

Title	組換えタンパク質生産に向けたMamestra brassicaeからの新規ヨトウガ細胞株の樹立
Author(s)	山本, 陽太郎
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91904
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (山本陽太郎)

論文題名 組換えタンパク質生産に向けた *Mamestra brassicae* からの新規ヨトウガ細胞株の樹立

論文内容の要旨

第1章 序論: 組換えタンパク質を生産する手法の中でも、昆虫細胞と baculovirus を用いた発現系 (Baculovirus-insect cell system: BICS) において最も広く利用されているのは *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf9 細胞株 (以下 Sf9 と記載) である。2014 年に Sf9 および派生株に Sf-rhabdovirus の感染が報告され、医薬品製造における安全性において問題となった。本博士論文では、Sf-rhabdovirus が非感染かつ Sf9 とは異なる種から細胞株を樹立し、その細胞株の特性を解明し、組換えタンパク質生産へ応用することを目的とした。

第2章 NIAS-Mb-32 細胞株からの高増殖、高生産クローンの樹立と特性解析: 第 2 章では *Mamestra brassicae* NIAS-MB-32 細胞株から限界希釈を行い単クローンにし、EGFP を発現させる組換え baculovirus を用いて選別し、2g2 細胞株 (以下 2g2 と記載) を取得した。2g2 の増殖能力は Sf9 と比較し、同様であることを示した。Sf9 にて生産実績のある mouse interleukin-23 (mIL-23) を発現させる組換え baculovirus を用いて、組換えタンパク質と組換え baculovirus の生産能力をそれぞれ、Western Blotting (WB) と免疫染色法にて評価した。WB の結果、2g2 と Sf9 生産の組換え mIL-23 のバンド強度は同様の値を示した。2g2 と Sf9 生産の組換えタンパク質のバンド強度と免疫染色法による力価測定値は同程度の値となり、Sf9 と同じ生産能力であることを明らかにした。次に Sf-rhabdovirus 感染の有無を確認するために、逆転写 PCR を行い、Sf-rhabdovirus ゲノム RNA の検出を行った。その結果、2g2 由来の total RNA からは非検出であり、Sf-rhabdovirus 非感染株であることを示した。以上より、2g2 は Sf-rhabdovirus 非感染で、増殖能力及び組換え mIL23 の生産能力と組換え baculovirus 生産能力が Sf9 と遜色ない細胞株であることを示した。

第3章 BICSにおける NIAS-Mb-32 2g2細胞株を用いたアメリカカブトガニ (*Limulus polyphemus*) 由来 Factor G の生産: 第3章では 2g2 を用いて組換えタンパク質生産が望まれる *L. polyphemus* 由来の Factor G (以下 LpFactor G) を生産し、実用的な使用の可否を確認した。LpFactor G は α subunit と β subunit からなる heterodimer であり、BDG によって活性化され、プロテアーゼ活性を発現する。LpFactor G の遺伝子クローニングを行い、LpFactor G α subunit では 2 つ、LpFactor G β subunit では 7 つの遺伝子配列を取得した。取得した各クローンの総当たり試験を 2g2 で行った。組換え LpFactor G α A は組換え LpFactor G β i2 と i3、LpFactor G α B は組換え LpFactor G β 2 と C2 の組合せにおいて BDG 依存的に活性化する組換え LpFactor G になることが明らかとなった。以上の結果より、*L. polyphemus* の血液を用いずに、2g2 で生産した組換え LpFactor G による再構成 BDG 測定系の構築に成功した。

第4章 NIAS-Mb-32 2g2 細胞株における組換え糖タンパク質の生産能力と性能評価: 本章では、2g2 における N-結合型糖鎖修飾能と 100 kDa 以上のタンパク質の合成能力の評価を SARS-CoV-2 Stabilized soluble Spike protein (SCoV2-sssp) にて行った。コントロールとして Sf9 においても並行して SCoV2-sssp を作製し、生産量、ELISA を用いた human Angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) との結合確認、nanoLC-MS/MS による N-結合型糖鎖解析 (大阪大学梶浦助教実施) を行った。2g2 は Sf9 より高い生産性を示した (収量、2g2 : 3.2 mg/L, Sf9 : 2.1 mg/L)。ELISA を用いた手法において、SCoV2-sssp 用量依存的に hACE2 の結合量の上昇を確認した。N-結合型糖鎖解析の結果、2g2 由来の SCoV2-sssp には昆虫細胞由来タンパク質の特徴であるハイマンノース型やコア型の N-結合型糖鎖型が占有していることが明らかとなり、Sf9 と類似の糖鎖修飾能力を有していることを示した。

第5章 総括: 第 2 章では NIAS-Mb-32 細胞株から Sf9 と比較して同様の増殖能力を有し、Sf-rhabdovirus 非感染である 2g2 を樹立した。第 3 章では、LpFactor G の遺伝子取得を行い、2g2 を用いた機能性スクリーニングによって BDG 依存的に活性化する LpFactor G を生産することに成功した。第 4 章では、2g2 を用いて生産された組換え SCoV2-sssp と hACE2 との結合が確認され、N-結合型糖鎖修飾解析においては Sf9 と類似した N-結合型糖鎖を確認した。以上の本研究結果から、樹立した 2g2 は Sf9 との比較において、組換えタンパク質生産株として利用可能であることを示した。本博士論文で樹立した 2g2 を通して、様々な組換えタンパク質を用いた製品が社会実装され、人類の豊さに貢献できることが期待できる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山本陽太郎)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤山和仁
	副 査	教授	大政健史
	副 査	教授	本田孝佑
論文審査の結果の要旨			
第1章 序論			
<p>組換えタンパク質及びその生産技術は生化学や分子生物学をはじめとした生命科学の現象を解明する汎用的なツールであり、工業製品や医薬品に使用され、社会に貢献している。組換えタンパク質を生産する手法の中でも、昆虫細胞と baculovirus を用いた発現系 (Baculovirus-insect cell system: BICS) において最も広く利用されているのは <i>Spodoptera frugiperda</i> 由来の Sf9 細胞株 (以下 Sf9 と記載) である。2014 年に Sf9 および派生株に Sf-rhabdovirus の感染が報告され、医薬品製造における安全性において問題となった。また、代替できる昆虫細胞株もなく、昆虫細胞系の脆弱性が露見した。以上の背景から、本博士論文では、Sf-rhabdovirus が非感染かつ Sf9 とは異なる種から細胞株を樹立し、その細胞株の特性を解明し、組換えタンパク質生産へ応用することを目的としている。</p>			
第2章 NIAS-Mb-32 細胞株からの高増殖、高生産クローンの樹立と特性解析			
<p>本章では <i>S. frugiperda</i> とは異なり、同じヨトウガの近縁種である <i>Mamestra brassicae</i> 由来 NIAS-Mb-32 細胞株から Sf9 と比較して同様の増殖能力と組換えタンパク質生産能力を有し、Sf-rhabdovirus 非感染である細胞株の樹立を試みている。培地にサプリメントを加えた無血清培地で限界希釈を行い単クローンにしている。EGFP を発現させる組換え baculovirus を用いて選別し、2g2 細胞株 (以下 2g2 と記載) を取得している。2g2 の増殖能力は Sf9 と比較し、同様であることを示している。Sf9 にて生産実績のある mouse interleukin-23 (mIL-23) を生産させる組換え baculovirus を用いて、組換えタンパク質と組換え baculovirus の生産能力をそれぞれ、Western Blotting (WB) と免疫染色法にて評価している。WB の結果、2g2 と Sf9 生産の組換え mIL-23 のバンド強度は同様の値を示している。免疫染色法による力価測定の結果、2g2 と Sf9 生産の組換え baculovirus 溶液は 5.6×10^8 IFU/mL と 5.1×10^8 IFU/mL となり、Sf9 と同じ生産能力であることを明らかにしている。次に Sf-rhabdovirus 感染の有無を確認するために、逆転写 PCR を行い、Sf-rhabdovirus genome RNA の検出を行っている。その結果、2g2 由来の total RNA からは検出されず、本検出系においては Sf-rhabdovirus 非感染株であることを示している。以上の結果より、2g2 は Sf-rhabdovirus 非感染であり、増殖能力、組換え mIL-23 の生産能力と組換え baculovirus 生産能力が Sf9 と遜色ない細胞株であることを示している。</p>			
第3章 BICS における NIAS-Mb-32 2g2 細胞株を用いたアメリカカブトガニ (<i>Limulus polyphemus</i>) 由来 Factor G の生産			
<p>第 2 章で樹立した 2g2 を用いて、組換えタンパク質生産が望まれる <i>L. polyphemus</i> 由来の Factor G (以下 LpFactor G) を生産し、実用的な使用の可否を確認している。LpFactor G はヒト血中の (1→3)-β-D-glucans (BDG) を測定する</p>			

深在性真菌症診断薬に用いられている。LpFactor Gは α subunitと β subunitからなるheterodimerであり、BDGによって活性化され、プロテアーゼ活性を発現する。現在、LpFactor Gは*L. polyphemus*の血液採取によって取得されており、組換え体生産の報告はない。そのため、次世代シーケンス解析と3'-RACE法を取り入れた遺伝子クローニングを行い、LpFactor G α subunitでは2つ、LpFactor G β subunitでは7つの遺伝子配列を取得した。BDG依存的に活性化するLpFactor G生産において、最適なクローンの組み合わせが存在すると考え、各クローンの総当たり試験を2g2にbaculovirusを二重感染させる方法で行っている。組換えLpFactor G α Aは組換えLpFactor G β i2とi3、LpFactor G α Bは組換えLpFactor G β 2とC2の組合せにおいてBDG依存的に活性化する組換えLpFactor Gになることが明らかとなった。以上の結果より、*L. polyphemus*の血液を用いずに、2g2を用いて生産した組換えLpFactor Gでの再構成BDG測定系の構築に成功している。

第4章 NIAS-Mb-32 2g2 細胞株における組換え糖タンパク質の生産能力と性能評価

本章では、2g2におけるN-結合型糖鎖修飾能力と100 kDa以上のタンパク質の合成能力を評価している。評価モデルタンパク質はN-結合型糖鎖修飾部位が22箇所、分子内ジスルフィド結合が15箇所あり、推定分子量が137 kDaとなるSARS-CoV-2 Stabilized soluble Spike protein (SCoV2-sssp)を使用している。コントロールとしてSf9とExpi293細胞株(以下Expi293と記載)も同様のSCoV2-ssspを生産し、生産量、ELISAを用いたhuman angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2)との結合確認、nanoLC-MS/MSによるN-結合型糖鎖解析(大阪大学梶浦助教実施)を行っている。1 L培養において、2g2はSf9より高い生産能力を示している(2g2: 3.2 mg/L, Sf9: 2.1 mg/L)。ELISAを用いた手法において、Sf9やExpi293由来と同様に2g2由来の組換えSCoV2-ssspは、用量依存的にhACE2の結合量が上昇することを確認している。N-結合型糖鎖解析の結果、2g2由来のSCoV2-ssspには昆虫細胞由来タンパク質の特徴であるハイマンノース型やコア型のN-結合型糖鎖によって占有されていることが明らかとなり、2g2はSf9と類似の糖鎖修飾能力を有していることを示している。

第5章 総括

第2章ではNIAS-Mb-32細胞株からSf9と比較して同様の増殖能力を有し、組換えmIL-23の生産量と組換えbaculovirusの生産量もSf9と遜色なく、Sf-rhabdovirus非感染である2g2を樹立している。第3章では、LpFactor Gの遺伝子取得を行い、2g2を用いた機能性スクリーニングによってBDG依存的に活性化するLpFactor Gを生産し、組換えLpFactor GによるBDG測定系を再構成することに成功している。第4章では、2g2の翻訳後修飾能力をより解明するために、高分子量かつ糖タンパク質であるSCoV2-ssspを生産した。2g2を用いて生産された組換えSCoV2-ssspはhACE2との結合が確認され、糖鎖修飾においてはSf9と類似したN-結合型糖鎖修飾を確認している。以上の本研究結果から、樹立した2g2はSf9との比較において、組換えタンパク質生産株として応用可能であることを示している。本博士論文で樹立した2g2を通して、様々な組換えタンパク質を用いた製品が社会実装され、人類の豊さへの貢献が期待できる。

以上のように、本論文はヨトウガ近縁種NIAS-Mb-32細胞株から汎用されているSf9と同様の増殖能力、組換えタンパク質生産量を持ち、Sf-rhabdovirus非感染である2g2細胞株を樹立している。第3章では、LpFactor Gの遺伝子取得を行い、この2g2細胞株を用いてヒト血中BDG測定する深在性真菌症診断薬に利用可能なアメリカカブトガニ(*L. polyphemus*) LpFactor Gタンパク質を生産し、BDG測定系を再構成することに成功している。また、2g2細胞株の翻訳後修飾能力(特に、糖鎖修飾)を、組換えSCoV2-ssspについて評価し、Sf9と類似したN-結合型糖鎖修飾能力を有することを確認している。以上、本研究で樹立した2g2細胞株は、組換えタンパク質生産株として応用可能であることを示し、生産した組換えタンパク質の社会実装化を期待できる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。