

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05162

研究課題名（和文）D0-stat流加培養に基づく組換え大腸菌を用いた単鎖抗体の高濃度菌体外生産

研究課題名（英文）Extracellular production of scFv using recombinant E. coli based on D0-stat fed-batch culture

研究代表者

堀内 淳一（Horiuchi, Jun-ichi）

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：30301980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本申請では組換え大腸菌における単鎖抗体(scFv)の菌体外分泌メカニズムを明らかにし、その知見に基づいて組換え大腸菌によりscFvを活性型のまま菌体外に効率的に生産する培養手法を確立することを目的とした。その結果、scFvの菌体外分泌現象が細胞内成分の非選択的漏出に基づくことを明らかにし、最適D0条件を決定し、D0-stat流加培養によるscFv生産性を大幅に向上させた。さらに培養中に遊離アミノ酸を含む酵母エキスを過剰に供給することによりD0-stat流加培養後期におけるscFv生産の分解を抑制した。これらの研究成果を原著論文2報により報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いられた単鎖抗体をはじめとする各種抗体断片は、今後の医療診断、免疫検査に必須の試薬で、その生産効率化の実現は大きな社会的意義がある。またタンパク質医薬品製造における分解抑制問題は切実なニーズであり、本課題を解決することにより生産コストを大幅に下げることにつながる。このように本研究は、免疫診断用抗体フラグメントを始めとする組換えタンパク質生産を革新的に低コスト化・効率化する手法であり、ウイルス感染症の検査用キットの低コスト化に大きく貢献するとともに、機能性ペプチドなど比較的低分子量で、糖鎖修飾が不要なタンパク質生産に幅広く応用できる。

研究成果の概要（英文）：In the present work, a D0-stat fed-batch culture system was developed and applied to the recombinant scFv production using recombinant E. coli. Successful soluble anti-CRP scFv production in a high cell density cultivation of recombinant E. coli was achieved under D0 conditions between 5 and 40% of saturation. Furthermore, it was found that the use of yeast extract-enriched feeding medium was effective to prevent scFv from proteolytic degradation.

研究分野：生物化学工学

キーワード：大腸菌 単鎖抗体 流加培養 分泌生産

1. 研究開始当初の背景

組換え大腸菌によるタンパク質発現系は遺伝子工学分野で広く用いられており、例えばタンパク質データベース(Protein Data Bank, PDB)に登録されているタンパク質の約80%が大腸菌により生産されている。このタンパク質発現系は、遺伝子組換え手法が確立されていることに加え、大腸菌の増殖速度が大きく発現レベルも高いことから、安価な培地で大量生産が可能であるが、一方、糖鎖修飾ができない、概ね70kD以上の分子量のタンパク質の生産は難しい、発現タンパク質が細胞内のみに蓄積し、不溶化して多くが封入体(inclusion body)を形成するなどの欠点を有する。中でも目的タンパク質が封入体を形成した場合、精製工程で遠心分離、菌体破碎、封入体のrefolding、エンドトキシン除去、イオン交換/クロマト精製などの多段階の複雑な操作が必要となり精製コストが増加するため大きな課題とされている。

このため大腸菌による組換えタンパク質生産において、目的タンパク質を活性型のまま菌体外に分泌生産できれば、右図に示すように遠心分離した培養液から活性のあるタンパク質を直接精製することが可能となり、タンパク質生産における精製プロセスを大幅に簡素化し低コスト化を実現できる。しかしながら、大腸菌においてタンパク質を活性型のまま菌体外に高濃度生産した例は殆どなく、一般的には不可能とされてきた。このような状況の下、当研究室では、大腸菌で安価に生産できる単鎖抗体などの抗体フラグメントの医療・診断分野への応用研究を生物化学工学立場から進めており、例えば、抗体フラグメントの一つVHH融合タンパク質の特性を報告している(Horiuchi, J., 他4名, *Biotechnology Progress*, 31, 6, 1563-1570 (2015))。それらの研究を進める中で、生産された抗体フラグメントの多くが封入体を形成し、前述のごとく精製工程が複雑となり収率が低下することが大きな課題であった。この点を改善するため、当初組換えタンパク質の可溶化率向上に汎用されるペリプラズム分泌シグナル(peIB leader)を導入し回分培養を行ったが、その効果は限定的で生産量も低かった。その後、申請者が長年培ってきた高度な流加培養技術に基づき溶存酸素濃度を精密に制御したDO-stat流加培養を行ったところ、モデルタンパクとして用いたscFvを活性型のまま数g/Lのオーダーで菌体外に分泌生産できることを見出した。(坂本、熊田、堀内他、組換え大腸菌を用いた流加培養による単鎖抗体の高濃度菌体外生産、第49回化学工学会秋季大会、優秀ポスター賞(2017))

2. 研究の目的

本申請ではこのような背景のもと、組換え大腸菌において新たに見いだされた単鎖抗体等の抗体フラグメントの菌体外分泌メカニズムを明らかにし、その知見に基づいて組換え大腸菌により目的タンパク質を活性型のまま菌体外に効率的に生産する培養手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

目的タンパク質を活性型のまま菌体外に効率的に生産する培養手法に関し、これまで

の検討で DO を精密に制御した長時間の DO-stat 流加培養により、活性型 scFv の菌体外生産が可能になったことが明らかになっている。そこで右に示す既設の DO-stat 流加培養実験装置を活用し、培養中の酸素供給速度、DO、培地成分、誘導のタイミングや IPTG 濃度などの培養条件を幅広く検討し最適化した。

特に、ペリプラズム内の酸化還元状態がタンパク質のフォールディング過程におけるジスルフィド結合の形成に大きな影響を及ぼすことから溶存酸素濃度が scFv の菌体外生産に及ぼす影響に焦点を当て詳細に検討を行った。上記の培養装置にはグルコース流加制御に独自に開発した PID 制御を導入し従来の ON/OFF 制御に比べ、DO の制御性が格段に向上させており、DO の影響を緻密に検討できる（右図参照）。

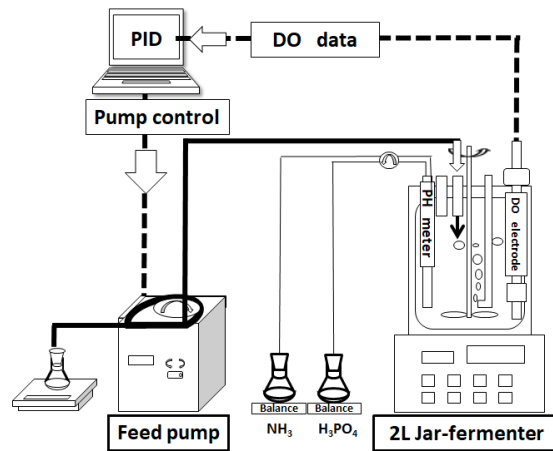
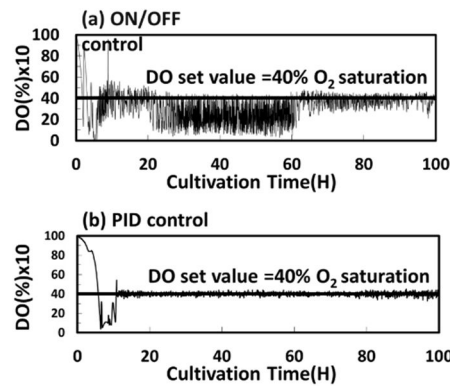


Fig. Schematic representation of experimental apparatus for DO-stat fed-batch culture



DO-stat流加培養におけるDOの制御性 (a)ON/OFF制御、(b)PID制御

4. 研究成果

まず計画初年度において、Anti-CRP scFv をモデルタンパクとし、N 末端側にペリプラズム分泌シグナル (pelB leader)、C 末端側に精製用 His タグを導入した pET-22 発現ベクターを用いて、大腸菌 Rosseta2(DE3)株を形質転換した。この組換え大腸菌を 2L 容 Jar-fermenter により DO-stat に基づく流加培養を行った。流加培養では、PID 制御に基づき DO 値が設定値になるようグルコース培地を流加した。菌体濃度が OD600 = 60 に達した時点で IPTG を添加し誘導生産を行い、約 100 時間流加培養を継続した。DO 値は 飽和溶存酸素濃度の 40%、60%、80%とした。その結果、DO=40%の条件では菌体増殖は速やかで、菌体濃度は最大約 112(OD600)となり、大腸菌の高密度培養が実現した。IPTG 添加後、細胞内に封入体が蓄積するが、その後培養液中に活性型 scFv が蓄積され、最終的に 4.8g/L の活性型 scFv が培養液中に生産されることが明らかになった。次に DO 設定値を 60%、80% と変化させ、scFv の菌体外生産に及ぼす DO の影響を検討した結果、DO の値を変化させても OD600、菌体外 scFv 濃度及び可溶化率はほぼ同じで、流加培養中の溶存酸素濃度は scFv の菌体外生産に大きな影響を与えないことが明らかになった。一方培養上清の SDS-PAGE から pelB leader を導入した大腸菌では、様々な細胞内タンパク質の菌体外への溶出が認められたことから、ペリプラズムでフォールディングした活性型 scFv が非選択的に菌体外に溶出するようになり、その状態が流加培養により長時間継続することで、scFv の菌体外の高濃度生産が行われたと考えられる。これらの研究については論文 1 により公表

した。

次に s c F v 遺伝子として anti-human IgG、anti-CRP、anti-CD9 を用い、これらの scFv 遺伝子を導入した pET-22 発現ベクターを用いて、大腸菌 Rosseta2(DE3)株を形質転換した。更に、scFv の高密度配向固定化を可能とする材料親和性ペプチドタグを導入した株も構築した。流加培養は、2L ジャーファーマンターを用い、PID 制御に基づく精度の高い DO stat によりグルコースを流加し、約 100 時間流加 培養を継続した。次に Anti-human IgG scFv 生産株、及び Anti-CD 9 scFv 生産株を用いて培養を行った結果、それぞれ最終的に 4.4g/L、2.1g/L の s c F v が菌体外にリフォールディング不要な活性型として生産された。一方材料親和性ペプチドタグを導入した scFv では、ほとんど菌体外への分泌生産が生じないことが明らかとなった。これは研究に使用した材料親和性ペプチドタグが大腸菌由来の配列であったため、大腸菌の細胞膜と強い親和性を持ち、細胞内において吸着・凝集するためと推定された。

一方研究の過程で流加培養中に分泌された scFv の分解現象が散見され、本技術の社会実装を進めるため培養中の scFv 分解を抑制した安定生産を実現する必要性が明らかとなった。この点の検討を進めたところ培養中途における scFv の分解は大腸菌由来のプロテアーゼによるものであり、そのプロテアーゼは培養後期の遊離アミノ酸不足の条件下で強く誘導されることが明らかとなった。そこで酵母エキスを過剰に供給する流加培養を検討したところプロテアーゼ活性の発現が抑制され scFv の分解をほぼ完全に抑制し、生産性も大きく向上できることが判明した。これらの結果について論文 2 で公表した。

< 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, 108184 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108184>

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nguyen Hieu Nghia, Yoichi Kumada, Michimasa Kishimoto, Jun-ichi Horiuchi	4. 巻 132
2. 論文標題 Effective Production of Single-chain Fv antibody (scFv) using Recombinant Escherichia coli by D0-stat Fed-batch Culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nghia Nguyen Hieu, Kumada Yoichi, Kishimoto Michimasa, Horiuchi Jun-ichi	4. 巻 176
2. 論文標題 Stabilization of single-chain Fv antibody production using recombinant Escherichia coli by D0-stat fed-batch culture employing yeast extract-enriched feeding medium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 108184 - 108184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2021.108184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 湯川 忠二・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 D0-stat流加培養による単鎖抗体生産の最適化を目指した基質供給制御
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真田 悠生・Nguyen Hieu Nghia・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 アミノ酸添加による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体生産の安定化
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 貴博・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 D0-stat流加培養による組換え大腸菌を用いた抗体フラグメントVHHの菌体外生産
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 貴博・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 D0-stat流加培養に基づく組換え大腸菌を用いたラクダ科重鎖抗体フラグメントの効率的生産
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯川 忠二・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 D0-stat流加培養における基質供給制御の最適化
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 貴博・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 D0-stat流加培養による組換え大腸菌を用いた抗体フラグメントVHHの効率的生産
3. 学会等名 化学工学会関西大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真田 悠生・ Nguyen Hieu Nghia・ 熊田 陽一・ 堀内 淳一
2. 発表標題 アミノ酸添加による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体生産の安定化
3. 学会等名 化学工学会関西大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯川 忠二・ 熊田 陽一・ 堀内 淳一
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いたD0-stat流加培養による単鎖抗体生産における基質供給制御
3. 学会等名 化学工学会関西大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 大介・ 熊田 陽一・ 堀内 淳一
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いた単鎖抗体生産における菌体外分泌特性
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun-ichi Horiuchi, , Nguyen Hieu Nghia, Yoichi Kumada, Michimasa Kishimoto
2. 発表標題 Enhanced production of soluble single-chain Fv antibody (scFv) using recombinant Escherichia coli by dissolved oxygen (D0)-stat fed-batch culture
3. 学会等名 AFOB2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun-ichi Horiuchi, Nguyen Hieu Nghia, Yoichi Kumada, Michimasa Kishimoto
2. 発表標題 Stabilized production of active single-chain Fv antibody using recombinant Escherichia coli by dissolved oxygen (DO)-stat fed-batch culture
3. 学会等名 The 3rd JAPAN-ASEAN Seminar 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯川 忠二・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いた単鎖抗体生産に及ぼす酸素移動速度の影響
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 貴博・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 DO-stat流加培養による組換え大腸菌の高密度培養と単鎖抗体生産への応用
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真田 悠生・堀内 淳一・熊田 陽一・坂本 祐一朗
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いたDO-stat流加培養による高効率単鎖抗体生産
3. 学会等名 化学工学会 第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川見 菜実香・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 PID制御を適用した組換え大腸菌のD0-stat流加培養
3. 学会等名 化学工学会 第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真田 悠生・Nguyen Hieu Nghia・熊田 陽一・堀内 淳一
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いたD0-stat流加培養による単鎖抗体の高効率菌体外生産
3. 学会等名 化学工学会 第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada
2. 発表標題 Extracellular production of soluble single-chain variable fragment using recombinant E. coli
3. 学会等名 ASEAN-JAPAN seminar 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 NGUYEN Hieu Nghia, Michimasa KISHIMOTO, Yoichi KUMADA, Jun-ichi HORIUCHI
2. 発表標題 Enhanced production of anti-CRP single-chain variable fragment (scFv) antibody using Escherichia coli by D0-stat fed-batch culture
3. 学会等名 APCCHE 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nghia Nguyen Hieu, Michimasa Kishimoto, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
2. 発表標題 Enhanced production of anti-CRP single-chain variable fragment (scFv) antibody using Escherichia coli by D0-stat fed-batch culture
3. 学会等名 第71 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井嶋 浩一朗, 坂本 祐一朗, 川見 菜実香, 熊田 陽一, 堀内 淳一
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いたD0-stat 流加培養による単鎖抗体の菌体外生産
3. 学会等名 第71 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川見 菜実香・堀内 淳一・熊田 陽一
2. 発表標題 グリセロール流加培養による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体の菌体外生産
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen Hieu Nghia・Kishimoto Michimasa・Kumada Yoichi・Horiuchi Jun-ichi
2. 発表標題 Factors affecting anti-CRP scFv production using E. coli by D0-stat fed-batch culture
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真田 悠生・堀内 淳一・熊田 陽一
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いたDo-stat流加培養による効率的単鎖抗体生産
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(岡山大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen Hieu Nghia・Kishimoto Michimasa・Kumada Yoichi・Horiuchi Jun-ichi
2. 発表標題 Stabilization of anti-CRP scFv production by use of yeast extract enriched medium in D0-stat fed-batch culture
3. 学会等名 化学工学会姫路大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川見 菜実香・堀内 淳一・熊田 陽一
2. 発表標題 グリセロール流加を用いた組換え大腸菌の流加培養による単鎖抗体の菌体外生産
3. 学会等名 化学工学会姫路大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada, Nghia Nguyen Hieu, Yuichiro Sakamoto
2. 発表標題 Extracellular Production of Single-chain Variable Fragments (scFvs) Using Recombinant E.coli by
3. 学会等名 ACB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------