

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】

クリックابلシルク実用生産システムの性状調査と実証飼育

【研究目的】

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。そこで昨年度の本助成においてクリックابلシルク生産改良系統を育成した。本年度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。これによりクリック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。

【研究内容及び成果】

背景と昨年度までの成果

クリックابلシルクとは、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) がフィブロインの一次構造中に直接導入されたシルクを指す (寺本英敏 *生化学* **2021**, *93*, 298-304)。アジド基は天然の生体分子中には存在しない官能基で、アルキン基と選択的に反応して安定な結合を形成するという特徴がある。このアジドとアルキン間での反応は一般にクリック反応 (click chemistry) と呼ばれることから、AzPhe 導入シルクをクリックابلシルク (clickable silk) と呼ぶ。穏和な条件下で進行しかつ適用範囲の広いクリック反応を用いて機能分子をフィブロインに結合させることで、様々な機能化シルクを簡便に作出することができる。

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改変している。この TG カイコの 5 齢幼虫に AzPhe 添加飼料を与えると、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 TG 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。

しかし、H06系統は小型の実験品種（白/CS）をホストとしているためクリッカブルシルク生産量は約100mg/頭と少なく、また、繭質も悪く自動繰糸による生糸の大量生産には適していない。そこで昨年度、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）との戻し交雑を実施し、改良系統（H06-MCS4）を確立した。改良系統（H06-MCS4）のクリッカブルシルク生産量は元系統（H06）の2.6倍に向上したとともに、繭質が改善して機械繰糸による生糸の繰製が容易となった。得られた生糸の物性（破断強度、破断伸度、ヤング率）はMCS4の生糸と同等であった。一方で、AzPheの導入量は約20%減少した。クリック反応テストにより、改良系統（H06-MCS4）で産生されたクリッカブルシルクにおいてもアジド基への機能分子の選択的結合が可能であることを確認した。

本研究の成果

本研究で実施した下記計画（1）（2）について現時点までに得られた成果を報告する。

（1）改良系統の性状調査

TGカイコによる改変シルクの生産を産業的に実施するためには、ゲノム中に導入した組換え遺伝子が世代を超えて安定的に維持されることを示す必要がある。そこで元系統（H06）の異なる2つの世代（遺伝子導入した蚕種を第0世代として、第3および第11世代）の成虫（蛾）からゲノムDNAを抽出し、サザンブロッティング法により組換え遺伝子（フェニルアラニル-tRNA合成酵素変異体遺伝子）の座位数を調査した。その結果、双方の世代において同一位置に一座の組換え遺伝子が挿入されていることを確認した（図1）。

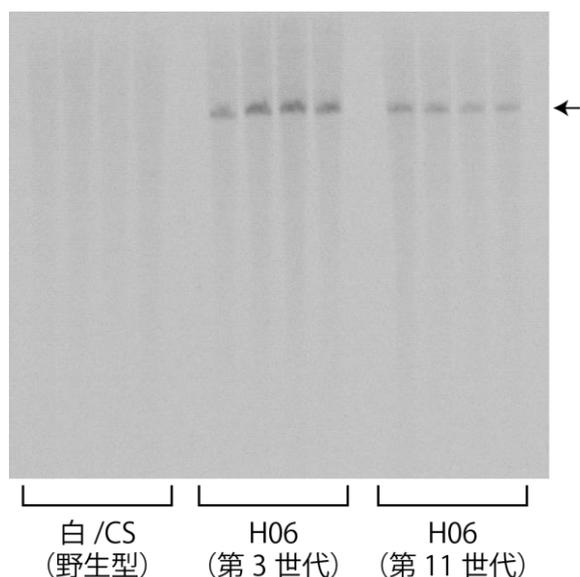


図1. サザンブロッティング法による組換え遺伝子の安定性解析（組換え遺伝子配列の一部に対して設計したプローブで検出されたバンドを矢印で示す）

上記の結果から、10 世代以上の継代を経ても組換え遺伝子が安定的に維持されていることを確認できた。今後、改良系統 (H06-MCS4) についても長期継代での組換え遺伝子の安定性を追跡する予定である。

H06-MCS4 を用いたクリッカブルシルクの実用生産を実施する上では、病気に対する強健性の観点から日本種との F₁ 交雑種を飼育することが望ましい。そこで、H06-MCS4 を日本種の実用品種 (MN2: 日 137 号の白眼系統) と交雑した F₁ 系統を作出し、そのフィブロイン生産量と AzPhe 導入量を調査した。その際、AzPhe の投与量を標準条件 (乾燥飼料に対して 0.05 wt% 添加) よりも 20% および 40% 増加させた条件でも飼育を行った。その結果、フィブロインの生産量は標準条件において H06-MCS4 と同等で、AzPhe 投与量を 20% 増加させた場合 (0.06 wt%) でもほぼ変化がなかった (図 2)。一方、AzPhe 投与量を 40% 増加させて 0.07 wt% とした場合はフィブロイン生産量の低下が観察された。

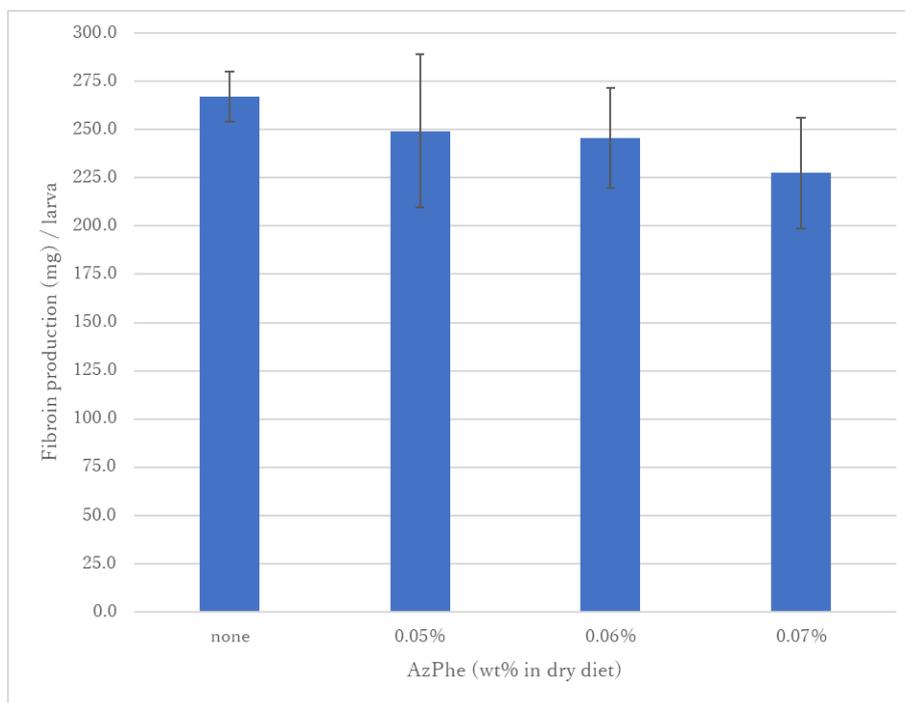


図 2. F₁ 交雑種 (H06-MCS4×MN2) におけるフィブロイン生産量

※比較データ: H06-MCS4 に 0.05 wt% AzPhe 投与の場合 Fibroin production は 255±21 mg

一方、AzPhe 導入量 (質量分析ピーク比からの推定量) は標準条件 (乾燥飼料に対して 0.05 wt% 添加) において H06-MCS4 よりも 24% 減少した (図 3)。野生型との交雑によって組換え遺伝子のコピー数が半減した影響と推察される。AzPhe 投与量を 20% 増加させた場合 (0.06 wt%) には AzPhe 導入量が 27% 増大し、H06-MCS4 と同等の導入量となった。

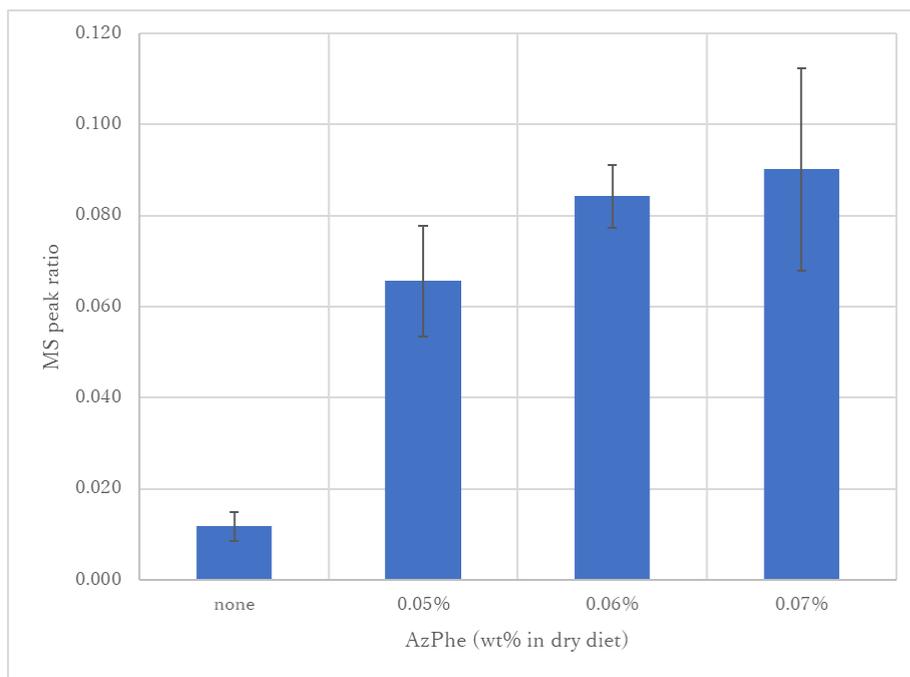


図3. F₁交雑種 (H06-MCS4×MN2) における AzPhe 導入量 (縦軸は AzPhe 導入量の指標となる質量分析ピークの比)

※比較データ：H06-MCS4 に 0.05 wt% AzPhe 投与の場合 MS peak ratio は 0.087 ± 0.006

以上の結果から、交雑種 (H06-MCS4×MN2) を用いたクリッカブルシルクの生産では AzPhe 投与量を乾燥飼料に対して 0.06 wt% に増量することが妥当と判断した。

(2) 改良系統の実証飼育

交雑種 (H06-MCS4×MN2) の蚕種を準備し、大日本蚕糸会蚕糸科学技術研究所において 5,000 頭スケールでの実証飼育を実施した。TG カイコの取扱い (搬出・搬入・飼育・不活化) はカルタヘナ法に基づく規程を遵守して適切に行った。飼育経過は一般的な品種と大きな差異がなく、掃立・飼育・上蔭・収繭を問題なく完了した。AzPhe の投与量は乾燥飼料の 0.06 wt% とした。投与は 5 齢 3 日目以降上蔭前まで行った。収繭調査の結果を表 1 に示す。

表 1. 交雑種 (H06-MCS4×MN2) の収繭結果 (蚕糸科学技術研究所提供)

不結 (頭)	斃蚕 (頭)	上繭 (粒)	玉繭 (粒)	下繭 (粒)	合計
7	61	4067	153	518	4806

上繭と判断した生繭重量は 7.96 kg、乾繭重量は 3.69 kg、乾燥歩合は 46.4%であった。乾繭の写真を図 4 に示す。



図4. 交雑種 (H06-MCS4×MN2) の実証飼育試験で得た乾繭 (上繭)

収穫した乾繭から繭 30 個をランダムにサンプリングし、繰糸試験を実施した。繰糸成績を表2に示す。その後乾繭から生糸を創製した (宮坂製糸所へ委託)。得られた生糸量は約 1 kg であった (図5)。

表2. 交雑種 (H06-MCS4×MN2) 繭の繰糸成績 (3 回のランダムサンプリングの平均値)

解じょ率 (%)	繭糸長 (m)	生糸量歩合 (%)	繭糸量 (g)	繭糸繊度 (d)	小節点 (点)
75	643	14.3	0.263	3.77	86.5

※1 回の繰糸試験に繭 30 個を使用



図5. 創製したクリッカブルシルク生糸

繰糸に利用できない玉繭を用い、AzPhe 導入量の測定とクリック反応テストを実施した。

その結果、AzPhe 導入量の指標としての MS peak ratio は 0.074 であった。図 3 に示したラボ飼育での結果と比較するとやや低い値であったが、問題なく AzPhe がフィブロインに導入されていることが確認できた。尿素精練後のフィブロインを臭化リチウム水溶液に溶解して蛍光色素とクリック反応させた後、電気泳動によってフィブロイン長鎖 (FibH) と短鎖 (FibL) とを分離してそれぞれの蛍光発色を観察した (図 6)。その結果、ラボ飼育の場合と遜色なく蛍光発色のシグナルを観察することができた。

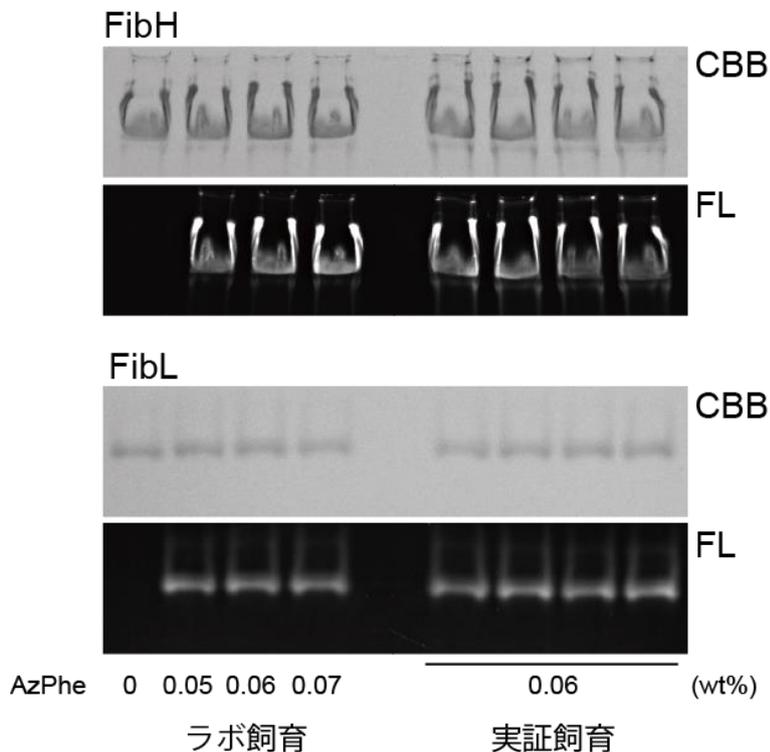


図 6. 交雑種 (H06-MCS4×MN2) 繭層フィブロインのクリック反応テスト

蛍光色素とクリック反応させた後、電気泳動で FibH と FibL とを分離し、蛍光発色を観察した (FL)。同一のゲルを CBB で染色し全タンパク質バンドを観察した (CBB)。左側はラボ飼育で AzPhe 投与量を変化させて得たフィブロイン、右側は実証飼育で得たフィブロイン (玉繭由来) の結果を示す。

以上の結果から、5,000 頭スケールでの実証飼育で得られたクリッカブルシルクはラボ飼育で得られたものと同等の性状を有することが分かった。繰糸試験で調製した生糸の物性試験についても今後実施する予定である。また、実証飼育で得た約 1 kg の生糸から織物を試作するため、織物業者への委託により試験製織を進めている。

【今後の課題】

クリッカブルシルクの社会実装を実現するためには、具体的な用途を見出し、民間企業との共同開発を開始する必要がある。また、クリッカブルシルクの生産にあたっては TG カイコ飼育施設の選定とカルタヘナ法に基づく産業二種使用の申請が必要となる。本研究で生産した生糸から得られる織物を原料として抗菌シルク等の機能化シルクを試作し、学会や展示会

での公表を通して民間企業との連携関係を構築していく計画である。

【発表論文等】

・Tian Y, Tsuboi H, Iga M, Nakajima K, Kojima K, Teramoto H “Breeding of a novel transgenic line for mass production of azido-incorporated clickable silk” 第68回日本シルク学会研究発表会要旨集, p. 16.

以上