

# 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における N結合型糖鎖欠損糖タンパク質の分泌生産

SATテクノロジー・ショーケース2021

## ■ はじめに

バイオ医薬品は、少ない副作用で高い薬効が得られることから、需要が拡大している。しかし、現在の哺乳動物細胞での生産系では、コストの高さや生産されたバイオ医薬品糖タンパク質の糖鎖部分が不均一であることが課題となっている。また、異なる生物種によって生産された糖タンパク質は、その宿主特有の糖鎖が修飾されることで薬効が発揮されないばかりか副作用のリスクも存在する。そのため、均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質の生産方法が求められている。現在の方法は、不均一な糖鎖を有する糖タンパク質をエンド-β-N-アセチルグルコサミンダーゼ(ENase)によりN結合型糖鎖を切断し、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が1分子残存したGlcNAc-タンパク質を調製後、均一な糖鎖を糖供与体として糖転移活性を有するENaseの変異体により転移させている。

そこで、我々は直接GlcNAc-タンパク質を大量生産する新たな手法として、異種タンパク質分泌生産の宿主によく利用されている黄麹菌 *Aspergillus oryzae* に着目した。黄麹菌は、古くから日本において日本酒、味噌、醤油といった醸造産業に使用されてきた有用な微生物であり、安全性が確認されている。糸状菌 *Hypocrea jecorina* 由来のENaseであるEndoTを黄麹菌のゴルジ体膜に発現させることで、GlcNAc-タンパク質を分泌生産することが期待できる(Fig. 1)。本研究は、黄麹菌におけるGlcNAc-タンパク質を大量発現させた生産株(AoGlycoDelete株)を作製し、その諸性質の解析を行った。

## ■ 活動内容

### 1. 黄麹菌におけるAoGlycoDelete株の作製

黄麹菌のゴルジ体膜に局在すると推定される4種類の膜タンパク質の膜貫通領域(TM領域)と黄麹菌用にコドン最適化したEndoTと融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、AoGlycoDelete候補株を作製した。AoGlycoDelete候補株を野生株とともにDPY液体培地で培養し、培養上清をSDS-PAGEに供した結果、N結合型糖鎖を1個有するα-アミラーゼについて、4種類のAoGlycoDelete候補株では野生株に比べて分子量が減少したことが確認された。このことから、作製した4種類のAoGlycoDelete候補株はGlcNAc-α-アミラーゼを分泌生産することが示された。4種類のAoGlycoDelete候補株のうち、最も糖鎖切断効率が高いTM391-EndoT株をAoGlycoDelete株として、その後の解析に使用した。

### 2. AoGlycoDelete株におけるEndoTの局在解析

AoGlycoDelete株におけるEndoTの細胞内局在を観察するために、EndoT-EGFP融合型発現株を作製した。蛍光顕微鏡解析により、いずれのAoGlycoDelete候補株でもEndoT-EGFPはドット状の蛍光として観察され、さらに、ゴルジ体マーカーを共発現することでEndoTがゴルジ体に局在することを確認した。

### 3. AmyB-HA, GlaA-HAの分泌生産

野生株およびAoGlycoDelete株を用いて、α-アミラーゼであるAmyB、グルコアミラーゼであるGlaAのHAタグ融合発現株を作製し、分泌生産されたAmyB-HA、GlaA-HAを精製した後、Intact MS およびN-glycan解析に供した。その結果、AoGlycoDelete株由来のAmyB-HA、GlaA-HAではGlcNAcが1分子残存し、さらにN結合型糖鎖が検出されなかった。以上の結果からAoGlycoDelete株はN結合型糖鎖を欠損したGlcNAc-AmyB、GlcNAc-GlaAを生産することが示された。

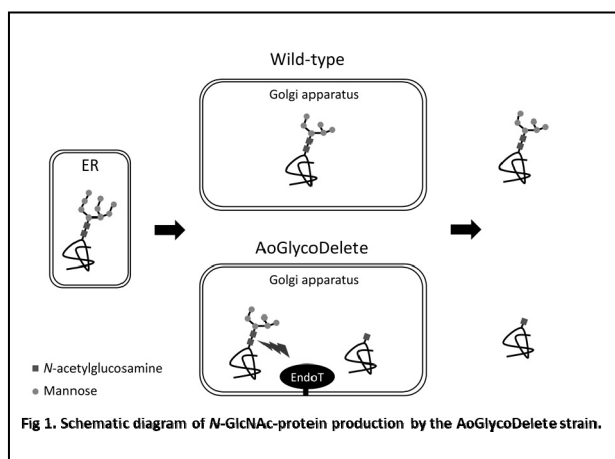
今後はAoGlycoDelete株を宿主にして、実際に異種医薬糖タンパク質をまずGlcNAcタンパク質として分泌生産させ、それを基質として糖転移反応を行うことで均一糖鎖の糖タンパク質を生産していきたいと考えている。

## ■ 関連情報等(特許関係、施設)

Li Q, Tanabe K, Katakura Y, Takegawa K, Higuchi Y

Secretory production of N-glycan-deleted glycoprotein in *Aspergillus oryzae*

*Journal of Bioscience and Bioengineering* 129, 573-580 (2020)



代表発表者 李 秋実(り しゅうじつ)  
所属 国立研究開発法人 産業技術総合研究所  
生物プロセス研究部門  
応用分子微生物学研究グループ  
問合せ先 〒062-0052  
北海道札幌市豊平区月寒東2条17-2-1  
TEL: 011-857-8926  
E-MAIL: hotriaki-li@aist.go.jp

■キーワード: (1) *Aspergillus oryzae*  
(2) N-glycan  
(3) Glycoprotein

■共同研究者: 玉野孝一<sup>1</sup>、竹川薫<sup>2</sup>、樋口裕次郎<sup>2</sup>  
1 産総研、2 九大院 生資環