

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H02528

研究課題名(和文) 長鎖クモ糸タンパク質遺伝子の利用による高強度シルクの創出

研究課題名(英文) Establishment of high-strength silk by using long-chain spider silk protein genes

研究代表者

小島 桂 (Kojima, Katsura)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：40370655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：オニグモの牽引糸を構成する主要タンパク質であるMaSp1, MaSp2, MaSp3 について、それらの完全長に近い3-9kbpのcDNAをクローニングし、配列を決定した。さらにこれらの遺伝子をカイコフィブロインH鎖の組換えタンパク質として発現する遺伝子組換えカイコを樹立した。遺伝子組換えカイコ繭糸の力学物性解析では、非組換え繭糸と同等かそれ以下の破断強度を示す系統がほとんどであり、これらのクモ糸タンパク質の導入によるシルクの顕著な力学物性向上効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クモの糸は、自然界で最も強度の高い繊維として知られている。クモ糸タンパク質を人工合成して活用する試みは多くなされているが、ほとんどが失敗している。その理由の一つが、天然のクモ糸タンパク質遺伝子のクローニングが極めて困難であることである。本研究では、クモ糸タンパク質3種のほぼ全長cDNAのクローニングに成功しており、クモ糸タンパク質の利活用のボトルネックの一つをクリアできることを示した。一方で、クモ糸タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコによる高強度シルクの生産には成功せず、遺伝子組換えカイコによる高強度繊維の創出には課題が残ることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cDNAs of Spider (*Araneus ventricosus*) dragline silk protein, MaSp1, MaSp2, and MaSp3, were cloned and sequenced. Each were 3-9 kbp in length, which were close to their full length. Furthermore, we established a genetically modified silkworm in which these genes are expressed as fusion proteins with the silkworm fibroin H chain. Mechanical properties of those genetically modified silkworm cocoon silks result in most of the strains showed the same or lower breaking strength as that of non-recombinant cocoon silks. The introduction of these spider silk proteins did not improve the mechanical properties of silk.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：遺伝子組換えカイコ オニグモ 縦糸 クモ糸シルク

1. 研究開始当初の背景

繊維、特に長繊維は工業的に広く用いられている。そのほとんどはナイロンやポリエステルなどの合成繊維で、特にポリエステルの使用量が最大である。合成繊維はマイクロプラスチックの発生など環境残存性や化石燃料への依存が問題である。

天然でもっとも強いタンパク質繊維は「クモの縦糸」といわれ、破断強度が高強度ポリエステルを超えるが大量生産ができない。また、人工的なクモ糸タンパク質合成の試みでも、クモ糸タンパク質遺伝子のクローニングは極めて困難な上、合成されたクモ糸タンパク質も不溶化しやすく取り扱いが困難である。これまでにクモの糸を培養細胞や大腸菌などを用いて工業的に生産して産業利用する試みが国内外で行われてきたが、クモ糸の強度を再現したタンパク質繊維は生み出されていない。

一方、申請者らはカイコのシルクにクモ糸タンパク質を発現させてシルクの強度を上げることを目指し、すでにクモ糸タンパク質遺伝子をカイコに導入して遺伝子組換えカイコの作出に成功している[Kuwana et. al., 2014]。しかし、その改変シルクの破断強度は590MPaと、通常シルクの1.1倍になったに過ぎず、クモ糸(破断強度1000MPa以上)に遠く及ばない。導入したクモ糸タンパク質の大きさが本来の300kDaに対し、60kDaと小さすぎた事が原因と考えられた。一方で、カイコに導入したクモ糸タンパク質遺伝子は世代を超えて安定に保持されており、クモ糸タンパク質も設計通りシルクに取り込まれるなど、カイコを利用するアドバンテージが大きいことは明らかである。

クモ糸タンパク質の遺伝子配列はクローニングが極めて困難な遺伝子として有名である。ゲノム配列解析などで全長配列の報告があるが、実際に全長遺伝子をクローニングした報告はない。現時点でクローニングされた最長の縦糸遺伝子は、我々が報告した約2.1kbpの遺伝子配列である[Kuwana et. al., 2014]。

2. 研究の目的

本提案では、これまで困難であった「長鎖クモ糸タンパク質遺伝子」をクローニングしてこれをフィブロインの一部としてシルクに含む遺伝子組換えカイコを作出する。これにより、一般的ポリエステルと同等以上である700MPaの破断強度を持つ新しいクモ糸シルクを創出する。創出した新しいクモ糸シルクの力学物性(破断強度・伸び・タフネス)を評価し、高強度クモ糸シルクに必要なクモ糸タンパク質の種類と組合わせを特定する。

「クモ糸シルク」は遺伝子組換えカイコが作るシルクで、オニグモの縦糸タンパク質の一部を絹糸に含む。申請者らが2014年に報告したクモ糸シルクには、約60kDaのオニグモ縦糸タンパク質が0.6wt%含まれ、非組換えシルクと比べて破断強度が1.1倍の590MPaであった。一方その後の研究で、クモ糸タンパク質の発現量を増加しても力学物性の向上が認められないという結果を得ている(未発表)。シルクにクモ糸タンパク質を発現させて力学物性を向上させるためには、これまでとは別の新しい方法でのアプローチが必要である。

3. 研究の方法

本研究計画では、オニグモの縦糸を構成するタンパク質遺伝子について、8kbpを超える長鎖遺伝子を複数種類クローニングして配列解析する。それぞれをカイコのフィブロイン合成器官である後部絹糸腺で発現するためのベクターにクローニングし、遺伝子組換えカイコを作出することでクモ糸タンパク質をシルクの一部として分泌する遺伝子組換えカイコを作出する。さらに異なるクモ糸タンパク質を発現する遺伝子組換えカイコを交配し、異なるクモ糸タンパク質の組合わせを持つシルクを創出する。これらの力学物性を解析して、改変シルクにおける「最適な縦糸タンパク質の種類と組合せ」を明らかにする。破断強度を700MPaに向上したシルクを創出する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子のクローニング

オニグモの大瓶状腺からmRNAを抽出し、SMART法を改良した手法によりcDNA合成を行って、カイコ絹糸腺発現ベクターに直接クローニングする方法で、クモ糸タンパク質遺伝子のクローニングを行った。およそ20回のcDNA合成からクローニングまでのプロセスを繰り返し、最終的にオニグモのMaSp1, MaSp2およびMaSp3の3種の主要構成タンパク質遺伝子のクローニングに成功した(図1)それぞれ、塩基長が、2.5kbp, 8.6kbp, 4.7kbpと、これまでにクローニングされた中で最長といえた。特にMaSp2は配列解析の結果ほぼ全長がクローニングされたと考えられる。これらの遺伝子は極めて繰り返しが多いためサンガーシーケンスでは配列決定ができなかった。ナノポアシーケンス(Oxford nanopore)によってのみ全長配列決定が可能であった。



図1 クローニングしたクモ糸cDNAから推測されるアミノ酸配列
 左から、MaSp1、MaSp2、MaSp3
 赤字：アラニン、緑字：プロリン 黒字：その他のアミノ酸
 いずれも、クモ糸タンパク質の特徴であるポリアラニン鎖の周期的な出現が認められる。
 MaSp2は全長に近い大きさのcDNAをクローニングできた。

(2) 遺伝子組換えカイコの作出及び、繭糸の力学物性解析

クローニングした3種の遺伝子について、それぞれ遺伝子組換えカイコの作出を行い、それぞれ3系統、5系統、1系統の遺伝子組換えカイコを作出し、系統として樹立した。それぞれの系統について、複数系統の繭から繭糸を調製し、引張試験機による力学物性解析を行った(図2)。その結果、いずれの遺伝子を導入したカイコにおいても力学強度が非組換え繭糸と同等かそれ以下となる傾向が認められた。

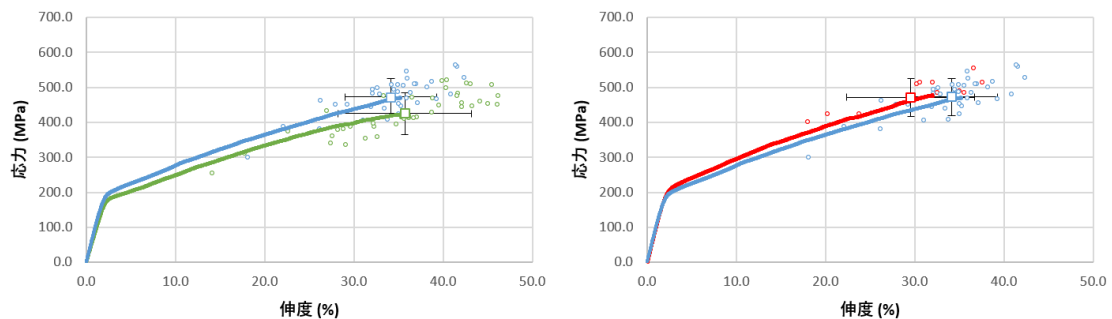


図2 遺伝子組換えカイコ繭糸の力学物性解析
 左 MaSp1を導入したクモ糸シルク。右 MaSp2を導入したクモ糸シルク。
 繭糸の破断点(丸)と、その平均(±SD)および、典型的なs-sプロットを示す。
 青線：非組換え繭糸 緑線・赤線：組換え繭糸
 MaSp1導入シルクでは、破断強度が低下したが、MaSp2を導入したシルクでは破断強度は非組換え繭糸と同等であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------