

S3-9

NKT 細胞活性化能を有する発酵食品及び天然物の探索と化学構造解析
Investigation and chemical characterization of traditional fermented foods and natural products with the ability of Natural Killer T cell activation

○榎泰典¹Yasunori kushi¹

Abstract: Natural killer T (NKT) cells recognize CD1d loaded with glycosphingolipid (GSL) antigens. After being stimulated by glycolipid antigens, NKT cells immediately secrete cytokines. Variety of cytokines release from these cells are able to promote immunoresponses against tumors, microbial infections, and regulate autoimmune responses. The fungi glycolipids are exogenous antigens for NKT cells, therefore, we focused and investigated fungi GSLs, and analyzed the chemical structures as ligands including fermented products. The results obtained here are expected to become one of the candidates of functional foods or materials of medicine. The study has mostly been done with some co-workers in our department as the project research.

はじめに

免疫系を構成する第 4 のリンパ球として知られている ナチュラルキラー T 細胞 (NKT 細胞) の多様な機能の解析ツールとして、この細胞の活性化の代表的なリガンドである α ガラクトシルセラミド (α -GalCer) が知られている (図-1)。本研究は、新たな NKT 細胞の活性化能を有する物質 (リガンド) を食品 (日常食品、発酵食品および食用キノコ類等の天然物) 中から見だし、得られた結果を最終的に機能性食品や医薬品開発に寄与することを目的とするプロジェクト研究である。即ち、日常的に摂取する発酵食品や伝統食、或は天然物中に NKT 細胞を直接刺激するリガンドの探索・解析を分担研究者と共に行った。

結果、

1. 候補天然物の入手→おおひらだけ及びエリンギと種類の類似しているハクレイタケから酸性糖脂質を精製し、構造解析を行なった。また、分担者が各種の微生物由来の候補を提供してくれ、その培養と候補物質の入手を行なった。
2. 候補天然物の粗脂質画分を用いた、簡便 (抗体) アッセイ法による α -GalCer と類似するリガンド能の確認→キノコ類由来の酸性糖脂質の構造はほぼ α -GalCer と非還元末端の構造が類似しており、抗体を使用しないでアッセイが可能であった。しかしながら今後の検討事項として類似候補の解析のために、抗体を作成する予定である。
3. 活性画分を用いた細胞レベルでの検討、サイトカイン分泌等の検討→ハクレイタケから酸性糖脂質

を精製し、解析にメンドがついた段階で着手する。サイトカイン定量のための ELISA キットは既に入っており、報告している系を用いて十分に使用できる。また、より微量化を目指した RT-PCR の系を現在構築している。

4. *in vivo* 及び *in vitro* アッセイで有効性が確認されたものから、リガンドの大量調製→1 及び 2 の系が既に達成度 80% 以上で行なわれているので、大量調製が現在進行している。

考察及び検討事項

ハクレイタケから酸性糖脂質の精製を行ない、構造解析を行った。既に確立した精製方法と決定した分析方法でイノシトール含有酸性糖脂質の構造と構造相関性についての結論が出つつある。今まで報告している食用きのこ由来のものとの比較検討が今後の課題とかる。とくに糖鎖構造の類似性が確認されているが、脂質部分の比較検討が NKT 活性とどのように関わるか興味を持たれる。

本研究は健康維持のための食事と免疫学との接点の視点から非常に独創的であり、学術的に高い意味を有している。更に、得られた研究成果は NKT 細胞の活性化能を多く含む健康食品の開発或はそれらの医薬品化へと発展的応用が期待でき、社会的にも大きな意味を有すると考えられる。また分担研究者とともに集めた試料はまだ解析や精製が不十分な物が存在するが、今後の継続的な研究と発展的な共同研究に結びつけたいと考えている。

参考論文

1: 日大理工・教員・応化

1. Nozaki, H., Yanagida, M., Fukui, H., Koide, K., Shiotani, K., Kobayashi, Y., Watarai, S., Nakamura, K., and Kushi, Y. Monoclonal antibodies specific to lacto-neotriaoacylceramide and its characterization. *Glycobiology* 20(2), 1631-1642 (2010)
2. 野崎浩文、櫛泰典 (株式会社) シーエムシー出版; 大野尚人監修: β -グルカンの基礎と応用、食用キノコ由来の糖脂質構造と食品の機能性 第 10 章、ページ、107-118、(2010)
3. Nozaki, H., Itonori, S., Sugita, M., Nakamura, K., Ohba, K., Ohnishi, M., Imai, K., Igarashi, Y., Suzuki, A., and Kushi, Y. Invariant V α 14 natural killer T cell activation by edible mushroom acidic glycosphingolipids *Biol. Pharm. Bull.* 33(4), 580-584(2010)
4. Kushi, Y., Kamimiya, H., Hiratsuka, H., Nozaki, H., Fukui, H., Yanagida, M., Hashimoto, M., Nakamura, K., Watarai, S., Kasama, T., Kajiwarra, H., and Yamamoto, T. Sialyltransferases of marine bacteria efficiently utilize glycosphingolipid substrates *Glycobiology* 20(2), 187-198 (2010)
5. Nozaki, H., Itonori, S., Sugita, M., Nakamura, K., Ohba, K., Suzuki, A., and Kushi, Y. Mushroom acidic glycosphingolipid induction of cytokine secretion from murine T cells and proliferation of NK1.1 α/β TCR-double positive cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 435-439, (2008)
6. Kamimiya, H., Suzuki, Y., Mathew, A., Kabayama, K., Kojima, H. and Kushi, Y. Simple and rapid removal of the interference in gangliosides extracted from high performance thin-layer chromatography (HPTLC) spot on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis. *Analytical Methods in press*
7. Nozaki, H., Itonori, S., and Kushi, Y. Biological effects of acidic inositolphosphate-containing glycosphingolipids using NKT cells *submitted*
8. Kushi, Y., *et al.* IL-4 secretion by inositolphosphate-containing glycosphingolipids using NKT cells is dependent on the ceramide composition of edible mushroom acidic glycosphingolipids. *in preparation*
9. M. Ukiya, S. Sawada, T. Kikuchi, Y. Kushi, M. Fukatsu, T. Akihisa, Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines, *Chem. Biodiversity*, 10(2) 177-188 (2013).
10. M. Ukiya, M., Kawaguchi, T., Ishii, K., Ogihara, E., Tachi, Y., Kurita, M., Ezaki, Y., Fukatsu, M., Kushi, Y., and Akihisa, T. Cytotoxic activities of amino acid-conjugate derivatives of abietane-type diterpenoids against human cancer cell lines *Chemistry and Biodiversity* 10, 126-1268 (2013)
11. T. Akihisa, T. Motoi, A. Seki, T. Kikuchi, M. Fukatsu, H. Tokuda, N. Suzuki, Y. Kimura, Cytotoxic activities and anti-tumor-promoting effects of microbial transformation products of prenylated chalcones from *angelica keiskei*, *Chem. Biodiversity*, 9(2) 318-330 (2012).
12. T. Akihisa, S. Tochizawa, N. Takahashi, A. Yamamoto, J. Zhang, T. Kikuchi, M. Fukatsu, H. Tokuda, N. Suzuki, Melanogenesis-inhibitory saccharide fatty acid esters and other constituents of the fruits of *morinda citrifolia* (Noni), *Chem. Biodiversity*, 9(6) 1172-1187 (2012).
13. T. Akihisa, K. Watanabe, A. Yamamoto, J. Zhang, M. Matsumoto, M. Fukatsu, Melanogenesis inhibitory activity of monoterpene glycosides from *Gardeniae Fructus*, *Chem. Biodiversity*, 9(8) 1490-1499 (2012).
14. T. Akihisa, X. Pan, Y. Nakamura, T. Kikuchi, N. Takahashi, M. Matsumoto, E. Ogihara, M. Fukatsu, K. Koike, H. Tokuda, Limonoids from the fruits of *Melia azedarach* and their cytotoxic activities, *Phytochemistry*, 89 59-70(2013).

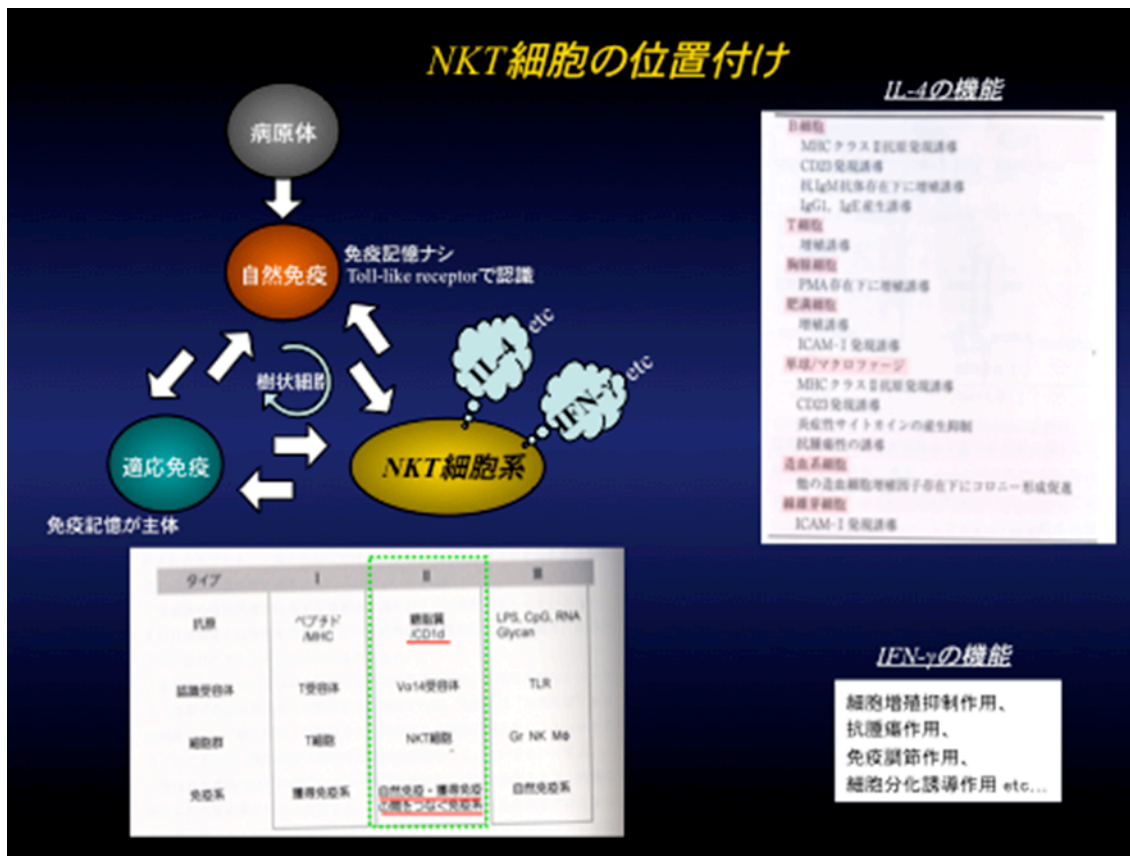


図-1 NKT細胞の位置付けとリガンド