



崇城大学
生物生命学部
応用微生物工学科
准教授

岡 拓二

1999年 九州大学農芸化学科卒業
2004年 同大学院生物資源環境科学府
博士課程修了
2004年 産業技術総合研究所
糖鎖工学研究センター研究員
2008年 崇城大学生物生命学部助教
2010年 崇城大学生物生命学部准教授

糸状菌のガラクトフラノース含有糖鎖生合成に関わる 新規糖転移酵素遺伝子の機能解析

【はじめに】

アスペルギルス属糸状菌の物質生産能や病原毒性には、菌糸の先端成長、すなわち、細胞壁の形成が関わっており、細胞壁構成糖鎖の生合成について世界中で活発な研究が行われている。アスペルギルス属の細胞壁成分には、 β 1,3(6)-グルカン、 α -グルカン、マンナン、キチン、ガラクトマンナンが知られている。このうち、ガラクトマンナン以外の細胞壁糖鎖構成成分の生合成に関わる遺伝子は、既に、同定され、遺伝子の機能解析により細胞壁形成における役割が明らかにされつつある。ガラクトマンナンは、 α 1,2-マンノースの重合体に β 1,5-ガラクトフラノース(Galf)の重合体(ガラクトフラナン)が β 1,6-結合する構造であることが知られている。このガラクトフラナンは、真核生物においては動物や植物および酵母には存在せず、*Aspergillus*属や*Trichoderma*属などの糸状菌にのみ存在する、糸状菌が特異的に持つ糖鎖である。細胞壁に含まれるガラクトフラナンは、ヒトに対する抗原性を持ち、肺アスペルギルス症の病原菌である*A. fumigatus*の病原毒性に関与することが示唆されている。よって、ガラクトフラナンの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子が同定されることで、この感染メカニズムの解明につながると考えられる。

近年、*A. nidulans*においてUDP-ガラクトピラノース(Galp)からUDP-Galfを合成するUDP-Galp ムターゼをコードする*ugmA*遺伝子が見つかり、*ugmA*遺伝子がガラクトフラナンの生合成や正常な細胞壁形成に必要な不可欠であることが明らかになっている。このことは、同時にガラクトフラナン合成酵素の糖供与体がUDP-Galfであ

ることを示している。しかしながら、UDP-Galf はガラクトフラナンのみならず糖脂質やタンパク質糖鎖など、他の Galf 糖鎖の糖供与体としても機能するために、ガラクトフラナン単体での機能や生理学的意義は未だに明らかにされていない。従って、ガラクトフラナン合成に直接関与する糖転移酵素遺伝子を同定することが、ガラクトフラナンの細胞壁形成における機能を解明するためには、必要不可欠となる。

本研究では、モデル糸状菌である *A. nidulans* を実験材料として、逆遺伝学的手法を用いて、ガラクトフラナンの生合成に関与する遺伝子を同定すると共に、ガラクトフラナンの生理的機能に関する知見を得るための諸研究について、その経過と結果を論述した。

【機能未知糖転移酵素遺伝子の選抜】

糖質関連酵素のデータベースである CAZY (carbohydrate active enzymes) によると、モデル糸状菌である *A. nidulans* のゲノム上には、90 種類の糖転移酵素遺伝子が存在する。この 90 種類の糖転移酵素遺伝子のうち、アミノ酸の相同性から既知の糖転移酵素と相同性が高くその機能が推定できるものを除外すると、30 種類の遺伝子が全く新規で、機能未知な糖転移酵素遺伝子であることが見出された。さらに、これら機能未知糖転移酵素遺伝子のうち、Galf 残基を糖鎖に持つ糸状菌類に共通に存在し、且つ、動物や植物などの Galf 残基を持たない生物群に、類似遺伝子が存在するものを除外すると、30 種類の遺伝子が Galf 残基を持つ生物に共通して存在する遺伝子であることが見出された。

このことから、これら 30 種類の機能未知糖転移酵素遺伝子の中にガラクトフラナンの生合成に関与する糖転移酵素遺伝子が含まれると考え、30 種類のうち 17 個の遺伝子について遺伝子破壊株を取得して、表現型の変化を調べた。

親株としては、遺伝子のターゲッティング効率の高い *A. nidulans* *nkuB* 破壊株 (AKU89) を用いた (1)。17 個の機能未知糖転移酵素遺伝子上流の 1 kb および下流の 1 kb の断片を PCR によってそれぞれ増幅し、それらの断片が、選択用マーカーである *argB* 遺伝子を挟み込む構造を持つ遺伝子破壊用 DNA カセットをフュージョン PCR 法によって作製した。この遺伝子破壊用 DNA カセットを *A. nidulans* にプロトプラスト-PEG 法を用いて導入し、得られた形質転換体の中から遺伝子ターゲッティングされた株を選抜した。

【ガラクトフラナン合成に関わる遺伝子の同定】

作製した 17 種類の遺伝子破壊株を、親株および Δ *ugmA* と表現型を比較した。その結果、1 種類の遺伝子破壊株 (No. 4 株) と Δ *ugmA* の表現型が類似しており、No. 4 遺伝子がガラクトフラナンの生合成に関与している可能性が示唆された (図 1)。また、

細胞壁中タンパク質に対してEB-A2 (anti- β 1,5-Gal f) 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行うことによるガラクトフラナンの検出を行った。その結

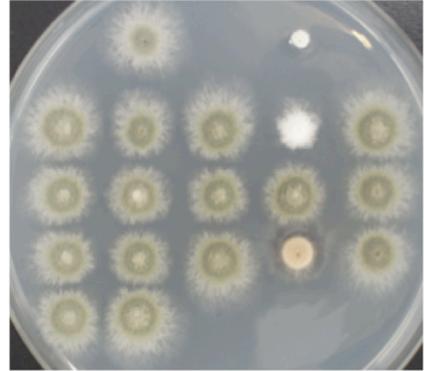
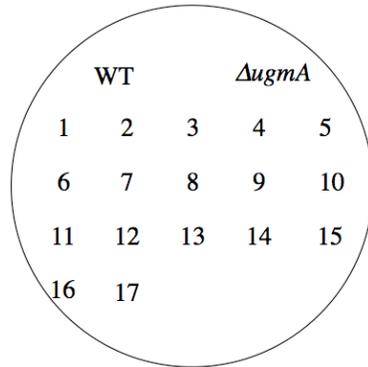


図1 遺伝子破壊株のコロニー表現型

果、No. 4 株の細胞壁中タンパク質のガラクトフラナンが欠損していた (図 2)。さらに、細胞壁の単糖組成分析の結果、グルコース量、N-アセチルグルコサミン量では、親株と比較して顕著な変化が認められなかった。一方、ガラクトース量は No. 4 株では 60%に減少していた。すなわち、No. 4 株では、ガラクトフラナンの構成糖であるガラクトース量が顕著に減少していることが明らかとなった。これらのこと

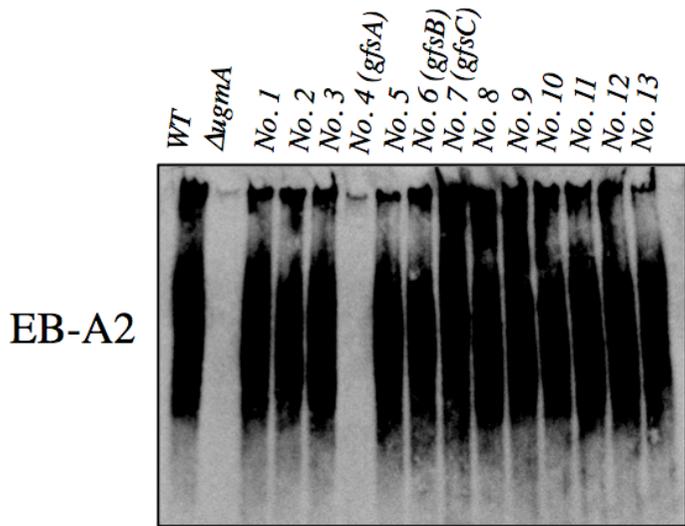


図2 ガラクトフラナン欠損株のスクリーニング

から、No. 4 遺伝子がガラクトフラナンの生合成に関与していることが強く示唆され、この No. 4 遺伝子を galactofuranan synthase A (*gfsA*) と名付けた。A. nidulans のゲノム上には、GfsA タンパク質とアミノ酸レベルで相互に 26.0-33.6%の相同性を有する、2つの遺伝子 (No. 6、No. 7) が存在している。これら遺伝子についてもそれぞれ、*gfsB*、*gfsC* と名付けた。しかしながら、*gfsB* および *gfsC* の遺伝子破壊株ではガラクトフラナンの欠損は示されなかった。

【ガラクトフラナン合成に関わる遺伝子破壊株の表現型解析】

$\Delta gfsA$ 株、 $\Delta gfsB$ 株および $\Delta gfsC$ 株の更なる表現型解析を行った。MM 培地にて 30°C で培養した結果では、 $\Delta gfsA$ 株は親株やその他の遺伝子破壊株に比べて生育速度

が遅く、浸透圧調整剤として 0.6 M KCl を添加した MM+KCl 培地においても、菌糸の生育速度は回復しなかった。しかし、42°C の培養温度で 0.6 M KCl を添加した培養条件において、生育速度が回復することが示された (図 3)。次に、カルコフルオロホワイト (CFW) により菌糸を染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。結果として、親株、 $\Delta gfsB$ 株および $\Delta gfsC$ 株では正常な菌糸の生育が示された。しかし、 $\Delta gfsA$ 株では菌糸形が不均一で湾曲しており、隔壁数の増加が観察された (図 4)。さらに、取得した遺伝子破壊株を MM 培地において生育させたところ、菌糸の成長速度が *gfsA* 遺伝子破壊株 (0.24 mm/hour) において、野生株 (0.35 mm/hour) の 66% に減少し、また分生子形成能も、*gfsA* 遺伝子破壊株 (6.6×10^7 個/mm²) では、野生株 (6.0×10^8 個/mm²) の約 10 % 程度に低下することが明らかになった。また、*gfsB* および *gfsC* の遺伝子破壊株では顕著な違いは認められなかった。薬剤耐性試験の結果、 $\Delta gfsA$ 株は 0.002% の SDS に感受性を示し、100 μ g/ml のカルコフルオロホワイトにおいて、耐性を示すことが明らかになった。また、 $\Delta gfsB$ 株および $\Delta gfsC$ 株は、親株に比べて薬剤に対して変化が認められなかった。以上のことから、糸状菌のガラクトフラナンは正常な菌糸及び、分生子の形成に必要であることが明らかになった。

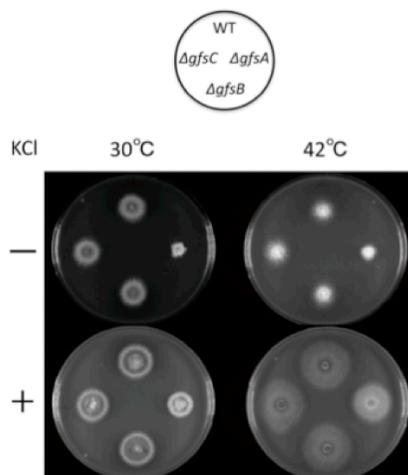


図3 培養条件によるコロニー形態の変化

図 3 培養条件によるコロニー形態の変化

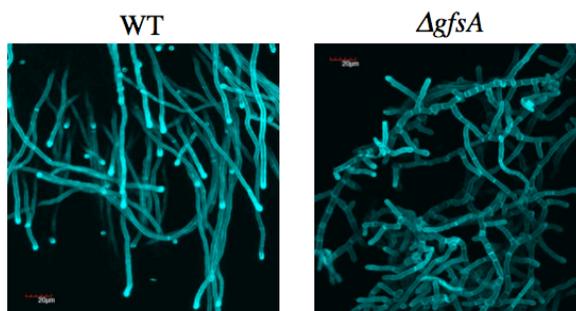


図4 菌糸の蛍光顕微鏡写真

は顕著な違いは認められなかった。薬剤耐性試験の結果、 $\Delta gfsA$ 株は 0.002% の SDS に感受性を示し、100 μ g/ml のカルコフルオロホワイトにおいて、耐性を示すことが明らかになった。また、 $\Delta gfsB$ 株および $\Delta gfsC$ 株は、親株に比べて薬剤に対して変化が認められなかった。以上のことから、糸状菌のガラクトフラナンは正常な菌糸及び、分生子の形成に必要であることが明らかになった。

【GfsA タンパク質のガラクトフラナン合成活性】

gfsA 遺伝子がガラクトフラナンの合成に関与していることが強く示唆されると共に、ガラクトフラナンが正常な菌糸および分生子の形成に関与していることが明らかになった。しかしながら、GfsA が糖転移酵素本体である証拠は得られていない。そこで、GfsA タンパク質の酵素活性の測定系の確立を行い、GfsA の酵素機能の解明を試みた。まず、GfsA の検出系を構築するために、染色体上の *gfsA* 遺伝子の 3' 末端側に 3xFLAG タグをコードする DNA 配列を挿入した株 (3xFLAG-*gfsA* 株) を構築した (図 5)。3xFLAG-*gfsA* 株の細胞破碎物に対して、anti-FLAG 抗体を用いてウェスタンブロー

ット解析を行ったところ、GfsA タンパク質は、65 kDa の単一シグナルとして検出された (図 6)。また、Endo Hf 処理を行ったところ、シグナルが 60 kDa の位置にシフトした (図 6)。このことから、GfsA は、確かにタンパク質として発現しており、N-結合型糖鎖修飾を受けている

ことが明らかになった。また、N-結合型修飾を受けていることからタンパク質の分泌経路上に局在するタンパク質であることが示唆された。次に、3xFLAG-gfsA 株の細胞破砕物より FLAG-Beads (Sigma)を用いて GfsA タンパク質を精製した。反応系に、

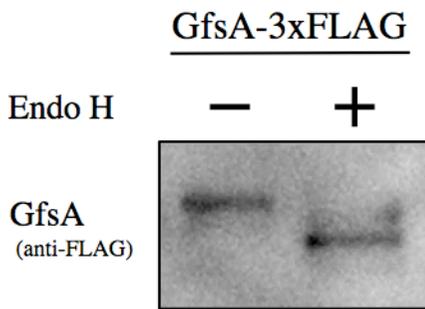


図6 GfsAのウェスタンブロット解析

ラナンを EB-A2 によって検出した。その結果、反応時間が 1、3、6、24 時間と長くなるに従って EB-A2 によるシグナルの増大が認められた (図 7)。また、煮沸により変性させた GfsA タンパク質を用いた場合では、シグナルは認められなかった (図 7)。さらに、UDP-Galp の代わりに UDP-Galp もしくは GDP-マンノースを添加した条件でも反応産物を示すシグナルは認められず、反応系に EDTA を添加した場合や基質である $\Delta gfsA$ 株より抽出したマンノプロテインを添加しなかった場合でも反応産物のシ

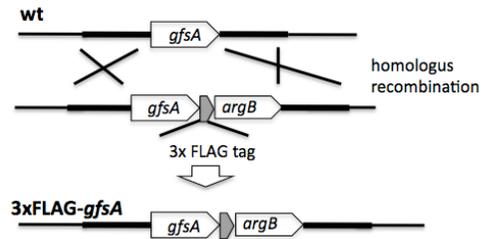


図5 3xFLAG-gfsA株の構築

1.25 μ g の精製した GfsA タンパク質、25 mM HEPES-NaOH (pH 6.8)、1 mM $MnCl_2$ 、15 mM KCl、0.5% Triton X-100、糖供与体として 1.25 mM UDP-Galp、基質として 9.3 μ g の $\Delta gfsA$ 株より抽出したマンノプロテインを加え 37°C で保温した。その後、反応産物を SDS-PAGE に供与し、反応系中に合成されたガラクトフ

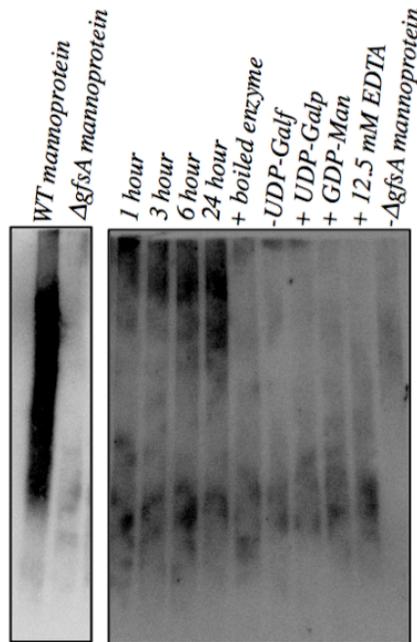


図7 GfsAタンパク質のガラクトフラナン合成活性測定

グナルは認められなかった (図 7)。以上のことから、GfsA タンパク質がガラクトフラナン合成酵素の本体であり、GfsA が UDP-Galf を糖供与体として用いることおよび Mn^{2+} 要求性の糖転移酵素であることが明らかになった。

【結論】

gfsA 遺伝子がガラクトフラナン合成酵素をコードしていることが明らかになった。また、*gfsA* 遺伝子破壊株では、顕著な菌糸成長阻害、分生子形成能の低下が生じたことから、ガラクトフラナンが正常な菌糸および分生子の形成に関与していることが明らかになった。

【参考文献】

(1) Goto M, Harada Y, Oka T, Matsumoto S, Kaoru T, Furukawa K. (2009) Protein O-mannosyltransferase B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 8(10):1465-1474

【謝辞】

本研究を助成いただきましたサッポロ生物科学振興財団、ならびに助成候補者としてご推薦下さいました松本清先生に心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり従事して頂いた研究室の大学院生および学部学生諸君に感謝申し上げます。