



崇城大学生物生命学部 岡 拓 二

糸状菌と植物の糖鎖生成に関与する諸酵素に関する研究

はじめに

糖鎖は、細胞間認識、細胞内情報伝達、タンパク質の品質管理、タンパク質の局在、タンパク質の安定化、タンパク質の活性制御などの多くの生命現象に関わっている。また、糸状菌や植物などの細胞壁を有する生物では複雑な三次元構造をとる多糖が、細胞壁の主要構成成分となっている。近年、多くの生物種においてゲノム情報が明らかにされ、遺伝子の配列を簡単に手に入れることが可能となった。しかし、糖転移酵素に関しては、どの遺伝子配列がどのような酵素をコードしているのかわからずに残されているものが多く残されている。私は、糸状菌や植物の糖鎖生成に興味を持ち、どの遺伝子がどのような酵素活性を持っているのかを逆遺伝学的手法および生化学的手法を用いて同定することで糖鎖生成に関わる諸酵素の機能や糖鎖の機能を明らかにする研究を進めてきた。以下にその概要を紹介する。

1. 糸状菌のガラクトマンナン生成

アスペルギルス属糸状菌の細胞壁を形成する多糖や菌体外に分泌する糖鎖にはガラクトマンナン (GM) が含まれている。菌類の GM は、マンノース (Man) とガラクトフラノース (Gal) というユニークな糖で構成されるオリゴ糖もしくは多糖である。GM は 1930 年代には既に構造の一部が報告されており、また、主に *Aspergillus fumigatus* が引き起こす肺アスペルギルス症の診断の指標として世界中の医療現場で用いられるなど広く知られている。また、GM はヒトを含む動物や植物には含まれていないことから、その生成に関わる酵素が副作用のない抗真菌剤の標的となることが期待されている。糸状菌の 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) が知られている。しかし、GM 生成を担う Galf 転移酵素の情報は、遺伝子はもとより、その酵素活性測定法さえも構造の発見から長きにわたって知られていなかった。

1-1. 糸状菌の O-マンノース転移酵素の同定

筆者は、2004 年に糸状菌において小胞体に局在するプロテイン O-マンノース転移酵素 (PmtA) が OMGM の根元の Man 合成を担う酵素であることを酵素的に明らかにした。pmtA の遺伝子破壊株は、菌糸が膨らむバルーン構造を示し、分子形成能が著しく減少するなどの異常を示した。また、PmtA のパラログである PmtB および PmtC も標的とするタンパク質は異なるものの、同じ酵素反応を担っていることを明らかにした。さらに、PmtA が糸状菌の代表的な分泌酵素であるグルコアミラーゼ I の糖鎖修飾に関わっていることを示した。これらのことから、糸状菌において OMGM が細胞壁形成過程や分泌酵素の安定化において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

1-2. 糸状菌のガラクトフラノース転移酵素の発見

筆者は、逆遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせることによる Galf 糖鎖の生成に関わる遺伝子の同定を試み、世界で初めて菌類由来の Galf 転移酵素遺伝子 (*gfsA*) を同定した。GfsA は、細菌類や原生生物において知られていた Galf 転移酵素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り、OMGM の非還元末端側の Galf 残基を UDP-Galf を糖供与体として転移する、ゴルジ体局在酵素であった (図 1, 図 2)。

*gfsA* 遺伝子の破壊は糸状菌の菌糸伸長を抑制し、菌糸を湾曲させ、分子形成能を著しく低下させた。*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分類群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。チャワンタケ亜門に属する菌には、多くの人畜病原菌 (白癬菌、肺アスペルギルス症病原菌等) や植物病原菌 (イネいもち病菌、うどんこ病菌等) が含まれており、GfsA 酵素活性の阻害剤は多くの感染症や植物病の新しい治療薬、農薬として期待できると考えている。さらに、GfsA を大腸菌発現系により大量に調製することに成功し、定量的な酵素活性測定系も確立した。また、NMR やメチル化分析を駆使することにより、GfsA が OMGM

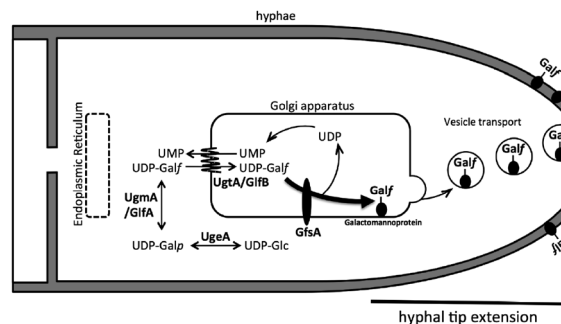


図 1. 糸状菌におけるガラクトフラノース含有糖鎖の生合成

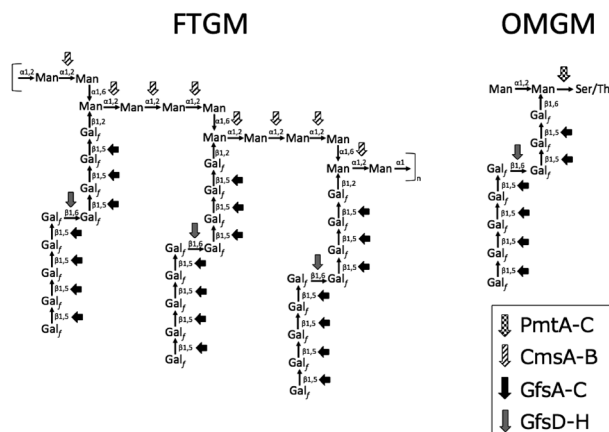


図 2. 糸状菌のガラクトマンナンの構造と推定される糖転移酵素の作用部位

のみならず FTGM 中の  $\beta$ 1,5-GalF 残基を転移する酵素であることを明らかにした (図2)。さらに、GfsA のパラログである GfsD-H が  $\beta$ 1,6-GalF 転移酵素であること、CmsA-B と名付けた酵素が FTGM 中の  $\alpha$ 1,2-マンナン主鎖の合成酵素であるという証拠を得ており、今後の研究の発展を期待している (図2)。

## 2. 出芽酵母による貴重な糖ヌクレオチドの合成と植物の糖ヌクレオチド合成酵素の発見

糖ヌクレオチドは糖転移酵素の糖供与体として機能することから、糖鎖生合成研究や糖鎖合成技術開発に必須な化合物である。植物細胞壁形成に必要な糖ヌクレオチドの大部分は UDP-グルコースや GDP-マンノースを前駆体として各種デヒドロゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デヒドラターゼ、エピメラーゼ、レダクターゼなどの酵素によって変換される。また、出芽酵母の細胞質には UDP-グルコースや GDP-マンノースが豊富に存在している。そこで、各種の糖ヌクレオチド合成酵素を出芽酵母細胞質で高発現させることにより貴重な糖ヌクレオチドを産生可能な出芽酵母の分子育種を目指した。

### 2-1. UDP-グルクロン酸および UDP-キシロースを産生する出芽酵母の分子育種

UDP-グルクロン酸は、UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (UGD) によって UDP-グルコースより合成される。また、UDP-キシロースは、UDP-キシロースシンターゼ (UXS) によって UDP-グルクロン酸より合成される。筆者は、UGD を高発現させたことにより UDP-グルクロン酸産生出芽酵母株 (生産性: 7.3 mg/L) を、UGD と UXS を高発現させることにより UDP-キシロース産生出芽酵母株 (生産性: 2.0 mg/L) の分子育種に成功した。育種した出芽酵母株に適切な糖転移酵素遺伝子や糖ヌクレオチド輸送体遺伝子を導入することで、自由に設計した糖鎖を出芽酵母に産生させることも可能となると考えている。

### 2-2. UDP-ラムノース合成酵素の発見

UDP-ラムノースはペクチンやラムノース配糖体の合成に関わる糖転移酵素に必要な不可欠な糖ヌクレオチドである。また、現在においても試薬として販売されておらず、そのことがラムノース転移酵素の研究の妨げとなっていた。筆者は、産業技術総合研究所において出芽酵母内で貴重な糖ヌクレオチドや糖ペプチドを産生させる技術の開発に取り組む中で RHM2 が UDP-グルコースから UDP-ラムノースへと変換する酵素本体であることを明らかにした。RHM2 は、1 つのタンパク質が UDP-グルコース 4,6-デヒドラターゼ活性、UDP-4-ケト-6-デオキシグルコース 3,5-エピメラーゼ活性および UDP-4-ケト-ラムノース 4-ケト-レダクターゼ活性の 3 つの酵素活性を持つという面白い特徴を有していた。本研究では、UDP-ラムノース合成酵素の機能を明らかにするだけでなく、貴重で手に入らなかった UDP-ラムノースを簡単に供することを可能にし、手に入れた UDP-ラムノースを用いて多くのラムノース転移酵素遺伝子が同定されている。

## 3. 植物に特徴的な O-結合型糖鎖生合成酵素の発見

植物では、他の生物種には見られない 3 種類の O-結合型糖鎖がタンパク質に修飾されていることが知られている。これら

は、タンパク質中のヒドロキシプロリン残基にガラクトースを転移する酵素 (HGT)、アラビノフラノースを転移する酵素 (HPAT)、もう 1 つは、セリン残基にガラクトースを転移する酵素 (SGT) によって生合成される。これらの糖鎖は、近年、植物における多くの生理現象に関わっていることが明らかになりつつある。筆者は、これら植物特異的な O-結合型糖鎖の生合成を担う酵素の遺伝子を生化学的手法により同定することを目的とし、HGT と SGT の活性を *in vitro* において検出する手法を開発した。2010 年には、HGT が UDP-ガラクトースを糖供与体とし、補因子として  $Mn^{2+}$  イオンを必要とする主に小胞体に局在する酵素であることを明らかにした。また、2014 年には SGT をコードする遺伝子 (*sgt1*) を世界で初めてクローニングし、その酵素的性質や生理学的機能を明らかにした。シロイヌナズナの *sgt1* 破壊系統では、主根の伸長や子葉の拡大などの表現型が認められた。SGT1 は植物界に広く分布する新規な酵素であり新規な糖転移酵素ファミリー (GT96) として登録された。

**謝 辞** 本研究は、崇城大学生物生命学部応用微生物工学科応用微生物学講座、九州大学農学部発酵化学講座ならびに産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター糖鎖生合成チームにおいて行われたものです。学生時代に糸状菌の研究を行う機会を与えて頂き、研究することの面白さを教えて頂いた九州大学・別府大学名誉教授・古川謙介先生、ならびに学生時代から現在に至るまで、酵素や糸状菌の研究手法、研究に対する取り組み方、私生活に至るまで懇切丁寧にご指導頂きました佐賀大学教授・後藤正利先生に深甚なる感謝の意を表します。また、ポストドク時代に最前線で研究することの面白さ、ポジティブな思考法、研究の楽しみ方を教えて頂いた産業技術総合研究所・地神芳文先生に衷心より感謝の意を表します。また、多くのご助言や激励を賜りました九州大学教授・竹川 薫先生に心より感謝申し上げます。崇城大学において常日頃から激励と暖かいご助言を頂きました崇城大学教授・野村善幸先生、崇城大学教授・太田一良先生、崇城大学准教授・浴野圭輔先生に心より御礼を申し上げます。共同研究者として多大なご助力を頂きました、九州大学教授・松岡 健先生、東北医科薬科大学教授・柴田信之先生、東北医科薬科大学助手・田中 大先生、千葉大学特任助教・萩原大祐先生、鹿児島大学准教授・二神泰基先生、産業技術研究所・新聞陽一博士、産業技術研究所・横尾岳彦博士、産業技術研究所・千葉靖典博士、産業技術研究所・仲山賢一博士、(株)糖鎖工学研究所・齋藤扶美恵さんに心から感謝申し上げます。本研究の成果は、崇城大学の応用微生物学研究室の卒業生・在学生およびすべての共同研究者の皆様のご協力、ご支援によるものであり、ここに深く感謝申し上げます。九州大学発酵化学研究室の多くの先輩、同期生、後輩および産業技術研究所糖鎖生合成チームの高 暁冬博士、喜多島敏彦博士、藤田盛久博士、平山弘人博士、岡本美智代博士、梅村真理子博士に心から感謝致します。最後に、本奨励賞にご推薦下さいました崇城大学教授・山田耕路先生に厚く御礼申し上げます。