

## 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25年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510028

研究課題名（和文）アレルギー性疾患予防のためのトビケラ目大量飛来時期高精度予測手法の開発

研究課題名（英文）Development of a high-precision technique for predicting massive flights of caddisflies for allergic disease prevention

研究代表者

平林 公男（HIRABAYASHI KIMIO）

信州大学・繊維学部・教授

研究者番号：20222250

研究成果の概要（和文）：ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫が作る巣網、捕獲網、巣糸タンパク質 (Larval Net Protein, LNP) をコードする遺伝子を同定し、野外個体群の遺伝子発現量を測定し、河川からの大量羽化時期の予測に応用できないかを検討した。その結果、大量に成虫となって羽化する時期（水温の高い6月～9月）に、Smsp-4 の発現量が多くなることが示唆された。LNP 遺伝子発現量とヒゲナガカワトビケラ幼虫の齢別解析の結果が良く一致するため、LNP の遺伝子発現を利用した新しいライフサイクルアセスメントへの応用が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We identified the gene which encoded the nest, net, and larval net protein (LNP) made by *Stenopsyche marmorata* larvae. We measured gene expression of population in the field and considered whether we could apply it for prediction of the time of its emergence in large quantities from the river. As a result, it was suggested that expression of Smsp-4 increased, from June to September when the water temperature is high, at the time it emerges in large quantities. Because the results well accorded with LNP gene expression of the analysis of age structure of *S. marmorata*, application to new life cycle assessments which used gene expression of LNP was feasible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：環境衛生学

科研費の分科・細目：環境学、環境影響評価・環境政策

キーワード：トビケラ目、タンパク質、クローニング、高精度発生予測、巣糸、ヒゲナガカワトビケラ、生活史、絹糸腺

## 1. 研究開始当初の背景

造網性トビケラ目幼虫はタンパク質性の絹様糸から構成されるネットを河川礫間に張り、自身の保護と捕食活動のために利用しつつ幼虫期を過ごす。幼虫は年間の特定時期

に大量・同時に羽化し、都市圏に飛来する。成虫（とくに翅表面の微毛）は人体に対して強いアレルギー性を保有していることから、公衆衛生面での重要種（有害種）と見なされる。また、河川水を水源とする水力発電所で

は、幼虫の大量発生および付着による流過水量阻害による発電効率低下が問題となっている。このように、トビケラ目水生昆虫のライフサイクルは人間の経済社会活動と密接な関係をもっている。国外においても同様な問題が数多く報告されているが、有効な解決策は見出されていない。日本国内では、平林らによりトビケラ目水生昆虫類の生態学的な調査・研究が継続され、その防除対策に応用可能な基礎的知見が蓄積されつつある。しかし、これまでの知見は、幼虫および成虫の二つの形態ステージのみに限られており、定量的なライフサイクルアセスメントの手法は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

トビケラ目昆虫の造網性幼虫が作る巣網(ネット)・巣糸タンパク質(Larval Net Protein, LNP)およびそれをコードする遺伝子を同定し、フィールドに生息する個体群の遺伝子発現量を定量する。遺伝子発現量の季節変化から、新しいライフサイクルアセスメント法を開発することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (a) *S. marmorata* 幼虫の個体群動態

調査は2010年、2011年、2012年の3年間、4月から12月までの毎月一度、千曲川中流域の2地点(常田新橋下流、冠着橋上流)において行った。サーバーネット(NGG42; 50 X 50cmのコードラートサンプル) サンプラーを用いて、各地点の瀬の部分で3サンプルずつ、試料を採集した。採集したサンプルは現地でも70%エタノールで固定し、実験室に持ち帰り、*S. marmorata* 幼虫を全て拾い出し、カウントした。幼虫の成長解析をするために、頭長を個体毎に接眼マイクロメータで計測し、頻度分布を作成して、齢を決定した。また、個体毎に湿重量も計測し、蛹化の時期を推測した。

### (b) *S. marmorata* silk proteins (Smsp) の一次構造解析

我々は、これまでに、幼虫絹糸腺内に4種の主要な幼虫ネットタンパク質(Larval Net Protein, LNP)として、*S. marmorata* silk proteins (Smsp-1~4) が存在することを明らかにした。そこで、Smsp-1~4のアミノ酸配列を推定するために、Smsp 遺伝子のクローニングを行った。Smsp-1~4のN末端アミノ酸配列を基に設計した縮重プライマーを用いて、絹糸腺 cDNA ライブラリーから Smsp-1~4 をそれぞれコードする cDNA のクローニングを行った。

### (c) LNP 検出用 PCR プライマー開発・リアルタイム PCR 法による LNP 遺伝子定量

クローニングした Smsp-1~4 の cDNA 配列を用いて、特異的に検出・定量が可能な PCR

プライマーを設計した。次に、毎月定期的にサンプリングした *S. marmorata* の絹糸腺から mRNA を抽出し、逆転写酵素を用いて調製した cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR 法により遺伝子定量解析を行った。

## 4. 研究成果

### (a) *S. marmorata* 幼虫の成長解析

調査期間中の *S. marmorata* 幼虫の生息密度の季節変化は両地点共に、同じ動態を示し、6月と11-12月に高い値(500-1000匹/m<sup>2</sup>)を示した。一方、現存量は、初春(5月)と初秋から冬期(9月~12月)に高く、60-80g/m<sup>2</sup>となった。常田新橋下流域よりも、冠着橋上流地点の方が、常に密度、現存量ともに低い傾向を示した。幼虫の成長解析の結果、5月と8月に羽化期のピークがあることが推測され、6月と9月には1, 2齢の若齢幼虫が高密度で出現した。既報告の発育ゼロ点と有効積算温度から推定した年間世代数とも一致した。大量羽化直前の蛹のステージの出現頻度は年により洪水パターンが異なるために同一ではなく、2011年では4月と8月に高かったが、2012年では4-5月、9月に高かった。

### (b) *S. marmorata* silk proteins (Smsp) の一次構造解析

Smsp-1~4のN末端アミノ酸配列を基に設計した縮重プライマーを用いて、絹糸腺 cDNA ライブラリーから Smsp-2, 3, 4 をコードする全長 cDNA のクローニングに成功した。Smsp-2 アミノ酸配列(167 aa)の大部分はG, Y, Dからなる特徴的な反復配列から構成されていた。Smsp-4 アミノ酸配列(132 aa)では、-GGW-を含む反復配列が特徴的であった。BLAST 検索の結果、Smsp-2 や Smsp-4 と有意な相同性を持つ既知蛋白質は無く、新規な蛋白質であることが判明した。また、Smsp-3 アミノ酸配列(248 残基)は、チェコ産シマトビケラ(*Hydropsyche angustipennis*)等の他種トビケラ由来のL-fibroinと顕著な相同性を有していた。一方、Smsp-1は分子量が非常に大きく、全長をクローニングすることは困難であったが、3'-末端断片配列をコードする cDNA クローンを獲得した。

### (c) LNP 検出用 PCR プライマー開発・リアルタイム PCR 法による LNP 遺伝子定量

クローニングした Smsp-1~4 の cDNA 配列を用いて、それらの遺伝子の特異的に検出・定量が可能な PCR プライマーを設計し、リアルタイム PCR 法による遺伝子定量解析の実験系の構築に成功した。

そこで、2011年4月から2012年1月の間及び2012年4月から2012年12月の間、毎月5齢幼虫を採集して、リアルタイム PCR により遺伝子発現解析を行った。その結果、Smsp-1 及び Smsp-3 は比較的安定して発現しているのに対し、Smsp-2 発現量の変動が非常

に大きい傾向が見られた。特に、Smsp-4 発現量は夏季に比較的多く、冬季には減少する傾向が見られ、幼虫巣網を形成するシルク蛋白質遺伝子は季節により変動していることが示唆された。これらの結果より、LNP の遺伝子発現解析を利用した新しいライフサイクルアセスメント法への応用の可能性が期待される。

#### 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 5 件)

- (1) Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013), Long-range periodic sequence of *Stenopsyche marmorata* cement/silk protein: Purification and biochemical characterization. *Biofouling*, 29(4), 357-367. DOI = 10.1080/08927014.2013.774376, 査読あり
- (2) Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2012), Isolation of silk proteins from a caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics* 5 (2), 125-137, 査読あり
- (3) Inoue, E., Kimura, G. and Hirabayashi, K. (2011), Distribution of benthic insects in a riffle/pool section of the middle reaches of the Shinano River, Japan, with emphasis on Trichoptera. *Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology*, 22(1)17-22, 査読あり
- (4) Hirabayashi, K., Kimura, G. and Inoue, E. (2011), Adult caddisfly (Trichoptera) attracted to artificial lights in the middle reaches of the Shinano River from 2005 to 2007. *Zoosymposia*, 5:143-146, 査読あり
- (5) Kimura, G., Inoue, E. and Hirabayashi, K. (2011), The effect of a summer flood on the density of caddisfly (Trichoptera) in the middle reaches of the Shinano River, Japan. *Zoosymposia*, 5:235-243, 査読あり

[学会発表] (計 33 件)

- (1) Kousaku Ohkawa, Masakazu Hachisu, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013), Biochemical natures of underwater silk proteins from caddisfly, *Stenopsyche marmorata*. Abstract Book, The international Textile Conference, 2013, April 16-18, Daegu, Korea, p. 90.
- (2) Kousaku Ohkawa, (2013), Bio-nanofibers -Fabrication and Engineering- Abstract

Book, The international Textile Conference 2013, April 16-18, Daegu, Korea, p. 44. (Invited lecture)

- (3) Kousaku Ohkawa, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiro Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013), Characterization and nanofiber fabrication of underwater silk protein from *Stenopsyche marmorata*. Abstract of 245<sup>th</sup>, American Chemical Society National Meeting, Spring 2013, March 7-11, New Orleans, LA, USA. Paper number POLY383.
- (4) H. Zukeran and K.Hirabayashi (2013), Exploration of biofiber for environmental technology. Life history and inster analysis of *Stenopsyche marmorata* in the middle reaches of the Shinano River, Japan, 5th International Symposium on High-Tech Fiber Engineering for Young Researcher, 2013, March 4-7, Suzhou, China.
- (5) 中山美咲, 瑞慶覧光, 渡邊直彦, 武田昌昭, 平林公男, 千曲川中流域におけるシマトビケラ科幼虫の季節変動, 日本陸水学会甲信越支部会, 2012年12月1日, 茅野
- (6) 渡邊直彦, 瑞慶覧光, 中山美咲, 武田昌昭, 平林公男, 千曲川上・中流域におけるシマトビケラ科幼虫の分布, 日本陸水学会甲信越支部会, 2012年12月1日, 茅野
- (7) 瑞慶覧光, 中山美咲, 渡邊直彦, 平林公男, 千曲川上・中流域におけるヒゲナガカワトビケラ幼虫の齢別解析, 日本陸水学会甲信越支部会, 2012年12月1日, 茅野
- (8) 大川浩作, "バイオナノファイバー", 平成24年度繊維学会ナノファイバー技術戦略研究委員会講演会「セルロース・バイオ材-最新研究から商品化まで-」, 2012年11月30日, 東京工業大学・本館3F 理学系第2会議室, 講演会要旨集 p. 16-24. (招待講演)
- (9) 大川浩作, 野村 隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) シルクタンパク質の線維形成機構について, 日本蚕糸学会 第66回東北支部 第68回中部支部 第64回東海支部 第78回関西支部 第68回九州支部 合同大会, 2012年11月10日, 信州大学繊維学部上田キャンパス, 研究発表要旨集 p. 43.
- (10) 大川浩作, "ハボウキガイから作られていた幻のクロス-生物付着現象に学ぶ先端繊維工学", 日本付着生物学会40周年記念シンポジウム「環境と付着生物との係わりの視点から今後10年先の付着生物研究を展望する」, 2012年11月8日, 東京大学農学部弥生講堂一条ホール, 講演要旨集 p. 12-13. (招待講演)
- (11) Hirabayashi, H. and Zukeran H., Massive

- flights of disruptive aquatic insects from a canal, Japan, 15th International Symposium on River and Lake Environments, 2012, October 15-18, Zhangjiajie, China.
- (12) 大川浩作, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata* シルクタンパク質リン酸化と長周期配列, (社)日本動物学会第 83 回大阪大会, 2012 年 9 月 15 日, 大阪大学豊中キャンパス, 予稿集 p. 151.
- (13) Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiko Tsukada and Kimio Hirabayashi. Isolation of silk proteins from a caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*, A contributed, peer-reviewed paper for Textile Bioengineering Informatics Symposium 2012, Aug. 8-12, Ueda, Proceedings, pp. 233-242. "Outstanding Research Award".
- (14) Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Koji Abe, Masuhiko Tsukada and Kimio Hirabayashi. Underwater silk fibers-Biochemical natures for novel textile technology, The 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, July 12-16, 2012, Kochi, Japan. Electronic Abstract Book (1 page): Paper Number P-059.
- (15) Hirabayashi K., Ohkawa K., Arai R., Nomura T., Tsukada M. and Abe K., Flight density of aquatic insects fauna over river water surface in the middle reaches of the Shinano River, Japan, with emphasis on Trichoptera, 14th International symposium on Trichoptera, 2012, July 2-7, Vladivostok, Russia.
- (16) 白雪, 石原詩織, 野村隆臣, 大川浩作, 塚田益裕, 阿部康次, 平林公男, 新井亮一, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 由来新規シルク蛋白質遺伝子のクローニング, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月 21 日, 名古屋(名古屋国際会議場), 要旨集, p.77.
- (17) 石原詩織, 山口裕子, 新井亮一, 大川浩作, 塚田益裕, 阿部康次, 平林公男, 野村隆臣, ヒゲナガカワトビケラ の絹糸腺特異的 cDNA ライブラリーから見つかったセリン様セメント蛋白質遺伝子, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月 20 日, 名古屋(名古屋国際会議場), 要旨集, p.62.
- (18) 山口裕子, 石原詩織, 新井亮一, 大川浩作, 塚田益裕, 阿部康次, 平林公男, 野村隆臣 (2012), ヒゲナガカワトビケラ の絹糸腺特異的 cDNA ライブラリーから見つ
- った新たな Fibroin H 様シルク蛋白質遺伝子, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月 20 日, 名古屋(名古屋国際会議場), 要旨集, p.62.
- (19) 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルクタンパク質 Smsp-1 のホスホリル化と繊維形成機構について, 平成 24 年度繊維学会年次大会, 2012 年 6 月 8 日, タワーホール船堀(東京), 講演要旨集 p. 114
- (20) 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルクタンパク質フィロムの固体物性, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 30 日, パシフィコ横浜, 高分子学会予稿集 61(1), p. 1939.
- (21) 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルク/セメントタンパク質 Smsp-1 の精製およびアミノ酸配列解析, 2012 年度 日本付着生物学会総会・研究集会 (第 19 回), 2012 年 3 月 30 日, 東京海洋大学品川キャンパス楽水会館, 講演要旨集 p. 17.
- (22) Kousaku Ohkawa, Yumi Miura, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Kimio Hirabayashi, Masuhiko Tsukada, and Koji Abe, Repetitive sequential motifs of underwater silk protein from caddisfly, *Stenopsyche marmorata*. Abstract of 244<sup>th</sup> American Chemical Society National Meeting, Spring 2012, March 25-28, San Diego Convention Center, Abstract CD-ROM (1 page). Paper Number BIOL163.
- (23) 石原詩織, 山口裕子, 白雪, 大川浩作, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, 野村隆臣 (2011), ヒゲナガカワトビケラ 絹糸腺の cDNA ライブラリーの構築—シルク関連遺伝子の探索, 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 14 日, 横浜 (パシフィコ横浜) 講演要旨集, Web 掲載.(18)
- (24) 大川浩作 (2011), 生物由来接着材料の工学利用法について, 第 42 回中部化学関連学協会連合秋季大会, 2011 年 11 月 6 日, 長野 (信州大学工学部) 講演要旨集, p. 190 (依頼講演).
- (25) 三浦優美, 大川浩作 (2011), ヒゲナガカワトビケラ 幼虫の水中シルク繊維形成に関与するタンパク質の周期構造, 第 42 回中部化学関連学協会連合秋季大会, 2011 年 11 月 6 日, 長野 (信州大学工

- 学部), 講演要旨集, p. 191.
- (26) 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮二, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次 (2011), ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫シルクタンパク質の周期的一次構造, 繊維学会年次大会, 2011年6月9日, 東京 (タワーホール船堀), 繊維学会予稿集 **66** (1), p. 49.
- (27) 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮一, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次, 大川浩作 (2011), ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼虫巢糸タンパク質の部分アミノ酸配列, 第60回高分子学会年次大会, 2011年5月26日, 大阪 (大阪国際会議場), 高分子学会予稿集 **60** (1), p. 2046.
- (28) 大川浩作, 三浦優美, 野村隆臣, 新井亮二, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次 (2011), ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼生巢糸タンパク質における周期的アミノ酸配列について, 2011年度 (第18回) 日本付着生物学会研究集会, 2011年3月27日, 東京 (東京海洋大), 講演要旨集, p. 10.
- (29) 野村隆臣, 石原詩織, 大川浩作, 新井亮二, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次 (2011), ヒゲナガカワトビケラ絹糸腺リボゾームの生化学的特徴—リボゾーム機能の季節変動性, 2011年度 (第18回) 日本付着生物学会研究集会, 2011年3月27日, 東京 (東京海洋大), 講演要旨集, p. 9.
- (30) 大川浩作 (2010), "Sea Silk" のファイバーテクノロジー, グリーンマテリアル新領域セミナー—生物・環境科学とファイバー工学によるグリーンイノベーション創出—, 2010年12月3日, 上田 (信州大学繊維学部) (依頼講演).
- (31) 大川浩作, 野村隆臣, 西田綾子, 新井亮二, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次 (2010), ヒゲナガカワトビケラ幼虫巢糸タンパク質のアミノ酸組成について, 繊維学会秋季大会, 2010年9月27日, 米沢 (山形大学工学部), 繊維学会予稿集 **65** (2), p. 80.
- (32) 大川浩作, 野村隆臣, 西田綾子, 新井亮二, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次 (2010), ヒゲナガカワトビケラ幼虫巢糸タンパク質の効率の調製法開発, 繊維学会年次大会, 2010年6月18日, 東京 (タワーホール船堀), 繊維学会予稿集 **65** (1), p. 60.
- (33) 大川浩作, 野村隆臣, 西田綾子, 新井亮二, 平林公男, 塚田益裕, 阿部康次 (2010), ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) 幼生巢糸タンパク質の同定および精製, 第59回高分子

学会年次大会, 2010年5月28日, 横浜 (パシフィコ横浜), 高分子学会予稿集 **59** (1), p. 1719.

〔図書〕 (計3件)

- (1) Kousaku Ohkawa, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai, Masuhiko Tsukada and Kimio Hirabayashi (2013). Characterization of underwater silk proteins from caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*. in *Biotechnology of Silk* (Eds. Tetsuo Asakura and Thomas Miller): Springer, Dordrecht, The Netherlands, Chapter 6, in press.
- (2) 山本浩之, 大川浩作 (2012). バイオ接着剤, 松本章一 監修, “接着とはく離のための高分子—開発と応用—”, 第6章, pp.122-136., シーエムシー出版, 東京.
- (3) 大川浩作, 山本浩之 (2011). バイオ接着剤, 宮入裕夫 編集委員長, “接着・解体技術総覧—資源・環境・エネルギー—”, 6章, pp. 316-323, NGT コーポレーション, 東京.

〔その他〕

ホームページ等

平林公男: 信州大学研究者総覧SOAR

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.WpTCjekV.html>

大川浩作: 信州大学研究者総覧SOAR

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.gUfejekV.html>

新井亮一: 信州大学研究者総覧SOAR

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OVkJFkV.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平林 公男 (HIRABAYASHI KIMIO)

信州大学・繊維学部・教授

研究者番号: 20222250

### (2) 研究分担者

大川 浩作 (OHKAWA KOUSAKU)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号: 60291390

新井 亮一 (ARAI RYOICHI)

信州大学・繊維学部・助教

研究者番号: 50344023