

Title	Investigation of ER retention machinery in CHO cells for understanding its biology and probable IgG production bottlenecks
Author(s)	Samy Abdelmalak Robair, Andrew
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87704
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (ABDELMALAK ROBAIR ANDREW SAMY)

Title

Investigation of ER retention machinery in CHO cells for understanding its biology and probable IgG production bottlenecks (CHO細胞におけるIgG生産の律速段階解明と生物学的解析を目指したERにおける保持機構に関する研究)

Abstract of Thesis

Chapter 1 Introduction: Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are used in the biopharmaceutical manufacturing as a host cell for the production of recombinant proteins, specifically IgG. It became clearer recently that the bottlenecks for CHO cells to achieve their best performance are not the transgene expression level but rather the folding and secretion machinery. The endoplasmic reticulum (ER) is the cell's factory where secretory and membrane proteins are folded to reach their active conformations. ER chaperones ensure the proper folding and assembly of multimeric proteins. Some of these chaperones localize in the ER owing to a C-terminal retention motif KDEL (Lysine, Aspartic acid, Glutamic acid and Leucine). The retention motif is recognized by the KDEL receptors that ensure their re-capturing from post ER compartments. This retention machinery has been proven to be saturable in plant and mammalian cells. The saturation is represented by the cell's inability to upregulate the KDEL receptors during stress conditions at the time when the chaperones are highly upregulated. In this study, saturation and engineering of the ER retention machinery is investigated in a pursuit of finding possible natural limitations that could be amended to help achieve better CHO cell performance.

Chapter 2 ER retention machinery response and engineering: The effect of ER stress induction on the expression levels of KDEL receptors and ER chaperones are elucidated. When ER stress was induced in CHO cells, the three KDEL receptors were upregulated to less than two folds. On the contrary, ER chaperones like Binding immunoglobulin Protein (BiP) and Glucose Regulated Protein-94 (GRP94) were upregulated with more than twelve folds. The effect of KDELR1 overexpression on IgG1 productivity was also investigated. KDELR1 was recombinantly overexpressed in IgG1 producing CHO cells and it had no effect on the cell growth, IgG1 titer or cell viability. The specific productivity of the cell showed slight but significant improvement. The exact reason behind this is still unclear, however it is considered to be due to an improvement in the intracellular traffic and/or signalling between the ER and Golgi.

Chapter 3 Secretion of ER chaperones to the medium: The secretion of ER chaperones to the medium was investigated during KDELR1 or PDI overexpression. PDI was recombinantly overexpressed in CHO-K1 cells and was significantly detected in cell lysates and concentrated medium. However, KDELR1 overexpression under CMV promoter did not prevent ER chaperones' secretion to the medium. A CHO cell model was constructed where the non-ER stress sensitive KDELR1 gene was expressed under an ER stress sensitive promoter (BiP promoter). BiP promoter was cloned from CHO-K1 cell genome after searching for the known ER stress elements to determine the proper length to be cloned. The expressed KDELR1 was responsive to ER stress; however, it only gave a slight improvement in chaperones' retention. ER chaperones were still secreted to the medium during stress conditions.

Chapter 4 ER stress induces GRP94 secretion as low molecular weight species: In the process of investigating ER chaperones' secretion under stress conditions, GRP94 was found to be truncated into a smaller molecular weight band of around 80-86 kDa in comparison with the full length GRP94 that is 94 kDa. It was hypothesized that this truncation happens at the C-terminal where the KDEL motif existed. Several techniques were used to analyse whether the C-terminal is intact. It is suggested that GRP94 is cleaved from its C-terminal and not the N-terminal. Brefeldin A (BFA) treatment of CHO cells showed that the secretion of ER chaperones to the medium occurs through the canonical ER to Golgi pathway. BFA caused the truncated GRP94 to accumulate inside the cell and was not secreted. All the results together suggest that upon ER stress, GRP94 is cleaved at its C-terminal inside the ER, this cleavage causes the loss of its retention motif which finally leads to its canonical secretion in abundance.

Chapter 5 Concluding remarks and future prospects: This study sheds light on ER retention machinery and the possibility of its saturation in CHO cells. ER chaperones secretion during stress conditions suggests the involvement of other mechanism of secretion other than the inability of CHO cells to upregulate KDEL receptors. The revealed low molecular weight species of GRP94 might be of importance as GRP94 is a trafficking molecule with antigen presentation properties.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (ABDELMALAK ROBAIR ANDREW SAMY)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	藤山 和仁
論文審査の結果の要旨			
<p>第1章 チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞は、組換えタンパク質、特に IgG を製造するための宿主細胞としてバイオ医薬品生産に利用されている。CHO 細胞が物質生産を効率よく行うためのボトルネックは、導入遺伝子の発現レベルではなく、折り畳みと分泌のメカニズムであることが近年明らかになってきている。小胞体は細胞におけるタンパク質合成の場であり、分泌タンパク質や膜タンパク質が折り畳まれて活性型の構造を形成する。小胞体シャペロンは、多量体タンパク質の適切なフォールディングとアセンブリを担っているが、これらのシャペロンの中には、C 末端に KDEL モチーフ (リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン) を持つため、小胞体に局在するものがある。この KDEL モチーフは KDEL 受容体によって認識され、小胞体後の細胞内コンパートメントからシャペロンを再回収する際に利用される。この保持機構において、植物や哺乳類の細胞でシャペロンが大量に発現するストレス条件下で、細胞が KDEL 受容体を十分な量発現できなくなることが知られている。そこで本研究では、小胞体における保持機構についての細胞工学的な研究を行い、CHO 細胞の生産性向上を検討した。</p> <p>第2章 小胞体ストレスの誘発が KDEL 受容体と小胞体シャペロンの発現レベルに及ぼす影響を解明した。CHO 細胞に小胞体ストレスを誘導すると、3つの KDEL 受容体は2倍以下にまで発現が上昇した。一方、Binding immunoglobulin Protein (BiP) や Glucose Regulated Protein-94 (GRP94) などの小胞体シャペロンは12倍以上に増加していた。KDEL 受容体の1つである KDELRI の過剰発現が IgG1 の生産性に及ぼす影響についても検討した。KDELRI を IgG1 生産 CHO 細胞において過剰発現させたところ、細胞増殖、IgG1 濃度、細胞の生存率に影響を及ぼさず、比生産速度は、わずかではあるが有意に上昇した。</p> <p>第3章 KDELRI または PDI の過剰発現時の小胞体シャペロンの培地への分泌量を検討した。PDI を CHO-K1 細胞で過剰発現させたところ、細胞抽出物や濃縮培地中に有意に分泌していた。しかし、CMV プロモーターで KDELRI を過剰発現させても、ER シャペロンの培地への分泌は止められなかった。そこで、通常は ER ストレスに応答しない KDELRI 遺伝子を、ER ストレスに応答するプロモーター (BiP プロモーター) を用いて発現させた CHO 細胞を構築した。発現した KDELRI は、小胞体ストレスに応答したが、シャペロンの保持力はわずかに改善されただけであった。</p> <p>第4章 ストレス条件下での小胞体シャペロンの分泌を検討する過程で、全長 94kDa の GRP94 が 80-86kDa 程度の小さな分子量に切断されていることがわかった。この切断検証した結果、GRP94 は C-末端から切断され、N-末端からは切断されないことが示唆された。CHO 細胞を Brefeldin A (BFA) で処理すると、小胞体シャペロンの培地への分泌は、小胞体からゴルジ体への通常の経路で行われ、切断された GRP94 は細胞内に蓄積され、分泌されなかった。これらの結果より、小胞体ストレスを受けると、GRP94 は小胞体内で C-末端が切断され、この切断によって保持モチーフが失われ、最終的には GRP94 が分泌されると示唆された。</p> <p>第5章 本研究は、CHO 細胞におけるボトルネック解消を目指して、細胞工学的な生産性改善とストレス条件下での小胞体シャペロンの分泌について研究をおこなった。</p> <p>以上のように、本論文は、CHO 細胞を用いた組換え医薬品生産の生産性向上に資する細胞内分泌過程の改善をめざし、細胞工学的手法として、KDEL 受容体の過剰発現による生産性向上を達成し、そのメカニズムの一端を解明した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			