

## 昆虫細胞のバイオリクター技術

山地 秀樹<sup>1\*</sup>・福田 秀樹<sup>2</sup>

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルスは、感染した昆虫の細胞にポリヘドリンとよばれるタンパク質を著しく大量に生産させる。昆虫細胞-バキュロウイルス系は、ポリヘドリン遺伝子の代わりに外来遺伝子を挿入した組換え核多角体病ウイルスを培養昆虫細胞に感染させ、ウイルス感染細胞に外来タンパク質を生産させる組換えタンパク質発現系である。発現したタンパク質は、昆虫細胞により糖鎖や脂肪酸の付加、リン酸化などの哺乳動物細胞と同様の DNA 翻訳後修飾を受けるため、本来の生物学的活性や高次構造を保持しており、しかも非常に強力なポリヘドリンプロモーターの作用によりきわめて大量の発現が可能である。このため、昆虫細胞-バキュロウイルス系は、質・量ともに高いレベルの組換えタンパク質を生産するための有力な手段として注目を集めている。

培養面から比較すると、昆虫細胞は微生物細胞ほど扱いやすくないが、動物細胞と比べると培養しやすい細胞である。増殖速度は動物細胞と大差ないが、培養温度は27~28°Cと低く、培養にCO<sub>2</sub>は不要である。後述するように、昆虫細胞培養用の培地には、動物細胞培養と同様に牛胎児などの血清が添加されることが多い。しかしながら、動物細胞と異なり、昆虫細胞は振とう法などにより比較的簡単に浮遊懸濁培養が可能であるため、培養のスケールアップが容易である。

昆虫細胞を用いた有用タンパク質の高生産プロセスを構築することを目的として、我々は高密度培養技術<sup>1</sup>や無血清培養技術<sup>2</sup>の開発を進めてきた。そのような取り組みのなかで、本稿では昆虫細胞のバイオリクター技術について紹介する。

### 多孔性粒子を用いる昆虫細胞の固定化

バキュロウイルスに感染した昆虫細胞は最終的に死滅するため、昆虫細胞-バキュロウイルス系による組換えタンパク質生産は通常回分培養により行われる。その際、昆虫細胞を高密度状態にまで増殖させた後に組換えウイルスを感染させると、低密度でウイルス感染を行った場合に比べて、細胞1個あたりの組換えタンパク質の生産量が低下する場合がある。そこで、ウイルス感染時の細胞密度や細胞1個に対し添加するウイルス粒子数(感染

多重度; moi) が組換えタンパク質生産に及ぼす影響を定量的に解析したところ、高密度条件下において組換えタンパク質生産が阻害される主な原因は培地中の栄養分の枯渇であることがわかった。<sup>2)</sup>

高密度培養下における栄養分の不足を回避するためには、培養途中で栄養分を補給する流加法<sup>3,4)</sup>や、細胞を培養系内に保持したまま古い培地を除去し新しい培地を供給する灌流法<sup>5,6)</sup>を用いる必要がある。灌流培養では、培養系内に蓄積した有害代謝産物を除去できるため、培養環境を良好に維持できる点で有利であるが、細胞と培地の分離操作が必要となる。我々は、*Spodoptera frugiperda* から樹立された細胞株である Sf9 を、孔径30-50 μm のポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体 (アイオン) の粒子 (2×2×2 mm) とともに振とう培養を行うと、細胞の有する付着力や凝集力により培養中に細胞が粒子内に自然に固定化され、定期的に培地を交換しながら培養することにより、固定化細胞が粒子内で10<sup>7</sup> cells/cm<sup>3</sup> 以上の高密度にまで増殖することを見いだした (図1)。また、ウイルス感染後も培地中の栄養分が枯渇しないように適時培地交換しながら培養することによって、高密度培養下においても、高い生産性を保持した組換えタンパク質の生産が可能であることを明らかにした。<sup>7)</sup> 多孔性粒子を用いた細胞の固定化法は、1) ゲル化剤などの固定化のための薬剤が不要である、2) 固定化や無菌操作が容易である、3) 固定化担体粒子が物理的に強固である、などの特長を有しており、実用的に有利

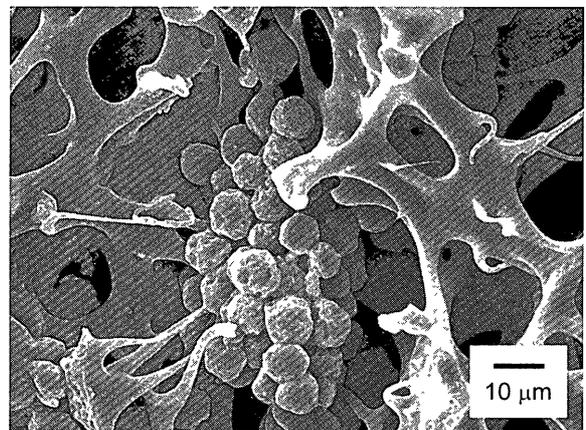


図1 PVF 樹脂多孔質体粒子に固定化された昆虫細胞 Sf9

\* 著者紹介 (代表) <sup>1</sup>神戸大学工学部応用化学科 (助教授) 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1  
TEL. 078-803-6200 FAX. 078-803-6206 E-mail: yamaji@kobe-u.ac.jp

<sup>2</sup>神戸大学大学院自然科学研究科

であると考えられる。<sup>8)</sup>

### 組換えタンパク質生産に及ぼす血清の影響

昆虫細胞の培養では、細胞の増殖、バキュロウイルスの感染、および組換えタンパク質生産を促進するために、牛胎児などの血清を10%程度添加した培地が伝統的に用いられてきた。しかしながら、血清の使用はコストや安全性などの点で多くの問題を惹起する。このため、血清を添加していない無血清培地が開発・市販されているが、組成が明らかにされていない、高価である、などの課題が残されている。

そこで、培養途中での血清の除去が組換えタンパク質生産に及ぼす影響について振とう培養にて検討した。<sup>9)</sup> 組換えウイルスの感染時にSf9を新鮮培地(10%の牛胎児血清(FBS)を添加したTNM-FH培地または血清無添加のTNM-FH)に懸濁させ、24時間後に細胞を遠心分離して培地交換を行い、組換え $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産に及ぼす影響を調べた結果を図2に示す。ウイルス感染24時間後に血清添加培地から血清無添加の培地に培地交換した場合、常時血清添加培地を使用した場合と同様に大量の

$\beta$ -ガラクトシダーゼが生産されることがわかった。反対に、血清無添加の培地から血清添加培地に交換した場合、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産量は常時血清無添加の培地を用いた場合と同等の低いレベルにとどまった。また、ウイルス感染24時間以内に血清添加培地から血清無添加の培地に培地交換した場合、ウイルス感染から培地交換までの時間が短ければ短いほど、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産量は少なくなった。これらの結果から、血清はウイルス感染後ポリヘドリンプロモーターが機能し始めるまでの間存在すればよく、それ以降は血清がなくとも支障なくバキュロウイルスの感染プロセスは進行するものと考えられる。昆虫細胞はウイルスに感染してから約1日間経過した後、組換えタンパク質を生産し始めるため、ウイルス感染24時間後に血清無添加の培地に培地交換することにより、安価でかつ分離精製の容易な培地中で組換えタンパク質を生産することができる。分泌タンパク質のみならず細胞内タンパク質を生産する場合も、ウイルス感染の進行にともない発現タンパク質が培地中に漏出するため、血清無添加培地への培地交換は有効である。

### 固定化バイオリクターにおける2段階培養

懸濁培養において培養途中で培地交換を行うには、遠心分離のような細胞と培地の分離操作が必要となる。これに対して、固定化培養では細胞と培地を簡単に分離できる。そこで次に、上述の多孔性粒子を用いた固定化培養において、ウイルス感染後の24時間は血清添加培地を使用しそれ以降は血清無添加培地を用いる2段階培養を試みた。固定化Sf9細胞の振とう培養におけるウイルス感染後のフラスコ1個あたりの組換え $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産量の経時変化を図3に示す。基本合成培地であるGrace's培地やこれにラクトアルブミン水解物と酵母エキスを添加したTNM-FH培地を常時血清無添加のまま使用した場合、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産量は10%のFBSを添加したTNM-FHを常時用いた場合のそれぞれ約1/4および2/3にとどまった。これに対し、ウイルス感染後24時間は血清添加培地を使用しその後血清を添加していないTNM-FHを用いた場合、常時血清添加培地を用いた場合とほぼ同量の $\beta$ -ガラクトシダーゼが生産された。また、基本合成培地であるGrace's培地に培地を変更した場合にも、同等の生産量が得られることがわかった。

次に、容量2lの攪拌槽型バイオリクター(図4)における固定化培養について検討した。バイオリクター内に $2 \times 2 \times 2$  mmのPVF樹脂多孔質体粒子を2万個と細胞懸濁培地を1l入れて攪拌し、Sf9を粒子内に播種し

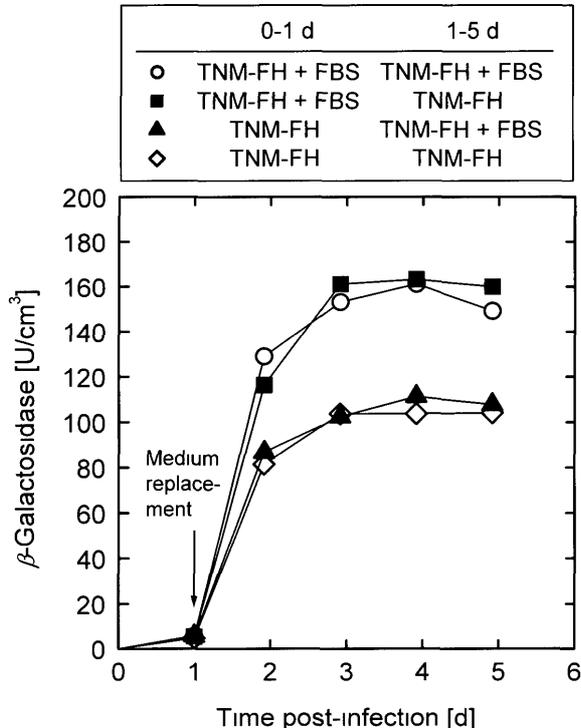


図2. 組換えバキュロウイルス (*Autographa californica* 核多角体病ウイルス)を感染させたSf9による $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産に及ぼす血清の影響. 初期細胞密度  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> moiが2 plaque-forming unit (pfu)/cellの条件でウイルス液を添加したが、細胞増殖は認められなかったことから、ほとんどすべての細胞がウイルスに感染したと判断される

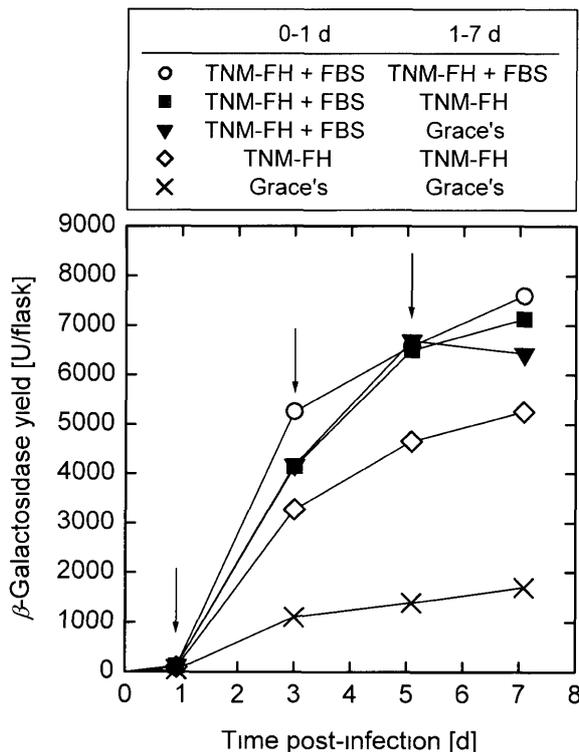


図3. 固定化細胞の振とう培養における $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産に及ぼす培地変更の影響 培地量 15 ml, 粒子数  $250$  個 ( $2 \text{ cm}^3$ ), 初期固定化細胞密度  $2.8 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$ -粒子,  $1 \text{ mol } 2 \text{ pfu/cell}$  矢印は培地交換時刻を示す

た。その後、10%のFBSを添加したTNM-FH培地を用いて2日ごとに培地交換しながら培養を行うと、固定化細胞は粒子内で $10^7 \text{ cells/cm}^3$ 以上の密度に達した。固定化細胞に組換えバキュロウイルスを感染させてから24時間は血清を添加したTNM-FHを使用しその後は血清無添加のTNM-FHを用いて培養を行うと、振とう培養の場合と同様に、常時血清添加培地を用いた場合とほぼ同量の $\beta$ -ガラクトシダーゼが生産されることがわかった。また、細胞1個あたりの $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産量は振とう培養の場合と同等以上であった。

上述した2段階培養においては、ウイルス感染後24時間が経過するまでは血清添加培地を使用したが、市販の無血清培地も同様に使用可能と思われる。市販の無血清培地は高価であることから、ウイルス感染24時間以降にGrace's培地などの安価な基本合成培地を利用できると、組換えタンパク質の大量生産の際には有利となる。このように、多孔性粒子を用いた固定化培養は、培地と細胞を簡単に分離できるため、培養環境を良好に維持することにより高密度培養が達成できるのみならず、培養途中で培養特性に応じて培地組成を変更することも容易であるため、効率的な組換えタンパク質生産を実現できる

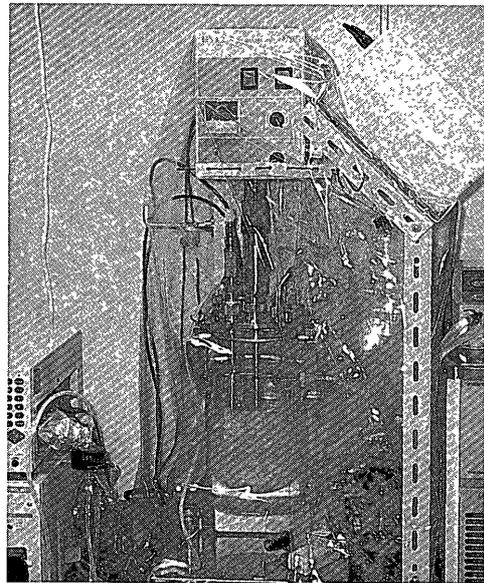


図4. 固定化バイオリアクター

と考えられる。

昆虫細胞-バキュロウイルス系による組換えタンパク質の生産は、ウイルスの感染により細胞が死に至るため、一過性のものとなる。これに対し、近年、バキュロウイルスを介さずに外来遺伝子を直接昆虫細胞に導入して安定形質転換細胞を作製し、外来タンパク質を連続的に生産するnon-lyticな発現系が開発されている。<sup>10)</sup>我々も、*Trichoplusia ni*由来のBTI-TN5B1-4細胞に抗体のFabフラグメントの遺伝子を導入すると、抗原結合活性を有するFabフラグメントが分泌発現されることを確認した。<sup>11)</sup>安定形質転換細胞を用いた組換えタンパク質生産にも、上述の多孔性粒子を用いた固定化培養技術は応用可能であると考えられる。今後、新たな組換えタンパク質発現系の開発や培養技術の進展により、昆虫細胞を用いた有用タンパク質生産の実用化が期待される。

## 文 献

- 1) 山地秀樹・バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 99 (2003).
- 2) Yamaji, H. *et al.* *J Biosci Bioeng.*, **87**, 636 (1999).
- 3) Chan, L. C. L. *et al.* *Biotechnol Bioeng*, **59**, 178 (1998)
- 4) Elias, C. B. *et al.* *Biotechnol Bioeng*, **68**, 381 (2000)
- 5) Zhang, J. *et al.* *Biotechnol Bioeng*, **59**, 351 (1998)
- 6) Chico, E. and Jager, V. *Biotechnol Bioeng.*, **70**, 574 (2000).
- 7) Yamaji, H. *et al.* *J Biosci Bioeng.*, **89**, 12 (2000).
- 8) 山地秀樹・化学工学, **63**, 682 (1999)
- 9) Nishikawa, N. *et al.* *Cytotechnology*, **43**, 3 (2003).
- 10) Farrell, P. J. *et al.* *Biotechnol. Bioeng*, **60**, 656 (1998).
- 11) 眞鍋利孝ら:日本生物工学会大会講演要旨集, p. 183 (2004)