

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450106

研究課題名(和文) 新規抗真菌剤開発のための糸状菌由来ガラクトフラノース転移酵素群の機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of galactofuranosyltransferases in filamentous fungus for development of novel antifungal agent

研究代表者

岡 拓二 (OKA, Takuji)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：50510690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：チャワントケ亜門に属する糸状菌の細胞表層に存在するガラクトマンナン(GM)は、病原性糸状菌の感染機構や宿主側の防御機構と深く関係していることが示唆されている。GMには、真菌型ガラクトマンナン(FTGM)とO-マンノース型ガラクトマンナン(OMGM)が存在している。本研究によって、AfGfsAが1,5-ガラクトフラノース転移酵素であること、AfGfsAの立体構造、およびAfGfsAとAfGfsCが協調的にはたらくことによってAspergillus fumigatusの全ての1,5-ガラクトフラノース糖鎖が生合成されることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The galactomannans (GMs) that are produced by filamentous fungi belonging to Pezizomycotina, many of which are pathogenic for animals and plants, are polysaccharides consisting of β -1,2- and β -1,6-mannosyl and β -1,5- and β -1,6-galactofuranosyl residues. GMs are located at the outermost layer of the cell wall. When a pathogenic fungus infects a host, its cell surface must be in contact with the host. The GMs on the cell surface may be involved in the infection mechanism of a pathogenic fungus or the defense mechanism of a host. There are two types of GMs in filamentous fungi, fungal-type galactomannans and O-mannose type galactomannans. In this study, we elucidated that AfGfsA protein acts as a UDP-Galf: β -galactofuranoside 1,5-galactofuranosyltransferase and all β -1,5-galactofuranosyl residues of FTGM and OMGM in *A. fumigatus* were biosynthesized by AfGfsA and AfGfsC.

研究分野：応用微生物学

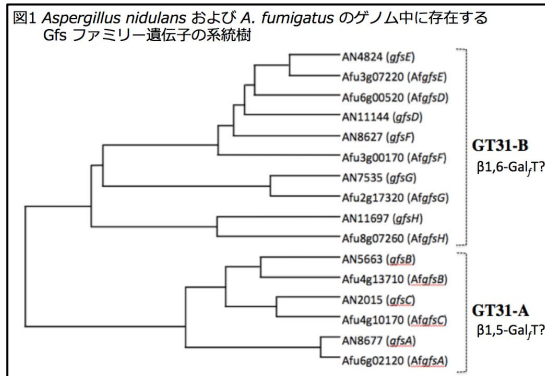
キーワード：ガラクトマンナン ガラクトフラノース 糖鎖 糖転移酵素 糸状菌 細胞壁 糖鎖生合成

1. 研究開始当初の背景

アスペルギルス属の細胞壁糖鎖成分は、 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 (GM) および *N*-グリカンや *O*-グリカンによって修飾されたガラクトマンノプロテイン (GMP) から構成されている。細胞壁糖鎖構成成分の生合成に関わる糖転移酵素遺伝子は、多くが既に同定され、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 (de Groot *et al.*, *Fungal Genet Biol.*, 2009)。しかし、これら糖鎖のうち、ガラクトフラノース (Gal_f) を含む糖鎖である真菌型ガラクトマンナン (FTGM) と *O*-マンノース型ガラクトマンナン (OMGM) の生合成に関する糖転移酵素遺伝子は明らかでなかった。FTGM は、9 から 10 個の α 1,2-テトラマンノシドが α 1,6-結合したコアマンナン主鎖に、 β 1,5-/ β 1,6-Gal_f で構成されるガラクトフラン側鎖がコアマンナン鎖に β 1,2-結合した構造である。OMGM は、タンパク質のセリン (Ser) もしくはスレオニン (Thr) 残基に Man が付加した構造を基本とする *O*-Man 型糖鎖の非還元末端側に Gal_f が β 1,5-結合したオリゴ糖が β 1,6-結合して形成されるガラクトフラン鎖が結合した糖鎖である。FTGM は、1930 年代には子囊菌類である *Penicillium charlesii* において存在が認められていた。また、肺アスペルギルス症患者の血清中に流出する GM が早期診断の指標として用いられてきたことにより世界的に広く知られていた。しかし、その生合成を担う糖転移酵素に関する情報は、遺伝子はもとより、その酵素活性測定法さえも全く不明であった。Gal_f は、結核菌をはじめとする真正細菌類、トリパノソーマなどの一部の原生生物、線虫類、担子菌類、一部の子囊菌類の糖鎖にのみ認められる単糖である。ヒトを含む高等動物や植物は、Gal_f 糖鎖を持たないことから Gal_f 糖鎖の生合成経路を阻害することが副作用の無い医薬や農薬の開発に

繋がるとして期待されている。

岡らは、この研究が遅れた状況を打破し、新しい遺伝子の機能を発見するためには、これまでのようにアミノ酸配列の類似性に頼る手法では成されないと考え、逆遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせた手法により、これまでに Gal_f 含有糖鎖の生合成に関わる遺伝子の同定を試み、*Aspergillus nidulans* および *A. fumigatus* より初めて Gal_f 転移酵素



遺伝子 (*gfsA*) を同定した (Komachi *et al.*, *Molecular Microbiology*, 2013)。Gal_f 転移酵素遺伝子は、細菌類やリーシュマニア属で報告があるが (Kremer *et al.*, *J Biol Chem*, 2001; Ryan *et al.*, *PNAS*, 1993)、*GfsA* は既知の Gal_f 転移酵素遺伝子とは全く異なる一次構造を有する新規な糖転移酵素であった (Komachi *et al.*, *Mol Microbiol*, 2013)。*GfsA* は、GMP に付加している *O*-グリカンの非還元末端の Gal_f 残基を UDP-Gal_f を糖供与体として転移する糖転移酵素であり、その遺伝子 *gfsA* の破壊は糸状菌の菌糸伸長を抑制し、胞子形成能を著しく低下させた。また、*gfsA* 遺伝子はアスペルギルス属のみならず子囊菌門のうち最も大きな亜門であるチャワンタケ亜門に広く分布する遺伝子であった。

2. 研究の目的

GfsA は、糖タンパク質中の OMGM の非還元末端側に結合している Gal_f を転移する活性を有することが明らかになっているが、どのような結合様式で Gal_f を転移する活性を有しているのか明らかでない。また、*Aspergillus nidulans* および *A. fumigatus* には

それぞれ7つのパラログが存在することが明らかになり、それぞれ *gfsB-gfsH* と名付けた (図1)。*gfsA* を含むサブファミリーを GT31-A, その他のサブファミリーを GT31-B とした。また、アスペルギルス属の OMGM 構造と FTGM の構造は似ているため、GfsA が GM の生合成に関わっている可能性も考えられる。そこで、本研究では *A. fumigatus* における GT31-A に属する3つの遺伝子に関して、組換え酵素を取得し、酵素機能を明らかにすること、および *gfsA-gfsC* の単独遺伝子破壊株および多重破壊株を構築し、それぞれの株から抽出した Gal_f 含有糖鎖の構造を決定することで、GT31-A に属する Gfs ファミリー酵素の機能の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

大腸菌を宿主としたガラクトフラノース転移酵素群発現系の構築

Aspergillus fumigatus の GfsA, GfsB および GfsC の発現プラスミドを構築した。大腸菌発現プラスミド pET15b-kai および pCold-II に *gfsA*, *gfsB* および *gfsC* の cDNA を連結することで発現プラスミドを構築した。各 cDNA は、N-末端に存在する膜貫通領域を除去するような形で挿入した。発現タンパク質は、Ni-アガロースアフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。活性測定を行い、GfsA に関しては、生成物質の構造を LC-MS および NMR 解析およびメチル化分析によって決定した。また、GfsA に関しては酵素の反応最適条件を決定した。

ガラクトフラノース転移酵素遺伝子破壊株の構築とガラクトマンナン酵素解析

A. fumigatus に存在する2つの *gfsA* パラログについて遺伝子破壊を行った。各遺伝子の上流および下流1 kbpを選択マーカー (*pyrG*, *ptrA* もしくは *hygB*) で挟み込むような構造を有するDNA断片をフュージョンPCR法を用いて作

製し、プロトプラスト-PEG法により導入することで遺伝子破壊を行った。また、*gfsAC* 二重破壊株および *gfsABC* 三重破壊株の構築も行った。各遺伝子破壊株よりガラクトマンナンを抽出し、NMRおよびメチル化分析による構造解析を行った。

4. 研究成果

GfsA は、 β -Gal_f: β 1,5-Gal_f 転移酵素酵素である

GfsA および GfsC について組み換え酵素を発現することができた。GfsA を大腸菌発現系により大量に調製し、pNP- β -Gal_f を受容基質、UDP-Gal_f を糖供与体として用いて反応させることで合成された化合物 (図2; product A) の構造を ¹H-NMR およびメチル化分析を用いて決定したところ、Gal_f β 1-5Gal_f -D- β -pNP であった (図3)。

このことから、GfsA は β -Gal_f 残基の5位の水酸基に UDP-Gal_f 中の Gal_f 残基を β -結合させる β -Gal_f: β 1,5-Gal_f 転移酵素酵素であることを明らか

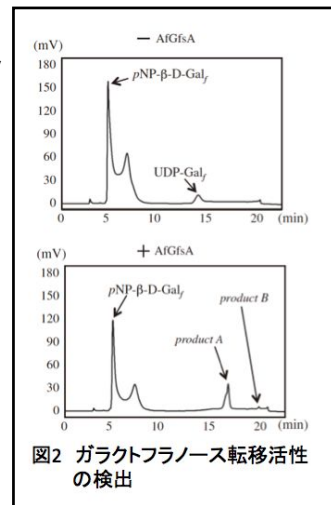
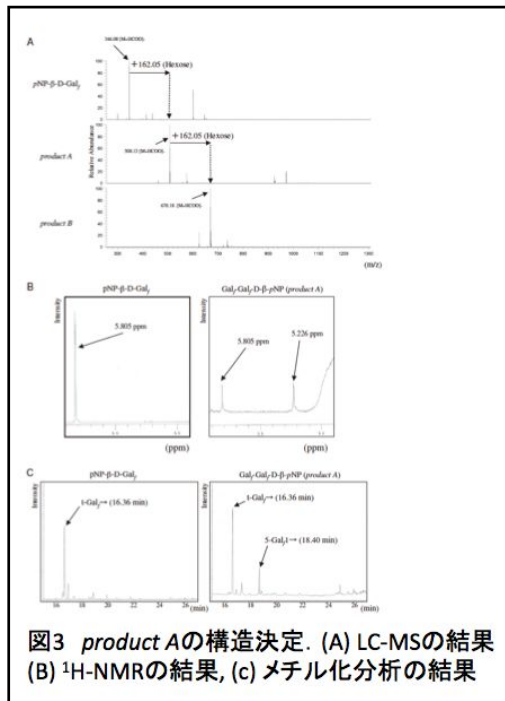
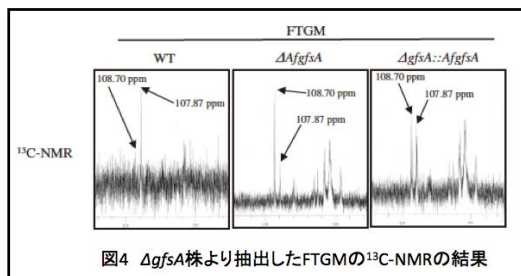


図2 ガラクトフラノース転移活性の検出

かにすることができた。また、 Δ *gfsA* 株の FTGM を抽出し、¹H-NMR, ¹³C-NMR およびメチル化分析によって構造解析を行ったところ、 Δ *gfsA* 株では、GM 中の β -Gal_f 残基が顕著に減少していることが明らかになった (図4)。すなわち、GfsA は OMGM のみならず、FTGM のガラクトフラン側鎖の生合成に関わる β -Gal_f: β 1,5-Gal_f 転移酵素酵素であることを明らかにすることができた。GfsC も GfsA と同様の酵素活性を示すことを確認した。



GfsA と GfsC は ,協動的にはたらくことで全



ての β1,5-Gal_f 残基を生合成する

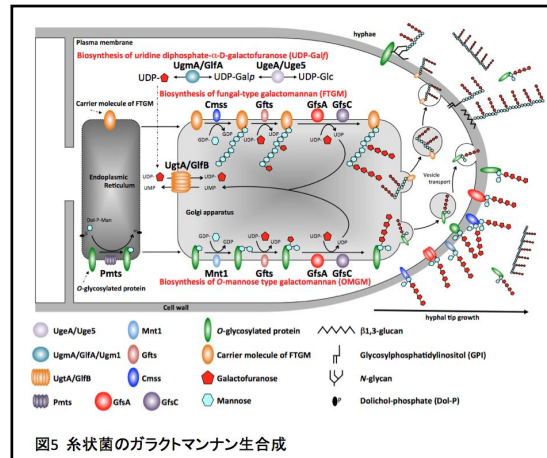
ΔgfsA 株では , GM 中の β-Gal_f 残基が顕著に減少するものの残存していることが明らかになった .そこで ,残存している β-Gal_f 残基の生合成をになう分子を同定するために GfsA のパラログである GfsB および GfsC に着目した . ΔgfsC , ΔgfsAC および ΔgfsABC 株の FTGM の構造解析を ¹H-NMR 解析およびメチル化分析によって実施した . その結果 , ΔgfsC 株においても ΔgfsA 株と同様に β1,5-Gal_f 残基が著しく減少し , ΔgfsAC 株および ΔgfsABC 株では , β1,5-Gal_f 残基が全く検出されないことが明らかになった (表 1). 以上の結果から , *Aspergillus fumigatus* の全ての β1,5-Gal_f 糖鎖は GfsA と GfsC が協動的に働くことで生合成されることを明らかにすることができた (図 5).

表1 Gfs遺伝子破壊株より抽出したガラクトマンナンのメチル化分析の結果

	WT	ΔgfsB	ΔgfsC	ΔgfsC:gfsC	ΔgfsAC	ΔgfsABC
1Mant1	16.99 ± 0.94	23.17 ± 1.17	21.58 ± 1.75	15.14 ± 1.35	22.54 ± 5.90	21.49 ± 2.75
2Mant1	29.57 ± 2.03	25.09 ± 2.93	26.89 ± 0.50	21.08 ± 1.75	25.92 ± 1.26	26.96 ± 1.14
6Mant1	11.65 ± 1.53	11.11 ± 1.08	15.42 ± 0.87	8.02 ± 0.49	16.92 ± 0.59	16.54 ± 1.08
2,6Mant1	7.64 ± 0.36	6.72 ± 0.54	6.49 ± 0.45	4.03 ± 0.25	9.23 ± 1.82	6.78 ± 1.22
16Gal1	15.52 ± 1.91	16.60 ± 1.79	21.68 ± 2.90	28.84 ± 2.59	22.32 ± 2.58	23.17 ± 0.48
5Gal1	16.40 ± 1.06	15.28 ± 0.62	2.41 ± 0.38	20.52 ± 1.18	N.D.	N.D.
6Gal1	2.23 ± 0.45	2.04 ± 0.85	3.24 ± 0.18	2.57 ± 0.46	3.06 ± 1.01	3.06 ± 0.85

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 9 件)



1. Oka T. Biosynthesis of galactomannans found in filamentous fungi belonging to Pezizomycotina. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 183-191 (2018) 査読有 , DOI: 10.1080/09168451.2017.1422383
2. Katafuchi Y, Li Q, Tanaka Y, Shinozuka S, Kawamitsu Y, Izumi M, Ekino K, Mizuki K, Takegawa K, Shibata N, Goto M, Nomura Y, Ohta K, Oka T GfsA is a β1,5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 27, 568-581 (2017) 査読有 , DOI: 10.1093/glycob/cwx028
3. Matsunaga E, Higuchi Y, Mori K, Yairo N, Toyota S, Oka T, Tashiro K, Takegawa K. Characterization of a PA14 domain-containing galactofuranose-specific β-D-galactofuranosidase from *Streptomyces* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81, 1314-1319 (2017) 査読有 , DOI: 10.1080/09168451.2017.1300518
4. Oka T, Goto M Biosynthesis of Galactofuranose-containing Glycans in Filamentous Fungi. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 28 e39-e45 (2016) 査読有 , DOI: 10.4052/tigg.1428.1E
5. Matsunaga E, Higuchi Y, Mori K, Yairo N, Oka T, Shinozuka S, Tashiro K, Izumi M, Kuhara S, Takegawa K. Identification and Characterization of a Novel Galactofuranose-Specific β-D-Galactofuranosidase from *Streptomyces* Species. *PLoS One* 10, e0137230 (2015) 査読有 , DOI: 10.1371/journal.pone.0137230

6. [Oka, T.](#), Katafuchi, Y., Fukuda, K., Ekino, K., Goto, M. and Nomura, Y. Determination of D-galactofuranose Content of Galactomannoproteins in *Aspergillus nidulans*. *Bio-protocol* 4, e1223 (2014) 査読有, DOI: 10.21769/BioProtoc.1223
7. [Oka, T.](#), Katafuchi, Y., Fukuda, K., Ekino, K., Goto, M. and Nomura, Y. Purification of the GfsA-3x FLAG Protein Expressed in *Aspergillus nidulans*. *Bio-protocol* 4, e1222 (2014) 査読有, DOI: 10.21769/BioProtoc.1222
8. [岡拓二](#), 後藤正利 糸状菌に特異なガラクトフラノース(Galf)糖鎖の生合成 **化学と生物** 52, 749-756 (2014) 査読有, DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.52.749
9. Komachi Y, Hatakeyama S, Motomatsu H, Futagami T, Kizjakina K, Sobrado S, Ekino K, Takegawa K, Goto M, Nomura Y and [Oka T.](#) *gfsA* encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 90: 1054-1073 (2013). 査読有, DOI: 10.1111/mmi.12416
4. [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* が産生するガラクトマンナン生合成の全貌解明を目指して(シンポジウム講演).第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2017 年 11 月 16-17 日. 佐賀市立東与賀文化ホール (佐賀市).
5. 尾上拓哉, 田中大, 後藤正利, 柴田信之, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* が産生する真菌型ガラクトマンナンのコアマンナン鎖生合成に関わる遺伝子の同定 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会. 2017 年 9 月 21-22 日. 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市).
6. [岡拓二](#). 病原性真菌が産生するガラクトマンナン生合成の全貌解明と今後の展開 2017 年度日本農芸化学会支部例会. 2017 年 6 月 2 日. 日田市民文化会館 パトリア日田 (大分県日田市).
7. [岡拓二](#). 糸状菌の真菌型ガラクトマンナン生合成の解明を目指して. 比較グライコーム研究会. 2016 年 6 月 11 日. 九州大学箱崎キャンパス (福岡市).
8. [岡拓二](#). 糸状菌と植物の糖鎖生合成に関与する諸酵素に関する研究. 2017 年度日本農芸化学会 (奨励賞受賞講演) 2017 年 3 月 18 日. 京都女子大学 (京都市).

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 坂本梓, 尾上拓哉, 田中大, 柴田信之, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* の AfMnt1 は O-マンノース型ガラクトマンナンの生合成に関わる α 1,2-マンノース転移酵素である. 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2017 年 11 月 16-17 日. 佐賀市立東与賀文化ホール (佐賀市).
2. 千原由莉亜, 尾上拓哉, 田中大, 後藤正利, 柴田信之, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* の β 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. 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2017 年 11 月 16-17 日. 佐賀市立東与賀文化ホール (佐賀市).
3. 尾上拓哉, 田中大, 後藤正利, 柴田信之, 太田一良, [岡拓二](#). *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 α 1,2-マンノース転移酵素である. 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2017 年 11 月 16-17 日. 佐賀市立東与賀文化ホール (佐賀市).
9. 川満洋平, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus nidulans* の分生子形成に関与する糖転移酵素様機能未知膜タンパク質の解析. 2016 年度日本農芸化学会西日本支部大会. 長崎大学文教キャンパス (長崎市).
10. 李秋実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* における新規ガラクトフラノース転移酵素の探索および機能解析. 2016 年度日本農芸化学会西日本支部大会. 長崎大学文教キャンパス (長崎市).
11. 川満洋平, 李秋実, 田中大, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 柴田信之, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素(AfGfsA)の酵素的諸性質の解析. 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2016 年 11 月 17-18 日. 京都大学宇治キャンパス (京都府宇治市).
12. 李秋実, 田中大, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 柴田信之, 太田一良, [岡拓二](#). *Aspergillus fumigatus* の推定 β 1,6-ガラクトフラノース転移酵素遺伝子の機能解析. 第

- 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス . 2016 年 11 月 17-18 日 . 京都大学宇治キャンパス (京都府宇治市) .
13. 岡拓二 逆遺伝学による機能未知な糖転移酵素遺伝子の機能解析 第 3 回 糸状菌分子生物学研究会若手の会 WS (東京) 2015 年 11 月 18 日 (水) , 19 日 (木)
14. 李秋実, 田中大, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 柴田信之, 太田一良, 岡拓二 *Aspergillus fumigatus* の推定ガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の機能解析 . 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス . 2015 年 11 月 19-20 日 . ルミエール府中 (東京都府中市) .
15. 片淵由佳子, 泉実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 岡拓二 *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析 . 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス . 2015 年 11 月 19-20 日 . ルミエール府中 (東京都府中市) .
16. 川満 洋平, 石井 千尋, 浴野 圭輔, 竹川 薫, 後藤正利, 岡拓二 *Aspergillus nidulans* の分生子形成に關与する糖転移酵素様機能未知膜タンパク質の解析 . 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス . 2015 年 11 月 19-20 日 . ルミエール府中 (東京都府中市) .
17. 片淵由佳子, 泉実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 岡拓二 *Aspergillus nidulans* のガラクトフラノース転移酵素 (GfsA) の機能解析 . 第 67 回日本生物工学会大会 . 2015 年 10 月 26-28 日 . 城山観光ホテル (鹿児島市) .
18. 川満 洋平, 石井 千尋, 浴野 圭輔, 竹川 薫, 後藤正利, 岡拓二 . *Aspergillus nidulans* の分生子形成に關与する糖転移酵素様機能未知膜タンパク質の解析 . 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26-28 日 . 城山観光ホテル (鹿児島市) .
19. 李 秋実, 片淵 由佳子, 浴野 圭輔, 竹川 薫, 後藤正利, 岡拓二 . *Aspergillus fumigatus* の推定ガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の機能解析 . 第 67 回日本生物工学会大会 . 2015 年 10 月 26-28 日 . 城山観光ホテル (鹿児島市) .
20. 岡拓二, 後藤正利 . 糸状菌に特異なガラクトフラノース (Gal) 糖鎖の生合成 . (シンポジウム講演) . 日本農芸化学会大会 . 2015 年 3 月 29 日 . 岡山大学 (岡山市) .
21. 片淵由佳子, 篠塚早紀, 泉実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 . *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析 . 日本農芸化学会大会 . 2014 年 3 月 27 日 . 岡山大学 (岡山市) .
22. 片淵由佳子, 篠塚早紀, 泉実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 . *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析 . 日本生物工学会九州支部大会 . 2014 年 12 月 6 日 . 熊本大学 (熊本市) .
23. 李秋実, 片淵由佳子, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 . 糸状菌の推定ガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の機能解析 . 日本生物工学会九州支部大会 2014 年 12 月 6 日 . 熊本大学 (熊本市) .
24. 片淵由佳子, 篠塚早紀, 泉実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 . *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析 . 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス . 2014 年 11 月 15-16 日 . 東北大学 (仙台市) .
25. 片淵由佳子, 篠塚早紀, 泉実, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 . *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析 . 日本農芸化学会西日本支部大会 2014 年 9 月 19 日 . 佐賀大学 (佐賀市) .

[図書] (計 1 件)

Takuji Oka, Taiki Futagami, Masatoshi Goto. Cell wall biosynthesis in filamentous fungi. In: Takagi H, Kitagaki H (eds), Stress Biology of Yeasts and Fungi. Springer Japan, pp. 151-168, 2015.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡 拓二 (OKA, Takuji)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号 : 50510690