

〈特集：カイコによるタンパク質生産と産業化〉

## カイコ/バキュロウイルス系によるタンパク質生産と産業利用

宇佐美 昭宏

### Protein production and applications by use of silkworm/Baculovirus expression system

Akihiro Usami

**Summary** The robust high expression system using silkworm/Baculovirus was developed about 30 years ago. We expressed many proteins using the silkworm/Baculovirus expression system during that period. We studied and came to understand the characteristics of this system. We especially compared the silkworm with insect cell lines, such as Sf-9 cell. Through these studies, we discovered several new uses for the silkworm system. We review here such contrasting characteristics between silkworm and Sf-9 cell by expression using 45 kinds of proteins, the advantages of using silkworm in industry, and some examples of applications. There are areas where this technology can be further improved as shown at the end. We consider that the technology can be used in various industries.

**Key words:** Baculovirus, Silkworm, Expression, Sf-9, Protein

#### I. はじめに

バキュロウイルスを用いたタンパク質の発現系は、開発されて30年近くが経過し、その技術についてはすでに一般的である。この技術の基礎は1983年にM.D. Summers<sup>1)</sup>らによって開発されたが、用いた発現系は*Autographa californica* NPV (AcNPV) とSF21AE細胞との組合せであり、昆虫の培養細胞技術を用いている。しかし、そのほぼ同じ時期の1984年に前田進博士ら<sup>2)</sup>は、カイコに感染する*Bombyx mori* NPV (BmNPV)

を用いて、カイコの幼虫にh-IFN $\alpha$ を生産させている。産業利用の視点では、このバキュロウイルス技術は共に、遺伝子組換えウイルスを使用する事や、昆虫細胞やカイコ自身の取扱の不慣れさ、さらに、製造工程の品質管理やバリデーションの実施例が少ないなどの点から、製品の生産系として取り組む企業数は少なかった。

一方、(独)農業生物資源研究所の田村俊樹博士らのチームが、2000年にカイコへの遺伝子組換え技術を完成させ、組換えウイルスを使わない、トランスジェニックカイコによるタンパ

シスメックス株式会社  
技術開発本部 要素技術開発第二部  
〒350-1332 埼玉県狭山市下奥富1548番地

Sysmex Corporation,  
Technology Development,  
Elemental Technology Development 2,  
1548 Shimo-okudomi, Sayama-City, Saitama 350-1332,  
Japan

ク質の生産系を紹介した<sup>4)5)6)</sup>。

この両者の技術は、産業化の視点からは異なるメリットもあるため、産業分野の要求仕様に応じて選択すれば良いと考えている。そして、現在では、昆虫細胞やカイコ自身の取扱要件も徐々に明らかとなり、カイコを用いた具体的な医薬品や診断薬などへの産業利用が徐々に加速しようとしている。

本報ではその中で、カイコ/バキュロウイルス系を用いたタンパク質生産系に絞り、欧米での主流である昆虫細胞培養/バキュロウイルス系と

比較しながら、その生産系の特徴と、産業化での期待効果と可能性等について解説したい。

## II. タンパク質生産宿主としての カイコ蛹の特徴

カイコ幼虫の特徴は、本特集の遺伝子組換えカイコ技術の紹介に記載されていると思うので、ここでは、カイコ/バキュロウイルス系で良く用いられる蛹の特徴を、下記にまとめた。

①カイコの蛹は消化器官が退縮し、そのプロテ

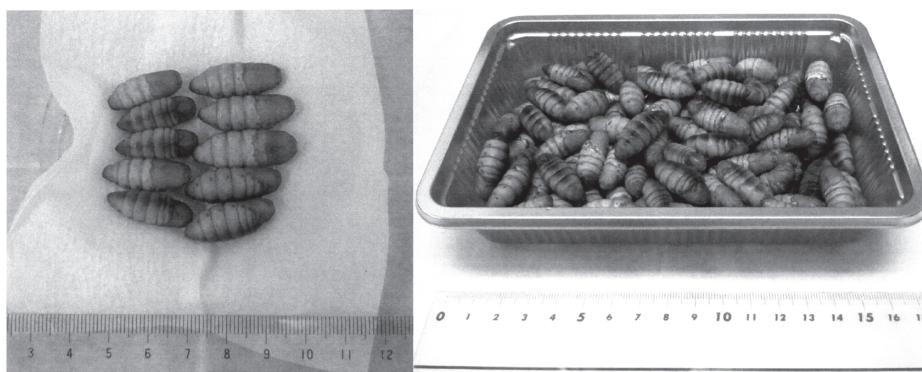


図1 カイコの蛹

蛋白質の生産量は、シャーレ1枚（写真左：蛹10匹）で、昆虫培養細胞の2リットルジャー（培養液1200 ml）に相当。

弁当箱程度のトレー1枚（写真右：蛹100匹）で、20リットルジャー（培養液12リットル）に相当。

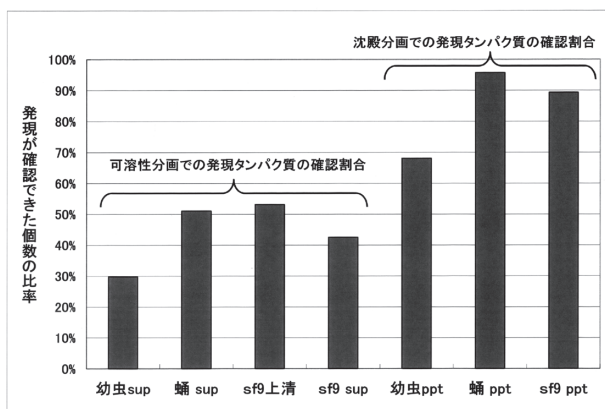


図2 上清（可溶性）・沈殿を区別した場合の、宿主別の組換え蛋白質発現の確認率の違い。

幼虫はサイトカインのみ体液中の発現確認を実施、他の種類は幼虫粉碎後の可溶分画と沈殿分画に分けて発現タンパク質の存在を確認、Sf-9上清は培地中の発現タンパク質を確認、sf-9の可溶分画と沈殿分画は培養細胞を濾過・粉碎後の発現タンパク質の存在を確認。

アーゼ活性がほとんど無いため、蛹全体を磨砕しても損耗なく目的タンパク質を回収できる。

② 蛹はバキュロウイルスへの感受性が高く、同一重量では昆虫細胞培養系（培地含む）と比較して、幼虫は1000分の1、蛹は100万分の1以下のウイルス量で感染可能。従ってタンパク質生産に資する組換えウイルス量の大幅な低減が可能。

③ 蛹は4-10℃の環境下で、成長を停止したまま2ヶ月程度保存可能。生産工程のタイミングの柔軟性が高い。

この様に蛹は1匹1匹が高密度培養装置に相当し、ごくわずかな飼育スペースの確保のみで目的のタンパク質量を確保できるため（図1）、多額の設備投資が不要である。

### Ⅲ. カイコ/バキュロウイルス系によるタンパク質生産の特徴

まず、カイコ/バキュロウイルスのタンパク質生産系の特徴をつかむために、同類のバキュロウイルスの発現系である昆虫細胞培養系（Sf-9）との比較結果を示す<sup>78)</sup>。

具体的には、発現させるタンパク質の種類を、サイトカイン（8種）、GPCR（8種）、転写関連因子（8種）、キナーゼ（6種）、プロテアーゼ（8種）、その他タンパク質（7種）の6種類に分類し、その分類別に分子量が極力分散する様に発現タンパク質を選択し（表1）、この計45種類のタンパク質を各々昆虫細胞培養系（Sf-9細胞）、カイコ幼虫、蛹の3種類の異なる宿主で発現させ、その発現量を調査した。

なお、今回の比較の目的は、産業化を意識したものであるため、実際に取り扱う状態の重量を同程度として、幼虫1匹：約5g\*、蛹1匹：約1.7g、培養細胞(Sf-9)：培地含め2mL（細胞数1×10<sup>6</sup>個/ml）当たりの生産量を比較した。

[\*タンパク質生産と無関係の腸内の餌（約2g）と絹糸腺（約1.2g）を除くと幼虫1匹≒2g弱]

#### 1. 高い発現成功率

まず、沈殿も含めてタンパク質発現の有無を見ると、カイコであってもSf-9細胞であっても45種類のうち90%程度のタンパク質の発現を確認できた（図2の蛹ppt、Sf-9ppt参照）。大腸菌では、そもそも発現の確認率が60~70%と言わ

れており、発現の成功率が高い事がわかる。

さらに、カイコや昆虫細胞を粉砕し、超遠心分離を1時間行い発現タンパク質を可溶性分画と沈殿分画に分けると、蛹とSf-9の両者で約50%のタンパク質が、活性が期待される可用性タンパク質として得られる事がわかる（図2の蛹sup、Sf-9上清参照）。ただし、GPCR（8種）や、その他のタンパク質に含まれるトランスポーター（2種）などの膜タンパク質は、活性型であっても超遠心処理によって沈殿分画となるため、活性型として発現しているタンパク質の

表1 発現比較試験に使用したタンパク質サイトカイン（8種）、GPCR（8種）、転写関連因子（8種）、キナーゼ（6種）、プロテアーゼ（8種）、その他（7種）、合計45種類

タンパク質分類	局在生	タンパク質名	分子量 (K Da)	
サイトカイン	分泌	WNT-3APROTEIN PRECURSOR	50.5	
		PLG	102.1	
		FGF1	31.8	
		DKK2	40.6	
		IGFBP6	37.8	
		FIGF	51.5	
		FGF7	36.1	
		mouse IFN-beta	32.4	
		IL8RB	54.4	
		GPCR	膜結合	HTR2A
LGR6	113.2			
CD97	90.6			
GPR39	64.6			
GPBAR1	51.1			
GPR125	138.4			
GPCR177	92.9			
ATF4	53.4			
TCF4	88.1			
転写関連因子	核内			L3MBTL2
		GRHL2	83.5	
		L3MBTL2	83.3	
		ZNF233	88.5	
		ZNF31	129.5	
		ASB6	61.1	
		細胞質内	DDR2	106.3
	MLTK		64.8	
	MAP2K3		49.8	
	キナーゼ	細胞質内	ERN2	121.9
SPHK1			57.0	
STK33			73.6	
SEN6			136.3	
DPPⅢ			49.6	
Caspase-1			59.2	
Caspase-3			45.2	
Chymase			39.9	
MMP1			63.9	
プロテアーゼ			細胞質内	ADAM12
	SPPL2A	69.0		
	SLC7A14	99.6		
	分泌	SLCIA2	76.9	
		MYST2	82.0	
		XPGC	114.7	
		PDE4C	93.1	
		UGDH	58.6	
		膜結合	SERPINB6	46.3
			その他	
その他	トランスポーター	SLCIA2	76.9	
		SLCIA2	76.9	
	一般酵素	核内	MYST2	82.0
		細胞質内	XPGC	114.7
その他	細胞質内	PDE4C	93.1	
	細胞室内	UGDH	58.6	

比率は、さらに多いと思われる。また、沈殿物として発現したタンパク質であっても、プロモータの変更やタグを付ける事などの対策によって、可溶性タンパク質として得られる比率をさらに高める事はできる。

2. 高い生産性

活性が期待できる可用性タンパク質の生産量を、Sf-9と蛹、及び蛹と幼虫とで比較したのが

図3である。まず、Sf-9と蛹とで比較すると、両者ではほぼ同量得られる1倍線近傍のタンパク質も2~3見られるが、蛹の方が100倍程度の量を得られるタンパク質が多く、カイコ蛹の生産性の高さがわかる。全体の発現量の倍率の平均値は約60倍であり、蛹1匹が、Sf-9細胞の培養液約120 mlから得られる発現量に相当する。ただし、この結果を見て分かる通り、発現タンパク質の種類によって発現量も倍率も大きく異なる

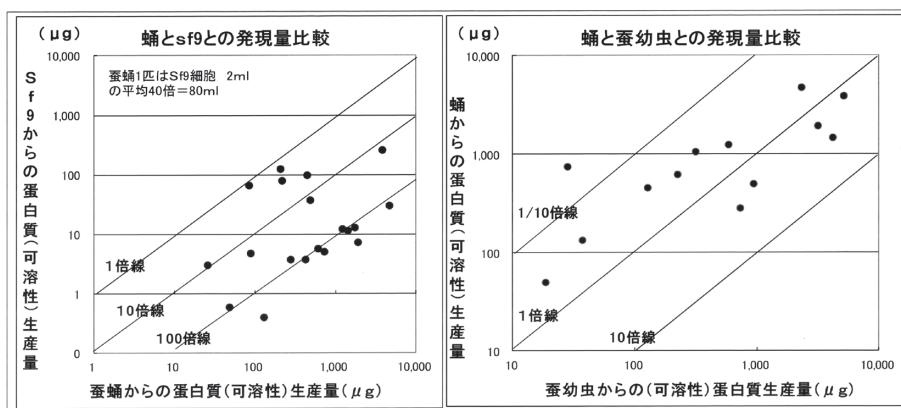
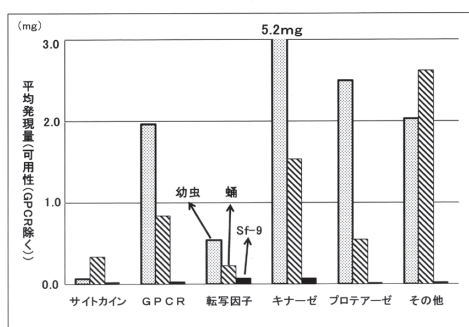


図3 宿主別の可溶性タンパク質の発現量の違い。  
可溶性タンパク質量は、サンプルを100,000 gで1時間、超遠心処理した上清に含まれる組換えタンパク質の量とした。タンパク質の定量は、泳動の定量マーカーをコントロールとして、デンストメーターによって算出した。



可用性が確認された分類別、宿主別のタンパク質種類数(上記グラフはその平均値)

	サイトカイン	GPCR(沈殿)	転写因子	キナーゼ	プロテアーゼ	その他
発現数	8	8	8	6	8	7
幼虫-sup	5	7	2	1	2	3
幼虫-sup	5	8	7	4	4	3
Sf-9-sup	6	6	3	4	3	4

図4 発現タンパク質の分類別、宿主別の発現量(可溶性)の比較。  
幼虫-supのサイトカインは体液の値、また、GPCRは超遠心処理ですべて沈殿に分離されるので、沈殿分画の発現量を記載。

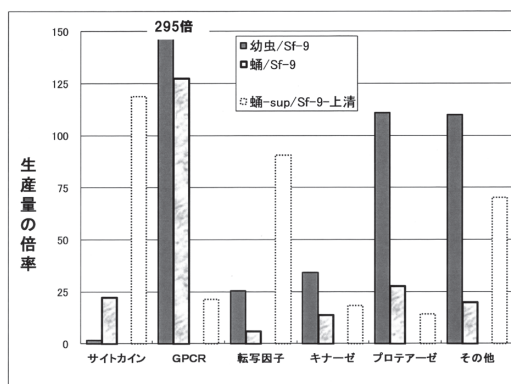


図5 タンパク質の分類別、Sf-9発現量に対するカイコの平均発現倍率。  
各タンパク質種類別の、「左側、中央の棒グラフ」が、沈殿も含めた総タンパク質量の倍率、「右側棒グラフ」が可溶性タンパク質量の倍率。なお、幼虫supとSf-9上清との比較は行っていない。

り、片方の発現量を見て、他方の発現量を推測する事はできない。

なお、個別データは示さないが、蛹を用いた場合、可用性タンパク質が得られた25種類のタンパク質の内、約1/3の7種類が1 mg/匹以上の可溶性タンパク質を生産し、範囲を100 μg/匹以上に拡大すると、その数は約3/4の19種類であった。

また、蛹と幼虫とで生産量を比較すると、両者にそれほど差は見られないが、やはりタンパク質の個性によって蛹と幼虫とで得られる量が異なり、幼虫向きのタンパク質と蛹向きのタンパク質が存在するようである。

### 3. キナーゼの発現量は全般に良い

さらに、タンパク質の分類別の可溶性タンパク質としての発現量を比較すると(図4)、3種類の宿主に共通して、サイトカインと転写因子が比較的低く、キナーゼは高かった。なお、GPCRは超遠心処理によって、活性型であっても沈殿分画に分画されるので、沈殿分画の発現量を比較した結果、幼虫を用いた発現が高かった。

また、グラフへの記載はないが、沈殿を含めた発現量を見た場合、カイコ幼虫では、「その他タンパク質」に分類したesterase (PDE4C) が17.9 mg/匹、protease inhibitor (SERPINB6) が18.3 mg/匹、dehydrogenase (UGDH) が14.6

mg/匹、および、Transporter (SLC1A2) が10.6 mg/匹など、幼虫 1 匹当たり 10 mg以上の発現が見られるタンパク質も多く、カイコの高い生産性を示した。

### 4. Sf-9との総発現量の比較倍率ではGPCRが際だって良い

タンパク質の分類別に、昆虫細胞培養系(Sf-9細胞)と幼虫及び蛹の平均発現量を比較し、昆虫細胞培養系に対する倍率を比較すると(図5)、沈殿も含めた総発現量では、サイトカイン以外では、幼虫、蛹のいずれも10倍以上の発現量であったが、幼虫の方が蛹よりも2.5~4倍、生産量倍率が高い事がわかった。また、種類別ではGPCR、プロテアーゼ、その他タンパク質の発現量が、Sf-9と比較して高い事がわかった。特にGPCRでは、幼虫で295倍、蛹で128倍とカイコの生産性が際立った。製薬企業などで創薬ターゲットとして注目されているGPCRは、膜貫通型のタンパク質であるが故に、生産自身も困難とされているが、カイコを用いた場合、Sf-9と比較してIL8RBは幼虫で634倍、蛹で305倍、CD97は幼虫で114倍、蛹で104倍、GPBAR1は幼虫で939倍、蛹で294倍など、発現タンパク質の種類にもよるが、圧倒的に多量に得られるタンパク質もあり、Sf-9とカイコとで、発現の様子が大きく異なる。

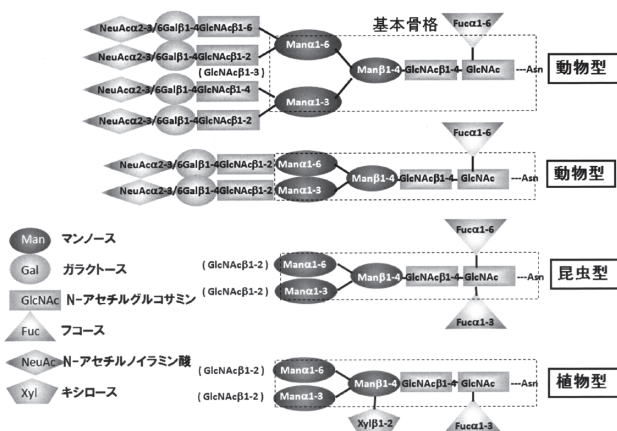


図6 宿主別の糖鎖構造の違い。

昆虫型と植物型では動物型と異なり、タンパク質のアスパラギンと結合しているGlcNAcにα 1-3フコースが付いている場合がある。また、動物型の糖鎖では、糖鎖の先端にアセチルノイラミン酸(シアル酸)やガラクトースが付いている場合が多いが、昆虫ではこれが無い。

5. Sf-9との可用性タンパク質の発現量の比較倍率では、サイトカインと転写因子が良い

さらに、発現タンパク質の内、可溶性タンパク質として回収できた量で同様に平均発現倍率を比較した結果（図5白抜き破線棒グラフ）、Sf-9と比べてサイトカインで119倍、転写因子で91倍、その他タンパク質で70倍であった。なお、幼虫からの可用性タンパク質状態での発現率は30%以下と低かったため、比較を行わなかった。この様に、同じ昆虫系、同じバキュロウイルス系であっても、個々のタンパク質によって驚くほど生産量が異なる場合があり、Sf-9で少量発現だったからと言って、カイコでも同様とは限らず、両者を試みる価値は十分あると考える。

6. 天然型に近い翻訳後修飾

昆虫細胞やカイコを用いる発現系では、糖鎖修飾が行われる事は良く知られており、我々も糖鎖が付加するほとんどのタンパク質で、糖鎖修飾が行われる事を確認している。

しかし、付加するN型糖鎖の構造は、末端にマンノースが2-5個結合した少マンノース型が主体であり、末端にガラクトースやシアル酸を有する複合型糖鎖の付加は認められない（図6）<sup>9)</sup>。これまで、複数の企業、及び研究所

においてバキュロウイルス生産系で付加する糖鎖構造を改良しようとする試みが数多くなされ<sup>10) 11) 12)</sup>、我々も糖転移酵素の遺伝子を導入したトランスジェニックカイコを作出するなど、糖鎖付加の取組みが進められている。

また、カイコや他の昆虫で発現したタンパク質には、アミド化が起こる事が知られている<sup>13)</sup>。これはカイコ自身がアミド化酵素を有しているため<sup>14)</sup>、昆虫細胞培養系ではアミド化は確認されておらず、カイコ個体を用いることの利点の1つである。

7. 迅速生産性と生産スケールの柔軟性

前述したように、組換えタンパク質を得るために必要とする組換えウイルス量は、カイコ個体を使用した場合は極めて少量で良い。

さらに、昆虫細胞培養系（Sf-9細胞）は、ウイルス接種量の変動が、得られる組換えタンパク質の生産量を大きく左右させるのに対して、カイコ個体を用いた場合はウイルス接種量が100倍変化しても、生産される組換えタンパク質の量には大きな変化が認められなかった（図7）。この差の原因は両者の細胞密度の差に起因し、感染細胞から出芽したウイルスの、二次感染の効率の差であると考えている。

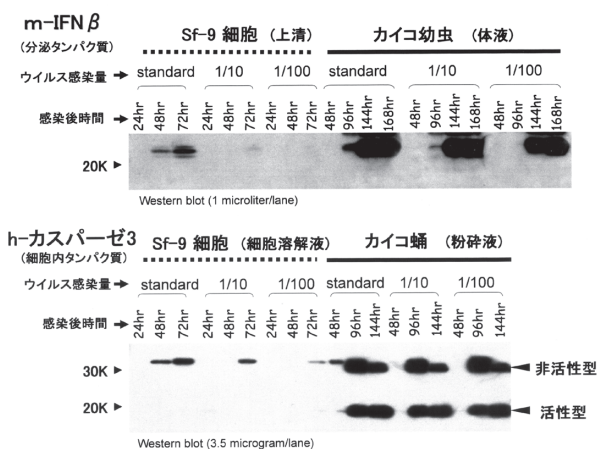


図7 宿主の違いによる発現安定性の差。Sf-9細胞及びカイコ虫体に標準量から1/10、1/100の組換えウイルス（mouse IFNβ: 上段、human caspase-3: 下段）を接種し、発現蛋白質量を調査した。Sf-9細胞への標準ウイルス接種量はm.o.i.=5、カイコへの標準ウイルス接種量は、カイコ1匹当たり10倍希釈したコ・トランスフェクションウイルス原液50μlとした。

このように、カイコ、特に蛹では高濃度ウイルス液の調製やウイルス力価の測定工程を、培養系ほど厳密に必要とせず、少量のウイルス液で全身感染が成立する事、さらに、カイコの蛹は冷蔵して保存できる事から、細胞の拡大培養やウイルスの増殖期間を必要とする昆虫細胞培養系と比較して、迅速な生産性と、高い再現性を可能としており、生産スケールの変更柔軟性が高い系であると考ええる。

#### IV. 期待される用途

従来、微生物で生産困難な糖タンパク質、複合体タンパク質などのタンパク質は、動物組織やヒト由来成分から抽出するか、高コストであってもそれに見合う貴重なタンパク質であれば、動物細胞を用いた培養系を用いて生産している。カイコ/バキュロウイルス系は、その微生物で生産困難なタンパク質であっても生産できる可能性が高く、同分野の生産系を置換える技術と考える。

カイコは、片方の手のひらに収まる、わずか10匹のカイコ（図1写真左）から1~10mg以上の組換えタンパク質を取得できる。この様にmg単位のタンパク質を容易に取得できることから、創薬スクリーニング用、結晶化構造解析用、抗体作製用の抗原タンパク質用、または新規機能タンパク質の試験生産用、さらに、動物投与実験用などなど、様々な研究目的のタンパク質生産手段として利用されている。

また、カイコ蛹は小さなシャーレやトレー上で飼育ができるため、数百種類のタンパク質の個別生産をわずかなスペースで同時に生産できる。生産量も使用するカイコの匹数を変更するだけで柔軟に変更可能であり、培養細胞系で20リットルジャーの運用に匹敵するタンパク質量（10~100mg以上）を、約100匹のカイコ（図1写真右）で生産でき、培養細胞系と比較して圧倒的に省スペース、省エネルギーで取り扱うことができる。このため、年間使用量が少量ではあるが、多種類のタンパク質を同時に必要とする、研究用試薬や診断薬分野としての活用、さらに需要の変動が大きかったり、頻繁に型が変化するワクチンなどの医薬品生産用等々、多品種少量、多品種中量のタンパク質を、フットワ

ーク良く、柔軟に迅速に生産できる産業用途に適していると考ええる。

#### V. カイコ/バキュロウイルス系による産業からの期待効果

蛹を含めたカイコ虫体は、細胞の増殖・更新が自動的に行われる、低エネルギー消費、低CO<sub>2</sub>排出の全自動高密度培養装置と考えられる。環境への貢献は間接的な期待効果として今後のエコ社会に非常に有用であるが、微生物で生産できなかったタンパク質の調達を、動物組織やヒト由来成分から抽出している事の多い診断薬産業などから見て、これをカイコ/バキュロウイルス系の生産方法に切替える事に対する期待効果は大きい。以下にその主な効果を述べる。

##### 1. 安定供給

1990年代にイギリスで報告された狂牛病は、生物資源の国際流通のリスクを浮き彫りとした。狂牛病ばかりではなく、ブタコレラ、口蹄疫、鳥インフルエンザなど、海外では現在でも各種の家畜伝染病が散発的に流行しており、完全撲滅までには到底至っていない。そして、この事は、動物やヒトなどの天然物からタンパク質原料を得るための大きな調達リスクとなっている。さらに、伝染病ばかりではなく、2011年には、米国での異常な高温気象によって、高温に弱い食用ウサギの生産が2割程度までに激減し、ウサギの組織から抽出していたタンパク質成分の調達が困難となった。

一方、近年では、動物愛護運動の活発化などによって、マウス（特にヌードマウス）の調達も困難になりつつあり、英国やドイツを中心とする欧州では、動物を用いた抗体生産が国内では困難となり、海外からの輸入品にまで、徐々にその影響を及ぼす勢いである<sup>15)</sup>。

このような状況下で、カイコを用いた生産系は、カイコが屋外と遮断され、環境がコントロールされた室内で年間飼育でき、しかも餌は人工飼料が開発されているため、病気発生の可能性や異常気象の影響は非常に低く、さらに、カイコは動物愛護の対象外であるため、将来に渡って安定生産が可能と考える。

2. 原材料のロット間差の縮小

動物は飼育状況が外界に対して比較的オープンであるため、その地域や施設的环境によって飼育動物の状態に差があり、得られる動物原材料のロット間差が大きく異なる。従って、輸出国は勿論、出荷先の企業によっても品質が異なり、さらに、供給企業が同じであったとしても、その年の環境やロットによって、大幅に品質が変わる事は常識で、安定な品質を保つために、製造工程の工数増大とコスト増をもたらしている。

一方、カイコを用いた生産系では、同一環境下で生産できるので、生産したタンパク質のロット間差が許容範囲以内に収まり、大幅なロット間差が生まれるリスクが少ない。このため、受入れ検査の試験工数も大幅に削減できると期待している。さらに、ロット間差による製品への投入量の変更調整がほとんど不要となるため、安定した品質の試薬を作成する労力が低減できると考える。この利点は、診断薬や動物医薬品などの生産において、メリットになるのではないかと考える。

3. 安定性・品質の向上

診断薬の様に、ヒトの体内に投与しないのであれば、製品性能に影響を与えない範囲内で、

製品への夾雑物の混入を容認できる。たとえば、血液の凝固時間を測定する試薬などは、標準とされる範囲内での血液凝固時間（活性）が求められているが、試薬原料の純度がかなり異なっているが、その原料中に血液凝固に影響する夾雑タンパク質の混入が無い場合には許容されている。

しかし、一方で、血液凝固や免疫などの、複数のタンパク質が段階的に反応を拡大増幅するカスケードを持つ系では、その増幅カスケードに係る夾雑タンパク質の混入は微量であっても非常に大きな問題となる。それらの夾雑タンパク質が極微量混入しただけで、試薬自身や血液検体へ大きな影響を及ぼし、検査結果に顕著な変動を与える為である。

これはトランスジェニックアニマルの生産系や動物細胞の培養系であっても起こりうるリスクで、動物組織から得られた原材料の、安定性を低くしている原因の1つでもある。

この点カイコを用いた生産系では、カイコ自身に哺乳動物の持つ血液凝固や、サイトカインを始めとする哺乳動物に類似した免疫メカニズムが存在せず、カイコはこれらに係るタンパク質を保有していないと思われる。従って、カイコでこれらのタンパク質を生産して回収した場

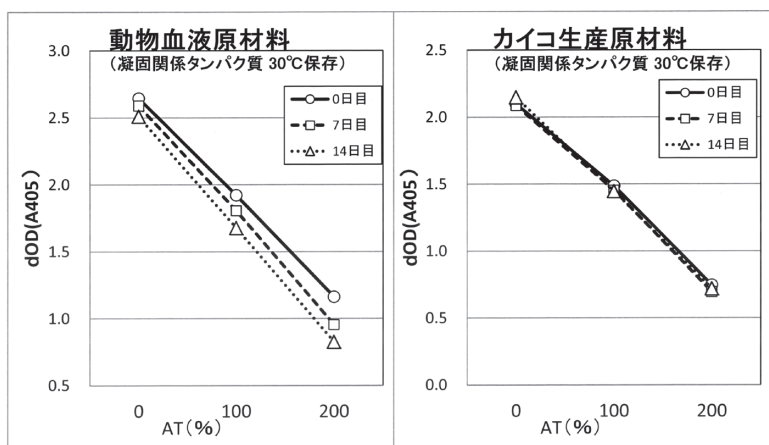


図8 原材料の取得方法の違いによる原材料の安定性の差。  
従来法である動物血液から回収、精製した凝固関係タンパク質は、微量に混入してしまう他の凝固因子などの影響で、安定性が悪い事が多い。このため製品には安定化剤を多量に加える必要があるが、カイコで生産した凝固関係タンパク質は、精製純度が同程度にもかかわらず、夾雑タンパク質の影響を受けず、安定である。



合、カイコ由来の夾雑タンパク質がいくらか存在したとしても、反応系や検査結果への影響の心配が低く、得られた目的タンパク質の保存安定性も高まるケースがある (図9)。

この、哺乳動物と類似する夾雑タンパク質の混入リスクが低い点は、多くのデータから完全に証明されたわけではなく、今後の実施例の蓄積に期待するものであるが、カイコ生産系の大きな利点になるのではないかと期待している。

#### 4. 高性能化

カイコで生産された糖タンパク質は、ヒトや動物細胞のそれと比べて、糖鎖構造が異なるため、その活性や、安定性などの特性が、ヒト型とは異なる事がわかってきている。

この糖鎖の違いは主に、昆虫ではアセチルグルコサミン分解酵素の活性が強いこと、および、ヒト型に成長させるためのNアセチルグルコサミン転移酵素やガラクトース転移酵素の活性が弱いことの他、シアル酸転移に関わる酵素群が欠損していることが指摘されている<sup>16)</sup>

昆虫培養細胞では、ガラクトース転移反応以降の酵素群の遺伝子を導入した培養細胞系「mimic-Sf-9」が開発されている。この細胞を用いて発現させた糖タンパク質には、複合型糖鎖が付加されていることが確認されているが<sup>17)</sup>、通常のSf-9と比較して発現量が大幅に低下する場合が多い点が問題であると認識している。

そこで、我々は、カイコを用いた生産系で、ヒト型に近い糖タンパク質を生産させる技術をすでに完成させ、さらに、一步進めて、現在ではこの技術を高活性化のタンパク質を得る方法に応用できないかと検討している。

具体的には、天然のヒト細胞や動物組織であっても、得られた個々の糖タンパク質の糖鎖構造は不均一で、十数種類の糖鎖構造のミクスチャーとして得られるが、我々が通常、特定の糖タンパク質の活性として得ている結果は、その混合物の平均値を見ているに過ぎない。しかし、個々の糖タンパク質には、活性に寄与する最適な糖鎖構造があるはずで、その最適な糖鎖構造を有する糖タンパク質を、天然の混合比率よりもリッチに生産できる生産系を構築できれば、その糖タンパク質の活性の平均値を上昇させる事が出来ると考える。

さらに、カイコを用いた生産系は、少量多品種の生産に向いているため、タンパク質に多数のアミノ酸変異を導入して、同時に生産、評価することが可能であるため、タンパク質の高性能化の開発にも適していると考える。

#### 5. コスト削減

カイコ/バキュロウイルス系を用いたタンパク質の生産系で期待される効果として、コスト削減も当然要求されている。特に用途が期待されている動物薬、その中でも産業動物 (家畜) は経済動物であるため、医薬品の生産コストが、その技術使用可否を決定する大きな因子であると考えられる。診断薬も、人の健康には関係はするが、治療をするわけではないという点で、コストに対する要求は、動物薬と同様に非常に高い。

その中でカイコ技術は、大腸菌生産で対応できないヒト由来及び動物由来などのタンパク質に対して、期待に応えられる可能性は高いと考えられる。しかし、動物組織や血液に、元々多量に存在するタンパク質や、抗体の様に、生産細胞と培養技術がかなり成熟し、数mg/mLの高濃度で生産できるタンパク質は、コスト的にカイコ/バキュロウイルス系のメリットが出ない場合がある。

しかし、カイコ/バキュロウイルス系技術の特徴の筆頭は、多種多様なタンパク質を非常にコンパクトに、迅速に生産できる点にあり、産業化の視点には、生産系構築までの開発期間と開発費用、それに設備投資も当然コストに含まれてくる事を考慮すると、必要量が年間1gにも満たないタンパク質が多い業界などでは、製品のライフサイクルを20年と想定したとしても、生産時のコスト差よりもむしろ、開発コストや設備投資をいかに抑えるかが、全体コストの低減に貢献する事が分かる。この事は診断薬に限らず、多くの産業界で、年間1g以下しか要求されないタンパク質も非常に多いのではないかと考えられ、その場面での活用という点で、トランスジェニックや培養細胞での生産系と、扱うタンパク質で棲み分けができるのではないかと考える。

#### VI. 終わりに

カイコは、従来、絹という単一タンパク質の生産用昆虫として、日本の産業を支えた生物である。国内でカイコが生産した絹の総量は、昭和初期には年間数万トンという単位で数えられ、近年では1kgの生糸が約3,500~5,000円（つまり1gのタンパク質が3~5円）で取引されている。このためか、どうしても、カイコ=大量生産、低コストとの連想から抜け切れない場合が多いようである。しかし、近年、個別化医療で象徴されるように、同一疾病に対しても個々の患者の体質（遺伝子等）に合わせた薬剤投与を処方する時代となりつつあり、益々検査項目や治療薬の細分化が進むものと考えられる。この様な時代には、いかに多品種少量の製品群を低コストで効率よく提供できるのかが強い競争力となり、その様な場面での活躍の場が、カイコにはあるのではないかと期待している。

今後も我々はこの生産系を更に改良し、タンパク質研究を進めるすべての研究者や様々な産業のニーズに応えられるように努力していく。

なお、末筆になるが、本論文に使われた各種の実験結果を実際に出された、当社の鈴木健夫、長屋英和、石山誠司、榎本知晃、横瀬範子の各開発担当者にこの場を借りて、深くお礼を申し上げる。

#### 引用文献

- 1) Smith GE, Summers MD and Fraser MJ: Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*, 3: 2156-2165, 1983.
- 2) Maeda S, Kawai T, Obinata M, Chika T, Horiuchi T, Maekawa K, Nakasuji K, Saeki Y, Sato Y, Yamada K and Furusawa M: Characteristics of Human Interferon- $\alpha$  produced by a Gene transferred by a Baculovirus Vector in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Japan Acad Ser*, B60: 423-426, 1984.
- 3) Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Saeki Y, Sato Y And Furusawa M: Production of human  $\alpha$ -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315: 592-594, 1985.
- 4) 田村俊樹: トランスポゾンを利用した形質転換カイコの作出方法. 第7回昆虫機能研究会講演要旨, p49-56, (1991)
- 5) Tamura T, C Thibert, C Royer, T Kanda, E Abraham, et al.: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol*, 18: 81-84, 2000.
- 6) 田中 貴, 平松紳吾, 山田勝成, 田村俊樹: サイトカイン遺伝子組換えカイコおよびそのタンパク質の製造方法. 日本国特許: 特開2003-325188 【出願日】 2003年2月24日
- 7) Usami A, Suzuki T, Nagaya H, Kaki H, Ishiyama S: Silkworm as a Host of Baculovirus Expression. *Curr Pharm Biotechnol*, 11(3): 246-250, 2010.
- 8) Usami A, Ishiyama S, Enomoto C, Okazaki H, Higuchi K, Ikeda M, et al.: Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf-9) and silkworm. *J Biochem*, 149(2): 219-227, 2012.
- 9) Misaki R, Nagaya H, Fujiyama K, Yanagihara I, Honda T, Seki T: N-linked glycan structures of mouse interferon-beta produced by *Bombyx mori* larvae. *Biochem Biophys Res Commun*, 311: 979-986, 2003.
- 10) Harrison RL, Jarvis DL: Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res*, 68: 159-191, 2006.
- 11) Aumiller JJ, Mabashi-Asazuma H, Hillar A, Shi X and Jarvis DL: A new glycoengineered insect cell line with an inducibly-mammalianized protein N-glycosylation pathway. *Glycobiology*, 22: 417-428, 2012.
- 12) Mabashi-Asazuma, Shi X, Geisler C and Jarvis DL: Impact of a human CMP-sialic acid transporter on recombinant glycoprotein sialylation in glycoengineered insect cells. *Glycobiology*, in press, 10/07/12, 2013.
- 13) Hellers M, Gunne H, Steiner H: Expression of post-translational processing of preprocecropin A using a baculovirus vector. *Eur J Biochem*, 199: 435-439, 1991.
- 14) Suwan S, Isobe M, Yamashita O, Minakata H, Imai K: Silkworm diapause hormone, structure-activity relationships indispensable role of C-terminal amide. *Insect Biochem Mol Biol*, 24: 1001-1007, 1994.
- 15) Select Committee on Animals In Scientific Procedures Report: LEGISLATION IN THE UNITED KINGDOM section 1.5: <http://www.publications.parliament.uk/pa/ld200102/ldselect/ldanimal/150/15004.htm>
- 16) Altmann F: N-Glycosylation in Insects Revisited. *Trends Glycosci Glycotechnol*, 8: 101-114, 1996.
- 17) Hollister J, Grabenhorst E, Nimtz M, Conradt H, Jarvis DL: Engineering the protein N-glycosylation pathway in insect cells for production of biantennary, complex N-glycans. *Biochemistry*, 41: 15093-15104, 2002.