

タンパク質の高速分子育種を基盤技術とする先端バイオ産業の創出
-アカパンカビにおける抗体タンパク質の大量産生に向けての研究-
Creation of the leading bio-industry based on rapid molecular breeding of protein
-Studies for production of recombinant antibodies in *Neurospora crassa*-

井上 弘一¹、田中 秀逸^{1*}、畠山 晋²
Hirokazu Inoue¹, Shuuitsu Tanaka¹, and Shin Hatakeyama²

¹ 埼玉大学 大学院理工学研究科 (生体制御)
Graduate School of Science and Engineering (Regulatory Biology), Saitama University
² 埼玉大学 科学分析支援センター
Molecular Analysis & Life science Center, Saitama University

Abstract

In this program, we will make systems for expression of selected antibodies in *Neurospora crassa*. The fungus grows well on simple synthetic medium and do not have a limit of life. If a DNA fragment coding a specific antibody is integrated into the chromosome and the antibody is expressed in the fungus, it makes easy acquisition of the same antibodies with enough quantity. Screening of best antibodies for each target material is performed as other programs by other groups in the REDS-2 project.

研究成果

1. アカパンカビにおける発現誘導性プロモーターの開発

アカパンカビでは、このカビのグルコース代謝関連遺伝子 *gcg-1* (または *ccg-1*)、キナ酸誘導性の遺伝子 *qa-1*、や麴カビ *trpC* 遺伝子のプロモーターが、強制発現用プロモーターとして遺伝子組み換え技術を用いて利用されてきた。しかしながら、それらの発現誘導能は十分に強いとは言えないものであった。そこで、より強力に発現誘導が

期待できるプロモーターの開発・導入が望まれた。今回、以下の2つのアプローチによりその実現を目指した。

① 麴カビのキシラナーゼ A (*xy1 A*) 遺伝子プロモーターの利用

このプロモーターは、麴カビにおいては培地にキシロースを加えることで発現誘導されること、グルコース添加によりその抑制がかかることが知られていた。このプロモーターがアカパンカビで稼働すれば、培地に加える糖源により、その下流につないだ遺伝子の発現をコントロールできると期待される。そこで、麴カビのゲノム DNA を鋳型に PCR によりこのプロモーターをクロー

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保255
電話/FAX : 048-858-3414
Email : shtanaka@mail.saitama-u.ac.jp

ニングし、アカパンカビで形質転換実験の選択マーカーとして利用されているハイグロマイシン耐性遺伝子を下流につないだプラスミドを作製した。この配列を含む DNA 断片を精製し、アカパンカビ分生子に高電圧パルス穿孔法により導入し、ハイグロマイシン耐性の株を得た。この株の染色体にハイグロマイシン遺伝子が挿入され発現し維持されていることは、PCR やハイグロマイシン添加培地での耐性試験により確かめた。このことから、麴カビ *xylA* 遺伝子のプロモーターがアカパンカビでも利用可能なことを明らかにした（第9回糸状菌学会, 2009.11; Neurospora 2010, 2010.3; 論文準備中）。

② アカパンカビのストレス応答性転写調節領域の利用

アカパンカビのラッカーゼ遺伝子のプロモーターには、ストレス負荷時においてこの遺伝子発現を上昇させる転写活性化因子 CPC-1 の結合領域がある。この領域は、制限酵素の1つ *Cla*I の認識/切断配列に挟まれていることから、*cla-cla* 領域と命名した。この領域を別のプロモーターである *ccg-1* プロモーター配列内に導入し、これをラッカーゼ遺伝子のコード領域配列につないだ DNA 配列を持つプラスミドを作製した。この一連の配列を内因性のラッカーゼ遺伝子を破壊したアカパンカビ分生子に導入し、染色体内に組み入れた株を得た。ラッカーゼは、その酸化活性により残留塩素測定用基質でもある ABTS を青色に発色させることから、この発色を分光器により測ることで発現量を定量できる。得られたカビに対しタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドの培地添加によりストレスを加え、ストレスの無い場合と比較したところ、明らかなラッカーゼ発現量の増加を示した。さらにその効果は、直列に配置する *cla-cla* 領域の数に依存して強くなることを明らかにした（第81回遺伝学会, 2009.9）。

2. アカパンカビにおけるほ乳類由来タンパク質の発現

アカパンカビにおいても GFP はもとより、様々な異種タンパク質の発現実験が行われてきた。しかし、それらのほとんどはアカパンカビの細胞内において機能するタンパク質発現を目的としたもので、その後の回収等には注目されなかった。本研究では、有効な異種タンパク質をいかに安定で多量に回収できるかを課題とした。異種タンパク質としてラットの窒素代謝に関わるオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCT) 遺伝子を対象に、アカパンカビにおける大量発現を試みた。

① ラット OCT 遺伝子発現誘導

アカパンカビ *arg-12* 株は OCT のホモログ遺伝子の変異株である。ラットの mRNA から逆転反応により得られた cDNA を鋳型に PCR により OCT 遺伝子のコード領域をクローニングした。この上流に麴カビ *xyl* プロモーターを、下流に選択マーカーとして *trpC* プロモーター支配のビアラフォス耐性遺伝子をつないだ DNA 断片 (*Pxyl-OCT-Bar*) を持つプラスミドを作製し、この DNA 配列を持つ断片を精製し、アカパンカビ *arg-12* 株または野生株に導入した。ラット OCT 遺伝子の発現で *arg-12* 株のアルギニン要求性が抑圧されるか調べた。

② アカパンカビ *qde-1* 株の利用

qde-1 株はアカパンカビにおける RNAi 能の欠損株である。近年、RNAi は、ゲノム上の非コード領域から転写され、20-26 塩基長の短い RNA として、新規の発現制御機構としてあるいは異常タンパク質の翻訳抑制に働くことが判ってきた。*qde-1* 株のタンパク質発現宿主としての利用は、異種タンパク質の発現量増加に働くと考えられる。①の *Pxyl-OCT-Bar* の DNA 配列を *qde-1* 株に直接、または、①の結果得られる株に *qde-1* 株を交雑させることで、異種タンパク質発現に対する *qde-1* 欠損の有効性を確かめている。

今後はこの実験で作製した DNA 配列を材料として、直接抗体の発現を調べることも可能である。

まとめ

これらの研究により、アカパンカビで抗体を多量に発現させるシステムが整いつつある。

アカパンカビは無限に増殖すると言えるので、この研究から得られる成果は、目的の抗体を均質で、しかも安定して供給できる新事業に結びつくと考えられる。発現させることが可能となっても、そのタンパク質の修飾や回収の為の検討は、手付かずのままである。それらのことも含め、今後は、実際の抗体の発現を試み、より安定で効率の良い条件の検討を行う必要がある。

謝辞

本研究は、「都市エリア産学官連携促進事業 埼玉・圏央エリア — Rational Evolutionary Design of Advanced Biomolecules, Saitama (REDS) — 」の中で行われた。