

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	<a href="https://doi.org/10.18910/52125">https://doi.org/10.18910/52125</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

博士学位論文

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

野村 雄

2015年1月

大阪大学大学院工学研究科

## 目次

第1章 序論 .....	2
第2章 カイコ新規 GlcNAcase の単離と基質特異性の解析 .....	11
第1節 材料と方法 .....	12
第2節 結果 .....	19
第3節 考察 .....	29
第3章 カイコ GlcNAcase の局在 .....	31
第1節 材料と方法 .....	31
第2節 結果 .....	35
第3節 考察 .....	40
第4章 カイコ GlcNAcase 抑制法の検討 .....	44
第1節 材料と方法 .....	44
第2節 結果 .....	52
第3節 考察 .....	61
第5章 総括 .....	63
引用文献 .....	68
出版リスト .....	78
謝辞 .....	79

## 第1章 序論

今日、遺伝子組換え技術を用いて、研究に用いる組換えタンパク質を発現させることは、生化学や分子生物学を始めとした生物科学分野において、最も汎用的に実施されている手法の1つである。また、研究目的だけでなく、インターフェロンや医療用抗体等の医薬品の生産や、洗剤用プロテアーゼ等の化学工業で用いられている種々の酵素の生産、抗原やスタンダード標品等の診断薬原料の生産等、広く医薬・化学産業においても、組換えタンパク質発現（生産）技術が広く利用されており、必要不可欠な手法として、今後さらに多くの場面で使用されることが予想される。

組換えタンパク質を発現する方法としては、無細胞から哺乳動物まで、種々の宿主を用いた方法が構築されている（Yin J *et al.*, 2007）。その中でも特に、大腸菌を用いる方法、酵母を用いる方法、昆虫細胞を用いる方法、CHO細胞等の哺乳動物細胞を用いる方法は、研究分野及び産業分野において頻繁に使用されている。

大腸菌を用いる組換えタンパク質発現系は、最も手軽に実施できる方法であり、実施例も他の生産系に比べて多い。発現量は一般的に多いが、発現タンパク質が不溶性になることも多く、また翻訳後修飾が起きない等の問題点もある。一方、酵母を用いる生産系は、真核生物であるため、ある程度の翻訳後修飾がなされるが、取り扱いが大腸菌に比べやや煩雑であり、発現タンパク質を抽出するのに強固な細胞壁を破砕する必要がある等、取り扱いに工夫が必要である。CHO等の哺乳類細胞は、翻訳後修飾が最もヒト型に近い修飾がなされるなど、組換えタンパク質の品質においては優れた系であり、抗体医薬品の生産等にも用いられているが、一般的に発現量は少ない等の問題点もある。昆虫細胞を用いた発現系は、組換えタンパク質の発現量が大きく、翻訳後修飾が起きること、真核生物のタンパク質が比較的可溶性の状態が発現される等の利点があり、使用される機会が増えている。このように個々の発現系は、各々長所と短所を持ち、今後も利用者の目的や都合に応じて、並行して使用さ

れていくと思われる。

一方、私は、後述する通り、mg 単位の多種類のタンパク質を、飼育室 1 つあれば同時に、かつ翻訳後修飾された形で発現できるバキュロウィルスの系に魅力を感じ、この方法を用いて主に組換えタンパク質の発現を行っている。

本論文で主として取り扱うカイコバキュロウィルス発現系は、昆虫（細胞）を用いた発現系の 1 種である。バキュロウィルスは昆虫に特異的に感染する昆虫ウィルスの 1 種であり、中でも核多角体ウィルス（Nucleopolyhedrovirus）が基本的に組換えタンパク質の発現に用いられる。このゲノムの長さが約 130 kbp の 2 本鎖 DNA ウィルスは、桿状のヌクレオカプシドとそれを包むエンベロープから形成されており、ウィルス粒子のサイズは 90×380 nm になる。鱗翅目、膜翅目、双翅目、毛翅目等の昆虫から、各々異なるバキュロウィルスが発見されていて、宿主昆虫は 600 種類以上になる。特に鱗翅目の昆虫に良く感染が見られるが、各々のウィルスの宿主特異性は高い (Martignoni ME *et al.*, 1986)。基本的には経口感染し、腸からウィルスが侵入する。宿主の昆虫の腸管の細胞に感染すると、増殖したウィルス粒子が体液中に放出され、他の組織に感染する。その後、全身の組織のほとんどでウィルスの増殖が起き、約 1 週間後の感染末期に多角体と呼ばれるウィルス封入体を大量に合成する (鈴木, 1999)。封入体を構成するポリヘドリンタンパク質は、ウィルスの生存・増殖には必須のタンパク質ではないため、このタンパク質の強力なプロモーターを利用し、ポリヘドリン遺伝子を、任意の発現させたいタンパク質の遺伝子と置き換えることで、組換えタンパク質を大量に発現することが可能となる。バキュロウィルスを用いたタンパク質発現系は、Summers ら (Smith GE *et al.*, 1983) と前田ら (Maeda S *et al.*, 1985) により、1980 年代に各々独自に開発された。Summers らはキンウワバの 1 種である *Autographa californica* に感染するバキュロウィルスを用い、昆虫培養細胞に感染する発現系を開発した。それに対し、前田らは、カイコに感染するバキュロウィルスを用い、カイコ培養細胞だけでなく、カイコの虫体を用いて組換えタンパク質を発現する系を開発した。この背景には、養蚕が盛んであった日本においては、カイコの飼育技術も広く普及してお

り、この飼育技術と新たに開発した組換えタンパク質発現系を組み合わせることにより、容易に大量のタンパク質を生産するシステムを構築する狙いがあったと思われる（前田, 1993）。

バキュロウィルスを用いた組換えタンパク質発現系の中でも、昆虫細胞を用いた発現系に対し、カイコを用いるカイコバキュロウィルス発現系は、幾つかの長所を有している（Nagaya H, 2009）。

[1] 高生産性 カイコ1頭で数百 $\mu\text{g}$ の組換えタンパク質の発現が可能であり、小さな容器で飼育可能な10頭のカイコで、 $\text{mg}$ 単位の組換えタンパク質が得られる。

[2] 多種目同時生産 カイコ1頭が、あたかも培養細胞を用いた組換えタンパク質発現時の個々の培養フラスコのように、異なる組換えタンパク質を発現することができ、しかも、カイコ自身は飛行もせず、移動もあまりしないため、小さな容器やシャーレで飼育することができるため、多種類の組換えタンパク質を同時に発現するのに向いている。

[3] スケールアップの柔軟性 発現量を増やすためには、飼育頭数を単純に増やすだけで対応可能。また生産規模を拡大しても、生産条件には変化がない。

このように、カイコバキュロウィルス組換えタンパク質発現系は、昆虫個体を使用するが故のユニークな特質を有しており、大変魅力的な系と思われる。しかしながら、一般的にはカイコを飼育することは、心理的にかなり高いハードルとして感じている人も多く、まだ広くは普及していない。そのようなカイコバキュロウィルス発現系を利用してみたいが、自ら実施することが困難な研究者のために、カイコバキュロウィルスを用いた発現受託もなされており（プロキューブ <http://procube.sysmex.co.jp/>）、これまで2,000種以上の組換えタンパク質の生産に成功している。

カイコバキュロウィルス発現系で発現したタンパク質は、大腸菌で発現したタンパク質に比べ、天然に存在するタンパク質と同等の機能や立体構造を有することが多く、また、タンパク質への糖鎖付加やリン酸化等の翻訳後修飾が見られる。翻訳後修飾は、タンパク質の機能に深く関わっていることが多く、そ

のコントロールはタンパク質発現系における重要な課題の1つである。特に糖鎖修飾は、主要な翻訳後修飾の1つであり、真核生物の多くのタンパク質に糖鎖付加がなされている。糖鎖の機能としては、細胞を識別する機能、感染症や炎症等での結合・認識部位としての役割、癌細胞等における転移との関わり、タンパク質の品質管理や体内での保護作用等、多岐に渡る機能が知られている (Lis H *et al.*, 1993; Varki A, 1993)。また、糖タンパク質の糖鎖付加のパターンは、発現組織や時期、細胞や組織の状態に依存していると考えられている (Lu Y *et al.*, 1991; Kukuruzinska MA *et al.*, 1998)。

糖タンパク質糖鎖としては、アスパラギン結合型糖鎖 (*N*-グリカン) と、ムチン型糖鎖 (*O*-グリカン) があり、カイコで (バキュロウィルスを用いて) 発現したタンパク質には *N*-グリカンが付加されることが分かっているが、その構造は哺乳類由来のタンパク質とはやや異なる (Misaki R *et al.*, 2003)。カイコを含む昆虫で付加される *N*-グリカンの特長としては、まず非還元末端にシアル酸が付加する哺乳類の糖タンパク質糖鎖に対し (図 1-1A)、一般的にはマンノース付加までの短い糖鎖構造のものが主体となっている (図 1-1B)。カイコ自身の糖タンパク質の糖鎖構造の詳細な解析を実施した例は少ないが、その1例として、ホルモン刺激因子である PTH の糖鎖構造の解析がなされており、短い糖鎖構造が付加されることが報告されている (永田, 1998)。次いで、還元末端側の *N*-アセチルグルコサミンに付加するフコース (コアフコース) が、哺乳類の糖タンパク質糖鎖では $\alpha$ -1,6 結合しているのに対し、カイコでは $\alpha$ -1,6 結合しているものに加え、 $\alpha$ -1,3 結合しているものも見られることが、大きな相違点である (Misaki R *et al.*, 2003; Ailor E *et al.*, 2000)。このような糖鎖の違いは、タンパク質の機能に影響を与える可能性が高い。例えば、エリスロポエチンは付加される糖鎖が4本鎖末端シアル酸であることが知られているが (Takeuchi M *et al.*, 1988)、このシアル酸が存在しないと、*in vivo* において活性が消失することが知られている (Goldwasser E *et al.*, 1974)。また、ショウジョウバエの研究 (北島 *et al.*, 2010) から *O*-グリカンも付加されることが予測されるが、研究は進んでいない。



図 1-1A. 哺乳類型 *N*-グリカン

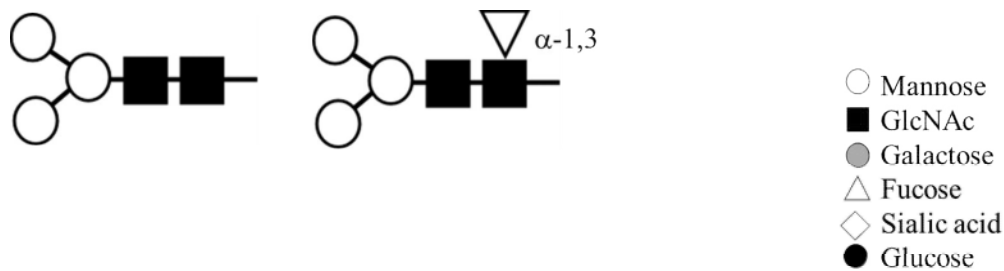


図 1-1B. 昆虫型 *N*-グリカン

*N*-グリカンを付加する経路は、哺乳類も昆虫も基本的には同じと考えられており (図 1-2)、まずはドリコールからグルコース (Glc) 3 残基、マンノース (Man) 9 残基、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 残基からなる構造を有する糖鎖 (図 1-2 ER 内) がペプチド鎖に転移されて糖鎖のプロセッシングが開始される。次にグルコースとマンノースの切断が起き、Man5GlcNAc2 の構造まで糖が切断される。カイコにおいてはグルコース切断に関する酵素の報告がなされている (Watanabe S *et al.*, 2013)。次いで *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GnTI) により、GlcNAc の付加がなされ、マンノース切断後、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTII) により、GlcNAc2Man3GlcNAc2 の基本構造を持つ糖鎖が形成される、この後、哺乳類及びその培養細胞においては、ガラクトースの付加やシアル酸の付加がなされるが、昆虫及びその培養細胞においては、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) により、非還元末端の GlcNAc が切断され、糖鎖の伸長が妨げられる (Altmann F *et al.*, 1999; Geisler C *et al.*, 2012)。また昆虫においては、ガラクトースを付加する酵素活性は低いと存在しないようである (Abdul-Rahman B *et al.*, 2002)。



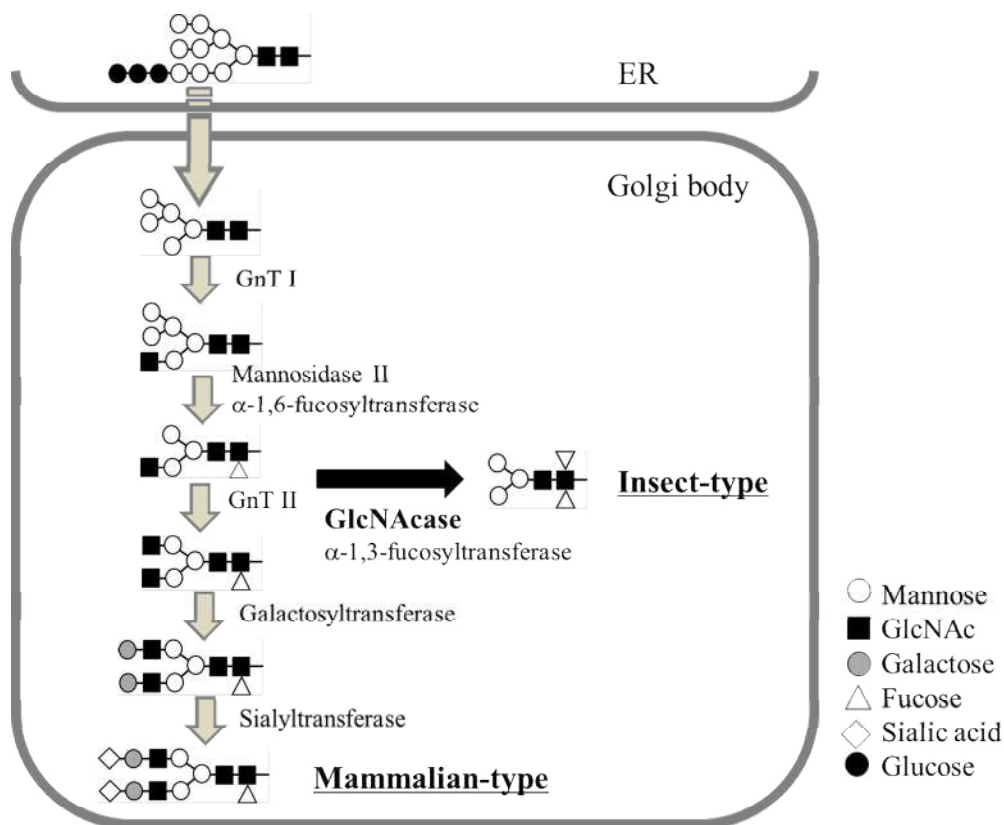


図 1-2. *N*-グリカンの合成経路

このように、哺乳類と昆虫では *N*-グリカンの構造が異なるため、哺乳類のタンパク質を昆虫で発現した場合、天然物に比べ、活性や安定性等の機能が不十分な場合がある。また、哺乳動物に投与した場合に、免疫原性を示したり、アレルギーを引き起こす可能性もある (Bencúrová M *et al.*, 2004)。そのため、糖鎖が糖タンパク質の機能に深く関わっている以上、哺乳類由来のタンパク質を発現した場合、発現した糖鎖も哺乳類型 (ヒト型) であることが望ましい。これに対し、主に昆虫培養細胞において、糖鎖構造を哺乳類 (ヒト) に近づける試みがなされてきた。その中の 1 つとして、糖鎖の長さが短い昆虫型糖鎖を伸長させるために、糖の付加を行う酵素遺伝子を細胞に導入する方法がある。具体的には、ガラクトース転移酵素やシアル酸転移酵素を遺伝子導入した昆虫培養細胞が作出されており (Hollister JR *et al.*, 2001)、その結果として、インビトロジェン社から Mimic Sf9 と称する昆虫細胞株が発売されている。

一方、カイコを用いた発現系においては、2000 年に、*piggyBac* トランスポ

ゾンを利用した遺伝子組換えカイコの作製方法が開発されることで (Tamura T *et al.*, 2000)、カイコの遺伝子を操作して糖鎖を改変することが可能となった。遺伝子組換えカイコを用いた糖鎖改変の最初の試みとして、ガラクトース転移酵素を導入した遺伝子組換えカイコが作出され、糖鎖にガラクトースの付加が見られることが示されている (竹田, 2006)。また、バキュロウィルスを用いた糖転移酵素の導入も試みられており、ガラクトース転移酵素発現バキュロウィルス及びシアル酸転移酵素発現バキュロウィルスを用いて、ウィルスの共発現による糖鎖改変が試みられ、シアル酸が非還元末端に付加することが示されている (Suganuma M *et al.*, 2013)。しかしながら、ガラクトース付加能やシアル酸付加能をカイコに与えることで糖鎖構造を変え、シアル酸まで付加されたヒト型糖鎖を作ることはできたものの、更に効率良くガラクトースが付加した糖鎖、さらにはシアル酸が付加した糖鎖の割合を増加させるためには、昆虫特有の GlcNAcase を抑えることで、長さが短いマンノース型糖鎖へ移行することを抑制する必要があると私は考えた。

そこで本研究においては、カイコ-バキュロウィルス発現系で産生される糖タンパク質の糖鎖をヒト型に近づけるために、糖鎖を昆虫型にする主要原因の1つである GlcNAcase に焦点を当てて研究を進めた。

これまで幾つかの昆虫の GlcNAcase の性質が調べられ、これら酵素が特に発生や成長等に関与していることが報告されている。例えば、GlcNAcase によりキトオリゴ糖 ( $\beta$ -1,4 GlcNAc 重合体) が構成糖である GlcNAc に分解され、変態時の外骨格形成に再利用されていることが示唆されている (Zen KC *et al.*, 1996; Bade ML *et al.*, 1962; Kaznowskia CE *et al.*, 1985)。また、*Drosophila Melanogaster* を用いた研究で、GlcNAcase が受精時の精子と卵子の結合に関与していることが示唆されている (Perotti ME *et al.*, 2001; Cattaneo F *et al.*, 2002; Cattaneo F *et al.*, 2006)。また、昆虫細胞には膜結合型の GlcNAcase が存在し、この酵素が昆虫型糖鎖への *N*-グリカンのプロセッシングに関与していることが、Altmann らにより報告されている (Altmann F *et al.*, 1995)。その後の研究で、幾つかの膜結合型の GlcNAcase が昆虫若しくは昆虫培養細胞から

見出され、性質が調べられた (Aumiller JJ *et al.*, 2006; Tomiya N *et al.*, 2006)。これらの酵素は、*N*-グリカン非還元末端の GlcNAc を加水分解することを示しており、昆虫における *N*-グリカンのプロセッシングに関与している可能性がある。例えば、ヨトウガの 1 種である *Spodoptera frugiperda* ではこれまでに複数の GlcNAcase (SfGlcNAcase) が単離されており、酵素の性質が調べられている (Aumiller JJ *et al.*, 2006)。そこでは、 $\alpha$ -1,3 及び  $\alpha$ -1,6 マンノース側両方の  $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc が切断される基質特異性が示され、加えて、これら SfGlcNAcase は、キトオリゴ糖を GlcNAc 単量体まで分解する活性も示した。しかし、*N*-グリカンのプロセッシングに関わる GlcNAcase が *in vivo* でどのような役割があるかは、未だ不明なことが多い。

カイコにおいては、これまで GlcNAcase の 1 種であるキチナーゼの存在に関する報告がなされている (Koga D *et al.*, 1997)。この酵素は、カイコを含む昆虫一般の外骨格の構成因子であるキチンの GlcNAc を切断する酵素であるが、*N*-グリカンの GlcNAc を切断する活性を有しているかどうかは不明であった。またキチナーゼ以外にも、幾つかの GlcNAcase が報告されており (Kimura S, 1976; Nagamatsu Y *et al.*, 1995)、幼虫から蛹への変態への関与が示唆されているが (Nagamatsu Y *et al.*, 1995)、これもまた *N*-グリカンの GlcNAc を切断するかどうかは不明であった。

近年 *D. melanogaster* の GlcNAcase である HEX02 に相同な酵素として BmGlcNAcase1 が、*S. frugiperda* の GlcNAcase に相同な酵素として BmGlcNAcase2、さらには BmGlcNAcase2 のアイソフォームである GlcNAcase が報告され (Okada T *et al.*, 2007; Kokuho T *et al.*, 2010)、*in vitro* の実験で *N*-グリカンの GlcNAc を切断する活性を有することが示された。またこれらの酵素は、GlcNAc が  $\beta$ -1,4 結合したキトオリゴ糖の GlcNAc を切断する活性も有しており、キチン分解に関わる可能性も考えられた。しかしながら、これら BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 の *in vivo* での役割は不明であり、カイコ体内における糖鎖修飾との関わりは不明確であった。

一方、カイコ培養細胞を用いた研究で、GlcNAcase の阻害剤である

2-acetamido-1, 2-dideoxynojilrimycin (2-ADN) の投与により、バキュロウィルスで発現させた糖タンパク質の糖鎖にシアル酸が付加されることが、レクチン染色の結果として報告された (Watanabe S *et al.*, 2002)。また、本阻害剤が GlcNAcase2 アイソフォームの活性を阻害することも報告されているが (Kokuho T *et al.*, 2010)、カイコ虫体における阻害効果は不明であった。

このような現状を踏まえ、本研究の第 1 章においては、カイコの糖鎖修飾に関連すると推測される新規の GlcNAcase 遺伝子を取得し、発現した酵素の基質特異性を示した。

第 2 章においては、今回同定した酵素を含む、幾つかの GlcNAcase に対し、カイコにおける合成器官や局在についての調査を行い、2 つの酵素が糖鎖修飾に関わっているのではないかという推測を得たことを述べる。

第 3 章においては、これらカイコ中の GlcNAcase を、阻害剤の使用や RNA 抑制 (RNAi) の手法を用いて抑制し、特に RNAi により、カイコの GlcNAcase の転写量や活性が低下することを示した。また、実際にバキュロウィルスを用いて糖タンパク質の発現を行い、発現した糖タンパク質糖鎖が、マンノース型の糖鎖から GlcNAc が付加した糖鎖に変化したことを述べる。

最後に総合討論として、GlcNAcase をターゲットとした糖鎖改変についてのまとめと、糖鎖改変法の今後について論ずる。

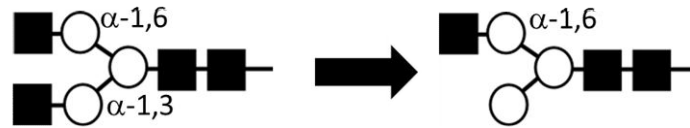
## 第2章 カイコ新規 GlcNAcase の単離と基質特異性の解析

序論でも述べたとおり、昆虫における *N*-グリカン合成は、主要な個所においては、哺乳類の合成経路と同様である。しかしながら、糖鎖の非還元末端へのガラクトース付加が見られないことと、さらには非還元末端の GlcNAc が、GlcNAcase によって切断されることで、昆虫特異的な糖鎖構造が生ずる。

近年、*D. melanogaster* において、*fused lobes (fdl)* 遺伝子が、新たな GlcNAcase 遺伝子として単離され、酵素の性質が調べられた (Leonard R *et al.*, 2006)。*fdl* は *D. melanogaster* の脳のキノコ体と呼ばれる神経中枢の発生に関する遺伝子として同定され、その変異体は構造上の変異を引き起こす (Boquet I *et al.*, 2000)。野生型と *fdl* 変異型を比較した研究で、*D. melanogaster* の FDL (DmFDL) が、脳以外でも発現しており、*N*-グリカンのプロセッシングに関与していることが示された (Leonard R *et al.*, 2006)。さらには、DmFDL をコードする塩基配列を元に作製した 2 本鎖 RNA を用いた、*D. melanogaster* S2 培養細胞での RNAi により、 $\beta$ 1-2 結合の GlcNAc の分解が抑制されたことから、DmFDL が *D. melanogaster* において、*N*-グリカンのプロセッシングに関与している GlcNAcase であることが示された (Kim YK *et al.*, 2009)。一方、他の昆虫においても、*S. frugiperda* の Sf9 培養細胞や *Tribolium castaneum* から FDL が単離された (Geisler C *et al.*, 2008; Hogenkamp DG *et al.*, 2008)。

これら *D. melanogaster* の FDL (DmFDL) や *S. frugiperda* の FDL (SfFDL) の *N*-グリカンの GlcNAc の切断を調べたところ、非還元末端側がマンノースから 2 つに分岐している 2 本鎖 *N*-グリカンの  $\alpha$ -1,3 マンノース側の  $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc のみを切断する基質特異性を示した。一方、*S. frugiperda* から単離された SfGlcNAcase は、 $\alpha$ -1,3 及び  $\alpha$ -1,6 マンノース側両方の  $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc が切断される基質特異性を示した (図 2-1) (Aumiller JJ *et al.*, 2006)。

DmFDL, SfFDL



SfGlcNAcase

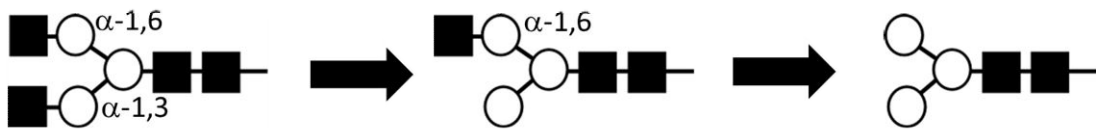


図 2-1. 各種 GlcNAcase の基質特異性

これら FDL や GlcNAcase の存在と性質は、昆虫細胞で発現される糖タンパク質の *N*-グリカンが、少マンノース型が主になることと関連しているように見える (Kubelka V *et al.*, 1994)。言い換えれば、これら酵素が、昆虫における糖タンパク質の糖鎖プロセッシングに、重要な役割を有していることを示唆する。

カイコにおいては、*N*-グリカンの非還元末端の GlcNAc を切断する GlcNAcase として、BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 が報告されているが (Okada T *et al.*, 2007)、これら 2 種類のカイコ GlcNAcase は、 $\alpha$ -1,3 及び  $\alpha$ -1,6 マンノース側両方の  $\beta$ -1,2 結合の末端 GlcNAc を切断する活性を有する。また、これら酵素は、キトトリオースから末端 GlcNAc を切断しキトビオースにする活性も有している。しかしながら、カイコに FDL 様の酵素 (BmFDL) が存在するかどうかの情報は、これまでなかった。そこで私は、カイコ幼虫からの BmFDL の単離を行い、カイコの GlcNAcase に関する更なる情報を得て、加えてカイコの糖鎖合成プロセスに関する情報も得るために、基質特異性等の性質を調べた。

## 第1節 材料と方法

### (1) 材料

カイコ系統として、後の過程で遺伝子を改変することを考慮し、遺伝子組換えカイコに用いられる系統である w1pnd 系統（農業生物資源研究所）及びバキュロウィルス発現系で通常用いられる春嶺鐘月（上田蚕種）を利用した。カイコ幼虫は人工飼料（シスメックス、日本農産工）を用いて、25°C 温度条件下で飼育した。

### (2) データベースサーチ

BmFDL の cDNA 配列を推定するために、DmFDL タンパク質のアミノ酸配列（Accession No. AAL55992）に対するホモロジーサーチを、農業生物資源研究所の KAIKO BLAST カイコゲノムデータベース

（<http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp>）上で行った。プログラムとして、tBlastn を用い、Silkworm WGS, Ramen assemble contigs に対し検索を行った。その他の条件は初期設定値を用いた。

### (3) カイコ幼虫からの BmFDL cDNA の単離

カイコ系統 w1pnd の 5 齢幼虫から脂肪体組織を摘出した。MagExtractor mRNA isolation kit（東洋紡）を用いて mRNA の抽出を行い、SMART RACE cDNA Amplification kit（クロンテック）を用いて cDNA の合成を行った。方法はキット添付のプロトコールに従った。

前項のデータベースサーチで得られた部分 cDNA 配列を元に 5'-RACE プライマーとして 5'-GTACCAGGCGTCCACGTGCGAGAT-3'を、3'-RACE プライマーとして 5'-CCAGAGCTCACTCTGCTTTGGTCATCG-3'を、3'-RACE nested プライマーとして 5'-CGAACGAGCGAATGGGGGTAAAGC-3'を設計した。プライマーの合成はベックスのオリゴヌクレオチド合成サービスを利用して行った。本プライマー及び BD Advantage 2 polymerase system（クロンテック）を使用して、5'及び 3' RACE を行い、BmFDL cDNA の増幅を行った。PCR の条件としては、基本的にはキット添付の文書に従い、容量 50 µl の反応液に、4%

になるようにジメチルスルホキシドを加えて行った。

増幅された 5'及び 3' RACE の cDNA 配列を、pT7-Blue T-Vector (タカラバイオ) に挿入し、クローン化した。クローン化された配列は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて、塩基配列を解読した。なおその際、Big Dye sequencing reagent (アプライドバイオシステムズ) 及び M13 forward (5'-ACGACGTTGTAAAACGACGG-3')、reverse (5'-TCACACAGGAAACAGCTATG-3')プライマーを用いた。

#### (4) 膜貫通領域の推定

BmFDL の膜貫通ドメイン及び分泌シグナルを推定するために、SOSUI システム (<http://www.bp.nuap.nagoya-u.ac.jp>) (名古屋大学) 及び SignalP システム (<http://cbs.dtu.dk/services/signalP/>) (Technical University of Denmark) を用いて解析を行った。パラメータとして、Organism group は Eukaryotes、D-cutoff values は Default を用いた。

#### (5) 組換え BmFDL バキュロウィルスの作製

全長 BmFDL 及び推定膜貫通ドメイン (N 末側 1-39 アミノ酸) を除いた BmFDL (可溶性 BmFDL) の各 cDNA を、各々「(3) カイコ幼虫からの BmFDL cDNA の単離」の項で合成した cDNA を鋳型に、5'末端には *Bgl*III の制限酵素切断サイト、3'末端には *Xho*I の制限酵素サイトを付加するよう、PCR を行い増幅した。プライマーとして、5'-GTTAGATCTATGAAGATGATGTCGTGGGGTG-3' と 5'-TCTCGAGACTAGAGGCACGCGTGCGG-3'を全長 BmFDL 用として、5'-GGAGATCTAGCTGTACTCTACTGGAAACAGC-3'と 5'-TCTCGAGACTAGAGGCACGCGTGCGG-3'を可溶性 BmFDL 用として各々を用いた。PCR 増幅産物を、*Bgl*III 及び *Xho*I で制限消化後、全長 BmFDL の cDNA 断片を、バキュロウィルストランスファーベクターであるプラスミド pM01 (シスメックスから提供) (Maeda S, 1989; Nagaya H, 2009) に、可溶性 BmFDL の cDNA 断片を、発現時に精製タグを付加するために、Strep タグ配列を、カ



イコ分泌タンパク質シグナル配列と 5'末端の間に付加するバキュロウィルストランスファーベクターであるプラスミド pM02(シスメックスから提供) (Maeda S, 1989; Nagaya H, 2009) に各々挿入し、クローン化した。これらベクター500 ng をカイコバキュロウィルス (BmNPV CPd 株) (Suzuki T *et al.*, 1997) DNA 200ng とカイコ培養細胞である BmN 細胞 (6 穴プレート使用、1 ウェル当たり  $0.5 \times 10^6$  cell/ 1 ml) にコ・トランスフェクションし、得られた組換えウィルスに対し限界希釈法でスクリーニングを行い、クローン化した。

#### (6) 昆虫細胞での BmFDL の発現とミクロソーム画分の調製

クローン化した全長 BmFDL 発現バキュロウィルス (感染細胞培養上清) を、 $1 \times 10^5$  cell/  $\text{cm}^2$  の BmN 細胞 (12 ml) に MOI 5.0 になるように感染を行った。感染後 5 日目の細胞を 3000 rp, 10 分の遠心で集め、1 ml の 5mM イミダゾールバッファー pH 7.3 (250 mM のスクロースを含む) を加え、超音波破砕機 SONIFIER 450 (ブランソン) を用い細胞の破砕を行った。その後、4°C 条件下で 10,000  $\times$ g, 10 分の遠心を行い、上清を回収し、110,000  $\times$ g, 60 分の超遠心を行い、沈殿を回収した。回収した沈殿に 2% の Triton X-100 を含む 100  $\mu$ l の 5mM イミダゾールバッファー pH 7.3 (250 mM のスクロース含む) を加え、穏やかに沈殿を可溶化し、その後タンパク質量を測定し、ミクロソーム画分とした。

#### (7) カイコ虫体での BmFDL の発現

可溶性 BmFDL 発現バキュロウィルスを、5 齢 2 日目のカイコ幼虫に注射し ( $5.0 \times 10^4$  pfu/幼虫)、感染を行った。感染後 6 日目に、約 100 頭の感染幼虫から体液を回収し、体液の黒化を防ぐために、50 ml 当たり 2 mg のフェニルチオウレアを加えた。回収した体液約 50 ml から血球を除くために、4°C 条件下で 1,870  $\times$ g, 15 分の遠心を行い、上清を回収した。次に 112,000  $\times$ g, 60 分の遠心を行い、上清を回収することでウィルスを除去した。回収した体液を、-80°C で凍結させ、精製に用いるまで保管した。

#### (8) 組換え可溶性 BmFDL のカイコ体液からの精製

前項で回収したカイコ体液 40 ml を、160 ml の 150 mM の NaCl を含む 100 mM Tris バッファー pH 8.0 (TBS) で希釈した。希釈した体液を、1 mM の EDTA と 20 mM の 2-メルカプトエタノールを含む TBS で平衡化した *Strep-Tactin Superflow* カラム (IBA 社) (20 ml  $\phi$ 2.5 cm) にアプライした。平衡化バッファで、280 nm の吸光度が一定になるまでカラムを洗浄後、200 ml の 2.5 mM のジスチオビオチンを含む平衡化バッファを用い、流速 1.0 ml/min にて溶出を行った。280 nm の吸光度を測定しながら、タンパク質の溶出が見られた溶出液を回収した。次に溶出された分画 30 ml を Milli-Q 水で 10 倍に希釈した。これを 20 mM Tris バッファー pH 8.0 で平衡化した HiTrap Q HP カラム (GEヘルスケア) (5 ml) に流速 5.0 ml/min でアプライした。カラムを Tris バッファー pH 8.0 で洗浄後、流速はそのまま、NaCl 濃度を 0 から 1.0 M に上げるグラジェント溶出を行い、5.0 ml のタンパク質吸着画分を回収し、精製物とした。

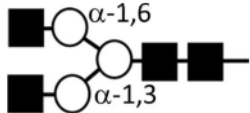
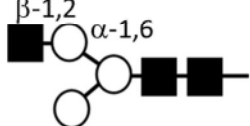
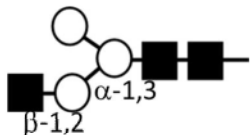
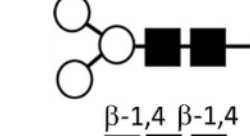

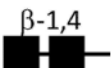
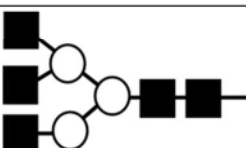
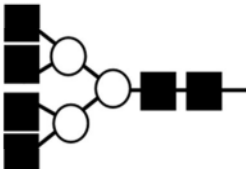
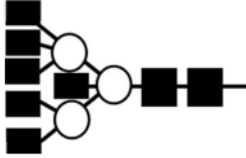
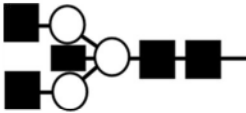
精製された BmFDL の確認は、12.5% の SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) ゲルによる電気泳動とクマシー染色によって行い、分子量は、Precision Pulus Dual molecular weight standards (BIO-RAD) を標準として計算した。

#### (9) 2-アミノピリジル (PA) 化糖鎖の調製

PA 化オリゴ糖鎖として、GN2M3-PA, M3-PA, tri-antennary GlcNAc-PA, tetra-antennary GlcNAc-PA, penta-antennary GlcNAc-PA をタカラバイオから、GNAM3-PA, GNBm3-PA, bisecting GlcNAc GN2M3-PA を生化学工業から購入して用いた (表 2-1)。chitotriose-PA 及び chitobiose-PA は、各々 tri-*N*-acetylchitotriose 及び bi-*N*-acetylchitotriose を生化学工業から購入し、Hase の方法 (Hase S *et al.*, 1984) に従い PA 化した。1.00 g の PA を 0.76 ml 塩酸で溶解しカップリング試薬とし、0.1-100 nmol のオリゴ糖を 40  $\mu$ l のカップリング試薬で溶解した。蒸留水を加え、pH を 6.2 に調整後、100°C で 10 分加

熱した。還元剤 (NaBH<sub>3</sub>CN 10 mg を 20 μl PA 溶液、30 μl 蒸留水で溶解) を 2 μl 反応液に加え、90°C で 15 時間加熱し、全量をゲル濾過して PA 化オリゴ糖を分離した。N-acetylglucosamine-PA はタカラバイオから購入した。

表 2-1. 2-アミノピリジル化糖鎖の構造

oligosaccharide	Structure
GN2M3	
GNAM3	
GNBM3	
M3	
chitotriose	
chitobiose	
	○ Mannose ■ GlcNAc
oligosaccharide	Structure
tri-antennary GlcNAc	
tetra-antennary GlcNAc	
bisecting GlcNAc penta-antennary GlcNAc	
bisecting GlcNAc GN2M3	

#### (10) GlcNAcase の活性測定

GlcNAcase の活性測定は合成基質を用いた方法、又は PA 化オリゴ糖鎖を用いた方法で行った。合成基質を用いた方法では、*p*-nitrophenyl-GlcNAc (*p*NP-GlcNAc、生化学工業) を基質として用いた。0.4% の Triton X-100 を含む 20 mM リン酸バッファー pH 6.0 の 1 ml 反応液中に、1 mM になるように *p*NP-GlcNAc と 0.143  $\mu$ g の精製した可溶性 BmFDL を加えた。30°C で一定時間 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間) 反応後、各々 100  $\mu$ l の反応液を取り、等量の 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加え、反応を停止させた。反応液中の遊離 *p*-ニトロフェノール (*p*NP) 量を 405 nm の吸光度で測定し、酵素反応量とした。

PA 化オリゴ糖鎖を用いた活性測定法では、0.4% の Triton X-100 を含む 100 mM クエン酸/リン酸バッファー pH 5.5 の 300  $\mu$ l 反応液中に、0.2  $\mu$ M になるように PA 化オリゴ糖鎖 (GN2M3-PA) と精製した一定量の可溶性 BmFDL を加えた。30°C で一定時間 (0, 3, 6, 9, 24 時間若しくは 0, 16 時間) 反応後、各々 50  $\mu$ l の反応液を取り、98°C で 3 分加熱した後、4°C で 10,000  $\times$ g、5 分の遠心を行い、上清を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で解析した。

#### (11) HPLC

前項反応液中の PA 化オリゴ糖鎖の分析に関しては、LaChrom Elite HPLC システム (日立ハイテク) を用いて行った。使用カラムとして、Cosmosil 5C18-AR-II カラム (6 mm  $\times$  250 mm) (ナカライテスク) 又は TSKgel Amido-80 カラム (6 mm  $\times$  250 mm) (東ソー) を用い、PA 化糖鎖の検出は、励起波長 310 nm、検出波長 380 nm の蛍光検出で行った。逆相 HPLC 法 (RP-HPLC) による解析は、Cosmosil 5C18-AR-II カラムを用い、0.02% のトリフルオロ酢酸 (TFA) で平衡化したカラムにサンプルをインジェクションした。その後、0.02% の TFA で 5 分間、流速 1.2 ml/min で洗浄後、アセトニトリル濃度を 0% から 4% まで上昇させる 35 分間のグラジエント溶出を行い、反応産物を溶出した。なおマーカーとして、2 pmol の GN2M3-PA と M3-PA、0.5 pmol 若しくは 1 pmol

の GNAM3-PA と GNBM3-PA を並行してインジェクションした。一方、順相 HPLC 法は、TSKgel Amido-80 カラムを用い、80%のアセトニトリルを含む 50 mM の酢酸/トリエチルアミン溶液 pH7.3 で平衡化したカラムにサンプルをインジェクションした。流速 1.0 ml/min の同じバッファーでカラムを洗浄後、アセトニトリル濃度を 80%から 65%まで下降させる 30 分のグラジエント溶出を行い、反応産物を溶出した。なおマーカーとして 2 pmol の PA 化オリゴ糖鎖を並行してインジェクションした。

## 第2節 結果

### (1) カイコからの BmFDL 遺伝子の単離

KAIKO BLAST を用いたホモロジーサーチの結果、DmFDL のアミノ酸配列にホモロジーを有する、3 つのアミノ酸配列をコードした部分 DNA 配列を見出した (C428324, C440214, C581745)。その後、DmFDL と最もアミノ酸配列のホモロジーが高い C581745 に対し、RACE 法を用い、C581745 配列の 5' 及び 3'末端の配列を増幅し、全長 ORF 配列を得た。得られた DNA 配列は長さ 1.9 kbp から成り、633 のアミノ酸配列をコードしていた (図 2-1)。アミノ酸配列に対し、Pfam システム (<http://pfam.xfam.org/>) を用いタンパク質のドメイン構造を推測した所、102-228 番目のアミノ酸配列が、 $\beta$ -acetyl hexosaminidase Domain like であること、252-591 番目のアミノ酸配列が、Glycosyl hydrolase family 20, catalytic domain であることが示された (図 2-2)。また分子量を算出した所、70,920 Da であった。クローン化された本配列を BmFDL と名付け (Accession number AB540233)、以降の実験に用いた。

アミノ酸配列の相同性を調べた所、BmFDL は DmFDL とは 42%、SfFDL とは 78%の相同性が見られた。また、同じカイコの GlcNAcase として BmGlcNAcase1 とは 34%、BmGlcNAcase2 とは 28%、Kokuho らによって報告された BmGlcNAcase2 アイソフォーム (Kokuho T *et al.*, 2010) とは 27% のアミノ酸配列の相同性を示した。なお、SOSUI ソフトウェアによる解析では、推定膜貫通領域は同定されなかった。一方、SignalP ソフトウェアを用いた解析

では、N末端 1-39 番目のアミノ酸がシグナルペプチドと推測された (図 2-3)。

```

1  ATGAAGATGATGTCGTGGGGTGATGCATTATGGCTCGGCTTGAACGGCGAGATTTGCGAGGGTGGGGCGGCTGCGACGAGCCGTGCTCATGCTGGCCGGG 100
   M K M M S W G D A L W L G L T A R F A R V G R L R R A V L M L A A
101 CTGCCTGCAACCGTCTGCTGTACTCTACTGGAAACAGCAGACTGACGACAGCGCCCAACAGACCGCTTCACTCCATGTATTCGGGGATCGAACCTCAGTG 200
   A A C T A A A V L Y W K Q Q T D D S A N R P L H S M Y S G I E P Q W
201 GTCTTGGTTATGTCAACACGACCGATGCGAGAGGTATCAAGCGTCCGGATACGACGACGCTACAGTCCGCTGCAGACTTGCACATGCTGTGGCCCTCCACC 300
   S W L C Q H D R C E R Y Q A S D T T T L Q S L Q T C N M L C A S T
301 CAGCTCTGGCCACAGCGACGGGGCCTGTGAGCCTCGCATCTGCGGCTGTGCCGTGAGATCGGACCGCTTCTCCCTCAAAGTATAGCGTGACCATCAC 400
   Q L W P Q P T G P V S L A S A A V P V R S D R F S L K V I A S P S
401 GCGACGTCAACAAACACATAAACGAAAGCGTTTATCGTGATGCAAAATCACATGCGAATTTAGAACATGCGGTGGTGGTAAACCGTGGTGTGACAT 500
   R D V T K H I N E A F I V M Q N H M R T L E H G V V G E N R R S D I
501 AGGACCCCGCGGGGAGTACTGTAAGGTATCCGTGAACGGGTCCGGGACCCCTGCGATGCGGCTCGACACGAAAGCTACAAAATCGCCTTACGG 600
   G P P R D V L V K V S V N G S G D P R M R L D T N E S Y K L A L R
601 CCCTCCGGCAATCCCTCGTGTAGACATCACAGCGCATTGTTCTGCGGAGCGAGACACGGCCCTCGAAACACTTTGCGAGGTCACTGGCTGGATCCGT 700
   P S G N S L V V D I T A H S F C G A R H G L E T L L Q V T W L D P
701 ACGCCGGATCGTTACTCATACTCGAAAGCGCACTGTAGTGTATGCTCCTCGTTTCCCTTACCCTGGCCACTCTCTGGATACGGCTCGTAATTTTTCCC 800
   Y A G S L L I L E A A T V V D A P R F P Y R G L L L D T A R N F F P
801 CGTCAGTGAGCTTCTCCGACCATAGACGCGATGGCCGCAACAACTAAACAGCTTCCACTGGCAGGTGAGCGATTCAACAATCGTTCCGTTGGAAGTTA 900
   V S E L L R T I D A M A A N K L N T F H W H V S D S Q S F P W K L
901 GACAGCGACCCCAACTGGCCAGCAAGCGCCTACGGACCGGGCCAGTGTACACGTCGACGACGTGAGAACAATGTTAAATACGACGACATCAGAG 1000
   D S A P Q L A Q H G A Y G P G A V Y T S D D V R T I V K Y A R I R
1001 GAATCAGGGTGTGATGGAATAGACACACCGGCGCAGTGTGAGCTTTCGGTTGGGGTCCGGAGGCTGGCCCTCGCCACTTACGCGACTGCATAGA 1100
   G I R V L M E I D T P A H V G R A F G W G P E A G L G H L A H C I E
1101 GGGCGAACCCGTGAGTTCCTACTGCGGAGAACCTCCGTGCGGCCAACTGAATCCTCGCAACCTCACAATACGATTTACTAGAACCGTCTACAGGGAG 1200
   A E P W S S Y C G E P P C G Q L N P R N P H I Y D L L E H V Y R E
1201 ATCATTCAATTAAGTGGTCCAGCAGCATCTCCACCTTGGTGGCGATGAGGTGTGGAACAGTGTGGGCTAAGCACTTCAATGATACGGATCCGATGG 1300
   I I Q L T E V D D I F H L G G D E V S E Q C W A K H F N D T D P M
1301 ATCTTTGGATGGAGTTCACGCGACAAGCCATGCACGTTCTCGAACGAGCGAATGGGGTAAAGCGCCAGAGCTCACTCTGCTTTGGTATCGCGATTGAC 1400
   D L W M E F T R Q A M H V L E R A N G G K A P E L T L L W S S R L T
1401 GCCTCCCGGTACCTCGAACCGCTCGACCCAAACGCTTTGGCGTACAAGTGTGGGGCGGTCGACGTGGCCGAGTCCGCTGCGGTTTTTGGACGCGCGC 1500
   R S P Y L E R L D P K R F G V Q V W G A S Q W P E S R A V L D A G
1501 TTCGATCGGTATCTCGCAGTGGACGCGCTGCTGACCTCGACTGCGGGTTCGGGTGCTGGCGGACAGCTCGGACGACACTGCGGGCGGTACCGGTGCT 1600
   F R S V I S H V D A W Y L D C G F G S W R D S S D G H C G P Y R S
1601 GGCAGCAGGTGTACGAGCACCAGCGTGGGGCAGGAAACGCCGAGAGCGCGCATGGCCGTTGGAGGTTGGCGCGCGTGCAGTGGACGGAGCAATT 1700
   W Q Q V Y E H R P W A T E T P E S A A W P V E G G A A C Q W T E Q L
1701 GGGTCCGGGCGGTTGGACGCGCGCTGTGGCCCGGACGCGGCTCTGGCGGAGCGGCTGTGGGACAGCGTGGCGGAGCGGTCGCGGAGGCGCCAGCGCGAGCTGAC 1800
   G P G G L D A R V W P R T A A L A E R L W A D R A E G A T A D V Y
1801 TTGCGGCTCGACACAGCGGGCGCGCTGGTGGCGGGGGTGGCGGGCGCGCTGTGGCCGCGCTGGTGGTCCCAACCCGCGACGCGTGCCTCT 1900
   L R L D T Q R A R L V A R G V R A A P L W P R W C S H N P H A C L
1901 AG 1902
      *

```

図 2-1. BmFDL cDNA の核酸及びアミノ酸配列

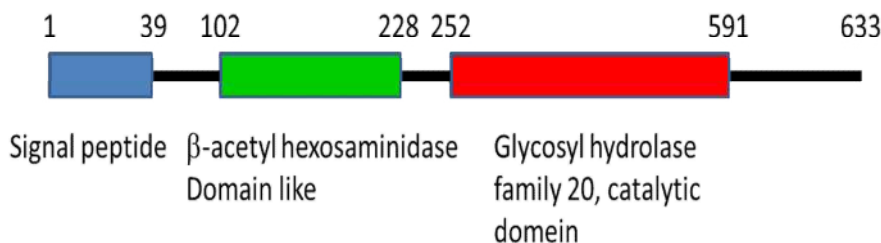


図 2-2. BmFDL のドメイン構造

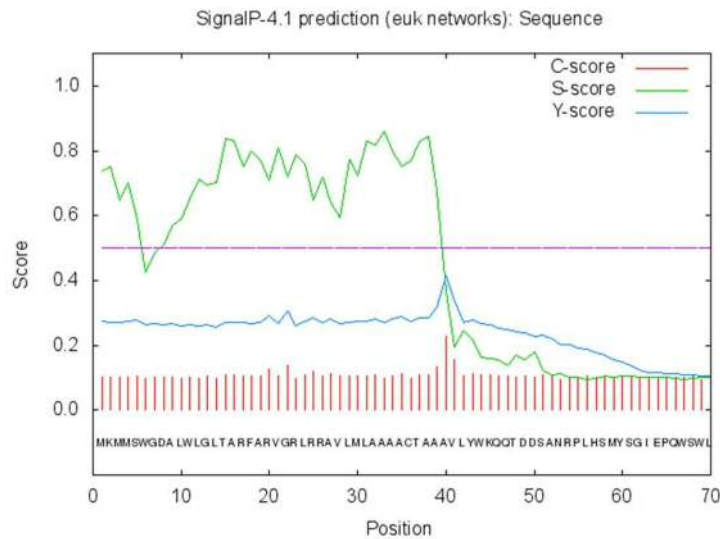


図 2-3. SignalP system を用いた BmFDL の解析

N 末端 1-39 番目のアミノ酸は推測されたシグナル配列

## (2) 昆虫細胞での組換え BmFDL の発現

BmFDL の GlcNAcase 活性を測定するために、組換え全長 BmFDL の発現を、昆虫培養細胞である BmN を用いて行った。組換えバキュロウィルスを用いて BmFDL を生産後、発現された BmN からマイクロソーム画分を調製し、PA 化オリゴ糖鎖である GN2M3-PA を用いて GlcNAcase の活性を測定した。反応には 30  $\mu$ l のマイクロソーム画分を用いた。その結果、コントロールの BmN に比べ明らかに反応産物（ピーク 2）の量が増えており、GlcNAcase 活性が上昇していることが示された（図 2-4）。この結果から、発現した BmFDL はマイクロソーム画分に存在することが示され、SOSUI ソフトウェアの結果とは異なるものの、BmFDL は膜に存在する GlcNAcase である可能性が高いことが示唆された。

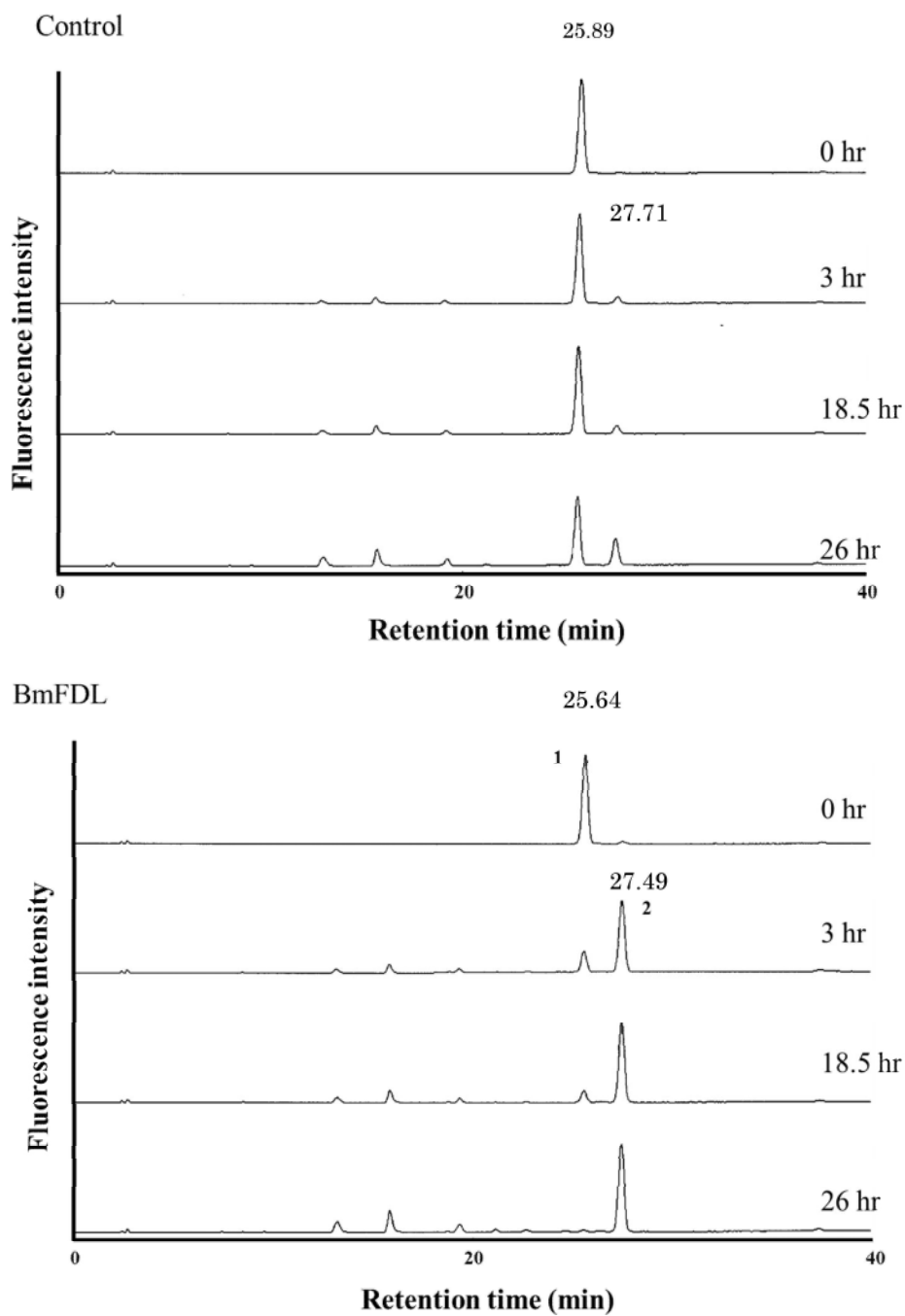


図 2-4. HPLC を用いた組換え BmFDL の活性確認

GN2M3-PA 基質を 0, 3, 18.5, 26 時間マイクロソーム画分と反応させ、反応産物を逆相 HPLC で解析した。マイクロソームとして Control は BmN から分画したマイクロソームを BmFDL は組換え BmFDL を発現した BmN から分画したマイクロソームを用いた。溶出ピークの 1, 2 は、各々 GN2M3-PA (溶出 25.43) と GNAM3-PA (27.28)。



### (3) 精製した BmFDL の酵素活性

BmFDL の性状を調査するために、Strep タグ付きの組換え可溶性 BmFDL を、バキュロウイルス-カイコ系の系で生産した。2 ステップのカラムクロマトグラフィによる精製の後、SDS-PAGE でシングルバンドを示す、BmFDL 精製物を得た (図 2-5)。分子量はアミノ酸配列から推測される量が 68,236 Da であるのに対し、SDS-PAGE 上では 68 kDa と、ほぼ同じ分子量を示した。

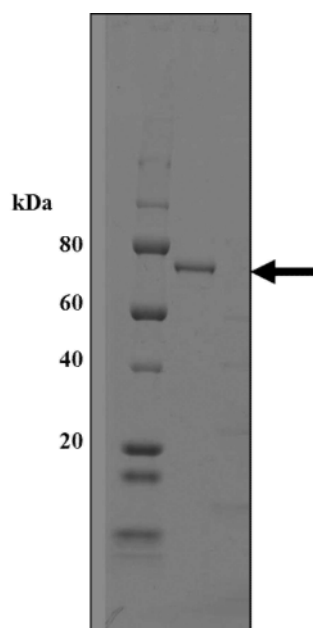


図 2-5. 精製組換え可溶性 BmFDL の SDS-PAGE

左のレーンはサイズマーカー。右のレーンは組換え BmFDL の精製結果。

矢印は BmFDL を示す。

精製した BmFDL の GlcNAcase 活性を調べるため、まずは合成基質である *p*NP-GlcNAc を用いて GlcNAcase 活性を測定した。加水分解により遊離した *p*NP の量が時間の経過 (0-6 時間) とともに増加していくことが、吸光度で示され、精製物に GlcNAcase 活性があることが示された (図 2-6)。なお比活性は、0.32  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  であった。次に、2 本鎖 *N*-グリカンの非還元末端の GlcNAc に対する加水分解を調べた。GN2M3-PA を基質として、精製した BmFDL と反

応後、逆相カラムを用いた HPLC で解析した所、GN2M3-PA から GNAM3-PA への加水分解は確認でき、かつ GNAM3-PA のピークの割合は時間の経過とともに大きくなった（3 時間 45%、6 時間 73%、9 時間 86%、23 時間 100%、比活性 1.05 nmol/min·mg）ものの、GN2M3-PA から GNBM3-PA への加水分解は見られなかった（図 2-7）。この結果から、BmFDL は、BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 の基質特異性（Okada T *et al.*, 2007, 図 2-8）と異なり、2 本鎖 *N*-グリカンの $\alpha$ -1,3 結合マンノース側の $\beta$ -1,2 結合した GlcNAc を特異的に分解し、 $\alpha$ -1,3 結合マンノース側の $\beta$ -1,2 結合 GlcNAc には作用しないことが示された。

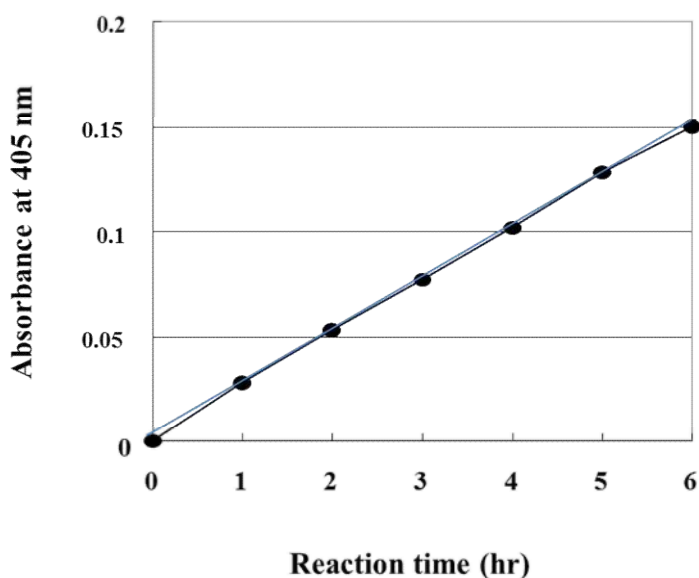


図 2-6. BmFDL の酵素活性反応曲線

pNP-GlcNAc を基質として、143 ng の BmFDL の酵素反応を測定した。

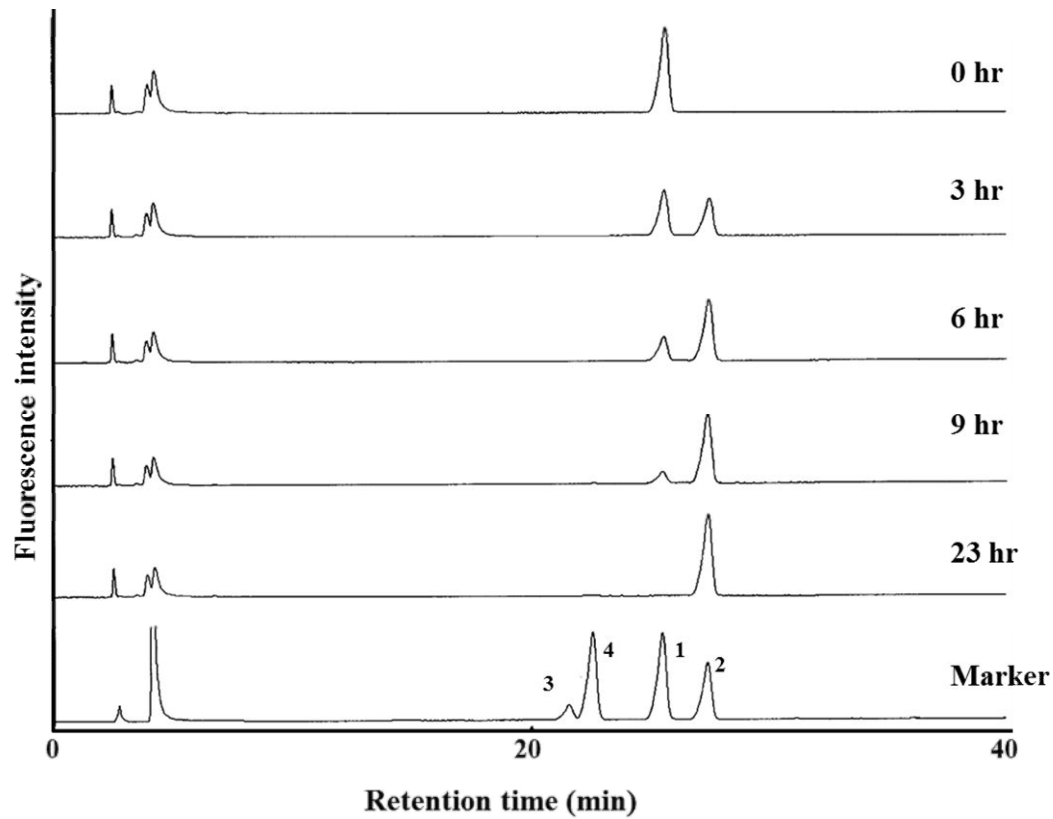


図 2-7. HPLC を用いた精製組換え BmFDL の活性確認

GN2M3-PA 基質を 0, 3, 6, 9, 26 時間、1  $\mu$ l の 143 ng 精製 BmFDL と反応させ、反応産物を逆相 HPLC で解析した。Marker の 1, 2, 3, 4 の数字は、各々 GN2M3-PA, GNAM3-PA, GNBM3-PA, M3-PA に相当する。

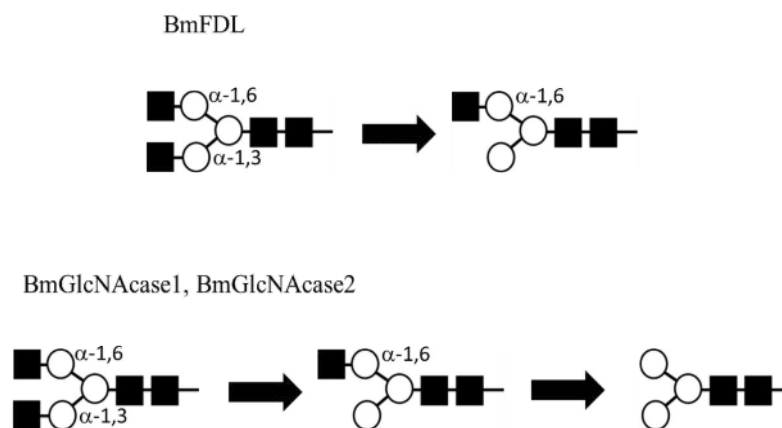
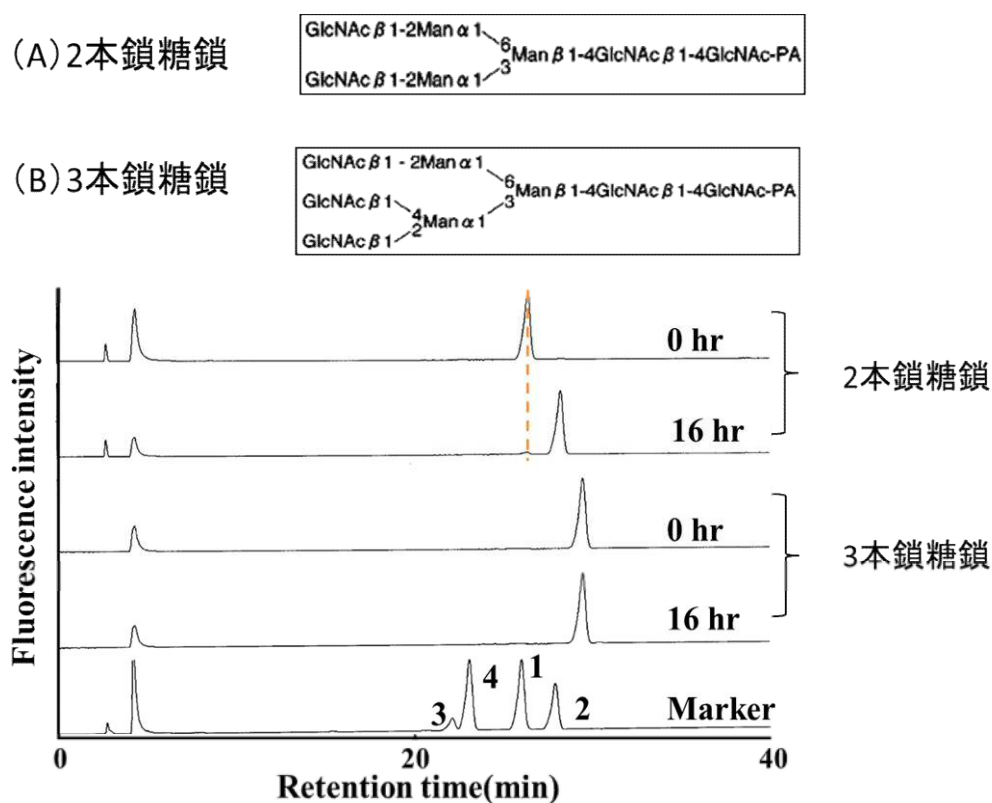


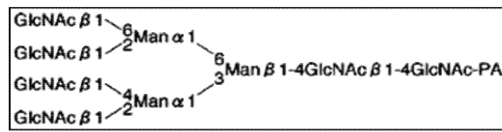
図 2-8. カイコ GlcNAcase の基質特異性

(4) BmFDLの基質特異性

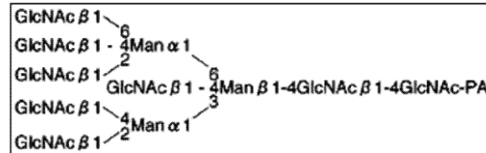
BmFDLの基質特異性を知るために、非還元末端に $\beta$ -1,2結合GlcNAcを有する幾つかのN-グリカン糖鎖基質を用いて、GlcNAc切断の可否を調べた。実験の方法としては、糖鎖基質と精製BmFDLを、2本鎖のN-グリカンからGlcNAcを完全に切断できる16時間の反応後、反応産物を逆相カラムを用いたHPLCで解析することで行った。実験の結果、BmFDLは2本鎖のN-グリカン(表2-1, GN2M3)の末端GlcNAcを切断することが示されたが(図2-9A)、3本鎖(表2-1, tri-antennary GlcNAc)(図2-9B)や4本鎖(表2-1, tetra-antennary GlcNAc)(図2-9C)や5本鎖(表2-1, bisecting GlcNAc penta-antennary GlcNAc)(図2-9D 5本鎖糖鎖)ではGlcNAcの切断は見られなかった。また、バイセクティングGlcNAc(表2-1, bisecting GlcNAc GN2M3)の存在は、末端GlcNAcの切断を阻害することも示された(図2-9D)。



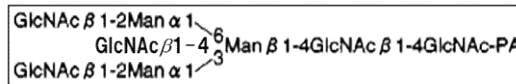
(C) 4本鎖糖鎖



(D) バイセクティングGlcNAc糖鎖



5本鎖糖鎖



2本鎖糖鎖

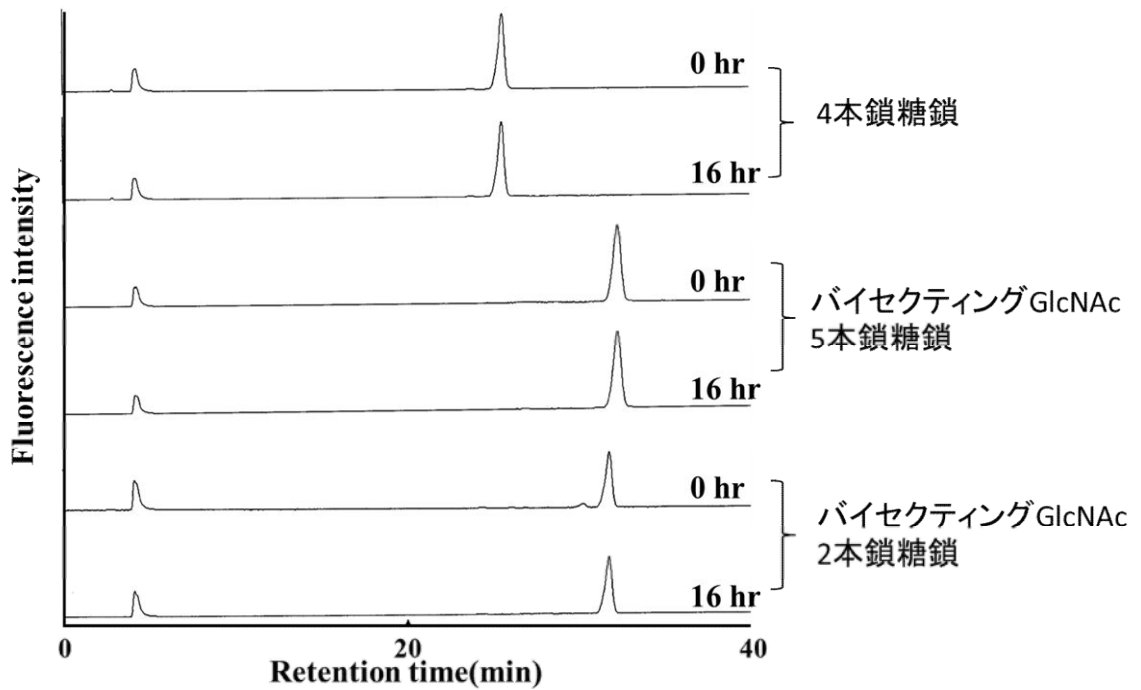


図 2-9 種々の *N*-グリカンに対する BmFDL の基質特異性

PA オリゴ糖鎖(表 2-1)各々を 16 時間、143 ng の精製 BmFDL と反応させ、反応産物を逆相 HPLC で解析した。Marker の 1, 2, 3, 4 の数字は、各々 GN2M3-PA, GNAM3-PA,GNBM3-PA, M3-PA に相当する。

一方、キトオリゴ糖鎖を基質として、これまでカイコで報告されてきたキチナーゼのように、 $\beta$ -1,4 結合 GlcNAc を切断する活性が BmFDL に存在するか調べた。キトトリオース-PA 糖鎖基質 (表 2-1, chitotriose) と精製 BmFDL を 16 時間反応後、反応産物を順相 HPLC で解析した。その結果、キトトリオース-PA の加水分解は見られず (図 2-10)、BmFDL には $\beta$ -1,4 結合の GlcNAc を切断するキチナーゼ様の活性が存在しないことが示された。これらの結果から、BmFDL は、 $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc は切断できるが、 $\beta$ -1,4 結合の GlcNAc は切断できないこと、2 本鎖 *N*-グリカン は切断できるが、3 本鎖、4 本鎖と糖鎖の本数が増えると、 $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc でも切断できなくなること、バイセクティング GlcNAc の存在で、末端 GlcNAc が切断できなくなることが分かり、基質特異性が高い GlcNAcase であることが判明した。

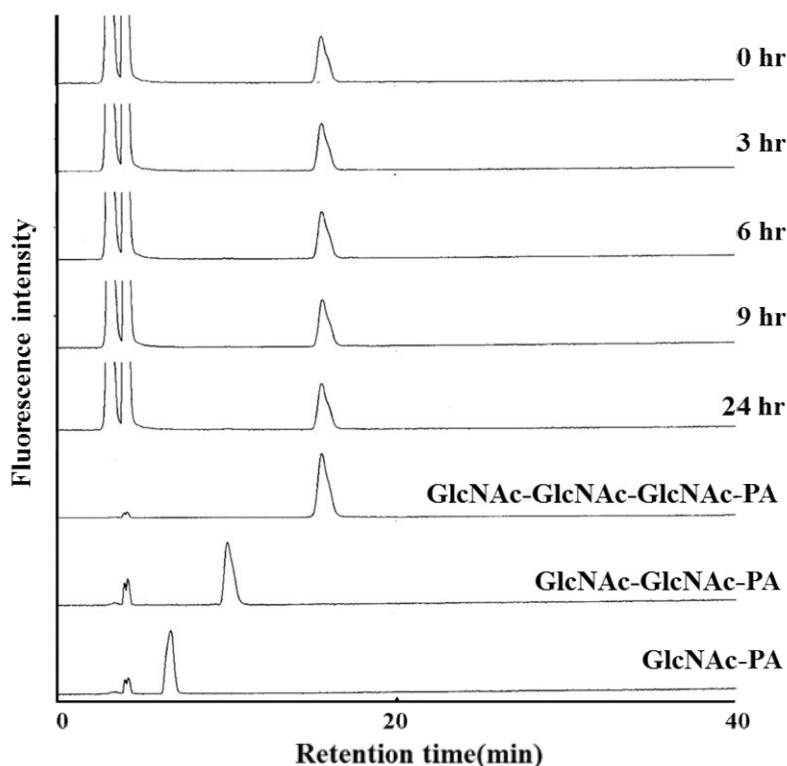


図 2-10. キトトリオース PA を基質とした BmFDL の基質特異性

143 ng の BmFDL をキトトリオース PA と一定時間反応後、順相 HPLC で解析した。マーカーとして Chitotriose-PA、Chitobiose-PA と GlcNAc-PA を各々流した。

### 第3節 考察

これまでカイコにおいて、*N*-グリカンの GlcNAc を切断する GlcNAcase として、BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 が報告されていたが (Okada T *et al.*, 2007)、FDL に相同な GlcNAcase の存在は明らかになっていなかった。そこで本章では、カイコから BmFDL を単離し、その基質特異性を調べ、本酵素が BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 の基質特異性と異なり、2 本鎖 *N*-グリカンの  $\alpha$ -1,3 マンノース側の  $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc のみを切断することを示した。これは本研究と同時期に、Geisler らにより独自に研究されたカイコ FDL の基質特異性と同様の結果であった (Geisler C *et al.* 2010)。

今回 BmFDL が示した、2 本鎖 *N*-グリカンの  $\alpha$ -1,3 マンノース側の  $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc のみを切断する活性は、DmFDL と同様の基質特異性であった。*D. melanogaster* では、変異体の糖鎖構造の解析の結果から、DmFDL が *N*-グリカンのプロセッシングに関与していることが報告されている (Leonard R *et al.*, 2006)。また、Altmann らによって報告された (Altmann F *et al.*, 1995)、カイコ培養細胞のミクロソーム画分に見られる GlcNAcase 活性の基質特異性は、BmFDL と同じであり、BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 とは異なっていた。ミクロソーム画分には *N*-グリカンのプロセッシングの場であるゴルジ体が含まれており、このことから、カイコ培養細胞ゴルジ体に存在する GlcNAcase は BmFDL であることが推測され、BmFDL が *N*-グリカンのプロセッシングに関与していることが示唆された。これらのことから、BmFDL は DmFDL と、ただ単にアミノ酸配列の相同性があるだけではなく、機能的にも類似した働きをしているのではないかと考える。今回、カイコにおいても FDL が存在することが分かったことで、*D. melanogaster* や *S. frugiperda* と同様に、昆虫培養細胞のミクロソーム画分と同じ基質特異性を有する、*N*-グリカンのプロセッシングに関与している可能性が高い GlcNAcase が同定されたと考える。

BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 と今回同定された BmFDL の関係であるが、どの酵素も *N*-グリカンの非還元末端の GlcNAc を切断する活性を有しており、今回の実験からは、どのような生理的機能を果たしているかは分からない。

他の昆虫においては、*T. castaneum* では3種類の GlcNAcase と1種類の FDL が、異なる組織、異なる時期に異なるパターンで発現していることが示されている (Hogenkamp DG *et al.*, 2008)。カイコにおいても同様に、BmFDL を含む複数の GlcNAcase が異なる組織や異なる状況下で、各々異なる役割を果たしている可能性が考えられる。



### 第3章 カイコ GlcNAcase の局在

前章の実験で、私はカイコにおける新規 GlcNAcase として BmFDL を見出し、クローニングを実施し、その基質特性を調べた。カイコにおいては、これまで BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 が膜結合性 GlcNAcase として報告されており (Okada T *et al.*, 2007)、複数の GlcNAcase がカイコの N-グリカンプロセッシングに関与している可能性が考え得る。カイコ培養細胞のミクロソーム画分の GlcNAcase 活性は BmFDL と基質特性が同じ特長を示すことから (Altmann F *et al.*, 1995)、カイコにおいても BmFDL が N-グリカンのプロセッシングに関わる可能性が示唆されるが、他の GlcNAcase の関わりも含め、明確ではない。そこで、本章においては、特にバキュロウィルス-カイコの系で組換えタンパク質生産に良く用いられるカイコ 5 齢 (終齢) 幼虫後期の、各々の GlcNAcase の N-グリカンのプロセッシングにおける役割を推測するために、GlcNAcase の合成部位と局在に関して調べた。

#### 第1節 材料と方法

##### (1) 材料

カイコ系統として、遺伝子組換えカイコに用いられる系統である w1pnd 系統 (農業生物資源研究所) 及びバキュロウィルス発現系に用いられる春嶺鐘月 (上田蚕種) を使用した。カイコ幼虫は人工飼料 (シスメックス、日本農産工) を用いて、25°C 温度条件下で飼育した。カイコ組織 (脂肪体、絹糸腺、血球等) は、5 頭の 5 齢の幼虫から、外科的手法にて摘出し、使用した。また、カイコ由来の培養細胞として BmN (理化学研究所) を使用した。培養には 10% の FBS 入りの昆虫細胞培養用培地である TC-100 (アプlichem) を用い、27°C 条件下で培養を行った。

##### (2) BmN 細胞からのミクロソーム画分の調製

BmN 細胞 ( $1.92 \times 10^7$ ) を 3000 rp, 10 分の遠心で集め、1 ml の 5mM イミ

ダゾールバッファーpH 7.3 (250 mM のスクロースを含む) を加え、超音波破砕機 SONIFIER 450 (ブランソン) を用い細胞の破砕を行った。その後、4°C条件下で 10,000 ×g, 10 分の遠心を行い、上清を回収し、110,000 ×g, 60 分の超遠心を行い、沈殿を回収した。回収した沈殿に 2%の Triton X-100 を含む 100 μl の 5mM イミダゾールバッファーpH 7.3 (250 mM のスクロース含む) を加え、穏やかに沈殿を可溶化し、再度 110,000 ×g, 60 分の超遠心を行い、上清を回収した。その後タンパク質量を測定し、ミクロソーム画分とした。

### (3) リアルタイム PCR 解析

カイコ組織からのトータル RNA の抽出には、Isogen-LS 試薬 (ニッポンジーン) を用いた。組織試料 100 μl に、Isogen-LS750 μl と、Milli-Q 水 150 μl を加えて、良く攪拌した。その後、試薬添付の使用説明書に従い Total RNA を抽出した。抽出した RNA を 42 μl の DW で溶解した。次に、RNA サンプルに 3 μl の Cloned Dnase I (2 U/μl) (タカラバイオ) 及び 5 μl の添付 10×Buffer を加え、37°Cで 30 分反応させた。その後、フェノール・クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿をおこない、乾燥後の RNA を 50 μl の Milli-Q 水で溶解した。トータル RNA を鋳型とした cDNA の合成には、iScript cDNA Synthesis キット (BIO-RAD) を用い、添付のプロトコールに従い実施した。定量 PCR は iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) を用い、Cromo4 リアルタイム PCR 検出システム (BIO-RAD) にて行った。各々のプライマー配列として、BmFDL は 5'- CCGCTGCTGCTGCTACTCTAC-3' と 5'-CGACGCTTGATACCTCTCGC-3'、BmGlcNAcase1 は 5'-CAGGTACCAATTGGAACACTGACGAACAATACA-3' と 5'-GAGATATCTCAAAGACATTTGCTGTCGTGCTG-3'、BmGlcNAcase2 は 5'-CCGTTACCCTCACAGAGGAC-3' と 5'-CTCGTGATAGGCTCCCAGAC-3'、BmRP49 は 5'-GCAGGCGGTTCAAGGGTCAA-3' と 5'-ACCATGAGCGATCTCTGCGC-3' を用いた。

反応条件として、

1. 95°C, 3 min

2. 95°C, 15 sec

3. 66°C, 45 sec

4. SYBR Green の蛍光測定

5. 2-4, 50 回サイクル

を用いた。サンプル及びスタンダードの増幅曲線がスレッシュホールドライン（デフォルト設定）と交差するサイクルをスレッシュホールドサイクル（ $C_T$  値）として求め、標準曲線を描いた。サンプルの RNA 量は、内部標準であるカイコリボソームプロテイン（rp49）の転写量に対する相対比で求めた。

#### （4） GlcNAcase 抗体の作製

BmFDL の活性中和抗体である組換えモノクローナル Fab 抗体は、ジーンフロンティア社のファージディスプレイシステムを用いて委託作製した。スクリーニングには精製した BmFDL を用い、交差性を有する 250 のクローンが獲得された。その内 20 クローンのシーケンスを確認し、配列が異なる 5 クローンが組換え抗体として選抜され、提供された。活性中和抗体を取得するために、5 クローンの組換え抗体 1.79  $\mu\text{g}$  に 35.8 ng の精製 BmFDL を加え（液量 49  $\mu\text{l}$ ）、30°C で 1 時間インキュベートした。これに 2 本鎖糖鎖である GN2M3-PA を 1  $\mu\text{l}$ （10 pmol）加え、30°C で 3 時間インキュベートした。その後、全量を逆相 HPLC で解析した。方法としては、Cosmosil 5C18-AR-II カラムを用い、0.02% のトリフルオロ酢酸（TFA）で平衡化したカラムにサンプルをインジェクションし、0.02% の TFA で 5 分間、流速 1.2 ml/min で洗浄後、アセトニトリル濃度を 0% から 4% まで上昇させる 35 分間のグラジエント溶出を行った。その結果、反応産物である GNAM3-PA が見られない試験区で用いた組換え抗体を、BmFDL 活性中和抗体とした。一方、通常抗 BmFDL マウスモノクローナル抗体は、一般的な方法（Harlow E *et al.*, 1988）を用いて作製した。精製可溶性 BmFDL（20  $\mu\text{g}$  もしくは 50  $\mu\text{g}$ ）を抗原として、マウスへの免疫に用いた。マウスへ 2 回免疫後、抗体価が上がっていることをウェスタンブロッティングで確認し、最終免疫を行った。細胞融合後、細胞を 10 枚の 96 穴プレートにまき、ハイブ

リドーマの存在の有無を確認した。その後、ELISA法を用いスクリーニングを行い、BmFDLに対してO.D.が1.0以上、ネガティブコントロール（市販のサイトカイン混合物）に対してO.D.が0.05以下のものを選抜した。さらに、これらのクローンの培養上清を用いウェスタンブロットを行い、泳動した5 ngのBmFDLのバンドが確認できたクローンを選抜した。実験に用いた抗体は、ハイブリドーマの培養上清から、プロテインAセファロースを用いて精製した。

抗BmGlcNAcase1ウサギ抗体と抗BmGlcNAcase2ウサギ抗体は、ホクドー社に、精製組換えBmGlcNAcase1とBmGlcNAcase2のウサギへの免疫を依頼して作製した。

#### (5) ウェスタンブロット解析

SDS-PAGEはLaemmliの方法に基づき（Laemmli UK, 1970）、10~20%のグラジエントゲル（アトー）を用いて行った。ゲルの染色はCoomassie Brilliant Blue R-250染色にて行い、分子量の確認は、Magic Mark XP（インビトロジェン）あるいはPrecision Plus Protein Standard（BIO-RAD）分子量マーカーを用いて行った。

抗BmFDL抗体の検出には、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）でラベルした抗マウスIgG抗体を二次抗体として用い、ECL検出システム（GEヘルスケア）による発光シグナルを、X線フィルムを用いて検出することで行った。

抗BmGlcNAcase1及び抗BmGlcNAcase2ポリクローナル抗体の検出には、HRPでラベルした抗ウサギIgG抗体を二次抗体として用い、ECL検出システムを用いて行った。

#### (4) 抗BmFDL抗体を使用したGlcNAcase活性の抑制

BmFDL抗体を用いてBmFDLの活性の抑制を行った。0.4%のTriton X-100を含む0.1 Mのクエン酸リン酸バッファー pH5.5に、抗BmFDL抗体（1.8 µg）と精製したBmFDL（36 ng）、若しくは抗体（1.4 µg若しくは14 µg）とカイコ培養細胞であるBmNのミクロソーム画分（タンパク質量22 µg）を加え、総量

を 49  $\mu$ l とした。30°C で 1 時間反応後、1  $\mu$ l の PA 化オリゴ糖基質である 10  $\mu$ M GN2M3-PA を溶液に加え、30°C で 16 時間反応させた。反応後の溶液を、3 分間煮沸後、10,000 $\times$ g, 5 分の遠心を 4°C 条件下で行い、上清を反応産物として回収した。その後、逆相カラムを用いた HPLC により、反応産物の解析を行った。

方法としては、LaChrom Elite HPLC システム（日立ハイテック）を使用し、分析カラムとして、Cosmosil 5C18-AR-II カラム（6 mm  $\times$  250 mm）（ナカライテック）を用いた。PA 化糖鎖の検出は、励起波長 310 nm、検出波長 380 nm の蛍光検出で行った。0.02% のトリフルオロ酢酸（TFA）で平衡化したカラムにサンプルをインジェクションし、その後、0.02% の TFA で 5 分間、流速 1.2 ml/min で洗浄後、アセトニトリル濃度を 0% から 4% まで上昇させる 35 分間のグラジェント溶出を行い、反応産物の溶出と検出を行った。

## 第2節 結果

### （1）カイコ GlcNAcase の局在

BmGlcNAcase1、BmGlcNAcase2 及び BmFDL の局在に関する情報を得るために、リアルタイム PCR 及びウェスタンブロットによる解析を行った。RNA をカイコ 5 齢幼虫 6 日目の絹糸腺、血球、脂肪体から抽出し、GlcNAcase 各々の転写量を、逆転写定量 PCR 法により求めた。その結果、BmGlcNAcase1 は絹糸腺で最も転写量が多かった。それに対し、BmGlcNAcase2 は脂肪体での転写量が多く、BmFDL は血球、脂肪体で転写が見られ、特に顕著に発現している組織はなかった（表 3-1）。

表 2-1. 3 種類のカイコ GlcNAcCase の転写量の測定

3つの組織における各々の転写量を測定した。値は rp49 に対する相対値 (%) で表した。N.D.は検出限界以下。±の値は標準偏差。5頭のカイコから抽出した組織を元に合成した cDNA に対し、2回測定を繰り返した。

	Blood cell	Fat body	Silk gland (middle)
BmGlcNAcase1	0.877 ±0.021	1.065 ±0.015	14.5 ±1.41
BmGlcNAcase2	N. D.	2.056 ±0.0007	N. D.
BmFDL	0.018 ±0.0002	0.014 ±0.0008	N. D.

一方、GlcNAcase タンパク質の局在を、各組織から抽出した一定量のタンパク質を泳動し、ウェスタンブロット法を用いて調べた。実験の結果、BmGlcNAcase1 は絹糸腺で最も多く存在し、BmGlcNAcase2 は主として体液中に存在していた。それに対し、BmFDL は脂肪体で主に検出された (図 3-1)。

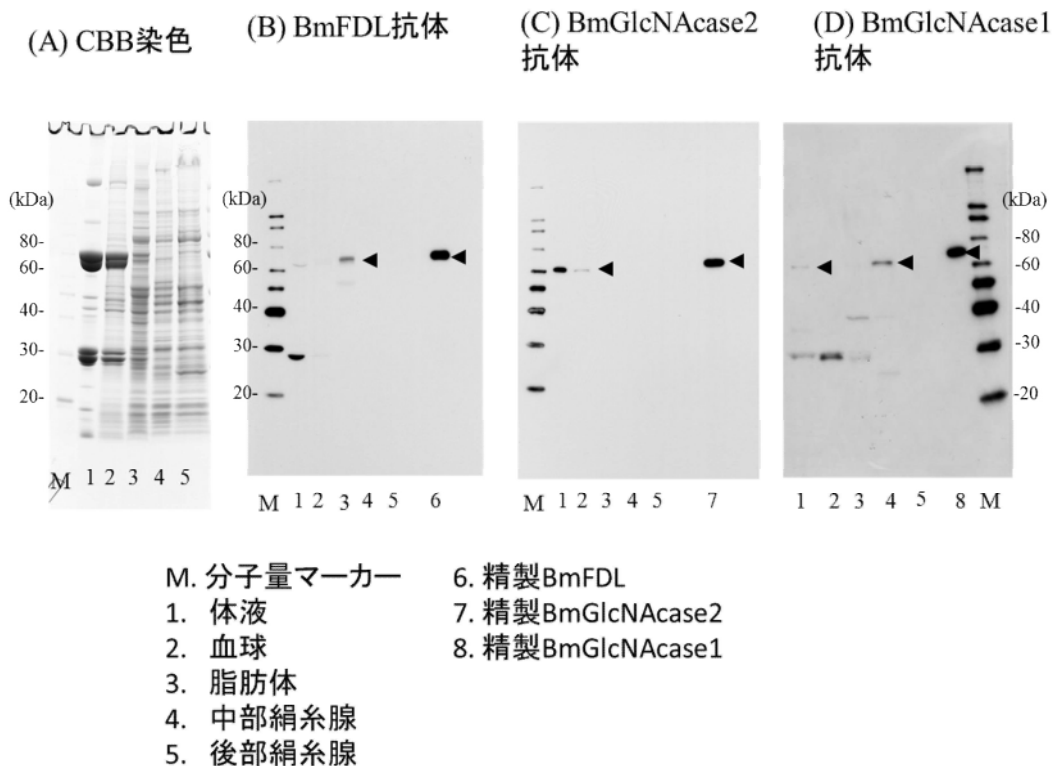


図 3-1. ウェスタンブロット解析による GlcNAcase の局在

(A) CBB 染色。(B)-(D) ウェスタンブロット、(B) BmFDL 抗体、(C) BmGlcNAcase2 抗体、(D) BmGlcNAcase1 抗体を各々使用。レーン 1-5 は 5  $\mu$ g、レーン 6-8 は 5 ng のタンパク質をアプライした。矢印は各々の GlcNAcase のバンド、矢印以外のバンドは非特異的吸着と推定された。

## (2) 抗 BmFDL 活性中和抗体を使用した GlcNAcase 活性の抑制

抗 BmFDL 抗体を用いて、細胞中に存在する GlcNAcase 活性の阻害試験を試みた。抗 BmFDL Fab 抗体が存在しない状態では、精製した BmFDL は、GN2M3-PA 糖鎖基質を GNAM3-PA 糖鎖基質に加水分解する活性を示す。そこで、5 種類作製した抗 BmFDL Fab 抗体の各々の抗体株を、まず精製 BmFDL と反応させた後に、GN2M3-PA 糖鎖基質と反応させた。その結果、クローン No. 31 株抗体では、反応産物の GNAM3-PA のピークは見られず、完全に BmFDL の活性を阻害することが分かった (図 3-2)。クローン No. 23 株抗

BmFDL 組換え Fab 抗体でも同程度の阻害効果が見られたが、抗体クローン No. 25 株、No. 26 株、BmGlcNAcase2 組換え Fab 抗体の No. 70 株では、BmFDL 活性の阻害効果は見られなかった。次に、阻害効果を示したクローン No. 31 株抗体を用いて、カイコ培養細胞である BmN のミクロソーム画分に見られる GlcNAcase 活性を阻害するかどうか調べたところ、精製 BmFDL の時と同様に、ミクロソーム画分の GlcNAcase 活性を阻害することが示された (図 3-3)。このことから、カイコ BmN 培養細胞のミクロソーム画分に存在する GlcNAcase は BmFDL であることが判明した。



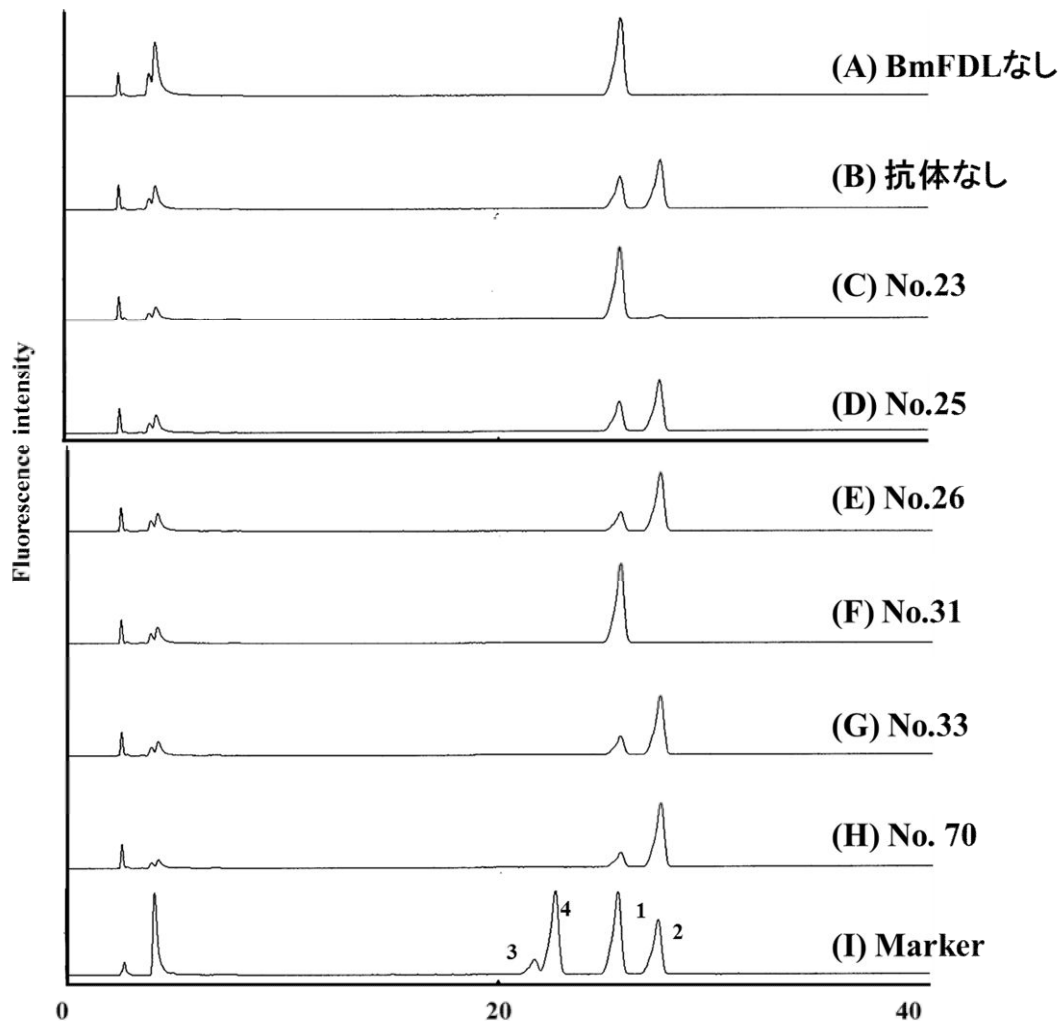


図 3-2. 抗 BmFDL 抗体を用いた BmFDL の阻害

BmFDL(36 ng)を抗 BmFDL 組換え抗体(1.8  $\mu$ g)と 25°Cで 1 時間反応させた。その後、10 pmol の GN2M3-PA 基質を反応液に加え、16 時間反応させ、逆相 HPLC で解析した。(A)酵素と抗体を含まないネガティブコントロール。(B)抗体を含まないコントロール。(C)-(G)抗体各株( No.23, No.25, No.26, No.31, No.33)との反応サンプル。(H)抗 BmGlcNAcase2 抗体(No. 70 株)を用いた反応サンプル。(I)マーカー。1, 2, 3, 4 の数字は、各々GN2M3-PA, GNAM3-PA, GNBm3-PA, M3-PA に相当する。

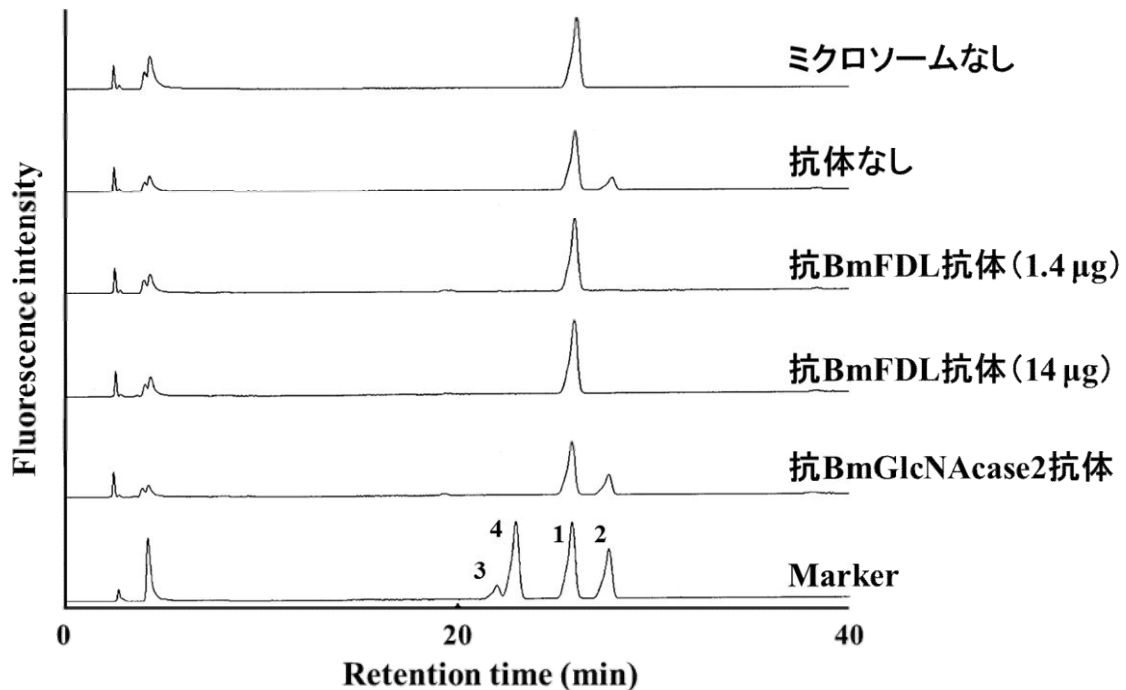


図 3-3. 抗 BmFDL 抗体を用いた BmN 培養細胞マイクロソーム画分 GlcNAcase 活性の阻害

マイクロソーム抽出物(22  $\mu\text{g}$  タンパク質)を抗 BmFDL 組換え抗体(1.8  $\mu\text{g}$ )と 25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。その後、10 pmol の GN2M3-PA 基質を反応液に加え、16 時間反応させ、逆相 HPLC で解析した。(A)酵素と抗体を含まないネガティブコントロール。(B)抗体を含まないコントロール。(C)抗 BmFDL 中和抗体(N0. 31 株、1.4  $\mu\text{g}$ )との反応サンプル。(D)抗 BmFDL 中和抗体(N0. 31 株、14  $\mu\text{g}$ )との反応サンプル。(E)抗 BmGlcNAcase2 抗体との反応サンプル。(F)マーカー。1, 2, 3, 4 の数字は、各々 GN2M3-PA, GNAM3-PA,GNBM3-PA, M3-PA に相当する。

### 第3節 考察

カイコに複数の膜結合型 GlcNAcase が存在しており、これらが *N*-グリカンのプロセッシングに関与している可能性があることは前章で述べたが、その機

能は明らかになっていない。本章においては、これら GlcNAcase の局在を、RNA の転写レベル及びタンパク質レベルで調べた。

RNA の転写レベルに関しては、BmGlcNAcase1 は絹糸腺での転写量が、脂肪体や血球に比べ大きく、絹糸腺で主に発現していることを示唆する結果であった。一方、BmGlcNAcase2 は BmGlcNAcase1 に比べ顕著ではないものの、脂肪体で転写量が多く、脂肪体での発現が示唆された。また、BmFDL は顕著な組織特異的な傾向は見られなかった。このように、転写量に関しては、BmGlcNAcase1 以外、顕著な結果ではなかった。なお、本研究と前後し、リアルタイム PCR 法を用いて、カイコ各 GlcNAcase の転写量を調査した研究が報告された (Zhai YF *et al.*, in press)。そこでは、BmGlcNAcase1 の転写量は表皮で最も多く、絹糸腺での転写量は少なく、本研究と異なる結果が得られている。また、BmGlcNAcase2 は卵巣、BmFDL は精巣で転写量が多かった。本研究においては、バキュロウィルスでの組換え組換えタンパク質の発現を念頭に、脂肪体での GlcNAcase 転写量を中心として調べたため、生殖器官等の転写量に関しては不明である。また、組織の採取時期が組換えタンパク質の発現時期である 5 齢 6 日目と、Zhai らの報告 (3 日目) (Zhai YF *et al.*, in press) に比べ遅い時期に行っているため、BmGlcNAcase1 は成長に伴う変動が大きい可能性がある。

次に GlcNAcase タンパク質の存在をウェスタンブロットで調べたところ、BmFDL は脂肪体に多く存在していて、絹糸腺にはほとんど存在しなかった。BmGlcNAcase2 は多くは体液中に存在しており、BmGlcNAcase1 は絹糸腺に多く存在していた。リアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法による解析から、BmGlcNAcase1 は絹糸腺で多く生産され、そこに存在する GlcNAcase である可能性が示唆された。一方、体液中に多く存在する BmGlcNAcase2 は、脂肪体での転写が検出され、逆にウェスタンブロットの結果では検出されなかったことから、脂肪体で合成され体液中に分泌されるのではないかとと思われる。BmFDL は必ずしも脂肪体特異的に転写されている訳ではないが、脂肪体に多く存在しているようである。

脂肪体は、カイコにおいて中間代謝の面で重要な器官であり、それ故にバキュロウイルスによるタンパク質発現における主要器官の1つである (Watanabe H, 1967)。従って、バキュロウイルスにより脂肪体で発現された糖タンパク質の糖鎖は、脂肪体に存在する BmFDL によって *N*-グリカンの GlcNAc が切断され、2つの GlcNAc に3個以下のマンノースが付加した少マンノース型糖鎖 (図 1-1B) になり、かつ、多くの発現タンパク質が脂肪体で合成されることから、バキュロウイルスで発現した糖タンパク質の糖鎖が、少マンノース型糖鎖主体になるものと思われる。反対に、BmFDL が検出されなかった絹糸腺において、トランスジェニックカイコ発現系を用いて、この器官特異的に組換えタンパク質の発現を行った場合、糖タンパク質の糖鎖に GlcNAc が切断されていない糖鎖が存在することは (Iizuka M *et al.*, 2009)、絹糸腺で発現した糖タンパク質の糖鎖の非還元末端 GlcNAc は、BmFDL が存在しないため、切断を免れていることが推測され、逆に言えば、BmFDL が存在している組織では、発現タンパク質の *N*-グリカンの GlcNAc の切断が起きることが予想される。一方、絹糸腺には BmGlcNAcase1 が多く存在するが、この GlcNAcase が GlcNAc の切断に関与しているかどうかは、前述したように、絹糸腺特異的に発現した糖タンパク質の糖鎖に GlcNAc 付加が見られることから、不明である。また、分泌タンパク質や膜タンパク質のほとんどが、糖タンパク質であり、これらの糖タンパク質はカイコ体内において体液中、若しくは体液と接して存在することから、体液中に多く存在している BmGlcNAcase2 も GlcNAc の切断に関与している可能性が高いと思われる。

一方、視点を変え、抗 BmFDL 抗体の活性阻害効果を利用して、BmFDL の機能を推測した。GlcNAc の切断は、主としてゴルジ体で行われることが予想され、またカイコ培養細胞である BmN においても、ゴルジ体を含むミクロソーム画分には GlcNAcase 活性が存在する (Altmann F *et al.*, 1995)。私は、BmFDL に対するモノクローナル抗体を作製する過程において、BmFDL の GlcNAcase 活性を阻害する抗体株を見出した。この BmFDL 活性阻害抗体とカイコ培養細胞である BmN から抽出したミクロソーム画分を反応させると、GlcNAcase 活

性が完全に阻害された。このことは、ミクロソーム画分に存在する GlcNAcase 活性は、BmFDL によるものであることを示す。

これらの情報から考えると、カイコにおいても *D. melanogaster* と同様に、糖鎖からの GlcNAc 切断にはまず FDL が関与しており、その活性が強い脂肪体で多く合成されるバキュロウィルス発現タンパク質は、タンパク質の翻訳後修飾時に GlcNAc が切断され、また例え GlcNAc が切断されない糖鎖が存在したとしても、体液に分泌後、BmGlcNAcase2 によりさらに GlcNAc が切断され、少マンノース型糖鎖を主とした糖鎖構造を取るようになるのではないかと考えられる。従って、*N*-グリカンの GlcNAc 切断を抑制するには、まずは翻訳後修飾時に BmFDL による切断を抑制すること、加えて、体液中に分泌後の BmGlcNAcase2 による切断を抑制することが必要ではないかと予想された。

## 第4章 カイコ GlcNAcase 抑制法の検討

前章においては、カイコの3種類のGlcNAcaseに対し、その局在組織を同定し、バキュロウィルスで発現した糖タンパク質のN-グリカンのGlcNAcがどのように切断されるか考察を行った。加えて、糖鎖を昆虫型からヒト型に改変を進めるためには、どのGlcNAcaseの抑制が効果的か、考察を行った。これまで糖鎖を改変する方法として、昆虫細胞においてGlcNAcase阻害剤の使用や(Watanabe S *et al.*, 2002)、dsRNAを用いたRNAiによるGlcNAcaseの阻害(Nagata Y *et al.*, 2013)、ガラクトース転移酵素の導入が報告されている(竹田, 2006; Iizuka M *et al.*, 2009)。しかしながら、バキュロウィルス-カイコ組換えタンパク質発現系において、N-グリカンの糖鎖構造を改変する試みはまだほとんどない。そこで私は、バキュロウィルス-カイコ発現系で発現した糖タンパク質の糖鎖を、昆虫型からヒト型に改変するための第1歩として、カイコにおいて阻害剤使用による体液BmGlcNAcase2の阻害を行うと共に、BmFDLの発現を抑制する遺伝子組換え(TG)カイコを行い、発現糖タンパク質のN-グリカンの糖鎖構造に及ぼす影響を調べた。

### 第1節 材料と方法

#### (1) 材料

BmFDLの368番目の塩基から859番目の塩基配列をRNAiに用いた。dsRNA配列作製用PCRプライマーとして、以下の配列を合成し(ベックス)、使用した。

センス鎖

P1 5'-GAAACGGACCGGTGAACGGATCCGGCGACCC-3'

P2 5'-GAGCTAGCGCCAGTGGAACGTGTTTAGTTTGTTCG-3'

アンチセンス鎖

P3 5'-GGACTAGTCCTTAAAGTTATAGCGTCACCATCACG-3'

P4 5'-GAAGGCCTACATGGCCGCCAGTGGAACGTGTTTAG-3'

コロニーPCR用プライマーとしては、以下の配列を使用した。

P5 5'-GAGCTAGCGCCAGTGGAACGTGTTTAGTTTGTTCG-3'

P6 5'-CTCACCTGTTGGCCCGGACCG-3'

P7 5'-GAAGGCCTACATGGCCGCCAGTGGAACGTGTTTAG-3'

P8 5'-GAATGACTTTGTTCTGTTTCAGAGAGAAG-3'

KMO シークエンス用プライマーとしては、以下の配列を使用した。

KMOseq1 5'-GCGAATTTAGAGAATGGAAC-3'

KMOseq2 5'-CTCTTCGCCAAAAATAATGC-3'

KMOseq3 5'-TCACTTTTGTTCCTTGGTAC-3'

KMOseq4 5'-TTATAAACGTAGAACGCTCC-3'

KMOseq5 5'-TCTTCTCGATATTCGTACAG-3'

KMOseq6 5'-TCCCATACACTCAATGTATC-3'

KMOseq7 5'-AAAGAATAGACCGAGATAGG-3'

TG カイコ作製のベクターとして、以下の農業生物資源研究所において構築されたものを使用した。

pBac-UAS.A3i.SV-3xP3.GFP (図 4-1)

カイコゲノムに挿入される *piggyBac* 配列 (レフトアームとライトアーム) の間に、UAS 配列と A3 イントロン配列、SV40 の polyA 配列を挿入したベクター。本研究での RNAi 配列をカイコに導入するために用いた。

pBacUAS-AKS2 (Kobayashi I *et al.*, 2007)

アクチンプロモーターの下流にカイコ体色マーカーである KMO 遺伝子を挿入した TG カイコ作製用ベクター。KMO 遺伝子の鋳型として用いた。

pHA3PIG (Tamura *et al.*, 2000)

トランスポザーゼを発現するベクター。カイコ卵にインジェクションした。

pGENe-pigORF-p(A)90

トランスポザーゼ mRNA を合成するための鋳型として用いた。

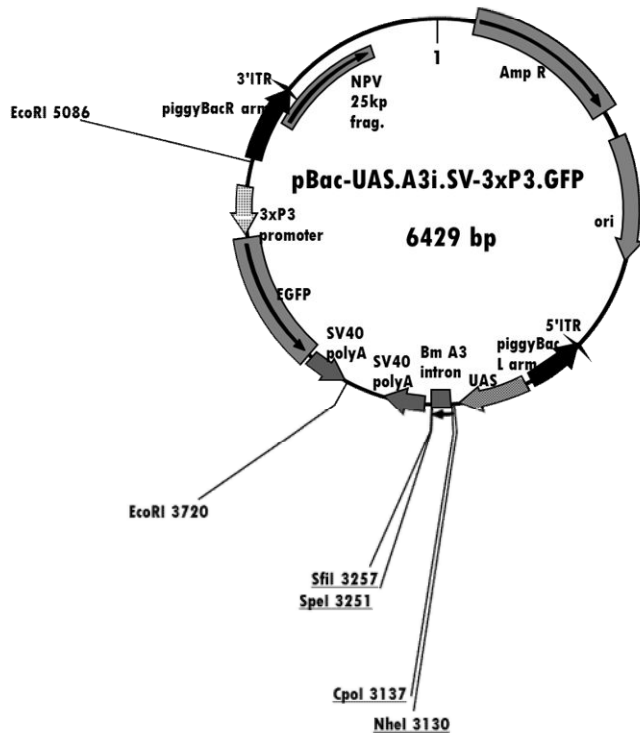


図 4-1. pBac-UAS. A3i. SV-3xP3. GFP ベクターのコンストラクト

## (2) BmFDL RNAi TG カイコ作成ベクターの構築

TG カイコ作製ベクター pBac-UAS.A3i.SV-3xP3.GFP のアクチン 3 イントロン (A3i) の上流と下流に、各々 BmFDL のセンス鎖及びアンチセンス鎖を組み込み、RNAi を引き起こすヘアピン RNA を転写する構造を構築した。

BmFDL 配列を挿入したベクター (第 2 章で作製) を鋳型に、上記プライマー (P1 と P2、P3 と P4) を用い PCR を行い、センス鎖とアンチセンス鎖を合成した。センス鎖及びベクター (pBac-UAS.A3i.SV-3xP3.GFP) に対し制限酵素処理 (*CpoI*, *NheI*) を行い、ベクターに対しては引き続き脱リン酸化処理も行った。次に、制限消化したベクターとセンス鎖のライゲーション (TAKARA Ligation kit) を行い、*E. coli* DH5 $\alpha$  をトランスフォーメーションした。得られ



たコロニーに対し、コロニーPCRを行い(P5とP6使用)、センス鎖の挿入が予想されるコロニーをスクリーニングした。続いて、得られたプラスミドとアンチセンス鎖に対し、制限酵素処理 (*SfiI*, *SpeI*) を行い、ベクターに対しては引き続き脱リン酸化処理も行った。以降、センス鎖の時と同様に、制限酵素処理したベクターとアンチセンス鎖のライゲーションを行い、*E. coli* DH5 $\alpha$ をトランスフォーメーションした。コロニーPCRを行い(P7とP8使用)、コロニーのスクリーニングを行った。その後、スクリーニングで得られたプラスミドベクターを *EcoRI* で切断し、末端を平滑化した。

pBacUAS-AKS2を *NheI* で切断した後、アガロース電気泳動を行い、A3-KMO (アクチン3プロモーター及びキヌレニン酸化酵素、TGカイコ選抜マーカー) の配列に相当する長さのDNA断片をゲル抽出し、末端を平滑化した。得られたDNA断片を前段落で構築したプラスミドベクターとライゲーションし、その後、トランスフォーメーションした。プラスミドを調製し、プライマーKMOseq1~KMOseq7を用いて挿入したA3-KMOの部分のシーケンスを行った。シーケンスの正しかったクローンについて、HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いベクターを精製し、インジェクション用のバッファー (0.5 mM リン酸バッファー pH7.0, 5 mM KCl) に溶解し、以降の実験に用いた。

### (3) *piggyBac* トランスホザーゼ mRNA の合成

pGEMe-pigORF-p(A)90ベクターを *NotI* で切断した後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製したDNAを鋳型として、mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion) を使用してRNAを合成した。方法はキット添付のマニュアルに従った。塩化リチウム沈殿後、インジェクション用のバッファー (0.5 mM リン酸バッファー pH7.0, 5 mM KCl) に溶解した。

### (4) BmFDL RNAi TGカイコの作出

TGカイコの作出はKandaらの方法に従った (Kanda T *et al.*, 1991)。w1pnd系統の雄蛾と雌蛾を交尾させ (交尾後試験当日まで5°Cで保存)、産卵当日の発

生初期の卵を用いた。卵へインジェクションする溶液として、(2) で構築したベクター (終濃度 400 ng/μl) と pHA3PIG ベクター (終濃度 200 ng/μl) と (3) で合成した *piggyBac* トランスポザーゼ mRNA (終濃度 200 ng/μl) を混合し調製した。このインジェクション溶液を、マイクロマニピュレーター (駿河精機) とマイクロインジェクター (ナリシゲ) を用いてカイコ卵にインジェクションした。遺伝子挿入個体のスクリーニングは KMO (キヌレニン酸化酵素) 遺伝子による体色の変化で行った (Kobayashi I *et al.*, 2007)。体色が赤色に変化した幼虫を選別飼育し、同系交配を行い、UAS-BmFDL dsRNA 系統を樹立した。

2 本鎖 RNA の発現には、GAL4/UAS のシステム (Imamura M *et al.*, 2003) を用いて行った。A3-GAL4 TG カイコ系統は、以前シスメックス社において作出された系統を用いた。A3-GAL4 TG 系統と UAS-BmFDL dsRNA 系統を同時に飼育し、各々の系統の蛾を交配させ、次世代の交雑種の卵を得た。A3-GAL4 系統は卵の赤色蛍光を確認することでスクリーニングを行い、A3-GAL4 配列が挿入されている卵を選別した。卵の孵化後、今度は体表が赤色な幼虫を選別し、BmFDL dsRNA 配列が挿入されている個体を得た。GAL4 及び BmFDL dsRNA 両方の配列が挿入されている個体は、A3 (アクチン 3) プロモーターにより常時全身で転写因子である GAL が発現され、発現した GAL4 により、UAS 下流の BmFDL へアピン RNA 配列の転写が誘導される。このような BmFDL RNAi TG カイコを飼育し、以下の実験に用いた。

#### (5) カイコ脂肪体からのマイクロソーム画分の抽出

5 齢末期の BmFDL RNAi TG カイコ及びコントロールカイコ 5~10 頭から抽出した脂肪体に、5mM イミダゾール-HCl pH7.3 (250mM スクロースを含む) を 1ml 加え、ペレットホモジェナイザーを用いて、組織をすり潰した。その後、超音波破碎装置 (Branson Advanced Digital Sonifier Model 250DA) を用い、超音波処理 (強度 20%, 20 秒) により、完全に細胞を破碎した。細胞破碎液を 100 μl 取り、RNA 抽出用の試料とした。残りの破碎液に対し、微量高速遠心機を用い、7,000 ×g で 10 分遠心をおこない、上清を回収した。次に 49,000 rpm

で 60 分超遠心をおこない、沈澱を回収した。沈澱に、5mM イミダゾール-HCl pH7.3 (250mM Sucrose を含む) を 90  $\mu$ l、20% Triton X-100 を 10  $\mu$ l 加え、ピペッティングで分散させ、氷上で 1 時間可溶化した。再度 49,000 rpm で 60 分超遠心をおこない、今度は上清を回収し、ミクロソーム画分とした。

#### (6) RNA の抽出と cDNA の合成

脂肪体破碎試料 100  $\mu$ l に、Isogen-LS (ニッポンジーン) 750  $\mu$ l と、Milli-Q 水 150  $\mu$ l を加えて、良く攪拌した。その後、試薬添付の使用説明書に従い Total RNA を抽出した。抽出した RNA を 42  $\mu$ l の DW で溶解した。次に、RNA サンプルに 3  $\mu$ l の Cloned Dnase I (2 U/ $\mu$ l) (タカラバイオ) 及び 5  $\mu$ l の添付 10  $\times$  Buffer を加え、37°C で 30 分反応させた。その後、フェノール・クロロホルム処理、イソプロパノール沈澱をおこない、乾燥後の RNA を 50  $\mu$ l の Milli-Q 水で溶解し、260 nm の吸光度測定により RNA の濃度を求めた。

cDNA の合成には iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) を用いた。Reaction Mix 8  $\mu$ l に、iScript reverse transcriptase 2  $\mu$ l、RNA サンプルを 1  $\mu$ l (1.5~2.0  $\mu$ g) 加え、さらに DW により総液量を 40  $\mu$ l とした。25°C 5 分 $\rightarrow$ 42°C 30 分 $\rightarrow$ 85°C 5 分の反応をおこない、反応産物を冷却後、-30°C で保管した。

#### (7) リアルタイム PCR 法による BmFDL 転写量の測定

iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) を用いて実験をおこなった。内部標準として、カイコ RP49 遺伝子を用い、これを増幅させるプライマー (5'-GCAGGCGGTTCAAGGGTCAA-3'、5'-ACCATGAGCGATCTCTGCGC-3')、及び BmFDL を増幅させるプライマー (5'-CCGCTGCTGCTGTACTIONCTAC-3'、5'-CGACGCTTGATACCTCTCGC-3') を実験に用いた。

cDNA サンプルを DW で 10 倍に希釈していき、100%~0.0001% ( $\times 1 \sim \times 1,000,000$ ) の希釈系列を作製した。1 試験区当たり、40  $\mu$ l の Supermix と 4  $\mu$ l の 10 pmol/ $\mu$ l のプライマー、2  $\mu$ l の cDNA サンプルを加え、DW で総液量 80  $\mu$ l とした。攪拌後、20  $\mu$ l ずつ反応プレートに分注した。反応プレートを Chromo4

リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD) にセットし、95°C 3 分の反応後、95°C 15 秒、60°C 45 秒の反応を 50 回繰り返す、その都度、蛍光測定を行った。サンプル及びスタンダードの蛍光強度の増幅曲線がスレッシュホールドライン (デフォルト設定) と交差するサイクルをスレッシュホールドサイクル ( $C_T$  値) として求め、標準曲線を描いた。BmFDL の cDNA の存在比は、内部標準であるカイコリボソームプロテイン (rp49) の転写量に対する相対比で求めた。

#### (8) GlcNAcase 活性の測定

PA 化オリゴ糖鎖を用いて GlcNAcase 活性を測定した。0.4% の Triton X-100 を含む 0.1 M クエン酸・リン酸バッファー pH 5.5 に 0.2  $\mu$ M になるように PA 化オリゴ糖 (PA-Sugar Chain 012, タカラバイオ) と一定量 (タンパク質量 5, 10, 20  $\mu$ g) のマイクロソーム画分を加え、総量を 100  $\mu$ l とした。30°C で 16 時間反応後、溶液を 98°C で 3 分加熱し、その後 4°C 条件下で、12,000 rpm、10 分の遠心を行い、上清を反応産物として回収し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で解析した。

反応液中の PA 化オリゴ糖鎖の分析は、LaChrom Elite HPLC システム (日立ハイテク) を用いて行った。使用カラムとして、Cosmosil 5C18-AR-II カラム (6 mm  $\times$  250 mm) (ナカライテスク) を使い、PA 化糖鎖の検出は、励起波長 310 nm、検出波長 380 nm の蛍光検出で行った。0.02% のトリフルオロ酢酸 (TFA) でカラムを平衡化後、サンプルを 10  $\mu$ l インジェクションした。その後、0.02% の TFA で 5 分間、流速 1.2 ml/min で洗浄後、流速は変えずに、アセトニトリル濃度を 0% から 4% まで上昇させる 35 分間のグラジエント溶出を行い、反応産物を溶出した。

#### (9) 組換えアルカリフォスファターゼ発現バキュロウィルスの構築

仔牛小腸アルカリフォスファターゼ (ALP) 全長をコードする DNA 配列に、5'末端に *KpnI*、3'末端に *XbaI* サイトを付加した配列を、オペロンバイオテクノロジーにて合成した。合成した ALP の DNA を、*KpnI* 及び *XbaI* で制限消化

後、同じく *KpnI* と *XbaI* で切断した Dock タグ配列を付加するバキュロウィルス  
ストランスファーベクターであるプラスミド (Kamezaki Y *et al.*, 2010) に挿  
入し、クローン化した。このベクターとカイコバキュロウィルス (BmNPV CPd  
株) (Maeda S, 1989) DNA を、カイコ培養細胞である BmN 細胞にコ・トラン  
スフェクションし、得られた組換えウィルスに対し限界希釈法でスクリーニン  
グを行い、ALP 発現バキュロウィルスをクローン化した。

#### (10) 組換え ALP の発現と精製

5 齢 2 日目のコントロール又は BmFDL RNAi TG カイコに、ALP を発現す  
るバキュロウィルスを注射した ( $2.5 \times 10^6$  pfu/larva)。感染後 2 日目に、  
GlcNAcase 阻害剤である 50 mM 2-acetamido-1, 2-dideoxynojilrimycin  
(2-ADN) (トロントリサーチケミカルズ) を 50  $\mu$ l ずつ注射した。感染後 6 日  
目に、微量のフェニルチオウレアを入れた容器に体液を採取し、1,870  $\times$ g で 10  
分 (4°C)、次に 112,000  $\times$ g で 60 分遠心し、上清を回収した。回収した上清を  
精製時まで -80°C で保存した。

精製には Dock-Tag purification system を用いた (Kamezaki Y *et al.*, 2010)。  
体液を結合バッファー (25 mM Tris pH 8.0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% glycerol) で 5  
倍に希釈し、Dock ペプチドにカルシウムイオン存在下で強く吸着するコヘシン  
タンパク質をカラム担体に結合させた、コヘシンセファロースカラム (10 ml,  
 $\phi$ 15 mm) にアプライした。カラムを結合バッファーで洗浄後、50 ml の溶出バ  
ッファー (25 mM Tris pH 8.0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 5 mM EGTA) で溶  
出を行った。その後、溶出物をセントリコン 10K (ミリポア) で、3000 rpm で  
遠心し、液量が 1 ml 以下になるまで濃縮し、精製サンプルとした。

#### (11) LC-MS による糖鎖構造の解析

精製した ALP 50  $\mu$ g に 500 mU/ml のグリコペプチダーゼ F (PNGase F) 4  
 $\mu$ l (タカラバイオ) を加え、37°C で 20 時間反応させ、糖鎖の切断を行った (液  
量 50  $\mu$ l)。方法は、製品添付のプロトコールに従った。その後、BlotGlyco (住

友ベークライト) を用いて、糖鎖の精製と PA 化を行った。方法は、キット添付のプロトコールに従った。糖鎖切断後のサンプル 40  $\mu$ l と 2%酢酸/アセトニトリル溶液 160  $\mu$ l を加え、反応用チューブ中で BlotGlyco ポリマービーズに糖鎖を吸着させた。ビーズを洗浄し、糖鎖以外の夾雑物を除いた後、反応用チューブに 20  $\mu$ l の Milli-Q 水と 180  $\mu$ l の 2%酢酸/アセトニトリル溶液を加え、70°C で 1.5 時間加熱し、糖鎖の再遊離を行った。再遊離した糖鎖に 2.76 mg/ $\mu$ l の PA を加え、80°C で 1 時間加熱した後、ジメチルアミンボラン溶液を加え糖鎖の PA 化を行った。PA した糖鎖をクリーンアップカラムに吸着させ、95%アセトニトリルで洗浄後、Milli-Q 水で溶出し、PA 化糖鎖を精製した。PA 化した糖鎖に対し、ULTRA FAST MASS SPECTROMETRY LCMS-IT-TOF 装置 (島津) を用いて、住友ベークライトに委託して LC-MS 解析を行い、糖鎖構造を解析した。LC の分析には Develosil C30-UG-3 カラム (野村化学) を用い、0.1%のギ酸存在下で 10%アセトニトリル濃度を 0%から 50%へグラジエント溶出することで行い、PA 化糖鎖を励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm で蛍光検出した。質量分析のイオン化モードとしては、ESI ネガティブを用いた。糖鎖構造の推測には、GlycoMod Tool (<http://web.expasy.org/glycomod/>) を用いた。

## 第2節 結果

### (1) 体液中の BmGlcNAcse2 を抑制したカイコでの組換え ALP の発現と糖鎖構造の解析

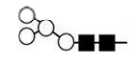
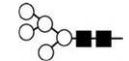
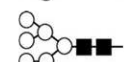








カイコの培養細胞を用いた実験で、GlcNAcse の阻害剤である 2-ADN 存在下で、バキュロウィルスによる糖タンパク質の発現を行い、糖鎖構造のヒト型化が起きることが報告されている (Watanabe S *et al.*, 2002)。そこでまずは、カイコ幼虫に 2-ADN を投与し、その効果を検証した。投与量は 0.25 mM の 2-ADN が BmGlcNAcse2 の活性の 80%を阻害するデータから (Kokuho *et al.*, 2010)、約 0.5 mM になる量を注射した。糖鎖修飾のモデルタンパク質として、過去に糖鎖改変の実績 (Suganuma M *et al.*, 2013) がある仔牛小腸の ALP を用いた。バキュロウィルスを用い、組換え ALP 発現バキュロウィルスを感染させ、並行

して感染後 2 日目に 2-ADN を注射した。発現された ALP を、Dock アフィニティタグを用いて精製し、PNGase F を用いて、*N*結合型糖鎖を切断した。切断された *N*-グリカン PA でラベル化し、LC-MS 解析を行った。

解析の結果、2-ADN を注射しないコントロールカイコにおいて ALP を発現した場合、糖鎖の多くは少マンノース型であり、63.2%の値を示した (表 4-1A)。残りの多くは (34.2%)、マンノースが 4-9 個付加したマンノース型糖鎖 (ハイマンノース型糖鎖) であり、非還元末端に GlcNAc を有する複合型に近い糖鎖は検出されなかった (146 fmol 以下)。一方、2-ADN を、ALP 発現バキュロウィルスで感染させたコントロールカイコに注射した場合、72.7%が少マンノース型糖鎖であり、24.7%がハイマンノース型糖鎖であったが、0.8%の非還元末端が GlcNAc である *N*-グリカンが検出された (1,438 fmol) (表 4-1B, Control)。このように、2-ADN の投与により、組換え ALP において GlcNAc 末端の糖鎖が検出されるようになることが示され、このことから、GlcNAcase 阻害剤により、カイコにおいても GlcNAcase の阻害が起き、GlcNAc が付加する方向に *N*-グリカンのプロセッシングを変えることができるものの、阻害剤の投与だけでは GlcNAc を付加するには不十分であることが分かった。

表 4-1. コントロールカイコ及び BmFDL RNAi TG カイコにおける組換え ALP の糖鎖構造と存在比

(A) 2-ADN 非投与のコントロールカイコ及び BmFDL RNAi TG カイコで組換え ALP を発現した。糖鎖の割合は全 *N*-グリカンに対する%で表した。ハイフンは非検出。M4-M9 はハイマンノース型 *N*-グリカン。M2-M3 は少マンノース型 *N*-グリカン。○、■、△は各々、GlcNAc、マンノース、フコースを表す。(B) 2-ADN をコントロールカイコ及び BmFDL RNAi TG カイコに注射すると共に発現を行った ALP の糖鎖構造と存在比。GNM3 と GNM3F は GlcNAc 型の *N*-グリカン。

N-glycan structures	Mimetic diagram	(A) 2-ADN (-)		(B) 2-ADN (+)	
		Control (%)	BmFDL RNAi (%)	Control (%)	BmFDL RNAi (%)
M4		6.5	10.4	9.2	5.5
M5		21.6	13.3	12.9	20.3
M6		1.3	1.2	1.0	0.9
M7		2.9	1.9	1.0	2.3
M8		1.2	1.3	0.6	-
M9		0.7	-	-	-
M2		35.9	37.7	41.4	33.7
M2F		25.6	30.5	31.3	27.8
M3		1.7	1.8	-	1.9
GNM3		-	-	0.8	3.4
GNM3F		-	-	-	0.9

(2) BmFDL RNAi TG カイコの作製

前項での GlcNAcase 阻害剤の投与により、GlcNAc 付加が起きたものの、そ



の割合は顕著ではなかった。そこで次に、脂肪体に局在する BmFDL を抑制するために、BmFDL を RNAi により阻害する TG カイコの作出を行った。

1,559 粒の卵に TG カイコ作製のベクターを約 5 nl インジェクションした。25°C で 10 日間保温後、878 粒の卵で孵化が見られた。孵化した卵を羽化まで飼育し、雄蛾雌蛾 186 組の交配を行った。交配した雌蛾が産卵した卵を再び孵化まで飼育し、KMO による孵化幼虫体表の赤色化をマーカーにしてスクリーニングを行った所、7 頭の雌蛾が産卵した卵でマーカーポジティブの幼虫が得られた。得られたマーカーポジティブの幼虫を飼育し、途中で死亡した幼虫を除き、最終的に 4 系統の TG カイコを得た。これらを GAL4 系統と交配し、dsRNA が発現している次世代カイコを用意した。これら dsRNA が発現している TG カイコは、コントロールカイコに比べ、スクリーニングマーカー以外、特に見かけ上に差はなく、致死や生育不良等の現象は見られなかった。コントロールカイコ及び TG カイコから、幼虫脂肪体ミクロソーム画分を採取し、GlcNAcase 活性を測定した (図 4-2)。コントロールカイコ (図 4-2B) と 4 系統の RNAi TG カイコを比較すると、系統 1 (図 4-2C)、系統 2 (図 4-2D)、系統 3 (図 4-2E)、系統 4 (図 4-2F) で各々反応産物である GNAM3-PA のピークが、コントロールに比べ小さくなっており (系統 1 は 38.3%、系統 2 は 31.8%、系統 3 は 35.2%、系統 4 は 20.3%、各々 GNAM3-PA のピーク面積が減少した)、GlcNAcase 活性を阻害していることが分かった。そこで得られた頭数が多かった系統 2 をさらに継代し、性能評価試験に用いた。

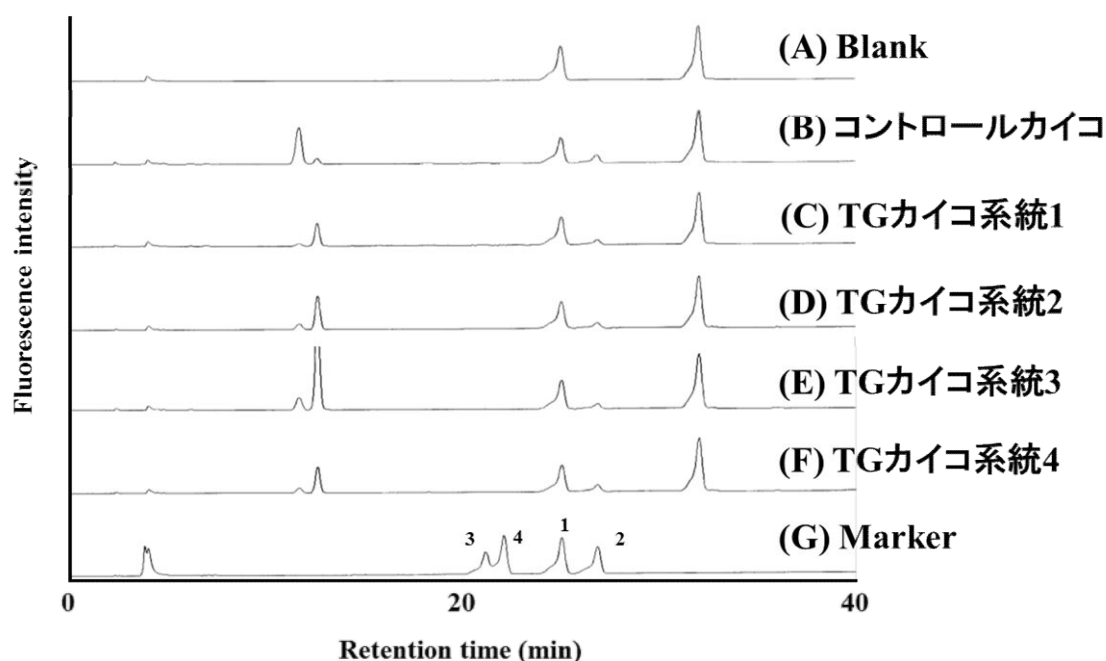


図 4-2. BmFDL RNAi TG カイコ各系統の GlcNAcase 活性

GN2M3-PA 基質と 8 時間反応後逆相 HPLC を用いて解析した。(A) 0  $\mu$ g ミクロソーム (ブランク)。(B)-(F) カイコ脂肪体ミクロソーム画分使用。(B) コントロールカイコ (C) BmFDL RNAi TG カイコ系統 1。(D) 系統 2。(E) 系統 3。(F) 系統 4。(G) マーカー。1, 2, 3, 4 の数字は、各々 GN2M3-PA, GNAM3-PA, GNBM3-PA, M3-PA に相当する。

(3) BmFDL RNAi TG カイコに対する BmFDL の転写量と酵素活性の測定  
BmFDL RNAi TG カイコにおける抑制効果を検証するために、まず BmFDL の転写量を調べた。5 齢幼虫脂肪体から RNA を抽出し、cDNA 合成後、リアルタイム PCR により測定を行った。転写量は rp49 (カイコリボソームタンパク質の一種) の転写量を内部標準として、それに対する比率で表した。その結果、コントロールカイコでの転写量が 0.77% に対し、RNAi TG カイコでは 0.19% となり、コントロールに比べ約 75% の抑制効果が見られた (表 4-2)。

表 4-2. BmFDL RNAi TG カイコにおける BmFDL 転写量

コントロールカイコと BmFDL RNAi TG カイコにおける転写量を、rp49 の転写量に対する比(%)及びコントロールカイコに対する比(%)で表した。

	Abundance relative to rp49 (%)	Abundance relative to control (%)
Control silkworm	0.77 ± 0.03	100
BmFDL RNAi TG silkworm	0.19 ± 0.01	24.7

一方、BmFDL の GlcNAcase 活性の測定は、PA 化糖鎖基質を用いた HPLC 法を用いて行った。幼虫脂肪体からマイクロソーム画分を抽出し、5~20 µg (タンパク質量) のマイクロソームと PA 化糖鎖基質を 16 時間反応させて逆相 HPLC で解析した。GN2M3-PA を糖鎖基質とした場合、BmFDL の活性により末端の GlcNAc が切断され、反応産物として GNAM3-PA のピークが HPLC で検出され、一方、GNBM3-PA や M3-PA のピークは検出されないことが判明している。(図 2-7)。実際、コントロールカイコにおいては、基質とした GN2M3-PA のピーク面積が減少し、GNAM3-PA のピークが生じ、しかもそのピークの大きさは、総ピークはマイクロソームの量が増えるに従い増加していくことが示された(図 4-3A, B, C, D)。一方、BmFDL RNAi TG カイコでは、同じマイクロソーム量のコントロールのカイコに比べ、全ての試験区で活性の抑制が見られた(図 4-3E, F, G)。なお抑制効果は約 50%であった(図 4-4)。

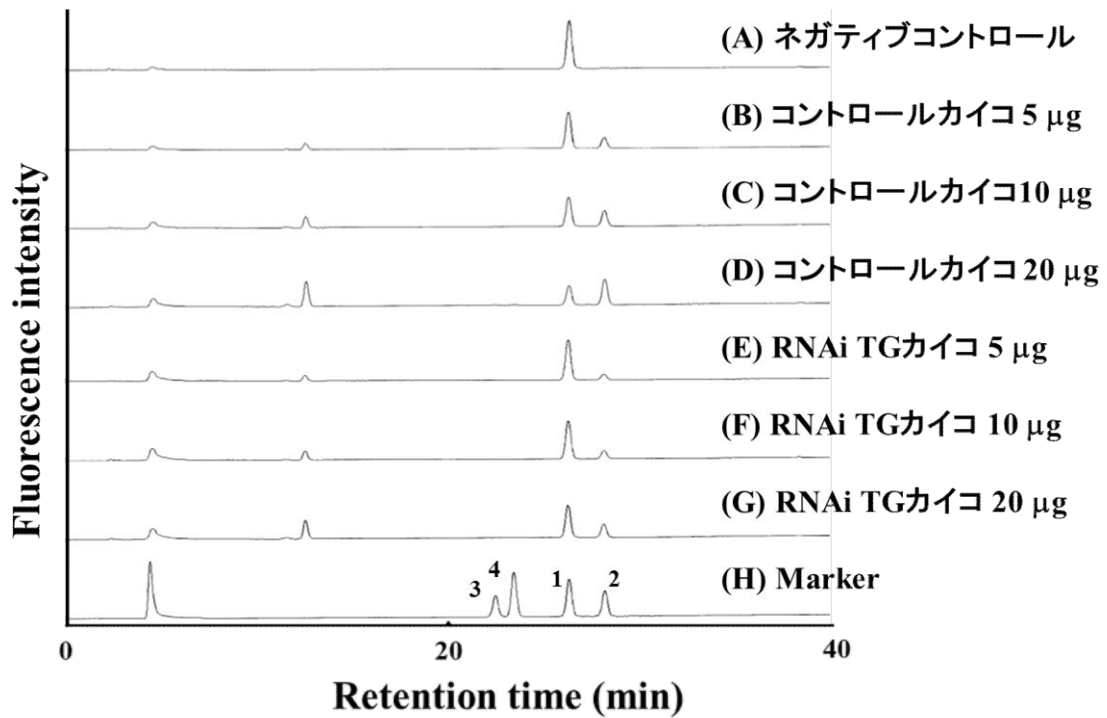


図 4-3. HPLC を用いた BmFDL RNAi TG カイコの GlcNAcase 活性抑制の解析

GN2M3-PA 基質をコントロールカイコ及び BmFDL RNAi TG カイコマイクロソーム画分と 16 時間反応度、逆相 HPLC で解析した。(A)ネガティブコントロール。コントロールカイコマイクロソーム画分タンパク質量 (B) 5 µg、(C) 10 µg、(D) 20 µg。BmFDL RNAi TG カイコマイクロソーム画分タンパク質量 (E) 5 µg、(F) 10 µg、(G) 20 µg。(H) マーカー。

1, 2, 3, 4 の数字は、各々 GN2M3-PA, GNAM3-PA, GNB M3-PA, M3-PA に相当する。

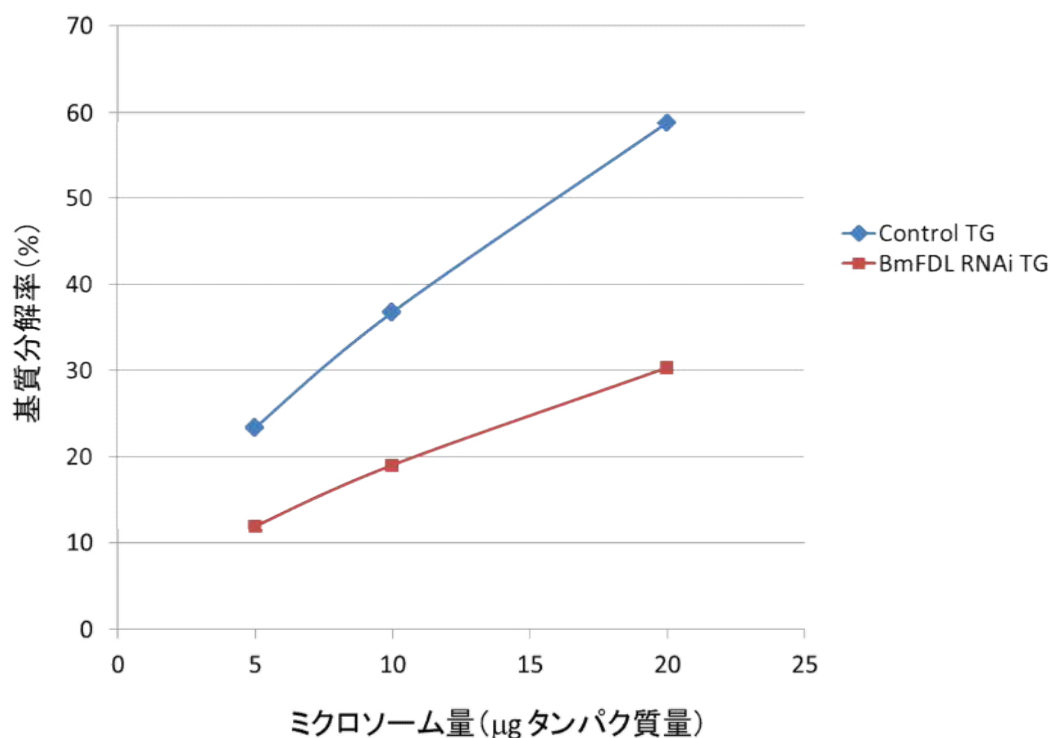


図 4-4. HPLC を用いた BmFDL RNAi TG カイコの GlcNAcase 活性抑制の解析

図 4-3 のマイクロソームタンパク質量を横軸に、HPLC のピーク面積から求めた GlcNAc が切断された基質の割合を縦軸にしてグラフを描いた。

#### (4) BmFDL RNAi TG カイコで発現した ALP の糖鎖解析

作製した RNAi TG カイコの糖鎖付加効果を検証するために、TG カイコ及びコントロールカイコに対し、バキュロウィルスで組換え ALP を発現し、精製後、N 結合型糖鎖の糖鎖構造の解析を、LC-MS を用いて行った。なお、主として体液中の GlcNAcase の活性を抑制するために、TG カイコに 2-ADN の投与も合わせて行った。

RNAi TG カイコにより BmFDL の発現を抑制した場合、N-グリカンの非還元末端への GlcNAc の付加は検出されなかった (60 fmol 以下) (表 4-1A BmFDL RNAi)。対照的に、2-ADN を注射したコントロールカイコにおいては、0.8% の非還元末端が GlcNAc である N-グリカンが検出された (表 4-1B Control)。さ

らに、2-ADN の注射に加え、BmFDL RNAi TG カイコを用いた場合、非還元末端が GlcNAc である *N*-グリカンの割合は 4.3%に増加していた (4,268 fmol) (表 4-1B BmFDL RNAi)。同様の実験を再度実施したが、結果は同様であった (表 4-3)。

以上のことより、体液中の GlcNAcase 活性を阻害することで、わずかながら糖鎖の非還元末端に GlcNAc が付加された糖鎖を検出することができるようになった。このことから、さらに BmFDL を RNAi 法を用いて抑制することで、GlcNAc が付加された糖鎖の含量を増やすことができることが示唆された。

表 4-3. 組換え ALP の糖鎖構造と存在比(再試験)

表記は表 4-1 と同じ。

N-glycan structures	Mimetic diagram	(A) 2-ADN (-)		(B) 2-ADN (+)	
		Control (%)	Control (%)	BmFDL RNAi (%)	BmFDL RNAi (%)
M4		-	9.5	-	-
M5		28.8	14.8	27.4	-
M6		1.1	-	-	-
M7		2.7	1.3	2.4	-
M8		1.6	0.6	-	-
M9		0.5	-	-	-
M2		38.6	42.9	34.0	-
M2F		25.2	28.5	26.9	-
M3		-	-	1.7	-
GNM3		-	0.9	3.5	-
GNM3F		-	-	0.9	-

### 第3節 考察

前章の研究で、BmFDL 及び BmGlcNAcase2 がカイコ虫体においても、GlcNAc の切断に関わっていることが推測された。そこで、私は、阻害剤の使用及び RNAi による BmFDL を抑制する TG カイコの使用により、これら GlcNAcase の抑制効果、及び糖鎖構造の変化を調べた。

実験の結果、BmGlcNAcase2 の抑制が *N*-グリカンの構造変化を引き起こすことが示された。しかしながら、2-ADN の投与による体液中の BmGlcNAcase2 の抑制だけでは、GlcNAc 付加糖鎖含量の増加はわずかであり、BmFDL も含めた発現抑制が必要なことが示された。反対に RNAi による BmFDL の抑制だけでは、*N*-グリカンの非還元末端への GlcNAc の付加は見られなかった。従って、GlcNAc の切断を効果的に阻害するためには、体液中の BmGlcNAcase2 の活性を阻害しつつ、かつ細胞内の BmFDL を抑制することが望ましいことが示唆された。

そこで、GlcNAcase 阻害剤と RNAi により、BmFDL と BmGlcNAcase2 を抑制した所、4.3%の GlcNAc 付加型の糖鎖が見られた。GlcNAc 付加糖鎖の含有量は明らかに増加したものの、まだ増加の余地があると考えられる。GlcNAc 付加糖鎖の含有量を制限している理由として以下の可能性が考えられる。

[1] 体液中の GlcNAcase2 活性を部分的にしか阻害していない可能性がある。これはまだ BmGlcNAcase2 を強力に阻害する方法が見出されていないためであり、まずは阻害剤の投与量を増やすことが考えられるが、コストの面で実用的でない。RNAi 法による抑制も選択肢として考えられるが、全身で強力な RNAi を行うとカイコに悪影響を及ぼす可能性も考えられる。前章で BmGlcNAcase2 の合成器官の候補として脂肪体が示唆されているが、今回実施した TG カイコによる RNAi では、組織特異的プロモーターを用いることで、組織特異的な抑制が可能なので、BmGlcNAcase2 の発現を脂肪体特異的に強く抑制しながら、カイコに与える悪影響を抑えることが可能かもしれない。

[2] BmFDL の阻害が不十分である可能性がある。しかしながら、FDL は *D. melanogaster* では脳形成に関わる遺伝子であり、カイコにおいても同様の機能

を有している可能性は高く、強く **BmFDL** を抑制するとカイコに悪影響を及ぼすことが懸念される。時期特異的若しくは組織特異的に **BmFDL** を阻害することで、カイコへの悪影響を回避しつつ、抑制効果を増強することが期待できる。

[3] カイコにおける *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I の活性が弱い可能性がある。昆虫には *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I が存在し、マンノース型糖鎖への **GlcNAc** 付加がなされることが示されているが (Geisler C *et al.*, 2012)、この活性が十分に強くないと **GlcNAc** が付加されない糖鎖が生ずる原因となる。この可能性に関しては、カイコ若しくはヒト等の *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I を発現する TG カイコを作製することで、酵素活性を増強し、**GlcNAc** 付加糖鎖の含量を増加させることが期待できる。

本章において私は、**GlcNAcase** を阻害することで、昆虫培養細胞だけではなく (Nagata Y *et al.*, 2013)、カイコ虫体においても糖鎖構造を変えうることを見出した。哺乳類型のシアル酸が付加された複合型糖鎖は、今回得られた **GlcNAc** 末端の *N*-グリカンに、さらにガラクトースとシアル酸が付加して合成される。従って、本研究で得られた **GlcNAcase** 活性の阻害により **GlcNAc** を付加する技術は、シアル酸まで付加された哺乳類の複合型糖鎖を合成するための、基盤となる重要な技術として位置づけられる。また、**RNAi** を引き起こす TG カイコを作出する試みは、バキュロウィルスの感染阻止の観点から、ウィルス遺伝子の発現を阻害する TG カイコを作製し、成功した報告はあるものの (Isobe R *et al.*, 2004; Kanginakudru S *et al.*, 2007)、カイコ自身の遺伝子を制御する試みはまだ少ない (Dai H *et al.*, 2008)。そのような状況で、**RNAi** による糖鎖修飾と言ったカイコの機能を改変した試みは、今後のカイコを用いた有用性向上や機能解析の研究においても重要なものと思われる。

現在バキュロウィルスを用いて、ガラクトース転移酵素とシアル酸転移酵素を共発現することにより、シアル酸までの付加が可能なことが報告されているが (Suganuma M *et al.*, 2013)、今回作製した **BmFDL RNAi** TG カイコと、転移酵素の発現を組み合わせることにより、これまで以上に高い効率で、昆虫型の糖鎖をシアル酸付加型の糖鎖に改変できることが期待される。



## 第5章 総括

カイコを用いたバキュロウイルス組換えタンパク質発現系は、比較的高発現であり、翻訳後修飾がなされ、また発現スケールに対する柔軟な対応性や簡便な設備で発現が行えること等、優れた特長を有している。カイコ-バキュロウイルスを用いた発現系の特長として、哺乳類と同様、糖鎖付加がなされることが挙げられるが、その構造はやや異なり、末端がマンノースである短い糖鎖が付加されることが多い (Misaki R *et al.*, 2003)。糖鎖が糖タンパク質の機能に深く関わっている以上、哺乳類由来のタンパク質を発現した場合、発現した糖鎖も哺乳類型 (ヒト型) であることが望ましい。

このような背景の下、ガラクトース転移酵素を発現する TG カイコを用いた糖鎖改変の検討が行われ、糖鎖の非還元末端にガラクトースが付加することが示された (竹田, 2006; Iizuka M *et al.*, 2009)。また、ガラクトース転移酵素発現バキュロウイルス及びシアル酸転移酵素発現バキュロウイルスを用いて、ウイルスの共発現による糖鎖改変が試みられ、シアル酸が非還元末端に付加することが示されている (Suganuma M *et al.*, 2013)。一方、昆虫の糖鎖において短いマンノース型糖鎖になる原因として、昆虫特有の GlcNAcase の存在が示されており、カイコでも *N*-グリカンの GlcNAc を切断する GlcNAcase は、これまで報告されていたが (Okada T *et al.*, 2007)、詳細は明らかになっていなかった。

このような状況の下、私は、*D. melanogaster* 等の研究から、カイコにおいても糖鎖のプロセッシングに関わる新規の GlcNAcase が存在することを予測し、そのクローニングと基質特異性の調査を行った (第 2 章)。新規に得られた GlcNAcase は、アミノ酸配列から推定される分子量が 70,920 Da であり、本酵素を *D. melanogaster* のホモロジーを有する酵素 FDL に対し、BmFDL と称することとした。BmFDL をバキュロウイルスで発現すると、膜画分に明らかに GlcNAcase 活性が観察され、このことから BmFDL は膜結合型の酵素であることが示された。バキュロウイルスで発現させた組換え BmFDL を精製し、2 本

鎖 GlcNAc 末端の糖鎖基質に対し酵素活性を測定した所、これまでカイコで報告されてきた BmGlcNAcase1 や BmGlcNAcase2 と異なり (Okada T *et al.*, 2007)、2 本鎖 *N*-グリカンの $\alpha$ -1,3 マンノース側の $\beta$ -1,2 結合の GlcNAc のみを切断することを示した。これは、DmFDL と同様の基質特異性である。また、キトリオースを切断するキチナーゼ様活性や、3 本鎖や 4 本鎖、バイセクティング GlcNAc 糖鎖など、各種糖鎖から GlcNAc を切断する活性は見られず、他のカイコ GlcNAcase に比べて狭い基質特異性を有することも示された。このような 1 方の鎖の GlcNAc を特異的に切断する活性は、カイコ培養細胞のゴルジ体を含むミクロソーム画分に見られる GlcNAcase 活性と同様の基質特異性であり、今回単離した BmFDL が、ゴルジ体で行われる *N*-グリカンのプロセッシングに関与することを示唆する結果であった。

次に、糖鎖改変のための抑制ターゲットとなる GlcNAcase を決めるために、バキュロウィルス-カイコの系で組換えタンパク質生産に良く用いられるカイコ 5 齢 (終齢) 幼虫後期の、各々の GlcNAcase の局在を調べた (第 3 章)。まずは、3 つのカイコ GlcNAcase (BmGlcNAcase1, BmGlcNAcase2, BmFDL) に対し、組織別の RNA の転写量を、リアルタイム PCR 法を用いて調べた。その結果、BmGlcNAcase1 は絹糸腺で転写量が多く、他の組織に比べ、絹糸腺で多く合成されることが示唆された。また、BmGlcNAcase2 は、顕著ではないものの脂肪体での転写量が多かった。BmFDL は全体的に突出して転写量が多い組織はなく、転写量が全体として低いこと、絹糸腺では検出限界以下であることが示された。一方、これら 3 つの GlcNAcase の存在組織をウェスタンブロッティングで解析した所、組織上の局在に大きな差が見られ、BmGlcNAcase1 は絹糸腺で、BmGlcNAcase2 は体液で、BmFDL は脂肪体で多く存在することが示された。転写量と酵素の存在組織から考えると、BmGlcNAcase1 は絹糸腺で多く合成され、そこに局在することが示された。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示唆された。また、BmFDL は脂肪体で局在しているが、合成量は少ない。合成された BmFDL は脂肪体に蓄積していて、これをウェスタンブロッティングで検出しているのかもしれない。これ

らの結果だけでは、各酵素の生体内での役割は不明であるが、バキュロウィルスでの組換えタンパク質の主要発現器官の1つが脂肪体であり、脂肪体で合成された多くのタンパク質は体液中に分泌されることから、糖タンパク質の非還元末端の GlcNAc の切断を防ぐためには、脂肪体に存在する BmFDL と体液中に存在する BmGlcNAcase2 を、共に阻害することが望ましいと判断した。

以上の知見から、BmFDL を抑制するための TG カイコの作製を行い、性能の評価を行った（第4章）。さらに体液中の GlcNAcase 活性を阻害するための阻害剤の使用も並行して実施した。作出された TG カイコは、コントロールカイコに比べ、脂肪体での BmFDL の転写量が 25%に、脂肪体ミクロソーム画分の GlcNAcase 活性が 50%に低下しており、RNAi 法によるカイコ虫体内での BmFDL の抑制が可能なが示された。また、阻害剤として 2-ADN をカイコに注射し、組換えバキュロウィルスを用いて ALP を発現した所、コントロールカイコでは、発現 ALP の糖鎖には GlcNAc 末端の糖鎖が全く見られなかったのに対し、阻害剤投与カイコでは、0.8%の糖鎖に GlcNAc の付加が見られ、阻害剤の効果が示された。加えてカイコを BmFDL の RNAi TG カイコに代えると、GlcNAc 末端の糖鎖の割合が、4.3%に上昇し、BmFDL の抑制効果が転写や酵素活性だけでなく、糖鎖構造にも効果があることが示すことができた。

以上、カイコにおいて糖鎖をヒト型化する基盤技術として、RNAi や阻害剤の利用により、GlcNAcase を阻害し、糖鎖を昆虫特有のマンノース型から、GlcNAc 末端型に変えることが可能なことが示された。昆虫型糖鎖のヒト型化には、ガラクトースやシアル酸付加の伸長促進と GlcNAc の切断抑制の2つのアプローチが、効率の良い糖鎖改変に必要であると考えられる。伸長促進に関しては、ガラクトース転移酵素やシアル酸転移酵素の導入が有効なことが分かっているが (Suganuma M *et al.*, 2013)、まだこれら転移酵素の、発現量のコントロールや時期特異的若しくは器官特異的なコントロールはなされていない。一般的には転移酵素の活性を強くすれば付加率も上昇する可能性は高いが、全身で常時、糖転移酵素の発現を強力に行った場合、私のこれまでの研究では、カイコの生存に悪影響が生じた例はないものの、問題が生ずる可能性はある。そのため、

時期特異的な発現を誘導することができるヒートショックプロテインのプロモーターや、抗生物質誘導性のプロモーターの利用も考えられるが、このようなプロモーターの使用は、カイコ虫体ではまだほとんど検討されていない。今後、導入する糖鎖修飾酵素の発現パターンを種々変更し、糖鎖付加の効率、カイコ生育に与える影響を調べることにより、カイコに与える悪影響を最小限に抑えながら、付加効率を向上させることができるようになることが予想される。

一方、ガラクトースの付加機能を亢進したとしても、ガラクトース受容体である GlcNAc 糖鎖の GlcNAc が消失している場合は、ガラクトース付加効率の向上は望めない。そのため、GlcNAcase の抑制もガラクトース付加率向上の大切な要素の 1 つである。本研究においては、RNAi を用いて BmFDL の抑制を行い、糖鎖の改変が可能であることを示した。RNAi 以外にも、TALEN 等ゲノム編集技術を用いた遺伝子のノックアウトがカイコで近年試みられているが (Takasu Y *et al.*, 2013)、主として体色等、表現型が観察しやすい遺伝子に対して研究が進められており、BmFDL の抑制に直ちに用いることは難しい。また、完全に BmFDL を抑制した場合、*D. melanogaster* の FDL が神経中枢の発生に関与することから推測して (Boquet I *et al.*, 2000)、カイコにおいても、致死になるか不明であるが、何らかの異常が予想される。それに対し、RNAi による BmFDL の部分抑制は、発育に必要な最低限な GlcNAcase 活性を残しておくことで、糖鎖を改変しつつ、カイコ自体は正常に生育させることができる可能性が高い。実際、今回作製した RNAi TG カイコの生育は、コントロールカイコに比べ特に差はなく、致死や生育不良等の現象は見られなかった。実験に用いた BmFDL RNAi TG カイコは、A3 (アクチン 3 プロモーター) -GAL 系統と UAS-BmFDL RNAi 系統を交配した交雑系統であるが、GAL4 の発現量が多い A3-GAL4 系統の作製、スクリーニングには時間がかかるため、本研究では既に樹立された A3-GAL4 系統を用いて実験を行っていて、また、この系統は、特に GAL4 の発現量が多い A3-GAL4 系統として確立された訳ではない。従って、今回の実験では、アクチン 3 プロモーターの作用により、全身で RNAi を発現しているが、その効果はまだ向上の余地があると思われる。今後、GAL4 系統の作製を再度行い、GAL4

発現量を指標にスクリーニングを繰り返し、GAL4 系統を新たに樹立することで、発現する dsRNA (ヘアピン RNA) 量を増やし、BmFDL の抑制を強化し、GlcNAc 付加糖鎖の割合を増やすことができることが予想されるが、BmFDL はカイコ自身の酵素であるため、どのように抑制すれば、生育に問題なく効果を最大限得ることができるか、今後の検討課題の 1 つになる。例えば、時期特異的に、カイコ卵発生時の BmFDL の機能は阻害せずに、幼虫又は蛹期のバキュロウィルス感染時に強く BmFDL を抑制するプロモーターを利用することで、カイコに悪影響を及ぼすことなく BmFDL 活性を阻害することが可能になる。または、BmFDL が機能していると予想される脳での発現は阻害せず、器官特異的に脂肪体等で強く BmFDL を阻害するプロモーターの利用も考えられる。このような手法を取ることで、ほぼ完全に BmFDL の発現を RNAi 法により抑制することができるようになると考えられ、それに伴い、GlcNAc 付加の著しい増加も見込まれる。

いずれにしても、カイコ虫体を用いた糖鎖改変法の開発は、まだ始まったばかりである。本研究の成果を土台として、今後、更なる抑制効果の強化と、糖付加法の開発により、実用的なヒト型糖鎖付加法が開発され、実際の糖タンパク質生産に使用されることが期待される。

## 引用文献

Abdul-Rahman B, Ailor E, Jarvis D, Betenbaugh M, Lee YC.: Beta-(1 --> 4)-galactosyltransferase activity in native and engineered insect cells measured with time-resolved europium fluorescence. *Carbohydr. Res.* 337: 2181-2186, 2002

Ailor E, Takahashi N, Tsukamoto Y, Masuda K, Rahman BA, Jarvis DL, Lee YC, Betenbaugh MJ: *N*-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiology* 10: 837-847, 2000

Altmann F, Schwihla H, Staudacher E, Glossl J, Marz L: Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-*N*-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein *N*-glycans. *J. Biol. Chem.* 270: 17344-17349, 1995

Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, Marz L: Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* 16: 109-123, 1999

Aumiller JJ, Hollister JR, Jarvis DL: Molecular cloning and functional characterization of beta-*N*-acetylglucosaminidase genes from Sf9 cells. *Protein Expr. Purif.* 47: 571-590, 2006

Bade ML, Wyatt GR: Metabolic conversions during pupation of the cecropia silkworm. 1. Deposition and utilization of nutrient reserves. *Biochem. J.* 83: 470-478, 1962

Bencúrová M, Hemmer W, Focke-Tejkl M, Wilson IB, Altmann F: Specificity of IgG and IgE antibodies against plant and insect glycoprotein glycans determined with artificial glycoforms of human transferrin. *Glycobiology* 14: 457-466, 2004

Boquet I, Hitier R, Dumas M, Chaminade M, Pr at T: Central brain postembryonic development in *Drosophila*: implication of genes expressed at the interhemispheric junction. *J. Neurobiol.* 42: 22-48, 2000

Cattaneo F, Ogiso M, Hoshi M, Perotti ME, Pasini ME: Purification and characterization of the plasma membrane glycosidases of *Drosophila melanogaster* spermatozoa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 929-941, 2002

Cattaneo F, Pasini ME, Intra J, Matsumoto M, Briani F, Hoshi M, Perotti ME: Identification and expression analysis of *Drosophila melanogaster* genes encoding beta-hexosaminidases of the sperm plasma membrane. *Glycobiology* 16: 786-800, 2006

Dai H, Ma L, Wang J, Jiang R, Wang Z, Fei J: Knockdown of ecdysis-triggering hormone gene with a binary UAS/GAL4 RNA interference system leads to lethal ecdysis deficiency in silkworm. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* 40: 790-795, 2008

Geisler C, Aumiller JJ, Jarvis DL: A fused lobes gene encodes the processing beta-*N*-acetylglucosaminidase in Sf9 cells. *J. Biol. Chem.* 283: 11330-11339, 2008

Geisler C, Jarvis DL: Identification of Genes Encoding *N*-glycan Processing

- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases in *Trichoplusia ni* and *Bombyx mori*:  
Implications for Glycoengineering of Baculovirus Expression Systems.  
Biotechnol. Prog. 26: 34-44, 2010
- Geisler C, Jarvis DL.: Substrate specificities and intracellular distributions  
of three *N*-glycan processing enzymes functioning at a key branch point in  
the insect *N*-glycosylation pathway. J. Biol. Chem. 287: 7084-7097, 2012
- Goldwasser E, Kung CK, Eliason J: On the mechanism of  
erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in  
erythropoietin action. J. Biol. Chem. 249: 4202-4206, 1974
- Harlow E, Lane D: Monoclonal antibodies. Antibodies a laboratory manual,  
Cold Spring Harbor Laboratory: 139-244, 1988
- Hase S, Ibuki T, Ikenaka T: Reexamination of the pyridylamination used for  
fluorescence labeling of oligosaccharides and its application to  
glycoproteins. J. Biochem. 95: 197-203, 1984
- Hogenkamp DG, Arakane Y, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW:  
Characterization and expression of the beta-*N*-acetylhexosaminidase gene  
family of *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol. 38: 478-489,  
2008
- Hollister JR, Jarvis DL.: Engineering lepidopteran insect cells for  
sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian  
beta 1,4-galactosyltransferase and alpha 2,6-sialyltransferase genes.  
Glycobiology 11: 1-9, 2001



- Iizuka M, Ogawa S, Takeuchi A, Nakakita S, Kubo Y, Miyawaki Y, Hirabayashi J, Tomita M: Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS. J.* 276: 5806-5820, 2009
- Imamura M, Nakai J, Inoue S, Quan GX, Kanda T, Tamura T: Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* 165: 1329-1340, 2003
- Isoe R, Kojima K, Matsuyama T, Quan GX, Kanda T, Tamura T, Sahara K, Asano SI, Bando H: Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms. *Arch. Virol.* 149: 1931-1940, 2004
- Kamezaki Y, Enomoto C, Ishikawa Y, Koyama T, Naya S, Suzuki T, Sakka K: The Dock tag, an affinity tool for the purification of recombinant proteins, based on the interaction between dockerin and cohesin domains from *Clostridium josui* cellulosome. *Protein Expr. Purif.* 70: 23-31, 2010
- Kanda T, Tamura T: Microinjection method for DNA in early embryos of the silkworm, *Bombyx mori*, using air pressure. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.* 2: 31-46, 1991
- Kanginakudru S, Royer C, Edupalli SV, Jalabert A, Mauchamp B; Chandrashekaraiyah, Prasad SV, Chavaney G, Couble P, Nagaraju J: Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. *Insect Mol. Biol.* 16: 635-644, 2007
- Kaznowskia CE, Schneidermana HA, Bryanta PJ: Cuticle secretion during

larval growth in *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 31: 801-813, 1985

Kim YK, Kim KR, Kang DG, Jang SY, Kim YH, Cha HJ: Suppression of beta-*N*-acetylglucosaminidase in the *N*-glycosylation pathway for complex glycoprotein formation in *Drosophila* S2 cells. Glycobiology 19: 301-308, 2009

Kimura S: Insect haemolymph exo-beta-*N*-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori*. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta. 446: 399-406, 1976

北島健, 佐藤ちひろ: 昆虫の糖タンパク質. コールドスプリングハーバー 糖鎖生物学第2版: 294-299, 2010

Kobayashi I, Uchino K, Sezutsu H, Iizuka T, Tamura T: Development of a New piggy Bac Vector for Generating Transgenic Silkworms using the Kynurenine 3-mono Oxygenase Gene. J. Insect Biotechnol. Sericol. 76: 145-148, 2007

Koga D, Sasaki Y, Uchiumi Y, Hirai N, Arakane Y, Nagamatsu Y: Purification and characterization of *Bombyx mori* citinases. Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 757-767, 1997

Kokuho T, Yasukochi Y, Watanabe S, Inumaru S: Molecular cloning and expression profile analysis of a novel beta-D-*N*-acetylhexosaminidase of domestic silkworm (*Bombyx mori*). Genes Cells 15: 525-535, 2010

- Kubelka V, Altmann F, Kornfeld G, März L: Structures of the *N*-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). Arch. Biochem. Biophys. 308: 148-157, 1994
- Kukuruzinska MA, Lennon K: Protein *N*-glycosylation: molecular genetics and functional significance. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 9: 415-448, 1998
- Laemmli UK.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970
- Leonard R, Rendic D, Rabouille C, Wilson IB, Preat T, Altmann F: The *Drosophila* fused lobes gene encodes an *N*-acetylglucosaminidase involved in *N*-glycan processing. J. Biol. Chem. 281: 4867-4875, 2006
- Lis H, Sharon N: Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur. J. Biochem. 218: 1-27, 1993
- Lu Y, Wold F: Regulation of glycan processing by Golgi enzymes from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. Arch. Biochem. Biophys. 286: 147-152, 1991
- Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Saeki Y, Sato Y, Furusawa M.: Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594, 1985
- Mada S: Invertebrate Cell system applications. CRC Press: 167-181, 1989

- 前田進: 昆虫ウイルスとバイオテクノロジー: サイエンスハウス: 53-78, 1993
- Martignoni ME, Iwai PJ: A catalog of viral diseases of insects. Mites, and Ticks, 4th edn. Portland, Oregon: USDA Forest Service, PNW-195, 1986
- Misaki R, Nagaya H, Fujiyama K, Yanagihara I, Honda T, Seki T: *N*-linked glycan structures of mouse interferon-beta produced by *Bombyx mori* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 979-986, 2003
- Nagamatsu Y, Yanagisawa I, Kimoto M, Okamoto E, Koga D: Purification of a chitooligosaccharidolytic beta-*N*-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori* larvae during metamorphosis and the nucleotide sequence of its cDNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 219-225, 1995
- 永田晋治: カイコ前胸腺刺激ホルモンの糖鎖構造と受容体に関する研究: 東京大学博士論文: 38-45, 1998
- Nagata Y, Lee JM, Mon H, Imanishi S, Hong SM, Komatsu S, Oshima Y, Kusakabe T: RNAi suppression of beta-*N*-acetylglucosaminidase (BmFDL) for complex-type *N*-linked glycan synthesis in cultured silkworm cells. *Biotechnol. Lett.* 35: 1009-1016, 2013
- Nagaya H: Recombinant protein production by a Kaiko-baculovirus system. *Methods Mol. Biol.* 577: 109-120, 2009
- Okada T, Ishiyama S, Sezutsu H, Usami A, Tamura T, Mita K, Fujiyama K, Seki T: Molecular cloning and expression of two novel beta-*N*-acetylglucosaminidases from silkworm *Bombyx mori*. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem. 71: 1626-1635, 2007

Perotti ME, Cattaneo F, Pasini ME, Verni F, Hackstein JH: Male sterile mutant casanova gives clues to mechanisms of sperm-egg interactions in *Drosophila melanogaster*. Mol. Reprod. Dev. 60: 248-259, 2001

Smith GE, Summers MD, Fraser MJ.: Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165, 1983

Suganuma M, Nomura T, Higa Y, Kataoka Y, Hunaguma S, Okazaki H, Suzuki T, Fujiyama K, Sezutsu H, Tatematsu K, Tamura T: N-glycan sialylation in silkworm protein expression system. 第36回分子生物学会年会, 2013

Suzuki T, Kanaya T, Okazaki H, Ogawa K, Usami A, Watanabe H, Kadono-Okuda K, Yamakawa M, Sato H, Mori H, Takahashi S, Oda K: Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. J. Gen. Virol. 78: 3073-3080, 1997

鈴木健夫: 新規バキュロウィルスを用いる効率的タンパク質生産系に関する研究: 京都工芸繊維大学博士論文: 1-2, 1999

Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, Osanai-Futahashi M, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Zurovec M: Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. PLoS One 8: e73458, 2013

竹田敏: 昆虫機能利用研究: 79-85, 2006

Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, Kobata A:  
Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human  
erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant  
Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 263: 3657-3663, 1988

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N,  
Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC,  
Couple P: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori L.* using  
a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18: 81-84, 2000

Tomiya N, Narang S, Park J, Abdul-Rahman B, Choi O, Singh S, Hiratake J,  
Sakata K, Betenbaugh MJ, Palter KB, Lee YC: Purification,  
characterization, and cloning of a *Spodoptera frugiperda* Sf9  
beta-*N*-acetylhexosaminidase that hydrolyzes terminal  
*N*-acetylglucosamine on the *N*-glycan core. *J. Biol. Chem.* 281: 19545-19560,  
2006

Varki A: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.  
*Glycobiology* 3: 97-130, 1993

Watanabe H: Protein synthesis in the tissues of the silkworm, *Bombyx mori*,  
infected with nuclear-polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.* 9: 428-429, 1967

Watanabe S, Kokuho T, Takahashi H, Takahashi M, Kubota T, Inumaru S:  
Sialylation of *N*-glycans on the recombinant proteins expressed by a  
baculovirus-insect cell system under beta-*N*-acetylglucosaminidase

inhibition. *J. Biol. Chem.* 277: 5090-5093, 2002

Watanabe S, Kakudo A, Ohta M, Mita K, Fujiyama K, Inumaru S: Molecular cloning and characterization of the  $\alpha$ -glucosidase II from *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 319-327, 2013

Yin J, Li G, Ren X, Herrler G: Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 127: 335-347, 2007

Zen KC, Choi HK, Krishnamachary N, Muthukrishnan S, Kramer KJ: Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect beta-*N*-acetylglucosaminidase gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 435-444, 1996

Zhai YF, Huang MX, Wu Y, Zhao GD, Du J, Li B, Shen WD, Wei ZG: The expression profile and promoter analysis of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases in the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.* : in press

## 出版リスト

Nomura T, Ikeda M, Ishiyama S, Mita K, Tamura T, Okada T, Fujiyama K, Usami A: Cloning and characterization of a  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (BmFDL) from silkworm *Bombyx mori*. J. Biosci. Bioeng. 110: 386-391, 2010

Nomura T, Suganuma M, Higa Y, Kataoka Y, Funaguma S, Okazaki H, Suzuki T, Kobayashi I, Sezutsu H, Fujiyama K: Improvement of glycosylation structure by suppression of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase in silkworm. J. Biosci. Bioeng. : in press



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学生物工学国際交流センターの藤山和仁教授に心より感謝申し上げます。また、数々のご指導とご助言を賜りました同センターの三崎亮講師、並びに大橋貴生助教に厚く御礼申し上げます。

また副査である大阪大学大学院工学研究科の渡邊肇教授、並びに村中俊哉教授には、本論文の作成及び博士論文公聴会での発表内容について、丁寧なご指導を賜りました。心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、遺伝子のご供与とご助言をいただきました農業生物資源研究所の田村俊樹博士、並びに瀬筒秀樹博士に厚く御礼申し上げます。また、実験に際しまして数々のご助言をいただきました、東京大学の津本浩平教授に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えて頂きました、シスメックス株式会社の浜口行雄氏、久保田文雄氏、伊佐見康氏に厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、ご支援いただきました同社の宇佐美昭宏氏、並びに一口毅氏に深く感謝いたします。

さらに、本研究を遂行するにあたり、シスメックス株式会社の鈴木健夫博士、前川泰範氏、岡崎博之氏をはじめ、同社技術開発本部の研究員及びスタッフの方々にご支援とご激励をいただきました。心より御礼申し上げます。

最後に、本研究の推進を陰で支えてくれた私の家族に、心より感謝いたします。