

報告番号	甲 第 11648 号
------	-------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 遺伝子組換えニワトリの取得効率化と糖鎖制御に関する研究

氏 名 木 溪 俊 介

### 論 文 内 容 の 要 旨

医薬品など有用タンパク質の生産を効率化するために、多様な生産手段が報告されているが、我々は遺伝子組換えニワトリを用いて卵の中にこれらタンパク質を生産する方法を提案している。本研究では、遺伝子組換えニワトリを用いての生産を効率化するとともに、生産物の質的改良を目指し研究を行った。第1章では本研究の目的と背景について述べた。第2章では抗ウイルス因子 IFITM に着目し、ニワトリにおける発現パターンと抗ウイルス機能の解析を行い、遺伝子組換えニワトリ作製の効率化の基礎データを得た。第3章では生産されるタンパク質の高品質化を目指し、シアル酸転移酵素(ST)の特異性の解析とニワトリ個体における発現パターンを明らかにした。

#### 第1章

近年の医療技術は目覚ましく進歩し、第2次世界大戦直後と比較して約30歳も平均寿命が延伸した。医療技術の進歩を支えているのは医薬品の発達であり、現在までに様々な医薬品によって多くの疾患・感染症に対する治療が行われてきた。しかし、ガンや循環器疾患といったアンメットメディカルニーズによる死因の増加に伴って画期的な治療薬が求められており、バイオ医薬品が注目されている。バイオ医薬品は抗体などのタンパク質が有効成分として作用するため、生体内と同様の構造・翻訳後修飾を持つことが必要不可欠である。また、薬価を下げるのが重要であるため、既存の細胞培養系での難点であるコストの高さを克服し、かつ高品質で安定な生産系が求められている。そこで我々は、遺伝子組換えニワトリによる生産系に着目し以前から研究を行ってきた。一方、ウイルス感染も人類にとっては脅威であり、ワクチンは現在様々なウイルスに対して用いられているが、中でも鶏卵を用いて生産するインフルエンザウイルスワクチンはパンデミックの防止等に

非常に重要である。このように、ニワトリは家禽という枠を超えて医薬品生産の現場でも大変重要な存在である。

現在我々が行っている遺伝子組換えニワトリの取得法はウイルスを用いる方法であるため、取得効率の上昇にはニワトリの持つ抗ウイルス因子の機能解析が不可欠である。また、糖鎖はインフルエンザウイルスの感染時の足場として重要であることに加えて、タンパク質の挙動を制御する重要な翻訳後修飾でもあるため、糖鎖修飾制御はニワトリを用いて医薬品・ワクチンの生産を目指す上で非常に重要である。中でも糖鎖の末端に付加するシアル酸はタンパク質医薬品の体内での半減期の調節やインフルエンザウイルスの感染時の受容体として働くため、ニワトリにおけるシアル酸転移酵素の解析は、より高品質な有用タンパク質を生産するための知見として重要といえる。これらの背景から、本研究では有用タンパク質を生産する遺伝子組換えニワトリの取得効率化およびワクチン生産の効率化を目指してニワトリ抗ウイルス因子の機能解析とニワトリ糖転移酵素の機能解析を行った。

## 第2章

### インターフェロン(IFN)誘導性膜タンパク質の発現とウイルス感染防御に関する役割

ニワトリを用いた有用タンパク質生産系を確立するためには、卵白中に有用タンパク質を生産する遺伝子組換えニワトリの容易で安定な取得法の確立が必要である。しかし、当研究室で行っているウイルスを用いる手法では遺伝子組換えニワトリを取得することは容易ではないため、ニワトリが持つ自然免疫系のうち、ウイルスとの膜融合を阻害する因子 IFITM に着目した。

既報での成鳥における IFITM 発現パターンは半定量的なものであったため、生理的条件下における IFITM の発現について正確な定量を試みた。まず、成鳥ニワトリ組織での mRNA 量を定量したところ、IFITM3 は肺での発現が一番高く、次いで脾臓で高い事がわかった。また、IFITM2 は IFITM3 より低いものの様々な組織で発現しており IFITM1 及び 5 は発現が低いことが明らかになった。一方で、IFITM1 は大腸でのみ例外的に高発現するという結果も示された。また、これらの結果が非生理条件下の結果でないことを保証するために SPF 条件下で飼育されたニワトリの組織についても IFITM の発現を解析したところ同様の結果を得た。

次に、ニワトリ初代培養細胞である CEF を用いて IFN- $\alpha$  誘導性を解析したところ、IFN- $\alpha$  非刺激の状態では IFITM3 及び 2 が発現している一方で IFITM1 及び 5 は発現しておらず、発現レベルも解析した成鳥組織と比べて著しく低いことが明らかとなった。また、IFN- $\alpha$  により刺激すると非刺激時と比較して IFITM3 はおよそ 13 倍、IFITM2 は 21 倍誘導されるが、IFITM1 及び IFITM5 は発現誘導レベルが低いという結果を得た。これらの結果は、ニワトリにおける IFN- $\alpha$  誘導性抗ウイルス活性に IFITM が関与していることを示唆している。

さらに、成鳥では報告があるもののニワトリ胚における IFITM の発現については、未だ

報告がないため、孵卵 5.5 日胚での IFITM の mRNA 量を解析したところ、IFITM3 は生殖腺と腸管で高い発現を示すものの、一般的に胚組織での発現は成鳥と比べて著しく低い事が明らかとなった。胚組織の中では生殖腺における IFITM3 の発現が高かったため、生殖腺に定着する始原生殖細胞(PGC)についても解析を行った結果、PGC の分化に伴って IFITM3 発現が低下し、PGC の中では血管循環 PGC(cPGC)での発現が最も高い一方で生殖腺(gPGC)では GAPDH に対して 1.2%程度の発現量であることが明らかとなった。この結果から、組換えウイルス導入のターゲットである cPGC では IFITM3 の発現が高く、ウイルス感染を阻害する可能性が示唆された。

遺伝子組換えニワトリ作製に用いるレンチウイルスベクターの感染に対して、生理条件下の発現レベルにおける IFITM3 が及ぼす影響を明らかにするため、ニワトリ株化細胞 DF-1 を用いて IFITM3 のノックダウン実験を行った。DF-1 細胞は IFN 非刺激でも cPGC の約 1.5 倍の IFITM3 を発現しており、特異的 siRNA によって gPGC に相当する発現レベルまで低下することを確認し、この実験系を感染モデル系として使用した。IFITM3 ノックダウン細胞にレンチウイルスベクターを感染させたところ、コントロールと比較して約 1.8 倍感染効率が上昇し、cPGC 程度の低レベルの IFITM3 発現であってもレンチウイルスベクターの感染を阻害する可能性が示された。

鶏卵は様々なウイルスのワクチン生産に用いられており、インフルエンザウイルスのワクチン生産が有名である。感染を阻害する IFITM の発現が低いほうがワクチン生産効率の向上につながるため、鶏卵の漿尿膜及び羊膜を採取して IFITM の発現を解析したところ、漿尿膜・羊膜では IFITM3 の発現は cPGC よりわずかに低かった。また、IFITM2 は IFITM3 と比較して 40-50%の発現レベルで、IFITM1 及び 5 の発現は著しく低く、胚を囲む膜である漿尿膜及び羊膜でわずかながら IFITM3 及び 2 が発現していることが示された。

これらの結果から、胚時期での IFITM3 の発現を制御することで、遺伝子組換えニワトリの取得効率やワクチン生産効率が向上する可能性が示唆された。

### 第 3 章

#### O型糖鎖合成に関わるニワトリシアル酸転移酵素の解析

糖鎖構造は、修飾されたタンパク質の挙動の制御やウイルス感染に対して重要な役割を果たしている。ニワトリに生産させた有用タンパク質の糖鎖制御とワクチン生産の効率化を目指し、第 3 章では糖鎖末端にシアル酸を転移させるニワトリシアル酸転移酵素(ST)の機能解析を行った。

まず、ニワトリ O型糖鎖修飾関連 ST と哺乳類 ST とのアミノ酸相同性を解析したところ、ST3Gal1 で 67 %、ST3Gal2 で 85 %、ST3Gal5 で 64 %のアミノ酸レベルでの相同が見られ、哺乳類 ST と同様のドメインが保存されていることが明らかとなった。

次に、His タグ結合のニワトリ ST3Gal を発現させた 293FT 細胞抽出液を用いて、様々な基質に対するニワトリ ST の糖転移活性を解析した。O型糖鎖の基質である

Gal-β1,3-GalNAc に対しては ST3Gal1, 2 が活性を示したが ST3Gal5 は活性を示さなかった。次に *N*型糖鎖基質に対する反応性を解析したところ、まれな *N*型糖鎖構造の Gal-β1,3-GlcNAc に対しては ST3Gal1, 2, 3 が活性を示したが、ST3Gal5 は活性を示さなかった。一方、主要な *N*型糖鎖構造の Gal-β1,4-GlcNAc に対しては ST3Gal6 が強い活性を示し、ST3Gal3 は弱い活性を示したが、ST3Gal1, 2, 5 は活性を示さなかった。これらの結果から、ST3Gal1, 2 は *O*型糖鎖修飾だけではなく、部分的に *N*型糖鎖修飾にも関与することが示唆された。さらに広範に基質特異性を明らかにするために、糖脂質に対する ST 活性についても解析し、基質としてガングリオシド関連の脂質である GM1a 及びラクツシルセラミドを使用した。ST3Gal2 は GM1a に対して強い ST 活性を示し、ST3Gal1 も弱い活性を示したが、ST3Gal3, 4, 5, 6 は GM1a に対しては活性を示さなかった。一方、ラクツシルセラミドに対する活性を解析したところ、ニワトリ ST3Gal5 のみが活性を示し、ニワトリ ST3Gal5 は GM3 の合成酵素である可能性が示唆された。これに加えて、合成糖基質だけではなく生理条件下に近い基質で ST 活性を明らかにするために、糖タンパク質であるアシアロフェツインを用いて解析を行った。ST3Gal1, 2 が強い活性を示し、ST3Gal3, 6 が弱い活性を示したが、ST3Gal5 はタンパク質基質に対して反応性を示さなかった。これらの結果から、ニワトリにおいて ST3Gal1, 2, 3, 6 がタンパク質の糖鎖修飾に関与していることが示された。

さらに、ニワトリ成鳥組織における ST3Gal の発現を qRT-PCR により解析した。ST3Gal1 は気道、肺、卵管膨大部、脾臓で高く、ST3Gal5 は卵管膨大部、小腸、大腸、脾臓で強く発現していたが、肝臓における ST3Gal1, 2, 5 の発現は著しく低かった。また、卵白成分を生産する組織である卵管膨大部の輸卵管上皮細胞 TGC についても解析したところ、ST3Gal1, 5 が強く発現し、次いで ST3Gal6 の発現が高かった。この結果は ST3Gal1 が卵白タンパク質の *O*型糖鎖修飾に関与していることを示唆しており、Gal-β1,4-GlcNAc に対しては ST3Gal6 がシアル酸転移に関与していることが示唆された。

インフルエンザウイルスのワクチンは発育鶏卵中で作製されるが、インフルエンザウイルスはヒト型とトリ型で異なるシアル酸の結合様式を認識して感染することが知られている。効率的なヒトインフルエンザウイルスワクチン取得のためには鶏卵中のシアル酸転移酵素のプロファイルを解析する必要があると考え、漿尿膜及び羊膜で発現を解析した。α2,3 結合のシアル酸転移に関与する ST3Gal1, 5, 6 は漿尿膜及び羊膜で高い発現レベルを示したが α2,6 結合のシアル酸転移に関与する ST6Gal1, 2 の発現は低く、漿尿膜及び羊膜における糖鎖修飾パターンは α2,3 結合のシアル酸が主であることが示唆された。

これらの結果は、ニワトリ成鳥組織（特に輸卵管）における ST の発現制御により、ニワトリを用いた有用タンパク質の生産系で糖鎖制御が改善できる可能性と、発育鶏卵におけるワクチン取得の効率化の可能性を示していると考えられる。

以上、本研究で得た結果はニワトリを用いたタンパク質生産系の構築・改善及びワクチン取得の効率化に向けて新たな可能性を示すものであると考える。