

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21780309

研究課題名 (和文) 金属トランスポーターを利用した動物細胞工学

研究課題名 (英文) Biological strategy for high quality and productivity of recombinant proteins in animal cells by the use of metal transporters

研究代表者

神戸 大朋 (KAMBE TAIHO)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：90303875

研究成果の概要 (和文)：高度に糖鎖修飾された組換え型タンパク質は動物細胞を用いて生産されるが、生産コストの抑制のため高い生産性を有する株の樹立が求められている。本研究では糖鎖付加効率の改善のため、糖鎖生成酵素の補因子である亜鉛・マンガンを提供するトランスポーターを同定することを試みた。その結果、カルシウム代謝に重要と目されていたトランスポーターが糖鎖生成に関与することを示唆する結果が得られ、動物細胞工学の新たな可能性を提示することができた。

研究成果の概要 (英文)：Mammalian cells are used for producing recombinant proteins whose post-translational modifications are important for their therapeutic efficacy. The manufacture of recombinant proteins is complicated by the need for both high levels of expression and appropriate processing of the nascent polypeptide, especially in glycoproteins, because the capacity of glycosylation in the secretory pathway is limited in the cells. In this study, we tried to improve the strategy for producing recombinant glycoproteins by identify metal transporters that supply metal such as zinc and manganese to glycosyltransferases in the secretory pathway because these metals are functional as cofactors of the enzymes. We found a homologue of Pmr1 that is a functional as calcium channel in yeast is important for manganese transport and likely functional in glycosylation reaction in the secretory pathway, which may lead to the improvement of the secretion capacities of recombinant cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：細胞工学、物質生産

1. 研究開始当初の背景

組換え型タンパク質医薬品は、重篤な疾患に著効を示す特効薬として汎用される。糖鎖

を含む複雑な高次構造を持つ組換え型タンパク質は、動物細胞を用いて生産されるが、その糖鎖構造に重要な生理活性を保持して

いるため、元来の形状に類似した糖鎖構造を付加させることは、非常に重要である。組換え型タンパク質を生産するには、1日に10 μ g/10⁶個以上の生産率を持つ株の樹立が必要とされているが、このような高生産株では、糖鎖構造の不均一化を生じ、結果的に生産性が低下してしまうという大きな問題を抱える。現在、この問題の解決に向けて活発な研究が行われており、これまでに、糖転移酵素やその基質となる糖ヌクレオチドの輸送体を過剰発現させることなどで、生産性の向上が見られることが示されているが、まだ抜本的な解決に至った状況ではなかった。

2. 研究の目的

上記問題を解決するために、本研究では糖鎖生合成酵素の活性を強化する手法の確立を試みた。組換え型タンパク質への糖鎖付加は、小胞体・ゴルジ体といった分泌経路内で行われる。多くの糖鎖合成酵素は、亜鉛やマンガンを活性補因子として要求するため、分泌経路内に亜鉛・マンガン絶えず供給することは、糖鎖生合成の活性を維持する上で非常に重要である。先日、組換え型タンパク質生産細胞の培養液中にマンガンを追加することが、糖鎖の不均一性を減少させ、糖鎖生合成の効率を増大させるのに有効であることが示され、この結果は、亜鉛やマンガンを糖鎖生合成の場である分泌経路内に効率良く送り込む手法を確立することが、質の高い組換え型タンパク質生産に直結することを暗示している。本研究は、糖鎖合成酵素の活性化に必要な分泌経路局在性の亜鉛・マンガントランスポーターを同定し、組換え型タンパク質の生産性の向上に役立てることを目的に実施した。

3. 研究の方法

(1) 高等生物細胞株で高い相同組換え効率を持つ唯一の細胞株であるニワトリ DT40 株を用いて、分泌経路に局在する2価金属イオンの輸送に関わると思われるタンパク質の欠損株を順次作成していった。これらの中にはトランスポーターと予想される機能未知タンパク質の他に、亜鉛、銅、鉄、カルシウムのトランスポーター・チャネルも含み、網羅的な欠損株ライブラリーの作成を試みると同時に、出来る限り多重欠損株についても作成した。

(2) それぞれのトランスポーターの糖鎖生合成に及ぼす影響について解析するため、各欠損株の細胞抽出液をWGA、ConA（主にN結合型糖鎖）、ABA（O結合型糖鎖）を用いたレクチンプロット解析にて検討し、糖鎖生合成量が低下したために、レクチンプロットによ

り検出される分子量のサイズが減少する株の同定を試みた。

(3) 分子量の半分を糖鎖が占めるエリスロポエチン（EPO）をマーカータンパク質としてPmr1欠損株、他の欠損株に発現させ、実際に糖鎖構造に変化が認められるかどうか

（糖鎖が不完全になるために、EPOの分子量が小さくなるかどうか）について検討を行った。なお、導入したEPOの発現量についてはELISAにて定量し、EPOの産生量がほぼ等しい株を選択した。上細胞外に分泌されたEPOは、免疫沈降にて回収し、ウェスタンブロット法にて糖鎖構造の違いを検討した。

4. 研究成果

(1) 作成した欠損株のマンガン耐性を指標にして、それぞれのトランスポーターの亜鉛・マンガン代謝における役割を検討した。その結果、亜鉛に対する感受性を大きく変化する株を見出すことはできなかったが、出芽酵母においてマンガン耐性に関与することが知られるPmr1のホモログ欠損株でマンガンに対する感受性が有意に高まることを示す結果を得た（図1）。免疫染色により、本タンパク質の細胞内局在を解析したところ、本タンパク質はゴルジ体に局在しており、分泌経路内へマンガンを輸送するタンパク質

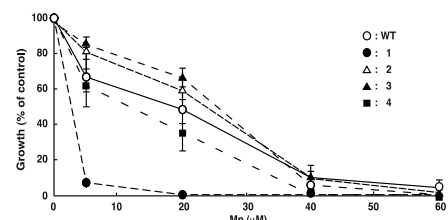


図1. 樹立したDT40欠損株のマンガン感受性の変化についての解析。マンガンを添加していない培養液での生育を100%とし、その値の相対値で表記した。1がPmr1欠損株であり、低濃度のマンガン(5 μ M)の存在で、生育が大きく阻害される。

であることが示唆された。

(2) Pmr1ホモログ欠損株を含む複数の株の糖鎖構造の違いをレクチンプロットにて検討したが、レクチンによって認識される糖鎖に有意な差異を見出すことはできなかった（図2A）。そこで、各欠損株にEPO遺伝子を導入し、過剰発現させたタンパク質に付加される糖鎖の差異に関する解析を実施した。樹立した全ての株において培養液中へのEPOの分泌が認められたため、各株によって分泌されたEPOに付加された糖鎖の違いをウェスタンブロット法にて解析したが、この解析においても顕著な差異を示す株は見出せなかった（図2A）。マンガンに対する感受性が大きく増加したPmr1欠損株においても変化が認められなかったため、単独欠損株における解析では、糖鎖構造に大きな異常の認められる欠損株の同定することが難しいことが予想される

結果となった。

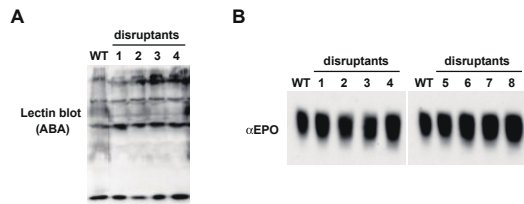


図2. 樹立したDT40 欠損株の糖鎖の解析。WT: 野生型DT40、数字: 樹立した欠損株
A. ABAを用いたレクチンプロット解析。
B. 欠損株から分泌されたEPOのウェスタンプロット解析。5がPmr1欠損株。

我々は、分泌経路には二つの亜鉛輸送経路が存在することを見出しており、この輸送経路が互いに強調して亜鉛酵素を活性化していることを認めている。今回の解析結果を受けて、現在、分泌経路内へのマンガンの輸送経路においても、亜鉛同様に複数の経路が存在している可能性が高いと考えており、Pmr1を中心にして、二重、三重欠損株を作成している。樹立できた株においては、順次、同様の解析を実施しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland M. L, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S and Kambe T, Tissue non-specific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway, *J. Biol. Chem.*, 286, 16363-16373, 2011、査読有
- ② Fukada T and Kambe T, Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis, *Metalomics*, in press、査読有
- ③ Kambe T, An Overview of a Wide Range of Functions of ZnT and Zip Zinc Transporters in the Secretory Pathway, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press、査読有
- ④ 神戸大朋、生体機能における亜鉛トランスポーターの重要性、-亜鉛トランスポーターをめぐる最近の知見-、*亜鉛栄養治療*、1, 54-64, 2011、査読無
- ⑤ 神戸大朋、分泌経路において機能する亜鉛トランスポーター、-亜鉛酵素の活性化との関わり-、*Biomedical Research on Trace Elements-日本微量元素学会誌*, 21, 25-31, 2010、査読有
- ⑥ 福中彩子、神戸大朋、「亜鉛トランスポ-

ターZnT と ZIP の亜鉛輸送機構」, *生化学*, 82, 30-34, 2010、査読無

- ⑦ Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, and Kambe T, Demonstration and characterization of the hetero-dimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway, *J. Biol. Chem.*, 284, 30798-30806, 2009、査読有
- ⑧ White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K, and Petris M. J, A roll for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity, *J. Biol. Chem.*, 284, 33949-33956, 2009、査読有
- ⑨ Ohana E, Hoch E, Keisar C, Kambe T, Yifrach O, Hershinkel M and Sekler I, Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter, *J. Biol. Chem.*, 284, 17677-17686, 2009、査読有
- ⑩ Matsuura W, Yamazaki T, Yamaguchi-Iwai Y, Masuda S, Nagao M, Andrews G. K and Kambe T, "SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: Characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1142-1148, 2009、査読有
- ⑪ White C, Kambe T, Fulcher Y. G, Sachdev S. W, Bush A. I, Fritsche K, Lee J, Quinn T. P, and Petris M. J, "Copper transport into the secretory pathway is regulated by oxygen in macrophages", *J. Cell. Sci.*, 122, 1315-1321, 2009、査読有
- ⑫ Kambe T and Andrews G. K, "Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations", *Mol Cell Biol.*, 29, 129-139, 2009、査読有
- ⑬ 神戸大朋、亜鉛トランスポーター研究から見た亜鉛バイオロジー、*Trace Nutrients Research-微量栄養素研究-*、26, 11-16, 2009、査読無
- ⑭ 神戸大朋、亜鉛の生理機能を司る亜鉛トランスポーター、*化学と生物*, 47, 545-552, 2009、査読無

[学会発表] (計 14 件)

- ① Taiho Kambe, Homeostatic Maintenance of Secretory Pathway Function by Zinc Transport complexes, The 1st PT-ERC

- (ISPM 2010), June 26, 2010, Cheongju, Korea
- ② Taiho Kambe, Roles of zinc transporters in the early secretory pathway, The 60th Fujihara Seminar: Zinc Signaling and Cellular Functions, Oct. 29, 2010, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - ③ Taiho Kambe, Regulation of mammalian SLC39A transporters-Zinc-regulated processing of mZIP4-, Japan/Korea Joint Symposium on Life Science, May 28, 2010, Seoul, Korea
 - ④ 神戸大朋, 生体機能における亜鉛トランスポーターの重要性-亜鉛トランスポーターをめぐる最近の知見-, 第2回 近畿亜鉛栄養治療研究会、平成23年2月5日 シノテスト大阪支店 (大阪府)
 - ⑤ Taiho Kambe, 消化管からの亜鉛吸収に機能する ZIP トランスポーターの制御機構、第21回日本微量元素学会学術集会、平成22年7月4日、京都大学百周年時計台記念館 (京都府)
 - ⑥ 神戸大朋, 分泌型亜鉛酵素のホロ酵素への変換と亜鉛トランスポーター、第10回日本蛋白質科学会シンポジウム、平成22年6月17日、札幌コンベンションセンター (北海道)
 - ⑦ 神戸大朋, 生体微量元素ホメオスタシスとその輸送システム、第82回日本生化学会大会シンポジウム、2009年10月23日、神戸
 - ⑧ Taiho Kambe and Glen K. Andrews, Regulation of mammalian SLC39A transporters-Zinc-regulated processing of mZIP4, International society for Zinc Biology 2009 meeting、2009年12月5日、イスラエル (エルサレム)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/seitaijoho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸 大朋 (KAMBE TAIHO)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：90303875

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし