

学位論文の審査結果の要旨

本論文は、蜘蛛糸タンパク質の分泌にシグナルペプチド配列が存在することを明らかにし、蜘蛛の牽引糸を形成するタンパク質中に低分子の構造タンパク質が関わっていることを明らかにした。この低分子タンパク質を蚕染色体に導入し、蚕の吐糸する繭糸の物性や構造にどのような影響を及ぼすかを調査している。

ナガコガネグモ *Argiope bruennichi* の卵糸タンパク質 CySp2 の遺伝子 5'末端領域には、シグナルペプチド配列が含まれないとされてきた。CySp2 タンパク質は細胞外に分泌されるシルクの構造タンパク質であるので、遺伝子の 5'末端領域を調査し直したところ、シグナルペプチド配列の存在することが明らかになった。

ホシズミグモ *Cyrtophora moluccensis* の牽引糸タンパク質の遺伝子について調査研究した。牽引糸タンパク質をつくる大瓶状腺の mRNA から作成した cDNA ライブライアリードで牽引糸タンパク質の遺伝子を探した。蜘蛛の牽引糸タンパク質として、多くの蜘蛛牽引糸遺伝子 MaSp1 は 10kb を超える大きな遺伝子である。この MaSp1 遺伝子で見いだされる構造と共通する特徴的な遺伝子構造を保有する 1320bp の小さな遺伝子を発見した。ゲノム・シークエンスを行い、この小さな遺伝子が間違いないゲノムに存在する真性遺伝子であることを確認した。この小さな遺伝子は、およそ 40kDa の 439 アミノ酸をエンコードする。そのアミノ酸配列は、蜘蛛糸の MaSp1 タンパク質に特有ないわゆる反復的な領域（192 アミノ酸残基）と、その両端に非反復的 N 末端（149 アミノ酸残基）、C 末端（98 アミノ酸残基）に分けられた。牽引糸タンパク質の SDS-PAGE を行うと、40kDa タンパク質がかなり濃いタンパク質バンドとして存在することを確認した。この小さな遺伝子は MaSp1 の遺伝子構造とよく似ているので、MaSp1s と名付けた。MaSp1s タンパク質の反復的な領域は、MaSp1 の特徴である GGX モチーフ (X=A, Q, Y)、GX モチーフ (X=Q, A, R) とポリ A モチーフを含むが、反復の回数が少なく、反復的な領域の長さが短い。MaSp1s の N 末端と C 末端のアミノ酸配列は、これまで報告のあった MaSp1 のものと非常に相応しており、保存性が高いことを明らかにした。この MaSp1s タンパク質の存在の発見は他の蜘蛛では報告がなく、貴重な知見である。蜘蛛糸は高分子タンパク質から形成されているので、蜘蛛糸形成に関わる高分子タンパク質がこれまで注目されていた。本論文で報告した低分子の MaSp1s は牽引糸タンパク質中にかなり多く含まれており、牽引糸のタンパク質構造を考える上で無視できないタンパク質であると推定された。

この低分子 MaSp1 の役割を明らかにするために、*piggyBac* ベクターを用いて「MaSp1 遺伝子カセット」を蚕ゲノムに組み込んだトランスジェニック蚕を作成した。蚕ゲノムに組み込む「MaSp1 遺伝子カセット」として、フィブロイン H 鎮遺伝子のプロモーターの下流に MaSp1 遺伝子と LBS 領域配列（フィブロイン H 鎮遺伝子の 3' 側領域）を連結した。後部網糸腺細胞で発現するシルク遺伝子の mRNA 量を調査したところ、LBS 領域配列を含む mRNA 量が、トランスジェニック蚕において、普通の蚕よりも 2.8 倍に高まることを定量的リアルタイム PCR 法によって明らかにした。この結果は、トランスジェニック蚕では、フィブロイン H 鎮遺伝子の mRNA 中の LBS 領域配列の増幅に上乗せして、LBS 領域配列を含む MaSp1 遺伝子の mRNA 量が増えることを示唆する。しかし、繭糸タンパク質中の MaSp1 が H 鎮フィブロインに比べて少なかった。この結果は、コドン使用頻度の問題などの影響と考えられる。

トランスジェニック蚕が作った繭糸の応力歪み曲線、FT-IR 像、WAXD 像、DSC 曲線等から、シルクの物性変化を調査した。その物性からトランスジェニック蚕の繭糸が普通の繭糸に比べて改善したと判断出来ず、残念ながら MaSp1 の役割を明らかには出来なかった。蚕に蜘蛛糸遺伝子を導入すれば、直ちに繭糸が物性改良するというものではないこともわかった。おそらく、「MaSp1 遺伝子カセット」を構築する際の MaSp1 遺伝子の種類やサイズ、*piggyBac* ベクターの導入部位などが、繭糸の品質改善の現れ方に大きく影響するものと考えられた。

本論文が明らかにした知見は学位論文として充分な内容であり、本論文は学位論文に値するもの判断した。

公表主要論文名

1. Leng Han, Lei Zhang, Tianfu Zhao, Yujun Wang and Masao Nakagaki: Analysis of a new type of Major Ampullate Spider Silk gene, MaSp1s. International Journal of Biological Macromolecules. 2013, 56, 156-161
2. Leng Han, Lei Zhang and Masao Nakagaki: Expression analysis of spider dragline silk gene MaSp1 in the transgenic silkworm. Journal of Anhui Agricultural University. 2013, 40(2): 169-174
3. Leng Han and Masao Nakagaki: Intramolecular homologous recombination event occurred in the spider egg case silk gene CySp2 of Wasp Spider *Argiope bruennichi*. Mol. Biol. (Mosk.). 2013, 47(5): 682-685