

カイコにおける糖鎖生物学と糖鎖工学

大阪大学 生物工学国際交流センター

藤山和仁

組換えタンパク質生産のための宿主が多様化している。従来のCHO細胞を代表とする動物細胞、あるいは酵母、大腸菌から、現在では昆虫(培養細胞)、植物(培養細胞)にまで実用化が広がっている。昆虫のなかでも、カイコを用いた生産系は魅力的である。カイコにおける組換えタンパク質生産には2種類の方法があり、カイコーバキュロウイルス系を用いた一過的発現、組換えカイコによる定常的発現が可能である。

組換えタンパク質生産では、宿主により翻訳後修飾、特に糖鎖修飾が異なり、生産したタンパク質の性状に影響することがある。そこで本セミナーでは、カイコの持つ糖鎖修飾に関する基本的な知見(糖鎖生物学)を示し、その知見にもとづく糖鎖工学技術の開発と展開について紹介する。

カイコの持つ糖鎖修飾に関する基本的な知見

カイコにおける組換えタンパク質の生産“現場”は主として、5齢虫体の脂肪体あるいは絹糸腺、およびサナギである。また、組換えタンパク質は、主として絹糸腺、脂肪体、体液に存在する。そこで、時期特異的、器官特異的に、糖タンパク質の糖鎖構造を解析した。

その結果、幼虫とサナギでは大きな糖鎖プロファイルには違いがなく、幼虫の器官では中腸、脂肪体、体液ではほぼ同じプロファイルで、GlcNAcを欠くパウチマンノース型構造であった。しかし、幼虫における絹糸腺の糖タンパク質は、a1,6-FucがなくGlcNAcを持つ構造が主で、特徴的な傾向を示した。このように、カイコにおける時期・

空間的な糖鎖プロファイルから、カイコにおける糖鎖修飾に関する興味深い結果を得た。

カイコゲノム情報を元に、糖鎖修飾関連酵素遺伝子の探索が可能である。これまでの我々の研究ではカイコにおける糖鎖修飾関連酵素遺伝子を単離している(図1)。カイコはSiaT遺伝子を持ち、その発現タンパク質はSiaT活性を示した。しかし、Sia付加型糖鎖を幼虫、サナギでは見出せていない。ショウジョウバエでは、Siaは胚発生時の神経形成に必須と報告されている。

カイコの糖鎖修飾機能改変技術の開発と展開

カイコ幼虫ではパウチマンノース型構造が主であるが、GlcNAcが分解されて生じる。この分解にはN-アセチルグルコサミダーゼGlcNAcaseが関与する(図1)。カイコには、糖鎖修飾に関わる4種のGlcNAcase遺伝子が存在し、そのうち一つFDLの遺伝子発現をノックダウンすると発育には問題がなく、転写量、酵素活性はそれぞれ75%、50%に減少し、同酵素阻害剤存在下でGlcNAc含有糖鎖存在量を亢進した。

一方で、ヒト糖鎖構造をカイコで形成させる技術開発も試みられている。カイコが保持しない

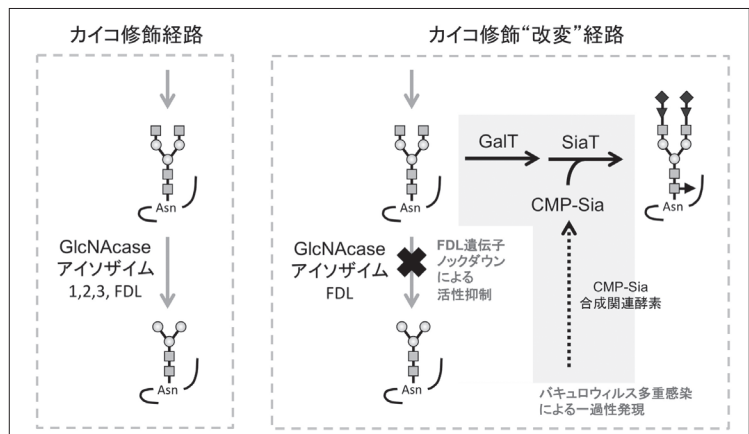


図1 カイコ糖鎖修飾経路

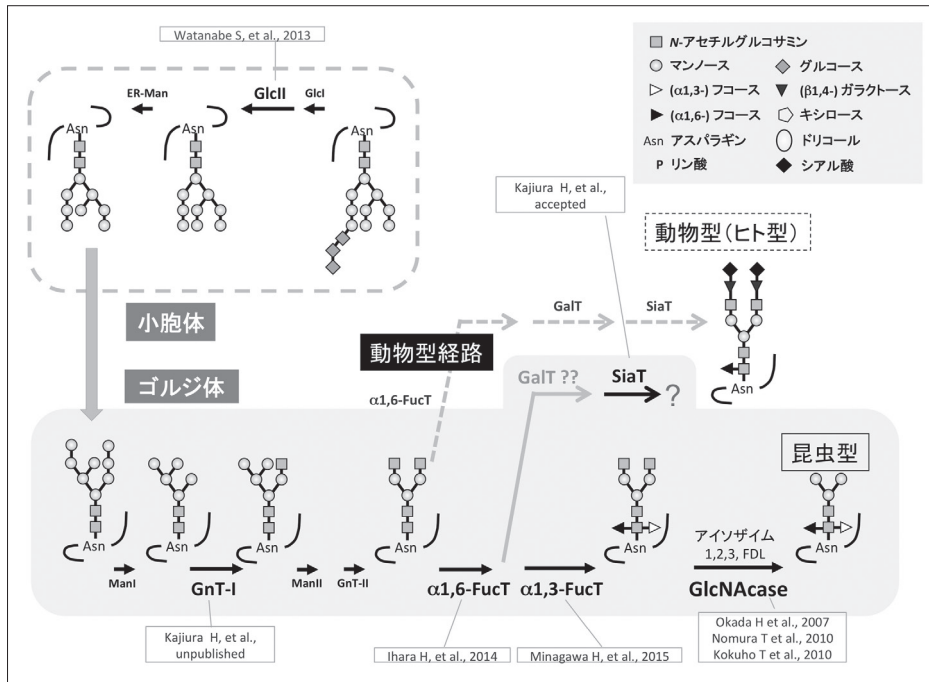


図2 カイコの糖鎖修飾機能改変技術

ヒト由来糖鎖修飾酵素遺伝子 (GalTなど) をカイコで発現させて、Gal, Siaを付加させる。まず、GalT遺伝子を定常的発現する組換えカイコが作出されている。Sia付加には、転移酵素以外にCMP-Sia合成関連酵素が必要で、Sia付加型糖鎖を形成できるスーパーカイコは興味深い。バキュロウィルスを用いると、GalT, SiaT, CMP-Sia合成関連酵素などを同時感染に発現させることができる (図2)。Suganumaらは、糖鎖酵素を同時感染し、さらに外部よりCMP-Siaを注入する方法

により、カイコ組換えタンパク質の糖鎖に効率的にシアル酸を付加できることを示した。

以上のようにカイコを持つ糖鎖修飾の能力を調査し、目的とする糖鎖構造の形成のための戦略を立てることが可能である。糖鎖修飾関連酵素遺伝子を操作することで、ヒト糖鎖構造を形成でき、また生物学的機能が同等の組換え (医療) タンパク質生産に繋がる。組換え医療タンパク質生産工場としてカイコが活用され、カイコ産業が日本のモノづくりルネッサンスになると期待している。

Title

Silkworm (*Bombyx mori*) has been developed for recombinant protein production. Glycan part of the protein plays a critical role for the expression of biological activity. However, protein glycosylation depends on machineries of the host cells. The glycosylation potential in silkworm was examined. The glycan profiles of glycoproteins were determined using larvae and pupa, and some organs in larvae stage. Genes of glycosylation enzymes were also shown over the silkworm genome database. Based on

this platform information, glycoengineering was applied to silkworms. This challenge developed reduction of enzyme activity by gene knock-down and creation of sialylated glycans in silkworms. These development of glycoengineering would bring small silkworms to be the promising production system for pharmaceutical protein production. Silk-industry is Japanese-traditional, but Silk-biofactory can be "renaissance".

Reference

- 1) Suganuma, M. et al.: 第36回分子生物学会年会, 2P-0970 (2013)
- 2) Nomura, T. et al.: J. Biosci. Bioeng., 119, 131 (2015)
- 3) Kajiura, H. et al.: Glycobiol., in press