

担子菌由来スフィンゴ糖脂質の構造解析

Structural analysis of sphingoglycolipid from *Basidiomycota*

小林 貴美子^{*1} ・ 合 田 麗 奈^{*1}
水 野 淨 子^{*1,2} ・ 中 崇^{*2,3}
土 江 松 美^{*4} ・ 前 田 伸 司^{*5}
藤 原 永 年^{*2}

I. 緒 言

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、機能的な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^{1,2,3)}。

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キノコの第三次機能として解明することを目的として研究を進めている。そのためには、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必要がある^{4,5)}。

本研究では、食用担子菌であるマイタケ、エノキタケに構造不均一な GSL が多量に含まれていることを見出し、その構造と偏在性を明らかにしたので報告する。

^{*1} 相愛大学人間発達学部発達栄養学科

^{*2} 大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野

^{*3} 株式会社 MBR

^{*4} 大阪市立大学大学院理学研究科分析室

^{*5} 財団法人 結核予防会 結核研究所 抗酸菌レファレンス部

II. 方 法

1. 実験材料

マイタケ (*Grifola frondosa*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) は市場で購入し、石突き部を除き試料とした。

2. GSL の抽出・精製

各キノコ 100 g をミキサーで細かく破碎し、Folch ら⁶⁾の方法に従い、chloroform/methanol (2 : 1, by vol.)、H₂O で二層分配し、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。

3. GSL の TLC による分析

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⁷⁾。

4. 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⁸⁾。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-QP 2010 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 Equity-1 (30 m, 0.25 mm ID, Supelco, Bellefonte, PA, USA)、注入温度 270°C, 検出器温度 270°C, カラム温度 80–200°C, 4°C/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。

5. GSL の構成糖の分析

単離した GSL を三フッ化酢酸中で 121°C, 2 時間、加水分解し、NaBH₄ で 25°C, 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⁹⁾。GC/MS はキャピラリーカラム SP-2380 (30 m, 0.25 mm ID, Supelco, USA)、注入温度 270°C, 検出器温度 270°C, カラム温度 170–220°C, 2°C/min の昇温条件で実施した。

6. 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、Reflection, 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¹⁰⁾。

7. 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。

Ⅲ. 結果及び考察

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及びアルカリ安定脂質画分の含量を Table 1 に示した。総脂質の割合はいずれも 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。

Table 1 Amount of Alkaline-stable Lipid in *Basidiomycotina*

	total lipid/ wet fruiting body	alkaline-stable lipid /total lipid	alkaline-stable lipid /wet fruiting body
<i>Grifola frondosa</i>	1.80%	8.90%	0.16%
<i>Flammulina velutipes</i>	5.30%	7.70%	0.40%

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加水分解すると、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。Fig. 1 に示した 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。Rf 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 Rf 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、セラミドモノヘキシンドと推定した。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。

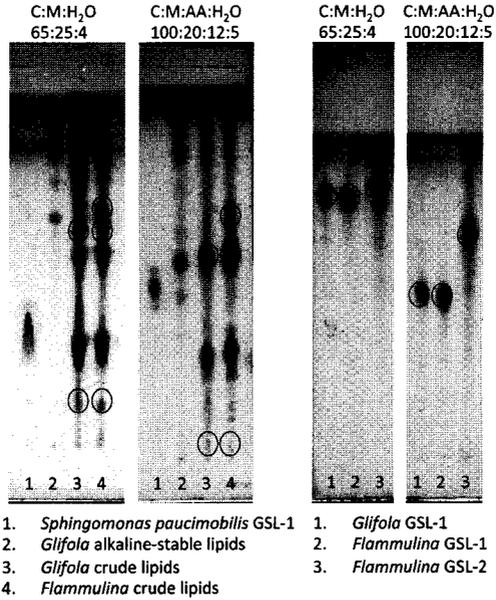


Fig. 1 TLC of GSLs derived from *Grifola frondosa* and *Flammulina velutipes*

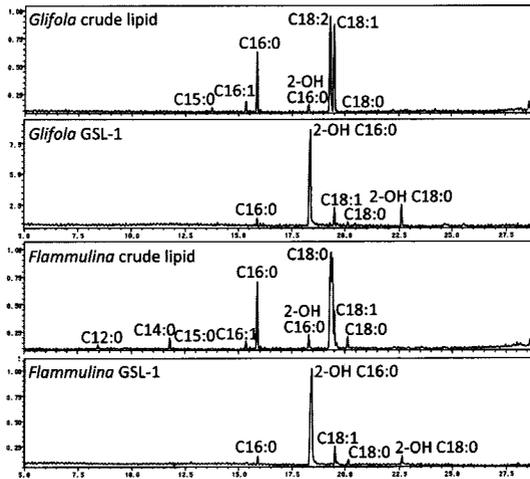


Fig. 2 Total ion chromatograph of fatty acid methyl esters

Table 2 Fatty acid composition of GSL-1 and -2

Fatty acid	<i>Grifola frondosa</i>		<i>Flammulina velutipes</i>		
	Crude lipid	SGL-1	Crude lipid	SGL-1	SGL-2
C12:0	-	-	t	-	-
C14:0	t	t	3.1	1.0	7.2
C15:0	13.2	t	1.5	t	3.2
C16:0	16.2	3.5	23.6	3.3	46.6
<i>cis</i> C16:1 ⁹	2.4	-	2.8	-	3.5
C18:0	t	2.5	3.6	2.7	28.0
<i>cis</i> C18:1 ⁹	28.4	9.2	10.3	7.6	11.6
C18:2	35.8	-	50.2	-	-
2-OH C14:0	t	t	-	-	-
2-OH C16:0	2.2	73.8	3.9	81.4	-
2-OH C18:0	t	10.7	t	3.5	-

(t<1%)

Table 3 Long-chain base composition of GSL-1

Long-chain base	<i>Grifola frondosa</i>		<i>Flammulina velutipes</i>	
	Crude lipid	SGL-1	Crude lipid	SGL-1
C18:1	7.3	15.8	8.8	35.3
C18:0	4.8	3.6	5.8	2.5
C20:1	87.9	80.6	85.4	62.2

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 の強アルカリ加水分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 C 16:0 が検出された (Fig. 2)。また、長鎖塩基として C18:1 と C20:1 の sphingenine が検出された (Table 2, 3)。

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

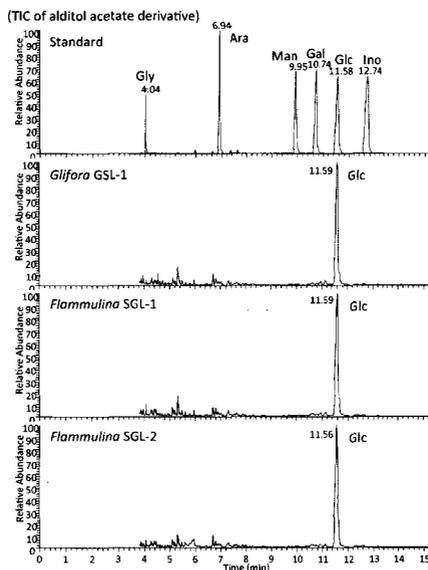


Fig. 3 Sugar species of GSL-1 and -2
 Gly, glycerol ; Ara, arabinose ; Man, mannose ;
 Gal, galactose ; Glc, glucose ; Ino, *myo*-inositol

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 (Fig. 3)。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 (Fig. 4)。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. 5)。以上の結果から、GSL-1 は C20:1 の sphingine、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

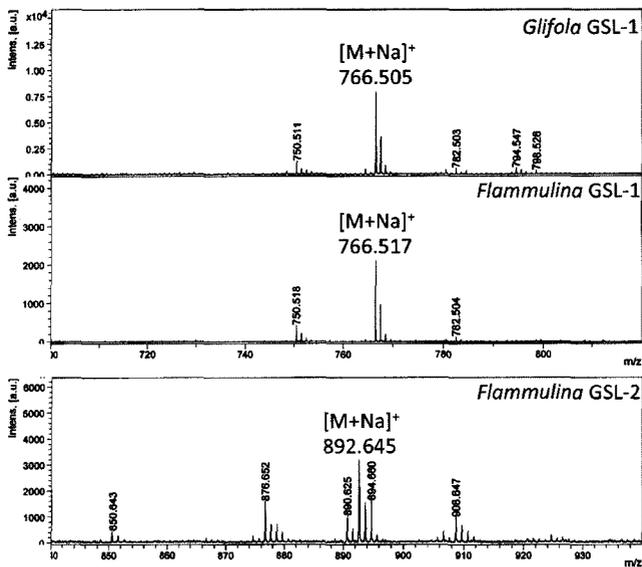


Fig. 4 MALDI/TOF MS spectra of GSL-1 and -2

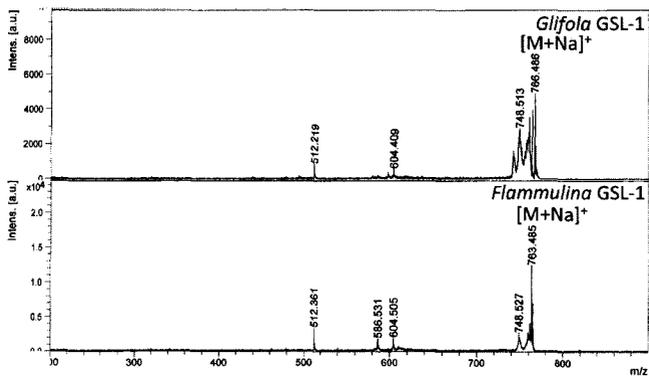
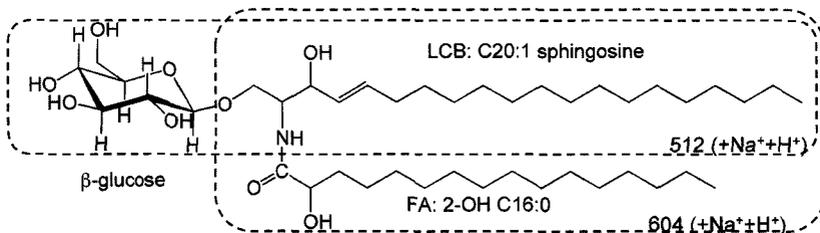


Fig. 5 MALDI-TOF MS/MS spectra of GSL-1

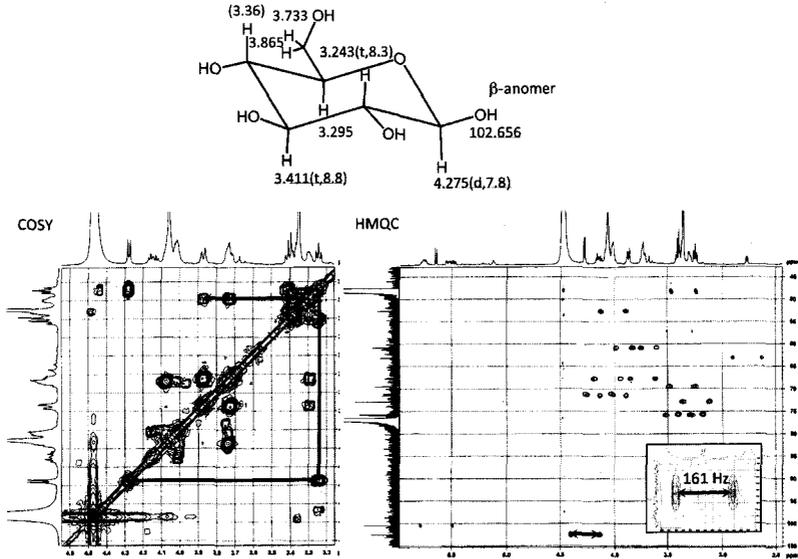


Fig. 6 COSY and HMQC spectra of *Grifora* GSL-1

Table 4 NMR analysis of anomeric regions of GSL-1

sample		¹ H		¹³ C		anomer
		ppm	<i>J</i> _{1,2} (Hz)	ppm	<i>J</i> _{C,H} (Hz)	
Grifola frondosa	GSL-1	4.275	7.8	102.656	157.0	β
Flammulina velutipes	GSL-1	4.277	7.8	102.680	161.0	β

157.0, 161.0 Hz であり、マイタケ、エノキタケの GSL-1 は β アノマー体であることが明らかとなった (Fig. 6, Table 4)。

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-β(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 R_f 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 と比較して

標記したが、構造の同定までは未だ至っていない。しかしながら、担子菌間で **GSL** の分布に違いがあることが示唆され、他の食用キノコについても **GSL** の偏在性を今後検討したい。

キノコの子実体に含まれる **GSL** を始めとする糖脂質は細胞分化の結果として発現するだけでなく細胞分化能を有すると考えられる^{4,5)}。キノコでは子実体型性能を有することに加え、これらの糖脂質が生体内でどのような働きを持っているのか興味深く、現在、生理活性についても解析中である。

本研究の成果は、食用キノコ本来の栄養素や視・聴・嗅（きゅう）・味・触の五感を満足させる効果に加え、健康維持、増進といった第三次機能を有することを示唆するものであった。今後科学的に評価することにより、食文化におけるキノコの差別化を可能にすると考えられた。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省学術研究助成基金助成金により実施した。

文献

- 1) Borchers, A. T., A. Krishnamurthy, C. L. Keen, F. J. Meyers, and M. E. Gershwin. 2008. The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med* (Maywood) **233** : 259–276.
- 2) Bendelac, A., P. B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25** : 297–336.
- 3) Harris, S. P., N. Fujiwara, R. H. Mealey, D. C. Alperin, T. Naka, R. Goda, and S. A. Hines. 2010. Identification of *Rhodococcus equi* lipids recognized by host cytotoxic T lymphocytes. *Microbiology* **156** : 1836–1847.
- 4) Mizuno, S., I. Tomiyasu, K. Kobayashi, J. Odachi, K. Ooshiba, A. Tanaka. 1995. 「Structure of glycolipids from various *Basidiomycotina*」 *Soai Collge.* **42** : 63–69.
- 5) Kawai, G. 1989. Molecular species of cerebrosides in fruiting bodies of *Lentinus edodes* and their biological activity. *Biochim Biophys Acta* **1001** : 185–190.
- 6) Folch, J., M. Lees, and G. H. Stanley. 1959. A simple procedure for the preparation of brain sulphatides. *J Biol Chem* **226** : 497–509.

- 7) Naka, T., N. Fujiwara, I. Yano, S. Maeda, M. Doe, M. Minamino, N. Ikeda, Y. Kato, K. Watabe, Y. Kumazawa, I. Tomiyasu, and K. Kobayashi. 2003. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. *Biochim Biophys Acta* **1635** : 83–92.
- 8) Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, K. Kobayashi, Y. Kato, and I. Yano. 2000. A novel sphingoglycolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of *Sphingomonas yanoikuyae*. *J Bacteriol* **182** : 2660–2663.
- 9) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. The structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol* **193** : 5766–5773.
- 10) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol* **190** : 3613–3621.