

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660271

研究課題名(和文) 昆虫細胞における新規遺伝子導入技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of the efficient dsDNA delivery system into insect cells

研究代表者

LEE JAEMAN (LEE, JAEMAN)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50404083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫細胞における効率的な遺伝子導入法の確立を目的として、多様な昆虫由来培養細胞に線虫SID1遺伝子を導入し解析した結果、カイコPS140-SID1細胞が最も高いdsDNA取込み能を示すことを明らかにした。また、二価の金属イオンの添加については、若干の取込み能の向上が認められたが、DNAとRNAのヘテロ2重鎖やヘテロ3重鎖については、いずれも取込み能を低下させることが明らかになった。

次に、dsRNA依存的なdsDNAの導入を行った所、0.05 mM以上の融合タンパク質を加えた場合に効果が認められた。また、N末端部分を加工したSID1発現細胞においてもDNAの取り込み能が上昇していた。

研究成果の概要(英文)：In order to establish the efficient dsDNA delivery system into insect cells, SID1 gene from *Caenorhabditis elegans* were introduced into various insect derived cell lines. Among the cells tested, silkworm derived PS140-SID1 cell exhibited the highest dsDNA uptake ability. Additional introduction of SID2, 3, 4, and 5 into BmN4-SID1 showed no effect on the dsDNA uptake. Also addition of divalent cations showed little increase of dsDNA uptake but the formation of hetero-duplex or triplex reduced the efficiency.

Then by using the fusion protein between lambda N protein with RNA binding activity and sso7d dsDNA binding protein, the RNA-dependent introduction of dsRNA was performed. As a result, the fusion protein more than 0.05 mM stimulated the dsDNA uptake in BmN4 cells. Also the attachment of sso7d or reverse LAMP2C peptide to the N-terminus of SID1 increased the dsDNA uptake.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：DNA導入法 線虫SID1 dsDNA取込み BmN4-SID1

1. 研究開始当初の背景

遺伝子機能解析や細胞機能改変には、細胞への遺伝子導入が必要である。現在、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロマニピレーション法、リン酸カルシウム法など多様な方法が開発・利用されているが、導入効率や簡便性に問題がある場合が多く、また、試薬や機器購入にかかるコスト等の研究経費も大きな負担となっている。特に、遺伝子機能解析においては遺伝子導入操作に付随する細胞ストレス・毒性が大きな問題となる。昆虫細胞への遺伝子導入に一般的に使用されるリポフェクション法は細胞毒性が低いと言われているが、RNA-Seq 解析などによるゲノムワイドな解析を行うと遺伝子導入操作によって大規模な遺伝子発現の変動が起こっていることがわかる。しかし、現時点でこの方法より細胞毒性が低い方法が存在しないため、この細胞の反応は実験上のやむを得ないノイズとして多くの研究者が目をつむっているのが現状である。また、リポフェクション法では、DNA がポリカチオン性のリポソームと巨大な凝集体をつくり、これが細胞に貪食されるように取込まれるため、大量の DNA が細胞内に侵入し、その量を制御できない。これらの問題を解決する方法として、線虫 *Caenorhabditis elegans* の SID-1 遺伝子を導入した細胞を利用することを思い立った。

2. 研究の目的

SID-1 は線虫の dsRNA 取り込みに関わる膜タンパク質をコードする遺伝子として単離され、この遺伝子を昆虫細胞に導入すると培養培地に dsRNA を少量添加するだけで非常に効率良く RNAi を誘導できる (Soaking RNAi: Mon *et al.*, 2012)。我々は、多くの昆虫細胞を用いて SID-1 導入細胞を樹立してきたが、その過程で SID-1 導入細胞が dsRNA だけでなく dsDNA を取込む能力があることを見出した

(Xu *et al.*, 2013)。本研究では、種々のアプローチにより SID-1 導入細胞における DNA 取込み効率の亢進を図り、これを実用上問題のないレベルまで向上させることを目的とする。リポフェクション法やリン酸カルシウム法などによって細胞内に導入された DNA の凝集体からはゆっくりと DNA が遊離してくると考えられているがその詳細は不明である。この点についても本研究申請の Soaking 法は優れている。Soaking 法では、細胞内に導入された DNA はほぼ裸の状態であり、その多くが発現に寄与すると考えられる。そのため、培地に添加する DNA 量が細胞での遺伝子発現量と平行になる条件が設定できるはずであり、遺伝子の発現量依存的な機能解析にも有効な手段と言える。これまで、細胞への遺伝子導入はいかに効率良く細胞膜を通過させるかということに終始し、その分子機構については研究がなされていない。また、細胞膜通過後、DNA がどのようにして細胞質を通過し、細胞核に至るのか、その過程でどのような分子と相互作用するのかも不明である。これらの分子機構へのアプローチは、従来の DNA 凝集体を経る方法では困難であり、Soaking 法はこれらの機構解明のツールとしても非常に優れている。

加えて、遺伝子導入後に急性期に起こる微細な変化を解析するためには、Soaking 法のような細胞にストレスを与えずに短時間で遺伝子発現が生じる実験系の確立が必須であり、従来法ではこのような実験系は構築できない。細胞の分化や刺激応答などに反応する初期遺伝子の多くはこのようなカテゴリーに属し、本法は他の方法に比較してオンリーワンの優位性がある。

本研究は、SID-1 導入細胞の DNA 取込みの発見に端を発するものであり、当然 Soaking RNAi との併用が可能である。すなわち、この本研究目標が達成できれば、遺伝子発現の足し算と引き算が非常に容易になり、細胞機能

を自由自在に改変できるようになる。現在、我々の研究室にはカイコ BmN4 細胞、Bme21 細胞、ヨトウガ Sf9 細胞に SID-1 遺伝子を導入した細胞を樹立している。これらの細胞はそれぞれウイルス感受性等の異なる特性を有しており、バキュロウイルス発現系を利用した組換えタンパク質生産系の改良にも有用である。例えば、バキュロウイルス発現系で生産した分泌型タンパク質は、糖鎖修飾が起ることが知られているが、ヒト型の修飾とは異なる。そのため、糖鎖修飾のヒト型化には修飾経路の改変が必要であり、我々は昆虫と哺乳類の糖鎖修飾経路の分岐転移ある酵素 FDL を Soaking RNAi によって抑制することで糖鎖構造が改変できることを報告している (Nagata et al., 2013)。FDL 阻害により少しヒト型修飾に近づくものの完全なヒト型化には 20 種以上の哺乳類由来の酵素が必要であり、必要な遺伝子の組み合わせを確定するための膨大な量の遺伝子導入・解析、および、多重遺伝子導入細胞の樹立には、RNAi 誘導と DNA 導入の両方が非常に簡便且つ高効率で行える Soaking 法が非常に有用である。

3. 研究の方法

まず、既に樹立している 3 種の昆虫由来 SID-1 導入細胞を用いて、導入する DNA の加工や修飾、取込み条件の検討により効率の向上をはかった。並行して、研究室保存のその他の昆虫培養細胞にも SID-1 遺伝子を導入し、DNA 取込み能を解析した。

DNA 取込み効率については、前述のようにより多くの細胞に均一に DNA を導入できる方法の開発を目指し、従来のレポーターアッセイ系に加えて、複数のアッセイシステムを用いた。

まず、DNA 取込み効率を測定するための各種アッセイシステムを作製した。従来のルシフェラーゼリポーター系に加えて、複数の蛍

光タンパク質発現系を用いた。また、蛍光色素によりラベルした種々の形態の核酸を合成し、遺伝子発現によらない導入効率の評価を視覚的に解析した。

DNA 取込み効率の向上については、まず、各種アッセイシステムを用いて、導入条件の検討を行った。これまで、2 価のイオンがトランスフェクションにおける DNA 取込み効率を向上させることが報告されているが (Maeda et al., 2005)、これらに加えて市販のトランスフェクションエンハンサーの効果を解析した。また、予備実験においてバキュロウイルスゲノムなどの巨大な DNA 分子は取込み効率が低かった。そこで導入する DNA をコンパクトに折り畳むことにより取込み効率が向上する可能性がある。そこで、少量のポリカチオン (短鎖のポリエチレンイミンやポリリジン) やプロタミンのようなヒストン様 DNA 結合タンパク質についてもその効果を解析した。

SID-1 導入細胞は非常に効率良く dsRNA を取込む (取込み効率 95%以上)。そこで、DNA と RNA のヘテロ 2 重鎖や 2 重鎖 DNA に RNA 鎖を滑り込ませたヘテロ 3 重鎖を用いて取込み効率を測定した。

SID-1 導入細胞は Soaking RNAi が利用可能な細胞であり、これまで、糖鎖修飾経路の分岐転移ある酵素 FDL を機能阻害した。この RNAi により標的タンパク質の糖鎖構造改変だけではなく、2 次 RNAi 誘導が阻害される可能性を見出している。SID-1 は、糖鎖付加部位を持つ膜タンパク質であることから、自身の糖鎖修飾が核酸の取込みに重要である可能性がある。そこで、FDL 機能阻害細胞における dsDNA 導入効率について検討を行った。まず、糖鎖の重要性については、N 型糖鎖を切断する酵素、グリコシダーゼ F や EndoH により SID-1 導入細胞を処理し、その効果を解析した。

また、dsDNA と dsRNA をタンパク質を介し

て結合し、取込み効率を測定した。配列特異的な RNA 結合タンパク質としてラムダ N タンパク質、dsDNA 結合タンパク質として sso7d タンパク質それぞれの核酸結合ドメインを融合したタンパク質を作製した。

また、膜タンパク質である SID1 の N 末端部分を加工して、DNA の導入を試みた。具体的には、DNA 結合能を持つ短いペプチド、sso7d 及びヒト LAMP2C 領域を付加した SID1 を作製し、それらを恒常発現する細胞を樹立し、解析を行った。また、LAMP2C はリソソーム膜に存在するタンパク質でその C 末端に DNA 結合能を持つ短いペプチドがある。そのため、逆向き LAMP2C-SID1 発現細胞も構築した

SID-1 のパートナータンパク質については、新たに同定された dsRNA の取込みに関わる線虫由来の膜タンパク質 SID-3, 4, 5 についてもクローニング後、昆虫の SID-1 導入細胞に追加導入し、DNA 取込み効率を解析した。

4. 研究成果

まず、多様な昆虫由来培養細胞に線虫 SID1 遺伝子を導入し解析した。その結果、カイコ PS140-SID1 細胞が BmN4 よりも良好な dsDNA 取込み能を示したが、カイコ Bm5-SID1 細胞、ヨトウガ Sf9-SID1 細胞の dsDNA 取込み能は、BmN4-SID1 より低く、細胞種により大きな相違があることが明らかになった。そこで、SID1 遺伝子と協調して働いている SID2, 3, 4, 5 遺伝子を BmN4-SID1 細胞に追加導入したが、dsDNA 取込み能は向上しなかった。また、核酸の取り込みに対する二価の金属イオンの影響を解析したところ、カドミウムを除く重金属は、dsRNA の取込みには影響を与えな

ったが、コバルト、マグネシウム、亜鉛は、dsDNA 取込み能を向上させることが明らかとなった。いくつかの二価の金属イオンに

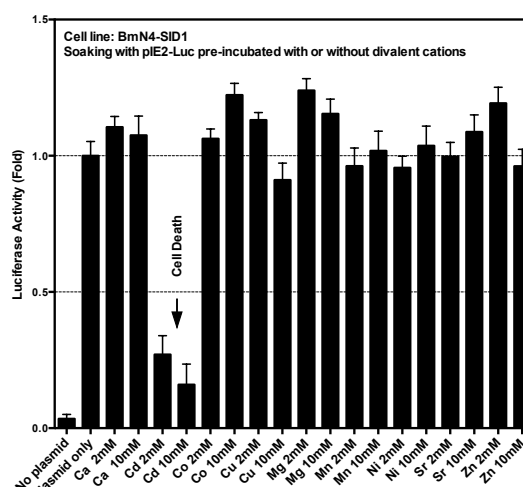


図1.ポリカチオンがdsDNA取込み能に及ぼす影響

ついては、遺伝子導入効率の向上に効果が認められたこと、また培地に添加するだけで容易であることから、他の方法との併用も考えられる。

DNA と RNA のヘテロ 2 重鎖やヘテロ 3 重鎖については、いずれも取込み能を低下させることが明らかになったが、その過程で PCR 産物がプラスミド DNA よりも高い取込みを示すことを見出した。

また、BmN4-SID1 において、内在の糖鎖修飾酵素 FDL を阻害した場合、dsDNA 取込み能が低下することを見出した。そこで、細胞に糖鎖を切断する酵素で処理することにより、dsDNA 取込み能を向上できる可能性がある。そのために必要な PNGaseF と EndoH についてバキュロウイルスを用いたカイコ発現系を構築し、精製した酵素を用いて、細胞表面を処理したが、効果は認められなかった。

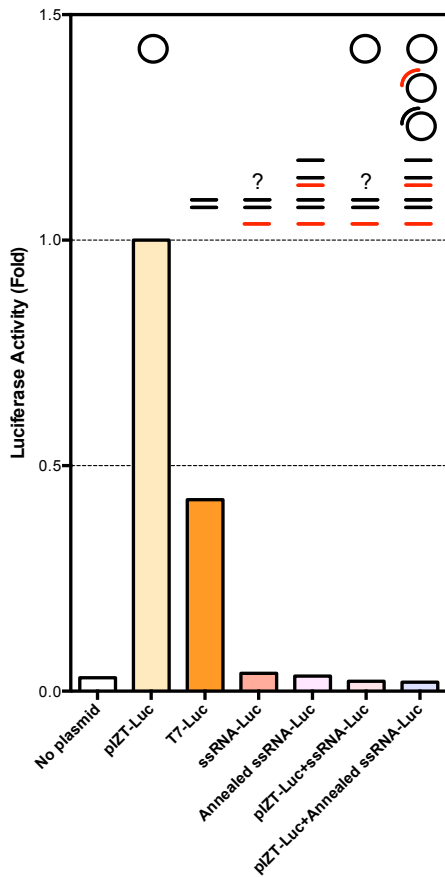


図2. ヘテロ2重鎖形成による核酸取り込み能の変化

カイコ BmN4-SID1 細胞をベースに効率的な DNA 導入法の確立を目指して研究を進めた。主として2つのアプローチを用いたが、まず、dsRNA と dsDNA を結合できる親和性の融合タンパク質を作製し、dsRNA と dsDNA をこのタンパク質を介して結合させることにより、dsDNA 取り込み能の向上を試みた。RNA を結合するタンパク質としては、ラムダ N タンパク質、dsDNA 結合タンパク質としては古細菌由来の sso7d を使い、BoxB 配列を有する dsRNA とルシフェラーゼ発現ベクターを作製した融合タンパク質を用いて結合し、BmN4-SID1 細胞への導入を行った。0.05 mM 以上の融合タンパク質を加えた場合に効果が認められたが、低濃度では効果が低かった。また、sso7d 単独やプロタミンなど DNA を部分的に凝集させる効果を持つタンパク質についても遺伝子導入効率に与える影響を検討したが、効果は認められなかった。

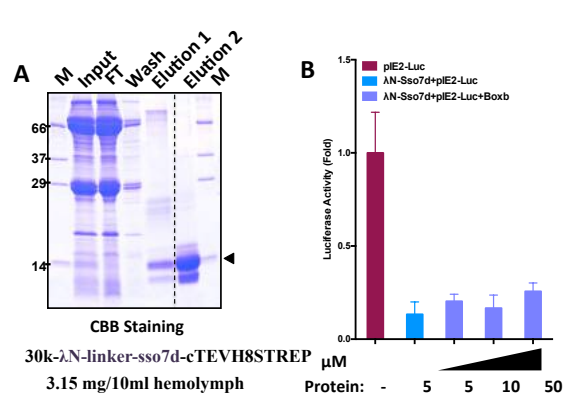


図3. ラムダN-sso7d融合タンパク質による核酸取り込み能の効果 pE2-Lucは通常のトランスフェクション

ついで、膜タンパク質である SID1 の N 末端部分に DNA 結合能を持つ短いペプチド、sso7d 及びヒト LAMP2C 領域を付加することによる影響を解析した。これらの融合配列を有する組換えタンパク質を発現する形質転換細胞を樹立し、ルシフェラーゼ発現プラスミドの導入を試みたところ、sso7d-SID1 及び逆向き LAMP2C-SID1 発現細胞において DNA の取り込み能が上昇していた。また、これらのペプチドの付加による dsDNA 取り込み能の顕著な低下は認められなかった。

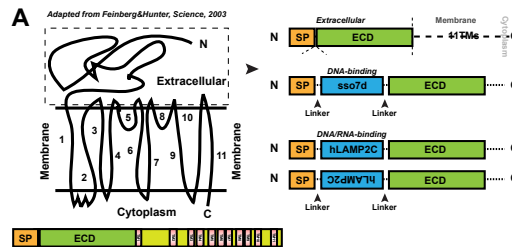


図4. SID1のN末端部分へのDNA結合タンパク質付加

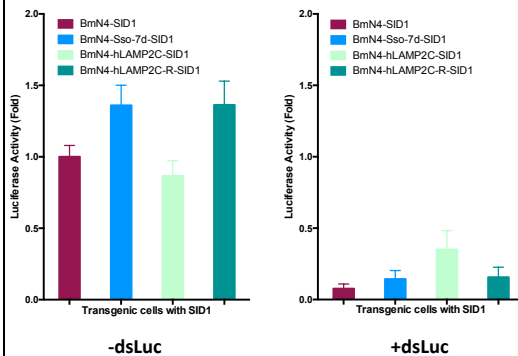


図5. SID1のN末端部分へのDNA結合タンパク質付加の効果

また、これらの細胞を用いて、長鎖 DNA の取り込みについても検討した。バキュロウイルスゲノムを有する 120 kbp の Bacmid

の導入を試みたところ、通常の方法では導入効率はかなり低かったが、細胞を培地ごとゆっくり振盪することにより、導入効率が上昇し、ウイルス粒子の産生が起こることを見出した。

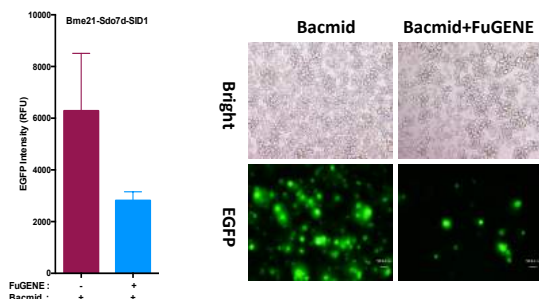


図6. 振盪によるバキュロウイルスゲノムの導入効率の向上
Bacmid+FuGENEは試薬を用いたリポフェクション法

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 1 件)

Masuda, A., Xu, J., Mitsudome, T., Morokuma, D., Mon, H., Banno, Y., Kusakabe, T., and Lee, JM. (2015) Improvement of Endo- β -N-acetylglucosaminidase H production using silkworm-baculovirus protein expression system, J. Asia-Pacific Entomol. 18, 175-180.

[学会発表] (計 1 件)

Improvement of *Caenorhabditis elegans* SID-1-Dependent DNA Delivery System in Cultured Silkworm Cells. Mami Yamashita, Jian Xu, Jae Man Lee, Hiroaki Mon, Takahiro Kusakabe: International Symposium on Basic and Applied Research on Sericulture and Insect Sciences (Daegu Korea) 2015.04.20-21

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 在萬 (LEE, JAEMAN) 九州大学・大学院農学研究院・助教 研究者番号: 50404083