

3. 遺伝子導入と発現シリーズ

昆虫細胞を利用した蛋白質の大量発現と解析： キサンチン酸化還元酵素を例に (3)

川口 裕子 岡本 研
日本医科大学大学院医学研究科医科生物化学

3. Gene Delivery and Expression Series

Overexpression of Recombinant Protein in Large-scale Culture Using a Baculovirus-insect Cell Expression System: Based on the Study of Xanthine Oxidoreductase (3)

Yuko Kawaguchi and Ken Okamoto
Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

The baculovirus-insect cell system is widely used to express recombinant proteins. Posttranslational modifications of proteins, such as glycosylation and the phosphorylation and incorporation of cofactors, in *Escherichia coli* are less sufficient than those in mammalian cells. Unfortunately, mammalian cells are not appropriate for large-scale culture. However, insect cells are eukaryotic cells and are suitable for large-scale culture; they can be used to produce recombinant proteins that cannot be expressed in *E. coli*. We established a baculovirus-insect cell system to express xanthine oxidoreductase and obtained about ~4 mg of purified enzyme from 2 to 4 L of culture medium. This amount of enzyme was sufficient for X-ray crystal structure analysis. Here, we describe of the outline of our methods for culturing insect cells, producing recombinant baculoviruses, and expressing recombinant proteins in large-scale culture.

(日本医科大学医学会雑誌 2012; 8: 26-30)

Key words: insect cells, sf9, baculovirus, xanthine oxidoreductase

はじめに

蛋白質の発現系において、最も良く使用されているのは大腸菌を用いた発現系であるが、原核細胞である大腸菌では、複雑な哺乳類の蛋白質を発現する際に、糖鎖、リン酸基などの修飾、補酵素の構築などがうまくいかないこともある。哺乳類の細胞を用いた発現系

は、これらの問題を解決することができるが、哺乳類細胞の培養はコストなどの難しさがあ、大量発現系には今のところ向かない。特にX線結晶構造解析には比較的少量の蛋白質試料が必要であり、哺乳類細胞の発現系で結晶化に必要な量の蛋白質を得ることは非常に困難である。そこで、酵母や昆虫細胞を用いた発現系が使われるが、これらの発現系の利点は、哺乳類細胞よりも培養が簡便で、大腸菌よりも糖鎖やリン酸

基の修飾などが有利で、複雑な蛋白質の発現に向いていることである。

当研究室で長年研究してきたキサンチン酸化還元酵素 (XOR) は、尿酸生成酵素であり、そのため XOR の阻害剤は痛風や高尿酸結晶の治療薬として使用される。また、活性酸素生成酵素でもあることから、その生理的作用が非常に注目されている。XOR は2つのサブユニットからなる分子量 30 万の巨大金属複合体酵素であり、補欠分子族として、サブユニット当り1つのモリブドプテリン、2つの鉄硫黄クラスター、1つの FAD を持つ。哺乳類 XOR の発現を大腸菌で試した所、封入体を形成し可溶化できなかつたり、複雑な補酵素であるモリブドプテリンをはじめ多種の補酵素を含むため、活性が全くなかつたり、安定した結果を得られなかつた。そこで、Sf9-バキュロウイルスを用いた発現系を樹立したところ、活性のある酵素を発現することができた¹。ここでは、この XOR の発現を例にとりながら、昆虫細胞を用いた大量発現について説明する。

1. バキュロウイルス

バキュロウイルスとは、核多核体病ウイルス (NPV) と呼ばれ、約 120 kb の環状二本鎖 DNA で悍状カプシドをもつ²⁴。蛋白質の発現系で用いるバキュロウイルスは主に、カイコを宿主とする BmNPV とヨトウ虫近縁種の *Spodoptera frugiperda* の樹立細胞 Sf9 を宿主とする AcNPV との二種類がある。バキュロウイルスは感染後期に、ポリヘドリン蛋白質からなる結晶構造物である核封入体を作り、その中に多数のウイルス粒子を埋め込み、宿主細胞から外に放出する。核封入体は自然界でウイルス粒子を保護する役割を持つ。この核封入体の主成分であるポリヘドリンは、感染末期において全細胞蛋白質の半分を占め、そのため非常に強力なプロモーターを持つ。また、ポリヘドリン自体は細胞内のウイルスの増殖に必須でないために、このプロモーターを利用して、そこに目的遺伝子を組み込むことにより、異種蛋白質の大量発現が可能となった。

2. 昆虫細胞の培養

当研究室では、発現系に *Spodoptera frugiperda* の卵巣由来の樹立細胞 Sf9 を使用しているが²、ほかに Sf21, High Five, Ea4, mimic Sf9, Sf9plus など様々な種類のものが販売されている。どの細胞種が適して

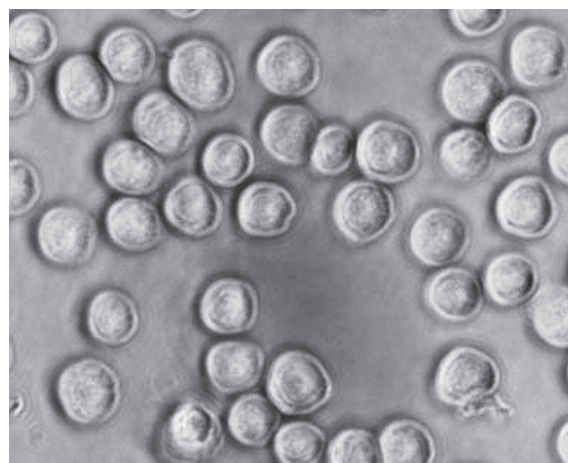


Fig. 1 Sf9 Cells

いるかは、発現したい蛋白質の性質によって異なるので、試してみるほかはない。昆虫細胞培養の利点として、哺乳類細胞培養時のように、CO₂ガスを必要とせず、室温に近い温度 (最適温度は 27°C) で培養でき、また、ほぼ無制限に継代できることがある。われわれの経験上、一年以上継代すると、増殖は何ら問題がないにもかかわらず、なぜかウイルスに感染しにくくなることもあり、そのため蛋白質の発現量が落ちるので、発現量が減少してきたのを目安に凍結保存しておいた細胞に切り替えている。培養は、静置、浮遊とどちらでも可であるが、大量に蛋白質を発現したい場合、浮遊細胞の方が効率が良い。静置培養の場合、使用するアングルネックフラスコやシャーレの種類にもよるが、ピペッティングで容易にはがれるので細胞の回収が簡単である。浮遊細胞で培養する際は、スピナーフラスコと呼ばれる内部に磁力で回転するスターラーのついた容器を用いるのが一般的であったが、最近では培地の改善などにより、三角フラスコを用いて、大腸菌と同様にインキュベーター内で攪拌して培養することも可能である。どのような方法をとるにせよ、エアレーションは非常に重要な問題で、液量はフラスコの容量のおよそ三分の一以下にすることが望ましい。

細胞の状態は、鏡検による形状、増殖の程度などから判断するが、われわれの研究室では浮遊細胞は 5×10^5 cells/mL で撒き、3~4日 で 5×10^6 cells/mL くらいまで増殖した後に継代している。顕微鏡下で判断できるようにするには、経験を要するが、細胞の周りがはっきりとしていて、ころっと丸いと良い (Fig. 1)。昆虫細胞発現系において、細胞の状態を良好に保つことが何よりも重要である。

培地は、メーカーから様々な種類のものが発売されているが、無血清培地と、血清の添加を必要とする培

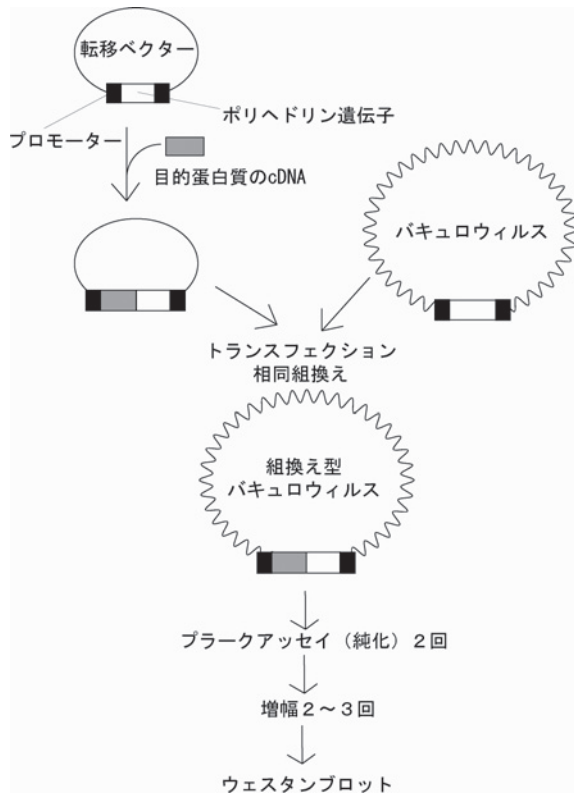


Fig. 2 相同組換えを用いたバキュロウイルスの作製法

地と2種類ある。無血清培地で培養できる事は昆虫細胞の利点の一つである。当研究室では、無血清培地 Sf-900II を使用している。継代培養の際は血清無添加培地で細胞の生育は良好であったが、ウイルスに感染させると、細胞の育成状態が悪くなり、その結果タンパク発現量は減ってしまった。そこで Sf900II に 2%FBS を加えた所、安定的にタンパク量を得ることができた。このように培養条件は発現する蛋白質によって異なる場合があるので、詳細な条件検討が必要である。

3. 組換えウイルスの作製方法

組換えウイルスの作製方法については、各メーカーが種々のキットを販売しており、詳細なプロトコルが添付されているので、実験を始めた方はそれらを熟読されることをお勧めする。ここでは、XOR の発現に用いた、Sf9 細胞内での相同組換えを用いる方法を例としてやや詳しく説明する。

トランスファーベクターの選択は非常に重要である。XDH の場合、pJVP10Z というオリジナルベクターを使用しているが⁵⁶、ほかのトランスファーベクターだと pJVP10Z の 1/10 ほどしか XOR が発現しなかったこともあった。どのベクターが適しているかは実際に試してみるほかはない。

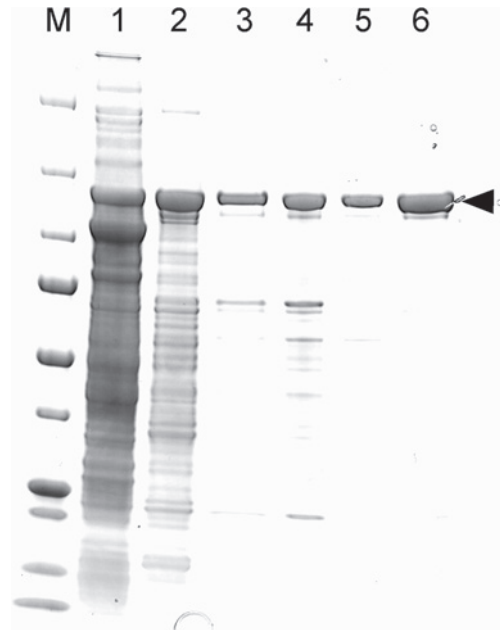


Fig. 3 XOR の精製

M: 分子量マーカー 1: 超遠心後上清 2: DE52 溶出画分 3: リン酸カルシウムカラム溶出画分 4: 葉酸アフィニティカラム洗浄画分 5: 4 をゲル濾過 6: 葉酸アフィニティカラム溶出画分 XOR は矢印で示した。

目的の XOR 遺伝子は、ポリヘドリンプロモーターを有するトランスファーベクター pJVP10Z に組み込み、Novagen の BacVec2000 を用いて相同組換えを行った (Fig. 2)。回収したウイルス液は、プラークアッセイを 2 回行い、純化精製した。トランスファーベクター pJVP10Z は β ガラクトシダーゼ遺伝子を有するため、相同組換えが成功したウイルスのみ青いプラークになり分別が容易である。その後、増幅を二、三回繰り返した後、細胞を回収し、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで目的蛋白質を確認することができた。この時点で、ウイルスの力価はおよそ $1 \times 10^7 \sim 10^8$ PFU/mL にはなっている。トランスフェクションから、増幅が終わるまで最短で三週間ほどかかる。

4. 大量発現

酵素を大量発現する際、1L 用のスピナーフラスコを 8~12 個使用している。1L のスピナーフラスコに 300 mL の培地を入れるので、2~3.6L の培養規模となる。Sf9 細胞は 5×10^5 cells/mL で培養を始め、2 日目におよそ 2×10^6 cells/mL になるので、ここでウイルスを感染させる。われわれの研究室では、細胞を一度回収して遠心し、培地を除いた後、細胞ペレットとウイルスを一時間接触させ、濃厚感染させることに

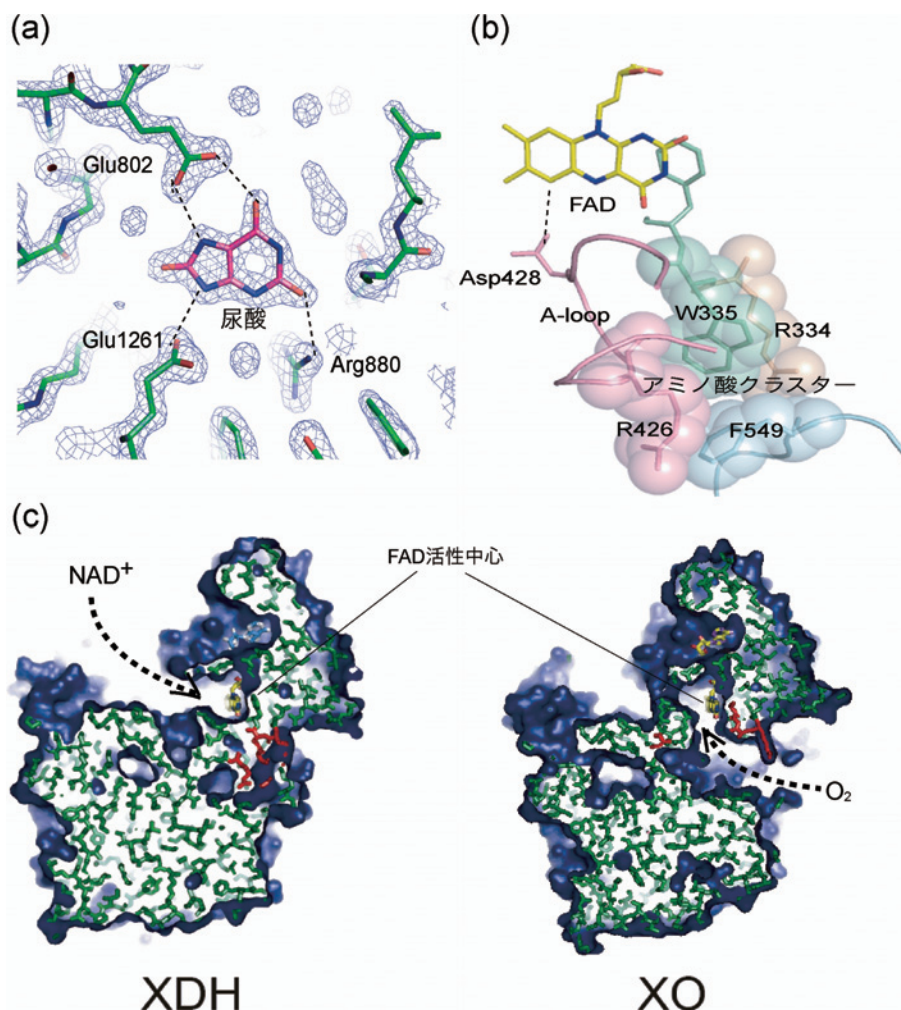


Fig. 4 (a) ラット XOR の尿酸結合部位：ラットデモリブド酵素にはモリブドプテリン補酵素の代わりに、生成物である尿酸が結合した形で精製された。尿酸の結合様式を検討することで、基質キサンチンの反応機構がわかった。(b) ラット XDH の FAD 周囲の構造：FAD 近傍にあるアミノ酸クラスターが FAD 周囲の XDH/XO 変換におけるコンフォメーション変化の中心的役割を果たしていることがわかった。クラスターを構成するアミノ酸を変異させると、アミノ酸クラスターは崩壊し、XO 型に発現する。(c) XDH, XO の FAD 周囲の構造変化：XDH において、基質である NAD⁺ は矢印で示す方向から FAD 活性中心に接近し、結合する。しかし、部分限定分解やジスルフィド結合の形成により、コンフォメーション変化が起こり、XO では NAD⁺ 結合部位が塞がれてしまう。代わりに、酸素が接近できる新たなチャネルが生じる。

よって発現量を増やしている¹。一時間反応後、培地を加え、40~48時間 27℃ で培養する。XOR の場合、補酵素もしくは補酵素の前駆物質である、リボフラビン、FeSO₄、モリブデン酸ナトリウムをそれぞれ所定の濃度加えている。ウイルスに感染した細胞は、増殖は抑えられ、バルーンを示し(風船のように大きく膨らみ)細長い異形の細胞も観察できる。

5. XOR の精製

活性のある XOR 酵素を発現できたものの、補酵素

の取り込みが必ずしも均一ではなく、アポ酵素も混在するため、均一なホロ酵素のみを精製する必要がある。以下に XOR の精製について説明する¹。

遠心し回収した細胞は、ホモジナイズ後、超遠心にて上清画分を回収する (Fig. 3 lane 1)。SDS-PAGE を見ると、XOR が非常に多く発現しているのがわかる。超遠心での上清を DE52 カラム (Fig. 3 lane 2)、カルシウムリン酸カラム (Fig. 3 lane 3)、さらに、葉酸アフィニティカラム⁷にかけて、モリブドプテリンを含む活性型酵素 (モリブド酵素, Fig. 3 lane 6) と、モリブドプテリンを欠いた不活性型酵素 (デモリ

ブド酵素, Fig. 3 lane 4) とを分別する. モリブド酵素は全体の 10% ほどで, デモリブド酵素の方が多 (2~4L の培養で約 4 mg). 活性型モリブド酵素は反応速度論などの機能解析に使用し, デモリブド酵素は, さらにゲル濾過して精製した後 (Fig. 3 lane 5), 結晶化し, X 線構造解析を行った⁸⁻¹⁰.

6. 変異酵素の解析により判明した XOR 酵素の性質

XOR はプリン分解経路の最終 2 段階を触媒し, ヒポキサンチンをキサンチンに, キサンチンを尿酸に酸化する. 哺乳類の XOR は, 生体内では NAD^+ を電子受容体とするキサンチン脱水素酵素 (XDH) として存在するが, 部分限定分解もしくは酵素内ジスルフィド結合の生成により, 酵素を基質とし過酸化水素, または O_2^- を生成するキサンチン酸化酵素 (XO) に変換することが知られている. XO によって生成されるこれらの活性酸素種が, 虚血性再還流障害を初めとする種々の病態の原因という報告¹¹もあり, XDH/XO 変換メカニズムは医学的にも非常に興味深く注目されている.

昆虫細胞発現系で得られた酵素の X 線結晶構造解析によって Fig. 4 (a), (b), (c) のように活性中心の詳細な情報がわかり, 酵素の反応機構の解明や阻害剤の開発などに非常に有用である. これらの酵素解析の結果を元に, 遺伝子改変マウスを作製し, 活性酸素が生理的にどのような影響を持つのか研究中である.

文 献

- Nishino T, Amaya Y, Kawamoto S, et al: Purification and characterization of multiple forms of rat liver xanthine oxidoreductase expressed in baculovirus-insect cell system. *J Biochem* 2002; 132: 597-606.
- 宮本 力: バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いた異種蛋白質の生産. *蛋白質核酸酵素* 1990; 35: 2598-2612.
- Summers MD, Smith GE: A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. 1987.
- 黒田和道: バキュロウイルスによる組換え蛋白質の生産. *蛋白質核酸酵素* 1990; 35: 957-965.
- Ueda A, Kawamoto S, Igarashi T, et al: Human monocyte chemoattractant protein-1 expressed in a baculovirus system. *Gene* 1994; 140: 267-272.
- Vialard J, Lalumiere M, Vernet T, et al: Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the beta-galactosidase gene. *J Virol* 1990; 64: 37-50.
- Nishino T, Nishino T, Tsushima K: Purification of highly active milk xanthine oxidase by affinity chromatography on Sepharose 4B/folate gel. *FEBS Lett* 1981; 131: 369-372.
- Kuwabara Y, Nishino T, Okamoto K, et al: Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8170-8175.
- Asai R, Nishino T, Matsumura T, et al: Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase. *J Biochem* 2007; 141: 525-534.
- Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, et al: Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J Biol Chem* 2005; 280: 24888-24894.
- McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.

(受付: 2011 年 11 月 14 日)

(受理: 2011 年 12 月 19 日)