

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

## 論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	松田 吉彦		
論文審査 審査員		氏名	職名		氏名	職名
	主査	和地 正明	教授	審査員	平沢 敬	准教授
	審査員	三原 久和	教授			
		福居 俊昭	准教授			
		蒲池 利章	准教授			

## 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「*Corynebacterium glutamicum* を用いた抗体 Fab 断片高生産菌の分子育種」と題し、4 章よりなっている。

第 1 章「序論」では、抗体医薬品の歴史と現状、および微生物を宿主としたタンパク質発現系について概説している。さらに、本論文の研究対象である *Corynebacterium glutamicum* を用いたタンパク質発現系の概要を紹介し、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章「*C. glutamicum* における抗体 Fab 断片発現系の構築および細胞壁タンパク質欠損株における分泌生産量向上」では、*C. glutamicum* を宿主として、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 領域の分泌発現系の構築を行っている。*C. glutamicum* 由来 *cspB* プロモーターおよび *Corynebacterium 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、Fab(H+L) 分泌発現を検討している。その結果、H 鎖と L 鎖がそれぞれ分泌されると同時に、これらが分子間ジスルフィド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を確認している。分泌した Fab を Protein G アフィニティクロマトグラフィにて粗精製し、Biacore を用いて抗原 HER2 への結合能を調べた結果、期待通りの抗原結合能を有していることを確認している。これは、*C. glutamicum* を用いて多量体タンパク質を活性型として分泌生産できることを示した初めての例である。しかしながらその生産量は約 10 mg/l と低レベルであったため、宿主の改変を行っている。まず細胞表層の透過障壁の影響を検討した結果、ペプチドグリカン合成酵素の 1 種 PBP1a と S-レイヤー構成タンパク質 CspB を同時に欠損させることにより生産量が約 6 倍に増大することを見出している。これらの結果より、*C. glutamicum* 細胞表層のタンパク質透過において、ペプチドグリカン層および S-レイヤーの少なくとも 2 つの透過障壁があり、それらを同時に除去することで Fab 分泌生産量を向上できると結論している。

第 3 章「Fab 生産効率化因子の探索および H 鎖-L 鎖の会合促進因子 NCgl0824 の取得」では、さらなる Fab の生産量の向上を目指し、Fab 生産効率化因子の探索を行っている。まず Fab の分解に関わる因子を明らかにする目的で、ペプチダーゼ・プロテアーゼ関連遺伝子の過剰発現の効果を調べている。その結果、予想に反して“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 NCgl0824 の増幅により、Fab(H+L)の分泌生産量が向上することを見出している。NCgl0824 の増幅は 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、未知の機構により H 鎖と L 鎖の会合を促進していると推測している。最終的に  $\Delta cspB \Delta pbp1a$  変異と NCgl0824 増幅を組み合わせることで相乗的に Fab 分泌量が向上し、約 9 倍に分泌量が向上することを示している。

これを要するに、本論文は *C. glutamicum* を宿主として抗体 Fab 断片を高発現させるための遺伝的因子を明らかにし、抗体医薬生産への応用の可能性を示したものであり、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は、博士 (工学) の学位論文として十分に価値があるものと認められる。