

氏名	いわもと しんいち <b>岩本 慎一</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第844号
学位授与の日付	平成29年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>昆虫細胞における N-結合型糖鎖プロファイリングに関する研究</b>
審査委員	(主査)准教授 小谷英治 教授 森 肇 教授 原田繁春

## 論文内容の要旨

昆虫細胞-バキュロウイルス発現系には、大腸菌の系とは異なり、リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾を伴ったタンパク質を生産できる長所がある。しかし、一般的に昆虫細胞で発現したタンパク質には、少マンノース型と呼ばれる比較的低質量で単純な構造の N-結合型糖鎖が見られるが、ほ乳類のタンパク質では、高マンノース型、ハイブリッド型、そしてコンプレックス型と多様であり、相対的に高質量のものが多く。このような修飾糖鎖構造の違いは、発現タンパク質の機能や、免疫原性に影響する可能性がある。昆虫細胞におけるタンパク質糖鎖修飾機構の解明とその制御は、高品質なバイオ医薬品を開発していく上での課題でもあるが、これまでに昆虫細胞で発現したタンパク質の修飾糖鎖プロファイリングは明らかになっていない。本研究では、昆虫細胞における糖鎖修飾機構解明へのアプローチとして、二種類の昆虫細胞で発現したタンパク質の修飾糖鎖の構造を、MALDI-TOFMS を用いた質量分析により比較した。

本論文は、四章から構成されており、第一章では、緒論として、最新バイオテクノロジーにおけるタンパク質発現系の重要性と、昆虫細胞タンパク質発現系の問題点について述べている。また、本研究のモデルタンパク質として用いた、鳥類に感染するニューカッスル病ウイルス (NDV) のヘマグルチニン- ノイラミニダーゼ (HN) および融合タンパク質 (F) の、感染過程での役割や、抗原としての重要性についても述べている。

第二章では、カイコ由来およびヨトウガ由来細胞に感染するハイブリッドバキュロウイルスを用いて発現させた HN および F タンパク質の検出および単離について詳述した。

第三章では、電気泳動で単離した両タンパク質から酵素的に分離した糖鎖についての、MALDI-TOFMS による分析について詳述した。ヨトウガ細胞の発現タンパク質には、11 糖である Man9GlcNAc2 が最大量に含まれていたが、カイコ細胞の場合 Man5GlcNAc2 や Man6GlcNAc2 の割合が高くなった。このように、同じタンパク質でも細胞によって N-結合型糖鎖の修飾パターンに違いのあることがわかった。さらに、両細胞の発現タンパク質において、糖鎖合成過程における中間体と考えられるグルコース残基を一つまたは二つ結合した Glc(n)Man9GlcNAc2 が検出され、細胞によってその修飾糖鎖の量に違いが見られた。このようなグリコシル化高マンノース型糖鎖のパターン変化は、特にタンパク質の構造や安定性、さらに

機能にも関与することが示唆された。

こうした知見をもとに第四章では、総合的な考察として、異なる細胞における N-結合型糖鎖の修飾の違いにもとづく昆虫細胞の糖鎖修飾機構について論じた。さらに、異なる昆虫細胞の糖鎖修飾機構の違いによって、発現するタンパク質の構造や性質に違いのあることも見出した。したがって、昆虫細胞発現系によるタンパク質生産の過程における、MALDI-TOFMS のような簡便法による糖鎖プロファイリング比較の重要性について示した。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文は、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系において産生したタンパク質における特徴的な N-結合型糖鎖の付加パターンを分析した結果を報告している。昆虫細胞-バキュロウイルス発現系において産生したタンパク質には、リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾が起るといわれてきたが、付加された糖鎖の分析はあまり行われてこなかった。タンパク質医薬品などでは、糖鎖修飾における違いがアレルギーの原因となる可能性もあり、近年タンパク質の糖鎖付加の正確性が問題視されるようになってきている。そこで本研究では、昆虫細胞における糖鎖修飾機構解明へのアプローチとして、二種類の昆虫細胞で発現したタンパク質の修飾糖鎖の構造を MALDI-TOFMS を用いた質量分析により比較した。モデルタンパク質として、養鶏業の脅威とされる鳥類感染性のニューカッスル病ウイルス (NDV) のエンベロープの膜タンパク質、すなわちヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN) および融合タンパク質 (F) を用いた。カイコ由来およびヨトウガ由来の培養細胞で発現させた HN および F タンパク質の N-結合型糖鎖を、MALDI-TOFMS により分析したところ、同じタンパク質でも細胞によって N-結合型糖鎖の修飾パターンに違いのあることが示された。両細胞の発現タンパク質において、タンパク質の構造や安定性、さらに機能にも関与すると考えられるグリコシル化高マンノース型糖鎖が見られることも、昆虫細胞発現系の特徴であった。このような結果から、昆虫細胞発現系によるタンパク質生産の過程において、MALDI-TOFMS のような簡易な方法で糖鎖プロファイリングを比較することの重要性を本論文は指摘している。このように本論文の内容は、新しい視点から昆虫細胞の特性を追求したものであり、得られた興味深い新規な知見は、今後のバイオ医薬品の開発における昆虫細胞の利用に関して非常に重要である。

申請者は、本論文を作成するにあたり、以下の三編の基礎論文の内容を基にしている。このうち一編では筆頭著者であり、二編では責任著者である。また、以下の二編の参考論文の技術に基づいて研究が進められた。

### 基礎論文

1. Shinichi Iwamoto, Mervyn Liew Wing On, Lye Ping Ying, Suriani Mohd Noor, Keiko Takaki, Eiji Kotani. Mass spectrometric profiling of N-linked glycan of recombinant Newcastle disease virus F and HN proteins produced by insect cell expression system. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* Vol. 86, 2017, in press (申請者が責任著者)
2. Yuki Ohta, Shinichi Iwamoto, Shin-ichirou Kawabata, Ritsuko Tanimura and Koichi

Tanaka. Salt tolerance enhancement of liquid chromatography-Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionization-Mass Spectrometry using matrix additive methylenediphosphonic acid. Mass Spectrometry, Vol.3, A0031, 2014 (申請者が責任著者)

3. Takashi Nishikaze, Shin-ichirou Kawabata, Shinichi Iwamoto and Koichi Tanaka. Reversible hydrazide chemistry-based enrichment for O-GlcNAc-modified peptides and glycopeptides having non-reducing GlcNAc residues. Analyst, Vol. 138 (23), pp. 7224-7232, 2013

#### 参考論文

1. Kaoru Kaneshiro, Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Sadanori Sekiya and Koichi Tanaka. Highly sensitive MALDI analyses of glycans by a new aminoquinoline labeling method using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid liquid matrix. Analytical Chemistry, Vol.83 (10), pp.3663-3667, 2011

2. Kaoru Kaneshiro, Makoto Watanabe, Kazuya Terasawa, Hiromasa Uchimura, Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Taka-Aki Sato, Kazuharu Shimizu, Gozoh Tsujimoto and Koichi Tanaka. Rapid quantitative profiling of N-glycan by the glycan-labeling method using 3-aminoquinoline/ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Analytical Chemistry, Vol. 84 (14), pp. 7146-7151, 2012

このように、申請者は学位認定に十分な業績および学識を持ち、申請期間内での基礎論文の公表も行っていることから、申請者に学位を授与することを審査員全員が認めた。