

## 第7章

# 昆虫工学の基礎

山口大学 小林 淳

### 1 昆虫学序論

現在までに記載された地球上の生物は約160万種であり、昆虫はその6割近い約95万種を占めている<sup>1)</sup>。別の最近の統計では、昆虫は約110万種に増加しており、おそらく、未記載のものを含めると少なくとも500万種あるいはそれ以上の昆虫が地球上に存在していると推定されている<sup>2)</sup>。このように、地球は多種多様の昆虫に満ちあふれた惑星であり、種数を生物繁栄の指標とすれば、地球上で最も繁栄しているのは私達人類を含む哺乳類ではなく、昆虫ということになる。

#### 1.1 分類

分類学上、昆虫は、動物界 (Kingdom Animalia) -節足動物門 (Phylum Arthropoda) -大顎亜門 (Subphylum Mandibulata) -六脚上綱 (=昆虫上綱) (Superclass Hexapoda) に属する生物の総称である。節足動物の共通した形態的特徴は、体がキチン質のクチクラ外皮 (外骨格) で覆われた「体節」と呼ばれる節からなり、その名のとおり、節のある脚を有することであるが、その中で昆虫は、体が頭部、胸部、腹部の3部分で構成され、胸部体節に3対の脚 (六脚) が付属しているという特徴により、他の節足動物から区別される。また、六脚上綱はさらに内顎綱 (Class Entognatha) と外顎綱 (=昆虫綱) (Class Ectognatha) に区分され、現存する昆虫は、内顎綱3目 (トビムシ目、カマアシムシ目、コムシ目) と外顎綱29目 (イシノミ目、シミ目、カゲロウ目、トンボ目、カワゲラ目、シロアリモドキ目、バッタ目、ナナフシ目、ガロアムシ目、ジュズヒゲムシ目、ハサミムシ目、シロアリ目、ゴキブリ目、カマキリ目、カカトアルキ目、チャタテムシ目、ハジラミ目、シラミ目、アザミウマ目、カメムシ目、

ネジレバネ目、コウチュウ目、アミメカゲロウ目、シリアゲムシ目、ノミ目、ハエ目、トビケラ目、チョウ目、ハチ目)の合計32目に分類されているが、外顎綱に属する29目だけを(真正)昆虫として扱うこともある<sup>1),3)</sup>。

## 1.2 進化

昆虫の遠い祖先にあたる節足動物は、古生代のカンブリア紀(約6億年前)からペルム紀(=二畳紀)中期(約2億年前)に繁栄した三葉虫であり、この三葉虫から大顎亜門と鉗角亜門(クモ、ダニ、サソリ、カブトガニなど)が分化し、さらに大顎亜門の中で、甲殻類(エビ、カニなど)、多足類(ムカデ、ヤスデなど)および昆虫類が分化したと考えられている<sup>1),3)</sup>。最も古い昆虫の化石は、スコットランドで発見されたトビムシ目(内顎綱)の化石であり、デボン期中期(約4億年前)の地層から出土している。また、アメリカ大陸でもほぼ同じ時代の地層から系統的に離れたイシノミ目(外顎綱)の化石が出土していることから、昆虫の起源は、陸上植物の出現と同じシルル紀(約4億3500万~4億1000万年前)にさかのぼると推定されている。なお、最近作成されたミトコンドリアDNAの配列比較に基づく分子系統樹では、六脚上綱内で内顎綱と外顎綱が分化したのではなく、それぞれ独立に六脚の形態に収斂進化した可能性を示唆している<sup>4)</sup>。デボン紀以降の年代の地層から、昆虫の化石はしばらく出土していないが、上部石炭紀(約3億2000万年前)からペルム紀の地層から翅のある昆虫(有翅昆虫)の化石が大量に出土している<sup>1),3)</sup>。したがって、石炭紀あるいはそれ以前に昆虫の進化において最も重要な翅の獲得が起こり、飛行による広範囲な移動が可能になった結果、鳥類や翼竜が登場する前の古生代後半の空中を独占的に飛び回り、さまざまな環境に適応した多種多様な昆虫に分化し、種数が飛躍的に増加したと考えられている。

## 1.3 生活環

現存する大部分の昆虫目は古生代後半に出現しており、それらの基本的な体制は化石のものとはあまり変わっていないので、多種多様な昆虫の発生の基本プログラム(ボディプラン)が、この時代にはほぼ確立したと考えられる。昆虫は、卵内で胚発生を終えると孵化し、その後何度か脱皮を繰り返して大きく成長するとともに、性的に成熟して成虫となるが、そのパターンから3種類に分類される。無翅昆虫、すなわち、内顎綱昆虫と一部の原始的な外顎綱昆虫は、孵化後の後胚発生において、幼虫と成虫の形態的特徴がほとんど変化しない(無変態類)。有翅昆虫の一部は、幼虫期から未発達な翅(翅原基)が体表に露出しており、幼虫の発育とともに徐々に発達し、成虫脱皮時に翅が完成する(不完全変態類)。それ以外の大多数の有翅昆虫(全昆虫種の約83%)<sup>3)</sup>では、翅原基は蛹になるまで幼虫の体内に格納されており、成虫脱皮時に一気に翅が完成するため、劇的な形態変化が起こる(完全変態類)。昆虫の進化は、無変態類→不完全変態類→完全変態類で進行したと考えられている。

なお、昆虫の卵内での胚発生は、核分裂が細胞分裂に先行して起こる、いわゆる表割ではじまるが、その分子機構についてはショウジョウバエ(ハエ目)で最も詳細に研究されており、特に、突然変異体(ホメオティックミュータント)を用いた解析により、胚子の形態形成を支配する遺伝子群とそれらの相互作用が見事に解き明かされている。興味深いことに、

ショウジョウバエで最初に同定された各体節特有の形態形成を支配する一連のホメオティック遺伝子と相同な遺伝子群が、私達ヒトを含むほとんどすべての多細胞動物に存在しており、それぞれの動物の形態形成を支配していることが明らかになり、現在では、*Hox* クラスタ遺伝子と総称されている<sup>5)</sup>。

昆虫の生殖は、通常、雌雄の交尾による有性生殖であり、交尾後の雌が産下した受精卵から次世代が孵化する。ただし、一部の昆虫は、雌が単為生殖を行う。また、有性生殖と単為生殖をうまく組み合わせて種を維持している昆虫もあり、たとえばミツバチの雌と雄は、それぞれ受精卵と未受精卵(単為発生)から孵化する。また、アブラムシの雌は、通常単為生殖を行い、卵ではなく仔虫(雌)を産んで繁殖(胎生)するが、秋になると雌だけでなく雄の仔虫も産む。これらの雌雄の交尾後、雌は越冬用の受精卵(休眠卵)を産下し、春になると卵から孵化した雌が、再び単為生殖による仔虫の産出を開始する。このように、アブラムシにおいては、有性生殖と単為生殖を季節に合わせて切り替えて生活環を成立させている<sup>6),7)</sup>。

## 2 昆虫の生理機能と代謝<sup>1),6)~8)</sup>

昆虫を有用物質生産のための工場として合理的かつ効果的に利用するためには、対象昆虫の生理学的特性を十分に理解することが必要不可欠である。ここでは多くの昆虫に共通した生理学的特性について記述する。また、昆虫の代謝産物や代謝経路の利用技術開発に関する学問分野を昆虫機能利用学というが、そのいくつかの例もあわせて紹介する。

### 2.1 組織と器官

昆虫は3胚葉動物であり、外胚葉からは皮膚、気管、神経系、感覚器、消化管の前腸と後腸、マルピーギ管などが、中胚葉からは筋肉、脂肪体、背脈管(心臓)、血球、生殖巣などがそれぞれ分化・形成される。一般に中腸は内胚葉由来といわれているが、昆虫の内胚葉の定義に諸説あり確定していない<sup>9)</sup>。以下、各種の組織・器官について、脊椎動物と異なる点を中心に概観する。

昆虫の皮膚は、一層の上皮細胞とその外側を覆うキチンとタンパク質を主成分とするクチクラ外被で構成されており、外骨格として機能している。一部の水生昆虫や内部寄生性昆虫などを除くと、皮膚に開口した気門と体内の各組織をつなぐ気管系を介した酸素と二酸化炭素のガス交換により呼吸が行われている。また、体表には、外界からの物理的および化学的刺激を受容するための昆虫特有の感覚器(複眼、単眼、触角など)が形成されており、それぞれの感覚器で受容された刺激は電気信号として感覚神経(ニューロン)を介して中枢神経系に伝えられる。昆虫の中枢神経系は、頭部にある脳と、胸部および腹部の体節に存在する神経球(神経節)が中央神経索により連結された、いわゆるはしご型神経系であり、ここから発せられた電気信号が、運動神経を介して筋肉などの効果器に伝えられ、運動や行動を引き起こす。なお、昆虫には脊椎動物に存在する有髄神経がなく、神経筋接合部において、脊椎動物のアセチルコリンのかわりにグルタミン酸を神経伝達物質として用いるなど、昆虫特

有の神経系の特性が明らかにされている。また、昆虫の筋肉系は全て横紋筋だけで構成されており、平滑筋は存在しない。

昆虫体内中央を縦走する消化管は、一般に口器から肛門にかけて、前腸、中腸、後腸に区分される。消化・吸収は主に中腸で行われ、通常、中腸内pHはアルカリ性であり、特にチョウ目昆虫ではpH11~12の強アルカリ性を示す。この中腸で吸収された栄養素は、血液(体液)中を輸送され、脂肪、タンパク質、グリコーゲンなどに変換されて脂肪体(ヒトの肝臓に相当)に貯蔵される。一方、血液中の老廃物は、中腸と後腸の境界部(あるいは直腸)から派生したマルピーギ管(ヒトの腎臓に相当)と呼ばれる盲状の細管により吸収され、塩分と水分を再吸収した残りが糞とともに排出される。なお、昆虫は開放血管系であるため、体内の各組織・器官の間隙(血体腔)は血液で満たされている。体の背面中央を縦走する1本の背脈管(心臓)が、腹部後端から頭部に血液を送り出して循環させるためのポンプとして働く。酸素を気管系で供給する昆虫では、血球は全て白血球であり、異物や病原微生物の排除([2.4]項参照)などに働く。

完全変態昆虫では、翅、複眼、生殖巣などが、幼虫から成虫へと変態する過程で発達してくる。これらの器官は、胚発生期に幼虫器官とは別に分化し、幼虫発育中は成虫原基として発達せずに細胞分裂だけを繰り返すが、変態に伴ってそれぞれの成虫器官を形成する。一方、幼虫器官は、変態期に組織崩壊を起こし、細胞死で完全に消失するか、細胞の再構成により形態的に異なる器官に分化する。

## 2.2 代謝経路と栄養要求性

昆虫の解糖系、TCAサイクル、脂質合成系など多くの基本的な代謝経路は、他の動物と共通している。ただし、解糖系に関しては、昆虫の飛翔筋に特徴的なグリセロリン酸シャトルが存在している。このシャトル系が機能すると、飛翔筋の細胞質内で不足する $\text{NAD}^+$ を、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素によるジヒドロキシアセトンリン酸→グリセロール-3-リン酸変換で生産し、生じたグリセロール-3-リン酸をミトコンドリア内でジヒドロキシアセトンリン酸に再変換して細胞質に戻すことができる。飛翔筋以外では、不足する $\text{NAD}^+$ は、乳酸脱水素酵素によるピルビン酸→乳酸の変換で生産するが、乳酸は細胞質内に蓄積するため回復に時間がかかり、 $\text{NAD}^+$ の持続供給は困難である。グリセロリン酸シャトルのおかげで、昆虫の飛翔筋は重量あたりの出力に関して小型自動車のエンジンに匹敵する継続出力最高の筋肉になっている。

栄養要求性に関しても、昆虫と他の動物で共通点が多いが、代謝経路の違いなどによる昆虫特有の要求性も認められる。昆虫とヒトの必須アミノ酸は基本的に同一であるが、ヒトの場合、オルニチン回路のおかげで成人になると必須アミノ酸のアルギニンを合成でまかなえるようになるのに対し、昆虫ではオルニチン回路を形成している酵素反応の1つが欠損しているため、一生を通じてアルギニンを必須アミノ酸として食物から摂取しなければならない。また、昆虫は酢酸やメバロン酸などから細胞膜や脱皮ホルモンの原料となるステロールを合成できないので、動物あるいは植物ステロールが必須脂質である。

昆虫特有の生理機能に関連して、栄養素や代謝産物の体内あるいは血液における分布や動

態に特徴が認められる。飛翔時の筋肉はエネルギー源として大量の脂質を必要とするが、この脂質の体内輸送において、昆虫特有の機構が明らかにされている。すなわち、昆虫では消化管から脂肪体、脂肪体から筋肉などへ血液を介して脂質を輸送する際に、ヒトなど哺乳類と同じようにタンパク質との複合体（リポタンパク質）として輸送するのだが、哺乳類ではリポタンパク質合成時に細胞内で脂質を結合させて血液中に放出し、輸送先の標的組織では脂質をリポタンパク質ごとに取り込んで分解して使用するのに対し、昆虫ではリポホリンと呼ばれるリポタンパク質が細胞表面で脂質を積み込んで血液中を移動し、標的細胞の細胞表面で脂質を積みおろし、脂質の積み込みに再利用される。しかも、必要に応じて特別なサブユニットを追加して、脂質の積み込み量を高めることができる。このようなリポホリンの特性により、長距離飛翔を行う昆虫の筋肉への効率的な脂質供給が達成される。なお、哺乳類のリポタンパク質はトリグリセリドを輸送するのに対し、昆虫のリポホリンはジグリセリドを輸送する<sup>10)</sup>。また、昆虫の血糖はヒトのようなグルコースではなく、トレハロースである。その他の血液成分では、特に食植性昆虫において、ヒトよりも $\text{Na}^+$ が少なく、 $\text{Mg}^{2+}$ とアミノ酸（特にヒスチジン）が多い。

## 2.3 内分泌による発育制御

昆虫の発育において、脱皮・変態と休眠は最も特徴的な現象であり、これらの現象は内分泌系により制御されている<sup>11)</sup>。脱皮・変態に関しては2種類のホルモン、すなわちアラタ体から分泌されるセスキテルペノイド（幼若ホルモン；JH）と前胸腺から分泌されるステロイド（脱皮ホルモン；エクジソン）のバランスにより制御されており、JHは幼虫形質の維持、エクジソンは脱皮の準備とタイミング決定に働く。したがって、JH濃度が高い時期にエクジソンが作用すると幼虫から幼虫への脱皮が起こり、JH濃度が十分に低下した時期にエクジソンが作用すると幼虫から蛹、蛹から成虫への脱皮が起こる。アラタ体におけるJH合成は、脳で合成される2種類のペプチド（アラタ体刺激ホルモン；アラトトロピンとアラタ体抑制ホルモン；アラトスタチン）により拮抗的に調節されている。同様に、前胸腺におけるエクジソン合成も、脳で合成される2種類のペプチド（前胸腺刺激ホルモン；PTTHと前胸腺抑制ホルモン；PTSP）によって調節されている<sup>12)</sup>。すなわち、昆虫の脱皮・変態制御機構の最上位には脳が、最下位には体内の細胞があり、脳はアラタ体（JH）と前胸腺（エクジソン）を介して間接的に各細胞を支配しているのである。なお、エクジソンについては、脊椎動物のステロイドホルモン同様、細胞質内で受容体と複合体を形成して核内に移行し、DNA上の応答配列に結合することにより遺伝子の転写を制御することが明らかにされているが、JHについては、エクジソン同様細胞の遺伝子発現に影響を与えることはわかっているものの、世界中の多くの研究者の努力にもかかわらず受容体の存在はまだ不明である。

休眠は、昆虫が冬の寒さや乾季における乾燥のような発育に不適当な季節をやりすごすために行う一時的な発育停止（遅延）である。休眠する発育段階は、昆虫種ごとに厳密に決まっており、それぞれ卵（胚子）休眠、幼虫休眠、蛹休眠、および成虫休眠と呼ばれている。これらのうち、幼虫休眠は過剰なJHにより、また、蛹休眠はエクジソン合成停止により、それぞれ次の発育段階への進行が抑制されて起こる。また、成虫休眠では生殖巣の発育停止

が起こるので、生殖休眠とも呼ばれるが、JHの不足により誘導される。脱皮・変態において、JHは幼虫形質の維持に働くことはすでに述べたが、成虫においては生殖巣の発育促進を示す。したがって、休眠によりJHの不足した成虫では、繁殖に都合のよい季節になって休眠が終わるまで性的な成熟が起こらないのである。卵休眠に関しては、未分化の胚子の状態で休眠するカイコでは、母親の食道下神経球で合成されたペプチド（休眠ホルモン；DH）が卵形成時に分泌されると、産卵後に発生途中の胚子が休眠に入る。数ヶ月の低温にさらされて休眠が終わると、胚子は発生を再開して孵化するが、母親がDHを分泌しない場合には胚子は休眠せずに発生を続け短期間で孵化する。ヤママユガのほぼ発生を完了した胚子による卵休眠では、胚子体内でペプチド（休眠維持因子；RF）が合成され、その作用により孵化直前の胚子の発育が停止する。DHとRFは、ともにC末端がアミド化されているが、それぞれ24アミノ酸とわずか5アミノ酸からなる全く異なる配列のペプチドである。それぞれのペプチドの作用機作は、まだ十分に明らかにされていないが、興味深いことに、RFにヒトのがん細胞の増殖を抑制（休眠？）させる作用が見出され、新規抗がん薬の候補として期待されている<sup>2)</sup>。昆虫由来の抗がん剤として、モンシロチョウからピエリシンも見つかっている<sup>2)</sup>。

昆虫の耐凍性や耐乾燥性は、通常、発育期よりも休眠期の方が高くなるが、この現象に関しては昆虫の糖代謝が重要である。越冬休眠する昆虫の多くは、休眠に伴って多量のグリセロールやソルビトールなどの糖アルコールが血液中に蓄積し、自動車のエンジンの冷却水に入れる不凍液成分のエチレングリコールと同じように凝固点降下作用を発揮し、厳寒期において休眠昆虫の細胞を凍結から守っている。特にカイコの卵では、休眠開始に伴って卵内に貯蔵されたグリコーゲンの大半をグリコーゲンとソルビトールに変換し、休眠が終結すると再びグリコーゲンに再変換して胚子発生に使用することが明らかにされている<sup>10)</sup>。また、シンジュサンやポプラハバチなどの一部の昆虫では、血糖のトレハロース濃度を上げて耐凍性を高めている。トレハロース濃度の上昇は、耐凍性のみならず耐乾燥性強化にも役立つ。特に熱帯に生息するネムリユスリカの幼虫は、乾季に水たまりが干上がると、脱水して永久的休眠（クリプトビオシス）と呼ばれる乾燥状態に入り、その後雨が降って吸水すると発育を再開するが、乾燥前に大量のトレハロース（乾燥体重の20%）を合成し、細胞内の水と置換してタンパク質や細胞膜を保護している<sup>13)</sup>。

## 2.4 生体防御および共生と寄生

昆虫の免疫系には、脊椎動物のような獲得免疫系、すなわち抗体産生機構がなく、自然免疫系だけで構成されている。自然免疫系は、血球が関与する細胞性免疫と血液成分の作用による液性免疫に区分される。昆虫の血球には、原白血球、顆粒細胞、プラズマ細胞、エノイシトイド、小球細胞などがあるが、これらのうち、顆粒細胞とプラズマ細胞が、主要な細胞性免疫担当血球である。顆粒細胞は活発な食作用を示し、小型の異物や病原微生物を丸ごと取り込んで分解する。大型の異物などに対しては、顆粒細胞とプラズマ細胞が共同で包囲して処理する。

昆虫の液性免疫に関与する血液成分としては、抗菌タンパク質、抗真菌性タンパク質、レ

クチン、リゾチーム、フェノロキシダーゼなどが同定されている。特に、カブトムシから分離されたディフェンシントタイプの抗菌タンパク質（第5編第1章5）は、従来の抗生物質に耐性となった院内感染菌（MRSA）に対して殺菌作用を示すことから、新たな抗生物質として医療への応用が検討されている<sup>14)</sup>。また、昆虫の血液に含まれるフェノールキシダーゼ前駆体（proPO）は、細菌やカビの細胞構成成分であるペプチドグリカン（PG）や $\beta$ -1,3-グルカンで誘導されるカスケード反応により活性型POに変換され、血液中のチロシンやドーパなどのフェノール性物質を酸化し、最終的にメラニンを合成する。メラニン合成経路の中間産物には毒性があるので、微生物の排除に役立ち、また、メラニンは血球による異物や病原体の包囲においても使用される。なお、PGや $\beta$ -1,3-グルカンの存在をpg/mlオーダーの高感度で検知できる検査試薬が、カイコのproPO活性化カスケード反応にかかわる血液成分を凍結乾燥して作られており、従来のリムルステストでは検出できなかったグラム陽性細菌もメラニンの発色で検出可能になっている<sup>15)</sup>。

微生物の中には、昆虫の生体防御の対象となる病原以外に、昆虫の体内で共生するものもある。体内の共生には、細胞外共生と細胞内共生があり、前者の例としては、シロアリの腸内に共生する細菌や原生動物が有名である。これらの腸内共生微生物が合成するセルラーゼは、シロアリが摂食した木材中のセルロースの消化に役立っており、それ以外にもメタン産生細菌、窒素固定細菌、尿酸をアンモニアに変換する尿酸リサイクル細菌などが共生しており、シロアリの栄養生理において重要な役割を果たしている。これらの共生微生物は、同一コロニー内のシロアリ個体間で伝達される。一方、細胞内共生の例としては、まず、アブラムシとグラム陰性細菌ブフネラの共生があげられる。ブフネラはアブラムシ腹部の菌細胞（マイセトサイト）内部に共生し、体外に出ることなく、母親の卵巣を経由して次世代に伝達される。ブフネラは、糖分に富む植物の篩管液を吸汁して栄養を得ているアブラムシに不足しがちな必須アミノ酸を合成してくれるので、アブラムシの生存に欠くことができない。もう1つの例として、野外のさまざまな昆虫種において共生範囲を現在も拡大中と思われるウォルバキアと呼ばれるリケッチアがある。ウォルバキアは昆虫の全身（特に卵巣や精巣）に共生し、卵巣を介して子孫に伝達されるが、ごく稀に異種昆虫へ感染することもある。ウォルバキアが共生している雄の精子は、共生していない雌の受精卵と細胞質不和合性をおこして受精卵を死滅させてしまう。この他にも、宿主昆虫の性比を操作するなどにより、宿主個体が子孫を多く残すように昆虫をコントロールすることが明らかにされている。この共生による昆虫側のメリットについては不明であるが、アズキノムシでは、ウォルバキアの遺伝子が性染色体に転移する現象も報告されている<sup>12)</sup>。

コマユバチ科とヒメバチ科の内部寄生バチは、獲物となる昆虫の体内に卵を産みつける際、卵とともにポリドナウイルスと呼ばれるウイルスを寄主の体内に注入する。ポリドナウイルスは、卵表面をコートして寄主昆虫の生体防御機構から卵を保護し、寄主体内での孵化を可能にするとともに、寄主細胞に感染して遺伝子発現を制御し、発育抑制や生殖巣の発達阻止などの寄主制御を行う。ポリドナウイルスの増殖は寄主体内では起こらず、寄生バチ卵巣のカリックス細胞でのみ起こるが、ハチ自身の発育がこのウイルスの増殖で異常になることはない。しかも、ウイルスゲノムはハチの染色体に挿入された状態で子孫に伝達される。この

ように、寄生バチとポリドナウイルスの間にはゲノムレベルの高度な共生関係が確立している。

### 3 昆虫の細胞株と培養技術<sup>16), 17)</sup>

昆虫の組織培養に関する研究は、脊椎動物よりも遅れてはじまり、連続継代培養可能な昆虫細胞株 (cell line) は、多くの研究者による試行錯誤の末、1962年にオーストラリアの T. D. C. Grace によりはじめて樹立された<sup>18)</sup>。Grace は、チョウ目ヤママユガ科 *Antheraea eucalypti* 雌蛹の卵巣を培養し、遊出してきた細胞を増殖させ、4種類の細胞株を得たが、その1つは今でも世界中の研究室で用いられている。また、この時開発された培地も、Grace 培地という名前で市販されている。それ以降、昆虫細胞株が次々に樹立され (1994年に200あるいは300株以上と推定)、培養技術や培地の改良も進展した。特に、1980年代半ばのバキュロウイルス遺伝子発現ベクター系の誕生とその後の普及により、バキュロウイルスの宿主となるチョウ目昆虫細胞株を中心に、低コスト無血清培地や大量培養法などの開発が飛躍的に進歩した ([4] 項参照)。

#### 3.1 細胞株と培地

現存する32目の昆虫のうち、細胞株が樹立されたのは、ゴキブリ目、バッタ目、カメムシ目、チョウ目、ハエ目、コウチュウ目、ハチ目のわずか7目であり、すでに細胞株が樹立された目でも、ごく一部の種、しかも比較的近縁な種で細胞株が樹立されているにすぎない。このように細胞株が特定の昆虫に偏っているのは、特定の利用目的のために細胞株が作製されてきたからである。カが媒介するヒトや家畜のウイルス病研究や、ヨコバイが媒介する植物ウイルス病研究のためにウイルス媒介昆虫の細胞株が多数樹立された。また、害虫防除に役立つ昆虫病原ウイルス研究や昆虫ウイルスを用いたタンパク質生産技術開発などのために宿主昆虫 (主にチョウ目) の細胞株の樹立も精力的に行われてきた。遺伝学のモデル生物であるキイロシヨウジョウバエに関しては、20種類以上の細胞株が樹立され、研究に役立てられている。

細胞株樹立の成否には、培地と組織の選択が重要である。あらゆる昆虫種の細胞培養に適した万能の培地が存在しないため、昆虫種によっては既存の培地の組成改変、あるいは新たな培地の開発が必要となる。また、胚子や1齢幼虫全体など組織が特定できない全身を初代培養に用いる場合を除くと、細胞株樹立に比較的高頻度で成功している組織は卵巣、脂肪体、血球、成虫原基などであり、それ以外の組織から樹立された例は極めて少ない。しかも、初代培養組織の中のどの細胞がいつ無限に増殖し続ける細胞株になるのか予測できないため、いまだに昆虫細胞株作製技術は経験と偶然が支配する職人芸となっている。このような状況は、細胞株出現機構が解明され、その効率化技術が開発されない限り改善されないであろう。なお、昆虫では、マウスのハイブリドーマ細胞のような細胞融合による細胞株作製はほとんど行われていない。

樹立された昆虫細胞株は、昆虫生体内の組織と異なり無限に増殖し続ける能力を獲得（ヒトなどの細胞のがん化に類似）しているが、通常、ウイルス感受性など由来した昆虫種の特徴を保持しており、由来した組織の性質も多かれ少なかれ残っているため、昆虫生体の代替実験材料として研究に利用されている。染色体数については、ハエ目由来の細胞株は正常な二倍体（ $2n$ ）であることが多いが、チョウ目の細胞株では $4n$ 、 $6n$ 、 $8n$ など高い倍数性を示すことが多く、染色体数が100本を超えるような場合には、正常な染色体の整数倍であるか正確に計数できない。チョウ目昆虫とカメムシ目昆虫の染色体は、一部の真核生物にみられる動原体分散型（紡錘糸の付着する動原体が染色体全長に分散している）であるため、染色体の切断によって生じた染色体断片が細胞分裂の際に正常に分配される。したがって、チョウ目昆虫細胞株の染色体数の増加には、ゲノムの倍数化以外に染色体の断片化もかかわっている可能性が考えられる。

昆虫細胞株は、それぞれの増殖に適した培地を用いて継代維持される。主にチョウ目昆虫細胞株の培養に用いられる Grace 培地、TC-100 培地、IPL-41 培地や、主にハエ目昆虫の細胞培養に用いられる Schneider's *Drosophila* 培地などは半合成培地と呼ばれ、昆虫細胞の栄養要求に基づいて、5～6種類の無機塩、1～3種類の糖、3～4種類の有機酸、20～22種類のアミノ酸、10種類程度のビタミン（主にビタミンB類）などを混合して合成され、さらに増殖促進物質として10%程度の牛胎児血清（FBS）が添加されている。また、アミノ酸およびビタミン混合物をそれぞれラクトアルブミン加水分解物と酵母抽出液で代用した組成の簡単な低コスト培地（約1,000円/l）として、Mitsuhashi & Maramorosch (MM) 培地が開発され、さまざまな昆虫細胞の培養に用いられている。なお、増殖促進物質にはもともと熱処理した昆虫の血液が使用されていたが、哺乳類の細胞培養のために市販されているFBSで代用可能であることが判明し、現在はFBS添加が主流となっている。しかしながら、FBSの供給が必ずしも安定していないことや、狂牛病問題などで動物性添加物の使用制限が強化されたことにより、培地の無血清化が強く望まれている。すでに、チョウ目昆虫用の Sf-900II、Express Hive、EX-CELL405、EX-CELL420、KBM710、ハエ目昆虫用の *Drosophila* SFM などの無血清培地が試薬メーカー（Invitrogen 社、SAFC Bioscience 社、コージンバイオ(株)）で開発され、実用に供されている。ただし、これらの無血清培地の組成はほとんど公表されていない。また、無血清化によりウイルス感受性が著しく低下する細胞が多く見られるが、カイコ細胞の場合、カイコ体液に含まれるタンパク質（PP）を培地に添加するとバキュロウイルス感受性が回復することが明らかにされている<sup>19)</sup>。

### 3.2 培養技術

クリーンベンチあるいは安全キャビネット内での無菌操作や培養容器などの器具類をはじめとする基本的な昆虫細胞の培養技術は、哺乳類細胞とほとんど違いはないが、培養温度がほぼ室温（25～28℃）で、CO<sub>2</sub>インキュベータのような特殊な培養装置を必要とせず、多くの細胞株が無血清培地で良好な増殖を示すなど、昆虫細胞の方が哺乳類細胞よりも手軽に培養可能である。

継代や小規模のタンパク質生産などに必要な数ミリリットル～数十ミリリットルの培養ス

ケールであれば、付着性あるいは浮遊性のいずれの細胞株も適当な大きさのT-フラスコやディッシュで静置培養される。培養スケールを数百ミリリットル程度まで増やす場合、付着性細胞はローラーボトルによる回転培養で、また浮遊性細胞はエーレンマイヤーフラスコによる振とう培養やスピナーフラスコによる旋回培養が適している。なお、一部の付着性昆虫細胞は浮遊した状態でも増殖可能であるため、浮遊性細胞と同様のスケールアップが可能である。また、細胞をゲルビーズ内に包み込むマイクロカプセルや、細胞を吸着させた高分子マイクロ担体（デキストラン、セルロース、ゼラチン、ポリスチレンなど）あるいは多孔質担体（ガラスやセラミックなど）を用いれば、完全な付着性細胞でも浮遊状態で培養可能である。リットル単位の大量培養には、酸素の供給やpHなどのモニターが可能な攪拌槽（stirred tank）型あるいはエアリフト型などのバイオリアクターが利用される。ただし、昆虫細胞は供給酸素の気泡破裂により生じる剪断力ストレス（shear stress）に非常に弱いので、培地にアンチフォーム剤（Pluronic F-68やメチルセルロースなど）を加えなければならない。中空糸膜を使ってバイオリアクター中の細胞に新しい培地を循環させる灌流（perfusion）方式の高密度培養装置も開発されている。実際の培養では、必要な細胞量（密度）、細胞株の増殖特性、コストなどに応じて、これらの培養法のどれかを選択することになる。

## 4

## バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系 (BEVS ; baculovirus expression vector systems)<sup>20)~22)</sup>

### 4.1 バキュロウイルスの特徴とBEVSの誕生

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス（NPV ; nucleopolyhedrovirus）は、昆虫類（チョウ目、ハエ目、ハチ目など）および甲殻類（エビ目など）に特異的に感染する約500種が同定されており、その大半（300種以上）はチョウ目を宿主とする。NPVには、感染細胞から出芽して形成される出芽型（BV ; budded virus）と、感染細胞核内で多角体に包埋される包埋型（ODV ; occlusion-derived virus）の2種類の感染力を有するウイルス粒子が存在する。いずれのウイルス粒子も、大きさが40～60×200～400 nmで、棒状のヌクレオカプシド（ウイルスゲノムDNAとタンパク質の複合体）がエンベロープ（脂質とタンパク質を主成分とする膜）で包まれた構造を有しており、ヌクレオカプシドの内部には、スーパーコイル状態の環状の二本鎖DNAゲノム（90～160 kbp）が1分子入っている。BVとODVの最大の相違点は、エンベロープの組成である。BVのエンベロープはヌクレオカプシドが感染細胞から出芽して脱出する際に獲得した細胞膜の一部なので、脂質組成は昆虫細胞の細胞膜と同一である。一方、ODVのエンベロープは感染細胞核内で合成され、脂質組成が細胞膜とは異なっている。感染細胞核内で形成される多数の多角体の内部には、多角体1個あたり数十～数百個のODV粒子が包埋されている。なお、多角体の形状は、4面体、6面体、12面体あるいは不規則型など、それぞれのNPVに特異的で、直径も0.15～15 μmとさまざまである。

NPVの感染サイクルをカイコを例にとって説明する（図1）。通常、NPVの感染は宿主昆虫が多角体により汚染されたエサ（カイコの場合は桑葉）を食下することによりはじまる。消化管（中腸）内でアルカリ性の消化液の作用によって多角体が分解すると、包埋されてい

たODVが放出される。放出されたODVが消化管（中腸）上皮細胞の微絨毛に付着すると、ウイルスエンベロップと微絨毛膜の融合が起こり、その結果、ODV内部のヌクレオカプシドは細胞内に侵入する。ヌクレオカプシドが核に到達すると、核内でウイルスのゲノムDNAが複製され、新しいヌクレオカプシドが形成される。消化管細胞の核内ではODVやそれを包埋する多角体がほとんど生産されず、ヌクレオカプシドは核から細胞質へ移行し、さらに基底膜から出芽してBVになる。

消化管細胞における一次感染で生産されたBVは、血体腔中に出芽して、血流によってほとんどあらゆる組織に二次感染していくが、特に、脂肪組織（脂肪体）、真皮、気管、血球などでよく増殖する。BVはこれらの二次感染組織の細胞表面に吸着し、エンドサイトーシスによって細胞内のエンドソームに取り込まれると、エンドソーム内の酸性pHによりエンベロップ上の膜タンパク質gp64の構造が変化し、ウイルスエンベロップとエンドソーム膜の融合を引き起こす。一部のNPVではgp64のかわりに別の膜融合タンパク質（LD130など）が同じ役割を果たす。その後、ヌクレオカプシドはエンドソームから細胞質に侵入して核へ到達し、一次感染同様、核内でウイルスゲノムDNAの複製とヌクレオカプシドの形成が起こり、それらは再びBVとして血体腔中に出芽して、三次感染、四次感染…、を繰り返していく。また、二次感染以降の感染細胞では多数のヌクレオカプシドが核内にとどまって

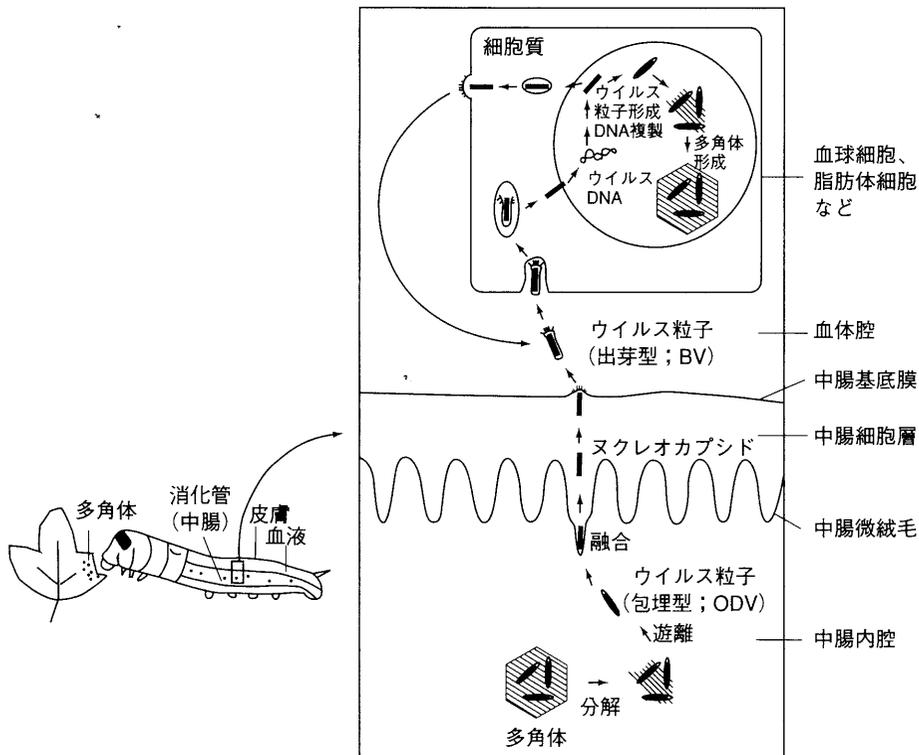


図1 カイコにおけるNPVの感染サイクル

ODVとして多角体に包埋される。多角体は感染後4～5日目に細胞が崩壊すると血液中に放出され蓄積する。そのため透明なカイコ幼虫の血液は、感染末期には濁って乳白色に変化する。その頃になると、幼虫の皮膚は破れやすくなるとともに這い回る異常行動が起こり、多角体を大量に含む濃汁状の血液を周囲にまき散らして致死する。この血液や死体で汚染された桑葉が新たな感染源となり、それを食べた周囲のカイコが次々と病死していくことになる。養蚕が盛んであった頃の日本の農家は、核多角体病を膿病と呼んで恐れてきた。

一方、害虫を宿主とするNPVは、微生物殺虫剤として利用されてきた。NPVは人畜にまったく無害で、宿主昆虫だけに感染するので、無差別に昆虫を殺し、ヒトを含む昆虫以外のさまざまな生物に悪影響を及ぼす化学殺虫剤よりもはるかに安全である。また、ウイルスが結晶性タンパク質の多角体に包埋されているため、製剤として取り扱いやすく、野外に散布してから宿主昆虫に食べられるまで長期間感染力が維持されることも、NPV殺虫剤の利点である。ただし、化学殺虫剤ほどの即効性はない。

NPVに感染した昆虫の細胞核内で大量に生産される多角体の主要構成タンパク質であるポリヘドリン(約30 kDa)はウイルスゲノム中にコードされており、さらにその直前(5'上流)にはポリヘドリン遺伝子の爆発的な発現を誘導する強力なウイルスのDNA配列(ポリヘドリンプロモーター)が存在している。感染後期のvery late phaseにこのポリヘドリンプロモーターが活性化されるため、細胞の全タンパク質の20～30%がポリヘドリンで占められるほどの大量生産が起こり、多角体の形成を可能にする。多角体は昆虫の体外でウイルス粒子を保護するシェルターとして機能するが、昆虫体内や培養細胞におけるBVの感染と増殖には必要でない。

1983年にテキサスA & M大学のM.D. Summersらの研究グループが*Autographa californica* NPV (AcNPV)のポリヘドリン遺伝子をヒト $\beta$ -インターフェロン遺伝子に置換した組換えウイルスを作製し、ヨトウムシの一種*Spodoptera frugiperda*由来のIPLB-Sf21-AE (Sf21)培養細胞に感染させて、活性のあるヒト $\beta$ -インターフェロンを大量に生産することに世界ではじめて成功し、BEVSが誕生した<sup>23)</sup>。当時BEVS開発の国際的な競争があり、日本においても1985年に前田進らがカイコNPV (BmNPV ; *Bombyx mori* NPV)を用いたBEVSを開発し、ヒト $\alpha$ -インターフェロンの大量生産に成功した<sup>24), 25)</sup>。しかも前田らは、カイコ培養細胞(BmN)のみならずカイコ幼虫にも組換えウイルスを感染させ、幼虫におけるヒト $\alpha$ -インターフェロンの発現効率が培養細胞を大きく上回ることを明らかにした。

誕生以来、BEVSは生物学のさまざまな分野の研究者により多種多様なタンパク質の生産に使用されてきた。その過程で、多くのタンパク質が多細胞真核生物の遺伝子発現系としては異例なほど高い効率で生産され、高等真核生物特有の翻訳後修飾も高頻度で起こることが実証されてきた。また、技術改良による操作性の向上や遺伝子発現キットの商業的成功により、昆虫ウイルスおよび昆虫培養細胞とは全く無縁な研究室でもBEVSの導入が容易になり、さらに、受託生産を行う業者も増え、現在では大腸菌とともに簡単で便利なタンパク質生産システムとして世界中で利用されている。

## 4.2 組換えウイルス作製技術

BEVSでタンパク質を大量生産するためには、通常NPVのポリヘドリンプロモーターの直後(3'下流)にタンパク質の遺伝子(実際にはタンパク質のアミノ酸配列をコードする相補DNA)を挿入した組換えウイルスを作製しなければならない。開発当初の組換えウイルス作製技術(図2)では、約130 kbpの環状二本鎖DNAゲノムの目的の位置にタンパク質遺伝子を直接挿入するのが困難なため、タンパク質遺伝子はまずトランスファーベクターと呼ばれる大腸菌のプラスミド(10 kbp前後)にクローニングされた。トランスファーベクターには、ポリヘドリン遺伝子の5'上流域(ポリヘドリンプロモーターを含む)と3'下流域がクローニングされており、その間のポリヘドリン遺伝子をすべてもしくは一部欠失させ、その代わりにタンパク質遺伝子を挿入するための制限酵素部位を加えて構築されている。タンパク質遺伝子を組み込んだトランスファーベクターを、ウイルスのDNAゲノムとともに昆虫培養細胞に同時に導入(コ・トランスフェクション)すると、細胞内ではウイルスDNAの複製がはじまり、大量のウイルス粒子が生産される。その際、通常1%以下の比較的低い頻度で、ウイルスDNAとトランスファーベクターの両方に共通して存在する配列、すなわちポリヘドリン遺伝子の上流域と下流域でそれぞれ1回ずつ、合計2回の相同組換えが起こるので、ポリヘドリン遺伝子がタンパク質遺伝子で置換された組換えウイルスDNAが生じる。その結果、トランスフェクションした細胞の培養上清中に大量に放出されたウイルス(BV)の中に、少数の組換えウイルスが混入することになる。この培養上清を適当な濃度に希釈して培養細胞に感染させ、その後寒天培地を細胞に重層すると、1個のウイルス粒子に感染した細胞を中心にしてその周りの細胞が同心円状に感染してゆく。形成された感染細胞の集団(プラーク)は、正常の細胞より白く見えるので肉眼で容易に識別できる。これらのプラークを光学顕微鏡で観察すると、非組換えウイルスのプラークには感染細胞核内に多数の多角体の形成を確認できるが、組換えウイルスのプラークには多角体がないので明瞭に区別できる(図3)。このように、ポリヘドリン遺伝子とタンパク質遺伝子の置換には、タンパク質を強力なポリヘドリンプロモーターの制御下で効率良く発現させる以外に、多角体の有無による組換えウイルスの識別を可能にするという利点もある。組換えウイルスは、通常2~3回プラーク法を繰り返して完全に純化され、その後タンパク質生産のために培養細胞または幼虫に接種される。

この古典的な組換えウイルス作製技術は、現在でもよく用いられるが、多数の多角体形成プラークの中に混在するごく少数の多角体非形成プラークを顕微鏡観察で見つけ出すことは初心者には必ずしも容易ではない。そこで、さまざまな改良が試みられ、ポリヘドリン遺伝子の下流に隣接するウイルスの増殖に必須な遺伝子(ORF1629)の一部を除去した線状化ウイルスDNAを使用するという画期的な技術が開発され、90%以上の頻度で組換えウイルスを得ることが可能になった。その他に、昆虫細胞内ではなく、酵母、大腸菌、あるいは試験管内でウイルスDNAにタンパク質遺伝子を導入する技術も開発され、昆虫細胞の操作に習熟していない研究者でも簡便かつ迅速に組換えウイルスを作製できるようになっている。

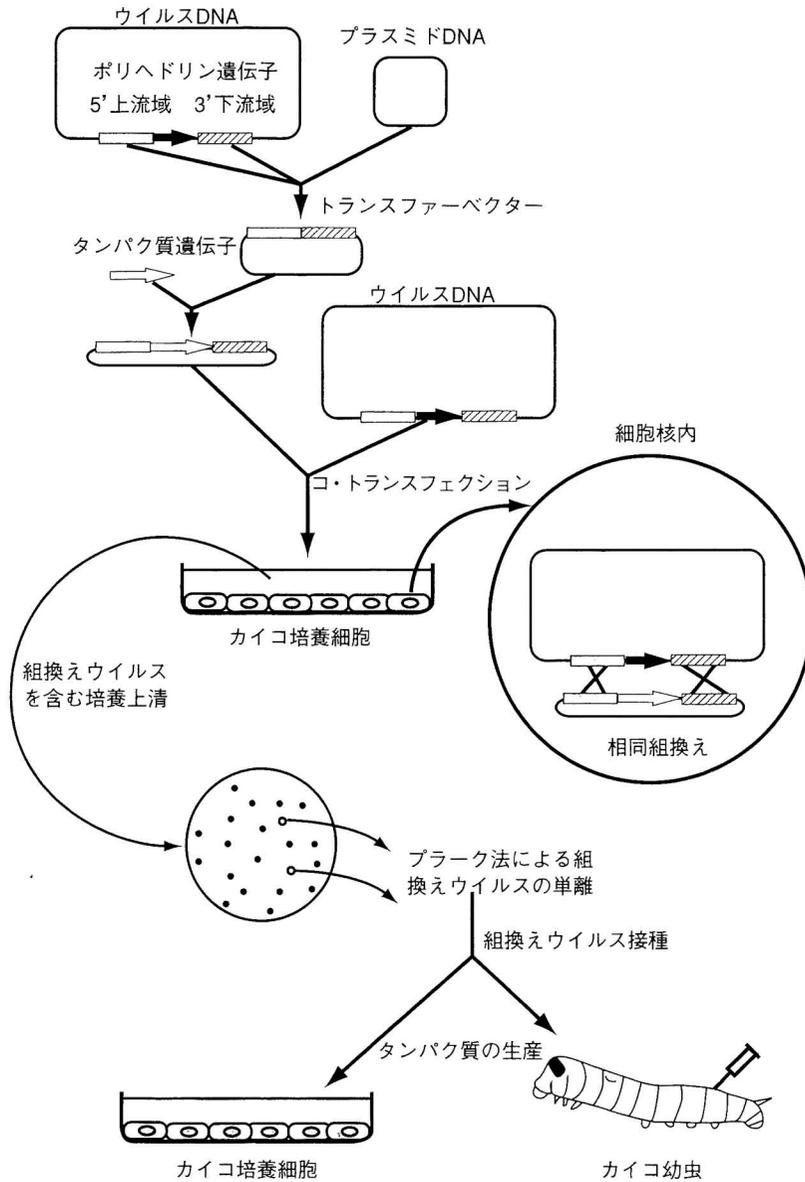
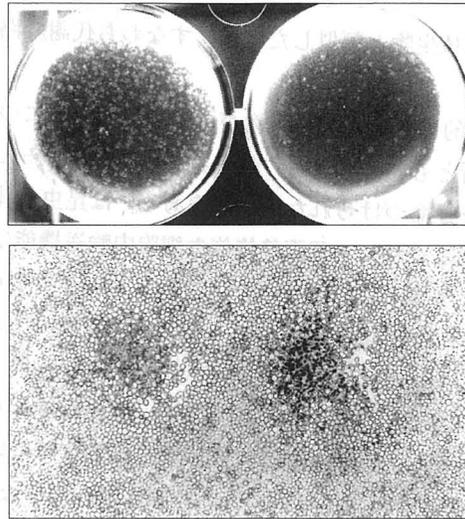


図2 カイコのバキュロウイルス遺伝子発現ベクター (BEVS) におけるタンパク質生産の手順

### 4.3 タンパク質生産特性と限界

強力なポリヘドリンプロモーターを使って培養細胞でタンパク質生産を行った場合、1lあたり (約  $1 \times 10^9$  細胞相当) 数百mgの組換えタンパク質が生産されるといわれているが、実際の生産量はタンパク質ごとに大きく異なっている。特に、分泌経路を通して生産されるタンパク質では、1lあたりの収量が1~5mgに低下する。生産量を支配する要因として発現効率とともに重要なのが、プロテアーゼによる分解である。バキュロウイルスのゲノムにはカテプシンと呼ばれるシステインプロテアーゼ遺伝子がコードされており、感染後期に同



上：ブラークの外見。培養容器の底から見ると白い斑点として確認できる。  
下：ブラークの光学顕微鏡像。左は組換えウイルスのブラーク。右は非組換えウイルスのブラークで、細胞核内の多角体が黒く見える。

図3 NPVが感染したカイコ培養細胞に形成されたブラーク

じくウイルスゲノムにコードされたキチナーゼ遺伝子とともに発現され、それらの遺伝子産物の共同作業により感染昆虫組織の分解・液状化が起こり、多角体の体外への放出を促進する。組換えウイルスにより生産されたタンパク質の中には、このカテプシンにより容易に分解されるものがある。さらに、昆虫細胞自体もさまざまなプロテアーゼを使ってタンパク質の分解や切断を行っており、BEVSで生産するタンパク質もそれらのプロテアーゼの作用により多かれ少なかれ分解を受ける可能性がある。これらの分解による生産量の減少を阻止するためには、各種プロテアーゼ阻害剤処理や、あらかじめカテプシン遺伝子を除去したウイルスの使用が必要となる。

高い発現効率と並ぶBEVSのもう1つの長所は、高等真核生物に特有な翻訳後修飾能力である。分泌シグナルペプチドの切断や前駆体タンパク質のプロセッシングのようなタンパク質の部分的切断、糖鎖付加、リン酸化、アシル化、N末端アセチル化、C末端メチル化、 $\alpha$ アミド化、プレニル化など哺乳類で見られる多くの翻訳後修飾は、昆虫細胞においても起こることが知られており、タンパク質や細胞の種類によって程度の差はあるものの、BEVSにより天然のタンパク質と同等な修飾を受けた生物学的に活性のあるタンパク質が数多く生産されてきた。それゆえに、あるタンパク質を大腸菌でうまく生産できなかった場合には、次にBEVSを試してみるというパターンがよく見られる。真核生物のタンパク質を大腸菌で生産しても、翻訳後修飾は全く起こらないうえに、不溶性の塊（インクルージョンボディ）になってしまう頻度が非常に高いが、BEVSで生産すると、修飾のみならず立体構造を含めた全体的な構造が天然のタンパク質と同等になり、活性を有する可溶性タンパク質が実際に得られる可能性が高い。これはBEVSにおけるタンパク質生産の場である昆虫細胞が、哺乳類

など他の高等真核生物と類似した環境、すなわち代謝経路や酵素群を有していることの反映に他ならない。

BEVSが世界的に普及し、使用例が飛躍的に増えるにつれ、不溶化や不完全な修飾の例も報告され、短所ともいべき能力の限界が明らかになってきた。それらの多くは、ウイルス感染により死を運命づけられた培養細胞あるいは昆虫生体でタンパク質を生産することに起因するものである。特に、翻訳後修飾や細胞内輸送機能は、ウイルス感染の影響で正常な細胞に比べて効率が悪化するため、生産されたタンパク質の糖鎖が著しく不均一になったり、分泌されずに細胞内に蓄積するなど、構造や局在性が天然の物と異なる場合がある。また、ウイルスがコードするカテプシンやホスファターゼ遺伝子産物が、生産したタンパク質の分解や脱リン酸化を起こす場合もある。また、昆虫細胞固有の特性に起因する限界もある。たとえば、N型糖鎖付加修飾に関しては、昆虫細胞では哺乳類細胞に比べてガラクトースやシアル酸転移酵素活性が極端に低いため、哺乳類と同等な構造の複合型糖鎖を形成できない。このことは医薬用糖タンパク質をBEVSで生産して人体に投与した場合、糖鎖の違いにより異物として認識され、活性を十分に発揮する前に血中からクリアランスされてしまうという問題をもたらす。さらに厄介なことには、昆虫細胞ではアレルギー源となるフコースを糖鎖に付加する酵素の活性が強いため、BEVSにより生産された糖タンパク質がアレルギー反応を引き起こす恐れもある。そのため、BEVSで生産した糖タンパク質が安全な医薬・獣医薬として認可されるためには、①糖鎖の完全切除、②糖鎖付加部位のアミノ酸配列変更による非糖タンパク質としての生産、あるいは、③昆虫細胞の代謝改変（[5.3] 項参照）による哺乳類と完全に同等な糖鎖構造の糖タンパク質生産のいずれかの対策を講じることが必要となる。

#### 4.4 新規用途の創出<sup>26)</sup>

BEVSの新しい用途として、組換えウイルス殺虫剤、トランスジェニック昆虫の作製、哺乳類細胞での遺伝子発現（遺伝子治療）などへの応用技術が開発されている。組換えウイルス殺虫剤については本稿の主題から外れるので省略し、トランスジェニック昆虫については次項で詳述するので、ここでは哺乳類細胞での遺伝子発現について紹介する。

バキュロウイルスの宿主範囲は極めて狭く、ヒトなど哺乳類細胞に侵入しても初期遺伝子すら発現されない。ただし、哺乳類の細胞で機能するプロモーターの制御下でマーカー遺伝子を発現するように構築した組換えAcNPVをさまざまな哺乳類の培養細胞株に接種すると、特に肝臓由来の培養細胞で高い発現が示された。しかも、高い感染多重度でも哺乳類細胞に全く細胞毒性を示さない。このようなNPVの特性に着目して、遺伝子治療用ベクターの開発研究が進展している。すでに、NPVのBVエンベロープ上に水疱性口内炎ウイルス（VSV）のエンベロープタンパク質を発現させることにより、肝細胞以外の広範な細胞への遺伝子導入効率が向上し、血清成分による不活化が抑制されるなど実用化に役立つ改良が行われている。また、免疫担当細胞に取り込まれたバキュロウイルスが自然免疫機能を誘導することから、アジュバント活性を持つワクチンベクターとしての利用法も考案されている。

## 5 遺伝子導入による形質転換<sup>15),27)</sup>

BEVSが開発されてから20年以上が経過し、その間さまざまな技術的改良により組換えウイルスの作製や細胞培養のスケールアップが容易になり、利用も増加の一途をたどってきた。これらの利用の多くはBEVSを用いるタンパク質生産の有効性を裏付けたが、ウイルス感染による細胞の機能不全や昆虫特異的な翻訳後修飾などBEVSの問題点も明らかにされた([4.3] 項参照)。これらの問題点の多くは、以下の昆虫細胞あるいは昆虫生体に遺伝子を直接導入する形質転換技術により克服可能である。

### 5.1 培養細胞の形質転換

ハエ目とチョウ目の昆虫細胞株では、遺伝子導入による一時的あるいは安定的形質転換細胞の作製技術が確立しており、それらを用いた一過的あるいは持続的タンパク質生産系の構築が可能である。

ハエ目に関しては、非常に形質転換効率の高いキイロショウジョウバエのS2細胞によるタンパク質生産系が確立しており、ショウジョウバエ発現系(DES; *Drosophila* expression system)としてキットも市販(Invitrogen社)されている。DESでは、目的のタンパク質遺伝子を発現するプラスミドと抗生物質耐性遺伝子を発現するプラスミドの2種類のプラスミドをS2細胞にコ・トランスフェクションし、培地に特定の抗生物質を添加して形質転換細胞を選抜する。比較的多量のプラスミドをコ・トランスフェクションすることにより、抗生物質耐性プラスミドを取り込んだ細胞は確率的にタンパク質発現プラスミドも一緒に取り込むことになる。そのため、ほとんど全ての抗生物質耐性形質転換細胞がタンパク質遺伝子を発現する。より確実にタンパク質遺伝子発現細胞を得るために、抗生物質耐性遺伝子とタンパク質遺伝子を同一のプラスミドに組み込んでトランスフェクションに使用することも可能である。選抜用の抗生物質としては、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシンなどが用いられる。また、タンパク質遺伝子発現には、高い定常的発現効率を有する細胞質アクチンのプロモーターや、熱ショックあるいは金属イオンによる発現誘導可能な熱ショックタンパク質(Hsp70)プロモーターあるいはメタロチオネインプロモーターが用いられる。特に、毒素など正常な細胞生理に悪影響を及ぼすタンパク質遺伝子を発現する場合には、誘導可能なプロモーターの使用が必須である。

チョウ目昆虫細胞に関しても、ハエ目同様、発現プラスミドのトランスフェクションと抗生物質耐性選抜による形質転換細胞作製技術が確立されており、細胞質アクチンプロモーターや熱ショックタンパク質プロモーターとともに、NPVの初期遺伝子*ie1*や*ie2*のプロモーターを利用したタンパク質生産系がBEVSにおけるウイルス感染細胞特有の弊害を回避するためのキットとしてInvitrogen社などから市販されている。通常、BEVSで用いられるポリヘドリンや*p10*遺伝子プロモーターは、NPV感染後のvery late期に極めて高い転写活性を示すが、20種類以上のウイルス遺伝子産物の助けがなければプロモーターとして機能できない<sup>20)</sup>。一方、初期遺伝子プロモーターはウイルス遺伝子産物を全く必要とせず、宿主の転写因子だけで発現調節されるので、形質転換した宿主昆虫細胞でウイルスを使わずにタンパ

ク質を生産できるうえ、ウイルス感染による細胞の機能不全が回避できるので、翻訳後修飾や分泌効率がウイルスを使った発現よりも高くなる。ただし、細胞あたりのタンパク質生産量が低いので、形質転換細胞における遺伝子増幅法や強力なプロモーターの開発が課題となっている。

ハエ目およびチョウ目細胞のいずれの形質転換においても、1ヵ月程度の選抜で抗生物質耐性になった細胞をそのまま使ってタンパク質生産が可能になるが、この段階の細胞は導入したタンパク質遺伝子の存在状態に関して不均一である。すなわち、染色体に抗生物質耐性遺伝子だけが挿入されている細胞が混在しており、タンパク質遺伝子が染色体に挿入されている場合も、挿入された部位やコピー数などによってタンパク質の生産量が異なるため、安定した持続生産を行うためには生産効率の高い形質転換細胞をクローニングしなければならない。

最近、*piggyBac* トランスポゾンを用いてさまざまな昆虫細胞の染色体に確実に目的 DNA 配列全体を挿入する *piggyBac* ベクターが開発され、トランスジェニック昆虫 ([5.2] 項参照) や形質転換培養細胞の作製に利用されている<sup>28)</sup>。このトランスポゾンは、両末端に逆向き反復配列 (ITR) を有する DNA 型転移因子であり、自身がコードする転移酵素の作用で、染色体 DNA 中の TTAA 配列に挿入される。*piggyBac* ベクターは、両末端 ITR 間に導入したいタンパク質遺伝子と抗生物質耐性遺伝子をクローニングしたドナープラスミドと、転移酵素遺伝子だけをクローニングしたヘルパープラスミドから構成されており、これらを昆虫細胞にコ・トランスフェクションすることにより、ドナープラスミドの ITR 間の DNA 配列を丸ごとカセットとして染色体の TTAA 配列に挿入することができる。*piggyBac* ベクターを使用すると、従来の発現プラスミドによる形質転換よりもタンパク質遺伝子を発現する抗生物質耐性細胞の出現頻度が高く、タンパク質生産量も増加するが、安定した持続生産のためには形質転換細胞のクローニングが必要である。

## 5.2 昆虫生体の形質転換

トランスジェニック昆虫作製技術は、*P* 因子と呼ばれるトランスポゾンを用いてショウジョウバエにおいて最初に開発された<sup>29)</sup>。*P* 因子は、*piggyBac* 同様、両末端に ITR を有する DNA 型トランスポゾンであり、自身がコードする転移酵素の作用により DNA 間を転移するので、両末端 ITR 間にマーカー遺伝子と導入したい遺伝子をクローニングしたドナープラスミドと、転移酵素遺伝子だけをクローニングしたヘルパープラスミドを作製し、これらを M 系統 (*P* 因子を保有していない系統) のショウジョウバエ受精卵に注入すると、ドナープラスミドの ITR 間の DNA 配列が染色体に挿入される。DNA を注入した受精卵から発生したショウジョウバエは、マーカー遺伝子の発現の有無により形質転換個体 (トランスジェニックフライ) であるか否か識別できる。*P* 因子の挿入部位はゲノム上に均一に分布しており、それらの部位の DNA 配列に明瞭な共通性は認められない。*P* 因子は外来遺伝子の導入以外に、ゲノム上の遺伝子のランダムなノックアウトによる遺伝子欠損個体の作製にも使用されてきた。このようにして作製されたトランスジェニックフライの解析は、基礎遺伝学研究に重要な知見をもたらし、モデル生物としてのショウジョウバエの地位をますます高めたが、

その小さな体型ゆえに有用タンパク質生産に用いられることはなかった。

ショウジョウバエ以外の昆虫の形質転換のために、*P*因子を含めさまざまなトランスポゾンを変化したプラスミドベクターを受精卵に注入して形質転換昆虫を作製する技術開発が試みられた結果、イラクサギンウワバ（チョウ目）由来の培養細胞TN-368で増殖させたバキュロウイルスに生じた突然変異ウイルス（FP mutant）ゲノム中に見出されたトランスポゾン*piggyBac*を利用したベクターが、ショウジョウバエを含むハエ目昆虫のみならずカイコ（チョウ目）、ゴミムシダマシ（コウチュウ目）、ハバチ（ハチ目）など幅広い昆虫種の形質転換に利用できることが明らかにされ、それぞれの昆虫種の分子遺伝学的研究に役立てられている<sup>28), 30)~32)</sup>。特に、トランスジェニックカイコに関しては有用タンパク質生産のための昆虫工場としての利用が試みられている（第1編第7章「特定研究15」参照）。

カイコの形質転換技術としては、弱毒性バキュロウイルスを用いる方法も開発されている<sup>33)</sup>。すなわち、AcNPVはカイコ細胞の核内に侵入できるがほとんど増殖できないので、感染したカイコは死なずに次世代を残すことができる。そこで、カイコのゲノムDNA断片を一部（標的配列）だけ外来遺伝子で置換してAcNPVに組み込み、それをカイコ幼虫に感染させると、低い確率で生殖細胞に侵入し、その核内でウイルスDNAと染色体DNAの相同組換えが起これ、外来遺伝子が染色体の標的配列と置換して挿入される。形質転換個体の得られる確率が極めて低いために利用例はあまり多くないが、ゲノム中の特定の遺伝子をターゲティングする場合に有効な方法である。形質転換効率を向上させるために、AcNPVに*piggyBac*ベクターを組み込んだ組換えウイルスをカイコの卵に注入する技術改良も行われている<sup>34)</sup>。

### 5.3 形質転換を利用した代謝工学

細胞の代謝反応経路を遺伝子工学的に改変することは代謝工学と呼ばれており、全ゲノムDNA配列が明らかにされた大腸菌や酵母などの微生物を用いた生産系で盛んに行われている。昆虫においても、有用タンパク質生産に用いられているショウジョウバエやカイコのゲノム解析が進展しており<sup>35)~37)</sup>、膨大なゲノム情報が蓄積されているので、これらを整理して、細胞の代謝経路の概要解明と人為的操作技術の確立を達成すれば、たとえばヒトの細胞と同等な翻訳後修飾能力、あるいは、タンパク質を不溶化させない強力なシャペロン能力を有する形質転換カイコ細胞やトランスジェニックカイコなどを合理的に作製することが可能になると期待される。

実際、哺乳類の $\beta$ -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子やシアル酸転移酵素遺伝子などを発現できるように形質転換させたMimic Sf 9細胞（Invitrogen社）が開発・製品化され、BEVSによる哺乳類特有の複合型糖鎖が付加された糖タンパク質生産が可能になっている。また、同様の形質転換を施されたトランスジェニックカイコの作出も試みられている<sup>14)</sup>。一方、昆虫細胞内でシャペロンタンパク質を同時発現することにより、タンパク質の不溶化阻止と正常な複合体形成や分泌の促進も試みられているが、現時点では、組換えタンパク質の修飾、折りたたみ、輸送などにかかわる昆虫細胞内の反応経路の理解が不十分なため、必ずしも期待通りの結果が得られていない。

## 6 昆虫工場

昆虫工場を「昆虫を用いて有用物質を生産するシステム」と広義に解釈すれば、養蚕業、養蜂業、カイガラムシによるラック生産、食料としての昆虫利用など、伝統的な昆虫利用技術が含まれるが、[6]項では、昆虫工場を「昆虫の遺伝子工学および細胞工学技術を応用して開発された有用物質生産システム」に限定することにする。この狭義の昆虫工場は、かつては基盤とする遺伝子発現技術により、BEVSと形質転換系の2種類に大別できたが、最近では形質転換細胞やトランスジェニックカイコをBEVSの宿主に用いる融合システムも構築され、区別が不明瞭になっている。また、生産の場（プラットフォーム）により、培養 (*in vitro*) 系と生体 (*in vivo*) 系に分類されるが、新たに昆虫細胞から抽出した成分を利用した無細胞 (cell free) 系も加わった。本項では、BEVSを中心に、昆虫工場の現状と将来の展望を概説する。

### 6.1 昆虫工場の現状<sup>20), 38)</sup>

現在BEVSは、基礎および応用生物学のさまざまな分野で利用されている。基礎生物学においては、大腸菌でうまく発現できない遺伝子産物の構造と機能の解析に威力を発揮しており、特に構造解析に関しては、多くの組換えタンパク質がX線結晶回折により分析されている。また、BEVSでは複数の遺伝子の同時発現や、発現されたサブユニットの昆虫細胞内での会合が容易なことから、IgGヘテロ二量体やウイルス様粒子が生産され、X線結晶回折やクライオ電子顕微鏡による立体構造解析に役立てられている。最近注目されている技術として、膜タンパク質がバキュロウイルスの出芽型ウイルス粒子のエンベロープに移行する現象を利用したバキュロウイルスディスプレイ法があり、膜タンパク質の機能解析などへの有効利用が図られている。なお、BEVSで生産されたさまざまなタンパク質は試薬として市販されており、たとえばシグマ社のカタログに記載されたBEVS製タンパク質の数は、2002～2003年版の約110件<sup>39)</sup>から2004～2005年版では140件以上と着実に増加している。なお、それらのほとんどはヒトのタンパク質であり、半分弱が酵素で占められている。生産系については、明記されているものはすべてAcNPVベクター系であり、ヨトウムシ細胞(Sf21あるいはSf9)かイラクサギンウワバ細胞(High Five)が使用されている。

一方、応用生物学では、ワクチンや診断薬開発などのためにBEVSが盛んに利用されてきた。BEVSにより病原微生物やウイルスのタンパク質成分を生産すると、それらの多くは天然のタンパク質と同等な抗原性を示し、それらによる実験動物の免疫化が防御免疫を誘導することが報告されている。これらの免疫学的所見は、BEVSがワクチンタンパク質の生産に適していることを示している。上述のウイルス様粒子以外にも、さまざまな病原微生物のタンパク質成分がBEVSを用いて生産され、ワクチンとしての効果が調べられてきた。また、病原微生物やがん細胞のマーカーとなるタンパク質成分をBEVSで生産し、それらを利用した診断薬開発も行われ、実用化の点でワクチンに先行していたが、つい最近、Protein Science社(アメリカ)がAcNPVの培養系BEVSで生産したインフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)を用いたワクチンFluBIÖk<sup>TM</sup>がFDAにより認可され、昆虫工場による実用

的ワクチン生産の道が開かれた<sup>40)</sup>。2006年には、UMNファーマ(株)がFluBIØk™の日本における独占的な開発・製造ならびに販売権を獲得している<sup>41)</sup>。また、獣医薬に関しては、東レ(株)がカイコ幼虫の生体系BEVSを用いてネコ・インターフェロンを1993年から製造・販売し、2000年には13億円の売上げを記録している<sup>42)</sup>。

このようにさまざまな有用タンパク質生産の実績を有するBEVSに対して、形質転換系の昆虫工場はまだ開発途上にあり、BEVSと比較すると生産実績もまだ少ない。しかしながら、ウイルス感染による細胞の機能低下や昆虫細胞の生産能力の限界などBEVSが抱える問題点を克服できるので、BEVSでの生産量があまり多くない分泌性タンパク質や膜タンパク質を形質転換培養細胞で安定に持続生産し、それらの機能や構造の解析に利用されている<sup>27)</sup>。一方、トランスジェニックカイコでは、もともと高純度で大量生産される絹タンパク質とともにヒトのコラーゲンが生産されている(第5編第1章3)参照)。また、同様に、抗菌タンパク質やクモの絹タンパク質などをカイコの絹タンパク質と一緒に生産させることにより、絹糸の品質改善が試みられている<sup>12)</sup>。さらに、このような絹糸腺での生産を、繊維状タンパク質以外に応用する研究も進行中である。この他、代謝改変した形質転換細胞やトランスジェニックカイコをBEVSの宿主に用いて、BEVSで生産されるタンパク質の翻訳後修飾パターンの改変も行われている([5.3]項)。

## 6.2 培養系と生体系の比較

BEVSの利用に際して、生産プラットフォームとして生体系と培養系のどちらを選択するかは、遺伝子産物の生産量だけでなく精製の難易度や生産コストなどを総合して判定しなければならないが、一般にそれぞれ以下のような長所と短所がある。まず、培養系では、比較的均質な発現産物が得られ、細胞を無血清培地で培養すれば分泌生産されたタンパク質の精製が極めて容易になるなどの長所があるが、培養液が高価なことと培養細胞で行われる翻訳後修飾が昆虫の全翻訳後修飾能力の一部にすぎないなどの短所もある。これとは正反対に、生体系では、昆虫の飼育に細胞培養ほどコストがかからないし、昆虫生体内のさまざまな組織にウイルスが感染することにより、培養細胞では不可能な翻訳後修飾が特定の組織で行われるなどの長所がある。特に、BmNPVのBEVSでは、養蚕業の長い歴史の中で確立されたカイコの低コスト大量飼育技術を応用するだけで簡単にカイコ幼虫を用いる大量生産システムを構築できる。AcNPVのBEVSにおいても、ヨトウムシやイラクサキンウワバなどのチョウ目幼虫を使用できるが、カイコに比べて小型の幼虫一匹から生産されるタンパク質が少ないうえ、優れた培養系が開発されているのであまり用いられない。幼虫以外に大型絹糸昆虫(チョウ目ヤママユガ科)の蛹を用いる生体系BEVSもある。中国と日本ではカイコよりも大型のサクサン休眠蛹とそのNPV(AnpeNPV)を用いるBEVSが、またヨーロッパではセクロピアサンの休眠蛹とAcNPVを用いるBEVSが構築されている<sup>43)~45)</sup>。これらの大型絹糸昆虫の休眠蛹を用いた生体系BEVSでは、幼虫飼育設備のない研究室でも蛹を購入して冷蔵保存しておけば、必要ときに冷蔵庫から取り出してウイルスを接種しタンパク質生産を行うことができる。

生体系と培養系におけるタンパク質生産効率を厳密に比較することは困難だが、分泌タン

バク質の場合には単純に体液中の濃度と培養液中の濃度を比較することが可能である。たとえば、BmNPVのBEVSでは、カイコ幼虫とカイコ培養細胞でこのような比較がいくつか報告されており、いずれの場合でも幼虫の発現量が培養細胞を大きく上回る結果が得られている(表1)。休眠蛹における生産効率は、幼虫をさらに上回る場合がある。たとえば、AnpeNPVとシンジュサン(ヤマムユガ科)休眠蛹を組み合わせた生体系BEVSでは、BmNPV/カイコ幼虫系を大きく上回るタンパク質生産効率が示され、休眠蛹が優れた天然のバイオリクターとなることが実証された<sup>46)</sup>。また、幼虫や蛹を用いた生体系では、培養系では不可能な翻訳後修飾の1つである $\alpha$ -アミド化された産物が得られることも報告されている<sup>45)</sup>。

生体系の主な欠点は、培養系よりも産物が質的に不均一になりやすく、しかも昆虫由来のさまざまな成分の中から発現産物だけを歩留まりよく精製することが極めて困難なことである。したがって、生体系の長所を生かしたタンパク質生産の実用化の成否は、ひとえに簡便かつ効率的な精製技術の確立にかかっているといても過言ではない。かつては昆虫細胞培養のスケールアップが技術的に困難であったため、有用タンパク質の大量生産における生体系の優位性は明白であった。しかし、さまざまな技術開発により、バイオリクター内で高密度培養した昆虫細胞における効率のよいタンパク質生産が可能になった([3.2] 項参照)。したがって、現状では、比較的精製が容易な分泌タンパク質を除けば、生体系よりも培養系を選択した方が最終的に精製純度の高い産物を多く回収できる可能性が高くなっている。しかも、昆虫細胞は哺乳類細胞に比べて無血清培地への順化が容易であるため、狂牛病の流行以来大きな問題となっている血清成分の組換えタンパク質への混入も回避できる。今後、さらに低コストの無血清培地が開発され、高密度培養した昆虫細胞におけるタンパク質生産効率が生体系を上回り、また、代謝工学的改変によりさまざまな翻訳後修飾能力を賦与された形質転換培養細胞が作出されれば、少なくともBEVSにおけるタンパク質生産はますます培養系に偏っていくと予想される。

### 6.3 将来の展望

BEVSの昆虫工場は、タンパク質生産における定番的ツールとなっており<sup>47)</sup>、これからも高い頻度で利用され続けるであろう。また、形質転換系は、BEVSではうまく生産できない

表1 カイコのBEVS昆虫工場における培養系と生体系の生産効率比較

タンパク質	生産量		文献
	細胞工場	昆虫工場	
ヒト・ $\alpha$ -インターフェロン	1×10 <sup>7</sup> units/ml上清	1.9×10 <sup>8</sup> units/ml血液	25), 50)
マウス・インターロイキン-3	1×10 <sup>6</sup> units/ml上清	6×10 <sup>6</sup> units/ml血液	51), 52)
B型肝炎ウイルス・表面抗原	3.4 $\mu$ g/ml上清	600 $\mu$ g/ml血液	53)
ネコ・インターフェロン	1.6×10 <sup>6</sup> units/ml上清	6.5×10 <sup>7</sup> units/ml血液	54), 55)
カエル・アミド化酵素	0.25 $\mu$ g/ml上清	40 $\mu$ g/ml血液	56), 57)
マウス・モノクローナル抗体	6.4 $\mu$ g/ml上清	800 $\mu$ g/ml血液	58)

タンパク質の生産やBEVSの機能改善のために今後利用が増大していくと予想される。ただし、大腸菌、酵母、動物細胞などあらゆるタンパク質生産システムにいえることであるが、昆虫工場だけで全てのタンパク質生産が可能ということにはならず、むしろ、昆虫工場に適合するタンパク質生産に特化していくことになるであろう。

最近、新たに開発された昆虫細胞成分を用いた無細胞系は、将来の昆虫工場、というよりも、有用タンパク質生産システムの1つのあり方を示すものとして注目される。すでにSf21細胞の抽出成分を含むキットがTransdirect™ *insect cell* (株島津製作所)として市販されており、その中にはBEVSにおける高いタンパク質生産効率を試験管内でうまく再現できるように工夫された発現ベクターが含まれている。無細胞系では、細胞のタンパク質合成にかかわる成分を人為的にコントロールできるので、わざわざ形質転換しなくても他の生物の細胞成分を混ぜるだけで昆虫にはない生産特性を付与できる。近い将来、このようなハイブリッド型無細胞昆虫工場が出現して、医薬用タンパク質生産などに活用されることになるかもしれない。

## 7 おわりに

本稿の前半では昆虫および昆虫機能の多様性を紹介し、後半では有用タンパク質生産に特化した昆虫機能利用として狭義の昆虫工場を解説してきた。しかしながら、「昆虫を用いて有用物質を生産するシステム」という広義の昆虫工場の立場からみると、タンパク質以外の有用物質生産のための技術開発という広大な分野がほとんど手つかずで残されている。ハエ目(ショウジョウバエとハマダラカ)とチョウ目(カイコ)に続きハチ目(ミツバチ)のゲノムも解読され<sup>35)~37), 48), 49)</sup>、また、さまざまな昆虫および昆虫に関する微生物の遺伝情報が明らかにされつつあることを考えると、今後の昆虫工場の創出は、多種多様な昆虫機能の分子機構を基盤とした物作りシステムの開発にも重点を置いて展開していく必要があると思われる。

## 参考文献 ●

- 1) 三橋淳編：昆虫学大事典，朝倉書店，p.1200 (2003)。
- 2) 赤池学：昆虫力，小学館，p.198 (2006)。
- 3) D. Grimaldi, M. S. Engel：Evolution of the Insects, Cambridge University Press, p.755 (2005)。
- 4) F. Nardi et al.：Science, 299, pp.1887-1889 (2003)。
- 5) 佐藤矩行他：発生と進化，岩波書店，p.238 (2004)。
- 6) 斎藤哲夫他：新応用昆虫学，朝倉書店，p.261 (1986)。
- 7) 中筋房夫他：応用昆虫学の基礎，朝倉書店，p.211 (2000)。
- 8) 池庄司敏明他：昆虫生理・生化学，朝倉書店，p.262 (1986)。
- 9) 日本節足動物発生学会編：昆虫発生学「上」，培風館，p.315 (1996)。

- 10) 茅野春雄：昆虫の生化学，東京大学出版会，p.146 (1980).
- 11) 西田育巧編：昆虫 [超能力の秘密]，共立出版，p.126 (1996).
- 12) 竹田敏：昆虫機能の秘密，工業調査会，p.238 (2003).
- 13) M. Watanabe et al. : *J. Exp. Biol.*, **205**, pp.2799-2802 (2002).
- 14) 竹田敏：昆虫機能利用研究，独立行政法人農業生物資源研究所，p.131 (2006).
- 15) 鈴木幸一他：昆虫機能利用学，朝倉書店，p.225 (1997).
- 16) 三橋淳：昆虫の細胞を育てる，サイエンスハウス，p.165 (1994).
- 17) J. Mitsuhashi : *Invertebrate Tissue Culture Methods*, Springer-Verlag : Tokyo, p.446 (2002).
- 18) T. D. C. Grace : *Nature*, **195**, pp.788-789 (1962).
- 19) T. Kanaya, J. Kobayashi : *J. Gen. Virol.*, **81**, pp.1135-1141 (2000).
- 20) L. K. Miller ed. : *The Baculoviruses*, Plenum Press, p.447 (1997).
- 21) S. Maeda : *Ann. Rev. Entomol.*, **34**, pp.351-372 (1993).
- 22) 小林淳：カイコを用いた物質生産「動物生産生命工学(村松達夫編)」，文永堂出版，pp.97-109 (1996).
- 23) G. E. Smith et al. : *Mol. Cell Biol.*, **3**, pp.2156-2165 (1983).
- 24) S. Maeda et al. : *Nature*, **315**, pp.592-594 (1985).
- 25) 前田進：昆虫ウイルスとバイオテクノロジー，サイエンスハウス，p.162 (1993).
- 26) 山地秀樹，福田秀樹他：生物工学会誌，**8**, pp.579-594 (2004).
- 27) L. I. Gilbert et al. eds. : *Comprehensive Molecular Insect Science* vol. 4 , Elsevier : Oxford p.540 (2005).
- 28) T. Tamura et al. : *Nature Biotechnol.*, **18**, pp.81-84 (2000).
- 29) G. M. Rubin, A. C. Spradling : *Science*, **218**, pp.348-353 (1982).
- 30) A. M. Handler, R. A. Harrell : *Insect Mol. Biol.*, **8**, pp.449-458 (1999).
- 31) A. J. Berghammer et al. : *Nature*, **402**, pp.370-371 (1999).
- 32) M. Sumitani et al. : *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**, pp.449-458 (2003).
- 33) M. Yamao et al. : *Genes and Devel.*, **13**, pp.511-516 (1999).
- 34) M. Yamamoto et al. : *Biotechnol. Bioeng.*, **88**, pp.849-853 (2004).
- 35) M. K. Adams et al. : *Science*, **287**, pp.2185-2195 (2000).
- 36) K. Mita et al. : *Genet. Res. Online*, **11**, pp.27-35 (2004).
- 37) Q. Xia et al. : *Science*, **306**, pp.1937-1940 (2004).
- 38) 小林淳：バキュロウイルス等のゲノム情報を利用した有用タンパク質生産技術「蚕から生産される有用タンパク質の製造方法等の特許・文献調査および製造法に関する技術動向調査報告書」，社団法人農林水産技術情報協会，pp.41-54 (2003).
- 39) 井上元：農林水産技術研究ジャーナル，**26** (7) , pp.5-10 (2003).
- 40) [http : // www.proteinsciences.com /](http://www.proteinsciences.com/)
- 41) [http : // www.umnpharma.com /](http://www.umnpharma.com/)
- 42) 竹田敏：バイオサイエンスとインダストリー，**62**, pp.825-828 (2004).
- 43) 張春発他：蚕業科学，**18** , pp.164-172 (1992).
- 44) Y. J. Huang et al. : *Int. J. Wild Silkmoth and Silk*, **6**, pp.59-71 (2001).
- 45) M. Hellers, H. Steiner : *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **22**, pp.35-39 (1992).
- 46) J. Kobayashi : *Int. J. Wild Silkmoth and Silk*, **7**, pp.37-41 (2002).

- 47) 塚越規弘：組換えタンパク質生産法，学会出版センター， p.188 (2001).
- 48) R. A. Holt et al. : *Science*, **298**, pp.129-149 (2002).
- 49) The Honeybee Genome Sequencing Consortium : *Nature*, **443**, pp.931-949 (2006).
- 50) T. Horiuchi et al. : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, pp.1573-1580 (1986).
- 51) A. Miyajima et al. : *Gene*, **58**, pp.273-281 (1992).
- 52) T. P. Knepper et al. : *Biochemistry*, **31**, pp.11651-11659 (2002).
- 53) N. Higashihashi et al. : *J. Virol. Methods*, **35**, pp.159-167 (1991).
- 54) T. Sakurai et al. : *Science*, **298**, pp.129-149 (1992).
- 55) Y. Ueda et al. : *J. Vet.Med. Sci.*, **54**, pp.563-565 (1993).
- 56) J. Kobayashi et al. : *Animal Cell Technol.*, **6**, pp.41-45 (1994).
- 57) H. Matsuoka et al. : *Vaccine*, **14**, pp.120-126 (1996).
- 58) U. Reis et al. : *Bio/Technology*, **10**, pp.910-912 (1992).