

総合論文

ピキア酵母を宿主とするヒト組換えタンパク質の分泌発現—小型培養槽を使用したミッドカイン、プレイオトロフィン、および胆汁酸活性化リパーゼの小規模生産—

村杉 章

株式会社 明治 生産本部技術部

(2011年6月6日受付 2011年8月29日受理)

Secretory expression of human proteins in *Pichia pastoris*: Production of midkine, pleiotrophin, and bile salt-stimulated lipase in controlled fermentor

Akira Murasugi (Technical Department, Production Division, Meiji Co., Ltd., 1-2-10 Shin-suna, Koto-ku, Tokyo 136-8908) Seibutsu-kogaku **89**: 570–583, 2011.

The recombinant protein expression system of methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, is now widely used in order to express various heterologous proteins. Densely cultured recombinant *Pichia* cell which can secrete a target protein, may efficiently produce a large amount of the target protein into the culture medium. The secreted proteins may be captured using expanded bed adsorption. We tried to express three human proteins, two cytokines (or growth factors), midkine (MK) and pleiotrophin (PTN), and breast milk bile salt-stimulated lipase (BSSL) in high cell density fermentor cultures of recombinant *P. pastoris* to obtain a great deal of the active and intact proteins. When MK secretion signal was used for MK protein expression, a half of secreted MK received yeast specific mannosylations. Thus, yeast α -mating factor (α -MF) secretion signal was used. MK secreted in the medium received no mannosylation, and the accumulated amount was about 640 mg/l. However, about 70% of the product was truncated. Therefore, *P. pastoris* host cell deficient for vacuolar proteinase A was used, and MK was expressed at 20°C and at pH 3. During one week induction, about 360 mg/l of non-modified authentic MK was accumulated. For the PTN expression, α -MF secretion signal and the host GS115 were used. PTN was expressed using a fermentor in the same manner for the final MK expression, except that the induction of PTN was conducted at pH 5. At fourth day after induction, about 260 mg/l of non-modified authentic PTN was obtained. PTN in the culture could be captured by expanded bed adsorption with efficiency of 96 %. In order to make the final recombinant *Pichia* cell for the expression of rhBSSL, secretion signal, C-terminal repeat number in hBSSL cDNA, copy number of expression cassette in a transformant, and host cell were determined on the basis of their efficiency for the expression in flask culture. When the BSSL expression was induced by methanol at low cell density in a fermentor, almost no enzyme was accumulated in the medium. Therefore, the time of induction, and then the cell growth condition were studied and optimized. Finally, about 1000 mg/l BSSL was accumulated in the medium. The heterologous protein expression system of *P. pastoris* may be powerful for productions of certain therapeutic proteins. As described above, three human proteins were successfully expressed in their suitable conditions, respectively. For the industrial productions of recombinant proteins, optimization of the fermentor production is indispensable and might be laborious work. Optimization processes described here will be helpful for fermentor expressions of other proteins.

[**Key words**: midkine, pleiotrophin, cytokine, growth factor, bile salt-stimulated lipase, *Pichia pastoris*, fermentor, expanded bed adsorption]

ピキア酵母 (*Pichia pastoris*) 異種タンパク質発現系の大きな特徴は、メタノールによって誘導されるアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*)^{1,2)} などの強力なプロモーターを使用していること、およびメタノールを炭素源とする合成培地を使用した宿主の高密度培養法が確立していることである^{3,4)}。

Phillips Petroleum Company (Bartlesville, Oklahoma) は1970年代、メタンから食品タンパク質への生物学的変換を目指して、ピキア酵母培養液1 l当たり130 gの乾燥菌体を生産する高密度培養法を確立した。しかし、ピキア酵母は米国FDA (Food and Drug Administration) によるGRAS (Generally Recognized as Safe) の認定を得られず⁵⁾、また第一次石油ショック (1973年) も生じたため、後にはこのプロジェクトを停止した。1980年代にはSalk Institute Biotechnology Industrial Associates (SIBIA) (La Jolla, California) などの研究者がピキア酵母の宿主-ベクター系を開発している⁶⁾。ピキア酵母は、2種類のアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1* および *AOX2*) を持つが、このうち *AOX1* の発現が強力である。この発現系では、メタノールによって強く発現が誘導されるアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*) の強力なプロモーターを使用している。ピキア酵母の *AOX1* 遺伝子について、メタノールにより最大限の発現誘導を行うと、*AOX1* タンパク質は、ピキア酵母全タンパク質の30%以上になると言われる¹⁾。このように有利な条件を備えたピキア酵母発現系を使用して、大腸菌LacZタンパク質、HB抗原、およびヒト腫瘍壊死因子をピキア酵母細胞内に発現させた例⁷⁻⁹⁾、パン酵母インベルターゼおよびヒト血清アルブミンを培地中に分泌発現させた例^{10,11)} が1987年から1992年にかけて報告された。Phillips Petroleum Company が出願した、このピキア酵母異種タンパク質発現系の米国特許は1989年に成立した¹²⁾。そして、この年の秋から4年間で、Glaxo-Wellcome社を含む20社と、この技術の使用契約を交わしている。また、研究用キットの販売も開始した。1993年には、Invitrogen Corporation (Carlsbad, California) にこの発現系の販売権を譲渡し、Research Corporation Technologies (Tucson, Arizona) に特許権を譲渡した⁵⁾。その結果、世界各地でこの発現系が広く使用されるようになり、1998年まででもすでに多くのタンパク質発現の報告が蓄積していた¹³⁾。

この発現系は分泌発現だけでなく、細胞内発現にも有用である。筆者らの行った発現実験でも、レクチン^{14,15)} であり、免疫調節タンパク質¹⁶⁻¹⁸⁾ でもある、霊芝 (*Ganoderma lucidum*) のLing Zhi-8 (LZ-8) タンパク質の発現において、発現株の改良を行った結果、高密度培

養と組み合わせると、1 g/l以上の発現を見込むことができた (未発表)。このタンパク質の場合、もともとシグナルペプチドを持たないものであり、細胞内発現が最適な方法であると思われたが、細胞内での発現では、一般的に、組換え体細胞の破壊、目的タンパク質のリフォールディングや不純物の多い状態からの精製などの操作が必要となり、特に培養規模が大きくなった場合、より多くの手間と時間を必要とする。このような観点から、できることなら目的タンパク質を組換え体菌体外に分泌させることを考える。分泌発現の例として医薬品ヒト血清アルブミンが挙げられる¹⁹⁾。ヒト血清アルブミンを使用する際、一回の投与量が数十グラムとなるため、またコストの面からも極端に高い発現量が必要であった。さらに、医薬品ヒト血清アルブミンは、静脈中に投与されるため非常に高い精製度も必須であった。これは非常にハードルの高い極端な例である。旧 (株) ミドリ十字は、このプロジェクトを開始した際、当初パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主として使用していたが、後にピキア酵母の発現系使用に移行した。メタノールによる誘導法を最適化するなどして10 g/l以上の発現量を達成している^{20,21)}。この組換えヒト血清アルブミンについては、(株) バイファが製造を行い、田辺三菱製薬 (株) が、遺伝子組換え人血清アルブミン製剤「メドウェイ注」として、2008年に上市した。

ここでは、小型培養槽を用いた発現例として、ヒトの多くの疾病に関連すると考えられるミッドカイン^{22,23)}、同一のタンパク質ファミリーに属するプレイオトロフィン、および特に出生直後の嬰兒にとって栄養学的に重要と考えられるヒト母乳胆汁酸活性化リパーゼ (human bile salt-stimulated lipase, hBSSL)²⁴⁾ の発現について、種々の方法を用いた発現の量と質の改良経過および結果について述べたい。これらの結果の多くは、2008年ドイツのニュルンベルグで開催された薬学系学会、2nd world Conference on Magic Bullets (Ehrlich II) におけるInvited Presentationの中で発表したものである²⁵⁾。

ピキア酵母異種タンパク質発現系

最近数多くの新たな発現ベクターと宿主が開発されているが、ここではおもに発現例に使用した初期型のベクターと宿主を使用した発現系について述べる。初期型発現ベクターの一般的な構造はFig. 1に示した。ここに示される5' *AOX1* には、目的タンパク質のメタノール誘導高発現に必須である *AOX1* 遺伝子のプロモーターが含まれる。*HIS4* 遺伝子は、この遺伝子を欠損した宿主を形質転換した後、組換え体を選択する際のマーカー遺伝子となる。

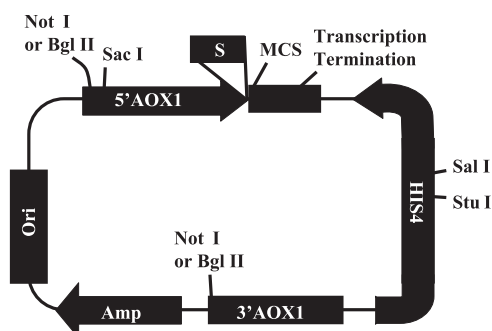


Fig. 1. A general structure of expression vectors. Secretion signals (S) are not used for intra-cellular expression. For obtaining properly processed amino-terminals of target proteins in secretory expression, DNAs coding signal sequences should be directly linked to 5' ends of DNA coding mature proteins. The multi-cloning site (MCS) cannot be used in this construction. There are expression vectors that do not contain 3'AOX1 regions. HIS4 shows the histidinol dehydrogenase gene from *P. pastoris*. Amp shows the ampicillin resistance gene. Ori shows the *Escherichia coli* origin of replication. 5'AOX1 region contains the promoter from *P. pastoris* AOX1 gene. This figure is reproduced from Ref. 30 with permission of Bentham Science Publishers.

代表的な発現ベクターと宿主ピキア酵母をTable 1およびTable 2に示した⁶⁾。これまで発現プロモーターとして使用してきたメタノールによって厳密に制御されるAOX1プロモーターのほかに、構成的に発現するGAPプロモーターなどを用いた発現ベクターも作製されている。また、後に述べるように選択マーカー遺伝子としてkan（カナマイシン耐性遺伝子）、またはble（ブレオマイシン耐性遺伝子）を含む発現ベクターを用いることによって、転写プロモーターから転写ターミネーターまでを含む「発現カセット」を多コピー含む組換え体を選択することができる。宿主については、最もよく使用されてきた宿主GS115のほかにも、プロテアーゼ欠損株SMD1168が使用できる。

目的タンパク質cDNAが発現ベクターの適切な位置に挿入された「発現プラスミド」を、宿主細胞へ移入するために電気穿孔法やスフェロプラスト法を使用する。この発現系では、発現プラスミドが宿主染色体DNAに挿入されること、または転写プロモーターから転写ターミネーターまでの発現カセットを含むDNA断片が、宿主染色体DNAの一部と置換されることにより、それぞれ染色体DNAの一部として固定され、安定した目的タンパク質の発現を実現している⁶⁾。発現プラスミドの染色体DNAへの挿入のされ方の一例を示す模式図をFig. 2に示した。

目的タンパク質cDNAの塩基配列中にSacI、またはSalIの認識配列が存在しない場合、発現ベクターに目的

Table 1. Expression vectors for secretion.

Name	Selectable marker	Feature
pHIL-S1	<i>HIS4</i>	<i>AOX1</i> promoter <i>PHO1</i> secretion signal
pPIC9K	<i>HIS4 kan</i>	<i>AOX1</i> promoter α -MF ^a secretion signal
pPICZ α	<i>ble</i>	<i>AOX1</i> promoter α -MF secretion signal
pGAPZ α	<i>ble</i>	<i>GAP</i> promoter α -MF secretion signal

^a α -mating factor

This table is reproduced from Ref. 30 with permission of Bentham Science Publishers.

Table 2. Host strains.

Strain	Genotype	Phenotype
X-33	Wild-type	
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ His ⁻
KM71	<i>aox1A::ScARG4 his4 arg4</i>	Mut ^S His ⁻
SMD1168	<i>his4 pep4A::URA3 ura3</i>	Mut ⁺ His ⁻ Proteinase-A deficient

This table is reproduced from Ref. 30 with permission of Bentham Science Publishers.

タンパク質cDNAを挿入した発現プラスミドをSacI、またはSalIにより切断すると、1ヶ所が切断されて直線化され (Fig. 1)、それぞれ染色体DNAのAOX1またはHIS4遺伝子への挿入が生じやすい。一方、目的タンパク質cDNAの塩基配列中にBglIII、またはNotIの認識配列が存在しない場合、発現プラスミドのBglIII、またはNotIによる切断では、発現カセットを含むDNA断片の切り出しが行われ (Fig. 1)、染色体DNAのAOX1遺伝子との置換が生じやすい。

発現カセットが多重に組み込まれ、発現量が増加すると期待される組換え体を確実に得るためには、カナマイシン耐性遺伝子やブレオマイシン耐性遺伝子が適切な位置に挿入された発現ベクターを使用し、より高い抗生物質耐性を示す組換え体を選択する。たとえばカナマイシン耐性遺伝子を持つpPIC9Kなどを使用して作製した組換え体について、タンパク質合成阻害剤であるG418（別名ジェネティシン）による選択をした場合、G418濃度0.5 mg/mlでは、1～2コピー、および4 mg/mlでは7～12コピーの発現カセットがカナマイシン耐性遺伝子と連動して組換え体に組み込まれていると見積られる²⁶⁾。

ピキア酵母異種タンパク質発現系の概要や、組換え体の作製については書籍、総説、論文およびInvitrogen Corporationのマニュアルなどに詳しい記載がある^{5,6,27-32)}。

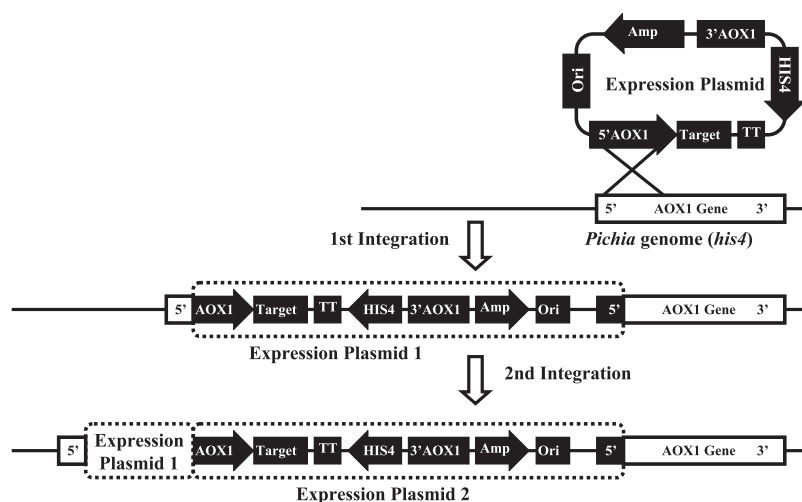


Fig. 2. Integration of an expression plasmid into *P. pastoris* genome. The schema shows the single cross-over integrations of an expression plasmid at the 5' *AOX1* gene of *P. pastoris* genome. TT shows transcription terminator. When an expression plasmid is digested with a restriction enzyme, e.g. *Bgl* II or *Sac* I, the cross-over event will be driven mainly at a digested site in the 5' *AOX1* region. The schema also shows the result of the 2nd integration made at the same site with the 1st one.

小型培養槽を使用する場合の標準的な培養法

ピキア酵母の高密度培養法は、既に1970年代に Phillips Petroleum Companyによって確立されている³⁾。異種タンパク質発現系への利用法についても種々の書籍、論文およびInvitrogen Corporationのマニュアルなどに記載されている³³⁻³⁵⁾。使用する培地は、詳細に規定された合成培地である。目的タンパク質の発現に関して最適な条件を知るためには、種々の条件を充分制御できる培養槽が必要である。標準的な組換え体の培養は、増殖期、移行期、発現期に分けられる⁵⁾。全体を通してpHを5-6、溶存酸素量(DO)を20-30%に保つ。基本的に酵母細胞の増殖のための炭素源としてグリセロールを使用し、*AOX1*遺伝子プロモーターを目的タンパク質の発現に用いる場合、その誘導はメタノールにより行う。増殖期は、初期培地に含まれるグリセロールを消費するまで、十分な溶存酸素濃度を保って培養する。移行期では、*AOX1*遺伝子プロモーターの脱抑制のため、炭素源であるグリセロールの供給速度を制限する。発現期には、DOを20-30%に維持しながら炭素源としてメタノールのみを流加する。このとき培養液中のメタノール濃度は、できれば0.1%程度までに抑える。Mut⁺ (methanol utilization plus) のピキア株は、*AOX1*および*AOX2*遺伝子を保持しており、メタノールを通常通り代謝できるが、Mut^S (methanol utilization slow) 組換え体では*AOX2*遺伝子のみを保持しているため、メタノール代謝能は低い。したがって、これらの株で発現培養時に必要とされるメタノールの流加速度が異なる。

分泌タンパク質の回収法： 拡張吸着流動床ストリームライン

細胞外に分泌されたタンパク質の回収法の1つとして拡張吸着流動床 (expanded-bed adsorption) がある。この原理をFig. 3に示した。この方法では、吸着体を拡張させた状態で、酵母菌体を含む希釈した培養液を、カラム下部から供給し、目的タンパク質を樹脂に吸着させる。吸着後、洗浄用緩衝液で同様に吸着体を洗浄し、その後、吸着体を沈降させて、最後に溶出用緩衝液をカラム上部から供給して目的タンパク質を溶出させる。

ここで使用したのはストリームラインC-50 (GE Healthcare Life Sciences) (カラム：5 cm × 100 cm, 吸着体：ストリームラインSP, ゲルベッド容積：300 ml, 線速：250 cm/h) である。

この方法は、実験室である程度の量の培養液から発現タンパク質を回収精製するのに便利であり、また、スケールアップも比較的容易に行える。これは実際組換えヒト血清アルブミン医薬品製造にも使用されている²¹⁾。組換えヒト血清アルブミンの工業的精製に関しては、規模の小さな装置 (0.4 cm × 90 cm) による耐久試験で、ストリームラインSP樹脂は1000回の繰り返し吸着、再生の間、回収率約70%に変化がなく、実用的使用に耐えると考えられた²¹⁾。また、この方法を工業的生産に採用することによって、従来法と比較すると、生産時間に関しては効率が約50%向上し、組換えヒト血清アルブミンの収率に関しても約30%向上するという。

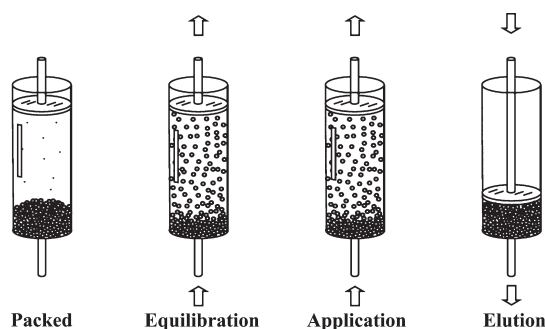


Fig. 3. Expanded-bed adsorption. Equilibration of the adsorbent resin by a buffer solution is conducted with upward flow after the resin was packed. Proper size-distribution of the resin is formed in a column through this process. Diluted culture broth containing high concentration of cells can be directly applied to the column with upward flow. After enough washing by a buffer solution with upward flow, the resin is packed to the bottom of the column, and target protein can be eluted by an elution buffer, e.g. a buffer containing salt, with downward flow. The concentrated solution of the target protein can be obtained. This figure is reproduced from Ref. 30 with permission of Bentham Science Publishers.

ヒトミッドカインおよび ヒトプレイオトロフィンの分泌発現

ミッドカインは、胚発生時に発現するヘパリン結合性成長因子の1種であり、多くの機能を持つタンパク質である^{22,36)}。ミッドカインは、細胞の成長、生存、および移動など多くの生物学的に重要な事象を調節する因子である。このような機能は、がん、炎症、自己免疫、虚血、神経の成長、修復や傷の治癒に関連していると考えられる^{22,23)}。門松らは、1988年、マウス胚性腫瘍性細胞をレチノイン酸で処理することによって誘導される遺伝子産物として、ミッドカインcDNAを初めてクローニングした³⁷⁾。続いて筒井らは、ヒトのミッドカインcDNAをクローニングした³⁸⁾。ヒトミッドカインタンパク質は、121個のアミノ酸から成る、分子量約13,200の塩基性タンパク質であり、何の修飾も受けていない単純タンパク質であると考えられている。このタンパク質は2つのドメインから成っている。そして、それぞれのドメインには3つずつの逆向き β -シートが含まれ、それぞれ3ヶ所および2ヶ所のジスルフィド結合により固定されている³⁹⁻⁴¹⁾。

現在、豪州のバイオテクノロジー会社Cellmid Ltd.は、ミッドカインの製造法、微量測定法、多くの使用用途などに関する約75の特許を保持しているという⁴²⁾。彼らは、すでに健常人の血液中に存在するごく微量のミッドカインを測定することができるELISAキットを開発した。がんや関節炎の初期にもミッドカインの発現量が増加するので、この測定キットを使用することによって、

がんや関節炎の初期診断ができる可能性がある。また、竹中ら⁴³⁾、および住田ら⁴⁴⁾は、ミッドカインタンパク質の心筋梗塞に関する動物実験で、治療薬としての効果を観察しており、Cellmid Ltd.は、この用途に関するヒト試験を計画しているという。さらに、脳梗塞に対しても効果が期待されている。ミッドカインは、他にも多くの疾患に関連しており、抗体を含めて、ミッドカインの活性を阻害する物質は、がん、炎症性疾患、および自己免疫疾患などに対する治療薬として期待される^{22,23)}。

一方、プレイオトロフィンは、繊維芽細胞や神経細胞の成長因子として発見されたタンパク質であり、ミッドカインと同じファミリーに属するとされる^{36,45,46)}。ヒトプレイオトロフィンは、136個のアミノ酸から成る分子量約15,300の塩基性の単純タンパク質であると考えられる。プレイオトロフィンはミッドカインとアミノ酸配列に関して約50%の同等性がある。これら2つのタンパク質は類似した生物学的活性を持つと考えられている。

ミッドカインの発現については、大腸菌を用いた細胞内発現の報告があるが、その発現量は、精製後で5-15 mg/lと比較的少ない^{47,48)}。ピキア酵母発現系を使用した発現においても、タンパク質によっては多量に細胞内に蓄積した例が知られているので¹³⁾、念のためピキア酵母細胞内でのミッドカイン発現を試みた。発現カセット、4~5コピーが組み込まれたピキア酵母(GS115)の高密度発現培養を行ったが、発現量は300 mg/l程度であった⁴⁹⁾。組換え体細胞から、糖の結合していないミッドカイン約64 mg/lを精製した。しかし、ここで細胞内に蓄積した目的タンパク質を精製するためには、細胞の破壊やタンパク質のリフォールディングなどの操作が必須であり、効率的でない。この程度の発現量ではあまり利点がないと考え、やはり分泌発現を目指すこととした。

ヒト血清アルブミン発現の場合には、それ自身の分泌シグナルを使用して充分の発現量が得られているので、まずミッドカイン自身が持つ分泌シグナルを使用した。ミッドカイン発現組換え体を作製し、この高密度培養を行ったが、発現量は100 mg/l程度であり、しかも発現したミッドカインには、多くの糖が結合していた^{50,51)}。Fig. 4Aに、このミッドカインのMALDI-TOF MSによる分析結果を示す。この中で、本来のミッドカインの分子量である13,240 Daから高分子量側に、分子量162 Daずつ増加する、周期的に見られるスパイクが糖の結合したミッドカインのシグナルである。

ミッドカインの簡便な生物活性確認法としては、CHO細胞などの増殖促進活性測定法を用いた。前述の細胞内発現ミッドカインについてもこの方法で活性を検出している。このミッドカイン分泌シグナルを使用して

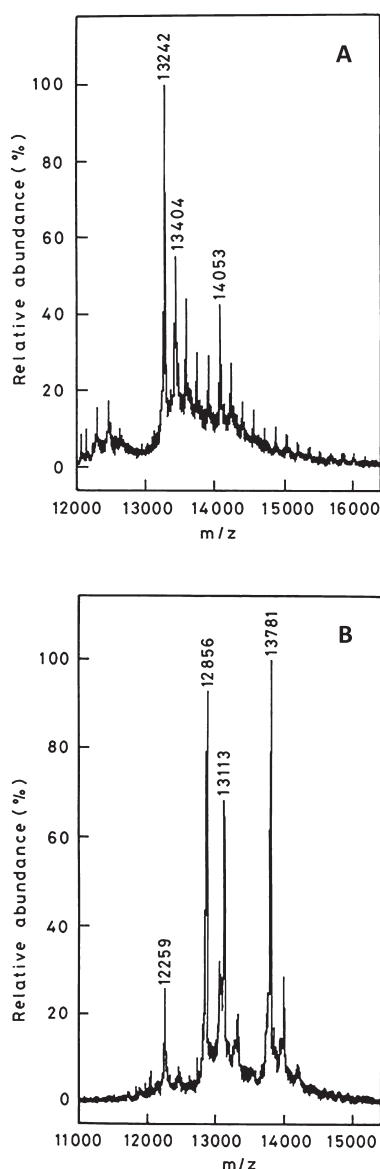


Fig. 4. Mass spectrometry of purified recombinant human midkine. Mass spectrograms of the purified recombinant human midkine (rh-midkine) expressed using its own secretion signal (A), and that expressed using the α -mating factor prepro sequence (B) are shown. Average masses of the components in the purified rh-midkine were measured. Mass per charge is indicated by m/z . Average masses of the spikes having abundant signals are indicated. These figures are reproduced from Ref. 50 with permission of Japanese Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry.

発現させたミッドカインの精製物（この場合は糖鎖を結合していないミッドカイン）は、細胞内発現精製ミッドカインより高い比活性を示した⁵⁰⁾。

ここで得られた糖化ミッドカインの糖結合部位は、カルボキシル末端側に存在する3個の特定のスレオニン残基であることが分かった。そこで、これらのスレオニン残基を遺伝子工学的にアラニン残基に置換し、そのミッ

ドカインを分泌発現させた。この変異型ミッドカインの、CHO細胞増殖促進活性の測定では、前述の、変異していない、糖が結合していない、分泌されたミッドカインと同程度の活性を確認した⁵¹⁾。しかしながら、このタンパク質はまだ発見されて時間も経ておらず、活性など未知な部分が多かったことと、将来医薬品として使用される可能性があることを考慮して、できる限り、修飾されていない、もともとのタンパク質そのものとして発現させる方向で考えることにした。

次は、分泌シグナルとして、パン酵母 α -接合因子のシグナルを使用した⁵²⁾。この場合、組換え体の発現カセットコピー数は、分泌発現量に影響を与えないことが確認されたので、多コピー発現カセットを含む組換え体の選択は行わなかった。小型培養槽を用いて発現株の高密度培養を行い、メタノールで発現を誘導した結果、発現量は約640 mg/lにも達した。ところが、発現ミッドカイン分子の約70%は、アミノ末端から数個のアミノ酸が欠失していた⁵⁰⁾。このミッドカインのMALDI-TOF MS分析の結果をFig. 4Bに示した。この発現物は本来のミッドカインタンパク質のアミノ末端に、制限酵素認識塩基配列に由来する4アミノ酸が余分に結合しているので、分解を受けていないミッドカインの分子量は、13,779 Daである。アミノ末端から5アミノ酸、7アミノ酸、および12アミノ酸が除かれた目的タンパク質の分子量が、それぞれ13,112 Da、12,856 Da、および12,257 Daである。この場合、発現産物が宿主自身のタンパク質分解酵素により分解されていると考えられた。最終的には、本来のアミノ末端を持つミッドカインを発現する発現プラスミドを構築し、プロテアーゼ欠損変異株SMD1168を用いて発現株を作成して発現培養を行った。組換え体増殖時のpHは、後述のrhBSSLの発現例⁵³⁾にならって4とし、発現時のpHは、インシュリン様増殖因子1 (IGF-1) の発現例⁵⁴⁾にならい、発現産物の分解が抑制されるという3とした。さらに、発現時の培養は20°Cで行った。

その結果、変化を受けていない、真正ミッドカインタンパク質約360 mg/lの発現を確認した (Fig. 5)⁵⁵⁾。この培養上清からミッドカインを精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した結果をFig. 6に示した。

また、精製ミッドカインのMALDI-TOF MS分析の結果をFig. 7に示した。この図に示された分子量13,241.2は、 $[M + H]^+$ イオンの平均分子量であり、分子量13,447.7は、ミッドカインにマトリックス分子であるシナピン酸が付加された分子の平均分子量である。

このように最終的には、何の修飾もされていない真正ミッドカインタンパク質を大量に発現させる方法を開発

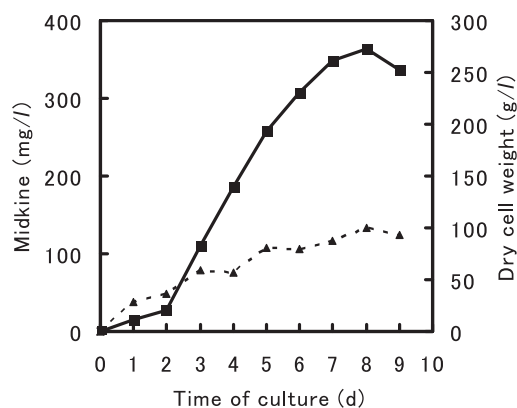


Fig. 5. High cell-density fermentation of a candidate clone expressing rh-midkine. Closed squares show concentration of rh-midkine in medium. Closed triangles show dry-cell weight of cells in one liter of culture broth. Concentration of rh-midkine in medium was determined with a HiTrap heparin column attached to an AKTAexplorer 10S (GE Healthcare Life Sciences). This figure is reproduced from Ref. 55 with permission of Elsevier.

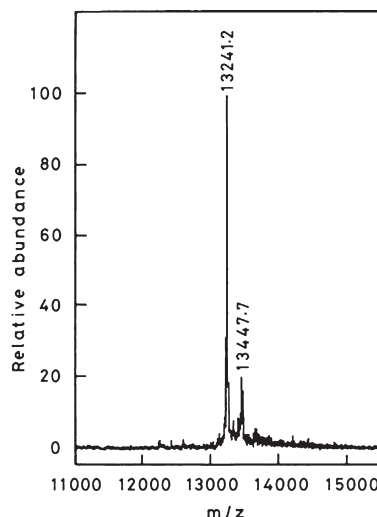


Fig. 7. Mass spectrometry of purified rh-midkine. Mass spectrogram of purified rh-midkine expressed using α -meting factor pre-pro sequence is shown. Average mass of the purified rh-midkine was determined. Mass per charge is indicated by use of m/z . Average masses of spikes are indicated. This figure is reproduced from Ref. 55 with permission of Elsevier.

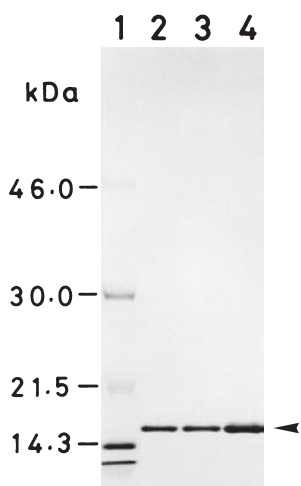


Fig. 6. SDS-PAGE of purified rh-midkine. Purified rh-midkine was analyzed using chemically synthesized midkine as the standard. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, 1 μ g standard; lane 3, 1 μ g purified rh-midkine; lane 4, 2 μ g purified rh-midkine. This figure is reproduced from Ref. 55 with permission of Elsevier.

した。1回の小型培養槽での発現培養により得られたミッドカインを回収し、数百ミリグラムの精製組換えミッドカインを得ることができるようになった。

プレイオトロフィンの発現の場合には、それ自身の分泌シグナルを使用したところ、発現は検出されず、ミッドカインシグナルの使用では、目的タンパク質が高度に糖化されてしまった。最終的には、 α -接合因子の分泌シグナルの使用、および宿主としてGS115を使用して組換え体を作製し、ミッドカインの最終培養条件で発現

培養を行った。ただし、発現は、pH 5で行った。その結果、約260 mg/lの発現を達成した⁵⁶⁾。

Table 3には、組換えプレイオトロフィンを、この培養液からストリームラインを用いて回収し、3段階のカラムクロマトグラフィーで精製した際の結果を示した。回収については、ストリームラインSP樹脂を用いてこのような塩基性タンパク質を回収したので、非常に高い収率(96%)が得られている。この1回の発現培養の結果、最終的に、4.9 lの培養液から、精製度90%の組換えプレイオトロフィンが、72%の回収率で713 mg得られた⁵⁶⁾。この精製組換えプレイオトロフィンのCDスペクトルをFig. 8に示した。229 nmに見られる大きな正のシグナルは、分子内に存在するジスルフィド結合を示すと考えられる⁵⁷⁾。また、このCDスペクトルの結果から、Chenらの方法⁵⁸⁾に従って求めた組換えヒトプレイオトロフィンの α -ヘリックス、 β -シート、およびランダムコイルの割合は、1:41:58であった。すでに知られているラットプレイオトロフィンの二次構造とよく一致しており⁵⁷⁾、同様に、それは、その構造が既に解析されているヒトミッドカインの二次構造ともよく似ていることが分かった³⁹⁾。

これらミッドカインとプレイオトロフィンの発現に関する結果をまとめて、1998年から一連の製造法に関する特許出願を開始し、2005年には米国の特許が成立した⁵⁹⁾。現在、豪州のバイオテクノロジー会社Cellmid Ltd.が、この特許を所有している。この特許は、彼らの

Table 3. Purification of recombinant human pleiotrophin (rhPTN) from fermentation broth^a.

Fraction	Volume (ml)	rhPTN (mg) ^b	Purity (%) ^c	Recovery (%)
Expanded bed adsorption	200	950	63	96
Sulfated cellulofine ^d	195	840	70	85
Gel filtration ^e	200	828	74	84
PolySULFOETHYLc	80	713	90	72

^a Recombinant hPTN was purified from 4.9 liters of fermentor broth.

^b Amounts of rhPTN were determined by HPLC analysis.

^c Purity was measured on the basis of the absorbance at 280 nm.

^d Sulfated cellulofine was obtained from Seikagaku Corp. Tokyo, Japan.

^e A Superdex 75 prep grade (GE Healthcare Life Sciences) column was used.

This table is reproduced from Ref. 56 with permission of Japanese Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry.

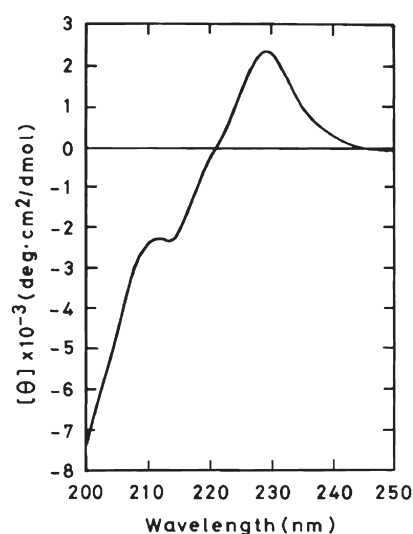


Fig. 8. Circular dichroism measurement of purified rh-pleiotrophin. Circular dichroism (CD) of the purified rh-PTN, 0.203 mg/ml in saline, was measured from 200 to 250 nm using J-500A CD spectropolarimeter (JASCO Corp., Tokyo, Japan). It is deduced from the spectrum that rh-PTN has disulphide bond(s)⁵⁷ and β -structure(s)⁵⁸ in the molecule. This figure is reproduced from Ref. 56 with permission of Japanese Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry.

所有するミッドカインに関する75の特許のうちでも、事業の鍵となる特許リストの最初に掲載されている⁴²⁾。

現在までに、組換えミッドカインの発現には、ピキア酵母異種タンパク質発現系の他に、昆虫細胞の発現系、L細胞の発現系、および大腸菌の発現系などが用いられているが、ピキア酵母の発現系を使用して調製したミッドカインは、取得できる量が多かったこともあり、これまで、細胞の生存を促進させる実験に最も広く利用されてきた²³⁾。その結果、この組換えミッドカインは、神経細胞および心臓の細胞などの生存に、効果的に作用することが分かってきた。したがって、この組換えミッドカインは、今後も種々の用途開発実験などに使用されるだろう。

母乳胆汁酸活性化リパーゼ (BSSL) の分泌発現

母乳胆汁酸活性化リパーゼは、ヒトの母乳に約0.4 g/lという比較的高い濃度で含まれる、糖鎖で修飾された分子量約11万のタンパク質である。このタンパク質は、722個のアミノ酸から成り、カルボキシル末端には、11アミノ酸の繰り返し配列が16回繰り返されている。この酵素は、ヒト、ゴリラ、イヌやネコなどの限られた哺乳類の乳に含まれるが⁶⁰⁾、羊、牛の乳には含まれない^{61,62)}。この酵素は、膵臓からも分泌され、コレステロールエステラーゼ、およびカルボキシエステルリパーゼとしても知られている。しかし、誕生間もない嬰兒では、膵臓からのBSSLの分泌が十分でない。したがって、このような場合、母乳に含まれるBSSLが、脂肪の消化吸収に重要な役割を果たしていると考えられている⁶³⁾。十分に発達せずに早期に誕生した未熟児では、母乳に含まれるこの酵素の重要性がより大きくなると考えられる。Anderssonらは実際、摂取する母乳中に、活性の損なわれていないこの酵素が存在することが、未熟児誕生後の成長、体重の増加に効果的であることを示唆する結果を得ている⁶⁴⁾。スウェーデンの医薬品企業、Sobi (Swedish Orphan Biovitrum) 社は、組換えヒトBSSL (rhBSSL) を、未熟児を対象とし、その成長を促す医薬品として開発中である。恐らくここでは組換え哺乳類動物細胞を用いて発現した酵素を使用している。Sobi社は、この医薬品候補 (Kiobrina®) について、すでに第二相ヒト臨床試験で有効性を確認しており、第三相試験の開始を決定している^{65,66)}。

ヒトBSSL cDNAは、1991年にクローニングされた⁶⁷⁾。これは分割されたcDNA断片を含む4個のファージクローンとして得られていた。これらDNA断片のセンス鎖およびアンチセンス鎖について、すべての領域の塩基配列の確認を行った。

分割されたcDNAを連結して得られた全長cDNAが、確かにhBSSLをコードしているかどうか確認するため、この全長cDNAを用いて、2つの方法でhBSSLタンパク質を発現させた。1つは、ウサギ網状赤血球溶解物を用いた試験管内での発現である。この場合あらかじめSP6プロモーターおよびRNAポリメラーゼを使用してセンス鎖RNAの合成を行い、mRNAを調製した。このmRNAを鋳型としてBSSLを発現させ、抗hBSSLウサギ抗体を用いたウエスタンブロット分析を行った。この場合糖鎖は結合しないので、理論的には78 kDaのタンパク質が生成されるはずである。この分析の結果、抗hBSSLウサギ抗体と反応する、理論値とほぼ同等の約80 kDaのタンパク質発現物を確認した。もう一つは、SR α プロモーターを使用したCOS細胞中での一過性の発現である。この場合、発現物は糖鎖で修飾されており、ウエスタンブロット分析では、抗hBSSLウサギ抗体と反応する約110 kDaのタンパク質発現物を検出した。また、この発現産物については、*p*-ニトロフェニル酢酸を基質としたエステラーゼ活性の存在を確認した。以上のことから、上記cDNAは、確かに酵素活性を持ったhBSSLをコードしていると判断した⁵³⁾。

ピキア酵母を用いたrhBSSLの発現については、最終的な発現株を得るにあたって、まず、フラスコを使用した発現培養により、いくつかの確認を行った。分泌シグナルについては、BSSL自身のシグナルと酵母インペルターゼの分泌シグナルによる発現を試みた。発現の結果には差が見られなかったもので、もともと酵母内で働くインペルターゼの分泌シグナルを選択した。宿主については、GS115とSMD1168を試みたがこれも発現量に差が観察されなかつたので、GS115を選択した。BSSLのカルボキシ末端の繰り返し配列は、この酵素に特異的なものであるが、この繰り返しの回数と発現量について検討した。このとき、繰り返し回数の異なるBSSL cDNAは、遺伝子工学的手法で作製された。これらが発現ベクターに挿入し、ピキア酵母を形質転換して得られたそれぞれの組換え体についての発現量を測定した。発現量を繰り返し回数に対してプロットすると5回から7回の部分に発現のピークが存在した (Fig. 9A)。16回の繰り返し回数を持つrhBSSLの発現量を基準とすると、最大5.5倍の発現である。

この繰り返し回数は、ウシやラットのBSSLでは少なく、ラットのBSSLでは4回のみである。この繰り返し部分については、BSSLの持つ酵素活性とは関係がないことが知られている⁶⁰⁾。ここでは、十分な活性を持つBSSLをできるだけ多く発現させることが目的であったので、5回の繰り返し配列を含むBSSL cDNAを使用す

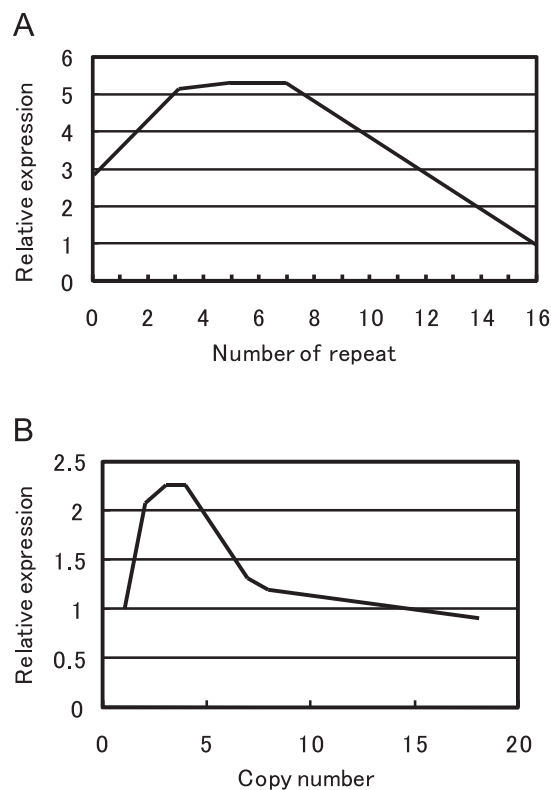


Fig. 9. Effect of C-terminal repeat number and expression cassette copy number on expression of BSSL. Relative rhBSSL expression to standard is plotted against C-terminal repeat number in the rhBSSL (A). The standard is the expression of a recombinant *P. pastoris* that is transformed with the expression plasmid constructed with cDNA coding 16 C-terminal repeat BSSL. Relative rhBSSL expression to standard is plotted against copy number of the expression cassette in a transformant (B). The standard is the expression of a transformant that is integrated with one copy of the expression cassette. Recombinant hBSSL was expressed using shaking flask culture of the recombinant *Pichia* cell. Amount of rhBSSL in the medium was determined from esterase activity.

ることとした。ピキア酵母組換え体に含まれる発現カセットのコピー数についても検討した。その結果、コピー数に対して発現量をプロットすると、この場合には、3, 4コピー部分にピークが存在した (Fig. 9B)。1コピーの組換え体の発現量を基準とすると、最大2.3倍の発現である。この結果から、コピー数が4である組換え体を使用することとした。したがって、次のようなピキア酵母組換え体を作製して使用した。酵母インペルターゼの分泌シグナルをコードするDNAに続けてすぐ下流に、5回のカルボキシ末端の繰り返し配列をコードするhBSSL cDNAを連結し、次にこのDNA断片を、カナマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクターの*AOX1* 遺伝子プロモーターの下流に挿入した。さらに、この発現プラスミドを用いて、ピキア酵母GS115を形質転換し、hBSSL発現カセットを4コピー含む組換え体を選択した⁵³⁾。

作製したピキア酵母発現株について、小型培養槽を使用した高密度培養および発現を試みた (Fig. 10). (Murasugi, A.: Optimized production of recombinant human proteins in fermentor cultures of the yeast, *Pichia pastoris*, *Current Topics in Biotechnology*, Volume 4, 103 (2008)⁶⁸⁾ から, Research Trends の許可を得て転載). 最初の試みは、標準的な方法で行ったので、メタノールの添加時期は、他のものに比べて早くになっている。このとき、発現した rhBSSL はほとんど検出されなかった (Fig. 10, 1a).

しかし、この組換え体を用いたフラスコでの発現の試みでは、増殖させた菌体を 10 倍に濃縮し、その菌体に 1% 程度のメタノールを加えて rhBSSL を発現させると、数日で最大約 200 mg/l の発現を観察していた。そこで、ある程度このフラスコでの発現を模した条件のもとで培養槽での発現を試みようと考え、菌体はメタノールで誘導を始める前に高密度にしておき、メタノールによる発現誘導時には溶存酸素はほぼ 0% (過剰に酸素を与えていない状態である)、温度は 20°C とした。また、発現産物の分解を少しでも抑制しようと、4 日に一度の割合で 0.1% 程度のスキムミルクを添加した。その結果、発現量は約 200 mg/l となった (Fig. 10, 2b)。この発現培養では 4 日程度で発現が停止しているように見える。次に、他の条件は Fig. 10, 2b と同様にして、菌体増殖時の pH を

5 から 3–4 に変更した。その結果、発現の期間が延長され、発現量も約 500 mg/l 程度と倍増した (Fig. 10, 3b)。さらに、他の条件は Fig. 10, 3b と同様にして、増殖時の炭素源であるグリセロールの添加速度を増大させた。この供給速度は、後のメタノールの誘導がスムーズにできるようにと、通常は制限されていたが、この制限をはずしたということである。その結果、また発現期間がさらに延長され、rhBSSL の発現量も約 1000 mg/l に達した (Fig. 10, 4b)⁵³⁾。このように細胞増殖時の条件の違いにより、その後の発現誘導による発現量がこれほど異なるのは興味深い。このときの発現量は、培養上清に含まれるトリオレイン分解活性を pH スタット法で測定し、一定量の精製した rhBSSL の同活性をもとに算出した。この値は、培養上清中のタンパク質を SDS-PAGE 後染色し、一定量の精製した rhBSSL を標準として、デンストメーターで培養上清中の rhBSSL を定量した値とよく一致していた。上記 Fig. 10, 4b の条件で発現培養した際の、培養上清の SDS-PAGE 分析結果の一例を Fig. 11 (Murasugi, A.: Optimized production of recombinant human proteins in fermentor cultures of the yeast, *Pichia pastoris*, *Current Topics in Biotechnology*, Volume 4, 104 (2008)⁶⁸⁾ から, Research Trends の許可を得て転載) に示した。

また、小型培養槽における発現誘導 4 日後のピキア酵

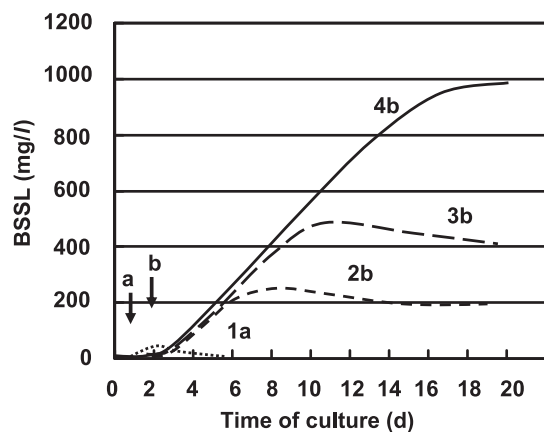


Fig. 10. Schematic representation of rhBSSL expression in fermentor with various conditions. a and b in the figure, time of induction with methanol; a in line designation shows short period glycerol feeding, and b in line designation shows long period glycerol feeding to obtain high cell density; line 1a, methanol induction is started at low cell density; line 2b, glycerol feeding is continued to high cell density, and then, methanol is added for induction; line 3b, the same condition with line 2b except that glycerol is fed at pH 3 or 4 at growth phase; line 4b, the same condition with line 3b except that glycerol is fed at unlimited rate at growth phase. This figure is reproduced from Ref. 68 with permission of Research Trends.

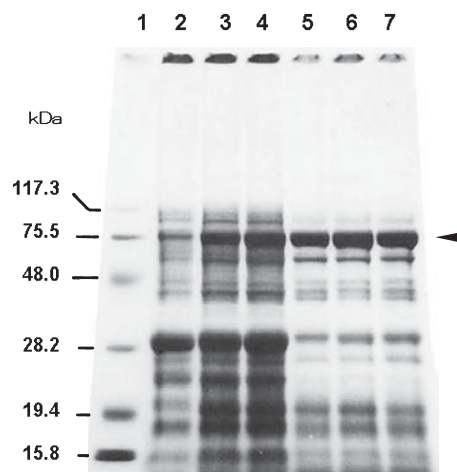


Fig. 11. Expression of rhBSSL in the fermentor culture. Result of SDS-polyacrylamide gel (5–20%) electrophoresis is shown. 10 μ l of culture medium was applied. Proteins were stained with Coomassie blue. The arrowhead on the right shows the position of rhBSSL migration. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, 2 days after induction; lane 3, 5 days after induction; lane 4, 9 days after induction; lane 5, 12 days after induction; lane 6, 16 days after induction; lane 7, 19 days after induction. This figure is reproduced from Ref. 68 with permission of Research Trends.

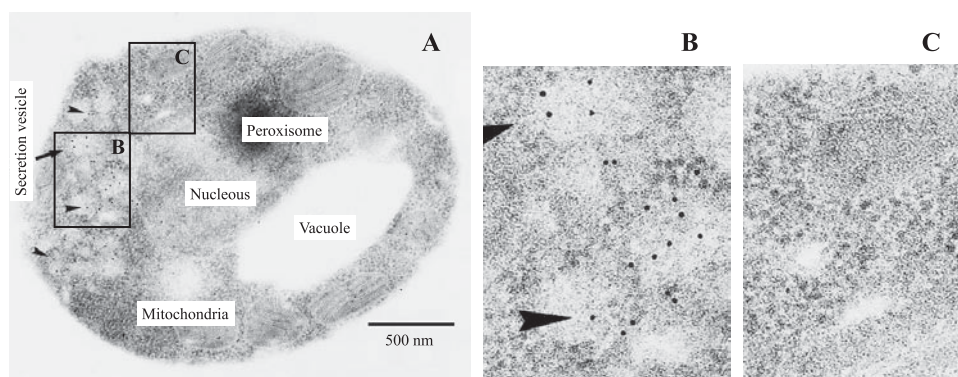


Fig. 12. Recombinant hBSSL synthesis in *P. pastoris*. Nascent rhBSSL enters into endoplasmic reticulum, goes through it, and gets into Golgi. It is transported from Golgi to a secretion vesicle and finally secreted from cell into medium. [Panel A (left)] A photograph of whole cell is shown. The photograph shows that a great numbers of BSSL-specific immuno-gold particles are concentrated in the secretion vesicle in which a high concentration of synthesized rhBSSL molecules are packed. The secretion vesicles are concentrated at a small part of the cell near cell wall. The region in “Box B” contains a great number of the BSSL-specific immuno-gold particles. The region in “Box C” contains a few immuno-gold particles. Arrow and arrow-head show secretion vesicle and immuno-gold particle in secretion vesicle, respectively. [Panel B (Center)] The region in “Box B” in Panel A is enlarged. [Panel C (Right)] The region in “Box C” in Panel A is enlarged. This figure is reproduced from Ref. 30 with permission of Bentham Science Publishers.

母発現株の免疫電子顕微鏡法による観察の結果、分泌小胞は細胞の一極に集中して存在しており、hBSSLに特異的に結合する抗体で標識された金コロイド粒子がその周辺に存在することが明確に示された (Fig. 12)。

発現させた目的タンパク質をストリームラインによって回収した際の結果を Fig. 13 に示した。培養液 4.2 l 中の rhBSSL 2.5 g のうち、1.7 g を回収した (回収率 68%)。この rhBSSL を用いて大まかな結合糖鎖の分析を行い、1 mol の酵素に約 2 mol の *N*-アセチルグルコサミン残基と約 80 mol のマンノース残基を検出した。この結果から、酵素 1 分子の一ヶ所に *N*-型糖鎖、およびカルボキシ末端の反復配列中のスレオニン残基に結合していると考えられる複数の *O*-型糖鎖の存在を予想した⁵³⁾。その後 Trimble らは、筆者らとは別に、ピキア酵母発現 rhBSSL の結合糖鎖の詳細な構造を決定した⁶⁹⁾。また、筆者らは、上記 rhBSSL を用いて各種脂肪酸トリグリセリドの分解速度などについて、母乳 BSSL との比較を行い、これらの同等性を確認した⁵³⁾。この rhBSSL は、牛乳中 37°C で 50 日間保温しても、その活性が半分程度残存しており、非常に安定である。この発現については 1993 年に製造法の特許出願を開始した⁷⁰⁾。1995 年にはすでに得られた結果をまとめ、論文投稿の準備が整っていたが、社内事情により投稿は 2001 年となった。同 2001 年にこれを論文として出版した⁵³⁾。

ヒト BSSL の発現については、90 年代初めから、スウェーデンの医薬品会社、当時の Astra AB の研究者も精力的に研究を行っていた。当初彼らは宿主としてパン酵母を使用していたが、その後ピキア酵母に変更して、

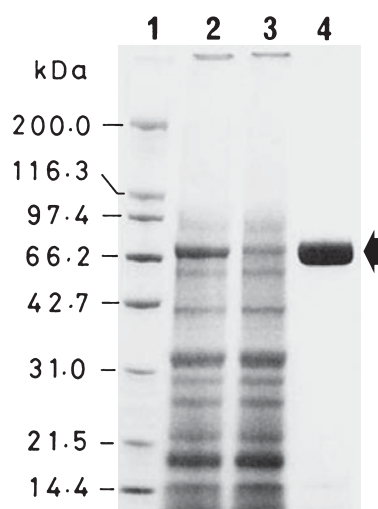


Fig. 13. Capture of rhBSSL from high cell-density fermentation broth. High cell-density culture broth was diluted with the same volume of distilled water, and rhBSSL in the broth was collected by expanded bed adsorption using Streamline SP resin (GE Healthcare Life Sciences). Streamline SP was equilibrated with 50 mM sodium phosphate, pH 6.0. After application of the fermentor broth, the bed was washed with the same buffer. Recombinant hBSSL was then eluted with 0.4 M NaCl, 50 mM sodium phosphate pH 6.6. Samples (10 μ l each) from the media and the eluate were submitted to SDS-PAGE, and proteins were stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, medium of the diluted culture broth; lane 3, medium of the diluted culture broth that flowed through the column; lane 4, salt eluted rhBSSL. Arrow, the position of rhBSSL. This procedure was conducted at room temperature. This figure is reproduced from Ref. 53 with permission of Elsevier.

1996年に特許出願を開始した^{71,72)}。さらに、発現量約300 mg/lの結果を得て、1998年に論文を出版している⁷³⁾。

考 察

本論文の一つのテーマは、ヒトミッドカイン、およびヒトプレイオトロフィンの小型培養槽による小規模生産である。その発現培養の結果として得られた大量の組換えタンパク質は、基礎実験および応用実験の両面で一定の役割を果たしていると考えている。また、もう一つのテーマであるrhBSSLの小型培養槽を用いた発現培養では、いくつかの、これまで論文などに記載されていない新たな培養法が開発されており、その点でも意義があると考えている。これまで一般に行われてこなかった培養法の一つは、ピキア酵母組換え体増殖期に、グリセロール添加速度を制限しなかったことである。この結果、発現期間が大幅に延長された。また、発現時にDOをほぼ0%としていた点である。各種タンパク質の発現においては、発現物の影響や、組換え体細胞の状況によって、それぞれの場合で条件の選択が必要であろう。さらに、ピキア細胞の増殖にグルコースを使用しても、発現時特に問題のないことも一部の実験で確認した。これは後に、他の研究者によっても確認された⁷⁴⁾。これまで述べてきた3種のタンパク質の発現に関する結果は、他のタンパク質をこの発現系で発現させようとする際、何らかのヒントとなるだろう。

あるタンパク質を効率良く分泌発現する発現株を作製するためには、使用する分泌シグナルの選択、導入される発現カセットのコピー数などを最適な状態にする必要がある。小型培養槽を使用した培養を行う際には、それぞれの過程で、温度、pH、およびDO、またメタノールによる誘導のタイミングなど、目的タンパク質の性質やそれまでに得られている情報をもとに決め、さらに確認することが必要である。

ピキア酵母異種タンパク質発現系を使用して発現させたrhBSSLに結合した糖の構造については、Trimbleらが詳細に分析した⁶⁹⁾。基本的には、1本のN-型糖鎖、3本に枝別れしたMan₁₀GlcAc₂、および複数のO-型糖鎖が存在する。O-型糖鎖の場合、構成する糖は基本的にマンノースであり、1ヵ所の部位に2個の糖分子の結合した糖鎖が最も多い。このときリン酸で修飾されたO-型糖鎖も検出されている。同様に、Mechrefら、およびQueらは、ヒト母乳のBSSLに結合した糖鎖の構造を詳細に分析した^{75,76)}。こちらにも1本のN-型糖鎖と複数のO-型糖鎖から成ると考えられる。N-型糖鎖は、2本に枝分かれした構造をしており、N-アセチルグルコサミン残基やマンノース残基のほかに、ガラクトース残基を

含み、さらにN-アセチルノイラミン酸残基やフコース残基を含む場合もある。このようにN-型糖鎖の全体の大きさは両者に大きな違いはないものの、糖鎖の枝別れの仕方や構成成分である糖の種類が異なっている。O-型糖鎖の場合でも、母乳のBSSLでは、構造がより複雑で、構成する糖としてN-アセチルヘキソサミン残基やフコース残基を含んでいる。特に静脈に投与するヒト糖タンパク質医薬品をピキア酵母発現系で生産しようとする場合、このような糖鎖構造の違いは大きな問題となるだろう。

最近、宿主ピキア酵母細胞を遺伝子工学的に改変して、ヒト型糖鎖が結合したタンパク質を発現させることが、ある程度行えるようになってきた⁷⁷⁻⁸⁰⁾。基本的には、宿主ピキア酵母から、タンパク質に結合する糖鎖の生成、およびその結合などに関与するピキア酵母特異的酵素遺伝子（例えば4遺伝子）を取り除き、ヒト糖鎖の生成、およびその糖鎖のタンパク質への結合などに必要な酵素遺伝子群（例えば14遺伝子）を宿主ピキア酵母に導入することである。このように改変された宿主ピキア酵母を使用してヒト化された糖鎖を結合したヒトのタンパク質を発現させることができ、しかも、ピキア酵母異種タンパク質発現系の特長を十分活用できるようになれば理想的である。このように調製した糖タンパク質が、ヒトに対して抗原として作用しなければ、この発現系は、医薬品としてのヒトタンパク質を生産する、さらに重要な手段となる。

要 約

メタノール資化性酵母、ピキア酵母 (*Pichia pastoris*) の異種タンパク質発現系は、現在ではいろいろなタンパク質の発現に広く使用されている。目的タンパク質を分泌することができる組換えピキア酵母細胞の高密度培養により、大量の目的タンパク質の、培地中への効率的な発現を達成できる可能性がある。筆者らは、このシステムを用いて、組換えピキア酵母の高密度培養により、3種のヒトタンパク質、サイトカイン（または成長因子）であるミッドカインとプレイオトロフィン、および母乳胆汁酸活性化リパーゼの発現を試みた。

ミッドカインの発現では、それ自身の分泌シグナルを使用したとき、分泌したミッドカインの約半分は酵母に特有なマンノシル化を受けていた。そこで次に、 α -接合因子の分泌シグナルを使用した。このとき、培地中に分泌したミッドカインはマンノシル化を受けておらず、発現量は約640 mg/lであった。しかし、発現物の約70%は、アミノ末端からいくつかのアミノ酸が欠失していた。この結果から次に、プロテアーゼA欠損株を宿主として

使用し、発現を、20°C、pH 3の条件で行った。1週間のメタノールによる誘導終了後、修飾されていない真正ミッドカイン約360 mg/lが得られた。プレイオトロフィンの発現は、 α -接合因子の分泌シグナル、および宿主としてGS115を使用して組換え体を作製し、ミッドカインの最終培養条件で発現培養を行った。ただし、発現は、pH 5で行った。メタノールによる発現誘導4日間で、約260 mg/lの修飾されていない真正プレイオトロフィンが得られた。拡張吸着流動床ストリームラインの使用によって、培養液中のプレイオトロフィンを96%の収率で回収した。

胆汁酸活性化リパーゼの発現では、パン酵母のインベルターゼ分泌シグナルを使用した。小型培養槽を用いた発現培養においては、胆汁酸活性化リパーゼの発現が、低い細胞密度でメタノールによって誘導されたとき、発現産物はほとんど培地中に蓄積しなかった。そこで、メタノールによる誘導の時期や酵母細胞増殖期の培養条件を種々検討し、これらを最適化した。最終的には約1000 mg/lの胆汁酸活性化リパーゼを、培地中に蓄積させられるようになった。

ビキア酵母異種タンパク質発現系は、既に特定のタンパク質医薬品の生産のための強力な手段となっている。上記のように、3種のヒトタンパク質について、多くの試行錯誤の結果、適切な組換え体作製、および適切な条件下で、それらの高密度発現培養を行い、結果として大量のヒト組換えタンパク質が得られた。組換えタンパク質を工業的に生産するためには、適切な組換え体の作製、および発現培養条件の最適化が必須であり、しかもこれらは時間のかかる研究である。ここで記述されたこれらの過程は、他のタンパク質の発現培養のためにも役に立つだろう。

文 献

- Couderc, R. and Baratti, J.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2279–2289 (1980).
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., and Stillman, C. A.: *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1316–1323 (1989).
- Wegner, E. H.: *United States Patent*, US4414329 (1983).
- Wegner, G. H.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **7**, 279–283 (1990).
- Sreekrishna, K.: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, (Flickinger, M.C.), John Wiley and Sons, Inc. (2010).
- Higgins, D. R. and Cregg, J. M.: *Pichia protocols* (Higgins, D. R. and Cregg, J. M.), p.1–15, Humana press (1998).
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., and Gingeras, T. R.: *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3859–3876 (1987).
- Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davis, G. R., Smiley, B. L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., and Thill, G. P.: *Bio/Technology*, **5**, 479–485 (1987).
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruse, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., and Parker, K.: *Biochemistry*, **28**, 4117–4125 (1989).
- Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., and Grinna, L.: *Bio/Technology*, **5**, 1305–1308 (1987).
- Barr, K. A., Hopkins, S. A., and Sreekrishna, K.: *Pharm. Eng.*, **12**, 48–51 (1992).
- Stroman, D. W., Brust, P. F., Ellis, S. B., Gingeras, T. R., Harpold, M. M., and Tschopp, J. T.: *United States Patent*, US4855231 (1989).
- Pichia protocols* (Higgins, D. R., and Cregg, J. M.), p. 249–261, Humana press (1998).
- 橋本洋一: *CACS FORUM*, **10**, 7–21 (1990).
- 長田嘉穂: 蛋白質核酸酵素, **37**, 1525–1529 (1992).
- Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., and Tsunoo, H.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 472–478 (1989).
- Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., and Tsunoo, H.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 16372–16377 (1989).
- Murasugi, A., Tanaka, S., Komiyama, N., Iwata, N., Kino, K., Tsunoo, H., and Sakuma, S.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 2486–2493 (1991).
- <http://di.mt-pharma.co.jp/mdw/code/>
- Sumi, A., Okuyama, K., Kobayashi, K., Ohtani, W., Ohmura, T., and Yokoyama, K.: *Bioseparation*, **8**, 195–200 (1999).
- 鷺見昭典, 奥山孝三, 小林 薫, 大谷 渡, 大村孝男: 日本PDA学術誌GMPとバリデーション, **2**, 28–33 (2000).
- Muramatsu, T.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **86**, 410–425 (2010).
- Muramatsu, T.: *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 410–423 (2011).
- Hernell, O. and Bläckberg, L.: *J. Pediatr.*, **125** (5 Pt 2), S56–61 (1994).
- Murasugi, A.: *Ehrlich II-2nd World Conference on Magic Bullets*, Nürnberg, Germany, Abstract book A-223 (2008).
- http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich-multi_man.pdf
- Romanos, M., Scorer, C., Sreekrishna, K., and Clare, J.: *Pichia protocols* (Higgins, D. R., and Cregg, J. M.), p. 55–72, Humana press (1998).
- Lin-Cereghino, J. and Lin-Cereghino, G. P.: *Pichia protocols 2nd Ed.* (Cregg, J.M.), p.11–26, Humana press (2007).
- 村杉 章: ポストシーケンス タンパク質実験法2 (大島泰郎, 鈴木絃一, 藤井義明, 村松 喬), p. 55–62, 東京化学同人 (2002).
- Murasugi, A.: *Recent Pat. Biotechnol.*, **4**, 153–66 (2010).
- http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf
- 櫻井一正: 蛋白質科学会アーカイブ, **1**, e018 (2008).
- Stratton, J., Chiruvolu, V., and Meagher, M.: *Pichia*

- protocols* (Higgins, D. R., and Cregg, J. M.), p. 107–120, Humana press (1998).
- 34) http://www.biotechlab.net/UserFiles/File/787348_Ref_Invitrogen2002.pdf
 - 35) Lin-Cereghino, G. P., Lin-Cereghino, J., Ilgen, C., and Cregg, J. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 329–332 (2002).
 - 36) Muramatsu, T.: *J. Biochem.*, **132**, 359–371 (2002).
 - 37) Kadomatsu, K., Tomomura, M., and Muramatsu, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 1312–1318 (1988).
 - 38) Tsutsui, J., Uehara, K., Kadomatsu, K., Matsubara, S., and Muramatsu, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 792–797 (1991).
 - 39) Iwasaki, W., Nagata, K., Hatanaka, H., Inui, T., Kimura, T., Muramatsu, T., Yoshida, K., Tasumi, M., and Inagaki, F.: *EMBO J.*, **16**, 6936–6946 (1997).
 - 40) <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MKN>
 - 41) <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MKC>
 - 42) http://www.cellmid.com.au/content_common/pg-key-patents.seo
 - 43) Takenaka, H., Horiba, M., Ishiguro, H., Sumida, A., Hojo, M., Usui, A., Akita, T., Sakuma, S., Ueda, Y., Kodama, I., and Kadomatsu, K.: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **296**, H462–469 (2009).
 - 44) Sumida, A., Horiba, M., Ishiguro, H., Takenaka, H., Ueda, N., Ooboshi, H., Opthof, T., Kadomatsu, K., and Kodama, I.: *Cardiovasc. Res.*, **86**, 113–121 (2010).
 - 45) Rauvala, H. and Pihlaskari, R.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 16625–16635 (1987).
 - 46) Li, Y. S., Milner, P. G., Chauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J., and Deuel, T. F.: *Science*, **250**, 1690–1694 (1990).
 - 47) Maruta, H., Bartlett, P. F., Nurcombe, V., Nur-E-Kamal, M. S., Chomienne, C., Muramatsu, T., Muramatsu, H., Fabri, L., and Burgess, A. W.: *Growth Factors*, **8**, 119–134 (1993).
 - 48) Seddon, A. P., Hulmes, J. D., Decker, M. M., Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., Backer, J., Dougher-Vermazen, M., and Böhlen, P.: *Protein Expr. Purif.*, **5**, 14–21 (1994).
 - 49) Murasugi, A., Aiba, Y., and Asami, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 395–399 (2000).
 - 50) Murasugi, A. and Aiba, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1295–1300 (2002).
 - 51) Asami, Y., Nagano, H., Ikematsu, S., and Murasugi, A.: *J. Biochem.*, **128**, 823–826 (2000).
 - 52) Murasugi, A. and Aiba, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2291–2293 (2001).
 - 53) Murasugi, A., Asami, Y., and Kikuchi, Y.: *Protein Expr. Purif.*, **23**, 282–288 (2001).
 - 54) Brierley, R. A.: *Pichia protocols* (Higgins, D. R., and Cregg, J. M.), p. 149–177, Humana press (1998).
 - 55) Murasugi, A. and Aiba, Y.: *Protein Expr. Purif.*, **27**, 244–252 (2003).
 - 56) Murasugi, A., Kido, I., Kumai, H., and Asami, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2288–2290 (2003).
 - 57) Kilpeläinen, I., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Avikainen, H., Fath, M., Linhardt, R. J., Raulo, E., and Rauvala, H.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 13564–13570 (2000).
 - 58) Chen, Y. H., Yang, J. T., and Martinez, H. M.: *Biochemistry*, **11**, 4120–4131 (1972).
 - 59) Murasugi, A., Asami, Y., Kido, I., and Kumai, H.: *United States Patent*, US6867037 (2005).
 - 60) Hansson, L., Bläckberg, L., Edlund, M., Lundberg, L., Strömqvist, M., and Hernell, O.: *J. Biol. Chem.*: **268**, 26692–26698 (1993).
 - 61) Bläckberg, L., Hernell, O., Olivecrona, T., Domellöf, L., and Malinov, R.: *FEBS Lett.*, **112**, 51–54 (1980).
 - 62) Swan, J. S., Hoffman, M. M., Lord, M. K., and Poechmann, J. L. P.: *Biochem. J.*, **283**, 119–122 (1992).
 - 63) Hamosh, M.: *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy* (Lebenthal, E.), p.121–134, Raven press (1989).
 - 64) Andersson, Y., Sävman, K., Bläckberg, L., and Hernell, O.: *Acta Paediatr.*, **96**, 1445–1449 (2007).
 - 65) <http://www.sobi.com/Product-Pipeline/Development-pipeline/Kiobrina/>
 - 66) http://www.sobi.com/PageFiles/356/Study020_eaps_abstract_FINAL.pdf
 - 67) Baba, T., Downs, D., Jackson, K. W., Tang, J., and Wang, C. S.: *Biochemistry*, **30**, 500–510 (1991).
 - 68) Murasugi, A.: *Curr. Topics Biotechnol.*, **4**, 101–108 (2008).
 - 69) Trimble, R. B., Lubowski, C., Hauer III, C. R., Stack, R., McNaughton, L., Gemmill, T. R., and Kumar, S. A.: *Glycobiology*, **14**, 265–274 (2004).
 - 70) 村杉 章, 浅見幸夫: 特願平5-245079 (1993).
 - 71) Das, G.: *WIPO Patent Application*, WO/1996/037622 (1996).
 - 72) Das, G.: *United States Patent Application*, US2003/0040040 (2003).
 - 73) Sahasrabudhe, A. V., Solapure, S. M., Khurana, R., Suryanarayan, V., Ravishankar, S., deSousa, S. M., and Das, G.: *Protein Expr. Purif.*, **14**, 425–433 (1998).
 - 74) Hang, H., Ye, X., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, M., and Zhang, S.: *Enzyme Microbial Technol.*, **44**, 185–188 (2009).
 - 75) Mechref, Y., Chen, P., and Novotny, M. V.: *Glycobiology*, **9**, 227–234 (1999).
 - 76) Que, A. H., Mechref, Y., Huang, Y., Taraszka, J. A., Clemmer, D. E., and Novotny, M. V.: *Anal. Chem.*, **75**, 1684–1690 (2003).
 - 77) Hamilton, S. R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R. C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J. H., Rausch, S., Stadheim, T. A., Wischniewski, H., Wildt, S., and Gerngross, T. U.: *Science*, **301**, 1244–1246 (2003).
 - 78) Bobrowicz, P., Davidson, R. C., Li, H., Potgieter, T. I., Nett, J. H., Hamilton, S. R., Stadheim, T. A., Miele, R. G., Bobrowicz, B., Mitchell, T., Rausch, S., Renfer, E., and Wildt, S.: *Glycobiology*, **14**, 757–766 (2004).
 - 79) Vervecken, W., Kaigorodov, V., Callewaert, N., Geysens, S., De Vusser, K., and Contreras, R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2639–2646 (2004).
 - 80) Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T. A., Li, H., Choi, B. K., Hopkins, D., Wischniewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R. R., Hoopes, J., Wildt, S., and Gerngross, T. U.: *Science*, **313**, 1441–1443 (2006).