

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生物プロセス	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
学生氏名： Student's Name	松田 吉彦		指導教員 (主)： Academic Advisor(main) 和地 正明 教授
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

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哺乳動物細胞の CHO 細胞が使用されるが、コストや培養期間の長さなど、課題も少なくない。微生物を用いた発現も検討されているが、発現系ごとに特有の問題点がある。 *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。

本研究では、味の素(株)で開発された CORYNEX® (*Corynebacterium glutamicum* protein expression system) を使用し、 *C. glutamicum* の *cspB* プロモーター、 *C. ammoniagenes* の CspA シグナル配列を Fab 発現に用いた。発現ターゲットは、癌細胞で過剰発現する HER2 に特異的なヒト化抗体である trastuzumab の Fab 領域を用いた。 H 鎖と L 鎖の共発現系を構築し、 CORYNEX® 基準株の YDK010 を宿主として Fab 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) ヘテロ二量体として培養上清に分泌されることが確認された。さらに Biacore 解析により、分泌した Fab が抗原 HER2 への結合能を有していることが確認された。

しかしながら、 YDK010 株による Fab 分泌量は約 10 mg/l と低レベルであった。 Fab 分泌の律速として細胞表面の透過障壁の影響を考え、細胞壁ペプチドグリカン (PG) 合成を担うペニシリン結合タンパク質 (PBP) の欠損が Fab 分泌に及ぼす影響を調べた。その結果、グリカン鎖伸長とペプチド架橋の両機能を有する PBP の一種、 PBP1a を欠損することで Fab 分泌量が顕著に向上した。ここでの検討宿主 YDK010 は、野生株 ATCC13869 への変異処理により取得された変異株 AJ12036 を基に、さらに Surface-layer (S 層) タンパク質 CspB を欠損させた株であった。そこで、野生株で $\Delta pbp1a$ 効果を調べた結果、 Fab 分泌量は向上しなかったため、 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、野生株を背景として $\Delta cspB$ と $\Delta pbp1a$ の組合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 分泌量が向上した。細胞表面の透過性を評価するためにリゾチーム感受性を調べた結果、野生株は強固な耐性を示したが、 $\Delta cspB$ および $\Delta pbp1a$ の各単独欠損株はリゾチームに対して感受的となり、二重欠損株ではさらに相乗的に感受性が増加した。これらの結果から、細胞表面中のタンパク質透過において PG 層と S 層の 2 つの透過障壁があり、それらを同時に改善することが Fab 分泌量向上に重要であることが示された。

さらなる Fab 生産効率向上のためには分解抑制が重要と考え、原因プロテアーゼ探索を目的として protease/peptidase 関連遺伝子の増幅を試みた。その結果、 "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、予想した効果に反し、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。 NCg10824 増幅は H 鎖および L 鎖モノマーの分泌量は減少させたことから、その効果は H 鎖-L 鎖の会合促進であることが示唆された。 $\Delta cspB \Delta pbp1a$ と NCg10824 増幅の組合せによりさらに相乗的に Fab 分泌量が増加し、 YDK010 株と比較して約 9 倍に向上した。

以上、 *C. glutamicum* を用いて抗体 Fab 断片を活性体として分泌生産することに成功した。さらに Fab 高生産性を目的とした分子育種研究の結果、細胞壁関連タンパク質の CspB と PBP1a の二重欠損による細胞表面の透過性の向上、および NCg10824 増幅による H 鎖-L 鎖の会合促進効果を見出し、分泌量 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ダウンストリームを簡略化できる系であるため、本研究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。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： 生物プロセス 専攻
Department of
学生氏名： 松田 吉彦
Student's Name

申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員 (主)： 和地 正明 教授
Academic Advisor(main)
指導教員 (副)：
Academic Advisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)
Thesis Summary (approx.300 English Words)

Antigen-binding fragments (Fabs) have been promising molecular species in the biopharmaceutical field. Although production of recombinant Fab using mammalian or microbial expression systems has been researched, there are some issues depending on those characteristics. *Corynebacterium glutamicum* is industrial strain used for amino acid production for many years, and the protein expression system (CORYNEX®) demonstrated improved yield and purity for some applications. In this study, I attempted to produce recombinant Fab in *C. glutamicum* and develop the improved system enables industrial production.

The Fab fragment of “trastuzumab” was successfully secreted by the CORYNEX® system using the conventional *C. glutamicum* strain YDK010, and the secreted Fab had correct antigen-binding activity. However, the productivity was very low, approximately 10 mg/l. To improve the secretion efficiency, I investigated the effects of deleting cell wall-related genes. Fab secretion was increased significantly by deletion of *pbp1a*, encoding one of the penicillin-binding proteins (PBP1a), mediating cell wall peptidoglycan (PG) synthesis. However, this $\Delta pbp1a$ mutation did not improve Fab secretion in the wild-type ATCC13869 strain. Because YDK010 carries a mutation in the *cspB* gene encoding a surface (S)-layer protein, I evaluated the effect of $\Delta cspB$ mutation on Fab secretion from ATCC13869. The $\Delta pbp1a$ mutation showed a positive effect on Fab secretion only in combination with the $\Delta cspB$ mutation. The $\Delta cspB\Delta pbp1a$ double mutant showed much greater sensitivity to lysozyme than either single mutant or the wild-type strain, suggesting that these mutations reduced cell wall resistance to protein secretion. Thus, there are at least two crucial permeability barriers to Fab secretion in the cell surface structure of *C. glutamicum*, the PG layer, and the S-layer. Furthermore, I investigated the effects of overexpressing protease/peptidase genes to screen for the protease(s) responsible for Fab degradation. Unexpectedly, overexpression of NCgl0824, encoding M23 family metalloendopeptidase-like protein, enhanced Fab production significantly. NCgl0824 overexpression reduced monomeric protein secretion, suggesting that it facilitated the assembly of heavy and light chains.

In conclusion, the Fab fragment was successfully secreted from *C. glutamicum* in active form. Combination of the $\Delta cspB\Delta pbp1a$ double mutation and the NCgl0824 overexpression increased Fab production considerably, over 100 mg/l. This improved CORYNEX® system allows efficient industrial Fab production.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).