

酵母を用いた抗体生産

黒田 康介・小林 和男*

最近、世界中の製薬企業で抗体医薬の開発が進められている。その中で生産コストの抑制は課題となっており、組換え抗体を安価に生産する生産系の確立が望まれている。抗体医薬を安価に生産できるようになれば、現在、癌疾患などの限られた領域での開発が先行している抗体医薬について、適用可能な疾患領域が広がる可能性がある。代替宿主の候補としては、大腸菌などの細菌、カビなどの真菌類、植物（細胞）、昆虫細胞などがあるが、動物細胞以外の宿主で抗体全長を大量に生産した例はほとんどない。

我々はこれまでにメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を用いて、1) アスパラギン結合型 (*N*-型) 糖鎖改変酵母の育種¹⁾、2) プロテアーゼ破壊株育種²⁾、による抗体生産を検討してきたが、十分な質・量を確保できる系を構築するに至っていなかった。

酵母を用いた抗体生産における課題

抗体に付加される酵母特有の糖鎖 酵母に抗体遺伝子（軽鎖・重鎖）を導入した場合、軽鎖（Lc）は培養液中に多量に分泌される。一方、重鎖（Hc）はほとんど分泌されず、わずかに分泌された重鎖分子についても、異常な糖鎖修飾を受けており、1) *N*-グリカナーゼ消化に耐性であること、2) Fc 領域を生産した場合には見られないこと、3) Fab 領域には *N*-型糖鎖付加部位は存在しないことから、*O*-グリコシル化を受けた分子として分泌されていることが解った。結果的に会合抗体（Hc2 Lc2）はほとんど存在していなかった（図1）。

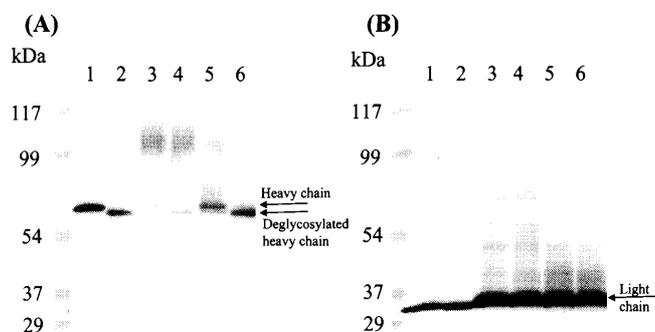


図1. 酵母にて生産した抗体に付加される特有の糖鎖。(A) 抗Fc抗体による重鎖検出。(B) 抗κ抗体による軽鎖検出。Lane 1, 2: 動物細胞。3, 4: Pmp 阻害剤未添加。5, 6: Pmp 阻害剤添加。1, 3, 5: *N*-グリカナーゼ未処理。2, 4, 6: *N*-グリカナーゼ処理。

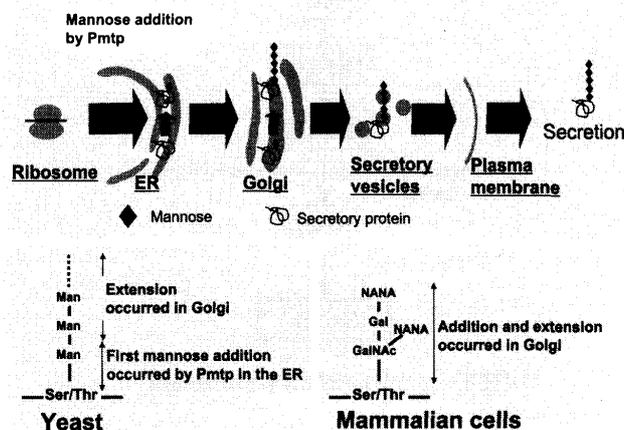


図2. 酵母における *O*-型糖鎖付加機構。酵母ではERで最初の *O*-型糖鎖が付加される。

酵母における *O*-型糖鎖形成機構 *O*-型糖鎖形成機構は、動物細胞と酵母細胞において大きく異なっている（図2）。動物細胞においては、ゴルジ体にてセリン・スレオニン（Ser/Thr）残基にまず *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）残基が付加され、さらにガラクトース（Gal）、シアル酸（NANA）などの糖が付加され、多様な分岐構造を形成する。一方、酵母においては、小胞体（ER）膜に局在する protein-*O*-mannosyltransferase（Pmp）により、マンノース残基が付加され、さらにゴルジ体にてマンノシルトランスフェラーゼによりマンノース残基が付加される。

この酵母特有の *O*-マンノース型糖鎖は、タンパク質のフォールディング、多量体形成の場である ER において起こることから、抗体軽鎖・重鎖の会合形成を阻害することが示唆され、さらにこの異常な糖鎖はヒトに対する抗原性の増大、安定性の低下、抗原やFcレセプターとの結合能の低下を及ぼす可能性がある。したがって酵母を用いて医薬品用途の抗体を生産するには、この *O*-マンノース型糖鎖を除去することが必要であると考えた。

酵母特有の *O*-型糖鎖を抑制した抗体生産

Pmp活性阻害剤を用いた *O*-型糖鎖の抑制 上記の酵母特有の *O*-マンノース型糖鎖を抑制する方法としては、1) 付加部位であるセリンおよびスレオニン残基を他のアミノ酸へ置換した抗体遺伝子の作製、2) Pmp活

* 著者紹介 キリンファーマ（株）生産技術研究所（主任研究員） E-mail: kkobayashi@kirin.co.jp

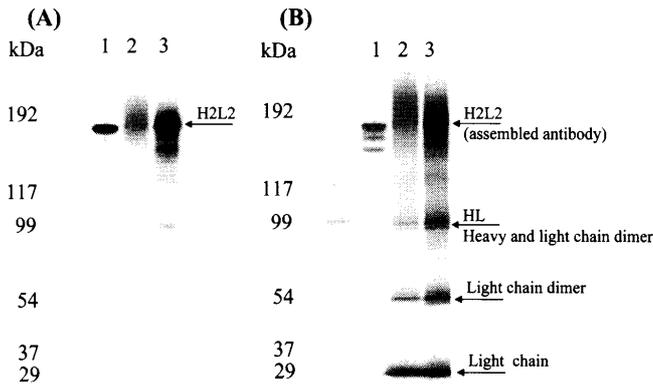


図3. PMT阻害剤によるO型糖鎖の抑制。(A) 抗Fc抗体による重鎖検出。(B) 抗 κ 抗体による軽鎖検出。Lane 1: 動物細胞, 2: Pmtp阻害剤未添加, 3: Pmtp阻害剤添加。

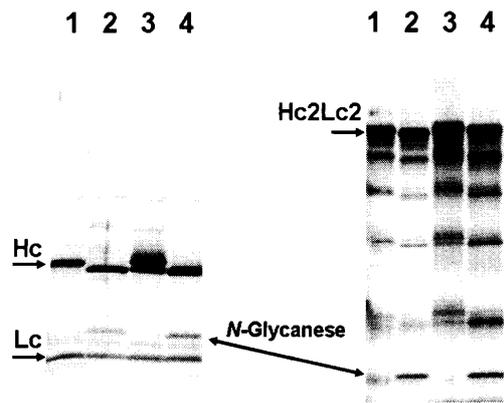


図5. 精製された酵母生産抗体。(A) 還元条件下でのSDS-PAGE, (B) 非還元条件下でのSDS-PAGE, Lane 1, 2: 動物細胞, 3, 4: 酵母細胞, 1, 3: N-グリカナーゼ未処理, 2, 4: N-グリカナーゼ処理。

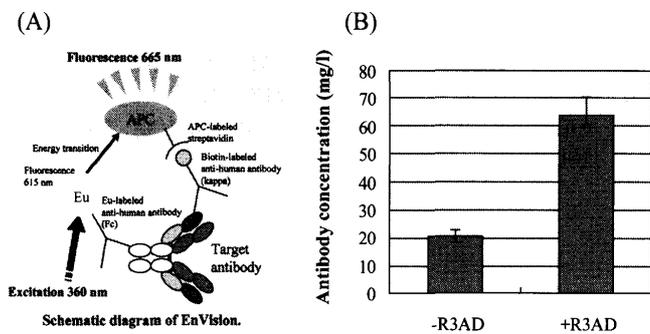


図4. O型糖鎖抑制による抗体生産性の増加。(A) EnVisionによる抗体定量方法。(B) O型糖鎖抑制剤 (R3AD) の有無による培養上清の抗体定量結果。

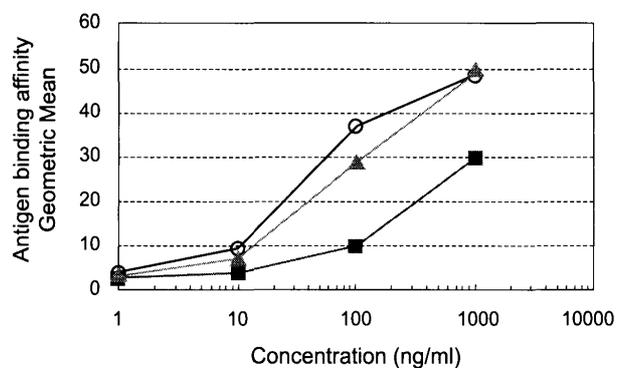


図6. 抗原への結合活性。■: 元株 + Pmtp 阻害剤, ○: PMT 遺伝子破壊株 + Pmtp 阻害剤, ▲: 動物細胞。

性を抑制する酵素阻害剤の添加培養, 3) PMT 遺伝子を抑制した株の育種, が考えられる。まず Pmtp 活性阻害剤 (R3AD)³⁾ の培地中への添加培養を検討した。培養液に分泌された抗体を分析したところ, 抗体へのO-グリコシル化が抑制され (図1), 会合体形成が効率的に起こっていることを確認した (図3)。

Pmtp 活性阻害剤によりO-グリコシル化が抑制した場合, 会合抗体の分泌量も増加していた。また細胞内の会合抗体も増加していたところから, 抗体軽鎖-重鎖の会合効率を増加させることにより, プロテアソームなどによる分解を抑制していることが示唆された。ある種の抗体では小スケールで数十 mg/l レベルの分泌生産が3日以内の培養で可能であった (図4)。

PMT 遺伝子抑制によるO型糖鎖の抑制 酵母において Pmtp は, タンパク質の活性発現・局在, さらに細胞壁を形成するマンノプロテインの合成に関与する重要な酵素である。このPmtpをコードするPMT遺伝子は実験酵母において6遺伝子が見いだされている。今回使用したメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* においても,

ゲノムのドラフトシーケンスの結果から, 5種の遺伝子を見いだした。そこでこれらのPMT遺伝子の破壊株または発現抑制株を作製し, 抗体遺伝子を導入し生産したところ, いくつかの株においてO-グリコシル化の抑制, 会合抗体の増収効果が見られた。また Pmtp 阻害剤との相乗効果を示す株も存在した。培養液中に分泌された抗体はプロテインA樹脂をベースとした一般的な方法で精製することができた (図5)。

精製された抗体の抗原結合活性を測定したところ, Pmtp 阻害剤添加培養単独では十分な結合活性を有さない抗体種もあった。一方, ある種のPMT遺伝子破壊・抑制株では単独, または Pmtp 阻害剤添加との相乗効果により, 動物細胞の生産する抗体と同等の結合活性を有していた例もあった (図6)。

まとめ

小胞体における酵母特有のO-グリコシル化は, 抗体の重鎖と軽鎖の会合による, 適切な立体構造の形成および分泌過程を阻害すること, この現象が酵母での抗体製造

特集

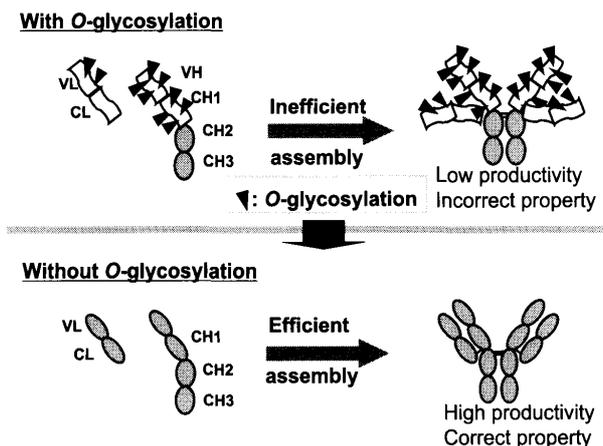


図7. 酵母におけるO型糖鎖抑制による抗体生産

における主課題の1つであることが解った。今回いくつかの方法を用いることにより、O-グリコシル化の抑制が、酵母を用いた高品質・高収量の抗体生産に効果的であることを示した(図7)4)。

今回の検討により、酵母を用いた医薬品用途への高品質な抗体生産の可能性を示した。さらに酵母特有のO-グ

リコシル化の抑制手法は抗体のみならず、他の医用タンパク質生産への応用が可能と考えられた。

本研究はNEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)の助成事業「バイオプロセス実用化開発プロジェクト(平成16年~18年度)」, 助成事業名「ヒト適応型糖鎖生産メタノール資化性酵母(ヒト型酵母)による糖タンパク質生産プロセス実用化」として、独立行政法人・産業技術総合研究所と共同で実施された。

現在、N-型糖鎖⁵⁾、O-型糖鎖⁶⁾をヒト適応型糖鎖へ改変する技術を確立し、酵母でのタンパク質生産技術を洗練していくべく、第一三共(株)をパートナーに加え研究開発を推進している。

文献

- 1) Kuroda, K. *et al.*: *FEM Yeast Res.*, **6**, 1052 (2006).
- 2) Kuroda, K. *et al.*: *FEM Yeast Res.*, **17**, 1307 (2007).
- 3) Orchard, M. G. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 3975 (2004).
- 4) Kuroda, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 446 (2008).
- 5) Chiba, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **273**, 26298 (1998).
- 6) Amano, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3232 (2008).



生態恒常性工学 —持続可能な未来社会のために

藤江幸一 編著 A5判, 197ページ, 定価 2,000円(税別), コロナ社

“生態”という言葉と聞くと、多くの人は動物や植物の生態を思い浮かべるのではないと思う。しかし、本書でいう“生態”は、少しその意味するところが違う。本書でいう“生態”は物質の循環を指しており、生物学の分野である“生態学”を指しているのではない。

今日、環境問題(地球温暖化・環境ホルモンなど)やエネルギー問題が大きく取り上げられている。CO₂排出規制や石油の高騰といった問題が連日マスコミで取り上げられており、誰もが無関心ではいることができなくなっているのも事実である。このような社会背景のもと、CO₂排出の少ないクリーンで、化石燃料消費の抑えられた社会構造を作るための技術開発のコンセプトが本書で述べられている。化石燃料は、エネルギーとしてだけ使われているのではなく、物質生産のための原材料としても重要である。また、CO₂は人が生活をすれば必ず廃棄物が出てくる。この廃棄物の処理過程で放出されてくる。このような事実から、本書では、効率のよい循環型(リサイクル)社会をどのようにして作っていくのかを中心に述べている。

生物工学分野の立場から言えば、研究者や学生が興味を持つと思われる事項として「生分解性高分子」が挙げられる。本書でも当然この話題について取り上げられている。また、「バイオレメディエーション」や「バイオマスの利用」などについても触れられており、今の時代の要求するほとんどの事項について広く解説がなされている。ただ、このように広い分野の解説がある反面、誌面の都合もあり、あまり深い解説とはなっていないことも事実である。

本書は、まずリサイクル社会について考えるときの入門書として利用するには、全体を鳥瞰できるので適した書籍であるといえる。本書をきっかけに、さらに深く勉強をと考えたなら、本書に挙げられている参考書などで勉強されることを勧める。

(長浜バイオ大学 川瀬雅也)