

Studies on Silkworm-Baculovirus Expression Vector System for Increased Productivity of Secreted Recombinant Proteins

海老原, 健

<https://hdl.handle.net/2324/7363874>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)



氏 名	海老原 健			
論 文 名	Studies on Silkworm-Baculovirus Expression Vector System for Increased Productivity of Secreted Recombinant Proteins (分泌型組換えタンパク質の生産性向上を目的としたカイコ-バキュロウイルス発現系に関する研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	日下部 宜宏
	副 査	九州大学	教授	角田 佳充
	副 査	九州大学	教授	李 在萬
	副 査	九州大学	准教授	門 宏明

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

カイコ-バキュロウイルス発現系（カイコ-BEVS）は、タンパク質生産の効率、糖鎖修飾に代表される哺乳類細胞における翻訳後修飾との類似性などから、低コストのバイオ医薬品生産系として期待されている。特に、天然からは微量にしか得られない高い生理活性をもつ難発現性組換えタンパク質の発現も可能であることが多いが、すべてのタンパク質分子種において高い生産性を達成できるわけではない。分泌型組換えタンパク質の場合、大量に翻訳されるが、その大部分が分泌されずに細胞内に蓄積されることも多い。そこで、本研究では、カイコ-BEVS における分泌型組換えタンパク質の分泌不全を引き起こす要因の解明を行った。

まず、バイオ医薬品生産宿主としてのカイコ-BEVS の優位性を確認し、SARS-CoV2 パンデミック時に社会からの要望が高かった、コロナウイルススパイク糖タンパク質に対する中和抗体 CR3022 の大量生産を試みた。異なる 3 種類のデザイン（scFV、Fab、IgG）で発現させた組換え CR3022 抗体は、当該分子を発現する組換えバキュロウイルスが感染したカイコ血清から、高純度で精製することができた。加えて、カイコ組換え抗体の抗原親和性は、哺乳類細胞で生産された IgG 抗体と同等であった。これらの結果から、カイコ-BEVS は、抗体に代表される架橋構造を有するヘテロ多量体型の分泌型糖タンパク質の優れた生産系であることを明らかにした。

次に、カイコ-BEVS において組換えタンパク質の分泌不全の原因解明を目的として、アミノ酸配列の相同性は高いが、分泌性が異なるモデルタンパク質を選定し、比較解析を行った。モデルタンパク質として、低分泌性ヒトインターロイキン 1 α （HsIL-1 α ）と高分泌性マウスインターロイキン 1 α （MmIL-1 α ）を用いて解析を進めた。相同アミノ酸領域のスワッピングで作製した 6 種類のキメラ IL-1 α の発現特性の解析により、HsIL-1 α の高次構造形成の重要な領域である 52-75 アミノ酸が分泌低下を引き起こす原因であることを明らかにした。また、バキュロウイルス非感染条件でのキメラ IL-1 α の発現は小胞体の恒常性を維持する小胞体ストレス応答（UPR）を誘導し、その誘導性はカイコ-BEVS における分泌性の高さと負の相関があることを明らかにした。これらの結果より、大量の組換えタンパク質発現により小胞体に大きな負荷がかかっているカイコ-BEVS では、UPR に依存せずに安定な構造を自律的にフォールディングできるタンパク質デザインにより、組換えタンパク質の高い分泌生産を可能にできると考えられた。

最後に、カイコ-BEVS のさらなる高度化を目的として、ベクターであるバキュロウイルスの効率的なゲノム編集技術法の開発を行った。約 130kb の長鎖ウイルスゲノムを 19 断片に分割、クローニングした。このプラスミドを個別に編集することにより、長鎖ウイルスゲノムを直接編集する場合と比較して、PCR 法や酵素反応によるゲノム編集が格段に容易になり、離れた領域に存在する複数

の遺伝子を自在に編集することが可能となった。すなわち、2段階の **Golden Gate Assembly** によって、これら 19 個のウイルスゲノム断片からバキュロウイルスゲノムを再構築することに成功し、新規ウイルスゲノム編集技術の基盤を確立した。

以上要するに、本論文は、カイコ-**BEVS** の課題である分泌不全に関する解析を行い、分泌性が異なるモデルタンパク質を用いて、その原因となる領域と作用機序の概要を明らかにした。また、新規ウイルスゲノム編集技術を開発し、バキュロウイルスゲノムの複雑なゲノム編集を行うことを可能にしたもので、昆虫ゲノム科学、特に、カイコ-**BEVS** における分泌型組換えタンパク質の生産効率の向上に寄与する優れた業績である。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。