

ハクレイタケ由来酸性糖脂質の構造解析

Structural characterization of acidic glycolipids from edible mushroom, *Pleurotus nebrodunsis*○吉永和矢¹, 上野弘樹², 上宮悠³, 鈴木佑典⁴, 櫛泰典⁴*Kazuya Yoshinaga¹, Hiroki Ueno², Hisashi Kamimiya³, Yusuke Suzuki⁴, Yasunori Kushi⁴

Abstract: Recently, We knows that Glycoconjugates on plasma membrane concern various biological phenomenon. In addition to the established structural analyses of mammalian glycopingolipids, physiological functions and the biosynthetic pathway of glycolipid expressed such as in a basidiomycete species are relatively poorly understand. As one of the approaches for understanding, we focused the detailed structural elucidation of glycosylinositorlphosphoceramides (GIPC) in a basidiomycete using several analytical methods including mass spectrometry and NMR spectroscopy. It has been reported that these glycolipids have very unique sugar chains structures and are able to modulate immune function such as promoting induction of cytokine and activity of NKT cells by co-cultured with spleen cells of mice and GIPCs in *Pleurotus eryngii*. The purpose of the study is to elucidate the detailed glycolipid structure in *Pleurotus nebrodunsis* and to survey the biological functions.

1. 緒言

近年, 細胞膜上に存在する蛋白質と脂質に糖鎖が付加した複合糖質が様々な生命現象に関与していることが知られている. その中で, 哺乳動物に発現する糖脂質の生合成経路や生理的機能はほとんど解明されつつあるが, 担子菌などに含まれる糖脂質の生合成経路や生理的機能についてはほとんど解明されていない. しかしながら, 担子菌などに含まれる糖イノシトールリン酸セラミド(GIPC)は非常に独特な糖鎖構造を有しており, ヒラタケ属のエリンギ(*Pleurotus eryngii*)に含まれる GIPC を α -ガラクトシルセラミドと共にマウスの脾細胞と共培養すると NKT 細胞の活性やサイトカインの誘導促進といった免疫機能を調節できることなどが報告されており, 食用キノコは健康食品としても着目されている. そこで, 我々は担子菌に含まれる糖脂質の生合成経路の解明や担子菌由来 GIPC の活用を目的として, ヒラタケ属の一種であるハクレイタケ(*Pleurotus nebrodunsis*)に含まれる糖脂質の構造解析を行っている.

2. 実験方法

2. 1. ハクレイタケから酸性糖脂質の分離

ハクレイタケ 6kg からクロロホルムおよびメタノールを用いて脂質を抽出した. 得られた脂質を弱アルカリ処理し, DEAE-Sephadex A-25 を用いて中性糖脂質と酸性糖脂質に分離した.

2. 2. 酸性糖脂質の精製

得られた酸性糖脂質をイアトロビーズを用いてクロロホルム/メタノール/水の濃度勾配法で各酸性糖脂質

を精製した.

2. 3. 酸性糖脂質の構造解析

精製した各酸性糖脂質を MALDI-TOF/MS, ¹H-NMR, GC-MS を用いて糖鎖およびセラミドの構造解析を行った.

3. 結果・考察

ハクレイタケから数種の酸性糖脂質(AGL1~5)を精製することができた(Figure. 1).

これらの酸性糖脂質は MALDI-TOF/MS により, 1~5 糖を有する GIPC であることとセラミドの主成分が h18:0 と t18:0, h22:0 と t18:0, h24:0 と t18:0 であることが推定され(Figure. 2, Table. 1), GC-MS によって同定できた. また, ¹H-NMR によって, AGL1 はマンノース(Man) α を有する GIPC, AGL-5 は 3 種のガラクトース(Gal) α とフコース(Fuc) α と Mana を有する GIPC であることが分かった.

本研究の結果と既報告の担子菌の文献と比較すると, ハクレイタケのセラミドの主成分は異種であるシメジ科シロタモキタケ属のブナシメジ(*Hypsizygus marmoreus*)に類似していることが分かり, 各 GIPC の含量と構成糖は同種であるヒラタケ科ヒラタケ属のエリンギ(*Pleurotus eryngii*)およびオオヒラタケ(*Pleurotus cystidiosus*)に類似していることが分かった. これらの知見により, 同じヒラタケ属でも含まれる GIPC の構成が異なることが分かった. この違いがヒラタケ属の担子菌にどのような影響を与えているか定かではないが, 今後の NKT 細胞への応用に違いが表れる可能性があるかもしれない.

4. 参考文献

1 : 日大理工・院(前)・応化 2 : 日大理工・学部・応化 3 : 日大理工・院(後)・応化 4 : 日大理工・教員・応化

[1] S. Itonori, *et al.* Structural characterization of glycosylinositolphospholipids with a blood group type B sugar unit from the edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*, *Glycobiology*, **18**, 540-548 (2008)

[2] H.Nozaki, *et al.*, Mushroom acidic glycosphingolipid induction of cytokine secretion from murine T cells and proliferation of NK1.1 a/b TCR-double, positive cells in vitro, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **373**, 435-439 (2008)

[3] S. Itonori, *et al.*, 食用キノコのスフィンゴ脂質—Ⅲ. オオヒラタケ *Pleurotus cystidiosus* のマイコグリコリピドにおけるヒラタケ属共通の多分岐型糖鎖構造—, 滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **57**, 1-21(2007)

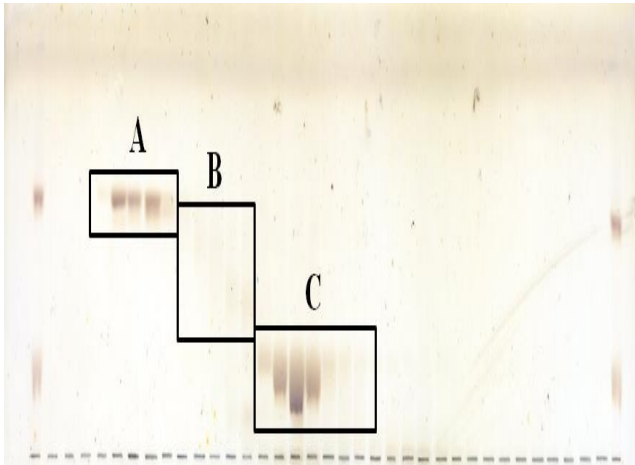


Figure 1. Thin layer chromatograms of the mycoglycolipids isolated from *Pleurotus nebrodunsis*.

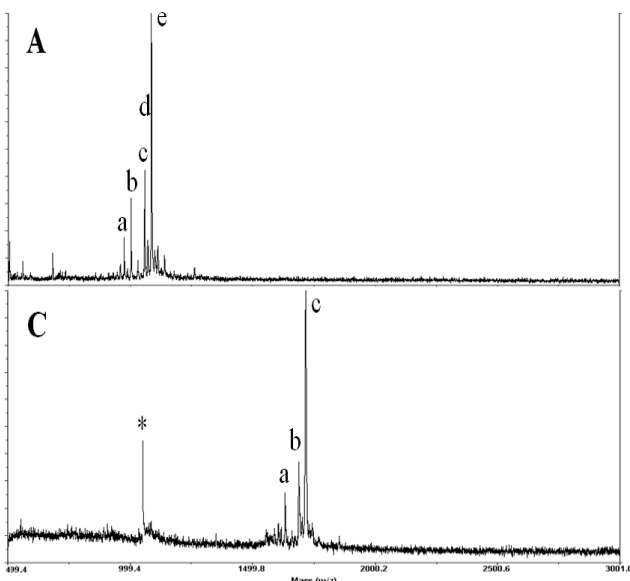


Figure 2. Negative-ion reflector mode MALDI-TOF MS spectra of AGL1 and AGL5.

Table 1. Estimation of composition of ceramide in *Pleurotus nebrodunsis* by MALDI-TOF MS.

| A | [M-H] ⁻ ion at m/z | Fatty acid | Sphingoid |
|---|-------------------------------|------------|-----------|
| a | 973.41 | h16:0 | t18:0 |
| b | 1001.38 | h18:0 | t18:0 |
| c | 1057.34 | h22:0 | t18:0 |
| d | 1084.34 | h24:1 | t18:0 |
| e | 1085.43 | h24:0 | t18:0 |
| C | [M-H] ⁻ ion at m/z | Fatty acid | Sphingoid |
| a | 1633.30 | h18:0 | t18:0 |
| b | 1689.27 | h22:0 | t18:0 |
| c | 1717.35 | h24:0 | t18:0 |

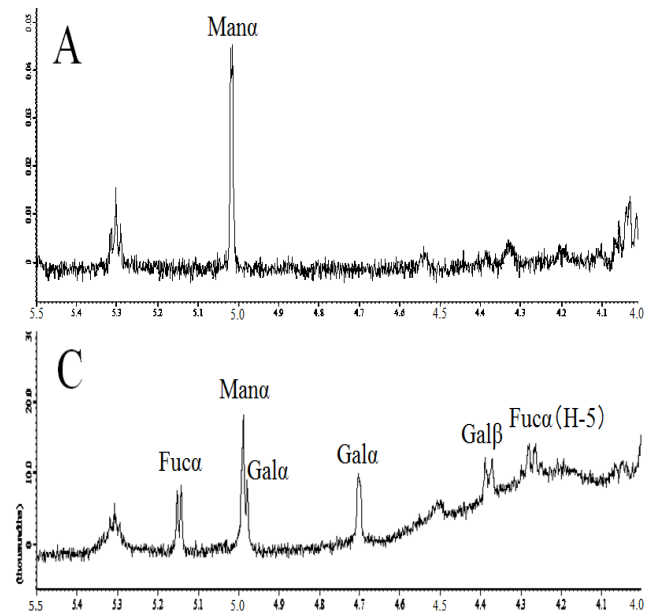


Figure 3. Anomeric proton regions of the ¹H-NMR spectra.