

中垣雅雄

目的別テーマ：新規バイオファイバーの産生

研究テーマ

15-2-3：蚕に蜘蛛の糸を吐かせる研究

ABSTRACT

The purpose of this study is to make silkworm which spin spider's silk. Spider silk is a materials science wonder. A self-assembling, biodegradable, high-performance, nano-fiber structure that can stop a bee traveling at full speed without breaking. Despite its unique properties, attempts to produce spider silk in large quantities by domesticating spiders have failed until now. Silkworms might be able to produce threads that compare well with spider silk by having their silk genes altered. Silkworms are worms which produce silk. Silk production by silkworms is eco-friendly. I have employed germline transformation using the piggyBac vector to breed transgenic silkworms that produce cocoons containing recombinant spider silk. There are several kinds of spider silk. I transposed a flagelliform silk gene to genome DNA of a silkworm. It was confirmed that the flagelliform silk protein was included in a cocoon which was made by the transgenic silkworm. The content of flagelliform silk protein in cocoon protein was one or two percent. Experiment to raise the content and experiment to transpose a dragline silk gene or a egg case silk gene to silkworm genome are now performed. we demonstrate the accumulation of recombinant silk proteins, which are encoded by synthetic genes of 8,000 base pairs, up to a level of at least 10% of total soluble protein in the silk cocoon.

研究目的

蚕に蜘蛛糸を吐かせること。蜘蛛糸は、魅力的な繊維であるのに、量産が難しく利用されていない。量産出来ない主な理由は、蜘蛛が肉食で、生きた餌しか食べず、共食いするので、大量飼育が困難なためである。また、1匹から連続して採れる蜘蛛糸の量は多くなく、どの蜘蛛糸を出糸するかは蜘蛛の都合によるので、特定の糸だけの量産が難しいためである。ところで、蜘蛛や蚕は、室温で省エネ的に繊維を作る。即ち、蜘蛛や蚕の体内の液状絹タンパク質が体外に排出されるとき、引張り応力により不可逆的に不溶性固体のシルクに変わる。蚕に蜘蛛の糸を吐かせると、人為的な糸引き操作が不要になる。この研究の目的は、蚕に蜘蛛糸を吐かせることである。

5年間の研究内容と成果

● 研究目標

- ・ 蚕に蜘蛛糸を吐かせることである。

蚕は遺伝子操作に適した昆虫であり、野外からの隔離が容易な実験用生物で、自然界に逃げ出す可能性がほとんどない。幼虫は自力で餌を探し求めない。蛾は空が飛べず、交尾や蚕卵のため遠くへ移動することがない。さらに他の昆虫に比べ飼育技術も確立しており、飼育し易くおとなしい生き物である。しかも効率よくシルクを作るための産業昆虫である。このような蚕に蜘蛛糸を吐かせ、蜘蛛糸の大量生産の途を開くことが本テーマの研究目標である。

● 研究内容及び研究範囲

1. 蜘蛛糸遺伝子のクローニングと配列解析

日本産の蜘蛛について、その蜘蛛糸遺伝子をクローニングする。そして、その配列解析を行い、海外で報告されている配列との相違を調査する。

2. 蜘蛛糸遺伝子を含む不完全piggyBacの構築

配列解析を行った蜘蛛糸遺伝子をトランスポゾンpiggyBacに挿入したものの構築する。このトランスポゾンに挿入する蜘蛛糸遺伝子が、蚕体内の絹糸腺細胞で発現し、mRNAを作り、蜘蛛糸タンパク質を作るように構築する。

3. 蜘蛛糸遺伝子を含む不完全piggyBacを蚕卵にマイクロインジェクション

構築したトランスポゾンpiggyBacを蚕の生殖細胞に注入して、効率よく蚕の染色体ゲノム内に挿入させるために、産下直後の蚕卵にマイクロインジェクターを用いて注入する。

4. 処理卵からの孵化幼虫の飼育と採種

マイクロインジェクション法により、不完全piggyBacを注入した蚕卵を25℃でインキュベーションし、孵化した幼虫を丁寧に飼育する。その成虫を交尾させ、採種する。

5. 採種した卵の中から形質転換卵を選別

採種した卵の中から胚子の眼が赤色蛍光を放つものを選別する。形質転換卵が赤色蛍光を放つのは、トランスポゾンpiggyBacを構築する際に、蜘蛛糸遺伝子とともに神経系の細胞で発現するDsRed遺伝子を組込んだためである。

6. 選別卵を孵化させ、飼育

DsRedの赤色蛍光を放った卵を選別して孵化させ、丁寧に飼育する。赤色蛍光を放った卵から孵化した幼虫は、蜘蛛糸遺伝子をもち、蜘蛛糸タンパク質を生産する。

7. 飼育した形質転換蚕の繭に含まれるタンパク質を分析し、蜘蛛糸タンパク比率を測定

DsRedの赤色蛍光を放った卵を選別して孵化させ、丁寧に飼育する。赤色蛍光を放った卵から孵化した幼虫は、蜘蛛糸遺伝子をもち、蜘蛛糸タンパク質を生産する。この形質転換蚕の繭に含まれるタンパク質を分析し、蜘蛛糸タンパク比率を測定する。

8. 繭糸の引張り強度などの物理性状を調査

蜘蛛糸を含む繭糸の引張り強度などの物理性状を調査し、通常の繭糸の引張り強度などの物理性状と比較する。

9. 以上の操作を、横糸、縦糸、卵のう糸などで行う。

横糸は、木綿と同じくらいの強さしか無いが、その弾力性には優れたものがある。縦糸は、通常の蚕が作る絹糸より遥かに強く、防弾チョッキを作るケブラー糸に匹敵する強さをもつという。卵のう糸の性状はまだ詳しく調べられていないが、卵を冬の寒さから優しく守る糸である。これらの蜘蛛糸を混ぜた蚕糸がどのような性状をもつかのについて調査する。

● 研究成果

不完全 piggyBac を利用して蜘蛛糸遺伝子を蚕のゲノム DNA に転移させた。蜘蛛糸には、数種類の糸があるが、まず横糸遺伝子を蚕ゲノム DNA に組込んだ。組込んだ横糸遺伝子が発現し、その発現した横糸タンパク質が繭中に含まれることを確認した。最初、横糸タンパク質の含量が繭タンパク質の1~2%程しか含まれていなかった。この含有比率の向上に挑戦した。横糸遺伝子の大きさを変更したり、選抜を重ねることにより、繭中の横糸タンパク質含量を10%程度まで増やすことに成功した。縦糸遺伝子を蚕ゲノム DNA に組込ようと成功した。また、これまで報告の例がなかった卵のう糸の遺伝子構造を明らかにし、この遺伝子を蚕のゲノム DNA への組込みに成功した。