

機関番号 : 37401

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21780313

研究課題名 (和文) 麹菌の糖鎖リモデリングを目指した新規な糖転移酵素遺伝子の機能解明

研究課題名 (英文) Identification and application of new genes involved in glycosylation in koji mold

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

研究成果の概要 (和文) : 麹菌を含むアスペルギルス属の持つ酵素の多くはグリコシル化される。タンパク質は、グリコシル化されることによって機能が向上し、多機能化することが知られている。アスペルギルス属のタンパク質に結合する *N*-結合型糖鎖と *O*-結合型糖鎖には、ガラクトフラノースやグルコースなど他の生物では見られない糖が付加されているが、これら糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素や生理的機能に関する知見は無い¹⁾。

また、糸状菌は、タンパク質分泌能が非常に高く、外来タンパク質の発現宿主としての利用が期待されている。しかしながら、糸状菌の糖鎖の中には、ヒトに対する抗原性を持つものがあり、例えば抗体医薬等を生産する際の妨げとなる。よって、糸状菌を宿主とした外来タンパク質発現系の開発にはタンパク質の糖鎖改変が必須の技術となる。

本研究では、この糸状菌に特異的に存在する糖を付加する糖転移酵素遺伝子を同定し、糖鎖の機能を解明することで、将来、タンパク質の糖鎖改変に必要となる基礎的知見を得ることを目的とした。

研究成果の概要 (英文) : Most of the enzymes from *Aspergillus*, including *koji* mold, are glycosylated, which improves both the functioning and efficacy of these enzymes. Although galactofuranose and glucose residues have been observed to be attached to the *O*-glycans and *N*-glycans of proteins in *Aspergillus*, the glycosyltransferase genes involved in the biosynthesis of these sugar residues have not yet been identified and the function of these sugar moieties also is not yet known¹⁾.

The ability of filamentous fungi to secrete large quantities of proteins means that they are well suited for use as expression hosts for extragenous genes in industrial applications. However, since the sugar moieties of glycoproteins from filamentous fungi are antigenic in humans, they cannot be used for medicinal applications, such as antibody preparation. Consequently, a method for altering the structure of these sugar moieties needs to be developed so that a protein expression system using filamentous fungi can be developed.

We therefore sought to identify the genes involved in the biosynthesis of these sugar moieties in filamentous fungi, and to elucidate the function of these sugar moieties in fungal growth and protein secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

麴菌を含むアスペルギルス属の持つ酵素の多くはグリコシル化されている。タンパク質は、グリコシル化されることによって機能が変化し、多様化することが知られている。アスペルギルス属のタンパク質に結合するN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖の非還元末端側には、ガラクトフラノース (Gal_f) やグルコースなど他の生物では見られない特殊な糖鎖が付加されている。しかし、これら糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素や、その生理的機能に関する知見は皆無である。麴菌は、タンパク質分泌能が非常に高く、外来タンパク質の発現宿主としての利用が期待されている。しかしながら、麴菌の糖鎖の中には、ヒトに対する抗原性を持つものがあり、例えば、抗体医薬等を生産する際の妨げとなる。よって、麴菌を宿主とした外来タンパク質発現系の開発には、タンパク質の糖鎖改変（糖鎖リモデリング）が必須の技術となる。本研究で得られる成果は、糖鎖リモデリングのための基礎的情報を与え、将来、麴菌の酵素機能の向上による発酵分野や医療用診断薬および治療薬の開発に貢献できると確信している。とくに、ガラクトフラノース糖鎖は真核生物においてはアスペルギルス属やトリコデルマ属などの一部の糸状菌にのみ存在しているが、

高等動物や植物には存在しない。そのため医薬品や農薬としての抗菌剤のターゲットになることが期待されている。また、アスペルギルス属の中には、*Aspergillus fumigatus* に代表されるように日和見感染しアスペルギルス症を発症させるものもいるが、ガラクトフラノース糖鎖は同じく日和見感染菌として知られる *Candida albicans* や *C. glabrata* には無いため、アスペルギルス症診断薬のターゲットとしても期待される。

2. 研究の目的

麴菌のタンパク質糖鎖に付加されるガラクトフラノース残基合成に、直接関与する糖転移酵素遺伝子を明らかにすることは、麴菌を用いた糖鎖リモデリングシステムの開発に必要なことから、遺伝子の同定が必要になっている。これまでに、多くの研究者が生化学的および遺伝学的アプローチにより、ガラクトフラノース転移酵素遺伝子の同定を試みているが、未だに誰も成功していない。本研究では、この糸状菌に特徴的な糖鎖であるガラクトフラノース糖鎖に注目し、ガラクトフラノース糖鎖の生合成に直接関係する糖転移酵素遺伝子を同定すると共に、その生理的意義や機能について基礎的知見を得、麴菌の糖鎖リモデリングに活用することを目的とする。

3. 研究の方法

モデル糸状菌 *A. nidulans* には、90 個の糖転移酵素遺伝子が存在する。この90 個の遺伝子のうち、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 個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、ガラクトフラノース残基をタンパク質糖鎖に持つ菌類に共通に存在しないものと哺乳類や植物などのガラクトフラノース残基を持たない生物群には、類似遺伝子が存在しないものを除外すると、16 個の遺伝子がガラクトフラノース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。このことから我々は、これら16 個の機能未知糖転移酵素遺伝子の中に目的とする糖転移酵素遺伝子が含まれると確信し、16 個すべての遺伝子について遺伝子破壊株を取得して、タンパク質糖鎖および細胞壁構成糖鎖の構造を解析することで、ガラクトフラノース糖鎖の合成に関与する遺伝子の同定を試みた。

(1) ガラクトフラノース糖鎖合成に関与する遺伝子のスクリーニング

16 個の機能未知糖転移酵素遺伝子破壊株を取得し、抗 β 1,5-galactofuranose 抗体を用いたウェスタンブロット解析によって、ガラクトフラノース糖鎖合成に関与する遺伝子のスクリーニングを試みた。

(2) ガラクトフラノース糖鎖欠損株の表現型の解析

gfsA、*gfsB* 及び *gfsC* 遺伝子破壊株の菌糸の成長速度や分子形成能を定量した。また、各種の抗菌剤などを（カルコフルオロホワイト、コンゴレッド、SDS）含む培地上で生育させて、親株と比較した。

(3) ガラクトフラノース糖鎖欠損株の細胞壁糖鎖構成の相違

gfsA、*gfsB* 及び *gfsC* 遺伝子破壊株の細胞壁糖組成を分析し、ガラクトフラノース糖鎖が他の糖鎖ポリマーの組成に与える影響について検討した。

(4) ガラクトフラノース糖鎖欠損株の菌糸形態観察

ガラクトフラノース糖鎖の欠失によって菌糸形態異常が観察されるかどうかを蛍光顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

(1) ガラクトフラノース糖鎖合成に関与する遺伝子のスクリーニング

フュージョン PCR 法によって作製した遺伝子破壊用カセットを *A. nidulans* にプロトプラスト-PEG 法を用いて導入し、形質転換体を多数得た。得られた形質転換体よりゲノム DNA を抽出し、PCR もしくはサザンハイブリダイゼーションによって、標的遺伝子の破壊を確認した。このようにして、19 個の候補遺伝子全ての遺伝子破壊株を取得した(Fig. 1)。取得した遺伝子破壊株

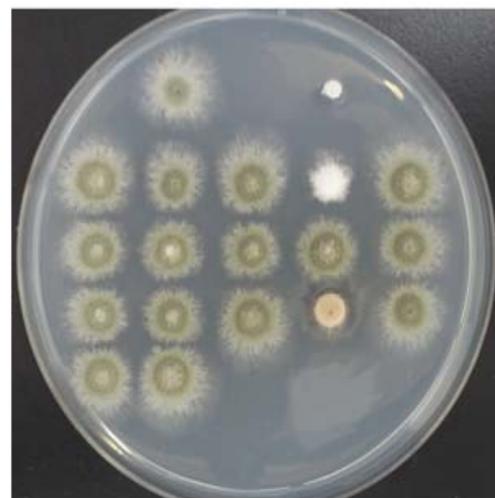
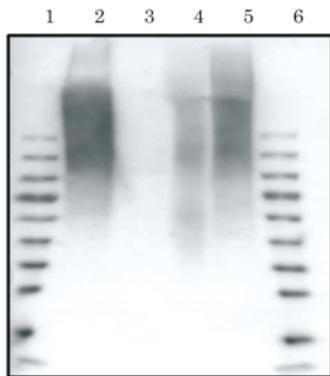


Fig. 1 取得した候補遺伝子破壊株のコロニー写真

から抽出した各遺伝子破壊株の細胞壁タンパク質に対して、抗 β 1,5-galactofuranose 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行っ

たところ、1つの遺伝子破壊株において細胞壁タンパク質中の β 1,5-galactofuranose 残基が完全に欠損していることが見いだされた。そこで、この遺伝子破壊株の責任遺伝子を *gfsA* と名付け、その2つのホモログを *gfsB* 及び *gfsC* と名付けて、更なる解析を行った。その結果、*gfsB* 及び *gfsC* 遺伝子破壊株においても β 1,5-galactofuranose 残基が減少していることが明らかになった。このことより、これら遺伝子がガラクトマンナンの生合成に関わる遺伝子であることが強く示唆された(Fig. 2)。



Lane 1, 6: Prestained Protein Ladder (Fermentas 社)
 Lane 2: 親株の細胞壁中タンパク質
 Lane 3: $\Delta gfsA$ 株の細胞壁中タンパク質
 Lane 4: $\Delta gfsB$ 株の細胞壁中タンパク質
 Lane 5: $\Delta gfsC$ 株の細胞壁中タンパク質

Fig. 2 β 1,5-Galf 残基の検出

(2) ガラクトフラノース糖鎖欠損株の薬剤耐性の相違

菌糸の成長速度の測定の結果、 $\Delta gfsB$ 株および $\Delta gfsC$ 株は親株に比べて、成長速度に変化は認められなかった。一方、 $\Delta gfsA$ 株の成長速度は、親株の成長速度を 100% としたとき、66%にまで抑制されていた。分生子形成能の検討の結果、30°Cの培養条件において、親株の分生子形成数を 100% としたとき、 $\Delta gfsA$ 株では 11%、 $\Delta gfsC$ 株

では 60%にまで減少し、 $\Delta gfsB$ 株では 128%にまで増加を示した。また、 $\Delta gfsA$ 株および $\Delta gfsC$ 株は42°Cで培養することにより、分生子形成能が飛躍的に回復することが明らかになった。さらに、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。

(3) ガラクトフラノース糖鎖欠損株の細胞壁糖鎖構成の相違

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、顕著な変化が認められなかった。一方、ガラクトース量では $\Delta gfsA$ 株は 60%に減少し、 $\Delta gfsC$ 株は 76%に減少し、 $\Delta gfsB$ 株は変化を示さなかった。すなわち、 $\Delta gfsA$ 株および $\Delta gfsC$ 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。

(4) ガラクトフラノース糖鎖欠損株の菌糸形態観察

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。

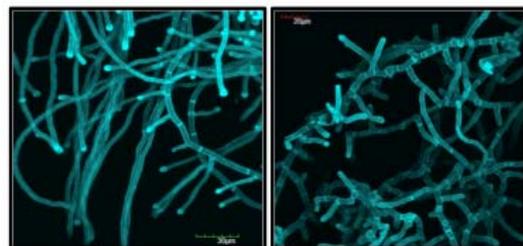


Fig. 3 親株と *gfsA*破壊株の菌糸蛍光顕微鏡写真

以上の結果から、*AgfsA* 株、*AgfsB* 株および*AgfsC* 株の3つの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。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

1. *Aspergillus nidulans* のガラクトマンナン生合成に関与する遺伝子の同定と機能解析

小町裕司¹, 浴野圭輔¹, 二神泰基², 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農) 第10回糸状菌コンファレンス 2010年11/18-19 (広島)

2. *Aspergillus nidulans* における分生子形成に関与する機能未知膜タンパク質の解析 石井千尋¹, 小町裕司¹, 浴野圭輔¹, 二神泰基², 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農) 日本農芸化学会 2010年度九州支部大会 2010/09/18 (熊本)

3. *Aspergillus nidulans* のガラクトマンナン合成に関与する遺伝子の機能解析 小町裕司¹, 浴野圭輔¹, 二神泰基², 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農) 日本農芸化学会 2010年度九州支部大会 2010/09/18 (熊本)

4. *Aspergillus nidulans* の 2 つのUDP-グルコース/UDP-ガラクトース 4-エピメラーゼ遺伝子の機能解析 岡拓二、浴野圭輔、二

神泰基¹, 竹川薫¹, 後藤正利¹, 野村善幸 (崇城大・生物生命・応微工、¹九大院・農院) 日本農芸化学会 2010年度大会 2010/03/29 (東京)

5. *Aspergillus nidulans* の GT31 ファミリーに属する新規糖転移酵素遺伝子の機能解析. 小町裕司¹, 岡拓二¹, 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農) 第9回糸状菌コンファレンス, 2009.11.18-19 (東京)

6. *Aspergillus nidulans* の GT31 ファミリーに属する機能未知糖転移酵素遺伝子の機能解析. 小町裕司¹, 岡拓二¹, 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農) 日本農芸化学会西日本支部大会 2009.10.30-31 (沖縄)

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