

研究成果報告書

【申請者氏名】

寺本 英敏

【所属機関】

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

【研究題目】

クリッカブルシルク実用生産系統の育成

【研究目的】

申請者らはこれまでに、結合の手（アジド基）を組み込んだ新しいシルク素材「クリッカブルシルク」を開発してきた。クリッカブルシルクは、繊維・フィルム・スポンジ等の所望の形状に加工した後に、クリック（click）反応を用いて機能分子を簡単に結合させることができる。したがって、クリッカブルシルクから様々な高機能シルク素材が作出できる。この技術により、服飾・医療・産業・電子等の多様な分野で有用な機能をもつシルク素材の開発が容易となった。しかし、現有のクリッカブルシルク生産系統は小型の実験用品種をホストとしているため、そのまま実用生産に利用するのは困難である。そこで本研究では、実用生産に適したクリッカブルシルク生産改良系統を育成し、クリッカブルシルクの実用化に向けた課題を解決する。

【研究内容及び成果】

本研究で実施した下記①～③の計画について現時点までに得られた成果を報告する。

① クリッカブルシルク生産改良系統の育成

クリッカブルシルクは、アジド基（ $-N=N=N$ ）をもつ人工アミノ酸（4-アジドフェニルアラニン，AzPhe）をフィブロインの一次構造中に直接導入することによって得られる。AzPheはタンパク質を構成するアミノ酸ではないため、通常はタンパク質合成には利用できない。そこで、AzPheを認識できる酵素（フェニルアラニル-tRNA合成酵素の変異体）を遺伝子組換え（TG）カイコの後部絹糸腺で発現させることで、AzPheがタンパク質合成に利用されるようにした。TGカイコの5齢幼虫にAzPhe含有人工飼料を与えると、フェニルアラニン（Phe）の一部がAzPheに置き換わったフィブロインが得られる。これまでに作出したうち最良の系統（H06系統）では、フィブロイン中のPheの約7%がAzPheに置換される。フィブロイン1分子あたりでは、約2.5個のAzPheが導入される。

現有のクリッカブルシルク生産系統（H06系統）では、1頭あたりのクリッカブルシルク生産量は約100mgと少ない。これは、小型の実験品種（白/CS）をホストとするTGカイコであ

るためである。そこで、白/CS と同じ中国種で、かつ、組換え体の識別に適した白眼をもつ実用品種（MCS4：支 146 号の白眼系統）と交配し、F₁ 交雑種を得た。この F₁ 交雑種を MCS4 に 5 回戻し交雑することにより、系統の改良を行った。組換え体の選抜は、蛾での眼色マーカアの発現確認により行った。5 回の戻し交雑を行った後、組換え遺伝子をホモでもつ系統（H06-MCS4）を確立した（図 1）。

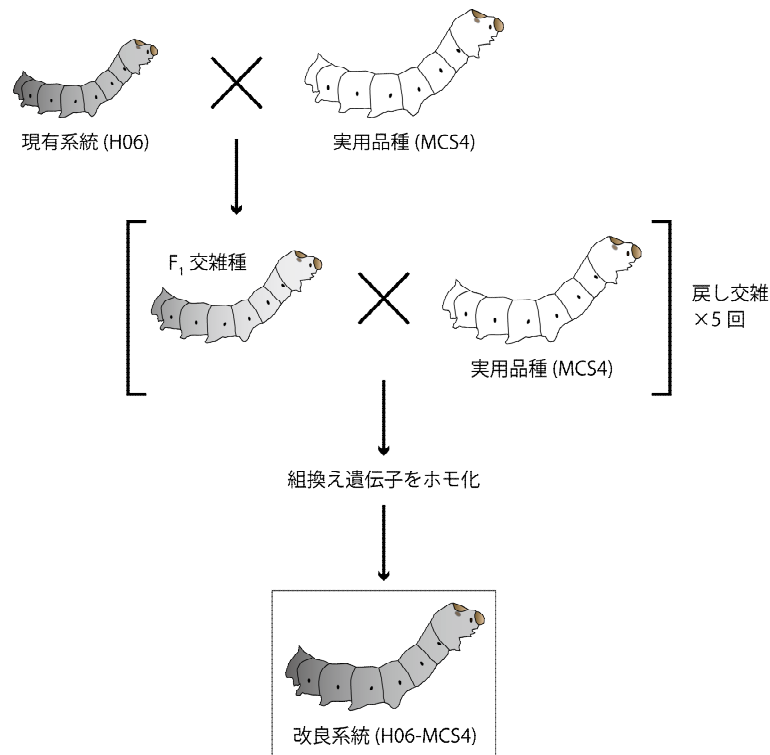


図 1. 戻し交雑による系統改良の経過

H06、戻し交雑 1、3、5 回後（それぞれ BC1、BC3、BC5 と略記）、H06-MCS4、MCS4 それぞれの系統の 5 齢 3～6 日の成長曲線を図 2 に示す。戻し交雑によって中体が大型化し、5 回の戻し交雑後では MCS4 と同等の大きさとなった。

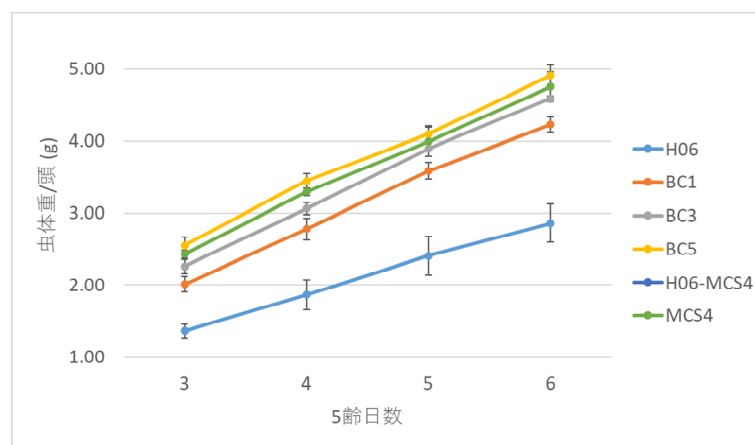


図 2. 乾燥重量で 0.05 wt% の AzPhe を添加した人工飼料で飼育した各系統 5 齢 3～6 日の成長曲線（7 日目以降は営繭を開始する個体が現れるためグラフには加えず）

② 改良系統により生産したクリッカブルシルクの特性解析

1、3、5の戻し交雑を行った各系統およびH06-MCS4の5齢幼虫をAzPhe含有人工飼料（乾燥重量で0.05%のAzPheを添加）で飼育し、1頭あたりのクリッカブルシルク生産量を調べた（図3）。その結果、系統育成によってクリッカブルシルク生産量が増加し、H06-MCS4ではH06の約2.3倍のクリッカブルシルク生産量が達成された。また、クリッカブルシルクへのAzPhe導入量を精密質量分析法により解析した（図4）。H06-MCS4においてもAzPheのフィブロインへの導入が確認され、その導入量はH06と顕著な違いが見られなかった。

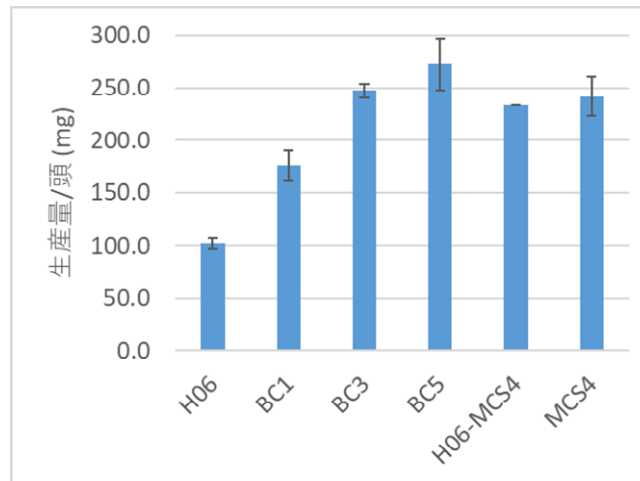


図3. AzPhe添加人工飼料で飼育した各系統のクリッカブルシルク生産量（ただしMCS4ではAzPheのフィブロインへの導入は起こらない）

*系統毎に各3回の反復実験を実施しており、上記データはその途中経過

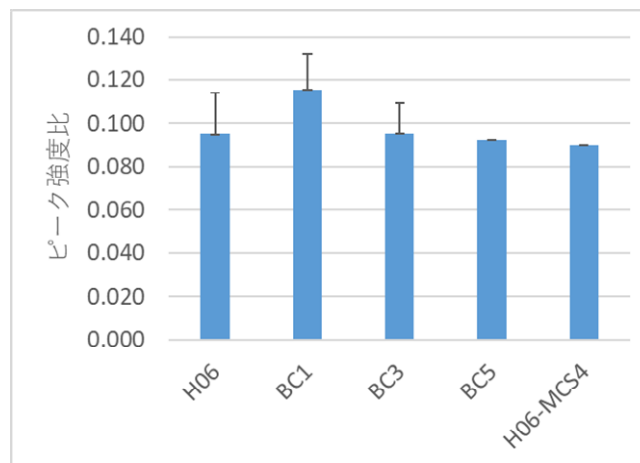


図4. クリッカブルシルクへのAzPhe導入量の目安となる質量分析ピーク強度比の比較

*系統毎に各3回の反復実験を実施しており、上記データはその途中経過

次に、H06、H06-MCS4、MCS4それぞれについてスケールアップ飼育を実施し、生糸繰製用の繭を得た。現在生糸の繰製と生糸物性（強度、伸度、弾性率）の解析を順次進めている。

③ クリックابلシルクのテスト生産に向けた準備

5,000 頭程度のスケールでクリックابلシルクをテスト生産するための準備として、H06-MCS4 と MN2（日 137 号の白眼系統）との F₁ 交雑種の蚕種（卵）を製造した。申請者らが所属する農研機構では 5,000 頭スケールでの全齢人工飼料育が困難なため、大日本蚕糸会蚕業技術研究所において飼育テストを行う可能性について情報交換を行った。

【今後の課題】

クリックابلシルクは任意の機能性を後付けでシルクに付加することができ、機能性繊維やバイオマテリアル等への利用展開が期待できる。しかし、従来の系統は小型で生産性が低く生糸品質も不十分であった。そこで本研究によってクリックابلシルク生産改良系統を育成することができた。今後は改良系統と通常品種との交雑種について性状調査および実証飼育を実施することにより、クリックابلシルクの普及促進のための試作品（反物）を製作するとともに、カルタヘナ法に基づく産業二種使用申請のためのデータを整備する必要がある。

【発表論文等】

[発表予定]

田 雅茜，坪井弘美，伊賀正年，中島健一，寺本英敏

Breeding of a transgenic silkworm line for large scale production of clickable silk”

令和 3 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第 91 回大会）

2021 年 3 月 19～20 日オンライン開催