糸状菌におけるガラクトフラノース含有糖鎖の生合成

岡 拓二¹; 後藤 正利²¹ 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科

FAX: +81-96-323-1330, E-mail: oka@bio.sojo-u.ac.jp

² 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門未来創成微生物学寄附講座

FAX: +81-92-642-3959, E-mail: mgoto@brs.kyushu-u.ac.jp

(受付日: 2015年4月29日, 受理日: 2015年5月22日)

キーワード: ガラクトフラノース, 細胞壁, 糖転移酵素, 糸状菌

要 約

ガラクトフラノース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。ガラクトフラノース含有糖鎖は医療現場において肺アスペルギルス症の指標として広く使われており、糸状菌の細胞壁形成における重要性が認識されてきたにも関わらず、その生合成に関わるガラクトフラノース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 *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース含有糖鎖生合成を担うガラクトフラノース転移酵素の同定と性質決定に初めて成功した。本酵素は、GT31 ファミリーに属する糖転移酵素であり、ゴルジ体においてUDP-ガラクトフラノースを糖供与体としてO-グリカンの非還元末端にガラクトフラノースを転移する活性を有していた。本総説では本酵素の同定までの過程、酵素学的性質、細胞内における機能および糸状菌のガラクトフラノース含有糖鎖合成について紹介する。

A. はじめに

六員環であるガラクトピラノース (Gal_p) は細菌類からヒトに至るまで、ほとんどすべての生物に利用されている。しかし、生物の中には五員環であるガラクトフラノース (Gal_f) を生体内の糖鎖に組み込んで利用しているものがある。Gal_fは、結核菌をはじめとする真正細菌類、トリパノソーマなどの一部の原生生物、線虫類、担子菌類、一部の子囊菌類にのみ認められるマイナーな単糖である(1)。また、ヒトを含む高等動物や植物は、Gal_f糖鎖を持たないことからGal_f糖鎖の生合成経路を阻害することが副作用のない抗菌薬や抗真菌薬および農薬の開発に繋がるとして期待されている。Gal_f糖鎖は、1930年代にはすでに子囊菌類である *Penicillium charlesii* が産生する多糖であるガラクトカロロス中に少なくとも9–10個のβ1,5-結合したGal_f構造として存在が認められていた(2)。その後、1960年代には真正細菌である *Mycoplasma* 属の細胞壁(3)、1980年代には *Trypanosoma* 属および *Leishmania* 属の糖脂質にGal_fが含まれていることがそれぞれ報告されている(4, 5)。1992年には担子菌類である *Cryptococcus neoformans* においても培養上清中に含まれるガラクトキシロマンナンにGal_fが含まれることが明らかにされた(6)。線虫類では、2009年にGal_fが後胚期発生に必要であることおよびGal_fが適切な体表構造の維持を通じて寒天培地上におけるスムーズな移動に必要であることが報告されている(7)。本稿では、我々が最近発見した *Aspergillus* 属糸状菌のGal_f転移酵素に関する知見を中心に、Gal_f含有糖鎖の生合成について紹介したい。

B. アスペルギルス属におけるガラクトフラノース糖鎖

Aspergillus 属においては、1968年にSakaguchiらにより *A. fumigatus* の産生する抗原性を有する多糖であるガラクトマンナン (GM) のマンノースコア構造にGal_f側鎖が結合していることが報告されている(8)。1980年代後半から1990年代にかけて多くのアスペルギルスの細胞壁抗原を認識するモノクローナル抗体が作製された(9–13)。それらのうち、EB-A2と呼ばれるモノクローナル抗体は末端のGal_f残基を認識する抗体として知られ、侵襲性アスペルギルス症の早期診断に用いられている(13)。

Aspergillus 属糸状菌のGal_fは、真菌タイプのGMおよびN-グリカンやO-グリカンに含まれていることが知られている(1, 14)。これらの糖鎖は、細胞壁の構成成分として細胞壁中に組み込まれているものと培養液中に分泌されるものがある。真菌タイプのGMは、一般的によく知られている植物細胞壁由来のGMとは全く異なる物質である(15)。真菌タイプのGMは、9から10組のα1,2-マンノテトラオースユニットが互いにα1,6-結合したマンナンコア構造にβ1,5-テトラガラクトフラノシドがβ1,3-もしくはβ1,6-結合した多糖である(16)。N-グリカンに付加しているGal_fにはいくつかの報告がある。*Aspergillus niger* 由来α-ガラクトシダーゼやα-グルコシダーゼに結合しているN-グリカンの非還元末端に、α1,2-結合で1つのGal_f残基が付加されていることが報告されている(17–19)。また、*Aspergillus fumigatus* より精製されたホスフォリパーゼCおよびフィターゼに結合しているN-グリカンの非還元末端においても同様に1,2-結合で1つのGal_f残基が付加されているがα/β-結合様式は不明である(20)。近年、*A. fumigatus* に

O-mannose type glycan

Fungal type galactomannan

N-glycan

図1. アスペルギルス属のガラクトフラノース含有O-結合型糖鎖、N-結合型糖鎖およびガラクトマンナンの構造。O-結合型糖鎖の構造はLeitaoらにより報告されている(26)。O-結合型糖鎖は種に依って多様な構造をもつ。N-結合型糖鎖の構造はTakayanagiら(17, 19)およびSchmalhorstら(39)によって報告されている。また、ガラクトマンナンの構造についてはLatgéら(16)によって報告されている。GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; Man, マンノース; GalF, ガラクトフラノース; Ser, セリン; Thr, スレオニン; Asn, アスパラギン酸。

おけるO-グリカンやN-グリカンの非還元末端側に β 1,6-GalF結合を含むGMが付加しているという報告がなされている(21)。

糸状菌のO-グリカンは、O-マンノース型グリカンと呼ばれ、セリン・スレオニン残基にマンノースが付加した構造である。O-マンノースグリカンの生合成は、小胞体に局在するプロテインO-マンノース転移酵素(Pmt)によって、ドリコール-リン酸-マンノースを糖供与体基質としてタンパク質上のセリンもしくはトレオニン残基にマンノースが転移されることによって始まる(22)。糸状菌においてpmtの破壊は、単に糖タンパク質のO-マンノース鎖の減少のみではなく、正常な細胞壁や分生子の形成といった表現型に影響を与えることが知られている(22-26)。その糸状菌のO-マンノース型グリカンの非還元末端側には β 1,6-結合で β 1,5-GalFオリゴ糖が付加されている(27)。タンパク質のO-マンノース型グリカン修飾は、細菌類から真核生物においては酵母からヒトまで広く分布していることが知られているが、GalFによる修飾は一部の糸状菌にのみ認められるものである。また、*A. fumigatus*においては酸性スフィンゴ糖脂質にも β 1,6-および β 1,2-GalFが修飾されていることが知られている(28)。

C. UDP-ガラクトフラノースの生合成と機能

UDP-GalFは、GalF糖鎖生合成の糖供与体として機能する重要な生体物質である。まず、1970年にTrejoらによりUDP-GalFがGalF糖鎖合成の中間物として機能することが明ら

かにされ(29)、1971年にはNikaidoらおよびTrejoらにより、UDP-ガラクトピラノースからUDP-ガラクトフラノースが生合成されていること、すなわちUDP-ガラクトピラノースムターゼの存在が明らかにされた(30,31)。続いて、1996年に大腸菌K-12株のO抗原生合成遺伝子クラスターであるrfb遺伝子クラスター上のorf6がUDP-ガラクトピラノースムターゼをコードしていることが示された(32)。

アスペルギルス属糸状菌のGalF糖鎖の生合成研究は、糖転移酵素の糖供与体としての役割を果たす糖ヌクレオチドの生合成酵素の同定から始まり、上記の細菌における先行研究を基に進められた(33)。モデル糸状菌*A. nidulans*におけるグルコースおよびガラクトースからのUDP-GalFへの合成経路を図2にまとめる。*A. nidulans*は、培地中にグルコースが存在するかもしれないがガラクトースが存在するかに応じて2つのUDP-GalFの合成経路を持つ。グルコースはグルコース-6-リン酸およびグルコース-1-リン酸を介してUDP-Glc_{6p}へと変換される。UDP-Glc_{6p}は、糸状菌の主要な細胞壁成分である α -グルカンおよび β -グルカンの合成に関係する α -グルカン合成酵素や β -グルカン合成酵素の糖供与体であるためアスペルギルス属の生育に必須の物質である(34-36)。UDP-Glc_{6p}の一部はUDP-グルコース4-エピメラーゼ(Uge)によって、UDP-ガラクトピラノース(Gal_{6p})に変換される。*A. nidulans*におけるugeA遺伝子は同定され、UgeAは細胞質ゾルにおいて機能することが知られている(37)。合成されたUDP-Gal_{6p}はUDP-GalFムターゼ(Ugm/Glf)によって、細胞質ゾルにお

図2. *Aspergillus nidulans*におけるグルコースおよびガラクトースからのUDP-Gal₁生合成経路。 *Aspergillus nidulans*は培地中にグルコースが存在するかガラクトースが存在するかによって2つのUDP-Gal₁生合成経路をもっている。UDP-Gal₁は、UgeA (AN4727) およびUgmA (AN3112) によってUDP-グルコピラノース (Glc_p) よりUDP-ガラクトピラノース (Gal_p) を経て合成される。グルコースを単一炭素源とするとき、UDP-Glc_pはGlkA (AN8689)、PgmB (AN2867) およびGalF (AN9148) によってグルコースよりグルコース-6-リン酸およびグルコース-1-リン酸を経て合成される。ガラクトースを単一炭素源とするとき、UDP-Gal₁は、GalE (AN4957)、GalD (AN6182) およびUgmA (AN3112) によってガラクトース-1-リン酸およびUDP-Gal_pを経て合成される。UDP-Gal_pは細胞壁の主要な構成糖鎖であるα1,3-グルカンやβ1,3-グルカンの合成のために使われる。UDP-Gal₁は、Gal₁糖鎖の合成に使われる。

いてUDP-Gal₁へと変換され(38, 39)、ゴルジ体内腔へと輸送される。一方、ガラクトースによって生育させた場合、ガラクトース-1-リン酸およびUDP-Gal_pを介してUDP-Gal₁が合成される。UgmによるUDP-Gal_pからUDP-Gal₁を合成する反応は可逆的であり、*in vitro*における実験によると平衡がUDP-Gal_pの合成に傾いていることからUDP-Gal₁産生の律速段階であると考えられる(38, 40)。また、GlfA (UgmA) タンパク質については、立体構造が明らかにされており、フラビン補因子の酸化還元により酵素活性部位の構造変化が起こり、活性が制御されていることが見出されている(41, 42)。

Gal₁糖鎖は上記のように多様である。しかし、すべてのGal₁糖鎖はUDP-Gal₁を糖供与体として合成される。それゆえに、*ugeA* 遺伝子や特に *ugmA/glfA* 遺伝子を破壊することでGal₁糖鎖全体の機能や役割が理解できる。いくつかの報告によってUDP-Gal₁の生合成に関わる遺伝子の破壊が糸状菌の表現型に影響するということが明らかにされている。*ugeA* 遺伝子破壊株は、グルコースを単一炭素源とする培地上で生育が遅れ、菌糸が高頻度に分岐しており、分生子形成能が低下することが報告されている。これは、*ugeA* 遺伝子破壊株では、グルコースで培養した際にUDP-Gal₁の生合成が止まっ

てしまうからである(37, 43, 44)。*Aspergillus niger*における *glfA* (*ugmA*) 遺伝子破壊株では、細胞壁中のキチン合成阻害剤であるカルコフルオロホワイトに高感受性を示した。このことから、Gal₁糖鎖の合成が細胞壁インテグリティ経路を通してGal₁糖鎖以外の細胞壁成分の生合成と関わっていることが示唆されている(45)。*A. fumigatus*の *glfA* 遺伝子破壊株では、生育が遅れ、細胞壁が薄くなること、および菌体抽出物のGal₁抗体による反応性が消失しており、*N*-グリカン末端のGal₁残基が欠失していることが報告されている(46)。また、*glfA* 遺伝子破壊株では野生株に比べてアンフォテリシンB、ボリコナゾール、カスポファンギン、ニコマイシンZに対する感受性が高くなっており、免疫抑制マウスへの感染実験により病原性の低下が認められている(46)。さらに、*glfA* 遺伝子破壊株では、ガラスやプラスチック樹脂および呼吸器上皮細胞への吸着能が増幅されていることが報告されている(47)。これは、糸状菌細胞壁表面のガラクトフラノースによる覆いがなくなることによりマンナン層が露出した状態になっていることに依るものである(47)。これらのことからGal₁糖鎖の糸状菌での独特な役割の存在が示唆されている。

D. UDP-ガラクトフラノース輸送体の発見

細菌類におけるGal₁糖鎖生合成の場合は、細胞質膜であり、細胞内で生合成されたUDP-Gal₁は細胞質膜上に局在する糖転移酵素によって使われる(48)。一方、真核細胞におけるGal₁糖鎖生合成の場合は、ゴルジ体である。*A. fumigatus*のゴルジ体に局在するUDP-Gal₁輸送体(GlfB)は、細胞質ゾルに存在するUDP-Gal₁をゴルジ体内腔へと輸送し、同時にゴルジ体内腔に輸送されたUDP-Gal₁が糖鎖合成に利用されることが明らかにされた(49, 50)。この遺伝子の同定のためにEngelらは、BLAST検索を利用することにより *A. fumigatus*のゲノム上に16個のUDP-Gal₁輸送体候補遺伝子を見出した(49)。その中で *glfB*は、シロイヌナズナのUDP-Gal_p輸送体であるAtUDP-GalT1と21%のアミノ酸レベルでの相同性を有し、染色体上で *ugmA/glfA*の隣に存在する遺伝子であった(49)。*A. fumigatus*においては、機能的に関係のある遺伝子がクラスターを形成している例がしばしば見られることから、*glfB* 遺伝子を可能性の高い候補遺伝子として解析を進めた。*glfB* 破壊株は *ugmA/glfA* 破壊株と同様の表現型を示した。*glfB* 破壊株では、菌体抽出物のGal₁抗体による反応性が消失し、*N*-グリカン末端のGal₁残基が欠失していた。また、*in vitro* アッセイによりGlfBとUDP-Gal₁が結合することおよびGlfBがその他の糖ヌクレオチドを輸送している可能性が除外されたことから、GlfBがUDP-Gal₁輸送体であることが明らかにされた。GlfBの局在がゴルジ体であったことから、糸状菌におけるGal₁糖鎖生合成の場合はゴルジ体であることが明らかになった(49)。

E. 細菌類および原生生物におけるガラクトフラノース転移酵素

細菌類および真核生物においてUDP-Gal₇がGal₇糖鎖の生合成に必要な不可欠であり、Gal₇転移酵素の糖供与体として機能することが明らかにされた(29, 30)。その後、研究者の興味はGal₇転移酵素に注がれるようになった。まず1993年に、原生生物である*Leishmania denovani*のリポホスホグリカン欠失変異体R2D2を相補する遺伝子としてLPG1が同定された(51)。LPG1は、R2D2の膜画分にGal₇転移酵素活性が検出されないこと、およびマンノース結合タンパク質モチーフを有するII型膜タンパク質であることからGal₇転移酵素であると推定されている。細菌類においては、結核菌*Mycobacterium tuberculosis*のRv3782およびRv3808cがGal₇転移酵素遺伝子であり、その産物であるGltT1およびGltT2は、ミコリルアラビノガラクトタン複合体(mAG complex)に含まれるβ1,5-Gal₇およびβ1,6-Gal₇の繰り返し構造からなるガラクトタンを合成していることが報告された(52)。GltTは、decaprenyldiphosphoryl-N-acetylglucosaminyl-rhamnose (C₅₀-P-P-GlcNAc-Rha)を基質としてβ1,5-Gal₇残基およびβ1,6-Gal₇残基を転移する酵素であり(48)、GltT2は、その後のβ1,5-Gal₇およびβ1,6-Gal₇の繰り返し構造を合成する酵素であった(48)。また、立体構造解析によりGltT2は四量体であることが明らかにされている(53)。

1996年にNassauらにより大腸菌K-12株のO抗原生合成に必要なβ1,6-Gal₇転移酵素をrfb遺伝子クラスター上のorf8(WbbI)がコードしているという仮説が発表され(54)、2006年にはWingらによって、WbbIがα-グルコース残基にβ1,6-結合でGal₇を転移する酵素であることが生化学的に実証された(55)。

F. 糸状菌のガラクトフラノース転移酵素の同定

細菌類および原生生物においていくつかのGal₇転移酵素遺伝子が同定されたことから、ゲノム情報を利用して菌類のGal₇転移酵素遺伝子の探索が始まった。しかし、LPG1, Gal₇T1, Gal₇T2およびWbbIに相同性を有するタンパク質配列はGal₇糖鎖を有する菌類のゲノム上には見出されなかった。筆者らは、新規な遺伝子を発見するために逆遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせた手法により、Gal₇転移酵素遺伝子の同定を試みた。

糖鎖糖質関連酵素のデータベースであるCAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database, <http://www.cazy.org>)によれば、糸状菌*A. nidulans* FGSC4ゲノム上には92の推定糖転移酵素遺伝子が存在する(56)。一方で、基礎研究の進んでいる出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*には59個、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*には62個の推定糖転移酵素遺伝子が存在する。出芽酵母および分裂酵母は、Gal₇糖鎖を持たないことからGal₇転移酵素遺伝子も持たないと考えられる。そこで

Gal₇転移酵素遺伝子を同定するために次のような方法で候補遺伝子を選抜した。はじめに、配糖体の生合成に関わると考えられるGTファミリー1に属する糖転移酵素遺伝子は除外した。次に、出芽酵母を含む他の生物種において同定されている遺伝子のオルソログを除外した。最後に、細胞壁中にGal₇抗原を有する糸状菌に共通の遺伝子を選抜した。そのようにして11種の遺伝子を推定Gal₇転移酵素遺伝子として選抜した。すべての遺伝子について遺伝子破壊株を構築し、遺伝子破壊株ライブラリーより遺伝子のスクリーニングを行ったところ、AN8677遺伝子がGal₇転移酵素をコードしていることが同定された。野生株より抽出したガラクトマンノプロテイン(GMPs)は、モノクローナル抗体であるEB-2Aと反応性を示す。EB-A2は、β1,5-テトラガラクトフラノシドを強く認識する抗体として選抜されたものであるが、N-グリカンに付加するGal₇残基も認識することが知られている(13)。AN8677破壊株より抽出したGMPsのシグナル強度はugmA破壊株と同様に減少していた。このことより、AN8677をgalactofuranose antigen synthase A (gfsA)と名づけた(57)。

gfsAは532アミノ酸からなり、推定分子量60.9kDaのタンパク質をコードしていた。GfsAは推定シグナル配列(アミノ酸番号: 1-17アミノ酸)と推定膜貫通領域(アミノ酸番号: 18-40)をN-末端に有することからII型膜貫通タンパク質であることが推察された。GfsAは他の生物間においても保存されている金属結合DXDシグナルモチーフ(アミノ酸番号: 256-258)および2つの推定N-グリカン付加部位(アミノ酸番号: 93-95および414-416)を有していた。GfsAは、CAZyの分類ではGTファミリー31に属する糖転移酵素であった。CAZy中のGTファミリー31では、既報の糖転移酵素としては、Fringeとして知られるフコース特異的β1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素など(58)、少なくとも9種の反応を担う酵素が登録されているが、Gal₇転移酵素は登録されていない。また、細菌由来のβ1,5-およびβ1,6-Gal₇転移酵素であるGltT2はGTファミリー2に属しており、リューシマニア由来のβ1,3-Gal₇転移酵素であるLPG1はGTファミリー40に属している。GfsAの一次構造は、既知のGal₇転移酵素との類似性は認められず異なっていた。

G. GfsAの酵素機能と局在

GfsAの機能解析を進めるために、*A. nidulans*菌体内においてGfsA-3xFLAG融合タンパク質を発現させた。GfsA-3xFLAG融合タンパク質を発現させた菌株は、GfsA-3xFLAGはN-グリカンが付加した68kDaの糖タンパク質を産生した。精製したGfsA-3xFLAG、糖供与体としてUDP-Gal₇、受容基質としてWscA-HAタンパク質もしくはGMPsを用いて受容基質Gal₇転移活性の検出を試みた。gfsA破壊株より得た受容基質を用いた時に、Mn²⁺依存的なGal₇転移活性が観察された。一方で、GfsAはUDP-Gal₇存在下でugmA破壊株より得

た受容基質に対して活性を示さなかった。糸状菌のO-グリカンの構造を基に考察すれば(26)、糸状菌のO-グリカンの生合成には少なくとも2種類のGal₇転移酵素が関与していることが考えられる。1つは α 1,6-マンノビオースの非還元末端マンノース残基を糖受容体として β 1,6-結合でGal₇を転移する酵素であり、もう1つは、非還元末端のGal₇残基を糖受容体として β 1,5-結合でGal₇を転移する酵素である。後者の反応にはGal₇残基が必須である。GfsAがGal₇糖鎖完全欠損株より抽出したGMPを受容基質として認識しなかったということはGfsAが非還元末端のGal₇残基に β 1,5-結合でGal₇を転移する酵素であることを示唆しており、GfsAは、 β 1,5-Gal₇転移酵素である可能性が高いと考えられる。しかし、詳細な受容基質の構造やGfsAの結合様式の決定には、さらなる解析が必要である。一方、ショ糖密度勾配遠心分離法によるオルガネラ分離によってGfsAの細胞内局在を決定したところ、ゴルジ体に局在することが明らかになった。この局在性は、UDP-Gal₇輸送体の局在と似ていた(49, 50)。また、受容基質と推定されるO-マンノースグリカンの伸長反応が、出芽酵母においてゴルジ体で起こることと一致していた(59)。

H. gfsA破壊による表現型

*A. nidulans*においてgfsA遺伝子を破壊することにより、さまざまな表現型の異常が生じた。gfsA遺伝子破壊株では、菌糸の伸長速度が野生株の約30%減少し、形成される分生子数が89%減少した。また、gfsA破壊株の菌糸は高頻度に湾曲しており、糸状菌細胞中に存在する隔壁間の平均距離が狭まっていた。gfsA破壊株は、野生株に比べて、細胞壁合成阻害剤に対する感受性が変化していた。したがって、O-グリカン部分の β 1,5-Gal₇糖鎖が*A. nidulans*の細胞形態や分生子形成の過程で何らかの重要な役割を担っていることが推察された。また、ヒトの日和見感染症である肺アスペルギルス症の原因菌*A. fumigatus*の*A. nidulans* gfsA (*AngfsA*) の推定オルソログであるAFUB_096220を*AfgfsA*と名づけ、遺伝子破壊株を取得するとともに、野生株との表現型の差異を解析した。その結果、*AfgfsA*破壊株では、培養温度47度という高温条件下において30–37度培養条件下における*AngfsA*破壊株と同様に白く小さいコロニー形態を示した。また、*AfgfsA*破壊株では*AngfsA*破壊株と同様にGMP中のGal₇糖鎖が減少していた。*A. fumigatus*における*AfgfsA*の破壊による菌体成長における影響は限定的であった。このことは、*A. fumigatus*におけるglfA破壊による影響が*A. nidulans*のugmA破壊による影響よりも限定的であることと一致した(38, 46, 57)。このことは、*A. nidulans*においてGal₇糖鎖の細胞壁形成における寄与度が*A. fumigatus*よりも高いことを示している。

I. ガラクトフラノース糖鎖生合成遺伝子の分布

gfsAのオルソログは、子囊菌門のうちチャワントケ

門に属する真菌に分布する。チャワントケ亜門は、いもち病原菌である*Magnaporthe oryzae*や白鮮菌である*Trichophyton rubrum*など多くの植物病原菌や人畜病原菌を含み、子囊菌門のうちもっとも大きな分類群である。また、ugmA/glfAおよびugtA/glfBのオルソログもgfsAと同様にチャワントケ亜門に属する真菌類が保持していた。これは、ugmA/glfA, ugtA/glfBおよびgfsAが一連のGal₇糖鎖合成経路上にあることを考えれば理にかなっていた。一方で、同じ子囊菌門のうち*Saccharomyces cerevisiae*や*Candida albicans*が属するサッカロミセス亜門や*Schizosaccharomyces pombe*が属するタフリナ菌亜門に属する菌はgfsAを持たない。また、接合菌門に属する*Rhizopus oryzae*もgfsAを持たない。このことは、これらの菌類がGal₇糖鎖を持たないことと一致した。これらの菌類は、一連のGal₇糖鎖合成経路であるugmA/glfA, ugtA/glfBも持たない。

一方で、担子菌門に属する*Cryptococcus neoformans*や*Ustilago maydis*ではgfsAは存在せず、ugmA/glfAおよびugtA/glfBのみが存在していた。*C. neoformans*の形成するカプセルの多糖には、 β 1,2-Gal₇糖鎖が含まれており、また、*C. neoformans*のO-グリカンにGal₇糖鎖が存在することは知られていない。すなわちこのことは、*C. neoformans*は、Gal₇糖鎖を持っているがGfsAが転移するO-グリカンの β 1,2-Gal₇糖鎖は持っていないという事実と一致した。担子菌類の持つGal₇糖鎖生合成には全く別の糖転移酵素が関わっていると考えられる。

H. おわりに

子囊菌門のチャワントケ亜門に属する菌類や担子菌門に属する菌類は、多様な構造のGal₇糖鎖を有している。それゆえ、これら菌類の多様なGal₇糖鎖の生合成に関わる多様な

図3. *Aspergillus nidulans*および*Aspergillus fumigatus*のGfsタンパク質の進化系統樹。*A. nidulans*および*A. fumigatus*は7つのgfsAホモログを有している。それらのタンパク質をGfsBからGfsHと名付けた。Gfsタンパク質は進化系統的にGT31-AとGT31-Bのグループに大別された。これらのホモログは、GfsAとは基質認識や結合様式が異なるGal₇転移酵素であることが予想される。

Gal₇転移酵素は、いまだ宝物として眠っている。ゲノム情報によると *A. nidulans* および *A. fumigatus* には *gfsA* の推定ホモログが7つ存在するが、機能は明らかにされていない。それぞれのタンパク質に、それぞれ GfsB から GfsH まで名前を付けた。これらのホモログは、GfsA とは異なる基質認識や結合様式を持つ Gal₇ 転移酵素であることが予想される。進化系

統樹によると Gfs タンパク質は2つのグループに大別できることが明らかになった (図3)。Gal₇ 糖鎖は多くの植物および人畜病原菌にも含まれている。Gal₇ 転移酵素群の解析により、病原菌の病原性や感染メカニズムにおける Gal₇ 糖鎖の役割が明らかにされることも期待したい。

参考文献

1. Tefsen, B., Ram, A. F., van Die, I., and Routier, F. H. (2012) *Glycobiology* **22**, 456–469.
2. Haworth, W. N., Raistrick, H., and Stacey, M. (1937) *Biochem. J.* **31**, 640–644.
3. Plackett, P., and Buttery, S. H. (1964) *Biochem. J.* **90**, 201–205.
4. de Lederkremer, R. M., Casal, O. L., Alves, M. J., and Colli, W. (1980) *FEBS Lett.* **116**, 25–29.
5. Turco, S. J., Orlandi, P. A. Jr., Homans, S. W., Ferguson, M. A., Dwek, R. A., and Rademacher, T. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6711–6715.
6. James, P. G., and Cherniak, R. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 1084–1088.
7. Novelli, J. F., Chaudhary, K., Canovas, J., Benner, J. S., Madinger, C. L., Kelly, P., Hodgkin, J., and Carlow, C. K. (2009) *Dev. Biol.* **335**, 340–355.
8. Sakaguchi, O., Suzuki, M., and Yokota, K. (1968) *J. Microbiol.* **12**, 123–124.
9. Bennett, J. E., Bhattacharjee, A. K., and Glaudemans, C. P. (1985) *Mol. Immunol.* **22**, 251–254.
10. de Repentigny, L., Boushira, M., Ste-Marie, L., and Bosisio, G. (1987) *J. Clin. Microbiol.* **25**, 863–867.
11. Ste-Marie, L., Sénéchal, S., Boushira, M., Garzon, S., Strykowski, H., Pedneault, L., and de Repentigny, L. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 2105–2114.
12. Haynes, K. A., Latge, J. P., and Rogers, T. R. (1990) *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2040–2044.
13. Stynen, D., Sarfati, J., Goris, A., Prévost, M. C., Lesourd, M., Kamphuis, H., Darras, V., and Latgé, J. P. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 2237–2245.
14. Goto, M. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1415–1427.
15. Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., Naikwadi, N. N., and Variya, B. C. (2013) *Int. J. Biol. Macromol.* **60**, 83–92.
16. Latgé, J. P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszkeski, J. M., Parra, E., Bouchara, J. P., and Fournet, B. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 5424–5433.
17. Takayanagi, T., Kimura, A., Chiba, S., and Ajisaka, K. (1994) *Carbohydr. Res.* **256**, 149–158.
18. Wallis, G. L., Easton, R. L., Jolly, K., Hemming, F. W., and Peberdy, J. F. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 4134–4143.
19. Takayanagi, T., Kushida, K., Itonuma, K., and Ajisaka, K. (1992) *Glycoconj. J.* **9**, 229–234.
20. Morelle, W., Bernard, M., Debeaupuis, J. P., Buitrago, M., Tabouret, M., and Latgé, J. P. (2005) *Eukaryot. Cell* **4**, 1308–1316.
21. Kudoh, A., Okawa, Y., and Shibata, N. (2015) *Glycobiology* **25**, 74–87.
22. Oka, T., Hamaguchi, T., Sameshima, Y., Goto, M., and Furukawa, K. (2004) *Microbiology* **150**, 1973–1982.
23. Shaw, B. D., and Momany, M. (2002) *Fungal Genet. Biol.* **37**, 263–270.
24. Oka, T., Sameshima, Y., Koga, T., Kim, H., Goto, M., and Furukawa, K. (2005) *Microbiology* **151**, 3657–3667.
25. Goto, M., Harada, Y., Oka, T., Matsumoto, S., Takegawa, K., and Furukawa, K. (2009) *Eukaryot. Cell* **8**, 1465–1474.
26. Kriangkripipat, T., and Momany, M. (2009) *Eukaryot. Cell* **8**, 1475–1485.
27. Leita, E. A., Tittencourt, V. C., Haido, R. M., Valente, A. P., Peter-Katalinic, J., Letzel, M., de Souza, L. M., and Barreto-Bergter, E. (2003) *Glycobiology* **13**, 681–692.
28. Guimarães, L. L., Toledo, M. S., Ferreira, F. A., Straus, A. H., and Takahashi, H. K. (2014) *Front. Cell Infect. Microbiol.* **4**, 138.
29. Trejo, A. G., Chittenden, G. J., Buchanan, J. G., and Baddiley, J. (1970) *Biochem. J.* **117**, 637–639.
30. Nikaïdo, H., and Sarvas, M. (1971) *J. Bacteriol.* **105**, 1073–1082.
31. Trejo, A. G., Haddock, J. W., Chittenden, G. J., and Baddiley, J. (1971) *Biochem. J.* **122**, 49–57.
32. Nassau, P. M., Martin, S. L., Brown, R. E., Weston, A., Monsey, D., McNeil, M. R., and Duncan, K. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1047–1052.
33. Bakker, H., Kleczka, B., Gerardy-Schahn, R., and Routier, F. H. (2005) *Biol. Chem.* **386**, 657–661.
34. Kelly, R., Register, E., Hsu, M. J., Kurtz, M., and Nielsen, J. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 4381–4391.
35. Beauvais, A., Maubon, D., Park, S., Morelle, W., Tanguy, M., Huerre, M., Perlin, D. S., and Latgé, J. P. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1531–1538.
36. Yoshimi, A., Sano, M., Inaba, A., Kokubun, Y., Fujioka, T., Mizutani, O., Hagiwara, D., Fujikawa, T., Nishimura, M., Yano, S., Kasahara, S., Shimizu, K., Yamaguchi, M., Kawakami, K., and Abe, K. (2013) *PLoS ONE* **8**, e54893.
37. El-Ganiny, A. M., Sheoran, I., Sanders, D. A., and Kaminskyj, S. G. (2010) *Fungal Genet. Biol.* **47**, 629–635.
38. El-Ganiny, A. M., Sanders, D. A., and Kaminskyj, S. G. (2008) *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1533–1542.
39. Schmalhorst, P. S., Krappmann, S., Vervecken, W., Rohde, M., Müller, M., Braus, G. H., Contreras, R., Braun, A., Bakker, H., and Routier, F. H. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 1268–1277.
40. Oppenheimer, M., Poulin, M. B., Lowary, T. L., Helm, R. F., and Sobrado, P. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.* **502**, 31–38.
41. Dhatwalia, R., Singh, H., Oppenheimer, M., Karr, D. B., Nix, J. C., Sobrado, P., and Tanner, J. J. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 9041–9051.
42. van Straaten, K. E., Routier, F. H., and Sanders, D. A. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 10780–10790.
43. Lee, M. J., Gravelat, F. N., Cerone, R. P., Baptista, S. D., Campoli, P. V., Choe, S. I., Kravtsov, I., Vinogradov, E., Creuzenet, C., Liu, H., Berghuis, A. M., Latgé, J. P., Filler, S. G., Fontaine, T., and Sheppard, D. C. (2014) *J. Biol. Chem.* **289**, 1243–1256.

44. Park, J., Tefsen, B., Arentshorst, M., Lagendijk, E., van den Hondel, C. A., van Die, I., and Ram, A. F. (2014) *Fungal Biol. Biotechnol.* **1**, 6.
45. Damveld, R. A., Franken, A., Arentshorst, M., Punt, P. J., Klis, F. M., van den Hondel, C. A., and Ram, A. F. (2008) *Genetics* **178**, 873–881.
46. Schmalhorst, P. S., Krappmann, S., Verwecken, W., Rohde, M., Müller, M., Braus, G. H., Contreras, R., Braun, A., Bakker, H., and Routier, F. H. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 1268–1277.
47. Lamarre, C., Beau, R., Balloy, V., Fontaine, T., Wong Sak Hoi, J., Guadagnini, S., Berkova, N., Chignard, M., Beauvais, A., and Latgé, J. P. (2009) *Cell. Microbiol.* **11**, 1612–1623.
48. May, J. F., Splain, R. A., Brotschi, C., and Kiessling, L. L. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 11851–11856.
49. Engel, J., Schmalhorst, P. S., and Routier, F. H. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 44418–44424.
50. Afroz, S., El-Ganiny, A. M., Sanders, D. A., and Kaminskyj, S. G. (2011) *Fungal Genet. Biol.* **48**, 896–903.
51. Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8609–8613.
52. Belánová, M., Dianisková, P., Brennan, P. J., Completo, G. C., Rose, N. L., Lowary, T. L., and Mikusová, K. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 1141–1145.
53. Wheatley, R. W., Zheng, R. B., Richards, M. R., Lowary, T. L., and Ng, K. K. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 28132–28143.
54. Nassau, P. M., Martin, S. L., Brown, R. E., Weston, A., Monsey, D., McNeil, M. R., and Duncan, K. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1047–1052.
55. Wing, C., Errey, J. C., Mukhopadhyay, B., Blanchard, J. S., and Field, R. A. (2006) *Org. Biomol. Chem.* **4**, 3945–3950.
56. Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997) *Biochem. J.* **326**, 929–939.
57. Komachi, Y., Hatakeyama, S., Motomatsu, H., Futagami, T., Kizjakina, K., Sobrado, P., Ekino, K., Takegawa, K., Goto, M., Nomura, Y., and Oka, T. (2013) *Mol. Microbiol.* **90**, 1054–1073.
58. Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S., and Vogt, T. F. (2000) *Nature* **406**, 369–375.
59. Lussier, M., Sdicu, A. M., and Bussey, H. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 323–334.

著者情報

岡 拓二：1976年生まれ。1999年九州大学農学部農芸化学化卒業、2004年九州大学生物資源環境科学府応用微生物学専攻博士課程修了 博士（農学）（指導教授：古川謙介）。2004年から2009年産業技術総合研究所地神芳文研究室にて博士研究員。2008年崇城大学生物生命学部応用微生物工学科助教、2010年同准教授。糸状菌の糖鎖合成に関与するタンパク質、特に細胞壁多糖やタンパク質糖鎖の生合成に興味を持って研究を進めている。

後藤正利：九州大学農学研究院准教授。1966年生まれ、福岡県出身。1995年九州大学大学院農学研究科博士課程修了 博士（農学）。1995年九州大学農学部助手。2001年より1年間イリノイ州立大学シカゴ校Chakrabarty研究室にて文科省在外研究員。現在は、白麹菌 *Aspergillus kawachii* の糖質関連酵素や有機酸産生の生化学と応用に興味を持って研究を進めている。