

東北医科薬科大学  
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	田中 大（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	薬科 第3号
学位授与の日付	平成30年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当
学位論文題名	病原性真菌の細胞壁保全性調節機構とその分子に関する研究
論文審査委員	主査 教授 永田 清
	副査 教授 久下周佐
	副査 教授 柴田 信之

病原性真菌の細胞壁保全性調節機構と

その分子に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科薬科学専攻

感染生体防御学教室

田中 大

## 略語表

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	complementary DNA
CFW	Calcofluor White
CR	Congo Red
CWI	Cell wall integrity
DOX	Doxycycline
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
DXD	Aspartic acid - X - Aspartic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FTGM	Fungal type Galactomannan
Gal <sub>f</sub>	Galactofuranose
Gal <sub>fase</sub>	Galactofuranosidase
Gal <sub>p</sub>	Galactopyranose
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
GM	Galactomannan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase

IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	kilo Dalton
MAP	Mitogen-associated Protein
MIC	Minimum inhibitory concentration
MOPS	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance
OMGM	O-linked mannose type Galactomannan
PA	2-aminopyridine
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pNP	para-Nitorophenol
ppm	parts per million
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
RNA	Ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SSC	Standard Saline Citrate
TBS	Tris buffered saline
tet	Tetracycline-activated promoter
TM	Tunicamycin

UDP

Uridine diphosphate

UGGT

UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase

UPR

Unfolded protein response

## 目次

緒言	1
----	---

### 第一章 *KRE5* 遺伝子の発現抑制により誘導される小胞体ストレス応答と *Candida*

#### *glabrata* の細胞壁保全性制御機構に関する解析

第一節 序論	8
第二節 実験方法	12
第三節 結果	24
第四節 考察	47

### 第二章 小胞体-ゴルジ体-分泌経路関連遺伝子の欠損により誘導される小胞体ストレ

#### ス応答と *Candida glabrata* の細胞壁保全性制御機構に関する解析

第一節 序論	52
第二節 実験方法	55
第三節 結果	64
第四節 考察	82

### 第三章 *Aspergillus fumigatus* における $\beta$ 1,5 ガラクトフラノース転移酵素 GfsA の

#### *in vivo* 細胞壁ガラクトマンナン生合成への影響

第一節 序論	.....	86
第二節 実験方法	.....	89
第三節 結果	.....	98
第四節 考察	.....	116

### 第四章 *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

第一節 序論	.....	119
第二節 実験方法	.....	121
第三節 結果	.....	125
第四節 考察	.....	134
総括	.....	139
参考文献	.....	143

## 緒言

細胞壁は真菌の正常な生育に必須の構造であり、一般に数種類の多糖から構成される。真菌の細胞壁は細胞形態を物理的に支持するとともに、有害環境に対する障壁として機能している (Cid *et al.* 1998; Chen and Thorner 2007)。また、菌種、生育ステージ、あるいは生育環境別に多糖構造を分子レベルで見ると、その糖組成や結合様式、グリコシド結合分岐数などのパラメータは驚くほど異なっていることがわかる (Shibata *et al.* 2007; Takahashi *et al.* 2012; Kudoh *et al.* 2015)。重要なことに、多くの真菌は生育環境変化に応答して細胞壁構造をリモデリングし、その結果、環境ストレスに対して抵抗性を獲得することが知られている (Martín *et al.* 2000; Ene *et al.* 2015)。このような細胞壁保全性の調節 (Cell Wall Integrity: CWI) は真菌の生存に必須のプロセスであり、これを担保するためのシグナル伝達機構は、まとめて CWI 経路と呼ばれている (Levin 2005)。

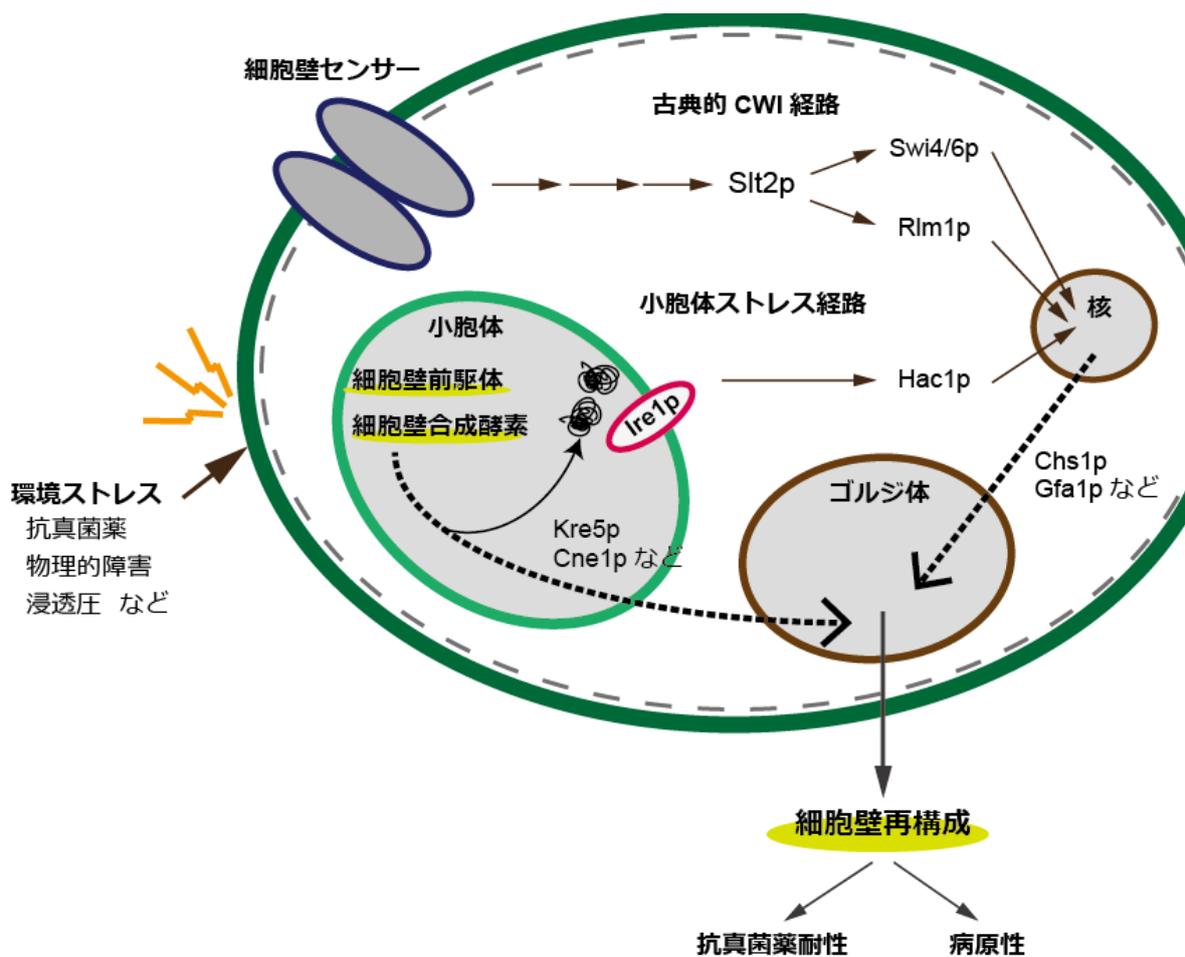
近年、代表的な病原性真菌である *Candida glabrata* が、エキノキャンディン系抗真菌薬の暴露に応じて MAP キナーゼ Slt2p を介した CWI 経路を活性化し、最少発育阻止濃度 (MIC) 付近のエキノキャンディン系薬に対する耐性を獲得することが報告された (Stevens *et al.* 2006; Chamilos *et al.* 2007)。すなわち、エキノキャンディン系薬剤

による  $\beta$ 1,3 グルカン構造へのダメージが CWI を誘導した結果、一過性に抗真菌薬低感受性を獲得したケースとして考えられており、特に血液疾患領域で臨床上問題になっている (De Rosa *et al.* 2015)。 *Candida* 属や *Saccharomyces* 属などの酵母様真菌は、マンナン、 $\beta$  グルカン、キチンから構成される細胞壁多糖を共通に有している (Georgopapadakou and Tkacz 1995; Levin 2005; De Groot *et al.* 2008)。酵母において、もっとも研究が進んでいる CWI は MAP キナーゼ経路を介した細胞壁構造のヘテロメリックな調節であり、 $\beta$ 1,6 グルカンを遺伝的に欠失した株では、CWI 経路が基底レベルで活性化するとともにキチン生合成の亢進していることが知られている (Boone *et al.* 1990; Meaden *et al.* 1990; Shahinian *et al.* 1998)。これについては、以下のように解釈されている。まず、細胞壁への物理的な障害、あるいは遺伝的な  $\beta$  グルカン欠失が起これると、細胞壁センサー Wsc1p や Wsc2p が細胞壁構造異常を感知する (Jin *et al.* 2013)。これに続いて、GTP 結合タンパク質 Rho1p が活性化し、細胞内キナーゼ Pkc1p、Mkk1/2p、Slt2p の逐次的リン酸化を介して、CWI 関連タンパク質やキチン生合成関連遺伝子が転写活性化される (Martín *et al.* 2000; Bermejo *et al.* 2008)。キチン生合成に関わるいくつかの遺伝子のうち、特にキチン生合成経路の律速酵素をコードする *GFA1*、GlcNAc 転移酵素をコードする *CHS* ファミリー遺伝子は、Slt2p 下流転写因子 Swi4/6、

Rlm1 の制御を受けることが分かっている (Munro *et al.* 2001; Lagorce *et al.* 2002; García *et al.* 2004)。興味深いことに、近年、MAP キナーゼを介した CWI 経路が、小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response, UPR) とクロストークして制御されていることが明らかになりつつある (Fig.1)。*Saccharomyces cerevisiae* や *Aspergillus fumigatus*、*Cryptococcus neoformans* では、小胞体における糖タンパク質品質管理機構の異常、すなわち小胞体ストレスの蓄積によって CWI 経路が活性化すること、また、Ire1p や Hac1p などの小胞体ストレス関連タンパク質を欠損することで、正常な CWI 調節に影響を及ぼすことが報告されている (Kimata *et al.* 2006; Scrimale *et al.* 2009; Feng *et al.* 2011; Glazier and Panepinto 2014)。Ire1p は RNase 型小胞体ストレスセンサーとして、Hac1p は活性化した Ire1p のスプライシングを受けて成熟する転写因子として機能しており、真菌属を含めた多くの真核生物において *IRE1-HAC1/XBP1* 経路として保存されている (Urano, Bertolotti and Ron 2000; Back *et al.* 2005)。特に、*S. cerevisiae* にとっては唯一の UPR 経路であると考えられている (Frost *et al.* 2012)。しかしながら、大変興味深いことに、*S. cerevisiae* 近縁種である *C. glabrata* では、Ire1p は小胞体ストレスセンサーとしての機能に必須な自己リン酸化ドメインを、さらに *HAC1* mRNA は、Ire1p の RNase ドメインが結合するスプライシング配列をそれぞれ失っていることが

報告された (Miyazaki *et al.* 2013)。このことは、*C. glabrata* が *IRE1-HAC1* 経路を機能的に欠損していることを強く示唆している。それにもかかわらず、本博士論文で示す通り、*C. glabrata* の CWI は、薬剤性の ER ストレス誘導や、小胞体恒常性に関わる遺伝子群の欠損によっても誘導されることが明らかになった。従って、*C. glabrata* における UPR と CWI 経路とのクロストークは、既知の *IRE1-HAC1* 経路を介さない、特徴的な制御を受けている可能性が考えられる。近年、*Candida albicans* に起因しない *Candida* 症、すなわち *C. glabrata* を含む「non-albicans *Candida* species」による症例が世界的な増加傾向にあることから (Pappas *et al.* 2003; Li *et al.* 2007)、*C. glabrata* の CWI を理解することは、*Candida* 症の新たな治療戦略を提案する上で有用である。

他方では、病原性真菌の細胞壁はヒト疾患マーカーとしても重要な役割を担っている。ヒト病原性糸状菌 *A. fumigatus* の細胞壁は、 $\alpha/\beta$  グルカン、キチン、ガラクトマンナン (GM) から成る多層構造を形成しており、特に GM は一部の糸状菌や二形成真菌にのみ観察される特徴的な多糖である (Hearn and Sietsma 1994; Bernard and Latgé 2001; Free 2013)。このため、血中 GM マーカーの検出は、臨床上重要な *Aspergillus* 症特異的診断基準として位置づけられている (Reiss and Lehmann 1979; White *et al.* 2013; Heng *et al.* 2014)。しかしながら、慢性壊死性肺アスペルギルス症など一部の症例では



**Fig. 1. Summary of the mechanism of cell wall integrity for yeast.**

GM マーカー陰性となることが多く、適切な治療が遅れてしまうケースがあるが、この原因は明らかになっていない。GM マーカー抗体検査は、GM に含まれるガラクトフラノース (Galf) 糖鎖を抗原とする検査である。Galf は 5 員環型のガラクトースであり、一般に、ヒトを含めた哺乳動物体内には認められない (Tefsen *et al.* 2012)。A. *fumigatus* の細胞壁 GM および Galf 糖鎖は 1960 年代に発見され、その後構造解析が成されてきたが、その糖鎖構造を形作るための遺伝子や制御に関わる機構は、2000

年代後半に至るまでほとんど明らかにされていなかった (Latgé *et al.* 1994; Kudoh *et al.* 2015)。近年、遺伝子組換え技術の発展により、GalF 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 GalF 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-Galf) 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 GalF 糖鎖が欠失する (Schmalhorst *et al.* 2008)。同様に、glfB 遺伝子は、細胞質で合成された UDP-Galf 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 GalF 糖鎖が全て欠失する (Engel *et al.* 2009)。加えて、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 GalF 糖鎖が、*A. fumigatus* の病原性に寄与していることが示唆される (Schmalhorst *et al.* 2008; Engel *et al.* 2009)。以上の事実は、GM の GalF 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 *gfsA* 遺伝子をクローニングし、この遺伝子産物が *in*

*vitro* において *Galf* 糖転移活性を有することを見出した (Komachi *et al.* 2013)。これを受けて、本研究では、*gfsA* 遺伝子が *A. fumigatus* の GM の *in vivo* 生合成に関与すること、また *gfsA* 遺伝子以外にも *Galf* 転移酵素をコードする遺伝子が存在する可能性を提示した (第三章)。これに続けて私は、*Galf* 糖鎖の加水分解に関わる酵素ガラクトフラノシダーゼを単離・精製し、その *in vitro* 活性を測定することに成功した (第四章)。

このように、細胞壁 GM の制御機構は、生合成、および分解の両面から徐々に明らかになりつつある。ところで、*A. fumigatus* の GM 構造を詳細に解析すると、*A. fumigatus* の GM は、 $\alpha$  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  $\beta$ 1,5 結合、および、 $\beta$ 1,6 結合の 2 種類が存在している (Kudoh *et al.* 2015)。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  $\beta$ 1,5 結合 *Galf* 糖鎖長が伸長した (未発表データ)。これらの事実は、*A. fumigatus* の *Galf* 糖鎖には構造多様性があること、また、その多様性を制御する機構、すなわち CWI 経路が内在性に備わっていることを示唆している。

以上の背景から、本研究では、代表的な病原性真菌 *C. glabrata*、および *A. fumigatus* の細胞壁構造制御、すなわち CWI に関わる遺伝子を明らかにすることを目標とし、

第一章、および、第二章では *C. glabrata* に特徴的な小胞体ストレス応答性細胞壁キチン制御機構について、第三章、および、第四章では GM の Galf 生合成と分解に関わる酵素の *in vitro*、*in vivo* 活性について検討した。

## 第一章

### *KRE5* 遺伝子の発現抑制により誘導される小胞体ストレス応答と

### *Candida glabrata* の細胞壁保全性制御機構に関する解析

#### 第一節 序論

*Candida glabrata* の細胞壁は、マンノプロテイン、キチン、 $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,6 グルカンから構成されている (De Groot *et al.* 2008)。なかでも  $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,6 グルカンは、もともと細胞膜に近い最内層を形成している。 $\beta$ 1,6 グルカンは  $\beta$ 1,3 グルカンに比べて少量だが、マンノプロテインとキチン、および  $\beta$ 1,3 グルカンそれぞれを繋ぎ留めるリンカーの役割をしている (Shahinian and Bussey 2000)。このことから、 $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,6 グルカンは細胞壁構造維持にとって重要な構成分子であり、その障害は真菌細胞の生育を脅かすと考えられている。従って、 $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,6 グルカン構造異常に伴った細胞壁リモデリング、すなわち CWI の調節は、真菌の生存にとって必須の機構である。

酵母様真菌では、細胞壁構造調節を担う CWI 経路は Slt2 MAP キナーゼに統合されるリン酸化カスケードが担保していることが知られており、細胞壁構造への直接の障害や、出芽に伴うダイナミックな構造変化が活性化の引き金であるとされてきた

(Martín *et al.* 2000; García *et al.* 2004; Ene *et al.* 2015)。近年、小胞体 (ER) が CWI を調節するプラットフォームとして機能している可能性のあることが相次いで報告された。小胞体は、多くの真菌にとって、細胞壁前駆体を生合成するために必須のオルガネラである。 *Saccharomyces cerevisiae*、 *Aspergillus fumigatus*、 *Cryptococcus neoformans* などの真菌では、小胞体糖タンパク質品質管理機構の異常 (ER ストレス) を感知する Unfolded Protein Response (UPR) が保存されており、これによって小胞体内における糖タンパク質生合成および細胞壁前駆体の合成・供給を管理している (Feng *et al.* 2011; Frost *et al.* 2012; Jung *et al.* 2013)。これら真菌の UPR シグナル伝達下流には細胞壁合成に関わる遺伝子がいくつか見つかり、ER ストレスの発生に起因して転写活性化されることが分かっている。しかしながら、興味深いことに、 *C. glabrata* では、最もよく研究されている UPR 経路としての *IRE1-HAC1* 経路が、進化的に欠失していることがわかっている (Miyazaki *et al.* 2013)。Ire1p は小胞体膜を貫通するセンサーとして働き、小胞体ストレスが生じると多量体化して RNA 切断活性ドメインを露出し、細胞質に存在する未成熟型 *HAC1* mRNA の選択的スプライシングを触媒する (Gardner and Walter 2011)。これによって生じた成熟型 *HAC1* mRNA から転写因子 Hac1p が翻訳され、ER ストレスに対して拮抗的に働く遺伝子群の転写を活性化する

(Patil and Walter 2001; Yoshida *et al.* 2001)。 *C. glabrata* は *S. cerevisiae* の近縁種でありながら、 *S. cerevisiae* が唯一持つ UPR 経路としての *IRE1-HAC1* 経路を欠失していることから、 *C. glabrata* は一見して、これまでに見つかった UPR 経路のいずれも有していないかのように見える。これと矛盾することに、 *C. glabrata* は、真核生物に小胞体ストレスを誘導する薬剤であるツニカマイシン (TM) に対して一次耐性を有している (Miyazaki *et al.* 2013)。さらに、TM 処理によって *S. cerevisiae* の UPR と共通するいくつかの遺伝子発現が上昇することもわかっている (Miyazaki *et al.* 2013)。これらことは、 *C. glabrata* が *IRE1-HAC1* 経路に拠らない UPR を持っている可能性を示唆しているが、新規の UPR 経路を持っているのか、または他の経路が UPR を代替しているのかは不明である。加えて、 *C. glabrata* も他の真菌と同様に、UPR 経路と CWI 経路のクロストークがあるのかは知られていない。

*KRE5* 遺伝子は、糖タンパク質の品質管理に関わる小胞体タンパク質である UDP-グルコース: グリコシルトランスフェラーゼ (UGGT) をコードすることが推定されており、UGGT は多くの真核生物に保存されている (Taylor *et al.* 2003)。 *C. albicans* の Kre5p は UGGT 様ドメインを持っており、小胞体内シャペロンと協調して、糖タンパク質前駆体および細胞壁前駆体の品質管理を担っている (Herrero *et al.* 2004)。一方、

*S. cerevisiae* の Kre5p は分子シャペロンの補因子としての機能を失っており (Levinson *et al.* 2002)、さらに、*C. glabrata* の推定 Kre5p においてはその分子特性は不明である。

興味深いことに、*KRE5* など UGGT タンパク質をコードする遺伝子の欠損は、様々な真菌において、細胞壁  $\beta$  グルカン構造異常を起こすことが分かっている (Meaden *et al.* 1990; Fanchiotti *et al.* 1998; Herrero *et al.* 2004)。そこで、本研究では、*C. glabrata* における *KRE5* 遺伝子の細胞壁構造に与える影響の解析を通して、*C. glabrata* における小胞体ストレスと細胞壁恒常性、すなわち ER ストレスと UPR および CWI の関連について考察した。

## 第二節 方法

### 使用菌株および培養条件

実験に使用した菌株は Table 1 に示した。HETS202 株は、リバーステトラサイクリン調整性トランス活性化因子 (rtTA) を発現するように改変した *C. glabrata* 株である (Ueno *et al.* 2007)。各株は YPD 培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 乾燥酵母エキス) あるいは SD 培地 (2% グルコース、0.17% yeast nitrogen base、0.5% 硫酸アンモニウム、2% drop out Mix) の液体培地あるいは寒天培地にて 37°C で培養した。また、rtTA を抑制するためのドキシサイクリン (DOX, Sigma Aldrich, United States) 濃度は 20 µg/ mL とし、必要に応じて、上記の培地に添加して用いた。

### tet-*KRE5* 株および tet-*KRE5* $\Delta$ SLT2 株の作製

テトラサイクリン感受性 *KRE5* 遺伝子発現抑制株 (tet-*KRE5*) は、HETS202 株を親株として作製した。また、クローニングに用いたプライマーは Table 2 に示した。プラスミド pTK916-97t (Ueno *et al.* 2007) を鋳型とし、プライマー p12784F、p12784TR を用いて PCR 法にて増幅した。得られた DNA 断片を酢酸リチウム法にて HETS202 株

にトランスフォーメーションし、ヒスチジン選択培地にてコロニーを形成させた。目的遺伝子の挿入は、サザンブロット法にて確認した。

*SLT2* 遺伝子欠損 *tet-KRE5* 株 (*tet-KRE5 ΔSLT2* 株) は、*tet-KRE5* 株を親株として作製した。HETS202 株よりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として、*SLT2* 遺伝子上流 1.0 kb をプライマー CgSLT2 5'Fw、CgSLT2 5'Rv+hphMX、および、下流 1.0 kb を CgSLT2 3'Fw+hphMX、CgSLT2 3'Rv を用いてそれぞれ増幅した。得られた DNA 断片と *hphMX* DNA 断片と fusion PCR 法にて結合増幅させ、遺伝子導入カセットを作製した。得られた遺伝子導入カセットを酢酸リチウム法にて *tet-KRE5* 株にトランスフォーメーションし、ハイグロマイシン選択培地にてコロニーを形成させた (Agatep *et al.* 1998)。目的遺伝子の挿入は、PCR 法にて確認した。

#### タンパク質一次構造解析

CAGL0E5412 がコードするタンパク質 (Cgkre5p) と *Saccharomyces cerevisiae* Kre5p (Sckre5p) は、NCBI の配列情報を用いて T-COFFEE ver. 11.00 (<http://tcoffee.crg.cat>) でアラインメント解析し、ESPrnt 3.0 (<http://esprint.ibcp.fr/ESPrnt/ESPrnt>) を用いて画像処理した。

## サザンブロッティング

サザンブロッティングは、標準的なプロトコルに従って実施した。HETS202、および tet-KRE5 株より抽出したゲノム DNA を制限酵素 *Nde*I (New England Biolabs, United Kingdom) で処理し、0.8% アガロースゲル電気泳動に供した。これを Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare, United State) に転写し、その後メンブレンを 0.1 M NaOH に浸した。次に、PCR 法を用いて *CAGLOE5412* の推定コード領域を含む塩基配列を増幅し、Random Primer DNA labeling kit ver.2 (TAKARA, Japan) および [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Perkin Elmer, United States) を用いて放射性 DNA プローブを作製した。メンブレンを 20× Standard Saline Citrate (SSC) 溶液中にて室温で 1 時間インキュベートし、放射性 DNA プローブを加えて 65°C でさらに一晩インキュベートした。その後、2× SSC 溶液で 2 回洗浄した後、BAS-5000 system (Fuji Film, Japan) にて画像解析した。

## 薬剤感受性試験

薬剤感受性は、スポットアッセイにより評価した。37°C にて 1 日培養した菌液を  $2.0 \times 10^8$ /mL に調製し、さらに 5 倍希釈系列を 4 点まで作製した。希釈した菌液を 5  $\mu$ L ずつ YPD 寒天培地上にスポットし、37°C にて 48 時間インキュベート後に観察した。

なお、必要に応じて、以下の薬剤をそれぞれの濃度で添加した。20 µg/mL DOX; 600 µg/mL Calcofluor White (CFW, Sigma Aldrich); 600 µg/mL Congo Red (CR, Sigma Aldrich); 1.5 or 2.0 µg/mL Tunicamycin (TM, Nacalai Tesque, Japan); 100 ng/mL FK-506 (Nacalai Tesque)

### フローサイトメトリー

細胞周期解析は、フローサイトメトリーを用いて、Borah らの方法に従って行った (Borah, Shivarathri and Kaur 2011)。対数増殖期まで培養した各菌株を回収し、滅菌水で 2 度洗浄した後、冷 70% エタノールを加えて 4°C にて 16 時間インキュベートした。細胞を洗浄した後、0.1 mg/mL RNaseA (Nippon gene, Japan) を含む 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液に懸濁し、37°C で 2 時間インキュベートした。これに、ヨウ化プロピジウム溶液を最終濃度 50 ng/mL となるように加え、超音波処理およびメッシュフィルターろ過した後で、FACS Calibur System (BD Biosciences, United States) にて解析した。細胞は極大波長 488 nm のレーザーを用いて 20,000 細胞までカウントし、CellQuest Pro software (BD Biosciences) にて解析した。

## アルカリ不溶性画分の調製および細胞壁組成分析

DOX を含む、あるいは含まない YPD 培地に各菌株を播種し、37°C にて定常増殖期まで培養した。それぞれの菌株を回収して滅菌水で 3 回洗浄した後、0.1 M NaOH に懸濁し、100°C にて 24 時間インキュベートした。処理後の菌体を滅菌水で洗浄後、再度 0.5 M 酢酸に懸濁し、80°C にて 24 時間インキュベートした。再度菌体を回収し滅菌水で 2 回洗浄後、イオン交換水で透析したのち、凍結乾燥処理してアルカリ不溶性画分とした。

アルカリ不溶性画分中の  $\beta$  グルカン含量は、Umeyama らの方法に従って行った (Umeyama *et al.* 2006)。まず、アルカリ不溶性画分 1.0 mg を 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) 1 mL に懸濁し、Zymolyase 100-T (Nacalai Tesque) を最終濃度 1.0 mg/mL となるように加え、37°C で 24 時間インキュベートした。これを 15,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離し、上清と残渣をそれぞれ回収した。上清の半量を透析前画分として保存し、かつ残りの半量を透析にかけ、その後透析内液を回収し、透析後画分とした。それぞれの画分に含まれる六単糖濃度をフェノール硫酸法で測定し、それぞれの画分が六単糖として以下の構成糖 [透析前画分、 $\beta$ 1,3 グルカンと  $\beta$ 1,6 グルカン; 透析後画分、 $\beta$ 1,6 グルカン; 残渣、 $\beta$ 1,6 グルカン] を含むものとして計算した。

細胞壁キチン含量は、François の方法を一部改変して行った (François 2006)。まず、アルカリ不溶性画分 20 mg に 1 M 硫酸を加えてよく懸濁し、100°C で 4 時間インキュベートした。4% 水酸化バリウム水溶液で中和した後、沈殿物を遠心除去して上清を回収し、多糖加水分解物溶液を得た。この溶液 500  $\mu$ L にアセチルアセトン溶液 (10% アセチルアセトン、1.25 M 炭酸ナトリウム) 1 mL 加え、100°C で 1 時間インキュベートしたのち、Reissig 試薬 (1% 4-dimethylaminobenzaldehyde, 1.25% HCl) 10 mL を添加して、さらに室温で 1 時間インキュベートした。この溶液の 490 nm における吸光度を測定し、グルコサミンを標準物質とした検量線に照らし合わせることで細胞壁キチン濃度とした。

### 総 RNA 抽出、cDNA 合成および qRT-PCR

総 RNA 抽出は、Sepasol RNA I super G (Nacalai Tesque) を用いて、マニュアルを一部改変して行った。対数増殖期の各菌株を YPD 培地に懸濁して OD = 0.1 とし、必要な試薬を各濃度で加えた上で、37°C で 4 時間振とう培養した。得られた菌体を回収し、滅菌水で 2 回洗浄後、Zymolyase buffer [1.2 M ソルビトール, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)] 1 mL に懸濁し、Zymolyase 100-T を最終濃度 1.0 mg/mL となるように加え、37°C

で1時間インキュベートした。処理後 3,000 rpm で緩やかに遠心して上清を除去し、Sepasol RNA I super G 500  $\mu\text{L}$  に懸濁して、以降は添付文書に記載の方法に従って、総 RNA を抽出した。得られた総 RNA 溶液は、Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, United States) を用いた吸光度値にて濃度および純度を測定した。得られた総 RNA 500 ng を出発物質とし、ReverTra Ace Master Mix (Toyobo, Japan) をマニュアルに従い用いて cDNA 溶液を得た。得られた cDNA 溶液は滅菌水で 10 倍に希釈し、qRT-PCR の鋳型として用いた。

qRT-PCR は、Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いてマニュアルに従い行った。総 RNA より得られた cDNA 希釈液 1  $\mu\text{L}$  を鋳型とし、Thunderbird SYBR qPCR Mix、および Table 2 に示すプライマーを最終濃度 300 nM となるように加えた PCR 反応系を 96-well プレート上に調製した。PCR 機器として StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, United States) を用い、反応条件はマニュアルに従い、(98°C, 5 秒  $\rightarrow$  60°C, 30 秒)  $\times$  40 サイクルとした。解析法は  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法に準じ、*PGKI* 遺伝子をリファレンス遺伝子、DMSO 処理した HETS202 群をリファレンス検体として、各遺伝子の相対発現量を計算した。

## ウエスタンブロッティング

総タンパク質画分の抽出は、酵母からの標準的な抽出プロトコルを一部改変して行った。対数増殖期の各菌株を YPD 培地に懸濁して OD = 0.1 とし、必要な試薬を各濃度で加えた上で、37°C で 4 時間振とう培養した。得られた菌体を回収し、冷滅菌水で 2 回洗浄後、タンパク質抽出 buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1× Complete (Roche, Switzerland), 1× PhosSTOP (Roche)] 100 μL に懸濁した。これにガラスビーズを適量加え、氷冷下ボルテックスミキサーを用いて破碎した後、遠心分離により残渣を除去し、総タンパク質溶液を得た。総タンパク質濃度は、XL-Bradford 試薬 (APRO Science, Japan) を用いて、吸光度法にて測定した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングは、標準的なプロトコルに従って行った。総タンパク質濃度として 4.0 mg/mL になるよう調整した総タンパク質溶液に 2× Sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)、10% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、10% スクロース、0.01% ブロモフェノールブルー]を等量加え、100°C で 5 分間インキュベートした。総タンパク質として 40 μg を含むように 10% ポリアクリルアミドゲルにアプライし、20 mA 定電流にて電気泳動を行った。泳動終了後のゲルから PVDF 膜 (PALL Life sciences Japan, Japan) にタンパク質をセミドライ法にて転写して、転写膜

を得た。転写膜を Blocking One-P (Nacalai Tesque) に浸して室温にて 30 分間振とうした後、各一次抗体(anti-phosphorylated-p44/42 MAP kinase antibody (#4370, Cell Signaling Technology, United States); anti-Pgk1p antibody, (Abcam, United Kingdom)) の 1 万倍希釈溶液に浸して室温にて 1 時間振とうした。その後、HRP 修飾二次抗体 (Promega, United States) の 10 万倍希釈溶液に浸して室温にて 1 時間振とうし、TBS + 0.05% tween20 で 3 回洗浄した後、ECL Plus western blotting detection system (GE Healthcare) にて検出した。

## 顕微鏡観察

対数増殖期の各菌株を YPD 培地に懸濁して OD = 0.1 とし、必要な試薬を各濃度で加えた上で、37°C で 4 時間振とう培養した。培養後集菌し、4% パラホルムアルデヒド溶液に懸濁した後、4°C で 16 時間インキュベートした。得られた菌体を Permafluor (Thermo scientific) を用いてスライドガラスに固定し、微分干渉顕微鏡 BX-53 (Olympus, Japan) にて観察した。

**Table 1. Strain list in chapter 1**

<b>Strain</b>	<b>Parent</b>	<b>Genotype or description</b>	<b>Reference</b>
CBS138	-	<i>C. glabrata</i> type strain, for genome project	
ACG4	2001HT	<i>his3 trp1 PScADH1-tetR-GAL4D::TRP1</i>	
HET80	ACG4	<i>his3 trp1 PScADH1-tetR-GAL4D::TRP1 yku80 ILV2 (P182L)</i>	(Ueno <i>et al.</i> 2007)
HETS202	HET80	<i>his3 trp1 PScADH1-tetR-GAL4D::TRP1 yku80::SAT1 flipper</i>	(Ueno <i>et al.</i> 2007)
tet-KRE5	HETS202	<i>his3 trp1 PScADH1-tetR-GAL4D::TRP1 yku80::SAT1 flipper kre5::CgHIS3</i>	This study
tet-KRE5 $\Delta$ SLT2	tet-KRE5	<i>his3 trp1 PScADH1-tetR-GAL4D::TRP1 yku80::SAT1 flipper kre5::CgHIS3 slt2::hphMX</i>	This study
NAU3	CBS138	<i>ura3</i>	(Niimi <i>et al.</i> 2012)
tet-KRE 5 $\Delta$ URA3	tet-KRE5	<i>his3 trp1 ura3 PScADH1-tetR-GAL4D::TRP1 yku80::SAT1 flipper kre5::CgHIS3</i>	This study

**Table 2. Primers list in chapter 1**

primer name	target	sequence (5'→3')
<b>(for gene cloning)</b>		
p12874F	<i>CgKRE5</i> 5'UTR	TTGTTAAGTG TAGCACCCGAGTATTACTCTGACAAGAAAAGTTTCT ACTAAGAGCCggccgctgatcacg
p12874TR	<i>CgKRE5</i> 5'UTR	TCTGTTTCATCATAACCCTAGCTTCTCATCTAGTGGCACAGGC GAGGCCCTCCTTGACATcgtgaggctgg
p22F	<i>CgKRE5</i> 5'UTR	CAGCTTTATCTCAGAAAACCAG
p12874tcheck	<i>CgHIS3</i>	CCTTTTGCCAGCCTTCTCTG
CgSLT2 5'Fw	<i>CgSLT2</i> 5'UTR	TTTCCTGTCGATATAACCAGGTG
CgSLT2 5'Rv	<i>CgSLT2</i> 5'UTR	GGGACAAGGCAAGCTAAACAGATCTATAACCAATGCGTGTTAA
+hphMX		TGAGA
CgSLT2 3'Fw	<i>CgSLT2</i> 3'UTR	TCGATTTCGATACTAACGCCGCCATTTGGAGATAGAGAGACAT
+hphMX		GCAAA
CgSLT2 3'Rv	<i>CgSLT2</i> 3'UTR	ACAGGTACAAATGCTCTCATCTCC
CgSLT2 3rd Fw	<i>CgSLT2</i> 5'UTR	TACACAAAGCCCAGGGACA
CgSLT2 3rd Rv	<i>CgSLT2</i> 3'UTR	AGCAATGATGACACCTGAGTG
<b>(for Southern blot probe )</b>		
CgKRE5 probe1		
Fw	<i>CgKRE5</i> CDS	ATGAAGTACTGGTTGTTGCTGTTT
CgKRE5 probe1		
Rv	<i>CgKRE5</i> CDS	GGACAACCATAGAATATGACCAA
<b>(for qRT-PCR)</b>		
CgPGK1 593Fw	<i>CgPGK1</i> CDS	CTTTGGAAAACCCAACCAGA

CgPGK1 769Rv	<i>CgPGK1</i> CDS	CGAAGATGGAGTCACCGATT
CgKRE5 2593Fw	<i>CgKRE5</i> CDS	TTGATTGTTGATCCCGTTGA
CgKRE5 2779Rv	<i>CgKRE5</i> CDS	CAAATCCGCCACTCTTCAAT
CgKAR2 945Fw	<i>CgKAR2</i> CDS	CGACTCCTTCGTTGATGGTATCG
CgKAR2 1086Rv	<i>CgKAR2</i> CDS	GATGTCCTTCTTCTCCAAGCCG
CgBAG7 115Fw	<i>CgBAG7</i> CDS	GACGACTCGGAGAAGACAGG
CgBAG7 341Rv	<i>CgBAG7</i> CDS	AGGTACCGCTTGAGCAAAGA
CgYPS1 554Fw	<i>CgYPS1</i> CDS	CTAATGGCGCAAGAGCTACC
CgYPS1 790Rv	<i>CgYPS1</i> CDS	GAAGACCGATACCCAGGACA
CgCHS1 454Fw	<i>CgCHS1</i> CDS	GGTACAACCAGCAGCTCCAT
CgCHS1 703Rv	<i>CgCHS1</i> CDS	GCTCGTTTCCCACAGGATTA
CgGFA1 671Fw	<i>CgGFA1</i> CDS	CCATGGGTAAGCCTGACACT
CgGFA1 868Rv	<i>CgGFA1</i> CDS	TTGGGGAACCATCTTCTGAC

---

### 第三節 結果

*S. cerevisiae* の *KRE5* 遺伝子の塩基配列情報を用いて BLAST 検索を行ったところ、*C. glabrata* において塩基配列相同性の高い遺伝子 *CAGL0E05412g* が見つかった。*CAGL0E05412g* はおよそ 1,326 アミノ酸から成るタンパク質 Cagl0e05412p をコードしており、その推定分子量は 152.3 kDa であった (Fig. 2)。Cagl0e05412p の中央から C 末端側には UGGT 様ドメインと相同性の高いアミノ酸配列が確認され、これは子囊菌門 *Ascomycota* の Kre5p に保存される配列であることがわかった。また N 末端にはシグナルペプチド配列が見られたことから、Cagl0e05412p が小胞体-ゴルジ体-分泌経路のいずれかに局在する可能性が示唆された。以上のことから、*CAGL0E05412g* は他の Kre5p と相同性の高いタンパク質をコードしていることが明らかになった。

## Signal peptide sequence

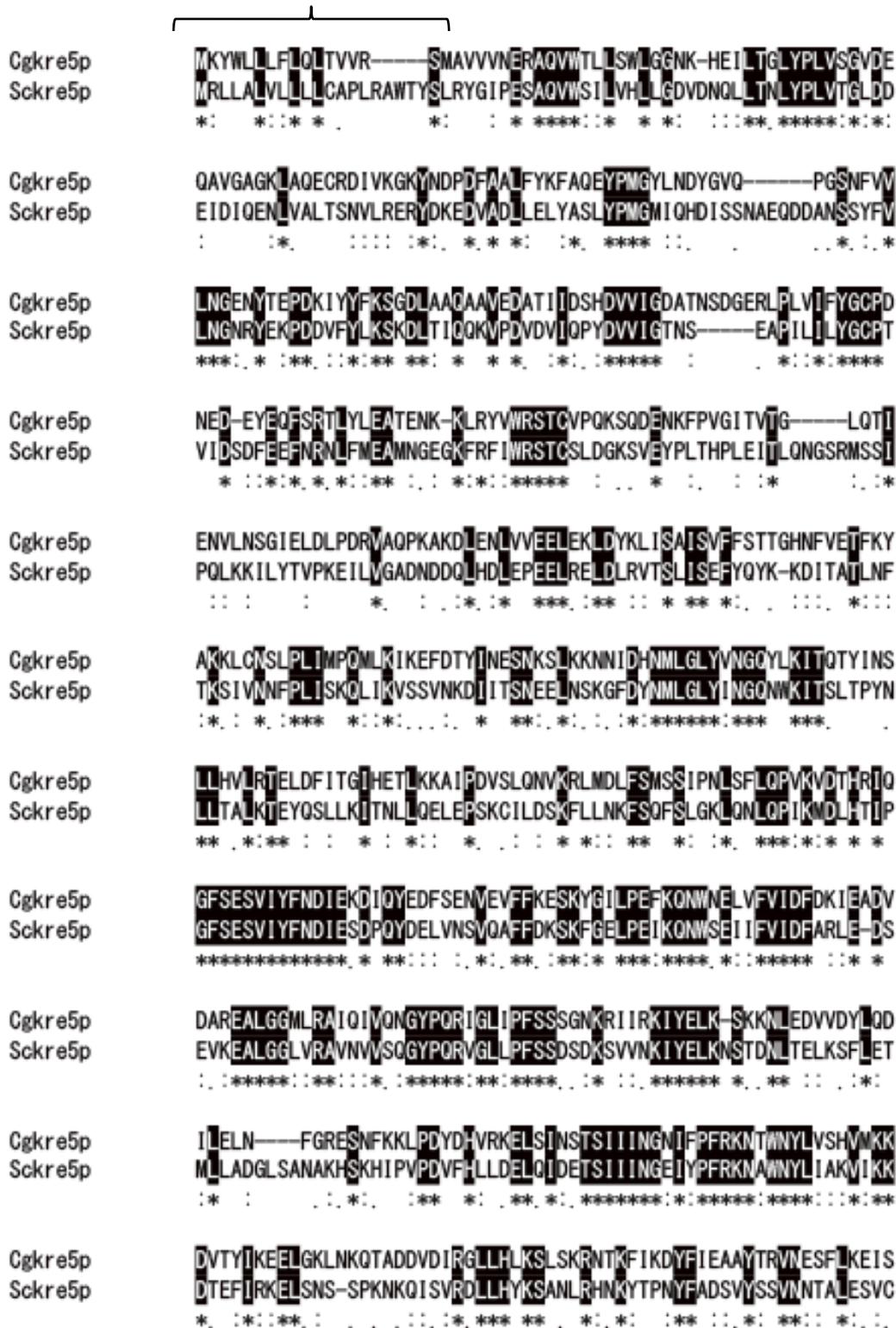
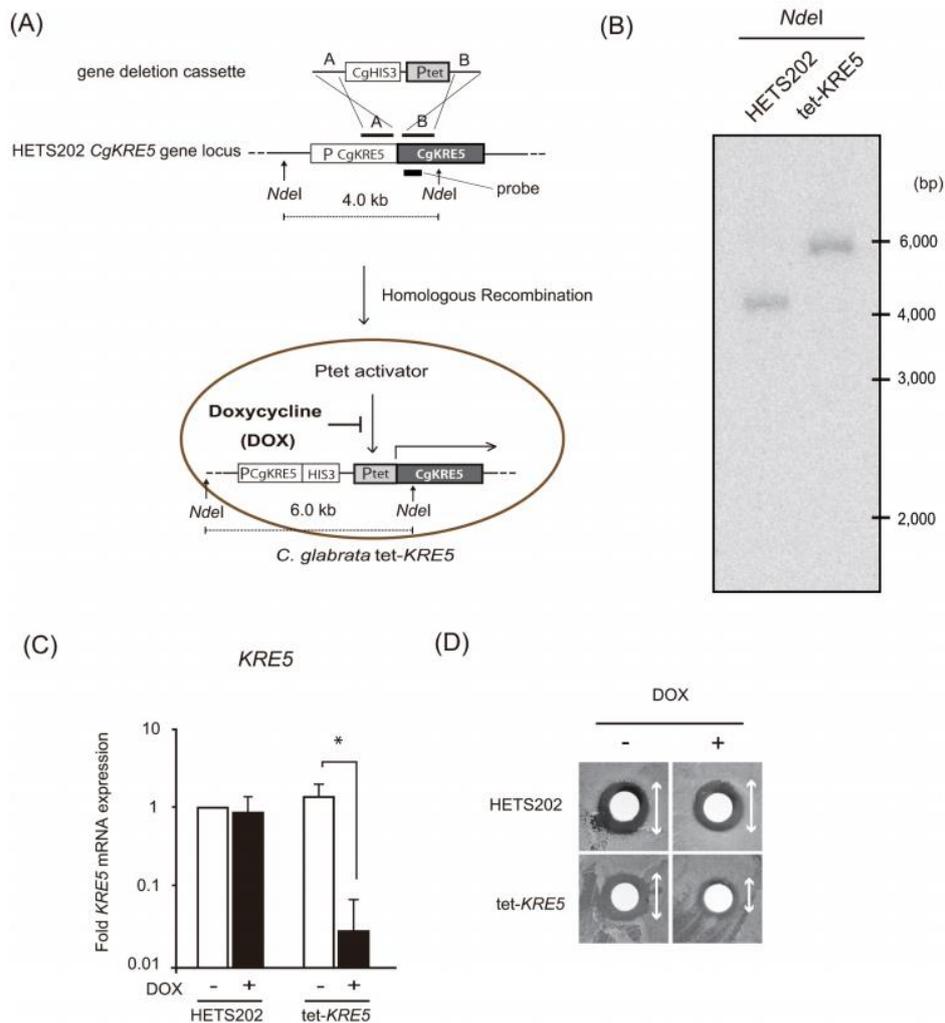


Fig. 2. Sequence analysis of *CgKRE5*.



*CAGL0E05412g* が *C. glabrata* における *UGGT/ KRE5* 遺伝子として機能するかを確かめる目的で、*CAGL0E05412g* 遺伝子推定コード領域の遺伝子欠損株作製を試みた。しかしながら、*CAGL0E05412g* 遺伝子欠損株クローンは得られなかった。先行論文では、他のいくつかの菌種で *UGGT/ KRE5* 遺伝子欠損株の樹立が試みられており、*Schizosaccharomyces pombe* での遺伝子欠損株は生存可能だが、*C. albicans* での遺伝子ホモ変異株や、一倍体 *S. cerevisiae* でのほとんどの亜株では致死であることが報告されている (Meaden *et al.* 1990; Herrero *et al.* 2004; Buzzi *et al.* 2011)。これらのことから、*C. glabrata* では *UGGT/ KRE5* 遺伝子の欠損は致死であると仮定した。そこで次に、テトラサイクリン感受性プロモーターを用いた遺伝子発現抑制株の作製を試みた。まず、*rtTA* を発現するように改変した *C. glabrata* HETS202 株を親株とし、*CAGL0E05412g* 遺伝子の推定コード領域上流に *rtTA* 感受性プロモーター配列を組み込んだ (Fig. 3A)。得られた組み換え体よりゲノム DNA を抽出し、サザンブロット解析を行ったところ、この組み換え体はおよそ 2.0 kb の DNA 配列が挿入されていることを確認できた (Fig. 3B)。この組み換え体をドキシサイクリン (DOX) で処理し、4 時間後の mRNA 発現量を qRT-PCR で確認したところ、組み換え体は DOX 未添加の条件に比べて、*CAGL0E05412g* mRNA の発現量が 1/20 程度に低下していることがわかった (Fig.

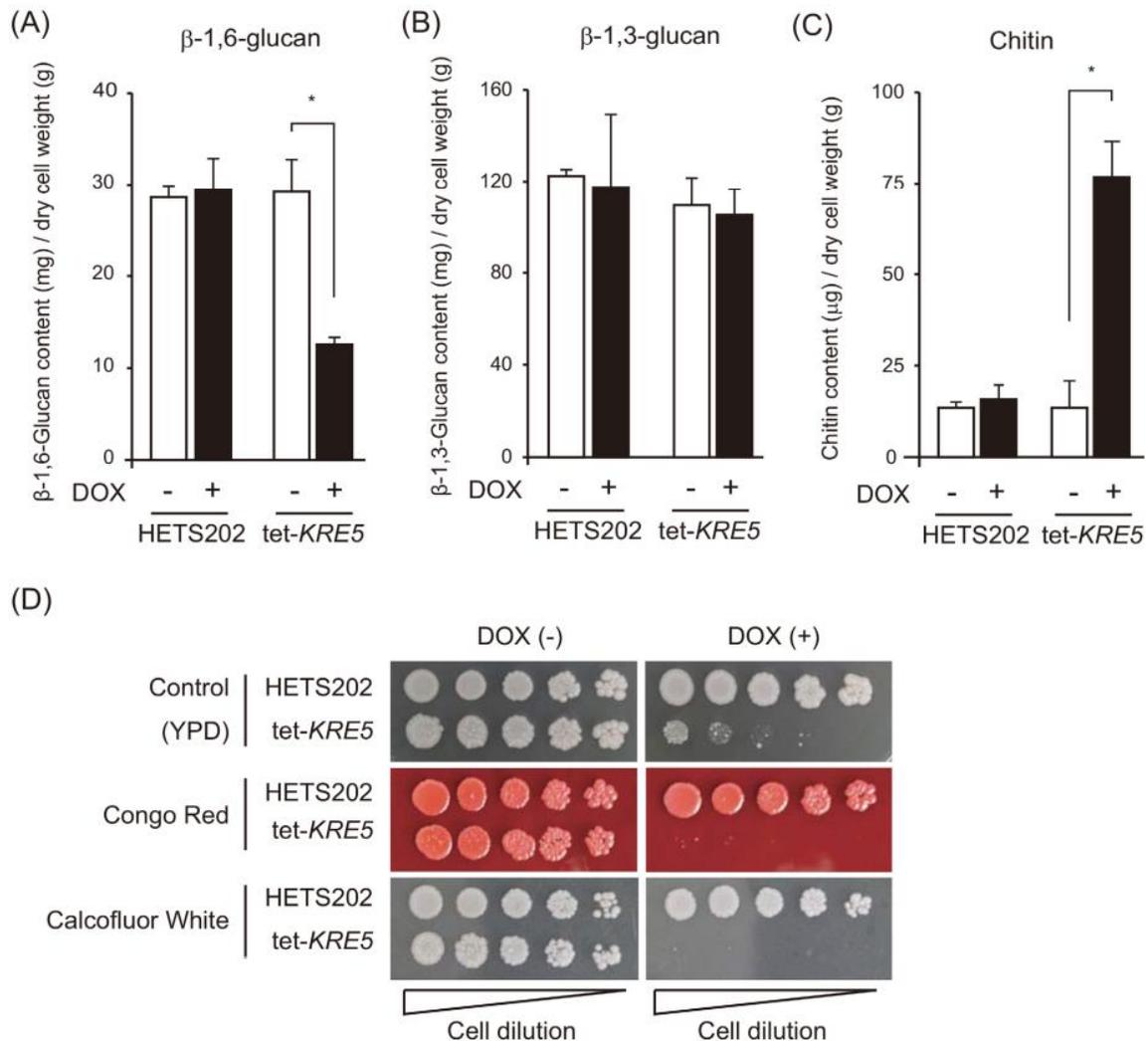
3C)。このことから、得られた組み換え体は、DOX 依存的に *CAGL0E05412g* 発現を転写レベルで抑制できることが明らかになった。この菌株を使って、*CAGL0E05412g* が *KRE* ファミリー遺伝子としての性質を持っているかを確認した。すなわち、*KRE* ファミリー遺伝子は、K-1 キラートキシニン感受性を指標とした変異体スクリーニングによって同定された遺伝子群であり、*KRE* ファミリー遺伝子を欠損する酵母様真菌はキラートキシニン耐性を示すことが知られている (Selvakumar *et al.* 2006)。そこで、DOX を含む培地に組み換え体を播種し、キラートキシニン感受性を確かめたところ、キラートキシニンによる増殖阻止円が小さくなった (Fig. 3D)。このことは、*CAGL0E05412g* が *KRE* ファミリーに属する遺伝子であることを示唆している。以上の結果をまとめると、*CAGL0E05412g* は *S. cerevisiae* の *Kre5p* とアミノ酸相同性が高く、かつ UGGT 様ドメインを持つタンパク質をコードしており、その遺伝子発現を抑制すると、*KRE* ファミリー遺伝子に特徴的な性質を示すことが明らかになった。これらのことから私は、*CAGL0E05412* を *C. glabrata* における *KRE5* 遺伝子であると仮定した。また、得られた組み換え体は、*KRE5* 遺伝子発現抑制株 (tet-*KRE5*) として扱うこととした。



**Fig. 3. Generation of tet-KRE5 cells.**

(A) Schematic representation of the integration of the controllable tet-off promoter. Region A represents the 5' flanking region of the target gene and region B represents the 5' end of the ORF. DNA fragment containing the controllable cassette in which *CgHIS3* and tetO-*ScHOP1* promoter were flanked by regions A and B, was used to transform *C. glabrata* HETS202 cells. (B) Correct integration of the tet-off promoter in the *CgKRE5* promoter locus was confirmed by Southern blot analysis. Genomic DNA isolated from both transformants and HETS202 cells was digested with *NdeI*, and hybridized by *CgKRE5* internal DNA probe. (C) Relative *CgKRE5* expression was determined by performing qRT-PCR. Data are expressed as the mean fold difference between HETS202 and tet-KRE5 cells treated with or without DOX. The value of HETS202 cells without DOX treatment was set as 1. Results are expressed as the mean standard deviation (S.D.) of triplicates; \*,  $p < 0.05$ . (D) Inhibition ring test with K-1 killer toxin. *C. glabrata* cells were streaked on YPD solid medium, and 1 mg mL<sup>-1</sup> of K-1 killer toxin solution was spotted onto paper discs that were then placed on the YPD solid medium inoculated with *C. glabrata*.

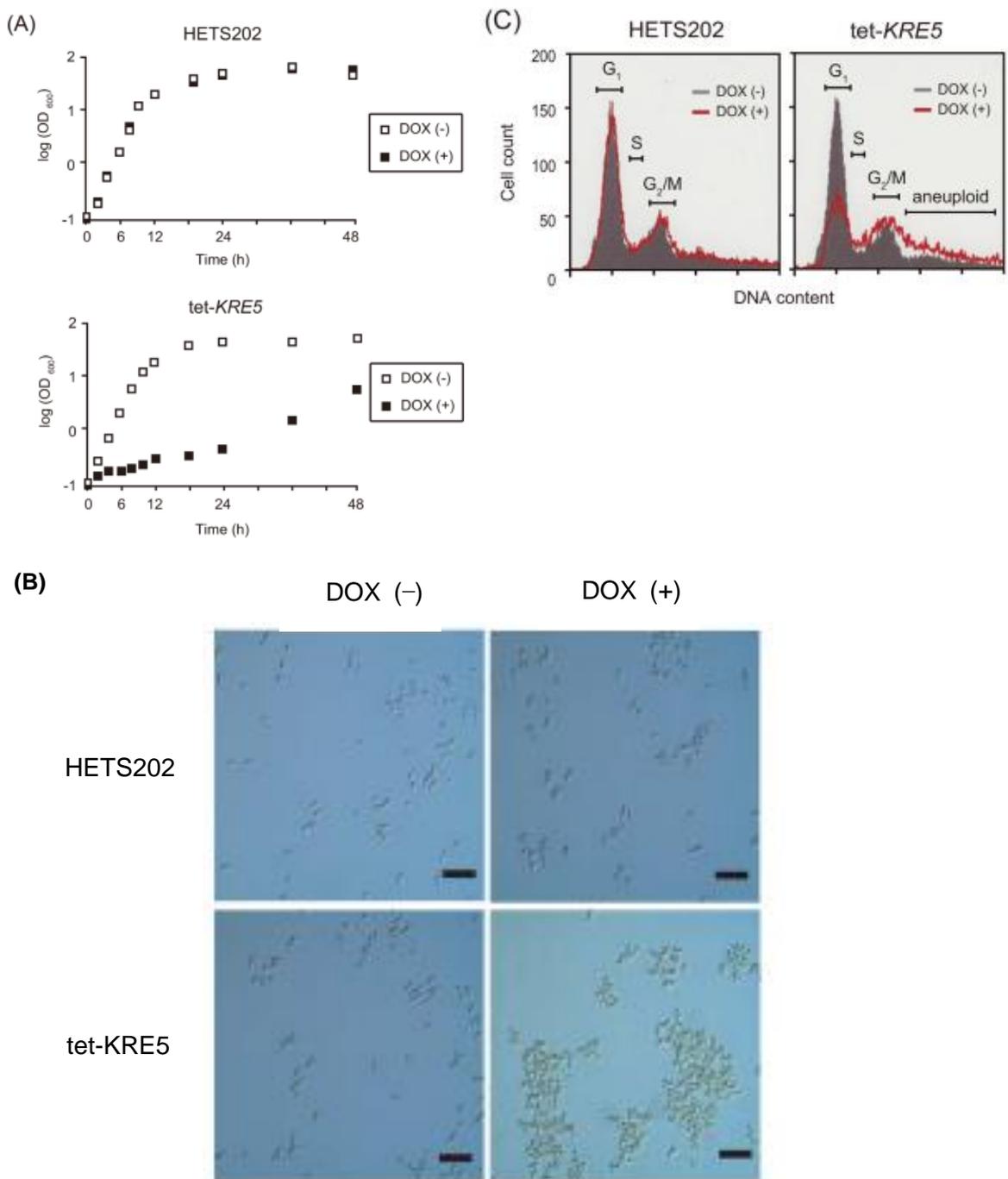
得られた tet-KRE5 株を用いて、まず、*KRE5* 遺伝子の発現抑制が細胞壁構造に与える影響を解析した。その結果、DOX 処理した tet-KRE5 は  $\beta$ 1,3 グルカン含量にはほとんど影響が無かったのに対し、 $\beta$ 1,6 グルカン含量がおよそ 50% 減少していることが明らかになった (Fig. 4A, B)。この結果は、*KRE5* 遺伝子が  $\beta$ 1,6 グルカン生合成に重要な役割を果たしていることを示唆している。一方、細胞壁キチン含量を比較したところ、親株、並びに tet-KRE5 DOX 未添加群に比べて 4 倍程度増加していることがわかった (Fig. 4C)。続けて、代表的な細胞壁障害性薬剤である Congo Red (CR)、および Calcofluor White (CFW) に対する感受性を確かめた。これらの薬剤はそれぞれ細胞壁グルカンやキチンと結合する性質を持ち、細胞壁代謝が正常な細胞では代謝回転と共に除去されるが、各細胞壁の生合成・分解過程に異常があるときに高感受性を示すことが知られている (Roncero and Duran 1985)。CR、CFW を含む培地に tet-KRE5 を播種したところ、いずれの薬剤でも、DOX を含む培地では細胞生育が阻害されることがわかった (Fig. 4D)。以上のことから、*KRE5* 遺伝子の発現抑制により、 $\beta$  1,6 グルカン含量が低下するとともにキチン含量が増加し、かつ、それぞれの代謝回転に異常が生じていることが明らかになった。



**Fig. 4. *CgKRE5* is involved in cell wall morphogenesis.**

Alkali-insoluble  $\beta$ -1,6-glucan (A),  $\beta$ -1,3-glucan (B), and chitin (C) contents in *C. glabrata* cells were measured as the quantity of glucose or glucosamine substituted for the standard curve. Data shown represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations; \*,  $p < 0.05$ . (D) Spot dilution assay was performed using 5  $\mu$ L suspensions at an OD of 0.1, and serially diluted (1:5) cells were spotted on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) plates with or without DOX and were incubated at 37°C. A representative image of three independent experiments is shown.

次に、*KRE5* 遺伝子の発現抑制および細胞壁の構造・代謝異常が、*C. glabrata* の生育に及ぼす影響を評価した。YPD 培地における生育を比較したところ、DOX 存在下、tet-*KRE5* 株の生育速度は、未処理群に比べて顕著に低下した (Fig. 5A)。次に、対数増殖期菌体を採取し、顕微鏡観察したところ、HETS202 や DOX 未処理群では出芽細胞が凝集せず分散していたのに対して、DOX 処理した tet-*KRE5* は多くの細胞が凝集しており、かつ 1 つ 1 つの細胞形態が不均一な様子が観察された (Fig. 5B)。また、フローサイトメトリーを用いて細胞周期解析を行ったところ、DOX 処理した tet-*KRE5* は、未処理群に比べて、 $G_2/M$  期細胞や異数体細胞の割合が多いことが明らかになった (Fig. 5C)。以上の結果から、*KRE5* 遺伝子の発現抑制は細胞同士の凝集と細胞周期の停止をもたらし、結果的に顕著な細胞増殖低下をもたらすことが示唆された。



**Fig. 5. *CgKRE5* repression induces cell growth defect.**

(A) Growth curve of HETS202 and tet-KRE5 cells. Cells were grown in YPD medium supplemented with or without DOX until they reached a stationary phase. Cell growth was recorded by examining aliquots of cell suspension at regular intervals. (B) Microscopic analysis of HETS202 or tet-KRE5 cells. A representative image of three independent experiments is shown; scale bars: 10  $\mu\text{m}$  (C) Flow cytometric analysis was performed using propidium iodide-stained HETS202 (left panel) and tet-KRE5 (right panel) cells treated with or without DOX. A representative image for three independent experiments is shown.

次に、*KRE5* 遺伝子の発現抑制によって CWI 経路が活性化しているかどうか、また細胞壁構造変化に CWI 経路が関与しているかどうかを確かめた。Slt2p は、*C. glabrata* の細胞壁障害に応答して働く MAP キナーゼであり、上流キナーゼによりリン酸化されることで CWI 経路の活性化を統合することが分かっている (Martín *et al.* 2000; Miyazaki *et al.* 2010)。そこでまず、tet-*KRE5* を親株として *SLT2* 遺伝子との二重変異株 (tet-*KRE5*  $\Delta$ *SLT2*) を作製し、tet-*KRE5* 株との比較解析を行った (Fig. 6)。各菌株における Slt2p タンパク質リン酸化体の量を測定したところ、DOX 処理した tet-*KRE5* において、Slt2p リン酸化体が顕著に亢進していることが明らかになった (Fig. 7A)。また、浸透圧刺激感受性 MAP キナーゼである Hog1p (Ene *et al.* 2015) のリン酸化も同様に亢進が認められた。興味深いことに、Hog1p のリン酸化は *SLT2* 遺伝子の欠損によってキャンセルされた。これらのことは、*KRE5* 遺伝子の発現抑制によって、Slt2p MAP キナーゼと Hog1p を介した CWI 経路が活性化していること、さらに Hog1p の活性化は Slt2 経路に依存していることを明確に示唆している。次に、*KRE5* 遺伝子発現抑制の結果観察される  $\beta$ 1,6 グルカン含量減少とキチン含量増加に CWI 経路活性化が作用しているかどうか確かめた。その結果、tet-*KRE5*  $\Delta$ *SLT2* は DOX 処理によるキチン含量増加がほぼ完全に抑制されたのに対し、 $\beta$ 1,6 グルカン含量の減少には影響を与えな

かった (Fig. 7B, C)。以上のことから、*KRE5* 遺伝子の発現抑制に伴うキチン含量の増加は、Slt2 MAP キナーゼを介したの活性化に依存している一方、 $\beta$  グルカン含量の減少は Slt2 非依存的であることが明らかになった。また、それぞれの菌株の生育を比較したところ、DOX 存在下における tet-*KRE5*  $\Delta$ *SLT2* 株の生育は顕著に遅いことがわかった (Fig. 7D)。興味深いことに、真核生物に小胞体ストレスを誘導するツニカマイシン (TM) (Kuo and Lampen 1974) の処理によっても同様に、Slt2p のリン酸化が亢進した (Fig. 7A)。また、TM 単独処理により細胞壁キチン含量が増加すること、その増加は *SLT2* 遺伝子の欠損により抑制されることが明らかになった。さらに、HETS202、tet-*KRE5* は 1.0  $\mu$ g/mL 濃度の TM に耐性であったのに対し、tet-*KRE5*  $\Delta$ *SLT2* は強い感受性を示した。これらのことは、Slt2p を介した CWI 経路の活性化が *KRE5* 遺伝子発現抑制や ER ストレス負荷環境下における *C. glabrata* の生存に重要な役割を果たす一方、ER ストレス負荷によっても Slt2p 経路が活性化することを示唆している。

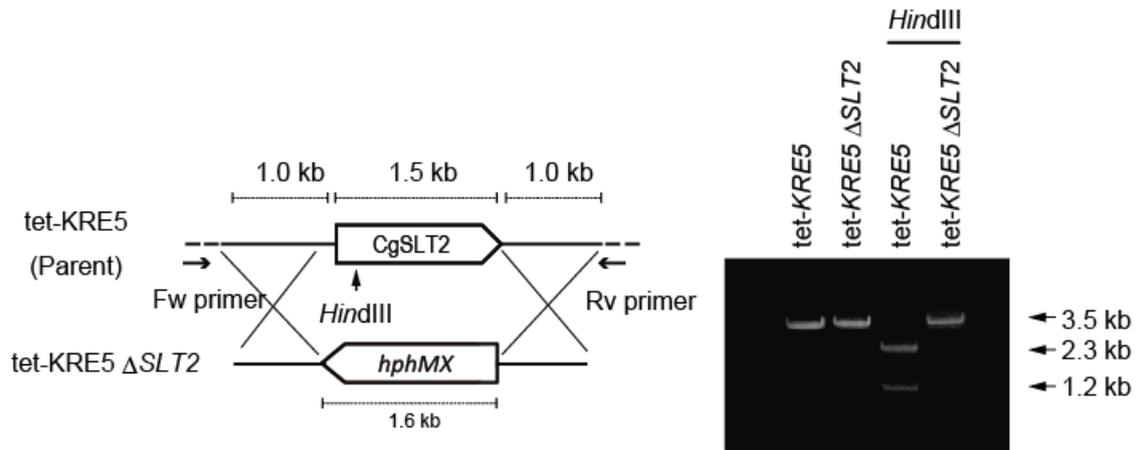
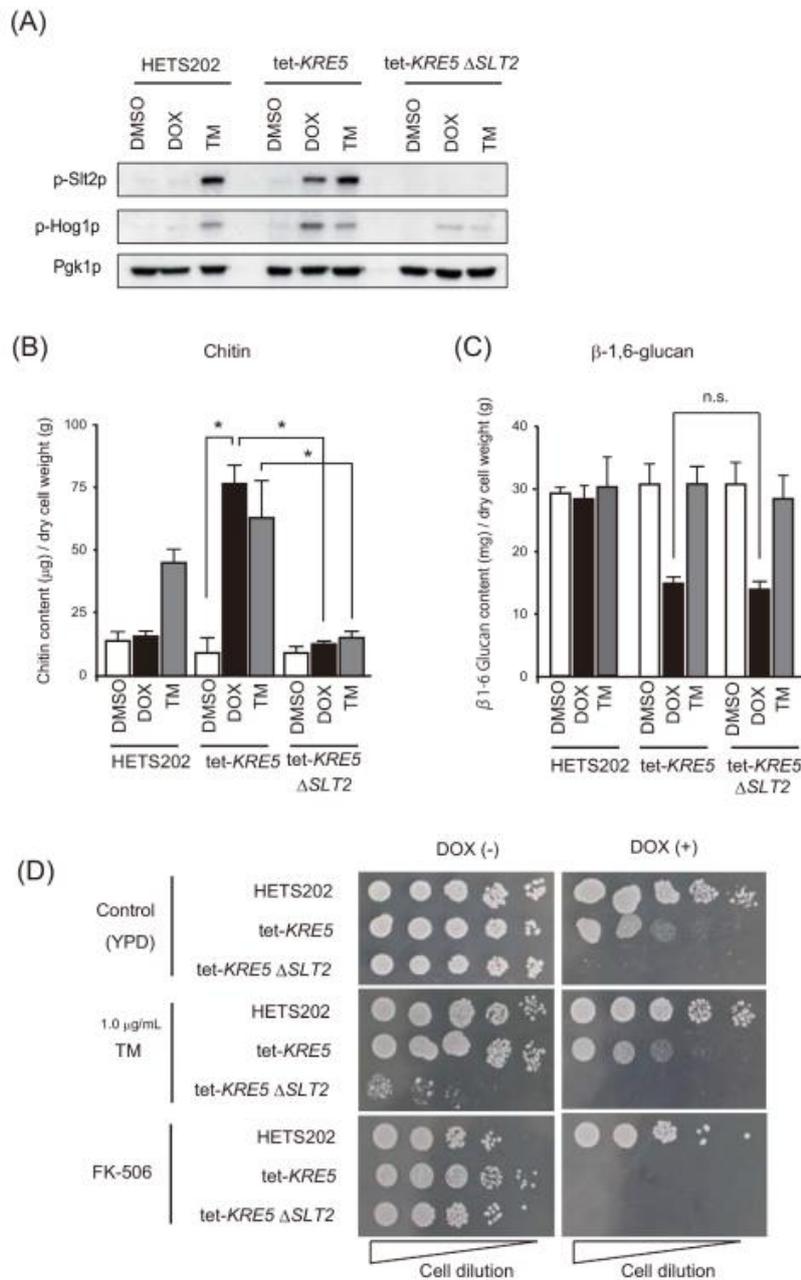


Fig. 6. Knock out confirmation of *SLT2* gene in *tet-KRE5* strain.



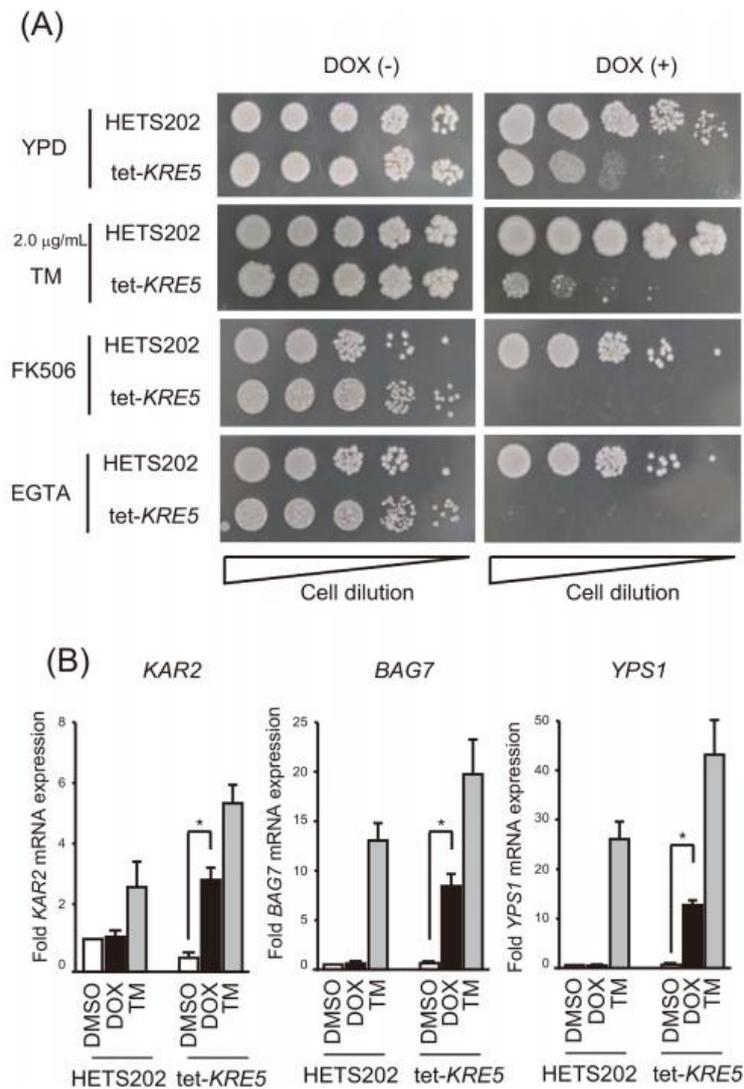
**Fig. 7. *CgKRE5* repression increased cell wall chitin content by activating the CWI-regulating MAP kinase pathway.** (A) Phosphorylation of Slt2p and Hog1p was determined by performing western blotting analysis with antibodies against phosphorylated Slt2p and Hog1p (p-Slt2p and p-Hog1p, respectively). Anti-Pgk1p antibody was used as a loading control. Representative data of three independent experiments are shown; TM, tunicamycin. (B and C) Alkali-insoluble chitin (B) and  $\beta$ -1,6-glucan (C) content in *C. glabrata* cells were measured as the quality of glucose or glucosamine substituted for the standard curve. Data represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations; \*,  $p < 0.05$ . (D) Spot assay was performed using ER stress indicator. For this, 5  $\mu$ L suspensions at an OD of 0.1 and serially diluted (1: 5) cells were spotted on YPD plates with the indicated concentration of reagents incubated at 37°C. A representative image of three independent experiments is shown.

前項の結果を受けて私は、小胞体コシヤペロン *kre5p* の発現抑制により小胞体内に変性タンパク質が蓄積することで ER ストレスが生じ、これを起源として CWI 経路活性化が誘導されているのではないかと仮説を立てた。そこで次に、*KRE5* 遺伝子の発現抑制によって *C. glabrata* 細胞内に ER ストレスが生じているかどうか確かめた。

まず、高濃度の TM (2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 暴露下における生育を比較したところ、親株、並びに DOX 非存在下では生育に影響を及ぼさず、DOX を共存させた tet-*KRE5* 株では、TM 非存在下と比較してやや高い感受性を示したものの、*KRE5* 遺伝子発現抑制による生育と大差が見られなかった (Fig. 8A)。すなわち、*C. glabrata* は、酵母様真菌に唯一見つかる UPR としての *IRE1-HAC1* 経路を欠失しているにも関わらず、TM に対し低感受性であることがわかった。この結果を解釈するにあたり、私は2つの仮説を立てた。すなわち、*C. glabrata* は ① ER ストレスを低減・除去するためのシステムを持たず、恒常的に高いレベルの ER ストレスに曝されている。従って、*C. glabrata* はそもそも、ER ストレスに対してある程度の抵抗性を有しているのではないかと。あるいは、今回用いた濃度の外的な薬剤刺激は生育に影響を及ぼさず、ER ストレスの閾値に達しなかったのではないかと。② *IRE1-HAC1* 経路によらないシグナル伝達経路 (あるいは未知の分子群) が UPR を代替しているのではないかと。そこで次に、

qRT-PCR を用いて、*S. cerevisiae* の *IRE1-HAC1* 経路下流で転写活性化される遺伝子群を比較定量し、*C. glabrata* においてもこれらの遺伝子が発現しているか否かを確認した。*KAR2* は ER 係留シャペロンをコードしており、*S. cerevisiae* では ER ストレス負荷に伴って発現上昇することが知られている (Jung *et al.* 2013)。また *BAG7* は GTPase 活性化タンパク質、*YPS1* は小胞体輸送に関与するプロテアーゼをそれぞれコードしており、いずれも ER ストレス負荷時に Hac1p 下流で転写調節されることが分かっている (Scrimale *et al.* 2009; Miyazaki *et al.* 2011)。これらの遺伝子発現量を測定した結果、*C. glabrata* においても、*KRE5* 遺伝子の発現抑制あるいは ER ストレス負荷によって、これら遺伝子が転写活性化されることが明らかになった (Fig. 8B)。このことは、*IRE1-HAC1* 経路を持たない *C. glabrata* においても、何らかの代替経路により UPR 経路が活性化されていることを示唆している。さらに興味深いことに、これらの菌株にカルシウムキレート剤 EGTA を処理したところ、DOX 共存下における tet-*KRE5* の生育が顕著に低下した (Fig. 8A)。加えて、細胞内カルシウム依存性プロテインホスファターゼ・カルシニューリンの阻害剤である FK-506 を処理したところ、同様に生育が低下することがわかった (Fig. 8A)。重要なことに、これらの薬剤は DOX 非存在下では細胞生育にほとんど影響を与えなかった (Fig. 8A)。以上のことから、*KRE5* 遺伝子

発現抑制によって *S. cerevisiae* と同様の UPR 関連遺伝子が活性化していること、かつ、  
*C. glabrata* の UPR がカルシウムシグナルを介している可能性が示唆された。

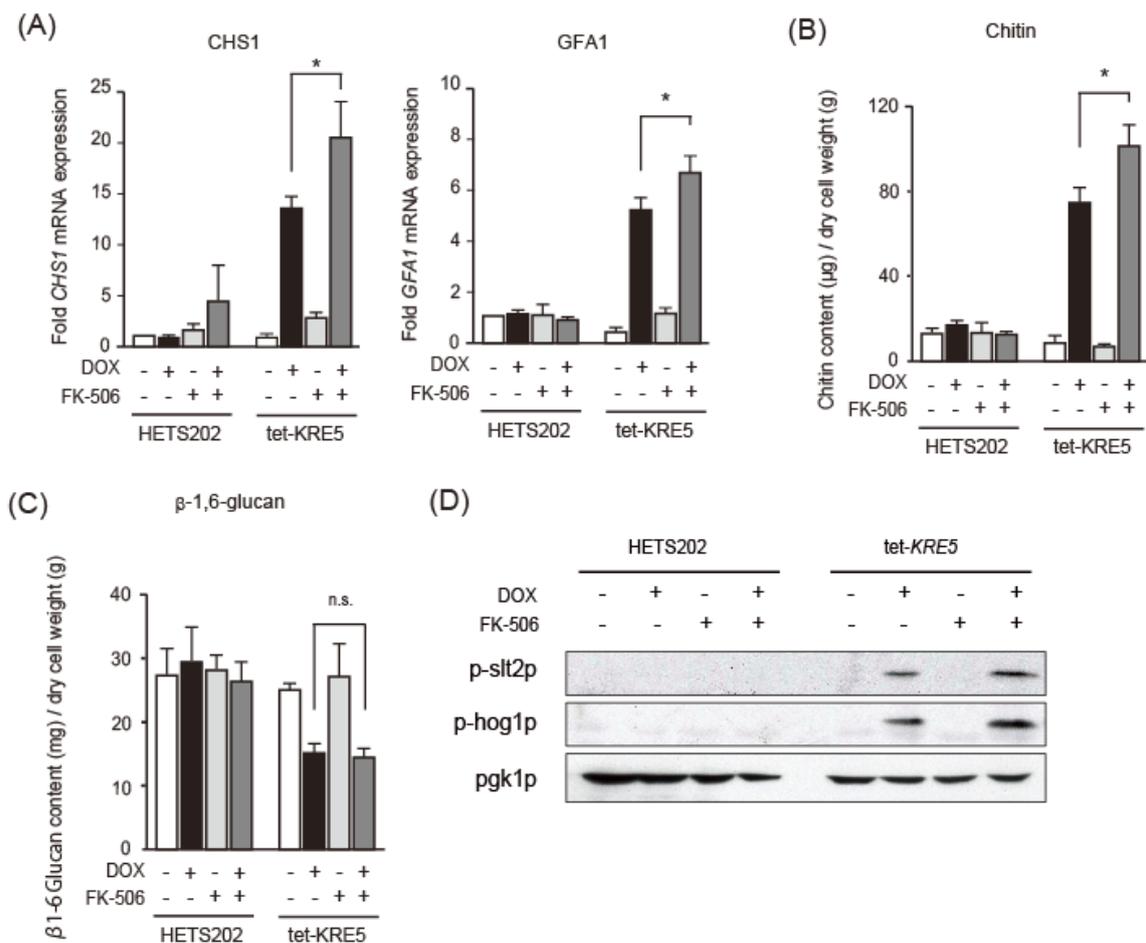


**Fig. 8. Repression of *CgKRE5* induces ER stress in *C. glabrata*.**

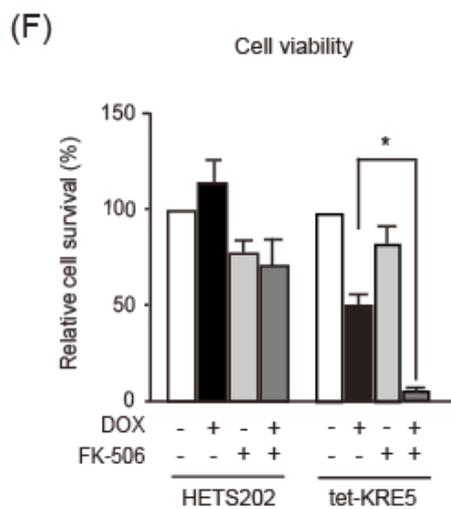
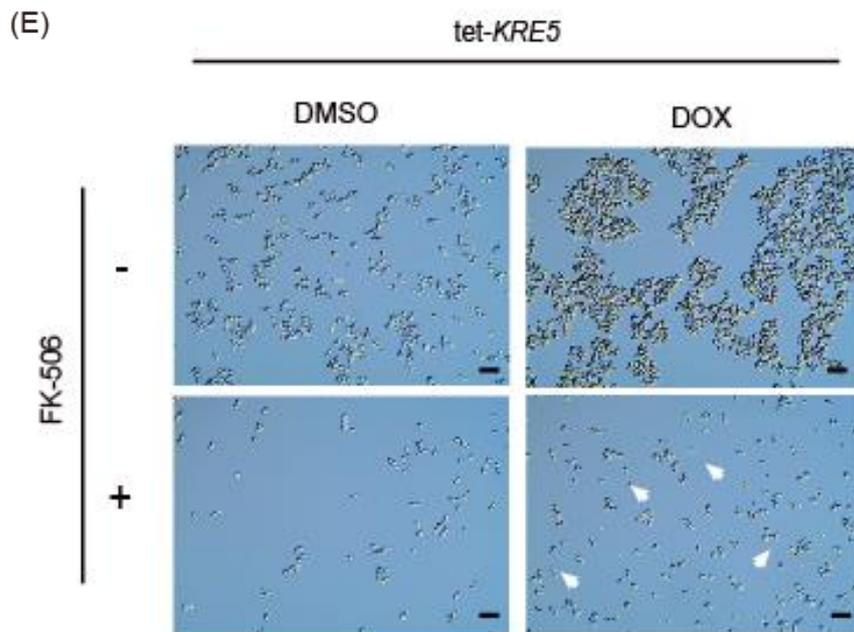
(A) Spot dilution assay was performed using the ER stress indicator. Five-microliter suspensions at an OD of 0.1 and serially diluted (1: 5) cells were spotted on YPD plates with the indicated concentration of reagents incubated at 37°C. A representative image of three independent experiments is shown. (B) qRT-PCR was performed to measure the mRNA expression levels of ER stress-associated genes. Amplification efficiencies were validated and were normalized using that of *PGK1*. Relative mRNA levels were calculated as the ratio of normalized mRNA level to the mRNA level of *PGK1*. Concentration of TM was 1.5 μg/mL. Values are represented as the average of three independent experiments, and error bars indicate S.D.; \*,  $p < 0.05$  compared with DMSO-treated tet-KRE5 cells (Student's *t*-test).

ここまでの検討で、① *KRE5* 遺伝子の発現抑制によって細胞壁キチン含量が増加すること、② キチン含量増加は Slt2p MAP キナーゼ依存性 CWI 経路を介していること、③ Slt2p MAP キナーゼの活性化は TM 処理によっても起こること、④ *KRE5* 遺伝子の発現抑制によって ER ストレスが誘導されること、さらに、⑤ *C. glabrata* では、ER ストレスに対する UPR にカルシウムシグナルが関わっている可能性があることを明らかにした。そこで次に、カルシウムシグナルが *KRE5* 発現抑制に伴う CWI 活性化とどのように相互作用しているかを確かめるため、カルシニューリン阻害剤 FK-506 を用いて検討した。*S. cerevisiae* におけるキチン生合成関連遺伝子のうち、ER ストレスおよび UPR 感受性に誘導される遺伝子である *N*-アセチルグルコサミン転移酵素をコードする *CHS1*、および、キチン生合成経路の律速酵素をコードする *GFA1* に着目した (Munro *et al.* 2001; Lagorce *et al.* 2002)。FK-506 処理条件下におけるこれら遺伝子の発現を測定したところ、tet-*KRE5* 株では DOX 単独処理に比べて、より強い転写活性化が観察された (Fig. 9A)。次に、FK-506 処理下における細胞壁キチン含量を測定したところ、*CHS1*、*GFA1* 遺伝子の転写活性化亢進と相関して、DOX 単独処理に比べてさらに 25% キチン含量が増加した (Fig. 9B)。また予想通りに、FK-506 処理は  $\beta$ 1,6 グルカン含量にはまったく影響しなかった (Fig. 9C)。さらに、Slt2p 並びに Hog1p

のリン酸化レベルを測定したところ、FK-506 処理によってさらに強いリン酸化の充進が認められた (Fig. 9D)。これらのことから、*KRE5* 発現抑制に伴う CWI 活性化は、カルシニューリンシグナルにより一部調節されていることが示唆された。興味深いことに、DOX 処理した tet-*KRE5* 株にさらに FK-506 を処理すると、DOX 単独処理時に見られた細胞の凝集が、細胞形態が不均一なままで、解消されることがわかった (Fig. 9E)。また、FK-506 と DOX を共処理した群は、生細胞の割合が大幅に減少していることがわかった (Fig. 9F)。この結果は、小胞体ストレス誘導条件下における細胞凝集、および生育に、カルシニューリンシグナルが必須であることを示唆している。

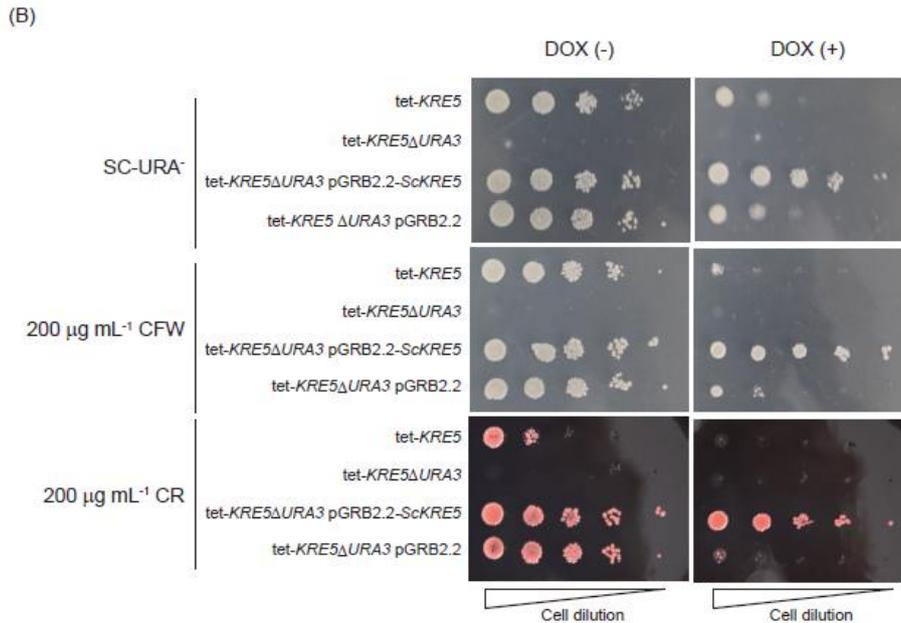
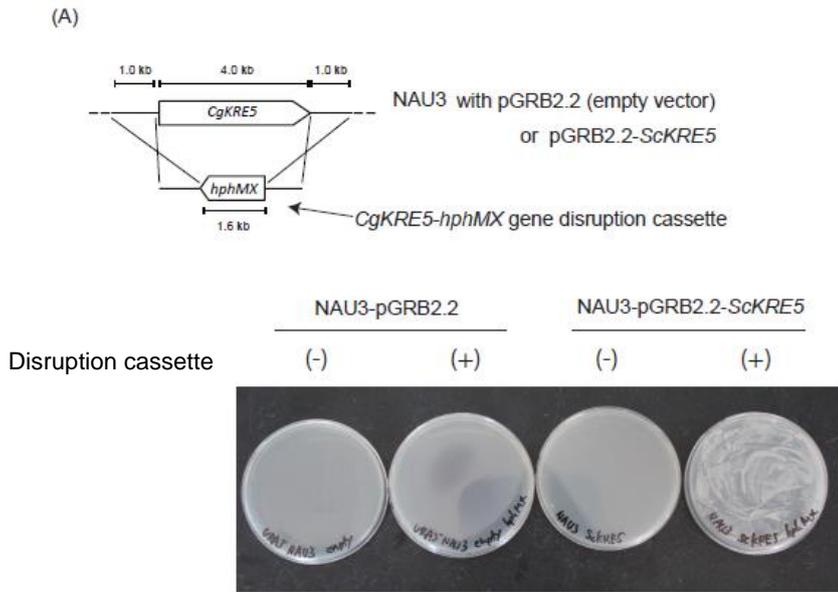


**Fig. 9. Calcineurin inhibitor FK-506 upregulated cell wall chitin synthesis by accelerating Slt2p phosphorylation.** (A) Relative mRNA levels of *CHS1* and *GFA1* were calculated from the ratio of the signal intensities of *GFA1* and *CHS1* mRNAs compared with that of *PGK1* mRNA, which was used as a reference. Values are represented as an average of three independent experiments, and error bars indicate S.D.; \*,  $p < 0.05$ , compared with DOX-untreated tet-KRE5 cells (Student's *t*-test). (B and C) Cell wall composition of *C. glabrata* strains is shown. Alkali-insoluble chitin (B) and β-1, 6-glucan (C) contents in *C. glabrata* cells were measured as the quantity of glucosamine or glucose substituted for the standard curve. Data shown represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations; \*,  $p < 0.05$ ; n.s., not significant. (D) Phosphorylation of Slt2p and Hog1p was determined by performing western blotting analysis with antibodies against p-Slt2p and p-Hog1p, respectively. Anti-Pgk1p antibody was used as the loading control. Representative data are shown of independent experiments is shown.



**(Following) Fig. 9. Calcineurin inhibitor FK-506 upregulated cell wall chitin synthesis by accelerating Slt2p phosphorylation.** (E) Microscopic analysis of tet-KRE5 cells. A representative image of three independent experiments is shown; scale bar: 10  $\mu$ m; white arrow, disrupted *C. glabrata* cells. (F) Relative cell viability analysis of tet-KRE5 cells by counting Trypan blue stained-cells. A value of 100% corresponds to the incorporation of untreated HETS202. Data shown represent the results of at least two independent experiments. Error bars represent standard deviations; \*,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ .

次に、ここまでに観察された CWI への影響が、*C. glabrata* の Kre5p タンパク質機能の違いによるものかどうかを検討した。すなわち、*S. cerevisiae* *KRE5* (*ScKRE5*) 遺伝子を導入することで、*C. glabrata* の *KRE5* 遺伝子 (*CgKRE5*) の欠損あるいは発現抑制を相補できるかを確認した。まず、*ScKRE5* をクローニングして *C. glabrata* 発現プラスミド pGRB2.2 に組み込み、pGRB2.2-*ScKRE5* を作製した。これをウラシル要求性 *C. glabrata* NAU3 株に導入したあとで、*CgKRE5* 遺伝子のノックアウトを試みたところ、*CgKRE5* 遺伝子を欠損する組み換え体が多数得られた (Fig. 10A)。次に、*CgKRE5* 発現抑制の相補実験のために、tet-*KRE5* 株を 5-フルオロオロチジン酸処理し、ウラシル要求性 tet-*KRE5* (tet-*KRE5*  $\Delta$ URA3) を得た。この tet-*KRE5*  $\Delta$ URA3 に pGRB2.2-*ScKRE5* をトランスフォームし、得られた株を DOX、CR、CFW に暴露したところ、pGRB2.2-*ScKRE5* を組み込んだ tet-*KRE5* は、DOX 共存下であっても、CR、CFW 感受性を示さなかった (Fig. 10B)。これらのことから、*CgKRE5* は *ScKRE5* で相補することが可能であることがわかった。すなわち、ScKre5p と CgKre5p の細胞壁生合成過程における機能は、少なくとも単一の遺伝子・タンパク質レベルでは類似していることが示唆された。



**Fig. 10. Complementation of *CgKRE5* knockdown/knockout by expressing *ScKre5p*.** (A) Homologous recombination with *CgKRE5* gene disruption cassette was performed under *ScKre5p* expressing mutant. A *ScKre5p* expression vector pGRB2.2-*ScKRE5* or an empty vector pGRB2.2 was transformed in *C. glabrata* strain NAU3. *CgKRE5* gene disruption cassette was then transformed in these strains and observed whether transformants were obtained. (B) Spot dilution assay was performed using *ScKre5p* expression tet-*KRE5* mutant, tet-*KRE5*Δ*URA3* pGRB2.2-*ScKRE5*. Empty vector pGRB2.2 was also transformed in tet-*KRE5*Δ*URA3* (tet-*KRE5*Δ*URA3* pGRB2.2). Five-microliter suspensions at an OD of 0.1 and serially diluted (1: 5) cells were spotted on SC URA<sup>-</sup> plates with the indicated concentration of reagents incubated at 37°C.

#### 第四節 考察

本章では、*KRE5* 遺伝子発現抑制株を用いた検討によって、*KRE5* 遺伝子の発現抑制が *Slt2* リン酸化を介した *CWI* 経路活性化と細胞壁キチン含量の増加をもたらすこと、同時に *UPR* 関連遺伝子の転写活性化を誘導することを明らかにした。すなわち、*KRE5* 遺伝子の発現抑制によって起こる *Slt2p* の活性化を伴うキチン生合成活性化は、細胞壁異常を引き起こさずに *ER* ストレスを誘導する *TM* によっても誘導されることから、細胞壁ストレスに起因するというよりも、小胞体における *ER* ストレスの蓄積と *UPR* 経路活性化に由来している可能性を示唆している。特筆すべきことに、*ER* ストレスによって起こるカルシウムシグナリングが *KRE5* 遺伝子発現抑制に伴う *CWI* 活性化に関与していること、さらに、カルシニューリンシグナルの抑制によって *CWI* 活性化を更に誘導することも明らかになった。このことは、*C. glabrata* においてはカルシウムシグナリングが *ER* ストレスを介した *CWI* 調節に一部関与している可能性を示唆している。

以上の結果をまとめ、*KRE5* 遺伝子発現抑制に伴う細胞壁構造変化と *CWI* 経路活性化の仮説モデルを Fig. 11 に示す。*Kre5p* は小胞体に局在し、*Cne1p* と協調して糖タンパク質の品質管理を担っており (Taylor *et al.* 2003)、細胞壁前駆体や細胞壁多糖合成

酵素の供給を通して、正常な細胞壁構造保全に関わっていると考えられる (Fig. 11A)。

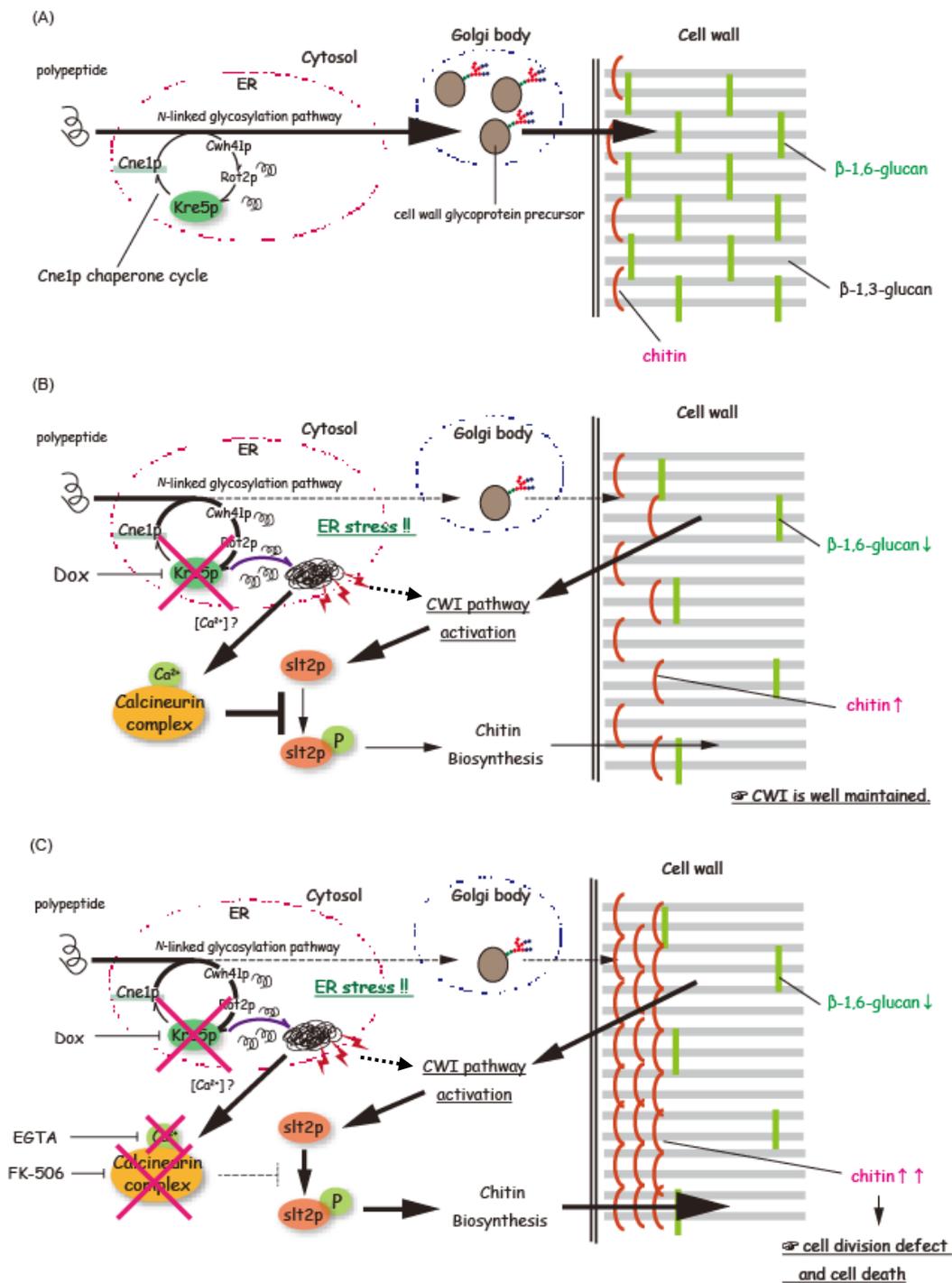
$\beta$ 1,6 グルカンは正常な細胞壁  $\beta$  グルカン層の構築に必須の構造であり、かつ Kre5p は  $\beta$ 1,6 グルカン合成に重要な遺伝子であることから (Levinson *et al.* 2002)、Kre5p の機能異常は  $\beta$  グルカン構造に重大な悪影響を及ぼす。一方、Kre5p 機能異常や TM の暴露に起因してミスフォールドタンパク質が増加すると、ER ストレスを誘導すると共に小胞体からカルシウムイオンが漏出し (Krebs *et al.* 2015)、細胞質カルシニューリン経路などカルシウムシグナリングが活性化する。 $\beta$  グルカン構造異常に起因した細胞壁ストレスと ER ストレスは、細胞内部 Slt2 MAP キナーゼを介した CWI 経路を活性化し、キチン生合成関連遺伝子 *CHS1* や *GFA1* を転写活性化することでキチン生合成亢進を促す。また、カルシニューリン複合体は Slt2p CWI 経路の活性化レベルを直接的、あるいは間接的に調節することで、適切なキチン合成量を決定しているのではないかと推察される (Fig. 11B)。従って、FK-506 や EGTA によって細胞内カルシウムシグナリングを阻害することで、*C. glabrata* の正常な CWI を攪乱し、細胞の凝集や正常生育を大幅に減弱させる (Fig. 11C)。

一方、Kre5p の機能や役割から鑑みると、Fig. 11 に示すモデルは、*KRE5* 遺伝子の発現抑制のみならず、ほかの関連タンパク質や遺伝子の異常によっても成立する可能

性があることを示唆している。Kre5p は、多くの真核生物において UGGT として機能しており、カルネキシン様タンパク質と協調して、小胞体内の糖タンパク質品質管理を担っている (Meaden *et al.* 1990; Taylor *et al.* 2003, 2004)。カルネキシンは小胞体に局在する分子シャペロンであり、フォールディングが正常に成立しなかった変性糖タンパク質のリフォールディングを実行する。一方、Kre5p/ UGGT は、変性糖タンパク質に糖鎖タグを付加する働きを有し、この過程はカルネキシンによる認識・結合に必須である (Taylor *et al.* 2003, 2004)。このことから、Kre5p の発現抑制や機能不全は、カルネキシン様タンパク質を介した変性糖タンパク質リフォールディング過程の異常をもたらすことが容易に予想されるが、これは *KRE5* 遺伝子の発現抑制によって ER ストレスマーカーの発現上昇が観察された結果ともよく一致する (Fig. 8)。すなわち、本研究で観察された現象が、*KRE5* 遺伝子に特徴的な現象なのか、あるいは、カルネキシンシャペロンの機能不全によっても誘導されるのか、はたまた、糖タンパク質品質管理異常によって誘導される広範な現象なのかを解明するには、更なる検討が必要である。

また本章では、*KRE5* 遺伝子発現抑制に伴う CWI 経路活性化に対するカルシウムシグナリングの阻害効果を検討した。しかしながら、仮説モデルに従うならば、小胞体

糖タンパク質品質管理機構や糖タンパク質分泌経路の異常についても同様に、カルシウムシグナリング阻害が効果的である可能性が高い。本章で観察された現象が、*KRE5* 遺伝子発現抑制に固有なのか、あるいは小胞体糖タンパク質品質管理機構や分泌経路の異常に起因する普遍的な現象なのかを明らかにすることは、*C. glabrata* の CWI 経路を正しく理解するために重要な一歩となるだろう。



**Fig. 10. A model showing the roles of the CWI and calcineurin pathway in response to *CgKRE5* repression.**

(A) During normal cell growth, Kre5p serves as a chaperone cycle member for the proper folding of N-linked glycoprotein required for the cell wall synthesis in ER. (B) *CgKRE5* repression induces CWI and UPR. The calcineurin pathway acts as a coordinating role for maintaining an appropriate chitin content in *CgKRE5* repression-mediated CWI. (C) FK-506 prevents the calcineurin pathway and induces an imbalance in cell wall structure.

## 第二章

### 小胞体-ゴルジ体-分泌経路関連遺伝子の欠損により誘導される小胞体 ストレス応答と *Candida glabrata* の細胞壁保全性制御機構に関する解析

#### 第一節 序論

$\beta$  グルカン障害時の細胞壁キチン生合成活性化は、最もよく観察される CWI 反応のひとつである。エキノキャンディン系薬剤の作用点は細胞壁  $\beta$ 1,3-グルカン合成酵素の阻害であり、*C. glabrata* に対して最少発育阻止濃度付近で使用すると、細胞壁キチン生合成を活性化させることが報告されている (Chamilos *et al.* 2007; Shields *et al.* 2011)。興味深いことに、小胞体-ゴルジ体-分泌経路上で  $\beta$ 1,6-グルカンの合成に関わる可能性のある遺伝子のいくつかは、その欠損によってキチン含量の増加をきたすことが知られている (Boone *et al.* 1990; Shahinian *et al.* 1998)。このようなキチン生合成活性化は、膜結合型細胞壁センサー Wsc1p や Wsc2p が  $\beta$ -グルカン構造異常を感知した後で、Pkc1p や Slit2p など MAP キナーゼのリン酸化を介して起こることが分かっている (Jung and Levin 1999; Jin *et al.* 2013; Kock *et al.* 2015)。一方、小胞体-ゴルジ体-分泌経路上では、細胞壁多糖合成に関わる膜型糖転移酵素、ならびに細胞壁前駆体が生

合成される。これらは輸送小胞に乗って細胞膜、細胞壁、あるいはペリプラスム間隙に輸送され、細胞外で細胞壁部分代謝に関与している。従って、小胞体-ゴルジ体-分泌経路のトラフィック異常は、正常な細胞壁生合成に重大な影響を与え、かつこれを相補するために CWI 経路活性化が誘導されることは容易に予想される。第一章の通り、小胞体にて糖タンパク質品質管理を担うコシャペロン Kre5p の発現を mRNA レベルで抑制すると、ER ストレス蓄積や CWI の活性化を引き起こす(Tanaka *et al.* 2016)。

Kre5p は、小胞体において糖タンパク質、すなわち細胞壁前駆体や膜型糖転移酵素の生合成を正常に保つためのカルネキシンシャペロンサイクルを形成している。このことは、Kre5p の発現抑制によって、カルネキシンサイクルの正常な働きが阻害されることで、① 細胞壁前駆体の正常な合成および輸送を抑制し、間接的な細胞壁ストレスを誘導する、また ② 小胞体ストレス蓄積に応答して、UPR を誘導する、という二つの現象が同時に起きていることが考えられる。一方、*KRE5* 遺伝子発現抑制に伴うキチン生合成活性化が、上記 ①② のどちらに起因して誘導されるのか、あるいは ③ Kre5p の発現抑制に特異的な現象なのかについての検討は不十分であった。

そこで本章では、Kre5p と協調してカルネキシンサイクルを形成する Cne1p をコードする *CNE1* 遺伝子に着目して解析を行った。Cne1p は小胞体に局在する分子シャペ

ロンであり、Kre5p や Rot2p などのコシャペロンと協調してカルネキシンサイクルを形成し、小胞体内における糖タンパク質前駆体のリフォールディングを司っている (Herscovics 1999; Molinari *et al.* 2004)。 *S. pombe* では、実に 30% もの糖タンパク質がカルネキシンサイクルによってリフォールディングされると考えられている (Parlati *et al.* 1995)。このことから、*CNE1* 遺伝子の欠損は、*KRE5* 遺伝子の発現抑制と同様に、カルネキシンサイクルの機能不全と ER ストレスの蓄積を起こすと考えられるが、*C. glabrata* における *CNE1* 遺伝子はまだ見つかっていなかった。従って、*CNE1* 遺伝子欠損株 (*cne1Δ*) における ER ストレス蓄積、細胞壁構造、CWI 活性化の程度を測定し、TM を用いた薬剤性 ER ストレス負荷による影響と比較しながら、カルネキシンサイクル阻害が *C. glabrata* の CWI に及ぼす影響の評価を試みた。

## 第二節 方法

### タンパク質一次構造解析

*Candida glabrata* の推定 Cne1p (Candida Genome Database ID: Cagl0d00242gp)、*Saccharomyces cerevisiae* の Cne1p (Calnexin Cne1p, Saccharomyces cerevisiae Genome Database ID: S000000054)、*Candida albicans* の推定 Cne1p (Candida Genome Database ID: C4\_04090cp\_a)、および *Schizosaccharomyces pombe* の Cnx1 (Calnexin Cnx1, Pombase ID: SPAC3C7.11c) のアミノ酸配列情報は NCBI から入手し、T-COFFEE ver. 11.00 (<http://tcoffee.crg.cat>) でアラインメント解析した。得られたデータは、ESPrnt 3.0 (<http://esprint.ibcp.fr/ESPrnt/ESPrnt>) を用いて画像処理した。

### 使用菌株および培養条件

本実験に使用した菌株は Table 3 に示した。各菌株は YPD 培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 乾燥酵母エキス) あるいは SD 培地 (2% グルコース、0.17% yeast nitrogen base、0.5% 硫酸アンモニウム、2% drop out Mix) の液体培地あるいは寒天培地にて 37°C で培養した。

## 遺伝子変異株および相補株の作製

各遺伝子変異株は、KUE100株を親株とし、PCR法により作製したDNAカセットの遺伝子導入と相同組み換えによって作製した。用いたプライマーとプラスミドはそれぞれTable 4、5に示した。プラスミドpHIS906 (Nakayama *et al.* 1998) を鋳型とし、各遺伝子欠損株を作製するためのプライマーペア (CAGL0D00242g, p12880F と p12880KR; CAGL0K06963g, p10532F と p10532KR; CAGL0M04169g, p12957F と p12957KR; CAGL0I08855g, p12038F と p12038R) を用いてPCR法にて増幅した。得られたDNA断片を酢酸リチウム法にてKUE100株にトランスフォーメーションし、ヒスチジン選択培地にてコロニーを形成させた。目的遺伝子の挿入は、PCR法にて確認した。

CNE1 遺伝子相補株は、目的遺伝子を挿入した *C. glabrata* 発現プラスミド pGRB2.2 を導入して作製した。*C. glabrata* および *S. cerevisiae* の CNE1 遺伝子をそれぞれ PCR 法で増幅し、得られた DNA 断片を *SalI* および *XbaI* で消化し、同様に消化した pGRB2.2 とライゲーションした。得られたプラスミドを酢酸リチウム法にて KUE100 株にトランスフォーメーションし、ウラシル選択培地にてコロニーを形成させた。

## mRNA 抽出および qRT-PCR

(第一章第二節に準ずる。また、使用したプライマーは Table 4 に示した。)

## 菌体アルカリ不溶性画分の調製および細胞壁組成分析

(第一章第二節に準ずる。)

## ザイモリエース感受性試験

定常増殖期の菌株を PBS に懸濁して OD=1.0 とし、さらに Zymolyase 100-T を最終濃度 1 mg/ mL となるように加え、37°C にて 1 時間振とうした。時間経過ごとに菌懸濁液を一部取り、経時的に OD を測定した。

## スポットアッセイ

37 °C にて終夜培養した菌液を  $2.0 \times 10^8$ / mL に調製し、さらに 5 倍希釈系列を 4 点まで作製した。希釈した菌液を 5  $\mu$ L ずつ YPD 寒天培地上にスポットし、37°C にて 48 時間インキュベート後に観察した。なお、必要に応じて、以下の薬剤をそれぞれの濃度で添加した。200  $\mu$ g/ mL CFW; 200  $\mu$ g/ mL CR; 100 ng/ mL FK-506; 1 mM EGTA

## 顕微鏡観察

対数増殖期の各株を YPD 培地に懸濁して OD = 0.1 とし、必要な試薬を各濃度で加えた上で、37°C で 4 時間振とう培養した。培養後集菌し、4% パラホルムアルデヒド溶液に懸濁した後、4°C で 16 時間インキュベートした。得られた菌体を Permafluor (Thermo scientific) を用いてスライドガラスに固定したのち、1 M KOH 溶液と CFW 溶液を 1 滴ずつスポットして封入し、微分干渉顕微鏡 BX-53 (Olympus, Japan) にて観察した。

## ウエスタンブロッティング

(第一章第二節に準ずる。)

## フローサイトメトリー

(第一章第二節に準ずる。)

## 抗真菌薬感受性試験

抗真菌薬感受性試験は、酵母様真菌 DP ‘栄研’ (Eiken Chemical Co., Japan) を用いて、添付のマニュアルに従い、吸光度法にて行った。すなわち、1 ウェルあたり  $1 \times 10^3$  個の菌を含むものとし、 $35^\circ\text{C}$  にて 24 時間培養後に観察した。アムホテリシン B の MIC は 100% 生育阻害 ( $\text{MIC}_{100}$ ) を、それ以外の薬剤は 50% 生育阻害 ( $\text{MIC}_{50}$ ) を指標とした。

**Table 3. Strains used in Chapter 2**

<b>Strain</b>	<b>Parent</b>	<b>Genotype or description</b>	<b>Reference</b>
<i>(Candida glabrata strain)</i>			
CBS138	-	<i>C. glabrata</i> type strain, for genome project	(Dujon <i>et al.</i> 2004)
KUE100	2001H	<i>Cghis3::Scura3 FRT-YKU80</i>	(Ueno <i>et al.</i> 2007)
<i>cne1Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cgcne1(CAGL0D00242g)::Cghis3</i>	This study
<i>cne1Δ::CNE1</i>	<i>cne1Δ</i>	<i>Cghis3::Scura3 FRT-YKU80 Cgcne1::Cghis3</i> <i>Cghis3::hphMX-Cgcne1</i>	This study
<i>cne1Δura3Δ</i>	<i>cne1Δ</i>	<i>Cghis3::Scura3 Cgcne1::Cghis3 ura3<sup>-</sup></i>	This study
<i>rot2Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cgrot2 (CAGL0K06963g) ::Cghis3</i>	This study
<i>kre1Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cgkre1 (CAGL0M04169g)::Cghis3</i>	This study
<i>kre11Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cgkre11 (Cgtrs65,</i> <i>CAGL0I08855g)::Cghis3</i>	This study
<i>mnn2Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cgmnn2 (CAGL0I04532g)::Cghis3</i>	(Ito <i>et al.</i> , under revision)
<i>mnn11Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cgmnn11 (CAGL0G07491g)::Cghis3</i>	(Ito <i>et al.</i> , under revision)
<i>hoc1Δ</i>	KUE100	<i>Cghis3::Scura3 Cghoc1 (CAGL0F00297g)::Cghis3</i>	(Ito <i>et al.</i> , under revision)
<i>(Saccharomyces cerevisiae strain)</i>			
BY4742	-	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> 1998)
<i>Scrne1Δ</i>	BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Scrne1::Schis3</i>	This study

**Table 4. Primers used in Chapter 2**

Primer name	Target	Sequence (5'→3')
p12880F	<i>Cgcn1</i>	AGATTCAAAATTTAGAATAATACTCACACTTTAGTACTATTGTTTAA
	5'UTR	TCTATCGATggccgctgatcacg
p12880KR	<i>Cgcn1</i>	ATAATACCAAGGTGATCAGAGCATCTTGTAGGGCGTCTCATTGTGAT
	3'UTR	ATATGTTTAcatcgtgagctgg
p10532F	<i>Cgrot2</i>	TGTAGCTATCGCGAATCCAAAGTGTGGTAAACTCCTGAATAATCCAT
	5'UTR	GCAAAGAAGGGCCGCTGATCACG
p10532KR	<i>Cgrot2</i>	AATGTGCATAAACTAATTATAATGATCATACTAATTCATAATAGCTG
	3'UTR	TTCAATTCACATCGTGAGGCTGG
p10532orfF	<i>Cgrot2</i>	CGTGACCGCTTTCGCAGATT
	ORF	
p10532orfR	<i>Cgrot2</i>	GCAGACAGAGTACCTGAACTATC
	ORF	
p12957F	<i>Cgkre1</i>	GCGCGTATATAAAGAAAGGATAAGTCAACACCGGGGGCCAATAGGT
	5'UTR	ATCTACTACCGGCCGCTGATCACG
p12957KR	<i>Cgkre1</i>	GCGGGAAGTGAAATGTGTGTCTCTGTGGTGAGTTAAATAATGAAT
	3'UTR	GCAACGGCGCATCGTGAGGCTGG
p12957orfF	<i>Cgkre1</i>	GTACCACCACGGGTACTACT
	ORF	
p12957orfR	<i>Cgkre1</i>	GCGGCTGCAGGGTCAACA
	ORF	
p12038F	<i>Cgkre11</i>	CTGTAACACTACCACTGAGTAAACTGGGTTACGCCTTCGGAATTGA
	5'UTR	GTGAGGTCTGGCCGCTGATCACG

p12038R	<i>Cgkre11</i> 3'UTR	CCTTCTTATGAGTATATTCTATATAAAAAATGCAAAGAGAGATGTAT ATATAGTGCCATCGTGAGGCTGG
p12038orfF	<i>Cgkre11</i> ORF	GAGACAGTTCTGACGATGAAATGCTG
p12038orfR	<i>Cgkre11</i> ORF	GTGCCGTATTTCGAAGCCTCA
CgPGK1 593Fw	<i>Cgpgk1</i> CDS	CTTTGGAAAACCCAACCAGA
CgPGK1 769RV	<i>Cgpgk1</i> CDS	CGAAGATGGAGTCACCGATT
CgKAR2 945Fw	<i>Cgkar2</i> CDS	CGACTCCTTCGTTGATGGTATCG
CgKAR2 1086Rv	<i>Cgkar2</i> CDS	GATGTCCTTCTTCTCCAAGCCG
CgBAG7 115Fw	<i>Cgbag7</i> CDS	GACGACTCGGAGAAGACAGG
CgBAG7 341Rv	<i>Cgbag7</i> CDS	AGGTACCGCTTGAGCAAAGA
CgYPS1 554Fw	<i>Cgyps1</i> CDS	CTAATGGCGCAAGAGCTACC
CgYPS1 790Rv	<i>Cgyps1</i> CDS	GAAGACCGATACCCAGGACA

---

**Table 5. Plasmids used in this study**

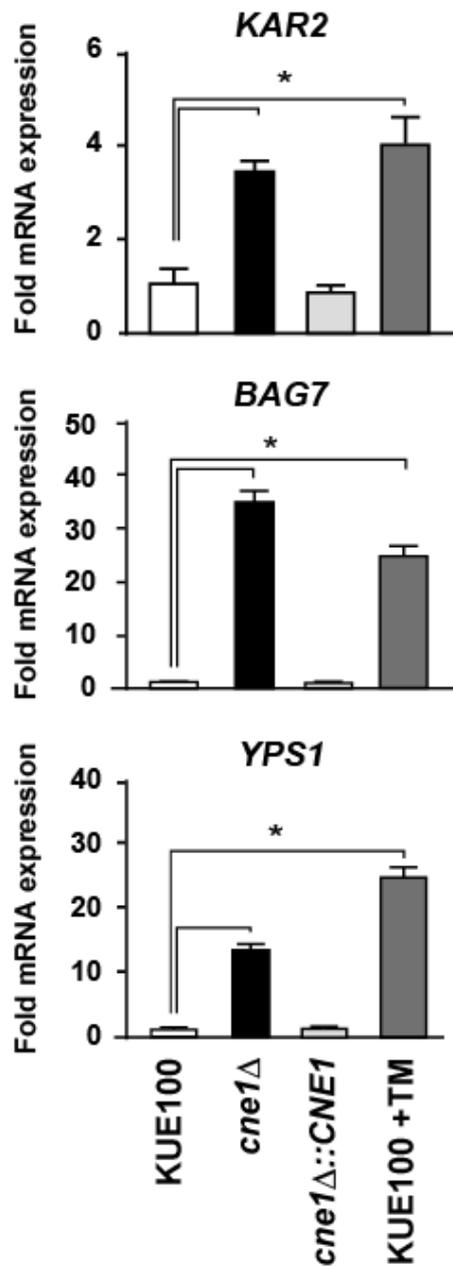
<b>Plasmid name</b>	<b>Description</b>	<b>Reference</b>
pGRB2.2	Expression vector for <i>C. glabrata</i> , which has <i>PGK1</i> promoter from <i>S. cerevisiae</i>	(Zordan <i>et al.</i> 2013)
pGRB2.2-ScCNE1	CDS of <i>S. cerevisiae CNE1</i> has introduced into pGRB2.2	This study
pGRB2.2-CgCNE1	CDS of <i>C. glabrata CNE1</i> has introduced into pGRB2.2	This study

### 第三節 結果

アミノ酸配列検索の結果、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、および、*Schizosaccharomyces pombe* のカルネキシン/カルレティキュリン様タンパク質、すなわち Cne1p/ Cnx1p と相同性の高い配列をコードする遺伝子 *CAGL0D00242g* が同定された。*C. glabrata* の *CNE1* (*CgCNE1*) と定義したこの遺伝子は、382 アミノ酸残基から成るタンパク質 *CgCne1p* をコードすることが推定された (Fig. 12)。これは、近縁種の Cne1p に比べてかなり短い (*S. cerevisiae* Cne1p は 502 残基、*C. albicans* C4\_04090C は 581 残基、*S. pombe* Cnx1p は 560 残基) もの、N 末端側にはレクチン様領域を、また中程から C 末端側に掛けて 2 つの酸性アミノ酸残基、175D と 285D を有していることがわかった (Fig. 12, 緑包囲線および黒矢印)。これらはカルネキシン様タンパク質によく保存されている構造である。一方、*CgCne1p* はシャペロン活性に必要とされるプロリンリッチ領域 (Fig. 12, マゼンタ包囲線) を欠失していることもわかった。



CgCne1p の欠失が内因性に ER ストレスの蓄積や UPR を起こすかどうかを確かめるため、CgCNE1 欠損株 (*cne1Δ*) および CgCNE1 相補株 (*cne1Δ::CNE1*) を作製して解析した。また、小胞体ストレス誘導剤 TM を処理した群を陽性コントロールとして用いた。その結果、*cne1Δ* は TM 処理群と同様に、代表的な UPR 標的である *KAR2*、*BAG7*、*YPS1* の mRNA が転写活性化していることがわかった (Fig. 13)。また、*cne1Δ::CNE1* ではこれらの転写活性化が抑制された。このことから、CgCNE1 遺伝子の欠損により、ER ストレスの蓄積や UPR が起きることがわかった。

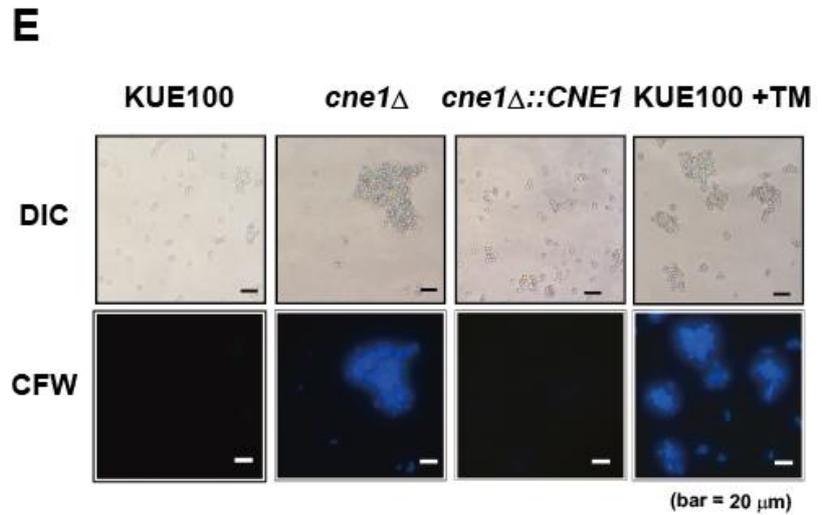
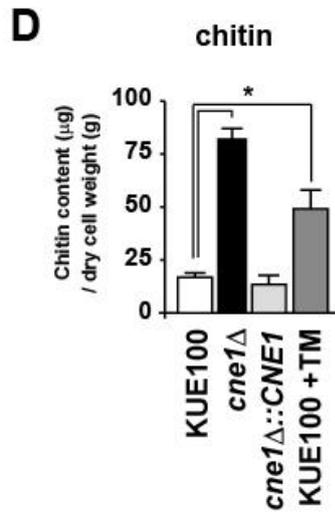
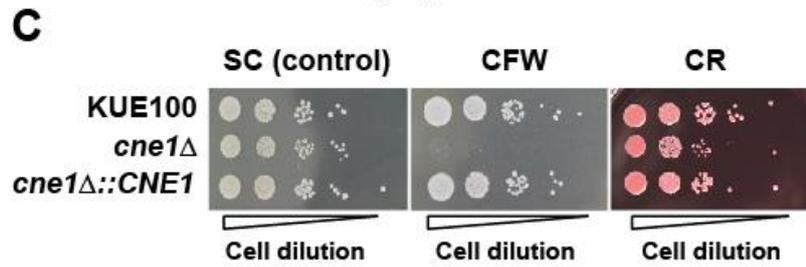
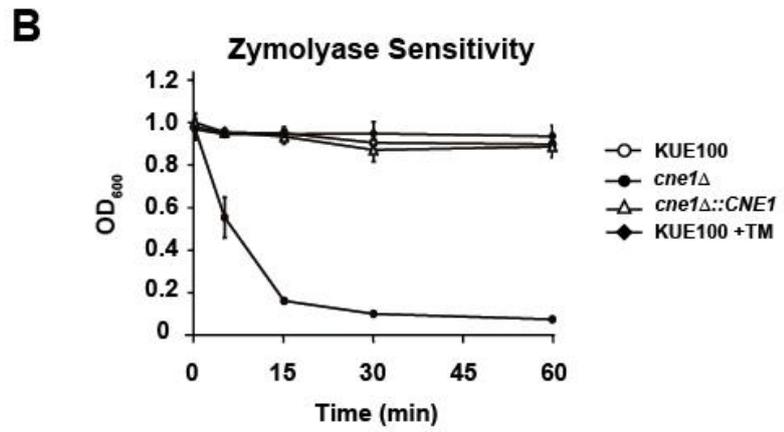
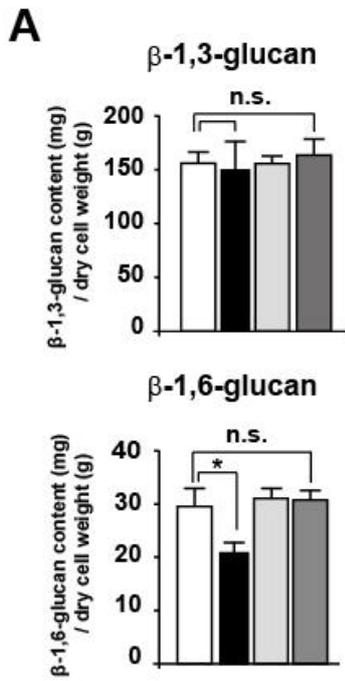


**Fig. 13. *CgCNE1* disruption induces ER stress in *C. glabrata*.**

Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis was performed to determine transcript levels of the ER stress-mediated gene expression. Amplification efficiencies were validated and normalized against *PGK1* levels. The relative transcript levels were calculated as the ratio of the normalized transcript level to that of *PGK1*. Values represent the average of three independent experiments and the error bars indicate the standard deviation (S.D.). Asterisks indicate  $P < 0.05$  compared to KUE100 cells (Student's *t*-test).

続いて、*cne1Δ* および TM 処理群における細胞壁組成を調べた。まず、細胞壁  $\beta$  グルカン含量を測定したところ、 $\beta$ 1,3 グルカン含量は各株間で差が見られなかったものの、 $\beta$ 1,6 グルカン含量は *cne1Δ* では 25% 程度低下していることが明らかになった (Fig. 14A)。一方、TM 処理群では、 $\beta$ 1,6 グルカン含量の低下は認められなかった。これらの株について  $\beta$ 1,3 グルカナーゼである Zymorylase -100T に対する感受性を確かめたところ、*cne1Δ* は高感受性を示した一方で、野生株および TM 処理群はほとんど感受性を示さなかった (Fig. 14B)。これを支持するように、*cne1Δ* は、細胞壁キチン障害性薬剤である CFW に対して高感受性を示した (Fig. 14C)。これらの結果は、*cne1Δ* では細胞壁グルカン構造の支持に重要な  $\beta$ 1,6 グルカン糖鎖含量が減少しており、細胞壁  $\beta$ -グルカン構造が脆弱化していることを示唆している。重要なことに、TM 処理群では  $\beta$ 1,6 グルカン含量の低下は観察されなかった。このことは、 $\beta$ 1,6 グルカン含量の低下は ER ストレスに起因しないことを示唆している。続けて、細胞壁キチン含量を測定したところ、*cne1Δ*、TM 処理群ともに、大幅な増加が観察された (Fig. 14D)。これと対応して、*cne1Δ* および TM 処理群の両方でキチン結合色素 CFW 陽性の細胞が大幅に増加し、かつ高度に凝集した像が観察された (Fig. 14E)。以上の結果は、小胞

体ストレスが起こすキチン生合成活性化と細胞凝集は、細胞壁ストレスと独立して誘導されていることを示唆している。



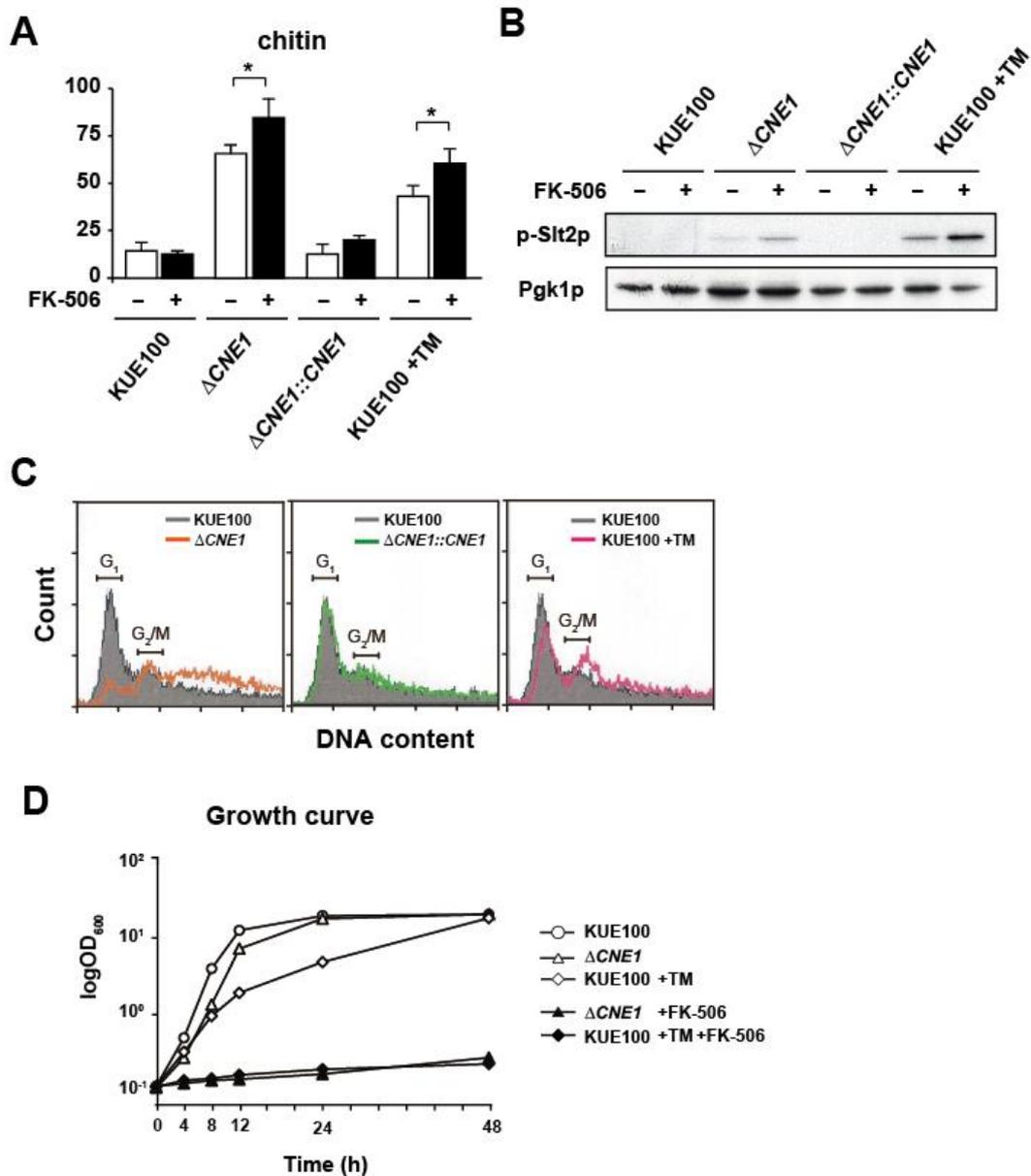
**Fig. 14. Both *cne1Δ* and TM-treated KUE100 cells exhibit cell wall chitin accumulation, but β-1,6-glucan is decreased only in *cne1Δ*.**

(A) Alkali-insoluble β-1,6-glucan and β-1,3-glucan in *C. glabrata* cells were measured as glucose quantity substituted for the standard curve. The data shown represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations. \* $P < 0.05$ , n.s.: not significant. (B) Zymolyase assay was performed at 37 °C. Turbidity of cell culture (OD<sub>600</sub>) was measured at indicated time points. (C) Spot dilution assay performed using 5 μL suspensions at an OD of 0.1. Serially diluted (1:10) cells were spotted on agar plates and incubated at 37 °C. A representative example of three independent experiments is shown. SC; SC medium control. (D) Alkali-insoluble chitin in *C. glabrata* cells was measured as glucosamine quantity substituted for the standard curve. The data shown represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations. \* $P < 0.05$  (E) Microscopic observation of KUE100 and *cne1Δ* strains. A representative example of three independent experiments is shown. DIC: Differential Interference Contrast microscopy, CFW: Calcofluor White staining of the *C. glabrata* strain, Scale bars = 20 μm.

次に、ER ストレスで誘導されるキチン生合成活性化がどのようなメカニズムで起こるのか、またどのような意義があるのかを考察するために、*C. glabrata* に特徴的な UPR 経路阻害が生育に及ぼす影響やキチン生合成への影響を、*cne1* 欠損株と TM 処理株とで比較した。第一章にて検討した通り、我々は、*KRE5* 遺伝子を発現抑制することにより、カルシニューリン経路下流で制御される CWI 経路を活性化されることを明らかにしている。一方、*S. cerevisiae* や *C. albicans* では、*Kre5p* と *Cne1p* が協調して小胞体内糖タンパク質品質管理を担うとされている (Shahinian *et al.* 1998; Herrero *et al.* 2004)。これらのことから、*C. glabrata* における *CNE1* 遺伝子の欠損は、*KRE5* 遺伝子の発現抑制と同様の表現型を示すのではないかと考えた。そこで、*cne1* 欠損、あるいは TM 処理条件下における ER ストレス誘導、および CWI 経路活性化におけるカルシニューリン経路の寄与を調べた。結果として、カルシニューリン阻害剤 FK-506 の処理によって、*cne1* 欠損株および TM 処理群の両方で、キチン生合成のさらなる活性化が観察された (Fig. 15A)。さらに、CWI 経路の中核を担う MAP キナーゼである *Slr2p* タンパク質のリン酸化はさらに亢進していることが明らかになった (Fig. 15B)。これらの結果は、*KRE5* 遺伝子の発現抑制によって観察された事象と一致しており (第一章、Fig. 9B, D)、*cne1* 遺伝子欠損、および、*KRE5* 遺伝子発現抑制によるキチン

生合成活性化は、ER ストレス暴露により誘導される CWI 経路活性化に依存すること、さらにカルシニューリン経路を介して制御されていることが示唆された。また、*cne1* 欠損株および TM 処理群は野生株に比べて G<sub>2</sub>/M 期の細胞集団の割合が多いと共に生育が極端に遅く、さらに、これら生育に関わる表現型は FK-506 処理によってより増強された (Fig. 15C, D)。これらの結果は、*KRE5* 遺伝子発現抑制に伴う生存性の低下が FK-506 処理によって増強される実験的事実と矛盾しない (Fig. 9F)。従って、*C. glabrata* は ER ストレスに応答して細胞周期を遅らせたり凝集したりすることで ER ストレスに耐えようとしており、かつカルシニューリンはこれらの応答を司る役割をしていると考えられる。

また、*cne1* 欠損株は、上市されているいくつかの抗真菌薬、特にミカファンギンやアゾール系薬剤に対してより低い MIC を示した (Table 6)。細胞壁を構成する要素の一部はこれら抗真菌薬の重要な標的であることから、*cne1* 遺伝子の欠損は細胞壁微細構造の更なる変化を誘導している可能性が示唆された。



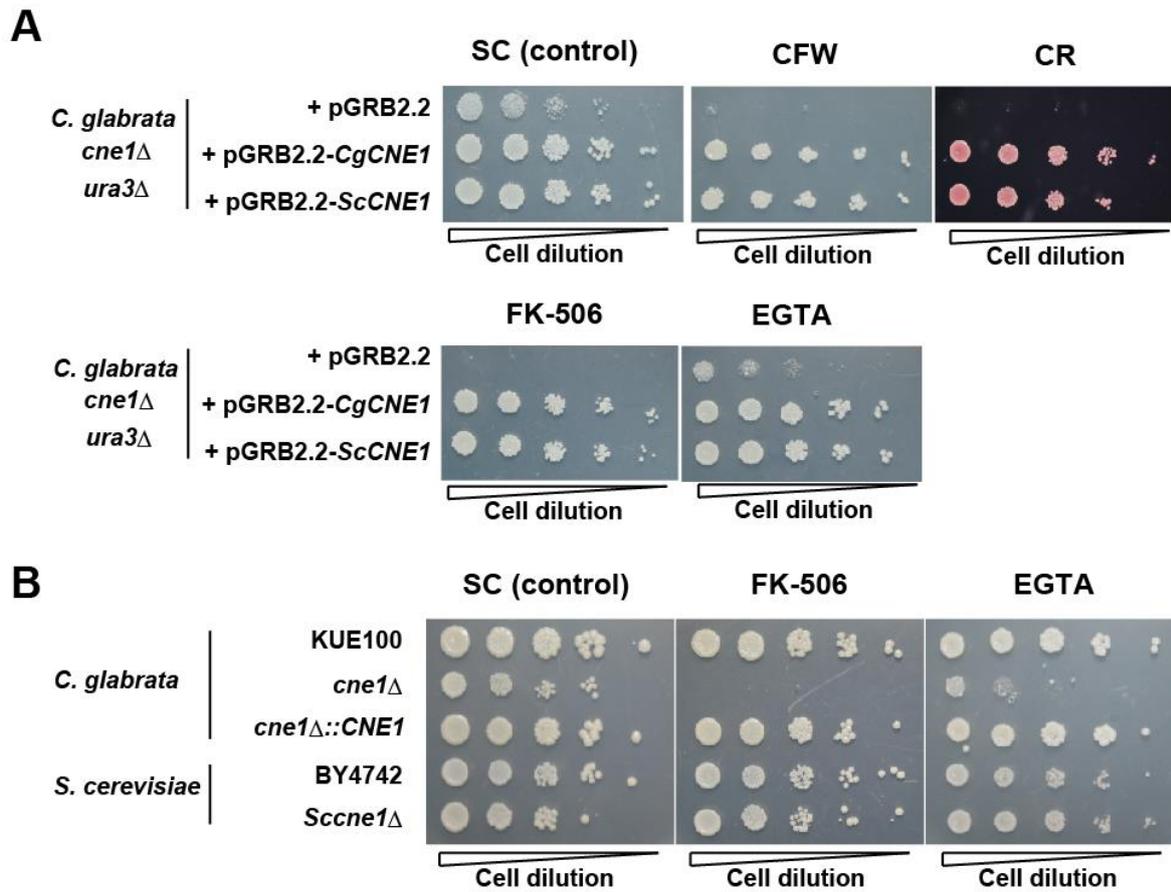
**Fig. 15. Treatment with FK-506 disrupts CWI pathway activation in both *cne1* $\Delta$  and TM treated KUE100 cells.** (A) Alkali-insoluble chitin in *C. glabrata* cells was measured as glucosamine quantity substituted for the standard curve. The data shown represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations. \* $P < 0.05$ . (B) Phosphorylation of Slt2p was determined by western blot. The amount of Pgk1 in cell lysates was determined using an anti-Pgk1p antibody as loading control. Data representative of three independent experiments are shown. (C) Flow cytometry analysis was performed using propidium iodide-stained *C. glabrata* cells treated or non-treated with TM. A representative example of three independent experiments is shown. (D) Growth curves of KUE100 and *cne1* $\Delta$  strains with or without TM or FK-506 treatment. Cells were grown in SC medium at 37 °C until stationary phase. Growth was recorded by taking aliquots at regular intervals.

**Table 6. Drug sensitivity of the *cne1*Δ strain**

Strain	MIC (μg/mL)							
	Micafu ngin	Caspofu ngin	Amphot ericin B	Flucyto sine	Flucona zole	Itracona zole	Voricon azole	Micono zole
KUE100	0.03	1	1	<0.04	16	1	0.5	0.5
<i>Δcne1</i>	<0.015	1	0.5	<0.04	8	0.25	0.12	0.12

次に、*CNE1* 遺伝子の欠損により起こるカルシニューリン経路を介した応答が、*C. glabrata* に特徴的な応答なのかどうかを調べた。前述の通り、近縁種 *S. cerevisiae* では細胞壁ストレスに応答した UPR として *IRE1-HAC1* 経路が働くことが想定されているが、*C. glabrata* では未成熟 *HAC1* mRNA の選択的スプライシング機構が欠損していることが分かっている (Miyazaki *et al.* 2013)。そこで、*CNE1* 遺伝子の欠損により生じる細胞応答とカルシニューリン経路の関与を、*C. glabrata* と *S. cerevisiae* を比較して検討することとした。まず、*C. glabrata cne1* 欠損株に *C. glabrata* の *CNE1* (*CgCNE1*) を相補した株、および *S. cerevisiae* の *CNE1* (*ScCNE1*) を相補した株をそれぞれ作製し、CFW と CR を含む培地に暴露した。その結果、*ScCNE1* 遺伝子を相補した *C. glabrata* 株は、*CgCNE1* 遺伝子を相補した株と同様に、CFW と CR を含む培地上での生育が完全に回復した (Fig. 16A)。また、FK-506 およびカルシウム選択的キレート剤 EGTA の存在下における生育も同様に回復した。これらの結果は、少なくとも *C. glabrata* 細胞内では、*C. glabrata* と *S. cerevisiae* の *CNE1* 遺伝子の間に機能的な差はほとんど無いことを表している。加えて、*C. glabrata* における *Cne1p* のふるまいには、シャペロン活性に重要なプロリンリッチ領域が必須ではないことを示唆している (Fig. 12)。次に、*S. cerevisiae* の *cne1* 遺伝子欠損株 (*Sccne1Δ*) を作製し、*C. glabrata* の *cne1* 遺伝子欠損

株 *cne1Δ* 株と比較した。FK-506 および EGTA を含む培地上での生育を比較したところ、*C. glabrata* の *cne1Δ* 株はこれらに感受性を示すのに対し、*Scne1Δ* は FK-506 および EGTA に対する感受性をほとんど示さなかった (Fig. 16B)。このことは、*CNE1* 遺伝子欠損によって誘導される現象について、*C. glabrata* と *S. cerevisiae* では、カルシニューリン経路の寄与度が異なることを示している。以上のことから、*C. glabrata* と *S. cerevisiae* では、*CNE1* 遺伝子の機能や役割はおおよそ保存されているものの、その遺伝子欠損により誘導される現象には、異なるシグナル伝達経路が関わっていることが予想された。

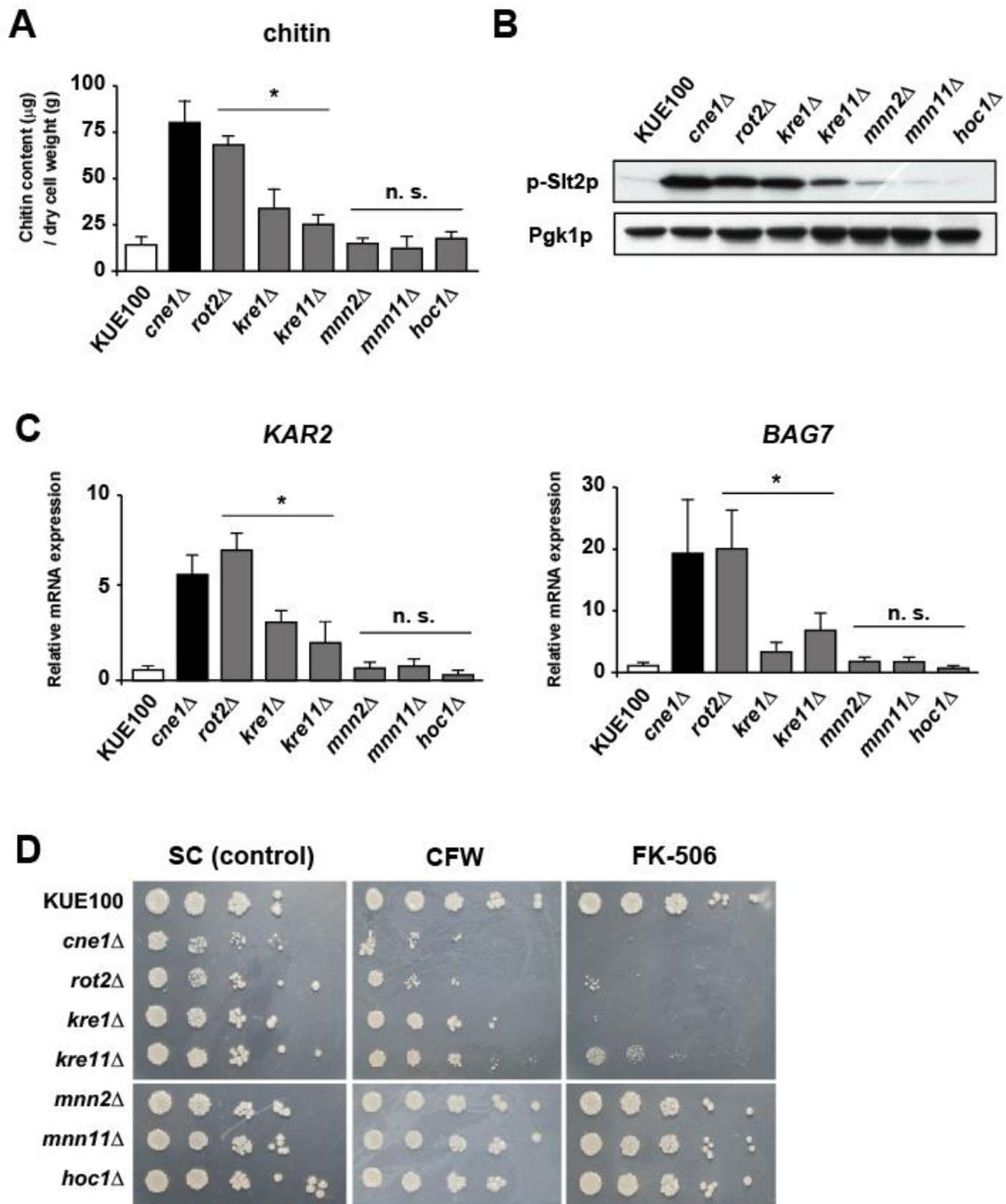


**Fig. 16. FK-506 inhibits cell growth of *C. glabrata cne1* $\Delta$  but not of *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta$ *Sccne1* cells.**

(A,B) Spot dilution assay was performed using 5  $\mu$ L suspensions at an OD of 0.1. Serially diluted (1:10) cells were spotted on agar plates and incubated at 37  $^{\circ}$ C. A representative example of three independent experiments is shown; SC, SC medium control.

これまでの結果から、*C. glabrata* では、*CNE1* 遺伝子の欠損により小胞体ストレスが起こること、細胞壁キチン含量の増加が起きること、これらがカルシニューリン経路を介して制御されていること、*S. cerevisiae* ではカルシニューリン経路の関与が小さいことが明らかになった。第一章の通り、Cne1p と協調して小胞体糖タンパク質品質管理に働く Kre5p タンパク質の発現抑制によっても、同様の現象が起きることが分かっている。そこで我々は、「糖タンパク質品質管理に関わる遺伝子/タンパク質の欠損により、同様の現象が観察できるのではないか」と仮説を立て、小胞体-ゴルジ体-分泌経路上に局在し、かつ糖タンパク質の合成・輸送・品質管理に関わることが分かっている遺伝子のいくつかについて、遺伝子欠損株を作製して解析した。まず、小胞体局在タンパク質をコードする遺伝子として、Cne1p および Kre5p と協調してシャペロンサイクル形成に関わる *ROT2* 遺伝子に着目した (Herscovics 1999)。さらに、ゴルジ体局在タンパク質をコードする遺伝子として、マンノース転移酵素をコードする *MNN2*、*MNN11*、*HOC1* 遺伝子を (Neiman *et al.* 1997; West *et al.* 2013)、膜間輸送に関与する遺伝子のうち、細胞壁合成に関わることが分かっている *KRE1*、*KRE11* (*TRS65*) 遺伝子を選択した (Boone *et al.* 1990)。これら欠損株の細胞壁糖組成を測定したところ、小胞体シャペロンサイクル形成に関わる *ROT2*、および膜間輸送に関わる *KRE1*、

*KRE11* の各欠損株 (*rot2Δ*、*kre1Δ*、*kre11Δ*) は、野生株よりもキチン含量が有意に多いことが明らかになった (Fig. 17A)。一方、ゴルジ体局在型のタンパク質をコードする *MNN2*、*MNN11*、*HOC1* 遺伝子の各欠損株 (*mnn2Δ*、*mnn11Δ*、*hoc1Δ*) のキチン含量は野生株と同程度であった。次に、各株の Sit2 MAP キナーゼのリン酸化レベルを測定したところ、キチン含量の結果と相関して、*rot2Δ*、*kre1Δ*、*kre11Δ* におけるリン酸化レベルは大幅に亢進していることが分かった (Fig. 17B)。一方、*mnn2Δ*、*mnn11Δ*、*hoc1Δ* のリン酸化レベルは野生株と同程度であった。加えて、小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現量を測定したところ、やはり *rot2Δ*、*kre1Δ*、*kre11Δ* では高い発現量を示した一方、*mnn2Δ*、*mnn11Δ*、*hoc1Δ* では野生株と変わらない発現量であることが分かった (Fig. 17C)。さらに、これらの株を CFW、および FK-506 を含む寒天培地上に播種して生育を観察したところ、*rot2Δ*、*kre1Δ*、*kre11Δ* は高感受性を示した一方で、*mnn2Δ*、*mnn11Δ*、*hoc1Δ* では野生株とほとんど変わらない生育を示した (Fig. 17D)。これらのことから、欠損により ER ストレスを誘導する遺伝子は同時にキチン生合成活性化を誘導する傾向があること、さらに小胞体-ゴルジ体-分泌経路の全ての遺伝子がこの性質を持つわけでは無いことが明らかになった。



**Fig. 17. Disruption of the gene involved in quality control of nascent glycoproteins causes UPR and CWI pathway activation in *C. glabrata*.**

(A) Alkali-insoluble chitin, in *C. glabrata* cells, was measured as glucosamine quantity substituted for the standard curve. The data shown represent the results of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviations. \* $P < 0.05$  vs WT. (B) Phosphorylation of Slt2p was determined by western blot. The level of Pgk1p recognized by an anti-Pgk1p antibody was used as loading control. Representative data are shown for three independent experiments. (C) qRT-PCR analysis was performed to measure the levels of ER stress-activated transcripts. Amplification efficiencies were validated and normalized against *PGK1* levels. The relative transcript levels were calculated as the ratio of the normalized transcript level to that of *PGK1*. Values represent the average of three independent experiments and error bars indicate the standard deviation (S.D.). \* $P < 0.05$  vs WT. (D) Spot dilution assay was performed using 5  $\mu$ L suspensions at an OD of 0.1. Serially diluted (1:10) cells were spotted on agar plates and incubated at 37 °C. A representative example of three independent experiments is shown. SC, SC medium control.

## 第四節 考察

本章の結果から、*C. glabrata* においては、ER ストレス誘導が細胞壁構造変化と CWI 経路活性化を誘導し得ることが明らかになった。特に、細胞壁キチン含量の増加は ER ストレス蓄積に起因して起こり、 $\beta$ 1,6 グルカン合成異常などの細胞壁ストレスには起因しないことが分かった。細胞壁キチン含量の増加とそれに続く細胞凝集は、酵母細胞における一般的な防御反応である (Martín *et al.* 2000; Levin 2005)。これまで、 $\beta$ 1,6 グルカン合成異常に伴う細胞壁キチン含量増加は、ヘテロ糖による細胞壁相補として、CWI 経路の中心を担う現象として捉えられてきた。一方 *C. glabrata* では、本章 Fig. 12-14 や Miyazaki らが示した通り、小胞体ストレス誘導によって、細胞壁キチン含量の増加や、キチン生合成遺伝子 *CHS1* あるいはキチン生合成経路の律速段階に関与する *GFA1* 遺伝子の発現が上昇することがわかった (Miyazaki *et al.* 2013)。本研究ではさらに、こうしたキチン生合成活性化がいかに始まるのかについて考察した。第一章で示した Kre5p は、Cne1p と協調して糖タンパク質品質管理に関わるシャペロンサイクルを形成する (Leach *et al.* 2002; Molinari *et al.* 2005)。さらに、Fig. 18 に示したように、小胞体-ゴルジ体-分泌経路を構成する遺伝子群のうち、その欠損により小胞体ストレス誘導とキチン生合成活性化を起こすのは、糖タンパク質合成・輸送に関わ

る遺伝子が主であった。これらのことは、分泌経路上における糖タンパク質品質管理が損なわれるケースでキチン生合成活性化が誘導されることを示唆している。細胞壁構成糖、例えばマンノプロテインや $\beta$ 1,6 グルカン糖鎖のほとんどが分泌経路上で合成されている一方、キチン生合成の一部が細胞質、あるいは細胞膜上で直接行われていることを鑑みると、分泌経路を介した細胞壁合成が損なわれる場合にキチン生合成が活性化して相補しようとする仕組みは、*C. glabrata* の細胞壁保全性を保つ上で合理的であると言える。

本研究結果は、*C. glabrata* の UPR が、近縁種 *S. cerevisiae* などとは異なるユニークな制御を受けるという仮説モデルを支持している (Springer *et al.* 2012; Miyazaki *et al.* 2013)。*C. glabrata* における代替的 UPR 経路であると示唆されるカルシニューリン経路を阻害することで、ER ストレスの蓄積、あるいは *CNE1* をはじめとする糖タンパク質品質管理に関わる遺伝子群の欠損による菌生育を大幅に抑制することが出来た。このことは、カルシニューリン阻害剤 FK-506 が潜在的な抗 *C. glabrata* 活性、あるいは抗真菌薬活性を有することを示唆している。すなわち、FK-506 は真菌に対して「CWI 攪乱薬」として機能することで、これまでとは異なった真菌症治療戦略を立てることができる可能性を秘めている。*C. glabrata* に代表される「non-albicans *Candida* species」

は、いくつかのアゾール系抗真菌薬に対して低感受性であり、治療が奏功しないケースが少なくないことから、特に血液疾患領域において問題となっている (Pappas *et al.* 2003; Li *et al.* 2007)。これらの「non-albicans *Candida* species」が示す抗真菌薬耐性はほとんどが一次耐性であり、例えば *C. glabrata* や *C. krusei* では、CWI を主因としてアゾール系、カンディン系薬剤の MIC が上昇する例が報告されている。このため、病原性真菌の CWI を攪乱する真菌症治療戦略は、従来難しかった「non-albicans *Candida* species」に対する治療戦略について、将来的に有力な選択肢となる可能性があるだろう。実際に、臓器移植後の移植片対宿主病の予防のための免疫抑制剤としてカルシニューリン経路阻害薬を選択することは、ステロイド系薬剤を用いる場合よりも術後真菌感染症、特にカンジダ血症の発症リスクを低減させることが報告されている (Sayer *et al.* 1994; Moiseev *et al.* 2016)。本研究結果はこの事実を支持するものであり、今まで成されていなかったこの現象の説明に有用であるかもしれない。

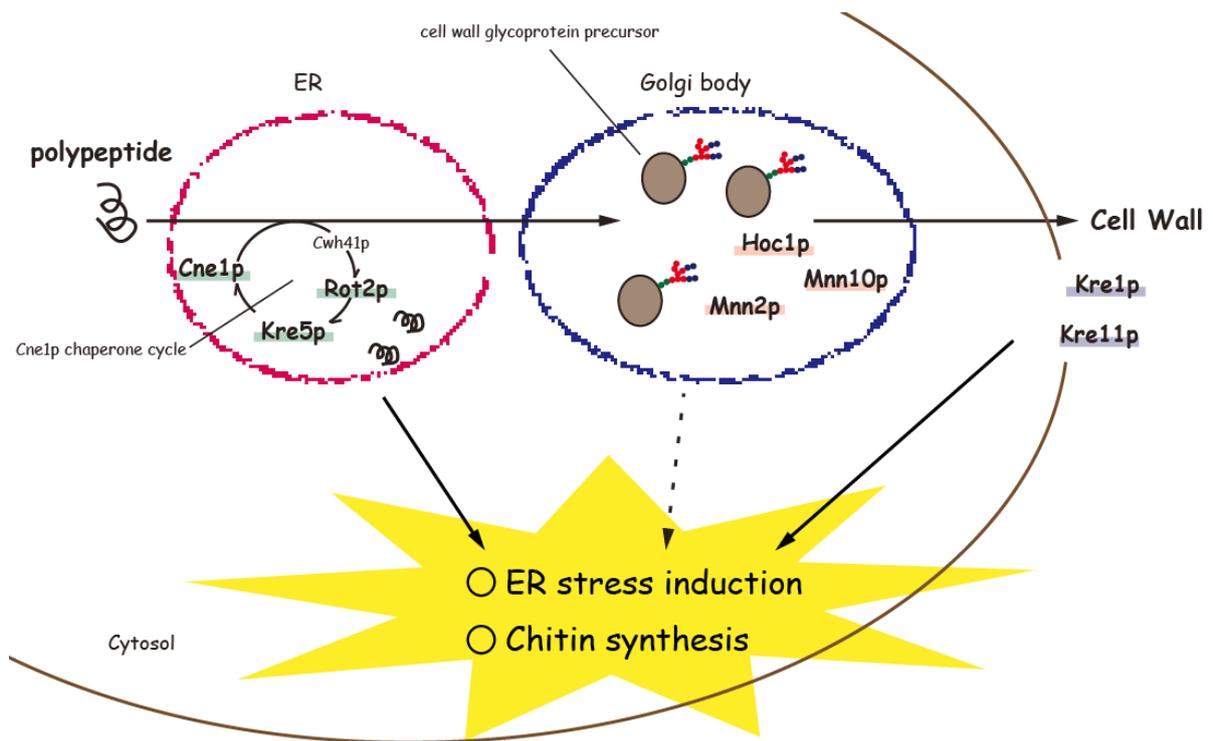


Fig. 18. A model showing the CWI and ER stress induction in response to malfunction of some genes involving in ER-Golgi-secretion pathway.

## 第三章

### *Aspergillus fumigatus* における $\beta$ 1,5 ガラクトフラノース転移酵素

#### GfsA の *in vivo* 細胞壁ガラクトマンナン生合成への影響

### 第一節 序論

*Aspergillus fumigatus* などの糸状菌は、多糖や複合糖質の産生能に優れており、形質膜上に一部を貯蔵するとともに、菌体外にそれらを分泌している。また、大部分の多糖は菌体最外層に細胞壁として存在し、多くの生理イベントや宿主感染過程に必要な役割を果たしている (Rhodes 2006)。糸状菌の細胞壁は  $\alpha/\beta$  グルカン、キチン、ガラクトサミノガラクトタン、ガラクトマンナン (GM) など、数種類の多糖から構成されている (Bernard and Latgé 2001; Mennink-kersten *et al.* 2006)。このうち、GM は D-マンノースと D-ガラクトフラノース (5員環型ガラクトース: Galf) から成るヘテロ多糖である (Bernard and Latgé 2001; Kudoh *et al.* 2015)。*A. fumigatus* における Galf は、4種類の複合糖質の構成成分として存在している。すなわち、N-グリカン型 (Latgé *et al.* 1994)、O-グリカン型 (OMGM) (Latgé *et al.* 1994)、グリコシルイノシトールセラミド型 (GIPC) (Costachel *et al.* 2005)、および、結合様式が不明なその他の型 (真菌型:

FTGM) である。 $\alpha/\beta$  グルカン、およびキチンは糸状菌や出芽酵母、分裂酵母などの真菌属に共通の細胞壁構成分子であるのに対し、ガラクトサミノガラクトタン(Gravelat *et al.* 2013) や GM は糸状菌に特徴的な分子である。特に Galf は糸状菌に特徴的な構成糖であり、しばしばヒト免疫原性や病原性と関連付けられるが、機能や役割についてはどの生物種においても明確な報告はない (Tefsen *et al.* 2012)。

これらの多糖分子を形作る糖転移酵素の多くは出芽酵母で見出され、遺伝学と紐づけられて研究が進展してきた。一方、糸状菌に特徴的な多糖の生合成に関わる遺伝子群の発見や機能解析は、農学・環境工学応用などの分野で大きく期待されているにも関わらず、他酵素との相同性の低さや希少糖リガンドの入手が困難などの理由で、やや遅れている。2015年、Bamfordらは、*A. fumigatus* のガラクトサミノガラクトタン合成に関わる遺伝子として新たに *sph3* 遺伝子を発見し、その欠損は病原性低下を招くことを報告した (Bamford *et al.* 2015)。一方、Komachiらは、*Aspergillus nidulans* 全遺伝子のうち、機能未知かつ糖転移酵素ドメインを持つことが予想される遺伝子をスクリーニングし、遺伝子変異株を作製することで、抗ガラクトフラノース抗体との結合親和性が低下する株を見出した (Komachi *et al.* 2013)。このうち、もっとも顕著な反応性低下を示した変異株の原因遺伝子を *gfsA* と名付け、Galf 糖鎖生合成に重要な働

きをする遺伝子として報告した。しかしながら、GfsA の酵素学的性質や、*A. fumigatus* の *in vivo* GM 生合成への寄与は不明なままであった。

そこで本章では、*A. fumigatus* の *gfsA* 遺伝子、すなわち *AfgfsA* をクローニングし、リコンビナント GfsA タンパク質の大腸菌発現系を作製するとともに、*in vitro* ガラクトフラノース転移酵素活性測定系を構築し、AfGfsA がガラクトフラノース転移活性を有するか否かを検証した。また、*AfgfsA* 遺伝子欠損株より GM を調製・精製し、NMR や GC-MS を用いた詳細な GM 構造解析を実施し、*in vivo* GM 分子構造生合成における *gfsA* 遺伝子の働きについて考察した。

## 第二節 方法

### 使用菌株および培地

菌株は、*Aspergillus fumigatus* A1160 株、A1159 株 (Da Silva Ferreira *et al.* 2006)、およびそれらを親株として作製した *AfgfsA* 遺伝子欠損株 ( $\Delta AfgfsA$ )、*AfgfsA* 遺伝子相補株 ( $\Delta AfgfsA::AfgfsA$ ) を用いた (Table 7)。培地は、*Aspergillus* Minimal Media (1% グルコース、0.6%  $\text{NaNO}_3$ 、5 mM  $\text{MgSO}_4$ 、1× Hunter’s trace element, pH 5.8) を用いた。

**Table 7. Strains list in chapter 3**

Strains	Genotype	Reference; Source
<i>A. fumigatus</i> A1151	<i>KU80::pyrG</i>	da Silva Ferreira <i>et al.</i> (2006); FGSC
<i>A. fumigatus</i> A1160	<i>KU80::pyrG, pyrG<sup>-</sup></i>	da Silva Ferreira <i>et al.</i> (2006); FGSC
<i>A. fumigatus</i> $\Delta AfgfsA$	<i>KU80::pyrG, pyrG<sup>-</sup>, AfgfsA::AnpyrG</i>	Komachi <i>et al.</i> (2013)
<i>A. fumigatus</i> $\Delta AfgfsA::AfgfsA$	<i>KU80::pyrG, AfgfsA::AnpyrG, \Delta AfgfsA::AfgfsA-ptrA</i>	This study

**Table 8. Primers list in chapter 3**

Oligonucleotide primers	Sequence
pET15-KAI-F	5'- GCGCGGATCCGCGGCCGCACTCGAGTGAGGCTGCTAACAAAGCC -3'
pET15-KAI-R	5'- GCGCGGATCCCATATGGCCGCTGCTGTG -3'
oligo-dT-18	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
pET15b-AfGfsA-NdeI-F	5'- AAAAACATATGCATGCGGCCCTTCGGTTC -3'
pET15b-AfGfsA-NotI-R	5'- AAAAGCGGCCGCTTAATGCTGCTTTCTCACAGCA -3'
ptrA-F	5'- CATATGTAAATGGCTGTGTCCCG -3'
ptrA-R	5'- TTTAGCTTTGACCGGTGAGC -3'
<i>AfgfsA</i> -complement-1	5'- TACGCCGCTTGCTACTTGG -3'
<i>AfgfsA</i> -complement-2	5'- TCGTTACCAATGGGATCCCCTTAATGCTGCTTTCTCACAGCATA -3'
<i>AfgfsA</i> -complement-3	5'- ATGCAAGAGCGGCTCATCGCCCTTCAACGCTATCACGCC -3'
<i>AfgfsA</i> -complement-4	5'- AGACATGATGGCGGTTCTCC -3'
<i>AfgfsA</i> -complement-7	5'- AAAAGAGGAATTCGCGGGAGG -3'
<i>AfgfsA</i> -complement-8	5'- AAGCTGGAAGTGGGATGGCT -3'

## AfGfsA 発現ベクタープラスミドの構築

プラスミド構築に用いたプライマーは Table 8 に示した。まず、*A. fumigatus* A1160 株を培養し、TRIzol Reagent (Thermo scientific) を用いて総 RNA を抽出して、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) にて cDNA を作製した。得られた cDNA を鋳型とし、pET15b-AfGfsA-NdeI-F、および pET15b-AfGfsA-NotI-R を用いて DNA 断片を増幅した。これを大腸菌発現プラスミド pET15b-KAI の *NdeI* および *NotI* サイトに組み込み、pET15b-AfGfsA を得た。得られたプラスミドは、大腸菌株 BL21 (DE3) 株に形質転換した。

## リコンビナントタンパク質の精製、定量および電気泳動

pET15b-AfGfsA を保持した大腸菌 BL21 (DE3) 株を LB 培地 1 L に播種し、最終濃度 40  $\mu\text{g/mL}$  のアンピシリン、および 20  $\mu\text{g/mL}$  のクロラムフェニコールを加えて、OD=0.2 となるまで培養した。続いて、最終濃度 1 mM となるように IPTG を加え、18°C にて 65 時間振とう培養した。その後菌体を回収し、Bug Buster Protein Extraction Reagent (Merck Millipore, United States) を用いて溶菌させ、上清を 10,000 rpm、10 分間遠心して回収した。上清中の GfsA タンパク質は、His60 Ni Superflow Resin

(TAKARA) を用いて精製した。酵素溶液は buffer A [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0)、30 mM KCl、100 mM NaCl、1 mM MnCl<sub>2</sub>、5% グリセロール] に対して透析することで buffer 交換し、タンパク質濃度は Qubit Protein Assay kit を用いて測定した。

### Galf-ウリジン二リン酸 (UDP-Galf) の調製

UDP-Galf を調製するために、リコンビナント UDP-Galp ムターゼを発現する大腸菌株 AG1 を得た (National BioResource Project, Japan) (Kitagawa *et al.* 2005)。まず、クロラムフェニコールを含む LB 培地にて AG1 を培養し、OD=0.2 となった時点で IPTG を加え、続けて 18°C にて 72 時間振とう培養した。得られたリコンビナント UDP-Galp ムターゼは His60 Ni Superflow Resin (TAKARA) を用いて精製した。酵素溶液は buffer A で透析することで buffer を交換し、タンパク質濃度は Qubit Protein Assay kit を用いて測定した。

得られたリコンビナント UDP-Galp ムターゼを用いて、既報を参考に、*in vitro* Galf 合成反応系を作製した (Oppenheimer *et al.* 2010; Poulin and Lowary 2010)。すなわち、250 mM UDP-Galp、250 mM 亜ジチオン酸ナトリウム、1 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、6% グリセロールから成る溶液にリコンビナント UDP-Galp ムターゼ 27 μg

を加え、全量が 100  $\mu$ L となるように調製した。これを 37  $^{\circ}$ C、6 時間インキュベートした後、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出した上清を回収した。得られた上清は、既報に従って、アニオン交換クロマトグラフィー用カラム CarboPac PA1 を備えた HPLC に供し、ピークを連続測定して、シグナルが得られるたびに検体を回収した (Oka and Jigami 2006)。なお、移動相を 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.4)、流速を 0.7 mL/分としたとき、UDP-Galp の保持時間は 14.5 分、UDP-Galf の保持時間は 18.0 分であった。回収した画分は凍結乾燥し、その後滅菌水に溶解して UDP-Galf として使用した。

### 酵素活性試験

UDP-Galf、*p*-nitrophenyl galactofuranose (*p*NP-Galf)、リコンビナント AfGfsA タンパク質を混和して全量 20  $\mu$ L とし、30 $^{\circ}$ C にて 60 分間インキュベートした。その後、99 $^{\circ}$ C にて 3 分間加熱して酵素を失活させ、上清を HPLC 解析に供した。HPLC は、カラムを Shodex Asahipak NH2P-50 4E amino column、移動相を溶媒 A (93% アセトニトリル、0.3% 酢酸アンモニウム (pH 7.0)) と溶媒 B (20% アセトニトリル、0.3% 酢酸アンモニウム (pH 7.0)) のイソクラティックグラジエント条件とし、流速 0.8 mL/分にて紫外

線検出器にて測定した。得られた反応成績体の LC-MS 解析は、LTQ-OrbitrapXL LC-MS (Thermo Scientific) を用いて行った。

### **AfgfsA 遺伝子相補株の樹立**

*AfgfsA* 遺伝子相補株を作製するにあたり、double-joint PCR 法を用いて、相同組み換え DNA カセットを作製した (Yu *et al.* 2004)。まず、*A. fumigatus* ゲノム DNA を鋳型とし、プライマー AfgfsA-complement-1 および AfgfsA-complement-2 を用いて断片 1 を増幅した。続いて、プラスミド pSH1 (Komachi *et al.* 2013) を鋳型とし、プライマー AfgfsA-complement-3 および AfgfsA-complement-4 を用いて断片 2 を増幅した。次に、プラスミド pPTR-I (TAKARA) を鋳型とし、プライマー ptrA-F および ptrA-R を用いて断片 3 を増幅した。断片 1、断片 2 および断片 3 を混和して 2<sup>nd</sup> PCR 反応に供した。この反応成績体を鋳型とし、プライマー AfgfsA-complement-7 および AfgfsA-complement-8 を用いて PCR を行い、相同組み換え DNA カセットとした。*gfsA* 欠損株を親株として、得られた相同組み換え DNA カセットをトランスフォーメーションし、10 µg/mL ピリチアミンおよび 0.6 M KCl を含む寒天培地に播種した。得られた株への相同組み換え DNA の挿入は、PCR 法にて確認した。

## 菌糸生育円形成試験

各菌株から調製した胞子を PBS + 0.05% tween 20 に懸濁し、寒天培地中央に 5  $\mu$ L 滴下した。これを 30°C にて 24、48、72 時間培養し、菌糸円直径を計測した。

## ウエスタンブロッティング

総タンパク質画分の抽出は、標準的なプロトコルを一部改変して行った。各株の胞子を培地に懸濁し、30°C で 18 時間振とう培養した。得られた菌糸体を Miracloth (Millipore) にてろ過して回収し、冷滅菌水で 2 回洗浄後、凍結乾燥した。乾燥した菌糸体を 1.5 mL キャップ付きチューブに移し、チタンビーズを適量加え、液体窒素で氷冷しながら Fastprep にて 20 秒間処理して破碎した。破碎した菌糸体をタンパク質抽出 buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 $\times$  Complete (Roche, Switzerland), 1 $\times$  PhosSTOP (Roche)] 100  $\mu$ L に懸濁した後、13,000 rpm にて 10 分間遠心して残渣を除去し、総タンパク質溶液を得た。総タンパク質濃度は、XL-Bradford 試薬 (APRO Science, Japan) を用いた吸光度法にて測定した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングは、標準的なプロトコルに従って行った。総タンパク質濃度として 2.0 mg/mL になるよう調整した総タンパク質溶液に 2 $\times$

Sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)、10% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、10% スクロース、0.01% ブロモフェノールブルー] を等量加え、100°C で 5 分間インキュベートした。総タンパク質として 10 µg を含むように 8% ポリアクリルアミドゲルにアプライし、20 mA 定電流にて電気泳動を行った。泳動終了後のゲルから PVDF 膜 (PALL Life science Japan) にタンパク質をセミドライ法にて転写して、転写膜を得た。転写膜を Blocking One (Nacalai Tesque) に浸して室温にて 30 分間振とうした後、抗 Galf 抗体(EB-A2, BioRad) 、あるいは、抗 DYKDDDDK 抗体 (Wako, Japan) の 10 倍希釈溶液に浸して室温にて 1 時間振とうした。その後、TBS + 0.05% tween20 で 3 回洗浄し、ECL Plus western blotting detection system (GE Healthcare) にて検出した。

### 細胞壁 GM の調製

各株を 37°C にて 18 時間液体培養し、得られた菌体を Miracloth でろ過した後、冷水で 2 回洗浄し凍結乾燥した。得られた凍結乾燥菌糸体を乳鉢ですりつぶし、100 mM クエン酸緩衝液に懸濁後、121°C にて 120 分間オートクレーブした。残渣を遠心除去後、上清を透析処理し、凍結乾燥して総細胞壁画分とした。得られた総細胞壁画分はセタブロン法にて精製した。総細胞壁画分を 3% セタブロン溶液に溶解し、最終濃度

1% となるようにホウ酸を加えた後、10 M NaOH 溶液を徐々に滴下して pH 9.0 とした。得られた沈殿を 90% エタノールで洗浄し、透析後凍結乾燥して細胞壁 GM 画分とした。

### **β エリミネーションによる FTGM の調製**

細胞壁 GM 画分からの O-結合型糖鎖の脱離は、還元条件下の β エリミネーションにて行った。得られた細胞壁 GM を 0.1 M NaOH/0.5 M NaBH<sub>4</sub> 溶液に溶解し、室温にて 24 時間インキュベートした。その後透析し、凍結乾燥して FTGM 画分とした。

### **糖メチル化分析**

糖メチル化分析法を用いた糖結合様式解析は、Ciucanu らの方法を用いて行った (Ciucanu and Kerek 1984)。まず、糖検体 2 mg を DMSO に溶解し、NaOH 粉末を加えて 3 時間攪拌した。ここにヨウ化メチル 500 μL を加え、さらに 2 時間攪拌した。残存するヨウ化メチルを水-クロロホルム抽出にて除いた後、クロロホルム上清をエバポレートし、2 M トリフルオロ酢酸に溶解して、100°C にて 2 時間インキュベートした。再度濃縮乾固した後、1% NaBD<sub>4</sub> に溶解し、室温にて 2 時間インキュベートした。

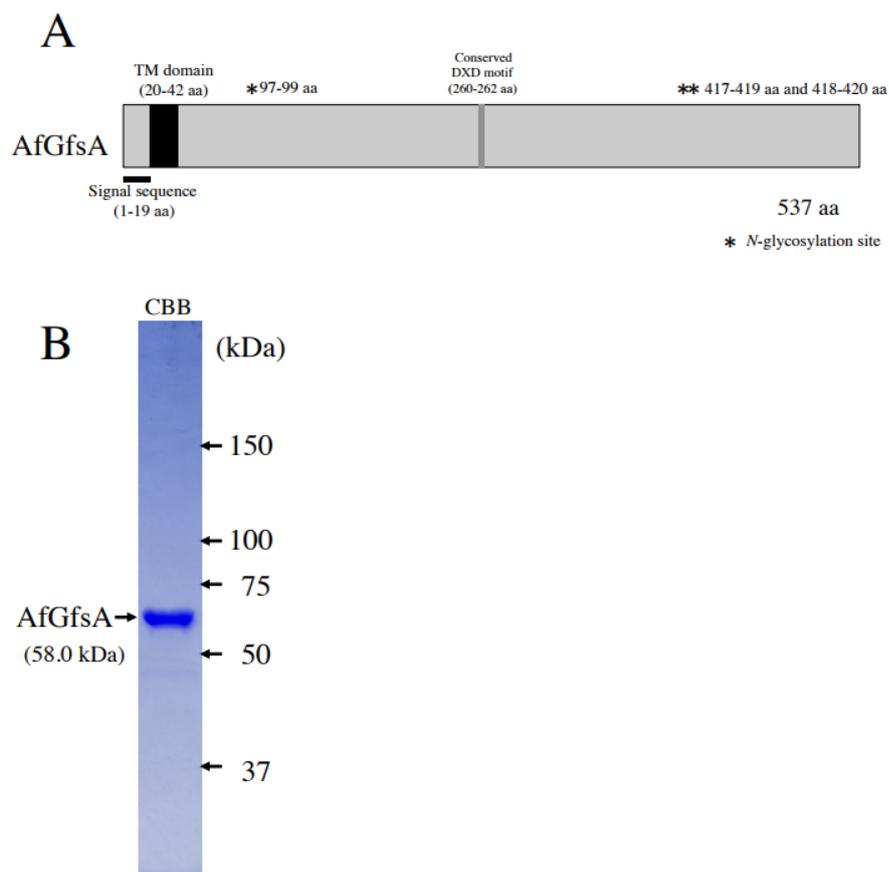
その後再度濃縮乾固し、無水酢酸:ピリジン = 1:1 混液を加えて 40°C にて 3 時間インキュベートした。これを濃縮乾固し、アセトンに溶解して糖メチル化サンプルとし、GC-MS 解析に供した。GC は、移動相をヘリウムガス、キャピラリーカラムを DB-5 (Agilent, Japan)、昇温条件を 5°C/分とし、JMS-K9 (JOEL, Japan) を用いて測定した。

## NMR

NMR 解析に供するサンプル 20 mg を重水 700  $\mu$ L に溶解し、JNM-LA600 (JEOL) にて 45°C で測定した。なお、NMR 解析の内部標準物質はアセトンを加え、 $^1\text{H-NMR}$  では 2.225 ppm、 $^{13}\text{C-NMR}$  では 31.07 ppm に現れるシグナルを基準とした。

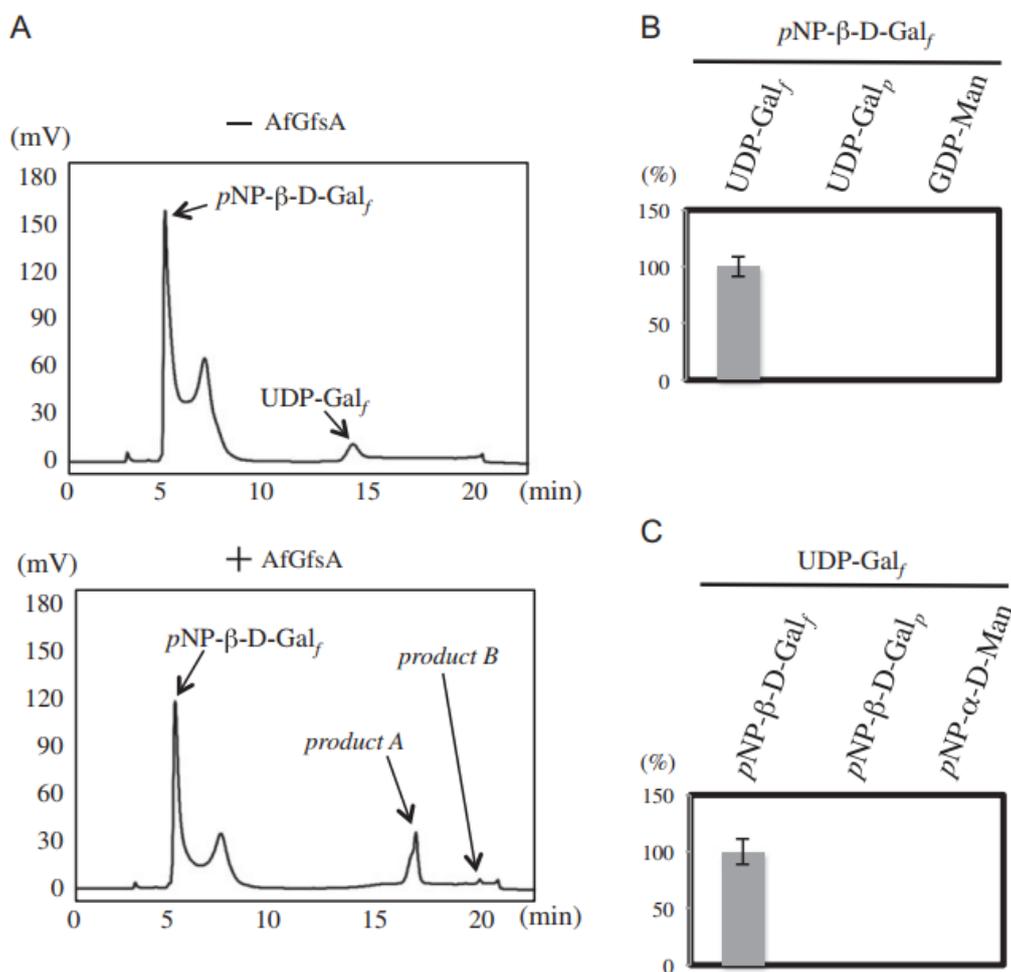
### 第三節 結果

*A. fumigatus* の *gfsA* 遺伝子 (*AfgfsA*) は、537 アミノ酸から成る予想分子量 61.3 kDa のタンパク質をコードしている (Fig. 19A)。一次構造解析の結果、*AfGfsA* タンパク質は 260-262 番目に金属イオン結合 DXD モチーフを持つことが推定された。加えて *N* 末端側 20-42 番目に膜貫通領域を有していることから、ゴルジ体に存在する II 型膜タンパク質であることが推定された。このことから、*N* 末端 1-42 番目のアミノ酸までをコードする配列を除いた領域をクローニングし、3×FLAG タグ配列を融合して、大腸菌発現ベクター pET15b に組み込んだ。本プラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションし、総タンパク質を回収したのち、抗 FLAG 抗体を用いてアフィニティー精製したところ、およそ 60 kDa の位置にシングルバンドが得られた (Fig. 19B)。これは、*N* 末端のシグナルペプチド配列、および、膜貫通領域を除く推定分子量 58.0 kDa とほぼ一致することから、このバンドがリコンビナント 3×FLAG-*AfGfsA* タンパク質に由来するものであると考えられた。



**Fig. 19.** (A) Schematic representation of AfGfsA protein. (B) Recombinant AfGfsA from *E. coli* was separated in SDS-PAGE. Gels were stained by CBB. Representative gel image in three independent experiments was shown.

次に、得られた AfGfsA タンパク質を用いた Galf 糖転移酵素活性測定系の構築を試みた。pNP-β-D-Galf (pNP-Galf) を基質、および、Galf ウリジン二リン酸 (UDP-Galf) をドナーとし、AfGfsA の存在下で触媒させることで、基質の Galf 残基にさらに 1 残基の Galf が転移された化合物が得られるか否かを確認した。十分量の pNP-Galf 基質、1 mM UDP-Galf ドナー、1 mM Mn<sup>2+</sup> を加え、HPLC 解析に供した。その結果、リコンビナント AfGfsA タンパク質を熱変性させて加えた群では、基質とドナーのピークのみが観察されたのに対し、AfGfsA を十分に触媒させた群では、18.0 min (product A)、および、21.5 min (product B) に新たなピークが生成した (Fig. 20A)。これを、基質やドナーを変えて試したところ、UDP-Galf 以外の他の糖ヌクレオチド供与体、すなわち Galp-ウリジン二リン酸や Manp-グアニン二リン酸、および、pNP-Galf 以外の基質、すなわち pNP-Galp や pNP-Manp を用いた条件では、Product A および B の生成は観察されなかった (Fig. 20B, C)。このことから、product A および B は、AfGfsA の触媒で特異的に生成される反応成績体であることが予想された。

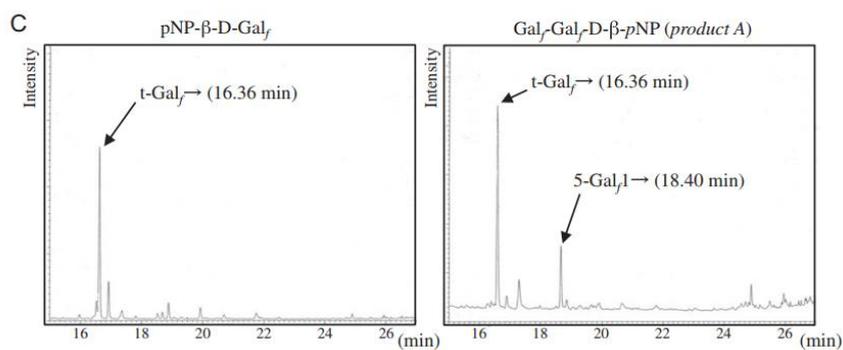
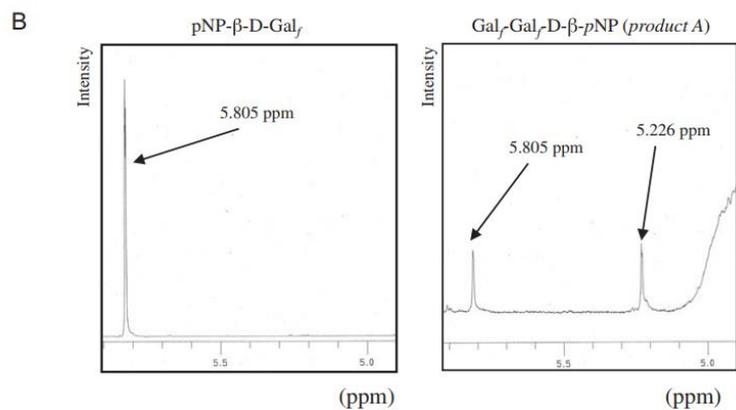
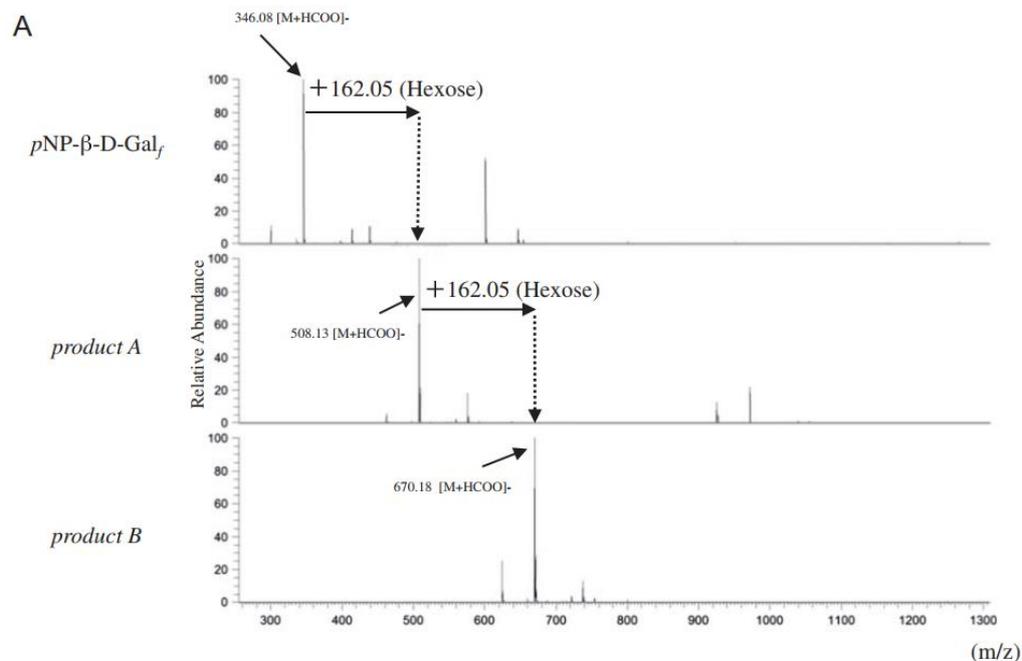


**Fig. 20.** Construction of *in vitro* assay for galactofuranosyltransferase activity of AfGfsA.

(A) Chromatograms of *in vitro* assay of galactofuranosyltransferase activity. The galactofuranosyltransferase activity of 5  $\mu\text{g}$  of purified AfGfsA protein was assayed using 0.5 mM UDP-Galf, 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$  as a cofactor, and 1 mM *pNP*- $\beta$ -D-Galf. The mixtures were incubated at 30°C for 6 h. Chromatograms indicate typical results of the assay with heat-denatured (upper panel) and undenatured AfGfsA (lower panel). The assay without AfGfsA showed no new peaks, but fractions with AfGfsA contained two new products (termed *product A* and *product B*) at 18.0 and 21.5 min. (B) Determination of appropriate sugar nucleotides. Each assay used 0.1 mM of a sugar nucleotide, *pNP*- $\beta$ -D-Galf (1 mM) as the acceptor substrate, and 0.82  $\mu\text{g}$  of purified AfGfsA protein. The mixtures were incubated at 30°C for 60 min. A value of 100% corresponds to the incorporation of  $2.3 \times 10^{-3}$  units (nmol/min/ $\mu\text{g}$ ) of UDP-Galf. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  independent experiments). (C) Determination of appropriate acceptor substrates. Each assay used 1 mM of an acceptor substrate, 0.1 mM UDP-Galf as the sugar donor, and 0.82  $\mu\text{g}$  of purified AfGfsA protein. The mixtures were incubated at 30°C for 60 min. A value of 100% corresponds to the incorporation of  $3.3 \times 10^{-3}$  units (nmol/min/ $\mu\text{g}$ ) of *pNP*- $\beta$ -D-Galf. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  independent experiments).three independent experiments is shown.

得られた Product A および B が Gal $f$  糖鎖を含む化合物であることを確かめるために、反応成績体それぞれについて質量分析解析と  $^1\text{H-NMR}$  解析、糖メチル化分析を行った。まず、質量分析の結果、 $p\text{NP-Gal}f$  基質は 346.1、product A は 508.1、product B は 670.2 の質量電荷比を持つ分子イオンピークが得られた (Fig. 21A)。質量電荷比 346.1 は、 $p\text{NP-Gal}f$  の分子量を表す値であり、508.1 は六炭糖が 2 残基、670.2 は 3 残基結合した化合物であることがそれぞれ予想された。次に、product A を  $^1\text{H-NMR}$  解析に供した結果、5.805 ppm と 5.226 ppm のケミカルシフトが観察された (Fig. 21B)。Varela ら、および、Kudoh らの報告によると、5.805 ppm は「Gal $f_{\beta 1}$ →ベンゼン環」を、5.226 ppm は「Gal $f_{\beta 1}$ → $_5\text{Gal}f_{\beta 1}$ →」のそれぞれ下線部の Gal $f$  残基の 1 位プロトンを表すケミカルシフトであることが分かっている。さらに、推定 Gal $f$  糖鎖の結合様式を明らかにするために、糖メチル化分析を行ったところ、 $p\text{NP-Gal}f$  基質は非還元末端 Gal $f$  を表す 16.36 min のフラグメントピークが得られたのに対し、product A の分析では、16.36 min に加えて、5 位置換 Gal $f$  を表す 18.40 min のフラグメントピークが併せて観察された (Fig. 21C)。これらのことから、product A は「Gal $f_{\beta 1}$ → $_5\text{Gal}f_{\beta 1}$ → $p\text{NP}$ 」であると同定された。このことは、リコンビナント AfGfsA タンパク質が、Gal $f$  転移活性を持つことを表している。さらに、AfGfsA の酵素機能は「UDP-D-Gal $f$ :  $\beta$ -D-Gal $f$  転移

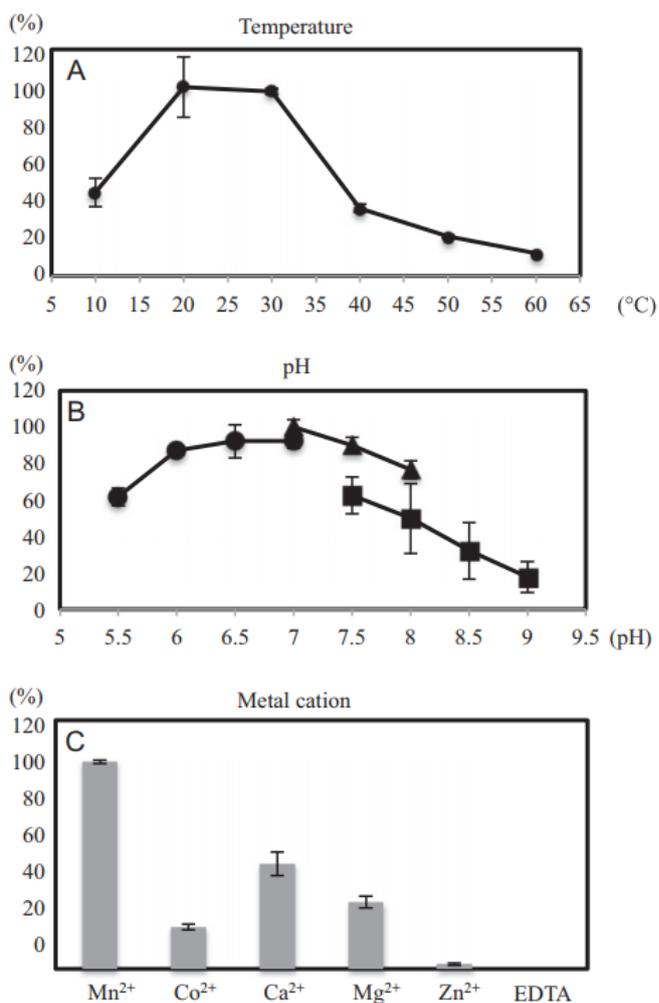
酵素」として表され、非還元末端 Gal<sub>f</sub> の 5 位水酸基に対して、1 残基の Gal<sub>f</sub> を β グ  
 リコシド結合させる機能であることを明確に示唆している。



**Fig. 21. Structural analyses of the enzymatic products of AfGfsA using *p*NP- $\beta$ -D-Galf as an acceptor.**

(A) LC/MS spectra of *product A* and *product B*. *Product A* and *product B* were collected from 17.5 to 18.5 min and from 21 to 22 min, respectively, as shown in Figure 19A (lower panel), and analyzed using LC/MS to determine their molecular masses. (B)  $^1\text{H-NMR}$  analyses of *p*NP- $\beta$ -D-Galf and Galf-Galf-D- $\beta$ -*p*NP (*product A*).  $^1\text{H-NMR}$  charts for *p*NP- $\beta$ -D-Galf (left panel) and *product A* (right panel). The chemical shift values of the H-1 position of the underlined Galf residue in the Galf $\beta$ 1 $\rightarrow$ benzoic acid and Galf $\beta$ 1 $\rightarrow$ 5Galf $\rightarrow$  structures are 5.805 and 5.226, respectively, according to previous reports (Varela et al. 1986; Kudoh et al. 2015). The 5.805 ppm signal was detected in the  $^1\text{H-NMR}$  chart for *p*NP- $\beta$ -D-Galf. Both signals were detected in the  $^1\text{H-NMR}$  chart for Galf-Galf-D- $\beta$ -*p*NP (*product A*). (C) Methylation analyses of *p*NP- $\beta$ -D-Galf and Galf-Galf-D- $\beta$ -*p*NP (*product A*). A 500- $\mu\text{g}$  sample of *product A* was analyzed. The retention times for t-Galf $\rightarrow$ , 5-Galf1 $\rightarrow$  and 6-Galf1 $\rightarrow$  were 16.36, 18.40, and 19.56 min, respectively, under these analysis conditions.

ここで、AfGfsA タンパク質の生物化学的性質について *in vitro* で検討した。本検討では、1 ユニットは「1 分当たり 1 nmol の Gal $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>5</sub>Gal $\beta$ <sub>1</sub>→pNP を生成する AfGfsA タンパク質の量 (μg)」と定義した。まず、至適温度について検討したところ、AfGfsA の酵素活性は、20°C から 30°C の範囲で安定であった (Fig. 22A)。次に至適 pH を検討したところ、pH 7.0 の 100 mM MOPS-NaOH 緩衝液中で最大活性を示したものの、pH 6.5 から 7.5 の範囲においても十分に高い活性を示した (Fig. 22B)。次に金属イオン要求性を確かめた。その結果、Mn<sup>2+</sup> の添加により最も高い酵素活性が観察され、次いで Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> の順で高い酵素活性を示した (Fig. 22C)。一方、Zn<sup>2+</sup> の添加では酵素活性はほとんど得られず、二価イオンキレート剤である EDTA の添加により、その活性は完全に抑制された。以上のことから、AfGfsA タンパク質は生理的な温度、pH で幅広く活性を発揮し、その酵素活性には Mn<sup>2+</sup> や Ca<sup>2+</sup> などの金属イオンを要求する酵素であることが明らかになった。

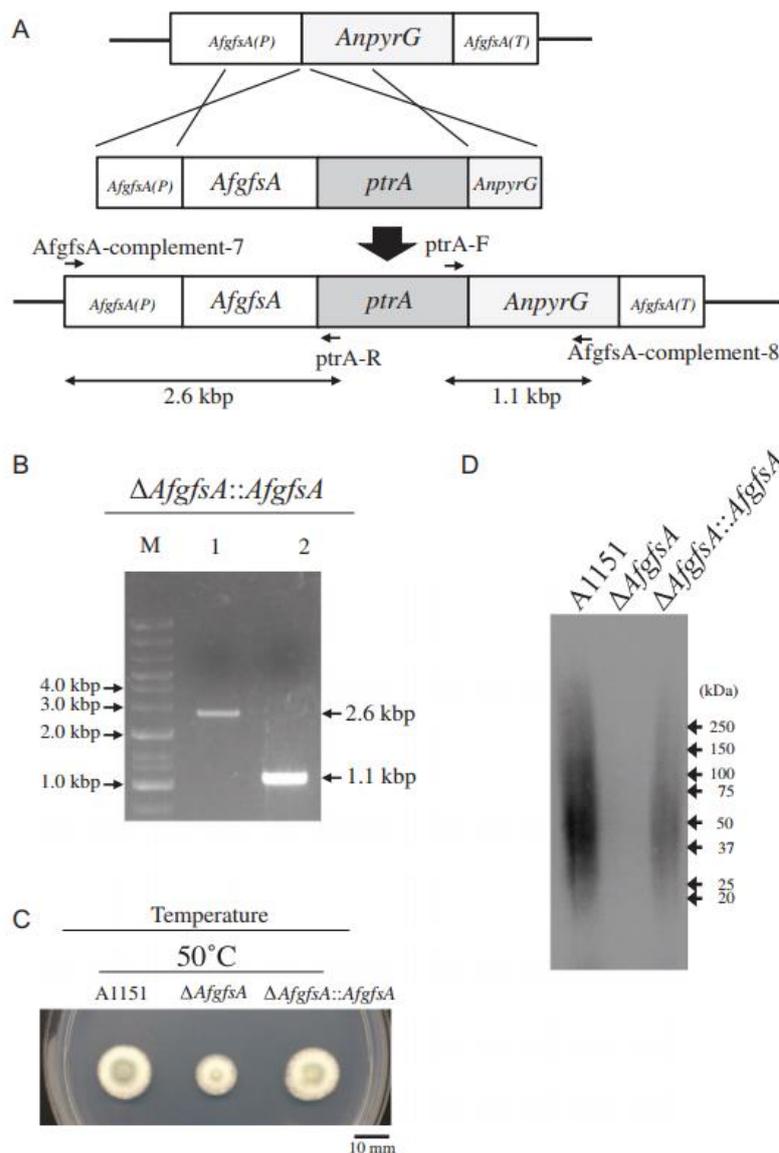


**Fig. 22. Determination of optimal temperature and pH range and the metal cation requirements for AfGfsA activity.** (A) Effects of temperature on AfGfsA enzymatic activity. The buffer used was 100 mM MOPS-NaOH (pH 7.0). A value of 100% corresponds to the incorporation of  $6.0 \times 10^{-3}$  units (nmol/min/ $\mu$ g) at 20°C. Each assay used 1 mM of an acceptor substrate, 0.1 mM UDP-Galf as the sugar donor, and 0.82  $\mu$ g of purified AfGfsA protein. The mixtures were incubated for 60 min. (B) Effects of pH on AfGfsA enzymatic activity. The buffers used were 100 mM MES-NaOH (circles), 100 mM MOPS-NaOH (triangles), or 100 mM Tris-HCl (squares). A value of 100% corresponds to the incorporation of  $3.8 \times 10^{-3}$  units (nmol/min/ $\mu$ g) of 100 mM MOPS-NaOH at pH 7.0. Each assay used 1 mM of an acceptor substrate, 0.1 mM UDP-Galf as the sugar donor, and 0.82  $\mu$ g of purified AfGfsA protein. The mixtures were incubated at 30°C for 60 min. (C) Metal cation requirements for AfGfsA activity. Reaction mixtures were incubated with 1 mM EDTA or 1 mM various divalent metals. A value of 100% corresponds to the incorporation of  $6.3 \times 10^{-3}$  units (nmol/min/ $\mu$ g) of manganese. Each assay used 1 mM of an acceptor substrate, 0.1 mM UDP-Galf as the sugar donor, and 0.82  $\mu$ g of purified AfGfsA protein. The mixtures were incubated at 30°C for 60 min. All data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3 independent experiments).

次に、AfGfsA が *A. fumigatus* の細胞壁 GM、特に FTGM 生合成に *in vivo* で働いているかを確認するため、遺伝子変異株を用いた GM 構造解析を試みた。Komachi らは、*A. fumigatus* の *gfsA* 遺伝子欠損株 ( $\Delta$ Af*gfsA*) を作製して解析したものの、Af*gfsA* 遺伝子の相補実験を行っていなかったことから、正しい表現型を評価できていたかどうか疑問が残されていた (Komachi *et al.* 2013)。そこで本研究では、 $\Delta$ Af*gfsA* 株と Af*gfsA* 遺伝子相補株 ( $\Delta$ Af*gfsA*::Af*gfsA*) を作製し、野生株と比較解析することを目標とした。

まず、既報で用いた  $\Delta$ Af*gfsA* を親株とし (Komachi *et al.* 2013)、 $\Delta$ Af*gfsA*::Af*gfsA* の作製を試みた。ゲノム DNA より Af*gfsA* 遺伝子の翻訳領域をクローニングし、ピリチアミン耐性遺伝子の DNA 配列と融合して増幅後、Af*gfsA* 遺伝子プロモーター領域と遺伝子欠損に用いた *pyrG* マーカーの配列とで挟み込み、相同組換え DNA カセットを作製し、 $\Delta$ Af*gfsA* にトランスフォーメーションした (Fig. 23A)。得られた組み換え体よりゲノム DNA を抽出し、PCR 解析を行ったところ、想定したゲノム位置に相同組み換えカセットが挿入されていることを確認できた (Fig. 23B)。このことから、得られた組み換え体は、Af*gfsA* 遺伝子を相補できていることが期待される。そこで次に、Af*gfsA* 遺伝子の欠損による表現型が、相補株で回復しているかを確認した。Komachi らは、 $\Delta$ Af*gfsA* 株は 50°C の高温ストレス環境下における生育が低下することを報告してい

る (Komachi *et al.* 2013)。そこで、 $\Delta AfgfsA$  株、並びに相補株を培地上に播種し、50°C における生育を観察したところ、 $\Delta AfgfsA$  の生育円は野生株に比べて小さかったのに対し、相補株の生育円は野生株と同程度まで回復した (Fig. 23C)。また、それぞれの総細胞壁 GM 中のタンパク質あたりの Galf 含量をウエスタンブロッティングで確認したところ、相補株のバンドは  $\Delta AfgfsA$  に比べて高い強度であった (Fig. 23D)。これらのことから、得られた組み換え体が *AfgfsA* 遺伝子の欠損を相補できていること、かつ高温ストレス感受性の増大や Galf 含量低下などの表現型が *AfgfsA* 遺伝子の欠損に依存していることが確かめられた。



**Fig. 23. Construction of the  $\Delta AfgfsA$  complementary strain with *AfgfsA*.**

(A) Schematic representation of  $\Delta AfgfsA$  complementation with *AfgfsA*. *AfgfsA* (P), *AfgfsA* promoter; *AfgfsA* (T), *AfgfsA* terminator; *AfgfsA*, open reading frame of *AfgfsA*; *ptrA*, pyrithiamine resistance gene, used as a selective marker. The positions of the primers are indicated by arrows. (B) Confirmation of correct recombination of the *AfgfsA* gene using PCR analysis. M, DNA size markers; lane 1, DNA fragment (2.6 kbp) amplified using PCR and the primers *AfgfsA*-complement-7 and *ptrA*-R; lane 2, DNA fragment (1.1 kb) amplified using PCR and the primers *ptrA*-F and *AfgfsA*-complement-8. (C) Colony phenotypic analysis of strains A1151,  $\Delta AfgfsA$ , and  $\Delta AfgfsA::AfgfsA$  at high temperature. Colonies of strains A1151 (left),  $\Delta AfgfsA$  (middle), and  $\Delta AfgfsA::AfgfsA$  (right) are shown. Conidia were incubated on minimal medium at 50°C for 3 days. (D) Functional rescue of the  $\Delta AfgfsA$  strain with the *AfgfsA* gene. Immunoblot analysis for galactomannoproteins (1.7  $\mu$ g per lane) from strain A1151 (left lane),  $\Delta AfgfsA$  (middle lane), and  $\Delta AfgfsA::AfgfsA$  (right lane) using antibody EB-A2.

次に、*AfgfsA* 遺伝子の欠損が細胞壁 GM 生合成に与える影響の評価を試みた。野生株、 $\Delta$ *AfgfsA*、 $\Delta$ *AfgfsA::AfgfsA* よりそれぞれ細胞壁 GM を抽出し、セタブロン-ホウ酸法にて精製した後、 $^1\text{H-NMR}$  解析、および、糖メチル化分析法にて解析した。なお、本法で精製した GM には OMGM と FTGM が含まれると考えられるため、精製後の GM を含む画分を「FTGM + OMGM」、さらに  $\beta$ -エリミネーション処理し *O*-結合型糖鎖を脱離させた画分を「FTGM」とした。 $^1\text{H-NMR}$  の結果、 $\Delta$ *AfgfsA* の FTGM + OMGM では、5.195 ppm ケミカルシフトのシグナル強度が野生株に比べて極端に小さいことが分かった (Fig. 24A)。また、*O*-結合型糖鎖を脱離させた FTGM 画分でも同様に小さい強度であった (Fig. 24B)。Shibata ら、および Kudoh らの報告によれば、5.195 ppm 近傍に出現するケミカルシフトは「Gal $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>5</sub>Gal $\beta$ <sub>1</sub>→<sub>5</sub>Gal $\beta$ <sub>1</sub>→...」の下線部に表されるように、 $\beta$ 1,5 結合 *Galf* オリゴ糖鎖の中間構造を表すことが分かっている (Shibata *et al.* 2009; Kudoh *et al.* 2015)。一方、5.0 から 5.1 ppm にまとまって出現するシグナルは GM のコアマンナン主鎖に由来し、5.05 ppm は主鎖マンナン糖鎖の  $\alpha$ 1,2 結合マンノースを表す (Takahashi *et al.* 2012; Kudoh, Okawa and Shibata 2015)。すなわち、5.195 ppm のシグナル強度を 5.05 ppm のシグナル強度で除すことで、相対的な *Galf* 糖鎖量を推定することができる。野生株ではこの値は 4.1 であったのに対し、 $\Delta$ *AfgfsA*

の値は 1.5 と、三分の一程度であった。さらに、 $\Delta AfgfsA$  で見られた 5.195 ppm シグナル強度の相対的な低下は、*gfsA* 遺伝子の相補によって改善された (Fig. 24A, B)。このことは、 $\Delta AfgfsA$  の FTGM では、 $\beta$ -1,5 結合している *Galf* の存在比がコアマンナン量に対して相対的に減少していることを示唆している。続いて FTGM + OMGM について  $^{13}\text{C}$ -NMR 解析を行った結果、すべての株で 107.87 ppm、および、108.70 ppm ケミカルシフトがそれぞれ観察されたが、 $\Delta AfgfsA$  は、野生株と 107.87 ppm のシグナル強度が 108.70 ppm の強度に比べて小さかった (Fig. 24C)。また、この傾向は FTGM でも同様であった (Fig. 24D)。既報により、107.87 ppm は「 $\text{Gal}\beta_{1\rightarrow 5}\text{Gal}\beta_{1\rightarrow 5}\text{Gal}\beta_{1\rightarrow \dots}$ 」、108.70 ppm は「 $\text{Gal}\beta_{1\rightarrow 6}\text{Gal}\beta_{1\rightarrow 5}\text{Gal}\beta_{1\rightarrow \dots}$ 」の下線部の構造に対応しており、*Galf* オリゴ糖鎖の  $\beta$ -1,5/1,6 グリコシド結合の結合様式の存在比を表すことが分かっている (Kudoh *et al.* 2015)。すなわち、 $\Delta AfgfsA$  の *Galf* 糖鎖は、 $\beta$ 1,5 結合 *Galf* の存在比が  $\beta$ -1,6 結合に比べて減少していることを示唆している。以上の結果をまとめると、 $\Delta AfgfsA$  の FTGM では  $\beta$ -1,5 *Galf* 含量および糖鎖長が減少していることを示唆している。さらに、結合様式ごとの存在比をより詳細に解析するために、糖メチル化分析を行った。FTGM + OMGM を比較した結果、野生株の 5 位置換 *Galf* フラグメントの含量比は  $18.16 \pm 3.48\%$  であったのに対し、 $\Delta AfgfsA$  では  $10.75 \pm 4.32\%$  であった (*p*

value < 0.05, n=3; Table 9)。同様に、FTGM で比較した結果、野生株の 5 位置換 GalF フラグメントの含量比は  $25.73 \pm 1.50\%$  であったのに対し、 $\Delta AfgfsA$  では  $4.37 \pm 0.39\%$  であった ( $p$  value < 0.05, n=3)。これらの結果は、*AfgfsA* 遺伝子が FTGM と OMGM 生合成の両方に機能していることを明確に示唆している。



**Fig. 24. NMR analyses of purified GMs from the WT,  $\Delta AfgfsA$ , and  $\Delta AfgfsA::AfgfsA$  strains.**

(A)  $^1\text{H}$ -NMR analysis of FTGM+OMGM. (B)  $^1\text{H}$ -NMR analysis of FTGM. (C)  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis of FTGM+OMGM. (D)  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis of FTGM. OMGM, *O*-mannose-type galactomannan; FTGM, fungal-type galactomannan; FTGM+OMGM, total GM (FTGM + OMGM). FTGM was prepared by  $\beta$ -elimination from total GM (FTGM+OMGM) treated with 0.5 M  $\text{NaBH}_4/0.1$  M  $\text{NaOH}$  for 24 h. The signal at 5.195 ppm of the  $^1\text{H}$ -NMR spectra is the H-1 signal of the C-1 position of the underlined Gal $f$  residue in the Gal $f\beta 1 \rightarrow 5$  Gal $f\beta 1 \rightarrow 5$  Gal $f 1$  ( $\beta 1,5$ -Gal $f$ ) structures (Kudoh *et al.* 2015). The signals at 107.87 ppm and 108.70 ppm represent a C-1 chemical shift of the underlined Gal $f$  residue in the Gal $f\beta 1 \rightarrow 5$  Gal $f\beta 1 \rightarrow 5$  Gal $f 1$  ( $\beta 1,5$ -Gal $f$ ) and Gal $f\beta 1 \rightarrow 5$  Gal $f\beta 1 \rightarrow 6$  Gal $f 1$  ( $\beta 1,6$ -Gal $f$ ) structures, respectively (Shibata and Okawa 2011; Kudoh *et al.* 2015). The proton and carbon chemical shifts were referenced relative to internal acetone at  $\delta$  2.225 and 31.07 ppm, respectively.

**Table 9. Methylation analysis of *AfgfsA* strain**

O-methylalditol acetate	Sugar linkage	FTGM+OMGM			FTGM		
		WT	$\Delta AfgfsA$	$\Delta AfgfsA::AfgfsA$	WT	$\Delta AfgfsA$	$\Delta AfgfsA::AfgfsA$
2,3,4,6-Me4-Man	t-Man <sub>p</sub> 1→	34.02 ± 3.64	28.40 ± 9.78	19.12 ± 1.75	21.67 ± 1.60	24.62 ± 4.66	24.95 ± 0.762
3,4,6-Me3-Man	2-Man <sub>p</sub> 1→	17.64 ± 3.13	21.34 ± 3.78	15.99 ± 2.46	21.42 ± 1.59	23.28 ± 2.78	21.82 ± 3.920
2,3,4-Me3-Man	6-Man <sub>p</sub> 1→	8.08 ± 2.48	11.67 ± 0.53	14.96 ± 2.03	7.23 ± 0.96	*15.36 ± 1.70	15.78 ± 2.067
3,4-Me2-Man	2,6-Man <sub>p</sub> 1→	7.12 ± 3.57	8.65 ± 1.20	9.47 ± 1.47	12.02 ± 2.01	10.08 ± 0.80	10.05 ± 0.782
2,3,5,6-Me4-Gal	t-Gal <sub>l</sub> 1→	12.66 ± 1.02	14.94 ± 1.60	20.01 ± 0.94	9.27 ± 2.21	*15.46 ± 1.92	13.57 ± 3.001
2,3,6-Me3-Gal	5-Gal <sub>l</sub> 1→	18.16 ± 3.48	*10.75 ± 4.32	16.67 ± 1.27	25.73 ± 1.50	*4.37 ± 0.39	11.79 ± 1.438
2,3,5-Me3-Gal	6-Gal <sub>l</sub> 1→	2.32 ± 0.48	*4.21 ± 0.61	3.78 ± 1.37	2.66 ± 0.49	*6.82 ± 1.64	2.04 ± 0.378

Values presented are means ± SD. \*P < 0.05.

## 第四節 考察

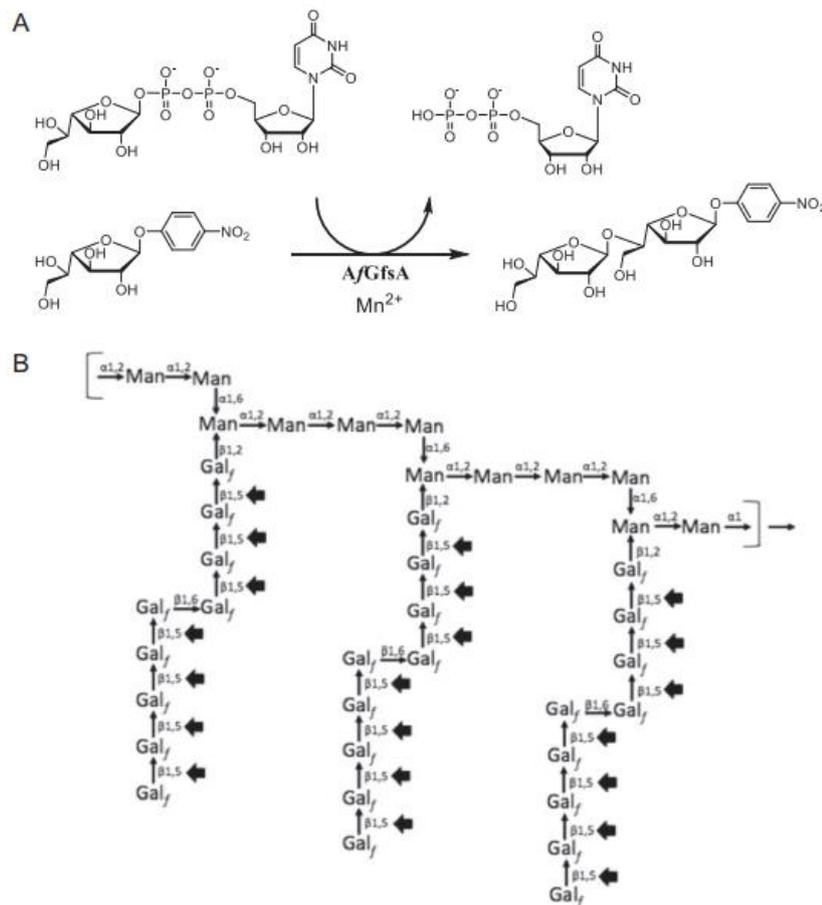
*A. fumigatus* 細胞壁に Galf 糖鎖が見出されてから既に 50 余年経過しているが、Galf 糖鎖の *in vivo* 生合成に関わる遺伝子や酵素は同定されていなかった。本研究では、AfGfsA が「UDP-D-Galf:  $\beta$ -D-Galf 転移酵素」としての活性を有していること、および、OMGM と FTGM 両方の生合成に重要な役割を果たしていることを見出した。

他のいくつかの生物種においては、Galf 転移酵素に関する報告が散見される。

*Leishmania donovani* の *LPG1* 遺伝子は  $\beta$ 1,3 Galf 転移酵素活性をもつことが予想されており、細胞壁の糖リン脂質コアの生合成に重要な働きを持つことが報告されている (Huang and Turco 1993)。バクテリアでは、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* が Galf 転移酵素遺伝子として *glfT1*、*glfT2* の 2 つを持つことが明らかにされている (Rose *et al.* 2006; Belánová *et al.* 2008)。*wbbI*、*wbbO* はそれぞれ *Escherichia coli* K-12 株、*Klebsiella pneumoniae* で見つかった Galf 転移酵素遺伝子であり、細胞壁糖脂質の生合成に重要な役割を担っている (Kos and Whitfield 2010)。興味深いことに、AfGfsA はこれらのいずれの Galf 転移酵素と比べても、アミノ酸相同性は極めて低かった。このことは、*gfsA* が *Aspergillus* 属に独特な遺伝子であることを想起させ、またこれによって、種特異的な Galf 転移酵素活性や基質認識特性などの違いが生じていることが推察される。

本研究では、化学合成した *pNP-Galf* を用いた *Galf* 転移活性の *in vitro* 測定系を構築した。*A. fumigatus* 細胞内における実際の基質は、おそらくより長鎖の *Galf* オリゴ糖であり、また還元末端側に主鎖マンナンバックボーンを含むはずである。今回の測定系では、あまりに大きい分子量の多糖を基質として用いることは不可能であるために、多くの糖転移酵素の基質最小単位である非還元末端糖鎖をミミックする形で *pNP-Galf* 基質を用いている。今後は、より生理的条件に近い基質を用いた活性測定系が必要になるかもしれない。

今回の解析の結果、*AfGfsA* が  $\beta$ 1,5*Galf* 転移酵素であったことを鑑みて(Fig. 25A)、GM 生合成における触媒部位を Fig. 25B の黒矢印の位置ではないかと推定した。一方、NMR 解析と糖メチル化分析の結果、 $\Delta$ *AfgfsA* の FTGM、OMGM には、 $\beta$ 1,5 *Galf* 残基が一部残存していることがわかった (Fig. 24, Table 6)。このことは、*A. fumigatus* が *AfGfsA* の他に *Galf* 転移酵素遺伝子を有していることをほのめかしている。*A. fumigatus* のゲノムには、*AfgfsA* と塩基配列相同性の高い推定遺伝子がいくつか見出されている。それぞれ *AfgfsB*、*AfgfsC* とし、今後は、糖転移活性や細胞壁 GM 生合成における役割、*AfgfsA* との違いなどについて解析していく予定である。これにより、*A. fumigatus* の細胞壁 GM 生合成過程を正確に理解できるだろう。



**Fig. 25. Schematic representation of the AfGfsA reaction.** (A) Schematic representation of the AfGfsA reaction in the *in vitro* assay. The AfGfsA protein transfers the D-Galf residue from UDP-Galf to the C-5 position of the Galf residue in *pNP*- $\beta$ -D-Galf via the  $\beta$ -linkage. In brief, AfGfsA protein acts as UDP-D-Galf:  $\beta$ -D-galactofuranoside  $\beta$ 1,5-galactofuranosyltransferase. At least two reactions occur consecutively.  $Mn^{2+}$ , divalent manganese cation. (B) Schematic of the biosynthesis of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. Arrows indicate the potential reaction points of the  $\beta$ 1,5-Galf linkage catalyzed by AfGfsA in fungal-type galactomannan biosynthesis. Man, mannose; Galf, galactofuranose; Asn, asparagine.

## 第四章

### *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

#### 第一節 序論

*A. fumigatus* 細胞壁 GM の構成糖である Galp 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低い。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 (Tefsen *et al.* 2012)。一方、細胞壁の構造を適切に保つためには、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同様に重要である (Dichtl *et al.* 2012)。すなわち、細胞壁 Galp 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、Galp 糖鎖が  $\beta$ 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 Galp 糖鎖加水分解酵素 (Galfase) が存在することを示唆している (Kudoh *et al.* 2015)。*Penicillium* 属菌 (Mariño *et al.* 2002) やトリパノソーマ (Miletti *et al.* 2003) では既に Galfase の存在と酵素活性について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、 $\beta$ 1,5、および  $\beta$ 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 (Latgé *et al.* 1994; Kudoh *et al.* 2015) (Fig. 25B)、*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もつのか、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る。一方、*Eupenicilium crustaceum* の細胞壁には  $\beta$ 1,5 結合の、また、*Malassezia pachydermatis* には  $\beta$ 1,6 結合の Galf ホモポリマー構造がそれぞれ存在することがわかっている (Leal *et al.* 1992; Shibata *et al.* 2009)。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  $\beta$ 1,5 結合 Galf に特異的なのか、あるいは  $\beta$ 1,6 結合に特異的なのか、又は両者に特異性を有するのかを確かめることができると考えた。そこで私は、*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。

## 第二節 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<sub>3</sub>、5 mM MgSO<sub>4</sub>、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 (Taylor 1995)。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 (*p*NP-Galf, Toronto Chemical Research, Canada) 1 mg を DMSO に溶解し、20 mM *p*NP-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 *p*NP-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  $\mu$ 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  $\mu$ 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*NP 標準液の希釈系列にて作製した検量線に代入し、*p*NP 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  $1 \times 10^7$  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) 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、1×タンパク質抽出液 (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) 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×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 × 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 × 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 (Ramli *et al.* 1995)。 *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、アセトンを除く・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 μL 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 (17×770 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

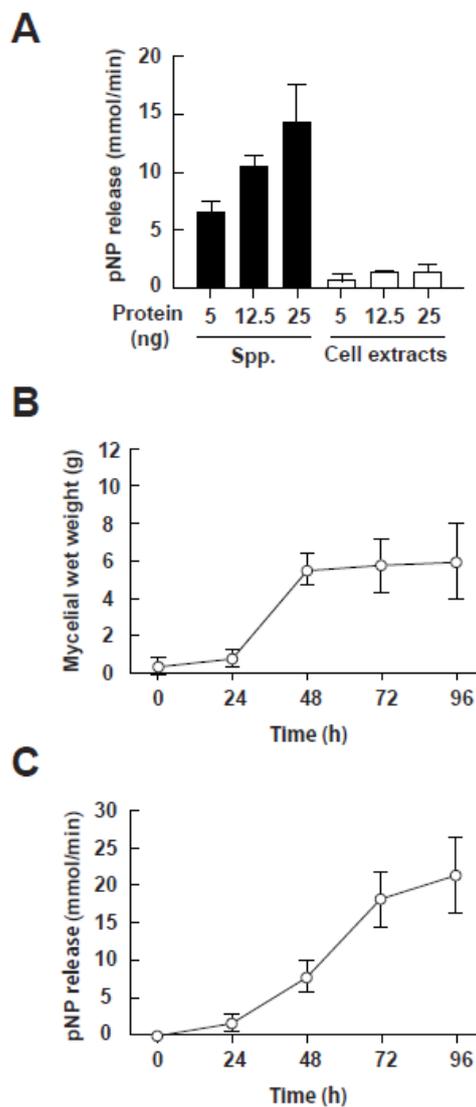
画分を凍結乾燥し、各々 1 mg に対し 2-aminopyridine 試薬 20  $\mu$ L 加え、90°C、1 時間加熱した。ボラン-ジメチルアミン複合体を用いて還元処理を行った後、80°C、35 分間加熱した。これに 28% アンモニア水溶液 300  $\mu$ L、クロロホルム 300  $\mu$ L を加えて攪拌した後、上層を回収し、PA 化 Galf オリゴ糖鎖とした。

### HPLC を用いた Galfase 活性測定

精製した Galfase 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $_5$ C $_{18}$  MS-II (Nacalai 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。

### 第三節 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、*pNP-Galf* 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 *pNP-Galf* 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. 26A)。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 96 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. 26B)。一方、培養上清中の Galfase 活性は、培養時間の経過に伴って増加し続けた (Fig. 26C)。

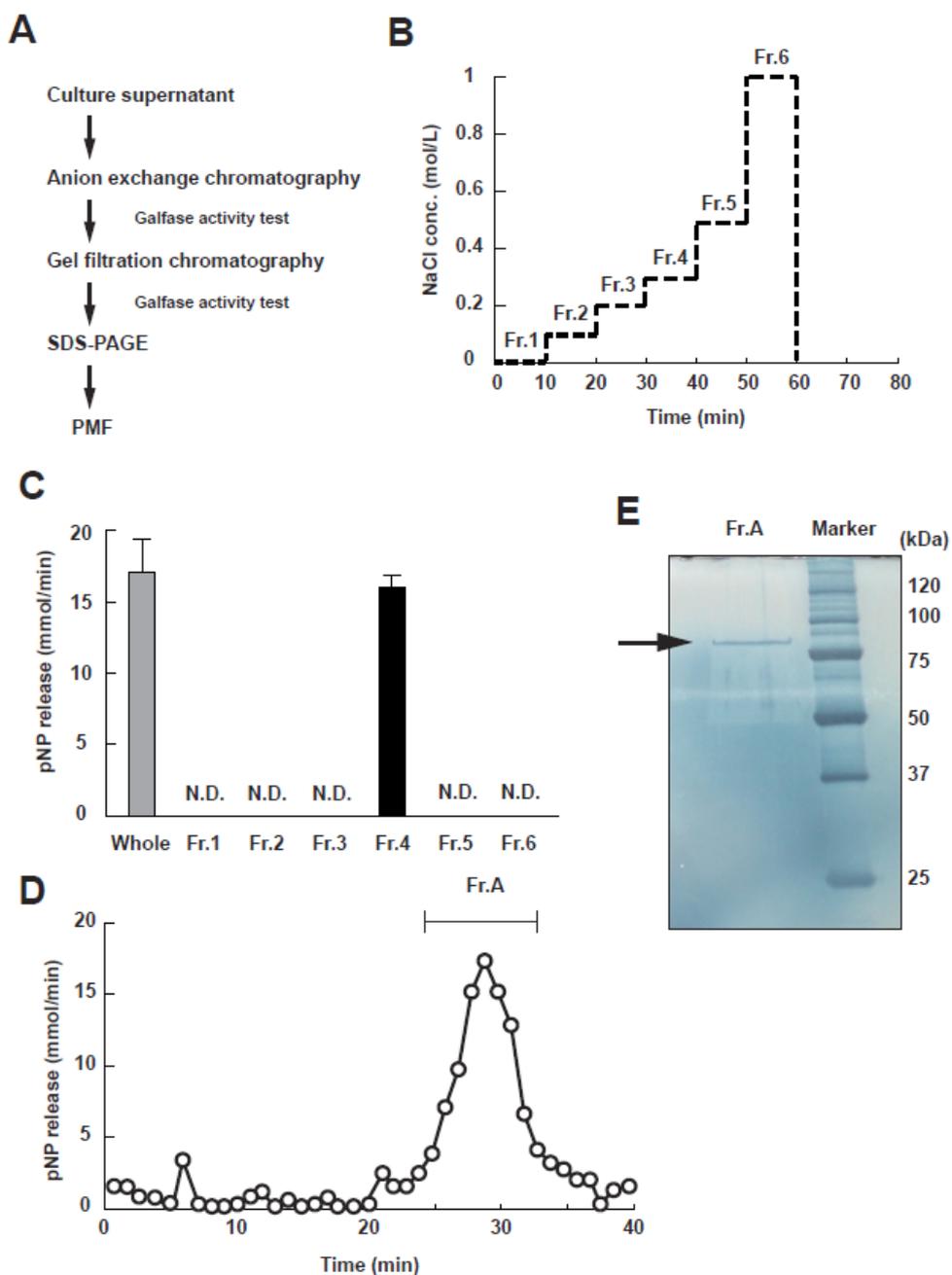


**Fig. 26. *A. fumigatus* Galfase is secreted protein.**

(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 (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.

*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、又は、負に帯電していることが知られていることから (Adav *et al.* 2013)、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. 27A)。*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. 27B, 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、分子サイズで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. 27D)。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. 27E)。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。

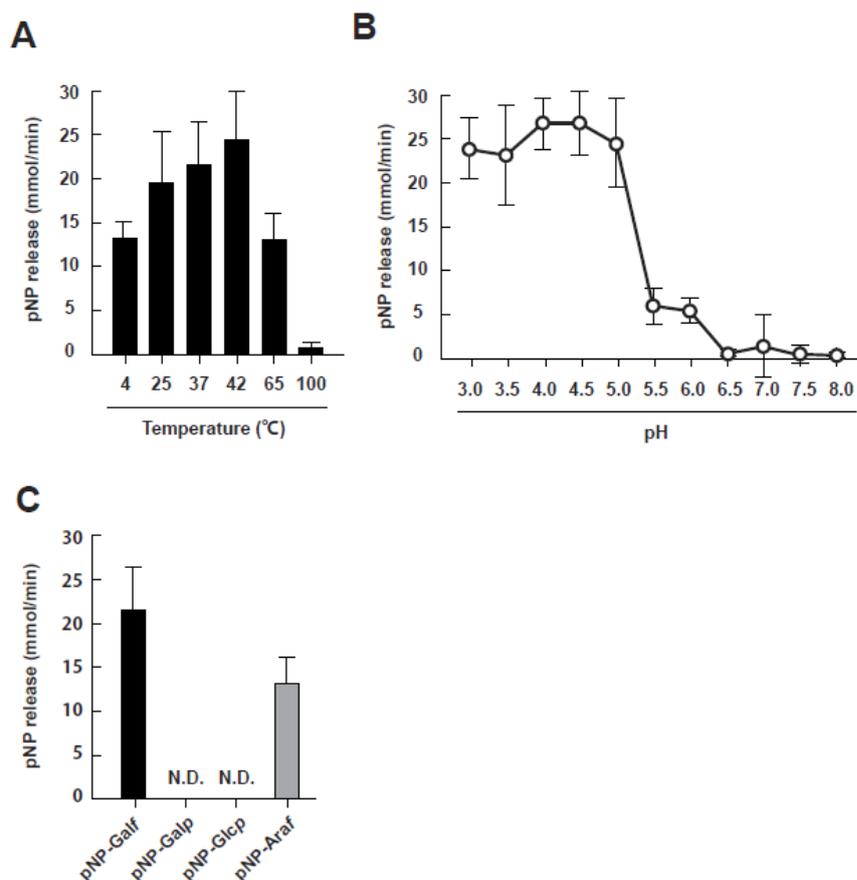


**Fig. 27. Isolation and purification of *AfGalase* from culture supernatant.**

(A) Strategy of isolation and purification of *AfGalase*. (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.

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活性を示した (Fig. 28A)。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. 28B)。一方、中性から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* 誘導体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 *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. 28C)。以上の結果から、AfGalase は 5 員環構造である Galf や Araf に高い特異性を有し、6 員環構造の Galp や Glcp を基質としないことが明らかになった。

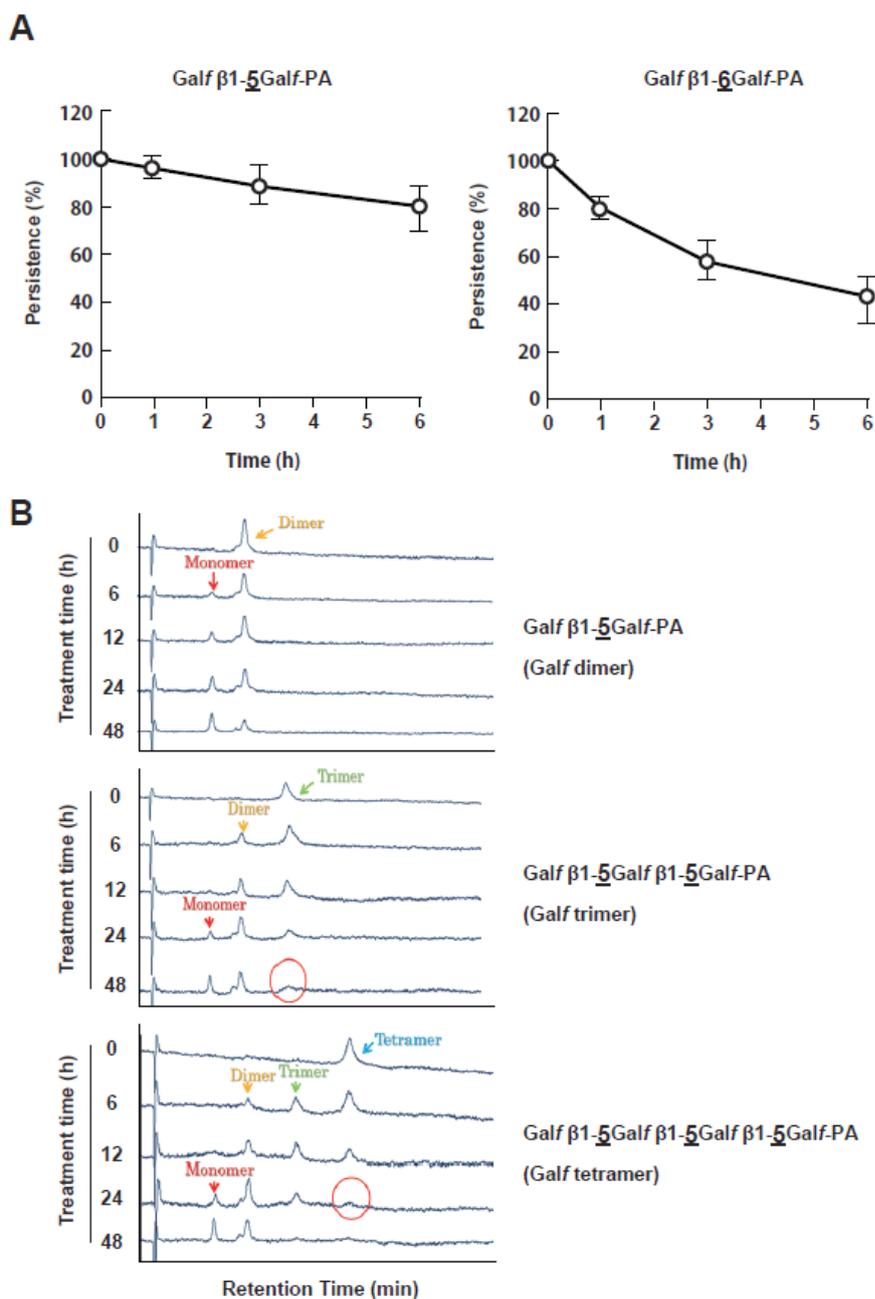


**Fig. 28. Enzymatic properties of AfGalase.**

(A) Temperature dependency of AfGalase 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 AfGalase 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 AfGalase 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.

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*- $\beta$ 1,5 *Galf*-PA ダイマー、および、*Galf*- $\beta$ 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. 29A)。すなわち、*AfGalfase* は、 $\beta$ 1,5 結合と  $\beta$ 1,6 結合の両方の *Galf* 残基を加水分解し、特に、 $\beta$ 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、 $\beta$ 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、酵素反応時間の経過に伴って、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. 29B)。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。これらのことから、本酵素は、*Galf* 糖鎖の非

還元末端から1残基ずつ *Galf* を切り出す「エキソ型糖加水分解酵素」としての活性を有することが示唆された。



**Fig. 29. *AfGalf*ase has exoglycosidase activity toward non-reducing terminal of  $\beta$ 1,5 and  $\beta$ 1,6 linked Galf oligomer.**

(A) Sugar linkage specificity of *AfGalf*ase 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  $\beta$ 1,5 or  $\beta$ 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 *AfGalf*ase. Arrows represent corresponding Galf-oligomers. Circles represent disappearance of an indicated molecule. Representative data are shown for three independent experiments.

## 第四節 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、④ Galf に基質特異性が高く、かつ、 $\beta$ 1,5 結合、および、 $\beta$ 1,6 結合の両方を加水分解できること (Fig. 30)、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 (Latgé 2001; Rhodes 2006; Frisvad *et al.* 2009)。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 (Dichtl *et al.* 2010; Valiante *et al.* 2015)。*A. fumigatus* を AMM 培地で培養すると、菌糸生育が盛んになるにつれて、培地 pH が酸性化することが良く知られている (Wallis *et al.* 2001)。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  $\alpha$ -マンノース主鎖に側鎖として結合する構造であるため (Kudoh *et al.*

2015)、Galfase が Galf 残基を除去することで、 $\alpha$ -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など疎水性表面への付着性が上昇することが報告されている (Schmalhorst *et al.* 2008)。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 (Clayton *et al.* 2000; Rhodes 2006)。高温でも活性を發揮できる *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、 $\beta$ 1,5、 $\beta$ 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、結合様式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 (Paris *et al.* 2003)。*Cat1* タンパク質の分子量はおよそ 90 kDa で、一次構造中に分泌シグナル配列、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 (Calera *et al.* 1997)。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、カタラーゼ活性阻害薬アミノトリアゾールなどの暴露によって *AfGalfase* 活性が消失するか否か、また、*cat1* 遺伝子変異株を作製し、細胞壁 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。Komachi らは、*A. nidulans* 由来 GfsA タンパク質を高収率に回収できるピキア酵母発現系を構築しており、さらにリコンビナント GfsA タンパク質が *in vitro* で Galf 転移活性を持つことを報告している (Komachi *et al.* 2013)。本章で見出した AfGalfase は、Galf 糖鎖に選択性が高い一方、 $\beta$ 1,5/ $\beta$ 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 糖鎖修飾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。

本研究により、*A. fumigatus* が分泌する AfGalfase の酵素学的特徴が明らかになった。

今後の研究が進展することにより、*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。

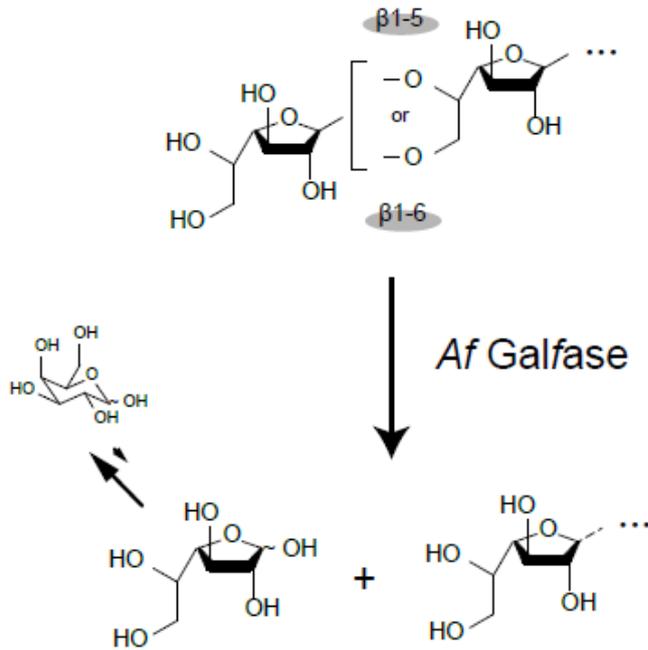


Fig. 30. Schematic representation of AfGalFase reaction.

## 総括

真菌の細胞壁は、環境ストレスから身を守るための防護壁であり、ヒト病原性に関わる抗原であり、いくつかの抗真菌薬の標的でもある。このような経緯から、病原性真菌細胞壁の研究はこれまでに多くの注目を集めた結果、 $\beta$  グルカンやキチン質の合成に関わる遺伝子の多くが、ほとんどの真菌属に保存されていることが分かってきた (Shahinian and Bussey 2000; Amanianda *et al.* 2009)。また、CWI の概念そのものは比較的古くから提唱されてきたが、2000 年代に入ってから、特に出芽酵母 *S. cerevisiae* における CWI 経路の統合的理解は急速に進んでいる (Levin 2005)。その過程で、MAP キナーゼ様遺伝子を介したグルカン-キチン調節が多くの真菌属にも保存されていることが明らかになり、時にヒト病原性や抗真菌薬耐性と関連付けて考えられるようになったことで、ヒト感染過程における宿主要因としての CWI への理解は、一層重要性を増している。一方で、真菌ごとに特徴的な細胞壁構造・組成やその制御機構を持つケースは意外と多く、時にそれらが、種特異的な病原性や環境ストレス耐性に関与することもある (Stevens *et al.* 2006; Chamilos *et al.* 2007)。従って、①真菌属に保存された CWI、すなわちグルカン-キチン調節を正しく理解すること、および ②菌種ごとに特徴的な CWI を理解すること、の両方が重要である。

第一章、第二章では、病原性酵母様真菌 *C. glabrata* の CWI、特にキチン制御に及ぼす小胞体ストレス伝達の役割について考察した。本研究の結果、*C. glabrata* にも MAP キナーゼを介した CWI 調節の仕組みが備わっているだけでなく、他の近縁種で報告された「UPR を介したキチン制御」が保存されているらしいことが明らかになった。*C. glabrata* をゲノム構造や塩基配列から分類すると、非病原性酵母 *S. cerevisiae* に近く、代表的な *Candida* 種である *C. albicans* とはむしろ遠い。さらに、*C. glabrata* のゲノム上にコードされている遺伝子数は、*S. cerevisiae* よりも数千個少ないばかりでなく、*C. glabrata* に特徴的な未知遺伝子は数十個に満たない。以上のことから、Roetzer らは、*C. glabrata* は *S. cerevisiae* からいくつかの遺伝子を「引き算」した生き物であると捉えられる、と述べている (Roetzer *et al.* 2010)。2009 年、Scrimale らが「*S. cerevisiae* では、*IRE1-HAC1* 経路と CWI 経路がクロストークする」ことを報告した 4 年後、Miyazaki らは、*C. glabrata* の *IRE1-HAC1* 経路が機能的に失われていることを明らかにした (Scrimale *et al.* 2009; Miyazaki *et al.* 2013)。今回の我々の研究によって、*C. glabrata* でもやはり小胞体ストレスに応答したキチン制御は保存されていたこと、*C. glabrata* は *IRE1-HAC1* 経路に依存せずに UPR 関連遺伝子を転写活性化できること、また、*S. cerevisiae* に比べて、カルシウムシグナリングの UPR への寄与度が大きいこ

となどが示唆された。*C. glabrata* において *IRE1-HAC1* 経路を代替しているシステムの正体は何なのかについては、いまだ検討の余地が大きい。しかしながら、カルシニューリン経路阻害剤 FK-506 (一般名タクロリムス) 処理によって、*C. glabrata* の UPR および CWI を攪乱できるとわかったことは大きな収穫である。例えば血液疾患領域においては、臓器移植後のカテーテル留置を原因とする *Candida* 症が頻繁に起こるため、*C. glabrata* や *C. krusei* に起因する術後感染には注意を払わなくてはならない (Yamazaki *et al.* 1999; Pappas *et al.* 2003; Pfaller *et al.* 2009)。そこで、施術後に処置される免疫抑制剤として、ステロイド剤でなくカルシニューリン阻害剤処置を選択することで、潜在的な抗 *Candida* 活性が期待でき、*Candida* 症の発生リスクを低減できるのではないかと考えている。

第三章、第四章では、糸状菌 *A. fumigatus* に特徴的な *Galf* 糖鎖に着目し、第三章では生合成に関わる糖転移酵素遺伝子を、第四章では分解に関わる加水分解酵素をそれぞれ解析した。その結果、これまで未発見だった「*A. fumigatus* の *Galf* 代謝マップ」の一部が明らかになった。Kudoh らは、貧栄養や低 pH 条件下で *A. fumigatus* の *Galf* 糖鎖長が長くなる現象を報告しており、環境ストレス条件下における *Galfase* の発現、および活性について予想している (Kudoh *et al.* 2015)。本研究結果と併せると、*A.*

*fumigatus* の Galf 糖鎖にも、GfsA や Galfase を介した新規の Galf 糖鎖の CWI 調節機構が備わっていることを示唆している。今後、Gfs 相同遺伝子ファミリーやその上流シグナル伝達を解明していくことで、*A. fumigatus* の病原性や CWI をより深く理解できるようになるだろう。興味深いことに、細胞壁に Galf を持つ生物のうち、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の *glfT1*、*glfT2* 遺伝子、大腸菌 *Escherichia coli* K-12 株の *wbbI* 遺伝子、肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* の *wbbO* 遺伝子がそれぞれ Galf 転移酵素をコードする遺伝子として同定されているが、これら遺伝子の塩基配列相同性、および遺伝子産物のタンパク質一次構造相同性は、*A. fumigatus* の *gfsA* を含めて比較しても決して高くない (Tefsen *et al.* 2012)。また、最終生成物である Galf 糖鎖の構造は、生物ごとに、結合様式や組成レベルでまるで異なっている。以上のことは、これらの生物のそれぞれの進化の過程で、Galf (糖鎖) を独自に獲得したのではないか、という考えを彷彿させる。また、Galf 糖鎖の機能や役割、Galf 代謝経路が菌種ごとに異なる可能性が高いものと予想される。今後、Galf 代謝マップの全容が徐々に明らかになることで、生物が Galf 糖鎖を利用することの生物学的意義が解明されていくことを期待する。

## 参考文献

- Adav SS, Ravindran A, Sze SK. Proteomic analysis of temperature dependent extracellular proteins from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state culture condition. *J Proteome Res* 2013;**12**:2715–2731.
- Agatep R, Kirkpatrick RD, Parchaliuk DL *et al.* Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Tech Tips Online* 1998;**3**:133–137.
- Aimanianda V, Clavaud C, Simenel C *et al.* Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *J Biol Chem* 2009;**284**:13401–13412.
- Back SH, Schroder M, Lee K *et al.* ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods* 2005;**35**:395–416.
- Bamford NC, Snarr BD, Gravelat FN *et al.* Sph3 is a glycoside hydrolase required for the biosynthesis of galactosaminogalactan in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 2015;**290**:27438–27450.
- Belánová M, Dianišková P, Brennan PJ *et al.* Galactosyl transferases in mycobacterial cell wall synthesis. *J Bacteriol* 2008;**190**:1141–1145.
- Bermejo C, Rodríguez E, García R *et al.* The sequential activation of the yeast *HOG* and *SLT2* pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* 2008;**19**:1113–1124.
- Bernard M, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 2001;**39 Suppl 1**:9–17.
- Boone C, Sommer SS, Hensel A *et al.* Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol* 1990;**110**:1833–1843.

- Borah S, Shivarathri R, Kaur R. The Rho1 GTPase-activating protein CgBem2 is required for survival of azole stress in *Candida glabrata*. *J Biol Chem* 2011;**286**:34311–34324.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ *et al*. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 1998;**14**:115–132.
- Buzzi LI, Simonetta SH, Parodi AJ *et al*. The two *Caenorhabditis elegans* UDP-glucose:Glycoprotein glucosyltransferase homologues have distinct biological functions. *PLoS One* 2011;**6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0027025.
- Calera JA, Paris S, Monod M *et al*. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1997;**65**:4718–4724.
- Chamilos G, Lewis RE, Albert N *et al*. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species in vitro: Evidence for Echinocandin-Specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;**51**:2257–2259.
- Chen RE, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1773**:1311–1340.
- Cid VJ, Cenamor R, Sánchez M *et al*. A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* 1998;**144**:25–36.
- Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 1984;**131**:209–217.
- Clayton ME, Steinmann R, Fent K. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat Toxicol* 2000;**47**:213–226.
- Costachel C, Coddeville B, Latgé JP *et al*. Glycosylphosphatidylinositol-anchored fungal polysaccharide in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 2005;**280**:39835–39842.

- Dichtl K, Ebel F, Dirr F *et al.* Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 2010;**76**:1191–1204.
- Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F *et al.* Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: Identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol* 2012;**83**:506–519.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G *et al.* Genome evolution in yeasts. *Nature* 2004;**430**:35–44.
- Ene I V., Walker LA, Schiavone M *et al.* Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *MBio* 2015;**6**, DOI: 10.1128/mBio.00986-15.
- Engel J, Schmalhorst PS, Dork-Bousset T *et al.* A single UDP-galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 2009;**284**:33859–33868.
- Fanchiotti S, Fernández F, D’Alessio C *et al.* The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biol* 1998;**143**:625–635.
- Feng X, Krishnan K, Richie DL *et al.* HacA-independent functions of the ER stress sensor irea synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 2011;**7**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002330.
- François JM. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nat Protoc* 2006;**1**:2995–3000.
- Free SJ. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Adv Genet* 2013;**81**:33–82.
- Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF *et al.* Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2009;**47 Suppl 1**:S53-71.
- Frost A, Elgort MG, Brandman O *et al.* Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell* 2012;**149**:1339–1352.

- García R, Bermejo C, Grau C *et al.* The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. *J Biol Chem* 2004;**279**:15183–15195.
- Gardner BM, Walter P. Unfolded Proteins are Ire1-Activating Ligands that Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* (80- ) 2011;**333**:1891–1895.
- Georgopapadakou NH, Tkacz JS. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol* 1995;**3**:98–104.
- Glazier VE, Panepinto JC. The ER stress response and host temperature adaptation in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Virulence* 2014;**5**:351–356.
- Gravelat FN, Beauvais A, Liu H *et al.* *Aspergillus* Galactosaminogalactan Mediates Adherence to Host Constituents and Conceals Hyphal  $\beta$ -Glucan from the Immune System. *PLoS Pathog* 2013;**9**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003575.
- De Groot PWJ, Kraneveld EA, Qing YY *et al.* The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: Differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell* 2008;**7**:1951–1964.
- Hearn VM, Sietsma JH. Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Microbiology* 1994;**140**, Pt 4:789–795.
- Heng S-C, Chen SC, Morrissey CO *et al.* Clinical utility of *Aspergillus* galactomannan and PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;**79**:322–327.
- Herrero AB, Magnelli P, Mansour MK *et al.* *KRE5* gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell* 2004;**3**:1423–1432.
- Herscovics A. Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* -

- Gen Subj* 1999;**1426**:275–285.
- Huang C, Turco SJ. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 1993;**268**:24060–24066.
- Jin C, Parshin A V., Daly I *et al.* The cell wall sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 are required for stress-induced nuclear to cytoplasmic translocation of cyclin C and programmed cell death in yeast. *Oxid Med Cell Longev* 2013, DOI: 10.1155/2013/320823.
- Jung KW, Kang HA, Bahn YS. Essential Roles of the Kar2/BiP Molecular Chaperone Downstream of the UPR Pathway in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* 2013;**8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0058956.
- Jung US, Levin DE. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 1999;**34**:1049–1057.
- Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Yamada S *et al.* Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells* 2006;**11**:59–69.
- Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M *et al.* Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (A complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* 2005;**12**:291–299.
- Kock C, Dufrene YF, Heinisch JJ. Up against the wall: Is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:806–811.
- Komachi Y, Hatakeyama S, Motomatsu H *et al.* gfsA encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 2013;**90**:1054–1073.
- Kos V, Whitfield C. A membrane-located glycosyltransferase complex required for

- biosynthesis of the D-Galactan I lipopolysaccharide O antigen in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 2010;**285**:19668–19678.
- Krebs J, Agellon LB, Michalak M. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;**460**:114–121.
- Kudoh A, Okawa Y, Shibata N. Significant structural change in both O- and N-linked carbohydrate moieties of the antigenic galactomannan from *Aspergillus fumigatus* grown under different culture conditions. *Glycobiology* 2015;**25**:74–87.
- Kuo SC, Lampen JO. Tunicamycin - An inhibitor of yeast glycoprotein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;**58**:287–295.
- Lagorce A, Berre-Anton V Le, Aguilar-Uscanga B *et al*. Involvement of *GFAI*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 2002;**269**:1697–1707.
- Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 2001;**9**:382–389.
- Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP *et al*. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994;**62**:5424–5433.
- Leach MR, Cohen-Doyle MF, Thomas DY *et al*. Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 2002;**277**:29686–29697.
- Leal JA, Guerrero C, Gómez-Miranda B *et al*. Chemical and structural similarities in wall polysaccharides of some *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 1992;**90**:165–168.
- Levin DE. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol*

- Rev* 2005;**69**:262–291.
- Levinson JN, Shahinian S, Sdicu AM *et al.* Functional, comparative and cell biological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Kre5p. *Yeast* 2002;**19**:1243–1259.
- Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* 2007;**86**:204–215.
- Mariño K, Lima C, Maldonado S *et al.* Influence of exo beta-D-galactofuranosidase inhibitors in cultures of *Penicillium fellutanum* and modifications in hyphal cell structure. *Carbohydr Res* 2002;**337**:891–897.
- Martín H, Rodríguez-Pachón JM, Ruiz C *et al.* Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2000;**275**:1511–1519.
- Meaden P, Hill K, Wagner J *et al.* The yeast *KRE5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1-6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol* 1990;**10**:3013–3019.
- Mennink-kersten MASH, Ruegebrink D, Wasei N *et al.* In Vitro Release by *Aspergillus fumigatus* of Galactofuranose Antigens, 1, 3-beta-D-Glucan, and DNA, Surrogate Markers Used for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Society* 2006;**44**:1711–1718.
- Miletti LC, Mariño K, Marino C *et al.* Evidence for exo  $\beta$ -d-galactofuranosidase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;**127**:85–88.
- Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S *et al.* Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2010;**10**:343–352.
- Miyazaki T, Izumikawa K, Yamauchi S *et al.* The glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease Yps1 is transcriptionally regulated by the calcineurin-Crz1 and Slt2 MAPK pathways in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2011;**11**:449–456.

- Miyazaki T, Nakayama H, Nagayoshi Y *et al.* Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog* 2013;**9**:e1003160.
- Moiseev IS, Pirogova O V., Alyanski AL *et al.* Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Unrelated Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Post-Transplantation Cyclophosphamide, Tacrolimus, and Mycophenolate Mofetil. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;**22**:1037–1042.
- Molinari M, Eriksson KK, Calanca V *et al.* Contrasting Functions of Calreticulin and Calnexin in Glycoprotein Folding and ER Quality Control. *Mol Cell* 2004;**13**:125–135.
- Molinari M, Galli C, Vanoni O *et al.* Persistent glycoprotein misfolding activates the glucosidase II/UGT1-driven calnexin cycle to delay aggregation and loss of folding competence. *Mol Cell* 2005;**20**:503–512.
- Munro CA, Winter K, Buchan A *et al.* Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* 2001;**39**:1414–1426.
- Nakayama H, Izuta M, Nagahashi S *et al.* A controllable gene-expression system for the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* 1998;**144**:2407–2415.
- Neiman AM, Mhaiskar V, Manus V *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* *HOC1*, a suppressor of *pkc1*, encodes a putative glycosyltransferase. *Genetics* 1997;**145**:637–645.
- Niimi K, Woods MA, Maki K *et al.* Reconstitution of high-level micafungin resistance detected in a clinical isolate of *Candida glabrata* identifies functional homozygosity in glucan synthase gene expression. *J Antimicrob Chemother* 2012;**67**:1666–1676.
- Oka T, Jigami Y. Reconstruction of de novo pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 2006;**273**:2645–2657.

- Oppenheimer M, Poulin MB, Lowary TL *et al.* Characterization of recombinant UDP-galactopyranose mutase from *Aspergillus fumigatus*. *Arch Biochem Biophys* 2010;**502**:31–38.
- Pappas PG, Rex JH, Lee J *et al.* A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;**37**:634–643.
- Paris S, Wysong D, Debeauvais JP *et al.* Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 2003;**71**:3551–3562.
- Parlati F, Dignard D, Bergeron JJ *et al.* The calnexin homologue *cnx1* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J* 1995;**14**:3064–3072.
- Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2001;**13**:349–355.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ *et al.* Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009;**47**:3185–3190.
- Poulin MB, Lowary TL. Methods to study the biosynthesis of bacterial furanosides. *Methods Enzymol* 2010;**478**:389–411.
- Ramli N, Fujinaga M, Tabuchi M *et al.* Isolation and characterization of a novel endo-beta-galactofuranosidase from bacillus sp. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995;**59**, DOI: 10.1271/bbb.59.1856.
- Reiss E, Lehmann PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1979;**25**:357–365.
- Rhodes JC. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol* 2006;**44 Suppl 1**:S77-81.

- Roetzer A, Gabaldón T, Schüller C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 2010, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02102.x.
- Roncero C, Duran A. Effect of Calcofluor White and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* 1985;**163**:1180–5.
- De Rosa FG, Corcione S, Filippini C *et al.* The effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in internal medicine wards. *PLoS One* 2015;**10**, DOI: 10.1371/journal.pone.0125149.
- Rose NL, Completo GC, Lin SJ *et al.* Expression, purification, and characterization of a galactofuranosyltransferase involved in *Mycobacterium tuberculosis* arabinogalactan biosynthesis. *J Am Chem Soc* 2006;**128**:6721–6729.
- Sayer HG, Longton G, Bowden R *et al.* Increased risk of infection in marrow transplant patients receiving methylprednisolone for graft-versus-host disease prevention. *Blood* 1994;**84**:1328–1332.
- Schmalhorst PS, Krappmann S, Vervecken W *et al.* Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2008;**7**:1268–1277.
- Scrimale T, Didone L, de Mesy Bentley KL *et al.* The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2009;**20**:164–175.
- Selvakumar D, Miyamoto M, Furuichi Y *et al.* Inhibition of fungal beta-1,3-Glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:3090–7.

- Shahinian S, Bussey H. beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2000;**35**:477–489.
- Shahinian S, Dijkgraaf GJP, Sdicu AM *et al*. Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta -1,6-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1998;**149**:843–856.
- Shibata N, Saitoh T, Tadokoro Y *et al*. The cell wall galactomannan antigen from *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* contains beta-1,6-linked linear galactofuranosyl residues and its detection has diagnostic potential. *Microbiology* 2009;**155**:3420–3429.
- Shibata N, Suzuki A, Kobayashi H *et al*. Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem J* 2007;**404**:365–372.
- Shields RK, Nguyen MH, Du C *et al*. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;**55**:2641–2647.
- Da Silva Ferreira ME, Kress MRVZ, Savoldi M *et al*. The *akuBKU80* mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2006;**5**:207–211.
- Springer DJ, Chen Y-L, Abraham SN *et al*. Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in *Candida glabrata*. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 2012;**2**:675–691.
- Stevens DA, Ichinomiya M, Koshi Y *et al*. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:3160–3161.
- Takahashi S, Kudoh A, Okawa Y *et al*. Significant differences in the cell-wall mannans from

- three *Candida glabrata* strains correlate with antifungal drug sensitivity. *FEBS J* 2012;**279**:1844–1856.
- Tanaka Y, Sasaki M, Ito F *et al.* *KRE5* suppression induces cell wall stress and alternative ER stress response required for maintaining cell wall integrity in *Candida glabrata*. *PLoS One* 2016;**11**, DOI: 10.1371/journal.pone.0161371.
- Taylor KACC. A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Appl Biochem Biotechnol* 1995;**53**:207–214.
- Taylor SC, Ferguson AD, Bergeron JJM *et al.* The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation. *Nat Struct Mol Biol* 2004;**11**:128–134.
- Taylor SC, Thibault P, Tessier DC *et al.* Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase. *EMBO Rep* 2003;**4**:405–411.
- Tefsen B, Ram AFJ, Van Die I *et al.* Galactofuranose in eukaryotes: Aspects of biosynthesis and functional impact. *Glycobiology* 2012;**22**:456–469.
- Ueno K, Uno J, Nakayama H *et al.* Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of *YKU80* expression in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 2007;**6**:1239–1247.
- Umeyama T, Kaneko A, Watanabe H *et al.* Deletion of the *CaBIG1* gene reduces  $\beta$ -1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun* 2006;**74**:2373–2381.
- Urano F, Bertolotti a, Ron D. *IRE1* and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 2000;**113 Pt 21**:3697–3702.
- Valiante V, Macheleidt J, Föge M *et al.* The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*

2015;**6**:325.

Wallis GL, Hemming FW, Peberdy JF. An extracellular beta-galactofuranosidase from *Aspergillus niger* and its use as a tool for glycoconjugate analysis. *Biochim Biophys Acta* 2001;**1525**:19–28.

West L, Lowman DW, Mora-Montes HM *et al.* Differential virulence of *Candida glabrata* glycosylation mutants. *J Biol Chem* 2013;**288**:22006–22018.

White PL, Parr C, Thornton C *et al.* Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2013;**51**:1510–1516.

Yamazaki T, Kume H, Murase S *et al.* Epidemiology of visceral mycoses: Analysis of data in Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:1732–1738.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A *et al.* *XBPI* mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;**107**:881–891.

Yu JH, Hamari Z, Han KH *et al.* Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 2004;**41**:973–981.

Zordan RE, Ren Y, Pan S-J *et al.* Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda)* 2013;**3**:1675–1686.