

カイコの糖鎖生物学と糖鎖工学：
カイコの糖鎖構造改変と複合型糖鎖生合成酵素の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-08-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮崎, 剛亜 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00027578

1 (1) 論文タイトル

2 (タイトル) カイコの糖鎖生物学と糖鎖工学

3 (サブタイトル) カイコの糖鎖構造改変と複合型糖鎖生合成酵素の解析

4 (タイトル (英))

5 (サブタイトル (副))

6 (キャッチコピー) カイコとヒトの糖鎖の形と酵素の違い

7 (2) 著者名

8 (和) 宮崎 剛亜

9 (英) Takatsugu MIYAZAKI

10

11 (3) 著者所属

12 静岡大学グリーン科学技術研究所

13

14 (4) 要旨

15 (和 : 100 字程度)

16 カイコは抗体やエリスロポエチンなどの糖タンパク質の組換え発現が可能であ

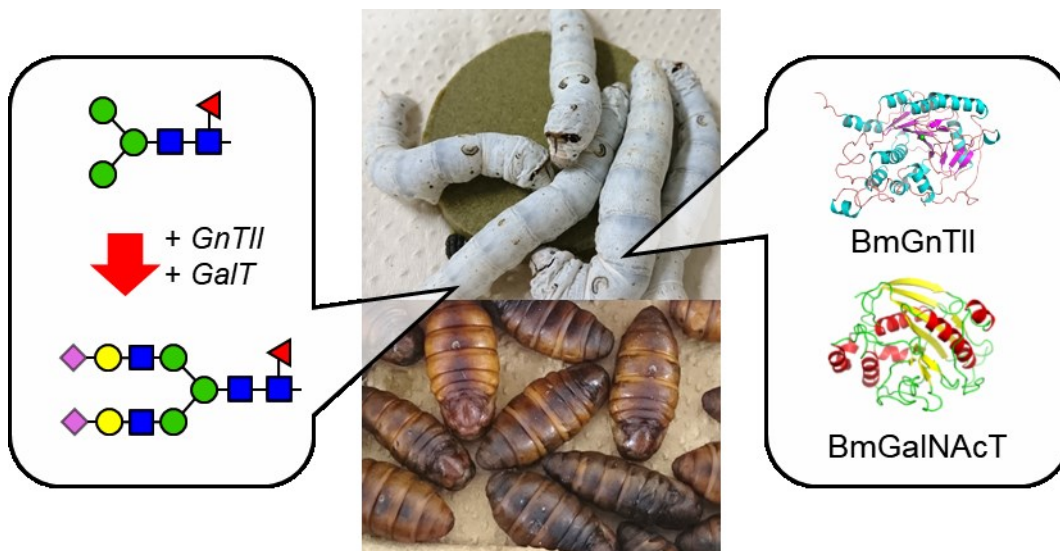
17 るが、糖鎖構造がヒトと大きく異なる。本稿では、カイコを含む昆虫の糖鎖構

18 造の改変やカイコの糖転移酵素に関する研究について紹介する。

19

20

21 (graphical abstract)



22

23

24

25 キーワード

26 1. 糖鎖

27 2. 糖転移酵素

28 3. 昆虫

29 4. カイコ

30 5. バキュロウイルス

31 【本文】

32 糖鎖付加は最も普遍的なタンパク質の翻訳後修飾であり、一部のバクテリア、
33 アーキア、真核生物に渡ってすべてのドメインに見られる。特に真核生物にお
34 いてはおよそ半分以上のタンパク質が糖鎖付加を受けると考えられている。真
35 核生物の N 結合型糖鎖はタンパク質の Asn-X-Ser/Thr モチーフ (X はプロリン
36 以外のアミノ酸残基) のアスパラギン (Asn) 残基に付加し、糖タンパク質の機
37 能や安定性、品質管理、輸送などに関わる重要な役割を果たす。糖鎖は複数の
38 単糖がいくつか枝分かれして連なったものであるが、その構造は生物種によっ
39 て大きく異なる。タンパク質の組換え発現に最も広く用いられている大腸菌は
40 糖鎖付加機構を持たないため、糖タンパク質の生産が苦手であり、代わりに酵
41 母や昆虫細胞、哺乳動物細胞が用いられる。酵母は安価で培養も容易であるが、
42 糖鎖構造がヒトと大きく異なるため、機能を持ったヒトの糖タンパク質を生産
43 できない場合があり、一方で哺乳動物細胞はコストが高いという問題がある。
44 昆虫細胞はその中間の性質を有しタンパク質の生産性も高いことから、研究室
45 レベルから産業レベルまで広く用いられている。昆虫細胞発現系は組換えバキ
46 ュロウイルスを介した遺伝子導入法が主であり、昆虫の虫体にも適用可能であ
47 る。古くから絹の生産に利用され、飼育方法が確立されているカイコ (*Bombyx*
48 *mori*) でもバキュロウイルスを利用した組換え発現系が開発されている⁽¹⁾。し
49 かし、昆虫細胞やカイコが産生する糖タンパク質の糖鎖はヒトなどの哺乳動物
50 のそれと全く同じではなく、例えば抗体医薬やエリスロポエチンなどのヒト用

51 バイオ医薬品の生産には向いていない。そこで、これらの生産する糖タンパク
52 質の糖鎖構造をヒトと同様の構造にしようとする試みがなされてきた。N 結合
53 型糖鎖の生合成は小胞体からゴルジ体にかけて進行するが、N-アセチルグルコ
54 サミン (GlcNAc) とマンノースから成る中間体構造 (図 1 の赤い矢印) までは
55 昆虫も哺乳動物も共通している。哺乳動物では複数の糖転移酵素 (図 1 の GnTIII,
56 GalT, SiaT) により糖鎖が伸長され、ガラクトースやシアル酸を含む複合型糖
57 鎖を形成するのに対し、昆虫では GlcNAc を取り除く酵素 (FDL) により、短い
58 パウチマンノース型糖鎖が形成される (図 1) 。したがって、糖転移酵素の導
59 入あるいは FDL のノックダウンが基本的なアプローチであり、昆虫細胞におい
60 ては主に米国の Donald Jarvis らによって精力的に進められてきた⁽²⁾。カイコ
61 虫体を用いた糖鎖構造改変研究は日本国内の複数のグループが報告しており、
62 昆虫細胞と同様のアプローチによってヒト型糖鎖に近い構造を有するタンパク
63 質の生産に成功している。筆者のグループは、ヒトの複合型糖鎖生合成酵素で
64 ある N-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTIII) およびガラクトース転移酵
65 素 (GalT) の遺伝子を有するカイコ核多角体ウイルス (BmNPV) バクミド (バキ
66 ュロウイルスのゲノム DNA を改変し大腸菌で複製可能にした環状 DNA ベクター)
67 をカイコ蛹に導入することにより、末端にガラクトースまで付加した糖鎖を有
68 する糖タンパク質を生産することに成功した⁽³⁾。また、Suganuma らはバキュロ
69 ウイルス発現系を用いて GalT およびシアル酸転移酵素 (SiaT) をカイコ幼虫で
70 発現させ、シアル酸が付加した複合型糖鎖の生成を確認している⁽⁴⁾。カイコは

71 シアル酸転移酵素の基質となるシチジナーリン酸 (CMP) -シアル酸を生合成す
72 る経路を欠いているため、これを経口あるいは注射によって補うというもので
73 あった。カイコではバキュロウイルスを利用した系だけではなく、糖転移酵素
74 を絹糸腺で発現するように改変したトランスジェニックカイコも作出されてい
75 る。トランスジェニックカイコの作製はバキュロウイルスを利用した一過性発
76 現より時間を要するが、絹糸腺で発現させた糖タンパク質を繭から抽出できる
77 というメリットがある。完全にヒト型糖鎖構造を有する糖タンパク質を生産す
78 るには課題が多いが、今後さらに効率的に糖鎖構造を改変する研究が期待され
79 る。

80 一方、ヒトなどに比べてカイコの糖鎖の構造と機能については、不明な部分
81 が多い。昆虫のモデル生物であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila*
82 *melanogaster*) やコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) を用いた研究では、
83 糖鎖生合成にかかわる酵素をノックダウンすることによって、発生や変態に異
84 常をきたしたり、中枢神経系や免疫に影響したりすることが報告されているが、
85 カイコではそのような研究例は報告されていない。また、カイコなどの昆虫が
86 なぜこのような短い糖鎖を作るのか、という問いに対する答えは見つかってい
87 ない。興味深いことにカイコのゲノムには哺乳動物の複合型糖鎖生合成に関わ
88 る糖転移酵素と相同性を有する遺伝子が存在している。筆者はカイコの GnTIII
89 オルソログ (BmGnTIII) と GalT オルソログ (BmGalNAcT) をクローニングし、組
90 換え酵素を上述のバクミドを利用したカイコ発現系にて調製して性質を調べた。

91 BmGnTIII はヒトの GnTIII と同様の GlcNAc 転移活性を示し, pH 依存性やマンガン
92 イオン (Mn^{2+}) を要する性質は類似していた⁽⁵⁾. 一方, BmGalNAcT はヒト GalT
93 と同じく Mn^{2+} 要求性であるが, ガラクトースよりむしろ *N*-アセチルガラクトサ
94 ミン (GalNAc) を好むことを明らかにした⁽⁶⁾. ヒト由来の酵素の立体構造との
95 比較から BmGnTIII の基質認識に関わるアミノ酸残基は完全に保存されているも
96 のの, GalT のガラクトースの 2-OH 基を認識するアミノ酸残基が BmGalNAcT で
97 は保存されていなかった (図 2). この部位 (Ile298 と Ile310) を異なるアミ
98 ノ酸に置換した変異体の GalNAc 転移活性が低下したことから, この残基が基質
99 特異性に重要であることが明らかになった. これらの酵素はキイロショウジョ
100 ウバエや他のチョウ目昆虫でも見出されており, 昆虫間で広く保存されている
101 ことが分かる. さらに興味深いことに昆虫にも複合型糖鎖と呼べるようなさま
102 ざまな糖鎖構造が見ついている. カイコと同じチョウ目であるイラクサギン
103 ウワバ (*Trichoplusia ni*) の幼虫や培養細胞やマイマイガ (*Lymantria dispar*)
104 の培養細胞では, GlcNAc だけでなく, GalNAc, ガラクトース, グルクロン酸な
105 どで伸長された特徴的な糖鎖が検出されている (図 1)⁽⁷⁾. カイコではそのよ
106 うな例は報告されていないが, 同様の糖鎖を有している可能性は十分に考えら
107 れる. しかしながら, 前述の糖転移酵素とこれらの複合型糖鎖との関りについ
108 ては未知である.

109 ここまで述べてきた研究がすべてではないが, カイコにおける糖鎖研究は組
110 換え糖タンパク質の糖鎖工学の観点から行われてきたものが多い. 昆虫では前

111 述の糖転移酵素に加えて、活性を有するシアル酸転移酵素や CMP-シアル酸合成
112 酵素のオルソログ遺伝子が見出されており、ヒト型糖鎖構造を生合成できるポ
113 テンシャルは秘めているが、内在的な発現やその局在などを明らかにすること
114 が課題となろう。また、糖鎖構造を改変することによるカイコ虫体や培養細胞
115 への影響も定かではない。カイコにおいてより効率的にヒト型糖鎖を産生する
116 ためには、さらなる基礎的な研究が求められる。その過程で昆虫がなぜ我々哺
117 乳動物と異なる糖鎖構造を持つようになったか明らかになることが期待される。

1 【文献】

2 (雑誌)

3 1) S. Maeda, T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato & M.
4 Furusawa: *Nature*, **315**, 592 (1985).

5 2) T. Kato, N. Kako, K. Kikuta, T. Miyazaki, S. Kondo, H. Yagi, K. Kato & E. Y. Park:
6 *Sci. Rep.*, **7**, 1409 (2017).

7 3) C. Geisler, H. Mabashi-Asazuma & D. L., Jarvis: *Methods Mol. Biol.*, **1321**, 131
8 (2015).

9 4) M. Sukanuma, T. Nomura, Y. Higa, Y. Kataoka, S. Funaguma, H. Okazaki, T. Suzuki,
10 K. Fujiyama, H. Sezutsu, K. I. Tatematsu et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 9 (2018).

11 5) T. Miyazaki, R. Miyashita, S. Mori, T. Kato & E. Y. Park: *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 273
12 (2019).

13 6) T. Miyazaki, R. Miyashita, S. Nakamura, M. Ikegaya, T. Kato & E. Y. Park: *Insect*
14 *Biochem. Mol. Biol.*, **115**, 103254 (2019).

15 7) R. Stanton, A. Hykollari, B. Eckmair, D. Malzl, M. Dragosits, D. Palmberger, P.
16 Wang, I. B. H. Wilson & K. Paschinger: *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1861**,
17 699 (2017).

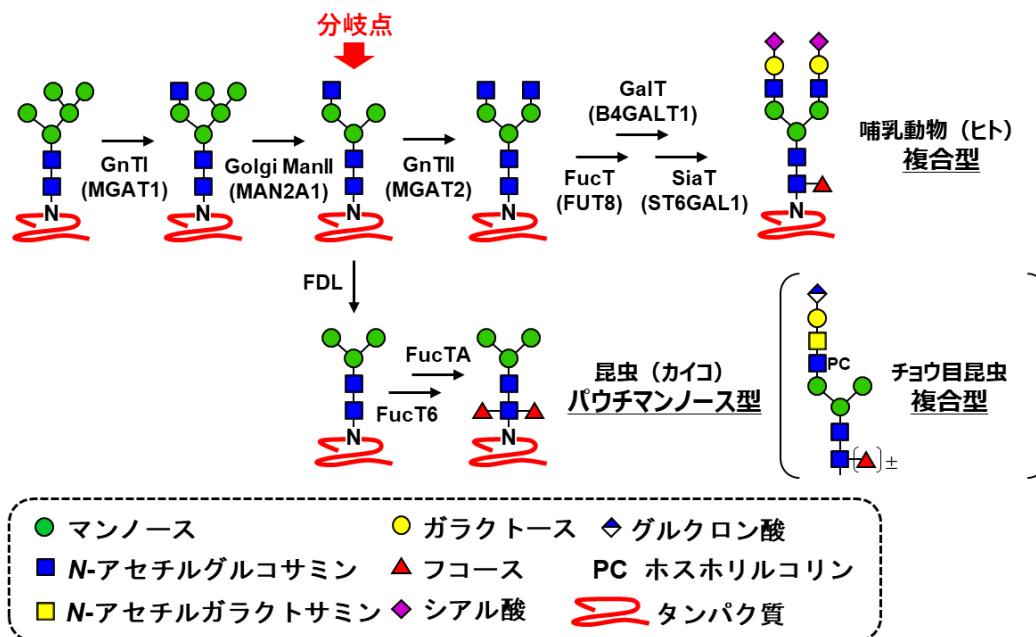


図1 N結合型糖鎖生合成経路の一部

ゴルジ体における糖鎖生合成経路を簡略的に示した。種々の糖質加水分解酵素（Golgi ManII, FDL など）や糖転移酵素（GnTI, GnTII, GalT, SiaT, FucT など）によって、糖が付加されたり取り除かれたりして多様な糖鎖構造を生んでいる。赤矢印で示した糖鎖が哺乳動物と昆虫の生合成経路の分岐点である。また近年、チョウ目昆虫で検出された特徴的な複合型糖鎖の一例を括弧内に示した。

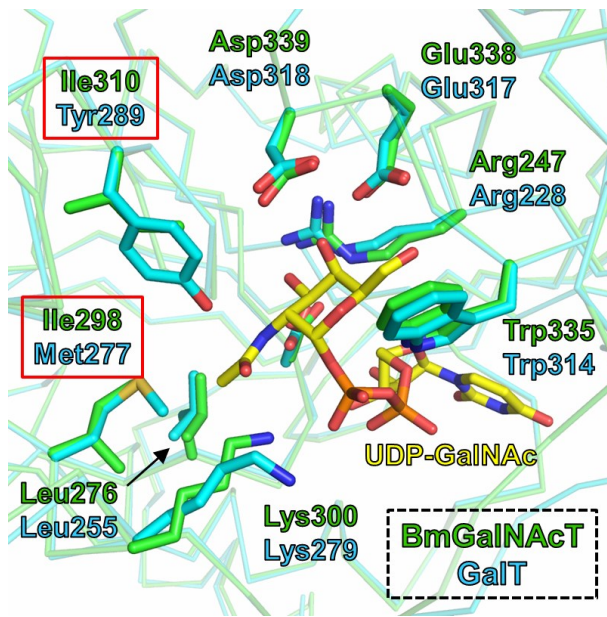


図 2 BmGalNAcT と哺乳動物 GalT の基質結合部位の構造

BmGalNAcT のホモロジーモデル（緑）と哺乳動物の GalT と基質である UDP-GalNAc の複合体構造（Protein Data Bank ID, 1OQM, 水色）を重ね合わせた。保存されていないアミノ酸残基を赤枠で囲った。