Molecular Breeding of a Yeast that Produces Human Compatible Glycoproteins

ヒト適応型糖タンパク質を生産する出芽酵母の分子育種

Nakayama, Ken-ichi ; Chiba, Yasunori ; and Jigami, Yoshifumi

Institute of Molecular and Cell Biology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Tsukuba Central 6, 1-1 Higashi, Tsukuba 305-8566, Japan
FAX:81 298-61-6220, E-mail: k-nakayama@aist.go.jp

Key Words : glycoprotein, molecular breeding, oligosaccharide, yeast

Abstracts

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a eucaryote that is easy to use for gene engineering and in cultivation. Yeast is suitable for production of valuable secretory proteins; however, in the case of production of glycoproteins in yeast, the mannose outer chain that consists of 30–100 mannose residues is attached to the *N*-linked oligosaccharide of the glycoproteins, which causes problems such as immunogenicity against humans or a reduction in protein activity. We have studied the molecular breeding of a yeast that produces human compatible glycoproteins by eliminating the yeast mannose outer chain and adding of essential genes for the synthesis of mammalian type oligosaccharide. In this study, we successfully cloned and disrupted the *OCH1* gene that encodes essential mannosyltransferase for the synthesis of mannose outer chain. We also succeeded in the cloning and disrupting the *MNN4* and *MNN6* genes that are involved in yeast specific mannosylphosphorylation. Furthermore we tried to clone glycosyltransferases, glycosidases, and sugar nucleotide transporter genes for the synthesis of mammalian type sugar chain, and tried to express these genes in yeast. In this report we introduce the results of these studies.

要 約

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、遺伝子操作や培養が容易な真核生物であり、有用タンパク質などの分泌発現系としては優れたものである。しかしながら、糖タンパク質の生産においては、マンノース30–100残基という大きな糖外鎖が*N*-結合型糖鎖に結合することから、ヒトに対する抗原性の付与やタンパク質の活性低下などの問題を引き起こしている。我々は、この酵母の*N*-結合型糖外鎖の除去及び哺乳類型糖鎖合成に必要な遺伝子の酵母への導入を行い、ヒトに適合できる糖タンパク質を生産可能な酵母の分子育種を行ってきた。この研究において、我々は、酵母の大きな糖外鎖を形成するのに必要なマンノース転移酵素をコードする*OCH1*遺伝子の単離と破壊に成功すると共に、同じく酵母特有のマンノースリン酸転移に関わる遺伝子*MNN4*と*MNN6*の単離と破壊に成功した。このことにより、ほぼ完全に酵母特有の糖外鎖の形成を取り除くことに成功した。さらに、哺乳類型糖鎖の、混成型や複合型糖鎖を酵母で合成可能とするために、様々な糖転移酵素、糖分解酵素、糖ヌクレオチド輸送体などの遺伝子の単離と酵母での発現を試みてきた。その成果をここに紹介する。

A. Introduction

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is easy to use for gene engineering and in cultivation. Moreover, yeast is a eucaryote whose secretion system is almost the same as that of mammalian cells in areas such as protein sorting and holding mechanisms. For that reason, yeast is suitable for the production of human proteins, especially secretory proteins. However, in the case of glycoprotein production, the poly-mannose outer chain that consists of 30–100 mannose residues is attached to the *N*-linked oligosaccharide chain of glycoprotein (1) (Fig.1), which causes problems such as immunogenicity against humans or a reduction in the protein activity. The *N*-linked glycosylation pathways are identical in yeast and mammalian cells up to the oligosaccharide assembly on dolichol pyrophosphate (Dol-PP) in the endoplasmic reticulum (ER) (2). This fact indicated that

A. 序

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は遺伝子操作が容易であり、培養が簡単な微生物である。しかも真核生物であり、タンパク質の分泌過程、そのホールディングや成熟過程に関しては、ほぼ動物細胞と同じであることから、ヒトなどのタンパク質の生産に適していると考えられる。しかしながら、糖タンパク質の生産の場合、30から100残基のマンノースから成る*N*-結合型糖鎖が付加してしまい(1)(図1)、抗原性の付与やタンパク質の活性低下などを引き起こす。この*N*-結合型糖鎖の生合成は小胞体(ER)でのドリコールリン酸上での糖鎖合成までは酵母と動物細胞でほぼ同じである(2)。これは、酵母と動物細胞の*N*-結合型糖鎖の違いは、ゴルジでの糖鎖付加が異なるためであること

Fig. 1. N-linked oligosaccharides of wild type yeast and molecular breeding yeast. The mutation genes that affect yeast specific glycosylation are shown by italic. By the disruption of these yeast specific glycosylation genes, yeast type oligosaccharide (A) is converted to human compatible high mannose type ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) oligosaccharide (B). M, mannose; GN, N-acetylglucosamine; P, phosphate.

the difference of N-linked oligosaccharide structure in yeast and mammalian cells was derived from the glycosylation system in Golgi. Therefore, we thought that it would be possible to breed yeast cells that produce a human compatible glycoprotein by changing the glycosylation system in Golgi from a yeast type system to a mammalian type system. For changing the glycosylation system in Golgi, we studied yeast specific glycosylation genes in Golgi and disruption of these genes, and introduction of mammalian specific glycosylation genes in Golgi to yeast cells.

As a result of these studies, we had found the *OCH1* gene, which encodes initiation specific α -1,6-mannosyltransferase for synthesis of the yeast poly-mannose outer chain in N-linked oligosaccharides (3,4). *MNN4* and *MNN6* genes had also been found as the positive regulator and transferase gene of a mannosylphosphorylation individual (5,6), which is also a yeast specific oligosaccharide residue. By the disruption of these *OCH1*, *MNN4* and *MNN1*, that encode yeast specific terminal α -1,3-mannosyltransferase (7), we successfully bred the yeast that attaches a kind of mammalian high mannose type oligosaccharide ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) to glycoproteins (Fig.1). Furthermore, this bred yeast was converted to the yeast that attaches $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide by introduction of the mannosidase I gene that encodes α -1,2-mannosidase. In this paper, we describe how to clone the yeast specific glycosylation genes and breed the yeast that produces the human compatible glycoprotein.

B. Cloning of *OCH1* Gene (3,4,8)

The *och1* mutant, which had been isolated by Nagasu et

al. (3), was shown to be a yeast specific gene. From this result, we thought that the N-linked oligosaccharide structure in yeast was derived from the glycosylation system in Golgi. Therefore, we thought that it would be possible to breed yeast cells that produce a human compatible glycoprotein by changing the glycosylation system in Golgi from a yeast type system to a mammalian type system. For changing the glycosylation system in Golgi, we studied yeast specific glycosylation genes in Golgi and disruption of these genes, and introduction of mammalian specific glycosylation genes in Golgi to yeast cells.

As a result of these studies, we had found the *OCH1* gene, which encodes initiation specific α -1,6-mannosyltransferase for synthesis of the yeast poly-mannose outer chain in N-linked oligosaccharides (3,4). *MNN4* and *MNN6* genes had also been found as the positive regulator and transferase gene of a mannosylphosphorylation individual (5,6), which is also a yeast specific oligosaccharide residue. By the disruption of these *OCH1*, *MNN4* and *MNN1*, that encode yeast specific terminal α -1,3-mannosyltransferase (7), we successfully bred the yeast that attaches a kind of mammalian high mannose type oligosaccharide ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) to glycoproteins (Fig.1). Furthermore, this bred yeast was converted to the yeast that attaches $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ oligosaccharide by introduction of the mannosidase I gene that encodes α -1,2-mannosidase. In this paper, we describe how to clone the yeast specific glycosylation genes and breed the yeast that produces the human compatible glycoprotein.

B. *OCH1* 遺伝子のクローニング(3,4,8)

長洲らによって取得された *och1* 変異株は、ポリマンノース

al., shows a deficiency in poly-mannose outer chain elongation in the yeast *S. cerevisiae* (9). We have cloned the *OCH1* gene by complementation of its temperature sensitive (ts) phenotype for growth. The *SalI-HindIII* 2.6 kbp fragment was found to complement the ts phenotype. The unique open reading frame (ORF) of 1,443 bp was found within the *SalI-HindIII* fragment of *OCH1* gene. This ORF encodes a protein of 480 amino acids with a molecular weight of 55,155 Da. A hydropathy profile of the predicted Och1p indicated a membrane spanning protein with a single hydrophobic region near the NH₂-terminus and a hydrophilic region at the COOH-terminal side. Four potential *N*-linked glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) were found in the large COOH-terminal region. *In vitro* translation and translocation of Och1p was performed by using the rabbit reticulocyte lysate and canine pancreatic microsomal membranes. While the translation product in the absence of membranes showed the 55 kDa band, which is identical to the predicted molecular weight of Och1p, four discrete bands larger than 55 kDa were observed in the presence of membranes. These larger bands were protected from proteinase K digestion, indicating that the large COOH-terminal region of Och1p was located in the luminal side. When these larger bands were treated with endoglycosidase H (Endo H), a 55 kDa band was observed, confirming that the Och1p is a glycoprotein containing four *N*-linked sugar chains (3).

The localization and properties of Och1p were analyzed in yeast cells by using the anti-peptide antibody. The yeast cells that express the Och1p was lysed and separated into cytosolic and membrane fractions. The Och1p bands were observed in the ER rich membranes and Golgi rich membranes fractions, while no specific bands were observed in the cytoplasmic fraction. The above data suggest that the Och1p is a membrane protein that resides in the ER and/or Golgi membranes *in vivo*. The Och1p bands were shifted to low molecular weight by Endo H digestion. The *N*-linked oligosaccharide length of the Och1p expressed in yeast was almost the same or slightly larger than the Man₈GlcNAc₂ formed in the ER because the estimated molecular weight of *N*-glycosylated Och1p by *in vitro* translation/translocation was almost identical with the molecular weight of Och1p in yeast. This result also suggests that the Och1p may exist in the ER and/or early Golgi membranes (3).

The mannosyltransferase activity of Och1p was measured by using various sugar chains or glycoprotein as an acceptor. We found that only the mannoprotein prepared from *och1* gene disruptant was recognized as an acceptor by Och1p. According to the results that Man₈GlcNAcOH did not serve as an acceptor for Och1p and that the length of *N*-linked sugar chain of *och1* mutant seemed to be larger than Man₈GlcNAc₂, we first thought that Och1p as an elongation specific mannosyltransferase for synthesis of yeast poly-mannose glycochain (3). However, analysis of the oligosaccharide structure of *och1* mutant and

糖外鎖の伸長の欠損を示した(9)。我々は*OCH1*遺伝子を温度感受性(ts)の相補性により単離を行った。*SalI-HindIII*の2.6 kbpの断片がtsの形質の相補性を示した。この*OCH1*遺伝子の*SalI-HindIII*断片中に1443 bpからなる唯一のORFを見出した。このORFには480 アミノ酸からなる分子量55,155のタンパク質がコードされる。Och1pの疎水性予測によると、NH₂-末端付近に膜貫通可能な疎水性部分を持ち、COOH-末端部分は親水性であることが分かった。この大きな親水性COOH-末端親水性領域には、4カ所の*N*-結合型糖鎖付加可能部位(Asn-X-Thr/Ser)が見出された。生体外のウサギ網状赤血球ライセートと犬膵臓膜画分を用いたOch1pの翻訳および膜透過実験を行った。犬膵臓膜画分を加えなかったものは翻訳産物として予測された分子量と同じ値である55 kDaのバンドを示したが、膜画分を加えたときには、4つの55 kDa以上のバンドが検出された。この分子量の大きなバンドはプロテアーゼKによる分解に抵抗性を示したことから、Och1pの大きなCOOH-末端部分は膜内腔側を向いていることが分かった。この分子量の大きなバンドをエンドグリコシダーゼH(Endo H)で切断したところ、55kDaのバンドに分子量が下がった。このことはOch1pに4つの*N*-結合型糖鎖が付加していることを示している(3)。

Och1pの酵母内での局在と性質の解析を抗ペプチド抗体を用いて行った。Och1pを発現している酵母を破碎し、細胞質画分と膜画分に分離を行った。Och1pはERが主に含まれている膜画分及びゴルジ体が主にふくまれている膜画分に検出され、細胞質画分には検出されなかった。これらの結果は、Och1pは膜タンパク質であり、ERもしくはゴルジに局在することを示している。このOch1pのバンドはEndo Hの処理により低分子側に移動した。酵母で発現されたOch1pに結合する*N*-結合型糖鎖の長さは、酵母で発現されているOch1pの分子量と*in vitro*のタンパク質合成・膜透過系で作られるOch1pの糖鎖修飾されたものの分子量がほぼ一致することから、ERで形成されるMan₈GlcNAc₂と同じかもしくは少し大きいと思われる。この結果も、Och1pが、ERもしくはゴルジ体のシス側に存在しているということを支持している(3)。

Och1pのマノース転移酵素活性測定を種々の糖鎖や糖タンパク質を糖受容体として用いて行ったところ、*och1*遺伝子破壊株より単離したマンナンタンパク質以外は、Och1pは糖受容体として認識しないことが見出された。このときMan₈GlcNAcOHはOch1pに糖受容体として認識されなかったことから、また、*och1*遺伝子破壊株の*N*-結合型糖鎖の長さがMan₈GlcNAc₂より大きいと思われたことから、当初我々は酵母のポリマンノース糖外鎖を合成する際の伸長に働くマンノース転移酵素であると考えた(3)。しかしながら、*och1*変異株及び遺伝子破壊株の糖鎖構造解析の結果、*och1*変異はポリマンノース外鎖合成の最初に働

och1 gene disruptant showed that the *och1* mutant was deficient in initiation specific mannosyltransferase for synthesis of the poly-mannose outer chain (4). Although the major peak of *N*-linked oligosaccharide in *och1* mutant was $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, attached mannose was the terminal α -1, 3-linkage to $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, not the initiation specific α -1, 6-mannose for outer chain synthesis (4).

Further analysis of Och1p specific activity indicated that Och1p is initiation specific α -1,6-mannosyltransferase that recognizes $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ as an acceptor, but not $\text{Man}_8\text{GlcNAcOH}$. This result indicated that at least one pyranose form of GlcNAc residue attached to β -1,4-linked mannose is essential for the recognition by Och1p (8).

In conclusion, we found that the *OCH1* gene encodes the initiation specific α -1,6-mannosyltransferase for synthesis of yeast poly-mannose outer chain in *N*-linked oligosaccharide. We also showed that the yeast specific poly-mannose outer chain was removed by the gene disruption of *OCH1*.

C. Mannosylphosphorylation of Oligosaccharide in Yeast (10)

Although the poly-mannose outer chain was removed by disruption of the *OCH1* gene, mannosylphosphate residue was still present as a yeast specific oligosaccharide residue (11). Oligosaccharide phosphorylation occurs in mammalian cells as mannose-6-phosphate, as a sorting signal to lysosome (12,13). However, in yeast, another mannose residue is attached to mammalian type mannose-6-phosphate and showed strong immunogenicity. The addition of mannosylphosphate residue results from the mannose-1-phosphate transfer from GDP-mannose in yeast, instead of the GlcNAc-1-phosphate transfer from UDP-GlcNAc in mammals. In mammalian cells, GlcNAc residue of GlcNAc-1-phosphate is removed, but mannose residue of mannose-1-phosphate is not removed in yeast cells. This mannosylphosphorylation occurs in *N*- and *O*-linked oligosaccharides (11,14). A common part of *N*-linked oligosaccharide synthesized in ER ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) is also attached to this mannosylphosphate residue. Therefore this mannosylphosphate residue must be removed from oligosaccharide for the production of human compatible glycoprotein in yeast.

Fortunately, the mutations that are deficient in this mannosylphosphorylation have already been found, and they are *mnn4* (15) and *mnn6* (16). The *mnn4* and *mnn6* mutants show the negative staining phenotype by alcian blue dye. The *MNN6* gene was isolated by complementation of this alcian blue dye staining phenotype (6). The *MNN6* gene encodes a type II membrane protein that consists of 446 amino acids. The Mnn6p is identical with Ktr6p, which is a homologue of Kre2p. As the Kre2p was known as α -1,2-mannosyltransferase, Mnn6p was thought to be a mannosylphosphate transferase itself. In fact, the membrane fraction prepared from the *mnn6* gene

くマンノース転移酵素の変異であることが示された(4). *och1*変異株の*N*-結合型糖鎖の主な糖鎖は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ であったが、付加されていたマンノースは末端の α -1, 3-マンノースであり、糖鎖鎖合成のための最初に付加する α -1, 6-マンノースではなかった(4)。

さらなるOch1pの基質特異性の解析の結果、Och1pは $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ を糖受容体とする糖鎖伸張開始の α -1, 6-マンノース転移酵素であるが、 $\text{Man}_8\text{GlcNAcOH}$ は糖受容体として認識しないということが明らかとなった。このことは、Och1pの認識には少なくともマンノースに β -1, 4-結合で付加しているGlcNAcの1残基がピラノース型になっている必要があることを示している(8)。

以上をまとめると、*OCH1*遺伝子は酵母の*N*-結合型糖鎖のポリマンノース外鎖形成の際の開始に特異的な α -1, 6-マンノース転移酵素をコードしていることを見出した。さらに、このポリマンノース外鎖は*OCH1*遺伝子を破壊することで取り除けることを示した。

C. 酵母の糖鎖のマンノースリン酸化(10)

ポリマンノースから成る糖外鎖は*OCH1*遺伝子の破壊により取り除くことが出来たが、マンノースリン酸残基が酵母特異的糖鎖残基として残っていた(11)。糖鎖のリン酸化は動物細胞でもリソソームへの輸送シグナルとして働くマンノース-6-リン酸として存在する(12, 13)。しかしながら、酵母の場合、このマンノース-6-リン酸のリン酸にさらにマンノースが付加しており、強い抗原性を示す。酵母でのマンノースリン酸残基の付加は、哺乳類で行われるUDP-GlcNAcからのGlcNAc-1-リン酸転移の代わりに、GDP-マンノースからのマンノース-1-リン酸の転移によっておこる。哺乳類細胞では、この後GlcNAc-1-リン酸のGlcNAc残基が酵素により切除されるが、酵母ではマンノース-1-リン酸のマンノース残基は切除されない。このマンノースリン酸化は*N*-および*O*-結合型糖鎖で起こる(11, 14)。*N*-結合型糖鎖のERで合成される共通部分($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$)にも、また、マンノースリン酸残基は結合する。それゆえ、このマンノースリン酸残基は、酵母でヒト適合型糖タンパク質の生産を行う場合、取り除かなければならない。

幸運にも、このマンノースリン酸化に関する欠損変異は、すでに*mnn4* (15)および*mnn6* (16)として知られていた。*mnn4*および*mnn6*変異株はアルシアンブルー色素による染色がされないという表現形を示す。*MNN6*遺伝子はこのアルシアンブルー色素の染色の相補性を用いて単離された(6)。*MNN6*遺伝子は446アミノ酸からなるII型膜タンパク質をコードしている。また、Mnn6pはKre2pと相同性の高いタンパク質であるKtr6pと同一であった。Kre2pは α -1, 2-マンノース転移酵素であることが知られていたもので、Mnn6pもマンノースリン酸転移酵素そのものであると考えられた。事実、*mnn6*遺伝子破壊株から調製した膜画分にはマン

disruptant did not show mannosylphosphate transferase activity, but activity was observed in the membrane fraction of *mn6* disruptant that was transformed with *MNN6* gene. We investigated the substrate specificity of Mnn6p using various sugar chains and found that α -1,2-linked mannobiose unit was required for recognition as an acceptor. However, no difference of ratio in mannosylphosphorylated $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ was observed between the *mn6* disruptant and *MNN6* wild type cells. This may indicate that a different gene encoding a mannosylphosphate transferase exists than the *MNN6* gene, and another mannosylphosphate transferase transfers the mannosylphosphate residue to $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (6).

The *MNN4* gene encodes a type II membrane protein consisting of 1178 amino acids with a remarkable tandem repeat of four lysines and four glutamic acids at the COOH-terminus region (5). The *MNN4* gene seems to encode a positive regulator of mannosylphosphorylation because mannosylphosphorylation was not recovered by the *MNN4* gene over expression in *MNN6* gene disrupted cells (17). Although the function of Mnn4p is still not known, the gene disruption of *MNN4* showed a lack of mannosylphosphorylation in *N*- and *O*-linked oligosaccharides (5,14). Especially, the mannosylphosphate residue transfer to $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ was reduced in the *mn4* gene disruptant (5). This result indicated that *MNN4* gene disruption was effective to remove the mannosylphosphate residue from oligosaccharides of glycoproteins.

D. Molecular Breeding of Yeast that Produces Glycoprotein that Added Mammalian High Mannose Type Oligosaccharide

In conclusion, we had succeeded in cloning the *OCH1* gene which encodes initiation specific α -1,6-mannosyltransferase for the synthesis of yeast poly-mannose outer chain. The *MNN4* and *MNN6* genes were also cloned as yeast specific mannosylphosphorylation genes. In particular, in the *MNN4* gene disruptant cells, mannosylphosphorylation of almost all oligosaccharides was not observed. Except *OCH1* and *MNN4* genes, the *MNN1* gene has been known as the gene that encodes the yeast specific terminal α -1,3-mannosyltransferase (7). The *OCH1* and *MNN4* genes that were isolated by us were disrupted with the *MNN1* gene in yeast cells, and we found the most of the *N*-linked oligosaccharide in this triple gene disruptant cell was $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Fig. B), which is a kind of mammalian high mannose type oligosaccharide. This result indicates that this triple gene disruptant cell is not attached an oligosaccharide that exhibits an immunogenicity against humans to glycoproteins.

E. Production of $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ Type Sugar Chain in *S. Cerevisiae*

As described above, we could produce a $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -type sugar chain, which had the same structure as an intermedi-

ノースリン酸転移酵素活性は見出されなかったが、*MNN6*遺伝子を導入した*mn6*遺伝子破壊株から調製した膜画分では活性は検出された。Mnn6pの基質特異性について種々の糖鎖を用いて調べたところ、 α -1,2-結合したマンノース2残基のユニットを糖受容体として必要とすることが分かった。しかしながら、マンノースリン酸化された $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ の比率は、*mn6*遺伝子破壊と*MNN6*遺伝子に関しては野生型株のものとは違いが見られなかった。これは、*MNN6*遺伝子以外にマンノースリン酸転移酵素をコードする遺伝子が存在し、そのマンノースリン酸転移酵素が $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ にマンノースリン酸残基を転移することを示している(6)。

*MNN4*遺伝子は、1178アミノ酸残基からなるC-末端領域に4残基のリジンと4残基のグルタミン酸残基の特徴的な繰り返し構造を持ったII型膜タンパク質をコードしている(5)。*MNN6*遺伝子破壊株で*MNN4*遺伝子を過剰発現させてもマンノースリン酸化は回復しないことから、*MNN4*遺伝子は正の制御因子をコードしていると思われた(17)。*MNN4*遺伝子の機能は、現在も不明であるが、*MNN4*遺伝子の破壊はN-およびO-結合型糖鎖のマンノースリン酸化の欠損を示す(5,14)。特に $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ へのマンノースリン酸残基の転移は*mn4*遺伝子破壊株では減少している(5)。このことは、*MNN4*遺伝子の破壊は糖タンパク質の糖鎖からマンノースリン酸残基を取り除くのに効果があることを示している。

D. 動物細胞の高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質を生産する酵母の分子育種

これまで述べてきたように、我々は、酵母のポリマンノース糖外鎖合成の最初に必要な α -1,6-マンノース転移酵素をコードする*OCH1*遺伝子の単離に成功した。さらに、この他に酵母特異的な糖鎖として存在するマンノースリン酸付加に関する遺伝子として、*MNN4*と*MNN6*遺伝子の単離に成功した。特に*MNN4*遺伝子の破壊株では糖鎖のマンノースリン酸化がほとんど観察されなかった。この*OCH1*と*MNN4*以外に、*MNN1*遺伝子が、酵母特異的な末端の α -1,3-マンノース転移酵素をコードしていることが知られていた(7)。そこで我々は、我々が取得した*OCH1*および*MNN4*遺伝子と、*MNN1*遺伝子の3つを同時に破壊した株を作成した。その結果、この3つの遺伝子を破壊した株の糖タンパク質のN-結合型糖鎖は、ほぼ全てが動物細胞の高マンノース型糖鎖の一つである $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ の糖鎖であることが分かった(図B)。この結果、この3つの遺伝子破壊株ではヒトに対する抗原性を持つ糖鎖はタンパク質に付加しないことを示している。

E. 出芽酵母における $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖の生産

前述の通り、 $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ の三重破壊株の作製により、哺乳類で見られる糖鎖の中間体と同様の構造である

ate of a mammalian oligosaccharide, in the *S. cerevisiae* $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ mutant strain. To change the yeast sugar chains into mammalian ones, a number of genes that encode glycosyltransferases, glycosidases, and sugar-nucleotide transporters must be introduced into the mutant cells.

The first step is a conversion of the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -type to $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -type by mannosidase I. Mannosidase I cuts only the α -1,2-mannoside linkage in the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Therefore, we have to use α -1,2-mannosidase. Several genes encoding α -1,2-mannosidase have been isolated from yeast and fungi (18), and some mammalian α -1,2-mannosidase genes have also been cloned (20, 21). A truncated soluble form of human α -1,2-mannosidase IB was produced as a secreted protein from *Pichia pastoris* (22). However, the cloning and expression of these genes in yeast had not been achieved when we started our work. The *S. cerevisiae* α -1,2-mannosidase gene (*MNS1*) was one of the well-studied enzymes, and cloning (23) and crystal structural analysis of the Mns1p protein were also performed (47). Substrate specificity of the Mns1p showed that only one α -1,2-linked mannose residue in the middle arm of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sugar chain was removed (23), indicating that the enzyme was not suitable for conversion of the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -type to $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -type. Among fungi species, α -1,2-mannosidase genes were cloned from *Aspergillus saitoi* (24) and *Penicillium citrinum* (19). The *A. saitoi* α -1,2-mannosidase gene (*msdS*) was introduced into the yeast cells as a chimeric gene with a signal sequence derived from the aspergillopepsin I gene from *A. saitoi* (24, 25), and the fusion protein was successfully expressed. Recombinant α -1,2-mannosidase activity was detected in the culture medium, indicating that the products of the *msdS* gene passed through the yeast secretory pathway. Therefore, we thought that this enzyme would be useful to produce the mammalian-type sugar chains in yeast, if it could be retained in the endoplasmic reticulum (ER) or in the lumen side of the Golgi apparatus. After this conversion by α -1,2-mannosidase, many enzymes consecutively act on the $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$; we decided to make the *A. saitoi* α -1,2-mannosidase express in the ER.

In *S. cerevisiae*, His-Asp-Glu-Leu (HDEL), the C-terminal sequence of proteins, is known to be involved in a retention mechanism in the ER (26). This sequence is also called the 'ER retention/retrieval signal'. Proteins with an HDEL sequence will be trapped and retrograde transported into the ER by a membrane-bound receptor that is encoded by the *ERD2* gene and is localized in the cis-Golgi network (27, 28).

We constructed the chimeric gene by adding 'HDEL' to the C-terminus of the *A. saitoi* α -1,2-mannosidase open reading frame and introduced it into the triple disruptant as described above (48). Expressed α -1,2-mannosidase was mainly localized in the ER, and the α -1,2-mannosidase activity was detected in the ER fraction prepared by ultracentrifugation (48). We ana-

$\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を酵母で生産することが可能となった。この糖鎖をさらに哺乳類型に近づけるためには、種々の糖転移酵素、糖分解酵素、糖ヌクレオチドトランスポーターなどを酵母内で発現させていく必要がある。

第一段階はマンノシダーゼ I による $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ への変換である。マンノシダーゼ I は $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ の α -1, 2-マンノシド結合を切断する酵素である。したがって、我々の目的のためには α -1, 2-マンノシド結合を選択的に切断する酵素 (α -1, 2-マンノシダーゼ) を利用する必要がある。 α -マンノシダーゼに関わるいくつかの遺伝子が酵母およびカビから分離されており(18)、また、哺乳動物からも同様に遺伝子がクローニングされてきた(20, 21)。ヒト α -マンノシダーゼ IB は可溶型として *Pichia pastoris* で分泌性タンパク質として発現された報告がある(22)。しかしこれらは我々が研究を開始した段階ではまだクローニングされておらず、酵母での発現に成功していなかった。*S. cerevisiae* の α -マンノシダーゼ遺伝子 (*MNS1*) は精力的に研究された酵素の一つであり、クローニング(23)や結晶構造解析(47)の報告がある。しかし、この酵素は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ からマンノースを1残基だけしか切断できないので(23)、我々の目的には不適であった。カビ由来のものでは *Aspergillus saitoi*(24)や *Penicillium citrinum*(19)の α -1, 2-マンノシダーゼ遺伝子もクローニングされている。*A. saitoi*由来の酵素遺伝子(*msdS*)は、*A. saitoi* から得られたアスペルギロペプシン I 遺伝子のシグナルシーケンスを付加したキメラ遺伝子として酵母に導入され(24, 25)、培地中に可溶型タンパク質として発現された。このことは *msdS* の融合タンパク質が分泌経路を通過したことを示している。従って、この酵素を酵母の小胞体(ER)あるいはゴルジ体のルーメン側に機能的に局在することができれば、我々の実験に有効である。この反応は第一段階で、以後多くの糖転移酵素群が逐次的に作用しなければならないので、我々は小胞体内で発現させることを考えた。

S. cerevisiae の小胞体局在メカニズムとして知られているのが、タンパク質C末端側の His-Asp-Glu-Leu (HDEL) の配列である(26)。これはER保持/回収シグナルとも呼ばれており、ER-Golgi間の小胞体内で発現している *ERD2* 遺伝子にコードされる HDEL 認識タンパク質によってトラップされ、小胞体へ逆行輸送されるものと考えられている(27, 28)。

A. saitoi の α -1, 2-マンノシダーゼのオープンリーディングフレームのC末端にHDEL配列を付加するようなキメラ遺伝子を作製し、前述の三重破壊株に導入した(48)。発現した α -1, 2-マンノシダーゼは主に小胞体に発現しており、また小胞体画分中に α -1, 2-マンノシダーゼ活性を確認できた(48)。この組み換え酵母の細胞内糖タンパク質であるカルボキシペプチダーゼ Y、細胞壁のマンノプロテインについて糖鎖構造を調べたところ、 α -1,

lyzed the sugar chains of intracellular carboxypeptidase Y and of cell wall mannoproteins from the recombinant disruptant. The structure of the sugar chains from the triple disruptant harboring only the null vector was $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ as expected. Compared with the sugar chains from the disruptant with the null vector, those from the recombinant disruptant contained $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, which was the intermediate form for hybrid- and complex-type sugar chains (48). Therefore, we achieved our first aim, to convert the yeast sugar chain into a mammalian one.

F. Trial for the Production of Hybrid- and Complex-Type Sugar Chains in *S. cerevisiae*

The next step of *N*-linked oligosaccharide modification was conversion into the hybrid-type by the addition of GlcNAc residue in the Golgi apparatus. To make this possible, *N*-acetylglucosaminyltransferase and UDP-GlcNAc transporter as well as a supply of $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ acceptor were needed. We previously reported that rat UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I) was successfully expressed in *S. cerevisiae* (29). Upon expression and careful characterization of GnT-I in *S. cerevisiae*, it was revealed that the expressed enzyme is localized in various organelles. Subsequently, we introduced one copy of the gene by homologous recombination into the triple disruptant, and most activity was detected in the Golgi fraction. For our purpose, Golgi localization of GnT-I is important because α -1,2-mannosidase is localized in the ER, providing $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ as the acceptor for GnT-I.

Given that we could express GnT-I protein in yeast, the UDP-GlcNAc transporter is another requirement. UDP-GlcNAc, which is the donor substrate for GnT-I, is synthesized in the cytosol and must be transported from the cytosol to the lumen of the Golgi apparatus in order to provide a donor substrate for sugar transfer. There are two UDP-GlcNAc transporters that could be selected, one from *S. cerevisiae*, the other from human. In our search for a homologue of the *Kluyveromyces lactis* MNN2-2 UDP-GlcNAc transporter, we found that the gene *YEA4* encodes a protein having 40% identity and 70% similarity of amino acid sequences with the Mnn2-2 protein in *S. cerevisiae* (33). We therefore tested the possibility that its product is a UDP-GlcNAc transporter and demonstrated that overproduction of the Yea4 protein increases UDP-GlcNAc transport activity. This transport activity of Yea4 protein is saturable with a high concentration of UDP-GlcNAc and shows the same apparent K_m values as those measured for the *K. lactis* Golgi-localized UDP-GlcNAc transporter (30, 31) and the rat liver ER-localized UDP-GlcNAc transporter (32).

There are no GlcNAc residues in the outer chain of the glycoproteins from *S. cerevisiae*. To assess the possible biological role of this UDP-GlcNAc transporter in the ER membranes, we constructed and analyzed a yeast strain deleted for *YEA4*

2-マンノシダーゼ遺伝子を導入しない株では $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ の構造を有していたのに対し、遺伝子導入株では一部の糖鎖が $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ の構造に変換されていた(48)。この $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ の構造は、ヒト混成型および複合型糖鎖の中間体であるので、ヒト型糖鎖への変換の第一段階を達成できた。

F. 出芽酵母における混成型および複合型糖鎖の生産を目指して

N-結合型糖鎖修飾の次の段階は、ゴルジ装置内での *N*-アセチルグルコサミンの付加反応である。これを行なわせるためには、アクセプターとなる $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ を供給するのはもちろんのこと、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素とUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターを酵母に導入する必要がある。ラットのUDP-*N*-アセチルグルコサミン: α -3-D-マンノシド β -1,2-*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I (GnT-I)を出芽酵母において活性を有する形で過剰発現できたことがすでに報告されている(29)。その酵母株においてGnT-Iの局在を解析した結果、この酵素は様々な細胞内小器官に分布していた。しかしその後の研究で、遺伝子を1コピーだけ導入した株ではほとんどの活性がゴルジ体画分に存在することが示された。 α -1,2-マンノシダーゼを小胞体に存在させ、GnT-Iのアクセプターとして $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ を供給することができたので、GnT-Iをゴルジ体内に局在させることは重要なポイントであった。

GnT-Iの発現ができたので、もうひとつ必要なものはUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターの発現である。GnT-Iのドナー基質であるUDP-*N*-アセチルグルコサミンは細胞質で合成されるため、糖転移反応のドナー基質を供給するためには、UDP-*N*-アセチルグルコサミンが細胞質からゴルジ内腔へ輸送される必要がある。UDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターに関しては、2つの選択肢があった。一つは出芽酵母由来のものであり、もう一つはヒト由来のものである。我々は *Kluyveromyces lactis*のUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーター遺伝子であるMNN2-2遺伝子を出芽酵母のホモログを検索した結果、アミノ酸レベルの比較でMnn2-2タンパク質と40%の同一性、70%の類似性を示すタンパクをコードしている*YEA4*遺伝子を発見した(33)。さらに*YEA4*遺伝子産物がUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターである可能性を検討し、*YEA4*の過剰発現によりUDP-*N*-アセチルグルコサミン輸送活性が増加されることを証明した。この輸送活性は、過剰のUDP-*N*-アセチルグルコサミンにより飽和する性質を有し、見かけ上の K_m 値は*K. lactis*のゴルジ体に存在するUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーター(30, 31)や、ラットの肝臓に存在する小胞体局在性のUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーター(32)と同等であった。

出芽酵母の糖タンパク質中の外糖鎖には*N*-アセチルグルコサミン残基は見いだされない。そこで*YEA4*にコードされるUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターの生物学的な役割を明らかにするために、我々は*YEA4*遺伝子を破壊した酵母株を作

(33). Comparatively, the null disruptant cells showed less UDP-GlcNAc transport activity to the wild type cells. The disruptant cells showed no apparent differences with the wild type ones in staining with FITC-conjugated concanavalin A. However, staining of the mannan layer of the cell wall with FITC-conjugated wheat germ agglutinin, which is a GlcNAc-specific lectin for yeast, and with Calcofluor white, which is a fluorescence dye that binds to chitin microfibrils, revealed less staining in the disruptant than in the wild type cells. The content of cellular chitin was also reduced in the disruptant compared to that in the wild type cells. These data indicated that the yeast UDP-GlcNAc transporter-encoded *YEA4* gene is required for chitin synthesis of the cell wall.

An alternative choice is the UDP-GlcNAc transporter from human. Based on its similarity to the human UDP-galactose (UDP-Gal) transporter, the human UDP-GlcNAc transporter was identified by a homology search in the expressed sequence tags (EST) database. The human transporter was expressed in *S. cerevisiae*, and the membrane fractions prepared from the yeast cells showed much higher UDP-GlcNAc transport activity (34). We have also confirmed the human transporter's Golgi localization and topology by using Golgi and ER marker proteins (our unpublished data).

For our purpose, the latter transporter had better potential; the *S. cerevisiae* Yea4p was localized in the ER, and the human transporter was localized in the Golgi apparatus. In our system, it was considered preferable to supply UDP-GlcNAc in the Golgi apparatus, given that rat GnT-I was mostly localized in the Golgi compartment of yeast.

In order to create a complex-type sugar chain like that observed in mammals, other glycosyltransferases, glycosidases, and sugar-nucleotide transporters must be expressed in *S. cerevisiae*. We have cloned several genes encoding those enzymes and transporters to produce a biantennary complex-type sugar chain, and we have tried to express these genes individually in yeast. The next trial involved the expression of the mannosidase II in the Golgi apparatus of *S. cerevisiae* with an appropriate topology, which would trim the GlcNAcMan₅GlcNAc₂ structure to GlcNAcMan₃GlcNAc₂. Human mannosidase II was expressed in the Golgi apparatus of yeast without constructing a fusion protein with the transmembrane region of *OCH1*, which is a yeast mannosyltransferase localized in the Golgi apparatus (unpublished data). Simultaneously, we attempted to express the human UDP-*N*-acetylglucosamine: α -6-D-mannoside- β -1, 2-*N*-acetylglucosaminyltransferase II (GnT-II) gene (35) in *S. cerevisiae*. GnT-II was also expressed in an active form by introducing cDNA coding the GnT-II amino acid sequence, as in the case of mannosidase II (unpublished data).

When we succeed in the addition of GlcNAc, the product can serve as an acceptor for the galactose addition, which is

製し、解析した(33)。この遺伝子破壊株は野生型に比べて低いUDP-*N*-アセチルグルコサミン輸送活性を示した。この破壊株の細胞壁について解析したところ、ConAによるマンナン層の染色には影響が見られなかった。ところが、キチンを認識するコムギ胚芽レクチン(WGA)やCalcofluor Whiteによる染色は、野生型に比べて明らかに減少しており、また組成分析でもキチンの含量が減少していた。このことから*YEA4*にコードされるUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターは、細胞壁のキチン合成に関与していると考えられた。

もう一つの選択はヒト由来のUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターである。ヒトのUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターは、ヒトのUDP-ガラクトース(UDP-Gal)トランスポーターに対する類似性に基づいてESTデータベースをホモロジー検索することにより同定された。このヒトのトランスポーターを出芽酵母で発現させ、細胞より回収した膜画分ではUDP-*N*-アセチルグルコサミン輸送活性が大幅に増加していた(34)。我々はこのトランスポーターがゴルジ体に存在することと、膜への配向性をゴルジ体と小胞体のマーカーを用いることにより確認した(未発表データ)。

我々の目的にはヒトUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターの方が適していると考えられる。つまり、出芽酵母のYea4pは小胞体に局在しているが、ヒト由来のUDP-*N*-アセチルグルコサミントランスポーターはゴルジ体に存在するからである。酵母内で発現させたラットGnT-IIは大部分がゴルジ体に存在するため、我々の系では、ゴルジ体にUDP-*N*-アセチルグルコサミンを供給する方が良いと考えられる。

さらに哺乳類で見られる複合型糖鎖を作るためには、他の糖転移酵素、糖分解酵素、糖ヌクレオチドトランスポーターを発現させる必要がある。我々は二本鎖複合型糖鎖の生産のために必要な遺伝子群をそれぞれ単離し、個々の遺伝子を酵母内で発現させることについても検討してきた。まず、GlcNAcMan₅GlcNAc₂構造をGlcNAcMan₃GlcNAc₂に変換するのに必要なマンノシダーゼIIを発現させることを検討した。ヒトマンノシダーゼIIは、酵母のゴルジ体内タンパク質である*OCH1*の膜貫通領域との融合タンパク質を作らなくても、ゴルジ体内で活性を有した形で発現した(未発表データ)。同様に我々はヒトのUDP-*N*-アセチルグルコサミン: α -6-D-マンノシド- β -1, 2-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素II(GnT-II)遺伝子(35)を出芽酵母において発現させることも試みた。ヒトマンノシダーゼIIと同様、GnT-IIもcDNAをそのまま発現させることで活性を有した酵素が発現した(未発表データ)。

N-アセチルグルコサミンを糖鎖に付加することに成功すれば、付加された糖鎖をさらにガラクトースを付加するためのア

similar to the GlcNAc addition, requires the expression of β -1,4-galactosyltransferase in the Golgi lumen and a UDP-Gal transporter to provide a substrate for *in vivo* galactose addition. Mammalian β -1,4-galactosyltransferase I is one of the most well studied glycosyltransferases. It has been reported that a full length of human β -1,4-galactosyltransferase or a chimeric gene encoding a catalytic domain of human β -1,4-galactosyltransferase ligated to a transmembrane domain of yeast α -1,2-mannosyltransferase (*MNT1*) was introduced into *S. cerevisiae* (36, 37). The expressed fusion protein was localized in the Golgi apparatus and showed *in vivo* activity of human β -1,4-galactosyltransferase in *S. cerevisiae* (37). We constructed a chimeric gene consisting of the coding region of the yeast *OCH1* transmembrane domain and a catalytic domain of human β -1,4-galactosyltransferase and got the same results as those obtained with a *MNT1* fusion protein.

Regarding the UDP-Gal transporter, we have reported UDP-Gal transport activity in *S. cerevisiae* and its localization in the Golgi apparatus, but the gene has yet to be identified (38). On the other hand, UDP-Gal transporter genes from human (39) and *Schizosaccharomyces pombe* have been cloned (40-43). Human UDP-Gal transporter (*hUGT2*) has been expressed in *S. cerevisiae* in an active form, which has almost the same specific activity and K_m value as those shown in the human microsomal fraction by *in vitro* transport assay. Therefore, *hUGT2* cDNA is not a regulatory protein but encodes the transporter (44, 45).

Notably, it has not yet been demonstrated whether expressed foreign sugar nucleotide transporter (*hUGT2*) is functional in *S. cerevisiae*. One hypothesis held that appropriate incorporation of UDP-Gal into the Golgi acquired a simultaneous antitransport of UMP. UMP is made from UDP by pyrophosphatase, and UDP is a byproduct of the reaction of sugar transfer. Therefore, glycosyltransferase and acceptor substrate should be co-expressed for functional analysis of *hUGT2* *in vivo*. We have expressed *S. pombe* α -1,2-galactosyltransferase (*gma12*⁺) in *S. cerevisiae* in order to assay for the UDP-Gal transporter. Because the α -1,2-galactosyltransferase can use both *N*- and *O*-linked sugar chains of glycoproteins as substrates (46), there is no need to supply an exogenous acceptor.

Compared with the wild type cells, 50% of the cells harboring the *gma12*⁺ and *hUGT2* were stained by α -galactose-specific-lectin conjugated FITC (46). This result indicated that *hUGT2* is functional in *S. cerevisiae*, which suggested that it would be useful for our investigation.

The production of a mammalian-type sugar chain in *S. cerevisiae* will be accomplished by the coordinated co-expression of components described in this review. When we have successfully altered the biosynthetic pathway of yeast toward the production of mammalian-type glycan by this approach, our system will offer economic production of glycoproteins and hold great potential for the application of glycoprotein therapeutics.

クセプターとして用いることができる。*N*-アセチルグルコサミン付加反応と同様に、*in vivo*でガラクトースを付加するためには、 β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼをゴルジの内腔に発現させ、かつ酵素の基質を輸送するUDP-Galトランスポーターを発現させることが必要である。哺乳類の β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼIは最もよく研究されているガラクトース転移酵素のひとつである。ヒトの β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼをそのまま(36)、あるいはヒトの β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の触媒部位のN末端に、酵母 α -1,2-マンノシルトランスフェラーゼ(*MNT1*)の膜貫通領域を融合するように構築したキメラ遺伝子を出芽酵母に発現させた例(37)が報告されている。発現した融合タンパク質はゴルジ体に存在し、ヒト β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有することが報告されている(37)。我々は酵母*OCH1*の膜貫通領域との融合タンパク質として発現させ、同様の結果を得ている。

UDP-ガラクトーストランスポーターに関しては、出芽酵母においてUDP-ガラクトース輸送活性が存在すること、およびその分子がゴルジ体に存在することを報告している(38)が、その遺伝子はまだ同定されていない。一方、ヒト(39)と分裂酵母(40-43)ではUDP-ガラクトーストランスポーターの遺伝子がクローニングされている。ヒトのUDP-ガラクトーストランスポーター(*hUGT2*)は出芽酵母で活性を有した形で発現させることができ、*in vitro*での輸送活性もヒトの膜画分のものと同等の比活性・ K_m を示していた。つまり*hUGT2*は調節タンパク質ではなく、トランスポーターをコードしていることが証明されている(44,45)。

ところで、この*hUGT2*が酵母内(*in vivo*)でUDP-ガラクトース輸送活性を有している証明はされていなかった。実際に糖ヌクレオチドトランスポーターが働く際には、糖転移反応後に生産されるUMPが対向輸送されるものと考えられている。つまり、*in vivo*での*hUGT2*の機能を見るためには、糖転移酵素とそのアクセプター基質が必要なのである。我々はUDP-ガラクトーストランスポーターを解析するためのツールとして、出芽酵母に分裂酵母由来の α -1,2-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子(*gma12*⁺)を導入し、発現させた。この酵素は基質として出芽酵母の*N*-と*O*-結合型の糖タンパク質を利用できるため(46)、アクセプターを外から供給する必要がない。

遺伝子を導入しない出芽酵母に対し、*gma12*⁺と*hUGT2*を共発現させた細胞集団の50%ほどの細胞壁が、FITCを結合した α -Galを認識するレクチンにより染色された(46)。この結果から、*hUGT2*は出芽酵母内でも正常に機能するものと考えられ、我々の研究で有効なツールになりうることが示唆された。

これまで述べてきたツールを組み合わせで発現させることにより、哺乳類型の糖鎖生産が出芽酵母で可能になると考えられる。この技術が利用可能になった暁には、安価な糖タンパク質を生産できるようになり、医療への応用が期待される。

References

1. Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L., and Jackson, B. J. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 915–944
2. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631–664
3. Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J., and Jigami, Y. (1992) *EMBO J.* **11**, 2511–2519
4. Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y., and Jigami, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26338–26345
5. Odani, T., Shimma, Y., Tanaka, A., and Jigami, Y. (1996) *Glycobiology* **6**, 805–810
6. Wang, X.-H., Nakayama, K., Shimma, Y., Tanaka, A., and Jigami, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18117–18124
7. Yip, C. L., Welch, S. K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J., and MacKay, V. L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2723–2727
8. Nakayama, K., Nakanishi-Shindo, Y., Tanaka, A., Haga-Toda, Y., and Jigami, Y. (1997) *FEBS Lett.* **412**, 547–550
9. Nagasu, T., Shimma, Y., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K., Suzuki, K., and Jigami, Y. (1992) *Yeast* **8**, 535–547
10. Jigami, Y., and Odani, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 335–345
11. Ballou, C. E. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 440–470
12. Natowitz, M. R., Chi, M.-M. Y., Lowry, O. H., and Sly, W. S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4322–4326
13. Kornfeld, S. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307–330
14. Nakayama, K., Feng, Y., Tanaka, A., and Jigami, Y. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 255–262
15. Ballou, C. E., Kern, K. A., and Raschke, W. C. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 4667–4673
16. Karson, E. M., and Ballou, C. E. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6484–6492
17. Odani, T., Shimma, Y., Wang, X.-H., and Jigami, Y. (1997) *FEBS Lett.* **420**, 186–190
18. Moremen K.W., Trimble, R.B., and Herscovics, A. (1994) *Glycobiology* **4**, 113–125
19. Yoshida, T., and Ichishima, E. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 159–162
20. Herscovics, A., Schneikert, J., Athanassiadis, A., and Moremen, K.W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9864–9871
21. Lal, A., Schutzbach, J. S., Forsee, W. T., Neame, P. J., and Moremen, K.W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9872–9881
22. Tremblay, L. O., Campbell Dyke, N., and Herscovics, A. (1998) *Glycobiology* **6**, 585–595
23. Camirand, A., Heysen, A., Grondin, B., and Herscovics, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15120–15127
24. Inoue, T., Yoshida, T., and Ichishima, E. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1253**, 141–145
25. Fujita, A., Yoshida, T., and Ichishima, E. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 779–783
26. Pelham, H.R. (1988) *EMBO J.* **7**, 913–918
27. Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (1990) *Nature* **348**, 162–163
28. Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean N., and Pelham, H. R. (1990) *Cell* **61**, 1349–1357
29. Yoshida, S., Suzuki, M., Yamano, S., Takeuchi, M., Ikenaga, H., Kioka, N., Sakai, H., and Komano T. (1999) *Glycobiology* **9**, 53–58
30. Abeijon, C., Robbins, P. W., and Hirschberg, C. B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5963–5968
31. Abeijon C., Mandon, E.C., Robbins, P.W., and Hirschberg, C.B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8851–8854
32. Bossuyt X., and Blanckaert, N. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 981–988
33. Roy, S. K., Chiba, Y., Takeuchi, M., and Jigami, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13580–13587
34. Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M., and Kawakita, M. (1999) *J. Biochem.* **126**, 68–77
35. Tan, J., D'Agostro, A. F., Bendiak, B., Reck, F., Sarker, M., Squire, J. A., Leong, P., and Schachter, H. (1995) *Eur. J. Biochem.* **231**, 317–328
36. Krezdorn, C. H., Watzele, G., Kleene, R. B., Ivanor, S. X., and Berger, E. G. (1993) *Eur. J. Biochem.* **212**, 113–120
37. Schwientek, T., Narimatsu, H., and Ernst, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3398–3405
38. Roy, S. K., Yoko-o, T., Ikenaga, H., and Jigami, Y. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2583–2590
39. Yoko-o, T., Roy, S. K., and Jigami, Y. (1998) *Eur. J. Biochem.* **257**, 630–637.
40. Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S., and Kawakita, M. (1996) *J. Biochem.* **120**, 1074–1078
41. Miura, N., Ishida, N., Hoshino, M., Yamauchi, M., Hara, T., Ayusawa, D., and Kawakita, M. (1996) *J. Biochem.* **120**, 236–241
42. Tabuchi, M., Tanaka, N., Iwahara, S., and Takegawa, K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 121–125
43. Yoshioka, S., Sun-Wada, G. H., Ishida, N., and Kawakita, M. (1997) *J. Biochem.* **122**, 691–695
44. Berninsone P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., and Hirschberg, C. B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12616–12619
45. Sun-Wada, G. H., Yoshioka, S., Ishida, N., and Kawakita, M. (1998) *J. Biochem.* **123**, 912–917
46. Kainuma, M., Ishida, N., Yoko-o, T., Yoshioka, S., Takeuchi, M., Kawakita, M., and Jigami, Y. (1999) *Glycobiology* **9**, 133–141
47. Dole, K., Liperi, F., Herscovics, A., and Howell, P. L. (1997) *J. Struct. Biol.* **120**, 69–72
48. Chiba, Y., Suzuki, M., Yoshida, S., Yoshida, A., Ikenaga, H., Takeuchi, M., Jigami, Y., and Ichishima, E. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 26298–26304

Received on April 24, 2001, accepted on June 14, 2001

Profile of the Authors

Ken-ichi Nakayama graduated from the Hokkaido University in 1985 and obtained his Ph.D. in Applied Biochemistry from the University of Tsukuba in 1999. He worked as a researcher at the National Chemical Laboratory for Industry (NCLI) and National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH) from 1987 to 1994, and as a senior researcher at NIBH and Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB) at the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) from 1995 to present. He has been studying the glycosyltransferase and sugar structure in yeast.

★★★★★★★★

Yasunori Chiba graduated Tohoku University in 1989 and received Ph.D in 1994 from the Faculty of Agriculture, Tohoku University. He worked as a JSPS fellow at the Laboratory of Molecular Enzymology, Tohoku University from 1994 to 1996, as a postdoctoral fellow at the Glycotechnology Group of Central Laboratory for Key Technology, KIRIN Brewery from 1996 to 1999, as a NEDO fellow at National Institute of Bioscience and Human-technology (NIBH) from 1999 to 2001. Since 2001 he has been a research scientist at National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). He has been trying the establishment of mammalian glycosylation system in yeast to produce therapeutic glycoproteins.

★★★★★★★★

Dr. Yoshifumi Jigami graduated from the University of Tokyo in 1970 and obtained his Ph.D. in Applied Microbiology from the University of Tokyo in 1975.

He worked as a Researcher at the National Chemical Laboratory for Industry (NCLI) from 1976 to 1986, as a Head of Gene Engineering Laboratory at the NCLI and at the National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH) from 1986 to 1995, as a Director of Molecular Biology Department at the NIBH from 1995 to 1996, as a chief senior researcher at the NIBH from 1996 to 1999, as a deputy director-general at the NIBH from 1999 to 2001, and as a director of Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB) at the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) from 2001 to present. He is also a Professor of Graduate School of Life and Environmental Sciences at the University of Tsukuba from 1991 to present.

His major research interest is the analysis of yeast cell wall biosynthesis to elucidate the function of carbohydrates attached to cell surface glycoproteins and its application for industry to establish a sugar chain remodeling technology for the production of human compatible therapeutic glycoproteins by yeast.