

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06083

研究課題名（和文）新規昆虫培養細胞系樹立プロトコルの確立

研究課題名（英文）Establishment of novel protocols for establishing insect cell lines

研究代表者

渡邊 和代（Watanabe, Kazuyo）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・契約研究員

研究者番号：80835116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫の培養細胞は、遺伝子機能解析・昆虫微生物研究・薬剤スクリーニングなど多くの研究分野で有用なツールとして数多く利用され、重要性・必要性が増してきている。しかし、どんな昆虫からも培養細胞が樹立できる方法は確立されていない。そこで昆虫培養細胞を樹立する新しい手法の確立を目指した。初代培養時に様々なストレスを与えた結果、培養液量の調整で細胞遊出が促進されることが分かった。また、新規初代培養用培養液の開発を行い良好な結果を得た。加えて、樹立された培養細胞とその由来組織との遺伝子発現を比較したところ、培養細胞ではがん化に関する遺伝子が高発現していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫培養細胞を用いた様々な研究において、研究対象とする昆虫由来のものを用いることがベストであるが、現時点では培養細胞を樹立できない昆虫が多く、他の昆虫の培養細胞を利用しなければならないことが多い。しかし、害虫防除に応用できる分野である昆虫ウイルスや共生微生物などの研究では、ホストとなる昆虫由来の培養細胞であることが求められる。どんな昆虫からでも培養細胞を樹立できる方法があれば、今まで培養細胞がなく他の研究手法を取らなければならなかった農業害虫をはじめとする様々な昆虫の研究促進に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Cultured insect cells have been used as a useful tool in many research areas, including gene function analysis, insect microbiology research, and drug screening. Their importance and need are increasing. However, a method for the establishment of cultured cell lines from any insect has not been established. Therefore, we aimed to establish a new method for the establishment of cultured insect cells. Subsequently, we found that changing the amount of culture medium during primary culture enhanced cell proliferation. We also developed a new culture medium for primary culture and obtained good effects. In addition, we compared gene expression between the established cultured cells and their derived tissues and found that genes related to oncogenesis were highly expressed in the cultured cells.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：昆虫 培養細胞 初代培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子生物学や遺伝子工学の進歩に伴い、生体内 *in vivo* から生体外 *in vitro* へと研究分野が広がってきているが、これには培養細胞・組織などの培養系の利用が必要不可欠である。昆虫学の分野では、1962年に Grace によって初めて昆虫の培養細胞が作出されて以来、今日までに 1500 系統を超える数の昆虫培養細胞が作られている¹⁾。これら培養細胞は、遺伝子機能解析・タンパク質発現・昆虫微生物研究・薬剤スクリーニングなど多くの研究分野で有用なツールとして数多く利用され、重要性・必要性が増してきている。複雑な生体内での反応などを比較的単純な系として検証することが出来、また実験材料として多くの昆虫を飼育または収集する代わりに、実験室内で増殖させることができるなど、その培養細胞を利用するメリットはとて大きい。

しかし、樹立されている昆虫培養細胞のうち、半数以上をハエ目とチョウ目由来のものが占めている。なぜなら比較的容易に細胞系の樹立ができるチョウ目やハエ目昆虫に対して、カメムシ目やハチ目昆虫などは樹立が困難な種が多いからである。このような差は、主に初代培養に用いる培養液の成分がその目専用に開発されたものではないことや、材料となる昆虫が共生細菌を持つことなどが理由として考えられてきた。このように、昆虫の種類によっては培養細胞樹立が成功する確率は非常に低く、どんな昆虫でも必ず培養細胞が作出できるという方法はいまだに確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、どんな昆虫からも培養細胞を樹立できる手法の確立を目的とし、二つのアプローチで新たな培養細胞樹立方法の検討を行なった。

1) 培養プロセスの改良と新規初代培養用培養液の開発：培養細胞を樹立するためには、長期間の初代培養が必要となる場合がほとんどである。その「長期間培養」という、培養期間中に細胞が受けるストレスの代わりに、人為的ストレスを与えることにより細胞増殖を誘導することができないか検証を行なった。また、初代培養に適した新規培養液の開発を行なった。

2) 培養細胞と細胞由来組織間での遺伝子発現の比較を行い培養細胞化に関わる遺伝子を探索し、初代培養に応用する方法の開発：培養に供試した組織が培養細胞になる過程では、共通の遺伝子発現変動が起きている可能性がある。そこで供試組織と樹立された培養細胞の遺伝子発現を比較し、その変化を人為的に起こすことにより新たな初代培養法へ応用することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 培養プロセスの改良を目的に、培養細胞の樹立報告がない昆虫(エンドウヒゲナガアブラムシ、クサギカメムシ、チャバネアオカメムシなど)の組織を用いて、様々なストレス処理を行い、培養中の細胞の増殖が誘導されないかを検証した。具体的には、高温処理(30℃、2~24hr)、低温処理(4℃、24hr)、pH 処理(pH4.5~5.6、3~30min)、高浸透圧処理、培養液の液高調整、スフェロイド様細胞塊(U底プレート、遠心処理)などを、培養開始直後、一日培養後、培養開始前(虫体)などに行なった。いずれのサンプルも、供試した組織や細胞が死んでしまうまで培養を継続し、経過を観察した。

(2) これまで初代培養に用いられてきた培養液を参考にして、新規初代培養用培養液の開発を行なった。市販の培養液だけでなく各成分を混合した自作の培養液を作成し、培養液中の糖、塩類などの含有量の変更、培養液の液性の検討を行なった。培養液の評価は、カメムシ、アブラムシ、ミツバチなどの初代培養に供することで行った。

(3) 3種類の組織(血球、表皮、脂肪体)から樹立したハスモンヨトウの培養細胞とそれら培養細胞の由来組織の RNA-seq 解析を行った。培養細胞と由来組織での遺伝子発現量解析を行い、発現量が大きく変化する遺伝子を抽出、精査した。

(4) (3)で精査した遺伝子が培養細胞樹立に関与しているかを検証する実験系として、ハスモンヨトウ幼虫体液を用いた *ex vivo* 評価系の構築を行なった。幼虫体液を培養液中に回収し、1日間培養後リポフェクション試薬を用いて蛍光遺伝子導入を行い、その後数日間培養し、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 様々な人為的ストレスを与えることで、細胞増殖の誘導を試みた結果、カメムシにおいて培養液の液量を通常用いる場合(3ml)に比べ多くし(5ml)、液高を高くした場合(図1)や、スフ

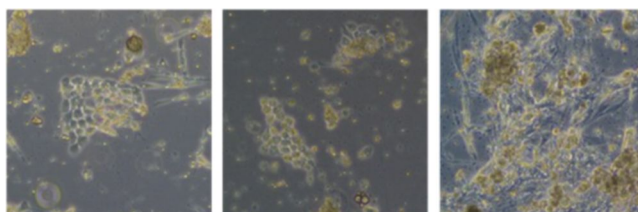
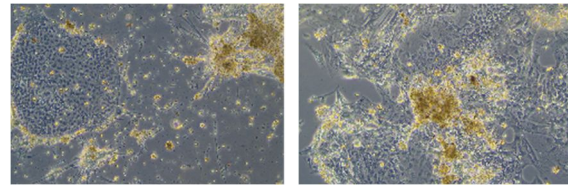


図1 培養液量を変えた場合の初代培養(クサギカメムシ)

エロイド様細胞塊を形成させた場合に、初期の細胞遊出が促進される傾向にあった。一部サンプルでは現在も培養が継続できている。それ以外の処理区では、細胞増殖が促進される傾向があってもサンプル間で差があり、はっきりとした効果が見られなかった。

(2) 初代培養には、市販されている培養液や、MGM-450²⁾、MGM-464³⁾など高栄養の培養液に10~20%のFBS(牛胎児血清)を添加して用いることが多い。今回これら既存の培養液の組成を参考に検討し、糖類の組成がこれまでの培養液とは異なる新規初代培養液MXap50を開発した。この培養液にFBSを20%添加したものを用いることで、培養細胞樹立の報告が少ないカメムシ目やハチ目昆虫の初代培養の期間を長いもので一年以上延長することに成功した(図2)。一部の昆虫サンプルでは現在も培養を継続中である。



チャバネアオカメムシ セイヨウミツバチ
図2 新規初代培養液 MXap50 を用いた初代培養

(3) 遺伝子発現量解析には、ハスモンヨトウのリファレンスゲノムにマッピングする方法と *de novo* アセンブリからコンティグごとの発現量を求める方法を行った。

これらの結果をもとに階層クラスター分析を行った結果、異なる3種の組織と、3種の培養細胞でそれぞれクラスターを形成することがわかった(図3)。これは組織から培養細胞になる過程で、遺伝子発現が同一方向に変化していることを示唆している。また培養細胞とその由来組織間での遺伝子発現量比較を行った(図4A)。赤のプロットは細胞で高発現、緑のプロットは由来組織で高発現の遺伝子を示す。また3種類の組織、細胞のそれぞれのサンプル間で

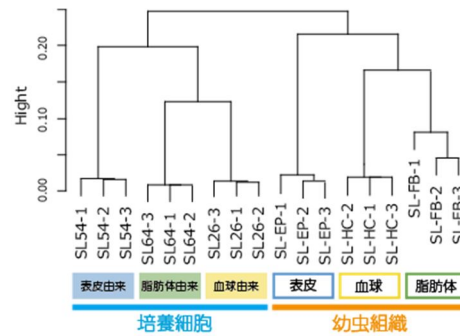


図3 階層クラスター分析

DEG(発現変動遺伝子)を検出した。そのうち3対のサンプル間で共通して細胞で高発現している遺伝子が992個、組織で高発現している遺伝子が1121個であった(図4B)。

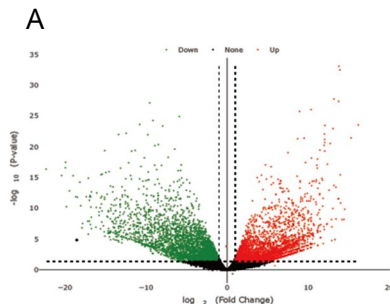
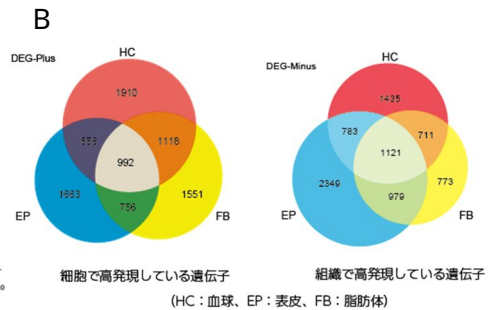


図4 発現変動遺伝子

A: Volcano plot B: 各組織、細胞間で共通している DEG



それぞれのサンプル間でのDEGを発現量の差が大きい順にスコア化し、共通してスコアが高いものから順位づけをした。それら遺伝子に対してアノテーションを行い、その結果をもとに、培養細胞で高発現している遺伝子から培養細胞化に関わる候補遺伝子を選択した(図5)。これら候補遺伝子には、哺乳類のがん化に関連する遺伝子のオースログやストレス応答タンパク質などが含まれていた。昆虫の培養細胞化の一つの過程として、細胞のがん化によるものがあることが示唆された。

(4) (3)の候補遺伝子を評価する実験系として、ハスモンヨトウ組織に遺伝子導入を行う *ex vivo* 実験系の検討を行った。検討の結果、以下の条件で導入した蛍光タンパク質の発現が観察された。使用組織は回収がしやすい幼虫の血球を使用、初代培養用培養液(20% FBS 添加)で培養、リポフェクション試薬はFuGENE HDを使用、メラニゼーション防止にグルタチオンを添加した(図6)。しかし、遺伝子導入から蛍光が観察されるまでの期間は2~7日と幅があった(ハスモンヨトウ培養細胞では翌日から蛍光が観察される)。また導入効率も低く、時には蛍光が観察されない時もあり、さらに安定した培養の方法、遺伝子導入条件を検討する必要がある。

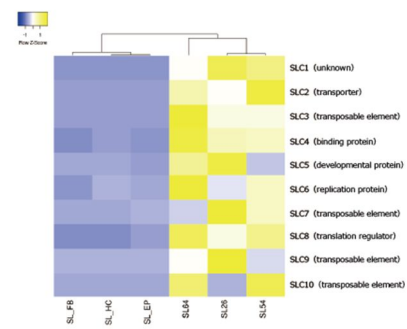


図5 候補遺伝子と heat map

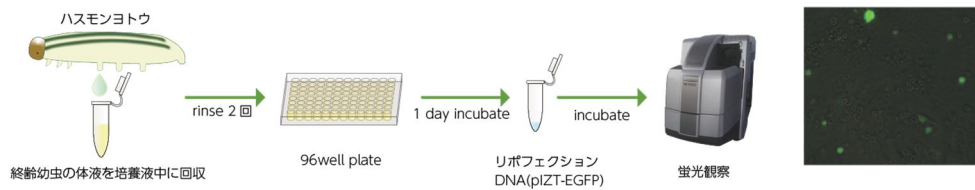


図6 幼虫血球を用いた *ex vivo* 培養系の検討

< 引用文献 >

- 1) Bairoch A. (2018) The Cellosaurus, a cell line knowledge resource. *J. Biomol. Tech.* 29:25-38
- 2) Mitsuhashi J and Inoue H (1988) Obtainment of a Continuous Cell Line from the Larval Fat Bodies of the Mulberry Tiger Moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera : Arctiidae). *Appl. Entomol. Zool.* 23:488-490
- 3) Mitsuhashi J (2001) Development of highly nutritive culture media. *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Animal* 37:330-337

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Herran Benjamin, Sugimoto Takafumi N, Watanabe Kazuyo, Imanishi Shigeo, Tsuchida Tsutomu, Matsuo Takashi, Ishikawa Yukio, Kageyama Daisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Cell-based analysis reveals that sex-determining gene signals in <i>Ostrinia</i> are pivotally changed by male-killing <i>Wolbachia</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgac293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Kazuyo, Yoshiyama Mikio, Akiduki Gaku, Yokoi Kakeru, Hoshida Hiroko, Kayukawa Takumi, Kimura Kiyoshi, Hatakeyama Masatsugu	4. 巻 16
2. 論文標題 A simple method for ex vivo honey bee cell culture capable of in vitro gene expression analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0257770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0257770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊和代、粥川琢巳
2. 発表標題 昆虫培養細胞の新たな初代培養法開発に向けた研究
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊 和代、立石 剣、粥川 琢巳
2. 発表標題 農業生物資源ジーンバンク・昆虫細胞バンクの紹介と新たな初代培養法開発に向けた研究
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本 貴史、エラン ベンジャミン、渡邊 和代、土'田 努、松尾 隆嗣、石川 幸男、粥川 琢巳、陰山 大輔
2. 発表標題 オス殺しボルバキアにより変動する宿主遺伝子の解析からわかってきたこと
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊和代、高務淳、相川拓也、粥川琢巳
2. 発表標題 マツノマダラカミキリ由来培養細胞系の樹立
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	粥川 琢巳 (Kayukawa Takumi) (70580463)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------