

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380058

研究課題名(和文) 真菌類の糖脂質代謝酵素の構造と機能に関する研究

研究課題名(英文) Studies on structures and functions of fungus glycolipid-metabolizing enzymes

研究代表者

伊東 信 (Ito, Makoto)

九州大学・(連合)農学研究科(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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：真菌類のグルコシルセラミド(GlcCer)分解酵素としてEGCrP1、ステリルグルコシド(SG)分解酵素としてEGCrP2を同定した。Cryptococcus neoformans のEGCrP1欠損株の解析から、EGCrP1はGlcCerの品質管理を行っていること、GlcCerの品質管理は莢膜形成に関わっていることが明らかになった。一方、EGCrP2欠損株では、EGの液胞への蓄積と液胞形態の異常、細胞増殖・分裂の抑制が見られた。また、X線結晶構造解析によってEGCrP2の立体構造、基質特異性、反応様式に関して詳細な情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：The two major glycolipids in *C. neoformans* are glucosylceramide (GlcCer) and steryl  $\beta$ -glucoside (SG). We found two homologues of EGCase in *C. neoformans* and designated EGCrP1 and EGCrP2. EGCrP1 is a neutral glucocerebrosidase specific to GlcCer, whereas EGCrP2 is an acid  $\beta$ -glucosidase capable of hydrolyzing not only GlcCer but also various  $\beta$ -glucosides, including SG. Using each disruption mutant of *egcrp1* and *egcrp2*, we elucidated that EGCrP1 plays an integral role in quality control of the fungus specific GlcCer, whereas EGCrP2 is involved in the catabolism of SG in the vacuoles of *C. neoformans*. The disruption of EG catabolism resulted in growth arrest, dysfunction in cell budding, and abnormal vacuole morphology. These results indicate that catabolism of two different glycolipids plays different physiological roles in *C. neoformans* and strongly suggest EGCrP1 and EGCrP2 as targets for anti-cryptococcal drugs with a new mechanism of action.

研究分野：生化学

キーワード：糖脂質 代謝 分解酵素 真菌類 グルコシルセラミド ステリルグルコシド 液胞形成

## 1. 研究開始当初の背景

セラミドにグルコースが $\beta$ 結合したグルコシルセラミド (GlcCer) は、真菌類の主要な糖脂質である。病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の GlcCer は、未成熟型セラミドにスフィンゴ脂質 8 デサチュラーゼ、9 メチルトランスフェラーゼが順次作用して生成される成熟型セラミドに、UDP-グルコース: セラミドグルコース転移酵素 (GlcCer synthase, GCS) によってグルコースが付加されることによって合成される。近年、8 デサチュラーゼ、9 メチルトランスフェラーゼの欠失変異株の解析から、成熟型 GlcCer を持つ野生株に比較して、未成熟型 GlcCer しか合成できない変異株は著しく病原性が弱いことが示された (S. M. Nobel et al. *Nat. Genet.* 42, 590-598, 2010)。GCS は成熟型のみならず未成熟型セラミドも基質とするにもかかわらず、野生株が成熟型 GlcCer だけを発現している分子基盤は明らかではない。一方、GlcCer 分解酵素 (グルコセレブリンダーゼ) が未同定なため、真菌の GlcCer の異化経路は未解明である。また、真菌類の糖脂質としてステロールグルコシド (SG) 類が知られているがその代謝経路は不明である。

筆者らは、糖脂質に作用し、オリゴ糖鎖とセラミドを遊離する酵素エンドグリコセラミダーゼのホモログタンパク質 (EGCrP1, EGCrP2) が広く真菌類に存在することを見出した。

## 2. 研究の目的

1) EGCrP1 と EGCrP2 の酵素化学的諸性質を明らかにする。2) EGCrP1 と EGCrP2 の結晶構造を解析し、反応機構を原子レベルで解明する。3) EGCrP1 と EGCrP2 の真菌類における生物学的な機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

EGCrP1,2 を大腸菌で発現させたりコンビナント酵素を用いて酵素化学的諸性質を明らかにする。また、精製タンパク質を結晶化し、立体構造を解明する。さらに、*C. neoformans* の EGCrP1,2 欠損変異株を作製し、真菌類における生理学的な役割を解明する。

## 4. 研究成果

大腸菌で発現させたりコンビナント酵素を用いて、EGCrP1 は GlcCer 分解酵素、EGCrP2 は SG 分解酵素とであることを明らかにした。また、EGCrP2 の X 線結晶構造解析によって本酵素の立体構造、基質特異性、反応様式に関して詳細な情報を得た。特に、EGCrP2 の基質結合クレフトの構造は、エンドグリコセラミダーゼのそれと比較して狭く、本酵素が GlcCer や SG などの  $\beta$ -グルコシド以外のオリゴ糖結合型糖脂質に作用しない理由を原子レベルで明らかにすること

ができた。

*C. neoformans* の EGCrP1 欠損株の解析から、EGCrP1 は GlcCer の合成過程で産生される未成熟なスフィンゴシン塩基を持つ GlcCer (未成熟 GlcCer) を分解除去する役割、つまり GlcCer の品質管理を行っていることを明らかにした。さらに、EGCrP1 欠損株の莢膜形成が不十分なことから、GlcCer の品質管理機構は、莢膜形成に重要な役割を持つことを示した。一方、*C. neoformans* の EGCrP2 欠損株では、SG の一種であるエルゴステリルグルコシド (EG) の液胞への蓄積と液胞形態の異常、細胞増殖・分裂の抑制が見られた。EGCrP2 は液胞に存在し、EG の分解に関わっていることが分った。また、EG 代謝は液胞形成に重要であることが示された。

さらに、出芽酵母のエンドグリコセラミダーゼホモログとして Egh1 を同定し、そのリコンビナント酵素の解析から Egh1 は EG 分解酵素であることを示した。出芽酵母の Egh1 欠損株も液胞形成に異常を呈することを明らかにした。

本研究によって、真菌類糖脂質代謝のミッシングリンクとされて来た、2つの鍵酵素、GlcCer 分解酵素 (EGCrP1)、SG 分解酵素 (EGCrP2, Egh1) が同定された。また、真菌類 GlcCer 合成機構に EGCrP1 が共役することで真菌類特異的な GlcCer が選択的、効率的に産生される分子機構が解明された。また、GlcCer の品質管理が病原性に深い関連性がある莢膜の形成に重要であることを突き止めた。さらに、SG (EG) 代謝が液胞形成に深く関わっていることを示した。以上の結果から、EGCrP1, 2 は抗真菌薬創成の新たな標的となりうると結論づけた。

## 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6件)

1. Ergosteryl- $\beta$ -glucosidase (Egh1) involved in sterylglucoside catabolism and vacuole formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Watanabe T, Tani M, Ishibashi Y, Okino N, and Ito M. *Glycobiology* (2015) in press
2. Physiological significance of glycolipid catabolism in *Cryptococcus neoformans*. Watanabe T, Ishibashi Y, Ito M. *TIGG* (2015) in press.
3. Sterylglucoside catabolism in *Cryptococcus neoformans* with endoglycocoramidase-related protein2(EGCrP2), the first steryl- $\beta$ -glucosidase identified in fungi.

Watanabe T, Ito T, Goda HM, Ishibashi Y, Miyamoto T, Ikeda K, Taguchi R, Okino N, Ito M. *J. Biol. Chem.* 290(2): 1005-1019 (2015)

4. Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. Fujitani N, Furukawa J, Araki K, Fujioka T, Takegawa Y, Piao J, Nishioka T, Tamura T, Nikaido T, Ito M, Nakamura Y, Shinohara Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(6): 2105-2110 (2013)

5. Vibrios adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream, *Pagrus major*, utilizing GM4 as an attachment site. Chisada SI, Shimizu K, Kamada H, Matsunaga N, Okino N, Ito M. *FEMS Microbiol. Lett.* 341(1): 18-26 (2013)

6. Quality control of fungi-specific glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* by a novel glucocerebrosidase EGCrP1. Ishibashi Y, Ikeda K, Sakaguchi K, Okino N, Taguchi R, Ito M. *J. Biol. Chem.* 287(1): 368-381 (2012)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 糖脂質代謝の進化と生物機能. 伊東 信 比較グライコーム研究会 (2015年6月6日、九州大学箱崎キャンパス、福岡市)

2. 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 (2015年5月28日-29日、一橋大学一橋講堂、東京都)

3. *C. neoformans*と*S. cerevisiae*のエルゴステリルグルコシド代謝の生理的意義. 渡辺 昂、伊藤 友治、谷 元洋、合田 初美、宮本 智文、池田 和貴、石橋 洋平、沖野 望、田口 良、伊東 信 日本生化学会九州支部例会 (2015年5月16日-17日、九州大学箱崎キャンパス国際ホール、福岡市)

4. 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. 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」(2015年4月21日、弘前大学創立50周年記念会館 岩木ホール、弘前市)

5. 糖脂質研究の新たな展開 Visiting Old, Learning New. 伊東 信 かがわ糖質バイオフォーラム 複合糖質・糖鎖研究会 (2015年1月30日、香川県立ミュージアム、高松市)

6. 出芽酵母のステリル- -グルコシド分解酵素と液胞形成. 渡辺 昂、遠藤郁実、谷 元洋、石橋洋平、沖野 望、伊東 信 第87回 日本生化学会大会 (2014年10月15日~18日、国立京都国際会館、京都市)

7. 病原性真菌*Cryptococcus neoformans*のステリル- -グルコシド合成酵素の同定. 藤田 実花、渡辺 昂、遠藤郁実、沖野 望、伊東 信 第87回日本生化学会大会 (2014年10月15日~18日、国立京都国際会館、京都市)

8. クリプトコッカス症原因菌の糖脂質代謝は抗真菌薬の標的となり得るか. 伊東 信 第33回 日本糖質学会年会 (2014年8月10日~12日、名古屋大学豊田講堂、名古屋市)

9. Integral roles of endoglycoceramidase-related protein 2 (EGCrP2) in pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans*. Takashi Watanabe, Tomoharu Ito, Yohei Ishibashi, Hatsumi Goda, Tomofumi Miyamoto, Kazuki Ikeda, Nozomu Okino, Ryo Taguchi, Makoto Ito. 55th International Conference on the Biosciences of Lipids (ICBL) (23 - 27 June 2014, Aberdeen, Scotland)

10. 病原性真菌*Cryptococcus neoformans*のエルゴステリル- -グルコシド分解酵素 (EGCrP2) の同定とその生物機能の解明. 渡辺 昂、伊藤友治、石橋洋平、合田初美、宮本智文、池田和貴、沖野 望、田口 良、伊東 信 第56回 日本脂質生化学会 (2014年6月6日~7日、近畿大学東大阪キャンパス、東大阪市)

11. クリプトコッカス症原因菌の糖脂質代謝経路の解明から浮上した抗真菌剤の新しいターゲット. 渡辺 昂、伊藤友治、石橋洋平、合田初美、宮本智文、池田和貴、沖野 望、田口 良、伊東 信. 第86回日本生化学会 (2013年9月11日~13日、パシフィコ横浜、横浜市西区)

12. 病原性真菌のEGCrP1とEGCrP2の異なる生理的役割. 渡辺 昂、伊藤友治、石橋洋平、合田初美、宮本智文、池田和貴、沖野 望、田口 良、伊東 信. 第32回 日本糖質学会 (2013年 8月5日~7日、大阪国際交流センター、大阪市天王寺区)

13. 病原性真菌*Cryptococcus neoformans*のEGCrP2の基質特異性の検討. 渡辺 昂、伊藤友治、石橋洋平、合田初美、宮本智文、池田和貴、沖野 望、田口 良、伊東 信. 第85回 日本生化学会大会 (2012年12月14日~16日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡、福岡市)

14. Metabolism of Glucosylceramide and Ergosterolglucoside in *Cryptococcus neoformans* by Endoglycoceramidase-related

Proteins, EGCrP1 and EGCrP2. Makoto Ito, Yohei Ishibashi, Tomoharu Ito, Hatsumi Goda, Keishi Sakaguchi, Nozomu Okino, Tomofumi Miyamoto, Kazutaka Ikeda, and Ryo Taguchi. 53rd The International Conference on the Bioscience of Lipids (4-9 September 2012, Banff Alberta, Canada)

〔図書〕(計2件)

1. クリプトコッカス症原因菌のグルコシルセラミドはグルコセレブロシダーゼ EGCrP1によって品質管理される.

石橋 洋平、渡辺 昂、伊東 信 バイオサイエンスとインダストリー Vol. 72 (2014)

2. クリプトコッカス症原因菌における糖脂質の代謝・品質管理機構の解明.

伊東 信、石橋 洋平 日本応用酵素協会誌 No. 48(2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kaishika/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 信

(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

(九州大学大学院・農学研究院・准教授)

研究者番号：00314360

沖野 望(

九州大学大学院・農学研究院・准教授)

研究者番号：90363324

(3)連携研究者

該当なし