

報告番号	※ 甲 第 11029 号
------	---------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 トランスジェニックニワトリによる有用タンパク質生産  
を目指したニワトリ糖転移酵素に関する研究

氏 名 小島 佑介

### 論 文 内 容 の 要 旨

本博士論文では、遺伝子組換えニワトリを用いて鶏卵卵白中に有用タンパク質を生産させる技術を実用化すべく、有用タンパク質の生理活性や安定性に非常に重要な糖鎖の制御に着目し、ニワトリ糖転移酵素に関する研究結果を記載している。

第1章では、バイオ医薬品市場の拡大に伴った新たな有用タンパク質生産技術開発の必要性や、その候補としてのニワトリの有用性を中心に、本研究の背景について記している。近年の目覚ましいバイオ医薬品市場の拡大により、抗体をはじめとした有用タンパク質の需要が増加している。それに伴い、有用タンパク質を安価に大量に生産できる技術の開発が必要とされている。現在は、チャイニーズハムスター卵巣癌(CHO)細胞などの動物細胞を大型のタンクで培養し、有用タンパク質を生産させる方法が主流であるが、大規模な培養槽の建設、高価な培地の大量消費などの観点から、安価に生産できているとは言い難い。そこで当研究室では、今まで培ってきたニワトリの遺伝子組換え技術を応用し、鶏卵卵白中に有用タンパク質を生産させる技術の開発を行ってきた。遺伝子組換えニワトリを有用タンパク質生産に利用する理由は、ニワトリが以下の3つの特徴を有するためである。第1に、ニワトリの飼育は簡便でコストも安いことである。ニワトリは昔から家畜として飼育され、大量に飼育する技術が確立されている。そして飼料も安く、他の哺乳類の家畜と比べて広い飼育スペースを必要としない。さらに、世代時間も比較的短く、1度の人工交配で100羽の子孫を得る事もできることから、繁殖も容易である。第2に、ニワトリが高いタンパク質生産能力を持つ事である。産卵用品種のホワイトレグホーンLINE/Mの雌鳥は、ほぼ毎日産卵を行う(約300個/年)。そして、その卵の卵白には豊富なタンパク質が含まれている。このことから、ニワトリは高いタンパク質生産・分泌能力があると言える。第3に、有用タンパク質の活性に重要な糖鎖構造について、ニワトリとヒトが類似している事である。これらの特徴から、ニワトリを用いる事でヒトに使用できる有用タンパク質を安価に大量に生産できる可能性がある。当研究室では実際に、抗体やヒトエリスロポイエチン(hEPO)など様々な有用タンパク質を生産する遺伝子組換えニワトリの作製に成功している。しかしながら、これら卵白中に生産された有用タンパク質の糖鎖構造を解

析すると、N型糖鎖の末端に付加するはずのシアル酸とガラクトースが十分に付加していないことが判明した。糖鎖構造は有用タンパク質の生理活性や安定性に非常に重要であり、またヒトに存在しない糖鎖構造は抗原性を示す原因となる可能性から、厳密に制御されなければならない。そして、不完全な糖鎖を有する有用タンパク質は十分な生理活性を持たないと考えられる。そこで私は、博士後期課程の課題としてこれらガラクトースとシアル酸を付加すべく、ニワトリ糖転移酵素に関して研究を行うこととした。

第2章ではまず、ニワトリガラクトース転移酵素 (chicken galactosyltransferase 1: ckGalT1) に着目して、有用タンパク質へのガラクトース付加に関する実験を行い、その結果について述べている。先行研究の結果によって、卵白を生産・分泌する輸卵管においてガラクトース付加を行う ckGalT1 遺伝子の発現が低い事が判明した。そして、ニワトリに ckGalT1 遺伝子を導入する事で一本鎖抗体 (scFvFc) へガラクトースを付加することができる事が示された。そこで私は、別の有用タンパク質の例として hEPO 遺伝子に着目し、hEPO にも同様にガラクトース付加が行えるか解析することとした。さらにウイルスベクターの構造にも工夫を加え、1つのウイルスベクターから2つの遺伝子を同時に発現させる事ができる IRES (Internal ribosomal entry site) 配列を用いて、hEPO 遺伝子と同時に ckGalT1 遺伝子を発現させることで、有用タンパク質の生産とその糖鎖修飾を同時に行う事ができるか実験をする事とした。新たなレトロウイルスベクター (pMSCV/GFP-Pact-hEPO-IRES-ckGalT1-WPRE) を構築し、これを用いて EPO-GalT 遺伝子組換えニワトリを作製した。そして、このニワトリが生産した hEPO タンパク質について、ガラクトース付加と活性を解析した。糖鎖切断酵素 (Neuraminidase F,  $\beta$ -galactosidase) や、ガラクトースを特異的に認識する RCA120 レクチンを用いた実験の結果、EPO-GalT ニワトリによって生産された hEPO にはガラクトースが付加している事が確認された。また、この時卵白の主要タンパク質であるオボアルブミン (OVA)、オボトランスフェリン (OTF) なども ckGalT1 によってガラクトース付加されていた。さらに、EPO 濃度依存的に増殖を示す EPOR-Ba/F3 細胞を用いて *in vitro* 活性を測定したところ、ガラクトース化された卵白中 hEPO タンパク質は正常な活性を保持していることが分かった。以上の実験結果より、ckGalT1 遺伝子を用いる事で一本鎖抗体だけでなく、卵白に生産された hEPO へもガラクトース付加を行う事ができることが示され、ckGalT1 が様々な有用タンパク質のガラクトース化に有効であることが示された。さらに、2つの遺伝子を同時に発現させる IRES 配列を用いる事で、有用タンパク質の発現とその糖鎖修飾を同時に行う事ができる事が示された。しかしながら、ガラクトース付加に成功した一方で、依然としてシアル酸付加が行われていないことが分かった。

第3章では、ガラクトース付加が行われたにも関わらず、ガラクトースの次に起こるシアル酸付加が依然として観察されなかったことを受け、その原因を探索することとした。ckGalT1 の場合と同様に輸卵管において、ニワトリシアル酸転移酵素 (sialyltransferase: ST) の発現も低いのではないかと仮説を立て、ニワトリ ST に着目をした。しかしながら、哺乳類 ST に比べ、ニワトリ ST に関してはデータベース上に登録されてはいるものの、酵素活性の有無などを解析した研究報告が少ない。そのためにニワトリ ST ファミリー遺伝子のクローン化や活性測定から解析を始める必要があった。現在哺乳類 ST は 20 種類同定されており、合成するシアル酸の結合様式によって 4 つに分類される。有用タンパク質の生理活

性にはN型糖鎖が大きく寄与していると言われている。そこで私はN型糖鎖にシアル酸を付加すると思われる5つのニワトリST (ckST3Gal3, ckST3Gal4, ckST3Gal6, ckST6Gal1, ckST6Gal2) についてクローン化を行い、哺乳類STとの配列の比較、活性の測定、臓器における発現量の解析などを行うこととした。これら5つのSTの中で、ckST6Gal1については既に研究報告がなされていた。STファミリーのタンパク質はType II transmembrane proteinに分類される膜貫通タンパク質であり、ゴルジ体に局在する。そしてSTタンパク質は同様の構造(細胞質テール、膜貫通ドメイン、ステム領域、活性ドメイン)を持っている。ckST3Gal6のクローン化の際には、ステム領域の長さの異なるスプライシングバリエーション(ckST3Gal6  $\Delta$  E2)を取得する事にも成功した。酵素活性測定では、既に活性が報告されているckST6Gal1に加え、新たに2つのニワトリST (ckST3Gal3, ckST3Gal6)の活性を検出する事に成功した。また、これらの基質特異性を解析したところ、哺乳類のホモログと同様の基質特異性である事が分かった。さらに、スプライシングバリエーションであるckST3Gal6  $\Delta$  E2の活性を解析したところ、全長の活性の約16%であったことから、ステム領域が酵素活性に重要である事が示唆された。次に、各臓器におけるこれらのニワトリST遺伝子の発現量を逆転写-定量PCR (RT-qPCR)によって解析した。結果として、他の臓器に比べ、輸卵管においては全体的にこれらのSTの発現は低いことが分かった。そして、臓器のゴルジ体画分を用いたST活性測定においても、輸卵管のST活性は非常に低いという結果が得られた。これらの結果は、卵白に生産された有用タンパク質にシアル酸が付加しない事実と合致しており、輸卵管においてST遺伝子の発現が低いためにこのような現象が起きている事が強く示唆された。

以上のニワトリ糖転移酵素に関する研究結果から、ckGalT1遺伝子の発現によって様々な有用タンパク質にガラクトースを付加することができる事、IRES配列を用いて糖転移酵素を同時に発現させる事で、有用タンパク質の生産とその修飾を同時に行う事ができる事、さらに、卵白に生産された有用タンパク質にシアル酸が付加されないのは、輸卵管においてST遺伝子の発現が不十分である事が分かった。今後の展望としては第1に、ckGalT1遺伝子に加えてニワトリST遺伝子も導入する事で、シアル酸まで付加された有用タンパク質が生産可能か実験を行っていく。一方で、ニワトリによる有用タンパク質生産実用化には糖鎖制御以外の技術開発も必要であり、輸卵管特異的な遺伝子の高発現システムなどの様々な技術を統合していくことが求められている。また、シアル酸は非常に多機能な分子として知られているため、さらなるニワトリSTの研究は有用タンパク質生産以外の分野でも貢献できる可能性がある。近年たびたび猛威を振るい、ヒトへの感染例もある鳥インフルエンザウイルスは、シアル酸をレセプターとして感染する。しかし、先にも述べたように、ニワトリSTに関する研究はほとんど行われていないのが現状である。したがって、継続的にニワトリ糖転移酵素に関して研究を行い、どの臓器でどのような糖鎖が付加しやすいか解析する事は重要であると考えられる。