

論文内容の要旨

申請者氏名 中澤 祐人

バイオ医薬品の生産において、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞が広く利用されているが、新たに Chinese hamster から採取した卵巣から、初代培養を経て、得られた細胞の不死化、無血清馴化、浮遊化によって、由来の異なる新規 CHO 細胞が樹立された。この新規 CHO 細胞は、既存 CHO 細胞と比較して倍加時間が短く、最高細胞密度が高いなど優れた増殖特性を有している。しかしながら、その表現型を司る要因は明らかになっていない。本研究では、CHO 細胞の増殖および代謝に関わる遺伝子の発現プロファイルを解析し、増殖特性に繋がるメカニズムを解明することを目的とした。

まず、RNA-seq により新規 CHO 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、既存 CHO 細胞と比較して、脂肪酸・アミノ酸分解および TCA サイクルなどのエネルギー代謝経路が有意に活性化していることが示唆された。また、既存 CHO 細胞では発現していないが、新規 CHO 細胞で比較的高発現している遺伝子として *GeneX* が見出された。*GeneX* は主に脂肪酸や分岐鎖アミノ酸代謝に関与するタンパク質をコードしており、その欠損はヒトでは脂肪酸代謝異常を引き起こすことから、CHO 細胞においても細胞増殖および代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

次に、*GeneX* が新規 CHO 細胞の表現型に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムにより *GeneX* のノックアウト (KO) を行った結果、新規 CHO 細胞が示す高い最高細胞密度が大幅に低下した。さらに、*GeneX*-KO 株の *GeneX* を相補した結果、最高細胞密度は回復した。一方で、*GeneX* の発現の有無によって、新規 CHO 細胞の倍加時間には有意な変化はなかった。以上の結果から、*GeneX* の発現は、新規 CHO 細胞が示す高い最高細胞密度の表現型に必須であることが明らかになった。

続いて、CHO 細胞の *GeneX* に関連する代謝経路を解析した。その結果、KO によって分岐鎖アミノ酸 (ロイシン・イソロイシン・バリン) の消費が大きく減少していた。また、KO 体でのみロイシン、イソロイシン、バリンそれぞれの異化中間体に由来する Isovaleric acid、2-Methylbutyric acid、Isobutyric acid が顕著に蓄積していた。これらの結果から、新規 CHO 細胞では分岐鎖アミノ酸の異化が活発に行われ、その正常な反応には *GeneX* が必須であることが示された。KO 体では *GeneX* を失ったことで異化反応が阻害されるため代謝中間体が蓄積したと考えられた。これらの代謝中間体は CHO 細胞の増殖を阻害して最高細胞密度を低下させることが報告されているため、*GeneX* の発現による正常な分岐鎖アミノ酸異化経路の存在が新規 CHO 細胞における高い最高細胞密度に重要であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中澤 祐人

バイオ医薬品の生産において、1950年代に樹立された Chinese hamster ovary (CHO) 細胞が広く利用されているが、近年 Chinese hamster の卵巣から由来の異なる新規 CHO 細胞が樹立された。この新規 CHO 細胞は、既存 CHO 細胞と比較して倍加時間が短く、最高細胞密度が高いなど優れた増殖特性を有しているが、その要因は不明である。申請者は、新規 CHO 細胞の増殖特性機構を解明することを目的に、増殖特性・代謝特性に関わる遺伝子の発現および代謝産物の解析を行い、以下のような新たな知見を得た。

- 1) 新規 CHO 細胞は既存 CHO 細胞と比較して、脂肪酸β酸化、分岐鎖アミノ酸異化、TCA 回路などのミトコンドリア関連遺伝子の発現が上昇していることを見出した。
- 2) 正常な脂肪酸代謝と分岐鎖アミノ酸代謝の必須タンパク質をコードする *GeneX* は新規 CHO 細胞でのみ発現し、既存 CHO 細胞では発現していないことを見出した。
- 3) CRISPR/Cas9 システムを用いた *GeneX* のノックアウトによって、新規 CHO 細胞の最高細胞密度は顕著に減少し、*GeneX* の発現が新規 CHO 細胞の増殖特性の 1 つである高い最高細胞密度に極めて重要であることを明らかにした。
- 4) *GeneX* のノックアウトによって、新規 CHO 細胞では分岐鎖アミノ酸の消費が大幅に減少し、増殖阻害性を示す分岐鎖アミノ酸異化中間体が蓄積することを明らかにした。
- 5) *GeneX* の発現は CHO 細胞の Acetyl-CoA からの 3-Hydroxybutyric acid 産生を促進し、細胞内のエネルギー蓄積に寄与することが考えられた。
- 6) 一方で、*GeneX* の発現消失は CHO 細胞の Acetyl-CoA と Butyryl-CoA の相互変換を阻害し、細胞増殖阻害活性を有する Butyric acid 生成を促進することが考えられた。

以上の結果から、新規 CHO 細胞に特徴的な高い最高細胞密度には、既存 CHO 細胞では発現していない *GeneX* の発現が必須であることが示された。また、本研究により *GeneX* が CHO 細胞の分岐鎖アミノ酸異化経路で正常に機能することが、新規 CHO 細胞の高い増殖特性に極めて重要であることが明らかになった。本研究の成果は、新規 CHO 細胞の増殖特性を理解するだけでなく、代謝特性に基づく新規 CHO の培養制御法の開発に資することができる。また、CHO 細胞における *GeneX* に関する代謝経路の研究はこれまで報告がなく、既存 CHO 細胞の機能改良にも展開できる可能性を示したことから、申請者が見出した知見は基礎・応用の両面で大きな意義がある。

以上のように、CHO 細胞の特性と *GeneX* の機能を関連づけることで、CHO 細胞の代謝を新規に改変できる可能性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。