

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248021

研究課題名(和文)キノコによる急性脳症発症の分子機構解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of Suguhiratake-acute encephalopathy;

研究代表者

河岸 洋和 (Kawagishi, Hirokazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：70183283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は「スギヒラタケによる急性脳症は、キノコ中の高分子2成分(PPLとB3)複合体がプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門(BBB)を破壊した後、低分子毒プレウロサイベルアジリジン(PA)によって発症する」という仮説をもつ。この仮説のもとに、以下の結果を得た。1) PAはB3とPPL共存下ではその分解が抑制される。2) プレウロサイベルアジリジンはオリゴデンドロサイトに特異的に細胞毒性を示す。3) スギヒラタケゲノムデータベースの構築した。4) 活性型recombinant PPL/recombinant B3発現系を構築した。5) rB3とrPPL複合体のプロテアーゼ活性を確認し、BBBを破壊する。

研究成果の概要(英文)：We have a hypothesis of the molecular mechanism of Suguhiratake-acute encephalopathy; the complex between two macromolecules, a lectin (PPL) and B3, destroyed blood brain barrier (BBB); then a low-molecular-weight toxin, pleurocybellaziridine (PA) attacked the brain and caused the unique lesion. To confirm the hypothesis, we obtained the following results. 1) PA was stable when it coexisted with PPL and B3. 2) PA showed toxicity against oligodendrocyte. 3) Genome database of Suguhiratake was established. 4) Expression systems of recombinant PPL and B3 were successfully constructed. 5) The complex of rB3 and rPPL exhibited proteinase activity and destroyed BBB.

研究分野：天然物化学

キーワード：キノコ スギヒラタケ 急性脳症 pleurocybellaziridine

1. 研究開始当初の背景

2004 年秋に、食用キノコのであるスギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) の摂取により、急性脳症が発生した。患者数は 59 名に達し、腎機能障害をもっていた 17 名が亡くなった。(2004/11/18 現在、厚生省調べ) この急性脳症の解明は困難を極め、厚生労働省は「原因不明」と結論した。しかし、この研究班の班員であった研究代表者はその後も現在に至るまで研究を続け、「高分子 2 成分によって血液脳関門 (blood brain barrier, BBB: 無秩序に物質が脳に移行しないための関門) が破壊され、低分子毒によって急性脳症が惹起された」という説を考えるに至った。その経緯を以下に箇条書きに示す。

- 1) スギヒラタケ抽出物をマウスに腹腔内注射すると死亡する。この致死毒性を指標に各種クロマトグラフィーによって、致死活性を示す糖蛋白質 (B3 と仮称) の精製に成功した。
- 2) 事件発生当時、原因説が新聞紙上に掲載されたレクチン (特定の糖や糖鎖と特異的に結合するタンパク質) を精製し、1 次構造、遺伝子のクローニングを行った。このレクチン (*Pleurocybella porrigens* lectin, PPL) はラットに対して致死毒性を示した。
- 3) B3 と PPL は共に、単独では死亡した動物の脳に異常を来さなかった。
- 4) インフルエンザ脳症では、ウイルスの感染によってトリプシン様蛋白質分解酵素が生成され BBB を破壊する。
- 5) 1 次構造のホモロジー検索によって、PPL はリシン B 鎖と HA1 (ボツリヌス毒ヘムアグルチニン) に構造類似性を有していた。この 2 つの蛋白質はそれら自体に毒性は無いが、毒本体 (リシン、ボツリヌス毒) と複合体を形成し、毒性発現に関与している。
- 6) 上記 4), 5) をヒントに、B3 と PPL を混合したところ蛋白質分解酵素活性が現れた。この複合体をマウスに腹腔内注射したところ、BBB が破壊された。また、その酵素活性には全く基質特異性が無かった。さらに、B3 と PPL の混合物の腹腔内投与によって、マウス脳に異常 (脱髄病変とは断定できず) を来した。
- 7) このキノコによる脳症で亡くなった患者の脳では共通に、大脳白質中のミエリン鞘に非常に特異な脱髄病変が起こっていた。そこで、研究代表者は、BBB 通過後に特異な脱髄病変を惹起するのは特定の低分子物質であると考え、細胞毒性を指標に毒性物質を得た。しかし、これらの物質は動物の脳に異常を来さなかった。
- 8) 得られた化合物の構造から共通の前駆体の存在を仮定した。この化合物は不安定で単離は出来なかったが、エステル化によって安定化すると考え、そのエステルを合成し、抽出直後にエステル化したキノコ抽出物にその存在を確認し、この化合物を pleurocybellaziridine、プレウロサイベルアジリジンと命名した。

2. 研究の目的

以上のように、研究代表者は、スギヒラタケによる急性脳症の発症機構に関する「スギヒラタケ中の高分子 2 成分 (PPL と B3) が複合体を形成することによってプロテアーゼ活性が現れ、そのプロテアーゼの作用によって血液脳関門が破壊される。そして、不安定性ゆえに単離はできなかったが合成化学的にこのキノコ中にその存在を証明した低分子毒プレウロサイベルアジリジンによってこの急性脳症に特有な脱髄病変が惹起された」という仮説をもった。また、この複合体のプロテアーゼ活性は全く基質特異性をもたないというこれまでに無い性質を示した。本研究では、上記の仮説の証明とプロテアーゼ活性の基質非特異性の発現機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下の検討を行った。

- 1) 各種細胞を用いて複合系におけるプレウロサイベルアジリジンの安定化機構解明
- 2) 反応条件検討によるプレウロサイベルアジリジンの効率的合成方法の確立
- 3) プレウロサイベルアジリジンのオリゴドンドロサイト特異的な細胞毒性の機構解明を *in vitro* で確認
- 4) 次世代シーケンサーを用いてスギヒラタケゲノムデータベースの構築
- 5) 活性型 recombinant PPL・B3 発現系の構築
- 6) recombinant 体を用いたプロテアーゼ活性再現
- 7) 2 成分系あるいは 3 成分系での脳への影響の評価、を行った。

4. 研究成果

- 1) 各種細胞を用いて複合系におけるプレウロサイベルアジリジンの安定化機構解明
プレウロサイベルアジリジンは徐々に分解する。そこで様々な条件下 (単独, B3 共存下, PPL 共存下, B3 と PPL 共存下, 様々な pH 下など) でのプレウロサイベルアジリジンの安定性と生じる分解物を NMR によって経時的に詳細に検討した。その結果、B3 と PPL 共存下ではその分解が抑制されることを見いだした。また、疎水条件下では比較的安定であることを見いだした。
- 2) プレウロサイベルアジリジンの効率的合成方法の検討
反応条件を種々検討した結果、プレウロサイベルアジリジンとそのエステル体の収率

が改善した。

3) プレウロサイベルアジリジンのオリゴデンドロサイト特異的な細胞毒性の機構解明を *in vitro* で確認

より生体に近い初代培養系を用い、プレウロサイベルアジリジンのオリゴデンドロサイト特異的な毒性について確認を行った。その結果、この化合物は神経細胞やアストロサイトには毒性を示さず、オリゴデンドロサイトにのみ細胞毒性を示すことを明らかにした。さらに、その活性が有機アニオン輸送体に関わっていることを証明した。

4) 次世代シーケンサーを駆使してスギヒラタケゲノムデータベースの構築

次世代シーケンサーを駆使してスギヒラタケゲノムデータベースの構築し、公表した。

5) 活性型 recombinant PPL・B3 発現系の構築

活性型 recombinant PPL の担子菌発現系を構築した。また酵母 Two-Hybrid 法により、PPL と相互作用を示す 5 つの B3 候補遺伝子を取得し、その中から最も可能性の高い候補遺伝子 1 つを選抜した。本遺伝子を酵母による異種発現を行い、目的タンパク質の取得に成功した。

6) recombinant 体を用いたプロテアーゼ活性再現

rB3 と rPPL を混合し insulin 分解実験に供した結果、insulin の分解が認められた。

7) 2 成分系あるいは 3 成分系での脳への影響の評価

BBB を *in vitro* で再現した市販の BBB キットによって、高分子 2 成分 (PPL と B3) 系で、BBB を破壊することを証明した。また、rB3 と rPPL をラットに投与し、BBB への影響を現在検討中である。

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 5 件)

1) 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 Res. Notes, 7, 866 (2014).
査読有り

doi: 10.1186/1756-0500-7-866.

2) Suzuki, T., Igarashi, K., Dohra, H., Someya, T., Takano, T., Harada, K., Omae, S., Hirai, H., Yano, K., and Kawagishi, H., A new omics data

resource of *Pleurocybella porrigens* for gene discovery, PLoS ONE, 8, e69681(2013).

査読有り

doi: 10.1371/journal.pone.0069681

3) 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, **J. Microbiol. Meth.**, 100, 70-76 (2014).

査読有り

doi: 10.1016/j.mimet.2014.02.016

4) 菅 敏幸, 河岸洋和, スギヒラタケの毒の「謎」に挑む, MEDCHEM NEWS, 23(2), 11-15 (2013). 査読無し

http://medchem.pod.ne.jp/index.php?option=com_content&view=article&id=100%3Amedchem-news-&catid=36%3Acategory3&Itemid=56&lang=ja

5) 河岸洋和, 菅 敏幸, スギヒラタケ急性脳症事件の化学的解明の試み, 化学と生物, 51(3), 134-137 (2013).

査読無し

doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.51.134

〔学会発表〕(計 12 件)

1) 亀澤哲弥, 竹島愛乃, 鈴木智大, 河岸洋和, 平井浩文: スギヒラタケ由来毒性高分子群異種発現系の構築, 第 65 回日本木材学会大会, タワーホール船堀 (東京都), 2015 年 3 月 18 日

2) Kawagishi, H.: ITbM-RCMS-IGER Seminar, Chemical explanations for mysteries related to mushrooms- “Sugihiratake-acute encephalopathy” and “fairly ring”-, 名古屋大学 (愛知県名古屋市), 2014 年 8 月 29 日 (招待講演)

3) 河岸洋和, スギヒラタケ毒による急性脳症の分子機構とレクチンの関与, 第 33 回日本糖質学会年会ワークショップ「真価を發揮し始めた Glyco-decoder 分子群『レクチン』: 構造生物学と進化工学の進展と医薬応用», 名古屋大学 (愛知県名古屋市), 2014 年 8 月 11 日 (招待講演)

4) 荒井勇人, 鈴木智大, 崔宰熏, 道羅英夫, 平井浩文, 館野浩章, 平林淳, 小林夕香, 河岸洋和, スギヒラタケレクチン (PPL) の糖鎖構造解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学 (神奈川県川崎市), 2014 年 3 月 29 日

5) 亀澤哲弥, 竹島愛乃, 鈴木智大, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和, スギヒラタケ由来毒性

物質の異種発現系の構築，日本農芸化学会
2014 年度大会，明治大学(神奈川県川崎市)，
2014 年 3 月 29 日

6) 河岸洋和：第 62 回日本応用糖質科学会中
部支部総会・講演会，キノコが産生するレク
チンの特異な機能とその応用，名古屋大学
(愛知県名古屋市)，2014 年 3 月 7 日 (招待
講演)

7) Suzuki, T., Omae, S., Fujita, M., Asakawa, T.,
Wakimoto, T., Nagai, K., Hirai, H., Kan, T.,
Kawagishi, H., Chemical investigation of the
food-poisoning epidemics caused by the
mushroom *Pleurocybella porrigens*,
13th International Conference on the Chemistry
of Antibiotics and other bioactive compounds
(ICCA), フジビューホテル (山梨県富士河口
湖町)，2013 年 9 月 25 日

8) 大前 沙央理，鈴木 智大，平井 浩文，河
岸 洋和，スギヒラタケレクチンの異種発現
解析，日本農芸化学会 2013 年度大会，東北
大学 (宮城県仙台市)，2013 年 3 月 25 日

9) 荒井 勇人，鈴木 智大，道羅 英夫，平井 浩
文，館野 浩章，平林 淳，小林 夕香，河
岸 洋和，スギヒラタケレクチン (PPL) の糖鎖構
造解析，日本農芸化学会 2013 年度大会，東
北大学 (宮城県仙台市)，2013 年 3 月 25 日

10) 鈴木 智大，五十嵐 香理，道羅 英夫，染
谷 拓海，高野 知之，大前 沙央理，平井 浩
文，矢野 健太郎，河岸 洋和，次世代シーケ
ンサーを用いたスギヒラタケのゲノム及び
トランスクリプトーム解析，日本農芸化学会
2013 年度大会，東北大学 (宮城県仙台市)，
2013 年 3 月 25 日

11) Kawagishi, H. , The angel's wing
mystery-Attempt to disclose the molecular
mechanism of acute encephalopathy caused by
eating angel's wing oyster mushroom
(Sughiratake), International Symposium on
Natural Products Chemistry and Chemical
Biology 2012, Hangzhou, China, November 25,
2012 (招待講演)

12) 鈴木智大，藤田基寛，田原慎太郎，徳山
真治，平井浩文，河岸洋和：白色腐朽菌
Phanerochaete sordida を用いたスギヒラタケ
レクチンの大量発現系の構築，第 11 回新規
素材探索研究会，横浜フジビューホテル (神
奈川県横浜市)，2012 年 6 月 8 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.ht
ml](http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河岸 洋和 (KAWAGISHI, Hirokazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：70183283

(2)研究分担者

菅 敏幸 (KAN, Toshiyuki)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10221904

長井 薫 (NAGAI, Kaoru)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：20340953

平井 浩文 (HIRAI, Hirofumi)

静岡大学・農学研究科・教授

研究者番号：70322138

森田 達也 (Morita, Tatsuya)

静岡大学・農学研究科・教授

研究者番号：90332692