

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590004

研究課題名（和文） 急性脳症を誘発するスギヒラタケの脳症起因物質の探索

研究課題名（英文） Study of encephalopathy inducing constituent in *Pleurocybella porrigens*

研究代表者 太田 富久 (OHTA TOMIHISA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：50108560

研究成果の概要:本研究はスギヒラタケ脳症が複数の毒性原因に基づくと仮定して検証を進め、これまでに得られた内臓障害性および炎症性を示すペプチジルポリシアル酸類縁体の精製と構造解析の結果、スギヒラタケの糖タンパクには、ヒト体内で抗原性を示す *N*-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) が特異的に含まれていることを明らかにし、スギヒラタケ脳症への関与を示唆した。一方、腸管上皮細胞障害性と神経組織への障害性が考えられる低分子成分であるスフィンゴ糖脂質の絶対構造を決定し化学合成を行った。

研究成果の概要: This study was focused on the supposition that Angel Wing (*Pleurocybella porrigens*) brain disorder was based on plural toxic causes. The refinement and the structural analysis of the peptidyl polysialic analogues having internal organs disorder characteristics and inflammatory nature showed that *N*-glycolyl neuraminic acid (NeuGc) indicating the antigenicity was specifically included in the glycoprotein of the Angel Wing. On the other hand, the structure of sphingoglycolipid A was determined and synthesized. Sphingoglycolipid A was presumed on impaired characteristics to the nervous system and intestinal epithelia.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生薬学・天然物化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

2004年、東北、北陸の日本海沿岸地域において急性脳症患者が多数発生し、同年中に19

名の死者と59名の脳症患者が報告された。患者の多くはスギヒラタケを食べから1週間以上の潜伏期があり、急性脳症の原因は特

定されていない。スギヒラタケ脳症に関する成分探索の結果、細胞毒性成分として不飽和脂肪酸誘導体のほか、水溶性エキスが溶血と致死を誘発する毒性を持ち、高分子成分の関与が報告されているが、いずれも脳症との直接的な因果関係は不明のままであった。

2007年10月にも脳症患者が発生ことから、スギヒラタケ脳症は2004年に突発的に発生したものではなく、スギヒラタケが本質的に持っている有害性成分にもとづくものであると考えるに至り、これまでの成果を発展させるべく本研究を応募するに至った。

2. 研究の目的

スギヒラタケ脳症の原因の一つとして内臓障害を想定して研究を進めた結果、細胞障害性を示す低分子成分及びペプチドグリカン様高分子を含むフラクションを得た。高分子フラクションは単球系血球を活性化して免疫反応の誘導を示した。細胞障害性を示したペプチドグリカン様高分子画分を一部精製して糖残基の解析を行った結果、これらの高分子はペプチドグリカンの中でもペプチジルポリシアル酸と推定された。ポリシアル酸は脳・神経系における局在が知られている。

本研究においてはCaco-2細胞障害性低分子の化学構造を、分光学的及び化学合成的手法により解明することを目指した。また、スギヒラタケ脳症の起因物質と仮定したペプチドグリカン様高分子の精製を行い、ペプチドグリカンの構成糖の違いを明確にし、ペプチジルポリシアル酸としての脳症との関連性を検討した。

3. 研究の方法

(1) Caco-2細胞障害性低分子物質の絶対構造

低分子画分から単離された2種のCaco-2障害性物質のうち一方のCaco-2障害性物質はこれまでの解析からスフィンゴ糖脂質と考えられるので、スペクトロメトリーによる解析に必要な重量の確保を行うとともに、立体構造の決定を試みた。続いて、スフィンゴ糖脂質の合成を試みた。まず、荻野らのセラミド合成法を参考にスフィンゴシン鎖から合成をはじめ、ヒドロキシ脂肪酸誘導体を合成し、スフィンゴ鎖の合成が完了したらグリコシル化を行い、スフィンゴ糖脂質の合成を試みた。

(2) スギヒラタケ脳症の起因物質と仮定

したペプチジルポリシアル酸類縁体の精製及び構造解析

1) スギヒラタケエキスの作成、分画

スギヒラタケを冷水(4℃)及び75℃で水抽出し、抽出温度条件の異なる凍結乾燥エキスを得た。エキスは透析により透析外液より低分子及び内液より高分子画分を得た。高分子画分はゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。

2) 高分子画分の分画によるペプチジルポリシアル酸類縁体の精製

小腸膜モデルとして使われているCaco-2細胞障害性を指標としながら、高分子画分をゲル浸透及びイオン交換クロマトグラフィーに付し、細胞障害性を示す画分を得た。

これらの画分について、それぞれタンパク含量を測定し、Laemmli bufferに溶解、熱変成後、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動してバンドを検出、精製度の確認をした。

3) シアル酸残基の変動の解析

これまでの予備試験により、スギヒラタケ脳症が多発した2004年産と、脳症が報告されなかった2005年産のスギヒラタケに含有されるペプチジルポリシアル酸類縁体には、シアル酸残基の種類により量的変動が見いだされているので、ABEE標識分析法を用いてシアル酸の変動を解析した。解析は2段階で行い、まず酵素処理で得られるManNAcとManNGcの比率をHPLCにて解析することによって、N-置換基の種類を決定することができた。

その後、産加水分解、アセチル化後、ManNAcにすることによって、ペプチドグリカンに含有されているシアル酸量を定量した。

(3) 生物活性評価

1) Caco-2細胞障害性

水抽出エキスからペプチジルポリシアル酸類縁体を単離する過程でCaco-2細胞障害性を指標として分画を進めた。

2) 炎症性サイトカイン分泌に対する影響

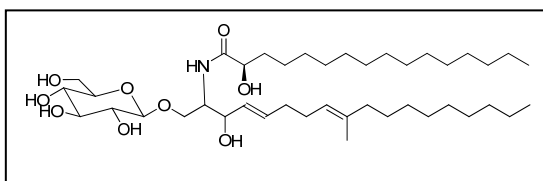
ヒト単球系THP-1細胞を用いて、精製したペプチジルポリシアル酸類縁体の炎症性サイトカイン分泌に対する影響を調べた。

4. 研究成果

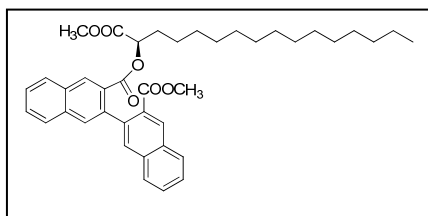
(1) Caco-2細胞障害性低分子物質の絶対構造

スギヒラタケ 1.8 kg をメタノールにて

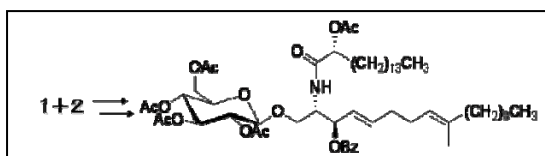
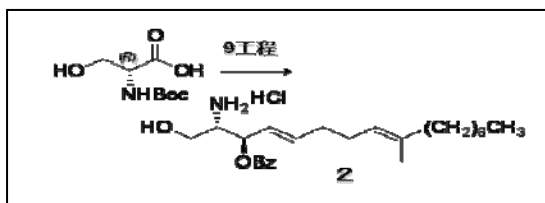
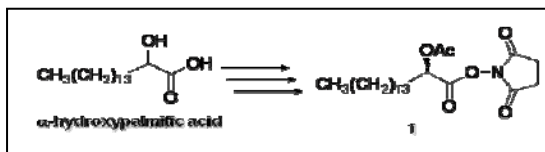
抽出し、各種クロマトグラフィーを用いて分画することにより 19 mg のスフィンゴ糖脂質 sphingoglycolipid A を単離した。このスフィンゴ糖脂質を分光学的手法を用いて解析し、化学構造を決定した。



Sphingoglycolipid A を塩酸メタノールにて加水分解後メチル化し、 α -ヒドロキシパルミチン酸メチルエステルを得た。続いてこのものを誘導体化後 CD 励起子キラリティー法を用いて解析し、C-2' 位は *R* 配置を持つことを明らかにした。



Sphingoglycolipid A の全合成は α -ヒドロキシパルミチン酸誘導体とジエン構造の sphingadienine 誘導体をそれぞれ合成し、アミド化によるカップリングによりスフィンゴ脂質を合成した後にグリコシル化を行った。



(2) スギヒラタケ脳症の起因物質と仮定したペプチジルポリシアル酸類縁体の精製及び構造解析

1) スギヒラタケエキスの作成、分画

スギヒラタケを水抽出し、抽出温度条件の異なる凍結乾燥エキスを得た。エキスは透析により低分子及び高分子画分を得た。高分子画分はゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。

2) 高分子画分の分画によるペプチジルポリシアル酸類縁体の精製

小腸膜モデルとして使われている Caco-2 細胞障害性を指標としながら、高分子画分をゲル浸透及びイオン交換クロマトグラフィーに付し、細胞障害性を示す画分を得た。同フラクションには 50-75 kDa のバンドが検出され、このバンドは細胞毒性を示さないフラクションには存在しなかった。

3) シアル酸残基の変動の解析

まず、ペプチドグリカンの糖とタンパク含有率の分析を行ったところ、脳症が多発した 2004 年と脳症の報告例がない 2005 年では糖含有率は大きな変化がなく、タンパク含有率に約 5% の違いが認められた。

スギヒラタケ年度別画分の糖含有率

採取年度	抽出温度(°C)	画分	糖含有率 (%)
2004	90	1b	90.0
		1c	42.0
2005	90	2b	88.0
		2c	36.8
2006	90	3b	88.4
		3c	66.2
2007	90	4b	92.6
		4c	45.2
2004	4	5b	60.0
		5c	41.0
2005	4	6b	52.9
		6c	52.7

糖含有率はフェノール硫酸法により測定

次に、糖組成解析のための HPLC 条件を決定し、各フラクションについて NeuGc 及び NeuAc の比率を HPLC にて決定した。

NeuGc 及び NeuAc は *N*-neur-aminic acid aldolase によりそれぞれ ManNgc 及び ManNac とし、ABEE 標識化処理により標識化した後 HRFABMS を測定した。その結果、スギヒラタケの高分子画分には、Gal や Man などに比べてシアル酸が豊富に含まれることが判明した。特に 2004 年採取のスギヒラタケ由来の Fr. 1b, Fr. 1c, Fr. 5b, Fr. 5c には NeuGc

と NeuAc が含まれていることがわかった。また 2007 年採取のズギヒラタケ由来の Fr. 4b および Fr. 4c には NeuGc が豊富に含まれていることが確認された。一方、急性脳症の発生が報告されていない 2005 年～2006 年採取のズギヒラタケ由来の Fr. 2b、Fr. 2c、Fr. 3b、Fr. 3c、Fr. 6b、Fr. 6c においては NeuAc の含有量が NeuGc の数倍～数十倍になることがわかった。

(3) 生物活性評価

1) Caco-2 細胞障害性

Sphingoglycolipid A は Caco-2 細胞に対して中程度の細胞障害性を示した。

Caco 2 細胞に対する細胞毒性

サンプル	IC ₅₀ (μg/mL)
MeOH エキス	≥100
EtOAc 画分	≥100
水画分	≥100
sphingoglycolipid A	3.7

2) 炎症性サイトカイン分泌に対する影響

ヒト単球系 THP-1 細胞を用いて、ズギヒラタケエキス及び精製したペプチジルポリシアル酸類縁体の炎症性サイトカイン分泌に対する影響を調べた。

まずは 100・g/mL の濃度のズギヒラタケエキスを THP-1 に作用させ、24 時間毎に 96 時間目まで経時的に培養液上清を回収してサイトカイン産生量を測定した。この結果、IL-1・産生は水エキスの添加から 72 時間後にプラトーに達し、TNF-・は培養開始から 96 時間目まで増加し続けた。また、ズギヒラタケの水エキス濃度を 1～200 mg/mL に分けて細胞に添加したところ、濃度依存的に 2 種のサイトカイン産生は増加した。ズギヒラタケ水抽出エキスによる THP-1 細胞刺激では、IL-1・よりも TNF-・のほうが常に高く分泌された。

次に、シアル酸 NeuAc および NeuGc の THP-1 細胞における炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。

1～200 mg/mL の濃度の NeuAc と NeuGc を PMA で分化誘導した THP-1 細胞に NeuGc と NeuAc をそれぞれ作用させた結果、IL-1・および TNF-・ともに濃度依存的な産生量増加が認められた。NeuAc および NeuGc のサイトカイン産生に及ぼす影響について比較した場合、同じ濃度における

NeuAc のほうが NeuGc よりも IL-1・において 2 倍、TNF-・において 1.4 倍強いことが判った。

シアル酸については NeuGc のみでなく *N*-acetyl neuraminic acid (NeuAc) も PMA 刺激によりマクロファージ様に分化させた THP-1 においてサイトカイン産生増強活性を示したことから、ズギヒラタケ中毒および関連脳症の発症において、ズギヒラタケに含まれるシアル酸成分を毒性の原因物質と結論し、シアル酸を含む高分子成分の血液へのリークに起因する非特異的炎症応答によって敗血症型の脳症が誘発されると推定した。以上、高分子成分が脳症発症の原因となっていると考えると発症メカニズムが合理的に説明できると考えられる。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T. Takata, T. Hasegawa, T. Tatsuno, J. Date, Y. Ishigaki, Y. Nakamura, N. Tomosugid, F. Takano, T. Ohta, *J. Health Science*, **55** (2009), 373-379, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① J. Date, T. Takata, T. Tatsuno, Y. Ishigaki, F. Takano, T. Ohta, *N*-glycoryl neuraminic acid from edible/toxic mushroom *Pleurocybella porrigens*, *The 4th KSP-JSP-CCTNM Joint Symposium on Pharmacognosy*, 2008. 6. 18, KAIST (Kore)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 富久 (OHTA TOMIHISA)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：50108560

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし