

“ヒト適応型糖鎖生産酵母”の開発とバイオ医薬品への応用

千葉靖典

(独) 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

近年の抗体医薬を中心としたタンパク質製剤開発はますます競争の一途をたどっている。これらの医療用糖タンパク質は主に動物細胞で生産されている。しかし、動物細胞を利用した生産は培養時間が長い上、コストが比較的高く、またウイルス感染のリスクが懸念されている。これらを克服するための様々な代替宿主の開発が進められてきた。我々はこれまで酵母での糖鎖リモデリングに関する基礎的研究を進めるとともに、この研究成果をより実用的に活用するため、ヒト型あるいはそれに類似した糖鎖を有する糖タンパク質をメタノール資化性酵母で生産することを検討してきた。

糖鎖修飾には GDP-マンノースなどの糖ヌクレオチドが必要となるが、酵母ではヒト型の糖鎖を作るために必要な 9 種類の糖ヌクレオチドのうち、3~4 種類しか合成する能力がない。従ってまず酵母の糖ヌクレオチド合成系を改変する必要があり、これらの合成系の構築を行なった。次にヒト型糖鎖を合成するため、酵母特異的な糖鎖合成遺伝子の破壊や酵素活性の抑制を行ないつつ、ヒト型糖鎖合成を行なうための糖転移酵素遺伝子、糖ヌクレオチド輸送体等の導入を行なうことで糖鎖合成を行なった。そしてこれまでに抗体¹⁻³⁾、ライソゾーム病治療用酵素⁴⁻⁶⁾、ムチン型糖鎖を有するポドプラニン分子^{7,8)}などの生産と機能解析を進めることができた。

既に治療用抗体については、製薬企業が実用化へ向けての検討を行なっている。しかし酵母を用いたバイオ医薬品生産の実用化へ向けては更なる改良・開発が必要である。これらには糖鎖改変のみならず、生産性や夾雑物の問題なども含まれる。ヒト型糖鎖生産酵母の開発における課題は、宿主となる酵母の更なる基礎研究が必要であることを示しており、これらの課題について議論したい。

参考文献

- 1) Kuroda K. *et al.* (2006) *FEMS Yeast Res.*, **6**:1052-62.
- 2) Kuroda K. *et al.* (2007) *FEMS Yeast Res.*, **7**:1307-16.
- 3) Kuroda K. *et al.* (2008) *Appl Environ Microbiol.*, **74**:446-53.
- 4) Chiba Y. *et al.* (2002) *Glycobiology*, **12**:821-8.
- 5) Akeboshi H. *et al.* (2009) *Glycobiology*, **19**:1002-9.
- 6) Tsuji D. *et al.* (2011) *Ann Neurol.*, **69**:691-701.
- 7) Kaneko MK. *et al.* (2007) *FEBS Lett.*, **581**:331-6.
- 8) Amano K. *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105**:3232-7.

酵母が増えるとき、増えないとき ～細胞の成長と分裂を調整するメカニズム

松浦 彰

千葉大学大学院融合科学研究科

細胞増殖には細胞成長（細胞の容積が増える）と細胞周期進行／細胞分裂（細胞の数が增える）という二つの側面がある。通常の細胞増殖では細胞成長と細胞分裂が協動的に進行しており、その結果細胞のサイズは一定に保たれている。しかし、両過程は実際には独立のプロセスであり、細胞周期進行が遅れる酵母変異株においても細胞成長は阻害されないことが知られている。一方、細胞成長が遅れる酵母変異株では細胞周期進行が遅れることがわかっており、このことから細胞成長（あるいは細胞サイズ）を監視する機構が細胞周期進行を制御していると考えられている。

出芽酵母の細胞増殖は外界の栄養源のレベルにより制御され、その進行は G1 期後期にある制御点、“START” で決定される。START は不可逆的な細胞周期進入点であり、一旦 START を通過した細胞は、その後栄養レベルが増殖に適さないレベルに悪化しても細胞周期を一周して再び G1 期に戻るまで細胞周期を停止しない。では、栄養が悪化して細胞成長が制限された条件下で、細胞周期の最後の一周はどのように調節されているのだろうか？

細胞外の栄養状態を伝えるシグナル因子として、Tor タンパク質を含む TORC1 複合体が知られている。出芽酵母では、栄養飢餓による TORC1 の不活性化に伴い、細胞周期の G2/M 期遅延が起きることが明らかになっている (Nakashima *et al.*, 2008)。我々は、栄養飢餓により低下した TORC1 の活性が数時間後から徐々に回復すること、この回復と一致して G2/M 期に停止した細胞周期の再開が起きること、を見いだした。この再開には TORC1 の活性低下により誘導されるオートファジーが必要であった。このことは、栄養飢餓条件下の細胞成長と細胞周期進行の共役にオートファジーが重要な役割を果たしていることを示している。

我々の解析結果は、細胞成長が制限された条件下での細胞周期進行の調節機構の一端を示していると考えられるが、一方細胞周期進行が妨げられた条件下で細胞成長を抑制するという調節は存在するのだろうか？ 本発表では、細胞成長と細胞分裂の関係という古典的（かつ現在進行形の）問題について、我々のアプローチを中心に議論してみたい。

病原性出芽酵母 *Cryptococcus neoformans* “細胞周期エンジン”の分子機能解析

川本 進

千葉大学 真菌医学研究センター 病原機能分野

病原性出芽酵母 *Cryptococcus neoformans* は、クリプトコックス症の原因真菌であり、ヒトの肺、脳、髄膜などを侵し、我が国に常在する真菌の中では最も病原性が強く、臨床的にも極めて重要な真菌である。とりわけエイズ患者の直接死因としても世界的に極めて重大な脅威となっており、全世界の HIV/AIDS 死の約 30% が、本菌感染によるとされる。しかるに、*C. neoformans* の全ゲノム解読の完了がすでに報告され、本菌研究もポストゲノムの時代に入っているものの、この重要な病原酵母 *C. neoformans* の感染成立過程の詳細や病原性発揮過程を考察するのに必須な基礎知識や分子情報の知見は非常に乏しいと言わざるを得ない。

我々はこれまでに、*C. neoformans* は同じ出芽酵母であるもののモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* とは大きく異なり、特異な細胞周期制御機構が存在し、本酵母の病原性にも深く関わっていることを示唆して来た。一般に真核細胞の細胞周期制御機構の中心はサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase, Cdk) 分子であり、Cdk タンパク質分子内の数カ所のアミノ酸残基のリン酸化・脱リン酸化反応などにより、その立体構造と生物機能とを大きく変化させる結果、Cdk 分子が様々な分子、特にサイクリン類と結合、解離することにより、そのタンパク質リン酸化酵素としての基質特異性を変化させて細胞周期を制御していると考えられている。我々は本菌 *C. neoformans* の示す特異な細胞周期制御現象を、その制御の中心分子であるサイクリン依存性キナーゼ Cdk がサイクリン等、他の細胞周期制御分子と相互作用して織り成す、いわゆる細胞内シグナル伝達過程として捉え、その分子機構の解明を進めている。今回、本菌の細胞周期制御に中心的な役割を果たしているタンパク質複合体、いわゆる“細胞周期エンジン”を構成している 2 つの鍵タンパク質分子、サイクリン (CnCln1) とサイクリン依存性キナーゼ (CnCdk1) の分子機能解析、及び、両タンパク質間相互作用のバイオインフォマテイクス解析・考察など、我々の研究の現況を報告する。

文献

- (1) K Takeo, Y Ogura, E Virtudazo, V Raclavsky, S Kawamoto: Isolation of a *CDC28* homologue from *Cryptococcus neoformans* that is able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 4(7): 737-744 (2004)
- (2) EV Virutudazo, S Kawamoto, M Ohkusu, S Aoki, M Sipiczki, K Takeo: The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression, but plays important roles in the proper commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. *FEMS Yeast Research* 10(5): 605-618 (2010)

次世代シーケンサーと酵母染色体ダイナミクス

白髭克彦

東京大学 分子細胞生物学研究所

次世代シーケンサーはゲノム解析を手がけるあらゆる分野に於いて途方も無い可能性を秘めた解析ツールとして導入され、基礎、臨床をとわずあらゆる分野に於いて大きく研究のあり方を変えようとしている。また、それに伴い、今まで以上に情報科学と生物学の両方のプラットフォームで活躍出来る人材が求められるようになっている。研究会においては我々自身の酵母およびヒトゲノムについての ChIP-seq、RNA-seq 解析の実体験を元に、それぞれの解析の現状と問題点を指摘し、次世代シーケンサーの功罪について議論したい。

酵母細胞の画像解析による薬剤標的予想

大矢 禎一

東京大学 大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

酵母を用いた薬剤標的の同定は、以前より生化学的アッセイ法を駆使することで行われてきた。近年になって薬剤処理後の変異株の表現型に注目し、増殖能を様々な変異株で網羅的に調べるフィットネスアッセイという方法も開発されてきている (Hillenmeyer *et al.*, 2008)。我々は、薬剤を作用させた時にあらわれる表現型の中でも特に顕微鏡画像の情報には非常に多くの情報が含まれていることに注目し、画像解析による薬剤標的予想法を開発したので、それについて紹介する。我々は既に CalMorph 画像解析システムを用いて出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 4,718 の非必須遺伝子破壊株の形態的特徴を解析し、データベース化した情報を得ている (Ohya *et al.*, 2005)。そこで、生理活性物質によって引き起こされる形態変化と同じような形態変化を起こす遺伝子欠損株を探ることが出来れば、その生理活性物質の細胞標的を推定できると考えた。

類似した表現型を持つ株を探索するためには、形態的特徴の類似性の比較 (プロファイリング) が必要になる。そこでまず細胞標的を推定したい生理活性物質を、野生型酵母に 5 段階の異なる濃度で 5 回ずつ処理し、形態情報を取得した。そして Jonckheere 検定と呼ばれる形態変化の濃度依存性を検出する特殊な検定の統計量、Z 値を使用して形態変化を統計的に評価した。ここで、実験誤差の影響をなるべく排除するために、501 パラメータのデータから主成分分析を用いて 104 主成分 (寄与率 99%) を抽出し、この主成分上の主成分得点を算出することで、4,718 変異株や濃度依存的形態変化の特徴を表す数値を得た。そして最後に両者の相関係数 R をすべての変異株について算出した。相関係数が高い変異株こそが形態変化が類似した変異株、すなわち薬剤標的の候補となる。そのような変異株を同定するために、false discovery rate (FDR) が 0.01 の無相関検定を行った。

この方法の有効性は、標的が既に知られている 4 つの薬剤 (Hydroxyurea, concanamycin A, lovastatin と echinocandin B) をモデルケースにして検証した。その結果、重複している成分やマイナーな成分である場合を除いて薬剤の標的は実際に候補として予想され、上位 100 株には関連する機能が欠損した変異株が濃縮されていた。これらの結果から、細胞の形態情報プロファイリングによって、形態変化を引き起こす生理活性物質の細胞標的が推定可能であることが示された (Ohnuki *et al.*, 2010)。

ただしこの薬剤の標的予想が可能になるのは、薬剤が十分な形態変化を引き起こし、かつ細胞中の標的がひとつの場合である。ところが実際多くの生理活性物質の場合、細胞内標的を複数持っている。我々は最近細胞内の標的が二つ以上あるのかどうかを判断する方法も開発したので、これも合わせて紹介する。

ナショナルバイオリソースプロジェクト（酵母）で 行なっている活動について

大矢 禎一

NBRP 酵母遺伝資源運営委員会委員長

ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）は、ライフサイエンスの研究に広く用いられる実験材料としてのバイオリソースのうち、わが国が特に重要と認めたものについて、体系的な収集、保存、提供体制を整備することを目的とした国家プロジェクトである（<http://www.nbrp.jp/>）。平成 19 年度から 23 年度まで第 2 期のプロジェクトが進められているが、酵母に関しては大阪市立大学理学研究科（代表機関）と大阪大学工学研究科（分担機関）が酵母遺伝資源センターをサポートし、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）と出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）で事業が展開している。運営に関する協議は酵母遺伝資源運営委員会で行い、リソース情報の発信、データベースをはじめとするオンラインシステムは国立遺伝研の情報中核機関がサポートする体制となっている。今回の講演では、現在ナショナルバイオリソースプロジェクト - 酵母（<http://yeast.lab.nig.ac.jp/nig/>）で行っている活動内容について紹介する。

今期の酵母遺伝資源センターの目標としては、世界トップの酵母リソース機関を作ることを目指し、(1) 酵母リソースの収集及び新規開発、(2) 保有リソースの安全な保存と品質管理、(3) リソース情報の公開と提供作業の迅速化、(4) 酵母研究者コミュニティとの連携の強化を進めてきた。現在保有する菌株には、分裂酵母 GFP 融合菌株ライブラリー、分裂酵母 Leupold 株（*S. pombe* の源流）、出芽酵母プロテインホスファターゼ破壊株セット、出芽酵母 gTOW6000 リソースなどがある。また保有する DNA には、全てのクローンがマッピングされている分裂酵母、ゲノムライブラリークローンセット、分裂酵母完全長 cDNA クローンセット、出芽酵母オーキシン誘導型デグロンプラスミドセットなどがある。来年度以降も引き続き、世界トップクラスのリソース事業の維持発展を目指すとともに、保有リソースの質的拡充をはかっていく予定である。