

カイコーバキュロウイルス発現系で産生された組換えタンパク質のN型糖鎖修飾の加工

諸熊, 大輔

<http://hdl.handle.net/2324/2236287>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

氏名	諸熊 大輔			
論文名	Engineering of N-Glycosylation of Recombinant Proteins Produced in Silkworm-Baculovirus Expression System (カイコ-バキュロウイルス発現系で産生された組換えタンパク質のN型糖鎖修飾の加工)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	日下部 宜宏
	副査	九州大学	教授	飯田 弘
	副査	九州大学	教授	伴野 豊

論文審査の結果の要旨

本論文は、医薬品などに広く利用されている組換えタンパク質について、カイコ-バキュロウイルス発現系で生産した組換え糖タンパク質の N-結合型糖鎖を昆虫のパウチマンノース型構造から哺乳類の複合型構造に変換することを目的とし、その研究のために必要なモデル糖タンパク質の開発とカイコ培養細胞の糖鎖修飾経路の改変による複合型構造の形成、エンドグリコシダーゼを用いた *in vitro* での糖鎖構造の改変を試みたものである。

タンパク質の糖鎖修飾は真核生物で広く保存された翻訳後修飾の一つであり、タンパク質の安定性や生理活性、タンパク質間の相互作用などに重要な役割を果たしている。バキュロウイルス発現系は、真核生物由来の組換えタンパク質を大量生産する方法として広く知られているが、カイコなどの昆虫を宿主とするため、哺乳類とは異なる構造の N-型糖鎖修飾が行われており、ヒトに投与する医薬品などの生産には不向きであると考えられている。

本研究では、まず、昆虫細胞での糖鎖構造の改変を評価するためのモデル糖タンパク質として、ヒト $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質 ($\alpha 1$ AGP) に着目し、カイコ-バキュロウイルス発現系で発現、精製した後、糖鎖構造解析を行った。また、 $\alpha 1$ AGP のアミノ酸配列を削り込み、人工的な糖鎖結合サイトを加えた $\alpha 1$ AGP Δ を開発し、本タンパク質が、組換え分泌型糖タンパク質の研究に有効であることを明らかにした。

次に、複合型糖鎖の形成に必要であり、かつ、昆虫細胞では発現が認められない哺乳類由来糖転移酵素群の導入を行い、昆虫の分泌修飾経路の改変を試みた。また、GlcNAc の分岐型糖鎖の付加効率の向上を図るために、昆虫細胞特異的に作用する GlcNAc 分解酵素である FDL 活性を抑制した。カイコ培養細胞に種々のヒト由来糖転移酵素を導入した安定発現株を作製し、さらに RNAi 法により、FDL をノックダウンした上で、モデルとなる組換え糖タンパク質を発現させたところ、糖タンパク質の分子量の変化が確認された。また、糖鎖構造を解析した結果、昆虫型構造から複合型構造などへの変化が観察され、組換えカイコ培養細胞において、糖鎖修飾経路が改変されていることを明らかにした。

最後に、上記とは異なるアプローチとして、N-結合型糖鎖に対して加水分解活性と転移活性の両方を持つエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) を用いた糖鎖のリモデリングに注目した。まず、*Streptococcus pyogenes* 由来の EndoS をカイコ-バキュロウイルス発現系で生産し、特定の糖鎖に対する加水分解活性を確認した。次に、活性部位に変異を導入した EndoS 変異体のカイコ-バキュロウイルス発現系を用いた大量生産システムを確立し、本酵素の加水分解活性の抑制と *in vitro* での糖鎖リモデリング活性を確認した。さらに、昆虫型の糖鎖を効率よく切断するための

ツールとして、カイコ由来の ENGase (EndoBm) を発現、精製し、加水分解活性の評価を行った。その結果、カイコ由来の糖鎖構造に対して切断活性をもつことを示した。

以上要するに、本論文は、カイコバキュロウイルス発現系で生産した組換え糖タンパク質の N-結合型糖鎖の解析に非常に有用な研究ツールを開発し、これを活用して、カイコ培養細胞における哺乳類型糖鎖への改変を実証した。また、ENGase による糖鎖のリモデリングの有効性も明示したもので、昆虫ゲノム科学、特に昆虫を用いた有用糖タンパク質生産システムの高機能化とその基盤となる分子機構の理解に寄与する優れた業績である。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。