

# 糸状菌の糖鎖リモデリングを目指した新規な糖転移酵素遺伝子の機能解明と応用研究

岡 拓二  
(崇城大学 生物生命学部)

## 研究の目的

麹菌を含むアスペルギルス属の持つ酵素の多くはグリコシル化される。タンパク質は、グリコシル化されることによって機能が向上し、多機能化することが知られている。アスペルギルス属のタンパク質に結合するN-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖には、ガラクトフラノースやグルコースなど他の生物では見られない糖が付加されているが、これら糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素や生理的機能に関する知見は無い<sup>1)</sup>。

また、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。しかしながら、糸状菌の糖鎖の中には、ヒトに対する抗原性を持つものがあり、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が必須の技術となる。

本研究では、この糸状菌に特異的に存在する糖を付加する糖転移酵素遺伝子を同定し、糖鎖の機能を解明することで、将来、タンパク質の糖鎖改変に必要となる基礎的知見を得ることを目的とした。

## 方法

糖質関連酵素のデータベースであるCAZY (Carbohydrate Active enZYmes) によると糸状菌 *Aspergillus nidulans* には、約90個の糖転移酵素遺伝子が存在する<sup>2, 3)</sup>。この約90個の遺伝子のうち、既知の糖転移酵素遺伝子と相同性が高く機能が推定できるものを除外すると、19個の遺伝子が新規な機能未知糖転移酵素遺伝子であることが見出された (表1)。我々は、この機能未知遺伝子の中に目的の糖転移酵素遺伝子があると考え、19個すべての遺伝子について遺伝子破壊株を取得して、表現型の変化を調べた。

宿主としては、遺伝子のターゲティング効率の高い *A. nidulans nkuB* 破壊株 (AKU89) を用いた<sup>4)</sup>。19個の機能未知糖転移酵素遺伝子上流の1 kbおよび下流の1 kbの断片をPCRによってそれぞれ増幅し、そ

表1 機能未知糖転移酵素遺伝子のリスト

Systematic Name	GT family No.
AN2923	GT25
AN5058	GT25
AN6460	GT25
AN10604	GT25
AN2015	GT31
AN5663	GT31
AN8677	GT31
AN4824	GT31
AN7535	GT31
AN8627	GT31
AN11144	GT31
AN11697	GT31
AN4092	GT69
AN4738	GT69
AN7483	GT69
AN6571	GT71
AN6857	GT71
AN0246	GT90
AN4084	GT90

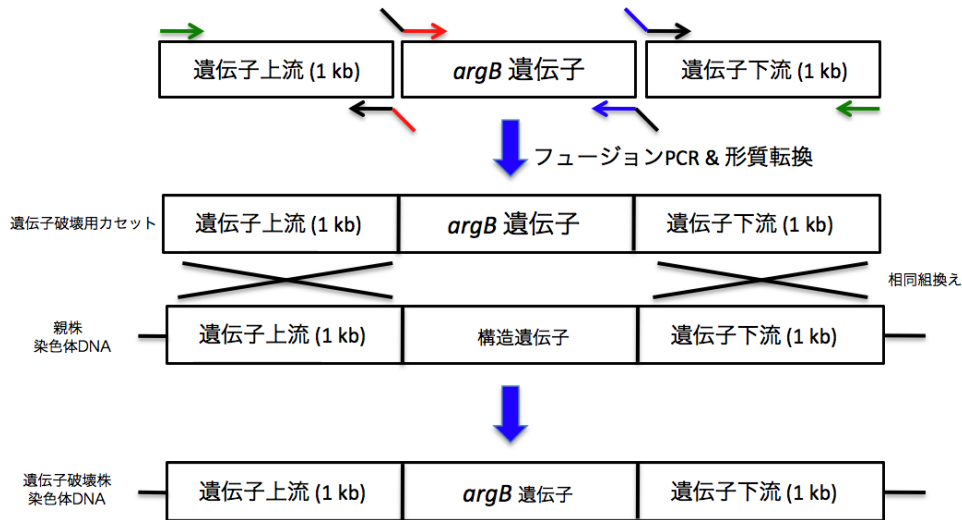


図1 遺伝子破壊のストラテジー

これらの断片が、選択用マーカーである *argB* 遺伝子を挟み込む構造を持つ遺伝子破壊用 DNA カセットをフュージョンPCR法によって作製した (図1)。この遺伝子破壊用DNA カセットを *A. nidulans* にプロトプラスト-PEG法を用いて導入し、得られた形質転換体の中から遺伝子ターゲティングされた株を選抜した。

## 結果

フュージョンPCR法によって作製した遺伝子破壊用カセットを *A. nidulans* にプロトプラスト-PEG法を用いて導入し、形質転換体を多数得た。得られた形質転換体よりゲノムDNAを抽出し、PCRもしくはサザンハイブリダイゼーションによって、標的遺伝子の破壊を確認した。このようにして、19個の候補遺伝子全ての遺伝子破壊株を取得した。取得した遺伝子破壊株をMM培地において生育させたところ、菌糸の成長速度がAN8677遺伝子破壊株 (0.24 mm/hour) において、野生株 (0.35 mm/hour) の66%に減少し、また分生子形成能も、AN8677遺伝子破壊株 ( $6.6 \times 10^7$  個/mm<sup>2</sup>) では、野生株 ( $6.0 \times 10^8$  個/mm<sup>2</sup>) の約10%程度に低下することが明らかになった。そこで、AN8677遺伝子が何らかの糖鎖合成に関わっていると考え、詳細な解析を進めた。その結果、抗β1,5-galactofuranose抗体を用いたウェスタンブロット解析において、AN8677遺伝子破壊株では細胞壁タンパク質中のβ1,5-galactofuranose残基が完全に欠損することが見いだされた (図2)。

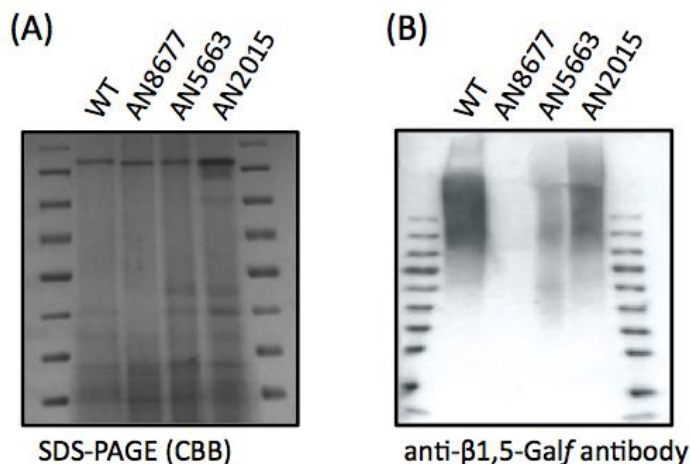


図2 細胞壁タンパク質に対するウェスタンブロット解析

## 結論

取得した遺伝子破壊株のうち、AN8677 遺伝子破壊株では、菌糸成長速度及び分生子形成能の低下が認められた。また、細胞壁タンパク質の  $\beta$ 1,5-galactofuranose 残基が完全に欠損していたことから、AN8677 遺伝子がガラクトマンナンの合成に関わる遺伝子であることが強く示唆された。現在、他の遺伝子破壊株を含め、詳細な解析を進めているところである。

## 文献

- 1) Goto, M. (2007) Protein *O*-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. ***Biosci Biotechnol Biochem.***, 71: 1415-1427.
- 2) Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., Henrissat, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. ***Biochem. J.*** 326: 929-939
- 3) Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. ***J. Mol. Biol.*** 328: 307-317
- 4) Goto, M., Harada, Y., Oka, T., Matsumoto, S., Takegawa, K., Furukawa, K. (2009) Protein *O*-mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. ***Eukaryot Cell.*** 8: 1465-1474.