

日本医療研究開発機構  
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：

(日本語) 国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術のうち高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発に係るもの

(英語) Next-generation biologics manufacturing conforming to global standards (Development of fundamental technologies for efficient construction of high material producible hosts)

研究開発実施期間：平成26年4月8日～平成30年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 近藤 昭彦

(英語) KONDO Akihiko

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 高機能遺伝子デザイン技術研究組合

／国立大学法人神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 教授

(英語) Technology Research Association of Highly Efficient Gene Design

／Professor, Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University

## II 研究開発の概要

### 1. 研究の目的・計画・実施体制等

本研究開発事業では、低分子型の抗体分子（低分子抗体）を酵母で生産性を向上させるために必要な遺伝子群をまとめて酵母に組み込むためのシームレスなシステムを構築することを目指して研究開発を遂行した。具体的には、100 を超える既報遺伝子に加えて、ゲノムデザインサイクル（GDC）の手法で新たに探索される候補遺伝子も含めて、すべての遺伝子をひとまとめにつないで巨大分子を正確かつ迅速に構築する技術とそれらを酵母に迅速に導入する技術開発を遂行した。設計された塩基配列を有するDNAを正確に合成し、多数の遺伝子を人工的につないで長鎖DNA（～5万塩基対程度を想定）を作製するには既存の大腸菌を用いる技術では対応困難であるため、慶應義塾大学で開発された枯草菌を用いる遺伝子集積技術（Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*: OGAB法）で10万塩基を超えるDNAを迅速、正確、そして大規模な数の合成技術開発を

行った。この OGAB 法の原理を細部まで検討し最適化を行うことにより、10 万塩基まで合成可能な自動合成装置を開発した。また、次世代型の抗体として注目されるタンデム型二重特異性一本鎖抗体(Tandem scFv; taFv)等の低分子型の抗体分子について、酵母を主とする微生物を宿主として生産することに成功し、精製した taFv を用いてがん細胞やマウスを用いた活性評価や糖鎖解析も行った。さらに、ゲノム変異や遺伝子破壊・過剰発現等のライブラリを作成し、低分子抗体の生産性向上に関わる遺伝子群について大規模にスクリーニングを行った。最終的に、見出した多数の有用遺伝子をアSEMBルして長鎖 DNA クラスターとして合成・酵母に導入することで生産性の向上した菌株の構築に成功した。

[中間目標 (平成 27 年度末)] 目的物質を迅速かつ高効率に生産するための基盤技術の構築に必要な要素技術を開発する。複数の遺伝子で構成される遺伝子クラスターを設計し、設計した 5 万塩基以上の長鎖 DNA 配列を迅速に合成する装置のプロトタイプを開発し、合成した遺伝子クラスターを宿主に導入し、生産性等を評価し、設計情報にフィードバックするための各要素技術を開発する。

[最終目標 (平成 29 年度末)] 目的物質を迅速かつ高効率に生産するための基盤技術を構築する。複数の遺伝子で構成される遺伝子クラスターを設計し、設計した 10 万塩基以上の長鎖 DNA 配列を迅速に再現性良く合成する装置を開発し、合成した遺伝子クラスターを宿主に導入し、生産性等を評価し、設計情報にフィードバックすることが可能な技術基盤を確立する。

具体的には下記項目について、4 年間実施した。

#### 分担研究①－(1)

課題名：

(日本語) 設計された抗体生産関連遺伝子クラスターを、OGAB 法で自動的に合成する技術開発

(英語) Technology development to automatically synthesize designed antibody production related gene cluster by OGAB method

所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科 特命准教授 柘植謙爾

(英語) Associate Professor, TSUGE Kenji (Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University)

#### 分担研究①－(2)

課題名：

(日本語) OGAB 法による長鎖 DNA 自動合成技術の開発

(英語) Development of automatic long DNA synthesizer based on OGAB method

所属 役職 氏名：

(日本語) プレシジョン・システム・サイエンス(株) 営業部 部長 上田哲也

(英語) Head, Tetsuya Ueda (Sales Director, Precision System Science Co., Ltd. )

#### 分担研究①－(3)

課題名：

(日本語) 長鎖 DNA クラスターを酵母細胞に迅速に導入する系の開発

(英語) Development of a system to rapid transfer of long DNA clusters to yeast cell

所属 役職 氏名：

(日本語) 慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授 板谷光泰

(英 語) Professor, Mitsuhiro Itaya (Institute for Advanced Biosciences, Keio University)

#### 分担研究②－(1)

課題名：

(日本語) 抗体の生産に関わる遺伝子の設計・構築技術の開発

(英 語) Technological development of gene design and construction for antibody production

所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科 教授 近藤昭彦

(英 語) Professor, KONDO Akihiko (Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University)

#### 分担研究②－(2)

課題名：

(日本語) 効率的抗体生産のための遺伝子クラスター設計技術の開発

(英 語) Development of technology to design gene clusters for the efficient antibody production

所属 役職 氏名：

(日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 総括研究主幹 町田雅之

(英 語) Principal Research Manager, Masayuki Machida (Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

#### 分担研究②－(3)

課題名：

(日本語) 低分子抗体の生産性向上加速プラットフォームの開発

(英 語) Development of a research platform to accelerate improvement of productivity for low molecular weight antibody

所属 役職 氏名：

(日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 総括研究主幹 町田雅之

(英 語) Principal Research Manager, Masayuki Machida (Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

## 2. 成果の概要 (総括研究報告)

GDC を活用し、設計された塩基配列を有する DNA を正確に合成するとともに、酵母を主とする宿主微生物に導入して抗体分子の生産性について大規模にスクリーニングを進めた。多数の遺伝子を人工的につなぐ技術として、高機能遺伝子デザイン技術研究組合 (TRAHED)・慶應義塾大学で開発された枯草菌を用いた遺伝子集積技術 (OGAB 法) で 10 万塩基を超える DNA を迅速、正確、そして大規模な数の合成技術開発に成功した。この OGAB 法の原理を細部まで検討し最適化を進めたことにより、10 万塩基まで合成可能な自動合成装置を開発することができた。さらに、低分子抗体を効率的に生産する細胞株を構築する基盤技術開発のために、ゲノム情報等が明らかで、生産系構築が比較的迅速な宿主である大腸菌や酵母等をモデル微生物として、関連する複数の最適遺伝子配列の設計、正確な長鎖遺伝子クラスターの合成、宿主への遺伝子導入、生産性の検証にまで至る一連のサイクル要素技術の開発を目標として研究開発を進めた。本研究開発において、scFv、taFv、Fab、Diabody などの異なる種類の低分子抗体、及び異なる配列を有する特異性の異なる低分子抗体に対して、極めて迅速な生産性の向上と最適

化を実現するプラットフォーム技術を構築することができた。(達成度：100%)

以下、研究開発項目ごとの達成目標と達成度について示す。

#### 研究開発項目①長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発

OGAB 法による長鎖 DNA 自動合成のトータルシステムをより実用的なレベルに高めることを目標として、プレシジョン・システム・サイエンス社の作成した長鎖 DNA 自動合成装置の Breadboard を利用し、DNA の希釈、濃度測定、等モル濃度混合の一連の自動化を、実際の集積用の DNA 材料を用いて、遺伝子集積が可能かについて検証した。OGAB 法によるコンビナトリアルライブラリーの構築において、OGAB ブロックの調製のための制限酵素反応条件を改良することにより、約 4 万 8 千の抗体生産関連遺伝子群のコンビナトリアルライブラリーの構築に成功した。さらに、長鎖 DNA 自動合成プロトタイプ機の開発を実施し、ハイスループット化のために処理可能なサンプル数を倍の 96 サンプルまで増やしたこと、さらに、DNA 濃度測定にかかる時間を短縮するために、8 本すべての分注ノズルに吸光度測定機構を搭載し、DNA 濃度測定の工程を大幅に短縮することが可能となった。(達成度：100%)

#### 研究開発項目②抗体生産遺伝子クラスター設計技術開発

生産宿主のゲノム設計や各種の解析支援システムの開発と GDC を効率よく回すための技術開発や有用性評価を進めた。微生物による低分子抗体生産をモデルとして抗体生産基本株を構築し、高生産性に関わる遺伝子やゲノム変異を迅速に同定するための基盤技術を開発した。さらに、細胞内生理状態の網羅的解析と情報解析を組み合わせた鍵因子の探索・推定技術や、長鎖 DNA 合成技術を利用した高生産株の構築技術の開発、即ち、長鎖 DNA で発現するための有用遺伝子を抽出するための変異解析システムや有効な遺伝子組み合わせを推定するためのネットワーク解析システム、さらには遺伝子クラスター全体を合理的に設計・最適化するための基盤技術開発を進めた。抗体の遺伝子を酵母等の微生物に導入して生産を行うとともに、変異導入や遺伝子導入等により抗体生産量の変化する株の構築を行った。そして、取得した株の生理状態の変動を網羅的かつ詳細に分析し、情報科学的解析を併用することによって高い生産性を実現するための改変ポイントを推定し、推定した改変ポイントをゲノムや長鎖 DNA 上に集積した株を作成し、生理状態の変動を同様に解析することによって、さらなる改変ポイントの推定に成功した。この過程を繰り返すことによって、目標とする生産性を達成する株の樹立を目指した研究開発を行った。このような方法論をベースに、長鎖 DNA 自動合成装置を核とした遺伝子設計と合成のスキームを開発することで、様々な種類や特異性を有する低分子抗体高生産株を迅速かつ効率的に樹立するためのプラットフォームを確立する研究開発を行った。CHO 細胞での抗体高生産マスター株の作出においても有効な手段として応用できる革新的な研究開発スキームの確立に向けて研究開発を推進することができた。(達成度：100%)

Utilizing genome design cycle (GDC), DNA having a designed nucleotide sequence was accurately synthesized, and introduced into a host microorganism, mainly yeast, to screen a large scale for antibody molecule productivity. Using DNA accumulation technology (Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*: OGAB method) developed at Technology Research Association of Highly Efficient Gene Design (TRAHED) and Keio University, we succeeded in rapid, accurate and large-scale synthesis of DNA over 100,000 bases. By examining the principle of this OGAB method in detail and advancing optimization, we have been able to develop an automatic synthesizer capable of synthesizing up to 100,000 bases. In this research and development, we discover extremely rapid productivity improvement and optimization for different kinds of small molecule antibodies such as

scFv, taFv, Fab, Diabody, and different small specific antibodies with different sequences. (Achievement: 100%)

1. Technological development for automatic long DNA synthesizer

With the goal of increasing the total system of long-chain DNA automatic synthesis by OGAB method to a more practical level, using breadboard of automatic DNA synthesizer for long-chain DNA using actual DNA material for integration. We succeeded in constructing a combinatorial library of about 48,000 antibody production related genes by improving restriction enzyme reaction conditions for preparation of OGAB block in construction of combinatorial library by OGAB method. Furthermore, in order to develop long-chain DNA automatic synthesis prototype machine, to increase the number of samples that can be processed for high throughput to 96 samples and to shorten the time required for DNA concentration measurement, absorbance measurement mechanism was installed in all 8 dispensing nozzles, and it became possible to drastically shorten the DNA concentration measurement process. (Achievement: 100%)

2. Technological development of gene cluster design for antibody production

We have promoted genome design of production host and development of various analysis support systems and technology development and usefulness evaluation for efficiently turning on GDC, We have developed basic antibody production strains by modeling the production of small molecule antibodies by microorganisms and developed basic technologies for rapidly identifying genes and genomic mutations involved in high productivity. Furthermore, we are developing technologies for searching and estimating key factors that combine comprehensive analysis of intracellular physiological conditions and information analysis, and techniques for constructing high production strains using long-chain DNA synthesis technology. We analyze variations in the physiological state of the acquired strain comprehensively to realize high productivity by using information scientific analysis. Based on such a methodology using a long-chain DNA automatic synthesizer, it is possible to quickly and efficiently produce high-production low-molecular-weight antibodies having various kinds and specificities R & D to establish a platform. We were able to promote R & D towards establishing an innovative research and development scheme that can be applied as an effective means in the creation of high antibody production master strains in CHO cells. (Achievement: 100%)

**英語略語**

CHO: Chinese Hamster Ovary,

OGAB: Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*,

REMI: Restriction Enzyme Mediated Integration

**用語説明**

OGAB 法 :

枯草菌プラスミドの形質転換系を利用して遺伝子集積をする方法。

Ordered Gene Assembly in *Bacillus Subtilis* method :

Gene assembly method using *Bacillus subtilis* plasmid transformation system.

Combi-OGAB 法 :

OGAB 法により一度構築したプラスミドを制限酵素で切断することにより部品に分解し、同様に調製した他の種類の集積体の材料と混合し連結したものを枯草菌形質転換に用いることによりコンビナトリアルライブラリーを効率的に作成する方法。

Method for efficient construction of combinatorial DNA library using OGAB method, as follows :  
Prepare DNA parts by restriction enzyme digestion of once assembled plasmid DNA by OGAB method, ligate mixture of DNA parts from several different OGAB plasmid DNAs, and then transform the DNA into *B. subtilis*.