

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	クリプトコッカス属真菌が産生するカプセル多糖生合成機構の解明
キーワード	① 莢膜多糖、② 糖転移酵素、③ クリプトコッカス症

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	カドオカ チヒロ 門岡 千尋
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	生物生命学科・助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	生物生命学科・助教
プロフィール	2015年3月 鹿児島大学農学部生物資源化学科中退（飛び級） 2017年4月 日本学術振興会特別研究員 DC1 2020年3月 鹿児島大学大学院連合農学研究科修了（博士（農学）） 2020年4月 日本学術振興会特別研究員 PD（筑波大学生命環境系） 2021年4月 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科 助教 2022年4月 崇城大学生物生命学部生物生命学科 助教 現在に至る。 真菌の特徴的な糖鎖構造の生合成機構について研究しています。

1. 研究の概要

クリプトコッカス症の主な原因菌である *Cryptococcus neoformans* は細胞壁の最外層に莢膜と呼ばれる多糖構造を産生する。この莢膜は宿主の免疫系の回避を通して、本菌における最も重要な病原性因子として機能することが指摘されている。莢膜はグルクロノキシロマンナン (GXM) とグルクロノキシロマンノガラクトン (GXMGal) と呼ばれる2種類の多糖で構成されていることが報告されているものの、その生合成に関与する糖転移酵素はほとんど明らかになっていない。本研究では *Cryptococcus neoformans* のゲノム上より見出した30種の推定ゴルジ体局在機能未知タンパク質の解析により、GXMGalの生合成に関与する新規 β -ガラクトシド α -(1,4)-マンノース転移酵素 Cgm1 を同定した（次頁図参照）。*C. neoformans* の *cgm1* 破壊株は GXMGal のマンナン側鎖が消失し、ヒトの体温である 37°C において温度感受性を示すことを明らかにした。今後は *cgm1* 破壊株のマウスに対する病原性や、Cgm1 タンパク質の立体構造の解析を行う予定である。

2. 研究の動機、目的

クリプトコッカス症は真菌による感染症の1つである。爆発的な感染拡大は起こらないものの、未だに人類を苦しめ続けていることから、未来に向けて克服する必要がある感染症である。従来、クリプトコッカス症はいわゆる日和見感染症であり、免疫不全者に多くみられる病気であったが、最近 *Cryptococcus gattii* による高病原性クリプトコッカス症が世界中で拡大している。高病原性クリプトコッカス症は免疫正常者であっても感染することが知られているため、クリプトコッカス症に対する抗真菌薬の開発が急務となっている。しかしながら、真菌はヒトと基本的な生命維持メカニズムが酷似していることから、抗真菌薬の開発は困難を極める。実際に、上市されている抗真菌薬は作用機序を基に分類すれば4種類しかない。現

在、真菌特有の脂質であるエルゴステロールの合成阻害剤（アゾール系抗真菌薬）が、多くの真菌性感染症に対する第一選択薬となっているが、耐性菌が出現していることから、全く異なる作用機序による抗真菌薬の開発が望まれている。*C. neoformans* の莢膜を欠損した変異体はその病原性をほぼ完全に失うことから、莢膜はクリプトコッカス症の創薬ターゲットとして有効であることが指摘されている。しかしながら、莢膜の生合成に関与する糖転移酵素はほとんど同定されていないのが現状であった。本研究では莢膜の生合成に関与する新規な糖転移酵素を同定し、莢膜生合成機構の全貌を明らかにすることを目指した。

3. 研究の結果

莢膜の生合成はゴルジ体で行われていると考えられているため、1) ゴルジ体に局在すること、2) 多くの糖転移酵素がもつ特徴である N 末端に 1 回膜貫通領域をもつ II 型膜タンパク質であること、3) 機能同定されたホモログが存在しない機能未知なタンパク質であることの 3 つの条件を満たす「推定ゴルジ体局在機能未知 II 型膜タンパク質」の中に莢膜の生合成を担う新奇糖転移酵素が存在すると考えた。そこで膜貫通領域予測ツール (TMHMM) とディープラーニングによって構築されたアルゴリズムに基づくタンパク質局在予測ツール (Deeploc-1.0) を併用することで *C. neoformans* の全 ORF6975 個から、30 種の候補遺伝子を選抜した。候補遺伝子の cDNA を調整し、pET15b ベクターにクローニングし、大腸菌宿主 SHuffle T7 を用いて発現させた。可溶性発現に成功したタンパク質について、様々な組合せの各種 4-メチルウンベリフェリル (4MU) 化糖および糖ヌクレオチドと反応させた結果、4MU- β -ガラクトースに対してマンノースを転移する新規酵素を発見した。この酵素反応産物について、NMR およびメチル化 GC-MS 解析によって構造解析を行った結果、反応産物の構造は 4MU- β -ガラクトースの 4 位に α -マンノースの 1 位が結合した構造であることが明らかになった。そこで当該新規酵素を Cgm1 と名付けた。 β -ガラクトースに α -マンノースを転移する糖転移酵素はこれまでに知られておらず、全生物を通して初めての発見である。次に、*C. neoformans* において *cgm1* 破壊株を構築し、表現型について解析した結果、*cgm1* 破壊株は 30°C においては野生株とほぼ同様の生育を示すものの、37°C において生育することができず、温度感受性を示すことが明らかになった。さらに、*cgm1* 破壊株が産生する GXMGal の構造について NMR およびメチル化 GC-MS により解析した結果、野生株の GXMGal に存在するマンナン側鎖が *cgm1* 破壊株の GXMGal では消失もしくは減少していることが明らかになった。以上の結果より、Cgm1 は GXMGal のマンナン側鎖の生合成に関与する β -ガラクトシド α -(1,4)-マンノース転移酵素であることが明らかになった (図)。加えて、*cgm1* 破壊株の表現型から、GXMGal のマンナン側鎖は *C. neoformans* の高温ストレス耐性において何らかの重要な役割があることが明らかになった。

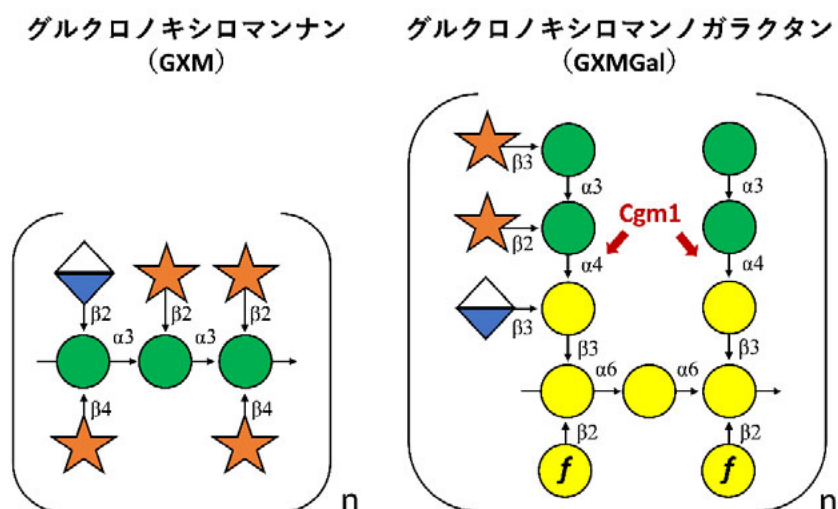


図 *C. neoformans* の莢膜を構成する多糖の構造

4. 研究者としてのこれからの展望

私は学生時代には焼酎製造に用いられる白麹菌のクエン酸高生産機構についての研究を行っており、本学に着任してから初めて糖鎖の研究に取り組んでいる。着任当初は白麹菌と近縁な *Aspergillus* 属糸状菌の病原菌である *A. fumigatus* のガラクトマンナンという多糖の生合成に関する研究に従事していたが、幅広い生物種においてユニークな糖鎖構造の生合成に関与する糖転移酵素を発見したいと思い、昨年度から担子菌酵母でありクリプトコッカス症の原因菌である *C. neoformans* を題材として研究を行っている。実際に、上記のように全生物を通して初めての反応を行う糖転移酵素として Cgm1 を同定することができた。今後は Cgm1 以外の莢膜生合成に関与する糖転移酵素を同定していくことで莢膜生合成機構の全貌を明らかにしたいと考えている。また、これから 40 年近く研究者人生は続いていくが、常に新しいものや現象を対象とした研究に取り組んでいきたい。独創的な研究を展開することで、国内外における当該研究分野の発展に貢献していきたいと考えている。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団および関係者各位に心より感謝いたします。ご支援いただきました奨励金によって、解析に必要な試薬類を購入することができ、新規な糖転移酵素を同定することができました。今後は、クリプトコッカス症に対する新たな抗真菌薬の開発に繋がるように本研究を発展させていきたいと考えています。