

令和元年6月15日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07698

研究課題名(和文) 均一な糖鎖を持つバイオ医薬品の微生物酵素を用いた革新的生産技術

研究課題名(英文) Innovative technique for production of biomedicines with uniform sugar chains by use of microbial enzymes

研究代表者

山本 憲二 (Yamamoto, Kenji)

石川県立大学・生物資源環境学部・特任教授

研究者番号：70109049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品である糖タンパク質のヒト由来インターフェロン- γ およびインターロイキン-3について、合成DNAを用いてPichia酵母による組換え糖タンパク質の発現に成功した。得られた組換え糖タンパク質の糖鎖にEndo-Hを作用して高マンノース型糖鎖を切断遊離し、これを受容体としてヒト型糖鎖のシアロ複合型糖鎖を糸状菌のエンドグリコシダーゼ(Endo-M)の変異酵素の糖転移活性を活用して付加し、糖鎖のリモデリングを行ってヒトに適応したバイオ医薬品の創製を試みたが、目的の生成物は少量しか得られなかった。そこで、糖転移反応の効率化を図るためにEndo-Mの分子サイズの縮小化を試みたが、成功しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ医薬品の多くは動物細胞を用いて調製されているが、多量生産が困難であり、糖タンパク質であるためにタンパク質は同一であっても薬効に影響を与える糖鎖の構造が不均一である故に同じ医薬品でも糖鎖構造の違いによって薬効に差が生じる。本研究の成果によって、多量生産できる微生物の酵母を用いてヒト由来サイトカインなどのバイオ医薬品の多量調製が可能であることが明らかになった事実は今後のバイオ医薬品の製造に有用な意義を持つ。さらに本研究では十分な成果を得ることができなかったが、本研究が微生物の酵素を用いたリモデリング法によって均一な糖鎖をもつバイオ医薬品を多量調製する技術開発に示唆を与えた学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：As the results of this work, we succeeded in the gene cloning and expression of glycoproteins such as human Interferon-gamma and Interleukin-3 which are known as the biomedicine, by use of Pichia yeast as a host. The recombinant glycoproteins obtained were treated with Endo-H to release their high-mannose type sugar chains. Thereafter the addition of human compatible sialo-complex type sugar chains of glycopeptides derived from hen egg yolk to these sugar chain-depleted proteins was carried out using the transglycosylation activity of the mutant enzyme of mold endoglycosidase (Endo-M) and the exchange (remodeling) of sugar chain was performed. It was intended to create human compatible biomedicines. However we could obtain only a little amount of the purposed products. Then in order to effectively act to the substrate, the minimization of the size of Endo-M was attempted, but it did not succeed.

研究分野：応用微生物学、糖鎖科学

キーワード：バイオ医薬品 糖鎖 エンドグリコシダーゼ 糖転移反応 リモデリング インターフェロン- γ インターロイキン-3 Pichia pastoris

1. 研究開始当初の背景

ヒトインスリンやヒト成長ホルモンなど1980年代から本格的な開発が行われ、第一世代バイオ医薬品と呼ばれている医薬品の多くが特許切れを迎えるために、これら先発品と同等の薬効と安全性を保持したバイオ後続品の開発が注目されている。大部分のバイオ医薬品は糖タンパク質であるために、その開発において糖鎖部分に対する注目は大きく、開発戦略の大きな柱が糖鎖部分の改変にある。糖タンパク質の糖鎖は生物活性の発現や調節のみならず、生体内動態、免疫学的性質、安定性、溶解性などに影響を及ぼすことが知られているが、その構造は多様であり、ミクロな不均一性が糖タンパク質の性質の多様性を生じさせる。とりわけ、バイオ医薬品の糖鎖についてはその薬効や安定性の面で極めて重要である。しかし、近年上市されているバイオ医薬品はチャイニーズハムスターなどの動物細胞を利用して調製されている糖タンパク質で、動物細胞による発現系ではヒトに適合しない、ヒトに対して強い抗原性を有する糖鎖の出現のリスクも大きく、バイオ医薬品の生産系としては未だ問題を含んでいる。バイオ後続品に求められる最も重要な点は一定の規格内の品質が保証されることであり、同じ遺伝子配列を用いて製造したバイオ医薬品であったとしても糖鎖構造の均一性が重要なカギになる。そこで、バイオテクノロジーの技術を用いた翻訳後修飾の糖鎖の付加や改変の技術の確立が非常に重要な課題となる。

2. 研究の目的

バイオ医薬品である糖タンパク質のヒト由来サイトカインを組換え酵母で発現させ、得られた酵母型の糖鎖を有する糖タンパク質を糸状菌のエンドグリコシダーゼ (Endo-M) の糖転移活性を用いてヒト型糖鎖へリモデリングすることにより、ヒトに適応したバイオ医薬品を多量生成する方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

バイオ医薬品であるヒト由来のサイトカイン (IFN- γ 、IL-3) のアミノ酸配列から酵母発現用に塩基配列を最適化した遺伝子の合成を外注し、この合成DNAをpUC57に挿入したプラスミドを大腸菌DH5 α に形質転換し、得られた組換え大腸菌をLB培地で培養した後、PCRによって遺伝子を増幅した。次に、目的タンパク質を菌体外に発現させるために α -FactorをN-末端側に、His-tagをC-末端側に付加するように設計した酵母用ベクターpPICZ α AをSacI処理した後、この遺伝子をInfusion法で導入し、次いでメタノール資化性酵母*Pichia pastoris* KM71株へエレクトロポレーション法により形質転換した。この形質転換株をグリセロール含有培地で30°CにてOD₆₀₀が1.0になるまで培養後、メタノール含有培地に移し替えて目的タンパク質の発現を誘導した。発現した組換え糖タンパク質に*Streptomyces plicatus*由来のEndo-Hを作用して高マンノース型糖鎖を切断遊離し、N-アセチルグルコサミン残基のみが結合したタンパク質を得て、MALDI-TOF-MS分析により確認した。これを受容体とし、ヒト型糖鎖であるシアロ複合型糖鎖を有する鶏卵黄由来のシアロ糖ペプチドを糖鎖供与体としてEndo-M-N175Q変異酵素の糖転移活性によりシアロ糖鎖の転移付加を試み、シアロ糖鎖に特異的なSNAレクチン (ニワトコ樹皮由来) を用いたLectin blottingで目的生成物を調べた。

Endo-Mのサイズの縮小化には完全長のEndo-MからC末端を部分的に削除した組換えEndo-Mを作成した。すなわち、削除された部分をコードするコドンから逆向きに2つのプライマーを設計し、またHisタグをコードする領域から順方向にプライマーを設計して、これらのプライマーを用いて全長Endo-Mを含むpET23dベクターを鋳型としてPCRを行い、得られた断片をそれぞれセルフライゲーションして、deletion mutantのコンストラクトを作成した。

4. 研究成果

(1) 酵母 *Ogatae minuta* で発現したヒト IgG の糖鎖のリモデリング

まず、産業技術総合研究所の千葉靖典博士より提供を受けた酵母 *Ogatae minuta* で発現したバイオ医薬品であるヒト免疫グロブリン G (IgG) の組換え糖タンパク質の糖鎖のリモデリングを試みた。すなわち、メタノール資化性酵母 *Ogatae minuta* の α -1,6 マンノース転移酵素遺伝子が破壊され、かつプロテアーゼが欠損された変異株を宿主として発現した組換えヒト IgG の糖鎖について、酵母が有する特有の高マンノース型糖鎖からヒトの糖タンパク質に多く存在する複合型糖鎖への挿げ替えを試みた。ヒト IgG は軽鎖と重鎖から構成されており、重鎖の Fc 領域に 2 本の N-結合型糖鎖が存在している。まず、組換えヒト IgG に Endo-H を作用させて結合している高マンノース型糖鎖を一残基の N-アセチルグルコサミン残基を残して遊離除去した後、シアロ複合型二本鎖糖鎖のオキサゾリン型化合物を供与体として、グライコシターゼ様の変異酵素 Endo-M-N175Q によって糖転移反応を行った。SDS 電気泳動により分析後、ヒト IgG に対する抗体を用いて Western blotting をしたところ、シアロ複合型糖鎖を有する IgG の生成を見出した。また、シアル酸に特異的な SNA レクチン (ニワトコ樹皮由来) によるブロッティングによっても確認した。この結果は、酵母により発現された組換えバイオ医薬品をヒトに適応したバイオ医薬品に変換できる可能性を示したものである。

(2) ヒト由来インターフェロン- γ の酵母による発現と糖鎖のリモデリング

次に、バイオ医薬品であるヒト由来のサイトカインを酵母で発現させ、得られた組換え糖タンパク質について、ヒト型糖鎖へのリモデリングを試みた。

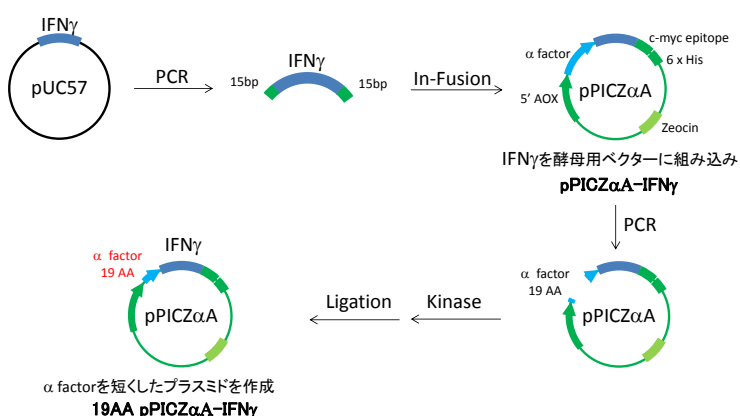


図1. 酵母 *Pichia pastoris* を宿主としたヒト IFN- γ の遺伝子発現

を菌体外に発現させるために α -Factor を N-末端側に、His-tag を C-末端側に付加するように設計した酵母用ベクター pPICZ α A に、この遺伝子を Infusion 法で導入し (図 1)、SacI 処理

ンパク質について、ヒト型糖鎖へのリモデリングを試みた。ヒト由来インターフェロン- γ (IFN- γ) のアミノ酸配列から酵母発現用に塩基配列を最適化して外注した合成 DNA を pUC57 に挿入したプラスミドを大腸菌 DH5 α に形質転換し、培養後に抽出した DNA を鋳型として PCR により IFN- γ 遺伝子を増幅した。次に、目的タンパク

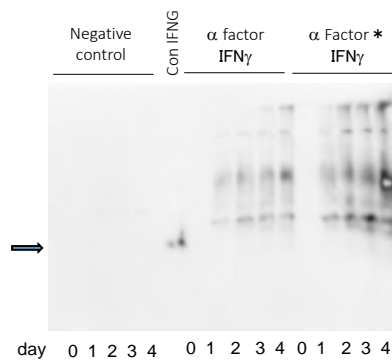


図2. 酵母*Pichia pastoris* によるヒトIFN- γ の発現

した後、*Pichia pastoris* KM71株へエレクトロポレーション法により形質転換した。形質転換株をメタノール含有培地で培養して、IFN- γ の発現誘導に成功した(図2)。

そこで、発現した組換えIFN- γ にEndo-Hを作用して高マンノース型糖鎖を切断遊離し、一残基のN-アセチルグルコサミンを含んだIFN- γ を得て、MALDI-TOF-MS分析により確認した。これを受容体とし、シアロ複合型糖鎖を有する糖ペプチドを供与体としてEndo-M-N175Q変異酵素の糖転移活性によりシアロ糖鎖の転移付加を試みてシアロ

糖鎖に特異的なSNAレクチンを用いたLectin blottingで糖鎖のリモデリングを調べた。しかし、N-アセチルグルコサミン残基を有するIFN- γ に対するEndo-MのN175Q変異酵素の糖転移付加反応はほとんど進行せず、目的のヒト型糖鎖を有するIFN- γ を得ることはできなかった。

(3) ヒト由来インターロイキン-3の酵母による発現と糖鎖のリモデリング

そこで、ターゲットとするバイオ医薬品を変更し、サイトカインのモデル糖タンパク質として

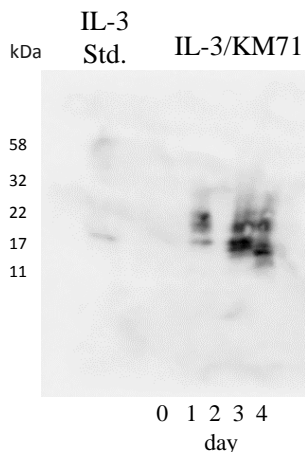


図3. 酵母*Pichia pastoris* によるヒトIL-3の発現

骨髄幹細胞を刺激するインターロイキン-3 (IL-3) について、酵母由来のIL-3のヒト型糖鎖へのリモデリングを試みた。先ず、ヒトIFN- γ と同様にIL-3のアミノ酸配列から酵母発現用に塩基配列を最適化して外注した合成DNAをpUC57に挿入したプラスミドを大腸菌DH5 α に形質転換し、培養後に抽出したDNAを鋳型としてPCRによりIL-3遺伝子を増幅し、上記の酵母用ベクターpPICZ α Aに、この遺伝子をInfusion法で導入し、SacI処理した後、*Pichia pastoris* KM71株へエレクトロポレーション法により形質転換した。得られた形質転換株をメタノール含有培地で培養して、IL-3の発現誘導に成功した(図3)。発現した組換えIL-3に

Endo-Hを作用して高マンノース型糖鎖を切断遊離し、一残基のN-アセチルグルコサミンを含有したIL-3を得て、MALDI-TOF-MS分析により確認した。これを受容体とし、ヒト型糖鎖であるシアロ複合型糖鎖を有する糖ペプチドを供与体としてEndo-M-N175Q変異酵素の糖転移活性によりシアロ糖鎖の転移付加を試みてシアロ糖鎖に特異的なSNAレクチンを用いたLectin blottingで糖鎖のリモデリングを調べたが、目的のヒト型糖鎖を有するIL-3を得ることはできなかった。この結果はEndo-Mの分子サイズが大きいため目的の糖タンパク質の糖鎖の作用部位に接することができないためと考えた。

(4) Endo-Mの分子サイズの縮小化

Endo-Mの分子サイズを縮小するためにC末端より削除した組換えEndo-Mを作成して受容体基質である一残基のN-アセチルグルコサミンを有する糖タンパク質に作用し易くすることを企てた。すなわち、Endo-MのC末端側の塩基配列の1734番目までを削除した変異酵素と1638

番号まで削除した変異酵素を作成した。すなわち、外注した合成 DNA プライマーを pET23d に挿入したプラスミドを大腸菌 DH5 α に形質転換して培養した後、PCR によって Endo-M の deletion mutant の遺伝子を増幅した。次に、この遺伝子を導入し発現した Endo-M 変異酵素について、BugBuster を用いて精製した。精製した変異酵素について、高マンノース型糖鎖を有する RNaseB を基質として酵素活性を調べたところ、元の Endo-M については活性が見られたが、いずれの変異酵素も活性を示さなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- ① Y.Mimura, T.Katoh, R.Saldova, R.O'Flaherty, T.Izumi, Y.Mimura-Kimura, T.Utsunomiya, Y.Mizukami, K.Yamamoto, T.Matsumoto and P.M.Rudd: Glycosylation Engineering of Therapeutic IgG Antibodies: Challenges for the Safety, Functionality and Efficacy. *Protein & Cell*, **9**(1), 47-62 (2018). 査読有 DOI: 10.1007/s13238-017-0433-3
- ② N.Ishii, K.Ogiwara, K.Sano, J.Kumada, K.Yamamoto, Y.Matsuzaki and I.Matsuo: Specificity of Donor Structures for Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase-catalyzed Transglycosylation Reactions. *ChemBioChem.*, **19**, 136-141 (2018). 査読有 DOI: 10.1002/cbic.201700506
- ③ T.Higashiyama, M.Umekawa, M.Nagao, T.Katoh, H.Ashida and K.Yamamoto: Chemo-enzymatic Synthesis of the Glucagon Containing *N*-Linked Oligosaccharide and Its Characterization. *Carbohydr. Res.*, **455**, 92-96 (2018). 査読有 DOI: 10.1016/j.carres.2017.11.007
- ④ Y.Tomabechi, T.Katoh, M.Kunishima, T.Inazu and K.Yamamoto: Chemo-enzymatic Synthesis of a Glycosylated Peptide Containing a Complex *N*-Glycan Based on Unprotected Oligosaccharides by Using DMT-MM and Endo-M. *Glycoconj. J.*, **34**, 481-487 (2017). 査読有 DOI: 10.1007/s10719-017-9770- γ
- ⑤ T.Yamanoi, Y.Oda, K.Katsuraya, T.Inazu and K.Yamamoto: Complete NMR Assignment of a Bisecting Hybrid-type Oligosaccharide Transferred by *Mucor hiemalis* Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase. *Carbohydr. Res.*, **427**(2), 60-65 (2016). 査読有 DOI: org/10.1016/j.carres.2016.03.013
- ⑥ K.Sakaguchi, T.Katoh and K.Yamamoto: Transglycosidase-like Activity of *Mucor hiemalis* Endoglycosidase Mutants Enabling the Synthesis of Glycoconjugates Using a Natural Glycan Donor. *Biotech. Appl. Biochem.*, **63**(6), 812-819 (2016). 査読有 DOI: 10.1002/bab.1433
- ⑦ T.Katoh, T.Katayama, Y.Tomabechi, Y.Nishikawa, J.Kumada, Y.Matsuzaki and K.Yamamoto: Generation of a Mutant *Mucor hiemalis* Endoglycosidase That Prefers Core-fucosylated *N*-Glycans. *J. Biol. Chem.*, **291**(44), 23305-23317 (2016). 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M116.737395

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 松尾一郎・石井希美・永田光穂・佐野加苗・加藤紀彦・山本憲二・飯野健太・松崎祐二・西川宣秀. 2019年. コアフコースを有する糖鎖に作用するENGase探索に向けた蛍光プローブの合成. 日本農芸化学会2019年度大会
- ② 苫米地祐輔・中川純樹・渡邊幹夫・小田慶喜・山本憲二・山ノ井孝. 2017年. Endo-M 酵素

を用いたグルコース七残基分岐 β -CyDへのN-結合型糖鎖の集積化. 第36回日本糖質学会年会

③ 伊藤孝司・西岡宗一郎・小林功・笠嶋めぐみ・原園景・松崎祐二・飯野健太・山本憲二・灘中里美・北川裕之・日高朋・辻大輔・石井明子・瀬筒秀樹. 2017年. エンドグリコシダーゼの糖鎖転移活性を利用するネオグリコ酵素の創製とリソソーム病治療薬開発. 第36回日本糖質学会年会

④ 山本憲二. 2017年. 微生物の特異なエンドグリコシダーゼを活用した創薬. 日本薬学会創薬懇話会.

⑤ 苫米地祐輔・加藤紀彦・坂口広大・千葉靖典・熊田純一・松崎祐二・山本憲二. 2017年. 酵母を発現宿主とした組換え糖タンパク質の調製と Endo-M による糖鎖構造の均一化. 日本農芸化学会 2017 年度大会

⑥ 加藤紀彦・片山高嶺・苫米地祐輔・岩城隼・熊田純一・松崎祐二・山本憲二. 2016年. コアフコースを有するN-結合型糖鎖に作用するエンドM変異酵素の作出. 第35回日本糖質学会年会

⑦ 山本憲二. 2016年. 改変型 Endo-M によるトランスグリコシレーション法の改良と応用. 日本糖質学会年会ワークショップ.

⑧ 山本憲二. 2016年. 微生物の応用から見た糖鎖. 糖鎖科学中部拠点、第13回「若手の力」フォーラム.

〔図書〕 (計2件)

① 山本憲二. 2018年. グライコエンジニアリングのツール: 鍵酵素. 未来を創るグライコサイエンス —我が国のロードマップ—、日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) 編、26-27.

② 加藤紀彦・山本憲二. 2018年. Endo-M酵素による糖鎖付加と均一化. 中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術. pp. 302-308. シーエムシー出版

〔その他〕

① 苫米地祐輔・加藤紀彦・山本憲二. 2016年. 均一な糖鎖を持つバイオ医薬品の開発. Medical Science Digest. 42(10): 449-452.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 加藤 紀彦

ローマ字氏名: Katoh Toshihiko

所属研究機関名: 京都大学大学院

部局名: 生命科学研究科

職名: 助教

研究者番号 (8 桁) : 4 0 7 2 4 6 1 2