

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 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：25660269

研究課題名(和文) 融合に頼らない機能性フィブロイン作製法の構築のための基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research on development of functional-silk fiber using noncovalent immobilization strategy

研究代表者

石橋 純 (Ishibashi, Jun)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：20391576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シルク結合ペプチドYN42と機能性タンパク質の融合タンパク質を組換えカイコに発現させることにより、シルクに機能性タンパク質を固定化した。機能性タンパク質は強固に固定され、洗浄による脱落はほとんど見られなかった。また、固定化された機能性タンパク質は繊維の表面に存在し、反応性が高いことが示唆された。酵素固定化シルクは酵素活性を示し、繰り返しの使用にも耐久性を示し、固定化酵素として使用可能であった。

研究成果の概要(英文)：Functional proteins were immobilized to silk fiber using a silk-binding peptide YN42 in transgenic silkworms. The immobilized proteins were stable on washing. The immobilized proteins were localized on the surface of silk fiber, suggesting highly reactive. The immobilized enzymes were active and durable. These results suggested the enzyme-immobilized silk fibers could be used for immobilized enzymes in industry.

研究分野：農芸化学

キーワード：シルク シルク結合ペプチド 固定化 酵素 組換えカイコ 機能性シルク 固定化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

シルクに機能性を付加するためには、機能性タンパク質とフィブロインの融合タンパク質として発現する手段がとられている。しかし融合タンパク質としての機能発現には限界がある。すなわち、フィブロインタンパク質の構造による立体障害、さらにフィブロインはセリシン層に覆われているためである。このため蛍光タンパク質のように単独で機能を発現するタンパク質との融合では機能しても、酵素や抗体のように、他の分子との相互作用が必要な場合は、十分な機能が得られない可能性が高い。また、フィブロインとの融合で発現した場合、得られる融合タンパク質は、内因性のフィブロインの数%程度であり、量的に不十分で機能を発現できない可能性がある。一方で、絹糸腺内で外来タンパク質を繭一個あたり数 mg 発現させることが可能であり、シルクに機能性を付加する際の問題を解決するために、融合に頼らない新たな固定化法が必要と考えられる。

研究代表者らは抗微生物ペプチドを用いた抗菌加工剤の開発を行い、メタクリル酸ポリマーを用いて非共有結合的に繊維の修飾を行う手法を確立した。シルクにおいても、非共有結合的に機能性分子を外から結合させることにより、機能付加することが可能であることが示唆される。この行程を組換えカイコを用いて、フィブロインに対して結合活性を持つタンパク質(ペプチド)と機能性タンパク質を融合させ、絹糸腺で発現させることにより、機能性シルクを発現させることが可能になると考えられる。シルク結合ペプチドについては、横林らの予備的な報告があるが、結合の特性について詳細な解析はなされておらず、応用にはさらなる改良が必要と考えられる。本研究課題ではシルク結合タンパク質を用いた非共有結合的修飾法を確立し、本手法が機能性組換えシルクが抱える問題点を解決できる画期的手段となりうることを

証明することを目的とする。

### 2. 研究の目的

近年、カイコの組換え手法が確立され、組換えカイコを用いた有用物質生産が行われている。その中でもシルクに機能性タンパク質を融合させ、機能性を付加する試みが数多くなされているが、蛍光タンパク質等の他は、必ずしも成功しているとはいえない。本課題では、シルク結合ペプチドを用いて、組換えカイコを用いたシルクへの機能性付加を、非共有結合的に行うシステムを構築することにより、立体障害や発現量の少なさといった機能性組換えシルク開発に関わる問題点を克服する画期的手段となりうることを証明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ・シルク結合ペプチドの特性解明

横林らが報告したシルク結合ペプチド YN42 について、Fmoc 法を用いた固相合成を行う。得られたペプチドを Biacore のチップに固定化し、フィブロインに対する親和性、特異性について表面プラズモン共鳴スペクトルにより測定する。また、YN42 に対する結合配列をファージディスプレイにより取得する。

#### ・シルク結合ペプチド融合タンパク質の評価

大腸菌などを用いて、シルク結合ペプチドと EGFP、酵素等と融合させたタンパク質を発現させる。酵素としてはシロアリセルラーゼ、ルシフェラーゼを用いる。

得られた組換えタンパク質の精製を行い、それらの酵素活性を測定するとともに、シルクとの結合活性について表面プラズモン共鳴スペクトルおよびシルクへの付加実験から検討する。

#### ・シルク結合ペプチド融合タンパク質の組換えカイコを用いた発現

シルク結合ペプチドと機能性タンパク質の融合ペプチドは、セリシンのシグナルペプ

チドを付加し、UAS の下流に挿入する。得られたプラスミドをカイコ卵にマイクロインジェクションすることにより、組換えカイコを得る。組換え体の選抜には、眼で蛍光タンパク質が発現する系を用いて選択する。得られた組換えカイコと後部絹糸腺で GAL4 を発現する系統との交配を行う。融合タンパク質の発現について、リアルタイム PCR およびウェスタンブロッティングなどを用いて解析する。

#### ・機能性シルクの評価

得られた組換えカイコによる機能性シルクの生産を行う。得られたシルクについて、活性試験を行い、その機能性が発揮されているかについて検討を行う。

#### 4. 研究成果

シルク結合ペプチド YN42 を化学合成し、そのシルクへの結合特性について表面プラズモン共鳴スペクトルを用いた解析を試みたが、YN42 およびフィブロインの凝集のため、結合定数は算出できなかった。

YN42 の結合配列を明らかにするために、ファージディスプレイによる探索を行ったが、コンセンサス配列は得られなかった。YN42 の結合特異性は低いと考えられる。

大腸菌を用いて YN42 と EGFP の融合タンパク質の発現を行った。YN42-EGFP 融合タンパク質はフィブロインパウダーに結合し、水による洗浄後も溶出が見られなかった。YN42-EGFP にさらにセルラーゼおよびルシフェラーゼなどの酵素を融合したタンパク質を設計し、大腸菌による発現を行い、その酵素活性を確認した。これらの融合タンパク質にセリシンのシグナルペプチドを付加し、UAS の下流に挿入した DNA をカイコ卵に注射し、組換えカイコを得た。得られた組換えカイコを後部絹糸腺で GAL4 を発現するカイコと交配することにより、後部絹糸腺で YN42-EGFP-酵素の融合タンパク質を発現する組換えカイコを作出した。

これらの組換えカイコの生産したシルク繊維を蛍光顕微鏡で観察したところ、EGFP の蛍光は繊維の表面に局在していることが明らかになり、融合した酵素が基質と接触しやすいことが示唆された。これらの組換えカイコが生産した酵素固定化組換えシルク繊維を基質溶液中に投入したところ酵素活性を示した。また、YN42-EGFP-酵素の融合タンパク質は水、0.4%炭酸水素ナトリウム溶液、8M 尿素溶液による洗浄の後も、ほとんどがシルク繊維上に保持されていた。

酵素固定化組換えシルク繊維を基質溶液に投入し、反応をさせた後に回収し、新たな基質溶液への投入を繰り返したところ、徐々に活性は低下したものの、繰り返しの使用が可能であった。このことから、本手法により作製した酵素固定化組換えシルクは、固定化酵素として利用可能であることが明らかになった。

本研究では、シルク結合ペプチドを用いた機能性タンパク質の非共有結合的固定化が、立体障害や発現量の少なさといった機能性組換えシルク開発に関わる問題点を克服する画期的手段をとりうることを証明された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

炭谷めぐみ, 藤井-村松理香, 朝岡 愛, 皆葉正臣, 渡辺裕文, 中島健一, 飯塚哲也, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 石橋 純 (2014) シルク結合ペプチドを用いた非共有結合的タンパク質固定化の試み 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕糸学会第 84 回大会

Sumitani M, Fujii-Muramatsu R, Asaoka A, Minaba M, Watanabe H, Nakajima K, Iizuka T,

Tatematsu K, Sezutsu H, Ishibashi J (2014)  
Development of functional silk fiber using a  
silk-binding peptide, YN42 第51回ペプチド討  
論会

炭谷めぐみ, 藤井-村松理香, 朝岡 愛, 皆  
葉正臣, 渡辺裕文, 中島健一, 飯塚哲也,  
立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 石橋 純 (2015)  
組換えカイコを用いた機能性タンパク質固  
定化シルクの開発 日本農芸化学会 2015 年度  
大会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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  
石橋 純 (Ishibashi Jun)

研究者番号：20391576

(2)研究分担者  
飯塚哲也 (Iizuka Tetsuya)

研究者番号：80414879

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：