

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19121

研究課題名（和文）昆虫工場に最適な無絹糸腺カイコの作出

研究課題名（英文）Generation of silkworm lacking silk gland suitable for insect factories

研究代表者

日下部 宜宏（Kusakabe, Takahiro）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30253595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：カイコ-バキュロウイルス発現系は、近年、医療薬品や研究試薬のためのタンパク質発現系として着目されている。しかし、発現量を十分確保できていないタンパク質もあり、発現系の効率上昇が望まれている。本申請では、無絹糸腺カイコを作り、絹糸腺と絹タンパク質を作るために消費されるリソースを外来タンパク質の生産に転用し、その生産効率を高めることを目指した。研究の結果、ゲノム編集によって作出した無絹糸腺カイコは多くの個体で発育不全が起こり、組換えタンパク質の発現量も向上しなかった。そのため、研究の後半では絹糸腺を積極的に利用する方に発想を転換し、絹糸腺に効率的に感染できるバキュロウイルスの作出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絹糸腺に効率よく感染するバキュロウイルスについては、変異導入と選抜を繰り返すことにより、絹糸腺に感染しやすくなるウイルスの作製を目指し、6回の絹糸腺での選抜により感染効率が向上したウイルス集団を得た。その集団からウイルスクローンの単離を行い、詳細な解析を進めている。絹糸腺で組換えタンパク質の生産が可能となれば、バキュロウイルス発現系でも繭に組換えタンパク質を生産することが可能となりタンパク質の精製工程が簡略化できる。また、絹糸腺はタンパク質糖鎖の構造が他の組織とは異なっているとの報告があり、ヒト型へ糖鎖改変した組換えタンパク質の生産が容易になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Silkworm-baculovirus expression system has recently attracted attention as a protein expression system for medical drugs and research reagents. However, some proteins have not been expressed in sufficient amounts, and there is a desire to increase the efficiency of the expression system. In this research, we aimed to increase the production efficiency by creating silk gland-free silkworm and diverting the resources consumed to produce silk glands and silk proteins to the production of exogenous recombinant proteins. The results showed that many silk gland-free silkworms generated by genome editing were stunted and the expression of recombinant proteins was not improved. Therefore, in the latter half of the study, we changed the concept to actively utilize silk glands and created a baculovirus that can efficiently infect silk glands.

研究分野：昆虫ゲノム科学

キーワード：絹糸腺 バキュロウイルス発現系 カイコ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

カイコは、クワコを祖先とする家畜化された昆虫であり、その唯一無二の目的はカイコが作る繭から絹糸を得ることであった。しかし、養蚕業の衰退後、カイコの利用は、医療薬品や研究試薬のためのタンパク質発現系へと転換し、大学や民間企業にて新たな価値が見出されている。カイコを利用したタンパク質生産方法のひとつであるカイコ・バキュロウイルス発現系は、大腸菌、昆虫および動物培養細胞など既存のタンパク質発現系と比較して、質的（糖鎖修飾など）・量的に優れた組換えタンパク質生産システムである。

カイコ絹糸腺は、絹タンパク質を大量に生産することに特化した器官であり、5 齢幼虫の体重の 4 割を占める。また、カイコに感染するウイルスを用いたカイコ・バキュロウイルス発現系では、ウイルスが感染したカイコの体液、脂肪体から目的タンパク質を抽出するが、絹糸腺はウイルスの感染効率が低く、組換えタンパク質生産への貢献度は低い。そのため、カイコ・バキュロウイルス発現系では、絹糸腺や絹タンパク質は不必要であり、これらに消費されるエネルギーやタンパク質の原料となるアミノ酸を外来有用タンパク質生産に転用できれば、より効率のよいタンパク質生産が達成できるのではないかという発想に基づき研究を行なった。

2. 研究の目的

カイコは、繭から絹糸を得るために育種された生き物であるが、近年、医療薬品や研究試薬のためのタンパク質発現系として着目され、大学や民間企業にて新たな価値が見いだされている。しかし、発現量を十分確保できていないタンパク質もあり、カイコタンパク質発現系の効率上昇が強く望まれている。本申請では、絹タンパク質を作る絹糸腺を欠失させた無絹糸腺カイコを作り、絹糸腺と絹タンパク質を作るために消費されるエネルギーとアミノ酸を外来タンパク質の生産に転用し、外来タンパク質の生産効率を高めることを目指す。無絹糸腺カイコを作る方法としては、1 細胞トランスクリプトーム解析を用いて、カイコ胚を構成する個々の細胞の遺伝子発現情報を網羅的に取得し、絹糸腺細胞の分化を制御する最上位の転写因子であるマスター遺伝子を同定する。その後、CRISPR/Cas9 による遺伝子の機能破壊を行い、無絹糸腺カイコを作出する。

3. 研究の方法

本研究計画では、① カイコ胚を構成するすべての細胞から、1 細胞ごとに遺伝子発現情報を取得し、発現している遺伝子プロファイルをもとに初期胚を構成する細胞をクラスタリングする。次に、② すでに同定済みである絹糸腺マーカー遺伝子を指標に、将来、絹糸腺に分化する細胞群の同定を行い、③ その細胞群の中で発生初期から発現している転写因子を絹糸腺分化誘導遺伝子（マスター遺伝子）の候補とする。さらに、④ 遺伝子編集技術を用いて候補遺伝子の機能破壊をおこない、カイコから絹糸腺が欠失した無絹糸腺カイコを作成する。最後に、⑤ 目的タンパク質を発現するバキュロウイルスを無絹糸腺カイコに感染させ、そのタンパク質発現量を定量することで、バキュロウイルス-カイコ発現系における無絹糸腺カイコの有用性を調べることとしていた。しかし、遺伝子編集技術を用いて作製した無絹糸腺カイコが極めて脆弱であったこと、また、無絹糸腺としてもサナギの増体重等が認められず、絹糸腺や絹タンパク質の生産に使用するリソースは他の組織の生産に向かなかったことから、研究

の後半では絹糸腺を組換えタンパク質の生産に積極的に利用することに目標を変更し、絹糸腺に効率よく感染・増殖できるバキュロウイルスの選抜育種と絹糸腺おけるバキュロウイルスの感染・増殖を阻害している可能性のある Long non-coding RNA の遺伝子破壊の効果を検証した。

4. 研究成果

まず、絹糸腺分化誘導を引き起こすマスター遺伝子の同定するために、多様なステージの卵や組織からの 1 細胞配列解析のための細胞の分離を試みたが、細胞を生きた状態で単離することが、非常に難しく、なかなか処理後の生存率を上げることができなかった。そこで、絹糸腺が未発達の若齢幼虫（2 齢）の微小な絹糸腺を取り出し、次世代シーケンス解析を行なった。その結果、未発達な絹糸腺で特異的に発現している 5 つの遺伝子を候補遺伝子として選定し、ゲノム編集技術によりノックアウトカイクを作製した。その後、幼虫期における絹糸腺の形成異常を解析した。

ノックアウトカイクの内、胚性致死となった遺伝子を除く 2 遺伝子（KWMTBOM006272 と KWMTBOM15340:BmSage）について、ノックアウトホモの G1 世代を育成した。KWMTBOM006272 ノックアウトカイクについては、T7 ヌクレアーゼ解析により変異アレルをホモに持つことを確認した全個体で正常な吐糸が観察されたため、同遺伝子をノックアウトしても無絹糸腺カイクにはならないことが明らかとなった。一方、BmSage については、先行研究で報告されているように、無絹糸腺カイクとなったが、G0 作製に用いた p50 系統をバックグラウンドに持つ個体で、GFP をレポーター遺伝子としてウイルス感受性を調査したが、顕著なタンパク質発現の向上は認められなかった。



図 1. KWMTBOM006272 と KWMTBOM15340:BmSage のノックアウト

KWMTBOM006272 は、全個体が吐糸。KWMTBOM15340 は、吐糸する個体と吐糸しない個体が分離。

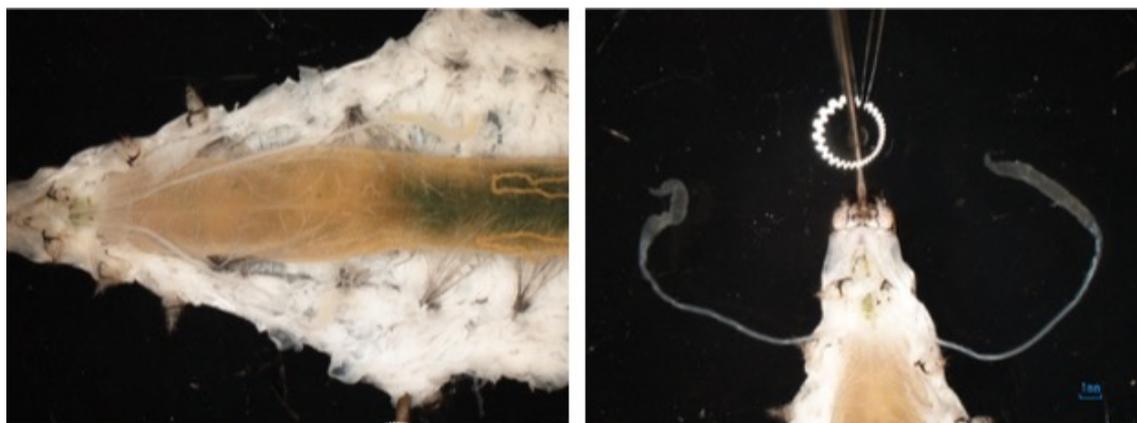


図 2. *Bmsage_KO_G1* 世代に分離した不吐糸蚕の解剖
中部絹糸腺が不発達。後部絹糸腺は確認できず。

そこで、タンパク質高生産性系統である f38 系統への導入を試み、T7 ヌクレアーゼ解析により変異アレルを持つ G0 個体を f38 と交配し、その F2 を観察したが、無絹糸腺カイコが分離しなかった、この交配を 4 区繰り返したが、やはり無絹糸腺カイコが分離しなかったため、p50 系統においてホモ化し無絹糸腺カイコを f38 と交配し、その F2 において分離した無絹糸腺カイコにレポーター遺伝子を発現する組換えウイルスを感染させたが、明瞭なタンパク質高発現は確認されていない。また、当初は、組換えタンパク質生産に絹糸腺や絹タンパク質は不必要であり、これらに消費されるエネルギーやタンパク質の原料となるアミノ酸を外来有組換えタンパク質生産に提供できれば、より効率のよいタンパク質生産が達成できると考えていたが、絹糸腺欠失カイコにおいても顕著な体重等の増加は認められず、外見からホモ個体を判別することはできなかった。そこで、組み換えタンパク質の高生産という目的に立ち帰り、絹糸腺を積極的に利用することとした。本構想の出発点は、バキュロウイルスが感染しにくい絹糸腺で大量の絹タンパク質が合成されることを回避すれば、そのリソースを脂肪体などのバキュロウイルスが感染しやすい組織に回せるのではないかという点にある。

そこで、バキュロウイルス発現系を絹糸腺でも利用するという方向性についても検討した。2つの方法で検討を行ったが、1つ目は、絹糸腺におけるウイルス感染を抑制している可能性がある2つの Long non-coding RNA のゲノム編集に関する研究で、KWMTBOM014361 と KWMTBOM006670 の2つの RNA 領域をノックアウトしたカイコを作出した。いずれのカイコにおいても絹糸腺は正常に形成されたが、組換えタンパク質の発現には大きな影響が認められなかった。そのため、現在、2つのノックアウトカイコの感染、非感染における絹糸腺各部位の遺伝子発現プロファイルを RNA-seq にて解析している。

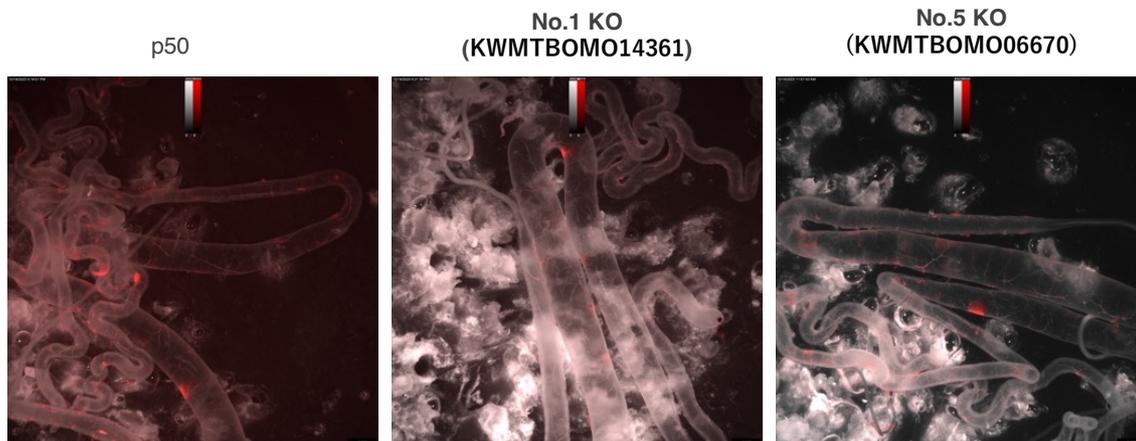


図3. Long non-coding RNA のゲノム編集カイコ絹糸腺におけるバキュロウイルス感染赤色タンパク質を発現する組換えウイルスを感染させたが、顕著な感染効率の改善は認められない。

2つ目は、絹糸腺に効率よく感染するバキュロウイルスの作出で、変異導入と選抜を繰り返すことにより、絹糸腺に感染しやすくなるウイルスの作製を目指した。6回の絹糸腺での選抜により感染効率が向上したウイルス集団を得た。その集団からウイルスクローンの単離を行い、詳細な解析を進めている。

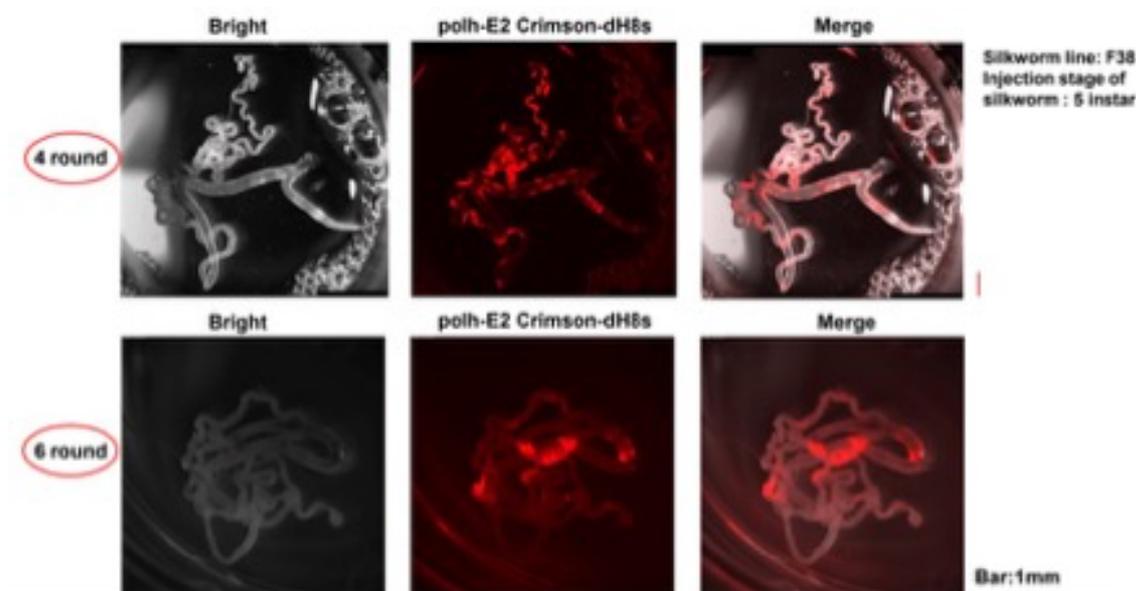


図4. 6回の絹糸腺での選抜により感染効率が向上したウイルス集団

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	門 宏明 (Mon Hiroaki) (30616412)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関