

組換えアプロチニンの大量生産

○米田 明広、中武 博、今村 隆幸、野崎 周英
財団法人 化学及血清療法研究所 第一研究部
〒869-1298 熊本県菊池市旭志川辺 1314 番地 1
TEL: 0968-37-3100 FAX: 0968-37-3616

【序論】

アプロチニンは、58 個のアミノ酸からなる分子量 6512Da の 1 本鎖ポリペプチドであり、ウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI: Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) と呼ばれ、Kunitz 型セリンプロテアーゼインヒビターの系統に属する。阻害されるセリンプロテアーゼには、トリプシン、キモトリプシン、プラスミン、血漿カリクレインなどが挙げられる。アプロチニンは、血液凝固反応で生成したフィブリン塊を、セリンプロテアーゼなどの線溶系酵素から防御する作用があるため、心臓血管外科等での手術における血液、体液等の漏出を防ぐことを目的とした生体組織接着剤の成分として、また、手術中における血液損出低下と術後出血減少を目的とした静注用製剤として広く使用されている。しかしながら、ウシ由来の製剤は、ウイルスやプリオン等の混在を完全に否定することが難しく、これに代わる安全性の高い医薬品の開発が望まれている。

我々は、酵母宿主細胞において均一にプロセッシングされ、分泌されたタンパク質の N 末端配列が天然型と同じである組換えアプロチニンを、大量生産するための方法を確立したので、以下にその内容を示す。

【結果及び考察】

1. 組換えアプロチニン発現プラスミドの構築

プラスミドベクター pSAC35 は、*S.cerevisiae* 2 μ m プラスミドを基本とした酵母-大腸菌シャトルベクターである。pSAC35 には 2 μ m プラスミドの特徴である 599bp の反復配列が組み込まれており、この間に、 β -ラクタマーゼ遺伝子を含むクローニングベクター pUC9 配列が挿入されている。pSAC35 によって形質転換された大腸菌はアンピシリン耐性を示し、プラスミドは複製維持されるが、一旦、酵母に導入されると、プラスミド上の反復配列間で相同組換えが起こり、このシャッフリングにて、pUC9 配列は脱落するように設計されている。この脱落により、プラスミドは酵母核内で安定的に複製維持される。本研究では、pSAC35 の *NotI* サイトに *PRBI* プロモーター、シグナル配列/アプロチニン構造遺伝子、*ADHI* ターミネーターを順に連結した発現カセットを挿入し、シグナル配列の異なる 4 種類の組換えアプロチニン発現プラスミドを構築した。

2. フラスコ培養における組換えアプロチニンの発現

組換えアプロチニン発現プラスミドを、それぞれ *S.cerevisiae* YBX7 株にエレクトロポレーション法にて導入し、BMMD 寒天培地上に生育してきた酵母コロニーを単離した。これらの酵母クローンを 10mL BMMD 培地に播種し、30°C で 4 日間の振とう培養後、培養上清中の組換えアプロチニン発現量を活性換算で測定した。また、組換えアプロチニンの発現を確認できた酵母株については、プロテインシークエンサーによる N 末端アミノ酸配列分析を行った。トリプシン阻害活性から換算した組換えアプロチニンの発現量は、YBX7 [pKAP008] 株と YBX7 [pKAP028] 株で最も高く、両株とも約 31mg/L であった。いずれも、プレ α 接合因子シグナル配列を組み込んでおり、これまでの報告に沿う高発現となった。N 末端配列に関しては、プレ(プロ) α 接合因子シグナル配列を用いた YBX7 [pKAP008] 株では、アプロチニンの N 末端にプロ配列の 3 残基が付加した状態で発現したが、プロ配列を含まないプレ α 接合因子シグナル配列のみを用いた YBX7 [pKAP028] 株では、天然型と同じ N 末端配列であった。この結果は、*S.cerevisiae* 由来のシグナルペプチダーゼが、プレ α 接合因子シグナル配列後方のアミノ酸配列に関係なく、 α 接合因子のシグナル切断を行うことができたことを示している。一方、

SUC2 シグナル配列を含んでいる YBX7 [pKAP010]株においては、天然型と同じ N 末端配列をもつ組換えアプロチニンの発現を確認できたが、 α 接合因子シグナル配列を含む株の約 1/10 の発現量であった。また、*PSTI* シグナル配列を含んでいる YBX7 [pKAP012]株においては、組換えアプロチニンの発現を確認することができなかった。以上のことから、組換えアプロチニンの *S.cerevisiae* 分秘発現系におけるシグナル配列は、発現量とシグナル切断に大きく関与していると考えられる。

3. 組換えアプロチニン発現株の高密度ファーメンター培養

次に、フラスコ培養で高発現を示し、N 末端配列が天然型アプロチニンと同じであった YBX7 [pKAP028]株の高密度ファーメンター培養を行った。フェドバッチ培養においては、RQ を常に 1.0 に保つように、手動又はコンピューター制御で、フェドバッチ培地の供給速度を調節した。10L タンクでの培養は、バッチ培養開始からフェドバッチ培地の供給が終了するまでの合計約 110 時間行った。培養終了時点の組換えアプロチニンの分泌発現量は活性換算で 426mg/L であり、細胞乾燥重量(CDW)は 70.9g/L に達した。この高発現は、RQ を 1.0 に保った培養の高密度化、並びに、組換えアプロチニンの高い安定性によって達成されたものと考えられる。

4. 組換えアプロチニンの精製

高密度ファーメンター培養からの上清を、50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化した SP-Sepharose XL-FF 陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、同緩衝液で洗浄後、0.4M 塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液 (pH7.0) の塩濃度勾配溶出により、OD₂₈₀ におけるピーク画分を回収した。次に、この溶出画分を分子量 50,000 カットオフの限外ろ過にかけ、パス画分を分子量 5,000 カットオフの限外ろ過にかけた。さらに、濃縮画分を生理食塩水に置換し、無菌ろ過した。精製工程における組換えアプロチニンの回収率は、高密度培養の上清を 100 として、最終的に、70%以上となり、高い回収率で組換えアプロチニンを精製できた。一方、我々は、組換えアプロチニンを発現しない YBX7 [pSAC35]株由来の培養上清を免疫源として作製した抗宿主酵母タンパク質/ウサギ抗体による宿主酵母タンパク質の含量測定にて、SP-XL、限外ろ過、無菌ろ過を経た精製組換えアプロチニンの純度は 99.9%以上であることを確認している。以上のように、我々は、高密度ファーメンター培養(総培養液量: 約 6.5L)から、高純度の組換えアプロチニン活性分子 1.37g を精製する系を構築した。これにより、安全性の高い組換えアプロチニンを低コストで生産できるものと考えられる。

3.5 組換えアプロチニンの物性解析

精製した組換えアプロチニンの物性を、ウシ由来アプロチニンと比較分析した。トリプシン阻害活性の比較では、いずれも、ほぼ同等のトリプシン阻害活性を示した。また、アミノ酸組成分析では、いずれも、ほぼ同等のモル比を示し、これらは、理論値と一致した。さらに、MALDI-TOF/MS による質量分析では、組換えアプロチニンは 6513.51[M+H]⁺、ウシ由来アプロチニンは 6518.25[M+H]⁺ でそれぞれ単一ピークが出現し、これらは、理論値(6512)と比較しても誤差範囲レベルであった。その他、SDS ポリアクリルアミド電気泳動、ゲルろ過 HPLC 分析でも、両者の同等性を確認した。

【結語】

本研究では、10L タンクを用いて最終培養液量 6.5L まで高密度ファーメンター培養を行う実験室スケールでの生産方法を構築した。我々は、実験室スケールから実製造スケールにスケールアップするための発現株及び発現産物の安定性を、細胞継代数を重ねた継代安定性試験にて確認しており、今後は、組換えアプロチニンを医薬品として展開するために、実際のスケールアップ実験及び更なる精製度向上検討を行うとともに、最終製剤における毒性試験や抗原性試験を行う予定である。