

Studies on the Catabolic Pathway of Steryglucoside and Its Physiological Significance in *Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae*

渡邊, 昂

<https://doi.org/10.15017/1500796>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



氏 名 : 渡邊 昂

論文題名 : Studies on the Catabolic Pathway of Sterylglucoside and Its Physiological Significance in *Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae*
(*Cryptococcus neoformans* と *Saccharomyces cerevisiae* のステリルグルコシド分解経路とその生理的意義に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

アスペルギルス症、カンジダ症、クリプトコッカス症、ムコール症などの深在性真菌症の患者数は、我が国でも年々増加している。これらの真菌症に対する既存の治療薬は、副作用が強いことや耐性菌の出現が問題となっている。特異性が高く、副作用の少ない抗真菌薬を開発するためには、ヒトにはない真菌特有の代謝系を標的とし、作用機序が既存の抗真菌薬と異なることが望ましい。

申請者の研究グループは、*Cryptococcus neoformans* のグルコシルセラミド(GlcCer)の分解酵素 EGCrP1 を同定していた (Ishibashi et al, *J Biol Chem*, 2012)。*C. neoformans* のゲノムデータベースには、EGCrP1 のホモログ (EGCrP2) が存在していた。EGCrP2 を大腸菌で発現精製したリコンビナント EGCrP2 は、GlcCer だけではなく、エルゴステリル- β -グルコシド(EG)を含む種々のステリルグルコシド、パラニトロフェニル- β -グルコシドなどの人工基質を酸性条件下で分解し、アグリコンに対して特異性の広い酸性 β -グルコシダーゼであることが分かった。

次に、EGCrP2 の生理機能を明らかにするために、*C. neoformans* の EGCrP2 欠損株を作製した。EGCrP2 欠損株の酸性 β -グルコシダーゼ活性は顕著に低下した。野生株と EGCrP2 欠損株の脂質組成を比較すると、欠損株では未知の糖脂質が蓄積していた。未知糖脂質を単離・精製後、質量分析及び二次元 NMR で解析したところ、EG であることが明らかとなった。EGCrP2 欠損株は、液胞の肥大化と対数増殖期中期以降の増殖抑制が観察された。そこで、液胞を単離して脂質を解析したところ、EGCrP2 欠損株では野生株と比較して顕著な EG の蓄積が認められた。また、野生株で検出された液胞画分の酸性 β -グルコシダーゼ活性は、EGCrP2 欠損株では欠失していた。以上の結果から、EGCrP2 は真菌類の EG 代謝のミッシングリンクとされていたステリル- β -グルコシダーゼであることが明らかになり、真菌類のステリルグルコシド分解経路が初めて解明された。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においても EGCrP2 ホモログ (Yir007w) が存在した。*S. cerevisiae* には EG 合成酵素は存在するが EG は殆ど存在せず、その理由として EG 分解系が活発に機能しているためと考えられてきた。しかし、出芽酵母の EG 分解酵素は未同定であった。そこで、Yir007w を大腸菌で発現し、リコンビナント精製酵素を用いて諸性質を調べた。その結果、Yir007w は、*C. neoformans* の EGCrP2 と同様に、酸性領域に最適 pH を持つステリル- β -グルコシダーゼであることが分った。*yir007w* 欠損株においても、EG が蓄積していた。*yir007w* 欠損株では液胞の断片化が観察されたが、*yir007w* リバータント株では酵素活性の回復とともに液胞形態もほぼ正常に戻った。緑色蛍光タンパク質 GFP を N 末端と C 末端にそれぞれ付加した Yir007w を出芽酵母で過剰発現させた結果、C 末端に付加した酵素は細胞質に、N 末端に付加した場合は細胞内顆粒に局在した。以上の結果から、出芽酵母の EG 分解は Yir007w が担っており、EG 分解系の欠損は液胞形成に大きな影響を与えることが判明した。

EGCrP2 はヒトには存在せず、深在性真菌症原因菌には普遍的に存在しているので、副作用が少なく、適用範囲の広い真菌症治療薬の標的として期待される。