

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440036

研究課題名(和文) 病原性真菌におけるスフィンゴ脂質様マイコトキシン産生機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the sphingolipid-like mycotoxin production in the pathogenic fungi

研究代表者

生城 浩子 (Ikushiro, Hiroko)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10280702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：フサリウム属真菌が産生するマイコトキシンの一種であるフモニシンB1の生合成関与の酵素群のうち、key unitであるFum8pとFum13pの異種発現系を構築した。Fum13pを電気泳動上単一バンドにまで精製することに成功し、酵素学的な特徴付けを行うとともに、タンパク質の結晶化を試みた。Fum8p発現ミクロソームと精製Fum13p、細菌由来セリンパルミトイル転移酵素(SPT)で合成した基質を組み合わせ、放射性同位体標識基質を用いない安価な活性測定系を構築した。フモニシン合成阻害剤の候補化合物のスクリーニング系として有用である。

研究成果の概要(英文)：We have partially succeeded in constructing the heterologous expression system for both Fum8 and Fum13, which were the key unit of the Fum gene cluster participating to fumonisin B1 biosynthesis. The Fum13p overproduced in Escherichia coli was homogeneously purified, enzymatically characterized and tried to crystallized. New convenient non-RI assay system for the detection of the precursor of FB1 was constructed by combination of the Fum8p-overexpressed yeast microsomes and the purified Fum13p, and substrates synthesized by bacterial SPT. This assay system is useful for the screening of the inhibitor of the fumonisin biosynthesis.

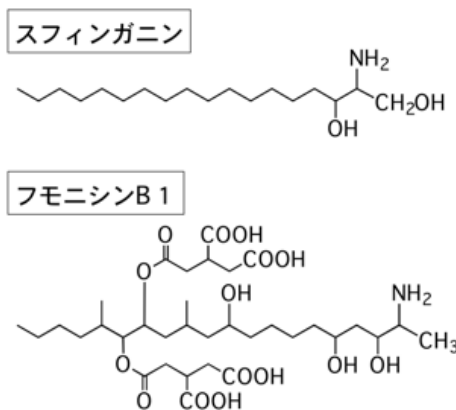
研究分野：生化学

キーワード：可溶性タンパク質、マイコトキシン産生、大腸菌内発現、酵母内発現系、結晶構造解析、スフィンゴ脂質、難発現性タンパク質、活性測定系

### 1. 研究開始当初の背景

フモニシン B1 (Fumonisin B1 ; FB1) は植物病原性フサリウム属真菌が産生するマイコトキシン (カビ毒) の一種であり、汚染穀物を介して家畜の急性中毒を起こすほか、ヒトにおいても発癌や新生児神経管欠損のリスク因子とされている。海外の研究者を中心に FB1 産生菌の比較ゲノム学的研究が進む一方で、FB1 生合成経路の個々の酵素についての生化学的な研究は進んでいなかった。

FB1 はスフィンゴ脂質類似の特徴的な化学構造を有し、その生合成経路もスフィンゴ脂質生合成と酷似している。スフィンゴ脂質生合成の初発酵素はセリンパルミトイル転移酵素 (serine palmitoyltransferase ; SPT) であり、L-セリンとパルミトイル-CoA の脱炭酸を伴う縮合反応を触媒し、長鎖塩基を合成する。続いて長鎖塩基の 3 位ケト基が還元されてスフィンガニンとなり、セラミド合成酵素によってアシル基転移反応を受けてジヒドロセラミドが生成する。一方、FB1 生合成ではグリシンや L-アラニンを出発基質として Fum8p によって長鎖塩基が合成され、Fum13p によって 3 位ケト基が還元されてスフィンガニン類似の 3-ヒドロキシ中間体が生成する。Fum8p は一次構造上 SPT と高い相同性を有しており、SPT 類似の反応機構によりグリシンや L-アラニンから長鎖塩基を合成すると推測されたが、実態は不明であった。



ヒト SPT 遺伝子の点変異に起因する『遺伝性知覚神経障害 I 型 (HSN1)』においては、SPT の基質特異性が L-セリンから L-アラニンやグリシンへと変化し、それらを基質として合成された異常な化学構造を持つ長鎖塩基を代謝中間体として、毒性のある異常セラミド誘導体が細胞内に蓄積することが判明している。また、FB1 処理した培養細胞において“正常セラミドの減少と異常セラミドの増加”という HSN1 の病態類似の現象が観察された。SPT の HSN1 型変異による異常セラミド

の合成機構を解明するためにも、野生型・変異型 SPT の立体構造決定が切望されていた。

### 2. 研究の目的

近年日本でも主食米から FB1 が検出され、FB1 による穀物汚染は世界的に深刻な食料問題となっている。研究代表者は FB1 産生阻害剤の創成を最終目標とし、FB1 生合成に関わる酵素群を対象とした生化学的研究基盤を構築することを本申請における第一の研究目的とした。さらに、フモニシン合成関与 Fum8p とスフィンゴ脂質生合成関与 SPT の構造 - 活性相関の解明に並行して取り組み、また、基質となるアミノ酸の動態やスフィンゴ脂質代謝物の細胞内での新規機能を探索し、ヒト HSN1 の発症機序の解明に役立つ知見を得ることを第二の研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) フサリウム属真菌由来 FB1 合成関連遺伝子の取得との大腸・酵母内大量発現系構築

フサリウム菌ゲノム DNA を理研バイオリソースセンターより購入し、これを鋳型に用いてフモニシン合成遺伝子クラスター遺伝子に関する PCR クローニングを行なった。

取得した遺伝子それぞれを pET system、pCold system の種々のベクターに組み込み、発現プラスミドを作成した。これらベクターでタンパク質発現用大腸菌株を形質転換し、組み換え酵素の発現量と酵素活性を検証した。発現量の微量な分子種に関しては、形質転換体の培養条件・タンパク質発現誘導の条件を詳細に検討した。改善できない場合には遺伝子配列情報をもとにコドン配列を最適化した人工遺伝子を受託合成し、それらを用いて組み換えタンパク質の大量発現を再検討した。依然として改善できなかったものについては、膜結合部位であると推定される領域の欠失変異体の発現ベクター、あるいは触媒活性に必須なドメイン領域に限定した発現ベクターを作成し、発現量の改善を試みた。

大腸菌内発現系において活性な酵素タンパク質が得られないものについては、発現宿主を出芽酵母、分裂酵母、メタノール資化酵母に変更した。また酵母用に最適化されたコドン配列を採用して発現量の増強を試みた。

#### (2) 酵素活性測定系の構築

研究代表者がこれまでに確立した SPT 活性測定法を改変して、放射性同位体標識・非標識のそれぞれの基質を使用する Fum8p、Fum13p の活性測定系を構築した。

### (3) 組み換えタンパク質の精製と結晶化

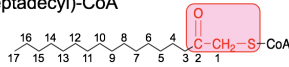
組み換えタンパク質を複数のクロマトグラフィーを組み合わせて精製し、精製表品について、市販のキットを用いて結晶化条件をスクリーニングした。

### (4) 基質および基質誘導体の合成

細菌由来 SPT を酵素源として用いて、L-セリン、グリシン、L-アラニンおよびアシル-CoA を基質として 3-ケト長鎖塩基を合成した。また、異なる炭化水素鎖長をもつ非反応性の基質アナログを化学合成した。

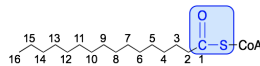
#### 合成基質アナログの一例

❖ S-(2-oxoheptadecyl)-CoA



パルミトイル-CoAのチオエステル部分にメチレン基を導入して反応性のない化学構造へ改変した非反応性基質誘導体

❖ パルミトイル-CoA (基質)



## 4. 研究成果

### (1) FB1 生合成に関わる酵素群を対象とした生化学的研究基盤の構築

フモニシン合成に関わる酵素群のうち Fum8p については、発現宿主株や培養条件の検討を重ねた結果、全長・N 末膜貫通領域欠失型変異体共に大腸菌内で大量発現させることができた。しかし、いずれのコンストラクトも封入体となって沈殿し、本申請期間内の取り組みにおいては活性を有する酵素を得ることはできなかった。Fum8p の機能ドメインごとに分けて発現させることも試みた。可溶性発現には成功しなかった。大腸菌に替えて、酵母を用いた発現系を検討した。酵母内発現系では全長・N 末膜貫通領域欠失型変異体共に大量発現を達成することはできなかったが、小胞体画分において酵素活性が確認された。

Fum13p については、大腸菌内で大量発現させた上、電気泳動上単一バンドにまで精製することに成功した。精製表品を用いてタンパク質結晶化スクリーニングを行なった。本申請の期間内に結晶構造解析に耐えうるクオリティを備えた結晶を作成することはできなかった。結晶化スクリーニングは今後も継続する予定である。

Fum13p の基質が市販されていないため、実験法で述べたように、これまでに研究代表者

が確立した実験系である細菌由来 SPT を用いて L-セリン、あるいは L-アラニンとアシル-CoA から 3-ケト長鎖塩基を合成し、これを Fum13p の基質として供給する活性測定系を構築した。Fum13p は NADPH 依存性に反応を触媒することが判明した。このことから NADPH の吸収変化を指標として反応進行を追跡する活性測定系を作成した。Fum8p 発現酵母ミクロソームと細菌由来 SPT と Fum13p 精製標品を併用して高価な放射性標識した基質を用いない Fum8p や SPT の活性測定も可能となった。

### (2) ヒト HSN1 発症機序の分子基盤の解明

SPT に関しては真核生物 SPT のサブユニットタンパク質の発現系の改善を行った。酵素の疎水性アミノ酸残基に可溶性を増加するように設計した変異を導入することで、格段に水溶性度を向上させることに成功した。今後は複数の部位に変異を導入し、酵素活性を維持した状態でのさらなる可溶性向上を進める予定である。真核生物酵素のモデル系である細菌由来 SPT については基質誘導体との複合体結晶の作成と立体構造解析をさらに進めた。SPT 結晶中においては副反応が進行しやすい傾向があることが判明した。結晶中で酵素タンパク質と基質（誘導体）分子が高濃度で長時間インキュベーションされることが原因と推察している。反応条件を調整することにより、結晶中で観測された副反応が水溶液中でも進行する可能性が示され、今後詳細な機構を解析する予定である。

細胞内の L-セリンのホメオスタシスに関わる酵素群の立体構造解析を行い、これらの酵素の基質認識における制御機構を明らかにした。また、SPT と同じフォールドタイプに分類され、グリシンのみを基質として厳密に認識する酵素の立体構造解析に成功した。SPT の立体構造と併せて考察することで、野生型と HSN1-変異型 SPT の基質認識機構のさらなる考察が可能になった。

スフィンゴ脂質代謝物の新規機能として、細胞内においてスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が HSP90 と相互作用することを明らかにし、S1P 受容体非依存性シグナル伝達に関与する可能性を示した。精製 HSP90 を用いた pull down assay によって両者が直接相互作用する可能性が示され、HSP90 の ATPase 活性が S1P の添加によって濃度依存的に阻害されることを確認した。速度論的解析によって阻害機構は混合型阻害の様式であることが示唆された。

## 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 3件)

Park, K., Ikushiro, H., Seo, H.S., Shin, K.O., Kim, Y. I., Kim, J. Y., Lee, Y. M., Yano, T., Holleran, W. M., Elias, P., Uchida, Y., "ER stress stimulates production of the key antimicrobial peptide, cathelicidin, by forming a previously unidentified intracellular S1P signaling complex." **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 113巻、2016、pp E1334 - E1342、

[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1504555113](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1504555113) (査読有)

生城 浩子、生化学、「セリンパルミトイル転移酵素の反応制御機構 変異酵素の副反応から明らかになった立体化学的反応制御」、87巻、3号、2015、pp 298-307 doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870298 (査読有)

赤井 翔太、生城 浩子、澤井 大樹、林 秀行、神谷 信夫、宮原 郁子、ビタミン、「高度好熱菌由来ホモセリン脱水素酵素の結晶学的研究」、88巻、2014、pp358 - 365 NAID : 110009833078 (査読有)

### [学会発表](計 20件)

生城 浩子、主馬野 祐希、宮原 郁子、神谷 信夫、矢野 貴人、*Caulobacter crescentus*由来アミノレブリン酸合成酵素の性状解析、第89回日本生化学会大会、2016年09月25日、仙台国際センター(宮城県、仙台市)

水田 啓文、生城 浩子、赤井 翔太、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、ホモセリン脱水素酵素・アスパラギン酸-4-セミアルデヒド複合体構造から推定される酵素反応機構、第89回日本生化学会大会、2016年09月25日、仙台国際センター(宮城県、仙台市)

Akai, S., Ikushiro, H., Sawai, D., Hayashi, H., Yano, T., Kamiya, N., Miyahara, I., Elucidation of catalytic mechanism in homoserine dehydrogenase based on crystal structures, The 5th International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016、2016年9月4日、黒部市宇奈月国際会館「セレネ」(富山県、黒部市)

Shimeno, Y., Ikushiro, H., Yano, T., Kamiya, N., Miyahara, I., Reaction control mechanism of

5-aminolevulinate synthasebhu, The 5th

International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016、2016年9月4日、黒部市宇奈月国際会館「セレネ」(富山県、黒部市)

生城 浩子、HSP90 と S1P の相互作用解析 2016年7月15日、第11回スフィンゴセラピー研究会、ホテルアローレ(石川県、加賀市)

主馬野 祐希、生城 浩子、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、グリシン複合体の結晶構造が明らかにしたアミノレブリン酸合成酵素における中間体形成の制御、日本ビタミン学会第68回大会、2016年6月17日、富山国際会議場(富山県、富山市)

主馬野 祐希、生城 浩子、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、*Caulobacter crescentus*由来アミノレブリン酸合成酵素のグリシン複合体の結晶構造、2015年量子ビームサイエンスフェスタ(第7回MLFシンポジウム、第33回PFシンポジウム)、2016年3月15日、つくば国際会議場エポカル(茨城県、つくば市)

赤井 翔太、水田 啓文、生城 浩子、澤井 大樹、林 秀行、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、アスパラギン酸セミアルデヒド結合型ホモセリン脱水素酵素のX線結晶構造解析、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

主馬野 祐希、生城 浩子、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、*Caulobacter crescentus*由来アミノレブリン酸合成酵素の結晶構造解析、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

主馬野 祐希、湯川 直樹、生城 浩子、林 秀行、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、セリンヒドロキシメチル基転移酵素の活性部位のpH依存的な挙動、日本結晶学会平成27年度年会、2015年10月17日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府、堺市)

主馬野 祐希、湯川 直樹、生城 浩子、林 秀行、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、セリンヒドロキシメチル基転移酵素のキノイド中間体の構造、日本ビタミン学会第67回大会、2015年6月5日、奈良春日野国際フォーラム麓~I・RA・KA~(奈良県、奈良市)

赤井 翔太、生城 浩子、澤井 大樹、林 秀行、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、高度好熱菌由来ホモセリン脱水素酵素の

基質認識、2014年11月1日、日本結晶学会、東京大学農学部（東京都）

Akai, S., Ikushiro, H., Sawai, D., Hayashi, H., Yano, T., Kamiya, N., Miyahara, I., 2014年8月26日、X-ray Analysis of homoserine dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. The Fourth International Conference on Cofactors (ICC-04), Casa della Musica, (イタリア、パルマ市)

生城 浩子、セリンパルミトイル転移酵素：近年の構造学的研究から得られた知見 2014年7月19日、第9回スフィンゴテラピー研究会、河鹿荘（石川県、加賀市）

赤井 翔太、生城 浩子、澤井 大樹、林 秀行、矢野 貴人、神谷 信夫、宮原 郁子、高度好熱菌由来ホモセリン脱水素酵素の三元複合体結晶構造解析、2014年6月13日、日本ビタミン学会、姫路市姫路商工会議所（兵庫県、姫路市）

湯川 直樹、生城 浩子、林 秀行、後藤 勝、神谷 信夫、宮原 郁子、基質アナログ型結晶構造から解明されたセリンヒドロキシメチル基転移酵素の反応機構、第2回物構研サイエンスフェスタ、2014年3月18日、つくば国際会議場エポカル（茨城県、つくば市）

赤井 翔太、生城 浩子、澤井 大樹、林 秀行、神谷 信夫、宮原 郁子、高度好熱菌 HB8 由来ホモセリン脱水素酵素の基質認識機構、2013年9月13日、第86回日本生化学会、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

堅山 あすか、生城 浩子、林 秀行、神谷 信夫、宮原 郁子、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ三者複合体のX線結晶構造解析、2013年9月11日、第86回日本生化学会、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

Yukawa, N., Ikushiro, H., Hayashi, H., Goto, M., Kamiya, N. and Miyahara, I., Reaction mechanism of Serine Hydroxymethyltransferase based on crystal structures at ultra-high resolution, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2013)、2013年5月28日、名古屋市中企業振興会館（愛知県、名古屋市）

赤井 翔太、生城 浩子、澤井 大樹、林 秀行、神谷 信夫、宮原 郁子、高度好熱菌由来ホモセリン脱水素酵素の結晶構造解析、日本ビタミン学会第65大会、2013年5月17日、立命館大学（滋賀県）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/med/staff/ikushiro/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

生城 浩子 (IKUSHIRO Hiroko)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10280702

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

宮原 郁子 (MIYAHARA Ikuko)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：40271176  
生城 真一 (IKUSHIRO Shin-ichi)  
富山県立大学・工学部・教授  
研究者番号：50244679

### (4) 研究協力者

なし