

原 著

Aspergillus fumigatus における
菌体外分泌型ガラクトフラノシダーゼの酵素学的解析

田中 大, 佐々木雅人, 伊藤 文恵, 柴田 信之*

Isolation and Characterization of an Extracellular Beta-Galactofuranosidase
from *Aspergillus fumigatus*

Yutaka TANAKA, Masato SASAKI, Fumie ITO, and Nobuyuki SHIBATA*

(Received November 20, 2016)

Fungal cell wall is composed of variety of carbohydrates and proteins and has enormous structural diversity. Pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* has a five-membered ring type galactose, galactofuranose (Galf), on its cell wall galactomannan (GM). It is believed that GM plays an important role for host infection, but its regulation mechanisms remain poorly understood. In *A. fumigatus*, biosynthesis of Galf sugar chain has become gradually evident, while degradation process of GM has not been defined. In genus *Penicillium*, *Bacillus* and *Trypanosoma*, Galf sugar chain is hydrolyzed by their galactofuranosidase (Galfase). However, it is unknown whether Galf sugar chain is decomposed in *A. fumigatus* because Galfase is not identified so far. In this study, we purified and identified a putative *A. fumigatus* Galfase (AfGalfase) from culture supernatant, and characterized its enzymatic properties. AfGalfase is an approximately 90 kDa protein which is dominantly secreted from hypha. *In vitro* enzymatic analysis revealed that AfGalfase exhibits specificity for Galf and arabinofuranose with acidic pH optimum and broad temperature optimum. Importantly, AfGalfase had hydrolytic activity for both β 1,5- and β 1,6- linked Galf residue. Furthermore, it specifically cleaved non-reducing terminal of Galf sugar chain, suggesting that AfGalfase is exoglycosidase.

Key words — *Aspergillus fumigatus*, glycosidase, galactofuranose, cell wall

緒 言

ヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の分生子は環境に広く存在しており, 免疫不全状態のヒト宿主が *A. fumigatus* に暴露されると肺アスペルギルス症を引き起こす。¹⁾ 侵襲性肺アスペルギロシスに進行した病態の致死率はおよそ 90%にも達し, かつ肺に形成した菌糸塊には現行の抗真菌薬のほとんどが著効せず, 治療に難渋することが臨床上問題となっている。²⁻⁴⁾ 化学療法や臓器移植に伴う免疫抑制療法の普及によって, 現在, 肺アスペルギルス症発症者数は増加の一途をたどっている。⁵⁻⁷⁾ このように, アスペルギルス症への対策は医療技術の進歩が目覚ましい現代にこそ解決されるべき重要な課題であるにもかかわらず, 本疾患の病態形成機序や主要な病原因子についての理解はいまだ不十分である。加えて, 本邦における肺アスペルギルス症起因菌の 90%以上が *A.*

fumigatus であることから, 本菌の生物学的特徴を十分に理解することは, 新たな肺アスペルギルス症治療薬の開発や効果的な治療戦略を決定するために重要である。⁷⁾

病原性真菌の細胞壁は, 細胞形態維持のための骨格として, また, 浸透圧や急激な pH 変化などに対する防御壁として機能することに加え, ヒト侵襲性病変を形成する過程における重要な因子であることが知られている。⁸⁻¹⁰⁾ *A. fumigatus* の細胞壁は, α/β -グルカン, キチン, ガラクトマンナン (GM) などの多糖類から成る多層構造を形成している。グルカンやキチンが他の真菌に共通して認められる抗原であるのに対し, GM は一部の糸状菌や二形成真菌にのみ認められる。GM の構成糖であるガラクトフラノース (5 員環型ガラクトース: Galf) は, ガラクトピラノース (6 員環型ガラクトース: Galp) の構造異性体であり, 熱力学的に不安定な構造であるために, 単糖での存在比は極めて

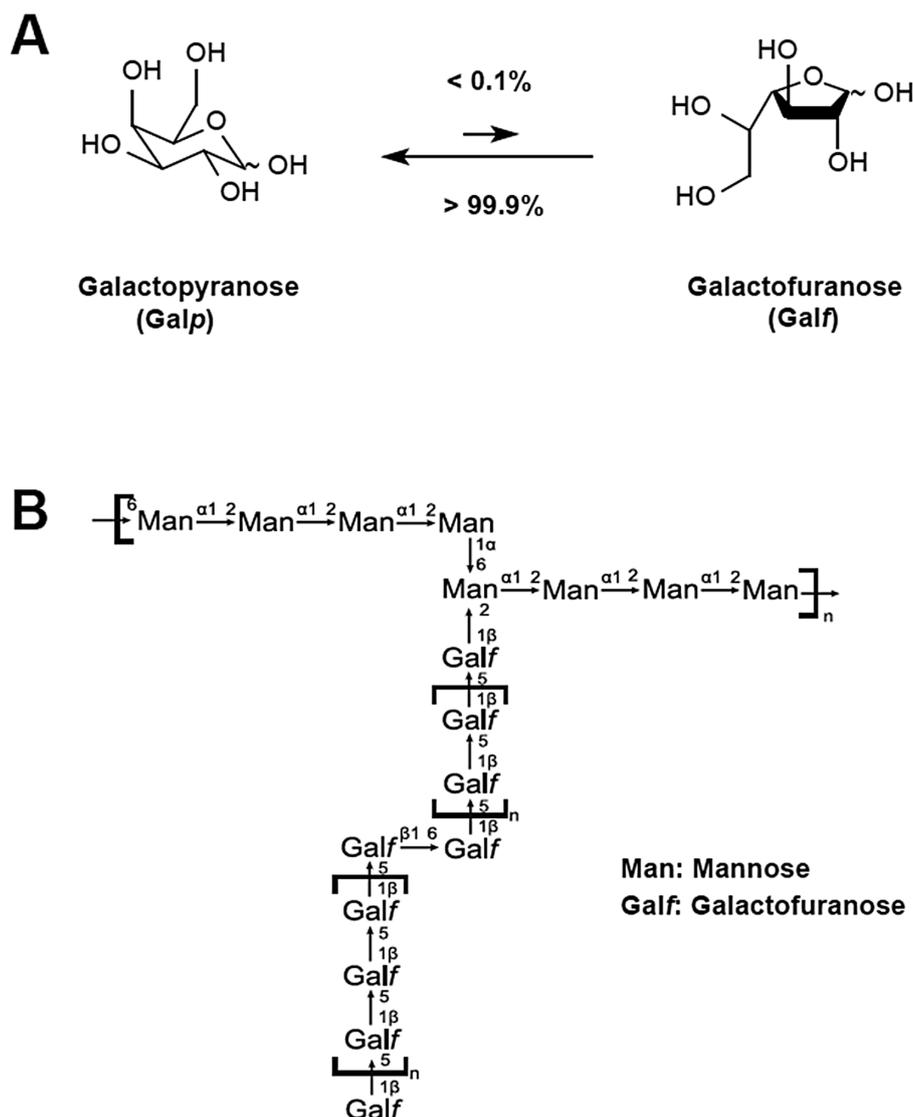


Fig. 1. Structural models of Galp monosaccharide and GM.

(A) Existence of Galp and Galp monosaccharide in aqueous solution. (B) The representative structure of *A. fumigatus* GM. Modified from A. Kudoh, Y. Okawa, N. Shibata, *Glycobiology*. **25**, 74–87 (2015).

低い (Fig. 1A). また, 自然界に普遍的に存在する Galp とは対照的に, 一部の糸状菌や古細菌, 藻類のみが持つ希少糖であり, 通常, ヒトを含めた哺乳動物体内には認められない.¹¹⁾ 従って, アスペルギルス症患者の血中には細胞壁由来 GM 抗原が高頻度に検出される. そのため臨床では, 血中 GM 抗原検査と PCR 検査を併用したアスペルギルス症診断法が広く普及している.¹²⁻¹⁴⁾

A. fumigatus の細胞壁 GM および Galp 糖鎖は 1960 年代に発見され, その後構造解析が成されたが, 病原性や抗原性に及ぼす影響やその生物学的機能はこれまで不明な部分が多かった.^{15,16)} 近年, 遺伝子組換え技術の発展により, Galp を遺伝的に欠失した菌株がいくつか樹立・解析され, GM お

よび Galp 生合成経路の一部が明らかになった. *glfA* 遺伝子は, 解糖系から供給されるウリジン二リン酸-ガラクトピラノース (UDP-Galp) をウリジン二リン酸-ガラクトフラノース (UDP-Galp) に変換する異性化酵素をコードしており, この遺伝子の欠損株では, 細胞壁 GM の全ての Galp 糖鎖が欠失している.¹⁷⁾ 同様に, *glfB* 遺伝子は, 細胞質で合成された UDP-Galp をゴルジ体内腔へ輸送するトランスポーターをコードしており, この遺伝子の欠損によっても, GM の Galp 糖鎖が全て欠失する.¹⁸⁾ マウスに対するこれら欠損株の感染実験では, 病原性が顕著に低下することから, GM の Galp 糖鎖が, *A. fumigatus* の病原性に寄与していることが示唆される.^{17,18)} 加えて, GM の Galp 糖

鎖の基質は解糖系代謝物の異化反応から供給されること、細胞質における Galf 基質生合成が単一の経路であること、GM はおそらくゴルジ体内で生合成されていること、Galf 糖鎖は *A. fumigatus* の少なくとも生存には必須ではないことを明示している。Komachi らは、*A. fumigatus* および *A. nidulans* のゴルジ体に局在する新規の Galf 転移酵素 *gfsA* 遺伝子をクローニングし、それが GM の生合成に関与していることを報告した。¹⁹⁾ 興味深いことに、*gfsA* 遺伝子の欠損では、GM 中の Galf 糖鎖含量は減少するものの、完全には欠失しなかった。これは、Galf 生合成に関わる遺伝子が *gfsA* の他にも存在しており、ゴルジ体における Galf 生合成が、いくつかの酵素の協調によって担われていることを示唆している。我々は、*A. fumigatus* の GM 構造を詳細に解析した結果、*A. fumigatus* の GM は、 α -結合マンノース主鎖に対して Galf 側鎖が付加する構造を取ること、さらに Galf 糖鎖同士の結合様式には β 1-5 結合、および、 β 1-6 結合の 2 種類が存在することを見いだした (Fig. 1B)。¹⁶⁾ 興味深いことに、Galf 側鎖長は培地中の窒素源濃度や pH に依存して変化し、低 pH や低窒素源条件下において β 1-5 結合 Galf 糖鎖長が伸長した。従って、*A. fumigatus* の Galf 糖鎖には構造多様性があり、また、その多様性を制御する機構が内在性に備わっていることを示唆している。

細胞壁の構造を適切に制御するためには、糖転移酵素による生合成プロセスのみならず、加水分解酵素が中心的役割を果たす分解プロセスも重要である。^{20,21)} すなわち、細胞壁 Galf 糖鎖の構造制御メカニズムを正しく理解するためには、分解に関わる酵素や遺伝子の働きについても考慮する必要がある。Kudoh らは、Galf 糖鎖が β 1-5 結合で伸長する原因を「生合成プロセスの活性化」あるいは「分解プロセスの抑制」であると提唱しており、*A. fumigatus* 培養上清中に Galf 糖鎖加水分解酵素 (Galfase) が存在することを示唆している。¹⁶⁾ また、真菌類である *Penicillium* 属菌²²⁾ や、バクテリアのトリパノソーマ²³⁾ では、すでに Galfase の存在が確認されており、酵素活性についてもそれぞれ確かめられているが、*A. fumigatus* の Galfase は未同定であり、詳細な酵素活性や細胞壁分解プロセスへの関与は不明である。また、*A. fumigatus* の GM は、 β 1-5、および β 1-6 結合 Galf が連結したヘテロポリマー構造を取っているため (Fig. 1B)、

A. fumigatus の Galfase が単一の酵素でこれら両方の結合様式を加水分解できる活性を持つのか、あるいは、異なる結合様式ごとに別の加水分解酵素の触媒を必要とするのかは不明であった。一方、*E. crustaceum* の細胞壁には β 1-5 結合の、また、*M. pachydermatis* には β 1-6 結合の Galf ホモポリマー構造がそれぞれ存在する。²⁴⁾ そこで、結合様式の異なるこれら 2 つの Galf ホモオリゴマーを用いることで、単離した Galfase の加水分解活性が β 1-5 結合 Galf に特異的なのか、あるいは β 1-6 結合に特異的なのか、または両者に特異性を有するののかを確かめることができると考えた。そこで我々は、*A. fumigatus* の Galfase タンパク質を単離・精製し、Galfase をコードする遺伝子を同定するとともに、様々な糖鎖基質を用いた加水分解活性測定系を構築し、酵素活性や安定性などの酵素学的解析を行った。

実験方法

使用菌株および培地

菌株として *Aspergillus fumigatus* NBRC33022 株、*Eupenicillium crustaceum* NMRC8847 株、*Malassezia pachydermatis* NBRC10064 株を用いた。培地として *Aspergillus* Minimal Media (AMM 培地) (1% グルコース、0.6% NaNO_3 、5 mM MgSO_4 、1×Hunter's trace element, pH 5.8)、および、YPD 培地 (1% 乾燥酵母エキス、2% グルコース、2% ペプトン) をそれぞれ用いた。

糖濃度測定

試料中の糖含量は、フェノール硫酸法で測定した。²⁵⁾ 試料溶液、あるいは、試料粉末懸濁液をリム付きガラス試験管に 20 μL 取り、5% フェノール水溶液 100 μL 、濃硫酸 500 μL を加えて混和し、37°C、30 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー MPR-A4i (TOSOH, Japan) を用いて 492 nm における吸光度を測定した。得られた吸光度値を、グルコース標準液の希釈系列にて作製した検量線に代入し、試料の糖濃度とした。

Galfase 活性測定

p-nitrophenyl Galactofuranose (pNP-Galf) (Toronto Chemical Research, Canada) 1 mg を DMSO に溶解し、20 mM pNP-Galf 溶液を調製した。また、反応溶液は図の説明文に記載がない限り、以下のように調製し反応させた。試料溶液に

pNP-Galf 溶液を終濃度 1 mM, および, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を終濃度 10 mM となるように加え, 全量 40 μ L とした. 37°C で 24 時間インキュベートした後, 0.1 M NaOH 水溶液 160 μ L を加えて反応を停止させ, マイクロプレートリーダー MPR-A4i を用いて 405 nm における吸光度を測定した. 得られた吸光度値を, *p*-ニトロフェノール標準液の希釈系列にて作製した検量線に代入し, *p*-ニトロフェノール濃度を算出した.

A. *fumigatus* 粗タンパク質画分の調製と Galfase の単離精製

2 L の AMM 培地に *A. fumigatus* 休眠胞子を 1×10^7 spore/mL となるように懸濁し, 37°C, 3 日間培養した. その後, ミラクロス (Merck millipore, Germany) を用いて菌体と上清画分に分離した. 菌体は, 凍結乾燥した後ビードビーター (Ikeda Rika, Japan) を用いて破碎し, タンパク質抽出液 (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH7.5) に溶解して不溶性画分を遠心除去後, 菌体粗タンパク質画分とした. 上清画分は, 10 \times タンパク質抽出液を 1/10 容量加えて上清粗タンパク質画分とした.

Galfase の単離精製は FPLC system (Pharmacia, USA) を用いた. 上清粗タンパク質画分を陰イオン交換カラム Mono Q (5 \times 50 mm) (Pharmacia) に供し, 流速 1 mL/分かつ 0~1.0 M NaCl 濃度条件で溶出し, 10 mL ずつ回収した. 回収した画分ごとに Galfase 活性を測定した. 活性が得られた画分をゲル濾過カラム Superdex 200 (10 \times 300 mm) に供し, 流速 0.3 mL/分で溶出し, 0.3 mL ずつ回収した. 同様に, 回収した画分ごとに Galfase 活性を測定した.

ピリジルアミノ (PA) 化 Galf オリゴ糖鎖の調製

Ramli らの方法を一部改変して行った.²⁶⁾ *E. crustaceum*, および, *M. pachydermatis* を YPD 培地に播種し 28°C で 9 日間培養した後, ミラクロスを用いて菌体と上清を分離した. 菌体をアセトンに浸漬して一晩放置後, アセトンを除去・乾燥し, 精製水 200 mL に懸濁, 次いで 121°C, 120 分間熱水抽出した. 残渣を除去した後, 水で 2 日間透析し, その後凍結乾燥したものを Galf 粗画分とした. 得られた Galf 粗画分 10 mg を 0.15 M トリフルオロ酢酸 700 μ L に溶解し, 100°C, 10 分間加熱した. メタノールを加え減圧濃縮し, ゲル濾過カラム Bio Gel-P-2 (17 \times 770 mm) (Bio Rad, USA) で分離し, 溶出液 110 滴を 1 画分として 120 画分ま

で回収した. 各画分を凍結乾燥し, 各々 1 mg に対し 2-aminopyridine 試薬 20 μ L 加え, 90°C, 1 時間加熱した. ボラン-ジメチルアミン複合体を用いて還元処理を行った後, 80°C, 35 分間加熱した. これに 28%アンモニア水溶液 300 μ L, クロロホルム 300 μ L を加えて攪拌した後, 上層を回収し PA 化 Galf オリゴ糖鎖とした.

HPLC を用いた Galfase 活性測定

精製した Galfase 100 μ g を 1.5 mL チューブに測り取り, PA 化 Galf オリゴ糖鎖 1 mg と共に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 500 μ L に溶解した後, 37°C で 6, 12, 24, および 48 時間インキュベートした. 反応終了後, フェノール/クロロホルム混液で除タンパク質処理を行った後, 水層を回収した. これを 0.22 μ m シリンジフィルターに通した後, HPLC 解析に供した. HPLC 機器は TOSOH HPLC system (TOSOH), カラムは COSMOSIL ODS 5C18 MS-II (Nakalai Tesque, Japan), 移動相は 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) を用いた. 流速は 1.0 mL/分とし, PA 化 Galf オリゴ糖鎖の蛍光検出は励起波長 315 nm, 蛍光波長 400 nm で行った.

結 果

まず, *A. fumigatus* が Galfase を菌体内・外に発現していることを確認する目的で, Galf-*p*-ニトロフェノール誘導体を用いた Galfase 活性測定系を構築し, *A. fumigatus* 菌体と上清中の Galfase 活性を測定した. 培養 72 時間後の菌体および上清から総タンパク質画分を調製し, それぞれを Galf-*p*-ニトロフェノール誘導体とともに 24 時間, 37°C で反応させたところ, 培養上清と菌体の両粗タンパク質画分のタンパク質量依存的に, Galfase 活性の増加が観察された (Fig. 2A). また, タンパク質 1 mg 当たりの Galfase 比活性は, 菌体画分と比べて, 培養上清画分の方が 7~9 倍高いことが明らかになった. 続けて, 培養上清中に分泌される Galfase の量的変動を詳しく調べるため, AMM 培地で 72 時間まで培養し, 菌体重量と培養上清中の Galfase 活性を経時的に測定した. 培養上清は, 経時的に一部サンプリングし, タンパク質量を試料とした. その結果, 菌体湿重量は 48 時間まで良好に増加し, 48 時間経過後の重量はプラトーに達した (Fig. 2B). 一方, 培養上清中の Galfase 活性は, 培養時

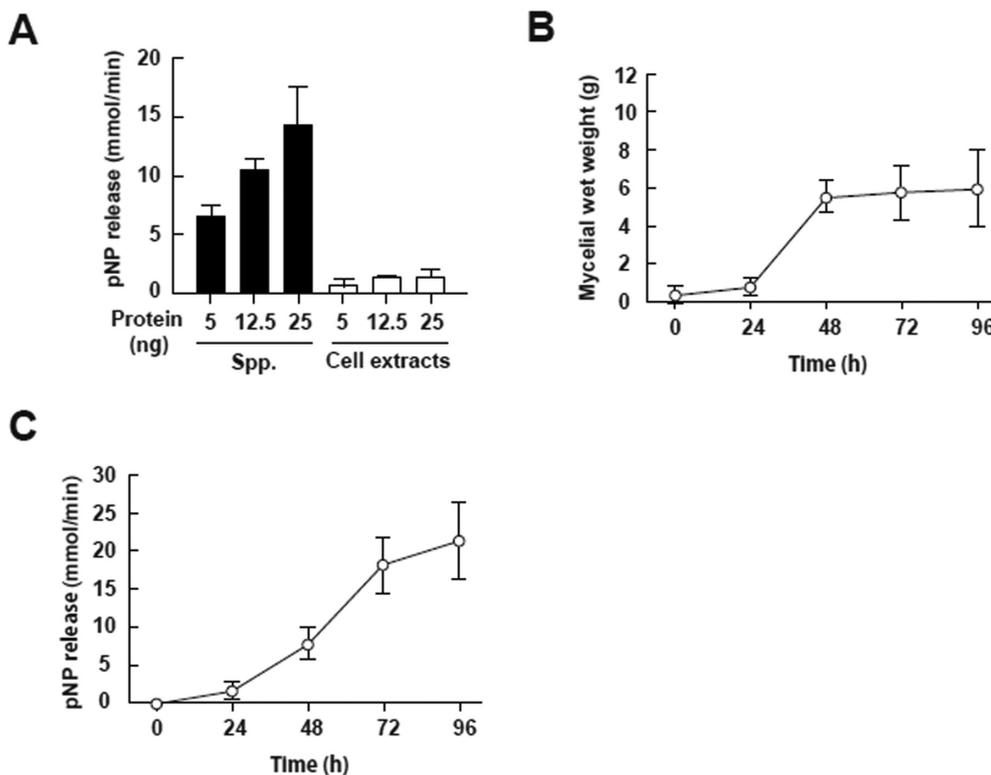


Fig. 2. *A. fumigatus* Galfase is secreted protein.

(A) Comparison of Galfase activity between the fraction of culture supernatants and the cell extracts. Galfase activity was assessed by using the *p*-nitrophenol-Galf (pNP-Galf) substrates. Black bars and white bars represent culture supernatant (Spp.) and cell extracts (Cell extracts) Galfase activity, respectively. Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the standard deviation (S.D.). (B, C) Time course of *A. fumigatus* mycelial wet weight (straight line and white circle) and media pH (dashed line and black circle, media pH) (B) and culture supernatant Galfase activity (C). *A. fumigatus* were grown on AMM media up to 96 h. Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the S.D.

間の経過に伴って増加し続けた (Fig. 2C).

A. fumigatus の Galfase の酵素学的性質や加水分解活性を詳細に検討するために、培養上清中の Galfase タンパク質の単離・精製を試みた。*A. fumigatus* はおよそ 90 種類の糖タンパク質を分泌しており、その多くが全体として正、または、負に帯電していることが知られていることから、²⁷⁾ イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせた精製を試みた (Fig. 3A)。 *A. fumigatus* を 72 時間培養して得られた培養上清を出発材料として、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたステップワイズ溶出にて粗精製を行ったところ、0.3 M NaCl 画分 (Fr. 4) に強い Galfase 活性が認められた (Fig. 3B, C)。 Fr. 4 を、さらにゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供し、分子サイズを細かく分画して回収したところ、溶出後 29 分を頂点とする単一の Galfase 活性ピークが得られた (Fr. A) (Fig. 3D)。 Fr. A 画分に含まれるタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE に供したところ、およそ 90

kDa にシングルバンドが検出された (Fig. 3E)。これらの結果から、*A. fumigatus* が菌体外に分泌する Galfase 活性本体は、比較的強く負に荷電した約 90 kDa のタンパク質であることが示唆された。次に、得られたタンパク質を抽出・精製し、トリプシン消化した後 Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 解析を行ったところ、*A. fumigatus cat1* 遺伝子 (Afu3g02270) の推定遺伝子産物と高いスコアで一致することが分かった。

単離・精製した Galfase タンパク質を用いて、至適温度・pH・基質特異性を検討した。精製して得られた Galfase (*AfGalfase*) タンパク質は凍結乾燥保存後も活性を保持していたため、試験ごとに凍結乾燥 *AfGalfase* を用時溶解、調製して用いた。始めに、*AfGalfase* の温度依存性を検討した。pNP-Galf および *AfGalfase* を酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解し、4~100°C の間で 24 時間反応させ、酵素活性を測定した。その結果、25°C、37°C、および、42°C の条件では、それぞれ同程度の強い加水分解

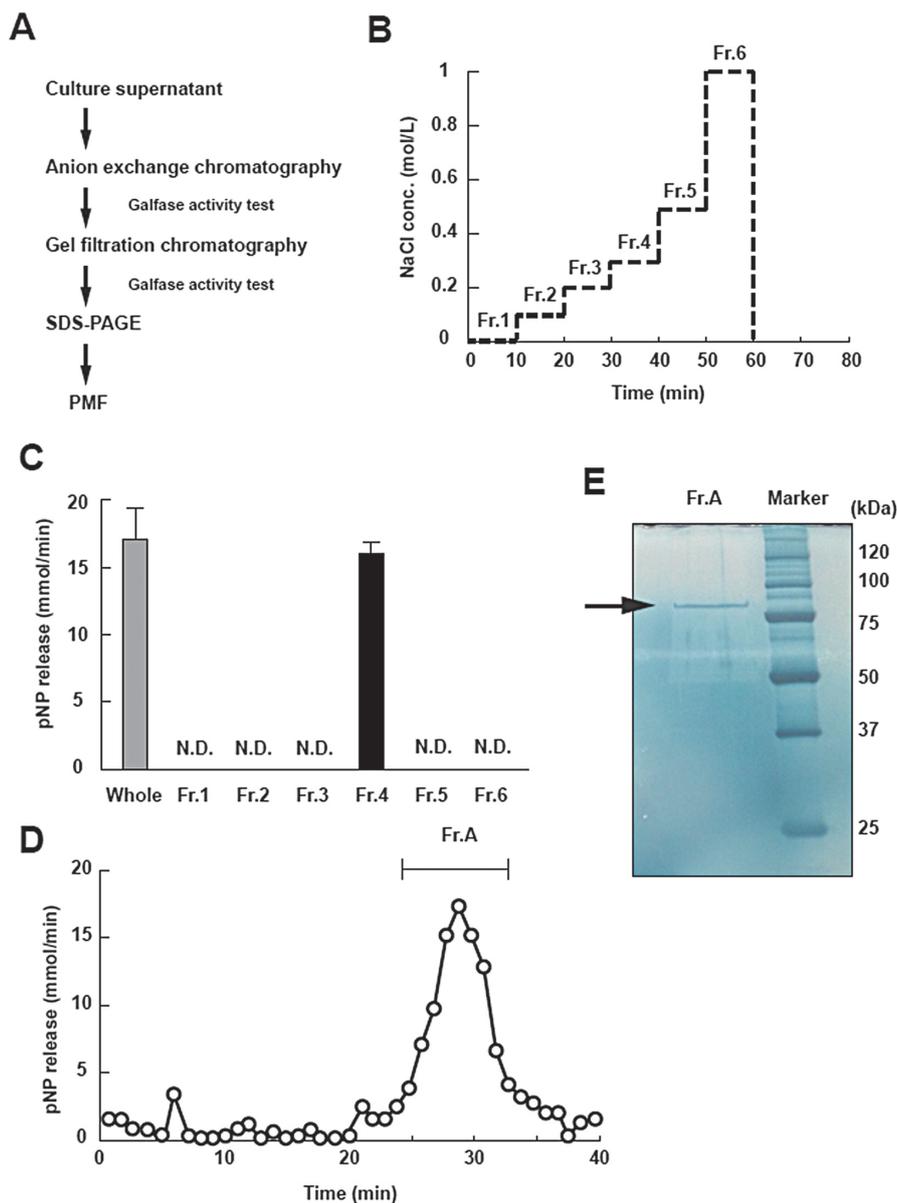


Fig. 3. Isolation and purification of *AfGalFase* from culture supernatant.

(A) Strategy of isolation and purification of *AfGalFase*. (B) Procedure of stepwise elution on an anion-exchange chromatography. A broken line indicates the NaCl concentration of mobile phase at the time. "Fr. XX" means fraction number eluted by each NaCl concentration. (C) Galfase activities of each fraction were determined using pNP-Galf. "Whole" indicates the sample prior to processing on chromatography. N. D. means "not detected." Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the S.D. (D) Galfase activity profile fractionated by a gel filtration chromatography. Fractions 25 to 32 from the superdex-200 column were pooled as a Fr. A. (E) SDS-PAGE analysis of the Fr. A containing protein(s). Representative data are shown for three independent experiments.

活性を示した (Fig. 4A). 驚くべきことに, 4°C, 65°Cの条件下でも, 37°Cにおける活性値のおよそ50~60%程度の活性を示した. 従って, *AfGalFase*は, 比較的広い温度域で Galfase 活性を示すことが分かった. 次に, pH 依存性を検討した. 緩衝液は, pH 3.0~6.0 の pH 域はクエン酸緩衝液, pH 6.5~8.0 の pH 域はリン酸緩衝液を用いた. その結果, pH 3.0~5.0 の酸性~弱酸性域において強い活性が

認められた (Fig. 4B). 一方, 中性~弱アルカリ性域ではごく弱い, あるいは, 全く活性が見られなかった. この結果から, *AfGalFase* の至適 pH は酸性域に存在することが判明した. 続いて, 基質特異性について検討した. pNP-Galfに加え, Galp, グルコピラノース (-GlcP), アラビノフラノース (-Araf) を結合させた pNP 基質をそれぞれ調製し, 加水分解活性を測定した. その結果, *AfGalFase* は

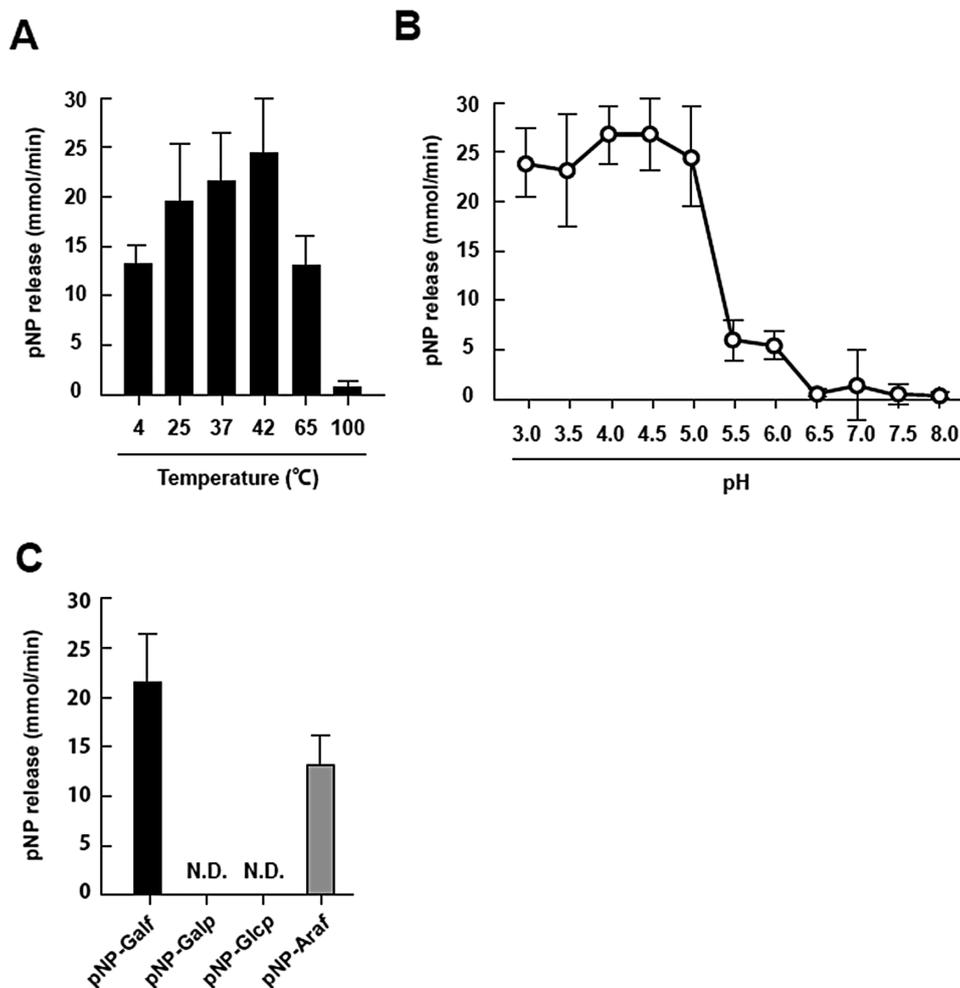


Fig. 4. Enzymatic properties of *AfGalFase*.

(A) Temperature dependency of *AfGalFase* was tested in acetate buffer (pH 4.5) for 60 min. Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the S.D. (B) pH dependency of *AfGalFase* was tested on 37°C for 60 min. Reactions were performed in citrate buffer (pH 3.0-6.0) or phosphate buffer (pH 6.5-8.0). Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the S.D. (C) Substrate specificity of *AfGalFase* was tested in acetate buffer (pH 4.5) on 37°C for 60 min. N. D. means “not detected.” Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the S.D.

pNP-Galp や pNP-Glcp に対して分解活性を示さず、一方で、GalF と構造的に類似する pNP-Araf 基質を加水分解する活性を示した (Fig. 4C)。以上の結果から、*AfGalFase* は 5 員環構造である GalF や Araf に比較的高い特異性を有し、6 員環構造の Galp や Glcp には特異性が低いことが明らかになった。

最後に、*AfGalFase* の GalF 加水分解活性の結合様式依存性を検討した。蛍光ラベル化した GalF オリゴマーを用いて、GalF 加水分解活性の経時的変化を HPLC で検出する系を構築した。それぞれの菌株から酸加水分解して得られた GalF オリゴマーを蛍光標識 (PA 化) し、*AfGalFase* と酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で 37°C、24 時間反応させた。得られた反応成績体について HPLC 解析を行い、クロマトグラムを比較した。GalF β 1-5 GalF-PA ダイマー、

および、GalF β 1-6 GalF-PA ダイマーを用いて解析したところ、いずれの GalF オリゴマーに対しても加水分解活性を示した (Fig. 5A)。すなわち、*AfGalFase* は、 β 1-5 結合と β 1-6 結合の両方の GalF 残基を加水分解し、特に、 β 1-6 GalF オリゴマーに対する加水分解活性がやや高いことが明らかになった。次に、 β 1-5 結合 GalF のダイマー、トリマー、および、テトラマーと *AfGalFase* を反応させ、経時的に反応物を解析したところ、いずれのオリゴマーでも、酵素反応時間の進行に伴って、より分子量の小さいオリゴマーのピークが順次出現することが確認された (Fig. 5B)。興味深いことに、GalF トリマーを用いた解析では、6 時間経過後にはダイマーが検出された一方で、モノマーはそれより遅れて 24 時間後に検出された。同様に、テ

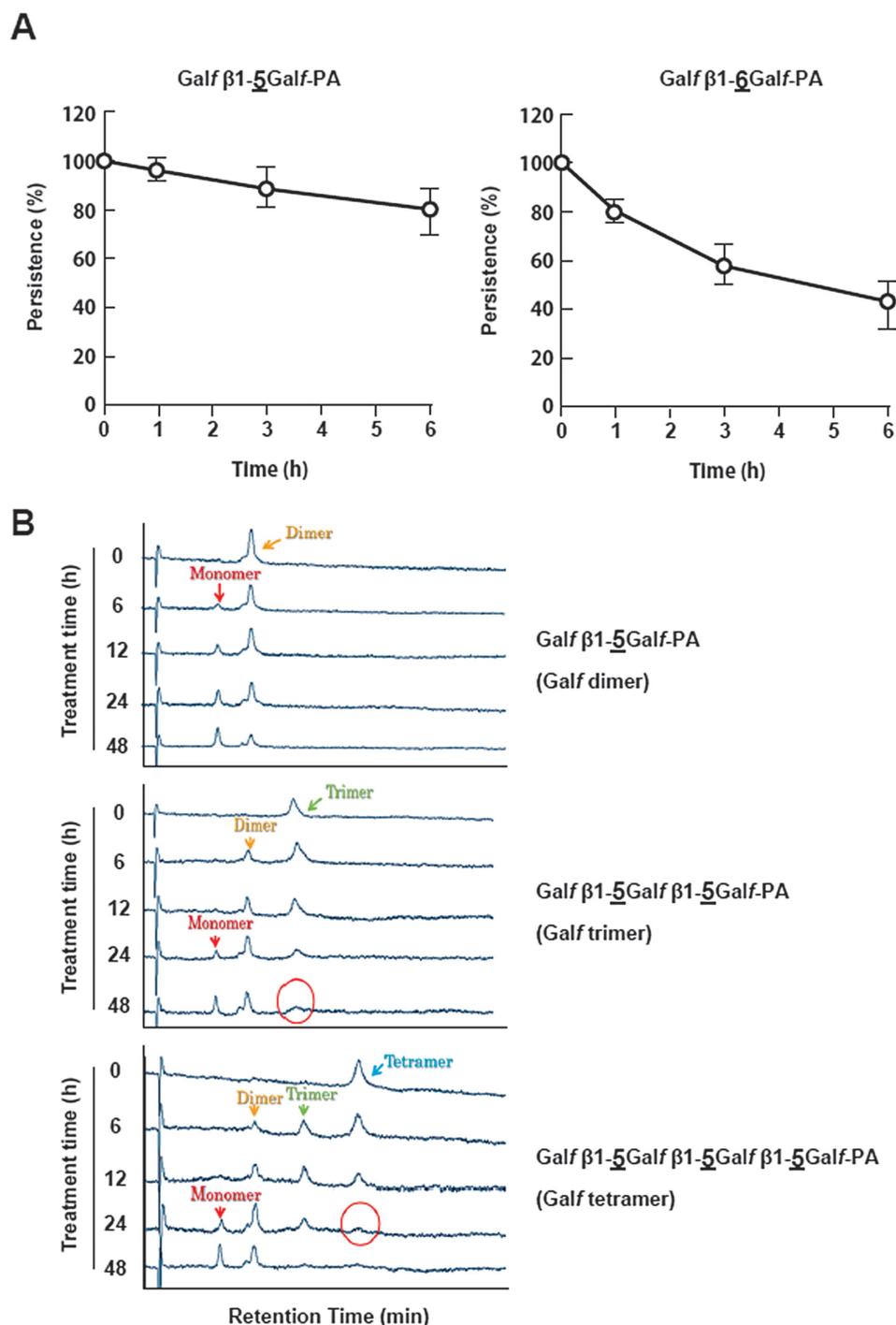


Fig. 5. *AfGalfase* has exoglycosidase activity toward non-reducing terminal of β 1-5 and β 1-6 linked Galf oligomer.

(A) Sugar linkage specificity of *AfGalfase* was tested in acetate buffer (pH 4.5) on 37°C for 1, 3 and 6 hour. Galf-dimer derived from *E. crustaceum* or *M. pachydermatis* used as β 1-5 or β 1-6 linked Galf sugar chain, respectively. Galf-dimer peak area at 0 h was defined as 100% persistence. Values represent the average of three independent experiments, and error bars indicate the S.D. (B) Kinetic degradations and generations of each PA-labeled Galf-oligomer. Each point were monitored measured by HPLC at the time point in the presence of *AfGalfase*. Arrows represent corresponding Galf-oligomers. Circles represent disappearance of an indicated molecule. Representative data are shown for three independent experiments.

トラマーを用いた解析でも、6時間後にはダイマー、テトラマーが検出されたのに対し、モノマーの検出は24時間後であった。

考 察

本研究により、*AfGalfase* は以下の特徴を有することが明らかになった。①菌体外に多く分泌され

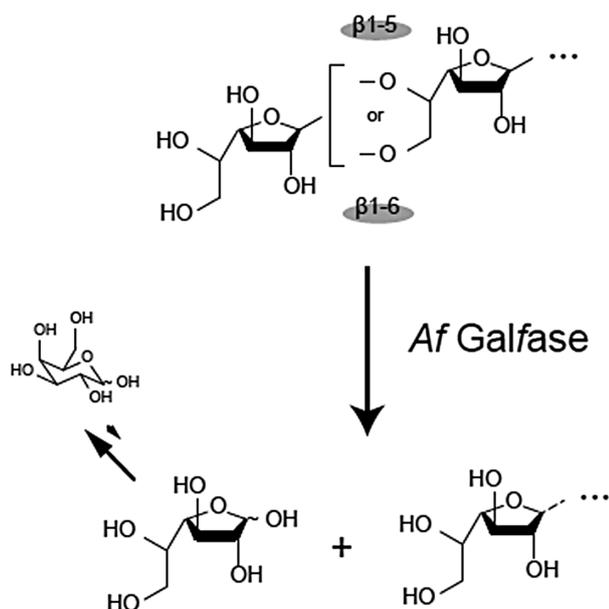


Fig. 6. Schematic representation of *AfGalfase* reaction.

るタンパク質であること。②至適 pH 域が酸性側であること。③低温・高温域でも比較的活性を保っていること。④GalF に基質特異性が高く、かつ、 β -1-5 結合、および、 β -1-6 結合の両方を加水分解できること (Fig. 6)。⑤エキソ型グリコシダーゼであること。これらの酵素学的特徴は、*A. fumigatus* の生活環にとって、以下の点で有利に機能していると推察される。すなわち、*A. fumigatus* は培養時間を経るにつれて菌糸型に大きく生育し、それに伴って種々の代謝物・老廃物を産生することで、培地 pH が酸性化することが知られている。²⁸⁻³⁰ 加えて、糸状菌が菌糸生育する過程では、菌糸先端の細胞壁の分解と生合成が盛んに、かつ、スムーズに行われることが重要である。^{20,21,31} AMM 培地培養では、菌糸生育が盛んになるにつれて培地 pH が酸性化し (Fig. 2B)、かつ *AfGalfase* の至適 pH 域は pH 4~5 付近であったことから、菌糸生育が進むにつれて *Galfase* 活性が強まり、それに伴って、GM の *Galf* 構造が経時的に変化していくと思われる。*Galf* 糖鎖は、GM の α -マンノース主鎖に側鎖として付加する構造であるため、¹⁶ *Galfase* が *Galf* 残基を除去することで、 α -マンノース主鎖構造が細胞壁表面に露出することが容易に予想される。これを支持するように、*glfA* 遺伝子欠損株を用いた解析では、*Galf* 糖鎖の欠失により、*A. fumigatus* の菌糸のプラスチックやガラスへの付着性が上昇することが報告されている。これらのこ

とは、菌糸生育が盛んな時期に *Galfase* を分泌し、*Galf* 残基を除去することが、スムーズな菌糸型生育や、土壌・植物など環境宿主への付着に有利な表面構造となる可能性を示唆している。さらに、*A. fumigatus* は、他の *Aspergillus* 属真菌と異なり、60°C 以上の高温下でも菌糸生育が可能であることがよく知られている。^{30,31} 高温でも活性を発揮できる *AfGalfase* のような細胞壁分解酵素の存在が、*A. fumigatus* の菌糸生育における高温抵抗性を示す一因となっている可能性がある。

HPLC を用いた *Galf* オリゴマーの加水分解実験の結果から、*AfGalfase* は、 β -1-5、 β -1-6 結合様式に非特異的に、かつ、*Galf* 糖鎖残基を非還元末端側から順番に切断するエキソ型グリコシダーゼであることが示唆された。これは、菌体外に分泌された *AfGalfase* は、*A. fumigatus* の細胞壁 GM の *Galf* 残基を、非特異的に加水分解できることを示している。一方、*AfGalfase* の至適 pH が酸性域であったこと、また、菌糸生育が進むにつれて *AfGalfase* 産生量が増大したことは、分泌された *AfGalfase* の活性制御が、環境中の pH と *AfGalfase* 産生量に依存していることを示唆している。すなわち、GM および *Galf* の分解過程は、菌体だけでなく環境因子にも依存していることが推察される。

PMF 解析の結果、*AfGalfase* をコードする遺伝子の候補として *cat1* 遺伝子が同定された。*cat1* 遺伝子は、*A. fumigatus* 胞子特異的カタラーゼをコードする *catA* 遺伝子のオルソログとしてクローニングされた。³² *Cat1* タンパク質の分子量はおよそ 90 kDa で、一次構造中にヘム結合領域、および、カタラーゼ触媒領域を有しており、そのリコンビナント酵素はカタラーゼ活性を有することが報告されている。³² これまでに、カタラーゼが糖鎖加水分解活性を有する例は知られておらず、加えて、*Cat1* タンパク質中には既知の糖加水分解ドメインは見つからないため、*Cat1* タンパク質自身が *Galfase* 活性を有するのか、あるいは *Cat1* タンパク質が他のタンパク質と複合体を形成、あるいは、協調して機能することで活性を示すのかは不明である。今後、*cat1* 遺伝子変異株を作製し、細胞壁ガラクトマンナン (GM)、および、*Galf* 糖鎖構造および細胞壁 GM 構造におよぼす影響を評価することで、真に *Cat1* が *Galfase* であるか否かが判明すると期待される。

近年, 糖鎖改変技術を応用した医薬品・研究試薬の開発が進んでおり, 様々な糖転移酵素や糖加水分解酵素のラインナップ充実に向けられる期待と需要が高まっている.^{35,36)} Komachiらは, ピキア酵母を用いた高収率リコンビナント GfsA タンパク質発現系を構築し, さらにリコンビナント GfsA タンパク質が *in vitro* で Galf 転移活性を発揮することを報告している.¹⁹⁾ 我々が見いだした AfGalfase は, Galf 糖鎖に選択性が高い一方, β 1-5/ β 1-6 結合の両方を加水分解できる活性を持つことから, GfsA などの Galf 糖転移酵素と組み合わせることで, 新規 Galf 糖鎖付加タンパク質の創出と糖鎖改変に利用できる可能性を秘めており, 糖鎖工学分野への応用が期待できる. さらに, Galfase 活性は培養上清中に多く検出され, 高温条件下でも著しい活性低下は認められなかった. 従って, *A. fumigatus* が分泌する AfGalfase は, 酵母などのタンパク質発現系と比べて, 培養上清中で比較的安定に, かつ, 高効率に回収できる点で優れている. 今回用いた陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせる手順は, AfGalfase を大量生産し産業応用するにあたり, 精製ステップの簡略化に資するものと考えられる.

今回の研究により, *A. fumigatus* が分泌する AfGalfase の酵素学的特徴が明らかになった. 今後は, AfGalfase が, 細胞壁 GM の分解過程, 細胞壁保全性, および, 菌糸生育への影響について詳細な検討を行っていく予定である. 本研究の進展により, *A. fumigatus* の細胞壁生合成・分解のサイクルが一層明らかになり, 本菌の生物学的特徴を捉えるための一助となることが期待される.

REFERENCES

- 1) A. Brakhage, *Curr. Drug Targets*, **6**, 875–886 (2005).
- 2) G. D. Brown, D. W. Denning, S. M. Levitz, *Science*, **336**, 647–647 (2012).
- 3) M. Lackner, C. Lass-Flörl, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 3595–3614 (2013).
- 4) W. J. Steinbach, K. A. Marr, E. J. Anaissie, A. Nkechi, S. P. Quan, H. U. Meier-Kriesche, S. Apewokin, D. L. Horn, *J. Infect.*, **65**, 453–464 (2012).
- 5) T. Yamazaki, H. Kume, S. Murase, E. Yamashita, M. Arisawa, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1732–1738 (1999).
- 6) D. Bitar, O. Lorthlary, Y. Le Strat, J. Nicolau, B. Coignard, P. Tattevin, D. Che, F. Dromer, *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1149–1155 (2014).
- 7) Y. Suzuki, H. Kume, T. Togano, Y. Kanoh, H. Ohto, *Med. Mycol.*, **52**, 1–5 (2013).
- 8) V. M. Hearn, J. H. Sietsma, *Microbiology*, **140**, 789–795 (1994).
- 9) M. Bernard, J. P. Latgé, *Med. Mycol.*, **39**, 9–17 (2001).
- 10) S. J. Free, *Adv. Genet.*, **81**, 33–82 (2013).
- 11) B. Tefsen, A. F. J. Ram, I. Van Die, F. H. Routier, *Glycobiology*, **22**, 456–469 (2012).
- 12) S.-C. Heng, S.-C. Chen, C. O. Morrissey, K. Thursky, R. L. Manser, H. D. De silva, C. L. Halliday, J. F. Seymour, R. L. Nation, D. C. Kong, M. A. Slavin, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **79**, 322–327 (2014).
- 13) P. L. White, C. Parr, C. Thornton, R. A. Barnes, *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 1510–1516 (2013).
- 14) E. Reiss, P. F. Lehmann, *Infect. Immun.*, **25**, 357–365 (1979).
- 15) J. P. Latge, H. Kobayashi, J. P. Debeauvais, M. Diaquin, J. Sarfati, J. M. Wieruszkeski, E. Parra, J. P. Bouchara, B. Fournet, *Infect. Immun.*, **62**, 5424–5433 (1994).
- 16) A. Kudoh, Y. Okawa, N. Shibata, *Glycobiology*, **25**, 74–87 (2015).
- 17) P. S. Schmalhorst, S. Krappmann, W. Vervecken, M. Rohde, M. Muller, G. H. Braus, R. Contreras, A. Braun, H. Bakker, F. H. Routier, *Eukaryot. Cell.*, **7**, 1268–1277 (2008).
- 18) J. Engel, P. S. Schmalhorst, T. Dork-Bousset, V. Ferrieres, F. H. Routier, *J. Biol. Chem.*, **284**, 33859–33868 (2009).
- 19) Y. Komachi, S. Hatakeyama, H. Motomatsu, T. Futagami, K. Kizjakina, P. Sobrado, K. Ekino, K. Takegawa, M. Goto, Y. Nomura, T. Oka, *Mol. Microbiol.*, **90**, 1054–1073 (2013).
- 20) K. Dichtl, C. Helmschrott, F. Dirr, J. Wagener, *Mol. Microbiol.*, **83**, 506–519 (2012).
- 21) V. Valiante, J. Macheleidt, M. Föge, A. A. Brakhage, *Front. Microbiol.*, **6**, 325 (2015).
- 22) B. A. Tuekam, Y. Park, C. J. Unkefer, *Society*, **67**, 4648–4656 (2001).
- 23) L. C. Miletti, K. Marino, C. Marino, W. Colli, M. J. Alves, R. M. de Lederkremer, *Mol. Biochem.*

- Parasitol.*, **127**, 85–88 (2003).
- 24) J. A. Leal, C. Guerrero, B. Gómez-Miranda, A. Prieto, M. Bernabé, *FEMS Microbiol. Lett.*, **90**, 165–168 (1992).
- 25) K. A. C. C. Taylor, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **53**, 207–214 (1995).
- 26) N. Ramli, M. Fujinaga, M. Tabuchi, K. Takegawa, S. Iwahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59** (1995).
- 27) S. S. Adav, A. Ravindran, S. K. Sze, *J. Proteome Res.*, **12**, 2715–2731 (2013).
- 28) J. P. Latgé, The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.*, **9**, 382–389 (2001).
- 29) J. C. Frisvad, C. Rank, K. F. Nielsen, T. O. Larsen, *Med. Mycol.*, **47**, S53–71 (2009).
- 30) J. C. Rhodes, *Med. Mycol.*, **44**, S77–81 (2006).
- 31) M. E. Clayton, R. Steinmann, K. Fent, *Aquat. Toxicol.*, **47**, 213–226 (2000).
- 32) J. A. Calera, S. Paris, M. Monod, A. J. Hamilton, J. P. Debeaupuis, M. Diaquin, R. Lopez-Medrano, F. Leal, J. P. Latgé, *Infect. Immun.*, **65**, 4718–4724 (1997).
- 33) E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *Eur. J. Biochem.*, **188**, 405–411 (1990).
- 34) V. Skibeli, G. Nissen-Lie, P. Torjesen, *Blood*, **98**, 3626–3634 (2001).