

氏名	ぐえん ひう にぎあ NGUYEN HIEU NGHIA
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	博甲第1035号
学位授与の日付	令和4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学位論文題目	Efficient production of single-chain Fv antibody using recombinant <i>Escherichia coli</i> by DO-stat fed-batch culture (組換え大腸菌を用いた DO-stat 流加培養による単鎖抗体の効率的生産)
審査委員	(主査)教授 堀内淳一 教授 亀井加恵子 教授 鈴木秀之 准教授 熊田陽一

論文内容の要旨

組換え大腸菌を用いるタンパク質生産システムは、遺伝子組換え手法が確立されていることに加え、安価な培地で大量生産が可能であることから産業応用が進み、バイオテクノロジ一分野における基盤技術として広く利用されている。一方、宿主として大腸菌を用いた場合、発現タンパク質が細胞内のみに蓄積し、不溶化し封入体 (inclusion body) を形成することが知られている。目的タンパク質が封入体を形成した場合、目的タンパク質の精製工程において、菌体破碎、封入体の refolding、エンドトキシン除去などの多段階の複雑な操作が必要となり、生産収率が低下し精製コストが大幅に増加する。このため封入体の形成を抑制した可溶性組換えタンパク質生産手法の確立は、大きな課題とされている。これまで発現タンパク質の封入体形成を抑制するため、タンパク質合成速度の制御や酸化還元環境の維持、分泌シグナルの導入などが検討されているが、必ずしも十分な成果が得られていない。

このような背景の下、本論文は培養工学的立場から本課題の克服を目指し、培養液中の溶存酸素濃度(Dissolved Oxygen, DO)を精密に制御できる DO-stat 流加培養システムを開発し、組換え大腸菌を用いた単鎖抗体(single-chain Fv antibody, scFv) 生産に適用した結果を報告するものである。本論文は全 6 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景と目的について述べた。

第 2 章では、主要な実験方法についてまとめている。本研究で用いたモデルタンパク質は、炎症反応時に產生される C-reactive タンパク質 (CRP)に対するマウス由来抗体の可変領域から構成される anti-CRP scFv である。

第 3 章では、本研究で構築した組換え大腸菌の anti-CRP scFv 生産特性を、従来法である回分培養により検討した結果を述べている。その結果、anti-CRP scFv 生産量は、0.5-0.8 g/L 程度であり、また発現した総タンパク質に対し不溶化していない活性型タンパク質の比率を示す可溶化率は、36-43%程度であることが明らかとなった。

第 4 章では、この菌株を用い Dissolved Oxygen (DO)-stat 流加培養システムによる培養実験を行

った結果を述べている。DO-stat 流加培養とは、グルコースなどの流加基質の流加速度を制御し DO を一定に維持する流加培養方法で、タンパク質合成速度の制御や酸化還元環境の維持が一定の範囲で可能になる。本研究ではグルコース流加制御に PID 制御を導入し DO の制御性を向上させている。このシステムを用い種々の DO 条件において約 50 時間の流加培養を行ったところ、DO=5-40% の条件において anti-CRP scFv 生産量は 2.8-3.0 g/L、可溶化率は、96-98% となり、scFv 生産およびその可溶化率がともに大幅に改善されることが明らかになった。この結果より、DO を精密に制御した流加培養を行うことにより、scFv の生産性及び可溶化率を大幅に向上去できることが判明した。

次に生産性の更なる向上を目指して、培養時間を 50 時間から 100 時間まで増加させた流加培養を行ったところ、生産された scFv が培養後期に急激に分解される現象が認められた。そこで第 5 章では、scFv の分解を抑制し、生産を安定化させる方法について検討を行った。scFv 分解の原因について検討したところ、培養後期に細胞内プロテアーゼ活性が上昇しており、プロテアーゼによる分解が生じていると推定された。プロテアーゼ活性の上昇は、菌体濃度が高い培養後期に遊離アミノ酸などの窒素源が不足することにより生じると考えられた。そこで、流加培地中のアミノ酸供給源である酵母エキス濃度を種々変化させて流加培養を行ったところ、流加培地におけるグルコースと酵母エキスの比を 1 対 1 とすることにより、scFv の分解を効果的に抑制できることが判明した。この流加培地を用い約 100 時間の流加培養を行ったところ、DO=40% の条件において anti-CRP scFv 生産量は 4.0-5.2 g/L、可溶化率 97% となり、100 時間の培養において分解を抑制し、scFv 生産を安定化しその生産量を大幅に増加させうることが明らかになった。

第 6 章では本論文の結論及び将来構想についてまとめている。

論文審査の結果の要旨

組換え大腸菌を用いるタンパク質生産では、封入体の形成を抑制した可溶性組換えタンパク質を効率的に生産する手法の確立が大きな課題とされている。この課題解決に貢献するため、本論文は、培養液中の溶存酸素濃度(Dissolved Oxygen, DO)を精密に制御できる DO-stat 流加培養システムを開発し、組換え大腸菌を用いた単鎖抗体(single-chain Fv antibody, scFv) 生産に適用した結果を報告した。

本論文ではモデルタンパク質として、炎症反応時に產生される C-reactive タンパク質 (CRP)に対するマウス由来抗体の可変領域から構成される anti-CRP scFv を用いた。構築した組換え大腸菌を用い Dissolved Oxygen (DO)-stat 流加培養システムにより、種々の DO 条件において約 50 時間の流加培養を行ったところ、DO=5-40% の条件において anti-CRP scFv 生産量は 2.8-3.0 g/L、可溶化率は、96-98% となり、scFv 生産およびその可溶化率がともに大幅に改善された。この結果より、DO を精密に制御した流加培養を行うことにより、scFv の生産性及び可溶化率を大幅に向上去できることを明らかにした。

次に生産性向上のため培養時間を約 100 時間に拡大したところ、培養後期に生産された scFv の急激な分解が生じたことから、scFv 生産の安定化について検討を行った。培養後期における scFv 分解の原因について検討したところ、培養後期にアミノ酸などの窒素源不足により細胞内プロテアーゼ活性が上昇し、scFv 分解が生じていると推定された。そこで、流加培地中のアミノ酸供給

源である酵母エキス濃度を種々変化させて流加培養を行ったところ、流加培地におけるグルコースと酵母エキスの比を 1 対 1 とすることにより、scFv の分解を効果的に抑制できることが判明した。この流加培地を用い約 100 時間の流加培養を行ったところ、DO=40% の条件において anti-CRP scFv 生産量は 4.0-5.2 g/L、可溶化率 97% となり、scFv 生産を安定化しその生産量を大幅に増加させうること明らかになった。この生産性と可溶化率は、従来報告されている大腸菌を用いた scFv 生産の実績を大幅に凌駕するものである。

以上ように、本博士論文は、DO-stat 流加培養システムの適用により scFv の生産性及び可溶化率を大幅に向かうことを明らかにし、さらに流加培地中のアミノ酸供給源である酵母エキスの供給量を適切に設定することにより、長時間の流加培養において scFv 生産の安定化及び生産性向上を実現できることを示した。これらの結果は、学術的及び実用的観点から極めて有益であり、高く評価できる。なお、論文の基礎となっている学術論文は、レフェリー制度の確立した専門学術誌に 2 編掲載され、2 編とも申請者が筆頭著者である。

【公表論文】

1. N. H. Nghia, Y. Kumada, M., Kishimoto, J. Horiuchi: Effective production of single-chain variable fragment (scFv) antibody using recombinant *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture, *J. Biosci. Bioeng.*, 132, 1, 56-63 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.013>
2. N. H. Nghia, Y. Kumada, M., Kishimoto, J. Horiuchi; Stabilization of single-chain Fv antibody production using recombinant *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture employing yeast extract-enriched feeding medium, *Biochem. Eng. J.*, 176, 108104 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108184>