

氏名(本籍)	黒田康介(兵庫県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4687号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Study on Production of Antibody by Methylophilic Yeast, <i>Ogataea minuta</i> (メタノール資化性酵母 <i>Ogataea minuta</i> による抗体生産系の開発)		
主査	筑波大学教授(連携大学院)	農学博士	地神芳文
副査	筑波大学教授	理学博士	漆原秀子
副査	筑波大学教授	理学博士	白岩善博
副査	筑波大学准教授	理学博士	吉村建二郎

論文の内容の要旨

近年、抗体医薬を用いた医療が注目を集めている。抗体は安全性が高く副作用が少ないこと、抗原に対する高い特異性や抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性に代表されるエフェクター機能を有することなどがその理由である。抗体の生産法としては、チャイニーズハムスター由来の細胞(CHO)を宿主とする生産系が主流であるが、動物細胞による生産系は、スケールアップが難しく、細胞の育種や培養が長期に及び、ウィルスのクリアランス試験が必要であるなどの問題を抱えている。さらに、抗体医薬は投与量が多く、慢性疾患への適用も頻繁であることから、より安価に組換え抗体を製造できる代替宿主による生産系の確立が期待されている。

動物細胞の代替宿主として、微生物、植物、カビ、昆虫細胞、トランスジェニック動物個体などが考えられるが、酵母は、動物細胞と同様、糖鎖付加などタンパク質の翻訳後修飾が可能であり、動物細胞に比べてスケールアップが容易で培養や育種の期間が短く、製造コストも動物細胞に比べて格段に安価となりうるため、近年、急速に注目を集めている。特に、メタノール資化性酵母はタンパク質生産能が高いため、糖タンパク質である抗体の生産系宿主として有望である。このような状況のもとで、本研究は、メタノール資化性酵母を用いた抗体生産系の開発をめざしたものである。

酵母を用いた糖タンパク質医薬品の生産では、動物細胞由来のアスパラギン結合型(N型)糖鎖の多くが複合型であるのに対し、酵母の糖鎖はマンナン型である点に留意が必要であり、N型糖鎖は糖タンパク質の生理活性に重要なことから、動物細胞と同等の糖鎖を持つ酵母株の開発が必要となる。さらに、酵母特有のN型糖鎖はヒトに対して抗原性を示す可能性があるため、ヒト適応型に変換する必要がある。これまで抗体の機能断片であるFcやscFvといった分子を酵母で発現または高生産させた例はあるものの、重鎖と軽鎖の4量体からなる抗体全長分子の大量分泌に成功した報告や抗体の生産性向上を試みた報告はない。そこで、本研究では、特に上記2つの課題の解決を目的とした。

まず、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* IFO 10746 より、メタノール誘導型ならびに構成発現型のプロモーターをクローニングし、異種タンパク質発現の宿主を構築した。次に、ヒト適応型N型糖鎖付加酵

母を創出するため、酵母のマンナン糖外鎖の合成に作用する *OCH1* 遺伝子を欠損した株を作成し、さらにカビ由来の α -1, 2 マンノシダーゼ遺伝子を導入して α -1, 2 結合したマンノースを消化することで、ハイマンノース型 (Man5GlcNAc2) の *N* 型糖鎖を生産する酵母の育種に成功した。ハイマンノース型糖鎖はヒト適応型 *N* 型糖鎖のプロトタイプであり、この成果は、酵母 *O. minuta* によるヒト適応型糖鎖生産の可能性を示したものと見える。

次に、抗体の生産性を向上させるため、酵母内在性のタンパク質分解活性を抑制することを試みた。液胞に存在するプロテアーゼは培養中に溶菌によって培地に漏出して目的タンパク質を分解するため、生産性向上には液胞プロテアーゼ欠損株の利用が有効と思われる。そこで、液胞プロテアーゼをコードする *PEP4* と *PRB1* の両遺伝子を欠損した株を構築して、その有効性を評価した結果、抗体の分泌生産性は向上しなかったが、細胞内での抗体の蓄積量が増加しており、野生型細胞では抗体が液胞に輸送されて分解されることが明らかとなった。一方、抗体の重鎖は酸性プロテアーゼである Yps1p によって分解を受けることが明らかとなった。そこで *YPS1* 遺伝子欠損株を作成して、発現した抗体分子を解析した結果、重鎖の限定分解が *YPS1* 遺伝子欠損株で抑制されることが確認された。従って、液胞プロテアーゼと酸性プロテアーゼの両遺伝子を欠損した酵母株が抗体生産に有効なことが示された。

さらに、*O. minuta* 酵母で分泌された抗体にはセリン／スレオニンにマンノースが結合した酵母特有の *O* 型糖鎖が付加されることが確認された。疎水性の高い抗体の重鎖と軽鎖 (特に会合面) は、酵母の小胞体 (ER) 内にて凝集しやすいために *O* 型糖鎖の付加が起こるが、動物細胞では ER にて重鎖と軽鎖が会合して安定な分子となり効率よく分泌されると思われることから、この *O* 型糖鎖の付加を抑制することで酵母における抗体の分泌を促進できると推測された。そこで、*O* 型マンノース付加酵素 Pmt の活性阻害剤を用いて、抗体への *O* 型糖鎖の付加抑制を試みた結果、Pmt 阻害剤によって *O* 型糖鎖付加が抑制され、抗体の分泌生産性も向上した。付加された *O* 型糖鎖が抗体重鎖と軽鎖の会合を阻害し、分泌阻害因子として作用することも同時に明らかとなった。

審査の結果の要旨

メタノール資化性酵母で生産した *O* 型糖鎖付加を抑制した抗体は、*O* 型糖鎖が付加した状態で分泌された抗体と比較して、高い抗原結合能を有しており、*O* 型糖鎖の付加抑制が酵母を用いた高品質抗体の高生産に効果的なことが明らかとなった。以上の結果は、新規に開発したメタノール資化性酵母変異株がヒト抗体全長を分泌生産するうえで有用なことを示しており、この過程で得られた多くの知見は、抗体医薬の生産だけでなく、タンパク質の高次構造形成と糖鎖との関連といった学術面でも貴重な情報を提供するものである。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。