

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14886

研究課題名(和文) ヒト型糖鎖を持つ抗体生産を可能にする大腸菌宿主の開発

研究課題名(英文) Development of Escherichia coli capable of producing antibody with humanized glycan structure

研究代表者

藤山 和仁 (Fujiyama, Kazuhito)

大阪大学・生物工学国際交流センター・教授

研究者番号：70209112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Campylobacter属細菌10種の糖鎖転移酵素PgIBの一次構造、転移糖鎖構造の多様性、タンパク質三次構造に関する報告を元に、変異型pgIBを設計し発現ベクターに挿入した。転移活性効率は低下した。大腸菌のペリプラズム画分にて抗体を可溶性かつ活性型で生産させるためペリプラズム移行シグナルPelBを付加したH鎖、L鎖をコードする遺伝子を持つ発現ベクターを構築した。H鎖は可溶性タンパク質画分としての生産性は低く、L鎖の発現そのものが低かった。PgIBの代わりにDesulfovibrio菌由来DsPglを、Truncated型抗体を用いた転移活性評価へと計画変更し実験に着手した。

研究成果の概要(英文)：Mutant PgIB genes were designed based on 10 Campylobacter PgIBs, substrate specificity, and 3D structure, and inserted into the expression vector. The transfer activity was examined resulting in decreased activity. Signal sequence from PelB for localization at E. coli periplasmic fraction was linked both H- and L-chains, and expressed in E. coli. The expression of H-chain was, even the level was low in soluble fraction, confirmed, but L-chain was not. DsPgl from Desulfovibrio gigas was picked up instead of PgIB. In addition, truncated forms of H- and L-chains were considered to be used to facilitate the project.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 大腸菌 抗体

1. 研究開始当初の背景

大腸菌は組換えタンパク質生産に汎用されているが、糖鎖修飾能力がなく、これまでヒト医療用糖タンパク質生産には不適であるとされてきた。これまでにバクテリア・酵母の糖鎖修飾酵素遺伝子を導入し、糖鎖修飾能力を付与した大腸菌が創出された。しかし、バクテリア由来糖鎖転移酵素を用いているため、ヒト型糖鎖付加効率が悪いなど未だ大腸菌が糖タンパク質生産宿主としては十分ではない (Srichaisupakit et al., 2015)。

2. 研究の目的

本申請では、糖鎖転移酵素を改変し、大腸菌で抗 Dengue 熱ウイルス抗体など糖タンパク質の生産を可能にする基盤技術を開発する。糖鎖転移酵素をタンパク質工学的変異操作し、ヒト前駆体型糖鎖に対する親和性と転移効率を上げ、抗体などの医療用タンパク質に、ヒト型糖鎖を持たせるような糖鎖修飾能力の確立を検証する。

3. 研究の方法

(1) これまで、Campylobacter jejuni JCM2013 (ATCC29428) より由来糖鎖転移酵素 CjPgIB を既に取得し、大腸菌で活性発現に成功している (Srichaisupakit, Ohashi, Fujiyama, 2014)。さらに、酵母由来糖鎖転移酵素遺伝子 4 種を導入し、ヒト型糖鎖 (Man3GlcNAc2) を持つ組換えタンパク質生産に成功した (Srichaisupakit et al., 2015; 図 1)。また、抗パンデミックインフルエンザウイルス抗体遺伝子を保持しており (Sasaki et al., 2013)、大腸菌での発現に使用できる。

大腸菌として、Escherichia coli BL21 waaL gmd を使用した (Srichaisupakit, Ohashi, Fujiyama, 2014)。

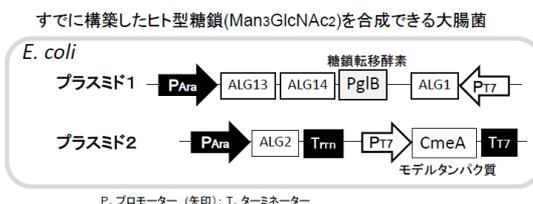


図 1 ヒト型糖鎖合成酵素遺伝子 (Srichaisupakit et al., 2015)

(2) Campylobacter 由来糖鎖転移酵素 CjPgIB の変異操作と機能改良

Campylobacter 由来糖鎖転移酵素 CjPgIB を変異操作し、ヒト型糖鎖 (Man3GlcNAc2) を生合成できる組換え大腸菌に導入し (以降、"改良型 CjPgIB 発現大腸菌" と呼ぶ) 酵素活性を検証する

バクテリア、特に、Campylobacter 属細菌

10 種の糖鎖転移酵素について、一次構造および転移する糖鎖構造の多様性について報告されている (Nothaft et al, 2012)。さらに、真核生物 (ヒト・酵母) に由来する糖鎖転移酵素のうち、実質的糖鎖転移酵素サブユニット Stt3 の一次構造情報を加えて、比較検討する。

C. jejuni 由来糖鎖転移酵素 CIPgIB のタンパク質三次構造 (Maita et al, 2011) が解明されている。また、C. lari 由来糖鎖転移酵素 CIPgIB のタンパク質三次構造 (Lizak et al, 2011) が解明されている (C. lari は C. jejuni 近縁種である)。その立体構造情報を活用し、糖鎖転移部位認識に関連する部位と、ヒト型糖鎖認識に対する親和性に関連する部位を推定し、変異導入部位を考察する。

糖鎖修飾検証用モデルタンパク質として、これまで C. jejuni 由来 CmeA タンパク質を用いてきた (Srichaisupakit, Ohashi, Fujiyama, 2014)。当該年度は CmeA を糖鎖修飾検証用モデルタンパク質とし用い、精製後、糖鎖解析に供する。

糖鎖構造解析は、これまで HPLC や質量分析機を用いた経験があるので問題なく遂行できる。

(3) 抗 Dengue 熱ウイルス抗体の大腸菌ペリプラズム画分での生産系開発

抗体を、大腸菌のペリプラズム画分にて可溶性かつ活性型で生産する技術が開発されている (Lee et al., 2014)。糖鎖付加もペリプラズム画分で行われると考えられるので、ペリプラズム移行シグナルとして PelB を用い、ペリプラズムに抗体ペプチドを移行させ、可溶性タンパク質としての生産を試みる。

(4) 組換え抗体の糖鎖構造の確認・糖鎖修飾能力の評価

組換え抗体の糖鎖構造をタンパク質量、HPLC や質量分析機を用いて解析する。

以上より、ヒト型糖鎖を持つ組換え医療糖タンパク質生産に適した大腸菌を創製する。

4. 研究成果

(1) Campylobacter 由来糖鎖転移酵素 CjPgIB の変異操作と機能改良

Campylobacter 属細菌 10 種の糖鎖転移酵素 PgIB の一次構造および転移する糖鎖構造の多様性に関する報告 (Nothaft et al, 2012) および C. jejuni 由来 CjPgIB のタンパク質三次構造 (Maita et al, 2011) 情報を活用し、糖鎖転移部位認識に関連する部位と、ヒト型糖鎖認識に対する親和性に関連する部位を推定し、重要なアミノ酸残基を改変対象として選抜した。候補変異 pgIB

を、他の修飾酵素遺伝子を持つベクター(図1のプラスミド1)に挿入した。H28年度確認した糖鎖修飾検証用モデルタンパク質として転移活性を確認した *C. jejuni* 由来 CmeA タンパク質を用いて、変異酵素 PglB の転移活性を検討したが、その転移効率は低下した。プラスミド1の細胞内の安定性よくなかった。

(2) 抗体など医療用モデルタンパク質の大腸菌ペリプラズム画分での生産系開発

抗体のH鎖、L鎖をコードする遺伝子を持つ発現ベクターを構築した。大腸菌のペリプラズム画分にて可溶性かつ活性型で生産させるためペリプラズム移行シグナル PelB を付加した。大腸菌でH鎖の発現を確認できたが、L鎖の発現は低かった。発現確認できたH鎖は可溶性タンパク質画分としての生産性は低かった。

(3) *Desulfovibrio gigas* 由来糖転移酵素 DgPglB に関して発表論文 (Ollis et al, 2015) を元に実験を計画を改変した。また、DgPglB は、抗体が本来糖鎖修飾され認識配列を、低効率ながら認識するため DsPglB を用いることにした。

図1のプラスミドベクター1のPglBをDgPglBに置換し、大腸菌で発現させた。発現誘導に用いるIPTG(mM)およびL-Ara(%)の濃度を変化させて発現状況を調査した。しかし、大腸菌内での生産性は、他のAlg13などに比べても低かった(図2、3、4)。

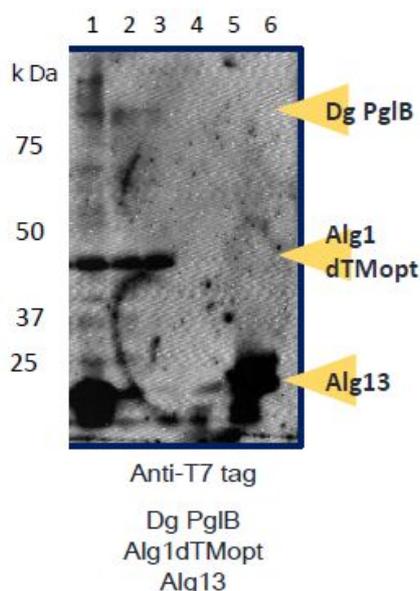


図2 DsPglBの発現の確認

誘導条件は、IPTG(mM):L-Ara(%)で表示すると、レーン1,4は0.02:0.002、レーン2,5は0.02:0.02、レーン3,6は0.02:0.2。

T7 タグ付タンパク質として発現しているため、タグに対する抗体を用いて DgPglB、Alg1、Alg13 を検出した。さらに、Alg2、Alg14 も同様に発現を確認した(図3、4)。

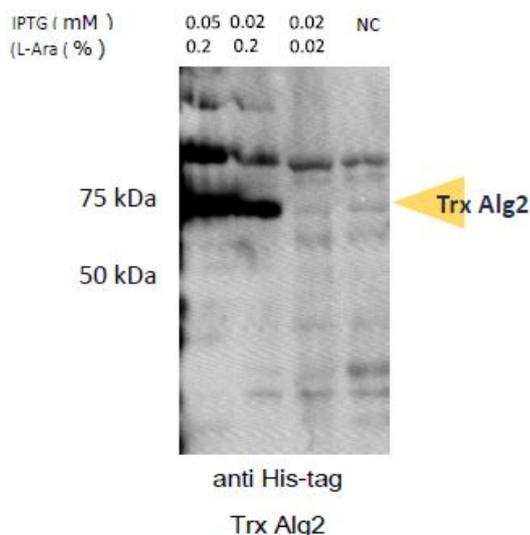


図3 Alg2の発現の確認

誘導条件は、IPTG(mM):L-Ara(%)で表示した。NCはネガティブコントロール。Hisタグ付タンパク質として発現しているため、タグに対する抗体を用いて Alg2 を検出した。

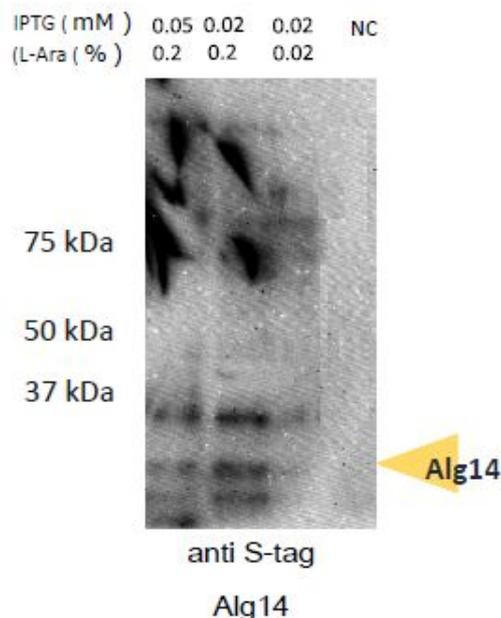


図4 Alg14の発現の確認

誘導条件は、IPTG(mM):L-Ara(%)で表示した。NCはネガティブコントロール。Sタグ付タンパク質として発現しているため、タグに対する抗体を用いて Alg14 を検出した。

以上より、当該組換え大腸菌における糖鎖関連酵素の遺伝子発現は、DsPglB は低い、他の Alg1、Alg13、Alg2、Alg14 の発現を、初期型 CjPglB を発現する大腸菌と同程度だった。この確認できたこの大腸菌における抗体 H 鎖の生産も確認した。

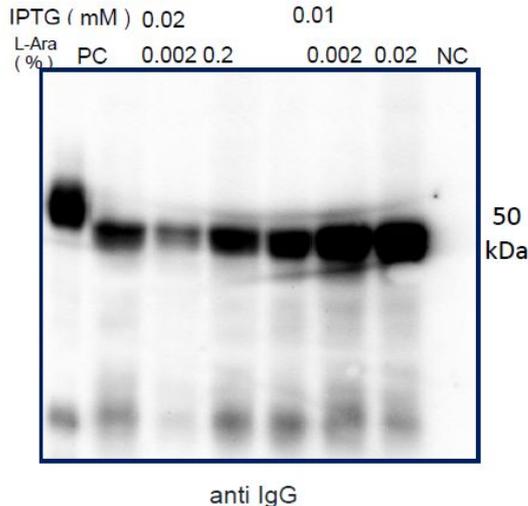


図4 H鎖抗体の検出
H鎖発現誘導条件は、IPTG(mM)
:L-Ara(%)で表示した。
検出は、抗 IgG 抗体を用いた。

続いて、DsPglB および抗体 H 鎖遺伝子を持つ発現バクターを作成した。DsPglB は、遺伝子のコドン最適化を施し、使用した。最適化コドンを持つ DsPglB 遺伝子を DsPglBopt と呼ぶことにする。

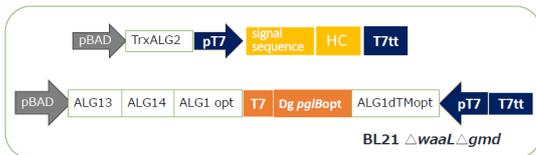


図5 作成した抗体 H 鎖および新規糖転移酵素 DsPglB 発現ベクター
2 種の発現ベクターを持つ。H 鎖には、ペリプラズム移行シグナルを付加している。最適化コドンを持つ DsPglB 遺伝子を DsPglBopt を使用した。

抗体 H 鎖をペリプラズム画分より調製した、改変糖転移酵素 PglB と *Desulfovibrio* 由来 DgPglB を比較して、改変 PglB では生産性が低下し、DgPglB では H 鎖を検出できなかった (図 6)。

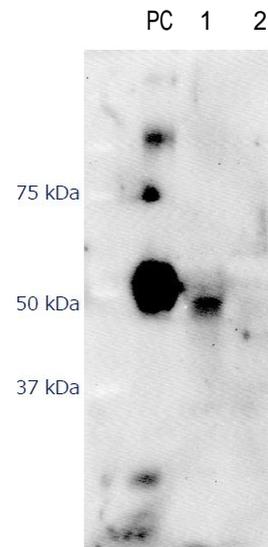


図6 ペリプラズム画分から調製した抗体 H 鎖
PC は標準 IgG、レーン 1 は改変糖転移酵素 PglB 発現株から調製した抗体 H 鎖、と *Desulfovibrio* 由来 DgPglB から調製した抗体 H 鎖

また、これまで、当該論文 (Lee et al., 2014) では、全長型 H 鎖、L 鎖を大腸菌で発現させて糖転移活性を調査するのではなく、Truncated 型抗体を用いて糖転移活性を評価していたので、本研究でもモデル抗体タンパク質を発現が期待できる Truncated 型に変更した。

Truncated 型 H 鎖抗体は、大腸菌内で可溶性型タンパク質生産が可能となった。今後、ペリプラズムへの移行シグナルを付加し、生産性を検討する必要がある。さらに、改変糖転移酵素 PglB と *Desulfovibrio* 由来 DgPglB との共発現させた場合の、抗体生産を検討し、糖鎖構造を検証することにより、大腸菌における糖鎖付加型抗体生産を確認できる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.icb.osaka-u.ac.jp/fujiyama_lab/gaiyo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 和仁 (FUJIYAMA, Kazuhito)
大阪大学・生物学国際交流センター・教授
研究者番号：70209112

(2) 研究分担者

大橋 貴生 (OHASHI, Takao)
大阪大学・生物学国際交流センター・助教
研究者番号：10597876

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()