

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2025年1月16日(16.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/013948 A1

- (51) 国際特許分類:  
A01K 67/033 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
A01K 67/04 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/080106
- (22) 国際出願日: 2024年7月4日(04.07.2024)
- (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 2023-114712 2023年7月12日(12.07.2023) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP];  
〒3058517 茨城県つくば市観音台3-1-1 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者: 立松 謙一郎(TATEMATSU Kenichiro);  
〒3058634 茨城県つくば市大わし1番2 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー3 2階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH,

(54) Title: TRANSGENIC LEPIDOPTERA INSECT

(54) 発明の名称: 遺伝子組換えチョウ目昆虫

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel expression system for stably mass-producing a target protein in a Lepidoptera insect such as the silkworm. The present invention further addresses the problem of providing a novel method for producing functional silk that includes a silk protein fused with the target protein. The present invention provides a transgenic Lepidoptera insect that includes a target gene sequence coding for a target protein or a fragment thereof in an exon sequence coding for a signal peptide of an endogenous gene or a functional fragment thereof, wherein the target protein or fragment thereof is fused to the C-terminal side of the signal peptide or functional fragment thereof. The present invention also provides a transgenic Lepidoptera insect that includes a target gene sequence coding for a target protein or a fragment thereof in an exon sequence coding for a signal peptide of an endogenous gene or a functional fragment thereof, wherein the target protein or fragment thereof is fused between the signal peptide or functional fragment thereof and a mature protein, obtained by cleaving the signal peptide from a precursor protein encoded by the endogenous gene, or the C-terminal fragment thereof.

(57) 要約: カイコ等のチョウ目昆虫において目的タンパク質を安定的かつ大量に生産するための新たな発現系を提供することを課題とする。また、目的タンパク質と融合したシルクタンパク質を含む機能性シルクを生産するための新たな方法を提供することを課題とする。遺伝子組換えチョウ目昆虫であって、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列において、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含み、前記目的のタンパク質又はその断片は、前記シグナルペプチド又はその機能性断片のC末端側に融合される、前記遺伝子組換えチョウ目昆虫を提供することを提供する。また、遺伝子組換えチョウ目昆虫であって、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列において、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含み、前記目的のタンパク質又はその断片は、前記シグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はそのC末端断片との間に融合される、前記遺伝子組換えチョウ目昆虫を提供する。

WO 2025/013948 A1

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称

遺伝子組換えチョウ目昆虫

5

技術分野

本発明は、遺伝子組換えチョウ目昆虫及びその作出方法等に関する。

背景技術

10 カイコ (*Bombyx mori*) の絹糸腺は、大量のタンパク質を短期間に合成できる能力を有している。また、カイコの絹糸腺は大型器官であるため摘出が容易であり、合成されたタンパク質は絹糸腺内腔に貯蔵されることから回収しやすいという利点もある。そのため、絹糸腺で目的のタンパク質を発現する遺伝子組換えカイコは、タンパク質の大量生産系として有望視されている。

15 カイコの絹糸腺は、左右1対の器官であり、それぞれは、前部絹糸腺、中部絹糸腺、及び後部絹糸腺の3つの領域で構成されている。後部絹糸腺細胞内では、絹糸の繊維成分であるフィブロインを構成する3つの主要なタンパク質、フィブロインH鎖（以下、しばしば「Fib H」と略称する）、フィブロインL鎖（以下、しばしば「Fib L」と略称する）、及びフィブロヘキサマリン（p25/FHXとも呼ばれる）が発現している。また中部絹糸腺細胞内では絹糸の被覆成分であるゼラチン様タンパク質のセリシンが発現している。後部絹糸腺細胞内で発現した前記  
20 3つのタンパク質は、Fib H : Fib L : p25 = 6 : 6 : 1の比率で複合体（silk fibroin elementary unit ; SFEU複合体）を形成し、後部絹糸腺内腔中に分泌される。これに対して、セリシンは、発現後に中部絹糸腺内腔中に分泌される。後部絹糸腺内腔中に分泌されたフィブロインは、その後、中部絹糸腺内腔に移行し、セリシンで被覆されて絹糸として吐糸される（非特許文献1）。したがって、カイコ絹糸腺をタンパク質発現系として利用する場合、中部絹糸腺又は後部絹糸腺で特異的  
25 的に発現する遺伝子発現系を利用すればよい。

カイコ絹糸腺をタンパク質発現系として利用する場合、これまでに組換えタン

パク質発現システムとして GAL4/UAS システム（非特許文献 2）、及びセリシン 1 プロモーター及び Hr3 エンハンサーを組み合わせた系による大量発現方法（非特許文献 3）が報告されているが、現状ではタンパク質発現量の点で優れた GAL4/UAS システムが多く利用されている。

5 GAL4/UAS システムは、酵母に由来する転写因子 GAL4 と制御配列 UAS とを組み合わせる遺伝子制御システムである。カイコの絹糸腺においてタンパク質生産系として用いる GAL4/UAS システムでは、中部絹糸腺又は後部絹糸腺で特異的に発現する遺伝子のプロモーター制御下で GAL4 遺伝子を発現する GAL4 システムと、制御配列 UAS の制御下で目的タンパク質遺伝子を発現する UAS システムとを  
10 piggyBac を用いた遺伝子組換えにより独立に樹立した後、両システムを交配することにより、絹糸腺で目的タンパク質を発現する発現系が構築される。

GAL4/UAS システムでは、GAL4 システムと UAS システムを別々に樹立した後で交配する必要があるため発現系の構築に時間を要する点や、GAL4 遺伝子及び UAS 制御配列はゲノム上のランダムな位置に導入されるため目的タンパク質の発現量が変動し得る点が、新たな GAL4 システム及び UAS システムを樹立する際の障害となっている。  
15 また、GAL4/UAS システムでの発現量は、技術的に限界に達していると考えられる。

非特許文献 4 には、カイコの絹糸腺において遺伝子組換えタンパク質を発現させるために過去に実施された様々な方法が開示されている。しかしながら、過去  
20 に報告された方法では、融合タンパク質の発現量が低いことやシルクタンパク質と融合したタンパク質の活性が失われるといった問題があった。

したがって、目的タンパク質を安定的かつ大量に生産するための新たな方法や、目的タンパク質と融合したシルクタンパク質を効率よく生産するための新たな方法が求められている。

25 先行技術文献

非特許文献

非特許文献 1 Inoue S. et al., 2000, The Journal of Biological Chemistry, 275 (51): 40517-40528.

非特許文献 2 Tatematsu K. et al., 2010, Transgenic Research,

19(3):473-87.

非特許文献 3 Tomita M. et al., 2007, Transgenic Research, 16 (4):449-465.

非特許文献 4 Tomita M. et al., 2011, Biotechnol Lett, 33:645-654.

5

#### 発明の概要

本発明の目的は、カイコ等のチョウ目昆虫において目的タンパク質を安定的かつ大量に生産するための新たな発現系を提供することである。また、目的タンパク質と融合したシルクタンパク質を含む機能性シルクを生産するための新たな方法を提供することを課題とする。

本発明者らは上記課題を解決するため、セリシン遺伝子やフィブロイン遺伝子等においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に、内在性のシグナルペプチドのC末端側に融合される目的タンパク質をコードする目的遺伝子をノックインすることによって、内在性遺伝子が有するプロモーター活性やエンハンサー活性をそのまま利用して目的遺伝子を発現させる新たな発現系を構築することを着想した。

一般的に、外因性遺伝子をカイコゲノムに効率的にノックインするには、ゲノム編集酵素等で標的遺伝子座を切断する必要がある。そこで本発明者らは、目的遺伝子配列を導入するエクソン配列内にゲノム切断位置を設定し、当該エクソン配列内へのノックインを試みた。しかしながら、この方法を実施した結果、注射当代では 95%以上の個体が正常な繭を作れず、98%以上の個体が交配可能な成体まで発生することができないという結果に直面した。したがって、この方法では系統を樹立することが極めて困難であることが判明した。

そこで本発明者らは、目的遺伝子配列を導入するエクソン配列ではなく当該エクソン配列近傍のイントロン配列内にてゲノムを切断することによって、エクソン配列内への目的遺伝子配列のノックインを試みた。その結果、注射当代のほぼ全ての個体が交配能を有する成体まで発生し、従来技術の GAL4/UAS 系統を大きく上回る量で目的タンパク質を生産し得ることを見出した。

さらに本発明者らは、上記ノックイン技術を用いて蛍光タンパク質遺伝子を内

在性フィブロイン遺伝子のエクソン配列内に導入し、蛍光タンパク質と全長フィ  
ブロインとの融合タンパク質を構成繊維として含む繭を作製した。その結果、白  
色光下の肉眼観察において、従来技術で最も強い色彩を示す蛍光繭及び蛍光絹糸  
と比較して圧倒的に強い色彩を示す新たな蛍光繭及び蛍光絹糸の作製に成功し、  
5 本発明を完成するに至った。本発明は、上記研究成果に基づくものであって、以  
下を提供する。

(1) 遺伝子組換えチョウ目昆虫であって、

内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配  
列において、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含み、  
10 前記目的のタンパク質又はその断片は、前記シグナルペプチド又はその機能性  
断片のC末端側に融合される、前記遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(2) 前記内在性遺伝子が、フィブロイン、セリシン、及び/又はフィブロヘキサ  
マリンをコードする、(1)に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(3) 前記フィブロインが、フィブロインH鎖及び/又はフィブロインL鎖であ  
15 る、(2)に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(4) 前記内在性遺伝子が、

フィブロインH鎖及びフィブロインL鎖、

フィブロインH鎖及びセリシン1、又は

フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、及びセリシン1

20 をコードする、(1)に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(5) 前記エクソン配列が、前記目的遺伝子配列の3'末端側に転写終結配列を  
含む、(1)～(4)のいずれかに記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(6) 遺伝子組換えチョウ目昆虫の内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲ  
ノム切断位置に目的遺伝子配列を導入するための二本鎖環状DNAであって、

25 前記内在性遺伝子は、

(a) 前記ゲノム切断位置の5'末端側に隣接する第1スペーサー配列、

(b) 前記ゲノム切断位置の3'末端側に隣接する第2スペーサー配列、

(c) 前記第1スペーサー配列の5'末端側で第1のゲノム編集酵素によって  
認識される第1認識配列、及び

(d) 前記第 2 スペーサー配列の 3' 末端側で第 2 のゲノム編集酵素によって認識される第 2 認識配列

を含み、

前記二本鎖環状 DNA は、前記第 1 認識配列、前記第 2 スペーサー配列、前記第 1 スペーサー配列、ゲノム相同配列、及び目的遺伝子配列をこの順で含み、

前記ゲノム相同配列は、前記第 2 認識配列から、前記イントロン配列の 3' 末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片の C 末端側に融合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記二本鎖環状 DNA。

(7) 遺伝子組換えチョウ目昆虫を相同組換え法を用いて作出するためのドナー核酸であって、

前記相同組換え法は、内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置をゲノム編集酵素で切断することを含み、

前記ドナー核酸は、

(a) 前記内在性遺伝子に由来する、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列、並びに

(b) その間に配置された目的遺伝子配列

を含み、

前記第 1 のゲノム相同配列は、ゲノム上で前記ゲノム切断位置より 5' 末端側に位置する塩基から、前記イントロン配列の 3' 末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、かつ前記ゲノム編集酵素の認識配列に変異を有し、

前記第 2 のゲノム相同配列は、ゲノム上で前記エクソン配列又はその部分配列より 3' 末端側に位置するゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片の C 末端側に融合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記ドナー核酸。

(8) 遺伝子組換えチョウ目昆虫を相同組換え法を用いて作出するためのドナー核酸であって、

前記相同組換え法は、内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置をゲノム編集酵素で切断することを含み、

5 前記ドナー核酸は、

(a) 前記内在性遺伝子に由来する、第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列、並びに

(b) その間に配置された目的遺伝子配列を含み、

10 前記第1のゲノム相同配列は、前記イントロン配列より5'末端側に位置する塩基から前記イントロン配列の5'末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

前記第2のゲノム相同配列は、前記エクソン配列又はその部分配列より3'末端側かつ前記ゲノム切断位置より5'末端側に位置する塩基から、前記ゲノム切断位置より3'末端側に位置する塩基までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、かつ前記ゲノム編集酵素の認識配列に変異を有し、

15 前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端側に融合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記ドナー核酸。

20 (9) 前記第1のゲノム相同配列及び/又は前記第2のゲノム相同配列の前記目的遺伝子配列とは反対側の末端に、ヌクレアーゼ認識配列を含む、(7)又は(8)に記載のドナー核酸。

(10) 前記ヌクレアーゼ認識配列が、前記ゲノム編集酵素の認識配列、又は制限酵素認識配列である、(9)に記載のドナー核酸。

25 (11) 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法であって、

(6)に記載の二本鎖環状DNA、

前記第1のゲノム編集酵素又は前記第1のゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸、及び

前記第2のゲノム編集酵素又は前記第2のゲノム編集酵素を発現可能な状態で

コードする核酸

をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する導入工程を含む、前記方法。

(12) 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法であって、

5 (7) ~ (10) のいずれかに記載のドナー核酸、及び

前記ゲノム編集酵素、又は前記ゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸

をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する導入工程を含む、前記方法。

10 (13) (1) ~ (5) のいずれかに記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫、又は(11)又は(12)に記載の方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫を用いて前記目的のタンパク質又はその断片を生産する方法。

(14) 前記チョウ目昆虫が絹糸虫であり、前記目的のタンパク質又はその断片が前記絹糸虫の絹糸腺において生産される、(13)に記載の方法。

15 本発明は、さらに以下を提供する。

(1) 遺伝子組換えチョウ目昆虫であって、

内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列において、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含み、前記目的のタンパク質又はその断片は、前記シグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はそのC末端断片との間に融合される、前記遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(2) 前記成熟型タンパク質が、フィブロイン、セリシン、及び/又はフィブロヘキサマリンである、(1)に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

25 (3) 前記フィブロインが、フィブロインH鎖及び/又はフィブロインL鎖である、(2)に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(4) 前記目的のタンパク質が、蛍光タンパク質、抗体、抗原ポリペプチド、酵素、サイトカイン、及び抗菌ポリペプチドからなる群から選択される、(1) ~ (3) のいずれかに記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(5) 前記目的遺伝子配列を含む前記エクソン配列をホモ接合で含む、(1)～(4)のいずれかに記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

(6) 遺伝子組換えチョウ目昆虫を相同組換え法を用いて作出するためのドナー核酸であって、

5 前記相同組換え法は、内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置をゲノム編集酵素で切断することを含み、

前記ドナー核酸は、

(a) 前記内在性遺伝子に由来する、第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列、並びに

10 (b) その間に配置された目的遺伝子配列を含み、

前記第1のゲノム相同配列は、ゲノム上で前記ゲノム切断位置より5'末端側に位置する塩基から、前記イントロン配列の3'末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、かつ前記

15 ゲノム編集酵素の認識配列に変異を有し、

前記第2のゲノム相同配列は、ゲノム上で前記エクソン配列又はその部分配列の3'末端側に位置するゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はそのC末端断片との間に融

20 合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記ドナー核酸。

(7) 遺伝子組換えチョウ目昆虫を相同組換え法を用いて作出するためのドナー核酸であって、

前記相同組換え法は、内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置をゲノム編集酵素で切断することを含み、

25

前記ドナー核酸は、

(a) 前記内在性遺伝子に由来する、第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列、並びに

(b) その間に配置された目的遺伝子配列

を含み、

前記第 1 のゲノム相同配列は、前記イントロン配列より 5' 末端側に位置する塩基から前記イントロン配列の 5' 末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

- 5 前記第 2 のゲノム相同配列は、前記エクソン配列又はその部分配列より 3' 末端側かつ前記ゲノム切断位置より 5' 末端側に位置する塩基から、前記ゲノム切断位置より 3' 末端側に位置する塩基までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、かつ前記ゲノム編集酵素の認識配列に変異を有し、

- 10 前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はその C 末端断片との間に融合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記ドナー核酸。

- (8) 前記第 1 のゲノム相同配列及び／又は前記第 2 のゲノム相同配列の前記目的遺伝子配列とは反対側の末端に、ヌクレアーゼ認識配列を含む、(6) 又は  
15 (7) に記載のドナー核酸。

(9) 前記ヌクレアーゼ認識配列が、前記ゲノム編集酵素の認識配列、又は制限酵素認識配列である、(8) に記載のドナー核酸。

(10) 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法であって、

(6) 又は (7) に記載のドナー核酸、及び

- 20 前記ゲノム編集酵素又は前記ゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸

をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する導入工程を含む、前記方法。

- (11) (1) ~ (5) のいずれかに記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫、又は  
25 (10) に記載の方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫を用いて、前記目的のタンパク質又はその断片、及び前記成熟型タンパク質又はその C 末端断片を含む融合タンパク質を生産する方法。

(12) 前記チョウ目昆虫が絹糸虫であり、前記融合タンパク質が前記絹糸虫の絹糸腺において生産される、(11) に記載の方法。

(13) N末端側から順に、

目的のタンパク質又はその断片、及び

フィブロイン、セリシン、又はフィブロヘキサマリン

を含む、融合タンパク質。

5 (14) 前記フィブロインが、フィブロインH鎖及び/又はフィブロインL鎖である、(13)に記載の融合タンパク質。

(15) (13)又は(14)に記載の融合タンパク質を含む、繭又は絹糸。

(16) 繭又は絹糸であって、

前記繭又は絹糸に含まれる、フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、セリシン

10 1、セリシン2、セリシン3、及びフィブロヘキサマリンからなる群から選択されるいずれか一以上のシルクタンパク質が、(13)又は(14)に記載の融合タンパク質からなる、前記繭又は絹糸。

(17) (1)～(5)のいずれかに記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫、又は

(10)に記載の方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫に由来する、(1

15 6)に記載の繭又は絹糸。

(18) 前記目的のタンパク質が、蛍光タンパク質、抗体、抗原ポリペプチド、

酵素、サイトカイン、及び抗菌ポリペプチドからなる群から選択される、(16)

又は(17)に記載の繭又は絹糸。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2023-114712 号の開

20 示内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

[図1] 終止コドンを含む目的遺伝子配列の内在性遺伝子への導入を示す。

25 目的遺伝子配列は、内在性遺伝子においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に導入される。目的遺伝子配列によってコードされる目的タンパク質は、内在性遺伝子によってコードされるシグナルペプチドのC末端側に融合される。

[図2] ノックイン系統の作製において、内在性遺伝子におけるゲノム切断位置を示す図である。ゲノム切断位置は、目的遺伝子配列を導入するエクソン配列の5'末端側に位置するイントロン配列内に設計される。目的遺伝子配列を導入

する内在性遺伝子の例として、図 2A はセリシン 1 遺伝子、図 2B はフィブロイン H 遺伝子、図 2C はフィブロイン L 遺伝子を示す。

[図 3] TAL-PITCh 法を用いた遺伝子ノックインの概要を示す図である。図 3A は、TAL-PITCh 法に用いるドナー核酸の構築に用いる各配列が内在性遺伝子において由来する位置を示す。図 3B は、TAL-PITCh 法に用いる二本鎖環状 DNA の構造を示す。図 3C は、目的遺伝子配列を TAL-PITCh 法でノックインして得られるノックイン遺伝子の構造を示す。

[図 4] 相同組換え法を用いた遺伝子ノックインの方法を示す図である。

[図 5] SP (FibH) -EGFP ノックイン系統の 5 齢幼虫における絹糸腺及び繭の観察結果を示す。

[図 6] 各ノックイン系統のカイコ 1 頭当たりの EGFP 発現量を測定した結果を示す。グラフは n=1~4 の測定値の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

[図 7] GM-CSF 遺伝子配列を内在性フィブロイン H 遺伝子の第 2 エクソンにノックインしたカイコ系統における GM-CSF 生産を示す。図 7A は、GM-CSF 遺伝子配列のフィブロイン H 遺伝子へのノックインを示す。図 7B は、ウエスタンブロッティングで GM-CSF を検出した結果を示す。

[図 8] IgG H 鎖及び IgG L 鎖をコードする遺伝子配列をそれぞれ内在性フィブロイン H 遺伝子の第 2 エクソン及び内在性フィブロイン L 遺伝子の第 3 エクソンにノックインしたカイコ系統における IgG 生産を示す。図 8A は、IgG H 鎖遺伝子配列のフィブロイン H 遺伝子へのノックインを示す。図 8B は、IgG L 鎖遺伝子配列のフィブロイン L 遺伝子へのノックインを示す。図 8C は、IgG 生産量を示す。

[図 9] 終止コドンをもたない目的遺伝子配列の内在性遺伝子への導入を示す。目的遺伝子配列は、内在性遺伝子においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に導入される。目的遺伝子配列によってコードされる目的タンパク質は、分泌ペプチドと、内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質からシグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質との間に融合される。

[図 10] 相同組換え法を用いた遺伝子ノックインの方法を示す図である。

[図 1 1]ウエスタンブロッティングで EGFP タンパク質を検出した結果を示す。図 11A は、野生型系統 (WT) 及び EGFP-FibL ノックイン系統の結果を示す。図 11B は、野生型系統 (WT)、SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統、及び EGFP-Ser1 ノックイン系統の結果を示す。

5 [図 1 2]EGFP-FibL ノックイン遺伝子をヘテロ接合又はホモ接合で含む EGFP-FibL ノックイン系統から得られた繭を通常の白色光下で撮影した写真を示す。

[図 1 3]本発明の方法で作出した EGFP-FibL ノックイン系統のヘテロ接合体及びホモ接合体によって生産された繭、並びに従来法の piggyBac の系を利用して作出された繭を白色光下で観察又は蛍光観察した写真を示す。

10 [図 1 4]ゲノム切断位置をイントロン配列内又はエクソン配列内に設計してノックインを実施した結果を示す。図 14A は、Fib H 遺伝子のイントロン配列内でゲノムを切断して相同組換えを実施した結果を示す。交配能を有する成体まで発生した個体は 99%以上であり、営繭不良や交尾不良は認められなかった。図 14B は、Fib H 遺伝子のエクソン配列内でゲノムを切断して相同組換えを実施した結果を示す。交配能を有する成体まで発生した個体は 2%未満であり、注射当代の 95%以上が蛹化不全又は裸蛹、薄繭等を示した。

発明を実施するための形態

20 1. 遺伝子組換えチョウ目昆虫

1-1. 概要

本発明の第 1 の態様は、遺伝子組換えチョウ目昆虫である。本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫は、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列において目的遺伝子配列を含み、シグナルペプチド又はその機能性断片の C 末端側に融合された目的のタンパク質又はその断片を発現する。

25 本態様の遺伝子組換えチョウ目昆虫は、目的タンパク質を安定的かつ大量に生産することができる。

1-2. 定義

本明細書で頻用する以下の用語について定義する。

本明細書において「チョウ目昆虫」とは、分類学上のチョウ目 (Lepidoptera) に属する昆虫であって、チョウ又はガをいう。チョウには、タテハチョウ科 (Nymphalidae)、アゲハチョウ科 (Papilionidae)、シロチョウ科 (Pieridae)、シジミチョウ科 (Lycaenidae)、及びセセリチョウ科 (Hesperiidae) に属する昆虫が含まれる。ガには、ヤママユガ科 (Saturniidae)、カイコガ科 (Bombycidae)、イボタガ科 (Brahmaeidae)、オビガ科 (Eupterotidae)、カレハガ科 (Lasiocampidae)、ミノガ科 (Psychidae)、シヤクガ (Geometridae)、ヒトリガ科 (Archtiidae)、ヤガ科 (Noctuidae)、メイガ科 (Pyrilidae)、スズメガ科 (Sphingidae) 等に属する昆虫が含まれる。

例えば、ガであれば、*Bombyx* 属、*Samia* 属、*Antheraea* 属、*Saturnia* 属、*Attacus* 属、*Rhodinia* 属に属する種、具体的には、カイコ、クワコ (*Bombyx mandarina*)、シンジュサン (*Samia cynthia*; エリサン *Samia cynthia ricini* 及びシンジュサンとエリサンの交配種を含む)、ヤママユガ (*Antheraea yamamai*)、サクサン (*Antheraea pernyi*)、ヒメヤママユ (*Saturnia japonica*)、オオミズアオ (*Actias gnoma*) 等が挙げられる。本発明の形質転換体の宿主としてのチョウ目昆虫は、これらに限定はされないが、産業上の利用可能性の高いカイコは、宿主として特に好ましい。

「遺伝子組換えチョウ目昆虫」とは、遺伝子組換え技術を用いて作製した外来 DNA を保有するチョウ目昆虫の遺伝子組換え体又はその後代をいう。本明細書の遺伝子組換えチョウ目昆虫は、特に、マイクロインジェクション法により外来 DNA をチョウ目昆虫の卵に導入して得られる遺伝子組換え体を意味する。

本明細書において「絹糸腺」とは、液状絹を産生し、蓄積し、また分泌する機能を有する唾液腺の変化した管状器官である。絹糸腺は、通常、絹糸を吐糸することのできる昆虫の、主として幼虫の消化管に沿って左右一対で存在し、各絹糸腺は、前部、中部及び後部絹糸腺の3領域で構成されている。後部絹糸腺は、絹糸の繊維成分であるフィブロインを産生及び分泌する。また、中部絹糸腺は、被覆成分であるセリシンを産生及び分泌し、後部絹糸腺より移行してきたフィブロインと共にその内腔に蓄積する。

本明細書において「内在性遺伝子」とは、チョウ目昆虫のゲノム上に先天的に

存在するそのチョウ目昆虫由来の遺伝子をいう。本発明において内在性遺伝子は、原則としてシグナルペプチドを有するタンパク質をコードする遺伝子である。したがって本明細書において内在性遺伝子は、原則として分泌タンパク質又は膜タンパク質をコードする遺伝子である。分泌タンパク質は、例えば絹糸を構成する任意のタンパク質であってもよい。なお、本明細書において絹糸を構成する任意のタンパク質をしばしば「シルクタンパク質」と呼び、シルクタンパク質をコードする遺伝子を「シルク遺伝子」と称する。チョウ目昆虫の内在性遺伝子の具体例としては、フィブロイン、セリシン、及びフィブロヘキサマリンをコードする遺伝子を挙げることができる。

10 また、本明細書において「外因性遺伝子」又は「外来遺伝子」とは、人為的操作等を介して後天的に獲得された外来性の遺伝子で、野生型のチョウ目昆虫のゲノムには存在しない遺伝子をいう。

「フィブロイン」は、絹糸における繊維成分を構成するタンパク質である。カイコのフィブロインは、主として3つのタンパク質、すなわち、フィブロインH鎖 (Fib H)、フィブロインL鎖 (Fib L)、及びフィブロヘキサマリン (Fibrohexamerin) で構成されている。フィブロヘキサマリンは、上述のように p25/FHX とも呼ばれる。

「セリシン」は、絹糸においてフィブロインが形成する繊維の外側を層状に覆うタンパク質である。カイコでは、セリシンは、中部絹糸腺細胞内で合成され、合成後に中部絹糸腺内腔中に分泌される。セリシンの機能としては、フィブロイン繊維同士の接着の他、外的刺激からのフィブロイン繊維の保護が知られている。カイコは孵化直後の段階から吐糸可能であるが、各齢で吐糸する絹糸と繭の絹糸ではタンパク質成分が異なっており、含まれるセリシンのバリエーション構成も異なる。一般にカイコでは、4種類のセリシン遺伝子 (Ser1、Ser2、Ser3、及びSer4) から生合成される6種類程度のセリシンタンパク質バリエーション (セリシン 1A'、セリシン 1C、セリシン 1D、セリシン 2、セリシン 3、及びセリシン 4) が知られている。このうち、繭に含まれる主要なセリシンのバリエーションは4種類 (セリシン 1A'、セリシン 1C、セリシン 1D、及びセリシン 3) である。本明細書中で単に「セリシン」と表記した場合、特に断りのない限りセリシンの総称を意味する

ものとする。

本明細書において「シグナルペプチド」又は「分泌シグナル」とは、遺伝子発現によって生合成されたタンパク質を細胞外に分泌させる際に必要となる細胞外移行シグナルである。シグナルペプチドは、翻訳後、細胞外に分泌される前にシグナルペプチダーゼによって切断除去される。なお、本明細書ではしばしばシグナルペプチドを「SP」と表記し、シグナルペプチドが由来する内在性遺伝子名を括弧書きで併記して示す。シグナルペプチドは、通常は数十アミノ酸以下の比較的短いペプチド配列であり、疎水性に富む配列を特徴とする。シグナルペプチドの配列は、signalP等の予測ツールを使用してタンパク質のアミノ酸配列に基づいて予測することができるが、データベース上で提供された構造予測を利用することもでき、例えばカイコであれば、農畜産物ゲノム情報データベース (Agrigenomics Information Database) で利用可能な KAIKObase や KAIKOcDNA 等のデータベース上で提供された配列アノテーションに基づいてシグナルペプチドの配列領域を決定することもできる。

本明細書においてシグナルペプチドの「機能性断片」とは、シグナルペプチドの部分配列からなり、細胞外移行シグナル活性を保持する断片をいう。シグナルペプチドの機能性断片は、例えば全長シグナルペプチドの細胞外移行シグナル活性の 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は同等以上を保持するものであってもよい。機能性断片のアミノ酸長は、全長のシグナルペプチドの活性を保持する限り特に制限しないが、例えば、全長の 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、又は 98%以上であってもよい。

本明細書において「全長」とは、生体内で合成されて機能するタンパク質に相当するアミノ酸配列の全体、又はそれをコードする遺伝子における塩基配列の全体を意味する。原則として、遺伝子の場合、開始コドンから終止コドンまでが全長遺伝子に該当し、タンパク質の場合、前記全長遺伝子にコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はペプチドが全長タンパク質に該当する。ただし、分泌性タンパク質の場合、N 末端側に含まれる内因性のシグナルペプチドは、分泌過程で切断、除去されて、最終的には包含されない。それ故に、分泌性タンパ

ク質の場合は、「全長」にはシグナルペプチドが含まれなくてもよい。なお、本明細書において全長タンパク質のうち分泌過程でシグナルペプチドが切断、除去される前のものを「前駆体タンパク質」と呼び、シグナルペプチドが切断、除去された後のものを「成熟型タンパク質」と呼んで区別する。

- 5 本明細書において、「エクソン」とは、遺伝子の塩基配列のうち、成熟転写産物中に残る領域を意味する。一般に真核生物では、遺伝子は一次転写産物として転写された後、スプライシングにより「イントロン」と呼ばれる介在領域が除去され、エクソン同士が連結されて成熟転写産物が形成される。本明細書において「エクソン配列」とは、エクソンに相当する塩基配列を意味し、「イントロン配列」とはイントロンに相当する塩基配列を意味する。任意の遺伝子においてエクソン配列及びイントロン配列は、当該遺伝子のゲノム配列と cDNA 配列とを比較することによって決定することができるが、アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) 等のデータベース上で公開されている配列情報を取得することや、当該技術分野において利用可能なゲノム解析ツールを用いてエクソン/イントロン構造を予測することもできる。例えばカイコの遺伝子情報であれば、農畜産物ゲノム情報データベース (Agrigenomics Information Database) で利用可能な KAIKObase や KAIKOcDNA 等のデータベースを利用してエクソン配列及びイントロン配列を検索することができる。
- 10
- 15

- 本明細書において「目的遺伝子配列」とは、目的タンパク質又はその断片をコードする遺伝子配列をいう。目的遺伝子配列は、ゲノム由来の遺伝子又は cDNA からなる遺伝子の配列であってもよく、目的遺伝子配列内にイントロンを含んでも含まなくてもよい。また、目的遺伝子配列は、目的タンパク質又はその断片をコードする遺伝子配列に加えて終止コドンを含んでも含まなくてもよく、終止コドンの下流に転写終結配列を含んでも含まなくてもよい。
- 20

- 本明細書において「目的タンパク質」とは、目的遺伝子にコードされた所望のタンパク質である。目的タンパク質の種類を問わない。構造タンパク質又は機能タンパク質のいずれであってもよい。構造タンパク質の例としては、コラーゲン、アクチン、ミオシン、フィブロイン等の繊維タンパク質、ケラチン、ヒストン等が挙げられる。機能タンパク質の例としては、ペプチドホルモン (インスリン、
- 25

カルシトニン、パラトルモン、成長ホルモン等)、サイトカイン(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、上皮成長因子(EGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)、インターロイキン(IL)、インターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、トランスフォーミング成長因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )等)、転写因子

5 (GAL4を含む)、抗体(免疫グロブリン等)、血清アルブミン、ヘモグロビン、酵素、蛍光タンパク質、色素合成タンパク質、発光タンパク質等が挙げられる。免疫グロブリンは、任意のクラス(例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及びIgY)、又は任意のサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)であつてもよい。蛍光タンパク質は制限されず、例えばCFP、AmCyan、RFP、

10 DsRed、YFP、GFP(EGFP、EYFP等の派生物を含む)であつてもよい。色素合成タンパク質は、例えばメラニン系色素(ドーパミンメラニンを含む)、オモクローム系色素、又はプテリジン系色素の生合成に関与するタンパク質であつてもよい。発光タンパク質は、例えばイクオリンやルシフェラーゼであつてもよい。なお、目的タンパク質は、野生型タンパク質又は変異型タンパク質のいずれであつても

15 よい。

本明細書においてタンパク質の「断片」とは、全長タンパク質の一部の領域を含むポリペプチド又はペプチドをいう。断片は、活性を保持するものであることが好ましい。例えば、全長タンパク質の活性の50%以上、60%以上、70%以上、

20 80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は同等以上を保持するものであつてもよい。断片のアミノ酸長は、全長タンパク質の活性を保持する限り特に制限しないが、例えば、全長の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上であつてもよい。

本明細書において「転写終結配列」とは遺伝子の転写を終結できる配列であり、ターミネーターとも呼ばれる。転写終結配列の種類は、特に限定はしない。好ま

25 しくは遺伝子組換えチョウ目昆虫と同一生物種由来のターミネーターである。例えば、カイコ等の昆虫であれば、hsp70ターミネーター、SV40ターミネーター等が使用できる。

本明細書において「複数個」とは、2以上の整数、例えば、2~10個、2~7個、2~5個、2~4個又は2~3個の整数をいう。

本明細書において塩基配列の「同一性」とは、比較する2つの塩基配列において、塩基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化（アラインメント）したときに、塩基配列全長における一致塩基数の割合（%）をいう。

- 5 本明細書において「相同配列」とは、参照配列に対して約60%以上の同一性を有する塩基配列をいう。参照配列に対する相同配列の同一性は、例えば70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、又は99.9%以上であってもよい。なお、「ゲノム相同配列」とはチョウ目昆虫のゲノム配列を参照配列として上述のいずれかの同一性を有する塩基配列を示し、「ゲノム配列」とはゲノム上でそれに対応する塩基配列に対して100%の同一性を有する配列をいう。

- 15 本明細書において「アミノ酸同一性」とは、比較する2つのポリペプチドのアミノ酸配列において、アミノ酸残基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化（アラインメント）したときに、全アミノ酸残基数における一致アミノ酸残基数の割合（%）をいう。

- 20 本明細書において「アミノ酸の置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保守的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群（Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr）、分枝鎖アミノ酸群（Leu, Val, Ile）、中性アミノ酸群（Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群（Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys）、酸性アミノ酸群（Asp, Glu）、塩基性アミノ酸群（Arg, Lys, His）、芳香族アミノ酸群（Phe, Tyr, Trp）内での置換が挙げられる。

- 25 本明細書において「5'末端側」及び「3'末端側」とは、特に断りのない限り内在性遺伝子から転写される転写産物のそれぞれ5'末端側及び3'末端側を基準として方向性を定めるものとする。また、本明細書において「上流」及び「下流」は、特に断りのない限り内在性遺伝子の転写方向を基準としてそれぞれ遺伝子上流方向及び遺伝子下流方向を示すものとする。

### 1-3. 構成

本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫は、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列において、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含む。目的遺伝子配列は、目的のタンパク質又はその断片がシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端側に融合されるように、上記エクソン配列に含まれる。

本明細書において「内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列」（以下、本明細書においてしばしば「標的エクソン配列」と表記する）とは、内在性遺伝子においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列であれば限定しない。通常、内在遺伝子においてシグナルペプチドはその内在性遺伝子から転写される mRNA において最も上流に位置する第1エクソン、又は第1エクソンを含む複数のエクソン配列にコードされているが、標的エクソン配列は、いずれのエクソン配列であってもよい。例えば標的エクソン配列は、第1エクソン、第2エクソン、第3エクソン、又は第4エクソンであってもよい。標的エクソン配列は、例えばシグナルペプチドのC末端アミノ酸残基をコードするエクソン、又はその5'末端側に隣接するエクソンであってもよい。

本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫では、目的遺伝子配列は、目的遺伝子配列によってコードされる目的のタンパク質又はその断片が内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端側に融合されるように、標的エクソン配列に挿入されている。より具体的には、目的遺伝子配列は、内在性遺伝子の標的エクソン配列においてシグナルペプチド又はその機能性断片をコードする塩基配列の3'末端側にインフレームに連結されている。したがって、目的のタンパク質又はその断片のN末端は、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端側に融合され、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片及び目的のタンパク質又はその断片を含む融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子が、内在性遺伝子の遺伝子座において構成される。なお、この融合ポリペプチドではシグナルペプチド又はその機能性断片と目的のタンパク質又はその断片とが直接連結されていてもよく、或いはその間に標的エクソン配列によってコードされるシグナルペプチド以外のアミノ酸配列（例えば、後述する成熟型タンパク質においてN末端に位置するアミノ酸配列）が挿入されていてもよい。

一実施形態において、内在性遺伝子は、絹糸を構成するタンパク質をコードする。絹糸を構成するタンパク質は特に限定されず、例えばフィブロイン、セリシン、及び／又はフィブロヘキサマリンであってもよい。フィブロインは、フィブロインH鎖及び／又はフィブロインL鎖であってもよい。セリシンは、特に制限されず、例えばセリシン1であってもよい。

カイコのフィブロインH鎖では、シグナルペプチドを含む前駆体タンパク質は配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、シグナルペプチドを除く成熟型タンパク質は配列番号2で示すアミノ酸配列からなる。フィブロインH鎖のシグナルペプチドは、配列番号1において1位～21位のアミノ酸配列からなる。

10 カイコのフィブロインH鎖遺伝子では、シグナルペプチドは第1エクソン及び第2エクソンによってコードされ、シグナルペプチドのC末端アミノ酸残基は第2エクソンによってコードされる(図2B)。フィブロインH鎖遺伝子の配列番号3で示すゲノム配列において、第1エクソンは1001位～1042位、第1イントロンは1043位～2013位であり、第2エクソンは2014位から少なくとも17763位までを含み、第2エクソンにおいてシグナルペプチドをコードする領域は2014位  
15 ～2034位である。

カイコのフィブロインL鎖では、シグナルペプチドを含む前駆体タンパク質は配列番号4で示すアミノ酸配列からなり、シグナルペプチドを除く成熟型タンパク質は配列番号5で示すアミノ酸配列からなる。フィブロインL鎖のシグナルペ  
20 プチドは、配列番号4において1位～16位のアミノ酸配列からなる。

カイコのフィブロインL鎖遺伝子では、シグナルペプチドは第1エクソン、第2エクソン、及び第3エクソンによってコードされ、シグナルペプチドのC末端アミノ酸残基は第3エクソンによってコードされる(図2C)。配列番号6で示すゲノム配列において、フィブロインL鎖遺伝子の第1エクソンは574位～889  
25 位、第1イントロンは890位～966位、第2エクソンは967位～1036位、第2イントロンは1037位～8976位、第3エクソンは8977位～9059位であり、第3エクソンにおいてシグナルペプチドをコードする領域は8977位～8988位である。

カイコのセリシン1では、選択的スプライシングにより複数のアイソフォームが生成される。アイソフォームの一例では、シグナルペプチドを含む前駆体タン

パク質は配列番号7で示すアミノ酸配列からなり、シグナルペプチドを除く成熟型タンパク質は配列番号8で示すアミノ酸配列からなる。セリシン1の上記アイソフォームにおいてシグナルペプチドは、配列番号7において1位~19位のアミノ酸配列からなる。

5      カイコのセリシン1遺伝子では、上記アイソフォームのシグナルペプチドは第1エクソン、及び第2エクソンによってコードされ、シグナルペプチドのC末端アミノ酸残基は第2エクソンによってコードされる(図2A)。配列番号9で示すゲノム配列において、セリシン1遺伝子において上記アイソフォームの第1エクソンは947位~1039位、第1イントロンは1040位~3051位、第2エクソンは  
10      3052位~3082位であり、第2エクソンにおいてシグナルペプチドをコードする領域は3052位~3069位である。

カイコのフィブロヘキサマリンでは、シグナルペプチドを含む前駆体タンパク質は配列番号10で示すアミノ酸配列からなり、シグナルペプチドを除く成熟型タンパク質は配列番号11で示すアミノ酸配列からなる。フィブロヘキサマリン  
15      のシグナルペプチドは、配列番号10において1位~17位のアミノ酸配列からなる。

カイコのフィブロヘキサマリン遺伝子では、シグナルペプチドは第1エクソンによってコードされ、シグナルペプチドのC末端アミノ酸残基は第1エクソンによってコードされる。配列番号12で示すゲノム配列において、フィブロヘキサマリン遺伝子の第1エクソンは918位~1052位、第1イントロンは1053位~  
20      1536位、第2エクソンは1537位~1756位であり、第1エクソンにおいてシグナルペプチドをコードする領域は1001位~1051位である。

本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫において、目的遺伝子配列は、単一の内在性遺伝子に導入されていてもよく、又は複数の内在性遺伝子に導入されていてもよい。また、本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫は、目的遺伝子配列を含むエクソン配列をヘテロ接合で有していてもよく、又はホモ接合で含んでいてもよい。  
25      目的遺伝子配列が複数の内在性遺伝子に導入されている場合、複数の内在性遺伝子に導入されている目的遺伝子配列の種類は、同一であっても異なってもよい。

一実施形態において、目的遺伝子配列が導入されている複数の内在性遺伝子は、フィブロインH鎖及びフィブロインL鎖をコードする遺伝子であってもよく、フィブロインH鎖及びセリシン1をコードする遺伝子であってもよく、又はフィブロインH鎖、フィブロインL鎖、及びセリシン1をコードする遺伝子であってもよい。

一実施形態では、本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫において、目的遺伝子配列は終止コドンを含む。さらなる実施形態において、本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫において標的エクソン配列は、目的遺伝子配列の終止コドンの3'末端側に転写終結配列を含む。

10 別の実施形態では、目的遺伝子配列は終止コドンを含まない。本実施形態では、目的のタンパク質又はその断片は、シグナルペプチド又はその機能性断片と、内在性遺伝子によってコードされる成熟型タンパク質（前駆体タンパク質からシグナルペプチドが切断されて除去されたタンパク質）又はそのC末端断片（例えば、成熟型タンパク質において標的エクソン配列によってコードされるN末端配列の一部が欠失した断片）との間に融合される。その結果、目的のタンパク質又はその断片のN末端は、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端側に融合され、目的のタンパク質又はその断片のC末端は成熟型タンパク質又はそのC末端断片のN末端側に融合される。したがって、内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片、目的のタンパク質又はその断片、及び成熟型タンパク質又はそのC末端断片を含む融合タンパク質をコードする融合遺伝子が、

15 内在性遺伝子の遺伝子座において構成される。

一実施形態において、目的のタンパク質は、蛍光タンパク質、抗体、抗原ポリペプチド、酵素、サイトカイン、又は抗菌ポリペプチドである。例えば目的のタンパク質が抗体である場合、抗体を構成する重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子は異なる

25 内在性遺伝子に導入されていてもよい。

#### 1-4. 効果

本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫は、標的エクソン配列に導入された目的遺伝子によってコードされた目的タンパク質を安定的かつ大量に生産することができる。

従来の GAL4/UAS システムでは、GAL4 遺伝子及び UAS 制御配列はゲノム上のランダムな位置に導入されるため目的タンパク質の発現量が大きく変動し得るが、本発明の遺伝子組換えチョウ目昆虫では、内在性遺伝子が有するプロモーター活性やエンハンサー活性をそのまま利用して目的遺伝子を発現させることができるため発現量をより確実に制御可能である。

## 2. 二本鎖環状 DNA

### 2-1. 概要

本発明の第2の態様は、二本鎖環状 DNA である。本態様の二本鎖環状 DNA によれば、チョウ目昆虫の内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置の 3' 末端側に位置する標的エクソン配列内に目的遺伝子配列を導入することができる。本態様の二本鎖環状 DNA は、例えば TAL-PITCh (precise integration into target chromosome) 法に基づく目的遺伝子のノックインに使用することができる。

### 2-2. 定義

本態様において「二本鎖環状 DNA」とは、チョウ目昆虫の内在性遺伝子に目的遺伝子配列を導入するために少なくとも目的遺伝子配列を含む環状の二本鎖 DNA 分子を意味する。二本鎖環状 DNA は、大腸菌等の細菌細胞内で保持可能及び／又は複製可能なベクターが好ましく、例えば細胞内での維持や複製に必要な配列（複製起点及び／又は抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子等）を含むことができる。二本鎖環状 DNA は、例えばプラスミドベクターであってもよい。

本明細書において「ゲノム編集」とは、DNA 切断酵素による二本鎖切断 (double strand break : DSB) に伴う DNA 修復機構等を利用して、ゲノム上の任意の位置で外来遺伝子の挿入 (ノックイン) や標的遺伝子の破壊 (ノックアウト) を行う遺伝子ターゲティング技術である。ゲノム編集技術には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 法、TALEN 法、及び CRISPR/Cas 法が知られるが、本明細書ではいずれの方法を用いてもよい。

「TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 法」は、植物病原細菌である Xanthomonas 属菌由来の TAL エフェクター (TALE) タンパク質と非特異的エンドヌクレアーゼドメインを融合させた人工 DNA 切断酵素によるゲノ

ム編集技術である。TALEN は、DNA 結合ドメインとして DNA 結合ユニットの繰り返しを含む TALE ドメインと FokI のヌクレアーゼドメインのような非特異的エンドヌクレアーゼドメインからなるタンパク質である。このうち、DNA を切断する酵素活性を持つヌクレアーゼドメインは二量体で機能するため、TALEN は、標的塩基配列における二本鎖切断 (DSB) 部位の上流側 (5' 側) 近傍の DNA 配列を認識するポリペプチド (本明細書においてしばしば「Left-TALEN」と呼ぶ) と DSB 部位の下流側 (3' 側) 近傍の DNA 配列を認識するポリペプチド (本明細書においてしばしば「Right-TALEN」と呼ぶ) からなる二量体で機能する。前記 TALE ドメインを構成する DNA 結合ユニットは、N 末端側から 12 位及び 13 位のアミノ酸残基に変異があり、2 アミノ酸一組で、DNA を構成する 4 種の塩基 (A: アデニン、G: グアニン、C: シトシン、T: チミン) のそれぞれを特異的に認識することができる。例えば、12-13 位のアミノ酸残基がそれぞれ、N-I 又は N-N のときはアデニンを、N-N のときはグアニンを、H-D のときはシトシンを、そして N-G のときはチミンを認識する。DNA 結合ユニットの繰り返し数は、標的塩基配列の塩基長に応じて変動することができる。TALE ドメインを操作することで、ゲノム上の任意の DNA 配列を標的とした遺伝子ターゲティングが可能となる。カイコ等のチョウ目昆虫における TALEN 法を用いた遺伝子ノックアウト方法は公知の技術である。例えば、Takasu Y., et al., 2013, PLoS One 8, e73458 に記載の方法を参考にすればよい。

「ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN: Zinc-Finger Nuclease) 法」は、DNA 結合ドメインとしてのジンクフィンガードメインと FokI のヌクレアーゼドメインのような非特異的エンドヌクレアーゼドメインからなる人工 DNA 切断酵素を用いるゲノム編集技術である。1 つのジンクフィンガーモチーフが 3 塩基を認識して標的核酸に結合できるため、ジンクフィンガーモチーフを複数連結することで、連結個数の 3 倍数の塩基を特異的に認識して結合する。二量体で機能し、標的部位に結合後、エンドヌクレアーゼ活性により標的核酸の特定部位を二本鎖切断 (DSB) する。

「CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPR associated proteins) 法」は、細菌や古細菌においてウイルスやプラ

スミド等の外来 DNA 又は RNA を排除するように進化した獲得免疫システムを利用したゲノム編集技術であり、Cas9 タンパク質を利用する CRISPR/Cas9 法を始め、Cpf1、Cas13a 等の他の Cas タンパク質を用いたバリエーションが報告されている。細菌や古細菌は、侵入した外来 DNA 又は RNA を断片化後、ゲノム中の CRISPR 領域内に挿入し、それを鋳型として約 40bp の CRISPR RNA (crRNA) を合成する。crRNA は、直接又はトランス活性型 RNA (tracrRNA) を介してヌクレアーゼ活性を有する Cas タンパク質と結合して CRISPR/Cas 複合体を形成する。CRISPR/Cas 複合体は crRNA を介して、それに相補的な塩基配列を有する標的 DNA 又は RNA 配列に結合して、切断する。Cas タンパク質として Cas9、Cpf1 といった二本鎖ヌクレアーゼを用いた場合は、標的部位で DSB を誘導する。

本明細書において「ゲノム編集酵素」とは、ゲノム上の標的部位を特異的に切断及び編集する活性を有するタンパク質を意味する。ゲノム編集タンパク質の例として、上述のゲノム編集に使用可能な TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)、Cas9 (CRISPR associated protein 9)、及び ZFN (zinc finger nuclease) が挙げられる。ゲノム編集タンパク質が TALEN である場合、2 量体で機能し得る TALEN として Left TALEN 及び Right TALEN を用いることができる。ゲノム編集タンパク質が Cas9 である場合、ゲノム編集を行うためには上述の crRNA 等のガイド RNA が必要である。

### 2-3. 構成

本態様の二本鎖環状 DNA は、第 1 認識配列、第 2 スペーサー配列、第 1 スペーサー配列、ゲノム相同配列、及び目的遺伝子配列をこの順で含む。ここで、第 1 認識配列、第 2 スペーサー配列、第 1 スペーサー配列、及びゲノム相同配列は、目的遺伝子配列を導入する標的となる内在性遺伝子を含むゲノム領域の塩基配列に由来する。なお、本態様の二本鎖環状 DNA は、ゲノム相同配列中の 5' 末端側に第 2 認識配列を含む。

本態様の二本鎖環状 DNA を用いる目的遺伝子の導入では、標的となる内在性遺伝子において 2 つのゲノム編集酵素 (以下、「第 1 のゲノム編集酵素」及び「第 2 のゲノム編集酵素」という) を用いてゲノム上のイントロン配列内で二本鎖切断部位を生じさせる。本明細書では、この二本鎖切断部位を「ゲノム切断位置」

という。ゲノム切断位置は内在性遺伝子のイントロン配列内であれば任意の位置に設定できるが、スプライシングに必要なスプライドナー配列及びスプライスアクセプター配列、ブランチ部位等の機能性配列以外の位置に配置することが好ましい。なお、ゲノム編集酵素の種類によってはゲノム切断位置を正確に特定できない場合があるが、その場合でも本発明の二本鎖環状 DNA を設計する際にはゲノム切断位置として仮定した位置に基づいて二本鎖環状 DNA を構成する各要素配列が特定され、上述の 2 つのゲノム編集酵素がゲノム及び二本鎖環状 DNA を実際に切断する位置はその位置に制限されるものではなく、その近傍の位置（例えば第 1 スペーサー配列及び／又は第 2 スペーサー配列における任意の位置）であってもよいものとする。

本態様の二本鎖環状 DNA に含まれる第 1 認識配列、第 2 スペーサー配列、及び第 1 スペーサー配列、並びにゲノム相同配列において 5' 末端側に位置する第 2 認識配列は、内在性遺伝子のゲノム配列においてゲノム切断位置の近傍に位置する塩基配列に由来する。「第 1 認識配列」及び「第 2 認識配列」は、内在性遺伝子のゲノム配列においてゲノム切断位置のそれぞれ 5' 末端側及び 3' 末端側に位置し、それぞれ第 1 のゲノム編集酵素及び第 2 のゲノム編集酵素によって認識及び結合される塩基配列と同一である。第 1 認識配列及び第 2 認識配列の塩基長は、ゲノム編集酵素の種類に応じて異なるが、通常は 8~30 塩基長であり、例えば 10 塩基長~25 塩基長、12 塩基長~20 塩基長、又は 14 塩基長~18 塩基長である。

「第 1 スペーサー配列」は、内在性遺伝子のゲノム配列においてゲノム切断位置の 5' 末端側に隣接する配列に由来し、上記の第 1 認識配列とゲノム切断位置との間に位置する塩基配列に由来する。「第 2 スペーサー配列」は、内在性遺伝子のゲノム配列においてゲノム切断位置の 3' 末端側に隣接する配列に由来し、ゲノム切断位置と上記の第 2 認識配列との間に位置する塩基配列に由来する。第 1 スペーサー配列及び第 2 スペーサー配列の塩基長は、ゲノム編集酵素の種類に応じて異なるが、通常は 6~30 塩基長であり、例えば 8 塩基長~25 塩基長、10 塩基長~20 塩基長、又は 12 塩基長~15 塩基長である。ここで内在性遺伝子は遺伝子上流側から順に第 1 認識配列、第 1 スペーサー配列、第 2 スペーサー配列、及び第 2 認識配列を含むのに対して、本態様の二本鎖環状 DNA では第 1 スペーサー

配列及び第 2 スペーサー配列の配置が逆になっていることが特徴である。

本態様の二本鎖環状 DNA に含まれるゲノム相同配列は、その 5' 末端側に上述の第 2 認識配列を含み、第 2 認識配列から、ゲノム切断位置を含むイントロン配列の 3' 末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相  
5 同な塩基配列からなる。ここでゲノム切断位置を含むイントロン配列の 3' 末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列は、ゲノム切断位置を含むイントロン配列の 3' 末端側に隣接するエクソン配列であってもよい。本態様の二本鎖環状 DNA では、ゲノム相同配列において 3' 末端側に含まれるエクソン配列又はその部分配列は、シグナルペプチド又はその機能性断片の C 末端側をコード  
10 し、そのさらに 3' 末端側に位置する目的遺伝子配列にインフレームに連結される。本態様の二本鎖環状 DNA においてゲノム相同配列はゲノム編集酵素の第 2 認識配列を含む限り、特に限定されない。ゲノム相同配列の塩基長は、例えば 15 塩基長～20,000 塩基長、20 塩基長～10,000 塩基長、50 塩基長～5,000 塩基長、100 塩基長～2,000 塩基長、又は 500 塩基長～1,000 塩基長であってもよい。

15 一実施形態において、本態様の二本鎖環状 DNA では、第 1 認識配列からゲノム相同配列における第 2 認識配列までの領域は、第 1 認識配列、第 2 スペーサー配列、第 1 スペーサー配列、及びゲノム相同配列における第 2 認識配列からなる。

一実施形態において、本態様の二本鎖環状 DNA における目的遺伝子配列は、終  
20 止コドンを含む。さらなる実施形態において、本態様の二本鎖環状 DNA は目的遺伝子配列の 3' 末端側に転写終結配列を含む。

一実施形態において、本態様の二本鎖環状 DNA は、内在性遺伝子に目的遺伝子配列が導入された個体を識別するための標識遺伝子を含む。例えば、標識遺伝子は目的遺伝子配列の 3' 末端側に配置された転写終結配列のさらに 3' 末端側に配置することができる。

25 本態様の二本鎖環状 DNA に含まれる第 1 認識配列及び第 2 認識配列を認識するゲノム編集酵素の種類は制限されず、TALEN、ZFN、及び／又は Cas9 であってもよい。例えば、第 1 認識配列及び第 2 認識配列を認識するゲノム編集酵素は TALEN であってもよい。この場合、第 1 認識配列及び第 2 認識配列を認識する 2 つのゲノム編集酵素は二量体で機能する Left-TALEN 及び Right-TALEN であって

もよい。

一実施形態において、本態様における内在性遺伝子では、第1エクソンを含む複数のエクソンがシグナルペプチドをコードする。

#### 2-4. 効果

5 本態様の二本鎖環状DNAを第1及び第2のゲノム編集酵素と共にチョウ目昆虫の卵に導入することによって、ゲノム上のゲノム切断位置に隣接する第1スペーサー配列と、二本鎖環状DNA中の第1スペーサー配列との間の微小ホモロジーに基づく末端再結合(microhomology-mediated end-joining)が可能となり、チョウ目昆虫の内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置の3'末端側

10 側に位置する標的エクソン配列内に目的遺伝子配列を挿入することができる。

一実施形態において本態様の二本鎖環状DNAをTAL-PITCh法に用いることができる。なお、TAL-PITCh法については公知の技術文献(Nature communications, 2014, 5:5560)を参照することができる。

### 3. ドナー核酸

#### 15 3-1. 概要

本発明の第3の態様は、ドナー核酸である。本態様のドナー核酸によれば、チョウ目昆虫の内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置の3'末端側又は5'末端側に位置する標的エクソン配列内に目的遺伝子配列を導入することができる。本態様のドナー核酸は、例えば相同組換え法に基づく目的遺伝子の

20 のノックインに使用することができる。

#### 3-2. 構成

本明細書において「ドナー核酸」とは、チョウ目昆虫の内在性遺伝子に目的遺伝子配列を導入するための核酸をいう。ドナー核酸の形態は問わず、例えばプラスミドベクター等の二本鎖環状DNAや直鎖状DNAであってもよい。

25 本態様のドナー核酸は、第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列、並びにその間に配置された目的遺伝子配列を含む。第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列は、目的遺伝子配列を導入する標的となる内在性遺伝子を含むゲノム領域の塩基配列に由来する。

本態様のドナー核酸を用いる目的遺伝子の導入では、標的となる内在性遺伝子

においてゲノム上のイントロン配列内で二本鎖切断部位を生じさせるために、その近傍領域内の配列を認識するゲノム編集酵素が使用される。第2態様と同様に本態様でもこの二本鎖切断部位を「ゲノム切断位置」という。なお、上述のようにゲノム編集酵素の種類によってはゲノム切断位置を正確に特定できない場合があるが、その場合でも本発明のドナー核酸を設計する際にはゲノム切断位置として仮定した位置に基づいてドナー核酸を構成する各要素配列が特定され、上述のゲノム編集酵素がゲノムを実際に切断する位置はその位置に制限されるものではなく、その近傍の位置であってもよいものとする。ゲノム切断位置は内在性遺伝子のイントロン配列内であれば任意の位置に設定できるが、スプライシングに必要なスプライスドナー配列及びスプライスアクセプター配列、ブランチ部位等の配列以外の位置に配置することが好ましい。また、本態様ではこのゲノム編集酵素が認識する配列を「ゲノム編集酵素の認識配列」又は単に「認識配列」という。

本態様のドナー核酸に含まれる第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列の具体的な構成は、ゲノム切断位置が目的遺伝子配列を導入する標的エクソン配列の5'末端側に位置する場合と、ゲノム切断位置の3'末端側に位置する場合との間で異なるため、以下では分けて説明する。

(1) ゲノム切断位置が標的エクソン配列の5'末端側に位置する実施形態

ゲノム切断位置が標的エクソン配列の5'末端側に位置する実施形態では、第1のゲノム相同配列は、ゲノム上でゲノム切断位置より5'末端側に位置する塩基（例えば、ゲノム切断位置より10塩基、20塩基、50塩基、100塩基、500塩基、1,000塩基以上上流に位置する塩基）から、ゲノム切断位置を含むイントロン配列の3'末端側に位置する（又は隣接する）標的エクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなる。本実施形態では、第1のゲノム相同配列に対応するゲノム配列は、上述のゲノム切断位置を切断するゲノム編集酵素による切断を受けないように、その認識配列において変異を有する。当該変異の種類は特に制限されず、例えば認識配列内の塩基の置換、欠失、及び／又は挿入であってもよい。認識配列内における変異塩基数は特に制限されない。例えば1又は複数の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていてもよく、より具体的には1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、又は6個以上

の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていてもよい。

本実施形態において、第2のゲノム相同配列は、標的配列又はその部分配列より3'末端側に位置するゲノム配列に対して相同な塩基配列からなる。

本実施形態において、第1及び第2のゲノム相同配列の塩基長は特に制限されず、例えば100塩基長～20,000塩基長、200塩基長～10,000塩基長、500塩基長～5,000塩基長、又は1,000塩基長～2,000塩基長であってもよい。

(2) ゲノム切断位置が標的エクソン配列の3'末端側に位置する実施形態

ゲノム切断位置が標的エクソン配列の3'末端側に位置する実施形態では、第1のゲノム相同配列は、ゲノム切断位置を含むイントロン配列より5'末端側に位置する塩基（具体的には目的遺伝子配列が挿入される標的エクソン配列中の位置よりも5'末端側の塩基であり、例えば目的遺伝子配列が挿入される位置より100塩基、200塩基、500塩基、1,000塩基、5,000塩基、又は10,000塩基以上上流に位置する塩基）から当該イントロン配列の5'末端側に位置する（又は隣接する）標的エクソン配列又はその部分配列まで（例えば、標的エクソン配列においてシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端アミノ酸残基をコードする塩基まで、又は標的エクソン配列においてシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端アミノ酸残基よりもさらにC末端側のアミノ酸残基をコードする塩基まで）のゲノム配列に対して相同な塩基配列からなる。

本実施形態において、第2のゲノム相同配列は、標的エクソン配列又はその部分配列より3'末端側かつゲノム切断位置より5'末端側に位置する塩基（例えば、標的エクソン配列においてシグナルペプチド又はその機能性断片のC末端アミノ酸残基よりもさらにC末端側のアミノ酸残基をコードする塩基）から、ゲノム切断位置より3'末端側に位置する塩基（例えば、ゲノム切断位置より10塩基、20塩基、50塩基、100塩基、500塩基、1,000塩基、5,000塩基、又は10,000塩基以上下流に位置する塩基）までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなる。

本実施形態では、第2のゲノム相同配列に対応するゲノム配列は、上述のゲノム切断位置を切断するゲノム編集酵素による切断を受けないように、その認識配列において変異を有する。当該変異の種類や変異塩基数は特に制限されず、上記

(1)と同様に例えば認識配列内の1又は複数の塩基の置換、欠失、及び／又は

挿入であってもよい。

本実施形態において、第1及び第2のゲノム相同配列の塩基長は特に制限されず、例えば100塩基長～20,000塩基長、200塩基長～10,000塩基長、500塩基長～5,000塩基長、又は1,000塩基長～2,000塩基長であってもよい。

5 本態様のドナー核酸では、第1又は第2のゲノム相同配列のいずれかに含まれる標的エクソン配列又はその部分配列は、シグナルペプチド又はその機能性断片又はそのC末端側の配列をコードし、場合により複数のアミノ酸残基をコードする塩基配列を介して、そのさらに3'末端側に位置する目的遺伝子配列にインフレームに連結される。

10 一実施形態において、本態様のドナー核酸における目的遺伝子配列は、終止コドンを含む。さらなる実施形態において、本態様のドナー核酸は目的遺伝子配列の3'末端側に転写終結配列を含む。

一実施形態において、本態様のドナー核酸は、内在性遺伝子に目的遺伝子配列が導入された遺伝子組換えチョウ目昆虫を識別するための標識遺伝子を含む。

15 本態様のドナー核酸を用いる相同組換え法に使用するゲノム編集酵素の種類は制限されず、TALEN、ZFN、及び／又はCas9であってもよい。

一実施形態において、本態様のドナー核酸は第1のゲノム相同配列及び／又は第2のゲノム相同配列の目的遺伝子配列とは反対側の末端に、ヌクレアーゼ認識配列を含む。ヌクレアーゼ認識配列は特に制限されず、上述のゲノム切断位置を切断するゲノム編集酵素の認識配列であってもよく、又はそのゲノム編集酵素とは異なる任意の制限酵素によって切断され得る制限酵素認識配列であってもよい。ヌクレアーゼ認識配列がTALEN認識配列である場合には、ヌクレアーゼ認識配列は、Left TALEN及びRight TALENが認識する2つの認識配列の組み合わせであってもよい。

25 3-3. 効果

本態様のドナー核酸をゲノム編集酵素と共にチョウ目昆虫の卵に導入することによって、チョウ目昆虫の内在性遺伝子において相同組換えを引き起こし、標的エクソン配列内に目的遺伝子配列を挿入することができる。

4. 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法

#### 4-1. 概要

本発明の第4の態様は、遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法である。本態様の作出方法は、第2態様に記載の二本鎖環状DNA又は第3態様に記載のドナー核酸をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入することによって、  
5 内在性遺伝子のエクソン配列に目的遺伝子配列を導入し、遺伝子組換えチョウ目昆虫を作出することができる。

#### 4-2. 方法

本態様の作出方法は、二本鎖環状DNA又はドナー核酸をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する導入工程を必須工程として含み、卵取得工程及び遺伝子組換えチョウ目昆虫選択工程を選択工程として含む。以下、各工程の構成について説明する。  
10

##### (1) 卵取得工程

「卵取得工程」とは、雌親カイコ成虫に産卵させて卵を得る工程である。卵の取得方法は、当該分野の常法で行えばよい。交配後の雌親カイコに産卵台紙を与えることで産卵が開始される。産卵時の温度は、23~28℃、好ましくは25℃前後である。通常、雌カイコは交尾後、数時間で産卵を開始する。卵に導入したDNAを核内へ取り込ませるためには、産下後2~8時間、好ましくは3~6時間の期間内にマイクロインジェクションを行う必要がある。  
15

##### (2) 導入工程

「導入工程」とは、二本鎖環状DNA又はドナー核酸をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する工程である。  
20

本態様の作出方法において導入工程が二本鎖環状DNAを卵に導入する実施形態では、二本鎖環状DNAの構成は、第2態様の記載に準じる。本実施形態の導入工程では、第2態様に記載の二本鎖環状DNA、第2態様に記載の第1のゲノム編集酵素又は第1のゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸、及び第2態様に記載の第2のゲノム編集酵素又は第2のゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する。  
25

本態様の作出方法において導入工程がドナー核酸を卵に導入する実施形態では、ドナー核酸の構成は、第3態様の記載に準じる。本実施形態の導入工程では、第

3 態様に記載のドナー核酸、第 3 態様に記載のゲノム編集酵素又はゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する。

本明細書において「発現可能な状態」とは、プロモーターの制御下にあるプロモーター下流域に、発現すべき遺伝子を配置していることをいう。また、ゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸は、mRNA 等の RNA、又はプラスミド DNA や直鎖状 DNA 等の DNA であってもよい。ゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする DNA は、第 1 又は第 2 のゲノム編集酵素をコードする塩基配列に加えてチョウ目昆虫の卵において発現可能なプロモーターを含み、必要に応じて、標識遺伝子（選抜マーカー）、エンハンサー、ターミネーター、複製起点、及びポリ A シグナル等の構成要素を含んでいてもよい。

マイクロインジェクション法は、当該分野で公知の方法によって行えばよい。例えば、二本鎖環状 DNA 又はドナー核酸、及びゲノム編集酵素又はゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸が適当な濃度となるように水やバッファー等の溶媒によって溶解又は希釈して注射液を調製する。続いて、産下後 3～6 時間の受精卵にマイクロインジェクションをする。導入する核酸の量は、特に限定しない。核酸の種類、性質、目的に応じて適宜定めればよい。通常は 50 nL～30 nL で足りる。導入後のチョウ目昆虫卵は、孵化するまで適当な条件下、例えば、25℃でインキュベートすればよい。

### 20 (3) 遺伝子組換えチョウ目昆虫選択工程

「遺伝子組換えチョウ目昆虫選択工程」とは、孵化したチョウ目昆虫から遺伝子組換えチョウ目昆虫を選択する工程である。本工程も当該分野で公知の方法によって行えばよい。例えば、導入工程に用いた二本鎖環状 DNA 又はドナー核酸が標識遺伝子を含む場合には、その標識遺伝子の発現に基づいて目的の遺伝子組換えチョウ目昆虫を容易に選抜することができる。

本明細書において「標識遺伝子」とは、選抜マーカーとも呼ばれる標識タンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

本明細書において「標識タンパク質」とは、標識遺伝子の発現により宿主チョウ目昆虫にない新たな形質を付与し得るタンパク質で、酵素、蛍光タンパク質、

色素合成タンパク質又は発光タンパク質等が含まれる。標識タンパク質の活性に基づいて、導入した核酸を保有している形質転換体を容易に判別することが可能となる。

## 5. 目的のタンパク質又は融合タンパク質を生産する方法

### 5 5-1. 概要

本発明の第5の態様は、目的のタンパク質又はその断片又はそれを含む融合タンパク質を生産する方法である。本態様の生産方法によれば、第1態様の遺伝子組換えチョウ目昆虫又は第4態様に記載の作出方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫を用いて目的のタンパク質又はその断片又はそれを含む融合タンパク質を大量に製造することができる。

### 5-2. 生産方法

本発明の生産方法は、飼育工程及び回収工程を含む。以下、各工程について説明をする。

#### (1) 飼育工程

「飼育工程」とは、第1態様の遺伝子組換えチョウ目昆虫又は第4態様に記載の作出方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫を飼育する工程である。遺伝子組換えチョウ目昆虫の飼育方法については、それぞれのチョウ目昆虫について当該分野で公知の技術によって飼育すればよい。例えば、チョウ目昆虫がカイコであれば、「蚕種総論；高見丈夫著、全国蚕種協会刊」を参照するとよい。飼料は、例えば、カイコやクワコであればクワ属 (*Morus*) の葉、エリサンであればトウゴマ (*Ricinus communis*) の葉若しくはシンジュ (*Ailanthus altissima*) の葉、サクサンであればブナ科 (*Fagaceae*) の葉のような食草樹種の天然葉であってもよいし、シルクメイト L4M 若しくは原蚕種 1-3 齢用 (日本農産工業) のような人工飼料であってもよい。病気の発生を抑え、安定した質及び量の給餌が可能であり、また必要に応じて無菌的に飼育できることを鑑みれば、人工飼料が好ましい。以下、簡単な飼育方法についてカイコを例に挙げて説明する。

掃立ては、適当な頭数 (例えば、4~10 頭) の同系の遺伝子組換えチョウ目昆虫の雌が産卵した卵で行う。孵化した幼虫は、卵台紙から蚕座である防乾紙 (パラフィン加工紙) を敷いた容器内に移し、シルクメイト等の人工飼料を防乾紙上

に並べて給餌する。餌の交換は、原則として1~2 齢では各1 回、3 齢では1~3 回行う。古い餌は食べ残しが多い場合には腐敗防止のため除去する。4~5 齢の壮カイコ幼虫時の飼育には、大型容器に移し、容器あたりの頭数を適宜調整する。湿度や容器内の状態により、容器に防乾紙、アクリル、又はメッシュ製のフタを

5 してもよい。飼育温度は、全齢を通して25~28℃で飼育する。

## (2) 回収工程

「回収工程」とは、遺伝子組換えチョウ目昆虫の幼虫が絹糸腺細胞内で発現し、分泌した後、絹糸腺内腔内に蓄積した目的のタンパク質又はその断片又はそれを

含む融合タンパク質を回収する工程である。

10 本態様において用いる遺伝子組換えチョウ目昆虫は、目的のタンパク質又はその断片、又は目的のタンパク質又はその断片のC末端側に内在性遺伝子によってコードされる成熟型タンパク質又はそのC末端断片を含む融合タンパク質（以下、「目的のタンパク質等」という）のN末端側にシグナルペプチド又はその機能性断片が融合した前駆体タンパク質を絹糸腺細胞内で発現する。絹糸腺細胞内で発

15 現した前駆体タンパク質は、シグナルペプチド又はその機能性断片の作用によって小胞体へ輸送され、そのシグナルペプチド又はその機能性断片が小胞体内のペプチダーゼ等の酵素作用によって切断された後、絹糸腺内腔へ分泌される。シグナルペプチド又はその機能性断片が切断された後の目的のタンパク質等は、蛹化

20 期の前部絹糸腺から個体外に分泌、吐糸される。したがって、目的のタンパク質等の回収方法には、繭から回収する方法、又は終齢後期から前蛹期に虫体から絹糸腺を摘出して直接回収する方法が挙げられる。特に繭から回収する方法は、目的のタンパク質等を簡便に回収できる点で優れている。

繭から目的のタンパク質等を回収する方法は、まず、終齢後期の幼虫を上蔭（じょうぞく：幼虫を蔭「まぶし」に移すこと）して、営繭させる。次に、繭から目的のタンパク質等を抽出する。抽出方法は、特に限定はしない。例えば、水

25 又はタンパク質変性剤を含まない適当な中性の抽出バッファー（例えば、1% Tween-20 及び 0.05% sodium azide を含む又は含まない phosphate-buffered saline, pH7.2）中に繭を浸漬するだけで目的のタンパク質等を回収することができる。抽出効果を高めるため浸漬前に繭を裁断又は粉碎してもよい。抽出温度

は、目的のタンパク質等の熱変性を防ぐため、0～10℃、好ましくは0～5℃の低温で行う。ただし、目的のタンパク質等が熱感受性ペプチドでなければ、10～40℃でも行うこともできる。抽出液は、必要に応じて攪拌してもよい。抽出時間は、繭の状態（例えば、未裁断状態か、粉末状態か）、抽出液の量、抽出温度、  
5 攪拌の有無等の抽出条件によって異なることから、条件に応じて適宜定めればよい。フィブロイン等の不溶性成分は、抽出液から必要に応じて遠心又は濾過によって除去することができる。

終齢後期～前踊期の虫体より絹糸腺を摘出して目的のタンパク質等を回収する方法は、当該分野で公知の方法によって達成することができる。例えば、終齢  
10 （5 齢）6 日目の吐糸直前カイコを氷上で麻酔にかけ、背側を切開してピンセットで絹糸腺を傷つけないように摘出すればよい（森靖編，カイコによる新生物学実験，三省堂，1970，pp. 249-255 参照）。摘出した絹糸腺を、例えば、前記抽出バッファー中で0～10℃、好ましくは0～5℃の温度下にて緩やかに振盪させて、目的のタンパク質等をバッファー中に溶出させることができる。目的のタンパク  
15 質等が熱感受性ペプチドでなければ、10～40℃の温度下で行ってもよい。その後、遠心又は濾過によって組織片等の夾雑物を除去し、目的のタンパク質等を含む上清を回収すればよい。

### 5-3. 効果

本発明の生産方法によれば、第1態様の遺伝子組換えチョウ目昆虫又は第4態  
20 様に記載の作出方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫の幼虫をタンパク質生産系として用いることで、GAL4/UAS 系統を用いた場合と比較して、目的のタンパク質等を大量に製造し、また容易に回収することが可能である。

### 6. 融合タンパク質

本発明の第6の態様は、融合タンパク質である。本態様の融合タンパク質は、  
25 N 末端側から順に、目的のタンパク質又はその断片、及び絹糸を構成する任意のタンパク質を含む。本態様の融合タンパク質に含まれる絹糸を構成するタンパク質は、フィブロイン、セリシン、又はフィブロヘキサマリンであってもよい。また、フィブロインは、フィブロインH鎖及び／又はフィブロインL鎖であってもよい。また、本態様の融合タンパク質に含まれる絹糸を構成するタンパク質は、

全長の成熟型タンパク質であってもよい。

本態様の融合タンパク質に含まれる目的のタンパク質又はその断片は、特に制限されない。例えば、蛍光タンパク質、抗体、抗原ポリペプチド、酵素、サイトカイン、又は抗菌ポリペプチドであってもよい。

## 5 7. 繭又は絹糸

本発明の第7の態様は、繭又は絹糸である。本態様の繭又は絹糸は、第6態様の融合タンパク質を含む。さらなる実施形態では、本態様の繭又は絹糸は、絹糸を構成する任意のタンパク質が第6態様の融合タンパク質からなる。例えば、本態様の繭又は絹糸に含まれる、フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、セリシン1、セリシン2、セリシン3、及びフィブロヘキサマリンからなる群から選択されるいずれか一以上のタンパク質が、第6態様に記載の融合タンパク質からなる。例えばフィブロインH鎖が第6態様に記載の融合タンパク質からなる場合には、本態様の繭又は絹糸ではすべてのフィブロインH鎖が第6態様に記載の融合タンパク質となっており、目的タンパク質が融合していないタンパク質は実質的に含まれない。

一実施形態において、本態様の繭又は絹糸は、第1態様の遺伝子組換えチョウ目昆虫又は第4態様に記載の作出方法で作出された遺伝子組換えチョウ目昆虫に由来する。この遺伝子組換えチョウ目昆虫は、目的遺伝子配列を含むエクソン配列をホモ接合で含むものであってもよい。

本態様の繭又は絹糸に含まれる融合タンパク質がフィブロインやフィブロヘキサマリン等と融合した蛍光タンパク質である場合、本態様の繭又は絹糸は極めて強い蛍光を有し、例えば通常の白色光下においても肉眼で識別可能な極めて強い色彩を有する。この色彩は従来技術で作出可能な蛍光繭又は蛍光絹糸の色彩と比較して圧倒的に強いため、利用価値の高い素材を提供することができる。

## 25 実施例

<実施例1：有用タンパク質生産のためのノックインシステムの作製>

(目的)

従来技術の GAL4/UAS システムは、酵母に由来する転写因子 GAL4 と制御配列 UAS とを組み合わせて利用する遺伝子制御システムである。カイコにおいてタン

パク質生産系として用いる GAL4/UAS システムでは、シルク遺伝子等のプロモーター制御下で GAL4 遺伝子を発現する GAL4 システムと、制御配列 UAS の制御下で目的遺伝子を発現する UAS システムとを交配することにより、絹糸腺等で目的タンパク質を発現する発現系が構築される。

- 5 GAL4/UAS システムでは、GAL4 システムと UAS システムを別々に樹立した後で交配する必要があるため、発現系の構築に時間を要する。また、GAL4 遺伝子及び UAS 制御配列はゲノム上のランダムな位置に導入されるため、目的タンパク質の発現量が変動し、予想が難しい。そのため、多数のシステムを作製した後に、GAL4 システムと UAS システムとを交配させて得られた個体において発現量を検討し、その結果に基づいて良好な親システムを選別する必要がある。

そこで本発明者らは、目的遺伝子配列を内在性遺伝子にロックインすることによって、目的タンパク質を安定的に大量に生産するための新たな発現系を構築することを着想した。より具体的には、内在性のセリシン遺伝子やフィブロイン遺伝子においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に、シグナルペプチドと融合されるように目的タンパク質をコードする目的遺伝子をロックインすれば、内在性遺伝子が有するプロモーター活性やエンハンサー活性をそのまま利用して、目的遺伝子を高発現できる可能性がある。

しかしながら、内在性遺伝子への効率的なロックインにはゲノム編集酵素等で標的遺伝子を切断する必要がある。

- 20 本発明者らは、後述の比較例 1 においてゲノム切断位置をエクソン配列中に設計してロックインを試みたところ、注射当代の 95%以上の個体が正常な繭を作れず、98%以上の個体が交配可能な成体まで発生することができないという結果を得た。したがって、この方法ではシステムを樹立することが極めて困難である。

そこで本実施例では、ゲノム切断位置をイントロン配列内に設計してエクソン配列へのロックインを実施することによって、上記問題点を克服できるか否かを検討する。

#### (方法と結果)

本実施例では、内在性のシルク遺伝子においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に、シグナルペプチドの C 末端側に融合される目的タンパク質と

して EGFP タンパク質をコードする目的遺伝子をノックインする。目的遺伝子のノックインには TAL-PITCh (precise integration into target chromosome) 法及び相同組換え法を使用し、標的エクソン配列の 5' 末端側に隣接するイントロン配列をゲノム編集酵素 TALEN (transcription activator-like effector  
5 nuclease) で切断する (図 2)。なお、本実施例では、目的遺伝子である EGFP 遺伝子配列は 3' 末端側に終止コドン及び転写終結配列を有する点で、後述する実施例 5~6 とは異なる (図 1)。

フィブロイン H (FibH) 遺伝子、フィブロイン L (FibL) 遺伝子、及びセリン 1 (Ser1) 遺伝子へのノックインは、以下の方法により行った。なお、以降の  
10 実施例において TALEN を発現するベクターは、Y. Takasu, S. Sajwan, T. Daimon, M. Osanai-Futahashi, K. Uchino, H. Sezutsu, T. Tamura, M. Zurovec (2013): Efficient TALEN construction for Bombyx mori gene targeting, PLoS One, 8, e73458. を参考に構築した。また、TALEN mRNA は、各 TALEN 発現ベクターを鋳型として、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Invitrogen) を用い  
15 て合成した。

#### (1) TAL-PITCh 法によるフィブロイン H 遺伝子へのノックイン

フィブロイン H 遺伝子 (以下、「FibH 遺伝子」という) では、第 1 エクソン及び第 2 エクソンがシグナルペプチドをコードする。FibH のシグナルペプチドの C 末端側に EGFP タンパク質が融合されるように、TAL-PITCh 法を用いて EGFP 遺  
20 伝子配列を第 2 エクソンに導入した。

具体的には、FibH 遺伝子のゲノム配列 (配列番号 3) において、第 1 エクソンと第 2 エクソンの間の第 1 イントロン内の位置 (配列番号 3 において 1945 位と 1964 位の間の位置、図 2A) をゲノム切断位置とし、TAL-PITCh 法に用いるド  
25 ナー核酸として図 3B に示す二本鎖環状 DNA を構築した (以下、「TAL-PITCh 用 SP(FibH)-EGFP ドナー核酸」という)。TAL-PITCh 用 SP(FibH)-EGFP ドナー核酸は、第 1 認識配列、第 2 スペーサー配列、第 1 スペーサー配列、ゲノム相同配列、目的遺伝子配列、転写終結配列、及びマーカー遺伝子をこの順で含む (図 3B)。

ここで第 1 スペーサー配列は、ゲノム切断位置の 5' 末端側に隣接し、配列番

号3において1945位～1954位からなる10塩基長の配列である。第2スパーサー配列は、ゲノム切断位置の3'末端側に隣接し、配列番号3において1955位～1964位からなる10塩基長の配列である。第1認識配列は、第1スパーサー配列の5'末端側でLeft TALENによって認識される、配列番号3において1925位～1944位からなる20塩基長の配列である。ゲノム相同配列は、第2認識配列から第2エクソン配列においてシグナルペプチドのC末端残基をコードするコドンまでのゲノム配列に対して相同な塩基配列であり、配列番号3において1965位～2034位からなる70塩基長の配列である。ここで第2認識配列は、第2スパーサー配列の3'末端側でRight TALENによって認識される、配列番号3において1965位～1984位からなる20塩基長の配列である。目的遺伝子配列はEGFP遺伝子配列であり、転写終結配列はカイコ由来のセリシン1遺伝子の転写終結配列を使用した。TAL-PITCh用SP(FibH)-EGFPドナー核酸において第1認識配列からEGFP遺伝子の転写終結配列までの塩基配列を配列番号13で示す。また、ノックイン後の遺伝子(図3C)によってコードされる、EGFPにおいて開始メチオニンを除くC末端断片のN末端側にFibH由来のシグナルペプチドが融合したタンパク質のアミノ酸配列を配列番号14で示す(以下、「SP(FibH)-EGFP融合タンパク質」と称する)。

TAL-PITCh用SP(FibH)-EGFPドナー核酸を、農業・食品産業技術総合研究機構で維持されている白眼・白卵・非休眠系統のw1-pnd系統の産卵後2～8時間のカイコ卵に、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Invitrogen)を用いて合成したLeft TALEN及びRight TALENをコードするmRNAと共にインジェクションした。インジェクション後の卵は、加湿状態、25℃で孵化するまでインキュベートした。インジェクション当代のカイコを親系統と交配し、得られた次世代の幼虫を全身で発現するDsRed2または絹糸腺で発現するEGFPの蛍光で選抜し、ノックインカイコ系統を得た。以下、得られたノックイン系統を「SP(FibH)-EGFPノックイン系統」という。また、このノックイン後のFibH遺伝子を「SP(FibH)-EGFPノックイン遺伝子」という。

上記マイクロインジェクションを行った105個の胚から発生した幼虫のうち、103個体が正常に営繭した。したがって、注射当代幼虫では営繭不良が認められ

なかった。

また、正常に営繭して発生した注射当代の成体では、36 個体の雌カイコのうち 34 個体が野生型の雄カイコと正常に交配して産卵し、53 個体の雄カイコのうち 50 個体が野生型の雌カイコと正常に交配して雌カイコが産卵した。したがって、注射当代の成体では、交尾不良が認められなかった。

以上の結果から、イントロン配列内でゲノムを切断することによって、正常に営繭及び交配可能なノックイン系統を極めて効率よく作製できることが示された。

SP(FibH)-EGFP ノックイン系統では、1 齢幼虫から中部絹糸腺及び後部絹糸腺で EGFP の強い蛍光が観察された。図 5 は、5 齢幼虫の絹糸腺及び繭の観察結果を示す。具体的には、5 齢 6 日目の吐糸直前に氷上で麻酔にかけ、背側を切開してピンセットで中部及び後部絹糸腺を傷つけないように摘出し、固定せずに蛍光顕微鏡で観察した結果、極めて強い EGFP 蛍光が観察された（図 5 左側）。また、当該系統の繭は通常の白色光下で明確な黄緑色を呈した（図 5 右側）。

## (2) 相同組換え法によるフィブロイン H 遺伝子へのノックイン

FibH のシグナルペプチドの C 末端側に EGFP タンパク質が融合されるように、相同組換え法を用いて EGFP 遺伝子配列を FibH 遺伝子の第 2 エクソンに導入した。

具体的には、上記 (1) と同様に第 1 イントロン内の位置（配列番号 3 において 1945 位と 1964 位の間の位置、図 2A）をゲノム切断位置とし、相同組換え法に用いるドナー核酸として図 4 に示す二本鎖環状 DNA を構築した（以下、「相同組換え用 SP(FibH)-EGFP ドナー核酸」という）。相同組換え用 SP(FibH)-EGFP ドナー核酸は、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列、並びにその間に配置された目的遺伝子配列である EGFP 遺伝子配列、転写終結配列、及びマーカー遺伝子を含み、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列の EGFP 遺伝子配列とは反対側の末端に TALEN 認識配列を含む。

ここで第 1 のゲノム相同配列は、ゲノム上でゲノム切断位置より 5' 末端側に位置する塩基（配列番号 3 において 1001 位）から第 2 エクソン配列においてシグナルペプチドの C 末端残基をコードするコドンまでのゲノム配列に対して相同な 1034 塩基長の配列である。なお、第 1 のゲノム相同配列は、上述のゲノム切

断位置の近傍において上記（１）に記載の Left TALEN 及び Right TALEN によって認識されないように変異を有する（具体的には、配列番号 3 において 1925 位～ 1984 位に位置する塩基配列 AACTTCGATTGAATGTGCGAAATTTATAGCTCAATATTTTAGCACTTATCGTATTGATTT（配列番号 3  
 5 3 ） が 塩 基 配 列 AtCTaCGATTGAAaGaGCGtAATTTATAGCTCAATATTTAtGCtCaTAaCGTATTGATTT（配列番号 3 4）に置換されている）。第 2 のゲノム相同配列は、ゲノム上で第 2 エクソン配列においてシグナルペプチドの C 末端残基をコードするコドンより 3' 末端側に位置するゲノム配列に対して相同な 377 塩基長の配列である。相同組換え用  
 10 SP(FibH)-EGFP ドナー核酸において、TALEN 認識配列及び第 1 のゲノム相同配列から第 2 のゲノム相同配列及び TALEN 認識配列までの塩基配列を配列番号 1 5 で示す。また、ノックイン後の遺伝子（図 4）によってコードされる、EGFP の N 末端側に FibH 由来のシグナルペプチドが融合したタンパク質は、上記（１）と同様に配列番号 1 4 で示すアミノ酸配列からなる（以下、上記（１）と同様に  
 15 「SP(FibH)-EGFP 融合タンパク質」と表記する）。

相同組換え用 SP(FibH)-EGFP ドナー核酸を、w1-pnd 系統の産卵後 2～8 時間のカイコ卵に mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Invitrogen) を用いて合成した Left TALEN 及び Right TALEN をコードする mRNA と共にインジェクションした。インジェクション後の卵は、加湿状態、25℃で孵化するまでインキュベートした。インジェクション当代のカイコを親系統と交配し、得られた次世代の幼虫を全身で発現する DsRed2 または絹糸腺で発現する EGFP の蛍光で選抜し、  
 20 ノックインカイコ系統を得た。以下、得られたノックイン系統を上記（１）と同様に「SP(FibH)-EGFP ノックイン系統」という。

上記マイクロインジェクションを行った胚から発生した個体では、上記（１）と同様に営繭不良や交尾不良が認められなかった。したがって、相同組換え法でもイントロン配列内でゲノムを切断することによって、正常に営繭及び交配可能なノックイン系統を効率よく作製できることが示された。

（３）相同組換え法によるフィブロイン L (FibL) 遺伝子へのノックイン

フィブロイン L（以下、「FibL」という）のシグナルペプチドの C 末端側に

EGFP タンパク質が融合されるように、相同組換え法を用いて EGFP 遺伝子配列を FibL 遺伝子の第 3 エクソンに導入した。

具体的には、FibL 遺伝子の第 2 イントロン内の位置（配列番号 6 において 8937 位と 8954 位の間の位置）をゲノム切断位置とし、相同組換え法に用いるドナー核  
5 酸として二本鎖環状 DNA を構築した（以下、「相同組換え用 SP(FibL)-EGFP ドナー核酸」という）。相同組換え用 SP(FibL)-EGFP ドナー核酸は、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列、並びにその間に配置された目的遺伝子配列である EGFP 遺伝子配列、転写終結配列、及びマーカー遺伝子を含み、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列の EGFP 遺伝子配列とは反対側の末端に  
10 TALEN 認識配列を含む。

ここで上述のゲノム切断位置は、配列番号 6 において 8917 位～8936 位からなる 20 塩基長の配列を認識する Left TALEN、及び配列番号 6 において 8955 位～8974 位からなる 20 塩基長の配列を認識する Right TALEN によって切断される。

また、第 1 のゲノム相同配列は、ゲノム上でゲノム切断位置より 5' 末端側に  
15 位置する塩基（配列番号 6 において 7864 位）から第 3 エクソン配列においてシグナルペプチドの C 末端残基をコードするコドンまでのゲノム配列に対して相同な 1128 塩基長の配列である。なお、第 1 のゲノム相同配列は、上述のゲノム切断位置の近傍において Left TALEN 及び Right TALEN によって認識されないように変異を有する（具体的には、配列番号 6 において 8917 位～8974 位に位置する  
20 塩基配列 CCGAGAAAACAATTTGTTGTGTATAATTTAAACCAAAACCCGAATTTAATTTTTCGC（配列番号 3 5）が塩基配列 CCGAGAAAAGAATTCGTTcTGTATAATTTAAACCAAAAttCGAATTTAATTTTTCGC（配列番号 3 6）に置換されている）。第 2 のゲノム相同配列は、ゲノム上で第 3 エクソン配列においてシグナルペプチドの C 末端残基をコードするコドンより 3' 末端側に位置  
25 するゲノム配列に対して相同な 1362 塩基長の配列である。相同組換え用 SP(FibL)-EGFP ドナー核酸において、TALEN 認識配列及び第 1 のゲノム相同配列から第 2 のゲノム相同配列及び TALEN 認識配列までの塩基配列を配列番号 1 6 で示す。また、ノックイン後の遺伝子によってコードされる、EGFP において開始メチオニンを除いた C 末端断片の N 末端側に FibL のシグナルペプチドが融合し

たタンパク質は配列番号 17 で示すアミノ酸配列からなる（以下、「SP(FibL)-EGFP 融合タンパク質」と称する）。

5 相同組換え用 SP(FibL)-EGFP ドナー核酸を、w1-pnd 系統の産卵後 2~8 時間のカイコ卵に mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Invitrogen) を用いて合成した Left TALEN 及び Right TALEN をコードする mRNA と共にインジェクションした。インジェクション後の卵は、加湿状態、25°C で孵化するまでインキュベートした。上記 (2) と同様の方法で、ノックインカイコ系統を得た。以下、得られたノックイン系統を上記 (1) と同様に「SP(FibL)-EGFP ノックイン系統」という。また、このノックイン後の FibL 遺伝子を「SP(FibL)-EGFP ノックイン遺伝子」という。

上記マイクロインジェクションを行った胚から発生した個体では、上記 (1) と同様に営繭不良や交尾不良が認められなかった。

#### (4) 相同組換え法によるセリシン 1 遺伝子へのノックイン

15 セリシン 1 (以下、「Ser1」という) のシグナルペプチドの C 末端側に EGFP タンパク質が融合されるように、相同組換え法を用いて EGFP 遺伝子配列を Ser1 遺伝子の第 2 エクソンに導入した。

具体的には、Ser1 遺伝子の第 1 イントロン内の位置 (配列番号 9 において 3020 位と 3033 位の間の位置) をゲノム切断位置とし、相同組換え法に用いるドナー核酸として二本鎖環状 DNA を構築した (以下、「相同組換え用 SP(Ser1)-EGFP ドナー核酸」という)。相同組換え用 SP(Ser1)-EGFP ドナー核酸は、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列、並びにその間に配置された目的遺伝子配列である EGFP 遺伝子配列、転写終結配列、及びマーカー遺伝子を含み、第 1 のゲノム相同配列及び第 2 のゲノム相同配列の EGFP 遺伝子配列とは反対側の末端に TALEN 認識配列を含む。

25 ここで上述のゲノム切断位置は、配列番号 9 において 3001 位~3019 位からなる 19 塩基長の配列を認識する Left TALEN、及び配列番号 9 において 3034 位~3049 位からなる 16 塩基長の配列を認識する Right TALEN によって切断される。

また、第 1 のゲノム相同配列は、ゲノム上でゲノム切断位置より 5' 末端側に位置する塩基 (配列番号 9 において 947 位) から第 2 エクソン配列においてシグ

ナルペプチドの C 末端残基をコードするコドンまでのゲノム配列に対して相同な 2069 塩基長の配列である。なお、第 1 のゲノム相同配列は、上述のゲノム切断位置の近傍において Left TALEN 及び Right TALEN によって認識されないように変異を有する（具体的には、配列番号 9 において 3000 位～3049 位に位置する塩

5 基配列 TATATTGTAAAGCACAAACATATATATTAATGAATTTTTTATTTATTTTTC（配列番号 37）が塩基配列 agTATTGagAAGCACAAgtaATATATTAATGAATTTTTTcTTTcTTTTTC（配列番号 38）に置換されている）。第 2 のゲノム相同配列は、ゲノム上で第 2 エクソン配列においてシグナルペプチドの C 末端残基をコードするコドンより 3' 末端側に位置するゲノム配列に対して相同な 2000 塩基長の配列である。相同組換え用

10 SP(Ser1)-EGFP ドナー核酸において、制限酵素認識配列及び第 1 のゲノム相同配列から第 2 のゲノム相同配列及び制限酵素認識配列までの塩基配列を配列番号 18 で示す。また、ノックイン後の遺伝子によってコードされる、EGFP において開始メチオニンを除いた C 末端断片の N 末端側に Ser1 のシグナルペプチドが融合したタンパク質は配列番号 19 で示すアミノ酸配列からなる（以下、

15 「SP(Ser1)-EGFP 融合タンパク質」と称する）。

相同組換え用 SP(Ser1)-EGFP ドナー核酸を w1-pnd 系統の産卵後 2～8 時間のカイコ卵に mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Invitrogen) を用いて合成した Left TALEN 及び Right TALEN をコードする mRNA と共にインジェクションした。インジェクション後の卵は、加湿状態、25℃で孵化するまでインキュ

20 ベートした。上記 (2) と同様の方法で、ノックインカイコ系統を得た。以下、得られたノックイン系統を上記 (1) と同様に「SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統」という。また、このノックイン後の Ser1 遺伝子を「SP(Ser1)-EGFP ノックイン遺伝子」という。

上記マイクロインジェクションを行った胚から発生した個体では、上記 (1) と同様に営繭不良や交尾不良が認められなかった。

#### <実施例 2 : EGFP タンパク質の生産>

##### (目的)

実施例 1 で作製した各ノックイン系統の絹糸腺における EGFP タンパク質の発現量を測定する。

(方法と結果)

(1) カイコ系統

実施例1の(2)~(4)で作製した各ノックイン系統を相互に交配することによって、複数のノックイン遺伝子を組み合わせで有する系統を作製した。本実施例では、例えば SP(FibH)-EGFP ノックイン遺伝子と SP(FibL)-EGFP ノックイン遺伝子の2つのノックイン遺伝子を有する系統を SP(FibH)-EGFP/SP(FibL)-EGFP ノックイン系統等と呼ぶ。なお、本実施例で使用したカイコでは各ノックイン遺伝子はすべてヘテロ接合である。

本実施例では、FibH 遺伝子プロモーター及び Ser1 遺伝子プロモーターの制御下で GAL4 遺伝子を発現する FibH+Ser1-GAL4 系統と UAS 制御配列の制御下で EGFP 遺伝子を発現する UAS-EGFP 系統とを掛け合わせて得られた系統(以下、「EGFP 産生 GAL4/UAS 系統」という)を対照群として使用した。

(2) 飼育条件

カイコの飼育は、以下の方法で実施した。25~27℃の飼育室で、幼虫の全齢を人工飼料(シルクメイト原種 1-3 齢 S、日本農産工業)で飼育した。人工飼料は2~3日毎に交換した(Uchino K. et al., 2006, J Insect Biotechnol Sericol, 75:89-97)。

(3) EGFP タンパク質発現量の測定

5 齢 6 日目の吐糸直前に氷上で麻酔にかけ、背側を切開してピンセットで絹糸腺を傷つけないように摘出した。絹糸腺は、中部絹糸腺及び後部絹糸腺を摘出した。これらをそれぞれ1本当たり 10 mL の PBS(pH 7.2)/1%Tween20/0.05%アジ化ナトリウムに入れて、室温で 24 時間振とうすることによって水溶性タンパク質を抽出した。得られた水溶性タンパク質抽出液を、2,000×g で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清に含まれる水溶性タンパク質中の EGFP タンパク質濃度を ELISA 法により測定した。具体的には抗 GFP 抗体(Aves GFP-1010、コスモバイオ)をコーティングした 96well プレートに上清液を 100 μL 添加し、室温で 1 時間静置した。PBS/0.05% Tween 20 で 3 回洗浄した後、horseradish peroxidase-conjugated anti-GFP antibody (Rockland Immunochemicals)を添加して、室温で 1 時間静置した。PBS/0.05% Tween 20 で 3 回洗浄した後、TMB

Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad)を用いて発色反応を行い、1N 硫酸を加えて反応を停止させた。発色を plate reader (SpectraMax iD3; Molecular Devices)で定量した。リコンビナント GFP タンパク質 (タカラバイオ; Z2373N)の系列希釈液 (1~400 pg/ $\mu$ L) を用いて標準曲線を作製した。

5 カイコ 1 頭当たりの EGFP 発現量を測定した結果を図 6 に示す。

SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統 (図 6、SP(Ser1)-EGFP) における EGFP 発現量は、EGFP 産生 GAL4/UAS 系統 (図 6、Control(GAL4/UAS)) をわずかに上回った。EGFP 産生 GAL4/UAS 系統では、Ser1 遺伝子プロモーターと FibH 遺伝子プロモーターの 2 つのプロモーターで GAL4 タンパク質を発現しており、3.3 mg の EGFP 発現量のうち Ser1 遺伝子プロモーターに由来する発現量は 1 mg 以下と推定されるため、SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統の EGFP 発現量は圧倒的に大きいと考えられる。

SP(FibH)-EGFP ノックイン系統 (図 6、SP(FibH)-EGFP) の EGFP 発現量は、SP(FibL)-EGFP ノックイン系統 (図 6、SP(FibL)-EGFP) と比較して 2 倍以上であり、SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統 (図 6、SP(Ser1)-EGFP) と比較して 4 倍以上だった。この結果は、カイコの絹糸腺で生産される FibH タンパク質と FibL タンパク質のモル数は、フィブロインの構成上等しいこと、並びに絹糸を構成するフィブロインが重量比でセリシンの 3 倍であることに基づくと予想外であった。

SP(FibH)-EGFP/SP(FibL)-EGFP/SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統 (図 6、右端) は、33.7 mg の EGFP 発現量を示し、SP(FibH)-EGFP ノックイン系統、SP(FibL)-EGFP ノックイン系統、及び SP(Ser1)-EGFP ノックイン系統の各系統における EGFP 発現量の和として予想される量を大きく上回った。

### <実施例 3 : GM-CSF タンパク質の生産>

#### (目的)

25 FibH のシグナルペプチドの C 末端側に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) が融合されるように、相同組換え法によるノックインを行う。絹糸腺における GM-CSF 生産量を評価する。

#### (方法と結果)

##### (1) カイコ系統

実施例 1 の (2) に記載の相同組換え法を目的遺伝子を EGFP 遺伝子配列から GM-CSF 遺伝子配列に置き換えて実施した。GM-CSF 遺伝子配列は配列番号 20 で示す塩基配列からなり、配列番号 21 で示すアミノ酸配列からなる GM-CSF タンパク質をコードする。得られたノックイン系統を「SP(FibH)-GM-CSF ノックイン

5 系統」と呼ぶ。また、ノックイン後の遺伝子 (図 7A) によってコードされる、GM-CSF において GM-CSF 由来のシグナルペプチドを除いた成熟型アミノ酸配列の N 末端側に FibH 由来のシグナルペプチドが融合したタンパク質は配列番号 22 で示すアミノ酸配列からなる (以下、「SP(FibH)-GM-CSF 融合タンパク質」と称する)。

10 また、Ser1 遺伝子プロモーターの制御下で GAL4 遺伝子を発現する Ser1-GAL4 系統と UAS 制御配列の制御下で GM-CSF 遺伝子を発現する UAS-GM-CSF 系統とを掛け合わせて得られた系統 (以下、「中部絹糸腺 GM-CSF 産生 GAL4/UAS 系統」という)、及び FibH 遺伝子プロモーターの制御下で GAL4 遺伝子を発現する FibH-GAL4 系統と UAS-GM-CSF 系統とを掛け合わせて得られた系統 (以下、「後部絹糸

15 腺 GM-CSF 産生 GAL4/UAS 系統」という) を対照群として使用した。

## (2) ウェスタンブロッティング

実施例 2 に記載の方法に準じて、それぞれの系統から中部絹糸腺及び後部絹糸腺を摘出し、各絹糸腺中のタンパク質を抽出した。続いて、希釈していない又は 2 倍~128 倍希釈した絹糸腺抽出液を規定量の NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo

20 Fisher) および NuPAGE Sample Reducing Agent (Thermo Fisher) と混合し、70°C で 10 分間加温することにより SDS 化した。SDS 化したサンプルを 8 cm×13 cm の 4-12% SDS-PAGE ゲルを用いて、20 mA 定電流で約 90 分間泳動した。ゲルはセミドライ転写装置 (iBlot2、Thermo Fisher) を用いて、PVDF メンブレンに転写した。転写後のメンブレンを EZ wash (AE-1480、ATTO) で 5 分間軽く振とうし

25 た後、1 次抗体 (抗 GM-CSF 抗体、3000 倍希釈、Immundiagnostik 社製、製品番号 AS1021.2) を 4°C で一晩反応させた。メンブレンを EZ wash で 10 分間、3 回洗浄した後、2 次抗体 (Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey、Cytiva 社製、製品番号 NA934-100UL、50,000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを EZ wash で 10 分間、3 回洗浄した後、ECL prime (RPN2232、GE ヘルスケ

ア) を 5 分間反応させ、Fusion FX (Vilber Bio Imaging) でシグナルを検出した。

結果を図 7B に示す。SP(FibH)-GM-CSF ノックイン系統の中部絹糸腺及び後部絹糸腺を合わせた抽出液では、中部絹糸腺 GM-CSF 産生 GAL4/UAS 系統及び後部絹糸腺 GM-CSF 産生 GAL4/UAS 系統と比較してそれぞれ約 13 倍及び約 3 倍の GM-CSF が検出された。SP(FibH)-GM-CSF ノックイン系統の絹糸腺では、GM-CSF を極めて効率よく発現、分泌されることが明らかとなった

#### <実施例 4 : 抗体の生産>

##### (目的)

10 FibH のシグナルペプチドの C 末端側に IgG H 鎖が融合されるように、相同組換え法によるノックインを行う。さらに、FibL のシグナルペプチドの C 末端側に IgG L 鎖が融合されるように、相同組換え法によるノックインを行う。得られた 2 つのノックイン系統を交配して IgG H 鎖及び IgG L 鎖を含む抗体分子を生産する。

##### 15 (方法と結果)

##### (1) カイコ系統

実施例 1 の (2) に記載の相同組換え法を目的遺伝子を EGFP 遺伝子配列から IgG H 鎖遺伝子配列に置き換えて実施した。IgG H 鎖遺伝子配列は配列番号 2 3 で示す塩基配列からなり、配列番号 2 4 で示すアミノ酸配列からなる IgG H 鎖をコードする。得られたノックイン系統を「SP(FibH)-IgG H 鎖ノックイン系統」と呼ぶ。また、ノックイン後の遺伝子 (図 8A) によってコードされる、IgG H 鎖の N 末端側に FibH 由来のシグナルペプチドが融合したタンパク質は配列番号 2 5 で示すアミノ酸配列からなる (以下、「SP(FibH)-IgG H 鎖融合タンパク質」と称する)。

25 また、実施例 1 の (3) に記載の相同組換え法を目的遺伝子を EGFP 遺伝子配列から IgG L 鎖遺伝子配列に置き換えて実施した。IgG L 鎖遺伝子配列は配列番号 2 6 で示す塩基配列からなり、配列番号 2 7 で示すアミノ酸配列からなる IgG L 鎖をコードする。得られたノックイン系統を「SP(FibL)-IgG L 鎖ノックイン系統」と呼ぶ。また、ノックイン後の遺伝子 (図 8B) によってコードされる、IgG

L鎖のN末端側にFibL由来のシグナルペプチドが融合したタンパク質は配列番号28で示すアミノ酸配列からなる（以下、「SP(FibL)-IgG L鎖融合タンパク質」と称する）。

上記2つのノックイン系統を交配することによって、2つのノックイン遺伝子を有し、IgG H鎖とIgG L鎖を含むIgG分子を生産し得る系統を作製した（以下、「SP(FibH)-IgG H鎖/SP(FibL)-IgG L鎖ノックイン系統」と呼ぶ）。

本実施例では、GAL4遺伝子をFibH遺伝子プロモーターおよびSer1遺伝子プロモーターの制御下で発現するFibH+Ser1-GAL4系統、UAS制御配列の制御下でIgG H鎖遺伝子を発現するUAS-IgG H鎖系統、及びUAS制御配列の制御下でIgG L鎖遺伝子を発現するUAS-IgG L鎖系統を掛け合わせて得られた系統（以下、「抗体産生 GAL4/UAS 系統」という）を対照群として使用した。

## (2) IgG 発現量の定量

実施例2に記載の方法に準じて、それぞれの系統から中部絹糸腺及び後部絹糸腺を摘出し、各絹糸腺中のタンパク質を抽出した。続いて、Ab SpinTrap (Cytiva) を用いIgGを精製し、プロテインアッセイBCAキット（ナカライ）を用いて抽出液中のIgG量を定量した。

結果を図8Cに示す。SP(FibH)-IgG H鎖/SP(FibL)-IgG L鎖ノックイン系統では、抗体産生 GAL4/UAS 系統の中部絹糸腺及び後部絹糸腺と比較して約4.6倍のIgGを生産できることが示された。SP(FibH)-IgG H鎖/SP(FibL)-IgG L鎖ノックイン系統の絹糸腺では、IgG H鎖とIgG L鎖を含む抗体分子を極めて効率よく発現、分泌されることが明らかとなった。

## <実施例5：融合タンパク質生産のためのノックイン系統の作製>

### (目的)

蛍光タンパク質や機能性ペプチドを融合したシルクタンパク質を含む蛍光シルク等の機能性シルクを生産するための従来技術では、FibHにおいて中央部分に位置するリピート配列部分を目的タンパク質で置換する方法や、FibLのC末端に目的タンパク質を融合させる方法が知られている。しかしながら従来技術では発現量が低いことや目的タンパク質の活性が失われるといった問題があった。

本発明者らは、セリシン遺伝子やフィブロイン遺伝子等のシルク遺伝子におい

てシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に目的遺伝子をノックインすることによって、ペプチドペプチドと、内在性シルク遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質からシグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質との間に目的タンパク質を融合すれば、内在性シルク遺伝子が有するプロモーター活性やエンハンサー活性をそのまま利用して、目的タンパク質が融合したシルクタンパク質を高発現できる可能性があることを着想した。

そこで本実施例では、上述の実施例と同様にシグナルペプチドをコードするエクソン配列の 5' 末端側に位置するイントロン配列内にゲノム切断位置を設計して相同組換え法を適用することによって、融合シルクタンパク質を発現するノックイン系統を作製する。

#### (方法と結果)

本実施例では、内在性のシルク遺伝子においてシグナルペプチドをコードするエクソン配列中に、シグナルペプチドの C 末端側に融合される目的タンパク質として EGFP タンパク質をコードする目的遺伝子をノックインする。目的遺伝子のノックインには相同組換え法を使用し、標的エクソン配列の 5' 末端側に隣接するイントロン配列をゲノム編集酵素 TALEN で切断する (図 10)。なお、本実施例では、目的遺伝子である EGFP 遺伝子配列は 3' 末端側に終止コドンを含まず、EGFP タンパク質は、シルクタンパク質 (内在性シルク遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質からシグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質) とインフレームに連結される点で、上述の実施例 1~4 とは異なる。

フィブロイン L (FibL) 遺伝子及びセリシン 1 (Ser1) 遺伝子へのノックインに用いるドナー核酸は、以下の方法により作製した。

#### (1) EGFP-FibL ドナー核酸

実施例 1 の (3) に記載の相同組換え法において、実施例 1 に記載の SP(FibL)-EGFP ドナー核酸から転写終結配列及びマーカ遺伝子を除去し、EGFP タンパク質の C 末端アミノ酸残基が、シグナルペプチドが切断された後の FibL の N 末端アミノ酸残基と融合し得るように EGFP 遺伝子配列及び第 2 のゲノム相同配列を改変して相同組換え用のドナー核酸 (二本鎖環状 DNA) を構築した (以下、「EGFP-FibL ドナー核酸」という)。内在性 FibL 遺伝子におけるゲノム切

断位置、Left TALEN 及び Right TALEN、第 1 のゲノム相同配列、TALEN 認識配列等の構成は、実施例 1 に準じた。構築したドナー核酸において、TALEN 認識配列及び第 1 のゲノム相同配列から第 2 のゲノム相同配列及び制限酵素認識配列までの塩基配列は、配列番号 15 で示す SP(FibH)-EGFP ドナー核酸において、1821 位  
5 ~1823 位の終止コドン TAA が欠失したものである。また、ノックイン後の遺伝子によってコードされる、EGFP の N 末端側に FibL のシグナルペプチドが融合し、EGFP の C 末端側にシグナルペプチド切断後の成熟型 FibL タンパク質が融合した EGFP-FibL 前駆体タンパク質は配列番号 29 で示すアミノ酸配列からなる。EGFP-FibL 前駆体タンパク質からシグナルペプチドが切断されて生じる EGFP-  
10 FibL 成熟型タンパク質は配列番号 30 で示すアミノ酸配列からなる。

#### (2) EGFP-Ser1 ドナー核酸

実施例 1 の (4) に記載の相同組換え法において、実施例 1 に記載の SP(Ser1)-EGFP ドナー核酸から転写終結配列及びマーカー遺伝子を除去し、EGFP タンパク質の C 末端アミノ酸残基が、シグナルペプチドが切断された後の成熟型  
15 Ser1 の N 末端アミノ酸残基と融合し得るように EGFP 遺伝子配列及び第 2 のゲノム相同配列を改変して相同組換え用のドナー核酸 (二本鎖環状 DNA) を構築した (以下、「EGFP-Ser1 ドナー核酸」という)。内在性 Ser1 遺伝子におけるゲノム切断位置、Left TALEN 及び Right TALEN、第 1 のゲノム相同配列、TALEN 認識配列等の構成は、実施例 1 に準じた。構築したドナー核酸において、制限酵素認  
20 識配列及び第 1 のゲノム相同配列から第 2 のゲノム相同配列及び制限酵素認識配列までの塩基配列は、配列番号 18 で示す SP(Ser1)-EGFP ドナー核酸において、2841 位~2843 位の終止コドン TAA が欠失したものである。また、ノックイン後の遺伝子によってコードされる、EGFP の N 末端側に Ser1 のシグナルペプチドが融合し、EGFP の C 末端側にシグナルペプチド切断後の成熟型 Ser1 タンパク質が  
25 融合した EGFP-Ser1 前駆体タンパク質は配列番号 31 で示すアミノ酸配列からなる。EGFP-Ser1 前駆体タンパク質からシグナルペプチドが切断されて生じる EGFP-Ser1 成熟型タンパク質は配列番号 32 で示すアミノ酸配列からなる。

上記 (1) 及び (2) で作製した各ドナー核酸を実施例 1 の (3) 及び (4) に記載の方法に準じてカイコ卵に TALEN をコードする mRNA と共にインジェクシ

ョンして、ノックイン系統を作製した。以下、それぞれ「EGFP-FibL ノックイン系統」及び「EGFP-Ser1 ノックイン系統」という。また、このノックイン後のFibL 遺伝子及び Ser1 遺伝子をそれぞれ「EGFP-FibL ノックイン遺伝子」及び「EGFP-Ser1 ノックイン遺伝子」という。

- 5 上記マイクロインジェクションを行った胚から発生した個体では、営繭不良や交尾不良が認められなかった。

<実施例 6 : EGFP タンパク質及びシルクタンパク質を含む融合タンパク質の生産>

(目的)

- 10 実施例 5 で作製したノックイン系統を用いて EGFP タンパク質及びシルクタンパク質を含む融合タンパク質を生産する。

(方法と結果)

- 15 実施例 2 に記載の方法に準じて、実施例 5 で作製した各ノックイン系統から中部絹糸腺及び後部絹糸腺を摘出し、各絹糸腺中のタンパク質を抽出した。続いて、実施例 3 の (2) に記載の方法に準じてウエスタンブロッティングを実施した。なお、本実施例では、検出用抗体として Peroxidase Conjugate 抗 GFP 抗体 (4000 倍希釈、ROCKLAND 社製、製品番号 600-103-215) を使用した。また、本実施例では対照群として、実施例 1 (4) で作製した SP (Ser1)-EGFP ノックイン系統、及び w1-pnd 系統を使用した。

- 20 ウエスタンブロッティングの結果を図 11 に示す。EGFP-FibL ノックイン系統では EGFP-FibL 成熟型タンパク質が検出された (図 11A)。EGFP-Ser1 ノックイン系統では EGFP-Ser1 成熟型タンパク質が検出された (図 11B)。

<実施例 7 : ノックイン遺伝子のホモ接合体>

(目的)

- 25 EGFP-FibL ノックイン遺伝子をホモ接合で含む個体を作製し、営繭させる。

(方法と結果)

EGFP-FibL ノックイン遺伝子をヘテロ接合で含む EGFP-FibL ノックイン系統同士を交配して、EGFP-FibL ノックイン遺伝子をホモ接合で含む個体を作製した。作製したホモ接合体及びヘテロ接合体に営繭させて得られた繭を通常の白色光下

で撮影した写真を図 12 に示す。ホモ接合体は非常に鮮やかな黄緑色を示した。

文献 (Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35: 51-59) に記載の方法により piggyBac の系を利用して作出された蛍光繭は、従来技術の中で最も強い蛍光を有することが知られている。野生型カイコの繭、piggyBac の系を用いて作出した FibL 融合 EGFP 繭、並びに上記のヘテロ接合体及びホモ接合体により生産された繭を並べて白色光下又は蛍光観察した結果を図 13 に示す。なお、蛍光観察では、青色光で励起して EGFP フィルターを用いて蛍光を検出した。piggyBac の系を用いて作出した FibL 融合 EGFP 繭と比較して、本発明の方法で作出した EGFP-FibL ノックイン系統のヘテロ接合体は強い蛍光を示し、ホモ接合体は圧倒的に強い蛍光を示すことが明らかになった。

<比較例 1 : ゲノム切断位置をエクソン配列中に設計する場合のノックイン系統作製>

(目的)

イントロン配列ではなくエクソン配列内にゲノム切断位置を設けて、相同組換え法によりフィブロイン H 遺伝子に EGFP 遺伝子をノックインする。ノックイン系統の作製効率について、イントロン配列内でゲノムを切断する場合と比較する。

(方法と結果)

実施例 1 における (2) に記載の相同組換え法においてゲノム切断位置を FibH 遺伝子の第 2 エクソン内に設定するように方法を改変して、EGFP 遺伝子配列のフィブロイン H 遺伝子へのノックインを実施した。具体的には、相同組換え用ドナー核酸には第 2 エクソン内のゲノム切断位置の近傍に TALEN によって認識されないように変異を導入した。384 粒の卵に上記相同組換え用ドナー核酸を、w1-pnd 系統の産卵後 2~8 時間のカイコ卵に mMESSAGING MACHINES T7 ULTRA Transcription Kit (Invitrogen) を用いて合成した TALEN をコードする mRNA と共にインジェクションした。インジェクション後の卵は、加湿状態、25°C で孵化するまでインキュベートした。インジェクション当代のカイコを成虫まで飼育し親系統と交配することにより、交配能力の有無を判定した。

結果を図 14B に示す。エクソン配列内でゲノムを切断する場合の相同組換え法では、5 齢幼虫まで成育した 118 頭のうち、113 頭は蛹化不全又は裸蛹や薄繭と

なり、羽化しても交配不全を示し、5 頭のみが正常な繭を生産するに至った。しかしながら、正常繭 5 個のうち交配可能な個体は 2 頭のみであり、雌 2 頭中 1 頭のみ、雄 3 頭中 1 頭のみが交配能力を有した。エクソン配列を切断した場合に異常を生じる理由としては、注射を実施した胚ではゲノム切断位置にフレームシフト等の変異が入る結果、正常に機能するタンパク質が発現されなくなる可能性が考えられる。

この結果は、実施例 1 の (2) においてイントロン配列内でゲノムを切断した場合に営繭不良や交尾不良がほとんど認められなかった結果 (図 14A) とは対照的であり、実施例 1 に記載の方法でノックインカイクシステムを作出する方法が圧倒的に高い効率でノックインシステムを作出できることを示している。これは、イントロン配列においては多少の変異が入ったとしても正常なタンパク質の発現への影響は軽微であるためと考えられる。

#### 産業上の利用可能性

15 本発明によれば、カイク等のチョウ目昆虫において目的タンパク質を安定的かつ大量に生産することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

20

## 請求の範囲

## [請求項 1]

遺伝子組換えチョウ目昆虫であって、

- 5 内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片をコードするエクソン配列において、目的のタンパク質又はその断片をコードする目的遺伝子配列を含み、  
前記目的のタンパク質又はその断片は、前記シグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はそのC末端断片との間に融  
10 合される、前記遺伝子組換えチョウ目昆虫。

## [請求項 2]

前記成熟型タンパク質が、フィブロイン、セリシン、及び／又はフィブロヘキサマリンである、請求項 1 に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

## [請求項 3]

- 15 前記フィブロインが、フィブロインH鎖及び／又はフィブロインL鎖である、  
請求項 2 に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

## [請求項 4]

- 前記目的のタンパク質が、蛍光タンパク質、抗体、抗原ポリペプチド、酵素、  
サイトカイン、及び抗菌ポリペプチドからなる群から選択される、請求項 1 に記  
20 載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

## [請求項 5]

前記目的遺伝子配列を含む前記エクソン配列をホモ接合で含む、請求項 1 に記  
載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。

## [請求項 6]

- 25 遺伝子組換えチョウ目昆虫を相同組換え法を用いて作出するためのドナー核酸  
であって、

前記相同組換え法は、内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位  
置をゲノム編集酵素で切断することを含み、

前記ドナー核酸は、

(a) 前記内在性遺伝子に由来する、第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列、並びに

(b) その間に配置された目的遺伝子配列を含み、

5 前記第1のゲノム相同配列は、ゲノム上で前記ゲノム切断位置より5'末端側に位置する塩基から、前記イントロン配列の3'末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、かつ前記ゲノム編集酵素の認識配列に変異を有し、

10 前記第2のゲノム相同配列は、ゲノム上で前記エクソン配列又はその部分配列の3'末端側に位置するゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はそのC末端断片との間に融合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記ドナー核酸。

15 [請求項7]

遺伝子組換えチョウ目昆虫を相同組換え法を用いて作出するためのドナー核酸であって、

前記相同組換え法は、内在性遺伝子においてイントロン配列内のゲノム切断位置をゲノム編集酵素で切断することを含み、

20 前記ドナー核酸は、

(a) 前記内在性遺伝子に由来する、第1のゲノム相同配列及び第2のゲノム相同配列、並びに

(b) その間に配置された目的遺伝子配列を含み、

25 前記第1のゲノム相同配列は、前記イントロン配列より5'末端側に位置する塩基から前記イントロン配列の5'末端側に位置するエクソン配列又はその部分配列までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、

前記第2のゲノム相同配列は、前記エクソン配列又はその部分配列より3'末端側かつ前記ゲノム切断位置より5'末端側に位置する塩基から、前記ゲノム切

断位置より 3' 末端側に位置する塩基までのゲノム配列に対して相同な塩基配列からなり、かつ前記ゲノム編集酵素の認識配列に変異を有し、

前記目的遺伝子配列は、前記内在性遺伝子のシグナルペプチド又はその機能性断片と、前記内在性遺伝子によってコードされる前駆体タンパク質から前記シグナルペプチドが切断されてなる成熟型タンパク質又はその C 末端断片との間に融合される目的のタンパク質又はその断片をコードする、前記ドナー核酸。

[請求項 8]

前記第 1 のゲノム相同配列及び／又は前記第 2 のゲノム相同配列の前記目的遺伝子配列とは反対側の末端に、ヌクレアーゼ認識配列を含む、請求項 6 又は 7 に記載のドナー核酸。

[請求項 9]

前記ヌクレアーゼ認識配列が、前記ゲノム編集酵素の認識配列、又は制限酵素認識配列である、請求項 8 に記載のドナー核酸。

[請求項 10]

15 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法であって、  
請求項 6 又は 7 に記載のドナー核酸、及び

前記ゲノム編集酵素又は前記ゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸

をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する導入工程

20 を含む、前記方法。

[請求項 11]

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫を用いて、前記目的のタンパク質又はその断片、及び前記成熟型タンパク質又はその C 末端断片を含む融合タンパク質を生産する方法。

25 [請求項 12]

前記チョウ目昆虫が絹糸虫であり、前記融合タンパク質が前記絹糸虫の絹糸腺において生産される、請求項 11 に記載の方法。

[請求項 13]

N 末端側から順に、

目的のタンパク質又はその断片、及び  
フィブロイン、セリシン、又はフィブロヘキサマリン  
を含む、融合タンパク質。

[請求項 1 4]

- 5 前記フィブロインが、フィブロイン H 鎖及び／又はフィブロイン L 鎖である、  
請求項 1 3 に記載の融合タンパク質。

[請求項 1 5]

請求項 1 3 に記載の融合タンパク質を含む、繭又は絹糸。

[請求項 1 6]

- 10 繭又は絹糸であって、  
前記繭又は絹糸に含まれる、フィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖、セリシン  
1、セリシン 2、セリシン 3、及びフィブロヘキサマリンからなる群から選択され  
るいずれか一以上のシルクタンパク質が、請求項 1 3 に記載の融合タンパク質か  
らなる、前記繭又は絹糸。

- 15 [請求項 1 7]

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫に由来する、  
請求項 1 6 に記載の繭又は絹糸。

[請求項 1 8]

- 20 前記目的のタンパク質が、蛍光タンパク質、抗体、抗原ポリペプチド、酵素、  
サイトカイン、及び抗菌ポリペプチドからなる群から選択される、請求項 1 6 に  
記載の繭又は絹糸。

図 1

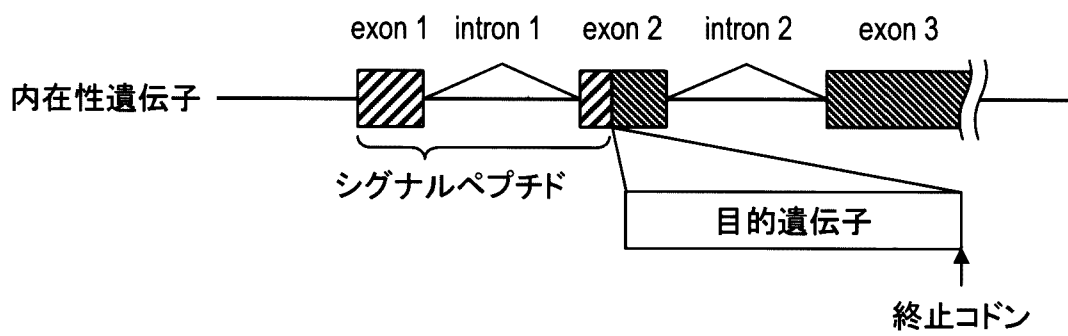


図 2

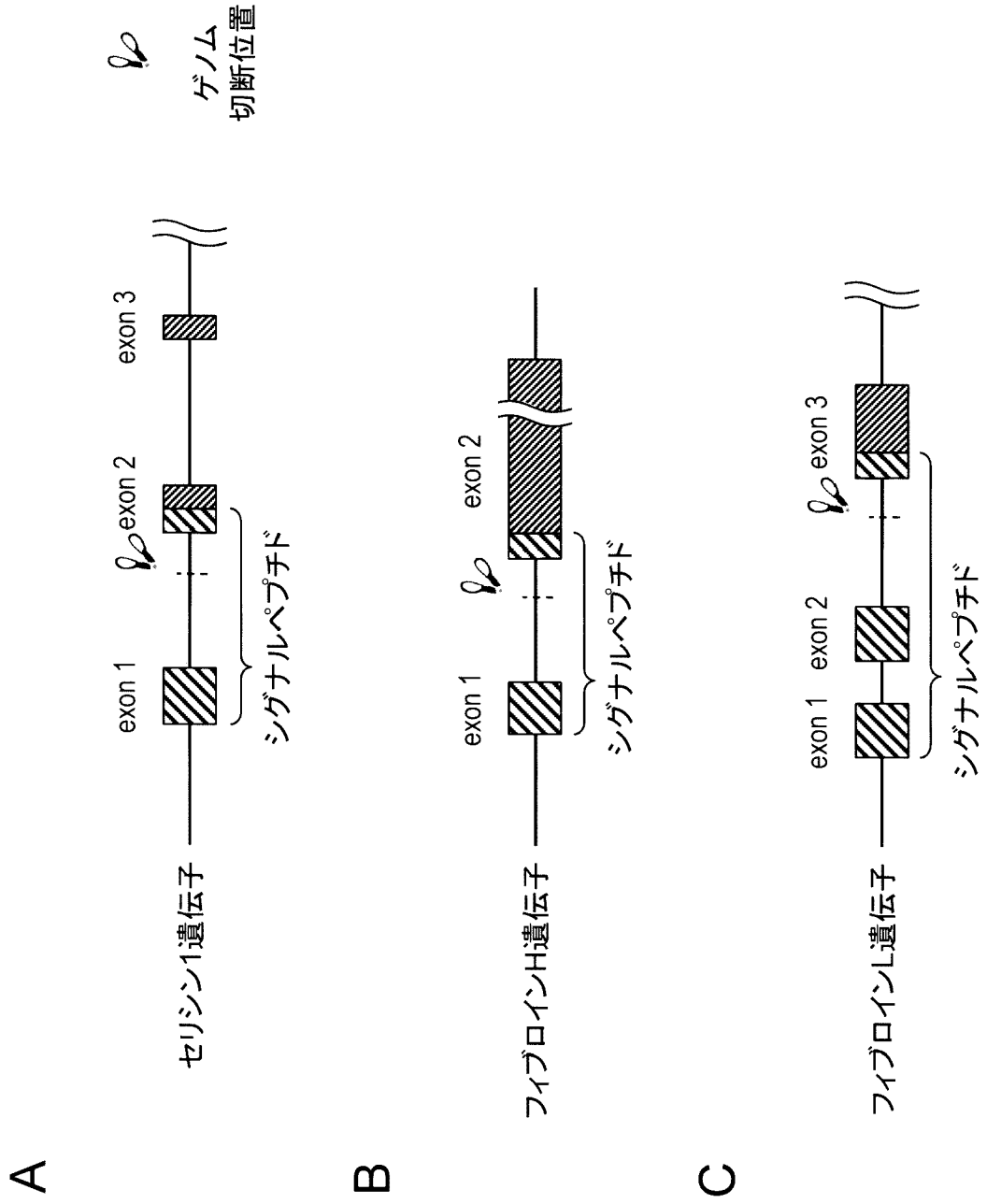
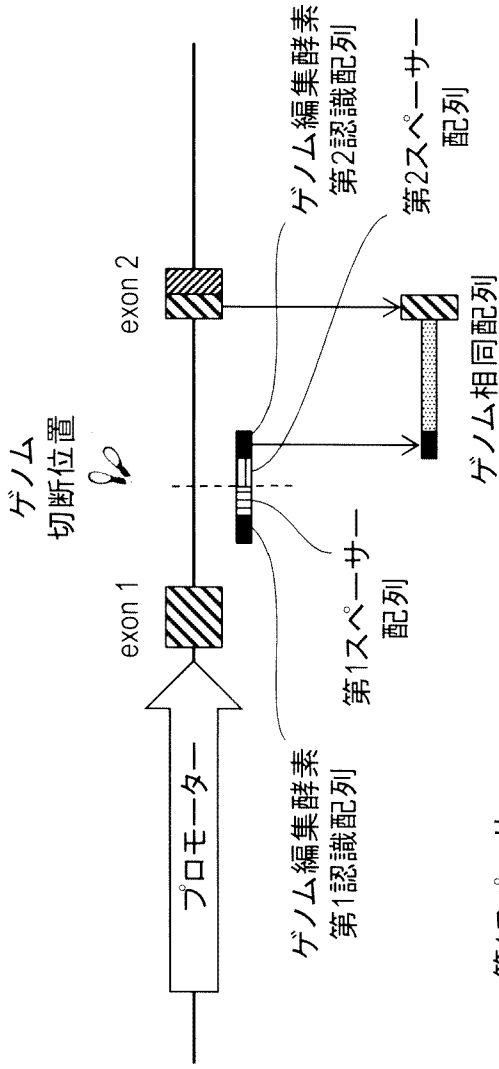
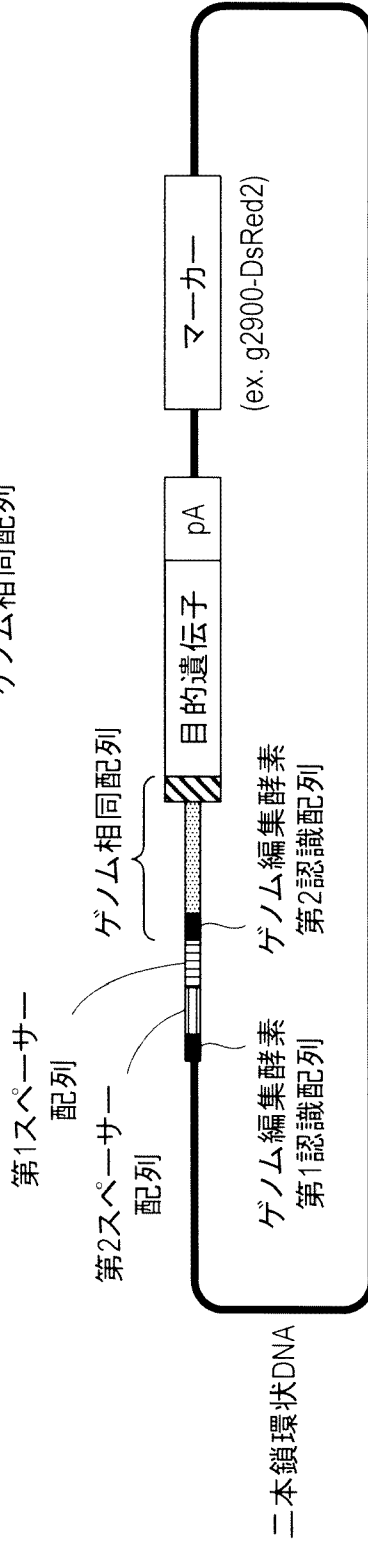


図 3

A



B



C

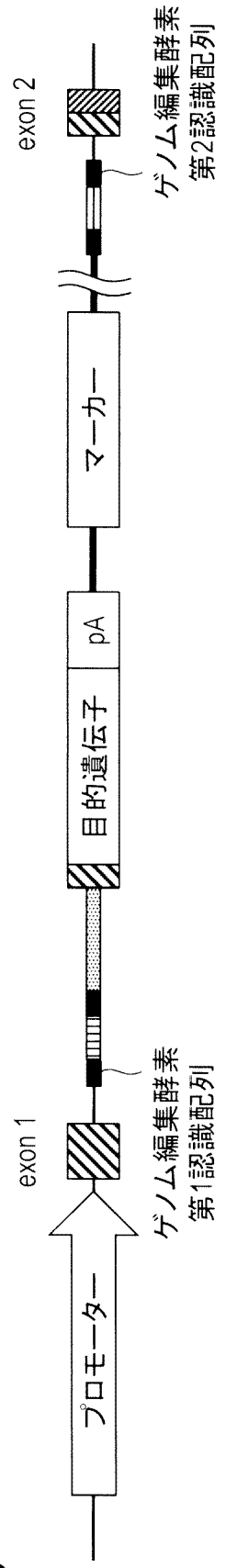


図 4

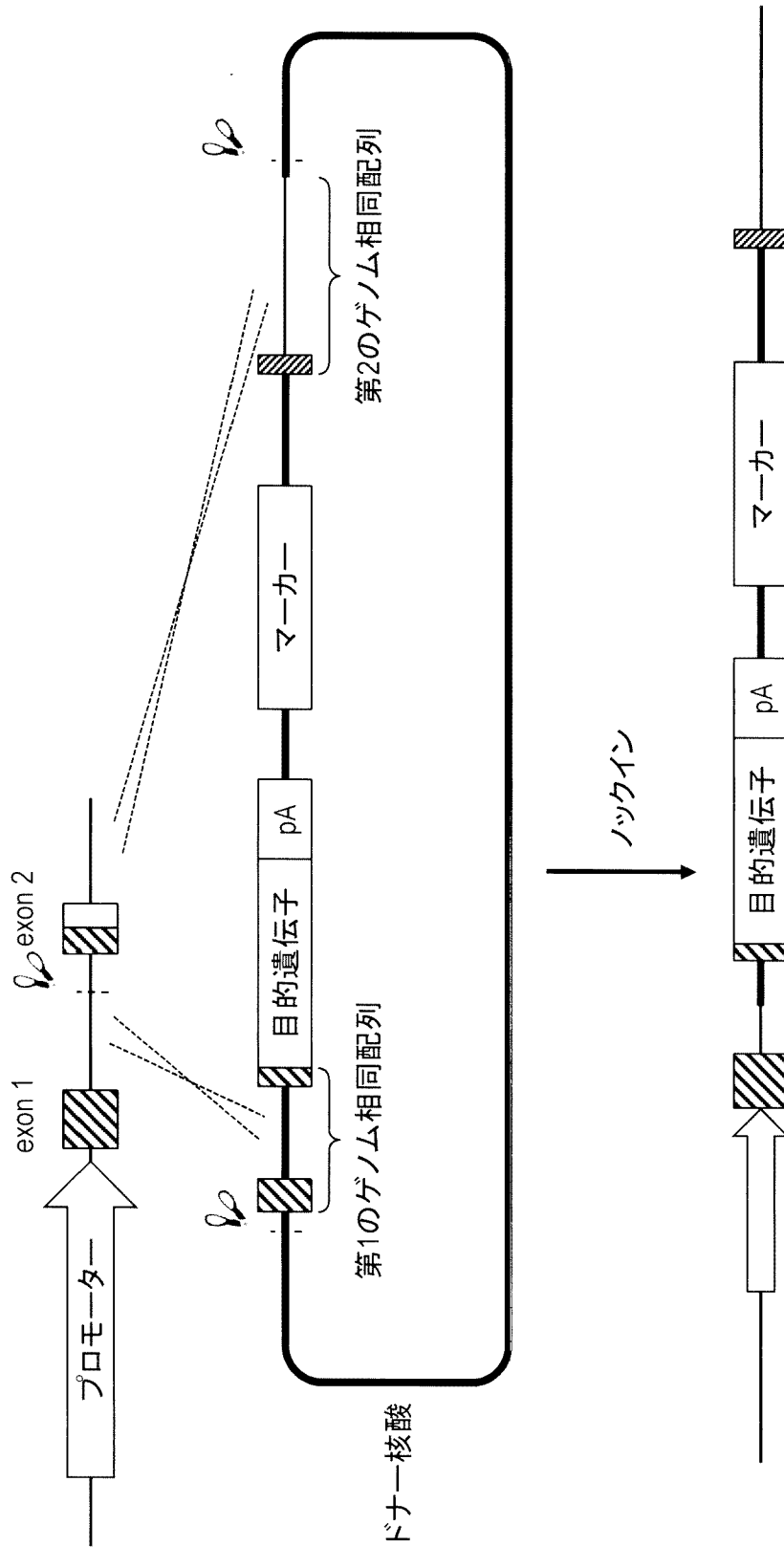
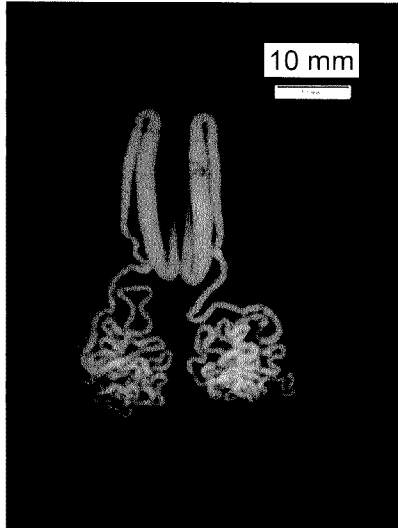


図 5

5齡絹糸腺



繭

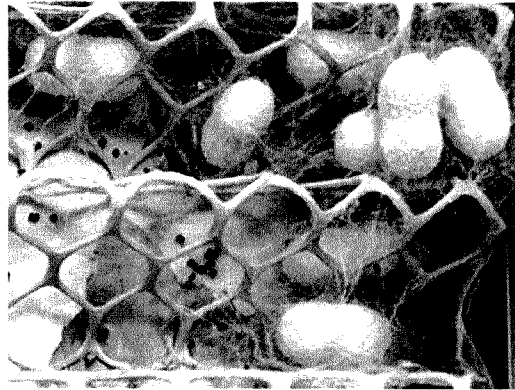


図 6

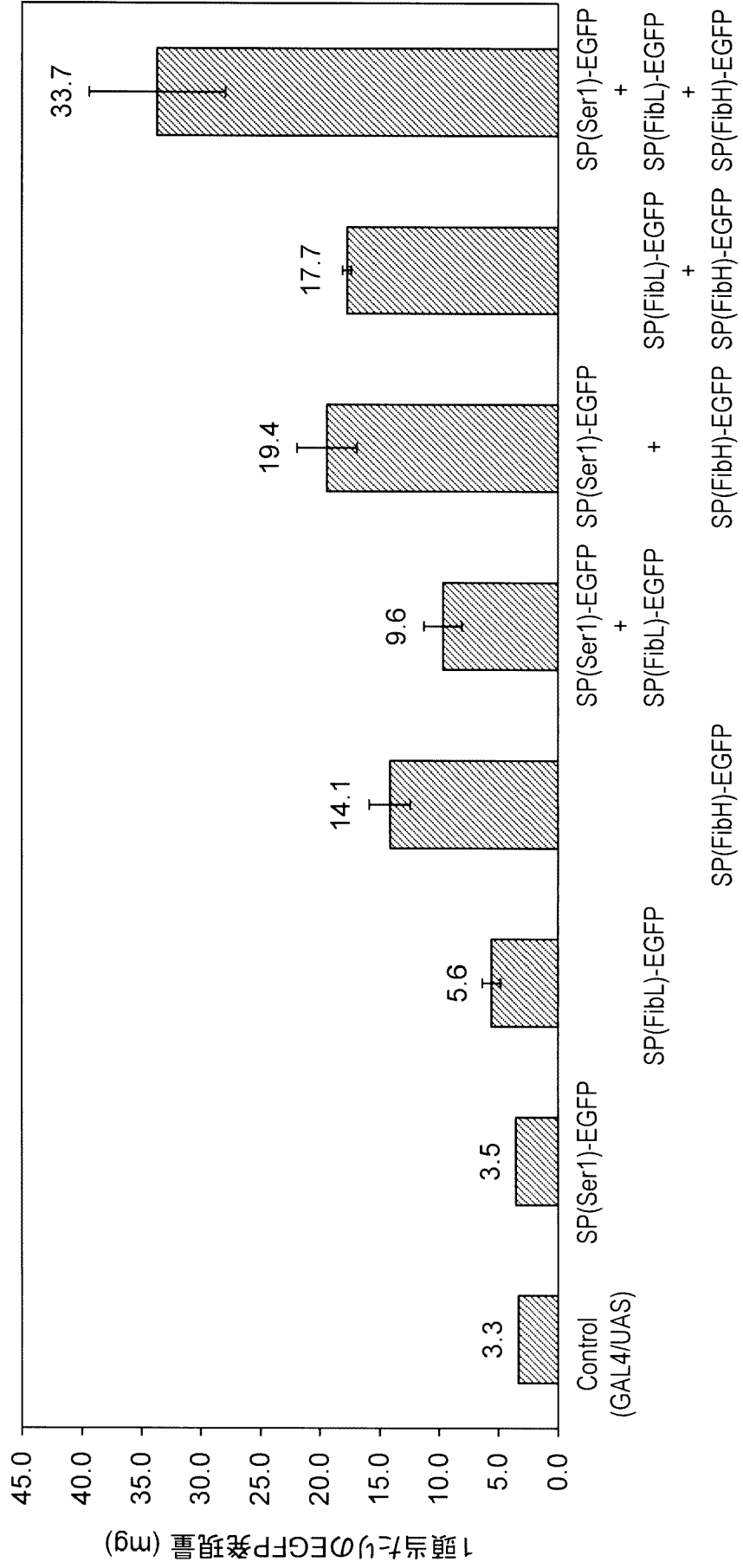
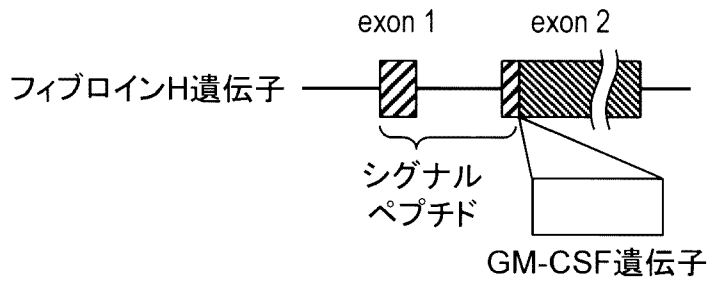


図 7

A



B

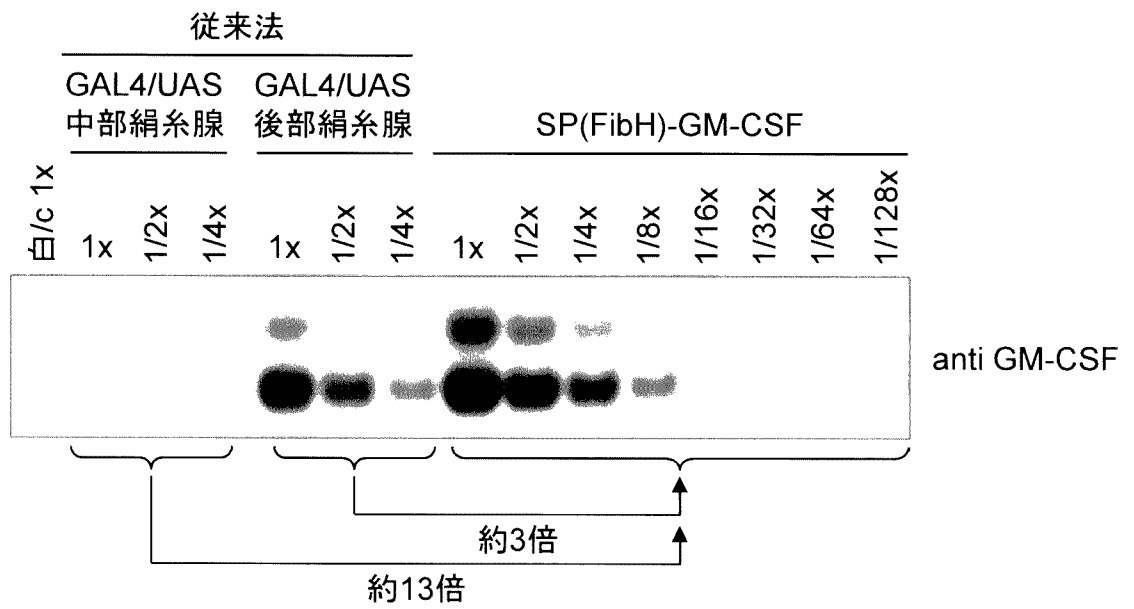
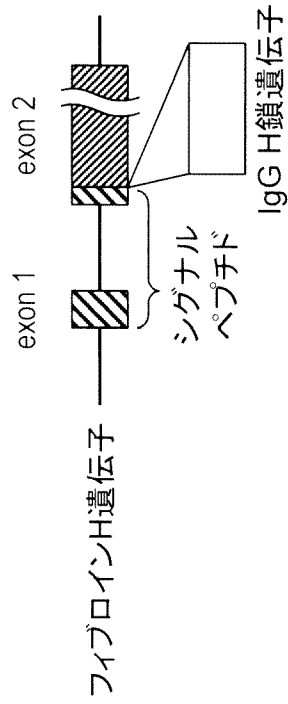
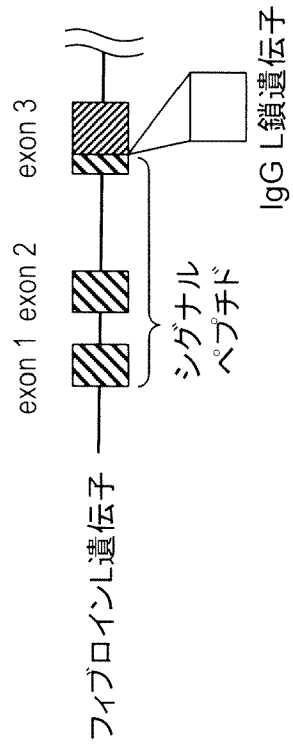


図 8

A



B



C

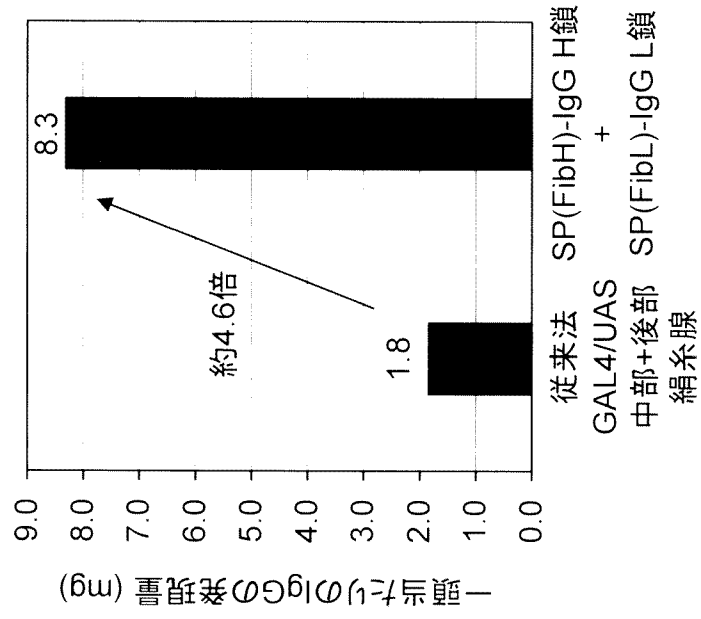


図 9

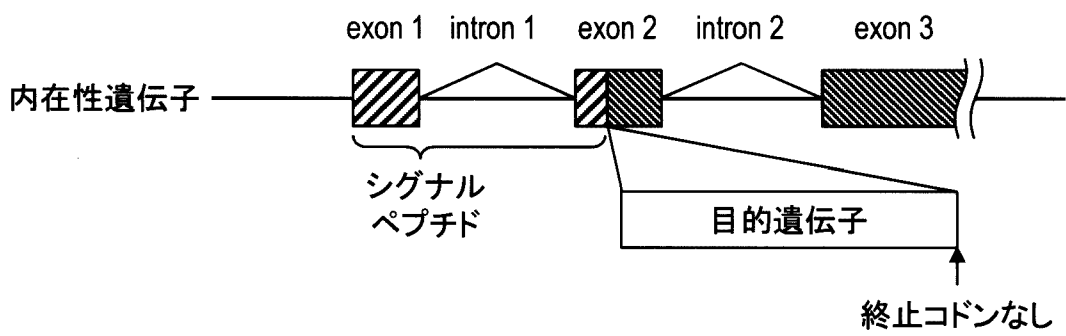


図 10

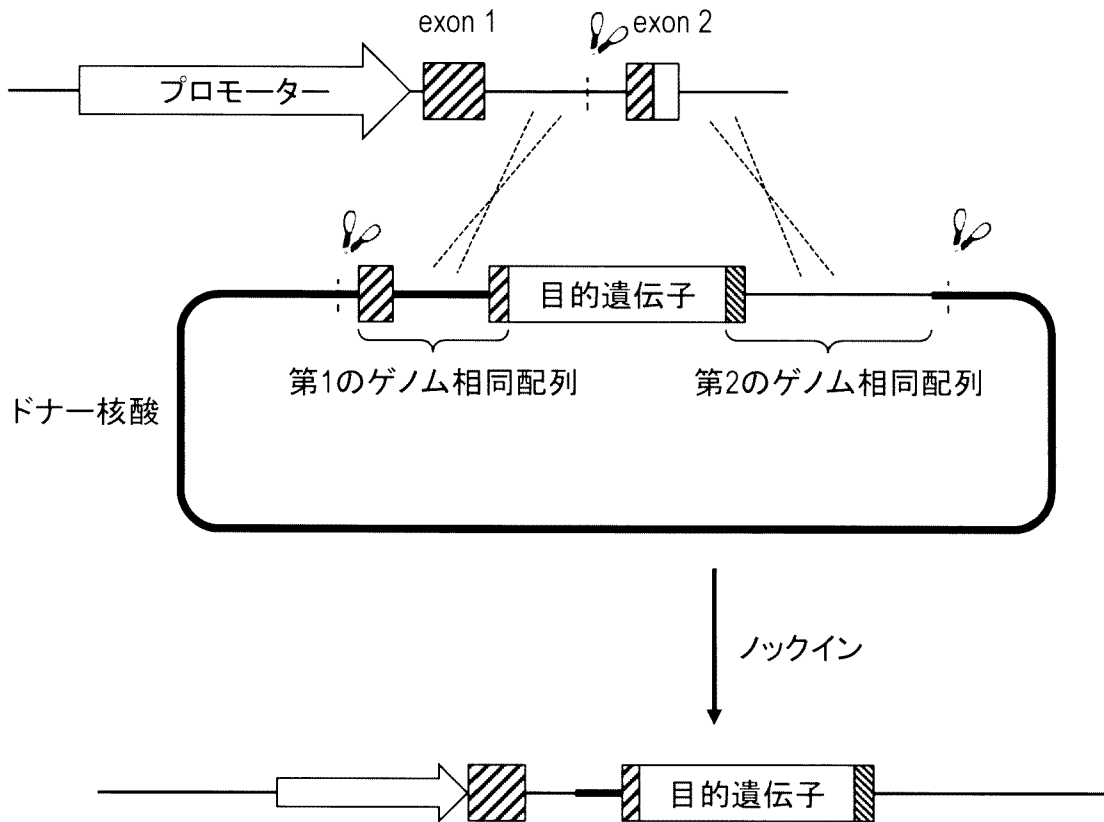
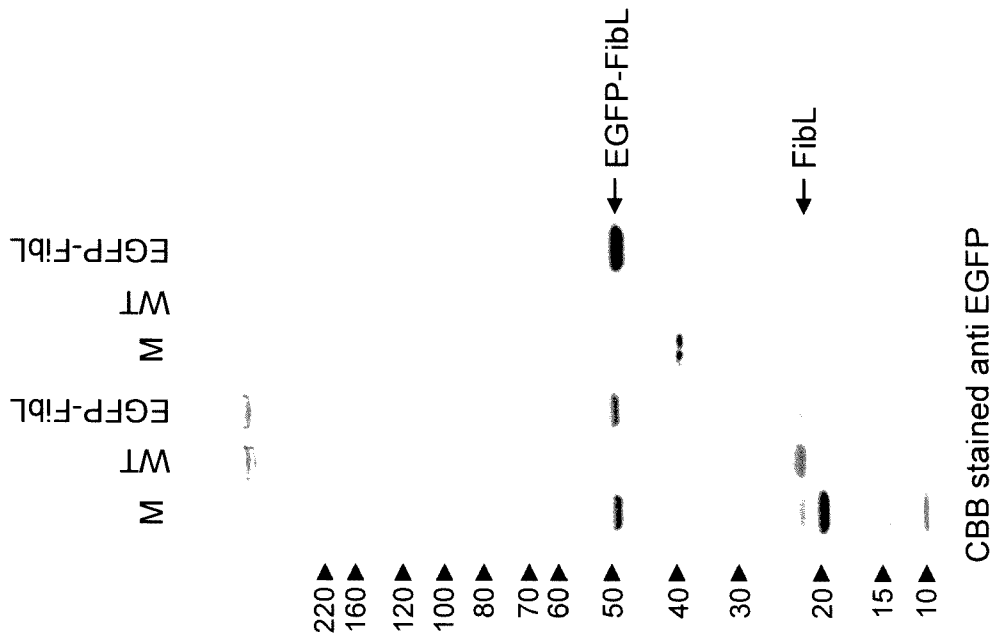


図 11

A



B

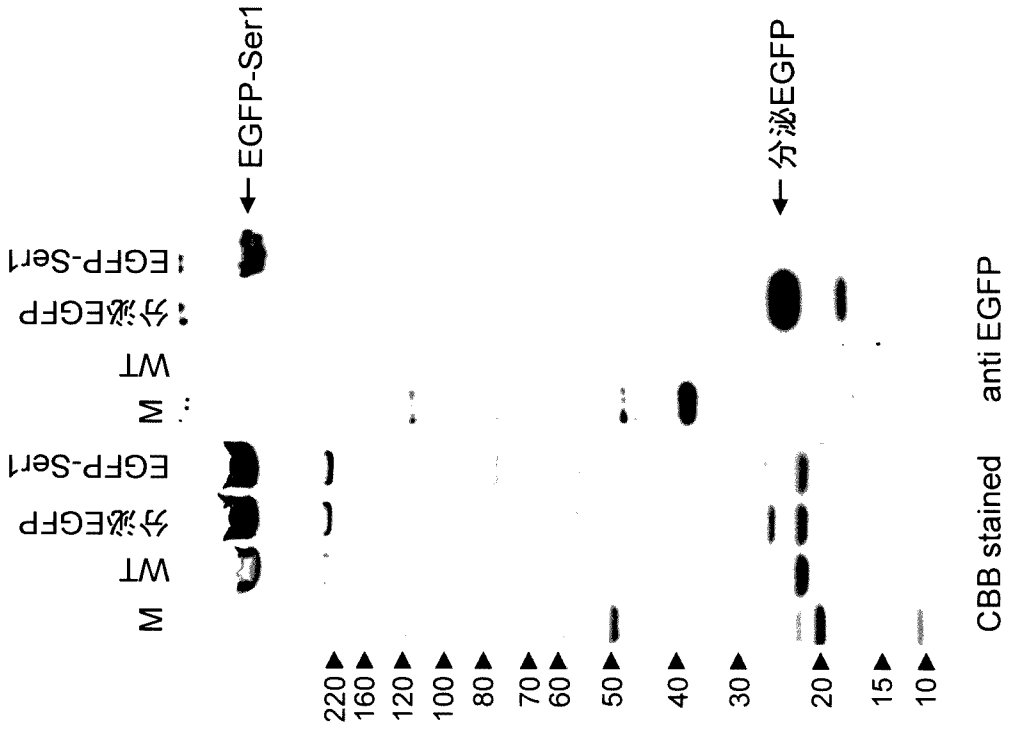


図 1 2



EGFP-フィブロインL  
ヘテロ

EGFP-フィブロインL  
ホモ

図 13

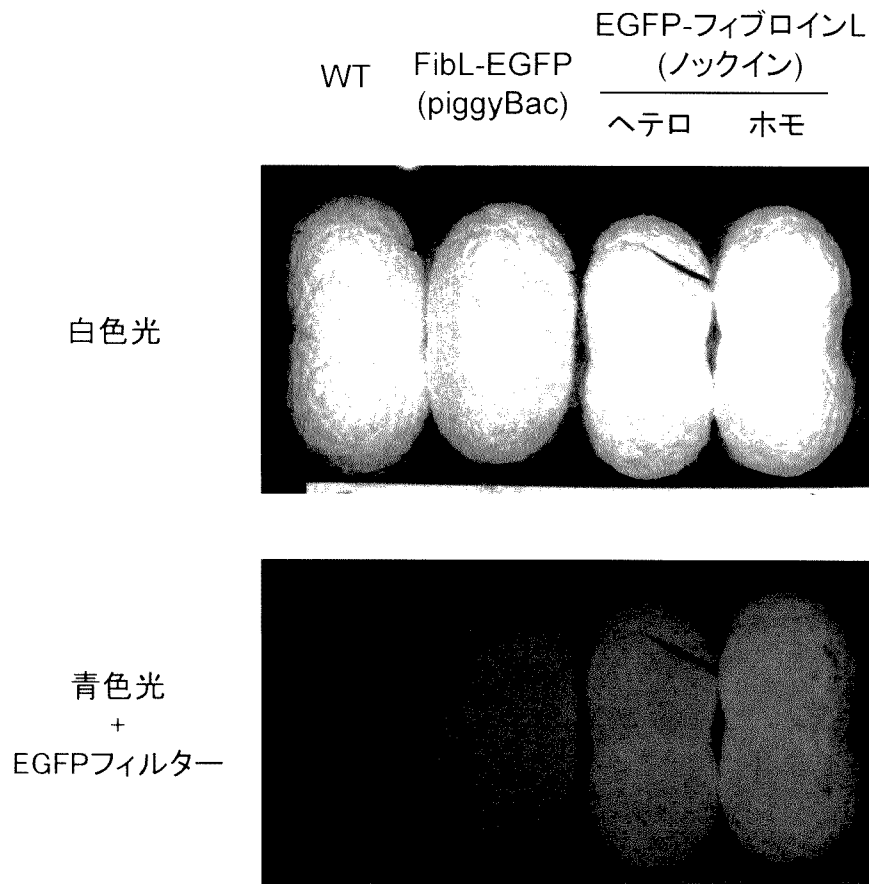
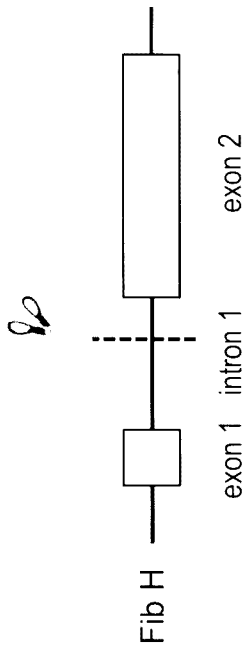


図 14

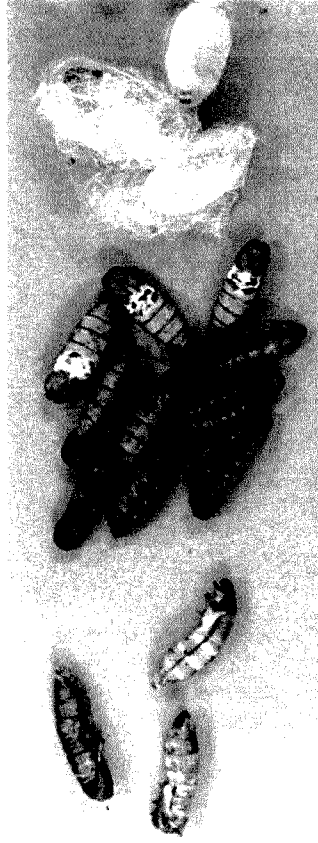
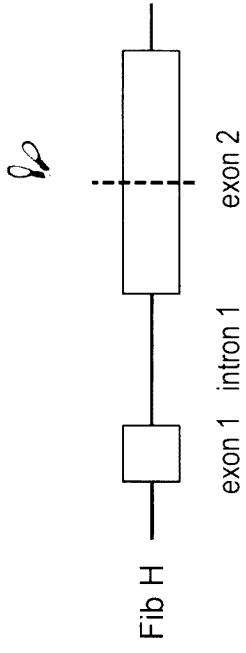
A

ゲノム切断位置: イントロン配列内



B

ゲノム切断位置: エクソン配列内



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2024/080106**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>A01K 67/033</i> (2006.01)i; <i>A01K 67/04</i> (2006.01)i; <i>C07K 19/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/62</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/02</i> (2006.01)i FI: A01K67/033 501; A01K67/04 Z; C07K19/00; C12N15/09 100; C12N15/12 ZNA; C12N15/62 Z; C12P21/02 C		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K67/033; A01K67/04; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/12; C12N15/62; C12P21/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-191523 A (NAT AGRICULTURE & FOOD RES ORG) 06 December 2018 (2018-12-06) claims 1, 4, paragraph [0034], examples, fig. 2-4	13-15
A		1-12, 16-18
A	WO 2014/104269 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) 03 July 2014 (2014-07-03) claim 1, examples 1-6, fig. 3(a)	1-18
A	JP 2002-315580 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 29 October 2002 (2002-10-29) claims 1, 4, examples	1-18
A	US 2018/0288988 A1 (UNIV UTAH STATE) 11 October 2018 (2018-10-11) examples	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>04 September 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>17 September 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2024/080106**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2022-515545 A (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 18 February 2022 (2022-02-18) claim 1, examples, fig. 1-3	1-18
A	JP 2022-516647 A (CRISP-HR THERAPEUTICS, INC.) 01 March 2022 (2022-03-01) paragraph [0095]	1-18
A	KOJIMA K., et al., A new method for the modification of fibroin heavy chain protein in the transgenic silkworm, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, vol. 71, pp. 70353-1-70353-9, ISSN:0916-8451 particularly, abstract, fig. 1, 3, 6	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/080106

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2024/080106**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2018-191523	A	06 December 2018	(Family: none)	
WO	2014/104269	A1	03 July 2014	CN	104903445 A
JP	2002-315580	A	29 October 2002	US	2007/0083940 A1 claims 1, 4, examples
				EP	1391509 A1
				WO	2002/086119 A1
				CA	2445011 A
US	2018/0288988	A1	11 October 2018	WO	2018/183946 A1
				CN	110719732 A
JP	2022-515545	A	18 February 2022	US	2021/0403924 A1 claim 1, examples, fig. 1-3
				EP	3902915 A1
				WO	2020/141109 A1
				CN	113260700 A
JP	2022-516647	A	01 March 2022	US	2021/0403922 A1 paragraph [0095]
				EP	3908659 A1
				WO	2020/146290 A1
				CN	113811611 A

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A01K 67/033(2006.01)i; A01K 67/04(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i FI: A01K67/033 501; A01K67/04 Z; C07K19/00; C12N15/09 100; C12N15/12 ZNA; C12N15/62 Z; C12P21/02 C</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A01K67/033; A01K67/04; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/12; C12N15/62; C12P21/02</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table> <p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年													
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年																						
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年																						
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2018-191523 A (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 06.12.2018 (2018-12-06) 請求項1、4、[0034]、実施例、図2-4</td> <td>13-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-12, 16-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014/104269 A1 (独立行政法人農業生物資源研究所) 03.07.2014 (2014-07-03) 請求項1、実施例1-6、図3(a)</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2002-315580 A (科学技術振興事業団) 29.10.2002 (2002-10-29) 請求項1、4、実施例</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2018/0288988 A1 (UTAH STATE UNIVERSITY) 11.10.2018 (2018-10-11) 実施例</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2022-515545 A (エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー) 18.02.2022 (2022-02-18) 請求項1、実施例、図1-3</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー          “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの          “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献          “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の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抵触するものではなく、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          “&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>			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 請求項の番号	X	JP 2018-191523 A (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 06.12.2018 (2018-12-06) 請求項1、4、[0034]、実施例、図2-4	13-15	A		1-12, 16-18	A	WO 2014/104269 A1 (独立行政法人農業生物資源研究所) 03.07.2014 (2014-07-03) 請求項1、実施例1-6、図3(a)	1-18	A	JP 2002-315580 A (科学技術振興事業団) 29.10.2002 (2002-10-29) 請求項1、4、実施例	1-18	A	US 2018/0288988 A1 (UTAH STATE UNIVERSITY) 11.10.2018 (2018-10-11) 実施例	1-18	A	JP 2022-515545 A (エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー) 18.02.2022 (2022-02-18) 請求項1、実施例、図1-3	1-18
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 請求項の番号																					
X	JP 2018-191523 A (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 06.12.2018 (2018-12-06) 請求項1、4、[0034]、実施例、図2-4	13-15																					
A		1-12, 16-18																					
A	WO 2014/104269 A1 (独立行政法人農業生物資源研究所) 03.07.2014 (2014-07-03) 請求項1、実施例1-6、図3(a)	1-18																					
A	JP 2002-315580 A (科学技術振興事業団) 29.10.2002 (2002-10-29) 請求項1、4、実施例	1-18																					
A	US 2018/0288988 A1 (UTAH STATE UNIVERSITY) 11.10.2018 (2018-10-11) 実施例	1-18																					
A	JP 2022-515545 A (エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー) 18.02.2022 (2022-02-18) 請求項1、実施例、図1-3	1-18																					
<p>国際調査を完了した日</p> <p>04.09.2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>17.09.2024</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>藤澤 雅樹 4B 5802</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																						

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 請求項の番号
A	JP 2022-516647 A (クリスプーエイチアール セラピューティクス, インコーポレイテッド) 01.03.2022 (2022 - 03 - 01) [0095]	1-18
A	KOJIMA K., et al., A new method for the modification of fibroin heavy chain protein in the transgenic silkworm, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, Vol.71, pp.70353-1-70353-9, ISSN:0916-8451 特に要約、図1、3、6	1-18

第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b.  国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）  
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2.  この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/080106

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-191523 A	06.12.2018	(ファミリーなし)	
WO 2014/104269 A1	03.07.2014	CN 104903445 A	
JP 2002-315580 A	29.10.2002	US 2007/0083940 A1 請求項1、4、実施例	
		EP 1391509 A1	
		WO 2002/086119 A1	
		CA 2445011 A	
US 2018/0288988 A1	11.10.2018	WO 2018/183946 A1	
		CN 110719732 A	
JP 2022-515545 A	18.02.2022	US 2021/0403924 A1 請求項1、実施例、図1-3	
		EP 3902915 A1	
		WO 2020/141109 A1	
		CN 113260700 A	
JP 2022-516647 A	01.03.2022	US 2021/0403922 A1 [0095]	
		EP 3908659 A1	
		WO 2020/146290 A1	
		CN 113811611 A	