

コンプレックス型組換え糖タンパク質発現への試み

免疫研究部 応用免疫研究室

渡邊 聡子

WATANABE, Satoko



組換えタンパク質は治療薬や検査用試薬として、また有用な実験ツールとして一般に広く利用されている。その発現にはバクテリアや酵母、動植物細胞など様々な宿主が利用されており、発現産物の使用目的に応じて適切な発現系を選択する必要がある。我々は主にウシやブタなど哺乳動物由来の糖タンパク質の発現を目的とすることから、バキュロウイルスと昆虫細胞を用いた発現系(以下、バキュロウイルス発現系)を利用している。バキュロウイルス発現系は、1)発現効率に優れ、大量の組換えタンパク質が得られる、2)無血清培地に馴化した昆虫細胞を利用できるため精製が容易である、などの利点を有している。加えて昆虫細胞が真核生物由来であることから、哺乳動物細胞と類似した一連の翻訳後修飾が期待でき、天然型分子の立体構造や機能を保持したタンパク質の生産が見込めるという大きな特長がある。しかし一方でこれら修飾機構は必ずしも哺乳動物細胞と同一ではなく、その点が当該発現系を用いて生産した組換えタンパク質の臨床応用を妨げるひとつの要因となっている。

生体を構成するタンパク質の多くは糖タンパク質であり、翻訳後修飾の過程で付加される糖鎖はタンパク質の体内動態や生理活性の発現に重要な役割を有している。主に哺乳動物細胞で付加される糖鎖はN-アセチルグルコサミンやガラクトースを含み、その末端にシアル酸が結合した'コンプレックス型'である。特に末端のシアル基はタンパク質の親水性の保持と網内系による捕捉阻止に重要な構造で、例えば哺乳動物への投与を目的とする場合にはシアル基を有するコンプレックス型糖鎖の合成が可能な発現系の利用が望ましい。一方、バキュロウイルス発現系で合成される糖鎖の殆どは'トリマンノシルコア'と呼ばれる昆

虫特有のもので、必ずしも動物への投与に適した構造を有してはいない。糖鎖の構造は宿主細胞質内に存在する糖鎖合成酵素系に依存し、哺乳動物細胞においては関連する糖転移酵素群ならびに付加反応経路がよく解析されている(表1、経路1)が、昆虫細胞に関しては生化学的および遺伝子工学的解析が僅かになされているに過ぎない。現在、昆虫細胞においては表1に示す別経路(経路2)の存在が想定されているが、哺乳動物と共通の経路(経路1)の存在、換言すれば、昆虫細胞におけるガラクトシルトランスフェラーゼ(GTase)やシアリルトランスフェラーゼ(STase)活性の有無などについて確定的な報告はない。

そこで我々はバキュロウイルス発現系で生産される組換え糖タンパク質の糖鎖構造を検討するため、まず当該発現系を用いてN型糖鎖結合部位を分子内に1ヶ所のみ有する組換えウシインターフェロン-(rbIFN-)を生産し、得られたrbIFN-の糖鎖構造をレクチンプロット法にて分析した。その結果、rbIFN-に付加されたN結合型糖鎖はその大半がトリマンノシルコア型であるものの、ごく微量ながらコンプレックス型糖鎖の存在を示唆するガラクトースならびにシアル酸の存在が認められた。次いでバキュロウイルス発現系を用いたコンプレックス型組換え糖タンパク質の効率的生産を試みるため、ワイオミング大のDr. Jarvisらと共同でウシGTaseならびにマウスSTaseの二つの遺伝子を導入した形質転換細胞株を用いてrbIFN-の発現を行った。

発現産物をレクチンプロット法で分析したところ、ガラクトースおよびシアル酸含量の増加が認められたが、糖鎖末端のシアル化の程度は低く'完全な'コンプレックス型糖鎖の合成と言う観点からは満足で



きるものではなかった。

次に我々はN-アセチルグルコサミニダーゼ (NA Gase) に着目した。他の生物種とは異なり昆虫ではNA Gase活性がライソゾーム画分とは別に、ゴルジを含む膜画分にも認められるという報告がある(J. Biol. Chem., 270, 17344-17349, 1995)。我々は昆虫細胞の有するNA Gaseが糖鎖合成経路の途上でN-アセチルグルコサミン残基の除去反応を触媒することによってコンプレックス型糖鎖合成経路を'見かけ上'遮断し、トリマンノシルコア型糖鎖の合成へと誘導するのではないかという作業仮説に立ち、NA Gase阻害条件下でのコンプレックス型糖鎖合成ならびに末端のシアル化について検討した。市販のヒトNA Gase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(2-ADN)の存在下でrbIFN- の発現を試みたところ、末端のシアル化も高率に認められ、SDS-PAGEでは糖鎖構造の変化に伴う分子量の増加が見られた(図1)。同様の結果がウシGM-CSFやプタIL-2など他の組換えタンパク質についても得られたことから、我々は1)昆虫細胞にも哺乳動物と同一の糖鎖合成経路が存在する、2)昆虫においてはNA Gaseが糖鎖の合成にも関与する、3)このNA Gaseがコンプレックス型糖鎖の合成経路を'見かけ上'遮断し、その結果トリマンノシルコア型糖鎖の合成が促される、ものと結論づけた。

上述したようにバキュロウイルス発現系を用いてコンプレックス型組換え糖タンパク質を発現させるにはNA Gase活性の制御が鍵となるが、昆虫由来のNA Gaseの構造や機能は解明されていない。我々は今後もこの昆虫における糖鎖合成経路に関する研究を進め、動物への投与に適した組換えタンパク質の大量生

産技術の開発、ひいては新たな予防・治療法の開発などを通じて畜産業の発展に貢献したいと考えている。



表1 N型糖鎖のプロセッシング

Gl: グルコース, M: マンノース, G: N-アセチルグルコサミン, F: フコース, Ga: ガラクトース, S: シアル酸

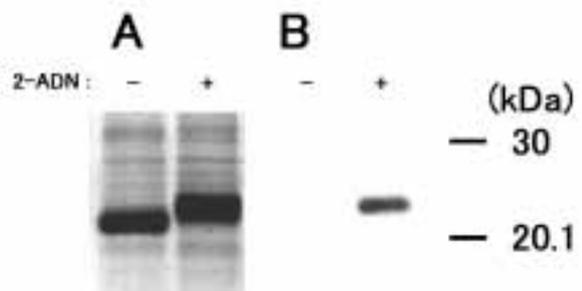


図1 rbIFN- の発現(A)とレクチンプロット(B) TN5細胞を2-ADNの存在下(+), 非存在下(-)で培養し、組換えウイルス感染3日後に培養上清を回収した。(A)Tricine-SDS-PAGE, (B)SNAによるレクチンプロット。