

フサリウム属真菌のかび毒（フモニシン）合成酵素に関する 活性測定法開発および生化学的研究

大阪医科大学 医学部 生化学教室
生城 浩子

1. 研究の背景と目的

スフィンゴ脂質に類似した化学構造を持つフモニシン (Fumonisin) 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) の一種である。世界的にマイコトキシンによる穀物の汚染は深刻な食糧問題であり、日本においても国産の主食米からフモニシンが検出されている。フモニシンは汚染穀物を介して家畜の急性中毒を起こすほか、ヒトにおいては発癌や新生児神経管欠損のリスク因子であることが報告されている。近年ではヒトの深在性真菌感染症の原因となるフサリウム菌やアスペルギルス菌におけるフモニシン産生が報告され、感染症発症との関連も指摘されている。

フモニシン産生真菌の比較ゲノム学的研究から、フモニシンがスフィンゴ脂質と類似の反応経路でアミノ酸基質から生合成されることが判明しているが、一方で個々の酵素に関する研究は遅れている。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て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、フモニシン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ているが、実態は不明である。

さらにヒトにおいては SPT 遺伝子の点変異によって

『遺伝性知覚神経障害 I 型 (HSN1)』を発症する。本疾患では、変異型 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、それらを出発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。培養細胞にフモニシンを添加すると、正常セラミドが減少し、変わって異常セラミドが増加する現象が観察されており、これは HSN1 の病態に類似している。このような背景から、農業・産業分野のみならず、医学分野においてもフモニシン生合成酵素 (中でも Fum8p) と SPT の構造-活性相関の解明は重要な研究課題である。本研究では、フモニシン合成遺伝子クラスターにおける重要な酵素である Fum8p と Fum13p に注目し、構造比較対象としてスフィンゴ脂質生合成の初発酵素である SPT、ならびに、これらが属する α -オキサミン酸合成ファミリー酵素の構造-活性相関の解明に並行して取り組み、また、基質アミノ酸の動態も含めてフモニシン生合成の解明に寄与する知見を得ることを目的とした。

2. 研究の方法

フモニシン生合成経路の第一段階と第二段階の反応を触媒する Fum8p と Fum13p に注目し、これらの異種発現系を構築し、大量培養した菌体から遺伝子組換えタンパク質をカラムクロマトグラフィーによって精製する。精製標品あるいは粗抽出液を実験材料として生化学的特徴付けを行い、酵素タンパク質の結晶化と X線構造解析を試みる。酵素標品を活用して、フモニシン合成酵素に対する特異的抗体を作成し、標識基質を用いない酵素活性測定法を確立する。

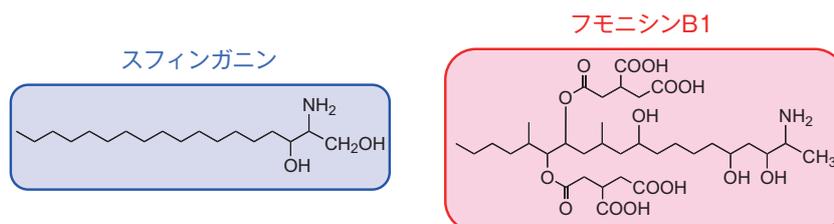


図1 長鎖塩基とフモニシンの化学構造

スフィンガニンはセラミドなど全てのスフィンゴ脂質の前駆体であり、長鎖アシル基とアミノ基を有し、長鎖塩基とも呼ばれる。フモニシンはスフィンゴ脂質様の化学構造をもつマイコトキシンである。フモニシン誘導体の中ではフモニシン B1 が最も毒性が強い。

3. 研究内容

本研究においては、フモニシン生合成機構や細胞毒性発揮の機序解明のためのツールを開発した。まず、フモニシン合成遺伝子クラスターの最も重要な Fum8p と Fum13p の大腸菌内大量発現系を構築した。Fum8p, Fum13p 精製標品を抗原に用いて各々に対する特異的抗体を作成し、以降の実験に活用した。大腸菌内で発現させた Fum8p は不活性な封入体であったが、酵母内で発現させた Fum8p はミクロソーム画分に局在し、酵素活性を有していた。Fum13p は大腸菌内で酵素活性を保持した可溶性タンパク質として大量発現した。すでに助成者が安定供給系を確立している SPT を活用して Fum13p の基質である 3-ケト長鎖塩基を大量合成し、これを精製 Fum13p の基質として活性測定を行った結果、Fum13p 標品は NADPH 依存性に反応触媒することが判明した。そこで、Fum8p 発現ミクロソームと精製 Fum13p を併用し、NADPH の吸収変化を指標として反応を追跡する活性測定系を作成した。本法は高価な標識基質や機器を用いないフモニシン合成活性測定系である。経過に関して、第 4 項において説明する。

4. 研究の実施経過

4.1. フサリウム属真菌由来フモニシン合成系遺伝子の取得と大腸菌・酵母内大量発現系構築

フサリウム菌ゲノム DNA を鋳型として *Fum8*, *Fum13* 両遺伝子を PCR クローニングし、それぞれを pET system, pCold system 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。Fum13p は可溶性タンパク質として大量発現した。Fum8p に関しては、全長の形質転換体の培養条件・タンパク質発現誘導条件を詳細に検討したが、発現量が非常に少なくなかつ封入体であった。膜結合部位と推定される領域の欠失変異体や触媒活性に必須な領域に限定したドメイン毎の発現ベクターを作成して発現量の改善を試みたところ、発現量は顕著に増加したものの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、大腸菌内発現系において酵素活性を有する Fum8p を得ることはできなかった。そこで、大腸菌に替えて、出芽酵母を用いた発現系を検討した。酵母用にコドン配列最適化した人工遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いたところ、ミクロソーム画分に Fum8p の発現を確認することができ、全長タンパク質を発現したミクロソーム画分においては酵素活性も確認された。

4.2. 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。Fum13p の基質は市販されていないため、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-ケト長鎖塩基を大量合成し、これを精製 Fum13p の基質として活性測定を行った。その結果、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 の酸化反応に伴う吸収変化を指標として酵素反応の進行を追跡する活性測定系を構築した。酵素源として Fum8p 発現酵母ミクロソーム、細菌由来 SPT 及び Fum13p 精製標品を併用することで、高価な標識基質を用いることなく、非標識基質による Fum8p や SPT の活性測定が可能となった。

4.3. Fum13p の精製および結晶化

Fum13p については、N 末端にあらかじめ付加した His6-tag に対する Ni-アフィニティカラムと陰イオン交換カラムの 2 段階のクロマトグラフィーによって電気泳動上均一にまで精製することに成功した。Fum13p 精製標品について、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が、本研究助成期間内では X 線結晶解析に供することができる結晶は得られなかった。

4.4. 基質および基質誘導体の合成

Fum8p および SPT のアシル-CoA 基質の認識機構を解明するためには、精製標品を用いた酵素反応の素過程の解析や酵素-基質複合体を模したタンパク質結晶の立体構造解析を行う必要がある。その際に必要となる基質誘導体を化学合成した。図 2 に結果をまとめた。

4.5. SPT の発現系と結晶化法の改良と、Fum8p 研究への適用

Fum8p の比較対象であり、Fum8p と同じ α -オキサミン酸合成酵素ファミリーに分類される SPT と 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS) に関して、発現系と結晶化法の改良を行った。真核生物 SPT については、これまで Fum8p と同様に大腸菌宿主では封入体を生じていたため、組み換えタンパク質の発現系の改良を行った。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。本改良法を Fum8 発現系にも適用したところ、同様に可溶性タンパク質の発現量の増加が確認された。細菌由来 SPT の結晶化法の改良を行い、新たな基質誘導体との複合体結晶の X 線結晶解析を行った。この複合体の結晶中において、今まで未確認だった副反応が進行していることが新たに判明した。ALAS に関しては、高分解能の構造解析によりこれまで未解明であった基質や生成物の活性部位における配向を決定することができた。

5. 研究から得た結果および考察

Fum8p の異種発現系構築に非常に難航した。当初、原因は Fum8p が N 末端に膜結合に関わると推定される疎水性領域と考え、欠失変異体を作成した。予想通り発現量の

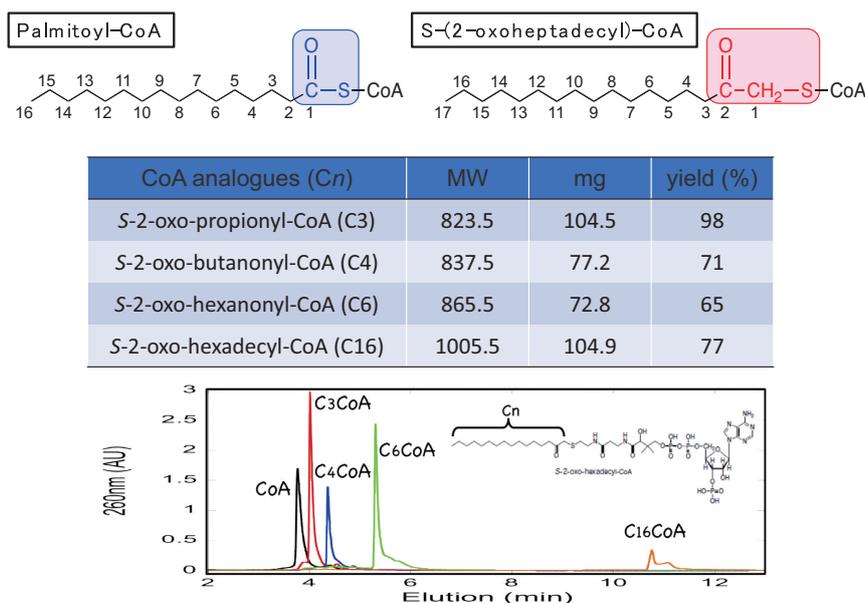


図2 アシル-CoA 誘導体の合成

Fum8p の非反応性のアシル CoA 基質アナログの構造式を示す (上段構造式). S-2-oxo-acyl-CoA は, アシル-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である. アシル基の炭素鎖長を C3 及び C4 から C16 まで 2 炭素ずつ変化させた一連基質誘導体を高収量で合成することに成功した (中段表). HPLC 分析によっていずれの誘導体も 95 % 以上の純度であることを確認した (下段図).

増加は達成できたが, 封入体形成を改善することはできなかった. 大腸菌内発現系では酵素活性のある Fum8p を得られなかったが, 封入体から精製した Fum8p 標品を抗原として力価の高い抗 Fum8p 抗体の作成に成功した. 同様に抗 Fum13p 抗体も作成した. 本助成研究実施に際して, これらの抗体は, 組換えタンパク質の発現確認や宿主細胞内での局在確認に利用できたことから, 今後もモニシン産生能を有する可能性の高いフサリウム菌株 (Fum8p/Fum13p 発現株) の検出などに有効活用できると考えられる. 酵母内発現系では全長 Fum8p を酵素活性を保持した小胞体局在の膜タンパク質として発現させることに成功した. これにより, 高価な標識基質を用いずに本来の基質が酵素に代謝されることに伴う吸光度変化を指標として酵素反応進行を追跡するモニシン合成活性測定系を作成した. 本法は検出機器として分光光度計やマイクロプレートリーダーを使用でき, フモニシン合成阻害剤のスクリーニング実験にも適用可能であると考えられる.

6. 残された問題, 今後の課題

現段階において, 酵母を宿主とした Fum8p 発現系は発現量に関しては大腸菌内発現系には遠く及ばない. 本助成期間中では大腸菌での可溶性 Fum8p 大量発現に取り組んできたが, 助成期間終盤に著しい発現量の改善の可能性が出てきており, 今後もその改良を継続することで酵素タンパク質の安定供給系を確立して, 本酵素の立体構造決定を目指す予定である. Fum13p については, 本助成の期間内に精製標品を用いてタンパク質結晶化スクリーニングを

行なったが, X線構造解析に耐えうるクオリティを備えた結晶を得ることができなかった. 今後も立体構造解明を目指し, 精製標品の安定化方法を工夫し, 結晶化スクリーニングを継続する. 並行して, 酵素としての生化学的な性状解析も進めていく予定である. また, 大腸菌発現 Fum13p を用いた長鎖塩基生成系の適用を広げ, フサリウム属真菌中の病原性フモニシン産生株の検出系としての開発を目指す.

学会発表

- 「細菌由来セリンパルミトイル基転移酵素における基質アナログ複合体の結晶構造解析」高橋亜弥, 生城浩子, 後藤春菜, 生城真一, 伊藤恵実, 平林義雄, 矢野貴人, 神谷信夫, 宮原郁子, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会; 第 90 回日本生化学会大会)
- 「スフィンゴ脂質合成酵素の反応制御機構研究」生城浩子, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会; 第 90 回日本生化学会大会)【フォーラム講演】
- 「細菌由来セリンパルミトイル転移酵素の L-セリン誘導体との反応について」生城浩子, 高橋亜弥, 伊藤恵実, 宮原郁子, 生城真一, 平林義雄, 矢野貴人, 第 12 回スフィンゴテラピー研究会
- 「基質複合体の構造解析によるアミノレブリン酸合成酵素の機能解明」主馬野祐希, 生城浩子, 矢野貴人, 神谷信夫, 宮原郁子, 日本結晶学会 平成 29 年度年会

5. 「セリンヒドロキシメチル基転移酵素の反応中間体構造から推定される触媒反応機構」赤井翔太, 生城浩子, 矢野貴人, 神谷信夫, 宮原郁子, 日本結晶学会 平成 29 年度年会

謝辞

基質誘導体合成に際し, 技術協力をいただきました富山県立大学濱田昌弘先生に深謝いたします。

本研究課題に対し多大なるご支援を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係の皆様方に心より御礼申し上げますとともに, 貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。