

2S-Da03 植物での有用タンパク質生産のための植物特異的糖鎖付加の抑制法の開発

○松岡 健^{1,2}, 新聞 陽一³, 岡 拓二^{3,4}, 陶山 明子¹, 森口 亮¹, 齋藤 扶美恵³, 地神 芳文³
(¹ 九大院・農,² 理研・植物センター,³ 産総研,⁴ 崇城大・応生命)

植物を宿主とする有用物質の組換え生産は、そのコストが動物、微生物と比較して安価なこと、植物は移動せず収穫も容易であること等から注目されている。特に、近年の再生医療技術の発達により、今後ヒト組織の再生の為に用いられるサイトカインや抗体医薬として用いられるヒト型抗体等のヒトや動物由来の有用タンパク質の安価な供給が求められるようになると考えられている。有用タンパク質として考えられる動物のサイトカインや抗体は、分泌性のタンパク質であり、一部のものではその活性発現の為にN-結合糖鎖の付加が必須であることが知られている。

植物の発現系は、植物が酵母等より動物に近いN-結合型糖鎖構造を持つことから、これらのタンパク質を生産する系として適していると考えられる。しかしながら、植物でサイトカインや抗体等の有用タンパク質を生産する場合には、これらの有用タンパク質に植物の分泌系固有の修飾が起らないことが望ましい。しかし、トウモロコシで発現させたIgAには、植物型固有のO-結合型糖鎖が付加されていることが報告されている、植物で発現させたN-結合型糖鎖を持つ蛋白質の多くで、動物と植物で共通な糖鎖構造のみならず、植物特異的なN-型糖鎖へと糖鎖が修飾されていることが見出されていること等から、植物固有の糖鎖修飾と糖鎖変換の抑制技術が必須となる。

このような植物特異的な糖鎖構造の形成を抑制するためには、その修飾に関わる酵素蛋白質の同定と、その人工的な制御が必須となる。植物のN-型糖鎖の修飾機構については古くから解析されており、既に植物固有の糖鎖修飾を抑制することが、モデル植物において成功している。

もう一つの植物に固有なタンパク質への糖鎖修飾である、植物型O-結合型糖鎖修飾としては、タンパク質中のプロリン残基の水酸化とそれに引き続くアラビノガラクトサンまたはオリゴアラビノースの付加、及びセリン残基へのガラクトースの付加が知られる。これらはその糖鎖付加部位や構造が動物や菌類のものと異なることから、その修飾機構も異なっていると考えられるが、その修飾に関わる遺伝子については、一部が同定されているに過ぎない。このような状況下で、我々は、経済産業省の直轄プロジェクト「植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発」プロジェクトに加わり、平成18年から、植物に固有なO-結合型糖鎖修飾機構の解明と、その機構を制御することによる植物型糖鎖修飾抑制技術の開発を進めている。

本シンポジウムでは、既に確立している植物に固有なN-結合型糖鎖の部分構造の制御について概略を照会し、次いで我々の進めている、植物に固有なO-結合型糖鎖修飾機構の解析結果、及びそれらを用いた糖鎖修飾の抑制の試みについて、紹介する。

Development of the suppression technology of plant-specific glycosylation for the production of useful proteins in plants

○Ken MATSUOKA^{1,2}, Yo-ichi SHIMMA³, Takuji OKA^{3,4}, Akiko SUYAMA¹, Ryo MORIGUCHI¹, Fumie SAITO³, Yoshifumi JIGAMI³
(¹ Fac. Agric., Kyushu Univ., ² RIKEN PSC, ³ AIST, ⁴ Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words glycosylation, plant, secretory pathway, prolyl hydroxylation

2S-Da04 代謝経路を包括的に制御する転写因子による植物イソプレノイドの代謝工学

○高橋 征司¹, 古山 種俊², 中山 亨¹
(¹ 東北大院・工・バイオ工, ² 東北大学・多元研)

【緒言】植物イソプレノイドは最も構造多様性に富む二次代謝物ファミリーであり、カロテノイド類、キノン類、ステロール類、天然ゴムなど産業的に重要な天然化合物が多く含まれることから、これらの代謝工学的高生産系の構築が期待されている。イソプレノイドは炭素数5のイソペンテニル二リン酸 (IPP) を基本単位として生合成されるが、植物細胞においてIPPは、細胞質中のメバロン酸経路と、色素体中のMEP経路の2つの経路により供給されている。従来のイソプレノイド代謝工学においては、IPP生合成以降の代謝経路における酵素の発現制御が主流であったが、IPPの供給向上も非常に重要である。しかし、IPP生合成経路は多段階で制御されており、IPP生合成経路各段階の酵素を単独で過剰発現させるだけでは十分な効果を得ることが出来なかった。本講演では、モデル植物シロイヌナズナを材料とした転写ネットワーク解析を利用した、IPP生合成経路の各段階を触媒する酵素の発現を包括的に制御しうる転写因子の探索と、それを用いたイソプレノイド高生産系の開発について紹介する。

【転写ネットワーク解析】転写ネットワーク解析では、多種多様なマイクロアレイデータを統計的に処理し、発現パターンに関連性の高い遺伝子群をネットワーク化する。植物の二次代謝物生合成では、同一の生合成経路に属する酵素群は協調的な転写制御を受けていることが多い。既知の生合成酵素遺伝子をガイドとし、それが含まれるネットワーク内の遺伝子群から同一の代謝経路に関与する酵素遺伝子候補を探索できる。さらに、それらの協調的発現を制御する転写因子も同じ転写ネットワークより見出せる可能性が高い。シロイヌナズナのイソプレノイド生合成関連酵素遺伝子群に対する転写ネットワーク解析の結果、MEP経路酵素遺伝子群を中心とした色素体内イソプレノイド生合成関連酵素の遺伝子群が密なネットワークを形成することが分かった。そこで、このネットワークに含まれる複数の酵素遺伝子に対し高い発現相関性を示す転写因子を探索し解析候補とした。

【イソプレノイド代謝を制御する転写因子の探索】転写ネットワーク解析により絞り込まれた転写因子候補の機能を迅速に解析するため、シロイヌナズナT87培養細胞においてこれらの候補遺伝子を過剰発現させ、MEP経路の酵素遺伝子を中心とした発現解析を行った。これらの候補のうち、bHLH型転写因子およびtype-B Response Regulator型転写因子に関し、各転写因子の過剰発現レベルに応じて、MEP経路の多段階の酵素遺伝子の発現上昇がみられた。また、これに対応し、色素体内イソプレノイドであるクロロフィル、カロテノイドの蓄積量が上昇していた。興味深いことに、過剰発現細胞ではカロテノイド生合成における律速酵素とされるフィエン合成酵素、フィエン不飽和化酵素の発現量は変化していなかった。また、詳細なカロテノイド分析の結果、上述の律速酵素以降で分岐した複数のカロテノイド生合成経路に由来する代謝物の蓄積量が同時に上昇していた。以上の結果は、MEP経路の増強とそれによるIPP供給の上昇が下流の代謝物の蓄積をもたらしたことを示唆している。MEP経路の酵素遺伝子を包括的に正に制御する転写因子の報告はこれまでに無く、転写因子の過剰発現のみで包括的にイソプレノイド生合成能を向上させることが出来る新規な代謝工学的手法として発展が期待される。

Metabolic engineering of isoprenoids in higher plants with transcription factors regulate the expressions of biosynthetic enzymes

○Seiji Takahashi¹, Tanetoshi Koyama², Toru Nakayama¹
(¹ Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ² IMRAM, Tohoku Univ.)

Key words isoprenoid, transcriptional regulation, *Arabidopsis thaliana*