

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  
(バイオ医薬品の高度製造技術の開発)  
事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 高性能な国産細胞株の構築  
(英語) Development of highly efficient microbial cells originating in Japan by structure/sequence rearrangement and complex genome design to advance biologics manufacturing

研究開発実施期間: 平成30年5月28日～令和3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 神戸拠点・拠点長/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, Director / Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, Professor

## II 研究開発の概要

### 【和文】

現在のバイオ医薬品の主流であるフルボディ抗体は Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞を宿主として生産されているが、生育速度が速く生産株の構築にかかる時間も短い微生物細胞は、低分子抗体を生産する次世代の宿主として期待されている。実際に、世界最大のバイオ医薬品受託製造機関 (Contract Manufacturing Organization: CMO) であるロンザをはじめとしたいくつかの企業が、CHO だけでなく、微生物を宿主としたバイオ医薬品の受託製造を開始している。我々はこれまで、タンパク質の分泌生産能力に優れ、高密度培養が可能な *Pichia pastoris* (以下、ピキア酵母) を宿主とした低分子抗体の生産に関する研究や、*Corynebacterium glutamicum* (以下、コリネ菌) を宿主として、Corynex<sup>®</sup>という商標でバイオ医薬品を含む組換えタンパク質の受託製造を独自に行ってきた。しかし、一般的に微生物を宿主としたバイオ医薬品の生産研究は CHO 細胞に比べてまだ成熟していないため、高度に遺伝子組換えを施した我が国オリジナルの高性能な国産微生物細胞を開発できれば、海外との競争におけるイニシアティブを握ることができる。

本研究では、上述の問題を解決するバイオ医薬品生産の宿主としてピキア酵母（真核生物）とコリネ菌（原核生物）を利用し、高性能なオリジナル国産微生物細胞を構築することを目的とした。難発現性タンパク質を対象に、構造や配列を再構成して生産性や活性が劇的に向上する低分子抗体を迅速に選択できる技術を開発することで、これまで生産や活性評価を諦めていた難発現のバイオ医薬品候補を高生産できる可能性が飛躍的に高まる。さらに、防爆が不要な人工転写発現系の開発や、輸送・品質管理を含む各種制御機構の高機能化に関わる因子の探索を行い、これらの組み合わせを最適化することで、低分子抗体を高生産できる我が国オリジナルの高性能な国産微生物細胞を開発することを目標とした。

## 研究開発項目 1. 「バイオ医薬品製造を高度化する再構成した構造および配列の迅速な選択技術の開発」の概要

バイオ医薬品を高生産する細胞を構築する上で、標的とする医薬タンパク質の構造と配列は生産性を大きく左右する極めて重要なファクターとなる。そこで、**tandem single chain variable fragment (tandem scFv; taFv)** など複雑な構造を有する難発現性タンパク質を対象に、構造や配列を再構成して生産性や活性が劇的に向上する低分子抗体を迅速に選択できる技術開発を進めることにした。高生産株を利用することで生産性が極めて低い配列についても評価漏れを回避し、活性・生産性などに寄与する構造・配列のルールを抽出することを目指した。具体的には、生産性や活性に違いが生じる低分子抗体の構造・配列情報を収集するために、長鎖 DNA 合成で培ってきた技術をベースにしたドメインシャッフリング技術を開発することとした。また、合成する多数の低分子抗体配列を導入した菌株を迅速かつ大量に並列で作成するために、溶菌法もしくは接合伝達法を応用したピキア酵母用の簡便な遺伝子導入法を開発することとした。さらに、合成した低分子抗体配列を評価して生産性や活性の異なる配列情報を収集するために、これまでに確立してきた低分子抗体評価システムに加え、さらなる高速な低分子抗体評価手法や配列決定法を開発を行うこととした。最終的に低分子抗体配列の最適化を行うことを目的として、機械学習などの情報解析により生産性・活性と配列・構造との相関則に関するルールを抽出して構造・配列を迅速に選択する技術を開発することとした。これらの技術を利用して、低分子抗体の生産性もしくは活性が大きく向上する配列の作出を目指した。

初年度は、1. 低分子抗体のドメインの順番を入れ替えた配列を簡便に合成できる技術の開発、2. 枯草菌から DNA を簡便に取り出して形質転換に直接利用することのできるピキア酵母用の溶菌法の開発、3. 抗体生産量を高速かつ大量に評価できる手法の開発、4. 低分子抗体の配列・構造に関するルール抽出を行うために必要なデータ数の推定と学習法の選定、を行った。また、「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発（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）」事業で開発した長鎖 DNA 合成装置を改造することで、**Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis* (OGAB)** 法を利用したコンビナトリアル DNA アセンブルに対応可能なライブラリ合成機を開発した。さらに、大量の抗体 DNA 配列を迅速に評価できるように、自動化対応の低分子抗体精製システムを構築した。

2年目は、1. 低分子抗体のドメインを入れ替えた配列の合成と変異導入技術の開発、2. 枯草菌もしくは大腸菌から DNA を直接形質転換することのできるピキア酵母用の接合伝達法の開発、3. ドメイン順番を組み替えた低分子抗体配列の生産性・塩基配列のデータ収集、4. 収集した生産性・塩基配列データを用いたルール抽出法の開発、を行うことで、生産に適したいくつかの低分子抗体配列を同定することに成功した。

最終年度は、1. 低分子抗体配列に変異を導入したライブラリ合成、2. 開発した遺伝子導入法を利用した低分子抗体発現株の迅速な調製、3. 変異を導入した低分子抗体ライブラリの生産性・塩基配列のデータ収集、4. 収集した生産性・塩基配列データからのルール抽出と低分子抗体配列の最適化、を行うことで、低分子抗体の活性が大きく向上した配列を作出することに成功した。

## 研究開発項目 2. 「バイオ医薬品製造を高度化する高性能な国産微生物細胞の開発」の概要

バイオ医薬品生産の宿主としてピキア酵母（真核生物）とコリネ菌（原核生物）を利用し、低分子抗体を高生産できる高性能なオリジナル国産微生物細胞を構築する。そのために、防爆が不要な人工転写発現系の開発や、輸送や品質管理などの各種制御機構の高機能化に関わる生産性向上因子の探索を行う。これらの組み合わせを最適化することで、低分子抗体をできる微生物細胞を開発することを目的とした。具体的には、ピキア酵母のメタノール誘導発現系の代わりに防爆設備が不要かつ安全な誘導剤を使用する人工転写制御ユニットを組み込んだ新規発現系を開発し、我が国オリジナルのピキア酵母開発の基盤とすることを目指した。また、これまで開発してきたライブラリ作出技術を利用して各種の低分子抗体に対して生産性を向上させる有用因子を探索したり、タンパク質の輸送機構や品質管理機構に関わる遺伝子の体系的な評価によって低分子抗体の高生産や安定生産に寄与する遺伝子を探索し、得られた有用因子について相加的に生産性向上に寄与する組み合わせを決定することとした。これらの生産性向上因子の探索サイクルを繰り返す（ゲノムデザインサイクル, GDC）ことで、2 g/L 以上の高生産を達成する我が国オリジナルの国産微生物細胞を開発することを目標とした。

初年度は、1. これまでに開発してきた ON/OFF セレクション系をピキア酵母に適用した転写制御系を選抜できるシステムの構築、2. 過剰発現ライブラリを中心としたライブラリの構築と数種類の低分子抗体に対するスクリーニング、3. タンパク質輸送に関わる遺伝子を発現する体系的なライブラリの構築と数種類の低分子抗体に対する評価、を行った。

2年目は、1. 人工転写ユニットの構築と開発した選抜システムによるセレクション、2. 過剰発現ライブラリからの生産性向上因子探索の継続と遺伝子破壊ライブラリの構築、3. 生産性向上に寄与するタンパク質輸送関連遺伝子探索の継続と品質管理機構に関わる遺伝子発現ライブラリの構築、4. コンビナトリアルな DNA 発現により生産性向上に寄与する遺伝子発現の組み合わせの決定、を行うことで、低分子抗体の生産量を大幅に向上させることに成功した。

最終年度は、1. 人工転写制御ユニットを組み込んだ新規発現系の開発、2. 構築した遺伝子破壊ライブラリを用いた低分子抗体生産性向上因子の探索、3. 品質管理機構に関わるライブラリを用いた低分子抗体の生産性向上に寄与する遺伝子の探索、4. ゲノム編集技術を利用した生産性向上に寄与する遺伝子破壊の組み合わせの決定、を行うことで、低分子抗体の生産量を大幅に向上させることに成功し、試験管で 2 g/L 以上の高生産を示すオリジナル微生物細胞を開発した。

### 【英文】

Full-length antibodies are the mainstream of biologics still yet, and are mainly produced using Chinese hamster ovary (CHO) cells as hosts. In contrast, microbial cells are recently expected as next-generation host cells, because they can grow rapidly and take a short time to construct a production strain produce small antibodies. In fact, several companies including Lonza, the world's largest contract manufacturing organization (CMO), have begun contract manufacturing of biologics using microbial cells as host organisms as well as CHO cells. We have conducted the researches on the production of small antibodies using *Pichia pastoris* (methanol-assimilating yeast), and the contract manufacturing of recombinant proteins including biologics using *Corynebacterium glutamicum* (Corynex<sup>®</sup>), which respectively have excellent capacities for protein secretory production and high-density culture. However, in general, research on the production of biologics using microorganisms as a host is not yet mature compared to CHO cells. Therefore, it is important to develop Japan's original high-performance microbial cells for high-production of small antibodies in order

to take the initiative in the world competition.

The purpose of this study was to construct high-performance original microbial cells by using *P. pastoris* (eukaryotes) and *C. glutamicum* (prokaryotes) as hosts for small antibody production. We thought that the possibility of high production of difficult-to-secrete biologics candidates, which had given up on production and activity evaluation, would increase dramatically by developing a rapid selection system for small antibodies whose structures and sequences have been reconstituted. In addition, we planned to develop an artificial transcription expression system that does not require explosion protection, and to search for the factors related to the improvement of various control mechanisms including transportation and quality control. By optimizing these combinations, we aimed to develop Japan's original high-performance microbial cells capable of high-production of small antibodies.

#### 1. Development of rapid selection method for reconstructed structures and sequences to advance biologics manufacturing

In the strain development high-producing biologics, the structure and sequence of the target protein are extremely important factors that greatly affect productivity. For the difficult-to-secrete proteins with complex structures such as tandem single chain variable fragments (tandem scFv; taFv), we therefore developed technology to enable rapid selection of small antibodies that can dramatically improve productivity and activity through the reconstruction of structure and sequence.

#### 2. Development of high-performance microbial cells to advance biologics manufacturing

Using *P. pastoris* and *C. glutamicum* as host cells for biologics production, we aimed to construct high-performance microbial cells capable of highly producing small antibodies. By repeating the search cycle for the effective factors to improve the productivity (genome design cycle, GDC), we developed Japan's original microbial cells that enable high production (over 2 g/L) of small antibody.