

氏名(本籍)	わた なべ さと こ 渡 邊 聡 子 (東京都)			
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	博 甲 第 6513 号			
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	バキュロウイルス-昆虫発現系における哺乳類型糖鎖付加のための基礎的研究			
主	査	筑波大学教授	博士(農学)	青柳秀紀
副	査	筑波大学准教授	博士(農学)	柏原真一
副	査	筑波大学教授	工学博士	王碧昭
副	査	筑波大学准教授	博士(農学)	中村 顕

論 文 の 内 容 の 要 旨

バキュロウイルス-昆虫発現系は組換えタンパク質の生産に広く用いられているが、付加される N 型糖鎖が昆虫特有のパウチマンノース型となり、哺乳動物細胞で合成される末端にシアル酸が付加された複合型と異なる。生産した組換えタンパク質が、糖鎖の違いが原因で十分な機能を示さない場合があり、哺乳類と同様の複合型糖鎖が付加した組換えタンパク質の生産が求められている。本研究では複合型糖鎖合成の鍵となる N-アセチルグルコサミニダーゼ (N-acetylglucosaminidase: GlcNAcase) とグルコシダーゼ II (glucosidase II: GII) に着目し、下記①~③の検討を行った。

①昆虫細胞におけるシアル酸付加糖鎖合成能の解明: GlcNAcase 阻害剤である 2-アセタミド-1,2-ジデオキシノジリマイシン存在下でウシインターフェロン- τ (bIFN- τ) など 3 種類の組換えタンパク質を生産した。Tricine-SDS-PAGE とレクチンプロットにより付加されている糖鎖末端の構造を解析したところ、糖鎖の伸長による分子量の増加と糖鎖末端への α -2,6-シアル酸の付加が認められた。このことから、昆虫細胞は哺乳動物細胞と同様のシアル酸が付加された糖鎖を合成する経路を有しているが、(a) 生理的条件下では昆虫特有の GlcNAcase によりその経路が遮断されているため付加される糖鎖がパウチマンノース型となること、(b) GlcNAcase を阻害することでシアル酸が付加された糖鎖を有する組換えタンパク質が生産できること、が示された。

② 2 種類のプロモーターを有するベクターの構築とその利用: カイコ由来 GlcNAcase (BmGlcNAcase 2) 遺伝子の転写を抑制するためカイコアクチン A3 プロモーター (A3) をバキュロウイルストランスファーベクター pAcYMI にポリヒドロリンプロモーター (ph) と逆方向に挿入し、2 種類のプロモーターを有するトランスファーベクター pAcA3ph を構築した。pAcA3ph を用いて A3 下流に BmGlcNAcase2 遺伝子の RNAi 発現コンストラクトを、ph 下流に bIFN- τ 遺伝子を挿入した組換えハイブリッドウイルス (HyNPV) を作製し、組換え bIFN- τ を生産したが、糖鎖の伸長による分子量の増加は認められず、糖鎖末端のシアル酸も検出されなかった (本手法では BmGlcNAcase2 の抑制が不十分だったことや、BmGlcNAcase2 以外の酵素が存在する可能性が示唆された)。また、構築した pAcA3ph の A3 下流に EGFP 遺伝子を挿入し組換え HyNPV を作製したところ、1 回目のプラーク純化時に、ウイルス接種後 48 時間で純化した組換え HyNPV を取得すること

ができた。EGFP の発現は ph により生産される目的タンパク質の発現量に影響を与えなかった。A3 と EGFP を利用することにより、従来法では 1 ヶ月間を要する組換え HyNPV の純化を 48 h で行うことが可能となった。

③複合型糖鎖合成に関与する昆虫由来の GII 遺伝子の単離と解析：カイコ GII α -サブユニット (*Bm*GII α)、 β -サブユニット (*Bm*GII β) およびヨトウガ GII α -サブユニット (*Sf*GII α) 遺伝子を単離し、活性を有する組換え GII サブユニットをそれぞれ生産した。 α -グルコシデース阻害物質に対する感受性を解析したところ、*Bm*GlcII α は *Sf*GlcII α に比べ桑に含まれる 1-デオキシノジリマイシンや 1,4-ジデオキシ-1,4-イミノ-D-アラビニトール、GII 阻害剤であるカスタノスペルミンに対して感受性が低かったが、カイコ消化管のグルコシデースに比べ低濃度で活性が阻害された。阻害物質に対する低い感受性がカイコが桑を餌として成長できる一因であると考えられたが、カイコで生産される組換えタンパク質に付加される糖鎖が影響を受ける可能性も示された。

審査の結果の要旨

本研究は、昆虫の糖鎖合成経路を改変して哺乳類型糖鎖を有する組換えタンパク質を効率よく生産することを最終目的とし、複合型糖鎖合成の鍵となる GlcNAcase と GII について諸特性の解析を試みた研究である。

研究の結果、(1) 昆虫細胞は哺乳動物細胞と同様にシアル酸付加糖鎖合成経路を有しており、GlcNAcase によって昆虫細胞でのシアル酸付加糖鎖合成が妨げられ、付加される糖鎖がパウチマンノース型になること、(2) GlcNAcase 活性を阻害するだけで、昆虫細胞に潜在的に備わっている糖鎖合成経路を利用したシアル酸付加糖鎖を有する組換えタンパク質の生産が可能であること、を国内外を通じてはじめて証明した。本研究の過程で構築した 2 種類のプロモーターを有するトランスファーベクターは、組換えウイルス取得までの時間と労力の大幅な削減（従来法では 1 ヶ月間を要する組換え HyNPV の純化を 48 h で完了）を実現している。本ベクターは、HyNPV を用いた培養細胞や虫体による組換えタンパク質生産へ幅広く利用可能であり、その有用性および実用性は高く評価できる。また、GII の阻害物質に対する感受性を解析し、カイコ GII はヨトウガ GII に比べて桑に含まれる阻害物質に対して感受性が低かったが、カイコ消化管に局在するグルコシデースに比べ低濃度でその活性が阻害され、カイコで生産される組換えタンパク質に付加される糖鎖が影響を受ける可能性を国内外を通じてはじめて指摘した。

本研究成果は、バキュロウイルス発現系による効率的な複合型糖鎖付加組換えタンパク質生産の実現に大きく貢献することが期待される。

平成 25 年 1 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。