

サクサン培養細胞における バキュロウイルス感受性に対する 培地の影響

山口大学農学部 小林 淳
高エネルギー加速器研究機構 前川憲一

はじめに

一般に、ウイルスとその宿主となる生物種の組み合わせは厳密に決まっており、これを宿主範囲あるいは宿主特異性と呼びます。宿主範囲は、ウイルス側の宿主制御機構と、宿主側の生体防御機構の拮抗的相互作用によって決定されます。有用タンパク質の大量生産に用いられているバキュロウイルス遺伝子発現ベクター系 (baculovirus expression vector system; BEVS) においても、ウイルスの宿主特異性のために使用できる昆虫は限定されています。実際、私たちが構築したサクサン核多角体病ウイルス (AnpeNPV) とサクサン由来の培養細胞 (AnPe) 及び野蚕休眠蛹を用いる発現系は、既存のBEVS以上のタンパク質生産効率、複合型N型糖鎖付加など、優れた特性を有しています。しかし、サクサンやエリサンなどの野蚕は、BEVSとして世界中で最も高頻度に使用されている *Autographa californica* NPV (AcNPV) の宿主範囲に含まれないため、AcNPVベクターのユーザーは野蚕の優れた特性の恩恵を享受できません。

原理的にはウイルスあるいは宿主の遺伝子操作により、野蚕をAcNPVの宿主にすることは可能です。AcNPVでは、DNAヘリカーゼ遺伝子の一部をカイコNPV (*BmNPV*) のDNAヘリカーゼ遺伝子と置換するだけで、カイコの幼虫や培養細胞での感染・増殖が可能になっています。しかし、AnpeNPVのDNAヘリカーゼ遺伝子をAcNPVに導入しても、AnPe細胞にお

ける感染・増殖の改善に全く無効であることが判明しました。したがって、AcNPVの宿主範囲を野蚕に拡大するためには、DNAヘリカーゼ以外の宿主範囲決定に関与する重要な因子(群)を見つけ出し、それ(ら)をターゲットにした遺伝子操作を行う必要があると判断されました。

サクサン培養細胞AnPeにおけるAcNPVの培地依存的増殖

最近になって、AnPe細胞の培養液をSf-900II無血清培地(Sf-)から10%の牛胎児血清を添加したTC-100培地(TC+)に変えるとAcNPV感受性が向上し、Sf-では全く認められなかった多角体タンパク質(ポリヘドリン)の生産と多角体の形成がはっきりと確認できました(図1)。この結果は、AnPe細胞におけるAcNPVの感染・増殖制御技術開発にとって重要なヒントといえます。

そこで、この培地依存的AcNPV感受性の分子遺伝学的メカニズムを明らかにするために、AnPe細胞における遺伝子発現パターンの培地による差異をディファレンシャルディスプレイ(DD)法により網羅的に解析し、さらに、Real-time PCR法により確認を行った結果、Sf-またはTC+で発現量が2倍以上多くなる遺伝子が、それぞれ3個と2個同定できました(図2)。また、Sf-とTC+でそれぞれ継代してきた細胞を、2種類の培地の等量混合培地(Mix)、あるいは10%牛胎児血清を添加したSf-900II(Sf+)に順化したところ、上述の5遺伝子の発現量(表1)、ウイルス生産量(図

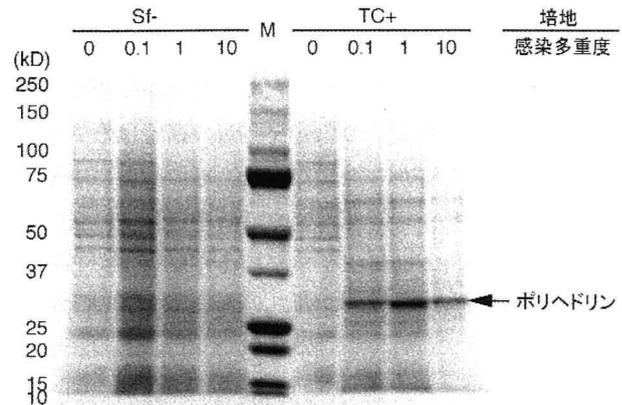


図1 AcNPV感染7日後のSDS-PAGE分析。Sf-あるいはTC+培地で培養したAnPe細胞は、非感染(感染多重度=0)、または3種類の異なる感染多重度(0.1, 1または10)でAcNPVに感染後27°Cで培養した。レーンMは分子量マーカーで、各マーカータンパク質の分子量(kD)を左端に示す。右端の30kDの位置の矢印は、ポリヘドリンタンパク質のバンドの位置を示す。

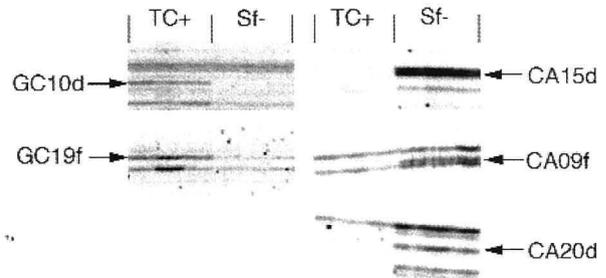


図2 Sf-とTC+で培養されたAnPe細胞から抽出された全RNAに対するDD分析により同定された培地反応性遺伝子。矢印は各遺伝子のバンドの位置を示す。

夏も冬も、1年中快適なタッサーシルクの敷シート

中国の野蚕(柞蚕)の大條糸をタテ糸、ヨコ糸に使い、145cmの広巾で敷シート用に織っていただいた絹布です。洗濯は10日~20日に一度、普通の洗剤でネットに入れて洗濯機で洗い、屋外での乾燥をおすすめしています。なお、上掛けシート用として、インドの手紡ぎタッサー糸で同じ145cm巾で作っていただきました。サイズと価格は同じで、1年中使える絹の毛布ができました。

- サイズ……145cm巾×2.5m(ミシン掛け済み)
- カラー……湯洗いのみ・未精練のナチュラル

価格 1枚7,000円
(税込7,350円・送料は別途請求)

絹のより 下村ねん糸

〒615-0816 京都市右京区西京極東町18
TEL・FAX 075-313-1348 下村 輝

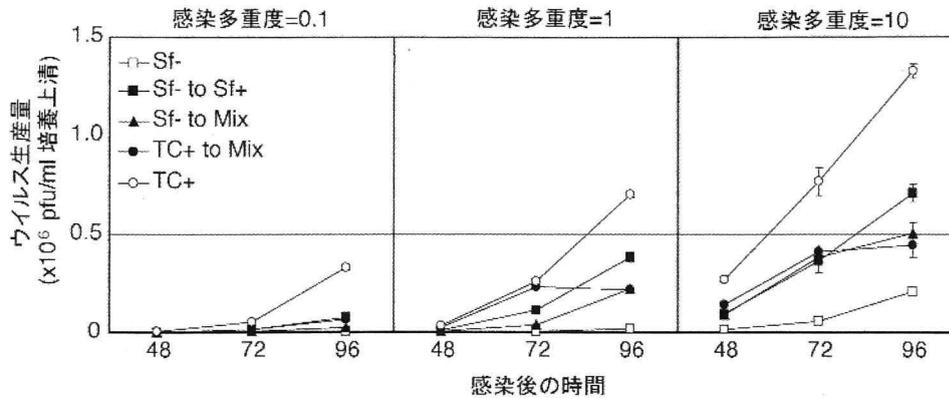


図3 AnPe細胞におけるAcNPVウイルス生産量に対する培地条件の影響。5種類の異なる培地条件下 (Sf-, TC+, Sf- to Sf+, Sf- to Mix および TC+ to Mix) のAnPe細胞は、3種類の異なる感染多重度 (0.1, 1または10) でAcNPVに感染後27℃で培養した。感染後48, 72および96時間後に回収した培養上清からウイルスDNAを抽出し、定量的Real-time PCRによりウイルス量を測定した。各測定値の誤差棒は、3反復における標準偏差を示す。

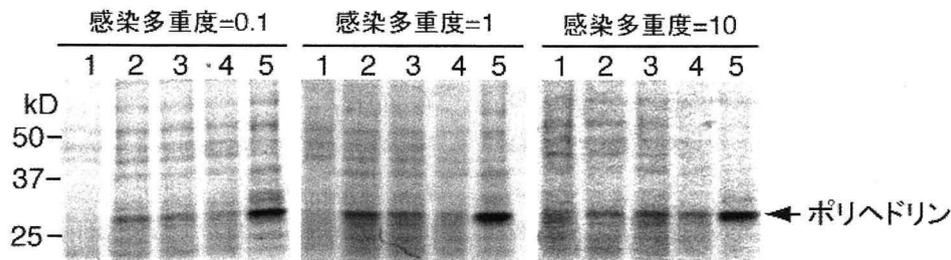


図4 AcNPV感染7日後のSDS-PAGE分析。5種類の異なる培地条件下 (Sf- (レーン1), TC+ (レーン5), Sf- to Sf+ (レーン2), Sf- to Mix (レーン3) および TC+ to Mix (レーン4) のAnPe細胞は、3種類の異なる感染多重度 (0.1, 1または10) でAcNPVに感染後27℃で培養した。レーンMは分子量マーカーで、各マーカータンパク質の分子量 (kD) を左端に示す。右端の30kDの位置の矢印は、ポリヘドリンタンパク質のバンドの位置を示す。各マーカータンパク質の分子量 (kD) を左端に示す。右端の30kDの位置の矢印は、ポリヘドリンタンパク質のバンドの位置を示す。

表1 AnPe細胞の培地反応性遺伝子に対する培地条件の影響

培地	相対的遺伝子発現量 (平均±標準偏差) %				
	GC10d	GC19f	CA09f	CA15d	CA20d
Sf-	0.6444±0.0190	0.0144±0.0004 ^b	0.1703±0.0025	0.7308±0.0086	1.2814±0.0239
Sf- to Sf+	0.7147±0.0242 ^a	0.0159±0.0010 ^b	0.0754±0.0009	0.0814±0.0031	0.2652±0.0045
Sf- to Mix	0.7431±0.0157 ^a	0.0248±0.0031 ^c	0.0373±0.0034	0.0082±0.0002 ^d	0.0325±0.0008
TC+ to Mix	0.3405±0.0040	0.0256±0.0036 ^c	0.2311±0.0009	0.1486±0.0077	0.2828±0.0079
TC+	1.3761±0.0092	0.0717±0.0093	0.0166±0.0004	0.0086±0.0005 ^d	0.0180±0.0005

5種類の異なる培地条件下 (Sf-, TC+, Sf- to Sf+, Sf- to Mix および TC+ to Mix) のAnPe細胞から抽出され全RNAは、定量的Real-time RT-PCRにより分析された。相対的遺伝子発現量 (%) は、個々の遺伝子発現量を内部標準遺伝子CA09e (リボソームL18タンパク質遺伝子ホモログ) の発現量で正規化することによって算出された。それぞれの遺伝子において、両側t-検定 (5%有意) において有意差がない相対発現量には、同じ添字 (a-d) が付けられている。

3) 及びポリヘドリン生産量 (図4) は、概ねSfとTC+における量の中間的な値になりました。なお、Sfで発現が多くなる3遺伝子はいずれも生体防御関連遺伝子に相同性を示し、Sf培地で培養したAnPe細胞にAcNPVを感染させると一時的に発現が増加するという興味深い結果も得られました。

以上の結果から、血清成分はAcNPV感染に対してポジティブに、また、Sfの成分はネガティブに作用しており、MixやSf+での中間的感受性は両成分のバランスが作り出していると考えられました。

おわりに

本研究により、サクサン培養細胞における培地依存的AcNPV感受性のメカニズム解明の糸口となる宿主遺伝子群が同定されました。また、AnpeNPVの全ゲノム配列の解読が完了し、野蚕を宿主とするために必要なウイルス遺伝子群の同定も可能になりました。最終的には、両者の遺伝子群の相互作用として宿主範囲決定機構を解明し、宿主範囲拡大技術の開発に応用したいと思っています。野蚕を次世代の昆虫工場にするために・・・。

最後に、本研究の推進において、独立行政法人農業生物資源研究所 (旧農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所) のCOEプロジェクトおよび動植物工場プロジェクトからの研究費が財政的に大きな支援となったことを明記し、関係各位に感謝の意を表して本稿を締めくくります。

文献

- Huang, Y. J., Kobayashi, J. and Yoshimura, T. (2002) Genome mapping and gene analysis of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus for improvement of baculovirus expression vector system. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 183-191.
- Kobayashi, J. (2002) Diapausing pupa of wild silkmoths as an ideal model of bioreactor. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, 7, 73-41.
- Maegawa, K., Itoyama, K., Shinoda, T., Yoshimura, T. and Kobayashi, J. (2002) Effects of medium compositions on *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus replication and cellular gene expression in *Antheraea pernyi* cell line. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 74, 63-73.
- Miller, L. K. and Lu, A. (1997) The molecular basis of baculovirus host range. In: *The Baculoviruses* (L. K. Miller ed.), pp. 217-235, Plenum Press, New York, NY.
- Nagaya, M., Kobayashi, J., Takahashi, N., Kato, K. and Yoshimura, T. (2003) Two-dimensional high performance liquid chromatography mapping of sugar chains demonstrated the biantennary, complex N-glycan addition to the recombinant glycoprotein produced by baculovirus-infected *Antheraea pernyi* insect cells. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 72, 79-86.



バイ菌だって
寄せつけないぞ!

野がいてサンブロック®

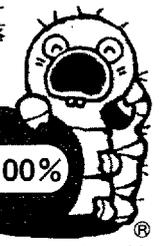
肌色美容液

年間通しての生活紫外線対策に!

野がいてタオル

中国鳳凰山のふもとで
放し飼いされた元気な
野生のかいこたちの大
切なまゆからつくりま
した。

とてもお肌に
やさしいのに
角質がよく落
ちる。



野蚕絹100%

株式会社 フリー・ゾーン

OFFICE 〒650-0002
神戸市中央区北野町4丁目10番5号Kabori M. 北野1F
PHONE 078-222-6722 FAX 078-222-5036

® 野がいてまゆ 野がいてくん