



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

博士学位論文

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

山 本 陽 太 郎

2023 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第1章 序章.....	2
第2章 NIAS-Mb-32 細胞株からの高増殖、高生産細胞株の樹立と特性解析. 13	
第1節 材料と方法.....	15
第2節 結果.....	20
第3節 考察.....	30
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	33
第1節 材料と方法.....	36
第2節 結果.....	44
第3節 考察.....	56
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量と性能 評価	61
第1節 材料と方法.....	63
第2節 結果.....	68
第3節 考察.....	74
第5章 総括	76
引用文献.....	81
出版リスト	97
謝辞	98
付録.....	99

第1章 序章

1900 年代後半から近年までに、遺伝子工学や細胞培養工学の発展に伴って組換えタンパク質を生産する技術は日々改良されている。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となっている。例えば、遺伝子の調節やタンパク質の構造および機能研究等がそれにあたる。また、研究領域だけではなく、インターフェロン、医療用抗体、ワクチン等の医薬品、癌バイオマーカー、病原性ウイルス・微生物の抗原、抗原に対する抗体等の診断薬や洗剤用プロテアーゼは広く社会実装されている。近年では繊維にも組換えタンパク質が使われている例もある (Spiess, Lammell, & Scheibel, 2010)。

組換えタンパク質を生産する方法は、様々な宿主を利用して開発されている (Yin *et al.*, 2007)。例としては、無細胞系、微生物系（大腸菌、酵母、グラム陽性菌）、植物、昆虫細胞、動物細胞などである。無細胞系は小スケールで生産することによりスループットが高い点、非天然型のアミノ酸を組換えタンパク質に導入できる利点があるが (Hosaka, 2007)、大量に生産するのに向いていない (Fogeron *et al.*, 2021)。微生物系の中で実施例が多いのは大腸菌を用いた発現系である。大腸菌発現系は様々な発現ベクターや組換えタンパク質生産用の宿主株が試薬メーカーから販売されており、最も手軽に実施できる方法である。組換えタンパク質との相性が合えば、大量に組換えタンパク質を取得することが可能である。ただし、生産した組換えタンパク質が不溶性になるなど、翻訳後修飾が適切に施されない組換えタンパク質になることが問題となる場合がある。翻訳後修飾と正確なタンパク質内のジスルフィド結合に基づく折り畳み構造形成の観点から、昆虫細胞と動物細胞が用いられる場合がある。動物細

胞ではチャイニーズハムスター卵巢に由来する Chinese hamster ovary 細胞（CHO細胞）とヒト胎児の腎由来の Human Embryonic Kidney 293 細胞（HEK293細胞）が主流の組換えタンパク質生産細胞株となっている（Graham *et al.*, 1977; Louis, Eveleigh, & Graham, 1997; Wurm, 2004）。特に CHO 細胞株は翻訳後修飾がヒト型に近い点、遺伝子工学と細胞工学に基づいた細胞、培地や培養法の開発が進み、g/L の生産能力に到達している。そのため、抗体医薬品の社会実装を成し遂げた実績を積んでおり、抗体医薬品の生産株としてデファクトスタンダードになっている（Omasa, 2021; Kishi, 2015）。昆虫細胞では *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf9 細胞株（以下 Sf9 と記載）や *Trichoplusia ni* 由来の BTI-Tn-5B1-4（High Five 細胞株：以下 High Five と記載）が主流の組換えタンパク質生産株である。他の宿主との比較においてよく注目される違いは、コンセンサス配列（Asn-X-Ser または Asn-X-Thr）のアスパラギン（Asn）に修飾される N-結合型糖鎖による差異である。図 1-1 に示した N-結合型糖鎖修飾の中で動物細胞は複合型、ハイブリッド型とハイマンノース型を適切に組換えタンパク質に付加するが、昆虫細胞は N-結合型糖鎖修飾サイトの大部分にハイマンノース型の糖鎖修飾を行うことが知られている（Altmann *et al.*, 1999; Harrison, & Jarvis, 2016）。ハイマンノース型の糖鎖が高い比率で修飾され、一定品質の組換えタンパク質が作製されるため、構造解析用の組換えタンパク質の生産株として良く用いられている（Dimovasili *et al.*, 2021）。昆虫細胞は動物細胞と異なり CO₂ が不要で、27 度が最適培養温度であるため、設備的な制約が動物細胞に比べ低い。加えて高密度で培養可能であり、スケールアップが容易である。一方、組換え baculovirus の取り扱いに注意が必要であり、糖鎖修飾の観点から生物活性が動物細胞で生産した物より劣る場合もある。例えば、組換えエリスロポエチンの場合は糖鎖の分岐型などによって活性が増減し（Takeuchi *et al.*, 1989;

Takeuchi *et al.*, 1990)、糖鎖末端にシアル酸を欠くと血中から速やかに排除されることも知られている (Blithe, 1993)。以上のように個々の生産系には長所と短所があり、今後も研究者・生産者が用途に合った生産方法を選択する必要がある。

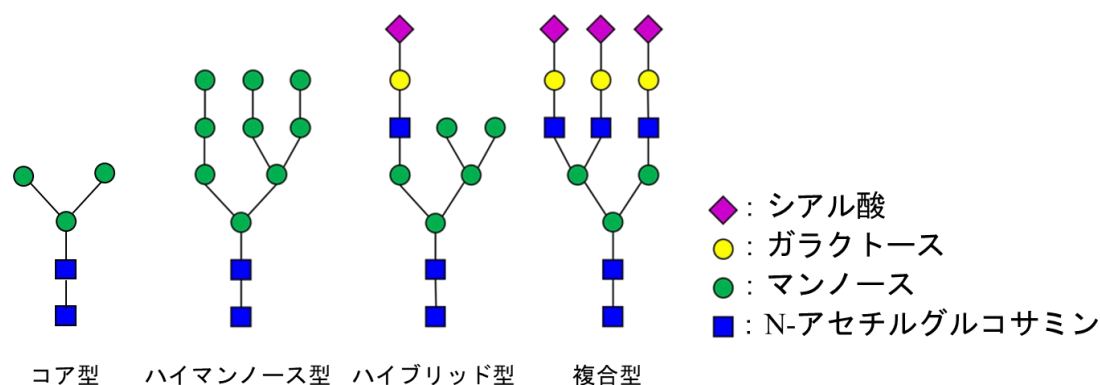


図 1-1. N-結合型糖鎖修飾サイトに付加される糖鎖型の大分類

上記で述べたように、組換えタンパク質を生産する技術は数多くある中で、本研究では昆虫細胞を用いた組換えタンパク質の生産に注力している。昆虫細胞と baculovirus を用いた組換えタンパク質生産技術の開発は 1983 年にテキサス A&M 大学の Smith 等の研究報告から始まっている (Smith, Summers, & Fraser, 1983)。彼らは baculovirus にヒトインターフェロン- β 遺伝子を組み込み、昆虫細胞 (*S. frugiperda* 由来細胞: Sf21 細胞株 (以下 Sf21 と記載する)) に感染させ、活性を保持したヒトインターフェロン- β を高生産できることを実証した。彼らの研究から約 40 年弱が経過するなかで、遺伝子、細胞、培養培地の改良が行われ、昆虫細胞で生産された組換えタンパク質はバイオ医薬品として商業利用されている。例えば、子宮頸がんに対する Virus-like particles (VLP) ワクチンである Cervarix (Evans *et al.*, 2001; Monie *et al.*, 2008)、前立腺がんに対する細胞免疫治療薬である Provenge (Cheever, & Higano, 2011)、家族性リポプロテインリ

パーゼ欠損症に対する遺伝子治療薬である Glybera (Cecchini, Virag, & Kotin, 2011)、インフルエンザに対するサブユニットワクチンである Flublok (Cox, & Hollister, 2009) がある。近々では、severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) による感染症 COVID-19 に対するワクチンである Nuvaxovid が開発されている (Parums, 2022)。ヒト用の医薬品だけでなく、獣医用のワクチンとしてブタサーコウイルス 2 型 (PCV2) 感染症のワクチンである Porcilis PCV、Ingelvac CircoFLEX がある (Fort *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2008)。以上に挙げた例を表 1-1 にまとめた。昆虫細胞-baculovirus 発現系は種々呼び方があるが、本論文では Baculovirus-insect cell system を略して以下 BICS と記載する。

BICS の利点は 4 点ある。1 点目は簡単な工程によって糖鎖修飾された組換えタンパク質を大量に生産できる点 (設備面、スケールアップによる問題が起きにくい) である。2 点目は複数種のタンパク質を同時に発現し複合タンパク質を生産する点に長所がある (Olga *et al.*, 2022)。3 点目は動物細胞発現系に比べると安価に組換えタンパク質生産を開始できる点である。Thermo fisher scientific 社が販売している組換えタンパク質作製用の各スターターキットの値段 (表 1-2) や細胞培養費用となる培地の値段 (図 1-2) を比較すると研究室規模においては安価に開始できることがわかる。商業規模においては、Felberbaum によると医薬品製造において安定高発現株を構築する必要がある動物細胞発現系に比べると単一の細胞株から組換え baculovirus を変更するだけで様々な組換えタンパク質を生産できる点は商業的にも費用対効果が高いとのことである (Felberbaum, 2015)。4 点目は baculovirus の利用法に関しての安全性と動物細胞への導入効率の高さから動物細胞への遺伝子発現ベクターとしても利用できる点である (Massaguer *et al.*, 2022)。

表 1-1. 昆虫細胞を用いて製造された医薬品

医薬品名	企業	効果	細胞
Cervarix	Glaxo Smith Kline	子宮頸癌ワクチン	High Five
Provenge	Dendreon	前立腺癌ワクチン	Sf21
Glybera	uniQure	1 型高リポタンパク血症治 療	Sf9
Flublok	SANOFI	季節性インフルエンザワ クチン	SF+*
Nuvaxovid	NOVAVAX	SARS-CoV-2 ワクチン	Sf9
Porcilis PCV	MSD Animal Health	porcine circovirus associated disease (PCVAD) ワクチ ン	Sf9
Ingelvac CircoFLEX	Boehringer Ingelheim	porcine circovirus associated disease (PCVAD) ワクチ ン	SF+

* : SF+は Protein Sciences Corporation が開発した *S. frugiperda* 由来の昆虫細胞 *expresSF+*[®] の略。

表 1-2. Thermo 社が販売しているキット価格における各発現系費用の比較^{*1, 2}

製品名	価格	発現系
ExpiSf™ Expression System Starter Kit	¥198,600	昆虫
ExpiCHO™ Expression System Kit	¥293,100	動物
Expi293™ Expression System Kit	¥251,600	動物
FreeStyle™ MAX 293 Expression System	¥228,000	動物
FreeStyle™ MAX CHO Expression System	¥219,600	動物

*1 : 2022 年 5 月時点での各メーカーのサイトを参照した価格。

*2 : 1 L 培養相当での比較。

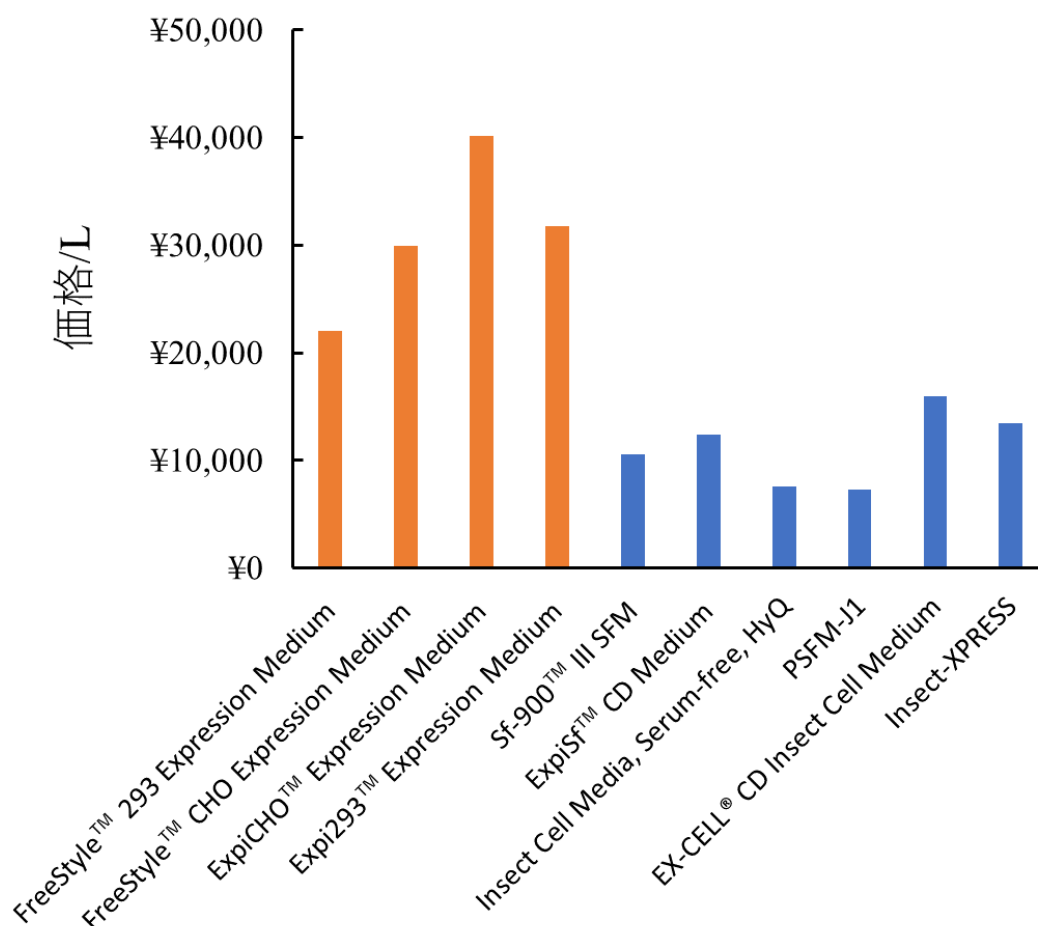


図 1-2. 動物細胞と昆虫細胞に用いられる培地の価格比較^{*1}

* : 2022 年 5 月現在各メーカーのサイトを参照した価格。橙色は動物細胞用の無血清培地、青色は昆虫細胞用の無血清培地。

しかしながら、より効率的に組換えタンパク質を生産するという観点から BICS で生じる問題は大きく分けて以下の 3 つあると考える。

1. Baculovirus 感染で生じる不要因子の生産、特に baculovirus 由来プロテアーゼに起因する目的組換えタンパク質の分解による収量が低下する点。
2. 生産される組換えタンパク質に N-結合型糖鎖修飾サイトがある場合、その

大部分がハイマンノース型やコア型であるため、動物細胞由来の組換えタンパク質に比べ安定性やその組換えタンパク質が持つ生物活性が低下する点。

3. 内在性ウイルスの感染による安全性への懸念があるという点。BICS において主流な組換えタンパク質生産株は Sf9、Sf21 (Vaughn *et al.*, 1977) もしくは High Five (Hink, 1970) であるが、2014 年には Sf9 に single strand RNA (-) のゲノム構造を持つウイルスである Sf-rhabdovirus の感染が判明し、医薬品の安全性について疑義が生じた (Ma *et al.*, 2014)。バイオ医薬品の製造プロセスの観点からも、十分に特性が把握できていないウイルスが感染している細胞株は使用を避けるべきであるとされている (ICH, 1998a; 1998b)。High Five に関しては 2007 年に alphanodavirus の感染が報告されている (Li *et al.*, 2007)。

近年、他の宿主における組換えタンパク質生産技術も同様に発展してきており、微生物系に比べると生産能力が劣り、組換えタンパク質の品質では動物細胞に劣り、尚且つ生産量についても優劣し難い状況になりつつある。さらに、以上の様な内在性のウイルス感染の問題も生じてきた状況の中で、細胞株の機能性の改良と共に細胞株のウイルスクリアランスも重要であると考えられる。機能性の改良においては、baculovirus を改変し性能を向上させる試みや、細胞株をゲノム編集技術によって改変する試みがこれまで行われてきている。例えば、Mabashi & Jarvis 等は β -N-acetylglucosaminidase を CRISPR-Cas9 によってノックアウトすることで、より哺乳細胞生産物に似た糖鎖修飾が可能であることを実証している (Mabashi, & Jarvis, 2017)。Maghodia、Geisler と Jarvis は human N-acetylglucosaminyltransferase I、(MGAT1)、human N-acetylglucosaminyltransferase II (MGAT2)、human N-acetylglucosaminyltransferase IV (MGAT4)、human N-

acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5)、 β 1,4-galactosyltransferase (GALT)、human UDP-N-acetylglucosamine transporter (UGT)、mannosidase I (Man I)、mannosidase II (Man II) を同時に発現させることで、哺乳細胞の糖鎖付加に近い糖鎖型の修飾が可能であることを報告している (Maghodia, Geisler, & Jarvis, 2021)。

細胞株の安全性や機能性の改良点もあるが、ライフサイエンス研究におけるツールとして BICS の応用研究も行われている (van Oers, Pijlman, & Vlak, 2015)。主に 4 つ分野で応用されており、1 つ目はウイルス様粒子 (virus like particle (VLP)) の生産ツールとして、2 つ目は baculovirus の膜上に抗原を提示して、タンパク質の輸送ツールとして、3 つ目はアデノ随伴ウイルスベクターの生産ツールとして用いられている。そして、4 つ目は動物細胞用の遺伝子発現ベクターとして用いられている。このように baculovirus を応用した研究は行われている。

前述において、BICS の歴史、長所・短所、医薬品製造の実績、Sf-rhabdovirus の問題、baculovirus の研究用ツールとしての応用展開を紹介してきたが、これまで Sf9 や High Five とは別系等の昆虫細胞株における組換えタンパク質生産株としての可能性について多くの検討はされていない。Wilde 等は *T. ni* と異なる種から新規の細胞株の作製を検討していたが、調査が進むと *T. ni* 由来の細胞株であり、従来の High Five と類似する細胞であった (Wilde *et al.*, 2014)。Isobe 等は Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* 由来の細胞と種々の baculovirus の感染性や DNA 複製の検討をしているが、組換えタンパク質の生産能力に関する検証は行っていない (Isobe *et al.*, 2021)。そのため、Sf9 や High Five と同様に組換えタンパク質生産能力を有した組換えタンパク質生産株として用いることはできていない。しかし、*T. ni* 由来の High Five のように *S. frugiperda* 以外からの細胞株に

おいても BICS を用いた組換えタンパク質生産株として用いることが可能な点から推察すると、近縁種から組換えタンパク質生産株として用いることが可能な細胞株を樹立できると考えた。そこで、本研究では、今後も BICS のさらなる発展に寄与するべく、*S. frugiperda* や *T. ni* とは異なる系統の種から Sf-rhabdovirus 非感染であり、組換えタンパク質生産へ応用可能な細胞株の樹立を検討した。そこで、着目したのが、近縁種である *Mamestra brassicae* である（表 1-3）。*S. frugiperda* とは異なる系統から樹立した細胞株が新しい可能性の発見や研究開発の土台となることを見据えて、まずは細胞株を樹立し基礎的な性能（細胞株の増殖性能、組換えタンパク質の生産能力、Sf-rhabdovirus 感染の有無）を評価し、BICS の長所である複合タンパク質の生産能力や、糖タンパク質生産能力を解明し、組換えタンパク質生産株として応用することを目標に本研究を行った。

表 1-3. 細胞株名と種の違い

Taxonomic Tree		Cell line	
Order		Lepidoptera	
Family		Noctuidae	
Genus	<i>Mamestra</i>	<i>Spodoptera</i>	<i>Trichoplusia</i>
Species	<i>Mamestra brassicae</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
Cell strain name	NIAS-Mb-32	Sf9 or Sf21	High Five (BTI-Tn-5B1-4)

まず、第 2 章では、研究が進んでいない、*M. brassicae* の卵巣組織から単離された NIAS-Mb-32 に着目した。NIAS-Mb-32 と Sf9 を比較して、遜色ない増殖性能、組換えタンパク質生産能力を有した細胞株の樹立を試みた。取得した 2g2 細胞株（以下 2g2 と記載する）と Sf9 との比較解析を行い、2g2 の増殖性能、

BICSにおける組換えタンパク質生産能力、組換え *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) の生産能力と Sf-rhabdovirus の感染有無について評価した。

第 3 章においては、BICS における生産方法の一つである二重感染方法と *M. brassicae* 由来 2g2 を用いて、実際に生産が望まれる、アメリカカブトガニ *Limulus polyphemus* (*L. polyphemus*) 由来 Factor G の生産を検討した。Factor G は真菌の細胞壁を構成する(1→3)-β-D-glucans (以下 BDG と記載) に結合するとプロテアーゼ活性示す機能を有し、カブトガニの自然免疫で重要な役割を果たす (Muta, & Iwanaga, 1996)。Factor G の機能を用いてヒト血中の BDG 量を測定することで、深在性真菌症の臨床診断を行っている。この深在性真菌症の診断薬はカブトガニの血液採取によって得られた Factor G を用いて製造されている。カブトガニの血液採取には動物愛護、環境保護の観点と製造ロットの品質管理の面で問題がある。そのため、BICS に 2g2 を用いることにより、組換え Factor G を生産し、カブトガニ血液採取に依存しない、BDG 検出系の再構成を検討した。

第 4 章では、前章において *M. brassicae* 由来 2g2 を用いて生産した組換え Factor G が期待した機能を有しているため、2g2 の組換えタンパク質の生産能力、糖鎖修飾能力、生物活性について注目し、特徴の解析を行った。詳細は本章の部分で説明するが、上記 3 点を評価するために、137 kDa と高分子量であり、22 カ所の N-結合型糖鎖修飾サイトと 15 カ所のジスルフィド結合を有する SARS-CoV-2 Spike protein をモデルタンパク質とした。

最後に総合討論として、本研究と本細胞株性能についてのまとめ、今後の細胞株開発について論じた。

第2章 NIAS-Mb-32 細胞株からの高増殖、高生産細胞株の樹立と特性解析

BICS を用いて生産された組換えタンパク質は社会に実装され、貢献している。昆虫を由来とした細胞を用いた組換えタンパク質生産系は *S. frugiperda*、*T. ni* 以外の宿主でも行われており、例えば、*Drosophila melanogaster* 由来の S2 細胞株（以下 S2 と記載）やカイコ幼虫・蛹・細胞を用いた生産系が知られている。S2 を用いた組換えタンパク質発現はプラスミドベクターによる一過性発現、もしくは薬剤処理による安定発現株による生産が主流で、baculovirus vector は用いない（Ceriani, 2007; Schneider, 1972）。カイコを用いた発現系では baculovirus vector を用いた一過性発現もしくは遺伝子組換えカイコによる生産が行われている。Silkworm-Baculovirus expression vector system の場合、上記で記載してきた AcMNPV とは異なり、宿主特異性の観点から *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus（BmNPV）が使用され、最初に成功した例として、カイコ細胞でのヒトインターフェロン- α がある（Maeda *et al.*, 1985）。遺伝子組換えカイコも *piggyBac*（トランスポゾン）を使う方法が開発され、様々な組換えタンパク質の実績がある。大関株式会社は遺伝子組換えカイコを作製するサービス運営をし、コラーゲンや抗体などの生産実績がある。2018 年に瀬筒等は AMED 創薬基盤推進研究事業（2014-2016 年度）を通して「トランスジェニックカイコを用いて製造されるバイオ医薬品の品質管理戦略構築に関する考え方」を取りまとめていると報告している（Sezutsu *et al.*, 2018）。さらに、株式会社免疫生物研究所は遺伝子組換えカイコ系統・バンク管理の妥当性について Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（PMDA）と合意を得たとプレスリリースをおこなっている（Immuno-biological laboratories co. ltd., 2019）。しかし、上記の生産系はそれぞれ危惧すべき点がある。S2 の場合、医薬品に関わる点として「生物由来原

料基準」の観点から培養培地に Fetal Bovine Serum (FBS) を必要とする点が好ましくない。カイコ生産系の場合は、世界中にカイコの供給（餌を含む）が難しい点である。結果として、世界中で広く普及し用いられている BICS は AcMNPV と Sf9、Sf21 もしくは High Five を用いた生産系である。その他に、*S. frugiperda* 由来では *expresSF+*[®]細胞株 (Smith, 1988)、*T. ni* 由来では BTI-Tnao38 細胞株（以下 BTI-Tnao38 と記載）などがある (Hashimoto *et al.*, 2012)。この *S. frugiperda* と *T. ni* 由来の細胞株は遺伝子工学による発現システムの改良や培養培地、培養方法の研究開発が進み、組換えタンパク質の生産能力が高く、バック培養やタンク培養での実績がある。近年では *Holotrichia obliqua* faldernann (Zheng, Li, & Li, 2014) や *Papilio demoleus* linnaeus (Ding *et al.*, 2020) から単離された昆虫細胞の報告があり、BICS に適合性はあるが、広く普及はしていない。*S. frugiperda* 由来の株が標準株として確立している中で、Sf-rhabdovirus の存在が問題になっている。別の観点として、BICS に用いることが可能な細胞株間における差異について Wilde 等は研究を行い (Wilde *et al.*, 2014)、Sf9、High Five、BTI-Tnao38 間で組換え baculovirus の感受性や組換えタンパク質の生産量を比較した。その結果では、*T. ni* 系列の High Five と BTI-Tnao38 は Sf9 に比べ組換えタンパク質の分泌量が多いことを報告している。このように、BICS に用いることが可能な細胞株間でも組換えタンパク質の生産能力については異なる結果になることが示唆されている。

本章では、Sf9 の起源である *S. frugiperda* とは異なり、近縁種の *M. brassicae* に着目し、特に、卵巣由来である NIAS-Mb-32 細胞株を研究対象とした。近縁種かつ Sf9 と同様に卵巣から単離された細胞を用いることで、AcMNPV への感受性もあり、Sf9 と比較して同水準の増殖性能と組換えタンパク質生産能力を有した細胞株を樹立できる可能性があると考えた。さらに、Sf9 系列の親株と

は異なるため Sf-rhabdovirus 非感染である可能性が高いと考え、限界希釈法において細胞株の樹立を試みた。AcMNPV に対する感受性を確認しながら単離株の性質を評価し、樹立後は Sf9 をコントロールとして増殖性能や組換えタンパク質生産能力、組換え baculovirus 生産能力を評価した。Sf-rhabdovirus 感染の有無についても確認し、樹立細胞について考察した。

第 1 節 材料と方法

(1) 細胞株

Sf9 や High Five (BTI-TN-5B1-4) と同様に、卵巣由来の細胞として NIAS-Mb-32 (RCB0413 理研セルバンク) を利用した。

(2) NIAS-Mb-32 細胞株の Serum Free Medium (SFM) への馴化

NIAS-Mb-32 細胞株を理研セルバンクの推奨方法で培養を行った。推奨培地は Schneider's 昆虫細胞培養培地+3% FBS であるため、SFM への馴化培養を行った。SFM は PSFM-J1 (富士フイルム和光純薬) を用いた。具体的な方法は推奨培地と PSFM-J1 培地の混合比率を 25%、50%、75%、100%に変更しながら馴化培養を行った。SFM への馴化完了後、130 rpm、27 度で攪拌培養を行った。以下、SFM 馴化細胞を NIAS-Mb-32 SFM と記述する。

(3) NIAS-Mb-32 SFM と Sf9 の増殖性能比較

NIAS-Mb-32 SFM の増殖性能は攪拌培養で確認した。同時に Sf9 も培養することと比較解析を行った。 0.5×10^6 cells/ml で NIAS-Mb-32 SFM と Sf9 それぞれ播種したベントキャップ型の 125 mL 三角フラスコ (50 mL PSFM-J1 入り) で攪拌培養を開始した (27 度、130 rpm、N=3)。経時的にサンプリングを実施し、生

死細胞オートアナライザーVi-CELL XR (Beckman Coulter) にて細胞数の計測を行った。

(4) NIAS-Mb-32 SFM から的高増殖性能を有した細胞のスクリーニング

NIAS-Mb-32 SFM は 10% BM Condimed H1 (phorbol myristate acetate (PMA) で刺激したマウス末梢血単核球の上清より調製された溶液で、成長因子及びリンホカインの混合物) (Roche) を含む PSFM-J1 で 1.0×10^3 cells/mL になるように懸濁した。NIAS-Mb-32 SFM 懸濁液を 96 well plate に 200 μ L/well で播種し、27 度で静置培養した。NIAS-Mb-32 SFM の増殖が速いクローンを 24 well plate、12 well plate まで拡大培養した。この時点において 3.0×10^5 cells/well (12 well plate) を播種した 12 well plate に対して enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する組換え baculovirus を感染させ、感染 48 時間後に蛍光顕微鏡で EGFP の蛍光を観測、定量し、最も蛍光強度が強いクローン 2g2 を選定した。選定したクローン 2g2 は 6 well plate、T-25 cm² フラスコ、T-75 cm² フラスコ、125 mL 三角フラスコへ拡大培養した。スクリーニングに用いた EGFP を発現する組換え baculovirus vector はポリヘドリンプロモーター直下に EGFP 遺伝子が挿入された pVL1392 ベクターと直鎖化した AcMNPV ゲノム DNA を Sf9 に co-transfection し、7 日間培養後、上清を回収し作製した。

(5) NIAS-Mb-32 2g2 と Sf9 の増殖性能の比較

前項(4)のスクリーニングにおいて、増殖が速く、EGFP の発現が最も良好であった 2g2 に注力し、以降の試験を行った。2g2 の増殖性能は Sf9 をコントロールとして比較解析を行い確認した。各細胞を 50 mL PSFM-J1 が入ったベントキャップ型の 125 mL 三角フラスコに 1.0×10^6 cells/mL で播種し、27 度、130 rpm

で攪拌培養を開始した（N=3）。経時的にサンプリングを実施し、生死細胞オートアナライザーVi-CELL XR（Beckman Coulter）で計測した。本実験では PSFM-J1 に CultureSure® 10% polyoxyethylene polyoxypropylene glycol Solution（富士フイルム和光純薬）を 1/100 量添加した培地を用いた。

（6）形態の比較解析

2g2 と Sf9 を 6 well plate に播種し、細胞占有面積率が 50%と 80%時の状態で fluorescence microscope observer Z1 により微分干渉画像を取得した。また、各細胞の継代時に細胞の直径を生死細胞オートアナライザーVi-CELL XR（Beckman Coulter）で計測した。

（7）Mouse Interleukin-23（mIL-23）組換え baculovirus を用いた組換えタンパク質の生産能力の比較

2g2 と Sf9 を 50 mL PSFM-J1 が入ったベントキャップ型の 125 mL 三角フラスコに 1.5×10^6 cells/mL で播種した。C 末端に hexa-histidine を融合した mIL-23 遺伝子（GenBank：LC710321）をポリヘドリンプロモーター直下にコードした組換え baculovirus vector 溶液を 250 μ L（Volume of infection（VOI）：1/200）添加した。VOI は簡易的に、培養する細胞数と baculovirus 量をコントロールする指標として用いた。同じ細胞数で、組換え baculovirus 溶液無添加の培養も開始した。130 rpm、27 度で 72 時間培養した後に、細胞培養液を 500 μ L 回収し、12000 $\times g$ において 2 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。回収した培養上清と還元剤入り SDS-Sample buffer を混合し 95 度、3 分間処理した。処理済みサンプルを 10-20%のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）ゲルに供し電気泳動を 2 枚分行った。電気泳動後、1 枚は CBB 染色を行

い、もう一枚は ClearTrans® SP PVDF 膜（富士フイルム和光純薬）に転写した。転写膜を 3% スキムミルクで 1 時間反応させてブロッキング後、 $1 \times$ PBS-T にて 10000 倍希釈した Anti-hexa-histidine monoclonal antibody (9C11)、peroxidase conjugated（富士フイルム和光純薬）と 1 時間反応させた。ImmunoStar® Zeta（富士フイルム和光純薬）で発光させ、ImageQuant LAS（Cytiva）で検出した。

(8) 組換え baculovirus の生産能力の比較

(7) で作製した mIL-23 生産培養上清を BacPAK™ qPCR Titration Kit（Takara Bio Inc.）と BacPAK™ Baculovirus Rapid Titer Kit（Takara Bio Inc.）に供した。組換え baculovirus の DNA 量を Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) によって定量し、感染性のあるウイルス量 (Plaque-Forming Unit) は、抗 GP64 抗体（Takara Bio Inc.）を用いた免疫染色により定量した。核酸量と感染力価の定量を行った。

(9) Sf-rhabdovirus の感染の確認

2g2 と Sf9 (5×10^6 cells) からの Total RNA の抽出には RNeasy Plus Mini kit（Qiagen）を用いた。各細胞の培養上清からの Total RNA の抽出には QIAamp viral RNA mini kit（Qiagen）を用いた。抽出 Total RNA 1 μ g を鋳型とした cDNA 合成には PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit（Takara Bio Inc.）を用い、添付のプロトコルに従い実施した（逆転写 primer は製品に添付されている Random primer を用いた）。作製された cDNA を鋳型にした PCR は表 2-1 に記載の primer set を用いて行った（以下、上記の一連の流れを reverse transcription PCR (RT-PCR) と記載する）。反応条件としては表 2-2 の通りに行った。PCR 産物は 1.0% アガロース S ゲルに供し 50 V、60 分電気泳動を行った（泳動緩衝

液は TAE buffer を用いた)。SAFELOOK™ レッド核酸染色液（富士フイルム和光純薬）を説明書（プレキャストステイン法）に従い使用してゲルを染色した。

表 2-1. Sf-rhabdovirus 確認用 primer set ^a

Set name	Primer name 配列 (5' to 3')	Position ^b	Product size ^c
Set 1	Mono-1	8045-8069	800 bp
	GGCAAGGCTGTTTGGATTACTGACC		
	Mono-2	8821-8844	
	ACAGGTTTGCAGCTAAGGAGGACA		
Set 2	Mono-3	10316-	730 bp
	TGGCGAGGGACTGCTTACAGAAGG	10339	
	Mono-4	11026-	
	CACAGCCGGGGGTGCAATCA	11045	
Set 3	Mono-5	11823-	826 bp
	ACAGGAGATGCGGAAGACCCCTC	11845	
	Mono-6	12627-	
	ATCTCGCAGGTGGGACAACCCC	12648	
Set 4 ^d	Sf-28S-F		277 bp
	ATAGGGACTGCGAAAGCACG		
	Sf-28S-R		
	ACTATCGCAACGACAAGCCA		

a : Set 1~3 は Ma 等が報告した配列を参照した (Ma *et al.*, 2014)。

b : Sf-rhabdovirus genome sequence (GenBank : MF536978.1) における primer の開始と終了位置。

c : primer set における PCR 後に推定される増幅産物のサイズ。

d : Set 4 は抽出コントロール PCR として Ma 等の報告 (2019) から参照して用いた。Primer set は *S. frugiperda* 28S ribosomal RNA gene (GenBank : EU314585) 内を増幅。

表 2-2. Sf-rhabdovirus の存在確認時に用いた PCR 条件

STEP	温度	時間
1	25 度	10 min
2	95 度	2 min
3	98 度	10 sec
4	55 度	30 sec
5	72 度	1 min
6	STEP 3~5、35 サイクル	
7	72 度	5 min

第 2 節 結果

(1) NIAS-Mb-32 細胞株からのスクリーニング及び樹立株における増殖能力の評価

SFM 培地に馴化した NIAS-Mb-32 SFM の増殖性能を確認するために、Sf9 をコントロールとして増殖試験を行った（図 2-1 A クローニング前）。クローニング前の比較では、培養開始後 72 時間の時点において Sf9 は 4.0×10^6 cells/mL 以上の生細胞密度に至っているのに対して、NIAS-Mb-32 SFM では 1.0×10^6 cells/mL に到達する生細胞密度であった。最高到達生細胞密度においても、Sf9 は約 10.0×10^6 cells/mL に達しているが、NIAS-Mb-32 SFM では約 7.0×10^6 cells/mL であった。倍加時間を培養 48 時間と 72 時間時の 2 点における生細胞数（表 2-3）を用いて算出した。本研究での細胞密度計測機器は Vi-cell XR（ベックマンコールター社）を用いており、N=3 における測定誤差は 1%未満であるため、測定精度は十分だと判断し、2 点での倍加時間の算出を行った。倍加時間の計算を行う前に、事前に Sf9 と NIAS-Mb-32 SFM にて予備実験を行い、経時変化を確認した。NIAS-Mb-32 SFM が対数増殖期を迎える培養時間は Sf9 に比べ

遅いため、倍加時間の計算に用いた培養時間はコントロールとなる Sf9 が対数増殖になっている範囲内の 2 点を用いた。加えて、本試験においても Sf9 の増殖曲線を描き 2 点（48 時間と 72 時間）が対数増殖期内にあることも確認した。NIAS-Mb-32 SFM の倍加時間は 66 時間、Sf9 は 23 時間となった（表 2-4）。以上の結果より、無血清培地に馴化した NIAS-Mb-32 SFM では Sf9 と比較して増殖性能が劣った。そのため、10% BM Condimed H1 を使用した限界希釈法により細胞をクローン化し、数種類のクローンを取得した。得られたクローンの中で増殖速度が速かった 1e11、4f10、2g2 に対して EGFP を発現させる組換え baculovirus を添加して感受性及び発現量を比較し選別した（図 2-1 B）。その結果、1e11、2g2、4f10 と Sf9 を比較した中で、最も EGFP の蛍光強度が高値であったのが 2g2 であった。そのため、2g2 に注目して拡大培養を行い、攪拌培養を行う段階で再度、Sf9 と増殖性能を比較した。図 2-1 A クローニング後に示した通り、標準的なフラスコ培養条件下において、2g2 は Sf9 と類似した増殖曲線を描いた。クローニング前と同じように倍加時間を培養 48 時間と 72 時間時点における生細胞数（表 2-3）を用いて算出した。本試験においても 2g2 を用いて事前に予備実験を行い、経時変化を確認した。2g2 は Sf9 と同様の培養時間で対数増殖期になることを確認し、同じ培養時間の点で倍加時間を算出した。Sf9 の倍加時間は 22 時間であり、2g2 の倍加時間は 20 時間であった（表 2-4）。以上の結果から、今回のような標準的なフラスコ培養条件下において、2g2 は Sf9 と同様の増殖速度を有する細胞株であることを示した（図 2-1 右（クローニング後））。

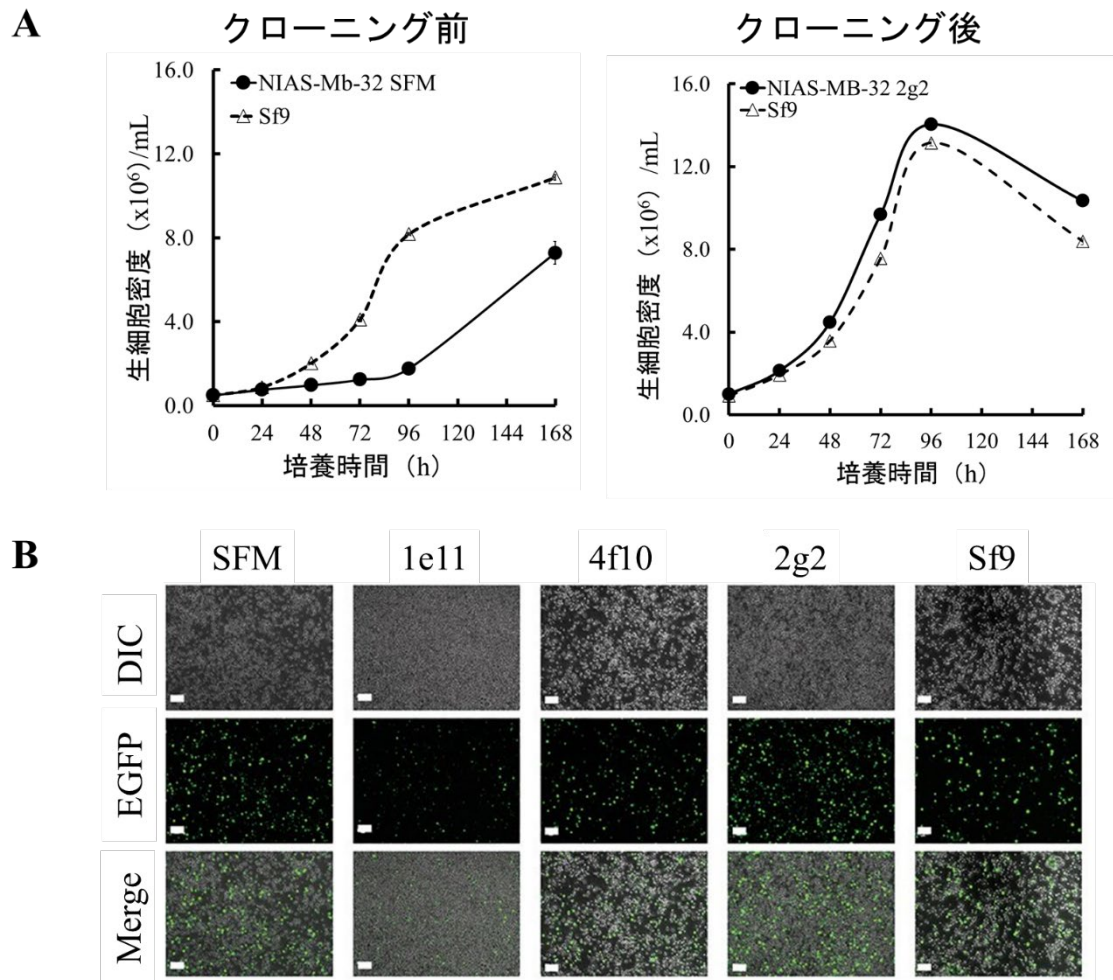


図 2-1. NIAS-Mb-32 SFM からのスクリーニング、2g2 の取得と増殖曲線

A: NIAS-Mb-32 SFM と Sf9 の増殖曲線。左図はクローニング前、右の図は、クローニング後の比較。△は Sf9、●は NIAS-Mb-32 SFM もしくは 2g2 の増殖プロット。エラーバーが見られないポイントはシンボルマーク範囲内に収まっている。B: BICS による EGFP 発現におけるスクリーニング試験。NIAS-Mb-32 SFM クローニング株と Sf9 の微分干渉顕微鏡 (Differential interference contrast microscope (DIC)) 像、EGFP 蛍光、および Merge 画像。スケールバーは 150 μm 。

表 2-3. 図 2-1 A 増殖試験における各細胞株の 48 と 72 時間培養時の生細胞密度

細胞株	培養 48 時間	培養 72 時間
	平均生細胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL)	
NIAS-Mb-32 SFM	0.98	1.3
Sf9 (クローニング前の増殖試験) *	2.0	4.1
NIAS-Mb-32 2g2	4.1	9.7
Sf9 (クローニング後の増殖試験) *	3.6	7.6

* : Sf9 のクローニングを行っているわけではない。増殖試験時のコントロールとしてのデータ

表 2-4. 図 2-1 A 増殖試験における各細胞株の比増殖速度と倍加時間

細胞株	比増殖速度 (h^{-1})	倍加時間 (h)
NIAS-Mb-32 SFM	0.011	66
Sf9 (クローニング前の増殖試験) *	0.030	23
NIAS-Mb-32 2g2	0.035	20
Sf9 (クローニング後の増殖試験) *	0.032	22

* : Sf9 のクローニングを行っているわけではない。増殖試験時のコントロールとしてのデータ

細胞株の比増殖速度と倍加時間の算出は下記の通り行った (Konishi, & Horiuchi, 2005)。

$$\mu = \ln (X_e/X_b) / t$$

$$\text{倍加時間 (h)} = \ln 2 / \mu$$

t : 培養時間 (h)

X_e : 増殖後の細胞数

X_b : 増殖前の細胞数

μ : 比増殖速度 (h^{-1})

(2) Mouse interleukin-23 組換え baculovirus を用いた BICS による組換えタンパク質の生産能力と組換え baculovirus 生産能力の評価

(1) で得られた 2g2 と BICS を組み合わせた時の組換えタンパク質生産量について確認した。本実験では Sf9 において生産実績のある mouse interleukin-23 (mIL-23) を生産させる組換え baculovirus を用いて試験を行った。mIL-23 は分泌タンパク質でありアミノ酸配列を図 2-2 に示した。Sf9 と 2g2 を用いて mIL-23 を生産し、培養上清を western blotting (WB) にて解析した。本試験では感染させる細胞数と組換え baculovirus の量及び培養時間を揃えて行った。非感染細胞の増殖が確認されている中で、Sf9 由来の培養上清と 2g2 由来の培養上清中の mIL-23 を示すバンドは同様の発光強度であった (図 2-3)。つまり、BICS における mIL-23 の生産能力については、2g2 と Sf9 において同様の組換えタンパク質生産能力を有していることが示された。

次に、本組換え mIL-23 baculovirus を用いて Sf9 と 2g2 の組換え baculovirus の生産能力を確認した。組換え mIL-23 baculovirus を同じ細胞数の Sf9 と 2g2 に感染させて、72 時間後の培養上清中の baculovirus 量を測定した。測定キットには核酸量を qPCR にて定量する方法と感染細胞を抗 GP64 抗体にて免疫染色する方法で実施した。その結果、核酸量においては 2g2 に比べ Sf9 は 1.9 倍高い値であった (図 2-4 A)。一方、感染の有無を指標にした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、2g2 は Sf9 と同じ生産能力であることが明らかになった。表計算ソフトの Excel (Microsoft 社) にて独立な 2 群かつ母分散未知の条件で実施した t 検定の結果においても有意差は示さなかった (図 2-4 B)。

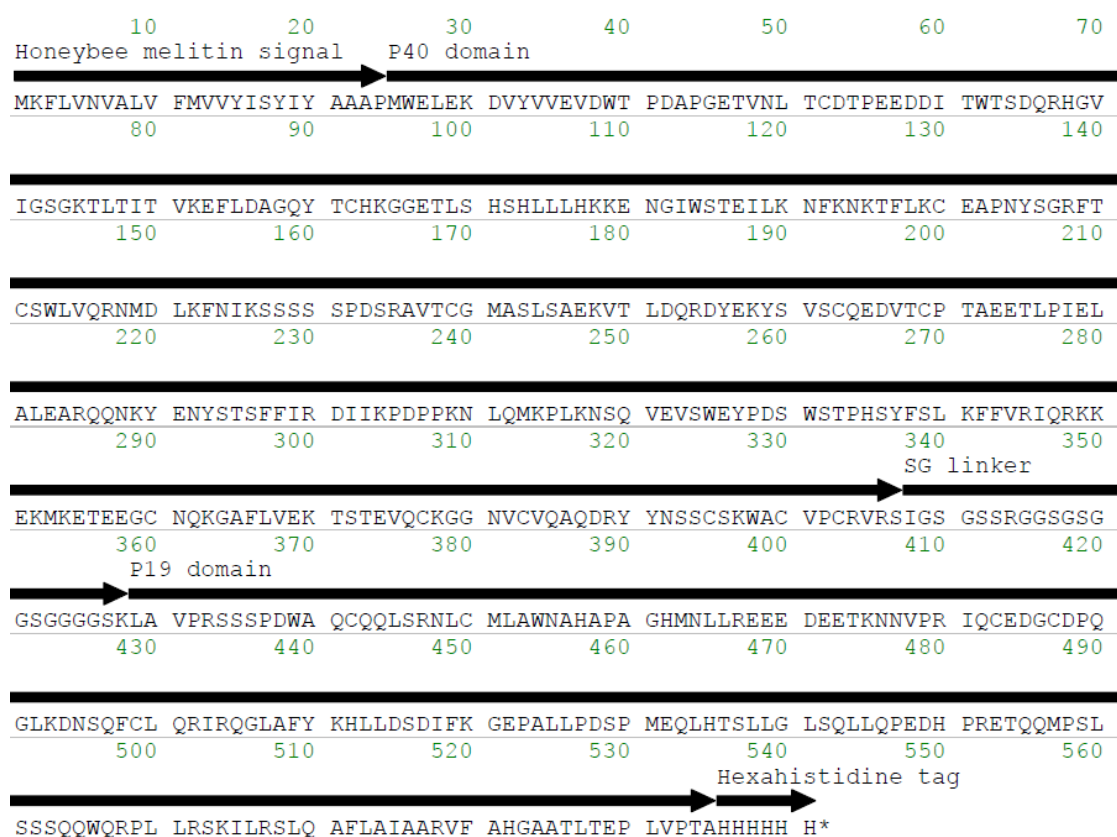


図 2-2. 発現試験に用いた mIL-23 (GenBank: LC710321) のアミノ酸配列

1-24 残基 : Honeybee melittin signal。25-337 残基 : P40 domain。338-358 残基 : SG linker。359-535 残基 : P17 domain。536-541 残基 : hexa-histidine。* : Stop codon。

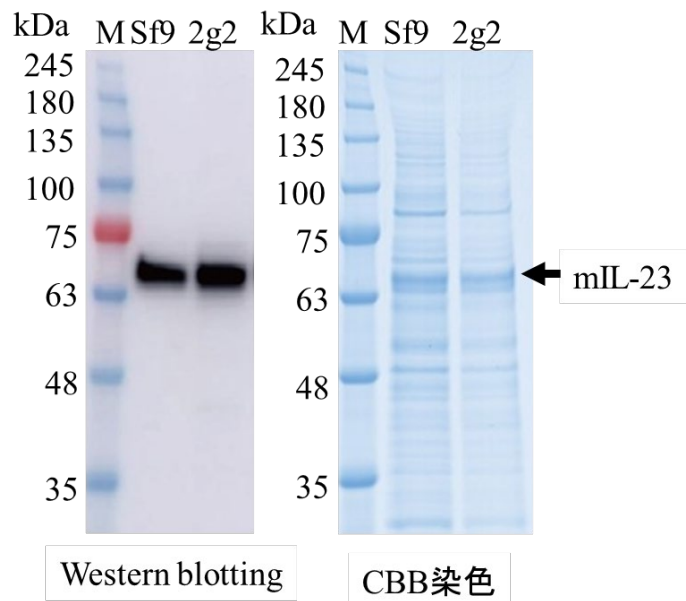


図 2-3. 培養上清中の mIL-23 の WB 解析と CBB 染色図

M : 分子量マーカー (WIDE-VIEWTM prestained protein size marker III)。Sf9 と 2g2 : 各細胞株由来 mIL-23 生産時の培養上清。黒矢印 : mIL-23 に相当するバンド。

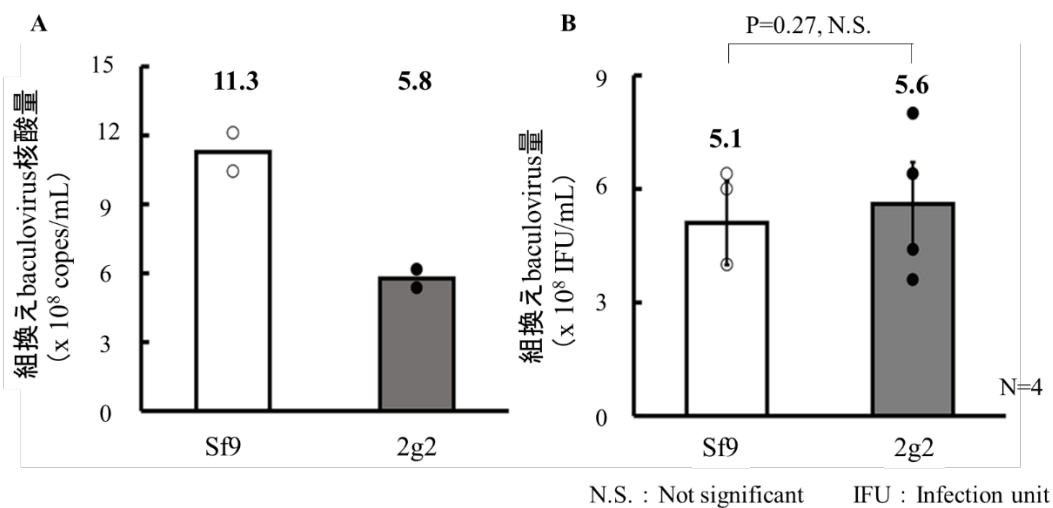


図 2-4. 組換え baculovirus の生産量の定量

A : qPCR 法による核酸ベースのウイルス定量値。B : 免疫染色法による感染細胞の計測による定量値。P 値は独立な 2 群における母分散が未知とする *t* 検定より算出。

(3) Sf-rhabdovirus の感染についての確認

2g2 における Sf-rhabdovirus の感染有無を確認するために、細胞及び培養上清から total RNA を取得した。Total RNA 量 (1 µg) を揃えて、Ma 等の報告で使用されていた primer set にて RT-PCR を行った (Ma *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2019)。Sf9 由来の Total RNA からは予想されるサイズのバンド (Set 1 : 800 bp、Set 2 : 730 bp、Set 3 : 826 bp) が検出された。一方、2g2 由来の total RNA からは検出されなかった。抽出コントロールとして行った Set 4 の予想されるバンドサイズ 277 bp は 2g2 と Sf9 の上清と細胞それぞれで検出された。そのため、2g2 は本アッセイにおいて Sf-rhabdovirus ゲノム配列が検出されないことが示された (図 2-5)。

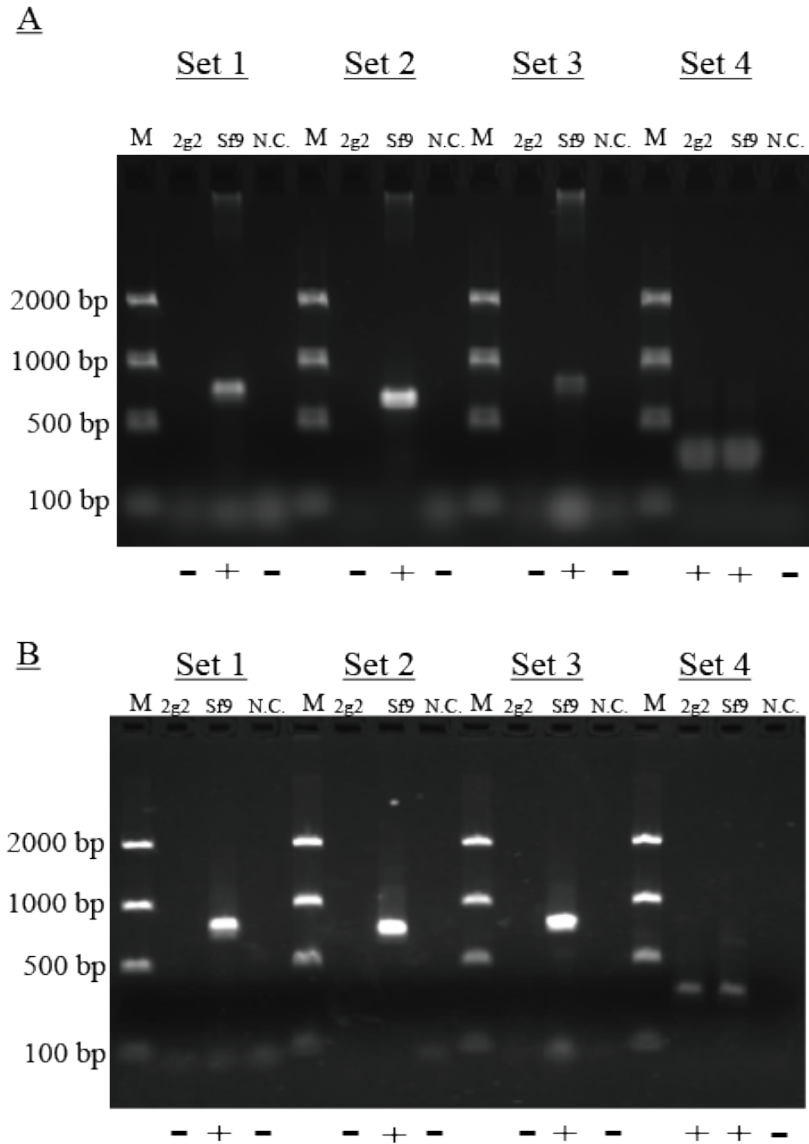


図 2-5. 昆虫細胞株における Sf- rhabdovirus 特異的配列の RT-PCR アッセイ

A：培養細胞ペレットから取得した total RNA を元に行った RT-PCR。B：培養上清から取得した total RNA を元に行った RT-PCR。レーン N. C.：ノーテンプレートネガティブコントロール。レーン M：Gene Ladder Fast 1 マーカー（ニッポンジーン）。+/- はバンド検出の結果。Set 1、2 と 3 は Sf-rhabdovirus を対象とした RT-PCR。Set 4 は *S. frugiperda* 28S ribosomal RNA gene を対象とした RT-PCR（抽出コントロール）。これらは表 2-1 の Set 番号と対応。

(4) 細胞の形態比較

微分干渉顕微鏡観察と生死細胞オートアナライザーVi-CELL XR による 2g2 及び Sf9 との形態比較を行った。Vi-CELL XR による細胞系の計測では 2g2 は約 20 μm に対して、Sf9 は 16 μm であり、1.25 倍の直径であった (図 2-6A)。細胞を静置培養した際の形態を微分干渉顕微鏡 (Differential interference contrast microscope (DIC)) で取得した (図 2-6B)。

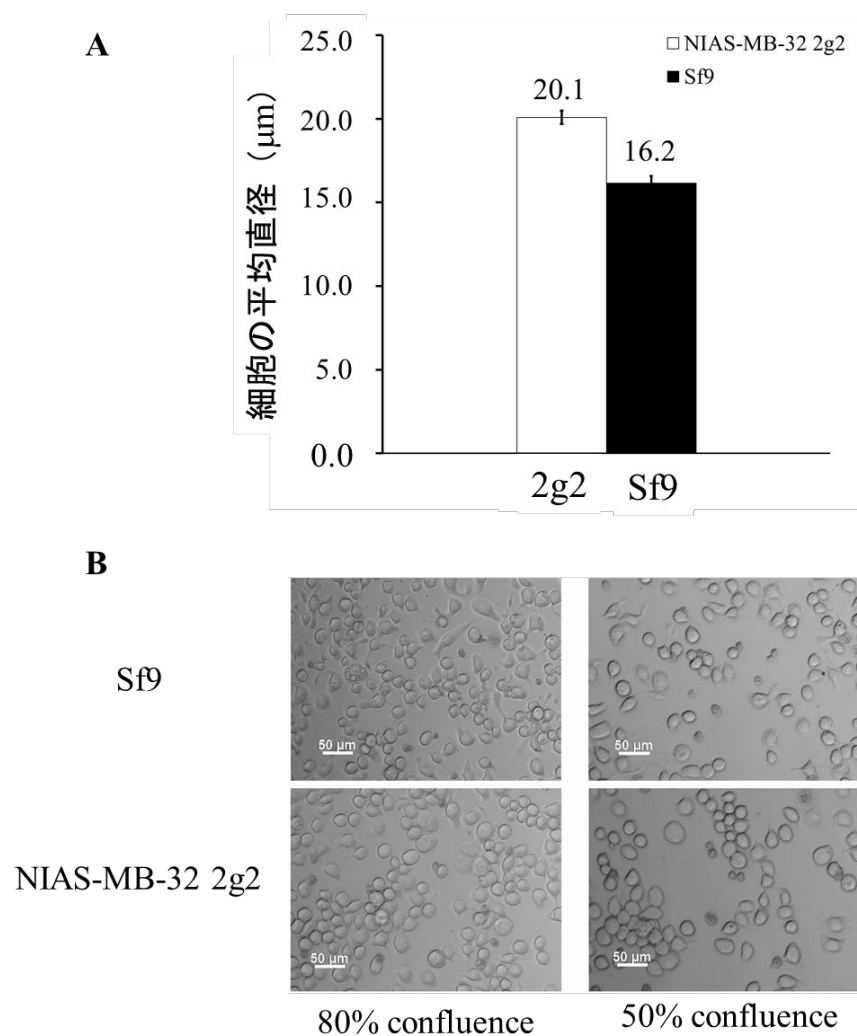


図 2-6. 2g2 と Sf9 の形態比較

A : Vi-CELL XR による細胞直径の比較。B : DIC 観察の比較。

第3節 考察

これまで、BICS の中でも AcMNPV が感染可能な組換えタンパク質生産用の宿主細胞として *S. frugiperda* 由来の Sf9、Sf21、*expresSF+* と *T. ni* 由来の High Five が知られている。上記以外で AcMNPV を用いた組換えタンパク質生産可能な認知度の高い細胞はない。上記の細胞株はバイオ医薬品の生産細胞株としても実績が報告され始めた。しかし、2014 年に Ma 等は Sf9 に single strand RNA (-) ウイルスが感染していることを発見し、この RNA ウイルスを Sf-rhabdovirus と呼称した (Ma *et al.*, 2014)。Sf-rhabdovirus の発見が問題となった理由は、本ウイルス遺伝子が医薬品製造株からも検出されたためである。ヒト用医薬品の登録に関する技術要件の調和に関する国際会議として 1990 年に設立された International Conference Harmonization (ICH) が発行しているガイダンスには、バイオ医薬品製造においては、ウイルス感染が生じている細胞株を使用する際は、製造する製品のベネフィット、必要性を十分に説明することとされている (ICH, 1998a, 1998b)。そのため、Sf-rhabdovirus の感染の有無は非常に重要な焦点となった。一方、BTI-Tn-5B1-4 によって生産した組換えタンパク質を診断用に用いると修飾糖鎖の影響により擬陽性が生じる可能性が報告されている (Hancock *et al.*, 2008)。既存の昆虫細胞でも上手く成功している場合もあるが、生産能力や糖鎖修飾能の改良が求められている。本章では、上記の問題を解決するために、*M. brassicae* 由来の NIAS-Mb-32 から組換えタンパク質生産能力がある細胞株の樹立を試みた。まず、血清を含む培地による静置培養から攪拌培養に移行するために、無血清培地への馴化を行い、増殖性能を確認したが、Sf9 に比べ増殖性能が劣った。これは無血清培地に細胞が対応出来ていないことや種々の形態を持った細胞が混合している状態が原因だと考え、限界希釈法により高増殖性能を示す細胞株の単離を試みた。昆虫細胞は無血清培地で限界希釈

による 1 cell/well で播種すると、細胞が死滅する性質があるため、10% BM-Condimed H1 含有無血清培地において 200 cells/well で播種を行った。200 cells/well で播種すると大多数は死滅してしまうが、1 cell だけ生存する well が生まれた。詳細なメカニズムは不明だが、BM-Condimed H1 に含まれている種々のサイトカインなどの増殖因子の配合に効果があると推察している。限界希釈法により増殖が確認されたクローンの内、増殖が速いクローン細胞に対して EGFP を発現させる組換え baculovirus を感染させ、EGFP の蛍光強度を比較した。Sf9 と比較して遜色ない蛍光強度を示したクローン 2g2 を取得した。以降、2g2 に注力して研究を進めた。2g2 の増殖性能を評価するために、再度培養試験を行い、増殖速度と倍加時間を算出すると、同時に同条件（初期細胞数、培地、温度）で培養した Sf9 と同様の倍加時間（2g2：20 時間、Sf9：22 時間）を示した。顕微鏡観察において、NIAS-Mb-32 SFM は形態が異なる細胞が観察される点や無血清培地に馴化しきれていない細胞が混在していると推察されるヘテロな集団であった。ヘテロな細胞集団から、サプリメントを加えた刺激を行いながら、クローニングすることで、適切な選択圧が掛かり、増殖性能に優れた 2g2 が分離され、増殖性能が改善されたと考えた。次に、2g2 の BICS における組換えタンパク質生産能力を評価するために、Mouse Interleukin-23（mIL-23、分子量：60 kDa、分泌タンパク質）を用いて組換えタンパク質の生産を行い、生産量を WB によって確認した。コントロールとして Sf9 を用いて生産した培養上清と同様のバンド強度を示し、mIL-23 の生産量においては生産能力に差が無いことが示された。次に、BICS においては高いウイルス力価を有した組換え baculovirus 溶液の生産も重要になるため、組換え baculovirus の生産能力についても評価した。宿主細胞におけるウイルスの生産はウイルス自身のゲノム DNA の複製とウイルス粒子を構成するタンパク質合成が迅速かつ大量に行われ、上

手く宿主細胞内で組立てられて、初めて感染性のあるウイルス粒子として細胞外に放出される。そのため、2g2 においてもウイルスゲノムの核酸合成の評価と、実際にどの程度の感染性 baculovirus が細胞から放出されているかを評価する必要がある。ウイルスの複製過程を踏まえ、組換え baculovirus の核酸量と力価（plaque forming units (PFU)）を定量した結果、組換え baculovirus の核酸量は Sf9 の方が 2 倍弱高値であったが、PFU 値は同程度の数値を示し、有意差は示さなかった。そのため、2g2 では組換え baculovirus の核酸合成と組換え baculovirus の構成因子の合成が最適な比率で行われており、効率よく感染性 baculovirus としての複製が行われ、細胞から出芽していることが示された。

2g2 は Sf9 に対して細胞直径が 1.25 倍であることを示した。細胞内のオルガネラが大きいのか、浸透圧を調整する膜タンパク質の発現量や性能に違いがあることで、細胞のサイズに影響があることが示唆された。細胞直径の大きいことが、組換えタンパク質の発現量や組換え baculovirus の生産能力に対してどの程度影響しているかは不明である。

Sf-rhabdovirus 感染の有無については Ma 等（2014、2019）が調査した際の primer 配列を用いて確認した。本試験では 2g2 由来の Total RNA からは sf-rhabdovirus 由来のバンドは非検出であった。Total RNA 1 µg と多い量からの RT-PCR を行っている点に加えて、2g2 も Sf-rhabdovirus に感染する点を踏まえると、本試験の結果は Sf-rhabdovirus 非感染であることを示す結果であると考えられる。

以上のことから、Sf-rhabdovirus 非感染であり、増殖性能、組換え mIL-23 タンパク質生産能力と組換え baculovirus の生産能力が Sf9 と同様の細胞株（2g2 細胞株）を樹立できたと考えた。

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

前章において、2g2 の増殖能力や BICS に用いることの可否について検討し、組換えタンパク質の生産能力や組換え baculovirus の生産能力について考察した。

本章では前章で樹立した 2g2 を用いて、組換えタンパク質として生産が期待される *L. polyphemus* 由来の Factor G (以下 LpFactor G) の生産を検討した。LpFactor G はヘテロダイマータンパク質であるため、BICS の長所でもある複合タンパク質の生産能力についても確認した。加えて、2g2 を用いて実際に望まれている組換えタンパク質を早期に生産することで、2g2 が実際に利用できるかを判断するため、本章で検討を行った。Limulus Amebocyte Lysate (LAL) は *L. polyphemus* の血球抽出物から調製されるライセート試薬を指し、Lipopolysaccharide (LPS) などのエンドトキシンを測定する試薬と、(1→3)-β-D-glucans (以下 BDG と記載) を測定する臨床診断薬がある (図 3-1)。BDG は深在性真菌症のマーカーであり (Obayashi, 2017)、深在性真菌症は抵抗力の弱った状態、例えば、臓器移植後に免疫抑制剤を投与され、免疫力が低下している患者が罹る病気であり、患者はしばしば極めて重篤な病態となる。深在性真菌症の起因菌の代表例としては、*Candida* 属、*Aspergillus* 属、*Cryptococcus* 属が挙げられ、BDG を細胞壁に有している。臨床診断の分野では、血中の BDG 量を測定することで、深在性真菌感染症の診断指標としている。

エンドトキシンを測定する試薬は Factor C、Factor B、Proclotting enzyme (PCE) の三つ因子と検出用の基質で構成されている (図 3-1)。エンドトキシンは発熱性物質として知られており、試験法については日本薬局方にも収載されている。上記のように、*L. polyphemus* の血液から採取した血球は、人類の公

衆衛生に貢献している。しかし、自然に放流された採血後のカブトガニは 30% 死んでいるという報告 (Smith *et al.*, 2020) もあることから、環境保護・動物愛護の観点において、カブトガニの血液を使用する試薬から組換え体を使用した試薬への移行が望まれている。さらに、生物由来原料であるため、ロット間の間差が大きく、製造が非常に難しいため、組換えタンパク質のみで再構成された試薬が望まれている。この 2 点を解決するために、エンドトキシン測定系では、組換えタンパク質を用いた検出系・試薬の開発が行われており、Ding 等が報告しているように Factor C のみで構成された「PyroGnse」が LONZA から販売されている (Ding, & Ho, 2010)。近年、3 因子構成の試薬 PyroSmart NextGen™ (生化学工業) と PYROSTAR™ Neo (富士フイルム和光純薬) が販売され、エンドトキシン測定試薬では脱カブトガニ採血が進んでいると言える。一方、深在性真菌症の診断薬に用いられている Factor G については組換えタンパク質の生産に関する研究がほとんど行われていない。Factor G はヘテロダイマータンパク質であり、BDG と結合する Factor G α subunit とプロテアーゼ活性を有する Factor G β subunit からなる (Muta *et al.*, 1995; Iwanaga, 2007)。Iwanaga の研究では日本カブトガニとされる *Tachypleus tridentatus* が研究対象である。我々はアメリカカブトガニ (*L. polyphemus*) を対象としている。これは、試料の入手が可能な点や製品に用いているカブトガニ種との差異が生じないようにするためである。以下から、*L. polyphemus* Factor G α subunit は LpFactor G α 、*L. polyphemus* Factor G β subunit は LpFactor G β と記載する。LpFactor G α については NCBI のデータベースに GenBank : AB547712 として登録され、概ねの配列構造は既知であるが、機能は十分に確認されていない。一方、LpFactor G β については報告されていない。そこで、本章では LpFactor G α と β 遺伝子のクローニングを行い、組換えタンパク質として機能性のある LpFactor G 遺伝子配列を取得した。加え

て、前章で樹立した 2g2 を用いて、機能性を有した LpFactor G の生産について検討した。

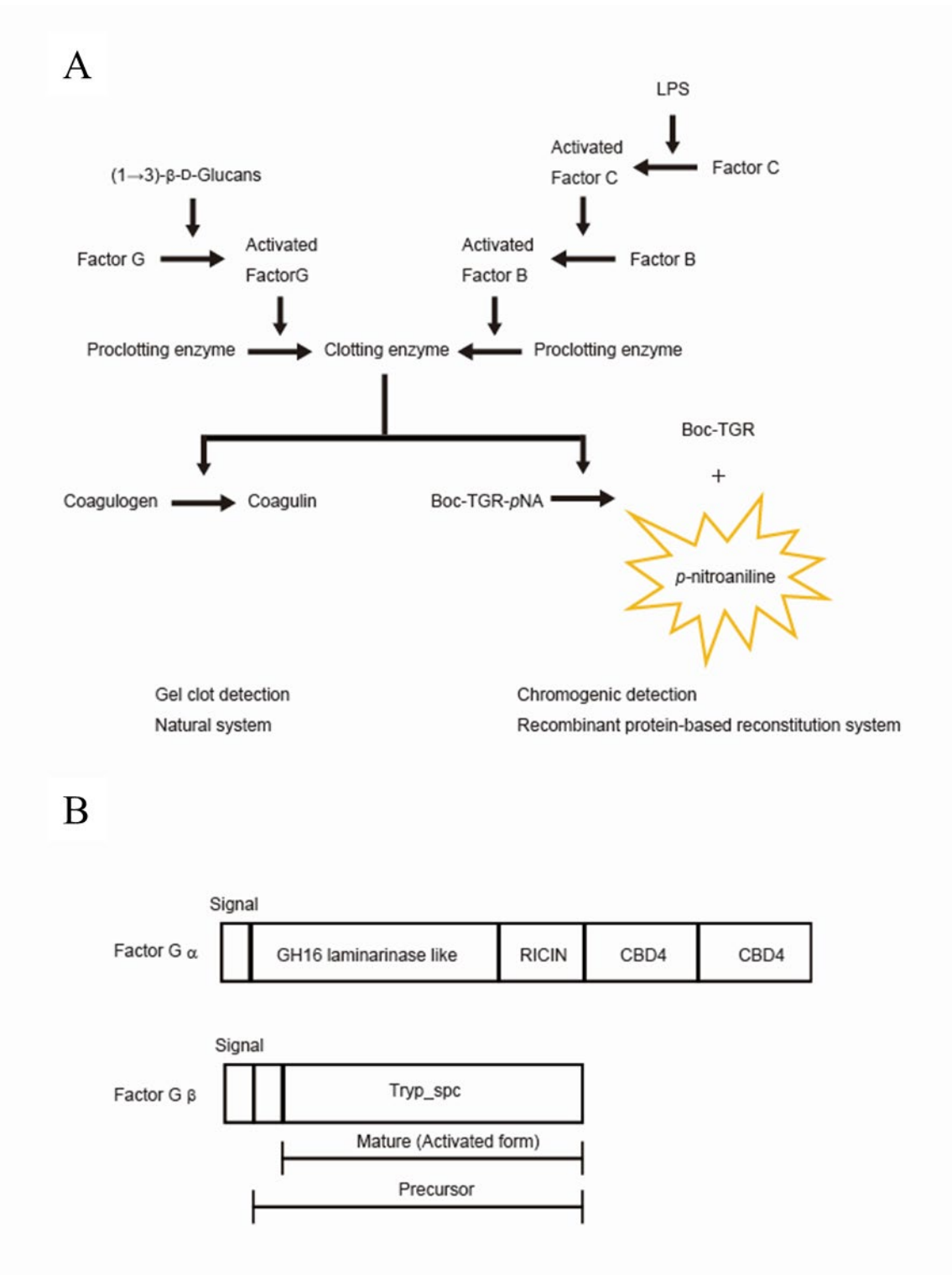


図 3-1. カプトガニ採血を基にしたライセート試薬の反応機構とドメイン構造

A：ライセート試薬の反応機構、B：カプトガニ由来 Factor G のドメイン構造、LPS：Lipopolysaccharide。Signal：分泌シグナル。GH16 laminrinase like：様々な glucan、galactans 中の β -1,4 もしくは β -1,3 グリコシド結合上で活性化し、グリコシド加水分解を起こす GH16 laminrinase に類似性ドメイン。RICIN：リシン型 β -トレフォイルであり糖鎖結合関連ドメイン。CBD4：セルロース結合ドメイン 4、BDG に対して結合するドメイン。Tryp_spc：トリプシンに類似したセリンプロテアーゼドメイン。

第 1 節 材料と方法

(1) カプトガニ血球細胞からの LpFactor G α と β 遺伝子の取得

RNA 抽出用試薬 ISOGEN（富士フイルム和光純薬）を用い、その製品付属のプロトコルに従って、*L. polyphemus* 血球細胞（Lp 血球細胞）（富士フイルム和光純薬）より total RNA を回収した。まず、すり鉢内で Lp 血球細胞を液体窒素で凍結後、すり潰し、破碎した。そこに ISOGEN（富士フイルム和光純薬）を加え、破碎物を懸濁させ、RNA を抽出した。得られた抽出液をチューブに移し、室温で 5 分間インキュベートした後、40%になるようにクロロホルムを添加した。15 秒攪拌後、27 度で 3 分間反応させ、15 分間遠心分離（12000 \times g、4 度）し、水相を回収した。回収した水相にイソプロパノール 3.5 mL を加え、攪拌後、10 分間で反応させた（27 度）。再度、10 分間遠心分離（12000 \times g、4 度）し、沈殿物を回収した。得られた沈殿物を 70%エタノールで洗浄し、total RNA を取得した。得られた total RNA を、70 μ L 滅菌水に溶解し、吸光度（260 nm）を測定した。Total RNA の濃度は 920 ng/ μ L であり Lp 血球細胞 から 64 μ g の total RNA が得られた。取得した total RNA を TruSeq Stranded mRNA sample Prep kit（イルミナ株式会社）を用いて、製品の仕様書に従って、シーケンスライブラ

リーを作製した。作製したシーケンスライブラリーを、次世代シーケンサーである HiSeq 2500 を用いた分析に供した。得られたシーケンスデータからアダプター配列とクオリティ値の低い塩基をトリム処理した後、Trinity ソフトウェアを用いた常法によりアッセンブルを行った。Trinity ソフトウェアはイルミナの NGS 機器から読み取られる RNA-Seq データからの転写産物配列データに対して、参照配列を用いずに配列を繋ぎ合わせる (*de novo assembly*) ソフトである (Grabherr *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2013)。その後、アッセンブル処理で得られたコンティグ配列 (一定の大きさの配列長になった配列) の ORF の予測を行い、ライブラリーのシーケンスがコードするアミノ酸配列を決定した。

次いで、上記アッセンブルで得られたアミノ酸配列ライブラリーに対して、*T. tridentatus* Factor G α subunit (TtFactor G α のアミノ酸配列 (GenBank : BAA04044.1))、もしくは *T. tridentatus* Factor G β subunit (TtFactor G β のアミノ酸配列 (GenBank : BAA04045.1)) との相同検索 (blastp) を行った。その結果、TtFactor G α との相同性を有した配列は 5' 末端側のみから構成された配列であり、ライブラリー内に全長を構築している配列が無いことが判明した。そのため、LpFactor G α は 5' 側の配列のみ取得した。一方、TtFactor G β との相同性がある配列は 2 つヒットし、どちらも cDNA 全長をコードしている配列であった。そのため、LpFactor G β は 2 配列を取得した (LpFactor G β i2 (GenBank : LC726265)、LpFactor G β i3 (GenBank : LC726266))。

得られた核酸配列情報をベースに LpFactor G α では 3'RACE 用の特異的 primer を設計し、SMARTerTM RACE 5'/3' Kit (Takara Bio Inc.) にて遺伝子クローニングを実施した。PCR には製品に付属されている高正確性 PCR 用酵素 SeqAmp DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) を用いた。その結果、2 つの LpFactor G α 配列を取得した : LpFactor G α A (GenBank : LC726258)、LpFactor G α B

(GenBank : LC726259)。LpFactor G α A と B のアミノ酸配列を NCBI の Blastp を通してドメイン検索を行い、配列解析ソフト Genetyx14 を用いて N-型糖鎖修飾サイトの検索を行った。さらに、LpFactor G α 配列間においてアライメントした解析結果をまとめて図 3-3 に示した。LpFactor G β は NGS によって得られた 2 配列の両末端で Fw 用 primer と Rv 用 primer を設計し、Lp 血球細胞由来 total RNA を鋳型に作製した cDNA ライブラリーから LpFactor G β の遺伝子クローニングを実施した。その結果、5 つの配列を取得した : LpFactor G β 2 (GenBank : LC726260)、LpFactor G β 5 (GenBank : LC726261)、LpFactor G β 6 (GenBank : LC726262)、LpFactor G β C1 (GenBank : LC726263)、LpFactor G β C2 (GenBank : LC726264)。LpFactor G α と同様にドメイン検索や N-結合型糖鎖修飾サイト検索、各配列のアライメントを行い、図 3-4 に示した。

(2) 組換え LpFactor G α 、 β baculovirus の作製

組換え baculovirus 作製のトランスファーベクターは以下のように取得した (図 3-2)。(1) で得られた遺伝子配列をアミノ酸配列に変換し、変換したアミノ酸配列の C 末端側に PA tag 配列 (GVAMPGAEDDVV) と hexa-histidine tag を付加した。続いて、開始コドンから終止コドンまでを昆虫細胞用のコドン配列に最適化した。PA tag はヒト・ポドプラニンが有する血小板凝集活性のドメイン配列を利用したペプチドタグを基に開発されたアフィニティータグシステムである (Fujii *et al.*, 2014)。最適化配列を遺伝子合成し、pIEx-Bac1 vector (Novagen 社) の *Nco* I サイトに挿入したトランスファーベクターを購入した (遺伝子合成からベクターへのクローニングまでを Genewiz 社で行った)。直鎖化された AcMNPV ゲノム 90 ng とトランスファーベクター 2 μ g を ScreenFectTMA plus にて Sf9 細胞 (25 cm² T-フラスコ) に co-transfection して 7 日間培養後、上

清を回収し組換え LpFactor G α と組換え LpFactor G β の baculovirus を作製した。

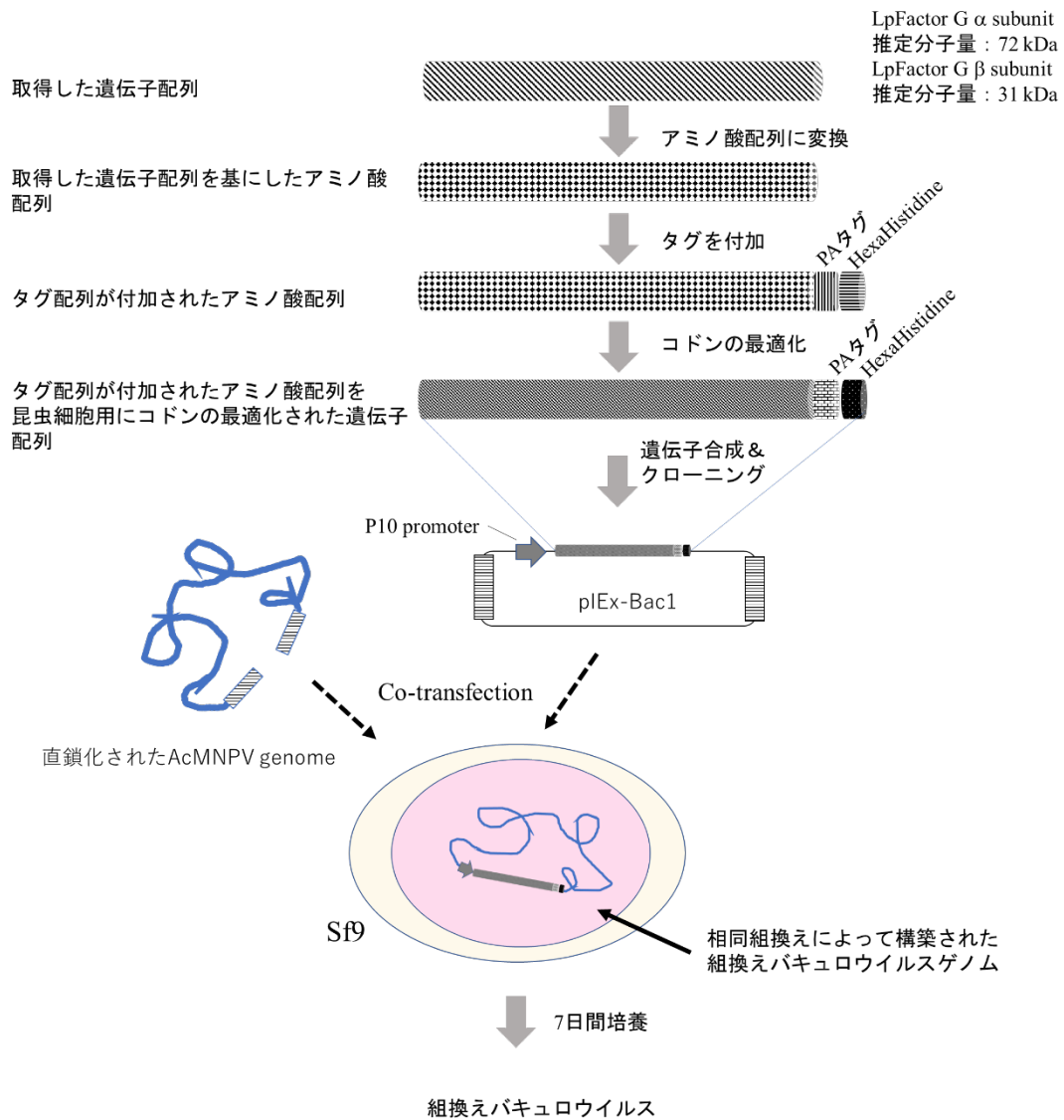


図 3-2. 遺伝子合成及び組換え baculovirus の作製

(3) 組換え LpFactor G α 、 β の発現確認及び組換え LpFactor G α Bの取得

2g2 を 50 mL PSFM-J1 が入ったベントキャップ型の 125 mL 三角フラスコに 1.5×10^6 cells/ml で播種した。前述で作製した組換え LpFactor G α 及び β baculovirus を別々の培養液に 250 μ L 添加した (VOI : 1/200)。130 rpm、27 度で 3 日間培養した後に、細胞培養液を 1 mL 回収し、 $12000 \times g$ で 2 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。回収した培養上清と還元剤入り SDS-Sample buffer を混合し 95 度、3 分間処理した。処理済みサンプルを 10-20%の SDS-PAGE ゲルに供し電気泳動を 2 枚分を行った。電気泳動後、1 枚は CBB 染色を行い、もう一枚は ClearTrans[®] SP PVDF 膜 (富士フイルム和光純薬) に転写した。転写膜を 3%スキムミルクで 1 時間反応を行いブロッキング後、 $1 \times$ PBS-T にて 10000 倍希釈した Anti-PA tag monoclonal antibody、peroxidase conjugated (富士フイルム和光純薬) で 1 時間反応させた。ImmunoStar[®] Zeta (富士フイルム和光純薬) で発光させ、ImageQuant LAS (Cytiva) で検出した。組換え LpFactor G α B については、別途同様の方法にて 800 mL 容量で培養し (2 L 三角フラスコ)、培養液を $5000 \times g$ で 30 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。上清を 0.22 μ m ポリエーテルスルホンフィルターに通し、濾過液を 1 mL cOmplete[™] his-tag purification column (Roche) に通した。Binding buffer (20 mM phosphate buffer (pH7.4)、500 mM NaCl、10 mM imidazole) を 10 mL 通して洗浄後、elution buffer (20 mM phosphate buffer (pH7.4)、500 mM NaCl、500 mM imidazole) にて溶出を行った。精製時の流速はすべて 1.0 mL/min で行った。溶出液は PD-10 カラムでカップリングバッファー (50 mM NaHCO₃、250 mM NaCl) に置換して保存した。

(4) 組換え LpFactor G α B結合ビーズを用いた培地中からの反応性 BDG の除去

CNBr activated sepharose 4FF (Cytiva 社) 4 mL net をカップリングバッファー (50 mM NaHCO₃、250 mM NaCl) にて平衡化し、組換え LpFactor G α B 約 16 mg 添加した。4 度で 72 時間攪拌し、組換え LpFactor G α B を CNBr activated sepharose 4FF に固定化した。カップリングバッファー (8 mL) で 2 回洗浄後、1 M Tris-HCl (pH8.0) を 8 mL 加えて、未反応残基のブロッキングを行い、最終的に 10 mM MOPS buffer (pH 7.2) に懸濁した。作製したビーズ (組換え LpFactor G α B 結合 CNBr-activated Sepharose 4FF) を PSFM-J1 培地に 0.5 mL 添加し、27 度で 4 時間、200 rpm で攪拌した。攪拌後、0.22 μ m ポリエーテルスルホンフィルターに供して、滅菌とビーズの除去を行い、ろ過液を BDG 除去培地とした。BDG 除去培地は β グルカンテストワコー (富士フイルム和光純薬) にて BDG 濃度を測定した。測定方法は添付のプロトコルに従って実施した。

(5) 組換え *L. polyphemus* Proclotting enzyme の調製

L. polyphemus Proclotting enzyme (LpPCE) (GenBank : XP_013783518.1) の C 末端に hexa-histidine を連結したアミノ酸配列からコドンの最適化した配列を作成し、GENEWIZ 社で遺伝子合成と pIE4 の *Nco* I サイトへのクローニングを実施し、入手した。入手したプラスミドを Sf9 にトランスフェクションすることで、一過性発現を行った。培養上清を cOmplete™ his-tag purification column (Roche) に供することにより精製し、試験用の精製された組換え LpPCE (rLpPCE) を準備した。

(6) 組換え LpFactor G α と LpFactor G β の組合せによる BDG 依存性プロテアーゼ活性の確認試験

2g2 を 50 mL BDG 除去培地が入った 125 mL 三角フラスコに 1.5×10^6 cells/ml で播種した。前述で作製した組換え LpFactor G α 及び β baculovirus を同じ培養液に添加した（組換え LpFactor G α は VOI : 1/200、組換え LpFactor G β は 1/50）。130 rpm、27 度で 3 日間培養した後に、細胞培養液を 1 mL 回収し、 $12000 \times g$ において 2 分間の遠心分離を行い、上清を回収し、活性評価まで、-80 度で保管した。組換え LpFactor G α と β 共生産培養の上清を用いて表 3-1 に従い反応溶液を調製し、37 度で 180 分反応させた。BDG の代表物質として 5 個のグルコースユニットからなる (1 \rightarrow 3)- β -D-glucose 骨格に (1 \rightarrow 6)- β -D-glucose 分岐が 2 個からなる Lentinan（以下 LNT と記載、味の素）を LpFactor G 活性化物質として用いた。4-(4-Aminophenyl) benzoic acid (APB) はプロテアーゼ阻害剤であり、*p*-nitroaniline 濃度上昇がプロテアーゼによる反応であることを判断するために用いた。MOPS (3-(N-morpholino) propane sulfonic acid) は緩衝液として用い、MgSO₄ と CaCl₂ はプロテアーゼ活性の補因子、NaCl は塩濃度の調製、注射用水で溶液量の調製、rLpPCE は LpFactor G によって活性化され、プロテアーゼ活性を発現する因子である。rLpPCE のプロテアーゼ活性によってペプチド-*p*NA 合成基質 (Boc-TGR-*p*NA (Boc : *tert*-butoxycarbonyl、TGR : Thr-Gly-Arg のアミノ酸配列、*p*NA : *p*-nitroanilide) (富士フイルム和光純薬) が切断され、*p*-nitroaniline が遊離される。マイクロプレートリーダー ELx808 (富士フイルム和光純薬) にて遊離された *p*-nitroaniline の検出波長である 405 nm の吸光度増加を検出し、*p*-nitroaniline 濃度に変換することで、プロテアーゼ活性を評価した。*p*-nitroaniline 濃度への変換は取得した吸光度を *p*-nitroaniline のモル吸光係数 (9920 [L/(mol⁻¹ cm⁻¹)] (Maeda, Shimizu, & Hatanaka, 2009) と well に 0.2 mL 入れたとき

の高さ（0.55 cm）を元に、*p*-nitroaniline 濃度を算出した。

表 3-1. BDG 依存性プロテアーゼ活性の反応組成

構成試薬	LNT+	LNT-	APB+	最終濃度
1 M MOPS pH7.9	20 μ L	20 μ L	20 μ L	100 mM MOPS pH7.9
1 M MgSO ₄	10 μ L	10 μ L	10 μ L	50 mM MgSO ₄
10 mM CaCl ₂	10 μ L	10 μ L	10 μ L	0.5 mM CaCl ₂
15 mM NaCl	20 μ L	20 μ L	20 μ L	1.5 mM NaCl
注射用水	40 μ L	60 μ L	20 μ L	
5 mM Boc-Thr(T)-Gly(G)-Arg(R)-pNA	20 μ L	20 μ L	20 μ L	0.5 mM Boc-Thr(T)-Gly(G)-Arg(R)-pNA
LNT溶液	20 μ L	0 μ L	20 μ L	3.5 pg/mL LNT溶液
76 pg/mL rLpPCE溶液	10 μ L	10 μ L	10 μ L	3.8 pg/mL rLpPCE溶液
25 mM 4-(4-Aminophenyl) benzoic acid (APB)	0 μ L	0 μ L	20 μ L	2.5 mM APB
LpFactor G共生産培養上清	50 μ L	50 μ L	50 μ L	
反応溶液量の合計	200 μ L	200 μ L	200 μ L	

LNT 溶液：Lentinan 溶液（味の素）。各反応は N=3 で実施した。APB：4-(4-Aminophenyl) benzoic acid。

(7) Lentinan（LNT）による濃度依存性確認試験

組換え LpFactor G α と組換え LpFactor G β 共生産培養の上清を用いて表 3-1 に従い、反応溶液を調製した。本試験においても BDG の代表物質として LNT を用いて試験を行った。LNT 濃度は 35、3.5、0.35、0.035 pg/mL の 4 点で行った。各濃度において N=3 で実施し、検出については前述（6）と同様に行った。

第2節 結果

(1) *L. polyphemus* 血球細胞由来 total RNA からの LpFactor G 遺伝子の単離

これまで、TtFactor G α 、 β と LpFactor G α の遺伝子配列は報告されている (Seki *et al.*, 1994; Yoneda, & Kurokawa, 2011) が、LpFactor G β については報告されていない。また取得された遺伝子配列を用いた組換えタンパク質によるグルカン依存的な凝固反応カスケードの *in vitro* における再構築についても報告はない。既知の配列は十分な機能検証が行われていないため、LpFactor G α と LpFactor G β の遺伝子クローニングから行った。Lp 血球細胞由来 total RNA から次世代シーケンス (Next Generation Sequencing (NGS)) を行った。得られた配列は *T. tridentatus* 由来の Factor G α と β 配列に対してアライメントを行った。解析の結果、LpFactor G β は2配列取得した。LpFactor G α は3'末端側の重複配列が原因で断片をつなぎ合わせることが出来ず、全長の cDNA 配列を取得できなかった。部分配列として5'末端側の配列を取得し、追加で3'-RACEを行い2つの全長配列を取得した (LpFactor G α AとLpFactor G α B)。取得した2配列と GenBank : AB547712 の配列、*T. tridentatus* 由来の Factor G α 配列を MAFFT (アミノ酸や核酸配列を多重にアライメントするプログラム) によってアライメントし、相同性を確認した。LpFactor G α AとAB547712は98.7%の相同性を示した。LpFactor G α BとLpFactor G α Aは90.3%、LpFactor G α BとAB547712は89.4%の相同性を示した。今回取得した2配列とAB547712は完全一致の配列ではないことが判明した (図 3-3、表 3-2)。

取得した LpFactor G β の2配列は *in silico* における仮想配列であるため、開始コドンを含む Fw primer と終始コドンを含む Rv primer を用いて Lp 血球細胞由来 total RNA から作製した cDNA ライブラリーに対して PCR を行い、遺伝子ク

ローニングを行った。その結果、追加で 5 つの配列を取得し、NGS で取得した配列と合わせて 7 つの配列が確認された（図 3-4、表 3-3）。

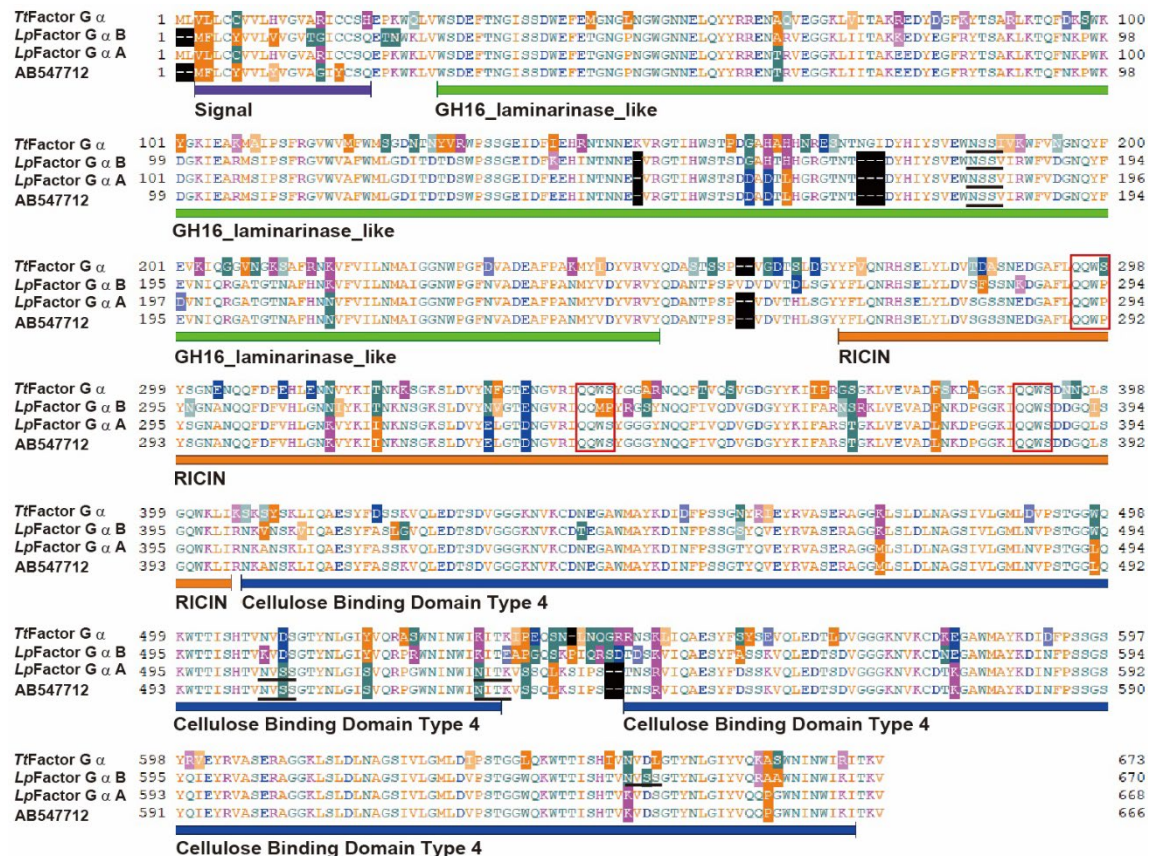


図 3-3. Factor G α 4 配列におけるアミノ酸配列の相同性比較

Signal : 分泌シグナル。GH16_laminarinase_like : ラミナリナーゼはラミナリン、カードランなどの(1→3)- β -D-glycosidic bond を加水分解するグリコシルヒドロラーゼファミリー16 メンバー。Cellulose binding domain type 4 : BDG 結合ドメイン。Ricin : Ricin-type beta-trefoil lectin domain-like。赤枠 : QQWP モチーフ。アンダーバー : GENETYX14 を用いて検索した N-結合型糖鎖修飾予測部位。

表 3-2. Factor G α 4 配列におけるアミノ酸配列間の相同性 (%)

Clone name or GenBank accession number	LpFactor G α A	LpFactor G α B	AB547712	D16622
LpFactor G α A	-	-	-	-
LpFactor G α B	90.3	-	-	-
AB547712	98.7	89.4	-	-
D16622	79.0	79.3	80.1	-

AB547712 : *L. polyphemus* 由来の Factor G α subunit の GenBank accession number
(既知配列)

D16622 : *T. tridentatus* 由来の Factor G α subunit の GenBank accession number

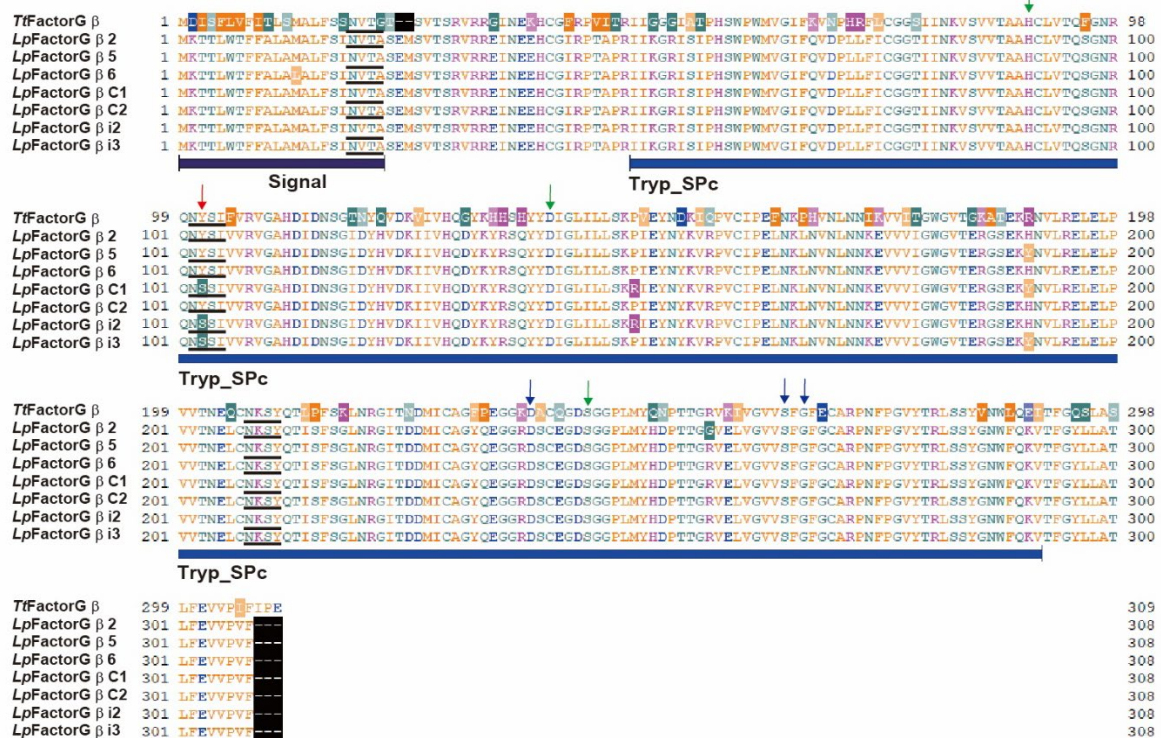


図 3-4. Factor G β 8 配列におけるアミノ酸配列の相同性比較

Signal : 分泌シグナル。Tryp_SpC : トリプシンに類似したセリンプロテアーゼドメイン。緑矢印 : プロテアーゼ活性関連アミノ酸残基。青矢印 : 基質結合関連アミノ酸残基。赤矢印 : WB の結果において、バンドサイズとの差異とアミノ酸変異に相関がある部位。アンダーバー : GENETYX14 を用いて検索した N-結合型糖鎖修飾予測部位。

表 3-3. 各 Factor G β 8 配列におけるアミノ酸配列間の相同性 (%)

Clone name or GenBank accession number	2	5	6	C1	C2	i2	i3	D16623
2	-	-	-	-	-	-	-	-
5	99.4	-	-	-	-	-	-	-
6	99.4	99.4	-	-	-	-	-	-
C1	98.7	99.4	98.7	-	-	-	-	-
C2	99.7	99.7	99.7	99.0	-	-	-	-
i2	99.0	99.0	99.0	99.7	99.4	-	-	-
i3	99.0	99.7	99.0	99.7	99.4	99.4	-	-
D16623	73.1	73.4	73.1	72.8	73.4	72.6	73.1	-

D16623 : *Tachypleus tridentatus* 由来の Factor G β subunit の GenBank accession number

(2) 組換え LpFactor G α と β の単独生産試験

LpFactor G α A と LpFactor G α B をコードした組換え baculovirus を作製し、2g2 に感染させることで、生産確認を行った。その結果、LpFactor G α A と LpFactor G α B 共に生産が確認された。また、LpFactor G α A は 1-19 残基のシグナルペプチドを除くと 647 のアミノ酸配列からなり、推定分子量は約 72 kDa、LpFactor G α B は 1-18 残基のシグナルペプチドを除くと 651 残基からなり、推定分子量は約 73 kDa となる。生産した培養上清を解析した WB の結果は LpFactor G α A のバンドの方が LpFactor G α B のバンドより高分子側に検出された (図 3-5)。次に LpFactor G β 7 配列をそれぞれコードした組換え baculovirus を作製し、LpFactor G α と同様に生産確認を行った。LpFactor G β は 1-23 残基のシグナルペプチドを除くと 283 残基からなり、アミノ酸配列からの推定分子量は約 31 kDa となる。WB の結果では推定分子量の大きさより、高分子量側にバンドが確認された。さらに、Clone 2、4、6、C2 と C1、i2、i3 で検出されたバンド位置に違いが確認された。各配列由来から生産された LpFactor G β のバンドは CBB 染色で検出できないことから生産量は低いことが確認された (図 3-6)。

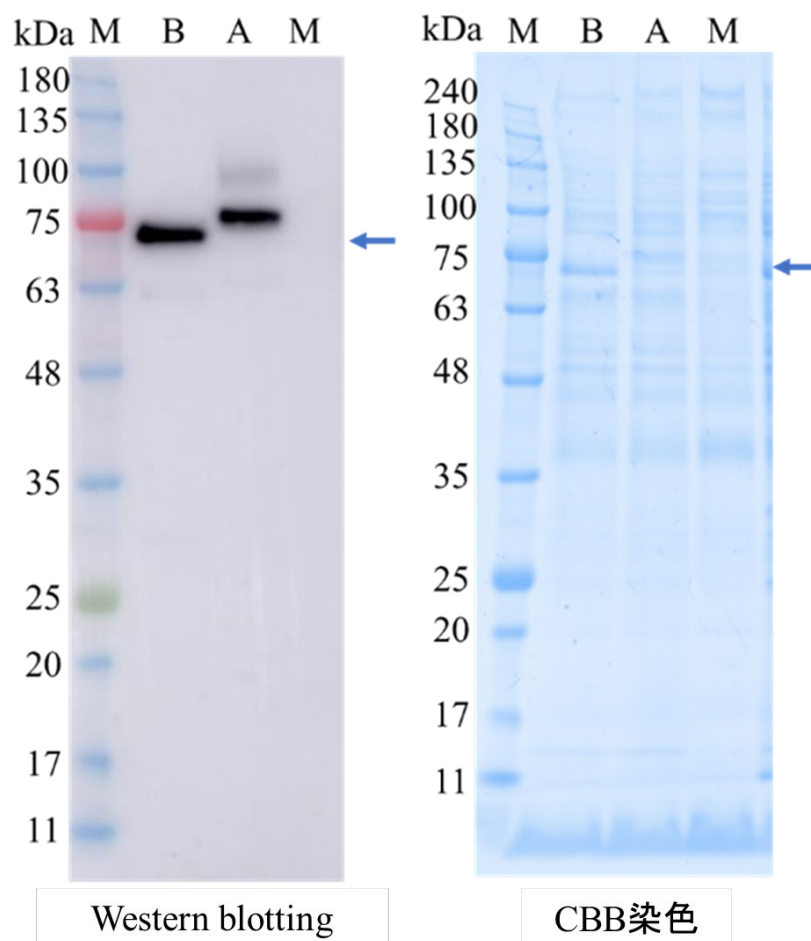


図 3-5.WB と CBB 染色による LpFactor G α の生産確認

M : 分子量マーカー (WIDE-VIEW™ prestained protein size marker III)。A : 組換え LpFactor G α A を生産した培養上清。B : 組換え LpFactor G α B を生産した培養上清。矢印 : アミノ酸配列から計算された推定分子量 (LpFactor G α A : 72 kDa、LpFactor G α B : 73 kDa)。

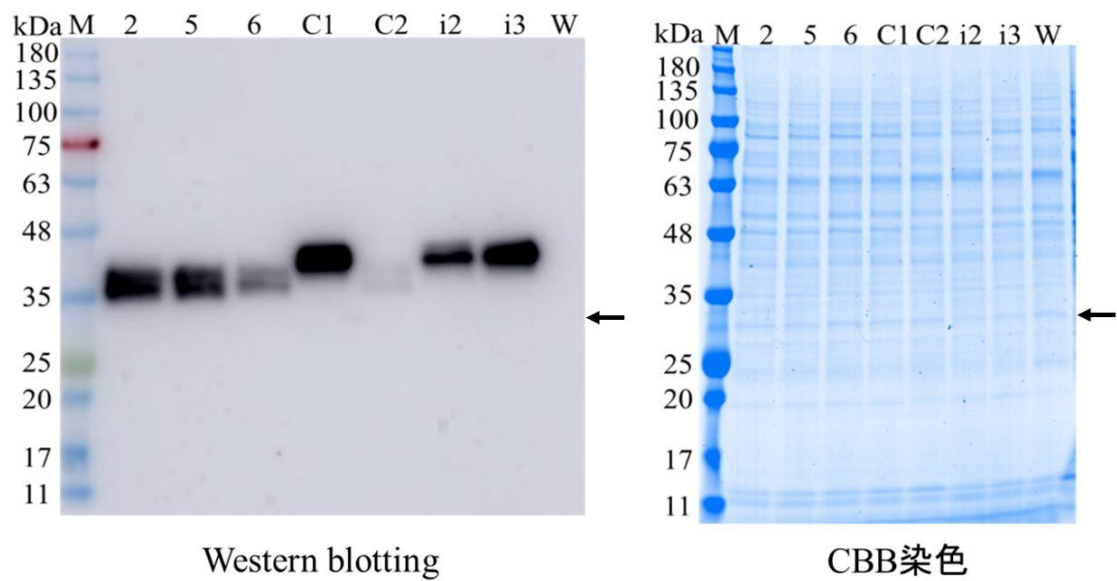


図 3-6. WB と CBB 染色による LpFactor G β の生産確認

M : 分子量マーカー (WIDE-VIEW™ prestained protein size marker III)。2、5、6、C1、C2、i2、i3 : 各組換え LpFactor G β 配列を生産した培養上清。W : 野生型 baculovirus を感染させて培養した培養上清。矢印は LpFactor G β アミノ酸配列から計算された推定分子量 (LpFactor G β : 31 kDa)。

(3) 組換え LpFactor G α subunit による培地中の反応性グルカンの除去

検出対象の BDG は酵母などの真菌に由来するため、環境中どこにでも存在している。そのため、実験や試験に使用するチップやチューブには細心の注意を払う必要がある。しかし、昆虫細胞用の無血清培地には Yeast Extract が使われており、LpFactor G α に結合する BDG を含有している。LpFactor G は一定の分子量サイズに対して活性型になることが報告されており、低分子 BDG においては LpFactor G α の 2 つの BDG 結合ドメイン (Cellulose binding domain type 4) の片方にだけ結合し、活性を阻害するとされている (Takaki *et al.*, 2002)。目的の活性を評価するためには可能な限り、反応性 BDG や阻害性のある低分子 BDG を除いておく必要がある。そのため、BDG 結合能を有する LpFactor G α B を修飾したビーズにて BDG の特異的除去を試みた (図 3-7 a)。LpFactor G α B は LpFactor G A と比較して、LNT への結合能力が高く、培養上清への分泌量も多いことから、ビーズへの固定化タンパク質として選定した。LpFactor G α B は 800 mL 分を生産した培養液から約 80 mg 取得でき、取得した LpFactor G α B 1 μ g 分を SDS 電気泳動後、CBB 染色と WB で確認し、90%以上の純度があることを確認した (図 3-7 b)。この LpFactor G α B 固定化ビーズで、BDG 除去処理を行った培地は、BDG 除去未処理培地と比較して BDG 量は約 96%減少した (図 3-7 c)。

この手法により、培地性能を低下させずに BDG のみを特異的に除去できることが可能であった。以下、LNT を用いた活性試験はこの BDG 除去培地で生産した培養上清を用いた。

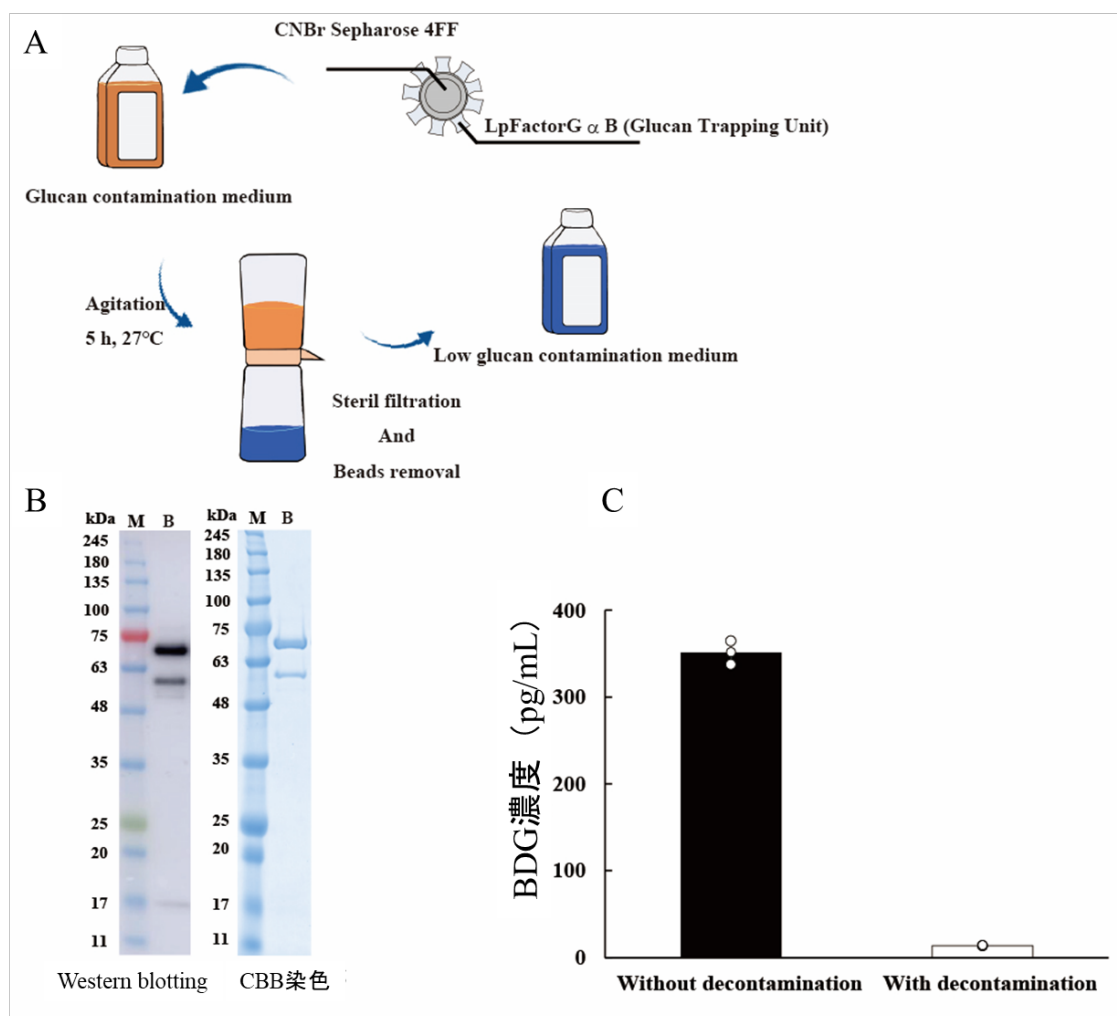


図 3-7. 培養培地からの BDG 除去スキームと除去処理の効果

A : 昆虫細胞用培地からの BDG 除去スキーム。B : BDG 除去ビーズに結合した LpFactor G α B の精製純度の確認。M : 分子量マーカー (WIDE-VIEWTM pre-stained protein size marker III)。B : 精製した組換え LpFactor G α B 1 μ g 分。

C : BDG 除去処理前後における培養液中の BDG 濃度。

(4) BDG によって活性化される LpFactor G α と β の組合せ試験

取得した LpFactor G α と β の各配列の組合せの中に、BDG 依存的に rLpPCE を活性化する最適な組合せになる LpFactor G が存在すると考え、組み合わせ試験を行った。本試験では、2g2 に LpFactor G α と LpFactor G β の各配列それぞれをコードする組換え baculovirus を二重感染させ、ヘテロダイマー型タンパク質を生産することが可能かどうかを LpFactor G にて確認した。本試験では BDG の代表として LNT を用いた。LNT は β -(1 \rightarrow 3)結合と β -(1 \rightarrow 6)結合を持ったグルカンである。LNT を 3.5 pg/mL で反応を行い、まず、BDG 依存性による rLpPCE 活性化能を示す組合せを確認した。コントロールとしてプロテアーゼインヒビター (4-(4-Aminophenyl) benzoic acid (APB)) を反応させ、*p*-nitroaniline 濃度の上昇が生じないことを確認している。本反応は試験で確認される吸光度の上昇が濁りではなく、プロテアーゼ活性による合成基質の切断によって遊離した *p*-nitroaniline を検出していることを担保している。本試験において、LpFactor G α 、LpFactor G β と rLpPCE それぞれ単独ではプロテアーゼ活性を示さなかった。二重感染することで生産した培養上清は 405 nm に測定において *p*-nitroaniline 濃度が上昇し、LNT 添加と無添加における *p*-nitroaniline 濃度の差を算出した。その結果、LNT 依存的なプロテアーゼ活性が確認された。LpFactor G α A との組み合わせでは β i2 と β i3、LpFactor G α B とは β 2 と β C2 が最も BDG 依存性の *p*-nitroaniline 濃度上昇（プロテアーゼ活性）を示した（図 3-8 A）。TtFactor G を用いた反応において *p*-nitroaniline 濃度上昇（プロテアーゼ活性）は確認されたが、LNT 添加と無添加において *p*-nitroaniline 濃度の差は示されず、BDG 依存性のある活性は確認されなかった。LpFactor G α A において最適な LpFactor G β は LpFactor G β i2 と i3 ではあるが、LpFactor G β 2、LpFactor G β 5、LpFactor G β C1 においても僅かに BDG 依存的な *p*-nitroaniline 濃度の上昇は確認された。上記で

示した最適な各 LpFactor G α に対しての LpFactor G β の組み合わせに注力して、LNT 濃度系列にて反応性を確認し、それぞれ、LNT 濃度依存的な *p*-nitroaniline 濃度の上昇が確認された。それらの結果、相関係数はどれも $R^2=0.99$ 以上となり良好な結果であった図 3-8 B)。

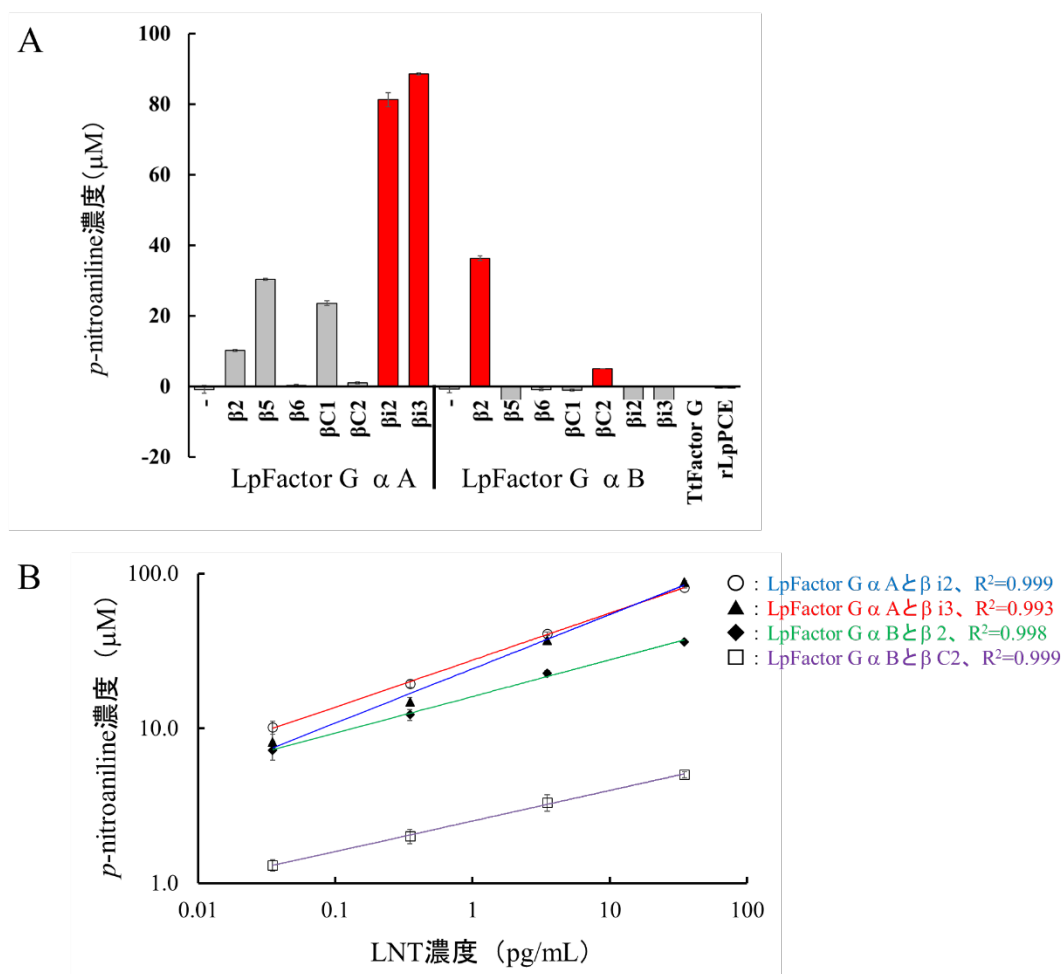


図 3-8. BDG 依存性 LpFactor G のプロテアーゼ活性の確認

A : LpFactor G α と β の組合せ試験。BDG の無添加と添加した反応における *p*-nitroaniline 濃度差を示した。B : 最適な LpFactor G α と β の組合せにおける BDG 濃度反応性確認試験。LNT 濃度は 35、3.5、0.35、0.035 pg/mL の 4 点。各濃度において N=3 で実施。エラーバーが見えない点においてはシンボルマーク範囲内に収まっている。

第3節 考察

これまで、*L. polyphemus* 由来の血球細胞を調製して製造された製品として、エンドトキシン測定試薬やBDG検出による診断薬が挙げられる。エンドトキシン測定系では血球細胞中のFactor C、Factor B、PCEの三因子が主要なカスケード因子であり、BDG測定系ではFactor G、PCEの2因子が主要なカスケード因子であることが解明されている（図3-1）。動物愛護、生態系保護の観点や製品性能向上の取り組みにおいて、エンドトキシン測定系では、組換え体を用いた再構成に成功している。しかし、BDG測定系において、Factor Gの組換え体を作製できたとされる報告はない。本研究の前に、公開されているTtFactor G配列を用いて再構成を試みたが、出来なかった。そのため、手持ちの資源から再構成に使用可能なLpFactor G遺伝子配列の取得と組換えタンパク質の生産を行い、*in vitro*での再構成に挑戦した。まずは、NGSと伝統的な遺伝子クローニング手法の結果、LpFactor G α とLpFactor G β 共にバリエーションと思われる新規の配列が確認され、それぞれの各配列を取得することが出来た（図3-3、3-4）。LpFactor G α は2配列取得し、LpFactor G α Aは既存の配列（GenBank：AB547712）と相同性が98.7%、LpFactor G α Bとは相同性が80%と差異があるアミノ酸配列であった。データを示すことが出来ないが、LpFactor G α AよりLpFactor G α Bの方がLNTに対する結合活性が2倍高値であった。この結果は、cellulose binding domain type 4（CBD4）のアミノ酸配列に起因していると考えられる。LpFactor G α B内の2つのCBD4ドメイン間にLpFactor G α Aと比べると2アミノ酸挿入（541、542残基）されているなど、変化があることに加えて、Yoneda & Kurokawaの研究（Yoneda, & Kurokawa, 2011）において、BDGへの結合にQ-Wモチーフ配列が関わっていると判明していることから336-339番目のアミノ酸のQ-Wモチーフ（LpFactor G α B：QQMP、LpFactor G α A：QQWS、図3-3

の赤枠の部分)の違いが一部起因していること推察される。アミノ酸の違いは研究開発が進んだ段階で、種々の BDG と反応させた時に反応性の違いがより明確になるとと思われる。アミノ酸配列とは別に、LpFactor G α A と LpFactor G α B では N-結合型糖鎖修飾サイト数にも違いがあり、LpFactor G α A では 502 残基と 525 残基のアスパラギン (Asn) に N-結合型糖鎖が修飾される可能性はあるが、LpFactor G α B にはそのアミノ酸配列はない。そのため、現状においてはアミノ酸配列以外の部分において、糖鎖修飾の有無が LNT との結合に影響を及ぼしている可能性はあると推察しているが、まだ断定はできない状況である。LpFactor G α は ELISA としての手法に用いる取り組みもあり、今後有用性が生まれる可能性もある (Yoneda, & Kurokawa, 2011)。LpFactor G β は 7 配列取得し、LpFactor G β アミノ酸配列間の相同性は 99% であり、TtFactor G β とは 73% であった。図 3-3 で示した、青矢印、緑矢印の部位は conserved domain database (CDD) を使ったホモロジーによって予測される基質結合部位やプロテアーゼ活性の中心に関わるアミノ酸であるが、各配列間において違いは確認されなかった (Lu *et al.*, 2020; Bauer, & Bryant, 2004)。アメリカカブトガニの染色体は $2n = 52$ と報告 (Shuster *et al.*, 2003) されており、LpFactor G α subunit の 2 配列は対立遺伝子の関係にある可能性がある。LpFactor G β については LpFactor G α と同様に対立遺伝子の関係性にある配列も存在すると考えられるが、その他の配列については対立遺伝子だけでは説明できない。可能性としては、カブトガニの血球細胞の不均一性に由来するか、スプライシングバリエーションや PCR による人工的なエラーに起因すると考えられる。PCR は正確性の高い酵素とサイクル数 (25 cycle) を抑えた遺伝子クローニングを行っているため、PCR によるエラーの可能性は低いと推察している。本研究で用いたカブトガニの血球細胞は採取時にプールされた血液から調製されている点や株化されていない細胞になるた

め、血球細胞の不均一性による可能性が高いと推察した。まずは機能ベースに配列の良し悪しを評価することで、目的の機能を有する配列を取得することを優先することにした。

次に、取得した配列を組換えタンパク質として生産すると、推定分子量からは僅かに高分子側にシフトしているが、概ね推定される分子量で生産されていることを確認した。高分子側へのシフトは糖鎖修飾による可能性があると考えている。なぜなら、*in silico* 解析の結果、LpFactor G α A は N-結合型糖鎖修飾サイトが 3 か所、LpFactor G α B と LpFactor G β はそれぞれ 2 か所あるため、糖鎖修飾に起因していると思われる。LpFactor G α B についても糖鎖修飾サイトが 2 か所あるため、同様の理由で高分子側にシフトしている可能性があると推察している。LpFactor G α B は Clone 2、4、6、C2 と C1、i2、i3 でバンド位置に違いが生じているが、この差は 103 残基のアミノ酸の tyrosine (Y) と serine (S) の差異と一致する。103 残基の位置は N-型結合型糖鎖修飾サイト内にあるため、N-結合型糖鎖修飾、O-結合型糖鎖修飾の双方に起因していることが推察される。LpFactor G β のバンドは 2 本確認され、糖鎖修飾の差に起因している可能性と N 末端からのプロセッシングを受けている可能性がある。なぜなら、エンドトキシン反応性カスケード因子である Factor C や Factor B では N 末端側からプロセッシングを受けて低分子化することが報告されているため (Kobayashi *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2015)、LpFactor G β についても同様にプロセッシングを受けていることが推察される。

過去の検討の中で、配列、発現方法に問題があるのか、細胞培養培地中の BDG 汚染が原因で BDG 依存的なプロテアーゼ活性が確認されないか不明であった。そのため、Factor G α と β の組合せを検討する試験を実施する前に、培地中の BDG 汚染をクリアにすることが重要と考え、BDG を細胞培養培地から特

異的に除去する方法として、LpFactor G α 結合ビーズを用いた除去を試みた（図 3-6 a）。その結果、BDG 除去処理細胞培養培地の BDG 濃度は数 pg/mL となり、未処理細胞培養培地に比べ約 96%減少させることが出来た（図 3-6 c）。BDG を除く方法として高圧蒸気滅菌やポジダインなどの電荷を利用したフィルターを通すことで、一定量を減少させることが出来るが、細胞培養培地成分も除去、分解されるため、細胞培養不可になる。そのため、LpFactor G α B 固定化ビーズを用いた BDG 除去法は培地性能を低下させずに BDG を取り除く方法として優れていることを示した。

BDG 依存性 LpFactor G α と β の組合せを探索する試験において、BICS の特徴である複合タンパク質を作製する手法である baculovirus を二重感染させる方法を 2g2 に用いた。本試験では、発現するプロテアーゼ活性によって合成ペプチド基質を切断し、遊離した *p*-nitroaniline を検出することで、評価を行った。その結果、LpFactor G α A は LpFactor G β i2 と LpFactor G β i3、LpFactor G α B は β 2 と β C2 の組合せにおいて最も BDG 依存的な *p*-nitroaniline 濃度の上昇が確認され、プロテアーゼ活性を示した（図 3-7 a）。LpFactor G を構成する α subunit と β subunit それぞれの配列が取得できたことで、BDG 依存的に活性化する Factor G を生産するためには、最適な配列の組合せが必要であることを示した。BDG 依存的に活性化する組換え LpFactor G α と組換え LpFactor G β の組合せ候補についてはさらに、LNT 濃度系列と反応させることで、LpFactor G が真に BDG によって活性化されているかを確認した。評価した 4 つの組合せは LNT 濃度依存的な *p*-nitroaniline 濃度上昇が確認され、相関係数は 0.99 以上と良好な数値であった。本試験では各組合せのタンパク量の標準化は行っていないため、組み合わせの良し悪しを評価するまでの結果ではあるが、本研究過程での検出感度は既存の BDG 測定試薬のカットオフ値である 11 pg/mL（Cento *et al.*, 2020）以下を

検出可能であるため、180 分の測定時間においては十分な感度に達していることを示した。しかし、測定時間やブランクの安定性、種類のグルカン分子との反応性について確認を検討する必要がある、課題は残っている。本研究の結果は、BDG 依存的なプロテアーゼ活性を有する LpFactor G α と β 遺伝子配列のクローニングと機能を実証した。本発見は特許として出願している（特許出願番号：WO2021117841A1）。これらの結果は、天然資源に依存しない LAL 内在性カスケードを利用した BDG 検出による深在性真菌症診断薬が開発可能であることを示した。加えて、baculovirus を二重感染させる手法によって 2g2 がダイマータンパク質を生産できることを示し、組換えタンパク質生産株として利用できる性能を一つ実証した。

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量と性能評価

第2章において *M. brassicae* 由来の細胞株 (NIAS-Mb-32) より 2g2 を樹立し、増殖性能や組換えタンパク質の生産能力、baculovirus の生産能力を Sf9 と比較して性能を考察した。第3章では BICS の baculovirus を二重感染させる方法を 2g2 に用いて、目的の活性を有した LpFactor G の生産に成功し、2g2 は実用的に使用可能な細胞株であることを示す実例を示した。本章ではさらに Sf9 とヒト Expi293 細胞株 (以下 Expi 293 と記載、Expi293 細胞はヒト胚性腎臓由来細胞である) もコントロールに加え、組換えタンパク質の生産能力と品質に注目して評価を行った。第4章での生産能力は、第2章における WB による培養上清中の組換えタンパク質量の比較ではなく、実際に Ni アフィニティー精製を行い、精製タンパク質としての収量で評価した。評価用のモデルタンパク質は大腸菌などの細菌を宿主とした生産系では生産が難しいと考えられている、高分子量かつ糖タンパク質を選定することにした。Niwa 等はタンパク質が高分子量になるにつれて凝集性が上昇すると報告 (Niwa *et al.*, 2009) している。SHuffle™ *Escherichia coli* K12 (New England Bio Labs inc.) など、大腸菌でのジスルフィド形成効率を改良した製品もあるが、タンパク質のフォールディング中に適切なジスルフィド結合を形成することが得意ではない、古典的な大腸菌にとっては 100 kDa を超える組換えタンパク質合成は大腸菌が保有しているタンパク質 (ジスルフィドイソメラーゼやシャペロン) や細胞内環境を考慮すると生産は難しいと考えられている。さらに、大腸菌などの原核生物はゴルジ体や小胞体など細胞小器官を持たないため、組換えタンパク質に糖鎖修飾することができない。この 100 kDa 以上でかつ糖タンパク質という難合成の要件に当てはまる

のが SARS-CoV-2 のエンベロープ上に存在する spike protein である。この SARS-CoV-2 spike protein (GenBank : QHD43416.1) は 1274 アミノ酸からなる糖タンパク質で、22 箇所の N-結合型糖鎖修飾サイトと 25 箇所の O-結合型糖鎖修飾部位を持つタンパク質である (Bagdonaite *et al.*, 2021; Shajahan *et al.*, 2020)。さらに、15 カ所の S-S 結合があることが報告されており (Shijian, 2022)、組換えタンパク質の生産が難しいタンパク質であることが示唆される。実際に、spike protein の一部分である receptor binding domain (RBD) を大腸菌で生産を試みている論文ではマルチジスルフィド結合が原因で古典的な大腸菌の生産方法では不溶性になることを報告している (Brindha, & Kuroda, 2022)。Spike protein は COVID-19 に対するワクチン開発候補分子であり Sf9 での生産の報告がある (Amanat *et al.*, 2020)。以上の背景から、SARS-CoV-2 spike protein は、真核細胞株として 100 kDa を超える分子量のタンパク質を適切なジスルフィド形成を行いながら立体構造にする能力と合成過程における糖鎖修飾能力を比較し評価する組換えタンパク質として最適だと考えた。ジスルフィド形成については、細胞内でジスルフィド形成が行われ、フォールディングが正しく行われていれば、spike protein が培養上清に分泌され、human Angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) と結合すると考え、hACE2 との結合の可否において評価した。spike protein の合成から分泌過程でフォールディングに不具合があれば、培養上清への分泌量も著しく減り、組換えタンパク質として得られたとしても、量当たりの hACE2 の結合量も減ると考えた。本章では、日本の規制があり SARS-CoV-2 由来の遺伝子を baculovirus に導入する遺伝子組換え実験が困難であった点、昆虫細胞発現系においても、プラスミドベクターを用いた一過性発現、もしくは薬剤選択による安定発現株の作製も行うことがある点も踏まえて、前章までに利用してきた BICS ではなく、プラスミドベクターを用いた一過性発現にて SARS-CoV-2

spike protein の生産を行った。生産物は精製し、結合能を有する human Angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) との結合性、修飾された糖鎖解析、生産量を比較し、2g2 の性能をより解明することを目的とした。

第 1 節 材料と方法

(1) SARS-CoV-2 spike protein の発現コンストラクト

SARS-CoV-2 spike protein のアミノ酸配列は Amanat 等の文献を参照して、アミノ酸配列のコンストラクトを設計した。簡潔に述べると、培養上清からの精製を行うために、膜貫通ドメインを除いて、3 量体を安定して形成するように T4 foldon ドメインと Ni アフィニティー精製用のタグとして hexa-histidine を C 末端に付加した。また、熱安定性を高めるために 986 番目の K と 987 番目の V のアミノ酸を P に変更し、Furin（プロテアーゼの一種）から切断されないように RRAR 配列を A に変更した (Amanat *et al.*, 2020)。本配列は SARS-CoV-2 Stabilized soluble Spike protein (SCoV2-sssp) とした (図 4-1)。SCoV2-sssp は遺伝子合成を行い、pIEx4 (Novagen) の *Not* I サイト間に挿入した発現ベクター（昆虫細胞発現用）と pCAG neo（富士フイルム和光純薬）の *Kpn* I サイトに挿入した発現ベクター（動物細胞発現用）を GENEWIZ 社から入手した。

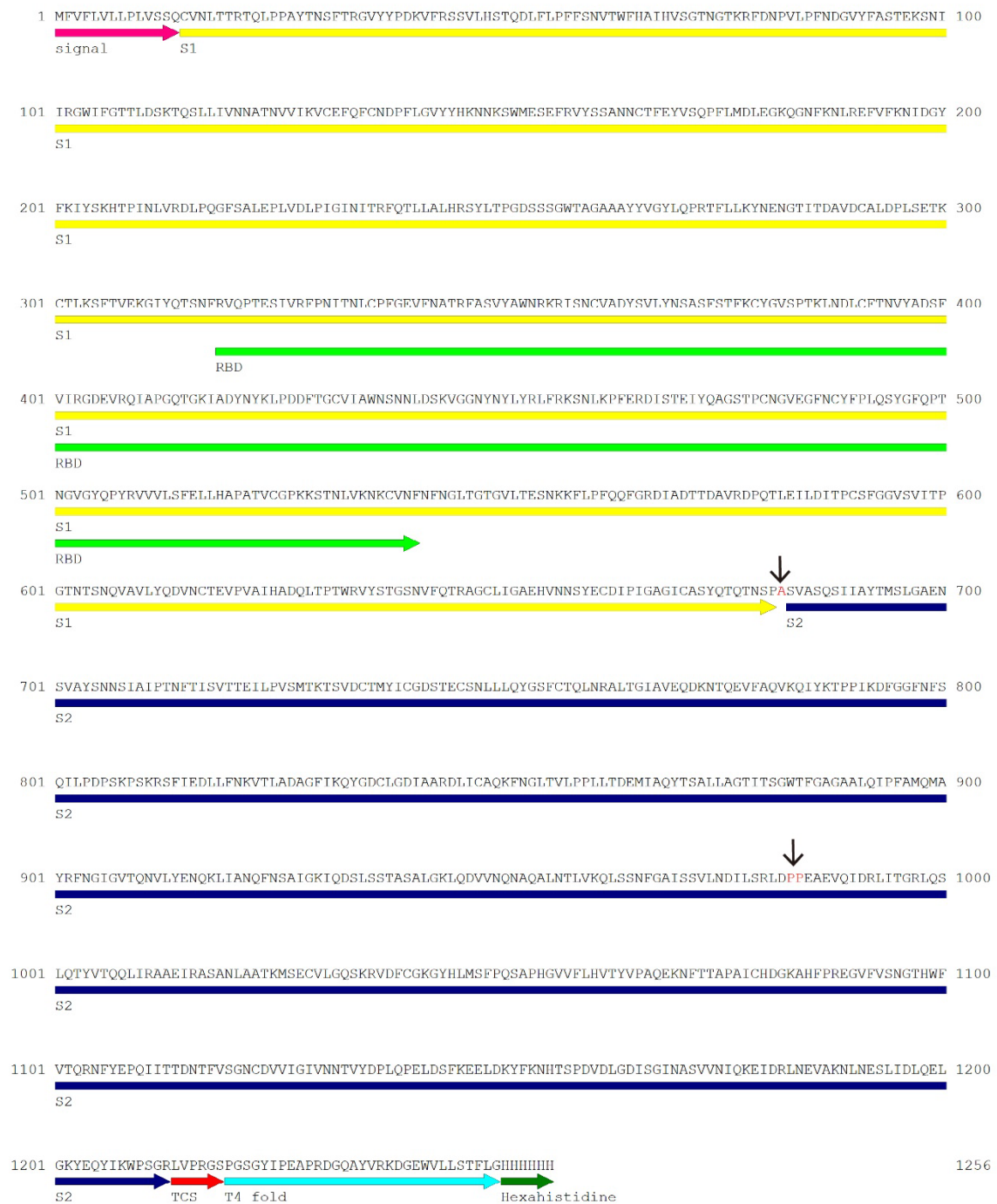


図 4-1. 本研究で用いた SCoV2-sssp のアミノ酸配列

signal : SARS-CoV-2 spike protein 由来の分泌シグナル配列。S1 : ウイルスが宿主に侵入する際に宿主細胞の受容体と相互作用する領域。RBD : S1 ドメインの中

でも宿主細胞の受容体と結合する領域。S2：宿主細胞の膜に融合し、ウイルスゲノムの細胞への侵入を担う領域。TCS：thrombin cleavage site。下向き矢印の A：RRAR 配列を A に置換。下向き矢印の PP：熱安定性を向上させるために 2 つの変異を導入（野生型のアミノ酸番号で K986P と V987P）。

(2) 組換え SCoV2-sssp (rSCoV2-sssp) の生産と精製

2g2 と Sf9 の 1.0×10^6 cells/mL (800 mL) に、0.8 mg の発現ベクターと ScreenFectTMA *plus* (富士フイルム和光純薬) 1.2 mL を混合して作製された複合体を添加した。その後、27 度、130 rpm で 4 日間培養した。4 日間培養後、5000 $\times g$ で 30 分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清を 0.22 μ m ポリエーテルスルホンフィルターに通し、濾過液を 1 mL cOmpleteTM His-tag purification column (Roche) に通した。Binding buffer (20 mM phosphate buffer (pH7.4)、500 mM NaCl、10 mM imidazole) を 10 mL 通して洗浄後、elution buffer (20 mM phosphate buffer (pH7.4)、500 mM NaCl、500 mM imidazole) にて溶出を行った。精製時の流速はすべて 1.0 mL/min で行った。溶出液は PD-10 カラムで stock buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM NaCl、10% Glycerol) に置換し、これを精製物とした。Expi 293 (Thermo Fisher Scientific) を用いた rSCoV2-sssp の生産はメーカーの取り扱い説明書の通りに行った。培養期間は上記昆虫細胞 (2g2 と Sf9) と同様に 4 日間培養し、Ni アフィニティー精製を行った。精製された rSCoV2-sssp 溶液の濃度は bovine serum albumin (BSA) を標準として、BCA assay kit (富士フイルム和光純薬) にて定量した。

精製された SCoV2-sssp の確認は 1 μ g 分を 10-20%の SDS-PAGE ゲルによる電気泳動と CBB 染色に供することで行った。分子量マーカーは WIDE-VIEWTM prestained protein size marker III (富士フイルム和光純薬) を用いた。

(3) 可溶性 Human Angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) との結合試験

本試験は Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) を基に下記の通り行った (図 4-2)。96 well plate (Nunc[®] MaxiSorp、イムノモジューF8) に各細胞株から生産・精製した rSCoV2-sssp を 0.2、0.1、0.05、0.025 µg/well (2.0、1.0、0.5、0.25 µg/mL : 100 µL/well) になるように添加し、4 度で一晩静置してプレートに固相化した。各 rSCoV2-sssp 濃度 2.0、1.0、0.5、0.25 µg/mL を作製する時は Coating buffer (15 mM Na₂CO₃、35 mM NaHCO₃、7.7 mM NaN₃、pH9.6) を用いた。次に 1 × PBS-T (PBS に 0.1% の Tween 20 が添加された溶液) (富士フイルム和光純薬) で 3 回洗浄し、100 µL Blocking buffer (4% BSA in 1 × PBS-T) を加えて 27 度で 1 時間反応させた。1 × PBS-T で 3 回洗浄し、各 well に human IgG Fc 融合型 hACE2 (ACRO biosystems) を 0.02 µg/well で添加し 27 度で 1 時間反応させた。1 × PBS-T で 3 回洗浄し、各 well に 1 × PBS-T で 25000 倍希釈した Anti-human IgG (Fc specific) - Peroxidase antibody produced in goat affinity isolated antibody (Sigma-Aldrich) を 100 µL /well で添加し 27 度で 1 時間反応させた。1 × PBS-T で 3 回洗浄し、TMB solution (富士フイルム和光純薬) を 50 µL 加えて 37 度で 20 分間反応後、1 N HCl を 50 µL を加えて反応を停止させた。最後に、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd) で測定した。測定時に 650 nm の吸光度をリファレンスとして同時測定した。取得した吸光度を TMB のモル吸光係数 ($5.9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) と well に 0.2 mL 入れたときの高さ (0.55 cm) を元に、TMB の濃度を算出した。

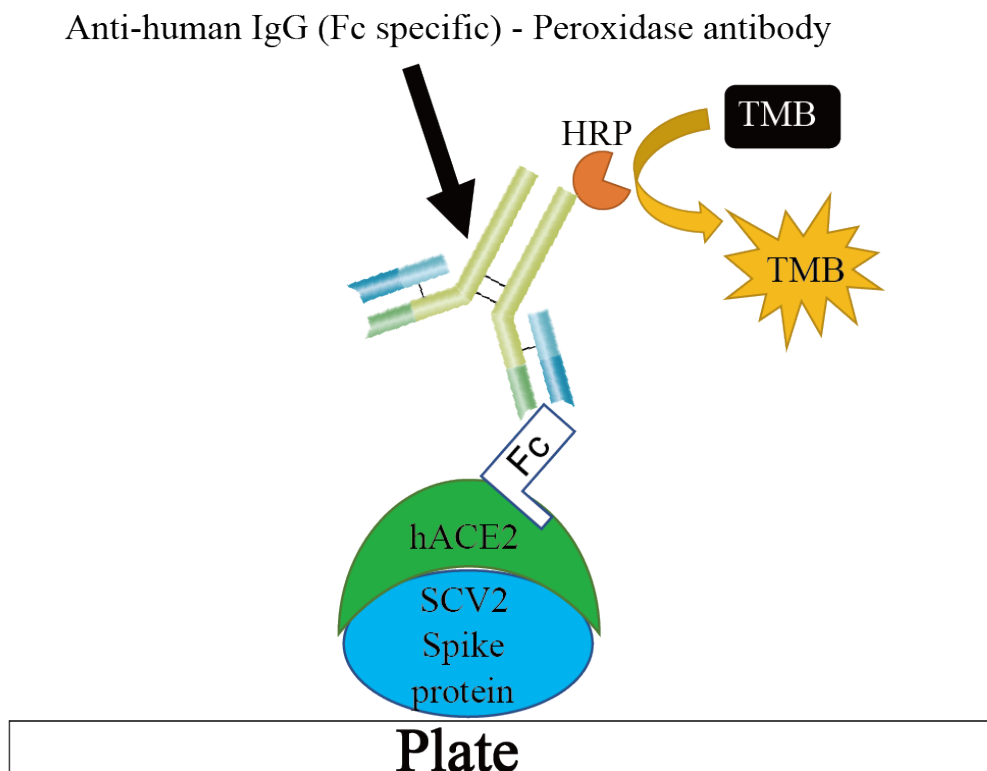


図 4-2. rSCoV2-sssp と hACE2 との結合試験の概要

96 well plate に rSCoV2-sssp を固相化し、human IgG Fc 融合型 hACE2 と Anti-human IgG (Fc specific) - Peroxidase antibody を反応させることで評価を行った。

hACE2 : human Angiotensin-converting enzyme 2。TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine。HRP : Horseradish peroxidase。Fc : Human IgG の Fc 領域

第2節 結果

(1) 各細胞株から生産・精製した rSCoV2-sssp の取得量と分子量の確認

Sf9、2g2 と Expi293 を用いて rSCoV2-sssp を生産し、それぞれ Ni アフィニティー精製を行った。精製した各 rSCoV2-sssp の収量を BCA assay にて確認し、電気泳動にて純度を確認した。続いて、各精製品は hACE2 との結合能を ELISA により評価した。最後に、共同研究者の梶浦 裕之 助教（大阪大学）に nano-LC MS/MS による N-結合型糖鎖解析を行って頂き、N-結合型糖鎖能力について評価した（方法については付録に記載した）。rSCoV2-sssp は全長で 1256 残基からなり、Signal IP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) により推測した分泌シグナル（N末端の 14 アミノ酸）を除くと 1242 残基からなり、*in silico* における解析では推定分子量 137 kDa となる。図 4-3 には 2g2 と Sf9 由来の rSCoV2-sssp は予想される分子量（図 4-3 の青色矢印の位置）より高分子量側にバンド（図 4-3 の緑色矢印の位置）が検出されていることから、糖タンパク質として生産されていることが確認された。Expi293 細胞由来の rSCoV2-sssp は 2g2 と Sf9 由来の rSCoV2-sssp より高分子量側にバンド（図 4-3 の橙色の矢印）が検出されており、より高分子量型の糖鎖修飾が行われていると推察された。2g2 と Sf9 では夾雑タンパク質のバンドサイズが異なる分子量の位置で確認された。（図 4-3 の黒矢印）。BCA assay によるタンパク質の定量結果から、Ni アフィニティー精製して得られた各 rSCoV2-sssp 量は 2g2 : 3.2 mg/L、Sf9 : 2.1 mg/L、Expi293 : 0.5 mg/L となった。生産方法（培地、細胞数、培養時間、培養温度）が同じである為、2g2 と Sf9 に関しては対等に比較できる条件であり、Sf9 より 2g2 は Sf9 に対して 1 L 培養の収量において 1.5 倍高い生産量を示した。

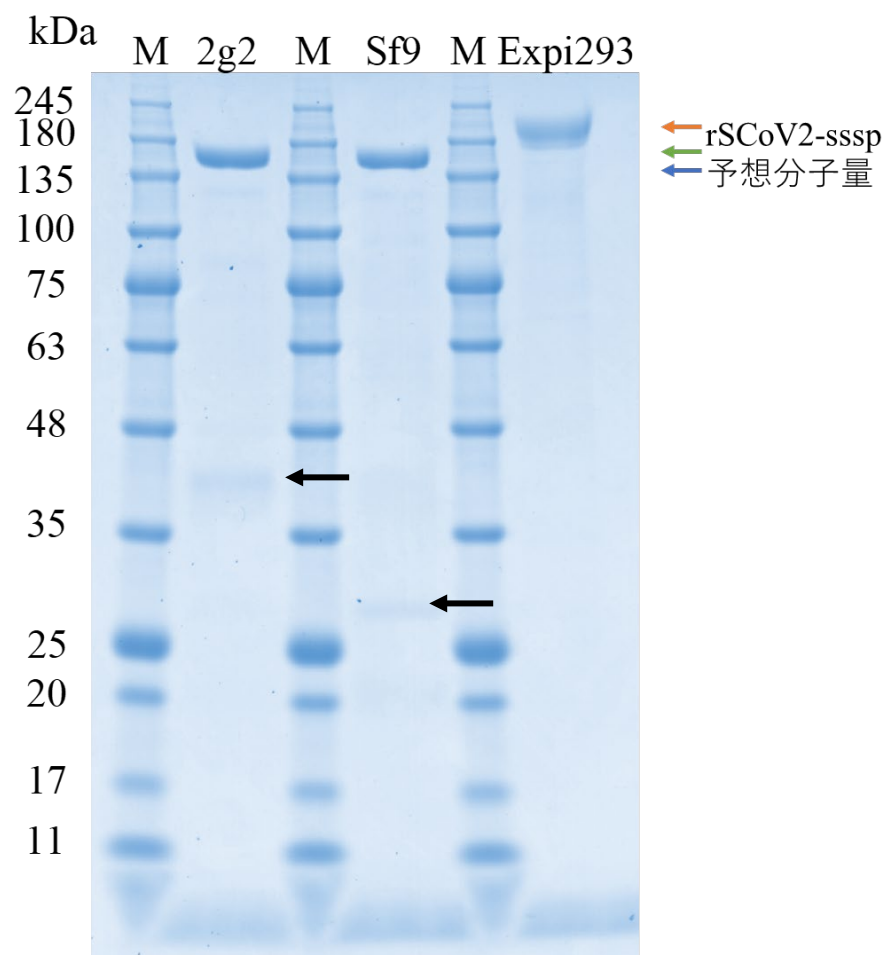


図 4-3. 精製した rSCoV2-sssp の SDS-PAGE 及び CBB 染色図

M : 分子量マーカー (WIDE-VIEW™ prestained protein size marker III)。

2g2、Sf9、Expi293 : 各生産細胞株由来の精製した rSCoV2-sssp (1 μg 分)。橙色

矢印 : Expi293 由来 rSCoV2-sssp の位置。緑色矢印 : 2g2 と Sf9 由来 rSCoV2-sssp

の位置。青色矢印 : アミノ酸配列から計算された推定分子量 (137 kDa) の位置。

黒色は夾雑物もしくは分解物。

(2) 各細胞株から生産・精製した rSCoV2-sssp と hACE2 との結合試験

図 4-2 の模式図のように ELISA を用いて hACE2 との結合試験を行い、各細胞株を用いて生産した rSCoV2-sssp と hACE2 との結合能を評価した。図 4-4 の通り、2g2 を用いて生産した rSCoV2-sssp は Sf9 や Expi293 と同様に固相化した rSCoV2-sssp の量に依存して、TMB 量の増加が確認された。相関係数は 2g2 : 0.99、Sf9 : 0.98、Expi293 : 0.96 となった。2g2 は、rSCoV2-sssp が hACE2 に対して結合能を有した組換えタンパク質として生産可能であることを示した。

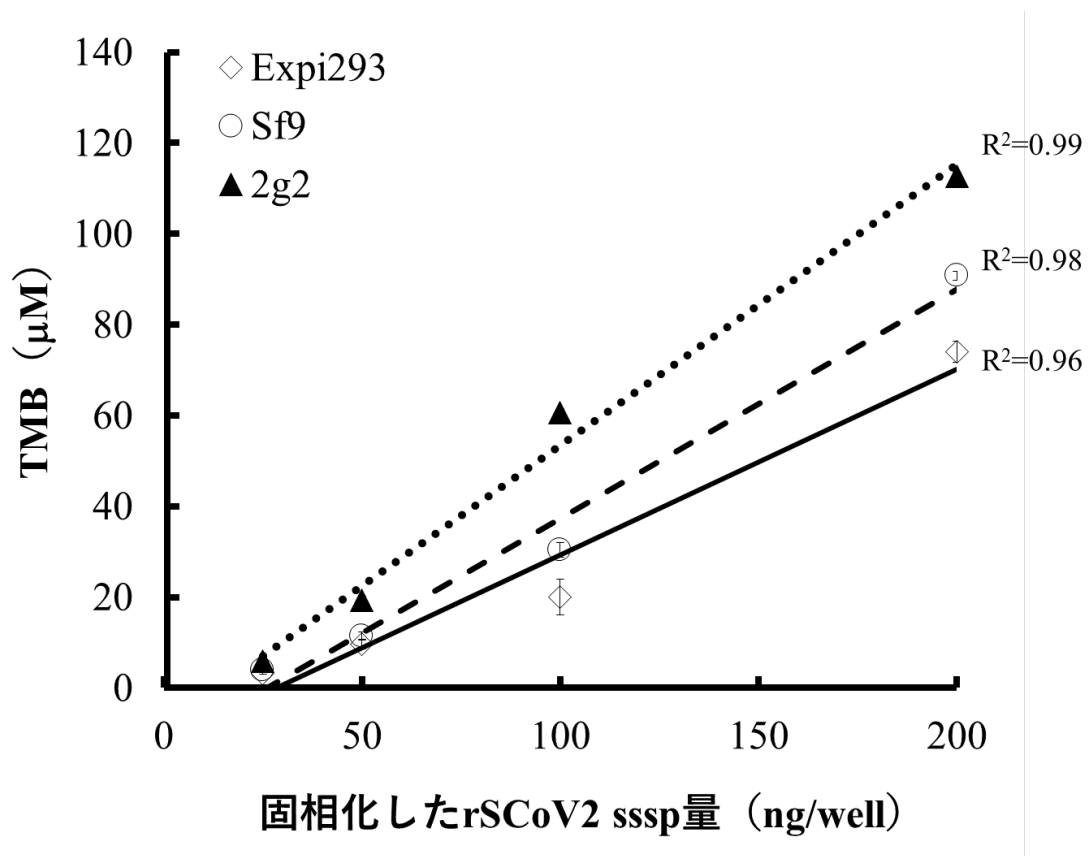


図. 4-4. Expi293、Sf9 と 2g2 由来の rSCoV2-sssp と hACE2 の結合確認

▲ : 2g2、○ : Sf9、◇ : Expi293

固相化した各細胞由来 rSCoV2-sssp に対して hACE2 を反応させて、結合能について比較した。Expi293、Sf9 由来と同様に 2g2 由来の rSCoV2-sssp は濃度依存的

に吸光度の上昇を示した。エラーバーが見えていない点は、シンボルマーク内に収まっている。

(3) 各細胞株から生産・精製した rSCoV2-sssp の N-結合型糖鎖解析

生産した rSCoV2-sssp の N-結合型糖鎖解析を共同研究者である大阪大学の梶浦が実施し、解析方法については付録に記載した。図 4-5 に rSCoV2-sssp の構造図と N-結合型糖鎖修飾サイト、ジスルフィド結合箇所を示し、図 4-6 に nano LC-MS/MS で解析した各細胞株における N-結合型糖鎖修飾の結果を示した。本研究では、97 の糖鎖型が検出され、それらを図 1-1 に示した大分類の通り、コア型（青色）、ハイマンノース型（緑色）、ハイブリッド型（黄色）、複合型（紫色）に分類した。Expi293 が生産した rSCoV2-sssp 由来の N-結合型糖鎖の多くは、ハイブリッド型と複合型であった。Sf9 と 2g2 で生産された rSCoV2-sssp は、大部分はコア型（青色）とハイマンノース型（緑色）によって N-結合型糖鎖修飾されていた。今回の解析から、Expi293 由来と Sf9、2g2 由来の rSCoV2-sssp 間において差異が確認された。それは Expi293 で生産した rSCoV2-sssp には、Asn331、Asn1157、Asn1170 の糖鎖が検出されなかった点である。一方、Sf9 と 2g2 間ではコア型（青）とハイマンノース型（緑）が同様の割合で検出され、Sf9 と 2g2 由来の rSCoV2-sssp の N-型糖鎖修飾能は類似していることを示した。

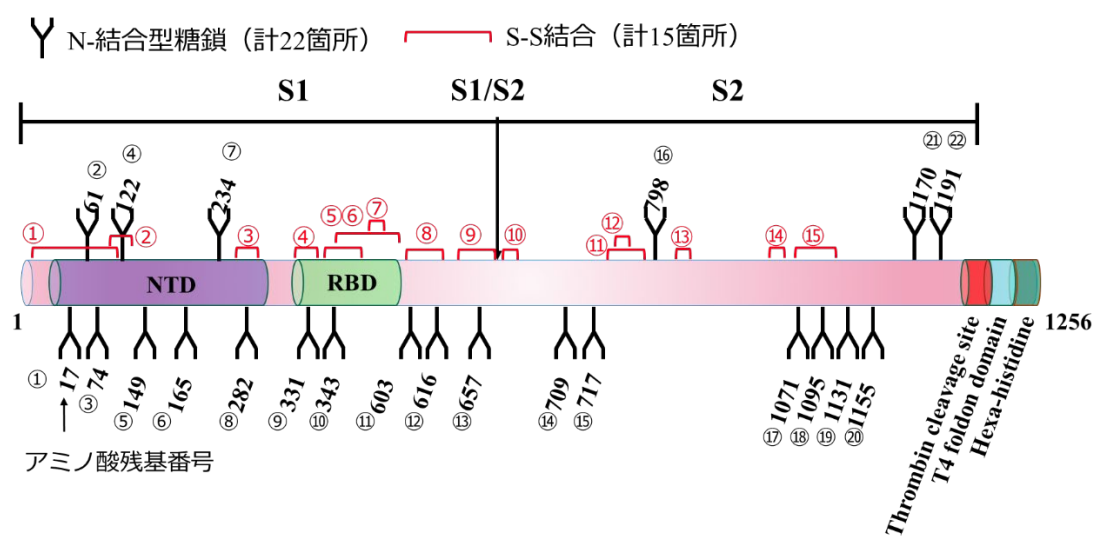


図 4-5. モデルタンパク質 rSCoV2-sssp におけるドメイン構成

rSCoV2-sssp アミノ酸配列上におけるドメインと N-結合型糖鎖修飾サイトとジスルフィド結合形成位置と数の模式図。

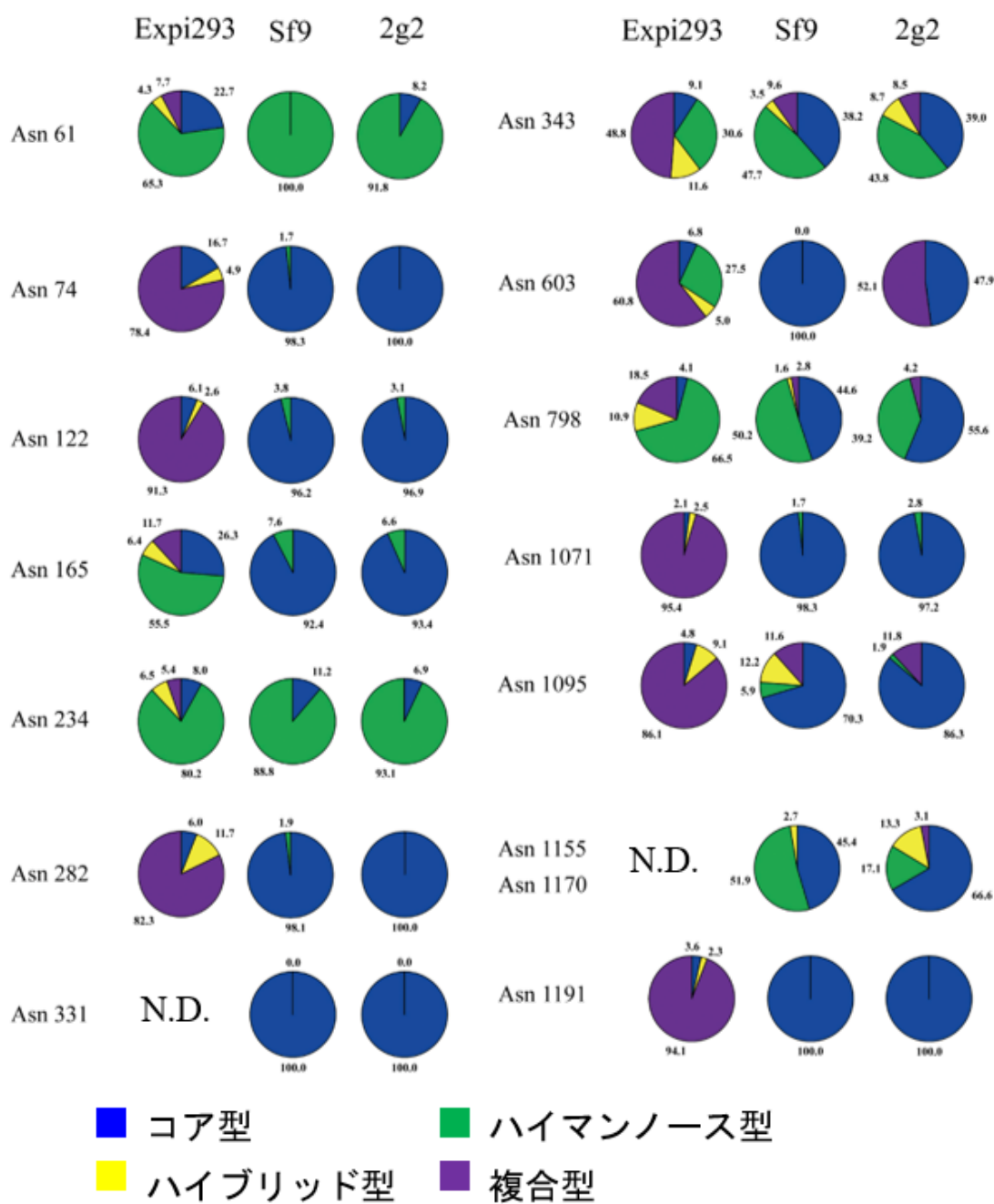


図 4-6. Expi293、Sf9 と 2g2 由来の rSCoV2-sssp における N-結合型糖鎖の比較
 各 N-結合型糖鎖修飾サイトにおける検出された糖鎖型の中での割合。青色：コ
 ア型。緑色：ハイマンノース型。黄色：ハイブリッド型。紫色：複合型。
 N. D. : No detection.

第3節 考察

第2章において2g2がSf9と同様の増殖性能と組換え mIL-23 タンパク質生産能力を有していることを示した。第3章ではBICSの長所を生かし、ヘテロダイマー型タンパク質である LpFactor G を baculovirus の二重感染による方法で生産を行えることを示した。本章では、さらに 2g2 の組換えタンパク質生産能力を確認するためにモデルタンパク質として、アミノ酸配列からの推定分子量が 137 kDa、N-結合型糖鎖修飾サイトが 22 カ所、タンパク質内のジスルフィド結合が 15 箇所ある SCoV2-sssp を選定した。rSCoV2-sssp の発現量と 100 kDa を超えるタンパク質においても正しくフォールディングされたタンパク質として合成できる能力を有しているかを確認し、N-結合型糖鎖修飾を解析することにより、2g2 が持つ糖鎖修飾能力について評価した。

実験の結果、Expi293 の収量は 0.5 mg/L で、Sf9 は 2.1 mg/L、2g2 は 3.2 mg/L となり、2g2 と Sf9 では 2g2 の方がより多く rSCoV2-sssp を生産した。そのため、生産能力については少なくとも Sf9 に対して劣らないことを示した。次に、SCoV2 spike protein は hACE2 と結合することが知られており、hACE2 を用いた結合試験を行い、結合能を有した組換えタンパク質として、生産を行っているかを確認した。その結果、Expi293 及び Sf9 由来の rSCoV2-sssp と同じように 2g2 由来の rSCoV2-sssp は濃度依存的に TMB 濃度の上昇が確認され、hACE2 と結合能を有した rSCoV2-sssp が生産されたことを示した。続いて、2g2 の持つ糖鎖付加能力を評価するために、rSCoV2-sssp の N-結合型糖鎖解析を行った。その結果、2g2 と Sf9 において、N-結合型糖鎖修飾サイトの大部分はコア型とハイマンノース型によって占有されていた。そのため、2g2 は Sf9 と類似の N-結合型糖鎖修飾能力を有していることが推察された。一方、Expi293 は Asn331 への N-結合型糖鎖が検出されなかった。Asn331 と Asn343 における糖鎖の欠落は hACE2

との結合を低下させるとの報告があるため (Zheng *et al.*, 2021)、Asn331 の N-結合型糖鎖の欠落は Expi293 由来の rSCoV2-sssp と hACE2 との結合試験において、Sf9 と 2g2 由来の rSCoV2-sssp より低い TMB 濃度を示した原因の一つだと推察される。図 4-3 で示した、Sf9 と 2g2 由来の rSCoV2-sssp の電気泳動図において、低分子側のエキストラバンドの分子量 (2g2 は約 40 kDa、Sf9 は約 30 kDa、黒矢印) が異なるため、TMB 濃度の差は純度の影響により生じた可能性がある。

以上より、生産能力及び生産した組換えタンパク質の活性、糖鎖修飾能において、2g2 は Sf9 と比較して類似の性能を有していることを改めて示した。

第5章 総括

BICS は 40 年弱に渡って、細胞、培養培地、発現ベクターの技術開発が行われ続けており、ライフサイエンスの基礎研究からバイオ産業へ広く貢献している。本発現システムが世界中に広く普及しているのは、以下の 5 点であると考ええる。1 点目は培養に CO₂ が不要無ことから、大腸菌が培養できるような設備で扱える点、2 点目は、細菌宿主で生産することが困難である翻訳後修飾が必要なタンパク質を高生産可能である点、3 点目は生産システムの改良と共に培地開発が進み、無血清培地やで高密度の浮遊培養及びタンク培養が可能になった点、4 点目は baculovirus の多重感染による複合型タンパク質を生産することが出来る点、5 点目は baculovirus ベクターやプラスミドベクターの開発が進み、生産量や組換えタンパク質としての品質改良が行われた点である。以上の利点を生かして、VLP の作製や組換えアデノ随伴ウイルスの作製などが行われている。baculovirus の応用として、タンパク質、遺伝子の輸送ツールとしても開発されており、BICS の技術は広く利用されている。技術開発が行われる一方で、BICS で使用されている細胞株の中で最も用いられている Sf9 系列の細胞に、Ma 等は NGS 解析、PCR と電子顕微鏡観察によって Sf-rhabdovirus が感染していることを示し、問題となった (Ma *et al.*, 2014)。この Sf-rhabdovirus については、Hashimoto 等や Maghodia 等などが動物細胞への感染性や変異体の特徴を解析してはいるが、人体内に入った時の影響については不明である (Hashimoto *et al.*, 2017; Maghodia, & Jarvis, 2017)。医薬品製造における ICH のガイドラインの観点において、通常は医薬品中への汚染リスクを回避するために、特性が不明なウイルス感染がある細胞は用いないとしている。もし、ウイルス汚染がある細胞株を用いる場合、必要性について規制当局とよく協議する必要がある (ICH, 1998a; ICH, 1998b)。

このような状況の中で、High Five のように、*S. frugiperda* の近縁種から Sf9 と比較して同様の増殖性能と組換えタンパク質生産能力を有しつつ、*S. frugiperda* とは異なる種から樹立することによって、内在的な Sf-rhabdovirus 感染が無い細胞株を樹立できると考えた。そのため、本研究では、BICS 研究開発の基礎となる細胞株を新たに樹立するために、*S. frugiperda* の近縁種である *M. brassicae* 由来の NIAS-Mb-32 細胞株から新規細胞株の樹立を試みた。第 2 章では限界希釈と適切なサプリメントによる選択圧によって樹立することができた 2g2 の特性解析を行った。新規に樹立した 2g2 は、コントロールである Sf9 に対して、細胞増殖性能、BICS による組換え mIL-23 タンパク質の生産量と組換え baculovirus の生産能力が同様であることを示した。Sf-rhabdovirus 感染の有無については Ma 等が報告した primer 配列 (Ma *et al.*, 2014) を用いて同様に試験を行った。RT-PCR の結果、定性的ではあるが、予想されるバンドが Sf9 由来のトータル RNA からは検出されるのに対して、2g2 由来のトータル RNA からは不検出であることから、本検出系において Sf-rhabdovirus 非感染であることを示した。

次に、第 3 章では、樹立した 2g2 を用いて、実際に組換えタンパク質の生産が望まれている LpFactor G の生産を検討した。この LpFactor G はヘテロダイマータンパク質であり、BDG と結合する α subunit とプロテアーゼ活性を有する β subunit をからなる。このようにヘテロダイマータンパク質を生産する手法として組換え baculovirus を二重感染させる方法がある。本手法を 2g2 に用いることで LpFactor G の生産を行い、二重感染による生産が行えるかを確認した。LpFactor G β については配列情報の報告がなく、LpFactor G α については GenBank に登録はあるが、機能性の検証が行われていないため NGS と 3'-RACE 法を用いた遺伝子のクローニングから行った。その結果、LpFactor G α は 2 配列、LpFactor G β は 7 配列を発見し、バリエーションの存在が確認された。次に、取得し

た LpFactor G α と LpFactor G β の組合せの内に目的とする BDG 依存的に活性化される LpFactor G があると考え、baculovirus を二重感染させる方法を 2g2 に用いて LpFactor G α と LpFactor G β の組合せを検討した。組合せ試験の結果、LpFactor G α A における LpFactor G β は LpFactor G β i2 と i3 であり、LpFactor G α B は β 2 と β C2 において BDG 依存的な活性が確認され、取得した配列の組合せによって BDG 依存的な活性を有する LpFactor G を生産できることを示した。以上の結果より、BICS の baculovirus を二重感染する方法と 2g2 を用いて BDG 依存的に活性化する組換え LpFactor G が生産できることを示した。今後、BDG 分子種との反応性、安定性、短時間測定組成など課題はあるが、組換え LpFactor G が血中 BDG 測定診断薬になることを期待する。

第 2 章、第 3 章の結果を受けて 2g2 が組換えタンパク質の生産株として十分可能性があるかと判断し、第 4 章では、より組換えタンパク質の生産能力について評価するために組換えタンパク質の活性や糖鎖修飾能を評価した。モデルタンパク質として、推定分子量として 100 kDa 以上あり、22 個の N-結合型糖鎖修飾サイトと 15 個のジスルフィド結合がある SARS-CoV-2 spike protein を選定した。本研究に用いた配列は野生型の配列から安定化させる変異を入れた配列を用いた (SCoV2-sssp (アミノ酸からの推定分子量は 137 kDa))。本研究ではコントロールとして Sf9 および Expi293 から生産された rSCoV2-sssp と比較した。各細胞から得られた収量の結果は 2g2 : 3.2 mg/L、Sf9 : 2.1 mg/L、Expi293 : 0.5 mg/L となり、2g2 は比較した細胞株の中で、最も多い収量であった。前章からの結果と変わりはなく、Sf9 と比較して同様の組換えタンパク質生産能力を有することを示した。得られた rSCoV2-sssp の N-結合型糖鎖解析では、2g2 と Sf9 由来の rSCoV2-sssp には同様の比率でハイマンノース型とコア型の糖鎖修飾が行われていた。そのため、2g2 は Sf9 と類似の糖鎖修飾能力があることを示し

た。SARS-CoV-2 spike protein がヒト細胞に侵入する際のレセプターとして知られている hACE2 に対しての結合活性を評価し、正しく立体構造を取った機能性のある rSCoV2-sssp が生産されているかを確認した。Expi293 と Sf9 由来と同様に 2g2 由来の rSCoV2-sssp は量依存的な TMB 量の上昇が確認され、結合活性を有していることが確認された。以上の 2 章、3 章、4 章に示した結果より、2g2 は組換えタンパク質生産株として用いることができる細胞株であると考えられる。

本研究を土台に、2g2 はさらに生産能力や糖鎖修飾性能を改良できる可能性があり、その改良の構想をおこなっている。2g2 は *S. frugiperda* の近縁種から樹立しているため、これまで蓄積されている Sf9 や High Five の遺伝子工学アプローチを模倣し、アレンジを加えてより良い細胞株の改良を行うことができる点や、Sf9 や High Five 向けに開発された無血清培養培地、完全合成培地への馴化培養が可能であると考えられる。

2g2 の機能増強において 2 つのアプローチがあると考えられる。1 つ目は発現増強や組換えタンパク質の保護に向けた取り組み、2 つ目は翻訳後修飾強化による組換えタンパク質の品質改善である。1 つ目は P-vank-1 遺伝子など baculovirus 感染時にアポトーシス抑制に働く遺伝子を導入することにより生産能力を向上させる (Goodin, Kroemer, & Webb, 2009)。その他にも、タンパク性プロテアーゼインヒビターであるセルピン分子を発現させ、組換えタンパク質を保護する作用を持たせることも考えられる (Curtis *et al.*, 2002)。品質改善の取り組みとしては Mabashi & Jarvis が行ったように fused lobes (FDL) と呼ばれる β -N-acetylglucosaminidase を CRISPR-Cas9 システムなどのゲノム編集技術でノックアウトすることで N-結合型糖鎖修飾においてコア構造の先に N-acetylglucosamine を付加することも可能だと考えている (Mabashi, & Jarvis, 2017)。これらの知見は知的財産化され特許として抑えられている場合もある

が、細胞株が既知の株（Sf9 や High Five）などに限定されている場合もあり、2g2 はこれらの知財的権利に制限されないなどの利点も考えられる。

いずれにしても、組換えタンパク質生産宿主の中で昆虫細胞の開発は 40 年弱行われており、日本国内では、経済産業省から「Baculovirus 生産系を用いて生産された試薬の取扱い見直し（2020 年 11 月）」が通知され、アフィニティー精製した組換えタンパク質はカルタヘナ法規制非対象品として扱って良いことになり、より BICS が普及し易くなると想定している。

昆虫細胞はライフサイエンス研究からバイオ産業に貢献してきている。今後も 2g2 の開発を通して、様々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を期待する。

引用文献

- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B., & März, L.: Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, **16(2)**, 109-123 (1999). doi: 10.1023/a:1026488408951
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., & Krammer, F.: A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, **26(7)**, 1033-1036 (2020). doi: 10.1038/s41591-020-0913-5
- Bagdonaite, I., Thompson, A. J., Wang, X., Sogaard, M., Fougereux, C., Frank, M., & Wandall, H. H.: Site-specific O-glycosylation analysis of SARS-CoV-2 spike protein produced in insect and human cells. *Viruses*, **13(4)**, 551 (2021). doi: 10.3390/v13040551
- Blithe, D. L.: Biological functions of oligosaccharides on glycoproteins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **5(22)**, 81-98 (1993). doi: 10.4052/tigg.5.81
- Brindha, S., & Kuroda, Y.: A multi-disulfide receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein expressed in *E. coli* using a SEP-Tag produces antisera interacting with the mammalian cell expressed spike (S1) protein. *International Journal of Molecular Sciences*, **23(3)**, 1703 (2022). doi: 10.3390/ijms23031703
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & van Steensel, B.: Easy quantitative

- assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, **42(22)**, e168 (2014). doi: 10.1093/nar/gku936
- Cecchini, S., Virag, T., & Kotin, R. M.: Reproducible high yields of recombinant adeno-associated virus produced using invertebrate cells in 0.02- to 200-liter cultures. *Human Gene Therapy*, **22(8)**, 1021-1030 (2011). doi: 10.1089/hum.2010.250
- Cento, V., Alteri, C., Mancini, V., Gatti, M., Lepera, V., Mazza, E., & Perno, C. F.: Quantification of 1,3- β -d-glucan by Wako β -glucan assay for rapid exclusion of invasive fungal infections in critical patients: A diagnostic test accuracy study. *Mycoses*, **63(12)**, 1299-1310 (2020). doi: 10.1111/myc.13170
- Ceriani, M. F.: Basic protocols for *Drosophila* S2 cell line. *Circadian Rhythms: Methods and Protocols*, **362**, 415-422 (2007). doi: 10.1007/978-1-59745-257-1_33
- Cheever, M. A., & Higano, C. S.: PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clinical Cancer Research*, **17(11)**, 3520-3526 (2011). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3126
- Cox, M. M., & Hollister, J. R.: FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, **37(3)**, 182-189 (2009). doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.014
- Curtis, H., Sandoval, C., Oblin, C., Difalco, M. R., & Congote, L. F.: Insect cell

production of a secreted form of human α 1-proteinase inhibitor as a bifunctional protein which inhibits neutrophil elastase and has growth factor-like activities. *Journal of Biotechnology*, **93(1)**, 35-44 (2002). doi: 10.1016/s0168-1656(01)00380-7

Dimovasili, C., Fadouloulou, V. E., Kefala, A., Providaki, M., Kotsifaki, D., Kanavouras, K., & Kokkinidis, M.: Crystal structure of glutamate dehydrogenase 2, a positively selected novel human enzyme involved in brain biology and cancer pathophysiology. *Journal of Neurochemistry*, **157(3)**, 802-815 (2021). doi: 10.1111/jnc.15296

Ding, J. L., & Ho, B.: Endotoxin detection-from *limulus* amebocyte lysate to recombinant factor C. *Sub-cellular Biochemistry*, **53**, 187-208 (2010). doi: 10.1007/978-90-481-9078-2_9

Ding, W. F., Liu, Z. G., Sun, N., Zhang, X., Li, X., & Feng, Y.: Screening of single-cell clonal lines from *Papilio demoleus* Linnaeus cell lines for exogenous protein expression and adaptation in serum-free culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **56(6)**, 444-451 (2020). doi: 10.1007/s11626-020-00484-z

Evans, T. G., Bonnez, W., Rose, R. C., Koenig, S., Demeter, L., Suzich, J. A., O'Brien, D., Campbell, M., White, W. I., Balsley, J., & Reichman, R. C.: A phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11

- in healthy adult volunteers. *The Journal of Infectious Diseases*, **183**(10), 1485–1493 (2001). doi: 10.1086/320190
- Fath-Goodin, A., Kroemer, J. A., & Webb, B. A.: The Campoletis sonorensis ichnovirus vankyrin protein P-vank-1 inhibits apoptosis in insect Sf9 cells. *Insect Molecular Biology*, **18**(4), 497-506 (2009). doi: 10.1111/j.1365-2583.2009.00892.x
- Felberbaum, R. S.: The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, **10**(5), 702-714 (2015). doi: 10.1002/biot.201400438
- Fogeron, M. L., Lecoq, L., Cole, L., Harbers, M., & Böckmann, A.: Easy synthesis of complex biomolecular assemblies: wheat germ cell-free protein expression in structural biology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **8**, 639587 (2021). doi: 10.3389/fmolb.2021.639587
- Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarias, M., Mateu, E., & Segalés, J.: One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*, **27**(30), 4031-4037 (2009). doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.028
- Fujii, Y., Kaneko, M., Neyazaki, M., Nogi, T., Kato, Y., & Takagi, J.: PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a

dodecapeptide derived from human podoplanin. *Protein Expression and Purification*, **95**, 240-247 (2014). doi: 10.1016/j.pep.2014.01.009

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., & Regev, A.: Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, **29(7)**, 644-652 (2011). doi: 10.1038/nbt.1883

Graham, F. L., Russell, W. C., Smiley, J., & Nairn, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, **36(1)**, 59-72 (1977). doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., & Regev, A.: *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, **8(8)**, 1494-1512 (2013). doi: 10.1038/nprot.2013.084

Hancock, K., Narang, S., Pattabhi, S., Yushak, M. L., Khan, A., Lin, S.-C., & Tsang, V. C. W.: False positive reactivity of recombinant, diagnostic, glycoproteins produced in High Five™ insect cells: effect of glycosylation. *Journal of Immunological Methods*, **330(1-2)**, 130-136 (2008). doi: 10.1016/j.jim.2007.08.002

Harrison, R. L., & Jarvis, D. L.: Transforming lepidopteran insect cells for improved

protein processing and expression. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, **1350**. 359-379 (2016). doi: 10.1007/978-1-4939-3043-2_18

Hashimoto, Y., Macri, D., Srivastava, I., McPherson, C., Felberbaum, R., Post, P., & Cox, M.: Complete study demonstrating the absence of rhabdovirus in a distinct Sf9 cell line. *Plos One*, **12(4)**, e0175633 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0175633

Hashimoto, Y., Zhang, S., Zhang, S., Chen, Y.-R., & Blissard, G. W.: Erratum to: BTI-Tnao38, a new cell line derived from *Trichoplusia ni*, is permissive for AcMNPV infection and produces high levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnology*, **12(1)**, 12 (2012). doi: 10.1186/1472-6750-12-12

Hink, W. F.: Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*, **226(5244)**, 466-467 (1970). doi: 10.1038/226466b0

Hosaka, T.: 無細胞翻訳系における非天然アミノ酸の導入技術の開発とその応用. *生化学*, **79(3)**, 247-253 (2007).

Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.: 「遺伝子組換えカイコによる医薬品製造に関する PMDA 戦略相談の結果について」. *Press Release*, March 4 (2019). https://www.ibl-japan.co.jp/stockholder/ir_release/detail/id=5067&disp=inline. (Accessed 28 Dec. 2022)

International Conference on Harmonisation (ICH): Q5a-viral-safety-evaluation-of-

biotechnology-products-derived-from-cell-lines-of-human-or-animal-origin.

FDA Guidance Document, FDA-1996-D-0065 (1998a).

International Conference on Harmonisation (ICH).: Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. ICH harmonised tripartite guideline. *Developments in Biological Standardization*, **93**, 177-201 (1998b).

Isobe, S., Ota, A., Takata, S., Hamajima, R., Makino, S., Kobayashi, J., & Ikeda, M.: NISES-AnPe-428 cell line derived from the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* is permissive for multiple nucleopolyhedrovirus species from insects of four different families. *Cytotechnology*, **73(4)**, 643-655 (2021). doi: 10.1007/s10616-021-00485-0

Iwanaga, S.: Biochemical principle of *Limulus* test for detecting bacterial endotoxins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, **83(4)**, 110-119 (2007). doi: 10.2183/pjab.83.110

Kishi, S.: Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いた 高品質な抗体医薬の高生産 培養 シ ス テ ム の 開 発. 筑 波 大 学 博 士 論 文. (2015). <http://hdl.handle.net/2241/00134998>

Kobayashi, Y., Shiga, T., Shibata, T., Sako, M., Maenaka, K., Koshiba, T., & Kawabata, S. I.: The N-terminal Arg residue is essential for autocatalytic activation of a

- lipopolysaccharide-responsive protease zymogen. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(37), 25987-25995 (2014). doi: 10.1074/jbc.m114.586933
- Kobayashi, Y., Takahashi, T., Shibata, T., Ikeda, S., Koshiba, T., Mizumura, H., & Kawabata, S.-I.: Factor B is the second lipopolysaccharide-binding protease zymogen in the horseshoe crab coagulation cascade. *Journal of Biological Chemistry*, **290**(31), 19379-19386 (2015). doi: 10.1074/jbc.m115.653196
- Konishi, M., & Horiuchi, J.: 細胞の増殖を捉える一計測方法から比速度算出まで一. *生物工学*, **93**(3), 149-152 (2015). info:ndljp/pid/10519164
- Li, T. C., Scotti, P. D., Miyamura, T., & Takeda, N.: Latent infection of a new alphavirus in an insect cell line. *Journal of Virology*, **81**(20), 10890–10896 (2007). doi: 10.1128/JVI.00807-07
- Louis, N., Eveleigh, C., & Graham, F. L.: Cloning and sequencing of the cellular–viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, **233**(2), 423-429 (1997). doi: 10.1006/viro.1997.8597
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., & Marchler-Bauer, A.: CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, **48**(D1), D265-268 (2020). doi: 10.1093/nar/gkz991
- Mabashi-Asazuma, H., & Jarvis, D. L.: CRISPER-Cas9 vectors for genome editing and

host engineering in the baculovirus-insect cell system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(34), 9068-9073 (2017). doi: 10.1073/pnas.1705836114

Maeda, R., Shimizu, Y., & Hatanaka, C.: 小麦粉タンパク質の酵素分解と生理活性を有するペプチドの探索. 北九州工業高等専門学校研究報告, **43**, 87-91 (2010). info:ndljp/pid/10372664

Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., & Furusawa, M.: Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, **315**(6020), 592-594 (1985). doi: 10.1038/315592a0

Maghodia, A. B., Geisler, C., & Jarvis, D. L.: A new Bacmid for customized protein glycosylation pathway engineering in the baculovirus-insect cell system. *ACS Chemical Biology*, **16**(10), 1941-1950 (2021). doi: 10.1021/acscchembio.0c00974

Maghodia, A. B., & Jarvis, D. L.: Infectivity of Sf-rhabdovirus variants in insect and mammalian cell lines. *Virology*, **512**, 234-245 (2017). doi: 10.1016/j.virol.2017.09.025

Ma, H., Galvin, T. A., Glasner, D. R., Shaheduzzaman, S., & Khan, A. S.: Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines. *Journal of Virology*, **88**(12), 6576-6585 (2014). doi: 10.1128/JVI.00780-14

- Ma, H., Nandakumar, S., Bae, E. H., Chin, P. J., & Khan, A. S.: The *Spodoptera frugiperda* Sf9 cell line is a heterogeneous population of rhabdovirus-infected and virus-negative cells: Isolation and characterization of cell clones containing rhabdovirus X-gene variants and virus-negative cell clones. *Virology*, **536**, 125-133 (2019). doi: 10.1016/j.virol.2019.08.001
- Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, **32(Web Server issue)**, W327-331 (2004). doi: 10.1093/nar/gkh454
- Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L., & Shakin-Eshleman, S. H.: The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry*, **37(19)**, 6833-6837 (1998). doi: 10.1021/bi972217k
- Monie, A., Hung, C.-F., Roden, R., & Wu, T. C.: Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics : Targets & Therapy*, **2(1)**, 97-105 (2008).
- Muta, T., & Iwanaga, S. Clotting and immune defense in Limulidae. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **15**, 154-189 (1996). doi: 10.1007/978-3-642-79735-4_8
- Muta, T., Seki, N., Takaki, Y., Hashimoto, R., Oda, T., Iwanaga, A., & Iwanaga, S.:

- Purified horseshoe crab factor G. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(2), 892-897 (1995). doi: 10.1074/jbc.270.2.892
- Niwa, T., Ying, B.-W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T., & Taguchi, H.: Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(11), 4201-4206 (2009). doi: 10.1073/pnas.0811922106
- Obayashi, T.: The Plasma (1→3)-β-D-glucan assay, a Japanese contribution to the diagnosis of invasive fungal infection. *Medical Mycology Journal*, **58**(4), J141-147 (2017). doi: 10.3314/mmj.17.020
- Olga, K., Amélie, Z., Simon, P., Judit, O., Natacha, R., Paola, R., & Arnaud, P.: HR-Bac, a toolbox based on homologous recombination for expression, screening and production of multiprotein complexes using the baculovirus expression system. *Scientific Reports*, **12**(1). 2030 (2022). doi: 10.1038/s41598-021-04715-5
- Omasa, T.: 生物化学工学分野における 動物細胞工学に関する研究. *生物工学会誌*, **99**(1), 15-22 (2021). doi: 10.34565/seibutsukogaku.99.1_15
- Parums, D. V.: Editorial: First approval of the protein-based adjuvanted Nuvaxovid (NVX-CoV2373) Novavax vaccine for SARS-CoV-2 could increase vaccine uptake and provide immune protection from viral variants. *Medical Science Monitor*, **28**, e936523 (2022). doi: 10.12659/MSM.936523

- Patterson, A. R., Johnson, J., Ramamoorthy, S., Meng, X. J., Halbur, P. G., & Opriessnig, T.: Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays to detect Porcine circovirus-2 (PCV-2)-specific antibodies after vaccination or inoculation of pigs with distinct PCV-1 or PCV-2 isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **20(6)**, 744-751 (2008). doi: 10.1177/104063870802000605
- Puente-Massaguer, E., Cajamarca-Berrezueta, B., Volart, A., González-Domínguez, I., & Gòdia, F.: Transduction of HEK293 cells with BacMam baculovirus is an efficient system for the production of HIV-1 virus-like particles. *Viruses*, **14(3)**, 636 (2022). doi: 10.3390/v14030636
- Schneider, I.: Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **27(2)**, 353-365 (1972).
- Seki, N., Muta, T., Oda, T., Iwaki, D., Kuma, K., Miyata, T., & Iwanaga, S.: Horseshoe crab (1,3)- β -D-glucan-sensitive coagulation factor G. *Journal of Biological Chemistry*, **269(2)**, 1370-1374 (1994).
- Sezutsu, H., Sumitani, M., Kondo, M., Kobayashi, I., Takasu, Y., Suzuki, T., & Tatematsu, K.-I.: Construction of a platform for the development of pharmaceutical and medical applications using transgenic silkworms. *Yakugaku Zasshi*, **138(7)**, 863-874 (2018). doi: 10.1248/yakushi.17-00202-1

- Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S., & Azadi, P.: Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*, **30(12)**, 981-988 (2020). doi: 10.1093/glycob/cwaa042
- Shuster, C. N., Barlow, R. B., & Brockmann, H. J.: *The american horseshoe crab*. Cambridge: Harvard University Press, p. 427 (2003).
- Smith, D. R., Newhard, J. J., McGowan, C. P., & Butler, C. A.: The Long-term effect of bleeding for limulus amebocyte lysate on annual survival and recapture of tagged horseshoe crabs. *Frontiers in Marine Science*, **7**, 607668 (2020). doi: 10.3389/fmars.2020.607668
- Smith, G. E., Foellmer, H. G., Knell, J., DeBartolomeis, J., & Voznesensky, A. I.: *Spodoptera frugiperda* single cell suspension cell line in serum-free media, methods of producing and using. *Patent*, US6103526. (1988).
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J.: Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, **3(12)**, 2156-2165 (1983). doi: 10.1128/mcb.3.12.2156-2165.1983
- Spiess, K., Lammel, A. & Scheibel, T.: Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, **10(9)**, 998-1007 (2010). doi: 10.1002/mabi.201000071

- Takaki, Y., Seki, N., Kawabata, S.-I., Iwanaga, S., & Muta, T.: Duplicated binding sites for (1→3)-β-D-glucan in the horseshoe crab coagulation factor G. *Journal of Biological Chemistry*, **277(16)**, 14281-14287 (2020). doi: 10.1074/jbc.m200177200
- Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T. W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., & Kobata, A.: Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86(20)**, 7819-7822 (1989). doi: 10.1073/pnas.86.20.7819
- Takeuchi, M., Takasaki, S., Shimada, M., & Kobata, A.: Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, **265(21)**, 12127-12130 (1990). doi: 10.1016/S0021-9258(19)38318-8
- Van Oers, M. M., Pijlman, G. P., & Vlak, J. M.: Thirty years of baculovirus–insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology*, **96(1)**, 6-23 (2015). doi: 10.1099/vir.0.067108-0
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P.: The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, **13(4)**, 213-217 (1977). doi: 10.1007/bf02615077

- Wilde, M., Klausberger, M., Palmberger, D., Ernst, W., & Grabherr, R.: Tnao38, high five and Sf9-evaluation of host–virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. *Biotechnology Letters*, **36(4)**, 743-749 (2014). doi: 10.1007/s10529-013-1429-6
- Wurm, F. M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, **22(11)**, 1393-1398 (2004). doi: 10.1038/nbt1026
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G.: Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, **127(3)**, 335-347 (2007). doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012
- Yoneda, A., & Kurokawa, T.: A sensitive sandwich ELISA to measure (1,3)- β -d-glucan levels in blood. *Journal of Immunological Methods*, **365(1-2)**, 158-165 (2011). doi: 10.1016/j.jim.2010.12.011
- Zhang, S., Go, E. P., Ding, H., Anang, S., Kappes, J. C., Desaire, H., & Sodroski, J. G.: Analysis of glycosylation and disulfide bonding of wild-type SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Journal of Virology*, **96(3)**, e0162621 (2022). doi: 10.1128/JVI.01626-21
- Zheng, G. L., Li, M. M., & Li, C. Y.: Establishment and characterization of three new cell lines from the embryonic tissue of *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera:

Scarabaeidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **50(6)**, 483-488 (2014). doi: 10.1007/s11626-013-9732-z

Zheng, L., Ma, Y., Chen, M., Wu, G., Yan, C., & Zhang, X. E.: SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain N-glycans facilitate viral internalization in respiratory epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **579**, 69-75 (2021). doi: 10.1016/j.bbrc.2021.09.053

出版リスト

Yamamoto Y, Kajiura H, Nishibu T, Fujiyama K.

Mamestra brassicae NIAS-Mb-32 cell strain 2g2 enables high-yield recombinant protein production in baculovirus-free and baculovirus-based insect cell expression. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **134**, 432-440 (2022) .

その他

Yamamoto Y, Fukuchi H, Kitagawa T.

Horseshoe crab-derived recombinant factor G and method for measuring β -glucan using same. *Patent*, WO2021117841A1, (2021) .

謝辞

本研究を遂行すりにあたり、終始多大なご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学生物工学国際交流センターの藤山和仁教授に心より感謝申し上げます。並びに、数々のご指導とご助言を賜りました同センターの三崎亮准教授と梶浦裕之助教に厚く御礼申し上げます。

また、副査である大阪大学大学院工学研究科の大政健史教授、並びに本田孝祐教授には、本論文の作成及び博士論文公聴会における発表内容について、丁寧なご指導を賜りました。深く心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました、富士フイルム和光純薬株式会社の白木一夫氏、吉井陽市氏、定村佳房氏、西部隆宏氏に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご支援、ご鞭撻頂きました北川剛史氏、福地大樹氏に深く感謝いたします。

さらに、本研究を遂行するにあたり、富士フイルム株式会社のバイオサイエンス&エンジニアリング研究所及び富士フイルム和光純薬株式会社の生産プロセス開発部の研究員、並びに開発部、知財部・法務部のスタッフの方々にご支援と激励を頂きました。心より御礼申し上げます。

最後に、社会人博士課程への入学にご理解頂き、本研究を遂行するなかで色々な負担をかけてしまいながらも陰で支えてくれた、私の妻や家族に、心より感謝いたします。

付録

Sf9、2g2 と Expi293 で生産した rSCoV2-sssp の N-結合型糖鎖修飾解析

下記 rSCoV2-sssp の糖鎖解析は共同研究者である大阪大学の梶浦 裕之 助教に解析頂いた。

各宿主細胞由来の rSCoV2-sssp は SDS-PAGE に供された。SDS-PAGE 後のゲルは CBB 染色された。約 100~200 kDa に位置するバンドを小さな断片として切り抜かれ、チューブに移された。切り抜いたゲル断片は acetonitrile (CAN) : 50 mM NH_4HCO_3 (1 : 1) と一緒にボルテックスを行い、脱色されるまで行われた。脱色されるまでに、数回の脱色液は交換された。ゲル断片内の rSCoV2-sssp の還元は 25 mM DTT を 50 度で 30 分反応によって行われた。そのチューブは 27 度まで戻し、上清は除かれた。25 mM iodoacetamide を等量加えて 27 度で 30 分間、暗闇で反応させた。ゲル断片は dH_2O で数回洗浄し、acetonitrile と SpeedVac (TOMY) にて脱水された。rSCoV2-sssp は ProteaseMAX™ Surfactant (Promega) が加えられた digestion buffer (50 mM NH_4HCO_3) 中で Trypsin Gold (Promega) と sequence grade chymotrypsin (Promega) を 50 度、1 時間と 37 度、18 時間反応させることによって切断された。この chymotrypsin により断片化処理されたペプチドは ZipChip (Thermo Fisher Scientific) によって精製された。精製された断片化ペプチドは nanoLC-MS/MS によって解析された。