

## ブレバチルス発現システムを用いたタンパク質の効率生産

花方 寛

## はじめに

現在、異種タンパク質の生産系として、数多くのタンパク質発現系が用いられている。種々のタンパク質発現系にはそれぞれに特長があり、構造が複雑な抗体などの生産には動物細胞、もっとも一般的なタンパク質発現系である大腸菌、これ以外にも酵母、昆虫細胞、無細胞システムなどたくさんの発現系が存在し、目的タンパク質の性質に応じて使い分けられている。

バクテリアの発現系としてもっとも実績の高い大腸菌はタンパク質の高生産に優れているが、細胞内に発現させた際に目的タンパク質が会合し、不溶性の封入体を形成することが多い。封入体は不活性なため、変性可溶化後、リフォールディングにより活性型に変換する必要があるが、この工程は煩雑で、また必ず成功するとは限らない。さらに、グラム陰性細菌であるため、エンドトキシンを産生し、その除去工程がタンパク質の収率低下に結びつくこともある。

一方、本来エンドトキシンを産生しないグラム陽性細菌を用いて、目的タンパク質を菌体外に分泌生産できれば、生産性の増大、正しい高次構造のタンパク質の取得、分離精製の単純化が期待される。このような観点から、Takagiらはタンパク質の分泌生産能に優れ、プロテアーゼを生産せず、培養や遺伝子組換えが容易な菌株のスクリーニングを行い、*Brevibacillus choshinensis* HPD31 (*Bacillus brevis*) を見いだした<sup>1)</sup>。しかしながら本菌はグラム陽性菌の特性として胞子を形成することが知られており、工業生産に用いる生産菌株としては、その滅菌の難しさからクロスコンタミネーションの問題があった。また、高感度のプロテアーゼ活性測定を行った結果、微弱ながらプロテアーゼ活性が残存していることが判明した。そこで、筆者らは複数の遺伝子を破壊する方法を開発し、胞子関連遺伝子と細胞内外のプロテアーゼ2種類の遺伝子を破壊し、汎用性の高いタンパク質生産宿主菌 *B. choshinensis* HPD31-SP3 株を創出した<sup>2)</sup>。

*Brevibacillus* 発現システムの主なメリットを以下に示す。

- 1) 異種タンパク質を効率的に分泌生産する。
- 2) 生産されたタンパク質が培養液中でプロテアーゼに

よって分解されることがほとんどない。

- 3) エンドトキシンを生産しない。
- 4) 正しい立体構造を維持した活性型のタンパク質を生産できる。
- 5) 培養、滅菌、遺伝子操作が容易である。

以上のような特長を生かし、これまでに400種類以上のタンパク質の分泌生産に成功し、特に分泌タンパク質の高生産を実現させてきた。

BIC (*Brevibacillus in vivo cloning*) 法を用いた簡便クローニング

ブレバチルス発現システムの最大の特長は目的タンパク質を高い効率で菌体外に分泌生産することにある。その際、目的遺伝子はプラスミドDNA上の分泌シグナルの下流に挿入されなければならない。制限酵素やリガーゼを使う従来法では、この発現プラスミドの構築の工程は、特に目的遺伝子のサイズが大きくなるほど、時間と手間を要するステップとなる。現在、ブレバチルスへの遺伝子導入法として、Tris-PEG法の改良法 (NTP法) を採用しているが、この方法を採用することで図1に示すような、菌体内相同組換えによる高効率な遺伝子クローン化が可能であることが見いだされた。

BIC法と名付けたこの簡便プラスミド構築法の特長は、目的タンパク質をコードする遺伝子の両端に、直鎖状の発現ベクターの両末端と相同な15塩基対の配列を付加したDNAをベクターと混合してコンピテントセルに導入すると、菌体内で相同組換え反応が起こり、発現プラスミドが自発的に形成されるという点にある<sup>3)</sup>。

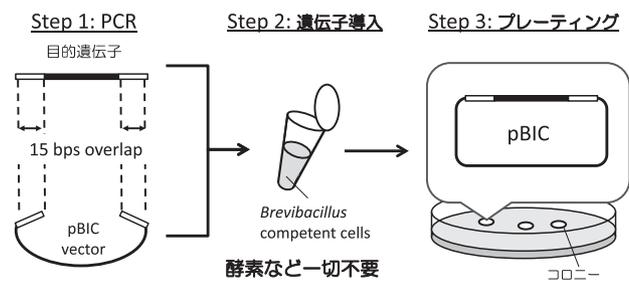


図1. BIC法の概略

BIC法による遺伝子導入効率は80~100% (インサートの遺伝子サイズ: 0.3~3.2 kbp) と非常に高いことが確認されている。BIC法の開発により、クローニング実験の手間が簡略化され、制限酵素サイトの選択に悩まされることもなくなった。また、ベクターの末端だけではなく、目的遺伝子プライマーの配列を操作することにより、内部配列にも遺伝子を導入することができる。その結果、一つのベクターで、プライマーの設定場所を変更するだけで、菌体内発現やタグ融合発現など複数の発現様式を試すことができるようになった。

### 分泌シグナルの選択による安定高生産の実現

分泌生産効率向上には分泌シグナルの最適化が重要と考えられていた。 *Bacillus subtilis* を用いた試験では、組換えタンパク質を生産させるのに、万能な分泌シグナルはなく、目的タンパク質によって異なるとの見解が示されている<sup>4)</sup>。 *Brevibacillus* においても、培養上清中に顕著に蓄積される分泌タンパク質を同定し、その分泌シグナルを用いることで、効率的な分泌生産に利用できることを確認している。遺伝子配列から分泌タンパク質を推定する方法も考えられるが、実際に高発現している分泌タンパク質の分泌シグナルを用いる方が実用的な分泌シグナルを取得できた。

従来法ではさまざまな分泌シグナルを試すことが制限酵素サイトの都合上難しかった。ところが、BIC法を応用することにより、分泌シグナルの下流に遺伝子を導入することが簡単にできるようになった。細菌由来のプロテアーゼBpr遺伝子を用い、分泌シグナルとプロモーターの組合せによる高生産株の取得を試みた。プロテアーゼはその活性ゆえ、多くの場合大腸菌での生産は難しいが、プレビパチルスを用いることで効率的生産に成功した事例がある<sup>5,6)</sup>。この試験において分泌シグナルとしてはすでに実績のある *B.brevis* 由来MWP, R2L6

(MWPを改変) シグナルと *B.choshinensis* 由来BprPI, P22シグナルを用いた。プロモーターにはP5 (pNOベクター), P22 (pNF41ベクター), P2 (pNF21) プロモーターを用い、12通りの組合せで試験を行った。対照として、従来用いているpNY326ベクターを用いた。各ベクターにBIC法を用いて遺伝子を導入し、2SY培地を用いて、48時間、30°Cで培養を行い、生産量をSDS-PAGEによって比較した。その結果、pNY326を用いた場合、約30 mg/Lであったのに対し、組合せの異なるベクターを試すことで、生産性にバリエーションが認められた。中でもpNF41-R2L6を用いることで約4倍の120 mg/Lの生産量を得ることができた(図2)。

さらに、3Lジャーを用いた流加培養を行った結果、3 g/Lという高生産に成功した(図3)。pNY326では約1/30の生産量しか得られず(データ省略)、培養途中から非生産菌が大勢を占めてしまっていた。pNF41-R2L6を用いることで、非生産菌の出現はなくなり、安定した生産が維持され、最終的な高生産につながった。

### 各種フラグメント抗体生産

近年、タンパク質生産のターゲットとして注目されている抗体は標的分子(抗原)への高い特異性からさまざまな分野で応用されており、特に抗体医薬品は急速な市場拡大を遂げている。このような抗体は多数のジスルフィド結合を含む巨大なタンパク質であるため、細胞内に導入したり、細胞内で機能させたりすることが難しい。また、生産には動物細胞を用いており、微生物を用いた生産と比較すると、高いコストが問題となる。そこで、抗体の可変領域を用いた低分子化抗体(フラグメント抗体)の開発が盛んに行われており、微生物を用いた活性

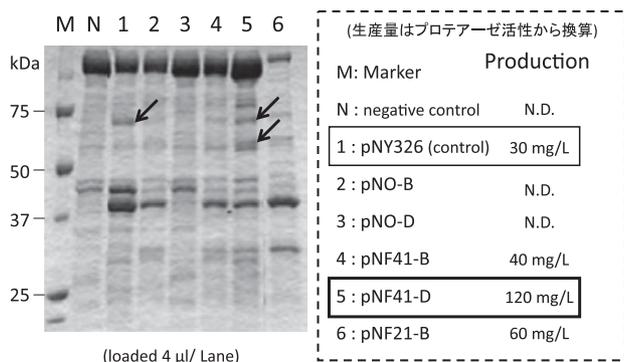


図2. Bprの高生産株の選抜

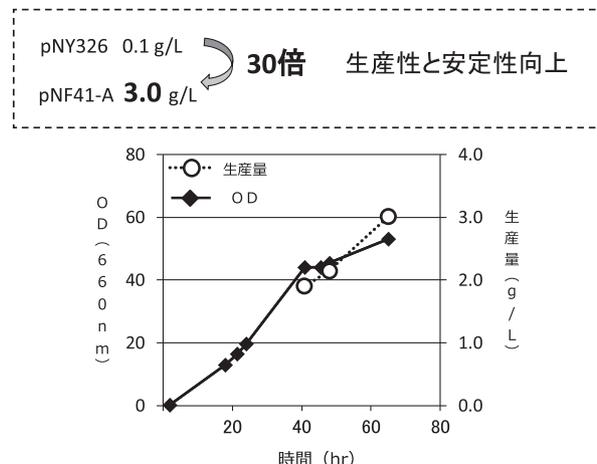


図3. Bprの安定高生産の実現

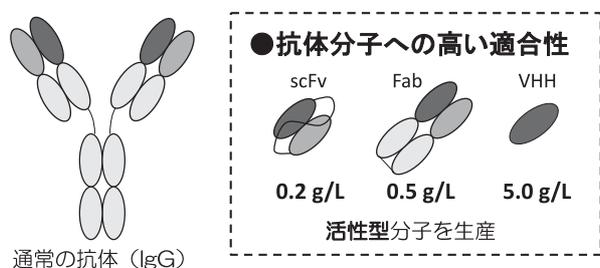


図4. 各種フラグメント抗体の生産

型分子の効率的生産が期待されている。*Brevibacillus* は分泌発現を特徴とした発現系であることから、これらフラグメント抗体との相性の良さが容易に予想され、以下の成功例を得ている(図4)。

(1) **一本鎖抗体** 可変領域のみをつないで一本鎖化した抗体(scFv)は分子量が小さく、バクテリアを宿主とした生産が可能であることから、次世代の抗体医薬として注目されている。そこで、分泌発現を特長とするプレバチルス発現システムを用い、4種類の分泌シグナルと3種類のプロモーター、計12種類の組合せによる高生産菌株の選抜を試みた。

目的遺伝子にはフルオレセイン(蛍光色素)に対するscFv-FLU抗体を用いた。BIC法を用いて各発現プラスミドを構築し、得られた株の生産性を比較した。その結果、発現プラスミドによる生産量のバラつきや一部分解が認められたが、もっとも高い菌株で約80 mg/Lの生産性を示した。さらに、分解抑制に実績のあるアルギニンを追加した培養を行うことで、200 mg/Lまで生産性を向上させることに成功している。精製したscFv-FLUとフルオレセインを混合し、25°C、1時間反応させ、蛍光強度を測定した結果、モル比1:1で混合した際に約95%の発光抑制が認められ、*Brevibacillus*によって生産したscFvが結合活性を有することが確認された<sup>7)</sup>。

(2) **Fab抗体** 重鎖(H鎖)と軽鎖(L鎖)がジスルフィド結合を介してヘテロダイマーを形成するFab抗体はもっとも汎用されているフラグメント抗体である。ここでは、抗erbB-Fab抗体をターゲットとし、まず、L鎖とH鎖を単独で発現させ、生産性の高い分泌シグナルを選択し、その後、L鎖とH鎖の遺伝子が一つのプラスミド上にタンデムに並ぶ構造のプラスミドをBIC法により構築した。その結果、最適な分泌シグナルを選抜することで100 mLスケールの培養では100 mg/L以上の高生産を達成し、3 Lジャーファーマンターによる流加培養の結果、500 mg/Lの生産を実現した。

(3) **単ドメイン抗体** ラクダ科の動物が産生する単ドメインVHH抗体は分子量が小さいことから、微生物による高生産が期待され、タンパク質工学の適用が可能であることから次世代抗体として注目されている。筆者らはこれまでと同様にVHH抗体の*Brevibacillus*による生産試験を行った。その結果、最適な分泌シグナルを選抜することで100 mLスケールの培養では100 mg/L以上<sup>8)</sup>、3 Lジャーファーマンターによる流加培養の結果、約5 g/Lという高い生産性を実現した。表面プラズモン共鳴法(Biacore)を用い、精製したVHHの結合活性を評価した結果、十分な活性が認められた。

### 今後の課題

*Brevibacillus*を用いたタンパク質発現系の一番の課題は医薬品生産用宿主として未だに採用されていない点があげられる。既述のように高活性のタンパク質を効率的に生産できることから、性能的には十分医薬品生産用宿主として応用可能と考えられる。医薬品生産用原材料や再生医療用培地成分などの生産系として、医療周辺では利用されるケースが増えているが、実績のなさから、現在のところ医薬品生産には利用されていない。

技術的な側面としては、培養技術情報の蓄積が不十分といえる。培養挙動と遺伝子発現の理解や培地成分に関する基礎データのさらなる蓄積が必要である。分泌生産の場合、培地成分に由来する着色物質の除去が精製時の問題になるため、効率的に生産し得る合成培地の開発も必須となる。

タンパク質発現系としては後発の部類に入る本発現系ではあるが、キットとして誰でも利用できる環境にある。多くの研究者が利用している現状では、培養技術やトラブルシューティングの情報などがさらに蓄積され、共有される取組みが今後重要になると考えている。

### 文 献

- 1) Takagi, H. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 691 (1989).
- 2) Mizukami, M. *et al.*: *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 251 (2010).
- 3) Hanagata, H. *et al.*: *Antibodies*, **3**, 242 (2014).
- 4) Brockmeier, U. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **362**, 393 (2006).
- 5) Sugimoto, S. *et al.*: *J. Appl. Microbiol.*, **111**, 1406 (2011).
- 6) Mu, T. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **91**, 125 (2013).
- 7) Onishi, H. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **91**, 184 (2013).
- 8) Mizukami, M. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **105**, 23 (2015).