



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

昆虫細胞を用いたヒト由来糖転移酵素 $\beta$  1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの効率的生産に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 加藤, 竜也 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2671">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2671</a>

氏名(本国籍)	加藤竜也(静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第330号
学位授与年月日	平成16年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	昆虫細胞を用いたヒト由来糖転移酵素 $\beta$ 1,3- <i>N</i> -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの効率的生産に関する研究
審査委員会	主査 静岡大学 教授 朴 龍 洙 副査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 信州大学 教授 柴 井 博四郎

## 論文の内容の要旨

糖鎖は生命現象に深く関わっており、特に最近食品、医薬品、および機能性材料として糖鎖を利用する応用研究が活発に行われるようになった。本研究は、ヒト母乳に含まれるラクト *N*-テトラオースの生合成の律速酵素であるヒト由来  $\beta$ 1,3-*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ2 ( $\beta$ 3GnT2) に着目し、本酵素の効率的生産のために昆虫細胞遺伝子発現系を用い、大量発現を可能にした。

### 1) パキキュロウイルス発現系における GFPuv- $\beta$ 3GnT2 遺伝子発現

ヒトの脳 cDNA から PCR で  $\beta$ 3GnT2 遺伝子を増幅し、同遺伝子の細胞質領域と膜貫通領域を取り除き、プリプロメリチンシグナル配列、6xヒスチジンタグ、GFPuv、エンテロキナーゼ切断部位を連結させた GFPuv- $\beta$ 3GnT2 融合遺伝子を構築し、パキキュロウイルス発現系 (BES) およびノンウイルス発現系に融合遺伝子を発現した。パキキュロウイルス発現系ではシグナル配列を付加させなかった場合、細胞内において融合タンパク質の発現は確認できたが活性がなかった。しかし、シグナル配列を付加させたところ、細胞内外に融合タンパク質の発現が確認できた。Sf-9 細胞での最大細胞外  $\beta$ 3GnT 活性は 0.80 mU/ml で Tn-5 細胞の 0.68 mU/ml 高い値であった。これは、Tn-5 細胞を用いた場合プロテアーゼによる融合タンパク質の分解によるものであった (SDS-PAGE により)。しかし、4種類のプロテアーゼ阻害剤の検討を行い、ロイペプチンと MG-132 の添加により、細胞内外  $\beta$ 3GnT 活性が Sf-9 細胞系のそれぞれ9倍と2.5倍向上した。

### 2) プロテアーゼ阻害剤を必要としないノンウイルス系における GFPuv- $\beta$ 3GnT2 融合遺

## 伝子の発現

バキュロウイルスを使用しないノンウイルス系における GFPuv-B3GnT2 融合遺伝子の発現系を構築し、Tn-pXme11 細胞を単離した。この細胞の細胞内外の B3GnT 活性は 4.87 および 6.83 mU/ml で、バキュロウイルス系の約 14 および 10 倍であった。ロイペプチンを添加した結果に比べても約 2.8 および 3.4 倍であった。バキュロウイルス系では大部分の融合タンパク質が細胞内に蓄積したが、ノンウイルス系では大部分が細胞外に効率よく分泌された。さらに、プロテアーゼによる融合タンパク質の分解も極端に減少した。

### 3) B3GnT2 の分泌におけるシグナル配列および N 型糖鎖の影響

さらに効率的に GFPuv- $\beta$ 3GnT2 融合タンパク質を分泌するためにシグナル配列の影響を調べた。バキュロウイルス系でもノンウイルス系においても、シグナル配列の影響は少なかったが、バキュロウイルス系の活性型融合タンパク質の分泌効率は 50~60% であったのに対し、ノンウイルス系では 70~85% であった。これは、ノンウイルス系が分泌タンパク質生産系に適していることを示唆する。

$\beta$ 3GnT2 の N 型糖鎖の解析を行ったところ、N 型糖鎖は 4 箇所結合していると推測され、それぞれ 79、89、127、および 219 番目のアスパラギンに結合していると推測された。219 番目のアスパラギンに変異を入れた変異体 N219Q を獲得し、活性を調べた結果 219 番目の N 型糖鎖が  $\beta$ 3GnT 活性に深く関与していることが明らかとなった。一方、変異体 S221T の場合、野生株に比べて約 1.3 倍活性の上昇が確認できた。この結果は、ノンウイルス系における糖鎖の結合メカニズムはバキュロウイルス系における糖鎖の結合メカニズムと類似であることを示唆する。

### 4) 分子シャペロン遺伝子導入による B3GnT2 生産性の向上

細胞の小胞体に存在するレクチン様シャペロン、カルネキシン遺伝子を GFPuv-B3GnT2 融合遺伝子と共発現系を構築し、Tn-pXme11-CNX6 細胞を単離した。この細胞の細胞外 B3GnT 活性は 22.4 mU/ml で、Tn-pXme11 に比べてそれぞれ 1.7 および 3.2 倍向上した。このことから、Tn-pXme11-CNX6 細胞内において GFPuv-B3GnT2 融合タンパク質とカルネキシンが結合することにより融合タンパク質のフォールディングが促進され、細胞内外 B3GnT 活性が上昇したと考えられる。

GFPuv-B3GnT2 融合遺伝子をカルネキシン遺伝子と共発現系させることによって、2001 年発表された研究結果に比べ約 280 倍高い活性を得ることができた。従って今後、本研究の成果は産業的に十分応用できるものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、昆虫細胞遺伝子発現系によるヒト由来糖転移酵素  $\beta$ 1,3-N アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 2 ( $\beta$ 3GnT2) の効率的生産に関するものである。

内容は、

1) ヒトの脳 cDNA から PCR で  $\beta$ 3GnT2 遺伝子を増幅し、同遺伝子の細胞質領域

と膜貫通領域を取り除き、プリプロメリチンシグナル配列、6×ヒスチジンタグ、GFPuv、エンテロキナーゼ切断部位を連結させた GFPuv- $\beta$ 3GnT2 融合遺伝子を構築し、バキュロウイルス発現系 (BES) およびノンウイルス発現系に融合遺伝子を発現した。BES では Sf9 細胞を用いた場合、最大細胞内外  $\beta$ 3GnT 活性はそれぞれ 0.55 および 0.80mU/ml であったが、Tn-5 細胞の場合、プロテアーゼによるタンパク質の分解が著しかった。しかし、2種類のプロテアーゼの添加により、細胞内外  $\beta$ 3GnT 活性が Sf9 細胞系のそれぞれ9倍と2.5倍向上した。ノンウイルス系の場合、発現された融合タンパク質は効率よく細胞外に分泌され、細胞外の  $\beta$ 3GnT 活性は 6.83mU/ml に達し、バキュロウイルス系の約9倍高い活性を示した。

2) GFPuv- $\beta$ 3GnT2 融合タンパク質の分泌能をさらに向上するためにシグナル配列を組み込んだ遺伝子発現系を構築し、同融合遺伝子の発現を行ったところ、ノンウイルス系の活性型融合タンパク質の分泌効率はバキュロウイルス系に比べ20-25%高いことが明らかとなった。N型糖鎖の解析を行ったところ、N型糖鎖はそれぞれ79, 89, 127, 219番目のアスパラギンに結合していると推測された。219番目のアスパラギンに変異を入れた変異体 N219Q により、219番目のN型糖鎖が  $\beta$ 3GnT 活性に深く関与していることを明らかにした。

3) 細胞の小胞体に存在するレクチン様シャペロンの1つであるカルネキシン遺伝子を同融合遺伝子との共発現系を構築し、同融合遺伝子を発現させた結果、細胞外  $\beta$ 3GnT 活性は 22.4 mU/ml を示し、ノンウイルス系に比べさらに3.2倍向上した。シャペロン遺伝子の導入により、同融合タンパク質とカルネキシンが結合し、タンパク質のフォールディングがより促進され、細胞内外の活性型  $\beta$ 3GnT の生産をさらに効率化した。

このような本論文の内容は、昆虫細胞遺伝子発現系によるヒト由来  $\beta$ 3GnT2 の生産を可能にしたものであり、今後本ヒト由来  $\beta$ 3GnT2 の構造と機能の研究が進展するものと評価された。本審査委員会は論文の構成、内容ならびに下記に示す学位論文の基礎となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

「基礎となる学術論文」

Tatsuya Kato, Takeomi Murata, Taichi Usui, Enoch Y Park, Efficient production of human  $\beta$ 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 fused with green fluorescence protein in insect cell, *Biochemical Engineering Journal*, in press 2004.

Tatsuya Kato, Takeomi Murata, Taichi Usui, Enoch Y Park, Improvement of GFPuv- $\beta$ 3GnT2 fusion protein production by suppressing protease in baculovirus expression system, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003.

Tatsuya Kato, Takeomi Murata, Taichi Usui, Enoch Y Park, Comparative analysis of GFPuv- $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 production in two insect cell-based expression systems, *Protein Expression and Purification*, in press 2004.