

平成27年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「均一糖鎖糖タンパク質製造用の酵素と

シアリル糖鎖誘導体の大量生産方法の開発」

研究開発成果等報告書

平成28年3月

委託者 公益財団法人かがわ産業支援財団

委託先 株式会社伏見製薬所

香川大学

九州大学

目 次

第 1 章 研究開発の概要

1-1	研究開発の背景・目的及び目標	4
【1】	研究開発の背景	4
【2】	研究の目的	7
【3】	研究の目標	7
1-2	研究体制	8
【1】	研究組織	8
【2】	管理体制	9
【3】	管理員及び研究員	9
【4】	経理担当者及び業務管理者の所属・氏名	11
1-3	成果概要	11
【1】	糖加水分解酵素 (Endo-CC*1) の生産・反応・保存条件の最適化	11
【2】	糖オキサゾリン化剤 (CDMBI) を用いた反応、 オキサゾリン化糖鎖の保存条件の最適化	11
【3】	糖転移酵素 (Endo-CC 変異体*2) の生産・反応・保存条件の最適化	11
【4】	Endo-CC、Endo-CC 変異体、オキサゾリン化糖鎖の大量生産方法の開発	12
1-4	当該研究開発の連絡窓口	12

〔用語の変更〕

*1：計画書の段階では *Coprinopsis Cinerea* には 2 つの Endo 酵素遺伝子が発見されていたため開発する酵素の名称を「Endo-CC2」としていたが、この酵素のみを開発することとしたため「Endo-CC」と変更した。

*2：計画書では「改変型 Endo-CC」としていたが、「Endo-CC 変異体」と同義語であり報告書では「Endo-CC 変異体」に変更する。

第2章 本論

2-1 研究開発成果

- 【1】 糖加水分解酵素 (Endo-CC) の生産・反応・保存条件の最適化 . . . 13
 - 【1-1】 遺伝子組換え大腸菌での Endo-CC の生産研究 13
 - 【1-2】 Endo-CC と SGP を用いたペプチド切断研究 15
 - 【1-3】 Endo-CC の保存安定性に関する研究 16

- 【2】 糖オキサゾリン化試薬 CDMBI を用いた反応、オキサゾリン化糖鎖の保存条件の最適化 17
 - 【2-1】 SG のオキサゾリン化の研究 17
 - 【2-2】 オキサゾリン化糖鎖の保存安定性に関する研究 19

- 【3】 糖転移酵素 (Endo-CC 変異体) の生産・反応・保存条件の最適化 . 20
 - 【3-1】 遺伝子組換え大腸菌での Endo-CC 変異体の生産研究 20
 - 【3-2】 Endo-CC 変異体を用いた糖転移研究 22
 - 【3-3】 Endo-CC 変異体の保存安定性に関する研究 23

- 【4】 Endo-CC、Endo-CC 変異体、オキサゾリン化糖鎖の大量生産方法の開発 24
 - 【4-1】 Endo-CC の大量生産研究 24
 - 【4-2】 Endo-CC 変異体の大量生産研究 25
 - 【4-3】 オキサゾリン化糖鎖の大量生産研究 25

- 2-2 全体総括 26
 - ◆プロジェクト会議の開催と進捗状況の確認と管理 26
 - ◆プロジェクトの総括 27
 - ◆その他の報告 28

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・目的及び目標

【1】研究開発の背景

(1) バイオ医薬品の現状と将来性

医薬品産業は、全世界で約 86 兆円という巨大な市場規模を有し、今後も毎年 3~6%の成長が予測される成長産業である。

医薬品は、分子量が小さく構造が簡単で、主に有機合成法で生産される「低分子医薬品」と、バイオテクノロジー技術を使い、分子量が大きくかつ複雑な構造を持つタンパク質等からなる「バイオ医薬品」に分類できる(表 1)。

バイオ医薬品は、「遺伝子組み換え技術」や「細胞培養技術」といったバイオテクノロジー技術を使ったタンパク質製剤で、従来の医薬品では対応できなかった癌、血液疾患、自己免疫疾患(関節リウマチ、バセドウ氏病など)などで高い有効性と安全性が確認され、急速に需要が増えている。これらバイオ医薬品の承認品目のうち約 6 割がタンパク質に糖鎖の付いた糖タンパク質製剤であり、バイオ医薬品の主流となっている。

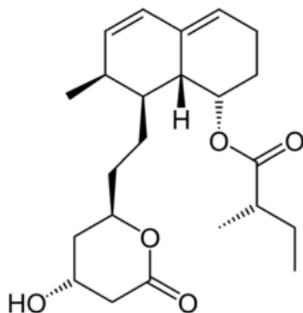
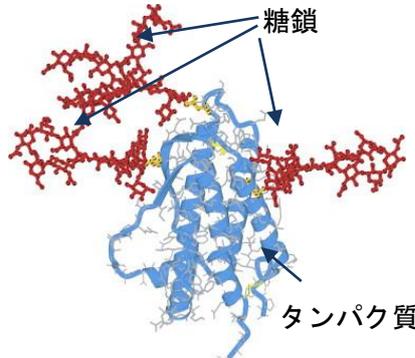
	低分子医薬品	バイオ医薬品
開発の由来	微生物などが産生する抗生物質などの有用物質を拾い上げ高度化したもの	もともとヒトの体の中で機能しているホルモン、酵素、抗体などをバイオテクノロジー技術を駆使して産生したもの
副作用	伴うことが多い	少ない
製造方法	有機合成(化学合成)法	生物由来の物質 (動物細胞、酵母、バクテリアなど)
分子量	1,000 以下	1,000 以上
代表的物質の構造	 <p>メバロチン(高脂血症薬)</p>	 <p>糖鎖 タンパク質</p> <p>エリスロポエチン(貧血治療薬)</p>

表 1. 低分子医薬品とバイオ医薬品

近年の世界医薬品市場における売り上げ上位 10 品目は、2005 年の時点ではバイオ医薬品は 2 品目であったが、2012 年には 7 品目へと急激に増加している（表 2）。

また、医薬品開発は低分子化合物からバイオ医薬品にシフトしており、更なる成長が見込まれる分野である。

2005年				2012年			
順位	製品名	メーカー名	(億円) 売上高	順位	製品名	メーカー名	(億円) 売上高
1	リピトール	ファイザー	12,963	1	ヒュミラ	アッビー	9,603
2	プラピックス	サノフィ・アベンティス	6,223	2	レミケード	J&J/メルク	9,071
3	エボジェン	アムジェン	6,145	3	エンブレル	アムジェン	8,476
4	ノルバスク	ファイザー	5,245	4	アドエア/セタイト	GSK	8,216
5	セレタイド	GSK	5,168	5	クレストール	塩野義	7,430
6	ネクスIAM	アストラゼネカ	4,633	6	リツキサン	ロシュ	7,227
7	タケプロン	武田薬品	4,394	7	ランタス	サノフィ	6,555
8	ゾコール	メルク	4,382	8	ハーセプチン	ロシュ	6,444
9	ジプレキサ	イーライ・リリー	4,202	9	アバステン	ロシュ	6,307
10	リツキサン	バイオジェン・アイデック	3,867	10	ジャヌビア	メルク	6,208

表 2. 世界の医薬品売上高上位 10 品目の推移

赤字はバイオ医薬品

(2) 糖タンパク質の課題と課題解決に向けた取り組み

バイオ医薬品の約 6 割がタンパク質に糖鎖が付加した糖タンパク質製剤である。糖鎖は、マンノース、ガラクトースなどの単糖が鎖状につながったオリゴ糖（単糖が 2~10 個程度結合したもの）で、細胞内の小胞体、ゴルジ体で付加・修飾され、糖タンパク質の細胞内輸送、安定性、生理活性に関与する重要な分子である。糖タンパク質の代表的なものでは、エリスロポエチン（貧血治療薬）があげられ、糖鎖の構造や付加数を変えることで薬理作用が大きく向上することが知られている。

現在、糖タンパク質の多くは CHO 細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）や酵母などの細胞で生産されている。組換え DNA 技術の発達によりタンパク質構造は均一にすることが可能であるが、細胞内の酵素反応により糖鎖構造は不均一なものしか得ることが出来ない。糖タンパク質は、主に動物細胞を使って生産されるため、その細胞由来の糖鎖（グリコリル型シアル酸、 α Gal）が発現し、その非ヒト型の糖が抗原となりショック症状などの重篤な拒絶反応を誘発することが報告され課題となっている（図 1）。

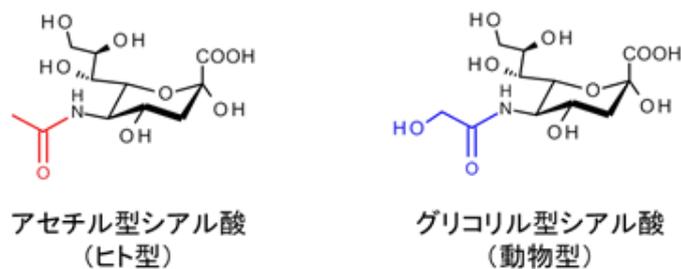


図 1. 異種糖鎖抗原の一例

糖鎖不均一性による有効性の課題、非ヒト型糖鎖による抗原性発現の課題に対し、より簡便に、生産効率・経済性が高く、糖鎖構造が均一な生産技術が開発できれば、有効性の高い新製品開発、そして競争が激化している後続バイオ医薬分野での優位性が確保できる。

糖タンパク質生産の課題解決に向け酵母・植物・カイコ・化学合成・酵素合成など様々な生産方法が検討されている。動物細胞を使った手法では、細胞内の糖転移酵素や糖鎖関連タンパク質をコードする遺伝子の破壊や過剰発現などを行い、糖鎖構造の均一化が試みられている。

現在のところ均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質が生産できる方法は、酵素を使った糖転移反応で均一糖鎖を付加する方法のみである。この方法をトランスグリコシレーション（糖鎖のすげ替え）法といい、伏見製薬所を中心とした研究グループはこの方法を用いた生産方法の研究開発を行なっている。（図 2）。

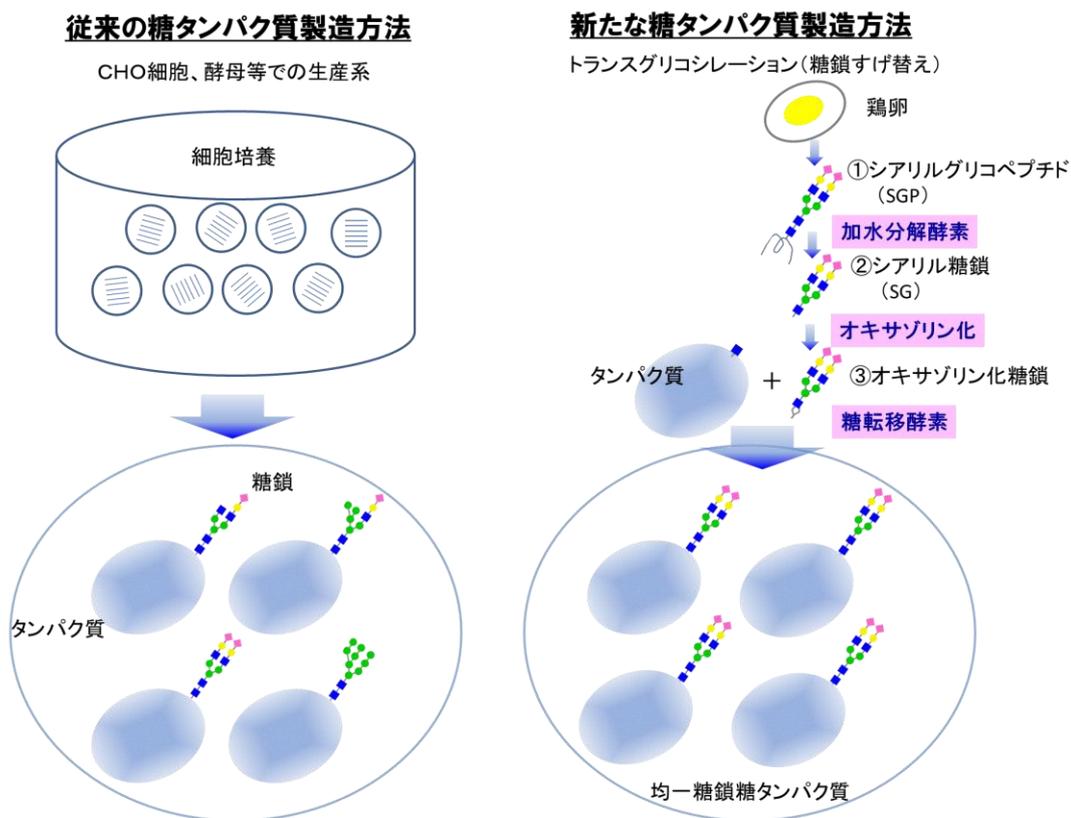


図 2. 従来の糖タンパク質製造方法とトランスグリコシレーション法

【2】研究の目的

トランスグリコシレーション法を用いた糖タンパク質の生産方法は、学会や研究会などで「バイオベター（次世代バイオ医薬品の製造プロセス）」として注目を集めている。この生産方法に興味を持つ製薬会社の中には、製品化を検討している会社も多数ある。既に試薬販売会社より関連試薬が販売され、研究レベルでは成功している。

伏見製薬所は、均一糖鎖ペプチドを川下製造業者の製薬企業に販売している中で、「安定した活性の Endo 酵素」と「工業レベルでの使用条件最適化」を望むニーズを把握した。これら課題を解決し、使用条件等ソフト面も含めた商品を供給することで、この生産プロセスでの実用化がさらに加速し、事業を拡大するとともに医療への貢献が可能となる。

同法による均一糖鎖糖タンパク質の製造方法を用いることで、二本鎖の先端にシアル酸が付いた糖鎖を付加することが出来る。これにより医薬品の血中濃度半減期（血中薬物貯留時間）を飛躍的に伸ばすことが可能である。このことは、患者の薬物服用回数を削減することに繋がり、患者の生活の質向上に役立つ。また、均一なヒト型糖鎖（異種糖鎖抗原の混入を防ぐこと）により、品質・安全性・有効性の高い糖タンパク質製造が可能となる。一方、これまで高額であったバイオ医薬品を安価に製造することで医療費全体の抑制に役立ち、かつ、富裕層にしか使用できなかったものが一般患者にも適用可能となる。

このようにトランスグリコシレーション法による均一糖鎖糖タンパク質の製造方法を確立することは、患者や医療行政に役立つとともに国内製薬企業の国際競争力を考慮した場合においても大変意義がある。

【3】研究の目標

現在市販されている Endo 酵素など試薬類の課題（高活性酵素の安定生産、保存安定性の向上、反応の最適化と使用しやすいレシピの構築）は明確である。これらの解決を行なうとともに、さらに「使いやすい製品」を目指した技術開発を行なっていく。

具体的には、「製品のキット化」である。既に販売されている製品は、反応に使用する試薬の品揃えのみであった。トランスグリコシレーション法には、バイオ技術、有機合成技術、さらに糖鎖構造解析といった複数の技術が必要である。バイオの専門家には、有機合成を不得意とする方も多く、また、逆も同様である。さらに、それに糖鎖構造解析と様々な専門技術が必要である。これらの課題を解決するために SGP を Endo-CC で切断した「シアリル糖鎖 (SG)」、さらにオキサゾリン化をした「オキサゾリン化糖鎖」の製品化を行なう。

オキサゾリン化糖鎖と転移用の Endo 酵素「Endo-CC 変異体」を用いたトランスグリコシレーションを行なうことで反応を簡便にすることが可能となる。

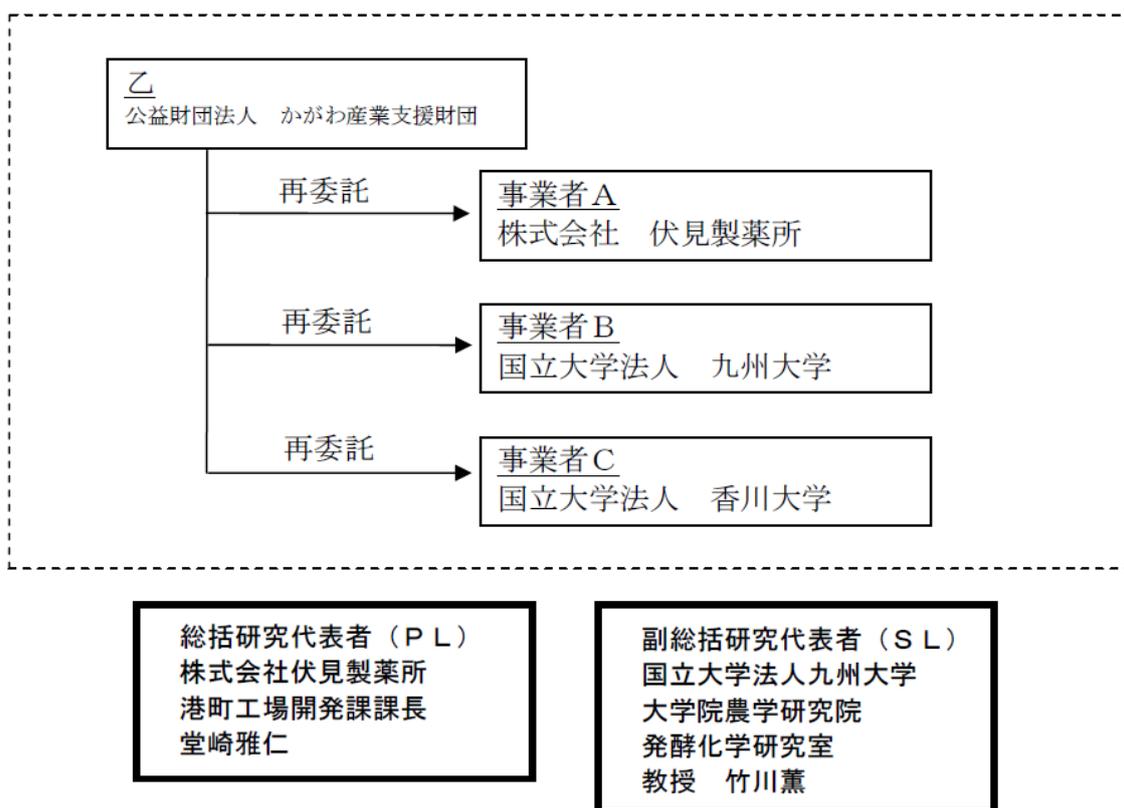
すなわち「タンパク質」と「オキサゾリン化糖鎖」と「Endo-CC 変異体」をある条件で反応させれば容易に均一糖鎖糖タンパク質が製造できるプロセスの構築と、製品のパッケージ化を最終目標としている。

さらに、実際にバイオ医薬品として世に送り出すためには、大量生産研究が必要不可欠であり、工業化レベルでの生産方法確立も目標としている。

伏見製薬所、香川大学、九州大学の共同研究を通じて、課題解決に向けた研究開発を行なっていく。

1-2 研究体制

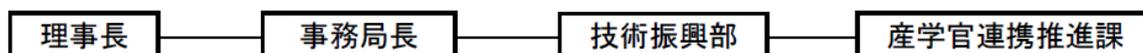
【1】研究組織



【2】管理体制

①事業管理者

[公益財団法人 かがわ産業支援財団]



②再委託先

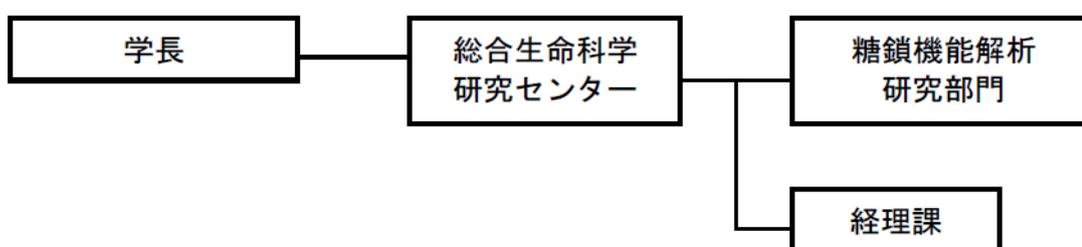
[株式会社 伏見製薬所]



[国立大学法人 九州大学]



[国立大学法人 香川大学]



【3】管理員及び研究員

【事業管理者】 公益財団法人かがわ産業支援財団

氏名	所属・役職
森 敏樹	技術振興部長
佐藤 恵子	技術振興部産学官連携推進課

【再委託先】

株式会社伏見製薬所

氏名	所属・役職
須田 稔	開発営業部長
堂崎 雅仁	港町工場 開発課 課長
木下 崇司	港町工場 開発課 研究員
住吉 渉	港町工場 開発課 研究員
小原 彩加	港町工場 開発課 研究員
三谷 藍	港町工場 開発課 研究補助員

国立大学法人 九州大学

氏名	所属・役職
竹川 薫	国立大学法人九州大学 大学院農学研究院 発酵化学研究室 教授

国立大学法人 香川大学

氏名	所属・役職
平林 淳	総合生命科学研究センター 糖鎖機能解析研究部門 客員教授
中北 慎一	総合生命科学研究センター 糖鎖機能解析研究部門 准教授

【4】 経理担当者及び業務管理者の所属・氏名

(事業管理者)

公益財団法人かがわ産業支援財団

(経理担当者) 技術振興部産学官連携推進課 佐藤恵子

(業務管理者) 技術振興部長 森敏樹

(再委託先)

株式会社伏見製薬所

(経理担当者) 経理部 経理係長 森川道雄

(業務管理者) 開発課長 堂崎雅仁

国立大学法人九州大学

(経理担当者) 農学部 経理係 係長 宇戸和彦

(業務管理者) 農学部 教授 竹川薫

国立大学法人香川大学

(経理担当者) 学術室 研究協力グループ 矢野 亜紀子

(業務管理者) 総合生命科学研究センター 准教授 中北慎一

1-3 成果概要

【1】 糖加水分解酵素 (Endo-CC) の生産・反応・保存条件の最適化

糖加水分解酵素(Endo-CC)の生産は、再現性のある培養系の構築に成功した。培養した菌体からの酵素抽出・精製と一連のプロセスについても確立した。調製した Endo-CC の保存安定性について検討を行ない、安定に保存できる条件や使用条件を確立した。

【2】 糖オキサゾリン化剤 CDMBI を用いた反応・生成物の保存条件の最適化

糖鎖のオキサゾリン化に関しては、反応率の向上・ロスの低減を行ない安定して生産可能なプロセスを確立した。製造を行なう際に反応効率を下げる一因になりやすい原因についても確認した。

また、保存時の安定性試験、反応に用いられるバッファー条件下での安定性の検討も行ない糖転移する際に非常に重要なデータを得た。

【3】 糖転移酵素 (Endo-CC 変異体) の生産・反応・保存条件の最適化

糖転移酵素(Endo-CC 変異体)については、180 番目のアスパラギンを他の全 19 種類のアミノ酸に置換した変異体を作成し、その転移活性と加水分解の評価を行なった。その中から、加水分解活性は残って

いるが、転移活性が非常に高い Endo-CC N180H を選択し糖転移に関する研究を行なった。

生産については、宿主変更を行なうことによって発現量を上げる事に成功し、作製された Endo-CC N180H を使用し、その保存安定性、使用に関する諸条件の検討を行なった。

また、モデル糖タンパク質を用いた研究においては、RNase B、への糖転移検討を行ない、均一糖鎖糖タンパク質を作製できる事を確認した。

【4】 Endo-CC、Endo-CC 変異体、オキサゾリン化糖鎖の大量生産方法の開発

Endo-CC、Endo-CC 変異体の大量培養検討では、ジャーファメンターを使用して流加培養を用いた高密度培養を行い単位当たりの酵素調製量を大幅に増加させることに成功した。また、培地組成の変更を行なうなど最適化を行った。

オキサゾリン化糖鎖の大量生産に関しては、反応スケールを 10 倍量 (100mg)、100 倍量 (1g) で検討し、スケールアップした場合においても少量と同様に 95%以上の反応収率を確認し、高純度化合物を得た。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

公益財団法人かがわ産業支援財団 技術振興部 産学官連携推進課

高松市林町 2217-16 FROM 香川 1 階

電話 : 087-840-0338

FAX : 087-864-6303

E-mail : scn@kagawa-isf.jp

第2章 本論

2-1 研究開発成果

【1】 糖加水分解酵素 (Endo-CC) の生産・反応・保存条件の最適化

【1-1】 遺伝子組換え大腸菌での Endo-CC の生産研究

[実施機関]

伏見製薬所、九州大学、香川大学

[目標値]

Endo-CC を安定して生産できるシステムを構築する。

菌体の培養条件、菌体からの酵素抽出方法、抽出した酵素の精製方法を検討し、精製した酵素の品質評価方法を確立する。

[研究内容]

複合型糖鎖に作用するエンドグリコシダーゼの探索を行い、*Coprinopsis cinerea* に安定な可溶性酵素を発見した (酵素の名称を、Endo-CC とした)。

大腸菌に Endo-CC 遺伝子を導入し、500mL フラスコで少量の菌体培養条件、菌体破碎条件、酵素抽出・精製方法を検討した。各種条件を最適化することにより、安定して高品質の酵素生産できるシステムを確立した。

さらに、Endo-CC 遺伝子のコドンが大腸菌で最も多く用いられているものに変換した場合の発現量を比較した。その結果、コドンが大腸菌用に適正化した場合の方が得られる Endo-CC の量が増加することが分かった (図3)。

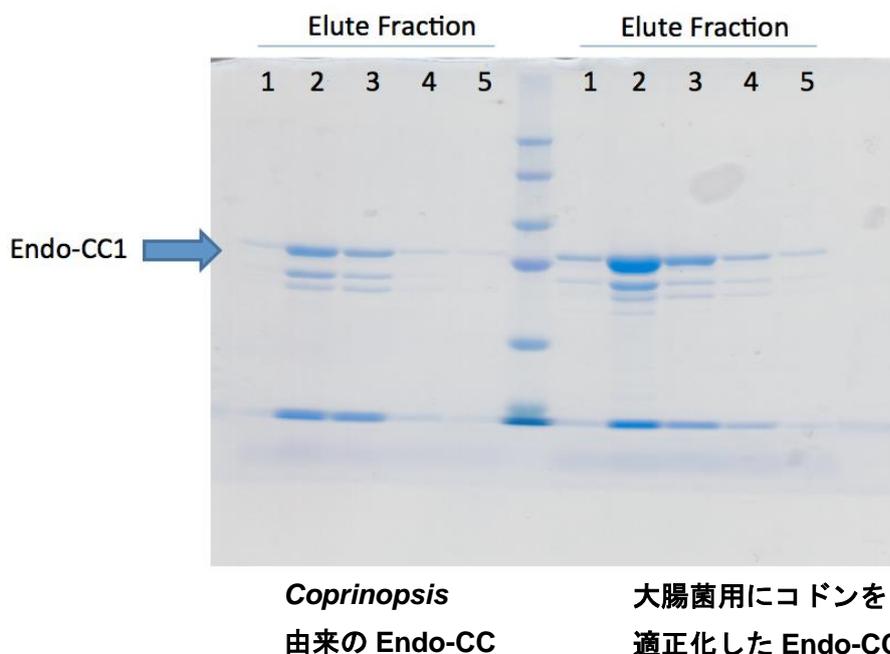


図3. Coprinopsis 由来とコドンが大腸菌用に適正化した Endo-CC の生産量の比較

Endo-CC の品質評価（酵素力価の測定）に関して、SGP を加水分解して活性を評価する分析系を確立した（図 4、図 5）。

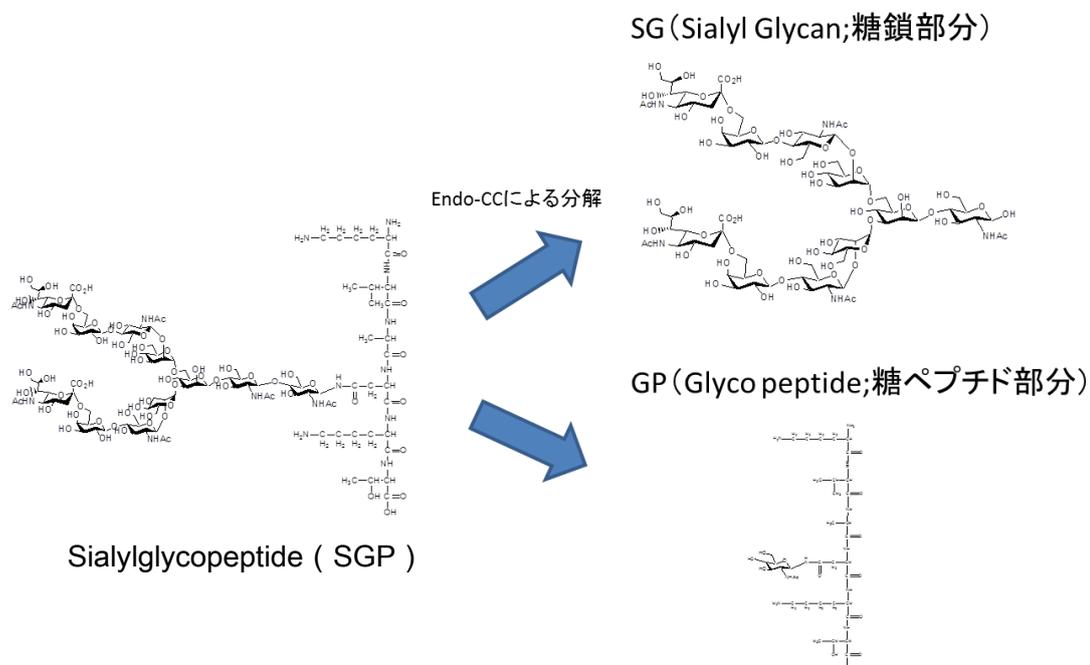


図 4. Endo-CC による SGP の加水分解反応図

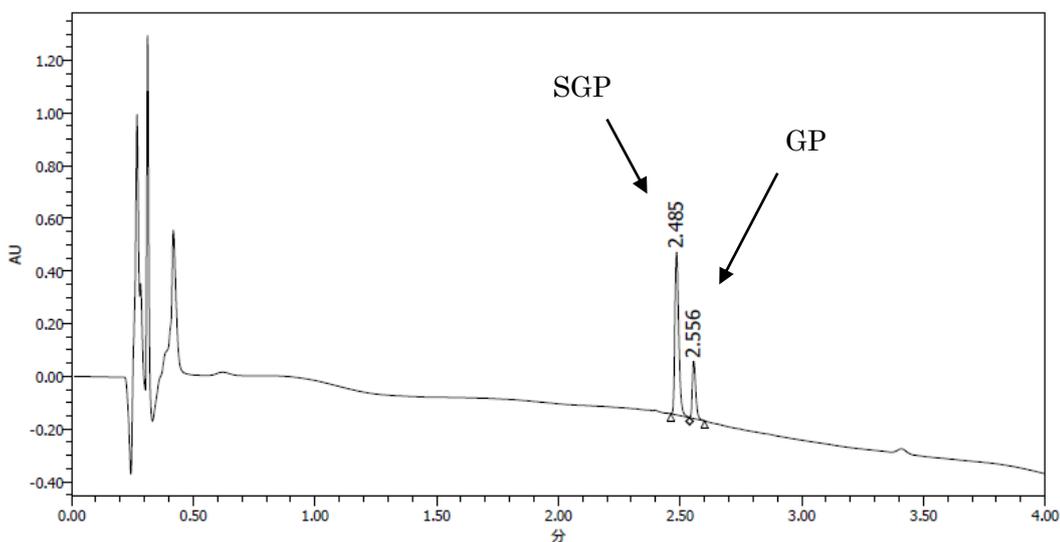


図 5. SGP を Endo-CC で加水分解し分析した結果

[結果]

菌体の培養条件、菌体からの酵素抽出方法、抽出した酵素の精製方法を最適化し、精製した酵素の品質評価方法も確立した。Endo-CC を安定して生産できるシステムを構築することが出来た。

【1-2】 Endo-CC と SGP を用いたペプチド切断研究

[実施機関]

伏見製薬所、香川大学

[目標値]

調製した Endo-CC を用いて SGP を SG と GP に切断するための最適化検討を行なう。製品化を目指して SG の精製条件についても検討する。

[研究内容]

均一糖鎖糖タンパク質を調製する場合に、SGP を加水分解して SG にした後、オキサゾリン化糖鎖として転移させる方法の転移効率が一番良い (P6、図 2)。そこで Endo-CC を用いて SGP を SG と GP に切断する検討を行なった (図 4)。

温度、pH、バッファーなどを検討し、最適な加水分解条件を見出すことが出来た。そして、SG を精製する条件検討を行なった。

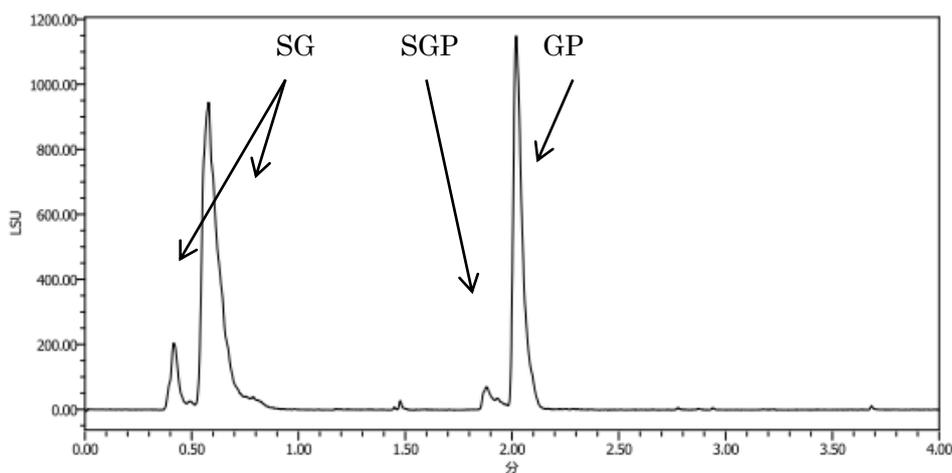


図 6. SGP を Endo-CC で加水分解し、反応液を精製したチャート

[結果]

図 6 の通り最適精製条件を確立することが出来た。

【1-3】 Endo-CC の保存安定性に関する研究

[実施機関]

伏見製薬所、香川大学

[目標値]

Endo-CC の保存安定性を検討し、商品として流通可能な条件を見出す。

[研究内容]

Endo-CC 調製後に各種保存温度（4℃、-30℃、-80℃）での安定性検討を行った（図 7）。

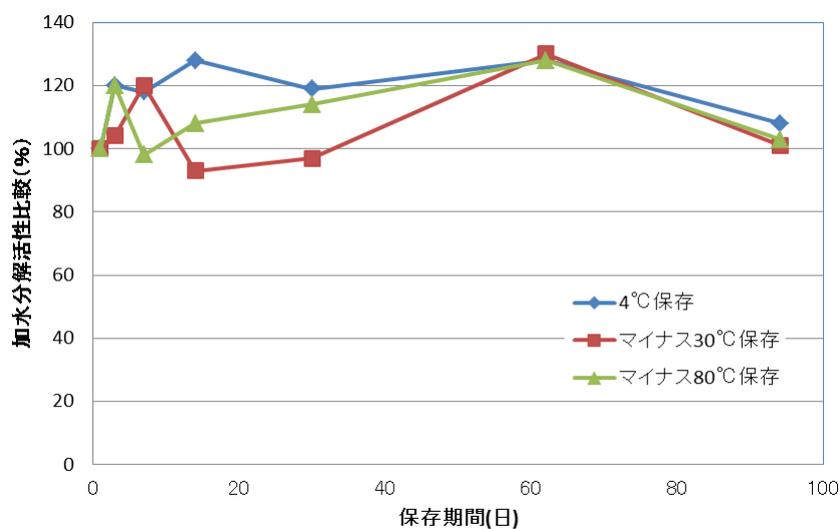


図 7. Endo-CC の保存安定性の評価

そして、さらに凍結融解を 5 回繰り返した時の保存安定性についても評価した。

[結果]

Endo-CC の保存安定性の条件検討を行ない、安定に保存可能な条件を確立した。また、凍結融解を繰り返した時の安定性についても確認した。

【2】 糖オキサゾリン化試薬 CDMBI を用いた反応、オキサゾリン化糖鎖の保存条件の最適化

【2-1】 SG のオキサゾリン化の研究

[実施機関]

伏見製薬所

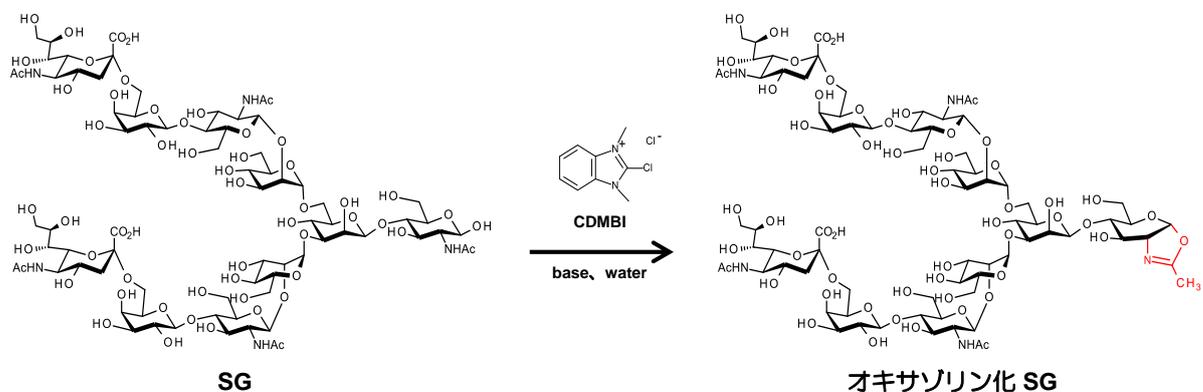
[目標値]

オキサゾリン化反応の最適化検討を行なう。

反応後のオキサゾリン化糖鎖の精製条件についても検討し最適化を行なう。

[研究内容]

SG のオキサゾリン化



野口らの論文 (Helvetica chem Acta, 2012) を参考に調製

図 8. オキサゾリン化糖鎖合成フロー

SG 2.5mg を用いてオキサゾリン化糖鎖の合成検討を行った。合成フローは図 8 の通り。

反応は NMR 管の中で行い、反応率は $^1\text{H-NMR}$ を用いて測定したシアル酸 C3-H のシグナルを基準にオキサゾリン化 GlcNAc の C1-H のシグナルの積分比から算出した (図 9)。

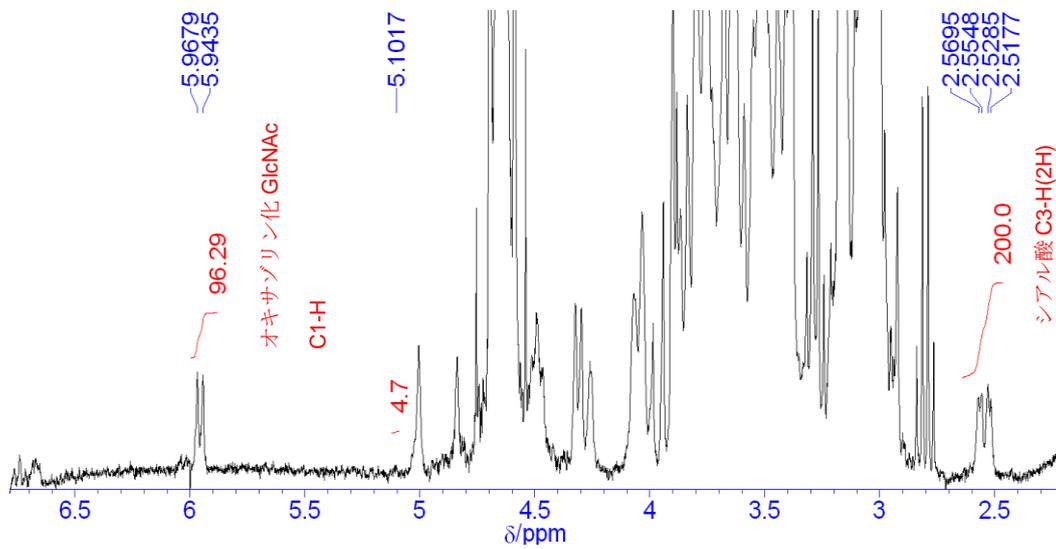


図 9. オキサゾリン化糖鎖合成後の NMR 分析チャート

[結果]

当初の目標としていた 95%以上の反応率を達成することが出来た。

【2-2】 オキサゾリン化糖鎖の保存安定性に関する研究

[実施機関]

伏見製薬所、香川大学

[目標値]

商品化するためにオキサゾリン化糖鎖の最適な保存条件を確立する。

[研究内容]

各種条件でのオキサゾリン化糖鎖の安定性試験を行なった(図 10、図 11)。

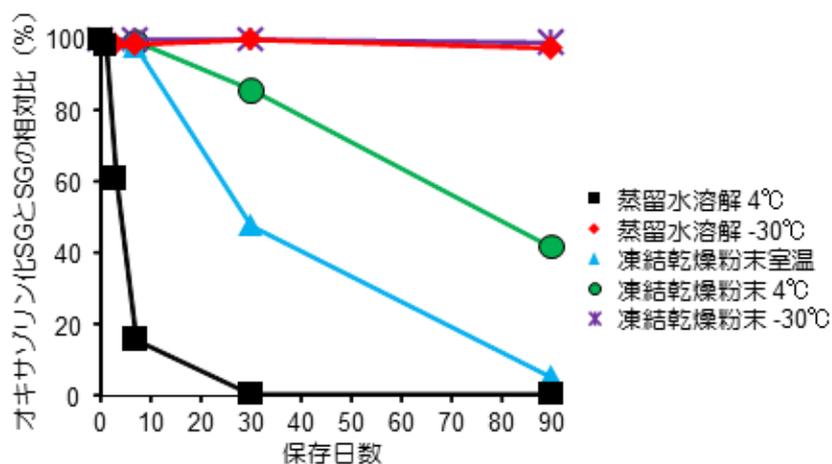


図 10. オキサゾリン化糖鎖の安定性試験結果

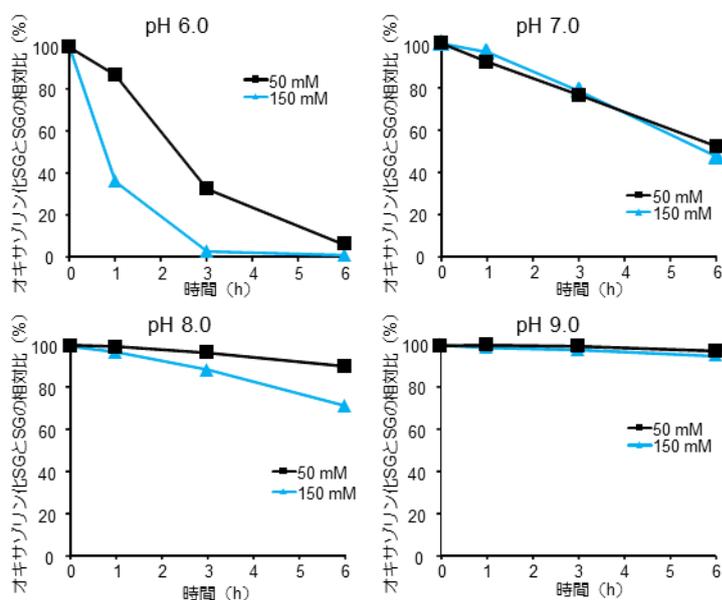


図 11. リン酸ナトリウムバッファー中でのオキサゾリン化糖鎖の安定性

[結果]

オキサゾリン化糖鎖の安定性試験を行い、当初の目標であった-30°Cでの安定な保存条件を確立した。

【3】 糖転移酵素（Endo-CC 変異体）の生産・反応・保存条件の最適化

【3-1】 遺伝子組換え大腸菌での Endo-CC 変異体の生産研究

[実施機関]

伏見製薬所、九州大学

[目標値]

Endo-CC 変異体を安定して生産できるシステムを構築する。

菌体の培養条件、菌体からの酵素抽出方法、抽出した酵素の精製方法を検討し、精製した酵素の品質評価方法を確立する。

[研究内容]

① Endo-CC 変異体の作成

Endo-CC の 180 番目のアスパラギン残基に変異を行うことで、加水分解活性を失い、糖転移活性のみを持つ変異体の作成を行った (図 12)。さらに 180 番目のアスパラギンを他の全 19 種類のアミノ酸に置換した変異体も作成し、加水分解活性の評価を行なった。

加水分解活性検討、および、糖転移検討 (P22、図 15) の結果から、Endo-CC N180H (180 番目をヒスチジンに置換) の転移効率が最も良いことが分かった。以降の検討は Endo-CC N180H を用いて検討を行なった。

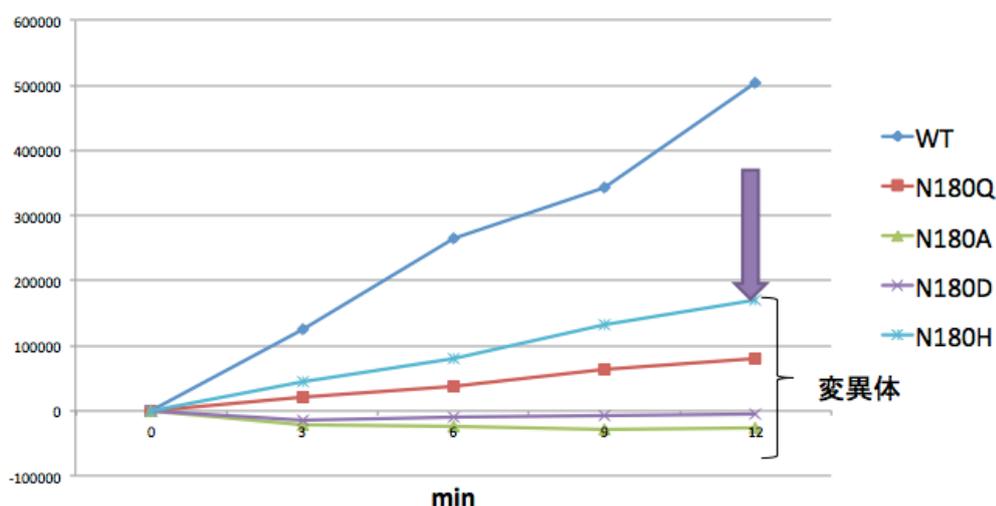


図 12. Endo-CC 変異体の加水分解活性

② Endo-CC 変異体 (Endo-CC N180H) の生産研究

大腸菌に Endo-CC N180H 遺伝子を導入し、500mL フラスコで少量の菌体培養条件、菌体破碎条件、酵素抽出・精製方法を検討した。

- ③ Endo-CC 変異体 (Endo-CC N180H) の品質評価 (酵素力価の測定)
 4-Nitrophenyl *N*-Acetyl- β -D-glucosaminide (pNP-GlcNAc)をアクセプターとして利用したときの糖転移反応の分析条件について検討した。

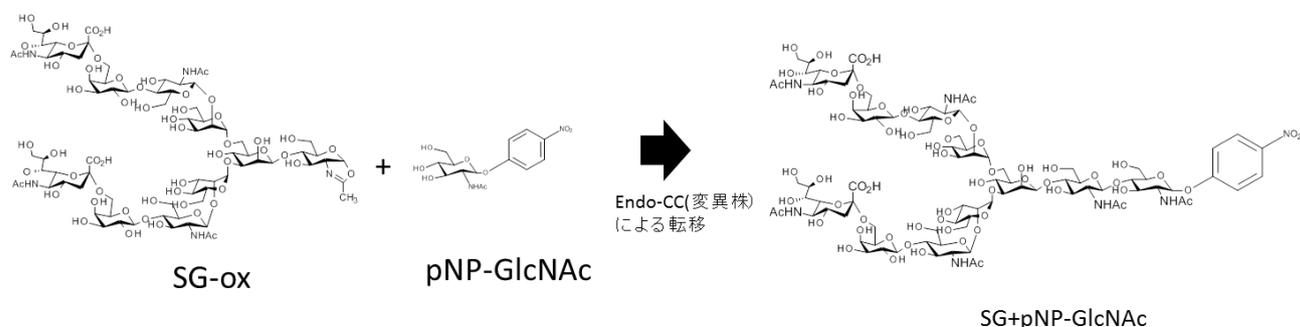


図 13. オキサゾリン化 SG の転移反応スキーム

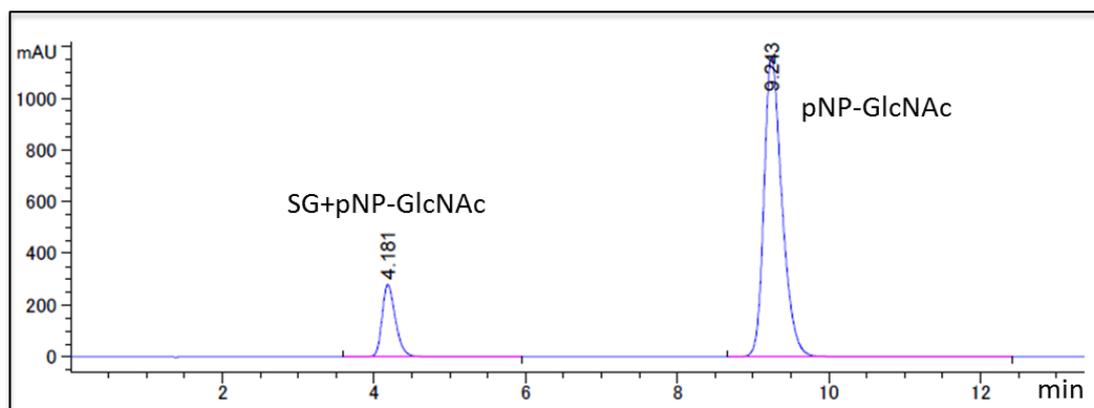


図 14. オキサゾリン化 SG の転移反応の分析条件

[結果]

各種条件を最適化することにより、安定して高品質の Endo-CC N180H を生産できるシステムを確立した。また、酵素力価の測定方法についても確立することが出来た。

【3-2】 Endo-CC 変異体を用いた糖転移研究

[実施機関]

九州大学、香川大学、伏見製薬所

[目標値]

調製した Endo-CC 変異体 (Endo-CC N180H)、およびモデルタンパク質を用いて糖転移反応の条件検討を行ない、最適条件を見出す。

[研究内容]

モデルタンパク質として調製した GlcNAc-RNaseB (リボヌクレアーゼの糖鎖を切断し、GlcNAc が 1 分子付加)、SGP、Endo-CC 各変異体を混合し、SDS-電気泳動で各変異体の糖転移について検討した (図 15)。

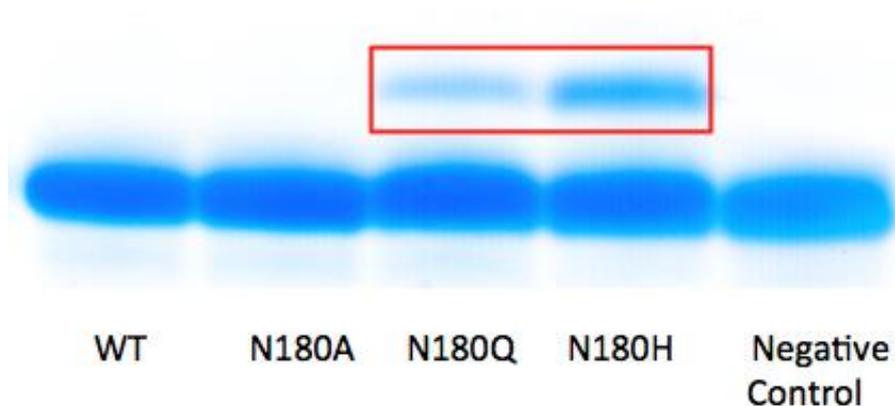


図 15. Endo-CC 野生型(WT)および変異体を用いた GlcNAc-RNaseB への糖鎖の転移

[結果]

Endo-CC N180H を用いてタンパク質に糖鎖が転移出来ることを確認した。

目標としていた糖転移反応の最適条件検討まで行うことが出来なかったが、現在、他の基質も使い糖転移実験を行っており、今後実施例を増やしなから使用バッファー、pH、温度など最適条件を見出していく。

【3-3】 Endo-CC 変異体の保存安定性に関する研究

[実施機関]

伏見製薬所、香川大学

[目標値]

Endo-CC N180H の保存安定性を検討し、商品として流通可能な条件を見出す。

[研究内容]

Endo-CC N180H 調製後に各種保存温度（4℃、-30℃、-80℃）での保存安定性検討を行なっている。

また、凍結融解を繰り返した時の保存安定性についても評価している。

[結果]

現在、保存安定性試験中のため完全な結果は出ていない。

これまでの検討では、酵素濃度が保存安定性に大きく影響することが判明したため、高濃度状態での保存安定性を再度行っている。

保存安定性は、製品品質に重要であり、引き続き検討を行なっていく。

【4】 Endo-CC、Endo-CC 変異体、オキサゾリン化糖鎖の大量生産方法の開発

【4-1】 Endo-CC の大量生産研究

[実施機関]

伏見製薬所

[目標値]

実験室で開発したプロセスを用いてスケールアップ検討を行なう。

[研究内容]

これまでフラスコ振盪法による培養検討を行ってきたが、工業的な生産・製造を考慮にいと、現在の条件よりも生産効率の良い条件で培養する必要がある。そこで現在のバッチ培養よりも多くのタンパク質を製造できるようにジャーファメンターを使用して流加培養を用いた高密度培養により単位あたりの生産量を増やす検討を行なった。



図 16. 使用ジャーファメンター（本事業での購入品）

[結果]

各種条件検討を行ない、フラスコ培養に比べ単位あたりの酵素調製量は 1mg/L から 6mg/L と大幅に増加した。当初の目標は、100mg/L であり、さらに検討を行なっていく。

【4-2】 Endo-CC 変異体の大量生産研究

[実施機関]

伏見製薬所

[目標値]

実験室で開発したプロセスを用いてスケールアップ検討を行なう。

[研究内容]

Endo-CC と同様に (P25) ジャーファメンターを用いた流加培養を行い、単位あたりの酵素調製量の増加を目標に検討している。

[結果]

これまで Endo-CC N180H は、野生株（加水分解活性の Endo-CC）に比べて発現しにくい印象であったが、各種条件（培地組成、温度、時間、攪拌、溶存酸素など）を最適化することにより野生株と同等の酵素量が得られるようになった。

今後、工業化に向けてさらに検討を行なっていく。

【4-3】 オキサゾリン化糖鎖の大量生産研究

[実施機関]

伏見製薬所

[目標値]

実験室で開発したプロセスを用いて実機でのスケールアップを行う。

[研究内容]

少量 (10mg スケール) 実験で 95%以上の反応収率でオキサゾリン化糖鎖が得られることが示されたので、将来の工業化に向けスケールアップ検討を行った。

反応スケールは、従来の 10 倍量 (100mg)、100 倍量 (1g) で検討した。

[結果]

スケールアップした場合においても少量と同様に 95%以上の反応収率で反応させることが出来、高純度化合物が得られること、そして再現性を確認した。

2-2 全体総括

◆プロジェクト会議の開催と進捗状況の確認と管理

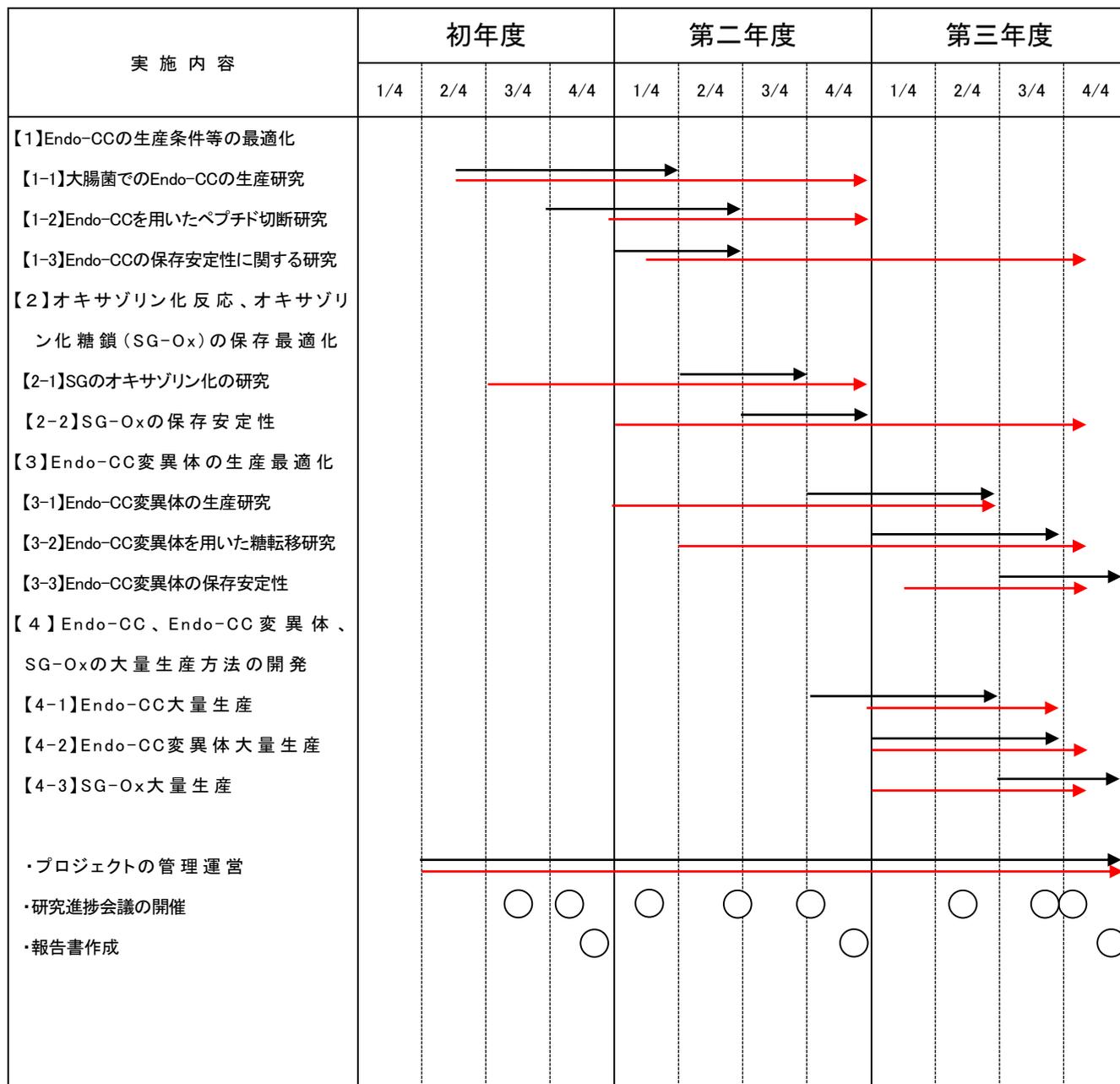
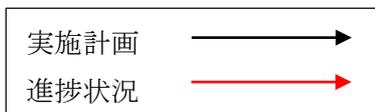


図 17. プロジェクト会議の開催と進捗状況の確認と管理

◆プロジェクトの総括

平成 25 年 9 月より 3 年間の研究開発を行った。

図 17 の通り定期的な研究進捗会議を開催し、関係者で進捗状況を把握するとともに課題解決に向けて意見交換を行った。

実施計画に対し、少し遅れはあったものの当初の目標に対し結果を出し、全ての内容について終了させることが出来た。

一方、研究開発を行う中で新たな課題も確認された。本件については、補完研究を行い、課題解決を図っていく。

◆その他の報告

(1) 共同研究

Endo-CC、およびオキサゾリン化 SG の評価を依頼するため、新たな共同研究を大学、研究機関と開始した。

(2) 学会、展示会での PR

国内外の学会、展示会等へ積極的に出展し「糖鎖すげ替えによる均一糖鎖糖タンパク質の製造方法」の技術紹介・PR を行い、サポイン終了後の販路開拓を行なっている。

[学会・展示会等への出展 (2015 年度)]

1. 日本糖鎖科学コンソーシアム、2013.10.25-26、東北薬科大学 (仙台)
2. Asia TIDES、2014.2.25~27、Tokyo Sheraton Miyako Hotel (東京)
3. 日本化学会年会、2014.3.27~30、名古屋大学 (名古屋)
4. 日本農芸化学会年会、2014.3.27~30、明治大学 (東京)
5. BIO International Convention、2014.6.23~26、San Diego Convention Center (USA)
6. 日本糖質学会、2014.8.10~12、名古屋大学 (名古屋)
7. ペプチド討論会、2014.10.22~24、徳島大学 (徳島)
8. 日本糖鎖科学コンソーシアム、2014.12.4~5、東京医科歯科大学 (東京)
9. 日本糖質学会、2015.7.31-8.2、東京大学 安田講堂 (東京)
10. 日本糖鎖科学コンソーシアム、2015.10.19-20、ウインクあいち (愛知)
11. グライコバイオリジクス研究会、2015.11.5、産総研臨海副都心センター (東京)
12. Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG), 2015.11.12-15, Hotel MATSUSHIMA (MIYAGI)
13. ペプチド討論会、2015.11.16-18、平塚中央公民館 (神奈川)
14. 日本農芸化学会 2015 年度大会、2016.3.27-30、札幌コンベンションセンター (北海道)

(3) 論文

1. Eshima Yasunari, Higuchi Y, Kinoshita T, Nakakita S, Takegawa K, Transglycosylation Activity of Glycosynthase Mutants of Endo- β -N-Acetylglucosaminidase from *Coprinopsis cinerea*, PLOS ONE0132859, July 21, 2015

(4) 学会、研究会での発表

多くの学会、研究会で発表、技術紹介を行なった。

(過去の発表を全て記載)

1. 江島康成、竹川 薫：担子菌 *Coprinopsis cinerea* ゲノムに存在するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、第 20 回日本生物工学会九州支部佐賀大会 (2013) 12.7 佐賀大学
2. 江島康成、竹川薫：担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、平成 26 年度日本生化学会九州支部例会 (2014) 5.17-18 九州大学
3. 江島康成、竹川薫：担子菌類ゲノム中に存在するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、第 51 回化学関連支部 合同九州大会 (2014) 6.28 北九州市 (優秀ポスター賞受賞)
4. 江島康成、竹川 薫：担子菌類ゲノムに存在するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、第 33 回日本糖質学会年会 (2014) 8.10-12 名古屋大学
5. 竹川 薫：組換え糖タンパク質医薬品製造に必要なツール開発—新規酵素の検索と最適化—、第 5 回グライコバイオロジクス研究会 (2014) 11.1 臨床研究情報センター (神戸市)
6. 竹川 薫：糖鎖末端のガラクトースをめぐる真核微生物の生存戦略、第 8 回多糖の未来フォーラム (2014) 11.6 九州大学
7. 江島康成、竹川 薫：2 本鎖複合型糖鎖を遊離転移する担子菌由来 Endo-CC1,Endo-CC2 の諸性質の解析、日本生物工学会第 21 回九州支部熊本大会 (2014) 12.6 熊本大学
8. 竹川 薫：組換え糖タンパク質医薬品製造に有用な酵素類の探索と利用、複合糖質・糖鎖研究会 (2015) 1.31 高松市
9. 竹川 薫：糖タンパク質を分解するための微生物の戦略、エンドグリコシダーゼ会議 (2015) 4.21-22 弘前
10. 竹川 薫：バイオ医薬品製造に向けた糖鎖改変・分析技術の開発、第 52 回 化学関連支部合同九州大会 (2015) 6.27-28 北九州市
11. 中北慎一、竹川 薫、平林 淳：Endo 型糖鎖の活性測定系の開発、第 34 回日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学

12. 木下崇司、江島康成、住吉 渉、中北慎一、平林 淳、竹川 薫 : *Coprinopsis cinerea* 由来 endo- β -N-acetylglucosaminidase(Endo-CC)の基質特異性の解析、第 34 回 日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学
13. 住吉 渉、木下崇司、内海圭一郎、中北慎一、竹川 薫、平林 淳 : オキサゾリン化 SG の安定性、第 34 回 日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学
14. 月村 亘、森 昌子、黒河内政樹、大隅賢二、高島 晶、高柳 淳、水野真盛、天野純子、松田昭生、木下崇司、竹川 薫、白井 孝 : 均一糖鎖を持つトランスツズマブ(6)コアフコース含有糖鎖を持つ IgG の調製、第 34 回日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学
15. 江島康成、竹川 薫 : 複 合型糖鎖を遊離・転移する担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来のエンド- β -N-アセチルグル コサミニダーゼの諸性質の解析、第 67 回日本生物工学会大会 (2015) 10.26-28 鹿児島市
16. Eshima Y, Higuchi Y, Kinoshita T, Nakakita S, Takegawa K: Identification and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidases from basidiomycete. International Symposium on Agricultural, Food, Environment and Life Science in Asia, 2015 (2015) 11.4-5 Kurayoshi-city, Tottori, Japan
17. 堂崎雅仁 : 糖タンパク質の糖鎖改変技術の紹介、第 6 回グライコバイオロジクス研究会 (2015) 11.5 産総研臨海副都心センター (東京都)
18. 月村 亘、森 昌子、大隅賢二、戸治野真美、高島 晶、菅原州一、弘瀬有理子、高柳 淳、水野真盛、天野純子、松田昭生、木下崇司、竹川 薫、黒河内政 樹、白井 孝 : コアフコース含有糖鎖を持つ糖鎖改変トラスツズマブの調製とその活性、第 88 回 日本生化学会大会 (2015) 12.1-4 神戸市
19. 江島康成、竹川 薫 : 担子菌由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異体を用いた均一糖鎖含有糖タンパク質の酵素合成、日本生物工学会第 22 回九州支部宮崎大会 (2015) 12.5 宮崎大学 (学生賞 (修士))
20. 江島康成、竹川 薫 : 担子菌由来のエンドグリコシダーゼを利用した均一糖鎖を持つ糖タンパク質の合成、微生物学の新たな発展、ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム (2015) 12.6-7 宮崎市
21. 竹川 薫 : エンドグリコシダーゼ : 糖鎖の機能・構造解析用試薬からバイオ医薬品製造ツールへの変遷、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016) 3.27-30 札幌コンベンションセンター

22. 白井 孝、黒河内政樹、月村 亘、森 昌子、大隅賢二、戸治野真美、高嶋 晶、菅原州一、弘瀬友理子、高柳 淳、水野真盛、天野純子、松田昭生、正田晋一 郎、木下崇司、竹川 薫、富田正浩:エンドグリコシダーゼによる糖鎖改変技術開発とそのバイオ医薬品トラスツマブへの応用、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016) 3.27-30 札幌コンベンションセンター

(5) 研究室整備の報告

遺伝子組換え大腸菌を用いた実験を行うため香川県科学技術研究センター（通称、フロム香川）内に入居し、専用のバイオ実験室に購入した装置等を整備した。この実験室にて大腸菌の培養、菌体破砕、酵素抽出、酵素精製について、それぞれの検討を行った。



図 18. バイオ実験室の写真