



技術解説

カイコを用いた 組換えタンパク質生産法の開発と応用

野村 雄*

Development and applications of recombinant protein production
using silkworm, *Bombyx mori*.

Key Words : baculovirus, silkworm, recombinant protein, protein production

1. はじめに

遺伝子組換え技術によって、生化学や分子生物学分野の研究で使用する組換えタンパク質を生産することは、今日最も広く用いられている手法の1つである。また、インターフェロンなどのタンパク質医薬品への利用、抗原タンパク質など診断薬原料への利用、化学工業などで用いられる種々の酵素（洗剤用プロテアーゼなど）への利用など、様々な分野において必要不可欠な技術となっており、今後さらに多くの場面で利用されることが予想される。

研究や開発では、一般的には大腸菌を用いたタンパク質生産系が利用されているが、その現場では、しばしば生産タンパク質が不溶化し、翻訳後修飾が起らないために本来の機能を有さないなど、問題点もある。このため、大腸菌以外にも、酵母、昆虫細胞、哺乳類培養細胞、それに無細胞生産系など、様々な組換えタンパク質の生産方法が開発された。しかしながら、各々の方法にはそれぞれに長所と短所があるため、多くの研究開発者は、自身の目的に合った生産系をどう選択し利用していけば良いのか、しばしば戸惑っているのが現状である。

本稿では、我々が用いている、カイコを用いた組換えタンパク質生産系（以下、「カイコ生産系」と略す）の特長を紹介し、この生産系をより使いやすく実用的にするために、我々が開発してきた事項に

ついて説明する。

2. カイコ生産系とは

我々が用いているカイコ生産系は、昆虫細胞系で一般的なバキュロウィルスを用いた組換えタンパク質生産系の1種である。バキュロウィルスは昆虫ウィルスの1種で、その中でも核多角体ウィルス（Nucleopolyhedrovirus）がタンパク質生産に用いられる。この2本鎖DNAウィルスは、宿主とする昆虫に感染すると、ほぼ全ての組織で増殖し、感染末期に多角体と呼ばれるウィルス封入体を大量に合成することが知られている。多角体は、ポリヘドリンと呼ばれるタンパク質の結晶物であり、ウィルス粒子を乾燥や紫外線などから保護する機能があるが、ウィルスの感染・増殖には必須なタンパク質ではない。そのため、多角体を作るポリヘドリンの遺伝子を、生産させたいタンパク質の遺伝子に置き代えた遺伝子組換えバキュロウィルスを作製し、このウィルスをカイコ虫体や昆虫細胞に感染させると、ウィルスの増殖過程で、組み込んだ遺伝子の大量発現が感染細胞内で起こる（図1）。

バキュロウィルスを用いたタンパク質生産系は、1980年代の半ばに、Summersら（米国）と前田ら（日本）によって、同時に、しかし別個に開発された^(1, 2)。Summersらは、宿主として昆虫培養細胞（ヤガ由来）を利用し、ヨトウガの一種である *Autographa californica* に感染するバキュロウィルスを用いた。一方、前田らは、カイコに感染するバキュロウィルスを用いて、カイコ虫体で生産を行うことで、飛躍的にタンパク質の生産性を高めることに成功した。我々は、後者のカイコ生産系を利用し、その改良と実用化を進めてきた。

カイコ生産系は、他の生産系で必須な培養タンクを必要とせず、カイコ1匹1匹が言わば培養タンク



* Tsuyoshi NOMURA

1967年8月生

金沢大学大学院理学研究科（1993年）
現在、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 生物科学グループ 修士（理学） 昆虫生化学

TEL : 04-2954-2171

FAX : 04-2954-2172

E-mail : Nomura.Tsuyoshi@sysmex.co.jp

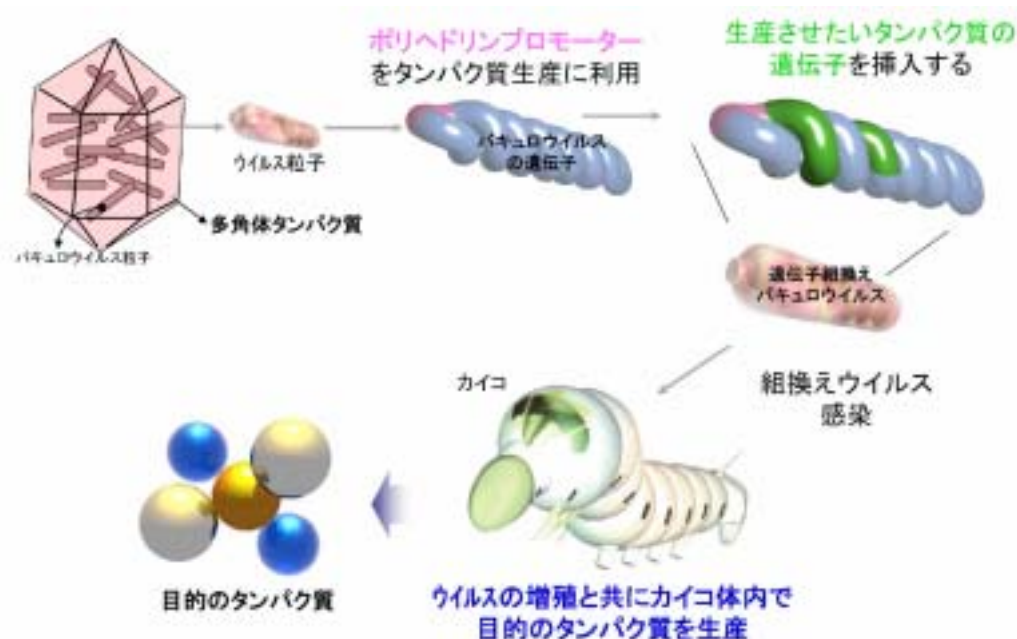


図1 カイコ生産系（カイコとバキュロウイルスを用いたタンパク質生産系）

となる。カイコ10匹は、およそ昆虫細胞の培養タンク1L分に相当し、この匹数で数mg～数十mgの組換えタンパク質を得ることが可能である。カイコは人工飼料を用いて飼育できるため、年間の飼育コントロールが容易である。さらにカイコ生産系は、生産システムとして以下の2つの大きな特長を有する。

(1) 多品種タンパク質の同時迅速生産への対応が可能

1畳程度のスペースで、1度に100種類以上の組

換えタンパク質を1週間で生産することが可能であり（図2）、多種類のタンパク質を同時に生産することが容易な生産系である。もし同様なことを昆虫細胞や哺乳細胞で行う場合は、100台の培養タンクを無菌操作で運用する必要があり、生産期間も2ヶ月程度を要する。即ちカイコ生産系は、開発の場面では、数十種類の生産条件を一挙に検討することが出来るため、開発スピードを飛躍的に高めることに貢献する。製造の場面においても、ごくわずかな設備とスペースで、多品種のタンパク質製造を同時に、



図2 カイコ生産系の特長（多品種同時迅速生産）

低コストかつ柔軟に実施可能である。実際に我々は、3～4名の開発者によって約5,000種類以上の異なる組換えタンパク質を、カイコ生産系で生産して、生産確認を行った実績があるが、これに要した年数は5年を必要としなかった。

(2) 生産のスケール変更に対し柔軟に対応が可能

カイコ生産系では、使用するカイコの匹数を増やすだけで、容易にスケールアップが可能である(図3)。前述のとおり、カイコ1匹が1つの培養タンクに相当するため、生産規模をスケールアップしても、生産条件に変化がないといった大きな利点がある。そのため安定生産が可能で、ロット間差も生じ難い。一方、培養系では、生産規模の拡大毎に、培養条件や装置を生産規模に合わせて調整する必要があり、それに費やす時間と費用は無視できず、カイコ生産系と比較して柔軟性が乏しい。

このように、カイコ生産系は、昆虫個体を使用するが故のユニークな優位点を有している。

3. カイコ生産系の改良

我々は、カイコ生産系の優位性をさらに強化するため、様々な改良の取り組みを行ってきた。既に、生産系の問題点の多くは解決され⁽³⁾、技術的には完成に近づき、産業応用を進めている段階である。

これまで我々は、タンパク質の生産量の改善のた

めに、大きく2つの取り組みを行った。1つは、カイコ体内で、生産タンパク質が分解される問題に対し、ウィルス由来のプロテアーゼ遺伝子を欠損させることで、生産量の大幅な改善に成功した⁽⁴⁾。もう1つは、生産タンパク質の種類によって、その一部が不溶化する問題への対処として、ウィルス感染によるカイコの細胞機能の低下前にタンパク質を生産できるよう、改善を試みた。今回は、後者の取り組みについて、以下に述べる。

大腸菌の生産系では、組換えタンパク質はしばしば不溶性の封入体として生産されることが良く知られている。そのため、生産温度を下げるなどの方法も採られるが、未だ解決には至っていない。カイコ生産系においても、大腸菌に比べると頻度は少ないが、生産タンパク質が不溶化することが見られる。しかし、完全に不溶化することは少なく、不溶性のものと可溶性のものが混在している場合が多い⁽⁵⁾。また、昆虫細胞では不溶性となるタンパク質でも、カイコ生産系では一部が可溶化する場合もある⁽⁵⁾。

バキュロウィルス生産系では、そのウィルスがポリヘドリンタンパク質を生産するために使用する強力なプロモーター(メッセンジャーRNAの転写を促す遺伝子)を、タンパク質生産に通常利用する。ただし、このプロモーターはウィルス感染後のウィルス増殖末期に働くため、ウィルス感染後に続くウ

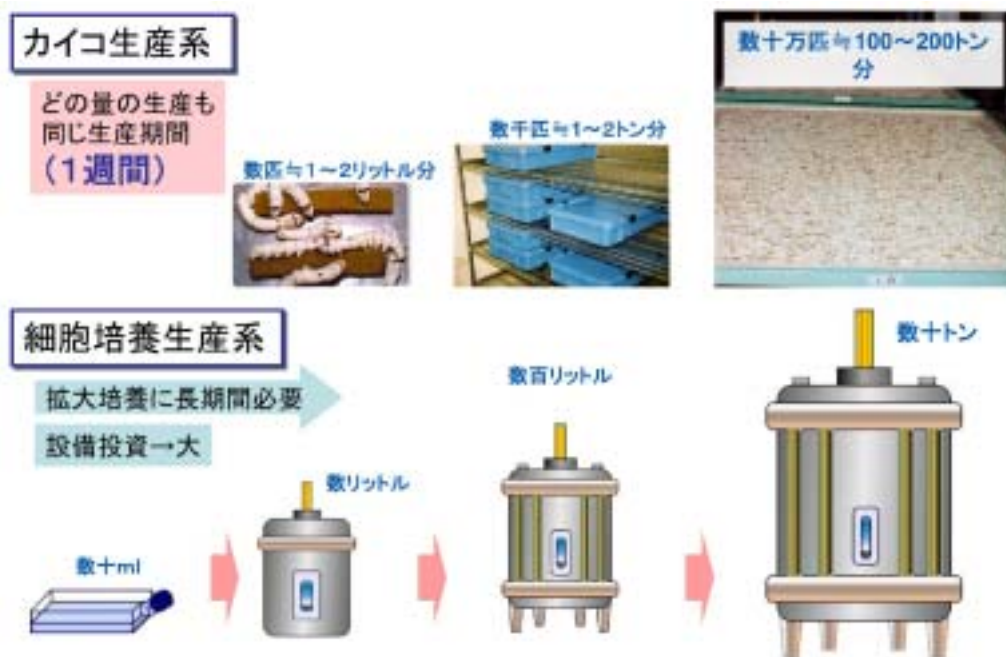


図3 カイコ生産系の特長 (柔軟なスケールアップ生産)

ウイルス複製機能によって昆虫細胞の本来の機能が低下した状況下で、組換えタンパク質が強制的に生産されることになる。そのため、一部の生産タンパク質では折れ畳みや相互の絡み合いなどによる立体構造障害などが生じ、不溶化する場合があるものと考えられる。そこで我々は、不溶化を引き起こすことが少ないプロモーターの開発を目指した。その結果、ウイルス感染時からタンパク質生産時までの時間差が従来のポリヘドリンプロモーターの半分と短く、プロモーター活性の低下も少ない新規なプロモーターを開発し、E-vp39 と命名した (図4)。このプロモーターの活用により、ウイルス感染後の宿主細胞機能の低下前に、その影響をほとんど受けずに組換

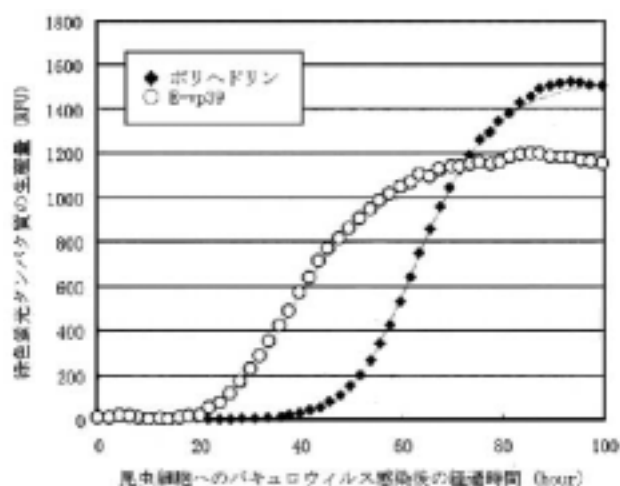


図4 新規プロモーターによる緑色蛍光タンパク質の経時生産

えタンパク質の生産が可能になる。具体的に、いくつかのタンパク質において、目的とする可溶性度が改善したという結果を得ている。また、2種類の組換え抗体 (IgG1) の生産を行い、タンパク質の構造を解析する超遠心分析という手法で評価を行ったところ (図5)、いずれの抗体においても従来のポリヘドリンプロモーターを使用した場合と比較して、「凝集していない抗体」の存在比率が顕著に高まった (抗キマーゼ抗体: 64.3% → 90.6%、抗 HA 抗体: 57.4% → 75.7%)。これは、E-vp39 プロモーターでの生産では、組換えタンパク質生産時の細胞機能 (品質管理) がうまく働いている証と考えられる⁽⁶⁾。不溶化の原因は様々であり、必ずしも全ての不溶化タンパク質に効果があるわけではないが、現在我々が生産を行う際には、この E-vp39 を有用な手法としてしばしば用いている。

4. 生産タンパク質の高品質化に向けて

カイコ生産系で生産したタンパク質は、天然に存在するタンパク質と同等の機能や立体構造を有することが多く、大腸菌生産系では見られない、タンパク質への糖鎖付加やリン酸化などの修飾 (翻訳後修飾) も起こる。翻訳後修飾は、タンパク質の機能発現に重要であり、タンパク質生産系において、そのコントロールは特に重要である。

ヒトの場合、構成タンパク質の半数以上、分泌タンパク質や膜タンパク質ではその大半が、糖鎖が付

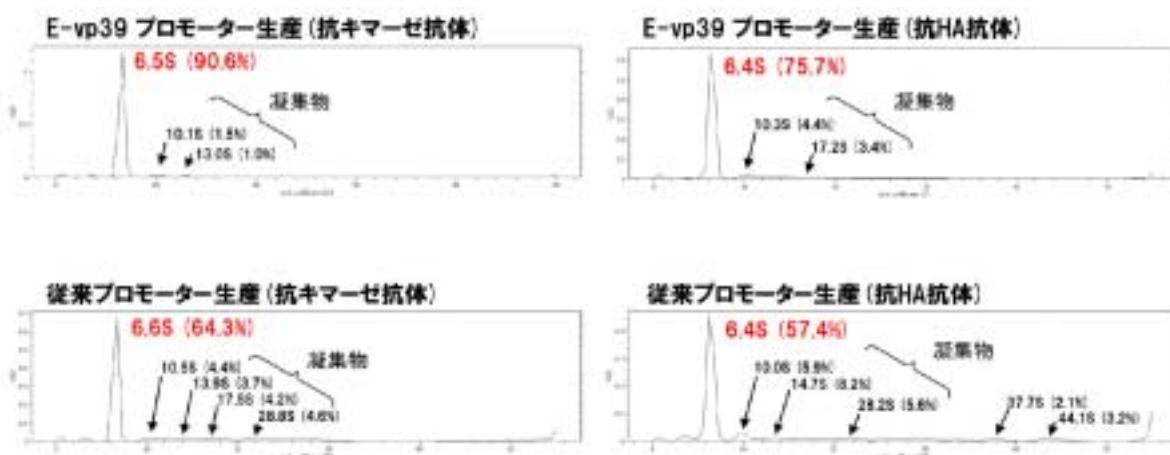


図5 E-vp39プロモーターの効果

2種類の組換え抗体の生産を、各々異なるプロモーターを用いておこなった。縦軸は沈降係数の分布関数 $c(S)$ 、横軸は沈降係数 S 。なお、抗体(IgG1)の沈降係数 S は、約6.6Sである。

加した糖タンパク質であると言われている。糖鎖の機能としては、細胞を識別するためのタグとしての機能、感染症や炎症での結合部位としての働き、タンパク質の品質管理や体内での保護作用、発生における機能など多岐に渡る機能が知られており、タンパク質の翻訳後修飾でも最も重要なものの1つである。特に主要な糖鎖であるアスパラギン結合型糖鎖は、ヒトを始めとする哺乳動物においては、図6Aに代表される糖鎖が存在することが知られている。

カイコ生産系及び昆虫細胞生産系では、アスパラギン結合型糖鎖が付加されるが、糖鎖構造はヒトを含めた哺乳類とはやや異なり、主として短い糖鎖構造が観察される(図6B)⁽⁷⁾。このように、哺乳類とは糖鎖構造が異なるために、機能的に十分な組換えタンパク質が生産できない場合がある。また、哺乳類とは異なる糖鎖構造のため、哺乳動物の生体に投与した場合には、免疫原性を示したり、アレルギーを引き起こしたりする可能性がある。

これを改善するため、カイコ生産系及び昆虫細胞生産系では、糖鎖構造を哺乳類型(ヒト型)化する開発が、複数の研究機関で進められている。糖鎖改変のポイントとなる箇所は幾つか存在するが(図7)。

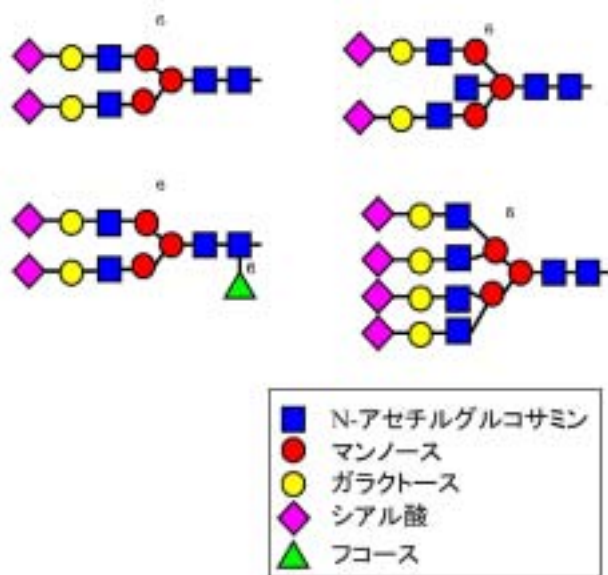


図6A 哺乳動物に見られる糖鎖の例



図6B 昆虫に見られる糖鎖の例

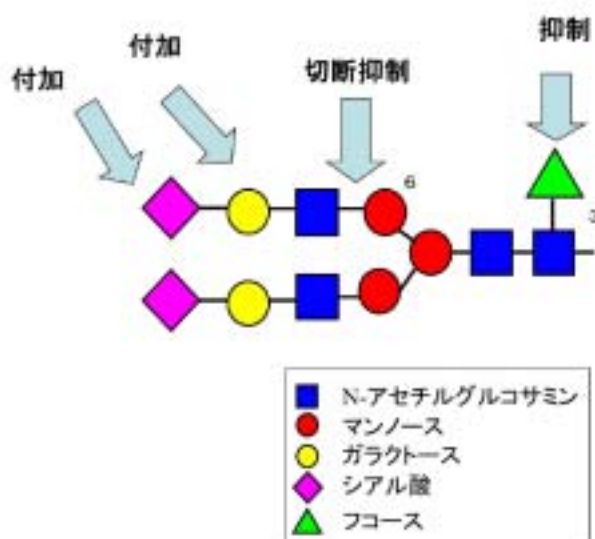


図7 哺乳類型糖鎖への改変のポイント

1つは長さが短い昆虫型糖鎖を、哺乳類に見られる長い糖鎖とするために、必要な糖の付加機能を持つ酵素遺伝子を、細胞やカイコに導入する方法が考えられる。また、糖鎖を切断して短くしてしまう昆虫独自の酵素(N-アセチルグルコサミニダーゼ(GlcNAcase))が関与し⁽⁸⁾、糖鎖伸長が抑制されているので、この酵素を阻害することも考えられる。さらに、もう1つのポイントは、免疫原性となる昆虫独自の構造の糖鎖付加を抑制することである。

例えば、昆虫培養細胞を用いた生産系では、ガラクトース転移酵素やN-アセチルグルコサミン転移酵素、シアル酸転移酵素など、哺乳動物由来の糖付加酵素遺伝子を導入した昆虫培養細胞の開発がなされている⁽⁹⁾。一方、カイコ生産系に関しては、2000年に遺伝子組換えカイコの作製方法が開発され⁽¹⁰⁾、この技術を利用して、カイコのゲノム改良をすることで、糖鎖改変が可能となった。我々を含む幾つかの機関では、ガラクトース転移酵素遺伝子をカイコに導入し、得られた遺伝子組換えカイコを用いて目的とする組換えタンパク質を生産し、糖鎖がヒト型に近づいたことを確認している⁽¹¹⁾。

また、我々は、カイコに見られる昆虫独自の糖鎖分解酵素(GlcNAcase)の探索をおこない、3つの酵素を同定した⁽¹²⁾⁽¹³⁾。これらの中でも特にBm-FDLと呼ばれる酵素は、カイコの糖鎖修飾に深く関わっているのではないかと予想されている。

これまで述べてきたように、カイコ生産系における糖鎖改変も徐々に進みつつある。ただ、カイコの

糖鎖形成に関しては未だ不明な点も多く、必要とする糖鎖が付加された組換えタンパク質を効率的に得られるよう、今後さらに研究を進める必要がある。

5. カイコ生産系の応用

これまで述べてきたように、カイコ生産系の特長（多品種組換えタンパク質の迅速生産やスケールアップの柔軟性、高品質なタンパク質の生産性）は、短期間での開発が要求される、多種類の高品質なタンパク質を使用する必要がある体外診断薬用の原料タンパク質や、医薬品開発のための試験用タンパク質の生産などに特に適している。我々は、診断薬の原料として、ウシ組織因子をカイコ生産系で製造し、凝固系の診断試薬「トロンボチェックTTOリコンビナント」として、2009年から販売を開始している。

また我々は、カイコに抗体を作らせる開発にも取り組んでいる。免疫系で重要な役割を果たす「抗体」は、がんや自己免疫疾患に対する医薬品（抗体医薬）としての利用が進んでおり、体外診断薬においても重要な構成要素である。抗体分子は、複雑な構造のタンパク質であり、大腸菌では、機能を有する完全な形の抗体の生産は困難である。我々はこれまでに、カイコ生産系で、一例としてキマーゼに対する抗体（IgG）を生産し、これが、抗体の機能を正しく保持していることを確認している⁽⁶⁾。カイコ生産系で抗体を生産することにより、今まで管理が大変であったモノクローナル抗体産生細胞の維持が不要となり、省力化と抗体の品質の安定化が期待できる。

さらに我々は、大腸菌では生産が困難である膜タンパク質の生産にもカイコ生産系が適している事を確認している。膜タンパク質は、しばしば医薬品や診断薬を開発する上での標的となるため、カイコ生産系を用いて、これらを迅速、かつ天然物と同等な機能を保持して生産することにより、開発のスピードアップとコストダウンに繋げる事ができるのではないかと考えている。

本稿では、主として医療分野で、本生産系で何が出来るか述べてきたが、その他の分野においてもカイコ生産系が役に立つ場面は決して少なくないと、我々は考えている。

6. 終わりに

以上、本稿では、カイコ生産系の特長とその応用

の可能性、高品質タンパク質の生産に向けた具体的取り組みについて説明してきた。この魅力的な生産系を生かすために、我々は今後も、引き続き内外の研究機関と協力しながら技術開発を進めるとともに、活用実績を蓄積していきたいと考えている。

本稿をまとめるに当たって、全般的に支援いただきましたシスメックス株式会社 タンパク質開発センター 宇佐美昭宏センター長に感謝いたします。また、執筆の機会を与えていただきました大阪大学 生物学国際交流センター 藤山和仁教授に感謝いたします。

引用文献

- 1) Summers, MD., Smith, GE. (1987) Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, No. 1555.
- 2) Maeda, S. (1989) Invertebrate Cell System Applications, CRC Press, 167-181.
- 3) Usami, A., Suzuki, T., Nagaya, H., Kaki, H., & Ishiyama, S. (2010) Current Pharmaceutical Biotechnology, 11, 246-250.
- 4) Suzuki, T., Kanaya, T., Okazaki, H., Ogawa, K., Usami, A., Watanabe, H., Kadono-Okuda, K., Yamakawa, M., Sato, H., Mori, H., Takahashi, S., & Oda, K. (1997) J.Gen. Virol., 78, 3073-3080.
- 5) Usami, A., Ishiyama, S., Enomoto, C., Okazaki, H., Higuchi, K., Ikeda, M., Yamamoto, T., Sugai, M., Ishikawa, Y., Hosaka, Y., Koyama, T., Tobita, Y., Ebihara, S., Mochizuki, T., Asano, Y., & Nagaya, H. (2011) J. Biochem., 149, 219-227.
- 6) Ishiyama, S., & Ikeda, M. (2010) Biotechnol Lett, 32, 1637-1647.
- 7) Misiaki, R., Nagaya, H., Fujiyama, K., Yanagihara, I., Honda, T., & Seki, T. (2003) Biochem, Biophys. Res. Commun., 311, 979-986.
- 8) Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glössl, J., & März, L. (1995) J. Biol. Chem., 270, 17344-17349.
- 9) Hollister, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H., & Jarvis, DL. (2002) Biochemistry, 41, 15093-15104.
- 10) Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas,

- JL., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, JC., & Couble, P. (2000) *Nat Biotechnol.*, 18, 81-84.
- 11) 竹田敏 . (2006) 昆虫機能利用研究 , 79-85.
- 12) Okada, T., Ishiyama, S., Sezutsu, H., Usami, A., Tamura, T., Mita, K., Fujiyama, K., & Seki, T. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1626-1635.
- 13) Nomura, T., Ikeda, M., Ishiyama, S., Mita, K., Tamura, T., Okada, T., Fujiyama, K., & Usami, A. (2010) *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 386-391.

