

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34421

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500980

研究課題名(和文) 食用担子菌におけるスフィンゴ糖脂質の偏在性と第三次機能の科学的評価

研究課題名(英文) Structural analysis of sphingoglycolipid from Basidiomycota

研究代表者

水野 淨子 (Mizuno, seiko)

相愛大学・人間発達学部・その他

研究者番号：90190652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：各種食用担子菌にセラミド含有糖脂質を見出し、その構造と生理活性を明らかにした。マイタケ、エノキタケより得られたスフィンゴ糖脂質は主要長鎖塩基はC18:1とC20:1のsphingenine、脂肪酸は2-OH C16:0と解析した。マイタケ、エノキタケには共通してGSL-1が存在し、その化学構造はGlucosyl-(1-1)-ceramideと同等した。また、マイタケ、エノキタケ、ヤマチャタケ、ヤマブシタケ、ハナビラタケおよびマツタケは属レベルが異なるものの、いずれの総脂質でも免疫賦活作用が明らかにされていることから、きのこ総脂質における免疫賦活作用は担子菌門共通である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found out the synthesis of glycosphingolipids(GSL-1) in Maitake and Enokitake, and reported the structure in detail for the first time. The sugar component of GSL-1 was assigned to be a glucose. LCB and FA fractions were analyzed by GC and GC/MS, and implied that the main components were C20:1 sphingenine for LCB, and C16:0, 2-OH-C16:0 for FA. Taken together, each GSL-1 of Maitake and Enokitake were same structure and defined as a glucosyl (1-1) ceramide. For biological clarification of the GSLs, the glycolipid fraction containing GSL-1 of Maitake and Enokitake were intraperitoneal injection to mouse. Numbers of peritoneal leukocyte were higher in mouse which intraperitoneal injected glycolipid fraction. From the results, the immunostimulatory effect of the glycolipid of Maitake and Enokitake was suggested.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 生理活性

1. 研究開始当初の背景

食品の機能性研究に関しては、以下の三つの機能があることが指摘されている。

- 1) 第一次機能-栄養素としての働き
- 2) 第二次機能-人間の五感に訴える働き
- 3) 第三次機能-人間の健康、身体能力、心理状態に好ましい影響を与える働き(生理システムを調節して、健康の維持や回復に好ましい効果を及ぼす働き)

また、総合科学技術会議が策定した分野別推進戦略には「予防的な観点から、ヒトの健康状態や食品機能を科学的に研究し、機能性食品や新たな診断技術を開発することが必要」と明記され、その推進が望まれている。

さらに、栄養改善法では「特定保健用食品」に関する制度が創設され、健康の維持、増進に役立つ又は適する旨を表示することが求められている。疾病予防の観点から生体の調節手段としての機能が期待されている。

一方、スフィンゴ糖脂質は糖とセラミド(長鎖塩基と脂肪酸)からなり、動植物などの真核生物に広く分布し、脳細胞、神経細胞膜、脾臓、筋肉等の重要な構成成分である。細胞シグナル伝達物質として分化、増殖、プログラム死を制御し、免疫学的に重要な働きをしている。また、皮膚においては保湿や細胞透過性に関与している。これらスフィンゴ糖脂質は自己免疫疾患や神経変性疾患の治療に役立つ可能性もあり、健康の維持増進への関与が示唆される(Cell Mol Life Sci 62: 2283-94. 2005)。また、スフィンゴ糖脂質を認識する CD1d 拘束性 NKT 細胞が見出され、その機能解明が求められている。(Annu Rev Immunol. 25:297-336. 2007)。

一方、キノコには抗腫瘍活性・免疫調節機能があり、これら機能は 1,6 側鎖を有する β -グルカン(リポ多糖)の関与が指摘されている。キノコの第三次機能はマクロファージや NK 細胞の自然免疫関連細胞の活性化のみならず、T 細胞活性化、各種サイトカイン産生によるメカニズムが提案されている(Exp Biol Med 233:259-76. 2008)。

2. 研究の目的

担子菌 (*Basidiomycota*) は子実体や胞子を形成する。その子実体(キノコ)は食用として馴染み深く市場に多数出回っているが、機能性研究が行われているものは限られている。一方、セラミド含有スフィンゴ糖脂質(GSL)は NKT 細胞の活性化、感染防御、自己

免疫疾患との関連が指摘され、免疫薬理学的有用物質として注目されている。

我々は、キノコによる健康維持、増進を脂質生化学的・脂質免疫学的側面から検討し、キノコの第三次機能の解明を目的として研究を進めている。

本研究では、まず種々の食用担子菌に含まれる GSL の分布と構造を解析する。次に、第三次機能について評価することを目的とする。

3. 研究の方法

マイタケ (*Glifola frondosa*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) ヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*)、ヤマチャタケ (*Flammulina velutipes*)、ハナビラタケ (*Sparassis crispa*)、マツタケ (*Tricholoma matsutake*) は市場で購入し、石突き部を除き試料とした。

1) GSL の抽出・精製

各キノコの凍結乾燥品 4 g を chloroform/methanol/H₂O(60:35:8, by vol.) 中で超音波処理し、50℃ で 2 時間抽出、さらに 37℃ で 12 時間抽出後、遠心分離し、有機層を減圧乾固して総脂質画分を得た。0.5 N-KOH in chloroform/methanol (2:1, by vol.) を加え、37℃、16 時間、弱アルカリ加水分解した。6.0 N-HCl で酸性化し、再度 chloroform/methanol (2:1, by vol.)、H₂O を加えて二層分配し、GSL を含む有機層をアルカリ安定脂質として得た。展開した薄層クロマトグラフィー (TLC) から GSL スポット部分のシリカゲルを掻きとり、chloroform/methanol (2:1, by vol.) で溶出した。遠心分離によりシリカゲルを除去し、上清を濃縮乾固した。この操作を繰り返し、単一スポットになるまで精製純化した。

2) GSL の薄層クロマトグラフィー分析

前項で得られた各キノコの総脂質画分と GSL を含むアルカリ安定脂質画分を TLC にスポットし、展開溶媒 chloroform/methanol/H₂O (65:25:4, by vol.) 及び chloroform/methanol/CH₃COOH/H₂O(100:20:12:5, by vol.) で 45 分間展開した。20% H₂SO₄/ethanol を噴霧し、180℃、3 分間加熱して黄褐色に発色した GSL のスポットを検出し、その移動度 (R_f 値) を比較した。

3) GSL の脂肪酸及び長鎖塩基の分析

単離した GSL を飽和水酸化バリウム溶液で 100℃、16 時間、強アルカリ加水分解し、ジ

エチルエーテルで長鎖塩基を抽出した。引き続き酸性化して *n*-ヘキサンで脂肪酸を抽出し、ジアゾメタンでメチルエステル誘導体とした。長鎖塩基及び脂肪酸メチルエステルは、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS, GCMS-QP2010 Plus, 島津製作所) により分子種を同定した。GC/MS はキャピラリーカラム SP-2380 (30 m, 0.25 mm ID, Supelco, Bellefonte, PA, USA)、注入温度 270 , 検出器温度 270 , カラム温度 80-200 , 4 /min の昇温条件で、電気衝撃イオン化法 (Electron ionization, EI) を用いて実施した。

4) GSL の構成糖の分析

単離した GSL を三フッ化酢酸中で 121 , 2 時間、加水分解し、NaBH₄ で 25 , 14 時間還元後、無水酢酸及びピリジン (1:1, by vol.) でアセチル化し、生じた alditol acetate 誘導体を GC/MS により分析した。GC/MS はキャピラリーカラム Equity-1 (30 m, 0.25 mm ID, Supelco, USA)、注入温度 270 , 検出器温度 270 , カラム温度 170-220 , 2 /min の昇温条件で実施した。

5) MALDI-TOF/MS による GSL の分子量測定

GSL 1 µg をターゲットプレートにスポットし、さらに matrix として 10 mg/ml の 2,5-dihydroxybenzoic acid を 1 µl 添加した。MALDI-TOF/MS (Ultraflex II, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) により、Reflectorn, Positive モードで分子量を測定した。また、MS/MS 解析により得られたフラグメントイオンから糖、セラミド構造を推定した。

6) NMR による分析

GSL を chloroform-d (CDCl₃)/methanol-d₄ (CD₃OD), (2:1, by vol.) に溶解して ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) を実施した。homonuclear correlation spectrometry (COSY) と ¹H-detected [¹H, ¹³C] heteronuclear multiple-quantum correlation (HMQC) を Bruker AVANCE-600 (Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA, USA) を用いて測定し、プロトン結合定数とカップリング定数からアノマー体を決定した。

7) 各種キノコ総脂質画分の抗原認識評価

前述のように調整した各種キノコの総脂質画分を N₂ 乾個させた後、全溶媒量の 30% 当量

のグリセロールを添加して緩やかに加温 (40) しながら脂質を溶解した。さらに全溶媒量の 70% 当量の滅菌生理食塩水を添加して良く混合し、脂質溶解液を調製した。総脂質投与量は 100 mg/kg 体重とし、マウス腹腔内の投与量は液量 0.1 ml が適当であることから、総脂質溶液は 30 mg/ml 30% グリセロール液で調製した。Balb/c マウス (, 8 週齢) の腹腔内に各種きのこ総脂質溶液 0.1 ml、また対照群では 30% グリセリン/生理食塩水を 0.1 ml 投与した。投与 3 時間後に麻酔下で腹腔内に生理食塩水 5 ml を注入して腹部をマッサージした後、腹腔内生理食塩水を回収した。遠心分離して上清を除去後、沈殿部分に赤血球溶血溶液 (0.17 M 塩化アンモニウム/10 mM Tris-HCl, 0.25 mM EDTA) 5.0 ml を添加して、全体をよくピペティングして赤血球の溶血処理を行った。この溶血処理を 2 回行った後に、沈殿部分に滅菌生理食塩水 4.0 ml を添加して細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液と等量のチュルク染色液をよく混合した後、セルカウンターを用いて青く染色された白血球の細胞数を計測した。

セルカウンターで計測した細胞数 (小マス 4 個 × 4 個分) × 10,000 (ml に換算) × 希釈倍率により腹腔内白血球数を算出した。

4 . 研究成果

1) キノコにおける総脂質画分及びアルカリ安定脂質画分の含量

各キノコの総脂質画分の含量は、10% 以下であり、総脂質画分のうちアルカリ安定脂質は 10% 弱であった。

2) GSL の単離精製と TLC 分析

各キノコの総脂質画分とアルカリ安定脂質を各種展開溶媒系で TLC 展開し、各脂質画分の分布を検討した。総脂質画分を弱アルカリ水解すると、エステル結合型のリン脂質や糖脂質は分解されるが、GSL は分解されずに安定であった。TLC の結果、アルカリ安定脂質画分で検出された糖脂質は、エステル結合を含むグリセロ糖脂質ではなく GSL であることが示唆された。マイタケからは 1 つの GSL スポット (GSL-1)、エノキタケからは 2 つの GSL スポット (GSL-1, -2) が検出された。R_f 値を比較すると、マイタケ、エノキタケの GSL-1 は等しく同一構造の GSL であると考えられた。エノキタケは GSL-1 に加え、さらに R_f 値の高い GSL-2 が存在した。標準品の *Sphingomonas paucimobilis* 由来の glucuronosyl-ceramide

よりも Rf 値が高く、セラミドモノヘキソシドと推定した。構造解析のため GSL-1, -2 を TLC プレートより回収し、単一スポットになるまで精製純化した。

3) GSL の構成脂肪酸及び長鎖塩基

マイタケ、エノキタケ GSL の脂肪酸組成を解析するため、精製 GSL の強アルカリ水解により脂肪酸メチルエステル誘導体を調製し、GC/MS 分析を実施した。その結果、脂肪酸のメインピークとして 2-OH C16:0 が検出された。また、長鎖塩基として C18:1 と C20:1 の sphingenine が検出された。

4) GSL の構成糖

精製した GSL を加水分解後、アセチル化したアルジトールアセテート誘導体を GC/MS により分析した。標準物質として、グルコース、マンノース、ガラクトース、イノシトールのアルジトールアセテート誘導体を用い、保持時間とフラグメントイオンを比較したところグルシトールと一致した。この結果、GSL の構成糖はグルコースと同定した。

5) GSL の MALDI-TOF/MS, MS/MS 解析による分子量測定

マイタケ、エノキタケの GSL-1, -2 を MALDI-TOF/MS 解析した結果、m/z 766, 892 を中心とした $[M+Na]^+$ 疑似分子イオンを検出した。また、GSL-1 の MS/MS 解析の結果、分子イオンから脂肪酸部分が解離した m/z 512、糖部分が解離したセラミド部分 m/z 604 が検出された (Fig. 1)。以上の結果から、GSL-1 は C20:1 の sphingenine、2-OH C16:0 の脂肪酸からなるグルコシルセラミドと同定した。

6) NMR によるアノマー体の分析

COSY, HMQC の NMR 解析から、マイタケ、エノキタケの GSL-1 はそれぞれプロトン結合定数 J_{1-2} が 7.8, 7.8 Hz、カップリング定数 J_{CH} が 157.0, 161.0 Hz であり、マイタケ、エノキタケの GSL-1 は アノマー体であることが明らかとなった。

7) GSL の分布、構造とまとめ

以上の結果から、マイタケ、エノキタケには共通して GSL-1 が存在し、その化学構造は glucosyl- (1 1)-ceramide と同定した。エノキタケにはマイタケに存在しない GSL-2 が産生された。GSL-2 は GSL-1 に比べ TLC 上の Rf 値が異なり、MALDI-TOF/MS の結果から分子

量が 120 大きかった。糖、脂肪酸、長鎖塩基の解析も含め一部 GSL-1 と比較したが、構造の同定までは未だ至っていない。しかしながら、各種担子菌間で GSL の分布に違いがあることが示唆された。

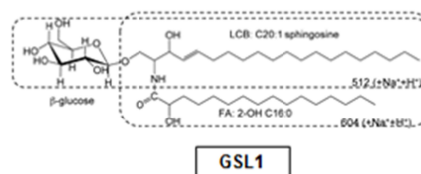
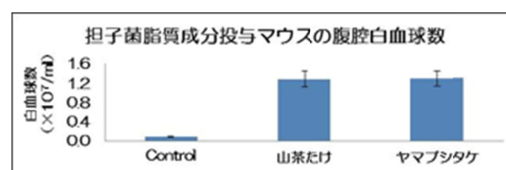


Fig. 1 GSL1 の推定構造

8) 腹腔内白血球数

マイタケ、エノキタケ、ヤマチャタケ、ヤマブシタケ、ハナビラタケおよびマツタケの総脂質を腹腔内に投与したマウスの腹腔内白血球数は、30%グリセリン/生理食塩水のみを投与した対照区に比べて著しく高い値を示した。この結果から、マウス腹腔内に投与したきのこ脂質成分は腸管および腹膜から吸収されることなく、マクロファージ・好中球などの白血球に抗原認識されていることが明らかとなった。マイタケ、エノキタケ、ヤマチャタケ、ヤマブシタケ、ハナビラタケおよびマツタケは属レベルが異なるものの、いずれの総脂質でも免疫賦活作用が明らかにされていることから、きのこ総脂質における免疫賦活作用は担子菌門共通である可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

- 1) Fujiwara, N., S.A. Porcelli, T. Naka, I. Yano, S. Maeda, H. Kuwata, S. Akira, S. Uematsu, T. Takii, H. Ogura, and K. Kobayashi. 2013. Bacterial sphingophospholipids containing non-hydroxy fatty acid activate murine macrophages via Toll-like receptor 4 and stimulate bacterial clearance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831 (6):1177-1184.

- 2) Hattori Y, D. Morita, N. Fujiwara, D. Mori, T. Nakamura, H. Harashima, S. Yamasaki, and M. Sugita. 2014. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, mincle. *J. Biol. Chem. J Biol Chem.* 2014 May 30;289(22): 15405-15412
- 3) 庄條愛子、古豪加奈、山本麗奈、小林貴美子、中崇、藤原永年、北村進一、水野淨子、八ナピラタケ子実体および脂質成分の免疫賦活作用、相愛大学研究論集第 30 巻
- 4) Kiniko Kobayasi, Reina Goda, Seiko Mizuno, Takashi Naka, Shinji Maeda and Nagatoshi Fujiwara. Structural analysis of sphingoglycolipid from Basidiomycota 相愛大学研究論集第 28 巻

〔学会発表〕（計 9 件）

国際学会

- 1) FEMS 2013-The 5th Congress of European Microbiologists. July 21-25, 2013: Reipzig, Germany.
N. Fujiwara, T. Naka, H. Kuwata, S. Maeda. Bacterial sphingophospholipids activate murine macrophages via Toll-like receptor 4 and stimulate bacterial clearance.
- 2) FEMS 2013-The 5th Congress of European Microbiologists. July 21-25, 2013: Reipzig, Germany.
K. Teramoto, T. Sato, T. Wada, A. Yamamoto, N. Fujiwara. Application of MALDI Spiral-TOF MS with High Mass Resolving Power to Assign Mycolic Acid Subclasses in *Mycobacterium tuberculosis*
- 3) The 5th EMBO meeting. September 21-24, 2013.: Amsterdam, The Netherlands.
N. Fujiwara, T. Naka, M. Ayata, M. Shibata, H. Kuwata, H. Ogura, and S. Maeda. Novel serotype-specific glycopeptidolipid from *Mycobac-*

terium intracellulare clinical isolate.

- 4) The 5th EMBO meeting. September 21-24, 2013.: Amsterdam, The Netherlands.
S. Maeda, T. Wada, T. Naka, M. Shibata, N. Fujiwara. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer (NGS).
- 5) The 5th EMBO meeting. September 21-24, 2013.: Amsterdam, The Netherlands.
M. Shibata, T. Naka, S. Maeda, and N. Fujiwara. Production of anti-lipid IgG antibodies in rabbit immunized with mycobacterial lipid antigens.

国内学会発表

- 1) 第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 26-28 日: 東京 (タワーホール船堀)
Naka, T., S. Maeda, M. Shibata, S. Mizuno, N. Fujiwara. Molecular composition of the intact glycopeptidolipid in cell-infected *Mycobacterium intracellulare*.
- 2) 第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 26-28 日: 東京 (タワーホール船堀)
Teramoto, K., N. Fujiwara. Rapid analysis of mycobacterial mycolate by MALDI spiral-TOFMS with ultra high mass-resolving power.
- 3) 第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 26-28 日: 東京 (タワーホール船堀)
Ogawa S., K. Ogawa, T. Yagi, N. Ohara, Y. Goto, N. Fujiwara, S. Maeda, T. Yamazaki, S. Itoh, T. Takii. Induction of *arcA* mRNA by an intracellular acidification in *Mycobacterium avium*.
- 4) 2012 年度 日本農芸化学会関西支部会 9 月 29 日: 京都 (京都学園大学) 八ナピラタケおよび脂質成分の免疫賦活作用の検討、庄條愛子、水野淨子、古豪加奈、小林貴美子、合田麗奈、中崇、藤原永年

(1)研究代表者

水野 浄子 (MIZUNO SEIKO)
相愛大学・人間発達学部・教授
研究者番号：90190652

(2)研究分担者

藤原 永年 (FUJIWARA NAGATOSHI)
帝塚山大学・現代生活学部・教授
研究者番号：80326256