

氏 名	あお き かず ひろ 青 木 一 弘
学 位 の 種 類	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 8 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Structures and Functions of Novel Glycosphingolipids from Filamentous Fungi (糸状菌における新規なスフィンゴ糖脂質の構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 本 憲 二 教 授 小 堤 保 則 教 授 佐 藤 文 彦

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid: GSL) は、疎水性のセラミドと親水性の糖鎖部分から成る両親媒性の生理活性分子で、多細胞生物では細胞の文化や増殖、器官形成などの他に、癌化、感染、細胞死など様々な生命現象に関与することが知られている。酵母やカビなどが含まれる真菌類の GSL の化学構造は、セラミドに糖鎖が結合したほ乳動物の GSL とは大きく異なる。すなわち、フィトセラミドにイノシトールリン酸が結合した Inositolphospho-ceramide (IPO) がコアとなり、これにマンノースなどの中性糖がさらに付加した Glycosylinositolphosphoceramide (GIPC) が主要な構成成分である。GIPC 以外の GSL 成分としては 9-メチル-4,8-スフィンガジエニンを特徴的なスフィンゴイド塩基成分とするグルコシルセラミド (GlcCer) が知られている。真菌類の GSL については、出芽酵母において GIPC の生合成に関与する遺伝子や機能の解析が進んでいる一方、糸状菌 (カビ) の GSL の詳細な構造や機能については、ほとんど明らかにされていない。本研究では糸状菌の GSL の生理的機能を解明する目的で、様々な糸状菌の GSL について調べたところ、不完全菌類と接合菌類に属する糸状菌から新規な糖鎖構造を有する GSL を見出し、それらの構造および機能について解析した。

1. 糸状菌における新規なコリンリン酸含有糖脂質グリコシルイノシトールホスホセラミドの構造解明とそのイネ培養細胞の細胞死誘導活性

様々な糸状菌の菌体から GSL 画分を調製し、その成分を単離して GC, MALDI-TOF-MS, ¹H-NMR などによって構造解析を行った結果、不完全菌類に属する植物病原性糸状菌 *Trichoderma viride* および土壌分離菌 *Acremonium* sp. から GPI (glycosylphosphatidylinositol) -anchor と糖鎖構造が類似した新規な両性イオン型スフィンゴ糖脂質 (zwitterionic glycosphingolipid: ZGL) を見出すとともに、これにホスホコリン (PC) 残基が結合した ZGL をも見出した。これまでに報告されている真菌類の GSL の糖鎖構造は Man-Ins (マンノシルイノシトール) をコアとするのに対して、本菌のそれは Man-GlcN-Ins (マンノシルグルコサミニルイノシトール) をコアとする糖脂質であった。

植物に疾病を及ぼす病原体の約 80% は真菌類に属する糸状菌であり、真菌類の GlcCer は植物の抵抗性反応を誘起する物質 (エリシター) であることが見出されている。そこで、イネ培養細胞を用いて ZGL の生理活性を検討した結果、Man-GlcN-Ins をコアとする ZGL を添加することによってイネ培養細胞の細胞死誘導活性が認められ、PC を持つ ZGL はさらに強い活性を示した。これら ZGL は植物の生体防御を誘起する上で重要な因子である活性酸素の生成や DNA のラダー化を伴わない細胞死をイネ培養細胞に引き起こした。一方、出芽酵母や非病原性糸状菌由来の Man-Ins をコアとする GIPC は細胞死を誘導しなかった。これらの結果より、糸状菌から見出した新規な GSL が植物への感染の成立に関与している可能性が推測された。

2. 抗生物質オーレオバシジン A に耐性を示す接合菌類から見出した新規な中性スフィンゴ糖脂質の構造と生合成経路の解明

担子菌類 (キノコなど) や子囊菌類 (酵母など) の生体膜を構成する主要な GSL は GIPC である。Aureobasidin A (AbA) は GIPC 合成の初期段階に深く関わる IPC 合成酵素を阻害する抗生物質であり、ほとんどの真菌類は AbA を含む

培地では成育が著しく阻害される。しかしながら、接合菌類においてはAbAによる成育阻害が全く認められないことを初めて見出した。そこで、接合菌 *Mucor hiemalis* のGSLを詳細に解析した結果、セラミドにガラクトースが β 1-6および α 1-6結合した糖鎖構造を持つ新規な中性糖脂質Ceramide di-~penta-saccharideを見出した。これらのGSLは接合菌類において共通の成分として見出され、接合菌類はGSL成分としてIPCを持たないため、AbAによって生育が阻害されないことが示された。すなわち、接合菌類にはGIPC合成経路とは全く異なるGSL生合成経路が存在することを見出した。

論文審査の結果の要旨

糖脂質は哺乳動物の細胞膜を構成する重要な成分であり、その糖鎖部分は細菌毒素やホルモンなどの受容体として機能し、また、細胞間相互認識を介した増殖・分化の制御において重要な機能を担う。一方、微生物においては担子菌類（キノコなど）や子囊菌類（酵母など）の細胞膜を構成する成分として重要であり、その主要な糖脂質はイノシトールリン酸セラミド（IPC）をコアとすることが知られ、構造や機能に関する詳細な研究が行われている。しかしながら、糸状菌（カビ）の生体膜を構成する糖脂質についてはほとんど知られていない。本論文の著者は糸状菌の糖脂質を詳細に解明し、*Acremonium* 属糸状菌から新規なスフィンゴ糖脂質を見出すとともに、その糖脂質がイネ培養細胞の細胞死を引き起こすことを示した。また、抗生物質 Aureobasidin A がケカビ *Mucor hiemalis* の生育を全く阻害しないことを見出し、ケカビやクモノスカビを含む接合菌類には他の真菌類に認められない新規なスフィンゴ糖脂質が存在することを見出した。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. *Acremonium* 属糸状菌の糖脂質について、さまざまな解析法を駆使して構造解析を行い、他の糸状菌には存在しない GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型の糖鎖構造を持つ両性イオン型糖脂質 (ZGL) を初めて見出した。さらに、糖鎖の末端にコリンリン酸基が結合した ZGL を糸状菌において初めて見出した。これらの ZGL は *Trichoderma viride* などの植物病原性糸状菌に特異的に存在することを示した。
2. 新規な ZGL はイネ培養細胞の細胞質の凝集を伴う細胞死を引き起こすことを見出した。その細胞死は活性酸素の生成や DNA のラダー化を伴わない細胞死であることを明らかにした。
3. 細胞死を誘導する ZGL は Mannose (α 1-6) glucosamine の構造を糖鎖に持つことを示すと同時に、コリンリン酸基がその糖鎖に結合した ZGL はより強い細胞死を引き起こすことを示した。
4. *Mucor* 属糸状菌は真菌類の生育を阻害する抗生物質 Aureobasidin A によって生育阻害を全く起こさないことを見出した。*M. hiemalis* の糖脂質について、さまざまな解析法によって構造解析した結果、ガラクトースを構成糖とする Ceramide di-, tri-, tetra- および penta-saccharide を有する新規な中性スフィンゴ糖脂質であることを明らかにした。これらの糖脂質は接合菌類にのみ共通に存在する特異的な糖脂質であることを示し、接合菌類は IPC を含む糖脂質を有さず、このような中性スフィンゴ糖脂質を有するために Aureobasidin A によって生育が阻害されないことを明らかにした。すなわち、接合菌類には IPC 合成経路とは全く異なる糖脂質生合成経路が存在することを示唆した。これらの事実は内臓疾患などの重篤な症状を引き起こすムコール症などを初めとする真菌症に対する有効な治療薬を創薬する上で重要な知見を与えるものである。

以上のように、本論文は微生物の糖脂質に新たな知見を加えたものであり、糖鎖生物学のみならず、微生物学、細胞生物学、医学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成16年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。