OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	カイコにおけるN-アセチルグルコサミニダーゼの探索と活性制御法に関する研究
Author(s)	野村, 雄
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52125
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　野村　雄　）	
論文題名	カイコにおける*N*-アセチルグルコサミニダーゼの探索と活性制御法に関する研究

論文内容の要旨

第1章　序章

バキュロウィルスーカイコを用いた組換えタンパク質発現法は、有用性が高い手法であるが、付加される糖鎖の構造が、非還元末端にシアル酸が付加される哺乳類とは異なり、短い糖鎖が付加される。この原因の１つとして、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の切断を行うN-アセチルグルコサミニダーゼ（GlcNAcase）が存在し、糖鎖の伸長が抑えられることが知られていた。糖鎖の構造が糖タンパク質の機能に大きく関わることから、カイコを用いた有用糖タンパク質の生産を考えた場合、糖鎖も哺乳類型であることが望ましい。そこでカイコにおけるGlcNAcaseの探索と活性抑制を行った。

第2章　カイコ新規GlcNAcaseの単離と基質特異性の解析

カイコデータベースを利用して、カイコ新規GlcNAcase（BmFDL）の遺伝子cDNAを取得した。バキュロウィルスを利用して組換え生産したBmFDLを精製し基質特異性を調べた所、これまでカイコで報告されてきたBmGlcNAcase1やBmGlcNAcase2とは明らかに異なることが分かった。BmFDLの基質特異性は、糖鎖プロセッシングに関わるショウジョウバエFDLと同様であったこと等から、今回単離・生産したBmFDLが、昆虫型糖鎖の形成に関与することが示唆された。

第3章　カイコGlcNAcaseの局在

3種のカイコGlcNAcaseに対し、組織別のmRNA転写量及びカイコ体内の局在を調べた所、BmGlcNAcase1は絹糸腺に局在する事、BmGlcNAcase2は主として脂肪体で多く合成され体液中に分泌される可能性が、BmFDLは脂肪体で合成、蓄積している可能性が見えてきた。

第4章　カイコGlcNAcase抑制法の検討

BmFDLを抑制するためにRNAi機構を持つ遺伝子組換え（TG）カイコの作製を行い、さらに体液中のBmGlcNAcase2の活性を阻害する為に、GlcNAcase阻害剤の投与も並行して行った。TGカイコでは、BmFDLの転写量が25%に、GlcNAcase活性が50%に低下しており、RNAi法を用いてBmFDL発現を抑制できた。また、モデル糖タンパク質であるALPを発現した所、コントロールカイコでは、ALP由来糖鎖の非還元末端にはGlcNAcが検出できなかったのに対し、阻害剤投与カイコでは0.8%の糖鎖にGlcNAcの付加が見られ、さらにRNAi法による遺伝子発現抑制TGカイコでは、その割合が4.3%に上昇した。

第5章　総括

以上の研究から、カイコにおいて、RNAi法を用いてBmFDLの発現抑制を行い、糖鎖構造の改変が可能なことを示した。今後、更なる抑制効果を強化すると共に、遺伝子工学的手法を用いて、糖鎖へガラクトースやシアル酸を付加することで、実際に糖鎖改変糖タンパク質生産への応用が期待できる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（野村　雄　　）

	(職)	氏　名
論文審査担当者		
主 査	教授	藤山　和仁
副 査	教授	村中　俊哉
副 査	教授	渡邊　肇
副 査	教授	原島　俊
副 査	教授	大竹　久夫
副 査	教授	福井　希一
副 査	教授	紀ノ岡　正博
副 査	教授	福崎　英一郎
副 査	教授	仁平　卓也

論文審査の結果の要旨

第1章　序章

バキュロウィルスーカイコを用いた組換えタンパク質発現法は、有用性が高い手法である。しかし、付加される糖鎖は、非還元末端にシアル酸が付加される哺乳類とは異なり、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基のない短い構造（昆虫型糖鎖）である。この原因の１つとして、カイコには、GlcNAc の切断を行う N-アセチルグルコサミニダーゼ（GlcNAcase）が存在し、糖鎖の伸長が抑えられることが知られていた。糖鎖構造は糖タンパク質の生物学的機能発現に大きく関わることから、カイコを用いた有用糖タンパク質の生産を考えた場合、糖鎖も哺乳類型であることが望ましい。そこでカイコにおける GlcNAcase 遺伝子の探索と、その活性抑制技術開発を行った。

第2章　カイコ新規GlcNAcaseの単離と基質特異性の解析

カイコデータベースを利用して、カイコ新規 GlcNAcase（BmFDL）の遺伝子 cDNA を取得した。バキュロウィルスを利用して組換え生産した BmFDL を精製した。精製酵素を用いて基質特異性を調べ、これまでカイコで報告されてきた BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 とは明らかに異なることを見出した。BmFDL の基質特異性は、糖鎖プロセッシングに関わるショウジョウバエ FDL と同様であったこと等から、今回単離・生産した BmFDL が、カイコにおける昆虫型糖鎖の形成に関与することが示唆された。

第3章　カイコGlcNAcaseの局在

3 種のカイコ GlcNAcase に対し、組織別の mRNA 転写量及びカイコ体内の局在性を調査し、BmGlcNAcase1 は絹糸腺に局在する事、BmGlcNAcase2 は主として脂肪体で多く合成され体液中に分泌される可能性が、BmFDL は脂肪体で合成されて蓄積している可能性が見えてきた。

第4章　カイコGlcNAcase抑制法の検討

BmFDL 活性を抑制するために RNAi 機構を持つ遺伝子組換え（TG）カイコを作製した。さらに GlcNAcase 阻害剤の投与も並行して体液中の BmGlcNAcase2 の活性を阻害した。TG カイコでは、BmFDL の転写量が 25%に、GlcNAcase 活性が 50%に低下しており、RNAi 法を用いて BmFDL 活性を抑制できた。また、モデル糖タンパク質である ALP を発現させ、BmFDL 活性の抑制効果を調査した。コントロールカイコでは、ALP の糖鎖の非還元末端には GlcNAc が検出できなかったのに対し、BmGlcNAcase2 阻害剤を投与した場合では 0.8%の糖鎖に GlcNAc の付加が見られた。さらに RNAi 法による遺伝子発現抑制 TG カイコに BmGlcNAcase2 阻害剤を投与して生産した ALP の糖鎖では、GlcNAc 付加糖鎖の割合が 4.3%に上昇した。

第5章　総括

以上の研究から、カイコにおいて、RNAi 法を用いて BmFDL の発現抑制を行い、糖鎖構造の改変が可能なことを示した。今後、更なる抑制効果を強化すると共に、遺伝子工学的手法を用いて、糖鎖へガラクトースやシアル酸を付加することで、実際に糖鎖改変糖タンパク質生産への応用が期待できる。

以上のように、本論文はカイコにおける糖鎖修飾酵素の遺伝子発現を RNAi 法を用いて抑制することができることを示した。本成果は、遺伝子発現制御による生体内糖鎖修飾の改変技術開発の基盤となることが期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。