

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22580060  
 研究課題名（和文） 水生昆虫バイオシルクの特性解明、高機能化、医工学分野への応用  
 研究課題名（英文） Physical characters and application of *Stenopsyche marmorata* silk protein  
 研究代表者  
 塚田 益裕（TSUKADA MASUHIRO）  
 信州大学・繊維学部・教授  
 研究者番号：20414922

研究成果の概要（和文）：ヒゲナガカワトビケラ幼虫絹糸腺からシルクタンパク質を溶液として調製する方法を確立した。シルクタンパク質の主成分は1種の高分子量タンパク質と3種の低分子量タンパク質であり、これらを Smsp-1, 2, 3, 4 と命名し、cDNA のクローニングを行った。さらに、シルクタンパク質の化学構造を  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS 固体 NMR スペクトル測定で評価した。シルクタンパク質への金属吸着挙動と医薬品を包括した DDS 担体としての可能性を追求した。

研究成果の概要（英文）：We established a method for preparation of the silk protein solution from the silk glands of *Stenopsyche marmorata* larvae. The silk protein solution contained one major and high molecular weight protein (~350 kDa) and three low molecular weight proteins. These proteins were designated as Smsp-1, 2, 3, and 4. We isolated cDNA clones of Smsps from *S. marmorata* silk glands. Furthermore, chemical structure of the *S. marmorata* silk was analyzed with  $^{13}\text{C}$  CP-MAS solid state NMR spectra. The silk was effective as the heavy metal absorption substrate and as DDS material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、応用昆虫学

キーワード：水生昆虫、素材利用技術、細胞培養床、遺伝子工学、タンパク質工学、幼虫、材料工学、吸着材料

## 1. 研究開始当初の背景

シルクは生物に由来する広範な繊維状タ

ンパク質の呼称である。河川や湖沼などの淡水域に生育する水生昆虫類は、バイオン

ルクを産出することが知られている。それらは「虫体の固定」、「食物の捕捉」、「対捕食者防御」等にバイオシルクを利用する。水生昆虫バイオシルクは、カイコとは異なり、気相中ではなく「水中環境」で繊維形成するという興味深い特徴を有する。また、急流下でも切断しない優れた強度を持ち、水中という特殊な生育環境条件下で凝固する「セメント」としての特徴も併せ持つ。これらのことは、水生昆虫バイオシルクは、カイコシルクとは異なる「分子構造」と「機能」を保有することを強く示唆しており、医療分野や医工学的な視野からの新材料として注目すべき未利用資源であると考えられる。

## 2. 研究の目的

### ① 水生昆虫バイオシルクの溶解技術の開発

ヒゲナガカワトビケラのバイオシルクの特性解析を進めるためには、可溶化が必要である。そこで、バイオシルクの可溶化手法を改良し、安定かつ大量に調製可能な溶解技術を確立する。バイオシルクの可溶化は、膜状、ゲル状、繊維状等、様々な形態の試料作製が可能となり、その応用用途が広範となる。

### ② 水生昆虫バイオシルクの特性解析

ヒゲナガカワトビケラ幼虫のバイオシルクタンパク質の構造と物理的特性を明らかにする。

### ③ 化学修飾加工による水生昆虫バイオシルクへの高機能性付与

ネットシルクに対して化学修飾加工を施し、繊維表面を改質することにより新機能を付与する。

### ④ 水生昆虫バイオシルクを用いた材料工学研究及び医工学分野への応用

バイオシルクの理化学的な特性を活用して低分子物質の吸着特性を解明するとともに、薬物を包括したバイオシルクゲルを作製し、DDS 担体としての医工学分野への応用化を検討する。

## 3. 研究の方法

### ①水生昆虫バイオシルクの溶解技術の開発

長野県千曲川中流域既からヒゲナガカワトビケラの5 齢幼虫を採集し、摘出した絹糸腺からの試料調製を試みた。尿素と還元剤である DTT 等の最適条件の検討を行った。また、プロテアーゼ分解を抑制するため、阻害剤による分解抑制を検討した。

### ② 水生昆虫バイオシルクの特性解析

バイオシルク溶液に含まれるタンパク質成分の分析（電気泳動解析、アミノ酸配列解析）を行い、得られたデータをもとに、シルクタンパク質の遺伝子クローニングを行った。また、ネットシルクの分子構造について、FTIR、DSC、<sup>13</sup>C-CP/MAS 固体 NMR 装置により解析を行った。

### ③ 化学修飾加工による水生昆虫バイオシルクへの高機能性付与

ヒゲナガカワトビケラのバイオシルクを産業材料として応用するため、化学修飾加工によるネットシルク表面の化学改質を行った。反応は EDTA 2 塩基酸無水物を溶解した DMSO 系にて行った。すなわち、10 wt%の EDTA 2 塩基酸無水物を含む DMF 溶液中、80°Cにて 8 時間加熱することで、塩基性アミノ酸分子側鎖が化学修飾されたバイオシルクを製造した。

### ④ 水生昆虫バイオシルクを用いた医工学分野への応用

化学修飾加工したバイオシルクを Cd, Pb, Zn イオン水溶液に浸漬することにより金属イオンの吸着実験を行った。また、0.28 M 硝酸中にて 30 分間静置することで金属イオンの脱着を行った。金属イオンの定量は ICP-AES にて行った。薬物（アセチルサルチル酸）を含包させたバイオシルクのハイドロゲルの製造は、絹糸腺より調製したシルク溶液をゲル状物質とし、1mM アセチルサルチル酸のエタノール溶液に浸漬することで作製した。

## 4. 研究成果

### ① 水生昆虫バイオシルクの溶解技術の開発

ヒゲナガカワトビケラ幼虫の絹糸腺からシルクタンパク質を効率的に抽出する最適条件は、9 M 尿素、1 mM DTT、3 mM EDTA を含む Tris 緩衝液（pH 8.0）であることを見出した。得られたバイオシルク溶液のプロテアーゼプロファイル解析を行ったところ、強いトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。そこで、各種プロテアーゼ阻害剤による分解抑制作用を検討したところ、ロイペプチンの添加により、著しく分解作用が低減することを見出した。

### ② 水生昆虫バイオシルクの特性解析

電気泳動解析にてシルクタンパク質の成分解析を行ったところ、主成分は約 350

kDa の高分子量タンパク質であるとともに、3 種の低分子量タンパク質の存在が判明した。これらを高分子量側から *Stenopsyche marmorata* silk protein (Smsp)-1, 2, 3, 4 と命名し、これらの N 末端および内部アミノ酸配列を明らかにした。絹糸腺より cDNA ライブラリーを作製し、各 Smsp の N 末端アミノ酸配列等を基に設計した縮重プライマーを用いて、Smsp-1~4 をコードする遺伝子のクローニングを行った。Smsp-2 の大部分は G、Y、D からなる反復配列により占められ、(SX)<sub>4</sub>E 型配列が見られた。Smsp-4 は GGW からなる反復配列が多く、(SX)<sub>4</sub>E 型配列も見られた。配列相同性検索 (BLAST) の結果、Smsp-2 や Smsp-4 には新規タンパク質であると考えられた。一方、Smsp-3 は、他種トビケラ由来の L-fibroin との高い相同性が見られた。また、Smsp-1 全長をクローニングすることは困難であったが、3' 末端断片配列をコードする cDNA クローンが得られた。さらに、Smsp-1 のアミノ酸配列分析の結果と合わせて、翻訳後修飾されたリン酸化セリンクラスターや特徴的なセグメント配列パターンを見出した。

ヒゲナガカワトビケラシルクの分子構造を解析するため、FTIR スペクトル測定を行ったところ、β ターン構造とランダムコイル構造を同時に含む繊維形態であると推定された。また、DSC 測定では、熱分解による吸熱ピークが 236°C に出現した。さらに、湿潤状態と乾燥状態における <sup>13</sup>C -CP/MAS 固体 NMR スペクトルを測定したところ、湿潤状態と乾燥状態の間でスペクトルの共鳴位置や強度に大きな違いは見られなかった。このことは、水中で吐糸形成したバイオシルク繊維中の水分が乾燥過程にて蒸発し、試料分子と水分子の凝集性が低下しても化学構造に及ぼす影響が少ないことを意味している。

### ③ 化学修飾加工による水生昆虫バイオシルクへの高機能性付与

EDTA 2 塩基酸無水物にて化学修飾したバイオシルクの FTIR スペクトルを測定したところ、未加工試料には見られない 1703 および 1165 cm<sup>-1</sup> の吸収スペクトルが出現した。前者のピークは EDTA のカルボニル基の伸縮運動に帰属することから、バイオシルク中の塩基性アミノ酸側鎖とのアシル化反応によって EDTA が化学的に結合することが明らかとなった。この化学修飾バイオシルクの DSC

曲線には、未加工試料には出現しない幅広い吸熱ピークが 300°C 付近に観察され、化学修飾を施すことによりバイオシルクの耐熱性が向上することが明らかとなった。

### ④ 水生昆虫バイオシルクを用いた医工学材料分野への応用

バイオシルクを医工学材料としての新素材として応用するため、環境汚染源となる金属 (Cd, Pb, Zn) の吸着挙動を解析した。化学修飾したバイオシルクの金属吸着量は、Cd は 0.45、Pb は 0.59、Zn は 0.42 mmol/g であった。これら金属イオンは、0.28 M 硝酸にて処理するだけでほぼ全量が脱着したことから、化学修飾バイオシルクはリサイクル可能な金属イオン吸着剤となり得ると考えられた。

薬物としてアセチルサルチル酸を包含したバイオシルクゲルを作製することに成功した。薬物の徐放挙動を解析したところ、24 時間後に薬物の徐放が確認され、作製したバイオシルクゲルが DDS 担体として有望であることが示された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiko Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013). Long-range periodic sequence of *Stenopsyche marmorata* cement/silk protein: Purification and biochemical characterization. Biofouling, 29(4), 357-367. 査読有  
DOI: 10.1080/08927014.2013.774376
- ② Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiko Tsukada and Kimio Hirabayashi (2012) Isolation of silk proteins from a caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*. Journal of Fiber Bioengineering and Informatics 5 (2), 125-137. 査読有
- ③ Masuhiko Tsukada, Md. Majibur Rahman Khan, Tomoko Tanaka, Hideaki

Morikawa (2011) Thermal characteristics and physical properties of silkfabrics grafted with phosphorous flame retardant agents. Textile Research Journal 81, 1541-1548. 査読有

- ④ Masuhiro Tsukada, Md. Majibur, E. Inoue, Goro Kimura, J. Y. Hun, M. Mishima, K. Hirabayashi (2011) Physical properties and structure of aquatic silk fiber from *Stenopsyche marmorata*. International Journal of Biological Macromolecules 46, 54-58. 査読有
- ⑤ Md. Majibur, M. Tsukada, Y. Gotoh, H. Morikawa, G. Freddi (2010) Physical properties and dyeability of silk fibers degummed with citric acid. Bioresource Technology, 101, 8439-8445. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① Kousaku Ohkawa, Masakazu Hachisu, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013) Biochemical natures of underwater silk proteins from caddisfly, *Stenopsyche marmorata*. Abstract Book, The international Textile Conference 2013, April 16-18, Daegu, Korea.
- ② Kousaku Ohkawa, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013) Characterization and nanofiber fabrication of underwater silk protein from *Stenopsyche marmorata*. Abstract of 245<sup>th</sup> American Chemical Society National Meeting, Spring 2013, March 7-11, New Orleans, LA, USA. Paper number POLY383.
- ③ 大川浩作, 野村 隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) シルクタンパク質の線維形成機構について, 2012 年 11 月 10 日, 信州大学繊維学部上田キャンパス, 日本蚕糸学会 第 66 回東北支部 第 68 回中部支部 第 64 回東
- 海支部 第 78 回関西支部 第 68 回九州支部 合同大会.
- ④ 大川浩作, 野村 隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata* シルクタンパク質リン酸化と長周期配列, 2012 年 9 月 15 日, 大阪大学豊中キャンパス, (社) 日本動物学会第 83 回大阪大会.
- ⑤ Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2012) Isolation of silk proteins from a caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*. A contributed, peer-reviewed paper for Textile Bioengineering Informatics Symposium 2012, Aug. 8-12, Ueda, Proceedings.
- ⑥ Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2012) Underwater silk fibers-Biochemical natures for novel textile technology. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, July 12-16, Kochi, Japan.
- ⑦ 白雪, 石原詩織, 野村隆臣, 大川浩作, 塚田益裕, 阿部康次, 平林公男, 新井亮一, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 由来新規シルクタンパク質遺伝子のクローニング, 2012 年 6 月 21 日, 名古屋国際会議場 (名古屋), 第 12 回日本タンパク質科学学会年会.
- ⑧ 石原詩織, 山口裕子, 新井亮一, 大川浩作, 塚田益裕, 阿部康次, 平林公男, 野村隆臣, ヒゲナガカワトビケラの絹糸腺特異的 cDNA ライブラリーから見つかったセリシン様セメントタンパク質遺伝子, 2012 年 6 月 20 日, 名古屋国再開議場 (名古屋), 第 12 回日本タンパク質科学学会年会.
- ⑨ 山口裕子, 石原詩織, 新井亮一, 大川浩作, 塚田益裕, 阿部康次, 平林公男, 野村隆臣, ヒゲナガカワトビケラの絹糸腺特異的 cDNA ライブラリーから見つかった新たな Fibroin H 様シルクタ

- ンパク質遺伝子, 2012年6月20日, 名古屋国際会議場(名古屋), 第12回日本タンパク質学会年会.
- ⑩ 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルクタンパク質 Smsp-1 のホスホリル化と繊維形成機構について, 2012年6月8日, タワーホール船堀(東京), 平成24年度繊維学会年次大会.
- ⑪ 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルクタンパク質フィアルムの固体物性, 2012年5月30日, パシフィコ横浜
- ⑫ 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルク/セメントタンパク質 Smsp-1 の精製およびアミノ酸配列解析, 2012年3月30日, 東京海洋大学品川キャンパス楽水会館, 2012年度日本付着生物学会総会・研究集会(第19回)
- ⑬ Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Kimio Hirabayashi, Masuhiko Tsukada, and Koji Abe (2012) Repetitive sequential motifs of underwater silk protein from caddisfly, *Stenopsyche marmorata*, American Chemical Society, National Meeting, 2012 Spring: March 25-28, San Diego Convention Center.
- ⑭ 石原詩織, 山口裕子, 白雪, 大川浩作, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, 野村隆臣, ヒゲナガカワトビケラ絹糸腺のcDNAライブラリーの構築 -シルク関連遺伝子の探索-, 第34回日本分子生物学会, 2011年12月14日, 横浜(パシフィコ横浜)
- ⑮ 塚田益裕, 佐藤俊一, 庄村茂, 梶浦善太, ウスタビガ繭糸の理化学的特性, 日本蚕糸学会中部支部第67回, 2011年11月24日, 八ヶ岳講演セラビーリゾート泉郷
- ⑯ Masuhiko Tsukada, Degumming of silk fibers with acidic solution (invited lecture) M. Tsukada The 4th International Symposium on High-Tech Fiber Engineering for Young Researchers, 2011年6月31日, 信州大学繊維学部
- ⑰ 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルクタンパク質の周期的一次構造, 平成23年度繊維学会年次大会. 2011年6月9日, 東京(タワーホール船堀)
- ⑱ 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, 大川浩作, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫巢糸タンパク質の部分アミノ酸配列, 第60回高分子討論会. 2011年5月26日, 大阪(大阪国際会議場)
- ⑲ 小山太吾, 村田夏子, 塚田益裕, シルクフィブロインと多糖類の複合ナノファイバーの製造に関する研究 第58回日本シルク学会研究発表会. 2011年5月20日, 蚕糸科学研究所(東京)
- ⑳ 野村隆臣, 石原詩織, 大川浩作, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ絹糸腺リボゾームの生化学的特徴-リボゾーム機能の季節変動性, 2011年度(第18回)日本付着生物学会研究集会. 2011年3月27日, 東京(東京海洋大)
- ㉑ 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫巢糸タンパク質における周期的アミノ酸配列について2011年度(第18回)日本付着生物学会研究集会. 2011年3月27日, 東京(東京海洋大)

[図書] (計1件)

- ① Kousaku Ohkawa, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiko Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013). Characterization of underwater silk proteins from caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*. in Biotechnology of Silk (Eds. Tetsuo Asakura and Thomas Miller):

Springer, Dordrecht, The Netherlands,  
Chapter 6, in press. 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: 金属含有液の処理方法及びこれに用いる高分子吸着材  
発明者: 塚田益裕、森脇洋、前田徹、百瀬淳、関本有莉  
権利者: 信州大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-021511  
出願日: 2011 年 2 月 3 日  
国内外の別: 国内
- ② 名称: セリシンナノファイバーおよびその製造方法、金属イオン吸着材、染色機能増強材、耐薬品増強材、ならびにセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーおよびその製造方法  
発明者: 塚田益裕、森川英明、ジャンシアンファ  
権利者: 信州大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-288973  
出願日: 2010 年 12 月 24 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

- ① 名称: Biodegradable biopolymers made of silk proteins  
発明者: Masuhiro Tsukada, Takayuki Arai  
権利者: National Institute of Agrobiological Sciences.  
種類: 特許  
番号: US 8,048,989 B2  
取得年月日: 2011 年 11 月 1 日  
国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田 益裕 (TSUKADA MASUHIRO)  
信州大学・繊維学部・教授  
研究者番号: 20414922

(2) 研究分担者

阿部 康次 (ABE KOUJI)  
信州大学・繊維学部・教授  
研究者番号: 00126658

野村 隆臣 (NOMURA TAKAOMI)  
信州大学・繊維学部・助教  
研究者番号: 90362110

新井 亮一 (ARAI RYOUICHI)  
信州大学・繊維学部・助教  
研究者番号: 50344023