

# 新規抗真菌剤の標的となる真菌型ガラクトマンナン生合成に関する 基盤研究

岡 拓二  
崇城大学 生物生命学部

## 研究の目的

*Aspergillus fumigatus* は、侵襲性肺アスペルギルス症を引き起こす主要な原因となる真菌である。*A. fumigatus* が産するガラクトマンナン (GM) は、1930 年代には構造が報告されていたことから古くより知られた多糖であると言える。また、侵襲性アスペルギルス症患者の血清中に漏出する GM が早期診断の指標として用いられてきたことから世界的にも広く知られていた多糖でもある。GM は、マンノース (Man) と ガラクトフラノース (GalF) から構成されている多糖であり、*A. fumigatus* の細胞壁の最表層に局在している<sup>1)</sup>。GM には、真菌型ガラクトマンナン (FTGM) と O-Man 型ガラクトマンナン (OMGM) が知られている<sup>2)</sup>。FTGM は、9 から 10 個の  $\alpha$ -(1→2)-テトラマンノシドが  $\alpha$ -(1→6)-結合したマンナン主鎖に、ガラクトフラン側鎖が  $\beta$ -(1→2)-、 $\beta$ -(1→3)-もしくは  $\beta$ -(1→6)-結合した糖鎖である (図 1)。一方で、OMGM は、タンパク質のセリン (Ser) もしくはスレオニン (Thr) 残基に Man が付加した構造を基本とする糖鎖の非還元末端側に GalF が  $\beta$ -(1→5)-結合したオリゴ糖が  $\beta$ -(1→6)-結合した構造である (図 1)。ヒトを含む高等動物や植物は、GM を持たないため、GM 生合成経路の阻害剤が副作用のない医薬や農薬となることが期待されている。しかし、その生合成に関わる糖転移酵素については知られていなかった。私は、2013 年にモデル糸状菌 *A. nidulans* および *A. fumigatus* の OMGM および FTGM の生合成を担う GalF 転移酵素 (GfsA) の同定と性質決定に世界で初めて成功した<sup>3)</sup>。そこで、本研究では、GfsA および、そのパラログである GfsC の詳細な酵素機能解析を進めると共に、マンナン主鎖の生合成に関わることが予測される推定 Man 転移酵素 (CmsA) の機能解析を進めた。糸状菌の FTGM 合成を担う糖転移酵素について全貌を明らかにすることで新規抗真菌剤開発のための基盤とすることを目的とする。

## 方法

大腸菌発現系を用いて GfsA、GfsC および CmsA の組換えタンパク質を発現させた。GfsA、GfsC および CmsA の N 末端のシグナル配列および膜貫通領域を欠失させた遺伝子領域を N 末端に 6x ヒスチジンタグが付加するように大腸菌発現ベクターに挿入した。組換えタンパク質は、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。GM は、*A. fumigatus* の菌糸体より 121°C、120 分の条件下で加圧熱水抽出した。抽出した GM を  $\beta$ -エリミネーション処理することにより FTGM 画分を調

整した。糖結合解析は、メチル化分析によって行った。NMR スペクトルの測定は JNM-LA600 を用いて行った。

## 結果

GfsA または GfsC の Galf 転移酵素活性を、UDP-ガラクトース、UDP-ガラクトース ムターゼ、10 mM 亜ジチオン酸ナトリウム、1 mM  $Mn^{2+}$  および 1 mM  $\beta$ -D-Galf-pNP を混合した反応系を用いて検出した。反応産物は、アミドカラムを備えた HPLC によって分析した。その結果、GfsA および GfsC は、それぞれ単独で  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 5)-ガラクトフラノテトラオース-pNP を合成することができた（データ示さず）。次に、野生株および  $\Delta$ gfsAC 株から GM を調製し、 $^{13}C$ -NMR およびメチル化分析によって構造解析を試みた。興味深いことに、 $\Delta$ AfgfsAC-GM における  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 5)-ガラクトフラノースの存在を示す  $^{13}C$ -NMR シグナルが消失していた。さらに、 $\Delta$ AfgfsAC-GM のメチル化分析の結果からも、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 5)-ガラクトフラノースが消失していることが示された（データ示さず）。これらの結果より、*A. fumigatus* の FTGM および OMGM に存在するすべての  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 5)-ガラクトフラノース残基が、GfsA および GfsC によって生合成されることを明らかにすることができた。

CmsA の Man 転移酵素活性を、GDP-Man、1.5 mM  $Mn^{2+}$  および 1.5 mM  $\alpha$ -D-Man-pNP を混合した反応系を用いて検出した。その結果、CmsA は  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-マンノビオース-pNP を合成することができた。このことは、CmsA が  $\alpha$ -1,2-マンノース転移酵素であることを示している（図 2A）<sup>4)</sup>。次に、野生株、 $\Delta$ cmsA 株および  $\Delta$ cmsA::cmsA 株から抽出した FTGM を酸加水分解処理することにより Galf 糖鎖を除去し、FTGM-HCl 画分を調整した。WT-FTGM-HCl の  $^1H$ -NMR スペクトルを測定したところ、 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-マンナン骨格の H-1 シグナルは 5.0~5.2ppm に現れた。対照的に、 $\Delta$ cmsA-FTGM-HCl の  $^1H$ -NMR スペクトルにおいては  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-マンナン主鎖の存在を示すシグナルは消失していた。このことは、 $\Delta$ cmsA 株においてマンナン主鎖の構造が大きく変化しているか完全に失われていることを示していた（図 2B）。次に、これらの FTGM-HCl をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画し、フェノール-硫酸法により糖の検出を行った。 $\Delta$ cmsA 株では、FTGM-HCl の分子量は低分子側にシフトし、 $\Delta$ cmsA::cmsA 株では野生株と同等にまで高分子側に回復していた（図 2C）。これらの結果は、cmsA 遺伝子の破壊により FTGM-HCl の平均分子量が低下することを示している。すなわち、CmsA が、FTGM マンナン主鎖生合成を担う  $\alpha$ -1,2-マンノース転移酵素であることを明らかにすることができた。

## 結論

*A. fumigatus* の FTGM および OMGM に存在するすべての  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 5)-ガラクトフラノース残基が、GfsA および GfsC によって生合成されることを明らかにすることができた。また、CmsA が、FTGM マンナン主鎖生合成を担う  $\alpha$ -1,2-マンノース転移酵素

であることを明らかにすることができた。また、 $\Delta gfsAC$  株および  $\Delta cmsA$  株では、強い生育阻害を示すことから、GfsA、GfsC および CmsA は、新規な抗真菌の標的として有望であると考えられる。

## 文献

- 1) Oka T. (2018) Biosynthesis of galactomannans found in filamentous fungi belonging to Pezizomycotina. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82, 183-191.
- 2) Katafuchi Y, et. al. (2013) GfsA is a  $\beta 1,5$ -galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology.* 27, 568-581.
- 3) Komachi Y, et. al. (2017) GfsA encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol.* 90, 1054-1073.
- 4) Onoue T, et. al. Identification of two mannosyltransferases contributing to biosynthesis of the fungal-type galactomannan  $\alpha$ -core-mannan structure in *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep.* (submitted)

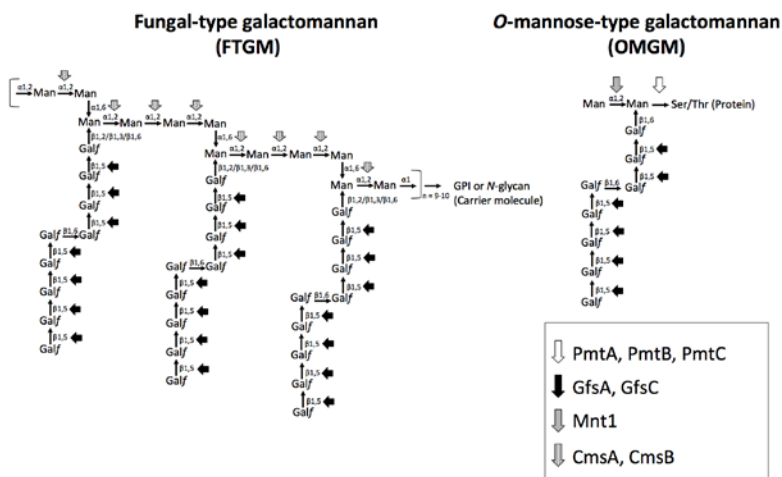


図1. *Aspergillus fumigatus* における真菌型ガラクトマンナン (FTGM) とO-マンノース型ガラクトマンナン (OMGM) の構造と生合成

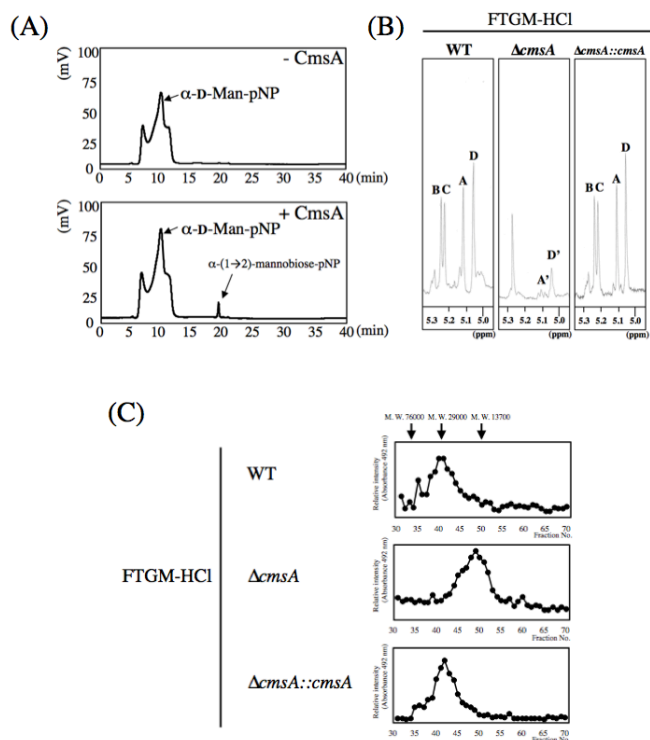


図2 (A) CmsAのマンノース転移酵素活性測定. クロマトグラムは、典型的な結果を示している。CmsAを添加した反応系では、 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-マンノビオース-pNPが合成される。

(B) 野生株 (WT)、 $\Delta cmsA$ 株および $\Delta cmsA:: cmsA$ 株より精製した FTGM-HCl 画分の  $^1$ H-NMR スペクトラム. 全GM (FTGM + OMGM) を抽出し、 $\beta$ -脱離により FTGM を調製し、FTGM を酸加水分解することにより FTGM-HCl を調製した。シグナル A (5.104 ppm)、シグナル B (5.233)、シグナル C

(5.216) およびシグナル D (5.054) は、各 Man 残基の C-1 位の H-1 に由来する。シグナル A' (5.1) およびシグナル D' (5.05) は、t-Man-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Man- の下線を引いた Man 残基の C-1 位の H-1 由来であり、t-Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man- である。

(C) 野生株 (WT)、 $\Delta cmsA$  株および  $\Delta cmsA:: cmsA$  株より精製した FTGM-HCl のゲルろ過分析. FTGM-HCl を調製し、Sephacryl S-200HR (1 $\times$ 75cm) カラムによって分画した。