

# *Cryptococcus neoformans* におけるカプセル生合成機構の解明

門岡 千尋

崇城大学 生物生命学部

## 研究の目的

クリプトコッカス症の主な原因菌である担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* は細胞壁の最表層に厚い莢膜を産生する。この莢膜は宿主の免疫系の回避を通して、本菌の毒性発揮において最も重要な病原性因子であると考えられている。莢膜はグルクロノキシロマンナン (GXM) とグルクロノキシロマンノガラクトタン (GXMGal) と呼ばれる 2 種類の多糖で構成されていることが知られているが、その生合成機構についてはほとんど明らかになっていない (図)。本研究では、*C. neoformans* の莢膜生合成を担う糖転移酵素を同定することを目的とする。カプセル合成に関与する糖転移酵素を同定することができれば、ヒトや動物への副作用のないクリプトコッカス症に対する新たな抗真菌薬の開発が期待できる。

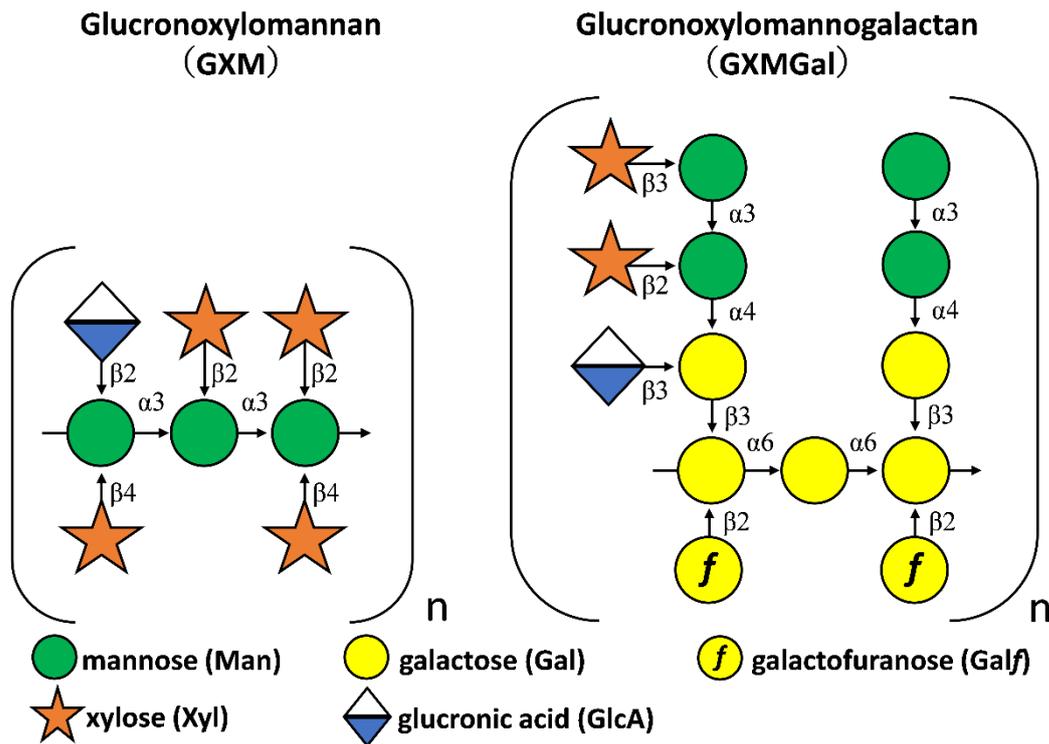


図 莢膜を構成する 2 種類の多糖

## 方法

*C. neoformans* において、ゴルジ体に局在する GDP-マンノース (Man) 輸送体および、UDP-グルクロン酸 (GlcA) 輸送体、UDP-ガラクトース (Gal) 輸送体遺伝子の

破壊株はいずれも莢膜産生能が異常になることが知られている<sup>1,2,3</sup>。そのため、莢膜生合成に関与する糖転移酵素は全てゴルジ体に局在すると仮説を立てた。また、ゴルジ体に局在する糖転移酵素の多くはN末端側に1回膜貫通領域をもつII型膜タンパク質である。そこで、膜貫通領域予測ツール (TMHMM) とディープラーニングによって構築されたアルゴリズムに基づくタンパク質局在予測ツール (Deeploc-1.0) を併用することで *C. neoformans* var. *grubii* H99 株の全 ORF6975 個から、30 種の候補遺伝子を選抜した。これらの候補遺伝子の cDNA を調整し、大腸菌発現系を用いて発現・精製した。可溶性発現に成功したタンパク質について、購入可能であった各種 4-メチルウンベリフェリル (4MU) 化糖および、糖ヌクレオチドの全ての組み合わせで反応させ、HPLC を用いて糖転移活性の測定を行った。また、各候補遺伝子について破壊株を構築し、表現型の解析を行った。

## 結果

大腸菌発現系によって可溶性発現に成功した候補タンパク質について、各種 4MU 化糖と糖ヌクレオチドの組み合わせで活性測定を行った結果、4MU- $\beta$ -Gal と GDP-Man の組み合わせで反応産物を生成する 2 種のタンパク質を発見した。これらのタンパク質は互いに 40% 程度の相同性を示したため、それぞれ Cgm1 (Cryptococcal  $\beta$ -Galactoside Mannosyltransferase 1) と Cgm2 と命名した。Cgm1 の反応産物を HPLC を用いて分取・精製し、<sup>1</sup>H-NMR およびメチル化 GC-MS によってその構造を解析したところ、4MU- $\beta$ -Gal の 4 位に  $\alpha$ -Man の 1 位が結合した構造であることが明らかになった。このことから、Cgm1 は  $\beta$ -Gal  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Man 転移酵素であることが明らかになった。次に *C. neoformans* H99 株において、CRISPR/Cas9 システムを用いて *cgm1* と *cgm2* の遺伝子破壊株を構築し、その表現型を観察したところ、*cgm1* 破壊株は 30°C の培養条件では野生株と生育の差はほとんどみられなかったが、37°C において生育が顕著に遅延することが明らかになった。一方、*cgm2* 破壊株は顕著な表現型を示さなかった。一部の莢膜欠損株は 37°C で温度感受性を示すことが知られているため<sup>3, 4</sup>、Cgm1 は莢膜生合成に関与する可能性が考えられた。また、Cgm1 の酵素活性の結果から、Cgm1 は GXMGal のガラクトマンナン側鎖の生合成に関与することが予測された。GXMGal は GXM とゆるく相互作用して存在しており、GXM 欠損株では GXMGal が培養上清中に拡散するため、GXMGal の精製が容易となる。そこで、GXM の生合成に関与することが考えられている推定  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Man 転移酵素遺伝子である *cap59* の破壊株を親株に *cgm1* 破壊株を構築し、産生する GXMGal の構造を <sup>13</sup>C-NMR およびメチル化 GC-MS により比較した。その結果、*cgm1* 破壊株が産生する GXMGal はガラクトマンナン側鎖が消失もしくは消失していることが明らかになった。以上の結果より、Cgm1 は GXMGal のガラクトマンナン側鎖の生合成に関与する  $\beta$ -Gal  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Man 転移酵素であることが明らかになった。

## 結論

選抜した候補タンパク質の中から新規な  $\beta$ -Gal  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Man 転移酵素として Cgm1 と Cgm2 を見出すことに成功した。また、Cgm1 は *C. neoformans* の GXMGal の生合成に関与することも明らかになった。Cgm1 のホモログはヒトを含めた哺乳類には存在せず、また *cgml* 破壊株はヒトの体温である 37°C で顕著に生育が遅延することから、Cgm1 はクリプトコッカス症に対する新規な抗真菌薬のターゲットとして有効である可能性が考えられる。

## 文献

- 1) Cottrell *et al.* (2007) The pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* expresses two functional GDP-mannose transporters with distinct expression patterns and roles in capsule synthesis. *Eukaryot Cell*. 6:776-785.
- 2) Li *et al.* (2017) *Cryptococcus neoformans* *UGT1* encodes a UDP-Galactose/UDP-GalNAc transporter. *Glycobiology*. 27: 87–98.
- 3) Li *et al.* (2018) UDP-Glucuronic Acid Transport Is Required for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 9:e02319-17
- 4) Wang *et al.* (2014) *Cryptococcus neoformans* Dual GDP-Mannose Transporters and Their Role in Biology and Virulence. *Eukaryot Cell*. 13: 832–842.