

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630378

研究課題名(和文) ヒト型糖鎖付加機能を持つ大腸菌創製の基盤形成

研究課題名(英文) Development of fundamental technology to create E. coli carrying human-type glycosylation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌を用いて、ヒト型糖鎖構造を持つ組換えタンパク質生産のための、基盤技術の開発を行った。これまで、大腸菌は糖鎖付加機能がなく、糖たんぱく質の生産に不向きとされていた。当該プロジェクトでは、*Campylobacter jejuni* JCM 2013の糖鎖修飾関連遺伝子と出芽酵母遺伝子は大腸菌に導入し、合成生物学的手法により、糖鎖修飾能をもった大腸菌を創製した。この技術を発展させると、抗体などの医療用糖タンパク質を大腸菌で簡便に生産できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a fundamental E. coli strain for recombinant production of glycoprotein. Further improvement of this technology would enable E. coli to produce pharmaceutical glycoproteins, such as antibody.

研究分野：糖鎖プロセスエンジニアリング

キーワード：大腸菌 ヒト型化 糖鎖

### 1. 研究開始当初の背景

植物・酵母など真核生物による組換え医療用タンパク質生産に注目されるのは、コスト・安全性の他に、翻訳後修飾、特に糖鎖修飾の機能を持つからである。しかし、大腸菌は糖鎖修飾能を持たないため、糖タンパク質生産には不向きとされていた。最近の研究から、アーキア・バクテリアの一部は、ペプチド鎖の Asn 残基に対して、真核生物に類似した糖鎖修飾能力を持つことが示された (Nothaft and Szymanski, 2010)。バクテリアでは、*Campylobacter jejuni* の糖鎖修飾酵素オペロンが研究され、それら遺伝子群が大腸菌での機能し、*C. jejuni* 由来タンパク質を糖鎖修飾することを示した(以下、Cj 型糖鎖; Wacker et al., 2002)。特に、糖脂質から糖部分をペプチドに転移する酵素 CjPglB の同定が大きな進展となった。酵母転移酵素は、9 個のサブユニットからなる複合体である。アーキアでは、*Sulfolobus* で糖鎖修飾酵素遺伝子 (PglB 類似体を含む) の解明が進められている(例; Kaminski et al, 2012)。一方、ヒト・酵母では、糖鎖修飾酵素遺伝子全容が解明され、遺伝子資源として活用できる。ヒト糖鎖修飾酵素遺伝子を、大腸菌で可溶性・活性型酵素として生産された。(Moran, Sakuradani, Fujiyama et al, 1998; Shibatani, Fujiyama, et al, 2001; Fujiyama et al, 2001; Fujiyama, 特許 EP1371732 B1)。Valderrama-Rincon ら (2012) は、酵母の 4 つの糖鎖修飾酵素遺伝子と CjPglB を大腸菌で共発現させ、真核生物型糖鎖の前駆体を構築させた。しかし、酵母由来の組換え糖鎖修飾酵素の低い発現効率のため、その糖タンパク質生産効率は非常に低く 10%程度と予想され、十分な系が確立しているとは言い難かった。

### 2. 研究の目的

アーキア・バクテリア・真核生物(ヒト・酵母)の糖鎖修飾酵素遺伝子研究の知見をベースに、必要な酵素遺伝子を組合せ、これまで申請者が持つ活性型組換え糖鎖修飾酵素の大腸菌生産技術とバクテリア・アーキア由来転移酵素を活用することにより、効率的な組換えヒト型糖タンパク質生産大腸菌を創製することを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト型糖鎖 GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> の合成経路を設計し、アーキア・バクテリアを中心として、一部真核生物(酵母・ヒト)より必要な遺伝子群を単離する。  
 (2) 単離した個々の遺伝子を効率的に配置して大腸菌に導入し、モデルタンパク質の糖鎖構造を調べて確認する。糖鎖構造と糖鎖修飾タンパク質存在比を調査し、糖鎖修飾能力を評価する。  
 (3) より糖鎖修飾機能を改善するため、修飾酵素の細胞内配置、遺伝子発現量、発現誘導

システムなどを改良する。

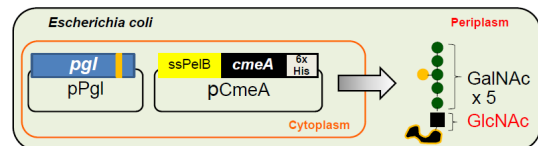
(4) モデルタンパク質を、当該大腸菌で生産し、糖鎖修飾能について検証する。

以上より、ヒト型糖鎖修飾機能を持つ新規組換え糖タンパク質宿主としての大腸菌を確立する。

### 4. 研究成果

当該プロジェクトでは、大腸菌を用いて、ヒト型糖鎖を持つ組換えタンパク質生産に成功した。

一年目は、*Campylobacter jejuni* JCM 2013 の糖鎖修飾オペロンの取得し、当該プロジェクトに必須な遺伝子を同定した。さらに、大腸菌で発現させたモデルタンパク質において、Asn-HexNAc-GalNAc-GalNAc-GalNAc(-Glc)-GalNAc-GalNAc構造で、既報と異なる Asn-HexNAc を構築でき、ヒト型化構造創出の基礎となることを示した(Srichaisupakit et al, J Biosci Bioeng. 2014)。アーキア、酵母、ヒト由来遺伝子を取得した。



1. Prokaryotic glycosylation operon from *C. jejuni* was expressed
2. CmeA model protein was glycosylated
3. GlcNAc moiety was observed at reducing ends of glycan in this constructed system

図1. *C. jejuni* JCM 2013 の糖鎖修飾オペロン遺伝子の大腸菌による発現

pgl は *C. jejuni* JCM 2013 の糖鎖修飾オペロン、ssPel は大腸菌 PelB のペリプラズム画分への移動シグナルペプチド、cmeA は *C. jejuni* JCM 2013 由来糖鎖修飾モデルタンパク質を示す。

二年目は、取得したアーキア、酵母、ヒト由来遺伝子を大腸菌で発現させることを試みたが、アーキアとヒト由来遺伝子は発現しない、あるいは発現量が低かった。一方で、出芽酵母由来の遺伝子は機能したため、当該研究では酵母遺伝子を用いた。最終的にヒト型糖鎖付加機構の創設に用いた酵素遺伝子は、i) *Campylobacter jejuni* JCM 2013 由来糖鎖転移酵素 PglB、ii) 出芽酵母由来糖転移酵素 ALG1, ALG2, ALG13, ALG14 の合計 5 種である。これら遺伝子を、その配置の最適化、プロモーターの選定などを行い、最終的に 2 種の発現ベクター(pM1 および pBAD ALG2 MBPGT)を構築した(図2)。

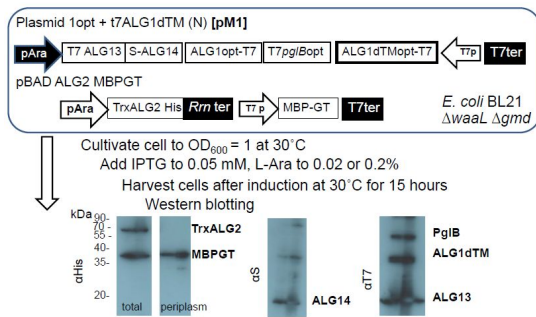
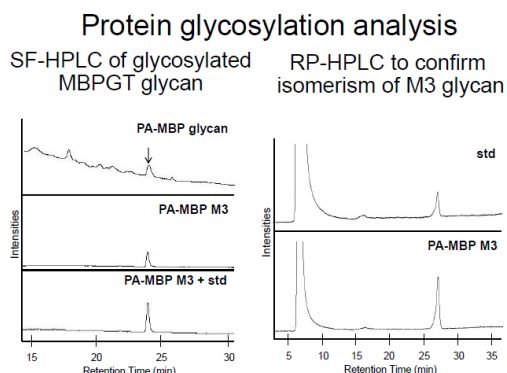


図2. ヒト型糖鎖付加機能遺伝を保持する発現ベクター

pAra は Ara プロモーター、T7p は T7 プロモーター、Rm ter はリボソーム遺伝子ターミネーター、T7 ter は T7 ターミネーターを示す。C. jejuni JCM 2013 由来 PglB、出芽酵母由来糖転移酵素 ALG1, ALG2, ALG13, ALG14 の各組換え酵素が生産されていることをウェスタン法で確認した。

まず、大腸菌内で前駆体型糖鎖として目的とする構造を持つ糖鎖が合成されていることを HPLC と MS を用いて確認した。その後、大腸菌で生産させたモデルタンパク質 MBP について、その糖鎖構造を検証し、ヒト型 Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 型糖鎖が付加していることを確認できた (図3)。

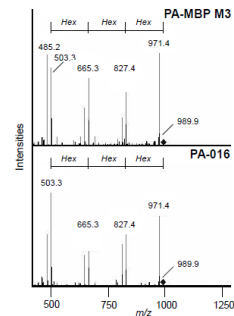


Man<sub>3</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> was found linked to MBPGT Glycan exists in identity to PA-016 standard (TaKaRa)

図3. モデルタンパク質に付加した糖鎖構造の解析 (1)

モデルタンパク質より調製した糖鎖 PA-MBP glycan をサイズ分画(SF)-HPLC で精製し、標準 Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 型糖鎖 ("std", Takara Bio 社 PA-016)の溶出位置が一致することを確認した。続いて、逆相(RP)-HPLC でもさらに、標準糖鎖 std と溶出位置が一致した。

以上から、大腸菌を用いてヒト型糖鎖を持つ組換えタンパク質を生産する技術基盤が完成できた。この技術を活用し、大腸菌での医療糖タンパク質生産が期待できる。



MS analysis of MBP-GT glycan was performed Fragmentation pattern of Man<sub>3</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-PA was observed

図3. モデルタンパク質に付加した糖鎖構造の解析 (2)

モデルタンパク質より調製した糖鎖 PA-MBP glycan を MS 解析を行い、m/z (971.4) や開裂パターンが標準糖鎖 PA-016 と一致した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Identification of a protein glycosylation operon from *Campylobacter jejuni* JCM 2013 and its heterologous expression in *Escherichia coli*.

Srichaisupakit A, **Ohashi T, Fujiyama K.**

J Biosci Bioeng. 118(3):256-262 (2014)

2. Production of initial-stage eukaryotic N-glycan and its protein glycosylation in *Escherichia coli*.

Srichaisupakit A, **Ohashi T, Misaki R, Fujiyama K.**

J Biosci Bioeng. 119(4):399-405 (2015)

〔学会発表〕(計 1 件)

日本農芸化学会 2014 年度東京大会 (明治大学) 2013.3.27-30 (一般公演)

Identification of the Protein Glycosylation Operon from *Campylobacter jejuni* JCM 2013

Akkaraphol SRICHAISUPAKIT, **Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA**

〔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：  
出願年月日：  
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/gyoseki.html](http://www.icb.osaka-u.ac.jp/fujiyama_lab/gyoseki.html)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

大橋 貴生 (OHASHI Takao)  
大阪大学・生物工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：