

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14771

研究課題名(和文)木材腐朽菌を用いたヒト型糖タンパク質生産用プラットフォームの開発

研究課題名(英文)Platform formation for pharmaceutical glycoprotein production system in wood rot fungus

研究代表者

本田 与一 (Honda, Yoichi)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70252517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：木材腐朽菌内での遺伝子発現を正確に評価することを可能にする一過性の遺伝子発現系を見出した。これを用いて、高い発現を誘導する チュープリンプロモーター機能に、14bpからなる配列が必須の役割を持つことを明らかにした。この配列は、様々な担子菌類の チュープリンプロモーターに共通して保存されており、TATAA配列に依存せず高い転写開始を促す機能を持つと推察された。一方、下流のCT-rich配列が重要な役を果たしていることも明らかにされた。また、多機能型ペルオキシダーゼのN-末と融合させたルシフェラーゼの発現を試み、菌体外への酵素活性の発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：With a transient gene expression system, that can evaluate gene expression level without nuisance of different gene dosage of integrated transgenes and their positional effect on the chromosome, it was demonstrated that a 14-bp stretch play a critical role in basic promoter function for beta-tubulin encoding gene in a white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. The similar sequence was found among various basidiomycetes, suggesting that this stretch may serve as entry site for transcriptional factors as TATAA sequence does. A CT-rich sequence was also demonstrated to be important for the promoter function. Furthermore, a fusion gene encoding N-terminal of versatile peroxidase combined with luciferase was constructed and introduced in *P. ostreatus*. Activity of luciferase was detected in culture filtrate of this transformant, indicating that a reporter gene construct to investigate secretion system in wood-rot fungi was developed for the first time.

研究分野：森林生化学

キーワード：白色腐朽菌 異種発現 糖タンパク質 遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

人口構成の変化によって、我が国の社会保障費は肥大化が顕著になっているが、近年大きな問題となっているのが、高額な新薬（バイオ医薬品）の出現である。例えば、一部の癌に劇的な効果を持つ抗がん剤「オプジーボ」は、1患者あたりの1年間の投薬料が約3500万円と極めて高額な事から、厚労省は本薬の薬料を50%切り下げを製造元である小野薬品工業に要請した。現在バイオ医薬品は新薬承認の約6割に上り、安全安価な生産法の開発は、経済的にも人類福祉的にも極めて大きな意義をもつ。

バイオ医薬品はもともと、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・ペプチドであり、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。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したが、発現プラスミドの導入が確認されず、本研究期間以前には異種発現ペプチドの生産には至らなかった。

2. 研究の目的

新しい医療用ヒト型糖タンパク質の生産システムの開発を目指して、木材腐朽菌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し、*in vitro*での糖鎖置換系と併せることで、バイオ医薬品を安全安価に大量生産するためのプラットフォームを作成する。

本研究では、とくに木材腐朽菌の中で異種タンパク質を大量に発現し、分泌するシステム作りにも挑んだ。具体的には、転写および分

泌系のボトルネックを解消するため、担子菌類においては初めてとなる、本格的なプロモーター解析、分泌型レポーター遺伝子の作成などを行った。

3. 研究の方法

初年度目は、コレラトキシンのBサブユニットをコードする遺伝子断片をヒラタケ内の構成的に発現していると期待される遺伝子である *sdi1* プロモーター配列、および菌体外分泌タンパク質 MnP2 のシグナル配列下流に連結した組換え発現プラスミドを作成し、抗菌剤カルボキシシンに対する耐性マーカープラスミド共に、野生型ヒラタケに共形質転換導入を行った。カルボキシシン耐性を指標としたファーストスクリーニングで、形質転換体を単離し、それぞれのカルボキシシン株についてゲノムDNAを抽出し、PCRによってコレラトキシンのBサブユニットコード配列の導入について確認を行って、複数の遺伝子組換え株を単離した。これらの株をふすま入りの液体培地中で振蕩培養を行って、菌体外に分泌されるタンパク質の解析を試みた。

2年度目は、初年度に引き続き、コレラトキシンのBサブユニットの *sdi1* プロモーター制御下における発現を行った。また、MnP2以外の分泌シグナル配列の有効性を試す目的で、ヒラタケラッカーゼとの融合タンパク質をコードするような組換え遺伝子を作り、複数の形質転換体を単離して発現を試みた。

3年度目は、担子菌の中で異種タンパク質を効率よく発現する為の組換え遺伝子発現力セットの構築を進めた。まずこれまでに開発してきた一過性の遺伝子発現系を用いて、プロモーター要因として担子菌内で高い発現を誘導する チュープリンプロモーター内のコアプロモーター機能に必要な特異的配列の解析を行った。様々な欠失変異体、および点変異導入体を作成し、プロモーター機能を測定することで同定されてきた配列については、多くの担子菌類の チュープリンプロモーターに共通して保存されているかどうかを、DNAデータバンクに登録されている担子菌類の チュープリンプロモーター配列を抽出し、blastによって14bpの配列（後述）と比較した。

この流れの中で、様々な担子菌類の チュープリンプロモーター配列において、このコンセンサス配列より下流に位置する転写開始点付近にCT-rich配列が共通して観察されたので、欠失解析によってプロモーター機能に重要な役割を果たしているかについて解析を行った。さらに、より効率的に転写を誘導する人工プロモーターの開発を目指して、CT-rich配列の上流に14bpの配列を複数持つ人工プロモーターを作成し、ハイグロマイシン耐性株の出現頻度を指標にして、転写機能を解析した。

一方で、異種タンパク質発現が転写後のどの段階で滞留しているのかを明らかにす

る目的で、ヒラタケの多機能型ペルオキシダーゼの N-末と融合させたルシフェラーゼの発現を試み、組換えコレラトキシン B サブユニットの時と同じように単離した形質転換体を培養して、菌体外へのルシフェラーゼ活性の発現を確認した。

4. 研究成果

コレラトキシン B サブユニットを発現する為の組換え遺伝子を作り、形質転換体を複数単離し、組換えに用いた *sdi1* プロモーターが効率よく発現する好気的な培養条件で培養して、培地中に生産されるタンパク質について分析を行ったが、期待される組換えタンパク質を著量に発現している株は見つからなかった。そこで、組換え遺伝子に His タグを融合させた新たな構築物を作り、同様に発現を試した。この際、微量の組換えタンパク質でも検出できるように Western blot も試みたが、培地中への組換えタンパク質の発現は見られなかった。一方で、糖タンパク質の糖鎖解析の指標として、MnP2 のアミノ酸置換変異体の生産を、上記の系と同一の系により行い、菌体外に変異型酵素を生産していると考えられる株を複数単離することに成功した。これらの結果は、組換えコレラトキシン B サブユニットの発現もしくは分泌が何からのステップでうまくいかないことを示しており、天然のヒラタケ由来のタンパク質はこの問題をクリアしてうまく発現することを示している。

そこで、新たな分泌シグナル配列の有効性を検証するため、コレラトキシン B サブユニットとヒラタケラッカーゼとの融合タンパク質をコードするような組換え遺伝子を作り、複数の形質転換体を単離して発現を試みたが、やはり組換えタンパク質を著量に蓄積する株の取得はできなかった。したがって、研究の技術的な壁となっている異種発現が阻害される原因を解明することに重点を移した。その過程で、独自に木材腐朽菌内での組換え遺伝子発現を正確に評価することを可能にする一過性の遺伝子発現系を見出した。この系は、従来の遺伝子発現系では、導入遺伝子が染色体上にランダムに複数コピーで組み込まれる安定形質転換系を利用しているのに対して、染色体に組み込まれることなく transient な遺伝子発現を評価することができるため、導入遺伝子の染色体上の位置やコピー数に影響されることなく、発現を解析することが可能である。

担子菌の中で異種タンパク質を効率よく発現する為の組換え遺伝子発現カセットの構築を進めた。前述の一過性の DNA 発現系を用いて、担子菌内で高い発現を誘導するチュープリンプロモーター内のコアプロモーター機能に必要な特異的配列の解析を行い、14bp からなる配列が必須の役割を持つことを明らかにした。この配列は、様々な担子菌類のチュープリンプロモーターに共

通して保存されており、TATAA 配列に依存せず高い転写開始を促す機能を持つと推察された。一方、この配列の他には、下流の転写開始点付近の CT-rich 配列が共通して観察され、欠失解析によってプロモーター機能に重要な役割を果たしていることも明らかにされた。次に、CT-rich 配列の上流に 14bp の配列を複数持つ人工プロモーターを作成し転写機能を解析したが、期待されたような相対的な高発現は達成できなかった。

一方で、異種タンパク質発現が転写後のどの段階で滞留しているのかを明らかにする目的で、ヒラタケの多機能型ペルオキシダーゼの N-末と融合させたルシフェラーゼの発現を試み、菌体外へのルシフェラーゼ活性の発現を確認した。これらの成果により開発された遺伝子発現カセットおよびレポーターシステムを用いて、白色腐朽菌のタンパク分泌系を解析するための研究基盤が整うに至った。今後は、翻訳後の糖鎖修飾系の分析とヒト型糖鎖修飾酵素遺伝子の導入、異種タンパク質の高発現に必要な分泌系ボトルネックの解消に向けて研究を続けていく予定である。

本研究の成果によってマウス培養細胞などと比べて安全性が高く、培養が容易な担子菌によるバイオ医薬品類の生産が可能になれば、高額な薬料を劇的に下げる技術的なブレークスルーとなる。また、インターフェロン、エリスロポエチン等の医療用タンパク質、抗ウイルス薬の安全安価な生産や、新規ペプチドの機能解析が可能になり、癌をはじめとした様々な病気の治療に貢献し、人類の健康の増進、医療費の軽減による社会的困難の解決などが期待される。

なお、本研究の成果を含めた研究代表者のこれまでの業績に対して、平成 29 年 7 月に森喜作賞が送られた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Yoichi Honda, T. Sakaguchi, E. Nishisaka, M. Tsuzuki, M. Horii, T. Nakazawa and M. Sakamoto, New tools for promotion of molecular biology of mushrooms, The 8th Meeting of Asia for Mushroom Science(招待講演) 2015 年 10 月 20 日~ 2015 年 10 月 23 日(米子)

(2) Yoichi Honda, Research tools for basic and applied science of mushrooms - beyond the post genomics -, TSB2017(招待講演) 2016 年 11 月 27 日~ 2016 年 11 月 29 日(タイ・チェンマイ)

(3) 本田与一、基礎から応用へ繋げる研究ツールの開発 -ポストゲノムを超えて-、日本きのこ学会特別シンポジウム(招待講演) 2016 年 09 月 08 日(静岡)

(4) Dong X Nguyen, Taku Sakaguchi, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda, A 14-nt stretch plays a significant role in gene expression from beta-tubulin promoter in basidiomycetes, Asia Mycological Congress, 2017, Ho Chi Minh, Viet num

(5) Yoichi Honda, Recent progress in molecular genetics of mushrooms. 9th Meeting of Asia for Mushroom Science(招待講演), 25 Oct 2017, Cheju, Korea

(6) Dong X. Nguyen, Emi Nishisaka, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda, Identification of cis-acting elements in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase terminator of *Ceriporiopsis subvermispora*. 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2017 (佐賀)

(7) Yoichi HONDA, Dong X NGUYEN, Emi NISHISAKA, Taku SAKAGUCHI, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO, Functional analysis of gene expression signals in basidiomycetous fungi using transfection, and random or targeted integration on the chromosome. European Conference on Fungal Genetics 14, 15-17 Feb 2018. Haifa, Israel
* ベストポスター賞を受賞

(8) Yoichi Honda and Takehito Nakazawa, Recent progress in molecular genetic approaches for mushroom science, Satellite workshop of European Conference on Fungal Genetics 14, 25 Feb 2018, Haifa, Israel

〔図書〕(計 1 件)

(1) 本田与一「きのこの分子生物学的解析技術」きのこの生理機能と応用開発の展望(江口文陽編) S & T 出版(東京)

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

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

(3) 研究協力者

DongXuan Ngyuen (NGYUEN, DongXuan)
京都大学・大学院農学研究科・院生

坂口 拓 (SAKAGUCHI, Taku)
京都大学・大学院農学研究科・院生

西坂 映美 (NISHISAKA, Emi)
京都大学・大学院農学研究科・院生

小寺 里奈 (KODERA, Rina)
京都大学・大学院農学研究科・院生

坂 智奈美 (SAKA, Chinami)
京都大学・農学部森林科学科・学生