

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660267

研究課題名(和文)スパイダーシルク完全長cDNAの獲得とその全塩基配列の決定

研究課題名(英文)Acquisition of complete cDNA of spider dragline protein

研究代表者

桑名 芳彦 (Kuwana, Yoshihiko)

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・主任研究員

研究者番号：30370654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は遺伝子組換え技術を用いて、クモの牽引糸タンパク質をコードする遺伝子をカイコに導入し、カイコシルクの強度と弾性を向上させることに成功した。その強度及び弾性をさらに向上させるべく、本研究において、オニグモの牽引糸タンパク質をコードする遺伝子の全長配列を獲得することを目指した。クモ糸の遺伝子は、長鎖かつ反復配列が多いという特徴があるので、本研究では通常のクローニング法とは異なる手法を用いた。その結果、1kb弱の遺伝子が得られたが、目標とする10kb超には至らなかった。今後、本研究で用いた実験システムを用いて、より長鎖の遺伝子を獲得していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in developing the transgenic silkworm that expresses the fusion protein of the fibroin heavy chain and spider dragline protein in cocoon silk. The tensile characteristics, e.g. strain, stress and toughness, of the raw silk improved. In order to obtain a stronger silk, we planned to acquire a longer cDNA of spider dragline protein than that of we have. The gene of spider dragline protein is very long (>10kb) and has highly repetitive sequence. Therefore, we arranged ordinary cloning method and obtained about 1kb dragline gene from garden spiders (*Araneus ventricosus*) silk glands. Hereafter we continued to acquire longer cDNA of spider dragline protein.

研究分野：遺伝子組換えカイコ

キーワード：オニグモ 牽引糸 cDNA

1. 研究開始当初の背景

天然繊維の中でも、オニグモやジョロウグモ等のクモ糸 (= スパイダーシルク) は強く切れにくい、またよく伸びるという特徴を持つことが知られており、通常の繊維としての利用はもちろんのこと、最近では人工腱・人工靭帯等の再生医療用途等への応用が期待されている。しかし、クモは肉食で共食いの習性があるため大量飼育できず、スパイダーシルクが持つ優れた特性を素材として産業に生かせないという重大な問題があった。

そこで近年では、遺伝子工学技術を利用して、大腸菌や酵母等の微生物や細胞[1]、カイコ[2]においてスパイダーシルクタンパク質を人工的に生産する様々な試みが行われているが、これまでのところ、力学特性が大きく向上した長繊維は得られていない。

我々の研究グループでは、カイコにオニグモ牽引系タンパク質を発現させて、強度と弾性が向上し、タフネスが通常シルクの1.5倍になった新しいシルク「クモ糸シルク」を発表している[3]。これは実用化に耐えうる、世界で唯一のクモ糸タンパク質含有繊維である。しかし、もっと強度や弾性が向上した繊維を求める声も多い。

クモの糸、特に牽引糸を人工的に作成しようという試みにおいて、その実現を阻む最も大きな要因は、牽引系タンパク質をコードする遺伝子が長鎖(10kbp以上と予想されている)で反復が多いので、そのクローニングが非常に困難だからである。実際、これまでの研究では、cDNAとして2kbp程度までしか得られておらず、そのため、反復配列の特徴的な部分を繰り返した人工配列を作成し、それを大腸菌やカイコで発現させているに過ぎない。

一方、我々の先行研究[3][4]で、スパイダーシルクタンパク質のクローニングを従来法で行い、3'末端側の約2.2kbpのクローンが得られたが、10kbp以上と予想される全長のクローニングには程遠かった。また、得られた配列ですら当初はシーケンスできない、大腸菌での増幅が困難、という問題があった。しかし、これらについてはほぼ解決し、完全長cDNA獲得へ向けた技術的な裏付けが整ったところである。

2. 研究の目的

(1) 研究全体の計画と目的

スパイダーシルクのタンパク質をコードする完全長cDNAをクローニングし、その全塩基配列を決定する。さらに得られたcDNAを用いて、スパイダーシルクタンパク質を繭糸中に発現する遺伝子組換えカイコを作出し、強く切れにくい等の優れた特徴を持つシルクを創出する。

(2) 本研究における目的

長鎖かつ高度な反復配列を持つためにこれまで獲得できなかったスパイダーシルク、特にオニグモの牽引系タンパク質をコード

する完全長cDNAを、新規の手法を用いて獲得し、その塩基配列を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子の獲得

これまでの我々の研究で、オニグモの牽引系タンパク質をコードする遺伝子の3'末端側の約2kbpの部分配列を獲得し、確定している。これまでの経験で、高度な反復配列を持ったクモ糸タンパク質の遺伝子はPCRで増幅できず、また環状プラスミドを用いた通常の方法ではクローニングできないとわかっているため、PCRや環状プラスミドベクターを用いない方法を考案した。

まず採集したオニグモを解剖し、絹糸腺(特に大瓶状腺と呼ばれる、牽引系タンパク質を発現する器官)を集めて、そこからmRNAを抽出する。オリゴキャッピング法によりmRNAの5'末端側を修飾する。3'末端側の配列は我々の先行研究でその配列が明らかになっているので、その配列を利用して、逆転写酵素により第1鎖cDNAを合成する。その際、なるべく高い温度で逆転写することにより、mRNAの高次構造の影響を避けるようにする。得られた第1鎖cDNAを基に、相補鎖cDNAを合成した後、リニアプラスミドベクターに入れて、大腸菌に形質転換する。

大腸菌のコロニーは、既知の3'末端側配列を基に作成したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法によってスクリーニングする。ポジティブなクローンからその配列を読んで配列を決定する。

(2) N末端解析

オニグモ牽引系タンパク質をコードする遺伝子の全長解明に向け、オニグモ牽引系タンパク質のN末端解析を行い、遺伝子の5'末端配列の解析を試みた。

採集したオニグモを30cmほどの長さの棒の先に置き、しばらく待つとそこから自然落下する。その際に棒と体をつないでいる「命綱」が牽引系である。その牽引糸を10mg程度集めて、9M臭化リチウムに溶解し、SDS-PAGEで牽引系タンパク質を分離した後、PVDF膜にプロットし、CBB-R250で染色する。

牽引系タンパク質は300kDaを超える巨大なタンパク質だが、一番大きなサイズのバンドを切り取り、N末端解析を行った。

(3) 牽引糸の引張物性比較

造網性のクモの牽引糸の特性を比較するため、オニグモの他、ジョロウグモとオオジョロウグモから(2)に示したのと同様の方法で牽引糸を得て、引張試験機にて引張試験を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子の獲得

オリゴキャッピング法で5'末端側を修飾したmRNAをテンプレートにして、逆転写酵素Thermoscript(Life technologies)を用

いて、60、4時間逆転写して第1鎖cDNAを作成した。さらにE. coli DNA Polymeraseを用いて16、2時間処理して第2鎖cDNAを合成した。この遺伝子を、リニアプラスミドベクターpJAZZ-0K(Lucigen)にライゲーションし、ベクターに添付の大腸菌にエレクトロポレーションによって導入し、37で培養した。

得られたコロニーをスクリーニングするため、既知のオニグモ牽引系遺伝子の3'末端配列を参考にしてプローブを作成し、コロニーハイブリダイゼーションを行った。図1にその結果を示す。

赤丸で囲ったコロニーが、オニグモ牽引系遺伝子を含んでいる可能性が高いと判断されたので、それらのコロニーに含まれるインサート遺伝子の配列をDNAシーケンサ(ABI 3130)を用いて調べた。

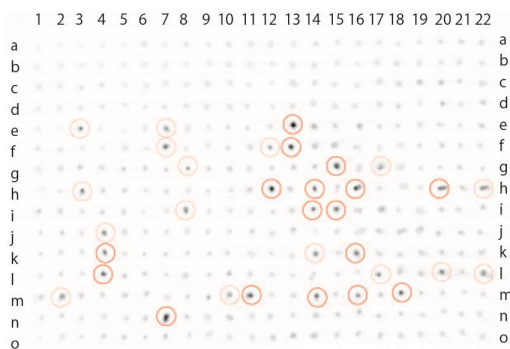


図1 コロニーハイブリダイゼーションの結果

その結果、これら赤丸を付けたコロニーは、いずれもオニグモ牽引系遺伝子を含んでいたが、得られた配列は300bpから800bpの長さであり、目標としていた「10kb以上」の配列を得ることができなかった。また、同じ配列が2回繰り返して大腸菌に入っていることもあり、反復配列の多い遺伝子のクローニングの難しさを改めて感じた。

しかし、本研究において考案した、

- ・ PCRを用いない、
- ・ 環状プラスミドを用いない、

クローニング手法により、反復配列が多い遺伝子のクローニングができることがわかったので、今後は、この手法を用いて、実験回数を増やすことで、より長い遺伝子を得ることができるものと考えている。

(2) N末端解析(アミノ酸解析)

オニグモ牽引系約10mgを300μlの9M臭化リチウムに溶かし、8M尿素で1:1に希釈してSDS-PAGEした。(図2)

その後、それらをPVDF膜にプロットした。図3は確認のため、オニグモ牽引系に特異的に当たる抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果である。プロットは、対象タン

パク質の分子量が大きいことからタンク式の容器にて行い、容器の周囲を氷で冷やしつつ、0.3A、1時間の定電流条件下(電圧は90~95V)で行った。

図3を見ると、図2では見ることはできない部分にもオニグモ牽引系特有のバンドが存在することがわかったが、CBB-R250では染色することができなかつたので、肉眼で確認可能な上2本のバンドをPVDF膜から切り取り、N末端解析を行った。

反復配列が多いため、解析は非常に困難であったが、それでも鋭意解析を進めた結果、上のバンドは「QAQTPWENTA」、下のバンドは「SGPGPYGGGA」となった。下のバンドは、オニグモ牽引系の反復配列によく似ているので、より大きなタンパク質が一部分解したものではないかと推測された。

また上のバンドから得られたデータのうち、「TPWEN」の部分は、先行文献[5]にあるコガネグモ類の牽引系のN末端解析結果とよく似ていたことから、オニグモ牽引系の5'末端である可能性が高いと考えられた。そこで、この配列を元に5'RACE法を行って5'末端の配列を決定しようと試みたが、今のところうまく行っていない。

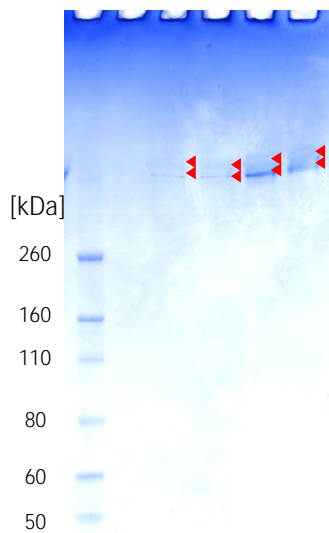


図2 オニグモ牽引系タンパク質のSDS-PAGE結果(4本のレーンは濃度の違いによる。赤印が目視できるバンド)



図3 オニグモ牽引系特異抗体を当てた結果(各レーンに4本のバンドが見える。下2本のバンドはSDS-PAGEでは目視できない。)

今後、この配列を参考にして 5'RACE 法により牽引系遺伝子の 5'末端側を決定するとともに、前記(1)で示した方法により、3'末端側からも配列を確定させていって、オニグモ牽引系の全長配列を得たいと考えている。

(3) 牽引系の引張物性比較

研究所の敷地内で採集したオニグモおよびジョロウグモと、沖縄県本島および久米島で採集したオオジョロウグモから採集した牽引系を用いた。引張り試験機での解析の結果、

- ・ オニグモの牽引系は 2本の繊維から成っているがジョロウグモ、オオジョロウグモの牽引系は 4本の繊維から成っていること、
- ・ オニグモとジョロウグモの強度はほぼ同じなのに対し、オオジョロウグモはその約 2 倍の強度があること、
- ・ オニグモ、オオジョロウグモの伸度はほぼ同じで、ジョロウグモの約 2 倍の伸度があること、

がわかった。つまり、オオジョロウグモの牽引系は、強度、伸度ともにオニグモ、ジョロウグモを凌駕し、繊維として傑出した特性を有していることが分かった。

今後は、オニグモだけでなくオオジョロウグモの牽引系遺伝子を利用することで、これまでより更に優れた特性を持ったシルクを作出できる可能性を示すことができた。

<参考文献>

- [1] Lazaris et al., Science 295:472-476 (2002),
- [2] Teule et al., PNAS 109(3):923-928 (2012)
- [3] Kuwana et al., PLOS ONE 9(8):e105325 (2014)
- [4] 小島ら, 第 32 回日本分子生物学会年会 4P-0894 (2009)
- [5] Rising et al., Biomacromolecules 7:3120-3124 (2006)

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

桑名芳彦、小島桂、瀬筒秀樹、中島健一、玉田靖、亀田恒徳、「医療用途を目指した遺伝子組換えシルク」、平成 26 年度繊維学会年次大会、2014 年 6 月 11 日。

桑名芳彦、小島桂、「スパイダーシルク牽引系の引張り物性比較」、第 61 回日本シルク学会研究発表会、2014 年 5 月 16 日。

桑名芳彦、小島桂、「クモ牽引系の引張り物性比較」、平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2014 年 3 月 10 日。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

桑名 芳彦 (KUWANA, Yoshihiko)
国立研究開発法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号：30370654

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小島 桂 (KOJIMA, Katsura)
国立研究開発法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号：40370655