

昆虫の培養細胞株の開発と利用

今西 重雄*・富田秀一郎・秋月 岳

培養細胞株は細胞生理学研究や病理学研究に重要な実験材料（ツール）である。昆虫では病原菌の媒介体として発生する動物の病気並びに植物ウイルス病などの原因究明の研究に培養細胞を使うことができる。細胞は組織器官を構成する最小単位であり、しかも遺伝情報は個々の細胞のゲノムに保存されているため分子遺伝学研究にも不可欠なツールとなっている。ここでは昆虫の培養細胞株の作出手法といかなる研究に活用されているかについて述べる。

培養細胞株の作出に用いる昆虫種、組織

連続継代が可能な昆虫の培養細胞株（以下省略して細胞株）に関する論文は Grace¹⁾ 以来、200 編以上が発表され、²⁾ 作出されている昆虫の細胞株数は現在 500 株以上と推定されている。由来する昆虫種の分類ではチョウ目とハエ目由来の細胞株が多く全体の約 8 割を占める。チョウ目ではヤガ科が圧倒的に多く次にカイコガ科であり、両者は後述する核多角体病ウイルスをベクターとする遺伝子発現系の構築に不可欠なツールである。ハエ目では衛生害虫のカ科と実験昆虫のショウジョウバエ科が多く、それぞれ病理研究と分子遺伝子学研究に活用されている。ハチ目、バッタ目由来の細胞株も数は少ないが作出されている。

次に細胞株が由来する組織をみると、胚由来の細胞株が全細胞株のおよそ半数以上を占める。Es 細胞系は発生分化研究に重要であるが、昆虫では未作出であり、胚由来細胞株の多くは反転期以降の发育ステージ由来と思われる。昆虫の脂肪体は物質代謝の中心になっており、脊椎動物の肝臓に相当し、生理学的、生体防御研究に重要な組織である。幼虫、蛹、成虫期の脂肪体を材料に数々の細胞株が作出されており、比較的株化しやすい。血液細胞は幼虫から採取しやすいが、血液成分中のフェノールオキシダーゼ活性による血液のメラニゼーションに基づく黒化が発生し、培養にあたって細胞がダメージを受けやすい。そのために還元型グルタチオン（1 mg/ml）やシステイン（0.6 mg/ml）を培地に添加することにより株化に成功している。卵巣由来の細胞株は胚由来に次ぐ作出数であり、Grace¹⁾ が作出した昆虫初の細胞株（Ae 細胞株：*Antheraea eucalypti*）は蛹卵巣由来である。脂肪体同

様に幼虫、蛹、成虫の組織から株化が成功しており、細胞株の作出は比較的難しくない。新生幼虫の各組織は胚よりも发育が進んでいるが、未分化な細胞も一部存在する。成長原基由来、神経由来の細胞株は重要な研究対象である。しかし成長原基由来の細胞は多細胞性小胞として成長する傾向があり、これが連続性細胞株に容易に至らない原因とみられているが、成長原基由来細胞株はショウジョウバエ科、メイガ科などで極少数が株化に成功している。中腸由来の細胞株はさまざまに特化した食性をもつ昆虫類の消化吸收機能の解明にとって重要であるが、培養や細胞株の作出には困難がともなう。初代培養では腸内細菌による培地の微生物汚染を防止せねばならない。Loeb and Hakim³⁾ は組織から培養器に遊出した中腸細胞の培養には 20-hydroxyl-ecdysone、脂肪体培養の順化培地や脂肪体の抽出物の添加が有効であるとしている。Goblet, Columnar, basal stem cells から構成される *Manduca sexta*, *Heliothis virescens* の中腸組織の偽重層上皮は stem cells の一次的な増殖と分化により数ヶ月間培養下で生存できるが、連続継代性細胞株には至っていない。⁴⁾

初代培養方法

胚由来細胞の株化が最も簡単で成功率が高い。胚は卵殻中にあるので、70%エチルアルコールまたは3%次亜塩素酸ナトリウム液に卵を浸漬して殻の外側を滅菌し、次に生理食塩水中で卵殻を切断して胚を液中に取り出す。数回洗浄後胚を培地に移してメスで細断し、そのまま培養器に移して培養する。幼虫以降のステージの脂肪体、卵巣、精巣などは生体内にあるため、解剖時に腸を破らないように注意する必要がある。培養容器は25～28℃の定温器に保護し、2週間ごとに培地の半分を新鮮培地と交換する。細胞は容器に付着した組織の切断面から容器表面に移住し、分裂を反復して増殖するが、この期間は昆虫種や組織により数ヶ月～1年間を要する。最近、我々は各種昆虫種の初代培養にすぐれた新培地（MX 培地）および細胞外マトリックスとしてカイコ蛹抽出のキチンならびにキトサンを容器の培養面に塗布し、組織から細胞の遊出と分裂を促進する方法を開発した。この方法は細胞株の短期間作出手法として特許出願中であり、さまざまな昆虫種の初代培養期間を数ヶ月間に短縮できる。

* 著者紹介（代表）（独）農業生物資源研究所昆虫生産工学グループ昆虫細胞工学研究チーム（チーム長）

〒305-8634 つくば市大わし1-2 TEL. 029-838-6100 FAX 029-838-6028 E-mail imanishi@affrc.go.jp

細胞の培養法 —特にS2細胞株—

昆虫の細胞培養は哺乳類と比較し、炭酸ガス培養装置が不要で、また高密度懸濁培養に容易に適応させることができるなど、培養し易い特徴がある。昆虫細胞を用いた遺伝子発現系である安定発現システム（形質転換システム）とはトランスフェクションと抗生物質による選択手法を併用してゲノムに遺伝子を直接導入し、安定発現する細胞株を作出する方法である。Schneider S2 細胞株（後述）は増殖性にきわめてすぐれ、組換えタンパク質を安定的にまたは一過性的に発現することができる。トランスフェクト後、形質転換細胞は2週間位で選抜でき、攪拌式大量培養も可能である。培養条件は、Schneider 培地を用い、培地のpHは6.8とする。培養開始時の細胞密度は 2×10^6 cells/mlとし、培養温度は25°C、溶存酸素濃度は50%に維持することによって、2 l 培養が可能である。また、一過性発現は一週間以内に確認ができる。この安定発現システムではDNAの転写・翻訳が旺盛な対数増殖期の細胞から高品質な遺伝子産物が得られる特長があり、その発現量は哺乳類発現システムより高く、バキュロウイルス発現系に匹敵する。またこのシステムではウイルス粒子が産生されないメリットもあり、取り扱いにもすぐれている。

外来遺伝子の発現によく用いられる培養細胞株

培養細胞は通常一種類の組織を由来として作出されているため、昆虫個体に比べて遙かに単純な系である。したがって分子、細胞レベルの基礎研究に適した実験系である。今日作出されている細胞株の内、数株が遺伝子発現システム用細胞株として販売されている。代表的なものとしてIPLB-SF21 (*Spodoptera frugiperda*, 通称 Sf21), IPLB-SF9 (*Spodoptera frugiperda*, 通称 Sf9), High Five™ (*Trichoplusia ni*), BmN (*Bombyx mori*), Schneider S2 Cells (*Drosophila melanogaster*) の各細胞株がある。IPLB-SF-21はVaughnら⁵⁾が*S. frugiperda*の蛹卵巣から作出した細胞株で、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcMNPV) や*S. frugiperda* 核多角体病ウイルスの感染・増殖にすぐれた特長を持つ。Sf21が昆虫体液を除いた基本培地で培養ができたものはIPLB-SF-21AEとも呼ばれ、細胞の大量培養やウイルスの大量増殖が可能である。Sf9はSf21のクローン細胞株であり、Sf900やSf900IISFMの無血清培地でも大量培養が可能であり、ゲノム解析がなされたAcMNPVをベクターにした遺伝子発現系は広く利用されている。High Five™は*T. ni*の胚由来のBTI-

TN-5B1-4⁶⁾細胞株に由来し、培養はExpress Five SFM培養液が利用できる。このHigh Five™とTN-368 (*T. ni*)⁷⁾ Sf9, Sf21の細胞株間において、組換えAcMNPVによるアルカリフォスファターゼ発現量を比較したところ、対細胞数あたりの発現活性はHigh Five™がSf9より24倍、またSf21より6倍とそれぞれ高い数値を示した。Schneider S2 Cellsは*D. melanogaster*の胚の後期ステージから作出された細胞株である。⁸⁾

我々はカイコ胚由来細胞株 (NISES-BoMo-15AIIc)⁹⁾を用いて次の発現系を構築した。それは、出芽型酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のFLP遺伝子組換え酵素を産生するヘルパープラスミドを作用させることにより、別途細胞株の染色体上に配列されてある2個のターゲットサイト (FRT) 間のネオマイシン抵抗性遺伝子カセットを切り出し、このカセットの直後に配列するレポーター遺伝子を発現させる系である (図1)。¹⁰⁾ ネオマイシン抵抗性遺伝子カセットの切り出し効率は20.1%を示し、哺乳動物細胞のCV1, F9細胞の8%, 293細胞の47%¹¹⁾と比較し遜色のない値を示した。この系は一種の誘導発現タイプと考えられる。

最近遺伝子組換え技術を用いて細胞の形質転換化が進んでいる。具体的な例として、昆虫のBTI-Tn-5B1-4細胞株を形質転換し、安定型形質転換細胞 Tn-pXme11に変換して活性型 β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 2をGFPとの融合タンパク質として発現した。発現量はバキュロウイルス発現システムと比較し、約3倍量が示された。¹²⁾ また、ヒト α 3/4fucosyltransferase IIIの可溶性分泌型 (SFT3) を安定発現する形質転換細胞株 Sf-9 はバキュロウイルス発現システムと比較し、高い発現量であったと報告されている。¹³⁾ 今後は細胞の形質転換技術により、遺伝子発現と発現産物の検証が進むものと予測される。

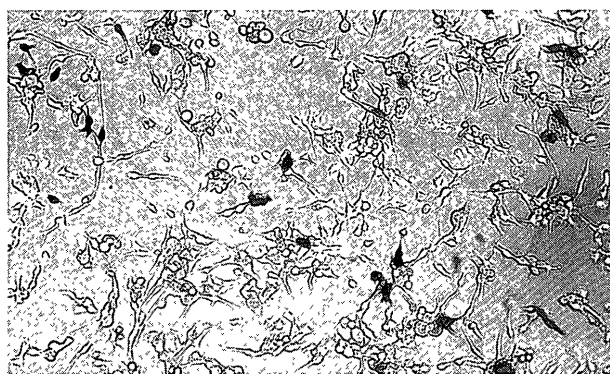


図1 NIAS-BoMo-15A II c 細胞株に pbsNEO β Gal と pbsFLP をトランスフェクトし、ネオマイシン抵抗性遺伝子カセットが切り出されて β Galの発現が見られる細胞 (黒)

培養細胞株を用いたウイルスの増殖

昆虫細胞の応用の一環として昆虫ウイルスの生産が細胞系を用いて行われている。これまで分離されてきた昆虫ウイルスの多くは、害虫の大多数を占めるチョウ目昆虫に感染するものである。昆虫の細胞へのウイルス感染は Grace¹⁾ が Ae 細胞株に核多角体病ウイルスを感染させたのが最初である。以来 21 種類の核多角体病ウイルス、2 種類の顆粒病ウイルス、2 種類のマレー病ウイルス、4 種類の細胞質多角体病ウイルスで、細胞への感染が確認されており（1993 年まで）、ウイルスと宿主の相互作用の解明、ウイルスの生産システムの開発など基礎、実用化に向けた研究が進んでいる。

昆虫ウイルスの生産は、虫体を用いた方が生産量は多いが虫の飼育の場所・飼育労働・他種ウイルスなどの混入の危険がある。一方、培養系は実験室規模で済み、スケールアップを含め、産業化に最適と考えられるが、培地の低コスト化や目的ウイルスの感染増殖に最適な細胞株の作出が問題点である。MM-SF¹⁴⁾ 培地は 1 l あたり 260 円の低コストであるが、フィルターろ過により割高になるため、高圧滅菌処理（121°C, 15 分間）により、フィルターが不要な培地が作製されている。

昆虫細胞を用いた天敵ウイルスの研究の一つを紹介する。極低血清濃度培地で培養できる FRI-SpIm-1229 細胞株（*Spilosoma imparilis* 幼虫脂肪体由来）を用いて街路樹の代表的な害虫であるアメリカシロヒトリの屋外罹病幼虫から分離された強い殺虫性の核多角体病ウイルスが増殖されている。我々が作出した NIAS-Bm-ke1 細胞株（カイコ胚子由来）は、カイコ細胞では初めて無血清培養が可能であるが、牛胎児血清（FBS）が添加されていない培地ではカイコ核多角体病ウイルスの感染は低い欠点がある。しかし培地にカイコ幼虫体液を極少量添加するだけで著しいウイルス感染効果を示している。本細胞株はカイコ核多角体病ウイルスをベクターにしたバキュロウイルス発現システムの大量発現系として期待されている。

これまで生物農薬として登録された昆虫ウイルスは、核多角体病ウイルス、顆粒病ウイルス、細胞質多角体病ウイルスがある。近年の遺伝子組換え技術の進歩に伴い、天然のウイルスでは不可能であった即効性を求めた組換えウイルスが考案された。*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid 核多角体病ウイルス（HaSNPV-wt）は中国では綿の害虫 *Helicoverpa armigera* (the cotton bollworm) の生物農薬として商品化されているが、速効性では化学

農薬に劣る。そこで ecdysteroid UDP-glucosyl transferase(egt) gene（変態を抑制する遺伝子）を欠如した組換えウイルス（HaCXW1）とサソリ毒遺伝子を egt 遺伝子と置き換えた組換えウイルス（HaCXW2）を構築し、HzAM1 細胞株¹⁵⁾ で増殖し、二齢幼虫に接種して野生型 HaSNPV-wt と致死効果を比較した。50% 致死に至る時間（LT₅₀）は HaCXW1 では 27%, HaCXW2 は 32%, それぞれ HaSNPV-wt と比較して早いことがわかった。¹⁶⁾

培養細胞はウイルスの感染性・抵抗性の機構の解明やウイルスのクローニングには不可欠なツールであり、ウイルス感受性の高い新規細胞株の需要は常に高い。

細胞銀行

昆虫の細胞株は、理化学研究所の細胞開発銀行や我々の農業生物資源研究所のジーンバンクで保存され、利用者に提供されている。農業生物資源研究所ではアクティブコレクションとして昆虫の細胞株が 50 株登録されており、それらの細胞株の特性は農業生物資源研究所のホームページ (<http://www.nias.affrc.go.jp/>) のサイトマップ中の公開データベースでみることができる。グルタミン（8株）、 α アラニン（4株）を産生する細胞株や数種ウイルスの感受性など、諸特性が記載されている。我々はチョウ目昆虫のみならずコウチュウ目、ハエ目およびカメムシ目の昆虫種から多種多様な機能を有する細胞株を作出し、分子遺伝学、害虫防除などの研究発展に応えようとしている。

文 献

- 1) Grace, T. D. C.: *In Vitro*, **3**, 104 (1967)
- 2) Mitsuhashi, J.: *Invertebrate Tissue Culture Methods, Springer lab Manual* (2002).
- 3) Loeb, M. and Hakim, R. S.: *J. insect Physiol.*, **42**, 1103 (1996).
- 4) Raziel, S. et al: *In Vitro Cell. Dev Biol -Animal*, **32**, 338 (2001).
- 5) Vaughn, J. L. et al.: *In Vitro*, **13**, 213 (1977).
- 6) Granados, R. R. et al. *J. Invert Pathol.*, **64**, 260 (1994).
- 7) Hink, W F and Strauss, E. M *J Inverteb Pathol.*, **29**, 390 (1977).
- 8) Schneider, I *J Embryol Exp. Morph.*, **27**, 353 (1972).
- 9) Inoue, H *Appl Entomol Zool*, **20**, 496 (1985).
- 10) Tomita, S. et al: *Appl Entomol Zool.*, **34** (2), 371 (1999).
- 11) O'Gorman, S. et al.: *Science*, **251**, 1351 (1991).
- 12) Kato, T. et al.: *Protein Exp. Purif.*, **35**, 54 (2004).
- 13) Morais, V. A. and Costa, J.: *J. Biotech*, **106**, 69 (2003).
- 14) Mitsuhashi, J.: *The 8th International Conference of Invertebrate and Fish Tissue Culture*, p.83 (1991)
- 15) McIntosh, A. H and Ignoffo, C. M.: *Appl Entomol. Zool.*, **18**, 262 (1983).
- 16) Chen, X. et al *J Invert Path*, **76**, 140 (2000)