

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：

(日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業

(英語) Project Focused on Developing Key Technology for Discovering and Manufacturing Drugs for Next-Generation Treatment and Diagnosis

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) Development of fundamental technologies for efficient construction of high material producible hosts

研究開発担当者 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)

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

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) LSM 事業本部 本部長 上田哲也

（英語） Head, Tetsuya Ueda (Life Science and Medical Business Division, 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 創薬基盤研究部門 主任研究員 富永大介

(英語) Senior Researcher, Daisuke Tominaga (Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, 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)

II. 成果の概要（総括研究報告）

抗体は巨大分子で非常に複雑な分子であり、その生産には CHO 細胞が主に用いられているが、その生産コストなどが課題となっている。一方で、近年、低分子抗体の開発が進んでおり、微生物による安価な生産も可能となってきた。微生物によるものづくりに強みのある我が国の技術を結集し、次世代の抗体医薬等の開発に取り組むべきである。そこで、本研究開発では、長鎖 DNA を迅速かつ正確に合成する自動技術を開発し、この長鎖 DNA を設計する技術を開発することによって、Fv、scFv、Fab、Diabody 等の異なる種類の低分子抗体、およ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の構築を目指す。当該年度において、研究開発項目①「長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発」、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」として、研究開発を進めてきた。

研究開発項目①「長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発」

柘植謙爾特命准教授（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科）らの研究グループは、開発中の 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、プレジジョン・システム・サイエンス社（以下 PSS 社）の作成した長鎖 DNA 自動合成機の 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行い、実際の集積用の DNA 材料を用いて、遺伝子集積が可能かどうか検証した。その結果、自動合成機内の加湿を行うことで実際に集積に用いることが可能であることが認められた。また、Combi-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、上田哲也診断システム開発本部長（PSS）らの研究グループにおいては、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。板谷光泰教授（TRAHED・サブプロジェクトリーダー、慶応義塾大学先端生命科学研究所）らの研究グループは、接合伝達プラスミドによる酵母への迅速な導入システムおよび枯草菌の溶菌化による酵母への迅速なプラスミド導入系について進めた。

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」

近藤昭彦教授（TRAHED・プロジェクトリーダー、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科）、町田雅之総括研究主幹（TRAHED・サブプロジェクトリーダー、産業技術総合研究所）、株式会社カネカらの研究グループは、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* においてこれまで見つかっていなかったセントロメア配列を RNA-Seq から得られた情報より同定し、環状プラスミドを安定的に自律複製できる新たなベクターを開発した。また、低分子抗体の分泌生産量を向上させる変異型の分泌シグナル配列や、遺伝子破壊・挿入を繰返し実行可能とするマーカーリサイクル法など、*P. pastoris* における基盤技術を開発した。また、*P. pastoris* における網羅的な遺伝子欠損または過剰発現ライブラリーを容易に構築するための新たな手法を確立し、低分子抗体の生産量を向上させる遺伝子のスクリーニングに有効であることを示した。さらに、REMI 法やオミクス解析、情報解析等により見出した有用遺伝子を 1 つの菌株に集積することで 20 倍以上の生産性を示す菌株を創出することに成功した。

Antibodies for medical therapy have been developed as biomedicine. These antibodies are big molecules, therefore therapeutic antibodies are produced by using CHO cells. Recently, the research and development of low-molecular-weight antibodies is now progressing, using microorganisms. Bio-production technology on All-Japan could lead to develop the next-generation antibodies. Our research and development program discovers the methods for high performance and optimized production of low-molecular-weight antibodies, such as Fv, scFv, Fab and diabody, by using automated long-chain DNA synthetic technology and long-chain DNA design technology. We organized two project teams in our research and development program (1. Technological development for automatic long DNA synthesizer and 2. Technological development of gene cluster design for antibody production).

1. Technological development for automatic long DNA synthesizer

Endurance tests of breadboard of Automatic long DNA synthesizer that had been developed by Precision System Science Co. (PSS) to raise it to a more practical level was performed. We confirmed that the breadboard can assemble multiple DNAs when the humidity inside the machine is raised by a humidifier. In method development of combinatorial library construction by Combi-OGAB method, the group succeeded in construction of a library with approximately 48,000 clones by taking account for reaction condition of restriction enzymes for OGAB block reparation. Moreover, high throughput version of prototyping machine of long DNA synthesizer was developed. This prototyping machine has two major alternations; One is that this machine is enlarged the limit of sample number that can be processed simultaneously up to 96. The other is that this machine drastically decreases operation time due to equipping spectrometer mechanism to all of nozzles of the 8-channel pipet, which is only one spectrometer mechanism in 8-channel pipet in the breadboard. Furthermore, the development of rapid plasmid DNA introduction system toward yeast by transduction plasmid has been tried, and the development of efficient plasmid DNA transformation of yeast using lytic cell of *Bacillus subtilis* has also been performed.

2. Technological development of gene cluster design for antibody production

The methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, has a high capability for the secretory production of target proteins. Here, we found the centromere sequence, which has ever been unknown in *P. pastoris*, by the acquirement of RNA-Seq data and their analyses. This finding guided the establishment of a new vector that enables the stable, autonomous replication of circular plasmids in *P. pastoris*. In addition, we developed the mutated secretion signal sequences for improving the secretory production of smaller antibodies and established the marker recycling method for permitting the repeated gene deletions or insertions as the fundamental technologies for engineering of *P. pastoris*. Furthermore, we established a new method to easily make the comprehensive gene deletion or overexpression libraries in *P. pastoris*, and demonstrated it was valid for the screening of useful genes for improving the production levels of smaller antibodies. Finally, we integrated the several useful genes that have been identified by the established technologies into the single *P. pastoris* strain, successfully generating the strain with 20-fold or higher productivity of smaller antibodies.

英語略語

CHO: Chinese Hamster Ovary, OGAB: Orded 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*.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Kumagai T, Machida M. Practical data processing approach for RNA-sequencing of microorganisms, Transcriptome Analysis, P.D.R. Cirillo & E.C.C. Mateo eds, *InTechOpen*, 2017, in print.
2. Terai G, Kamegai S, Taneda A, Asai K. Evolutionary design of multiple genes encoding the same protein. *Bioinformatics.* 2017, DOI:10.1093/bioinformatics/btx030

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Enhanced protein secretion by accumulation of novel effective factors in *Pichia pastoris*, Poster, Yoichiro Ito, Yasuyuki Nakamura, Shimpei Aikawa, Tomohisa Hasunuma, Jun Ishii and Akihiko Kondo, 14th International Congress on Yeasts (ICY14), 2016/9/11-15, 国際会議.
2. A new autonomous replicating plasmid vector containing centromere DNA sequence of *Pichia pastoris*, Poster, Yasuyuki Nakamura, Teruyuki Nishi, Risa Noguchi, Yoichiro Ito, Toru Watanabe, Tozo Nishiyama, Shimpei Aikawa, Tomohisa Hasunuma, Jun Ishii, Yuji Okubo and Akihiko Kondo, 14th International Congress on Yeasts (ICY14), 2016/9/11-15, 国際会議.
3. 吸光度測定機能を兼ね備えた分注機の開発, ポスター発表, 芳澤舞, 鈴木武尊, 柘植謙爾, 板谷光泰, 近藤昭彦, 杉元崇紀, 上田哲也, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内.
4. 溶菌法(CELyTED)による細胞外核酸を利用した形質転換技術の確立 Cell Lysis Technology to provide transformable Extra-cellular DNA (CELyTED), 口頭発表 (シンポジウム), 金子真也, 板谷光泰, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内.
5. 溶菌法(CELyTED)による細胞外核酸を利用した形質転換技術の確立 Cell Lysis Technology to provide transformable Extra-cellular DNA (CELyTED), ポスター発表, 金子真也, 板谷光泰, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
6. Estimation of a virtual active pathway from time series data and metabolic pathway maps, Poster, Daisuke Tominaga, Hideo Kawaguchi, Yoshimi Hori, Tomohisa Hasunuma, Sachiyo Aburatani, The 39th annual meeting of the molecular biology society of Japan (MBSj 2016), 2016/12, Japan.
7. ライフサイエンス分野におけるラボ自動化システム確立のための技術開発, 口頭発表, 鈴木武尊, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017/3/3, 国内.
8. 細胞外核酸を利用した形質転換技術「溶菌法(CELyTED)」, シンポジウム (口頭), 金子真也, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017/3/3, 国内.
9. *P. pastoris* のセントロメア DNA 配列の探索と自律複製型ベクターへの応用, ポスター発表, 西輝之, 中村泰之, 野口理紗, 伊藤洋一郎, 渡邊徹, 西山陶三, 藍川晋平, 蓮沼誠久, 石井純, 近藤昭彦, 八十原良彦, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017/3/3, 国内.

10. 合成生物工学の現状と今後, 招待講演, 近藤昭彦, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017/3/3, 国内.
11. 酵母でのモノづくり細胞のエンジニアリング, 招待講演, 石井純, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017/3/3, 国内.
12. 代謝経路デザインの限界, 招待講演, 荒木通啓, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 2017/3/3, 国内.
13. 時系列データと代謝マップからの実反応経路の推定, 口頭発表, 富永大介, 川口秀夫, 堀良美, 蓮沼誠久, 荻野千秋, 油谷幸代, 化学工学会第 82 年会, 2017/3/8, 国内.
14. Genomic and bioinformatics analyses of biosynthesis and production enhancement of a novel antifungal antibiotics, FR901469, from a filamentous fungus., Poster, Machida, M., Mastui, M., Yokoyama, T., Itoh, H., Ohyama, A., Shibata, T., 29th Fungal Genetics Conference, 2017/3/15, Pacific Grove, CA (米国) .
15. Analyses on dynamics of a metabolic system for small sample time series data, 口頭発表, Daisuke Tominaga, Hideo Kawaguchi, Yoshimi Hori, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Sachiyo Aburatani, 情報処理学会第 48 回バイオ情報学研究会, 2017/3/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
無し

(4) 特許出願
公開希望無し