

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750133

研究課題名(和文)クモの糸の紫外線による特異的劣化機構の解明研究

研究課題名(英文) Study for elucidating the mechanism for the specific degradation of spider silk by ultraviolet rays

研究代表者

松平 崇 (MATSUHIRA, Takashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20570998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：絹糸は紫外線で容易に劣化するのに対し、クモの糸は紫外線に高い耐性を示す。この特性の違いを、糸タンパク分子の大きさ(分子量)の視点から理解することを目的とした。SDS電気泳動法で分子量を測定する場合、糸タンパクをバラバラの分子にして測定を行う。この方法で測定されたクモの糸の分子量は27万で、絹糸の35万よりも小さかった。しかし、測定条件を変えて、実際の天然タンパクに近い未還元状態のクモの糸の分子量を調べた。その結果、クモの糸の本当の分子量は絹糸よりもずっと大きく、60～70万であることが分かった。クモの糸は糸タンパクの架橋によって紫外線耐性を獲得していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, Osaki et al. showed that the silk of the *Nephila clavata* spider was more resistant to UV irradiation than that of the *Bombyx mori* silkworm. In the present study, we focused on the difference in UV resistivity between silkworm silk and spider silk from the viewpoint of molecular weight. Generally, molecular weight is determined using gel-electrophoresis method after denaturing proteins by sodium dodecyl sulfate (SDS PAGE). Here, the molecular weight of spider silk protein was determined to be 272 kDa, which is smaller than that (350 kDa) of silkworm silk using SDS PAGE. We tried to change the method for denaturing spider silk to realize the native condition. The molecular weight of native spider silk protein was determined to be about 600-700 kDa, which was much larger than that of silkworm silk. Such a large molecular weight may be ascribed to cross-linkages of protein molecules with a molecular weight of 272 kDa.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：生体関連高分子 クモの糸 紫外線 タンパク質 分子量 電気泳動 絹糸

1. 研究開始当初の背景

ジョロウグモの糸は絹糸に比べて紫外線に耐性を持つという結果が報告されている。しかし、クモの糸がなぜ劣化しにくいのかについては、明確な知見がなかった。クモの糸の劣化メカニズムを解明すれば、紫外線耐性も理解でき、ひいては繊維素材の分野に有益な情報をもたらすと考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クモの糸がタンパク質繊維でありながら、なぜ高い紫外線耐性を持つのか、そのメカニズムを化学的な観点から明らかにすることである。絹糸とクモの糸の劣化機構の違いを解明すれば、クモの糸が紫外線に強い理由が明らかになると考えた。

3. 研究の方法

クモの糸と絹糸の糸タンパクを電気泳動法 (SDS PAGE) により分析して分子量を調べ、紫外線による劣化速度を比較した。また、クモの糸束を塩酸により加水分解した後、分解生成物であるアミノ酸を色素で修飾してクロマトグラフ法により分離、検出した。検出されたシグナル強度から糸タンパクのアミノ酸組成を算出した。

4. 研究成果

(1) クモの糸の効率的な採糸方法の確立

生体高分子であるクモの糸タンパクを研究対象とする際の課題は、分析に必要な量のサンプルを確保することである。対象であるジョロウグモを安定供給するために、研究機関近隣のジョロウグモの生息地の分布調査が必要であった。また、当時、絹糸の採糸方法は確立されていたが、クモの糸の糸束を得るには困難が伴った。研究協力者である大崎茂芳 (奈良医大医, 教授) から専門的知識の提供を受けることで、クモの牽引糸の糸束を得られるようになった。

(2) 電気泳動法による分子量測定法の確立

クモの牽引糸はほとんどの溶媒に不溶であり、一般に用いられている分子量測定法をそのまま適用することはできない。しかし、高い塩濃度の水溶液に溶かした後に必要な処理を行えば、電気泳動法により分子量測定を行うことができる。紫外線照射前後のクモの糸と絹糸の分子量測定を行い、紫外線で分解していない糸タンパクの濃度を追跡した結果、クモの糸は絹糸の 1.70 倍も紫外線に強いことが明らかになった (図 1)。

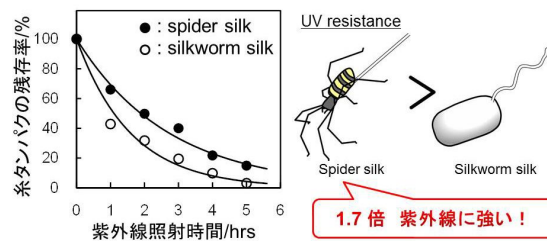


図 1. クモの糸と絹糸の紫外線耐性の比較

(3) クモの糸と絹糸の分子量の比較

糸タンパクを化学的に還元して、バラバラの分子にして測定を行う電気泳動法 (SDS PAGE) がある。この方法で測定されたクモの糸の分子量は約 27 万で、絹糸の 35 万よりも小さかった。測定条件を変えて、還元されていない、より実際に近い条件で糸の分子量を調べた。その結果、クモの糸の未還元タンパク質の分子量は絹糸よりもずっと大きいことが分かった。この還元による分子量の大幅な低下は、絹糸タンパクでは見られない現象である。クモは糸タンパクを多量化することによって、高い力学的強度や紫外線耐性を獲得していると考えられる。

(4) 紫外線によるクモの糸タンパクの切断

紫外線照射により切断されたクモの糸タンパクのペプチド断片を電気泳動法により分析したところ、不連続な分子量分布を持つペプチド断片を観測した。この結果は、糸タ

ンパクが部位特異的に切断されていることを示唆している(図2)。また、紫外線照射を行う前後のクモの糸タンパクのアミノ酸組成を比較して、どの残基が切断しやすいかを調べた。その結果、絹糸とは異なる残基の光感受性が高いことがわかった。

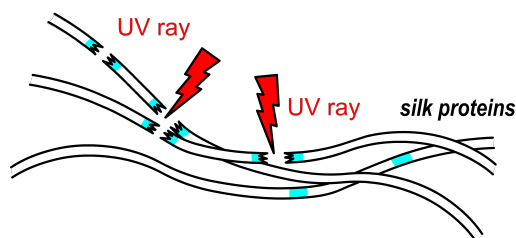


図2. クモの糸の部位特異的な切断様式

(5) まとめ

絹糸とクモの糸の紫外線による劣化機構の差異を、電気泳動法とアミノ酸組成分析を用いて比較した。その結果、紫外線照射によりクモの糸は部位特異的に切断されており、分解するアミノ酸残基も絹糸とは異なることが分かった。また、クモの糸は多量体を形成することにより絹糸よりも大きな分子量を持つことが明らかとなった。クモの糸は糸タンパクの架橋によって紫外線耐性を獲得していると考えられる。

本研究では、クモの糸がタンパク質繊維でありながら、なぜ高い紫外線耐性を持つのか、そのメカニズムの一端を、化学的な観点から明らかにすることができた。

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 2 件)

Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto and Shigeyoshi Osaki, Effects of UV irradiation on the molecular weight of spider silk,

Polymer Journal, **45**, 1167-1169, 2013.

査読有り

DOI: 10.1038/pj.2013.41

Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, Shigeyoshi Osaki, Why does the spider silk show the high resistivity of UV Rays?, *Proceedings of the 5th International Peptide Symposium*, pp 277, 2011.

査読なし

ISBN: 978-4-931541-11-5

[学会発表](計 8 件)

大崎茂芳, 松平崇, 天然のクモ糸の分子量は一体いくらなのか?, 第62回高分子討論会, 2013年, 金沢.

松平崇, 大崎茂芳, クモの糸の分子量はさらに大きかった, 第62回高分子討論会, 2013年, 金沢.

Takashi Matsuhira, Shigeyoshi Osaki, Effects of UV Rays upon Molecular Weight of Spider Silk, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), 2012, Kobe.

Takashi Matsuhira, Shigeyoshi Osaki, Effects of UV Rays upon Molecular Weight of Spider Silk, Joint Symposium, 5th International Symposium on Polymer Materials Science (ISPMS'12) & 8th Osaka University Macromolecular Symposium (OUMS'12), 2012, Osaka.

松平崇, 大崎茂芳, クモの糸の分子量に対する紫外線の影響, 第61回高分子討論会, 2012年, 名古屋.

松平崇, 大崎茂芳, クモの糸タンパク質

は多量体か？,第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年, 横浜.

松平崇, 大崎茂芳, 高分子量のクモの糸タンパク, 第 60 回高分子討論会, 2011 年, 岡山.

松平崇, 大崎茂芳, クモ糸のタンパク質の分子量, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年, 大阪.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/profile_matsuhira.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

松平 崇 (Takashi MATSUHIRA)

研究者番号: 20570998

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし