

〈特集：カイコによるタンパク質生産と産業化〉

## 遺伝子組換えカイコ繭でのタンパク質生産

富田 正浩

### Protein production in transgenic silkworm cocoons

Masahiro Tomita

**Summary** Increasing needs exist to produce useful proteins in recombinant technologies. Various host cell/vector systems were developed, but it is still difficult to efficiently produce large proteins with complex structures. As a result of breeding for several thousand years, the silkworm has acquired the ability to synthesize bulk amounts of silk proteins. To utilize this capacity for mass production of useful proteins, transgenic silkworms were generated that synthesized recombinant proteins in the silk gland and secreted them into the silk cocoon. Using the transgenic silkworm system, various proteins including antibodies, collagen, fibrinogen and influenza hemagglutinin were successfully produced, and are being developed as materials for diagnostic reagents, cosmetics, or animal/human therapeutic products. Thus, transgenic silkworms are promising tools for producing recombinant proteins at industrial scales. By relying on the knowledge accumulated over thousands of years of sericulture, the implementation of low-cost and high-yield protein production using transgenic silkworms should be straightforward.

**Key words:** Transgenic silkworm, Silk gland, Antibody, Collagen, Fibrinogen, Vaccine

#### I. はじめに

様々な有用タンパク質が遺伝子組換え技術を用いて生産されている。特に、医薬品の分野では、病原体の感染源となるヒト血液や動物組織を医薬品タンパク質の供給源とすることを止め、より安全性の高い遺伝子組換え技術による生産が用いられる場合が多い。医薬品タンパク質の多くは、CHO細胞等の哺乳動物細胞を宿主とし

て利用する系にて生産されている。哺乳動物細胞では、複雑な構造および翻訳後修飾を必要とするタンパク質でも生産でき、既に多くの実績があることから規制の面からもバイオ医薬品の生産に適する。しかし、培養タンク等の巨額な設備投資に加え、高価な培養液が必要となるため生産コストは高い。一方、大腸菌や酵母などの微生物を宿主とした生産系では、複雑な構造のタンパク質の生産は難しいが、低コストでの

株式会社免疫生物研究所  
遺伝子組換えカイコ事業部  
〒375-0005 群馬県藤岡市中1091-1

Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.  
Transgenic Silkworm Department  
1091-1 Naka, Fujioka-Shi, Gunma 375-0005, Japan

高効率生産が可能である。従って、構造が比較的単純であり、かつ高い生産性が求められるタンパク質の生産には、これら微生物が宿主として選択される。このように、生産するタンパク質の構造や用途等に応じて、適切な生産系が選択されるが、複雑な構造のタンパク質を低コストで生産できるケースは少ない。

カイコは、数千年の長い養蚕の歴史の中で、繭を大きくする方向で品種改良が繰り返されてきた生き物である。その結果、カイコには、一頭あたり0.2~0.5 gの絹タンパク質の塊を短時間で生産する能力が付与された。カイコのもつ、この優れた絹タンパク質合成能力を利用して、有用タンパク質を繭の中に分泌させれば、低コストで大量のタンパク質を生産することが可能である。カイコの繭は、フィブロインやセリシンなどのごく限られた種類のタンパク質により構成されている。そのため、繭からの組換えタンパク質の精製が容易である。さらに、生産したタンパク質に、ヒトに感染性のある病原体や動物由来のタンパク質等が混入する危険性が低いこと、ライフサイクルが短く、小規模な飼育設備で多くの個体を飼育できるため、短期間にスケールアップができること、カイコは成虫になっても飛ぶことができないため組換え生物の管理が容易であること、など様々な利点を有している。カイコへの遺伝子導入については、piggyBacと呼ばれているDNA型トランスポゾ

ンをベクターとして用いる方法が確立されており、絹タンパク質を合成する組織である絹糸腺で組換えタンパク質を発現させることにより、繭の中へ組換えタンパク質を分泌させることが可能となっている<sup>2)</sup>。

## Ⅱ. 中部絹糸腺におけるタンパク質発現

絹タンパク質は、約75%がフィブロイン、残りの約25%がセリシンにより構成されている。絹タンパク質を合成する絹糸腺は後部絹糸腺、中部絹糸腺および前部絹糸腺より成り、フィブロインは後部絹糸腺で、セリシンは中部絹糸腺で、それぞれ特異的に合成・分泌される(図1A)。後部絹糸腺から分泌されたフィブロインは、徐々に中部絹糸腺へと送られ、そこで分泌されたセリシンによって周りが被覆され、さらに前部絹糸腺へと送られ絹糸として吐糸される。吐糸された絹糸において、フィブロインは糸の中心に、セリシンは、フィブロインの周りを取り巻くように存在する(図1B)。フィブロインは、難溶性の繊維構造を形成するのに対し、セリシンは親水性の糊状構造を形成する。

遺伝子組換えカイコにおいて、組換えタンパク質の発現組織をコントロールすることにより、発現したタンパク質を絹糸中心のフィブロイン繊維内、または外側のセリシン層に局在させることが可能である。すなわち、フィブロインな

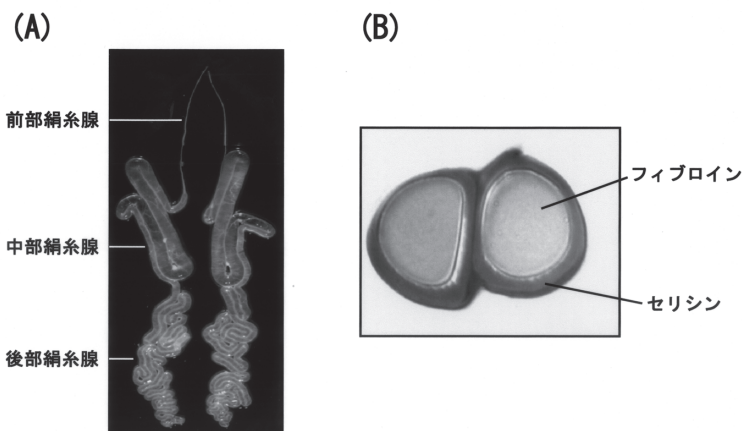


図1 絹糸腺と絹糸の構造  
(A) 絹糸腺の構造。  
(B) 絹糸の構造。絹糸の横断切片をAzure-Bで染色した。

どのプロモーターを用いて後部絹糸腺で発現させることにより、組換えタンパク質をフィブロイン繊維へ、セリシンなどのプロモーターを用いて中部絹糸腺で発現させることにより、セリシン層へ局在させることができる。フィブロインに局在させた組換えタンパク質は、フィブロインの結晶構造中に安定に保持される。従って、後部絹糸腺での発現は、絹糸から組換えタンパク質を単離する目的には向かないが、絹繊維の物理的性質などの改変や、フィブロインから新しいバイオマテリアルを作り出す目的には有用である<sup>3)</sup>。一方、中部絹糸腺でタンパク質を発現させた場合、親水性のセリシン層に局在した組換えタンパク質を容易に抽出することができるため、タンパク質の回収という面では大変都合が良い。抽出に中性緩衝液などを用いると、緩衝液中にセリシン自体が溶け出さないため、組換えタンパク質を優先的に抽出することができ、その後の精製を極めて容易に行うことができる。従って、医薬品原料となる有用タンパク質等を生産する場合は、中部絹糸腺で発現させセリシン層に局在させるタンパク質生産系が有効である。セリシンプロモーターに、プロモーター活性を増強するエンハンサーや転写調節因子の遺伝子を組み合わせることにより、多量の組換えタンパク質をセリシン層に分泌させる技術が開発されている<sup>4)</sup>。この生産系を用いて、抗体 (IgG)<sup>5)</sup>、コラーゲン (ゼラチン)<sup>6)</sup>、アルブミン<sup>7)</sup>、各種サイトカインや成長因子類など、様々な組換えタンパク質の生産が可能である。これら生産したタンパク質を、研究用試薬・診断用医薬品原料、化粧品原料、および医薬品原料として活用する試みが進められている。

### Ⅲ. 研究用試薬・診断用医薬品原料としての抗体の生産

抗体は、抗原と特異的に結合する性質を持つことから、特定の物質を検出するために有用であり、研究用試薬・診断用医薬品の原料として用いられている。また、元来、体内における生体防御反応において中心的役割を担っているタンパク質であり、体外で抗体を生産して体内に戻す、いわゆる抗体医薬品は、副作用の少ない

医薬品として爆発的に市場を拡大している。この様に、抗体 (特にモノクローナル抗体) は、様々な産業分野において利用されており、組換え技術により安価に生産することが求められている。以上の背景から、筆者らは、遺伝子組換えカイコによるモノクローナル抗体生産系の開発を進めてきた。以下、マウス抗体 (IgG) を生産した場合の結果を記す。

マウスIgGのL鎖およびH鎖を、それぞれ単独に発現する遺伝子組換えカイコを作製した。次に、これらを交配することにより、中部絹糸腺でL鎖およびH鎖の両方を合成するカイコを得て繭を作らせた。繭のタンパク質を解析した結果、IgGのL鎖およびH鎖の両方を、絹糸のセリシン層から検出することができた。中性緩衝液または低濃度の尿素溶液にてタンパク質を抽出し、非還元条件で電気泳動を行ったところ、L鎖2分子とH鎖2分子からなる四量体を形成したIgG分子が認められた。驚いたことに、抽出液中には、L鎖単量体、またはH鎖の単量体や二量体などの不完全な分子は含まれず、ほとんどが完全な四量体として存在していた。繭から抽出したIgGの抗原結合性を調べたところ、組換えIgGは、天然型と同一の抗原結合活性を有しており、また抗原特異性も一致していることが確認された<sup>5)</sup>。発現量は、一繭あたり最大3~4mgであり、低コストでの大量生産が可能であることが確認されている。

研究用試薬・診断用医薬品の原料として用いられるモノクローナル抗体のうち、多量に、かつ安価に生産する必要があるものについては、ハイブリドーマをマウス腹腔内に注射し腹水から回収する方法によって生産されることが多い。しかし、この生産系にはいくつかの問題が存在する。生きたマウスの腹腔内で細胞を増殖させ、炎症の結果として生じる腹水から抗体を回収するため、抗体価などの重要な品質に関してロット間差が生じる。さらに近年では、動物福祉の観点からの問題も提起されている。海外、特にヨーロッパでは、マウス腹水による抗体生産そのものを制限する動きが活発化しており、ドイツ、スイス、オランダ、および北欧諸国では、既にマウスによる抗体生産が禁止されている。このように、マウス腹水生産法の問題点を克服する新規の抗体生産系が必要とされているが、

遺伝子組換えカイコの生産系は、その候補として有望である。カイコを用いると、マウス腹水法と同等のコストで多量の抗体が生産でき、ロット間差の問題が解決できる。カイコ生産系では、抗体遺伝子が染色体内に安定的に組み込まれている遺伝的に均一な遺伝子組換えカイコ集団が用いられる。そのため、生産される抗体の品質は極めて安定しており、ロット間差がとても少ない。さらに、抗体は、プロテアーゼ等が含まれない繭に生産させるため、繭の保存や抗体の精製工程においても品質に差異が生じない。カイコは昆虫であり動物愛護の対象外であるため、マウス腹水生産法で懸念されている動物福祉の問題も完全に解決できる。

遺伝子組換えカイコの抗体生産系では、ハイブリドーマから取り出した抗体遺伝子をカイコに組み込む工程が必要なため、その工程で抗体遺伝子を加工して、抗体の性能を改善することも可能である。抗体によるヒト検体の診断における問題点の一つとして、検体に含まれるHAMA (Human Anti-Mouse Antibody) などの異

好性抗体により引き起こされる非特異反応がある<sup>8)</sup>。HAMAはある割合(数%~数十%)でヒト血清中に存在するマウス抗体を認識するヒト抗体である。HAMAを含む血清を検体として、例えば、二種類のマウスモノクローナル抗体を固相抗体と標識抗体として用いているELISA系に添加した場合、HAMAが固相抗体と標識抗体をブリッジさせてしまうことにより、抗原が存在しなくても高い非特異反応が出る場合がある(図2A)。このような非特異反応を抑える方法はいくつか存在するが、反応系に使う抗体にHAMAが結合しないような改良を加えるのが効率的である。HAMAの多くは、マウス抗体の定常領域を認識する。従って、例えば、定常領域をヒト抗体のものに変換したキメラ抗体を用いればHAMAの反応を大きく低減できる。トランスジェニックカイコでキメラ抗体を生産し、これを用いてHAMAの反応性を測定したモデル実験の結果を図2Bに示した。キメラ抗体を用いることで、HAMAによる非特異反応は約1/30にまで低減している。

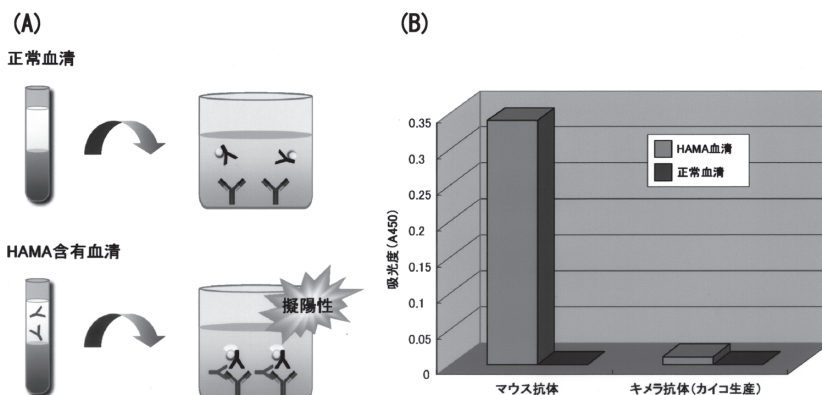


図2 キメラ抗体によるHAMA非特異反応の低減  
 (A) HAMA非特異反応による擬陽性の出現。ELISA系において、検体にHAMA (Human Anti-Mouse Antibody) が存在すると、抗原が存在しなくても、固相抗体と標識抗体がHAMAによりブリッジされ擬陽性反応が生じる。  
 (B) カイコ生産キメラ抗体によるHAMA非特異反応の低減。マウスIgG可変領域とヒトIgG定常領域を融合したキメラ抗体の遺伝子を作製し、これをトランスジェニックカイコで発現させることにより組換えキメラ抗体を生産した。キメラ抗体を固相化し、検体を反応させた後、抗原の異なる標識抗体により反応を検出するモデル実験を行った。マウス抗体を固相抗体として用いた場合、正常血清では全く反応が認められないが、HAMA含有血清では高い非特異反応が確認された。カイコで生産したキメラ抗体を用いると、HAMAによる非特異反応は約1/30に低下した。



#### Ⅳ. ヒトコラーゲンの生産

コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する代表的タンパク質であり、生体のタンパク質の約1/3を占める程多量に存在する。特に真皮、腱、骨等には高い割合で存在し、これらの組織や器官の構造を維持する機能を担っている。また、細胞にとっては、その足場となるタンパク質であり、細胞の移動、増殖、分化等を制御する機能を有している。コラーゲンの中でもⅠ型コラーゲンなどの線維性コラーゲンは、安価に入手でき、ゲル、スポンジやシートなど様々な形状に加工することができるため扱いやすい。そのため、Ⅰ型コラーゲンは、化粧品や医療の分野で様々な用途に利用されている。水分を保持する能力が高いため、化粧品分野では保湿剤として使われている。生体内での安定性が高く、組織に馴染みやすいため、医療分野では、組織修復剤や、皸取りまたは尿失禁治療用の注入剤として用いられている。このような広範な用途に利用されているコラーゲンは、従来は、ほとんどがウシの真皮由来であった。ところが、近年、ウシ由来のコラーゲンから、ウシ海綿状脳症(BSE)の病原体であり、ヒトに感染した場合クロイツフェルト・ヤコブ病を引き起こす異常プリオンが混入する危険性が指摘され、その使用量は大きく減少した。化粧品業界では、動物由来のコラーゲンはほとんど利用されなくなり、現在ではサケやサメなどの魚の皮膚や鱗から精製したコラーゲンが使われている。

異種動物由来のタンパク質がヒトの体内に入ると、タンパク質が非自己として認識され、アレルギー反応を引き起こすアレルゲンになる場合がある。コラーゲンは、一般的にアレルゲンになり難いタンパク質といわれているが、ウシコラーゲンをヒト体内に注入すると、約3%にアレルギー反応が起きることが知られている<sup>9)</sup>。また、魚食物アレルギーの約30%は、魚のコラーゲンが原因であるとの報告もある<sup>10)</sup>。

筆者らは、抗原性が低い安全なヒトコラーゲンを世の中に提供したいと考え、カイコにヒトⅠ型コラーゲンの $\alpha 1(I)$ 鎖の遺伝子を組み込み、ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖を中部絹糸腺で合成し繭に分泌する遺伝子組換えカイコを作製した。 $\alpha$ 鎖が会合して三重らせん構造を形成するためには、 $\alpha$ 鎖内のプロリン残基が水酸化される必要があるが、カイコの絹糸腺には、この反応に必要な酵素がほとんど存在しない<sup>11)</sup>。そのため、プロリン残基の水酸化は起こらず、細胞内で合成された $\alpha$ 鎖は変性状態のまま繭に分泌された<sup>6)</sup>。変性状態であり、コラーゲン特有の三重らせん構造は形成されなかったが、分子量が均一であるため品質管理が容易であり、また、中性溶液に対して可溶性であるメリットもある。また、一繭あたりの発現量は約10 mgと生産性は高い。

カイコで生産したヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖のヒトに対する低アレルギー性を検証するため、以下の実験を行った。かつて、ゼラチン(ウシⅠ型コラーゲン変性産物)を安定化剤として含む麻疹、おたふくかぜ、風疹、水痘ワクチンを

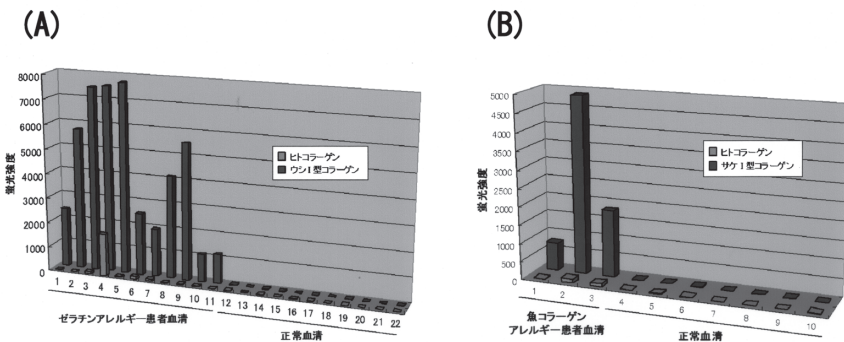


図3 コラーゲンアレルギー患者IgEとヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖の反応性  
 (A) ウシゼラチンアレルギー患者IgEとカイコ生産ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖の反応性  
 (B) 魚コラーゲン食物アレルギー患者IgEとカイコ生産ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖の反応性



図4 カイコで生産したネオシルク®-ヒトコラーゲンI

接種した子供について、100万接種あたり4～19人の割合で、アナフィラキシーショックが発生している<sup>13)</sup>。今回の実験では、このアナフィラキシーショックを起こした患者の血清に含まれるIgEと、ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖の反応性を調査した。ゼラチンアレルギー患者血清11検体と、正常血清11検体を、それぞれヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖およびウシI型コラーゲンと反応させ、結合したIgE抗体の検出を行った。その結果、ゼラチンアレルギー患者血清に含まれるIgEはウシI型コラーゲンには強く反応したが、ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖に対しては、No. 4の1検体を除き、ほとんど反応しなかった(図3A)。

同様に、魚コラーゲンアレルギー患者由来IgEとの反応性も調べた。上記のとおり、魚コラーゲンは、魚食物アレルギーの原因となることが知られている。魚コラーゲンに対して食物アレルギーを起こした患者の血清(魚コラーゲンアレルギー患者血清)3検体と、正常血清7検体を、それぞれヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖およびサケI型コラーゲンと反応させ、結合したIgE抗体を検出した。結果、魚コラーゲンアレルギー患者血清に含まれるIgEはサケI型コラーゲンに対して強く反応したが、ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖には、ほとんど反応しないことが明らかとなった(図3B)。以上の実験結果は、カイコで生産したヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖の低アレルギー性を直接的に証明するものではない。しかしながら、ヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖は、ウシコラーゲンや魚コラーゲンにアレルギーを起こした患者に対

しても、ほとんどアレルギー反応を引き起こさない安全なコラーゲンであるといつてよいであろう。

カイコで生産したヒトコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖は、優れた保湿作用を有するため、化粧品の保湿剤としての開発が進められている。現在、化粧品原料として用いられているコラーゲンは、主に、魚の皮膚やうろこから抽出されたコラーゲン、または、その加水分解物である。化粧品として用いるコラーゲンには、必ずしも三重らせん構造を有することは求められないため、カイコで生産したコラーゲン $\alpha$ 鎖も、「コラーゲン」として使用することが可能である。ヒトI型コラーゲンの遺伝子から生産された「ヒト型コラーゲン」であり、上記のとおり、アレルギー反応を引き起こす危険が低い安心・安全なコラーゲンである。既に、国際表示名称(INCI名)の取得も完了しており(INCI名: Transgenic Silkworm rh-Polypeptide 47)、「ネオシルク®-ヒトコラーゲンI」という商品名の新規化粧品原料として、製造および販売活動が始まっている(図4)。

#### V. 糖鎖構造と抗体医薬生産の可能性

抗体(IgG)の定常領域にはN結合型糖鎖が存在し、この糖鎖の構造が抗体のエフェクター活性や血中半減期に影響を及ぼすことが知られている。また、IgGを抗体医薬品として用いる場合、抗原性の観点からも糖鎖の構造は重要とな

ってくる。そこで、筆者らは、遺伝子組換えカイコにて生産したIgGの糖鎖構造について解析を行った。一般的に、哺乳動物の糖タンパク質には、図5に記載した複合型と呼ばれる構造の糖鎖が付加されている。IgGの場合、非還元末端にシアル酸を有した糖鎖はほとんど存在せず、 $\beta$ ガラクトース若しくはNアセチルグルコサミンを末端に有する糖鎖が大部分を占める。また、糖鎖基部のNアセチルグルコサミンには、 $\alpha$ 1,6結合をしたフコース ( $\alpha$ 1,6フコース) が認められる。一方、一般的にカイコを含む昆虫では、複合型糖鎖は合成されず、パウチマンノース型と呼ばれる短い糖鎖が合成されることが知られている<sup>13)</sup>。また、昆虫の糖鎖の基部には、 $\alpha$ 1,6フコースのみならず、 $\alpha$ 1,3結合をしたフコース ( $\alpha$ 1,3フコース) が存在するが、体内に投与することを考えた場合、深刻な問題を提起する。 $\alpha$ 1,3フコースは、昆虫や植物には存在するが、哺乳動物には存在しない糖であるため抗原性を

有し、体内に投与した場合にアレルギー反応を引き起こす危険がある。

遺伝子組換えカイコで生産させたIgGの糖鎖を解析したところ、驚いたことに、これらの結果とは大きく異なることが明らかとなった<sup>9)</sup>。パウチマンノース型糖鎖はほとんど認められず、末端にNアセチルグルコサミンを有する複合型糖鎖が一定量検出された。さらに、基部には $\alpha$ 1,3フコースおよび $\alpha$ 1,6フコースの両方を検出することができなかった(図5)。その後の解析の結果、このような糖鎖構造の特異性は、絹糸腺の組織特異性に起因していることが判明した。絹糸腺以外のカイコの組織では、基部にフコースを有したパウチマンノース型糖鎖が検出されるのに対し、絹糸腺、または絹糸腺から分泌された繭の糖タンパク質には、フコースが無い複合型糖鎖が存在し、パウチマンノース型糖鎖はほとんど検出されない。

以上のように、遺伝子組換えカイコの絹糸腺

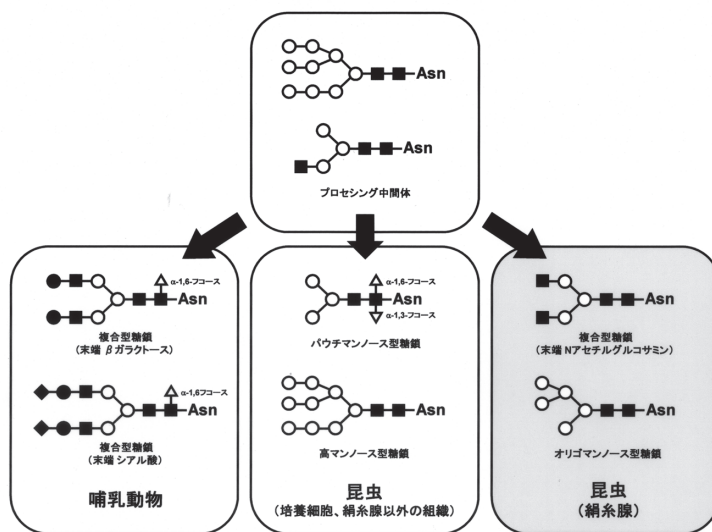


図5 哺乳動物および昆虫のN結合型糖鎖の構造

哺乳動物および昆虫のN結合型糖鎖は、共通のプロセッシング中間体から生成される。哺乳動物のN結合型糖鎖の主な構造は、非還元末端が $\beta$ ガラクトースやシアル酸である複合型であり、基部のNアセチルグルコサミンに $\alpha$ -1,6フコースを有する。培養昆虫細胞や脂肪体などの昆虫の組織においては、主にパウチマンノース型や高マンノース型糖鎖が存在することが報告されている。基部のNアセチルグルコサミンには、 $\alpha$ -1,6フコースに加え $\alpha$ -1,3フコースも検出される。一方、昆虫の絹糸腺においては、主要な糖鎖の構造は、非還元末端がNアセチルグルコサミンである複合型、およびオリゴマンノース型の糖鎖である。 $\alpha$ -1,6フコースおよび $\alpha$ -1,3フコースの両方ともほとんど検出されない。

■: Nアセチルグルコサミン、○: マンノース、●:  $\beta$ ガラクトース、◆: シアル酸、△: フコース

で発現させたIgGの糖鎖にはパウチマンノース型は含まれず、末端にNアセチルグルコサミンを有する複合型糖鎖が一定量存在する。まだ伸張が不十分ではあるが、哺乳動物で生産したIgGの糖鎖構造に近い構造である。カイコで生産した抗体を抗体医薬として実用化するためには、糖鎖を哺乳動物型化する改良が必須であるが、このような改良において、遺伝子組換えカイコは大変有利である。Nアセチルグルコサミンにさらにβガラクトースを転移させる改良を行えば、糖鎖の哺乳動物型化に大きく前進することになる。糖鎖の基部にフコースが存在しないという特性も、医薬品としての実用化を考える上で大変有利に働く。抗原性があるためアレルギー反応を引き起こす危険があるα1,3フコースが存在しないことは、言うまでも無く大きな利点である。また、1,6フコースが存在しないことにより、カイコ生産抗体の付加価値がさらに高まる可能性がある。哺乳動物において通常付加されるα1,6フコースを除去することで、抗体の有する抗体依存性細胞障害活性が飛躍的に高まることが知られている<sup>14)</sup>。遺伝子組換えカイコによる抗体生産系は、高い抗腫瘍活性を有する抗体医薬品等の生産に適しているかもしれない。

## VI. その他の医薬品タンパク質の生産

### 1. フィブリノゲン

フィブリノゲンは血液凝固因子の一つであり、糊状になって血液を固まらせことで直接的に止血反応にかかわるタンパク質である。先天性の低フィブリノゲン血漿の治療に加え、産科出血や重傷外傷、および外科的治療などに伴う出血に対する止血剤として使用されてきた。原料はヒトの血液であり、かつてはウイルスの不活化処理が不十分であったために、B型やC型肝炎の感染源となる事故が多数発生した。現在では、確実なウイルス不活化処理が施されるようになってはいるが、より安全性の高い生産系の開発が強く望まれている。そのため、酵母や哺乳動物細胞を用いた組換えフィブリノゲン生産系の開発が試みられてきたが、未だ実用化レベルの高効率生産系の開発に成功した例はない。そこで、遺伝子組換えカイコによりフィブリノゲン

の生産を試みた。フィブリノゲンは、Aα、Bβおよびγの三種類のサブユニットが、それぞれ2分子ずつ会合した六量体構造を形成している分子量350kの巨大なタンパク質である。これら三種類のサブユニットの遺伝子を組み込んだカイコを作製したところ、繭から三種類のサブユニットから成る六量体分子が多量に検出された。抗体の場合と同様に、各サブユニットの単量体等は検出されず、正しい高次構造を形成した分子のみが繭に分泌されていることが判った。生産量は1頭あたり約1mgであり、生産性は比較的高い。トロンピンを作用させることにより凝固する性質を有していることも確認された。

一般に、分子量が大きく、複雑な構造を有するタンパク質は組換え技術での生産が難しい。一方、カイコの絹糸腺は、元々フィブリンやセリシンといった高分子量のタンパク質を合成する器官であるためと考えられるが、高分子量の組換えタンパク質を多量に生産する傾向にある。フィブリノゲンの発現成功は、この傾向を顕著に示した例といえる。現在のフィブリノゲン製剤がヒト血液を原料としている状況において、安全性の高い組換え型フィブリノゲンを効率良く生産できる遺伝子組換えカイコへの期待が高まっている。

### 2. インフルエンザワクチン

現在、インフルエンザワクチンは、インフルエンザウイルス株を発育鶏卵に接種し、増殖したウイルスを回収して不活化することにより製造されているが、株によってはウイルスの増殖効率が低く、十分量のワクチン原料が得られない場合がある。また、鶏卵由来のアレルゲンが混入する危険性があるなどの問題もある。そのため、発育鶏卵の代わりに、培養細胞を用いてウイルスを増殖させる細胞培養法や、ウイルスの表面抗原であるヘマグルチニン(HA)等を組換えタンパク質として生産して、サブユニットワクチンとして使用する方法などが開発されている。サブユニットワクチンを生産する宿主として、培養昆虫細胞が優れているとされており、バキュロウイルスベクターを用いて昆虫培養細胞にて生産した組換えHAの治験が進められている<sup>15)</sup>。

筆者らは、サブユニットワクチンとしての実



用化を目指し、カイコを宿主とした組換えHAの生産を試みている。パンデミック (H1N1) 2009のHA遺伝子をカイコに組み込むこととし、繭からHAを分泌させるために、C末端側の膜貫通ドメインをコードする配列を取り除いた分泌型HA (sHA) の遺伝子を作製し、これをカイコに組み込んだ。また、HAの三量体構造の形成を促すため、膜貫通ドメインの代わりにT4ファージフィブリチン由来の三量体化ドメイン (Foldon) を付加したHA (sHA-Foldon) 遺伝子も作製し、同様にカイコに組み込んだ。作製された遺伝子組換えカイコの繭において、sHAまたはsHA-Foldonの生産が確認できたため、これらを精製してマウスに接種し、免疫応答能を確認する実験を行った。sHAまたはsHA-Foldonを接種したマウスから血清を回収し、赤血球凝集阻害アッセイにより、マウスにおいて産生された抗HA抗体の抗体価を求めた。その結果、sHAおよびsHA-Foldonともに、高い免疫誘導能を有することが示され、ワクチンとしての有用性が確認された (図6)。現在、強毒性鳥インフルエンザ (H5N1) についても同様の実験を行っているが、組換えHAを高発現する遺伝子組換えカイコの作出に成功している。

HAに限らず、繭に生産された組換えタンパク質は、あたかも保護剤を加えて凍結乾燥されて

いるかのように、繭の中で非常に安定に保存できる。また、繭にはタンパク質を分解するプロテアーゼが含まれないため、抽出の際にタンパク質が分解されることもない。そのため、長期間タンパク質を保存するために、繭は大変都合が良い。遺伝子組換えカイコを作製し、タンパク質を生産するまでには6ヶ月以上の期間が必要であるため、全く新しいウイルス株のワクチンを短期間で生産することは難しいかもしれないが、予め流行が予測されるウイルス株については、組換えカイコを作製し、繭を生産・保存しておけば、迅速なワクチン製造・供給体制を構築することが可能である。

## VII. おわりに

現在までに、様々な組換えタンパク質生産系が開発されているが、全てのタンパク質を高効率に生産できる万能な生産系は存在しない。そのため、目的とするタンパク質に適した生産系を選択することが重要となる。遺伝子組換え技術を用いて製造されるタンパク質製品が激増する中、哺乳動物の糖鎖構造に近い構造の糖鎖が付加でき、フィブリノゲンのように構造が複雑な高分子量タンパク質も生産できる遺伝子組換えカイコの実験系は、宿主の選択肢として検討

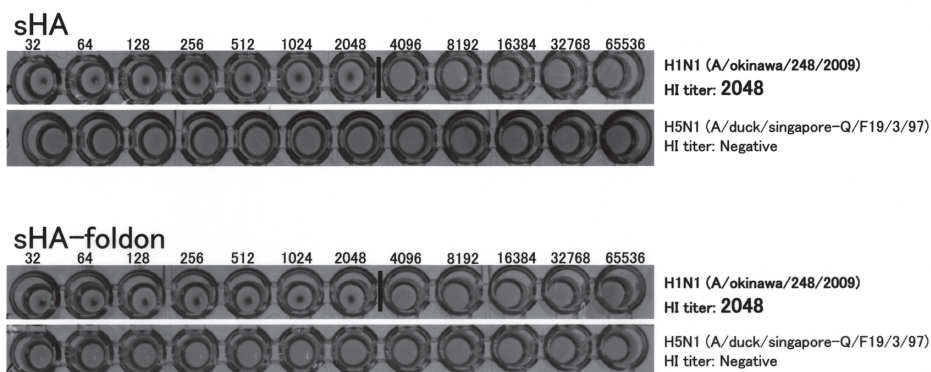


図6 カイコ生産HAの免疫誘導能  
パンデミック (H1N1) 2009のHA遺伝子をカイコに組み込むことにより生産した分泌型HA (sHA) と三量体化ドメインを付加したHA (sHA-Foldon) を、それぞれ30 $\mu$ gずつマウスに免疫し、14日後および21日後に追加免疫を行った。28日後に採決し血清を分離した後、赤血球凝集阻害アッセイにより、産生誘導された抗HA抗体の抗体価を求めた。抗体はH5N1ウイルスに対しては反応しなかったが、H1N1ウイルスに対しては高い反応性をもつことが確認された。

される機会が増すと予想される。生産されたタンパク質は、既に実用化されている研究用試薬・診断用医薬品や化粧品の原料だけでなく、今後は、動物用やヒト用治療薬の原料としても開発が進むであろう。

遺伝子組換えカイコを用いた有用タンパク質生産は、絹糸を生産することを目的とした養蚕業のノウハウをベースとし、これに遺伝子組換えという新しい技術を組み入れたテクノロジーである。養蚕業は、かつては我が国の基幹産業であったが、現在は、中国やブラジルからの安価な絹の流入により、国内全域で壊滅的な状況に陥っている。遺伝子組換えカイコの技術により、新しい形態の養蚕業を復活させ、欧米には存在しない新産業が創出されることを期待する。

#### 文献

- 1) T Tamura, et al.: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol*, 18: 81, 2000.
- 2) M Tomita, et al.: Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*, 21: 52, 2003.
- 3) R Hino, et al.: The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 27: 5715, 2006.
- 4) M Tomita, et al.: A germline transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon. *Transgenic Res*, 16: 449, 2007,
- 5) M Iizuka, et al.: Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS J*, 276: 5806, 2009.
- 6) T Adachi, et al.: Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 106: 860, 2010.
- 7) S Ogawa, et al.: Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *J Biotechnol*, 128: 531, 2007.
- 8) LJ Kricka: Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem*, 45: 942, 1999.
- 9) L Cooperman and D Michaeli: The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*, 10: 638, 1984.
- 10) M Sakaguchi, et al.: IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 579, 2000.
- 11) T Adachi, et al.: Synthesis of prolyl 4-hydroxylase alpha subunit and type IV collagen in hemocytic granular cells of silkworm, *Bombyx mori*: Involvement of type IV collagen in self-defense reaction and metamorphosis. *Matrix Biol*, 24: 136, 2005.
- 12) M Sakaguchi, et al.: IgE reactivity to alpha1 and alpha2 chains of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 695, 1999.
- 13) PC Kulakosky, et al.: N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology*, 8: 741, 1998.
- 14) T Shinkawa, et al.: The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*, 278: 3466, 2003.
- 15) MM Cox and YJ Hashimoto: A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *Invertebr Pathol*, 107(Suppl): S31, 2011.