

2P-277 LactiNac 認識能を有する組換え型ノダフジレクチンの酵母での発現
○清水 明¹, 佐藤 隆¹, 館野 浩章¹, 久保田 智巳², 櫻田 紀子¹, 米田 幸代², 成松 久¹, 千葉 靖典¹
(¹産総研・創薬基盤, ²産総研・バイオメディカル)
akira-shimizu@aist.go.jp

【背景と目的】近年、マメ科レクチンに属するノダフジレクチン (*Wisteria floribunda* agglutinin, WFA) が様々ながんのバイオマーカー検出に有効であることが報告されている。また佐藤らはノダフジ種子より WFA をコードする遺伝子のクローニングと大腸菌発現系の構築に成功した。さらに二量体形成への関与が示唆されている 272 残基目の Cys を Ala に置換した変異体 (C272A) が LactiNac (GalNAc β 1,4GlcNAc) を強く認識することを明らかにした。そこで我々は WFA の産業利用のためより効率的な生産系の開発を目的とし、高発現が期待される酵母を用いた組換え型 WFA の発現系を検討した。
【方法・結果】C272A 変異に加え、WFA 自身の N-型糖鎖付加部位である 146 残基目の Asn を Gln に置換した二重変異体の遺伝子を作製した。この遺伝子を His タグもしくは His および FLAG タグを有する分泌発現ベクターに組み込み、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* (*O. lindneri*) へ導入した。大腸菌では培養 1 L あたり 0.3 mg 程度の発現であったのに対し、酵母では培養 1 L あたり His タグのみの精製 WFA を 10 mg 調製することが出来た。一方 His-FLAG タグが付加した組換え体は酵母でも 4 mg の標品しか得られなかった。このことから、FLAG タグの付加は酵母での WFA の発現に影響を与えると示唆された。精製した組換え体の糖鎖認識能を糖鎖アレイで解析した結果、大腸菌組換え体と同様に LactiNac を強く認識することが示された。以上より、酵母由来の組換え型 WFA はバイオマーカー検出のためのツールとして有効活用が期待できる。

Production of the recombinant WFA with binding specificity to LactiNac by yeast
○Akira Shimizu¹, Takashi Satou¹, Hiroaki Taten¹, Tomomi Kubota², Noriko Sakurada¹, Yukiyo Komeda², Hisashi Narimatsu¹, Yasunori Chiba¹
(¹BRD, AIST, ²BRI, AIST)

Key words WFA, LactiNac, *Ogataea minuta*, lectin

2P-278 B 型肝炎ウイルスの感染は肝細胞膜糖タンパク質糖鎖構造を変化させる
○岡本 雄太¹, 三崎 亮¹, 下村 真由香², 高松 真二², 大橋 貴生¹, 三善 英知², 藤山 和仁¹
(¹阪大・生工国際セ, ²阪大院・医)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】
B 型肝炎ウイルス (HBV) は、肝硬変などの症状を引き起こし、世界には数多くの感染者が存在する。しかも完治に至る有効な治療薬がない。その理由として HBV の病態発症メカニズムが明らかになっていないことや、実験室レベルで培養細胞を用いた正確な感染実験系の構築が困難であることが挙げられる。一方、複数のウイルスの感染には糖鎖が深く関わるのが分かってきた。こうしたことを踏まえ、本研究では、HBV の感染が、宿主肝細胞の糖鎖構造へ及ぼす影響を解析した。ヒト肝癌細胞 Huh6 と、HBV ゲノムを保持する、偽感染 Huh6(HB611) の細胞膜表面糖鎖構造解析を行い、HBV 感染による糖鎖構造を比較した。
【結果】
Huh6 と HB611 を、グルタルアルデヒドを用いて固定化し、ペプチド-N-グリコシダーゼ F を用いて、膜表面に局在する N 結合型糖鎖を切断した。ピリジルアミノ化法で糖鎖を蛍光標識し、HPLC により分画、LC/ESI-IT-MS/MS を用いて、糖鎖構造を解析した。Huh6 と HB611 の膜局在糖鎖構造を比較した結果、 α -1,6 コアフコースを有する糖鎖構造の割合が、26.8%増加していることが確認された。シアリル化糖鎖構造や、ハイマンノース型糖鎖構造の割合には、顕著な変化は見られなかった。この結果から、 α -1,6 コアフコースを有する糖鎖の増加は HBV 感染が引き起こしたと考えられる。

Infection of hepatitis B virus alters glycosylation pattern on membrane proteins of hepatocytes.
○Yuta Okamoto¹, Ryo Misaki¹, Mayuka Shimomura², Shinji Takamatsu², Takao Ohashi¹, Eiji Miyoshi², Kazuhito Fujiyama¹
(¹ICBiotech, Osaka Univ., ²Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

Key words hepatitis B virus, glycosylation, hepatocyte

2P-279 チャイニーズハムスター卵巣細胞 K1 株および DG44 株の糖鎖構造比較
○前田 晶子, 岡本 雄太, 三崎 亮, 大橋 貴生, 藤山 和仁
(阪大・生工国際セ)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景および目的】
翻訳後修飾の一つである糖鎖修飾はタンパク質の生物学的活性、安定性、タンパク質間相互作用などに大きな影響を与える。組換えタンパク質生産の宿主であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞では、ヒトと異なる糖鎖修飾機構が存在するため、組換えタンパク質の生物学的活性に及ぼす影響が懸念される。そのため、CHO 細胞の糖鎖構造に関する知見を集積しておく必要がある。さらに、CHO 細胞では複数の株が樹立されてきたが、株間で糖鎖構造がどのように異なる分布を示すのか情報は少ない。本研究では、組換えタンパク質生産宿主として特に広く使用される CHO 細胞 K1 および DG44 株について、N-結合型糖鎖構造を解析し糖鎖構造の分布について比較した。

【方法および結果】
CHO 細胞 K1 および DG44 株より、界面活性剤を含む溶液を用いて糖タンパク質を抽出し、グリコペプチダーゼ F を利用して N-結合型糖鎖を調製した。2-アミノピリジンで蛍光標識した糖鎖を逆相 HPLC にて精製し、LC/MS/MS を用いて糖鎖構造を解析した。各株の糖鎖分布を比較したところシアル酸結合型糖鎖の分布に大きな違いは見られなかったがハイマンノース型糖鎖およびフコース結合型糖鎖の分布には違いが見られた。よって目的タンパク質の性状と機能を考慮して発現宿主を選択することが望ましい。

Comparison of N-glycosylation patterns in Chinese Hamster Ovary K1 and DG44 cells
○Akiko Maeda, Yuta Okamoto, Ryo Misaki, Takao Ohashi, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words N-glycan, CHO-K1, CHO-DG44

2P-280 産業化を指向した N 型糖鎖の系統的化学合成と Endo-M 変異体による糖鎖転移
○石田 秀樹¹, 西川 宜秀¹, 太田 尚志¹, 石原 幹生¹, 飯野 健太¹, 三郎丸 みゆき¹, 熊田 純一¹, 羽生 正人¹, 丹治 嵩裕¹, 湯浅 徳行¹, 岩城 隼¹, 加藤 紀彦², 山本 憲二², 松崎 祐二¹
(¹東京化成工業株式会社, ²石川県大・生物資源研)
yuji.matsuzaki@tcichemicals.com

【背景と目的】
生体における糖タンパク質の糖鎖は、翻訳後修飾として酵素によって伸長される。N 型糖鎖においてはアミノ酸配列によって付加予測部位があるものの、その末端構造は遺伝暗号によって規定されず不均一であり、またバイオ医薬品などの糖タンパク質においても製造に用いる細胞の宿主によって糖鎖構造が異なることが知られている。近年、エンド型糖加水分解酵素を用いて N 型糖鎖を挿け替える技術開発が進み、今後は構造既知の糖鎖供給体制が課題である。
【方法】
本研究では、N 型糖鎖の共通部分構造の大量合成を基軸とし、各種構造を系統的に合成する戦略を立てた。特に、コア 4 糖構造の還元末端および非還元末端側の糖鎖ブロックの種類の選別と保護基の使い分けにより、多様なグリコシル化反応を通じて糖鎖を伸長した。また、Endo-M 関連酵素を使った均一構造の糖鎖のタンパク質への導入を試みた。
【結果と考察】
N 型糖鎖の系統的な化学合成によって、コア糖鎖ブロックを基軸とした効率的なヒト型/非ヒト型 N 型糖鎖の合成が可能となった。また、Endo-M およびその変異酵素を用いた酵素化学的手法により、糖タンパク質へ均一構造糖鎖を導入することに成功した。

Systematic chemical synthesis of N-glycan series & Chemoenzymatic transglycosylation by Glycosynthase
○Hideki Ishida¹, Yoshihide Nishikawa¹, Takashi Ota¹, Mikio Ishihara¹, Kenta Iino¹, Yuiyuki Saburoumaru¹, Junichi Kumada¹, Masato Habu¹, Takahiro Tanji¹, Noriyuki Yuasa¹, Jun Iwaki¹, Toshihiko Katoh², Kenji Yamamoto², Yuji Matsuzaki¹
(¹Tokyo Chemical Industry Co., LTD, ²Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)
Key words oligosaccharides synthesis, N-linked oligosaccharide, transglycosylation, Endo-M