



Title	Construction of an Escherichia coli System for the Production of N-linked Glycoproteins
Author(s)	Srichaisupakit, Akkaraphol
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52182
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (SRICHAISUPAKIT AKKARAPHOL)	
論文題名	Construction of an <i>Escherichia coli</i> System for the Production of <i>N</i> -linked Glycoproteins 大腸菌を用いた <i>N</i> -結合型糖鎖付加型糖タンパク質生産系の構築
論文内容の要旨	
<p>Chapter 1: Introduction</p> <p>Asparagine-linked (<i>N</i>-linked) protein glycosylation is an abundant protein post-translational modification mechanism by adding sugar moiety (generally described as glycan) onto designated amino acid sequence on the nascent polypeptide chain. Glycan structure varies, depend on corresponding hosts. This process is sophisticated; yet shares common mechanisms amongst eukaryotes and available throughout domains of life. Eukaryotic <i>N</i>-glycosylation was elucidated to possess variety of glycosyl linkages, glycan branching and complex structures. Numerous implications of protein <i>N</i>-glycosylation are such as for protein folding, oligomerization, structural stability, cellular trafficking, secretion, protease protection and cell-to-cell adhesion. In eukaryotes, early stage of <i>N</i>-glycosylation includes the synthesis of lipid-linked oligosaccharide (LLO) donor Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol (Glc, glucose; Man, mannose; GlcNAc, <i>N</i>-acetylglucosamine; Dol, dolichol) by dolichol pathway consisted of various glycosyltransferases (GTases). Oligosaccharyltransferase (OST) complex transfers oligosaccharide moiety from LLO onto <u>N</u>-X-S/T sites of nascent polypeptide chain. Moreover, <i>N</i>-glycosylation could be observed in archaeal organisms and bacteria. <i>Campylobacter jejuni</i> is a Gram-negative and pathogenic bacterium whose <i>N</i>-glycosylation pathway was most extensively studied. Previously, the protein glycosylation (<i>pgl</i>) operon of <i>C. jejuni</i> NCTC 81116 (Wacker et al., 2002) could be functionally transferred into <i>Escherichia coli</i>. Using advantages of the transferred <i>pgl</i> operon along with native components of <i>E. coli</i>, glycoengineering of glycosylation pathway, by introduction of corresponding GTases, could be performed. By this manner, a novel glycan structure could be synthesized in <i>E. coli</i>.</p> <p>Chapter 2: Cloning and Characterization of Protein Glycosylation Operon from <i>Campylobacter jejuni</i> JCM 2013</p> <p><i>C. jejuni</i> JCM 2013 is available in the Japan Collection of Microorganisms (JCM), but there has been no report focusing on its protein <i>N</i>-glycosylation. In this study, identification of the <i>C. jejuni</i> JCM 2013 <i>pgl</i> operon was performed. CmeA protein from <i>C. jejuni</i> was chosen as a glycan acceptor protein in this work. To assess the function of the cloned <i>pgl</i> operon, it was co-expressed with CmeA, which possesses 2 prokaryotic <i>N</i>-glycosylation sites (D/E-X1-N-X2-S/T), in the constructed <i>E. coli</i> BL21 $\Delta waaL$ mutant. Protein expression was successful, putative protein glycosylation activity was observed using immuno- and soybean agglutinin lectin-blotting. The detailed glycan structure was analyzed by mass spectrometry (MS) and the fluorophore-labeling method. Operon minimization and induction conditions were studied. Furthermore, maltose binding protein (MBP) and DsbA were C-terminally fused with synthetic glycosylation sequon and expressed as alternative glycan acceptor proteins. In brief, protein glycosylation of <i>pgl</i> operon resulted in glycan structure (Hex)-αGalNAc₅-GlcNAc, where protein glycosylation was observed on native glycosylation site of CmeA and on synthetic acceptor sites on MBP and DsbA.</p> <p>Chapter 3: Biosynthesis of an Initial-Stage Eukaryotic <i>N</i>-Glycan and its Protein Glycosylation in <i>E. coli</i></p> <p>To prove the principle of glycoengineering in <i>E. coli</i>, Man₃GlcNAc₂ was chosen as the desired structure to be synthesized. Because it is the smallest branched glycan unit observed in eukaryotes, and could accommodate further modifications to obtain complex-type or hybrid-type glycans. Furthermore, Man₃GlcNAc₂ structure was tested and found</p>	

minimally required for clinical efficacy in delivering of therapeutic glycoprotein β -glucocerebrosidase. Some GTases from *Saccharomyces cerevisiae* were shown to be solubly expressed in *E. coli* with in vitro activity. Therefore, *S. cerevisiae* was chosen as a source of GTase genes. To synthesize $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ in *E. coli*, Alg13, Alg14, Alg1 and Alg2 are required. The *E. coli* endogenous lipid-glycosyltransferase WecA helps establish the GlcNAc-PP-Und, which is required for subsequent catalytic steps of GTases listed above. Finally, PglB derived from *C. jejuni* JCM 2013, identified in Chapter 2, was used as OST. The glycan acceptor protein was the MBP-GT carrying synthetic prokaryotic glycosylation motif recognized by PglB. This system was transferred into constructed *E. coli* BL21 $\Delta\text{waaL}\Delta\text{gmd}$ mutant, where GDP-Man can be accumulated as a substrate of mannosyltransferases Alg1 and Alg2. Protein expression and the LLO biosynthesis in the constructed system was analyzed by immuno-blotting and HPLC, respectively. Structure of glycan released from MBP-GT was identified. Finally, glycosylation of $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ synthesized from the constructed pathway was observed on glycosylation motif of MBP-GT by MS analysis.

Chapter 4: General Conclusions and Perspectives

First, *pgl* operon of *C. jejuni* JCM 2013 was reconstituted in the engineered *E. coli*, resulted in functional prokaryotic *N*-glycosylation. Secondly, "Proof of Principle" was conducted that the early-stage eukaryotic *N*-glycan structure could be synthesized, and found glycosylated onto model protein in *E. coli*. For future application, design and engineering of glycan structure and protein secretion pathway will need to be determined. Following the $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ core structure, complex glycan structure could be synthesized by integration to the constructed system of eukaryote- or human-derived GTases. The culmination of this particular biotechnology research area will be the *E. coli*-synthesis of eukaryotic glycoproteins in high yield, and the engineering of *N*-glycan structures for applications of benefit to humans.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (SRICHAISUPAKIT AKKARAPHOL)			
	(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	金谷 茂則
	副 査	教授	仁平 卓也

論文審査の結果の要旨

本論文では元来糖鎖付加機能を有していない大腸菌において、糖鎖付加に必要な糖転移酵素および糖ヌクレオチド合成酵素を異種発現させ、原核生物型および真核生物型の *N*-結合型糖鎖が付加した糖タンパク質生産系を構築したものである。

第一章では、本研究の背景及び目的について説明している。*N*-結合型糖鎖付加は真核生物における主要なタンパク質の翻訳後修飾の一つであるが、近年、*Campyrobacter* 等の原核生物においても *N*-結合型糖鎖付加機構を有することが報告されてきていることを述べている。次に、真核生物及び原核生物における *N*-結合型糖鎖構造およびその生合成機構、さらに各生物間で最終的な糖鎖構造が大きく異なっていることを示している。真核生物および原核生物において、*N*-結合型糖鎖生合成は脂質キャリアー上で糖脂質として成熟型糖鎖ブロックが合成され、オリゴ糖転移酵素によりポリペプチド鎖にその糖鎖ブロックが転移し、糖ペプチド（糖タンパク質）が合成される。特に、医療用糖タンパク質において *N*-結合型糖鎖構造はその生理活性等に大きく寄与することが知られている。そこで、元来糖鎖付加機構を持たない大腸菌に、真核生物型および *Campyrobacter* 型の *N*-結合型糖鎖付加機構を導入することにより、真核生物型糖鎖を有する糖タンパク質生産系を構築することは非常に有用であることに触れ、本研究の目的を述べている。

第二章では *C. jejuni* JCM 2013 株より原核生物型のタンパク質糖鎖付加オペロンをクローニングし、大腸菌にて異種発現を行い、その機能を調べた。塩基配列解析の結果、クローン化した本オペロンは種々の推定糖転移酵素および推定糖転移酵素の基質合成系に関与するタンパク質をコードしていることが明らかとなった。次に、本オペロンの糖鎖転移能を解析するために、2 つの推定原核生物型糖鎖付加部位 (D/E-X₁-N-X₂-S/T) を有する *C. jejuni* 由来糖タンパク質である CmeA タンパク質を糖鎖アクセプタータンパク質として用いることとした。CmeA タンパク質を本オペロンと共に発現させ、ウエスタンブロット解析を行ったところ、糖鎖付加を示す移動度の低いバンドが検出された。さらに、レクチンブロット解析により、GalNAc 残基が含まれていることが明らかとなった。次いで、CmeA タンパク質を精製し、ヒドラジン分解-PA 化法により蛍光標識化糖鎖を調製し、HPLC および質量分析により糖鎖部分の構造解析を行ったところ、Hex 分岐を有する *C. jejuni* 型の α -GalNAc₂-(Hex-)HexNAc₄ 糖鎖が付加していることが明らかとなり、クローン化したオペロンは *C. jejuni* 型糖鎖付加能を有することが示した。続いて、大腸菌における *C. jejuni* 型糖鎖付加に必要な最小単位のエペロン構造を調査するため、複数の遺伝子を削った欠損型オペロンを構築し、モデル糖タンパク質と共に発現させ、糖鎖構造解析を行った。その結果、大腸

菌における糖鎖付加に不必要な遺伝子を除去することができ、また分岐 Hex の付加に必要な糖転移酵素も同定することができた。また、Hex 分岐含有型および直鎖型糖鎖を付加できる大腸菌の構築に成功した。さらに、直鎖型糖鎖の構造解析により、糖鎖の還元末端は真核生物型と同様の GlcNAc であることが明らかとなった。以上の結果より、大腸菌において 2 種類の原核生物型糖鎖を有した糖タンパク質の生産系を構築することができた。

第三章では真核微生物である酵母および *C. jejuni* 由来の糖転移酵素群、および糖鎖アクセプタータンパク質として大腸菌由来タンパク質である MBP に糖鎖付加タグを付加させた融合タンパク質を大腸菌で共発現させた。糖転移酵素群および糖鎖アクセプタータンパク質の発現を至適化するために、プロモーターの種類、オペロン発現カセットにおける遺伝子の配置、遺伝子発現カセットの向き、およびコドン最適化等の条件を検討した。その結果、ウェスタンブロット解析によって、全てのタンパク質の発現が確認できる遺伝子構成を見出した。次いで、糖鎖ドナーとなる糖脂質を抽出し、糖脂質より糖鎖部分を酸水解により遊離後、PA 化法により遊離糖鎖の還元末端を蛍光標識し、HPLC 分析をおこなった。その結果、真核生物型の $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖が生産されていることが明らかとなった。さらに、第二章と同様の方法で、糖鎖アクセプタータンパク質を精製し、ヒドラジン分解-PA 化法により蛍光標識化糖鎖を調製し、HPLC および質量分析を用いて糖鎖構造を解析し、その構造が真核生物型 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖であることを示した。続けて nanoLC-MS 解析を用いた糖ペプチドをより詳細に解析することにより、この真核生物型 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖が糖鎖付加タグ部分に付加していることを証明した。以上の結果より、大腸菌において真核生物型糖鎖を有した糖タンパク質の生産系を構築することに成功した。

第四章では本論文の結果をまとめ、考察した。本論文で構築した大腸菌における原核生物型および真核生物型糖鎖が付加された糖タンパク質生産系の具体的な応用例および展望について記載した。

以上のように、本論文は汎用的なタンパク質生産宿主として用いられている大腸菌において、原核生物型および真核生物型糖鎖を有する糖タンパク質生産系を構築した。本成果は大腸菌における医療用糖タンパク質生産への応用の基盤技術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。