

## メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた異種タンパク質の生産

柿 谷 均  
金 子 貴 史

### Heterologous Protein Production by a Methanol- Utilizing Yeast, *Pichia pastoris*

Hitoshi KAKIDANI  
Takashi KANEKO

*Pichia pastoris*, a methanol-utilizing yeast, has been developed as a host organism of recombinant DNA molecules. *Pichia pastoris* has a broad range of potential advantages in economical production of heterologous proteins. We discuss herein its feasibility and limitations when the *Pichia* system is to be applied to the production of pharmaceutical proteins.

#### 1. はじめに

遺伝子工学は我々の消化管に棲む微生物である大腸菌 (*Escherichia coli*) との「科学的な」おつきあいの中で育まれてきた技術体系である。ついには彼らをなだめすかして我々の体にしか存在しないタンパク質を造らせるに至り、我々は従来とは別の意味で大腸菌と親密な関係を持つことになった。大腸菌はしかしながら我々の奴隷となった訳ではなく、彼ら独自の主張を持つ。ソマトスタチン (1977年)<sup>1)</sup>、成長ホルモン (1979年)<sup>2)</sup>、インシュリン (1979年)<sup>3)</sup> と立て続けに生物活性を持つヒトタンパク質が生産できることが報告されて以来、大腸菌はヒトタンパク質の生産工場としての過大な期待を担うことになった。事実、種々のタンパク質は活性体として大腸菌で生産されたが、それ以上の種類のタンパク質がほとんど生産されなかったり、甚だしく分解されたり、あるいは強固な構造体として不溶化してしまうことが次第に明らかになってきた。

大腸菌とタンパク質とのこのような「相性」はタンパ

ク質の生合成過程が生物ごとに大きく異なっていることに起因しており、必要とするタンパク質を生産させるには大腸菌にさらに無理をお願いするかあるいは相性の良い微生物を選んでやるかいずれかの方法を取らざるを得ない。大腸菌以外のホストベクター系の構築はこのような認識に基づいて枯草菌、パン酵母、培養昆虫細胞、培養哺乳動物細胞などで精力的に進められてきた。それぞれ実験室レベルでの研究材料としてはかなり完成度の高い系が作られてきている。しかしながら工業的な生産に適した系としてはそれぞれ長所、短所があり、経済的な遺伝子発現系を構築するための研究開発は未だ発展途上にあるといえよう。

*Pichia pastoris* はメタノールを唯一の炭素源として生育できる微生物で、広い分類法では酵母に属するが、我々に馴染みの深いパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) とはかなり性質を異にする。米国オクラホマ州にあるフィリップス社 (Phillips Petroleum Company) の研究開発チームは *Pichia pastoris* を1970年台の初頭に自然界から分離・同定し、SCP (Single cell protein) として開

発を進めたが<sup>4)</sup>、後年この微生物の持つ際立った特性を遺伝子工学に応用することを考え、約8年の年月をかけて宿主-ベクター系を確立した<sup>5)</sup>。

我々はフィリップス社のピキア発現系のライセンスを受け、異種タンパク質生産のためにどのような利点あるいは欠点を持っているかを評価することにした。ピキア発現系の特徴の一つは後述するようにタンパク質の高い分泌発現性にある。このことは輸血血液から得られている比較的安価なタンパク質製剤(血清アルブミン)の代替

製法として活用できる可能性があることを意味している。我々はピキア発現系を種々のタンパク質生産に用いることを検討しているが、ここではウサギ血清アルブミン(RSA)のピキア酵母での分泌生産を例にとり、この遺伝子発現系の特徴と医用タンパク質製剤の生産において考慮すべき問題点について考察する。

## 2. ピキア発現系の特徴

### (1) 遺伝子操作の原理 (Fig. 1)

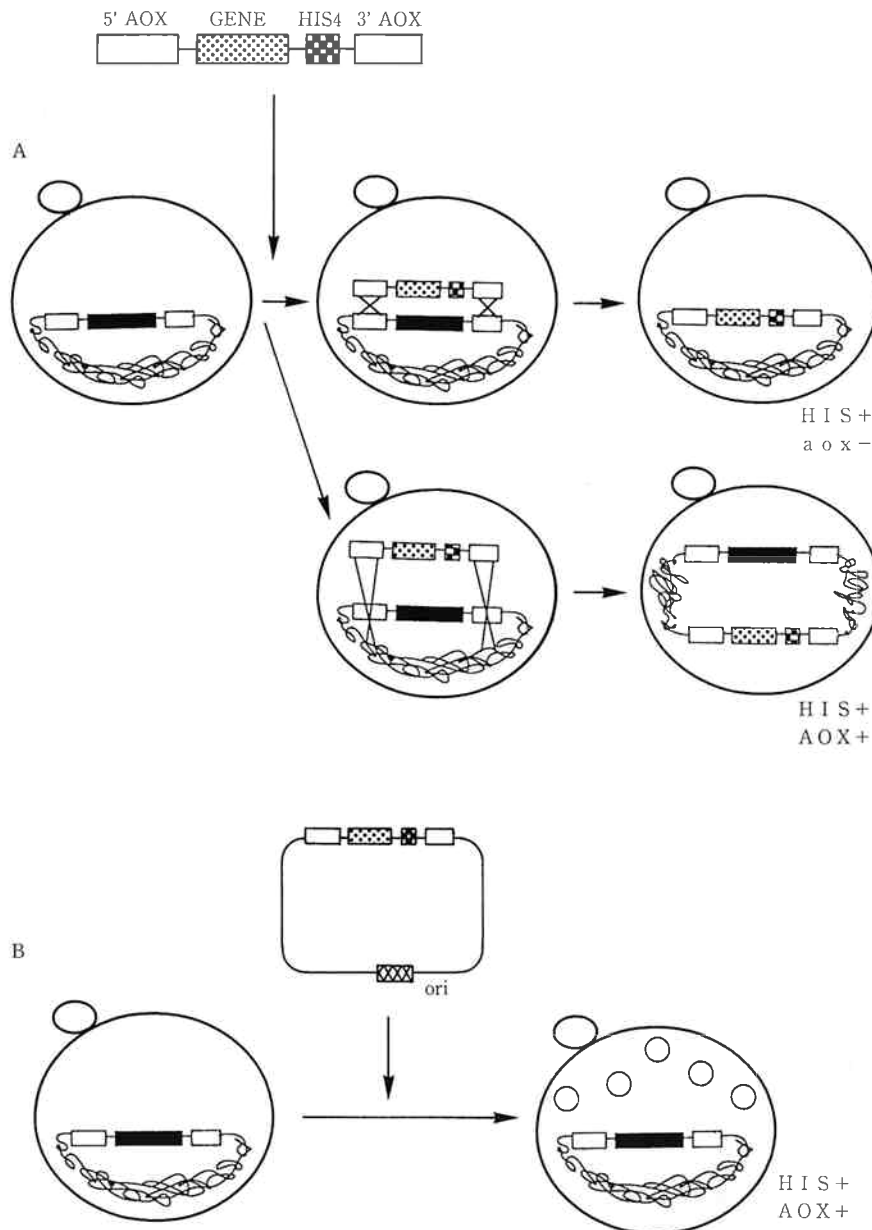


Fig. 1 Principle of *Pichia* Gene Engineering.

A. Integration of heterologous genes into the host chromosome. Transformants, selected as HIS<sup>+</sup>, are either replacement integration type (upper, aox<sup>-</sup>) or additional integration type (lower, AOX<sup>+</sup>). B. Autonomous replication vector is used to introduce heterologous genes as a multicopy state. Recombination between chromosomal and extrachromosomal DNA sometimes occurs.

ピキア酵母への遺伝子の導入と遺伝子発現は基本的にパン酵母で開発された方法と同じ原理で行われる。すなわち

- 1) ベクターは自律増殖型 (Autonomous replication type) と染色体組み込み型 (Integration type) の2種類がある。
  - 2) 発現させたい遺伝子をベクター上の強力なプロモーターとターミネーターの間に挿入し、発現ベクターを構築する。
  - 3) 自律増殖型の発現ベクターの場合にはそのまま、染色体組み込み型の発現ベクターの場合には酵素で直鎖状にしてから、形質転換に用いる。
  - 4) 形質転換はリチウム法、スフェロプラスト法いずれによっても行うことができる。
  - 5) 形質転換菌は栄養要求性の消失 (この場合はヒスチジン要求性; his<sup>-</sup>) によって選抜される。
- 以上のようなパン酵母と共通した原理に加え、以下の様な特徴がある。
- 6) 染色体組み込み型の発現ベクターを用いて形質転換をおこなった場合には外来遺伝子が相同な染色体と置き代わった場合とそうでない場合が生じる。両者はメタノールの資化能力で区別できる。すなわちメタノール培地上で生育しないものは内在の AOX (アルコールオキシダーゼ) 遺伝子が外来遺伝子によって置き代わっていると考えられ、生育するものは染色体上の別の箇所に外来遺伝子が組み込まれたと考えられる。それぞれの形質転換菌をメタノール資化 (Methanol utilization) にしたが、Mut<sup>-</sup>, Mut<sup>+</sup> と略記する。
  - 7) 培地中のメタノールによって強力に誘導される AOX 遺伝子のプロモーターが利用できるので、培地の炭素源をグリセロールからメタノールに換えることによって菌の増殖段階とタンパク質の生産段階を分けることができる。

## (2) 細胞内発現と分泌発現

一般にパン酵母を用いた遺伝子発現においては分泌発現のレベルが非常に低く、分泌タンパク質生産の目的で酵母を用いることは有利でないと考えられてきた。ピキア酵母についても当初分泌発現は期待されず、専ら細胞内発現のみが行われた。ピキア酵母は通常の培養を行った場合にほとんど自らのタンパク質を分泌しないので、分泌能の高い微生物であるとは考えられなかったのである。しかしながらパン酵母のインベルターゼ遺伝子をピキア酵母で発現させると非常に良く分泌される事が見出された<sup>6)</sup>。これ以来、ウシリゾチーム<sup>7)</sup>、ヒト血清アルブ

ミン、EGF (Epidermal growth factor)<sup>8)</sup> などでピキア酵母の高い分泌能が示されてきている。最近の電顕観察によるとピキア酵母はゴルジ体が良く発達しているといわれており、生化学的な実験結果が細胞内構造の上でも裏付けられつつある<sup>9)</sup>。

上記の分泌発現の例で極めて興味深かったのは高い分泌発現にピキア酵母のシグナル配列が必要ではなかったということである。すなわち酵母あるいは動物細胞のシグナル配列が効率良く利用されていた。これは単離された cDNA をそのまま用いてピキア酵母での分泌発現が行えることを意味しており、簡単な遺伝子操作により分泌発現が確認できるというメリットを有する。

## (3) 発現レベルの実績

以下に現在までにフィリップス社と SIBIA 社 (The Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc.) から報告されたピキア発現系を用いた蛋白質生産の成績を概説する (Table 1)。

ピキア酵母はメタノールによる誘導でペルオキシゾームに大量のアルコールオキシダーゼを蓄積する。これは最適条件下で全可溶性タンパク質の30%になる。これに相当するほどの高い細胞内発現が TNF<sup>10)</sup>、破傷風毒素 C フラグメント<sup>11)</sup>、百日咳抗原<sup>12)</sup> で得られている。HBV 抗原<sup>13)</sup>、SOD も細胞内発現として好成績を示している。ストレプトキナーゼの発現量<sup>14)</sup> はこれらよりもかなり低く 100 mg/L 未満である。成長ホルモン、IL-2 などは生産物が不溶化したと言われているが、本来分泌タンパク質であるので分泌発現を行えばこの問題は解決されるかもしれない。

一方分泌発現の場合数種類のタンパク質について 1 g/L 内外の生産性が得られている。HSA の結果はまだ報文として公表されていないが<sup>15)</sup>、3 g/L の好成績が得られたという。

表には現われていないが、生産物が菌に対して毒性を示し、結果として発酵生産を断念したタンパク質も存在する。γ-インターフェロン、TPA などがこれにあたる。毒性発揮の機構は明らかでないが、両者では異なる原因によるものではないかと思われる。われわれは TPA と類似の構造を持つプロウロキナーゼの発現がピキア酵母に対して毒性をもつことを見出している<sup>16)</sup>。またプロウロキナーゼと TPA がパン酵母で極めて生産されにくいことは多くの研究室が経験していることであり、これらのタンパク質の生合成が酵母に共通した代謝を乱すために高発現が得られないのであろう。

Table 1 Summary of Heterologous Protein Expression by *Pichia pastoris*

recombinant protein	expression level	comments
<u>intracellular expression</u>		
HBV-S antigen (22 kd)	400 mg/L	22 nm particle formed
human TNF (17 kd)	10 g/L	30% of total cellular protein clonal variation observed
human SOD (16 kd)	1 g/L	N-terminal acetylated
tetanus toxin C fragment (50 kd)	10 g/L	20-25% of total cellular protein
whooping cough p. 69 antigen	10 g/L	>20% of total cellular protein insoluble
streptokinase (45 kd)	77 mg/L	
<u>secretion</u>		
<i>S. cerevisiae invertase</i> (100 kd)	2.5 g/L	glycosylated
bovine lysozyme (14 kd)	800 mg/L	
mouse EGF (6 kd)	1 g/L	
HSA (67 kd)	3 g/L	

### 3. RSA (ウサギ血清アルブミン) の生産

#### (1) 背景

HSA はヒトの血漿中に大量に含まれる (40 g/L) 分子量67,000の単純タンパク質であり、体内でコロイド浸透圧維持、種々の血液タンパク質あるいは低分子物質の運搬などの生理作用に与っている。HSA はまた熱傷、ネフローゼ、出血性ショックなどの症状に対して静注投与されるタンパク質製剤であり、その需要は極めて大きい。全世界のマーケットは約6億7000万ドル (HSA 200 t)、このうち約半分近くが日本国内で消費されている。ところが日本は原料の血漿を90%海外に頼っており、倫理的観点および血漿中の病原体に対する不安などから国内自給に向けた動きが数年前から起っている。

HSA は他のタンパク質製剤とは桁違いに高い投与量 (5~10 g) で用いられており、またかなり安価に供給されている (薬価約800円/g)。このため長い間遺伝子工学のターゲットとされながら実用化技術が追いつかなかったために実現されず今日に至っている。過去10年間大腸菌、パン酵母などを宿主とした遺伝子組換えによる製法転換が試みられたが、いずれも実用的なプロセスとはなっていない。

我々はピキア酵母の特性を評価するため、HSA のピキアによる生産が技術的、経済的に意味のあるものであるか否かを併せて検討するために HSA と類似のタンパク質であるウサギの血清アルブミンを題材として取り上げた。

#### (2) RSA cDNA の単離、解析

RSA をコードする cDNA は以下のようにして単離した。RSA のアミノ酸配列は明らかでないのでヒトを

含めた数種の血清アルブミンの相同性の高い領域を選び出し、これに対応するオリゴヌクレオチドを合成してハイブリド形成用のプローブとした。

$\lambda$ gt11 ベクターで作製されたウサギ肝臓の cDNA ライブラリー (Clontech 社製) を用い、上記オリゴヌクレオチドをプローブとして約30,000クロンの組換え体ファージをスクリーニングした。その結果、約100個の陽性クロンが検出され、うち12クロンを単離した。このうち cDNA 挿入部分の長い2クロンについてはより詳細な解析を行った。

$\lambda$  clone13 は最も5'側に伸びたクロンであり、 $\lambda$  clone19 は終止コドンを含むクロンであることが分かったので、HindIII 部位より上流は  $\lambda$  clone13 を、下流は  $\lambda$  clone19 を用いて dideoxy 法により塩基配列の決定を行なった。

cDNA の配列から RSA はプレプロアルブミンとして608アミノ酸残基よりなり、成熟アルブミンとして584アミノ酸残基よりなることが推定された (Fig. 2)。プレプロ配列は HSA の場合とまったく同じ配列であったので、成熟タンパク質になるためにプロセスされる部位は両者で共通であることが示唆された。またプレプロ HSA と比較すると全体で75%の相同性があり、金属の主要結合部位であるヒスチジン残基 (成熟タンパク質の N末端から3番目) と35個のシステイン残基はすべて保存されていることがわかった。

#### (3) 発現ベクターの構築とピキア酵母の形質転換

HindIII 部位より上流を  $\lambda$  clone13 から、下流を  $\lambda$  clone19 から取り出して RSA の全体をコードする RSA カセットベクター pRT01 をまず作成した。pRT01 の RSA cDNA 部分を自律増殖型プラスミドベ

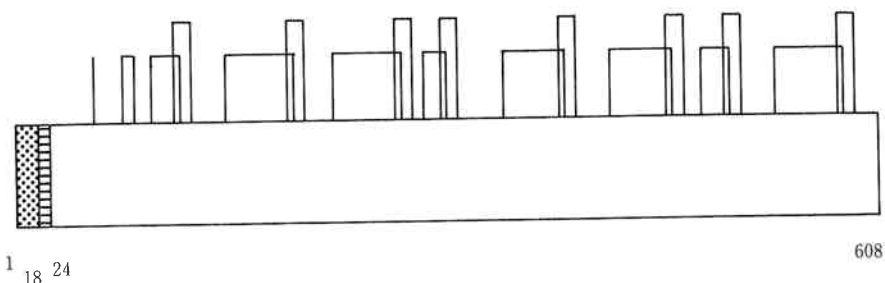


Fig. 2 Hypothetical Diagram of RSA Structure Deduced from the cDNA Sequences.

PreproRSA (composed of 608 amino acid residues) has an N-terminal prepropeptide of 24 amino acid residues. Shaded box represents the "pre" sequence followed by the "pro" sequence (hatched box). Vertical lines indicate the position of cysteine residues, 34 of which are supposed to be involved in specific disulfide bonds (horizontal lines).

クター pTHFK $\Delta$ <sup>17)</sup> に組み込み, pYRSA2 を得た。また同様に染色体組み込み型ベクター pAO804<sup>5)</sup> に組み込み, pYRSA3 を得た (Fig. 3)。

ピキア酵母の形質転換はフィリップス社のプロトコルに従い, スフェロプラスト形質転換法によって行った。

#### 〔4〕 RSA 発現の確認

pYRSA2 あるいは pYRSA3 で形質転換したピキア酵母 (それぞれ Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>-</sup>) を 100 ml の BMGY 培地 (炭素源グリセロール) で OD<sub>600</sub>=11~14 となるまで 30°C で振盪培養し, 遠心で細胞を集めた後 20 ml の BMMY 培地 (炭素源メタノール) に移し, 4 日間培養を続け, 培養上清と細胞を遠心分離によって分画した。それぞれを還元条件下 15% SDS-PAGE にかき, CBB 染色によってタンパク質を検出すると効率的な分泌発現が行われていることが示された。Fig. 4 に Mut<sup>+</sup> 株を用いた場合の結果を示す。ピキア酵母自体は培地中にはわずかのタンパク質しか分泌しないので, RSA が培地中のタンパク質の大部分 (80%以上) を占めていることが分かる。メタノールによる誘導をはじめ 4 日後には Mut<sup>+</sup> 株, Mut<sup>-</sup> 株ともに約 200  $\mu$ g/ml のタンパク質が培地中に検出された。このとき培養液の濁度は各々 OD<sub>600</sub> の値で 60 と 25 であった。またいくつかの独立な形質転換菌を試したが, それらの間で有意な差は見られなかった。

後述するようにピキア酵母は 2 種類の AOX 遺伝子を持っているために<sup>18)</sup> Mut<sup>-</sup> 株においても微弱な AOX 活性が保持されている。このため増殖速度は Mut<sup>+</sup> 株と比べ非常に遅くなるがメタノールを唯一の炭素源とした場合にも生育が可能である。

#### 〔5〕 培養条件の検討

フラスコレベルでの実験結果では Mut<sup>+</sup> 株と Mut<sup>-</sup> 株ではほぼ同等の成績が示されたが, ジャーフェンターを用いた培養では両者の培養制御が極めて異なることが明らかになった。ピキア酵母の利点の一つは高濃度での培養が安価な培地で行えることにあるので, フェンターでは無機塩類とビオチンに炭素源 (グリセロールあるいはメタノール) を加えただけの単純な組成の培地が用いられる。まずはじめに Mut<sup>+</sup> 株の培養を行ったが, これはメタノールを活発に資化するので培養液の DO 値を 30% 以上に保つことが困難であり, フェンターへの酸素の供給を飛躍的に向上させるか菌の濃度をあまり上げないように連続培養を行なう必要があることが分かった。また高濃度のメタノールはピキア酵母に毒性を示すので, メタノールの供給方法にも微妙な制御が必要であると考えられた。

次に Mut<sup>-</sup> 株の培養を行なった。メタノールを連続的に供給し, 培養液内の濃度を 0.5% 以下に保つことで長時間にわたる高密度培養が達成された。Fig. 5 に培養の結果を示す。培養開始後約 10 時間で培地中のグリセロールが完全に消費されるので, グリセロールの消費を確認した後メタノールを添加した。メタノールによる誘導後約 120 時間で菌体量 (乾燥重量) は約 85 g/L に, 培養上清中の蛋白質量は, 約 0.7 g/L (Bradford 法で測定) に達した。

#### 〔6〕 RSA の精製

培養液 11 L を遠心分離して 7 L の上清を得, TS-300 膜 (東ソー社製) を用いた膜濾過により高分子物質を除き, さらに TS-10 膜 (東ソー社製) による膜濃縮を行って濃縮液 4 L を得た。これを 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) に対して 4°C で一夜透析したもの

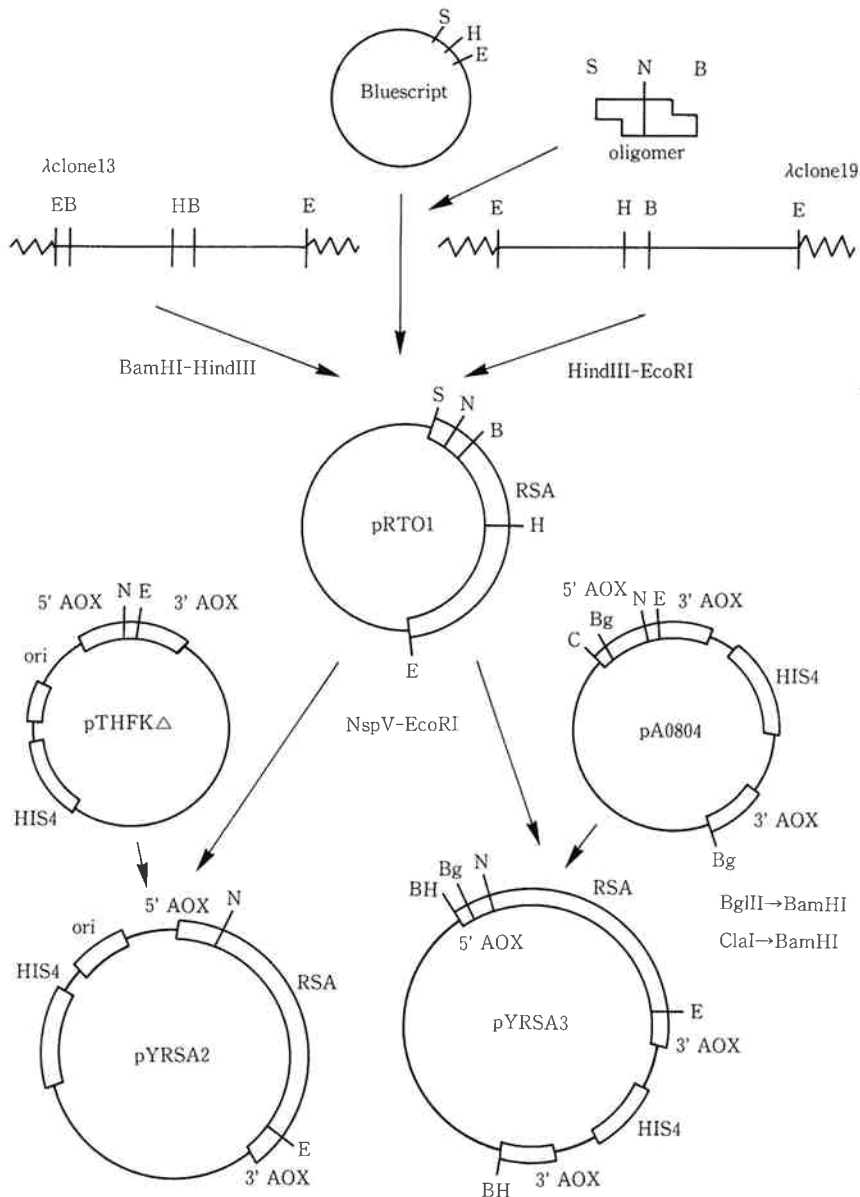


Fig. 3 Construction of RSA Expression Vectors.

As a Bgl II site was present in the RSA coding sequence. Bgl II site and Cla I site in pA0814 were converted to BamH I sites for linealization (see Fig. 1). B, BstE II; Bg, Bgl II; BH, BamH I; C, Cla I; E, EcoR I; H, Hind III; N, Nsp V; S, Sal I.

を粗標品とし、これについて様々の精製方法を適用した。その結果、陰イオン交換樹脂と金属キレートカラムを併用した精製法が比較的好成績を示したので一例を示す。

上記透析物を 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) で平衡化した DEAE-5PW カラム (東ソー社製) にアプライし、上記緩衝液で洗浄した後 0~0.5 M NaCl 濃度勾配による溶出を行った。RSA の溶出画分を 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM NaCl よりなる緩衝液に 5% (wt/vol) 酢酸亜鉛を加えて平衡化したキレート 5PW カラム (東ソー社製) にアプライし、上記緩衝液で洗浄した後

0~0.14 M グリシン濃度勾配による溶出を行った。さらにこれを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH. 7.0), 100 mM NaCl で平衡化した G3000SWXL カラム (東ソー社製) を用いたゲル濾過により精製して最終標品を得た。各々の精製段階における標品の 15% SDS-PAGE による分析結果を Fig. 6 に示す。

最終標品の N 末端アミノ酸配列を分析した結果、プレプロ RSA の 25 番目のグルタミン酸から始まる配列が同定され、明らかな不均一性は認められなかった。標準品としてシグマ社製のウサギ血清由来の精製 RSA を分析

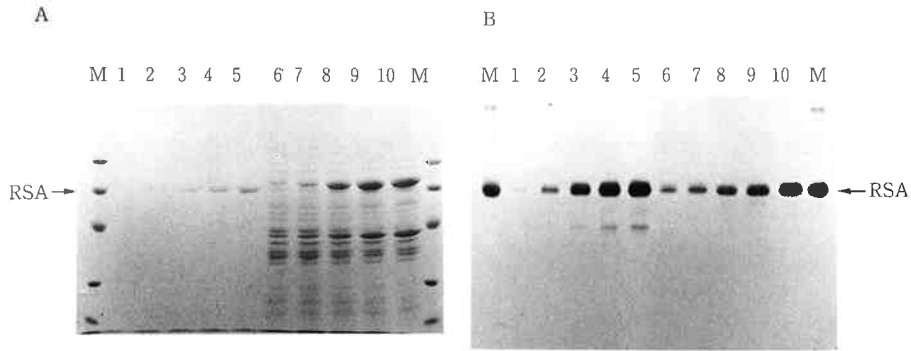


Fig. 4 Expression of RSA by *Pichia pastoris* GTS115 (pYRSA2). Proteins in the culture supernatant (lanes 1 through 5) and in the cell (lanes 6 through 10) after methanol induction were analyzed. Lanes 1 and 6, 15 hr; 2 and 7, 24 hr; 3 and 8, 48 hr; 4 and 9, 72 hr; 5 and 10, 96 hr after induction. Lanes M represent the molecular markers. A. CBB staining. 25  $\mu$ l culture supernatant or culture equivalent cell was electrophoresed in 15% polyacrylamide gel, respectively. B. Western blotting analyzed by polyclonal goat antiserum raised against RSA. 10  $\mu$ l sample was analyzed.

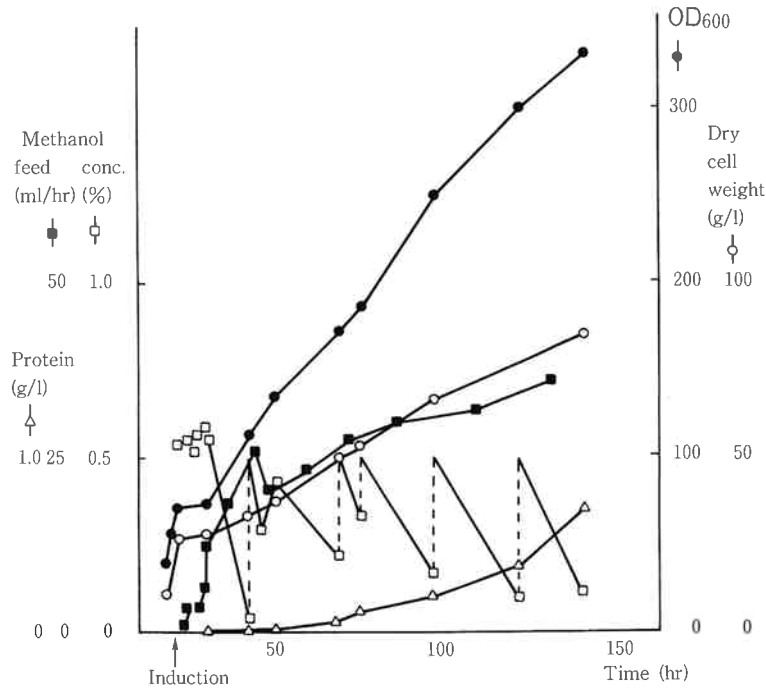


Fig. 5 Jar Fermentor Culture of *Pichia pastoris* GTS115 (pYRSA3). Cellular growth and RSA expression were shown along with methanol feed ratio and observed methanol concentration in the culture. Dotted and solid lines connecting open squares are arbitrary. The feed ratio was so adjusted as to maintain the methanol concentration around 0.5%.

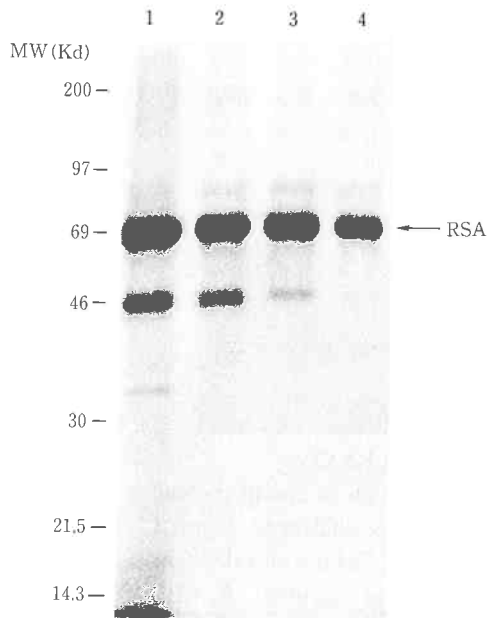


Fig. 6 Purification of RSA from the Culture Medium.

Proteins were analyzed by 15% polyacrylamide gel. Lane 1. membrane concentrate; 2. DEAE-5PW peak fraction; 3. chelate 5PW peak fraction; 4. G3000SWXL peak fraction.

し、同一の結果が得られた。

また上記標品を直径 2.5 mm のディスクゲルを用いた等電点電気泳動法により分析した。培養上清から精製した RSA は pI 値 5.6~6.0 にかけて 4 本のバンドとして現れた。一方シグマ社製 RSA は同じ pI 値の 4 本のバンドに加え、微量ながらより低い pI 値のバンドが数本観察された。

#### 〔7〕 RSA 精製品の検定

上記の方法で精製した標品は蛋白質として 95% 以上の純度のものが得られた。厚生省の生物薬剤基準によると HSA のタンパク質としての純度は 96% 以上とされているが、一般に組換え体タンパク質製剤に求められる純度は通常の生体由来のものよりはるかに厳しい。この理由は血漿由来の場合には混在する成分が病原体を除き基本的に安全なものであるとみなされているのに対し、組換え体の場合には菌体由来成分の毒性が危惧されるからである。大腸菌を宿主とする場合には菌体に発熱性物質があり、このため医薬品原体生産において厳密な管理が必要とされている。現在までピキア酵母の発現系を用いて製造された組換え体タンパク質製剤で製造承認の得られたものはまだないし、菌体成分の薬理作用について公開

されたデータもない。従ってタンパク質としての純度が 96% 以上であることは必要条件の一つであるが、不純物の除去方法および検定方法について細かい検討を加えてゆく必要がある。我々は菌体由来成分の検定のために二つの方法を用いた。第一は糖タンパク質の混入度測定であり、第二は抗体を用いた菌体成分の抗原量としての測定である。

#### (1) 糖タンパク質の混入

ベーリンガー・マンハイム社製の Glycan detection kit を用いて標品中の糖タンパク質を検出した。これは原理的には標品中の糖部分を過ヨウ素酸で酸化した後 Digoxigenin で標識し、Digoxigenin に対する抗体を用いた ELISA により検出するものである。標識後の標品は SDS-PAGE により展開し、ニトロセルロース膜にブロットされた状態で抗原抗体反応を行うので、通常の Western blotting の操作とほぼ同様に行うことのできる簡便な検出方法である。この方法により精製各ステップの標品について分析したところ粗標品には多量の糖タンパク質が含まれ、これらが DEAE-5PW カラムと金属キレートカラムの操作により著しく減少していることが確認された (Fig. 7)。ただしこの検出法の欠点は各糖タンパク質により ELISA の検出感度が異なるので標品中の糖タンパク質の混入度を定量化することが困難なことである。例えば  $\alpha$  酸性糖タンパク質の場合の標準検出感度が 10 ng であるのに対し、酵母カルボキシペプチターゼの場合 250 ng とされている。

#### (2) ピキア菌体成分の混入

ピキア酵母の培養液を抗原としてウサギ抗ピキア抗体を調製し、これを用いた Western blotting と ELISA アッセイを行った。Western blotting の結果、金属キレートカラムによりピキア酵母由来抗原が極めて効率的に除去されていることが明らかになった (Fig. 8)。Western blotting では非タンパク性の多糖類などは検出されないため、ELISA を併用した。上記抗ピキア酵母抗血清から IgG (2 次抗体) および F(ab)<sub>2</sub> (1 次抗体) を定法に従って調製し、これらを 2 サイト ELISA に用いた。ピキア菌体抽出物を用いた標準曲線を作成し、これに基づいて精製 RSA 標品を分析した。その結果、精製標品中には重量比 0.5±0.2% の ELISA 陽性物が含まれることが明らかになった。

### 4. ピキア酵母の医用タンパク質製剤製造宿主としての利点と問題点

#### 〔1〕 RSA



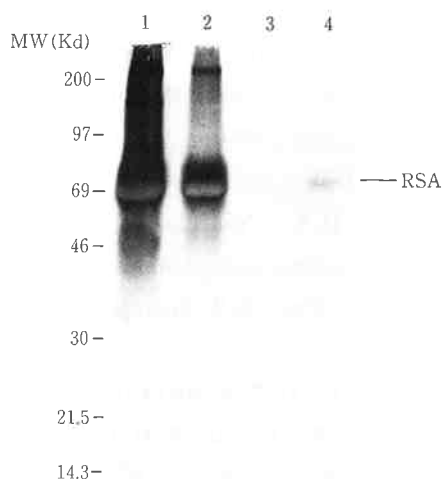


Fig. 7 Impurities Detected in the Protein Preparations by the Glycan Detection Procedure.

Carbohydrates covalently linked to proteins were detected. Procedure was as suggested by the vendor (Boehringer Mannheim Biochemica). Note that serum albumin shows a weak positive signal due to the nonenzymatic attachment of carbohydrate to the protein. Lane 1. membrane concentrate; 2. DEAE-5PW peak fraction; 3. chelate 5PW peak fraction; 4. G3000SWXL peak fraction.

以上述べたように我々はピキア酵母による RSA の分秘生産と生産物の精製を行ったが、この中で種々の問題点が明らかになってきた。まずファーメンターの制御が十分な技術レベルに達しなかったために安定した発現が行えなかったことである。HSA の薬価を考慮すると 1 g/L の分秘生産は決して十分であるとはいえない。生産性をさらに数倍高める工夫が必要であろう。

また一週間にわたる培養を続けているうちに RSA の分解がかなりの程度進んでいることが認められた。精製途中においてもこの分解はさらに進む傾向があった。HSA は血漿中および血漿からの精製途中にほとんど分解されることのない極めて安定なタンパク質であるといわれており、意外であった。おそらくは菌体由来のプロテアーゼによるものである。このプロテアーゼ活性を抑える工夫が必要である。

これらにも増して重要なことは大量操作が可能な経済

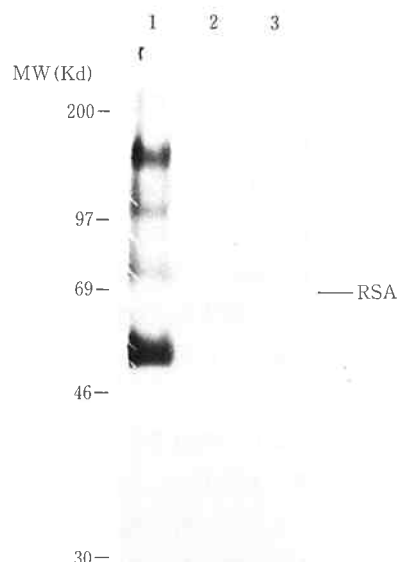


Fig. 8 Impurities Detected in the Protein Preparations by Antiserum Raised against *Pichia* Culture. Lane 1. DEAE-5PW peak fraction; 2. chelate 5PW peak fraction; 3. G3000SWXL peak fraction.

的な精製法を確立することである。我々の行った精製法は数 100 mg レベルまでを意図したものであり、工業的な精製法は化学工学的な見地から再検討する必要があると思われる。

HSA の投与量を考慮すると不純物の除去と検定は他の組換え体タンパク質の基準よりもはるかに厳しくなることが予測される。このための技術構築も容易ではなく、ここに示した方法はそのための予備的な検討にすぎない。

## (2) 一般の組換え体タンパク質製剤

ピキア酵母の高い分秘発現能は組換え体タンパク質の生産にとって魅力的であることはすでに指摘した通りであり、多くのタンパク質製剤の生産に経済的な生産方法を提供する可能性は高い。しかしながらピキア酵母によって生産されたタンパク質に付加される糖鎖は酵母に特有の構造をとっており、ヒトに投与したとき抗原性を持つというのが最大の懸念である。一般に血漿に含まれるタンパク質はほとんどの場合糖鎖が付加されており、血清アルブミンはむしろ例外的な単純タンパク質である。ピキア酵母の糖鎖構造はまだほとんど分析されていないが、例えばインベルターゼには動物型のハイマンノース糖鎖が結合するといわれているのに対して<sup>19)</sup>、我々のプロウロキナーゼ遺伝子を導入した場合の分析では酵母に特有のハイパーマンノース糖鎖が結合するという結果が

得られている<sup>16)</sup>。糖鎖の付加は真核生物にとって必須の生物現象であると思われるので、ピキア酵母の糖鎖付加反応を制御して動物型糖鎖を付加させるかあるいは酵母と動物に共通のコア糖鎖を付加させるようにするといった工夫がピキア酵母の汎用性を高めるために必要であると考えられる<sup>20)</sup>。

これらの技術的な問題点が解決されたとしてもピキア酵母はまだポピュラーな微生物ではないので、安全性評価のための様々の試験が行政機関から要求されることが予想される。

これらのことを総合して結論できることは、新しい宿主ベクター系（遺伝子発現系）を持つことはそれまで不可能とされてきたタンパク質の供給を可能にするが、医薬品原体の生産という観点からは新しさゆえのハードルが相当程度高いということであろう。ピキア酵母によるタンパク質製剤の供給が一般的な技術となった日にはこれらの状況が一変するだろうが、そのためには今後5年あるいは10年の年月が必要であると思われる。

## 5. お わ り に

以上ピキア酵母を医用タンパク質製剤生産に適用する場合に考慮する必要がある問題点について RSA を例にとって概説してきたが、ピキア酵母の利用はこれに限られるわけではない。我々の日常的な研究材料の提供のためあるいは診断材料の提供のためには医薬品原体の生産で直面するような複雑な問題は生じない。この新規発現系の特徴を生かした利用が今後とも活発に進められると思われるし、また上にのべたような欠点を克服した発現系が開発されたならより汎用性の高い系として医薬品原体の生産に用いられる機会が増えていくものと予想される。

(なお脱稿後、酵母を用いた異種タンパク質の生産に関する総説が *Bio/Technology* 紙に掲載された<sup>21)</sup>。参照されたい。)

## 6. 謝 辞

本研究遂行にあたりご協力頂いた当社生物学研究所・三宅俊男副主任研究員、堀比斗志副主任研究員、甲斐健一研究員ならびに新材料研究所・大友玲子研究員、の皆様へ感謝します。

## 文 献

1) Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. and boyer, H. W.;

*Science* 198, 1056 (1977)

- 2) Goeddel, D. V., Heyneker, H. L., Hozumi, T., Arenzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeberg, P. H.; *Nature* 281, 544 (1979)
- 3) Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 106 (1979)
- 4) Wagner, G. H.; U. S. P. 4414329 (1983)
- 5) Sreekrishna, K., Potenz, R. H. B., Cruze, J. A., McCombie, W. R., Parker, K. A., Nelles, L., Mazzaferro, P. K., Holden, K. A., Harrison, R. G., Wood, P. J., Phelps, D. A., Hubbard, C. D. and Fuke, M.; *J. Basic Microbiol.* 28, 265 (1988)
- 6) Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. and Grinna, L.; *Bio/Technology* 5, 1305 (1987)
- 7) Digan, M. E., Lair, S. V., Brierley, R. A., Siegel, R. S., Williams, M. E., Ellis, S. V., Kellaris, P. A., Provow, S. A., Craig, W. S., Velicelebi, G., Harpold, M. M. and Thill, G. P.; *Bio/Technology* 7, 160 (1989)
- 8) Clare, J. J., Rayment, F. B., Romanos, M. A., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K. and Henwood, C. A.; *Gene* in press (1991)
- 9) Wagner, G. H.; Personal communication.
- 10) Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P. and Parker, K.; *Biochemistry* 28, 4117 (1989)
- 11) Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K. and Romanos, M. A.; *Bio/Technology* 9, 455 (1991)
- 12) Romanos, M. A., Rayment, F. B., Beesley, K. M. and Clare, J. J.; in Abstract of *15th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology*, S428 (1990)
- 13) Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W., S., Buckholz, E., Velicelebi, G. and Thill, G. P.; *Bio/Technology* 5, 479 (1987)
- 14) Hagenson, M. J., Holden, K. A., Parker, K. A., Wood, P. J., Cruze, J. A., Fuke, M., Hopkins, T.

- R. and Stroman, D. W.; *Enzyme Microb. Technol.* 11, 650 (1989)
- 15) Sreekrishna, K., Barr, K. A., Hoard, S. A., Prevatt, W. D., Torregrossa, R. E., Livingston, R. E., Cruze, J. A. and Wegner, G. H. in Abstract of 15th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology, S447 (1990)
- 16) Yamada, M.; unpublished results.
- 17) 特開昭63-164891
- 18) Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. R., Thill, G. P. and Stillman, C.; *Molec. Cell. Biol.* 9, 1316 (1989)
- 19) Grinna, L. S. and Tschopp, J. F.; *Yeast* 5, 1107 (1989)
- 20) Marino, M. H.; *Bio/Pharm.* July/August 18 (1989)
- 21) Buckholz, R. G. and Gleeson, M. A. G.; *Bio/Technology* 9, 1067 (1991)



著 者

氏名 柿 谷 均  
Hitoshi KAKIDANI  
入社 昭和54年10月16日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          第二研究室  
          主任研究員



著 者

氏名 金 子 貴 史  
Takashi KANEKO  
入社 昭和60年4月1日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          第二研究室