

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26288101

研究課題名(和文)水生昆虫シルクナノ繊維と3次元織布技術を用いる幹細胞培養足場材料開発

研究課題名(英文)Silk nanofibers of aqueous insects and new biomaterials

研究代表者

塚田 益裕 (Tsukada, Masuhiro)

信州大学・繊維学部・特任教授

研究者番号：20414922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*)のE2Pタンパク質、および蚕シルク(SF)との混合系膜におけるMC3T3-E1細胞の付着増殖評価によると、E2P膜は、SF膜より細胞接着性は良好であった。SFと生体適合性高分子のシルク複合ナノファイバー表面ではNIH3T3細胞が、SFとポリ乳酸(PLA)の複合ナノファイバー表面では、ヒトの角膜実質細胞が良好に付着増殖することが検証された。水生昆虫のE2Pタンパク質膜およびシルク複合ナノファイバーは、細胞足場材として有効であることが示唆され、今後の再生医療技術の発展に必要なバイオ材料として利用できる展望を開くことが可能となった。

研究成果の概要(英文)：The goal of our research program is to produce silk protein materials from *S. marmorata*, aqueous insect, which can be used as a scaffold for tissue engineering. We prepared then the silk protein film, made of E2P, which contains Smsp-1 core component from aqueous silk fiber. E2P transparent film prepared thus was insolubilized by heat and/or ethanol treatment. E2P film enhanced MC3T3-E1 osteoblast-like cells. These findings suggest E2P film confirmed to be an efficient bioactive protein to mediate cell-biomaterial interaction.

Additionally, we are succeeded in preparing the SF composite nanofibers made of silk fibroin and compatible high polymers. Silk composite nanofibers showed that the incorporation of SF into compatibles high polymers enhanced Murine fibroblasts [NH3T3] cell or human keratinocytes cell adhesion and proliferation. These findings suggest silk composites materials confirmed to be an efficient bioactive protein to mediate cell-biomaterial interaction.

研究分野：生体高分子

キーワード：E2Pタンパク質 蚕シルク 細胞接着 ナノファイバー 細胞足場材

1. 研究開始当初の背景

ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の幼虫が水中で吐出するタンパク質シルク (水生昆虫シルク) は、河川中の小石と接着でき、優れた「濡れ・接着特性」を有する特徴ある天然繊維材料である。水生昆虫シルクは、我々が最近分離に成功した独自の新材料で、水に触れて凝固する特性があり、カルシウム等を吸着する機能があることが検証された。水生昆虫から分離できる機能性タンパク質の等電点は中性領域にあること、リン酸化を受けた生体高分子であることが当該研究により解明され、骨芽・軟骨芽細胞や間葉系幹細胞との適合性が高いものと期待できる。有用細胞を付着増殖する機能を備えているものとの推定から、将来は、再生医療分野にも応用できるだろう。

我々は、水生昆虫シルクを構成する超高分子量タンパク質の Smsp-1 (*Stenopsyche marmorata* silk protein-1) が水生昆虫シルクのコア成分であること、Smsp-1 がリン酸化セリン (pS) を含む親水性の高いタンパク質であることを解明した。Smsp-1 について、pS を含む (pSX)_nE モチーフと Ca²⁺ のイオン対を介した分子間・分子内相互作用による繊維形成・接着機構が提唱されている。

他方、生物由来材料の蚕シルク (SF) は高い生体適合性を示し、加工が比較的容易なため細胞足場基材としての研究が進展しているが、疎水性寄りのアミノ酸組成であることから細胞接着性には工夫の余地がある。親水性の水生昆虫シルクは SF に代わる新規材料として期待できるが、その収集効率は SF と比べて劣悪である。

生化学特性に優れていると想定できる水生昆虫シルクから比表面積が広い「ナノファイバー」が製造でき、生体細胞との接着増殖性が実証できれば、細胞培養用足場材

して有望となるであろう。水生昆虫シルクにおける有用細胞の付着増殖性を実証することができれば、バイオ材料化が可能となり、特に需要の高い骨・軟骨再生医療分野での広範な利用が期待できるであろう。

2. 研究の目的

足場材料の設計・作成および知財管理

水生昆虫シルクに SF を混合したシルク膜を製造し、その基本物性および細胞接着への影響を調査する必要がある。

水生昆虫シルクの代わりに SF とメタクリレートとのシルク複合体、あるいは SF と生体適合性のポリ乳酸とのシルク複合体を電界紡糸してシルク複合体ナノファイバーを製造し、シルク複合ナノファイバーへの NIH3T3 細胞あるいはヒトの角膜実質細胞 (Keratocyte) の付着・増殖性を評価する。

水生昆虫の集団動態解析、シルク材料の 相関調査、および、水生昆虫試料種選定・ 提供および品質管理

千曲川中流域の河道内に優占するトビケラ類を対象に、生活史のパターン等を推定する。

細胞培養実験・データ解析と管理

水槽で飼育・吐糸したシルク繊維から、シルクタンパク質の直接可溶性を試みる。シルクナノ繊維素材のリン酸化組換えシルク蛋白質調製への将来的な応用を目指す。

昆虫捕獲の適切時期特定のための時系的 遺伝子解析

水生昆虫体内の絹糸腺からより高品質で多量のシルクタンパク質を得ることができるため水生昆虫が棲息する水環境との関係で時系列的遺伝子解析が必要である。

水生昆虫シルクタンパク質の遺伝子発現 動態解析とその結果に基づく素材改良の 検討

水生昆虫シルクが新しいバイオ素材としての利用の可能性を論議し、水生昆虫シル

クナノ繊維を素材として再生医療技術の発展加速のため新規足場材料の開発を目指す。水生昆虫の主要シルクタンパク質遺伝子のクローニングおよび遺伝子発現動態解析を進める。

3. 研究の方法

足場材料の設計・作成および知財管理

水生昆虫の5齢幼虫を採集し、2段階抽出法(60 で 30 分抽出処理)でタンパク質(E2P と Smsp-1 を含む)を抽出した。

シルク複合ナノファイバーを医用分野に適用するため、SF と水溶性高分子(HEMA/HBA)とのシルク混合物あるいはSF と生体適合材料であるポリ乳酸(PLA)とのシルク混合物を電界紡糸してシルク複合ナノファイバーを製造する。シルク複合ナノファイバー表面における NIH3T3 細胞あるいはヒトの角膜実質細胞(Keratocyte)の付着・増殖性を評価した。

水生昆虫の集団動態解析,シルク材料の 関連調査、および、水生昆虫試料種選定・ 提供および品質管理

上田市常田地区の瀬と流程の異なる千曲川中流域の岩野地区の瀬2地点で、トビケラ群集を各地点で3回採集し解析に用いた。

細胞培養実験・データ解析と管理

シルクタンパク質にタンパク質変性剤を作用させて可溶化する技法を試み、シルクタンパク質収量の評価を行った。水生昆虫絹糸腺由来プロテインキナーゼ遺伝子の探索及びクローニングを実施する。

昆虫捕獲の適切時期特定のための時系的 遺伝子解析

水生昆虫の絹糸腺からシルクタンパク質を精製する手法を改良し、より多量で高品質の試料を取り出すため昆虫捕獲のための適切な時期を特定し、時系列的遺伝子解析および水温との相関を調べた。

水生昆虫シルクタンパク質の遺伝子発現 動態解析とその結果に基づく素材改良の検 討

絹糸腺内に主要なシルクタンパク質4種 *S. marmorata* silk protein (Smsp-1~4) の存在が発見でき、Smsp-1 の cDNA 断片のクローニングを行った。Smsp-2,3,4 についても、各 N 末端アミノ酸配列をもとに設計した縮重プライマーを利用し、絹糸腺 cDNA ライブラリーから Smsp-2,3,4 をコードする遺伝子(cDNA)のクローニングを行う。繊維状シルク及び絹糸腺タンパク質を電気泳動により分離し、ゲル内トリプシン消化後、質量分析測定及び絹糸腺 cDNA 配列情報を利用したタンパク質の同定を実施した。

4. 研究成果

足場材料の設計・作成および知財管理

SF あるいは水生昆虫シルク・E2P により作製したシルク膜は無色透明であり、双方のシルクを 0.5 w/v % ずつ含むシルク混合膜(条件5)は最も白くなった。P^k に対する EDS 解析から、シルク膜中の E2P 含有率とリン元素(P^k) の存在割合は正の相関を示し、シルク膜内の E2P が均一に混合されていることが確認された。

水生昆虫シルクの E2P と SF の各シルク溶液を混合して作製したシルク膜は、相分離することなく混合比の通り均一に分散していることが EDS 解析により示唆された。シルク膜に播種した MC3T3-E1 細胞観察により、E2P 添加によりシルク膜の親水性が高まり、良好な細胞接着をもたらしたものと考えられる。

繊維径 360 nm のシルク複合(SF/PLA)ナノファイバー表面では NIH3T3 細胞あるいはヒトの角膜実質細胞(Keratocyte)が効率的に付着増殖することが検証でき、細胞の足場材としての有用性が確認できた。

水生昆虫の集団動態解析,シルク材料の 関連調査、および、水生昆虫試料種選定・ 提供および品質管理

ヒゲナガカワトビケラのような大型個体種では、一個体あたりに確保できるタンパク量は比較的多いが、環境耐性に相対的に弱く、洪水などの環境かく乱要因を直接受けると個体群へのダメージが大きく、回復も遅いことを確認した。一方、ウルマーシマトビケラやウルマークダトビケラなどは、小型種であるために、大型種に比べて内的自然増加率が高く、環境かく乱に対して、相対的に強い傾向が認められたが、1匹当たりのターゲットとなるタンパク量は少ないものと予想された。

細胞培養実験・データ解析と管理

キレート化合物およびタンパク質変成剤の共存環境下において、水生昆虫シルクタンパク質主成分である Smsp-1 が可溶化できることを始めて確認した。飼育水槽内で吐糸されたシルク繊維から直接可溶化したシルクタンパク質は、動物体内の組織間や体腔内中を満たす体液と等張な緩衝液に溶解する特異機能があるため、細胞の付着・増殖のための足場材として利用できる可能性が示唆された。

幼虫絹糸線 RNA-seq 解析結果から Ser/Thr プロテインキナーゼと推定されるものがいくつか見付き、その中でも特に Fam20C ホモログに注目して遺伝子をクローニングすることに成功した

昆虫捕獲の適切時期特定のための時系列的遺伝子解析

シルクタンパク質遺伝子発現は採取時期により若干異なる。幼虫ステージが5令となる初夏において、シルクネット品質がある程度保証されることがわかり、水温が低下する冬期にはシルクタンパク質合成（翻訳）活性が低下することが検証できた。可溶化・回収される収率は、原料乾燥重量の

およそ 40-50% であり、絹糸腺からのシルクタンパク質主成分精製と比較して操作効率を向上させることが可能となった。

飼育水槽内で吐糸されたシルク繊維から、シルクタンパク質を直接可溶化させることに成功した。タンパク質組成物はカルシウムイオン等の刺激により瞬時に凝固することが見出され、医用性機能バイオ材料として広範に利用できる展望を見出すことができた。

水生昆虫シルクタンパク質の遺伝子発現 動態解析とその結果に基づく素材改良の検討

主要なシルクタンパク質の Smsp-2,3,4 の遺伝子クローニングにより、水生昆虫絹糸腺 cDNA ライブラリーから Smsp-2,3,4 をコードする遺伝子(cDNA)のクローニング、及び大腸菌による組換えタンパク質の発現に成功した。特に、Smsp-2 と Smsp-4 は、配列相同性検索の結果、有意な相同性を持つ既知タンパク質は無く、全く新規なタンパク質であることが検証された。Smsp-2 のアミノ酸配列は非常に特徴的な GYD 反復配列モチーフから主に構成され、Smsp-4 のアミノ酸配列は、特徴的な GW 反復配列モチーフを多数含んでいることを明らかにした。さらに、水生昆虫のシルク繊維及び絹糸腺タンパク質の網羅的同定を行ったところ、Smsp-1~4 以外にも、新規タンパク質を含む多くのタンパク質がシルクや絹糸腺に存在していることを見出した。例えば、絹糸腺から、ナミアゲハチョウ由来 Protein disulfide isomerase (PDI)に高い相同性 (65%)を示すタンパク質が新たに同定された。PDI は、正しいジスルフィド結合の形成を触媒する酵素であり、Smsp-2, 3, 4 等をはじめ比較的多くの Cys を含むシルクタンパク質のジスルフィド結合形成を促進する機能のあることが推測できた。また、水生昆虫のシルク繊維と絹糸腺の両方から、

クワコ由来 Serpin 2 に高い相同性(49%)を示す Y7-28 や、新規蛋白質 Y11-82 が同定された。特に、Y11-82 では、アミノ酸配列内部に GPX や GGX からなる反復配列が多く、また SXE 型配列も多く現れ、Smsp-1 等と類似した特徴が確認できた。Y11-82 は水生昆虫特有かつ重要なシルク蛋白質である可能性が高い。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Ryoichi Arai (2018) Hierarchical design of artificial proteins and complexes toward synthetic structural biology. *Biophysical Reviews*, 10, 391-410. 査読有

P.Taddei, S.Tozzi, G. Zuccheri, S. Martinotti, E. Ranzano, V. Chiono, I. Carmagnola, and M.Tsukada (2017)

Intermolecular interaction between *B.mori* silk fibroin and Poly(L-lactic acid) in electronspun composite nanofibrous scaffolds.

Materials Science and Engineering C 70(2017),777-787.査読有

Hirabayashi Kimio and Zukeran Hikari (2017) Increase in environmental light conditions boosts massive flights of aquatic insects. *Proceedings of the 9th International Conference on Urban Pests*, Matthew P. Davies, Carolin Pfeiffer and William H Robinson (Edits.) Printed by Pureprint Group, Crowson House, Uckfield, East Sussex TN22 1PH UK. 45-51. 査読有

Hirabayashi, K, Ikutama, E., Ohkawa, K., Arai, R., Nomura, T., Tsukada, M. and Abe K. (2016) Flight density of the aquatic insect

fauna over the water surface in the middle reaches of the Shinano River, Japan, mainly among Caddisflies (Trichoptera). *Zoosymposia*.

10:203-213. 査読有

平林公男 (2014) 3.2.3 中流域の多様な川虫群集、水辺と人の環境科学 (中) 小倉・竹村・谷田・松田(共編) 朝倉書店 33-36. 査読有

Kobayashi, N, Inano, K, Sasahara, K, Sato, T, Miyazawa, K, Fukuma, T, Hecht, M.H, Song, C, Murata, K, and Arai, R.(2018) Self-assembling supramolecular nanostructures constructed from de novo extender protein nanobuilding blocks, *ACS Synth. Biol.* 7, 1381-1394.

DOI: 10.1021/acssynbio.8b00007

(査読有、オープンアクセスではない)

Arai, R.(2018) Hierarchical design of artificial proteins and complexes toward synthetic structural biology, *Biophys. Rev.* 10, 391-410.

DOI: 10.1007/s12551-017-0376-1

(査読有、オープンアクセスではない)

〔学会発表〕(計5件)

Arai, R. (2018) Hierarchical design of artificial proteins and complexes toward synthetic structural biology, *Biophys. Rev.* 10, 391-410.

Okada S., Choi S. and Hirabayashi K. (2017) Secondary production of chironomidae (Diptera) in the middle reaches of the Chikuma River. *International Symposium on River and Lake Environment*.

Denda M., Miyabara Y., Kitano S., Kayaba Y. and Hirabayashi K. (2017) Development and verification of

compartment model on production at pool and riffle structure in middle reach of the Chikuma river. International Symposium on River and Lake Environment.

Hirabayashi Kimio and Zukeran Hikari (2017) Increase in environmental light conditions boosts massive flights of aquatic insects. The 9th International Conference on Urban Pests. July 9-12.

難波広樹，崔翔気，岡田峻典，大塚健斗，平林公男 (2017)，千曲川中流域におけるウルマーシマトビケラの二次生産力の変動幅．日本陸水学会甲信越支部会

〔産業財産権〕

取得状況（計1件）

名称：血液凝固溶液、血液凝固溶液の製造方法、および液体の血液塞栓性タンパク質固有組成物 E2P の製造方法

発明者：結城一郎、大川浩作、他4名

権利者：信州大学、結城一郎

種類：特許

番号：特許第6047689号

取得年月日：2016年11月25日

出願年月日：2015年03月26日

国内外の別：国内

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・特任教授

研究者番号：20414922

(2) 研究分担者

平林 公男 (HIRABAYASHI KIMIO)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：20222250

大川 浩作 (OHKAWA KOUSAKU)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：60291390

野村 隆臣 (NOMURA TAKAOMI)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：90362110

新井 亮一 (ARAI RYOICHI)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：50344023