

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658084

研究課題名(和文) 新奇糖脂質の生合成経路の発見を基盤とした抗真菌性抗生物質の探索

研究課題名(英文) Search for new antifungal agent based on finding of biosynthetic pathway of novel glycosphingolipids

研究代表者

山本 憲二 (Yamamoto, Kenji)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：70109049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：我々は抗真菌性の抗生物質オーレオバシジンAがケカビやクモノスカビなどの接合菌類に対して全く効果を示さないことを見出すとともに、その細胞膜を構成するスフィンゴ糖脂質の新しい生合成経路を発見し、それを阻害する物質が新規な抗生物質となり得ると考えて、糖脂質糖鎖を合成するガラクトース転移酵素の阻害物質を探索した。まず、クモノスカビのガラクトース転移酵素遺伝子を動物細胞や酵母を宿主として形質転換を試みたが成功しなかった。また、ケカビのミクロソームを粗酵素として阻害物質を調べたが、 α -メチルグルコシドにのみ、僅かな阻害活性が見られた。麹菌の酵素の遺伝子クローニングも試みたが、異なる酵素が得られた。

研究成果の概要(英文)：We had found that Zygomycetes species showed resistance to Aureobasidin A, an anti fungal agent. A novel family of neutral glycosphingolipids including galactosyl polymer was found in these fungi and the presence of biosynthetic pathway for the novel glycosphingolipids in Zygomycetes was elucidated. These results suggested that any inhibitor of this pathway may be effective for mucormycosis, which is a serious pathogenic disease for humans. We attempted to find any inhibitor of galactosyltransferase in these fungi. However, we failed to clone the galactosyltransferase genes of *Rhizopus oryzae* though we used animal cells or yeast as the host cells. Furthermore, we attempted to find any inhibitor of galactosyltransferase of *Mucor hiemalis* microsome but could not find it except α -methylglucoside having a weak inhibitory activity. We also tried to clone the gene of ceramide galactosyl transferase of *Aspergillus oryzae*. But we failed to clone it.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物

キーワード：スフィンゴ糖脂質 抗生物質 接合菌類 ガラクトース転移酵素 オーレオバシジンA 糖鎖 セラミドガラクトシル転移酵素

1. 研究開始当初の背景

真核微生物の細胞膜の主要な構成成分であるスフィンゴ糖脂質は生命の維持に不可欠な生体成分である。キノコなどの担子菌類や糸状菌、酵母などの子囊菌類のスフィンゴ糖脂質は脂質セラミドにイノシトールとリン酸が結合したイノシトールリン酸セラミドを基本骨格とした構造を有する酸性糖脂質である。このスフィンゴ糖脂質の生合成の経路は、スフィンゴシンの合成に至る前半の経路については動物の真核細胞と真核微生物では同じであるが、その後の経路は全く異なっている。動物細胞ではスフィンゴシンに脂肪酸が結合したセラミドが合成される一方、真核微生物では水酸化されたフィトスフィンゴシンからフィトセラミドが生合成され、さらにフィトセラミドはフォスファチジルイノシトールと結合してイノシトールリン酸セラミドが生合成される。このように真核微生物のスフィンゴ糖脂質は動物細胞のスフィンゴ糖脂質とその生合成経路が全く異なる。そのために真核微生物のイノシトールリン酸セラミドの合成に関わるイノシトールリン酸セラミド合成酵素 (IPC synthase) を阻害するオーレオバシジン A (Aureobasidin A) は動物細胞を損傷しない広範な有効性を示す抗真菌性抗生物質として活用されている。

以前に私たちはオーレオバシジン A がケカビやクモノスカビを含む接合菌類の生育を全く阻害しないことを偶然に発見した (Aoki et al., *J. Biol. Chem.*, 279, 32028, 2004)。この発見は国内外で反響を呼んだ。そこで、*Mucor* 属(ケカビ)や *Rhizopus* 属(クモノスカビ)の細胞膜に存在するスフィンゴ糖脂質について詳細な解析を行った結果、フィトセラミドにガラクトースのオリゴマー糖鎖が結合した全く新奇な中性スフィンゴ糖脂質 (ガラ系列の糖脂質) であることを見出した。すなわち、コウジカビやアオカビなどの他の糸状菌のスフィンゴ糖脂質とは全く異なる糖脂質によって細胞膜が構成されており、そのために抗生物質オーレオバシジン A による生育阻害が全く見られないことを明らかにした。さらに、ガラクトースのオリゴマー糖鎖は糖転移酵素によってガラクトース基が順々に付加されていくことも明らかにした。最近になって、この糖脂質が線虫の寄生菌である *Hirsutella* 属の細胞膜にも見出されることを明らかにし、やはりオーレオバシジン A はその生育を阻害しないことを見出している (Tani et al., *Glycobiology*, 20, 433, 2010)。*Mucor* 属や *Rhizopus* 属の糸状菌は食品の製造などに用いられる有用な糸状菌である一方、食品の腐敗や悪変を引き起こし、植物病原性の原因になる菌種もある。とりわけ、ある種の *Mucor* 属の菌は典型的な日和見感染症である“ムコール症”の原因真菌でもあり、本症は急性でしばしば致命的経過をたどることがある。こ

のような事実に鑑みて、接合菌類の新奇なスフィンゴ糖脂質の生合成経路を阻害する物質が接合菌類に対する特異な抗生物質になって、感染症の治療薬になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上記のような背景のもとに、接合菌類の細胞膜を構成する新規なスフィンゴ糖脂質の生合成経路をブロックする物質を発見して、接合菌類に特異な抗生物質を見出すことを本研究の目的とした。具体的にはこのスフィンゴ糖脂質のガラクトースのポリマー糖鎖の生合成に関わるガラクトース転移酵素について、その阻害物質を微生物の培養液を初めとして幅広く検索し、得られた阻害物質について医薬や農薬としての応用を検討するとともに、抗生物質としての可能性を探る。目的の抗生物質を見出すことができれば、医薬、農薬、食品などの幅広い分野に大きな貢献をすることができる。

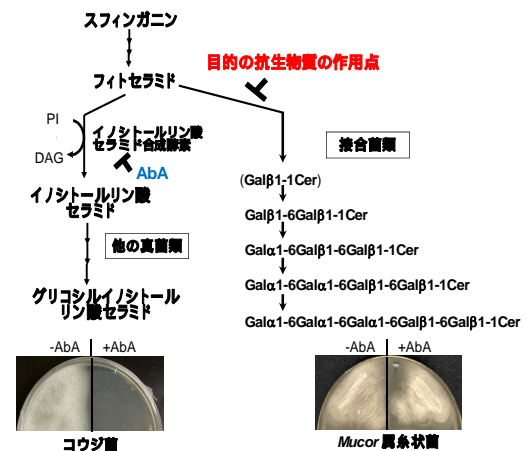


図1 接合菌類で見出された新規なスフィンゴ糖脂質の合成経路

3. 研究の方法

本研究の計画の基本的な課題としては接合菌類の細胞膜を構成するスフィンゴ糖脂質を合成する初発酵素であるセラミドガラクトシルトランスフェラーゼまたは糖脂質のガラクトースオリゴマー糖鎖を合成するガラクトース転移酵素の調製とその酵素阻害物質を検索して取得することである。すなわち、脂質のフィトセラミドにガラクトースのオリゴマー糖鎖が伸長する過程に関わるガラクトース転移酵素を調製することが課題となる。このガラクトース基の転移酵素はバイオインフォマティクスの手法によって遺伝子を探るか、あるいは当該の酵素タンパク質を菌体内から精製してペプチドのアミノ酸配列を解析するか、の方法で酵素遺伝子を取得した後、組換え酵素を調製する。あるいは菌体を破碎した粗酵素液から、さまざまな方法によって目的酵素を精製する。このようにして得られた酵素標品を用いて、種々の微生物の培養液を初めとするさまざまな物質についてその酵素阻害活性を調べ、

有効な阻害物質を見出して精製単離する。さらに抗菌スペクトルを調べて、接合菌類に特異な阻害物質を選抜し、構造解析を行うとともに抗生物質としての応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) 接合菌のガラクトース転移酵素の遺伝子クローニング

まず、マウス由来の既知のガラクトース転移酵素の遺伝子配列を基にしたバイオインフォマティクス解析により、接合菌類において全ゲノム解析が行われている *Rhizopus oryzae* のゲノム配列上で高い相同性を持つガラクトース転移酵素の候補遺伝子を探した。その結果、高い相同性を持つ4種類の候補遺伝子を見出した。そこで、これらの遺伝子配列を基にしたプライマーを設計し、*R. oryzae* の菌体から抽出精製したゲノムをテンプレートにしてPCRを行ったところ、3種類の増幅した遺伝子を得た。これらの遺伝子について、CHO細胞や酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*)、*Aspergillus oryzae*, *Mortierella alpina*などを宿主とした形質転換を試みた。発現したと見られる形質転換体について、TLCを用いて酵素活性を解析したところ、ガラクトース転移酵素の活性によって生成する新たな糖脂質を検出することはできなかった。

(2) ケカビ *Mucor hiemalis* のガラクトース転移酵素の粗酵素標品

そこで、*Mucor hiemalis* の粗酵素標品を用いてガラクトース転移酵素の活性を調べた。すなわち、*Mucor hiemalis* の菌糸体をホモゲナイザーによって破碎して粗酵素標品とし、酵素活性を検討した。RIラベルしたUDP-[U-¹⁴C]ガラクトースを基質として用いて、粗酵素標品の活性について酵素反応を行って調べた。生成物の検出にはイメージングアナライザー (BAS2500) を用いた。本酵素について、高い酵素活性を有する画分を調べたところ、マイクロソーム画分に高いガラクトース転移酵素活性を見出した。そこで、マイクロソーム画分を酵素標品として、さまざまな物質について酵素阻害活性を調べた。8 μM濃度の糖およびその誘導体の存在下で、タンパク質濃度 6pg/μl のマイクロソーム画分を添加し、28、15分間に酵素反応を行った。ガラクトース、マンノース、フルクトース、ラクトース、メチルグルコシド、メチルマンノシド、 α -サイクロデキストリンなどについて、その阻害活性を調べたところ、 α -メチルグルコシドについてのみ、僅かな阻害活性が見られた。これはUDP-ガラクトースのUDPとガラクトースが β -結合しており、メチル基とグルコースが α -結合している α -メチルグルコシドが競合阻害した結果であると推察された。500 μMの高濃度のNB-deoxynojirimycinを反応液に添加して、ガラクトシルセラミドの生成の低下を調べ

たところ、その低下はわずかであったことより、ガラクトース転移酵素阻害剤としての効果は低いと考えられる。

(3) 真菌類のセラミドガラクトシルトランスフェラーゼの遺伝子解析

接合菌類のセラミドガラクトシルトランスフェラーゼについては結局、遺伝子のクローニングおよび組換え酵素の発現などに成功できなかった。セラミドガラクトシルトランスフェラーゼはスフィンゴ糖脂質の生合成の初発酵素であり、糸状菌では *Aspergillus oryzae* にその存在が示唆されている。そこで、接合菌類のセラミドガラクトシルトランスフェラーゼに関する何らかの知見および情報を得ることができるのではないかと考え、酵素活性などを比較するためにゲノム解読が完了している麹菌 *A. oryzae* の本酵素の遺伝子クローニングと酵母 *Pichia pastoris* への異種発現を試みた。麹菌 *A. oryzae* OSI1013株から総脂質を抽出し、陰イオン交換樹脂と Iatro beads を用いたカラムクロマトグラフィーによって、グルコシルセラミドとガラクトシルセラミドの存在を確認した。すなわち、セラミドガラクトシ

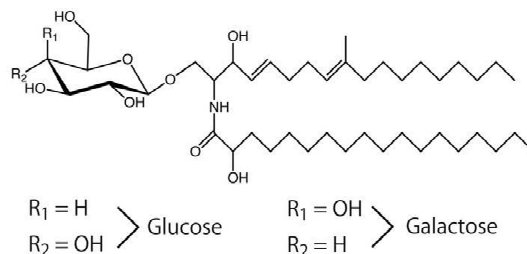


図2. *A. oryzae* OSI1013より単離されたセラミドモノヘキソシドの構造

ルトランスフェラーゼを本菌が有していることが示唆された。ガラクトシルセラミドが麹菌から見出されたのは本研究が初めてである。ガラクトシルセラミドについて、ガスクロマトグラフィーやMALDI-TOF-MS、GC/MSなどを用いて、詳細な構造解析を行ったところ、真菌類や植物に特有のフィトセラミドではない脂質構造を持つことが明らかになった。また、数株の *A. oryzae* について、セラミドモノヘキソシドの含有量を調べたところ、グルコシルセラミドの含量は少なく、ガラクトシルセラミドの含量が多い菌株が見出された。菌株によって、セラミドヘキソシドの組成が大きく異なることも見出され、さらに、培養温度によってもグルコシルセラミドとガラクトシルセラミドの含量の比が変化することが明らかになった。そこで、ガラクトシルセラミドを有することが明らかになった *A. oryzae* および *A. fumigates* を用いて、酵母を宿主としたセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングと組換えタンパク質の発現を試みた。その結果、哺乳動物のセラミドガラクトシルトラン

スフェラーゼとの相同性が高い候補遺伝子を単離し、*P.pastoris*にて発現を誘導したが、酵素活性は認められず、結局、同定できなかった。*A.oryzae*より単離した候補遺伝子は相同する遺伝子の配列との比較の結果、糸状菌では未だ同定されていない Sterol glucosyltransferase であることが明らかになった。

5．主な発表論文等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 憲二 (YAMAMOTO, Kenji)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：70109049

(2)研究分担者

片山 高嶺 (KATAYAMA, Takane)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：70346104