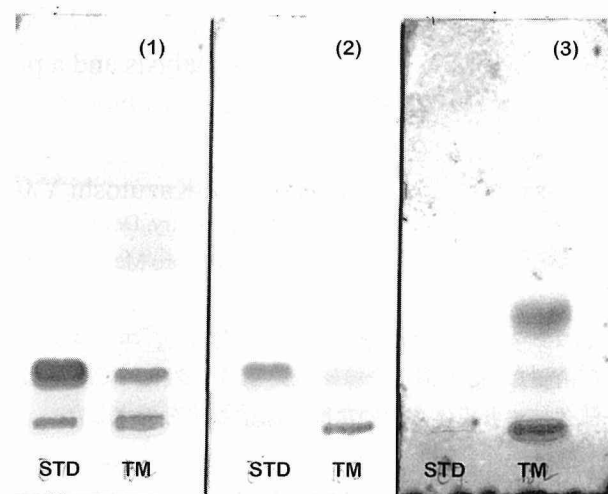


図2 TLC pattern of ergothioneine and water-extracted mushroom.

Panels (1) ~ (3) were the same plate developing with CHCl₃-CH₃OH-H₂O=50:50:10, and differently stained with step wise as follows, (1) was stained by iodine vapor, then (2) was ninhydrin reagent, and finally (3) was orcin-sulfuric acid. In the panels, STD demonstrates commercial ergothioneine and TM is the extract from the mushroom.

エルゴチオネインはヨード蒸気に極めて良く染色された。これはエルゴチオネインの還元力や不飽和結合の多さあるいは正荷電によるものと思われる。エルゴチオネインはタモギタケの水溶性画分に比較的大量 (重量比約 20%) に含まれ、精製のための原材料として最適である。陽イオン交換法による精製法は既に報告されており³⁾、水煮画分からの回収率は 85%、純度は 45% (重量比) に精製された。低濃度のアルカリ溶液で溶出されるのは、酸性溶液中ですらエルゴチオネインは常に正に荷電されていることによるものと思われる。一方、陰イオン交換クロマトグラフィー (IRA1, Cl⁻-form) を行ったが、精製法には適さなかった (データ未発表)。キノコ類の常として、水溶性画分には二糖類のトレハロースが大量に含まれている (図 2)。陽イオン交換樹脂にはこの糖質は補足されず、エルゴチオネイン画分から糖質を除くには最適な方法である。一方、活性炭カラムはその粒子型によってはほとんどの糖質が吸着する事が知られているが、本報告で用いた活性炭はトレハロースですら未吸着画分に

含まれた。これも混在する小糖類を除く簡便な方法である。水煮画分からの回収率は45～55%で比較的低回収率であったが、純度は55～60%とイオン交換法よりは好結果が得られた。尚、イオン交換カラムとの連結では回収率は約60%であり、単独カラム法より幾分収率が上昇し、純度は60%以上に上昇した事から連結カラム法は簡便かつ迅速な方法として優れていた。水煮試料の脱臭効果はイオン交換カラム法が優れていた。

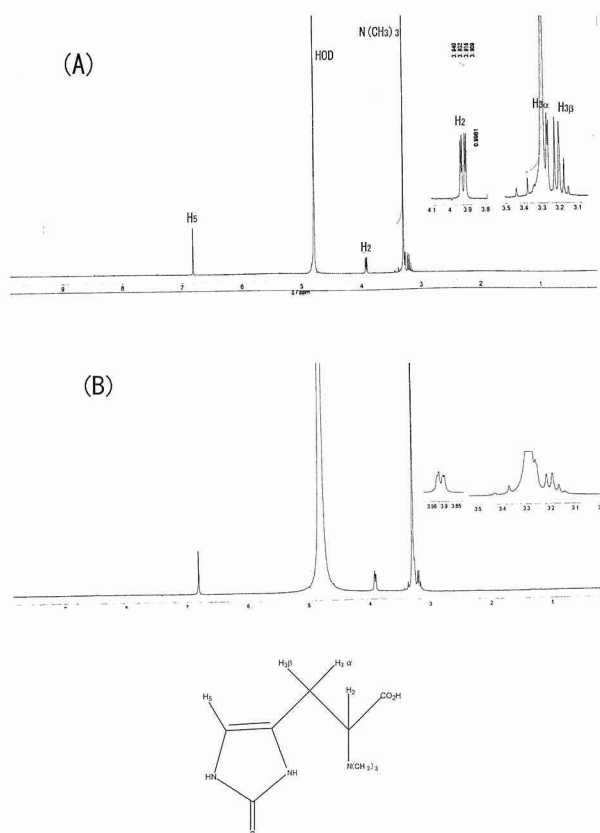


図3 500MHz-¹H-NMR spectra of ergothioneine. Commercial (A) and purified from mushroom (B) ergothioneines. The spectrum was observed in D₂O at room temperature.

シリカゲルカラムは吸着力を利用した精製法であり、エルゴチオネインの最終精製には脱色や脱臭に威力を発揮した点で必須の精製法である。回収率も90%と好結果を与え、この方法を加えることでエルゴチオネインはほぼ純品の標品となった。また、逆層カラムも優れた最終精製法として好結果がえられた(回収率95%)。C18-逆層担体は殆どのアミノ酸を捕捉出来ることが知られているが、エルゴチオネインは本カラムには吸着しなかったことから夾雑するアミノ酸類の除去には最適であった。

これらのカラム担体の内、陽イオン交換樹脂は1M-HCl, C18-逆層担体は20%-ethanol-H₂Oで洗浄することにより再利用できた。

3・2 エルゴチオネインの構造

図3に市販品およびタモギタケからのエルゴチオネインの¹H-NMRスペクトルを示す。

市販品と精製物は同じスペクトルを示した。質量分析(positive FAB-MS)でも両者は同じ分子量230を示した(データ未発表)ことから、両者は同一の物質と同定された。

3・3 定量法の確立

各物質量に対応したピーク面積およびピーク強度(ピーク高)で検量線を作成したところ、いずれも同一の検量線を与えたため、未知の試料中のエルゴチオネインの定量にはピーク強度で作成した検量線を用いた。図4にHPLC上のエルゴチオネインのピークと検量線を示す。

測定限界は下限が1μg/mLで上限は1,000μg/mLであった。

3・4 簡易精製法

当初、イオン交換カラムと活性炭カラムは個別に行っており、前者の溶出液を濃縮乾固してアンモニアを除いていたが、濃縮操作に長時間を要していた。この操作を省いて溶出液を直接活性炭カラムに添加した後

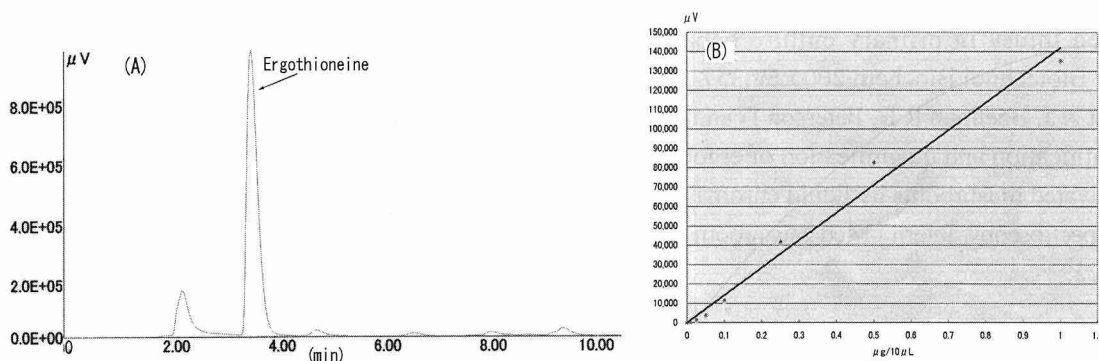


図4 Peak of ergothioneine on HPLC and linearity of the response observed on HPLC. (A) The sample injected on the HPLC is that after purification on a cation-exchange column chromatography. (B) The linearity demonstrates between various amount (1 to 100μg/mL) of ergothioneine and the corresponding peak height observed on HPLC.

で溶出させたところ、個別に活性炭カラムを行ったときと比べてエルゴチオネインの回収率や純度がわずかではあるが上昇したため両カラムを連結させて行った。従って、省力性や迅速性で本方法が優れている。また、イオン交換カラムからの溶出液中のアンモニアは活性炭カラムの操作には悪影響を及ぼさなかった。精製したエルゴチオネインはエタノール/水系で結晶化した。

考 察

タモギタケ水煮画分からエルゴチオネインを簡便かつ迅速に精製した。本物質の精製法は数多く報告されているが、活性炭カラムの導入は本報告が初めてである。精製した標品の結晶の融点、紫外線吸収スペクトルは既報通りであった（データ未発表）。HPLCやLC-MSを用いたエルゴチオネインの定量法は既に報告されており、新規性はない。また、3-Hydroxyergothioneineが他の菌類で発見されている⁴⁾が、本報告で用いた水煮画分からは検出されなかった。

謝 辞

本研究は文部科学省「教育研究高度化のための支援体制整備事業」によって支援された。

文 献

- 1 Tarnet C. Su rune base nouvelle retiree du seigle ergote, l' ergothioneine. Rend Acad Sci 1909; 149:222-224.
- 2 Barger G and Ewins A J. CCLVII.-The constitution of ergothioneine: a bertaine related to histidine. J Chem Soc 1911;41:2336-2341.
- 3 Kimura C, Nukina M, Igarashi K, and Sugawara Y. β -Hydroxyergothioneine, a new ergothioneine derivative from the mushroom *lyophyllum connatum*, and its protective activity against carbon tetrachloride-induced injury in primary culture hepatocytes. Biosci Biotechnol Biochem 2005;69:357-363.
- 4 Dubost N J, Beelman R B, Peterson D and Royse D J. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. Intern j Med Mushrooms 2006; 8: 215-222.