

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06013・19K21153

研究課題名（和文）フィブロインH鎖遺伝子の多型解析を用いた新特性シルクの創出

研究課題名（英文）Polymorphism analysis of fibroin heavy chain gene for creating new silks

研究代表者

伊賀 正年（Iga, Masatoshi）

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・研究員

研究者番号：70721497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：カイコには絹糸の太さや力学物性に特徴を有する品種が存在するが、絹繊維を構成する主成分であるフィブロインH鎖（FibH）遺伝子はサイズが大きく、かつ高度な反復配列を多数含むため全長配列の解析が困難であり、絹糸性状と遺伝情報との関連性は不明であった。本研究ではナノポアシーケンサーを用いることで特徴的な絹糸性状を有する品種のカイコのFibH遺伝子の全長配列を解読し、品種間でFibH遺伝子の配列が異なることを明らかとした。また、絹糸の力学物性の違いに関係することが期待される配列の差異を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで困難とされてきたカイコのフィブロインH鎖（FibH）遺伝子の解析がナノポアシーケンサーを用いることで可能であることが明らかとなった。これにより、今回初めて品種間でFibH遺伝子の配列が異なることがわかった。また、絹糸性状とFibH遺伝子の配列情報との相関を検討することにより、力学物性の違いに関係することが期待される配列の差異を見出した。これらの成果は学術的な意義に加え、品種育成や遺伝子組換えによる特徴的な力学物性を有する絹糸を産生するカイコの作出等への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：There are varieties of silkworm strains that have character in the silk thread, such as thickness and physical properties. Since, the fibroin H chain (FibH) gene, which is the principal component of silk fiber, has a large size and contains many highly repetitive sequences, the sequencing of full-length FibH gene is very difficult. Therefore, the relationship between character of silk thread and genetic information was unknown. Verification of the raw silk character and sequencing the full-length FibH gene using a nanopore sequencer were performed on several silkworm strains that have characteristic silk threads. The sequences of FibH were different among the strains, and examining the correlation between the raw silk character and sequence information of the FibH gene showed expecting factor for influencing the difference in physical property of raw silks.

研究分野：蚕糸科学

キーワード：フィブロイン H鎖 絹糸性状 シルク カイコ

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

シルクはその優れた材料特性と幅広い用途により多くの人々から注目されている素材である。近年では服飾用素材としてだけでなく脱石油を目指した工業用素材としても見直されており、より強度や伸度に優れたシルクの要望が高い。これまでに数多くの品種が作出され、繭糸の織度や強度など、絹糸性状に様々な特徴を有する品種が貴重な遺伝資源として保存されている。

繭糸は主に繊維を構成するフィブロインと糊状の接着物質であるセリシンという2種の構造からなる。フィブロイン繊維は後部絹糸腺で合成されるフィブロインH鎖(FibH)、フィブロインL鎖、P25/フィブロヘキサメリンから成り、主要成分はFibHである(文献1)。FibHは結晶領域とそれをつなぐ非晶領域からなり、結晶領域のアミノ酸配列はグリシン(G)とアラニン(A)の繰り返し配列(GAGAGS)<sub>n</sub>が多数含まれる(図1)。絹糸腺で合成されたフィブロインタンパク質の解析によると品種毎に分子量が異なるフィブロインが検出されるため、フィブロインには品種間で多型があることが知られている(文献2、図1)。これらの多型は、結晶領域におけるアミノ酸の繰り返し配列の回数の違いによることが予想されているが、FibH遺伝子は塩基配列のグアニン/シトシン含量が60%と高くかつ高度な反復配列となっているため、従来の一般的な方法でFibH遺伝子の全長配列を決定することは不可能である。したがって、これまでにカイコでFibH遺伝子の全長配列がわかっているのは、莫大な時間と労力を費やしショットガン法によるゲノムシーケンスと物理地図を組み合わせて構築されたp50系統のみであり(文献3)、品種間における塩基配列の違いについては詳細が明らかとなっていない。一方で、カイコの品種間における絹糸性状の違いについては数多くの報告が存在し、同じカイコという生物が産生した物質であるにも関わらず、品種間で力学物性や太さといった絹糸性状に多様性が見られる。

この様に、研究開始当初において明らかとなっているのは品種間でカイコのFibHタンパク質の分子量に多型があるということのみであり、FibH遺伝子の配列ならびにFibHタンパク質を構成する結晶領域のサイズや数などの違いに関する知見は皆無であった。そこで、本研究ではOxford Nanopore Technologies社により実用化されたナノポアシーケンサーを用いることで、これまで実現し得なかった特徴的な絹糸性状を有する品種のFibH遺伝子の塩基配列の解読を可能とし、絹糸性状とFibH遺伝子の配列情報との関連を明らかにすることで、現行品種に比べさらに特徴的な力学物性を有する絹糸を産生するカイコの品種育成や、遺伝子組換え技術による新特性シルク産生カイコの作出といった、これまでに無い優れた絹糸性状を有するカイコの開発に向けた基盤の構築を目指した。

## 2. 研究の目的

絹糸性状は絹糸を構成するタンパク質の遺伝情報や行動を含む吐糸プロセスなど、複合的な要素により制御されているが、中でも絹糸の主成分であるFibHタンパク質の遺伝情報が重要であると考えられる。そこで、本研究ではFibH遺伝子の特異な配列により技術的に決定することが不可能であったFibH遺伝子の全長配列をナノポアシーケンサーを用いて明らかにし、これまで実現し得なかった絹糸性状とFibH遺伝子の配列との関連性を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

特徴的な絹糸性状を有するカイコの品種を選び、繭より生糸を繰製し、各品種の力学物性等について検証を行った。FibH遺伝子の全長配列の解読においては、データベースに登録されているp50系統と繭糸の強度に優れる高強度系統についてゲノムDNAを調製し、ナノポアシーケンサーでゲノムDNA配列を解読することにより、FibH遺伝子のmRNAのリファレンスとなるFibHのORF全長を含むゲノムDNA配列を取得した。また、PCRを必要とせず直接mRNAの配列を読むことが出来るナノポアシーケンサーによるダイレクトRNAシーケンシングにより、FibH遺伝子のmRNA配列を解読し、ゲノムDNAの配列情報と合わせ全長配列の解析を行った。得られたp50系統と高強度系統のFibH遺伝子の配列のアライメントならびに結晶/非晶領域の予測を行い、系統間の差異について検討を行った。

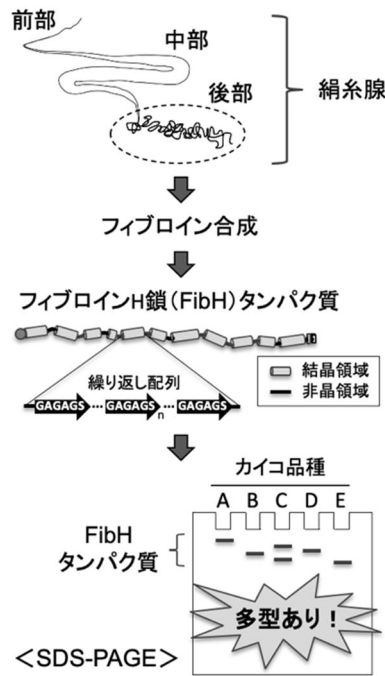


図1

#### 4. 研究成果

繭糸性状ならびに生糸の力学物性について検討を行った。今回の検討に用いた p50 系統ならびに高強度系統の平均繭糸繊度はともに 2 デニール(d)内外であり、大きな違いは見られなかった。一般的な実用品種が 3d 内外であることを考えると、両系統ともに繊度が細めの系統であることがわかる。繭糸長については、一般的な実用品種の繭糸長が 1200~1500m 程度であるのに対し、p50 系統は 230m 程度と非常に短く、高強度系統も 450m 程度と短い結果であった(図 2)。

10 粒の定粒繭糸により繰製した 20d 内外の生糸を用いて力学物性を測定した結果、p50 系統では 1d あたり約 3.8 g の強度を有するのに対し、高強度系統は約 5.2 g であり、高強度系統の方が有意に強度に優れることが確認された。一方、伸度に関しては p50 系統では約 27% であるのに対し、高強度系統は約 22% であり、p50 系統の方が有意に伸度に優れることがわかった(図 3)。

FibH 遺伝子の mRNA のリファレンスとなるゲノム DNA 配列の解読を行った。p50 系統と高強度系統の蛹からゲノム DNA を調製し、ナノポアシーケンサーにより解読を行った。リード長が 10kb 以上の配列を抽出した後、Blast 検索によりデータベースに登録されている p50 系統の FibH 遺伝子に類似した配列を含むリードを選抜し、データベースに登録されている p50 系統の FibH 遺伝子の配列とアライメントを行った。

FibH の mRNA の解読については、p50 系統と高強度系統の終齢幼虫の後部絹糸腺から mRNA を調製し、ナノポアシーケンサーのダイレクト RNA シーケンシングにより解読を行った。リード長が 10kb 以上の配列を抽出した後、Blast 検索によりデータベースに登録されている p50 系統の FibH 遺伝子に類似した配列を含むリードを選抜し、各系統のゲノム DNA 配列とともにアライメントを行った。

今回の検討により、グアニン/シトシン含量が高くかつ高度な反復配列となっている FibH 遺伝子であっても、ナノポアシーケンサーを用いることで約 16kb ある FibH 遺伝子の ORF 全長配列を含むゲノム DNA ならびに mRNA の解読が可能であることがわかった。しかし、今回の解析ではゲノム DNA および mRNA ともに正確な配列情報を同定出来るだけの十分なリード数が得られなかったため、品種間の FibH タンパク質のアミノ酸配列レベルでの検討には至らなかった。しかし、ドラフトの塩基配列情報から以下に示す新たな知見が得られた。

p50 系統と高強度系統で FibH の ORF 全長配列のサイズは大きく異ならないが、塩基配列は異なることがわかった。また、ゲノム DNA の配列と mRNA の配列を比較することにより、スプライシング部位とイントロンの数がこれまでの報告と一致することが確認された。さらに、FibH 遺伝子中の非晶領域を探索し、結晶領域の数とサイズの概要を検討した結果、p50 系統と高強度系統では結晶領域の数は同じであるが、結晶領域のサイズに違いが見られ、サイズの分布が異なることが明らかとなった(図 4)。これらの結果より、FibH を構成する結晶領域のサイズ分布が絹糸の力学物性に関係する要素の一つである可能性が見出された。

本研究成果は、現行品種に比べさらに特徴的な力学物性を有する絹糸を産生するカイコの品種育成や、遺伝子組換え技術による新特性シルク産生カイコの作出など、これまでに無い優れた絹糸性状を有するカイコの開発への貢献が期待される。

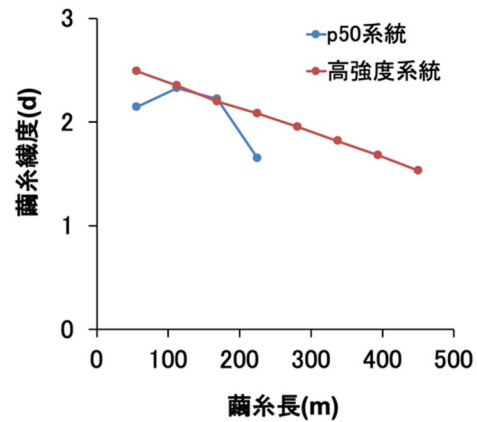


図2. 繭糸長と繊度の変化

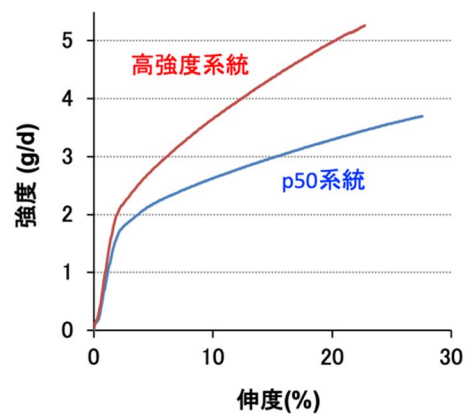


図3. 応力-ひずみ曲線

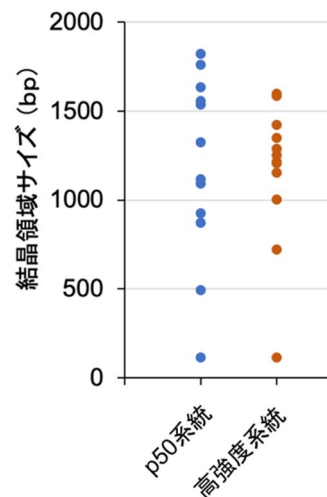


図4. 結晶領域のサイズ分布

<引用文献>

1. 小島 桂、伊賀 正年、機能性・力学物性改変シルク、蚕糸・昆虫バイオテック 86、2017、39-45
2. Ronald F. Manning and L. Patrick Gage、 Internal Structure of the Silk Fibroin Gene of *Bombyx Mori*. II. Remarkable Polymorphism of the Organization of Crystalline and Amorphous Coding Sequences、 J. Biol. Chem.、 255、 1980、 9451-9457
3. Cong-Zhao Zhou et al.、 Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene、 Nucleic Acids Res.、 28、 2000、 2413-2419

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----