

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06081

研究課題名(和文)糖転移酵素の基質認識のゆらぎを利用した高付加価値抗体生産細胞の構築

研究課題名(英文) Construction of high-value-added antibody-producing cells using substrate recognition fluctuation of glycosyltransferase

研究代表者

三崎 亮(Misaki, Ryo)

大阪大学・生物工学国際交流センター・准教授

研究者番号：20571186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：チャイニーズハムスター肺(CHL)細胞のフコシル化糖鎖合成経路を利用して、フコースの構造類似糖であるアラビノースを細胞内N型糖鎖に付加した。細胞を10 mMのアラビノース存在下で14日間培養し、抽出したタンパク質の糖鎖構造を解析したところ、全フコシル化糖鎖量の約4%の割合でアラビノース結合物型(アラビノシル化)糖鎖を得た。さらに、フコシル化糖鎖de novo合成経路を破壊した細胞で同様の実験を行ったところ、フコシル化を抑制しつつアラビノシル化糖鎖量を野生型の3倍以上増加することに成功した。これらの結果はCHL細胞が細胞外より添加したアラビノースをサルベージ経路を使って利用できることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、糖鎖合成に関わる酵素の基質特異性のゆらぎに着目し、細胞内で本来合成しない新規糖鎖を細胞外から安価な単糖を添加するだけで、しかも細胞内在性の糖鎖合成経路を利用して簡便に作出することに成功した。タンパク質の糖鎖構造はタンパク質自身の生物学的活性に影響を与える。本研究が示したように、簡便な新規糖鎖合成システムを確立できれば、より生物学的活性を高めた高付加価値タンパク質の生産が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Using the fucosylated glycan synthesis pathway of Chinese hamster lung (CHL) cells, arabinose, a structural analog of fucose, was added to intracellular N-linked glycans. The cells were cultured in the presence of 10 mM arabinose for 14 days. Analysis of the glycan structure of the extracted proteins resulted in synthesis of arabinosylated N-linked glycans at a ratio of about 4% of the total amount of fucosylated glycans. Furthermore, when the same experiment was performed in cells in which the fucosylation pathway de novo synthesis was disrupted, the amount of arabinosylated glycans was successfully increased more than 3-fold over the wild type with strong suppression of fucosylation. These results indicate that CHL cells can utilize arabinose added from outside the cell through the salvage pathway related to glycan fucosylation.

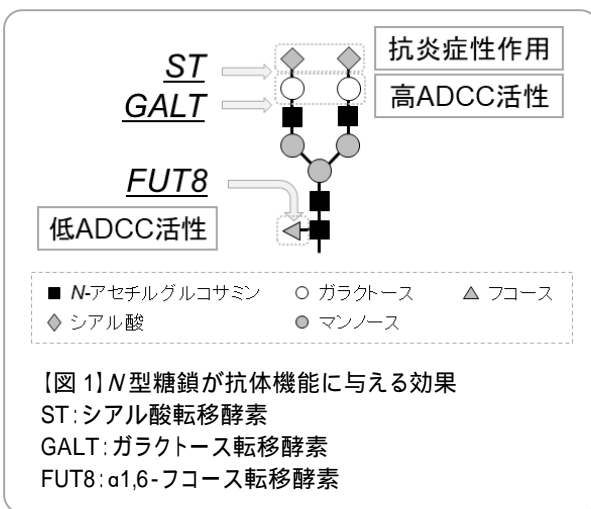
研究分野：糖鎖工学、生物工学、生化学

キーワード：糖鎖 フコース 構造類似糖 チャイニーズハムスター 抗体

## 1．研究開始当初の背景

バイオ医薬品産業の市場は巨大化の一途をたどり、中でも次世代バイオ医薬品の代表である抗体医薬品の市場成長とニーズ拡大は著しい。抗体あたりの品質が向上すれば一投与あたりの投与量が軽減でき、安価な供給が可能となる。抗体医薬品の広い普及のため、品質（機能）を高めた抗体を生産できる優れた抗体生産細胞の樹立が求められる。

抗体品質を左右する大きなファクターとして抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性と糖鎖に着目した。抗体重鎖に付加した *N* 型糖鎖の構造が ADCC 活性を変化させることは広く知られており（図 1） $\alpha$ 1,6-結合したフコース残基の除去、非還元末端のガラクトースの存在が ADCC 活性を高める。つまり、糖構造を改変することで抗体機能の向上が期待できる。これまでに、遺伝子工学的あるいは酵素学的手法を利用して、特定の糖残基の付加を抑制した抗体、あるいは特定の糖結合を増加した抗体の作出は試みられてきた。これに対し、本研究課題では既存の糖鎖がもつ糖残基を構造類似糖に置換し、合成した新規糖鎖を抗体に付与するシステムを構築したい。

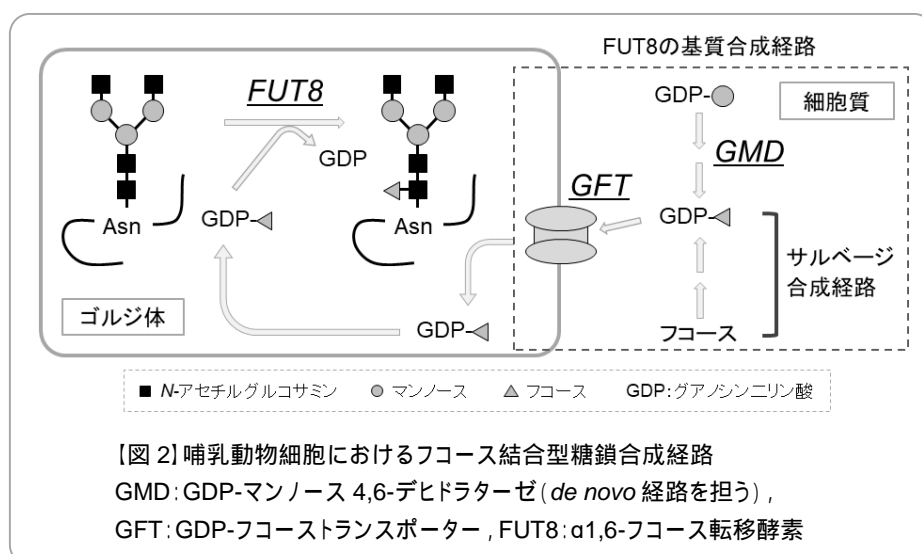


## 2．研究の目的

細胞がもつ内在性糖鎖合成経路を利用して抗体 *N* 型糖鎖の構成糖を構造類似糖に置換し、機能性の向上した抗体を生産するシステムを構築する。

## 3．研究の方法

本研究では、*N* 型糖鎖構造の構成糖のうち FUT8 により転移される  $\alpha$ 1,6-フコース残基（コアフコース）である。細胞内において、フコース結合型糖鎖は図 2 に示した経路で合成される。



ここで、FUT8 を活用してコアフコースの代わりに L-フコースと構造の類似した糖を転移した。

FUT8 の基質は GDP の結合した糖ヌクレオチドである。Hossler ら (2017) の報告より目的構造類似糖を培養液中に添加すれば、抗体生産チャイニーズハムスター由来の細胞においてサルベージ経路を使って類似糖-ヌクレオチドの合成が可能である。

#### (1)GMD ノックアウト細胞の構築

内在性 GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) の働きで GDP-フコースが合成され、FUT8 に対して類似糖-ヌクレオチドとの競合基質となってしまう、目的新規糖鎖の合成効率が大きく低下する恐れがある。したがって、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を利用して GMD をノックアウトした細胞を構築した。さらに、抗体生産を視野に入れ、構築したノックアウト株と野生株を無血清培地に馴化することで浮遊細胞とした。

#### (2)抗体生産細胞の構築

(1)で構築した浮遊細胞にヒト IgG 抗体発現用ベクターを導入し、抗体生産細胞を構築した。

#### (3)L-フコース構造類似糖の添加と糖鎖構造解析

(2)で構築した各抗体生産細胞の培養液中に L-フコースの構造類似糖である D-アラビノースを終濃度が 10 mM となるように添加し、フラスコ内で 14 日間振とう培養した。培養後の細胞より全可溶性タンパク質を調製し、ヒドラジン分解法を利用して糖鎖をタンパク質より遊離、2-アミノピリジンで糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖 (PA 化糖鎖) の構造を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析器を用いて詳細に解析した。また、抗体生産細胞培養液をプロテイン G カラムに供し、細胞より分泌生産された抗体を精製した。精製抗体の糖鎖構造については、上述した細胞由来糖鎖構造の解析と同様の手法にて解析した。

#### (4)抗体性能の評価

精製抗体を Fc 受容体を固相したカラムに供し、HPLC にて抗体のカラムへの保持時間を測定することで当該受容体との結合強度を評価した。

### 4. 研究成果

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) およびチャイニーズハムスター肺 (CHL) 細胞を対象に、それぞれの GMD をノックアウトした (CHO- GMD、CHL- GMD の構築)。CHO- GMD 細胞の糖鎖構造を解析したところ、野生株と比較してフコース結合型 (フコシル化) 糖鎖量がまだ約 50%程度残存していることが分かった。この原因として、血清含有培地中に FUT8 の供与体基質である GDP-フコースが含まれていることがわかった (Data not shown)。そこで、CHO- GMD および CHL- GMD を無血清培地に馴化し各細胞を浮遊化させたところ、CHO- GMD では野生株と比較してフコシル化糖鎖量が 1%未満に減少し、CHL- GMD では質量分析器レベルで未検出であった。また、これらの浮遊細胞に抗体発現用ベクターを導入し、抗体生産細胞 CHO- GMD-IgG、CHL- GMD-IgG、CHO-IgG、CHL-IgG を構築した。CHO- GMD-IgG ならびに CHL- GMD-IgG から分泌生産された抗体の糖鎖からはフコシル化糖鎖は検出されなかった。

次に、構築した細胞株の培養液中に D-アラビノースを添加し、細胞内でフコース残基の代わりに N 型糖鎖に付加されるかどうかを確かめたところ、野生型 CHO 細胞および CHO- GMD ではアラビノース結合型 (アラビノシル化) 糖鎖を検出することができなかった。これは Hossler らの報告に反する結果となったが原因を特定するには至らなかった。一方で、野生型 CHL 細胞では

細胞から調製した全糖鎖量のうち 0.6%がアラビノシル化糖鎖であった。これはアラビノース非添加時のフコシル化糖鎖量が 20.4%、アラビノース存在下でのフコシル化糖鎖量が 14.7%であることを考慮するとアラビノシル化の効率が極めて低いことがわかった。検出できたアラビノシル化糖鎖は 2 種類「ガラクトース 2 残基、マンノース 3 残基、*N*-アセチルグルコサミン 4 残基、アラビノース 1 残基 (0.4%)」と「マンノース 2 残基、*N*-アセチルグルコサミン 3 残基、アラビノース 1 残基 (0.2%)」であった。これに対し、CHL- GMD では全糖鎖量のうち 2.6%がアラビノシル化糖鎖であった。この結果は、GMD ノックアウトにより *N*型糖鎖のアラビノシル化が促進された、つまり、細胞内 GDP-フコースの枯渇によってサルベージ経路で合成された GMD-アラビノースが FUT8 の供与体基質として利用しやすい環境が整ったことを示唆する。一方で、検出できたアラビノシル化糖鎖は 2 種類「マンノース 3 残基、*N*-アセチルグルコサミン 2 残基、アラビノース 1 残基 (0.5%)」と「マンノース 2 残基、*N*-アセチルグルコサミン 2 残基、アラビノース 1 残基 (2.1%)」であり、非還元末端にガラクトースやシアル酸をもつ複合型糖鎖ではなかった。

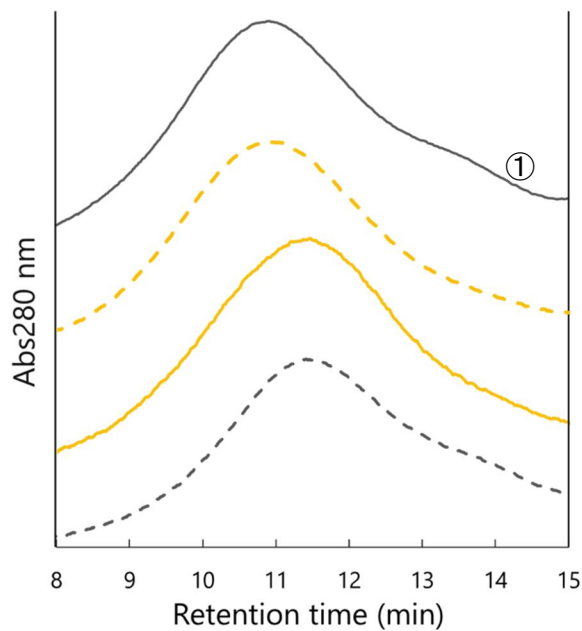
次に、アラビノース存在下で培養した CHL- GMD-IgG、CHL-IgG から分泌生産された IgG を精製し *N* 型糖鎖構造を解析したところ、予想に反してアラビノシル化糖鎖を検出することができなかった (表 1)。その最も大きな要因として、複数のマンノース残基からなる高マンノース型糖鎖 (M5GN2 ~ M8GN2) の占める割合が非常に大きい (全糖鎖の 60%以上を占める) ことが考えられた。FUT8 は高マンノース型糖鎖を受容体基質とはしないためアラビノシル化の効率が顕著に低下したと思われる。

表 1 各抗体に結合していた糖鎖分布 (表記: %、- : 検出限界以下)

構造	野生株	野生株+ アラビノース	ΔGMD	ΔGMD+ アラビノース
M8GN2	11.7	13.1	10.1	10.9
M7GN2	20.6	23.0	20.0	21.2
M6GN2	21.3	21.7	20.7	21.4
M5GN2	11.5	9.6	14.4	14.4
M4GN2	6.5	5.6	7.9	7.9
M3GN2	3.5	3.0	4.9	4.7
GNM3GN2	2.7	2.7	3.7	3.4
GN2M3GN2	5.9	5.9	7.8	6.6
GN2M3FGN2	5.5	5.5	-	-
GalGNM3GN2	-	-	3.4	3.1
GalGN2M3GN2	5.2	4.3	7.1	6.4
GalGN2M3FGN2	5.8	5.7	-	-

GN : *N*-アセチルグルコサミン、M : マンノース、Gal : ガラクトース、F : フコース

ところが、一般的に CHO 細胞で分泌生産した抗体の糖鎖に高マンノース型糖鎖が占める割合は低く、糖鎖のほとんどが複合型糖鎖である。CHL で生産した抗体あるいは分泌タンパク質に優先的に高マンノース型糖鎖が付加するとは考えにくく、抗体の過剰生産による小胞体ストレスが起きているのかもしれない。また、アラビノース存在下で生産した抗体の Fc 受容体との結合力を HPLC で評価したが、アラビノースの添加の有無で抗体糖鎖構造に大きな変化が現れなかったため、抗体の保持時間に顕著な違いは認められなかった (図 3)。



【図 3】アラビノース存在下、非存在下で分泌生産した抗体の Fc 受容体との結合力

- ①CHL-IgG (アラビノース無添加) 由来  
 CHL- GMD-IgG (アラビノース添加) 由来  
 CHL- GMD-IgG (アラビノース無添加) 由来  
 CHL-IgG (アラビノース添加) 由来

今回、L-フコース構造類似糖 (D-アラビノース) を細胞外から加えることで、細胞のフコシル化糖鎖合成経路を利用して内在性タンパク質にアラビノースを転移させることに成功した。しかしながら、その転移効率は期待値よりも低く、当初の目標に設定した抗体へのフコース構造類似糖転移を達成できなかった。今後、まずは抗体生産細胞を再構築し、高マンノース型ではなく複合型糖鎖を豊富に持つ抗体生産系を構築することに注力する必要がある。アラビノースとは異なる構造類似糖 (L-ガラクトースなど) では転移効率が異なるかどうかについても調査する。また、アラビノシル化糖鎖量を増強するため、細胞にアラビノースから GDP-アラビノースを合成できる酵素を発現するなどフコシル化糖鎖合成経路のサルベージ経路を補強・活性化するアプローチが必要になると考えている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 三石秋澄、三崎亮、武智大樹、梶浦裕之、藤山和仁
2．発表標題 CHL細胞を用いたフコース構造類似糖の添加による新規糖鎖合成系の開発
3．学会等名 日本生物工学会2023年度大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 三崎 亮
2．発表標題 糖鎖工学的手法による高付加価値バイオ医薬品生産系の開発
3．学会等名 日本動物細胞工学会（招待講演）
4．発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------