

水生昆虫トビケラシルクの新規タンパク質遺伝子の発見及び解析に成功

～信州産有用生物資源“ざざむしシルク”のバイオ・医工学分野への応用が期待～

信州大学繊維学部の「水生生物ファイバー工学共同プロジェクト」研究グループは、信州（伊那地方）で“ざざむし”としても知られる水生昆虫ヒゲナガカワトビケラ幼虫の新奇なシルクタンパク質遺伝子の発見及び解析に世界で初めて成功しました。本研究成果により、今後、信州生まれの有用生物繊維資源として“ざざむしシルク”のバイオテクノロジー及び医工学分野での応用研究につながることを期待されます。

<本研究成果のポイント>

- ・ ヒゲナガカワトビケラの水生シルクタンパク質 Smsp-2, 3, 4 の遺伝子取得及び配列解析に成功
- ・ 過去に類似の配列が全く報告されていない新規なシルクタンパク質 Smsp-2 と Smsp-4 を発見
- ・ 微生物によるシルクタンパク質発現系を構築し、今後の研究発展や応用につながることを期待

本研究成果は、生化学分野等の国際学術専門誌 *Biochemical and Biophysical Research Communications* の 8 月 28 日号に掲載されました。

<概要>

ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) は日本各地に生息する毛翅目（トビケラ目）の昆虫で、その幼虫は河川の代表的な水生昆虫であり、千曲川や天竜川をはじめ信州地域の河川にも多く生息しています。特に、信州伊那地方では“ざざむし”^{*1}とも呼ばれ、佃煮等が高級珍味としても食されており、信州地域にとって馴染みの深い生物資源の一種であります。ヒゲナガカワトビケラ幼虫は、シルク^{*2}を吐糸して巣網を張り、流れてくる有機物栄養源を捕集しています（図1）。この水中で接着性があり、川の流れにも負けない強い強度を持つという、カイコのシルクとは全く異なる特徴的な水生トビケラシルクを研究することにより、将来的に新しいバイオファイバー素材の開発や応用につながることを期待されています。そこで、我々、信州大学繊維学部内共同研究グループでは、約7年程前より、このヒゲナガカワトビケラシルクに関する研究を重ねてきており、これまでに、例えば、幼虫絹糸腺内に4種の主要なシルクタンパク質 *Stenopsyche marmorata* silk proteins (Smsp-1~4) が存在することを発見し、主要シルクタンパク質である Smsp-1 のアミノ酸配列パターン等を明らかにしてきました。そこで、さらに、他の主要シルクタンパク質遺伝子を単離し、その配列を解明することを目的として研究を進めたところ、今回、Smsp-2, 3, 4 の遺伝子の獲得及び解析に世界で初めて成功しました。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判明しました。Smsp-2 のアミノ酸配列はグリシン(G)、チロシン(Y)、アスパラギン酸(D)からなる非常に特徴的な GYD 反復配列モチーフから構成され、また、Smsp-4 のアミノ酸配列は、

グリシン(G)とトリプトファン(W)からなる特徴的な GW 反復配列モチーフを多数含んでいました(図2)。

さらに、主要シルクタンパク質 Smsp-1~4 について、バイオ実験微生物の大腸菌による組換えタンパク質発現系の構築にも成功したことより、昆虫を大量に採集や飼育等しなくても、バイオテクノロジーによりシルクタンパク質を効率よく生産できる可能性が開かれ、今後の研究の発展や応用に大いに役立つと考えられます。

本研究成果は、今後、信州生まれの有用生物資源として“ざざむしシルク”ファイバーのバイオテクノロジー及び医工学分野等での研究の発展につながり、将来的に、例えば、手術等の際に用いる止血剤・接着縫合糸等や再生医療に向けた細胞培養基材等への応用にもつながる可能性が期待されます。

本研究は、信州大学繊維学部「水生生物由来のファイバーとその工学的利用に関する学部内共同プロジェクト(水生プロ)」研究グループの信州大学繊維学部学生(卒業生)白雪さん、坂口真代さん、山口裕子さん、石原詩織さん、信州大学先鋭領域融合研究群国際ファイバー工学研究所 大川浩作教授、信州大学学術研究院繊維学系 平林公男教授(先鋭領域融合研究群山岳科学研究所併任教員兼務)、塚田益裕特任教授、野村隆臣助教、新井亮一助教(先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所協力教員兼務)らの共同研究として実施されました。

本研究成果は、生化学・生物物理学分野等の国際学術専門誌 *Biochemical and Biophysical Research Communications* の 8 月 28 日号に論文が掲載され、日本発・信州発の独自性の高い研究成果として、世界に向けて発表致しました。

<発表論文情報>

Xue Bai, Mayo Sakaguchi, Yuko Yamaguchi, Shiori Ishihara, Masuhiro Tsukada, Kimio Hirabayashi, Kousaku Ohkawa, Takaomi Nomura, Ryoichi Arai* (*Corresponding author)

“Molecular cloning, gene expression analysis, and recombinant protein expression of novel silk proteins from larvae of a retreat-maker caddisfly, *Stenopsyche marmorata*”

Biochemical and Biophysical Research Communications,

Volume 464, Issue 3, 28 August 2015, Pages 814–819.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.041

論文(Web) URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X15302722>



ヒゲナガカワトビケラ幼虫



ヒゲナガカワトビケラシルクの巣網

図1 “ざざむし”としても知られるヒゲナガカワトビケラ幼虫とそのシルクで作られた巣網

<詳細解説>

1. 背景・目的

ヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*)は日本各地に生息する毛翅目(トビケラ目)の昆虫で、その幼虫は河川の代表的な水生昆虫として知られています。千曲川や天竜川をはじめ信州地域の河川にも多く生息しており、特に、伊那地方では“ざざむし”とも呼ばれ、佃煮等に加工され高級珍味として食されており、信州地域にとって大変馴染みの深い生物資源であります。ヒゲナガカワトビケラ幼虫は、シルクを吐糸して巣網を張り、流れてくる有機物等の栄養源を捕集します。水中で接着性があり、川の流れにも負けない強い強度を持つヒゲナガカワトビケラシルク(“ざざむしシルク”)は、カイコシルクやスパイダーシルク(クモ糸)とは全く異なる独自の特性を有しています。そこで、この独特な“ざざむしシルク”を研究することにより、将来的に新奇な有用バイオファイバー素材開発への応用が期待されています。これまでに、我々信州大学繊維学部「水生プロ」研究グループでは、約7年程前より、このヒゲナガカワトビケラシルクに関して、世界に先駆けた研究を積み重ねてきました。まず、水中シルクの物理的特性や構造について調べました[1]。次に、幼虫絹糸腺内に4種の主要なシルクタンパク質、*Stenopsyche marmorata* silk proteins (Smsp-1~4)が存在することを明らかにしました[2,3]。さらに、Smsp-1のアミノ酸配列解析に成功しました[4]。そこで、今回の研究では、他の主要シルクタンパク質のSmsp-2~4の遺伝子を単離し、その配列や発現を解析することを目的としました。

2. 研究手法と成果

千曲川中流域よりヒゲナガカワトビケラの5齢幼虫を採集し、絹糸線を摘出して絹糸腺cDNAライブラリー^{*3}を調製しました。Smsp-2~4のN末端アミノ酸配列を基にした遺伝子増幅法(PCR法^{*4})等により、Smsp-2~4の遺伝子クローニング^{*5}及び全長塩基配列解析に成功しました。

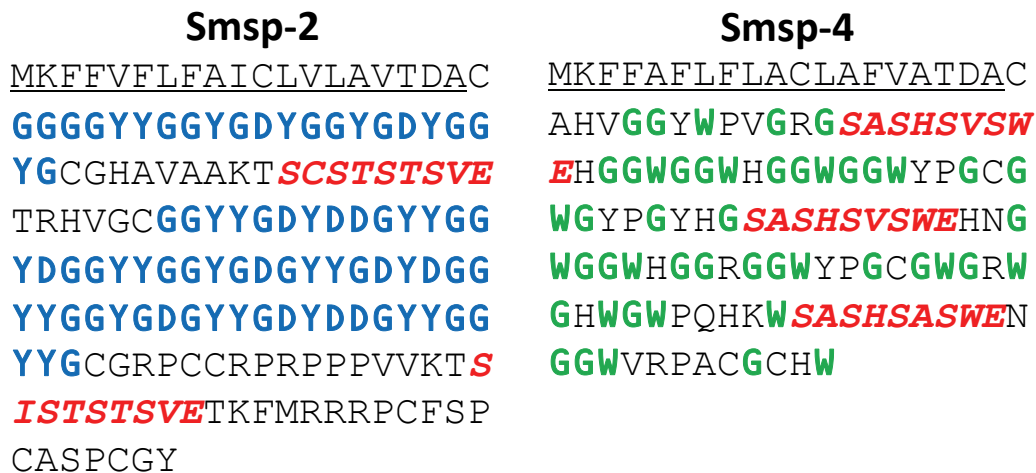


図2 ヒゲナガカワトビケラ新規シルクタンパク質 Smsp-2 と Smsp-4 のアミノ酸配列

図2のように、Smsp-2アミノ酸配列(全長167アミノ酸残基)の大部分はグリシン(G)、チロシン(Y)、アスパラギン酸(D)からなる非常に特徴的なGYD反復配列モチーフにより構成されていました。また、Smsp-4(全長132アミノ酸残基)では、グリシン(G)とトリプトファン(W)からなる特徴的なGW反復配列モチーフを多数含んでいました。配列相同性検索の結果、Smsp-2とSmsp-4は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判明しました。さらに、Smsp-2とSmsp-4には、リン酸化部位と予想される(SX)₄E配列モチーフも存在しており、実際、絹糸腺中でSmsp-4はリン酸化されていることが明らかになりました。

次に、千曲川中流域より、5月から12月の間、毎月5齢幼虫を採集して、リアルタイムPCR法により Smsp-1~4 遺伝子の発現解析を行いました(図3)。その結果、Smsp-2 発現量の変動は非常に大きく、また、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、幼虫巣網を構成するシルクタンパク質の組成は季節により変動している可能性が示唆されました。また、これらの結果等を用いて、トビケラのライフサイクルの予測手法の開発にも取り組みました[5]。

さらに、トビケラシルクタンパク質 Smsp-1~4 について、バイオテクノロジー実験微生物の大腸菌による組換えタンパク質発現系^{*6}を構築したところ、各タンパク質の発現を電気泳動により確認しました(図4)。これにより、昆虫を大量に採集や飼育しなくてもシルクタンパク質をバイオテクノロジーにより効率よく生産できる可能性が開かれ、今後の研究の発展や応用に大いに役立つと考えられます。

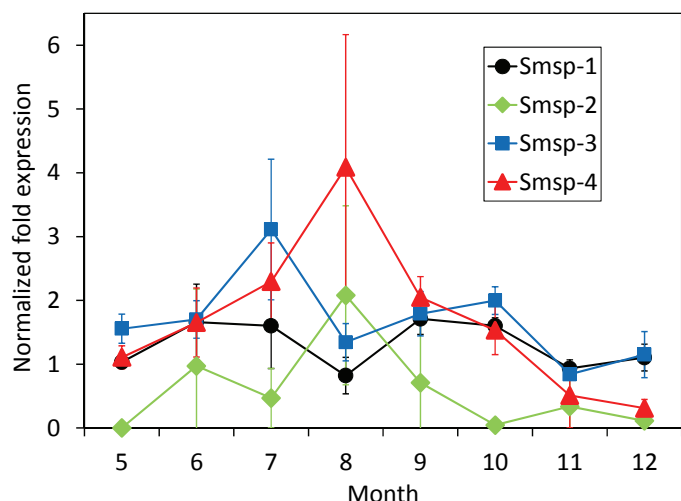


図3 トビケラシルクタンパク質 Smsp-1~4 遺伝子の季節による発現変動解析

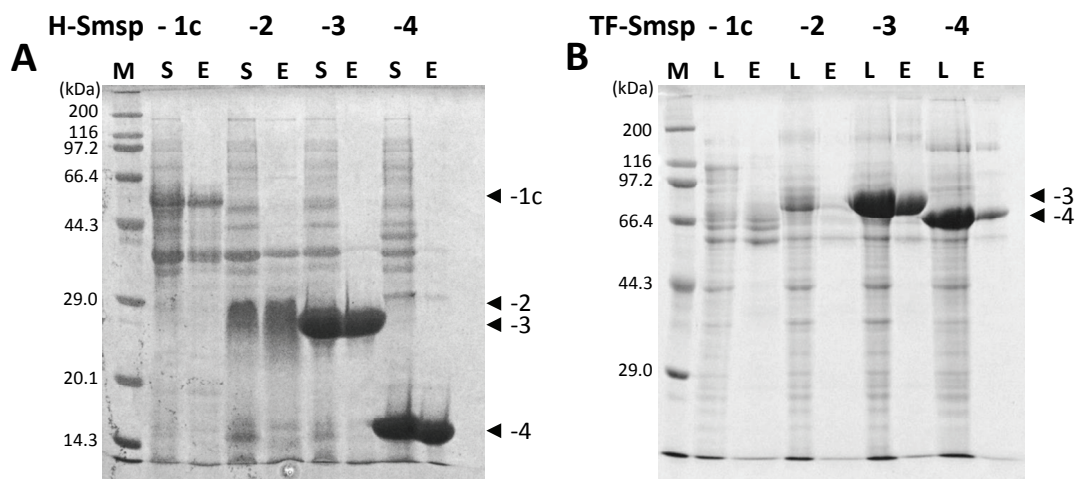


図4 トビケラシルクタンパク質 Smsp-1~4 の大腸菌による組換えタンパク質発現確認の電気泳動

3. 今後の期待

本研究により、ヒゲナガカワトビケラの主要シルクタンパク質 Smsp-2~4 の遺伝子の取得及び配列解析に世界に先駆けて成功したことにより、トビケラシルクタンパク質の理解が大きく進展するとともに、バイオ実験微生物の大腸菌による組換えシルクタンパク質の発現が可能となりました。今回の研究成果は、今後、信州生まれの独自性の高い有用生物資源として“ざざむしシルクファイバー”のバイオテクノロジー及び医工学分野等での研究の発展につながり、将来的に、例えば、手術等の際に用いる止血剤・接着縫合糸等や再生医療等に向けた細胞培養基材等への応用につながる可能性も期待されます。

<参考文献>

- [1] M. Tsukada, M.M. Khan, E. Inoue, G. Kimura, J.Y. Hun, M. Mishima, K. Hirabayashi, Physical properties and structure of aquatic silk fiber from *Stenopsyche marmorata*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 54-58 (2010).
- [2] K. Ohkawa, Y. Miura, T. Nomura, R. Arai, K. Abe, M. Tsukada, K. Hirabayashi, Isolation of silk proteins from a caddisfly larva, *Stenopsyche marmorata*, *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 5, 125-137 (2012).
- [3] K. Ohkawa, T. Nomura, R. Arai, K. Abe, M. Tsukada, K. Hirabayashi, Characterization of underwater silk proteins from Caddisfly Larva, *Stenopsyche marmorata*, in: T. Asakura, T. Miller (Eds.), *Biotechnology of Silk, Biologically-inspired Systems*, 5, Springer, Dordrecht, pp. 107-122, (2014).
- [4] K. Ohkawa, Y. Miura, T. Nomura, R. Arai, K. Abe, M. Tsukada, K. Hirabayashi, Long-range periodic sequence of the cement/silk protein of *Stenopsyche marmorata*: purification and biochemical characterisation, *Biofouling*, 29, 357-367 (2013).
- [5] 平林公男, 大川浩作, 新井亮一, 野村隆臣, 塚田益裕, 阿部康次, トビケラ目昆虫類の大量飛来時期の高精度予測手法の開発, *昆虫と自然*, 50, 42-45 (2015).

<謝辞>

本研究において、信州大学繊維学部学生（卒業生）の瑞慶覧光さん、西村歩樹さん、武舎哲矢さん、渡邊直彦さん、中山美咲さん、永井義成さん、山寄健人さん、三浦優美さん、金森茉依さん、及び、技術職員の武田昌昭さんには、サンプル採集等で大変お世話になりました。また、信州大学ヒト環境科学研究支援センター機器分析部門の石川えりさんには、質量分析実験等で大変お世話になりました。心より感謝致します。

本研究は、文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金 22113508, 24113707, 24780097 (新井亮一)、22510028 (平林公男)、22350103, 23651083 (大川浩作)、22580060, 26288101 (塚田益裕) 等の助成を受けたものです。また、信州大学若手研究者萌芽研究支援事業のご支援も頂きました。

最後に、本研究に至る一連の研究プロジェクト推進のため「水生プロ」共同研究グループの立ち上げから多大な御尽力を頂きました信州大学繊維学部（故）阿部康次教授に心より深謝致します。

<問い合わせ先>

(責任著者)

信州大学学術研究院繊維学系 助教

新井 亮一

〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

信州大学繊維学部 応用生物学系 生物資源・環境科学課程

TEL&FAX: 0268-21-5881

E-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp

研究室 HP : <http://fiber.shinshu-u.ac.jp/arai/index.html>

*本資料の鮮明なカラー版 PDF ファイルは上記ホームページよりダウンロード頂けます。また、電子メールでもお送りすることもできますので、上記までご一報頂ければ幸いです。

<用語説明>

※1 ざざむし

ざざむし（ざざ虫）とは、長野県伊那地域などの天竜川上流域で、清流に住むカワゲラ、トビケラ等の水生昆虫の幼虫を食用とする（昆虫食）時の総称である。主に佃煮や揚げ物などにして食する。現在では、ヒゲナガカワトビケラの幼虫が主になっている。

※2 シルク

学術用語としての“シルク”とは、主に昆虫やクモ等の生物が生産するタンパク質性繊維（バイオファイバー）の総称である。一般的にカイコのシルク（絹）が最も有名であるが、他にも多くの蛾や蝶、トビケラ、クモの仲間など、シルクを生産する生物は数多く存在する。

※3 cDNA ライブラリー

ある生物組織の mRNA を逆転写して作成した cDNA の集合体。この中にその組織で発現している遺伝子の多くが含まれており、目的の遺伝子を探索することができる。

※4 PCR 法

PCR 法は、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）法の略称であり、特定の DNA 断片を増幅するための代表的な分子生物学的手法である。分子生物学や遺伝子工学等の研究分野で基本的な実験手法の 1 つであると共に、少数の細胞から得た微量の DNA 断片を増幅できることから、親子鑑定や遺伝病の診断、犯罪捜査、遺伝子組み換え食品判別試験、作物品種の鑑定などでも利用されている。

※5 遺伝子クローニング

ある特定の遺伝子を増幅して単離することを意味する。これにより、その遺伝子の塩基配列を決定することや組換えタンパク質発現等の遺伝子工学研究や応用が可能となる。

※6 組換えタンパク質発現系

研究や産業利用などの目的で、特定のタンパク質を人為的に微生物や培養細胞などで発現させるための実験系。