

(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 2025/013739 A1

(51) 国際特許分類:

A01K 67/033 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

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, 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.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/024180

(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 2023-114730 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).

(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).

(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).

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))

(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MOR1タワー32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,

(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 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.

(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。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。

WO 2025/013739 A1

明 細 書

発明の名称： 遺伝子組換えチョウ目昆虫

技術分野

[0001] 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

[0002] 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。

[0003] 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に発現する遺伝子発現系を利用すればよい。

[0004] 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。

[0005] 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とを組み合わせ利用す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系統と、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系統とをpiggyBacを用いた遺伝子組換えにより独立に樹立した後、両系統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。

[0006] GAL4/UASシステムでは、GAL4系統とUAS系統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わり得る点や、新たなGAL4系統及びUAS系統を樹立する際の障害となっている。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。

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が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 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.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 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。

課題を解決するための手段

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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、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。

[0012] (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

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

、

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、

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、

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。

(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。

(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、
(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。

(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。

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2023-114730号の
開示内容を包含する。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、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ことができる。

図面の簡単な説明

[0014] [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。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]ノックインシステムの作製において、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]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9A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9B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

[0015] 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。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。

[0016] 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)、シャクガ (Geometridae)、ヒトリガ科 (Archtiidae)、ヤガ科 (Noctuidae)、メイガ科 (Pyralidae)、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)、ヤマユガ (*Antheraea yamamai*)、サクサン (*Antheraea pernyi*)、ヒメヤマユ (*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。

[0017] 「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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 「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。

[0022] 「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。

[0023] 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KAIK0baseやKAIK0cDNA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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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

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KAIK0cDNA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。

[0027] 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。

[0028] 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、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 α （TNF- α ）、トランスフォーミング成長因子 β （TGF- β ）等）、転写因子（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）であってもよい。蛍光タ

ンパク質は制限されず、例えばCFP、AmCyan、RFP、DsRed、YFP、GFP（EGFP、EYFP等の派生物を含む）であってもよい。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ってもよい。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ってもよい。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ってもよい。

[0029] 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、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。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%以上であってもよい。

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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存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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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、内在性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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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～2034位である。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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～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。

[0048] 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。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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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内在性遺伝子に導入されていてもよい。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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 int

egration 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 「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。

[0058] 「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。

[0059] 「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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 2-4. 効果

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。

[0070] 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。

[0071] 3. ドナー核酸

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ノックインに使用することができる。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] (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。

[0077] 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。

[0078] (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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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、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。

[0086] 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。

[0087] (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。

[0088] (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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] (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。

[0094] 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。

[0095] 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

5-1. 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。

[0096] 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。

[0097] (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。

[0098] 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してもよい。飼育温度は、全齢を通して25~28℃で飼育する。

[0099] (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。

[0100] 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、蛹化期に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。

[0101] 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、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。

[0102] 終齢後期~前蛹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（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。

[0103] 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。

実施例

[0104] <実施例1：有用タンパク質生産のためのノックイン系統の作製>

(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系統と、制御配列UASの制御下で目的遺伝子を発現するUAS系統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。

[0105] GAL4/UASシステムでは、GAL4系統とUAS系統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の変動し、予想が難しい。そのため、多数の系統を作製した後に、GAL4系統とUAS系統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系統を選別する必要がある。

[0106] そこで本発明者らは、目的遺伝子配列を内在性遺伝子にノ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

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ノックインすれば、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。

[0107] しかしながら、内在性遺伝子への効率的なノ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。

[0108] 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ノ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、この方法では系統を樹立することが極めて困難である。

[0109] 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ノ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。

[0110] (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 nuclease) で切断する(図2)。なお、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(図1)。

[0111] 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 targe

ting, 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)を用いて合成した。

[0112] (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遺伝子配列を第2エクソンに導入した。

[0113] 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位の間的位置、図2A）をゲノム切断位置とし、TAL-PITCh法に用いるドナー核酸として図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）。

[0114] 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スペーサー配列は、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スペーサー配列の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スペーサー配列の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)。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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）。

[0119] (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。

[0120] 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位の間的位置、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。

[0121] 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AACTTCGATTGAATGTGCGAAATTTATAGCTCAATATTTAGCACTTATCGTATTGATTT（配列番号33）が塩基配列AtCTaCGATTGAAaGaGCGtAATTATAGCTCAATATTTTAtGcTcaTAaCGTATTGATTT（配列番号34）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15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14で示すアミノ酸配列からなる(以下、上記(1)と同様に「SP(FibH)-EGFP融合タンパク質」と表記する)。

[0122] 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、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。

[0123] 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。

[0124] (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。

[0125] 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)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(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TALEN認識配列を含む。

[0126] 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。

[0127] 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位に位置する塩基配列CCCGAGAAAACAATTTGTTGTGTATAATTTAAACCAAAACCCGAATTTAATTTTTTCGC（配列番号35）が塩基配列CCCGAGAAAAGAATTcGTTcTGTATAATTTAAACCAAAAttCGAATTTAATTTTTTCGC（配列番号36）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16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）。

[0128] 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℃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、ノックインカイクシステムを得た。以下、得られたノックインシステムを上記（１）と同様に「SP(FibL)-EGFPノックインシステム」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）と同様に営巣不良や交尾不良が認められなかった。

[0129] （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

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。

[0130] 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）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。

[0131] 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。

[0132] 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

する塩基配列TATATTGTAAAGCACAAACATATATATTAATGAATTTTTTATTTATTTTTTC（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、「SP(Ser1)-EGFP融合タンパク質」と称する）。

[0133] 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。

[0134] 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。

[0135] <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。

[0136] (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。

[0137] 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。

[0138] (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）。

[0139] (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、1 N 硫酸を加えて反応を停止させた。発色をplate reader (SpectraMax iD3; M

olecular 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/ μ L) を用いて標準曲線を作製した。

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。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] <実施例3 : GM-CSFタンパク質の生産>

(目的)

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。

[0144] (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)。

[0145] 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、「後部絹糸腺GM-CSF産生GAL4/UAS系統」という)を対照群として使用した。

[0146] (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 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。

[0147] 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

[0148] <実施例4：抗体の生産>

(目的)

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。

[0149] (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23で示す塩基配列からなり、配列番号24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25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)。

[0150] 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26で示す塩基配列からなり、配列番号27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）。

[0151] 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）。

[0152] 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。

[0153] (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。

[0154] 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。

[0155] <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

インシステム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。

[0156] (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mMESSAGE mMACHINE 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。

[0157] 結果を図9B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。

[0158] 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9A)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コ系統を作出する方法が圧倒的に高い効率でノックイン系統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。

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。

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、
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。
- [請求項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、請求項1に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。
- [請求項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、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
をコードする、請求項1に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。
- [請求項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、請求項1に記載の遺伝子組換えチョウ目昆虫。
- [請求項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、
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。

[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、

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。

[請求項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、

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、

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。

[請求項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、請求項7又は8に記載のドナー核酸。

[請求項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、請求項9に記載のドナー核酸。

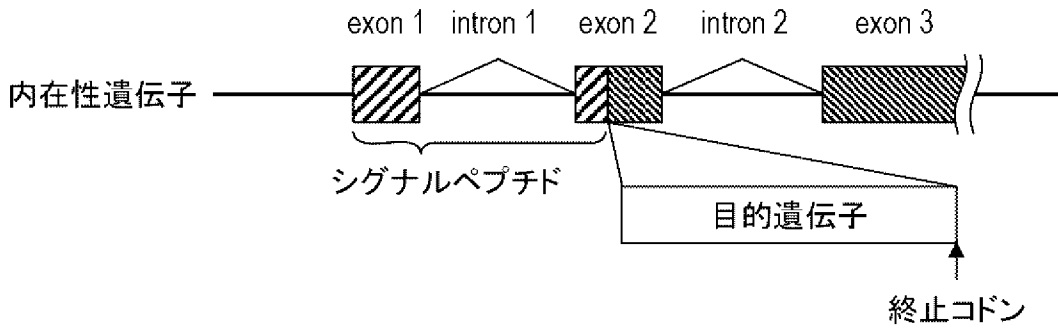
[請求項11] 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法であって、
請求項6に記載の二本鎖環状DNA、
前記第1のゲノム編集酵素又は前記第1のゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸、及び
前記第2のゲノム編集酵素又は前記第2のゲノム編集酵素を発現可能な状態でコードする核酸
をチョウ目昆虫の卵にマイクロインジェクション法で導入する導入工程
を含む、前記方法。

[請求項12] 遺伝子組換えチョウ目昆虫の作出方法であって、
請求項7又は8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。

[請求項13] 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、又は請求項11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。

[請求項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、請求項13に記載の方法。

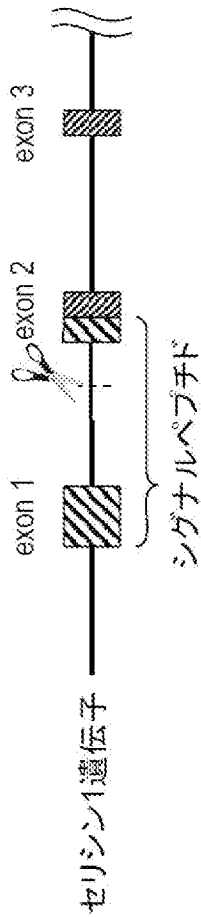
[図1]



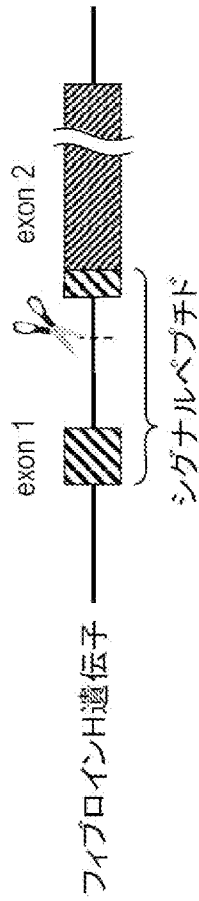
[図2]

ゲノム
切断位置

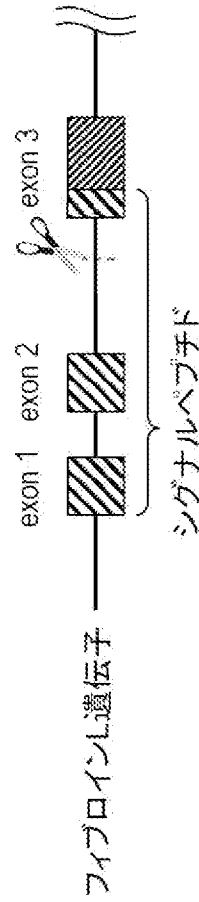
A



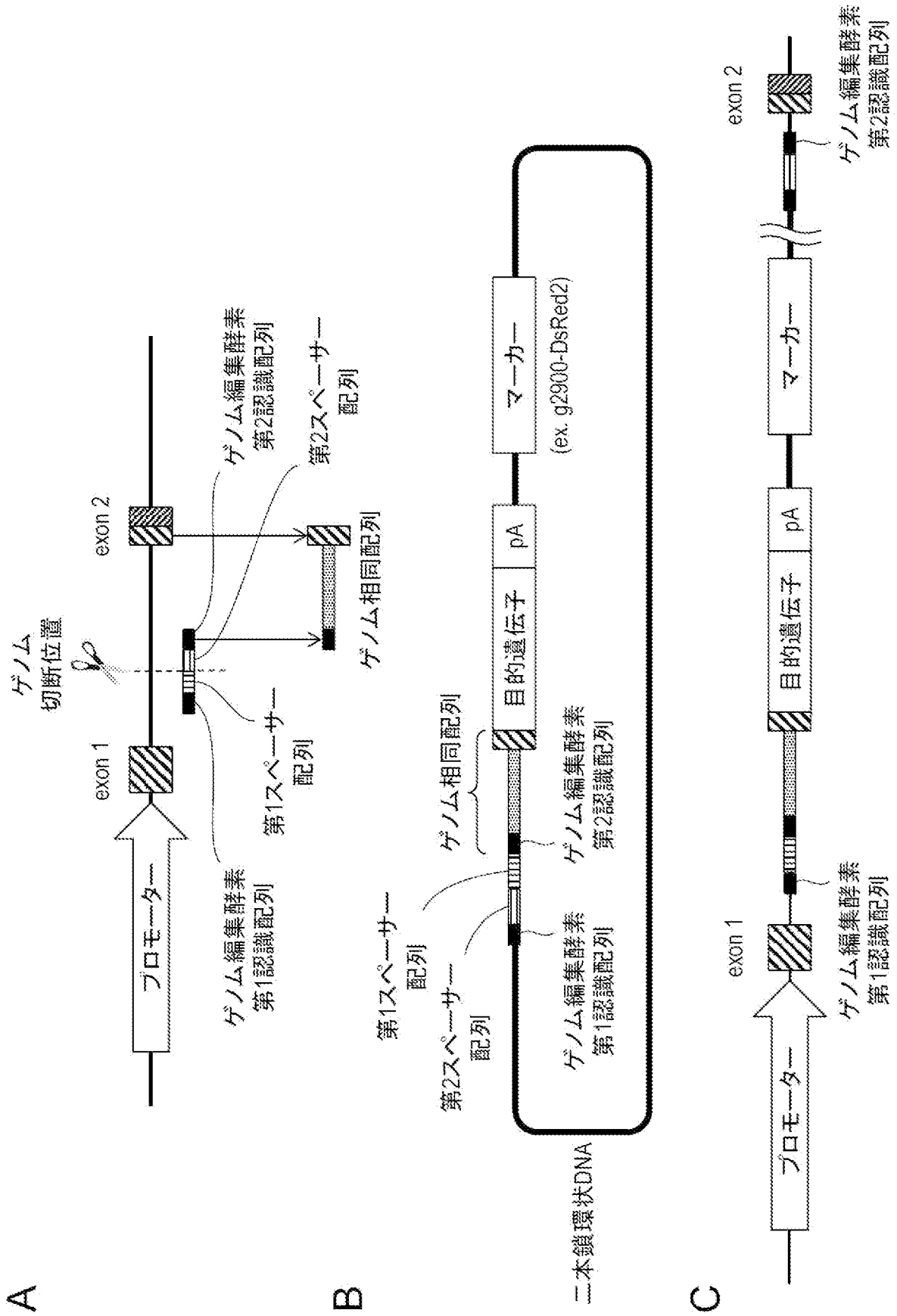
B



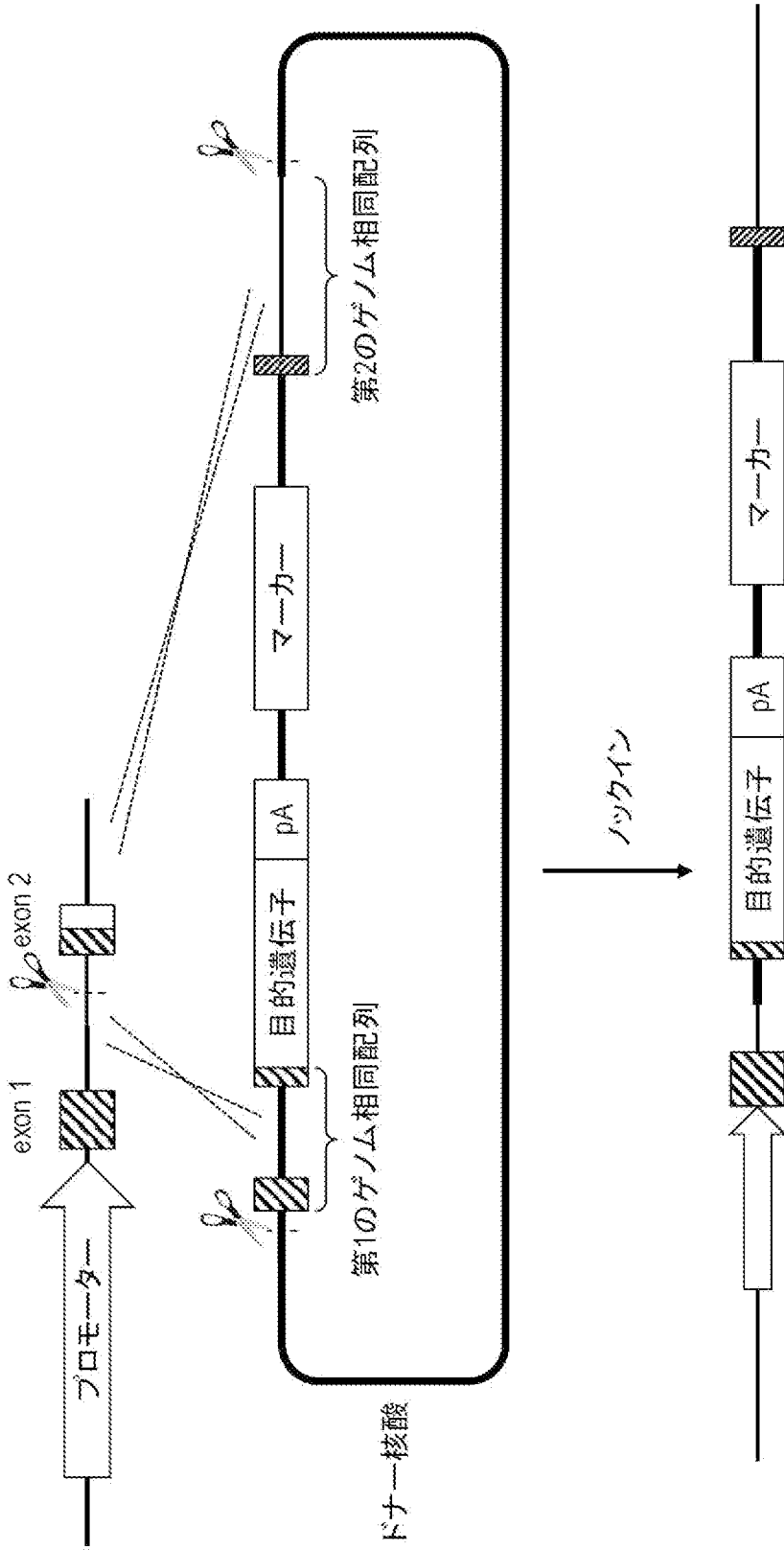
C



[図3]

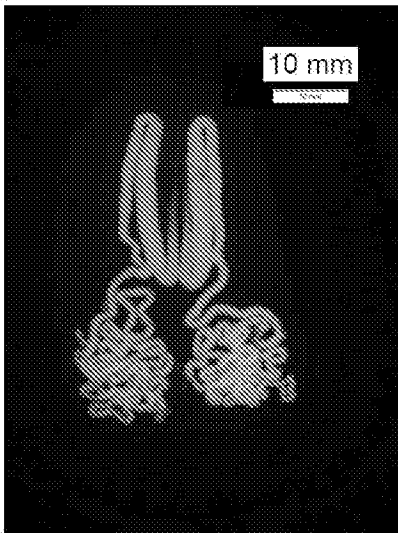


[図4]

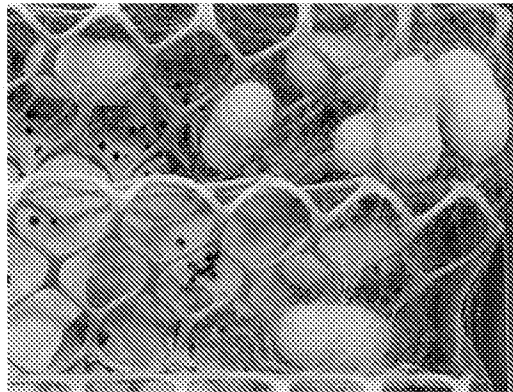


[図5]

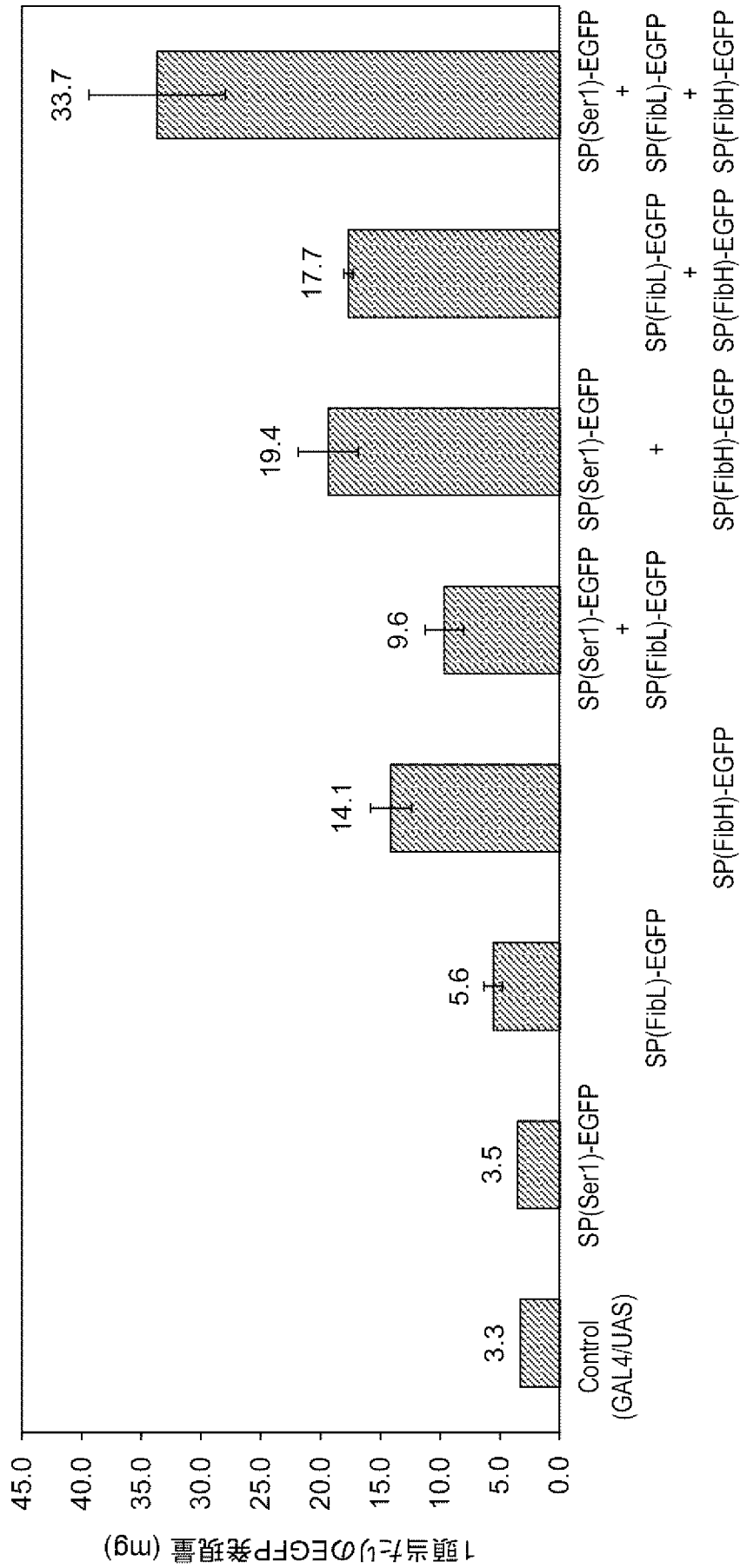
5齡絹糸腺



繭

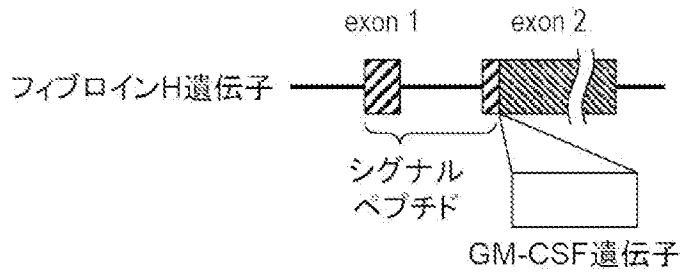


[図6]

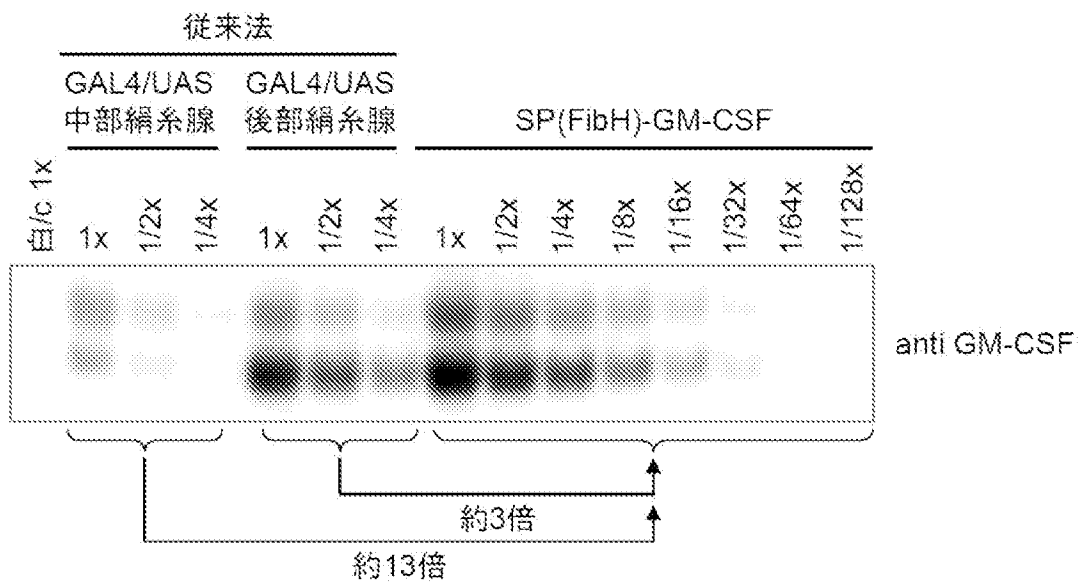


[図7]

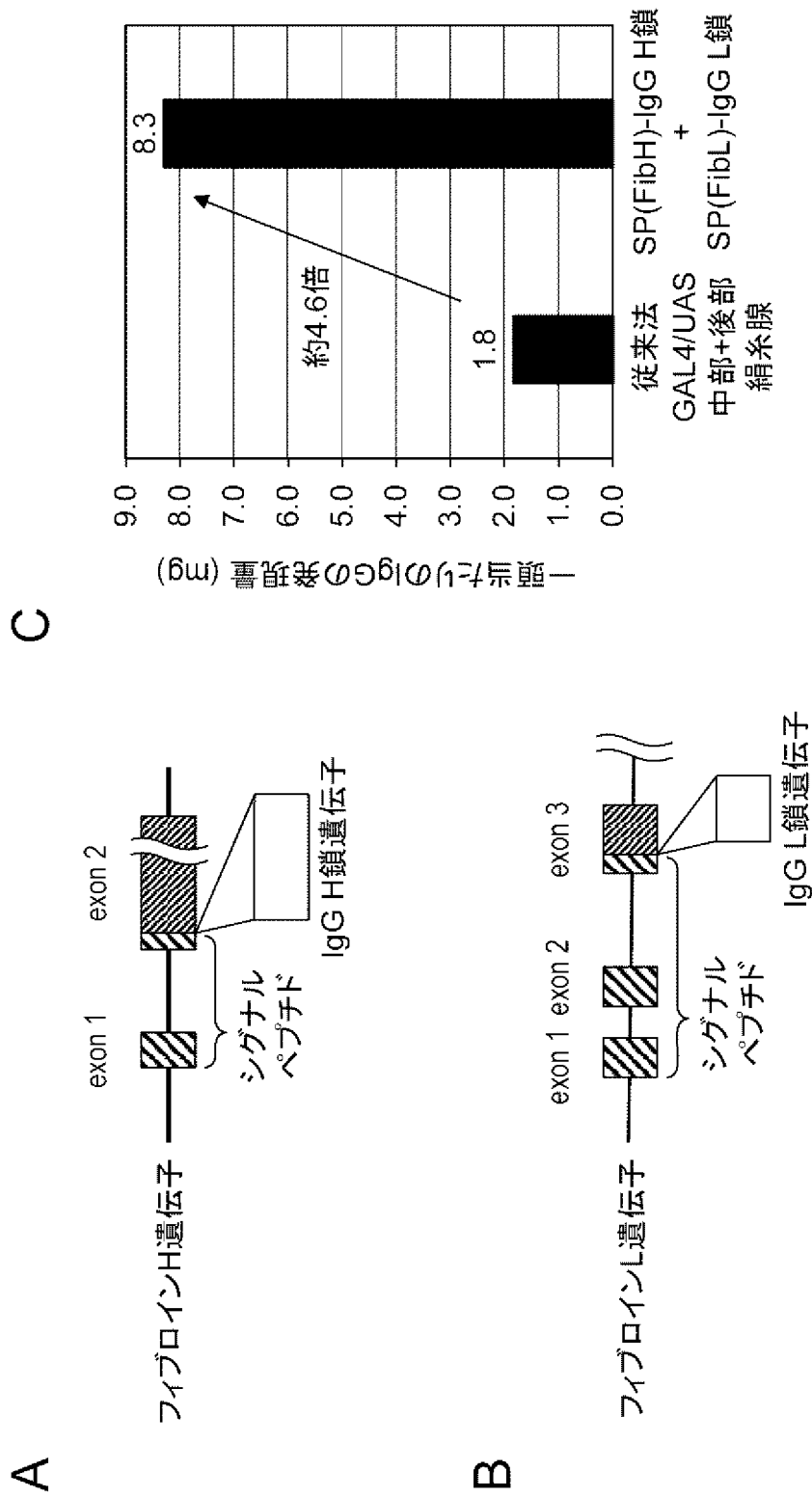
A



B



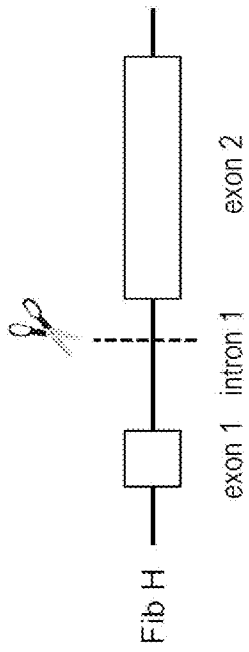
[図8]



[図9]

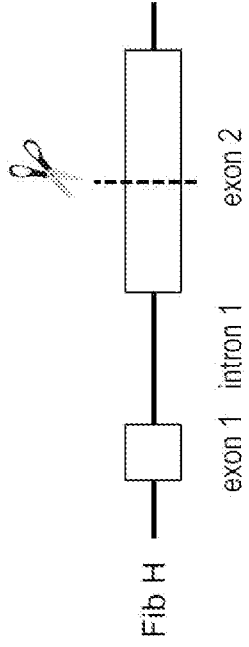
A

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/JP2024/024180

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| <p>A01K 67/033(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i</p> <p>FI: A01K67/033 501; C12N15/09 100; C12N15/11 Z; C12N15/12; C12N15/52 Z ZNA; C12N15/63 Z; C12P21/02 C</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p> | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| A01K67/02-67/0278;67/033; C12N15/00-15/90; C12P1/00-41/00 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| <p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2024</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2024</p> | | |
| 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) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | TATEMATSU, K., et al., Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm <i>Bombyx mori</i> , <i>Transgenic Research</i> , 2010, vol. 19, pp. 473-487 particularly, abstract, page 474, right column, third paragraph - page 475, left column, first paragraph, page 476, right column, second paragraph - page 477, right column, fifth paragraph, page 481, left column, second paragraph - page 484, right column, first paragraph, fig. 2, 8 | 1-2, 5, 13-14 |
| Y | particularly, abstract, page 474, right column, third paragraph - page 475, left column, first paragraph, page 476, right column, second paragraph - page 477, right column, fifth paragraph, page 481, left column, second paragraph - page 484, right column, first paragraph, fig. 2, 8 | 4, 13-14 |
| A | particularly, abstract, page 474, right column, third paragraph - page 475, left column, first paragraph, page 476, right column, second paragraph - page 477, right column, fifth paragraph, page 481, left column, second paragraph - page 484, right column, first paragraph, fig. 2, 8 | 3, 6-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 06 September 2024 | | 17 September 2024 |
| Name and mailing address of the ISA/JP | | Authorized officer |
| <p>Japan Patent Office (ISA/JP)</p> <p>3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915</p> <p>Japan</p> | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/024180

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2014/104269 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) 03 July 2014 (2014-07-03) claims, examples, fig. 3, 8 | 1-2, 5, 13-14 |
| Y | claims, examples, fig. 3, 8 | 4, 13-14 |
| A | claims, examples, fig. 3, 8 | 3, 6-12 |
| X | JP 2002-315580 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 29 October 2002 (2002-10-29) paragraphs [0029]-[0032] | 1-3, 5, 13-14 |
| Y | paragraphs [0022], [0029]-[0032] | 4, 13-14 |
| A | paragraphs [0022], [0029]-[0032] | 6-12 |
| X | JP 2020-134368 A (NAT AGRICULTURE & FOOD RES ORG) 31 August 2020 (2020-08-31) paragraph [0266] | 1-3, 5, 13-14 |
| Y | paragraph [0266] | 4, 13-14 |
| A | paragraph [0266] | 6-12 |
| A | NAKADE, S., et al., Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9, Nature Communications, 2014, vol. 5, 5560 (pp. 1-8) particularly, abstract, page 2, left column, first paragraph - page 2, right column, first paragraph, page 3, right column, second paragraph - page 4, right column, first paragraph, fig. 2 | 1-14 |
| A | 立松謙一郎ほか, カイコのセリシン 1 遺伝子イントロン領域への TALEN を用いたノックイン, 第 4 1 回日本分子生物学会年会 要旨集, 2018, 2P-0713, non-official translation (TATEMATSU, Kenichiro et al., TALEN-based knock-in into silkworm sericin 1 gene intronic region, Abstracts of the 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan) particularly, abstract | 1-14 |
| A | NGUYEN, T.M., et al., Applications of CRISPR/Cas9 in a rice protein expression system via an intron-targeted insertion approach, Plant Science, 2022, vol. 315, 111132 (pp. 1-8) particularly, abstract, fig. 1 | 1-14 |
| P, A | 立松謙一郎, カイコフィブロイン遺伝子への TALEN を用いたノックインによる組換えタンパク質生産, 第 4 6 回日本分子生物学会年会 要旨集, 13 November 2023, 1P-283, non-official translation (TATEMATSU, Kenichiro, Recombinant protein production by means of TALEN-based knock-in into silkworm fibroin gene, Abstracts of the 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan), particularly, abstract | 1-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/024180

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/JP2024/024180

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | | | Publication date (day/month/year) |
|--|-------------|----|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|----|-----------------------------------|
| WO | 2014/104269 | A1 | 03 July 2014 | CN | 104903445 | A | |
| | | | | claims, examples, fig. 3, 8 | | | |
| JP | 2002-315580 | A | 29 October 2002 | US | 2007/0083940 | A1 | |
| | | | | paragraphs [0035], [0047]-[0073] | | | |
| JP | 2020-134368 | A | 31 August 2020 | (Family: none) | | | |

| <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; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i FI: A01K67/033 501; C12N15/09 100; C12N15/11 Z; C12N15/12; C12N15/52 Z ZNA; C12N15/63 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））</p> <p>A01K67/02-67/0278;67/033; C12N15/00-15/90; C12P1/00-41/00</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）</p> <p>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>TATEMATSU, K., et al., Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm Bombyx mori, Transgenic Research, 2010, Vol.19, pp.473-487 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8</td> <td>1-2,5,13-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8</td> <td>4,13-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8</td> <td>3,6-12</td> </tr> </tbody> </table> | | | 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 | TATEMATSU, K., et al., Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm Bombyx mori, Transgenic Research, 2010, Vol.19, pp.473-487 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8 | 1-2,5,13-14 | Y | 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8 | 4,13-14 | A | 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8 | 3,6-12 | | |
| 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 | TATEMATSU, K., et al., Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm Bombyx mori, Transgenic Research, 2010, Vol.19, pp.473-487 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8 | 1-2,5,13-14 | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8 | 4,13-14 | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 特に、Abstract、第474ページ右欄第3段落-第475ページ左欄第1段落、第476ページ右欄第2段落-第477ページ右欄第5段落、第481ページ左欄第2段落-第484ページ右欄第1段落、Figs. 2,8 | 3,6-12 | | | | | | | | | | | | | | |
| <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> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table> | | | * 引用文献のカテゴリー | “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 | “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 | “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 | “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 | “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 | “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 | “&” 同一パテントファミリー文献 | “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 | |
| * 引用文献のカテゴリー | “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 | | | | | | | | | | | | | | | |
| “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 | “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 | | | | | | | | | | | | | | | |
| “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 | “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 | | | | | | | | | | | | | | | |
| “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 | “&” 同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | | | | | | | |
| “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 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>国際調査を完了した日</p> <p>06.09.2024</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>小林 薫 4B 6114</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</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 |
| X | 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) 請求の範囲、実施例、図3、図8 | 1-2, 5, 13-14 |
| Y | 請求の範囲、実施例、図3、図8 | 4, 13-14 |
| A | 請求の範囲、実施例、図3、図8 | 3, 6-12 |
| X | JP 2002-315580 A (科学技術振興事業団) 29.10.2002 (2002 - 10 - 29) 段落 [0029] - [0032] | 1-3, 5, 13-14 |
| Y | 段落 [0022]、[0029] - [0032] | 4, 13-14 |
| A | 段落 [0022]、[0029] - [0032] | 6-12 |
| X | JP 2020-134368 A (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 31.08.2020 (2020 - 08 - 31) 段落 [0266] | 1-3, 5, 13-14 |
| Y | 段落 [0266] | 4, 13-14 |
| A | 段落 [0266] | 6-12 |
| A | NAKADE, S., et al., Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9, Nature Communications, 2014, Vol.5, 5560 (pp.1-8) 特に、Abstract、第2ページ左欄第1段落-同右欄第1段落、第3ページ右欄第2段落-第4ページ右欄第1段落、Figure 2 | 1-14 |
| A | 立松謙一郎ほか、カイコのセリシン1遺伝子イントロン領域へのTALENを用いたノックイン、第41回日本分子生物学会年会 要旨集, 2018, 2P-0713 特に、Abstract | 1-14 |
| A | NGUYEN, T.M., et al., Applications of CRISPR/Cas9 in a rice protein expression system via an intron-targeted insertion approach, Plant Science, 2022, Vol.315, 111132 (pp.1-8) 特に、Abstract、Fig.1 | 1-14 |
| P, A | 立松謙一郎、カイコフィブロイン遺伝子へのTALENを用いたノックインによる組換えタンパク質生産、第46回日本分子生物学会年会 要旨集, 2023.11.13, 1P-283 特に、Abstract | 1-14 |

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/JP2024/024180

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|-------------------|------------|--|-----|
| WO 2014/104269 A1 | 03.07.2014 | CN 104903445 A 請求の範囲、実施例、図 3、図8 | |
| JP 2002-315580 A | 29.10.2002 | US 2007/0083940 A1 段落[0035]、[0047]-[0073] | |
| JP 2020-134368 A | 31.08.2020 | (ファミリーなし) | |