

題目：

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

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

バイオテクノロジー専攻

平成27年秋入学

岩本 慎一

論文の要約：

昆虫細胞-バキュロウイルス発現系による有用タンパク質生産が広く行われている。多くの場合、昆虫細胞にはヨトウガやカイコ由来の細胞が、発現ベクターにはバキュロウイルス科の核多角体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus, NPV) が用いられる。

昆虫細胞-バキュロウイルス発現系は、大腸菌の発現系とは異なり、リン酸付加や糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けたタンパク質を生産することができる。タンパク質の構造や機能は、遺伝子情報から翻訳されたアミノ酸配列のみで決まるものではなく、翻訳後修飾、特に糖鎖修飾が密接に関係している。

しかし、昆虫細胞による糖鎖修飾は、哺乳類の糖鎖修飾とは特徴が異なる。昆虫の *N*-結合型糖鎖において、少マンノース型や高マンノース型とよばれる比較的単純な構造の糖鎖が主に見られるが、哺乳類においては、高マンノース型に加えて、ハイブリッド型、コンプレックス型と、様々な構造の糖鎖が多く見られる。また、フコースの付加についても昆虫独特の結合様式を示すことがある。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。したがって、昆虫細胞発現系における糖鎖修飾機構の解明とその制御は、特にバイオ医薬品の開発などにおいて重要な課題と言える。

本研究では、昆虫の糖鎖修飾機構解明へのアプローチとして、異種昆虫細胞に発現させた糖タンパク質の修飾糖鎖解析を行った。モデル糖タンパク質としては、鳥類に感染するニューカッスル病ウイルス (NDV) のエンベロープに、スパイク状に存在する膜糖タンパク質、ヘماغグチニンノイラミナーゼ (Hemagglutinin-neuraminidase, HN) と融合タンパク質 (Fusion protein, F) を用いた。

通常、NPV は宿主特異性が高い。バキュロウイルスベクターとして最もよく使われる、*Autographa californica* から分離された AcNPV は比較的広い宿主域を示し、ヨトウガ *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf 細胞にも感染するが、カイコ *Bombyx mori* 由来の Bm 細

胞への感染は不完全で、細胞の変化は見られてもウイルスタンパク質の産生にいたらない。また、*Bombyx mori*から分離された BmNPV は、Sf細胞には感染しない。Moriらは、AcNPV と BmNPV のゲノムを交雑して、AcNPV の宿主域をカイコおよび Bm 細胞にまで広げた、宿主拡張型ハイブリッドウイルス HyNPV を開発した。

我々は、組み換え遺伝子として、NDV HN あるいは F をコードする配列に 6×Histidine (His-tag) 配列を付加したものを組み込んだ 2 種類のリコンビナントウイルスペクター、HyNPV NDV HN と HyNPV NDV F を作成した。これらベクターを、カイコ由来の BmN、ヨトウガ由来の Sf21 と、2 種類の培養細胞に別々に接種した。そして、感染細胞から組み換えタンパク質の検出と、質量分析による N-結合型糖鎖プロファイリングをおこなった。

SDS-PAGE と、抗 His-tag モノクローナル抗体を用いた Western blotting の結果から、BmN および Sf21 のどちらの細胞も、リコンビナント HN および F を十分な量発現することが示された。

さらに質量分析 (MALDI-TOFMS) による N-結合型糖鎖プロファイルからは、修飾糖鎖のパターンが宿主細胞の種類ごとに特徴的であることが示された。Sf21 細胞においては、マンノース残基 (Man) が 9 個、N-アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) が 2 個である Man9GlcNAc2 の信号強度が著しく高く、次に Man が 8 個の Man8GlcNAc2、7 個の Man7GlcNAc2 と続いた。Sf21 では、Man が 5 個以下の糖鎖の信号はほとんど検出されず、Man が 9, 8, 7 個の 3 種類に偏った糖鎖プロファイルを示した。一方、BmN 細胞においては、Man が 9 から 5 個まで、Sf21 より多くの種類の糖鎖が、信号強度も特に偏りがなく検出された。同じ細胞種であれば、HN、F によらず糖鎖プロファイルは同じ特徴を示した。

N-結合型糖鎖のプロセッシングは小胞体とゴルジ体において逐次的に起こる。Man 数が 9 個から 8 個までの高マンノース糖鎖は小胞体において生成し、Man 数 8 個以下の糖鎖はゴルジ体に輸送されたのちに生成する。本研究の結果から、Sf21 においては N-結合型糖鎖のプロセッシングのほとんどは小胞体で完結し、一方 BmN においては小胞体に加えてゴルジにおける糖鎖プロセッシングも、相対的に高いレベルで起こっていると考えられた。これらの結果は、Sf21 よりも BmN の方が、より多様な糖鎖修飾を行う哺乳類細胞発現系の N-結合型糖鎖プロセッシングに近づける可能性を示唆しているのかもしれない。

以上