

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～23年度

課題番号：21580072

研究課題名（和文）スズメバチのシルクが有するコイルドコイル構造の精密解析と構造形成機序の解明

研究課題名（英文）Characterization and formation of coiled-coil structure in the silk produced by hornet larvae

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・主任研究員

研究者番号：70334042

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、以下ではHSと略す）が、Coiled-coil構造を主体とした構造を有していることを実験的に証明した。さらに、このCoiled coilの形成に伴うゲル形成能力を利用したCoiled coil構造から成る高伸縮性タンパク質素材を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Hornet silks, fibrous proteins present in the cocoon produced by the larvae of vespa species, are composed of four major proteins. Complete amino acid sequences of the four major proteins (Vssilk 1-4) in the hornet silk produced by the yellow hornet (*Vespa simillima*, Vespinae, Vespidae) have been determined. The amino acid sequences in Vssilk 1-4 are highly divergent, but the four proteins have some common properties. The most attractive feature of these proteins is that they have an α -helix region, which includes coiled-coil α -helices, and a β -sheet region. The aforementioned coiled-coil and β -sheet structures are responsible for the intermolecular binding between the Vssilk 1-4 proteins that make up the composite structure in hornet silk. This coiled-coil structure is restored when hornet silk gel films are formed by pressing and drying hornet silk hydrogel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：シルク・スズメバチ・タンパク質・高次構造・コイルドコイル・ゲル・フィルム・昆虫素材

1. 研究開始当初の背景

我々は、スズメバチのシルク（HS）につ

いて遺伝子解析を行い、HS のアミノ酸配列が Coiled-coil 構造を形成している確率が

非常に高いことをバインフォメクス解析から明らかにした。しかし、これまでの高次構造の解析は全てアミノ酸配列を基にバインフォメクスによって構造を予測した推定構造であり、実測に基づく、さらなる詳細な構造情報を得るためにも実証実験が必要不可欠となっていた。

2. 研究の目的

そこで、本申請課題は、HS の高次構造が Coiled coil 構造から成ることを実験的に証明することを目的とした。さらに、さらに、この Coiled coil の形成に伴うゲル形成能力を利用した Coiled coil 構造から成る高伸縮性タンパク質素材を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ラベル化 HS 作製技術の確立・・・幼虫への経口投与方法による HS の同位体ラベル化条件を確立する。
- (2) HS の Coiled coil 構造を実証・・・(1)で得たラベル化 HS を試料とした固体 NMR 測定を行い、Coiled coil 構造の形成実証につながる様々な構造情報を得る。
- (3) HS ゲルフィルムの成形過程の解明・・・HS ゲルをフィルム化、およびフィルムを延伸する過程での構造変化の様子を測定する。

4. 研究成果

HSのゲルを圧縮乾燥して作製したフィルム（ゲルフィルム）が天然状態のHSと同様の構造を有することが固体NMRおよびX線回折測定より明らかになった。そこで、このゲルフィルムの構造および物性を詳しく調べることによって、HSの天然状態での構造や物性が明らかになると考えた。ゲルフィルムは比較的容易に延伸することができ、延伸したフィルムのX線回折測定からは、分子構造に関する詳細な情報を得ることができた。この結果、HSがCoiled-coil構造を主体としていることが明らかになった。

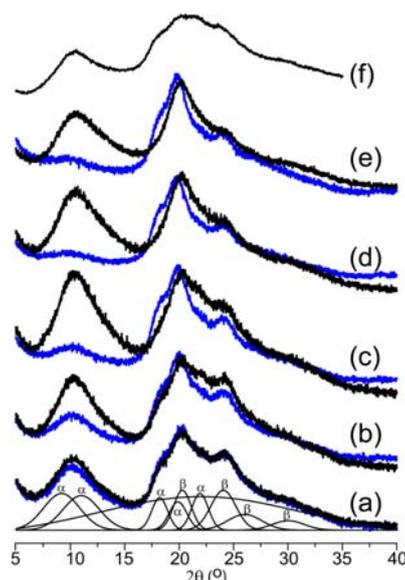


図1 ホーネットシルクのゲルフィルムの未延伸物(a), 1.25倍延伸物(b), 1.50倍延伸物(c), 1.75倍延伸物(d), 2.00倍延伸物(e), およびマユ(f)の赤道方向(黒線)および子午線方向(青線)の広角X線回折プロファイル。下段には、未延伸フィルムのプロファイルのピーク分離結果と帰属を示している。

さらに、複屈折や力学測定の結果を組み合わせることにより、ゲルフィルムの物性に Coiled-coil 構造の形成が大きく寄与していることが分かった。このような結果は、HS がゲル化する過程において、Coiled-coil の形成が、ゲル化の起点となって進行していることを示唆している。

¹³C 同位体アミノ酸を混ぜた餌を与えて5 齢スズメバチ幼虫を飼育する方法を検討した。その結果、¹³C 同位体元素を含むシルク蛋白質を幼虫体内で生合成させることに成功し、¹³C 標識 HS を得ることが可能になった。この HS を固体NMR 試料として用いることにより、同位体標識部位の構造を選択的、且つ、高感度で解析することが可能になった。さらに、磁場強度が強い高磁場固体NMRを用いることにより、スペクトルの分解能と感度が大幅に向上した。これらの技術的な進歩により、HS の延伸過程における分子鎖配向挙動を詳細に解析することに成功した。



図2 ^{13}C 同位体標識したHSの作製。 ^{13}C 同位体標識アラニン(Ala)のHSへの導入により、Alaの ^{13}C NMRピークが増大。

この解析結果は、HS中にCoiled-coil構造が形成されていること、さらに、それらが剛直な分子鎖束を形成していることを示唆するものであった。これらの結果は、上記の目的を達成するための重要な手掛かりを与えた。

さらに、幼虫に与える餌の検討から行い、 ^{13}C 同位体標識された繭を得ることを可能にした。Alaを ^{13}C 同位体標識した繭を使って固体NMR解析を行うことにより、ホーネットシルク中に存在する α -ヘリックス構造の割合を定量評価することに成功した。この結果と、バイオインフォマティクス計算からの結果を組み合わせることにより、ホーネットシルクの詳細な分子構造を解明することができた。

また、ホーネットシルクのハイドロゲルから円筒状に乾燥・収縮させてチューブを作製する技術を開発した。このチューブは、天然状態のホーネットシルクと同様のCoiled-coil構造を有し、さらに、高い伸縮性を示した。

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6件)

Kameda, T. and Aratani, E., Production and Characterizations of Tubes from Hornet (*Vespa*) Silk, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* (印刷中)

Kameda, T., Quantifying the fraction of alanine residues in an α -helical conformation in hornet silk using solid-state NMR, *Polymer Journal* (印刷中)

Kameda, T., Kojima, K., Zhang, Q. and Sezutsu, H., Identification of Hornet Silk Genewith a Characteristic Repetitive Sequence in *Vespa simillima xanthoptera*, *Comparative Biochemistry and Physiology, B*, 161, 17-24 (2012).

Kameda, T., Hashimoto, T. and Tamada, Y., Effects of supercooling and organic solvent on the formation of a silk sponge with porous 3-D structure, and its dynamical and structural characterization using solid-state NMR, *Journal of Materials Science*, 46, 7923-7930 (2011).

亀田恒徳、小島桂、瀬筒秀樹、張 薔、寺本英敏、玉田靖, コイルドコイル形成タンパク質からなるスズメバチのシルク, *高分子論文集*, 67, 641-653 (2011).

Tsunenori Kameda, Katsura Kojima, Eiji Togawa, Hideki Sezutsu, Qiang Zhang, Hidetoshi Teramoto and Yasushi Tamada, Drawing-Induced Changes in Morphology and Mechanical Properties of Hornet Silk Gel Films, *Biomacromolecules*, 15, 1002-1008 (2010).

[学会発表] (計18件)

亀田恒徳, シルク素材の最前線, バイオジャパン2011, 平成23年10月5日, パシフィコ横浜

亀田恒徳, シルクで作るタンパク質素材の新展開, アグリビジネス創出フェア, 平成23年12月2日, 幕張

Tsunenori Kameda, Hidetoshi Teramoto, Daisuke Hashizume, Hiroyuki Koshino, Katsuyuki Nishimur, Hydrogen-bonding network and rotational motion of Ser side-chain studied by solid-state NMR, 第50回NMR討論会, 平成23年11月15-18日, 横浜大さんばしホール

亀田恒徳, シルク蛋白質ゲルで作る成形体の構造と物性, 第60回高分子討論会, 平成23年9月29日, 岡山大学 津島キャンパス

亀田恒徳・小島桂・張蓄・瀬筒秀樹・玉田靖, ハチが作るシルクの構造的特徴, 平成 23 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東日本大震災のため大会は中止 (要旨のみ公表)

亀田恒徳, 張蓄, 玉田靖, 新たな医療用フィルム素材としてのホーネットシルクの利用, 繊維学会年次大会, 2010年6月16日, 東京 (船堀)

亀田恒徳・張蓄・小島桂・寺本英敏・玉田靖, 蜂シルクの特徴を活かした素材加工, 第57回日本シルク学会研究発表会, 2010年6月18日, 信州大学

亀田恒徳, 寺本英敏, 玉田靖, シルクタンパク質によるチューブ状成形体の作製とキャラクタリゼーション, 第59回高分子討論会, 2010年9月15-17, 北海道大学

Kameda, T., HORNET (VESPA) SILK, 6th INTERNATIONAL CONFERENCE ON WILD SILKMOTHS 2010, 2010年9月22, Tokyo University of Agriculture

亀田恒徳, ホーネットシルクの構造と素材化, 「群馬大学ファイブバイオプロセス研究会」第5回研究会, 2010年9月22日, 桐生地域地場産業振興センター

Kameda, T., Hornet (Vespa) silk: Structural studies by solid-state NMR, Pacificchem2010, 2010年12月15-20, 米国 (ハワイ)

亀田恒徳, ハチが作る有用物質の固体NMR構造解析, 09-1 NMR研究会, 平成21年5月15日, 東京工業大学

亀田恒徳, 張蓄, 秦珠子, 玉田靖, ホーネットシルクフィルムの延伸過程における構造と物性の変化, 平成21年度繊維学会年次大会, 平成21年6月10日, タワーホール船堀

亀田恒徳, 小島桂, 張蓄, 寺本英敏, 桑名芳彦, 玉田靖, スズメバチのシルクから作製したフィルムの延伸, 第58回高分子学会年次大会, 平成21年5月27日, 新型インフルエンザ流行のため中止 (予稿集公表)

亀田恒徳, 張蓄, 戸川英二, 玉田靖, スズメバチのシルクの階層構造制御とキャラクタリゼ

ーション, 第58回高分子討論会, 平成21年9月17日, 熊本大学

亀田恒徳, スズメバチのシルクの延伸配向挙動に関する固体NMR解析, 第48回NMR討論会, 平成21年11月11日, 九州大学

亀田恒徳, スズメバチの繭の固体NMR構造解析からタンパク質材料の高強度化技術を考える, 理研シンポジウム「第10回分析・解析技術と化学の最先端」, 平成21年12月10日, 理化学研究所

亀田恒徳, 固体NMRでタンパク質材料の高強度化の鍵を解く, 第46回固体NMR・材料フォーラム, 平成21年10月13日, 東京理科大学

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 筒状構造物及びその製造方法
発明者: 亀田恒徳, 寺本英敏, 玉田靖
権利者: 農業生物資源研究所
種類: PCT
番号: JP2011/069850
出願年月日: 2011年8月31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:
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・主任研究員

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：