

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580086

研究課題名(和文)スズメバチが作るシルクの人工タンパク質生産と天然マユ構造の再構築

研究課題名(英文)Recombinant production and film properties of full-length hornet silk proteins

研究代表者

亀田 恒徳(Kameda, Tsunenori)

独立行政法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・ユニット長

研究者番号：70334042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：スズメバチの幼虫が作るマユ(ホーネットシルク、HS)について、構成する4種類のタンパク質(Vs1～4)を合成、構造を調べ、HSの人工生産系の基盤を築くことを本研究の目的とした。Vs1～4を大腸菌で高効率で生産する条件と見出した。Vs1～4の構造および構造転移挙動は天然HSの挙動と一致した。各pHにおけるポテンシャルを測定した結果、Vs1～4の等電点(pI)は、それぞれ、アミノ酸配列から計算されるpIの理論値と全てよく一致した。生理条件(pH 7.4)下で表面が正に帯電しているVs1と2は高い細胞接着活性を示した。

研究成果の概要(英文)：Full-length versions of the four main components of silk cocoons of *Vespa simillima* hornets, Vssilk1-4, were produced as recombinant proteins in *Escherichia coli*. In shake flasks, the recombinant Vssilk proteins yielded 160-330 mg recombinant protein/L. Films generated from solutions of single Vssilk proteins had similar secondary structure to that of films generated from native hornet silk. The films made from individual recombinant hornet silk proteins had similar or enhanced mechanical performance to that of films generated from native hornet silk. The pH-dependent changes in zeta (Zeta) potential of each Vssilk film were measured, and isoelectric points (pIs) of Vssilk1-4 were determined. Films generated from Vssilk1 and 2 had net positive charge under physiological conditions and showed significantly higher cell adhesion activity.

研究分野：昆虫利用学

キーワード：昆虫新素材

1. 研究開始当初の背景

申請者は、スズメバチの幼虫が作るマユ (ホーネットシルク)の素材化を世界に先駆けて成功し、ホーネットシルクを再生医療材料に活用することを最終目標として研究を行っていた。またホーネットシルクを構成する主要タンパク質(4種類)の存在も明らかにした。これら4種類のタンパク質のアミノ酸配列や、高次構造がコイルドホーネットシルクコイル構造を形成していることを明らかにした。

一方、ミツバチの幼虫が作るシルク(ミツバチシルク)では天然のミツバチシルクを自然界から調達することが難しく、組換え生物によって生産することが早くから検討されてきた。その研究の先駆者である Dr. Sutherland(オーストラリア国立研究所 CSIRO)は、ミツバチシルクを構成している4種のタンパク質を大腸菌で合成し、4種のすべてを組合せることで、天然マユが形成している Coiled-coil 構造が再構築されることを2010年に見出した。すなわち、天然ミツバチシルクは、構成している4種類のタンパク質の混成により形成された超分子であることがわかった。

2. 研究の目的

ホーネットシルクを構成する複数タンパク質を大腸菌培養で各々に合成し、それらを組合せることで、天然状態のホーネットシルクが再構築できることを明らかにする。

3. 研究の方法

HS を構成する4種のタンパク質 (Vs1~4)のそれぞれをコードする遺伝子の全塩基配列は既に明らかにしている。これらの全塩基配列をベクターの中に組み込み、大腸菌に導入する(図1)。最適な培養条件の決定には様々な関連因子について検討を行う必要があり、長時間を要してしまう。ここでは、目的のタンパク質が発現できたことが確認できたら、その条件での培養を必要回数繰り返すことで、必要量のタンパク質を確保するようにする。

4. 研究成果

ホーネットシルクを構成している主要4種タンパク質(Vs1~4)について、それらをコードするDNAをpETベクター(Novagen製)に挿入し、それぞれの組換えベクターを得た。これらを用いて Rosetta2(DE3)大腸菌(novagen製)を形質転換し、培養の最適条件の検討を行った。

その結果、Vs1~4の収率は、大腸菌懸濁液10当たり、それぞれ340(25培養時)、170(31培養時)、250(31培養時)、360(31培養時)mgであり、高い収率でタンパク質が得られることが分かった。

得られたVs1~4はすべてヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に可溶であり、溶液をシャーレ上に流延して乾燥することで、柔軟性のある透明なフィルムを得ることができた(図2)。乾燥直後に形成されるフィルム中ではヘリックスを形成していた。その後、エタノールに漬すとシートへの構造転移が起こったが、ヘリックスも一部残った。こうした構造変化は天然ホーネットシルクの挙動と一致した。各pHにおけるポテンシャルを測定した結果、等電点(pI)はVs1, 2, 3, 4の順にそれぞれ8.9, 9.1, 5.0, 4.2であった。これらの値は、アミノ酸配列から計算されるpIの理論値10.29, 10.18, 5.76, 4.38と全てよく一致した。生理条件(pH7.4)下で表面電荷が正に帯電しているVs1と2は高い細胞接着活性を示した。

タンパク質の大量生産に向けた培養条件の更なる効率化を検討する傍らで、ホーネットシルクに細胞接着機能を有するペプチド(Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS))を導入することで、ホーネットシルクの機能性付加についての検討を行った。実験の結果、ホーネットシルクを構成するタンパク質の1つであるVs1の全長にRGDSが付加したタンパク質の培養に成功した。得られたRGDS含有シルクをフィルム化して、その上に繊維芽細胞を播種し、細胞接着活性を調べたところ、RGDS付加による細胞接着性の顕著な向上が認められた(図3)。

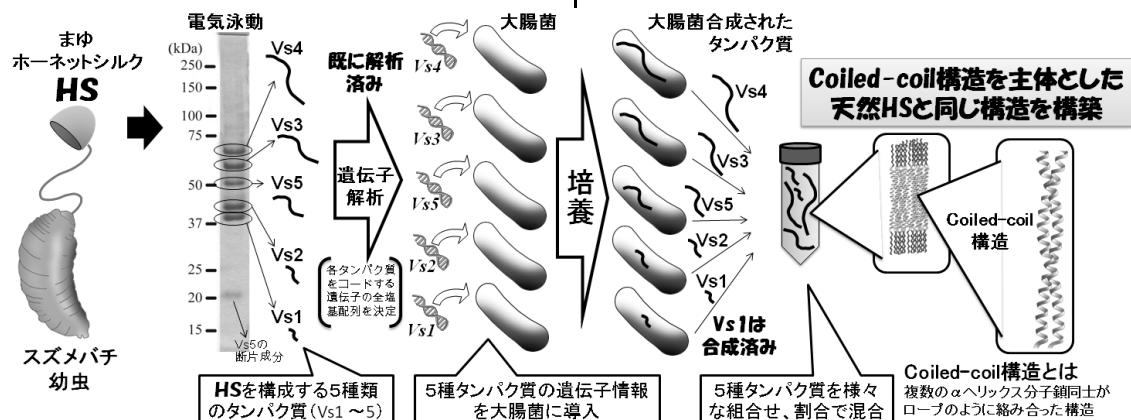


図1 大腸菌培養から天然ホーネットシルク構造の再構築までの研究の流れ



図2 人工合成したホーネットシルクのフィルム。天然ホーネットシルク(Native hornet silk)、および家蚕絹フィブロイン(B. mori silk)のフィルムも比較で示した。

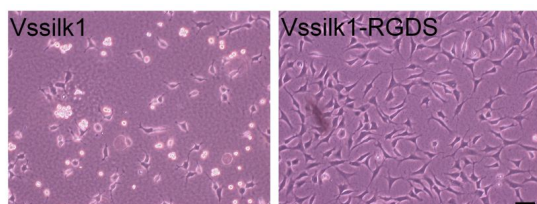


図3 Vs1 および Vs1-RGDS のフィルム表面への NIH3T3 繊維芽細胞の接着の様子。(Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)) を導入することで細胞の接着性が顕著に向上していることがわかる。

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)

Kambe, Y., Sutherland, T. D., and Kameda T., (2014) Recombinant production and film properties of single full-length hornet silk proteins, *Acta Biomaterialia*, 10, 3590-3598.

Kambe, Y., Kameda, T., (2014) Production and cell adhesion activity of recombinant full-length hornet silk protein fused with RGDS peptide, *J. Silk Sci. Tech. Jpn.*, 22, 47-49.

〔学会発表〕(計 5 件)

神戸裕介, 亀田恒徳, Sutherland T, 玉田靖 (2013) スズメバチが作るシルクの大腸菌生産系構築と機能評価 高分子学会予稿集 62(1):1878 (2013.5.29-31、京都国際会館)

亀田恒徳 (2013) シルクタンパク質でつくる医療・香料・電子材料 アグリビジネス創出フェア 2013 : (2013.10.25 東京ビックサイト)

亀田恒徳、新しい生物資源としてのホーネットシルク”、つくば医工連携フォーラム、(2013.1.29 産総研つくば)

Kameda T (2014) Use of insect fibrous proteins: fabrication, characterization and functionalization of silk produced by hornet (*Vespa*) larvae **JSPS AA Science Platform Program on Neo-Fiber Technology Seminar Series 9**:12-15

亀田恒徳 (2014) スズメバチのシルクで作る環境低負荷材料 **第63回高分子学会年次大会予稿集** 63(1):3697-3698

〔図書〕(計 4 件)

Kameda T, Walker A.A, Sutherland T.D (2014) Evolution and application of coiled coil silks from insects *Biotechnology of Silk* (5):87-106.

亀田恒徳 (2013) 素材利用の立場から見たスズメバチの繭 - 繭の形態と物性 -, 昆虫バイオテック、82, 175-185.

亀田恒徳、スズメバチの繭由来の新シルク素材 - その特性と利用可能性について - 『昆虫科学読本 一虫の目で見た驚きの世界』 昆虫科学連合編、東海大学出版会 230-242

河原豊, 吉岡太陽, 亀田恒徳 (2014) エレクトロスピニング法によるバイオナノファイバーの開発 高機能性繊維の最前線 ~ 医療、介護、ヘルスケアへの応用 ~ 2(3):32-41

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 蜂のシルク蛋白質の水溶液とその製造方法

発明者: 亀田恒徳

権利者: 農業生物資源研究所

種類: PCT

番号: PCT/JP2014/064155

出願年月日: 2013年5月28日

国内外の別: 国外

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀田 恒徳 (KAMEDA TSUNENORI)
(独) 農業生物資源研究所・新機能素材研
究開発ユニット・ユニット長
研究者番号：70334042

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：