MINIREVIEW (TIGG-05/02/90-MR-3)

**Expression of Human Glycoproteins in Recombinant Mammalian Cells:
towards Genetic Engineering of N- and O-Glycoproteins**

Harald S. CONRADT, Bernd HOFER and Hansjoerg HAUSER

Department of Cell Biology and Genetics, GBF-Gesellschaft fuer Biotechnologische
Forschung mbH, Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig, FRG, FAX: 49-531-6181202

The expression of foreign genes in various host systems using recombinant DNA technology allows for the production of human proteins of therapeutic interest on a large scale. Most of the clinically important human proteins are glycoproteins and their biotechnological preparation therefore requires a mammalian host cell to generate a protein with the correct posttranslational modification. The role of carbohydrates attached to proteins are discussed with respect to their effect on bioactivity, half-life in vivo, interaction with specific cell membrane receptors (modulation of specific targeting to cellular receptors of distinct cell subsets?), solubility, stability against proteolytic degradation, as well as antigenic properties etc.

The complete description/evaluation of the in vivo and in vitro biological properties of glycoproteins requires detailed knowledge of the structure of both the polypeptide and the carbohydrate portion. Apart from academic investigations where interest lies in the application of recombinant DNA technology to glycoprotein research, much attention has been given to the production of recombinant glycosylated polypeptides by commercial biotechnological companies. Potential problems include the laborious primary structural analysis of carbohydrate as well as batch analysis of biotechnologically produced glycoproteins destined for subsequent clinical use.

It has become possible within only the past four years, to answer comparatively simple questions associated with the expression of recombinant (wild-type) glycoproteins from heterologous mammalian cells at the level of their oligosaccharide primary structures. Major considerations related to biotechnology of glycoproteins are;

- Stability of producer cell lines?
- Is protein glycosylation related to cellular productivity?
- Are variations in oligosaccharide structure related to different physiological conditions during cell culture (energy supply, growth factor requirements, cells grown in suspension vs. adherent cells, low protein media etc.)?
- Leaky cells at high densities
- Presence of antigenic oligosaccharide structures in recombinant glycoproteins

At the laboratory scale, adequate control of culture conditions is usually achieved by using standard media and common tissue culture flasks at rather low cell density.

In principle, the expression of foreign glycoproteins in well defined glycosylation-mutant cell lines (1) should lead to homogeneous glycoproteins and should provide a means to study and to evaluate the biological properties of distinct "glycoforms" of a polypeptide.

The expression of glycoproteins

ミニレビュー (TIGG-05/02/90/MR-3)

リコンビナント哺乳動物細胞におけるヒト糖タンパクの発現：
N-及びO-糖タンパクの遺伝子工学にむけて

Harald S. CONRADT, Bernd HOFER, Hansjorg HAUSER

1. はじめに

リコンビナントDNAテクノロジーを用い、いろいろな宿主細胞で外来遺伝子を発現させることで、治療目的でのヒトのタンパクの大量生産が可能となった。多くの臨床的に重要なヒトのタンパクは糖タンパクであり、それ故にそれらのバイオテクノロジーによる生産には翻訳後の修飾を正しく受けたタンパクを生産する為に、哺乳動物細胞が必要である。タンパクに結合した糖鎖の役割については、生物活性、in vitroにおける寿命、細胞膜に存在するレセプターとの相互作用(異なった cell subsetの細胞のレセプターに対する特異的なターゲッティングの調節?)、溶解性、タンパク分解酵素による分解に対する安定性、抗原性などの観点から議論される。

糖タンパクのin vivoとin vitroの生物学的性質の完全な記述と評価にはポリペプチドと糖鎖の両方の構造の詳細な知識が必要である。リコンビナントDNAテクノロジーの糖タンパクへの応用に興味がおかれている学問的研究とは異なって、商業的なバイオテクノロジーファームではリコンビナントDNAテクノロジーによるグリコシル化されたポリペプチドの生産に力点が置かれている。従って、厄介な予備的な糖鎖の一次構造の分析と共に、次の臨床

的応用の為の糖タンパクのバイオテクノロジーによる生産の際のバッチ分析が問題となる。

やっと、この過去4年の間に、ヘテロな哺乳動物細胞によるリコンビナント(野生型)糖タンパクのオリゴ糖の一次構造レベルでの発現に関する比較的簡単な質問に答える事が可能になった。糖タンパクのバイオテクノロジーに関係した主な問題点といったものとして、下記の事柄が挙げられる。

-細胞株の安定性

-タンパクのグリコシル化は細胞の生産性に関係があるかどうか?

-糖鎖構造における変異は細胞培養の生理的条件(エネルギーの供給、成育因子要求性、浮遊培養と静止培養による差、低タンパク培地等)と関連しているのか?

-高い細胞濃度におけるリーキな細胞(生産効率の低下)

-リコンビナントタンパクの抗原性糖鎖構造の存在

実験室のスケールでは通常、標準の培地と普通の組織培養フラスコを用いて比較的低い細胞濃度で細胞培養の適当な条件が達成されている。

原理的にいって、良く研究されたグリコシル化変異細胞株で異種糖タンパクの発現(1)を

in heterologous mammalian cells represents a valuable tool to gain more insight into the cellular regulatory mechanisms that govern this complex type of posttranslational modification of proteins. In view of the possible roles of oligosaccharide structures discussed with respect to a wide range of biological phenomena (although in only rare cases has the significance of protein glycosylation been unequivocally demonstrated) it may be attractive e.g. to genetically engineer novel glycoproteins with possible "improved" biological properties (e.g.: to build in sites for attachment of N- or O-linked oligosaccharides). However, we do not know how the amino acid sequence of a polypeptide dictates its 3D-structure and we do not understand the rules by which the 3D-structure determines protein function. We are a long way from understanding how carbohydrates attached to polypeptides interact with the protein backbone and form 3D-structures with specific biological activities.

"Natural" glycoproteins

The enormous variety of carbohydrate structures and microheterogeneity encountered in many so-called "natural glycoproteins" have made it difficult to define the specific biological role of this type of post-translational modification for most of these proteins. This complicates efforts to answer the question as to which type of oligosaccharide structure the recombinant counterpart requires when it is to be produced for pharmaceutical purposes; e.g. antithrombin III from human serum contains NeuAc preponderantly in α 2-6 linkage and lacks fucose at the proximal GlcNAc (but contains some fucose α 1-3 linked to GlcNAc, (2)). The recombinant protein from CHO cells as well as from BHK cells contains all

of the NeuAc in α 2-3 linkage, oligosaccharides are almost completely fucosylated and contain a higher amount of tri-antennary oligosaccharides (3) compared to human serum derived AT III. A challenging situation arises in the production of recombinant glycoproteins such as human lymphokines which play an important regulatory role in the complex network of the immune system. Most of the lymphokines are glycoproteins. Their oligosaccharide structure has been shown (4,32) to depend on the induction protocol used to stimulate cells for secretion and on the differentiation state of the cells (subset specific glycosylation). IFN- γ contains two potential N-glycosylation sites at Asn 25 and Asn 97. When secreted from primary T lymphocytes, all the IFN- γ Asn-25 linked oligosaccharides bear proximal fucose, NeuAc is α 2-3 and α 2-6 linked to Gal β 1-4GlcNAc-R whereas glycans at Asn 97 lack fucose and they are sialylated to a lesser extent (4). The protein from propagated, proliferating T lymphocytes contains more than 50% of high-mannose type of structures at Asn 97 whereas almost all at Asn 25-linked oligosaccharides are of complex type with α 1-6 linked fucose and are more highly sialylated.

Carbohydrate structure(s) of recombinant glycoproteins:

The carbohydrate structures of a few recombinant glycoproteins have been elucidated (5-11). To our knowledge only two reports (2,7,9) compare the proteins produced in different recombinant host cells. The results indicate, that in the case of **N-linked oligosaccharides** the final carbohydrate structure(s) of a given secretory recombinant glycoprotein vary largely from host to host cell and they exhibit microheterogeneity as do the proteins

させると、均一な糖タンパクの生産ができるし、そしてポリペプチド上の異なった“グリコフォーム”の生物学的性質の研究と評価に手掛かりを与えてくれる。

ヘテロな哺乳動物における糖タンパクの発現の研究で、タンパクの翻訳後の修飾の複雑な形式を支配する細胞の制御機構がより良く理解される。幅広い生物学的現象(極く稀な場合にのみタンパクのグリコシル化の意義が明確に示されているけれども)に関係したオリゴ糖の可能性のある役割からいえば、(例えば、N-およびO-結合糖鎖の結合位置を作ることで)改良された生物学的性質を持った新しい糖タンパクを遺伝子工学的に設計する事は魅力的であろう。しかしながら、我々はポリペプチドのアミノ酸配列がいかにその三次元構造を支配するか知らないし、又その三次元構造がタンパクの機能を決定する規則を理解していない。我々はポリペプチドに結合した糖鎖がタンパクのバックボーンと相互作用し、そして特別な生物作用を有する三次元構造を形成するかを理解するには程遠い所にいる。

2. “天然”糖タンパク

多くのいわゆる“天然糖タンパク”における糖鎖構造とマイクロヘテロジェニティーの数知れない程の多様性は、これらのタンパクの大部分の翻訳後の修飾の特別な生物学的役割を定義づけるのを困難にしている。これは次の質問に答えようとする努力を複雑にしている。即ち、リコンビナント法によって薬学的目的で生産する時、例えば、ヒト血漿中のアンチ

トロンビンIIIは α 2-6結合で主として結合しているNeuAcを含有し、根元に結合したGlcNAcにフコースを欠く[しかしGlcNAcに α 1-3結合した幾つかのフコースを含む(2)]が、リコンビナント法による生成物がどのタイプのオリゴ糖の構造を必要とするかという質問である。CHO細胞からのリコンビナントタンパク(AT III)はBHK細胞からのものと同様に α 2-3結合したNeuAcを含有し、オリゴ糖は殆ど完全にフコース化されており、ヒト血漿に由来するAT IIIと比較して、より高含量の三本側鎖型オリゴ糖(3)を含有している。免疫システムの複雑なネットワークにおける重要な調節的役割を演じているヒトのリンフォカインのようなリコンビナント糖タンパクの生産においてはチャレンジングな状況にある。たいていのリンフォカインは糖タンパクである。それらのオリゴ糖構造は報告されている(4, 32)が、それらは分泌の為に細胞を刺激するのに使われる誘導法及び、細胞の分化状態(細胞サブセットに特異的なグリコシル化)に依存している事が示された。IFN- γ はAsn25とAsn97に2つの潜在的なN-グリコシル化部位を持っている。静止期のT細胞から分泌された時、全てのIFN- γ -Asn25に結合したオリゴ糖は根元に結合したフコースを持っており、NeuAcは α 2-3と α 2-6結合でGal β 1-4GlcNAc-Rに結合しているが、一方Asn97の糖鎖はフコースを欠いており、より少ない割合でシアル酸が結合している(4)。増殖中のTリンパ球のIFN- γ はAsn97に高マンノース型の糖鎖を50%以上含んでいるが、Asn25に結合したほぼ全てのオリゴ糖は

from "natural" sources.

From the N-linked oligosaccharide structures of recombinant glycoproteins that have been elucidated in our laboratory over the past few years (IFN- β , AT III, EPO, tPA, IL-2, as well as mutant proteins thereof) and from the work of others, characteristic carbohydrate structural features can be expected in glycoproteins when using mammalian host cells as summarized in Table 1.

Concerning **O-linked carbohydrates** found in recombinant glycoproteins, the human IL-2 has been shown to bear exclusively the common NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc chain or the tetrasaccharide with an additional NeuAc α 2-6 linked to GalNAc when produced from BHK, Ltk- or CHO cells (7). The same type of structure is found in IL-2 from human T cells and is exclusively attached to Thr3 of the polypeptide chain (cited in ref. 7). Human EPO produced from CHO and BHK cells has been shown to be O-glycosylated at Ser126 (5,12). The polypeptide: α 1-O GalNAc-transferase(s) from all cell lines tested so far seem to perform initiation of O-glycosylation in each protein only at specific sites. However, no primary peptide sequence of higher ordered structure has so far been identified as a recognition signal for this type of carbohydrate linkage on proteins (13). We have observed that each cell line secretes O-glycosylated and non O-glycosylated proteins in a characteristic ratio that is **not affected** by cell culture conditions or productivity (7).

Expression of glycoproteins in heterologous mammalian cell lines:

Transient expression: For many studies, transient expression which is observed in only a limited proportion of cells within a few days of the introduction of foreign DNA may be

sufficient for a preliminary analysis of e.g. the effect of site-directed mutagenesis of a DNA encoding a glycoprotein. For these studies transiently replicating plasmids based on the SV40 origin of replication and its triggering T-antigen are frequently used (14,15). This system, which is restricted to some primate cell lines leads to high expression of the recombinant protein (16). Transient expression may lead to inaccurate results which is due to cell death upon the transfection procedure.

Stable expression: If a larger amount of protein is required (for subsequent biochemical analysis), however, the selection of cell clones is indispensable, here the expression plasmid sequences are retained during cell proliferation. Stable vector maintenance can be achieved by the use of bovine papilloma virus (BPV) vectors as an episomal replicating plasmid (17). However, high expression with these vectors is demonstrated only in very few cell lines e.g. C 127. Alternatively, the integration of the vector DNA sequences into the host cell's DNA leads to stable transgenic cells. In both approaches, selection markers have to be used (17) which identify recombinant cells. The marker is either physically linked to the expressed gene (vector construction) or becomes linked upon co-integration together with the expression plasmid sequences in the chromosomal DNA (18). Various techniques can be used for introduction of foreign DNA into tissue culture cells. The most widely used method is the calcium phosphate transfection method (19). Depending on the cell line, other methods, in particular electroporation, may be more efficient.

In order to optimize expression in heterologous cells, cDNA genes are

α 1-6結合したフコースを含有する複合型糖鎖で、それらには沢山のシアル酸が結合している。

3. リコンビナント糖タンパクの糖鎖構造

ごく僅かのリコンビナント糖タンパクの糖鎖構造が明らかにされている(5-11)。我々の知る限りでは、ただ2つの論文(2, 7, 9)が異なったリコンビナント宿主細胞で生産された糖タンパクの糖鎖構造を比較している。それによるとN-結合オリゴ糖の場合、ある分泌型リコンビナント糖タンパクの最終糖鎖構造は宿主細胞が異なると大きく変化し、“天然”起源の糖タンパクが示すように、ミクロヘテロジェニティーを示す。

我々の研究室および他の研究室で過去2-3年の間に明らかにされたリコンビナント糖タンパク(IFN- β , AT III, EPO, tPA, IL-2とそれらの変異タンパク)のN-結合糖鎖構造から、哺乳動物宿主細胞を用いた場合の糖タンパクにおける特徴的な糖鎖構造がTable 1に示すよ

うに推測できる。

リコンビナント糖タンパクのO-結合糖鎖に関していえば、ヒトIL-2はもっぱら普通のNeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc糖鎖、あるいはGalNAcにNeuAcが α 2-6結合した四糖構造を示す(7)。それと同じ構造がヒトT細胞のIL-2に見いだされているが、もっぱらそのポリペプチド鎖のThr₃に結合している(文献7から引用)。CHO細胞、BHK細胞によって生産されたヒトEPOではSer₁₂₅にO-糖鎖が結合している(5, 12)。調べられた全ての細胞株のポリペプチド:

α 1-O-GalNAcトランスフェラーゼは、各タンパクの特定の部位のみでO-グリコシル化の開始を行うように見受けられる。しかしながらタンパクのこの種の糖鎖に対する認識シグナルを持つ高次構造を保ったペプチド配列は同定されてはいない(13)。我々は各々の細胞株でO型糖鎖を持つタンパクと持たないタンパクが、細胞培養条件や生産性によって影響を受けないある特定の比率で分泌されることを観察している(7)。

Table 1. Structural features of N-linked oligosaccharides from recombinant glycoproteins^{a)}

Host cell line:	CHO	LtK ⁻	C1271	BHK-21
proximal fucose	+	+	+	+
α 2-6 NeuAc	-	+	+	-
α 2-3 NeuAc	+	+	+	+
tri/tetra-antennarity	+	+	+	+
lactosamine repeats	+	+	+	+
sulfated glycans	-	+	+	-
Gal α 1-3Gal	-	+	+	-
bisecting GlcNAc	-	+	+	-

a) ref. No.(5-12)

integrated into expression vectors which usually provides a heterologous promoter and a polyadenylation signal. The most efficient promoters are from viruses. Some of them are suitable for use in a variety of host cell types (e.g. ref. 20). In addition to the transcriptional control elements translation-inhibiting sequences or mRNA destabilizing sequence elements (often located in the 5' or 3' untranslated regions of the genes) have to be eliminated from the cDNA gene (21,22). If the sequence around the translational initiation codon is not optimal according to the rules of Kozak (23) it should be mutated in order to get more efficient translation initiation.

Expression efficiency is not only determined by elements regulating transcription and translation but is also correlated to the gene copy number. High copy number can be achieved either by episomal vectors (BPV) or by amplification of the integrated foreign DNA within the chromosomal DNA. The latter method is based on the spontaneous gene amplification of chromosomal DNA fragments which is an infrequent event that has to be selected for (24). The most frequently used amplification method uses a mutant CHO cell line lacking endogenous dihydrofolate reductase (DHFR) activity. Cotransfer of a DHFR cDNA-expression plasmid together with the gene of interest allows for the selection of cells with amplified genes treatment with increasing concentrations of methotrexate.

A third factor effecting expression is dependent on the integration site within the chromosomal DNA. It is assumed, that eukaryotic DNA is organized in chromosomal domains which determine the transcriptional strength of genes located within these domains. Because the foreign DNA apparently integrates randomly the resultant cell

clones vary greatly in their expression of the recombinant gene product. It is therefore possible to screen for over-producing cells by taking advantage of coupled resistance markers the expression of which correlates with rDNA product expression and can be selected for by high drug resistance (25).

The exploitation of retroviruses as vectors has provided a versatile method of introducing and expressing cloned genes into a variety of mammalian cells. Because of the high titer of infectivity which can be achieved even cells which are not manipulatable with other methods can be stably transformed (26). However, most of these vectors exhibit low expression of the integrated genes (27). Furthermore, the number of retroviral copies in infected cells is usually one. Therefore, the use of these vectors are presently very limited with regard to glycoprotein research.

Genetically engineered glycoproteins:

Site-directed mutagenesis of a human IL-2 cDNA and both transient and stable expression of corresponding plasmids in BHK and HeLa cells (using a pBEH vector containing the poly linker of M13mp8 as described in ref. 20) has allowed us to characterize a number of proteins mutated with respect to O-glycosylation (28). Since human IL-2 is O-glycosylated only to about 60% when expressed in BHK-21 cells (7), any alterations introduced by site-directed mutagenesis of the DNA, allows detection of improved or reduced O-glycosylation acceptor properties of a secreted protein variant by simple SDS-PAGE analysis. Our results obtained with some 40 IL-2 variant proteins indicate, that Thr3 (which is the only O-glycosylation acceptor site within wild type IL-2 : A-P-T₃-S-S-S-T-K-K-T₁₀-...) cannot be replaced by Ser, any substi-

4. ヘテロな哺乳動物由来細胞株における糖タンパクの発現

一時的(遷移的)な発現: 多くの研究によって、外来DNAの導入後の2-3日以内に観察される一時的な発現は、予備的な分析、即ち1つの糖タンパクをコードする1つのDNAの部位特異的な変異導入法の効果を調べるのに十分である。これらの研究には、SV40の複製開始点と複製を起こさせるT抗原に由来する一時的な複製プラスミドがしばしば利用されている(14, 15)。類人猿由来の細胞株に限定されるこのシステムはリコンビナントタンパクを良く発現する(16)。一時的な発現は形質転換による細胞死に起因する不正確な結果を導くことがある。

安定な発現: しかし、もしより多くのタンパクが(その次ぎの生化学的分析の為に)要求されるならば、発現プラスミド配列が細胞増殖中保持されるようなクローン細胞の選択が不可欠である。安定なベクターの保持はエピゾームの複製プラスミドとしてのウシパピローマウイルス(BPV)を使う事によって得られる(17)。しかしながらこれらのベクターによる発現はごくわずかな限られた細胞株、例えばC 127で見られただけである。この代わりにベクターDNA配列を宿主細胞のDNAに組み込ませると、安定なトランスジェニックな細胞が得られる。どちらにせよリコンビナント細胞を見分けるための選別の目印が必要である(17)。その目印は発現された遺伝子(ベクター構造)に物理的にリンクしているか、染色体DNAに発現プラスミド配列と一緒に組み込まれる(18)。

培養細胞に外部DNAを導入する為にいろいろな技術が利用できる。もっとも広く使われているのはリン酸カルシウム形質転換法である(19)。細胞株にもよるが、他の方法、特にエレクトロポレーションが効果的である場合がある。

ヘテロな細胞での発現を最適化する為に、cDNA遺伝子はヘテロなプロモーターとポリAシグナルを与える発現ベクターに組み込まれる。最も効果的なプロモーターはウイルスからのものである。それらのあるものは色々な宿主細胞に適している(例えば文献20)。転写の制御因子に加えて、翻訳阻止配列あるいは、mRNA不安定化配列(遺伝子の翻訳されない領域の5'あるいは3'の位置に存在している)をcDNA遺伝子から除去しなくてはならない(21, 22)。

もし翻訳開始コドンの周りの配列がKozakの法則(23)にしたがっていなければ、もっと効果的に翻訳が開始されるように構造を変えてやらねばならない。発現効率は転写と翻訳を調整している要素のみならず、遺伝子のコピーナンバーにも関係している。高いコピーナンバーはエピゾームベクター(BPV)、あるいは染色体DNAに組み込まれた外来DNAの増幅によって得られる。後者の方法は、染色体DNA断片の自発的な遺伝子増幅によるものであるが、極めて稀な事象である。最もしばしば使われる増幅方法は内因的にデヒドロフォレート レダクターゼ(DHFR)活性を欠いた変異CHO細胞株を用いる方法である。DHFR cDNA-発現プラスミドを対象となる遺伝子に導入するとメソトレキセートの濃度を上げることによって、増幅

tution at this position, or any deletion of more than 1 hydroxy amino acid adjacent to the normal acceptor Thr at the NH₂-terminus of IL-2 leads to secretion of only the nonglycosylated IL-2 form. Again, no O-glycosylation is observed in the absence of Thr₃ and a new Thr is inserted at position 4, 5 or 6 (in place of Ser). When Thr₃ is kept and Ser in pos. 4, 5 or 6 is substituted by Thr, the ratio of secreted glycosylated and nonglycosylated IL-2 is modulated. None of other Ser or Thr residues within the hydroxy amino acid cluster except for Thr₃ serves as an alternative acceptor for O-glycans. The O-glycosylation domains of both human tissue plasminogen and human glycophorin A when transferred to the NH₂-terminus of IL-2 in form of a hexa- or heptapeptide, respectively, are both recognized as acceptors for O-linked carbohydrate, although with different efficiency.

After transfer of the human tissue plasminogen O-glycosylation site (A-P-T-A-P-P- ...) to the NH₂-terminus of human IL-2, improved O-glycosylation was observed in the product secreted from BHK and HeLa cells. An "improved" O-glycosylation domain could be constructed that contained two or three proline residues COOH-terminal to the acceptor Thr residue. This "improved" O-glycosylation domain could be successfully transferred to different locations within the IL-2 protein yielding 100% of O-glycosylated IL-2 variant protein in both BHK and HeLa cells. This is in contrast to the IL-2 wild-type O-glycosylation sequence which functions as an acceptor only when present at the NH₂-terminus of the polypeptide (28,29). Obviously, the natural NH₂-terminal domain of human IL-2 is a poor substrate for polypeptide: α 1-O GalNAc transferase. The tertiary structure is not known since

AA 1-11 of IL-2 is not resolved in crystals of nonglycosylated protein produced in *E. coli* i.e. exhibits high flexibility.

The **creation of N-glycosylation sites** at five different positions of the IL-2 polypeptide by single amino acid exchanges (leading to the Asn-X-Thr/Ser tripeptide sequence) results in N-glycosylated IL-2 variants only in one case, moreover with low yield (20% of total secreted IL-2 variant). No N-glycosylation was observed when Thr₃ was changed to Asn. However, when an 11 AA peptide sequence of human IFN- β comprising the N-glycosylation domain (residues 149-159) was inserted at various locations (in the absence of Thr₃), N-glycosylation was observed in all variants.

Some preliminary conclusions can be drawn from these studies:

- i. a minimal alteration in the IL-2 polypeptide (deletion of a single methyl group by changing Thr to Ser) completely abolishes O-glycosylation
- ii. the acceptor properties of proteins for O-glycosylation can be modulated via changes in primary structure
- iii. creation of N-glycosylation sites generated by single amino acid exchanges results in poor N-glycosylation
- iv. O- as well as N-glycosylation domains (peptide regions of 8-11 AA) can successfully be transferred from one protein to another
- v. "improved" O-glycosylation sites can be engineered and can be displaced within a polypeptide as well as from one protein to another

These studies represent a preliminary effort towards the genetic engineering

された遺伝子をもった細胞を選択できる。

発現に影響を与える3番目の要因は、染色体DNA内のどこに組み込まれるかである。真核動物のDNAには転写活性の高さを決定する染色体ドメインがあると思われる。外来DNAはランダムに組み込まれるので、その結果、得られた細胞クローンにはリコンビナント生産物の発現量が大いに変動する。それ故に、rDNA産物の発現に相関し、かつ高薬剤抵抗性により選べる抵抗性マーカーを利用して生産性の高い細胞をスクリーニングする事ができる(25)。

レトロウィルスをベクターとすることで、クローンされた遺伝子を哺乳動物細胞に導入し、発現させる用途の広い方法が開発された。高い感染性の為に、他の方法では操作出来なかったものも安定にトランスフォームされた(26)。しかしながら、これらのベクターの大部分では組み込まれた遺伝子の発現は低かった(27)。更に、感染されたレトロウイルスのコピーナンバーは通常1である。それ故に、これらのベクターの使用は現在のところ、糖タンパク研究に関してはあまり使われていない。

5. 遺伝子工学で作られた糖タンパク

ヒトIL-2 cDNAの部位特異的変異導入法と、BHK細胞とHeLa細胞における相当するプラスミドの一時的なあるいは安定な発現(文献20に記載されているM13p8のリンカーを含むpBEHベクターを用いる)によって、我々はO-グリコシル化に関して変異した多くのタンパクを同定で

きた。ヒトIL-2はBHK-21細胞で発現させた時は60%のみがO-グリコシル化されているので、そのDNAの部位特異的変異導入法によって惹き起こされた変化はSDS-PAGE分析を用いて、分泌されたタンパクバリエーションのO-グリコシル化が改善されたかあるいは低下したかで簡単に検出できる。40種のIL-2 タンパク バリエーションで得られた我々の結果はThr₃(野生型IL-2の唯一のO-グリコシル化部位: A-P-T₃-S-S-S-T-K-K-T₁₀-...)はSerでは置換出来ないし、この位置を置換したり、あるいはIL-2のN-末端の正常な受容体Thrに隣接した1つ以上のオキシアミノ酸を削除すると、糖鎖の結合していないIL-2分子が分泌される。Thr₃を削除し、新しいThrを(Serの代わりに)4, 5,あるいは6のSerをThrで置換すると、糖鎖の結合していないIL-2分子が得られる。Thr₃をそのまま残し、4, 5,あるいは6のSerをThrで置換すると、分泌された糖鎖型、非糖鎖型IL-2の比が変わってしまう。オキシアミノ酸が沢山集まっても、Thr₃以外の他のSerあるいはThrはO-グリカンの受容体にはならない。IL-2のN-末端にヘキサペプチド、あるいはペンタペプチドの形でヒトTPAとヒトグリコフォリンのO-グリコシル化ドメインをそれぞれ挿入すると、異なった効率であるけれども、O-結合糖鎖に対する受容体として認識される。

ヒトTPAのO-グリコシル化部位(A-P-T-A-P-P-...)をヒトIL-2のN-末端に導入すると、BHK細胞、HeLa細胞を用いた場合に、O-グリコシル化が改良された。この"改良された"O-グリコシル化アクセプタードメインはアクセプ

of glycoproteins. Future experiments, e.g. introduction of ("improved") N- and O-glycosylation domains into proteins of well-characterized 3D-structure will eventually lead to crystallizable variants and permit the elucidation of the polypeptide conformation at (individual) carbohydrate attachment sites and, hopefully, allow analysis of the interaction of carbohydrate(s) and the polypeptide backbone. This, then may allow a more specific description of the roles of individual AA side chains adjacent to the carbohydrate attachment sites and will help us to understand in more detail the rules that govern biosynthesis of these complex structures as well as the structure/function relationships in glycoproteins which until now are understood to a such limited degree.

The final aim, however, a "design of glycoproteins", can be achieved only by combining a wide variety of techniques (X-ray crystallographic methods, high resolution NMR, computer graphic model building as well as genetic engineering). Significant advances can be expected through a better understanding of protein tertiary structure.

A prerequisite, in our opinion, is a "good model system" suitable for examining the biological properties of "fashioned glycoproteins".

References

1. Stanley, P. (1984) *Ann. Rev. Genet.* 18, 525-552
2. Conradt, H.S. and Nimtz, M. (1989) *Proceedings of the Xth International Symposium On Glycoconjugates*; Sept. 10-15 Jerusalem, Israel; N. Sharon ed. pages 237-238
3. Zettelmeissl, G., Conradt, H.S., Nimtz, M. and Karger, H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 21153-21159
4. M. Nimtz, M., Lorenz, C., Mohr, H. and Conradt, H.S. (1989) *Proceedings of the Xth International Symposium On Glycoconjugates*; Sept. 10-15 Jerusalem, Israel, N. Sharon ed. pages 239-240
5. Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. and Fukuda, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12059-12076
6. Conradt, H.S., Eggge, H., Kata-linic, J., Siklosi, T., Reisewr, W. and Schaper, K. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14600-14605
7. Conradt, H.S., Nimtz, M., Ditt-mar, K.E.J., Lindenmaier, W., Hauser, H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17368-17373
8. Takeuchi, M., Takahashi, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N. and Kobata, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3657-3663
9. Kakgawa, Y., Takasaki, S., Utsu-mi, J., Hosoi, K., Shimizu, H., Kochibe, N. and Kobata, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17508-17515
10. Parekh, R.B., Dwek, R.A., Ruud, P.M., Thomas, J.R., Rademacher, T.W., Warren, T., Wun, T.-C., Hebert, B., Reitz, B., Palmier, M., Ramabharahn, T. and Tiemeier, B.C. (1989) *Biochemistry* 28, 76170-76179
11. Spelman, M.W., Basa, L.J., Leo-narde, C.K., Chakel, J.A., O'Connor, J.V., Wilson, S. and Van Halbeek, H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 14100-14111
12. Nimtz, M. and Conradt, H.S. (1990) submitted
13. Sadler, J.E. (1984) in: *Biology of carbohydrates*, Ginsburg, V. and Robbins, P.W. eds., John Wiley, New York
14. Gluzman, Y. (1981) *Cell* 23, 175-182
15. Oppenheim, A., Peleg, A., Fibach,

ターのThrのC末端側に2つ、あるいは3つのプロリン残基を含むものである。この"改良された"グリコシル化ドメインをIL-2タンパク分子内の異なった部位に移すことができ、BHK細胞とHeLa細胞の両方において、100%O-結合糖鎖の付加されたIL-2バリエーションを生産した。これはポリペプチドのN-末端に存在する時のみ受容体として機能するIL-2野生型のO-グリコシル化配列とは対照的である(28, 29)。明らかにヒトIL-2の天然のN-末端ドメインはポリペプチド: α 1-O-GalNAcトランスフェラーゼの基質としては貧弱である。IL-2のアミノ酸配列1~11は大腸菌で生産された非糖鎖型タンパクの結晶では解像されない。即ち、高いフレキシビリティを示すので、その三次元構造は知られていない。

1個のアミノ酸置換(Asn-X-Thr/Serトリペプチド配列を作る)によりIL-2ポリペプチド内の5ヶ所でN-グリコシル化部位を創出すると、N-糖鎖型IL-2バリエーションが得られた。しかし、一例だけであり、しかも低い収率(分泌されたIL-2バリエーションの20%)であった。Thr₃をAsnに置換しても、N-糖鎖型分子は得られなかった。しかしながら、IFN β のN-グリコシル化ドメイン(残基149-159)の11アミノ酸のペプチド配列をThr₃の非存在下で色々な部位に挿入すると、全てのバリエーションにN-結合型糖鎖が観察された。

これらの研究から幾つかの予備的な結論が引き出される。

i. IL-2ポリペプチドにおける最小の変更

(ThrをSerに変化させる事によるメチル基

の除去)は完全にO-型糖鎖を失わせる。

- ii. タンパクがO-グリコシル化されるかどうかは一次構造を変化させる事により調節できる。
- iii. 1個のアミノ酸配列の置換によるN-グリコシル化部位の創出では貧弱なN-グリコシル化しか起こらない。
- iv. O-及び、N-グリコシル化ドメイン(アミノ酸残基8-11のペプチド領域)は1つのタンパクから他のタンパクへ移すことが可能である。
- v. "改良された" O-グリコシル化部位は操作することが可能で、1つのポリペプチド内で、あるいは1つのタンパクから他のタンパクに移すことができる。

これらの研究は糖タンパクの遺伝子工学における予備的な努力である。将来の実験、即ち(改良された)N-及びO-グリコシル化ドメインを三次元構造の良く研究されたタンパクへ導入することによって、最後には結晶可能なバリエーションが得られ、そして(各々の)糖鎖部位におけるペプチドコンフォメーションを明らかにし、糖鎖とポリペプチドバックボーンの相互作用の分析が可能となることが望まれる。これによって糖鎖部位に隣接する各々のアミノ酸の側鎖の役割をもっと明確に記述することができるだろうし、より詳細にこれらの複雑な構造の生合成を支配する法則と、今までに少ししか判っていない、糖タンパクの構造/機能の関係を理解できるようになるだろう。

しかしながら究極の目的、つまり"糖タンパ

- E. and Rachmilewitz, E.A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6925-6929
16. Oppenheim, A. and Peleg, A. (1989) Gene 77, 79-86
17. Campo, M.S. (1985) in: DNA cloning Vol. II, Grover, D.M. ed., pp. 213-238, IRL-Press, Oxford
18. Gorman, C. (1985) in: DNA cloning Vol. II, Grover, D.M. ed., pp. 143-190, IRL-Press, Oxford
18. Perucho, M., Hanahan, D. and Wigler, M. (1980) Cell 22, 309-317
19. Graham, F. and Van der Elb, A.J. (1973) Virology 52, 456-487
20. Artelt, P., Morelle, Ch., Ausmeier, M., Fitzek, M. and Hauser, H. (1988) Gene 68, 213-219
21. Kozak, M. (1986) Proc. Natl. Sci. USA 83, 2850-2854
22. Shaw, G. and Kamen, R. (1986) Cell 46, 659-667
22. Stark, G.R., Debatisse, m., Giulotto, E. and Wahl, G.M. (1989) Cell 57, 901-908
23. Kozak, M. (1986) Cell 44, 283-292
24. Bebbington, C.R., Hentschel, C.C.G. (1987), in DNA cloning Vol. III, Grover ed., pp. 163-188, IRL-Press, Oxford
25. Wirth, M., Bode, J., Zettlmeissl G. and hauser, H. (1988) Gene 73, 419-426
26. Brown, A.M.C., Scott, M.R.D. (1987) in: DNA cloning Vol. III, Grover, D.M. ed., pp. 189-227, IRL-Press, Oxford
27. Artelt, P., Bartsch, J., Hauser, H., Wirth, M. (1989) in: NATO ASI Series, Vol. H34, Vectors as Tools for the Study of Normal and Abnormal Growth and Differentiation, Lothar, H. et al., eds., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
28. Conradt, H.S., Hauser, H., Dittmar, K.E.J., Lindenmaier, W. and Hofer, B. (1990) submitted for publication
29. Dittmar, K.E.J., Conradt, H.S., Hauser, H., Hofer, B. and Lindenmaier, W. (1989) Advances in Protein Design, Bloecker, H., Collins, J., Schmid, R.D. and Schomburg, D. eds., GBF Monographs Vol. 12, 231-246, VCH Publishers, Weinheim, New York, Cambridge
31. Brandhuber, B.J., Boone, T., Kenney, W.C. and McKay, D.B. (1987) Science 240, 1707-1709

ク的设计”は、広いバラエティーに富んだ技術(X線結晶学、高分解能NMR、コンピューターグラフィックによるモデル設計、遺伝子工学)を組み合わせることによってのみ達成できると思われる。タンパクの三次元構造を理解することで大きな進歩が期待できるだろう。

我々の考えでは、“本来の形を変えた糖タンパク”の生物学的性質を検討するのに最適の“モデル系”を持つことが不可欠である。

(高砂リサーチ・インスティテュート/帝京大・
医 川口吉太郎 訳)