

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03944

研究課題名(和文) 昆虫中腸幹細胞培養系を基盤とした生理学および病理学的実験プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Establishment of experimental platform for physiological and pathological studies based on insect midgut stem cell culture

研究代表者

小林 淳 (Kobayashi, Jun)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授

研究者番号：70242930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫中腸幹細胞の安定した培養分化系の樹立と生理学および病理学的機能検証を目的として、カイコ幼虫および蛹の中腸幹細胞の簡便な調製法を確立し、初代培養幹細胞の生存率改善に有効な添加物を探索・検証するとともに、生存率を低下させずに4℃で短期保存する技術を開発した。また、カイコの発育に伴う中腸幹細胞の遺伝子発現の変動には、ホルモン以外の因子が大きく関与する可能性を明らかにした。さらに、中腸細胞病変の詳細なメカニズム解明ならびに害虫防除に役立つ、カイコおよびヒトスジシマカのそれぞれに対して特異的な殺虫活性を有する*Bacillus thuringiensis*のCry毒素内包多角体の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、数多くの農業害虫を含むチョウ目幼虫の中腸細胞の分化に伴う機能変化や病原微生物の侵入過程を分子レベルで明らかにするための世界初となる中腸幹細胞の培養分化系の構築を目指し、その基盤となる幹細胞の分離調製法が確立され、発育ステージやホルモンが幹細胞の遺伝子発現に及ぼす影響が明らかにされ、また、害虫防除への応用が期待される*Bacillus thuringiensis*の数種Cry毒素内包多角体が構築され、それらの中腸細胞に対する種特異的な殺虫効果が明らかにされるなど、基礎ならびに応用昆虫学上意義ある成果が得られ、今後、農業や関連産業に役立つ技術開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a stable in vitro differentiation system of the insect midgut stem cell and to verify its physiological and pathological functions, we have developed a simple protocol for stem cell preparation from larvae and pupae of the silkworm, *Bombyx mori*, and have investigated effectiveness of supplementation to the primary stem cell culture for survival rate improvement, together with the development of a short-term intact stem cell preserving method at 4℃. We have also revealed the possibility that factors other than hormones are predominantly involved in changes in gene expression of the stem cell during the growth of *B. mori*. Furthermore, we have succeeded to make protein crystals containing *Bacillus thuringiensis* Cry toxins showing specific insecticidal effects on *B. mori* and *Aedes albopictus*, respectively, which are useful not only for elucidation of detailed mechanisms for pathogenic changes in midgut cells, but also for pest management.

研究分野：分子昆虫科学

キーワード：中腸幹細胞 カイコ *Bacillus thuringiensis* Cry毒素 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

昆虫は短期間のうちに大量摂食とその代謝同化による個体の成長と生殖を成し遂げる。昆虫を宿主とする微生物も共生や侵入感染を通じて、微生物自らを継代維持している。昆虫消化管、とりわけ中腸は、毒物・薬剤や侵害性の細菌・カビ・ウイルスの作用点であり、これらと対峙する宿主側でも防衛応答の機構も存在する。中腸研究の焦点は、消化吸収に関わる酵素や透過機構に関わるトランスポーターの研究や感染病理学的課題から、より統合的な生物機能の分子メカニズムや病気の原因究明およびこれら昆虫科学の有効利用へと進展してきている。また、様々な昆虫や昆虫病原微生物の膨大なゲノム情報が利用可能となっており、それらの中から、まだ教科書では語られていない重要かつ多様な新機能を発見できる可能性も期待されている。

一方、チョウ目幼虫中腸の幹細胞研究では、21世紀初頭より、幹細胞の分離採取と継代維持に関する技術開発と分化誘導因子の探索が集中的に取り組みられ、技術的進展が見られるものの、培養条件下でシート形成や管状化などの高次組織に分化再生させるアプローチはほとんど手つかずのまま残されている。また、昆虫病理学研究では、*Bacillus thuringiensis* が産生する殺虫性タンパク質 (BT トキシン, Cry 毒素) の殺虫作用解明に初代培養中腸幹細胞が活用されはじめているものの、病原微生物の感染機構研究への応用は試みられていない。特に、昆虫ウイルスの多くは消化管から侵入するにもかかわらず、中腸由来の培養細胞が存在しないため、詳細な感染増殖機構の解明が困難であった。したがって、昆虫ウイルスの中腸における感染増殖を再現できる培養細胞系を作製できれば、消化管からの感染効率が高いウイルスの選抜やウイルス感染促進あるいは阻害剤の開発が可能になると期待される。

そこで、昆虫遺伝学、生理学および病理学の専門家による横断的な研究チームを組み、消化管 (中腸) という外界・異物侵入の接点となる重要な境界組織の *in vitro* 再構築技術を確立し、生理学および病理学的研究への有効利用を図るために本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

昆虫の消化器系における栄養摂取機能のセンターである中腸は、分化した細胞集団—チョウ目幼虫では円筒細胞と杯状細胞—で構成されるが、病原微生物の侵入のような非常時には、完成上皮組織基底部に点在する幹細胞塊 (新生細胞の巣: *regenerative nidi*) から供給される新たな分化途上細胞が修復再生を担う。本研究課題では、この中腸幹細胞を安定に維持し、潜在能力を再現しうる画期的な培養分化系の開発に取り組み、遺伝子発現解析、薬理的機能破壊、昆虫病原微生物の増殖などにより、中腸組織における特異的機能および病原微生物に対する抵抗性や感受性のメカニズムならびに分化に伴う獲得過程を追究し、中腸組織の基礎生物学的研究ならびに新たな生物的・化学的防除のターゲット探索に役立つ *in vitro* 実験プラットフォームとしての有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) チョウ目昆虫中腸幹細胞培養技術の開発・改良

主にカイコを材料に用いて、タバコスズメガやオオタバコガの幼虫で報告された中腸幹細胞の調製方法を改良し、中腸幹細胞の簡便かつ効率的な調製法の開発を試みた。また、調製後の幹細胞を長期間培養維持するために、各種添加物や培養温度の効果を検証した。また、同様の方法をエリサンにも応用し、汎用性を検討した。

(2) 培養中腸細胞の生理学研究への応用

カイコの発育に伴う中腸幹細胞における各種消化酵素遺伝子などの発現変動を RNA-seq により網羅的に解析し、培養条件下でホルモン投与により生体内での変動を再現できるかなど、*in vitro* 実験系としての有効性を検証した。

(3) 培養中腸細胞の病理学的研究への応用

BT の数種 Cry 毒素を内包化した多角体を調製し、経口投与により殺虫活性を検証した。また、Cry 毒素の殺虫機序を明らかにするために、カイコ中腸細胞の Cry 毒素受容体候補であるアルカリ性ホスファターゼの発現分布の解析、およびショウジョウバエの酸分泌に関わる遺伝子のノックダウンを試みた。

4. 研究成果

(1) チョウ目昆虫中腸幹細胞培養技術の開発・改良

タバコスズメガやオオタバコガの幼虫で以前より報告されている中腸幹細胞の調製方法を改良し、6~9個体のカイコ4齢眠期幼虫または吐糸終了期幼虫を使って、それぞれのステージからの中腸の幹細胞調製方法を開発した (図1)。一人の実験者による半日程度の作業で約 50~100 万 cells の均一な形状の幹細胞を調製することが可能である。また、この調製した幹細胞は、市販 Grace 培地のみの存在下、冷蔵庫で1~2週間は生存率7~8割を維持した状態で保存可能であることが判明したが、通常の 27°C の培養条件下で Grace 培地にさまざまな添加物 (牛胎児血清, カイコ幼虫体液, カイコ蛹抽出物など) を

加えても、若干の延命効果はあるものの、増殖分化を促進することはできなかった。

なお、エリサン4齢眠期幼虫を使って、同様に中腸幹細胞の調製を試みたところ、組織片の混入が多く、カイコほどきれいには分離調製できず、昆虫種ごとに調製方法の最適化が必要と判断された。

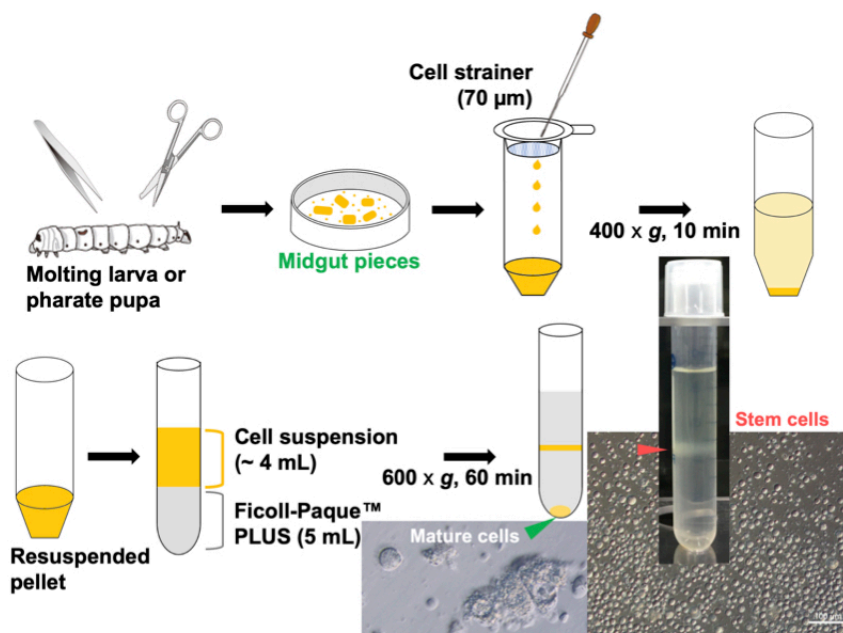


図 1. カイコに最適化した中腸幹細胞分離調製法の概略。Grace 培地を 5 mL 入れたシャーレ（直径 6 cm）を 3 枚用意し、1 枚目のシャーレにカイコ 3 個体から摘出した中腸を入れ、混入組織を除去する。2 枚目のシャーレに 3 個体分の中腸だけに移し、そこで各中腸を 3～4 分割する。さらに分割片を 3 枚目のシャーレに移し、ピンセットで中腸を体軸方向に延ばしながら細片する。その後、図のプロセスに沿って作業を進め、密度勾配遠心で分離形成された幹細胞のバンドを回収する。

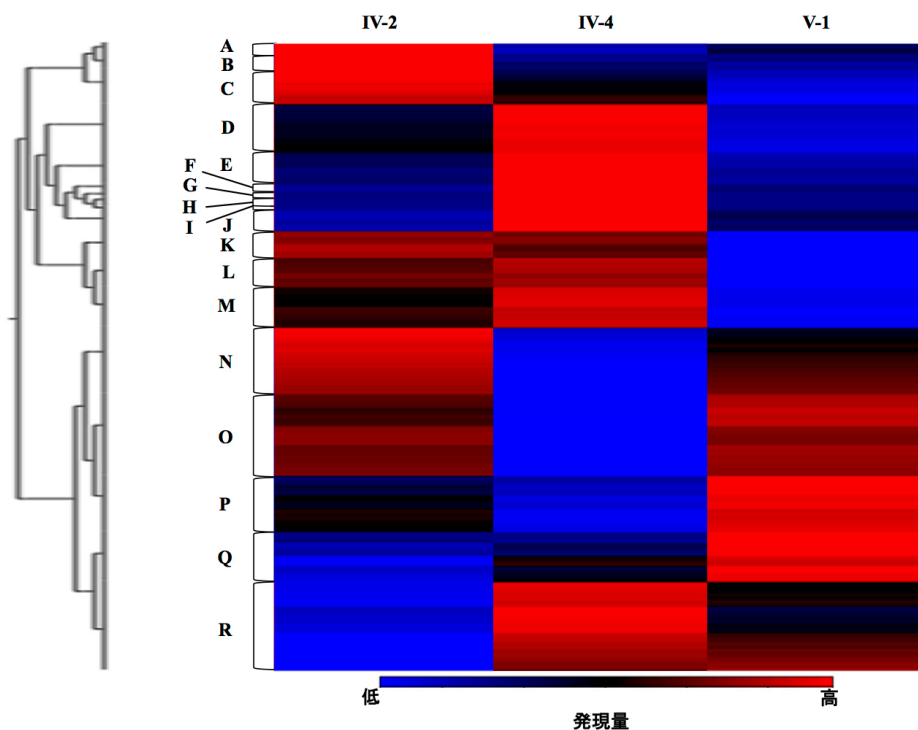


図 2. カイコの発育に伴う中腸幹細胞における遺伝子発現変動。4 齢 2 日 (IV-2)、4 齢眠期 (IV-4) および 5 齢 1 日 (V-1) のカイコ幼虫から図 1 の方法で分離調製した中腸幹細胞の遺伝子発現を RNA-Seq により解析し、それらと比較してヒートマップを作成した。パネル左には、変動パターンの類似性により遺伝子が A～R の 18 クラスターに分類されたことを示す。

(2) 培養中腸細胞の生理学研究への応用

カイコ幼虫の中腸幹細胞を4齢眠期およびその前後(4齢2日と5齢1日)から図1に示した手順で分離回収し、発育に伴うトランスクリプトームの変化をRNAseqにより解析したところ、さまざまな遺伝子の発現変動(図2)が生じており、脱皮期に顕著に減少する遺伝子(消化に関与する遺伝子など)や、増加する遺伝子(キチン合成、クチクラ形成および脱皮ホルモンカスケードに関与する遺伝子など)が確認された。これらの発育に伴う遺伝子発現変動には、ホルモンが関与していると考えられたので、4齢2日目の培養中腸幹細胞に脱皮ホルモン(20E)と幼若ホルモンアナログ(メトプレン)を単独あるいは同時に投与し、24時間後にRNA-SeqおよびRT-PCRで遺伝子発現の変動を確認したところ、ごく一部の遺伝子(β -tublin 遺伝子や脱皮ホルモンカスケードに関わるHR3 遺伝子など)以外の発現に有意な変化は検出されず、中腸幹細胞の発育に伴う遺伝子発現には、ホルモン以外の因子(おそらく中腸組織特有の成分)が大きく関与している可能性が示唆されるとともに、今回開発した中腸幹細胞培養系は生理学研究のためのin vitro実験系としては不十分であり、まだまだ改良が必要と判断された。

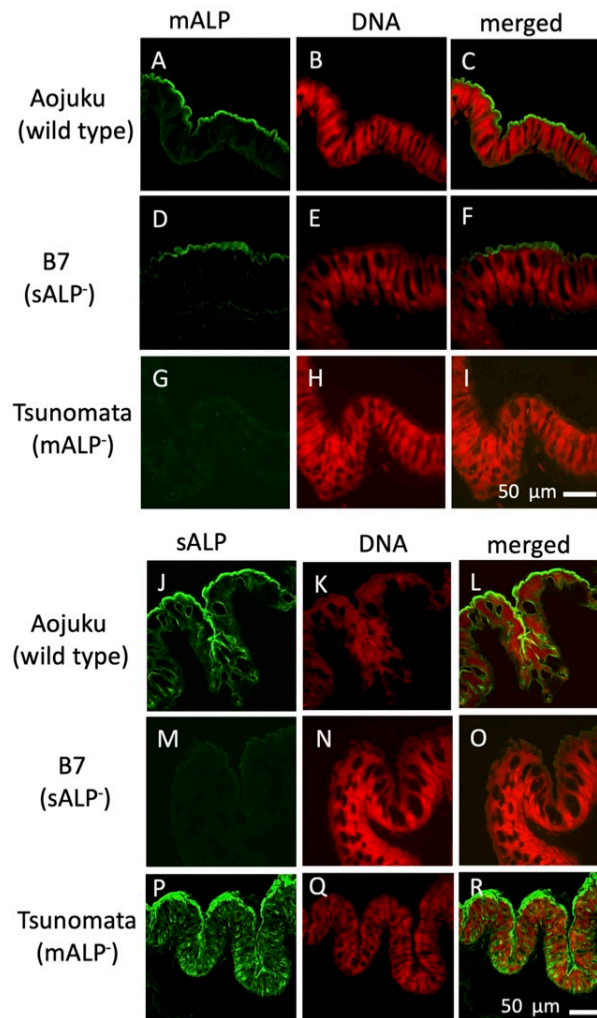


図3. カイコ3品種(青熟, B7および角又)の中腸における2種類のアルカリ性ホスファターゼ(膜結合型mALPと遊離型sALP)の発現比較。抗mALP抗体染色画像(A, D, G), 抗sALP抗体染色画像(J, M, P), DNA染色画像(B, E, H, K, N, Q), 各品種の抗体染色とDNA染色のマージ画像(C, F, I, L, O, R)。

(3) 培養中腸細胞の病理学的研究への応用

カイコガ幼虫に対して強い殺虫活性を示すCry1Laを内包化した多角体を作製し、カイコ3齢幼虫に経口投与したところ、非常に強い殺虫効果を示した。特に、投与後2時間以内に幼虫は苦悶し、吐液するなどCry毒素典型的な症状を示した。このCry1Laはプレ体の状態で多角体に内包化しているが、経口摂取された多角体はカイコガ幼虫の消化管内で溶解し、さらに溶け出たプレ体のCry1LAは消化液中のタンパク質分解酵素(トリプシン)で切断され、活性体になったものと判断された。さらに、カイコ中腸細胞におけるCry毒素受容体の候補と考えられるアルカリ性ホスファターゼ(ALP)の発現を調査したところ、

野生型品種の青熟では、抗体染色により円筒細胞の冊子縁に mALP（膜結合型）と sALP（遊離型）の両方の発現が確認されたが、sALP 遺伝子欠損品種の B7 では mALP のみ、mALP 遺伝子変異品種の角又では sALP のみ発現が確認された（図 3）。Cry 毒素作用の観点からは、細胞表面の mALP が受容体として働くのに対し、遊離型は消化管内の毒素を吸着して殺虫効果を緩和すると考えられており、遊離型酵素が円筒細胞において膜結合型酵素と同様の局在を示すことから、遊離型酵素が Cry 毒素に対する防御機構として機能している可能性が示唆された。

一方、ハエ目に殺虫活性を示す Cry4Aa および Cry11Aa を内包化した Cry4Aa 多角体 (HyH1/Cry4a(N)DCC)、Cry11Aa 多角体 (HyH1/Cry4a(N)DCC) を作製し、ヒトスジシマカ 2 齢幼虫に経口投与すると、消化管で溶解し強い殺虫活性を示したが、ショウジョウバエの成虫および 1 齢幼虫に経口投与しても消化管で溶解せず、そのまま体外に排出されている可能性が強く示唆された。この違いはショウジョウバエの消化管内部の pH（4 以下）に起因すると考え、消化管内 pH と Cry 毒素の効果の関係の解明するため、ショウジョウバエ中腸の Copper 細胞が酸を分泌するために不可欠な *labial (lab)* 遺伝子の RNAi 系統を新たに作出し消化管の酸分泌の阻害を試みたが、作出したノックダウン個体が幼虫期致死となり Cry4Aa と Cry11Aa の毒性検証には至らず、本研究課題で実施できなかった昆虫ウイルスの感染機構の解明とともに、病理学的研究における *in vitro* 実験系の有効性検証において今後取り組むべき課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 N. Fujiwara, M. Azuma, M. Itoh, J. Kobayashi	4. 巻 89
2. 論文標題 Isolation and primary culture of stem cells from midgut epithelium of the silkworm <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 55-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11416/jibs.89.3_055	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 Abe Satoshi, Atsumi Kohei, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Mori Hajime, Ueno Takafumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Structure of in cell protein crystals containing organometallic complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2986 ~ 2989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c7cp06651a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Negishi Hashiru, Abe Satoshi, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Niwase Kento, Boudes Marion, Coulibaly Fasseli, Mori Hajime, Ueno Takafumi	4. 巻 54
2. 論文標題 Supramolecular protein cages constructed from a crystalline protein matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1988 ~ 1991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c7cc08689j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mori Hajime, Oda Naoki, Abe Satoshi, Ueno Takafumi, Zhu Wenliang, Pernstich Chris, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 203
2. 論文標題 Raman spectroscopy insight into Norovirus encapsulation in <i>Bombyx mori</i> cyovirus cubic microcrystals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.saa.2018.05.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Haruka Endo, Masaaki Azuma, Satomi Adegawa, Shingo Kikuta, Ryoich Sato	4. 巻 591
2. 論文標題 Water influx via aquaporin directly determines necrotic cell death induced by the <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry toxin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 56-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12506	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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉永侑生, 東政明, 小林淳
2. 発表標題 カイコ幼虫消化管幹細胞の初代培養とトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉永侑生, 東政明, 小林淳
2. 発表標題 カイコ (<i>Bombyx mori</i>) 消化管幹細胞トランスクリプトームの幼虫脱皮に伴う変化
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 淳
2. 発表標題 昆虫培養細胞の樹立と利用
3. 学会等名 第27回病害動物の生理分子生物談話会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉永侑生, 小林淳, 東政明
2. 発表標題 チョウ目昆虫の中腸幹細胞の分離・培養とトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 西日本応用動物昆虫研究会・中国地方昆虫学会 令和元年度合同例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉永侑生, 東政明, 小林淳
2. 発表標題 チョウ目昆虫中腸幹細胞の分離・培養とトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林淳, 東政明, 伊藤雅信ほか, 日本蚕糸学会編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 210
3. 書名 カイコの科学	

〔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	東 政明 (Azuma Masaaki) (20175871)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	伊藤 雅信 (Ito Masanobu) (60221082)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授 (14303)	
研究分担者	森 肇 (Mori Hajime) (80201812)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授 (14303)	削除：2019年11月28日

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