

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04488

研究課題名(和文) 真核微生物のステリルグルコシド代謝とその生理機能

研究課題名(英文) Sterylglucoside metabolism of eucaryotic microbes

研究代表者

伊東 信 (Ito, Makoto)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40253512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* のエルゴステリルグルコシド(EG)合成酵素遺伝子を2つ同定し、それぞれの遺伝子欠損株、両遺伝子二重欠損株を作製した。欠損変異株の解析からEG合成は *C. neoformans* の熱ストレス耐性に重要であり、欠損させるとマウス体内での生存率低下と著しいマウス殺傷性の低下が観察された。一方、海洋真核生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* では、様々なステロールにグルコースが結合したステリルグルコシド(SG)、およびSGのグルコースにDHAが結合した新規な糖脂質アシルステリルグルコシドが合成されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We identified two ergosteryl glucoside (EG) synthase genes of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, and generated each gene-deficient mutant and both genes double-deficient mutants. Analyses of the defective mutants showed that EG synthesis is important for the heat stress tolerance of *C. neoformans*, thereby it relates to the survival in the mouse and its pathogenicity for mouse. On the other hand, we found that marine eukaryotic microbe *Aurantiochytrium limacinum* synthesizes various steryl glucosides (SGs) in which glucose is bound to various sterols. Furthermore, we identified a novel acyl steryl glucoside in which DHA is bound to glucose of SG in *A. limacinum*.

研究分野：応用生物学

キーワード：糖脂質 代謝 病原性真菌 海洋性真核生物 ステリルグルコシド アシルステリルグルコシド

1. 研究開始当初の背景

ステリルグルコシド (SG、ステロール骨格にグルコースが結合した糖脂質の総称) は、真核微生物からヒトまで生物界に広く存在する糖脂質である。SG は熱ショック等により出現するので、ストレス応答糖脂質としても注目されている (Kunimoto et al. Cell Struct Funct, 2002)。真核微生物の SG 合成酵素として *Saccharomyces cerevisiae* の UGT51、*Pichia pastoris* の Atg26 が同定されおり (Warnecke et al. JBC, 1999)、Atg26 は液胞におけるペルオキシソームの分解に関与していることが示唆されている (Oku et al. EMBO J, 2003)。一方、SG 分解酵素は、本報告者の伊東らによって病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* で初めて同定されたが、その構造、生理機能、病原性との関わり等に関しては不明な点が多く残されている。さらに、EGCrP2 は *C. neoformans* 以外の病原性真菌にも存在することが明らかになっており、その阻害剤は新しい抗真菌薬としても期待される。また、*C. neoformans* や油糧微生物ラビリンチュラ類の SGS 合成酵素も未同定であり、SGS 代謝の全貌とその生物学的意義の解明が望まれている。

2. 研究の目的

SG は真核微生物に広く存在する糖脂質で、ストレス応答分子としても知られる。*C. neoformans* や出芽酵母では、エルゴステロールにグルコースが結合したエルゴステリルグルコシド (EG) が主要な SG である。一方、ラビリンチュラ類ではグルコースに様々なステロールが結合した SG が存在する。本研究では *C. neoformans* の EG 分解酵素である EGCrP2 の構造と触媒機構を明らかにし、その阻害剤の開発を目指すとともに、EGCrP2 の生理機能を解明する。また、*C. neoformans* およびラビリンチュラ類の SG 合成酵素遺伝子をクローニングしその諸性質を明らかにするとともに、それぞれの欠損株を作製して生理機能を解明する。本研究では、SG の代謝と機能を明らかにすることを目的として、SG 分解酵素と合成酵素の機能を分子、細胞、個体レベルで解析する。

3. 研究の方法

SG は真核微生物に広く存在する。本研究では、病原性真菌 *Cryptococcus neoformans*、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および油糧微生物 *Aurantiochytrium limacinum* を主な研究対象とした。SG 分解酵素 (EGCrP2) および SG 合成酵素 (SGS1, 2) 遺伝子は対象生物の cDNA またはゲノム DNA からクローニングし、大腸菌または出芽酵母で発現させ、リコンビナント酵素を得た。EGCrP2 のリコンビナント酵素を用いたハンギングドロップ法で結晶を作製し、X 線結晶解析に

供試した。それぞれの代謝酵素の生理機能を明らかにするために、抗生物質耐性遺伝子をマーカーとした相同組換え法によりそれぞれの遺伝子の欠損株を取得した。*C. neoformans* の病原性は、C57BL/6J マウス (5 週齢、メス) を用いた感染実験で調べた。

4. 研究成果

EGCrP2 の構造解析

EGCrP2 の結晶を得ることに成功し、X 線結晶構造解析を実施した結果、EGCrP2 の基質結合クレフトはグルコース 1 分子とステロール 1 分子がタイトに挿入される構造であることが分かった。また、E270 が酸塩基触媒残基、E520 が求核触媒残基であることが構造からも確かめられた。EGCrP2 の構造が解明されたことで in silico での阻害剤開発が可能になり、ハイスループットスクリーニングで得られた EGCrP2 阻害剤が酵素とどのように相互作用するかを調べることができた。

EGCrP2 の生理機能解析

C. neoformans の EGCrP2 欠損株 (EGCrP2 KO) は、野生株と比較して対数増殖期以降の増殖が抑制される。この要因の 1 つは、液胞へのエルゴステリルグルコシド (EG) の蓄積だと考えられる。EG が蓄積することで、*C. neoformans* の液胞の肥大化が観察された。この分子メカニズムを明らかにするために、出芽酵母において EGCrP2 のホモログ Egh1 をクローニングし、その欠損株を作製した。Egh1 欠損株においても液胞の異常が観察された。出芽酵母の液胞異常の表現型は、エルゴステロール合成不全株と類似していた。この結果から Egh1 は液胞におけるエルゴステロールの供給に関与している可能性が示された。また、*C. neoformans* の EGCrP2 KO において、EG 以外に新たな糖脂質が蓄積することを見出した。LC-MS 等による解析の結果、本糖脂質は EG のグルコースに脂肪酸が結合したアシル EG (AEG) であることを明らかにした。*C. neoformans* 野生株を C57BL/6J マウスに鼻腔感染させると今回の条件下では約 20 日間でマウスは全滅した。しかし、EGCrP2 欠損株投与群のマウスの生存期間は有意に延長し、感染 3 日目のマウス肺の EGCrP2 KO 株の菌数は野生株と比較して激減していた。

EG と AEG が自然免疫系を賦活化する可能性を調べるために、自然免疫系で駆動する種々の C 型レクチンとの反応性を調べた。その結果、EG、AEG とともに Mincle を活性化することが分かった。その活性化は AEG の方がより強いことも示された。以上の結果は、病原性真菌の EG、AEG が新規の免疫賦活化糖脂質であることを示している。

SGS1, 2 遺伝子のクローニングと機能解析

上記のように EG 分解酵素が欠失すると *C. neoformans* や出芽酵母の液胞形成に異常が見られ、マウス殺傷性の低下が観察された。これは EG の蓄積が原因と考えられる。続いて EG の生理機能を解明するために、EG(SG)合成酵素に関して調べた。出芽酵母の SG 合成酵素のホモログとして、*C. neoformans* から 2 つの SG 合成酵素遺伝子 (SGS1, 2) を単離した。両酵素とも種々のステロールを受容体基質、UDP-グルコースを供与体基質とすることが分かった。CnSGS 1, 2 の二重欠損株は、EG を全く合成しないことが明らかになった。二重欠損株投与群では、80%以上のマウスが 40 日以上生存した。二重欠損株では、熱ストレス負荷時の HSP104 の mRNA の増加量が野生株と比較して有意に低下し、それとともに生存率も低下した。

以上の結果から、EGCrP2 欠損による EG 蓄積だけでなく、EG が欠損すると *C. neoformans* のマウスに対する病原性が大きく損なわれることが明らかになった。つまり、宿主への感染時の熱ストレスに対応するために EG 合成は必要であるが、その後の EGCrP2 による EG の分解は増殖抑制や宿主免疫系からの攻撃を回避し、感染を成立させるために必要なプロセスであることを示唆している。

ラビリンチュラ類 *A. limacinum* の EG 合成酵素を解析し、本遺伝子も熱ストレスによって mRNA レベルで上方制御されることを明らかにした。また、*A. limacinum* から DHA を含む、新規 AEG を見出し、その生産法を開発した (特許出願中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Regulation of TG accumulation and lipid droplet morphology by the novel TLDP1 in *Aurantiochytrium limacinum* F26-b. Watanabe T, Sakiyama R, Iimi Y, Sekine S, Abe E, Nomura KH, Nomura K, Ishibashi Y, Okino N, Hayashi M, Ito M. *Journal Lipid Research*, 58, 2334-2347 (2017) Doi.org/10.1194/jlr.M079897 査読あり
2. Neutral Ceramidase. Tani M, Ito M. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. 1-8 (2016) 査読なし
3. Klotho-Related Protein KLRp: Structure and Functions. Hayashi Y, Ito M. *Vitamins and Hormones*, 101, 1-16 (2016) Doi.org/10.1016/bs.vh.2016.02.011 査読あり

4. A label-free impedance-based whole cell assay revealed a new G protein-coupled receptor ligand for mouse microglial cell migration. Fukano Y, Okino N, Furuya S, Ito M. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 478, 624-630 (2016) Doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.119 査読あり
5. Molecular mechanism for sphingosine-induced *Pseudomonas* ceramidase expression through the transcriptional regulator SphR. Okino N. and Ito M. *Scientific Reports*, 6:38797(2016) Doi:10.1038/srep38797 査読あり
6. Physiological significance of glycolipid catabolism in *Cryptococcus neoformans*. Watanabe T, Ishibashi Y, Ito M. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 27(157), E21-E31 (2015). Doi:10.4052/tigg.1504.1E. 査読あり
7. Ergosteryl- β -glucosidase (Egh1) involved in sterylglucoside catabolism and vacuole formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Watanabe T, Tani M, Ishibashi Y, Okino N, and Ito M. *Glycobiology*, 25(10), 1079-1089(2015). Doi:10.1093/glycob/cw045. 査読あり

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 脂質代謝マシーナリの進化と生物機能, 伊東 信, 日本農芸化学会西日本支部例会, 福岡, 2018/1/20
2. Quality Control of Glucosylceramide by EGCrP1 Is Related to the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*, Oral (Invited), Watanabe T, Ito M. Gordon Research Conference, Huston, 2018/2/15
3. 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* は EGCrP2 によって免疫賦活糖脂質を分解することで宿主免疫系から逃避する 渡辺 昂, 藤田 実花, 今井 崇史, 永田 雅大, 谷 元洋, 本田 智美, 角田 佳充, 石橋 洋平, 沖野 望, 山崎 晶, 伊東 信. 日本農芸化学会, 2017/3/18
4. 病原性真菌の免疫賦活化糖脂質とその分解酵素の生理的意義. 渡辺 昂, 藤田 実花, 今井 崇史, 永田 雅大, 谷 元洋, 本田 智美, 角田 佳充, 石橋 洋平, 沖野 望, 山崎 晶, 伊東 信. 第 36 回日本糖質学会, 旭川, 2017/7/20
5. EGCrP1 による *Cryptococcus neoformans* のグルコシルセラミドの

- 品質管理機構
渡辺 昂、小原 淳一郎、石橋 洋平、
沖野 望、伊東 信. セラミド研究会、
札幌、2017/10/20
6. 病原性真菌の免疫系からの逃避戦略：
糖脂質分解酵素の新しい役割. 伊東
信, 第 15 回糖鎖コンソーシアムシンポ
ジウム、福岡、2017/10/26
 7. 病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* のエ
ルゴステリル-β-グルコシド分解酵素
(EGCrP2) 欠損株の作製と解析.
溝口 正輝、渡辺 昂、石橋 洋平、沖野
望、伊東 信. 2017 年度生命科学系学会
合同年次大会 (ConBio2017), 2017/12/7
 8. 出芽酵母のエルゴステリルグルコシド
排出マシーナリの同定. 渡辺 昂、谷 元
洋、石橋 洋平、沖野 望、伊東 信. 2017
年度生命科学系学会合同年次大会
(ConBio2017), 2017/12/7
 9. 病原性真菌の免疫系からの逃避戦略：
糖脂質分解酵素の新しい役割、口頭
(招待)、伊東 信, 第 15 回糖鎖科学
コンソーシアムシンポジウム、福岡、
2017/10/26
 10. 出芽酵母のエルゴステリルグルコシド
排出マシーナリの同定. 渡辺 昂、谷
元洋、石橋 洋平、沖野 望、伊東 信、
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio
2017), 神戸、2017/12/7
 11. 病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* のエ
ルゴステリル-β-グルコシド分解酵素
(EGCrP2) 欠損株の作製と解析. 溝口
正輝、渡辺 昂、石橋 洋平、沖野 望、
伊東 信, 生命科学系学会合同年次大
会 (ConBio 2017), 神戸、2017/12/7
 12. EGCrP1 による *Cryptococcus*
neoformans のグルコシルセラミドの
品質管理機構. 渡辺 昂、小原 淳一
郎、石橋 洋平、沖野 望、伊東 信、
札幌、2017/10/19
 13. 病原性真菌の免疫賦活化糖脂質とその
分解酵素の生理的意義. 渡辺 昂、藤
田 実花、今井 崇史、永田 雅大、
谷 元洋、本田 智美、角田 佳充、
石橋 洋平、沖野 望、山崎 晶、伊東
信, 日本糖質学会, 旭川, 2017/7/20
 14. 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans*
の EGCrP2 は宿主免疫系から逃避するた
めに働く. 渡辺 昂、藤田 実花、今
井 崇史、永田 雅大、谷 元洋、本
田 智美、角田 佳充、石橋 洋平、
沖野 望、山崎 晶、伊東 信, 日本脂
質生化学会, 旭川, 2017/6/15
 15. Sterylglucoside metabolism and
vacuole formation in *Cryptococcus*
neoformans and *Saccharomyces*
cerevisiae. Takashi Watanabe, Makoto
Ito. Progress 100: Second
International Symposium "Protein
Trafficking and Intracellular
Signaling of Plant and Fungal Cells",
Fukuoka, 2016/2/8
 16. Sterylglucoside metabolism: A
historical perspective and an
update. Makoto Ito, Takashi Watanabe,
Yohei Ishibashi, Motohiro Tani. 2016
Korea-Japan Bioactive Lipid Joint
Symposium, Korea, 2016/5/12
 17. 宿主免疫系を活性化する糖脂質を分解
する酵素 EGCrP2. 渡辺 昂、藤田実花、
永田雅大、今井崇史、谷 元洋、本田
智美、角田佳充、石橋洋平、沖野 望、
山崎 晶、伊東 信. 第 40 回蛋白質と酵
素に関する九州シンポジウム、指宿、
2016/8/27
 18. 病原性真菌は免疫賦活化糖脂質を分解
することで Mincle を介した自然免疫系
から逃避する. 渡辺 昂、永田雅大、
今井崇史、藤田実花、谷 元洋、石橋
洋平、沖野 望、山崎 晶、伊東 信.
第 35 回日本糖質学会、高知、2016/9/2
 19. 進化の過程で失われたユニークな糖脂
質代謝酵素. 伊東 信. 第 89 回日本生
化学会、仙台、2016/9/26
 20. ステリルグルコシドの過剰な蓄積は真
菌類の増殖抑制や液胞の異常を引き起
こす. 渡辺 昂、藤田実花、谷 元洋、
石橋洋平、沖野 望、伊東 信. 第 89
回日本生化学会、仙台、2016/9/26
 21. 糖脂質研究の新たな展開: Visiting Old,
Learn New. 伊東 信、香川糖質バイオ
フォーラム、高松、2015/1/30
 22. 深在性真菌症創薬の新たな標的: エン
ドグリコセラミダーゼ関連タンパク質
(EGCrP). 伊東 信、石橋 洋平、渡
辺 昂, 公開セミナー「エンド型グリ
コシダーゼから糖鎖科学を展望する」、
弘前、2015/4/21
 23. 出芽酵母のステリルグルコシド代謝と
液胞形成. 渡辺 昂、谷 元洋、石橋
洋平、沖野 望、伊東 信, 第 57 回日
本脂質生化学会、東京、2015/5/28
 24. 糖脂質代謝の進化と生物機能. 伊東
信. 平成 27 年度比較グライコム研究
会、福岡、2015/6/6
 25. 糖脂質代謝のホメオスタシスは出芽酵
母の液胞形成に強く関与する.
渡辺 昂、谷 元洋、石橋洋平、沖野
望、伊東 信. 第 34 回日本糖質学会、
東京、2015/7/31
 26. 糖脂質・スフィンゴ脂質代謝研究の醍
醐味: Curiosity-driven Research and
Mission-oriented Research.
伊東 信, 第 39 回蛋白質と酵素の構造
と機能に関する九州シンポジウム、大
分、2015/9/10
 27. Biological significance of
sterylglucoside metabolism
in *Cryptococcus*
neoformans and *Saccharomyces*

- cerevisiae*. Makoto Ito, 56th International Conference on the Bioscience of lipids (ICBL), Argentina, 2015/9/23
28. 真核単細胞生物の糖脂質/スフィンゴ脂質精密構造の生物学的意義. 伊東信, 第 88 回日本生化学会、神戸、2015/12/3
29. Ergosterylglucoside catabolism by ergosteryl- β -glucosidase (Egh1) is associated with vacuole formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Takashi Watanabe, Motohiro Tani, Yohei Ishibashi, Nozomu Okino, Makoto Ito, PACIFICHEM 2015, Hawaii, /12/16

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：アシルステリルグルコシド、アシルステリルグルコシドの製造方法、組成物
発明者：伊東 信、渡辺 昂、植村 涼、鈴木 健吾、杉本 良太、林 雅弘
権利者：九州大学、（株）ユーグレナ
種類：
番号：特願 2017-231961
出願年月日：平成 29 年 12 月 1 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kais hika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 信 (ITO, Makoto)
(九州大学大学院・農学研究院・教授)
研究者番号：40253512

(2) 研究分担者

角田 佳充 (KAKUTA, Yoshimitsu)
(九州大学大学院・農学研究院・教授)
研究者番号：00314360

谷 元洋 (TANI, Motohiro)
(九州大学大学院・理学研究院・准教授)
研究者番号：20452740

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし