

## 出芽酵母によるバイオ医薬品生産を目指して

富本 和也

バイオ医薬品とは、遺伝子工学的手法によって生産される主に抗体・サイトカインなどの組換えタンパク質を有効成分とする医薬品で、近年世界的に需要が拡大している。組換えタンパク質生産系としてもっとも汎用されているのは大腸菌であろうと思われるが、原核生物である大腸菌はタンパク質の翻訳後修飾である糖鎖付加を行うことができない。糖鎖（とりわけアスパラギン残基のアミノ基に付加されるN-結合型糖鎖）には、タンパク質の安定化・プロテアーゼからの保護、中和抗体生産の抑制などの作用があり、バイオ医薬品においては、投薬量の削減、長期にわたる薬効継続などの効果をもたらす。このため、バイオ医薬品は主に哺乳動物培養細胞を宿主として生産されている。しかし、同細胞には培養液が高価、人畜共通感染ウイルスによる汚染、増殖が遅いなどの問題がある。これらの諸問題を克服すべく、哺乳動物培養細胞以外の宿主の開発が進められている。もっとも注目されている宿主の一つは、醗酵食品製造に使用されている出芽酵母である。出芽酵母は真核生物であるためタンパク質への糖鎖付加能を持ち、安価な培地で速く増殖する上、人畜共通感染ウイルスも存在しないと思われる。しかし、出芽酵母のN-結合型糖鎖構造はヒトのそれとは大きく異なる。哺乳動物において特徴的・典型的な糖鎖は複合型糖鎖と呼ばれ、還元末端側からN-アセチルグルコサミン・ガラクトース・シアル酸が付加された構造をとる。一方、出芽酵母のそれは多数のマノース残基で構成されており（図1）、哺乳動物とは大きく異なるため哺乳動物に対して抗原性を示す<sup>1)</sup>。したがって、野生株の出芽酵母で生産した組換え糖タンパク質をバイオ医薬品として用いることは不可能である。そこで、出芽酵母糖鎖構造改変の試みがなされている。MNN1・OCH1（いずれもマノース転移酵素）・MNN4（リン酸化マノース転移酵素活性化因子）遺伝子の三重破壊株では、抗原性のない、マノース残基が8つの糖鎖（ハイマンノース型糖鎖）を合成することが知られている。しかし、このような糖鎖構造改変株は著しい増殖不良と

なり、タンパク質生産性も低下する。出芽酵母において、N-結合型糖鎖は細胞壁共有結合性タンパク質に付加されることで細胞壁を強化するが、改変株では主としてこの機能が損なわれるために、増殖不良になると考えられる。

この問題を解決するため、不均衡変異導入法による増殖能回復変異株の取得が試みられた。同法は（株）ネオ・モルガン研究所（2015年4月より（株）ちとせ研究所）によって開発された方法であり、変異体を取得したい細胞に対し、校正能が欠損した変異型DNAポリメラーゼ $\delta$ 遺伝子を導入して、継代を繰り返す方法である。DNAポリメラーゼ $\delta$ は、細胞分裂時のDNA複製においてラギング鎖のみに作用して変異導入されるため、同鎖に対して「不均衡」に変異が蓄積する。不均衡変異導入法は、EMSなどの変異導入剤処理やUV照射などと比べて変異導入頻度こそ低いものの、塩基置換に偏りが少ないことが知られている（たとえばEMS処理ではGC $\rightarrow$ ATへの置換が頻発する）。このため、出芽酵母においては80%以上の高頻度でアミノ酸置換を伴う変異が導入され、目的とする変異体取得率も高いとされる<sup>2)</sup>。前述の三重破壊株（糖鎖構造改変株）を親株とし、不均衡変異導入法を適用したところ、複数の増殖能回復変異株が得られた。そのうち1株ではグリオキシル酸回路・糖新生に関連する遺伝子群の高発現が見られ、細胞壁の肥厚も認められた<sup>3)</sup>。この他にも同法を用いて、バイオ燃料生産用酵母として広く使用されている「台研396号」を親株としたエタノール・塩ストレス耐性株<sup>4)</sup>、偏性嫌気性で培養困難な*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株（胃潰瘍の原因となるピロリ菌除去能を持つ）を親株とした酸素耐性株の分離なども行われており<sup>5)</sup>、同法は産業用微生物全般の育種においてきわめて有望な手法である。

出芽酵母を宿主としたバイオ医薬品には、子宮頸がんワクチンなど製品化されているものもあるが、ごく一部である。特に、出芽酵母には合成経路がまったく存在しないシアル酸の付加反応は困難とみられるが、メタノール資化酵母*Pichia pastoris*においては、異種生物由来遺伝子を複数導入することで、これに成功したとの報告もある<sup>6)</sup>。今後の進展に期待したい。

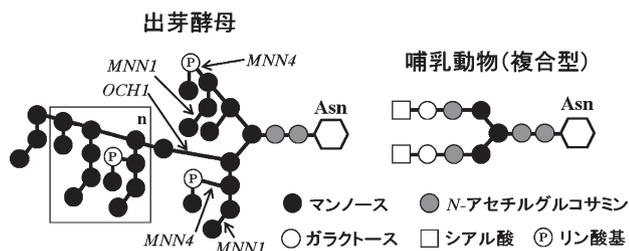


図1. 出芽酵母・哺乳動物のN-結合型糖鎖構造

- 1) Chiba, Y. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 786 (2009).
- 2) 笠原 堅：第182回酵母細胞研究会例会 講演要旨集, p. 1 (2012).
- 3) Abe, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1398 (2009).
- 4) Hayashi, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 476 (2012).
- 5) 伊藤喜之ら：特許公開2011 - 135804.
- 6) Hamilton, S. R. *et al.*: *Science*, **313**, 1441 (2006).