



# Development of an Agri-biomass-based Production System of Useful Protein and Advanced Materials using Silkworm

カイコによるサステナブルな有用タンパク質・新高機能素材の生産システムの開発

**Hideki SEZUTSU**

**NARO (National Agriculture and Food Research Organization)**

**農研機構 瀬筒秀樹**



# Development of an Agri-biomass-based Production System of Useful Protein and Advanced Materials using Silkworm

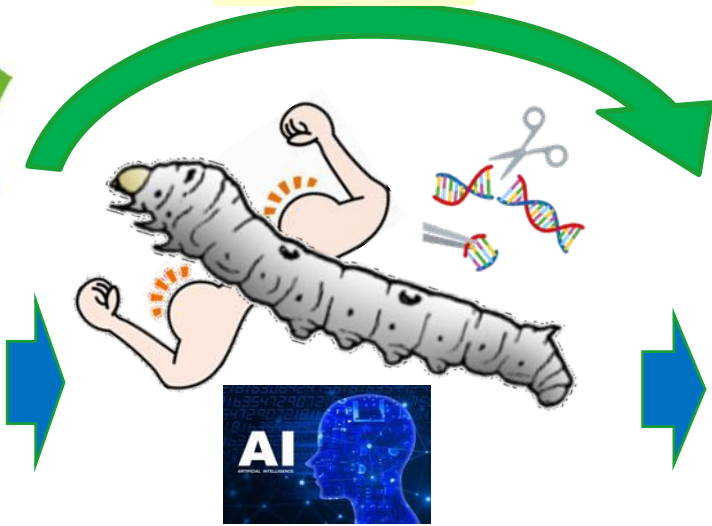


SIPにおける、カイコによるサステナブルな有用タンパク質・新高機能素材の生産システムの開発

## Agri-biomass



## Bioreactor



"Super silkworm"

With low environmental impact (low CO<sub>2</sub>, water use,,)

## Products



Wearable sensing device

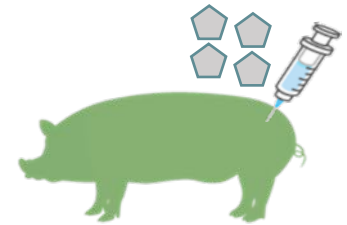
Azide-incorporated "Clickable silk"  
ScFv-conjugated "Affinity silk"



Antibody  
Antigen  
Cytokine  
etc.



Diagnostics  
for AGEs, SARS-CoV-2, etc.



Vaccine

Other biomass,  
Chemicals, etc.

Artificial diet

## Prototype production of pharmaceutical proteins and new silk materials in SIP

- Reagents for research use (bFGF, GM-CSF, SCF, TNF- $\alpha$ , Interleukin-3, VEGF, E-cadherin, etc.)
- Detection kit of AGEs (Advanced Glycation End-products) for research and diagnostic use
- Vaccine for animals (for swine, etc.)
- Antibody drug for human (Anti-HIV antibody), Antigen/Antibody for detection of SARS-CoV-2
- ScFv (Single chain antibody)-conjugated "Affinity silk" for detection of bacteria
- Azide-incorporated "Clickable silk" for chemical modification of silk and wearable device

- 試薬
- 診断薬
- ワクチン
- 抗体
- 抗体シルク
- クリックブルシルク

SIPで様々なユースケースの製品を試作し、成功事例を創出



## 昆虫生産系ものづくりコンソーシアム

Since October 2018

- **National Agriculture and Food Research Organization (NARO) , representative**  
(代表) 農研機構 生物機能利用研究部門、食品研究部門
- **Kyushu Univ.** 九州大学 農学研究院
- **Kumamoto Univ.** 熊本大学 (ヒトレトロウイルス学共同研究センター)
- **Kagoshima Univ.** 鹿児島大学 農学部
- **Ryukyu Univ.** 琉球大学 熱帯生物圏研究センター
- **Tokyo City Univ.** 東京都市大学 環境学部
  
- **Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.** 株式会社免疫生物研究所
- **Kyorin Co., Ltd.** 株式会社キョーリン
- **Nippon Bio-test Laboratories Inc.** 株式会社日本バイオテスト研究所
- **AI Silk Co.** エーアイシルク株式会社
- **Atsumaru Holdings Co., Ltd.** 株式会社あつまるホールディングス
- **Nippon Institute for Biological Science** (一財) 日本生物科学研究所
- **Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.** 日本全薬工業株式会社
- **KAICO Ltd.** KAICO株式会社

And collaborated with >5 companies.



蚕の一生

7 weeks

500 eggs/♀

Easy mass-rearing

11-14 days

3-4 days

2-3 days

3-4 days

4-6 days

6-8 days

Mulberry (20g)

10-15 days

10,000 times weight in 3 weeks

Cocoon = Silk protein (0.2~0.5g)

Larva (~5g) 20% protein

High potential of protein production

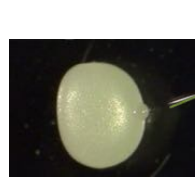
# Two expression systems for production of recombinant proteins

2つの組換えタンパク質生産系

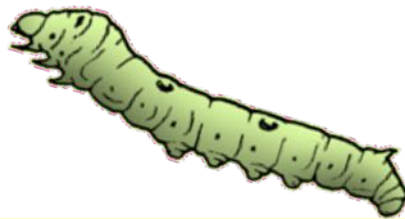
## 1) Transgenic Silkworm Expression System

遺伝子組換えカイコ生産系

Transposon vector



Egg



Genetically modified



Cocoons



New silks



New materials

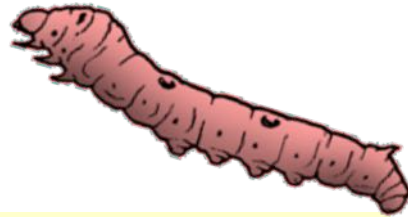
## 2) Silkworm-Baculovirus Expression System

カイコ-バキュロウイルス生産系

Recombinant baculovirus



Transient expression



Body fluid



Useful proteins

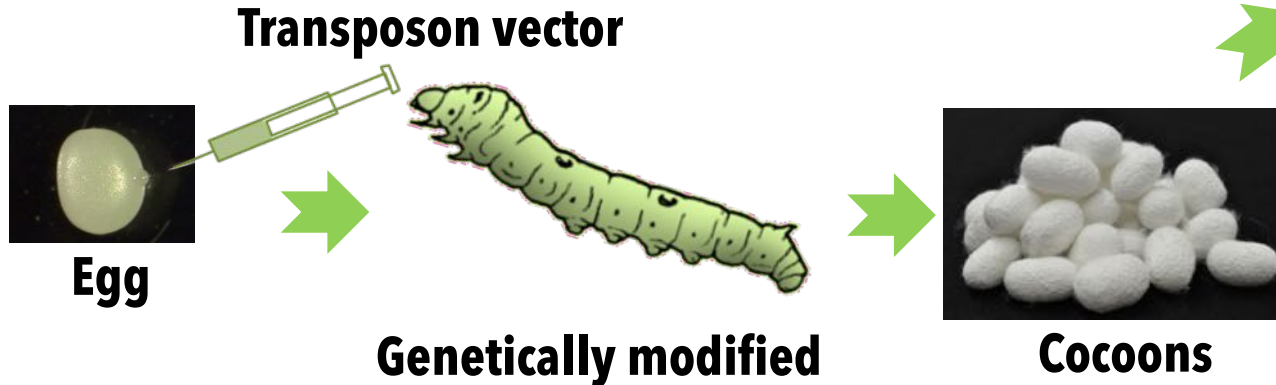
### Processes

- Transgenic silkworm is obtained by injection of transposon vector. The foreign gene is integrated into the genome. The recombinant protein is easily extracted from the cocoons. Silk modification is possible, too.
- Recombinant baculovirus is inoculated and the recombinant protein is highly expressed in the body fluids after 6 days.

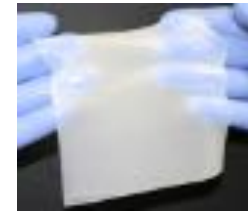
# 1) Transgenic Silkworm Expression System

遺伝子組換えカイコ生産系

By NARO, IBL (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd), etc.  
農研機構、免疫生物研究所 (IBL) 等



**New silks**

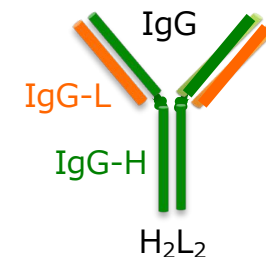


**New materials**

- Azide-incorporated "Clickable silk"
  - ScFv-conjugated "Affinity silk"
- in SIP



**Useful proteins**



**Antibody**  
**Antigen**  
**Cytokine**  
**Enzyme**  
**Receptor**  
**etc.**

- Genetically modified silkworms can stably produce pharmaceutical protein (**0.1 to 20 mg in a cocoon**) and new silk material. (Potential: 200 to 500 mg)

- **Protein extraction from cocoon is easy.**

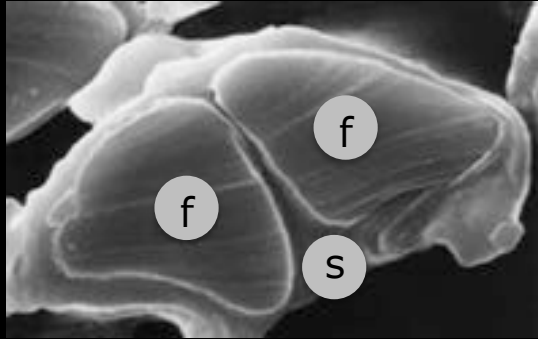
- The difference between lots is less. The **scalability is high.**

- Protein with **complicated structure** and **glycoprotein** can be produced.

# 1) Transgenic Silkworm Expression System

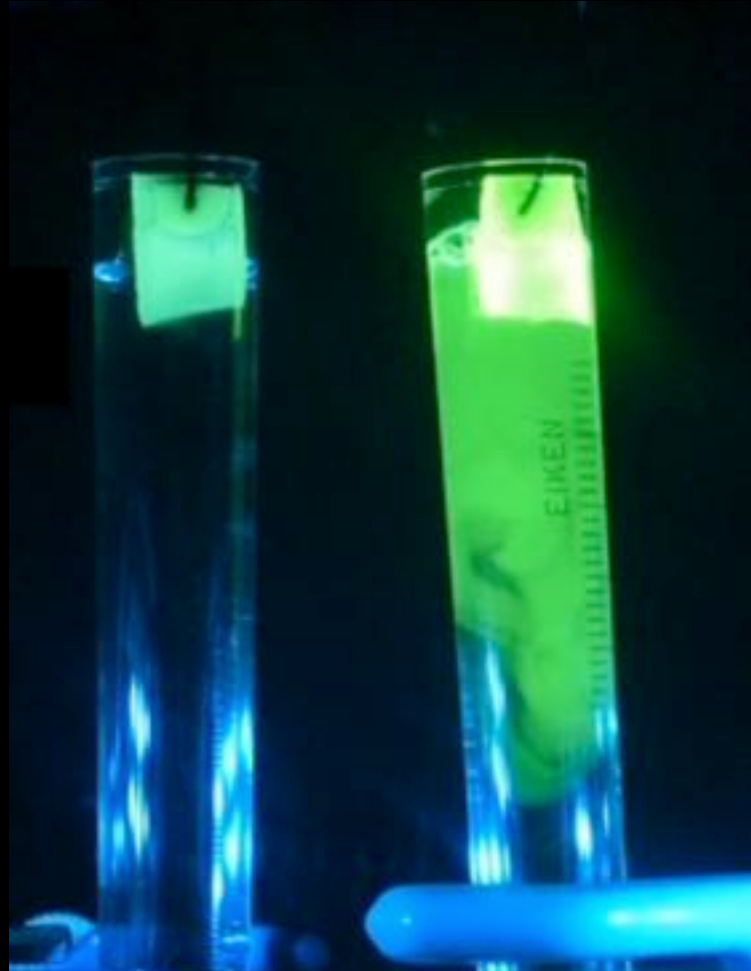
**Protein extraction is easy from the transgenic cocoon.**

Cross section of silk fiber



f: fibroin (fiber)  
フィブロイン (繊維)  
s: sericin (glue)  
セリシン (糊)

繭のセリシン層に発現させたタンパク質は、  
バッファーに漬けるだけで溶出する。夾雑物が少ない。



# 1) Transgenic Silkworm Expression System

Launched Examples of Biological Pharmaceuticals Produced by Transgenic (Tg) silkworms (1)

これまでの開発事例 (1)

By NARO and Nittobo Collaborative R&D

日東紡 (ニッポーメディカル)

## Diagnostic Reagent Kit for Human osteoporosis (TRACP-5b; present only in Osteoclast)



ヒト骨粗鬆症診断キット標準品

(TRACP-5b(骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ))

Conventional Reagent has been derived from bone and blood.  
(Ethical Issues)

従来は、血液等由来

**TRACP-5b protein can not be produced in large amount by conventional cultured cell. Tg-silkworms would solve the difficulty of protein expression in other conventional production systems (*E.coli*, mammalian cultured cell, animal, etc.)**

TRACP-5bタンパク質は、大腸菌や哺乳類培養細胞等では大量生産が困難だったが、組換えカイコでは生産できた。



# 1) Transgenic Silkworm Expression System

## Launched Examples of Biological Pharmaceuticals Produced by Tg-silkworms (2)

これまでの開発事例 (2)

By collaborative R&D between NARO and IBL (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd)  
(patent license from NARO) (株)免疫生物研究所IBL

### Ingredient of cosmetics (human collagen $\alpha$ I, collagen III)

化粧品 Conventional products are derived from cattle and fish  
(Issues on BSE and allergy)

### In-vitro diagnostic medicine, animal and human medicines

研究試薬、診断薬、動物・ヒト医薬品

#### Anti Amyloid $\beta$ , Monoclonal Antibody



Switching from  
Mouse ascites fluid  
production system

#### Laminin(iPS Cell culture substrate)



Half price by switching  
from CHO cell production system

IBL has established facilities for GMP pilot production in 2016.

**Fibrinogen (hepatitis virus free), Anti HIV Antibody, etc.**

# 1) Transgenic Silkworm Expression System

in SIP



## Development of the detection kit of Advanced Glycation End products (AGEs)

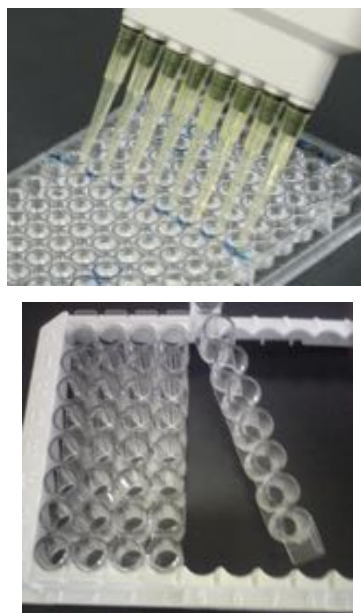
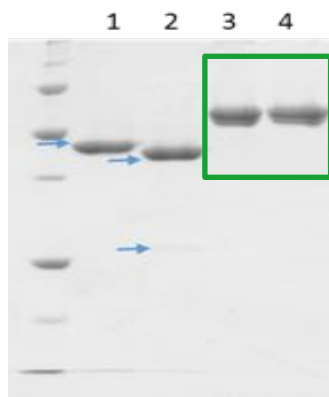
### 刺激性終末糖化産物(AGEs)検出キットの開発

糖尿病合併症や加齢性疾患(動脈硬化、認知症等)を惹起する刺激性AGEsを検出可能なキットの開発

- AGEs are involved in the pathogenesis of diabetic complications and age-related diseases.
- Co-expression of biotin ligase with biotin bait achieves *in vivo* biotinylation of overexpressed **stable N-glycosylated receptor of AGEs (sRAGE)** in transgenic silkworms.

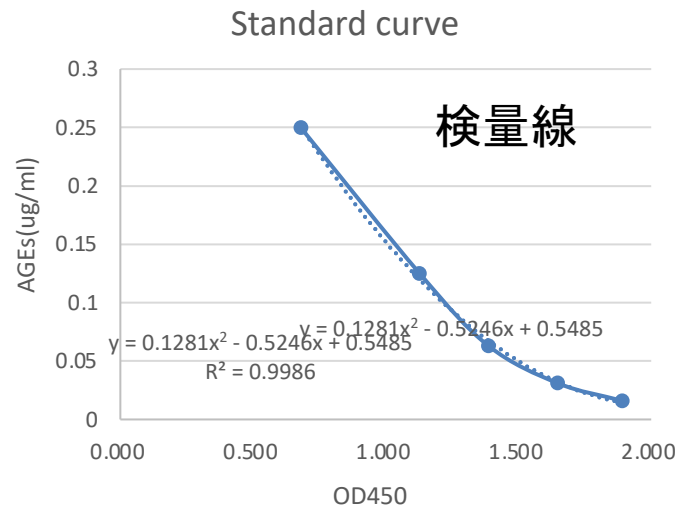
(Kumano-Kuramochi et al. Sci. Rep. 2017)

ビオチンリガーゼ共発現により、安定なRAGEタンパク質の生産とカイコ体内でのビオチン化に成功



sRAGE  
1: *E. coli*, 1 days  
2: *E. coli*, 40 days  
3: Tg-silkworm, 1 days  
4: Tg-silkworm, 40 days

### SIPでの開発事例



The research kit will be sold by FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation in 2021.

富士フイルム和光純薬(株)より、受注販売開始見込 (2021)

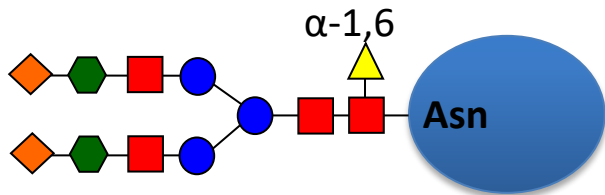
# 1) Transgenic Silkworm Expression System

## Glycosylation affect the efficacy and stability of medicines?

カイコとヒトでは糖鎖修飾が異なるので問題があるのでは？

### Human Glycan

ヒトのN型糖鎖例



◆ Sialic Acid

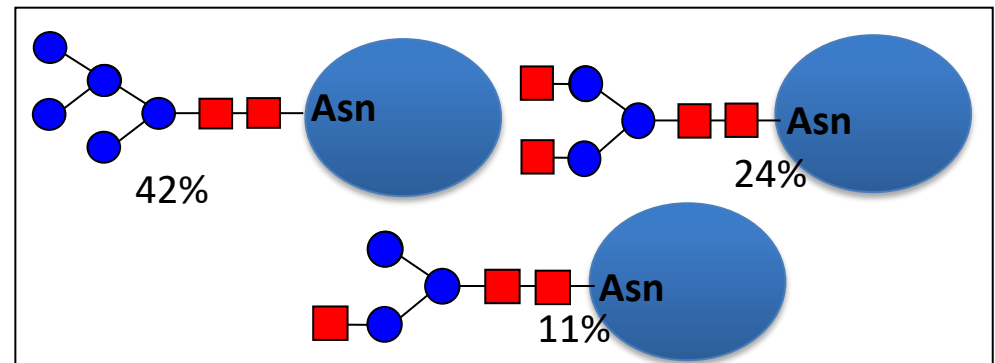
● Galactose

▲ Fucose

≠

### Glycan Produced in Silk Gland of Tg-silkworm

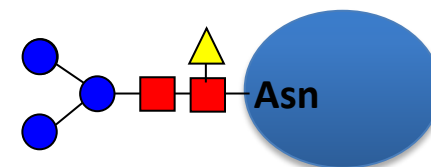
カイコのN型糖鎖例 (絹糸腺)



lizuka et al. FEBS 2009

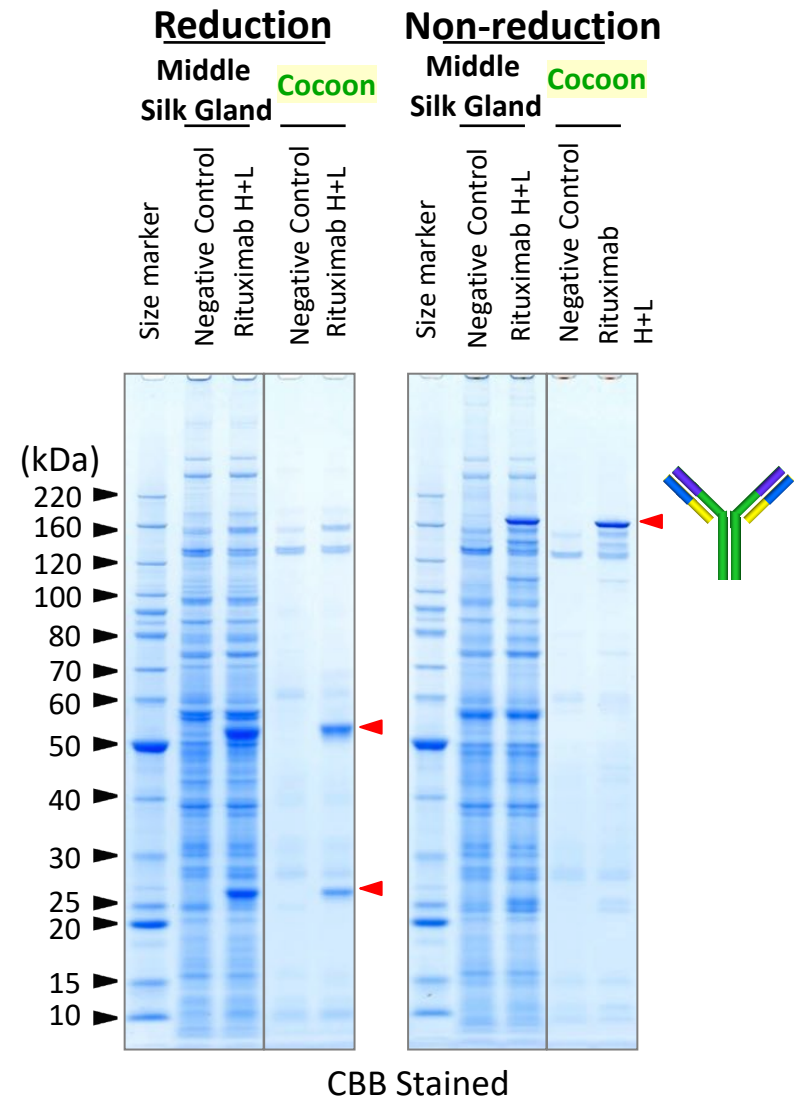
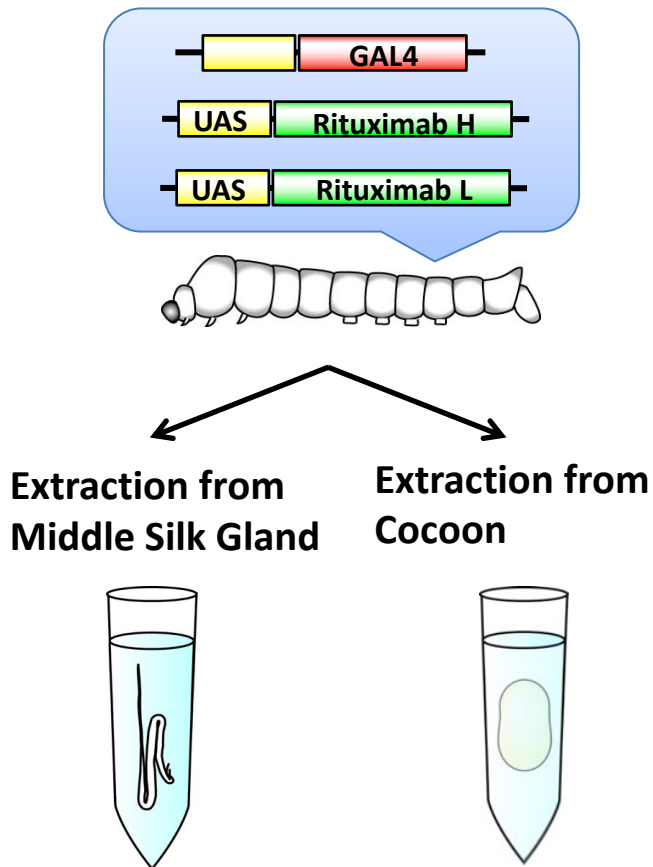
### Glycan Produced in Body Fluid of silkworm

カイコのN型糖鎖例 (体液)



# 1) Transgenic Silkworm Expression System

NARO and NIHS Collaborative Research on the Production of Anti-CD20 Antibody Medicine (Rituximab) by Tg-silkworms (1) 抗CD20抗体 (リツキシマブ) の生産例



NARO and NIHS Collaborative Research  
Tada, Tatematsu et al. *mAbs*, 2015  
(NIHS: National Institute of Health Sciences)

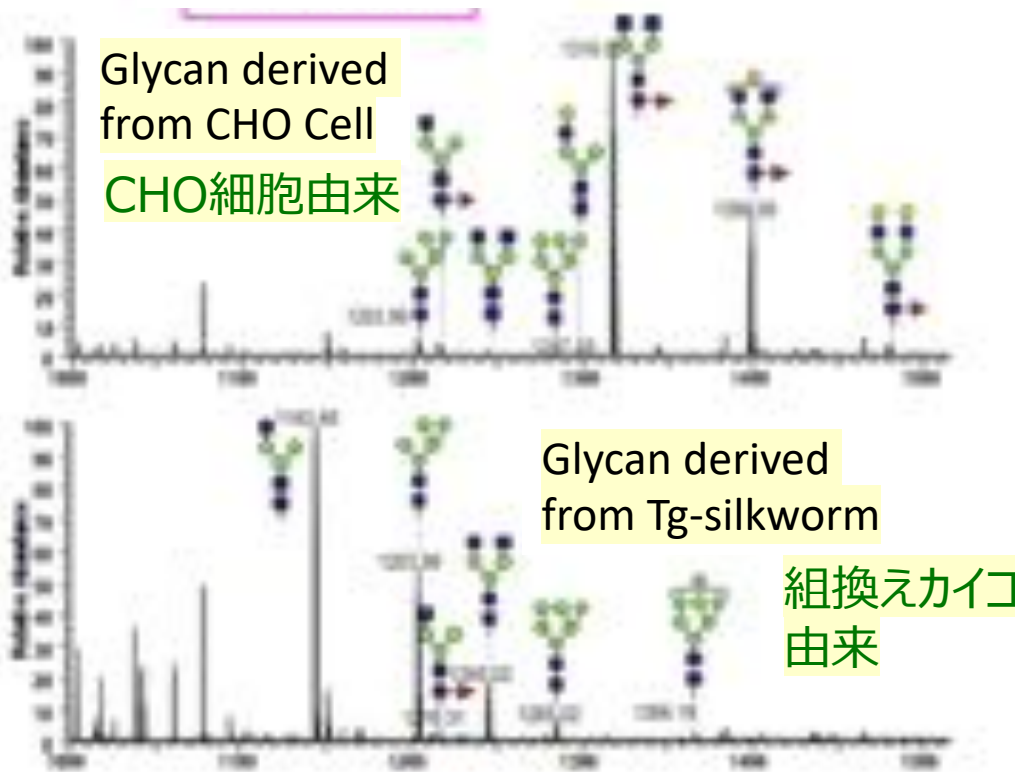
国立衛研との共同

# 1) Transgenic Silkworm Expression System

NARO and NIHS Collaborative Research on the Production of Anti-CD20 Antibody Medicine (Rituximab) by Tg-silkworms (2) 抗CD20抗体（リツキシマブ）の生産例

## Structural Difference of Glycan in Different Production Systems

Structure of Glycan 糖鎖構造



mAbs (antibody journal)

Glycan which may cause antigenicity has been scarcely identified from NIHS data.

Tada, Tatematsu et al. *mAbs* 7(6):1-13, 2015

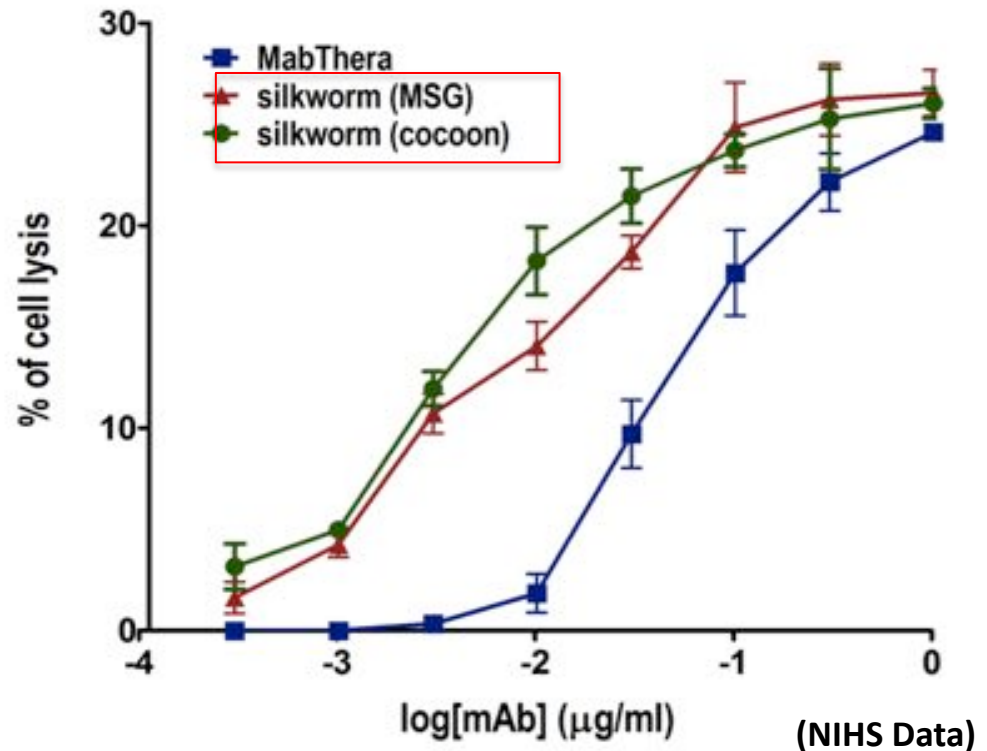
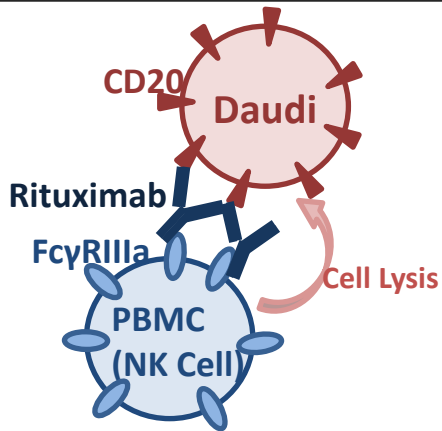
特に抗原性がありそうな糖鎖はみられなかった

# 1) Transgenic Silkworm Expression System

NARO and NIHS Collaborative Research on the Production of Anti-CD20 Antibody Medicine (Rituximab) by Tg-Silkworms (3) 抗CD20抗体 (リツキシマブ) の生産例

Activity of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

Daudi cells ( $1 \times 10^4$  cells)  
 ↓ + PBMC ( $2 \times 10^5$  cells)  
 ↓ + Rituximab  
 ↓ 37°C, 4 hours  
 Sup.  
 ↓ Measure LDH activity  
 using Cytotoxicity Detection Kit  
 (Roche)



Tada, Tatematsu et al. *mAbs* 7(6):1-13, 2015

CHO細胞由来よりも高いADCC活性を示した

**Rituximab derived from Tg-silkworms has much more higher ADCC activity than those derived from conventional CHO cells!**

# 1) Transgenic Silkworm Expression System

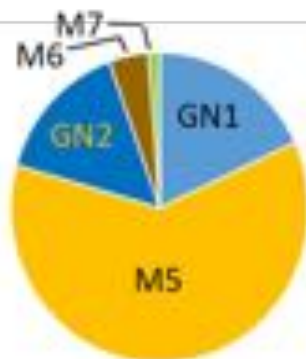
in SIP



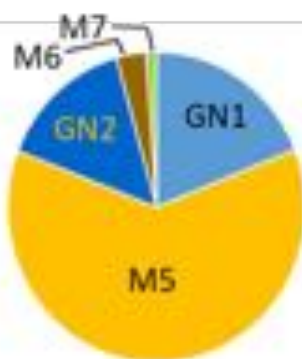
## Robustness of the expression system

SIPでの研究事例

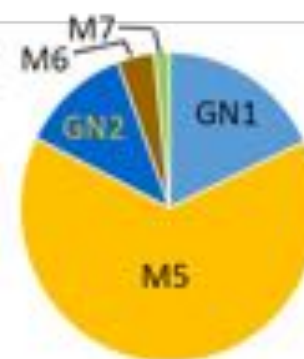
Rearing Temp. 20°C



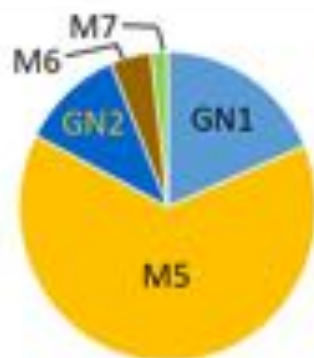
23°C



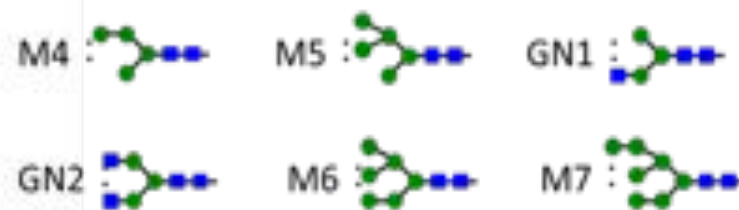
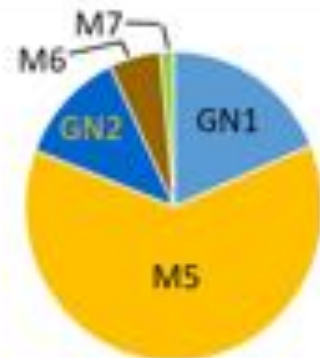
25°C



27°C



30°C



Tomita M, *JATAFF J.* 7(12), 2019改

**Glycosylation patterns were not affected by the rearing temperature.**

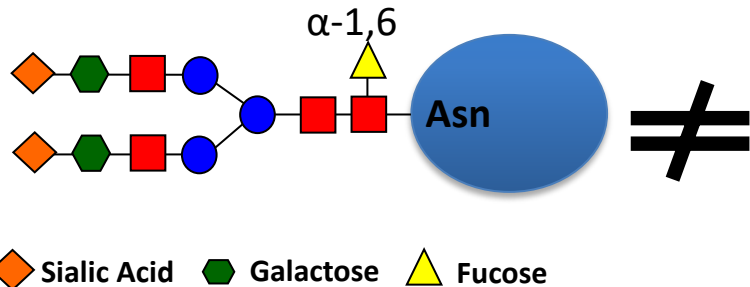
抗HIV抗体に付加される糖鎖は、飼育温度等の条件に影響されなかった

# 1) Transgenic Silkworm Expression System

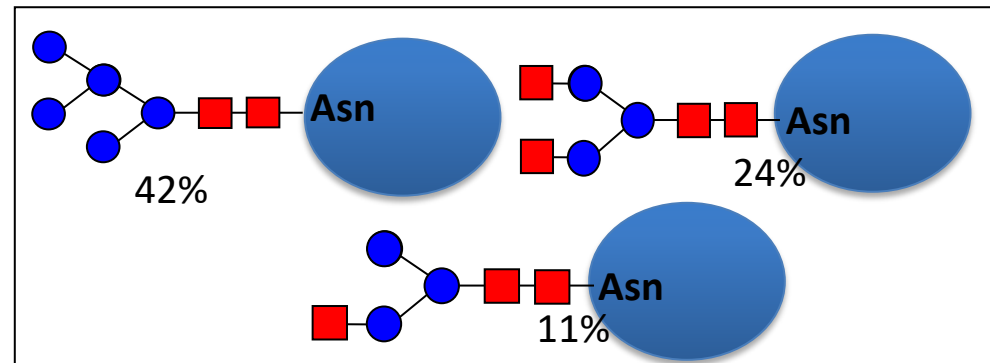
## Control and Modification of Glycosylation For Functional Improvement

哺乳類糖鎖修飾酵素の導入等により、糖鎖修飾のコントロールが可能になりつつある

### Human Glycan



### Glycan Produced in Silk Gland



lizuka et al. FEBS 2009

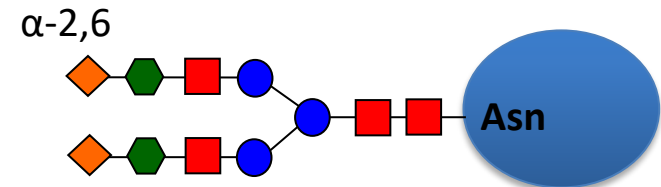
**Affect the efficacy and stability of medicines?**



**Undergoing Research Development of Tg-silkworms and Baculovirus system**

**Glycan Humanization, modification of glycosylation for high functionality.**

高機能化のため、糖鎖のヒト型化などを進めている



シアル酸も付けられるようになった

**Invention of Glycosylation: "Addition of Sialic Acid by Tg-silkworms"**  
 (JP Patent Publication 2017-136052 by NARO and Osaka University)



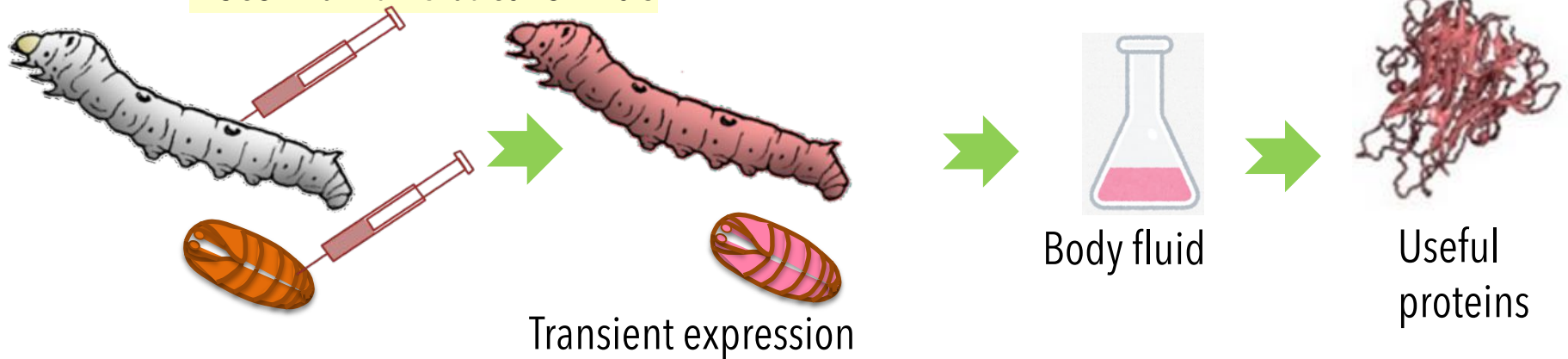
## 2) Silkworm-Baculovirus Expression System

カイコ-バキュロウイルス生産系

By KAICO, Kyushu Univ. (Prof. Kusakabe), etc.

KAICO(株)、九州大(日下部教授)等

### Recombinant baculovirus



- **Silkworms infected with recombinant baculovirus can make useful proteins in the body fluids within a week.** ウイルス摂取後 1 週間内に体液で組換えタンパク質生産可能
- **The expression level is 10 to 100 times higher than insect cell-culture expression system.** 昆虫培養細胞の10-100倍の高発現

### Launched Examples of Biological Pharmaceuticals produced by the system

(1) Toray Industries, Inc.: **Interferon (Intercat<sup>®</sup>, Interdog<sup>®</sup>)** 東レ

これまでの開発事例

(2) Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.: **Recombinant Derf 2 and pullulan combined product (Allermune HDM)** 日本全薬工業

(3) Sysmex Corporation: **"Revohem PT" reagent for measuring prothrombin time**  
シスメックス

# 2) Silkworm-Baculovirus Expression System

in SIP



SIPでの開発事例

## 研究用試薬販売開始



カイコバキュロウイルス発現系(右図)は、真核細胞で最も効率の良いタンパク質生産系と言われています。

### カイコ発現メリット

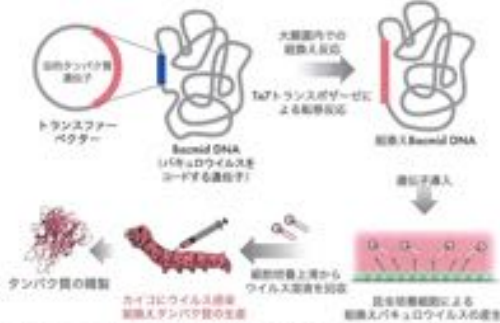
①大量飼育が可能な唯一の昆虫種であり、頭一頭が小さなバイオリアクターとして機能します。そのためスケールアップにおける煩雑な条件検討なしに大量生産が実施可能です。

②カイコは哺乳類に近い修飾を受けた組換えタンパク質を得られる上に発現量が多い特徴があります。

③昆虫飼育を用いる生産系は、昆虫細胞を用いる場合より、微生物汚染が少なく、生産条件の制御が容易であるという利点もあります。

当社のカイコバキュロウイルス発現系は、分泌性タンパク質、膜タンパク質、細胞質ならびにオルガネラ局在タンパク質などの全ての種類のタンパク質において発現の可能性ががあります。九州大学のカイコバイオリソースから、すでにこれらタンパク質の種類に応じた大まかな好適系統を提出しており、また今後大量生産が必要な場合には、生産に好適な系統をスクリーニングするシステムが確立しています。

### カイコバキュロウイルスタンパク質発現系の概要



**KEEP** 大学・研究機関にご所属の研究者限定の割引プラン  
 カイコバキュロウイルス発現系を用いたタンパク質受託発現を承ります！

#### Purification plan

- ・トランスファーベクター構築
- ・組換えバキュロウイルス作成
- ・カイコ5頭を使った生産
- ・血清 or 細胞抽出液の回収
- ・アフィニティ精製
- ・精製品を納品

250,000\*

#### Standard plan

- ・トランスファーベクター構築
- ・組換えバキュロウイルス作成
- ・カイコ5頭を使った生産
- ・血清 or 細胞抽出液の回収
- ・クールド品を納品

200,000\*

#### Additional plan

- ・作成済みの組換えバキュロウイルスを使用
- ・カイコ10頭を使った生産
- ・血清 or 細胞抽出液の回収
- ・クールド品を納品

100,000

※：目的タンパク質をコードする遺伝子資源を提供いただいた場合、DNA合成が必要な場合は別途、合成費用ならびに作業料が必要。目的タンパク質の発現が確認できなかった場合は所定の作業料のみお支払い頂きます。全て税別価格です。

### 発現実績

ヒト由来Dpp-4、ヒト由来PARP1、ヒト由来HMGB1、その他、各種サイトカイン類、キメラタンパク質、膜タンパク質細胞外ドメインなど

KAICO株式会社は、九州大学農学研究院のカイコを用いたタンパク質生産技術に、工学研究院のタンパク質機能解析技術を採用し、難発現タンパク質ならびに医薬品・診断薬・試薬を開発することを目的に2018年4月に設立したベンチャーです。

KAICO株式会社  
 〒819-0388 福岡市西区九大新町4-1  
 Tel:092-707-4016 Fax:092-707-4017  
<http://www.kaico ltd.jp>



### Product list

遺伝子組換えバキュロウイルスを含まないカルタヘナ培養液に溶解です。全て所定濃度(10<sup>5</sup> IU/ml)で凍結したReady to useです。(0.22 μmフィルター滅菌済) 保存料は含まれておりません。

品名	容量(μg)	凍結回数
KT-D007-100UG	10	400,000
KT-D007-50UG	50	400,000
KT-D007-100UG	100	100,000
KT-D007-500UG	500	100,000

品名	容量(μg)	凍結回数
KT-D008-10UG	10	400,000
KT-D008-50UG	50	400,000
KT-D008-100UG	100	100,000
KT-D008-500UG	500	100,000

品名	容量(μg)	凍結回数
KT-D009-10UG	10	400,000
KT-D009-50UG	50	400,000
KT-D009-100UG	100	100,000
KT-D009-500UG	500	100,000

品名	容量(μg)	凍結回数
KT-D010-10UG	10	400,000
KT-D010-50UG	50	400,000
KT-D010-100UG	100	100,000
KT-D010-500UG	500	100,000

品名	容量(μg)	凍結回数
KT-D011-10UG	10	400,000
KT-D011-50UG	50	400,000
KT-D011-100UG	100	100,000
KT-D011-500UG	500	100,000

品名	容量(μg)	凍結回数
KT-D012-10UG	10	400,000
KT-D012-50UG	50	400,000
KT-D012-100UG	100	100,000
KT-D012-500UG	500	100,000

【新発売】  
**KAICO株式会社**  
 〒819-0388 福岡市西区九大新町4-1  
 Tel:092-707-4016 Fax:092-707-4017  
<http://www.kaico ltd.jp>

【提携会社】  
**正晃株式会社** <http://www.seiko.co.jp>

## 2) Silkworm-Baculovirus Expression System

in SIP



The research kit for the SARS-CoV-2 antibody test service is available.

新型コロナウイルス抗体検出キットを研究用試薬として完成

SIPでの開発事例

KAICOは、株式会社プロテックス（埼玉県和光市、代表取締役：西崎政男、以下：プロテックス）と、新型コロナウイルス感染症の抗体検出キットを共同で開発し、研究用試薬として完成しました。ウイルス検出装置および抗体検査キットの開発を行うプロテックスは、KAICOと開発した抗体検出キットを用いた法人向け抗体検査サービスを10月より開始します。

### ■共同開発の内容

KAICOは、技術導出元である九州大学農学研究院日下部研究室の主導のもと、新型コロナウイルスに関して、組換えウイルス抗原と組換え抗ウイルス抗体の共同開発を行い、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質（Sプロテイン）三量体の抗原開発に成功し、複数の抗体との結合を確認しました。この開発成果をもとにプロテックスと抗体検出キットを共同で開発しました。

共同開発では、KAICOが新型コロナウイルスの抗原・抗体の開発・改良・量産化検討を行い、プロテックスがその抗原・抗体を用いて新型コロナウイルスの検出キット開発および検査サービスの組み上げを担当し、今般抗体検査サービスの提供が可能となりました。



今回共同開発した抗体検出キット（研究用試薬）。

2020.10.2  
Press release by  
KAICO and Protects



## Various production systems of recombinant proteins

	Cell-free system	E. coli, Yeast	Plant (transient)	Plant (transgenic)	Silkworm (Baculovirus)	Silkworm (transgenic)	Mammalian cells (CHO)	Animals (Mouse, Goat,,)
<b>Speed</b>	◎	◎	○	×	○	△	△	×
<b>Cost/g</b>	△	◎	○	◎	◎	○	△ Antibody ◎	○
<b>Mass production</b>	×	○	△	◎	△	◎	△	○
<b>Protein activity (Quality)</b>	△	△	○	○	○	○	◎	○
<b>Post transcriptional modification (Glycosylation)</b>	×	×	△	△	△	○	◎	◎
<b>Higher-order structure, Complex</b>	×	×	○	○	◎	◎	◎	◎
<b>Safety (virus contamination)</b>	△	○	△	○	△	○	△	△

それぞれの生産系で得意・不得意あり。カイコで作る優位性があるものもある。

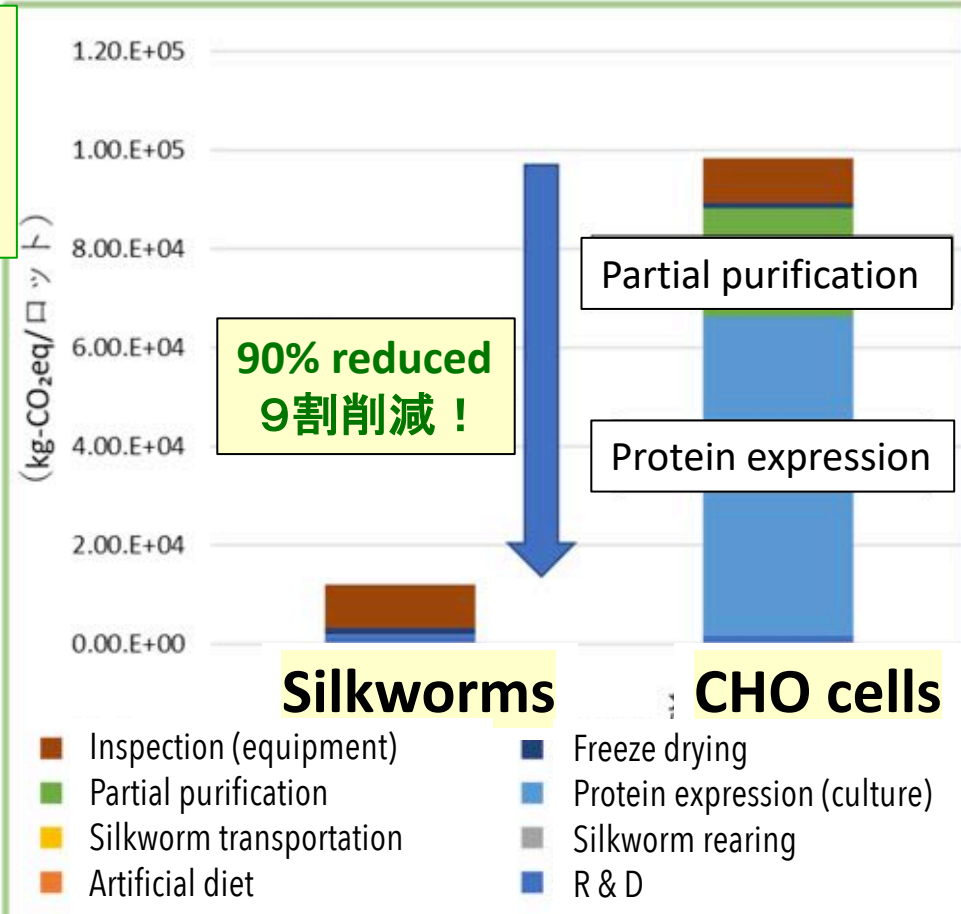


## LCA (Life Cycle Assessment) in the Silkworm-Baculovirus Expression System

By Itsubo Lab. Tokyo City Univ. 東京都市大 伊坪研究室

### Carbon footprint in a reagent for clinical test (1 lot: for 60,000 samples)

**CO<sub>2</sub> total emissions (kgCO<sub>2</sub> equivalent/lot)**  
温室効果ガスGHG排出量  
CO<sub>2</sub>換算値/ロット



in SIP  
SIPでの検証事例

渡辺ら  
日本LCA学会  
2018改

Itsubo N  
JATAFF J. 7(12)  
2019改

**90% of CO<sub>2</sub> can be reduced by using silkworm expression system.**



## Summary of Advantages of Silkworms for Manufacturing Biological Medicines

- (1) Mass production at room temp. (high production and low CO<sub>2</sub> emissions)
- (2) Low infection risk (no human virus, high level of safety)
- (3) Possible frozen bank (securing of stable supply of pharmaceutical ingredient)
- (4) Easy alteration of production scale, Easy extraction from transgenic cocoons
- (5) Substantially no difference in quality of products for different lot and breeding environment (high quality stability of products)
- (6) Fast protein expression using baculovirus system, Easy VLP formation
- (7) No fucose in glycan (increasing ADCC activity)
- (8) Possible introduction of human-type glycan (further lowering immunogenicity)
- (9) Few Animal ethics issues (improving public image of corporation)

*Silkworm is an ultimate single use tool. Each silkworm is a stable protein expression unit.*



*Please join us and challenge to be a pioneer for the applications of silkworms in manufacturing human/animal biological medicines!*