

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658286

研究課題名(和文)次世代医療用糖タンパク質の生産を目指したカイコからヒト型糖鎖創出技術の開拓

研究課題名(英文)Development of humanized sugar chain in silkworm targeting for production of next-generation medical glycoprotein

研究代表者

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：90238246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ハイマンノース型糖鎖から哺乳類細胞の複合型糖鎖に近い糖鎖合成能力を付与するため、カイコの糖鎖合成経路の改変を試みた。RNAサイレンシングによって3種類のN-アセチルグルコサミニダーゼ活性を約60%発現抑制に成功した。糖鎖解析の結果、パウチマンノース型の糖鎖は全体の70%から80%の割合を占め、アセチルグルタミニダーゼ抑制効果は検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to provide an ability to synthesize sugar chains close to the complex type of mammalian cells from high mannose type of silkworm, we tried to modify the sugar chain synthetic pathway of silkworm. The activity of targeting N-acetylglucosaminidase in both Bm 5 cell and silkworm was decreased to 60% compared to control by adopting RNA silencing technology. As a test molecule IgG was expressed, and analyzed sugar chains. The paucimannose sugar chain of IgG accounted for 70% to 80% of the total, which suggests that silencing effect of N-acetylglucosaminidase was not enough to modify sugar chain synthetic pathway of silkworm. These results indicate that N-acetylglucosaminyltransferase may need to modify mannose type to complex type in silkworm.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界能楽・応用分子細胞生物学

キーワード：バイオテクノロジー 糖鎖 タンパク質 昆虫 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

カイコ(蚕)は、哺乳動物細胞と類似した一連の翻訳後修飾が期待でき、天然型分子の立体構造や機能を保持したタンパク質の生産が見込まれる大きな特徴を持つ。しかし、昆虫細胞の糖タンパク質に付加されるN型糖鎖の殆どは、昆虫特有の糖鎖合成経路によって合成されるためトリマンノシルコア(ハイマンノース)型構造を有している。しかし、哺乳動物細胞由来の糖タンパク質が持つ糖鎖は複合(コンプレックス)型で、糖鎖末端にシアル酸が付加されている。

そこで、申請者は各種糖タンパク質やヒト抗体をカイコと昆虫細胞に発現させ、糖鎖パターンと比較を行ったところ、カイコで発現したヒト 1,3*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(h 3GnT)の糖鎖は、昆虫細胞で発現した糖鎖と比べ、複合型に近いことが明らかになった。即ち、カイコで発現したh 3GnT糖鎖パターンは、昆虫細胞とは異なり 1,3-Fuc の非修飾型で、またマンノースコア残基からバイセクティング *N*-acetylglucosamine (*N*-GlcNAc)糖鎖が16.2%、その末端にガラクトース付加糖鎖が21.3%検出された。これらの糖鎖構造がカイコで検出されたのは初めてであり、カイコは昆虫細胞とは違い、哺乳動物細胞の複合型に近い糖鎖合成能力を有することを示す特筆すべき成果である。

昆虫細胞の糖鎖合成系に関する研究は米国ジョンスホプキンス大学の Betenbaugh 教授、ワイオミング大学の Jarvis 教授、日本の免疫研究所を中心に行われているが、これらの研究はカイコではなく昆虫細胞に限りバイセクティング *N*-GlcNAc 構造の複合型糖鎖形成の発見までには至っていない。そこで、カイコでの複合型糖鎖合成系が確立されれば、カイコは、従来では達成し得ない医療用タンパク質の画期的生産用宿主となる。特にフコースの非修飾抗体の生産は、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)の高い次世代抗体医薬の創出が見込まれ、その波及効果は計り知れない。

2. 研究の目的

既に得られた成果に基づき、カイコのパウチマンノース型の生合成経路を欠損させ、バイセクティング *N*-GlcNAc 構造の糖鎖合成系を強化し、また複合型糖鎖生合成経路を導入する。これによって末端にガラクトースが付加されたヒト型糖鎖類似のフコース非修飾バイセクティング *N*-GlcNAc 構造を持つ複合型糖鎖(図1参照)の創出を目標とした。

次世代医療用糖タンパク質の生産を目指し、カイコからヒト型糖鎖の創出を達成すべく、下記の3つの挑戦的糖鎖のヒト型化戦略で研究を推進した。

挑戦1)パウチマンノース型糖鎖の合成経路遺伝子の欠損(図1の 1)

挑戦2)バイセクティング *N*-GlcNAc 構造の糖鎖合成系の強化(図1の 2)

挑戦3)カイコでの複合型糖鎖合成経路の導入(図1の 3)

これによって、カイコから初めて複合型(ヒト型)糖鎖合成が達成できる。

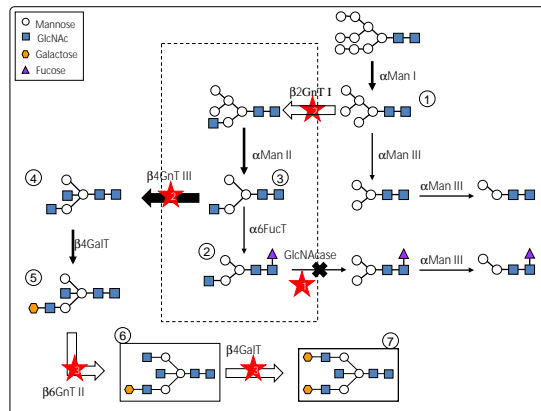


図1. カイコ糖鎖のヒト化。点線内経路は予測である。図中の矢印付近の文字及び印は、それぞれ糖鎖生合成系の酵素及び本研究の挑戦順序を示す。GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GlcNAcase, *N*-acetylglucosaminidase; 2GnT I, 1,2*N*-acetylglucosaminyltransferase I; 4GnT III, 1,4*N*-acetylglucosaminyltransferase III; 6GnT II, 1,6*N*-acetylglucosaminyltransferase II; 4GalT, 1,4-galactosyltransferase; -Man II, -mannosidase II; -Man III, -mannosidase III; -6FucT, -1,6-fucosyltransferase

3. 研究の方法

(1) RNA interference (RNAi) 用プロモーターの選定

本研究では前述のようにバクミド発現系にて *N*-アセチルグルコサミニダーゼの発現抑制を行った。手段としては、RNAi 技術を用いて *N*-アセチルグルコサミニダーゼの発現抑制を試みる。RNAi は、タンパク質発現の選択的かつ一時的なノックダウンを行う技術として、生物学的な研究に関して重要なツールとして認識されている。

本研究では、double-stranded RNA (shRNA) による RNAi を行った。ShRNA は 18~29 塩基の dsRNA 領域と 3~9 塩基の loop 領域を含んでいるヘアピン状に折りたたまれた一本鎖 RNA である。昆虫細胞の遺伝子発現には感染後期に発現をする強力なポリヘドリンプロモーターが用いられるが、感染初期に転写された *N*-アセチルグルコサミニダーゼの mRNA をターゲットとした RNAi によって発現抑制することができない。故に本研究では、ポリヘドリンプロモーターの代わりに 3 種類のプロモーター [immediate-early 2 promoter (IE2 プロモーター)、アクチンプロモーター、U6-2 small nuclear RNA promoter (U6-2 プロモーター)] で shRNA の発現抑制を試みた。

3 種類のプロモーター領域は PCR 法によって増幅しインフュージョン反応を用いて pFastBac™1 に挿入した。

次に、dsRNA の塩基配列をプロモーターの下流に挿入し、構築したプラスミドは DH5 に形質転換し、Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System によって組換え BmNPV バクミドを構築した。Bm5 細胞 1 well あたり 1.6×10^5 の細胞数に組換えウイルスを MOI=1 で感染させ、1 日、2 日、3 日間培養し、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性の経時変化を測定した。カイコの場合、 1.0×10^7 pfu/ml のウイルス液を調製し、その溶液 50 μ l をカイコに注射した。注射を施したカイコは 27%、湿度 65% のインキュベーター内で飼育し、シルクメイト S2 (日本農産、横浜、日本) で飼育した。体液と脂肪体をサンプルとして回収し、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性を測定した。

Bm5 細胞培養液やカイコの体液と脂肪体を回収してカイコ由来 *N*-acetylglucosaminidase (BmFDL)、*N*-acetylglucosaminidase2 (BmNAG2) 活性測定を行った。ネガティブコントロールとして EGFP を用いた。

(2) IgG の発現と糖鎖解析

BmNPV bacmid Cp-Chi⁻/291J6 IgG を U6-2 Promoter/NAG 或いは U6-2 Promoter/FDL と混合してカイコに注射し共発現を行った。カイコから体液を回収後 12000g \times 30 分 (4) で遠心分離を行った後、0.45 μ m フィルターにてろ過し、Protein A カラムによる精製を行った。タンパク質を吸着後溶出バッファー (0.1 M クエン酸ナトリウム、pH3.0) で溶出し、分画回収した。精製後、SDS-PAGE や Wesern Blot を行いで分子量や精製度を確認した。hIgG の定量は ELISA で、糖鎖構造解析は HPLC (逆相 ODS カラム、順相 Amide カラム) により段階的に分離し、MALDI-TOF-MS による質量測定を行い糖鎖構造を同定した。

4. 研究成果

(1) RNA interference (RNAi) 用プロモーターの選定

Bm5 細胞をウイルスに感染させてから 3 日目の *N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性を測定した (図 2)。U6-2 プロモーターを用いたサンプルで最大 61% であった。

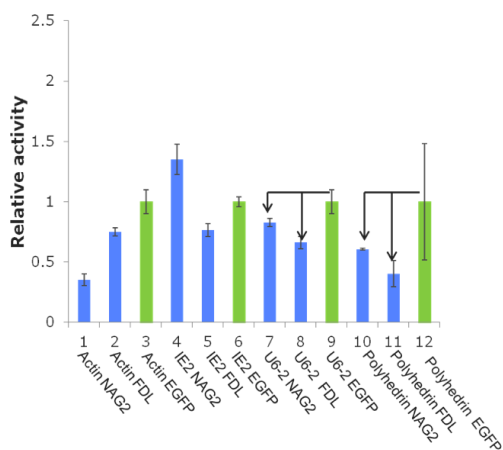


図 2. Bm5 細胞の *N*-アセチルグルコサミニダーゼ相対活性 (培養 3 日後)。それぞれの比活性とネガティブコントロールである EGFP を 1.0 とした相対活性の値を示す。

カイコでは IE-2 プロモーターを用いたサンプルで最大 42%の GlcNAcase 活性の低下を確認した。

カイコの場合、組換えウイルス感染後、2日目の脂肪体、3日目の体液を回収して FDL 及び NAG2 を測定したところ、Actin Promoter、IE2 Promoter での *N*-アセチルグルコサミナーゼ活性の低下を確認した(図3)。特に Actin Promoter では、60%程にまで *N*-アセチルグルコサミナーゼ活性が低下した。

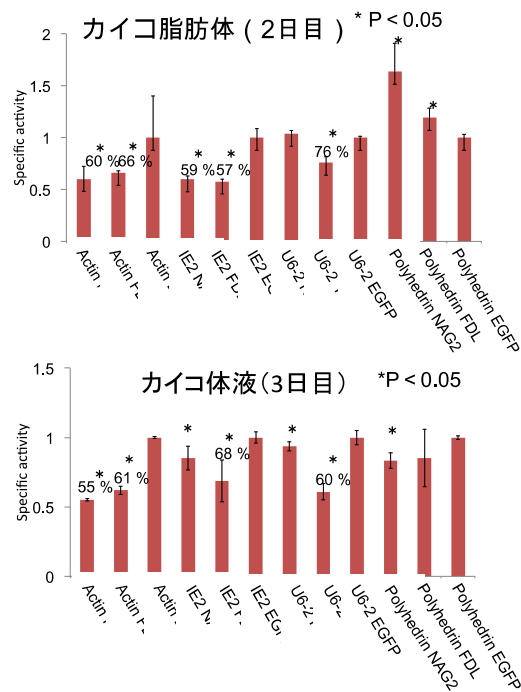


図3 .カイコ脂肪体と体液の *N*-アセチルグルコサミナーゼ活性

Bm5 細胞では U6-2 プロモーターが、カイコでは IE2 プロモーターが有効であることが明らかとなった。総合的に評価して U6-2 Promoter での *N*-アセチルグルコサミナーゼ活性の低下が顕著であると判断できる。

(2) IgG の発現と糖鎖解析

SDS-PAGE とウエスタンブロットの結果、それぞれ Actin promoter/hIgG、IE2 promoter/hIgG、U6-2 promoter/hIgG について、hIgG の重鎖 52kDa のタンパク質が確認された(図4)。また、細胞内 FDL の mRNA 定量

を行ったところ、Actin /FDL、IE2/FDL 及び U6-2/FDL それぞれ 29%、21%及び 42%の mRNA 量が低下した。

糖鎖解析の結果、主にハイマンノース型の糖鎖とパウチマンノース型が多くみられた。特にパウチマンノース型の糖鎖は全体の 70% から 80%の割合を占めている(表1)。また昆虫型糖鎖の特異な特徴としてフコースの付加が挙げられるがその傾向もみられた。レクチンプロットにおいては非還元末端に GlcNAc が付加した糖鎖が存在することが示唆されていたが、糖鎖構造解析においては検出されなかった。

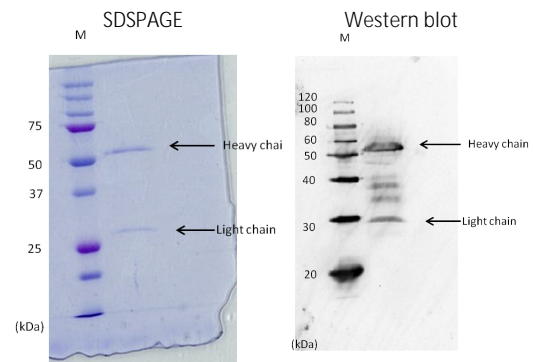


図4 .カイコで発現した IgG の SDS-PAGE 及び Western Blot

表1 IgG に修飾された糖鎖の組成

Actin promoter			
Structures	MS value[M+H] ⁺	Relative quantity(%)	
Man ₂ -6, Fucos1-6, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	1135	65	
Man ₂ -6, Fucos1-6, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA, Man ₂ -3	973	15.4	
Others		19.6	
IE2 promoter			
Structures	MS value[M+H] ⁺	Relative quantity(%)	
Man ₂ -6, Fucos1-6, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	1135	61.5	
Man ₂ -6, Fucos1-6, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA, Man ₂ -3	973	9.9	
Others		28.6	
U6-2 promoter			
Structures	MS value[M+H] ⁺	Relative quantity(%)	
Man ₂ -6, Fucos1-6, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	1135	46.0	
Man ₂ -6, Fucos1-6, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA, Man ₂ -3	973	22.1	
Others		31.9	

カイコのような固体における RNAi 技術はまだ完全ではなく、さらなる遺伝子の改変が必要であることが明らかになった。

本結果を踏まえて、NAG 付加の確率を高め

る目的でヒト由来糖転移酵素である

-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II (h 2GnTII) または -1,4-galactosyltransferase I (h 4GalTI) 遺伝子をカイコで過剰発現させ IgG 発現を行った結果、h 2GnTII を発現した場合、N型糖鎖の還元末端 N-アセチルグルコサミンの付加が認識られたので、今後糖鎖解析を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計4件)

菊田 孝太郎、兼松亜弓、加藤 竜也、近藤幸子、矢木 宏和、加藤晃一、朴 龍洙、カイコ幼虫でのヘアピン型 dsRNA 発現による N-アセチルグルコサミンダーゼの発現制御、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 19 日、広島国際会議場(広島)

兼松亜弓、Deo Vipin Kumar、加藤竜也、朴 龍洙、カイコ細胞及び幼虫での shRNA 発現による N-アセチルグルコサミンダーゼ遺伝子の発現制御、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 25 日、神戸国際会議場(神戸)

Ayumi Kanematsu, Vipin Kumar Deo, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Development of humanized sugar chain in silkworm by silencing N-acetylglucosaminidase gene using RNA interference technique, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2012 年 9 月 18 日、EXCO (Daegu in Korea)

Ayumi Kanematsu, Vipin Kumar Deo, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Suppression of N-acetylglucosaminidase genes in Bombyx mori cells and silkworm larvae by shRNA expression、シーズ&ニーズビジネス マッチング研究発表会ー高齢化社会・健康・食品産業ー、2012 年 12 月 7 日、ホテルアソシア(静岡)

[図書](計1件)

百嶋 崇、朴 龍洙：第 V 編トランスジェニック動物・昆虫・その他 第 2 章 カイコによるヒト型抗体の生産と糖鎖解析、バイオ医薬品製造の効率化と生産機材の開発。監修 山口照英、シーエムシー出版、pp161-164、2012 年 4 月

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biotech/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：90238246

(2)連携研究者

加藤 竜也 (Kato, Tatsuya)

静岡大学・農学研究科・準教授
研究者番号：00397366

碓氷 泰市 (Usui, Taichi)

静岡大学・理事
研究者番号：50111802

加藤 晃一 (Kato, Kouichi)

名古屋市立大学・薬学研究科・教授
研究者番号：20211849