

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656505

研究課題名(和文)機能性膜タンパク質の新規分泌生産システムの開発

研究課題名(英文)Secretory production of a functional membrane protein

研究代表者

山地 秀樹(Yamaji, Hideki)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40283874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：Bacteriorhodopsinの遺伝子を昆虫細胞用の高発現型プラスミドベクターにクローニングし、昆虫細胞High Fiveにトランスフェクションして培養後の細胞抽出液および細胞膜画分をウェスタンブロット法で分析したところ、細胞内および膜画分にbacteriorhodopsinが発現していることを確認した。日本脳炎ウイルスの表面タンパク質であるprMおよびEの遺伝子が導入され、日本脳炎ウイルス様粒子を分泌生産する組み換え昆虫細胞株に、上記の発現ベクターをトランスフェクションし共発現させることにより、bacteriorhodopsinが組み込まれたウイルス様粒子の分泌発現の検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：The DNA fragment encoding the bacteriorhodopsin gene from Halobacterium halobium was cloned into a plasmid vector that contained the Bombyx mori actin promoter downstream of the B. mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) IE-1 transactivator and the BmNPV HR3 enhancer for high-level expression. After transfection with the resultant plasmid into Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 (High Five) cells, cellular extract was analyzed by western blot analysis. Specific protein bands were detected at electrophoretic mobility of approximately 20 kDa in the cell lysate, indicating successful expression of bacteriorhodopsin in insect cells. The plasmid vector was then transfected into recombinant High Five cells that expressed the precursor (prM) of the viral membrane protein (M) and the envelope glycoprotein (E) of Japanese encephalitis (JE) virus. Secretory expression of virus-like particles embedding bacteriorhodopsin has been examined.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：昆虫細胞 組み換えタンパク質生産 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

すべての生物の最小構成単位である細胞は、細胞膜によって外界と隔てられている。細胞膜は外界との境界となるのみならず、外界と物質、エネルギー、情報の交換を能動的に行う場として生命活動において重要な役割を果たしている。細胞膜においてこのような機能を担っているのが、リン脂質二重層にモザイク状に組み込まれたチャネル、ポンプ、トランスポーター、受容体などの膜タンパク質である。近年のゲノム解析の結果、ヒトの全タンパク質の約 30% が膜タンパク質であることが判明している。また、現在市販されている医薬品のうち、第一作用点が膜タンパク質であるものが 60% 以上を占めるとされる。

このように膜タンパク質の重要性はきわめて高く、世界中で膜タンパク質のプロジェクト研究が行われつつある。しかしながら、細胞における存在量が少ない、疎水性が高く水に溶けないため取り扱いが困難である、などの理由から、膜タンパク質に関する研究は、水溶性タンパク質に比べて大幅に遅れているのが現状である。このため、膜タンパク質に関する構造・機能解析やプロテオミクス、医薬品開発などを推進するためには、本来の機能を保持した膜タンパク質を高収量で迅速に調製可能な技術が不可欠となっている。

これまで膜タンパク質の結晶解析は、多くの場合、自然界に豊富に存在する原料から膜タンパク質を精製することにより進められてきた。しかしながら、利用可能な材料が限定されることから、近年、遺伝子工学的手法を用いた膜タンパク質の調製が試みられている (Massotte: *Biochim. Biophys. Acta*, 1610, 77-89 (2003))。膜タンパク質の発現系の中で、大腸菌は培養や遺伝子工学的な取り扱いが簡便であるが、合成したタンパク質に糖鎖修飾などの翻訳後修飾を施せないため、ヒトなどの高等生物由来の膜タンパク質をターゲットとする場合利用が限定される。また、酵母は G タンパク質共役型受容体を発現させると糖鎖が付加されない場合が多く、強固な細胞壁を有するため膜タンパク質の回収や分離精製が困難である。哺乳動物細胞は機能を保持した膜タンパク質を発現可能な宿主であるが、発現量が少ない、培養操作が煩雑である、コストが高い、などの問題を有する。外来遺伝子を導入した組み換えバキュロウイルスを培養昆虫細胞に感染させ、目的タンパク質を産生させる昆虫細胞 - バキュロウイルス系は、比較的多量の膜タンパク質が得られるが、プロテアーゼによるタンパク質の分解が起こる、バキュロウイルス感染後期には十分な翻訳後修飾が施されないなどの欠点がある。また、哺乳動物細胞や昆虫細胞 - バキュロウイルス系では、いずれも膜タンパク質は宿主の細胞膜に発現するため、目的の膜タンパク質の界面活性剤による可溶化やその後の分離精製の操作がきわめて煩雑と

なる。これらのことから、膜タンパク質を本来の機能を保持した状態で効率よく調製できる新たな手法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、医薬品開発などの重要なターゲットである膜タンパク質を本来の機能を保持した状態で迅速にかつ高収量で調製できる新たな手法を開発することである。

このために本研究では、培養昆虫細胞を宿主として、エンベロープを有するウイルスの表面タンパク質の遺伝子と目的の膜タンパク質の遺伝子を共発現させることにより、膜タンパク質がリン脂質二重層に組み込まれたウイルス様粒子として分泌生産する技術の確立を検討する。

3. 研究の方法

ウイルスの表面タンパク質の遺伝子を哺乳動物細胞で発現させると、ウイルス感染細胞と同様の生合成過程によりウイルス様の空の粒子が形成、分泌される。このようなウイルス様粒子はゲノムをもたず感染性がないため安全性が高く、ワクチンや診断薬としての利用が期待されている。しかしながら、ウイルスタンパク質の動物細胞に対する毒性のため、生産性が低いことが問題であった (Konishi et al.: *J. Virol.*, 75, 2204-2212 (2001))。これに対し、研究代表者らはこれまでに、日本脳炎ウイルスの表面タンパク質の遺伝子を培養昆虫細胞で発現させ、動物細胞を用いた場合の 100 倍以上の収量のウイルス様粒子を分泌生産することに成功している。本研究では、エンベロープウイルスである日本脳炎ウイルスの表面タンパク質の遺伝子と、目的の膜タンパク質の遺伝子を昆虫細胞において共発現させることにより、膜タンパク質が脂質二重層に組み込まれたウイルス様粒子として分泌生産するシステムの開発を目標として、基盤となる技術の開発を試みた。

(1) 昆虫細胞による膜タンパク質の発現

モデル膜タンパク質として *Halobacterium halobium* 由来の bacteriorhodopsin を選定し、このタンパク質をコードする DNA のコドンを用いた昆虫細胞での発現用に最適化したものを調製した。得られた遺伝子を PCR で増幅し、*Bombyx mori* 由来のアクチンプロモーターの上流にバキュロウイルス由来のトランス作用因子 IE-1 とエンハンサー HR3 を有するプラスミド (図 1) にクローニングすることにより、昆虫細胞用の高発現型プラスミドベクターを構築した。ここで、bacteriorhodopsin 遺伝子の 5' 末端側には 3 種類のシグナル配列 (*Drosophila* 由来の BiP シグナル配列、バキュロウイルスの gp64 シグナル配列、日本脳炎ウイルスの prM シグナル配列) のいずれかを付加し、3' 末端側には (His)₆ タグの塩基配列を付加した発現ベクターもあわせて構築した。構築した発現ベクターを *Trichoplusia*

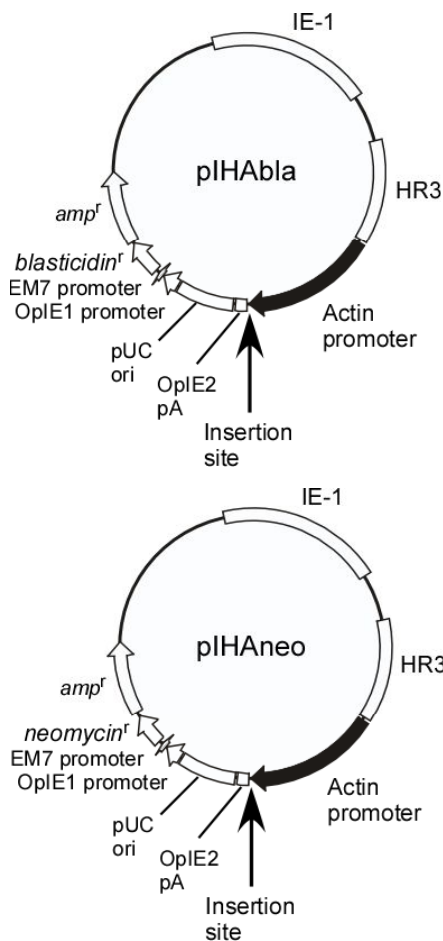


図 1 使用した高発現型プラスミドベクター (Yamaji et al.: *Biochem. Eng. J.*, 41, 203–209 (2008))

ni 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) に FuGENE 6 (Promega) を用いてトランスフェクションし、静置培養を行った。培養後の上清および細胞を回収し、培養上清、細胞抽出液、および細胞膜画分を非還元条件下において SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) し、抗 (His)₆ 抗体を用いたウェスタンブロット法で分析した。

(2) ウイルス表面タンパク質遺伝子との共発現

日本脳炎ウイルスの表面タンパク質である prM および E の遺伝子が導入され、日本脳炎ウイルス様粒子を分泌生産する組み換え昆虫細胞株 (High Five) ((Yamaji et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 203–209 (2013)) に、上記のように構築した発現ベクターをトランスフェクションした。培養後の細胞抽出液および細胞膜画分を、非還元条件下における SDS-PAGE および抗 E 抗体と抗 (His)₆ 抗体を用いたウェスタンブロット法により分析した。

4. 研究成果

モデル膜タンパク質である *H. halobium* 由

```

ATGCAAGCTC AAATCACTGG TCGCCCTGAA
TGGATCTGGC TCGCTCTCGG CACCCGCCCTC
ATGGGACTCG GCACACTCTA CTCCTCGTT
AAGGGAATGG GTGTGTCAGA CCCAGATGCT
AAGAAGTTCT ACGCCATCAC CACTCTGGTC
CCGGCTATCG CCTTACAAT GTACCTGTCT
ATGCTGCTCG GCTACGGACT CACCATGGTG
CCCTTCGGTG GCGAGCAGAA CCCTATCTAC
TGGGCTCGTT ACGCCGACTG GTTGTTTACA
ACCCCATTGC TGCTCTTGA TCTGGCTCTG
CTCGTCGACG CCGATCAAGG AACCATCCTG
GCTCTCGTTG GTGCCGACGG CATCATGATC
GGTACTGGCT TGTCGGTGC TCTGACAAAAG
GTTTACAGCT ACAGGTTCTG GTGGTGGGCC
ATCTCAACTG CTGCCATGTT GTACATCCTG
TACGTCCTCT TCTTCGGCTT CACATCCAAG
GCTGAGTCTA TGAGGCCTGA AGTGGCCTCC
ACCTTCAAGG TGCTCAGAAA CGTCACTGTG
GTCTTGTGGT CCGCTTACCC CGTTGTGTGG
CTGATCGGTT CCGAGGGAGC CGGTATCGTC
CCTCTCAACA TCGAAACTTT GCTGTTTCATG
GTCTTGGACG TTTCTGCTAA AGTGGGCTTC
GGACTCATCCT CTTGCGTAGC CGCGCCATCT
TCGGCGAGGC TGAGGCCCTT GAACCATCTG
CTGGAGACGG TGCTGCTGCT ACATCG

```

図 2 昆虫細胞での発現用にコドン最適化した、*Halobacterium halobium* 由来の bacteriorhodopsin の遺伝子の塩基配列

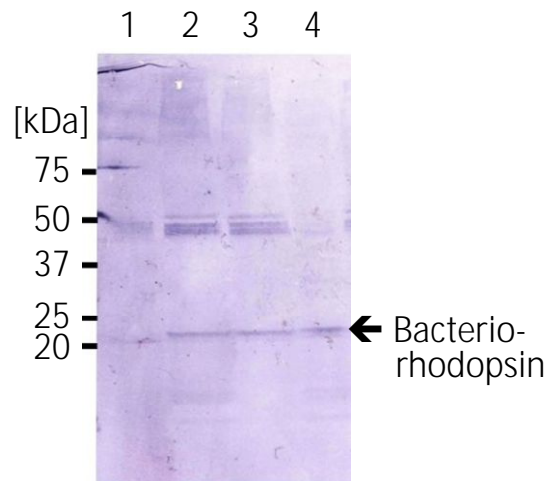


図 3 *H. halobium* 由来の bacteriorhodopsin の遺伝子をトランスフェクションした High Five の培養上清 (Lane 1) 細胞抽出液 (Lane 2, 3), および細胞膜画分 (Lane 4) のウェスタンブロット法による分析結果。日本脳炎ウイルス由来の prM シグナルを使用した場合の結果を示す

来の bacteriorhodopsin の遺伝子のコドン昆虫細胞での発現用に最適化した。その配列を図 2 に示す。

最適化した bacteriorhodopsin 遺伝子を昆虫

細胞用の高発現型プラスミドベクター (図 1) にクローニングしたものを, High Five にトランスフェクションした後, 3 日間静置培養を行った。得られた細胞から細胞抽出液および細胞膜画分を調製し, 非還元条件下での SDS-PAGE および抗 (His)₆ 抗体を用いたウェスタンブロット法により分析を行った。その結果, bacteriorhodopsin の分子量に相当する約 20 kDa の位置に特異的なバンドを確認することができた (図 3, Lane 2-4)。このことから, プラスミドを導入した High Five の細胞内において bacteriorhodopsin が発現していることがわかる。特に日本脳炎ウイルスの prM シグナルを用いた場合に比較的高い発現レベルが得られることが示唆された。また, 培養上清中には bacteriorhodopsin の存在は確認できず, bacteriorhodopsin は単独では分泌されないことがわかった。

次に, 日本脳炎ウイルスの表面タンパク質である prM および E の遺伝子が導入され, 日本脳炎ウイルス様粒子を分泌生産する組み換え昆虫細胞株に, 上記の発現ベクターをトランスフェクションし, 静置培養を行った。現在, 培養上清の分析を行い, bacteriorhodopsin が組み込まれたウイルス様粒子の分泌発現の確認を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Hideki Yamaji: Suitability and perspectives on using recombinant insect cells for the production of virus-like particles, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1963-1970 (2014), DOI: 10.1007/s00253-013-5474-9 (査読有)

Hideki Yamaji, Eiji Konishi: Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cells, *Bioengineered*, 4, 438-442 (2013), DOI: 10.4161/bioe.24514 (査読有)

Hideki Yamaji, Masataka Nakamura, Miwa Kuwahara, Yusuke Takahashi, Tomohisa Katsuda, Eiji Konishi: Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1071-1079 (2013), DOI: 10.1007/s00253-012-4371-y (査読有)

Hideki Yamaji, Maiko Segawa, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 657-662 (2012), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.06.012 (査読有)

山地秀樹: 昆虫細胞を用いたウイルス様粒子の生産, PHARM TECH JAPAN, 28,

2503-2508 (2012)
<http://www.jiho.co.jp/shop/list/detail/tabid/272/catid/75/pdid/92354/Default.aspx> (査読無)

[学会発表](計 3 件)

Hideki Yamaji, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Efficient production of viral envelope proteins in recombinant insect cells, 23rd ESACT (European Society for Animal Cell Technology) Meeting, (2013/6/24) (Lille, France)

Yuri Hotta, Azusa Minamitani, Kazuma Narita, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji: Production and purification of Japanese encephalitis virus-like particles from recombinant insect cells, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012) (2012/11/30) (名古屋)

Hideki Yamaji, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Secretory production of virus-like particles by recombinant insect cells, The 15th European Congress on Biotechnology of the European Federation of Biotechnology (ECB15) (2012/9/26) (Istanbul, Turkey)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山地 秀樹 (YAMAJI HIDEKI)

神戸大学・大学院工学研究科応用化学専攻・教授

研究者番号: 40283874

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし