



昆虫細胞を用いた有用物質生産

山地 秀樹

昆虫細胞－バキュロウイルス系は、昆虫を宿主とするバキュロウイルスに外来遺伝子を組み込み、昆虫細胞に感染させて目的のタンパク質を発現させる。1983年末に、本系を用いた活性型ヒトインターフェロン β の大量生産が初めて報告された¹⁾。その後30年余りの間、組換えバキュロウイルスの作製法が改良されるとともに、関連する技術も整備され、本系は多種多様なタンパク質の生産に活用されてきた²⁻⁶⁾。また、本系を用いて製造された動物用の組換えワクチンが2000年に上市され、2007年にはヒト用のワクチンも承認された⁴⁻⁸⁾。本稿では、昆虫細胞－バキュロウイルス系を中心に、培養昆虫細胞を宿主として用いる有用物質生産について概説したい。

昆虫細胞－バキュロウイルス系

生体外で連続して継代培養できる昆虫細胞株は、1960年頃から数多く樹立されてきた^{6,9)}。昆虫細胞－バキュロウイルス系で用いられる細胞株はチョウ目のヤガ科やカイコガ科の昆虫に由来し、特に*Spodoptera frugiperda*由来のSf9や*Trichoplusia ni*由来のBTI-TN-5B1-4(High Five)が広く利用されている。

培養の観点から比較すると、昆虫細胞は微生物細胞よりも哺乳動物細胞に似ているが、異なる点も多い。Sf9やHigh Fiveをプラスチック製の組織培養用ディッシュやフラスコを用いて静置培養すると、細胞は球状の形態を保ったままプラスチックの表面に接着した状態で生育する。ところが、哺乳動物細胞と異なり、これらの細胞はピペッティングにより剥離し、振とう法などにより容易に浮遊懸濁状態で培養することができる。培養温度は27°C前後であり、培養にCO₂は必要なく、スクリーキャップ式のフラスコを用いると無加湿型のインキュベーター内で培養できる。培地は糖、アミノ酸、ビタミン、無機塩類などを含む基本合成培地に、昆虫の体液の代わりに10%程度のウシ胎児血清を添加したものが使用されてきた^{4,5)}。現在では、無血清培地や動物由来成分を含まない培地も市販されている。培地のpHは6.2～6.4と酸性側にある。増殖速度は哺乳動物細胞と大差なく、倍加時間は約1日であるため、雑菌汚染に注意する必要がある。以上のことから、昆虫細胞は概して哺乳

動物細胞よりも培養しやすいといえるだろう。

昆虫細胞－バキュロウイルス系では、バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルスを外来遺伝子のベクターとして利用する。ヤガ科の昆虫由来のSf9やHigh Fiveを宿主細胞として用いる場合には*Autographa californica*核多角体病ウイルス(AcNPV)が、カイコガ科の昆虫由来の細胞が宿主の場合には*Bombyx mori*核多角体病ウイルス(BmNPV)が用いられる。核多角体病ウイルスは約130 kbpの二本鎖環状DNAをゲノムとしており、比較的大きな外来遺伝子を組み込むことができる。ウイルス粒子は40 × 300 nm程度の桿状で、ヌクレオキャプシドがエンベロープに包まれた構造をしている。

核多角体病ウイルスは宿主となる昆虫の細胞に感染すると、複製されたウイルス粒子がまず細胞から出芽し、他の細胞に感染を広める^{5,6)}(図1)。その後ウイルス感染末期になると、感染した細胞の核内にポリヘドリンとよばれるタンパク質を大量に産生させる。ポリヘドリン遺伝子のプロモーターは非常に強力であり、細胞の全タンパク質の数十%をポリヘドリンが占めるようになる。ポリヘドリン(約30 kDa)は、ウイルス粒子を包埋し保護する多角体とよばれる封入体を形成し、乾燥や紫外

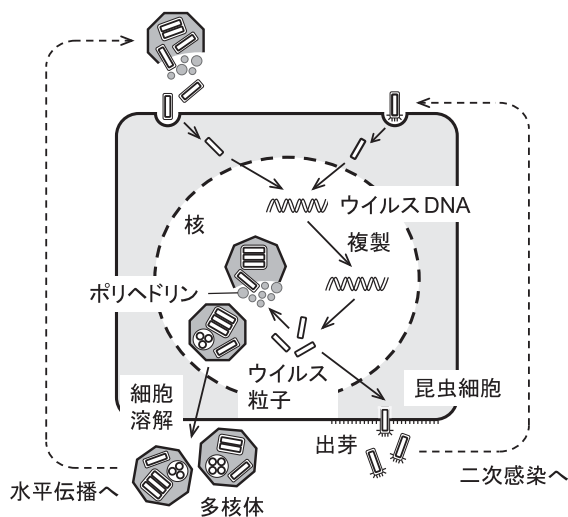


図1. 核多角体病ウイルスの生活環

線からウイルスを保護している。このため、自然界においてウイルスの水平伝播には不可欠であるが、ウイルスの感染や増殖には必要ない。そこで、ポリヘドリン遺伝子を目的タンパク質の遺伝子に置換した組換えバキュロウイルスを作製し、これを人工的な環境の下で培養された昆虫細胞に感染させると、ウイルス感染細胞はポリヘドリンの代わりに目的タンパク質を大量に生産することになる。同様にウイルス感染末期に発現するタンパク質であるp10もウイルスの感染や増殖に不要であるため、その強力なプロモーターはしばしば外来遺伝子の発現に利用される³⁾。バキュロウイルスは昆虫細胞のもつ機能を使って増殖するのに対し、昆虫細胞-バキュロウイルス系ではバキュロウイルスの機能を巧みに利用して、昆虫細胞に人の役に立つ物質をつくってもらうのである。

したがって、昆虫細胞-バキュロウイルス系は、バキュロウイルスに組み込む外来遺伝子を変えることにより、異なる組換えタンパク質を同一の細胞株を用いて生産できる特長をもつ⁸⁾。また、宿主として昆虫細胞を用いるため、発現タンパク質は高等真核生物のDNA翻訳後修飾が施される。上述のように、強力なポリヘドリンプロモーターやp10プロモーターを用いる場合、目的タンパク質の大量発現が期待できる。さらに、バキュロウイルスは動物や植物に感染しないため、安全性が高い。しかしながら、本系ではバキュロウイルスの感染により宿主昆虫細胞が死に至るため、目的タンパク質の発現は一過的となり連続生産はできない。組換えタンパク質発現の宿主として用いられる代表的な細胞を、培養とタンパク質生産の観点から大まかに比較したものを表1に示す。昆虫細胞-バキュロウイルス系は、質・量ともに高いプラットフォームとして位置づけられる。

近年、昆虫細胞-バキュロウイルス系を用いて製造されたバイオ医薬品が実用化されている^{4-6,8)} (表2)。これ

表1. 組換えタンパク質生産のための宿主細胞の比較

	大腸菌	酵母	昆虫細胞	動物細胞
増殖速度	大	大	小	小
培養コスト	低	低	中～高	高
生産性	高	低～高	高	低
分泌生産	×	△	○	○
フォールディング	△	△	○	○
翻訳後修飾	×	△	○	◎

らのうち二つは組換えワクチンであり、子宮頸がん発症の原因となるヒトパピローマウイルスや季節性インフルエンザの感染予防に使用されている。わが国では21,000 Lの培養槽を擁するバイオ医薬品工場が竣工しており、昆虫細胞-バキュロウイルス系により季節性インフルエンザの組換えワクチンを大規模に製造できる¹⁰⁾。また、遺伝性疾患である家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症に対する遺伝子治療薬として、患者にリポタンパク質リパーゼの遺伝子を導入するアデノ随伴ウイルスベクターが昆虫細胞-バキュロウイルス系により製造されている。

昆虫細胞が生産したタンパク質をヒトの治療薬として用いる場合、課題がないわけではない。それはアスパラギン結合型糖鎖の合成である。哺乳動物細胞の場合、末端にシアル酸が結合した複合型糖鎖がアスパラギンの側鎖に形成される。一方、昆虫細胞の場合、哺乳動物細胞と同様の複合型糖鎖の合成経路を有しているものの通常活性が低く、多くの場合、昆虫特有の経路を経てパウチマンノース型の糖鎖が形成される^{6,11,12)}。これに対し、昆虫特有の経路を阻害する、あるいは複合型糖鎖合成に関与する哺乳動物由来の糖鎖転移酵素の遺伝子を導入することにより、昆虫細胞も哺乳動物の複合型糖鎖をもつ糖タンパク質を発現できることが報告されている^{3,11,12)}。

表2. 昆虫細胞-バキュロウイルス系により生産されるバイオ医薬品

製品名 (企業名)	機能・用途	生産物	宿主細胞
Cervarix (GlaxoSmithKline)	子宮頸がん予防 (ヒトパピローマウイルス) ワクチン	L1 タンパク質 (ウイルス様粒子を形成)	Hi-5 Rix4446 (<i>Trichoplusia ni</i> 由来)
PROVENGE (Dendreon)	前立腺がんに対する樹状細胞ワクチン	前立腺酸性ホスファターゼと顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の融合タンパク質 (樹状細胞の刺激に使用)	Sf21 (<i>Spodoptera frugiperda</i> 由来)
Glybera (uniQure)	家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症に対する遺伝子治療薬	リポタンパク質リパーゼの遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター	expresSF+ (<i>S. frugiperda</i> 由来)
Flublok (Protein Sciences)	季節性インフルエンザワクチン	ヘマグルチニン	expresSF+

今後このような検討が進展することにより、治療用タンパク質の生産においても昆虫細胞の利用が拡大すると思われる。

組換えバキュロウイルスを作製する際、バキュロウイルスのゲノムは大きいため、外来遺伝子を直接ウイルスのゲノムに挿入することは困難である。そこで、初期の作製法では、トランスファーベクターとよばれるプラスミドを利用した³⁾。トランスファーベクターはポリヘドリン遺伝子の翻訳領域はもたないが、その上流および下流のウイルスゲノムDNAと同じ塩基配列を有しており、ポリヘドリンプロモーターの下流に目的タンパク質のcDNAを挿入する(図2a)。得られたトランスファーベクターとバキュロウイルスのゲノムDNAを昆虫細胞にコトランスフェクションすると、細胞内で相同組換えによりポリヘドリン遺伝子が目的遺伝子に置換され、組換えバキュロウイルスが生成、出芽する。しかしながら、組換えを起こすバキュロウイルスの割合は小さく、野生型のウイルスと組換えウイルスを分離するブランクアッセイは熟練を要し手間暇がかかることが課題であった。

これに対し、トランスポゾンによる部位特異的組換えを利用して大腸菌内で組換えバキュロウイルスDNAを作製する方法が開発され¹³⁾、キットになっている(Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen))。本法で用いるバクミドとは、大腸菌内で自律複製するように細菌人工染色体(BAC)の配列(mini-F replicon)を導入したバキュロウイルスゲノムDNAであり、さらに大腸菌のトランスポゾンTn7の結合部位(mini-attTn7)を挿入したlacZ遺伝子が組み込まれている(図2b)。Tn7の両端にある反復配列(Tn7R, Tn7L)の間にポリヘドリンプロモーターをもつドナープラスミドに、目的の遺伝子を挿入する。これを、トランスポナーゼを発現するヘルパープラスミドとバクミドを保持する大腸菌に導入すると、菌体内でトランスポナーゼの作用により、ドナープラスミド上のTn7R, Tn7L間の目的遺伝子を含む領域がバクミドに転位し、組換えバクミドが生成する。さらに、この大腸菌はlacZが欠損しており、転位が起るとバクミド上のlacZが不活性化されるため、Bluo-Galなどの発色基質を含む寒天プレート上で白色のコロニーを形成する。一方、転位が起きていない大腸菌は青色のコロニーをつくるため、容易に区別することができる。組換えバクミドDNAを大腸菌から精製して昆虫細胞にトランスフェクションすると、組換えバキュロウイルスが生成する。本法は簡便であるため広く用いられているが、作製した組換えバキュロウイルスのゲノムが比較的不安定であるとの報告もある⁶⁾。一方、

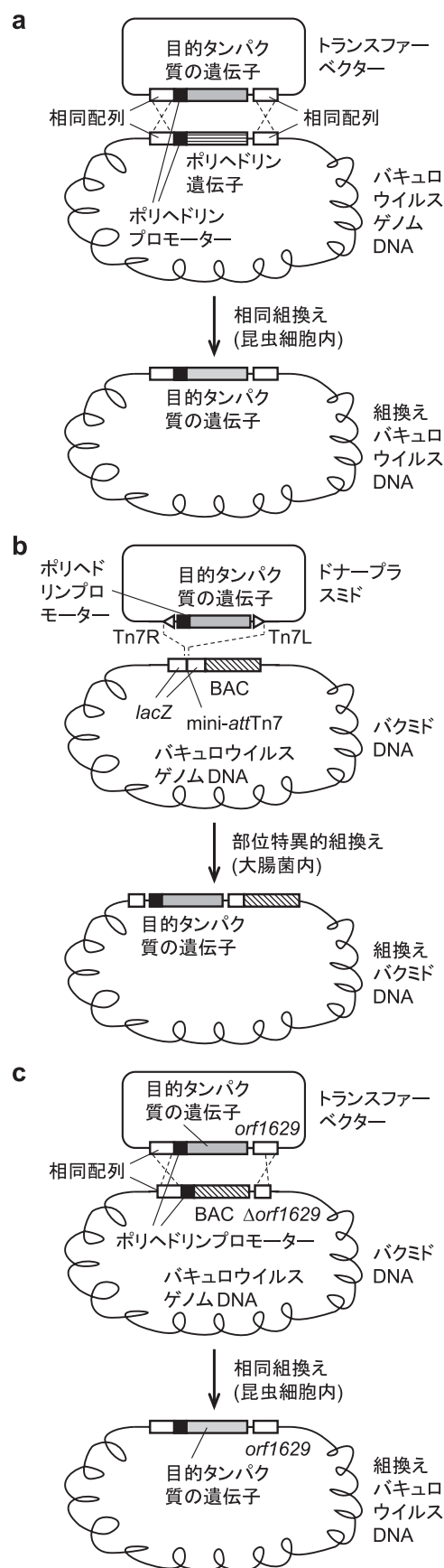


図2. 組換えバキュロウイルスDNAの作製

本法を利用して、単一のバキュロウイルスで複数の遺伝子を発現する手法も開発されており (MultiBac), 多くのサブユニットからなるタンパク質複合体の生産や、複合型糖鎖合成に関与する糖鎖転移酵素と目的タンパク質の共発現 (SweetBac) が可能となっている¹⁴⁾。

また、バクミドとトランスファーベクターの相同組換えを利用する簡便な方法も開発されている¹⁵⁾ (flashBAC (Oxford Expression Technologies), BacMagic (Novagen))。本法では、ポリヘドリン遺伝子の翻訳領域をBAC配列に置換し、さらにポリヘドリン遺伝子の下流に隣接しウイルスの増殖に不可欠な遺伝子である *orf1629* の一部を欠損させたバキュロウイルスゲノムDNAを使用する (図2c)。このDNAは大腸菌内で複製、保持されるが、昆虫細胞内ではバキュロウイルスを生成できない。このバクミドDNAと、目的遺伝子を挿入したトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションすると、両者の間の相同組換えによりBAC配列が目的遺伝子に置換されるとともに *orf1629* の機能が回復するため、組換えウイルスのみが出芽する。

昆虫細胞-バキュロウイルス系では、宿主である昆虫細胞をあらかじめ増殖させた後、組換えバキュロウイルスを感染させて目的タンパク質を生産する。感染多重度 (1個の細胞に対して添加するウイルス粒子の数) が十分高い場合、バキュロウイルス添加直後にすべての昆虫細胞がウイルスに感染する。ところが、感染多重度が低いと、未感染細胞は一次感染細胞から出芽したウイルスに二次感染するまで増殖する。昆虫細胞を高密度状態まで増殖させた後に組換えバキュロウイルスを感染させると、低細胞密度でウイルスを感染させた場合に比べて、細胞1個あたりの組換えタンパク質の生産量が減少することがある。この主な原因は培地中の栄養分の不足であることから、培地中の栄養分が枯渇する前に組換えタンパク質の生産が完了するように、ウイルス感染時の細胞密度と感染多重度を調整すればよい¹⁶⁾。培養途中で栄養分を補給する流加法や、細胞を培養系内に保持したまま古い培地を除去し新しい培地を供給する灌流法の利用も有効である^{4,5,17)}。

ウイルスを使わないタンパク質発現

バキュロウイルスではなく、プラスミドをベクターとして用いて目的タンパク質の遺伝子を昆虫細胞に導入する一過性発現や安定発現も検討されている。哺乳動物細胞と同様に、昆虫細胞の場合も細胞内でプラスミドは自律複製しないため、プラスミドをベクターとして外来遺伝子を細胞に導入してもその発現は一過的になる。一過

性発現は大量のタンパク質を得るには不向きであるが、短時間で目的タンパク質を調製することができる。このため、リード探索や最適分子構築をとまなうバイオ医薬品の開発に際して有用であり、近年、哺乳動物細胞のみならず昆虫細胞を宿主とした一過性発現の検討が進められている¹⁸⁾。

プラスミドベクターを用いて導入した遺伝子が宿主細胞の染色体に組み込まれると、細胞が分裂を繰り返しても外来遺伝子の発現は安定に維持される (安定形質転換細胞)。目的遺伝子とともに、選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子を細胞に導入した後、薬剤存在下で長期間培養を行い、耐性のある細胞を選択することにより安定形質転換細胞を樹立することができる。昆虫細胞を宿主とする安定発現系としては、ハエ目ショウジョウバエ科の *Drosophila melanogaster* 由来の Schneider 2 (S2) 細胞と、Cuイオンにより誘導可能なメタロチオネインプロモーターをもつプラスミドベクターを用いる系が知られている¹⁹⁻²¹⁾。本系では1回のトランスフェクションにより数百個のプラスミドが安定に細胞のゲノムに導入されるため、目的タンパク質の高発現が期待できる。

一方、チョウ目ヤガ科の昆虫由来の Sf9 や High Five を用いる安定発現についても検討されている²⁰⁻²²⁾。このような安定発現系は、昆虫細胞-バキュロウイルス系と異なり、宿主細胞がウイルスの感染による障害を受けないため、目的タンパク質が正確な翻訳後修飾を施されるとともに、プロテアーゼによる分解を受けにくい。しかしながら、昆虫細胞-バキュロウイルス系と比べると、通常、組換えタンパク質の発現レベルが低い点が課題であった。これに対し、*B. mori* 由来の細胞質アクチンプロモーターの上流に BmNPV 由来のトランス作用因子 IE1 とエンハンサー HR3 を配置したプラスミドベクターが開発されている²²⁾。このプラスミドを用いると、アクチンプロモーターを単独で使用した場合に比べて外来遺伝子の発現レベルが1000倍以上も増大することが報告されている。筆者らは、IE1, HR3, およびアクチンプロモーターとともに、薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドベクターを構築し、抗体 Fab フラグメント²³⁾ や日本脳炎ウイルス様粒子²⁴⁾ を高分泌発現する組換え昆虫細胞を効率よく作製することに成功している。後者の組換え昆虫細胞は、昆虫細胞-バキュロウイルス系よりも多量の日本脳炎ウイルス様粒子を生産した^{24,25)}。

おわりに

昆虫細胞-バキュロウイルス系は、この30年余りの間、高等真核生物のさまざまな機能性タンパク質を得る

ための発現系として多用されてきた。近年になって、本系を用いて製造された組換えワクチンや遺伝子治療用ベクターが実用化されている。さらに、現在、種々のウイルス抗原タンパク質やウイルス様粒子を生産するために、昆虫細胞－バキュロウイルス系の利用が精力的に検討されている^{7,8)}。また、昆虫細胞に感染して増殖するバキュロウイルスは、ウイルス粒子表面への外来タンパク質の提示技術や哺乳動物細胞に外来遺伝子を導入できるベクターが開発され、生物農薬にとどまらず応用範囲が広がっている^{2,6,20,26,27)}。一方で、バキュロウイルスを使用しない昆虫細胞の安定発現系についても新たな技術が構築されつつある²¹⁾。今後も、多彩な有用物質を高生産するためのプラットフォームとして昆虫細胞の利用が拡大していくことを期待したい。

文 献

- 1) Smith, G. E. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2156 (1983).
- 2) Kost, T. A. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 567 (2005).
- 3) Jarvis, D. L.: *Methods Enzymol.*, **463**, 191 (2009).
- 4) Drugmand, J.-C. *et al.*: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1140 (2012).
- 5) Contreras-Gómez, A. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **30**, 1 (2014).
- 6) van Oers, M. M. *et al.*: *J. Gen. Virol.*, **96**, 6 (2015).
- 7) van Oers, M. M.: *Adv. Virus Res.*, **68**, 193 (2006).
- 8) Cox, M. M. J.: *Vaccine*, **30**, 1759 (2012).
- 9) 今西重雄ら：生物工学, **82**, 580 (2004).
- 10) 小川敦嗣：生物工学, **93**, 330 (2015).
- 11) 渡邊聡子ら：生物工学, **82**, 583 (2004).
- 12) Harrison, R. L. and Jarvis, D. L.: *Adv. Virus Res.*, **68**, 159 (2006).
- 13) Luckow, V. A. *et al.*: *J. Virol.*, **67**, 4566 (1993).
- 14) Palmberger, D. *et al.*: *Bioengineered*, **4**, 78 (2013).
- 15) Hitchman, R. B. *et al.*: *Methods*, **55**, 52 (2011).
- 16) Yamaji, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 636 (1999).
- 17) Yamaji, H. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **28**, 67 (2006).
- 18) 濱田宏嗣ら：化学工学会第46回秋季大会講演要旨集, ZA1P46 (2014).
- 19) Moraes, A. M.: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 613 (2012).
- 20) Yamaji, H.: Al-Rubeai, M. (Ed.), *Cell Engineering*, **7**, p. 53, Springer (2011).
- 21) Yamaji, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 1963 (2014).
- 22) Douris, V. *et al.*: *Adv. Virus Res.*, **68**, 113 (2006).
- 23) Yamaji, H. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **41**, 203 (2008).
- 24) Yamaji, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 1071 (2013).
- 25) Yamaji, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 657 (2012).
- 26) 松浦善治：生物工学, **82**, 592 (2004).
- 27) Airenne, K. J. *et al.*: *Mol. Ther.*, **21**, 739 (2013).