

分裂酵母の糖鎖リモデリングを目指した新奇糖転移酵素遺伝子の機能解析

大橋 貴生
(大阪大学 生物学国際交流センター)

研究の目的

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の糖鎖は、他の酵母(ガラクトースを含有しない)やヒト (β -ガラクトース残基を含有する)とは異なり多量の α -ガラクトース残基を含有している。糖鎖にガラクトースを含有しガラクトース生合成機構を有することは分裂酵母の1つの特色である。しかし、分裂酵母を宿主として医療用糖タンパク質を生産させた場合には、この α -ガラクトースを含む糖鎖が付加され抗原性を示してしまうことが考えられるため、 α -ガラクトース完全欠損株の育種が必要である。そこで、我々は先行研究において、糖転移の場であるゴルジ体にガラクトース転移酵素の基質 (UDP-ガラクトース) を輸送する UDP-ガラクトース輸送体遺伝子 (*gms1*⁺) を破壊し、ガラクトース完全欠損株を作出した。一方、ヒト型糖鎖改変のためには α -ガラクトース残基を除去した後に、 β 1,4-ガラクトースを糖鎖に付加させる必要があるが、 β 1,4-ガラクトース転移酵素を酵母細胞内で働かせるためには *gms1*⁺ 遺伝子が必須である。そこで、*gms1*⁺ 遺伝子破壊の代替法として、分裂酵母のゲノム配列情報から予測した7つの α -ガラクトース転移酵素遺伝子を全て破壊した7重破壊株 (7GalT Δ 株) を作成し、糖鎖構造解析を行ったところ、 α 1,2-ガラクトースは完全に欠損していたものの、まだ α 1,3-ガラクトースが糖鎖に付加していることが明らかとなった¹⁾。そこで本研究では未同定の α 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の同定・機能解析と7GalT Δ 株からの更なる破壊を行い、 α -ガラクトース転移酵素遺伝子の多重破壊による α -ガラクトース完全欠損株の育種を目的とした。

方法

分裂酵母の培養は YES 培地を用いて行った。糖鎖解析用のサンプルは、YES 培地で培養した菌体から熱クエン酸抽出により、糖タンパク質を調製後、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離し、ピリジルアミノ (PA) 化法により蛍光標識し調製した²⁾。調製した蛍光標識化糖鎖サンプルはサイズ分画 HPLC を用いて解析を行った。

結果

7GalT Δ 株で見出された α 1,3-ガラクトース含有糖鎖の生合成を担っている α 1,3-ガラクトース転移酵素を同定するため、分裂酵母ゲノムデータベースより、機能未知糖転移酵素遺伝子を探索したところ、3つの遺伝子があり、それぞれ *otg1*⁺ - *otg3*⁺ (α 1 (one),3 (three)-galactosyltransferase) と名付け、この遺伝子解析を行うことにした。これらの遺伝子を7GalT Δ 株より破壊し、10重破壊株 (10GalT Δ) を作製した。作製した10GalT Δ 株より O-結合型糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、*gms1* Δ 株と同様

の HPLC プロファイルが得られた。また *otg1Δotg2Δotg3Δ* 株では α 1,2-ガラクトース含有糖鎖は検出されるものの、 α 1,3-ガラクトース含有4糖ピークは検出されなかった(図1)。

次に各 Otg タンパク質が α 1,3-ガラクトース転移酵素活性を有しているかどうかを調べるために、各 Otg タンパク質を 10GalT Δ に発現させ、マイクロソーム画分を調製し、酵素活性測定を行った。*N*-結合型糖鎖である Man₉GlcNAc₂-PA を基質とした場合、Otg2 および Otg3 タンパク質は転移活性を示し、*O*-結合型糖鎖である Man₃-PA を基質とした場合、Otg2 タンパク質のみ転移活性を示した(図2)。Man₃-PA を基質とした場合の酵素反応生成物については、HPLC にて精製後、¹H NMR および LC-MS を用いた構造解析を行い、 α 1,3-ガラクトースが転移されていることを明らかにした。

以上の結果より、10GalT Δ 株の糖鎖には全く α -ガラクトースが付加しておらず、また少なくとも *otg2*⁺ および *otg3*⁺ は α 1,3-ガラクトース転移酵素をコードしていることが明らかとなった³⁾。

結論

分裂酵母において新たに見出した *otg2*⁺ および *otg3*⁺ 遺伝子は α 1,3-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子であることが明らかとなった。これらの遺伝子を 7GalT Δ 株より破壊し 10GalT Δ 株を作製し、*gms1Δ* 株に変わる α -ガラクトース完全欠損株の育種に成功した。10GalT Δ 株はゴルジ体への UDP-ガラクトース輸送活性を有しつつ、 α -ガラクトースが完全に欠損しており、ヒト型複合型糖鎖生産の基盤となる非常に有用な株であると言える。

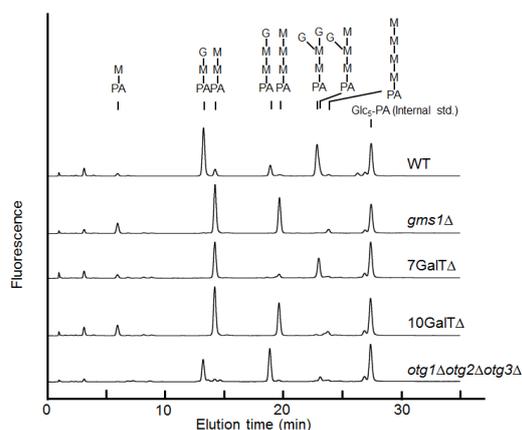


図1 10GalT Δ 株より調製した *O*-結合型糖鎖のサイズ分画 HPLC

各分裂酵母株より蛍光標識化糖鎖を調製しサイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線は野生株で同定された構造既知糖鎖の溶出位置とその模式構造を示す (M: マンノース、G: ガラクトース、図中の縦線は α 1,2 結合を斜め線は α 1,3 結合を示す)。

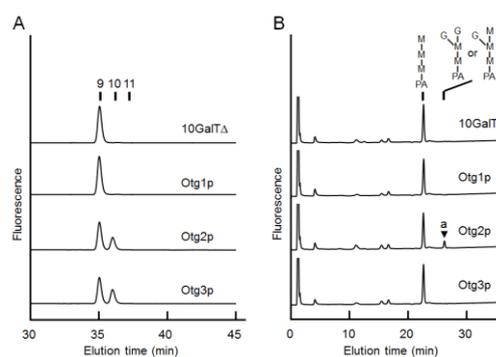


図2 Otg タンパク質のガラクトース転移酵素活性測定

各 Otg タンパク質を過剰発現させた 10GalT Δ 株からマイクロソーム画分を調製し、酵素溶液として用いた。UDP-ガラクトースおよび Man₉GlcNAc₂-PA (A) または Man₃-PA (B) を基質として用いた際の酵素反応生成物のサイズ分画 HPLC を示した。

文献

- 1) Ohashi, T. *et al.* (2011) Structural analysis of α 1,3-linked galactose-containing oligosaccharides in *Schizosaccharomyces pombe* mutants harboring single and multiple α -galactosyltransferase genes disruptions. *Glycobiology*. **21**:340-351.
- 2) Ohashi, T. *et al.* (2009) The *och1* mutant of *Schizosaccharomyces pombe* produces galactosylated core structures of N-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**:407-414.
- 3) Ohashi, T., Fujiyama, K., and Takegawa, K. (2012) Identification of novel α 1,3-galactosyltransferase and elimination of α -galactose-containing glycans by disruption of multiple α -galactosyltransferase genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **287**:38866-38875.