

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15492

研究課題名（和文）病原糸状菌ガラクトフラノース糖鎖の構造制御メカニズムと宿主感染における意義の解明

研究課題名（英文）The mechanisms maintaining galactofuranose sugar chains structure in fungal cell wall and its significance in host infection

研究代表者

田中 大 (Tanaka, Yutaka)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00613449

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞壁多糖の構造多様性は、ヒト病原糸状菌の病原性に直接影響を与える因子である。研究代表者は、特に強力な病原性をもつ *Aspergillus fumigatus* が希少糖鎖ガラクトフラノースを細胞壁中に保持していることに着目し、ガラクトフラノース糖鎖がどのように形作られるのか、どの遺伝子の働きによって作られるのか、どのような環境ストレス要因が構造に影響を与えるのか、を調べ、それらメカニズムの一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは真菌の細胞壁多糖と同じ成分を体内に持っていない。したがって、細胞壁多糖をターゲットにした抗真菌薬は、ヒトへの副作用低減・防止の観点から鑑みてとても優れている。一方、現在上市されている抗真菌薬のラインナップには、ガラクトフラノース糖鎖生合成機構を標的にした薬はまだ無い。本研究で見出されたガラクトフラノース生合成遺伝子やその制御システムは、新たな抗真菌薬の開発や真菌症治療戦略の標的として有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The structural diversity of cell wall polysaccharides is a crucial factor that directly affects the pathogenicity of human pathogenic fungi. We noted that *Aspergillus fumigatus*, which has particularly strong pathogenicity, retains the rare sugar chain galactofuranose in the cell wall, and investigated whether the sugar chain is formed by the action, and whether the structural change of the galactofuranose sugar chain affects the human infection process.

研究分野：真菌学

キーワード：ガラクトフラノース 細胞壁多糖 *Aspergillus fumigatus* 糖転移酵素 環境ストレス応答 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

多くの真菌は、数種の異なった多糖から成る複層構造を細胞最外層に保持している。この多糖構造は細胞壁と呼ばれており、環境や宿主との相互作用におけるインターフェースとして機能する。細胞壁多糖の微細構造は、環境・宿主ストレス負荷に対応して、そのときどきに適した化学構造にダイナミックな変化・組換えを起こすことが知られている。このように、受動的に細胞壁構造を最適化する現象は Cell Wall Integrity (CWI) 調節と呼ばれており、病原性真菌の抗真菌薬耐性獲得過程や環境適応過程を説明するメカニズムのひとつとして注目されているが、その全貌は未だ明らかでない。

ヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞壁には、主鎖 α -結合マンノースと側鎖 β -結合 5 員環型ガラクトース (ガラクトフラノース; Galf) から成るヘテロ多糖ガラクトマンナン (GM) が観察される。Galf 糖鎖は本菌の疎水性表面への付着性、およびヒト免疫細胞との相互作用強度と関連付けられており、本菌の強力な病原性を説明する因子のひとつである。研究代表者らは、*A. fumigatus* の細胞壁 Galf 糖鎖の微細化学構造が窒素限飢餓ストレスの影響を受けて長鎖化すること、さらに、長鎖化した Galf 糖鎖がヒト免疫細胞膜上のパターン認識受容体の認識結合能を阻害することを見出したことをはじめ、*A. fumigatus* の細胞壁 Galf 糖鎖の CWI 調節メカニズムとその生物学的機能について明らかにしてきた。しかしながら、Galf 糖鎖の CWI 調節を直接制御する遺伝子群や、糖鎖構造を適切に保存するメカニズム、また Galf 糖鎖の CWI を活性化する環境ストレス要因など未解明の点は多い。また、Galf 糖鎖の CWI 調節が環境・宿主との相互作用に及ぼす影響はほとんど評価されていない。

Galf 糖鎖生合成に直接関わる遺伝子群は *A. nidulans* など近縁の糸状菌種でも発見が相次いでおり、*A. fumigatus* でもそれらのオルソログの多くが発現している。Galf 糖鎖の基質は解糖系と一部競合しており、グルコース-6 リン酸から UDP-グルコースの形に変換されて供給される。いくつかの糸状菌では、この UDP-グルコースを UDP-ガラクトースに変換したのち、糸状菌に特徴的な UDP-Galf ムターゼ GifA の触媒によって UDP-Galf に変換される。広く支持されているモデルでは、この UDP-Galf はトランスポータータンパク質 GifB を介して GM 合成の場であるゴルジ体に輸送され、ゴルジ体に局在する Galf 転移酵素 GfsA の働きによって成熟した GM となり、細胞壁間隙へ小胞輸送される。このように、一見すると GM 生合成に必要な遺伝子群は出揃っているものの、GfsA の働きのみでは説明できない Galf 糖鎖が細胞壁に残存していたり、主鎖マンナン生合成に関わる遺伝子群が未同定であったり、あるいは GM 生合成経路の活性化や CWI 調節を指揮する遺伝子群やその働きは未解明のままであった。一方、CWI を調節する働きをする遺伝子として、*mpkA*、*sakA*、カルシニューリン様遺伝子などが同定されている。これらの遺伝子の CWI における働きは、主に細胞壁 β -グルカンあるいは細胞壁キチンの構造調節メカニズムと関連付けられており、細胞壁 GM や Galf 糖鎖の CWI と関連しているかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

上述の背景から、細胞壁 GM や Galf の CWI 調節について理解を深めるためには、いくつかのステップを踏む必要があると考えられた。本研究計画では *A. fumigatus* における細胞壁 Galf の CWI 調節メカニズムの全貌を解明することを最終目標とし、以下の 3 点を具体的な目的とした。

- (1) GM 生合成に関わる未知遺伝子群を明らかにすること
- (2) Galf 糖鎖の CWI 調節と既知遺伝子群との関わりを明らかにすること
- (3) Galf の CWI 調節メカニズムを活性化する環境ストレス要因を明らかにすること

3. 研究の方法

- (1) PEG-プロトプラスト法と CRISPR-Cas9 システムを組み合わせた遺伝子導入・破壊技術を駆使して、*A. fumigatus* 標準株に遺伝子変異を導入し遺伝子欠損株を作製した。
- (2) NMR、GC-MS、HPLC、ウエスタンブロット法、ゲル濾過クロマトグラフィー等を駆使して、GM や Galf 糖鎖を含む細胞壁多糖の微細化学構造を詳細に解析した。
- (3) 次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を駆使して、環境ストレス負荷条件における遺伝子転写産物の発現解析と相関解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規 Galf 転移酵素遺伝子 *gfsC* の発見

A. fumigatus における Galf 転移酵素遺伝子 *gfsA* のホモログとして *gfsC* 遺伝子を新規に同定した。*gfsC* 遺伝子の遺伝子欠損株を作製し、細胞壁 GM 構造を詳細に解析したところ、Galf 糖鎖含量の著しい低下と Galf 糖鎖長の減少が観察された。このことは、*gfsC* 遺伝子は単独で Galf 糖鎖生成に関与していることを示唆している。さらに、*gfsA* 遺伝子との二重破壊株を作製し同様に解析したところ、主鎖マンナン枝分かれ起部の 1 残基を除くすべての Galf 糖鎖の消失が観察された。このことは、*gfsA* および *gfsC* のただ 2 つの遺伝子産物の協調によって、*A. fumigatus* の Galf 糖鎖生成のほぼすべてが形成されることを示している。

(2) GfsC タンパク質は GfsA タンパク質とヘテロ複合体を形成する

研究代表者らが新たに見出した Galf 転移酵素タンパク質 GfsC は、既知 Galf 転移酵素 GfsA とヘテロ複合体を形成することがわかった。また、この複合体は飢餓ストレス負荷強度を高めることで形成度が上昇することが示された。一方、GfsC と GfsA はそれぞれ単独で発現させた場合にも Galf 転移活性を示す。これらのことは、GfsA と GfsC がそれぞれ独立に Galf 糖鎖生成に寄与できるにも関わらず、一部では協調してこれを制御している可能性を示唆しているが、このヘテロ複合体が細胞壁 Galf 生成や GM 構造、生物的機能に及ぼす影響は依然不明である。

(3) 新規マンノース転移酵素遺伝子 *cmsA* および *cmsB* の発見

A. fumigatus におけるマンノース転移酵素遺伝子 *cmsA* および *cmsB* 遺伝子を新規に同定した。*cmsA*、*cmsB* 遺伝子欠損株をそれぞれ作製し、細胞壁 GM 構造を詳細に解析したところ、主鎖マンナン構造の破壊が観察された。両遺伝子の欠損によっても側鎖 Galf 糖鎖は残存していたこと、*O*-結合型マンノース糖鎖の構造には影響を与えなかったことから、本遺伝子は GM の主鎖マンナンの生成に特徴的な遺伝子であると考えられる。また、これらの表現型は *cmsA* および *cmsB* 遺伝子の単独破壊株でも十分に観察され、かつ二重破壊株でも同様の構造が観察されたことから、2 つの遺伝子には冗長性のあることが予想される。

(4) Galf の CWI 調節は既知 CWI 調節メカニズムとはほぼ独立している

キャンディン系抗真菌薬は細胞壁 β グルカンを標的として殺真菌作用を発揮し、キチンの CWI 調節を誘導することが知られている。3 種のキャンディン系抗真菌薬ミカファンギン、カスポファンギン、アニデュラファンギンを *A. fumigatus* 標準株に処理したのちに細胞壁構造を観察したところ、これら薬剤の処理によっては、Galf 含量の増加は観察されなかった。同様に、細胞壁ストレスを誘導するカルコフルオルホワイトやコンゴレッドの処理によっても Galf 構造の変化は観察されなかった。一方、窒素限飢餓、鉄欠乏、重金属ストレスなどの環境ストレス要因は細胞壁 Galf 含量を増加させることがわかった。他方、 β グルカンへの細胞壁ストレス負荷によって細胞壁 MAP キナーゼ遺伝子 *MpkA*、*SakA* のリン酸化カスケードが活性化することが知られているが、Galf 含量を増加させる環境ストレス要因の負荷によっては *MpkA* タンパク質のリン酸化は一樣な亢進は観察されなかった。また、*mpkA* 遺伝子欠損株や *sakA* 遺伝子欠損株においても Galf 含量増加は観察されることがわかった。これらのことから、少なくとも研究代表者が見出した Galf 含量増加現象は、既知の CWI 調節メカニズムとは独立している可能性が高いことが予想される。

(5) 次世代シーケンサーを用いた Galf 糖鎖 CWI 調節に働く未知遺伝子の探索

Galf 構造に影響を与える環境ストレス要因と、与えない要因のいくつかが明らかになったことから、それぞれの条件下で特徴的な動きをする遺伝子のなかに、Galf の CWI 調節を制御する未知の遺伝子が存在するのではないかと仮定した。そこで、標準菌株に細胞壁 Galf 含量を増加させる環境ストレスを負荷したのち、それぞれトランスクリプトーム解析と相関解析を行ったところ、共通して発現上昇する遺伝子が 192 種類、発現抑制される遺伝子が 38 種類それぞれ見つかった。これらのうち、undefined の遺伝子が 8 割を占めたことから、Galf の CWI を制御する未知遺伝子がこの中から見つかる可能性は高いのではないかと考えている。現在、すべての遺伝子について遺伝子欠損株を作製し、細胞壁構造解析を行う準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takuya Onoue, Yutaka Tanaka, Daisuke Hagiwara, Keisuke Ekino, Akira Watanabe, Kazuyoshi Ohta, Katsuhiko Kamei, Nobuyuki Shibata, Masatoshi Goto & Takuji Oka	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of Two Mannosyltransferases Contributing to Biosynthesis of the Fungal-type Galactomannan -Core-Mannan Structure in <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-35059-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chihara Yuria, Tanaka Yutaka, Izumi Minoru, Hagiwara Daisuke, Watanabe Akira, Takegawa Kaoru, Kamei Katsuhiko, Shibata Nobuyuki, Ohta Kazuyoshi, Oka Takuji	4. 巻 5
2. 論文標題 Biosynthesis of (1-5)-Galactofuranosyl Chains of Fungal-Type and O-Mannose-Type Galactomannans within the Invasive Pathogen <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00770-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中大、佐々木雅人、伊藤文恵、柴田信之
2. 発表標題 <i>Aspergillus fumigatus</i> のガラクトフラノース糖鎖構造制御メカニズム解明に向けた逆遺伝学的アプローチ
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千原由莉亜、田中大、泉実、岡拓二
2. 発表標題 逐次反応によるガラクトフラノース転移酵素活性測定法を用いたGfsA, GfsBおよびGfsCの機能解析
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾上拓哉 , 田中 大 , 後藤正利 , 柴田信之 , 太田一良 , 岡 拓二
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus が産生する真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成酵素に寄与する 2 つのマンノース転移酵素の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度 西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 大
2. 発表標題 アスペルギルス細胞壁糖鎖の構造制御機構とヒト免疫相互作用における役割
3. 学会等名 第2回東北医真菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松永恵美子、豊田早紀、山田久恵、田中 大、樋口裕次郎、竹川 薫
2. 発表標題 Aspergillus nidulansに存在する2つの α -D-ガラクトフラノシダーゼの機能解析
3. 学会等名 第37回日本糖質学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 大
2. 発表標題 糸状菌細胞壁レア糖鎖の構造制御メカニズムと免疫パターン認識回避分子としての機能に関する研究
3. 学会等名 衛生薬学・環境トキシコロジー 若手研究者の会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 大、岡 拓二、佐々木雅人、伊藤文恵 柴田信之
2. 発表標題 病原糸状菌Aspergillus fumigatusが持つ細胞壁ガラクトフラノース糖鎖の構造制御と免疫回避に及ぼす役割の解明
3. 学会等名 フォーラム2017衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 千葉 由莉亜, 尾上 拓哉, 田中 大, 後藤 正利, 柴田 信之, 太田 一良, 岡 拓二
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusの 1-5ガラクトフラノース糖鎖はGfsAとGfsCによって生合成される
3. 学会等名 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾上 拓哉, 田中 大, 後藤 正利, 柴田 信之, 太田 一良, 岡 拓二
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusのCmsAは真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成に関わる 1,2-マンノース転移酵素である
3. 学会等名 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 大、岡 拓二、佐々木 雅人、伊藤 文恵、柴田 信之
2. 発表標題 環境ストレスに応答した糸状菌ガラクトフラノース糖鎖構造制御機構と免疫細胞との相互作用における役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 大, 岡 拓二, 佐々木 雅人, 伊藤 文恵, 柴田 信之
2. 発表標題 系状菌ガラクトフラノース糖鎖は飢餓ストレスを受けて長鎖化し、免疫細胞パターン認識受容体との相互作用を阻害する
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----