

植物特異的なタンパク質への糖鎖付加の抑制を目指して

松岡 健

植物を用いた有用物質の生産は、生産コストが低いこと、植物はエンドトキシンを持たず、またヒトなどの動物感染性ウイルスを持たないことから近年注目されている。また、植物において分泌性タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の構造は、菌類のものに比べてヒトなどの動物のものに近いことから、一部のサイトカインや抗体などのようにN-型糖鎖の付加がその活性や血液中での安定性に影響を及ぼすタンパク質のホストとして特に注目されている。しかしながら真核生物の分泌系で起るタンパク質への糖鎖付加のうち、O-結合型糖鎖の付加は、動植物菌類で大きく異なっており¹⁾これをいかにして回避するかが将来の植物バイオ産業発展の大きな鍵を握っている。本稿では九州大学・産業技術総合研究所・崇城大学からなる共同研究グループが、経済産業省主管の植物工場プロジェクトの一環として、この5年間に植物特異的なO-結合型糖鎖修飾の抑制を目指して行ってきた研究を中心に、現状と今後の展望について解説する。

植物特異的なO-結合型糖鎖とその動物への影響

植物特異的なO-結合型糖鎖付加 植物のO-結合型糖鎖は、タンパク質中で単独に存在するプロリン残基が、プロリン水酸化酵素と呼ばれる酵素により変換されたヒドロキシプロリン残基の水酸基に、アラビノガラクトサンと呼ばれる糖鎖が付加される型、プロリン水酸化酵素の作用で生じた連続したヒドロキシプロリン残基の水酸基にアラビノガラクトサンまたは1から数個のアラビノースが付加される型、セリン残基の水酸基にガラクトースが付加される型の三種が主要な修飾として知られる(図1)。エクステンシンと呼ばれる植物細胞壁中の主要構造タンパク質や、アラビノガラクトサンタンパク質と呼ばれる植物のプロテオグリカン様タンパク質、および一部の植物細胞間情報伝達に関わるペプチドホルモンが、これらの修飾を受けている。特に、エクステンシンやアラビノガラクトサンタンパク質は、これらの修飾を受ける配列がタンデムに数回から数十回繰り返された構造を持っている。したがって植物においてはこれらの糖鎖修飾はタンパク質の糖鎖修飾部位数として、N-型糖鎖のものより多いと見積もられている。

アラビノガラクタンの付加されるプロリンに関しては、配列の比較からの推定や実験的なモチーフ解析^{2,3)}により、次のように考えられている。すなわち、非連続したヒドロキシプロリン残基へはアラビノガラクトサン糖鎖が付加され、連続したヒドロキシプロリン残基へはオ

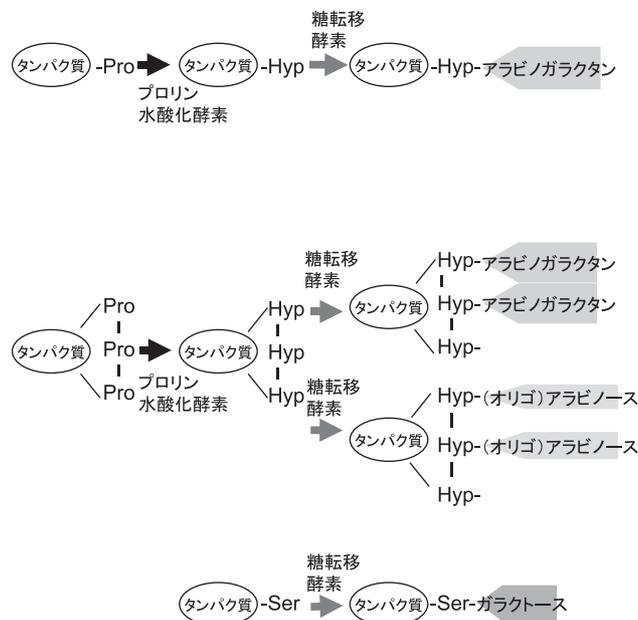


図1. 植物特異的なタンパク質への糖鎖付加. 上から、単独のプロリン残基の水酸化と生じたヒドロキシプロリン残基へのアラビノガラクトサン糖鎖付加、連続したプロリン残基の水酸化と生じたヒドロキシプロリン残基へのアラビノガラクトサンまたはオリゴアラビノースの付加、およびセリン残基へのガラクトースの付加。

リゴアラビノースが付加される。しかしながら、連続したプロリン残基のどのプロリンがヒドロキシプロリンへと変換されるかについての法則性は解析されておらず、また、不連続なヒドロキシプロリン残基を持ち、オリゴアラビノースが付加されているペプチドホルモンも最近植物から見いだされており⁴⁾、更に連続したプロリン残基であってもそれらのC-末端側のアミノ酸により付加される糖鎖が異なるという実験結果も得られていることから(陶山ら、未発表)植物におけるヒドロキシプロリン残基への糖鎖修飾機構とその配列特異性については、現在考えられているもの⁵⁾よりさらに複雑であると考えられる。

植物特異的なO-結合型糖鎖のヒトや動物への影響

これらの糖鎖、特にアラビノガラクトサン糖鎖は、ヒトや動物に対して抗原性を持つものがあること、動物のマクロファージ活性化能を有すること、この糖鎖を結合させた化合物は投与された動物の肝臓と腎臓に蓄積することなどの、ヒトや動物に対して多彩な効果を有することが

報告されている²⁾。また、漢方薬中のアラビノガラクトタン糖鎖が、強い抗補体活性など各種の作用を示すことも報告されている⁶⁾。したがって、これらの糖鎖が付加された有用タンパク質が組換え植物により合成されても、産物は予期しない活性を示す可能性がある。実際、トウモロコシで発現させたIgAのヒンジ部分に存在するプロリン残基が水酸化され、そこに植物特異的な糖鎖修飾が起っていることも報告されている⁷⁾。したがって、遺伝子組換え技術を用いて植物で動物由来有用タンパク質、特に医薬原料を合成させる場合には、これら植物特異的な糖鎖修飾を抑制する必要がある。

植物特異的なO-結合型糖鎖の生合成 植物特異的な糖鎖修飾のうち、ヒドロキシプロリン残基に糖鎖が付加する形の修飾の第一段階は、プロリン水酸化酵素と呼ばれる酵素により触媒される。小胞体からゴルジ装置への輸送の阻害剤の存在下でこの糖鎖付加が抑制されること⁸⁾、タバコのプロリン水酸化酵素の1種はおもにシス側のゴルジ装置に局在し小胞体とゴルジ装置の間をリサイクリングしていること⁹⁾、複数のシロイヌナズナプロリン水酸化酵素オルソログとGFPの融合体は小胞体またはゴルジ装置に局在したこと¹⁰⁾などから、このプロリン水酸化酵素が機能する細胞内部位は、小胞体またはシス側のゴルジ装置であると考えられている。

プロリン水酸化に引き続き糖鎖のポリペプチドへのアラビノガラクトタンまたはオリゴアラビノース糖鎖の付加の第一段階の酵素である、ヒドロキシプロリン残基への糖酵素については、筆者らの研究を含めガラクトース転移酵素の活性が植物の抽出液を用いて最近同定されている^{11,12)}が、アラビノース転移酵素についての報告はまだまだなされていない。筆者らがガラクトース転移酵素の活性の局在を、細胞分画により解析した結果では、この酵素活性は主に小胞体に存在した¹¹⁾。したがって、おそらくヒドロキシプロリン残基の生成とそこへのガラクトースの付加は小胞体で開始され、多くの細胞壁タンパク質のようにこの糖鎖付加を受ける配列を繰り返して多数持つもの場合は、シスゴルジにおいてもその反応が継続して進行し、その後ゴルジ装置内において糖鎖の伸長などが起ると推定される。

もう一種の糖鎖修飾であるセリン残基へのガラクトースの転移酵素について、筆者らはこの酵素を最近同定した。興味深いことに、この酵素は以前からポリペプチドへの糖転移酵素として同定されているタンパク質グループに属さず、またこれらの酵素のほとんどが2型の膜タンパク質であるのとは異なる、1型膜タンパク質であった¹³⁾。したがって、現在は糖転移酵素として推定されていない遺伝子産物に、今まで酵素分子の同定が為されていないヒドロキシプロリンへのガラクトースやアラビノースの転移酵素が含まれる可能性も考えられる。

植物のプロリン水酸化酵素とその抑制

植物プロリン水酸化酵素の構造 植物には、構造的な特徴から、2種類に分類されるプロリン水酸化酵素が存在している⁸⁾。1型プロリン水酸化酵素はN-末端にII型の膜アンカーを持つ膜貫通タンパク質で、細胞質側に短いN-末端を露出し、活性部位は小胞体/ゴルジ装置の内腔側に存在している⁸⁾。一方、2型プロリン水酸化酵素は、N-末端に膜透過のためのシグナルペプチドと推定される配列、次いで活性ドメイン、そして最もC-末端側にTox1と呼ばれるシステインに富む領域を持っている。

それら活性ドメインは、古くから解析されている動物のコラーゲンに対するプロリン水酸化酵素と同様に、2価の鉄イオンを補欠分子属として持つ構造を取っている。この構造は、2-オキソグルタル酸を基質とするオキシゲナーゼに共通なものであり、通常プロリン水酸化酵素として呼ばれる酵素は、実際は“水酸化酵素:ヒドロキシラーゼ”ではなく、“酸素添加酵素:オキシゲナーゼ”に分類される。いずれにせよ、この補欠分子属である2価鉄イオンは活性に必須であり、それをキレートして除く薬剤、たとえば2,2'-ジピリジルを共存させると活性が完全に消失する。

これらのうち一部のタンパク質は、プロリンの繰り返し配列を持つペプチドや、エクステンシン、アラビノガラクトタンタンパク質などの糖鎖付加部位の合成ペプチドを基質として、実際プロリン水酸化酵素活性を持つことが示されている。

阻害剤を用いた抑制 プロリン水酸化酵素を抑制することは、動物の有用タンパク質を、閉鎖系環境を用いて遺伝子組換え植物で発現させる場合に、植物を水耕栽培で育てている場合においては非常に簡便なシステムとして、その確立に期待が持たれる。そこで筆者らは、アラビノガラクトタン糖鎖付加部位を一か所持つタンパク質であるサツマイモ貯蔵タンパク質、スボラミンを発現する形質転換タバコを用いて、プロリン水酸化酵素を阻害する2,2'-ジピリジルによる糖鎖修飾抑制の効果を検討した¹⁴⁾。その結果、1日間、0.5 mMの濃度で処理することにより、糖鎖修飾を20%程度抑制することができた(図2)。この条件において、スボラミン以外にもタバコ植物中のアラビノガラクトタン糖鎖付加を受けているタンパク質のパターンも変化したことから¹⁴⁾、この処理によりある程度の糖鎖修飾の抑制が可能であると考えられた。しかしながら、この薬剤の処理は植物の生育に多大な悪影響を及ぼし、またその効果は一過的であったことから(図2)、薬剤処理によりプロリン水酸化を抑制するためには、今回用いたものより特異性の高い薬剤、すなわち2価鉄のキレート剤ではなく、プロリン水酸化酵素に特異的な薬剤の開発が必要であると考えられる。

遺伝子発現抑制 プロリン水酸化酵素の抑制法とし

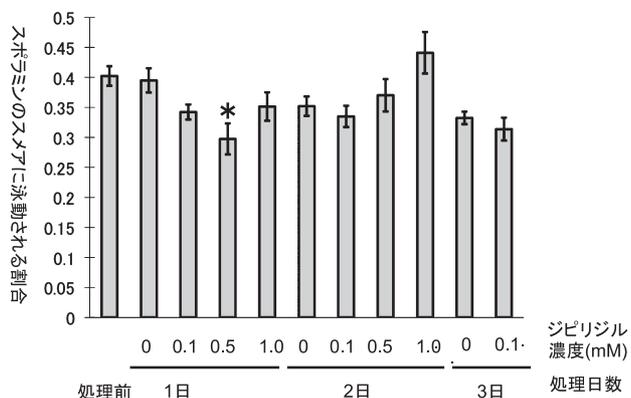


図2. モデルタンパク質スポラミンのスメアリングの程度を指標とした、2,2'-ジピリジル処理による糖鎖修飾抑制効果の検討。0.5 mMの2,2'-ジピリジル処理を一日行った際には、処理前に比べて糖鎖修飾の統計的に有為な抑制 (*: p<0.05) が認められたが、処理日数が長くなるとその効果は認められなくなった。

ては、前述の阻害剤を用いたもの以外にも、遺伝子発現の抑制による方法も考えられる。そこで筆者らは、タバコの複数のプロリン水酸化酵素に対するRNAiコンストラクトとをタバコ植物に発現させ、その抑制を試みた¹⁵⁾。mRNAの蓄積量が減少した植物は獲得可能であったが、完全に発現を抑制した植物は獲得できなかった。そこでそれらの発現抑制個体について、アラビノガラクトサン糖鎖の付加を受けているタンパク質のパターンを、坑糖鎖抗体を用いて解析したところ、タンパク質量当りの反応性の低下と、特異的なポリペプチドの電気泳動パターンの変化が認められた。したがって、この遺伝子発現抑制もある程度の糖鎖修飾抑制効果があると考えられた。

しかしながら、多くのプロリン水酸化酵素の発現部位は重複しており、またシロイヌナズナにおいてそれらのうち一部の抑制体は植物の形態形成に影響を及ぼすという知見も最近報告されている¹⁰⁾。これらの知見と、RNAiコンストラクトとの発現で完全な遺伝子発現の抑制ができなかったことから、プロリン水酸化酵素の抑制により糖鎖修飾を抑えるためには、植物体の発生に悪影響を及ぼさないための技術開発が必要であると考えられる。したがって、抑制を図りながら有用タンパク質を発現させるために適した組織の同定と共にそれに適した生育段階の同定など、今後の技術開発が待たれるところである。

糖鎖修飾部位の減少した組織の同定による抑制

筆者らが糖鎖修飾のモデルとして実験に用いているタンパク質は、サツマイモの貯蔵組織（いわゆるイモ）に多量に蓄積しているタンパク質である。このタンパク質をタバコ細胞などで発現させたところ、タンパク質がスメアに泳動され、その原因が特異的なプロリン残基へのアラビノガラクトサン糖鎖の付加に依存していたため⁸⁾、筆者らはこのタンパク質をモデルとして糖鎖修飾の解析

を進めている。

しかしながら、サツマイモで蓄積しているスポラミンのN-末端は糖鎖付加に用いられるプロリンの後ろ側であり、アラビノガラクトサン糖鎖は付加されていない。一方、シヨ糖溶液にサツマイモの葉を浸すとスポラミンが誘導合成されるが、その際のスポラミンはスメアに泳動された。このことから、貯蔵組織と非貯蔵組織では修飾に差がある可能性が示唆された。

そこで、スポラミン発現形質転換植物を有しているタバコの貯蔵器官である、種子におけるスポラミンへの糖鎖修飾の検討を進めた。その結果ほとんどの種子で発現したスポラミンはアラビノガラクトサン糖鎖を有しておらず、ヒドロキシプロリンに変換されたプロリンも、解析を行ったものの半量程度に留まっていた¹⁶⁾。このことにより、発現させる器官を選択することにより、植物特異的な糖鎖修飾を抑制したタンパク質の組換え植物での生産系の確立が可能となると考えられた。

今後の展望

本稿では、筆者らが行ってきた、植物特異的なヒドロキシプロリン残基への糖鎖修飾の抑制に関する現在の進行状況を概説した。その中で、発現組織を選ぶ方法がもっとも有用である可能性が見いだしている。しかしながら、この結果は形質転換タバコを用いたものであり、タバコの種子生産能はあまり高くないため、実用的ではない。そこで、このタバコでの結果がどのくらい他の（種子の大きい）作物に当てはまるかなどの検討を今後進めることにより、植物特異的なプロリン残基への糖鎖修飾のためのコンセンサス配列を持つ外来有用タンパク質を、糖鎖修飾を受けない形で植物を用いて生産するシステムが確立できると期待される。

文 献

- 1) 松岡 健：バイオサイエンスとインダストリー, **63**, 303 (2005).
- 2) 森口 亮ら：月刊バイオインダストリー, **26**, 561 (2009).
- 3) Shimizu, M. *et al.*: *Plant J.*, **42**, 877 (2005).
- 4) Matsubayashi, Y.: *Plant Cell Physiol.*, **52**, 5 (2011).
- 5) Xu, J. *et al.*: *Phytochemistry*, **69**, 1631 (2008).
- 6) 山田陽城：化学と生物, **24**, 701 (1986).
- 7) Kamoup, A. S. *et al.*: *Glycobiology*, **15**, 965 (2005).
- 8) Matsuoka, K. *et al.*: *Plant J.*, **8**, 877 (1995).
- 9) Yuasa, K. *et al.*: *Plant J.*, **41**, 81 (2005).
- 10) Velasquez, S. M. *et al.*: *Science*, **332**, 1401 (2011).
- 11) Oka, T. *et al.*: *Plant Physiol.*, **152**, 332 (2010).
- 12) Liang, Y. *et al.*: *Plant Physiol.*, **154**, 632 (2010).
- 13) Shimma, Y-I. *et al.*: IBC2011 Abstract book, p. 117 (2011).
- 14) Moriguchi, R. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 995 (2011).
- 15) 森口 亮ら：第51回日本植物生理学会大会講演要旨集, p. 141 (2010).
- 16) 陶山明子ら：日本農芸化学会平成21年度大会講演要旨集, p. 317 (2009).