

## Study on the mucin-type O-glycosylation pathway in the silkworm *Bombyx Mori*

森尾, 明大

<https://hdl.handle.net/2324/7157388>

---

出版情報 : Kyushu University, 2023, 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 : 森尾 明大

論文題名 : Study on the mucin-type O-glycosylation pathway in the silkworm *Bombyx Mori* (カイコにおけるムチン型 O 結合型糖鎖形成機構の解明)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

カイコは鱗翅目におけるモデル生物として研究で利用されていると共に、近年ではバキュロウイルスを用いた有用タンパク質生産の宿主として産業面でも用いられている。カイコ-バキュロウイルス発現系（以下、*silkworm-BEVS* と表記）においては、広く産業利用されている大腸菌を用いた発現系とは異なり、比較的ヒトに近い翻訳後修飾が起こることが確認されている。種々存在するタンパク質の翻訳後修飾の中でも糖鎖修飾はタンパク質の安定性や分泌機構に大きく寄与することが報告されており、付加される糖鎖はタンパク質への結合様式の違いにより主に N 結合型と O 結合型に大別される。*silkworm-BEVS* をタンパク質発現系として産業利用してゆくに当たり、生産されるタンパク質の品質をコントロールするために、付加される糖鎖構造や修飾メカニズムの解明は必須であるが、カイコにおいては N 結合型糖鎖についてのみ知見が蓄積されているのが現状である。よって、本研究では、*silkworm-BEVS* によって生産されるタンパク質に付加されている O 結合型糖鎖の構造を液体クロマトグラフィー質量分析法（以下、*LC-MS* と表記）を用いてプロファイリングすると共に、O 結合型糖鎖を形成する糖転移酵素の機能解析を実施することにより主要な O 結合型糖鎖形成メカニズムを解明した。

始めに、内在性タンパク質すべてに付加されている O 結合型糖鎖の挙動を追うのは困難であるため、糖鎖構造解析に用いるためのモデルタンパク質の作成を目的として、複数の糖タンパク質のスクリーニングを実施した。培養細胞における発現量および糖鎖付加の有無の確認を実施し、*proteoglycan 4*（以下、*PRG4* と表記）が発現量に優れると共に多数の O 結合型糖鎖が付加されていることが確認され、モデルタンパク質として選定された。また、*silkworm-BEVS* を用いて作製された O 結合型糖鎖切断酵素の活性評価においても *PRG4* はモデルタンパク質として十分に機能しており、O 結合型糖鎖のレポーターとして申し分ないことが確認された。

次に、*LC-MS* を用いた O 結合型糖鎖構造のプロファイリングおよびムチン型 O 結合型糖鎖の形成起点となる構造 (*GalNAc1-Ser/Thr*) を形成する糖転移酵素 *N-acetylgalactosaminyltransferase*（以下、*PGANT* と表記）の機能解析を実施した。*LC-MS* を用いた解析においては、単糖 (*GalNAc* or *GlcNAc1-Ser/Thr*) および二糖 (*Galβ1-3GalNAc1-Ser/Thr*) が主要な構造として検出され、ヒトと比べ比較的短い糖鎖構造が付加されていることが確認された。また、糖転移酵素 *PGANT* に関しては、ヒトやショウジョウバエが持つ *PGANT* と類似の機能を持つと推定される遺伝子が 9 つ (*PGANT 1-9*) 確認された。培養細胞において各遺伝子をノックダウンし機能を確認したところ、カイコにおいては *PGANT2* のみが糖転移酵素としての機能を示した。また、培養細胞を用いた局在解析においても、*PGANT2* はゴルジ体に存在していることが確認された。

加えて、もう一つの主要構造である二糖 (*Galβ1-3GalNAc1-Ser/Thr*) を形成する糖転移酵素 *core 1 β1-3galactosyltransferase*（以下、*T-synthase* と表記）の機能解析を実施した。カイコにおいては、スプライシングバリエーションとして 5 つの遺伝子が存在しており、左記から 4 つのアイソフォーム（以下、*isoform 1-4*）が確認された。培養細胞を用いて各 *isoform* の局在および糖転移活性を確認した

ところ、**isoform 1/2** がゴルジ体に局在し、糖転移活性を示した。更に、**in vivo** での各 **isoform** の挙動を確認するために **T-synthase** ノックアウトカイクを作製すると共に、タンパク質中の各ドメインの糖転移活性への寄与を確認するために一部のドメインを欠失した変異体を用意した。ノックアウトカイクにおいても **isoform 1/2** は活性を示すと共に、**stem** と呼ばれるドメインが糖転移活性に重要な働きを持っていることが確認された。

以上の結果より、**silkworm-BEVS** で生産されるタンパク質に付加される **O** 結合型糖鎖の構造および主要な構造である単糖/二糖を形成する糖転移酵素の機能が明らかとなった。これらの成果は、**silkworm-BEVS** を用いて作製されるタンパク質の品質コントロールという面に大きく寄与し、医薬品や診断薬などに用いられるタンパク質の有用な発現系としての利用が進むであろう **silkworm-BEVS** の産業的価値を高めるものと考えられる。