













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、わずかに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

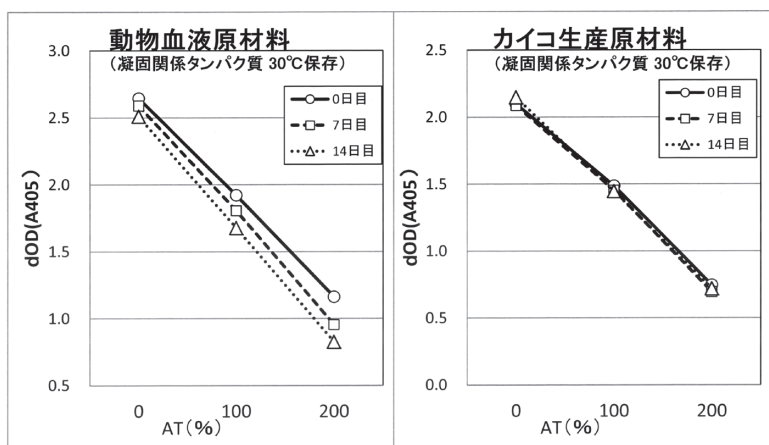


図8 原材料の取得方法の違いによる原材料の安定性の差。  
従来法である動物血液から回収、精製した凝固関係タンパク質は、微量に混入してしまう他の凝固因子などの影響で、安定性が悪い事が多い。このため製品には安定化剤を多量に加える必要があるが、カイコで生産した凝固関係タンパク質は、精製純度が同程度にもかかわらず、夾雑タンパク質の影響を受けず、安定である。



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.