

| | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名 | ふく た かず ひろ 福 田 一 弘 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学) |
| 学位記番号 | 論 農 博 第 2389 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 13 年 7 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当 |
| 学位論文題目 | Biosynthetic Control of <i>N</i> -Linked Sugar Chains in Mammalian Cells (動物細胞における <i>N</i> -結合型糖鎖の生合成制御に関する研究) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 熊 谷 英 彦 |

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、糖蛋白質に付加される糖鎖の構造を制御する技術の開発に関するものである。本論文は、動物細胞を用いて糖蛋白質を生産する系において、動物細胞内の糖転移酵素活性を調節し、もって産生される糖蛋白質における *N*-結合型糖鎖の構造を制御する方法について研究した成果をまとめたものである。本論文は6章より成り、主な内容は以下に示すとおりである。

1. ハイブリドーマおよびその親細胞の生産する IgM 抗体の μ 鎖上 5 本の糖鎖について、それぞれ構造を詳細に解析した。これにより、糖鎖構造の site dependency を明らかにするとともに、親細胞とハイブリドーマの糖鎖ではバイセクティング *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の付加率に差が見られることを示した。また、親細胞とハイブリドーマにおける細胞内の糖転移酵素活性と、生産される IgM の糖鎖構造の比較により、ハイブリドーマの糖転移酵素発現特性は両親細胞の特性を共に取り込んでおり、さらには、ハイブリドーマが生産する IgM の糖鎖構造は、融合によって変化した糖転移酵素発現特性を反映していることを明らかにした。
2. ヒト B 細胞内の糖転移酵素の発現量を調節することにより、産生される IgM の *N*-結合型糖鎖におけるバイセクティング GlcNAc の付加率を制御した。バイセクティング GlcNAc の付加率は、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT)-III によって直接的に制御されるだけでなく、 β 1, 4-ガラクトース転移酵素 (β 1, 4-GalT) との相対活性バランスによって影響を受けることを明らかにした。
3. チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞において、*N*-結合型糖鎖を多分岐型に変換する糖転移酵素である GnT-IV および GnT-V の片方または両方を高発現させた細胞株を数種類構築した。これらの細胞株によってインターフェロン- γ (IFN- γ) を生産することにより、付与される糖鎖の構造を多分岐型に改変することに成功した。その際、糖鎖の分岐構造は、CHO 細胞内の GnT-IV と GnT-V の活性に対応していることを明らかにした。多分岐型糖鎖は限られた種類の蛋白質にしか付与できないとの従来の見方に対し、宿主細胞の GnT-IV, GnT-V 活性が糖鎖の分岐度の決定において重要なファクターであることを示した。
4. 4分岐型糖鎖を生産するように改変した CHO 細胞に β 1, 4-GalT を高発現させた。この際、 β 1, 4-GalT 活性の異なる細胞株を数種類取得した。これらの細胞株によって IFN- γ を生産し、糖鎖構造を解析した。その結果、IFN- γ 糖鎖の分岐構造は、 β 1, 4-GalT 活性の上昇度に応じて変化するを見出した。細胞内の GnT-IV, GnT-V, β 1, 4-GalT の活性バランスを制御することによって糖鎖の分岐構造を制御できることを示すとともに、糖鎖プロセッシングに対して β 1, 4-GalT が、広範な影響を及ぼすことを明らかにした。
5. 糖鎖構造を多分岐型に改変した IFN- γ では、糖鎖の末端においてシアル酸の付加率が充分でないこと、およびポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造が増加していることを認めた。シアル酸の付加率を上昇させることを目的として、多分岐型糖鎖を生産するように改変した CHO 細胞において、シアル酸転移酵素を高発現させた。この細胞株の生産する IFN- γ の糖鎖では、シアル酸の付加率が向上するとともに、ポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造が減少することを見出した。すなわ

ち、シアル酸の付加とポリ-*N*-アセチルラクトサミンの生成が、生合成経路上で競合することを見出した。

6. 繊維芽細胞増殖因子 (FGF)-6 を CHO 細胞によって生産し、糖鎖付加体として取得した。得られた糖鎖付加体 FGF-6 の糖鎖構造は 2 分岐型であることを示した。糖鎖付加体 FGF-6 は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する増殖活性を示すことを明らかにした。また、糖鎖非付加体と糖鎖付加体の活性を比較し、糖鎖付加体が高い活性を示すことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

大腸菌などの原核細胞を用いて生産した組換え蛋白質には期待される生物活性を示さない場合があるが、この原因は糖鎖の欠如による。大腸菌などの原核細胞には糖鎖生合成機構が備わっていないため、生産される蛋白質に糖鎖が付与されない。一方、動物細胞が生産する蛋白質の大部分には糖鎖が付加されている。

糖鎖は様々な生命現象に関与していることから、糖鎖の構造を制御し、その機能を積極的に利用できれば、現在のバイオ医薬品開発に新たな道を開くことが期待できる。一方で、糖鎖の構造は非常に複雑であり、構造を制御することが困難なことが、糖鎖の産業利用を妨げてきた。糖鎖の構造は *microheterogeneity* を示す複雑な構造であり、糖鎖構造を自由に制御する技術は確立されていない。

著者は、動物細胞を用いて糖蛋白質を生産するにあたり、動物細胞のエンジニアリングによって、蛋白質に付与される糖鎖構造を制御する技術の開発を目指して研究を行った。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. IgM 抗体の μ 鎖上 5 本の糖鎖について、それぞれ構造を詳細に解析し、糖鎖構造の *site dependency* を明らかにするとともに、細胞融合が糖鎖構造に与える影響を明らかにした。また、糖鎖構造の変化と、細胞内の糖転移酵素活性の変化との相関を調べることにより、宿主細胞の糖転移酵素活性が糖鎖構造に与える影響が大きいことを示した。

2. ヒト B 細胞内の *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT)-III と β 1,4-ガラクトース転移酵素 (β 1,4-GalT) の活性バランスを調節することにより、バイセクティング *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の付加率を制御できることを示した。GnT-III と β 1,4-GalT が細胞内で競合することを示したことは意義が大きい。

3. *N*-結合型糖鎖を多分岐型に変換する糖転移酵素である GnT-IV および GnT-V の片方または両方を高発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株によってインターフェロン- γ (IFN- γ) を生産し、付与される糖鎖の分岐構造を改変することに成功した。GnT-IV および GnT-V の高発現により、糖鎖の多分岐化が一般的に起こることを示したことは糖鎖生物学の研究分野に新たな知見を提供するものである。

4. 細胞内の GnT-IV, GnT-V, β 1,4-GalT の活性バランスを制御することによって糖鎖の分岐構造を制御できることを示した。細胞内で β 1,4-GalT が GnT-IV, GnT-V とともに競合することを明らかにするとともに、糖鎖プロセッシングに対して β 1,4-GalT が広範な影響を及ぼしていることを明らかにした。

5. 多分岐型糖鎖を生産する CHO 細胞にシアル酸転移酵素を高発現させることにより、シアル酸の付加率を向上させるとともに、ポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造が減少することを示した。シアル酸の付加とポリ-*N*-アセチルラクトサミンの生成が競合することを明らかにした。

6. 繊維芽細胞増殖因子 (FGF)-6 を CHO 細胞によって生産し、糖鎖付加体として取得した。糖鎖付加体は糖鎖非付加体より高い活性を示すことを明らかにした。

以上のように、本論文は、動物細胞内の各種の糖転移酵素活性を調節することにより、産生される糖蛋白質の糖鎖構造を制御することが可能であることを示した。このような体系的な糖鎖制御を示した例は過去にはなく、本論文は糖鎖工学、糖鎖生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年6月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。