

昆虫等の利用による有用物質の大量生産

—現状と展望—

蚕糸・昆虫農業技術研究所 遺伝育種部

木村 滋

項目

- I. 光るカイコーその意味論
 - ①ホモロジー検索と進化
 - ②ジャーナリスト—研究管理—研究者

- II. カイコの高ウイルス感受性細胞株の誕生と昆虫ウイルスの利用技術の確立—NISES-BoMo-15A II c細胞株とP 6 Eウイルス株の作出
 - ①相同組換えと培養細胞
 - ②ウイルスの変異

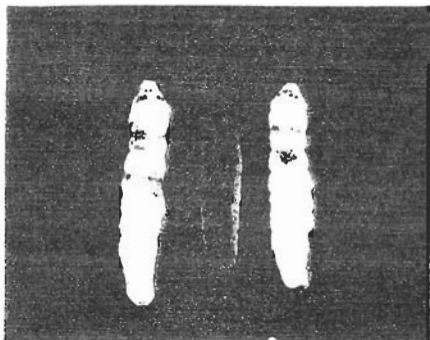
- III. 組換えウイルスの作出—ポリヘドリン& p 1 0発現ベクターの利用
 - ①ウイルスの接種法の改善
 - ②組換えウイルスの選抜法の確立

- IV. バキュロウイルス発現系における遺伝子産物の性状
 - ①大腸菌、酵母等の生産系との比較
 - ②系統発生的な視点として昆虫の位置

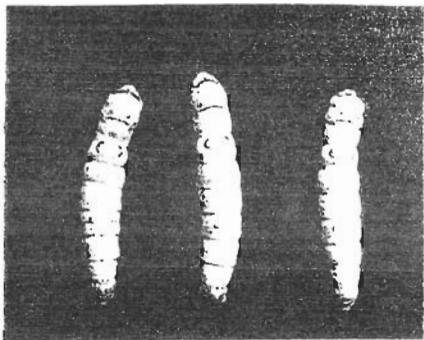
- V. バキュロウイルスを用いた有用物質の生産の現状
 - ①培養細胞系と生体生産系
 - ②製品化

- VI. 今後の展望
 - ①製品開発に向けてのプロセス工学的な発想—ウイルス高増殖性品種の選抜並びに安定生産、製品化技術の開発
 - ②高効率組換えウイルスの作出
 - ③高分子遺伝子産物の生産方法の確立

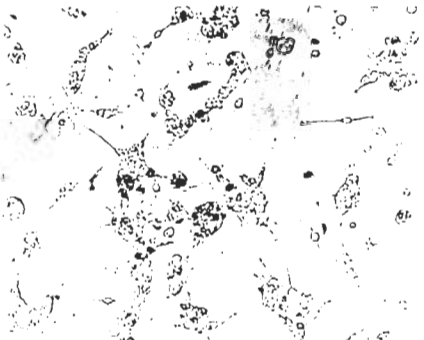
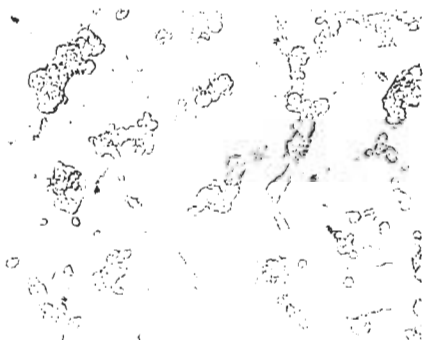
I



(暗いところ)



(明るいところ)

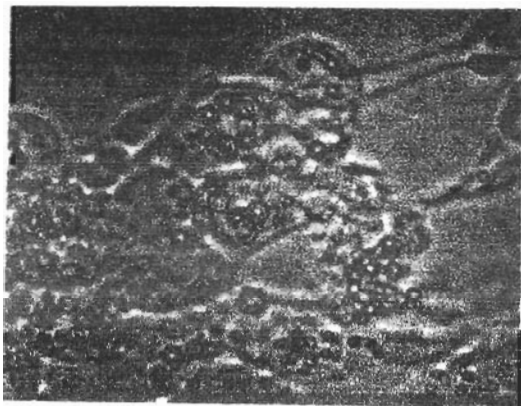


カイコ核多角体病ウイルスを用いた新しいバキュロウイルスベクターの開発

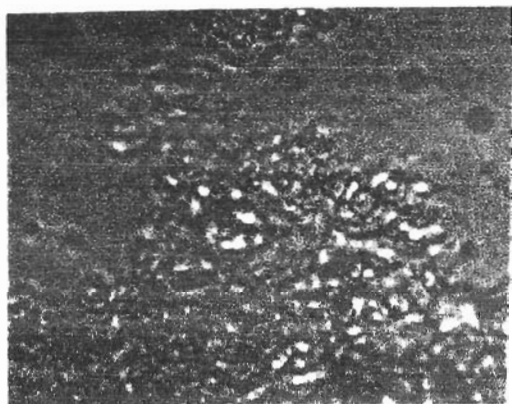
上段写真2枚とも右側がポリヘドリンプロモーターを用いた組換えウイルス接種カイコ、左側がp10プロモーターを用いた組換えウイルス接種カイコ（両者ともホタルのルツフェラーゼ遺伝子を導入）、中央は対照でウイルス無接種カイコ。

下段左写真はポリヘドリン組換えウイルスに感染したカイコ培養細胞NISES-BoMo-15A II c、右写真はp10組換えウイルスに感染したカイコ培養細胞NISES-BoMo-15A II cで黒い粒のように見えるのが形成された多角体。

II



B o M o - 1 5 A II c 細胞に感染した
B m N P V



B o M o - 1 5 A II c 細胞に感染した
組換え B m N P V



図1-2 多角体の電子顕微鏡による観察。黒く見える多角体に多数のウイルス粒子が包埋されている

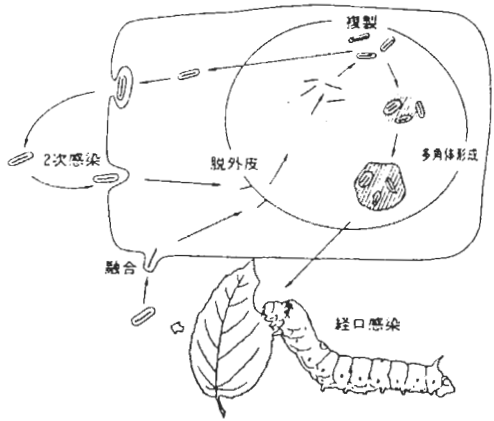


図2-9 カイコ核多角体病ウイルスの感染と細胞内での増殖

ウイルスの遺伝子発現順位

- 1) immediately early genes
DNA複製遺伝子など
- 2) late genes
ウイルス構造遺伝子など
- 3) very late genes
ポリヘドリン遺伝子など

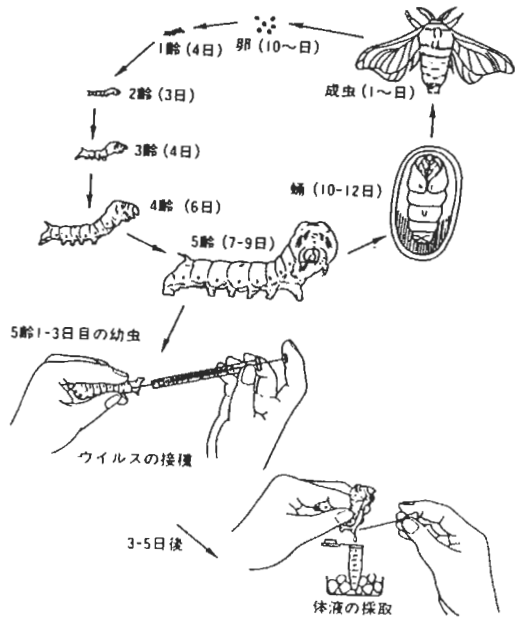


図4-4 カイコの成長と幼虫での外来遺伝子の発現

III

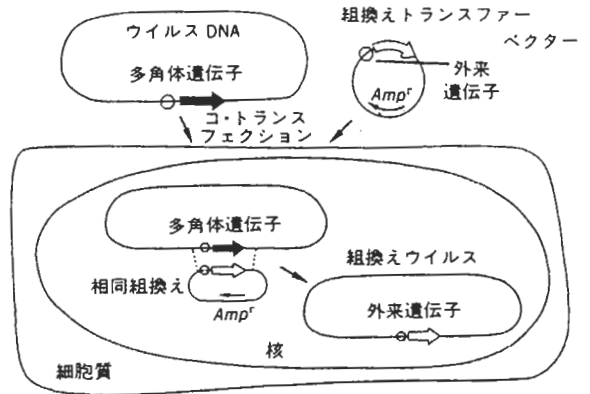


図 4-2 細胞中でのトランスファーベクターとウイルス DNA との組換え

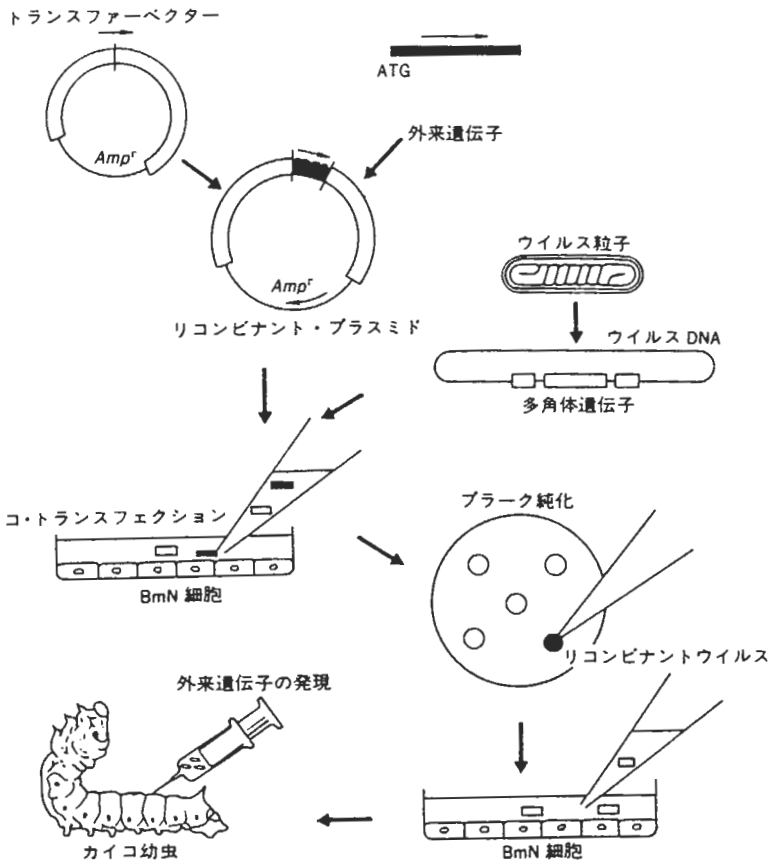
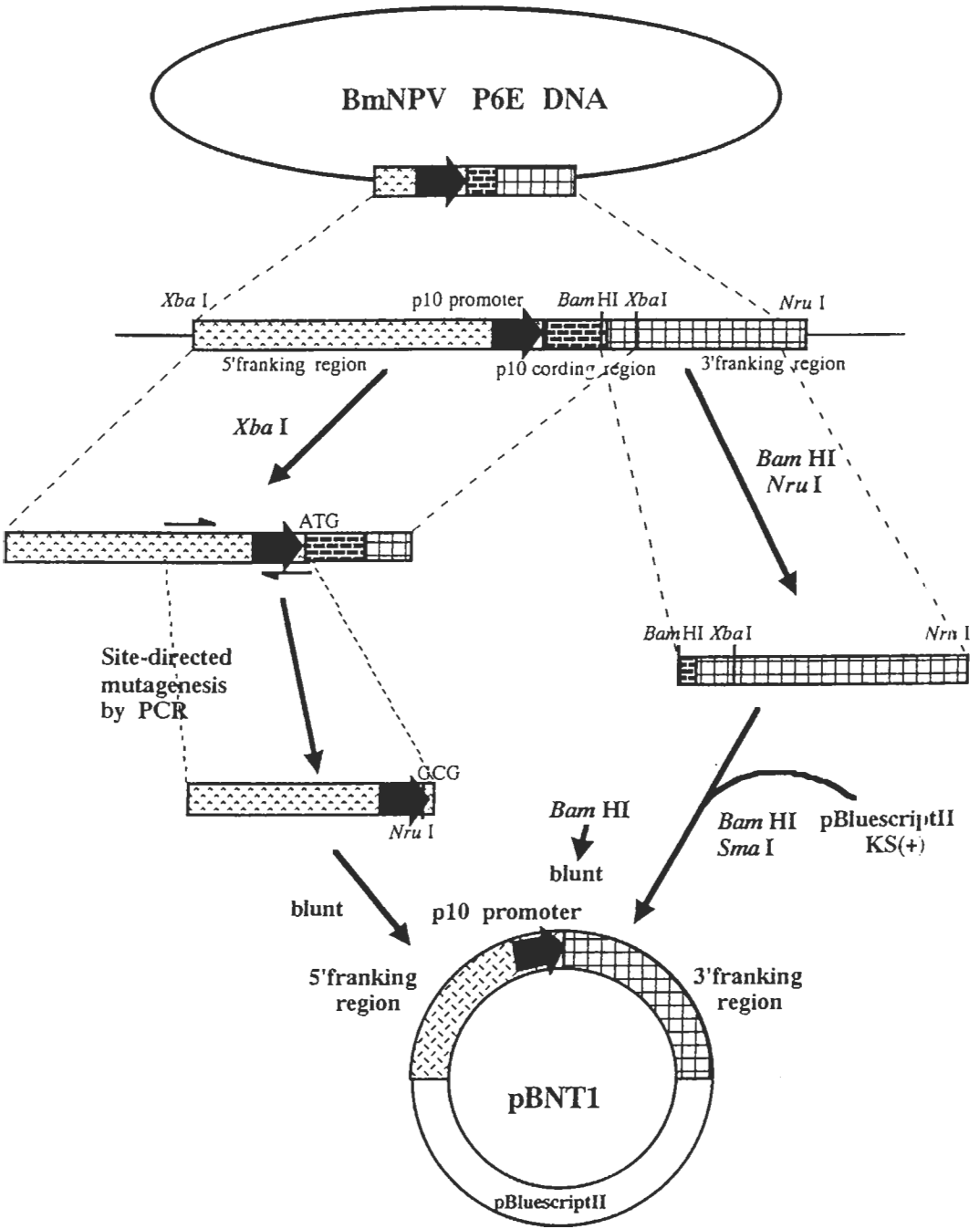
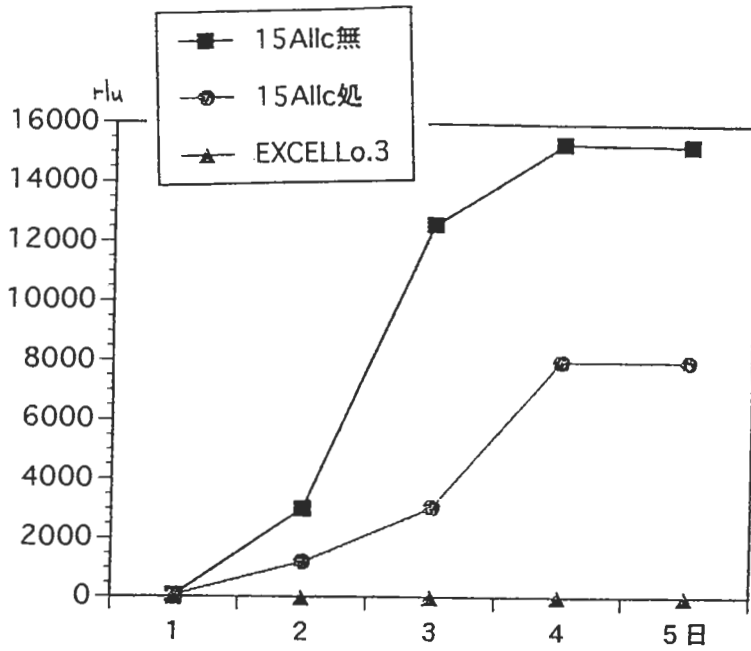


図 4-1 バキュロウイルス発現ベクターへの外来遺伝子の導入と発現の手順





異なる細胞株におけるルシフェラーゼ遺伝子の経時的発現

ルシフェラーゼ遺伝子発現に及ぼす蚕体液の
時期的効果

体液接触時間	蛍光発光強度
① 接種後 6 時間	570 rlu
② // 20 時間	2,337
③ // 4 日間	1,844
④ 体液無添加	46.71
⑤ 無処理	0.08

SES-BoMo-15A・EX-CELL 400(0.3%FBS)

IV

バキュロウイルス発現系における遺伝子産物の性状

バキュロウイルス発現ベクターの有利な点は発現させたタンパク質が本来のものと同じ修飾を受けることである。

- 蛋白質の細胞内局存性
- 分泌シグナルの切断と分泌
- 糖鎖の付加 → 安定性、抗原性
- リン酸化 → 酵素活性、ガン化
- アミド化 → 生理活性、安定化
- 高次構造・抗原性 → ワクチン

V

バキュロウイルスベクターによる有用蛋白質の生産

特許公開公表 (1990.4~1994.2)

ウイルス-寄主	件数	用途
A c NPV-S f	18	ワクチン、獣医薬、検査試薬、診断薬、医療薬、医試薬、医薬
B m NPV-カイコ	6	診断薬、ワクチン、獣医薬、畜産薬、検査試薬、医療薬
B m-A c NPV カイコ、S f	1	獣医薬
不明	1	殺虫剤

A c : *Autographa californica* (ヤガの一種)

B m : *Bombyx mori* (家蚕)

S f : *Spodoptera frugiperda* cell line (ハスモンヨトウ細胞株)

B m-A c NPV : ハイブリッドNPV

日本 : 17、米国 : 7、イタリア : 2

ワクチン : 日本脳炎ウイルスの非構成蛋白、インフルエンザウイルスHA蛋白、パラミクソウイルスの融合蛋白、単純性ヘルペスウイルス2型の糖蛋白、牛疫ウイルスの核蛋白など

診断薬 : 成人T細胞白血病ウイルス外皮蛋白、C型肝炎ウイルスの構造蛋白、β2-グリコプロテインIなど

獣医薬 : ネコ・インターフェロン、ニワトリ・ニューカッスル病ウイルスの抗原蛋白、狂犬病ウイルス糖蛋白、ブタ・ヘルペスウイルスの糖蛋白

畜産薬 : ブタ成長ホルモン

検査試薬 : アルドースリダクターゼ、1、25-ヒドロキシビタミンD3受容蛋白、ホスホリパーゼA2

医療薬 : 成長ホルモンレセプターのホルモン結合蛋白、インスリン様成長因子の誘導体ポリペプチド、ヒト神経成長因子

医試薬 : ペプチジルグリシンα-ヒドロキシ化モノオキシゲナーゼ

医薬 : ヒルジンはヒルジンはヒルジン様ポリペプチド、ヒト・プラスミノーゲン変異体

殺虫剤 : 原始狩猟クモの殺虫毒(プレクトキシン類)

培養器としてのカイコ (Part-I)

フローチャート :

