

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380044

研究課題名 (和文) 昆虫培養細胞高度利用技術開発のための遺伝子発現ネットワーク解析

研究課題名 (英文) Gene expression network analysis for developing advanced utilization technology of cultured insect cells

研究代表者

小林 淳 (KOBAYASHI JUN)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：70242930

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫細胞・遺伝子発現ネットワーク・カイコ・ゲノム・マイクロアレイ

1. 研究計画の概要

昆虫培養細胞の高度利用技術開発の基盤となる昆虫細胞の代謝特性に関する遺伝子発現ネットワークの解明を目的として、以下の研究項目を実施する。

(1) カイコ培養細胞の培養条件に対する反応パスウェイに関わる遺伝子発現の網羅的解析

(2) 各種カイコ培養細胞株に特有な代謝パスウェイに関わる遺伝子発現の網羅的解析

(3) 遺伝子発現ネットワークの検出及び検証に必要なアッセイ系の構築

2. 研究の進捗状況

(1) カイコ卵巣由来 BmN4 細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行い以下の結果を得た。

① 10%牛胎児血清 (FBS) 添加した TC-100 培地と Sf-900II 培地で培養し、それぞれの培養条件における遺伝子発現の差異をオリゴ DNA マイクロアレイを用いて網羅的に分析し、2倍以上発現量が異なる遺伝子を 383 個検出した。

② TC-100 (+10%FBS) 培地で発現が増加する遺伝子にはコラーゲンなど細胞外マトリクスや糖鎖修飾など分泌経路に関わるものが多いのに対し、Sf-900II 培地では特定のレクチンや熱ショックタンパク質遺伝子の発現が増加していた。

③ 特に発現量に大きな差が見られた遺伝子のプロモーターは、培養液成分による遺伝子発現制御に利用可能と示唆された。

(2) カイコ胚子由来 Ke1 細胞に特有なカイコ体液依存的なバキュロウイルス BmNPV 感受性に関して、体液中の promoting protein が感染増進効果の約 70% を担っており、残り 30% は別の体液因子の作用による可能性を明らかにし、未知因子の同定および培養細胞の代謝パスウェイへの影響解明に着手した。

(3) カイコ培養細胞において特定の遺伝子発現を人為的に促進あるいは抑制し、その機能と他の遺伝子発現に及ぼす影響を解析するアッセイ系構築のために以下のベクター開発を行った。

① piggyBac ベクターにより形質転換したカイコ培養細胞に転移酵素遺伝子を発現するヘルパープラスミドが長期間残存することを明らかにし、ヘルパープラスミドの代わりに転移酵素 mRNA を用いて、染色体に導入した遺伝子を安定かつ持続的に発現させる形質転換細胞作製技術を確立した。

② カイコアクチン A3 プロモーターを hr5 エンハンサーで増強した一過性発現ベクターの構築に成功し、人為的突然変異アセチルコリンエステラーゼ遺伝子およびカイコ 2 型濃核病ウイルス感受性遺伝子の生産とその機能検定に着手した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

豊富なゲノム情報が利用可能なカイコの培

養細胞株を供試して研究計画（3項目）を遂行することにより、研究課題の目的である昆虫培養細胞の高度利用技術開発に必要な基盤的知見の集積と遺伝子操作技術の開発が、効率よく着実に進展しており、今後のカイコゲノム配列のアノテーションの充実次第で、当初の計画以上の完全な遺伝子ネットワークの解明が可能になると期待される。なお、これまでの成果の一部は、雑誌論文、学会発表、図書の形で公開されており、さらに論文2編を執筆中である。

4. 今後の研究の推進方策

(1) カイコ BmN4 細胞において培地の違いで発現量が2倍以上異なる383遺伝子のうち、既知のパスウェイ上にマッピングできたものについて、定量 RT-PCR で確認するとともに、他の培養液やカイコ細胞株における発現量を比較解析し、タンパク質生産などへの利用の有効性を検証する。

(2) カイコ体液中に含まれる Ke1 細胞のバキュロウイルス BmNPV 感受性増進因子の分離同定を実施し、得られた活性分子が Ke1 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を promoting protein と比較しながらマイクロアレイ分析し、Ke1 細胞株特有な代謝パスウェイの解明をめざす。

(3) トランスポゼースを mRNA で供給する piggyBac ベクター形質転換技術で作製したトランスジェニック細胞をクローニングし、導入遺伝子のコピー数および染色体上の位置を決定し、導入遺伝子の発現量およびその近傍の遺伝子発現に対する影響を明らかにする。また、一過性発現ベクターによる変異アセチルコリンエステラーゼ遺伝子発現検定系を用いて、新規農薬候補の有効性を検証し、同様の発現系を濃核病ウイルスなど他の昆虫ウイルスの感受性決定に関わる遺伝子の発現に応用し、感染メカニズムの解明などに役立つ in vitro アッセイ系構築を試みる。

5. 代表的な研究成果

(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4件)

- ① Fukushima, H., Mizutani, M., Imamura, K., Morino, K., Kobayashi, J., Okumura, K., Tsumoto, K., Yoshimura, T., Development of a novel preparation method of recombinant proteoliposomes using baculovirus gene expression systems, *Journal of Biochemistry*, 144, 763-770, 2008, 査読あり

- ② Moriya, K., Hirakura, S., Kobayashi, J., Ozoe, Y., Saito, S., Utsumi, T., Pyridalyl inhibits cellular protein synthesis in insect, but not mammalian, cell lines, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69, 22-31, 2008, 査読あり

[学会発表] (計19件)

- ① 光武宏, 小林 淳, 転移酵素mRNAを用いた piggyBacによる昆虫培養細胞の形質転換, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月10日, 神戸ポートアイランド
- ② Imai, K., Kanaya, T., Imanishi, S., Kobayashi, J., Effects of promoting protein on baculovirus susceptibility in *Bombyx mori* cell line NIAS-Ke-1, Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, 2008年3月22日, 名古屋大学

[図書] (計2件)

- ① 小林淳, NTS (東京), バイオプロセスハンドブック (有限会社ブッカーズ編) (第1編第7章昆虫工学の基礎), 2007, p. 233-257

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/~member/kobayashi/p.html>