

カイコ細胞質多角体病ウイルス由来ポリヘドリン遺伝子の タバコ BY-2 細胞における発現

秋田 求¹, 山崎恭央², 斎藤直也², 黒田敏章²

要旨

カイコ細胞質多角体病ウイルス由来のポリヘドリン遺伝子と、ポリヘドリンと相互作用して多角体に包埋されるタンパク質である VP3 遺伝子とを植物細胞内で同時に発現させ、多角体を形成させることを試みた。ポリヘドリン遺伝子と、GUS 遺伝子に連結した VP3 遺伝子とが同時に発現するように各々 CaMV35S プロモーター下においた。このように作成したベクターを用いてタバコ BY-2 細胞を形質転換したところ、選抜マーカーに対する耐性を示す細胞塊が複数得られた。顕微鏡観察したところ、GUS 染色しても多角体と明らかにわかる粒子を含む細胞はなかった。ポリヘドリン抗体を用いたウエスタン解析の結果から、このタンパク質が組換えタバコ BY-2 細胞で生産されていることが明らかになった。

1. 緒論

本研究は、カイコ細胞質多角体病ウイルス (*Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus*, 以下 BmCPV) 由来の 2 種のタンパク質 (ポリヘドリンおよび VP3 タンパク質) の相互作用を利用して、有用な機能を有するタンパク質粒子を植物に生産させることを目的とした。BmCPV は、レオウイルス科の *cypovirus* 属に属するバキュロウイルスの一種であり、「多角体」と呼ばれる結晶状のタンパク質粒子を宿主細胞の細胞質中に形成させるという特徴がある⁽¹⁾。通常、多角体内部には 1 万個以上ものウイルス粒子が封入されている。この多角体を構成する主要なタンパク質はポリヘドリン (AB003360) と呼ばれ、大きさは約 27KDa、BmCPV のゲノムにおいては、セグメント 10 にコードされている。このタンパク質は、ウイルス粒子表面に局在する VP3 と呼ばれるタンパク質 (AF433659、以下 VP3) と相互作用し、結果、ウイルス粒子が多角体に包埋されると考えられている。ポリヘドリンは、それ単独でも集合して多角体と同様の正六面体の結晶状の粒子を形成する性質がある。さらに、VP3 は単独でもポリヘドリンと相互作用し、ポリヘドリンと共存させると、VP3 を封入した状態のタンパク質粒子が形成される。従って、VP3 に他のタンパク質を連結したキメラタンパク質を用いると、そのタンパク質を封入したタンパク質粒子が形成される。このとき、一部のタンパク質は粒子表面に存在することが明らかになっている^{(2) (3)}。

キメラタンパク質を多角体に包埋させ利用する技術については、京都工芸繊維大学の森らのグループによって精力的な検討が行われている。例えば、多角体に包埋された enhanced green fluorescent protein (U57608, EGFP) は非常に高い安定性を示し、一月もの長期間におよぶ乾燥状態や 75°C もの高温処理でも失活せずに EGFP の発光が観察された⁽³⁾。粒子内部でタンパク質がどのような状態にあるのかという問題については明らかになっていないが、タンパク質としての活性を失わずに存在していることは上述のとおりである。したがって、キメラタンパク質を包埋させた多角体を用いたライブラリーの構築などへの応用が始められている。また、多角体自体は酸に強い反面、アルカリ条件下で不安定である、という特長から、例えば、胃酸に弱くかつ小腸内壁に直接作用させなければならないような生理活性ペプチドを、多角

原稿受付 2006 年 6 月 16 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.04-IV-6, 2005 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

体に包埋させた状態で経口摂取するといった利用法も考えられている。

ところで、植物細胞にこのような有用タンパク質を生産させることができれば、より安価に、かつ大量に生産できると期待される。植物を用いた生産系にはそのほかに優れた点がある⁽⁴⁾。実際、植物を利用する有用タンパク質生産技術は最近注目を集めており、なかでも、閉鎖系温室で遺伝子組換え植物を生産する試みが話題になっている。そこで、本研究では、ポリヘドリンタンパク質が植物細胞内で発現し、多角体が形成されるか否かを観察した。これは、機能性を有するタンパク質粒子を細胞内に蓄積する植物を開発することにつながる。同時に、昆虫細胞内で結晶状の粒子を構成するタンパク質が植物細胞内でも正確に機能しうるのかという興味深い問題に関係するものでもある。

2. 材料と方法

2. 1 植物材料

植物材料として *Nicotiana tabacum* L. BY-2 細胞を用いた。培養系は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の原島氏より譲渡していただいた。細胞は、LS 培地を用いて 24°C 下で継代培養した。

2. 2 コンストラクト

図 1 に、本実験で使用したコンストラクト (pIG-121-P-VP3/GUS) を示した。本ベクターは、名古屋大学大学院生命農学研究科の中村研三教授よりいただいた pIG121-Hm⁽⁵⁾ に対し *Califlower mosaic virus* 35S promoter (CaMV35S) 制御下でポリヘドリンおよび VP3 と β -glucuronidase (GUS) とのキメラタンパク質が発現するよう当研究室で構築したものである。

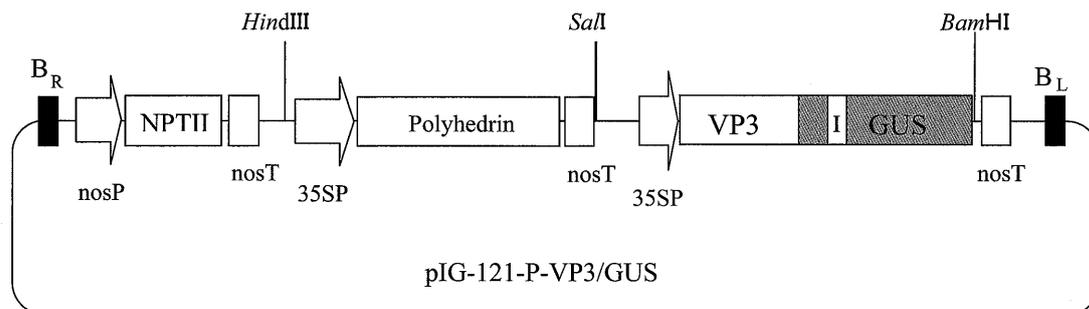


図 1 BY-2 細胞の形質転換に用いたベクター (pIG-121-P-VP3/GUS)

BL : left border、BR : right border、NPTII : ネオマイシン耐性遺伝子、nosP : ノパリン合成酵素のプロモーター配列、nosT : ノパリン合成酵素のターミネーター配列、35SP : CaMV35S、I : トウゴマのカタラーゼ遺伝子由来のイントロン

2. 3 アグロバクテリウムを用いた形質転換

アグロバクテリウムとして LBA4404 (Invitrogen) を用いた。エレクトロポレーション装置として Gene Pulser Transfection Apparatus (Bio-Rad) を使い、50 μ l の細胞懸濁液にプラスミド溶液 2 μ l (DNA を 100 ng 含む) を混合し、Voltage 1.8 kV、Capacitance 25 μ F、Resistance 200 Ω の条件でパルス処理し、YM 液体培地 (Mannitol 10 g/l、Yeast Extract 0.4 g/l、NaCl 0.1 g/l、K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g/l、MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l、pH 7) を用いて 30°C、225 rpm の条件で 3 時間振とう培養した。次いで、選抜用 YM 固形培地 (ストレプトマイシン 100 μ g/ml、カナマイシン 50 μ g/ml、寒天 15 g/l で固化) を用いて 30°C、暗条件下で 48-50 時間培養した。

形質転換したアグロバクテリウムの培養には LB 液体培地を用いた。15 ml ファルコンチューブにカナマイシン 50 mg/l を含む培地 4 ml を入れ菌を接種後、28°C、200 rpm で 3 日間振とう培養した。BY-2 細胞への感染と組換え体の選抜は定法⁽⁶⁾によった。選抜にはカナマイシンを用いた。GUS 染色は定法⁽⁷⁾に従って行った。

2. 4 タンパク質の抽出と可溶化

予備実験により、ポリヘドリンタンパク質の含量は低いと推定されたうえ、不溶体で存在しているのか否かも不明であったので、エタノールを用いて脱水したのち全タンパク質を可溶化する方法をとることにした。BY-2 細胞をカナマイシンを含む固形培地上で増やし、2 ml チューブに採取した。18000 ×g で 5 分間遠心分離して上清を除いたのち、35%エタノール 1 ml に分散させて 3 分間静置した。次いで 18000 ×g で 10 分間遠心分離して上清を除いたのち、50%エタノール 1 ml に分散させて 3 分間静置した。同様の操作を 70%エタノール、99.5%エタノールと繰り返し、最後に減圧下で乾燥させた。これに試料溶解液 (1% SDS、50 mM トリス (pH 6.8)、2%グリセロール、0.14 Mメルカプトエタノール) 200 μl を加え、沸騰浴上に 2 分間保ったのち常温にもどした。次いで 18000 ×g で 20 分間遠心分離して上清を集めて試料とした。ポリヘドリンの標準試料は京都工芸繊維大学の森助教授から試供され、上記の試料溶解液を用いて同様に可溶化して標準試料とした。

2. 5 ウェスタンブロッティング

コンパクト PAGE (AE-7300/5、ATTO) を使い、ATTO 社のプロトコルに従って SDS 電気泳動用ゲルを調製した。アクリルアミド濃度は、濃縮ゲル 4.5%、分離ゲルは 10%とした。泳動は泳動装置の出力モード Tris-Gly/PAGEL H (定電流 20.5 mA)で行い、次いで定法⁽⁸⁾により Hybond-P+メンブレン (Amersham Bioscience) にブロッティングした。

6×5.5 cmに切ったメンブレンと、電気泳動したゲルをブロッティング装置 (セミドライプロッター、フナコシ) にセットし、15 V、54 A で 45 分間通電してタンパク質を移動させた。メンブレンは PBS⁽⁸⁾ で洗浄し、次いで、1 g のスキムミルク (ナカライ) を含む 20 ml の PBS-T (0.1%の Tween-20 を加えた PBS) 中で 1 時間振盪した後、PBS-T で 5 分間振盪した。抗ポリヘドリン抗体を加えた 10 ml の PBS-T 中で 1 時間振盪した。次に 20 ml の PBS-T 中で 10 分間洗浄することを二回行った。一次抗体溶液は、京都工芸繊維大学の森助教授よりいただいた。希釈率は森助教授からの情報に従い、1/10000 とした。二次抗体として Anti-Rabbit IgG 抗体 (HRP-Linked whole Ab、Amersham Bioscience)を用いた。二次抗体 0.8 μl を含む 20 ml の PBS-T にメンブレンを浸し、室温で 1 時間振盪した。次いで PBS-T で 10 分間洗浄することを 3 回行った。Western blotting detection reagents (Amersham Bioscience) をメーカープロトコルに従って使い、ECL Mini-camera (Amersham Bioscience) にセットし、インスタントカメラフィルム (EP-3000B、富士フィルム) に記録した。

3. 結果および考察

定法に従いアグロバクテリウム法によって形質転換した BY-2 細胞培養系からは、カナマイシン耐性を示す小細胞塊が多数得られた。これらの細胞塊を顕微鏡観察した結果、GUS 染色の有無によらず、多角体の構造物を確認することはできなかった。なお、ポリヘドリン遺伝子のみを導入した場合でも同様であった (結果省略)。植物細胞内には各種のオルガネラやデンプン粒などが多数存在するので、仮に小型の多角体のみが形成されていたとしたら、顕微鏡下で見分けることができない。GUS 染色して発色があったとしても、小型の多角体のみであったならバックグラウンドとそれを明瞭に見分けることができない

い可能性がある。実際、GUS 染色しても明らかに青く染まった粒子を確認することができなかった。従って、本研究で得られた形質転換細胞では、両遺伝子が発現していないか、ポリヘドリンが多角体を構成できない状態であったか、あるいは発現していたとしても何らかの理由でタンパク質の量が少なく、観察にいたらなかったと考えられた。

しかしながら、過去に我々はベラドンナ不定根培養系を用いた実験で明らかに青く染色される粒子が細胞内に形成されることを報告している⁽⁹⁾。ただし、その後の観察ではそれを確認できていない。また、ポリヘドリン遺伝子のみを導入したヒメツリガネゴケ細胞内に多角体と類似した粒子が存在する場合のことも確認している（未発表データ）。これらのことから、植物細胞内でもポリヘドリンタンパク質が生産されるものの、その発現は不安定で発現量も少なく、結果として顕微鏡では観察できなかったと予想し、ウエスタン法によってポリヘドリンタンパク質の有無を確かめることにした。結果を図2に示す。測定に用いた4株すべてについて、ポリヘドリンと同じ大きさにシグナルが観察された。しかし、これらのタンパク質は細胞内で活発に生産されているわけではないと予想された。さらに、いずれの試料にも高分子側および低分子側にシグナルが観察されており、細胞内に存在したポリヘドリンタンパク質の一部は何らかの形でポリヘドリン同士、VP3、ないし他の高分子と結合した状態にあり、あるいは分解された状態で存在しているものと予想された。なお、ポリヘドリンは昆虫細胞内で糖鎖修飾されることはないと言われている。本実験においても、最も強いバンドは昆虫細胞由来のポリヘドリンと同じ分子量を示しており、植物細胞内でも多くのポリヘドリンは修飾されずに存在していることが示唆される。



図2 pIG-121-P-VP3/GUS により形質転換したタバコ BY-2 細胞におけるポリヘドリンの生産

P: 昆虫細胞由来ポリヘドリン、1, 2, 3, 7: 組換え BY-2 細胞抽出液、4: 組換え BY-2 細胞抽出液とポリヘドリン (P×1/10) の1:1混合液、5: ポリヘドリン (P×1/10)、6: コントロール、8: 組換え BY-2 細胞抽出液とポリヘドリン (P) の混合液

本実験に用いた両遺伝子は、いずれも CaMV35S という強力なプロモーターの制御下にある。この場合、いわゆるサイレンシングをしばしば受けることが知られている⁽¹⁰⁾。タバコ細胞の培養系では、ゲノム上の様々な位置に様々なコピー数で DNA が挿入され、遺伝子発現レベルの異なる多数の細胞群が集合していると考えることができるので、全体としてポリヘドリン量が少なく測定されたのではないかと考えるこ

とができるであろうが、少なくとも、昆虫由来細胞由来のポリヘドリンと同じ分子量でポリヘドリンの生産が確認されたことは、植物細胞を利用してポリヘドリンからなるタンパク質粒子を生産する可能性を示唆するものとする。

ポリヘドリンによるタンパク質粒子の構造の詳細と、その形成のメカニズムの詳細はいまだ明らかでない⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。無細胞系で生産させたポリヘドリンのみ、またはポリヘドリンと VP3 とのキメラタンパク質のみで、試験管内で結晶状の粒子を形成することも知られているので⁽³⁾、基本的には、これらのタンパク質間の相互作用によって結晶状粒子が形成されるのではないかと考えられているが、低温下に保たなければならないこと、および形成される粒子の大きさは昆虫細胞内よりも明らかに小さいことから考えると、他の何らかの因子が昆虫細胞内に、ないしはウイルスの産物として存在していて、それが少なくとも結晶の成長を促進している可能性があるのかも知れない。

4. 結論

カイコ細胞質多角体病ウイルス由来のポリヘドリン遺伝子をタバコ BY-2 細胞で発現させることができた。すなわち、ウェスタン解析の結果からは、昆虫細胞内と同様のポリヘドリンが植物細胞でも生産されることが示された。しかし、顕微鏡観察においてその粒子を確認することはできなかった。その原因についてはいまだ不明である。今後、ポリヘドリンを植物細胞内で結晶状に成長させる条件を明らかにし、それに必要な因子の有無等に関する検討を行う必要がある。さらに、植物細胞内で VP3 タンパク質が多角体に正しく包埋されるのか否かを確かめ、機能性を有するタンパク質粒子を生産する植物の作出を目指すことが必要である。

5. 参考文献

- (1) Bellonick, S. (1989) Cytoplasmic polyhedrosis viruses - Reoviridae. *Adv. Virus Res.* 37, 173-209.
- (2) Ikeda, K., Nagaoka, S., Winkler, S., Kotani, K., Yagi, H., Nakanishi, K., Miyajima, S., Kobayashi, J. and Mori, H. (2001) Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4. *J. Virol.* 75, 988-995.
- (3) Ikeda, K., Nakazawa, H., Shimo-oka, A., Ishio, K., Miyata, S., Hosokawa, Y., Matsumura, S., Masuhara, H., Bellonick, S., Alain, R., Goshima, N., Nomura, N., Morigaki, K., Kawai, A., Kuroita, T., Kawakami, B., Endo, Y. and Mori, H. (2006) Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. *Proteomics* 6, 54-66.
- (4) 太田喜元, 秋田求 (2002) 植物による異種タンパク質生産. 近畿大学生物理工学部紀要, 11, 1-23.
- (5) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a β -Glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31, 805-813.
- (6) 齊藤武, 中川強 (1998) 1-3-2 GFP 指標を付けたタンパク質の発現と検出, 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ9 植物のタンパク質実験プロトコール 遺伝子と組織から迫るタンパク質の機能と構造 (中村研三, 西村幹夫, 長谷俊治, 前島正義 監修) pp.80-87, 秀潤社, 東京
- (7) 高橋美佐, 森川弘道 (1997) 2-3 細胞レベルで GUS 活性を観る方法, 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ6 植物の細胞を観る実験プロトコール 遺伝子発現から細胞内構造・機能まで (福田裕穂, 西村幹夫, 中村研三 監修) pp.71-79, 秀潤社, 東京
- (8) 西方敬人 (1997) タンパク質なんてこわくない. 細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ pp.120-126, 秀潤社, 東京

- (9) 秋田求, 太田喜元, 星野真輝, 一法師幹也 (2002) カイコ細胞質多角体病ウイルスを利用した有用タンパク質生産に関する研究, 日本農芸化学会 2002 年度大会大会要旨集, p149.
- (10) Gallie, D. R. (1998) Controlling gene expression in transgenics. *Curr. Opinion Plant Biol.* 1, 166-172.
- (11) Doye, J. P. K. and Poon, W. C. K. (2006) Protein crystallization in vivo. *Curr. Opinion Colloid & Interface Sci.* 11, 40-46.
- (12) Anduleit, K., Sutton, G., Diprose, J. M., Mertens, P. P. C., Grims, J. M. and Stuart, D. I. (2005) Crystal lattice as biological phenotype for insect viruses. *Protein Sci.* 14, 2741-2743.

英文抄録

Expression of Polyhedrin of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells

Motomu Akita¹, Yasuhiro Yamazaki², Naoya Saito², Toshiaki Kuroda²

Polyhedrin of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus is a protein that crystallizes and forms polyhedral particles in insect cells infected by the virus. We introduced the polyhedrin gene to *Nicotiana tabacum* BY-2 cells with the GUS-fused VP3 gene, encoding the viral protein that is encapsulated in the polyhedron, by an *Agrobacterium* mediated transformation. The expression vector was constructed to regulate these two genes under CaMV35S promoters. A NPTII expression cassette regulated by the nopaline synthase promoter was located on the same T-DNA region. Transformed BY-2 cells that proliferated well on solid medium were examined with a microscope but no polyhedra were distinguished in the cells even if the cells were GUS-stained. Since production of polyhedrin was confirmed by a western blotting analysis, it is necessary to investigate another suitable condition for crystallization of polyhedrin and encapsulation of VP3 into the polyhedra.

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan