

論文内容の要旨

論文題目

バキュロウイルスーカイコ発現系による医薬タンパク質 生産を目指した基盤研究

氏名

菅井（二ツ森） 睦美

【序論】

バイオテクノロジーの飛躍的な発展により、生命現象や疾病原因の解明が進み、それを基にした新しい医薬品設計が可能になってきた。また、遺伝子組換え技術の発展に伴いタンパク質医薬品生産開発が推進されてきており、特に高い臨床効果及び安全性から抗体医薬の重要性は益々増加している。抗体医薬を中心としたタンパク質医薬品は、主にチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの細胞培養によって生産されているが、課題も多く残っている。例えば、設備投資やランニングコストが非常に高く、タンパク質医薬品を安定に供給できる製造設備が不足しているといった問題点がある。このような問題点を解決するために、トランスジェニック動植物でのタンパク質生産の実用化が積極的に進められているものの、この生産系については環境的・倫理的な問題の解決が求められている。このため細胞培養やトランスジェニック生物に代わる実用的なタンパク質生産系の確立が望まれている。

新しい医薬タンパク質生産系の候補として1983年テキサスA&M大学のSummersらによって開発された、バキュロウイルス発現系があげられる。バキュロウイルス発現系は高いタンパク質生産能を持ち、ジスルフィド結合・複合体形成・プロセッシング・翻訳後修飾が起こるため、組換えタンパク質は本来の活性を有していることが多いという量と質を兼ね備えたタンパク質生産系である。バキュロウイルスは鱗翅目昆虫にしか感染せず動物に感染しないので、安全なタンパク質発現用ウイルスとして幅広く使用されている。バキュロウイルス発現系は昆虫細胞を宿主として用いることが多いことに加え、宿主としてカイコ虫体を使うことによりさらに多くのメリットが見込まれる。カイコは卵から孵化してから約一万倍にまで急成長するため、高いタンパク質生産能力を持っている。カイコで

のタンパク質生産は細胞培養とは異なり、培養タンクなどの大規模設備や大量生産に最適な培養条件の検討が不必要である。カイコはそれ自身が培養タンクであるのでカイコの頭数を増減するだけでタンパク質生産量を調節することができ、また数千年にわたる品種改良と養蚕の技術が集積されていることから大量飼育も容易である。更に、カイコは高度に家畜化されているため餌を自分で探しに行かず、成虫においては空を飛べなくなっているため、逃げ出して野生化する可能性は全くなく、トランスジェニック動植物のように環境への影響を心配する必要がない。加えて、これまでカイコでは動物やヒトに感染する病気が知られていないことから、安全なタンパク質生産ホストであると言える。このようにバキュロウイルスとカイコを組み合わせたタンパク質発現系はコスト・設備・環境・安全性といった点において既存のタンパク質生産系の中で総合的にすぐれている系であると考えられる。

本研究ではこのようなバキュロウイルス-カイコ発現系によるタンパク質医薬品生産を目指した基盤技術を整備することを目的とした。

【結果と考察】

1.FLAG 融合タンパク質精製法の改良

FLAG タグは8つの親水性アミノ酸から構成される組換えタンパク質の検出・精製において広く使われているタグである。FLAG タグ融合タンパク質の精製には FLAG 抗体カラムが使用される。その抗体カラムからの目的タンパク質の溶出には FLAG ペプチド競合法を用いることが一般的である。FLAG ペプチド競合溶出法は溶出条件が穏やかであるため、目的タンパク質を変性させることなく精製できるものの、精製タンパク質に FLAG ペプチドが混入することにより、タンパク質相互作用解析や抗体作製のための抗原調整において悪影響を及ぼす場合がある。また、FLAG ペプチド競合法にかわる溶出方法として酸性条件下での溶出法があるが、この方法では目的タンパク質が変性してしまうことが多い。そこで、本研究では微酸性条件下でアルギニンがタンパク質間相互作用を非特異的に調節できる性質(1)を FLAG 精製に応用し、ペプチド混入や酸性条件によるタンパク質変性が起こらない精製法の確立を目指した。

バキュロウイルス-カイコ発現系で発現させた FLAG タグ融合 Caf1 タンパク質を FLAG 抗体カラムによるアフィニティー精製を行い、FLAG ペプチド、酸性グリシン、微酸性アルギニンそれぞれを用いて溶出した。それぞれの条件で溶出した Caf1 をゲルろ過により分離したところ、酸性グリシン溶出 Caf1 はペプチドあるいは微酸性アルギニンで溶出したものより、10 分程度遅くゲルろ過カラムから溶出された (Fig1)。このことから微酸性アルギニン溶出条件下では溶出タンパク質の構造が変化していないものの、酸性グリシン溶出条件下では何かしらの構造変化

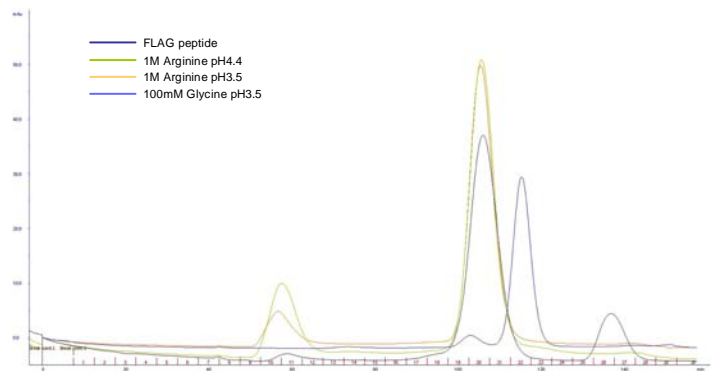


Fig1 Caf1/FLAGゲルろ過結果

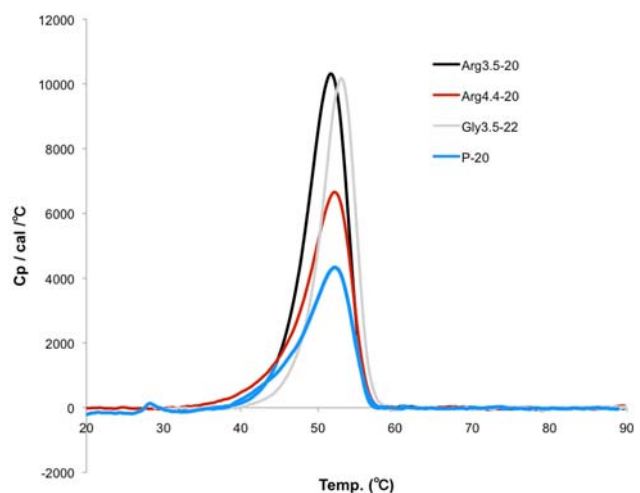


Fig2 Caf1/FLAG DSC結果

が生じていることが推測された。また、示差走査型熱量測定 (DSC) を行った結果、酸性グリシンによる溶出タンパク質はペプチドあるいは微酸性アルギニンによる溶出タンパク質より変性温度が約2度高いことがわかり、このことから微酸性アルギニン溶出は目的タンパク質の変性を引き起こしていないことが示唆された。本手法により JNK3、膜蛋白質も同様に精製が可能となり、その有効性も示された (発表論文1)

2.バキュロウイルスーカイコ発現系における分泌タンパク質発現システムの改良

創薬ターゲットあるいはタンパク質医薬として注目されているサイトカイン等の分泌タンパク質は、バキュロウイルス発現系において不溶性になる場合があるという問題点がある。特に、バキュロウイルス発現系におけるシグナルペプチドについては報告例が少なく、効率的な分泌タンパク質発現系の確立が望まれてきた。そこで、本研究ではシグナルペプチドの探索・改良により、バキュロウイルス発現系の分泌タンパク質の分泌量向上を目的とした。

まず、カイコ体内で分泌量が豊富であるいくつかの分泌シグナルを検索したところ、分泌シグナル N 末端側に塩基性アミノ酸、中央部に極性アミノ酸があるという分泌シグナル一般的な共通点の他に、C 末端側に極性アミノ酸が存在しているということがわかった (table1)。そこで、本研究ではバキュロウイルスーカイコ発現系における分泌シグナル N 末端側塩基性アミノ酸、C 末端側の極性アミノ酸の影響について検証を行うために、N 末端側塩基性アミノ酸及び/あるいは C 末端側極性アミノ酸を導入したシグナルペプチドを設計 (table2)、その下流に hIL-4、hIL-13 あるいは hIL-11 受容体細胞外ドメインを融合し、それぞれの分泌量について ELISA 法で測定を行った。この結果、hIL-13 と hIL-11 受容体細胞外ドメインの場合、分泌シグナル N 末端側塩基性アミノ酸数が増加すると分泌量が減少していることがわかった (fig3-5)。また、C 末端側極性アミノ酸を導入すると分泌量が増加し、更に N 末端側塩基性アミノ酸導入により分泌量が減少したものが回復した (fig3-5)。以上から、バキュロウイルス発現系において分泌シグナル C 末端側極性アミノ酸は重要な役割を果たしていることが示唆された (投稿論文準備中)。

protein name	accession number	signal peptide sequence
30K	X07552	MR L TLF A FV L AV C AL A SN
SP1	NM_001113276	MR V L V LL A CL A AA S A
SP2	NM_001044125	M K S V L I L A GL V AV A L S S A VP K P
bombyxin A-4	NM_001128135	M K I L L A I A L M L S T V M V S T
vitellogenin	AB239763	M K L F V L AA I IA A V S S
lysozyme	NM_001043983	M Q K L I I F A L V V L C V G S E A
chitinase precursor	AB052914	M R A I F A T L A V L A S C A A L V Q S

Table 1 カイコ分泌シグナル一覧

30K	MR L TLF A FV L AV C AL A SN A
SP1	MR V L V LL A CL A AA S A
SP1-2	MR V L V LL A CL A AA S N A
SP1-3	MR R V L V LL A CL A AA S A
SP1-4	MR R V L V LL A CL A AA S N A
SP1-5	MR R R R V L V LL A CL A AA S A
SP1-6	MR R R R V L V LL A CL A AA S N A

Table2 設計分泌シグナル一覧

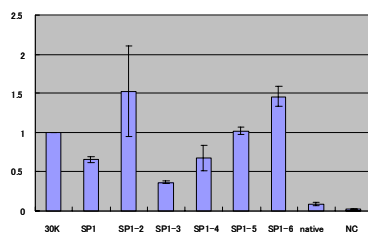


Fig3 hIL-4 相対分泌量

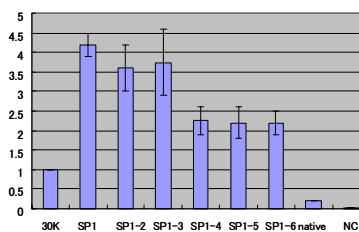


Fig4 hIL-13 相対分泌量

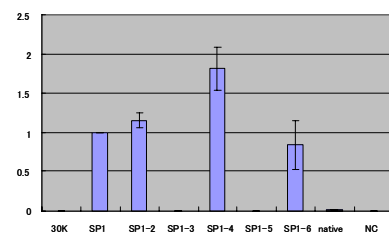


Fig5 hIL-11 受容体細胞外ドメイン相対分泌量

3.Fc 融合タンパク質の発現・精製法改良及び物性解析

抗体は抗原に結合する可変ドメイン (Fab) と、エフェクター機能をもたらす定常ドメイン (Fc) の機能的に独立した2つのドメインから構成される。Fc ドメインは長い血漿半減期、Fc 受容体結合、プロテイン A 結合、補体結合、胎盤通過などの機能を有している。これらの機能を付与するために、Fc ドメインを融合した治療用タンパク質に注目が集まっている。しかし、Fc 融合タンパク質の物性については十分な知見が報告されていない。

そこで、本研究では Fc 融合タンパク質発現・精製法の改良及び物性解析を行い、Fc 融合タンパク質の医薬品開発を目指した基盤構築を目的とした。

バキュロウイルス-カイコ発現系で発現させた Fc 融合 hIL-4 受容体をプロテイン A カラムで精製し、その精製タンパク質についてゲルろ過分離解析を行ったところ凝集体が非常に多く存在していることがわかった。そ

こで、この凝集体を減少させるためにシャペロンタンパク質の PDI あるいは Bip との共発現を行った。PDI との共発現では凝集体の減少は見られなかったが、Bip と共発現させた場合には hIL-4 受容体の凝集体の割合が 55.3%から 45.2%へと減少した。このことにより Fc 融合タンパク質と Bip の共発現では Fc 融合タンパク質の発現量は減少するものの、より高品質なタンパク質が得られることが示唆された。

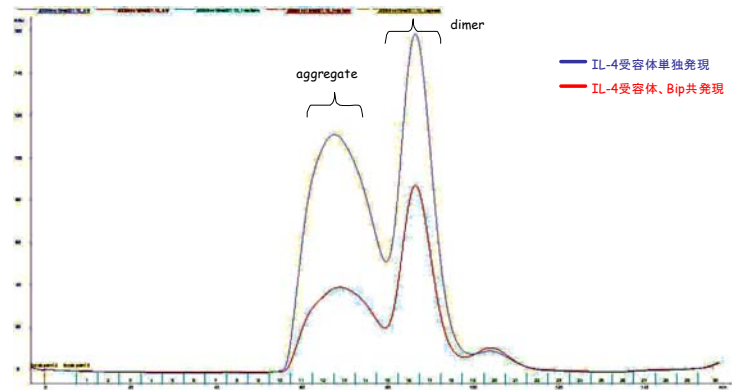


Fig6 IL-4受容体ゲルろ過結果

【結言】

バキュロウイルスとカイコを用いた発現・精製法の改良を行った本研究により、タンパク質医薬生産実用化への可能性を広げることができた。まだ、バキュロウイルス-カイコ発現系には解決すべき問題は残っているが、今後更に発現系の基盤技術を整備していくことにより医薬品や工業用酵素等、あらゆる有用タンパク質の大量生産が可能になることが期待される。

【参考文献】

- [1] Einhauer, A., and A. Jungbauer. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2001; 49:455-465.
- [2] Smith GE, Fraser MJ, Summers MD. Molecular Engineering of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *J Virol.* 1983 May;46(2):584-593.

【発表論文】

- (1) Futatsumori-Sugai M, Abe R, Watanabe M, Kudou M, Yamamoto T, Ejima D, Arakawa T, and Tsumoto K. Utilization of an arginine-elution method for FLAG-tag chromatography Protein Expr. Purif. in press, (2009)
- (2) Signal peptide design for improvement of the recombinant protein secretion level in baculovirus expression vector system. (投稿準備中)