

# 遺伝子組換えカイコによる機能性シルクの開発

(独)農業生物資源研究所 遺伝子組換えカイコ研究センター長 田村 俊樹

## はじめに

シルクはフィブロインと呼ばれるタンパク質からできています。フィブロインを作る生物には昆虫類やクモ類、貝類などが知られていますが、昆虫ではカイコやヤサンを始め、ハチやハエ、トビケラなど多くの種類がフィブロインを作っています。最も多くの種類のフィブロインを作り、利用している生物はクモです。クモはいくつもの種類のシルクを作り、餌を捕獲するための網や巣の作製に用いています。また、貝類や一部の昆虫は水中で繊維化する特殊なフィブロインを作ります。これらのシルクはX線による結晶構造の解析やタンパク質の一次構造、遺伝子の塩基配列の同定等、いろいろな角度から研究が行われ、生物種によって一次構造は全く異なることが明らかにされています。この一次構造とシルクの性質には密接な関係があります。実際に衣料としてつかわれているシルクの大部分はカイコによって作られ、例外的にサクサンやテンサン、ヒマサンなどの野蚕で生産されるものが使用されているに過ぎません。一部の昆虫やクモの作る糸は強度や弾性が高く、繊維としての性質は優れていますが、大量生産することができません。

しかしながら、最近の分子生物学の進歩によって、異種類の生物の遺伝子を特定の生物に導入することが可能になりました。そのため、クモの遺伝子を大腸菌やヤギ、植物に導入し、大量に生産する研究が行われています。カイコでも組換え体を作ることが可能になっていますので、人為的にカイコのシルクタンパク質を作っている遺伝子を改変することができ、理論的にはいろいろな生物のフィブロインを作ることが可能です。ここでは、遺伝子組み換えカイコの作出法やカイコが絹を作る仕組み。シルクの遺伝子からみた特徴などを紹介し、新しい絹タンパク質の生産の可能性と限界について述べたいと思います。

## 1. 遺伝子組換えカイコの作出法

遺伝子組換えカイコはトランスポゾンベクターとして利用することによって作出することができます。実際には特殊な構造を持つプラスミドをベクターとして、別の遺伝子を導入する作用のあるプラスミドと一緒にカイコの卵に注射します。次の世代で組換え個体をスクリーニングすることによって、遺伝子組換えカイコを作出することができます。遺伝子組換えカイコを見分けるためのマーカー遺伝子には緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤色蛍光タンパク質 (DsRed)、カイコの突然変異第一白卵 (*w-1*) の野生型遺伝子であるキヌレニン酸化酵素遺伝子などを用いることができます。また、実際に作出された遺伝子組み換えカイコは安定で、継代を重ねることによって染色体中を移動することはありません。

ん。したがって、一度組換えカイコを作れば系統として保存でき、大量に増殖できるとともに長期間利用することができます。

## 2. 遺伝子から見た絹の構造と多様性

カイコのシルクは結晶領域と非結晶領域から構成され、結晶領域では (Gly-Ala-Gly-Ala-Ser)<sub>n</sub> のアミノ酸配列から構成されています。遺伝子の塩基配列を利用した解析により、大部分の領域でこの結晶領域のアミノ酸配列に対応する塩基配列が存在し、小さな反復の繰り返しでより大きなユニットが作られ、遺伝子全体はこのユニットの繰り返しによって作られていることが明らかにされています。ヤママユ蛾科のテンサンやサクサン、ヒマサンはポリアラニン型のシルクを持ち、10前後のアラニンの繰り返し配列の後にグリシンの多い配列が続き、これが一つのユニットを形成し、このユニットの反復によって大きな遺伝子が作られています。クモのフィブロイン遺伝子でも、ユニットの繰り返しによって作られるというフィブロイン遺伝子の基本構造は変わりません。異なったユニットを利用することによって種々の異なる遺伝子が作られています。これは貝類のフィブロインでも同じで、フィブロインの基本的な特徴の一つといえます。

## 3. カイコが絹を作る器官と絹生成の仕組み

カイコは5齢後期になると吐糸して繭を作りますが、この繭糸はセリシンとフィブロインと呼ばれるタンパク質から作られています。繭糸の25%がセリシンで残りの75%がシルクとなるフィブロインです。このシルクを作る器官は絹糸腺と呼ばれ、前部と中部、後部に分けることができます。前部絹糸腺は吐糸するための器官で、セリシンは中部絹糸腺の細胞で合成されます。また、フィブロインは後部絹糸腺で作られます。絹糸腺の構造はチューブ状の構造であり、内肛にセリシンやフィブロインが蓄積します。セリシンはセリンを多く含む複数のタンパク質の総称です。これまでに明らかにされているセリシン遺伝子には3種類あり、それぞれセリシン1と2、3遺伝子と呼ばれています。セリシン1遺伝子はイントロンの多い構造をしており、この遺伝子からは少なくとも4種類のmRNAがスプライシングの違いによって作られ、セリシン2遺伝子からは2種類のmRNAが作られることが分かっています。フィブロインは分子量が約35万ダルトン前後のフィブロインH鎖と分子量が3万弱のフィブロインL鎖及び分子量2.5万のP25の3種類のタンパク質からできています。フィブロインH鎖とL鎖、P25のそれぞれに対応する遺伝子が1種類あり、フィブロインH鎖遺伝子、フィブロインL鎖遺伝子、P25遺伝子と呼ばれています。後部絹糸腺で合成されたタンパク質はフィブロインH鎖とL鎖がS-S結合し、この結合した分子にP25が結合して複合体が形成され、内肛に分泌されると考えられています。このようにして後部絹糸腺の内肛に分泌されたタンパク質は中部絹糸腺へと移動し、蓄積される。そして、吐糸期になると前部絹糸腺を通じて繭を作ります。

#### 4. 組換えカイコによる絹の改変とその可能性

カイコは絹タンパク質を大量に作るための絹糸腺という器官を持っています。また、トランスポゾンを利用した遺伝子組換えカイコ作出法により、目的とする外来遺伝子を導入した組み換え体を簡単に作ることができます。そのため、他の昆虫やクモ等からクローニングしたフィブロイン遺伝子をカイコの絹糸腺において大量に発現するよう絹タンパク質遺伝子を改変し、カイコに導入することにより、カイコのフィブロインと一緒に、別の生物の絹タンパク質を作ることができます。しかしながら、実際に実験を進めてみると多くの問題を抱えています。その一つはシルクを作る遺伝子が反復配列から構成されていることです。これに加えて、遺伝子のサイズが大きく、目的とする遺伝子を作ることは困難なことが多いのです。また、カイコで発現するようにした遺伝子を導入した場合、カイコのシルクのタンパク質遺伝子が無くなっている訳ではないので、導入した遺伝子と内在する遺伝子の両方が発現するようになります。この場合、現在の技術では導入した遺伝子の発現量は内在性の遺伝子の発現に比較して、遥かに量が少ないのです。現在、遺伝子を発現させるシステムには、フィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖及び p 25 の遺伝子を利用した 3 種類が知られています。このうち、フィブロイン L 鎖遺伝子については、対応する遺伝子の突然変異系統を利用して、大量に発現させ、絹糸として分泌させることができます。また、フィブロイン H 鎖を利用した系でもかなり大量の組換えタンパク質を含むフィブロインの生産が可能です。そのため、これらの遺伝子を利用することによってカイコのシクルに別の遺伝子を作るものを少し付け加えたような機能性のシルクを作ることは可能です。これらの遺伝子発現システムと使ってこれまで、カイコのシステムを使ってつくられた機能性のシルクとして、GFP, DsRed、コラーゲン、フィブロネクチン、デフェンシン、ヒト腺維芽細胞増殖因子、インターフェロン、テンサンのフィブロイン、クモのフィブロイン等が報告されています。しかしながら、強さなどの繊維としての基本的な性質を変えるには現在確立されている方法ではまだまだ不十分であり、シクルに関する遺伝子を全く別の遺伝子を置き換える方法、たとえば染色体レベルでの相同組換えなどの手法を開発することが必要で、カイコでも研究が進められています。

#### おわりに

遺伝子組換えカイコを利用して新しい機能性のシルクを作ることができるようになりました。この技術を使って、カイコのシルクの性質を変えることができます。しかしながら、まだカイコが本来持っている遺伝子を取り除くことはできません。そのため、導入した遺伝子が作ったものはシクルの僅かな部分を占めるに止まっています。今後、新しい機能を持つシルクを作るためには、導入した遺伝子の発現量を上げ、絹糸腺細胞から内肛への分泌量を増やす工夫とともに内在性の遺伝子の発現を抑制する方法を見出すことが大切です。

そのためには、相同組換えによる遺伝子の置換法の研究やシルクタンパク質の分泌のメカニズム、シクルの繊維化の機構については研究を進めることが大切です。このような研究が進むことにより、日本初の新しいシルクができることを期待されます。