

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660137

研究課題名(和文) 木材腐朽菌を用いた医療用ヒト型糖タンパク質生産への挑戦

研究課題名(英文) Challenge for production of therapic glyco-peptides using gene expression system in wood rot fungi

研究代表者

本田 与一 (Honda, Yoichi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70252517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラタケの生産する野生型マンガンペルオキシダーゼ2(MnP2)のN-結合型糖鎖について、MALDI-TOF MSを用いた構造解析を行った結果、102番目のアスパラギンにGlcNac2-Hex5が結合していることが解明されたことから、MnP2は高マンノース型の糖鎖修飾を1箇所のみで受けていることを初めて明らかにした。一方、新規に加わった糖鎖を持ち高い高分子酸化作用を持つに至ったR263Nの精製と糖鎖解析を試みは、本研究期間中に達成することはできなかった。また、コレラトキシンのBサブユニットをコードするcDNAを入手し、ヒラタケにおける発現について試したが、異種発現ペプチドの生産には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated that wild type MnP2 enzyme from *Pleurotus ostreatus* contains a GlcNac2-Hex5 glycan attached to Asp102 using MALDI TOF-MS analysis. This is the first report of glycan structure attached to fungal lignin-degrading peroxidase. We also tried to analyze an additional glycan supposed to its artificially modified mutant, MnP2 R263N, but production and purification of the enzyme was not enough for the carbohydrate analysis. Moreover, a cDNA fragment encoding for cholera toxin B subunit was inserted to an expression vector for *Pleurotus ostreatus* and tried to introduced into host strain but no protein-producing transformants have been isolated so far.

研究分野：森林生化学

キーワード：木材腐朽菌 糖タンパク質 異種発現 糖鎖工学

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析やプロテオーム解析の進歩により、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、新たな創薬ターゲットとして脚光を浴びてきている。しかし、これらの糖タンパク質が安定して機能する為には、*N*-結合型糖鎖等によるヒト型の翻訳後修飾が必要である。現在、マウスの培養細胞を用いて一部の医療用タンパク質の生産が始まっているが、こうした系では、生産性が低く、培養に必要な血清培地が極めて高価であるうえ、レトロウイルスによる感染が問題となっている。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生産システムの確立が望まれている。

しかし、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が付加（ハイパーグリコシレーション）した構造を持っていて、ヒト型糖タンパク質の生産には向かない。一方、ほとんどの木材腐朽菌が含まれる担子菌類では、*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）型のみであることが、明らかになってきた。

申請者は、これまで白色腐朽性の担子菌ヒラタケにおいて遺伝子組換え系の開発に成功し、組換えタンパク質の菌体外への分泌・高生産、アミノ酸変異による新たな糖鎖修飾の付加等の成果を挙げた。

2. 研究の目的

安価で安全な医療用ヒト型糖タンパク質の生産システムの新規開発を目指して、ヒラタケが生産するタンパク質の修飾糖鎖構造を解析し、その構造がヒトと共通で *in vitro* におけるグルコシダーゼによる切断、転移を行うための良い基質となる高マンノース型であるか確認する。また、このヒラタケの組換え遺伝子発現系を用いて、ヒト型の糖鎖修飾を持った医療用糖タンパク質前駆体を生産する可能性を探る。

3. 研究の方法

3.1 組換え MnP2 及び R263N の発現

ヒラタケの #261、TM2-18、TM-R263N 株を 10%ふすま入り PGY 培地 (200 mL) で培養し、組換えの野生型 MnP2 および糖鎖修飾が新たに付加されたと考えられる変異体 R263N を発現させた。

3.2 MnP2 の粗精製

3.2.1 タンパク質溶液の回収、濃縮

本培養開始後 11 日目もしくは 14 日目の培養液を回収し、限外ろ過で濃縮を行った。濃縮前:後で 10:3 (v/v) 程度にまで濃縮が行えたが、濃縮液の粘性が高くバッファー交換を行っても更なる濃縮は行えなかった。目的タンパク質の分子質量は約 42 kDa であるため、限外ろ過を Centriprep 30 K で行うことで、夾雑物の除去及び濃縮率の向上が可能であると考えられる。また 10 K で濃縮した液

を 30 K に供して濃縮を行うことも可能である。夾雑物の減少と濃縮操作によるタンパク質の喪失を加味して最適な濃縮操作が必要である。

3.2.2 陰イオン交換クロマトグラフィー

培養開始後 11 日目の濃縮液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して得られた主なフラクションの MnP 活性を調べた。Fr. 2 は 0 M NaCl で溶出したフラクション、Fr. 7-9 は 0.1 M NaCl で溶出したフラクション、Fr. 17 は 0.3 M NaCl で溶出したフラクション、Fr. 21 は 1 M NaCl で溶出したフラクションである。予備実験では、Kamitsuji らの先行研究と同様に NaCl 濃度が 0.1 M での溶出で MnP 活性のある画分が得られた。また他の NaCl 濃度での溶出では MnP 活性が見られなかった。以上のことから MnP2 の陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離には 0.1 M NaCl を用いた。

Fr. 8 では Mn²⁺非存在下でも酵素活性の値が高くなった。これは他の酸化酵素によるものであると考えられる。MS 解析に用途でのサンプルでは SDS-PAGE による分離を行うため、問題にはならない。しかしタンパク質非変性下で糖鎖の切断や酵素の反応性を検証するためには他の酸化酵素の存在は大きな障害となりうる。このため、分離する際に溶出液の濃度勾配を更に細かく設定し、MnP2 の溶出に最も適した塩濃度を検討して行った。

3.2.3 タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度の決定に用いた検量線を作成した。BSA スタンダード濃度が 5-20 µg/mL の時吸光度と直線的な関係が得られた。以降のタンパク質濃度の決定ではこの測定範囲に適するようにタンパク質溶液を希釈して測定を行った。3.3 で得られたろ液、濃縮液と 3.4 で得られた MnP 活性のある画分 (Fr. 7、Fr. 8) を 10 倍 (1.0×10⁻¹ mL/mL) に希釈した希釈液を調製した。スタンダードと同様にして 595 nm の吸光度を分光光度計で測定し、サンプル溶液の濃度を検量線から計算した。

3.3 SDS-PAGE

3.3.1 電気泳動

培養開始後 14 日目の培養液を回収、精製して得た陰イオン交換クロマトグラフィーのフラクション 6 つを SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った。

3.3.2 ゲル内消化

トリプシンによる MnP2 の消化断片の予想分子質量とそのアミノ酸番号を予測した。4 つの断片について消化前に還元アルキル化処理を行ったため、Cys のカルバミドメチル化により質量が増加することが予想された。MALDI-TOF/MS での質量分析においてはこれらの m/z のピークが観測されると考えられる。また 2558.3 Da のピークは糖鎖の結合により、

消失するものと考えられる。

3.4 MALDI-TOF/MS による質量分析

3.4.1 WT 型 MnP2 の MS 解析

WT 型 MnP2 の MALDI-TOF/MS による質量分析に供した。その際に脱塩処理後のサンプル、脱塩処理前のサンプル、タンパク質サンプルを流さないで SDS-PAGE を行い切り出したゲルによるネガティブコントロールについて解析を行った。ゲル内消化からのサンプル処理は Bruker 社推奨のゲル内消化プロトコルに基づき行った。十分なピーク強度を得るために、ゲル内消化、抽出条件の検討を行った。

3.4.2 ゲル内消化、抽出条件の再検討

予備実験の結果から特に高分子量領域においてピーク強度が小さかったため、以下のように処理条件を変更して、再度サンプル処理を行った。

- ・1 mm 角程度のゲル片を 1 つのチューブに 3-4 個入れた。
- ・ゲルは冷凍せず 4℃ で保存した。
- ・トリプシン処理の際に 200~250 rpm で振盪した。
- ・ゲルからのペプチドの溶出の際、超音波処理の時間を 3 分から 15 分にした。
- ・トリプシン溶液の濃度を 3 倍にした (20 ng/mL 60 ng/mL)。
- ・反応時間を over night から 4 時間にした。

また、BSA を標準タンパク質としてトリプシン消化の検討実験を行った。さらに、ゲル内消化及び抽出に使用する試薬の劣化が予想された。このことから試薬を再調製し、MnP2 の MS スペクトルを得た。

3.4.3 N-結合型糖鎖切断処理 WT 型 MnP2 の MS 解析

N-Glycosidase A による N-結合型糖鎖切断処理を行った MnP2 の MS スペクトルについて、糖鎖切断後、糖鎖切断前、ネガティブコントロールで含めて行った。

3.5 変異型 MnP2 R263N の糖鎖解析

R263N を高発現する TMR263N を用いて、野生型 MnP2 高発現と同様の条件で培養を行った。しかし、著量のマンガンペルオキシダーゼ活性を認めることがなかったので、同変異タンパク質を発現するプラスミドを新たに野生型ヒラタケに形質転換し、新規な組換え体を構築した。これらの新規発現株を用いて変異タンパク質の調製を試みた。

3.6 コレラトキシン B サブユニットの発現

イネでの発現用に作られた cDNA 配列を (大阪大学生物工学国際センターの藤山和仁教授より分譲) ヒラタケの発現用ベクター pIpM に挿入し、組換えプラスミドの構築を行った。これを野生型ヒラタケに PEG/CaCl₂ 法により形質転換導入を試みた。

4 . 研究成果

ヒラタケの生産する野生型マンガンペルオキシダーゼ 2 (MnP2) の N-結合型糖鎖について、MALDI-TOF MS を用いた構造解析を行った結果、アミノ酸配列から予想される殆どのトリプシン消化断片に対応する分子量に相当する MS が観察された。しかし、推定 N-結合型糖鎖結合サイトを含む断片 (アミノ酸 101-135) の分子量 (2544.24) に相当する MS は検出されず、代わりにその断片に GlcNAc₂-Hex₅ を主とした 3 種類の糖鎖が結合していることが示唆される MS が観察された。さらに、上記の試料に対して糖鎖の切断処理を行った結果、それらの MS は消失し、新たに糖鎖が除去された場合に予想される分子量に相当する MS が観察された。MS/MS 解析を行った結果、推定通り 102 番目のアスパラギンに GlcNAc₂-Hex₅ が結合していることが確認された。このことは、ヒラタケの野生型 MnP2 は高マンノース型の糖鎖修飾を 1 箇所のみで受けていることを初めて明らかにしたものである。

一方、人為的なアミノ酸変異により、過酸化水素耐性や pH 安定性などが増加し、野生型 MnP2 に比べて、高い高分子酸化作用を持つに至った R263N については、分子量の増大と糖鎖切断語の挙動によって新たに加わった糖鎖修飾の存在が予想されている。R263N の新たな糖鎖の構造や修飾位置の確認、酵素活性に与える影響について分析するために、本酵素の精製と糖鎖解析を試みた。繰り返し行った培養実験と新規形質転換株の作成にもかかわらず、本酵素を必要量精製することができなかったため、修飾糖鎖構造の解析を行うことはできなかった。また、医療用ペプチドとして注目を浴び、植物などの異種発現システムでの生産が試みられているコレラトキシンの B サブユニットをコードする cDNA を入手し、ヒラタケにおける発現について試そうとしたが、発現プラスミドの導入が確認されず、本研究期間中には異種発現ペプチドの生産には至らなかった。2 年間の研究期間中には、思うような成果は得られなかったが、今後研究を継続することで、医療用をはじめとした有用糖タンパク質発現システムとしての木材腐朽菌の可能性について明らかにしていきたい。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 4 件)

長岡潤, 伊藤奎梧, 中沢威人, 坂本正弘, 本田与一, 吉岡康一, 渡辺隆司: 白色腐朽菌の生産する糖タンパク質と外来タンパク質の修飾。シンポジウム「微生物科学研究の多様性と新展開」京都 2013.11.8

伊藤奎梧, 長岡潤, 吉岡康一, 中沢威人, 坂本正弘, 渡辺隆司, 本田与一: ヒラタケの野生型 MnP2 の糖鎖構造解析。日本きのこ学会 25 周年記念大会 京都 2014.9.10-12

Keigo ITO, Jun NAGAOKA, Koichi YOSHIOKA,

Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO, Takashi WATANABE & Yoichi HONDA, Analysis of *N*-glycan of the extracellular versatile peroxidase MnP2 secreted by *Pleurotus ostreatus*, 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, New Delhi, India, 2014.11.19-22

Yoichi HONDA, Genetic transformation of mushrooms and its utilization in basic and applied sciences, Invited Lecture, 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, New Delhi, India, 2014.11.19-22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 与一 (HONDA, Yoichi)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：70252517

(2) 研究分担者

渡辺 隆司 (WATANABE, Takashi)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号：80201200

(3) 連携研究者

中沢 威人 (NAKAZAWA, Takehito)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：80608141

研究者番号：

吉岡 康一 (YOSHIOKA, Koichi)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・特任助教
研究者番号：20540149

(4) 研究協力者

長岡 潤 (NAGAOKA, Jun)
京都大学・大学院農学研究科・院生

伊藤 奎梧 (ITO, Keigo)
京都大学・農学部森林科学科・学生