

研究成果報告書

研究題目：スギヒラタケの急性脳症事件の分子機構全容解明とその応用展開

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

【背景および目的】 2004年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は59名に達し、17名の患者が亡くなった。これらの症例のうち55名はスギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) を摂取していたことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。

本研究室ではこれまでにスギヒラタケレクチン (PPL) の諸性質および一次構造配列の決定¹⁾、スギヒラタケ致死性高分子 (B3) の単離を報告している。またB3とPPLは複合体を形成し、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タンパク質を分解すること、それら複合体を腹腔内投与したマウスで血液脳関門 (BBB) が破壊されていることを明らかにした²⁾。更に、その不安定性ゆえに単離が不可能であった新規化合物 pleurocybellaziridine (PA) のスギヒラタケ中での存在証明およびその神経毒性を明らかにした³⁾。上記結果より、スギヒラタケによる急性脳症の発症機構に関して「スギヒラタケ中の高分子2成分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。そして新規の低分子毒 pleurocybellaziridine によって本急性脳症に特異な脱随病変が惹起される。」という仮説を提唱している。上記背景から、(1) 各毒性物質が脳に与える影響を検討することを目的とした。

また、B3は難溶性であるため未だ1次構造が不明である。また粗精製段階でのPPL単独でもプロテアーゼ活性が表れる場合があり、その時のMSスペクトルにはPPLのピークのほかに m/z 13000 付近にピークが確認された (Fig. 1)。そのため、この物質がB3と同様にプロテアーゼ活性に関与していると推定し、(2) 本タンパク質 (PP13000 と命名) の構造決定を行うことを目的とした。

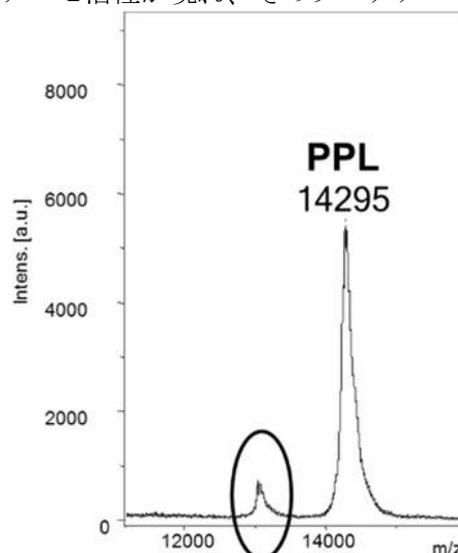


Fig.1 プロテアーゼ活性を有する粗精製のPPLのMSスペクトル

【結果】

(1) 毒性物質がマウスの脳に与える影響の検討

PPL-B3複合体およびこれら複合体にPAを加えた場合でのマウスの脳に与える影響を検討するために以下の実験を行った。

投与試験は①対照群としてPBS (phosphate buffered saline)を投与した検体、②複合体投与群としてPPL (24 mg/kg) およびB3(30 mg/kg)を投与した検体、③3成分投与群としてPPL、B3およびPA (70 mg/kg)を

投与した検体の計3群で行った。投与後、死亡が確認されたマウスは確認直後に、その他のマウスは投与後3日目で還流固定を行い、脳組織を採取し厚さ50 µmの切片を作成した。その後、Glut1(血管内皮細胞マーカー)、NeuN(神経細胞マーカー)、GFAP(グリア細胞マーカー)を一次抗体に用いて免疫染色した後、顕微鏡で観察し投与群ごとの違いを観察した。

その結果、Glut1とGFAPを用いて免疫染色した検体においては、対照群と比較して脳全体で複合体投与群では発色が薄い傾向が確認され、3成分投与群では発色が強くなる傾向が確認された。また、NeuNを用いて免疫染色した複合体投与群の検体においては、海馬と皮質Ⅰ層に顕著な発色の差異が観察された。海馬は記憶・知能行動を司る部位であり、海馬へのPPL-B3複合体の影響がスギヒラタケ摂取患者に確認された意識障害・記憶障害を惹起する可能性が示唆された。

(1) PP13000の構造決定・異種発現系の構築

逆相クロマトグラフィーおよび二次元電気泳動を用いてPP-13,000を単離し、トリプシンおよびGluエンドペプチダーゼを用いて消化した。Triple TOF MS (AB sciex)を用いて取得したPP-13,000のMS/MSスペクトルデータを用いてスギヒラタケデータベースにPEAKS searchを行ったところ、PPLのC末端側の11アミノ酸が欠落しているアミノ酸配列が確認できた。更に、ここまでのアミノ酸配列の推定分子量が約13000であることからPP-13,000はPPLの部分配列である可能性が考えられた。

そこで、PP-13,000およびPPLのリコンビナント体を作製し、それらを混合した際のプロテアーゼ活性の有無を確認した。大腸菌のコールドショック発現系用ベクター(pCold □)に目的遺伝子(pp1およびpp13000遺伝子)をそれぞれ導入し、発現プラスミドを構築した。本プラスミドを大腸菌に形質転換した後、発現誘導を行い菌体を回収・破砕し可溶性画分を精製した。得られた可溶性画分をHis GraviTrapアフィニティークロマトグラフィーにより精製後、SDS-PAGEおよびLC-MS/MSを用いたタンパク質同定を行い、それぞれの組換えタンパク質の発現および精製を確認した。得られた組換えタンパク質の諸性質を決定するため、赤血球凝集活性試験を行いレクチン活性の有無を試験した。さらにインスリンを基質としたプロテアーゼ活性試験を行い、MALDI-TOF/MS解析を用いプロテアーゼ活性の有無と基質開裂パターンの確認を試みた。

精製した組換えタンパク質をSDS-PAGEに供した結果、それぞれ目的とする分子量付近にそれぞれのシングルバンドが確認された。さらに赤血球凝集活性試験を行った結果、rPPLではレクチン活性が確認されたが、rPP13000ではその活性は確認されなかった。また、プロテアーゼ活性試験の結果、native B3とrPPLを混合したサンプルでは、天然と同様の基質の開裂パターンを示したのに対し、rPPLとrPP13000を混合したサンプルでは基質の消失のみが観察された。これらのサンプルをLC-MS/MSに供した結果、rPPLとrPP13000を混合したサンプルで、基質であるインスリンの分解産物が検出されたため、基質の開裂パターンは異なるもののrPPLとrPP13000を混合するとプロテアーゼ活性を有することが証明された。

1) Suzuki, T., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 702-709 (2009)

2) 河岸洋和、菅敏幸、化学と生物、51(3)、134-137 (2013)

3) Wakimoto, T., et al., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 50, 1168-1170 (2011)