

組換え昆虫細胞による scFv-Fc 融合タンパク質の生産

藺田 啓之¹・熊田 陽一²・勝田 知尚¹・山地 秀樹¹

¹神戸大学大学院工学研究科 応用化学専攻

〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

E-mail: yamaji@kobe-u.ac.jp

²京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 生体分子工学専攻

昆虫細胞－バキュロウイルス系は、本来の立体構造や機能を保持した組換えタンパク質の発現系として広く利用されているものの、バキュロウイルスの感染により宿主昆虫細胞が死滅してしまうため、目的タンパク質を連続的に生産することはできない。これに対し、プラスミドベクターを用いて外来遺伝子を昆虫細胞に導入して安定形質転換細胞を作製し、目的タンパク質を連続的に生産する安定発現系が開発されている。我々は、昆虫細胞を用いた有用物質の高生産システムの確立を目的として、昆虫細胞－バキュロウイルス系や組換え昆虫細胞による抗体タンパク質やウイルス抗原タンパク質の生産について検討している。本研究では、Fc フラグメントと融合した一本鎖抗体 (scFv-Fc) の組換え昆虫細胞による分泌生産を試みた。

1. はじめに

遺伝子組換え技術を利用したタンパク質の生産は、タンパク質の機能や構造を解明するうえで不可欠であるのみならず、バイオ医薬品の開発、製造においても基盤技術となっている。組換えタンパク質の発現には、現在、さまざまな宿主細胞を利用することができるが、昆虫細胞は本来の構造や機能を保持した組換えタンパク質を大量に発現可能な宿主細胞として注目を集めている。2009 年、子宮頸がん発症の原因となるヒトパピローマウイルス (HPV) の感染を予防するワクチンが我が国で承認された。このワクチンの有効成分 (抗原) である HPV L1 タンパク質は、昆虫細胞－バキュロウイルス系、すなわち組換えバキュロウイルスを感染させたイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の培養昆虫細胞を用いて製造されている。また、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 由来の昆虫細胞に組換えバキュロウイルスを感染させてつくられるインフルエンザワクチンは、現在、米国で承認目前であり、我が国でも開発が進められている。

昆虫細胞－バキュロウイルス系は、通常、ポリヘドリン遺伝子の代わりに外来遺伝子を挿入した核多角体病ウイルス (NPV) を培養昆虫細胞に感染させ、非常に強力なポリヘドリンプロモーターの作用によりウイルス感染細胞に目的タンパク質を大量に発現させる。宿主である昆虫細胞は合成したポリペプチド鎖に哺乳

動物細胞と同様の翻訳後修飾を施すため、本来の立体構造や活性を保持した組換えタンパク質の発現が期待できる。バキュロウイルスは動・植物には感染しないため、安全性が高い。また、昆虫細胞は培養に CO₂ を必要としない、浮遊細胞として大量に無血清培養可能である、など、哺乳動物細胞と比較して培養面で有利である。しかしながら、バキュロウイルスの感染により昆虫細胞が死滅するため、本系では目的タンパク質を連続的に生産することはできない。これに対し、プラスミドベクターを用いて外来遺伝子を昆虫細胞に導入して安定形質転換細胞を作製し、目的タンパク質を連続的に生産する安定発現系が開発されている。我々は昆虫細胞－バキュロウイルス系や昆虫細胞を用いた安定発現系による抗体タンパク質やウイルス様粒子の生産について検討を進めている [1-6]。ここでは、Fc フラグメントと融合した一本鎖抗体 (scFv-Fc) の組換え昆虫細胞による分泌生産を試みた結果について報告する。

2. 実験方法

マウス抗ウシ ribonuclease A 抗体である 3A21 [7] の VH, VL ドメイン、および (G₄S)₃ リンカーからなる scFv とヒト IgG1 の Fc フラグメントとの融合タンパク質をコードする DNA を *Drosophila* 由来の Bip などのシグナル配列とともに、カイコ由来のアクチンプロモ

ーターの上流にバキュロウイルス由来のトランス作用因子 IE-1 とエンハンサーHR3 を有するプラスミドに挿入した。得られた発現ベクターと、選択マーカーを有するプラスミドを *T. ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) にコトランスフェクションし、薬剤存在下で培養することにより、安定形質転換細胞を作製した。培地として、無血清培地である Express Five SFM (Invitrogen) を使用した。

3. 結果と考察

まず、分泌シグナル配列が scFv-Fc の生産に及ぼす影響を一過性発現において比較検討した。発現ベクターをトランスフェクションした High Five の培養上清を酵素免疫測定法 (ELISA) およびウェスタンブロット法により分析したところ、*Drosophila* 由来の Bip, ミツバチ由来の melittin, およびバキュロウイルス由来の gp64 のいずれのシグナル配列を用いた場合も、High Five は抗原結合活性を有する scFv-Fc を分泌することがわかった。Bip シグナル配列および melittin シグナル配列を用いた場合、gp64 シグナル配列に比べて scFv-Fc の分泌生産量は増大した。

次に、Bip シグナル配列を用いた発現ベクターを、

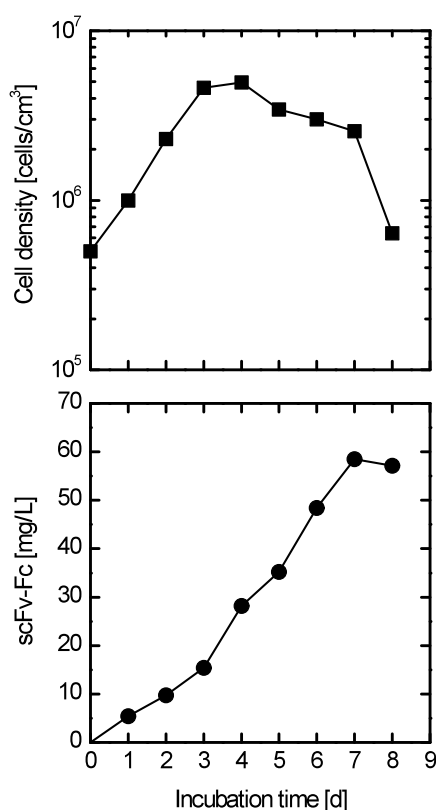


図 1. 組換え High Five による scFv-Fc の分泌生産

選択マーカーを有するプラスミドとともに High Five にコトランスフェクションし、薬剤存在下で培養した。約 2 週間後に薬剤耐性細胞のコロニーが得られ、ELISA により scFv-Fc の高発現株を選択した。得られた組換え細胞の振とう培養を行うと、7 日間で約 60 mg/L の scFv-Fc が分泌生産された (図 1)。大腸菌を用いて同じ scFv-Fc を発現させた場合、抗原結合活性を有する可溶性の scFv-Fc の細胞質における収量は 13 mg/L であった [8]。したがって、大腸菌に比べて、昆虫細胞は活性を保持した scFv-Fc を効率よく分泌生産可能であることがわかる。

組換え細胞による分泌生産を促進するために、培地添加物の影響を検討した。酪酸ナトリウムおよびジメチルスルホキシドの培地への添加は、scFv-Fc の分泌生産を促進しなかったが、セリシンを 0.3% 添加すると scFv-Fc の分泌生産量は約 80 mg/L にまで増大した。

4. 今後の展望

昆虫細胞を用いた安定発現系は、細胞がバキュロウイルスの感染による障害を受けないため正確な翻訳後修飾が行われるなどの利点を有するものの、昆虫細胞ーバキュロウイルス系と比べて一般に発現レベルが低いとされる。これに対し、強力な発現ベクターと適切な宿主昆虫細胞を用いることにより、安定発現系でも著量の抗体タンパク質を分泌生産可能であった。昆虫細胞は、新しい機能をもつタンパク質を見出し、本来の構造や活性を有する組換えタンパク質を大量生産するためのプラットフォームとして大きな可能性を秘めており、今後、バイオ医薬品やワクチンなどの開発や製造に利用が拡大していくものと期待される。

参考文献

- [1] Yamaji H: Cell Engineering, 7, 53–76 (2011)
- [2] Yamaji H, *et al.*: Biochem. Eng. J., 41, 203–209 (2008)
- [3] Furuta T, *et al.*: J. Biosci. Bioeng., 110, 577–581 (2010)
- [4] Sonoda H, *et al.*: Biochem. Eng. J., 67, 77–83 (2012)
- [5] Yamaji H, *et al.*: J. Biosci. Bioeng., in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.012> (2012)
- [6] Yamaji H, *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., in press, DOI: 10.1007/s00253-012-4371-y (2012)
- [7] Katakura Y, *et al.*: J. Ferment. Bioeng., 82, 312–314 (1996)
- [8] Sonoda H, *et al.*: Biochem. Eng. J., 53, 253–259 (2011)