

研究課題名 酵母による糖タンパク質医薬の生産系の開発
所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所
研究者氏名 千葉 靖典

・研究計画の概要

研究の趣旨・目的

従来、エリスロポエチンや G-CSF などの医療用糖タンパク質は動物細胞で生産されてきた。しかし、動物細胞を利用した生産はコストが高く、生産性が悪い、また感染症の問題も指摘されてきた。これらを克服するための代替宿主が望まれており、これまでに昆虫細胞、植物細胞、酵母、カビ、大腸菌などが考えられてきた。しかしこれらを用いて生産した糖タンパク質では糖鎖構造が哺乳類のものと異なるため、抗原性を有する、またヒト生体内に導入した際にタンパク質が目的の臓器へ集積する前に分解されてしまうなどの不安定性が問題とされてきた。

提案者が所属する研究グループでは、これまで、出芽酵母の糖鎖のリモデリングに関する基礎的研究を進めてきた。そして一昨年末までに「ハイマンノース型」と呼ばれる糖鎖を生産する酵母の分子育種に成功した。この株をもとに、ハイマンノース型およびその類似構造であるマンノース-6-リン酸型糖鎖、さらにはヒト複合型・混成型を生産する酵母の作出をおこない、モデル糖タンパク質酵素の生産と機能評価を行ない、有用医薬品の安価な生産系を確立することを目的とする。さらに高分泌型酵母であるメタノール資化性酵母に系を移植し、より生産性を高めた酵母による糖タンパク質の生産を試みる。

研究計画の概要

まず酵母特有の糖鎖を生産する酵素遺伝子の破壊株の育種を行ない、抗原性のない糖鎖を生産する酵母を作出する。マンノース-6-リン酸型糖鎖については、酸性糖鎖が多く付加するような遺伝子を強く発現させ、リン酸含量を上げた株を作出する。これに発現させたい遺伝子を導入して糖タンパク質を生産した後、糖鎖部分のリン酸を露出させるため、マンノシダーゼを作用させる。精製された酵素について、動物細胞およびマウスを使い機能評価を行なう。ヒト複合型・混成型については、糖鎖関連酵素の遺伝子(マンノシダーゼ I, II, GnT-I, II, III, GalT など)を酵母糖鎖変異株に導入し、協奏的に発現させることによってヒト型糖鎖への改変を行なう。モデル糖タンパク質を発現させ、その糖鎖構造解析を行なう。

さらにタンパク質を大量に発現させることが重要であるため、メタノールでタンパク質の発現誘導をかけることのできる酵母(メタノール資化性酵母)の育種を行なう。上記同様、酵母特有の糖鎖を生産する遺伝子の破壊とヒト型糖鎖の生産に必要な遺伝子の共発現を試みる。遺伝子の破壊については、出芽酵母の場合と異なり全ゲノム配列が決定していないため、出芽酵母の遺伝子情報等をもとにホモロジークローニングを行ない、全長の取得と破壊を行なう。また発現等に必要ベクター等の構築も行なう。

研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1. リゾーム病治療薬の生産系の開発	15.6	16.2				31.8
2.						
(1) 出芽酵母糖鎖変異株での発現	11	5				16
(2) 細胞を使った評価	1					1
(3) 大量生成系の構築	3.6	9				12.6
(4) モデルマウスを使った評価		0.2				0.2
(5) ファブリー病以外のリゾーム病治療薬の開発		2				2
3. ヒト型糖鎖を生産する酵母の分子育種			3			3
4.			2.5			2.5
(1) 糖転移酵素の発現ベクターの構築			0.5			0.5
(2) 宿主の開発						
(3) ヒト混成型糖鎖の生産						
(4) ヒト複合型糖鎖の生産						
5. メタノール資化性酵母への系の移殖			16.3			16.3
(1) 発現宿主への遺伝子の導入			10.3			10.3
(2) 糖鎖構造解析			6.0			6.0
所要経費(合計) (間接経費を含む)	15.6	16.2	19.3			51.1

研究成果の概要

研究成果の概要

ファブリー病は、リソソーム中に存在する加水分解酵素の一つである α -ガラクトシダーゼの遺伝的欠損に起因する糖脂質代謝異常症である。ファブリー病の治療薬となる組換え型 α -ガラクトシダーゼを安価で大量にかつ効率良く供給するために、まず酵母を宿主としてヒト α -ガラクトシダーゼを生産させることを検討した。

出芽酵母の中から高リン酸付加株を選択し、抗原性があると考えられている糖鎖を欠損した酵母株の作製を行なった。この酵母 (HPY21) 株にヒト α -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、酵素を発現させることに成功した。精製された α -ガラクトシダーゼの糖鎖構造解析を行なったところ、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 型の中性糖鎖だけでなく、マンノースリン酸を有する酸性糖鎖 $[(\text{Man}-\text{P})_{1-2}\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2]$ を付加していた。糖鎖 1 分子中あたりのリン酸残基の数は平均で約 1 個であったが、特に 2 残基のリン酸を有するものが全体の約 30%を占めていた。次に酵母特有のマンノースフォスフォジエステル結合を切断可能なマンノシダーゼ生産菌のスクリーニングを行なった。マンナンを炭素源とする培地より単離されたマンノシダーゼ生産菌より、それぞれの生産する酵素の基質特異性を検討して一株を選択した。このマンノシダーゼを用いて HPY21 株で発現させた α -ガラクトシダーゼを処理し、糖鎖構造解析を行なったところ、いわゆる Man-6-P 型糖鎖を有していることが明らかとなった。ファブリー病患者由来の線維芽細胞を材料とし、細胞の取り込み活性を測定した。マンノシダーゼ未処理の α -ガラクトシダーゼに対し、Man-6-P を有する α -ガラクトシダーゼは $1 \mu\text{g/ml}$ という低い濃度で培地中に添加した場合でも取り込まれ、その細胞は正常人と同じ程度の活性を有していた。この取り込みは 5 mM の Man-6-P 培地に添加することにより押さえられたことから、Man-6-P レセプター依存的な取り込みであると考えられた。Man-6-P 含有 α -ガラクトシダーゼを培地中に添加した場合、18 時間後には細胞中に α -ガラクトシダーゼが取り込まれており、その局在は late endosome およびリソソームであった。5 日後には酵素を取り込んだ細胞ではその細胞中の Ceramide trihexoside がほぼ消失していた。この結果は酵母で生産し、 α -マンノシダーゼ処理した α -ガラクトシダーゼがファブリー病の治療薬となりうることを示唆するものと思われた。さらに大量培養法とその高効率精製法を検討した。150 L の培養産物から、疎水性カラムクロマトグラフィーを利用することにより多量の酵素を高度に精製することが出来るようになり、最終的に約 13mg の酵素標品を得た。

現在生産された酵素を用いて、病態モデルマウスへの投与を行なっているところである。また酵母で生産された糖タンパク質の細胞内への取込について、機能評価を行なう際にその都度マウスへ投与することは困難なため、細胞膜上にあるマンノース-6-リン酸レセプターの組換え体を作成し、結合能を評価している。

メタノール資化性酵母への系の移殖については、キリンビール(株)と別途共同開発した *Ogatae minuta* 株を利用することにした。*O. minuta* の糖鎖の合成に関与する酵素 *och1* を破壊した株に α -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をメタノールを含む培地で培養し発現誘導を行なったところ、数十 mg/L 程度の発現量を得ることが出来た。この酵母の糖鎖構造についても解析を行なっているところである。

波及効果、発展方向、改善点等

上記の研究成果はファブリー病の治療薬として利用でき、年間数千万円もかかる医療費を10分の1近くまで下げることが可能になると考えられる。またこれまで数十種類のリソソーム病が確認されているが、患者数が少ないため、なかなか治療薬の開発は行なわれずにきている。導入する遺伝子を変えることにより、ファブリー病だけでなくポンペ病やテイ-サックス病など他のリソソーム病への応用も可能である。さらに酵素のみでなく、例えばホルモン、造血因子、抗腫瘍薬となるタンパク質の遺伝子を導入させ、発現させることにより、より細胞内に取り込まれやすい治療薬となりうる可能性がある。

今後、さらにいくつかのヒト型糖鎖と呼ばれる構造を生産するため、酵母にヒト型糖鎖を作るための糖鎖関連酵素遺伝子を導入し、うまく共発現できれば、多種類の糖鎖を生産する酵母の育種が可能になると考えられる。これまで出芽酵母を利用し、ヒト型糖鎖を生産する酵母の分子育種を試みてきたが、よりタンパク質を高効率で生産するメタノール資化性酵母を用いて、上記のように遺伝子導入を行ない、単一の糖鎖構造を有する糖タンパク質を多量生産する系を確立する。得られた糖タンパク質については、特定の臓器中にある特定のレクチンとの結合能を利用したドラッグデリバリーシステムへの応用が可能となるであろう。

さらにこれまで糖タンパク質性医薬品の生産は、主に動物細胞によって行なわれてきたが、本研究の成果により、酵母のみならず、昆虫細胞、植物細胞などを利用した生産系の開発がますます進むようになると思われる。加えて、ヒト型糖鎖を生産する酵母を分子育種し、様々な糖タンパク質を自由自在に生産することが可能になれば、ホルモン、サイトカイン、抗体などを医薬品として生産することができる。これにより、国民の健康・長寿への貢献ができるものと考えられる。

. 研究成果発表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0件	3件	3件	6件
国際	1件	0件	4件	5件
合計	1件	3件	7件	11件

(2) 特許等出願件数

合計 5件 (うち国内3件、国外2件)

(3) 受賞等

1件 (うち国内1件、国外0件)

1. 日本糖質学会ポスター賞

(4) 主な原著論文による発表の内訳

国外誌

1. Chiba, Y., Sakuraba, H., Kotani, M., Kase, R., Kobayashi, K., Takeuchi, M., Ogasawara, S., Maruyama, Y., Nakajima, T., Takaoka, Y., and Jigami, Y.: 'Production in yeast of α -galactosidase A, a lysosomal enzyme applicable to Fabry disease', *Glycobiology*, **12**, 821-828 (2002)

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor
Glycobiology	3.457

酵母による糖タンパク質 医薬の生産系の開発



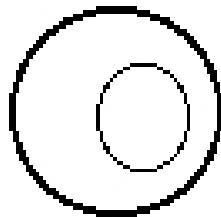
- ・ 出芽酵母
- ・ メタノール酸化性酵母

→ そのままでは糖鎖に抗原性



- ・ 酵母外糖鎖生合成系遺伝子の破壊
- ・ ヒト糖鎖生合成系関連遺伝子の導入
- ・ 酵母高生産系に關与する遺伝子の改変

ヒト型糖鎖生産酵母



- ・ 抗原性がない
- ・ 標的臓器へのシグナルとなる糖鎖の創出

医薬用糖タンパク質遺伝子の導入



- ・ 糖器分析による糖鎖構造解析
- ・ 動物を使った、タンパク質の機能評価
- ・ リソソーム病治療薬の開発

