

堀内 淳一 教授 E-mail: horiuchi@kit.ac.jp

熊田 陽一 准教授 E-mail: kumada@kit.ac.jp

## ■ キーワード

組換え大腸菌 タンパク生産 流加培養 分泌生産 短鎖抗体 DO stat

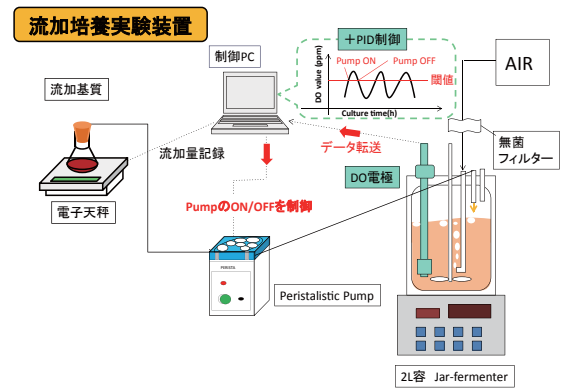
 流加培養による組換えタンパクの高効率分泌生産  
 組換え大腸菌の高密度培養によるタンパク質の分泌生産

## ■ 研究の概要

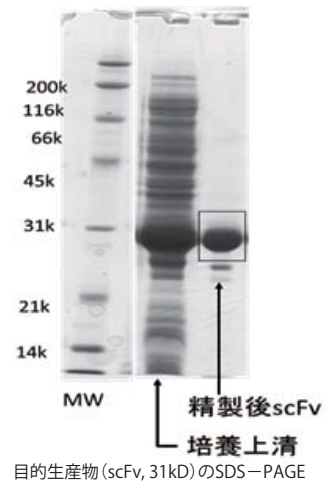
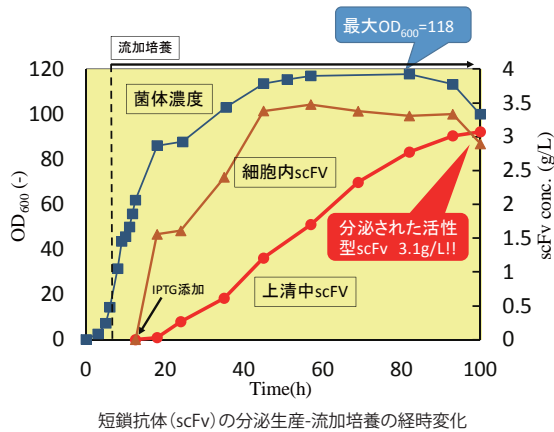
遺伝子組換え大腸菌を用いるタンパク生産系はバイオテクノロジー分野で幅広く用いられています。しかしながら大腸菌を宿主として用いる場合、回分培養など従来の培養方法では菌体濃度が低く生産性が低いことに加え、発現したタンパク質が菌体外には分泌されず、細胞内で不溶化し封入体を形成してしまうため、リフォールディングなどの操作が必要で生産コストの増大を招いていました。我々はこれまで蓄積してきた高度な流加培養技術と独自の発現系/分泌シグナルの組み合わせを駆使して、大腸菌の安定した高密度培養を実現し、活性型タンパク質を数g/Lのレベルで菌体外に分泌する技術を開発しました。

## ■ 研究・技術のプロセス/研究事例

大腸菌の高密度培養技術として、PID制御に基づいたDO statによる流加培養制御システムを開発し、溶酸素濃度(DO)を精密に制御できる流加培養系を構築しました。DO statはDOが一定になる様にグルコースを流加する培養方法です。これにより、大腸菌を高い代謝活性を維持したまま長時間培養することが可能になり、菌体濃度は $OD_{600}$ で約130-160程度まで増加します。また発現系としてpET systemを採用し、pel B leaderなど各種のペリプラズム分泌シグナルと組み合わせました。この発現系を用いて流加培養により数種の短鎖抗体(scFv)の生産を試みたところ、約100時間の培養により、菌体外に約2-4g/Lのリフォールディング不要な活性型scFvが分泌生産されることが明らかになりました。この様なリフォールディング不要の活性型タンパク質の上清中への高濃度分泌生産は大腸菌によるタンパク生産系の大幅なコスト低減を実現します。



PID制御に基づいたDO statによる流加培養制御システム



## ■ セールスポイント

大腸菌では活性型タンパクの菌体外生産は不可能だと思いませんか? 本技術は遺伝子組換え大腸菌によるタンパク生産の効率化、生産コスト低減に大きく貢献します。