

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	Corynebacterium glutamicumを用いた抗体Fab断片高生産菌の分子育種
Title(English)	Molecular breeding of antibody Fab fragment-hyperproducing strains of Corynebacterium glutamicum
著者(和文)	松田吉彦
Author(English)	Yoshihiko Matsuda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9639号, 授与年月日:2014年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:和地 正明,三原 久和,福居 俊昭,蒲池 利章,平沢 敬
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9639号, Conferred date:2014/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

*Corynebacterium glutamicum* を用いた  
抗体 Fab 断片高生産菌の分子育種

松田 吉彦

## 要約

### 【緒言】

バイオ医薬分野において、低分子抗体の一種である Fab (H 鎖断片と L 鎖からなるヘテロ二量体) が次世代抗体の重要な分子骨格として着目されている。抗体関連分子の生産には主にチャイニーズハムスターオーバリー (CHO) 細胞が使用されるが、培養期間が長い、コストがかかるなど課題も少なくない。微生物を用いた発現系も検討されているが、一般的に用いられる大腸菌発現系は、主に菌体内に発現するため菌体破碎やリフオールディング工程を要することやエンドトキシン産生などの問題がある。また酵母など真核微生物による発現系は菌体外への分泌生産が可能であるが、しばしばプロテアーゼによる分解や望まれない糖鎖修飾が生じることなどのデメリットがある。

*Corynebacterium glutamicum* は、アミノ酸生産菌として長きにわたり使用されてきた実績があり、安全性についても問題がない産業微生物である。また、異種タンパク質生産系としてはダウンストリーム工程を簡略化できる優れた特徴がある。そこで本研究では、*C. glutamicum* を用いて抗体 Fab 断片の分泌発現系を構築し、より高効率な生産系を開発することを目指して分子育種研究を行った。

## 【方法，結果と考察】

### 1. *C. glutamicum* を宿主とした抗体 Fab 断片分泌発現系の構築

本研究では，味の素(株)にて開発された CORYNEX®システム (*Corynebacterium glutamicum* protein expression system) を発現系として用いた．発現ターゲットは，癌細胞で過剰発現する HER2 タンパク質に特異的なヒト化抗体である Herceptin® (一般名 trastuzumab) の Fab 領域を用いた．*C. glutamicum* 由来 *cspB* プロモーター，*C. ammoniagenes* 由来 CspA シグナル配列を用いて H 鎖および L 鎖の共発現系を構築し，CORYNEX®の基準株である YDK010 を宿主として Fab(H+L) 分泌発現を検討した．その結果，非還元 SDS-PAGE，ウエスタンブロット，N 末端アミノ酸配列解析により，H 鎖と L 鎖がそれぞれ分泌されると同時に，これらが分子間 S-S 結合を介して会合し，目的とする Fab(H+L) ヘテロダイマーとして培養上清中に分泌されることが確認された．分泌した Fab を Protein G アフィニティにて粗精製し，Biacore を用いて抗原 HER2 への結合能を調べた結果，目的とする抗原結合能を有していることが確認された．本結果は，*C. glutamicum* を用いて多量体タンパク質の活性型での分泌生産を示した初めての例である．

### 2. 細胞壁タンパク質 CspB と PBP1a の二重欠損による Fab 分泌生産量向上

YDK010 株を用いて Fab の分泌生産に成功したが，その生産量は約 10 mg/l と低レベルであった (Fig. 1, lane 2)．Fab 分泌発現におけるボトルネックの一因として，細胞表層の透過障壁の影響が考えられた．そこで，細胞壁ペプチドグリカン (PG) の合成酵素であるペニシリン結合タンパク質 (PBP) の欠損株を構築して Fab 分泌に及ぼす影響を調べた．その結果，PG 合成においてグリカン鎖の伸長を行うトランスグリコシラーゼ活性とペプチド架橋を行うトランスペプチダーゼ活性の両機能を有する PBP の一種で

ある PBP1a を欠損することで, Fab 分泌量が顕著に向上することを見出した (Fig. 1, lane 4).

ここまで検討に用いてきた発現宿主 YDK010 株は, 野生株 ATCC13869 へのニトロソグアニジン変異により取得されたタンパク質分泌生産用の変異株 AJ12036 株を基に, さらに Surface (S)-layer タンパク質 CspB を欠損させた株であった. そこで, 野生株 ATCC13869 を背景として *pbp1a* 欠損効果を調べた結果, Fab 分泌量は向上しなかったことから, YDK010 株中に存在する他の変異との併用が重要であることが示された. そこで, ATCC13869 株を背景として  $\Delta cspB$  と  $\Delta pbp1a$  の二重欠損株を構築し, その組み合わせ効果を検証した結果, 両遺伝子の二重欠損により初めて Fab 分泌量が向上することが明らかとなった.

細胞表層の透過性を評価するために各欠損株のリゾチーム感受性を調べた結果, 野生株 ATCC13869 は強固なリゾチーム耐性を示したが,  $\Delta cspB$  および  $\Delta pbp1a$  の各単独欠損株ではリゾチームに対して感受的となり, これらの二重欠損株においてはさらに相乗的にリゾチーム感受性が増加した. これらの結果から, *C. glutamicum* 細胞内外のタンパク質透過において, 細胞表層中の PG 層および S-layer の少なくとも 2 つの透過障壁があり, Fab 分泌生産においてはそれらを同時に改善することで分泌生産量を向上できることが示された.

### **3. H 鎖-L 鎖の会合促進因子 NCg10824 の発見**

さらなる Fab 生産効率向上を目指すためには, (1) Fab の分解抑制, (2) H 鎖-L 鎖の会合効率促進, が重要と考えられた. そこで, (1) の改善に向けたアプローチ法のひとつとして”protease/peptidase”関連遺伝子の増幅を試みた. その結果, 予想した効果に反し, ”metalloendopeptidase-like membrane protein”とアノテーションが付けられた機能未知遺伝子 NCg10824 の増幅により, 分解産物ではなく目的の Fab(H+L) 生産量が向上する

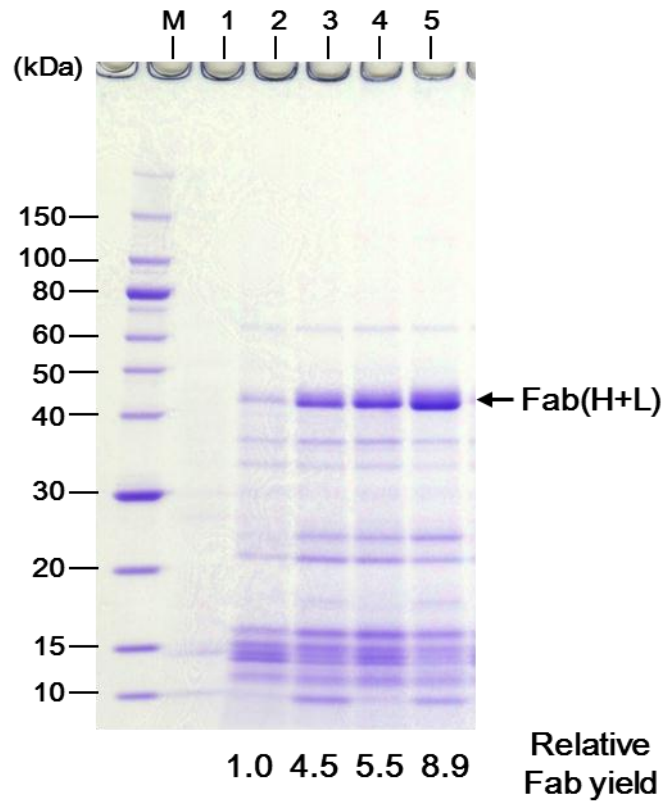
ことを見出した (Fig. 1, lane 3). NCgl0824 増幅は H 鎖および L 鎖モノマー体の分泌量は減少させたことから, H 鎖-L 鎖の会合を促進していることが示唆された.

*ΔcspBΔpbp1a* 変異と NCgl0824 増幅を組み合わせることでさらに相乗的に Fab 分泌量が向上し, YDK010 株と比較して約 9 倍に分泌量が向上した (Fig. 1, lane 5).

## 【結言】

本研究により、アミノ酸生産菌 *C. glutamicum* を用いてヘテロ二量体である抗体断片 Fab(H+L) を活性体として分泌生産することに成功した。初期検討の分泌発現量は低レベルであったため、Fab 高生産化を目的として分子育種研究を実施した結果、細胞壁関連タンパク質である CspB と PBP1a の二重欠損により細胞表層中の透過障壁を改善し Fab 分泌能が顕著に向上すること、および H 鎖-L 鎖の会合を促進する手法として NCgl0824 増幅を見出し、生産量 100 mg/l を超える Fab 高分泌生産菌育種を達成した。

*C. glutamicum* によるタンパク質分泌発現系は他宿主の発現系と比較してダウンストリーム工程を簡略化できる系であるため、本研究の成果を利用することで、工業化レベルでの Fab 生産が実現可能となった。



**Fig. 1** *C. glutamicum* を用いた抗体 Fab 断片高生産菌の分子育種

各菌株の Fab 生産培養における，培養上清の非還元 SDS-PAGE 解析の結果を示す．各レーンに培養上清 10  $\mu$ l のタンパク質サンプルを供し，電気泳動後，CBB 染色でタンパク質バンドを検出した．

M, Molecular weight marker; lane 1, YDK010/空ベクター株 (Negative control); lane 2, YDK010 株 (CORYNEX®標準株); lane 3, NCgl0824 増幅株; lane 4,  $\Delta cspB\Delta pbp1a$  株; lane 5,  $\Delta cspB\Delta pbp1a + NCgl0824$  増幅株．