

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850110

研究課題名(和文) スギヒラタケの毒性解明と特異な基質開裂特性を有する新規酵素の創出

研究課題名(英文) Elucidation of toxicity mechanism(s) of *Pleurocybella porrigens* and creation of enzymes with novel substrate cleavage properties.

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スギヒラタケレクチンと相互作用のある蛋白質の探索を行い、候補タンパク質の1つが、rPPLと混合するとプロテアーゼ活性を有することを見出した。PPL単独でもプロテアーゼ活性を示すことがあり、その時のMSの解析結果ではm/z 13,000付近にピークが確認される。そこで、このタンパク質の精製を行った結果、精製および部分一次アミノ酸配列の取得に成功した。担子菌*Phanerochaete sordida* YK-624株を用い、rPPLの異種発現系の構築を行った。スギヒラタケのゲノム及びトランスクリプトームのデータを用いて、データベースの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：We have tried to obtain the gene which is interacted with PPL by a yeast two-hybrid method. As a result, the mixture (rPPL and recombinant clone protein) showed protease activity. Occasionally PPL showed the protease activity when it contained a minor peak at m/z 13,000 in MALDI-TOF-MS. We isolated PP-13,000 by reversed phase liquid chromatography and partial amino acid sequence was determined by LC-MS/MS analysis. We constructed heterologous expression systems of recombinant PPL by the basidiomycete *P. sordida* YK-624. We developed genomic and transcriptomic database of this mushroom which was equipped with three search functions; Keyword Search, GO Tree View and BLAST Search.

研究分野：木質科学

キーワード：きのこ スギヒラタケ

1. 研究開始当初の背景

スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) は食用とされてきたキノコであるが、2004年9月以降、東北各県で原因不明の急性脳症が相次いだ。そこで申請者はこのキノコを急遽入手し、マウスに対する影響を検討したところ、水溶性画分に致死活性を世に先駆けて確認した。また、一部報道でスギヒラタケにはレクチンの含有量が多いなどの理由からレクチンが毒物質ではないかという可能性も示唆された。その背景を踏まえ、(1) スギヒラタケ由来マウス致死性毒物質の探索、(2) スギヒラタケのレクチンの精製及び諸性質決定(3) 急性脳症発症機序の解明を試みた。この研究により得られた成果は図1の通りである。

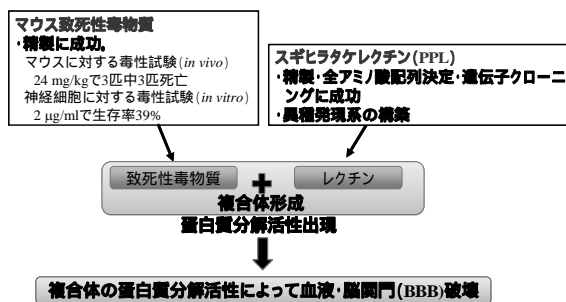


図1 研究開始当初の研究成果概要

スギヒラタケ摂取により亡くなった患者の脳には、脱髄病変が多発していることが報告されており、申請者はスギヒラタケ粗抽出物、致死性毒物質及びレクチンをマウスに投与し、その脳切片を調査したが、脳に異常は見られなかった。そこで申請者は(1) 脳への物質の流入に血液・脳関門 (BBB) が深く関与しており、インフルエンザ脳症においてミニプラスミンと呼ばれる蛋白質分解酵素がマトリックスメタロプロテアーゼ9を活性化することで BBB を破壊すること、(2) レクチン (PPL) は、リシン B 鎖と HA1 と構造類似性を持ち、これら自体には毒性は無いが毒本体と複合体を形成し毒性発現していることから、レクチンと致死性毒物質を混合して蛋白質分解活性の有無を検討した。その結果、レクチンと致死性毒物質は複合体を形成し、蛋白質分解活性を示している事を明らかにした。また、この蛋白質分解活性がどのような基質解裂特性を持つのか詳細に調べるため MALDI-TOF-MS を用い、インスリンを基質として反応を行い解析に供した結果、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分解するということが明らかになった。またこれら複合体をマウスに投与し、脳切片を BBB のマーカーであるグルコーストランスポーター1抗体 (Glut 1) で免疫染色したところ、複合体を投与した検体では染色が低下し BBB が破壊されていることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では申請者が過去に行ってきた構造決定技術を基盤として、(1) スギヒラタケ中の有害物質の特定及び構造決定、(2) 異種発現系の構築、(3) 発症機序の解明及び (4) 新規の蛋白質分解酵素の創出を行うことを目標とする。

具体的には以下の方法を用いて致死性毒物質の構造決定を行う。(1) 致死性毒物質は PPL と相互作用するという観点から、致死性毒物質の構造を酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングによる探索を行い、既存のスギヒラタケのゲノム及びトランスクリプトームデータベースと比較し、発現プロファイル比較等を用いて候補蛋白質の構造を決定する。(2) 得られた候補蛋白質の一次構造から遺伝子クローニング・異種発現を行い、既に構築済みの組換え体 PPL との相互作用解析、蛋白質分解活性の基質特異性、構造と活性の相関を試験する。更に PPL 抗体を用いた致死性毒物質とレクチン複合体が BBB 以外のどの器官に作用しているか、また実際のスギヒラタケの生体内ではどの組織細胞に局在しているかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 有害物質の構造決定・異種発現

レクチンの遺伝子は既にクローニング・異種発現に成功しており、致死性毒物質と混合すると蛋白質分解活性を示すことも確認している。また、スギヒラタケのゲノム及びトランスクリプトーム情報は既に次世代シーケンサーを用いて解析済みであり、各遺伝子にマップしたリードをカウントし、子実体及び菌糸体における各遺伝子の発現プロファイル情報を取得済みである。しかし、致死性毒物質はあらゆる緩衝液や界面活性剤に溶解度が極めて低く、一次構造の決定には至っていない。そこで致死性毒物質はレクチンと複合体を作るため、酵母 two-hybrid 法による PPL と相互作用のある蛋白質の探索を行い、子実体に特異的に発現する遺伝子等、トランスクリプトームデータとの比較を行い、致死性毒物質の構造解析を行う。

(2) 有害物質の複合体形成機構解明

BBB を破壊する蛋白質分解活性は致死性毒物質とレクチンの混合によって現れる。しかしこの活性は精製した致死性毒物質及びレクチン中に微量に含まれる他の蛋白質分解酵素に起因する可能性がある。そこでまず、異種発現させた致死性毒物質及びレクチンを用いて酵素活性の再現を試みる。次いでこの複合体形成の詳細を、結晶構造解析・表面プラズモン共鳴 (Biacore) 等を用いて明らかにしていく。また、その蛋白質分解活性の基質特異性について、様々な蛋白質、ペプチドの分解を MALDI-TOF-MS あるいは ESI-TOF-MS を用いて解析する。また、発現し

た致死性毒物質とレクチンのアミノ酸変異を行い、構造と活性の相関を検討する。

(3) 急性脳症発症機序の解明

BBB 破壊にスギヒラタケレクチンが関与しているかを確認するため、スギヒラタケレクチンの抗体を作成し、複合体の投与検体において、BBB 表面にレクチンが存在するかどうかを免疫染色によって確認する。更なるメカニズム解明のため、致死性毒物質とレクチン複合体が BBB 以外のどの器官に作用しているか、また実際のスギヒラタケの生体内ではどの組織細胞に局在しているかを調べる。

4. 研究成果

(1) 有害物質の構造決定・異種発現

酵母 two-hybrid 法を用いたスギヒラタケレクチン (PPL) と相互作用のある蛋白質の探索を行い、得られた候補タンパク質の酵母を用いた異種発現を順次行なった。その結果、候補タンパク質の 1 つが、担子菌で異種発現させた rPPL と混合するとプロテアーゼ活性を有することを見出した。このことから本プロテアーゼ活性は、スギヒラタケ中に存在する微量のプロテアーゼのコンタミネーションの可能性ではないことが証明された。

また、プロテアーゼ活性試験を行っていくと、PPL 単独でもプロテアーゼ活性を示すことがあり、その時の MALDI-TOF-MS の解析結果では m/z 13,000 付近に夾雑タンパク質のピークが確認される。そのため、このタンパク質 (PP-13000) がプロテアーゼ活性に関与している可能性が示唆された。そこで PP-13000 の精製方法の確立と構造解析を行うこととした。精製には Super Octyl を用いた逆相クロマトグラフィーを用いた。溶媒には 10%アセトニトリル(0.05% TFA)と 90%アセトニトリル(0.05% TFA)を用い、150 分間グラジエント溶出を行うことで精製を行った。その結果 PP-13000 の単離に成功した。また単離した PP-13000 を担子菌にて発現させた rPPL と混合し、insulin を基質としたプロテアーゼ活性試験を行った結果、基質を N 末端、C 末端の両方から切断する活性を示した。

更に PP-13000 のアミノ酸配列情報を取得するため、精製した PP-13000 を電気泳動に供し、目的のバンドを切り出しトリプシン消化を行なった後、LC-MS/MS 解析に供した。その結果、PP-13000 の部分一次アミノ酸配列の決定に成功した。現在、既に取得済みのスギヒラタケのゲノム・トランスクリプトーム情報から、該当するアミノ酸配列を有する遺伝子をマイニングし、現在 5' RACE 法、3' RACE 法を用いて、PP13000 遺伝子のクローニングを試みている。

(2) 有害物質の複合体形成機構解明

担子菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株を用い、rPPL の異種発現系の構築を行った。宿主由来の lignin peroxidase の細胞外分泌型シグナルペプチドを付加し、

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase プロモーターを用いて細胞外に分泌させる系を構築した。この研究成果は論文にまとめた。

更にスギヒラタケレクチンの抗体作成のため、PPL とマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を融合させ担子菌 (*Phanerochaete sordida*) を用いた細胞外分泌異種発現系の構築を行うことで、スギヒラタケレクチンの大量発現系の構築を試みている。

上述のように異種発現させた rPPL および新たに精製に成功した PP-13000 を混合することによって、蛋白質分解活性が現れることは確認されたが、PPL と B3 の複合体と同様に血液脳関門 (BBB) を破壊し、脳に異常を来すことを確認するか否かの検討を行った。B3 PP-13000 (24 mg/kg) と rPPL (30 mg/kg) の混合物、PP-13000 単独 (24 mg/kg)、rPPL 単独 (30 mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与し (n=5)、対照群 (n=5) を作り、実験を行った。その後 BBB のマーカーである、グルコーストランスポーター 1 抗体 (Glut 1) とタイトジャンクションの形成に関わる主要なタンパク質である claudin 5 で蛍光免疫染色およびクリューバー・バレラ染色を行った。現在結果を詳細に確認中である。

その他、スギヒラタケのゲノム及びトランスクリプトームのデータを用いて、ユーザーが利用しやすい BLAST 検索・キーワード検索・Gene ontology tree 等を実装したデータベースの構築も行い、研究成果を論文に発表した。

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 2 件)

Suzuki, T., Dohra, H., Omae, S., Takeshima, Y., Choi, J.-H., Hirai, H. and Kawagishi, H. Heterologous expression of a lectin from *Pleurocybella porrigens* (PPL) in *Phanerochaete sordida* YK-624. *Journal of Microbiological Methods*, 査読有, 100, 2014, 70-76. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.02.016

Yamamoto, N., Suzuki, T., Kobayashi, M., Dohra, H., Sasaki, Y., Hirai, H., Yokoyama, K., Kawagishi H. and Yano, K. A-WINGS: an integrated genome database for *Pleurocybella porrigens* (Angel's wing oyster mushroom, Sugihiratake) *BMC Research Notes*, 査読有, 7, 2014, 866. DOI: 10.1186/1756-0500-7-866.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/suzuki/>

6．研究組織

(1)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