解説

カイコとバイオテクノロジー

竹田 敏・今西重雄

1. はじめに

カイコは我が国、あるいは全世界でも、もっとも多くの人々に知られた昆虫の一つであると言える。チョウや蛾の仲間、鱗翅目昆虫に属しているカイコは絹糸を吐くということで約五千年前から人類に利用されてきた。カイコを飼育して繭を生産する蚕糸業は戦前の一時期には我が国の輸出品の約5割を占める基幹産業となり、「繭と生糸で軍艦をつくった」とまで言われた。このようにカイコは農林水産生物として古くから重要な地位を占めてきた。

一方、カイコは、生物学の分野において、ショウジョウバエと比肩される有用な実験動物として扱われてきた。カイコの遺伝学は、外山(1906)のメンデルの法則の、動物での再発見以来、100年近い歴史を持っている。この点では、現在も分子生物学分野で実験動物として君臨しているショウジョウバエを凌駕している。カイコは、蚕糸業をバックグラウンドに、生理学、栄養学、病理学など数多くの分野で多大な研究蓄積がされてきた。その過程で、人工孵化を用いた年間随時孵化システム、人工飼料の開発とそれを用いた通年大量飼育など、発育の均一性と相まって実験動物としてのカイコ独自の優位な特性が付加された。特に、体のサイズが比較的大きいことから器官、組織の特異性に関する研究では、体が小さいため丸ごとでしか使えないショウジョウバエに比べはるかに優

れた利点を持っている。バイオテクノロジーの分野でもカイコが持つこれらの有利性を生かした研究が進められてきている。

農林水産分野において、バイオテクノロジーは「生物が持つ機能を効率的に利用する技術」と定義されている。その主な手法として遺伝子操作、細胞培養、微生物・酵素利用が挙げられる。遺伝子操作には、遺伝子組換え、細胞融合、核移植、性のコントロールなどがあり、細胞培養には、細胞培養・組織培養、薬培養、胚培養がある。また、微生物・酵素の利用としては、微生物・酵素の高度利用、バイオリクター(固定化酵素、固定化微生物)などがある。

昨年1月には科学技術庁、文部省、厚生省、農林水産省、通商産業省の閣僚による申し合わせとして「バイオテクノロジー産業の創造に向けた基本方針」が策定された。我が国も国策としてバイオテクノロジー産業の振興を掲げ、バイオ分野での欧米諸国への遅れを取り戻そうと動き出した。

2. カイコはバイオテクノロジーの草分

今日のバイオテクノロジーの草分け的な仕事がかいこでなされたということを知る人はそれほど多くないと思われる。今でいう、染色体工学的手法でカイコに新しい形質が付与され、有用系統が作出されたのは、何と今から約50年も前、1940年代のことである。

竹田 敏

今西重雄

Biotechnology of the Silkworm

著者紹介 SATOSHI TAKEDA* and SHIGEYO IMANISHI**

National Institute of Sericultural and Entomological Science

*蚕糸・昆虫農業技術研究所 企画連絡室 企画科長 農学博士

**蚕糸・昆虫農業技術研究所 遺伝育種部細胞工学研究室 細胞工学研究室長 農学博士

竹田氏は、昆虫生理学、特に内分泌学を専門とされ、平成10年蚕糸学賞を受賞されている。著書に「昆虫機能利用学」(共著、朝倉書店、1997)がある。趣味は、ジョギング(毎年1回はフルマラソンに参加している)、雑文投稿とのこと。

今西氏は、細胞生理学を専門とされている。

本稿では、カイコや昆虫培養細胞が遺伝子組換えによる有用物質生産系として非常に使われ、将来「昆虫工場」としてシステムされることについて解説していただいた。

当時農林省蚕糸試験場にいた田島弥太郎氏(元国立遺伝学研究所長, 元大日本蚕糸会蚕品種研究所長)は, X線をカイコの蛹に照射することによって, 「セーブル」と呼ばれる斑紋形質を含む染色体の付着染色体断片が, 性染色体であるZ染色体に転座した系統を作出した。この系統はカイコ幼虫の背中にある斑紋の有無によって, 容易にオス, メスの識別ができた。しかしながら, メスが過剰な染色体構成を持っているのが原因で, 病気に対する健康度や成長速度などに支障が見られた。そこで, 転座した染色体断片の過剰部分をできるだけ取り除く試みがなされた。そのため, 再度転座染色体を持つ, メスの蛹にX線を照射し, 形質が改善されて系統を得た。この過剰分を除去する操作を繰り返し, さらに, 実用系統のオスに交配することによっての選抜育種を経て, 幼虫斑紋により雌雄鑑別ができる系統として確立された。この系統は当時の緊急課題として育種が精力的に進められ, 1944年には品種として指定された。第2次世界大戦のさなかのことであった。

このように, カイコにおける染色体転座を用いた幼虫斑紋による雌雄鑑別法は, 染色体工学の一手法であり, 先に述べた「生物が持つ機能を効率的に利用する技術」, すなわちバイオテクノロジーそのものであった。

3. カイコーバキュロウイルス発現系を利用した有用物質生産系

今日, カイコにおけるバイオテクノロジーの最先端に行く開発研究が, カイコーバキュロウイルス系を利用した有用物質の生産系である。以下, 主として現在におけるカイコを用いた有用物質生産系の開発に関する研究の現状と問題点, さらに将来の方向について述べる。

微量蛋白質など有用物質を異種生物体で生産させる試みは, 当初, 原核生物である大腸菌を対象としたものであった。しかし, 大腸菌を用いて作製した遺伝子産物には問題点があった。この遺伝子産物には, 生物学的活性が失われており, 大腸菌は医薬品などの生産系として不適切であることがわかった。一方, 真核生物である昆虫を用いた場合, 大腸菌と異なり, 遺伝子産物には糖鎖, リン酸などが付加されており, 生物学的活性が認められた。そのことから, 遺伝子組換えによる有用物質生産系の構築に向けた将来性が期待されていた。

(1) バキュロウイルス発現系にカイコを用いる理由

昆虫に感染するウイルスは大きく9つのグループ(科)に分けられる。カイコを用いた有用物質の生産には, カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)が用いられる。BmNPVはバキュロウイルス科に属し, 約130キロベースペア(kb)の長さのDNAが鎖状に2本寄り集まって構成する環状ウ

イルスである。カイコに伝染性の核多角体病という病気を引き起こす。BmNPVの特徴は多角体という結晶性の蛋白質をすることで, 多角体は感染蚕1匹で10mg程生成され, 最大時には虫体の全細胞蛋白質量の20~30%にもなる。BmNPVを遺伝子組換えのツールとして利用しようとする理由はこの点にある。

(2) BmNPVをベクターにした遺伝子発現系の構築

BmNPVのゲノムDNAは長すぎてそのままでは外来遺伝子を導入しにくい。そのため, 大腸菌のプラスミドに先ず外来遺伝子を導入し, 遺伝子の運び屋(トランスファーベクター)とする方法が考えられた。

まず, 外来遺伝子が導入できるように, プラスミドに制限酵素による切断部位を作る。次に, 導入された遺伝子が蛋白質をつくるように指示するプロモーターを部位の上流域に並べる。プロモーターはBmNPVのウイルス粒子が封入されている多角体蛋白質を作るよう指示する多角体プロモーターを使うことにより, 高い遺伝子発現能力が期待できる。このプラスミドのDNAと野生型BmNPVのゲノムDNAとを, 薬品や高電圧を利用した方法によりカイコ培養細胞に取り込ませると, 双方のDNAどうして外来遺伝子の相同組換えがおこり, 組換えウイルスができる。この組換えウイルスを培養細胞または, カイコ虫体に感染させ, それぞれの培地または体液を回収して分離精製すると, 目的とする蛋白質が得られる。

(3) バキュロウイルスベクター系による有用物質の生産

バキュロウイルスベクター系を用いた遺伝子発現が初めて行われたのは1983年, 米国でのことである。サマースらのグループはイラクサキンウワバの一種に感染するAcMNPVをベクターにし, ハスモンヨトウ近縁種由来の培養細胞(Sf9細胞株)とを組み合わせ, ヒトβインターフェロン遺伝子を発現することに成功した。1985年には, 前田らはBmNPVをベクターとし, カイコの培養細胞およびカイコ虫体でヒトαインターフェロン遺伝子を発現させた。得られたヒトαインターフェロンの量はカイコ体液1ml当たり, 1.9×10^8 乗ユニットであった。この値は約190μg/mlに相当し, カイコ1匹当りに換算すると200~250μgになる。

BmNPVを用いた遺伝子発現はカイコおよびカイコの培養細胞の両方で行えるという優れた特徴がある。筆者の1人, 今西らは独自に構築したベクター(蚕昆研1号と名付けられた)を用いて, α-アミド化酵素遺伝子をカイコおよび培養細胞での発現を試みた。その結果, カイコでは体液1ml当たり40,000ng, また培養細胞では培養液1ml当たり250ngのα-アミド化酵素蛋白質が得られた。このことは, 虫体における遺伝子発現効率率は培養細胞のものよりも100倍以上も高いことを示していた。

4. 「昆虫工場」

世界一のレベルを誇る我が国のカイコ飼育技術とバキュロウイルスベクター系の両技術を組合わせ、「昆虫工場」システムの構築が図られている。

クローン羊ドリーの誕生が世界中に衝撃を与えたのは3年半前のことである。クローン動物を作出する目的の一つは「動物工場」の実現である。「動物工場」ではヒトの遺伝子病の治療に用いられる微量ホルモンなど有用物質を遺伝子組換えによるクローン動物に生産させることを目指している。

一方、「昆虫工場」ではカイコが主役で、インターフェロンなどの微量な有用物質をカイコに作らせ、それを精製することによって、医薬品として役立たせようとするのが目的である。

「昆虫の体は、バイオリアクター(生物の反応槽)である」と言われている。これは次のようなことからである。大量培養装置のような培養細胞系の反応槽を考えてみよう。培養槽は昆虫では皮膚に包まれた体に例えられる。培養槽内には培地(カイコでいえば体液、以下カッコ内はカイコに例えた場合を示す)があつてその中に培養細胞(ウイルスが感染する組織など)があつて、酸素を供給できるノズル(気門)がある。このように昆虫の体は培養槽とほとんど同じ仕組みであることがわかる。

カイコに組換えウイルスを接種し、体液を採取して組換え蛋白質を回収する方式がカイコ・バキュロウイルス発現系を利用した有用物質の生産方式である。カイコは卵から孵化して1, 2, 3, 4 齢と成長と脱皮を繰り返して大きくなり、5 齢に脱皮する。この5 齢のカイコに組換えウイルスを接種し、組換え蛋白質が含まれる体液を採取する。

「昆虫工場」システムの構築において解決すべき問題点の一つとして、個々のカイコに組換えウイルスを接種する方法の開発である。接種に用いるカイコの数膨大なものになる。従来までの手作業に依存しない、機械化された方法が求められる。

アメリカのデュポン社でも昆虫工場システムを構築しているということだが、ここで実用化されている方法は以下のものであると聞いている。多角体に封入した安定な形の組換えウイルスを、餌となる人工飼料の上に塗布しておく。昆虫はこの多角体を摂食することによって自動的に感染する。この方式では組換えウイルスを昆虫体内に注射により接種しなくてもよいのである。

5 齢4 日目のカイコ1 匹から普通、約1mlの体液を得ることができる。2 万匹のカイコからは20リットル弱の体液が得られる計算になり、科学技術庁組換えDNA実験指

針に定められた“20リットル以上の大量生産”には該当せず、取り扱い基準が緩和されることになる。2 万匹レベルのカイコの飼育技術、バキュロウイルス発現系の技術はすでに蚕糸・昆虫農業技術研究所で開発されている。残されているのは大量生産システムの樹立に向けた組換えウイルスの自動接種システムとカイコからの体液の自動採取システムの開発であるが、これについては現在精力的に進められている。

5. カイコにおける有用物質生産と遺伝資源の利用

蚕糸・昆虫農業技術研究所はカイコのジーンバンクを山梨県の小淵沢にもっている。このジーンバンクでは在来種を127品種、改良種を143品種、突然変異品種を172品種、その他27品種を毎年継代して、その遺伝資源を内外に配布している。また、遺伝資源としての特性を明らかにしつつあるものについては配布せず、保存のみを行っている。

BmNPVの発現系はカイコ幼虫または培養細胞系を宿主とするわけだが、BmNPVの感染性にはカイコの品種や培養細胞の系統で相違があると考えられる。このことは遺伝子発現の程度にも差があることを十分に推察させる。蚕糸・昆虫農業技術研究所では、この観点からバキュロウイルス発現系に適したカイコ品種の育成を行った。

育成に当たっては、いくつかの目標が立てられた。1 つとしては、バキュロウイルス発現系による有用物質生産を行う「昆虫工場」では、カイコを人工飼料を用いて飼育することになる。そのため、低コストな人工飼料を良く摂食するカイコ品種を育成する必要がある。2 つ目として、体液が多く採取できる品種が求められる。有用物質を体液から回収するため、これは幼虫の体重を指標に選抜すれば良いわけである。3 つ目として、これよりも重要な要因であるが、BmNPVが良く感染する品種でなくてはならない。

蛍の発光蛋白質ルシフェラーゼ遺伝子を導入した組換えウイルスを接種し、この発現量を指標に品種の選抜を試みた。その結果、低コスト人工飼料で飼育でき、さらに体が大きなカイコの中でも、ルシフェラーゼの産生量に関して品種間に違いのあることがわかった。この違いはウイルス感染性や遺伝子の翻訳と転写の差などから生じているものと考えられたが、最終的に上記の条件を満たす有用物質生産に提起したカイコ系統を育成した。

6. 昆虫培養細胞系の利用

これまで述べて来たように細胞培養系は昆虫におけるバイオテクノロジーの重要な基盤技術の一つとなっている。

昆虫の組織培養の歴史は古く、1960年代にオーストラリアのGrace博士によって初めて連続的に継代できる培養細胞株が作られた。この細胞株はカイコの卵巣組織由来のものだった。日本では三橋淳博士(現東京農業大学教授)が創始者であり、害虫のバクテリア類を材料にして同じく1960年代に組織培養を開始した。蚕糸・昆虫農業技術研究所でもカイコの胚組織由来の培養細胞株が作出されるなど、その後複数の研究者により多くの細胞株が樹立された。これらの細胞株や寄託された細胞株を含めて約40種が細胞銀行として保存・維持され、カイコの遺伝資源と同様に研究者などの要望に応じて国の内外に配布されている。

昆虫培養細胞の利用法として有用物質の生産がもっとも注目されていることは前述したとおりである。昆虫の培養細胞株は世界中で300株以上も作出されていると聞く。この中で自ら有用物質として抗菌物質を産生している細胞株もある。一方、外来遺伝子の導入が可能で、さらに、昆虫の脱皮ホルモンにより遺伝子発現を随時に制御することができる形質転換細胞株の樹立が進められている。この細胞株は有用物質生産に画期的な培養系であり、先に述べたバキュロウイルス発現系の構築と並んで昆虫を用いた物質生産系の開発に大きな期待がかけられている。

昆虫培養細胞系の他の利用法の一つに害虫防除用の天敵ウイルスの増殖がある。培養細胞系の利用によりウイルスの接種と回収が昆虫体の利用に比べて極めて単純化

される。しかしながら、培養細胞は、昆虫ウイルスに感受性が高いか、培地が安価か、細胞の大量増殖技術が開発されているかなど問題点も多い。カイコ幼虫の体液蛋白質がBmNPVの感染増進効果を持つことが示唆されている。この蛋白質に関する遺伝子を導入した組換えウイルスを作出して、感染増進と有用物質生産を同時に高める研究が実施されている。また、ドウガネブイブイボックスウイルスが産生するスピンドルという蛋白質はBmNPVの感染を増進する。この遺伝子の構造や機能の解明が進んでいる。培地の低コスト化や高密度培養装置の開発も民間企業で急速に進み、1リットルが1ドルという極めて安価な培地も作られている。細胞培養系の利用についての周辺環境は整いつつあるといっている。

7. 結 び

以上、カイコとバイオテクノロジーということで、カイコおよびその培養細胞における遺伝子組換えを利用した有用物質生産を中心に述べてきた。昨年、カイコにおいて、トランスジェニック技術が開発された。ショウジョウバエ、カ、ミバエについて昆虫では4番目のことであり、鱗翅目昆虫としては初めてである。トランスジェニックカイコの作出は、バキュロウイルスを用いた有用物質生産系と並んで、今後におけるバイオテクノロジーの有用な武器になると思われる。

日本複合材料学会2000年度研究発表講演会

主 催：日本複合材料学会

協 賛：(社)繊維学会他

会 期：2000年5月29日(月)～30日(火)

会 場：山上会館・大会議室(東京大学構内)

〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1 TEL：03-3818-3008

地下鉄丸の内線「本郷三丁目」駅下車徒歩10分、地下鉄千代田線「根津」駅下車徒歩12分

一般講演テーマ

1. 材料
 2. 力学特性
 3. 応用解析
 4. 物性および機能
 5. 環境特性
 6. 試験および評価法
 7. 加工法および成形法
 8. 最適構造設計
 9. コストパフォーマンス, LCA
 10. スマートコンポジット
 11. その他
- プログラム詳細及び申込方法については、下記にお問い合わせ下さい。

〒113-8622 東京都文京区本駒込5-16-9 (財)日本学会事務センター内

日本複合材料学会

TEL：03-5814-5801, FAX：03-5814-5820