

# 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 ( $\text{Gal}_f$ ) 含有糖鎖は子囊菌門のうちチャワンタケ亜門に属する糸状菌に見られる。 $\text{Gal}_f$ 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、 $\text{Gal}_f$ 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 $\text{Gal}_f$ 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 $\text{Gal}_f$ 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 $\text{Gal}_f$ 残基を UDP- $\text{Gal}_f$  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、胞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 $\text{Gal}_f$ 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 $\text{Gal}_f$ 糖鎖合成にかか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 $\text{Gal}_f$ 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つた。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 $\beta\text{-Gal}_f$ を結合させた基質である pNP- $\beta\text{-Gal}_f$  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- $\beta\text{-Gal}_f$ 、糖供与体として UDP- $\text{Gal}_f$ 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- $\beta\text{-Gal}_f$ 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- $\beta\text{-Gal}_f\text{-Gal}_f$  および pNP- $\beta\text{-Gal}_f\text{-Gal}_f\text{-Gal}_f$  であることが明らかになった。また、GfsA は、pNP- $\beta\text{-Gal}_f$  や pNP- $\alpha\text{-Man}$  には  $\text{Gal}_f$

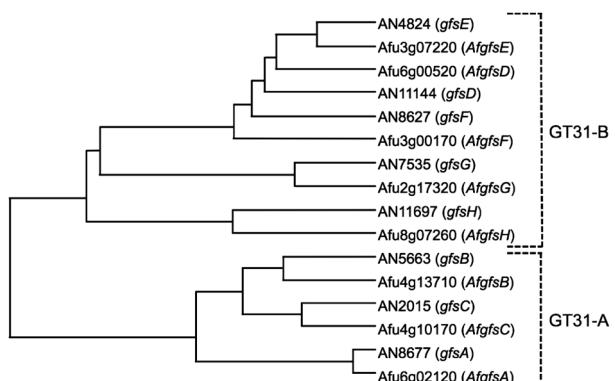


図1 *Aspergillus nidulans* および *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の進化系統樹。

転移活性を全く示さないことも明らかにした。これらのことから、GfsA は O-グリカン末端の Gal<sub>f</sub> 残基に  $\beta$ 1, 5-Gal<sub>f</sub> を 2つまで転移する酵素であることが明らかになった。また、GfsB および GfsC に関しても酵素活性を調べたところ、GfsA と同じ酵素活性を有することが明らかになった。

構造の明確な受容基質を用いたアッセイ系が構築できし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つたため、部位特異的変異導入法を用いることで、酵

素の構造改変や詳細な機能解析が行えるようになった。また、立体構造を解明することも可能となった。今後、立体構造情報やこのアッセイ系を用いることで新規な抗真菌薬となる GfsA の酵素活性阻害剤のスクリーニングを目指す予定である。最後に、本研究を遂行するにあたり、援助してくださいました公益財団法人農芸化学研究奨励会に感謝申し上げます。

## 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

京都大学大学院生命科学研究科 助教 宮前友策

### 1. 背 景

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は核内受容体スーパーファミリーの一種であり、糖や脂質代謝、炎症など細胞内の様々な応答に関与する。核内で retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上の応答配列に結合する。PPAR $\gamma$ の転写活性はリガンドにより制御されることが知られ、リガンド結合により構造変化が生じると、複数の共役因子と解離、及び会合し複合体を形成することで、標的遺伝子の転写が制御される。PPAR $\gamma$ のリガンド結合ドメイン (ligand-binding domain: LBD) には、複数のサブポケットから構成される巨大な Y 字型の結合ポケットが存在する。本ポケットに結合するリガンドの化学構造によって、立体構造の変化や、会合する共役因子に違いが生じ、下流遺伝子の発現や生理作用の表れ方が異なることが知られる。

受領者らは、天然物を探索源とした新たな PPAR $\gamma$ アゴニストの探索研究を行い、複数種の天然由来アゴニストを単離してきた<sup>1)</sup>。その過程で、バンウコン根茎に豊富に含まれるケイヒ酸誘導体 **1** に、PPAR $\gamma$ の不可逆的アンタゴニストである GW9662 共存下でのみ、顕著なアゴニスト活性を示すという、ユニークな生物活性を有することを見出した。チアゾリジンなどの従来の PPAR $\gamma$ アゴニストは、白色脂肪細胞への分化を促進することが知られるが、興味深いことに、両化合物を共処理した 3T3-L1 細胞においては、PPAR $\gamma$ 依存的な脂肪蓄積の抑制が認められた。ドッキングスタディから、両化合物は従来のアゴニストとは異なるサブポケットに結合することが示唆されたため、結合により生じ得る PPAR $\gamma$ の立体構造変化が異なることにより、従来とは異なるフェノタイプが表れたと考えられる。しかし、これらの化合物が結合した PPAR $\gamma$ に会合する転

写共役因子やその結合部位等、詳細な遺伝子発現機構は明らかではない。本研究では、特異な脂肪細胞分化を制御すると考えられる、両化合物による PPAR $\gamma$ 活性化機構を、包括的に明らかにすることを目的とした。

### 2. 方法と結果

#### 1) GW9662 及びケイヒ酸誘導体の両者を融合させたハイブリッドリガンドの合成

両化合物により誘導されると考えられる特異な PPAR $\gamma$ 活性化機構を解析するにあたり、それぞれの化合物の off-target 効果やそれらの相乗的な影響による解析結果の複雑化が懸念された。そこで、両化合物共処理時と同様の活性フェノタイプを示す单一の化合物が得られれば、複数の化合物の影響による解析結果の複雑化を緩和できると考え、両化合物を融合させた構造を有するハイブリッド型リガンドの合成に着手した。両化合物を用いたドッキングシミュレーションにより、**1** は GW9662 存在下で、H3,  $\beta$ -sheet,  $\Omega$ -loop から構成される  $\Omega$ -pocket に結合する可能性が強く示唆されている。この推定結合様式に基づき、GW9662 の芳香環のメタ位にケイヒ酸誘導体を結合させた化合物**2** (図1) をデザインし、合成した。市販の化合物を出発原料として、計 7段階の反応により化合物**2**を得た。また、GW9662 ユニットの塩素原子を水素原子に置換した化合物**3** も同時に合成した。

#### 2) 合成したハイブリッド型リガンドの活性評価

まず、合成したリガンドが Cys285 残基と共有結合を形成するか、検証した。リコンビナント PPAR $\gamma$  LBD と化

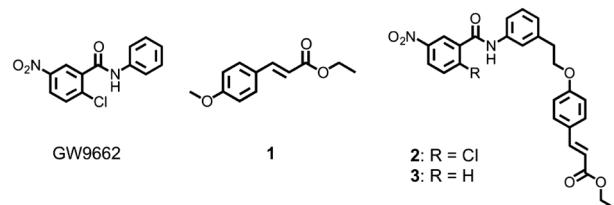


図1 GW9662, 化合物**1**, **2**, 及び**3** の構造。