

Title	ヒト由来N-結合型糖鎖付加機能を有する植物細胞の構築
Author(s)	三崎, 亮
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44981">https://hdl.handle.net/11094/44981</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	三崎 亮
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 18779 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 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	ヒト由来 <i>N</i> -結合型糖鎖付加機能を有する植物細胞の構築
論文審査委員	(主査) 教授 関 達治  (副査) 教授 塩谷 捨明 教授 室岡 義勝 教授 原島 俊 教授 金谷 茂則 教授 清水 浩 岡山大学農学部生物資源化学講座教授 木村 吉伸 教授 二井 將光 教授 卜部 格 教授 福井 希一 教授 小林 昭雄 教授 仁平 卓也 教授 大竹 久夫

### 論文内容の要旨

本報は、ヒト由来 *N*-結合型糖鎖付加機能を有する植物細胞より細胞外に分泌された糖タンパク質糖鎖の構造解析及び、植物細胞においてシアル酸生成基本経路を構築したものである。

緒論では、本研究の背景及び意義について説明している。まず、植物細胞を利用した動物由来タンパク質生産が有する利点について述べている。一方で、タンパク質の生理活性や安定性等に寄与する糖鎖の重要性についての知見を述べており、植物細胞を利用して生産された動物由来タンパク質には、動物型ではなく植物型糖鎖が付加されることから、本来の機能を発揮しない可能性がある」と指摘している。こうしたことを踏まえ、植物細胞の糖鎖合成経路を改変し、動物(ヒト)型糖鎖合成機能を持つ有用植物細胞を構築することでオリジナルに近い糖鎖を持つタンパク質を生産させることは、植物を利用した外来タンパク質生産において有効な手段の一つであると考え、本研究を行うに至っている。

第一章では、植物細胞からの外来タンパク質分泌を考えて、その糖鎖構造に関する知見を得る為にタバコ培養細胞 BY2 株より細胞外に分泌された糖タンパク質の糖鎖構造解析を行っている。この結果、細胞内由来糖鎖構造では  $\alpha$ -1,2 キシロース及び  $\alpha$ -1,3 フコース結合を含む糖鎖は全糖鎖量の 89.2%であったのに対し、細胞外では僅か 14.1%である等、細胞内外において糖鎖構造の分布が大きく行っていることを明らかにしている。

第二章では、ヒト由来  $\alpha$ -1,4-ガラクトース転移酵素を発現するタバコ培養細胞 BY2 株 (GT6 株) より、培養液中に分泌された糖タンパク質糖鎖構造の解析を行っている。GT6 株に関しては、細胞内と同様に細胞外糖タンパク質糖鎖においても  $\alpha$ -1,4-ガラクトース残基を持つ *N*-結合型糖鎖が付加されており、且つ確認された全糖鎖構造において  $\alpha$ -1,4-ガラクトース結合が見られる。即ち、動物由来の糖鎖修飾酵素を植物細胞において発現させたとしても、糖タンパク質は細胞外に分泌され動物型への糖鎖修飾も行われることを示している。更に、*in vitro* シアル酸転移酵素反応の結果から、GT6 細胞外糖タンパク質糖鎖が哺乳類由来のシアル酸転移酵素の基質となることを示している。これは、植物細胞より細胞外へ分泌させた外来タンパク質を精製し、その糖鎖を *in vitro* において動物型に改変出来ることを示しており、更にシアル酸付加機能を導入すれば、より動物型に近い *N*-結合型糖鎖を合成出来る有益なバイオ

リアクターの構築が可能であることを示している。

植物細胞が糖タンパク質糖鎖へシアル酸を付加する為には、少なくともシアル酸合成酵素、CMP-シアル酸合成酵素、CMP-シアル酸トランスポーターそしてシアル酸転移酵素が必要とされる。第三章では、シアル酸転移酵素の基質である CMP-シアル酸を合成する CMP-シアル酸合成酵素及び糖鎖修飾の場であるゴルジ体内へ CMP-シアル酸を輸送する CMP-シアル酸トランスポーターに注目し、タバコ培養細胞 BY2 株において各遺伝子を発現させている。この結果、植物細胞において生産されたヒト由来 CMP-シアル酸合成酵素が、CTP 及び *N*-アセチルノイラミン酸からの CMP-シアル酸合成活性を有し、合成された CMP-シアル酸は、ドナー基質としてアシアロ糖タンパク質糖鎖へのシアル酸転移酵素反応に利用されることを明らかにしている。一方で、植物細胞内において生産されたヒト由来 CMP-シアル酸トランスポーターに関しても、ゴルジ装置内への CMP-シアル酸の取り込み活性を有することが示された。以上から、ヒト由来シアル酸合成酵素関連遺伝子を植物細胞で発現させ、シアル酸合成経路を植物で構築出来ることを示している。

総括では、本論文の結果をまとめており、ヒト由来 *N*-結合型糖鎖付加機能を有する植物バイオリアクターの構築がバイオ医薬品生産等へ利用されることの有用性、将来の展望について考察している。

### 論文審査の結果の要旨

本報は、ヒト由来 *N*-結合型糖鎖付加機能を有する植物細胞より細胞外に分泌された糖タンパク質糖鎖の構造解析及び、植物細胞においてシアル酸生合成基本経路を構築したものである。

緒論では、本研究の背景及び意義について説明した。

第一章では、タバコ培養細胞 BY2 株 (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2) より培養液中に分泌された糖タンパク質の糖鎖構造解析を行った。この結果、細胞内糖鎖構造では  $\alpha$ -1,3 フコース結合を含む糖鎖が全糖鎖量の約 90%であったのに対し細胞外糖鎖構造では約 14%である等、植物細胞より細胞外に分泌された糖タンパク質糖鎖構造の分布は、細胞内とは大きく異なっていることを示した。

第二章では、ヒト由来  $\alpha$ -1,4-ガラクトース転移酵素を発現するタバコ培養細胞 BY2 株 (GT6 株) より、培養液中に分泌された糖タンパク質糖鎖構造の解析を行った。この結果、GT6 株より細胞外に分泌された糖タンパク質糖鎖では、構造の推定された全糖鎖においてガラクトース残基が  $\alpha$ -1,4 結合で付加されていることを確認した。更に、GT6 株より細胞外に分泌された糖タンパク質糖鎖が *in vitro* において動物由来シアル酸転移酵素の基質となり、実際にシアル酸が転移されることを証明した。

第三章では、植物細胞におけるシアル酸生合成基本経路の構築を目的とし、ヒト由来 CMP-シアル酸合成酵素及びヒト由来 CMP-シアル酸トランスポーターをタバコ培養細胞 BY2 株で発現させた。この結果、植物細胞において生産したヒト由来 CMP-シアル酸合成酵素より CMP-シアル酸が合成され、更に、合成した CMP-シアル酸を用いて *in vitro* シアル酸転移酵素反応を行うことでヒト由来シアル酸転移酵素の基質となることを示した。同様に植物細胞において生産したヒト由来 CMP-シアル酸トランスポーターが、ミクロソームベシクル内への CMP-シアル酸輸送活性を有し、更に、膜に局在することを示した。

総括では、本論文の結果をまとめ、考察した。ヒト由来 *N*-結合型糖鎖付加機能を有する植物バイオリアクターの構築がバイオ医薬品生産等へ応用されることへの期待、植物工場としての将来の展望について述べた。

以上のように、本論文は、ヒト由来 *N*-結合型糖鎖付加機能を有する植物細胞より細胞外に分泌された糖タンパク質糖鎖の構造を明らかにし、植物細胞においてシアル酸生合成基本経路を構築した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。