

D124

Pichia pastoris を用いた一本鎖抗体生産における誘導初期のメタノール濃度の影響
(神戸大工)○(学)藤田啓介・(学)秋山直毅
(正)勝田知尚*・(正)山地秀樹

【緒言】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は、メタノールで誘導可能な AOX1 プロモーターを有しており、効率的に異種タンパク質発現を誘導することができる。しかし、過剰なメタノールは菌体に対して有毒であるため、誘導期間中のメタノール濃度を適切に制御することが重要である。

本研究では、組換え *P. pastoris* を用いた一本鎖抗体(抗 bisphenol A scFv)の効率的生産を目的とし、最適なメタノール供給方法の検討を行った。これまでの研究で、誘導期間中にメタノール濃度を 2.0vol% に保持すると、メタノール濃度を 1.0vol% に保持する際よりも顕著に高い生産速度が誘導初期に得られるが、誘導途中で生産速度が低下し、最終的に高い scFv 生産量は得られないことを見出した。

そこで、誘導初期のメタノール濃度が scFv 生産におよぼす影響について検討し、生産性の向上を試みた。

【実験方法】菌株には *P. pastoris* GS115 に抗 bisphenol A scFv 遺伝子を組み込んだものを用いた。菌体増殖は、まずグリセロールを炭素源とする回分培養を行い、続いて 80 %グリセロールを供給する半回分培養を行い、OD₆₀₀ が 400 程度となるまで増殖させた。その後、100 %メタノールを供給する半回分培養で scFv 発現を誘導した。培養条件は、温度 30℃、pH は 30 %のアンモニア水によって菌体増殖期 5.0、誘導期 7.0 に調整し、攪拌回転数 400~1000 rpm、空気供給量 1.0~2.0 vvm で行った。

誘導期におけるメタノール供給方法として、培地中の溶存酸素濃度(DO)を指標として基質を供給する DO-Stat と、メタノール濃度を一定に制御するために Katakura らの方法を用いた Methanol Control System (MCS) の二通りの供給方法を用いた。

【結果および考察】誘導初期の各メタノール濃度における scFv 生産量の経時変化を Fig. 1 に示した。MCS を用いてメタノール濃度を 3.0vol% に保持した際に、誘導初期における生産速度は最も高くなった。これは、メタノール濃度 3.0vol% において、AOX1 プロモーターの脱抑制が最も効率的に行われたためと考えられる。一方、メタノール濃度を 4.0vol% で保持した際には、scFv 生産はすぐに停止したため、メタノール濃度は過剰と考えられる。

メタノール濃度を 3.0vol% に保持した際に得られた高い生産速度を維持するため、生産速度の低下が始まる誘導開始から 4 時間の時点で DO-stat に切り替える手法で培養を行った。その結果、生産速度の低下が起こることなく scFv は生産され続け、一般に最適とされるメタノール濃度 0.5vol% における生産量を越え、DO-stat のみをメ

タノール供給に用いた時よりも 1.6 倍以上高い 242.3 mg L⁻¹ に達した。

結論として、誘導初期のメタノール濃度は 3.0vol% となるよう MCS を用いて制御し、その後 DO-stat に切り替えてメタノール供給を行う方法が、scFv 生産にとって効率的であると考えられる。

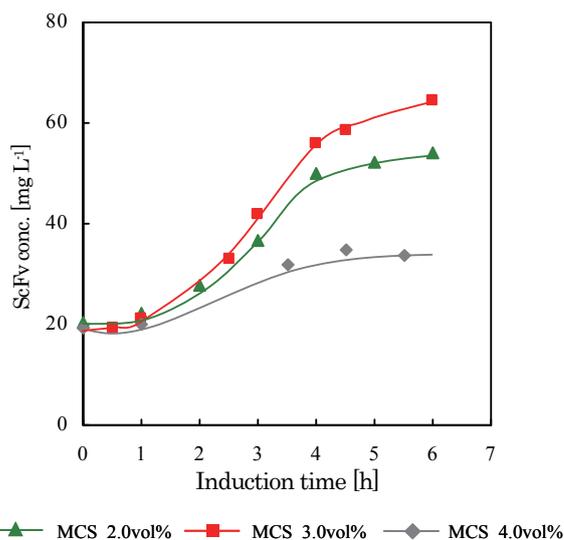


Fig. 1 Time courses of scFv production during early induction phase

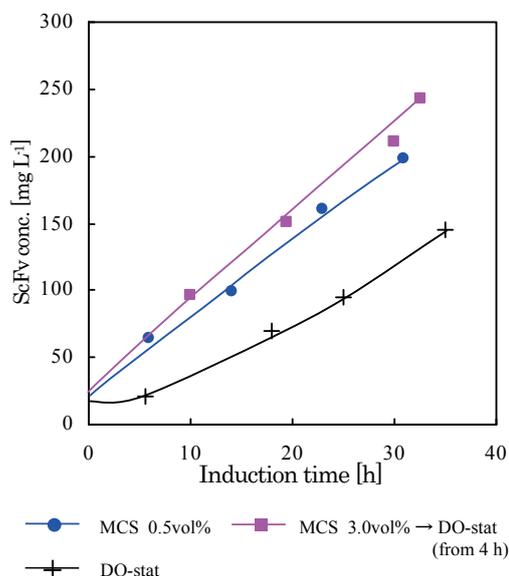


Fig. 2 Time courses of scFv production with 200 mL methanol

[参考文献] 1) Y. Katakura, et al., J. FERMENT. BIOE NG., 86, 482-487(1998)

* Tel&Fax : 078-803-6207
e-mail : katsuda@kobe-u.ac.jp