

糸状菌のガラクトマンナン生合成マップの完成を目指して

崇城大学 生物生命学部生物生命学科 岡 拓二



【略歴】

1999年3月 九州大学農学部農芸化学科卒業
2004年3月 九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了 博士（農学）
2004年3月 独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター特別研究員
2008年4月 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科 助教
2010年4月 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科 准教授
2020年4月 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科 教授
2022年4月 崇城大学生物生命学部生物生命学科 教授（改組のため）

はじめに

チャワンタケ亜門に属する糸状菌の細胞壁最表層は、マンノース (Man) とガラクトフラノース (Galf) から構成される多糖であるガラクトマンナン (GM) で覆われている¹⁾。糸状菌の産生する GM の構造には 2 種類がある。1 つは、真菌型ガラクトマンナン (FTGM) と呼ばれ、4 つの Man 残基が α -(1 $\rightarrow$ 2)-結合した短糖鎖が 9 から 10 個、連続的に α -(1 $\rightarrow$ 6)-結合した構造であるマンナン主鎖と、 β -(1 $\rightarrow$ 5)-/ β -(1 $\rightarrow$ 6)-Galf 糖鎖であるガラクトフラン側鎖から構成される (図 1 上)。ガラクトフラン側鎖は、マンナン主鎖に β -(1 $\rightarrow$ 2)-、 β -(1 $\rightarrow$ 3)-もしくは β -(1 $\rightarrow$ 6)-結合している (図 1 上)。もう 1 つは、O-Man 型ガラクトマンナン (OMGM) と呼び、タンパク質に含まれるセリンもしくはスレオニン残基に α -(1 $\rightarrow$ 2)-マンノビオースが結合した構造を基本骨格とする O-Man 型糖鎖の還元末端側の Man 残基に β -(1 $\rightarrow$ 5)-/ β -(1 $\rightarrow$ 6)-Galf 糖鎖が β -(1 $\rightarrow$ 6)-結合した構造である (図 1 下)。糸状菌の細胞壁の機能は、細胞の物理的な保護のみならず、外部環境のセンシングや物質交換など多岐に渡り、その生合成酵素は抗真菌薬の標的として期待されている¹⁾。我々は、GM の生合成に関わる新規な Man 転移酵素および Galf 転移酵素を見出し、機能解析を進めることで新規な作用機序を有する抗真菌開発のための基盤とすることを目的として研究を進めてきた。本発表では、これら研究成果について報告する。

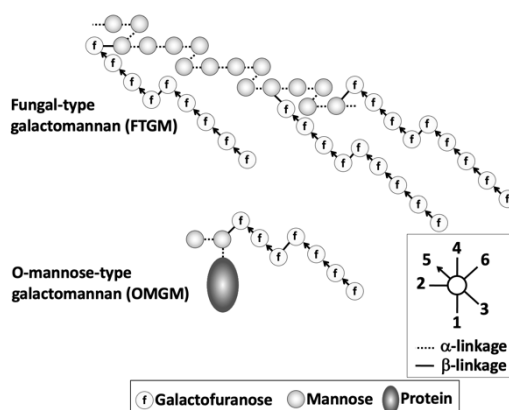


図1. 糸状菌のガラクトマンナンの構造

β -ガラクトフラノシド β -(1 $\rightarrow$ 5)-ガラクトフラノース転移酵素の同定と機能解析

GM 中の β -Galf 残基の 5 位の水酸基に Galf 残基を β -結合させる酵素 (GfsA, GfsB および GfsC) は、糖質関連酵素のデータベースとして知られている CAZy に登録された推定糖転移酵素のうち糸状菌に特異的に存在する酵素の中から見出された²⁾。GfsA は新規な一次構造を有する糖転移酵素であった。組換え GfsA の解析により本酵素は β -ガラクトフラノシド β -(1 $\rightarrow$ 5)-Galf 転移酵素であることを明らかにした³⁾。また、病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* では GfsA および GfsC が協調的にはたらくことで GM 中の全てのガラクトフラン側鎖を生合成していることを明らかにした⁴⁾。また、 $\Delta gfsABC$ 三重破壊株では、著しい菌糸伸長の抑制、分生子形成能の低下、菌糸分岐の増加、細胞表層の疎水性度の増加、薬剤感受性の増加が引き起こされることなども明らかにした⁴⁾。

α -マンノシド α -(1 $\rightarrow$ 2)-マンノース転移酵素の同定と機能解析

FTGM 中の α -Man 残基の 2 位の水酸基に Man 残基を α -結合させる酵素(CmsA および CmsB)は、出芽酵母の α -(1 $\rightarrow$ 2)-Man 転移酵素である ScMnt1 とアミノ酸レベルの相同性を有するタンパク質の中から見出された。組換え CmsA の解析により本酵素は α -マンノシド α -(1 $\rightarrow$ 2)-Man 転移酵素であることを明らかにした⁵⁾。また、 Δ cmsA 株および Δ cmsB 株では、著しい菌糸伸長の抑制、分生子形成能の低下、菌糸分岐の増加、菌糸の膨潤が観察された⁵⁾。さらに、 Δ cmsA 株および Δ cmsB 株由来の GM ではマンナン主鎖構造が完全に失われていることが ¹H-NMR の解析から明らかになった⁵⁾。CmsA のタンパク質立体構造を明らかにしたところ ScMnt1 とは異なり、基質結合部位に大きな溝構造があることが明らかになった⁶⁾。生体内では、ScMnt1 は短鎖の Man 鎖を合成するのに対し、CmsA は多糖を合成する。大きな溝構造は、CmsA が多糖合成のために最適化された結果、形成されたものであることが示唆された⁶⁾。また、ScMnt1 が α -(1 $\rightarrow$ 6)-マンノビオースに対して転移活性を有さないのに対し、CmsA では α -(1 $\rightarrow$ 6)-マンノビオースに対して強い Man 転移活性を示した⁵⁾。この基質特異性は、FTGM の構造を形作る上で重要な特徴であると考えられる。

α -マンノシド β -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトフラノース転移酵素の同定

GM 中の α -Man 残基に Glaf 残基を β -結合させる転移酵素を見つけることは長らくできていなかった。そこで、 α -マンノシド β -Galf 転移酵素は「ゴルジ体に局在する機能未知 II 型膜タンパク質の中にある」という仮説を立て。その仮説に基いた候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、17 個のタンパク質が「ゴルジ体に局在する機能未知 II 型膜タンパク質」として選抜された。この 17 個の候補について遺伝子破壊株の作製し、生育に異常が認められた株の責任遺伝子から組換え酵素の取得を行い、解析を進めた。その結果、1 つの組換え酵素が 4-メチルウンベリフェリル α -マンノシド (4MU- α -Man) を受容基質とした時に強い Galf 転移活性を示した。酵素反応産物の構造を解析したところ Galf- β -(1 $\rightarrow$ 6)-Man- α -4MU であったことから、本酵素は世界で初めての α -マンノシド β -(1 $\rightarrow$ 6)-Galf 転移酵素であることが明らかになった。このタンパク質を MgfA と名付けた(unpublished data)。 α -Man 残基の 6 位の水酸基に Galf 残基を転移する反応を担う酵素が見出されたのは MgfA が全生物を通じて最初の例であり、MgfA は機能既知の糖転移酵素とは全くアミノ酸配列の類似性が認められない新しい糖転移酵素ファミリーを創る酵素であった。

今後の展望

FTGM 生合成のキャリアー分子はわかっていない。ゴルジ体で生合成される FTGM が、何に結合して、どのようにして細胞壁に運ばれるのかを明らかにすることで糸状菌の GM 生合成マップの完成を目指したい。

謝辞

本研究は崇城大学生物生命学部で行われたものです。研究遂行に関わって頂いた全ての先生方、学生の皆さんに心より感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Oka T. *Biosci Biotechnol Biochem* 82, 183-191 (2018).
- (2) Komachi Y, and Oka T. *Mol Microbiol.* 90: 1054-1073. (2013)
- (3) Katafuchi Y, and Oka T. *Glycobiology* 27, 568-581 (2017).
- (4) Chihara Y, and Oka T. *mSphere* 5, :e00770-19 (2020).
- (5) Onoue T, and Oka T. *Sci Rep* 8, 16918 (2018).
- (6) Hira D, Onoue T, Oka T. *J Biol Chem* 295, 15407-15417 (2020).