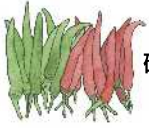


## カイコの高次な生物機能の“革命的”利用



研究ノート

藤山 和仁\*

Revolutionary application of highly-advanced biological function of silkworm

Key Words : silkworm, recombinant protein, transgenic, glycosylation

## 1. はじめに

カイコ (*Bombyx mori*) の持つ生物機能はシルクの生産 (養蚕業) に活用されていた。シルクは、明治から昭和初期にかけて日本からの主要輸出品であり、日本の近代化を支えた。しかし、外国産のシルクの需要に押されて養蚕業は大きく衰退し、1929年には221万戸を超えた国内養蚕農家は、2016年には349戸にまで減少している [1]。近畿圏では、私がインターネットで調べた限りであるが、兵庫県、京都府に数戸残っているだけである。いま、カイコの高次な生物機能をシルク以外の生産に使う新しい養蚕業が興ってきた (“蚕業革命”)。この研究ノートでは、その蚕業革命に関する私達の研究について述べる。

## 2. カイコによる組換えタンパク質生産

カイコは、長い歴史のなかで、高生産、高品質のシルクを生産するため品種改良が続けられてきた。カイコは古くから、遺伝学や生理学研究に利用されており、多くの基礎的知見の蓄積がある。また、2009年にゲノム配列が解読されて、分子育種の技術開発を加速化させた。さらに、組換えタンパク質の生産のための技術も開発され、現在2種類の方法が使用可能である。バキュロウイルス (カイコガに感染するウイルス) を用いた一過的発現系による生

産と、遺伝子をカイコ染色体に導入した安定的発現系による組換えタンパク質の生産である。組換えタンパク質生産技術を使い、カイコの高次な生物機能がシルク以外のタンパク質生産への活用が始まった。いくつかの実用化例を示す。詳細は本誌の「技術解説」 [2] を参考いただきたい。東レは、バキュロウイルス生産系を用い、イヌ・ネコのインターフェロン (IFN) 製剤を事業化した。日本全薬工業は、カイコにより生産したイエダニアレルゲンを使ったイヌ・アトピー性皮膚炎に対する減感作療法薬を販売している。以上の2点は、イヌやネコに直接使用されるもので、世界的に画期的である。さらに、シスメックスは、血栓が原因とされる疾患 (心筋梗塞や脳梗塞などの) への抗凝固療法モニタリング主要検査項目である、プロトロンビン時間 (PT) の測定試薬を国内で発売した。PT試薬には、バキュロウイルス系を用いて生産した組換えタンパク質 (ヒト組織因子) が用いられている。診断薬原料タンパク質の生産に関する詳細は本誌の「企業レポート」 [3] を参考いただきたい。ニッポーメディカルは、診断薬用のヒト骨代謝マーカーなどを製品化している。免疫生物研究所は、組換えカイコを用いて、ヒト・コラーゲンを化粧品として製品化した。

## 3. タンパク質の高品質化な翻訳後修飾

組換えタンパク質の高品質化には、翻訳後修飾、特に糖鎖修飾は重要である。糖鎖修飾は、タンパク質の生物学的機能や活性に影響する。糖鎖修飾には2種類のタイプがあるが、私達はより機能等が研究されているN-結合型糖鎖に着目した。2003年にカイコ・バキュロウイルス系により生産したマウス・インターフェロン $\beta$  (mIFN $\beta$ ) の糖鎖構造を解析した (図1) [4]。高マンノース型 (Man7-Man5、計48.7%)、Man3型 (計24.9%)、Man2型 (計10.1%)



\* Kazuhito FUJIYAMA

1961年8月生まれ  
大阪大学工学部附属生物工学国際交流センター助手 (1988年)  
現在、大阪大学 生物工学国際交流センター 教授 工学博士  
TEL : 06-6879-7455  
FAX : 06-6879-7454  
E-mail : fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

名前	構造	存在比 (%)
Man7		15.5%
Man6		4.7%
Man5		28.5%
Man3		11.8%
Man3F <sub>3</sub> F <sub>6</sub>		12.0%
Man3F <sub>6</sub>		1.1%
Man2aF <sub>6</sub>		6.4%
Man4F <sub>6</sub>		16.3%
Man2bF <sub>6</sub>		3.7%

基本骨格構造を淡青の背景で示している

図1 カイコで生産したマウス・IFNβの糖鎖構造 (Misaki et al., 2003)

である (Man; マンノース)。末端はすべて Man であり、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) は存在しなかった。他の糖タンパク質の糖鎖構造解析からも、カイコの内生糖タンパク質あるいは組換えタンパク質でも同様に、末端が Man 型糖鎖が多かった。

私は、農林水産技術会議事務局の「アグリ・ゲノム研究の総合的な推進」プロジェクト (平成19年度～平成23年度) に参加し、カイコの持つ基本的糖鎖修飾能力を調査した。まず、カイコの雌雄を考慮し、異なる時間ステージ (幼虫、サナギ)、幼虫体内の異なる器官 (脂肪体、絹糸腺など) より糖タンパク質を調製し、糖鎖構造を解析した (図2)。シルクは絹糸腺で合成される。絹糸腺は、シルクとなるフィブロインを合成する後部絹糸腺、糊の機能を果たすセリシンを合成する中部絹糸腺に機能的に区別できる。中部絹糸腺における糖タンパク質糖鎖は、末端が GlcNAc 型で、Fuc α 1-6 (Fuc; フコース) が付加していない糖鎖が主要であった。さらに、ヒト由来糖タンパク質に認められるガラクトース (Gal)、シアル酸 (NeuAc) は検出できなかった。

この GlcNAc 型末端を持つ糖鎖は、ヒト型糖鎖と比較すると未成熟型と捉える事ができ、GlcNAc 型

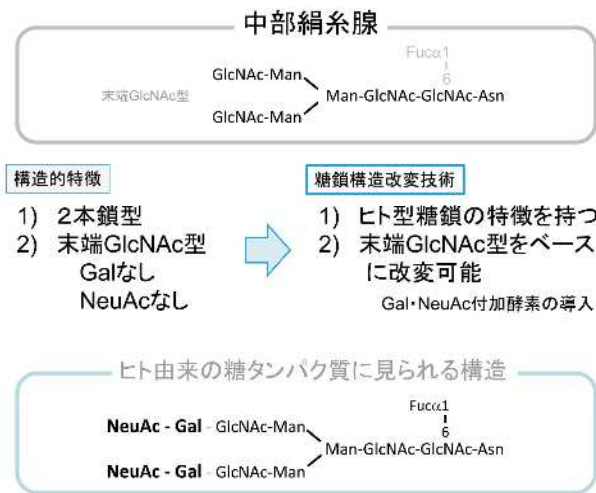


図2 カイコ中部絹糸腺における糖鎖構造付加機能

末端をプラットフォームとして、ヒトに存在する Gal や NeuAc を転移する酵素を導入することでヒト型へと改変することが期待できる。また、農業生物資源研究所 (現、農研機構) では、中部絹糸腺で特異的に遺伝子を発現させるプロモーターを開発している。今後、中部絹糸腺で組換えタンパク質を生産し、さらに Gal や NeuAc 転移酵素を中部絹糸腺で同時に機能させることができれば、末端に Gal あるいは NeuAc を持つ糖タンパク質の生産が可能となるだろう。また、Fuc α 1-6 は抗体の糖鎖に存在するが、Fuc α 1-6 を除去すると抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が増強される。この点からも、中部絹糸腺は、Fuc α 1-6 はないが Gal を持つ抗体の生産などにおいては優位なバイオリクターである。糖鎖はタンパク質の生物学的機能や活性に影響するが、その修飾機能は生産する細胞 (バイオリクター) の能力に依存する。そこで上述のように、糖鎖修飾機能の改変は、より高品質のタンパク質生産には必要な技術である。

#### 4. 糖鎖改変タンパク質生産

私に関わった研究も含めて3つのグループの糖鎖修飾改変の最近の成果を、図3に示した。また、基本的なカイコの糖鎖修飾に関する説明は、詳細は本誌の「技術解説」[2]を参考いただきたい。

Mabashi-Asazumaら (2015) は、GlcNAc 転移酵素 II、Gal 転移酵素を後部絹糸腺で発現させ、その組換えカイコの内在性糖タンパク質の糖鎖構造を解析した。Gal 付加型糖鎖は全糖鎖の15%で、Gal2Glc-

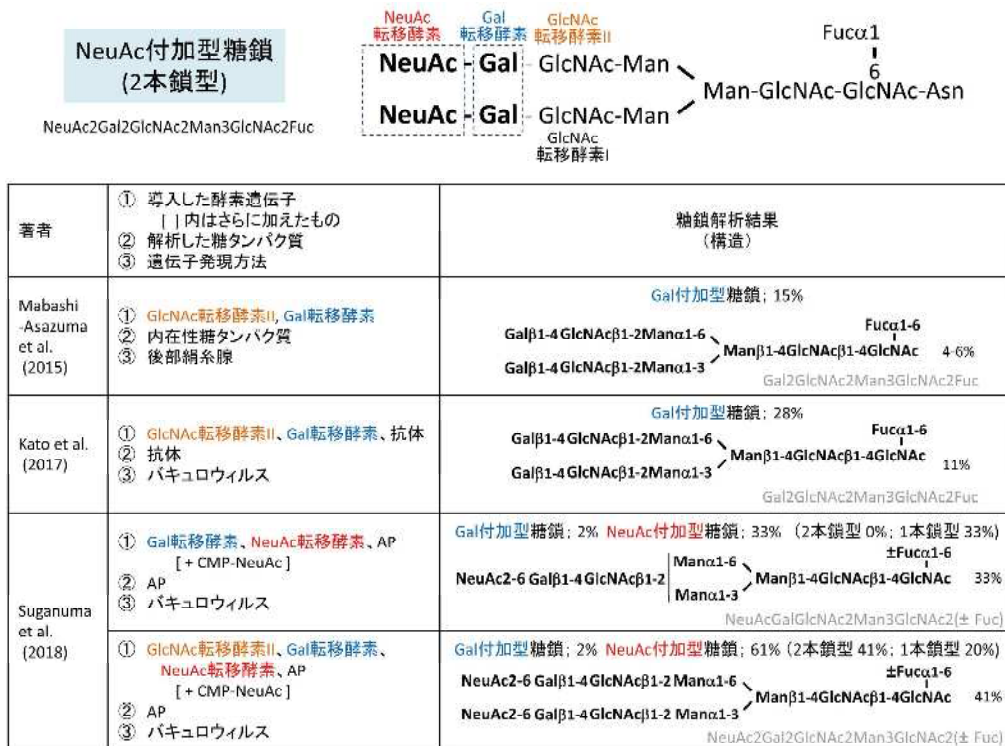


図3 カイコ糖鎖修飾機能の改変技術

NeuAc2Man3GlcNAc2Fuc 構造は 4 - 6% だった [5]。

Kato et al. ら (2017) は、GlcNAc 転移酵素 II、Gal 転移酵素、抗体をバキュロウイルスで発現させ、組換え抗体を精製して糖鎖構造を解析した。Gal 付加型糖鎖は全糖鎖の 28% で、Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc 構造は 28% だった [6]。

私に関わった研究について、Suganuma (シスメックス社) ら (2018) の報告がある [7]。まず、Gal 転移酵素、NeuAc 転移酵素、アルカリホスファターゼ (AP) をバキュロウイルスで発現させ、および CMP-NeuAc を虫体内に注入して糖鎖改変組換えタンパク質 AP を生産した。各糖鎖の存在率は示され、Gal 付加型糖鎖が 2%、NeuAc 付加型糖鎖が 33% だった。NeuAc 付加型糖鎖については、2 本鎖型 0%、1 本鎖型 33% であった。次に、NeuAc 付加型糖鎖で 2 本鎖型が 0% であったことから、GlcNAc 転移酵素 II 遺伝子を追加し、GlcNAc 転移酵素 II、Gal 転移酵素、NeuAc 転移酵素、アルカリホスファターゼ (AP) をバキュロウイルスで発現させ、および CMP-NeuAc を虫体内に注入して糖鎖改変組換えタンパク質 AP を生産した。組換えタンパク質 AP の NeuAc 付加型糖鎖は 61% となり、2 本鎖型 41%、1

本鎖型 20% と、2 本鎖 NeuAc 付加型糖鎖の含量が著しく向上した。

野村 (シスメックス社) ら (2015) は、上記 3 つの糖鎖修飾酵素遺伝子を導入した方法で生産した NeuAc 付加型糖鎖 AP を精製し、市販の仔牛小腸由来 AP と、AP 活性を比較評価した。糖鎖修飾酵素遺伝子を導入していないカイコで生産した AP は比活性が仔牛小腸由来 AP の約 30% だったが、NeuAc 付加型糖鎖 AP は約 85% へと向上した [8]。

以上のように、カイコにおける糖鎖修飾機能を改変することにより、より高品質のタンパク質を生産することが可能である。さらに、改変技術により糖鎖構造はよりヒト適応型になるため、医療への展開を考えると好ましい。

### 5. 今後

平成 29 年度群馬県蚕糸技術センターでは、カルタヘナ法 (産業利用第一種使用等) に基づき、センター内の隔離飼育区画において、遺伝子組換えカイコ (青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ、橙色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコなど) の飼育を実施した [9]。モニタリング調査結果が示され、野

生種との交雑は認められず、遺伝子の拡散はないことを示した。また、同年10月には、群馬県の農家で、世界初めて、緑色蛍光シルクを生産する組換えカイコがカルタヘナ法に基づき飼育された [1] (図4)。

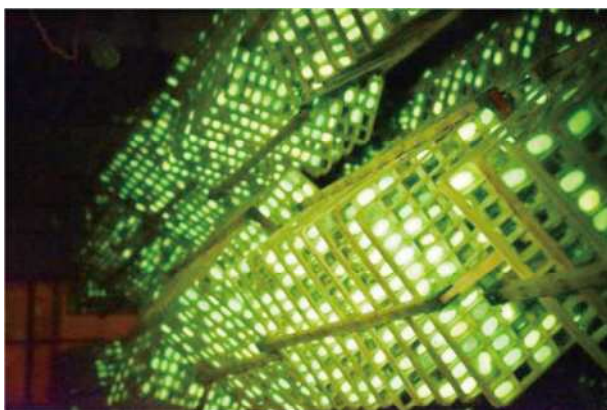


図4 カルタヘナ法 (産業利用第一種使用等) のもと、群馬県の農家で生産された緑色蛍光シルクの繭 (写真提供 群馬県蚕糸技術センター)

農林水産省「蚕業革命による新産業創出プロジェクト」が開始された。遺伝子組換えカイコを利用した新たな機能性シルク素材や医薬品等の産業化に取り組みようとする地方自治体や民間企業等が現れており、その取組みを研究開発面からさらに支援することで、中山間・離島地域を中心とする生物資源 (桑、カイコ) を活かした新たな市場を創出し、産業・雇用が促進されると確信する。

カイコの持つ高次な生物機能を、新しいシルク素材 (緑色蛍光シルクなど) や健康関連タンパク質 (診断薬、医薬品)、化粧品、ペット医薬品などに活用することで、新しい蚕業と産業を創出できる。また、緑色蛍光シルクで作られた西陣織衣装なども開発されている [1]。蚕業が21世紀にまた輝き、さらに中山間・離島地域が発展し、日本のモノづくりの基幹となることを夢見ている。

そして、2020年のオリンピックに訪れた多くの

人に、国際空港到着ロビーで緑色・青色・橙色蛍光シルクの着物を展示し、革新的な衣装を見てもらいたい。また、開会式で緑色蛍光シルクの衣装が舞うとなると素晴らしいことだろう。

## 6. 謝辞

研究は、農業生物資源研究所 (現、農研機構)、シスメックス株式会社、動物衛生研究所 (現、農研機構)、大阪大学の皆さまのご協力を得て成し得たものです。緑色蛍光カイコの写真は、群馬県蚕糸技術センターよりご提供いただきました。

## 参考文献

- 1) [http://www.science-academy.jp/showcase/17/pdf/T-003\\_showcase2018.pdf](http://www.science-academy.jp/showcase/17/pdf/T-003_showcase2018.pdf)  
T-3「蚕業革命」が創る新産業の未来
- 2) 野村 雄 (2012) 生産と技術 64 (2)
- 3) 鈴木健夫 (2015) 生産と技術 67 (1)
- 4) Misaki R, Nagaya H, Fujiyama K, Yanagihara I, Honda T, Seki T. (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* 311(4):979-86.
- 5) Mabashi-Asazuma H, Sohn BH, Kim YS, Kuo CW, Khoo KH, Kucharski CA, Fraser MJ Jr, Jarvis DL. (2015) *Insect Biochem Mol Biol.* 65:20-27.
- 6) Kato T, Kako N, Kikuta K, Miyazaki T, Kondo S, Yagi H, Kato K, Park EY. (2017) *Sci Rep.* 7(1):1409.
- 7) Suganuma M, Nomura T, Higa Y, Kataoka Y, Funaguma S, Okazaki H, Suzuki T, Fujiyama K, Sezutsu H, Tatematsu KI, Tamura T. (2018) *J Biosci Bioeng.* 126(1):9-14
- 8) 野村 雄 他 (2015) 生物工学会誌 93 (6)
- 9) <http://www.pref.gunma.jp/07/p14700042.html>