The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

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の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αsubunitとβsubunit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。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　山本陽太郎　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	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

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 *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。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。

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

本章では *S. frugiperda* とは異なり、同じヨトウガの近縁種である *Mamestra brassicae* 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。

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 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 *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ている。LpFactor G はヒト血中の(1→3)-β-D-glucans（BDG）を測定する

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。