

令和元年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04572

研究課題名(和文) CHO細胞における抗体構造形成に関わる分子シャペロンの解明と抗体生産への利用

研究課題名(英文) Identification of the molecular chaperone responsible for antibody folding in CHO cell and application of it for the antibody production

研究代表者

養王田 正文 (Yohda, Masafumi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・卓越教授

研究者番号：50250105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗体には多数のジスルフィド結合があるため、CHO細胞によって産生される。ジスルフィド結合の形成はERのPDIにより触媒されるが、哺乳動物細胞には様々なPDIが存在し、どのPDIが抗体の構造形成に関与しているのかは不明である。ERストレスが誘発されると、pdia4の発現レベルは抗体産生CHO細胞において有意に増加した。また、抗体産生CHO細胞におけるpdia4のノックダウンは抗体の産生および成熟に有意に影響を与えた。さらに、組換えPDIa4がin vitroで抗体のフォールディングを促進した。以上の結果から、PDIa4がCHO細胞におけるフォールディングに重要な役割を担っていると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬品は使用量が多いため、大量生産技術の開発が課題となっている。低分子化学薬品と比較すると治療に要するコストは高く、その恩恵を得られる人が限られるだけでなく、医療費の高騰という問題も引き起こしている。本研究の成果により、CHO細胞による抗体の生産効率を上げて、生産コストを下げることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic monoclonal antibodies are produced by mammalian cells, mostly CHO cells, because antibody formation requires intra- and inter-chain disulfide bond formation and glycosylation. Folding and assembly of antibody polypeptide chains take place in the ER. In the antibody-producing plasma cell, thus, to enhance the antibody production by CHO cell, it seems necessary to improve the folding and assembly system in CHO cells. There exist various PDIs in mammalian cells. However, it is unknown which PDI is responsible for antibody production. When ER stress is induced, expression-level of pdia4 significantly increased in the antibody-producing CHO cell. Knockdown of pdia4 in the antibody-producing CHO cell caused significantly affected the production and maturation of antibody. PDIa4 could assist folding and assembly of the reduced and denatured antibody in vitro. Therefore, we concluded that PDIa4 takes an essential role in the folding and assembly in CHO cells.

研究分野：生物工学

キーワード：CHO cell antibody PDI Chaperone

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品のほとんどは、大腸菌、酵母、CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞で生産されている。現在最も注目されているバイオ医薬品である抗体医薬品は大腸菌や酵母での生産が不可能であることから、ほとんどが CHO 細胞で生産されている。抗体医薬品は使用量が多いため、大量生産技術の開発が問題だったが、様々な技術開発により、大量生産と低コスト化が実現している。それでも、低分子化学薬品と比較すると治療に要するコストは高く、その恩恵を得られる人が限られるだけではなく、医療費の高騰という問題も引き起こしている。このため、さらに高効率での抗体生産の技術の開発が不可欠である。

抗体は、B 細胞が産生する糖タンパク質であり、“Y”字型の 4 本鎖構造 (軽鎖 (LC)・重鎖 (HC) の 2 つのポリペプチド鎖が 2 本ずつ) を基本構造としている。各鎖は、約 100 アミノ酸残基からなるイムノグロブリンフォールドを 2 または 4 つ含み、それらの中及び間に多数のジスルフィド結合を有している。イムノグロブリンフォールドの形成ではプロリン異性化が律速段階である。免疫抑制剤シクロスポリン A がプロリン異性化を触媒する Peptidyl Prolyl Isomerase (PPIase) の 1 種であるシクロフィリン B に結合して抗体産生を阻害するという報告がある。さらに、糖鎖の付加も抗体分子としての活性や動態に重要である。これらの翻訳後修飾は小胞体で行われている。実際、我々の体で抗体を生産する B 細胞から分化した形質細胞では、小胞体が発達している。小胞体に翻訳後修飾能力を超えた過剰の負荷がかかると小胞体ストレスが生じ、タンパク質生産が抑制されたり、アポトーシスによる細胞死が誘導されたりする。形質細胞やモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞における抗体の構造形成に関する研究は行われているが、CHO 細胞を対象とした研究は断片的なものであり、ほとんど明らかになっていない。CHO 細胞は、バイオ医薬品の生産に最も利用されている細胞であるが、特に抗体の構造形成や生産に最適化されたものではないので、改良の余地が多くあると考えて良い。

2. 研究の目的

本研究は、CHO 細胞における抗体の構造形成に関わる小胞体分子シャペロンシステムを明らかにし、合成生物学的手法による CHO 細胞の抗体医薬生産動物細胞としての高機構化を可能とする基盤を構築することを目的としている。抗体 1 分子あたり 16 個以上のジスルフィド結合を有することから、小胞体におけるジスルフィド結合形成が構造形成に特に重要である。しかし、小胞体にはジスルフィド結合形成を触媒する Protein Disulfide Isomerase (PDI) は多種類存在するため、どの PDI が抗体形成に寄与するかは明らかになっていない。哺乳類において PDI ファミリーは、小胞体局在化シグナルを有すること、少なくとも 1 つのチオレドキシシン様ドメインを有することを基準に 20 種類のタンパク質が同定されている。本研究では、CHO 細胞における抗体の構造形成に関わる PDI を明らかにし、CHO 細胞における抗体構造形成機構を明らかにすることを目的としている。本研究による CHO 細胞による抗体の構造形成の律速段階などが明らかにすることができる。

3. 研究の方法

本研究で用いた細胞株は、物質生産に多用される CHO-K1 株及びこれにモノクローナル抗体 (IgG, Trastuzumab) の遺伝子を恒常発現させた CHO HcD6 株である。CHO HcD6 株は大阪大学大学院工学研究科 大政健史教授より供与された。小胞体ストレスは、N 型糖鎖の付加を阻害する Tunicamycin 及び Ca^{2+} -ATPase を非可逆的に阻害する Thapsigargin を用いて誘導した。PDI 遺伝子や小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現量は逆転写定量 PCR で定量した。DMSO で処理した条件を対照サンプルとして、ハウスキープینگ遺伝子 *gapdh* を基準に $\Delta\Delta Ct$ 法によりノーマライズを行った。CHO 細胞内における PDIA4 と IgG の相互作用は、抗 PDIA4 抗体による免疫沈降で行った。CHO 細胞のライセートに一次抗体としてマウス抗 ERp72/PDIA4 モノクローナル抗体を加え、二次抗体として磁気ビーズ結合ヤギ抗マウス IgG を添加した。磁気ビーズで回収されたタンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写し、HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG Fc フラグメントポリクローナル抗体を用いて、検出した。CHO HcD6 株に合成 siRNA を導入することで、*pdia4* をノックダウンした。細胞画分及び培養上清中に存在する抗体は Sandwich-ELISA により定量した。細胞内の抗体成熟度に関しては非還元条件下での Western blot を行った。その後、ImageJ を用いて β -actin でノーマライズし、抗体の各サブユニット (HC, LC) 及び構造形成中間体 (HC/LC, HC₂, HC₂/LC, (HC/LC)₂) について相対定量した。CRISPR-Cas9 Nickase を用いてゲノム編集を行い、PDIA4 ノックアウト株の作製を目指した。Tunicamycin 処理した CHO-HcD6 株の total RNA から逆転写 PCR により PDIA4 の全長 cDNA を獲得した。PDIA4 cDNA を pCI mammalian expression vector に組み込み、CHO-HcD6 株で発現した。PDIA4 を大腸菌組換え体として獲得し、インスリンに対する還元能の評価を行った。CHO 細胞より獲得した IgG (Trastuzumab) を用いて PDIA4 の酸化的フォールディング活性を評価した。IgG を DTT で還元したのち PDIA4 によるリフォールディングの様子を非還元 SDS-PAGE で観察した。

4. 研究成果

まず、CHO-K1 株と CHO HcD6 株の小胞体ストレス状況を *grp78* mRNA の発現で確認したところ、優位な差は確認できなかった。CHO HcD6 株の IgG 生産量はそれほど多くないことか

ら、小胞体に負荷がかかっていないと考えられた。そこで、小胞体に過剰な負荷がある状態にするために、小胞体ストレスを誘導する Tunicamycin と Thapsigargin を添加して、PDI の発現誘導を解析した。PDIa1 とそのホモログである PDIa2 から PDIa6 の 6 種をターゲットとした。その結果、小胞体ストレスを誘導すると、両株ともに *pdia3* 及び *pdia4* mRNA の発現量が有意に増大していた。特に、CHO HcD6 において、*pdia4* mRNA の発現量がと極めて有意に増大していることが明らかとなり、PDIa4 が抗体構造形成で重要な役割を担っていることが示唆された(図1)。PDIa4 は ERp72, CaBP2 とも呼ばれ、3 つのチオレドキシシン様触媒ドメインを有する。Tunicamycin による小胞体ストレス誘導または非誘導した CHO HcD6 のライセートを、抗 PDIa4 抗体を用いて免疫沈降した。その結果、沈降物中に IgG HC のシグナルが強く検出され、PDIa4 と IgG の相互作用が示唆された。次に、合成 siRNA を用いてノックダウンを行った。ノックダウンの効果を逆転写定量 PCR により解析したところ、*pdia4* 発現量はコントロールと比較して約 70%減少していた。*pdia4* ノックダウン条件下では、培養上清中の IgG 分泌量が少ないことが確認された。さらに、細胞内での未確成熟中間体の比存在量の上昇がみられた(図2)。次に、PDIa4 の一過性発現の効果を調べた。SDS-PAGE 解析により PDIa4 発現量の顕著な増大を確認された、免疫染色により、発現した PDIa4 は ER に局在していた。しかし、コントロールと比較し、IgG の生産量及び成熟度に有意な結果が得られなかった。また、免疫染色により発現した PDIa4 の局在確認をしたところ、正しく小胞体に局在していた。ゲノム編集による PDIa4 ノックアウト株構築については、スクリーニングまで行ったが、ノックアウト株を獲得することはできなかった。

大腸菌で発現・精製した組換え PDIa4 は、インスリンに対する還元活性を示した。また、酸性配列欠損体 PDIa4 ΔCB においても野生型と同等の活性が示された。本実験より、PDIa4 が還元酵素として働くとともに、相互作用に関与するとされる酸性配列が、PDIa4 単独での活性には寄与しない事が示唆された。IgG を基質とした実験で、PDIa4 の添加に伴って IgG が中間体を経て成熟化する様子が観察された。さらに、抗 HC 抗体および抗 LC 抗体を用いた Western blot による解析で、PDIa4 添加に伴う IgG の増加が確認された。本実験より、PDIa4 は IgG に対しジスルフィド結合形成を促進する酸化酵素として機能することが示された。

本研究の結果、PDIa4 が CHO 細胞における抗体(IgG)のジスルフィド結合形成による構造形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。しかし、PDIa4 の発現により抗体の生産量などが改善されなかったことから、PDIa4 以外の他のタンパク質も IgG の生産に重要であることが示唆された。以上の結果は、CHO 細胞による抗体生産量の増加に寄与する重要な成果である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1: Conway de Macario E, Yohda M, Macario AJL, Robb FT. Bridging human chaperonopathies and microbial chaperonins. *Commun Biol.* (2019) **2**: 103. 査読有

2: Morita K, Yamamoto YY, Hori A, Obata T, Uno Y, Shinohara K, Noguchi K, Noi K, Ogura T, Ishii K, Kato K, Kikumoto M, Arranz R, Valpuesta JM, Yohda M. Expression, Functional Characterization, and Preliminary Crystallization of the Cochaperone Prefoldin from the Thermophilic Fungus *Chaetomium thermophilum*. *Int J Mol Sci.* (2018) **19**: E2452. 査読有

3: Ogawa N, Yamamoto YY, Abe K, Sekiguchi H, Sasaki YC, Ishikawa A, Frydman J, Yohda M. Time-Resolved Measurement of the ATP-Dependent Motion of the Group II Chaperonin by Diffracted Electron Tracking. *Int J Mol Sci.* (2018) **19**: E950. 査読有

4: Sahlan M, Zako T, Yohda M. Prefoldin, a jellyfish-like molecular chaperone: functional cooperation with a group II chaperonin and beyond. *Biophys Rev.* (2018) **10**: 339-345. 査読有

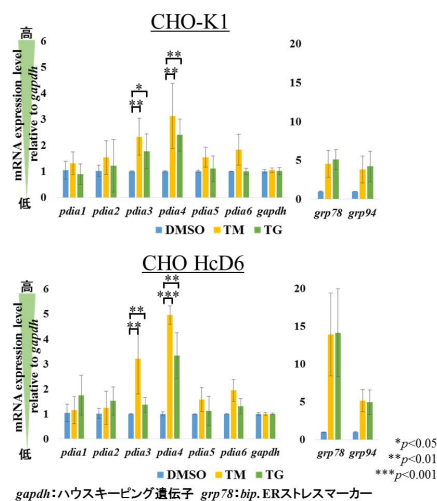


図1 CHO-K1 株及び CHO HcD6 株における *pdia* mRNA の発現量解析

TM : Tunicamycin, TG: Thapsigargin

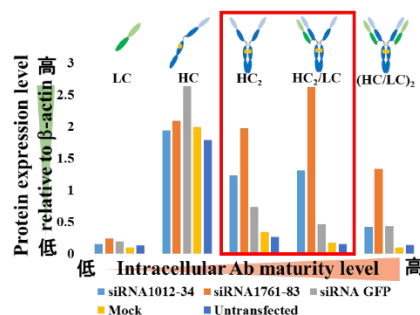


図2 *pdia4* ノックダウンの IgG 成熟度への影響

5: Yamamoto YY, Uno Y, Sha E, Ikegami K, Ishii N, Dohmae N, Sekiguchi H, Sasaki YC, Yohda M. Asymmetry in the function and dynamics of the cytosolic group II chaperonin CCT/TRiC. PLoS One. (2017) **12**: e0176054. 査読有

6: Yamamoto YY, Tsuchida K, Noguchi K, Ogawa N, Sekiguchi H, Sasaki YC, Yohda M. Characterization of group II chaperonins from an acidothermophilic archaeon *Picrophilus torridus*. FEBS Open Bio. (2016) **6**: 751-64. 査読有

7: Zako T, Sahlan M, Fujii S, Yamamoto YY, Tai PT, Sakai K, Maeda M, Yohda M. Contribution of the C-Terminal Region of a Group II Chaperonin to its Interaction with Prefoldin and Substrate Transfer. J Mol Biol. (2016) **428**: 2405-2417. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 安海一優、野口恵一、石井健太郎、加藤晃一、井上林太郎、守島健、杉山正明、養王田正文
HO細胞由来 HspB1 のオリゴマー構造の解明

第18回日本蛋白質科学会年会

朱鷺メッセ、平成30年6月28日

2. 公文健人、小松圭、福谷洋介、董金華、上田宏、養王田正文
CHO細胞由来 PD1a4 の抗体形成に関する機能

ConBio2017: 2017年度生命化学系学会合同年次大会

神戸国際会議場、平成29年12月6日

3. 小松圭、公文健人、福谷洋介、鬼塚正義、大政健史、養王田正文
CHO細胞における PD1a4 の抗体産生に及ぼす影響

第68回日本生物工学会大会

富山国際会議場、平成28年9月29日

4. 公文健人、小松圭、福谷洋介、養王田正文

CHO細胞由来 Protein Disulfide Isomerase PD1a4 の発現と機能解析

第89回日本生化学会大会

仙台国際センター、平成28年9月25日

5. 公文健人、小松圭、福谷洋介、養王田正文

CHO細胞由来 Protein Disulfide Isomerase PD1a4 の発現と機能解析

平成28年度日本生化学会関東支部例会

自治医科大学医学部教育研究棟、平成28年6月11日

6. 公文健人、小松圭、福谷洋介、養王田正文

CHO細胞由来 Protein Disulfide Isomerase PD1a4 の発現と機能解析

第16回日本蛋白質科学会

福岡国際会議場、平成28年6月7日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://web.tuat.ac.jp/~yohda/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 野口 恵一

ローマ字氏名: Keiichi Noguchi

研究協力者氏名：篠原 恭介
ローマ字氏名：Kyosuke Shinohara

研究協力者氏名：福谷 洋介
ローマ字氏名：Yosuke Fukutani

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。