

学位論文の要旨	
氏名	米田明広
学位論文題目	出芽酵母を用いた医療用組換えタンパク質の生産性向上
<p>本論文は、出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を宿主として、医薬品となりうる機能性タンパク質の生産性向上についてまとめたものである。本論文は以下の5章から成り立っている。</p> <p>第1章では、組換えタンパク質生産法の概要と宿主酵母としての酵母特徴について述べた。</p> <p>多様な組換えタンパク質の生産において、大腸菌を宿主にした生産系が先行しているが、現在では、大腸菌以外の原核細胞としてグラム陰性菌、グラム陽性菌なども組換えタンパク質の生産宿主として利用されるようになってきている。一方、下等真核生物としては、酵母などの菌類、また高等真核生物としては動植物細胞に加えて、昆虫細胞も組換えタンパク質の生産宿主として使用でき、さらには動植物固体までも宿主に使用可能となっている。本章では、これらの宿主における長所・短所を明らかにし、酵母を宿主とすることの最大の利点について説明する。</p> <p>第2章では、発現系の構築において重要な因子について述べ、組換えアプロチニンの発現株構築までの検討結果を示した。</p> <p>発現系構築に関わる重要な因子には、宿主-ベクター系、プロモーターおよびターミネーター、シグナルペプチド、コドン使用頻度などがあげられるが、組換えタンパク質を高発現させるためには、発現させるタンパク質に応じた遺伝子構築の最適化が求められる。その標的タンパク質として、本研究では、ウシ由来のタンパク質である「アプロチニン」を選択した。本章では、アプロチニンというタンパク質がどのような機能および特性を持っているかを明らかにし、組換えアプロチニンを高発現させるための戦略について説明する。特に、アプロチニンのN末端アミノ酸配列とシグナル配列のC末端アミノ酸配列の関係次第で、組換えアプロチニンのN末端が天然型と同じ配列になるか、または、シグナルペプチド由来の配列がN末端に付加するかが決まることから、過去に報告された内容も踏まえて説明する。</p>	

第3章では、第2章にて構築した酵母株における組換えタンパク質の発現量を評価し、高密度培養から精製までの検討結果を示した。

フラスコ・レベルでの培養の結果、プレ α 接合因子シグナル配列のみを用いた YBX7 [pKAP028] 株で、組換えアプロチニンの発現量は最大となり (31 mg/L)、また、組換えアプロチニンの N 末端アミノ酸配列は、天然型アプロチニンの N 末端アミノ酸配列を同じであった。この株ファーメンター・レベルで高密度培養したところ、培養終了時点の組換えアプロチニンの分泌発現量は活性換算で 426 mg/L であり、細胞乾燥重量 (CDW) は 70.9 g/L に達した。次に、高密度培養からの上清を、SP-Sepharose XL-FF 陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、アプロチニンを含む溶出画分を回収した。その後、限外ろ過膜によるパスおよび濃縮操作により、最終的に、約 80% の高い回収率と 99.9% 以上の高い純度で組換えアプロチニンを精製することができた。本章では、培養法と精製法の詳細について詳細に説明する。

第4章では、組換え酵母および組換えタンパク質について、医薬品としての品質管理について述べた。

医薬品においては、常に同じ特性の製剤を安定的に市場に供給することが求められる。一般的に、遺伝子組換えタンパク質などの製剤は、化学合成品以上に品質を安定させることが困難であるため、ハードルは必然的に高くなる。本章では、大スケールでの培養の出発材料となるセルバンクの品質、また、セルバンクを継代培養したときの細胞および組換えタンパク質の安定性についてまとめる。

第5章では、以上の結果を総括し、医薬用組換えタンパク質の生産性向上における今後の展望と課題を提唱した。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第 297号	氏名	米田 明広
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	隅田 泰生	伊東 祐二
		—	—
<p>学位論文題目</p> <p>出芽酵母を用いた医療用組換えタンパク質の生産性向上 (Productivity improvement of pharmaceutical recombinant protein using budding yeast.)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を宿主として、医薬品となりうる機能性タンパク質の生産性向上について述べたもので、全文5章より構成されている。</p> <p>第1章は（序章）である。</p> <p>第2章では、「アプロチニン」を標的タンパク質として、天然型と同じN末端アミノ酸配列をもつ組換えアプロチニンを高発現させるための重要な因子（宿主ベクター系、プロモーター、シグナル配列、構造遺伝子の Codon-Usage）について述べている。</p> <p>第3章では、出芽酵母における代謝経路（呼吸と発酵）を最大限に利用した高密度培養を行い、天然型と同じN末端アミノ酸配列をもつ組換えアプロチニンを426mg/Lという高い産生量で発現させることに成功し、また、アプロチニンの分子特性を最大限に利用して、高密度培養液から高純度（ゲルろ過 HPLC 純度 100%）・高回収率（約 80%）で組換えアプロチニンを精製することに成功したことを示している。これらの検討結果は、これまでの組換えアプロチニンの生産においては達成しえなかったことであり、画期的なことであると言える。</p> <p>第4章では、精製した組換えアプロチニンを医薬品として使用するための酵母株および精製タンパク質の品質管理について示している。</p> <p>第5章は（総括と展望）である。</p> <p>以上、本論文は出芽酵母を用いた生産系が、医療用組換えタンパク質生産の足場として産業上優れていることを、組換えアプロチニンを実例に示しており、また、本生産系が組換えアプロチニン以外の有用タンパク質生産の足場としても利用できることを示唆している。これは、医薬品産業を含む有用タンパク質の製造において画期的なことであり、高生産・低コストに大きく寄与する。</p> <p>よって、審査委員会は学位（博士）の学位論文として合格と判定する。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第 297号	氏名	米田 明広
審査委員	主査	杉村 和久	
	副査	隅田 泰生	伊東 祐二
		—	—

博士論文に関する最終試験は、平成21年2月12日16時00分より、鹿児島大学工学部共通棟403号室にて、主査（杉村和久教授：生体工学科）および副査（隅田泰生教授：ナノ専攻、伊東祐二准教授：生体工学科）出席の下、その他約20名の聴講者の前で行われた。約30分間の博士論文発表の後、約30分間の質疑応答が以下の通り行われた。

1) 本論文の最も優れている部分

論文全体を通して最も優れている部分はどこであるかとの質疑があり、アプロチニンターゲットとした場合の「均一分子の発現」、「N末端アミノ酸配列の正確性」、「未だかつて達成されていない産生量」、「精製産物の高い純度」、「精製工程における高回収率」が議論され、また、本論文で示されている生産系がアプロチニン以外のタンパク質に応用できることが述べられた。

2) アプロチニンのプロテアーゼ阻害メカニズム

本論文でターゲットタンパク質とされたアプロチニンの機能に関する質疑が行われた。セリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンの阻害は、プロテアーゼとの拮抗反応により起こり、ヒト由来のPSTI (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor) 以上にその拮抗強度が強いことが述べられた。現在、生体組織接着剤はフィブリノゲン、トロンビン、血液凝固第XIII因子、アプロチニンにより構成されるものが主流であるが、アプロチニンの抗線溶作用に勝るセリンプロテアーゼインヒビターはヒトでは見つかっておらず、ウシ由来のタンパク質であるアプロチニンを組換え化することで医薬品としての安全性が高まるという議論がなされた。

3) シグナル配列の違いによる発現量の差および発現分子の均一化

シグナル配列の違いで発現量が異なる理由、また、発現する分子のN末端が天然型アプロチニンと同じく均一になった理由について説明が求められた。発現量の差異については宿主の分泌経路に応じた配列、今回の場合は酵母由来が有効であることが述べられ、N末端配列の均一化については、酵母内のシグナルペプチダーゼがシグナル配列のC末端とアプロチニンのN末端の境目を認識することが重要であるという議論がなされた。

4) 組換えアプロチニンの純度と医薬品としての安全性

第3章にて、精製アプロチニンのHPLC純度が100%であったという点について、この精製品が医薬品として使用可能か否かの説明が求められた。純度表示はあくまでも精製する際の指標であり、最終的には動物などを用いた安全性試験により評価されることが述べられた。

以上のように、申請者は、上記の質疑に的確に回答し、学位を授与するに値する十分な学力と見識を有していると認定された。