



Study on Production of Virus-like Particles Using Stably Transformed Insect Cells

松田, 拓也

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Date of Publication)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8649号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482397>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏 名 _____ 松田 拓也 _____

専 攻 _____ 応用化学専攻 _____

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

Study on Production of Virus-like Particles Using Stably

Transformed Insect Cells

組換え昆虫細胞を用いたウイルス様粒子の生産に関する研
究

指導教員 _____ 山地 秀樹 _____

(注) 2, 000 字~4, 000 字でまとめること。

ウイルス様粒子 (Virus-Like Particles, VLPs) は、ウイルスの構造タンパク質や表面タンパク質から構成される粒子であり、外部構造はウイルスに似ているためウイルスと同様の免疫応答を誘導できるが、内部にはゲノムを持たないため感染性を有さない (Fig. 1a, b)。これらの特徴から、VLPs は安全かつ有効性の高いワクチンとして、哺乳動物細胞や酵母、大腸菌などの種々の組換えタンパク質生産系を用いて生産され、様々な感染症への応用が研究されており、これまでにいくつかの VLPs ワクチンが承認を受けている。また、昆虫細胞は組換えタンパク質の生産において、哺乳動物細胞に比べ安価かつ簡便に培養でき、ヒト型とは異なる糖鎖修飾を行うものの高等真核生物の翻訳後修飾を施すため複雑なタンパク質やタンパク質複合体の生産を行うことができる。そのため、ヒト型の糖鎖修飾が必要である抗体医薬とは異なり、ヒト型の糖鎖修飾が必須ではないと考えられる組換えタンパク質ワクチンの生産に応用可能であり、昆虫細胞は VLPs 生産のためのバランスの取れた宿主細胞であるといえるだろう。本論文ではこのような背景から、組換え昆虫細胞を用いた VLPs の生産に関する研究を行い、これについてまとめている。

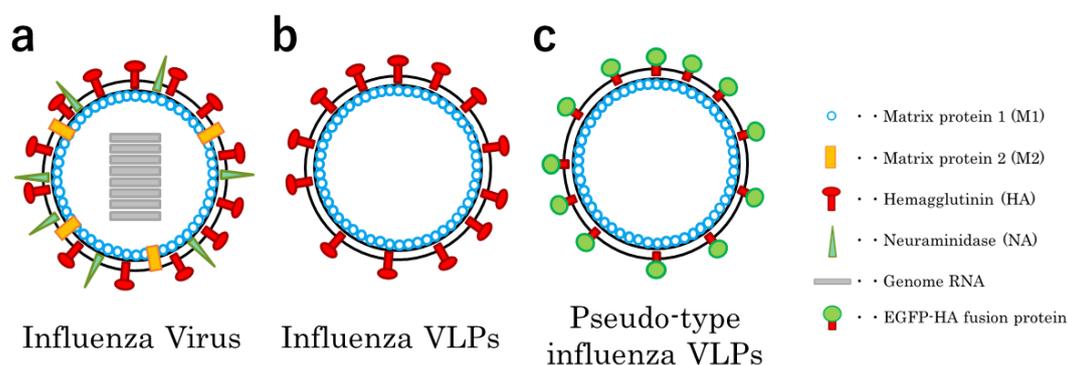


Fig. 1 インフルエンザウイルス(a)、本研究で作製したインフルエンザ VLPs (b) および緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 提示インフルエンザ VLPs (c) の模式図

第 1 章では、組換え昆虫細胞を用いたインフルエンザ VLPs (Fig. 1b) の生産について検討を行った。インフルエンザウイルスの主要抗原タンパク質であるヘマグルチニン (HA) および構造タンパク質であるマトリックスタンパク質 1 (M1) の遺伝子を、異なる薬剤耐性遺伝子を有する 2 種類の高発現型プラスミドベクターに挿入した。構築した 2 種のプラスミドベクターを昆虫細胞 High Five にコトランスフェクションし、2 種類の抗生物質存在下で培養することにより、HA と M1 の遺伝子がゲノムに組み込まれた組換え昆虫細胞を樹立した。樹立した昆虫細胞において、HA は主に細胞膜、M1 は細胞質に存在しており、インフルエンザウイルス感染細胞における HA, M1 の存在領域と一致していた。また、western blotting を用いた分析により、培養上清中に HA および M1 分子が分泌されていることや、免疫沈降法により HA と M1 からなる複合体の存在が示唆された。TEM を用いた観察により表面に HA 分子が存在し、形態がインフルエンザウイルスに近い粒子の存在を確認した。

また、作製した組換え昆虫細胞の培養上清より、16 HAU/50 μ l の HA 活性が確認され、ELISA により測定した HA 濃度は 11 μ g/ml であった。これらの結果から、本研究で樹立した組換え昆虫細胞による、インフルエンザ VLPs の効率的な分泌生産が可能であることが分かった。

第 2 章では、第 1 章の組換え昆虫細胞を用いたインフルエンザ VLPs 生産の知見を活かし、インフルエンザ VLPs を基盤とする、VLPs 表面への外来タンパク質提示について検討を行った。現在、VLPs ワクチンの研究開発は非常に時間と労力が掛かるプロセスである。VLPs の生産では、VLPs を構成するウイルスタンパク質の組み合わせを決定する必要があるため、由来となるウイルスに関する知見が必要となり、特に新興感染症に対するワクチン開発において、抗原タンパク質の遺伝情報が分かれば生産可能である mRNA およびサブユニットワクチンに比べ時間が掛かってしまう。そこで、インフルエンザ VLPs を基盤として、他種のウイルスの抗原タンパク質を VLPs 表面に提示することにより、VLPs ワクチン開発の迅速化を目指した。本研究ではモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を選択し、EGFP の c 末端側に 4 種類の長さの異なる HA の c 末端側ペプチドをそれぞれ付加した EGFP-HA-short (-mid1, -mid2, -long) 融合タンパク質の遺伝子を作製し、プラスミドへ組み込んだ。それぞれの EGFP-HA 発現プラスミドを M1 発現プラスミドと共に昆虫細胞 High Five にコトランスフェクションし、一過的に発現させることで、EGFP を表面に提示したインフルエンザ VLPs の生産を試みた (Fig. 1c)。トランスフェクション後に共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、特に EGFP-HA-mid2 および-long を用いた場合において、細胞膜上に EGFP の蛍光が観察されたことから、HA の c 末端側ペプチドの付加による EGFP 分子の細胞膜への提示が可能であることが示唆された。また、蛍光を発する細胞の数は長い HA の c 末端側ペプチドを用いた場合ほど多くなった。Western blotting により培養上清を分析したところ、M1 単独の発現では M1 は検出されなかったが、EGFP-HA 融合タンパク質と M1 を共発現した場合には上清より M1 が検出された。このことから、EGFP-HA との共発現により M1 が細胞質から上清中に VLPs として分泌している可能性が示唆された。金ナノ粒子標識抗体による免疫染色を用いた電子顕微鏡観察では、精製後の上清から表面に EGFP 分子を持つ粒子が観察された。これらの結果から、EGFP-HA と M1 分子からなるインフルエンザ VLPs が分泌生産されていることが確認された。HA の c 末端側ペプチドと M1 を用いることにより、外来タンパク質をインフルエンザ VLPs の表面に提示できることを明らかにした。

第 1 章では、昆虫細胞-バキュロウイルス系などの一過性発現系ではなく、組換え昆虫細胞を用いた VLPs の安定発現について検討した。現在、組換えタンパク質生産に利用する組換え昆虫細胞の樹立にはプラスミドのランダムインテグレーションを利用しており、この方法では目的遺伝子の導入遺伝子座や導入コピー数が制御できないといった欠点がある。

(氏名：松田 拓也 NO.3)

このため、目的タンパク質を高発現可能な細胞の樹立には長期間のスクリーニングを行う必要がある。そこで第3章では、高発現な組換え細胞株樹立の樹立の迅速化を目指し、昆虫細胞におけるゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を利用した目的遺伝子座への遺伝子導入を検討した。CRISPR-Cas9 によるゲノムの切断位置としては、High Five 細胞の由来である *Trichoplusia ni* において活性の阻害が幼虫の成長に致命的でないことが報告されている carboxypeptidase A2 遺伝子の exon1 領域を選択した。High Five における CRISPR-Cas9 によるゲノム切断用に設計した Cas9 プラスミドとターゲット領域への位置特異的な遺伝子ノックインのために設計したドナーベクターを High Five 細胞にコトランスフェクションしたところ、ゲノム DNA への目的遺伝子の組込みが確認された。抗生物質を用いたセレクションの後に得られた 21 個の抗生物質耐性細胞株の内 19 個の株よりゲノム DNA への遺伝子の組込みが確認されたが、目的遺伝子の発現および目的タンパク質の活性は確認できなかった。これらの結果から、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 により位置特異的に遺伝子ノックインを行うことにより組換え昆虫細胞を樹立できたが、今後 High Five において導入遺伝子を高発現可能な遺伝子座を特定する必要があると考えられる。