

論文審査の結果の要旨および担当者

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

氏 名 小島 佑介

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

論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	飯島 信司
委員	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	北島 健
委員	名古屋大学	准教授	西島 謙一

論文審査の結果の要旨

小島佑介君提出の論文「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」は、遺伝子組換えニワトリを用いて鶏卵の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重要な糖鎖の制御をめざしてニワトリ糖転移酵素に関する研究を行なったものである。

第1章では、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を安価かつ大量に生産する技術の開発が必要であることなど研究のバックグラウンドについて述べた。また、高いタンパク質生産能力や飼育が簡便でコストも安いなど、生産システムとしてのニワトリの有用性と、反面、卵白に生産されたタンパク質の糖鎖修飾が不完全であるという短所、すなわち本研究の発想の原点についても述べた。

第2章では、ニワトリガラクトース転移酵素 (ckGalT1) に着目した。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ている。糖鎖は、有用タンパク質の生理活性や安定性に重要であり、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ことから厳密に制御されなければならない。付加しない原因としては、卵白を生産・分泌する輸卵管において ckGalT1 遺伝子の発現が低い事が予想されている。そこで、ニワトリに ckGalT1 遺伝子を導入してヒトエリスロポイエチン (hEPO) にガラクトース付加がおこることを証明した。具体的には、hEPO 遺伝子と同時に ckGalT1 遺伝子を発現させるウイルスベクターを構築し、これを導入したニワトリの卵白に生産された hEPO タンパク質のガラクトース付加と活性を解析した。糖鎖切断酵素や、ガラクトースを認識するレクチンを用いた実験の結果、このニワトリによって生産された hEPO にガラクトースが付加している事が確認された。さらに、ガラクトースが付加された卵白中の hEPO タンパク質は正常な活性を保持していることがわかった。しかしながら、シアル酸付加がおきていないことも判明した。

第3章では、シアル酸付加が観察されなかった原因として、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 (ST) の発現も低いのではないかと考え、ニワトリ ST に着目した。哺乳類に較べニワトリ ST を解析した報告が少ないので、ニワトリ ST 遺伝子のクローン化や活性測定を行なった。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) をクローン化し、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った。その結果、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) の活性を検出することに成功した。また、これらの酵素は、哺乳類のホモログと同様の基質特異性を示すことがわかった。次に、各臓器におけるニワトリ ST 遺伝子の発現量を逆転写-定量 PCR 法及び酵素活性測定によって解析した。他の臓器に比べ、輸卵管においては全体的に ST の発現が低いことがわかった。この結果は、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ことを強く示唆している。

第4章ではこれらの結果をまとめその意義を考察した。

以上、本論文で得られた結果は医薬品開発をはじめ幅広い生物産業の発展に寄与するところが大きい。よって本論文提出者小島佑介君は博士 (工学) の学位を受けるのに十分な資格があるものと判定した。