

# 「CORYNEX」： *Corynebacterium glutamicum* を用いたタンパク質分泌生産系

松田 吉彦

## はじめに

*Corynebacterium glutamicum* は、1956年に木下祝郎、鵜高重三らによってグルタミン酸生産菌として分離されたグラム陽性細菌であり<sup>1)</sup>、グルタミン酸やリジンなど多くのアミノ酸の工業的生産菌として60年にわたり利用されてきた。長らくアミノ酸生産に使用されてきたため、各アミノ酸の生産性を向上させる目的で、代謝生理学、生化学、遺伝学、培養技法など数多くの基礎的知見が得られており<sup>2)</sup>、日本国内では各研究機関がそれぞれ独自の株を単離して全ゲノム配列を決定している<sup>3-5)</sup>。近年はアミノ酸以外のさまざまな物質生産宿主としても着目されているが、筆者らは特にアミノ酸の重合体であるタンパク質に関して、本菌を用いた異種タンパク質生産のための分泌システムを新たに開発してきた。

*C. glutamicum* は当初、タンパク質生産宿主としてほとんど着目されていなかったが、筆者らは本菌が実は優れたタンパク質分泌能を有していることを見だし、1998年に微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) 分泌を目的として基盤研究を開始した。以来基礎的知見を積み重ね<sup>6,7)</sup>、2009年からは本発現系を用いたタンパク質の製法開発受託事業 CORYNEX<sup>®</sup> (*Corynebacterium glutamicum* protein expression system) へと展開してきた(以下、登録商標の“事業”と区別し、本生産システムの“技術”を「CORYNEX」と表記する)。「CORYNEX」は、近年成長著しいバイオ医薬品の新規生産系としても期待されており、2016年には医薬品候補タンパク質のGMP生産、そして初の臨床試験ステージへと進捗している。本稿では、異種タンパク質分泌生産システム「CORYNEX」の特徴と有用性、汎用性拡大や生産量向上に関する技術開発、さらには産業応用について、最近の知見も加えて解説する。

## *C. glutamicum* によるタンパク質分泌発現の特長

はじめに、*C. glutamicum* を用いた異種タンパク質分泌生産システムの特徴、ならびに既存の異種タンパク質分泌システムと比較した時に有利となる点について説明する。

**高い純度** 本システム最大の特徴としてまず1点目にあげられるのは、宿主本来の分泌タンパク質が培養上清中に非常に少ないため、“きれい”な状態で目的タンパク質を生産できる点である。図1は培養上清のSDS-PAGE解析結果の例であるが、目的タンパク質以外の夾雑タンパク質がほとんどなく、精製前から純度が非常に高いことが分かる。タンパク質生産のトータルプロセスにおいて、精製工程を簡便にできることは非常に大きなメリットである。

**細胞外プロテアーゼ分解が起らない** 2点目としては、培養上清中にプロテアーゼ活性が検出されず、他の多くのタンパク質分泌システムでしばしば問題となるような、生産タンパク質の分解が起らない点があげられる。これまでに筆者らは、MTGをはじめとする酵素類、ヒト由来の上皮細胞増殖因子 (EGF)、インスリン様成長因子 (IGF-1)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、VHH抗体などさまざまなタンパク質の分泌発現に成功しているが、いずれも宿主由来のプロテアーゼによる分解はまったく認められていない。図1はこれらタンパク質生産株の試験管培養上清のSDS-PAGE解析の結果であるが、このまま培養サンプルを放置しておいてもまったく分解が起らない。これも異種タンパク質を生産する上で有利な点である。

**正常な立体構造・活性型で分泌** 3点目としては、生産されたタンパク質が正常な高次構造を取っている点があげられる。特に、EGFなどヒト由来のタンパク質

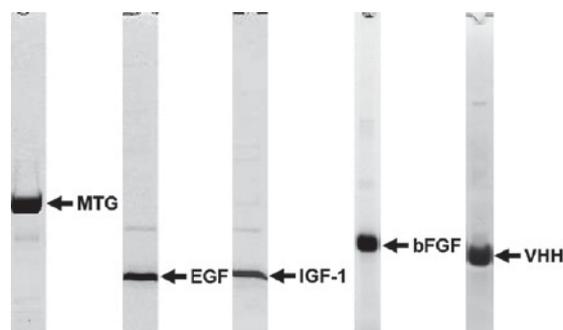


図1. *C. glutamicum* を用いた異種タンパク質生産時における培養上清のSDS-PAGE解析。

の多くは複数のジスルフィド (S-S) 結合を有しているが、「CORYNEX」により分泌したEGFは3か所の正常なS-S結合を形成し、天然EGFと同等の比活性を有していた<sup>8)</sup>。さらには、分子内S-S結合だけでなく、分子間S-S結合を有するヘテロ二量体である抗体断片Fabも、活性型として分泌発現することに成功している<sup>9)</sup>。このように、これまでに「CORYNEX」で分泌発現に成功した異種タンパク質は、いずれも天然型と同等の活性を有していることが確認されている。

**簡便な培養法** 4点目としては、この菌株の培養の容易さをあげることができる。前述の通り、*C. glutamicum*は60年にわたり、アミノ酸の工業的生産菌として使用されてきた豊富な経験と実績により、単純な合成培地を使用した培養法が確立されており、最近では1000 LスケールでのGMP生産にも成功している。

**安全性** 5点目としては、病原性や孢子形成能がなく、またグラム陽性細菌であるためエンドトキシンを産生しないことから、安全性や生産設備の保全においても優位な点があげられる。

以上のような特長から、筆者らは「CORYNEX」が産業用酵素など大量生産を必要とする場合から、医薬用タンパク質のように高度な精製を必要とする場合まで、幅広く利用可能な優れたシステムであると考えている。

### 生産タンパク質の適用拡大：三つの分泌手法

ここまで、このシステムの特長を説明してきたが、異種タンパク質生産系として万能なシステムかと言うと必ずしもそうではない。それはおそらくすべての異種タンパク質分泌システムに当てはまる課題であるが、あらゆるタンパク質を分泌生産できるわけではない点である。筆者らはこの課題を改善するための方策として、初期発現検討の標準システムとして三つの分泌手法を開発した。

**Sec系 (従来の分泌手法)** 一つ目は、“Sec系”と呼ばれる一般的な分泌経路である。Sec系は、原核生物から真核生物まで広く進化的に保存されている経路であり(図2A左)、菌体内で翻訳されたタンパク質が、フォールド(折りたたみ)されることなく“伸びた状態”で輸送され、膜透過後にフォールドする。本システムに限らず、従来、異種タンパク質分泌生産システムとして利用されているのがこの経路である。

**CspB融合法 (Sec系応用)** 二つ目は、上記Sec系分泌の応用技術である“CspB融合法”である(図2A中央)。CspBは、味の素(株)の*C. glutamicum*野生株が著量分泌して細胞表層に吸着しているタンパク質 (cell surface protein) であり、そのN末端配列数残基をタグ

として目的タンパク質のN末端に融合させることで、分泌量が劇的に向上することが見いだされた<sup>10)</sup>(図2B)。CspB融合法で目的タンパク質を生産する場合は、CspBタグの後ろに特定のプロテアーゼ認識配列を付加し、分泌生産後に切断することで、目的タンパク質を取得する。基本的なSec系分泌では十分な分泌量が得られない場合や、アミノ酸鎖長の短いペプチドを生産する場合に有用な手法である。

**Tat系 (新規の分泌経路)** 三つ目は、Sec系とはまったく異なる経路である“Tat系”分泌の利用である。この経路の特徴は、図2A右に示したように、菌体内で翻訳されたタンパク質がフォールドされた状態で輸送されることにある。この経路で分泌されるタンパク質はSec系依存のタンパク質と同様の性質を有するシグナル配列を持つが、配列中の明確な特徴としてArg-Argモチーフが存在する。このため、この経路はtwin-arginine translocation pathway (Tat系)と呼ばれている。このような輸送過程の違いから、従来のSec系では分泌できなかったタンパク質でも、Tat系を利用することで初めて分泌させることに成功している<sup>11,12)</sup>。さらに、Tat系の分泌能を向上させるため、分泌装置の構成因子であるTatABCを高発現させることで、目的タンパク質の分泌量を飛躍的に向上させることにも成功した<sup>13)</sup>(図2C)。

Tat系は、本来は微量なタンパク質を分泌するための経路であると一般的に考えられているが、「CORYNEX」では異種タンパク質分泌発現、さらには産業応用レベルでも利用可能となった。

このように、(1) 一般的なSec系分泌、(2) CspB融合法、(3) 新規のTat系分泌、の三つの分泌コンストラ

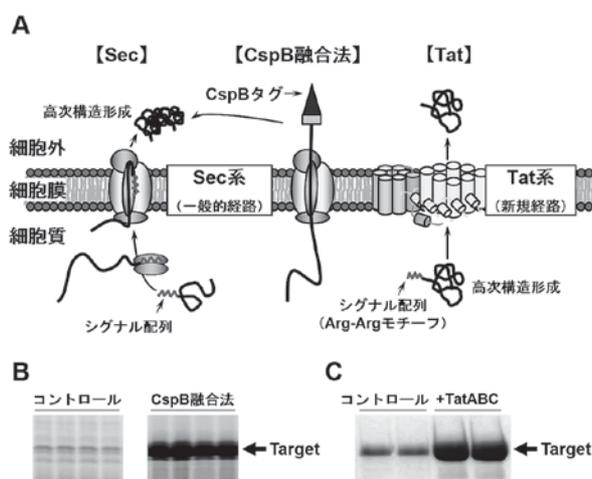


図2. 三つの分泌コンストラクトによるタンパク質生産. A: 「CORYNEX」で標準的に用いている三つの分泌手法の模式図. B: CspB融合法. C: Tat系分泌の発現例.

クトを発現検討の基本システムとして使用することによって、他の発現系において発現が困難であった多くのタンパク質の分泌を成功させることができた。

### 分泌生産量向上：改良菌育種のツールボックス

ここまで、分泌コンストラクトの種類を拡充することによって、生産可能タンパク質の種類を拡大するための技術開発、すなわち0→1のための方策について説明した。しかしながら、最初の発現検討で必ずしも満足いく発現量が得られるとは限らない。筆者らはさらに生産量向上、すなわち1→10のための独自ツールボックス<sup>10)</sup>を開発してきた。

**シグナルペプチドライブラリー** 一つ目として、“シグナルペプチドライブラリー”があげられる。一般的に、目的タンパク質によって好適なシグナル配列が異なる。筆者らは、味の素(株)の*C. glutamicum*野生株ゲノム情報<sup>5)</sup>よりシグナル配列を網羅的に抽出し、異種タンパク質発現に用いるライブラリーを構築した。図3Aに至適シグナルペプチドスクリーニングの一例を示したように、目的タンパク質ごとに、標準シグナル配列と比較して優れたシグナル配列を見いだすことが可能となっている。

**宿主株ライブラリー** 二つ目として、“宿主株ライブラリー”の構築があげられる。筆者らはさまざまな研究開発の過程で、特定の遺伝子欠損株やランダム変異処理により取得した変異株を取得しており、それらを包括した宿主株ライブラリーとして保有している。図3Bに発現宿主スクリーニングの一例を示したように、目的タンパク質ごとに、標準宿主と比較して優れた宿主を見いだすことが可能となっている。

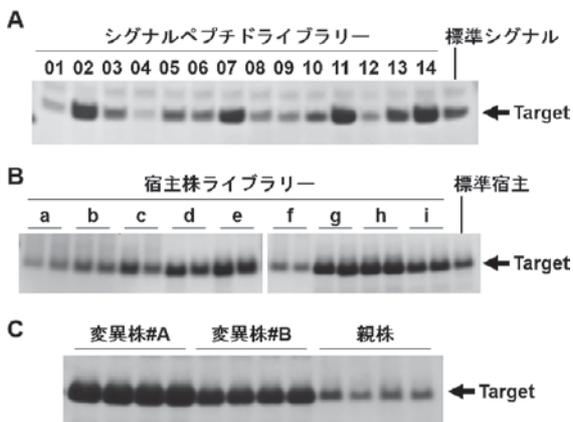


図3. 分泌生産量向上のための育種ツールボックス。A: シグナルペプチドライブラリー, B: 宿主株ライブラリー, C: テーラーメード変異株育種, の活用例。

**テーラーメード変異株育種** 三つ目として、目的タンパク質生産に特化した変異株を取得する“テーラーメード変異株育種”があげられる。この手法は、目的タンパク質の生産菌に対してニトロソグアニジンなどを用いた従来法により突然変異処理を施し、ランダム変異株の中から目的タンパク質が高分泌となった株をスクリーニングする。図3Cに示したように、変異処理前の親株と比較して、分泌能が優位に向上した生産株を取得することができる。

このように、生産菌開発では最初に三つの分泌手法でプラットフォーム菌を決めた後、ここで説明した育種ツールボックスを活用して最適なシグナル配列と宿主株を選抜し、目的タンパク質ごとに最適な生産株を効率的に育種することができる。

### 「CORYNEX」の産業応用展開

ここまで解説した技術を活用し、実際の産業化レベルでの「CORYNEX」システムの活用例、およびタンパク質製法開発受託事業CORYNEX<sup>®</sup>について述べる。

**希少高価値タンパク質の高効率生産** 近年市場が大きく成長している抗体医薬は、現在はそのほとんどがチャイニーズハムスターの卵巣由来のCHO細胞を用いて生産されている。従来はCHO細胞の増殖因子としてインスリンが用いられてきたが、培地への添加量がインスリンの1/100程度で同等の効果を発揮するIGF-1の需要が高まってきている。しかしながら、IGF-1は既存のタンパク質生産系では効率的な生産が困難であり、非常に高価なタンパク質となっていた。筆者らは、「CORYNEX」を用いたIGF-1の分泌生産菌、培養プロセス、そして精製プロセスの開発を検討した結果、既存のタンパク質生産システムと比較して、精製工程を極力簡略化した製造方法を確立することに成功した。その結果、コスト競争力のあるCHO細胞培地用IGF-1の画期的な工業化に成功し、2009年から販売を開始した。

同様に、再生医療分野ではiPS/ES細胞用培地の必須添加因子であるbFGFも既存のタンパク質生産系では効率的な生産が困難であり、非常に高価なタンパク質であった。筆者らは、「CORYNEX」によるbFGFの分泌生産菌、培養プロセス、および精製プロセスの開発に取り組み、高効率な製造方法を確立した。その結果、京都大学iPS細胞研究所と味の素(株)が共同開発しているiPS/ES細胞研究用培地StemFit<sup>®</sup>に添加されるbFGFに関して、自製化による圧倒的なコストダウンに成功した。

なお、IGF-1は従来のSec系、bFGFは新規のTat系で分泌生産に成功して工業的生産に至っている。それぞれ、



図4. 味の素(株)広報部プレスリリース(2013年3月6日)より抜粋。左はCORYNEX®のロゴ。

もう片方の分泌経路ではまったく分泌できなかったため、やはり最初の発現検討で複数の分泌コンストラクトを検討することが肝要であると考えられる。

抗体医薬分野では、従来の完全抗体IgGに加えてFabや一本鎖抗体などの低分子抗体の開発が盛んに進められているが、最近ではラクダ科動物が有する重鎖抗体の可変領域のみから成る“VHH”抗体も、次世代抗体の有望な分子骨格の一つとして着目されている。筆者らは「CORYNEX」によるVHH生産菌育種と培養条件の最適化を検討した結果、モデルとして用いたVHH種に関しては10 g/Lを超える高分泌生産を達成している。このことから、今後のVHH生産系として「CORYNEX」が非常に有望な系であると考えている。

**タンパク質製法開発受託事業CORYNEX®** 味の素(株)は、本稿で解説した*C. glutamicum*を用いたタンパク質分泌生産システムを活用した事業としてCORYNEX®の商標を取得し、2009年からタンパク質受託発現サービスを開始した。各製薬会社には、既存のタンパク質生産系では効率良く生産できず、希望通りに開発を進められないタンパク質性医薬品候補が数多く存在する。筆者らは、このようなお客様が抱えているタンパク質生産に関する諸問題の解決に貢献したいと考え、CORYNEX®に関する技術紹介を幅広く行ってきた。その結果、これまでに日米欧を主として多くのタンパク質発現を受託し、お客様個々のニーズに応える柔軟なサービスを展開している。

その一環として、医薬品タンパク質のGMP生産も可能とするため、2013年に米国のバイオ医薬品の開発・製造受託会社であるアルテア・テクノロジーズ社を買収し(現・味の素アルテア社)、発現検討から実生産まで

をトータルでサポートできる体制を整えてきており(図4)<sup>14)</sup>、さらにはレギュラトリーサイエンスとして宿主由来DNA、宿主由来タンパク質の測定系も開発してきた。その結果、「CORYNEX」の特長・技術力と味の素アルテア社の製造機能により、バイオ医薬品候補の1000 LスケールのGMP生産に成功し、2016年には初めての第1相臨床試験ステージに進んでいる<sup>15)</sup>。

## おわりに

これまでにさまざまなアミノ酸の工業的生産菌として利用されてきた*C. glutamicum*は、その発見以来60年、伝統的アミノ酸生産の第一線で活躍したまま還暦を迎え、さらに今後はアミノ酸以外のさまざまな物質生産、そして次世代のタンパク質生産系としても大きな期待が寄せられている。筆者らはこれまでに、産業用酵素からバイオ医薬品までさまざまなタンパク質の工業的生産が可能となるまで「CORYNEX」の技術開発を進めてきたが、今後もさらなる改良研究・開発を推進し、このシステムの汎用性・技術力を向上させていきたい。そして世界中のタンパク質生産に貢献していくことで、当技術分野の進歩と、人々の健康な生活に貢献できるよう努めていきたい。

## 文 献

- 1) Kinoshita, S. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193 (1957).
- 2) Hermann, T.: *J. Biotechnol.*, **104**, 155 (2003).
- 3) Ikeda, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 99 (2003).
- 4) Yukawa, H. *et al.*: *Microbiology*, **153**, 1042 (2007).
- 5) Nishio, Y. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 157 (2017).
- 6) Kikuchi, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 358 (2003).
- 7) Date, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 3011 (2003).
- 8) Date, M. *et al.*: *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 66 (2006).
- 9) Matsuda, Y. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **13**, 56 (2014).
- 10) 松田吉彦: 日本農芸化学会大会講演要旨集, LS14 (2015).
- 11) Kikuchi, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7183 (2006).
- 12) Kikuchi, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 67 (2008).
- 13) Kikuchi, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 603 (2009).
- 14) 味の素株式会社: [https://www.ajinomoto.com/jp/presscenter/press/detail/2013\\_03\\_06.html](https://www.ajinomoto.com/jp/presscenter/press/detail/2013_03_06.html) (2017/7/31)
- 15) 味の素株式会社: [https://www.ajinomoto.com/jp/presscenter/press/detail/2016\\_10\\_04.html](https://www.ajinomoto.com/jp/presscenter/press/detail/2016_10_04.html) (2017/7/31)