

第41回（平成25年度）研究奨励金受領者研究報告

糸状菌のガラクトフラノース転移酵素群の機能解析

崇城大学生物生命学部 岡 拓二

研究目的

ガラクトフラノース (Gal_f) 含有糖鎖は子囊菌門のうちチャワタケ亜門に属する糸状菌に見られる。Gal_f含有糖鎖は1930年代に構造が見つかり、近年、糸状菌の細胞壁形成における重要性が認識されてきた。また、Gal_f糖鎖はヒトを含む動物や植物には存在していないため新規な抗真菌剤のターゲットとなることが期待されている。さらに、医療現場においては肺アスペルギルス症の指標として広く使われてきた。それにも関わらず、その生合成に関わるGal_f転移酵素に関する情報は知られていなかった。2013年に我々は、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* およびヒト病原菌 *A. fumigatus* のGal_f転移酵素の同定と性質決定に初めて成功した (*Molecular Microbiology*, 2013)。GfsAは、細胞表層のガラクトマンノプロテイン (GMP) に付加しているO-グリカン非還元末端のGal_f残基をUDP-Gal_fを糖供与体として転移するゴルジ体局在の糖転移酵素であり、その責任遺伝子 *gfsA* の破壊は糸状菌の菌糸伸長を抑制し、孢子形成能を著しく低下させた。

一方で *A. nidulans* および *A. fumigatus* には、*gfsA* のホモログが7つ存在することが明らかになっている。これらホモログは、GfsAと結合様式や基質特異性が同じかもしくは異なるGal_f転移酵素である可能性が非常に高いと考えられる。そこで、本研究では、GfsAおよび7つのホモログの組換え酵素を取得し、機能解析を進めると共に、遺伝子破壊株の表現型の解析を進めることで糸状菌のGal_f糖鎖合成にかかわる転移酵素ファミリーの機能全貌を明らかにすることを目的とした。

結果と考察

A. nidulans における *gfsA* の7つのホモログを *gfsB*-*gfsH*、*A. fumigatus* における *AfgfsA* の7つのホモログを *AfgfsB*-*AfgfsH* と名付けて機能解析を進めた。進化系統樹を描いたところ糸状菌のGal_f転移酵素ファミリーは大きく2つのグループに大別されることが明らかになった (図1)。そこで、*gfsA* を含むグループをGT31-A、他のグループをGT31-Bとして解析を進めた。まず、すべての遺伝子について単独破壊株を作製したところ、*A. nidulans* における

単独遺伝子破壊株のコロニー形態は親株と大きな違いは認められなかった。一方で、*A. fumigatus* における単独遺伝子破壊株のうち *AfgfsD*破壊株および *AfgfsE*破壊株は、60 μg/mL のカルコフルオロホワイトを含む培地上で生育阻害を示した。このことから、GT31-Bに属する *AfgfsD* および *AfgfsE* が *A. fumigatus* の細胞壁形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

酵素機能の解析を進めるために組換えタンパク質の取得を試みた。まず、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主としてGT31-Aに属するGfsA、GfsBおよびGfsCについて組換えタンパク質の発現を試みたが、発現させることができなかった。そこで、大腸菌ベクター pET32a を用いて組換えタンパク質の発現を試みた。pET32aのT7プロモーター下流に *gfsA* 遺伝子を挿入し、pET32a-*gfsA* を構築した。pET32a-*gfsA* を大腸菌宿主 Rosetta-gami に導入し、低温条件 (18度) で培養および発現誘導することで可溶性GfsAを得ることができた。また、同様の方法によりGfsBおよびGfsCも得ることができた。次に、得られた組換えGfsAおよびパラニトロフェノールにβ-Gal_fを結合させた基質であるpNP-β-Gal_fを受容基質として用いた酵素アッセイ系を立ち上げ、機能解析を試みた。組換えGfsA、受容基質としてpNP-β-Gal_f、糖供与体としてUDP-Gal_fを反応系に添加し、30度で保温後、HPLCにより反応産物を分離、検出した。その結果、pNP-β-Gal_fとは異なる新たなピークが2つ検出された。そこで、この2つの物質をLC-MSにより解析したところ、それぞれpNP-β-Gal_f-Gal_fおよびpNP-β-Gal_f-Gal_f-Gal_fであることが明らかになった。また、GfsAは、pNP-β-Gal_fやpNP-α-ManにはGal_f

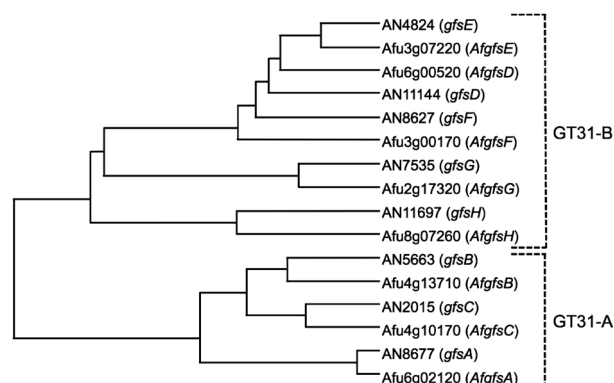


図1 *Aspergillus nidulans* および *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の進化系統樹。

構造の明確な受容基質を用いたアッセイ系が構築できたことおよび大腸菌を用いた組換え体を調製することが可能となったため、部位特異的変異導入法を用いることで、酵

特異な脂肪細胞分化を誘導する核内受容体リガンドの遺伝子発現機構解析

— 10 —