

QUANTITATIVE IMPROVEMENT OF RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION USING SILKWORM-BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM

今井，咲

<https://hdl.handle.net/2324/1500771>

出版情報：九州大学，2014，博士（農学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏 名 : 今井 咲

論文題名 : QUANTITATIVE IMPROVEMENT OF RECOMBINANT PROTEIN
PRODUCTION USING SILKWORM-BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM
(カイコバキュロウイルス発現系による組換えタンパク質生産の量的改変)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

組換えタンパク質生産は、基礎的なタンパク質の機能解析、構造解析のみならず、産業・医療への応用にも期待されている。これまで広く使われてきた大腸菌による生産系では大量のタンパク質を生産することが可能であったが、タンパク質の翻訳後修飾の多くが行われなため、哺乳動物由来のタンパク質が十分な活性を持たない事例が多くあった。カイコを用いたバキュロウイルス発現系では、大腸菌では不可能な翻訳後修飾が可能であり、より本来の形に近いタンパク質が生産可能である。これまで、バキュロウイルス発現系では分泌タンパク質であるヒトEPOなどの様々な組換えタンパク質が生産されており、その機能が解析されている。しかし、バキュロウイルス発現系を用いた場合でも、生産が困難なタンパク質や、生産可能であっても生産量が非常に少ないタンパク質があり、生産されたタンパク質の利用に大きな問題が残されている。そこでカイコバキュロウイルス発現系を用いたタンパク質生産における量的改変を試み、研究を行なった。

1. バキュロウイルス発現系によるヒトBMP4の生産

iPS細胞からの骨組織の誘導に必須でありながら、組換えタンパク質の発現が困難でことが知られているヒトBMP4の分泌生産をカイコ・バキュロウイルス発現系を用いて行った。他の発現系とは異なり、高い活性を持ったヒトBMP4を大量に分泌生産することができた。しかし、同時に分泌発現を試みたネコHGF、マウスWnt3Aでは、分泌量が少なく、細胞内に蓄積しているタンパク質が多くあることが明らかになった。

2. 小胞体シャペロンが分泌タンパク質生産に与える影響

カイコ・バキュロウイルス発現系での分泌タンパク質の分泌量には相違があり、さらに、分泌されず細胞内に蓄積したままのタンパク質も存在する。分泌量の異なる3種類のタンパク質ヒトEPO、ネコHGF、マウスWnt3Aを用いて実験を行った。生産されたタンパク質はその分泌量に応じて、小胞体内での小胞体シャペロン（ERシャペロン）との結合にも差が認められた。ERシャペロンはタンパク質のフォールディングや修飾に関わる因子である。分泌量の多いヒトEPOはERシャペロンであるBiP、CNX、CRT、ERp57、そしてPDIと結合していたが、分泌量の少ないネコHGFやマウスWnt3AではBiPとPDIとの結合は観察されたが、その他のシャペロンとの結合は観察されなかった。このことから、分泌量にはERシャペロンの働きによって正常な形をとることができたタンパク質のみが分泌することが示唆された。

次に、ERシャペロンを人為的に操作した条件下でタンパク質分泌量の解析を行った。その結果、BiPが枯渇した培養細胞では全てのタンパク質の分泌量、発現量が低下することが明らかになった。また、BiP、CNX、そしてERp57を単独で過剰発現させた細胞株を作製し、それらを用いてタンパク質の生産を行なったところ、これらの細胞では若干の分泌量、発現量の増加が見ら

れた。これらのことから、E Rシャペロンの制御はバキュロウイルスによる分泌タンパク質の生産量の改善に有効である可能性が示された。

3. カイコX B P 1 の機能解析及びタンパク質生産への影響

多様な生物のE Rシャペロン上流には転写因子であるX B P 1 が存在する。X B P 1 は小胞体にストレスが誘導されると活性型に変換することが知られている。また、小胞体内ではX B P 1 が活性することによってその下流にあるE Rシャペロンの転写誘導が行なわれる。まず、カイコX B P 1 のクローニングを行い塩基配列及び、アミノ酸配列を決定した。続いて、カイコX B P 1 の有無がE Rシャペロンに与える影響を解析した。その結果、カイコX B P 1 が存在する細胞では小胞体にストレスがかかるとE Rシャペロンが誘導されるが、カイコX B P 1 の存在しない細胞ではE Rシャペロンの誘導が起こらないことを明らかにした。さらに、X B P 1 の存在しない細胞では組換えタンパク質の分泌量、発現量が共に減少することが明らかになった。

以上の結果より、バキュロウイルス発現系における難分泌タンパク質生産には、E Rシャペロンの制御が重要であることが明らかになった。特に、E Rシャペロンの上流制御因子であるカイコX B P 1 がE Rシャペロン誘導に大きな役割を担っていることを明らかにできたことから、同因子を中心としたE R品質管理機構の改変が難分泌タンパク質生産の量的改変に有効であると示唆された。

(文字数 1847 字)