

《日本農芸化学会功績賞》



酵母の糖鎖生物学および糖鎖工学に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門 上席研究員 地 神 芳 文

ポストゲノム研究として糖鎖生物学・糖鎖工学が注目されるなか、筆者はグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) 生合成の新規遺伝子の機能解明を通じて、酵母細胞壁 GPI 型糖タンパク質の生理機能を解明した。また、酵母の N-結合型糖鎖合成の新規遺伝子の機能解析を基盤として、ヒト型糖鎖含有糖タンパク質の生産技術を開発し、糖タンパク質医薬品に応用した。以下にその概要を述べる。

1. 酵母の GPI 生合成遺伝子の機能解明

真核生物の細胞表層には糖脂質 GPI がタンパク質に付加して細胞膜に局在した分子が存在する。この修飾は酵母からヒトまで広く保存されており、細胞の増殖や個体発生などに必須である。GPI は小胞体で生合成され、完成した GPI はタンパク質に転移後、脂質改変を経て細胞膜に輸送・局在化する。さらに、酵母では、この多くは細胞膜で GPI の脂質部分が除去されて細胞壁のグルカンに共有結合する。GPI の生合成や生理的意義は未解明であり、分子遺伝学的手法が駆使できる出芽酵母は GPI の機能を解明する理想的なモデル生物である。そこで筆者らは、GPI の生合成遺伝子、特に *GWT1*, *GPI7*, *BST1* および *PER1* の解析を通じて GPI の生理的役割を解明した。

1) *GWT1* 遺伝子の同定と機能解明

筆者らは企業と共同で GPI 型タンパク質を融合したレポーター酵素の活性を指標にした新規抗真菌剤探索系を開発し、さらに、この標的分子として機能未知遺伝子 *GWT1* を同定した。薬剤開発ではこの薬剤の作用標的分子の同定が必須であるため、筆者らはこの遺伝子の機能を解析し GPI 生合成過程でフォスファチジルイノシトール (PI) のイノシトール環にアシル基を付加する過程 (すなわち PI-GlcN から PI (Acyl)-GlcN への変換) に関与することを明らかにした。

さらに、この *GWT1* の機能解析の一環として、低温感受性を示す *gwt1-10* 変異株を単離し、さらに、この低温感受性を多コピーで回復する遺伝子として、細胞膜におけるトリプトファンに取り込みに関与する *TAT2* 遺伝子を単離した。この変異株では、Tat2p が本来の細胞膜ではなく小胞体に局在しており、しかも、この膜タンパク質が、本来の脂質ラフトに内包されていないことを明らかにした。他の結果とともに、既報のステロールやスフィンゴ脂質だけでなく、GPI 型タンパク質が膜タンパク質の細胞内輸送と局在化に重要なことを明らかにした。

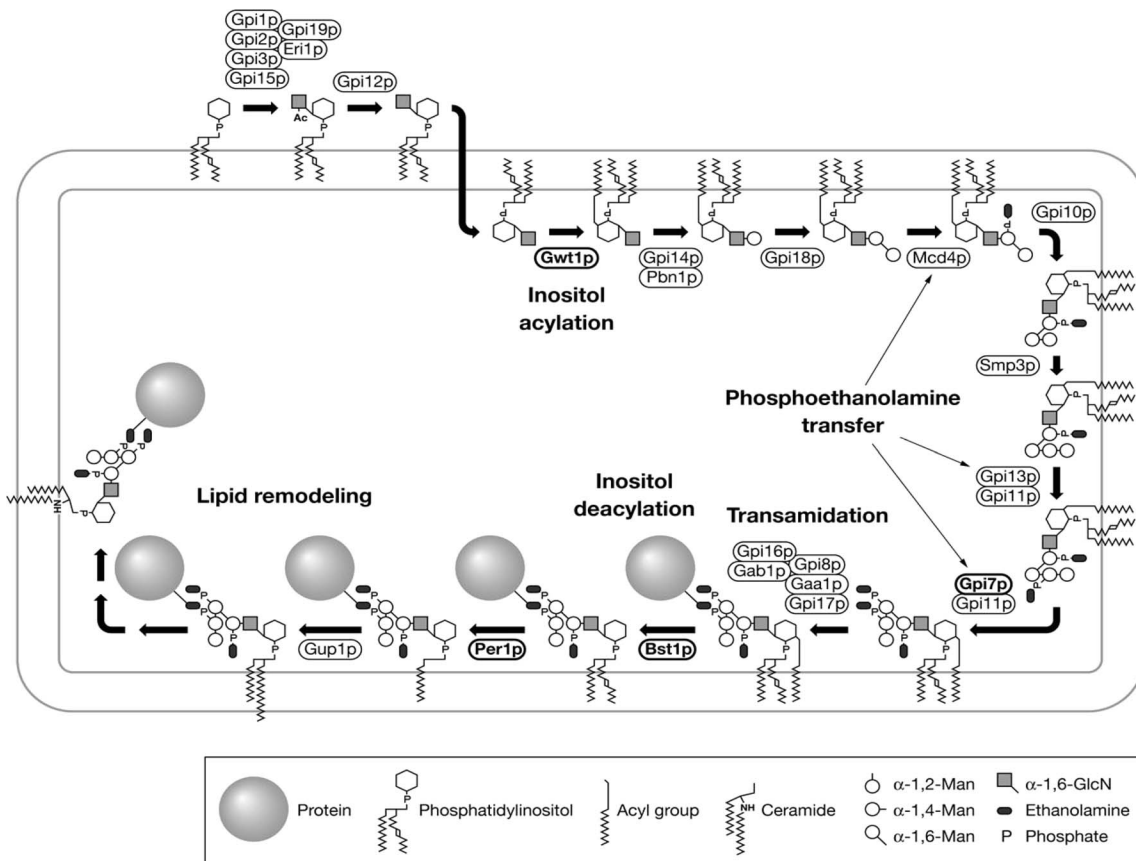


図 1 GPI 生合成経路と合成遺伝子 (特に、本研究で解析した *GWT1*, *GPI7*, *BST1*, *PER1* は太字で示す)

2) *GPI7* 遺伝子の機能解明

GPI 生合成には 24 以上の遺伝子が関与しており酵母ではその大半が生育に必須である。しかし、生育に必須でない遺伝子の一つで GPI の側鎖にエタノールアミンリン酸を付加する酵素をコードしている *GPI7* の生理的役割は不明であった。筆者は、*GPI7* が、娘細胞が母細胞から分離するのに機能する GPI 型グルカナーゼ Egt2p が母細胞・娘細胞間の隔壁に適切に局在するのに必須なこと、すなわち、細胞分離時の娘細胞における GPI 型タンパク質の隔壁への局在化に Gpi7p の機能が重要なことを明らかにした。

3) *BST1* 遺伝子の機能解明

小胞体にはタンパク質の品質管理機構が存在し、正しい立体構造をとれなかったタンパク質は小胞体から排出されて細胞質に存在するプロテアソームで分解される。N-結合型糖タンパク質ではこの機構にシャペロンや糖鎖が重要なことがわかっているが、GPI 型タンパク質の品質管理については全く不明であった。筆者らは正しい立体構造をとれないモデル GPI 型タンパク質 (Gas1*p) を用いてこの機構を解明した。Gas1*p は GPI を付加しているが細胞表面には輸送されず小胞体にとどめられており、プロテアソームで分解されることが判明した。さらに、この品質管理機構に対する GPI アンカー部分の役割を検討した結果、GPI がタンパク質に転移した後の最初の段階 (GPI のイノシトール環の脱アシル化) にかかわる Bst1p が品質管理に極めて重要な役割を果たすことを示した。

4) *PER1* 遺伝子の機能解明

GPI がタンパク質に付加後の脂質改変については、やっとその一端が明らかになり始めた状況である。遊離型 GPI における PI の脂肪酸組成は sn-2 位の脂肪酸が C16 や C18 の不飽和型であるのに対して、GPI がタンパク質に付加した後は、sn-2 位の脂肪酸が C26 などの長鎖飽和脂肪酸またはセラミド脂質に変換されている。この一連の変換では、PI の脂肪酸が sn-1 位の 1 カ所のみ付加した「1 本足」のリゾ PI が生成し、その後、このリゾ PI の sn-2 位により長い飽和型の脂肪酸が付加される。この後者の反応にかかわる遺伝子は *GUPI* として最近

報告されたが、この前の段階 (PI からリゾ PI への変換) に関与する遺伝子は不明のままであった。

筆者らは候補遺伝子 *PER1* の機能解析により、この遺伝子が PI からリゾ PI への変換に関与する GPI-phospholipase A2 活性を有することを見いだした。また、この遺伝子の欠損や過剰発現で GPI の脂質改変が異常になると、GPI 型タンパク質が脂質ラフト (マイクロドメイン) に入れないため、細胞膜に局在できず、細胞外に放出されてしまうことを示した。

2. 酵母による糖タンパク質糖鎖の改変

1) 酵母の細胞表面を利用するオリゴ糖合成システム

酵素や抗体など有用タンパク質を細胞表面に局在化する手法は穏和で簡便な酵素の固定化法として期待されている。細胞表面への固定化としては、GPI 型の細胞壁局在タンパク質を利用するのが一般的であるが、糖転移酵素など C 末端側に機能部位をもつタンパク質には適用が困難である。このため、筆者らは、GPI 型タンパク質とは異なる機構で細胞壁に局在する PIR 型タンパク質との融合によりタンパク質を出芽酵母の細胞表面に効率良く局在化させる手法を見いだした。さらに、ヒト由来の糖転移酵素 51 種を出芽酵母の細胞表面に発現させたライブラリーを構築し、これが各種のヒト有用オリゴ糖鎖の酵素合成に利用できることを示した。

一方、糖転移酵素による糖鎖合成では、各種の高価な糖ヌクレオチドを酵素反応の原料に使用するため、均一な標品の大量生産系の開発が望まれる。筆者らは、シロイズナズナの関連遺伝子を出芽酵母に導入・発現させることで、出芽酵母の細胞質内に多量に存在する GDP-マンノースや UDP-グルコースを各々、GDP-フコース、または UDP-グルクロン酸や UDP-キシロースに効率よく変換する生産系を構築した。

2) 酵母を宿主とするマンナン型からヒト高マンノース型への糖鎖改変

サイトカインや抗体など現代医療で有用な糖タンパク質の多くは動物細胞で生産されているが、安価で大量生産が可能な代替宿主の開発が期待されている。筆者らは哺乳類と類似のタンパク質の分泌発現や品質管理系をもつ酵母に注目し、酵母によ

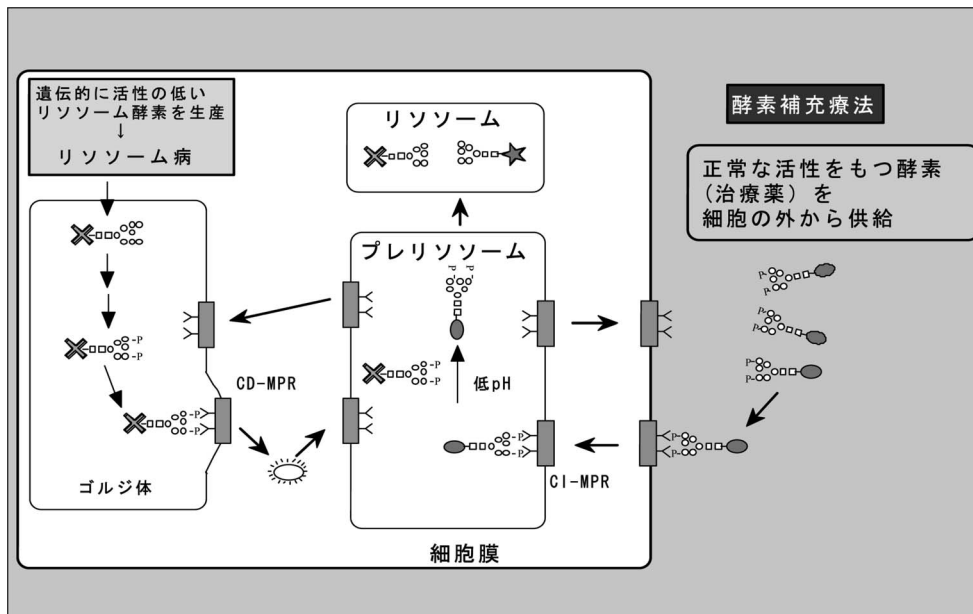


図 2 リソソーム病と酵素補充療法の説明

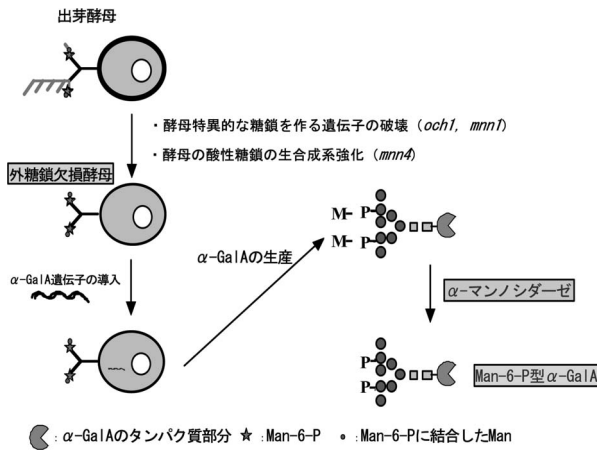


図3 糖鎖改変酵母によるファブリー病治療薬の生産法

る糖タンパク質糖鎖の改変とその医薬品への応用研究を実施した。この際、ヒト型糖鎖を生産するためには宿主細胞固有の糖鎖合成を抑制する必要がある。筆者らは、出芽酵母の *OCH1* 遺伝子を単離し、これが糖外鎖合成の開始に必要な α -1,6-マンノース転移酵素をコードしていることを明らかにした。*OCH1* 遺伝子は分裂酵母やメタノール酵母にも存在し、この遺伝子の機能破壊が酵母の糖鎖改変では共通の必須事項であることを示した。

出芽酵母では糖鎖の末端部分に α -1,3-Man が結合し、これがヒトに強い抗原性を示す。そこで、この糖転移反応を行う *MNN1* 遺伝子と前述の *OCH1* 遺伝子の二重変異株を作製して、哺乳類と同一のコア型糖鎖 (Man8GlcNAc2) の生産を可能にした。さらに出芽酵母特有の酸性糖鎖 (Man-6-P) の転移酵素遺伝子 (*MNN6*) とその制御遺伝子 (*MNN4*) を単離し、 $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 三重破壊株を作製した結果、酸性糖鎖が有意に減少し抗原性のない哺乳類型糖鎖 (高マンノース型) の生産に成功した。また、高マンノース型糖鎖の構造と生理活性や体内動態との相関をモデル糖タンパク質 (FGF) で解明した。

3) マンノース-6-リン酸型糖鎖の生産とリソソーム病治療薬の開発

リソソーム病は特定の酵素が欠損して本来代謝されるべき物

質が分解されずにリソソームに蓄積する疾患群の総称で約40種類の病気が報告されている。その一つであるファブリー病は、リソソーム中の α -ガラクトシダーゼ (α -Gal) の活性が欠損または低下して起こる糖脂質代謝異常症で、セラミドトリヘキソシドが分解されず、全身の臓器障害を起こす。根本的な治療法が確立されていなかったが、最近、動物細胞で生産した組換え体 α -Gal を静脈から点滴する酵素補充療法が欧米で進められ、日本でも販売されている。

筆者らはリソソーム病の酵素補充療法用治療薬の酵母での生産を検討した。*MNN4* を構成的に発現し *OCH1, MNN1* の二つの遺伝子を破壊した出芽酵母株で培地中に分泌した α -Gal を精製し、その糖鎖構造の解析により、マンノースリン酸を有する酸性糖鎖の生成を確認した。リソソームへの輸送にはその特異的なリセプター (CI-M6PR) との結合が必要であり、このためにはリン酸残基が露出したリン酸モノエステル結合が必要であるが、酵母ではマンノースリン酸が非還元末端のマンノースに転移されており、リン酸ジエステル結合を形成している。そこで土壤中よりリン酸ジエステル結合を切断可能なマンノシダーゼ生産菌を探索し、この分泌する酵素を利用した。この酵素で処理した α -Gal は非還元末端にリン酸が露出した M6P 型糖鎖を有しており、ファブリー病患者由来の線維芽細胞に効率良く取り込まれることを確認し、その有用性を示した。また、マウス個体による体内動態でも酵素補充療法用医薬品として有用であることを示した。

酵母を利用する本研究の進め方については、東京大学微生物利用学研究室で指導を受けた (故) 蓑田泰治先生、児玉 徹先生、大森俊雄先生から多くのご助言やご指導をいただきました。また、筑波大学名誉教授・山根國男先生には研究途上で種々のご支援をいただきました。本研究成果は多数の方々との共同研究で得られたものであり、関係者の方々に深く感謝いたします。特に、工技院・生命研、産総研・糖鎖工学研究センターで、筆者の研究チームに所属して本研究に従事した産総研の研究職員、ポスドク、大学院生、研究補助員など、多くの方々の努力に心から敬意を表するとともに、深く感謝いたします。