



Title	Difficult-to-express shark IgNAR antibody produced in CHO cells: production bottleneck identification and a trial for productivity enhancement
Author(s)	呂, 小芳
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101622
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (LYU XIAOFANG)	
Title	Difficult-to-express shark IgNAR antibody produced in CHO cells: production bottleneck identification and a trial for productivity enhancement (CHO細胞を用いた難発現サメIgNAR抗体生産：ボトルネックの解明と生産性改善の試み)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Chapter 1 Introduction: Antibodies are a complex, large protective proteins produced by immune system to fight against invading antigens. Antibodies are widely applied in various field, especially IgG antibody, due to their specificity and affinity to antigens. However, conventional antibodies face challenges which limiting their applications. First, they easily denature under non-physical conditions. Besides, the large antigen binding sites of conventional antibodies reduce their ability to access to recessed or cryptic epitopes. Furthermore, the poor tissue penetration limits the applications of conventional antibodies in treatment of brain diseases. Recently, the novel shark-derived antibody isotype, known as immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR), has potentials to overcome these limitations due to its high stability and small antigen binding site. Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most widely used expression system for antibody production. Recently, the recombinant monoclonal IgNAR, fused with a human IgG Fc region at the C-terminus (termed IgNAR-Fc), was successfully produced in CHO cells (named CHO IgNAR cell). However, the low productivity limits further studies and applications of IgNAR. Therefore, in this study, the production bottleneck of IgNAR-Fc was investigated, and a potential solution to improve its productivity was discussed.</p> <p>Chapter 2 Identification of the production bottleneck of IgNAR-Fc: A high-producing IgG producing CHO HcD6 cell line was used as comparison in investigation of IgNAR-Fc production bottleneck. The specific production rate of IgG was 24-times that of IgNAR-Fc. However, the low productivity of IgNAR-Fc was not due to its transcription level, as its mRNA level was comparable to that of IgG heavy chain, which is the lower-expressed chain between the two chains of IgG. The chase assay revealed the slower secretion and translation rate of IgNAR-Fc compared to IgG. However, a comparable amount of intracellular dimeric IgNAR-Fc to dimeric IgG suggested IgNAR-Fc could fold and assemble properly within cells and the accumulation of IgNAR-Fc could be one of the reasons for its slower translation rate. Subsequently, Immunofluorescence imaging indicated that most of intracellular IgNAR-Fc localized within the endoplasmic reticulum (ER). Further co-immunoprecipitation and co-localization analyses showed IgNAR-Fc was not retained by calnexin and ER mannosidase I, but strongly co-localized with ERGIC-53, a COPII vesicles cargo receptor. In conclusion, large amount of dimeric intracellular IgNAR-Fc remained in the ER and recruited by ERGIC-53, indicating the COPII-mediated ER-to-Golgi transport might be the bottleneck in IgNAR-Fc production in CHO cells.</p> <p>Chapter 3 Evaluating a potential solution for productivity improvement: <i>Sec12</i> catalyzes the initiation of COPII vesicle formation. Therefore, overexpression of <i>Sec12</i> is a potential approach to enhance the COPII-mediated ER-to-Golgi transport for improving IgNAR-Fc productivity. However, in the NCBI gene database, the <i>Sec12</i> gene hasn't been clearly annotated for Chinese hamster. Instead, the prolactin regulatory element binding (<i>Preb</i>) gene is considered to function as <i>Sec12</i> in Chinese hamster. In this chapter, stably <i>Preb</i> knockdown reduced IgG specific production rate. Multiple sequence alignment indicated that <i>Preb</i> of CHO cells shared high sequence similarity with <i>Preb/Sec12</i> of mouse, rat and human. These findings suggested <i>Preb</i> in CHO cells likely function as <i>Sec12</i>. Subsequently, <i>Preb</i> was overexpressed in CHO IgNAR cells, resulting in significantly higher productivity compared to mock cells. However, both mock and overexpression cell pools exhibited lower productivity than the original CHO IgNAR cells.</p> <p>Chapter 4 Conclusions and future perspectives: COPII-mediated ER-to-Golgi transport was identified as the production bottleneck for IgNAR-Fc in CHO cells. <i>Preb</i> was proved to likely function as <i>Sec12</i> in CHO cells. Overexpression of <i>Preb</i> in CHO IgNAR cells resulted in higher IgNAR-Fc productivities compared to mock cell pools. However, both <i>Preb</i> overexpression cell pools and mock cell pools had lower productivity than original CHO IgNAR cells which might be due to incidental factors. Further optimizations may be needed to reach higher productivity than the original CHO IgNAR cells.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (LYU XIAOFANG)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	大政 健史
	副査 教授	渡邊 肇
	副査 教授	藤山 和仁

論文審査の結果の要旨

第1章においては、サメ IgNAR 抗体の有用性と課題について述べられている。抗体は、免疫系によって産生される複雑なタンパク質であり、特に IgG 抗体は抗原に対する特異性と親和性が高く様々な場面で用いられている。しかし、従来の抗体は、非物理的な条件下では容易に変性し、抗原結合部位が大きいため、様々なエピトープにアクセスする能力が低い。最近、免疫グロブリン新抗原受容体 (IgNAR) として知られるサメ由来の新規抗体が、その高い安定性と小さな抗原結合部位により、これらの欠点を克服する可能性があり目されている。本グループでは、抗体産生に最も広く用いられている発現系であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いて、C 末端にヒト IgG Fc 領域を融合した IgNAR (IgNAR-Fc) 産生系を構築したが、その生産性は低く、IgNAR のさらなる研究や応用には限界があった。そこで本研究では、IgNAR-Fc 産生のボトルネックについて検討し、生産性を向上させるための解決策について検討している。

第2章においては、IgNAR-Fc の生産ボトルネックの同定を行っている。IgNAR-Fc の生産ボトルネックの検討には、IgG を高生産する CHO HcD6 細胞株を比較対照として用いている。本細胞株の IgG の比生産速度は IgNAR-Fc の 24 倍であるが、IgNAR-Fc の mRNA レベルは IgG 重鎖と同程度であり、これは、IgG の 2 つの鎖の中で発現量の低い鎖であることから、IgNAR-Fc の生産性の低さはその転写レベルによるものではないことが示されている。さらにチエイスアッセイにより、IgNAR-Fc の分泌および翻訳速度は IgG に比べて遅いことも明らかにしている。しかしながら、細胞内に二量体 IgG と同程度の二量体 IgNAR-Fc が存在することから、IgNAR-Fc は細胞内で適切にフォールディングおよびアセンブルできることが示唆され、IgNAR-Fc の蓄積は翻訳速度が遅いことが一つの理由と考えられている。免疫蛍光イメージングにより、細胞内 IgNAR-Fc のほとんどが小胞体内に局在していることが示され、さらに共免疫沈降と共局在解析から、IgNAR-Fc はカルネキシンや小胞体マンノシダーゼ I には保持されず、COPII 小胞のカーゴレセプターである ERGIC-53 と強く共局在化することが示されている。結論として、多量の細胞内二量体 IgNAR-Fc は ER に留まり、ERGIC-53 によってリクルートされると推定され、COPII を介した ER からゴルジ体への輸送が、CHO 細胞における IgNAR-Fc 産生のボトルネックになっている可能性を示している。

第3章においては、生産性向上のための解決策を検討している。Sec12 は COPII 小胞形成の開始を触媒する蛋白質であり、Sec12 の過剰発現は、COPII を介した小胞体からゴルジ体への輸送を促進し、IgNAR-Fc の生産性を向上させる可能性がある。しかしながら、NCBI 遺伝子データベースでは、チャイニーズハムスターの Sec12 遺伝子は明確にアノテーションされておらず、代わりにプロラクチン調節エレメント結合 (Preb) 遺伝子がチャイニーズハムスターの Sec12 として機能していると考えられている。そこで Preb を安定的にノックダウンすることで、IgG 特異的産生率を低下させている。また、アラインメント解析により、CHO 細胞の Preb はマウス、ラット、ヒトの Preb/Sec12 と高い配列類似性を有しており、CHO 細胞の Preb は Sec12 として機能している可能性が示されている。Preb を CHO IgNAR 細胞で過剰

発現させたところ、Mock 細胞に比較して生産性が著しく向上したが、Mock 細胞も Preb 過剰発現細胞プールも、元の CHO IgNAR 細胞より生産性が低い結果となっている。

第 4 章 では、結論と今後の展望が述べられている。本研究によって、COP II を介した小胞体からゴルジ体への輸送が IgNAR-Fc の産生ボトルネックとして同定され、Preb は CHO 細胞において Sec12 として機能する可能性が示され、CHO IgNAR 細胞で Preb を過剰発現させると、IgNAR-Fc の生産性が高くなっているが、Preb 過剰発現細胞プールと Mock 細胞プールの両方が、元の CHO IgNAR 細胞よりも生産性が低いことから、CHO IgNAR 細胞の生産性をより高めるためには、さらなる最適化が必要であると結論づけている。

以上のように、本論文は IgNAR 生産性のボトルネックを解明し、その生産性向上の糸口を明確に示しており、IgNAR 生産におけるボトルネック解明に貢献している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。