

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 名	Study on the mucin-type O-glycosylation pathway in the silkworm <i>Bombyx Mori</i> (カイコにおけるムチン型 O 結合型糖鎖形成機構の解明)			
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	准教授	沖野 望
	副 査	九州大学	准教授	李 在萬
	副 査	九州大学	准教授	門 宏明

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

カイコ・バキュロウイルス発現系 (silkworm-BEVS) は、有用タンパク質の生産システムとして産業利用が進んでいる。本発現システムでは、広く利用されている大腸菌を用いた発現系とは異なり、ヒトに近い翻訳後修飾が起こることが確認されている。多様なタンパク質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 で生産した組換えタンパク質を産業利用、特に医療利用するに当たっては、生産されるタンパク質の品質制御が重要であり、付加される糖鎖構造や修飾メカニズムの解明が必須である。一方、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。そこで、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 (LC-MS) 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を解析することにより、カイコにおける O 結合型糖鎖形成機構を解明した。

まず、多様な内在性タンパク質に付加されている O 結合型糖鎖の挙動を網羅的に解析することは困難であるため、糖鎖構造解析に用いるためのレポータータンパク質を作製した。複数の糖タンパク質を用いて、培養細胞における発現量および付加される O 結合型糖鎖の量を解析した結果、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を確認した。

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 (PGANT) の機能解析を行なった。LC-MS 解析では、単糖 (GalNAc or GlcNAc1-Ser/Thr) および二糖 (Galβ1-3GalNAc1-Ser/Thr) がカイコ由来 O 結合型糖鎖の主要構造として検出され、ヒトと比較して短い糖鎖構造が付加されていることを確認した。また、タンパク質のセリンあるいはスレオニン側鎖に 1 つ目の単糖を付加する糖転移酵素 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カイコゲノム中に 9 つ確認されたが、培養細胞を用いた各遺伝子の機能阻害実験により、PGANT2 のみが糖転移酵素としての機能していることを明らかにした。

さらに、二糖 (Galβ1-3GalNAc1-Ser/Thr) を形成する糖転移酵素 core 1 β1-3galactosyltransferase (T-synthase) の機能解析を行なった。カイコにおいては、当該遺伝子に 5 つのスプライシングバリエーションが存在しており、4 つのアイソフォーム (以下、isoform 1-4) の存在を確認した。各 isoform の局在および糖転移活性を解析した結果、isoform 1/2 がゴルジ体に局在し、糖転移活性を

示した。更に、個体における各 isoform の役割を解析するために T-synthase ノックアウトカイコを作製した。T-synthase ノックアウトカイコは、致死性を示さなかったことから、一部のドメインを欠失した変異体を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、タンパク質中の各ドメインの糖転移活性への寄与を解析した。その結果、ノックアウトカイコにおいても isoform 1/2 が活性を有すること、stem ドメインが糖転移活性に重要な働きを持っていることを明らかにした。

以上要するに、本論文は、silkworm-BEVS で生産されるタンパク質に付加される O 結合型糖鎖の構造を明らかにし、主要な構造である単糖/二糖を形成する糖転移酵素を同定した。また、当該糖転移酵素 core 1 β 1-3galactosyltransferase の機能を詳細に明らかにしたもので、昆虫ゲノム科学、特に silkworm-BEVS を用いて作製されるタンパク質の品質向上に大きく寄与し、医薬品や診断薬用組換えタンパク質発現系として silkworm-BEVS の実用化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。