

生物医薬糖タンパク質生産に向けた 糖鎖改変と糖鎖代謝経路可視化ツール開発

Glyco-engineering and Development of a Visualization Tool for Glycan Metabolic Pathways for Glycoprotein Production

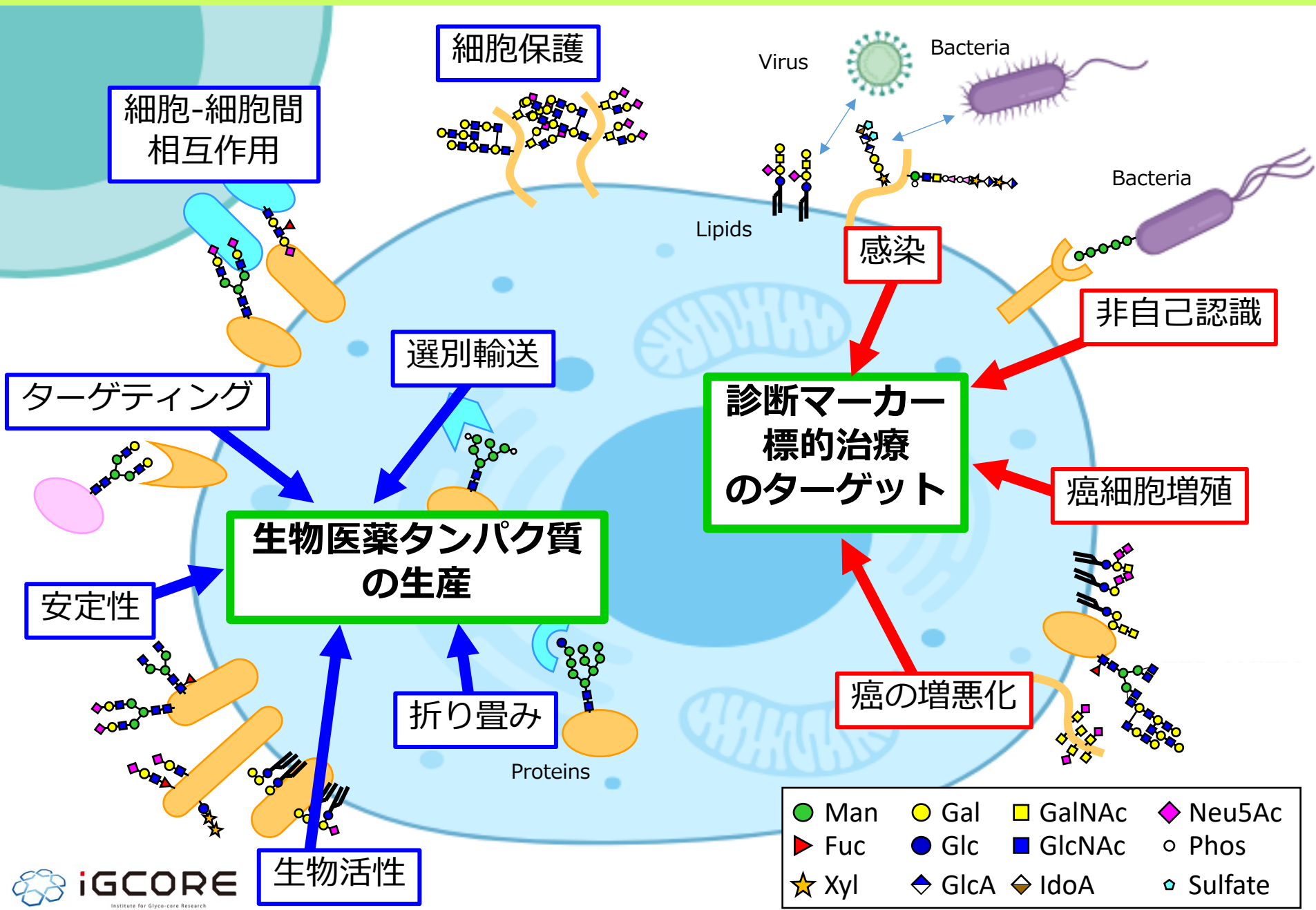
Glycoforum

岐阜大学 糖鎖生命コア研究所
iGCORE, Gifu Univ.

藤田盛久
Morihis Fujita



糖鎖の役割と重要性



生物医薬タンパク質
の生産

診断マーカー
標的治療
のターゲット

ターゲティング

選別輸送

安定性

生物活性

感染

非自己認識

癌細胞増殖

癌の増悪化

- | | | | |
|-------|--------|----------|-----------|
| ● Man | ● Gal | ■ GalNAc | ◆ Neu5Ac |
| ▶ Fuc | ● Glc | ■ GlcNAc | ○ Phos |
| ★ Xyl | ◆ GlcA | ◆ IdoA | ◇ Sulfate |

「糖タンパク質の一生」解析

細胞

細胞膜

エンドソーム

リソソーム

ゴルジ体

GPIアンカー型タンパク質

生物医薬糖タンパク質
(IgG, lysosomal enzymes)

小胞体

GPI
アンカー

免疫グロブリン (抗体)

リソソーム酵素

N型糖鎖

糖タンパク質の生合成と細胞内輸送に関わる因子の同定と解析

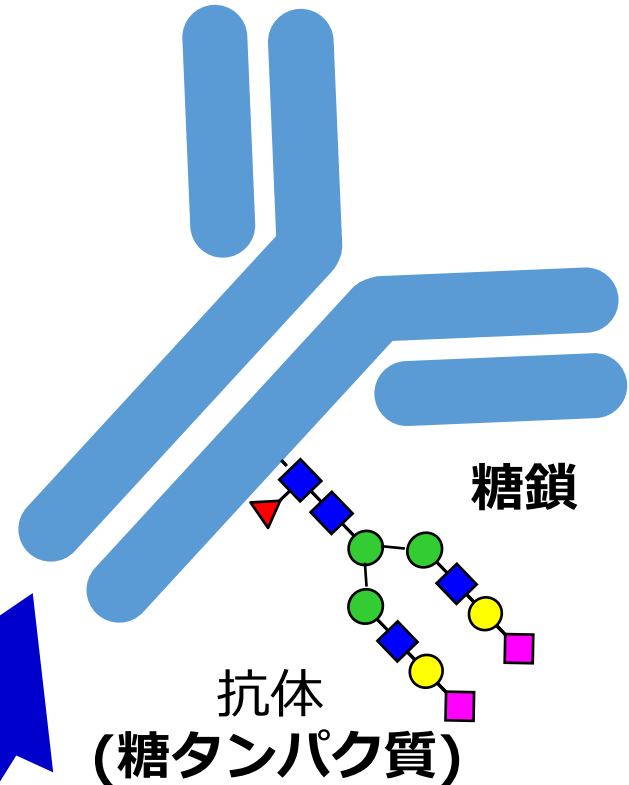
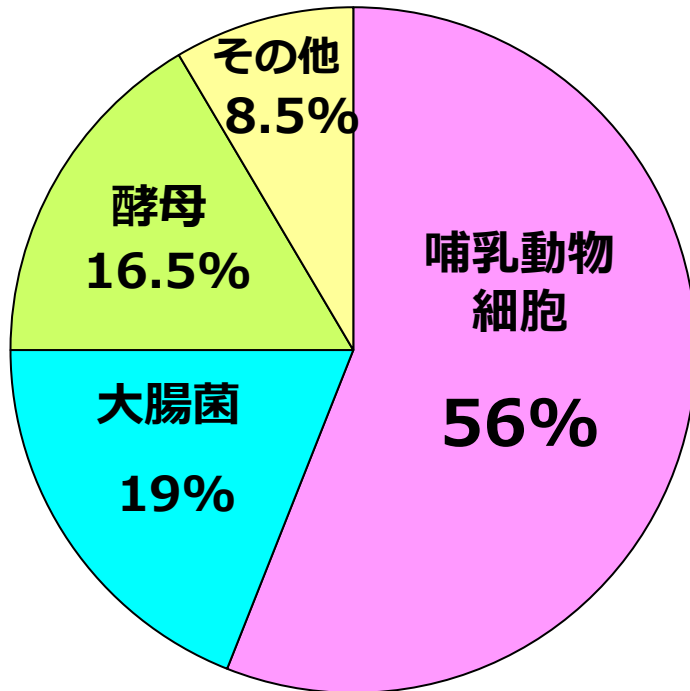
生物医薬糖タンパク質を生産するための宿主細胞の改変

HEK293細胞におけるN型糖鎖のシンプル化：
高マンノースN型糖鎖のみを有するタンパク質の生産

糖鎖遺伝子発現に基づく糖鎖代謝可視化ツールの開発：
GlycoMapleを用いた糖鎖構造の改変および比較

生物医薬タンパク質

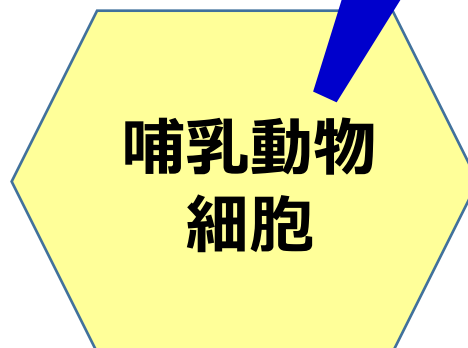
生物医薬タンパク質



タンパク質の折り畳み、アセンブリー
翻訳後修飾

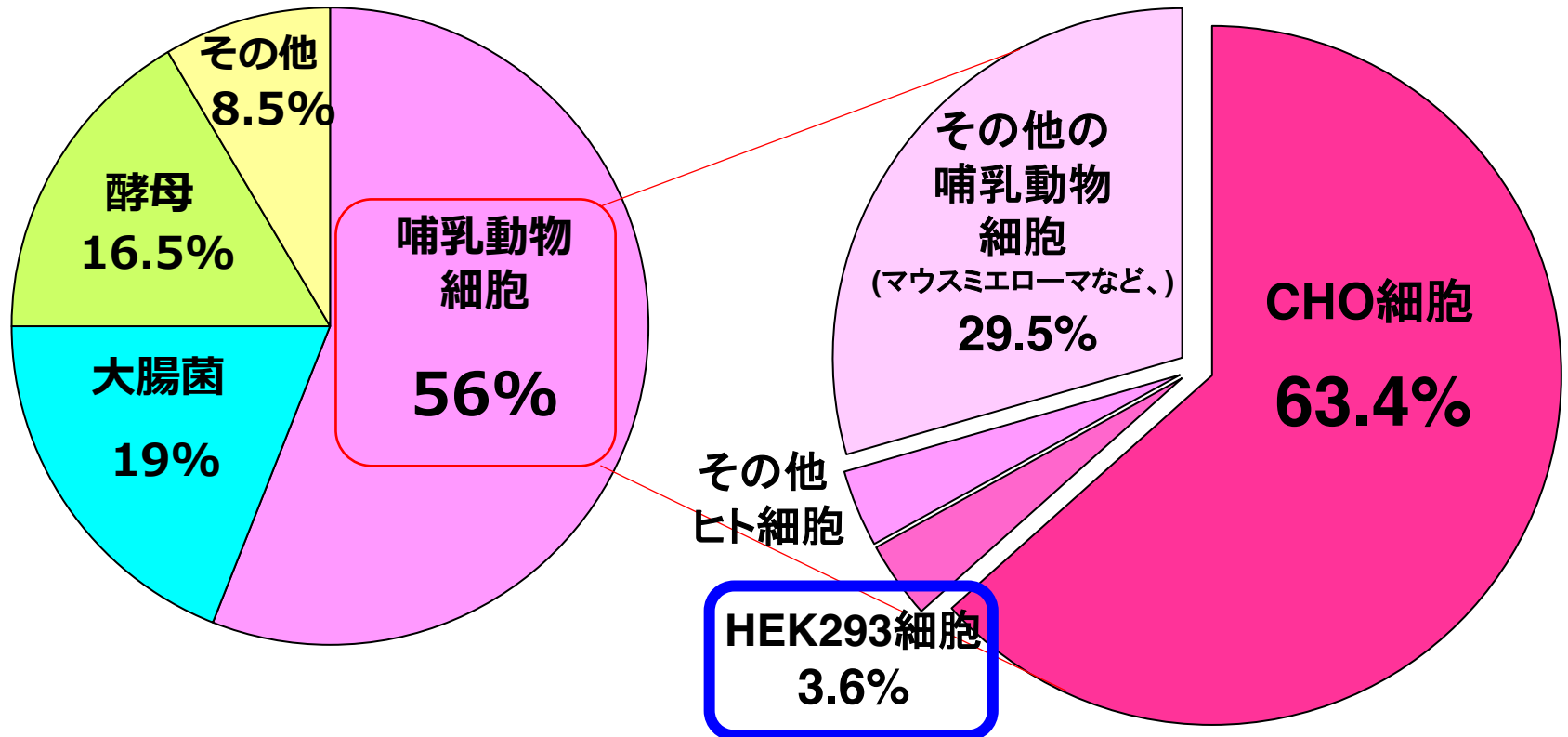
タンパク質の糖鎖修飾

安定化
生物活性
免疫原性



Modified from
Walsh G (2014)
Nat. Biotech. 12: 992

哺乳動物細胞による生物医薬タンパク質の生産



HEK293細胞

HEK293 (human embryonic kidney 293)

1977年にFrank Graham (McMaster Univ., Canada) によって樹立

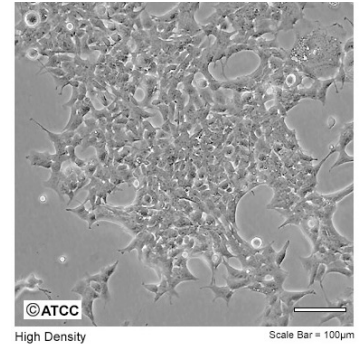
扱いが容易、基礎研究および応用研究で広く使用されている

血清フリーの浮遊培養系に適応できる

いくつかの医薬タンパク質(ex. factor VIII, factor IX)の生産に使用されている
ウイルスやウイルス様粒子(VLPs)の産生に利用されている

CHO細胞と比べて、競争が少ない

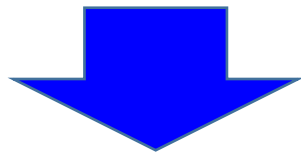
ヒトのデータベースに蓄積された情報を利用できる



HEK293

HEK293の糖鎖修飾

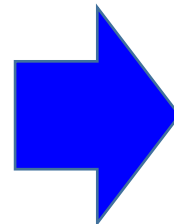
ヒトのグリコフォーム



哺乳動物細胞を用いたタンパク質
生産の欠点

糖鎖の不均一性

機能的、適切な糖鎖修飾の欠如



糖鎖工学

- 1) シンプル化
- 2) カスタム化

均一糖鎖を有するタンパク質を生産するための動物細胞の改変

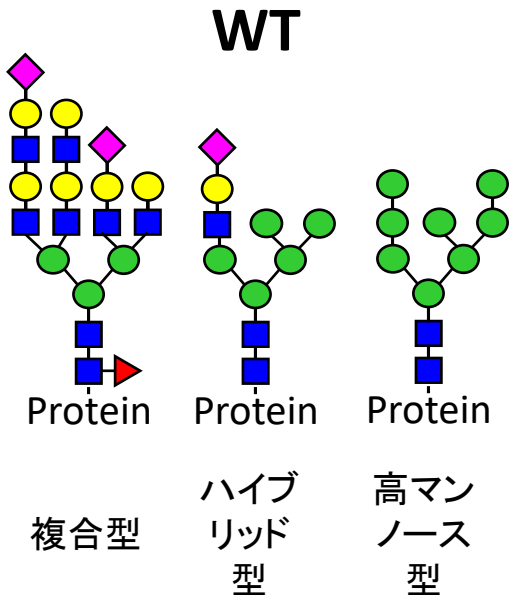
One issue for recombinant protein production in mammalian cells

Heterogeneity of glycans on proteins

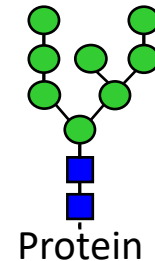
Heterogeneous glycan

Genome-editing using
CRISPR/Cas9 system

Uniform glycan

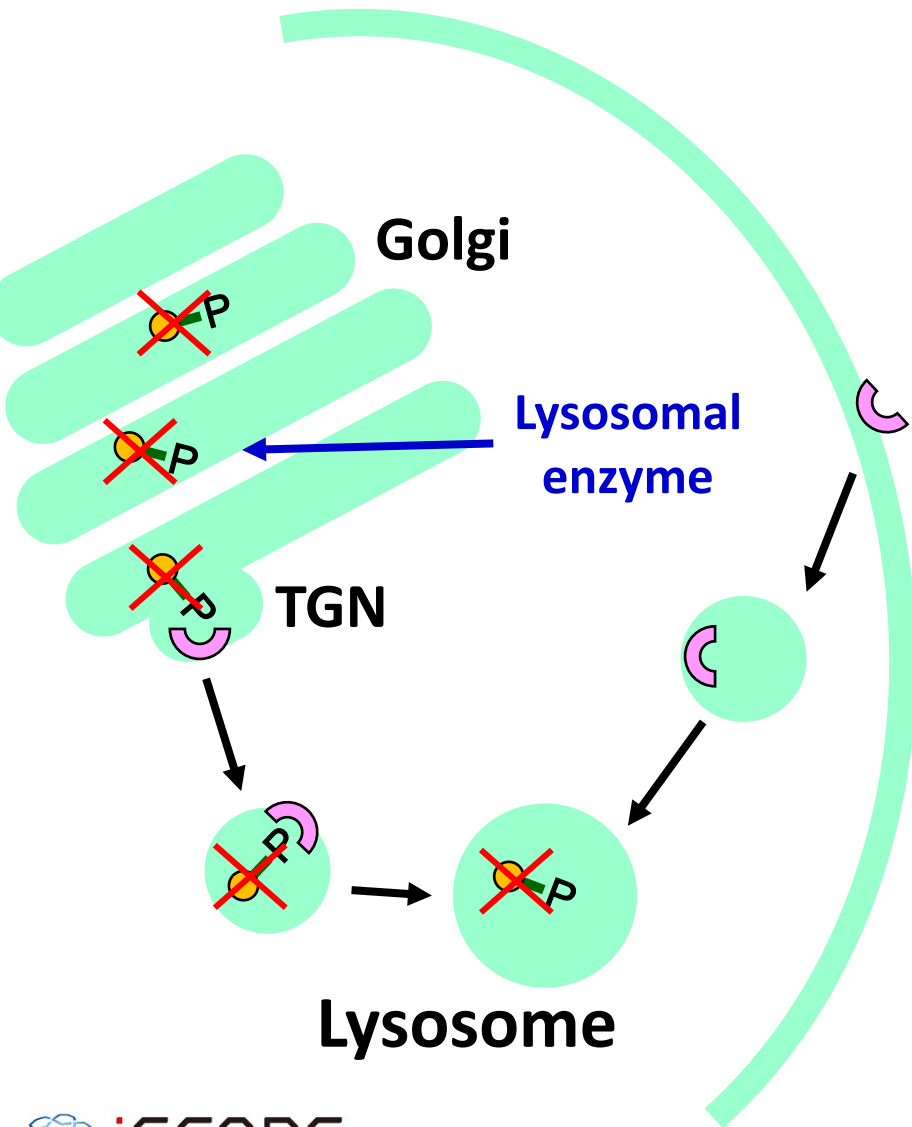


高マンノース型のみ
複合型なし



Man8あるいはMan9から成る
高マンノース型

リソソーム蓄積症治療のための酵素補充療法



リソソーム

細胞のゴミ処理工場

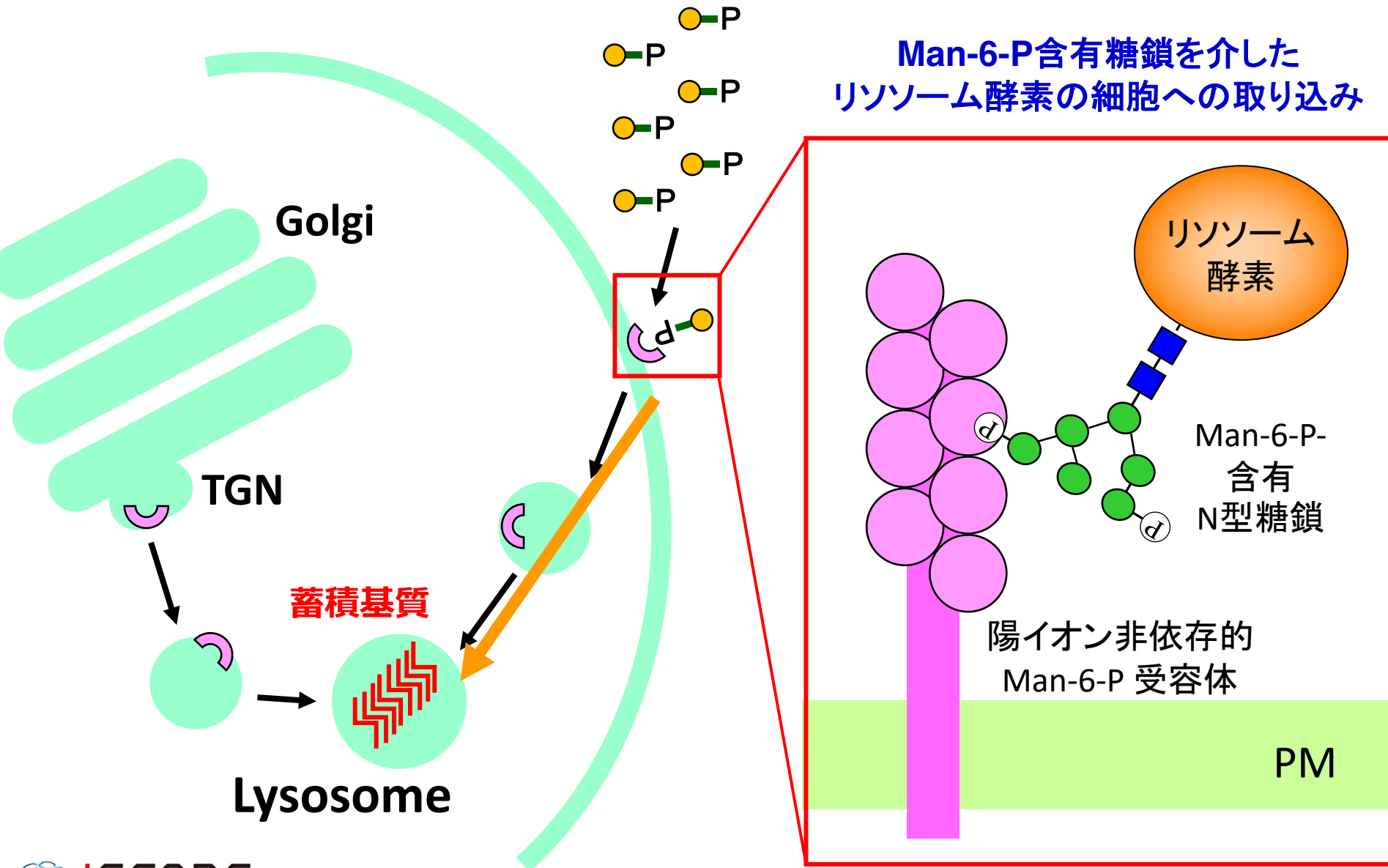
50種類以上のリソソーム酵素が存在し、核酸、タンパク質、脂質、糖鎖などの基質を加水分解している。

リソソーム酵素遺伝子の欠損は、リソソーム蓄積症を引き起こす。

酵素補充療法

組換えリソソーム酵素を静脈内投与

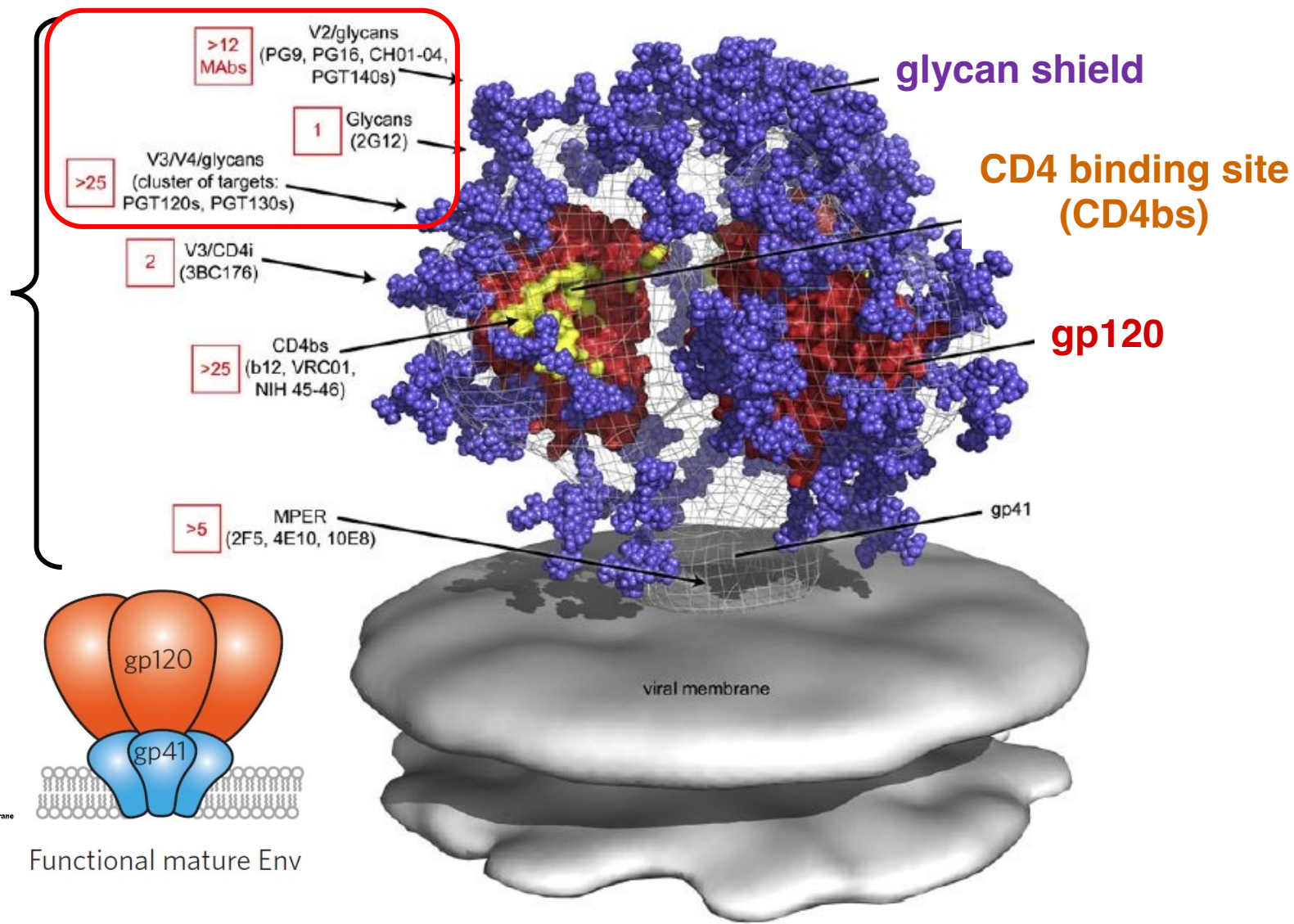
リソソーム蓄積症治療のための酵素補充療法



HIV-1に対する広域中和抗体 (Broadly Neutralizing Antibodies)

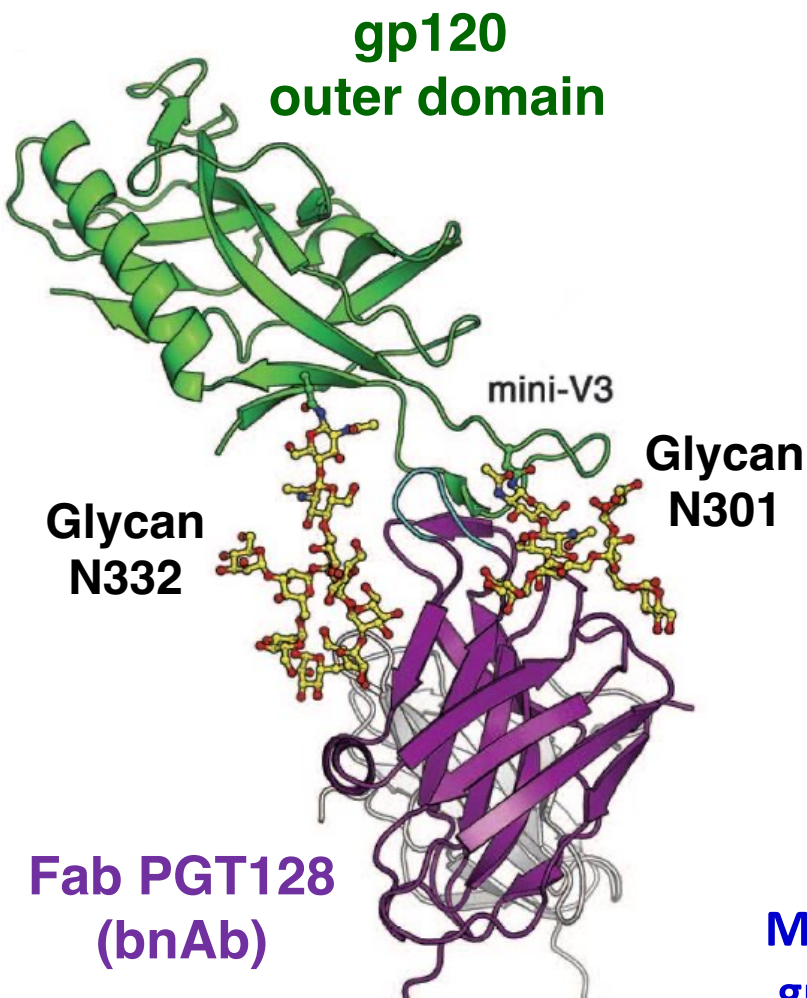
HIV-1患者から単離された
広域中和抗体

N型糖鎖に結合

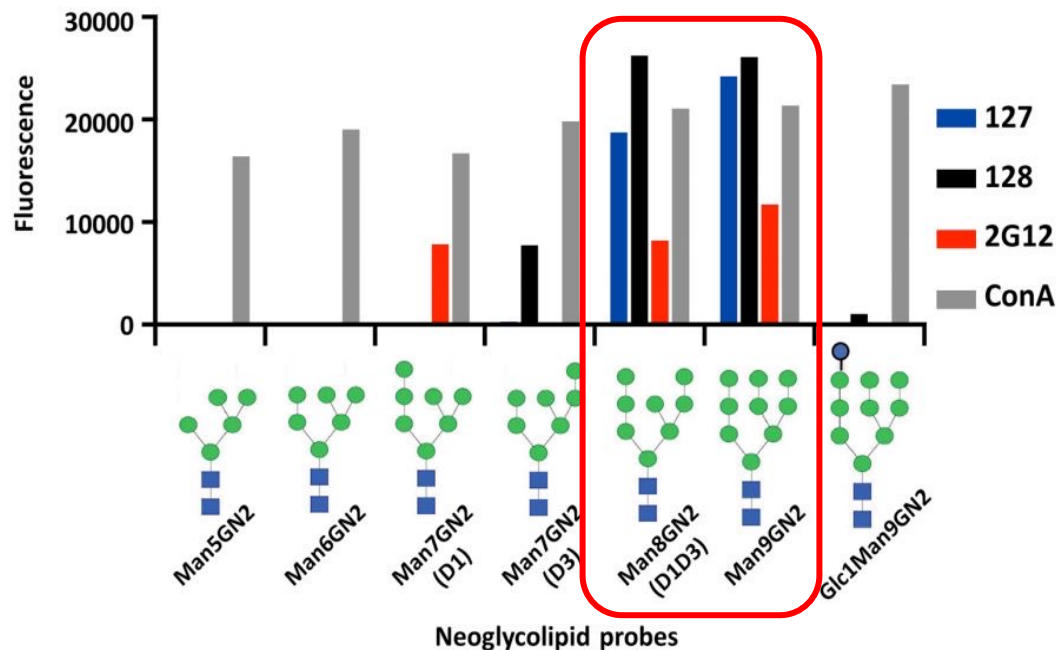


HIV-1

多くの中和抗体がgp120上の高マンノースN型糖鎖を認識する

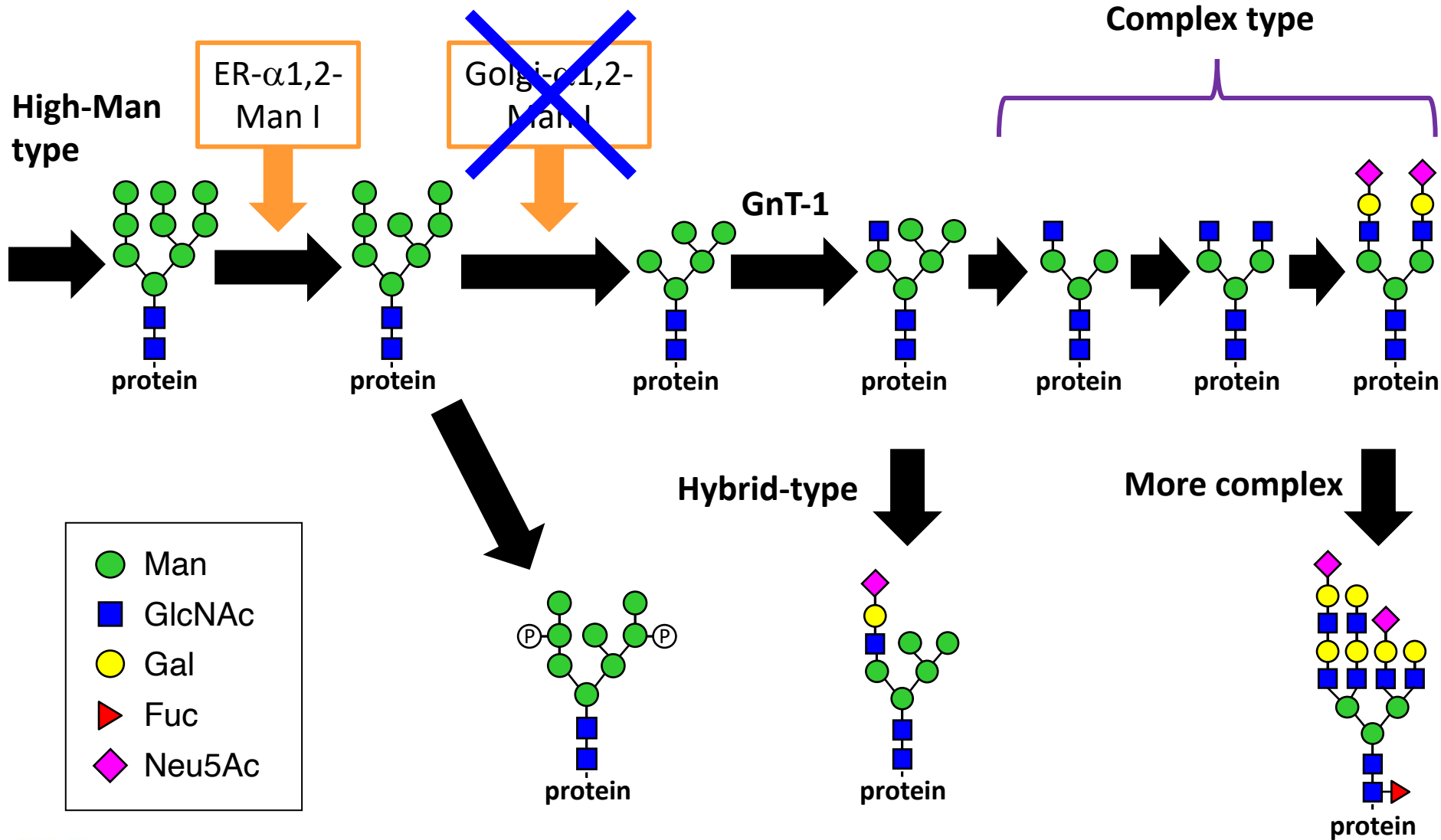


広域中和抗体のN型糖鎖構造への結合能

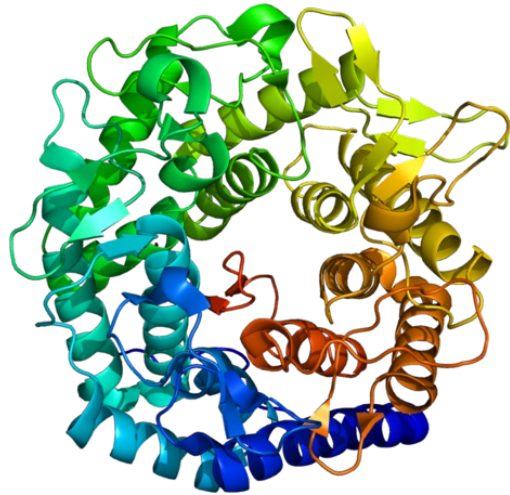


Man8やMan9の高マンノースN型糖鎖を有するgp120はHIV-1に対するワクチンの候補の一つ

高マンノースN型糖鎖含有タンパク質を発現するための ゴルジマンノシダーゼIの破壊



CAZyデータベースにおけるヒトGH47 (α 1,2-mannosidases)



Golgi Man-I A
(MAN1A1)

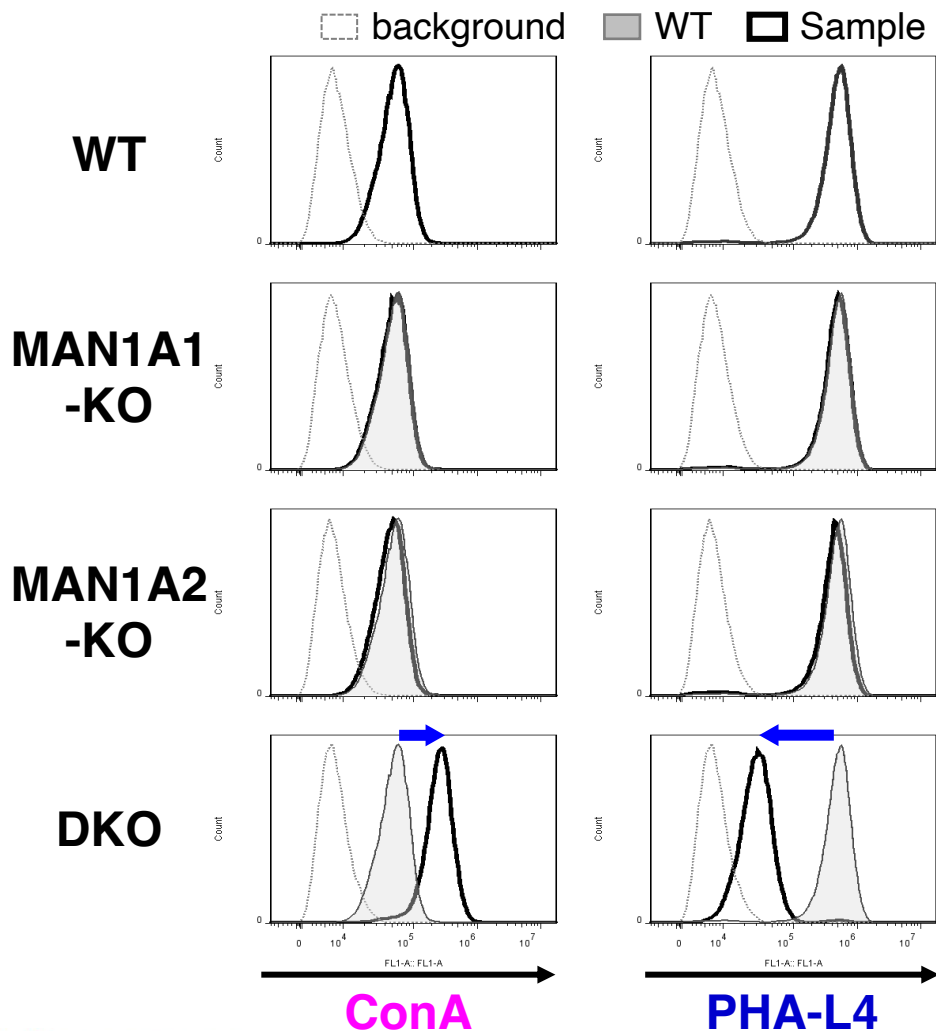
Human GH47 (α 1,2-mannosidases)

| Protein name | Gene name | TPM | Function |
|---------------|---------------|-------|---------------------------|
| Golgi Man-I A | <i>MAN1A1</i> | 34.82 | Glycan maturation |
| B | <i>MAN1A2</i> | 25.65 | |
| C | <i>MAN1C1</i> | 5.24 | |
| ER Man-I | <i>MAN1B1</i> | 64.97 | Protein quality control ? |
| EDEMs | <i>EDEM1</i> | 28.91 | ER-associated degradation |
| | <i>EDEM2</i> | 24.59 | |
| | <i>EDEM3</i> | 24.01 | |

Tempel et al (2004) *J. Biol. Chem.*

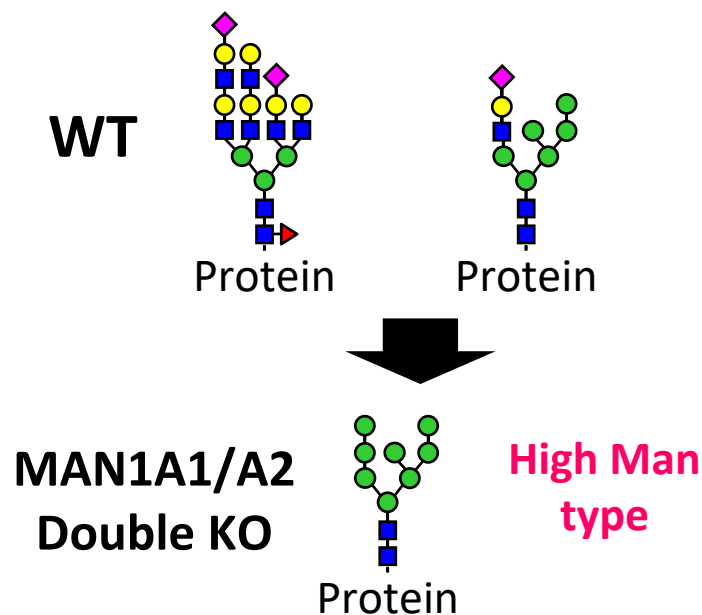
MAN1A1 & MAN1A2 二重破壊細胞は複合N型糖鎖の減少と高マンノースN型糖鎖の上昇が見られた

Flow cytometric analysis of glycans on the cell surface using two lectins



PHA-L4: lectin binding to **complex type** of glycans

ConA: lectin binding to **high Man type** of glycans



二重遺伝子破壊細胞で他の α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子の破壊

Human GH47 (α 1,2-mannosidases)

Protein name Gene name

Golgi Man-I A ~~MAN1A1~~

B ~~MAN1A2~~

C MAN1C1

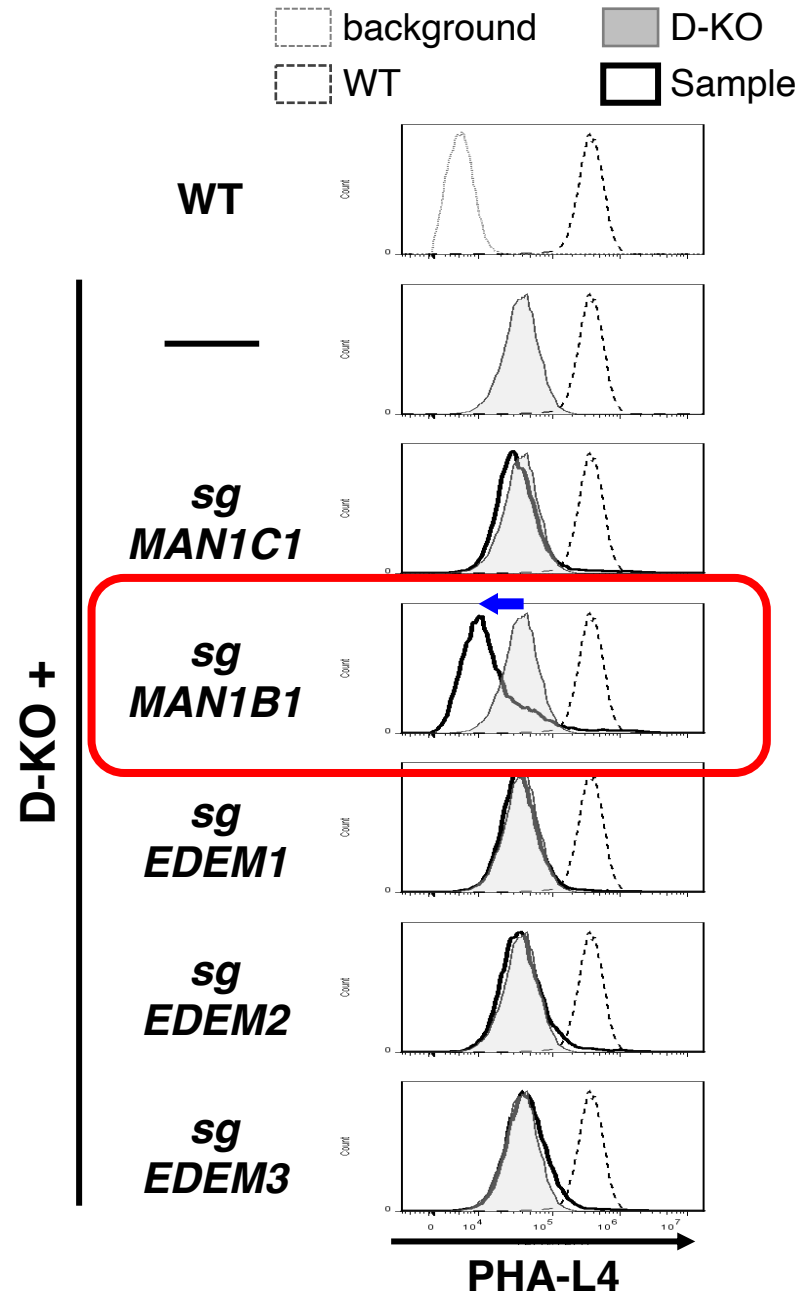
ER Man-I MAN1B1

EDEMs EDEM1

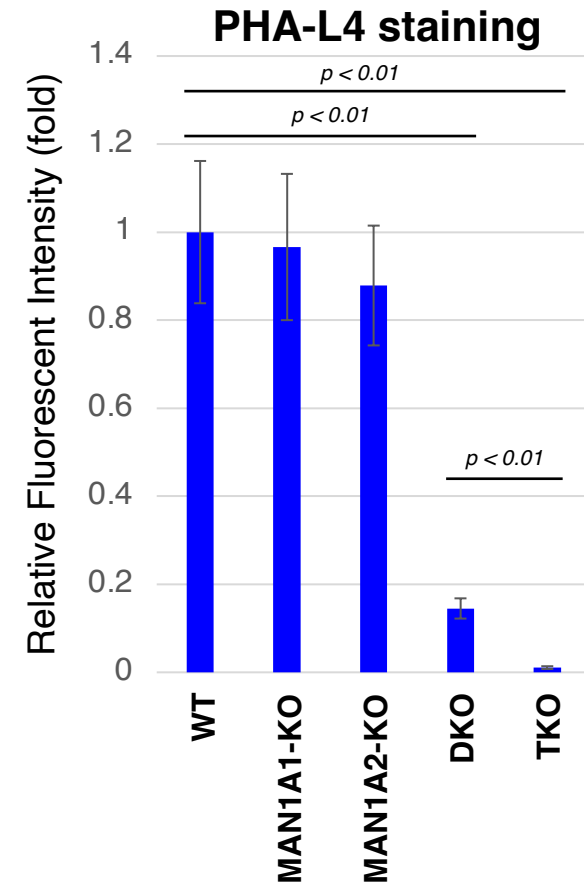
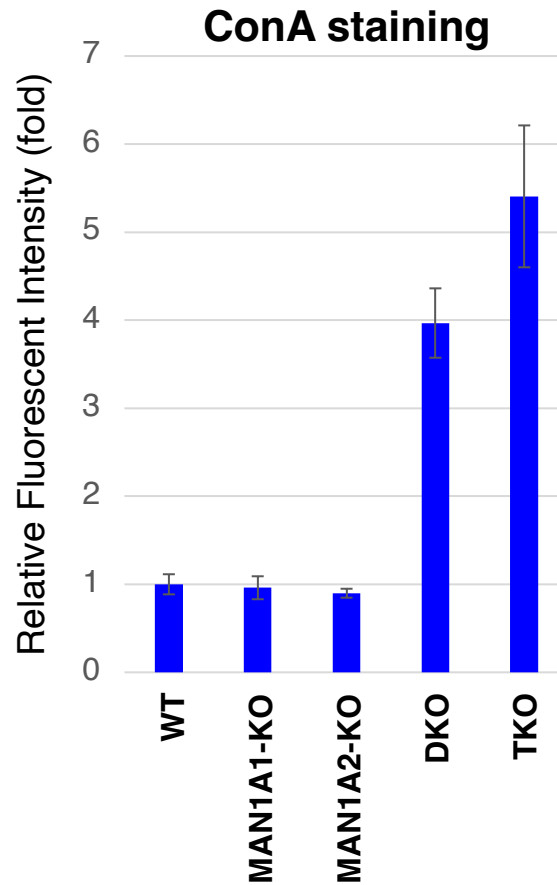
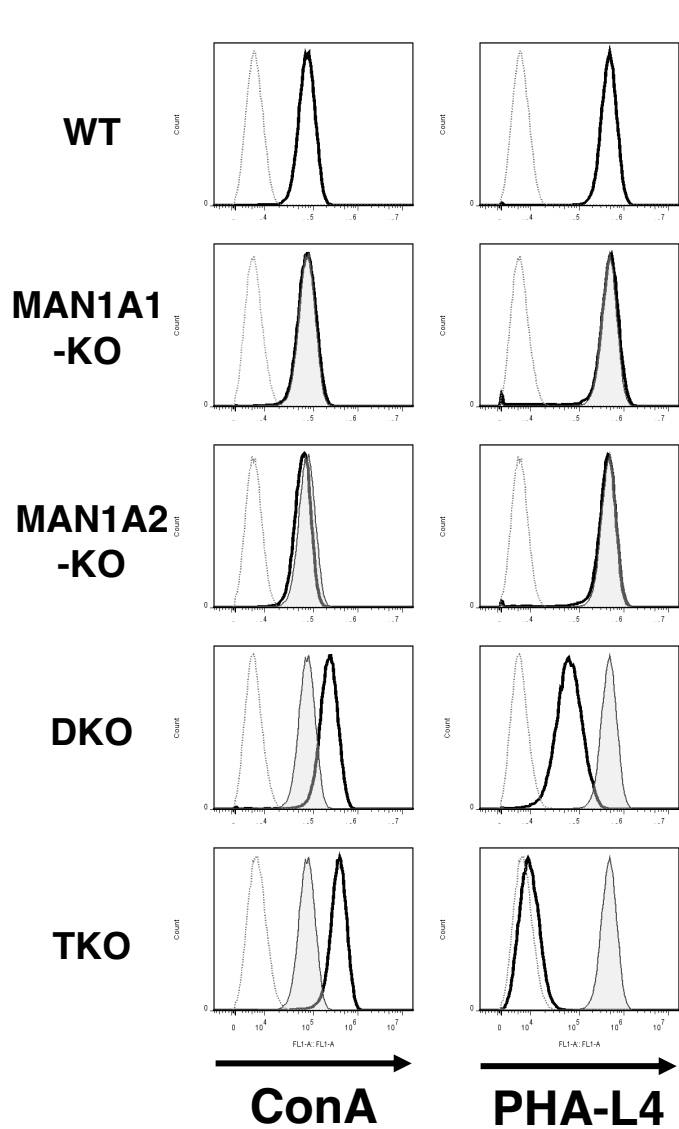
EDEM2

EDEM3

Knockout of MAN1B1 in double-KO cells almost completely diminished the PHA-L4 staining.



MAN1A1/A2/B1三重遺伝子破壊細胞



MAN1A1 & A2二重遺伝子破壊細胞に、さらにMAN1B1遺伝子をノックアウトすることで、PHA-L4染色がほとんど完全に喪失した。

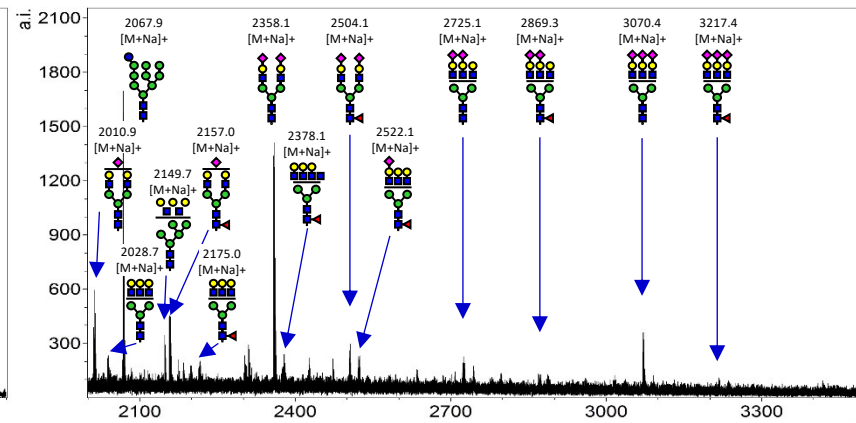
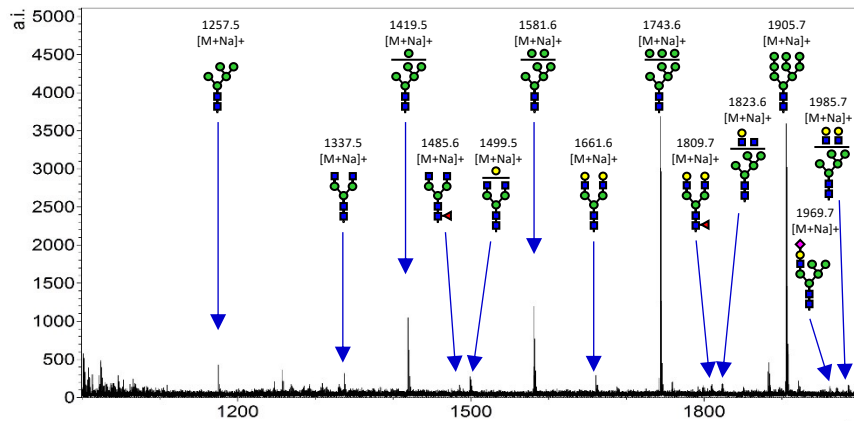
MALDI-MSによるN型糖鎖解析 (whole cell lysates)

$m/z = 1000 - 2000$

$m/z = 2000 - 3500$

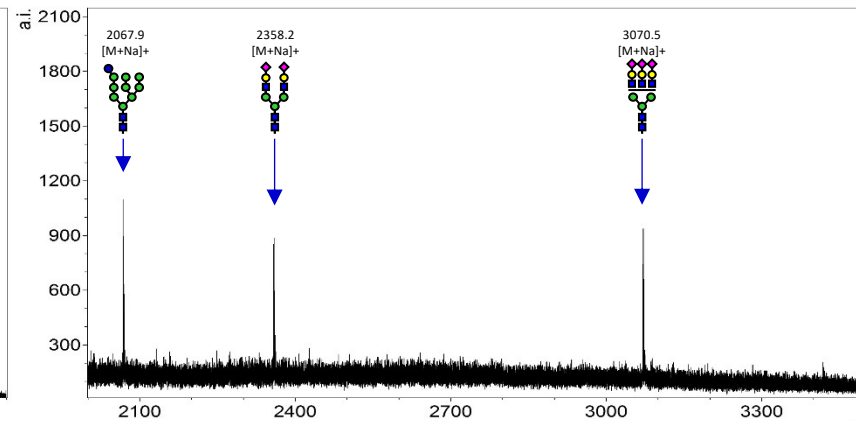
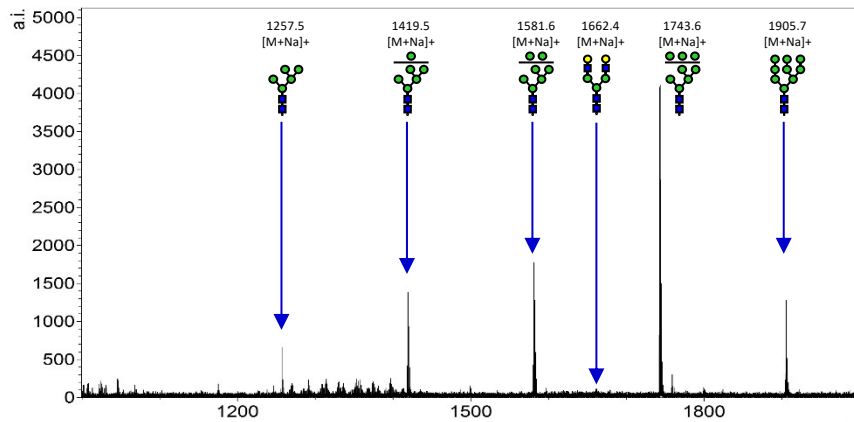
A

WT



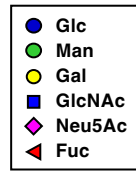
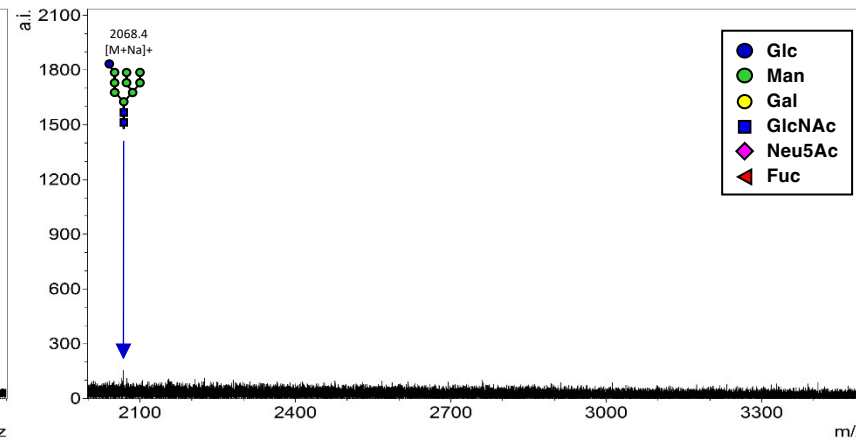
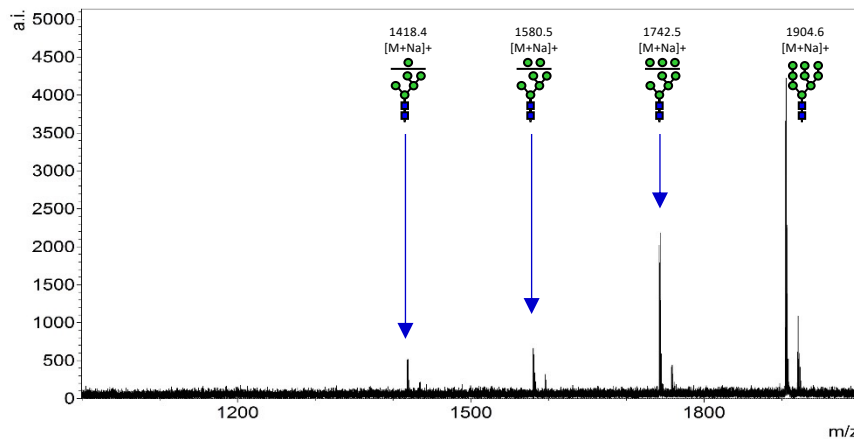
B

D-KO



C

T-KO



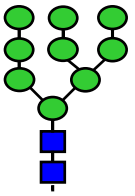
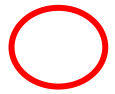
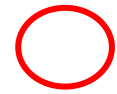
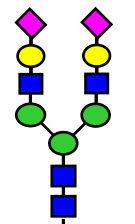
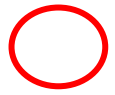

組換えエリソソーム酵素の発現

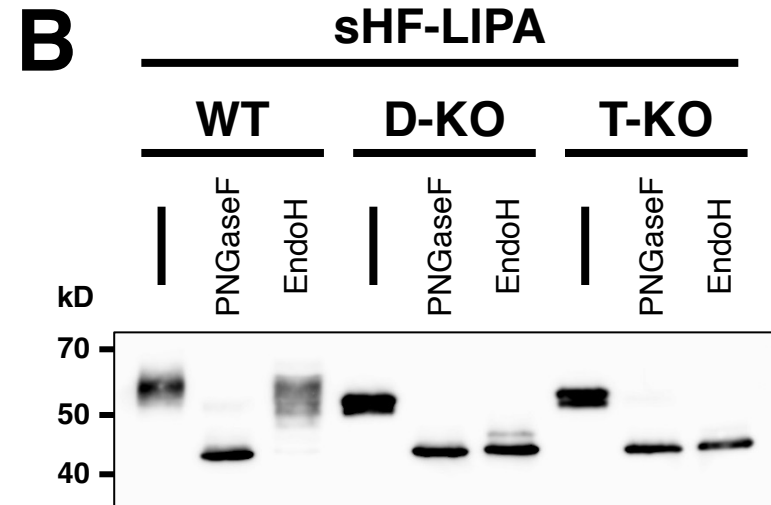
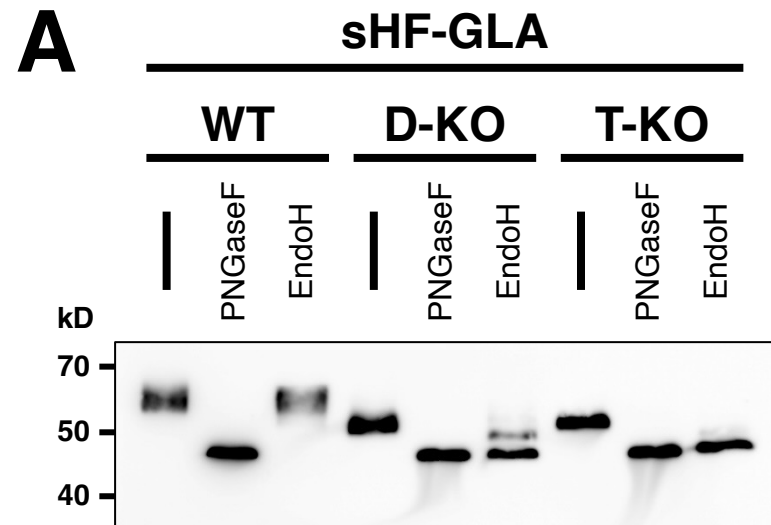
α -Galactosidase A (GLA):

hydrolyzes a glycosphingolipid Gb3 in the lysosomes and the **mutations in GALA cause Fabry disease**

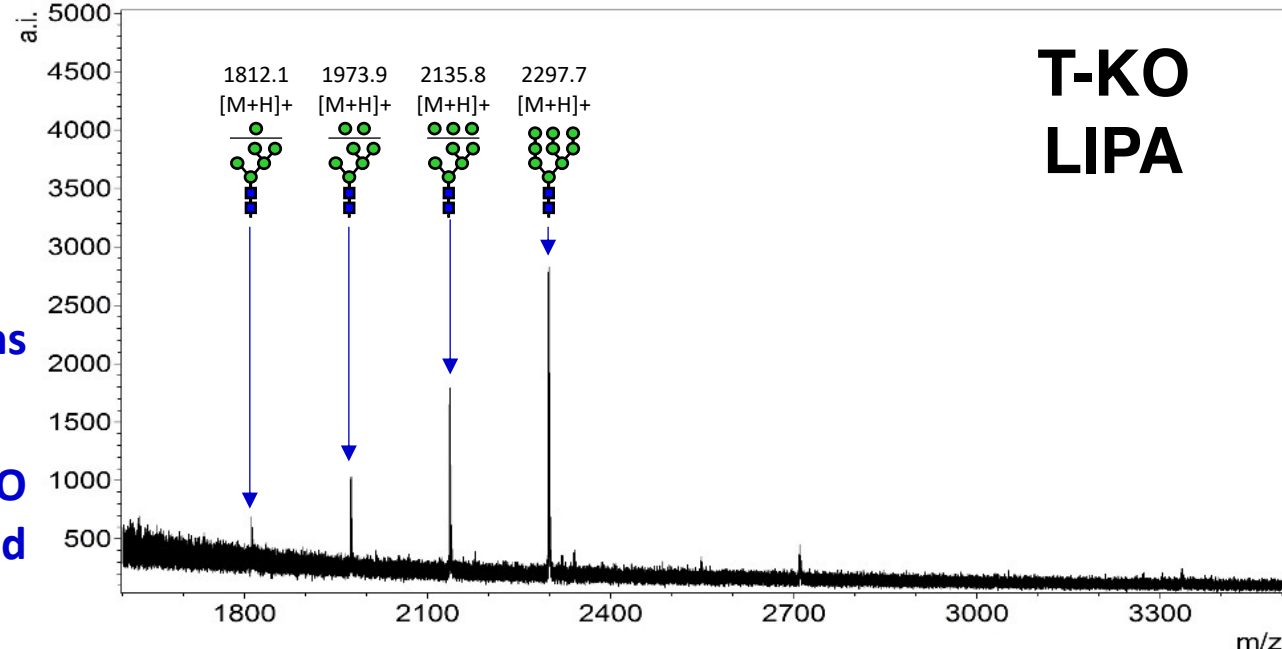
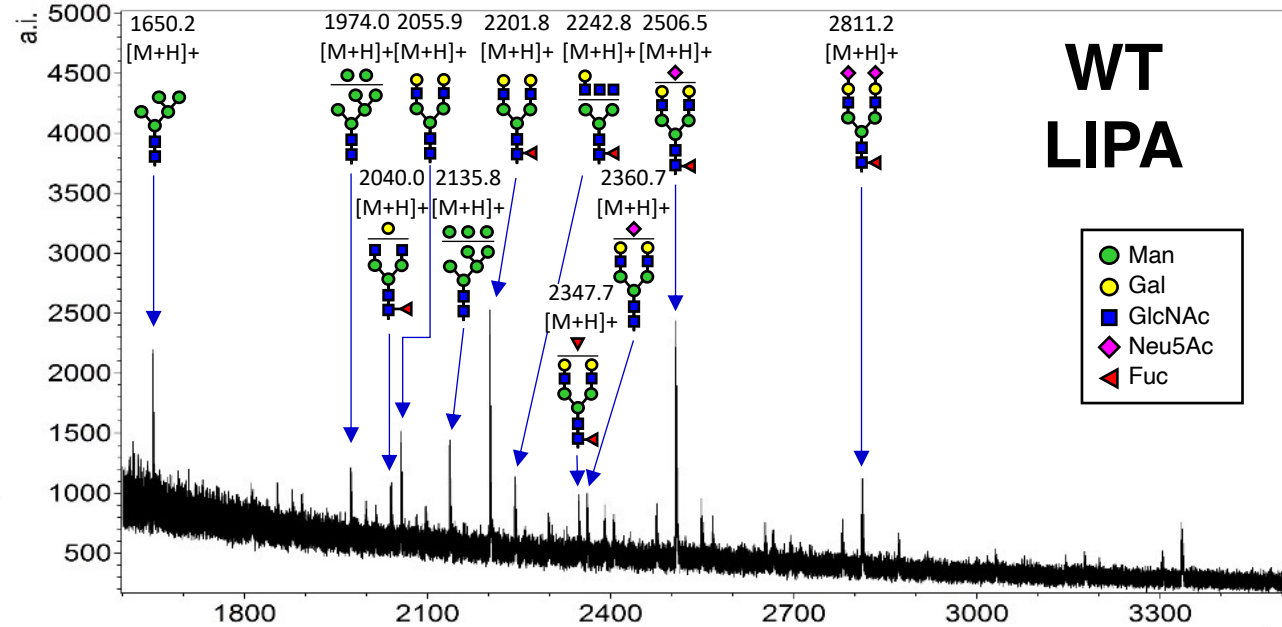
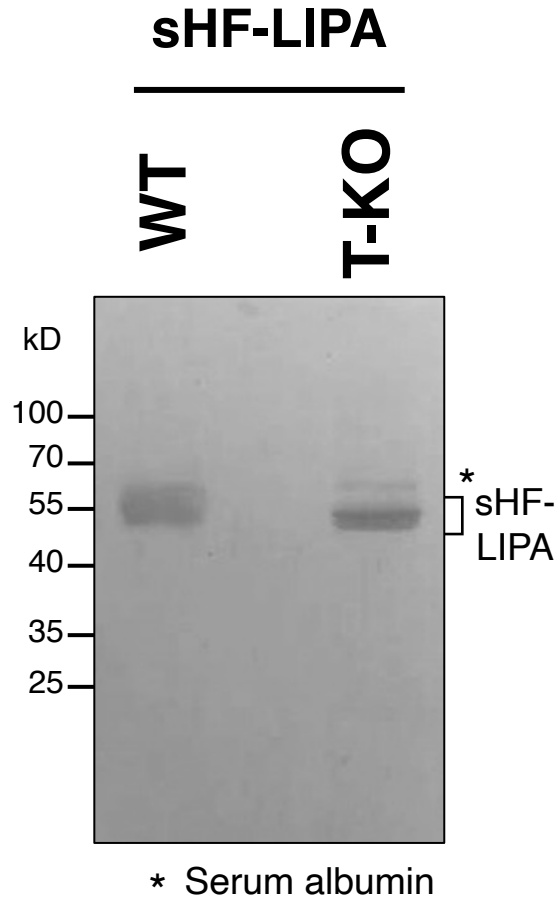
Lysosomal acid lipase (LIPA):

breakdown of lipids such as cholesterol esters and triacylglycerols in lysosomes, **its deficiency leads Wolman disease and cholesteryl ester storage disease**

| | PNGaseF | EndoH |
|---|---|---|
|  |  |  |
|  |  |  |



三重遺伝子破壊株で発現させた組換えLIPAのN型糖鎖解析

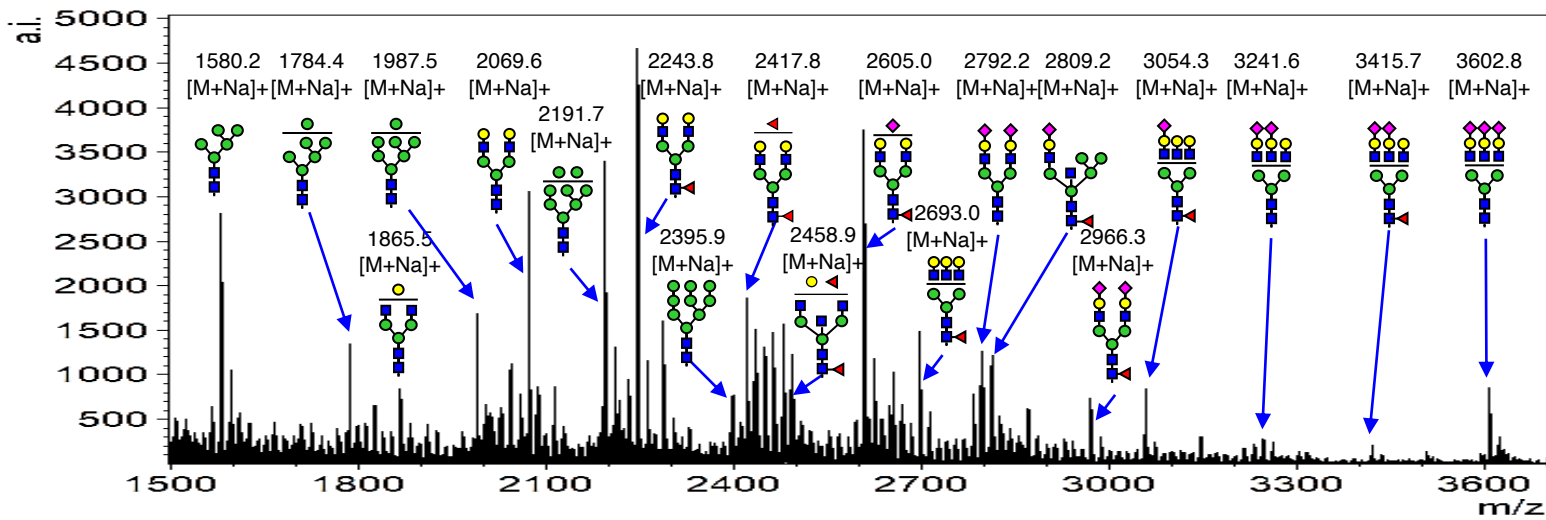


More than 30 different glycans were observed from WT-LIPA.

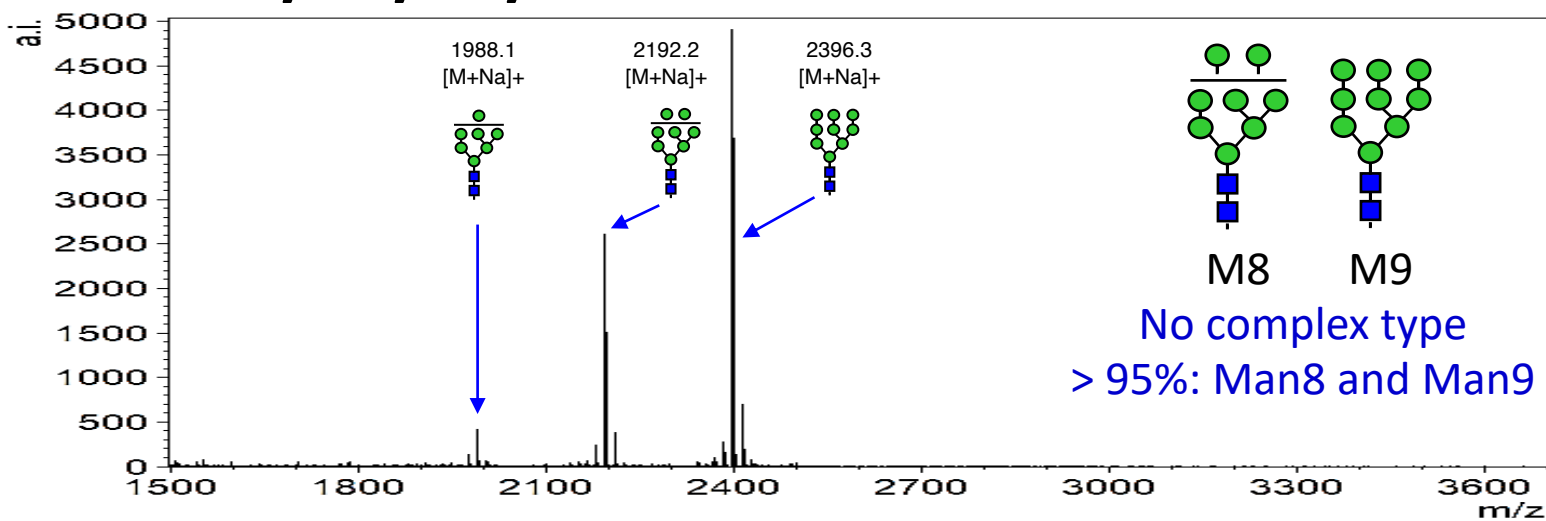
N-glycans on LIPA from T-KO were simplified and changed to high-Man-types.

MAN1A1/A2/B1/C1四重遺伝子破壊細胞のN型糖鎖構造

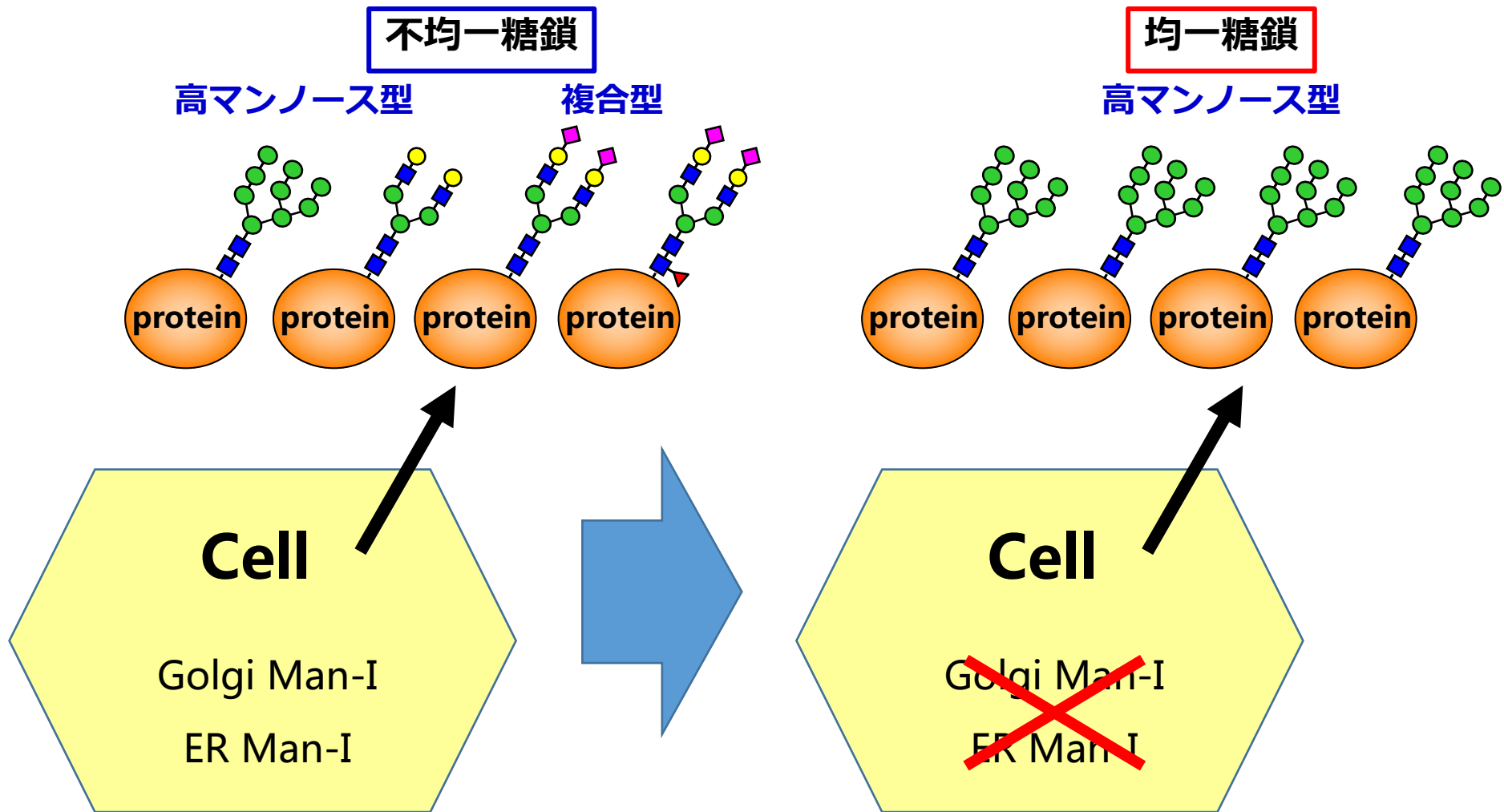
WT



MAN1A1/A2/B1/C1-KO



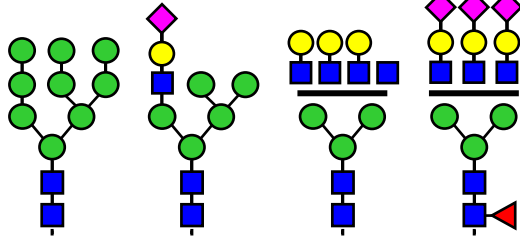
Conclusion 1: 高マンノースN型糖鎖を有する組換えタンパク質生産のためのHEK293細胞の改変



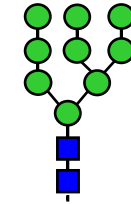
多重マンノシダーゼ-I遺伝子破壊HEK293細胞を樹立した。
これは、高マンノースN型糖鎖を有するタンパク質の生産に有用である。

HEK293細胞の糖鎖シンプル化

N-glycans

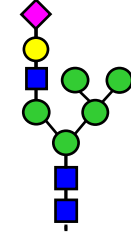


MAN1A1/A2/B1/C1-KO



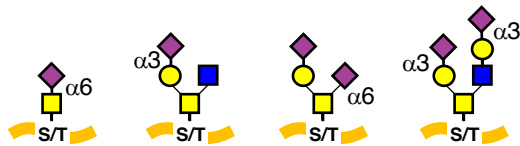
High-Man

MAN2A1/A2/FUT8-KO + MsdS-OE



Hybrid

O-glycans

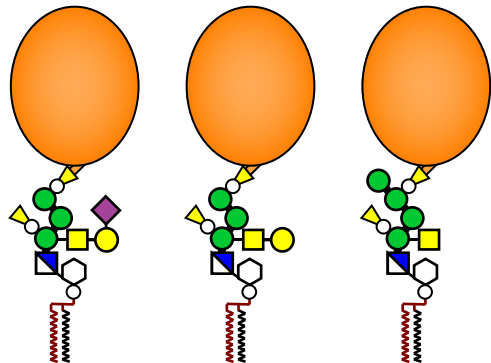


C1GALT1/SLC35A1-KO

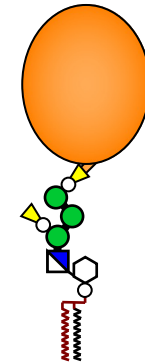


Tn

GPI-APs



PGAP4/PIGZ-KO + PGAP1-OE



GPI core

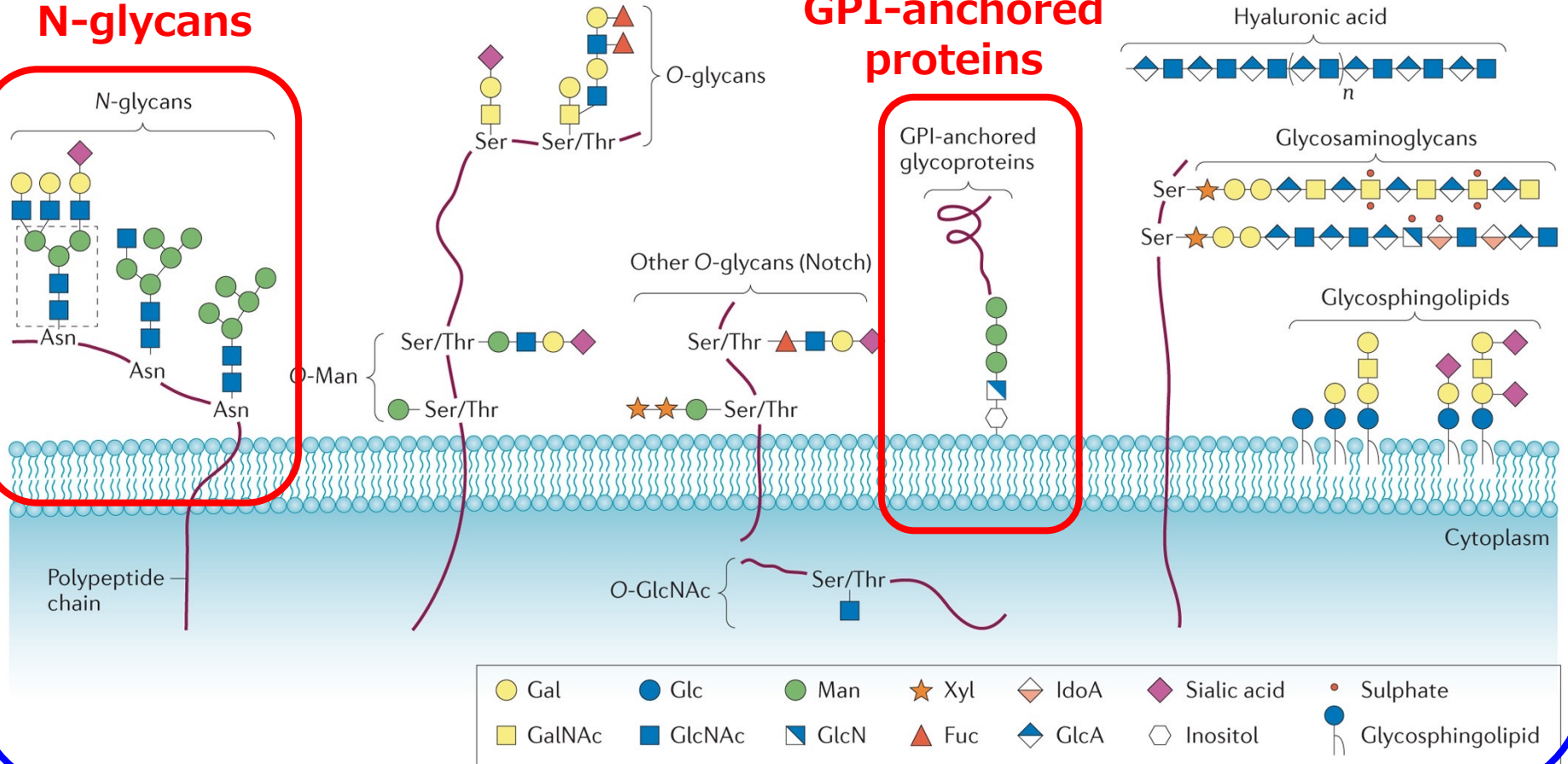
HEK293細胞におけるN型糖鎖のシンプル化：
高マンノースN型糖鎖のみを有するタンパク質の生産

糖鎖遺伝子発現に基づく糖鎖代謝可視化ツールの開発：
GlycoMapleを用いた糖鎖構造の改変および比較

哺乳動物の糖鎖構造

N-glycans

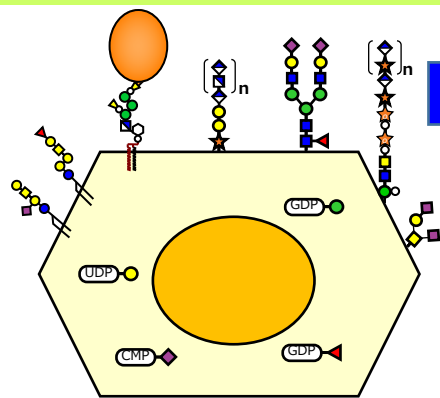
GPI-anchored proteins



Nature Reviews | Cancer

Glycome: どんな構造が細胞/組織で発現し、どのように合成されるのか？

糖鎖構造の可視化、予測、改変 : GlycoMaple



細胞でどんな糖鎖が合成されるのか知りたい

糖鎖構造解析 (質量分析装置、液体クロマトグラフィ)
熟練の技術が必要、分子量の大きな糖鎖・
電荷のある糖鎖・異性体のある糖鎖は特に解析が難しい

糖鎖研究を専門としない多くの研究者にとって大きなハードル
糖鎖が関係する重要な現象を見逃している可能性

より簡便に糖鎖研究に
アクセスできる方法が必要

より俯瞰的に糖鎖構造を
解析する方法が必要

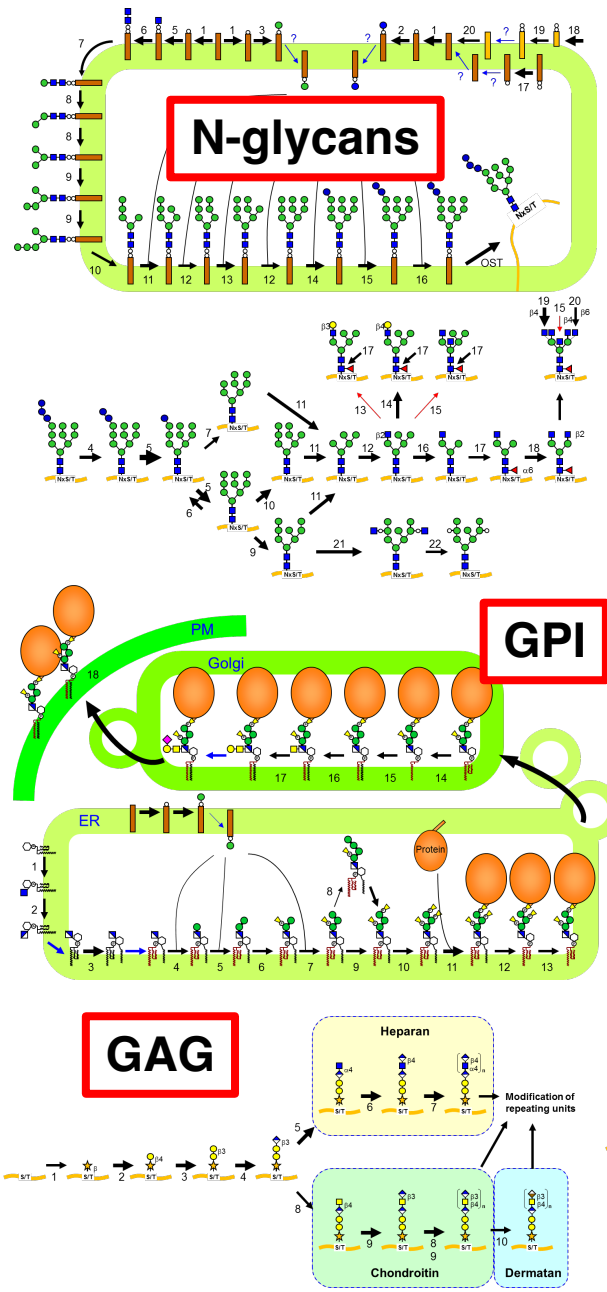
遺伝子発現情報から糖鎖代謝経路を可視化することができれば有用

- (1) 糖鎖関連遺伝子のリストの作成 (950遺伝子)
- (2) 糖鎖代謝経路マップの作成 (20種類)

(1) 糖鎖関連遺伝子のリストの作成

| Group | No. of genes |
|--|--------------|
| 1. Lipid-linked oligosaccharide (LLO) biosynthesis | 38 |
| 2. N-glycan processing and branching | 41 |
| 3. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and proteins | 64 |
| 4. O-glycan (mucin-type) biosynthesis | 33 |
| 5. O-glycan (others) biosynthesis | 36 |
| 6. Glycosphingolipid (GSL) biosynthesis | 77 |
| 7. N-glycan / O-glycan / GSL modification | 47 |
| 8. GPI biosynthesis and proteins | 178 |
| 9. C-mannosylation | 4 |
| 10. Sugar-nucleotide biosynthesis | 56 |
| 11. Sugar transporters | 47 |
| 12. Golgi homeostasis | 19 |
| 13. Lectins | 172 |
| 14. Glycogen synthesis/metabolism | 14 |
| 15. Hyaluronan synthesis/metabolism | 11 |
| 16. Sulfate related | 18 |
| 17. Lysosomal degradation of glycans | 16 |
| 18. Other Glycosyltransferase (CAZy) | 33 |
| 19. Other Glycoside hydrolase (CAZy) | 32 |
| 20. Carbohydrate binding module (CAZy) | 15 |
| Total | 951 |

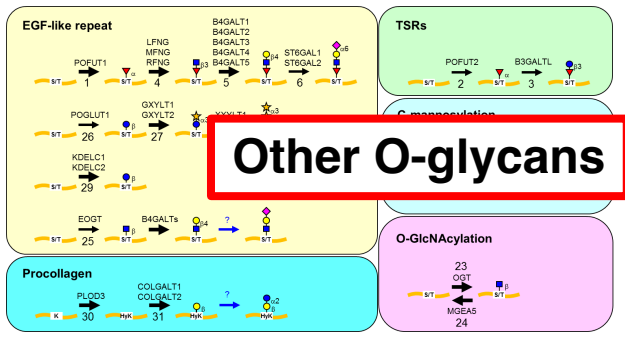
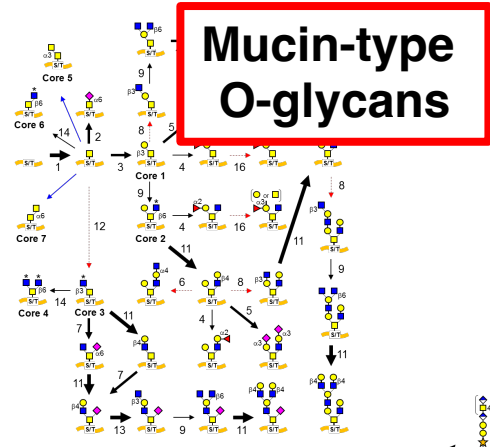
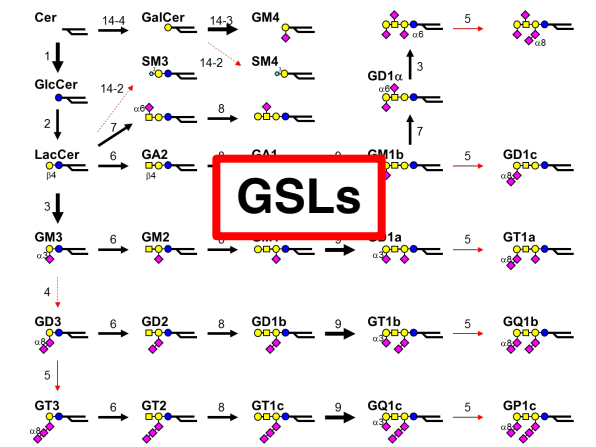
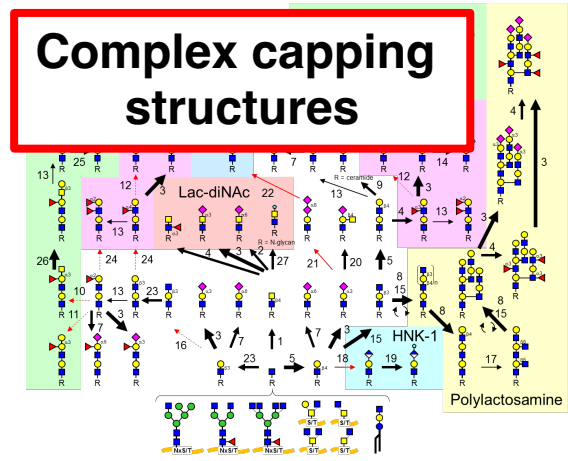
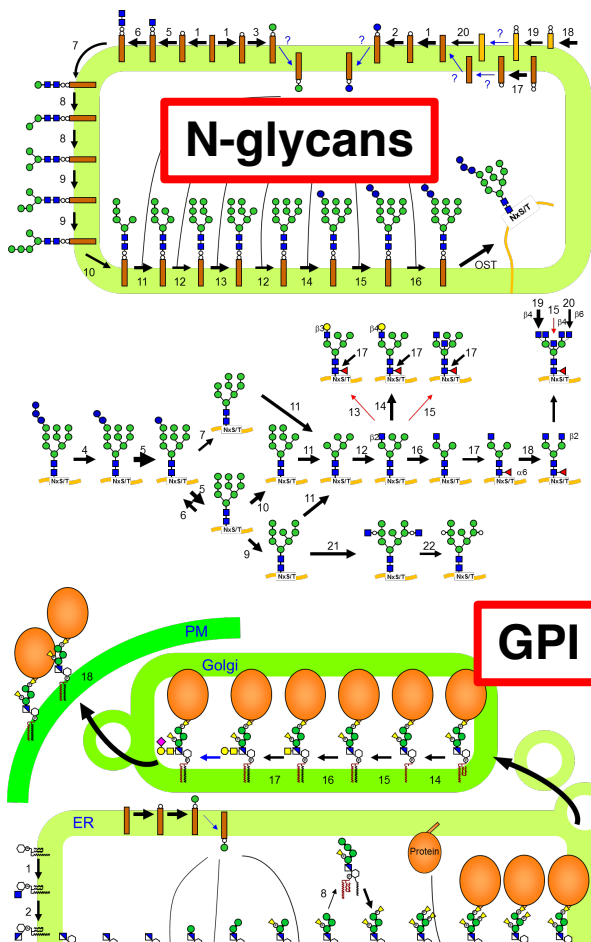
(2) 糖鎖代謝経路マップの作成



Map Number

1. Lipid-linked oligosaccharide (LLO) biosynthesis
2. N-glycan processing and branching
3. Complex capping of N-glycan / O-glycan / GSLs
4. GPI biosynthesis
5. O-GalNAc (mucin-type) biosynthesis
6. O-Fuc / O-Glc / Col-Gal / O-GlcNAc / C-Man
7. O-Man biosynthesis
8. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis
9. Heparan sulfate biosynthesis
10. Chondroitin sulfate and dermatan sulfate
11. Keratan sulfate
12. Glycosphingolipid (core) biosynthesis
13. Globoside biosynthesis
14. Ganglioside biosynthesis
15. Sugar nucleotide biosynthesis
16. Lysosomal degradation of N-glycans
17. Lysosomal degradation of GSLs
18. Lysosomal degradation of GAGsy)
19. Hyaluronic acid biosynthesis and catabolism
20. Human milk oligosaccharide

糖鎖合成、代謝経路へのマッピング



遺伝子発現情報に基づいて、糖鎖代謝経路を可視化、推定できるwebツール「GlycoMaple」の開発

<https://glycosmos.org/glycomaple/index>



Huang et al. (2021) *Dev. Cell*

GlycoMaple: 糖鎖経路可視化ツール



GlycoMaple
(グライコメープル)

糖鎖地図: Glycan Map

Maple syrup = Sugar

Mapleと言え、葉っぱが特徴的
樹木がタンパク質なら、糖鎖は葉っぱ
のような存在

季節によって葉っぱの色が変わるのは、
環境によって糖鎖が変わるのに似ている。

-le: ~する人 (道具)

Googleで検索 -> Googる

糖鎖経路を検索 -> GlycoMapる

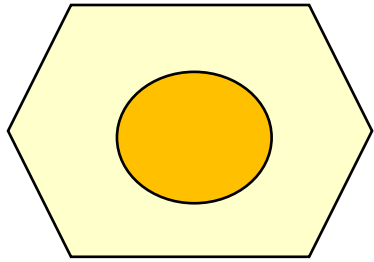
遺伝子発現情報に基づいて、糖鎖代謝経路を
可視化、推定できるwebツール「GlycoMaple」の開発

<https://glycosmos.org/glycomaple/index>



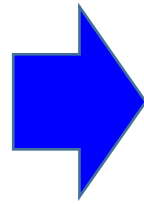
Huang et al. (2021) *Dev. Cell*

HEK293細胞における糖鎖関連遺伝子の発現



Model cell:
HEK293

RNA-seq



Calculate each gene expression as
TPM: Transcripts Per Million




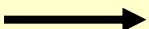



$$\text{TPM} = \frac{\text{Reads} / \text{length of transcript}}{\sum_{\text{All transcripts}} \left(\text{Reads} / \text{length of transcript} \right)} \times 10^6$$



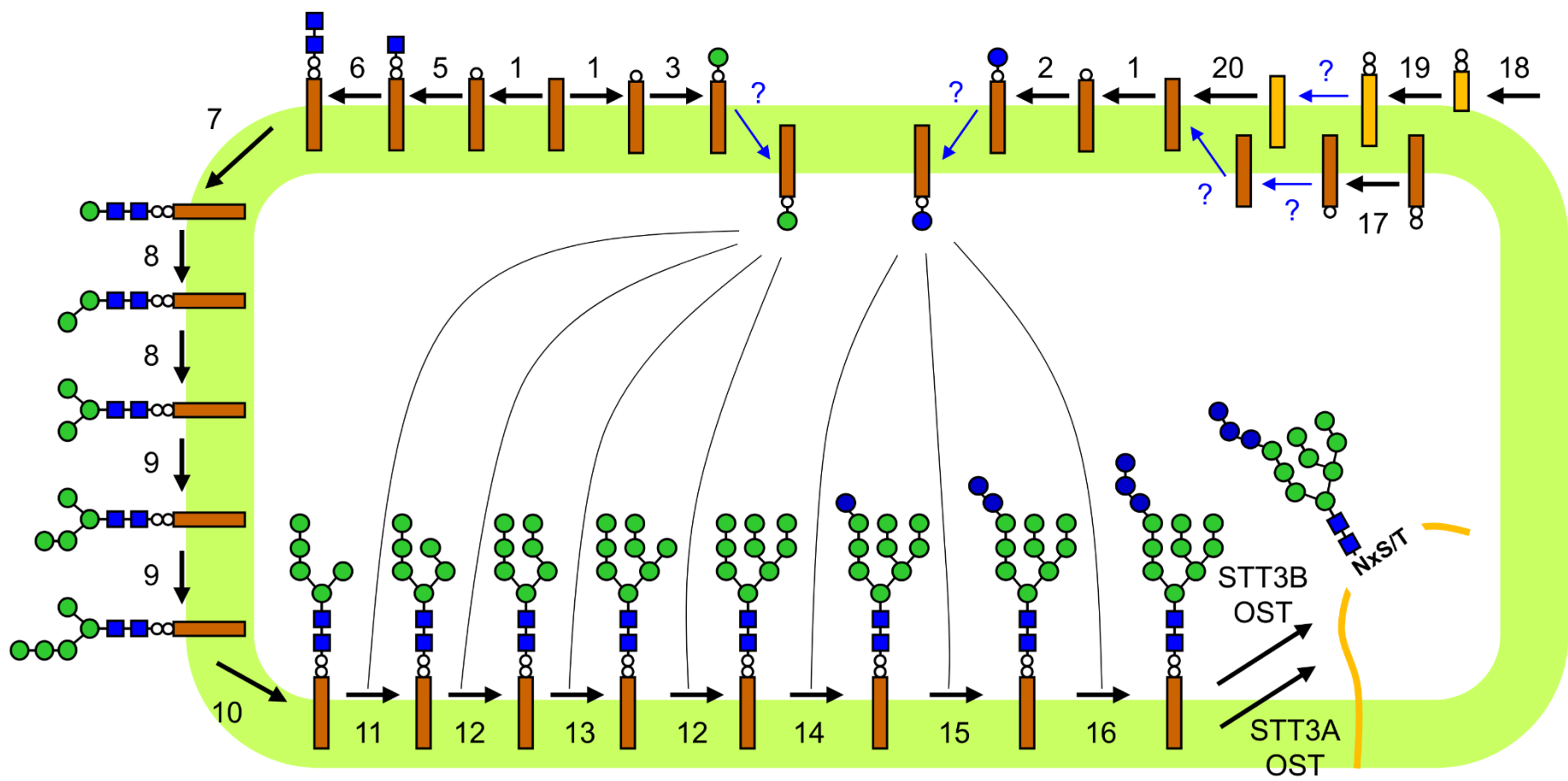
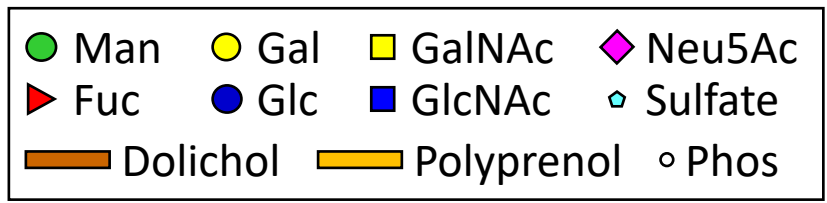
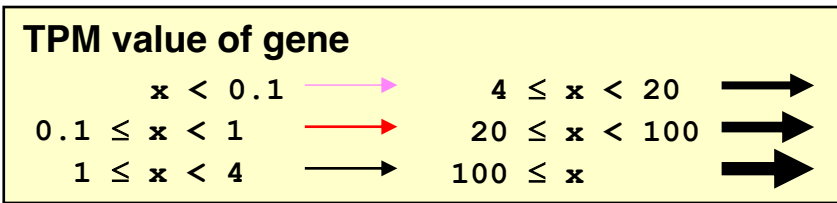
Analyze 951 glycan-related gene expression



Integrate the information to the glycan metabolic pathways

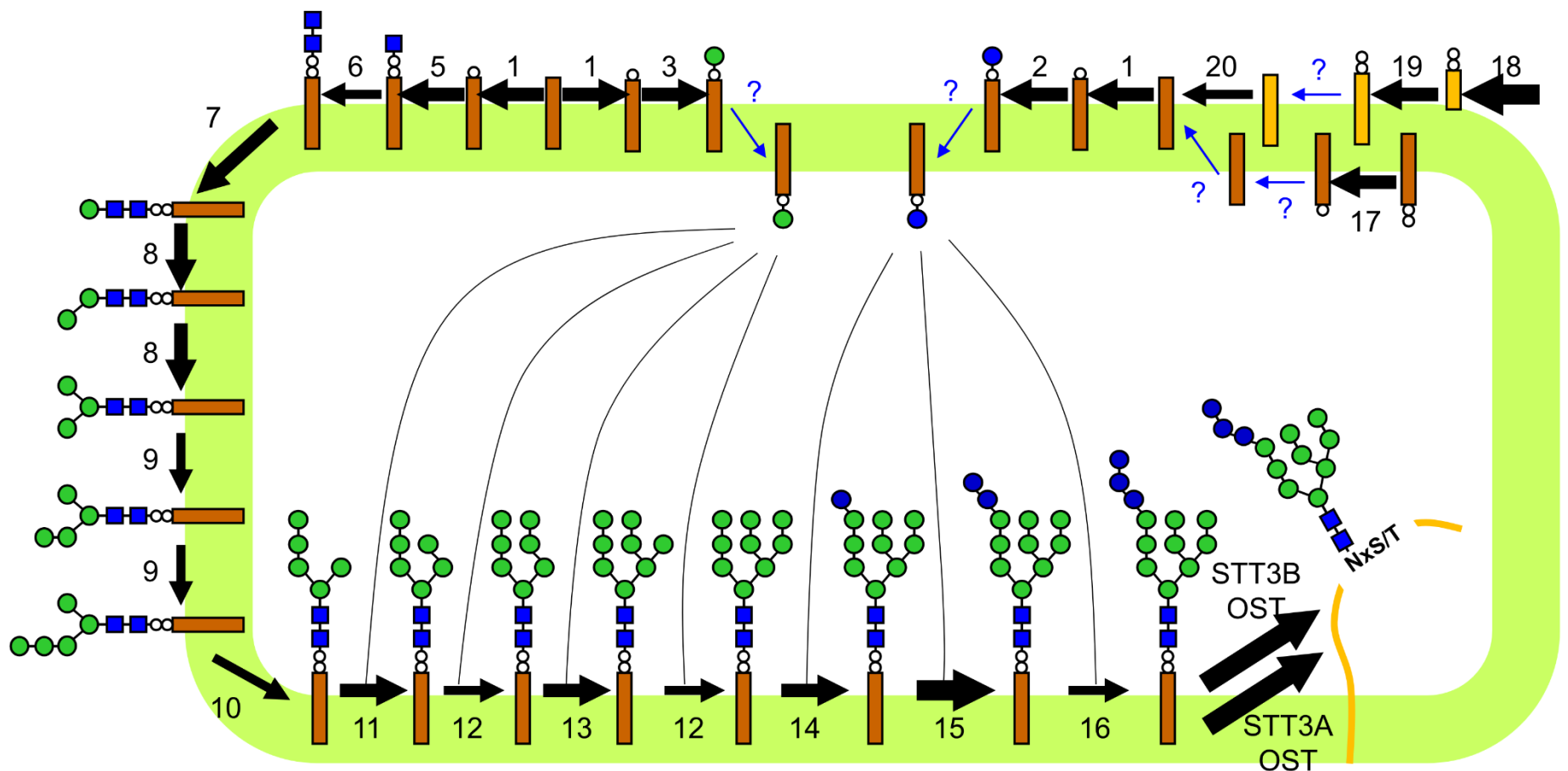
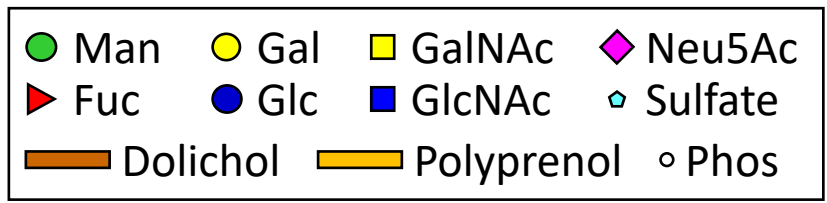
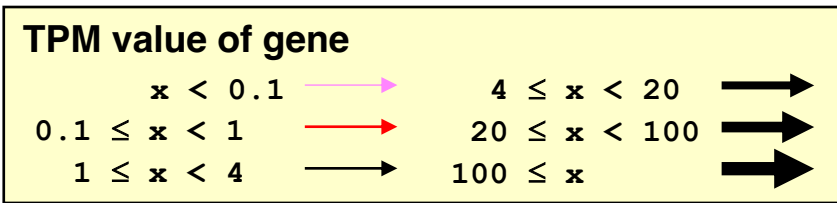
| TPM value of gene | Biosynthetic pathway |
|-------------------|--|
| $x < 0.1$ |  } Not expressed |
| $0.1 \leq x < 1$ |  } Very weak |
| $1 \leq x < 4$ |  } rowspan="4"> Expressed |
| $4 \leq x < 20$ |  |
| $20 \leq x < 100$ |  |
| $100 \leq x$ |  |
| Unknown gene |  |

LLO合成とオリゴ糖転移



LLO: lipid-linked oligosaccharide; LLO is a precursor for N-glycosylation.

HEK293細胞におけるLLO合成とオリゴ糖転移



LLOの合成系は細胞にとって基盤的で必須の経路

LLO: lipid-linked oligosaccharide; LLO is a precursor for N-glycosylation.

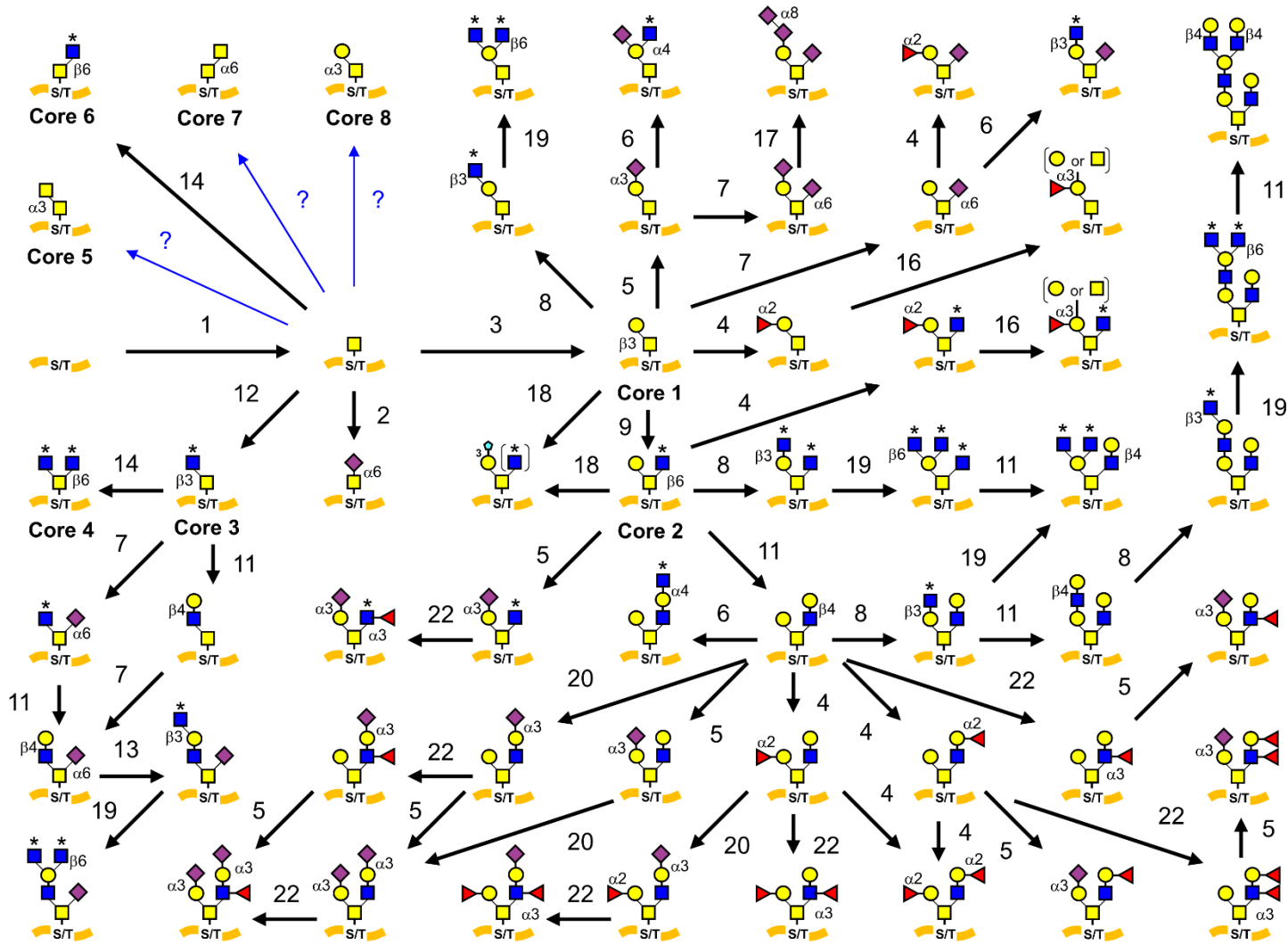
ムチン型O型糖鎖の生合成

TPM value of gene

- $x < 0.1$
- $0.1 \leq x < 1$
- $1 \leq x < 4$
- $4 \leq x < 20$
- $20 \leq x < 100$
- $100 \leq x$

Legend:

- Man
- Gal
- Fuc
- Glc
- GalNAc
- Neu5Ac
- GlcNAc
- Sulfate



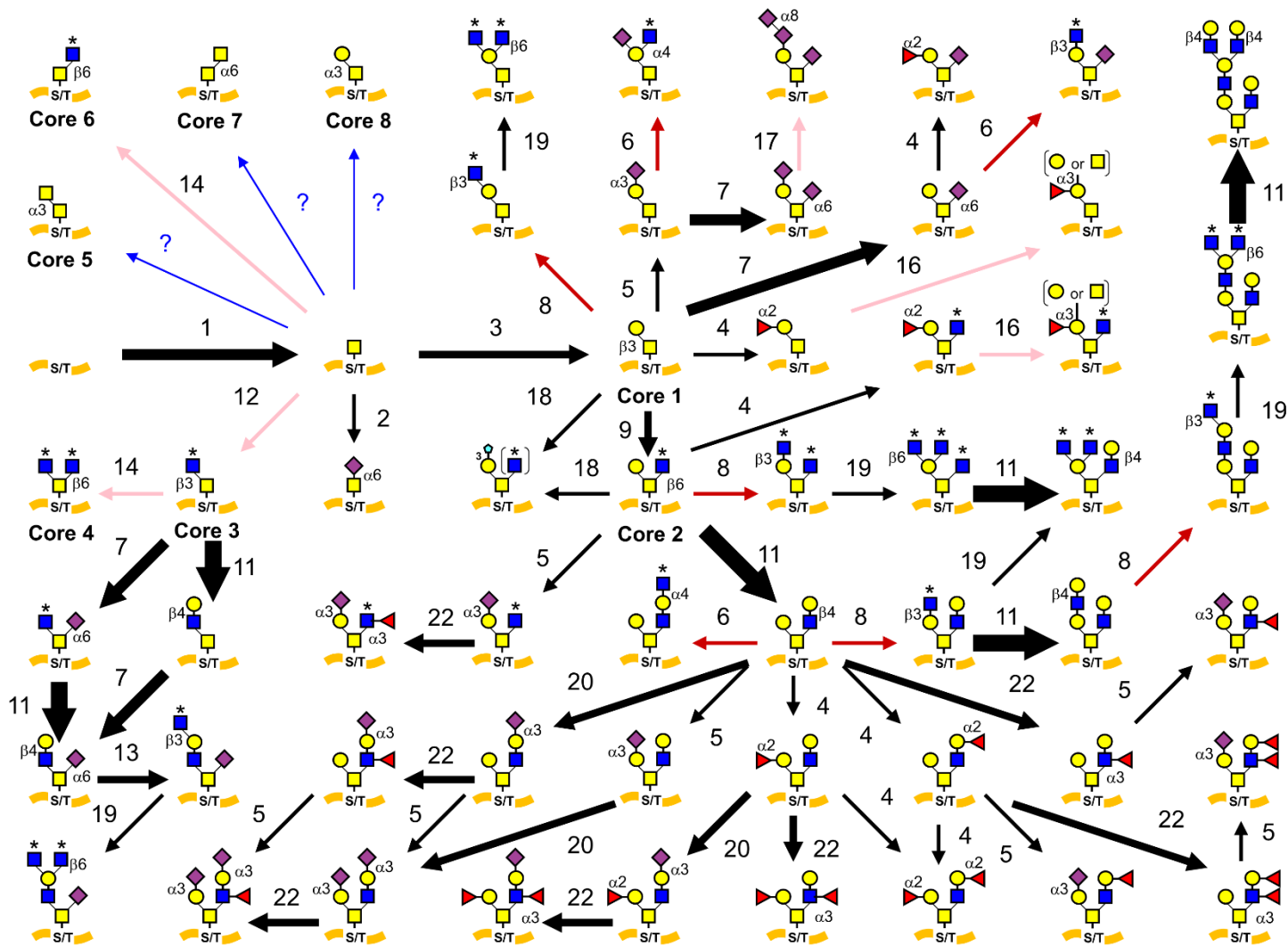
HEK293細胞におけるムチン型O型糖鎖の生合成

TPM value of gene

- $x < 0.1$ →
- $0.1 \leq x < 1$ →
- $1 \leq x < 4$ →
- $4 \leq x < 20$ →
- $20 \leq x < 100$ →
- $100 \leq x$ →

Legend:

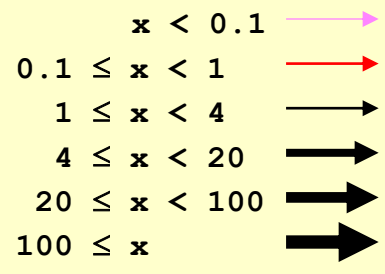
- Man
- Gal
- ▶ Fuc
- Glc
- GalNAc
- ◆ Neu5Ac
- GlcNAc
- ◆ Sulfate



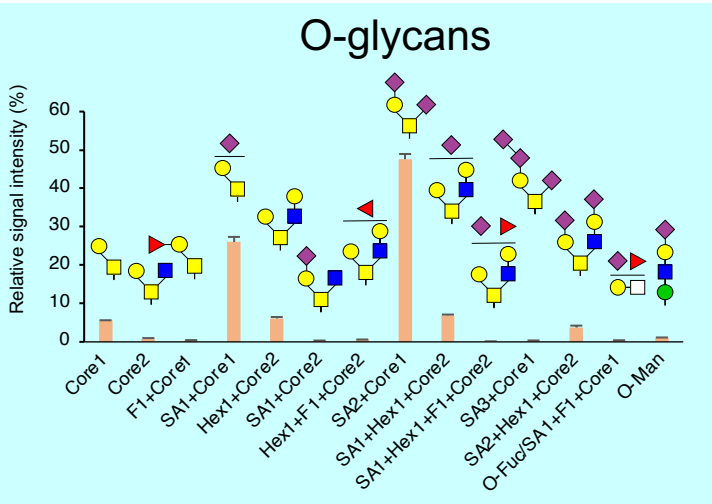
Several genes required for the pathways are not expressed in HEK293 cells

HEK293細胞におけるムチン型O型糖鎖の生合成

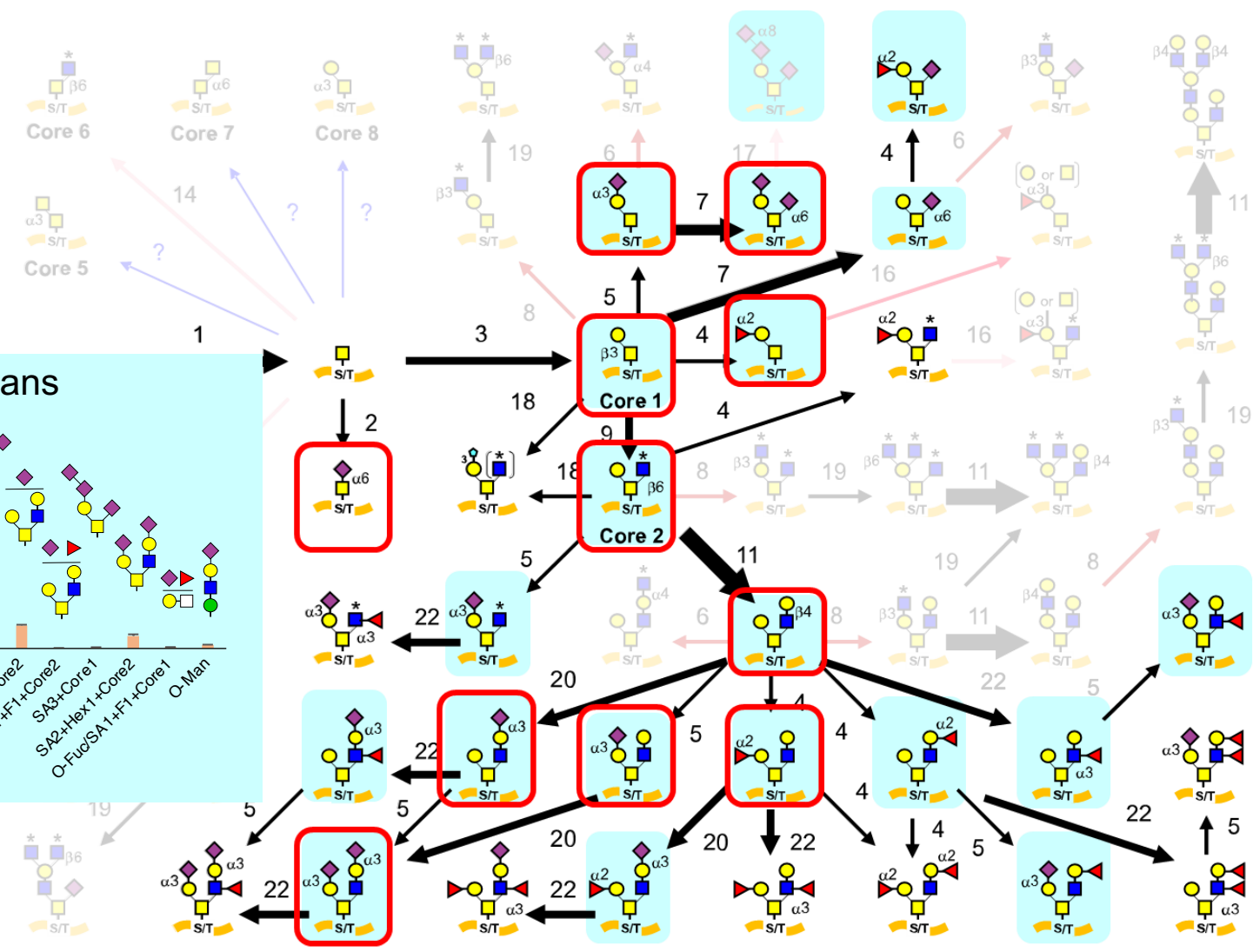
TPM value of gene



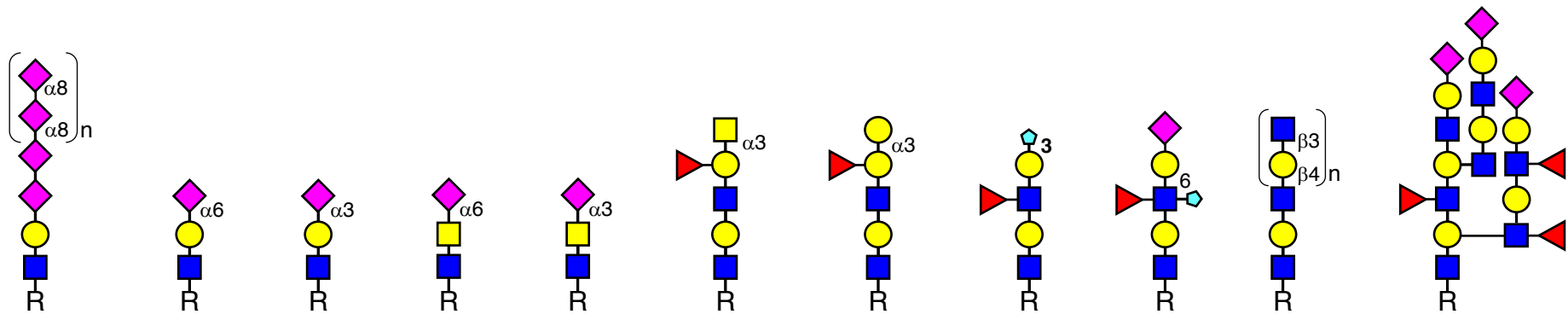
Razawi H et al. (2013)
Glycobiology 23: 935-945



Our glycomic analysis
 (ESI-MS)



N型糖鎖 / O型糖鎖 / 糖脂質の伸長とキャッピング構造



Polysialic acid

LacNAc

Lac-diNAc

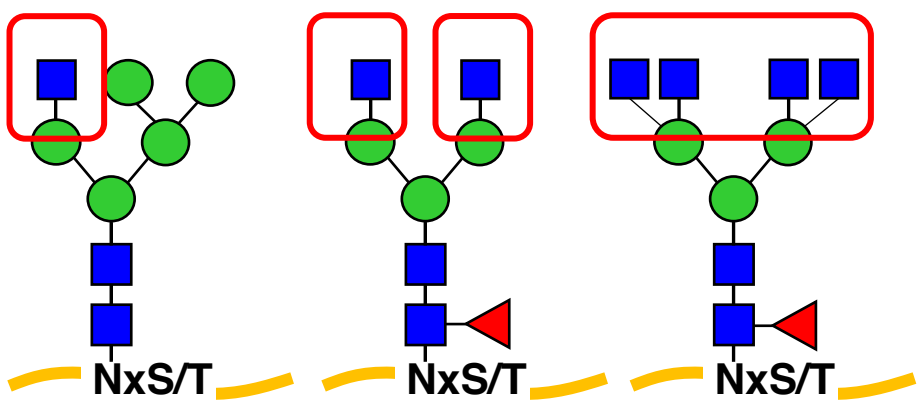
ABO

Lewis

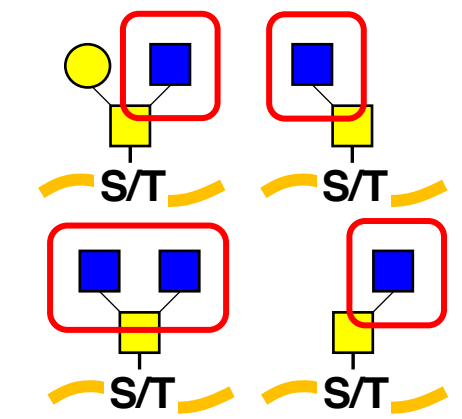
Polylactosamine



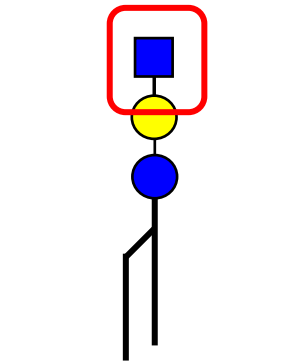
| | | | |
|-----|-----|--------|---------|
| Man | Gal | GalNAc | Neu5Ac |
| Fuc | Glc | GlcNAc | Sulfate |



N-glycans

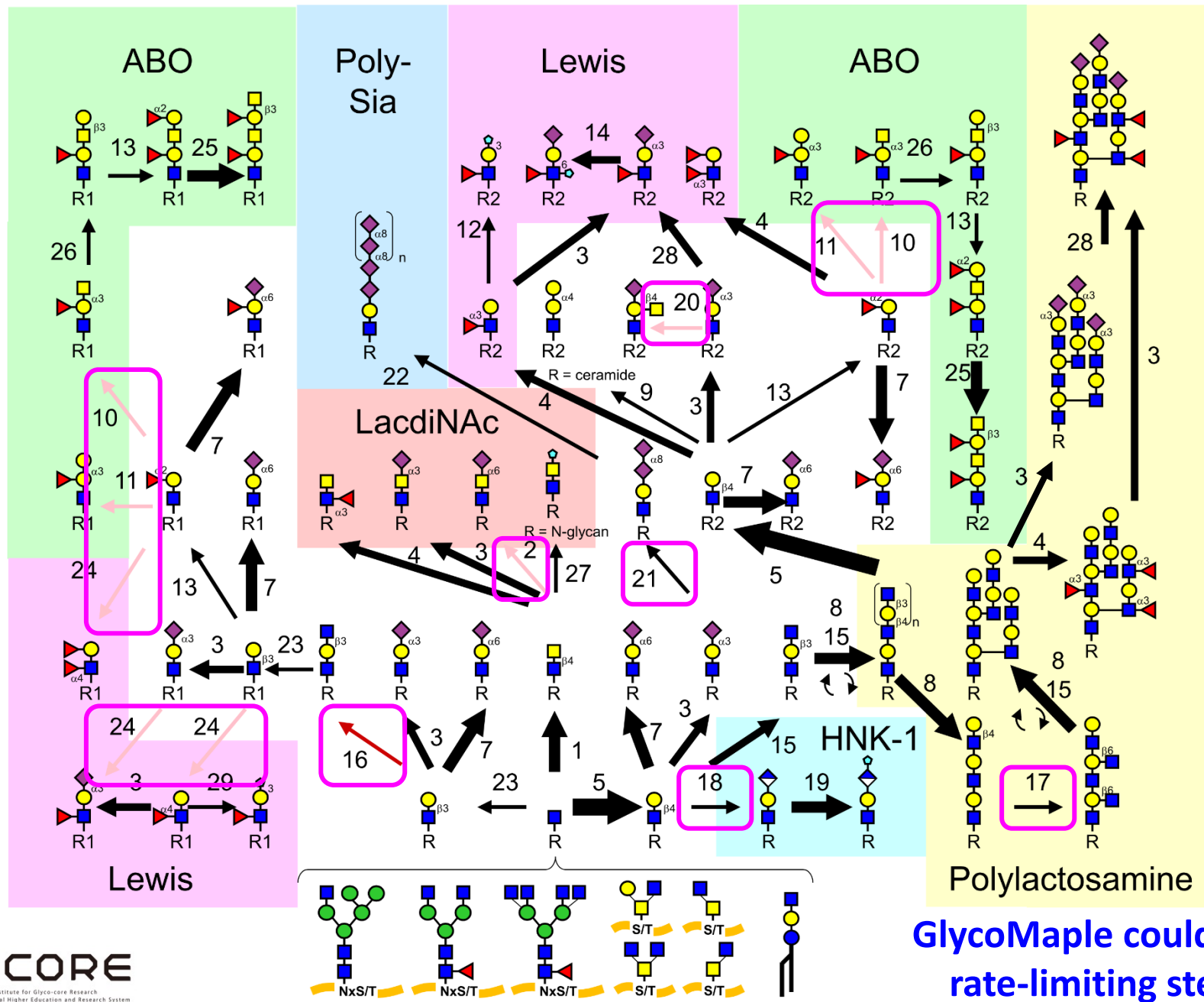


O-glycans



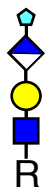
Glycolipids

HEK293におけるN型糖鎖 / O型糖鎖 / 糖脂質のキャッピング構造



GlycoMaple could find rate-limiting steps

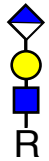
カスタム化: HEK293細胞におけるHNK-1エピトープの発現



**HNK-1
epitope**

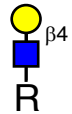


CHST10: 25.40



B3GAT1: 0.61

B3GAT2: 2.49



B4GALT1: 64.06

B4GALT2: 92.05

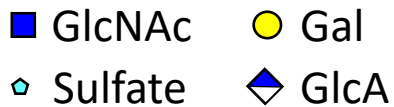


B4GALT3: 53.71

B4GALT4: 27.04



B4GALT5: 76.22

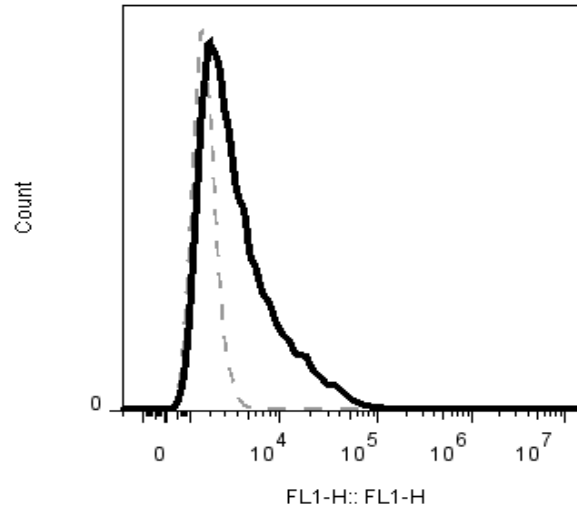


background

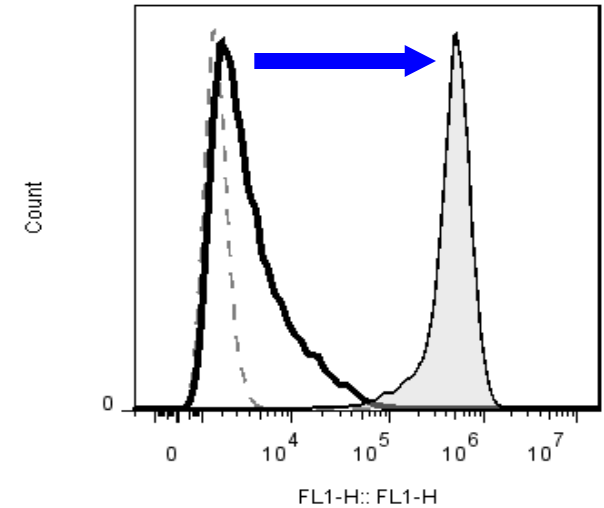
HEK293

+ B3GAT1

HEK293



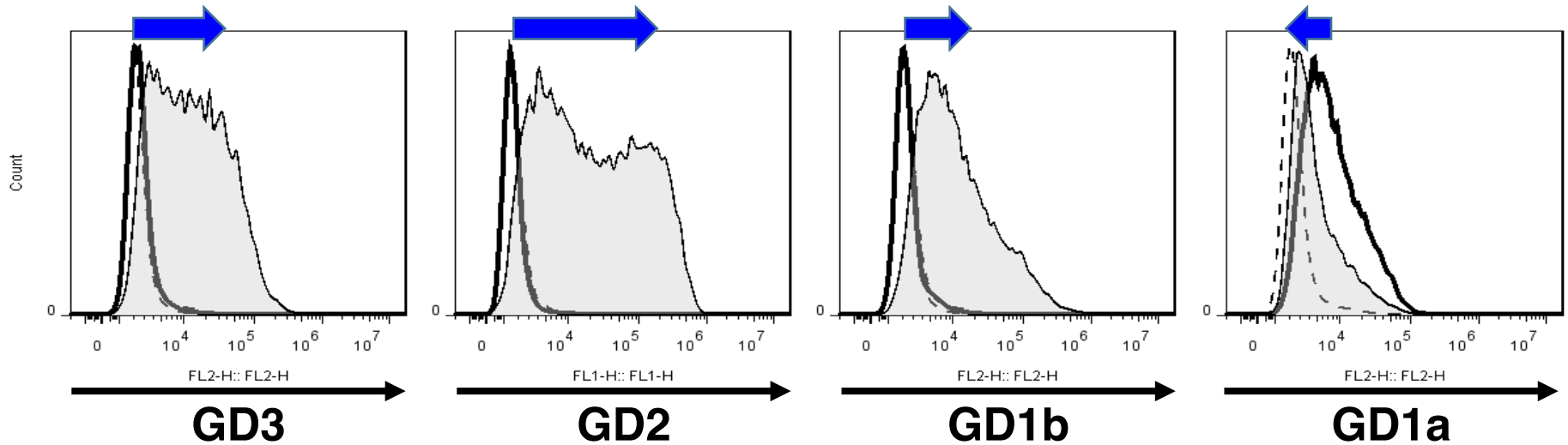
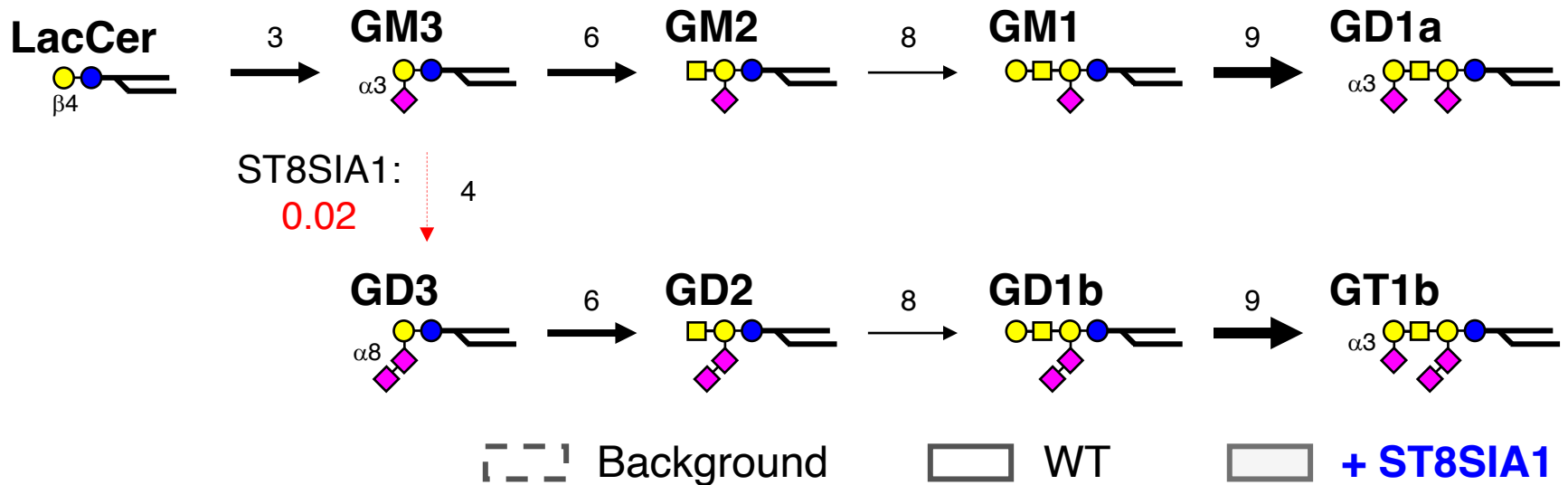
+ B3GAT1



HNK-1 epitope (CD57)

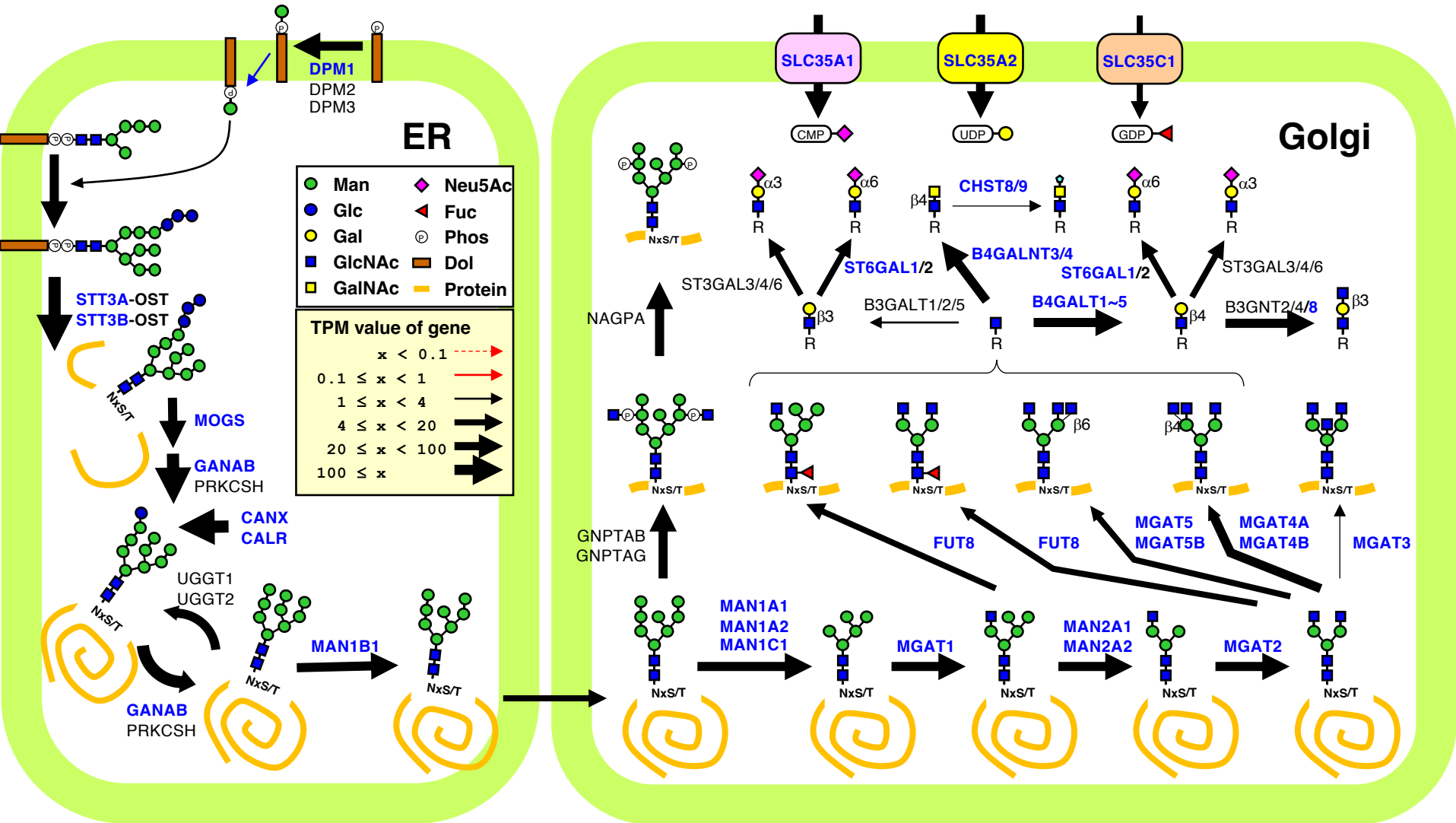
発現情報に基づいて、遺伝子を高発現あるいはKOすることで、細胞上の糖鎖構造をカスタマイズすることが可能

カスタム化: HEK293細胞におけるガングリオシドの発現



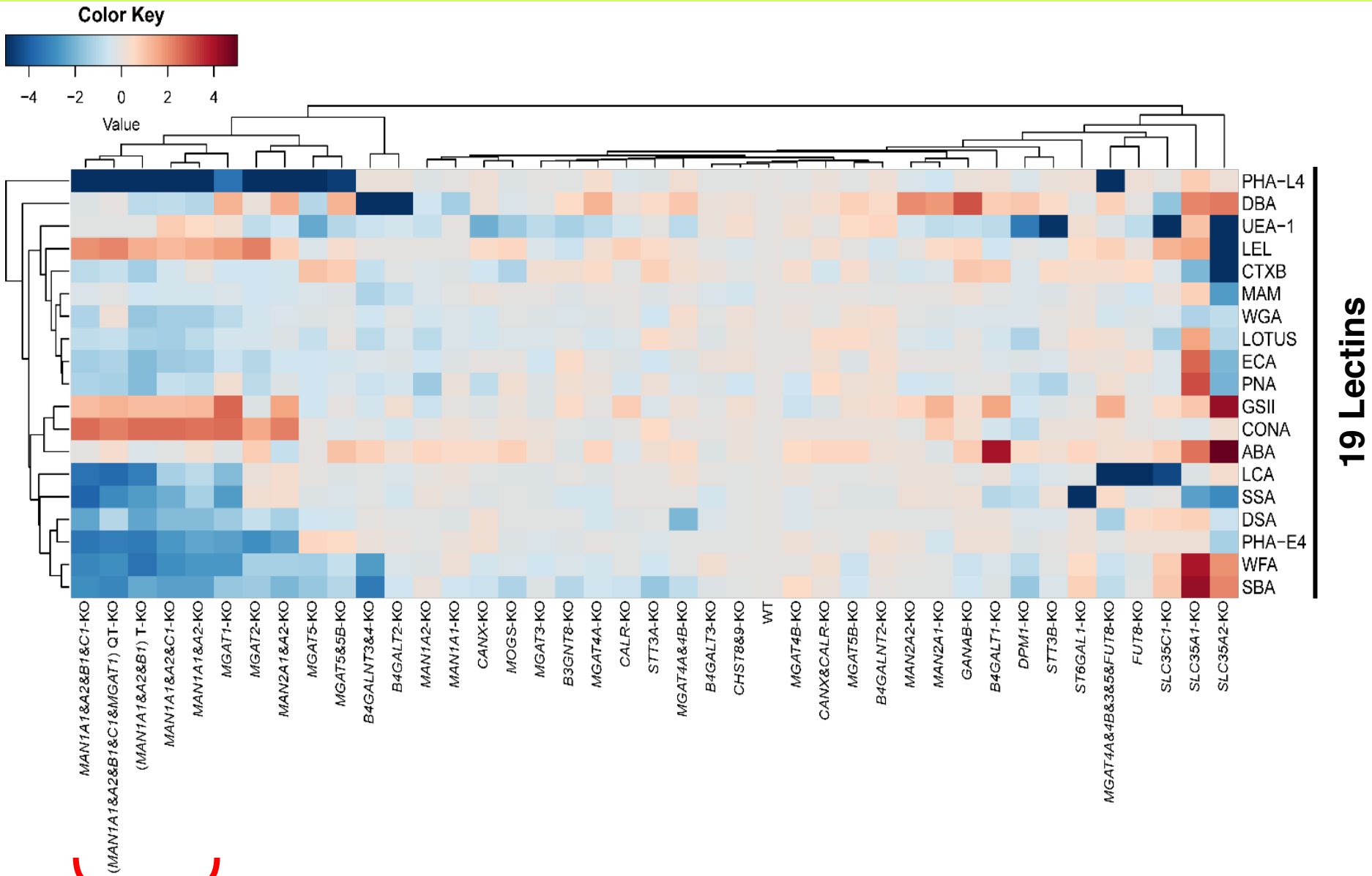
発現情報に基づいて、遺伝子を高発現あるいはKOすることによって、細胞上の糖鎖構造をカスタマイズすることが可能

糖鎖関連遺伝子のKO細胞ライブラリーの構築



Based on the gene expression profiles in HEK293 cells,
 We selected genes required for N-glycan processing (Blue)
We constructed 40 different gene KO cell library.

糖鎖関連遺伝子のKO細胞ライブラリーを用いたレクチン染色解析

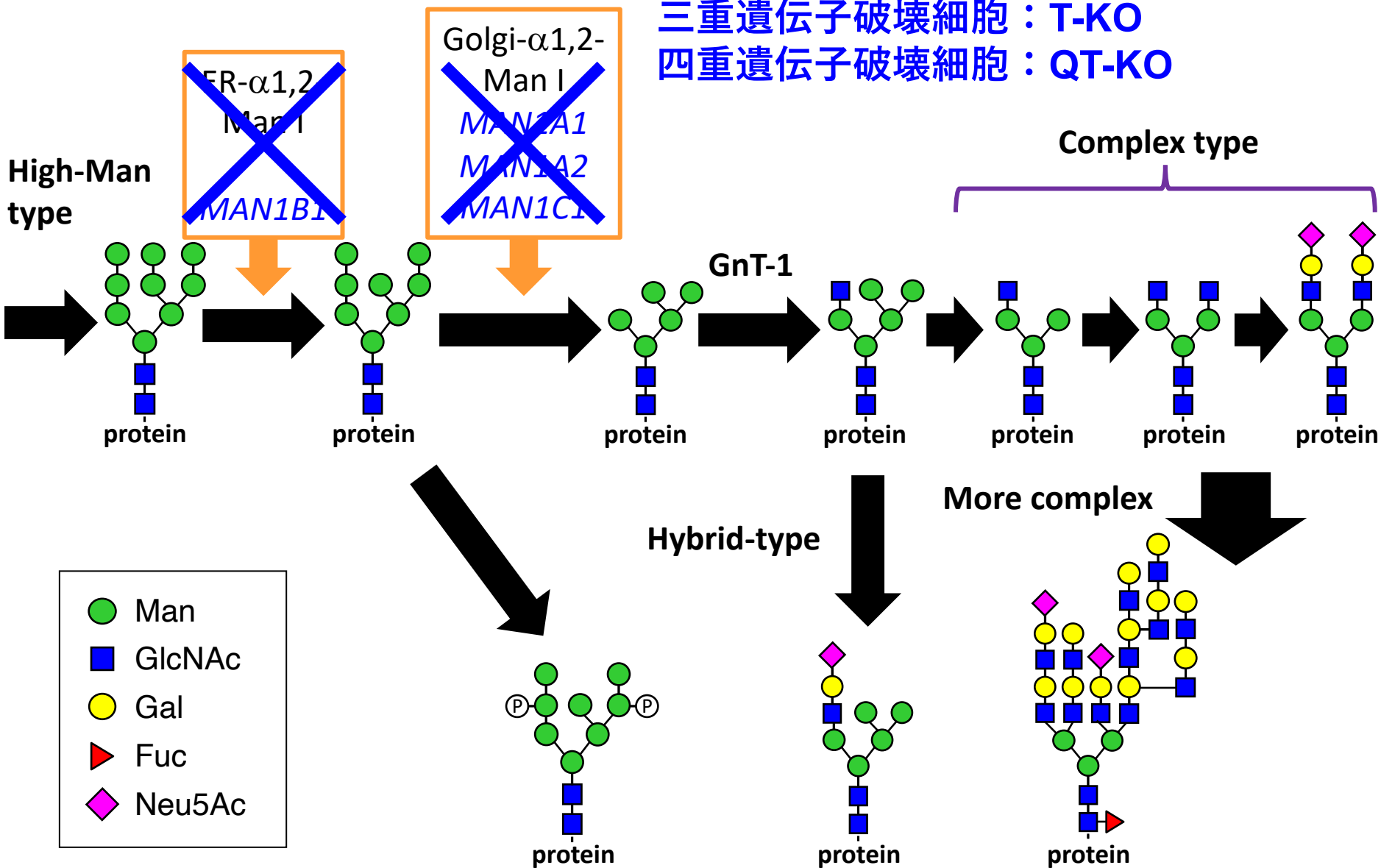


Mannosidase-I
Gene KO cells

40 Glyco-Gene KO cells

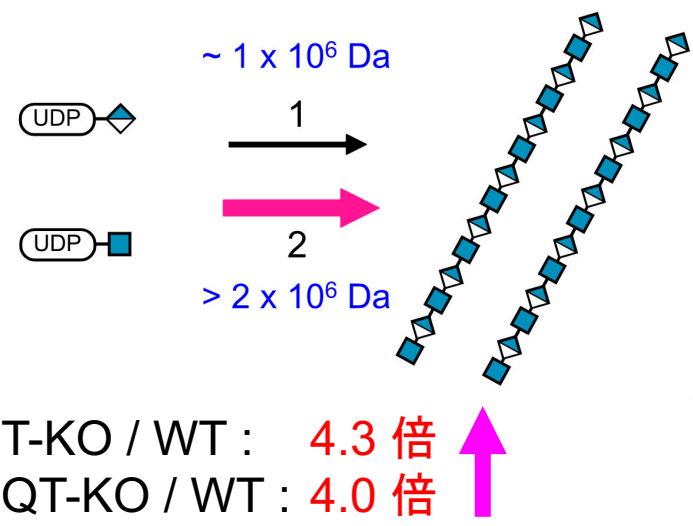
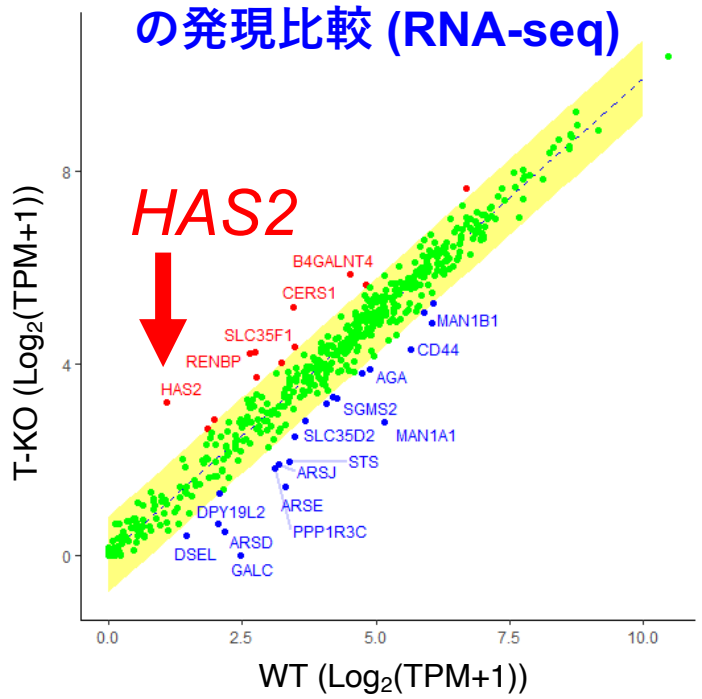
マンノシダーゼI遺伝子の多重破壊細胞

三重遺伝子破壊細胞：T-KO
 四重遺伝子破壊細胞：QT-KO

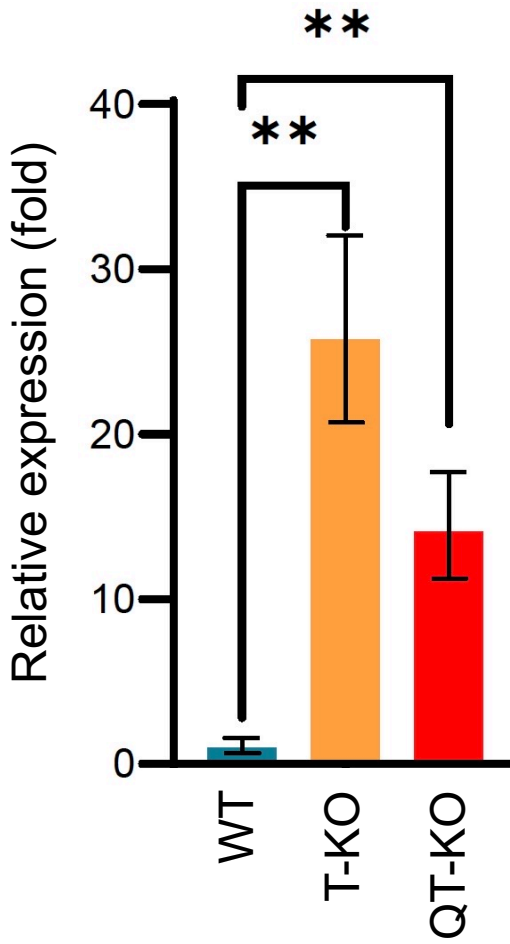


マンノシダーゼI破壊細胞ではヒアルロン酸が増加する

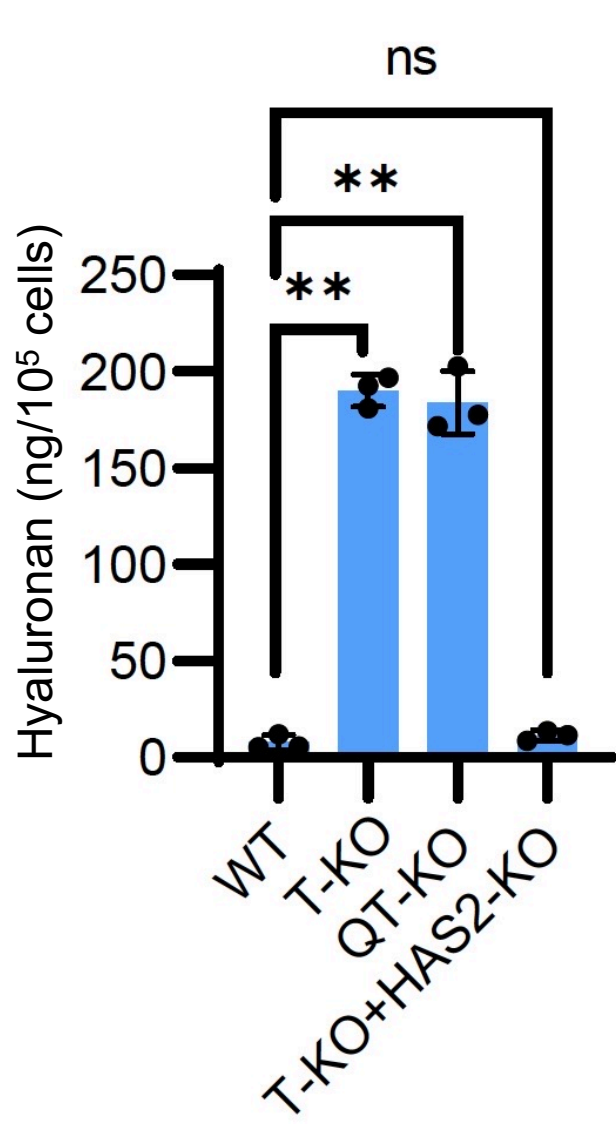
WTとT-KOでの糖鎖関連遺伝子の発現比較 (RNA-seq)



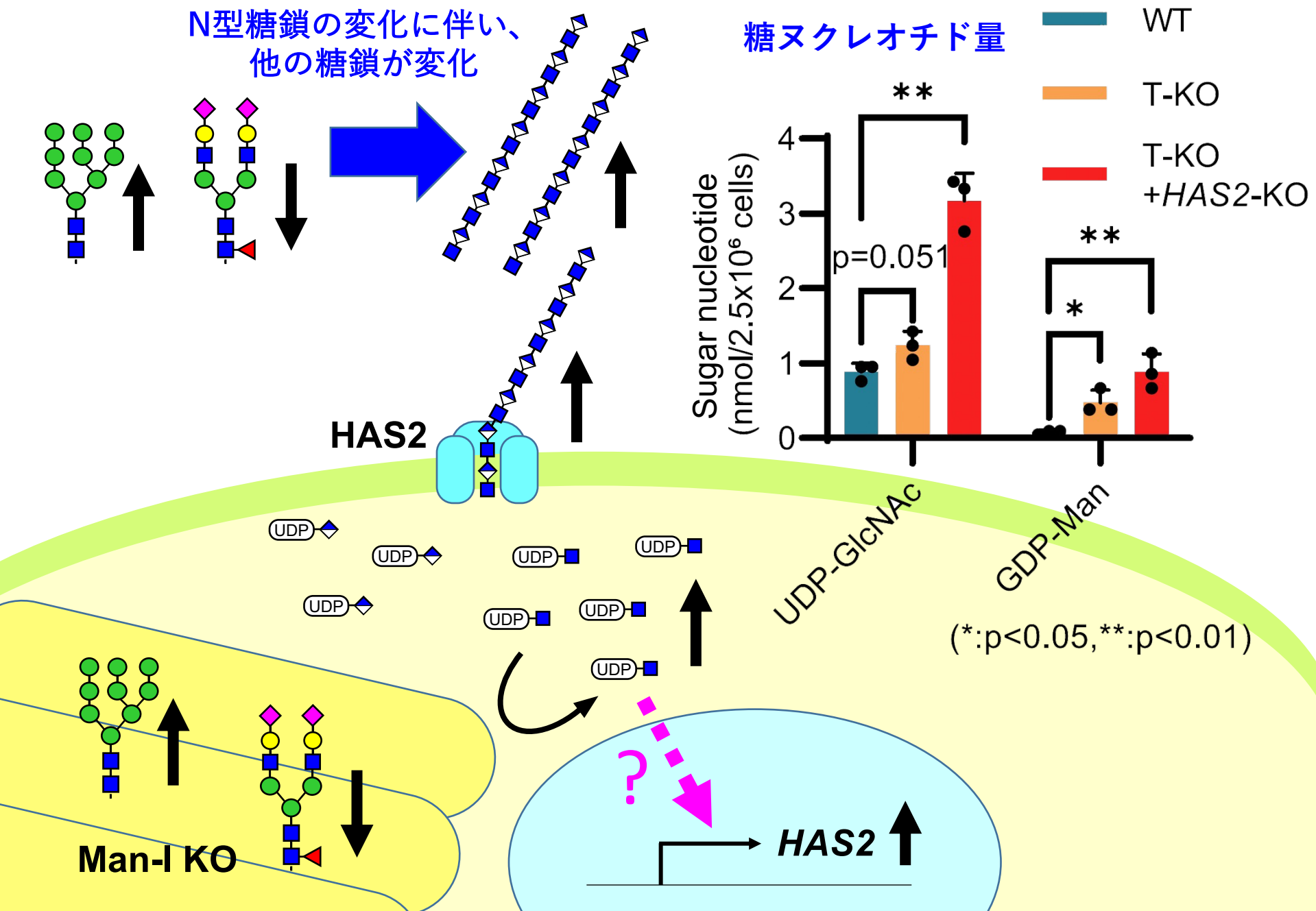
HAS2 mRNAの発現



ヒアルロン酸量



マンノシダーゼI破壊細胞ではヒアルロン酸が増加する



腎癌組織のRNA-seqデータを用いたGlycoMaple解析

TCGA (The Cancer Genome Atlas)

正常組織と疾患組織の比較

Kidney

Solid Tissue Normal
(Normal) N = 140

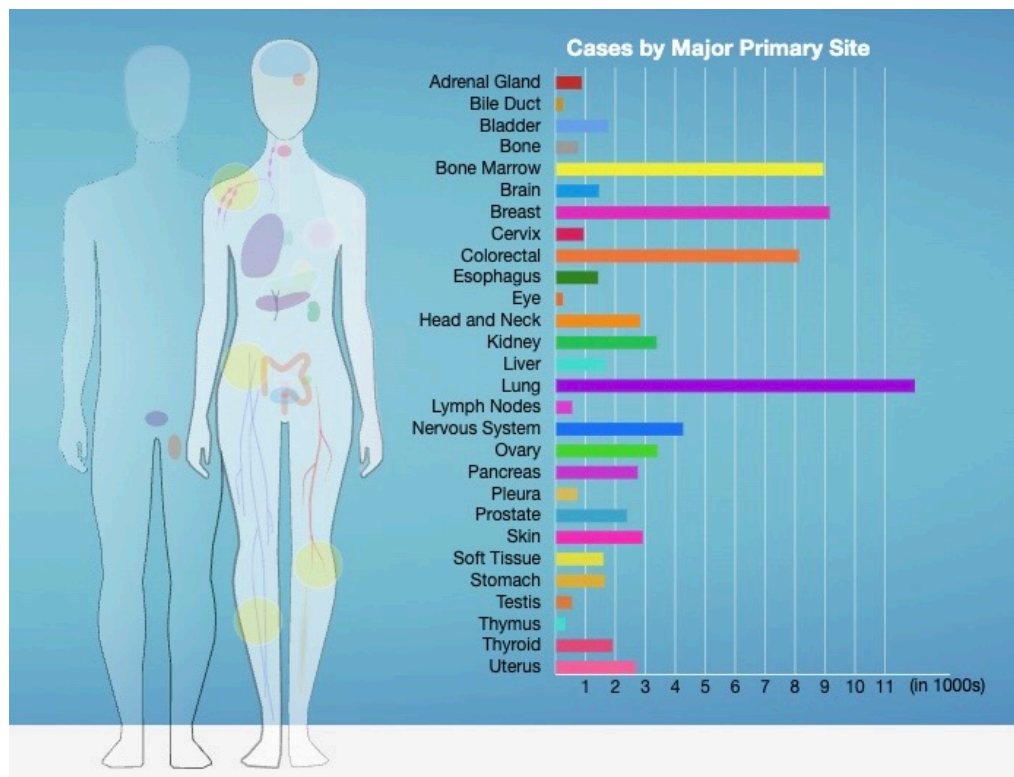
Clear cell carcinoma
淡明細胞型腎細胞癌
(ccRCC) N = 530

Papillary cell carcinoma
乳頭状腎細胞癌
(pRCC) N = 288



UCSC Xena

See the bigger picture



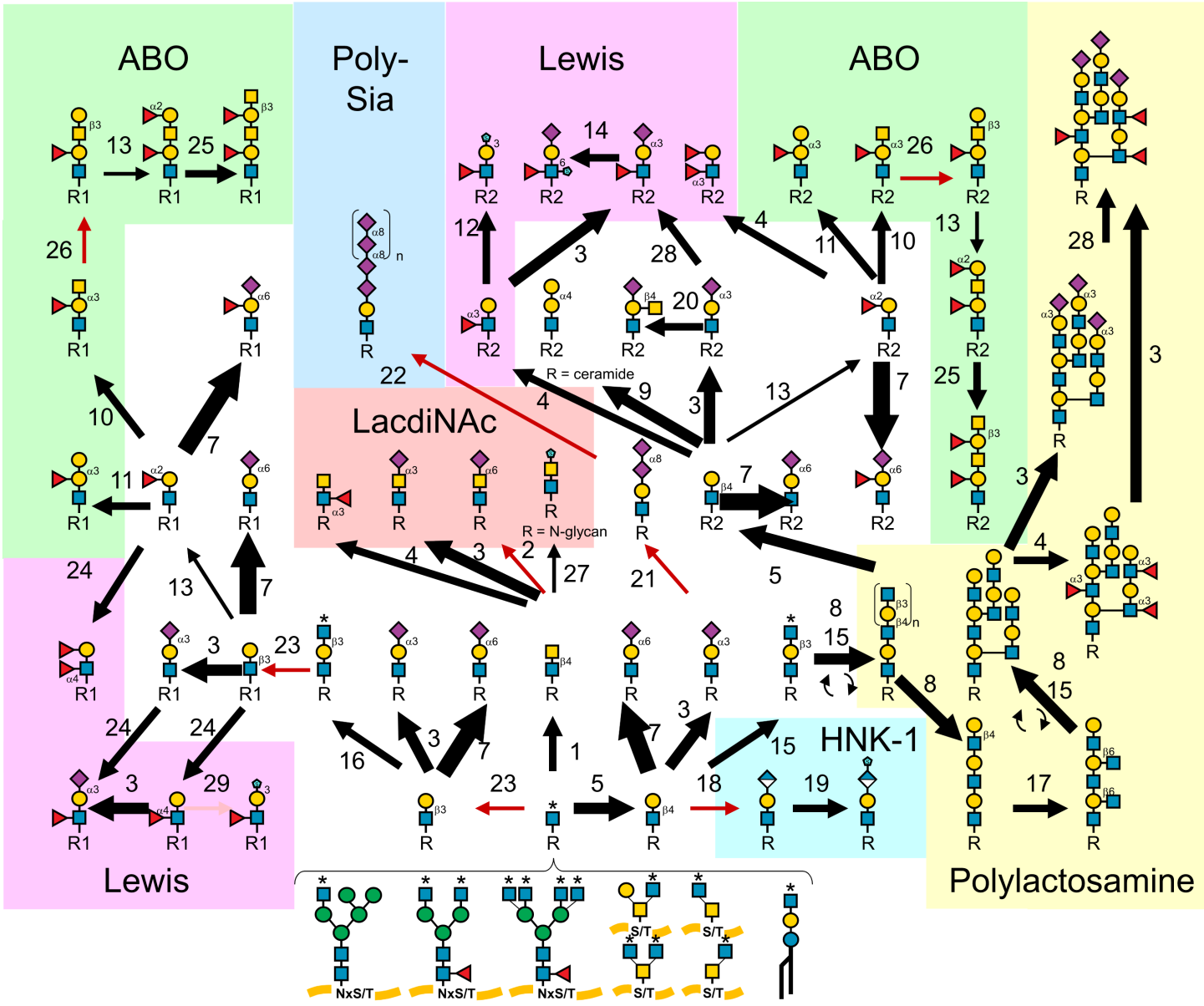
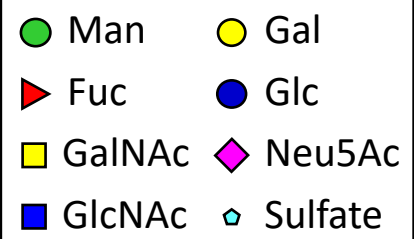
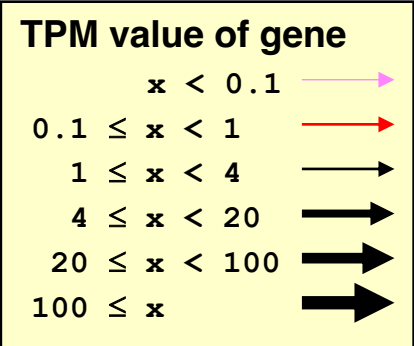
<https://portal.gdc.cancer.gov/>
<https://xenabrowser.net/>

腎癌組織におけるキャッピング構造の生合成

Normal tissue
(N = 140; Median)

V.S.
ccRCC
(N = 530; Median)

V.S.
pRCC
(N = 288; Median)



腎癌組織におけるキャッピング構造の生合成

Normal tissue

(N = 140; Median)

V.S.

ccRCC

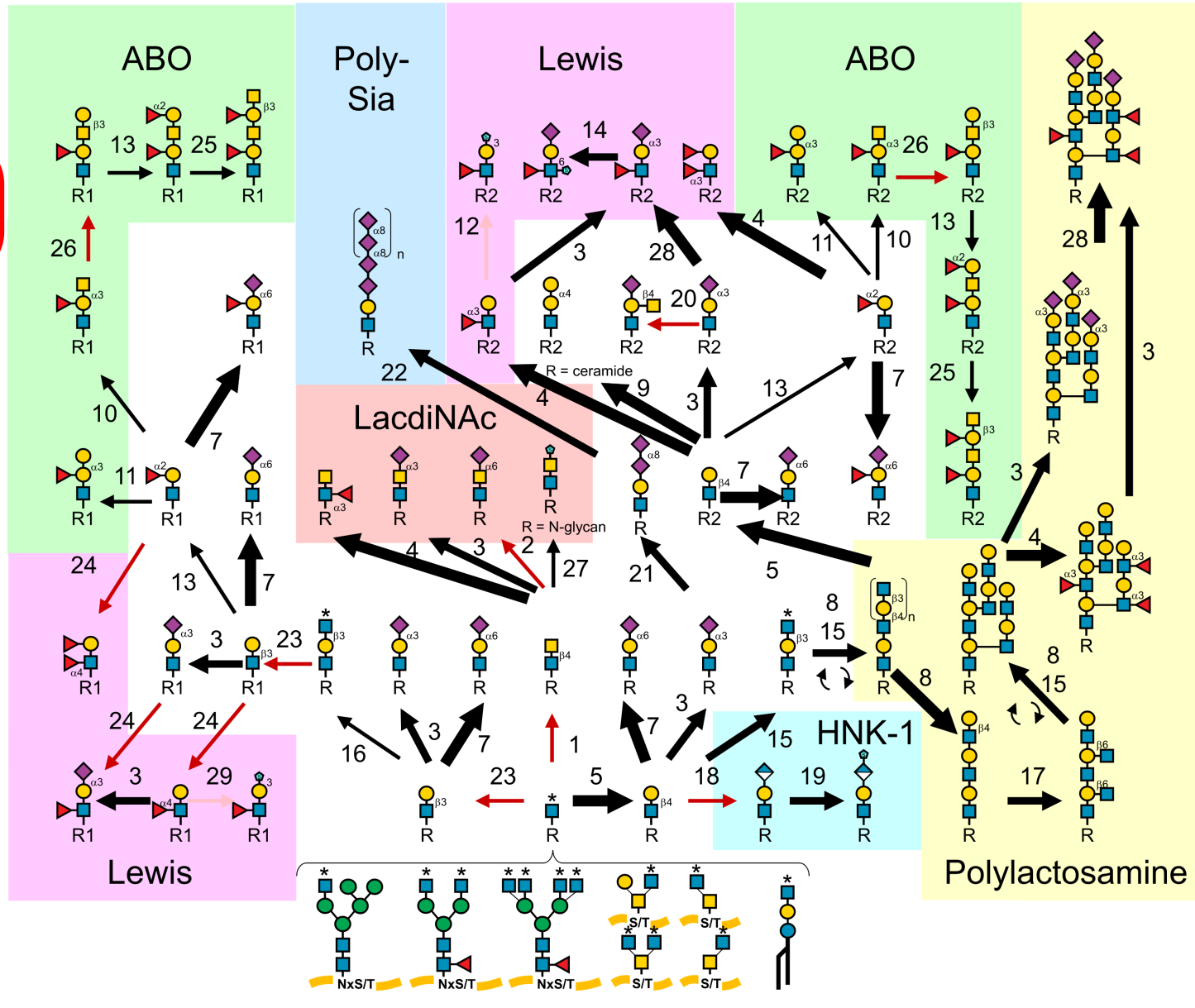
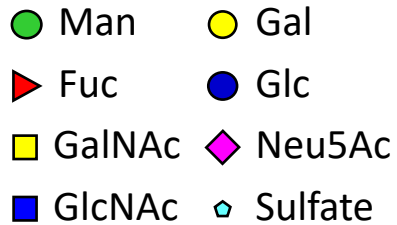
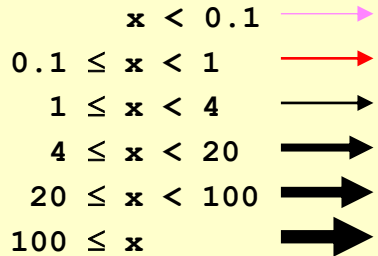
(N = 530; Median)

V.S.

pRCC

(N = 288; Median)

TPM value of gene



腎癌組織におけるキャッピング構造の生合成

Normal tissue
(N = 140; Median)

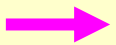
V.S.


ccRCC
(N = 530; Median)

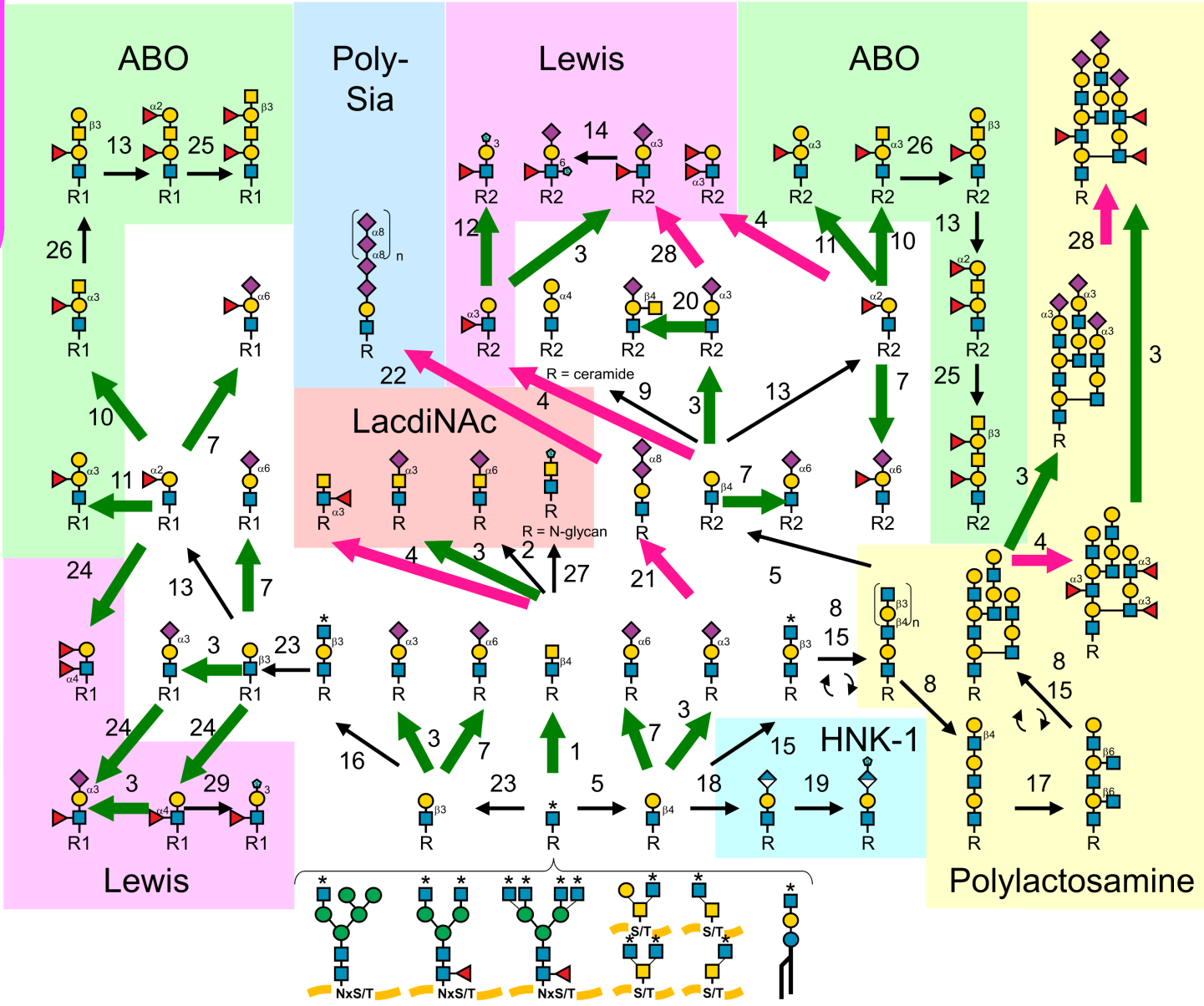
V.S.

pRCC
(N = 288; Median)

$\frac{TPM_{tumor} + 1}{TPM_{normal} + 1}$

≥ 2 

< 0.5 



腎癌組織におけるキャッピング構造の生合成

Normal tissue
(N = 140; Median)

V.S.

ccRCC
(N = 530; Median)

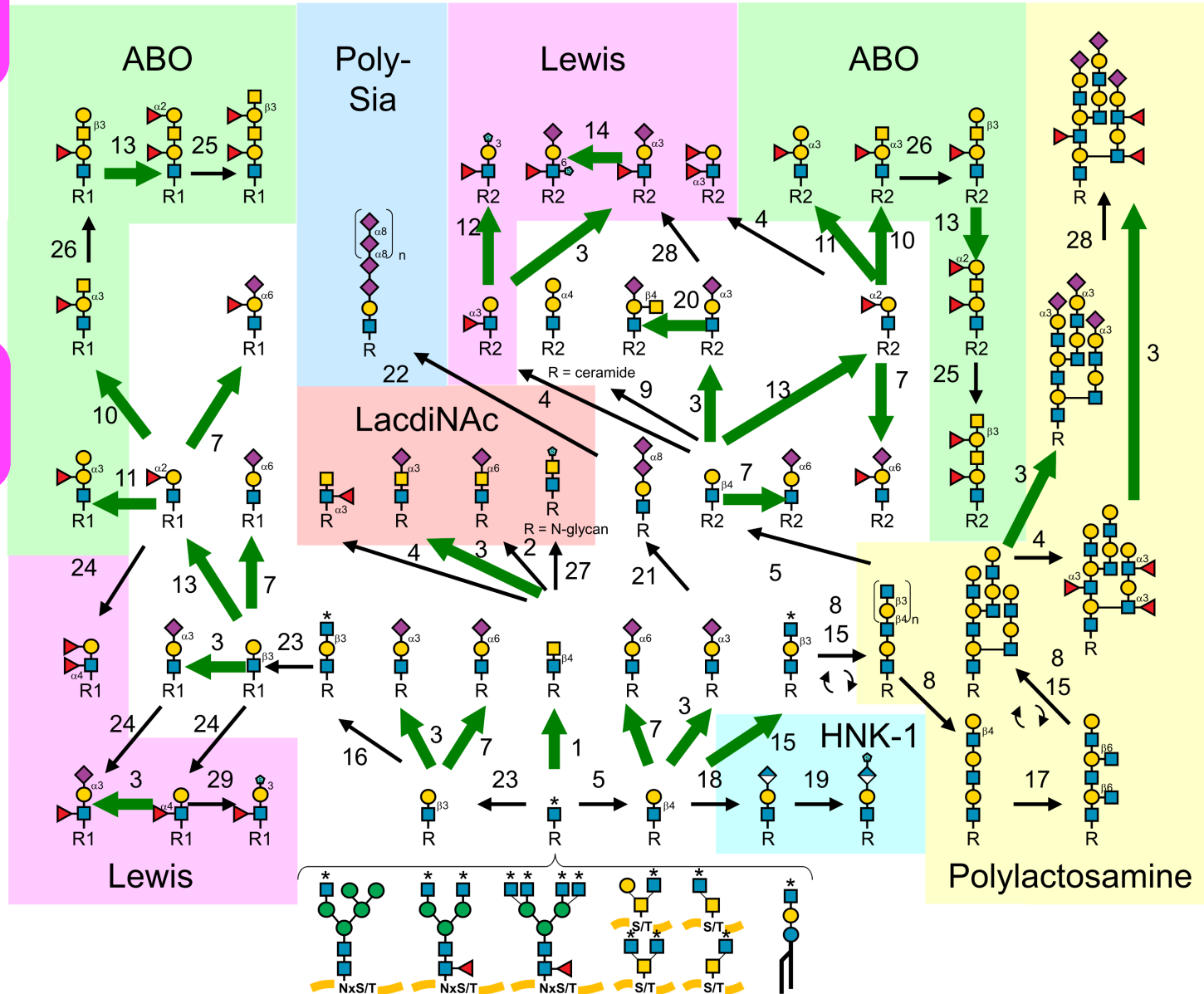
V.S.

pRCC
(N = 288; Median)

$\frac{TPM_{tumor} + 1}{TPM_{normal} + 1}$

≥ 2

< 0.5



Conclusion 2

糖鎖関連遺伝子のリスト化、マッピング・ツールの開発を行った。
糖鎖関連遺伝子の発現解析により、糖鎖構造の推定を行った。

糖鎖構造解析の補助：

推定糖鎖構造の同定をスムーズに行うことができる
遺伝子の発現パターンから異性体の推定が可能

糖鎖改変（リプログラミング）：

遺伝子の発現パターンに基づいて、
糖鎖のシンプル化、糖鎖のカスタマイズ化

新たな糖鎖の制御、役割の発見：

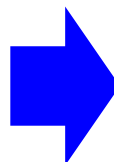
N結合型糖鎖－糖脂質間の補完機構
正常組織、疾患組織における糖鎖変化

糖鎖研究の普及：発現情報 → 糖鎖研究への足掛かり

謝 辞

Key Laboratory of
Carbohydrate Chemistry & Biotechnology
Jiangnan University (2014 - 2022)

Yi-Fan Huang



Institute for Glyco-Core Research (iGCORE)
Gifu University (2022 -)



Osaka University

Taroh Kinoshita

Soka University

Kiyoko F. Aoki-Kinoshita

Sachiko Akase

University of Georgia

Kazuhiro Aoki (MCW, now)

Michael Tiemeyer

AIST

Yasunori Chiba

Gifu University

Yasuhiko Kizuka

Meijo University

Shuji Mizumoto

Jiangnan University

Xiao-Dong Gao



GlycoMaple

最後まで御覧いただき、ありがとうございました。