

私 の 研 究

野蚕を利用したバイオテクから
生物学をめざして三重大学工学部
小林 淳

野蚕のウイルス病は役に立つ

野蚕学会の会員のみならずの多くは、野蚕糸の生産及び利用を専門とされる方だと思いますので、私が野蚕のウイルス病を利用して有用タンパク質の生産ができると書いてもあまりピンとこないかも知れません。いうまでもなく、ウイルス病は野蚕を死に至らしめるため、絹糸生産に百害あって一利なしです。それでも、ウイルスに感染して死にかけた野蚕の体内でタンパク質の生産ができるのです。実は、カイコでは今から10年以上前の1984年にこのような技術が開発された(Maeda *et al.*, 1984)のですが、それを野蚕に応用し、カイコより優れたシステムを開発しようというのが私の研究の当面の目標なのです。

カイコのウイルスを利用したタンパク質生産の手順を図1に示します。組換えDNA技術など遺伝子操作についてご存知ない方にはわかりにくいと思いますが、簡単にまとめると以下ようになります。カイコ

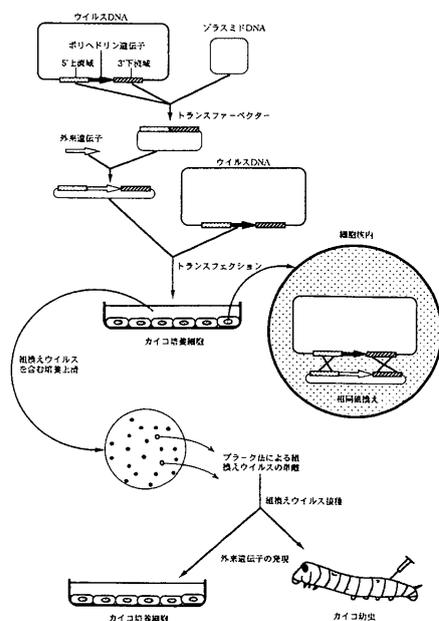


図1 カイコ・バキュロウイルスベクター系における組換えウイルス作製と有用タンパク質生産の手順

に膿病を起こす核多角体病ウイルス(BmNPV)の遺伝子DNAの中の特定の場所に有用タンパク質遺伝子(例えばヒトのインターフェロン遺伝子)を挿入すると、ウイルス自身のタンパク質(多角体タンパクなど)の代わりに大量の有用タンパク質がカイコ体内で生産されるのです。こうしたNPVと昆虫細胞を利用したタンパク質主産システムは、バキュロウイルスベクター系と呼ばれ、世界各国の生物系の研究室で使われるほどポピュラーな昆虫機能を利用したバイオテク技術になっています。

さて、野蚕のバキュロウイルスベクター系の開発に話を戻しますが、野蚕にはカイコよりもタンパク質生産に有利な点がいくつかあります。野蚕がカイコより大型であることもその一つですが、それにも増して、長期保存可能な休眠蛹にウイルスを接種してタンパク質を生産できることは特筆に値します。なぜなら、カイコのバキュロウイルスベクター系では、カイコ幼虫にウイルスを接種してタンパク質を生産させますが、野蚕の休眠蛹を使えば、タンパク質生産作業を飼育から分離し、かつ機械化することにより大幅な効率化が可能になるからです。このようなアイデアは私のオリジナルではなく、1992年にスウェーデンのHellersとSteinerは、セクロピア蚕の休眠蛹にAcMNPVを感染させて抗菌タンパク質を生産し、また、同じ年に中国の張らは柞蚕のNPV(AnpeNPV)と柞蚕休眠蛹を用いて外来遺伝子を発現させることに成功しています。ただし、これらの先駆的研究で開発されたシステムは、その後ほとんど利用されていません。セクロピア蚕の場合には休眠蛹の入手が容易ではないために、また、柞蚕の場合にはウイルスの遺伝子組換えに必要な培養細胞が中国になかったために、それぞれ誰もが簡単に利用できるシステムには成り得なかったのです。

Made in Japanの柞蚕ベクター系

日本における柞蚕の培養細胞樹立の試みは1986年に蚕糸試験場(現:蚕糸・昆虫農業技術研究所)の井上らによって開始されました。その結果、1991年に自発的に伸縮する筋肉様組織を形成するNISES-AnPe-426細胞株が得られ、さらに1995年にこの細胞株から

筋肉様組織を形成しない増殖型の NISES-AnPe-428 (AnPe) 株が分離されました。私はこの AnPe 細胞を蚕糸昆虫研から、また、中国の瀋陽農業大学から遼寧省鳳城で分離された AnpeNPV をそれぞれ分譲していただき、柞蚕の有用タンパク質生産系の開発研究を開始しました。

まず、AnPe 細胞が AnpeNPV に感染するか確認したところ、ウイルス接種後 5 日目にはほとんどすべての細胞の核内にウイルス感染を示す多角体が形成されました (図 2)。次に、AnPe 細胞を使って AnpeNPV のプラーク純化を行った結果、ゲノム DNA の制限酵素による切断パターンが異なる A、B 及び C 株が得られ (図 3)、それらはいずれも柞蚕の休眠蛹を 20 日以内で 100% 致死させました (図 4)。そこで、A 株のゲノム DNA からポリヘドリン (多角体タンパク) 遺伝子を含む約 6.6kbp の *Pst*I 断片をクローニングし、その中から強力なポリヘドリンプロモーターを含む 5' 上流域約 1.8kbp と翻訳領域直後の 3' 下流域約 1.9kbp を切り出し、図 5 のように大腸菌のプラスミド pUC19 に挿入して外来遺伝子発現用トランスファーベクター pApCH1 を構築しました。つい最近、外来遺伝子として大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだ pApCH1 と AnpeNPV のゲノム DNA の組換えにより、ポリヘドリンの代わりに β -ガラクトシダーゼを発現する組換えウイルスの作製及び純化に成功しました。今後、柞蚕の休眠蛹を使ったタンパク生産技術を確認し、この Made in Japan の柞蚕ベクター系を既存のバキュロウイルスベクター系よりも生産性が高く使いやすいシステムに改良して行こうと考えております。

生物工学への展開

以上のように、柞蚕ベクター系の基礎はほとんど完成しましたので、今後はその実用性を追求することになるわけですが、その研究過程で得られた成果を、将来、昆虫機能を利用した生物工学 (Bioengineering) へ展開するのが私の夢です。絹、ハチミツ、染料、フェロモン、抗菌物質、抗凝血物質などの昆虫素材利用に比べると、昆虫機能利用技術はまだ未開拓であり、それゆえに実り多い分野であるといえます。しかしながら、複雑である生物のメカニズムを操る技術の開発は容易でなく、通常その糸口を見つけることすら困難です。ウイルスの利用は、このような障壁の打破に有効であると考えられます。なぜなら、ウイルスは

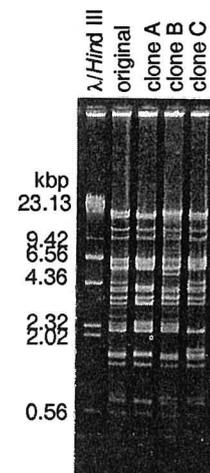


図 3. プラーク純化した AnpeNPV A、B 及び C 株のゲノム DNA の HindIII 制限消化パターン。λ/HindIII、分子量マーカー。original、純化前の AnpeNPV DNA。clone A~C、純化した A~C 株の DNA。

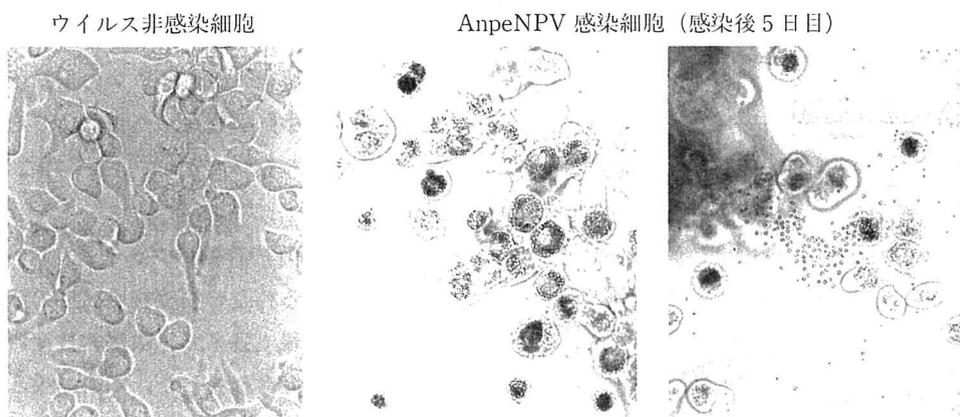


図 2. AnpeNPV に感染した AnPe 細胞

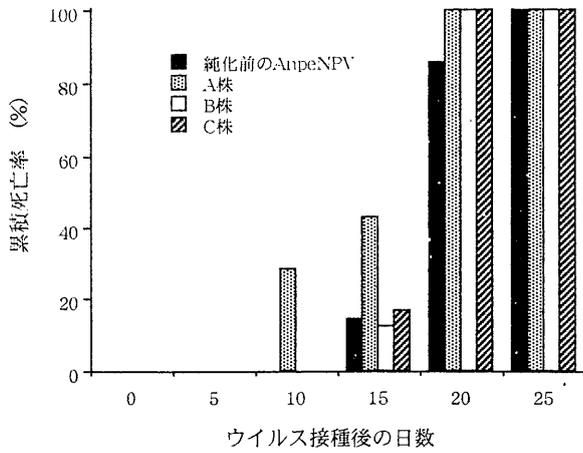


図4. AnpeNPV 接種による柞蚕休眠蛹の累積死亡率

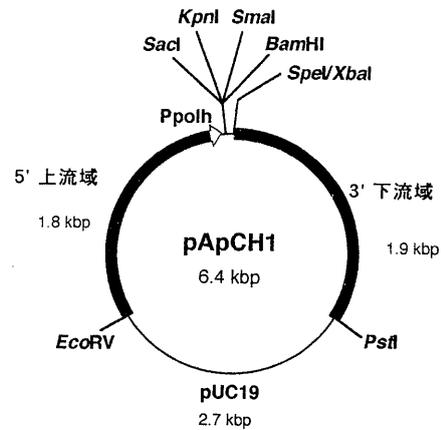


図5. AnpeNPV 株のポリヘドリンプロモーターとポリヘドリン遺伝子の周辺領域を利用して作製したトランスファーベクター pApCH1 の構造。Ppolh はポリヘドリンプロモーター。

長い進化の過程で宿主を分子レベルでうまく制御する能力をすでに獲得しているからです。

さて、柞蚕ベクター系の開発ですが、それ自体はいうまでもなく農学的色彩の強いバイテク(Biotechnology)研究ですが、その本質は休眠及びバキュロウイルスという昆虫に特異的な事象の人為的操作です。おそらくウイルスは休眠中の昆虫の低レベルの代謝活性の中で、自身の増殖を効率よく達成する機構を有しているのではないのでしょうか？あるいは、細胞レベルで休眠を解除して代謝を活性化させているかもしれません。このような可能性を実際に検討することにより、細胞レベルにおける昆虫の休眠制御の分子機構が明らかになり、その応用として、例えば昆虫培養細胞を凍結せずに休眠保存する技術が誕生するかもしれません。これは単なる一つのアイデアにすぎませんが、近い将来、柞蚕ベクター系の開発研究を、このような生物工学に発展させるため努力を続けていきたいと思えます。

最後に、柞蚕ベクター系の開発研究の遂行を手助けしてくれた三重大学工学部分子生物工学講座の学生及

び院生の方々と中国瀋陽農業大学の王学英先生、ならびに、研究を COE プロジェクトとして援助して下さった蚕糸昆虫研の関係各位に心より感謝いたします。

参考文献

小林淳 (1996) カイコを用いた物質生産「動物生産生命工学(村松達夫編)」, 97-109, 文永堂出版。
 Maeda, S. *et al.* (1984) Characteristics of human interferon- α produced by a gene transferred by a baculovirus vector in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Jpn. Acad., 60, 423-426.
 Hellers, M. and Steiner, H. (1992) Diapausing pupae of *Hyalophora cecropia*: an alternative host for baculovirus mediated expression. Insect Biochem. Molec. Biol., 22, 35-39.
 張春発ら (1992) 柞蚕 NPV 転移載体組建及外源遺伝子 Sf 9 細胞, 柞蚕卵巣原代細胞和蛹体中の表達。蚕業科学, 18, 164-172。
 Inoue, H. *et al.* (1991) Insect muscle cell line forms contractile tissue networks *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol., 27A, 837-840.
 Inoue, H. and Hayasaka, S. (1995) A new cell line separated from contractile muscle cell line of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. J. Seric. Sci. Jpan., 64, 79-81.

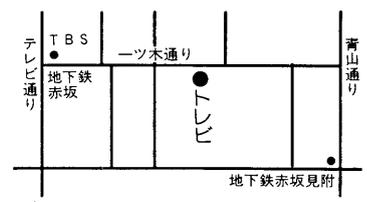


ポディテリア・ワークショップトレビ

AKASAKA Be-In CO. LTD.

3-17-7 AKASAKA MINATO-KU, TOKYO Phone: 03-3585-5925

野蚕類(各種)を使ってドレスからスカートなど小物まで、製造、小売、オーダーも承ります。



東京都港区赤坂3-17-7 <一ツ木通り>