

Engineering of N-Glycosylation of Recombinant Proteins Produced in Silkworm-Baculovirus Expression System

諸熊, 大輔

<https://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

論文題名：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)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

近年、医薬品などに広く利用されている組換えタンパク質の多くが N-型糖鎖修飾を受けた分泌性糖タンパク質である。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 (BES) 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。そのため、本研究では、カイコ-BES 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シマンノース型から哺乳類の複合型構造に改変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、そして、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。

まず、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) をカイコ-BES で発現、精製し、糖鎖構造などの解析を行なった。また、 $\alpha 1$ AGP のアミノ酸配列を削り、人工的な糖鎖結合サイトを加えた $\alpha 1$ AGP Δ を開発し、精製および特性の評価を行なった。

昆虫の分泌、修飾経路には複合型糖鎖の形成に必要な GlcNAc に特異的に作用する分解酵素 FDL が存在し、さらにヒトなど哺乳類で見られるいくつかの糖転移酵素が発現していない。そこでカイコ培養細胞にヒト由来の糖転移酵素を導入した安定発現株を作成し、さらに RNAi 法により、FDL をノックダウンした上で、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、糖鎖修飾経路改変の効果が確認された。

次に、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 (ENG'ase) を用いた糖鎖のすげ替え (リモデリング) に注目した。まず、*Streptococcus pyogenes* 由来の EndoS をカイコ-BES で生産し、特定の糖鎖に対する加水分解活性を確認した。そして、活性部位に変異を入れた EndoS 変異体を作成し、加水分解活性の抑制を確認したのち、*in vitro* での糖鎖リモデリング反応に使用可能であることを確認した。加えて、昆虫型の糖鎖を切断するためのツールの開発として、カイコ由来の ENG'ase (EndoBm) を発現、精製し、加水分解活性の評価を行なった。その結果、カイコ由来の糖鎖構造に対して活性をもつ可能性を見出した。

以上の結果より、カイコ-BES における糖鎖改変研究について、有用な糖タンパク質ツールを開発し、これを活用して、カイコ培養細胞における糖鎖改変を確認できた。また、カイコ-BES で生産した ENG'ase による糖鎖のすげ替え反応にも成功し、昆虫型糖鎖を切断するための新規 ENG'ase の可能性も見出すことができた。