

バキュロウイルスと昆虫培養細胞の新規利用技術開発

小林 淳

バキュロウイルス遺伝子発現系は、有用タンパク質生産にとどまらず、遺伝子治療への応用も検討されるなど、その可能性はますます広がりつつある。筆者は、昆虫機能の有効利用を目的として、既存のバキュロウイルス発現系とは異なる、大型の野蚕休眠蛹を利用した長期保存可能なタンパク質生産系を構築し、さらに、広食性の野蚕に適合した安定同位体含有人工飼料を開発し、昆虫生体の安定同位体標識、さらには標識組換えタンパク質生産に成功した。また、ウイルスエンベロープ上に発現させた組換え膜タンパク質をリボソームに移行させ、診断などに利用する技術を開発した。一方、昆虫培養細胞のゲノム操作にも取り組み、piRNA経路による導入遺伝子特異的発現抑制機構を解明し、現在は、ゲノム編集技術を応用した翻訳後修飾特性の改変を推進している。

1. はじめに

1983年にテキサス A&M 大学の M.D. Summers らの研究グループ¹⁾が、バキュロウイルス (*Autographa californica* 核多角体病ウイルス: AcMNPV) にヒト β -インターフェロン遺伝子を組み込み、宿主昆虫培養細胞 (*Spodoptera frugiperda* 由来 IPLB-Sf21-AE: Sf21) に感染させ、活性を保持したヒト β -インターフェロンの高レベル生産に成功したことを世界に先駆けて報じてから 30 年以上が経過した。この間、バキュロウイルス発現ベクターシステム (Baculovirus expression vector system: BEVS) はキットとして販売され、さまざまな改良が加えられるとともに、受託生産サービスを行う業者も増え、現在では、多くの実績を有する定番的遺伝子発現ツールとして、昆虫とは無縁な基礎および応用生物学の幅広い分野で頻繁に利用されている。また、BEVS で生産された酵素、サイトカイン、抗原タンパク質などの中には、試薬、獣医薬、診断薬、ワクチンとして製品化され、研究や臨床の現場で役立てられてい

るものもあり、その数は今後も増加すると期待される。さらに、宿主昆虫以外の動植物で増殖できないというバキュロウイルスの安全性に基づき、遺伝子改変したバキュロウイルスを遺伝子治療やドラッグデリバリーに利用する技術開発も進展している。このように、かつては養蚕業に被害を及ぼす膿病ウイルスあるいは農作物や森林の害虫の防除に役立つ天敵ウイルスなど昆虫病理学の研究対象にすぎなかったバキュロウイルスが、今ではバイオテクノロジーの最前線で新たな技術開発に利用されている^{2,3)}。

筆者は、1988 年に農林水産省蚕糸試験場に採用され、同年、蚕糸・昆虫農業技術研究所 (2001 年に独立行政法人農業生物資源研究所に統合) への改組に伴い新設された細胞工学位研究室で BEVS の研究開発を担当することになり、それ以来、三重大学工学部、山口大学農学部と研究の場を移しながら、既存の BEVS とは異なるシステムの構築や培養細胞の利用技術開発に取り組んできた。本稿では、その概要を紹介させていただく。

2. 蛹休眠と安定同位体標識

AcMNPV とヤガ科昆虫培養細胞 (Sf21 あるいはそのクローン Sf9, イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* 由来 High 5 など) を用いる BEVS は世界的に最も普及しており、それとはほぼ同時期に開発されたカイコ *Bombyx mori* 核多角体病ウイルス (BmNPV) とカイコ培養細胞 (BM-N あるいはそのクローン BmN4 など) あるいはカイコ生体 (幼虫と蛹) を用いる BEVS も、カイコ生体における生産効率

山口大学農学部生物資源環境科学科分子昆虫学研究室
(〒753-8515 山口県山口市吉田 1677-1)

Development of new technologies for utilizing baculoviruses and insect cell lines

Jun Kobayashi (Laboratory of Molecular Entomology, Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1, Yoshida, Yamaguchi, Yamaguchi 753-8515, Japan)

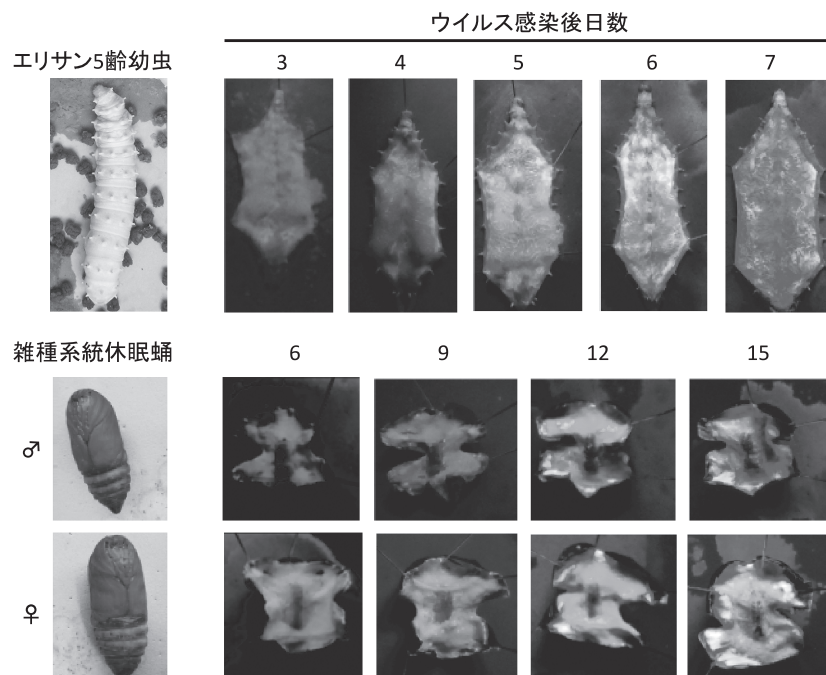


図1 ヤママユガ科野蚕を宿主とするバキュロウイルス遺伝子発現系
エリサン（5 齢幼虫）およびエリサンとシンジュサンの交雑により得られた雑種系
統（休眠蛹♂と♀）に緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する組換えバキュロウイ
ルス（AnpeNPV）を感染させ、幼虫は感染3日目から7日目まで毎日、蛹は6日
目から15日目まで3日おきに解剖し、紫外線照射下で写真撮影を行い、GFPの蛍
光を観察した。

やコストパフォーマンスが培養細胞を上回るなどの利点により日本を中心に利用されている。一般に、バキュロウイルスの宿主範囲は狭いため、既存のBEVSで利用できない宿主範囲外の昆虫が優れたタンパク質生産特性を有しているか評価するためには、対象昆虫を宿主とするバキュロウイルスのベクター化が必要となる。

カイコ（家蚕）とともにシルク生産に利用されているヤママユガ科（Saturniidae）野蚕は、カイコよりも大型で、中国で飼育されるサクサン *Antheraea pernyi* など蛹休眠能力を有するものが多い。卵（胚子）休眠で越冬するカイコには蛹休眠能力がなく、いったん蛹になると体内で幼虫組織の崩壊～成虫組織の形成というダイナミックな変態プロセスがノンストップで進行するため、タンパク質生産適期が短く、蛹に脱皮してから数日以内に組換えウイルスを接種しないと生産量が大きく低下する。一方、野蚕の蛹休眠では変態プロセスが停止し、冷蔵庫等で適切に保護すれば、休眠状態のまま半年以上生存し続けるので、その間、いつでもタンパク質生産に利用できると期待された。実際、サクサン NPV（AnpeNPV）を用いて新たに BEVS を構築したところ、サクサン休眠蛹において、カイコ幼虫とほぼ同等の高い生産効率（体重 1 g あたりの β -ガラクトシダーゼ活性）が示された⁴⁾。さらに、別のヤママユガ科野蚕シンジュサン *Samia cynthia pryeri* 休眠蛹での生産効率は、サクサン休眠蛹のおよそ 5 倍に達した⁵⁾。また、ウイルス感染後 1 週間以内にピークに達する幼虫あるいは非休眠蛹でのタンパク質生産に対し、休眠蛹ではピーク到達に

2 週間以上かかることも明らかとなった（図 1）。これらの結果により、長期保存可能なタンパク質生産工場（天然のバイオリクター）としての野蚕休眠蛹の特性が明らかとなった。最も高い生産効率を示した野生種シンジュサンは、魅力的な宿主であるが、発育がばらつきやすく、人工飼料に対する適合性が低いなど、室内での大量飼育に適していない。一方、長い間シルク生産に利用されてきた近縁種のエリサン *S. cynthia ricini* は、蛹休眠能力はないが、飼育が容易で、人工飼料でも良好な発育を示す。両種は交雑可能であり、妊性のある子孫が得られるため、蛹休眠能力と人工飼料適合性を兼ね備えた雑種系統の選抜育種を試みており、高い生産効率だけでなく、以下に述べる安定同位体標識技術の実用性向上への貢献も期待される。なお、AnpeNPV の BEVS はすでに株式会社バキュロテクノロジー（<http://www.baculotech.com>）に技術移転され、Wild-Bac システムとしてタンパク質の受託生産に活用されている。

昆虫生体における高いタンパク質生産効率の価値をさらに高めるための技術開発として、安定同位体標識タンパク質の生産にも取り組んできた。すでに、¹³C、¹⁵N、¹⁸O などの安定同位体で標識された炭素源や窒素源または水を含む培地で大腸菌や酵母を培養し、標識タンパク質を合成する技術が確立されており、タンパク質の NMR による立体構造決定などに利用されている⁶⁾が、BEVS で安定同位体標識タンパク質を合成できれば、微生物では発現困難な高等真核生物由来の遺伝子産物の溶液中での立体構造決定が可

能になる。昆虫培養細胞に関しては、AcMNPVのBEVSにおいて、高価な安定同位体標識アミノ酸を添加した培地が開発され、効率よく生産された安定同位体標識タンパク質をNMRで構造解析した結果が報告されている^{7,8)}が、培地が非常に高価なため、その後ほとんど利用されていない。これに対して、安定同位体含有培地で増殖させた微生物（藻類や酵母）の粗抽出物を主成分とする人工飼料を開発し、カイコや野蚕を飼育してバキュロウイルスを感染させれば、標識タンパク質を培養細胞よりも効率よく、したがって安価に生産できると期待された。そこで、独立行政法人農業生物資源研究所および太陽日酸株式会社との共同研究を開始した。

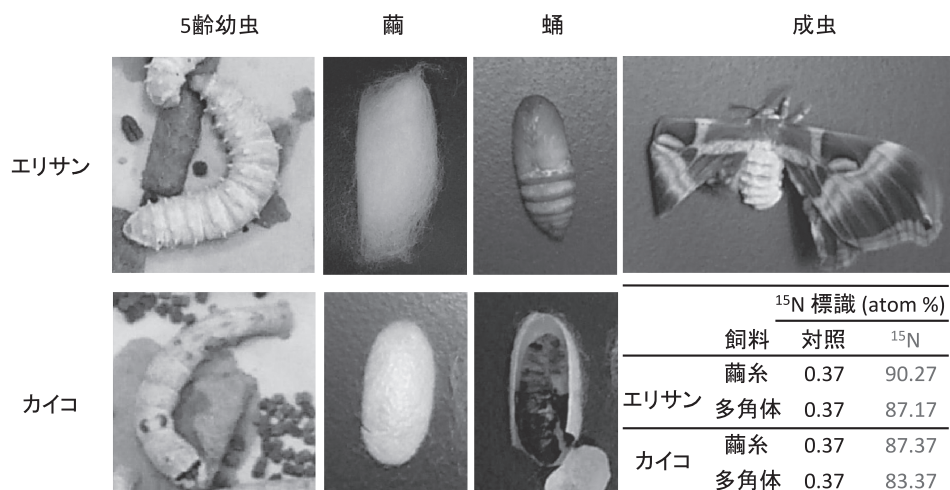
エリサンは、通常、ヒマやキャッサバなどの葉を食料とするが、それ以外の植物の葉や飼育容器に敷いた紙にまで無差別に食らいつき、先に述べたように人工飼料でも良好に生育する。一方、桑の葉を選好する狭食性のカイコでは、味覚異常の突然変異を利用した広食性品種が育種され、桑の粉末をまったく含まない人工飼料での飼育が可能になっている。しかし、これら人工飼料と相性がよい昆虫たちでも、開発当初の安定同位体含有人工飼料との相性はきわめて悪く、かじりついてはみるもののまったく発育しなかった。その後、粗タンパク質抽出法、人工飼料の組成などの改良に約3年間取り組んだ結果、摂食したエリサンと広食性カイコの幼虫がともに繭を作り、エリサンが成虫にまで発育する人工飼料を開発できた（図2a）。これらの幼虫が作り出した繭（すなわち絹糸タンパク質）およびAnpeNPVあるいはBmNPVの野生株に感染した幼虫体内で生産された多角体（すなわちウイルスタンパク質）の同位体（¹⁵N）標識率を調べたところ、いずれも80 atom%以上に達し、高度に標識されたタンパク質の生産が実現した^{9,10)}。試みに、¹³C、¹⁵N安定同位体含有飼料（市価約100万円相当！）で飼育したエリサン5齢幼虫15個体に組換えAnpeNPVを接種して、血液中に分泌生産された糖タンパク質（カイコ前胸腺刺激ホルモン、prothoracicotropic hormone: PTTH）を、C末端に付加したHis-tagに対するアフィニティー精製とゲル濾過精製で回収した。この2段階の精製で得られた高純度PTTHは約0.25 mg（ラフな見積りで精製前の1/10未満）で、¹³Cと¹⁵NのNMR分析ではそれぞれ良好なスペクトルが得られた（図2b）が、多次元NMR測定による構造決定用サンプルとしては量的に不十分であった。したがって、構造決定の実現には、さらなる生産効率および精製効率の改善が必要である。

3. バキュロウイルスディスプレイと組換えプロテオリポソームの作製

バキュロウイルスの感染サイクルにおいて、ODV（occlusion-derived virus）とBV（budded virus）という形態と機能の異なる2種類のウイルス粒子が生産される（図3）。ODVは、感染細胞核内で多角体に包埋され、宿主昆虫間

の水平伝播に寄与し、BVは、感染細胞から出芽し、昆虫体内あるいは培養細胞間での感染拡大に寄与する。BVが細胞から出芽する際、GP64などウイルス膜タンパク質で修飾された宿主の細胞膜をエンベロープとして獲得する。この性質を利用して、組換えウイルス感染細胞でGP64と融合させた膜タンパク質を生産させ、それをBVエンベロープ上に提示させるバキュロウイルスディスプレイ法が開発された¹¹⁾。その後、外来膜タンパク質でも、GP64との融合なしでBVエンベロープへの移行が起こることが明らかにされた¹²⁾。いずれにしても、膜結合状態のタンパク質をそのまま提示できることは、大腸菌のファージディスプレイには真似のできない利点である。しかも、バキュロウイルスディスプレイでは、細胞内で正しくプロセシングされて膜に結合した産物が、BVエンベロープ上に選択的に濃縮される。そのため、BVエンベロープ上の膜タンパク質は抗原性やリガンド結合性が高く、抗体作製や創薬への応用に適しており、ワクチン、遺伝子治療、ドラッグデリバリーなど臨床治療への応用を目指した研究開発も盛んに行われている¹³⁾。このように、バキュロウイルスディスプレイは優れた膜タンパク質の利用技術であるが、BVエンベロープ上に濃縮された膜タンパク質を人工脂質膜小胞（リポソーム）に移行させることができれば、膜の脂質組成を任意に変化させて非特異反応を低下させるなど、さらに高度な技術開発が可能になると期待された。都合のよいことに、BVエンベロープには、膜融合タンパク質GP64が豊富に存在している。本来、GP64は宿主昆虫細胞にエンドサイトーシスで取り込まれた後、エンドソーム内の酸性条件（pH 5～5.5）によりコンホメーション変化を起こし、BVエンベロープとエンドソーム膜を融合させ、内部のスクレオカプシドを細胞内に侵入させる役割を担っている（図3）。したがって、BVとリポソームを混ぜて酸性条件にすれば、BVエンベロープとリポソーム膜の融合が起こり、融合の前後で膜タンパク質の方向性は維持されるはずである。この組換えプロテオリポソーム作製技術の開発は、リポソームの専門家であり、その当時私が助手として在籍していた三重大学工学部分子生物学研究室の教授であった吉村哲郎博士が中心となって推進し、ヒト甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）およびニコチン性アセチルコリン受容体αサブユニット（nAChRα）の組換えプロテオリポソームの作製、ならびに前者を用いたTSHRを標的とする2種類の自己免疫疾患（バセドウ病と橋本病）の検出と識別が可能な高感度診断システムの構築に成功した^{14～16)}。また、同研究室講師の湊元幹太博士は、直径が1 μmに満たない通常のリポソームではなく、直径1 μm以上の巨大リポソーム（giant unilamellar vesicle: GUV）を用い、細胞とほぼ同スケールの組換えプロテオリポソームの作製に取り組んでおり¹⁷⁾、複雑な細胞膜機能の再構築を目指している。なお、この組換えプロテオリポソーム作製技術は、現在、吉村博士が設立された大学発ベンチャー株式会社リポソーム工学研究所（<http://www.lsl.co.jp>）に

(a)



(b)

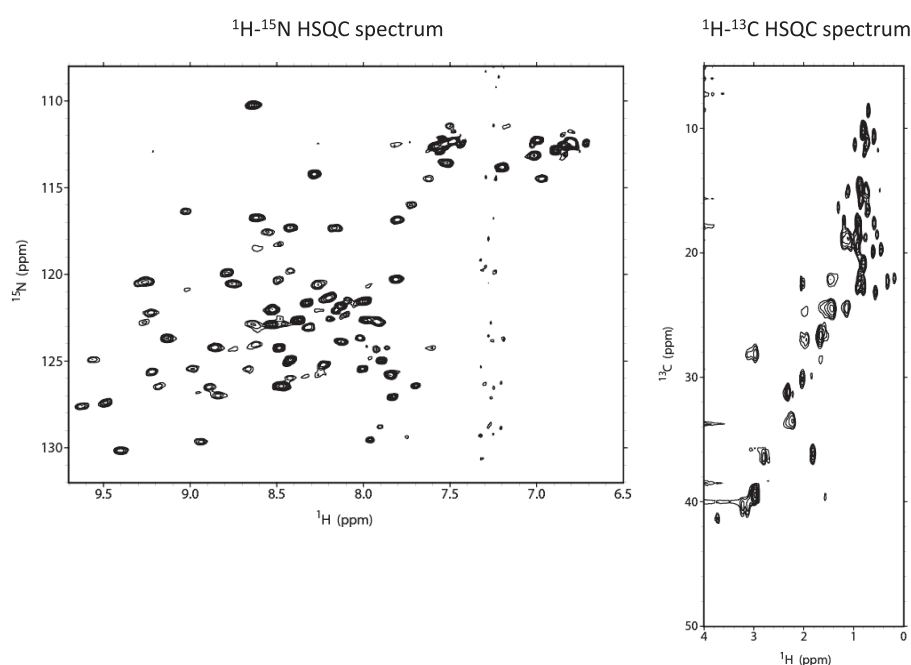


図2 昆虫用安定同位体含有人工飼料の開発と組換えタンパク質生産

(a) ¹⁵N 含有人工飼料で飼育したエリサンとカイコの5 齢幼虫, 繭, 蛹および成虫. なお, カイコは繭の中でうまく蛹に変態できなかった. 図中の表に, 通常的人工飼料 (対照) と安定同位体含有飼料 (¹⁵N) で飼育した幼虫が作った繭糸とバキュロウイルス野生株 (エリサンには AnpeNPV, カイコには BmNPV) 感染により幼虫体内で生産された多角体の ¹⁵N 標識率 (atom %) を示す. (b) ¹³C および ¹⁵N 含有人工飼料で飼育したエリサン 5 齢幼虫に組換え AnpeNPV を感染させ, 体液中に分泌生産された糖タンパク質 (前胸腺刺激ホルモン: PTTH) の精製サンプルを測定して得られた NMR スペクトル (名古屋市立大学矢木宏和博士提供).

おける受託製造事業の一つになっている.

バキュロウイルスのもう一つのウイルス粒子 ODV は, 感染細胞の核内でエンベロープを獲得する. この ODV エンベロープはウイルス膜タンパク質で修飾された核膜の内膜由来と考えられおり, ODV の多角体への包埋に必須であり, アルカリ性 (pH 10~12) の昆虫消化管 (中腸) 内で, 上皮細胞微絨毛の刷子縁膜と融合し, スクレオカプシドが細胞内に侵入するといわれているが, そのメカニズムはまだ解明されていない (図 3). そこで, ODV, 刷子縁膜小胞 (BBMV) およびリボソームの三者総あたりによる

融合検定を行ったところ, アルカリ条件での融合因子が ODV ではなく BBMV に存在することが示唆された¹⁸⁾. この融合因子 (おそらくタンパク質) を同定できれば, ODV とリボソームのアルカリ融合による組換えプロテオリボソームの作製が可能になると期待される. さらに, ODV 由来の組換えリボソームを多角体に包埋する技術を開発できれば, 昆虫消化管に限らず, さまざまなアルカリ環境で利用可能なバイオマテリアルの創出に役立つであろう.

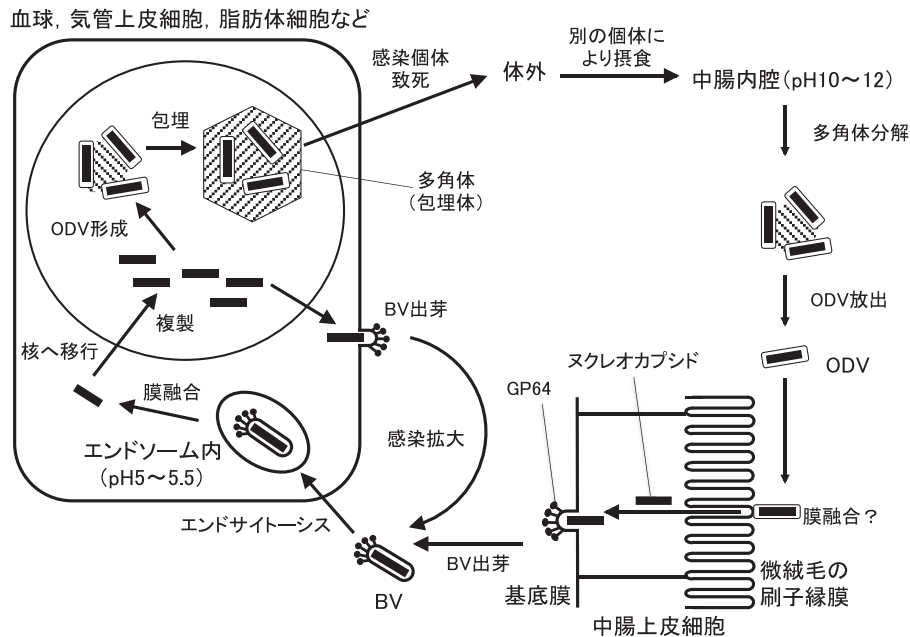


図3 バキュロウイルス〔チョウ目昆虫を宿主とする核多角体病ウイルス (NPV) グループ I〕の感染・増殖サイクルにおける2種類のウイルス粒子の役割

宿主昆虫が食物とともに多角体を摂食すると、アルカリ性の中腸内で多角体が分解され、内部に包埋されていた ODV が放出される。ODV が中腸微絨毛に到達すると ODV エンベロープと刷子縁膜が融合し、ヌクレオカプシドが中腸細胞内に侵入するといわれているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。その後、中腸細胞核内でウイルス DNA の複製と遺伝子発現が起こり、新たに形成されたヌクレオカプシドが GP64 で修飾された基底膜側の細胞膜をエンベロープとしてかぶり、血体腔中に BV として出芽する。なお、中腸細胞では ODV の形成はほとんど起こらない。一方、BV は、血球、気管上皮細胞、脂肪体細胞などにエンドサイトーシスで取り込まれ、エンドソーム内の酸性条件により GP64 が活性化されると、BV エンベロープとエンドソーム膜の融合が起こる。融合により細胞質に放出されたヌクレオカプシドが核に移行すると、中腸細胞同様、ウイルス DNA の複製と遺伝子の発現が起こり、BV が出芽して、感染が全身に広がる。さらに、中腸細胞とは異なり、感染後期に細胞核内で核膜内膜由来といわれるエンベロープによりヌクレオカプシドが包まれて ODV が形成され、多角体に包埋される。多角体は感染個体の致死前後に、体外に放出され、別の個体への感染源となる。

4. *piggyBac* トランスポゾンによる昆虫培養細胞の形質転換と piRNA による発現抑制

BEVS では、ウイルス感染の進行により正常な細胞機能が失われつつある後後期 (very late phase) に組換えタンパク質の過剰生産が行われるため、タンパク質のフォールディング、翻訳後修飾、局在性などが厳密に制御されず、不均一化しやすい。このようなウイルス感染に伴う弊害は、昆虫培養細胞のゲノムに直接外来遺伝子を導入し、ウイルスを使わずに組換えタンパク質を持続生産すれば回避可能である。実際、ショウジョウバエの S2 細胞や BEVS の宿主として用いられるチョウ目昆虫細胞において、このような形質転換細胞生産系が構築されており、細胞あたりの生産効率は BEVS には及ばないものの、質的に優れたタンパク質を得たい場合には有望な代替法となっている^{19, 20)}。また、*piggyBac* トランスポゾンの発見とベクター化により、形質転換昆虫あるいは昆虫培養細胞の作製が容易になり、タンパク質生産系だけでなく昆虫のさまざまな遺伝子機能の解析にも盛んに活用されている²¹⁾。

piggyBac は短い TTAA 配列を標的として転移するため、ゲノム DNA への挿入はほぼランダムに起こり、コピー数の制御も効かない。導入遺伝子の挿入部位とコピー数は遺伝子発現効率に大きな影響を及ぼす要因であり、それゆえに、形質転換後の細胞集団では、細胞ごとに遺伝子発現効率が大きく異なる。実際、カイコ培養細胞 BmN4 に *piggyBac* で緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入し、クローニングを行ったところ、さまざまな蛍光強度を示す細胞を分離できたが、まったく蛍光を発さない細胞も複数得られた²²⁾。これらの無蛍光細胞のゲノムには複数の GFP 遺伝子が挿入されており、少なくともいくつかは転写されていることが、定量 PCR と逆転写 PCR により確認された。ただ奇妙なことに、逆転写 PCR 産物の長さは、GFP 遺伝子を発現するために使用したアクチン A3 プロモーター直後のイントロンがスプライシングされていないことを示唆した。この現象のメカニズムは、BmN4 細胞における PIWI-interacting RNA (piRNA) (23~30 塩基長の小分子 RNA で、生殖細胞で特異的に発現する Argonaute タンパク質 (PIWI サブファミリー) と複合体を形成し、相補的な配列を有する転移因子の転写産物 (センス鎖) およびそのアンチセン

ス鎖を切断することにより、生殖細胞における転移因子を抑制)の生合成経路を研究していた東京大学の研究グループとの共同研究によって明らかとなった。スプライシングのない転写産物の正体はアンチセンス RNA であり、導入遺伝子がたまたま染色体上の piRNA 産生部位 (piRNA クラスター) の近傍に挿入されたことにより合成されたものであった。このアンチセンス RNA 合成により、導入遺伝子の転写産物を配列特異的に切断する piRNA 経路が活性化され、それ以外の部位に挿入された GFP 遺伝子もろとも一網打尽に発現抑制されていたのである²³⁾。この piRNA 合成部位は *torimochi* (鳥もち) と命名された。トランスポゾンにとってはまさに墓場、細胞にとってはトランスポゾンに対抗するための重要な防御センターといえよう (図 4)。

生体における piRNA 経路が機能するのは生殖細胞であるが、卵巣由来の BmN4 細胞では、その機能がそのまま保持されているらしい。AcMNPV の BEVS で使用される Sf9 細胞や High5 細胞も卵巣由来なので、piRNA 経路による導入遺伝子の発現抑制が起こるかもしれない。したがって、これらの卵巣由来の昆虫細胞で形質転換を行う場合には、必ず発現効率の高い細胞をクローニングしてから使用するべきであろう。なお、BmN4 細胞の piRNA 経路を利用すれば、外来遺伝子のみならずカイコの内在遺伝子の発現も、通常の RNAi よりも強力にノックダウンできるかもしれない²⁴⁾。

5. ゲノム編集技術による昆虫培養細胞の代謝工学的改変

BEVS の長所の一つは真核生物特有の翻訳後修飾を施されたタンパク質を生産できることであるが、昆虫の *N* 型糖鎖修飾によりタンパク質に付加される糖鎖の構造は、トリマンノシル構造を主体とした短いオリゴマンノース (またはパウチマンノース) 型であり、末端シアル酸を有する哺乳類の複合型とは異なっている。また、 α 1,3-フコースの枝分かれが生じる点も昆虫の *N* 型糖鎖構造の特徴である。これらの違いにより、BEVS で医薬・獣医薬用の糖タンパク質を生産しても、哺乳類の生体内で異物として認識され、期待された効果を発揮する前に排除される可能性や、アレルゲンとして作用する危険性が指摘されている^{25,26)}。ところが、少数ながら昆虫でも複合型糖鎖が付加される例が報告されており、先に紹介した AnpeNPV の BEVS で使用されるサクサン胚子由来 NISES-AnPe-428 細胞でも、オリゴマンノース型と複合型の中間的な末端 *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を有する糖鎖の付加が確認されている²⁷⁾。ただし、これらの例でも、オリゴマンノース型が主体であり、複合型あるいはそれに近い構造は一部にすぎない。要するに、*N* 型糖鎖修飾の仕上げを行う昆虫のゴルジ体では、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) の活性が強く、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素などの糖転移酵素の活性が不足あるいは完全に欠如しているた

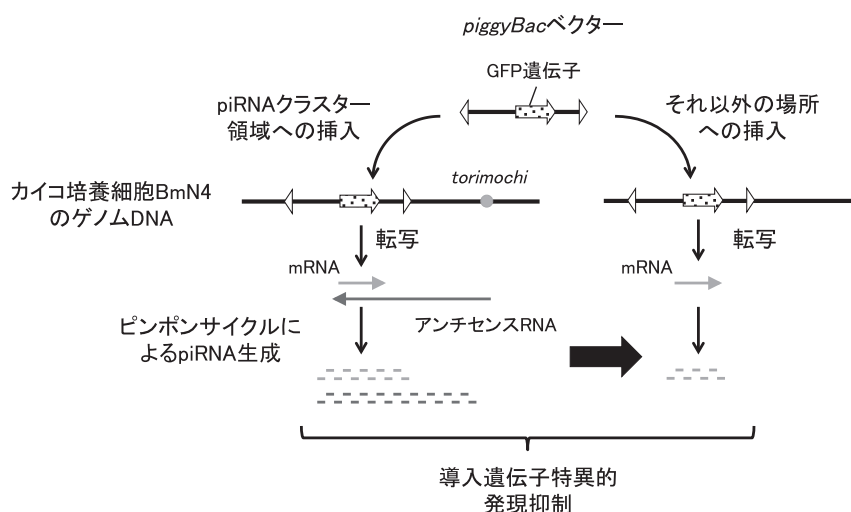


図4 カイコ卵巣由来 BmN4 細胞における piRNA 経路を介した導入遺伝子特異的発現抑制機構

生殖細胞の piRNA 合成機能を保持している BmN4 細胞では、ゲノム DNA 中の piRNA クラスター (*torimochi*) 近傍にトランスポゾン *piggyBac* を介して GFP 遺伝子が挿入されると、GFP の mRNA が転写されると同時に、*torimochi* 内の転写開始点からアンチセンス RNA も転写される。これが引き金となって、mRNA がアンチセンス RNA とともにピンポンサイクルにより piRNA に細断され、翻訳不能となる。この piRNA 合成は、*torimochi* とは異なる場所に挿入された GFP 遺伝子から転写される mRNA に対しても無差別に起こるため、細胞内に導入した GFP 遺伝子すべての発現が抑制される。

め、複合型糖鎖への伸長が起こりにくく、むしろ末端が切断されて短いオリゴマンノース型糖鎖ばかりできてしまうのである(図5a)。実際、昆虫細胞で不足する酵素活性を強化するために、哺乳類由来の各種糖転移酵素遺伝子を導入した形質転換細胞あるいは組換えバキュロウイルスが作製され、複合型糖鎖が付加された糖タンパク質の生産が可能になっている^{28,29)}。しかしながら、このような外来遺伝子の導入だけでは、末端を切除するGlcNAcaseの活性がそのまま維持されているので、オリゴマンノース型糖鎖の混在を完全には阻止できない、さらにアレルゲンとなる $\alpha 1,3$ -フコースの枝分かれも残存したままである。

これらの問題は、昆虫ゲノムのGlcNAcase遺伝子と $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素遺伝子をノックアウトすれば解決可能であるが、昆虫の発育や高次機能に対して悪影響を及ぼす可能性が高いため、昆虫生体よりも培養細胞の方が比較的容易に達成可能と考えられる。しかしながら、従来の効率の低い相同組換えで、培養細胞の相同染色体の遺伝子を両方ノックアウトするのはきわめて困難(細胞によっては相同染色体が2本よりも多いためますます困難)であった。ところが、最近になって、人工ヌクレアーゼTALENおよ

びCRISPR/Cas9システムなど変異導入効率のきわめて高いゲノム編集ツールが相次いで開発され、昆虫の遺伝子ノックアウトが格段に容易になった³⁰⁾。そこで、カイコBmN4細胞のGlcNAcase遺伝子(*BmFDL*)の翻訳領域を標的としたTALENを作製し、*BmFDL*のノックアウトを試みたところ、ゲノム中の全コピーの標的配列にフレームシフト欠損変異が生じた細胞をクローニングすることができた。このノックアウト細胞の増殖に異常は認められず、組換えBmNPVを感染させたところ、正常なBmN4細胞あるいはフレームシフトを起こさない欠損変異を有する細胞とはほぼ同程度の糖タンパク質(PTTH)が分泌生産された(図5b)。しかも、電気泳動におけるPTTHのバンドがわずかに高分子量側にシフトしたことから、PTTHに付加されたN型糖鎖の伸長が示唆された。現在この*BmFDL*ノックアウト細胞のN型糖鎖修飾特性の詳細な解析を行うとともに、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素遺伝子のノックアウトを試みており、最終的には、哺乳類由来の各種糖転移酵素遺伝子を導入して、N型糖鎖構造を完全に複合型に改変し、BEVSによる医薬・獣医薬用糖タンパク質生産に役立たいと考えている。

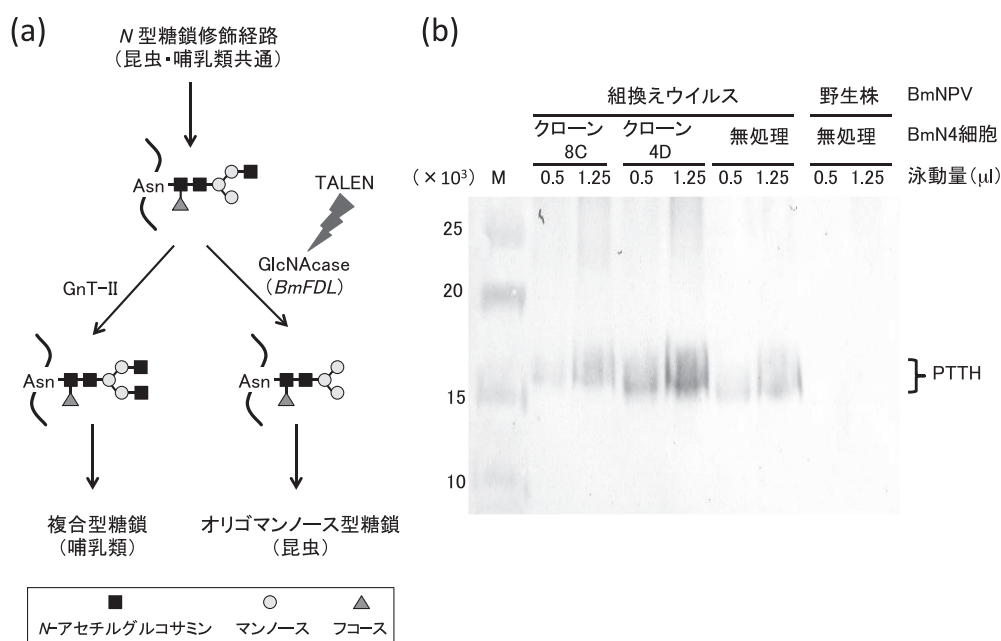


図5 GlcNAcase 遺伝子(*BmFDL*)をノックアウトしたBmN4細胞のクローニングとN型糖鎖修飾特性の変化

(a) 昆虫と哺乳類のN型糖鎖修飾経路の分岐点は、昆虫のゴルジ体における強力なN-アセチルグルコサミニダーゼ(GlcNAcase)活性と、相対的に弱いN-アセチルグルコサミン転移酵素II(GnT-II)活性により生じる。カイコのGlcNAcaseをコードする遺伝子(*BmFDL*)の翻訳領域を標的とするTALENを用いて、ノックアウトBmN4細胞を作製し、N型糖鎖修飾特性の改変を試みた。(b) ノックアウト細胞のクローニングにより、*BmFDL*の翻訳領域にフレームシフト変異が生じたクローン8Cと、フレームシフトを起こさない変異を有するクローン4Dが得られた。これらのクローンと無処理のBmN4細胞に組換えバキュロウイルス(BmNPV)を感染させ、糖タンパク質(前胸腺刺激ホルモン:PTTH)を分泌生産させた。培養上清(0.5または1.25 μ l)中のPTTHをウエスタンブロット法で検出したところ、いずれの細胞でもほぼ同程度の量のPTTH(分子量 17×10^3 付近)生産が確認されたが、クローン8Cで生産されたPTTHだけバンドの位置がやや高分子量方向にシフトしていた。なお、対照として、無処理のBmN4細胞にウイルス野生株を感染させた培養上清も分析に用いた。レーンMは分子量マーカーで、各マーカーの分子量($\times 10^3$)はパネルの左側に表示(山口大学今井嘉彦氏提供)。

6. おわりに

昆虫のゲノム解読の進展、遺伝子発現調節に関する知見の集積、ゲノム編集ツールの充実により、いよいよ昆虫細胞を自由自在に改変できる時代が近づいたように思われる。今後取り組んで見たい「夢」の一つに、休眠誘導可能な培養細胞の作製がある。BEVS による有用タンパク質生産に関するこれまでの研究の一つのゴールとして、休眠蛹のように長期保存可能なバイオリクターとしてタンパク質生産に利用可能で、蛹が不得意な分泌タンパク質の生産も実現できる培養系が構築できないだろうか。また、タンパク質以外の有用物質生産も魅力的である。多種多様な昆虫種の変化に富む代謝経路の遺伝的バックグラウンドを理解し、それらを培養細胞で再現することにより、昆虫の代謝産物を医薬・獣医薬、食品、燃料などとして有効利用する新しい昆虫産業の創出につながるのではないだろうか。そんなことを考えながら、最近いろいろな昆虫の培養細胞株の樹立にもトライしている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、多くの共同研究者と研究室の学生・院生の協力と支援により得られました。特に、休眠蛹の BEVS に関しては、中国瀋陽農業大学の王学英教授、広西医科大学の黄元姣教授、株式会社バキュロテクノロジーの馬嶋景博士、安定同位体標識に関しては、農業生物研究所の中村匡利博士、大陽日酸株式会社の横山順博士、名古屋市立大学の加藤晃一教授と矢木宏和講師、プロテオミクスに関しては、三重大学の吉村哲郎特任教授と湊元幹太講師、piRNA に関しては東京大学の勝間進准教授と泊幸秀教授、ゲノム編集に関しては農業生物研究所の大門高明博士に大変お世話になりました。皆様に心より感謝いたします。

文 献

- Smith, G.E., Summers, M.D., & Fraser, M.D. (1983) *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2156–2165.
- van Oers, M.M. (2011) *J. Invertebr. Pathol.*, **107**, S3–S15.
- 小林 淳 (2014) 最新昆虫病理学 (国見, 小林編), pp. 223–230, 講談社サイエンティク.
- Huang, Y.J., Wang, X.Y., Miyajima, S., Yoshimura, T., & Kobayashi, J. (2001) *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, **6**, 59–71.
- Kobayashi, J. (2002) *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, **7**, 37–41.
- Takahashi, H. & Shimada, I. (2010) *J. Biomol. NMR*, **46**, 3–10.
- Strauss, A., Bitsch, F., Cutting, B., Fendrich, G., Graff, P., Liebentanz, J., Zurini, M., & Jahnke, W. (2003) *J. Biomol. NMR*, **26**, 367–372.
- Strauss, A., Bitsch, F., Fendrich, G., Graff, P., Knecht, R., Meyhack, B., & Jahnke, W. (2005) *J. Biomol. NMR*, **31**, 343–349.
- 小林 淳 (2007) 蚕糸・昆虫バイオテック, **76**, 189–196.
- 小林 淳, 中村匡利, 横山 順 (2012) 特許第 5071740 号.
- Boublik, Y., Di Bonito, P., & Jones, I.M. (1995) *Biotechnology*, **13**, 1079–1084.
- Loisel, T.P., Ansanay, H., St-Onge, S., Gay, B., Boulanger, P., Strosberg, A.D., Marullo, S., & Bouvier, M. (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1300–1304.
- Paul, A., Hasan, A., Rodes, L., Sangaralingam, M., & Prakash, S. (2014) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **71**, 115–130.
- Fukushima, H., Mizutani, M., Imamura, K., Morino, K., Kobayashi, J., Okumura, K., Tsumoto, K., & Yoshimura, T. (2008) *J. Biochem.*, **144**, 763–770.
- Fukushima, H., Mizutani, M., Imamura, K., Morino, K., Okumura, K., Tsumoto, K., & Yoshimura, T. (2008) *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 551–556.
- 吉村哲郎, 湊元幹太, 今村幸治, 森野和彦, 小林 淳 (2013) 特許第 5266459 号 (U.S. Patent No. US8,568,291 B2).
- Kamiya, K., Kobayashi, J., Yoshimura, T., & Tsumoto, K. (2010) *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1798**, 1625–1631.
- 松岡龍雄, 西井愛子, 小林 淳, 吉村哲郎 (1999) 生化学, **71**, 778.
- Culp, J.S., Johansen, H., Hellmig, B., Beck, J., Matthews, T.J., Delers, A., & Rosenberg, M. (1991) *Biotechnology*, **9**, 173–177.
- Jarvis, D.L., Fleming, J.A., Kovacs, G.R., Summers, M.D., & Guarino, L.A. (1990) *Biotechnology*, **8**, 950–955.
- Fraser Jr., M.J. (2012) *Annu. Rev. Entomol.*, **57**, 267–289.
- Mitsutake, H., & Kobayashi, J. (2011) *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **80**, 15–24.
- Kawaoka, S., Mitsutake, H., Kiuchi, T., Kobayashi, M., Yoshikawa, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Shimada, T., Kobayashi, J., Tomari, Y., & Katsuma, S. (2012) *RNA*, **18**, 265–273.
- 光武 宏, 小林 淳 (2012) 蚕糸・昆虫バイオテック, **81**, 201–207.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B.H., & März, L. (1999) *Glycoconj. J.*, **16**, 109–123.
- Jarvis, D.L. (2003) *Virology*, **310**, 1–7.
- Nagaya, M., Kobayashi, J., Takahashi, N., Kato, K., & Yoshimura, T. (2003) *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **72**, 79–86.
- Harrison, R.L. & Jarvis, D.L. (2006) *Adv. Virus Res.*, **68**, 151–191.
- Palmberger, D., Wilson, I.B.H., Berger, I., Grabherr, R., & Rendic, D. (2012) *PLoS One*, **7**, e34226.
- Daimon, T., Kiuchi, T., & Takasu, Y. (2014) *Dev. Growth Differ.*, **56**, 14–25.

著者寸描

●小林 淳 (こばやし じゅん)



山口大学農学部教授、農学博士。

■略歴 1958年東京都に生る。81年東京大学農学部卒業。87年東京大学大学院農学系研究科修了(農学博士)。88年農林水産省蚕糸試験場(蚕糸・昆虫農業技術研究所)研究員。91年科学技術庁長期在外研究員(カナダ・ケベック大学に1年間)。92年三重大学工学部助手。2002年同助教授。03年より現職。

■研究テーマと抱負 2010年から山口大学研究推進体「新規昆虫能力の探索とその利用技術開発」の代表者を務め、学内の研究者とともに、新規昆虫機能の発見、分子メカニズムを基盤とする創薬・創農薬および昆虫食開発に取り組んでいる。

■ウェブサイト <http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/kobayashi/index.html>

■趣味 旅行、コンピュータの修理。