

カイコーバキュロウイルス発現系を用いた糖タンパク質の発現と糖鎖構造の改変

野村 雄^{1*}・片岡由起子¹・藤山 和仁²

はじめに

遺伝子組換え技術を用いて、組換えタンパク質を生産することは、すでに研究面や産業面において広く実施されて普及が進んでいる。組換えタンパク質を発現させる発現系としては、大腸菌をはじめとして、酵母や動物細胞（CHO細胞など）を用いる系など、幾つかの方法が知られているが、その中でも我々は、主としてバキュロウイルスを用いた発現系を用いている。

バキュロウイルスは節足動物（主に昆虫）に感染する事が知られているウイルスで、中でも核多角体ウイルス（nucleopolyhedrovirus）が、一般的に組換えタンパク質発現に用いられる。このウイルスは主として昆虫に特異的に感染し、かつ宿主特異性が高い。宿主に感染すると感染末期に多角体と呼ばれるウイルスの封入体を大量に合成する。多角体を構成するポリヘドリンタンパク質はウイルスの生存・増殖には必須でないため、この強力なプロモーターを利用して、ポリヘドリンタンパク質の遺伝子を発現させたいタンパク質の遺伝子と置換することで、組換えタンパク質を大量に発現することができる。

バキュロウイルスは昆虫培養細胞および昆虫虫体で増殖が可能であるが、カイコを用いる方法はMaedaらにより開発された¹⁾。カイコーバキュロウイルス発現系の特長としては、比較的高発現（カイコ1頭当たり数百μg）であり、発現スケールの調整が容易であること（カイコの飼育頭数を調整すればよく、培養タンクなどは不要）、多種類の同時発現が容易なこと（小さな飼育容器ごとで異なるタンパク質が発現可能）などがあげられ、きわめて有用な発現系と思われる。

カイコーバキュロウイルス発現系で発現した組換えタンパク質は大腸菌発現物とは異なり、糖鎖付加やリン酸化などの翻訳後修飾が起きる。翻訳後修飾はタンパク質の機能と密接に関係しており、その制御は重要な課題の1つである。その中でも糖鎖修飾は多くのタンパク質に見られる修飾で、タンパク質の品質管理や体内での保護作用、発生や細胞認識の目印としての機能、感染症や発生での関わりなど、多くの機能を有している。糖鎖修飾の中でも主要な糖鎖としてアスパラギン結合型糖鎖が知られている。この糖鎖は、哺乳類においては、一例とし

て図1Aに示したような構造を有している。カイコーバキュロウイルス発現系では、アスパラギン型糖鎖が付加するが、その構造は哺乳類型とはやや異なり、図1Bに示すように、ヒトを含む哺乳類がシアル酸まで付加されるのに対し、カイコでは少マンノース構造で糖鎖の修飾が止まり、長さが短い糖鎖が主に見られる²⁾。また、フコースの結合様式が異なる場合もある。このように糖鎖構造が異なるため、発現タンパク質の機能に差が生ずる可能性がある。また、哺乳動物に投与した場合、免疫原性を示したり、アレルギーを引き起こしたりする可能性も考えられる。そのため、昆虫に特異的な糖鎖をどのように制御するかは、組換えタンパク質の、特に医薬品への利用に際して大きな課題となっている。

糖タンパク質の糖鎖の制御に関しては、生体内において糖鎖の生合成を制御する方法と、生体外において、合成した糖鎖をペプチド鎖に結合させたりする化学的な方法が検討されている。化学的糖鎖付加法は、現在のところ、均一な糖鎖付加が可能であるなどのメリットがある一方、生理活性を有する複雑な立体構造をとるタンパク質への、自由、かつ確実な糖鎖付加は難しく、糖タンパク質の機能を維持しながら糖鎖を制御するには、やはり生体内で糖鎖の合成経路を利用した上で、必要な糖鎖修飾を行うことがまずは望ましいと考える。

昆虫型糖鎖の合成経路

アスパラギン結合型糖鎖の合成経路は、途中までは哺乳

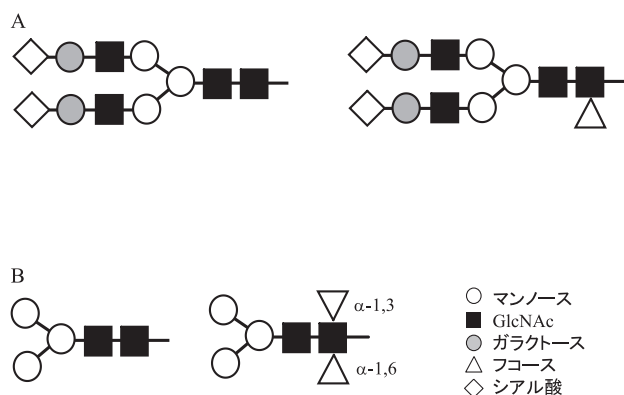


図1. A：哺乳類におけるアスパラギン型糖鎖の例。B：昆虫におけるアスパラギン型糖鎖の例。

*著者紹介 ¹シスメックス株式会社技術開発本部 E-mail: Nomura.Tsuyoshi@sysmex.co.jp

²大阪大学生物工学国際交流センター

特 集

乳類もカイコを含む昆虫でも同様である。まず、グルコース3残基、マンノース9残基、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2残基からなる糖鎖がペプチド鎖に転移されて糖鎖のプロセッシングが開始される。続いて、グルコースやマンノースの切断、GlcNAcの付加が起き、非還元末端側にGlcNAcが付加した糖鎖になる(図2)。その後、哺乳類では、ガラクトースやシアル酸の付加が起きるが、昆虫においては、ガラクトース転移酵素 (Gal T) の活性が弱い存在しないため、糖鎖の伸長が停止する³⁾。加えて、昆虫には糖鎖末端のGlcNAcを切断する*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) 活性が存在し、糖鎖の伸長が妨げられる⁴⁻⁵⁾。

昆虫培養細胞を用いた糖鎖改変の試み

前記の糖鎖合成経路を踏まえ、主として昆虫培養細胞を用いて、糖鎖構造を改変する試みがなされてきている。

昆虫型糖鎖を哺乳類型の糖鎖 (ヒト型糖鎖) へ改変する方法として、ガラクトース付加能やシアル酸付加能を細胞に与えることにより、糖鎖の伸長を誘導する方法と、昆虫に特異的なGlcNAcaseを抑制して、糖鎖の切断を抑制する方法が考えられる。一例として、昆虫細胞にGal Tやシアル酸転移酵素 (Sial T) 遺伝子を導入した遺伝子組換え培養細胞が作出され、発現する糖鎖のヒト型化に成功している⁶⁾。また、昆虫特異的なGlcNAcaseを阻害するために、GlcNAcase阻害剤である2-アセトアミド-1,2-ジデオキシノジリマイシン (2-ADN) の昆虫培養細胞への投与や⁷⁾、dsRNAを用いたRNAi法により、GlcNAcaseの発現を抑制する試みがなされており⁸⁾、その結果、GlcNAcの分解抑制により糖鎖構造の変化が起きることが報告されている。一方、カイコ虫体をはじめとする昆虫自体を用いた糖鎖改変に関しては、これま

であり検討されてこなかった。本稿においては、我々が実施してきた方法を中心に、カイコで実施した組換え糖タンパク質の糖鎖改変の試みについて紹介する。

糖鎖修飾酵素過剰発現による糖鎖改変

従来カイコ虫体を用いた糖鎖改変は、糖鎖修飾酵素遺伝子をカイコに導入することが困難であったために、培養細胞に比べ遅れていたが、2000年にTamuraらにより、トランスポゾンを用いたGMカイコ (遺伝子組換えカイコともいう) 作出技術が開発され、遺伝子導入が可能となった⁹⁾。カイコを用いた糖鎖改変の試みとして、まずGal Tを導入したGMカイコが、我々を含む複数の機関で作出された¹⁰⁻¹¹⁾。野生型カイコではガラクトース付加糖鎖が見られなかったのに対し、このGMカイコを用いてバキュロウイルスにより糖タンパク質を発現させたところ、30%以上の糖鎖にガラクトース残基を検出できた。Gal Tアイソザイムにより、ガラクトース残基付加の様子は異なった (農食事業 未発表)。

次に我々は糖鎖へのシアル酸付加を目標に実験を行った。カイコにおいてはSial Tが機能しているかどうか、未だ不明である。加えて、シアル酸の糖供与体であるCMP-シアル酸を、体内にて生合成する系が存在するかどうかも分かっていない。GMカイコ作製技術を用い、カイコに不足していると思われる複数の酵素を補う方法も考えられたが、我々はCMP-シアル酸を外部から投与 (注射) する方法で、カイコへの糖供与体の供給を試みた。また、Sial Tの供給も、バキュロウイルスを用いて行った¹²⁾。

カイコ5齢幼虫に、哺乳類のGal Tを発現するバキュロウイルスとSial Tを発現するバキュロウイルス、ターゲットとなる組換え糖タンパク質を発現するバキュロウイルスを三重共感染させ、CMP-シアル酸をカイコに注射し、6日目に回収した体液からターゲットタンパク質を精製し、レクチンプロット法を用いて糖鎖付加の様相を観察した。その結果、Gal TとSial T、CMP-シアル酸が存在する試験系にのみシアル酸特異的のレクチンであるSNAによりレクチン染色のバンドが見られ、シアル酸の付加が示唆された (図3)。なお、このレクチン染色のバンドは、シアリダーゼ処理により消失することを確認している。

糖鎖改変による組換えタンパク質の機能向上

さらなる検証のために、アルカリフォスファターゼ (ALP) をモデル糖タンパク質として糖鎖改変を行い、MALDI-TOF-MS分析による糖鎖構造の調査を実施した。糖鎖改変には、前項で述べた糖転移酵素2種 (Gal T, Sial T) に加えて、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素2

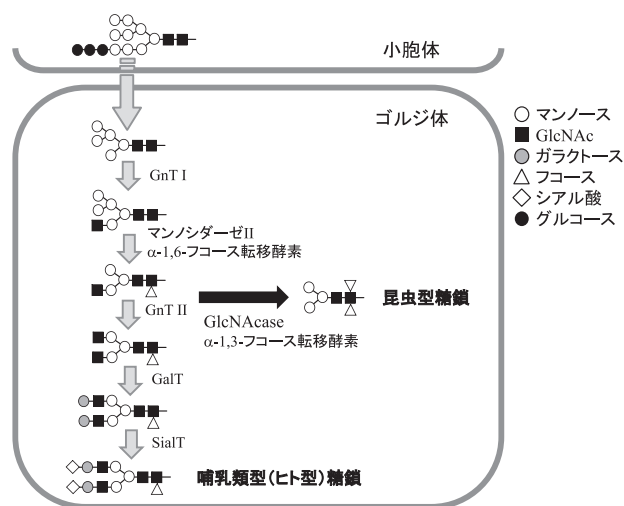


図2. 糖鎖の生合成

ガラクトース転移酵素 (+) (+)
 シアル酸転移酵素 (+) (+)
 CMP-シアル酸 (-) (+)

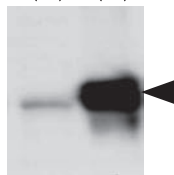


図3. Sial T導入による糖鎖へのシアル酸付加. CMP-シアル酸投与によるシアル酸付加を検証した. 検証はSNAレクチンを用いたレクチンブロット法により行った. CMP-シアル酸非投与（レーン左）ではほとんどバンドが見られないのに対し、投与（レーン右）ではシアル酸が強く検出された.

(GnT II) も同時に発現させた.

その結果, MALDI-TOF-MS 分析においても, シアル酸結合型糖鎖が検出された(図4). このようなシアル酸付加型糖鎖は, コントロールカイコでの発現ではまったく検出されず, 糖鎖修飾酵素の共発現により, 新たな糖鎖が創出できた. また, GnT II の共発現により, 2本鎖のシアル酸結合型糖鎖を創出することにも成功した. さらに, 同様のALPサンプルに対しLC-MS分析を行い, 糖鎖全体に対し, シアル酸結合型糖鎖の存在比が40.9%であることも確認した.

続いてALPの活性と安定性(pH, 温度)が, 糖鎖改変によってどのように変化するかを調査した¹³⁾.

通常, カイコで発現させたりコンビナントALP(Normal-ALP)は, 天然物ALP(Native-ALP)に比べて低い活性を示すが, 糖鎖改変によりシアル酸まで付加すると活性が向上した(Sia-ALP)(図5A). さらに, レクチン精製によりシアル酸が付加されたALPを精製すると, 活性はさらに上昇し, 天然物ALPの活性に近づいた(SNA-Purified Sia-ALP). このことは, シアル酸付加により, 活性が天然物に近づくことを意味している.

また, 安定性(pH, 温度)に関しても, シアル酸付加により, 天然物ALPと同等の安定性が示された(図5B, C). 以上より, 糖鎖改変によるタンパク質機能の向上が示唆された.

GlcNAcaseの抑制による糖鎖付加効率の向上

ここまで, カイコに不足している糖鎖修飾酵素を供給することで, 糖鎖をヒト型化する試みを紹介してきたが, ガラクトースやシアル酸の付加には, 土台となるGlcNAc末端の糖鎖が必要である. しかし, 昆虫ではこの末端GlcNAcがGlcNAcaseにより切断されるため, 高効率の糖鎖改変を行うためには, GlcNAcaseによる切断を抑える必要がある. 我々は, カイコにおけるGlcNAc

糖鎖パターン	コントロールカイコ	糖鎖改変カイコ (GalT, SialT, GnT2共発現)
ハイマンノース型		
少マンノース型		
GlcNAc結合型	—	
ガラクトース結合型	—	
シアル酸結合型	—	

図4. 糖鎖改変ALPの糖鎖構造の調査. 野生型カイコおよび糖鎖修飾酵素共発現感染カイコで発現したALPの糖鎖を, MALDI-TOF-MSにより解析した. 糖鎖の模式図は分子量から算出された推定構造.

(A)活性

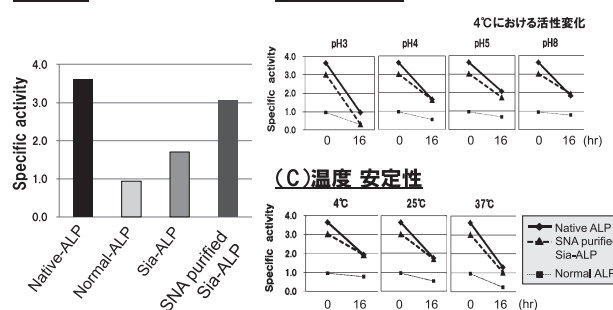


図5. 糖鎖改変ALPの機能向上. 活性(Specific activity)は, ALP 1 μ g当たりの595 nmにおける基質の吸光度変化で求めた. Native ALP: 仔牛小腸由来ALP, Normal-ALP: カイコ生産リコンビナントALP, Sia-ALP: シアル酸付加カイコ生産リコンビナントALP, SNA-purified Sia-ALP: SNAレクチン精製したSia-ALP.

の切断に関わる酵素として, 幾つかのGlcNAcaseを同定してきた(BmGlcNAcase1, BmGlcNAcase2, BmFDL)¹⁴⁻¹⁶⁾. これらGlcNAcaseの機能は, まだ完全には解明されてはいないが, ショウジョウバエの変異体を用いた研究から, FDLが昆虫型糖鎖の形成に関与していることが報告されており¹⁷⁾, そのことから, カイコにおいてもBmFDLがGlcNAcの切断に関わっていることが推測されている. このような情報を踏まえ, 我々はBmFDLの発現を抑制するRNAi GMカイコの作出を行った¹⁸⁾. 作出されたGMカイコは, 発育障害を起こさず正常に成長した. このカイコのBmFDL遺伝子の転写をリアルタイムRT-PCR法により調べたところ, 転写量は約75%減少していた. また, カイコ幼虫から脂肪体を摘出し, ミクロソーム画分に存在するGlcNAcase活性を測定したところ, 活性は約50%に減少していた.

次に, BmFDL RNAi GMカイコの糖鎖修飾に与える影響を調べるために, モデル糖タンパク質として仔牛小

特 集

糖鎖構造	構造例	(A) 2-ADN 非投与		(B) 2-ADN 投与	
		野生型カイコ (%)	RNAiカイコ (%)	野生型カイコ (%)	RNAiカイコ (%)
M9		0.7	-	-	-
M8		1.2	1.3	0.6	-
M7		2.9	1.9	1.0	2.3
M6		1.3	1.2	1.0	0.9
M5		21.6	13.3	12.9	20.3
M4		6.5	10.4	9.2	5.5
M3		1.7	1.8	-	1.9
M2		25.6	30.5	31.3	27.8
M2F		35.9	37.7	41.4	33.7
GNM3		-	-	0.8	3.4
GNM3F		-	-	-	0.9

図6. GlcNAcaseの阻害と発現ALPの推定糖鎖構造¹⁸⁾. LC-MSによる解析. 糖鎖構造は分子量から算出された推定構造.

腸アルカリフォスファターゼ (ALP) をカイコで発現させて糖鎖構造を解析した. 通常の野生型カイコで組換えバキュロウイルスを用いてALPを発現させ, ALPを精製後, 糖鎖の切り出しとラベル化を行い, LC-MSによる糖鎖構造を調べたところ, マンノース3つ以下からなる少マンノース型糖鎖が多く, 残りはマンノース4つ以上のハイマンノース型糖鎖からなり, GlcNAcが付加した糖鎖は検出されなかった. 同様の実験をBmFDL RNAi GMカイコを用いて行ったが, 期待に反し, 野生型カイコと同様, GlcNAc付加型糖鎖は検出されなかった (図6A).

組換えALPを含む分泌タンパク質は, 合成後体液中に分泌されるが, 体液中にはBmGlcNAcase2と予想されるGlcNAcaseが存在し, GlcNAcの切断がなされたと推測した¹⁸⁾. そこで今度は, カイコに前述したGlcNAcase阻害剤である2-ADNを注射し, 体液中のGlcNAcaseの阻害を行った. 通常カイコでこの阻害を行うと, GlcNAc付加型の糖鎖が検出された (0.8%). 一方, BmFDL RNAiカイコに対し, 阻害剤を投与しALPを発現させるとGlcNAc付加型糖鎖の割合が4.3%に上昇した (図6B). このことから, カイコにおいては, 細胞内でGlcNAcの切断を行うBmFDLと, 体液中でGlcNAcを切断するGlcNAcase (BmGlcNAcase2) を共に抑制することで, GlcNAc付加型糖鎖へと糖鎖が改変されることが示された.

今後, RNAiをさらに強力に効かせることや, 体液中のGlcNAcase活性を効果的に阻害することなどの工夫により, GlcNAc付加率の向上が期待できる. さらに, 前述したガラクトース付加法やシアル酸付加法との組み合わせにより, より多くの糖鎖をヒト型化に誘導するこ

とが今後できるようになるものと思われる.

おわりに

以上, カイコに不足する糖鎖修飾酵素の増強や, カイコ由来の糖鎖修飾酵素抑制による糖鎖改変の試みを紹介した. 現在, カイコバキュロウイルス発現系において, 目的の糖鎖付加率の微妙な調整や, 糖鎖の均一化など, まだ完全な制御には課題があるものの, 組換え糖タンパク質の糖鎖を希望の糖鎖に改変することは可能になりつつある. 組換えタンパク質生産技術は, バイオ医薬品の生産において現在必要不可欠の技術である. 加えて, 医療用タンパク質における糖鎖コントロール技術の重要性は, ますます高くなっており, 特に抗体医薬品では, 生産時の糖鎖コントロールが品質管理上の大きな課題となっている. バキュロウイルスの発現系は, これまでも医療分野において, 診断薬原料の生産などに利用され有用性が示されている. 今後, 我々は単なるタンパク質の発現だけではなく, 糖鎖付加を初めとするタンパク質の品質までも高度レベルでコントロールされた組換えタンパク質の生産および生産系の開発を進め, 医療分野の進化に貢献していきたいと考えている.

本研究の遂行に当たり, シスメックス株式会社の菅沼政俊氏および比嘉友紀子氏に多大な協力を頂きました. ここに感謝の意を表します.

文 献

- 1) Maeda, S. *et al.*: *Nature*, **315**, 592 (1985).
- 2) Misaki, R. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 979 (2003).
- 3) Abdul-Rahman, B. *et al.*: *Carbohydr. Res.*, **337**, 2181 (2002).
- 4) Altmann, F. *et al.*: *Glycoconj. J.*, **16**, 109 (1999).
- 5) Geisler, C. and Jarvis, D. L.: *J. Biol. Chem.*, **287**, 7084 (2012).
- 6) Hollister, J. R. and Jarvis, D. L.: *Glycobiology*, **11**, 1 (2001).
- 7) Watanabe, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **277**, 5090 (2002).
- 8) Nagata, Y. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **35**, 1009 (2013).
- 9) Tamura, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **18**, 81 (2000).
- 10) 竹田 敏: 昆虫機能利用研究, 79 (2006).
- 11) 農林水産技術会議事務局: 研究成果, **497**, 133 (2013).
- 12) Suganuma, M. *et al.*: 第36回分子生物学会年会, 2P-0970 (2013).
- 13) Kataoka, Y. *et al.*: *Glycobiology*, **24**, 1184 (2014).
- 14) Okada, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1626 (2007).
- 15) Nomura, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 386 (2010).
- 16) Geisler, C. and Jarvis, D. L.: *Biotechnol. Prog.*, **26**, 34 (2010).
- 17) Leonard, R. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **281**, 4867 (2006).
- 18) Nomura, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 131 (2015).