

バキュロウイルス発現系を用いた 絹糸腺における組換えタンパク質の発現解析

工藤遼亮¹⁾・李 在萬²⁾・日下部宜宏²⁾・*・河口 豊²⁾

¹⁾九州大学農学部・²⁾九州大学大学院農学研究院

(2009年12月1日受付; 2010年2月23日受理)

Analysis of recombinant protein expression in silk gland using baculovirus expression system

RYOUSUKE KUDOU, JAE-MAN LEE, TAKAHIRO KUSAKABE and YUTAKA KAWAGUCHI

To produce recombinant protein, baculoviral expression system (BES) has been widely used in a laboratory and industry. Previously it was reported that amount of protein expression using BES varies between silkworm tissues, and is apparently low in silk gland that has capability to produce large amount of protein. Therefore, if the level of protein expression in silk gland is increased, the total yield of recombinant protein per silkworm larva can be improved. In this study, to uncover the reason for low recombinant protein expression in silk gland, we have analyzed the efficiency of viral DNA replication, transcription of viral and target mRNAs and expression of target protein in several larval tissues. As a result, low protein expression is related to the level of virus infection, in addition to this, there is a possibility of suppressing target protein transcription. These results suggest that silk gland have the system suppressing gene transcription which is not relevant to synthesis of silk protein.

Key words : Baculoviral expression system, *Bombyx mori*, Silk gland

結 言

バキュロウイルス発現系は組換えタンパク質生産系として広く用いられている (MOTOHASHI et al., 2005)。カイコ個体を用いた場合、あらゆる組織で組換えタンパク質の発現が確認される。しかし、絹糸腺ではその発現量が比較的低くなっている。

(KAWAKAMI et al., 2008)。カイコの5齢幼虫において、絹糸腺では繭を形成する為のフィブロインなどの繭タンパク質が大量に合成される (赤井, 1963)。このように、絹糸腺はタンパク質合成能に特化しているため、絹糸腺において組換えタンパク質の発現が可能になれば、その総生産量の大幅な増加が期待される。

絹糸腺におけるタンパク質発現量の向上を最終的な目標として、本実験では絹糸腺における組換えタンパク質発現量が低い原因を調べた。標的タンパク質として、*HsEPO*、*FcHGF*、*MmWnt3a*の遺伝子をそれぞれ導入した3種類の組換えウイルスを用いて実験を行った。

各ウイルスの感染後4日目のカイコから、脂肪体、精巢、中腸、表皮、絹糸腺、血球を採取し、各組織におけるウイルスの感染度、標的タンパク質の転写レベル、またその発現量について比較、解析を行った。

材料と方法

供試材料：供試蚕は九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター保存のd17 (KAWAKAMI et al., 2008) 系統を用いた。

プライマー：本研究で用いた全プライマーの塩基配列を Table 1 にまとめた。

Table 1. Primer used in this experiment.

Primer	Sequence
EPO/5'	5'-ATGAAGTTATGCATATTACTGGCCGTCGTG-3'
EPO/3'	5'-GGCCTGCAGGACAGGGGACAGAACCTCGAG-3'
HGF/5'	5'-ATGTGGGTGACCAAACCTCTCCAGTCCTG-3'
HGF/3'	5'-ATTAACATATAAGATACCCAGTCGTCGAC-3'
Wnt3a/5'	5'-ATGGCTCCTCTCGGATACCTCTTAGTGCTC-3'
Wnt3a/3'	5'-CTATGACGTGCACACCTGCAAGTCCTCGAG-3'
ie1/5'	5'-GGGTTTAAACGCGTCGTACACCAGTGCTC-3'
ie1/3'	5'-ATCTCAAACAGGATGCTCAAAGATTCCTCG-3'
p10/5'	5'-ATGTCAAAGCCTACCGTTTGACCCCAATT-3'
p10/3'	5'-TTACTTGGAACTGAGTTTACCCAGACGAGC-3'
BmGAPDH/5'	5'-GGCCGATGGCCGTTTGGTGCTCCG-3'
BmGAPDH/3'	5'-GTGGGGCAAGACAGTTTGTGTGCAAGAAG-3'

組換えウイルス：今回の実験では、当研究室既存の組換えウイルス3種を使用した。それぞれ *HsEPO*、*FcHGF*、*MmWnt3a* に HA-tag が結合したタンパク質を発現する。以降、各ウイルスを導入した遺伝子名で表記している。

カイコ各組織の回収：ウイルス接種後4日後のカイコ個体の腹脚を切除し、カイコ体液をチューブに回収した。血清と血球を分離するため、3,000 rpm で5分遠心し、上清を除去した。さらに、カイコの背面を切り開いて解剖し、脂肪体 (FB)、精巢 (TE)、中腸 (MG)、表皮 (EP)、絹糸腺 (SG) を回収した後液体窒素で凍結させた後 -80 °C で保存した。

ゲノム DNA を用いた PCR：各組織を 100 mg 程度ずつ、1.5 ml チューブに移し、ペレットミキサー

* 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Tel, Fax: 092-642-2842

E-mail: kusakabe@agr.kyushu-u.ac.jp

で破碎後 750 μ l の Buffer I (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.25 % SDS, RNaseA 20 μ g/l, protease K 100 μ g/l) を加え, 12 時間 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。その後 14,000 rpm で 10 分間遠心し, 上清を 1.5 ml チューブに移し, フェノール処理, クロロホルム処理後, エタノール沈殿によってゲノム DNA を回収した。このゲノム DNA を用いて, カイコ由来の遺伝子 *BmGAP-DH* について PCR を行い, 鋳型の濃度を均等化した後, ウイルス由来の遺伝子, *ie1*, *p10* 及び各標的遺伝子 (*HsEPO*, *FcHGF*, *MmWnt3a*) について PCR を行った。これによってウイルスの感染度を調べた。

RT-PCR: 各組織 100 mg 程度ずつ, ISOGEN (Nippon gene) 1 ml を加えながらホモジナイズし, その後 0.2 ml クロロホルムを加え, ゆるやかに 15 秒攪拌した。2 分間室温で放置した後, 14,000 rpm で 15 分遠心し, 水相を 1.5 ml チューブに移して 2-プロパノール処理を行い, total RNA を回収した。こうして得られた total RNA を逆転写反応に供試する事により cDNA を合成した。逆転写には逆転写酵素 Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いた。この cDNA を用いて, ゲノム DNA の場合と同様, *BmGAP-DH* について PCR を行い, 鋳型の濃度を均等化した後, 各標的遺伝子 (*HsEPO*, *FcHGF*, *MmWnt3a*) について PCR を行った。これによって標的遺伝子の転写レベルを調べた。

ウエスタンブロッティング: 各組織 100 mg 程度に Buffer II (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP40, 10 mM 2-Mercaptoethanol, Complete tablet, 1 mM PMSF) を 200 μ l 加え超音波によって破碎した後, 14,000 rpm で 10 分遠心し, 上清を回収した。こうして回収したタンパク質を Protein assay buffer (BIO-RAD) によって定量し, ウエスタンブロッティングに用いるサンプルとした。各サンプルと SDS Dye (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% glycerol) を 1:1 で混合後, 15% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。ろ紙と PVDF メンブレン (Immobilon-P) をあらかじめゲルと同じ大きさに切っておき, A 液 (0.3 M Tris, 5% MeOH), B 液 (20 mM Tris, 5% MeOH), C 液 (20 mM Tris, 40 mM 6-アミノカプロン酸, 5% MeOH) にろ紙を各 2, 1, 3 枚, メンブレンを B 液に 30 分以上浸し, タンパク質の電気泳動終了後ろ紙を転写機械 (ATTO) の上に A 液に浸したろ紙を 2 枚, B 液に浸したろ紙 1 枚, メンブレン 1 枚, 泳動後のゲル, C 液に浸したろ紙 3 枚の順に乗せ, 1 時間メンブレンの面積 (cm^2) の 2 倍量の電流値である電流を通電し, メンブレンへの転写を行った。転写後, メンブレンを TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 5 分洗浄する作業を 3 回繰り返した。その後メンブレンをブロッキング溶液 5% のスキムミルク (Wako) をハイブリバック (コスモバイオ) 内で 1 時間ブロッキングを行った。

ブロッキングを行ったメンブレンを TBS-T で 5 分洗浄する作業を 3 回繰り返した。一次抗体 (抗 HA 抗体) を TBS-T で 1,000 倍に希釈したものとメンブレンをハイブリバック内で 1 時間の抗体反応後, 再び TBS-T で 5 分洗浄する作業を 3 回行った。次に二次抗体を TBS-T で 30,000 倍に希釈し, 溶かしたものとメンブレンをハイブリバック内で 1 時間の抗体反応後, TBS-T で 5 分洗浄する作業を 3 回行った。その後 3 ml の Assay Buffer (200 mM $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ pH 9.8, 10 mM MgCl_2) に 3 μ l の CDP-Star (Applied Biosystems) を溶かした反応液とメンブレンをハイブリバックに入れて 5 分振とうした。5 分後ハイブリバックから反応液を出し, メンブレンを密封後, X 線フィルム (FUJI FILM) に露光し現像した。

結果と考察

ゲノム PCR の結果から, 絹糸腺におけるウイルスゲノムの量は他の組織と比較して低くなっている (Fig. 1)。このことから, 絹糸腺ではウイルスの感染度が低いと考えられた。また, そのために, 標的タンパク質の転写レベルも低くなっていることが RT-PCR の結果から考えられた (Fig. 2)。それに加え, ウエスタンブロッティングの結果から, 絹糸腺における標的タンパク質の発現量が低いことが分かる (Fig. 3)。これらのことから絹糸腺における標的タンパク質の低い原因のひとつはウイル

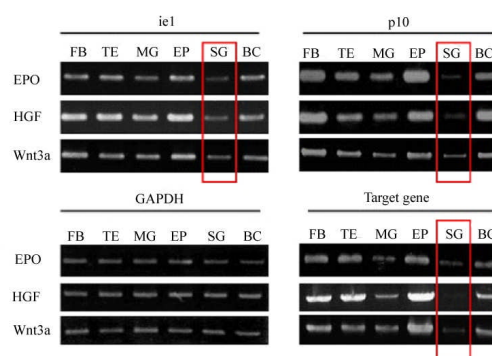


Fig. 1. The level of virus multiplication.

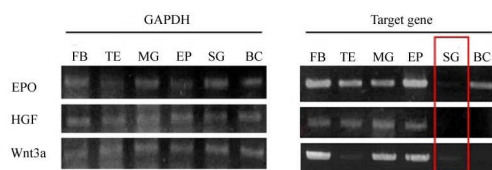


Fig. 2. The transcription level of target gene.

スの感染が弱いためであることが考えられた。加えて、ゲノム PCR と RT-PCR の結果を比較したとき、ウイルス増殖度に対する mRNA の転写量が少ないことから、標的遺伝子には転写抑制がかかっている可能性が示唆された。

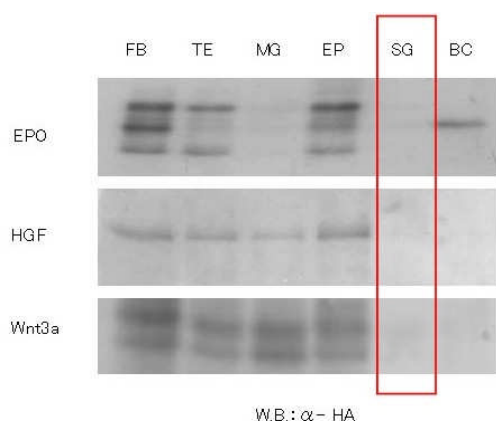


Fig. 3. Each target protein expression level.

本実験で標的タンパク質として EPO, HGF, Wnt3 のいずれを用いた場合でも、絹糸腺においては同様の分析結果が得られた (Fig. 4)。

以上の結果から、絹糸腺では絹タンパク質を大量に発現するため、外部から導入されたウイルスの増殖に必要な遺伝子や標的遺伝子など、その他の遺伝子の転写が抑制されるような機構が存在しているのではないかと考えた。

摘 要

絹糸腺でのタンパク質発現が低い原因として、ウイルスの感染度が低いことと、標的タンパク質に発現抑制がかかっていることが考えられた。また、それがタンパク質の種類によらないと推測さ

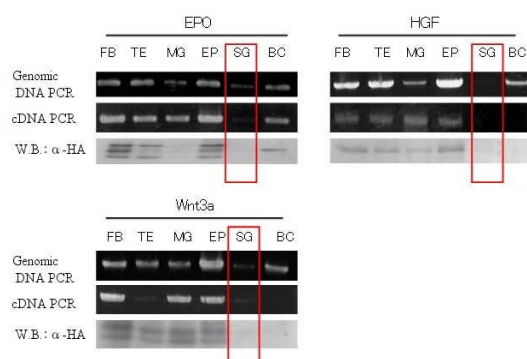


Fig. 4. Analysis result of each protein.

れることから、絹糸腺では繭タンパク質の発現に関係しない遺伝子の転写が抑制されるのではないかと考えた。

文 献

- KAWAKAMI, N., LEE, J.-M., MON, H., KUBO, Y., BANNO, Y., KAWAGUCHI, Y., MAENAKA, K., PARK, E. Y., KOGA, K. and KUSAKABE, T. (2008) Efficient protein expression in *Bombyx mori* larvae of the strain d17 highly sensitive to *B. mori* nucleopolyhedrovirus. *Mol. Biotechnol.*, **40**, 180-185.
- 赤井 弘 (1963) カイコの絹糸腺の腺腔内フィブリンの流動について. *蚕糸試験場報告*, **18**, 191-196.
- MOTOHASHI, T., SHIMOJIMA, T., FUKAGAWA, T., MAENAKA, K. and PARK, E. Y. (2005) Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 564-569.