

〈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の拡散防止措置を執った 大量飼育技術の開発

桑原 伸夫、池田 真琴、清水 健二、鹿沼 敦子、伊藤 寛

### Development of mass rearing techniques for transgenic silkworm containment measures

Nobuo Kuwabara, Makoto Ikeda, Kenji Shimizu, Kanuma Atsuko and Ito Hiroshi

**Summary** By means of genetic engineering techniques, transgenic silkworms were generated to produce useful recombinant proteins. In the transgenic silkworm system, recombinant proteins are produced into cocoons. To commercialize the production of such high-value-added cocoons, transgenic silkworms were improved by crossbreeding with silkworm moths which had been used commercially by silk-raising farmers. We also developed techniques for the rearing of transgenic silkworms and their containment measures by using existing facilities and instruments. Consequently, commercial rearing of transgenic silkworms was started by silk-raising farmers.

**Key words:** *Bombyx mori*, Transgenic silkworm, Useful recombinant protein, Containment measures, Commercialization

#### I. はじめに

外国からの安価な輸入品の増大による国産の繭と生糸の価格低迷により養蚕業は厳しい状況におかれている。群馬県の養蚕は、畑作地帯の基幹作物として農家の収入源の大きな位置を占めてきた。繭生産量は全国第1位を続けていて、日本一の養蚕県である。今後、養蚕業の振興を図るには、安価な外国産と差別化された付加価値の高い繭生産による繭の価格向上が必要である。

カイコでは、2000年に独立行政法人農業生物

資源研究所（茨城県つくば市）で遺伝子導入法が世界で初めて開発され、本来カイコが持っていない遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコの作出が可能となった<sup>1)</sup>。この技術を用いれば、有用な遺伝子を導入するだけで、これまでの交配による品種育成では不可能であった新たな特徴を有する画期的なカイコが作出できる。このため、有用タンパク質や今までにない機能を持った絹糸を生産する遺伝子組換えカイコの開発が進められている<sup>2),3)</sup>。群馬県では養蚕業の維持や新しいカイコ産業の創出を目指して、繭の高付加価値化が期待できる遺伝子組換えカイコの実

群馬県蚕糸技術センター  
〒371-0852 群馬県前橋市総社町総社2326-2

Gunma Sericultural Technology Center  
2326-2 Soja Soja-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-0852, Japan

用化を推進している。

遺伝子組換えカイコの作出には、繭が小さく、生産性の低い実験系統が使われていて、作出された遺伝子組換えカイコをそのまま実用飼育に移すことができない。また、遺伝子組換えカイコは遺伝子組換え生物にあたることから、野生動植物等へ影響を与えないよう管理するための「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下、「カルタヘナ法」という）に適合した取扱いが求められる。カルタヘナ法には、実験室内などの外界と隔離された施設内で拡散防止措置を執って行なう第二種使用等と、屋外など外界と隔離されていないところで拡散防止措置を執ら行なう第一種使用等がある。このため、農家で飼育している実用蚕品種との交配による遺伝子組換えカイコの改良、既存の施設や器具を利用した遺伝子組換えカイコの飼育と拡散防止措置（第二種使用等）の検討を進めてきた。これにより、遺伝子組換えカイコの実用飼育が可能となったので報告する。

## II. 遺伝子組換えカイコによる有用タンパク質生産

遺伝子組換えカイコを用いた有用タンパク質の生産では、カイコが本来持っている絹糸腺の高いタンパク質生産能力を利用する。絹糸腺は繭糸の原料となる液状絹を合成・分泌する器官である。前部、中部、後部の3つの部分に分け

られ、後部絹糸腺からフィブロイン、中部絹糸腺からセリシンが分泌される。

株式会社免疫生物研究所（群馬県藤岡市）では、抗体等の有用タンパク質を産生する遺伝子組換えカイコを開発し、その事業化を進めている。これまでに、中部絹糸腺細胞で多量の導入遺伝子のタンパク質を発現させることが可能なベクターを作製し、繭糸のセリシン部分に有用タンパク質を分泌する遺伝子組換えカイコを作出している。セリシン部分に分泌された有用タンパク質は、繭から蛹を取り除いた繭層を抽出液中で攪拌するなどの処理により簡単に抽出可能である。また、抽出液中には、繭糸タンパク質の混入がないため、有用タンパク質の精製も非常に容易となる。

## III. 遺伝子組換えカイコの実用性の向上

遺伝子組換えカイコを利用した有用タンパク質生産の実用化を図るため、株式会社免疫生物研究所との共同研究を実施した。企業所有の体外診断薬用の抗体を生産する遺伝子組換えカイコを飼育したところ、実験系統のために繭が小さくてカイコ一頭当たりの生産性が低く、さらに大量飼育が難しいなどの問題点が認められ、直ちに実用飼育に利用することは困難であった。そこで、農家で飼育している実用蚕品種との交配による遺伝子組換えカイコの改良を試みた。当センターで育成した交雑種「ぐんま200」は、群馬県独自のオリジナル蚕品種として、県

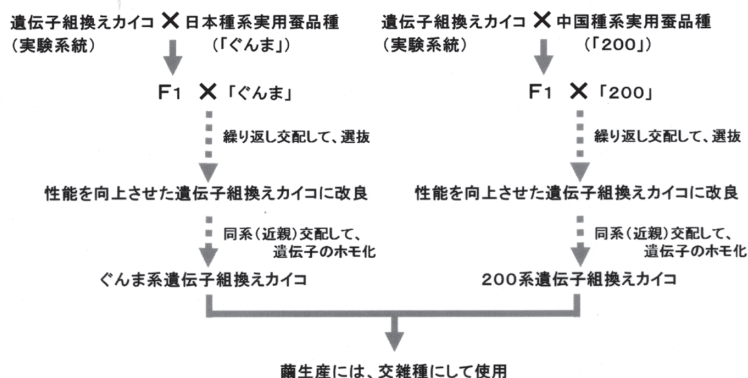


図1 遺伝子組換えカイコの交配による実用性の改良

内の養蚕農家で糸繭生産のために飼育されている。この蚕品種の原種である日本種「ぐんま」または中国種「200」<sup>4)</sup>との交配と選抜を繰り返して、丈夫で飼育しやすく、目的とする有用タンパク質の収量を格段に高めた「ぐんま系遺伝子組換えカイコ」と「200系遺伝子組換えカイコ」の改良に成功した(図1)。有用タンパク質を得るための繭生産には、この改良した遺伝子組換えカイコを交雑種にして使用する。

改良した遺伝子組換えカイコの交雑種(以下、「改良遺伝子組換えカイコ」という)は、元の遺伝子組換えカイコに比べて、幼虫や繭は大きくなり、繭層重を重くすることができた(図2)。改良遺伝子組換えカイコ繭1粒あたりに含まれる有用タンパク質量を調査した結果、生産する抗体は2.5~3.0倍の収量の向上が認められ、実用的に利用可能な遺伝子組換えカイコであった。

#### IV. 遺伝子組換えカイコの拡散防止措置を執った全齢人工飼料育による繭生産技術の開発

遺伝子組換えカイコの飼育においては、カルタヘナ法に適合した取扱いが求められる。遺伝子組換えカイコの場合、カイコの祖先と考えられている野外の桑にいるクワコとの交雑による遺伝子組換え生物の拡散が指摘されるため、拡散防止措置を執った第二種使用等で取扱われてきた。

カイコは人工飼料による飼育も可能で、有用タンパク質生産には、桑の収穫に関係なく通年飼育できる全齢人工飼料育が有効である。遺伝子組換えカイコを農家が安心して飼育できるようにするため、養蚕農家に普及している稚蚕人工飼料育装置を活用し、全齢人工飼料育と繭生産が可能となる装置への改良を行った。稚蚕人工飼料育装置は、人工飼料により稚蚕期(1齢~3齢)を飼育するための装置である。加温・冷却機能と加湿・除湿機能を備え、稚蚕期の飼育に適した環境(温度27~30℃、湿度40~90%)のコントロールが可能である。この装置で全齢人工飼料育を行う場合、壮蚕期(4齢~5齢)の温湿度管理は十分に可能と考えられる。課題は、カイコが大きく成長する壮蚕人工飼料育とその後の繭生産方法であった。そこで、飼育容器は軽くするために稚蚕用の半分のサイズに取



図2 改良した遺伝子組換えカイコの交雑種(左)と元の組換えカイコ(右)の繭

り替え、飼育容器を置く棚間隔を広く改善した。さらに、繭生産のために飼育容器専用の波型箔を作製した。

また、全齢人工飼料育による安定した繭生産には、飼育環境のコントロールと同時に給餌などの飼育作業を的確に実施する必要がある。このため、改良遺伝子組換えカイコについて、各齢期の給餌量や飼育経過に応じた作業内容を定めた飼育標準表を作成した。

遺伝子組換えカイコを飼育する場合、廃棄物の中に遺伝子組換えカイコの混入する可能性が考えられる。第二種使用等で求められる拡散防止措置を執るためには、遺伝子組換えカイコを殺虫する不活化処理をしないと屋外に廃棄することができない。このことから、飼育室内での簡単に便利な廃棄物の不活化処理の手段として、フリーザー(-20℃)での凍結により遺伝子組換えカイコを確実に殺虫できることを明らかにした。

次に、有用タンパク質の抽出には、汚れのない繭層を使用するため、生産した遺伝子組換えカイコ繭から蛹を取り除いた繭層の汚れた部分を除去して出荷するまでの繭層調整技術を確立した。これにより、有用タンパク質を抽出するための高品質な繭層の出荷が可能となった。

以上のような成果に基づき、全齢人工飼料育装置(最大2.4万頭飼育)における拡散防止措置を執った飼育マニュアルが作成できた。このマニュアルは、作業従事者の使いやすさに重点を置き、毎日の作業内容を写真入りで詳細に解説

した。

作成した飼育マニュアルに従い、改良遺伝子組換えカイコの飼育試験を実施した。稚蚕期は防乾紙折りたたみ育（図3）、壮蚕期および繭生産はネットで被覆してアルミフレームで固定（図4、図5）することで、飼育容器からの遺伝子組換えカイコの逃亡あるいは散逸防止が図れた。全齢人工飼料育装置内は目的の温湿度をコントロールすることができ、計画した作業内容のと通りの飼育が可能であった。

#### V. 遺伝子組換えカイコを利用した有用タンパク質生産の実用化

遺伝子組換えカイコの飼育は、拡散防止のための取扱いや施設整備が必要となることから、養蚕農家への技術指導を目的に当センター内の施設で実用飼育を開始することにした。施設は、

窓を閉め切りとし、換気扇や排水口などの昆虫の出入り可能な箇所は網を張って塞ぐことにより遺伝子組換えカイコの飼育施設として整備した。

拡散防止措置を執った全齢人工飼料育による繭生産技術の開発や飼育施設の整備により、改良遺伝子組換えカイコの実用飼育を開始するため、カルタヘナ法に基づく産業利用第二種使用の申請を行い、2010年3月に経済産業大臣から使用の確認を得た。また、遺伝子組換えカイコの飼育を希望する養蚕農家を対象に、開発した拡散防止措置を執った全齢人工飼料育法の研修会を実施し、飼育取扱い方法の農家への普及を図った。この研修に参加した農家を構成員とする「前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合」が組織され、遺伝子組換えカイコの実用飼育に関する体制が整った。

これにより、株式会社免疫生物研究所から繭

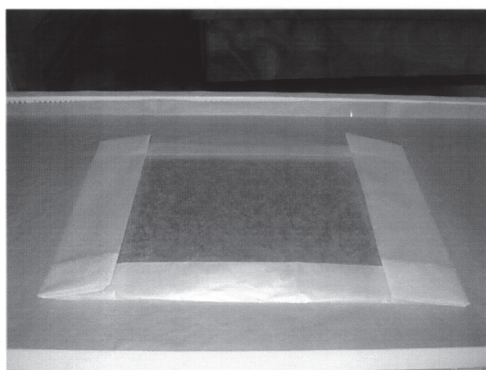


図3 稚蚕期の飼育

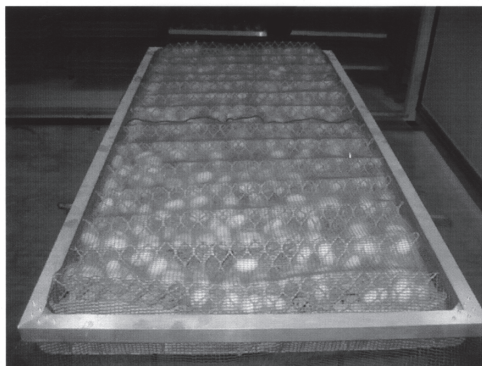


図5 繭生産

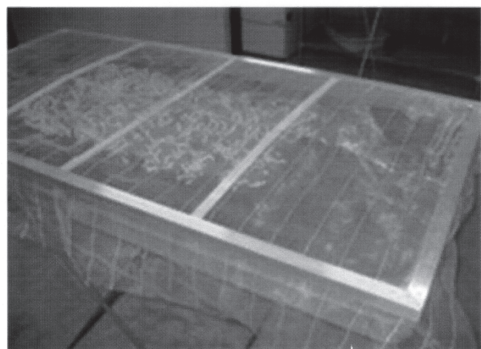


図4 壮蚕期の飼育



図6 農家による遺伝子組換えカイコの実用飼育の様子



生産を委託された飼育組合の農家による改良遺伝子組換えカイコ3,000頭の実用飼育を2010年11月に開始した(図6)。産業利用の大臣確認を得た当センター内の施設において、改良遺伝子組換えカイコの飼育から繭生産を行って、繭から蛹を取り除いた繭層が出荷された。株式会社免疫生物研究所では、この繭層を用いて、抗体抽出・精製方法、および精製した抗体を製品化するための検討が行われた。翌年度は24,000頭、翌々年度は48,000頭が飼育され、体外診断薬の原料となる抗体の繭から抽出・精製が開始された。

## VI. 稚蚕共同飼育所を利用した 遺伝子組換えカイコの飼育



図7 稚蚕共同飼育所での壮蚕飼育の様子



図8 稚蚕共同飼育所での繭生産の様子  
繭を作る際には、繭を作る場所を求めて移動が活発となるため、網で覆って容器からの逃亡あるいは散逸を防止する。

稚蚕共同飼育所は、養蚕農家で飼育する前の稚蚕期を人工飼料で飼育する機械化された施設である。カイコを載せた容器が高密度で収納されるので施設を効率的に使用でき、自動循環するので飼育作業も軽減できる。また、防疫上外界と隔離された施設となっているため、拡散防止措置が執りやすい構造となっている。

今後の飼育場所の確保や飼育量の拡大に対応するため、養蚕現場での遺伝子組換えカイコ飼育施設として稚蚕共同飼育所の利用を検討した。稚蚕専用の施設であるため、稚蚕期の飼育は問題ないが、狭い棚間隔での壮蚕飼育と繭生産に対応した技術開発が必要となる。そこで、全齢人工飼料育による繭生産(非遺伝子組換えカイコを使用)を行い、拡散防止措置を執った全齢人工飼料育技術や繭生産方法を開発して、この施設でのカルタヘナ法第二種使用申請に向けた飼育マニュアルを完成させた。

この成果に基づき、飼育組合が当センター施設で飼育してきた改良遺伝子組換えカイコについて、稚蚕共同飼育所での産業利用第二種使用申請を行い、2014年1月に経済産業大臣から使用の確認を得た。これにより、株式会社免疫生物研究所から繭生産を委託された飼育組合による改良遺伝子組換えカイコ30,000頭の稚蚕共同飼育所での実用飼育を2014年2月に開始した(図7、図8)。飼育成績は、当センター施設での飼育と同様に良好となり、優良繭が生産された。

稚蚕共同飼育所での遺伝子組換えカイコの飼育に関しては、1回に10万頭規模の最大飼育技術を確立している。しかし、施設は最大30万頭の飼育が可能であり、作業方法等の改善によりさらなる大量飼育技術を開発する予定である。

## VII. おわりに

株式会社免疫生物研究所の有する遺伝子組換えカイコを用いた有用タンパク質に関する技術開発力と、当センターの有する蚕品種育成と飼育に関する技術力を結集することにより、体外診断薬用の抗体を高レベルで生産する遺伝子組換えカイコが開発できた。さらに、養蚕農家からなる遺伝子組換えカイコ飼育組合への技術移転により実用飼育が開始され、従来の糸繭生産ではない有用タンパク質生産という新たなカイ

コ産業の創出に向けた一步を踏み出すことができた。

現段階では利用可能な遺伝子組換えカイコが少ないため、養蚕現場での大量飼育が期待できる新たな遺伝子組換えカイコの開発を進めている。今後、遺伝子組換えカイコによる新たなカイコ産業が大いに発展するために遺伝子組換えカイコが次々と実用化されることを期待している。

#### 文献

- 1) Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Kômoto N, Thomas J-L, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme J-C and Couble P: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derive vector. *Nature Biotechnol*, 18: 81-84, 2000.
- 2) Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T and Yoshizato K: Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnol*, 21: 52-56, 2003.
- 3) 田村俊樹, 飯塚哲也, 瀬筒秀樹, 立松謙一郎, 小林功, 米村真之, 内野恵郎, 小島 桂, 町井博明, 高林千幸, 山田勝成, 栗原宏征, 朝倉哲郎, 中澤靖元, 宮脇敦史, 唐澤智司, 小林初美, 山口純次, 桑原伸夫, 中村 敬, 吉井 圭: 遺伝子組換えカイコによる蛍光色を持つ高機能絹糸の開発. *農林水産研究ジャーナル*, 32: 7-10, 2009.
- 4) 農林水産省: ぐんま200及びその交雑種. 蚕の新品種, 技術資料第131号: 11-12, 1996.