

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22332

研究課題名(和文)木材腐朽菌と酵素法の併用が拓く安価で安心安全なバイオ医薬品の製造

研究課題名(英文)Biopharmaceuticals production by combining wood-rot fungi and enzymatic transglycosylation

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品は、効果的な新薬として注目を集めているが、極めて高価な事が社会的な問題となっている。本研究では、安心安全なバイオ医薬品を安価に製造することを目指して、木材腐朽菌の進化的にユニークな糖鎖修飾系に着目し、*in vitro*の糖鎖転移反応と組み合わせることで、バイオ医薬品を生産する為の新しい方法を開発する事を目指して研究を行った。ヒラタケの分泌シグナルを有する融合タンパク質としてヒトタンパク質の発現に成功した。また、糖鎖転移反応のモデル反応を行って、実際にこの系を用いてバイオ医薬品の生産が可能であることを示した。さらに、発展的な基盤技術としてヒラタケのゲノム編集系の導入を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々がこれまでの研究で開発してきた木材腐朽菌(担子菌)における異種タンパク質発現のためのプラットフォームをより効率化し、ヒト由来のタンパク質の分泌発現を実現した。さらに、モデルタンパク質を用いた*in vitro*での糖鎖転移反応が実際に起きることを示すことにより、さらに研究を続けることでヒラタケを用いたバイオ医薬品の生産が可能である事が示された。また、ゲノム編集系の確立は、本課題の継続的発展に留まらず木材腐朽菌、食用担子菌類における分子遺伝学の発展に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Biopharmaceuticals are quite expensive which is a social problem. We set sail for developing a safe and cheap production system for biopharmaceuticals using wood rot fungi and *in vitro* transglycosylation reaction. We successfully produced human proteins fused with homologous secretion signal in the culture filtrate of recombinant *P. ostreatus*. And purified versatile peroxidase was treated with variant of Endo-M, resulting in product with altered glycosylation profile. Furthermore, we have successfully developed a genome-editing system in this fungus for the first time.

研究分野：森林生化学

キーワード：木材腐朽菌 バイオ医薬品 糖鎖修飾 組換えタンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの体内で分泌されるサイトカイン、抗体などの糖タンパク質・ペプチドは、新薬として脚光を浴びてきている。これらのバイオ医薬品は極めて高価であり、また安定して機能する為には、ヒト型の糖鎖による翻訳後修飾が必要である。現在、バイオ医薬品の生産は主にマウスの培養細胞を用いているが、生産性が低く、培地が高価であるうえ、レトロウイルスによる感染の潜在リスクがある為、コストが極めて高額である。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安価で安心安全なバイオ医薬品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)される事から、ヒト型糖タンパク質の生産には向かない。さらに、様々な宿主で糖鎖修飾系に人為的に変更を導入した研究例では、多くの場合、宿主生物の生育自体に重篤な問題が生じてしまう。

研究代表者はこれまで、木材腐朽菌が分泌するリグニン分解酵素の発現制御と糖鎖修飾について研究する中で、担子菌類においては、高マンノース型以降の高次の糖鎖修飾系が無いことに気づくに至った。すなわち、殆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(Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)型のみである。

このような中、

これまでの、申請者らによる分泌型レポーター遺伝子や遺伝子発現シグナル解析、ゲノム編集系の開発により、腐朽菌において効果的に異種タンパク質の発現を可能にする手法や誘導型発現システム等の材料が整ってきた。

高額なバイオ医薬品による負担が社会問題化してきている中で、腐朽菌のシンプルな糖鎖修飾機構を活用することで、この問題を解決できるチャンスがある。

等の事由により、これまで不可能だった研究を実施する準備と必要性が揃った。

また、これまで、世界中で様々な宿主系を用いた研究が行われてきたが、バイオ医薬品の低コスト化には成功していない。一方で、ヒラタケは食用で安全性が高く、動物ウイルスが感染するリスクもない。また、安価な培地を用いて培養のスケールアップが容易である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、安心安全なバイオ医薬品を安価に製造することを目指して、木材腐朽菌(ヒラタケ)のユニークな糖鎖修飾系に着目し、*in vitro*の糖鎖転移反応と組み合わせることで、バイオ医薬品を生産する為の新しい方法を開発する事である。

### 3. 研究の方法

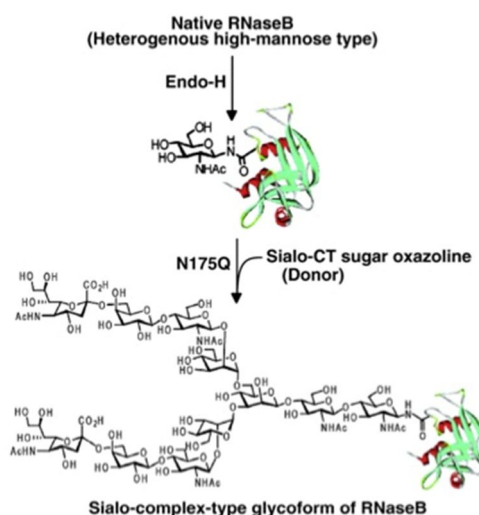
A. ヒラタケの組換え遺伝子発現系を用いた、高マンノース(Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)型の単純な糖鎖を持つ、ヒト由来の糖タンパク質前駆体の生産

ヒラタケ 20b 株を用いて、外来遺伝子を高発現するプロモーター制御下で codon を最適化したヒト由来のトランスフェリン(他にもインターロイキン等複数の候補を試す)のコード領域を組み込んだ発現カセットを形質転換導入する。菌体外に分泌生産された前駆体タンパク質について FPLC(研究室所有)を用いて精製し、トリプシン分解を経て精製後 MALDI-TOF/MS(学科共通機器)を用いて N-結合型糖鎖の構造・結合部位について確認した。

なお、その後の Endo-H による糖鎖切断ステップでは、このシンプルな糖鎖をもつ前駆体タンパク質でない、反応が先に進まない(後述)。

B. 酵素法を用いたヒト型の糖鎖への置換反応と評価、条件最適化

まず Endo-H を用いて、前駆体からヒラタケ由来の高マンノース型糖鎖を切断する。続いて Umekawa らによって開発された変異型グリコシダーゼ Endo-M(N175Q)を用いて、ニワトリ卵黄より調整したシアル酸含有複合糖鎖オキサゾリンと組換えタンパク質の GlcNAc が 1 残基のみ残った還元末端の間で転移反応を起こし、糖鎖の置換を完成させる(右図)ことで、ヒト型糖鎖を持つ組換えタンパク質を合成する。置換された生成物についても、精製し MALDI-TOF/MS による糖鎖の構造確認を行った。



糖鎖転移酵素による糖鎖の置換法の原理

上記の二つのステップを組み合わせ、木材腐朽菌の糖鎖修飾システムのユニークさと、酵素法の巧妙さの利点を併せることで、他の宿主生物を用いた系では不可能だったヒト型糖タンパク質の安価で安心安全な生産法の創出を試みた。

#### 4．研究成果

これまでヒラタケにおける異種タンパク質発現を可能にするプラットフォーム造りを行ってきた。それは、形質転換マーカーの開発に始まり、形質転換プロトコルの最適化、発現プラスミドの構築、プロモーター解析(Ngyuen et al. 2020)、誘導型プロモーターの単離などを含んでいる。この系を用いてヒラタケの菌体外酵素 VP1 のN末に存在する分泌シグナルを含むタンパク質との融合タンパク質としてヒトタンパク質の発現を試み、菌体外への分泌に成功した。また、in vitro における糖鎖転移反応のモデルとして多機能型ペルオキシダーゼ VP1 及び VP2 の生産と精製を行い、糖鎖構造の解析とヒト型糖鎖との置換反応を試みた。反応産物と基質についてリブシン分解を経て精製後 MALDI-TOF/MS ( 学科共通機器 ) を用いて *N*-結合型糖鎖の構造・結合部位について確認したところ、Endo-H 処理により担子菌由来の糖鎖の切断がされていること、また変異型グリコシダーゼ Endo-M(N175Q)によるトランスグリコシレーション反応によりさらに、シアル酸含有複合型糖鎖を含むと考えられる糖鎖が結合していることを示唆するデータが得られた。これらの結果については、さらに実験を積み重ね論文化していく予定である。これらの結果から、実際にこの系を用いてバイオ医薬品の生産が可能であることが示された。

また、発展的な基盤技術として、ヒラタケ内において任意の染色体改変を行って安定に異種タンパク質を発現する基盤技術として CRISPR/Cas9 の導入を行い、ゲノム編集を可能にした ( Boontawon et al., 2021 )。今後は、ここで開発されたゲノム編集系を用いて、さらに精度の高いゲノム工学を活用することにより、組換えタンパク質の生産性向上と、糖鎖転移反応のより精度の高い解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dong Xuan Nguyen, Taku Sakaguchi, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda	4. 巻 66
2. 論文標題 A 14-bp stretch plays a critical role in regulating gene expression from beta(1)-tubulin promoters of basidiomycetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CURRENT GENETICS	6. 最初と最後の頁 217 - 228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dong Xuan Nguyen, Taku Sakaguchi, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda	4. 巻 66
2. 論文標題 Correction to A 14-bp stretch plays a critical role in regulating gene expression from beta(1)-tubulin promoters of basidiomycetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CURRENT GENETICS	6. 最初と最後の頁 445 - 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Boontawon Tatpong, Nakazawa Takehito, Inoue Chikako, Osakabe Keishi, Kawauchi Moriyuki, Sakamoto Masahiro, Honda Yoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient genome editing with CRISPR/Cas9 in Pleurotus ostreatus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-021-01193-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	入江 俊一  (Irie Toshikazu)  (30336721)	滋賀県立大学・環境科学部・教授    (24201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------