

GMカイコの医療関連タンパク質生産への 利用と技術の高度化

立松謙一郎*・瀬筒 秀樹

近年、バイオ医薬品（バイオテクノロジーを利用した医薬品）の市場が急速に拡大している。2013年における世界の医薬品の売上高TOP10中、バイオ医薬品が7製品を占め、その売上割合は73.5%と2011年と比較して実に2倍近くに増加している（「出典：セジテム・ストラテジックデータ（株）ユート・ブレン事業部」）。一方、日本の医薬品産業に目を向けると、輸入額が輸出額を大きく上回っているうえに右肩上がりに増加しており、貿易赤字が3兆円近くに上っている（平成25年 厚生労働省「薬事工業生産動態統計調査」より）。このような状況の中、バイオ医薬品などの医療関連タンパク質の新しい生産基材（宿主）として、純国産の技術を用いたGMカイコ（遺伝子組換えカイコ、TGカイコとも呼ばれる）が注目されている。

本稿では、検査薬の生産などではすでに実用化に成功している、GMカイコを用いた医療関連タンパク質の生産技術について、現状と今後の課題や展望を紹介したい。

カイコの特徴

組換え生物としての優れた特性 カイコ (*Bombyx mori*) は約5千年の養蚕の歴史のなかで絶えず品種改良が続けられ、もっとも家畜化された生物の一つである。本来の餌は桑の葉だが、桑葉粉末などを用いた人工飼料も開発されており、通年・無菌飼育も可能である。1世

代は6~7週間であり、孵化してから4回脱皮を行い、もっとも大きい時で約5g（孵化時の1万倍）の5齢幼虫となる（図1）。孵化して約3週間で繭を作り始め、繭の中で蛹となる。その後約2週間で羽化し交尾をした後、産卵する。幼虫、成虫共におとなしく、1000頭/m²程度の高密度での大量飼育が可能である。また、室温で飼育できるため、高額な飼育設備投資が不要であるとともに、環境負荷も小さい。餌は1頭あたり約2円（桑）~20円（人工飼料）ほどで飼育コストも低い。また、カイコは絹糸の生産のためだけでなく、日本では遺伝学や生理学研究に古くから利用されており、実験昆虫としての知見の蓄積がある。また、2009年にゲノム配列が解読されており、他の生物種で用いられる遺伝子工学的実験手法が利用できる。これらのカイコの特徴や知見の蓄積は、カイコを遺伝子組換え生物や、タンパク質発現系として利用する際に非常に有利である。

絹糸腺：タンパク質を大量合成する器官 カイコが作る繭自体の重さは0.2~0.5gであり、繭は約98%がタンパク質から構成されている。カイコは幼虫期に約20gの桑の葉を食べると言われており、カイコ個体を非常に効率的なタンパク質生産工場と見なすことができる。繭を構成するタンパク質（繭糸タンパク質）を合成しているのが、絹糸腺と呼ばれる器官である（図2）。絹糸腺は、繭糸タンパク質を短期間に大量合成・分泌・繊維化するために特化した筒状の器官であり、5齢幼虫では体重の4割を占めるほど大きくなる。絹糸腺細胞の一日あたりのタンパク質合成速度は、培養細胞の100万倍以上とされる¹⁾。絹糸腺は機能的、構造的に前部絹糸腺、中部絹糸腺、後部絹糸腺の3つの部位に分けられる。繭糸繊維の主成分であるフィブロインは後部絹糸腺で合成される。フィブロインは、フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、フィプロヘキサマリンの3種類のタンパク質からなる複合体を形成している。一方、中部絹糸腺では接着の役割を持つ水溶性のセリシンが合成されている。セリシンには、セリシン1~3の3種類があり、それぞれ異なる役割や性質を持っている。繭におけるフィブロインとセリシンの重量比はほぼ3:1であり、タンパク質合成のポテンシャルとしては後部絹糸腺の方が中部絹

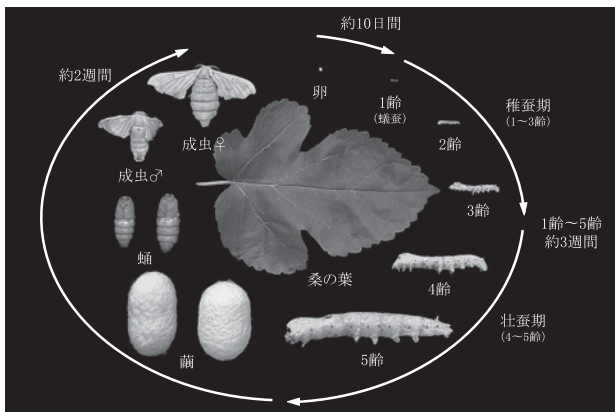


図1. カイコの一生。1世代が6~7週間。幼虫のもっとも大きい時期で6~8cmになる。

* 著者紹介 国立研究開発法人農業生物資源研究所遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット（主任研究員）
E-mail: K.Tatematsu@affrc.go.jp

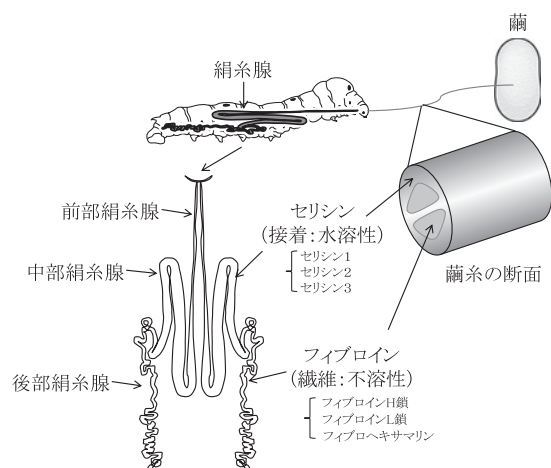


図2. 繅糸および繅糸腺の構造と構成タンパク質。繅糸は繊維成分であるフィブロインタンパク質と接着成分であるセリシタンパク質から構成される。フィブロインは後部繅糸腺で、セリシンは中部繅糸腺で生産される。

糸腺よりも高いと考えられる。

GMカイコによる組換えタンパク質生産系

GMカイコの作出方法 GMカイコの作出技術は、弊所の田村らによって2000年に世界で初めて発表された²⁾。GMカイコ作出の第一工程は、カイコ卵へのベクターDNAの注射である(図3)。カイコの卵は殻が厚く固いため、金属の針で一度穴を開けてから、その穴にガラスキャピラリーを入れてDNA溶液を注入する方法が開発された。発現ベクターをゲノムDNAへ挿入するためには、カイコでは主にpiggyBacというトランスポゾンが用いられている。ゲノムDNAへの挿入に必要な逆方向末端反復配列(inverted terminal repeat: ITR)を両端に配置した発現ベクターと、転移酵素を供給するヘルパーDNAやmRNAをカイコ卵に注射することにより、発現ベクターがカイコ卵の一部の細胞に組み込まれる。この際、生殖細胞に組み込まれれば、次世代で目的遺伝子がすべての細胞に組み込まれたGMカイコとなる。GMカイコを選抜するためには、非侵襲的に識別が可能な遺伝子組換えマーカーを用いることが多い。特に、蛍光タンパク質をカイコの眼や全身、繅糸腺などで発現させる蛍光マーカーがよく用いられているが、これらの蛍光マーカーは、観察のために高額の蛍光顕微鏡が必要であるなどの問題もある。そこで、われわれは、肉眼で判別できる体色マーカー^{3,4)}や薬剤耐性遺伝子であるプラスタジジン耐性遺伝子を用いた薬剤選抜マーカー⁵⁾なども開発している。

組換えタンパク質生産系 GMカイコにおける組換

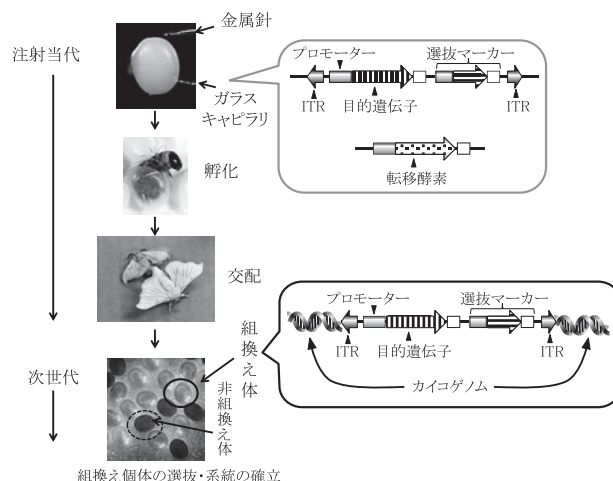


図3. GMカイコの作出法。カイコ卵に金属針とガラスキャピラリーを用いて、DNA溶液などを注入する。この図では、眼で蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換えマーカーを用いている。

えタンパク質生産系では、水溶性のタンパク質であるセリシンを発現している中部繅糸腺が主に用いられている。目的タンパク質をセリシン層へ分泌させることにより、リン酸緩衝液などの温和な条件で溶出が可能になり、活性を保持したまま目的タンパク質を抽出できることが期待されるためである。プロモーターには、3種類のセリシンのうちもっとも発現量の高いセリシン1遺伝子のプロモーターが用いられているが、このプロモーターに目的遺伝子を直接つないだ場合には、発現量が低いことが報告されている⁶⁾。そこで、発現量を上昇させるために、これまでにバイナリー発現系がいくつか開発されており、われわれは、GAL4/UAS (upstream activation sequence) 系を主に利用している(図4)^{6,7)}。この発現系は、酵母の転写因子であるGAL4タンパク質が、GAL4タンパク質の認識配列であるUAS配列の下流に配置した目的遺伝子の発現を活性化する発現系である。GAL4/UAS系の利点は、発現量の上昇が期待されるだけでなく、発現組織の変更が可能であるなど発現系の自由度が高いことに加え、GAL4の非存在下では目的遺伝子が発現しないため、生育に悪影響を及ぼす遺伝子を持つGMカイコの作出も可能であるという点があげられる。セリシン1プロモーターを用いたGAL4/UAS系で、現在では、最大で一頭あたり数mgの目的タンパク質を生産することが可能となっている。目的タンパク質は繅糸腺では液状のセリシン中に存在し、繅では固まったセリシン中に存在するが、どちらからも抽出が可能である。繅は夾雑タンパク質が少なく、長期保存が可能である可能性が高いが、目的タンパク質の性質によっては、繅からの抽出

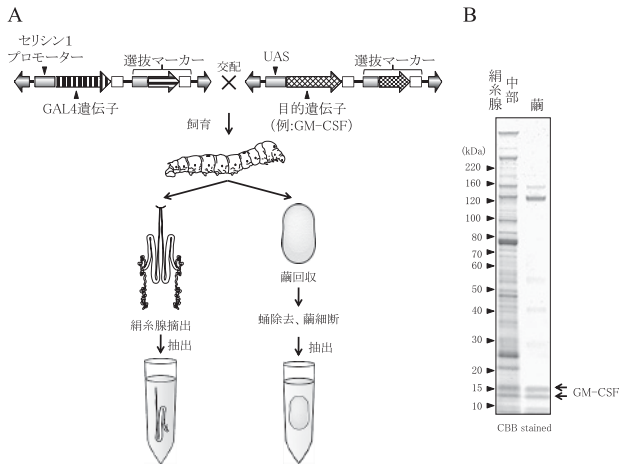


図4. GMカイコにおける組換えタンパク質生産. A. GAL4/UAS系における中部絹糸腺発現系. 組換えタンパク質は、絹糸腺または繭から抽出できる. B. ウシGM-CSFを発現した場合のSDS-PAGE像. 中部絹糸腺および繭抽出液で、GM-CSFのバンドが観察された.

が困難である場合や、カイコが繭を作りにくくなることがあるので、注意が必要である。絹糸腺の摘出は想像されるよりも容易であり、繭を切って蛹と脱皮殻を取り除く操作に要する時間と同程度である。これまでに、この発現系を用いて、抗体や酵素、サイトカインなどさまざまな有用タンパク質を、生理活性を維持したまま生産することに成功している。

GMカイコを用いた医療関連タンパク質の生産

現在、臨床検査薬や化粧品、抗体医薬品、希少疾病用医薬品などのヒト用および動物用医薬品の原料となるタンパク質について、GMカイコによる生産と実用化の研究が産学官連携で進められている。2011年には、われわれと共同研究している民間企業が、GMカイコを用いてヒト由来タンパク質やイヌ由来タンパク質を生産し、体外診断キットの構成成分として上市している。また、GMカイコで生産されたヒトコラーゲンを含む化粧品なども商品化されている。GMカイコによるバイオ医薬品の生産についてはまだ課題が多いが、動物用医薬品については、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構と共同で、ウシ乳房炎に対する新規動物用バイオ医薬品の開発を目指して、GMカイコを用いたウシGM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) の生産を行っている(図4)。ウシ乳房炎は、国内で年間800億円以上の甚大な経済的損失をもたらす細菌感染性の病気である。これまでの研究により、サイトカインの一種であるGM-CSFがウシ乳房炎に対して治療効果を示すことが明らかにされている。そこで、ウシGM-CSF

をGMカイコで生産し、乳房炎発症牛に投与したところ、非常に高い治療効果が得られている。ウシ乳房炎に対しては、抗生物質を使用しない治療法の開発が望まれており、早期の実用化が期待される。また、ヒト用医薬品の開発を目指して、国立医薬品食品衛生研究所などと共同で、GMカイコによる医薬品用抗体の生産や、GMカイコのバンク作成および管理手法に関する要件の明確化、製造される医薬品の品質安全性評価に関する研究を行っている。徳島大学の伊藤らは、GMカイコを用いたヒト難病治療薬(リソソーム病治療薬)の開発を行っている。このほか、臨床検査試薬などを製造・販売している民間企業や研究所とともに、さまざまな医療関連タンパク質をGMカイコで生産する共同研究が進行中である。大腸菌や哺乳類培養細胞では発現が困難だったタンパク質の発現が可能だった例や、他の発現系で生産させると非常に不安定だったタンパク質が、GMカイコで生産した場合には安定であった例などがあり、実用化が期待されている。

技術の高度化

発現系の改良 GMカイコにおける組換えタンパク質生産の実用化推進のため、われわれは絶えず技術開発を続けている。発現量については、現状では絹糸腺の持つタンパク質生産ポテンシャルの数%程度しか活用できていない。ここでは、発現効率上昇のための研究のうち、後部絹糸腺の利用について紹介したい。前述のとおり、現在の発現系では水溶性タンパク質であるセリシンを発現している中部絹糸腺を利用している。後部絹糸腺発現系では、組換えタンパク質をフィブリンH鎖やフィブリンL鎖と融合させることにより、主に組換えシルク(繊維)の形で発現させており、水溶性タンパク質としての発現はほとんど試されてこなかった。これは、後部絹糸腺においては組換えタンパク質単独では細胞からの分泌が難しいとされていたからである。しかし、組換えタンパク質の合成能力は後部絹糸腺の方が高いと予想される。そこで、発現組織の変更が容易であるというGAL4/UAS系の特徴を生かして、後部絹糸腺で、非融合型の組換えタンパク質の発現を試したところ、後部絹糸腺でも組換えタンパク質が効率良く発現、分泌することが明らかになり、発現効率も中部絹糸腺の約2倍を示した⁸⁾。現在、中部絹糸腺と後部絹糸腺の同時発現も可能になっている。

近年、急速に発展しているZFN (zinc finger nuclease) やTALEN (transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic

repeat) /Cas9といった、ゲノム編集と呼ばれる技術が、カイコでも利用可能であることが明らかにされている⁹⁾。中でもカイコではTALENによる遺伝子ノックアウトの効率が非常に高く、現在多数の遺伝子ノックアウト系統が作出されている。一方、遺伝子ノックインはカイコにおいては成功例が少なく、技術的なブレイクスルーが求められていた。最近、TALENとマイクロホモロジー媒介末端結合を利用したTAL-PITCh (precise integration into target chromosome) 法により、カイコでも遺伝子ノックインが正確かつ高効率に行われることが明らかになった¹⁰⁾。今後、これらの方法を用いて、発現量の高い遺伝子のプロモーターやゲノム領域に目的遺伝子を挿入することができれば、GMカイコでの組換えタンパク質発現量が飛躍的に上昇することが期待される。

糖鎖修飾の改変 タンパク質の糖鎖修飾は、生理活性や安定性に関与しており、バイオ医薬品の場合には体内動態や免疫原性にも関わるため、非常に重要な翻訳後修飾である。これまでに、大阪大学の藤山らや(株)免疫生物研究所の富田らの解析により、カイコ絹糸腺は、昆虫でよく見られる糖鎖修飾であるパウチマンノース型の糖鎖ではなく、非還元末端がN-アセチルグルコサミンのN結合型糖鎖を付加するポテンシャルを持ち、フコースの付加は非常に少ないことが明らかにされつつある(図5)。国立医薬品食品衛生研究所の川崎らとの共同研究により、カイコで抗CD20抗体を生産し、糖鎖構造および活性を解析したところ、フコースの付加が少なく、

CHO細胞で生産した抗体と比較して、抗体依存性細胞障害活性が著しく高いことが明らかになっている。また、われわれは農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の助成を受けて、大阪大学の藤山らと共同で、GMカイコにより生産される組換えタンパク質の糖鎖修飾をよりヒト型に改変する研究を行っている。

今後の課題と展望

今後の課題としては、上であげた糖鎖修飾の改変や発現効率の上昇に加え、GMカイコの大量飼育システムの構築が必須であると考えられる。群馬県では、2010年から県内の養蚕農家で構成された前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合により、県の施設を利用したGMカイコの受託飼育を開始している。その規模は年々増加しており、医薬関連タンパク質生産への活用が期待される。今後、ゲノム解析技術の飛躍的な発展により、患者個人のゲノム情報を基にしたオーダーメイド医薬品や、いまだ医療ニーズが十分に満たされていない希少疾患に対する医薬品など、少量多品目のバイオ医薬品の需要が高まっていくと予想される。GMカイコはこのようなバイオ医薬品の生産に対応できる高いポテンシャルを持っており、良い生産基材となるだろう。

2014年に富岡製糸場と絹産業遺産群が世界遺産に登録され、養蚕業が注目されている。日本の一時代の発展を支えてきた養蚕業とその技術を、伝統や遺産で終わらせずに生きた産業として発展させていくためにも、GMカイコによる医療関連タンパク質生産の実用化を拡大していきたい。

文 献

- 1) Florian, M. W.: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 34 (2003).
- 2) Tamura, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **18**, 81 (2000).
- 3) Kobayashi, I. *et al.*: *J. Insect Biotechnol. Sericology*, **76**, 145 (2007).
- 4) Osanai-Futahashi, M. *et al.*: *Nat. Commun.*, **3**, 1295 (2012).
- 5) 立松謙一郎ら：蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 講演要旨集, p. 29 (2011).
- 6) Tatematsu, K. *et al.*: *Transgenic Res.*, **19**, 473 (2010).
- 7) Tatematsu, K. *et al.*: *Springer Plus*, **3**, 136 (2014).
- 8) 立松謙一郎ら：蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 講演要旨集, p. 54 (2013).
- 9) Daimon, T. *et al.*: *Dev. Growth Differ.*, **56**, 14 (2014).
- 10) Nakade, S. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 5560 (2014).

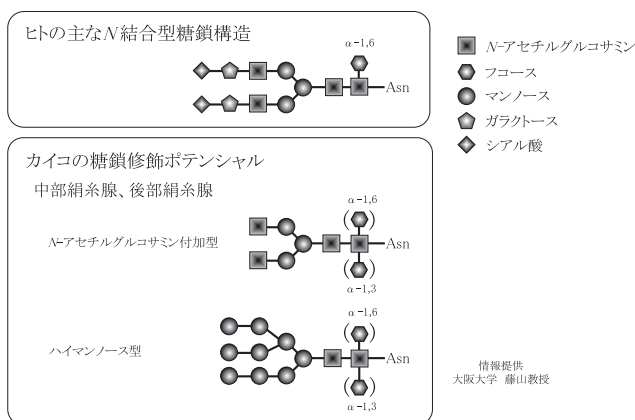


図5. カイコ絹糸腺の糖鎖修飾. カイコ絹糸腺では、非還元末端がN-アセチルグルコサミンのコンプレックス型糖鎖を付加するポテンシャルがある。