

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年9月12日 (12.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/074699 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02675

(22) 国際出願日: 2003年3月6日 (06.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-60374 2002年3月6日 (06.03.2002) JP
特願2002-268726 2002年9月13日 (13.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒103-8666 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo (JP). 独立行政法人農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台二丁目1番地2 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平松 紳吾 (HIRAMATSU, Shingo) [JP/JP]; 〒467-0042 愛知県名古屋

市瑞穂区八勝通2-33-1 瑞穂寮208 Aichi (JP). 田中 貴 (TANAKA, Takashi) [JP/JP]; 〒457-0851 愛知県名古屋市南区明治1-7-5 アトレ内田橋1101 Aichi (JP). 山田 勝成 (YAMADA, Katsushige) [JP/JP]; 〒481-0004 愛知県西春日井郡師勝町鹿田3469の2 Aichi (JP). 田村 俊樹 (TAMURA, Toshiki) [JP/JP]; 〒300-1207 茨城県牛久市ひたち野東50-1-1 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, IN, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN USING GENETICALLY MODIFIED SILK-WORM

(54) 発明の名称: 遺伝子組換えカイコを利用した生理活性タンパク質生産法

(57) Abstract: It is intended to provide a genetic engineering material for insects whereby a target protein can be easily purified without resort to a recombinant baculovirus and a process for producing a foreign protein with the use of this genetic engineering material. A genetically modified silk worm is obtained by transferring a foreign protein gene (for example, a cytokine gene) ligated to a promoter functioning in the silk gland into silkworm chromosome. Then the foreign protein (for example, cytokine) is extracted and purified from the silk gland or cocoon of the silkworm or its offspring. By transferring a gene cassette for expression wherein the 5' -terminal DNA sequence of fibroin H-chain gene is fused with the 3' -terminal DNA sequence of a foreign protein gene into silk gland cells or the like, the foreign protein can be produced in a large amount both inside and outside the silk gland cells as well as in silk yarn and cocoon.

(57) 要約: 組換えバキュロウイルスを用いる必要がなく、かつ、目的タンパク質の精製を容易にすることができる昆虫用の遺伝子工学材料を提供すると同時に、その遺伝子工学材料を利用した外来タンパク質の製造方法を提供する。絹糸腺で機能するプロモーターに連結したサイトカイン遺伝子など外来タンパク質遺伝子をカイコ染色体へ導入し、遺伝子組換えカイコを得る。このカイコまたはその子孫の絹糸腺または繭からサイトカインなど外来タンパク質を抽出し精製する。フィブロイン鎖遺伝子の5'末端部分のDNA配列と3'末端部分のDNA配列を外来タンパク質遺伝子に融合させた発現用遺伝子カセットを絹糸腺細胞などに導入することで、大量の外来タンパク質を絹糸腺細胞内、絹糸腺細胞外、さらには絹糸、繭にまで産生させることが可能となる。



WO 03/074699 A1

明 細 書

遺伝子組換えカイコを利用した生理活性タンパク質生産法

発明の分野

本発明は、サイトカイン遺伝子が染色体に組み込まれたカイコを利用した組換え型サイトカインの製造方法に関する。また、絹糸腺または繭糸に組換え型サイトカインを産生する性質を持つ遺伝子組換えカイコ、ならびに、その組換えカイコを作製するためのカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクターに関する。また、昆虫細胞への遺伝子導入ベクターおよびそのベクターを用いて遺伝子導入された昆虫細胞、昆虫組織、昆虫を用いた外来タンパク質の製造方法に関する。さらに、本発明で得られる組換えカイコが産生した外来タンパク質を含む絹糸に関する。

背景技術

遺伝子組換え技術を用いた外来タンパク質の生産は、様々な産業に利用されている。その宿主として主に大腸菌、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが用いられている。しかし、あらゆる外来タンパク質を効率よく生産できる宿主は開発されておらず、目的とするタンパク質ごとに生産系を構築することが必要であり、個々の宿主における外来タンパク質生産技術においてさらなる技術革新が望まれている。

大腸菌などの細菌または酵母の系では、翻訳後修飾に問題があり、タンパク質を十分機能する形で合成できないことがある。また、動物細胞は、タンパク質を機能する形で合成できることが多いが、一般的に増殖させるのが困難で産生量も低く経済的ではない。

一方、昆虫または昆虫細胞を用いた遺伝子組み換えタンパク質の生産では、酵素や生理活性を持つ有用タンパク質等が、比較的安価に量産でき、動物に近いタンパク質の翻訳後修飾が得られることが知られている。具体的には、外来タンパク質遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを、昆虫または昆虫細胞に感染させる方法で、外来タンパク質が比較的安価に量産が可能であり、医薬品として製品化された生理活性タンパク質も知られている（特開昭61-9288号公報、特開昭61-9297号公報）。

免疫調節作用を持つ生理活性物質であり医薬用途で注目されているサイトカイン類の生産について挙げるならば、特開平3-139276号公報、特開平9-234085号公報においてそれぞれネコインターフェロンの遺伝子、イヌインターフェロンの遺伝子を組み込んだBmNPVを、カイコに接種する方法が開示されている。また、インターフェロン以外のタンパク質の昆虫における生産の例としては、バキュロウイルスを感染させた昆虫細胞によるヒトコラーゲンの生産方法も知られている（特開平8-23979号公報）。

しかし、従来の昆虫または昆虫細胞を用いた組換えタンパク質の生産技術では、外来遺伝子の導入に組換えウイルスを用いることから、安全性の点から、その不活性化や封じ込めが必要であるという課題がある。また、組換えウイルスをカイコに接種する方法では、組換えウイルスの接種が煩雑であり、目的とする外来タンパク質が体液中に産生されるため、目的の組換えタンパク質をカイコ体液由来の大量の夾雑タンパク質から精製することが必要であった。このため高純度な組換えタンパク質を得ることが困難であるという課題があった。

一方、近年、昆虫染色体への外来遺伝子の組換えが試みられ、核多核体病ウイルスの一種である *Autographa californica nuclear p*

olyhedrosis virus (AcNPV)のDNAを用いて、カイコフィブロインL鎖遺伝子にクラゲ緑色蛍光タンパク質遺伝子を付加した融合遺伝子を、相同組み換えにより、カイコ染色体上に導入し、発現させる方法が開発され (Genes Dev., 13, 511-516, 1999)、その技術を用いたヒト・コラーゲン遺伝子を導入したカイコおよびその製造方法が開示されている (特開2001-161214号公報)。また最近、外来遺伝子を、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBacを用いてカイコ染色体へ安定に導入し、その外来遺伝子がコードするタンパク質を発現させる方法が、クラゲ緑色蛍光タンパク質をモデルとして研究され、交配により子孫へと遺伝子が安定に伝わることも確認された (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000)。

しかし、上記のAcNPVを用いた昆虫染色体への外来タンパク質遺伝子の導入方法では、組換えバキュロウイルス (AcNPV) を用いることから、組換えウイルスの不活化や封じ込めの課題が依然として残っている。次に、トランスポゾンpiggyBacを用いた例では、緑色蛍光タンパク質は、産生量が十分ではなく、かつ、カイコ全身に産生されるため、発現させた組換え型緑色蛍光タンパク質を高純度な形で回収するためには、高度な精製技術を必要とすることから、経済的に問題があった。また、生産された組換え型タンパク質の生産量はまだ十分ではなく、きわめて少ない。

すなわち、このような昆虫細胞を宿主とした外来タンパク質の生産技術においては、組換えバキュロウイルスの不活化や封じ込めが必要であったり、カイコを用いた場合など大量の夾雑タンパク質が存在する体液から目的タンパク質を精製することが困難である、目的タンパク質の発現量が少ないなど、いくつかの課題がある。

これまでに、サイトカイン遺伝子など生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をカイコ染色体に導入し、目的タンパク質を

発現させた例は知られていない。また、カイコ体液以外の部位である絹糸腺やカイコの分泌物である絹糸から、組換え型のサイトカインを回収し、得られたサイトカインの生理活性を確認した例はない。また、こうした性質を、遺伝することのできるカイコについても前例はない。また、トランスポゾンを利用して作製した組換えカイコにより、絹糸に大量の組換えタンパク質を産生させた例はない。

発明の開示

昆虫を用いた組換え型タンパク質の生産技術は、精力的に研究されているが、外来タンパク質遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルスの不活化や封じ込めの必要があり、また、組換えウイルスの接種が煩雑であるなどの課題がある。また、組換えバキュロウイルスを用いたカイコにおける外来タンパク質の生産では、大量の夾雑物を含む体液より目的タンパク質を抽出、精製することが困難であるという課題があった。

カイコ染色体に外来タンパク質遺伝子を導入する組換えタンパク質の製造技術の検討が行われているが、目的の外来タンパク質の生産量は低く、また、カイコ体液から目的タンパク質を精製することが困難であるという課題もある。

本発明は、こうした状況に鑑み、組換えバキュロウイルスを用いる必要がなく、かつ、生理活性を有する目的タンパク質の精製を容易にすることができる昆虫用の遺伝子工学材料を提供すると同時に、その遺伝子工学材料を利用した外来タンパク質の製造方法を提供することを課題としている。

本発明者らは鋭意検討の結果、目的とするタンパク質をコードする遺伝子がカイコ絹糸腺特異的に発現するプロモーターの下流に結合した構造を持つDNA配列を、トランスポゾン由来のDNAを利用

してカイコ染色体に導入することで、目的タンパク質が、絹糸腺または繭糸中に生理活性を保持した形で生産されることを見だし本発明に至った。本発明では、組換えタンパク質は、大量の夾雑物を含まない絹糸腺または絹糸から回収することが可能なため、目的タンパク質の精製が容易であるという利点がある。さらに、バキュロウイルスのようなウイルスを使用しないことから、ウイルスの不活化が不要であり、簡便かつ安全に組換えタンパク質の生産を実施することが可能となる。

また、本発明者らは、カイコ絹糸腺特に後部絹糸腺が、絹タンパク質の70~80%を占めるフィブロインを大量に生産し、かつ、絹糸腺細胞外へ分泌する点に着目し、鋭意検討した結果、絹糸腺で発現するプロモーターの下流にフィブロインH鎖遺伝子の第1イントロンを含む5'末端部分の3'末端側に外来タンパク質遺伝子の5'末端側をアミノ酸フレームが一続きなるように連結した遺伝子カセットを絹糸腺細胞に導入することで、外来タンパク質の産生量が飛躍的に向上することを見出した。また、外来タンパク質遺伝子の3'側にフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分をアミノ酸フレームが一続きとなるように連結した融合遺伝子を絹糸腺で発現するプロモーター制御下で発現させた時に、外来タンパク質が絹糸腺細胞の外に大量に分泌生産されることを見出した。また、外来タンパク質遺伝子の5'側にフィブロインH鎖遺伝子の第1イントロンを含む5'末端部分のDNA配列を、3'側にフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分のDNA配列を、それぞれアミノ酸フレームが一続きになるように設計した遺伝子カセットを作製し、この遺伝子カセットを染色体に導入した組換えカイコを作製したところ、この組換えカイコが、絹糸中に目的タンパク質を大量に産生していることを見出した。

本発明者らは、フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分のDNA配列

と3'末端部分のDNA配列を外来タンパク質遺伝子に融合させた発現用遺伝子カセットを絹糸腺細胞などに導入することで、大量の外来タンパク質を絹糸腺細胞内、絹糸腺細胞外、および絹糸に産生させることに成功し、組換えバキュロウイルスを用いることなく、また、絹糸腺を利用して外来タンパク質生産を生産させることで精製を容易にする外来タンパク質生産技術を確立することができた。

すなわち、本発明は、染色体にサイトカイン遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えカイコを作製し、その絹糸腺または繭糸からサイトカインを回収することを特徴とする組換え型サイトカインの製造方法に関するものである。さらには、サイトカイン遺伝子が組み込まれた遺伝子組換えカイコ、カイコへのサイトカイン遺伝子導入に用いられる遺伝子組み換えベクターに関するものである。

さらに、本発明は、以下に示す遺伝子カセット、ベクターなど昆虫での外来タンパク質生産に利用可能な遺伝子工学材料、形質転換体、その形質転換体を用いた外来タンパク質の製造方法および外来タンパク質を含む絹糸に関するものである。

したがって、本発明は、1) (1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分を外来タンパク質構造遺伝子の5'側に融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを提供する。

本発明は更に、2) (1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、終止コドンを含まない外来タンパク質構造遺伝子の3'側にフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分を融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現カセット。または(1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分の

3'側に外来タンパク質構造遺伝子を融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを提供する。

本発明は更に、3) (1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、終止コドンを含まない外来タンパク質構造遺伝子の5'側にフィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分を融合させ、且つ前記構造遺伝子の3'側にフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分を融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを提供する。

本発明はまた、4) 上記1)から3)のいずれかの外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを含むことを特徴とする昆虫細胞用発現ベクター。

本発明は更に、5) 上記4)に記載の昆虫細胞用ベクターを昆虫細胞へ導入することを特徴とする外来タンパク質の製造方法を提供する。

本発明は更に、6) 上記1)から3)に記載のいずれか一つの外来タンパク質発現用遺伝子カセットを染色体に組み込んだ組換えカイコを作製し、得られた組換えカイコの絹糸腺または絹糸に外来タンパク質を産生させた後、その絹糸腺または絹糸から外来タンパク質を回収することを特徴とする外来タンパク質の製造方法を提供する。

本発明はまた、7) 上記1)から3)に記載のいずれか一つの外来タンパク質の発現用遺伝子カセットが染色体に導入され、かつ、絹糸腺または絹糸に外来タンパク質を生産する能力を持つ組換えカイコを提供する。

本発明は更に、8) 上記7)に記載のカイコが産生した外来タンパク質を含む絹糸を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、遺伝子導入ベクター pigSIB の制限酵素地図を示す図である。

図 2 は、遺伝子導入ベクター pigFIB の制限酵素地図を示す図である。

図 3 は、transposase を持つプラスミド pHA3PIG の制限酵素地図を示す図である。

図 4 は、表 1 の陽性蛾区より得られた 11 頭のカイコ (G1) のゲノム DNA を EcoRV, XmnI 処理した後、ネコインターフェロンの遺伝子をプローブにしてサザンブロットィング解析を行った結果を示す図である。

図 5 は、フィブロイン H 鎖プロモーターに連結したネコインターフェロンの遺伝子を導入した組換えカイコの絹糸抽出液の抗ウイルス活性を示す図である。染色されているレーンのサンプルに活性があることを示す。

図 6 は、表 3 の陽性蛾区 (実験 1 から 3 蛾区、実験 2 から 2 蛾区) より得られたカイコ絹糸腺ゲノム DNA を EcoRI または Bgl II 処理したのち、ネコインターフェロンの遺伝子をプローブにしてサザンブロットィング解析を行った結果を示す図である。

図 7 は、遺伝子組換えカイコ中部絹糸におけるネコインターフェロン mRNA の発現を RT-PCR によって検出した図である。

図 8 は、セリシンプロモーターに連結したネコインターフェロンの遺伝子を導入した組換えカイコの中中部絹糸腺抽出液および繭糸抽出液の抗ウイルス活性を示す図である。染色されているレーンのサンプルに活性があることを示す。

図 9 は、図 9 は、P・IC・A 遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法 (前半) を示す図である。

図10は、P・IC・A遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（後半）を示す図である。

図11は、HP・IC・HA遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（前半）を示す図である。

図12は、HP・IC・HA遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（後半）を示す図である。

図13は、HUP・IC・HA遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（前半）を示す図である。

図14は、HUP・IC・HA遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（後半）を示す図である。

図15は、HP・IC・A遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（前半）を示す図である。

図16は、HP・IC・A遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトの作製手法（後半）を示す図である。

図17は、培養カイコ絹糸腺での β -ガラクトシダーゼの発現を、ウエスタン解析により解析した図である。細胞内でのタンパク質の合成もしくは遺伝子の発現にフィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。また細胞外への分泌も確認された。

図18は、カイコ絹糸腺組織での組換えタンパク質の発現を、ウエスタン解析により解析した図である。カイコ後部絹糸腺細胞内での組換えタンパク質発現の飛躍的な向上に、フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域が重要な役割を果たしている事が再確認された。また、フィブロインプロモーター上流領域約5.5kbpにタンパク質産生量を向上させる遺伝子領域があることが明らかとなった。

図19は、絹糸への組換えタンパク質の産生をウエスタン解析に

より解析した図である。絹糸腺細胞内で合成されたタンパク質の絹糸への分泌には、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。また、フィブロインプロモーター上流領域約5.5kbpにタンパク質産生量を向上させる遺伝子領域があることが再確認された。

発明の実施の形態

サイトカインは、様々な細胞により産生され、造血細胞や免疫細胞に対し免疫調節作用、抗ウイルス作用、血球細胞増殖作用を持つタンパク質である。その作用は的確な高次構造を形成し細胞膜上の特異的な受容体に結合することにより発揮される。現在までにその作用の特徴からヒトをはじめとする動物に対する臨床応用がなされている。

本発明のサイトカイン類としては特に限定されないが、カイコ体内で発現したときにその生理活性が保持されるサイトカイン類であればよく、免疫調節作用、抗ウイルス作用、血球細胞増殖作用などを持つ生理活性物質であり、医薬・医療用途で注目されているタンパク質、例えばヒトインターフェロン- α 、 β 、 γ (J. Interferon Res. 5, 521-526, 1985, Nucleic Acids Res. 10, 2487-2501, 1982)、ヒトインターロイキン-1 β (J. Immunol. 146, 3074-3081, 1991)、ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (Nature, 319, 415-418, 1986)、ヒトエリスロポイエチン (Nature, 313, 806-810, 1985)、ヒトロンボポエチン (Cell. 77, 1117-1124, 1994)、ネコインターフェロン- ω (Biosci. Biotech. Biochem., 56, 211-214, 1992、GenBank データベース登録番号 E04599)、ネコエリスロポエチン (GenBank データベース登録番号 FDU00685)、ネコ顆粒球コロニー刺激因子 (Gene, 274, 263-269, 2001)、イヌインターフェロン- γ (GenBank データベース登録番号 S4120

1)、イヌインターロイキン-12（特開平10-36397号公報）、イヌ顆粒球コロニー刺激因子（米国特許第5606024号）などが挙げられる。サイトカイン類として好ましくは、インターフェロン類またはコロニー刺激因子類であり、これらにはインターフェロン- α 、 β 、 γ 、 ω 、 τ や顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・単球コロニー刺激因子、単球コロニー刺激因子、エリスロポイエチン、トロンボポイエチンなどが含まれる。さらに好ましくは、ネコインターフェロン- ω 、ネコ顆粒球コロニー刺激因子、ヒトインターフェロン- β である。

ネコインターフェロン- ω 遺伝子は、例えばE. Coli(pFeIFN1)（微工研条寄第1633号）から抽出したプラスミドから切り出すことで得ることができる。または、切り出したネコインターフェロン- ω 遺伝子を、カイコのクローニングベクター（T.Horiuchiら、Agric. Biol. Chem., 51, 1573-1580, 1987）に連結して作製した組換えプラスミドとカイコ多核体病ウイルスDNAとを、カイコ樹立細胞にコ・トランスフェクションして作製したrBNV100から得ることも可能である。

ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子はネコ腎臓由来の培養細胞であるCRFK細胞をLPSで刺激した後、その細胞よりmRNAを回収し、さらに逆転写により得られたcDNAを鋳型に、GenBank データベース登録番号AB042552を参考に設定したプライマーを用いてPCRにより得ることができる。

ヒトインターフェロン- β 遺伝子は、そのcDNAをコードするプラスミドpORF-hIFN- β （Invivogen社）から切り出すことで取得できる。

本発明におけるカイコ染色体への遺伝子導入方法については、遺伝子が安定に染色体に組み込まれ、発現し、交配により子孫にも安

定に遺伝子が伝わるような遺伝子導入方法であればよく、カイコ卵にマイクロインジェクションする方法、遺伝子銃を用いる方法などを用いることができるが、好ましくは、トランスポザーゼ遺伝子を含むヘルパープラスミド (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000) と同時に目的遺伝子を含むカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクターをカイコ卵にマイクロインジェクションする方法が採用される。

目的遺伝子は、マイクロインジェクションされたカイコ卵から孵化し成長した組換えカイコにおいて生殖細胞へ導入される。こうして得られた組換えカイコの子孫は、その染色体上に目的遺伝子を安定に保持することが可能である。本発明で得られる遺伝子組換えカイコは、通常のカイコと同様な方法で、継代維持可能である。すなわち、卵を通常の方法で催青し、孵化した蟻蚕を人工飼料等へ掃立てし、通常のカイコと同様な条件で飼育することで5令カイコまで飼育できる。

本発明で得られる遺伝子組換えカイコは、通常のカイコと同様に蛹化し、繭を作ることができる。蛹の段階で雌雄を区別し、発蛾したのち雌雄を交尾させ、翌日採卵する。卵は通常のカイコ卵と同様に保存することが可能である。本発明の遺伝子組換えカイコは、こうした飼育を繰り返すことで継代することが可能であり、また、大量に増やすことが可能である。

本発明において用いるサイトカイン遺伝子をカイコ染色体に導入する目的で使用される外来遺伝子導入ベクターは、サイトカインの発現を的確に制御するように設計されるならば特に限定されないが、通常は、サイトカイン遺伝子に対して絹糸腺特異的に発現するプロモーターを上流に、任意のポリ A 配列を下流に連結した構造を持ち、これら遺伝子配列の外側に、1対のトランスポゾン由来のDN

A配列を有する。さらにはプロモーターとの間に任意の遺伝子由来のシグナル配列などを連結してもよく、ポリAとの間にも任意の遺伝子配列を連結してもよい。また人工的に設計、合成された遺伝子配列を連結することもできる。また、必要に応じてバクテリア宿主内で複製するための配列、抗生物質耐性遺伝子、蛍光タンパク遺伝子、LacZ遺伝子などを連結することもできる。例えば、適切なプロモーター下流に結合された緑色蛍光タンパク質GFPの遺伝子を、1対のトランスポゾン由来DNA配列の間の適切な部位に導入することができる。このことによって、遺伝子組換えカイコのスクリーニングを容易にすることが可能である。また、本ベクターは、pUC9、19など、大腸菌由来プラスミドの一部または全てを含むこともできる。

さらに、ここで用いるプロモーターは特に限定されず、どのような生物由来のプロモーターであってもカイコ細胞内で有効に働くプロモーターであればよいが、カイコ絹糸腺で特異的にタンパク質の発現を誘導するように工夫されたプロモーターが好ましい。例えば、フィブロインH鎖プロモーター、フィブロインL鎖プロモーター、p25プロモーター、セリシンプロモーターなどのカイコ絹糸腺タンパク質のプロモーターが挙げられる。

そのほかプロモーター以外に用いられる遺伝子配列については、シグナル配列、ポリA配列や、その他遺伝子の発現を制御する配列などが挙げられる。これらは特定のものに限定されず、目的タンパク質の発現に適したものを選択することができる。例えば、ネコインターフェロナー ω などサイトカインのシグナル配列やポリA配列など目的タンパク質由来のもの、宿主となるカイコなど昆虫タンパク質のシグナル配列、ポリA配列が挙げられる。または、SV40ポリAやウシ成長ホルモンポリAなどの一般的にタンパク質の発現に実

績のあるものなどが挙げられる。上記のプロモーターやその他サイトカイン類遺伝子と連結する遺伝子配列を変えることにより、その発現する部位や発現量を操作することが可能である。

本発明において、「外来タンパク質の発現用遺伝子カセット」とは、昆虫細胞に導入された場合その外来タンパク質構造遺伝子がコードするタンパク質が発現されるために必要なDNAのセットをいう。この外来タンパク質発現カセットは、外来タンパク質構造遺伝子とその遺伝子の発現を促進するプロモーターを含む。通常はさらに、ターミネーター、ポリA付加領域を含み、好ましくはプロモーター、外来タンパク質構造遺伝子、ターミネーター、ポリA付加領域の全てを含む。さらにプロモーターとの間に外来タンパク質構造遺伝子に結合した分泌シグナル遺伝子を含んでいてもよい。ポリA付加配列との間にも任意の遺伝子配列を連結しても良い。また人工的に設計、合成された遺伝子配列を連結することもできる。

また、「遺伝子導入用遺伝子カセット」とは、両側に1対のピギーバック(piggyBac)トランスポゾンの逆位反復配列を有する外来タンパク質の発現用遺伝子カセットであり、かつ、ピギーバック(piggyBac)トランスポゼーゼの作用により昆虫細胞染色体へ導入されるDNAセットをいう。

本発明において使用されるDNAを取得する方法に特に制限はない。既知の遺伝子情報に基づき、PCR(polymerase chain reaction)法を用いて必要な遺伝子領域を増幅取得する方法、既知の遺伝子情報に基づきゲノムライブラリーやcDNAライブラリーより相同性を指標としてスクリーニングする方法などが挙げられる。本発明においては、これらの遺伝子は遺伝的多型性や変異剤などを用いた人為的変異処理による変異型も含む。遺伝的多型性とは遺伝子上の自然突然変異により遺伝子の塩基配列が一部変化しているものをいう。

外来タンパク質発現カセットにおけるプロモーターは特に限定されないが、外来タンパク質遺伝子の発現を促進する活性の高いものが好ましい。例えば、特開平6-261770や特開昭62-285787に記載されているショウジョウバエの熱ショックタンパク質遺伝子のプロモーターやカイコアクチン遺伝子のプロモーター (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000) などが挙げられるが、フィブロインH鎖遺伝子 (GenBank登録番号V00094の塩基番号255~574番目)、フィブロインL鎖遺伝子 (Gene, 100:151-158:GenBank登録番号M76430)、セリシン遺伝子のプロモーター (GenBank登録番号AB007831の塩基番号599~1656番目) などカイコ絹糸腺細胞中で高い促進活性を有するプロモーターが好適である。

「外来タンパク質構造遺伝子」とは、遺伝子を発現させようとする宿主細胞が有しない遺伝子のことであり、宿主細胞が本来産生しないタンパク質をコードしている遺伝子のことであり、特に限定されない。産業的価値から考えて、ヒトやほ乳類が産生するタンパク質、例えば、成長ホルモン、サイトカイン、増殖因子および細胞骨格タンパク質の遺伝子などが挙げられる。また、微生物、植物または昆虫などが産生する酵素や種々タンパク質の遺伝子なども本発明の範囲に含まれる。

本発明における外来タンパク質発現用遺伝子カセットにおいて、フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分は、プロモーターによる外来タンパク質遺伝子の発現を増強する作用を有するDNA配列であり、フィブロインH鎖遺伝子の第1エクソンと第1イントロンの全長またはその一部および第2エクソンの一部を含むDNA配列である。この第2エクソンの3'側に外来タンパク質構造遺伝子の5'側をアミノ酸フレームが一続きとなるように融合させることによって、外来タンパク質の産生量を向上させることができるが、第2エクソン部

分を長くしすぎると目的とする外来タンパク質のN末端側に余分なアミノ酸残基が付加されるため、目的とする外来タンパク質の構造や活性が失われる場合もあるので、目的に応じて適切な長さとする必要がある。多くの場合、第2エキソン部分は、フィブロインH鎖遺伝子の分泌シグナル遺伝子の直後もしくは数アミノ酸残基までとすることで好適な結果を得ることができる。また、フィブロインH鎖遺伝子プロモーターの5'側上流領域、すなわち約5.5kbp上流領域中にはプロモーター活性を増強する領域があると考えられるので、この領域を付加することで、目的タンパク質の発現量の増大が期待できる。

フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分は、外来タンパク質をカイコ絹糸腺で産生させる場合に、外来タンパク質を絹糸腺細胞の外に大量に分泌させる効果を有するDNA配列である。この絹糸への分泌シグナルであるフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分を3'側に融合させた外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを染色体に導入した組換えカイコは、その絹糸中に外来タンパク質を産生することが可能である。また、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分は、外来タンパク質遺伝子上流、下流、外来タンパク質遺伝子中のいずれに存在してもよい。

この部分には、少なくともシステイン残基が一つ存在しており、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端をそのまま利用した場合、システイン残基はフィブロインH鎖タンパクのカルボキシル末端から20番目に位置することになる。このシステインは、フィブロインL鎖とジスルフィド結合で結合する役割を有している。フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分のDNA配列の長さは、フィブロインL鎖とのジスルフィド結合の形成を阻害することがない限り特に制限はない。フィブロインH鎖は、3'末端から約100塩基以上上流には、DNA

の繰り返し配列が続いているため、この上流部分のDNA配列は制限酵素で任意の長さに切断したり加工することが困難である。従って、遺伝子工学的手法の容易さからは、フィブロインH鎖3'末端部分は、フィブロインH鎖遺伝子の繰り返しDNA配列が終了した3'側の約100塩基対が好適に使用できる。また、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分が長いと外来タンパク質のカルボキシル末端、もしくはアミノ末端にフィブロインH鎖タンパク質のカルボキシル末端由来のアミノ酸が多く結合することになり、目的とする外来タンパク質の構造や活性が失われる場合がある。従って、目的とするタンパク質によっては、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分のDNA配列は、できる限り短くすることが必要となる場合がある。

ポリA領域についても特に制限はないが、フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、セリシンなど絹糸腺で大量に発現しているタンパク質遺伝子のポリA領域が好適に使用できる。

本発明におけるベクターとは、環状DNA構造または線状DNA構造を有するものをいう。特に、大腸菌内でも複製可能で、かつ、環状DNA構造を持つベクターが好適に使用できる。このベクターには、形質転換体の選抜を容易にする目的で、抗生物質耐性遺伝子、クラゲ由来蛍光緑色タンパク質遺伝子などマーカー遺伝子を組み込んでおくこともできる。

本発明で使用する昆虫細胞とは特に限定されるものではないが、好ましくは鱗翅目昆虫、より好ましくはカイコガ(*Bombyx mori*)由来細胞、さらに好ましくはカイコ絹糸腺細胞またはカイコガ(*Bombyx mori*)の卵に含まれる細胞である。絹糸腺細胞においては、フィブロインタンパク質の合成が盛んで、かつ、取り扱いが容易なカイコ5令幼虫の後部絹糸腺細胞が好適である。

昆虫細胞へ外来タンパク質の発現用遺伝子カセットおよびベクタ

一を導入する方法には、特に制限はない。昆虫培養細胞への導入方法としては、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーションによる方法、リポソームを用いる方法、遺伝子銃を用いる方法、マイクロインジェクションする方法などを用いることができるが、カイコ絹糸腺細胞への導入においては、例えばカイコ5令幼虫の体内から取り出した後部絹糸腺組織に対して遺伝子銃を用いることによって簡便に遺伝子を導入することが可能である。

遺伝子銃による後部絹糸腺への遺伝子導入は、例えば、外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを含むベクターをコーティングした金粒子を、バイオラッド社のパーティクルガン（型番：PDS-1000/He）を用いて、寒天プレートなどに固定した後部絹糸腺へ、1,100～1,800psiのHeガス圧で噴射させることによって可能である。

カイコガ(*Bombyx mori*)の卵に含まれる細胞に遺伝子を導入する場合には、マイクロインジェクションする方法が好適である。ここで卵にマイクロインジェクションを行う場合、卵中の細胞に直接マイクロインジェクションする必要はなく、卵中にマイクロインジェクションするだけで遺伝子を導入することが可能である。

本発明の「遺伝子導入用遺伝子カセット」を有するベクターをカイコガ(*Bombyx mori*)の卵にマイクロインジェクションすることで、本発明の「外来タンパク質の発現用遺伝子カセット」が染色体に導入された組換えカイコを取得することが可能である。例えば、田村らの方法（*Nature Biotechnology* 18,81-84,2000）に従って、「遺伝子導入用遺伝子カセット」を有するベクターとカイコアクチンプロモーター制御下にピギーバック（PiggyBac）トランスポゼーゼス遺伝子を配置したプラスミドを、同時にカイコガの卵にマイクロインジェクションし、孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫（G0）を群内で掛け合わせて次世代（G1）カイコ幼虫を得る。組換えカイ

コは、このG1世代において通常1～2%の頻度で出現する。

組換えカイコの選抜は、G1世代カイコの組織の一部からDNAを取り出し、外来タンパク質遺伝子を基に設計したプライマーを用いてPCRによって行うことができる。または、予め「遺伝子導入用遺伝子カセット」内に、カイコ細胞で発現可能なプロモータ下流に連結した緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を導入しておけば、G1世代のカイコ、例えば1令幼虫について紫外線下で緑色蛍光を発する個体を選抜することで組換えカイコの選抜が容易に行える。

また、「外来タンパク質の発現用遺伝子カセット」が染色体に導入された組換えカイコを取得する目的で、「遺伝子導入用遺伝子カセット」を有するベクターをカイコガ(*Bombyx mori*)の卵にマイクロインジェクションするにあたり、ピギーバック (PiggyBac) トランスポゼーセスタンパク質を同時にマイクロインジェクションすることによっても、上記と同様にして組換えカイコを取得することが可能である。

ピギーバック (PiggyBac) トランスポゾンとは両端に13塩基対の逆位配列と、内部に約2.1k塩基対のORFを有するDNAの転位因子である。本発明において使用されるピギーバック (PiggyBac) トランスポゾンは特に限定されないが、例えば*Trichoplusia ni* cell line TN-368、*Autographa californica* NPV(AcNPV)、*Galleria mellonea* NPV(GmMNPV)由来のものを用いることができる。好ましくは*Trichoplusia ni* cell line TN-368由来ピギーバック (PiggyBac) の一部を持つプラスミドpHA3PIGとpPIGA3GFP(Nature biotechnology 18,81-84,2000)を用いて、その遺伝子およびDNA転移活性を有するピギーバックトランスポゼースを調製することができる。

piggyBac由来のDNA配列の構造としては、TTAA配列を含む1対の末端逆位配列が必須であり、そのDNA配列の間にサイトカイン遺伝

子など外来遺伝子が挿入された構造を有するものである。トランスポゾン由来のDNA配列を利用して外来遺伝子をカイコ染色体へ導入するためには、さらにtransposaseを利用することが好ましい。例えば、piggyBac由来のtransposaseを発現することが可能なDNAを同時に導入することで、カイコ細胞内において転写・翻訳されたtransposaseがその2対の末端逆位配列を認識してその間の遺伝子断片を切り出し、カイコ染色体へと転移させることにより、カイコ染色体へ遺伝子が導入される頻度を著しく向上させることができる。

本発明で用いられる遺伝子組換えカイコとは、外来タンパク質遺伝子がカイコ染色体に導入されたカイコのことであり、そのカイコ染色体DNAを常法に従って制限酵素処理したのち、常法に従って標識した外来タンパク質遺伝子をプローブとしてサザンブロッティングを行う時、ポジティブなシグナルを与えるカイコのことである。サイトカイン遺伝子が導入される染色体上の遺伝子座位は、カイコの発生、分化、成長を阻害しない部位であれば特に制限はない。組換えカイコは、その絹糸腺細胞、絹糸腺内腔、および、絹糸中に外来タンパク質を産生する能力を有している。また、組換えカイコは、正常に発育し、交配が可能であり、導入された外来タンパク質遺伝子を安定に保有し、かつ子孫に伝えることが可能である。従って、組換えカイコを継代し頭数を増やすことで、外来タンパク質の生産量を容易にスケールアップすることが可能である。交配において、野生型のカイコと交配させることで、外来タンパク質の生産量を向上させることも可能である。この場合、目的の外来タンパク質遺伝子が導入されたカイコを適宜選抜しながら継代していく必要が生じる。この場合、任意の組織から得られた細胞のDNAを用いて、組換えカイコ選抜に使用したマーカー遺伝子や外来タンパク質遺伝子存在や構造を、PCR、サザンブロッティング法などで解析するこ

とで、容易に組換えカイコの遺伝子を継承した子孫を判別することが可能である。

本発明の外来タンパク質の発現用遺伝子カセットを導入された昆虫細胞やカイコ絹糸腺は、それぞれ培養に適した培養液で培養することで、その培養上清や細胞中に外来タンパク質を産生することが可能である。例えば、本発明の発現用遺伝子カセットを導入されたカイコ卵巣由来細胞であるBmN細胞は、TC-100培地（ファーミンジェン社製）で、27℃で培養することで、培養3から4日で、目的とする外来タンパク質を産生する。また、カイコ後部絹糸腺は、例えば5令幼虫から無菌的に摘出したのち、インセクト・グレース培地中で、25℃で培養することで、外来タンパク質を産生する。絹糸腺でタンパク産生を行う場合は、培地中の溶存酸素濃度を高く維持することが好適であり、また、培地中に蓄積する低分子のタンパク質合成を阻害する因子を、例えば、限外濾過膜などで除去しながら培養することが好適であり、長時間のタンパク合成が可能となる。

本発明のフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分を融合させた外来タンパク質遺伝子を導入した絹糸腺は、目的の外来タンパク質を培養上清に大量に産生することが可能である。絹糸腺培養上清中の夾雑タンパク質は、ほぼフィブロインのみであることから、絹糸腺培養上清からの目的タンパク質の精製が容易であり、その結果、高純度な目的タンパク質を得ることが可能となる。

本発明で得られる組換えカイコは、通常のカイコと同様に飼育が可能であり、通常の方法で飼育することで外来タンパク質を産生させることが可能である。目的とする外来タンパク質に応じて、特に5令時期の培養温度、湿度、給餌条件などを最適化することで、外来タンパク質の産生量を向上させることも可能である。

本発明のフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分を融合させた外

来タンパク遺伝子を導入した組換えカイコは、その繭中に目的とする外来タンパク質を大量に産生することが可能となる。得られた繭から、目的外来タンパク質を容易に精製、回収することが可能となる。また、産生させた外来タンパク質の機能によっては、得られた外来タンパク質を含む絹糸を、各種の産業用途で、そのままの形態、または、一部加工した形態で利用することができる。

本発明で得られる組換えカイコの絹糸腺または繭糸より、適当な抽出操作によって、外来タンパク質を得ることができる。外来タンパク質を、絹糸腺または繭糸から抽出するために使用する溶媒については特に制限はないが、多くの場合、水溶媒系が好ましい。抽出に使用する水溶液は、外来タンパク質の抽出を促進させるために適切な溶質を含むことが可能である。例えば、リン酸などの無機酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸などの有機酸や、食塩、尿素、塩酸グアニジン、塩化カルシウムなどの塩類、エタノール、メタノール、アセトニトリル、アセトンなどの極性有機溶媒などが挙げられる。また、抽出溶液のpHも特に限定はなく、目的とする外来タンパク質の機能を失活させないpHであれば、任意のpHを用いることができる。

抽出された外来タンパク質を、単離・精製するための方法に特に限定はなく、通常のプロテインの精製方法を用いることができる。例えば、目的とする有用蛋白質が本来有する機能を指標としながら、シリカゲル担体、イオン交換性担体、ゲル濾過担体、キレート性担体、色素担持担体等を用いたクロマトグラフィーや、限外濾過、ゲル濾過、透析、塩析等による脱塩、濃縮を組み合わせることによって精製し単離することができる。例えば、ネコインターフェロン- ω は、ネコインターフェロン- ω の遺伝子を導入したカイコの絹糸腺または繭糸を、20mMリン酸緩衝液 (pH7.0) をホモジナイズして得

られる可能性画分に回収することができる。さらに、得られた抽出液を、例えばブルーセファローズ担体に吸着させ、洗浄後、塩類を含む緩衝液で溶出することにより、ネコインターフェロン- ω の純度を上げることができる。

このように製造されたサイトカイン類は、従来の他の製造方法で製造されたサイトカインと同様に、医薬用途や各種の測定、診断用途に用いることができる。この場合、各種添加剤を加えた混合物として使用してもよい。また、サイトカイン類を発現したカイコの組織、もしくは繭糸は、そのまま、もしくは加工して、医療用または衣料用の繊維として用いることができる。また、酵素類を発現した組換えカイコの組織もしくは絹糸は、そのまま酵素反応に使用することも可能である。

実施例

以下に実施例を示し、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例の記載に限定されるものではない。

参考例

抗ウイルス活性測定法

インターフェロンの生理活性は抗ウイルス活性として以下の方法により行った。

ウイルスとしてVesicular Stomatitis Virus(VSV)を用い、感受性細胞としてはネコインターフェロン- ω の場合にはネコFc9細胞(J. K. Yamamotoら ; Vet. Immunol. and Immunopathol. , 11, 1-19, 1986) を、ヒトインターフェロン- β にはヒトFL細胞を用いて、CPE法により測定した。すなわち、96穴マイクロプレート上にコンフルエントとなるまで37°Cで培養された感受性細胞にサンプルの希釈

液を上端の行に加え、下端に向かって2倍ずつ段階希釈した。

37°Cで20～24時間培養した後、V S Vを加えさらに37°Cで16～20時間培養した。生存してマイクロプレート上に付着している感受性細胞を20%ホルマリンを含むクリスタルバイオレット染色液で染色し、マイクロプレート上のクリスタルバイオレットの量を570nmにおける吸光度を測定することによって、スタンダードとの比較により、抗ウイルス活性を求めた。スタンダードとしてはネコインターフェロン- ω にはインターキャット（東レ（株）製）を細胞培養用培地で1000 Unit/mlに調整したものを、ヒトインターフェロン- β にはフェロン（東レ（株）製）を細胞培養用培地で1000 Unit/mlに調整したものをを用いた。またサンプルは細胞培養用培地で15倍希釈した後、抗ウイルス活性測定に用いた。

実施例 1. *Bombyx mori* genomic DNAの調製

5齢3日目のカイコを解剖し、後部絹糸腺組織を取り出した。1×S SCで洗浄した後、DNA抽出バッファー(50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 100mM NaCl)200 μ lを加えた。Proteinase K(final 200 μ g/ml)を加えて組織をグラインダーで充分すりつぶし、更にDNA抽出バッファーを350 μ l、10%SDS 60 μ lを加え混合後、50°C 2時間保温した。Tris-HCl飽和フェノール pH8.0 500 μ lを加え10分混合後、10,000rpm 5分 4°Cにて遠心分離し上清を回収した。上清に等量のフェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコール(25:24:1)を加え混合後、遠心分離した。再度フェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコールを加え、遠心分離後上清を回収した。等量のクロロフォルム/イソアミルアルコール(24:1)を加え混合後、遠心分離した上清に再度クロロフォルム/イソアミルアルコールを加え、遠心分離後上清を回収した。得られた上清に1/10量の3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え混合し、更に2.5倍量の冷エタノールを加

え-80℃にて30分静置後、15,000rpm 10分 4℃にて遠心分離しgenomic DNAを沈殿させた。70%エタノールでDNAの沈殿を洗浄した後、風乾させた。RNase入り滅菌水で100 μg/mlとなるように溶解、希釈しgenomic DNA溶液を調製した。

実施例 2. 遺伝子の調製

用いた遺伝子は既知の配列を利用して、その両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型にしてPCRすることにより取得した。プライマーの端側には後の遺伝子構築操作のために制限酵素部位を付加した。

ネコインターフェロナーω遺伝子（GenBank登録番号S62636の塩基番号9～593番目）はネコインターフェロナーω遺伝子をコードするバキュロウイルスrBNV100を鋳型にプライマー3（配列番号3）とプライマー4（配列番号4）の2種類のプライマーを用いてPCRにより取得した。rBNV100は、例えばE.Coli(pFeIFN1)（微工研条寄第1633号）から抽出したプラスミドからFeIFNの遺伝子を切り出して、カイコのクローニングベクター（T.Horiuchiら、Agric. Biol. Chem., 51, 1573-1580, 1987）に連結して作製した組換えプラスミドとカイコ多核体病ウイルスDNAとを、カイコ樹立細胞にコ・トランスフェクションして作製することができる。

セリシン-1遺伝子のプロモーター（GenBank登録番号AB007831の塩基番号599～1656番目）はカイコ染色体DNAを鋳型にプライマー5（配列番号5）とプライマー6（配列番号6）の2種類のプライマーを用いてPCRにより取得した。フィブロインH鎖遺伝子のプロモーター（GenBank登録番号V00094の塩基番号255～574番目）はカイコ染色体DNAを鋳型にプライマー7（配列番号7）とプライマー8（配列番号8）の2種類のプライマーを用いてPCRにより取得した。ウシ成長ホルモン遺伝子ポリA（pcDNA3.1(+)配列番

号1011~1253番目)はプラスミドpcDNA3.1(+)ベクター (Invitrogen社製)を鋳型にプライマー9(配列番号9)とプライマー10(配列番号10)の2種類のプライマーを用いてPCRにより取得した。

PCRはKODplus(東洋紡(株)製)を用いて添付のプロトコールに従って行った。すなわち、それぞれの鋳型を、プラスミドの場合には10ng、染色体DNAの場合には100ng加え、各プライマーを30pmol、添付の10×PCRバッファーを10 μ l、1mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、2単位KODplusとなるように各試薬を加え、全量100 μ lとする。DNAの変性条件を94 $^{\circ}$ C,15秒、プライマーのアニーリング条件を55 $^{\circ}$ C,30秒、伸長条件を68 $^{\circ}$ C,30秒~60秒の条件でPerkin-Elmer社のDNAサーマルサイクラーを用い、30サイクル反応させた。

これらの反応液を1~1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれネコインターフェロンの遺伝子では約580bp、セリシン-1プロモーターでは約1kbp、フィブロインH鎖プロモーターでは約320bp、ウシ成長ホルモンポリAでは約230bpのDNA断片を常法に従って抽出、調製した。これらのDNA断片をポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造(株)製)によりリン酸化した後、Hinc IIで切断後脱リン酸化処理したpUC19ベクターに宝酒造(株)のDNA Ligation Kit Ver.2を用いて16 $^{\circ}$ C、終夜反応を行い、連結した。これらを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体にPCR断片が挿入されていることを、得られたコロニーを前述と同じ条件でPCRすることによって確認し、PCR断片の挿入されたプラスミドを常法によって調製した。これらのプラスミドをシーケンスすることにより、得られた断片がそれぞれの遺伝子の塩基配列であることを確認した。

実施例3. 遺伝子導入用プラスミドの作製

遺伝子導入用プラスミドにはpigA3GFP (Nature Biotechnology 1

8, 81-84, 2000)を利用した。すなわち、米国特許第6218185号に開示されるプラスミドp3E1.2より transposase をコードする領域を取り除き、その部分に A3 プロモーター (GenBank 登録番号 U49854 の塩基番号 1764~2595 番目) および pEGFP-N1 ベクター (Clontech 社製) 由来の GFP および SV40 由来ポリ A 付加配列 (GenBank 登録番号 U55762 の塩基番号 659~2578 番目) を挿入したベクターが pigA3GFP である (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000)。その A3 プロモーターの上流側にある Xho I 部位にネコインターフェロノン- ω 遺伝子の発現単位を挿入した。導入する遺伝子の発現単位としては、セリシン-1 遺伝子プロモーター-ネコインターフェロノン- ω -ウシ成長ホルモンポリ A 付加配列 (配列番号 1)、またはフィブロイン H 鎖遺伝子プロモーター-ネコインターフェロノン- ω -ウシ成長ホルモンポリ A 付加配列 (配列番号 2) を用いた。以下に具体的な方法を示す。

実施例 2 で調製したプラスミドより、あらかじめプライマー内に設定しておいた制限酵素部位を利用して遺伝子を切り出した。すなわち、セリシン-1 遺伝子プロモーターおよびフィブロイン H 鎖遺伝子プロモーターでは EcoRI, SalI を用いて、ネコインターフェロノン- ω 遺伝子では SalI, XbaI を用いて、ウシ成長ホルモンポリ A では XbaI, BamHI を用いてインサート断片を切り出し、1~1.5% アガロースゲルにて電気泳動した後、常法により断片を抽出、精製した。

セリシン-1 遺伝子プロモーター断片 200ng、ネコインターフェロノン- ω 遺伝子断片 100ng、ウシ成長ホルモンポリ A 50ng を混合し、等量の宝酒造 (株) の DNA Ligation Kit Ver. 2 を加えて 16°C、終夜反応を行った。反応液 0.5 μ l をプライマー 1 1 (配列番号 1 1) とプライマー 1 2 (配列番号 1 2) を用いて実施例 2 と同様の条件で伸長条件 2 分で PCR を行う。これらの反応液を 1% アガロース

ゲルにて電気泳動し、増幅した約1.9kbのDNA断片（SIB断片）を常法に従って抽出、調製した。

同様にフィブロインH鎖遺伝子プロモーター断片70ng、ネコインターフェロンの遺伝子断片100ng、ウシ成長ホルモンポリA50ngを混合し、等量の宝酒造（株）のDNA Ligation Kit Ver.2を加えて16°C、終夜反応を行った。反応液0.5 μ lをプライマー13（配列番号13）とプライマー12（配列番号12）を用いて実施例1と同様の条件で伸長条件2分でPCRを行った。これらの反応液を1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅した約1.15kbのDNA断片（FIB断片）を常法に従って抽出、調製した。

これらの断片をXhoIにより消化した後、XhoIで切断後脱リン酸化処理したpigA3GFPに宝酒造（株）のDNA Ligation Kit Ver.2を用いて16°C、終夜反応を行い、連結した。SIB断片を挿入したプラスミドをpigSIB（図1）、FIB断片を挿入したプラスミドをpigFIB（図2）とし、塩化セシウム法により超遠心2回で精製し、遺伝子導入実験に用いた。

実施例4. 遺伝子組換えカイコの作製（フィブロインH鎖遺伝子プロモーター）

pigFIBとヘルパープラスミドpHA3PIG（図3、Nature Biotechnology 18,81-84,2000）をそれぞれ200ng/mlの濃度で0.5mMリン酸バッファー（pH7.0）、5mM KCl中で調整し、15~20nlを産卵後4時間以内のカイコ卵に対してマイクロインジェクションした。

そのカイコ卵より孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫（G0）を群内で掛け合わせ得られた次世代（G1）をネコインターフェロンの遺伝子と同時に導入した緑色蛍光タンパク質の蛍光を観察することにより、ネコインターフェロンの遺伝子が染色体への導入されたカイコをスクリーニングした。遺伝子導入カイコの得られた

蛾区の割合を表1に示す。カイコ卵へのインジェクションを2回実施し、2回目において1蛾区から遺伝子組換えカイコが得られた。

表1. 遺伝子組換えカイコの取得状況 (フィブロイン重鎖プロモーター)

実験区	注射卵数	孵化卵数	成虫数	同胞交配蛾数	ネコインターフェロン- ω 遺伝子陽性蛾区数
1	1 2 1 5	2 9 2	2 2 0	1 0 0	0
2	1 3 2 6	3 7 4	2 5 0	1 2 3	1

その蛾区より得られた遺伝子導入カイコのサザンブロッティングの結果を図4に示す。サザンブロッティング法はG1世代の蛾より染色体DNAを抽出し、制限酵素処理したサンプルを電気泳動後、DNAを転写させたメンブレンをネコインターフェロン- ω 特異的な核酸プローブを用いてAlkPhos Direct Labelling and Detection System (アマシャムファルマシア)を用いた化学発光により検出した。

G1蛾11匹を調べたところ、10匹のカイコにネコインターフェロン- ω の遺伝子が導入されていることが確認できた。

実施例5. ネコインターフェロン産生の確認 (フィブロインH鎖プロモーター)

ネコインターフェロン- ω は抗ウイルス活性を持つことから、その力価よりネコインターフェロン- ω の存在を知ることができる。実施例4で得られた陽性蛾区のカイコ(G1)を野生カイコと交配し得られた世代(G2)のうち、ネコインターフェロン- ω 遺伝子の導入が確認されたカイコの5齢幼虫の中部絹糸腺および後部絹糸腺を摘出した。それらを20mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)をもちいてホモジナイズし、得られた抽出液をネコ細胞を用いた抗ウイ

ルス活性測定の系により測定した。その結果、遺伝子導入カイコの絹糸腺抽出液からは、中部絹糸腺、後部絹糸腺ともに抗ウイルス活性が検出されたが、コントロールとなる野生カイコの絹糸腺抽出液からは検出されなかった。その結果を図5に示す。

フィブロインH鎖プロモーター制御下ではネコインターフェロンの ω は主に後部絹糸腺に発現されていると考えられ、その後、フィブロインと同様に中部、前部絹糸腺へと移動すると考えられ、生理活性の分布もそれに一致しているものと考えられる。一方、遺伝子を導入していないカイコからは抗ウイルス活性は全く検出されなかった。このことからネコインターフェロンの ω 遺伝子導入カイコではネコインターフェロンの ω タンパク質が、生理活性を保ったまま発現していることが明らかとなった。

実施例6. ネコインターフェロンの精製

実施例5で得られたG2世代5令カイコの後部絹糸腺の抽出液からネコインターフェロンの精製を行った。抽出液1mlをHiTrap Blues epharose カラム (Amersham pharmacia社製)に通液し、その後10mlの20mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)で洗浄した。続いて10mlの20mMリン酸ナトリウムバッファー(pH8.0)-0.5M NaCl、さらに10mlの20mMリン酸ナトリウムバッファー(pH8.0)-1M NaClで溶出した。洗浄画分、0.5M溶出画分、および1M溶出画分を分取し、脱塩・濃縮を行い約1mlとした。抽出液および各精製フラクションの抗ウイルス活性およびタンパク定量した結果を表2に示す。

表 2. ブルーセファロースクロマトによるネコインターフェロン- ω の精製

	抗ウイルス活性(U/ml)	タンパク量(mg/ml)	比活性(U/mg)
抽出サンプル	5 2 3	0. 3 7	1 4 0 1
素通り、洗浄画分	2 3	2. 9 1	8
NaCl 0.5M溶出画分	1 4 9 4	0. 8 5	1 7 5 8
NaCl 1 M溶出画分	6 2 7 0 以上	0. 4 1	1 5 2 9 3 以上

精製操作により、1 M溶出画分に抗ウイルス活性すなわちネコインターフェロン- ω が回収でき、その比活性は抽出液に比べて約10倍となった。

実施例 7. 遺伝子組換えカイコの作製 (セリシン1プロモーター)

pigSIBとヘルパープラスミドをそれぞれ200ng/mlの濃度で0.5mMリン酸バッファー (pH7.0)、5mM KCl中で調整し、15~20nlを産卵後4時間以内のカイコ卵に対してマイクロインジェクションした。そのカイコ卵より孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫 (G0)を群内で掛け合わせ得られた次世代 (G1)より緑色蛍光タンパク質の蛍光を観察することにより、ネコインターフェロン- ω 遺伝子の染色体への導入を調べた。2回の実験において、それぞれ1218および1375個の卵にセリシンプロモーターに連結したネコインターフェロン- ω 遺伝子を含む遺伝子組換えベクターをマイクロインジェクションし、それぞれ、12蛾区ずつの陽性蛾区を得ることができた (表 3)。

表3. 遺伝子組換えカイコの取得状況 (セリシンプロモーター)

実験区	注射卵数	孵化卵数	成虫数	同胞交配蛾数	ネコインターフェロン- ω 遺伝子陽性蛾区数
1	1 2 1 8	5 0 0	3 2 0	1 5 8	1 2
2	1 3 7 5	5 4 0	5 0 0	2 2 5	1 2

得られた陽性蛾区のうち、1回目の実験の3蛾区、2回目の実験の2蛾区からそれぞれ1頭ずつの遺伝子の導入が確認されたカイコ(G1)を選び、その絹糸腺よりゲノムDNAを抽出した。それらをEcoRIまたはBglII処理したのち、ネコインターフェロン- ω 遺伝子をプローブにしてサザンブロッティング解析を行った結果を図6に示す。その結果、すべてのカイコのゲノム中にネコインターフェロン- ω 遺伝子の導入が確認された。また検出位置の違いにより、蛾区によってゲノムへの遺伝子導入部位が異なっていることがわかった。

次にネコインターフェロン- ω 遺伝子のmRNA発現を調べた。サザンブロッティングでネコインターフェロン- ω 遺伝子の導入が確認されたG1世代カイコを任意に7頭選び、そのmRNAを抽出し、RT-PCRによりネコインターフェロン- ω 遺伝子mRNAの発現を調べた。mRNAの抽出・精製にはISOGEN (ニッポンジーン) およびオリゴテックス dT-30 (ロシュディアグノスティクス) を、cDNA合成にはReady-To-Go T-Primed First-Strand Kit (アマシャムファルマシア) を用い、添付のプロトコールに従い行った。PCRは実施例2のネコインターフェロン- ω 遺伝子取得時の条件で行った結果、全頭よりネコインターフェロン- ω 遺伝子のmRNAの発現が確認された(図7)。

実施例8. 中部絹糸腺および繭糸でのネコインターフェロン産生の確認

実施例7で得られた遺伝子組換えカイコ3頭、野生カイコ1頭の中部絹糸腺を摘出し、20mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)をもちいてホモジナイズし、遠心分離して抽出液を調製した。また、遺伝子組換えカイコおよび野生カイコ由来の繭1個ずつについても同様に抽出した。これらの抽出液の抗ウイルス測定したところ、全頭の遺伝子組換えカイコの中部絹糸腺より抗ウイルス活性が検出され、野生カイコの絹糸腺からは検出されなかった。さらに遺伝子組換えカイコの繭からも抗ウイルス活性が検出された(図8)。

このことから、遺伝子組換えカイコでは、ネコインターフェロシ- ω が生理活性を保ったまま発現しており、その活性は糸として吐糸されてもなお残存していることがわかった。

実施例9. ヒトインターフェロシ- β 遺伝子導入用プラスミドの作製

ヒトインターフェロシ- β 遺伝子導入用プラスミドの作製は、実施例2から4に示したネコインターフェロシ- ω 遺伝子の場合と同様の方法により行った。

すなわちヒトインターフェロシ- β 遺伝子をコードするプラスミドpORF-hIFN- β (Invivogen社)を鋳型にプライマー14(配列番号14)およびプライマー15(配列番号15)を用いてPCRを行い、ヒトインターフェロシ- β 遺伝子断片を得た。この断片を制限酵素Sal IおよびXbaI処理した後、5'末端側にフィブロインH鎖遺伝子プロモーターまたはセリシン遺伝子プロモーターを、3'末端側にウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリAシグナルを連結した遺伝子発現用配列(フィブロインH鎖遺伝子プロモーター-ヒトインターフェロシ- β 遺伝子-ウシ成長ホルモン遺伝子ポリAシグナル(FhIB) : 配列番号16、セリシン遺伝子プロモーター-ヒトインターフェロシ- β -ウシ成長ホルモン遺伝子ポリAシグナル(ShIB) :

配列番号17)を含むプラスミドを構築した。

それらのプラスミドより上記の遺伝子発現用配列FhIBおよびShIBをそれぞれXhoI処理により切りだし、XhoIで切断後脱リン酸化処理したpigA3GFPに連結した。FhIB断片を挿入したプラスミドをpigFhIB、ShIB断片を挿入したプラスミドをpigShIBとし、塩化セシウム法により超遠心2回で精製し、遺伝子導入実験に用いた。

実施例10. ヒトインターフェロン-β 遺伝子組換えカイコの作製

ヒトインターフェロン-β 遺伝子組換えカイコの作製は、実施例9において作製した遺伝子導入用プラスミドを用いて、実施例4において示したネコインターフェロン-ω 遺伝子組換えカイコの作製と同様の方法により行った。

すなわち、pigFhIBおよびpigShIBをそれぞれヘルパープラスミドpHA3PIGとともにカイコ卵に対してマイクロインジェクションし、得られた成虫をかけあわせた次世代をスクリーニングした。それぞれ600個ずつの卵にインジェクションしたところ、pigFhIB導入カイコでは7蛾区、pigShIB導入カイコでは5蛾区より緑色蛍光陽性のカイコが得られ、PCRにより染色体への遺伝子導入が確認された。これらのカイコの絹糸腺および絹糸を採取し、その抽出液を用いてヒトインターフェロン-β の生理活性である抗ウイルス活性を測定した。値はサンプル中の全タンパク質濃度で補正して表記した。

表 4. ヒトインターフェロン-β 遺伝子組換えカイコ組織抽出液中の抗ウイルス活性

プロモーター	蛾区番号— 個体番号	抗ウイルス活性 (Unit / g protein)		
		後部絹糸腺	中部絹糸腺	絹糸
フィ	3-1	5 9 9 7 2 3	8 2 5 9 1	未試験
プロ	3-2	6 5 6 1 1 0	4 1 5 4 5	
イン	1 1 - 1	5 0 2 7 5 0	1 9 8 5 9	
H鎖	1 1 - 2	1 1 5 5 6 0	3 9 1 3 0	
セリ シン	1-1	未試験	5 3 8 8 4	4 2 1 8 7
	1-2		6 4 8 9 5 3	1 0 1 7 1 3
	5-1		4 3 7 2 9 1	1 3 3 2 8 8
	5-2		5 4 1 1 0 6	9 2 7 4 9
正常カイコ		検出せず	検出せず	検出せず

検出限界は、約 1 0 0 0 Unit / g protein

その結果、pigFhIB導入カイコの後部絹糸腺および中部絹糸腺より抗ウイルス活性が検出され、pigShIB導入カイコの中中部絹糸腺および絹糸より抗ウイルス活性が検出されたことから、ヒトインターフェロン-βのカイコ絹糸腺組織での産生が確認された。

実施例 1 1. ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子導入用プラスミドの作製

ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子導入用プラスミドの作製は、実施例 2 から 4 に示したネコインターフェロン-ω 遺伝子の場合と同様の方法により行った。

ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子は、Yamamotoらの報告 (Gene, 274, 263-269, 2001) に従い、10 μg/mlのLPSで24時間刺激したCRFK細胞より得られたcDNAより、プライマー18 (配列番号18) およびプライマー19 (配列番号19) を用いてPCRを行い、ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子断片を得た。この断片を制限酵素Sal IおよびXba

I処理した後、5'末端側にフィブロインH鎖遺伝子プロモーターまたはセリシン遺伝子プロモーターを、3'末端側にウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリAシグナルを連結した遺伝子発現用配列（フィブロインH鎖遺伝子プロモーター－ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子－ウシ成長ホルモン遺伝子ポリAシグナル（FGB）：配列番号20、セリシン遺伝子プロモーター－ネコ顆粒球コロニー刺激因子－ウシ成長ホルモン遺伝子ポリAシグナル（SGB）：配列番号21）を含むプラスミドを構築した。

それらのプラスミドより上記の遺伝子発現用配列FGBおよびSGBをそれぞれXhoI処理により切りだし、XhoIで切断後脱リン酸化処理したpigA3GFPに連結した。FGB断片を挿入したプラスミドをpigFGB、SGB断片を挿入したプラスミドをpigSGBとし、塩化セシウム法により超遠心2回で精製し、遺伝子導入実験に用いた。

実施例 1 2. ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子組換えカイコの作製

ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子組換えカイコの作製は、実施例 1 1 において作製した遺伝子導入用プラスミドを用いて、実施例 4 において示したネコインターフェロンの ω 遺伝子組換えカイコの作製と同様の方法により行った。

すなわち、pigFGBおよびpigSGBをそれぞれヘルパープラスミドpHA3PIGとともにカイコ卵に対してマイクロインジェクションし、得られた成虫をかけあわせた次世代をスクリーニングした。それぞれ600個ずつの卵にインジェクションしたところ、pigFGB導入カイコでは3蛾区、pigSGB導入カイコでは7蛾区より緑色蛍光陽性のカイコが得られ、PCRにより染色体への遺伝子導入が確認された。これらのカイコの絹糸腺および絹糸を採取し、その抽出液を用いてネコ顆粒球コロニー刺激因子の生理活性であるNFS-60細胞（ATCC）の増

殖促進活性を測定した。

増殖促進活性の測定は以下のように行った。まずNFS-60細胞をM-CSF非存在下に96ウェルプレートに 2×10^4 個ずつまき、30分後にサンプルを $10 \mu\text{l}$ 加え、さらに培養を24時間行った後に、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて細胞増殖活性を測定した。増殖促進最大効果の50%を与えるサンプル量 (ED50) を1 Unit/mlとし、希釈倍数を乗じてサンプル中の生理活性を算出した。値はサンプル中の全タンパク質濃度で補正して表記した。

表5. ネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子組換えカイコ組織抽出液中の増殖促進活性

プロモーター	蛾区番号— 個体番号	増殖促進活性 (Unit / g protein)		
		後部絹糸腺	中部絹糸腺	絹糸
フィ	9-1	36	検出せず	未試験
プロ	9-2	412	113	
イン	16-1	326	226	
H鎖	16-2	4030	53	
セリ シン	3-1	未試験	4330	590
	3-2		2277	524
	8-1		3966	846
	8-2		2137	211
正常カイコ		検出せず	検出せず	検出せず

検出限界は、約20 Unit / g protein

その結果、pigFGB導入カイコの後部絹糸腺および中部絹糸腺より増殖促進活性が検出され、pigSGB導入カイコの中部絹糸腺および絹糸より増殖促進活性が検出されたことから、ネコ顆粒球コロニー刺激因子のカイコ絹糸腺組織での産生が確認された。

実施例13. 遺伝子の調製

以降、ネコインターフェロナー ω を生理活性タンパク質のモデルとして、絹糸腺組織および絹糸での産生量向上検討を進めた。

用いた遺伝子は既知の配列を利用して、その両端配列のプライマーを作製し、適当なDNAソースを鋳型としてPCRを行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

フィブロインH鎖プロモーター (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号62118~62437番目：以下P領域) は、*Bombyx mori* genomic DNAを鋳型に、プライマー25 (配列番号25) とプライマー26 (配列番号26) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

フィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号62118~63513番目：以下HP領域) は、*Bombyx mori* genomic DNAを鋳型に、プライマー25 (配列番号25) とプライマー31 (配列番号31) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

フィブロインH鎖上流プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号57444~62927番目：以下HUP領域) は、*Bombyx mori* genomic DNAを鋳型に、プライマー33 (配列番号33) とプライマー34 (配列番号34) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

ネコインターフェロナー ω 遺伝子 (GeneBank登録番号S62636の塩基番号9~593番目：以下IC領域) はネコインターフェロナー ω 遺伝子をコードするバキュロウイルスrBNV100を鋳型にプライマー27 (配列番号27) とプライマー28 (配列番号28) の2種類のプライマーを用いてPCRにより取得した。rBNV100は、例えば*E. Coli*(pFeIFN1)

(微工研条寄第1633号) から抽出したプラスミドからネコインターフェロナー ω の遺伝子を切り出して、カイコのクローニングベクター (T.Horiuchiら、Agric. Biol. Chem., 51, 1573-1580, 1987) に連結して作製した組換えプラスミドとカイコ多核体病ウイルスDNAとを、カイコ樹立細胞にコ・トランスフェクションして作製することができる。

フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号79201~79995番目: 以下A領域) は、*Bombyx mori* genomic DNAを鋳型に、プライマー29 (配列番号29) とプライマー30 (配列番号30) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

フィブロインH鎖C末端領域遺伝子・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (GeneBank登録番号AF226688の塩基番号79099~79995番目: 以下HA領域) は、*Bombyx mori* genomic DNAを鋳型に、プライマー32 (配列番号32) とプライマー30 (配列番号30) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 遺伝子は、p β gal-Basic vector (Clontech社) を鋳型に、プライマー37 (配列番号37) とプライマー38 (配列番号38) の2種類のプライマーを用いたPCRにより取得した。

PCRはKODplus (東洋紡 (株) 製) を用いて添付のプロトコールに従って行った。すなわち、それぞれの鋳型を、*Bombyx mori* genomic DNAの場合には100ng、*Bombyx mori* 後部絹糸腺 cDNAおよびp β gal-Basic vectorの場合には10ng加え、各プライマーを50pmol、添付の10 \times PCRバッファーを10 μ l、1 mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、2単位KODplusとなるように各試薬を加え、全量100 μ lとする。DNAの変性条件を94 $^{\circ}$ C, 15秒、プライマーのアニーリング条件を55 $^{\circ}$ C, 30秒、伸長条件を68 $^{\circ}$ C, 60秒~300秒の条件でPerkin-Elmer社のDNAサーマ

ルサイクラーを用い、30サイクル反応させた。

これらの反応液を1%アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれP領域では約0.3kbp、HP領域では約1.4kbp.、HUP領域では約5.5kbp.、IC領域では約580bp.、A領域では約0.8bp、HA領域では約0.9bp、 β -gal遺伝子では約3.2kbpのDNA断片を常法に従って抽出、調製した。これらのDNA断片をポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造（株）製）によりリン酸化した後、Hinc IIで切断後脱リン酸化処理したpUC19ベクターに宝酒造（株）のDNA Ligation Kit Ver.2を用いて16℃、終夜反応を行い、連結した。これらを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体にPCR断片が挿入されていることを、得られたコロニーを前述と同じ条件でPCRすることによって確認し、PCR断片の挿入されたプラスミドを常法によって調整した。これらのプラスミドをシーケンスすることにより、得られた断片がそれぞれの遺伝子の塩基配列であることを確認した。

実施例14. β -ガラクトシダーゼ発現用プラスミドの作製

実施例13で調製した β -gal遺伝子を持つプラスミドをSal IとHind IIIにより切断し、ここにフィブロインH鎖プロモーターを持つプラスミドからSal IとHind IIIにより切り出した約0.3kbp.断片(P領域)を挿入した。さらにこれをBamH Iにより切断し、ここにフィブロインH鎖ポリAシグナル領域を持つプラスミドからBamH Iにより切り出した約0.8kbp.断片(A領域)を挿入し、得られた β -gal遺伝子を持つプラスミドをQIAGEN Plasmid Maxi Kitを用い、添付のプロトコールに従って精製した。得られたプラスミドをpPgalAと名付け、PCRおよびシーケンスにより目的のプラスミドであることを確認した。

同様に実施例13で調製した β -gal遺伝子を持つプラスミドをSal IとHind IIIにより切断し、ここにフィブロインH鎖プロモーター

・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域を持つプラスミドからSal IとHind IIIにより切り出した約1.4kbp.断片(HP領域)を挿入した。さらにこれをBamH Iにより切断し、ここにフィブロインH鎖C末端領域・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域を持つプラスミドからBamH Iにより切り出した約0.9kbp.断片(HA領域)を挿入し、得られた β -gal遺伝子を持つプラスミドをQIAGEN Plasmid Maxi Kitを用い、添付のプロトコールに従って精製した。得られたプラスミドをpHPgalHAと名付け、PCRおよびシーケンスにより目的のプラスミドであることを確認した。

実施例 15. 遺伝子導入用プラスミドの作製

遺伝子導入用プラスミドにはpigA3GFP (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000) を利用した。すなわち、米国特許第6218185号に開示されるプラスミドp3E1.2よりtransposaseをコードする領域を取り除き、その部分にA3プロモーター (GenBank登録番号U49854の塩基番号1764~2595番目) およびpEGFP-N1ベクター (Clontech社製) 由来のGFPおよびSV40由来ポリA付加配列 (GenBank登録番号U55762の塩基番号659~2578番目) を挿入したベクターがpigA3GFPである。そのA3プロモーターの上流側にあるXho I部位を平滑化しネコインターフェロナー ω 遺伝子の発現カセットを挿入した。本実施例における遺伝子発現カセットの構成は、フィブロインH鎖プロモーター・ネコインターフェロナー ω ・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (P・IC・A)、もしくはフィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域・ネコインターフェロナー ω ・フィブロインH鎖C末端領域・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (HP・IC・HA)、もしくはフィブロインH鎖上流プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域・ネコインターフェロン

ー ω ・フィブロインH鎖C末端領域・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (HUP・IC・HA) もしくはフィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域・ネコインターフェロナー ω ・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域 (HP・IC・A) である。

以下に具体的な方法を示す。

P・IC・Aコンストラクトの作製は以下の手法により行った。実施例13で調製したネコインターフェロナー ω (IC領域)を持つプラスミドをSal IとHind IIIにより切断し、ここにフィブロインH鎖プロモーターを持つプラスミドからSal IとHind IIIにより切り出した約0.3kbp.断片(P領域)を挿入した。さらにこれをBamH Iにより切断し、ここにフィブロインH鎖ポリAシグナル領域を持つプラスミドからBamH Iにより切り出した約0.8kbp.断片(A領域)を挿入した。このP・IC・Aを持つプラスミドをAsc Iで切断し、切り出した約1.7kbp断片を宝酒造(株) T4 DNA Polymeraseにより平滑化したものと、Xho Iで切断後平滑化、脱リン酸化処理したpigA3GFPとを連結し、P・IC・A遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトを作製した。その手法を図9及び図10に示す。

HP・IC・HAコンストラクトの作製は以下の手法により行った。実施例13で調製したネコインターフェロナー ω (IC領域)を持つプラスミドをSal IとHind IIIにより切断し、ここにフィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域を持つプラスミドからSal IとHind IIIにより切り出した約1.4kbp.断片(HP領域)を挿入した。さらにこれをBamH Iにより切断し、ここにフィブロインH鎖C末端領域・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域を持つプラスミドからBamH Iにより切り出した約0.9kbp.断片(HA領域)を挿入した。このHP・IC・HAを持つプ

ラスミドをAsc Iで切断し、切り出した約2.9kbp断片を宝酒造（株）T4 DNA Polymeraseにより平滑化したものと、Xho Iで切断後平滑化、脱リン酸化処理したpigA3GFPとを連結し、HP・IC・HA遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトを作製した。その手法を図11及び図12に示す。

HUP・IC・HAコンストラクトの作製は以下の手法により行った。HP・IC・HAコンストラクト1ngをテンプレートにプライマー35（配列番号35）とプライマー36（配列番号36）の2種類のプライマーを用いたPCRにより、フィブロインH鎖第一イントロン・第二エクソン領域・ネコインターフェロナー ω ・フィブロインH鎖C末端領域・フィブロインH鎖ポリAシグナル領域約2.1kbp.を取得した。これをXho IとSph Iにより切断し、ここにフィブロインH鎖上流プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロンを持つプラスミドからXho IとSph Iにより切り出した約5.5kbp.断片(HUP領域)を挿入した。このHUP・IC・HAを持つプラスミドをAsc Iで切断し、切り出した約7.6kbp断片を宝酒造（株）T4 DNA Polymeraseにより平滑化したものと、Xho Iで切断後平滑化、脱リン酸化処理したpigA3GFPとを連結し、HUP・IC・HA遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトを作製した。その手法を図13及び図14に示す。

HP・IC・Aコンストラクトの作製は以下の手法により行った。実施例13で調製したネコインターフェロナー ω （IC領域）を持つプラスミドをSal IとHind IIIにより切断し、ここにフィブロインH鎖プロモーター・フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域を持つプラスミドからSal IとHind IIIにより切り出した約1.4kbp.断片(HP領域)を挿入した。さらにこれをBamH Iにより切断し、ここにフィブロインH鎖ポリAシグナル領域を持つ

プラスミドからBamH Iにより切り出した約0.8kbp.断片(A領域)を挿入した。このHP・IC・Aを持つプラスミドをAsc Iで切断し、切り出した約2.8kbp断片を宝酒造(株)T4 DNA Polymeraseにより平滑化したものと、Xho Iで切断後平滑化、脱リン酸化処理したpigA3GFPとを連結し、HP・IC・A遺伝子カセットを含む遺伝子導入用コンストラクトを作製した。その手法を図15及び図16に示す。

P・IC・A遺伝子導入用コンストラクト、HP・IC・HA遺伝子導入用コンストラクト、HUP・IC・HA遺伝子導入用コンストラクト、HP・IC・A遺伝子導入用コンストラクトをQIAGEN Plasmid Maxi Kitを用い、添付のプロトコールに従って精製した。

実施例 16. カイコ絹糸腺での β -ガラクトシダーゼの発現

直径1.6 μ mの金粒子を100%エタノールで洗浄滅菌し、滅菌蒸留水中に懸濁(60mg/ml)した。カイコ絹糸腺への β -gal遺伝子発現カセットの導入は、遺伝子銃を用いて行った。すなわち、金粒子50 μ l(0.3mg)、実施例14で得られた発現用プラスミドpPgalAもしくはpHPgalHA 10 μ gと、2.5M塩化カルシウム50 μ l、0.1Mスペルミジン20 μ lを順々に混合し、室温で30分間放置した後に遠心分離でpHgalCがコーティングされた金粒子を回収した。得られた金粒子を70%エタノールで2回洗浄後、100%エタノール50 μ l中に分散した。マイクロキャリアー上に10 μ lの金粒子懸濁液を載せて、乾燥させた。遺伝子銃は、BIO-RAD製 PDS-1000/Heを用いた。5令3日目のカイコ幼虫から摘出した後部絹糸腺を、PBSで軽く2度洗浄後、1%寒天プレート上に設置し、1,100psiの圧力でDNAをコーティングした金粒子を噴射させた。DNA導入後、絹糸腺を20mlグレース・インセクト培地に移し、25°Cで2日間培養した。培養後、培養上清および絹糸腺細胞を回収し、 β -galの発現を確認した。

発現の確認はウエスタン解析により行った。絹糸腺細胞をPBS中

でホモジナイズし細胞内容物を抽出した。培養上清および細胞抽出液を、共に総タンパク質濃度が1.0mg/mlになるように調整し、これらをサンプルとしてSDS-PAGEを行った。メンブレンにブロッキング後、ECL Plus™ Western blotting Kit（アマシャムファルマシア社製）を用い、添付のプロトコールに従ってβ-galタンパク質の検出を行った。すなわち、ブロッキングしたメンブレンをブロッキング溶液（5%スキムミルク・0.1%Tween20・PBS）中で4℃終夜ブロッキングした。メンブレンをTPBS(0.1%Tween20・PBS)で2回洗浄し、TPBSで1000倍希釈した抗β-galタンパク質抗体（シグマ社製）で室温1時間処理した。メンブレンをTPBSで2回洗浄し、更にTPBSで5分間3回洗浄した。その後TPBSで10000倍希釈した後、HRPラベル抗ラビットIgG抗体で室温1時間処理した。メンブレンをTPBSで2回洗浄し、更にTPBSで5分間3回洗浄した後、ECL Plus™ Western blotting Detection System（アマシャムファルマシア社製）の検出試薬（溶液A+溶液B）を加えた。発光をHyperfilm™TMECL™に露光、現像した。

pHPgalHAを導入した絹糸腺細胞および培養上清にのみβ-galタンパク質が検出されたことから、細胞内でのタンパク質の合成もしくは遺伝子の発現にフィブロインH鎖プロモーター以外の領域すなわちフィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。また細胞外への分泌も確認された。この結果を図17に示す。

実施例17. 遺伝子組換えカイコの作製

実施例15に記載の遺伝子導入用プラスミドとピギーバックトランスポゼースタンパク質を生産するDNA(pHA3PIG)を各200μg/ml含んだ0.5mMリン酸バッファー（pH7.0）・5mM KCl溶液を調整し、3~20nlを産卵後4時間以内のカイコ卵500個に対してマイクロインジ

エクシオンした。

そのカイコ卵より孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫 (G0) を群内で掛け合わせ得られた次世代 (G1) をクラゲ緑色蛍光タンパク質の蛍光を観察することにより、クラゲ緑色蛍光タンパク質遺伝子が染色体へ導入されたカイコをスクリーニングした。その結果、クラゲ緑色蛍光タンパク質の働きにより蛍光を発する遺伝子組換えカイコが得られた。

実施例 18. ウェスタン解析による絹糸腺組織中の組換えタンパク質の発現解析

非形質転換カイコ、形質転換カイコ (HP・IC・A形質転換カイコ、HP・IC・HA形質転換カイコ、HUP・IC・HA形質転換カイコ) の後部絹糸腺組織を回収し、組織中でのネコインターフェロンの発現をウェスタン解析により調べた。カイコ後部絹糸腺を100mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 中でホモジナイズし、遠心分離後上清を回収しサンプルとし、ECL Plus™ Western blotting Kit (アマシャムファルマシア社製) を用い、添付のプロトコールに従ってネコインターフェロンの検出を行った。すなわち、ブロッティングしたメンブレンをブロッキング溶液 (5%スキムミルク・0.1%Tween20・PBS) 中で4℃終夜ブロッキングした。メンブレンをTPBS (0.1%Tween20・PBS) で2回洗浄し、TPBSで1000倍希釈した抗ネコインターフェロン抗体で室温1時間処理した。メンブレンをTPBSで2回洗浄し、更にTPBSで5分間3回洗浄した。その後TPBSで10000倍希釈した後、HRPラベル抗ラビットIgG抗体で室温1時間処理した。メンブレンをTPBSで2回洗浄し、更にTPBSで5分間3回洗浄した後、ECL Plus™ Western blotting Detection System (アマシャムファルマシア社製) の検出試薬 (溶液A+溶液B) を加えた。発光をHyperfilmTME CLTM に露光、現像した。その結果非形質転換カイコおよびP・IC・

Aコンストラクト導入形質転換カイコの後部絹糸腺組織からはシグナルが検出されなかったのに対し、HP・IC・Aコンストラクト、HP・IC・HAコンストラクトおよびHUP・IC・HAコンストラクト導入形質転換カイコの絹糸腺組織からはシグナルが検出された。本実験の結果から、カイコ後部絹糸腺細胞内でのタンパク質の合成もしくは遺伝子発現の飛躍的な向上に、フィブロインH鎖プロモーター以外の領域すなわちフィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域が重要な役割を果たしている事が再確認された。この結果を図18に示す。フィブロインH鎖の5'末端プロモーター領域5.5kbpとネコインターフェロン遺伝子とフィブロインH鎖の3'末端を含むHUP・IC・HA遺伝子カセットを含む形質転換カイコにおけるネコインターフェロンの後部絹糸腺組織内での蓄積量は、フィブロインH鎖の5'末端プロモーター領域とネコインターフェロン遺伝子とフィブロインH鎖の3'末端を含むHP・IC・HA遺伝子カセットを含む形質転換カイコにおけるネコインターフェロンの後部絹糸腺組織内での蓄積量より高かった。H鎖5'末端上流領域に、タンパク質産生量を向上させる遺伝子領域があると考えられる。

実施例 19. ウェスタン解析による絹糸中の組換えタンパク質の測定

次に絹糸への外来タンパク質すなわちネコインターフェロン ω の分泌を調べた。

非形質転換カイコ、形質転換カイコ（HP・IC・A遺伝子導入形質転換カイコ、HP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコ、HUP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコ）の繭を各10mg量り採り、60%LiSCN4mlを加え攪拌後、終夜室温に静置し繭を溶解した。これを8M尿素・2% SDS・5%2-メルカプトエタノールで10倍希釈したものをサンプルと

し、ECL Plus™ Western blotting Kit (アマシヤムファルマシヤ社製) を用い、添付のプロトコールに従ってネコインターフェロンの検出を行った。その結果をモレキュラーイメージャー(BioRad社製)を用いてシグナル強度を測定し、濃度既知のネコインターフェロンのシグナル強度と比較しタンパク質含量を測定した。

その結果非形質転換カイコおよびHP・IC・A遺伝子導入形質転換カイコの繭からはシグナルが検出されなかったのに対し、HP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコおよびHUP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコの繭からはシグナルが検出され、ネコインターフェロンタンパク質が絹糸中へと分泌されていることが確認できた。またその含量はHP・IC・HA形質転換カイコでは約0.8~2.0%であり、HUP・IC・HA形質転換カイコでは約1.8~5.4%であった。これはカイコ一頭当たりの重量に換算すると0.4~2mgであった。

本実験の結果から、後部絹糸腺細胞内で合成されたタンパク質の絹糸への分泌には、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。この結果を図19に示す。フィブロインH鎖の5'末端プロモーター領域5.5kbpとネコインターフェロン遺伝子とフィブロインH鎖の3'末端を含むHUP・IC・HA遺伝子カセットを含む形質転換カイコにおけるネコインターフェロンの産生量は、フィブロインH鎖の5'末端プロモーター領域とネコインターフェロン遺伝子とフィブロインH鎖の3'末端を含むHP・IC・HA遺伝子カセットを含む形質転換カイコにおけるネコインターフェロンの産生量より高かった。H鎖5'末端上流領域に、タンパク質産生量を向上させる遺伝子領域があると考えられる。

実施例20. ELISA法による絹糸中の組換えタンパク質の測定

絹糸中のネコインターフェロンの ω の定量をELISA法により行った。

。

非形質転換カイコ、形質転換カイコ（HP・IC・A遺伝子導入形質転換カイコ、HP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコ、HUP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコ）の繭を各10 μ g量り採り、60%LiSCN4mlを加え攪拌後、終夜室温に静置し繭を溶解した。これをPBSで8倍もしくは16倍に希釈し、マイクロタイタープレートにアプライした。スタンダードとして濃度既知のネコインターフェロンをPBSで順次希釈し用いた。

その結果絹糸中のネコインターフェロン ω はHP・IC・A遺伝子導入形質転換カイコでは検出されず、HP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコでは約1.1~2.2%であり、HUP・IC・HA遺伝子導入形質転換カイコでは約1.0~4.9%であった。

産業上の利用可能性

サイトカイン遺伝子をカイコ絹糸腺で機能するプロモーターと連結したプラスミドベクターを作製し、カイコ染色体へ遺伝子導入することにより得られた遺伝子組換えカイコの絹糸腺または繭糸から、サイトカインを生理活性を保ったまま大量に回収することが可能となった。また、得られたサイトカイン抽出液は、夾雑タンパクが少なく、従来法と比較して精製が容易となる。

フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分のDNA配列と3'末端部分のDNA配列を外来タンパク質遺伝子に融合させた発現用遺伝子カセットを絹糸腺細胞などに導入することで、大量の外来タンパク質を絹糸腺細胞内、絹糸腺細胞外、さらには絹糸にまで産生させることが可能となった。この新手法により、組換えバキュロウイルスを用いることなく、絹糸腺を利用して外来タンパク質生産を生産させることで精製の容易な外来タンパク質生産技術を確立した。

請 求 の 範 囲

1. 染色体にサイトカイン遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えカイコを作製し、得られた遺伝子組換えカイコの絹糸腺または繭糸に組換えサイトカインタンパク質を生産させた後、その絹糸腺または繭糸からサイトカインを回収することを特徴とする組換え型サイトカインの製造方法。

2. 絹糸腺特異的に発現するプロモーターの下流に結合されたサイトカイン遺伝子を、染色体に組み込むことを特徴とする請求項1記載の組換え型サイトカインの製造方法。

3. 絹糸腺特異的に発現するプロモーターが、セリシン遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項2記載の組換え型サイトカインの製造方法。

4. 絹糸腺特異的に発現するプロモーターが、フィブロインH鎖遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項2記載の組換え型サイトカインの製造方法。

5. サイトカイン遺伝子をトランスポゾン由来のDNAを利用してカイコ染色体に組み込むことを特徴とする請求項1から4に記載の組換え型サイトカインの製造方法。

6. サイトカイン遺伝子がトランスポゾン由来の2対の末端逆位配列の間に位置することを特徴とする請求項5記載の組換え型サイトカインの製造方法。

7. トランスポゾン由来のDNAが、昆虫由来であることを特徴とする請求項5から6に記載の組換え型サイトカインの製造方法。

8. トランスポゾンが、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンpiggyBac由来であることを特徴とする請求項7記載の組換え型サイトカインの製造方法。

9. サイトカイン遺伝子が、インターフェロン遺伝子またはコロニー刺激因子遺伝子であることを特徴とする請求項1から8のいずれか1項記載の組換え型サイトカインの製造方法。

10. インターフェロン遺伝子またはコロニー刺激因子遺伝子が、ネコインターフェロン ω 遺伝子、ヒトインターフェロン β 遺伝子またはネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子であることを特徴とする請求項9記載の組換え型サイトカインの製造方法。

11. 繭糸から水溶性溶媒を用いてサイトカインを抽出することを特徴とする請求項1から3のいずれか1項記載の組換え型サイトカインの製造方法。

12. 染色体中にサイトカイン遺伝子が導入され、かつ、絹糸腺または繭糸にサイトカインを産生する性質を持つ遺伝子組換えカイコ。

13. 染色体に導入されたサイトカイン遺伝子が、インターフェロン遺伝子またはコロニー刺激因子遺伝子であることを特徴とする請求項12記載の遺伝子組換えカイコ。

14. 染色体に導入されたインターフェロン遺伝子またはコロニー刺激因子遺伝子が、ネコインターフェロン ω 遺伝子、ヒトインターフェロン β 遺伝子またはネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子であることを特徴とする請求項13記載の遺伝子組換えカイコ。

15. サイトカイン遺伝子を、絹糸腺特異的に発現するプロモーターの下流に連結することを特徴とするカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクター。

16. プロモーターが、セリシン遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項15記載のカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクター。

17. プロモーターが、フィブロインH鎖遺伝子のプロモーターで

あることを特徴とする請求項 15 に記載のカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクター。

18. サイトカイン遺伝子が、トランスポゾン由来の 2 対の末端逆位配列の間に位置することを特徴とする請求項 15 から 17 のいずれか 1 項記載のカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクター。

19. サイトカイン遺伝子が、インターフェロン遺伝子またはコロニー刺激因子遺伝子であることを特徴とする請求項 15 から 18 記載のいずれか 1 項記載のカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクター。

20. インターフェロン遺伝子またはコロニー刺激因子遺伝子が、ネコインターフェロン ω 遺伝子、ヒトインターフェロン β 遺伝子またはネコ顆粒球コロニー刺激因子遺伝子であることを特徴とする請求項 19 記載のカイコ染色体への外来遺伝子導入用ベクター。

21. (1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、フィブロインH鎖遺伝子の5'末端部分を外来タンパク質構造遺伝子の5'側に融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現用遺伝子カセット。

22. (1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、終止コドンを含まない外来タンパク質構造遺伝子の3'側にフィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分を融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現カセット。または(1)絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)の下流に連結された、フィブロインH鎖遺伝子の3'末端部分の3'側に外来タンパク質構造遺伝子を融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現用遺伝子カセット。

23. (1) 絹糸腺で発現するプロモーターと、(2) 前記(1)

) の下流に連結された、終止コドンを含まない外来タンパク質構造遺伝子の 5' 側にフィブロインH鎖遺伝子の 5' 末端部分を融合させ且つ前記構造遺伝子の 3' 側にフィブロインH鎖遺伝子の 3' 末端部分を融合させた遺伝子と、を含む外来タンパク質の発現カセット。

24. 前記フィブロインH鎖遺伝子の 5' 末端部分が、フィブロインH鎖遺伝子の第1エクソン、第1イントロン、第2エクソンの一部を含むことを特徴とする請求項21又は23に記載の遺伝子カセット。

25. 前記フィブロインH鎖遺伝子の第1エクソンと第2エクソンを合わせた部分が、フィブロインH鎖遺伝子の分泌シグナル遺伝子領域であることを特徴とする請求項24に記載の遺伝子カセット。

26. 前記(1)絹糸腺で発現するプロモーターと、(2)前記(1)の下流に連結された、フィブロインH鎖遺伝子の 5' 末端部分が、配列番号22又は配列番号23に示すDNAであることを特徴とする請求項25に記載の遺伝子カセット。

27. 前記フィブロインH鎖遺伝子の 3' 末端部分が、システインをコードするコドンを少なくとも一つ含むことを特徴とする請求項22または23に記載の遺伝子カセット。

28. 前記フィブロインH鎖遺伝子の 3' 末端部分が、配列番号24に示すDNAであることを特徴とする請求項27に記載の遺伝子カセット。

29. 絹糸腺で発現するプロモーターが、フィブロインH鎖遺伝子のプロモーター、フィブロインL鎖遺伝子のプロモーターおよびセリシン遺伝子のプロモーターのうちから選ばれる少なくとも一つのプロモーターであることを特徴とする請求項21から28に記載の遺伝子カセット。

30. 請求項21～29のいずれか1項に記載の外来タンパク質発現カセットの下流に、フィブロインH鎖遺伝子のポリA付加領域、フィブロインL鎖遺伝子のポリA付加領域およびセリシン遺伝子のポリA付加領域のうちから選ばれる少なくとも一つのポリA付加領域が存在することを特徴とする請求項21から29に記載の遺伝子カセット。

31. 請求項21～30のいずれか1項に記載の外来タンパク質発現遺伝子カセットの両側に、1対のピギーバック(piggyBac)トランスポゾンの逆位反復配列が存在することを特徴とする昆虫細胞の染色体への遺伝子導入用遺伝子カセット。

32. 請求項21から31のいずれか1項に記載の外来タンパク質発現遺伝子カセットを含むことを特徴とする昆虫細胞用発現ベクター。

33. 請求項31に記載の昆虫染色体への遺伝子導入カセットを含むことを特徴とする昆虫細胞用遺伝子導入ベクター。

34. 請求項32又はまたは33に記載の昆虫細胞用ベクターを昆虫細胞へ導入することを特徴とする外来タンパク質の製造方法。

35. 昆虫細胞が鱗翅目昆虫由来であることを特徴とする請求項34に記載の外来タンパク質の製造方法。

36. 昆虫細胞がカイコガ(*Bombyx mori*)由来であることを特徴とする請求項35に記載の外来タンパク質製造方法。

37. 昆虫細胞がカイコガ(*Bombyx mori*)の絹糸腺細胞であることを特徴とする請求項36に記載の外来タンパク質製造方法。

38. 請求項33に記載の昆虫細胞用遺伝子導入ベクターとピギーバック(piggyBac)トランスポゼーゼのDNA転移活性を利用して、請求項21～31のいずれか1項に記載の外来タンパク質発現用遺伝子カセットを染色体に組み込んだ組換えカイコを作製し、得られ

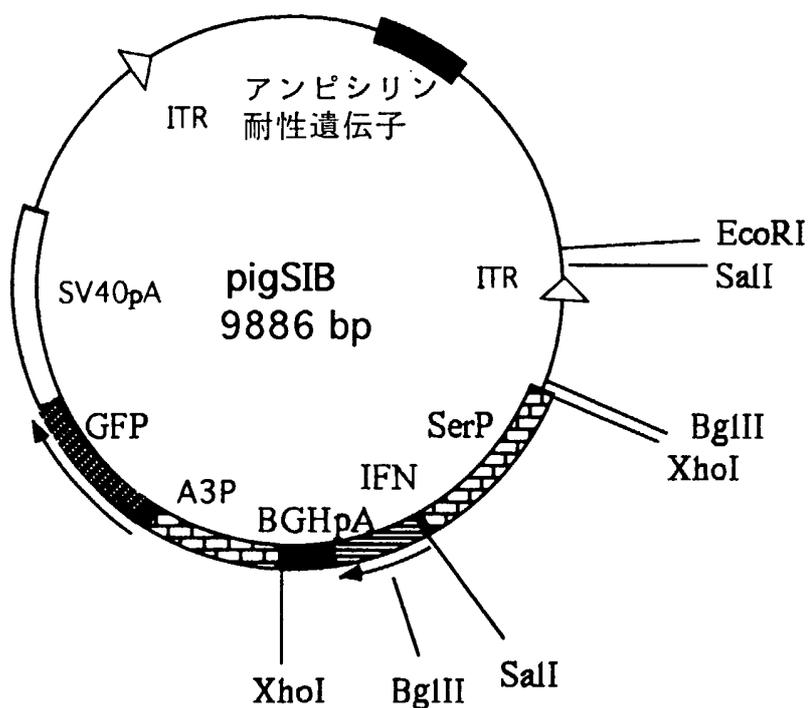
た組換えカイコの絹糸腺または絹糸に外来タンパク質を産生させた後、その絹糸腺または絹糸から外来タンパク質を回収することを特徴とする外来タンパク質の製造方法。

39. 昆虫細胞用遺伝子導入ベクターとピギーバック(piggyBac)トランスポゼースを生産するDNAもしくはRNAを同時にカイコ卵にマイクロインジェクションすることによって外来タンパク質発現用遺伝子カセットを染色体に組み込んだ組換えカイコを作製することを特徴とする請求項38記載の外来タンパク質製造方法。

40. 請求項21～31のいずれか1項に記載の外来タンパク質の発現遺伝子カセットが染色体に導入されており、且つ、絹糸腺または絹糸に外来タンパク質を生産する能力を持つ組換えカイコ。

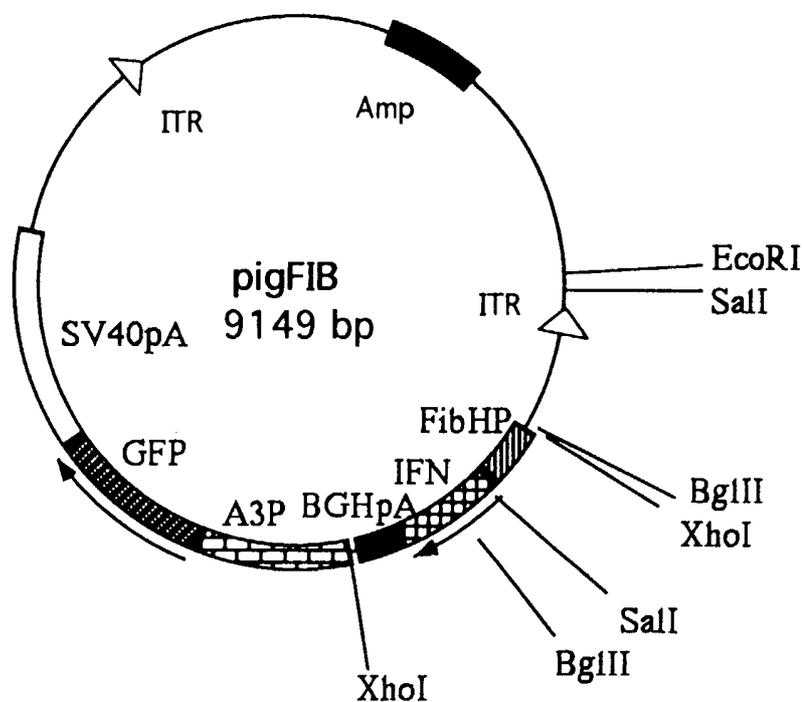
41. 請求項40に記載の組換えカイコが産生する外来タンパク質を含む絹糸。

Fig.1



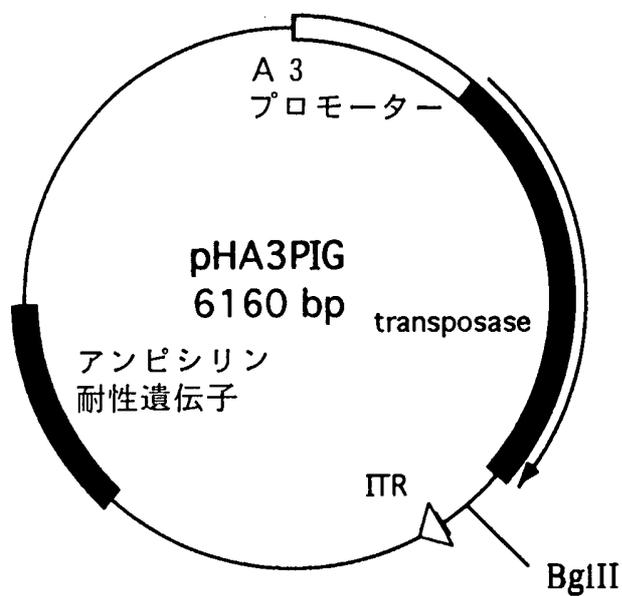
- SerP : セリシン-1 遺伝子プロモーター
- IFN : ネコインターフェロン- ω 遺伝子
- BGHpA : ウシ成長ホルモンポリA
- A3P : A3プロモーター
- GFP : 緑色蛍光タンパク質
- SV40pA : SV40ポリA
- ITR : 末端逆位配列

Fig.2



- FibHP : フィブロインH鎖遺伝子プロモーター
- IFN : ネコインターフェロン ω 遺伝子
- BGHPA : ウシ成長ホルモンポリA
- A3P : A3プロモーター
- GFP : 緑色蛍光タンパク質
- SV40pA : SV40ポリA
- ITR : 末端逆位配列

Fig.3



I T R : 末端逆位配列

Fig.4

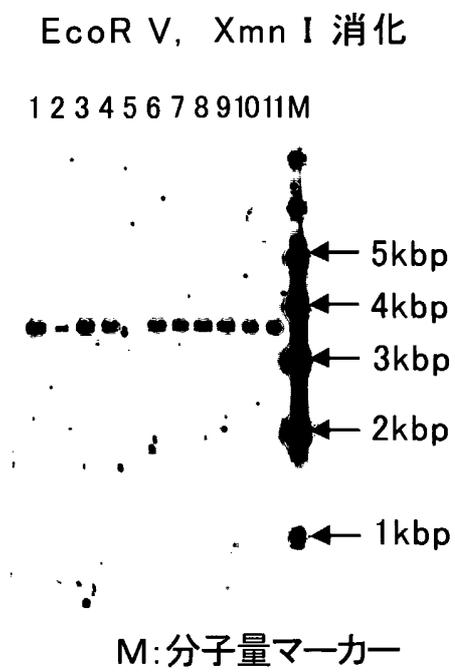


Fig.5

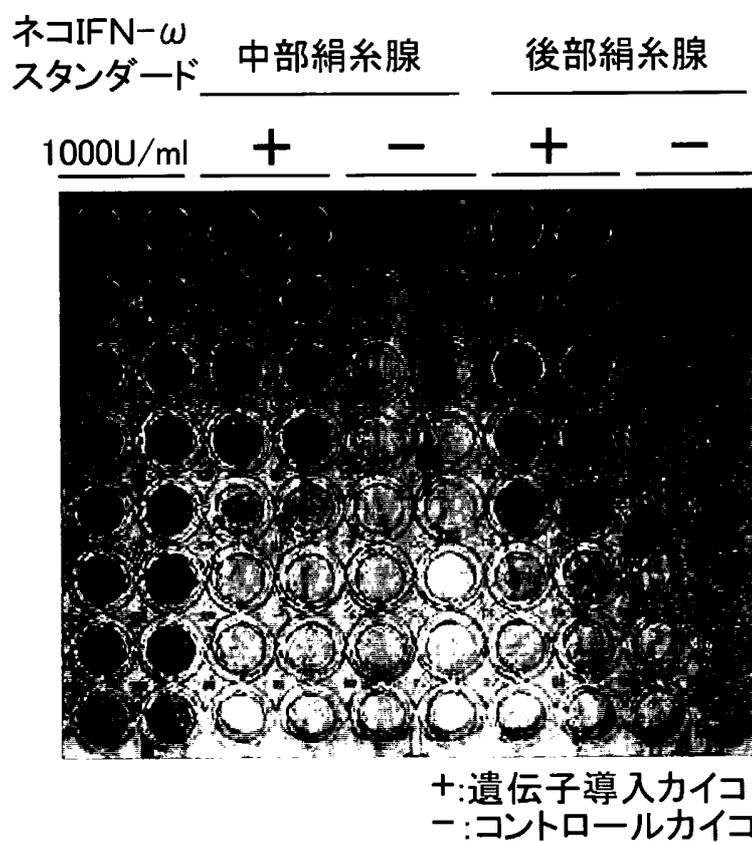


Fig.6

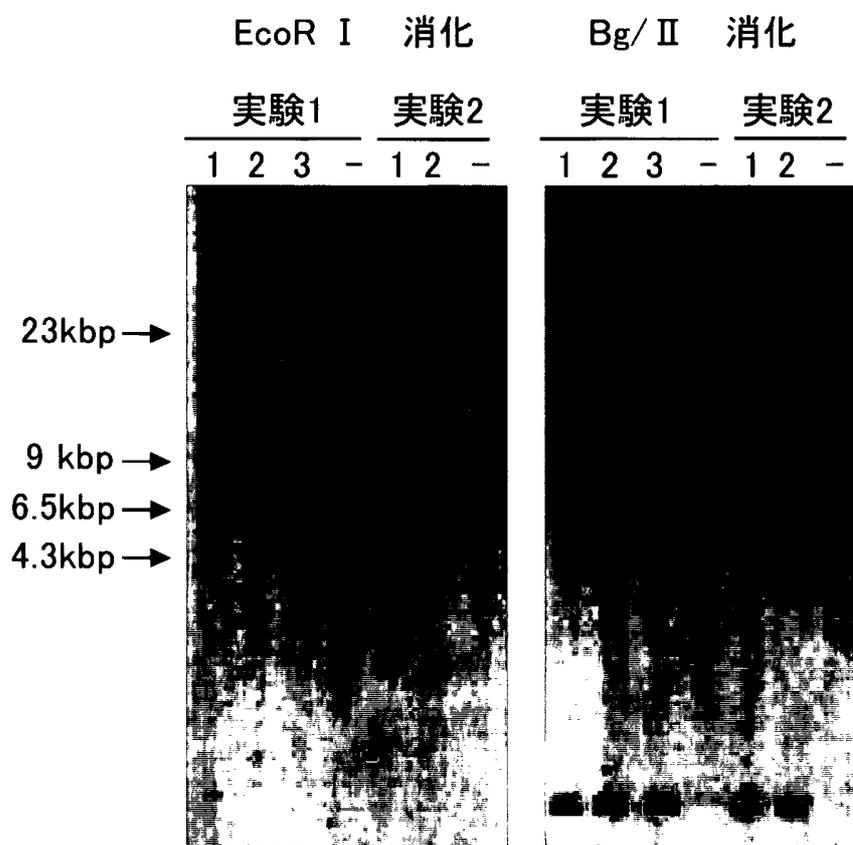


Fig.7

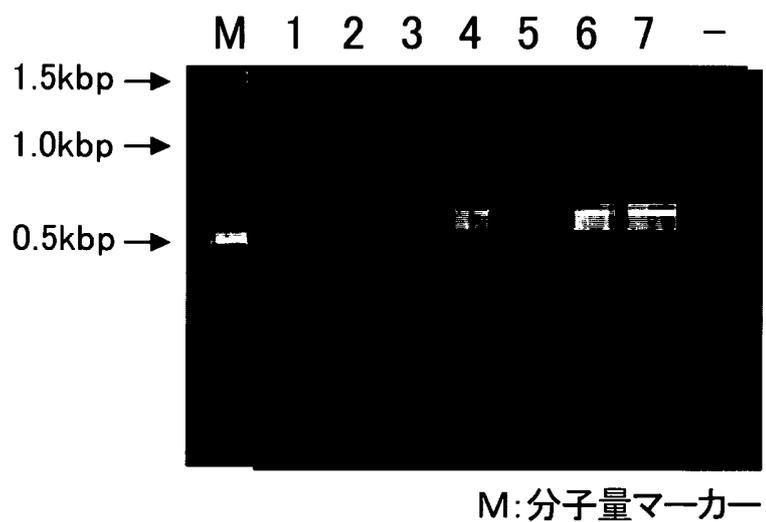


Fig.8

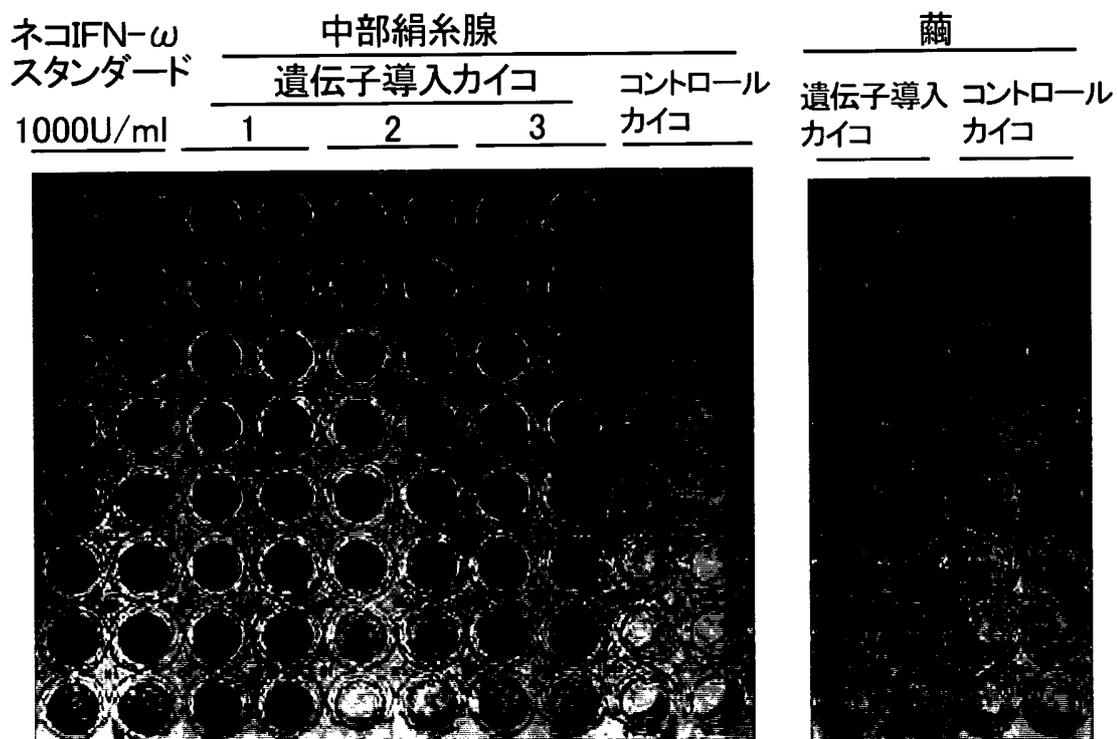


Fig.9

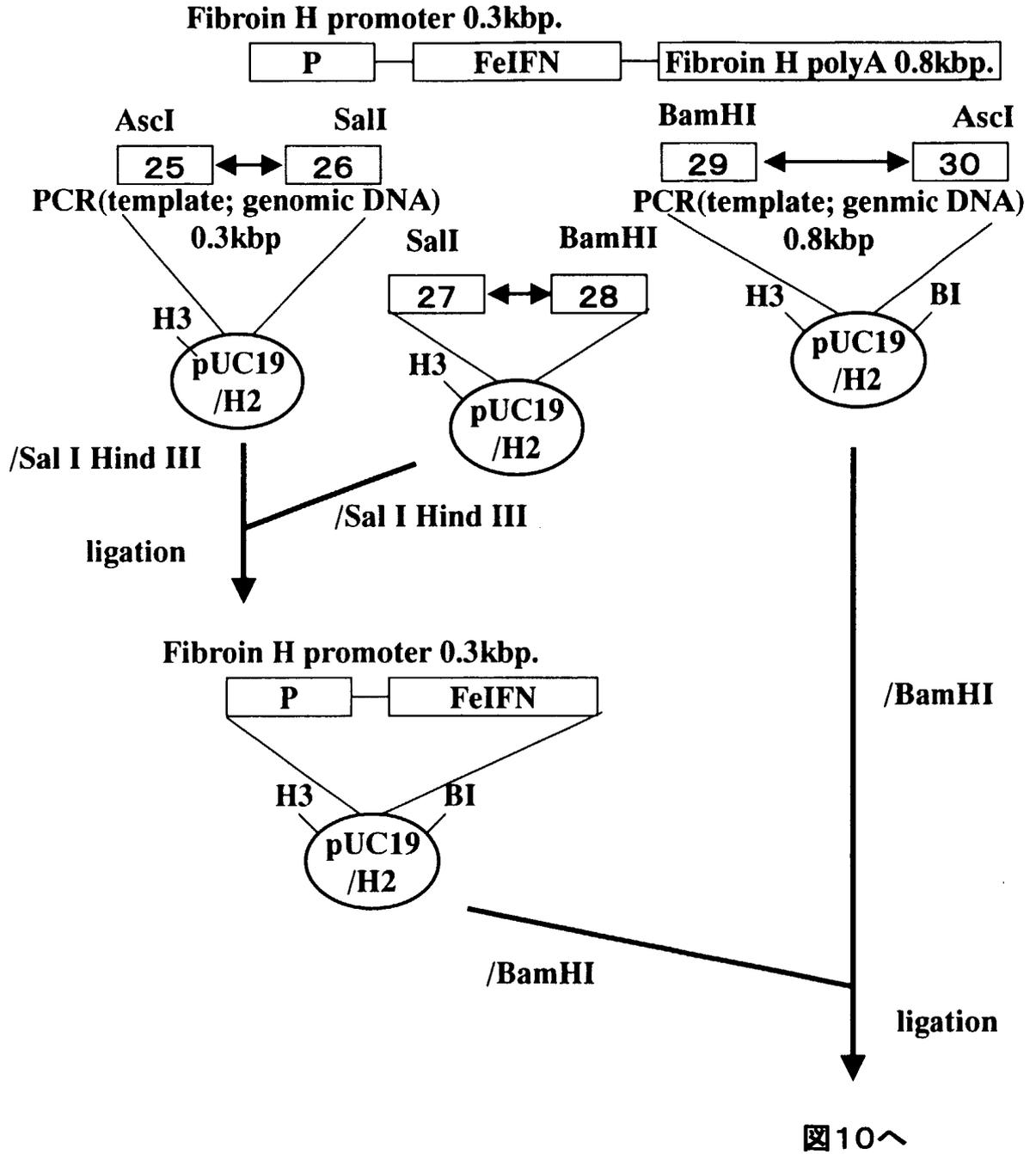


Fig.10

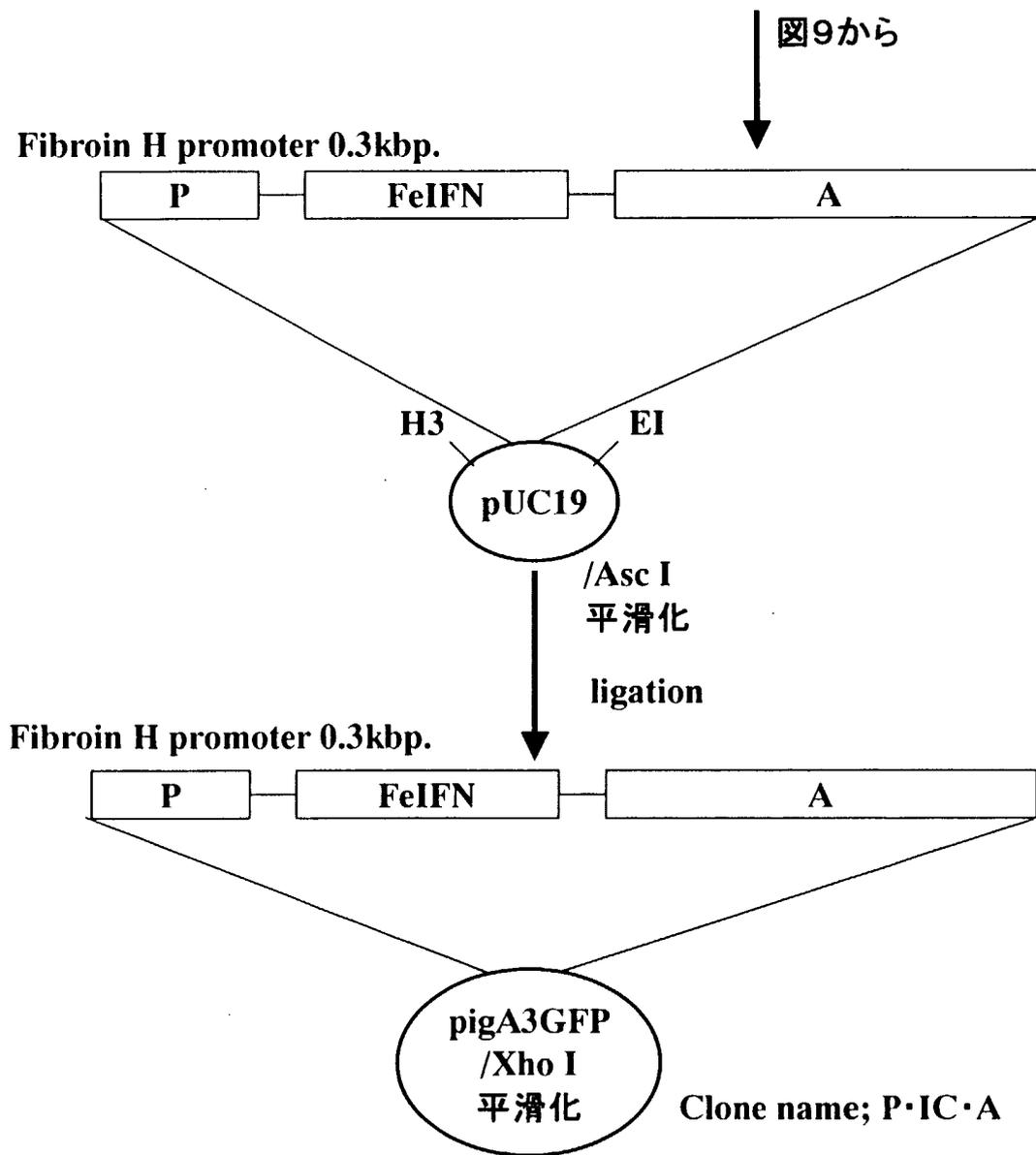


Fig.11

Fibroin H promoter 0.3kbp.

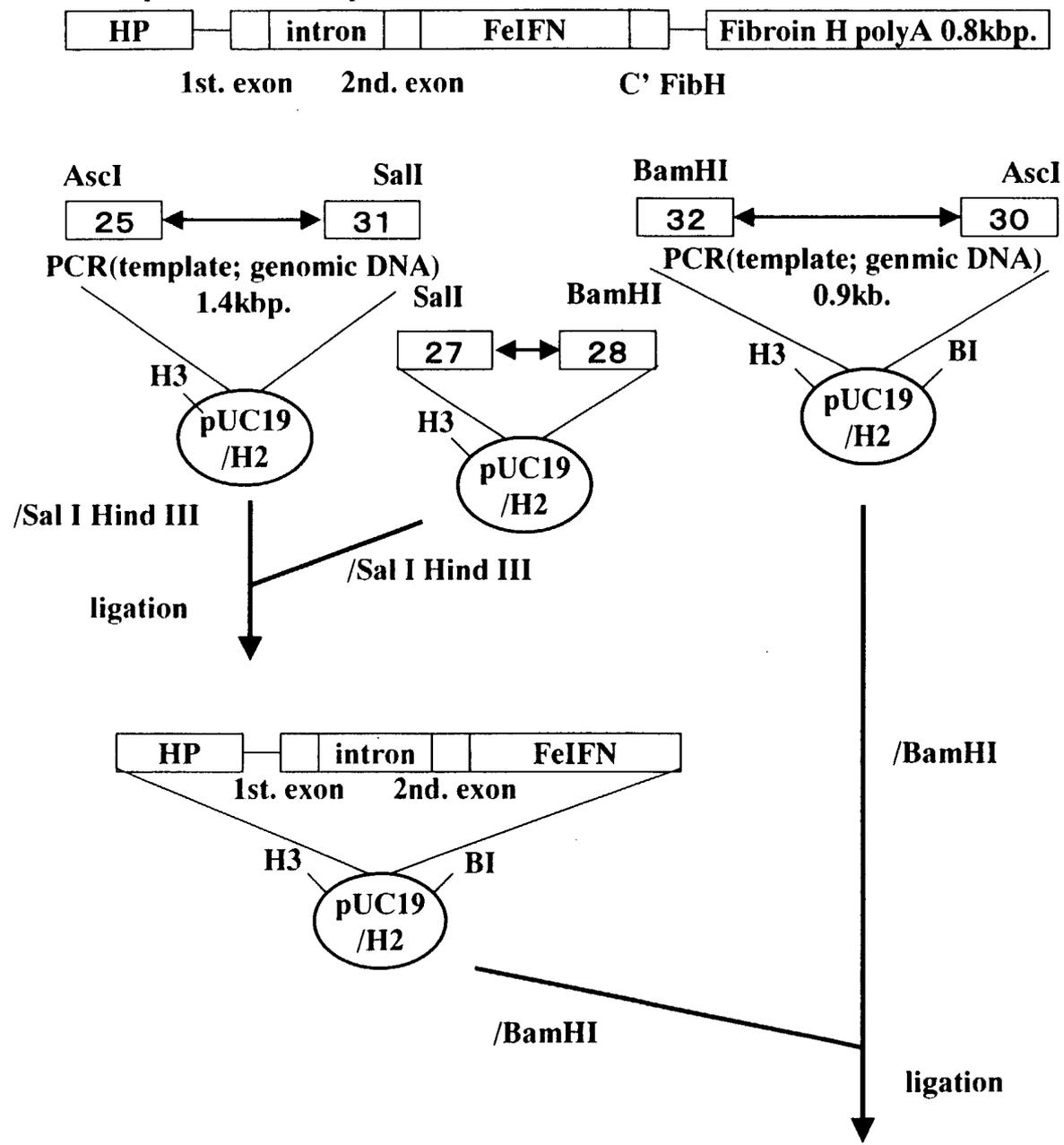


図12~

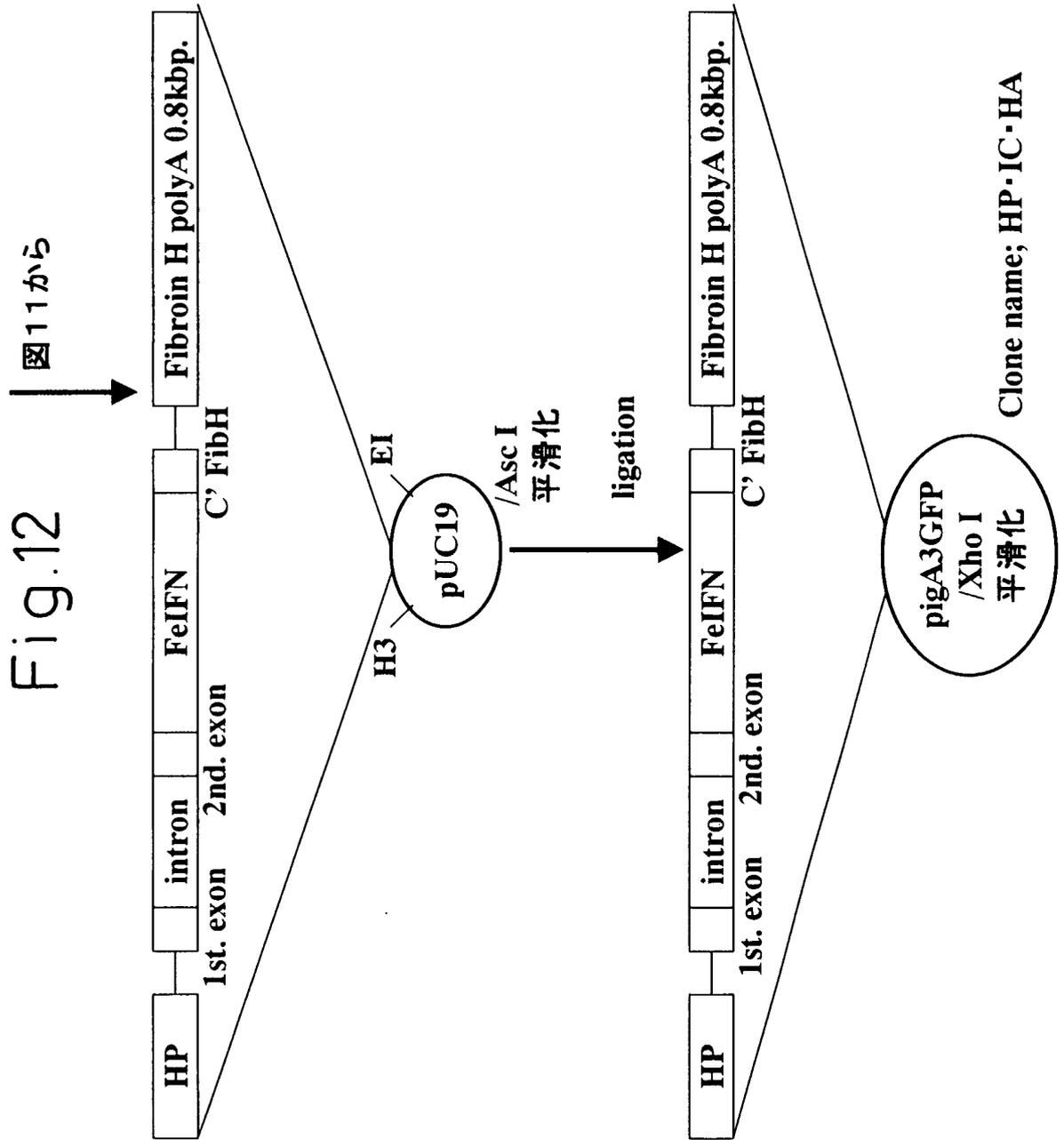


Fig.13

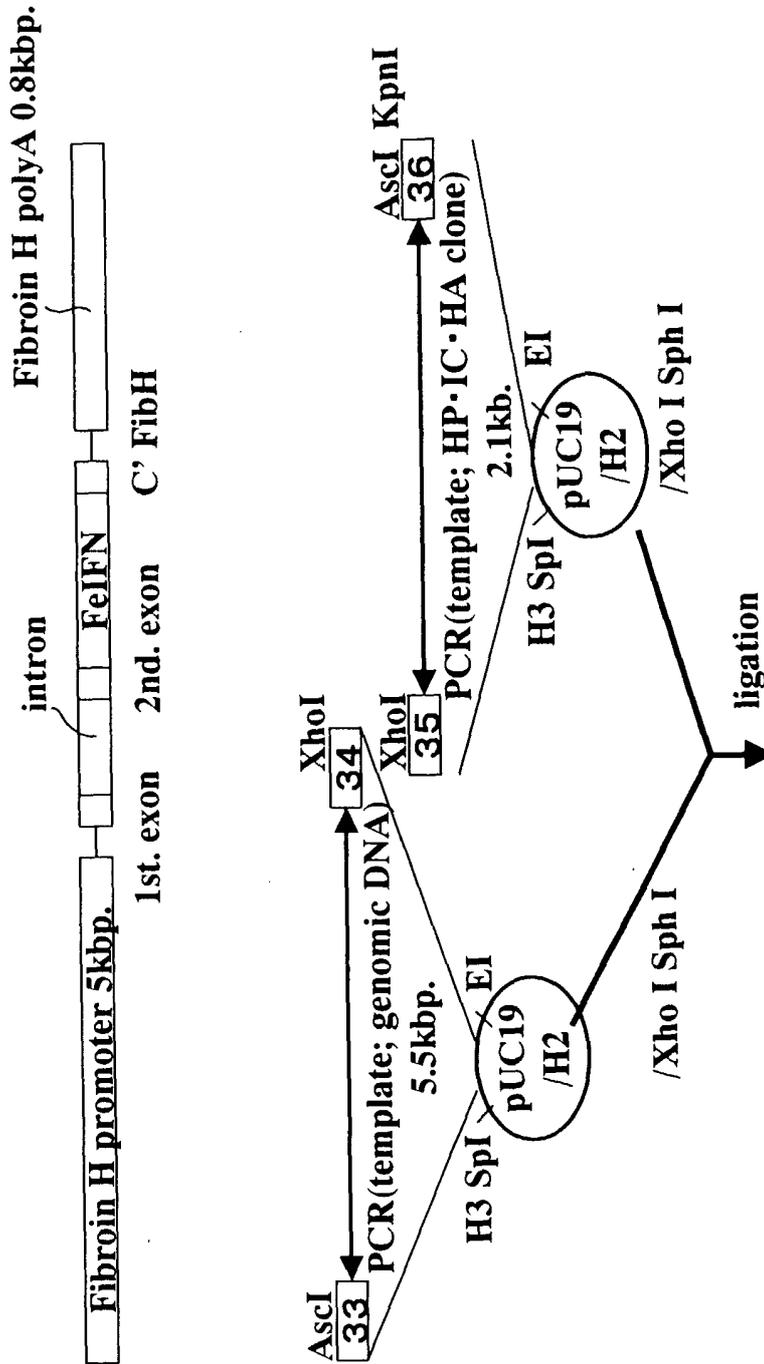


图14

Fig.14

図13から

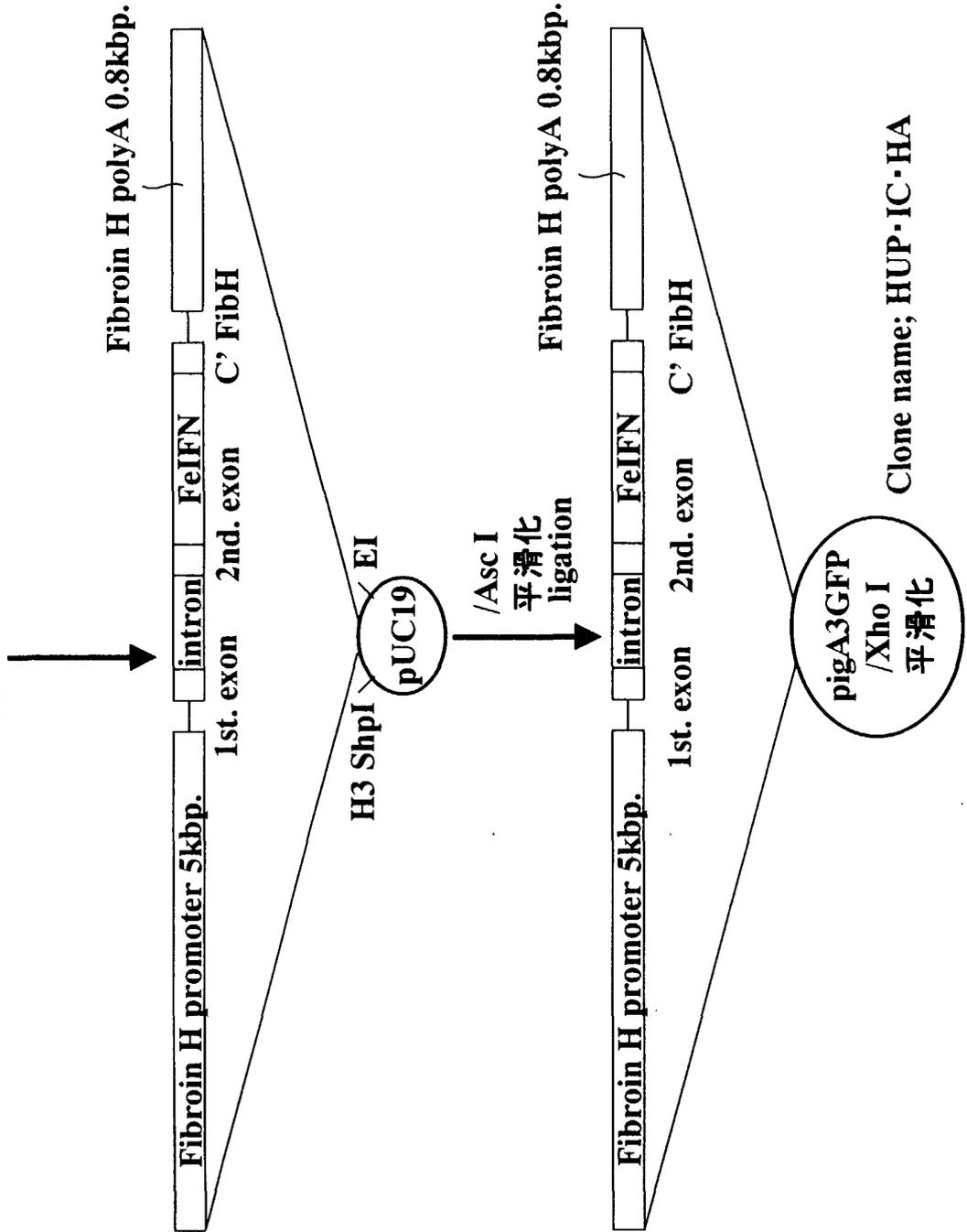


Fig.15

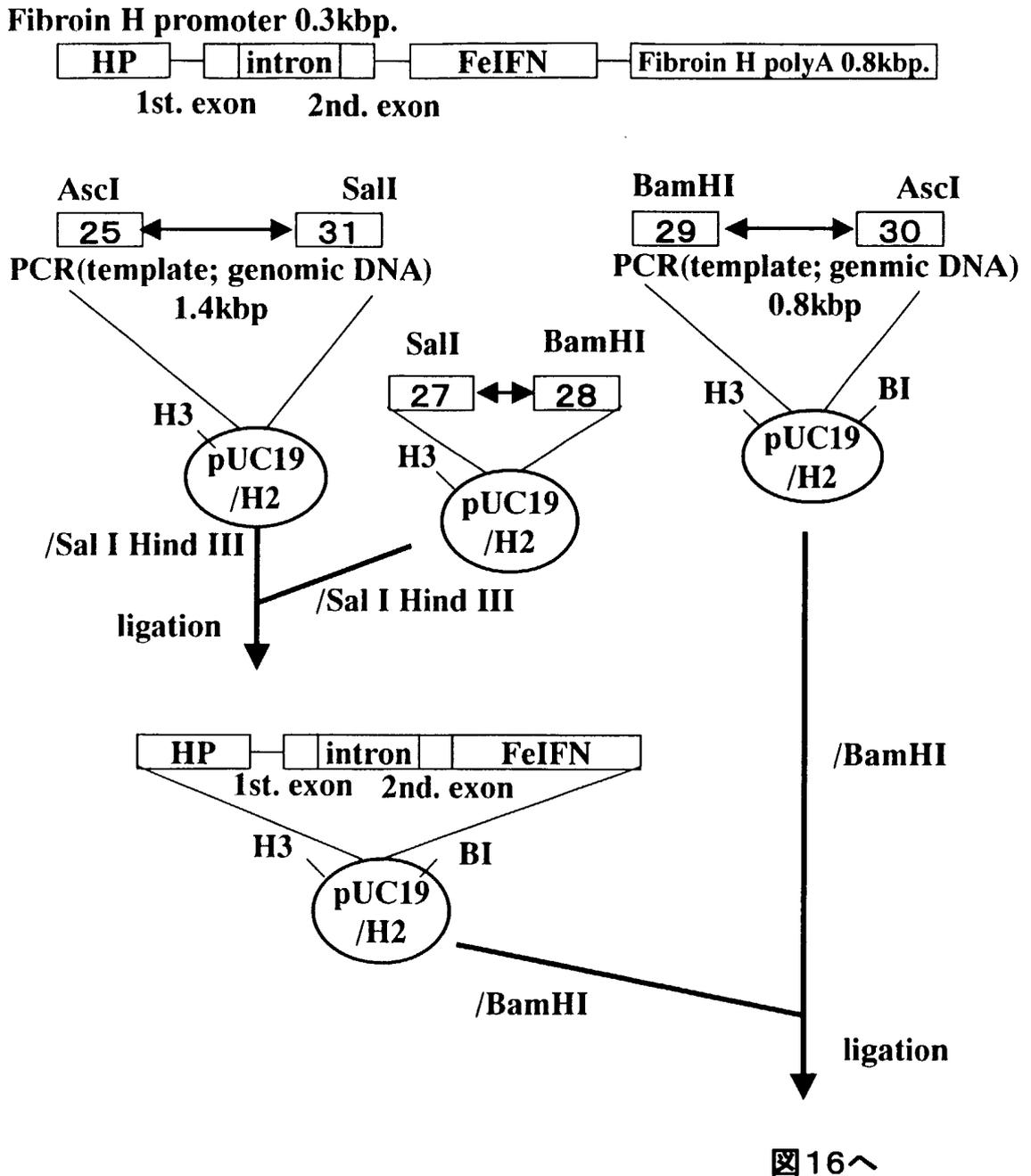


Fig.16

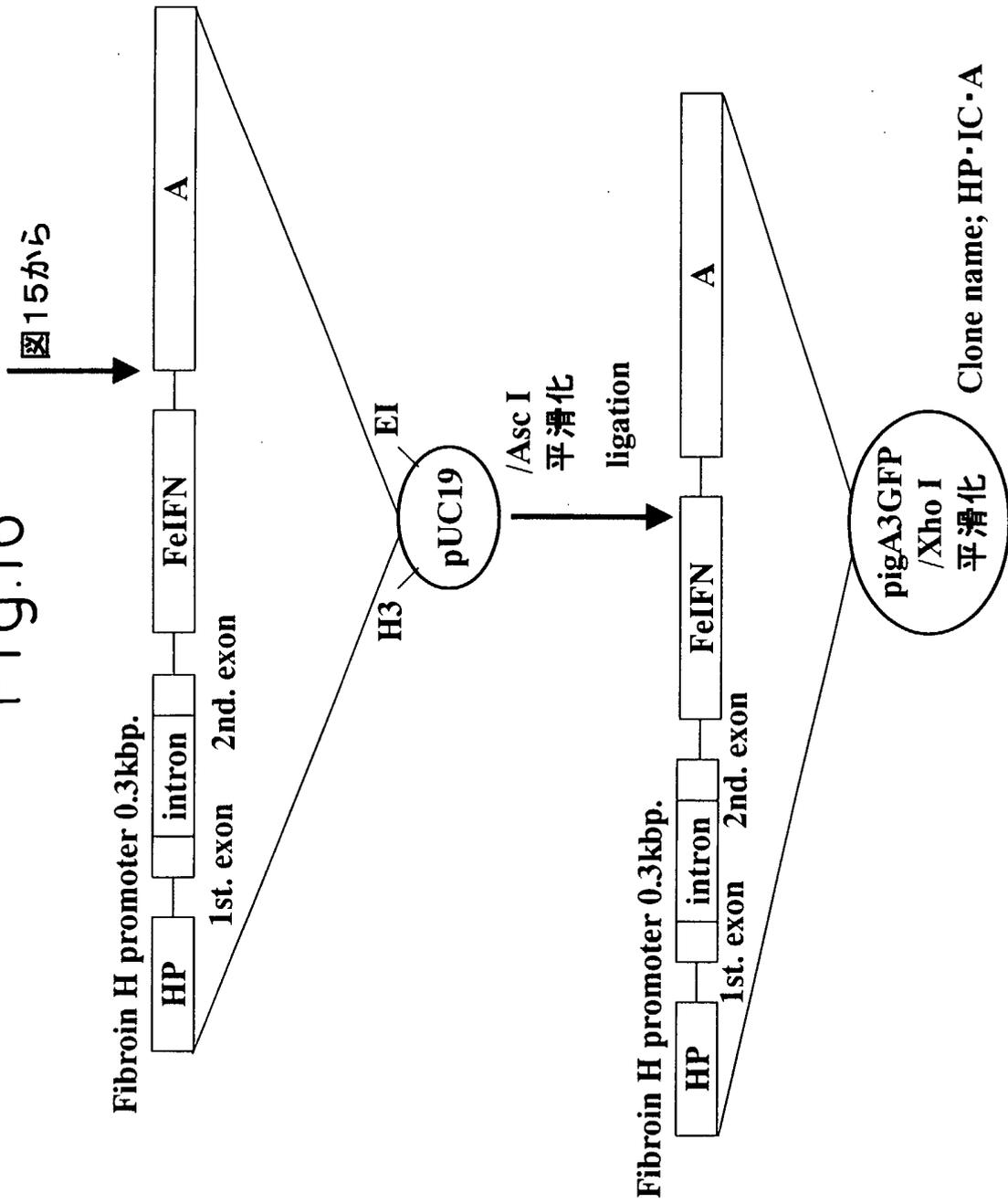


Fig.17

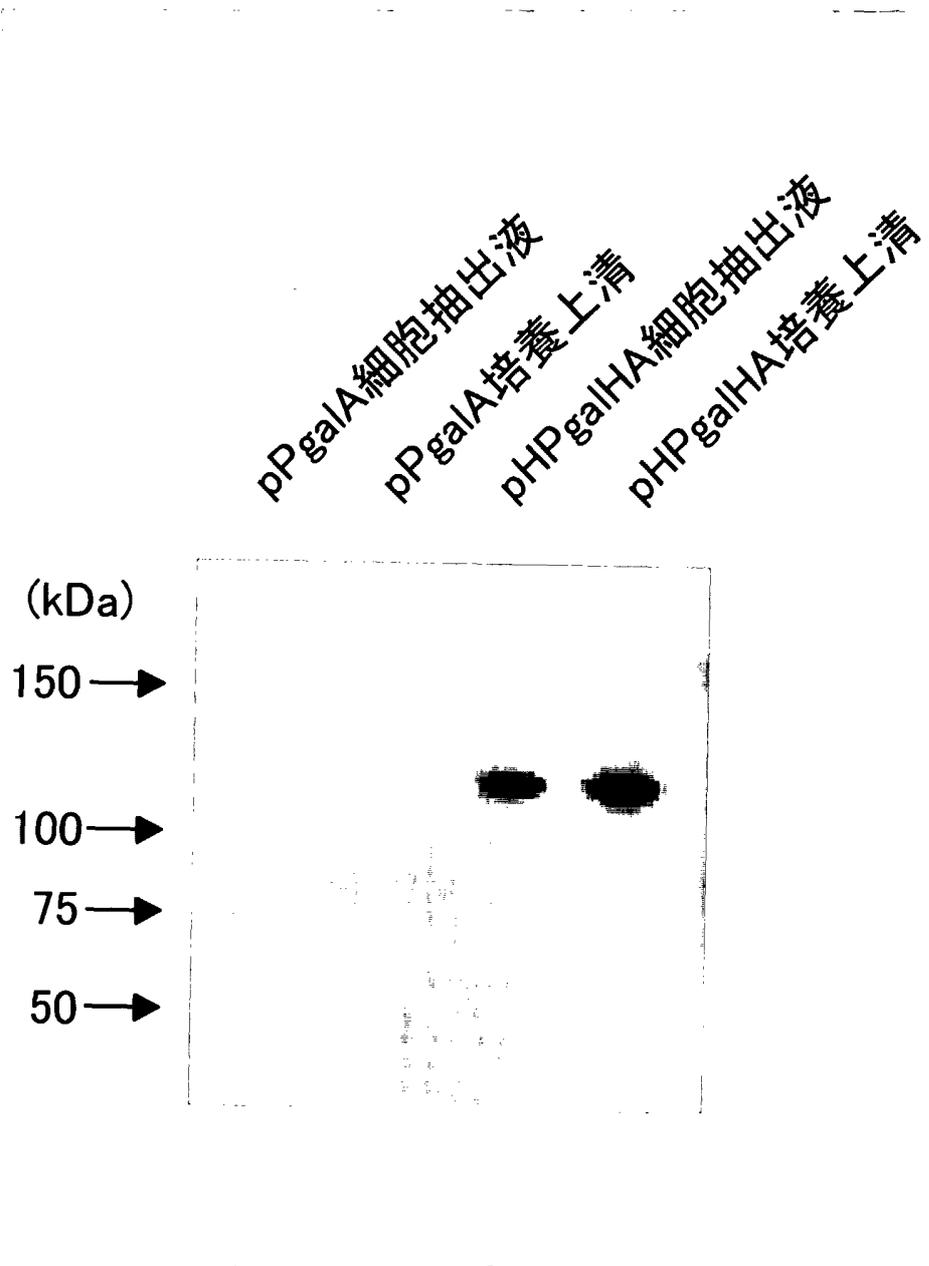


Fig.18

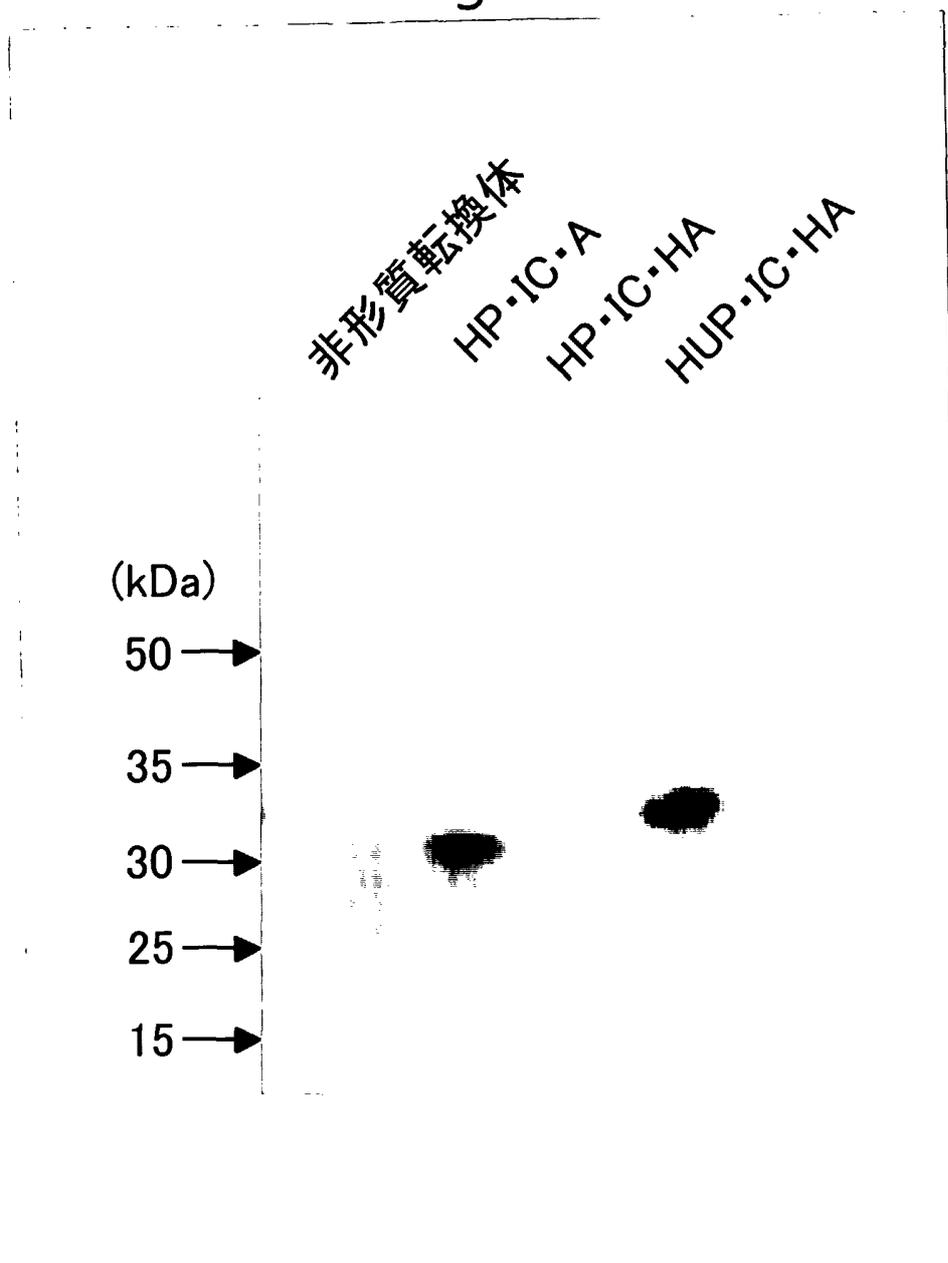
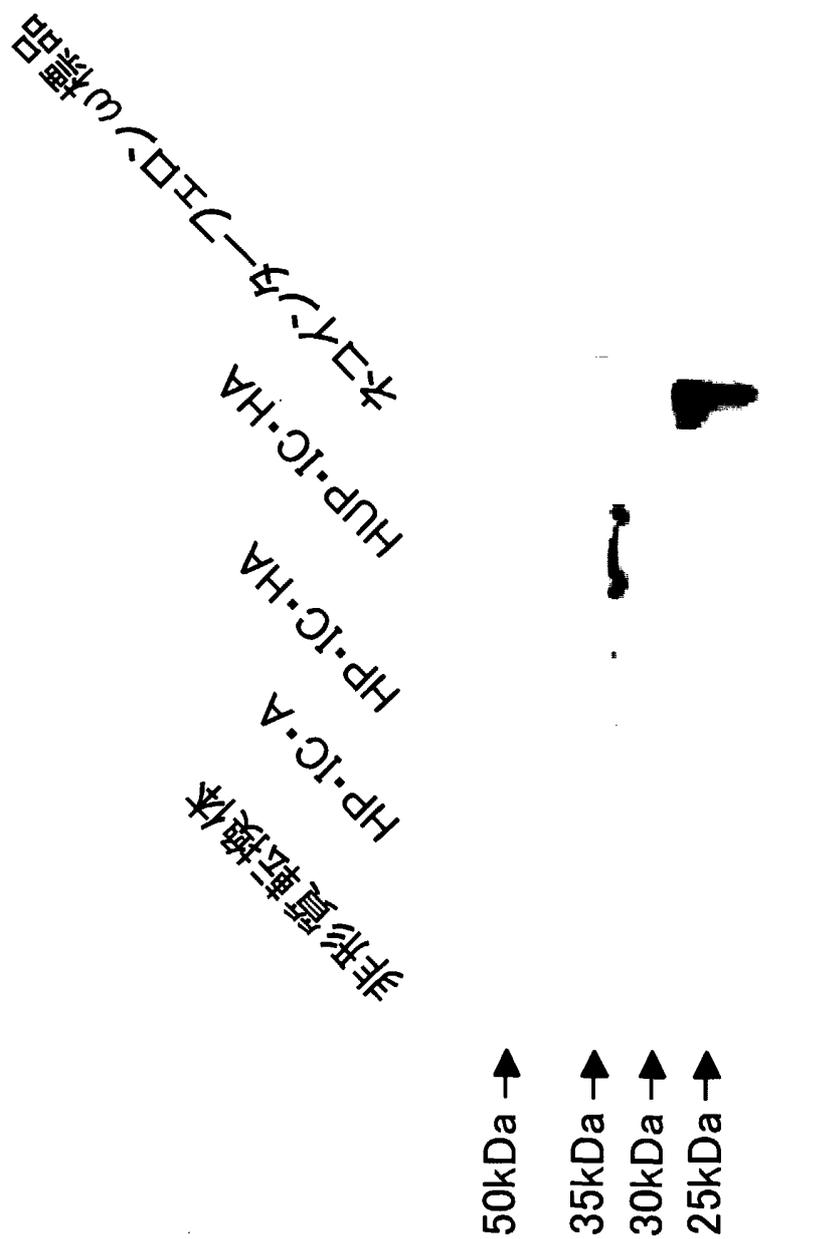


Fig.19



SEQUENCE LISTING

<110>Toray Industries, Inc.

<110>National Institute of Agrobiological Science

<120>Process for production of physiologically active proteins using
recombinant silkworm

<130>

<160>38

<210>1

<211>1910

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<221>CDS

<222>(1071)... (1652)

<221>sig_peptide

<222>(1071)... (1139)

<221>mat_peptide

<222>(1140)... (1652)

<400>1

```

ctcgagggtc agaaaccttg ttaaccaata gagccaaata tagttaacac aatagaaatt   60
tatccaaata ttattcgtgt attgtttata gcctttgtca agtcttttac aaggcaagat  120
aataagtaat attccgtgat tggacgtaac atttcccgga agatccttag ccgataagtc  180
gaagagccgc atgtggctag agagacgagg gtttccgacc actggcttag gcgcttattc  240
cgccataata gatgtacgtg ttcacaatta gcacccgaaa ttcgtaatag ctacgagaag  300
tatcgaatat caaaaatcta tatattaata cgtgaagcaa aaactttgta tcccttttta  360
cgaaaattgc gaggacggag gagtatgaaa tttcccacac ttatagagaa tacagagaag  420
aagtgcacaa tgctaataatt tttttaaaat aatgcataaa agatacttta aatcaataaa  480

```

gaaaacagca cacacactac ataccatgta ttgacgcac acacgcattg atactattta 540
 ttgtcaaact ttgttcttg acgtctgtgt tcaaactgag aatagattaa atattgtttg 600
 tctttattaa ttttttttaa tagtgtagtc ttggcgaaat ttgtgattat agaagtataa 660
 aatacaatca taatagtgtg caaacttaca attccaatt aattatagtc gaatttcgac 720
 tactgcggga cctctagtat taataattct ctttaaaaaa aaacagagca tcaaatactg 780
 tcacaaatgt caagcgggtc tcaacgagcc atgaataaat tagaaatcaa ttaataacat 840
 aaaaataggca aacaaaataa aaccatttac atagagaacg ttgtttgac aaaaacaata 900
 acttgatac attgtttgca caaatgtttg aaccgaaaat ttattactct ctacgtaagc 960
 ttgatcaaac ttcgttttcg tataaaaacgc gttggcccaa ccactttggc atagtcgtct 1020
 tatcatcggg tctctaagga tcaagcgatc caagaccgc caacgtcgac atg gcg 1076

Met Ala

1

ctg ccc tct tcc ttc ttg gtg gcc ctg gtg gcg ctg ggc tgc aac tcc 1124
 Leu Pro Ser Ser Phe Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Gly Cys Asn Ser

5

10

15

gtc tgc gtg ctg ggc tgt gac ctg cct cag acc cac ggc ctg ctg aac 1172
 Val Cys Val Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Gly Leu Leu Asn

20

25

30

agg agg gcc ttg acg ctc ctg gga caa atg agg aga ctc cct gcc agc 1220
 Arg Arg Ala Leu Thr Leu Leu Gly Gln Met Arg Arg Leu Pro Ala Ser

35

40

45

50

tcc tgt cag aag gac aga aat gac ttc gcc ttc ccc cag gac gtg ttc 1268
 Ser Cys Gln Lys Asp Arg Asn Asp Phe Ala Phe Pro Gln Asp Val Phe

55

60

65

ggt gga gac cag tcc cac aag gcc caa gcc ctc teg gtg gtg cac gtg 1316
 Gly Gly Asp Gln Ser His Lys Ala Gln Ala Leu Ser Val Val His Val

70

75

80

acg aac cag aag atc ttc cac ttc ttc tgc aca gag gcg tcc tcg tct 1364
 Thr Asn Gln Lys Ile Phe His Phe Phe Cys Thr Glu Ala Ser Ser Ser
 85 90 95
 gct gct tgg aac acc acc ctc ctg gag gaa ttt tgc acg gga ctt gat 1412
 Ala Ala Trp Asn Thr Thr Leu Leu Glu Glu Phe Cys Thr Gly Leu Asp
 100 105 110
 cgg cag ctg acc cgc ctg gaa gcc tgt gtc ctg cag gag gtg gag gag 1460
 Arg Gln Leu Thr Arg Leu Glu Ala Cys Val Leu Gln Glu Val Glu Glu
 115 120 125 130
 gga gag gct ccc ctg acg aac gag gac att cat ccc gag gac tcc atc 1508
 Gly Glu Ala Pro Leu Thr Asn Glu Asp Ile His Pro Glu Asp Ser Ile
 135 140 145
 ctg agg aac tac ttc caa aga ctc tcc ctc tac ctg caa gag aag aaa 1556
 Leu Arg Asn Tyr Phe Gln Arg Leu Ser Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Lys
 150 155 160
 tac agc cct tgt gcc tgg gag atc gtc aga gca gaa atc atg aga tcc 1604
 Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser
 165 170 175
 ttg tat tat tca tca aca gcc ttg cag aaa aga tta agg agc gag aaa 1652
 Leu Tyr Tyr Ser Ser Thr Ala Leu Gln Lys Arg Leu Arg Ser Glu Lys
 180 185 190
 tga tctagaccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg 1705
 ttgtttgccc cteccccgtg ccttccttga ccttggaagg tgccactccc actgtccttt 1765
 cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 1825
 gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 1885
 atgcggtggg ctctatggcc tcgag 1910

<210>2

<211>1172

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<221>CDS

<222>(333)...(914)

<221>sig_peptide

<222>(333)...(401)

<221>mat_peptide

<222>(402)...(914)

<400>2

```

ctcgagggga gaaagcatga agtaagttct ttaaataatta caaaaaaatt gaacgatatt      60
ataaaattct ttaaataatt aaaagtaaga acaataagat caattaaatc ataattaatc      120
acattgttca tgatcacaat ttaatttact tcatacgttg tattgttatg ttaaataaaa      180
agattaattt ctatgtaatt gtatctgtac aatacaatgt gtagatgttt attctatcga      240
aagtaaatac gtcaaaaactc gaaaattttc agtataaaaa ggttcaactt tttcaaatca      300
gcatcagttc ggttccaact ctcaaggctg ac atg gcg ctg ccc tct tcc ttc      353
                                     Met Ala Leu Pro Ser Ser Phe
                                     1             5
ttg gtg gcc ctg gtg gcg ctg ggc tgc aac tcc gtc tgc gtg ctg ggc      401
Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Gly Cys Asn Ser Val Cys Val Leu Gly
          10             15             20
tgt gac ctg cct cag acc cac ggc ctg ctg aac agg agg gcc ttg acg      449
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Gly Leu Leu Asn Arg Arg Ala Leu Thr
          25             30             35
ctc ctg gga caa atg agg aga ctc cct gcc agc tcc tgt cag aag gac      497
Leu Leu Gly Gln Met Arg Arg Leu Pro Ala Ser Ser Cys Gln Lys Asp
    
```

40	45	50	55	
aga aat gac ttc gcc ttc ccc cag gac gtg ttc ggt gga gac cag tcc				545
Arg Asn Asp Phe Ala Phe Pro Gln Asp Val Phe Gly Gly Asp Gln Ser				
	60	65	70	
cac aag gcc caa gcc ctc tcg gtg gtg cac gtg acg aac cag aag atc				593
His Lys Ala Gln Ala Leu Ser Val Val His Val Thr Asn Gln Lys Ile				
	75	80	85	
ttc cac ttc ttc tgc aca gag gcg tcc tcg tct gct gct tgg aac acc				641
Phe His Phe Phe Cys Thr Glu Ala Ser Ser Ser Ala Ala Trp Asn Thr				
	90	95	100	
acc ctc ctg gag gaa ttt tgc acg gga ctt gat cgg cag ctg acc cgc				689
Thr Leu Leu Glu Glu Phe Cys Thr Gly Leu Asp Arg Gln Leu Thr Arg				
	105	110	115	
ctg gaa gcc tgt gtc ctg cag gag gtg gag gag gga gag gct ccc ctg				737
Leu Glu Ala Cys Val Leu Gln Glu Val Glu Glu Gly Glu Ala Pro Leu				
	120	125	130	135
acg aac gag gac att cat ccc gag gac tcc atc ctg agg aac tac ttc				785
Thr Asn Glu Asp Ile His Pro Glu Asp Ser Ile Leu Arg Asn Tyr Phe				
	140	145	150	
caa aga ctc tcc ctc tac ctg caa gag aag aaa tac agc cct tgt gcc				833
Gln Arg Leu Ser Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala				
	155	160	165	
tgg gag atc gtc aga gca gaa atc atg aga tcc ttg tat tat tca tca				881
Trp Glu Ile Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Tyr Tyr Ser Ser				
	170	175	180	
aca gcc ttg cag aaa aga tta agg agc gag aaa tga tctagaccgc				927
Thr Ala Leu Gln Lys Arg Leu Arg Ser Glu Lys				

185 190
 tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttagc cagccatctg ttgtttgccc ctcccccggtg 987
 ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 1047
 gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc 1107
 aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgCGgtggg ctctatggcc 1167
 tcgag 1172

<210>3

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>3

acgcgtcgac atggggcgctg ccctcttct t 31

<210>4

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>4

ctagtctaga tcatttctcg ctcttaatc 30

<210>5

<211>29

<212>DNA

<223>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>5

ccggaattcg gtcagaaacc ttgttaacc

29

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>6

acgcgtcgac gttggcggtc tttggatcgc

30

<210>7

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>7

ccggaattcg ggagaaagca tgaagtaag

29

<210>8

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>8

acgcgtcgac cttgagagtt ggaaccgaac

30

<210>9

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>9

ctagtctaga ccgctgatca gcctcgactg

30

<210>10

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>10

cgcgatccg ccatagagcc caccgcatcc

30

<210>11

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>11

gacctcgagg gtcagaaacc ttgttaacca atag

34

<210>12

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>12

gacctcgagg ccatagagcc caccgcatcc

30

<210>13

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>13

gacctcgagg ggagaaagca tgaagtaag

29

<210>14

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>14

acgcgtcgac atgaccaaca agtgtctcct c

31

<210>15

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>15

ctagtctaga tcagtttcgg aggtaacctg 30

<210>16

<211>1151

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<221>CDS

<222>(333)...(893)

<221>sig_peptide

<222>(333)...(395)

<221>mat_peptide

<222>(396)...(893)

<400>16

ctcgagggga gaaagcatga agtaagttct ttaaataatta caaaaaaatt gaacgatatt 60

ataaaattct ttaaataatt aaaagtaaga acaataagat caattaaatc ataattaatc 120

acattgttca tgatcacaat ttaatttact tcatacgttg tattgttatg ttaaataaaa 180

agattaattt ctatgtaatt gtatctgtac aatacaatgt gtagatgttt attctatcga 240

aagtaaatac gtcaaaactc gaaaattttc agtataaaaa ggttcaactt tttcaaatca 300

gcatcagttc ggttccaact ctcaaggtcg ac 332

atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc 380

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15

act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga 428

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg

20 25 30

agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg 476

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45
 ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag 524
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60
 att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc 572
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct 620
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95
 agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc 668
 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110
 tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag 716
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125
 aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa 764
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140
 aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt 812
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160
 cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac 860
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175
 ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga tctagaccgc 906

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

180

185

tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg 960

ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 1026

gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc 1086

aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgCGgtggg ctctatggcc 1146

tcgag 1151

<210>17

<211>1849

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<221>CDS

<222>(1071)...(1631)

<221>sig_peptide

<222>(1071)...(1133)

<221>mat_peptide

<222>(1134)...(1631)

<400>17

ctcgagggtc agaaaccttg ttaaccaata gagccaaata tagttaacac aatagaaatt 60

tatccaaata ttattcgtgt attgtttata gcctttgtca agtcttttac aaggcaagat 120

aataagtaat attccgtgat tggacgtaac atttcccga agatccttag ccgataagtc 180

gaagagccgc atgtggctag agagacgagg gtttccgacc actggcttag gcgcttattc 240

cgccataata gatgtacgtg ttcacaatta gcacccgaaa ttcgtaatag ctacgagaag 300

tatcgaatat caaaaatcta tatattaata cgtgaagcaa aaactttgta tccttttta 360

cgaaaattgc gaggacggag gagtatgaaa tttccacac ttatagagaa tacagagaag 420

aagtgcacaa tgctaataatt tttttaaaat aatgcataaa agatacttta aatcaataaa 480

gaaaacagca cacacactac ataccatgta tttgacgcac acacgcatgt atactattta 540
 ttgtcaaact tttgttcttg acgtctgtgt tcaaactgag aatagattaa atattgtttg 600
 tctttattaa tatttttttaa tagtgtagtc ttggcgaaat ttgtgattat agaagtataa 660
 aatacaatca taatagtgtg caaacttaca attccaatt aattatagtc gaatttcgac 720
 tactgcggga cctctagtat taataattct ctttaaaaaa aacagagca tcaaatactg 780
 tcacaaatgt caagcgggtc tcaacgagcc atgaataaat tagaaatcaa ttaataacat 840
 aaaaataggca aacaaaataa aaccatttac atagagaacg tttgttgaac aaaaacaata 900
 acttgatac attgtttgca caaatgtttg aaccgaaaat ttattactct ctacgtaage 960
 ttgatcaaac ttcgttttcg tataaaaacgc gttggcccaa ccactttggc atagtcgtct 1020
 tatcatcggg tctctaagga tcaagcgatc caagaccgc caacgtcgac 1070
 atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc 1118
 Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga 1166
 Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30
 agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg 1214
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45
 ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag 1262
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60
 att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc 1310
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct 1358
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser

	85	90	95	
agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc				1406
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val				
	100	105	110	
tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag				1454
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu				
	115	120	125	
aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa				1502
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys				
	130	135	140	
aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt				1550
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser				
145	150	155	160	
cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac				1598
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr				
	165	170	175	
ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga cagccatctg				1644
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn				
	180	185		
ttgtttgcc cteccccgtg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt				1704
cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg				1764
gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg				1824
atgcggtggg ctctatggcc tcgag				1849
<210>18				
<211>28				
<212>DNA				
<213>Artificial sequence				

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>18

acgcgtcgac atgaagctga ccgccctg 28

<210>19

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Synthesized oligonucleotide

<400>19

ctagtctaga tcagggcttg gtgaagtg 28

<210>20

<211>1175

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<221>CDS

<222>(333)...(917)

<221>sig_peptide

<222>(333)...(401)

<221>mat_peptide

<222>(402)...(917)

<400>20

ctcgagggga gaaagcatga agtaagttct ttaaataatta caaaaaaatt gaacgatatt 60

ataaaattct ttaaataatt aaaagtaaga acaataagat caattaaatc ataattaatc 120

acattgttca tgatcacaat ttaatttact tcatacgttg tattggtatg ttaaataaaa 180

agattaattt ctatgtaatt gtatctgtac aatacaatgt gtagatgttt attctatcga 240
aagtaaatac gtcaaaactc gaaaattttc agtataaaaa ggttcaactt tttcaaatca 300
gcatcagttc ggttccaact ctcaaggctg ac 332
atg aag ctg acc gcc ctg cag ctg ctg ctg tgg cac agc gca ctc tgg 380
Met Lys Leu Thr Ala Leu Gln Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp
1 5 10 15
atg gtg caa gaa gcc acc ccc ttg ggc cct acc agc tcc ctg ccc cag 428
Met Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu Gly Pro Thr Ser Ser Leu Pro Gln
20 25 30
agc ttc ctg ctc aag tgc tta gaa caa gtg agg aag gtc cag gct gat 476
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Val Gln Ala Asp
35 40 45
ggc aca gcg ctg cag gag agg ctg tgc gcc gcc cac aag ctg tgc cac 524
Gly Thr Ala Leu Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His
50 55 60
cct gag gag ctg gtg ctg ctt ggg cac gct ctg ggc atc ccc cag gct 572
Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ala Leu Gly Ile Pro Gln Ala
65 70 75 80
ccc ctg agc agc tgc tcc agc cag gcc ctg cag ctg acg ggc tgc ctg 620
Pro Leu Ser Ser Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu
85 90 95
cgt caa ctc cac agt ggc ctc ttc ctc tac cag ggc ctc ctg cag gcc 668
Arg Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala
100 105 110
ctg gca ggg ata tcc ccc gag tta gcc ccc acc ctg gac atg ctg cag 716
Leu Ala Gly Ile Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Met Leu Gln
115 120 125

ctg gac atc acc gac ttt gct atc aac atc tgg cag cag atg gaa gac 764
 Leu Asp Ile Thr Asp Phe Ala Ile Asn Ile Trp Gln Gln Met Glu Asp
 130 135 140
 gtg ggg atg gcc cct gca gtg ccg ccc acc cag ggc acc atg cca acc 812
 Val Gly Met Ala Pro Ala Val Pro Pro Thr Gln Gly Thr Met Pro Thr
 145 150 155 160
 ttc acc tcg gcc ttc cag cgc cgg gca gga ggc acc ctg gtt gcc tcc 860
 Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Ala Ser
 165 170 175
 aac ctg cag agc ttc ctg gag gtg gca tac cgt gct ctg cgc cac ttc 908
 Asn Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ala Tyr Arg Ala Leu Arg His Phe
 180 185 190
 acc aag ccc tga tctagaccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc 960
 Thr Lys Pro
 195
 cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccttgggaagg tgccactccc 1020
 actgtccitt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct 1080
 attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg 1140
 catgctgggg atgCGgtggg ctctatggcc tcgag 1175
 <210>21
 <211>1873
 <212>DNA
 <213>Artificial sequence
 <220>
 <221>CDS
 <222>(1071)...(1655)
 <221>sig_peptide

<222>(1071)...(1139)

<221>mat_peptide

<222>(1140)...(1655)

<400>21

```

ctcgagggtc agaaaccttg ttaaccaata gagccaaata tagttaacac aatagaaatt    60
tatccaaata ttattcgtgt attgtttata gcctttgtca agtcttttac aaggcaagat    120
aataagtaat attccgtgat tggacgtaac atttcccgga agatccttag ccgataagtc    180
gaagagccgc atgtggctag agagacgagg gtttccgacc actggcttag gcgcttattc    240
cgccataata gatgtacgtg ttcacaatta gcacccgaaa ttcgtaatag ctacgagaag    300
tatcgaatat caaaaatcta tatattaata cgtgaagcaa aaactttgta tccttttta    360
cgaaaattgc gaggacggag gagtatgaaa tttcccacac ttatagagaa tacagagaag    420
aagtgcacaa tgctaataatt tttttaaaat aatgcataaa agatacttta aatcaataaa    480
gaaaacagca cacacactac ataccatgta tttgacgcac acacgcatgt atactattta    540
ttgtcaaact tttgttcttg acgtctgtgt tcaaactgag aatagattaa atattgtttg    600
tctttattaa tattttttaa tagtgtagtc ttggcgaaat ttgtgattat agaagtataa    660
aatacaatca taatagtgtg caaacttaca attccaatt aattatagtc gaatttcgac    720
tactgcggga cctctagtat taataattct ctttaaaaaa aaacagagca tcaataactg    780
tcacaaatgt caagcgggtc tcaacgagcc atgaataaat tagaaatcaa ttaataacat    840
aaaataggca aacaaaataa aaccatttac atagagaacg tttgttgaac aaaacaata    900
actgtatac attgtttgca caaatgtttg aaccgaaaat ttattactct ctacgtaagc    960
ttgatcaaac ttcgttttcg tataaaacgc gttggcccaa ccactttggc atagtcgtct 1020
tatcatcggg tctctaagga tcaagcgatc caaagaccgc caacgtcgac                1070
atg aag ctg acc gcc ctg cag ctg ctg ctg tgg cac agc gca ctc tgg    1118
Met Lys Leu Thr Ala Leu Gln Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp
  1           5           10          15
atg gtg caa gaa gcc acc ccc ttg ggc cct acc agc tcc ctg ccc cag    1166
Met Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu Gly Pro Thr Ser Ser Leu Pro Gln

```

20	25	30	
agc ttc ctg ctc aag tgc tta gaa caa gtg agg aag gtc cag gct gat			1214
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Val Gln Ala Asp			
35	40	45	
ggc aca gcg ctg cag gag agg ctg tgc gcc gcc cac aag ctg tgc cac			1262
Gly Thr Ala Leu Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His			
50	55	60	
cct gag gag ctg gtg ctg ctt ggg cac gct ctg ggc atc ccc cag gct			1310
Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ala Leu Gly Ile Pro Gln Ala			
65	70	75	80
ccc ctg agc agc tgc tcc agc cag gcc ctg cag ctg acg ggc tgc ctg			1358
Pro Leu Ser Ser Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu			
85	90	95	
cgt caa ctc cac agt ggc ctc ttc ctc tac cag ggc ctc ctg cag gcc			1406
Arg Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala			
100	105	110	
ctg gca ggg ata tcc ccc gag tta gcc ccc acc ctg gac atg ctg cag			1454
Leu Ala Gly Ile Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Met Leu Gln			
115	120	125	
ctg gac atc acc gac ttt gct atc aac atc tgg cag cag atg gaa gac			1502
Leu Asp Ile Thr Asp Phe Ala Ile Asn Ile Trp Gln Gln Met Glu Asp			
130	135	140	
gtg ggg atg gcc cct gca gtg ccg ccc acc cag ggc acc atg cca acc			1550
Val Gly Met Ala Pro Ala Val Pro Pro Thr Gln Gly Thr Met Pro Thr			
145	150	155	160
ttc acc tcg gcc ttc cag cgc cgg gca gga ggc acc ctg gtt gcc tcc			1598
Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Ala Ser			

165 170 175
 aac ctg cag agc ttc ctg gag gtg gca tac cgt gct ctg cgc cac ttc 1646
 Asn Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ala Tyr Arg Ala Leu Arg His Phe
 180 185 190
 acc aag ccc tga cagccatctg ttgtttgccc ctcccccggtg ccttccttga 1698
 Thr Lys Pro
 195
 ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt 1758
 gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg 1818
 attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggcc tcgag 1873
 <210>22
 <211>1396
 <212>DNA
 <213>Bombyx mori
 <400>22
 gggagaaaagc atgaagtaag ttctttaaat attacaaaaa aattgaacga tattataaaa 60
 ttctttaaaa tattaanaagt aagaacaata agatcaatta aatcataatt aatcacattg 120
 ttcgatgaca caatttaatt tacttcatac gttgtattgt tatgttaaat aaaaagatta 180
 atttctatgt aattgtatct gtacaataca atgtgtagat gtttattcta tcgaaagtaa 240
 atacgtcaaa actcgaaaat tttcagtata aaaaggttca actttttcaa atcagcatca 300
 gttcggttcc aactctcaag atgagagtca aaacctttgt gatcttgtgc tgcgctctgc 360
 aggtgagtta attattttac tattatttca gaaggtggcc agacgatatc acgggccacc 420
 tgataataag tggtcgcaa aacgcacaga tategtaaat tgtgccattt gatttgcac 480
 gcccgggggg gctacggaat aaactacatt tattttattha aaaaatgaac cttagattat 540
 gtaacttgig atttatttgc gtcaaaaagta ggcaagatga atctatgtaa atacctgggc 600
 agacttgcaa tatectatth caccggtaaa tcagcattgc aatatgcaat gcatattcaa 660
 caatatgtaa aacaattcgt aaagcatcat tagaaaatag acgaaagaaa ttgcataaaa 720

ttataaccgc attattaatt tattatgata tctattaaca attgctattg cctttttttc 780
 gcaaattata atcattttca taacctcgag gtagcattct gttacatttt aatacattgg 840
 tatgtgatta taacacgagc tgcccactga gtttctcgcc agatcttctc agtgggtcgc 900
 gttaccgatc acgtgataga ttctatgaag cactgctctt gttagggcta gtgtagcaa 960
 attctttcag gttgagtctg agagctcacc tacccatcgg agcgtagctg gaataggcta 1020
 ccagctaata ggtagggaaa acaaagctcg aaacaagctc aagtaataac aacataatgt 1080
 gaccataaaa tctcgtgggtg tatgagatac aattatgtac tttcccacaa atgtttacat 1140
 aattagaatg ttgttcaact tgcctaacgc cccagctaga acattcaatt attactatta 1200
 ccactactaa ggcagtatgt cctaactcgt tccagatcag cgctaacttc gattgaatgt 1260
 gcgaaattta tagctcaata ttttagcact tatcgtattg atttaagaaa aaattgtaa 1320
 cattttgttt cagtatgtcg cttatacaaa tgcaaacatc aatgattttg atgaggacta 1380
 ttttgggagt gatgtc 1396

<210>23

<211>6070

<212>DNA

<213>Bombyx mori

<400>23

tcaagacatc cttgattaag gcagctgccg atattgacat ggacctcgtt cgtgctgcga 60
 tagacgactg gccgcgcaga ttgaaggcct gtattcaaaa tcacggaggt cattttgaat 120
 aaactttagt gtcataagaa tctatgtttt gttaagttca ttttggata tgaatggta 180
 cataatgaat aaacttgttt caattatfff acattaaaca tgtgacagaa tttatgacct 240
 gactaggtag gtacaaacag cttttttgat attagaaaac taagtaaaat agcctacggt 300
 cacatctctt tccgtgggtg tcgttaaagg gcgacttaga gaaccaccaa gaacgtagca 360
 gaatcctcag agtgcatac cagcatacag ccatcgctaa ctgctattta ctggtaatag 420
 ggcacattgt aatctcactt aaccatactg tcgggccacc atctagccta tttctgccac 480
 gaatcaatcg tgagtgatgg acatagagaa actattagtt gagaagaaaa caagagcact 540
 aaaggtttga tattgacaaa aatctacttc gccgtcactc cataggttta ttgtctctca 600

ttagtccaga acagcagtta cagacgtaag cttttacgca caaactacag ggttgctctt 660
tattgtatcg aaaatatggg acctgaataa gggcgatfff gacgcgtcct gcccgcccat 720
tcccgatcct acggacagaa tggcaagcag tcgacgtcgc cccaacacg tcatttcgga 780
tcctcacgat ccaactaacgg tgcttttaggt acctcaagca ccggtcatcg ttctcgtcgg 840
accgctcgtc tgcgacgaag ggctcgacga gcaaattaac cctcagacac agcccactga 900
gtttctcgcc ggatcttctc agcgggtcgc gtttccgac cgggtgtaga ttctgcgaag 960
cacggctctt gctaggattc gtgttagcaa cgtcgtcagg tttgagcccc gtgagctcac 1200
ttactagtta aggttacgct gaaatagcct ctcaaggctc tcagctaggt aggaaacaaa 1080
aaaaaaagtc ctgcccttaa caccgttgcg atggcttgtc ttctgcagcg tactgtcgtg 1140
gcagggcggg accgcacat ctttttcgac gccaccttgt gatctgaagg cgaagatact 1200
cgacctaat gattgaggca agagcgtaat acctcgcgt ccttagacga gtagatctcg 1260
tggaagattc ggcacacggc acacaaaaat agcttttgag atagcctca atgtaattat 1320
gtttttatat atatttacta gctgaccggc caaacgttg gttgcctta atagatttc 1380
tagggaaatt ctagttaga aaaataacct cattcaacca cataatact cattataacc 1440
aaaaaaaaat aatatccaaa aaataaaaat ataaaataaa tgtttggggg ggacaaccct 1500
tatcacatag gggatgaaa attagatagt agccgattct cagacctact gaacatacta 1560
ttgatacaca aataaaacca aaaaaacatg gctgaaaaat gtatagtagg tattgtatta 1620
ttaagtgtat aatctatgat gtatatgagt aagtaagaca ggagaccggc ttcgtcctca 1680
tccgtcataa aaaccgtcat aaaaatcaaa cccgcaaaat tataatttgc gtaattactg 1740
gtggctggg gtaggacctt cttgtgagtc cgcgcgggta ggtaccacca tctgactatt 1800
ctgccgtgaa gcagtaatgg gtttcggttt gaagggcggg acagccgttg taactatact 1860
tgagacctta gaacttatat ctcaatgtgg gtggcgcatt tttttacggt aggcagcggc 1920
ttggctctgc ccctggcatt gctgaagtcc ataggcgacg gttaccactc accatcaggt 1980
gggccgtatg gccgtctgcc tacaaaatca ataaaaaaaa aataaaaaat ttacgttgta 2040
gatgtctatg ggctccagta accactaac accaggcggg ctgtgagctc gtccacccat 2100
ctaagcaata aaaataaata aatagatagt tgatcagtag tggaccggcg agggcgggag 2160
atcaaatga atttaaaata aaacataatt aaaggaattt gaaactataa actctgaata 2220

ataatttate gactacaat tataatattt gattgccatc ttgcaacctt attgcccgatc 2280
tgtgaataga aaaaaaaaaa aaatcgggat ggaaaaatag gggttgatcg tataagagtg 2340
aaaattgaga gtaatatgga atttttttat ttttaagtcac gacaaaataa aaataagatc 2400
ttgccaaaaa aatttaagtt tattattaaa ttaagtttaa caataaaaa attgggggttg 2460
atcgcagagg ggtgaaaatt tagggtttta tgtatTTTTG tatgctgtat cataaaaaaa 2520
taaaaacaaa aaataaaaat aggggggatga aaaataaatg ttgttcgatt ctcaacctg 2580
gccgatatgc acgctaagat tcacaaaaat cggtcgagcc gtttcggagg agttcaatca 2640
cgcacccccg cacacgagaa ttttatttat tagatttaga agagctgaa gataaatcga 2700
tatttaattt tgtaagttgt cttgatgata cattttttcg tttgtcattc tttcctgcag 2760
ttagaacata atataaatg caaatgaaaa atagaaatat aataaataat aataaataa 2820
taataaatat ttactaaca tcacgctacg ttaactggtc ccgtgataag ttcgtaaaga 2880
acttgtgta caggtaccag ataacggata taaatgtaag atttttatta tacacataca 2940
tatatttcat atacattcat aacctggaa aatacattta ttttatcat acaaatatct 3000
tccttggcg ggattcgaac ccgcgacccc cttgtgtagt gacaatgtca cttaccacta 3060
caccctctgg cattgctggg cgacggtaac caccacat taggtgggcc atatgctcgt 3120
ctgcctaca gggaaataaa aaaaatatcc taatataaat tgcattaatt ttttaaacc 3180
gactttcaat cacaatgaag acagattctc gtcgaagttt gtttttgaaa ctatatcaat 3240
aacttttcat tatccgttct tcgtcttttg tcttttttc gaaacaaaa cgaacaaaac 3300
gttctaattc gaaagatgtt ttgtacggaa agtttgaata agtgcttaat tgcaagtaac 3360
gtaacaatgt ttagggttc ggctctcaat aaattcgacc aataaacat acaattctt 3420
taacattttt ttaatcttat actagctgac ccggcagact tcgtggtgcc tcaatcgata 3480
aataaaatac ctatgcttct gtataaaata aacataaac aaacaaaagg aatccgtccg 3540
acgggagaca catcaaagga aaaacatctt ttttattttt ttaccttta aaccttctt 3600
ggacttccac aaataattta agaccaaaat tagccaaatc ggtctagcat tttcgagttt 3660
tagcgagact aacgaacagc aattcatttt tatatacaca gatttatgtt accgggggtct 3720
agtgacctaa acgacttcag ctctaact aggctaactc aggcttagta gcctggctct 3780
agtgttagat ttgaagtcgt ctaatgcaa gattattgga tctgatgat ccgtaaggac 3840

gtgtctagag cgctgacggt gactagctcc tgcgtgatca ggaaaaatgt ggaaagctta 3900
acgattttgt cacattttac ttatcacaac ttgtttttat aataattcgc ttaaatgagc 3960
agctattact taatctcgta gtggtttttg acaaatcag cttctttaga actaaaatat 4020
catttttttc gtaatttttt taatgaaaaa tgctctagtg ttataccttt ccaaaatcac 4080
cattaattag gtagtgttta agcttgttgt acaaaactgc cacacgcatt tttttctcca 4140
ctgtaggttg tagttacgcg aaaacaaaaat cgttctgtga aattcaaac aaaaatattt 4200
tttcgtaaaa acacttatca atgagtaaag taacaattca tgaataattt catgtaaaaa 4260
aaaaatacta gaaaaggaat ttttcattac gagatgctta aaaatctggt tcaaggtaga 4320
gatttttcga tatttcggaa aattttgtaa aactgtaaat cgtataaatt ttgctaaaca 4380
tatattgtgt tgttttggta agtattgacc caagctatca cctcctgcag tatgtcgtgc 4440
taattactgg acacattgta taacagttcc actgtattga caataataaa acctcttcat 4500
tgacttgaga atgtctggac agatttggtt ttgtattttt gatttacaac tgtttttttg 4560
gtgatttacc catccaaggc attctccagg atggttgtgg catcacgccg attggcaaac 4620
aaaaactaaa atgaaactaa aaagaaacag tttccgctgt cccgttcttc tagtgggaga 4680
aagcatgaag taagttcttt aatattaca aaaaaattga acgatattat aaaattcttt 4740
aaaatattaa aagtaagaac aataagatca attaaatcat aattaatcac attgttcatg 4800
atcacaattt aatttacttc atacgttgta ttgttatggt aaataaaaag attaatctt 4860
atgtaattgt atctgtacaa tacaatgtgt agatgtttat tctatcgaac gtaaatcgt 4920
caaaactcga aaattttcag tataaaaagg ttcaactttt tcaaatcagc atcagttcgg 4980
ttccaactct caagatgaga gtcaaaacct ttgtgatctt gtgctgcgct ctgcaggtga 5040
gttaattatt ttactattat ttcagaaggt ggccagacga taccagggc cacctgataa 5100
taagtggctc ccaaaacgca cagatatcgt aaattgtgcc atttgatttg tcacgcccg 5160
gggggctacg gaataaacta cttttattta tttaaaaaat gaaccttaga ttatgtaact 5220
tgtgatttat ttgcgtcaaa agtaggcaag atgaatctat gtaaatcctt ggcagactt 5280
gcaatatcct atttcaccgg taaatcagca ttgcaatatg caatgcatat tcaacaatat 5340
gtaaaacaat tcgtaaagca tcattagaaa atagacgaaa gaaattgcat aaaattataa 5400
ccgcattatt aatttattat gatatttatt acaattgct attgcctttt tttcgcaaat 5460

tataatcatt ttcataacct cgaggtagca ttctgttaca ttttaataca ttggatatgtg 5520
attataacac gagctgceca ctgagtttct cgccagatct tctcagtggg tcgcgttacc 5580
gatcacgtga tagattctat gaagcactgc tcttgtagg gctagtgtta gcaaattctt 5640
tcaggttgag tctgagagct cacctacca tcggagcgta gctggaatag gctaccagct 5700
aataggtagg gaaaacaaag ctgaaacaa gctcaagtaa taacaacata atgtgacat 5760
aaaatctcgt ggtgtatgag atacaattat gtactttccc acaaatgtt acataattag 5820
aatgttggtc aacttgccia acgccccagc tagaacattc aattattact attaccacta 5880
ctaaggcagt atgtcctaac tcgttccaga tcagcgctaa cttcgattga atgtgcgaaa 5940
tttatagctc aatatttttag cacttatcgt attgatttaa gaaaaattg ttaacatttt 6000
gtttcagtat gtcgcttata caaatgcaaa catcaatgat ttgatgagg actattttgg 6060
gagtgatgtc 6070

<210>24

<211>99

<212>DNA

<213>Bombyx mori

<400>24

cgcagttacg actattctcg tcgtaacgtc cgcaaaaact gtggaattcc tagaagacaa 60
ctagttgtta aattcagagc actgccttgt gtgaattgc 99

<210>25

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<400>25

ggcgcgccgg gagaaagcat gaagtaag 28

<210>26

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial sequence
<400>26
gtcgaccttg agagttggaa ccgaac 26
<210>27
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<400>27
gtcgacatgg cgctgccctc ttcc , 24
<210>28
<211>26
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<400>28
tgtggatcct ttctcgctcc ttaatc 26
<210>29
<211>32
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<400>29
ggatcctaata ttttaataata aaataaccct tg 32
<210>30
<211>35
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<400>30
cttggcgcgc cagcagctag acgtatagcc atcgg 35

<210>31

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<400>31

ctgtgcgacg acatcactcc caaaatagtc c

31

<210>32

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<400>32

gtcggatccc gcagttacga ctattctcgt cgt

33

<210>33

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<400>33

cccaatttgg cgcgcctcaa gacatccttg a

31

<210>34

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<400>34

gaatgctacc tcgaggttat gaaaatg

27

<210>35

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial sequence	
<400>35	
aacctcgagg tagcattctg ttac	24
<210>36	
<211>26	
<212>DNA	
<213>Artificial sequence	
<400>36	
ggtaccggcg cgccacgacg tagacg	26
<210>37	
<211>30	
<212>DNA	
<213>Artificial sequence	
<400>37	
gtcgacatgt cgtttacttt gaccaacaag	30
<210>38	
<211>30	
<212>DNA	
<213>Artificial sequence	
<400>38	
ggatcctttt tgacaccaga ccaactggta	33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMANO, M. et al., Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus, Genes, December 1999, Vol.13, No.5, pages 511 to 516	1-41
Y	Katsutoshi YOSHIZATO, "Kumikaetai Konchu Riyo eno Teigen", Sanshi Konchuken Shiryo, No.28, pages 93 to 95	1-41
Y	YAMAQ, M. et al., Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus, Genes, December 1999, Vol.13, No.5, pages 511 to 516	1-41
Y	ZHOU CZ et al., Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene, Nucleic Acids Res., 2000, Vol.28, No.12, pages 2413 to 2419.	4, 17, 21-44

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 April, 2003 (08.04.03)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2003 (22.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,Y	TOMITA, M. et al., Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons, Nat.Biotechnol., 2003 January, Vol.21, No.1, pages 52 to 56	1-2, 5-15, 18-20 3-4, 16-17, 21-44

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl. 7 C12N15/09, C12P21/02

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl. 7 C12N15/09, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMANO, M. et al., Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus, Genes Dev. 1999, Vol.13, No.5, p.511-516	1-41
Y	吉里勝利, 組み換え体昆虫利用への提言, 蚕糸昆虫研資料, 第28号, p.93-95	1-41
Y	YAMA, M. et al., Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus, Genes Dev, 1999, Vol.13, No.5, p.511-516	1-41

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
 08.04.03

国際調査報告の発送日
 22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 七條 里美
 4B 2936
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ZHOU CZ et al., Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene, Nucleic Acids Res, 2000, Vol. 28, No. 12, p. 2413-2419	4, 17, 21-44
PX/PY	TOMITA M et al., Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons, Nat Biotechnol, 2003 Jan, Vol. 21, No. 1, p. 52-56	1-2, 5-15, 18-20/3-4, 16-17, 21-44