

遺伝子組換えカイコの養蚕農家による飼育

桑原伸夫*

はじめに

群馬県の養蚕は、畑作地帯の基幹作目として農家の収入源の大きな位置を占めてきた。繭生産量は1954年（昭和29年）から全国第1位を続けていて、日本一の養蚕県である。しかし、外国からの安い生糸や絹製品等の輸入増大による国産の繭と生糸の価格低迷により、養蚕農家数、繭生産量は減少し、養蚕業は厳しい状況におかれている。今後、養蚕業の振興を図るには、外国産と差別化された付加価値の高い特徴ある繭生産が必要となっている。

カイコでは、2000年（平成12年）に農研機構（茨城県つくば市）で遺伝子導入法が開発され、本来カイコが持っていない遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコの作出が可能となった。この技術を用いて、これまでの交配による品種育成では不可能であった新たな特徴を有する遺伝子組換えカイコの開発が進められている。

遺伝子組換えカイコの大量飼育が実用化すれば、付加価値の高い繭生産による農家所得の向上と、これまでの養蚕業と異なる新たな「カイコ産業」の創出が期待できる。このため、当センターでは、農家による遺伝子組換えカイコ飼育の早期実現に向けた技術開発を行っている。ここでは、その研究の概要と成果について紹介する。

1 遺伝子組換えカイコの作出法

図1が遺伝子組換えカイコの作出方法である。作製したカイコに導入する遺伝子を産卵直後の卵に注射（図2）すると、カイコの染色体DNAに挿入される技術が開発された。この時、生殖細胞の染色体に挿入されれば、その形質は遺伝するため、注射した卵からふ化した幼虫を成虫まで飼育し、その成虫を交配して産卵させ、注射した次の世代で出現する遺伝子組換えカイコを選抜できれば遺伝子組換えカイコの作出となる。

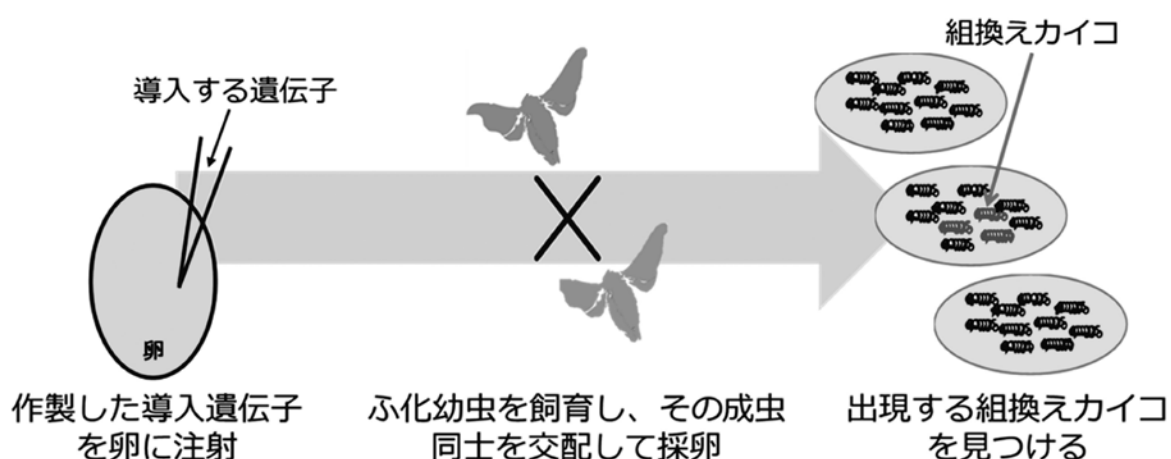


図1 遺伝子組換えカイコの作出方法

*くわばら のぶお・群馬県蚕糸技術センター



図2 卵への導入遺伝子の注射

選抜したカイコに導入された遺伝子は次の世代に確実に遺伝するので、継代飼育を続けるだけで遺伝子組換えカイコが永続的に得られる。このため、卵への注射は、最初の1回で済む。

2 遺伝子組換えカイコの利用法

卵からふ化したカイコ幼虫は、約25日で体重が1万倍にもなり、糸を吐いて繭を作る。カイコの繭糸はタンパク質できていて、カイコはタンパク質の

合成能力が非常に高い。繭糸はのり状のタンパク質であるセリシンと、繊維状のタンパク質であるフィブロインで構成されている（図3）。シルクとして利用されるのは、精練剤を用いて外側のセリシンを除いたフィブロインの部分である。

遺伝子組換えカイコの利用は、大きく分けて二つの用途で研究開発が進められている。一つは、従来の糸繭生産ではない有用物質生産であり、もう一つは、シルクに新たな機能を付与した高機能シルク生産である（図3）。

有用物質生産では、カイコが持っている絹糸腺の高いタンパク質生産能力を利用して、検査薬や化粧品などの原料となるタンパク質を生産する。絹糸腺は繭糸の原料となる液状絹を合成・分泌する器官である。前部、中部、後部の3つの部分に分けられ、後部絹糸腺からフィブロイン、中部絹糸腺からセリシンが分泌される。これまでに、繭糸のセリシン層に導入遺伝子のタンパク質を分泌する遺伝子組換えカイコが作出されている。セリシン層に分泌されたタンパク質は、繭から蛹を取り除いた繭層を抽出液中で攪拌するなどの処理により、簡単に抽出可能である。さらに、抽出液中には、繭糸タンパク質の混入がないため、有用タンパク質の精製も非常に容易となる。

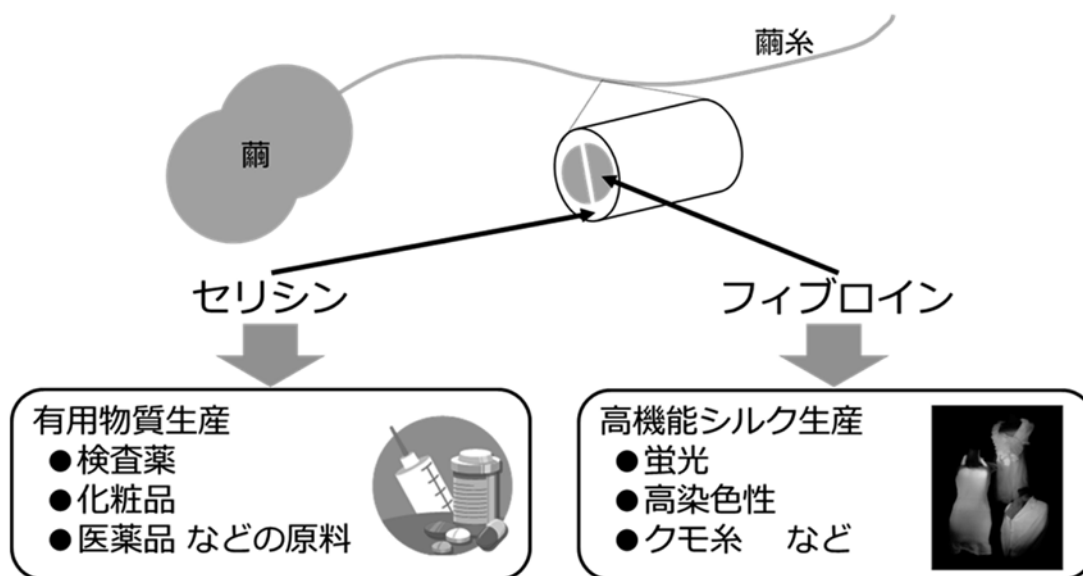


図3 遺伝子組換えカイコの利用法

一方、高機能シルク生産は、新たな機能の付与や機能性の向上を目的に、シルクとして利用されるフィブロインにタンパク質を発現させたり、フィブロインのアミノ酸組成を変えるなどして、これまでにないシルクを作るものである。シルクの洗濯ができない、黄ばむといった欠点を補うものは実現していないが、クラゲやサンゴの蛍光タンパク質をフィブロインに結合した形で発現させることで、蛍光を発するシルクが開発されている。また、フィブロインのアミノ酸組成を変えることにより染色性が良く、超極細のシルクも開発されている。

3 カルタヘナ法に基づく使用規制

遺伝子組換えカイコは遺伝子組換え生物にあたることから、飼育にあたっては、野生の動植物等に影響を及ぼさないように管理するための「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下、「カルタヘナ法」という。）に適合した取扱いが求められる。カルタヘナ法では、使用形態に応じて第二種使用と第一種使用に分けられる。

生きた遺伝子組換えカイコを外に出さなければ、生物の多様性に影響を及ぼすことはないので、第二

種使用は施設内から出さないような拡散防止措置を執って使用するものである。これに対して第一種使用は、生物の多様性に影響を及ぼさないことが認められた場合にのみ、拡散防止措置を執らずに使用することができるものである。なお、カルタヘナ法では、遺伝子組換えカイコごとに使用申請が必要となる。

カイコは、野外の桑にいるクワコと交雑可能で、遺伝子組換えカイコとクワコの交雑により導入遺伝子が野外に広がる可能性が指摘される。これに対応するため当センターでは、既存の施設や器具を利用した農家による遺伝子組換えカイコの飼育技術の開発を進めている。

4 遺伝子組換えカイコの改良

遺伝子組換えカイコの作出には、繭が小さく、大量飼育が難しい実験用品種のカイコが使われていて、作出された遺伝子組換えカイコをそのまま実用飼育に移すことができない。このため、農家飼育に適応するように改良し、大量飼育ができるようにする必要がある。

当センターで育成した交雑種「ぐんま200」は、群馬県独自のオリジナル蚕品種として、県内の養蚕

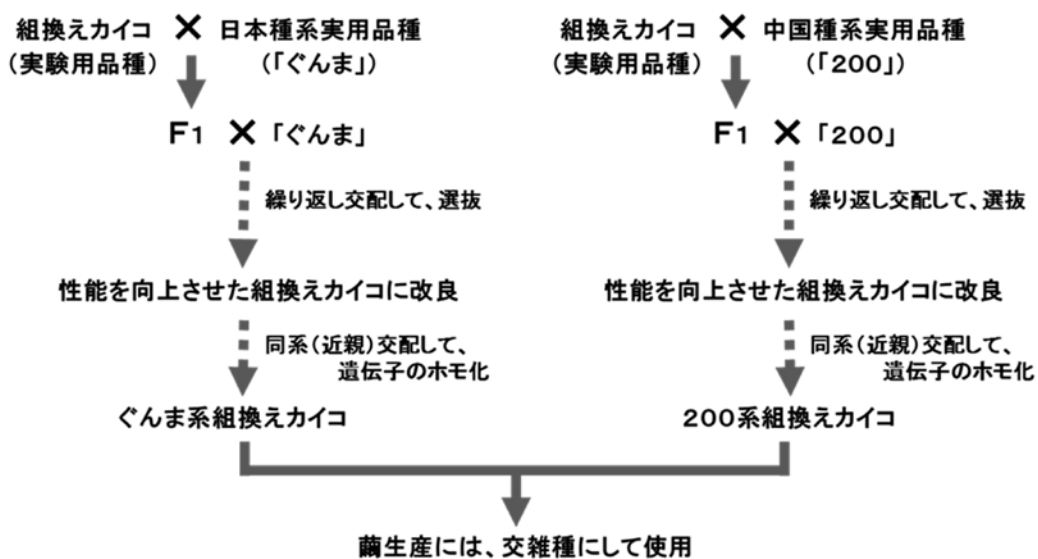


図4 交配による遺伝子組換えカイコの改良

農家で飼育されている。そこで、作出された遺伝子組換えカイコと「ぐんま200」の原種である日本種「ぐんま」や、中国種「200」との交配と選抜を繰り返し、実用的に利用可能な「ぐんま系組換えカイコ」と「200系組換えカイコ」に改良した(図4)。農家による大量飼育では、この改良した遺伝子組換えカイコの交雑種を使用する。この交雑種は、元の遺伝子組換えカイコに比べて、繭は大きくなり(図5)、収量の向上が図れる。これまでに、有用物質生産で6品種、高性能シルク生産で1品種の遺伝子組換えカイコを改良し、農家による大量飼育が可能となっている。



図5 遺伝子組換えカイコ繭の比較
左：改良した遺伝子組換えカイコ
右：元の遺伝子組換えカイコ

5 遺伝子組換えカイコによる有用物質生産

(1) 拡散防止措置を執った飼育

①飼育装置等の整備

有用物質を生産する遺伝子組換えカイコは、一定の清浄環境を保つ施設での取り扱いが求められていることから、桑の生育に関係なく通年飼育できる人工飼料育が有効である。このため、早期の実用化を目指して、第二種使用での飼育技術の開発を行った。

遺伝子組換えカイコを農家が安心して飼育できるようにするため、稚蚕期(1齢～3齢)の人工飼料育に用いる装置(図6)を活用し、全齢人工飼料育と繭生産ができる装置への改良を行った。この装置は、加温・冷却機能と加湿・除湿機能を備え、稚蚕期の飼育に適した環境(温度27～30℃、湿度40～

90%)のコントロールが可能である。この装置で全齢人工飼料育を行う場合、壮蚕期(4齢～5齢)の温湿度管理は十分に可能と考えられる。課題は、カイコが大きく成長する壮蚕期の人工飼料育とその後の繭生産方法であった。そこで、飼育容器は軽くするために半分のサイズに取り替え、飼育容器を置く棚間隔を広く改善した。さらに、繭生産のために飼育容器専用の波型簇を作製した。



図6 稚蚕人工飼料育装置

②飼育標準表の作成

全齢人工飼料育による安定した繭生産には、飼育環境のコントロールと同時に給餌などの飼育作業を的確に実施する必要がある。このため、各齢期の給餌量や飼育経過に応じた作業内容を定めた飼育標準表を作成した。なお、人工飼料は、群馬県が製造販売している稚蚕人工飼料「くわのはな」(図7)を使用する。



図7 稚蚕人工飼料「くわのはな」(1齢用)

③廃棄物の殺虫処理

遺伝子組換えカイコを飼育する場合、廃棄物の中に遺伝子組換えカイコの混入する可能性が考えられる。第二種使用で求められる拡散防止措置を執るためには、遺伝子組換えカイコを殺虫する不活化処理をしないと施設外に出すことができない。このことから、飼育室内での簡単で便利な廃棄物の不活化処理の手段として、フリーザー（-20℃）での凍結により遺伝子組換えカイコを確実に殺虫できる方法を明らかにした。

④出荷する繭層の調整

有用物質を繭層から抽出する場合、繭層の汚れ（糞尿、致死カイコの付着物等）が抽出したタンパク質の精製に悪影響を及ぼすことがある。このため、生産した遺伝子組換えカイコ繭から蛹を取り除いた繭層の汚れた部分を確実に除去して出荷する繭層調整技術を確立した。これにより、有用物質を抽出するための高品質な繭層の出荷が可能となった。

⑤飼育試験

以上のような成果に基づき、全齢人工飼料育装置（最大24万頭飼育）における拡散防止措置を執った飼育マニュアルが作成できた。このマニュアルは、作業従事者の使いやすさに重点を置き、毎日の作業内容を写真入りで詳細に解説した。

作成した飼育マニュアルに従い、カイコの飼育試験を実施した。稚蚕期は防乾紙折りたたみ育（図8）、壮蚕期と繭生産はネットで被覆してアルミフレームで固定（図9、図10）することで、飼育容器からの遺伝子組換えカイコのはい出し防止が図れた。また、全齢人工飼料育装置内は目的の温湿度をコントロールすることができ、計画した作業内容のと通りの飼育が可能であった。

（2）有用物質生産の実用化

①飼育施設の整備等

遺伝子組換えカイコの飼育は、拡散防止のための取扱いや施設整備が必要となることから、農家への技術指導を目的に当センター内の施設で実用飼育を開始することにした。施設は、窓を閉め切りとし、換気扇や排水口などの昆虫の出入り可能な箇所は網を張って塞ぐことにより遺伝子組換えカイコの飼育

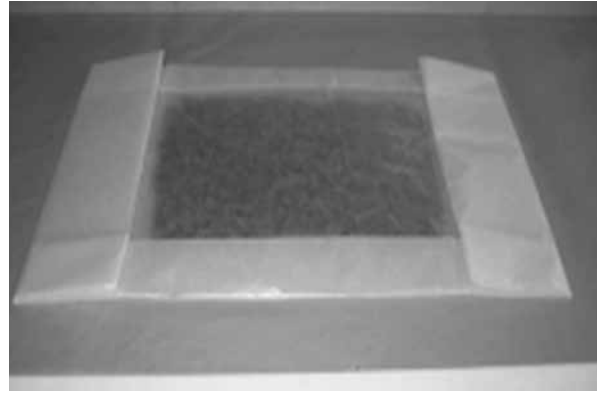


図8 稚蚕期の拡散防止措置

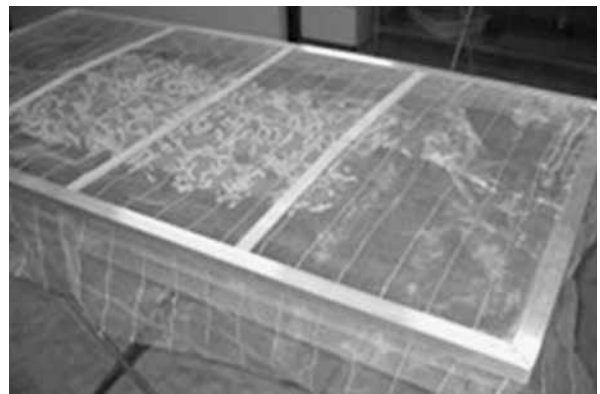


図9 壮蚕期の拡散防止措置



図10 繭生産の拡散防止措置

施設として整備した。

拡散防止措置を執った全齢人工飼料育による繭生産技術の開発や飼育施設の整備により、遺伝子組換えカイコの実用飼育を開始するため、検査薬の原料となる抗体を生産する遺伝子組換えカイコのカルタヘナ法に基づく第二種使用の申請を行い、2010年（平成22年）3月に大臣の使用確認が得られた。

②世界で初めての農家による遺伝子組換えカイコ飼育

遺伝子組換えカイコの飼育を希望する養蚕農家を対象に、開発した拡散防止措置を執った全齢人工飼料育法の研修会を実施し、飼育取扱い方法の農家への普及を図った。この研修に参加した農家を構成員とする「前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合」が組織され、遺伝子組換えカイコの実用飼育に関する体制が整った。

これにより、企業から繭生産を委託された飼育組合の農家による遺伝子組換えカイコの実用飼育が2010年（平成22年）11月に実現した（図11）。大臣確認を得た当センター内の施設において、遺伝子組換えカイコの飼育から繭生産を行って、繭から蛹を取り除いた繭層が出荷された。企業では、この繭層に分泌された抗体の抽出・精製、および精製した抗体の製品化を開始した。



図11 農家による遺伝子組換えカイコ飼育の様子

（3）稚蚕共同飼育所を利用した遺伝子組換えカイコ飼育

①稚蚕共同飼育所の利用

稚蚕共同飼育所は、養蚕農家に配蚕されるカイコの稚蚕期を人工飼料で飼育する機械化された施設である。カイコの飼育容器が高密度で収納されるので施設を効率的に使用でき、自動循環するので飼育労力も軽減できる。また、防疫上外界と隔離された施設となっているため、拡散防止措置が執りやすい構造となっている。

今後の飼育場所の確保や飼育量の拡大に対応する

ため、養蚕現場での遺伝子組換えカイコ飼育施設として稚蚕共同飼育所の利用を検討した。稚蚕専用の施設であるため、稚蚕期の飼育は問題ないが、高密度で収納された飼育容器の狭い間隔（図12）での壮蚕飼育と繭生産に対応した技術開発が必要となる。そこで、全齢人工飼料育による繭生産（非遺伝子組換えカイコを使用）を行い、拡散防止措置を執った全齢人工飼料育技術や繭生産方法を開発して、この施設での第二種使用申請に向けた飼育マニュアルを完成させた。



図12 飼育容器の収納状況

②稚蚕共同飼育所での遺伝子組換えカイコ飼育

この成果に基づき、飼育組合が当センター施設で飼育してきた遺伝子組換えカイコについて、稚蚕共同飼育所でのカルタヘナ法に基づく第二種使用申請を行い、2014年（平成25年）1月に大臣の使用確認を得た。これにより、遺伝子組換えカイコの稚蚕共同飼育所での飼育を開始した（図13、図14）。飼育成績は、当センター施設での飼育と同様に良好となり、優良繭が生産された。これまで、検査薬用抗体のほかに、化粧品の原料となるヒトコラーゲンを生産する遺伝子組換えカイコの飼育が大臣確認を得て行われている。

稚蚕共同飼育所での遺伝子組換えカイコの飼育に関しては、1回に10万頭規模の飼育技術を確立している。しかし、施設は30万頭の飼育が可能であり、作業方法等の改善によりさらなる大量飼育が可能となる。



図13 稚蚕共同飼育所での牡蚕飼育



図14 稚蚕共同飼育所での繭生産

6 遺伝子組換えカイコによる高機能シルク生産

(1) 農家での遺伝子組換えカイコ飼育に向けて

①隔離飼育試験

第二種使用で遺伝子組換えカイコを飼育する場合、閉鎖施設のため飼育量が限られ、施設の整備や廃棄物の殺虫処理などの費用もかかる。製品を作るために大量の繭が必要となる高機能シルク生産では、これまでと変わらない開放的な方法（第一種使用）で飼育できるようにする必要がある。

そこで、遺伝子組換えカイコを農家で飼育するための取組みを農研機構と共同で開始した。農家での飼育に向けた前段階として、農家蚕室に近い環境と方法で遺伝子組換えカイコの飼育を行い、成育や行

動、繭生産に問題ないか調査し、農家蚕室で飼育しても生物多様性に影響を及ぼさないか評価した。

最初に農家に導入する遺伝子組換えカイコとして、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）をフィブロインに発現させた緑色蛍光シルクを生産する遺伝子組換えカイコ（以下、「GFPカイコ」という。）を選定し、第一種使用による大臣承認を得て隔離飼育試験を実施した。このほかに、高染色性・超極細シルクや青色蛍光シルクを生産する遺伝子組換えカイコについても農家への導入を目指して同様の試験を進めた。

②隔離飼育試験の施設

隔離飼育試験は、部外者の立ち入りを制限するためにフェンスで囲んだ隔離飼育区画の中に設置した2種類の蚕室（パイプハウス蚕室とプレハブ蚕室）で実施した（図15）。各蚕室では、最大で6万頭のカイコを飼育して、繭生産することができる。

カイコと唯一交配可能なクワコが周辺に生息していることを考慮し、この試験では、パイプハウス蚕室の内側全体とプレハブ蚕室の開閉可能な窓に網を設置してクワコ成虫の侵入を防止した。

③隔離飼育試験の方法

隔離飼育区画の各蚕室では、3齢以降の桑による飼育から収穫までを行い、稚蚕飼育、収穫後の殺蛹などは拡散防止措置を執った第二種使用の施設で行った。飼育試験では、GFPカイコと非遺伝子組換えカイコ（ぐんま200）をそれぞれ飼育して比較した。

さらに、GFPカイコとクワコの交雑の有無を確認するモニタリングとして、隔離飼育区画の周囲に設置したフェロモントラップでクワコ成虫を捕獲し、遺伝子解析によりGFPカイコとクワコの交雑の有無を調査した。

④隔離飼育試験の結果

養蚕農家での飼育と同様の条桑育、回転簇によりGFPカイコの繭が生産できた（図16～図18）。また、モニタリングでは、GFPカイコとクワコの交雑個体は見つからなかった。

このことから、GFPカイコの成育の揃いや行動などに非遺伝子組換えカイコとの違いはなく、農家



図15 隔離飼育区画の飼育施設



図16 隔離飼育試験の様子（給桑）



図18 隔離飼育試験の様子（収繭・毛羽取り）



図17 隔離飼育試験の様子（繭生産）

蚕室で飼育しても生物多様性に影響を及ぼすことはないと考えられた。

（2）農家蚕室での遺伝子組換えカイコ飼育

隔離飼育試験での調査成績を用いて、GFPカイコを農家蚕室で飼育するためのカルタヘナ法に基づく第一種使用の承認申請を農研機構が行った。この申請における遺伝子組換えカイコの飼育は、3齢幼虫から繭生産までとなっており、一般的な養蚕農家での壮蚕飼育に対応している。なお、飼育に用いる卵の製造や農家に配蚕するまでの稚蚕飼育は、第二種使用の大臣確認を得て行う必要がある。クワコ成虫の侵入を防ぐため、蚕室の窓に網を設置し（図19）、壁の隙間を埋める（図20）ことにより、従来の蚕室での飼育が可能となるため、通常の養蚕と同様に条桑を与えて繭を生産することができる。

遺伝子組換えカイコが含まれる可能性のある飼育

後の桑の枝や糞などの残渣については、クワコとの交雑を防止するため、上蔟から9日後までに粉碎して殺虫するか、カイコが全て死ぬまで蚕室内や網で覆って30日間保管する等の管理手順が定められていて、確実に順守することが求められる。そのほか、飼育翌年には周辺のクワコに交雑がないことを確認するモニタリングを実施することとしている。なお、実際の飼育開始前には、施設の確認や管理手順の研修を受ける必要がある。

以上のような管理をすることにより、2017年（平成29年）9月にGFPカイコの第一種使用の大臣承認が得られ、このカイコの農家飼育が可能となった。その後、高染色性・超極細シルクを生産するカイコについても大臣承認が得られ、世界で初めてとなる一種使用による農家蚕室での遺伝子組換えカイコ飼育が開始されている（図21）。

7 今後の展開

当センターでは、遺伝子組換えカイコによる付加価値の高い繭生産に向けて、国や企業等との共同研究を進めてきた。本稿で紹介したように、当センターの有する蚕品種育成と飼育に関する技術力により、遺伝子組換えカイコの農家による飼育が実現し、遺伝子組換えカイコを利用した有用物質生産や高機能シルク生産によるこれまでの養蚕業と異なる新たな「カイコ産業」の創出に向けた一歩を踏み出すことができた。

この新産業を拡大して、遺伝子組換えカイコによる付加価値の高い養蚕業の展開を図るには、農家による繭生産を継続させることが重要である。このためには、遺伝子組換えカイコによる生産物の製品開発を進めて需要を拡大する取組みをさらに強化する必要がある。同時に、市場展開を図るには、形質の異なる遺伝子組換えカイコのラインナップが求められることから、養蚕現場での大量飼育が期待できる遺伝子組換えカイコの実用化を進めていく。

有用物質生産では、稚蚕用の「くわのはな」を使用して全齢人工飼料育が行われている。カイコはエサの約95%を壮蚕期に食べるため、全齢を人工飼料



図19 窓に網を設置



図20 蚕室の隙間を埋める



図21 農家蚕室での遺伝子組換えカイコ飼育の様子

で飼育するには、壮蚕用の低コスト人工飼料が必要となる。現在、人工飼料の組成検討などによる壮蚕用低コスト人工飼料の開発を進めており、有用物質生産の飼育コスト削減に繋げることで遺伝子組換えカイコの普及拡大を図りたい。また、農家蚕室での高機能シルク生産では、繭生産コストの削減と農家への普及を図るために、第一種使用が可能な範囲を

蚕種製造や稚蚕飼育にも広げることや、クワコとの交雑防止のための対策を必要としないなどこれまでの養蚕に近い方法で遺伝子組換えカイコを飼育できるような対応を今後も進めていく。

謝辞

本研究は、多くの共同研究者の協力により行われたものである。ここで全員の名前を挙げることはできないが、この場をお借りして関係各位に心よりお礼申し上げる。また、研究の一部は、農林水産省の「攻めの農林水産業の実現に向けた革新的技術緊急展開事業」（平成26～27年度）および「革新的技術開発・緊急展開事業」（うち地域戦略プロジェクト）（平成28～30年度）により実施した。

参考文献

- 農林水産省「ぐんま、200及びその交雑種」『蚕の新品種』技術資料第131号（1996）
- Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Kômoto N., Thomas J.-L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme J.-C. and Couble P. 「Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derive vector.」『Nature Biotechnol.』18（2000）
- Tomita M., Munetsuna H., Sato T., Adachi T., Hino R., Hayashi M., Shimizu K., Nakamura N., Tamura T. and Yoshizato K. 「Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons.」『Nature Biotechnol.』21（2003）
- 田村俊樹、飯塚哲也、瀬筒秀樹、立松謙一郎、小林 功、米村真之、内野恵郎、小島 桂、町井博明、高林千幸、山田勝成、栗原宏征、朝倉哲郎、中澤靖元、宮脇敦史、唐澤智司、小林初美、山口純次、桑原伸夫、中村 敬、吉井 圭「遺伝子組換えカイコによる蛍光色を持つ高機能絹糸の開発」『農林水産研究ジャーナル』32（2009）
- 桑原伸夫、池田真琴、清水健二、鹿沼敦子、伊藤 寛「遺伝子組換えカイコの拡散防止措置を執った大量飼育技術の開発」『生物試料分析』37巻3号（2014）
- 河本夏雄、津田麻衣、岡田英二、飯塚哲也、桑原伸夫、瀬筒秀樹、田部井豊「遺伝子組換えカイコの飼育における生物多様性影響の評価手法の構築」『蚕糸・昆虫バイオテック』83巻2号（2014）
- 伊藤 寛、桑原伸夫、池田真琴、清水健二、下田みさと、

- 岡野俊彦「養蚕農家による遺伝子組換えカイコ飼育」『生物工学』93巻6号（2015）
- 瀬筒秀樹、笠嶋めぐみ、近藤まり、小林 功、高須陽子、鈴木誉保、米村真之、飯塚哲也、内野恵郎、田村俊樹、坪田拓也、立松謙一郎「遺伝子組換えカイコによる医薬品開発プラットフォームの構築」『YAKUGAKU ZASSHI』138巻7号（2018）
- 特集「蚕業革命：カイコが拓く新産業」『蚕糸・昆虫バイオテック』88巻3号（2019）
- 池田真琴「日本のシルク産業を支えています！群馬県蚕糸技術センターの取り組みについて」『日本シルク学会誌』28巻（2020）