

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04789

研究課題名（和文）培養温度制御に基づく真核細胞への遺伝子導入の効率化

研究課題名（英文）Effective transfection of eukaryotic cells by temperature control

研究代表者

勝田 知尚（Katsuda, Tomohisa）

神戸大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50335460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：

本研究では、真核細胞において外来遺伝子の発現を促進させることを目的として、培養液中の細胞間で細胞周期を同調させたのち、分裂期に起こる核膜の崩壊に合わせて外来遺伝子を細胞内へ導入するといった手法の開発を行った。真核細胞のモデルに用いた昆虫細胞は、最適条件より低い温度で培養すると増殖が抑制され、細胞周期がDNA合成の開始を待つ期（G1期）にある細胞が減少することを見出した。このことを利用し、外来遺伝子を導入する前にあらかじめ細胞を低温処理することにより、外来遺伝子の発現を促進させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫細胞や哺乳動物細胞などの高等動物細胞に対する外来遺伝子の導入では、ウイルス感染を利用した手法が効率的であり、広く用いられている。しかし、この手法には外来遺伝子のサイズに制限があることと、安全性を高める工夫はされているものの、ウイルスの形成や感染にかかわる遺伝子が含まれることの懸念が残る。そこでウイルス感染に依存しない効率的な外来遺伝子の導入法が求められているが、本研究で開発した手法はこうした要請に応えられることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

For enhanced expression of foreign genes in eukaryotic cells, we have developed a method in which cell cycle of the cells in a culture is synchronized by means of temperature control and then the genes are introduced into the cells in time breakdown of nuclear envelope happens. Insect cells, employed as a model eukaryotic cell, showed the suppression of cell division and the reduction of the cells being in the gap phase before starting DNA replication along with the decrease in cultivation temperature. Applying this finding, we pretreated the cells in a lower temperature before introduction of a foreign gene and successfully enhanced its expression.

研究分野：バイオ機能応用およびバイオプロセス工学関連

キーワード：遺伝子導入 細胞周期 同調培養 昆虫細胞 培養温度制御

1. 研究開始当初の背景

昆虫や哺乳動物といった高等動物の遺伝子組換え細胞は、近年、抗体医薬やワクチンなどのバイオ医薬品の生産を中心に工業的にも盛んに利用されている。そこでは、CRISPR-Cas9 システムに代表されるゲノム編集技術の飛躍的な進歩により、目的タンパク質の精緻な設計に基づく改変や発現調節が可能となり、これまでにない効能の付与、生産性や品質の向上が図られている。また、緑色植物亜界に属する緑藻や高等植物は、カーボンリサイクルの観点から有用物質生産への応用が期待されており、代謝工学に基づく高生産株の創製が注目されている。さらに医療においても、患者から採取した細胞に対して治療用遺伝子を導入したのち、ふたたび患者の体内にその細胞を戻すといった手法の再生医療が実用化されつつある。以上のように、真核生物の細胞に対して外来遺伝子を導入し、その形質の改変を図る操作—遺伝子導入—は、工業や医療における基盤技術として、ますます重要となりつつある。

これら真核細胞への遺伝子導入では、細胞の保有する核 DNA が核膜で区画された核の中にあるため、外来遺伝子をコードした核酸は細胞内へ導入するばかりではなく、核内まで移行させる必要がある。遺伝子導入法にはエレクトロポレーションなどの物理的方法、リポフェクションなどの化学的方法、そしてウイルスベクターを用いる方法が採られるが、前二者は、非分裂細胞に対する遺伝子導入などで用いられる核移行シグナルを含む助剤を利用しない限り、核膜を通過できず、細胞質中で分解されてしまうのを免れなければならないため、優れた組換え細胞が得られるかどうかは幸運に委ねられる側面がある。一方、ウイルスベクターは高効率な遺伝子導入が可能であるが、ウイルス粒子に核酸をパッケージするとき、またパッケージされた核酸を核 DNA に組み込むときには、ウイルスゲノムに含まれる塩基配列が必要となり、これらウイルス由来の塩基配列も核 DNA に挿入されてしまうため、遺伝子組換え細胞の安全性や安定性に懸念が残る。したがって、真核細胞への遺伝子導入では、ウイルスベクターに匹敵する効率を示しつつも、ウイルス由来の塩基配列を挿入することのない手法が待望されている。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが緑藻の培養で見出した、培養温度を適切な範囲で周期的に変化させると培養液中の細胞の細胞周期が同調するという知見に基づき、真核細胞の細胞周期を同調させることにより、核膜の消失から再構成の間にあわせて外来遺伝子を導入できるようにし、これによって外来遺伝子の核内移行、ならびに核 DNA との接触を促進させて、真核細胞への遺伝子導入の効率化を図ることを検討する。

はじめに、開放型の有糸分裂を行う昆虫細胞に注目し、培養温度をプログラム制御できるインキュベーターを用いて培養を行い、細胞周期が同調する温度制御条件を明らかにする。つぎに、外来遺伝子の遺伝子導入を試み、細胞周期を同調させたときとさせないときで、目的タンパク質の発現の効率化を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、高等動物細胞のモデルとして昆虫細胞 *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (High Five) を用いた。培地には Express Five SFM (Thermo Fisher Scientific) に 2.6 g/L L-glutamine (ナカライテスク) と 10 mg/L gentamycin sulfate (Thermo Fisher Scientific) を加えた無血清培地を使用し、27°C で細胞を維持した。細胞密度は、適宜、自動細胞カウンターにより測定したほか、インキュベーションモニタリングシステム Provi CM20 (Olympus) を使用して連続測定も行った。薬剤を用いた細胞周期の同調では、2'-deoxy-5-fluorouridine (FdUrd) を 2.5×10^{-5} M となるように培地に添加した。細胞周期の分析では、回収した細胞を 70 v/v% エタノールで固定したのち、Guava Cell Cycle Reagent (Cytex Biosciences) を用いて DNA の propidium iodide (PI) 染色を行った。遺伝子導入は、緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 遺伝子を組み込んだプラスミドベクター pIHANeo-ZsGreen1 を用い、3 µg の DNA に対して 9 µg の linear polyethylene imine (Polysciences) を添加したものを 2 mL の培養液 (2×10^5 cells/mL) に添加して行った。

4. 研究成果

(1) 培養温度の周期的変化による細胞周期の同調

はじめに、培養温度が High Five 細胞の増殖に及ぼす影響を調べ、37°C では細胞は死滅せず、増殖が顕著に抑制されることが分かった。そこで、培養温度が 12 h ごとに最適条件の 27°C と 37°C で切り替えながら培養を行い、High Five 細胞の細胞増殖を調べた。図 1 (a) に、こうして得

られた増殖曲線を、27°C あるいは 37°C で一定に保持して培養を行ったときのものとともに示す。図中の実験点は 3 h ごとに測定された細胞密度である。培養温度を 27°C と 37°C の間で周期的に変化させたときの細胞増殖は、27°C で一定に保持したときとほぼ同等であった。このとき、細胞密度の増加は 27°C で一定に保持したときと同様に連続的に増加し、図 1 (b) に示されるような、微細藻類 *Haematococcus pluvialis* の培養で細胞密度が一時に倍加する挙動は見られなかった。このことから、High Five 細胞では培養温度の周期的変化によって細胞周期の同調を図ることは困難であることが分かった。

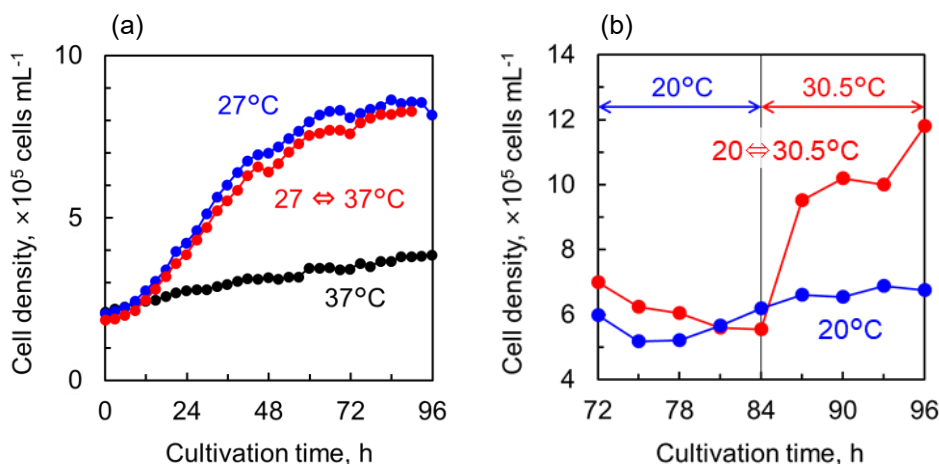


図 1 昆虫細胞と微細藻類の増殖曲線の比較 (a) High Five 細胞の増殖曲線。培養温度：27°C で一定 (青)、37°C で一定 (黒)、27–37°C の間で 12 h ごとに変化 (赤)。(b) *H. pluvialis* の増殖曲線。培養温度：20°C で一定 (青)、20–30.5°C の間で 12 h ごとに変化 (赤)。

(2) 薬剤を用いた細胞周期の同調と外来遺伝子の発現

つぎに、細胞周期の進行を妨げる薬剤を用い、High Five 細胞における細胞周期の同調を確認した。図 2 に、DNA 合成阻害剤 FdUrd を用いたときの、PI の蛍光強度と培養液中でその強度を示す細胞数の分布を示す。PI の蛍光強度は細胞の DNA 含有量に比例するため、蛍光強度 150 付近と 250 付近の各ピークがそれぞれ G1 期と G2/M 期に対応する。FdUrd で 24 h 処理すると、図 2 の 0 h に示されるように、培養液中の細胞は G1 期にあるものが増加し、G2/M 期にあるものが減少した。FdUrd を除去した新鮮培地に置き換えてから 8 h 後には、細胞周期の進行に伴って G2/M 期にある細胞が増加し、12 h 後に最も多くなることが分かった。

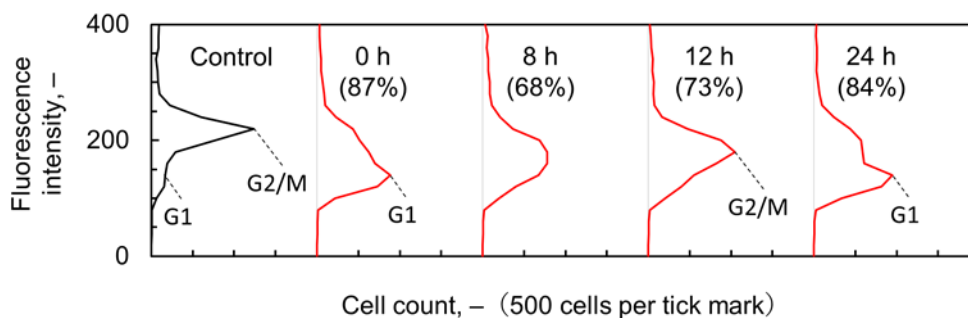


図 2 PI の蛍光強度とその強度を示す培養液中の細胞数の分布。各分布には FdUrd 処理後に新鮮培地に置き換えてからの経過時間とそのときの生細胞率を示す。Control は FdUrd 処理前の分布。

そこで、FdUrd で 24 h 処理し、新鮮培地に置き換えてから 12 h 培養した後、緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 の遺伝子を導入し、その発現効率を調べた (図 3)。図 3 (a) には、緑色蛍光を発する細胞数の全細胞数に占める割合 (蛍光細胞率) を遺伝子導入後の経過時間に対して示す。遺伝子導入より 24 h 後の蛍光細胞率が FdUrd で前処理したときには無処理のときと比べて 4.3 倍増加した。High Five 細胞の倍加時間はおおよそ 24 h であることから、外来遺伝子は細胞周期が一周するのを待たず、速やかに核内へ移行し、発現することが確認された。図 3 (b) には、ZsGreen1 の蛍光強度と培養液中でその強度を示す細胞のパーセンテージを示す。同じ経過時間で比較すると、緑色蛍光タンパク質の蓄積によって強い蛍光を発する細胞が FdUrd で前処理したときに多く、導入した ZsGreen1 遺伝子の発現が導入後早くから行われたことが示唆される。したがって、培養液中の細胞間で細胞周期を同調させたうえで外来遺伝子を導入すると、その発現を速やかに行わせられることが示された。

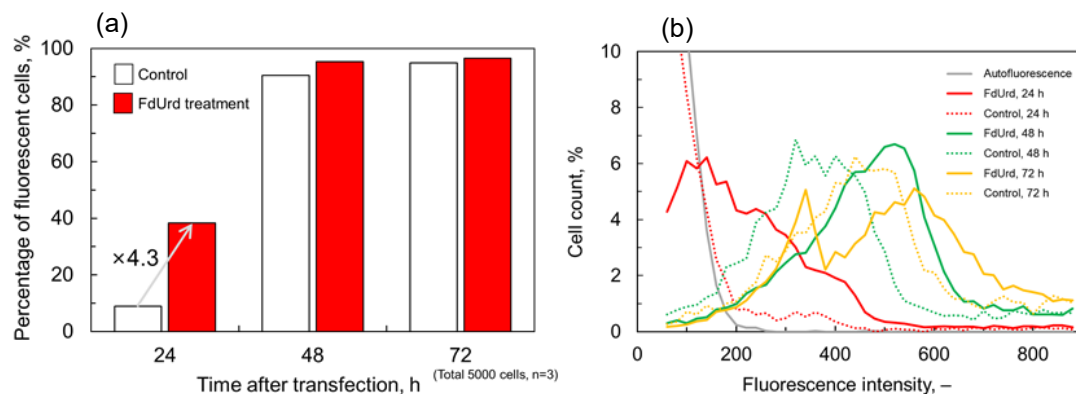


図3 FdUrd による細胞周期の同調が遺伝子導入に及ぼす影響。(a) 蛍光細胞率と遺伝子導入後の経過時間の関係。前処理：FdUrd で処理 (赤棒)、なし (白棒)。(b) ZsGreen1 の蛍光強度とその強度を示す培養液中の細胞数の分布。遺伝子導入後の経過時間：24 h (赤)、48 h (緑)、72 h (黄)。実線は FdUrd で処理した条件、点線は処理しなかった条件。灰色の実線は自家蛍光の分布。

(3) 低温処理による細胞周期の同調と外来遺伝子の発現

低温の培養温度が High Five 細胞の増殖と細胞周期に及ぼす影響を調べた (図4)。図4(a)には、培養温度を 27°C から 15°C までの各値で一定に保持して行った培養における増殖曲線を示す。培養温度の低下にしたがって細胞増殖は顕著に抑制され、17°C では増殖がほぼ停止した。それぞれの培養温度で培養を開始してから 24 h 後の細胞に対して細胞周期を調べた。図4(b)には、PI の蛍光強度と培養液中でその強度を示す細胞数の分布を示す。培養温度を低下させると、蛍光強度 150 付近の G1 期にある細胞が減少することを見出した。このとき図4(a)に示されるように、細胞密度は増加しないことから、細胞周期が M 期前で停止したことが示唆される。

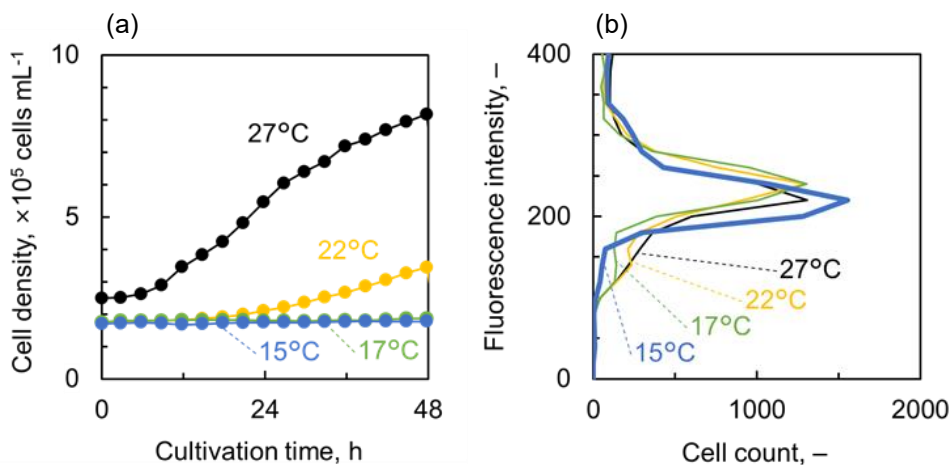


図4 昆虫細胞と微細藻類の増殖曲線の比較 (a) High Five 細胞の増殖曲線。培養温度：27°C で一定 (青)、37°C で一定 (黒)、27-37°C の間で 12 h ごとに変化 (赤)。(b) *H. pluvialis* の増殖曲線。培養温度：20°C で一定 (青)、20-30.5°C の間で 12 h ごとに変化 (赤)。

そこで、細胞を 15°C、24 h 低温で前処理したのち、ZsGreen1 遺伝子を導入し、その発現効率を調べた (図5)。図5(a)には、遺伝子導入後の経過時間に対して蛍光細胞率を示す。低温で前処理したときには、FdUrd で前処理したときと同様に、遺伝子導入より 24 h 後の蛍光細胞率が無処理のときと比べて 4.5 倍増加し、導入した外来遺伝子が速やかに発現することが示された。図5(b)には、ZsGreen1 の蛍光強度と培養液中でその強度を示す細胞のパーセンテージを示す。低温で前処理することにより、より強い蛍光を発する細胞が増加し、導入した ZsGreen1 遺伝子の発現が早期より行われたことが確認された。

以上のように、培養液中の細胞間で細胞周期を同調したうえで遺伝子導入を行うと、導入した外来遺伝子は速やかに核内へ移行し、発現することが確かめられた。細胞周期の同調を DNA 合成阻害剤や有糸分裂阻害剤などの薬剤を用いて行くと、薬剤処理後にその除去が必要で、また薬剤処理に加えて M 期前まで細胞周期を進めるためにも時間を要し、さらに生細胞率の低下の恐れもある、といった困難がある。一方、低温での前処理は薬剤を用いたときと同等に外来遺伝子の導入を促進することができたが、遺伝子導入を行う前日に培養液を低温インキュベーターへ

移すといった簡便な操作のみで実行することができる。よって、こうした低温処理は昆虫細胞など高等動物細胞への遺伝子導入を効率化できる簡便な手法となることが期待される。

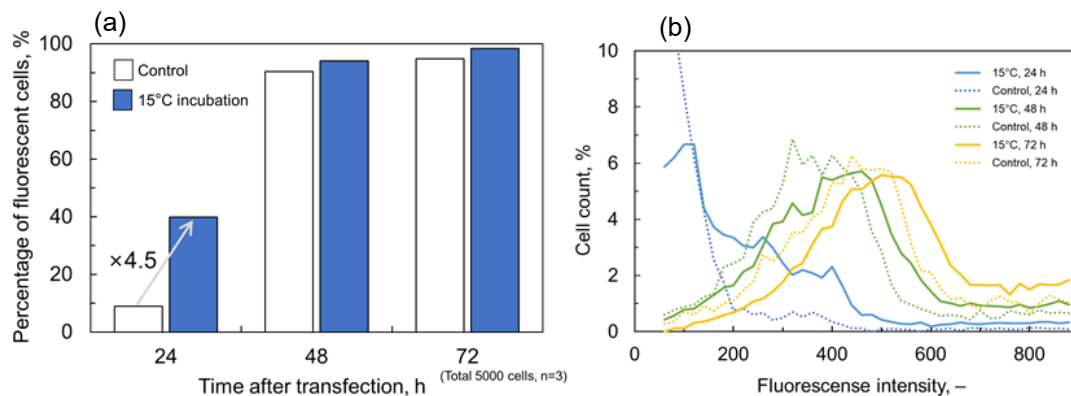


図5 低温処理による細胞周期の同調が遺伝子導入に及ぼす影響。(a) 蛍光細胞率と遺伝子導入後の経過時間の関係。前処理：15°Cで24 h処理(青棒)、なし(白棒)。(b) ZsGreen1の蛍光強度とその強度を示す培養液中の細胞数の分布。遺伝子導入後の経過時間：24 h(青)、48 h(緑)、72 h(黄)。実線は低温処理した条件、点線は処理しなかった条件。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 光, 岩永 凌, 本條雄己, 山地秀樹, 勝田知尚
2. 発表標題 細胞周期の制御に基づく昆虫細胞への遺伝子導入の効率化
3. 学会等名 化学工学会第89年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 勝田知尚, 奥村 魁, 山地秀樹
2. 発表標題 培養温度と光強度を概日周期で制御したヘマトコッカス プルビアリスによるアスタキサンチン生産
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------