

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05551

研究課題名(和文) ゲノム編集昆虫細胞による迅速なVLPワクチン大量生産法の開発

研究課題名(英文) Rapid large scale VLP vaccine production by genome edited insect cells

研究代表者

馬橋 英章 (Mabashi-Asazuma, Hideaki)

お茶の水女子大学・基幹研究院・助教

研究者番号：40785937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モデルVLPとして日本脳炎ウイルスJEVを用いて、JEVのprM、Eタンパク質を同時に過剰発現することでVLPを作製した。PEIトランスフェクションを用いて振とう培養中のSf9細胞にprM、Eタンパク質をコードする遺伝子を一過性発現を行った。ショ糖濃度勾配遠心とゲルろ過クロマトグラフィーを用いてVLPの精製を行ったが、2本の主要なバンドが夾雑物として検出された。これら2本のタンパク質のバンドをエドマン分解法でN末端アミノ酸配列を決定した。しかし、データベース上にこれらのタンパク質に高い相同性を有するタンパク質は見当たらず、残念ながらこれらのタンパク質を同定することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VLPを振とう培養中のSf9細胞に一過性発現させることで産生させることができた。これまで安定的発現を用いて発現されていたVLPを、一過性発現で大量発現できるようになったことは、迅速なワクチン開発という点から非常に意義がある。

残念ながら同定できなかった2本のタンパク質のバンドも、他の方法で同定することができれば、VLP精製過程で取り除くことが難しい細胞由来タンパク質として除去することが可能となる。これにより、精製過程を簡便化し、より精製度の高いVLPを産生することができるようになる。

研究成果の概要(英文)：We produced VLP with JEV as a model VLP by overexpressing prM and E proteins. The VLP was produced by transiently transfecting suspension cultured Sf9 cells with PEI. The VLP was purified by sucrose density gradient centrifugation and size exclusion chromatography. After the purification steps, two main bands were observed. The bands were excised and applied to Edman degradation to analyze N-terminal amino acid sequences. NCBI database has no proteins which are similar to the N-terminal amino acid sequences.

研究分野：細胞工学

キーワード：VLP ワクチン 昆虫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

蚊が媒介するウイルスによる感染症は、地球温暖化により先進国でもパンデミックが生じる可能性が高まる一方で、その多くにワクチンが存在しない。ウイルス構造タンパク質から構成されるウイルス様粒子 Virus-like particle (VLP)は、これらのウイルスに対するワクチンとして期待されている。バキュロウイルス昆虫細胞発現系は VLP 生産に広く用いられているが、バキュロウイルス粒子の混入が避けられず、精製方法が煩雑になることが問題である。

本研究ではバキュロウイルスを用いず、高効率な一過性トランスフェクション法を昆虫細胞の大量振盪培養へ応用し、バキュロウイルス関連因子の混入のない迅速な VLP 生産系を構築する。さらに、混入しやすい内在性因子を同定し、それらを CRISPR-Cas9 によるゲノム編集にてノックアウトすることで新規な昆虫細胞株を樹立し、精製の容易な VLP の大量生産法の開発を目標とする。新規 VLP 生産系により、パンデミックに対応可能な迅速な VLP 供給が期待できる。

VLP はウイルスの構造タンパク質によって構成されるウイルス様粒子で、強い免疫原性を有するが感染性を持たないため、安全性の高い、有望なワクチン候補として注目されている。これまで、様々なウイルスタンパク質から VLP の作製が試みられ、蚊が媒介する多くのウイルスにおいて VLP の作製が可能であることが示された (Pijlman, Biotech J, 2015)。VLP をさらに実用的な技術にしていくには、その生産量の向上、精製法の簡便化が重要課題として挙げられる。特に昆虫細胞-バキュロウイルス発現系では、バキュロウイルス粒子の混入を防ぐために精製法が煩雑となる。この問題は、発現宿主として哺乳類細胞を用いることで解決できる。しかし、哺乳類と昆虫では糖鎖構造や、細胞膜を構成する脂質組成などが著しく異なることから、哺乳類細胞では蚊で産生されたウイルス糖タンパク質の本来の構造を再現することができない。よって、より有効なワクチンとして機能するには本来の構造に近い方が望ましく、蚊と類似の糖鎖構造を産生することが知られている昆虫培養細胞を用いる利点がある。また、パンデミック

に対応するにはワクチンの迅速な供給が求められる。そこで本研究では、バキュロウイルスに頼らない、迅速な VLP の大量調整を可能とする昆虫細胞発現系の構築を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では主に 2 つ具体的な目標を掲げ、それぞれを達成することで最終目的である VLP の大量生産の実現を目指す。第一の目標は、昆虫培養細胞を用い、大量生産にスケールアップが可能な振盪培養での一過性トランスフェクション法を VLP 生産に応用することである。一過性トランスフェクションでタンパク質を発現する場合、組換え体バキュロウイルスの作製、増殖、ウイルス価検定等を行う必要が無い場合、大幅な時間短縮が可能となる。しかし昆虫培養細胞における振盪培養での一過性トランスフェクション法はま

だ研究段階であり、実際のタンパク質医薬の生産には用いられていない。申請者は独自に大量培養に応用可能な実験条件を見出した。これをもとに、迅速な VLP 大量生産の実現を目指す。第2の目標は、VLP 発現宿主細胞自体を改変することで VLP の夾雑物を低減することである。申請者は昆虫培養細胞である Sf9 細胞における CRISPR-Cas9 を世界に先駆けて可能とし、組換え体タンパク質発現宿主細胞における自在な細胞工学を可能とした (Mabashi-Asazuma et al., PNAS, 2017)。よって、自ら開発した技術を用い、新たな宿主細胞工学による VLP 生産系の構築を目指す点で独自性と創造性が認められる。

### 3. 研究の方法

#### 一過性PEIトランスフェクションによるウイルスE、prMタンパク質の産生

これまでに昆虫培養細胞におけるウイルスタンパク質の一過性発現は、小スケールの接着培養にて行われた。そこで昆虫細胞 Sf9 では哺乳類細胞 (CHO 細胞) に比べて、約 10 倍の DENV2 E タンパク質、約 100 倍の JEV E タンパク質の産生がそれぞれ可能であることが報告されている (Kuwahara et al., 2010)。そこで、Flavivirus 属ウイルスの VLP 構築に最低限必要であるとされる E タンパク質と prM タンパク質が振盪培養のトランスフェクション法でも産生可能であるか検証する。

昆虫細胞の振盪培養におけるトランスフェクションは polyethylenimine (PEI)を用いることで可能となったが、その報告例は限られており、提示された最適条件にも幅が見られる (Mori et al., JBB, 2017; Shen et al., J Biotech, 2014)。申請者は、独自に PEI を用いたトランスフェクション条件を検討し、これまでに EGFP をモデルタンパク質として、100 ml 培養 ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml) までの無血清培地で浮遊振盪培養中の Sf9 細胞に対して 60% 以上のトランスフェクション効率を達成している (未発表データ、図 2)。この PEI トランスフェクション法の条件をもとに、JEV の E タンパク質、prM タンパク質の発現を行う。

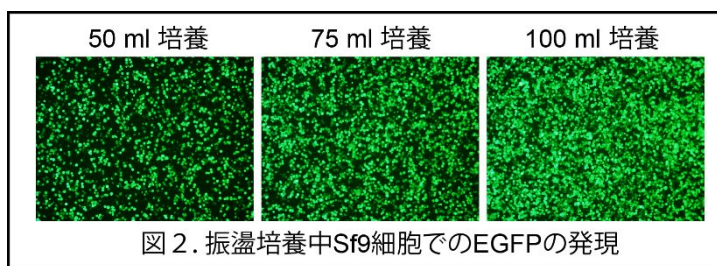


図 2. 振盪培養中 Sf9 細胞での EGFP の発現

発現コンストラクトの構築には、申請者が作製した発現ベクター (pUW6-hr5-FASTR) を用い、Opie2 プロモーターの下流に JEV それぞれの E、prM を連結して作製する。発現の確認を容易にするため、それぞれ N 末端に 8XHis タグを付加する。タンパク質の発現を確認した後、アフィニティー精製を行い、糖鎖付加、糖鎖構造の確認を行う。

#### E、prM の同時発現による VLP の形成

E タンパク質、prM タンパク質の発現を確認した後、これらの共発現が可能な連結発現ベクターを作製する。これを Sf9 細胞に同様に PEI トランスフェクション法にて導入し、VLP の産生を試みる。VLP の粒子形成はゲルろ過クロマトグラフィーと電子顕微鏡にて確認する。

### **JEV VLPの精製時に含まれる内在性夾雑タンパク質の同定**

精製した VLP に含まれる細胞由来夾雑タンパク質を同定する。具体的には、精製 VLP を SDS-PAGE にて展開し、VLP 構成タンパク質以外のバンドを単離し、エドマン分解、LC-MS/MS にて部分アミノ酸を同定する。

#### **4. 研究成果**

モデル VLP として日本脳炎ウイルス JEV を用いて、JEV の prM、E タンパク質を同時に過剰発現することで VLP を作製した。PEI トランスフェクションを用いて振とう培養中の Sf9 細胞に prM、E タンパク質をコードする遺伝子の一過性発現を行った。ショ糖濃度勾配遠心とゲルろ過クロマトグラフィーを用いて VLP の精製を行ったが、2 本の主要なバンドが夾雑物として検出された。これら 2 本のタンパク質のバンドをエドマン分解法で N 末端アミノ酸配列を決定した。しかし、データベース上にこれらのタンパク質に高い相同性を有するタンパク質は見当たらず、残念ながらこれらのタンパク質を同定することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------