

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04612

研究課題名(和文) 昆虫工場におけるタンパク質糖鎖修飾の解析と改変

研究課題名(英文) Analysis and modification of protein glycosylation in an insect cell expression system

研究代表者

LEE JAEMAN (LEE, JAEMAN)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50404083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：優れた組換え分泌タンパク質発現系として知られている昆虫細胞では、糖鎖付加も起こるが、糖鎖の構造が哺乳類由来細胞とは異なることが知られており、創薬分野では昆虫細胞で発現したタンパク質糖鎖のヒト型化が求められている。

糖鎖修飾にはN型、O型の2種の糖鎖修飾があるが、N型糖鎖については、複数のヒト由来糖転移酵素を導入した昆虫細胞株を作製し、バキュロウイルス発現系により発現した組換え糖タンパク質のヒト型化に部分的にはあるが成功した。また、これまでほとんど知見がなかった昆虫細胞O型糖鎖修飾の第1、第2反応に関わる遺伝子を同定し、その諸性質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質糖鎖の役割については、未解明の部分も多いが、一部は、タンパク質の構造や安定性、生理活性などに重要な役割を果たしていることが報告されている。優れた難分泌性糖タンパク質発現系である昆虫細胞発現系で糖鎖修飾機構の理解が深まり、これを制御できるようになれば、糖鎖の生物学的機能における基礎研究を強力に推進できる上、これまで必要十分な活性を有する組換えタンパク質が生産できないだけの理由で医薬品化されていない難分泌性糖タンパク質の産業利用が可能となる。また、人工糖鎖の付加により、天然型タンパク質を超える活性を有するスーパータンパク質の生産につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Insect cell expression systems are known as excellent systems for secreted protein production with glycosylation modification, although the structure of the sugar chains is different from that of mammalian-derived cells. In the field of drug discovery, there is a need for humanization of protein sugar chains expressed in insect cells. There are two types of sugar chain modification, N-type and O-type, in sugar chain modification. As for the N-type sugar chain, insect cell lines introduced several human-derived glycosyltransferases had been established, and partially succeeded in humanizing the recombinant glycoprotein expressed by the baculovirus expression system. In addition, we identified genes involved in the first and second reactions of the O-type sugar chain modification of insect cells, for which there was almost no knowledge so far, and clarified their properties.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：糖鎖修飾 バキュロウイルス発現系 N型糖鎖 O型糖鎖

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

サイトカインや成長因子、ホルモンなど脊椎動物の血液中に微量存在し、低濃度で生理活性を示すタンパク質や膜結合型受容体、ワクチンおよび診断薬抗原候補タンパク質などは、創薬の格好のターゲットとされているが、これらタンパク質、難分泌性機能ペプチドには組換えタンパク質の生産技術が確立されていないものが多い。また、これらのタンパク質の多くは、産生生物（細胞）に依存した種特異的な糖鎖修飾を受けることが多く、異種の生物を宿主としてタンパク質生産システムを構築する場合、糖鎖構造の相違が問題となることもあり、その制御法の確立が求められている。

バキュロウイルス発現系は、非常に優れた難分泌性機能ペプチド生産系として知られている。この発現系の利点の一つとして、哺乳類に近い修飾、特に糖鎖修飾を受けたタンパク質を得られることが挙げられるが、その構造は同一ではない。糖鎖構造の相違が組換えタンパク質の安定性や活性、抗原性に影響を及ぼす場合があり、創薬分野では昆虫細胞で発現したタンパク質糖鎖のヒト型化が求められている。ここでいう生産技術とは、医薬品市場において採算の取れるコストでの生産が可能であることまでを含むが、加えて、組換えタンパク質が native タンパク質と同等以上の比活性を獲得できない場合もある。このように、組換えタンパク質を製品化するためには求められる基準以上の質・量を提供可能な生産技術が確立されなければならないのが現状である。

分泌性タンパク質の多くは糖鎖修飾を受けているが、糖鎖構造と生理活性や血中安定性の関連については体系だった研究は少ない。また、哺乳類型のタンパク質糖鎖でも、同一細胞中の1つのタンパク質を解析しても異なる構造の糖鎖がついていることもある。タンパク質のどの領域にどのような糖鎖を構築するのかその制御機構も未解明である。これら糖鎖構造の制御原理や機能解析が進まない原因は、簡便な糖鎖構造制御技術の欠如にあり、糖鎖を自由自在にコントロールする技術が確立できれば、糖鎖の生物学的機能における基礎研究を協力的に推進できる上、天然型タンパク質を越える活性を有するスーパータンパク質を生産することも可能となる。

2. 研究の目的

組換えタンパク質の比活性が天然型タンパク質に劣る場合、その化学的な構造が異なることがある。タンパク質を構成するアミノ酸は全ての生物で共通であるが、翻訳後修飾があり、その修飾が生物間で異なる場合が多い。特にタンパク質の糖鎖修飾が問題となることが多いが、昆虫におけるタンパク質糖鎖修飾経路については未解明の部分が多い。哺乳類細胞と同様に、昆虫細胞においてもアスパラギン残基が修飾される N-結合型糖鎖とセリン/スレオニン (S/T) 残基が修飾される O-結合型糖鎖の両方が存在することが確認されている。N-結合型糖鎖については、ヒトを含めた哺乳類では末端がシアル化された複合型糖鎖が形成されるが、昆虫では複合型糖鎖が形成されず、トリマンノシルコア型と呼ばれる小さな構造の糖鎖が多く形成される。そのため、バキュロウイルス発現系でヒト由来の分泌タンパク質を発現させる場合にはヒトと同じ構造の糖鎖が形成されず、創薬や医学研究には適さない場合がある。一方、昆虫の O-結合型糖鎖については、ほとんど報告例がない。

N-結合型糖鎖のプロセッシングは小胞体とゴルジ体に存在する種々の糖転移酵素やグリコシダーゼによって段階的に行われる。両者の経路の前半は共通であり、その分岐点において作用する酵素は、 β -N-acetylglucosaminidase (FDL) である。昆虫では FDL が強く作用し、結果として還元末端側の N-アセチルグルコサミンに3個かそれ以下のマンノース残基が結合したトリマンノシルコア型と呼ばれる小さな構造の N-結合型糖鎖が多く形成される。実際、カイコ培養細胞において RNAi による FDL 阻害を行うと、分泌される糖タンパク質の分子量が大きくなる。哺乳類で見られる N-結合型糖鎖には高マンノース型、混成型、複合型が存在するが、その大部分は複合型糖鎖が占めている。哺乳類の複合型糖鎖はガラクトース転移酵素やシアル酸転移酵素によってさらなる修飾を受け、シアル化複合型糖鎖が形成される。

本研究では、カイコ細胞における2種の糖鎖修飾経路の解明と改変、および糖鎖関連遺伝子導入による昆虫細胞発現タンパク質糖鎖のヒト型化、細胞機能の改変により生じるタンパク質発現量低下を回避するシステムの構築に必要な基盤情報の取得を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、上記目標を達成するために、以下の3項目について研究を実施した。**①** 複数のヒト由来糖鎖修飾酵素を昆虫細胞に導入することによるバキュロウイルス発現系における分泌タンパク質のN-結合型糖鎖のヒト型化、**②** 遺伝子機能解析、特に阻害実験による昆虫O-結合型糖鎖修飾経路の解明、**③** 糖鎖改変により生じるタンパク質分泌量低下や分泌タンパク質難分泌性の分子機構を解析し、これを回避するシステムの構築を試みる。

①と**②**の糖タンパク質の解析においては、解析目的に応じたレポータータンパク質が必要となる。そこで、まず、N-結合型糖鎖構造解析用、O-結合型糖鎖修飾経路解析用、そしてタンパク質分泌量低下の分子機構解明用、それぞれについてレポータータンパク質発現系を構築する。

① N-結合型糖鎖構造解析においては、糖鎖の質量分析用試薬の開発や測定機器の技術革新により必要なタンパク質量は少なくなっている。それでも数百マイクログラムの糖タンパク質が必要なことも多く、当然タンパク質1分子に多くのN-結合型糖鎖が付加されるタンパク質が理想である。そこで、このような標的タンパク質として、天然由来タンパク質であるヒト急性期血清タンパク質 a1AGP 発現系を構築済である。この a1AGP は、推定分子量 23kDa の比較的小さなタンパク質でありながら5つのN-結合型糖鎖付加部位を有している。そこで、これらの部位に加えて、N-結合型糖鎖付加部位のコンセンサス配列 NSTIRV を複数回繰り返した人工遺伝子を合成し、レポータータンパク質としての有効性を検証した。次いで、これらのレポーターを駆使して以下の研究を行った。

N-結合型糖鎖については、哺乳類由来の糖転移酵素群、分岐型 GlcNAc 転移酵素 5 種、ガラクトース転移酵素、シアル酸合成系及び転移酵素 2 種を昆虫培養細胞に遺伝子導入し、レポータータンパク質を用いて、昆虫型糖鎖からヒト型糖鎖への変換を検証した。具体的には、GlcNAc 多分岐構造の構築と GlcNAc 末端へのガラクトース転移を行った。昆虫においては、FDL 阻害によりトリマンノシルコアの2本の分岐鎖に GlcNAc が付加されるが、哺乳類においては最大5本の分岐構造となる。MGAT1 は昆虫にも内在しており、MGAT2 が基本となる2本目の GlcNAc であるため、FDL RNAi と MGAT2 導入を基本として、これにさらに MGAT3 以下4種の GlcNAc 転移(分岐)酵素を追加導入し、糖鎖構造の変化を解析した。安定形質転換細胞の樹立には、piggyBac 転移系を利用し、糖鎖解析については、aoWR 標識した糖鎖の質量解析を用いた。

次いで、この GlcNAc 末端へのガラクトース付加を行ったが、この反応にはヒト由来の B4GALT1 を用いた。この場合は、FDL RNAi に加え、MGAT2+B4GALT1+もう1種の MGAT を同一の転移ベクターに導入し形質転換細胞樹立後、レポータータンパク質を利用して糖鎖構造解析を行った。

② O-結合型糖鎖(ムチン型)については、N-結合型糖鎖と異なり、S/T 残基に1つずつ単糖を積み重ねるように転移していく。例えば、ポリペプチドN-アシルガラクトサミン転移酵素(ppGalNAc-T)がN-アセチルガラクトサミンをS/T残基に付加し、次いで別の酵素がガラクトースやGlcNAcを付加していく。ppGalNAc-Tの場合、哺乳類には20種ほどのアイソフォームが知られており、カイコゲノムにも9種のアイソフォームが存在し、どの酵素がカイコ細胞でO-結合型糖鎖の合成に主要な役割を担っているか明らかになっていない。そこで本研究では、この経路の第一、第二の過程に関わる内在性酵素9種と1種および、その補助酵素を同定し、その機能解析を行うことにより、昆虫O-結合型糖鎖修飾経路初期反応の全容を解明した。このような遺伝子機能の同定については、培地に dsRNA を添加するだけで高効率かつ複数遺伝子に対する多重 RNAi 誘導が可能な鱗翅目昆虫由来細胞を利用した。また、最終的な糖鎖構造の決定には aoWR 標識した糖鎖の質量解析および、高分解能 LC/MS/MS 分析を用いた。

さらに、**①**と**②**の研究成果を合わせて、N-型糖鎖、O-型糖鎖の導入がタンパク質分泌量に与える影響を解析した。具体的には、タンパク質分泌シグナルの直後に複数個のN-型糖鎖、O-型糖鎖付加部位を導入したタンパク質発現組換えウイルスを構築し、このウイルスを摂取したカイコ幼虫での体液中への分泌効率を解析した。

③ N-結合型糖鎖に関しては、研究の前半において遺伝子導入による糖鎖修飾経路の改変を行ったが、予備実験において、ある種の糖鎖修飾経路によりタンパク質分泌量が低下する現象を観察している。このことから、より高度な経路改変操作を行った場合、生産量の低下を引き起

こすことが予想された。そこで、分泌量の異なる N-結合型糖鎖付加タンパク質を発現するウイルスをカイコ幼虫に摂取し、組換えウイルス接種脂肪体の網羅的遺伝子発現プロファイル (RNA-Seq 法を利用) を比較した。

4. 研究成果

① まず、糖鎖構造改変を効率よく簡便に解析するためのレポーター糖タンパク質の開発を行った。ヒト酸性糖タンパク質 (α 1AGP) をベースに、糖鎖付加が起こらない領域のアミノ酸配列を削り込み、さらに人工糖鎖付加部位を組み込んだ改良型ヒト酸性糖タンパク質を作製した。このタンパク質は、分泌量が多く精製が容易な上に、高度にグリコシル化されていた。また、糖鎖の構造解析の結果、比較的均一で典型的な昆虫型 N-結合型糖鎖を有しており、糖鎖構造の変化を観察するためのモデル糖タンパク質として非常に有効であることがわかった。さらに、このタンパク質を異なるカイコ系統に摂取したところ、付加される糖鎖の本数に相違があることが示唆された。これらの成果をまとめ、カイコにおける N 結合型糖鎖修飾の詳細について解析した論文を発表した。

次いで、昆虫細胞における糖鎖修飾経路の改変のため、複数のヒト由来糖転移酵素(MGAT2, MGAT3, MGAT4, MGAT5A, MGAT5B, B4GalT1, ST6Gal1) をカイコ培養細胞に導入した各種安定発現株を作製し、バキュロウイルス発現系により組換え糖タンパク質を発現させ、ウェスタンブロット、レクチンブロットを用いて、糖鎖構造の変化を解析した。その結果、MGAT2、MGAT3、MGAT5A、MGAT5B 発現株において糖鎖構造が昆虫型から、複合型構造や bisecting 構造、多分岐構造へと構造が一部変化したことが確認された (図 1)。し

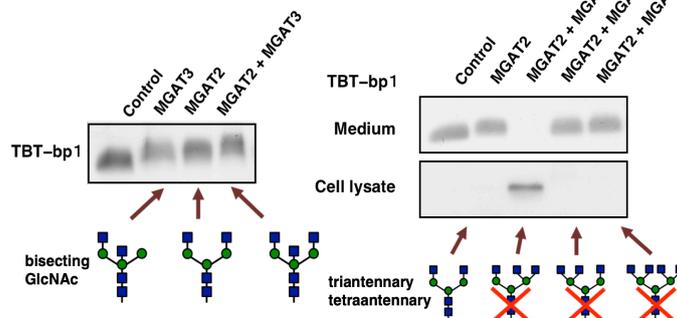


図1 複数のヒト由来糖転移酵素導入による糖鎖構造の変化

しかし、昆虫型構造が一定の割合で残留しており、改変効率の改善に向けさらに研究を進めた。特に、N-アセチルグルコサミン分岐型の糖鎖構造を誘導する MGAT5A 及び MGAT5B 導入細胞では、糖鎖の付加が確認されなかったため、繰り返し実験を行ったが、同様の結果であった。一方、MGAT4 導入細胞は標的タンパク質の不溶化が起こり、この構造を持つ糖鎖は、昆虫細胞では許容されない可能性が示唆された。さらに、シアル酸の付加には、その前駆体の生合成経路の導入が必要との報告があったため、同経路に関わるヒト由来の GNE、SAS、CSS、CST の 4 遺伝子を昆虫細胞に導入したがシアル酸の付加は検出できなかった。また、*in vitro* での糖鎖加工のためのツールの開発に取り組み、ヒトフコース転移酵素およびフコシダーゼをカイコバキュロウイルス発現系により発現・精製した。これらの組換え糖代謝酵素が高い酵素活性を有していることを確認した。

これまでの結果より、複数のヒト由来糖転移酵素を導入したカイコ培養細胞において糖鎖修飾経路の改変が示唆されたため、より詳細な糖鎖構造を解析するために質量解析を行った。その結果、MGAT2 導入株での biantennary 複合型構造、MGAT3 導入株での bisecting 構造、そして MGAT2・MGAT3 導入株での biantennary-bisecting 構造の形成が確認されたが、その他の MGAT4A や MGAT5A、MGAT5B による多分岐型構造や、B4GalT1 の導入によるガラクトシル化は質量分析の結果からほとんど確認されず、改変効率の向上が課題とされた。以上のことから、カイコ産生の組換え糖タンパク質の糖鎖構造を改変する方法として、精製酵素を用いた *in vitro* での糖鎖改変や、糖鎖修飾経路の改変と組換えタンパク質の生産を時間差で制御するバキュロウイルスの共感染・多重感染を利用した方法等の検討が必要であると考えられた。

② O型糖鎖付加の分子機構解析については、レポータータンパク質として既存の 3 種に加え、カイコ由来O-結合型タンパク質、および、ヒト軟骨ムチンの改変タンパク質についてレポータータンパク質としての利用を試みた。その結果、カイコ由来O-結合型タンパク質はいずれも発現効率が低く、レポーターには不向きであった。ヒト軟骨ムチンのムチンドメインのみを発現

させると分泌効率がよく、また、これにヒトフィブロネクチンのコラーゲン結合ドメインを付加した組換えタンパク質の発現が良好であったため、これらをレポータータンパク質として使用することとした。

まず、第一段階の転移反応であるタンパク質の Ser/Thr 残基に単糖を転移する ppGalNAc-T の同定を進めた。カイコゲノムデータベースより、Ser/Thr 残基に GalNAc を付加する機能的 GalNAcN を 9 種同定したが、そのいずれが O-糖鎖付加の第一段階の転移反応を担っているのかは判断できなかった。そこで、構築した O 型糖鎖修飾を解析するレポータータンパク質を用い、9 種の ppGalNAc-T 抑制細胞での O-糖鎖付加を解析し、カイコ ppGalNAc-T を同定した (図 2)。

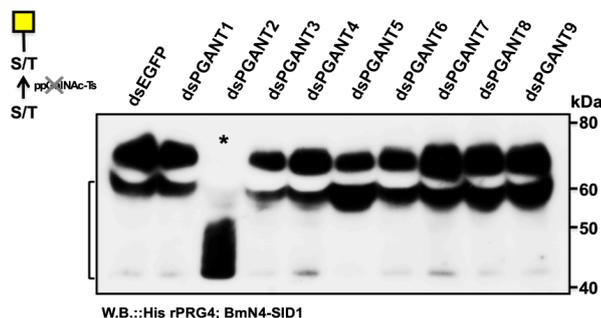


図2 BmN4-SID1細胞におけるppGalNAc-Tの機能的スクリーニング

また、Tn抗原にガラクトースを転移する糖転移酵素 C1GalT1については、

カイコ内在性ホモログをクローニングし、3種のバリエントの同定に成功した。これらの酵素の、局在解析、活性測定、レスキュー実験を行い、カイコにおけるO-型糖鎖修飾におけるCore1構造形成に関する貴重な成果を得た。3種のバリエントの内、糖転移活性が確認できたのは2種であった。さらに、タンパク質のN末端側にN-結合型、O-結合型糖鎖付加部位を導入したところ、二つ糖鎖部位を付加するより三つ糖鎖部位付加の効果が高かった。

③ N-結合型糖鎖の改変により分泌量が低下するタンパク質は、研究室保存の80種程度の組換えウイルスを用いてスクリーニングを行い、4種を選抜し、ウイルス接種カイコ個体のRNA-Seq解析を行ったが、変動している宿主遺伝子の数が非常に多かった。これは、ウイルス由来遺伝子のリードが多く、宿主遺伝子の変化を追うために必要かつ信頼できる情報量(リード数)が得られなかったためであると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Morio A, Xu J, Masuda A, Kinoshita Y, Hino M, Morokuma D, Goda H, Okino N, Ito M, Mon H, Fujita R, Kusakabe T, Lee JM. Expression, purification, and characterization of highly active endo- α -N-acetylgalactosaminidases expressed by silkworm-baculovirus expression system. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22 404-408 (2019) 査読有 <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.01.009>
2. Xu J, Morio A, Morokuma D, Nagata Y, Hino M, Masuda A, Li Z, Mon H, Kusakabe T, Lee JM. A functional polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (PGANT) initiates O-glycosylation in cultured silkworm BmN4 cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 8783-8797 (2018) 査読有 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9309-6>
3. Morokuma D, Hino M, Tsuchioka M, Masuda A, Mon H, Fujiyama K, Kajiura H, Kusakabe T, Lee JM. A truncated form of human alpha 1-acid glycoprotein is useful as a molecular tool for insect glycobiology. *International Journal of Industrial Entomology* 36 15-24 (2018) 査読有 <http://dx.doi.org/10.7852/ijie.2018.36.1.15>

[学会発表] (計 5 件)

1. Morio A, Kinoshita Y, Masuda A, Karasaki N, Morokuma D, Lee JM, Kusakabe T. Exploring high-efficient purification method for endo- α -n-acetylgalactosaminidase from enterococcus faecalis (Endo EF) expressed by baculovirus expression system. *International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2017 Fukuoka, Japan*
2. Morio A, Xu J, Kinoshita Y, Masuda A, Karasaki N, Tatsuke T, Hino M, Lee JM, Kusakabe T. Human and Silkworm glycoproteins as reporter protein for O-glycosylation analysis in

insect cells. The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology Feb. 2017 Bangkok, Thailand

3. Kinoshita Y, Masuda A, Morio A, Karasaki N, Tatsuke T, Mon H, Lee JM, Kusakabe T. Characterization of proprotein convertase-furin expressed by using the silkworm-baculovirus expression system. The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology Feb. 2017 Bangkok, Thailand

4. Yamashita M, Hino M, Hirata K, Xu J, Ji M, Morokuma D, Mon H, Lee JM, Kusakabe T. Characterization of BmNPV Promoters for Improving Exogenous Genes Expression in Bombyx Cells. The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology April 2015 Busan, Korea

5. 山下 真実、徐 劍、季 明明、門 宏明、李 在萬、日下部 宜宏 カイコ培養細胞における BmNPV 136 遺伝子のプロモーター活性 日本蚕糸学会 2015 年 9 月 札幌市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。