

## 研究成果報告書

### 【申請者氏名】

梶原 英之

### 【所属機関】

農業・食品産業技術総合研究機構

### 【研究題目】

カイコ絹糸の品種および品質の分析法の開発と標準質量スペクトルの収集

### 【研究目的】

これまでカイコや野蚕、野生蛾の繭・絹糸を酸で処理し質量分析することで、種や品種の判別ができることを発見し、特許出願した。さらに、生産年が違う絹糸を比べると、酸化によると思われる経時的なピークシフトがあったことから、生産年・品質を推定できると期待された。本課題でこれらを示すことができれば、絹糸や繭では世界で初めてのことであり、今後、絹糸の品質や製造年代を保証するための規格になり得る。この技術は、絹織物を科学的に品質保証できることを示しており、絹織物産業にとって重要な変換点になる。

本課題の目的とそれが達成できた時に得られる展開は以下の通りである。

- カイコ品種、野蚕、野生蛾の繭を質量分析し、得られたスペクトルをデータベース化する。データマッチングによって繭・絹糸の種さらに品種の識別ができ、トレーサビリティ確立の第一歩となる。
- 酸による切断部位を明らかにするとともに、品種間の多様性をクラスター解析で調べる。絹の物理的特性との相関が解明され、より強度な絹糸の開発に繋がる。学術的にはカイコの家畜化過程を考察する。
- 酸化アミノ酸を同定し、各酸化速度を計算する。品質管理、つまり生産年・品質を推定できる。絹糸の劣化を防ぐための技術開発に繋げることができる。

### 【研究内容及び成果】

カイコの品種識別

カイコ繭および絹糸の品種識別は特願 2020-098849 の方法、即ち常温法で行っていたが、それでは判別できないものが出てきた。新たに、加熱またはマイクロ波(MW)処理法を開発した(特願 2021-080897)。これを使用することで、当機構遺伝資源センターに所蔵されている地方品種などについては問題なく品種判別を行うことができた。しかし、大日本蚕糸会から提供された実用 14 品種を分析したところ、MW 法でも明確な違いを見出すのが難しいと思われるものがあった。フィブロイン等の分析については、既に MW 法で十分と考えていたのでこ

の結果は想定外で、本課題開始時には全く予想していなかった。各実用品種の来歴は不明だが、育種選抜を通じて優秀な品種が組み合わせられたため、フィブロン上のアミノ酸配列の違いが少なくなったのではないかと考えられた。

いずれにしても肝心の実用品種の判別ができないのでは困る。そこで、これらの品種判別法の開発に注力することにした。これまでギ酸分解法が有効だったので幾つかの化学分解法を試みたが、良好な結果は得られなかった。ギ酸分解法で得られた可溶性画分（これまで質量分析していたもの）をさらにトリプシン処理

したが、処理前とは違うピークは見出されるものの、新たな差異はなかった（図1）。しかし、ギ酸分解法では断片化せず依然として不溶化のまま沈殿として残っていた繊維に中性界面活性剤および有機溶媒存在下でトリプシン処理を行うと、新たな断片化が起き、品種間差が見出された。沈殿物は全体としては不溶性だが、繊維表面は先立って行われたギ酸処理、それに続く界面活性剤と有機溶媒によって一部可溶化した状態となり、トリプシンがアクセスできることで酵素的切断が行われたのではないかと考えられた。ギ酸処理に5分、洗浄に5分、酵素処理に15分、質量分析に5分要するとしても30分で実用品種の品種識別ができることと計算された。この結果については、カイコ繭品種識別法の実用化において重要と考えられるので特許化を視野に入れてさらに検討する必要がある。本課題の範囲ではないが、MW法でニワトリ羽毛の品種判別もできることを確認している。ギ酸処理後トリプシン分解法を応用すればより広い範囲で詳細な品種識別が他の動物性繊維でもできると期待された。

大造の繭10個を個別に生繭、加熱処理、煮繭、炭酸ナトリウム処理、およびマルセル石鹼処理を行った。それぞれについて、常温処理およびMW処理を行い、質量スペクトルを比較した。その結果、出現するピークは全く同じだった（図2）。他の品種でも繰り返し測定は行っているがやはり同一で、本法の再現性は高いと考えられた。方法の実用化において機種依存性の有無を検討する必要があるが、少なくともレーザー光源の種類が異なるブルカー社製質量分析装置2機種においては同じ結果が得られた。

品種判別は生繭、加熱処理、煮繭、炭酸ナトリウム処理、およびマルセル石鹼

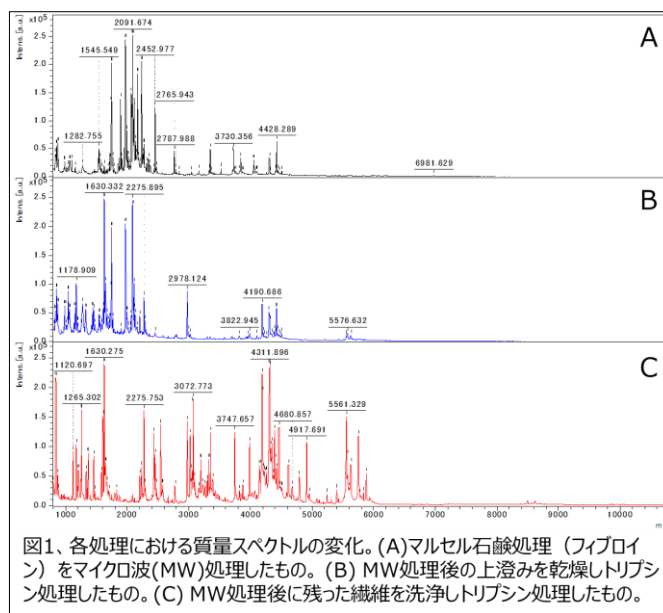


図1、各処理における質量スペクトルの変化。(A)マルセル石鹼処理（フィブロン）をマイクロ波(MW)処理したもの。(B) MW処理後の上澄みを乾燥しトリプシン処理したもの。(C) MW処理後に残った繊維を洗浄しトリプシン処理したもの。

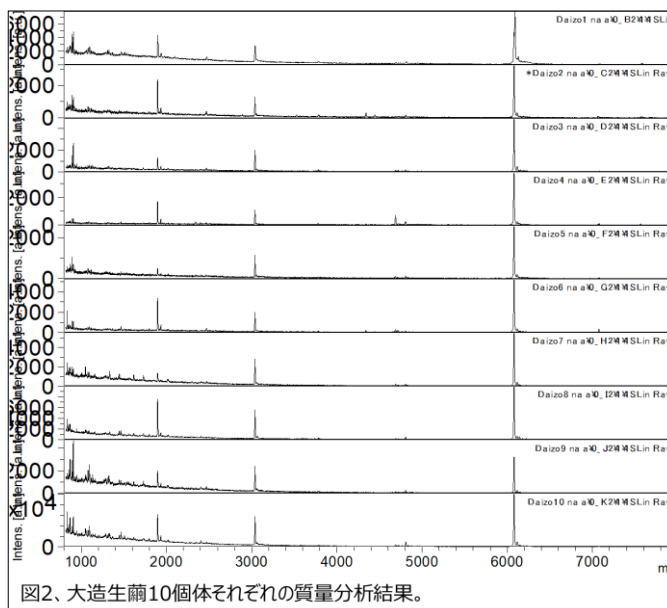
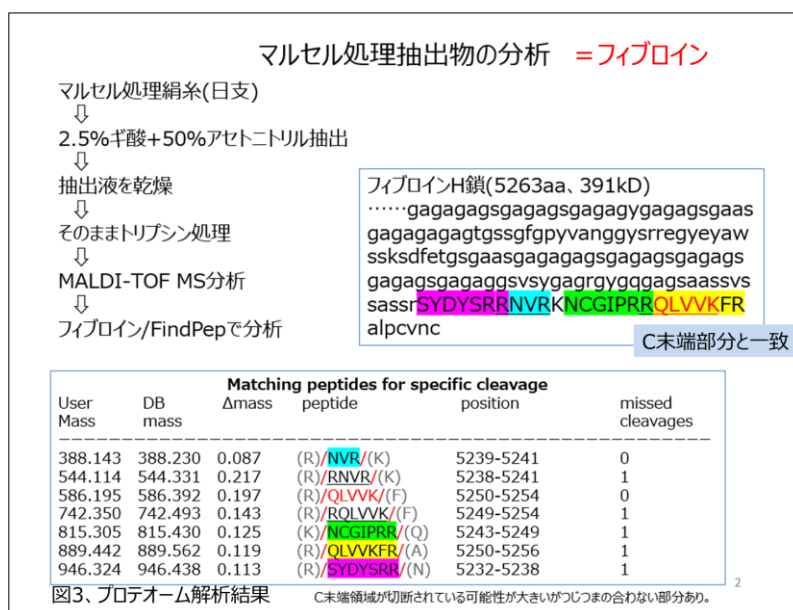


図2、大造生繭10個体それぞれの質量分析結果。

処理の各段階で行った。遺伝資源センター所蔵の地方品種約 211 品種 (2/18 時点)、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) として保存され次世代ゲノム解析が行われた 20 品種 (九州大の都合で一部未入手)、栃木県農試提供の 9 品種、信州大学提供の野蚕繭 11 品種、大日本蚕糸会提供の 14 品種、その他の野性蛾やハチ類の繭を分析した。これら全てで質量スペクトルは得られた。

### 切断部位

フィブロインの切断部位については一部明らかになった (図 3)。常温法において検出されるフィブロイン断片は C 末端側の配列 (非結晶領域) に由来することがわかった。MW 法では出てくる断片が大きいと、結晶領域 (中央部の反復配列の多い部分) で切断が起き、それが可溶化して質量分析装置で検出されていると考えられた。LC-MS が故障中のためその切断部位については十分な解析ができなかった。MALDI-TOF MS でも MS/MS 解析が可能だが、試みたものの芳しい結果は得られなかった。当研究室の装置では限界があると考えられるので、より高性能な装置を有する外部機関に委託する必要があると思われる。



### アミノ酸修飾

より高濃度の酸素存在下に置けば、フィブロイン中のアミノ酸の酸化がより早く進むと期待される。カイコの飼育はこれまでしたことがなかったので、自ら大造の飼育を試みた。最初はクワ葉、次は人工飼料を用いて飼育したが健全な繭が十分にとれなかった。再度、人工飼料で生育させたところ、一定量の繭の取得に成功した。それを用いて高濃度酸素条件下に置く実験を行っている。一部についてプロテオーム解析法による分析を試みた。しかし、繰り返し配列が多く、今のところ、どのアミノ酸が修飾されているのか不明である。

### 【今後の課題】

絹糸について今までできなかったことあるいはわからなかったことについて、ギ酸処理したものを質量分析するという新アプローチによって多くのことを解明できたと考えている。しかし、まだ未解明の点も多く残されている。

- 1) 実用品種では、MW 法でも完全に判別できないものが散見された。しかし、その反応残渣をトリプシン処理すれば品種間差が見出された。本成果については特許出願を検討し、切断部位等の解明を含めて詳細を詰める必要がある。特願 2021-080897 の内容は学会発表予定だが、論文化はまだである。本課題の範囲外ではあるが、他の動物性繊維への応

用についても検討すべきと思われる。

- 2) 200 品種以上の絹糸のスペクトルは収集したが、そのデータベース化は未完である。機器付属の検索プログラムで判別するが、2 品種の絹が混合された場合でも割合を含めて判別できるか検証する必要がある。地方品種はこれまで物理学的特性が調べられた品種から選んだが、まだ質量スペクトルとの関係はわからない。
- 3) 古い絹糸は酸化され、それを利用して品質管理ができることを見出した。高濃度酸素等を用いて、絹糸の酸化過程を調べる実験はまだ途上である。
- 4) 大造のフィブロインの遺伝子配列は報告された。NBRP 中のカイコ 20 品種は次世代ゲノム解析されたが、まだアッセンブルされていない。各リード断片のアッセンブルを自ら試みたが、反復配列が長く、うまくつながらなかった。専門家の助けを借りてもう一度試みたい。ゲノム配列と質量分析結果の関係を探りたい。
- 5) 獣毛の種決定法は特許出願され、日本産業規格 (JIS) や国際標準規格 (ISO) に登録されている。本法は絹糸の品種判別法として、日本農林規格 (JAS) や ISO に登録できる内容だと思う。なお、特願 2021-080897 は絹糸のみならず、獣毛、羽毛、皮革、クモ糸、角の分析にも有効だった。トリプシン分解法ではさらに詳細に品種判別できる可能性がある。産業界の協力を得ることができれば、絹糸ばかりでなくより広範な動物性繊維を対象とし、JAS、JIS、および ISO に登録できると期待する。輸入品の検査、国産品および特産品の差別化、詐称の防止に貢献できる。

#### 【発表論文等】

- H. Kajiwara, R. Murakami, K. Nakajima (2021) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based biotyping of silk. I. Method development. J. Electrophore. 65, 39-47.
- H. Kajiwara, R. Murakami, K. Nakajima, E. Kosegawa (2021) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based biotyping of silk. II. Differences in 34 Local silkworm race cocoons. J. Electrophore. 65, 49-60.
- 梶原英之 (2021) MALDI biotyping による絹タンパク質の分析. 電気泳動 65, 35-39.
- 梶原英之、村上理都子、伊賀正年、小瀬川英一 (2021) 絹の質量分析法の改良と他の動物性繊維への応用. 電気泳動 65, s32. (学会発表)
- 梶原英之、村上理都子、伊賀正年、小瀬川英一 (2022) 質量分析による繭および絹の種と品種の判別法の改良. 令和 4 年度蚕糸昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第 92 回大会. (発表予定) 印刷前のため添付せず
- 絹糸虫由来の絹の由来種、品種及び/又は品質を同定する方法及びシステム、特願 2020-098849、特開 2021-192020.
- 動物性素材の由来種、品種及び/又は品質を試験する方法及びシステム、特願 2021-080897. (現時点で非公開) 公開前のため添付せず