



きのこ類が産生する生物活性物質に関する天然物化学的・遺伝情報学的研究

宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター 鈴木 智 大

はじめに

きのこは、真菌のうち比較的大型の子実体を形成するものとされており、一般的にその多くは担子菌門または子囊菌門に属する。また、きのこは地球上に14万種程度存在すると言われていたが、そのうち同定されている種は2万種程度である。さらに機能性に関する研究がおこなわれているのはそのうちの数%に過ぎず、きのこは未開拓な資源といえる。

また近年、次世代シーケンサーの普及により、様々な生物の遺伝情報が解読されており、既に多くのきのこ類の遺伝子情報(ゲノムやトランスクリプトーム)が解読されている。きのこの有する様々な特徴を理解し、さらに応用展開していくために、今後さらに幅広い種の遺伝情報の解読が期待される。筆者らは、これらきのこ類の機能性研究や遺伝情報解読を継続的に行ってきた。以下にその概要を紹介する。

1. スギヒラタケの急性脳症に関わる毒性物質に関する化学的研究

スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) はキシメジ科スギヒラタケ属に属し、スギ等の針葉樹に発生するきのこである。このきのこは長く食用とされてきたが、2004年以降、スギヒラタケの摂取者に原因不明の急性脳症が相次いだ。筆者らは事件発生直後にいち早くこのきのこを入手し、このきのこ自体が毒物質を産生しているか否かを試験し、抽出物をマウスに腹腔内注射すると死亡することを明らかにした。その後、マウスに対する致死毒性を指標に糖タンパク質 (pleurocybellin; PC と命名) の精製に成功した。また、事件発生当時、スギヒラタケはレクチンの含有量が多いことから、レクチン原因説が新聞で報道された。そこでレクチン (*P. porrigens* lectin; PPL) を精製し、一次構造および諸性質決定・遺伝子クローニング・異種発現系の構築を行った¹⁻²⁾。

これまでにスギヒラタケ脳症患者の脳内には、髄鞘に特異な脱髄病変が起こっていることが確認されている。筆者らはスギヒラタケ粗抽出物、PC および PPL をマウスに投与し、その脳切片を調査したが、脳に異常は観察されなかった。そこで、(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

タンパク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) PPLは、リシンB鎖とHA1(ボツリヌス毒ヘムアグルチニン)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(リシン、ボツリヌス毒)と複合体を形成し毒性発現していることから、PCとPPLを混合してタンパク質分解活性の有無を検討した。その結果、上記致死性毒物質とレクチンは複合体を形成し、タンパク質分解活性を示している事を明らかにした。また、このタンパク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検討するため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、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事を明らかにした。さらに、これら複合体をマウスに投与し、脳切片をBBBのマーカ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。

このきのこによる脳症で亡くなった患者の脳では共通して、大脳白質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、筆者らは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はずと考え、前記の2成分の研究と同時に、低分子の毒性物質の探索を開始し、弱い細胞毒性を示すアミノ酸誘導体を得た³⁾。さらに、これら化合物の構造から推定された予想前駆体であるアジリジン化合物 (pleurocybellaziridine; PA) の合成に成功し、スギヒラタケ中での存在及びミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに特異的な毒性を明らかにした⁴⁾。それら総合的な知見から、PC-PPL複合体がBBBを破壊し、その後神経細胞毒性を持ったPAがスギヒラタケ脳症に特異な脱髄病変を引き起こすという仮説急性脳症メカニズムを提唱した(図1)。

2 きのこ類の遺伝情報解読

筆者らは生物情報学的手法を用いてきのこ類の遺伝情報の解読を行ってきた。特に上述したスギヒラタケのゲノムおよびトランスクリプトーム解析を行い、スギヒラタケに特徴的な機能未知の遺伝子が多数存在することを報告した⁵⁾。さらに上記ゲノムデータを用いて、スギヒラタケのゲノムデータベースの作成も行った⁶⁾。

また、芝が大きな曲線を描いて色濃く繁茂し、後にきのこが発生する現象は「フェアリーリング(病)」と呼ばれているが、このフェアリーリングを惹起するコムラサキシメジ培養液から、シバの成長促進物質2-アザヒポキサンチン(AHX)、成長抑制物質イミダゾール-4-カルボキシアミド(ICA)並びにAHXの代謝産物2-アザ-8-オキソヒポキサンチン(AOH)が確認され、「フェアリー化合物」と命名されている。筆者らはこれらのフェアリー化合物は5-aminoimidazole-4-carboxamide ribo-

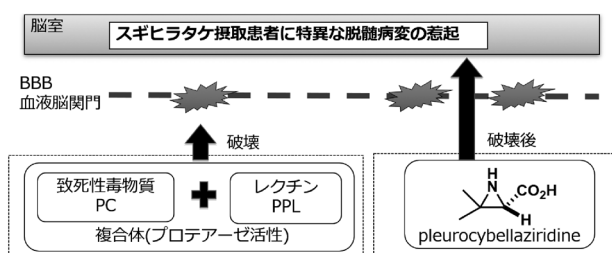


図1 スギヒラタケの仮説急性脳症メカニズム

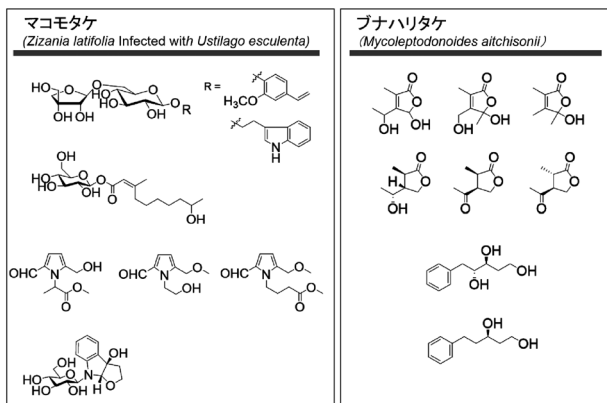


図2 マコモタケおよびブナハリタケから単離した低分子化合物

nucleotide (AICAR) から合成されると分子構造から推定した。そこで、コムラサキシメジのゲノム解読・データベース構築を行い、さらに AICAR の添加によって adenine/5-aminoimidazole-4-carboxamide phosphoribosyltransferase (APRT) の発現が上昇し、AHX が蓄積されることを明らかにし、本菌におけるフェアリー化合物の生合成経路の存在を証明した⁷⁾。

その他、遺伝子解析を通じてエタノール発酵菌である *Phlebia* MG-60 株のエタノール発酵メカニズムの解明⁸⁾、木材保存剤の性能基準試験において JIS 規格に規定されるオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) や薬用きのことして知られるカバノアナタケ (*Inonotus obliquus*) のミトコンドリア・全ゲノム決定も行った⁹⁻¹¹⁾。

3 その他機能性物質に関する研究

糖鎖は核酸、タンパク質に次いで第三の生命鎖とも呼ばれ、タンパク質や脂質と結合して生体内で重要な機能を果たしている。特定の糖鎖と結合するタンパク質 (レクチン) は癌などの疾病に対するバイオマーカーなど、その応用が期待されている。筆者らは前述のスギヒラタケからのレクチンだけでなく、サクラシメジ (*Hygrophorus russula*) からこれまで全く知られていなかったマンノースの α 1-6 結合のみを特異的に認識する新規レクチンを単離し、その一次アミノ酸配列の決定・遺伝子クローニングを行った¹²⁾。その他、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) などのきのこ抽出物からもレクチンを単離・構造決定し、その糖認識特異性を含めた諸性質を決定した¹³⁾。

また、その他低分子化合物の単離・構造決定も行っている。骨粗鬆症の予防及び治療には破骨細胞による骨吸収を抑制することが有効と考えられるが、筆者らは菌類抽出物の破骨細胞形成阻害スクリーニングの結果をもとに研究を行い、マコモタケ (*Ustilago esculenta* が感染した *Zizania latifolia*) から活性物質の単離・構造決定に成功した¹⁴⁻¹⁵⁾。その他、ブナハリタケ (*Mycoleptodonoides aitchisonii*) から小胞体ストレス誘導細胞死の抑制物質の単離・構造決定に成功した¹⁶⁻¹⁷⁾。

(引用文献)

- 1) Suzuki, T., et al., Purification, characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 73, p. 702-709 (2009)
- 2) Suzuki, T., et al., Heterologous expression of a lectin from *Pleurocybella porrigens* (PPL) in *Phanerochaete sordida* YK-624. *J. Microbiol. Methods*, Vol. 100, p. 70-76 (2014)

- 3) Kawaguchi, T., et al., Unusual amino acid derivatives from the mushroom *Pleurocybella porrigens*. *Tetrahedron*, Vol. 66, p. 504-507 (2010)
- 4) Wakimoto, T., et al., Proof of the existence of an unstable amino acid: Pleurocybellaziridine in *Pleurocybella porrigens*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 50, p. 1168-1170 (2011)
- 5) Suzuki, T., et al., A new omics data resource of *Pleurocybella porrigens* for gene discovery. *Plos One*, Vol. 8, p. e69681 (2013)
- 6) Yamamoto, N., et al., A-WINGS: an integrated genome database for *Pleurocybella porrigens* (Angel's wing oyster mushroom, Sugihiratake). *BMC Res. Notes*, Vol. 7, p. 866 (2014)
- 7) Suzuki, T., et al., The biosynthetic pathway of 2-azahypoxanthine in fairy-ring forming fungus. *Sci. Rep.*, Vol. 6, p. 39087 (2016).
- 8) Wang, J., et al., Analysis of ethanol fermentation mechanism of ethanol producing white-rot fungus *Phlebia* MG-60 by RNA-seq. *BMC Genomics*, Vol. 17, p. 616 (2016).
- 9) Tanaka, Y., et al., The complete genome sequence and phylogenetic analysis of mitochondrial DNA from the wood-decaying fungus *Fomitopsis palustris*. *Genes Genom.*, Vol. 39, p. 1377-1385 (2017)
- 10) Tanaka, Y., et al., A GH family 28 endo-polygalacturonase from the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*: purification, gene cloning, enzymatic characterization and effects of oxalate. *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 123, p. 108-116 (2018)
- 11) Agnestis, R., et al., The complete mitochondrial genome sequence of the medicinal fungus *Inonotus obliquus* (Hymenochaetaceae, Basidiomycota). *Mitochondrial DNA Part B.*, Vol. 4, p. 3504-3506 (2019)
- 12) Suzuki, T., et al., Mannose α 1-6-specific lectin from the mushroom *Hygrophorus russula*. *Glycobiol.*, Vol. 22, p. 616-629 (2012)
- 13) Suzuki, T., et al., Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Mycosci.*, Vol. 56, p. 359-393 (2015).
- 14) Suzuki, T., et al., Makomotindoline from Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 22, p. 4246-4248 (2012)
- 15) Choi, JH., et al., Makomotines A to D from Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*. *Tetrahedron Lett.*, Vol. 55, p. 3596-3599 (2014)
- 16) Choi, JH., et al., Endoplasmic reticulum stress suppressive compounds from the edible mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *J. Nat. Prod.*, Vol. 77, p. 1729-1733 (2014)
- 17) Choi, JH., et al., Thapsigargin-induced ER stress suppressive compounds from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Tetrahedron Lett.* Vol. 56, p. 5561-5563 (2015)

謝辞 本研究は静岡大学農学部、静岡大学遺伝子実験施設、宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターを中心に行われたものです。なかでも卒業論文から博士論文の研究指導のみならず、現在もお心配り頂いている恩師である静岡大学の河岸洋和先生に心より感謝申し上げます。また、研究に関する様々な指導・助言・激励を賜った、静岡大学・宇都宮大学・静岡県立大学・明治大学の諸先生方にも深謝いたします。また、本研究にご協力いただいた静岡大学農学部生物化学研究室および宇都宮大学生物分子情報学研究室の修了生、院生、学生、研究補助員諸氏に改めて感謝申し上げます。最後に、本賞にご推薦くださいました米山弘一先生に心より御礼申し上げます。