

杉山産業化学研究所 2019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（Man₅GlcNAc₂）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、転写終結シグナルの重要性について解明することを目指した。

実験方法：

担子菌を宿主とした異種タンパク発現では、期待されるような発現が得られないことが頻繁に発生するため、これらの菌類の持つユニークな特徴を産業において利用していく際の障害となっている。我々が独自に開発してきた「一過性の組換え遺伝子発現」は、従来の担子菌の研究では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およびターミネーターの構造解析を進め、担子菌において基本的な転写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., 2020）。本研究では、これらの知見を集めて構築してきた担子菌の組換え遺伝子発現系を用いてヒト由来の糖タンパク質の生産を試みるため、以下の様な実験を行った。

結果：

ヒト由来の糖タンパク質であるエリスロポエチンおよびインターフェロン β 、およびワクチンとしての利用が期待されるコレラトキシン β サブユニットをコードする領域を合成し、ヒラタケの菌体外分泌酵素である多機能型ペルオキシダーゼ (VP1) の N 末側の分泌シグナルを含むフラグメント制御下に連結し、C 末側にはレポーター遺伝子としてナノルシフェラーゼを連結した発現カセットを構築した。これら組換えタンパク発現配列をヒラタケに形質転換し、染色体上の *fcy1* サイトに相同組換えによりノックインで組み込まれた安定形質転換体を複数株獲得した。菌体外に分泌されるタンパク質を回収し、SDS-PAGE によって確認したところ、エリスロポエチンで 8 株中 5 株およびインターフェロン β では 7 株中 3 株でルシフェラーゼ活性が検出された。この結果は、それぞれの組換えタンパク質が融合タンパク質として発現し、菌体外に分泌生産されたことを示唆している。また、コレラトキシン β サブユニットの発現を試みた形質転換株では、これまでのところ培地中にルシフェラーゼ活性は検出されておらず、タンパクが発現されていないか、または融合タンパク質において何らかの理由でルシフェラーゼ活性が失活していることが考えられた。一方で、これらの培養液を用いて Western blot にタンパク質の検出を試みたが、抗ルシフェラーゼ抗体に反応する強いシグナルは得られなかった。

結論：

融合タンパク質に由来すると考えられるルシフェラーゼ活性が、培地中に確認されたことは、ヒト由来のタンパク質が担子菌の発現系を用いて初めて発現されたことを示している。しかしながら、Western blot により検出できなかったことは、キメラ構造が抗原抗体反応に影響を与えた、もしくは融合タンパクの発現量が低く、当該実験では検出限界以下であった可能性も考えられる。今後分泌量の拡大を検討すると共に、タグを利用したタンパクの精製を行って、ペプチド鎖の長さや、部分アミノ酸配列解読、糖鎖構造の解析を行っていく必要がある。

本研究の成果は、今後様々なヒト由来の組換え遺伝子を発現させ、担子菌を用いたバイオ医薬品の生産に向けてさらに進めていくための出発点となる成果である。

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 - 96.
- 2) D.X. Nguyen, T. Nakazawa, G. Myo, C. Inoue, M. Sakamoto, Y. Honda (2020) A promoter assay system using gene targeting in agaricomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Coprinopsis cinerea*. *J. Microbiol.Meth.* DOI: 10.1016/j.mimet.2020.106053.