

# spERt<sup>TM</sup>技術による翻訳装置の高機能化とその応用

後藤希代子

## はじめに

spERt<sup>TM</sup>技術は、バイオ医薬品生産に使用される動物細胞などの培養において、小胞体の翻訳装置の高機能化により1細胞あたりの生産性を高める新規技術である。Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞などの動物細胞を用いて外来性の組換えタンパク質を発現、分泌させる際に遭遇する問題の一つとして、目的遺伝子の転写産物量の増加とそのタンパク質発現量が必ずしも相関しないという問題がある。しかし、小胞体膜上の翻訳過程やその分子機構に関する理解が不十分であり、この問題解決は困難であった。筆者らは線維芽細胞がコラーゲンを分泌する際に重要な役割を担う小胞体膜タンパク質p180を見だし、そのユニークな分泌活性化機構を明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。この分泌活性化機構を応用して小胞体を高機能化できれば、mRNAの翻訳効率を改善して分泌を大幅に増強させようと予想し、さまざまな検討を行った。その結果、p180と協同的に働き、かつmRNAの選択性に関わる因子としてSF3b4を新たに同定し、spERt<sup>TM</sup> (Selective Polyribosome assembly on the ER with Three factors) 技術を開発した<sup>3)</sup>。

本稿では分泌タンパク質の合成の場である小胞体上での翻訳の特徴とspERt<sup>TM</sup>技術の各要素について概説し、本技術導入により期待される効果、さらに、バイオ医薬品製造への応用に向けて抗体産生細胞へ適用した取組みのうち、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合での成果例について紹介する。

## 小胞体上での翻訳の特徴

分泌タンパク質は小胞体膜上で翻訳されると、ただちに小胞体内腔へと輸送され、シャペロンなどによる品質管理、翻訳後修飾などが施される。小胞体膜の通過は分泌経路へ入る最初の重要な関門であり、この過程はトランスロコンと呼ばれるタンパク質膜透過装置を介して行われる。すなわち、小胞体膜上で効率良く分泌タンパク質を合成するためには、翻訳装置の本体であるリボソームとトランスロコンが同調して機能し、さらには内腔側のシャペロンなども協働可能なことが求められる。また、目的のmRNAのみならず、翻訳因子、アミノアシルtRNAなどが小胞体へ十分に供給されることも必要である。小胞体へのmRNA輸送に関してはシグナル認識

粒子 (SRP) とSRP受容体による古典的経路として、いわゆるシグナル仮説が解明されている。しかし最近ではこのシグナル仮説以外の経路、すなわちSRP非依存的、翻訳非依存的な小胞体へのmRNA輸送も多数報告されている<sup>4-6)</sup>。またシグナル仮説では説明できない事象として、小胞体上のリボソームが膜タンパク質、分泌タンパク質のみならず細胞質タンパク質も効率良く合成し、小胞体がタンパク質合成のための高效率プラットフォームを担うという機能を提唱する興味深い知見も蓄積されている<sup>6-8)</sup>。このように小胞体での翻訳過程には未解決な問題が多く残されており、近年、主流となっている動物細胞によるバイオ医薬品製造における生産性向上のためには、これらの分子機構の詳細を明らかにし科学的根拠に基づいた問題解決を図ることが有効であろうと思われる。

## spERt<sup>TM</sup>技術の原理

spERt<sup>TM</sup>技術は、小胞体上の翻訳装置の活性化を担うタンパク質p180とその補助因子SF3b4を利用して、小胞体上のポリリボソーム形成を促進させ、分泌タンパク質の生合成能を高めている (図1)。まず、これら因子の

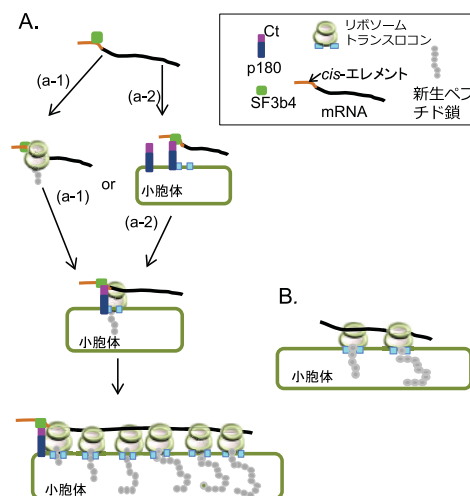


図1. spERt<sup>TM</sup>技術によるポリリボソーム形成の促進機構のモデル。(A) 小胞体におけるp180依存的なポリリボソーム形成による高效率生合成のモデル図、(a-1) SRP 依存的および (a-2) SRP 非依存的な経路の例を示した。(B) p180-非存在下で、ポリリボソームの発達程度が弱い場合の例を示した (文献3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press) より改変)。

特性と本技術導入により期待される効果, *cis*-エレメントの併用による効果について以下に述べる.

### 高効率コラーゲン生合成に必須な因子p180

ヒト細胞のp180は, 全長1540アミノ酸からなり<sup>9)</sup>, さまざまな機能ドメインを含み, その大部分を細胞質側に突出させた配置をとる小胞体膜タンパク質である. 図2にこれまで報告されたp180の機能ドメインについて図示した. N末端領域は強塩基性を呈し, 10アミノ酸モチーフが54回連続したリピートが存在する<sup>9,10)</sup>. このリピート領域を介してp180はリボソームと結合すると考えられる<sup>11)</sup>. 一方で, p180はリボソーム非依存的にSec61, TRAPなどのトランスロコン関連分子とも相互作用し, これは先に述べたリボソームとトランスロコンの同調を制御し効率的翻訳に寄与しうる特性と考えられる<sup>1)</sup>.

C末端領域は酸性性を呈しコイルドコイル構造をとる<sup>9)</sup>. *In vitro* 試験でのキネシンモーターとの結合性<sup>12)</sup>, PDZドメインへの結合に必要なコンセンサス配列の存在<sup>13)</sup>などが報告されている. 最近, このコンセンサス配列が特異的に結合する相手としてミトコンドリア外膜タンパク質が同定された<sup>14)</sup>. この報告はミトコンドリアと小胞体の機能的連携にp180が関与する可能性を示す知見として興味深い.

筆者らは線維芽細胞におけるコラーゲンの分泌活性化機構に関する研究において, コラーゲンの生合成・分泌経路で重要な役割を担う分子としてp180に着目して研究を進めてきた. 分子中央のリピートからコイルドコイルを含む領域 (MTB-1) は微小管束形成能を示し, p180が小胞体と微小管を直接結合させるリンカーとして機能すること<sup>15)</sup>, トランスゴルジネットワークの発達にも寄与する<sup>16)</sup>など, この分子が細胞骨格との相互作用を介して分泌経路全体へ影響する可能性を示した. 特に, 高効率なコラーゲンの翻訳促進にはポリリボソーム形成の亢進が必須である点に筆者らは注目した. この現

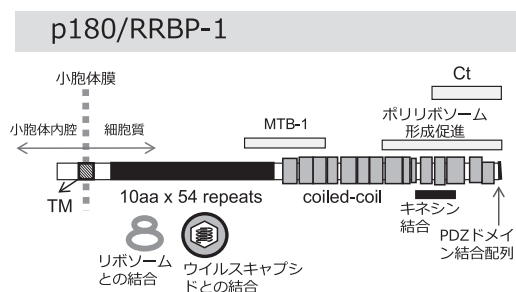


図2. p180分子のドメイン構造とこれまで報告された各ドメインの機能 (出典は本文を参照). TM: 膜貫通ドメイン, MTB-1: 微小管結合ドメイン.

象はp180依存的であり, C末端領域 (Ct) に責任領域があることを報告した<sup>1)</sup>.

### SF3b4の小胞体における新規機能

上記のポリリボソーム形成促進能は, 対象となるmRNAに関して選択性が認められたが, その機構は不明であった. 筆者らはこの選択性を未知の可溶性因子が担うと仮定して, Ctとの結合能を指標にこの因子を検索し, SF3b4を見いだした<sup>3)</sup>. SF3b4はSF3bというスプライシング因子の構成成分であり, その分子内に二つのRNA認識モチーフ (RRM) を持つことからmRNAの選択性を規定しうる分子である. SF3b4は通常は核内に存在してスプライシングに従事しているが, コラーゲンを活発に分泌している線維芽細胞の小胞体では非常に重いポリリボソーム画分にコラーゲンmRNAと共局在し, p180と特異的に相互作用することが確認された<sup>3)</sup>.

### CHO細胞での実施可能性検証

以上に概説した通り, spERt<sup>TM</sup>技術はコラーゲン分泌に特化した線維芽細胞の分泌機構を手本として, p180とSF3b4の2種の因子 (以下, 2因子) によりその基本効果が発揮される新規技術である (図1). 本技術の応用を目指し, バイオ医薬品製造における宿主細胞として重要なCHO細胞を対象に実施可能性を検討した. その過程において, さらに, 分泌を増強できる*cis*-エレメントを新規に同定した<sup>3)</sup>. CHO細胞における2因子の導入と*cis*-エレメントの分泌活性への効果を併せて検証した例を図3に示す. 2因子を単独, または共発現させた細胞株を用いて分泌マーカー (AP) の活性を比較すると, 期待通り共発現株でもっとも分泌活性が高く対照細胞の約3倍へ増加した. さらに, *cis*-エレメントを併用すると約9倍に上昇するという顕しい効果を確認した. 加えて, 2因子導入株では, (i) 小胞体へのmRNA輸送が亢進する, (ii) ポリリボソーム解析により, *cis*-エレメントを挿入したりポーターmRNAは, さらに重い分画へ

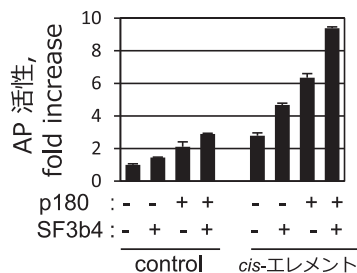


図3. CHO細胞における2因子導入と*cis*-エレメントの分泌活性への効果 (文献3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press) より改変).

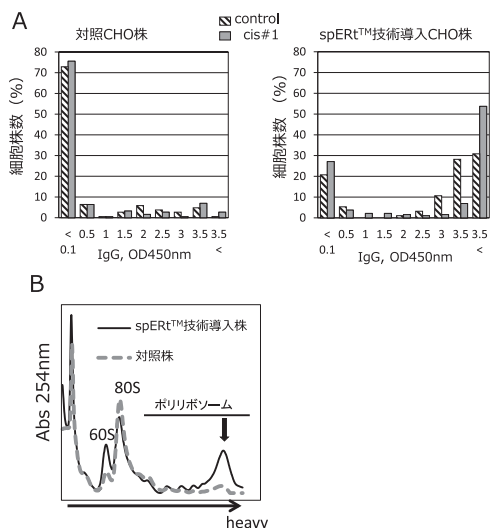


図4. spERt™技術導入CHO細胞を用いた抗体産生細胞株の構築。(A) spERt™技術導入CHO細胞と対照CHO細胞より樹立した抗体産生株の力価の分布を比較した。(B) 力価が最大値を示した細胞株の小胞体ポリリボソーム解析結果。

とシフトすることが示されており *cis*-エレメントによる更なる分泌促進の機序としては翻訳開始過程の活性化が予想されている<sup>3)</sup>。

### 抗体生産CHO細胞への応用

次に、CHO細胞を用いた抗体産生における本技術の効果を評価した。既存の抗体産生細胞へ2因子を導入したCHO細胞株は、生産性の指標である比生産速度が対照株に比べて約3.8倍に増加した。また、本技術を導入したCHO細胞株を宿主として、抗体発現ベクターを導入して、約200株のクローンを取得しその力価の分布を対照株と比較したところ、spERt™技術により高力価株を高頻度で取得できることが示された(図4A)。さらに、2因子と *cis*-エレメントの併用により、これらの増強効果をさらに高める結果も得られた(図4A)。これら2因子導入細胞株では小胞体のポリリボソーム量が増加し(図4B)、期待通り小胞体の翻訳装置の活性化が誘導され、抗体生産量の増大に寄与していると推察された。

さらに、抗体医薬製造に必要なg/L以上の高生産性CHO細胞株での実施可能性を検証するため、MAB組合において第一三共(株)が開発したモデル細胞株へspERt™技術を導入し、比較検討した。Fed-Batch培養において技術導入前と比べて生産性が顕著に向上し、さらに、(株)アイエスジャパンによる培地開発および培養条件の検討の結果、更なる生産性向上が達成された。

### まとめ

以上のように、線維芽細胞の分泌機構を手本として、

小胞体膜上のタンパク質翻訳装置を高効率型に改変できるspERt™技術を開発した。g/L以上の高生産性CHO細胞においてもspERt™技術導入の効果が検証され、小胞体の翻訳装置活性化という手法によりmRNAの利用効率を相加・相乗的に増強させ、高発現生産株の構築に利用可能であることが確認された。バイオ医薬品製造に資する高生産細胞株の構築技術として翻訳過程に焦点を当てた例はほとんどなく、高生産を誘導する既存の各種技術との併用も可能なため、今後更なる応用が期待できる。抗体製造のみならず、その他の生産困難なタンパク質への応用など、さまざまな開発を進める予定である。

### 謝辞

本研究開発は株式会社ニッピバイオマトリックス研究所spERt™チームメンバーによる努力の結果としてなされました。本研究開発の実施にあたり多大なご協力、ご助言を頂いた株式会社ニッピバイオマトリックス研究所の皆様、第一三共株式会社様、株式会社アイエスジャパン様をはじめとした関係各方面のすべての皆様に心より御礼申し上げます。

本研究の一部は、日本科学技術振興機構(JST)の「再生医療実現化ネットワークプログラム事業」、経済産業省の「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業(国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号(JP17ac0101003)の支援によって行われた。

### 文献

- 1) Ueno, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3006 (2012).
- 2) Ueno, T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **285**, 29941 (2010).
- 3) Ueno, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, DOI: 10.1073/pnas.1901742116.
- 4) Hermesh, O. and Jansen, R. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2519 (2013).
- 5) Kraut-Cohen, J. and Gerst, J. E.: *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 459 (2010).
- 6) Jagannathan, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **289**, 25907 (2014).
- 7) Jagannathan, S. *et al.*: *RNA*, **20**, 1489 (2014).
- 8) Reid, D. W. and Nicchitta, C. V.: *J. Biol. Chem.*, **287**, 5518 (2012).
- 9) Langley, R. *et al.*: *DNA Cell Biol.*, **17**, 449 (1998).
- 10) Ogawa-Goto, K. *et al.*: *J. Virol.*, **76**, 2350 (2002).
- 11) Wanker, E. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **130**, 29 (1995).
- 12) Diefenbach, R. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 987 (2004).
- 13) Kim, M. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 1151 (2002).
- 14) Hung, V. *et al.*: *Elife*, DOI 10.7554/eLife.24463.
- 15) Ogawa-Goto, K. *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3741 (2007).
- 16) Ueno, T. *et al.*: *Exp. Cell Res.*, **316**, 329 (2010).