

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780097

研究課題名(和文)新規育種技術による糖鎖改変酵母を利用した糖鎖機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of oligosaccharide function using N-and O-glycan-deficient *Saccharomyces cerevisiae* mutant

研究代表者

安部 博子 (Abe, Hiroko)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：40363220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：N-およびO-結合型糖鎖改変出芽酵母(YFY21株)の著しい増殖能の低下を回復させた株(YFY22株)の網羅的遺伝子発現解析の結果から、YFY22では解糖系で機能する遺伝子が過剰に発現していることがわかった。また、O-結合型糖鎖抑制株の増殖回復株では細胞膜センサータンパク質の分解が抑制されていた。また、細胞壁タンパク質および分泌糖タンパク質のO-結合型糖鎖量は増加していた。以上の結果から、糖代謝を上げてより効率的にエネルギーの生産を行うこと、O-結合型糖鎖量を増やすことによって生存に関わるタンパク質を分解から守ることなどが増殖能力を高めるために必用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Saccharomyces cerevisiae strain YFY21 engineered of both of N- and O-glycan, exhibit a severe growth defect. YFY22, which was isolated from YFY21, had normal growth. The gene expression profiles of YFY21 and YFY22 were analyzed using DNA microarrays. Expression of genes that encodes enzymes in the glycolysis was up-regulated in YFY22. Additionally mutated pmt2pmt4 disruptant strain exhibits the growth defect lacking phenotype of pmt2pmt4 disruptant. In the mutated pmt2pmt4 disruptant, Wsc1 was not processed and O-mannosylation of mannoprotein on cell wall increased. These results showed that up-regulation of glucose metabolism and protection against protein-degradation by addition of O-mannosylation are essential role for restored growth.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：糖鎖 出芽酵母 不均衡変異導入法 O-結合型糖鎖

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は多様な構造を形成しうる事に加え、多くのタンパク修飾に関与することから、現段階では糖鎖の機能を総合的に理解することは難しい状況にある。また、糖転移酵素 KO マウスなどの解析からその重要性が明らかになっているが、糖鎖不全による標的タンパク質の機能低下が原因である場合が多く、糖鎖自身の機能に迫る研究は少ない。出芽酵母の酵母型糖鎖(外糖鎖)除去株 TIY20(och1 mnn1 mnn4 破壊株:マンノース 8 個の N-結合型糖鎖を持つ (M8) )(Takamatsu S. et al. Glycoconjugate J.,1998)は、高温度感受性(ts 性)および著しい細胞増殖遅延、薬剤感受性を示す。我々は、新規育種技術である不均衡変異導入法を駆使して TIY20 ゲノム中に変異を導入したところ、外糖鎖を持たないにも関わらず、上記表現型を回復した YAB 株(M8)を取得することに成功した (Abe H. et al., Glycobiology 2009) (特許公開 2008-220172、米国特許番号 7803605 号)。YAB 株の取得によって、外糖鎖は酵母の上記表現型の回復には必須でないことが初めて明らかになった。さらに、YAB 株の遺伝子発現解析から、糖新生経路の活性化が TIY20 株の表現型の一部を抑圧できることも明らかにできた (Abe H. et al, b.b.b., 2009)。近年、O-マンノース型糖鎖が N-結合型糖鎖の付加位置を制御することが明らかとなっており (Ecker M. et al, EMBO reports, 2003)、糖鎖の機能を明らかにするには、N-だけでなく、O-結合型糖鎖も含めて総合的に解析する必要がある。我々は、マンノース 5 個までにトリミングした N-結合型糖鎖(M5)を持つ YFY20 に、PMT1 遺伝子 (protein-O-mannosyltransferase) を破壊することで O-マンノース型糖鎖付加の抑制も加えた YFY21、不均衡変異導入法の適用により増殖能および ts 性を回復させた YFY22 をすでに取得している。この YFY 株の増殖回復のメカニズムを解析することで、N-あるいは O-結合型糖鎖の細胞増殖に関わる機能を見いだしたい

### 2. 研究の目的

我々は、糖転移酵素欠損酵母が示す増殖能力の低下を新規育種技術を適用することによって回復させた変異株を独自に取得している。このことは糖鎖異常を補填するための機能が細胞に存在することを示している。本研究は、取得株の詳細な解析を通じて、糖鎖および糖転移酵素がもつ細胞増殖に関する機能について明らかにすることを目的とする。得られた成果は、酵母から高等動物まで普遍的に存在する糖鎖自身が関わる広範囲な生体内機能の解明に迫れるだけでなく、近年需要の高まる糖タンパク生産のための宿主および高活性化バイオ医薬の開発にも応用できる。

### 3. 研究の方法

(1)YFY22 株 (N-および O-結合型糖鎖欠損酵母の ts 性および増殖能を回復させた酵母株) の網羅的遺伝子発現解析

高マンノース型 N-糖鎖の外糖鎖を除去し、マンノース 5 個までにトリミングした N-結合型糖鎖を持つ YFY20 株に、O-マンノース型糖鎖付加の抑制も同時に行う目的で、PMT1 遺伝子 (protein-O-mannosyltransferase) の破壊を加えた YFY21 株を取得した。しかしながら、YFY21 株は増殖能の低下および ts 性を引き起こす。そこで、新規育種技術である不均衡変異導入法を適用し、増殖能等を回復させた YFY22 株を取得することに成功している。この YFY22 株がどのようなメカニズムによってこれらの表現型を回復することができるのかを調べることを目的に、YFY21 株とその増殖回復株である YFY22 株との間で DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、YFY22 株にて発現量が増加する遺伝子、および発現量が低下する遺伝子の探索を行った。DNA マイクロアレイにより発現量が増減する遺伝子についてリアルタイム PCR を行い YFY22 株において発現量が増減する遺伝子の特定をおこなった。これらの遺伝子を強制発現用マルチコピーベクターである YEp352GAP2 にクローニングし YFY21 株へ導入し、増殖能および ts 性が回復するかどうかについて解析を行った。

(2) protein-O-mannosyltransferase をコードする *pmt2pmt4* 二重遺伝子破壊株とその増殖回復株の解析

O-結合型糖鎖の機能を調べる目的で著しい増殖能の低下を示す、PMT2 および PMT4 の 2 重遺伝子破壊株を構築し、不均衡変異導入法の適用によってその増殖回復株の取得を試みた。本変異法の適用によって、*pmt2Δpmt4Δ* 株の増殖能が回復した株を取得することができた。本 *pmt2Δpmt4Δ* 株が示す増殖能の低下は、細胞膜センサータンパク質 Wsc1、Mid2 の不安定性が原因であることが分かっている。本研究にて取得した増殖回復株にてこれらタンパク質の分解が抑制されているかどうかの解析を行った。WSC1-HA 融合遺伝子をシングルコピープラスミドにクローニングし、本プラスミドを野生型株、*pmt2Δpmt4Δ* 株、増殖回復株に形質転換した。これらの形質転換体の膜画分を回収し、ウエスタンブロッティングにより Wsc1-HA のシグナルを検出した。

さらに *pmt2Δpmt4Δ* 株およびその増殖回復株においてキチナーゼおよび、細胞壁マンノタンパク質の O-結合型糖鎖量を調べた。キチナーゼは培地中に分泌されるので、培地中のキチナーゼをキチンに吸着させることにより回収し、SDS-PAGE により分離した。CBB 染色によりキチナーゼのバンドの検出を行った。マンノタンパク質由来 O-結合型糖

鎖は、それぞれの株からの細胞壁タンパク質のβ-イルミネーションに調整した。これらの糖鎖は PA-化の後に HPLC にて解析された。

### (3) 分裂酵母 och1 破壊株の形態解析

分裂酵母の α 1,6-マンノース転移酵素をコードする och1 遺伝子の破壊株の形態は通常の円筒形から球形に変化する。このことから、och1 破壊株では極性の喪失が考えられる。そこで、och1 破壊株またはその増殖回復株のアクチン染色を行うことによって、糖鎖変異株におけるアクチンの極性について調べた。

## 4. 研究成果

(1) YFY22 株 (N-および O-結合型糖鎖欠損酵母の ts 性および増殖能を回復させた酵母株) の網羅的遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイ解析後のリアルタイム PCR による再確認の結果を図 1 に示す。

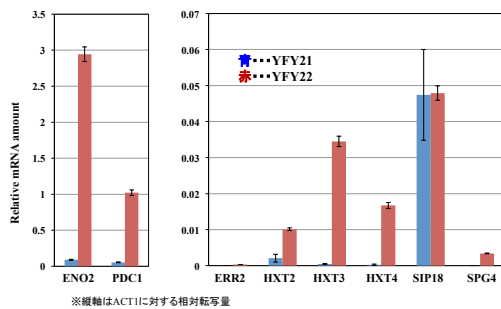


図1 リアルタイムPCR

図 1 に示す通り YFY22 株において ENO2、PDC1、HXT3、HXT4 の発現が増加していた。解糖系で機能する遺伝子が過剰発現していることが明らかになった。このことから、糖鎖改変による増殖能の低下を回復するためには、糖代謝を上げてより効率的にエネルギーの生産を行う必要があると考えられる。糖鎖はエネルギー代謝に何らかの機能を示すことが示唆された。

ENO2、HXT3、HXT4 遺伝子をそれぞれ YFY21 株に形質転換し、増殖能および ts 性を調べた結果、これら単独遺伝子の強制発現では増殖能および ts 性を回復させることができなかった。

(2) protein-O-mannosyltransferase をコードする *pmt2pmt4* 二重遺伝子破壊株とその増殖回復株の解析

*pmt2Δpmt4Δ* 株およびその増殖回復株のキチナーゼとマンノタンパク質の O-結合型糖鎖量を調べた。その結果、*pmt2Δpmt4Δ* 二重破壊株では野生型株に比べてキチナーゼの O-結合型糖鎖量が減少していることが分かった(図 2)。一方、増殖回復株のキチナーゼに付加される O-結合型糖鎖は、野生型株由来のものよりも減少しているが、*pmt2Δpmt4Δ* 二重破壊株よりも少し増加していることが分かった。一方、マンノタンパク質の

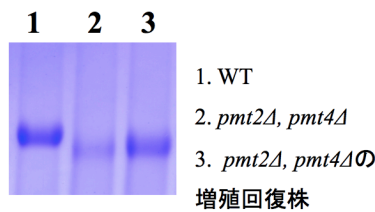


図2. キチナーゼアッセイ

O-結合型糖鎖は、*pmt2Δpmt4Δ* 二重破壊株では野生型株に比べ約 40%程度にまで減少していたが、増殖回復株ではむしろ、野生型株よりも増加していた。このことから、増殖回復には O-結合型糖鎖を増やすシステム、すなわち、他の PMT タンパク質が過剰に機能していることが予想された。

次に、Wsc1 タンパク質の細胞膜上での発現の結果を示す。図 4 では各株の形質転換体

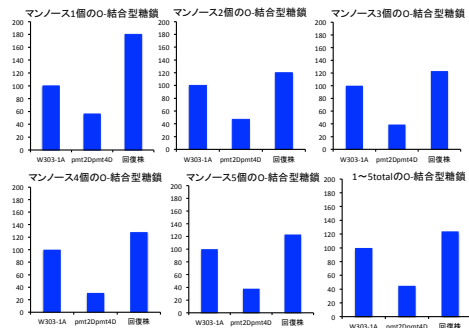


図3. 細胞壁タンパク質のO-結合型糖鎖量

2 クローンずつの膜画分を各レーンにアプライしている。野生型株では 110Kb 付近に Wsc1-HA のバンドが検出されるが、*pmt2Δpmt4Δ* 株では 100Kb より小さいサイズのバンドが複数確認できた。このことから、*pmt2Δpmt4Δ* 株では Wsc1-HA の糖鎖が減少していること、また、25Kb 程度の小さなバンドがたくさん観察されることから、分解されていることが分かった。一方増殖回復株では 100Kb 付近にメインのバンドが観察されたことから、*pmt2Δpmt4Δ* 株よりも糖鎖が多く付加されていることが分かった。さらに、小さなバンドも *pmt2Δpmt4Δ* 株に比べ少ないことから、分解の抑制がおこって

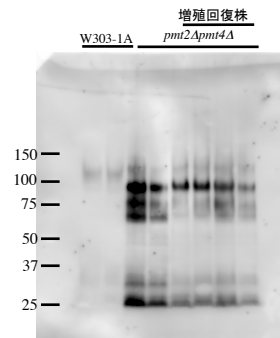


図4. Wsc1-HAのウエスタン解析

いることが分かった。これらの結果は、*pmt2Δpmt4Δ* 株に比べ、増殖回復株では細胞膜センサーである Wsc1 の O-結合型糖鎖付加が増

加し、分解が抑制されることにより細胞膜で機能することが可能となり増殖能や ts 性の回復につながるのではないかと示唆される。

### (3) 分裂酵母 och1 破壊株の形態解析

分裂酵母の och1 破壊株またはその増殖回復株 (och1Dmut) のアクチン染色を行うことによって、糖鎖変異株におけるアクチンの極性について調べた。

野生型株ではアクチンパッチが両端もしくは片方に局在しているが、och1D株ではアクチンパッチが細胞全体に広がり、通常細胞の中央に観察されるアクチンリングが中央には観察されない。一方 och1Dmut株ではアクチンパッチが両極に局在し、アクチンリングが中央にできていた (図5)。このことから、och1 破壊株では極性が喪失していることが考えられる。

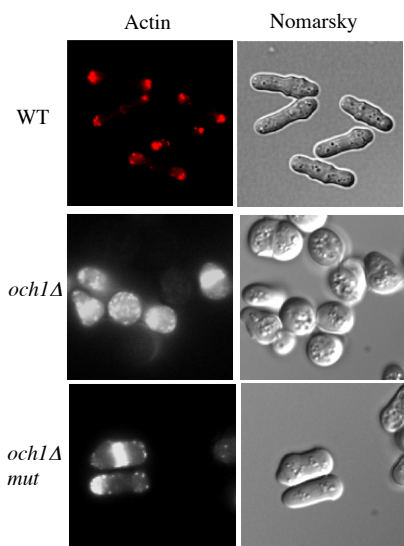


図5 アクチン染色

## 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 2 件)

著者名 : Kazuya TOMIMOTO, Yasuko FUJITA, Tomoko IWAKI, Yasunori CHIBA, Yoshifumi JIGAMI, Ken-ichi NAKAYAMA, Yoshihiro NAKAJIMA and Hiroko ABE

論文 標 題 : I Protease-Deficient *Saccharomyces cerevisiae* Strains for the Synthesis of Human-Compatible Glycoproteins

雑誌名 : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*

査読の有無 : 有り

巻 : 77 (12)

発行年 : 2013

ページ : 2461-2466

DOI: 10.1271/bbb.130588

著者名 : Manikantan, Kiran; Abe, Hiroko;

Fujita, Yasuko; Tomimoto, Kazuya; Ishikawa, Mitsuru; Biju, Vasudevanpillai; Ozaki, Yukihiro; Itoh, Tamitake

論文 標 題 : Inhibition assay of yeast cell walls by plasmon resonance Rayleigh scattering and surface-enhanced

Raman scattering imaging

雑誌名 : *Langmuir*

査読の有無 : 有り

巻 : 28

発行年 : 2012

ページ : 8952-8958

DOI: 10.1021/la3004245

[学会発表] (計 5 件)

発表者 : 富本 和也・安部 博子

発表 標 題 : 新規バイオ医薬品生産宿主の開発 - 出芽酵母の糖鎖構造改変

学会名 : SAT テクノロジーショーケース

発表年月日 : 2014 年 1 月 24 日

発表場所 : つくば国際会議場(茨城県)

発表者 : 富本 和也・中島 芳浩・安部 博子

発表 標 題 : 新規バイオ医薬品生産宿主の開発 - 出芽酵母の糖鎖構造改変

学会名 : 産総研オープンラボ 2013

発表年月日 : 2013 年 10 月 31 日 ~ 2013

年 11 月 01 日

発表場所 : 産総研つくば本部(茨城県)

発表者 : 富本 和也、藤田 康子、千葉 靖典、地神 芳文、仲山 賢一、中島 芳浩、安部 博子

発表 標 題 : N-結合型・O-結合型糖鎖改変出芽酵母株の開発

学会名 : 農芸化学会

発表年月日 : 2012 年 3 月 24 日

発表場所 : 京都女子大学

発表者 : 安部博子・富本 和也・藤田康子・高岡友紀・千葉靖典・板谷有希子・下田 親・地神芳文・仲山賢一・中島芳浩

発表 標 題 : DNA ポリメラーゼ変異を利用した不均衡変異導入法によるヒト適応型糖タンパク質生産酵母株の開発

学会名 : 真菌分子細胞研究会 (招待講演)

発表年月日 : 2011 年 11 月 12 日

発表場所 : 徳島文理大学

発表者 : 富本 和也、藤田 康子、千葉 靖典、地神 芳文、仲山 賢一、中島 芳浩、安部 博子

発表 標 題 : ヒト型 N-結合型糖タンパク質生産酵母の O-マンノース型糖鎖の改変

学会名 : 生化学会

発表年月日 : 2011 年 9 月 23 日

発表場所 : 京都国際会館

[図書] (計 1 件)

著者名：安部博子  
出版社名：シーエムシー出版  
書名：バイオ医薬品開発における糖鎖技術  
発行年：2011  
総ページ数：139-147

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：糖鎖改変酵母及びそれを用いた糖タンパク質の製造方法  
発明者：安部博子、富本和也、藤田康子、千葉靖典、仲山賢一  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：13/409,558  
出願年月日：2012年03月01日  
国内外の別：外国

名称：糖鎖改変酵母及びそれを用いた糖タンパク質の製造方法  
発明者：安部博子、富本和也、藤田康子、千葉靖典、仲山賢一  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特願2011-286  
出願年月日：2012年01月04日  
国内外の別：国内

○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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 ( )

研究者番号：

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：