



Title	MODIFICATION OF PLANT CELL N-GLYCOSYLATION TO PRODUCE GLYCOPROTEINS WITH HUMAN COMPATIBLE TYPE STRUCTURE
Author(s)	Palacpac, Nirianne Marie BQ
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155531">https://doi.org/10.11501/3155531</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 【 3 】

氏 名	パラックパク ニリアン・マリー・ビーキュー Palacpac Nirianne Marie BQ
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 14822 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 5 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科 応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	MODIFICATION OF PLANT CELL N-GLYCOSYLATION TO PRODUCE GLYCOPROTEINS WITH HUMAN COMPATIBLE TYPE STRUCTURE (ヒト適応型糖鎖構造を持つ糖タンパク質生産のための植物細胞 N-結合型糖鎖付加機構の改変)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 関 達治 (副査) 教 授 小林 昭雄 教 授 新名 悅彦 教 授 吉田 敏臣

## 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヒト型糖鎖修飾タンパク質の植物における生産を目標とし、ヒト由来の糖鎖付加酵素を植物細胞に導入し発現させ、植物細胞内糖鎖プロセシング機構に与える効果に関する研究成果をまとめたものであり、以下の 5 章から構成されている。

第一章では、宿主として植物体を用いたヒト抗体やワクチンなどの組換えタンパク質の生産において重要である翻訳後修飾、特にヒト型糖鎖構造への修飾について、その問題点を明らかにし、本研究の背景と目的について述べている。

第二章では、宿主とするタバコ BY2 細胞内の糖鎖構造を解析し、5 種類からなることを明らかにしている。また、抗原性となり得るキシロースを含む型が 92.5% を占め、少量 (7.5%) の高マンノース型糖鎖が存在することを示している。さらに、非還元末端に N-アセチルグルコサミン残基を持つ糖鎖が全体の 48.2% 存在することを明らかにし、BY2 細胞内の糖タンパク質糖鎖が、ヒト型糖鎖構造への変換に必須なガラクトース転移酵素の基質となる可能性を示唆している。

第三章では、ヒト由来の  $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素をタバコ細胞に導入するため、同酵素 cDNA を用いてタバコ BY2 細胞を形質転換している。ガラクトース転移酵素の発現を、酵素活性の測定、サザン解析、ウェスタン解析で確認するとともに、本形質転換タバコ細胞の糖鎖構造を解析し、全体の 47.3% がガラクトース残基が付加されていることを明らかにしている。フコースやキシロース残基が付加した糖鎖が存在しないことを見出し、形質転換タバコ細胞を用いれば抗原性となる糖鎖を持たない糖タンパク質を生産できる可能性を導いている。得られた糖鎖構造の解析結果から、ガラクトース残基を含む糖鎖合成経路を推定している。

第四章では、植物細胞におけるヒト型外来糖タンパク質生産モデルとして、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用い、形質転換タバコ細胞における外来糖タンパク質の特異的な糖鎖構造賦与について検証している。形質転換タバコ細胞および野生株を HRP 遺伝子を用いて形質転換し、等電点電気泳動、酵素活性染色、ウェスタン解析などにより形質転換体における HRP の発現を確認している。組換え体 HRP のガラクトース残基を持つ糖鎖構造は、種々の解

析から Gal1GlcNAc1Man3GlcNAc2 であると推定している。形質転換タバコ細胞で生産させた HRP は抗キシロース抗体とは免疫反応せず、キシロース残基が存在しないことを示唆している。

第五章では、本論文を総括し、将来の研究を展望している。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、植物細胞にヒト由来の糖鎖付加酵素を導入し発現させ、植物細胞内糖鎖プロセシング機構に与える効果に関する研究成果をまとめたものである。植物体を用いたヒト抗体やワクチンなどの組換えタンパク質の生産に関する研究には、翻訳後修飾、特に糖鎖修飾について、ヒト適応型糖鎖構造の賦与に関する研究が不可欠であるが、本研究は、ヒト由来の  $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子を用いて形質転換した植物細胞において、本来にはない糖鎖合成経路を構築することに成功している。本研究の成果を要約すると以下の通りである。

(1)宿主とするタバコ BY2 細胞内の糖タンパク質に存在する糖鎖構造が 5 種類であることを明らかにしている。また、抗原性となり得るキシロースを含む型が、全体の 92.5% を、少量 (7.5%) の高マンノース型糖鎖が存在することを示している。フコース残基を持つ糖タンパク質をタバコで初めて検出している。非還元末端に N-アセチルグルコサミン残基を持つ糖鎖が全体の 48.2% 存在することを見出し、BY2 細胞内の糖タンパク質糖鎖はガラクトース転移酵素の基質となる可能性が示唆している。

(2)ヒト由来の  $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素 cDNA を用いてタバコ BY2 細胞を形質転換している。ガラクトース転移酵素の発現を、酵素活性の測定、ザザン解析、ウェスタン解析で確認後、最も酵素活性の高い株 GT6 を取得している。糖鎖構造解析の結果、全体の 47.3% がガラクトース残基が付加されていることを明らかにしている。フコースやキシロース残基が付加した糖鎖が付加しないことを見出し、GT6 を用いれば、植物で見出される抗原性となる糖鎖を持たない糖タンパク質を生産できる可能性を導いている。得られた糖鎖構造の解析結果から、ガラクトース残基を含む糖鎖合成経路を推定している。

(3)GT6 細胞における糖タンパク質の異種宿主における発現と、外来タンパク質に特異的な糖鎖構造を賦与できる宿主としての GT6 細胞の能力について検証している。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を外来糖タンパク質のモデルとして用い、HRP 遺伝子により GT6 及び野生株を形質転換し、等電点電気泳動、酵素活性染色、ウェスタン解析などにより形質転換体における HRP の発現を確認している。組換え体 HRP のガラクトース残基を持つ糖鎖構造は、種々の解析から Gal1GlcNAc1Man3GlcNAc2 であると推定している。GT6 で生産させた HRP は抗キシロース抗体とは免疫反応せず、キシロース残基が存在しないことを示唆している。GT6 細胞にいて外来糖タンパク質にガラクトース残基を糖鎖構造に賦与できることを実証している。

以上のように、本論文は植物体を用いたヒト抗体やワクチンなどの組換えタンパク質の生産の場合に不可欠なヒト適応型糖鎖構造賦与のための糖鎖合成経路を構築することに成功している。また、その開発研究を通じ、ガラクトース残基を含む糖鎖合成経路に関し新たな知見を得ている。これらの研究成果は、植物細胞工学、特に植物バイオテクノロジーの発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。