

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05808

研究課題名（和文）スギヒラタケの急性脳症事件の分子機構全容解明とその応用展開

研究課題名（英文）Chemical elucidation and its application of acute encephalopathy caused by the mushroom *Pleurocybella porrigens*

研究代表者

鈴木 智大（Suzuki, Tomohiro）

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：10649601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は現在までにスギヒラタケの急性脳症に関して複数の物質（それぞれB3、PPL、PAと命名）が毒性に関与するという仮説を立てているが、本研究では、これら複数の物質がマウス脳内にアポトーシスを引き起こしていることを明らかにした。さらに、PPLと混合するとプロテアーゼ活性を発現する候補タンパク質を決定し、その異種発現系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、2つの高分子が複合体を形成することによって基質特異性が全く無いプロテアーゼ活性が現れる酵素は前例が無い。本酵素は酵素学における科学的価値だけでなく、食品中のタンパク質を無作為に分解し、機能性物質の精製・分離を容易にするなど、様々な応用の可能性を秘めており、新たな酵素の創出も期待できる。

研究成果の概要（英文）：To date, we have hypothesized that multiple substances (named B3, PPL, PA, respectively) are involved in toxicity for acute encephalopathy by the mushroom *Pleurocybella porrigens*. In the present study, we demonstrated that these substances from this mushroom cause apoptosis in the mouse brain. Furthermore, we determined candidate proteins that express protease activity when mixed with PPL, and succeeded in constructing its heterologous expression system.

研究分野：生化学、天然物化学

キーワード：スギヒラタケ 急性脳症 きのこと プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) は食用とされていたが、2004 年以降、摂取者に原因不明の急性脳症が相次いだ。この事例に対し厚労省研究班は「原因不明」と結論づけ、現在も発症機構に関しては不明のままであるが、農水省は申請者らの先行研究を引用してスギヒラタケに対する注意喚起を行っている。また、2014 年にも秋田県で 20 代男性が急性脳症を発症し、申請者らに分析を依頼している。本課題はこのスギヒラタケ急性脳症の毒性機序を科学的に解明し、治療・予防法の確立を目指す先駆的試みである。

これまでに申請者らは、(1) スギヒラタケの熱水高分子画分からマウスに致死性を示す糖タンパク質 (B3 と仮称) の探索、(2) スギヒラタケレクチン (*P. porrigens* lectin: PPL) の精製、(3) エタノール可溶部から神経細胞に毒性を示す低分子化合物の探索を行うことで急性脳症発症機序の解明を試みてきた。その結果、現在までにスギヒラタケからの B3 の精製、PPL の精製・遺伝子クローニング・異種発現系の構築に成功している。またスギヒラタケ脳症患者の脳内には、髄鞘に特異な脱髄病変が起こっていることが報告されている (新井信隆, 医学のあゆみ, 第 223 巻, 505-506 頁, 2007)。申請者は現在までに B3 と PPL は複合体を形成し、基質の N 末端、C 末端から基質特異性を示さずにエキソ型にタンパク質を分解する活性を示すこと、複合体を腹腔内投与したマウスで血液脳関門 (BBB) が破壊されていることを明らかにした。申請者が BBB 破壊を証明した後に、スギヒラタケ脳症患者の脳画像と神経病理の結果から、摂取患者は血液脳関門が破壊されていることも報告されている (川並透, 日本内科学会雑誌, 第 95 巻, 1323-1327 頁, 2006)。また申請者らは、エタノール可溶

画分から複数の新規アミノ酸誘導体を単離し、これら化合物の構造から推定された予想前駆体であるアジリジン化合物 (pleurocybellaziridine、以降 PA と略称) の合成に成功し、スギヒラタケ中での存在及び髄鞘を構成する細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的な毒性を明らかにした。この結果は、アメリカ化学会発行の Chemical and Engineering News に大きく紹介された。それら総合的な知見から、PPL-B3 複合体が血液脳関門を破壊し、その後、神経毒性を持った低分子化合物 (PA) がスギヒラタケ脳症に特異な脱髄病変を引き起こすというこのキノコによる急性脳症メカニズムを提唱した (図)。

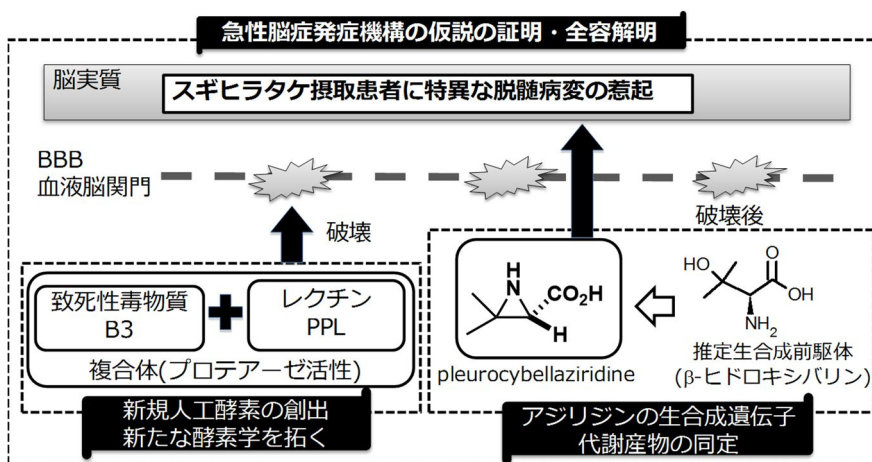


図 スギヒラタケ急性脳症の発症機構に関する仮説および研究概要

2. 研究の目的

本課題では、

- (1) B3 の構造解析・PPL-B3 複合体形成機構の解明
- (2) PA の生合成経路の解明と代謝産物の同定
- (3) 毒性発現機構の解明

の 3 課題に取り組み、基質特異性が全くない新規酵素の創出、PA 生合成に関与する遺伝子・代謝産物の同定、スギヒラタケ急性脳症の発症メカニズムの全容解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) B3 の構造解析・PPL-B3 複合体形成機構の解明

申請者はスギヒラタケからマウスに致死活性を示すタンパク質 (B3) の単離に成功したが、その不溶性のため一次構造は不明である。しかしながら、申請者らは、スギヒラタケ水溶性画分から B3 に相当する (PPL と混合するとプロテアーゼ活性を示すと考えられる) 候補タンパク質の同定および大腸菌を用いての異種発現に成功した。上述の組換えタンパク質を用いて、プロテアーゼ活性の再現性・蛍光プロテアーゼ基質等を用いた基質特異性試験を行う。

- (2) PA の生合成経路・代謝産物の同定

申請者らはこれまでに、PA はスギヒラタケの子実体中に多量に存在することを明らかにして

いる。さらに予備実験において菌系体中においても PA が存在することを確認している（未発表データ）。そこで培養期間が短く生合成経路の解明において扱いやすい菌系体を用いて下記の実験を行う。PA の推定生合成前駆体の候補として挙げられる β -ヒドロキシバリンを菌系体に添加し、PA の存在量の変動確認・代謝産物の探索を行う。

（3）毒性発現機構の解明

申請者らは、PPL-B3 複合体や PPL-B3 複合体に加えて PA を添加する 3 成分での毒性試験を行った結果、3 成分を投与した検体において脳の海馬領域にアポトーシスによる細胞死が誘導されることを明らかにした。そこで、海馬を中心とした全ての脳領域における影響を検討するため、脳全体の連続切片を作製し、組織学的検討を行う。神経細胞マーカー NeuN、血液脳関門マーカー Glut1、グリア細胞マーカー GFAP を用いて免疫染色を行い、毒成分の添加によって影響を受ける領域と毒性を顕著に示す細胞種を特定する。

4．研究成果

（1）B3 の構造解析・PPL-B3 複合体形成機構の解明

これまでに B3 に相当する（PPL と混合するとプロテアーゼ活性を示すと考えられる）候補タンパク質の同定に成功している。本研究で大腸菌を用いた候補タンパク質の異種発現系の構築に試み、可溶性画分での発現に成功した。また得られた候補タンパク質を PPL と混合後、インスリンを基質としてそのプロテアーゼ活性試験に供した後に、MALDI-TOF-MS を用いた解析によってその分解の有無を検討した結果、インスリンの分解が確認された。さらに、候補タンパク質中に存在するプロテアーゼ活性に寄与すると推定されるアミノ酸部位を推定し、それらの候補タンパク質のアミノ酸変異体の作出を試み、大腸菌での異種発現系の構築にも成功した。また得られた候補タンパク質と PPL の表面プラズモン共鳴装置（Biacore）を用いた相互作用解析を行い、PPL と候補タンパク質間に相互作用が認められることを確認した。

また別途、rPPL の大腸菌を用いた異種発現に成功し、SDS-PAGE および PEAKS 解析を用いて精製を確認した。その収量は 9.3 mg/L であり、Gpd プロモーター担子菌を用いた既存の発現系と比較して約 9 倍に向上した。上記の rPPL の異種発現系の構築に関しては、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 誌に投稿・受理された。

（2）PA の生合成経路・代謝産物の同定

スギヒラタケ菌系体粗抽出液を LC-MS/MS に供し、外部標準物質の PA とイオンクロマトグラムおよび MS2 スペクトルの比較を行った。その結果、スギヒラタケ菌系体内に PA が存在していることが明らかになった。

スギヒラタケ菌系体を用いて、PA 代謝実験を行った。推定生合成経路から、前駆体と予想される β -ヒドロキシバリンをスギヒラタケ菌系体培養液に添加し、粗抽出液を得た。回収した粗抽出液を LC-MS/MS に供した結果、 β -ヒドロキシバリン添加から 1 時間後に PA 量が最も増加することが明らかになった。この結果から、 β -ヒドロキシバリンの添加によって PA 含有量が増加することが明らかになった。

また、スギヒラタケのトランスクリプトーム情報の更新のため、スギヒラタケ（NBRC30334）の菌系体および山梨県で採取したスギヒラタケ子実体より RNA を抽出し、NovaSeq 6000 を用いたシーケンスを行った。その結果、子実体から 44,169 個、菌系体から 42,029 個の遺伝子配列を得た。さらに、種々のアノテーション（BLAST、KEGG、Gene ontology 解析）を行った。

（3）毒性発現機構の解明

申請者らはこれまでに、PPL-B3 複合体や PPL-B3 複合体に加えて PA を添加する 3 成分での毒性試験を行った結果、3 成分を投与した検体において脳の海馬領域にアポトーシスによる細胞死が誘導されることを明らかにしたため、様々な抗体を用いた免疫組織学検討を行い、ssDNA 抗体を用いて染色したマウス脳内で最も顕著に 3 成分投与によるアポトーシス細胞の増加が観察されることを見出した。

この毒性が、BBB 破壊によって脳内に取り込まれたスギヒラタケ毒成分によるものであることを立証するため、マウス脳内から高分子化合物である PPL を検出することを試みた。プロテアーゼ活性を示す rPPL と PC を複合的にマウスに投与後、Anti-6 x His antibody を用いて免疫染色を行った結果、対照群と比較して 2 成分投与群で染色性が向上していることが明らかとなった。上記の毒性発現機構に関しては、新たなメカニズムの毒性発現機構であるとして、論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Tomohiro, Nakamura Luna, Inayoshi Satomi, Tezuka Yuki, Ono Akiko, Choi Jae-Hoon, Dohra Hideo, Sasanami Tomohiro, Hirai Hirofumi, Kawagishi Hirokazu	4. 巻 85
2. 論文標題 An efficient heterologous Escherichia coli-based expression system for lectin production from Pleurocybella porrigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 630 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Tomohiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Genetic sequence analysis and characterization of bioactive compounds in mushroom-forming fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 8 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 モウ ウェン, 鈴木 智大, 河岸 洋和, 二瓶 賢一
2. 発表標題 スギヒラタケから単離された異常アミノ酸誘導体の全合成とその立体化学
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 瑠奈, 稲吉 里美, 手塚 裕紀, 宰, 道羅 英夫, 笹浪 知宏, 平井 浩文, 河岸 洋和, 鈴木 智大
2. 発表標題 スギヒラタケ由来レクチンに関する生化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木智大
2. 発表標題 「きのこ類が産生する生物活性物質に関する天然物化学的・遺伝情報学的研究」
3. 学会等名 日本農芸化学会 受賞講演 2021年（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Luna NAKAMURA, Satomi INAYOSHI, Yuki TEZUKA, Jae-Hoon CHOI, Hideo DOHRA, Tomohiro SASANAMI, Hirofumi HIRAI, Hirokazu KAWAGISHI, Tomohiro SUZUKI
2. 発表標題 Biochemical research on lectin production from <i>Pleurocybella porrigens</i> .
3. 学会等名 日本分子生物学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚裕紀、中村瑠奈、浅川倫宏、前川文彦、木村栄輝、菅敏幸、河岸洋和、鈴木智大
2. 発表標題 スギヒラタケが産生する毒性物質に関する組織学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro SUZUKI
2. 発表標題 Analysis of genomic information and research on functionality of mushrooms
3. 学会等名 広州大学 講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 瑠奈、稲吉 里美、手塚 裕紀、崔 宰熏、道羅 英夫、笹浪 知宏、平井 浩文、鈴木 智大、河岸 洋和
2. 発表標題 スギヒラタケ由来レクチンに関する生化学的研究
3. 学会等名 グライコサイエンス若手の会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research map https://researchmap.jp/Tomohiro_Suzuki 研究室HP http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/suzuki/ 宇都宮大学 生物分子情報学研究室 HP http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/suzuki/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前川 文彦 (Maekawa Fumihiko) (40382866)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員 (82101)	
研究分担者	浅川 倫宏 (Asakawa Tomohiro) (80571257)	東海大学・海洋学部・准教授 (32644)	
研究分担者	崔 宰熏 (Choi Jae-Hoon) (40731633)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------