

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：37401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780350
 研究課題名（和文）糸状菌に特異的なガラクトフラノース糖鎖の生合成に関与する遺伝子の同定と機能解析
 研究課題名（英文）Identification and functional analysis of the *gfsA* gene involved in the biosynthesis of galactofuranose containing oligosaccharides
 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）：

アスペルギルス属糸状菌の細胞壁に存在する Galf 糖鎖は、細胞壁構造の保全に重要な役割を果たしている。しかし、これら Galf 糖鎖の合成に関与する糖転移酵素遺伝子は未だ同定されていない。そこで、我々は Galf 転移酵素の同定および機能解析を行った。スクリーニングの結果、*gfsA* 遺伝子破壊株において、O-結合型糖鎖修飾を受けている WscA タンパク質に対する抗-Galf 抗体 (EB-A2) による反応性が著しく低下することが明らかになった。そこで、精製 GfsA タンパク質および WscA を用いて *in vitro* における Galf 抗原合成活性を調べたところ、GfsA は UDP-Galf を糖供与体として必要とする Mn²⁺ 要求性の糖転移酵素であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The walls of filamentous fungi contain galactofuranose-containing polysaccharides and glycoconjugates. Galactofuranose residues are thought be important for *Aspergillus* cell wall integrity, however, galactofuranosyltransferases involved in galactofuranose antigens biosynthesis have not previously been identified. We used reverse-genetic and biochemical approaches to identify *A. nidulans* the *gfsA* gene which is responsible for galactofuranose antigen biosynthesis. Disruption of *gfsA* reduces reactivity with the EB-A2 antibody, which recognizes β -galactofuranose residue, to galactomannoproteins and to the purified WscA, which is one of O-glycosylated sensor protein of cell surface. The results of an *in vitro* galactofuranose antigen synthase assay revealed that the purified GfsA has a galactofuranosyltransferase activity and requires a divalent manganese cation and consumes UDP-D-galactofuranose as a sugar donor. This is the first characterization of fungal β -galactofuranosyltransferase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：糸状菌、糖鎖、糖転移酵素、細胞壁、ガラクトフラノース

1. 研究開始当初の背景

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。糸状菌の細胞壁構成糖鎖には、ガラクトフラノース(Galf)が含まれていることが知られている。このGalf糖鎖は、一部の糸状菌に特異的に存在し、日和見感染病原性の酵母であるクリプトコッカス属やカンジタ属、さらには、基礎研究が精力的に行われているサッカロミセス属やシゾサッカロミセス属の細胞壁には含まれていない。その特異性からGalf糖鎖の生合成経路は、*A. fumigatus*が引き起こす肺アスペルギルス症の特異的な診断薬や治療薬開発のターゲットとしても期待されている。さらに、Galf糖鎖の生合成に関わる遺伝子の変異体を用いることで、肺アスペルギルス症の感染機構や病理メカニズムの解明に繋がると考えている。

糸状菌のガラクトフラノース糖鎖には、 α 1,2-テトラマンノースが α 1,6 結合したポリマーに最大4つのGalfが β 1,5 結合したオリゴ糖が β 1,3 もしくは β 1,5 結合した構造であるガラクトマンナン、タンパク質に結合する *M*-結合型糖鎖の非還元末端側に α / β 1,2 結合したもの、および同じくタンパク質に結合する *O*-結合型糖鎖の非還元末端側に β 1,6/1,5 結合したものが知られている。これら、Galf糖鎖の生合成には Galf 転移酵素が関係していると考えられる。これらの糖転移酵素遺伝子が同定されれば、感染メカニズムとGalf糖鎖との関係に関する研究が加速することは間違いない。一方、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が、宿主として期待されている *A. niger* にも Galf糖鎖が多く結合していることが報告されている。糸状菌の持つGalf糖鎖は、ヒトに対する抗原性を持

つことから、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(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、糸状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も貢献できる。しかし、これらGalf糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素遺伝子や、その生理的機能に関する知見は皆無である。

2. 研究の目的

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、Galf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。そこで、我々はこれまでにGalf糖鎖合成に関わる遺伝子のスクリーニングを以下のストラテジーによって行ってきた。

糖質関連酵素のデータベースである CAZY (<http://www.cazy.org/>) によると、*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、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し、さらに、Galf残基をタンパク質糖鎖に持つ菌類に共通に存在し、且つ哺乳類や植物などの Galf 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 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 Galf 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 *Aspergillus nidulans* および *A. fumigatus* において全ての遺伝子破壊株を取得した。次に、遺伝子破壊株の細胞壁タンパク質に対して抗-Galf 抗体として知られている EB-A2 によるウェスタ

ンブロット解析を行った。その結果、両菌株共にウェスタンブロット解析によって1つの遺伝子破壊株でシグナルの消失が認められ、*in vivo*でのGal f 合成能が低下していることが確認された。そこで、本遺伝子がGal f 合成酵素遺伝子であると推定し、*gfsA*と名付けた。

本研究では、このGfsAタンパク質がGal f 転移酵素活性を保持していることを明らかにすると共に、GfsAタンパク質が基質とする分子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

*A. nidulans*の*gfsA*遺伝子の染色体上の3 ϕ 末端側に3xFLAGをタグングすることによって、GfsAの検出および精製を可能とする系を構築する。糖供与体となるUDP-Gal f は、UDP-ガラクトースムターゼを用いて合成後、HPLCを用いて精製した。受容基質は*wscA*遺伝子の3 ϕ 末端側にHAタグを挿入し、発現したWscA-HAをHA-アガロースを用いて精製したものをを用いた。

4. 研究成果

*A. nidulans*の*gfsA*遺伝子のゲノム上の3 ϕ 末端側に3xFLAGをコードする配列を挿入することでGfsA-3xFLAGを発現する株を構築した。構築した株より膜画分を抽出し、0.2%CHAPSOを含む緩衝液でタンパク質の可溶化を行った。可溶化したタンパク質溶液にFLAG-アガロースを添加し、洗浄、溶出することでGfsAタンパク質を高度に精製した(図1)。また、UDP-Gal f をUDP-ガラクトースムターゼであるUgmAを用いてUDP-ガラクトースより合成し、HPLCを用いて精製した。さらに、細胞表層のセンサータンパク質であり、*N*-および*O*-結合型糖鎖修飾されていることが知られているWscAにHAタグが付加されたWscA-HAタンパク質を発現する株において*gfsA*遺伝子を破壊し、 Δ *gfsA*-AnwscA

株を構築した。構築した Δ *gfsA*-AnwscA株よりWscA-HAをHA-アガロースを用いて精製した。精製したWscA-HAの*N*-結合型糖鎖を除去するために

PNGase Fによって処理を行った。精製したGfsAタンパク質と糖供与体としてUDP-Gal f 、受容基質として Δ *gfsA*-AnwscA株より精製したWscA-HAを用いて、*in vitro*に

おいて37 $^{\circ}$ C、24時間反応させ、反応産物をSDS-PAGEに供与した後に、EB-A2を用いてWscA-HA上のGal f 残基を検出した。その結果、精製したGfsA-3xFLAG、WscA-HAおよ

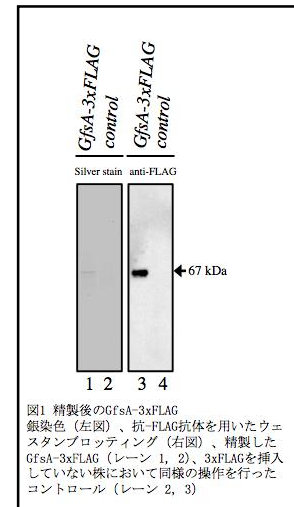


図1 精製後のGfsA-3xFLAG銀染色(左図)、抗-FLAG抗体を用いたウェスタンブロット解析(右図)、精製したGfsA-3xFLAG(レーン1, 2)、3xFLAGを挿入していない株において同様の操作を行ったコントロール(レーン2, 3)

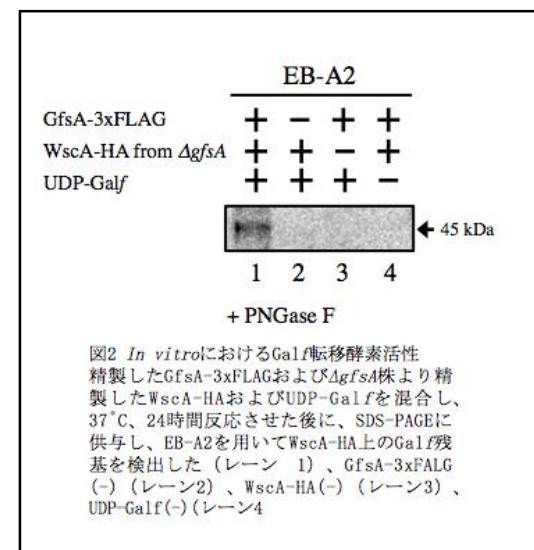


図2 *In vitro*におけるGal f 転移酵素活性
精製したGfsA-3xFLAGおよび Δ *gfsA*株より精製したWscA-HAおよびUDP-Gal f を混合し、37 $^{\circ}$ C、24時間反応させた後に、SDS-PAGEに供与し、EB-A2を用いてWscA-HA上のGal f 残基を検出した(レーン1)、GfsA-3xFLAG(-)(レーン2)、WscA-HA(-)(レーン3)、UDP-Gal f (-)(レーン4)

びUDP-Gal f 全てを加えた反応系でのみEB-A2によるシグナルが検出された(図2、レーン1)。また、GfsA-3xFLAG、WscA-HAおよびUDP-Gal f のうち、1つでも欠けることでシグナルは消失した(図2、レーン2,3,4)。また、同様の反応系を用いてGfsAの酵素の性状について検討したところ、GfsAは、UDP-

ガラクトース、GDP-マンノース、UDP-グルコースなどの他の糖ヌクレオチドを糖供与体とすることはできなかった。また、 Mn^{2+} の存在下でのみ反応産物が検出され、EDTAの存在下では全く反応が認められなかった。以上のことから、GfsA タンパク質は、UDP-Galf を糖供与体とし、WscA 上の O-結合型糖鎖を受容基質とする Mn^{2+} 要求性の Galf 転移酵素であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 11 件)

1) *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子の探索 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 第 12 回糸状菌コンファレンス (ウインクあいち (名古屋市)) 平成 24 年 11 月 12 日 (月), 13 日 (火)

2) *Aspergillus nidulans* における *ugeB* 遺伝子の機能解析 田中麻左人, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 第 12 回糸状菌コンファレンス (ウインクあいち (名古屋市)) 平成 24 年 11 月 12 日 (月), 13 日 (火)

3) *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン合成に関与する遺伝子の機能解析 元松遥, 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 第 12 回糸状菌コンファレンス (ウインクあいち (名古屋市)) 平成 24 年 11 月 12 日 (月), 13 日 (火)

4) *Aspergillus nidulans* における *ugeB* 遺伝子の機能解析 田中麻左人, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 (日本

農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 (鹿児島大学)) 平成 24 年 9 月 29 日 (土)

5) *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン合成に関与する遺伝子の機能解析 元松遥, 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 (日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 (鹿児島大学)) 平成 24 年 9 月 29 日 (土)

6) *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子の探索 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 (日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 (鹿児島大学)) 平成 24 年 9 月 29 日 (土)

7) 糸状菌のガラクトフラナン合成に関わるガラクトフラノース転移酵素遺伝子の同定 岡拓二, 小町祐司, 畠山信太郎, 元松遥, 二神泰基, Karina Kizjakina, Pablo Sobrado, 浴野圭輔, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸 第 31 回日本糖質学会年会 (鹿児島市民文化ホール) 平成 24 年 9 月 18 日 (火)

8) *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン合成に関与する遺伝子の機能解析 岡拓二, 元松遥, 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 後藤正利, 竹川薫, 野村善幸 2011 年度大会 日本農芸化学会大会 (京都) 平成 24 年 3 月 26 日 (土)

9) *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子の探索 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 日本生物工学会九州支部大会

(福岡) 平成 23 年 12 月 10 日 (土)

10) *Aspergillus nidulans* のガラクトマンナン
生合成に關与する遺伝子の機能解析 元松
遙, 畠山信太郎, 浴野圭輔, 二神泰基, 竹川
薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 日本生物
工学会九州支部大会 (福岡) 平成 23 年 12 月
10 日 (土)

11) *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
機能解析 石井千尋, 浴野圭輔, 二神泰基,
竹川薫, 後藤正利, 野村善幸, 岡拓二 日本
生物工学会九州支部大会 (福岡) 平成 23 年
12 月 10 日 (土)

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