

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510220

研究課題名（和文）バキュロウイルス時間差多重感染による糖鎖修飾ライブラリー構築システムの開発

研究課題名（英文）Development of glycosyl modification machinery by sequential multiple infections of baculoviruses

研究代表者

後藤 猛（GOTOH TAKESHI）

秋田大学・大学院工学資源学研究所・教授

研究者番号：10215494

研究成果の概要（和文）：糖転移酵素を昆虫細胞内に時間差発現させることによるタンパク質の糖鎖修飾システムを構築するために、早期発現型の gp64 プロモーターの下流に糖転移酵素の可溶性ドメインの遺伝子を導入した複数の組換えバキュロウイルスを作成した。さらに、組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させて組換えタンパク質を生産する際にしばしば問題となるプロテアーゼ分解について、これを安価で効率的に抑制する方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Several recombinant baculoviruses that contained cDNAs of glycosyltransferase soluble domains under the control of gp64 early promoter were constructed, in order to develop a glycosyl modification machinery in insect cells, in which multiple glycosyltransferases were sequentially expressed. In addition, a novel method was proposed that the proteolytic degradation of recombinant proteins expressed in baculovirus-infected insect cells was efficiently inhibited.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物活性分子の設計・合成・糖鎖化学

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾のための化学合成法の研究が行われてきたが、保護・脱保護反応を経た多段階の化学反応を用いており、不安定なタンパク質に直接応用することは難しい。近年、種々の糖転移酵素を用いた酵素合成反応も研究されている。特に、糖転移酵素を時系列的に反応系に添加する方法は、構造と機能発現の研究に強力なツールとなる糖鎖ライブラリーの構築を可能にするものとして注目

されている。しかし、この様な糖転移酵素の *in vitro* 利用には酵素反応の生成物阻害や酵素の安定性の問題が残されている。

一方、細胞培養による糖鎖修飾の研究も行われている。バキュロウイルスを遺伝子ベクターとする昆虫細胞-バキュロウイルス発現系は、生理活性の発現に必要な翻訳後修飾が施された組換えタンパク質の大量生産を可能にする。しかし、昆虫細胞におけるタンパク質翻訳後の糖鎖修飾経路では動物に比べ

て幾つかの糖転移酵素が欠落しているため、昆虫細胞によって生産されるタンパク質の糖鎖は通常の動物タンパク質が有するものとは異なる。そのため動物の糖転移酵素の遺伝子を Sf9 昆虫細胞の染色体内に組み込んだ昆虫細胞 Mimic Sf9 が開発されている (Invitrogen)。しかし、この Mimic Sf9 では動物細胞に近い糖鎖修飾反応が期待できるものの、多様な構造の糖鎖を意図して調製することはできない。

著者は、これまで昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いた組換えタンパク質の生産プロセスに関する研究を行ってきた。その過程で、ウイルスエンベロープを酵素的に放射能標識する ELVA 法を開発し、一旦感染した昆虫細胞へのウイルス再結合は時間経過に伴って減少するものの感染後 12 時間までは可能であること、複数のバキュロウイルスの感染多重度 (MOI) を変化させて時間差感染させることにより昆虫細胞培養系の中に複数の組換えタンパク質を共発現できることを示した。

2. 研究の目的

種々の糖転移酵素遺伝子をそれぞれ導入した複数のバキュロウイルスを昆虫細胞に時間差多重感染させることにより、発現する糖転移酵素の種類と濃度を時系列的に変化させ、この転移酵素群を用いて糖鎖が多様に結合したタンパク質の糖鎖修飾ライブラリーを構築するシステムを開発する。さらに、糖転移酵素の発現と反応を数学モデルで表し、糖鎖構造の分布をシミュレートするプログラムを開発する。

3. 研究の方法

(1) 組換えバキュロウイルスの作成

糖鎖修飾を施すモデルタンパク質として O 型糖鎖を有するヒトインターロイキン-2 (hIL-2) を、糖鎖修飾のための糖転移酵素は β -1,4-Galactosyltransferase (AcGal) と N-acetylglucosaminyl transferase II (AcGlcNAc) を用いた。まず始めに、トランスフェクションベクター pFastBac 1 (Invitrogen) をもとに、プロモーターを感染前期にはたらく gp64 プロモーター (P_{gp64}) に置き換えた pFastBac1-Pgp64 さらに P_{gp64} の下流に gp64 分泌シグナル配列 (SS) を付加した pFastBac1-Pgp64-SS をベクターとして作成した。hIL-2 の C 末側に His-tag を付加したもの、また、各糖転移酵素の N 末側の細胞質ドメインと膜貫通ドメインを除いた可溶性ドメインに検出用の Flag タグを付加したものをそれぞれ PCR 増幅し、得られた cDNA を P_{gp64} の下流にそれぞれ組み込んだ。得られたトランスファーベクター (pFastBac1-Pgp64-hIL2, pFastBac1-Pgp64-SS-hIL2, pFastBac1-Pgp64-

GalT, pFastBac1-Pgp64-SS-GalT, pFastBac1-Pgp64-GlcNAcT, pFastBac1-Pgp64-SS-GlcNAcT) で大腸菌 DH10Bac を形質転換し、トランスファーベクターと Bacmid DNA との部位特異的トランスポジションにより組換え Bacmid DNA をそれぞれ構築した。組換え Bacmid DNA を有する大腸菌はブルー・ホワイトセレクションにより選別した。抽出した組換え Bacmid DNA を Cellfectin (Invitrogen) を用いて Sf9 昆虫細胞にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを得た。ウイルスタイターは限界希釈法により決定した。

(2) バキュロウイルス感染培養

指数増殖期にある Sf9 細胞を無血清培地 Sf-900 II に懸濁させて細胞密度 5×10^6 cells/mL とし、ウイルスを感染多重度 (MOI) 10 pfu/cell で接種した。1 時間振とうした後、新鮮培地をさらに加えて 1×10^6 cells/mL とし、28°C で培養を行った。

(3) hIL-2 の精製

感染培養液を遠心分離により細胞外面分と細胞画分に分け、細胞外面分から 40-60% 硫酸アンモニウム分画により hIL-2 を塩析させた。沈殿を PBS で透析した後、Ni アフィニティー樹脂 (Ni-IMAC Profinity) と混合した。5 mM Imidazole を含むリン酸緩衝液 (pH 8.0) で十分洗浄した後、500 mM Imidazole により hIL-2 を溶出させた。

(4) 組換えタンパク質の分析

精製物の SDS-PAGE を行った後、ウエスタンブロットにより組換えタンパク質を分析した。1 次抗体には Goat anti-hIL2 Polyclonal antibody (Sigma) または Rabbit Anti-Flag Polyclonal antibody (Rockland)、2 次抗体には Anti-Goat IgG AP conjugate または Anti-Rabbit IgG AP conjugate を使用した。

hIL-2 の糖鎖分析試料はヒドラジン分解により調製した。凍結乾燥した hIL-2 に無水ヒドラジンを加え、60°C で 6 h ヒドラジン分解反応を行った。ヒドラジンを減圧留置した後、飽和炭酸水素ナトリウム-無水酢酸混合液を加えて遊離した糖鎖の N-アセチル化を行った。これを LC-TOF-MS により分析し、hIL-2 糖鎖の構造を推定した。

(5) 糖転移酵素活性測定

AcGal の酵素活性は 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.2, 1 mM $MgCl_2$, 0.05 w/v% Triton X-100, 25 μ M UDP-Gal, 50 μ M GlcCer, 0.5 μ M UDP-[3H]Gal (100 Ci/mmol), ラクトシルセラミド (GalGlcCer) を含む全量 100 μ L の反応溶液を用いて測定した。細胞内または培地面分 10 μ L を含む酵素反応溶液を 37°C で 30 min インキュベートし、 $CHCl_3/MeOH$ (2:1 v/v) に抽出された生成物の放射能を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

4. 研究成果

(1) 組換えバキュロウイルスの構築

構築した6種類の組換え Bacmid DNA をそれぞれ Sf9 昆虫細胞にトランスフェクションし、2種類の hIL-2 発現バキュロウイルス (AchIL2, AcSShIL2) と4種類の糖転移酵素発現バキュロウイルス (AcGalT, AcSSGalT, AcGlcNAcT, AcSSGlcNAcT) を作成した。各ウイルスについて感染培養を数回繰り返して増幅を行い、Table 1 に示すウイルスストック溶液が得られた。

Table 1. Titer of virus stock solutions.

Virus	Titer [pfu/mL]
AchIL2	4.79×10^8
AcSShIL2	1.39×10^7
AcGalT	8.30×10^7
AcSSGalT	1.23×10^8
AcGlcNAcT	6.90×10^8
AcSSGlcNAcT	1.39×10^7

(2) 糖転移酵素の発現

4種類の糖転移酵素発現バキュロウイルスを Sf9 細胞に感染させて培養を行い、その発現挙動を調べた。Fig. 1 は AcSSGalT 感染培養における細胞内外の GalT をウェスタンブロットにより分析した結果を示す。GalT は早期プ

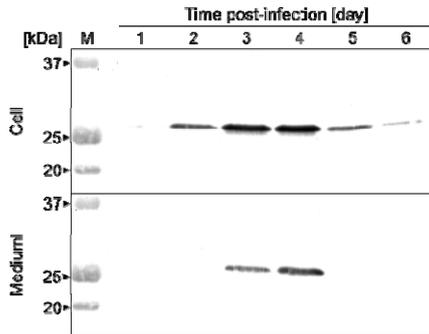


Fig. 1 Western blot of GalT expressed in the culture of AcSSGalT-infected Sf9 insect cells.

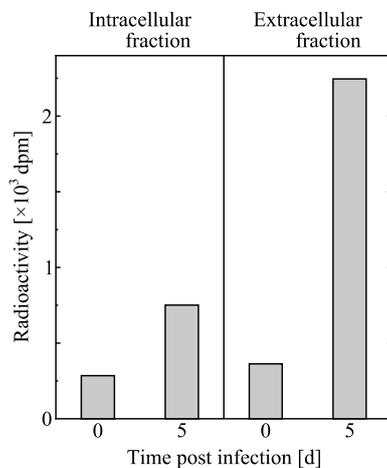


Fig. 2 Gal-T activity of the culture of AcGalT-infected Sf9 insect cells.

ロモーター P_{gp64} の作用によりウイルス接種2日目から発現おり、それと同時に細胞外へと漏出している様子が見られる。しかし、5日目以降は細胞内で次第に減少し、細胞外では完全に消失している。これは内在性プロテアーゼによる分解によるものと考えられる。同様の傾向は他のすべての糖転移酵素発現バキュロウイルス感染培養においても認められた。

Fig. 2 は、AcGalT 感染前と感染5日目の細胞内画分および細胞外面分について Gal-T の酵素活性を測定した結果である。細胞内、細胞外のいずれにおいても感染5日目に放射能が増加しており、活性な Gal-T が発現したことを示している。しかし、プロテアーゼ分解により Gal-T 活性は低い値であった。

(3) hIL-2 の生成挙動および分解抑制

AchIL2 および AchSSIL2 による Sf9 の感染培養を行い、hIL-2 の生成挙動を調べた。その結果、糖転移酵素の場合と同様に発現した hIL-2 の生成蓄積量は感染後3日目に最大となった後、プロテアーゼ分解を受けて急激に

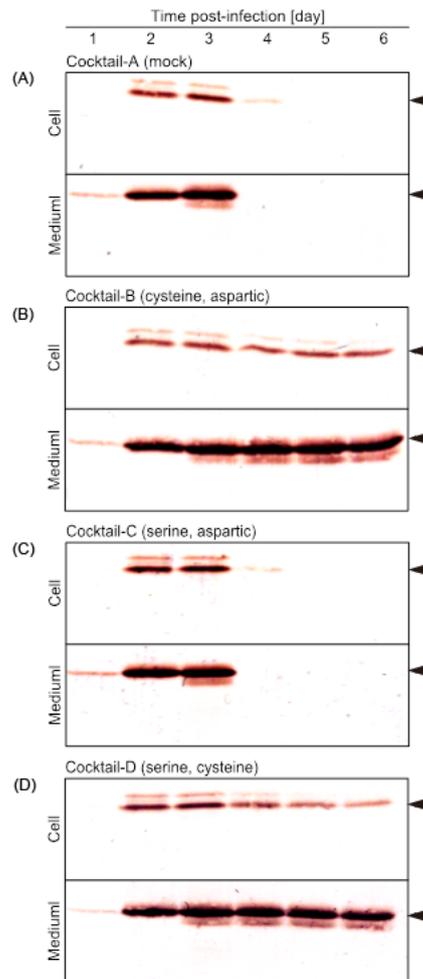


Fig. 3 Western blot of hIL-2 produced by AchIL2-infected Sf9 cultures supplemented with protease inhibitor cocktails at 3 d post-infection. Arrow heads indicate hIL-2.

減少することが分かった。

糖転移酵素の時間差発現による糖鎖修飾反応系の構築系を Sf9 細胞内に構築するためには、組換えタンパク質のプロテアーゼ分解を抑制する必要がある。一方、このようなプロテアーゼ分解は、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系においてしばしば大きな問題となっている。そこで、まず始めに原因プロテアーゼの種類を明らかにするために、4 種類のプロテアーゼ阻害剤カクテル：Cocktail-A (mock), Cocktail-B (0.2 mM E-64, 2 mM Leupeptin, 0.2 mM Pepstatin A), Cocktail-C (20 mM AEBSF, 0.02 mM Aprotinin, 0.2 mM Pepstatin A), Cocktail-D (20 mM AEBSF, 0.02 mM Aprotinin, 0.2 mM E-64, 2 mM Leupeptin) をバキュロウイルス接種 3 日目の培養液に添加し、hIL-2 の分解挙動を分析した。これより、システインプロテアーゼ阻害剤 (E-64, Leupeptin) を含むカクテルの添加によってのみ細胞内外の hIL-2 の分解が抑制され (Fig. 3B, D), hIL-2 の分解はシステインプロテアーゼに起因することが分かった。さらに、プロテアーゼ分解の競争阻害を期待して安価な

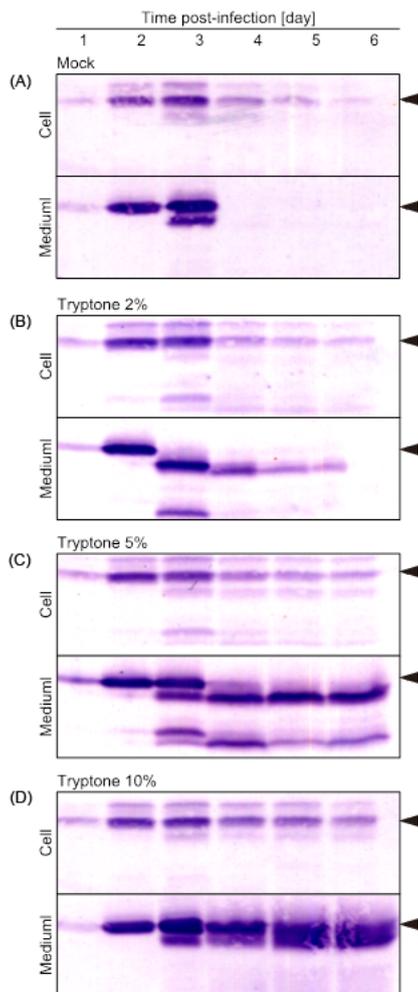


Fig. 4 Western blot of hIL-2 produced by AchIL2-infected Sf9 cultures supplemented with tryptone at 3 d post-infection. Arrow heads indicate hIL-2.

Tryptone の添加による hIL-2 分解抑制について検討した。その結果を Fig. 2 に示す。これより、Tryptone は濃度依存的に hIL-2 のプロテアーゼ分解を抑制し、10% Tryptone 存在下では hIL-2 が分解されずに大量に生成することが分かった。

(4) 初期細胞密度と MOI の検討

昆虫細胞-バキュロウイルス発現系における組換えタンパク質の生産量は特に細胞密度と MOI は生産量に大きく影響される。そこで初期細胞密度および MOI を種々変えて培養液体積 1 L の通気攪拌槽による感染培養を行い、hIL-2 の生成量を調べた。その結果、初期細胞密度 2×10^6 cells/mL, MOI 1 pfu/cell の条件で最も高い hIL-2 収量が得られた。

(5) hIL-2 の精製

非常に高濃度の Tryptone を含む培養液からの hIL-2 の精製について検討した。Fig. 5 は、10% Tryptone を含む培養液を 40-60%硫酸アンモニウムで分画した後の Ni アフィニティークロマトグラフィーの結果を示している。精製物の SDS-PAGE およびウエスタンブロットで hIL-2 の単一のバンドが検出されたことから、硫酸アンモニウム分画と一段階のクロマトグラフィーにより単一の hIL-2 を得ることが分かった。

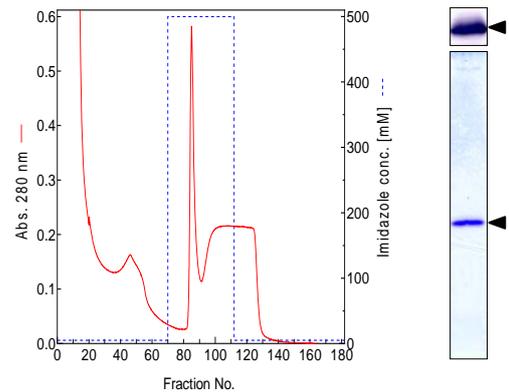


Fig. 5 Purification of hIL-2 produced by AchIL2-infected Sf9 cultures supplemented with 10% tryptone. (A) Ni-affinity chromatography, (B) Western blot, (C) SDS-PAGE. Arrow heads indicate hIL-2.

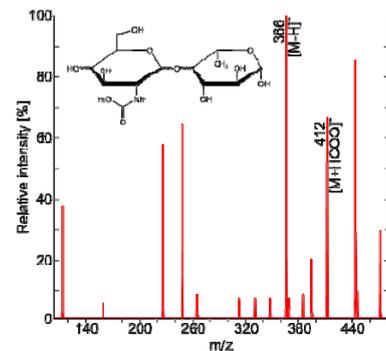


Fig. 6 Mass spectrum of hIL-2 glycan. [M]= (HexNAc)1(Fuc)1 (m/z 367).

(6) hIL-2 の糖鎖構造

hIL-2 のヒドラジン分解物を LC-TOF-MS により分析した結果を Fig. 6 に示す。m/z 366, 412 に (HexNAc)₁(Fuc)₁ のピークが見られることから hIL-2 糖鎖は少なくとも GlcNAc-Fuc または GalNAc-Fuc の構造を有すると推定された。

現在, 10% Triptone 共存下における hIL-2 発現バキュロウイルスと糖転移酵素発現バキュロウイルスの時間差共感染を行って, 得られる hIL-2 の糖鎖構造の解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Gotoh, T., Ono, H., Kikuchi, K.-I., Nirasawa, S., Takahashi, S. (2010): Purification and characterization of aspartic protease derived from Sf9 insect cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** (10) 2154-2157.
- ② Gotoh, T., Kikuchi, K.-I., Takahashi, S. (2010): Active human renin production using a baculovirus expression vector system: An effective method for preventing excessive proteolytic degradation of recombinant proteins. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **43** (7) 603-607.
- ③ Gotoh, T., Awa, H., Kikuchi, K.-I., Nirasawa, S., Takahashi, S. (2010): Prorenin processing enzyme (PPE) produced by baculovirus-infected Sf-9 insect cells: PPE is the cysteine protease encoded in the AcMNPV gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** (2) 370-374.
- ④ Gotoh, T., Awa, H., Kikuchi, K.-I., Takahashi, S. (2009): Expression and in situ processing of human prorenin to active renin in baculovirus-infected Sf-9 insect cell cultures under several infective conditions. *Biochem. Eng. J.*, **43** (2) 216-220.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 進藤祐宜, 後藤猛, 菊地賢一, バキュロウイルス感染 Sf9 昆虫細胞によるヒトインターロイキン-2 の生産, 秋田応用生命科学研究会講演会, 2011. 5. 27, 秋田県総合食品研究センター (秋田)
- ② 進藤祐宜, 後藤猛, 菊地賢一, バキュロウイルス感染 Sf9 昆虫細胞によるヒトインターロイキン-2 生産と糖鎖構造解析, 化学工学会第 76 年会, 2011. 3. 22-24, 東京農工大学 (東京)
- ③ Gotoh, T., Horii, I., Kikuchi, K.-I. (2010): Optimization of soluble human interleukin-2 production in *E. coli* with coexpression of molecular chaperons in the cold induced system. 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2010. 9. 14-18, Palacongressi (Rimini, Italy)

④ 小野洋輝, 後藤猛, 菊地賢一, 葦澤悟, 高橋砂織, 昆虫細胞-バキュロウイルス発現におけるアスパルティックプロテアーゼについて, 第 76 回日本生化学会東北支部例会, 2010. 5. 8, コラッセふくしま (福島)

⑤ 小野洋輝, 後藤猛, 菊地賢一, 葦澤悟, 高橋砂織, Sf-9 昆虫細胞-バキュロウイルス発現系由来アスパルティックプロテアーゼ (SAP) の特性解析, 秋田化学技術協会講演会, 2010. 3. 5, 秋田大学 (秋田)

⑥ Takahashi, S., Hori, K., Hiwatashi, K., Awa, H., Kikuchi, K.-I., Gotoh, T. (2009): Expression of recombinant human (rh)-renin in Sf-9 insect cells: Application of rh-renin for inhibitor screening. 6th General Meeting of the International Proteolysis Society, 2009. 10. 26-30, Marriot Hotel (Surfers Paradise, QLD Australia)

⑦ Gotoh, T., Awa, H., Hikage, S., Kikuchi, K.-I., Takahashi, S. (2009): Characterization of prorenin processing enzyme responsible for in situ active human renin production by baculovirus-infected Sf-9 cells and inhibition of excessive processing. 14th European Congress on Biotechnology. 2009. 9. 13-16, Palau de Congressos de Catalunya (Barcelona, Spain)

⑧ 後藤猛, 安和広乃, 日景翔輝, 菊地賢一, 葦澤悟, 高橋砂織, バキュロウイルス感染 Sf-9 昆虫細胞培養におけるプロレニンプロセッシング酵素の特性とレニン過剰分解の抑制, 第 9 回食品酵素化学研究会・第 15 回, 2009. 9. 4, 秋田県総合食品研究センター (秋田)

⑨ Gotoh, T., Awa, H., Kikuchi, K.-I., Takahashi, S. (2009): Direct production of active human renin by baculovirus-infected Sf-9 insect cell culture. 8th World Congress of Chemical Engineering. 2009. 8. 23-27, Palais des Congrès de Montréal (Montréal, Canada).

⑩ 高橋砂織, 樋渡一之, 菊地賢一, 後藤猛, バキュロウイルス感染 Sf-9 昆虫細胞培養系におけるキチナーゼの発現, 第 23 回キチンキトサンシンポジウム, 2009. 8. 20-21, 佐賀大学 (佐賀)

⑪ 安和広乃, 後藤猛, 菊地賢一, 葦澤悟, 樋渡一之, 堀一之, 高橋砂織, Sf-9 昆虫細胞におけるプロレニンの発現とプロレニンプロセッシング酵素の動態, 日本生化学会東北支部第 75 回例会・シンポジウム, 2009. 5. 9, 東北大学 (仙台)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 猛 (GOTOH TAKESHI)

秋田大学・大学院工学資源学研究科・教授

研究者番号：10215494