

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06652

研究課題名(和文) N-結合型糖鎖におけるポリアミンモジュロンの同定と抗体医薬への応用

研究課題名(英文) Effect of polyamines on the N-glycosylation of antibody and its production.

研究代表者

東 恭平 (HIGASHI, KYOHEI)

東京理科大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号：10463829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗IL-8抗体を産生するCHO DP-12細胞にポリアミン生合成阻害剤を添加して細胞内ポリアミン量を減少させたところ、抗体産生量が減少し、糖鎖のガラクトシル化が亢進することが明らかとなった。そのメカニズムを調べたところ、小胞体シャペロンであるBiPやカルレティキュリン、およびガラクトース転移酵素B4Gal-T1の発現増加が認められた。以上の結果は、抗体産生細胞をグルコース飢餓やツニカマイシン処理して小胞体ストレスを起こした時と類似していた。従って、小胞体内のドリコール型オリゴ糖合成酵素の中にポリアミンモジュロンが存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は細胞の環境や状態に応じてその構造が変化します。そのため、糖鎖を有する抗体医薬を細胞で生産する際には、その培養条件を非常に厳密にコントロールする必要があり、非常にコストがかかります。細胞増殖促進因子ポリアミンは細胞の状態に応じてその量が変化しますが、私達は今回、ポリアミンが抗体の糖鎖構造に影響を及ぼすことを明らかにしました。本研究で得られた成果は、安価で安定した抗体の生産技術の開発に資すると考えています。

研究成果の概要(英文)：Increased level of terminal galactosylation of N-glycan of antibody and decreased level of antibody production were found in polyamine-depleted cells. Thus, the genes whose expression level was enhanced by polyamines (polyamine modulon) were explored, however, it was found that polyamine depletion cause the ER stress because expression levels of BiP, carleticulin were increased in polyamine depleted cells. In addition, B4Gal-T1 level was also elevated in polyamine depleted cells. These results are consisted with the result of ER stress response caused by glucose starvation or tunicamycin treatment. Thus, these results suggest that polyamines influence the biosynthetic pathway of dolichol-linked oligosaccharide (DLO) on the endoplasmic reticulum. The experiments are in progress to identify the polyamine modulon in DLO sythetic pathway.

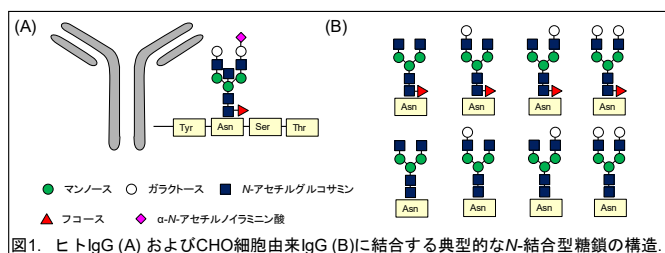
研究分野：分析化学、糖鎖生物学

キーワード：抗体医薬 ポリアミン N-結合型糖鎖 小胞体ストレス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬は、特定の抗原への結合やそれに続く免疫機構を介した異物の除去など、抗体の性質を利用したバイオ医薬品である。抗体医薬は、動物細胞 (主としてチャイニーズハムスター卵巣細胞; CHO 細胞)を用いて生産するが、高価な培地や培養設備が必要であるため、安定供給・低コスト化へ向けた取組みが盛んに行われている。*N*-結合型糖鎖は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (マンノース; Man、*N*-アセチルグルコサミン; GlcNAc)から成るコア構造に中性糖や GlcNAc およびシアル酸がいくつか結合して多様な構造を形成する複合糖質の一種である (図 1A)。分泌タンパク質の Asn 残基 (Asn-X-Ser/Thr 配列)に結合した *N*-結合糖鎖はその糖鎖構造によって細胞間相互作用、タンパク質品質管理、免疫応答調節およびタンパク質の安定性に大きく影響することが知られている。例えば、CHO 細胞が産生する抗体では 8 種類の *N*-結合型糖鎖が重鎖の Asn<sup>297</sup> に結合することが知られているが (図 1B) (Sha *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2016, **34**, 835-846)、コア構造上のフコースを除くと抗体依存性細胞障害 (ADCC)活性が増強すること、および非還元末端のガラクトース (Gal)の付加量を増加させると ADCC 活性や補体依存性障害 (CDC)活性が増強することが明らかとなり、ゲノム編集技術を駆使した CHO 細胞の作製が盛んに行われている (Yang *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2015, **33**, 842-844)。しかしながら、培地中のグルタミンやグルコースの低下に伴う細胞増殖速度の減少により、高マンノース型と混成型の糖鎖が増加するとの報告 (Fan *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, **112**, 521-535)や、細胞培養日数の経過に伴う生存率の低下により、糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加量が減少するとの報告 (Kaneko *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2010, **109**, 281-287)があり、糖鎖修飾を完全にコントロールするためには更なる検討が必要とされている。



### 2. 研究の目的

*N*-結合型糖鎖発現に対するポリアミンの効果を検討すべく、ヒト結腸腺癌由来 HCT116 細胞をポリアミンの有無で培養し、抽出した *N*-結合型糖鎖をラベル化した後に蛍光 HPLC 分析を行った。その結果、検出された 38 本のピークのうち前半 17 本がポリアミン減少に伴い増加傾向にあり、後半 17 本が減少傾向にあった (データ示さず)。このデータは、*N*-結合型糖鎖生合成遺伝子の中にポリアミンモジュロンが存在することを示唆している。細胞膜に発現する *N*-結合型糖鎖の構造は多様であるため、糖鎖構造解析が容易な抗体に着目した。ポリアミンが抗体の *N*-結合型糖鎖構造に影響を及ぼすのであれば、本研究の成果は安定した力価を有する抗体医薬の生産に資すると期待される。本研究では、抗体の糖鎖構造に対するポリアミンの効果を調べ、ポリアミンモジュロンを同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養方法と抗体の抽出

抗 IL-8 抗体を産生する CHO DP-12 細胞は ATCC より購入し、Gibco™Advanced™DMEM 培地に 0.5%の血清を添加して、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。細胞内ポリアミン量を減少させる際は 10 mM  $\alpha$ -Difluoromethylornithine (DFMO)を培地中に添加した。CHO DP-12 細胞から産生された抗体の抽出は、培養上清 5 mL を MonoSpin®ProA (GL Science)に供することで行った。抗体のタンパク質濃度は Lowry 法で調べた。

#### (2) HPLC

抗体のアフィニティークロマトグラフィー：カラムは TSKgel® FcR-III A-NPR カラム (東ソー) を用いた。溶離液 B (50 mmol/L クエン酸ナトリウム, pH6.5)、溶離液 C (50 mmol/L クエン酸ナトリウム, pH4.5) を調製し、グラジエント条件は 0-2 min (0% C)、 2-20 min (0-100% C)、 20-25 min (100-0% C)、 25-30 min (0% C) で、流速 0.8 mL/min の条件で抗体を分離し、UV 280 nm で検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) CHO DP-12 培養法の確立

CHO DP-12 を Advanced DMEM 培地に順化させた後、ポリアミン合成阻害剤である DFMO を最終濃度で 10 mM 添加し、培養 3 日後の細胞数および細胞内ポリアミン量を HPLC で調べた。その結果、DFMO 処理により細胞数は無添加に比べて約 60% に減少し、スペルミジン (SPD) およびスペルミン (SPM) の濃度も有意に減少した (Table 1)。一方、DFMO と 20  $\mu$ M SPD を同時に添加するとプトレッシン (PUT) と SPD の濃度が有意に増加し、細胞数が無添加とほぼ同じにまで回復した。以降の実験は、この 3 種の条件で細胞を培養した。

	Polyamines (nmol/mg protein)		
	PUT	SPD	SPM
Control	0.01	0.112	8.04
DFMO	0.00	0.019	4.22
DFMO + SPD	2.21	14.4	9.56

Table 1. CHO DP-12 のポリアミン組成と DFMO の効果

##### (2) 抗 IL-8 抗体の産生量と糖鎖構造に対するポリアミンの効果

抗 IL-8 抗体の産生量および糖鎖構造に対するポリアミンの効果調べることを目的に、スピンカラムで抗体を抽出し、タンパク質濃度を測定した。抽出した抗体量を細胞のタンパク質量で補正した結果、DFMO を添加した細胞では抗体の産生量が約 20% 減少することが明らかとなった (図 2)。

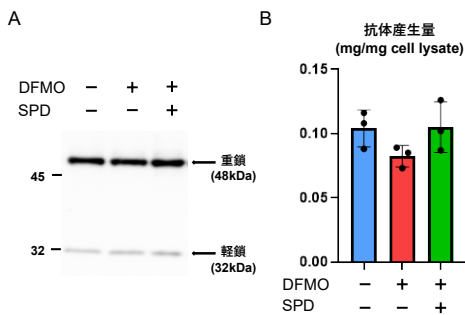


図 2. 抗体の分泌に対するポリアミンの効果

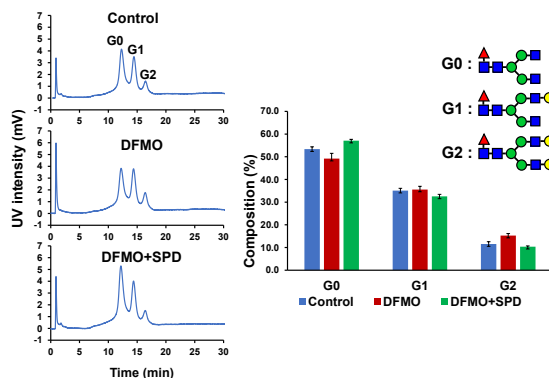


図 3. TSKgelFcR III A-NPR カラムで分離した抗 IL-8 抗体のクロマトグラム

(A) ウェスタンブロット法による抗体の検出。抗体 1  $\mu$ g を用いた。(B) それぞれの培養条件下における抗体産生量。抽出した抗体および細胞のタンパク質濃度は Lowry 法により調べた。

次に抗体 20  $\mu\text{g}$  を TSKgel FcR-III A-NPR で分析した。このカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーでは、抗体に結合したガラクトース (G)の数に応じて抗体を分離することができる (図 3)。DFMO 無添加で培養した時の割合は、G0 (53.4%)、G1 (35.1%)、G2 (11.5%)であるのに対し、DFMO 添加により細胞内ポリアミン量を減少させると G0 の割合が 49.2%に減少し、G2 の割合が 15.3%に増加した。更にスペルミジンを添加すると DFMO 存在下にも関わらず、G0 (57.1%)、G1 (32.5%)、G2 (10.4%)に回復した。この結果は、nano LC-MS/MS による解析でも再現できた (データ示さず)。以上の結果より、ポリアミンは N-結合型糖鎖のガラクトシル化に影響を及ぼすことが明らかとなった。

### (3) オリゴ糖転移酵素の発現に対するポリアミンの効果

グルコース飢餓は IgG の産生量を減少させること、および糖鎖の生合成に必要な糖ヌクレオチドの割合を変化させることが報告されている (Fan *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, **112**, 2172-2184)。糖ヌクレオチドの割合は DFMO の有無で培養しても変化しなかったため (データ示さず)、DFMO 処理による抗体分泌量の減少は糖転移酵素の発現変化に関与するのではないかと考え、オリゴ糖転移酵素 (Oligosaccharyltransferase: OST)に着目した。OST は小胞体に存在する膜タンパク質複合体であり (図 4A)、ドリコール結合型オリゴ糖の 14 糖 ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ )をリボソームから生合成されたタンパク質の Asn 残基 (Asn-X-Ser/Thr)に転移する。

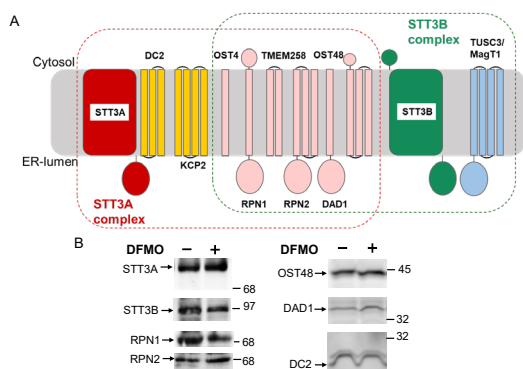


図 4. オリゴ糖転移酵素の発現に対するポリアミンの効果

A. オリゴ糖転移酵素の構造. B.オリゴ糖転移酵素サブユニットの発現に対するポリアミンの効果.

DFMO の有無で培養した細胞を回収し、オリゴ糖転移酵素の発現量を各サブユニットの抗体を用いてウェスタンブロット法で調べた (図 4B)。今回、STT3A、STT3B、RPN1、RPN2、OST48、DAD1、DC2 の発現量を調べたが、細胞内ポリアミン量減少下においてもほとんど変化しなかった。以上の結果より、ポリアミンはオリゴ糖転移酵素の発現には関与しないことが示唆された。

### (4) $\beta$ 4-ガラクトース転移酵素の発現に対するポリアミンの効果

ポリアミン減少に伴い、ガラクトース付加糖鎖の割合が増加したことから、N-結合型糖鎖の  $\beta$ 4-ガラクトース転移酵素 (B4Gal-T)に着目した。CHO 細胞では B4Gal-T1-4 が発現しているが、そのうち B4Gal-T1 が N-結合型糖鎖のガラクトース転移に重要であることが報告されている (Yang *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2015, **33**, 842-844) (図 5A)。そこで、B4Gal-T1 の発現に対するポリアミンの効果を用いてウェスタンブロット法で調べた。その結果、DFMO 添加による細胞内ポリアミン量の減少に伴い、B4Gal-T1 の発現量が増加した (図 5B)。ポリアミンによる B4Gal-T1 の発現量の増加は転写レベルであることも定量 PCR により確認した (図 5C)。以上の結果より、細胞内ポリアミン減少は B4Gal-T1 の発現を誘導することが明らかとなった。

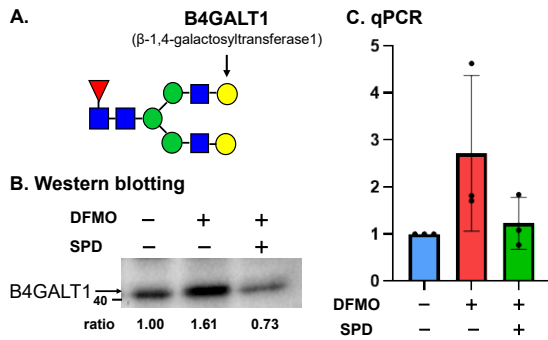


図 5. B4Gal-T1 の発現に対するポリアミンの効果

A. N-結合型糖鎖におけるガラクトース結合部位. B. B4Gal-T1 タンパク質の発現量に対するポリアミンの効果. C. B4Gal-T1 mRNA の発現量に対するポリアミンの効果.

#### (5) 小胞体シャペロンの発現に対するポリアミンの効果

細胞内ポリアミン量を減少させると、小胞体ストレス応答である PERK-eiF2 $\alpha$  経路が活性化することが報告されている (Landau *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 35825-35837)。免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP)は小胞体ストレス受容体 PERK や IRE1 $\alpha$  に結合して存在し、変性タンパク質を検知すると受容体から解離して変性タンパク質に結合することでストレス応答する。そこで、小胞体ストレスセンサーである BiP に着目し、CHO DP-12 に DFMO 処理した時に BiP の発現が変動するかどうかをウェスタンブロット法で調べた (図 6)。その結果、DFMO 処理により BiP の発現が増加した。次にレクチン型分子シャペロンのカルネキシン (Calnexin: CNX)とカルレティキュリン (Calreticulin: CRL)の発現量をウェスタンブロット法で調べた。その結果、カルネキシンの発現量が DFMO 処理による細胞内ポリアミン量減少により増加した。以上の結果より、細胞内ポリアミン量の減少は小胞体ストレスを引き起こすことが明らかとなった。

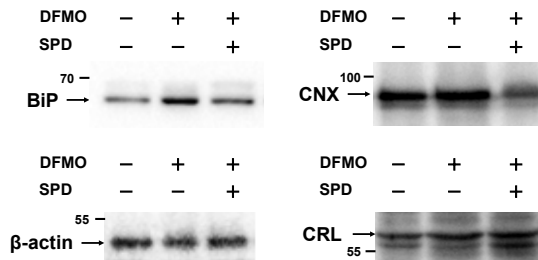


図 6. 小胞体シャペロン分子の発現に対するポリアミンの効果

本研究により、細胞内ポリアミン量の減少は、抗体の産生量低下、ADCC 活性に関与する糖鎖のガラクトシル化を亢進することが明らかとなった。最近、グルコース飢餓は抗体産生量の減少やガラクトシル化の亢進を引き起こすこと (Fan *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, **112**, 2172-2184)、および小胞体ストレス (ATF6 や BiP の発現誘導)を引き起こすこと (Nadanaka *et al.*, *Cell Struct. Funct.*, 2006, **31**, 127-134)が報告されている。グルコース飢餓による抗体産生や糖鎖構造への影響は細胞内ポリアミン量を減少させたときの結果と類似することから、ポリアミンは小胞体におけるドリコール型オリゴ糖の合成そのものに影響している可能性が考えられた。現在、ドリコール型オリゴ糖の合成を阻害するツニカマイシン処理やグルコース飢餓で B4Gal-T1 の発現や影響を及ぼすかどうかを調べているところである。今後はドリコール型オリゴ糖の合成に関与する糖転移酵素の中にポリアミンモジュロンが存在する可能性が高いと考え、探索する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Higashi Kyohei	4. 巻 32
2. 論文標題 Expression of Glycosaminoglycan-Related Genes and the Role of Polyamines in the Glycosaminoglycan Biosynthetic Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E167 ~ E175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1979.7E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashi Kyohei	4. 巻 32
2. 論文標題 グリコサミノグリカン構造に関連する遺伝子の発現制御機構と生合成過程におけるポリアミンの役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 J143 ~ J151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1979.7J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Katsutoshi, Asakura Kiryu, Imamura Masataka, Kawai Gota, Sakamoto Taiichi, Furihata Tomomi, Linhardt Robert J., Igarashi Kazuei, Toida Toshihiko, Higashi Kyohei	4. 巻 475
2. 論文標題 Polyamines stimulate the CHSY1 synthesis through the unfolding of the RNA G-quadruplex at the 5'-untranslated region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3797 ~ 3812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20180672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真中瞳、本田達也、浅見詩生、五十嵐一衛、戸井田敏彦、東恭平
2. 発表標題 抗IL-8抗体の糖鎖構造に対する細胞増殖促進因子ポリアミンの影響
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真中 瞳、本田 達也、浅見 詩生、五十嵐 一衛、戸井田 敏彦、東 恭平
2. 発表標題 抗IL-8抗体の糖鎖構造に対する細胞増殖促進因子ポリアミンの影響
3. 学会等名 日本ポリアミン学会 第11回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 悠佑、東 恭平、戸井田 敏彦
2. 発表標題 メチレンブルーを用いたグリコサミノグリカンの半定量法の開発
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅見 詩生、東 恭平、工藤 遥香、五十嵐 一衛、戸井田 敏彦
2. 発表標題 ポリアミンによるEXT1のタンパク質合成促進機構の解明
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅見 詩生、東 恭平、工藤 遥香、今村 正隆、西村 和洋、五十嵐 一衛、戸井田 敏彦
2. 発表標題 ポリアミンによるEXT1のタンパク質合成促進機構の解明
3. 学会等名 東京慈恵会医科大学 学外共同研究助成 ポリアミンと核酸の共進化 第17回 合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木雅斗、浅見詩生、工藤遥、今村正隆、河合剛太、五十嵐一衛、戸井田敏彦、東恭平
2. 発表標題 ポリアミンによるヘパラン硫酸伸長酵素EXT1の発現調節機構
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅見詩生、東恭平、工藤遥香、今村正隆、河合剛太、五十嵐一衛、戸井田敏彦
2. 発表標題 ポリアミンによるEXT1のタンパク質合成促進機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.tus.ac.jp/academics/teacher/p/inde3.php?7015#pills-t3-tab4">https://www.tus.ac.jp/academics/teacher/p/inde3.php?7015#pills-t3-tab4</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	戸井田 敏彦  (TOIDA TOSHIHIKO)  (60163945)	千葉大学大学院・薬学研究院・教授    (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------