

平成22年5月6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

研究成果の概要(和文)：昆虫培養細胞の高度利用技術開発の基盤となる遺伝子発現ネットワークの解明を目的として、カイコ培養細胞を材料に供試して、オリゴDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施し、培養条件の違いにより発現量が異なる遺伝子群の検出に成功した。また、安定な形質転換細胞の構築に必要な *piggyBac* ベクター系の確立、ならびに、安全な新規農薬開発や昆虫ウイルス感染メカニズム解明に有効な一過性発現ベクターを利用した *in vitro* アッセイ系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：As fundamental knowledge for developing advanced utilization technology of cultured insect cells, gene expression networks of the silkworm cells have been analyzed comprehensively using the oligo-DNA microarray and a number of genes changing their expression levels under different culture conditions have been successfully detected. In addition, *piggyBac* vector system required for establishing stable transformed cells, and transient expression vector-based *in vitro* assay systems effective for developing safer insecticides and elucidating infection mechanisms of insect viruses have been successfully produced.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,000,000	0	9,000,000
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	15,400,000	1,920,000	17,320,000

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. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫培養細胞の有用性と問題点

① チョウ目昆虫培養細胞は、バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系における宿主細胞として、有用タンパク質の生産に世

界中で頻繁に利用され、大腸菌では不可能な真核生物特有の翻訳後修飾反応が可能なことから、ヒトなどさまざまな高等真核生物由来の遺伝子産物と同等な構造及び機能を有する組換えタンパク質の大

量生産に利用されてきた。

- ② 医薬等への応用に関しては、糖鎖の微細構造がヒトなどの脊椎動物とは異なるなど、昆虫固有の翻訳後修飾特性に起因する質的な違いのために、昆虫細胞由来のほとんどの組換えタンパク質は実用化に至っていない。
- ③ ヒトの細胞と同じ翻訳後修飾特性を有する昆虫細胞の作出には、細胞の代謝工学的改変が必要だが、その基盤となる昆虫細胞のさまざまな代謝反応に関わる遺伝子群及びそれらの発現パターンはほとんどが未解明であった。

(2) カイコゲノムプロジェクトと遺伝子操作技術の進展

- ① カイコの培養細胞に関しては、カイコのゲノムプロジェクトによってもたらされた膨大なゲノム配列データとマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析技術などを利用すれば、いままでブラックボックスであったさまざまな代謝特性に関わる詳細な遺伝子発現ネットワークが一挙に解明できる状況になった。このような遺伝子発現ネットワークに関する知見は、細胞の代謝改変を合理的かつ効率的に達成する上で有効である。
- ② トランスポゾン *piggyBac* や発現ベクターあるいはRNAiなどの遺伝子操作技術が開発されたことで、これらを駆使すればカイコ培養細胞の遺伝子の改変や人為的発現制御も比較的容易に行える状況となった。

2. 研究の目的

昆虫培養細胞の高度利用技術開発の基盤研究として、以下の2項目を主な目的とした。

- (1) 昆虫細胞の代謝特性に関する遺伝子発現ネットワークを、特に細胞株間および培養条件間の差異に注目して解明する。
- (2) 遺伝子発現ネットワーク解析で得られた知見を、新しい有用物質生産システムの構築や安全な農薬開発のターゲットの探索などに応用するための昆虫細胞の遺伝子操作技術を確立する。

3. 研究の方法

- (1) カイコ培養細胞株 BmN4 をモデルとして、培養条件（主に培地の種類や成分）を変化させることにより、細胞に生じる遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に分析し、それらの要因が影響を及ぼす遺伝子発現とその結果生じる細胞の代謝や機能変化との因果関係を推定する。
- (2) BmN4 およびそれ以外の入手可能なカイコ培養細胞株数種類の反応特性や代謝特性を比較解析し、細胞株間で共通あるいは異なる特性に関与する遺伝子群を検出し、それら

の遺伝子産物の機能を同定する。

(3) カイコ細胞の反応特性や代謝特性に関する遺伝子のうち、特に、物質生産や農薬のターゲット探索に役立つ可能性のある遺伝子については、形質転換による強制発現などを行い、その影響を定量的PCRにより解析可能な *in vitro* アッセイ系を構築し、目的物質の生産量の向上あるいは特定の代謝経路を効果的に阻害するための技術開発を考案し、検証を行う

4. 研究成果

(1) カイコ卵巣由来 BmN4 細胞の網羅的遺伝子発現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。これらの遺伝子の代謝パスウェイ上へのマッピングが今後の課題である。
- 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く、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。
- ④ 新規農薬ピリダリルの数種チョウ目昆虫培養細胞への影響を調べた結果、ヤガ科由来の培養細胞のタンパク質合成を抑制するものの、BmN4 細胞には毒性を示さないことを明らかにした。標的分子および関与する反応パスウェイの同定が今後の課題である。

(2) 各種カイコ培養細胞株に共通あるいは特有な反応特性および代謝特性の解析を行い、以下の結果を得た。

- ① 農業生物資源研究所において保存されているカイコ由来の6種細胞株ならびにクワコ由来の細胞株から抽出したDNAに対してRAPD分析及びDNAバーコード分析を行い、細胞株間共通および細胞株特異的なDNAの基本的性状を明らかにした。
- ② 上記の細胞株のうち、カイコ胚子由来 Kel 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た。この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が今後の課題である。
- ③ カイコゲノム情報を利用してクローニン

与された3種類のras遺伝子ホモログがすべてグラニルグラニル化されていることを明らかにし、ほ乳類のファルネシル化とは異なるカイコ Ras タンパク質の翻訳後脂質修飾パスウェイが存在すると判断された。この昆虫特有の修飾パスウェイに関わる酵素遺伝子群のネットワーク解析が今後の課題である。

(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 上記の *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から、導入遺伝子の翻訳産物量の異なる10種類の細胞をクローニングし、導入遺伝子のコピー数と転写量を比較検討した結果、翻訳産物量はコピー数あるいは転写量のいずれとも明瞭な相関を示さないが、転写量/コピー数に強く依存することを明らかにした。各クローン細胞の導入遺伝子の染色体上の位置を決定し、発現量との関係を明らかにすることが今後の課題である。
- ③ 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を用いて、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 *in vitro* 発現検定系を構築し、前者に関しては理論的考察から設計された新規昆虫特異的殺虫剤に対して1塩基置換で抵抗性になる可能性を実証し、後者に関しては発現遺伝子産物以外の因子がウイルス感受性に必須であることを明らかにした。
- ④ 新たな殺虫剤ターゲットのモデル分子としてシロアリの水利用に関与するアクアポリン遺伝子のクローニングに成功した。また、カイコ核多角体病ウイルスの比較対象として宿主範囲が異なるサクサン核多角体病ウイルスの全遺伝子配列を解読した。今後、これらの遺伝子を上記の *piggyBac*ベクターや一過性発現ベクターを用いて発現し、安全な農薬候補分子検定やウイルス感染メカニズムの解明に役立つ。

5. 主な発表論文等

(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6件)

- ① Moriya, K., Tsubota, T., Ishibashi, N., Yafune, A., Suzuki, T., Kobayashi, J., Shiotsuki, T., Utsumi, T.: *Bombyx mori* Ras proteins, BmRas1, BmRas2 and BmRas3 are neither farnesylated nor palmitoylated but are geranylgeranylated, *Insect Molecular Biology* (published online) 2009, 査読あり
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/123224731/abstract>
- ② Kambara, K., Takematsu, Y., Azuma, T., Kobayashi, J., cDNA cloning of aquaporin gene expressed in the digestive tract of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera; Rhinotermitidae), *Applied Entomology and Zoology*, 44, 3-770, 2009, 査読あり
<http://dx.doi.org/10.1303/aez.2009.315>
- ③ 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
<http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvn125>
- ④ 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
<http://dx.doi.org/10.1002/arch.20252>
- ⑤ Huang, Y., Mitsutake, H., Itakura, M., Wang, X., Kobayashi, J., Nucleotide sequence analysis of *Pst*I D fragment of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus clone A and identification of *Escherichia coli* insertion sequence, *International Journal of Wild Silkmoth & Silk*, 12, 1-8, 2007, 査読あり
- ⑥ 小林淳: 野蚕を宿主とするバキュロウイルスベクター系の魅力と実用化への挑戦, *蚕糸・昆虫バイオテック*, 76, 189-196, 2007, 査読なし
<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/kochubiotec/-char/ja>

[学会発表] (計29件)

- ① 光武宏, 小林淳, 形質転換カイコ培養

- 細胞のクローニングおよび導入遺伝子の安定性解析, 日本蚕糸学会第80回記念大会, 2010年4月4日, 信州大学
- ② 塩月孝博, 坪田拓也, 守屋康子, 石橋直人, 八舟宏典, 小林淳, 鈴木崇, 小倉岳彦, 内海俊彦, カイコ ras 遺伝子の解析と Ras タンパク質の脂質修飾解析, 日本蚕糸学会第80回記念大会, 2010年4月3日, 信州大学
- ③ 津田恵寛, 門野敬子, 城所久良子, 今西重雄, 伊藤克彦, 小林淳, 昆虫培養細胞における DNV-2 抵抗性および感受性遺伝子の発現, 2010年4月3日, 信州大学
- ④ 津田恵寛, Huang, Y., 光武宏, 板倉真, 王学英, 小林淳, サクサン核多角体病ウイルスの全ゲノム解読と他の分離株との比較, 第54回日本応用動物昆虫学会大会, 2010年3月27日, 千葉大学
- ⑤ 光武宏, 小林淳, 転移酵素 mRNA を用いた piggyBac で形質転換した昆虫細胞における転移酵素活性残存期間の短縮, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜
- ⑥ Tsuda, Y., Mitsutake, H., Itakura, M., Huang, Y., Wang, X., Kobayashi, J., Genome sequence of Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus used for baculovirus expression vector system, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜
- ⑦ 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, 第82回生化学会大会, 2009年10月23日, 神戸国際会議場
- ⑧ 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技術の改良, 日本蚕糸学会第79回大会, 2009年3月22日, 東京農工大学
- ⑨ 津田恵寛, 門野敬子, 城所久良子, 伊藤克彦, 小林淳, バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系を利用した DNV-2 抵抗性遺伝子産物の生産, 日本蚕糸学会第79回大会, 2009年3月21日, 東京農工大学
- ⑩ 門野敬子, 城所久良子, 津田恵寛, 今井啓太, 光武宏, 小林淳, 伊藤克彦, 瀬筒秀樹, 内野恵郎, 小林功, 田村俊樹, 三田和英, BmDNV-2 感受性遺伝子 (+^{nsd-2}) の強制発現による感受性誘導の試み日本蚕糸学会第79回大会, 2009年3月21日, 東京農工大学
- ⑪ 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
- ⑫ Kobayashi, J., Attractive properties of baculovirus expression vector systems using wild silkmoths, The 5th International Conference on Wild Silkmoths, 2008年9月10日, Phoenix Hotel (瀋陽, 中国)
- ⑬ 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
- ⑭ Seto, H., Fukuhara, A., Imanishi, S., Kobayashi, J., Performances of RAPD and DNA barcoding in identification and phylogenetic analysis of insect cell lines, Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, 2008年3月22日, 名古屋大学
- ⑮ Mitsutake, H., Kobayashi, J., Improvement of piggyBac-mediated stable transformation of cultured insect cells, Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, 2008年3月22日, 名古屋大学
- ⑯ 板倉真, 富田隆史, 古崎利紀, 日堂修, 河野義明, 小林淳, カイコバキュロウイルスベクター系を用いた殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼの生産, 日本蚕糸学会第77回大会, 2007年4月4日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所
- ⑰ 福原明子, 小林淳, 今西重雄, 新たに作出した数種昆虫培養細胞の RAPD 分析, 日本蚕糸学会第77回大会, 2007年4月4日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所
- ⑱ 光武宏, 小林淳, piggyBac ベクターの改変と形質転換カイコ培養細胞における染色体挿入特性, 日本蚕糸学会第77回大会, 2007年4月4日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所
- その他支部会発表など11件あり (省略)
- [図書] (計2件)
- ① 小林淳: 朝倉書店 (東京), 微生物の事典 (渡邊信ほか編) (III. 5.7 バキュロウイルスベクターによる有用タンパク質の生産), 2008, p. 294-295
- ② 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

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/
member/kobayashi/p.html](http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/kobayashi/p.html)

~

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし