

杉山産業化学研究所  
2018 年度「研究助成」  
研究報告書

題目：担子菌の *N*-結合型糖鎖の特殊性を用いたバイオ医薬品生産システムの構築

研究者：本田与一

所属：京都大学大学院農学研究科

研究の目的：

ヒトの体内で微量に分泌されるサイトカインなどの糖タンパク質・ペプチドは、新薬として脚光を浴びてきている。これらのバイオ医薬品は極めて高価であり、また安定して機能する為には、ヒト型の糖鎖による翻訳後修飾が必要である。現在、バイオ医薬品の生産はマウスの培養細胞を用いているが、生産性が低く、生産コストが極めて高価であるうえ、レトロウイルスによる感染リスクも存在している。このため、こうした問題をクリアできる真核微生物を用いた安全安価なヒト型糖タンパク質生産システムの確立が望まれている。

酵母や麹菌などの子囊菌類を用いた系では、糖鎖に過剰量のマンノースを付加（ハイパーグリコシレーション）する機能を持っていて、ヒト型糖タンパク質の生産には向かない。一方、真正担子菌類（きのこの仲間）では、*N*-結合型糖鎖が全ての真核生物の基本骨格である高マンノース（Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>）型のみである事がわかってきた。本研究は、担子菌類において、糖鎖転移反応の前駆体となるヒトの組換えタンパク質発現をより効率の良い確かな技術とすることを目的として、転写開始から成熟 mRNA が合成される過程における、担子菌システムの独自性について解明することを目指した。

実験方法：

独自に開発してきた担子菌プロトプラストのトランスフェクションによる「一過性の組換え遺伝子発現」は、安定形質転換体を用いた従来の研究では染色体への組込様態のバラツキのため困難だった、個々の遺伝子発現を制御するシステムを正確に評価することが可能である。我々はこれまでに、この系を用いてプロモーターの構造解析を進め、担子菌において基本的な転写開始に必要な配列等について明らかにしてきた (Honda et al., 2019; Ngyuen et al., 2019)。本研究では、転写開始以降の成熟 mRNA 形成に至る過程が、担子菌における組換え遺伝子の発現調節においてどのような役割を果たしているかについて以下の様な実験を行った。

結果:

① イントロンの必要性と機能

スエヒロタケ安定形質転換体を用いた研究では、組換え遺伝子の発現にはイントロンが必須であると報告され、この考え方が担子菌類における定説とされている。本研究では、担子菌 *Ceriporiopsis subvermispora* のトランスフェクション系を用いて、一過性の組換え遺伝子発現におけるイントロンの必要性について解析を行った。その結果、イントロンの有無による遺伝子発現に有意差は確認されず、イントロンがなくても効率よい組換え遺伝子の発現が可能であることが明らかとなった。

② 転写ターミネーターの評価

mRNA プロセッシングは転写中に始まるとされるが、転写終結シグナルの重要性については、担子菌ではこれまであまり注目されてこなかった。組換え遺伝子発現を行うとき、いわばおざなりにされてきた転写ターミネーターの影響について、上記トランスフェクション系を用いて解析を行い、ターミネーター配列が存在しないと発現が極めて低くなること、また配列の種類 (*gpd*もしくは  *$\beta$ -tubulin* 遺伝子の *ter* 配列) によって発現効率が著しく異なることが示された。

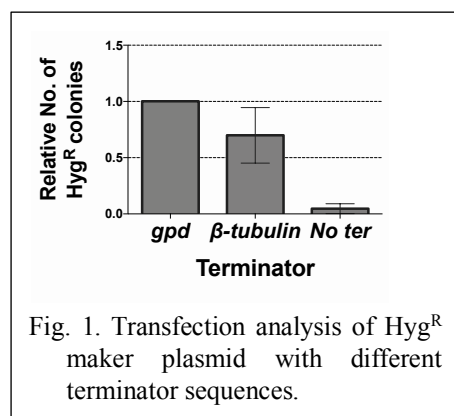


Fig. 1. Transfection analysis of Hyg<sup>R</sup> maker plasmid with different terminator sequences.

結論:

トランスフェクションによる一過性の遺伝子発現アッセイ系を用いて、担子菌における効果的な組換え遺伝子発現には、定説とは異なりイントロンは必ずしも必要では無いこと、転写ターミネーターは重要な役割を果たしており、異種遺伝子発現カセットの要素として重要である事が初めて明らかになった。

本研究の成果は、今後様々な組換え遺伝子を安定して効率よく発現させ、担子菌類の産業利用をさらに進めていくための基礎となる成果である。なお、成果の一部については、欧州菌類遺伝学会議にて報告され、ベストポスター賞を受賞した。

文献:

- 1) Y. Honda, E. Tanigawa, T. Tsukihara, D.X. Nguyen, H. Kawabe, N. Sakatoku, J. Watari, H. Sato, S. Yano, T. Tachiki, T. Irie, T. Watanabe, T. Watanabe (2019) Stable and transient transformation, and a promoter assay in the selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *AMB Express* 9(1) 92 - 92.
- 2) D.X. Nguyen, T. Sakaguchi, T. Nakazawa, M. Sakamoto, Y. Honda (2019) A 14-bp stretch plays a critical role in regulating gene expression from  $\beta$ 1-tubulin promoters of basidiomycetes. *Current Genetics* in print.