

# 野蚕繭からの新規生理活性物質の同定と機能解析

Identification and function of biologically active  
compounds from the cocoon of the wild silkmoths

2009. 3

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物環境科学専攻  
(岩手大学)

崔 相元

## 目 次

序 論	1
第一章 天蚕繭層由来セリシン抽出液から単離したタンパク質の機能解析	1 0
材料と方法	1 3
結 果	
1. 天蚕繭層抽出液	2 3
2. HPLC による目的タンパク質の分離精製	2 3
3. アミノ酸組成分析	2 5
4. 抗酸化活性分析	2 8
5. 41 kDa タンパク質によるショウジョウバエ S2 細胞増殖効果	2 8
6. ラット肝がん細胞 (dRLh84) に対する細胞活性	3 0
7. 41 kDa タンパク質によるマウスリンパ細胞増殖効果	3 0
考 察	3 4
摘 要	4 0
第二章 ウスタビガ繭層由来フィブロインパウダーからの生理活性物質の機能解析	4 1
材料と方法	4 3
結 果	
1. 元素分析	5 5
2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による活性物質の精製	5 5
3. 抗カビ活性	5 8
4. 抗細菌活性	6 2
5. 抗がん活性試験	6 2
6. <sup>1</sup> H NMR スペクトル測定	6 2
7. LC/MS による質量測定	6 6
考 察	6 8
摘 要	7 3
総合考察	7 4
引用文献	8 1

## 緒 言

生命の 40 億年の歴史の中で進化を遂げた昆虫類は、地球上には約 80 万種が確認され、未同定の種を含めると 100 万種以上が存在しているといわれている。これは全動物種の実に 80%以上にも及び、その生息環境は乾熱の砂漠から寒冷の極地まで幅広く分布している。昆虫の生命現象はあるときは人間の想像をはるかに超えるものでもある。例えば、アフリカに棲むネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) は、乾燥した状態で何年も生き延びられ、乾燥状態の休眠ユスリカ幼虫が 17 年後に水の中で蘇生された記録もある (Watanabe *et al.*, 2002)。またハエの *Psilopa petrolei* 属の幼虫は唯一油田の原油中で生息し、石油を餌とする昆虫で、別名 petroleum fly と呼ばれている (Kadavy *et al.*, 2000)。

最も繁栄している生物とも言われる昆虫の秘密とは一体何なのか。昆虫は地上のあらゆる環境に生息しているため、苛酷な環境に適応する過程で、様々な特異的生体機能を選択的に獲得した上、発達させてきたと考えられる。換言すれば、各種の昆虫がそれぞれの環境に見事に適応し、繁栄を保っているとも考えられる。その根拠として、昆虫

は無脊椎動物中唯一翅を持ち、小型で摂取食物量が少ない，種ごとに生活空間が異なる，世代交代が早い，生活環における独特の休眠期の介在で生殖活動に不適な環境を克服することなどが挙げられる．

動物種は進化の過程で脊椎動物と無脊椎動物に大きく分かれ，前者の代表であるヒトを含む哺乳類と後者を代表する昆虫は進化の変遷は異なるが，興味深いことに両者は神経伝達系，免疫系，酸素利用，生体リズムなど共通あるいは類似した機能を持つことがいままでの研究で明らかになっている．このような見地から昆虫をモデル動物として使用し，ヒトの神経伝達、免疫反応、長寿のメカニズムなどの解明に貢献する研究が多く報告されている．

また，昆虫は人間社会のあらゆる生活活動に深く関わっている．どのような関わりを持つかにより昆虫は大きく二つに分けられる．一つは人間にとって重要な農作物を食害する鱗翅目の幼虫，ヒトおよび家畜を侵害するサシバエ (*Stomoxys calcitrans*) 等，またマラリア原虫の媒介で人体に疾病をもたらすネッタイイエカ (*Culex pipiens fatigans*) などの害虫と呼ばれる昆虫である．もう一つは植物の受粉を媒介するミツバチを含むハナバチ類，薬品素材として使用されているサナギタケ (*Cordyceps militaris*) 類の寄主となる昆虫類，牧場の代表

的な雑草であるギシギシ類を特異的に摂食するコガタルリハムシ (*Gastrophysa atrocyanea*), 遺伝学研究領域でヒトの各種疾病のモデル動物として利用されているキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) などの有用昆虫である。その中でも, 家畜化に成功し, 産業規模まで発展させたのは, 絹を生産するカイコ (*Bombyx mori*) や, 蜂蜜を生産するセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) である。特にカイコの生産する絹糸は, 木綿や麻のようなセルロースを主成分とする植物繊維や、羊毛などのタンパク質で構成される動物繊維などに比べ, 唯一細長い糸が作られる繊維である。この糸を使って作られた絹織物は他に類をみない深い光沢を持ち, 染色性に優れている。この絹織物は東西を結ぶシルクロードを越えてヨーロッパに運ばれ, 等量の金と交換されるほど珍重な物であった (村上ら, 1992)。この昆虫生産物で結ばれた「ロード」は単なる物流のロードではなく, 人類文明の歴史の「代名詞」に位置づけられると言っても過言ではないだろう。

今日, バイオテクノロジー分野の中でも資源昆虫を中心とする領域の研究開発が台頭してきた。韓国では国民の古くから漢方医薬、栄養補助への執着を基盤に, いち早く国を挙げ昆虫また昆虫生産物を治療薬、健康食品、栄養ドリンクへと応用開発や商品化に力を注いだ。不

思議なことに、韓国と日本の養蚕農家数はそれほど変わらないにもかかわらず韓国の繭生産高はほとんどない。その理由はカイコが営繭する前、すでに漢方薬剤の冬虫夏草や、糖尿病治療剤のカイコ粉末として利用されたからである。実際 1998 年カイコを用途別に統計された数値を見ればわかるようにカイコ粉末に 95 %、冬虫夏草に 4.3 %、繭として利用されたのは残りのわずか 0.7 %に過ぎない。こういったカイコの新規利用法の確立は伝統的な繭生産を目的とする養蚕から機能性養蚕に転換させた（竹田，2003）。一方日本では、昆虫を利用した国際的競争力がある高付加価値の昆虫テクノロジーの創出には、産学官連携と知的財産を機軸とした地域特産品のブランド化が重要な鍵であることが提案されている（鈴木，2005）。また、1993 年当時の科学技術庁（現文部科学省）から自然科学研究の一環として「昆虫機能利用研究」が打ち出された。その目的とは、人類にとって二十一世紀最大の未利用の生物資源としての昆虫を基軸とし、科学技術手段—遺伝子解析や組換え技術等のバイオテクノロジーを用いて、昆虫及び昆虫生産物が持つ特異的機能の発見と利用、新産業創出等の研究領域の水準を世界最高レベルに引き上げることである（竹田，2003）。そして、2003 年には「バイオマテリアルの隠れた宝庫」という視点で、これまで昆虫機能

の知られざる研究成果を産業とどう結びつけるかがビジネスの側面からも検討された（赤池，2003）。

このような流れの中，研究材料として注目されている繭は，昆虫の変態に適した環境を提供する昆虫生産物である．興味深いことに，最近の研究ではカイコが繭糸に大気中の二酸化炭素を取り込むことが明らかになった．従来，大気中の二酸化炭素を利用できるのは，光合成をおこなう植物，光合成細菌，一部の微生物のみ，という考え方が常識であったが，動物も炭素固定ができるという事実は生物学、昆虫学の新たな重要な発見である（Magoshi *et al.*, 2003）．その繭を構成する絹繊維は主要成分として 2 種類の高分子タンパク質のフィブロインとセリシンが知られ，フィブロインタンパク質はシルク繊維素材の主成分でもある．また近年，カイコの繭を単なる繊維として利用するだけではなく，非繊維分野における利用技術のために研究開発が急速に進展し始めた（塚田，1997）．すなわち繭を粉末，膜，ブロックといった新しい形態で利用するというものである．また，フィブロインは全アミノ酸組成の 90% がグリシン、アラニンのほか，セリン、チロシンで構成されている特殊なタンパク質である．このような特性を生かした製品の研究開発も進んでいる．絹タンパク質に多く含まれているア

ラニン は肝臓機能を高める作用を持ち，グリシンとセリンは血液コレステロール値を低下させる機能を持ち，またチロシンは認知症の治療に効果があることが知られていることから，絹タンパク質を食品添加剤として利用したそうめん，うどん，飴，お菓子などがすでに商品化されている．ほかにも，優れた吸湿性、放湿性の特性を利用した「シルクレザー」ボールペンと時計が開発され，生体適合性や酸素透過性に優れた性質を利用したコンタクトレンズが試作され実用化に向け研究中である．

一方セリシタンパク質は，主に化粧品分野への応用開発研究が進められている．古くから製糸工場の従業者は手肌が荒れることは少なかったという事実が知られている．今まで廃棄物として処分されていたセリシンに関する機能が解析され，セリシンの中に天然保湿成分が多量に含まれており，強い抗酸能も有していることから活性酸素の発生を抑制するなど様々な特性が明らかにされた．マウスを用いた実験により抗酸化機能が皮膚癌を抑制するとの報告もある

(Zhaorigetu *et al.*, 2003a, b)．一般に，化粧品素材として各種の抗酸化性物質が使用されるのは，大気中の酸素にさらされる皮膚に発生する活性酸素を抑制するためである．さらに最近の研究では，チロ



シナーゼ活性を阻害してメラニン色素発生を抑制することが明らかになっており、美白化粧品への応用が期待されている。また、カイコ繭層由来のフラボノイド類による抗酸化作用（山崎ら，1999）や抗菌性作用（栗岡ら，1999）が明らかになった。

近縁種が多い家畜されたカイコに比べ、野生の絹糸昆虫は多種多様で、インドのタサールサン（*Antheraea mylitta*）、エリサン（*Samia cynthia ricini*）、ムガサン（*A. assama*）、中国のサクサン（*A. pernyi*）、日本原産の天蚕（ヤママユ：*A. yamamai*）、そして主に東アジアに生息しているウスタビガ（*Rhodinia fugax*）などが知られている。その中でも天蚕の繭から作り出された生糸は、特有の光沢をもち、家蚕の糸より30～40倍の高値がつく高級糸で「繊維のダイヤモンド」とも呼ばれている。

これら野蚕といわれる昆虫の繭は厳しい外部環境に耐えるために、家畜化されたカイコより強い抗菌性、抗酸化性、紫外線の反射・吸収力（瓜田，1994，1997，2007）を持つように進化したと考えられる。この野蚕繭由来の特異的なタンパク質関連物質を同定できれば、繭の新規機能性物質を明らかにするだけでなく、その生理活性機能を利用することで新しい昆虫機能利用の確立にも貢献できると考えられる。

そこで本研究では，第一章において，日本原産の天蚕繭層からの抽出物を研究材料とした細胞増殖活性物質の探索と機能解析をおこない，第二章では，ウスタビ繭層由来フィブロイン抽出物を研究材料とした抗菌，抗微生物，抗がん活性機能解析をおこなったうえで，機能性利用の視点から考察した．

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った，岩手大学農学部農業生命課程教授・鈴木幸一博士，講師・安嬰博士，また御指導ならびに御助言を賜った岩手大学農学部共生環境学課程准教授・小藤田久義博士，帯広畜産大学農学部准教授・倉持勝久博士，岩手大学農学部応用生物化学課程教授・長澤孝志博士，大阪市立大学准教授・品田哲郎博士に深遠なる感謝の意を表する．ならびに実験材料を提供していただいた福島県農業総合センターの瓜田章二博士に心から感謝の意を表する．さらに実験を進める上で御助言と御指導を惜しまれなかった University of Notre Dame Indiana 研究員譚安江博士，岩手大学 COE 研究員楊平博士，そして，多くの御援助を賜った岩手大学農学部応用昆虫研究室佐藤嘉則氏，山本圭一郎氏を始めとする諸氏に心から深く御礼申し上げる．

最後に，すべての面において私を支えていただいた家族に感謝の意を表する．

## 第一章 天蚕繭層由来セリシン抽出液から単離した

### タンパク質の機能解析

絹糸昆虫は、幼虫から成虫への変態の時に、生体防御手段として繭を形成し、身を守る。繭の絹糸は、食葉より摂取されたアミノ酸から合成したフィブロインとセリシン 2 種類のタンパク質が主たる構成物質であり、その他にロウ状物質、炭水化物、色素、無機物なども含まれている。

最近の研究では、カイコ由来セリシンに親水性アミノ酸 Gly, Asp, Ser などが多く含まれ、それらの組成がヒト皮膚の天然保湿因子で知られている Natural moisturizing factors (NMF) と類似していることが明らかになった。さらにセリシンは強い抗酸化性を有し活性酸素の発生を抑制し、チロシナーゼ活性を阻害してメラニン色素発生を抑制することも明らかになっており、マウスを用いた実験により抗酸化機能が皮膚がんを抑制、また、セリシンを投与された動物はその抗酸化作用により大腸がんの発現が抑制されるとの報告もある (Zhaorigetu *et al.*, 2003 a, 2003 b, 2007)。その上、カイコセリシンの細胞増殖、細胞凍結保護機能性が着目され、精製方法は工業レベルで高純度に精

製することに成功し、細胞増殖や細胞凍結保存に有効な添加物として製品化されてる (Terada *et al.*, 2002, 2005).

日本原産大型絹糸昆虫である天蚕の繭層はカイコと同様にフィブロインとセリシンから構成されており、繊維状タンパク質フィブロインは繊維として古くから利用されてきたが、絹糸を構成するもう一つ主要タンパク質であるセリシンは絹織物の製造過程で未利用のまま廃棄物として処理されてきた。一方、多数の野蚕は様々な外敵や苛酷な自然条件に対応するため一般的に繭は著しく堅牢に作られている。具体的には、野蚕の繭糸は家蚕系に比べセリシンが少なく、シュウ酸カルシウムなどの無機成分を多く含んでいるのが特徴で、その存在意義として繭層の強化、膠着促進、液状絹の固化促進などが考えられる (小松, 1980)。こういった、野蚕繭の特性である無機物質などの癒着は野蚕繭層からセリシンの抽出を一層困難なものにし、野蚕セリシン研究はアミノ酸組成分析、無機成分の分析、野蚕糸の物理的な構造解析に留まっていた (小松ら, 1975)。しかし、近年バイオテクノロジー技術の進歩とあいまって野蚕繭の機能性が注目され、新規の機能性バイオ素材として研究が進められている。一例として、インド等に生息している野蚕の一種タサールサンのセリシンは 70~200 kDa のポリペプチ

ドから構成されており，紫外線照射によるヒト皮膚細胞のアポトーシスを抑制する機能を持つことが明らかになった (Dash *et al.*, 2008).

そこで，第一章では確立された天蚕のセリシン抽出法を活用し，天蚕繭層由来セリシン抽出液に含まれている特定のタンパク質を単離精製し，機能利用の視点から解析を試みた．

## 材料と方法

### 1. 材料

天蚕繭層からの抽出液は、福島県農業総合センターの瓜田章二博士より提供されたものを用いた。具体的には、天蚕の生繭を 1/4 大きさにカットした繭層をまず 100 倍量の 65℃の温水で 3 分間洗浄した。その後、17G ガラスフィルター (Sibata 社) で固液分離し、得られた繭層を室温で 10 日間 70%メタノールで色素を抽出した後、50 倍量の 0.5% (W/V)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液により 98℃、2 時間の精練処理を行った。17G ガラスフィルターを用いて上澄を濾過し、得られた抽出液をさらに 98℃で 30~60 分間加温濃縮後、常温で 2 日間静置することにより不純物を沈殿させ、濾紙 (Advantec, No.2) で濾過した。濾過液をセルロースチューブ (MWC0 : 10,000, SPECTRUM Laboratories 社) に充填し、20℃で水道水による流水透析を 3 日、純水で 1 日透析した。透析した抽出液を天蚕セリシン水溶液とし、さらに凍結乾燥機 (EYELA FDU-810, 東京理科器械株式会社) を用いて凍結乾燥した。

なお、70%メタノールでの抽出液は天蚕繭層色素とし、ロータリー

エバポレーターによって濃縮した後，凍結乾燥機を用いて乾燥した．

これらの凍結乾燥物を各粗抽出物として以降の実験に用いた．

## 2. 電気泳動

### (1) Tricine-SDS ポリアクリルアミド電気泳動

凍結保存した天蚕繭層由来セリシンパウダーを，10 % (T)，3 % (C) の分離ゲル上に濃縮ゲルを重層した垂直型スラブゲルを用いて分離した (Schägger and Jagow, 1987)．陰極槽は 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, 0.1% (W/V) SDS、陽極槽は 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.9)，泳動用試料 (20  $\mu$ l) は等量の Tricine SDS-PAGE 用 sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % (W/V) SDS, 12 % (W/V) glycerol, 2 % (V/V)  $\beta$ -mercaptethanol, 0.01 % (W/V) Serva blue G] を加え，3 分間熱処理したものを用いた．分子量マーカールには，Protein Marker Kit (M. W. Range 97,000~14,400, GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を使用した．泳動は，分離ゲルに入るまでは 30 V，その後分離ゲルの下端に達するまでは 80 V の定電圧で通電した．泳動後のゲルは，0.25 % Coomassie brilliant blue (CBB) R-250, 45 % ethanol, 7 % acetic acid 中で染



色し, 20 % ethanol, 7 % acetic acid 中で脱色した.

## (2) Blue Native-PAGE (BN-PAGE) 電気泳動

Blue Native-PAGE 電気泳動には 4-16 %のグラジエントゲルを用いた (Invitrogen 社). 泳動方法は基本的に SDS-PAGE と同様であるが, サンプルバッファ、泳動バッファに還元剤や界面活性剤を用いず, サンプルも熱処理しないのが特徴である. 泳動槽に泳動用バッファ (Invitrogen 社) を入れ, 泳動用試料 (20  $\mu$ l) は等量のサンプルバッファ (Invitrogen 社) を加えて調整した. 分子量マーカーには, Native Marker Protein Standards (M. W. Range 1,236,000 ~ 20,000, Invitrogen 社) を使用した. 泳動は, 150 V 定電圧で行い, 泳動後のゲルの脱色は Invitrogen 社 BN-PAGE Manual に従っておこなった. 具体的には泳動後のゲルを 100 ml の固定液 (40 %メタノール, 10 %酢酸) に入れ, 電子レンジで 45 秒暖めた後, シェーカーで室温/5 分間振とうし, 固定液を捨てた. 続いて 100 ml の脱色液 (8 %酢酸) を加え, 電子レンジで 45 秒間暖めた後, バックグラウンドが鮮明になるまでシェーカーで振とうした.

なお, 電気泳動に使用するタンパク質の定量は BCA protein assay

reagent kit (Pierce 社)の測定手順に従っておこなった。

### 3. アミノ酸組成分析

凍結乾燥した天蚕セリシン抽出パウダーおよび天蚕 41 kDa タンパク質 1 mg を 6 N 塩酸 1 ml に混合溶解して減圧封管した。封管した物を加熱分解 (110 °C/24 時間) を経て真空乾燥処理した後, Lithium citrate サンプルバッファ (pH 2.2) で溶解し, 孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルタ (直径 4 mm, Millipore 社) で濾過し分析試料とした。分析試料はアミノ酸アナライザー (JLC-500/V, 日本電子社) に注入しアミノ酸組成を測定した。

### 4. DPPH フリーラジカル消去活性測定

DPPH (1, 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) 水溶液は紫色を呈する安定なフリーラジカルである。517 nm 吸収スペクトルの変動からラジカルの減少量あるいは減少速度を測定することによってラジカル消去率を評価することができる。

具体的には, 0.5 ml マイクロチューブに 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 80

μl (pH 7.4), 500 μM DPPH・エタノール溶液 100 μl 添加した。その後、終濃度が天蚕セリシンの場合 0.1 %、0.5 %、1 % (W/V), 70 %メタノール抽出物の場合 21.5, 43, 86, 172 μg/ml になるように調整した試料を 20 μl, 同様にポジティブコントロールとして市販されているカイコ由来のピュアセリシン(Wako), 対照区には同量のトリス緩衝液を添加し, 室温で 20 分放置した後, マイクロプレートリーダーによって波長 517 nm における吸光度を測定した (UV-1600 島津製作所)。フリーラジカル消去活性は, 対照として緩衝液を添加した場合の吸光度を  $A_{\text{control}}$ , および試料を添加した場合の吸光度を  $A$  とし, フリーラジカル

消去活性 (%) =  $[1 - (A/A_{\text{control}})] \times 100$  として算出した。

## 5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製

Tricine-SDS ポリアクリルアミド電気泳動で確認された 41 kDa タンパク質を精製するため, HPLC システム (島津製作所) に接続したゲル濾過カラム TSK-gel G3000pw (7.5×300 mm, 東ソー) を用いて分離をおこなった。あらかじめ凍結乾燥して保存していた試料を蒸留水で 3 mg/ml になるように調整後, 遠心 (10,000 rpm, 5 分間, 4°C), 上清を

孔径 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して不純物を除去した上、200  $\mu\text{l}$  ずつカラムに注入した。0.2 M リン酸バッファ (pH 6.8) でカラムを平衡化、流速 0.5 ml/min で分離を行い、280 nm の紫外吸収で検出し、レコーダー (C-R6A, 島津製作所) で記録した。溶出液をピークごとに分取し、脱塩と濃縮を兼ねて限外濾過 (MWC0: 10,000, Millipore 社) をおこない、凍結乾燥したものを各生物検定に供した。

## 6. 生物検定

### (1) 昆虫培養細胞試験

#### a) Schneider S2 細胞培養

検定には、ショウジョウバエ胚子由来 Schneider S2 培養細胞を用いた。培地は 10%ウシ胎児血清および Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL 社製) 抗生物質ペニシリン (10 U/ml)、ストレプトマイシン (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、アンフォテリシン B (25 ng/ml) を添加した Schneider's insect medium (Sigma 社) を使用した。

b)細胞増殖活性測定：

培養フラスコ（25 ml, Falcon）で増殖させた細胞を回収後，ビュルケルチュルク血球計算盤を用いて計数した．96 well マイクロプレート（岩城硝子社）に播種細胞密度を  $1 \times 10^5$  cells/ml に調整して 100  $\mu$ l/well 添加し，27℃全暗条件で 24 時間前培養を行った．その後，終濃度が 0.1 %，0.05 % (W/V) になるように調整した試料を 11  $\mu$ l/well，同様にポジティブコントロールとして市販されているカイコ由来のピュアセリシン，対照区には同量の PBS（-）[Phosphate-buffered saline(-), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ] を添加して通常条件で 48 時間培養した．その後，WST-1 溶液 [WST-1 6.5 mg, 1-Methyl PMS 0.7 mg, PBS(-) 10 ml] を 11  $\mu$ l /well 添加後 4 時間培養し，450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（Immuno miniNJ-2300, インターメッド社）にて測定した．細胞増殖効果は，対照として PBS 緩衝液を添加した場合の吸光度を  $A_{\text{control}}$ ，および試料を添加した場合の吸光度を A とし，

細胞増殖率 (%) =  $(A / A_{\text{control}}) \times 100$  として算出し，評価した．

## (2) ラット肝がん細胞試験

### a) 細胞培養

細胞は、ラット肝がん細胞 (dRL84) を用い、培養液は、10% ウシ新生児血清 (NBS, GibcoBRL), 4 mM グルタミン, 50 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml カナマシンを含むダルベッコ変成イグル培地 (DMEM, 日本製薬社製) を使用し、5 % CO<sub>2</sub> 存在下、37°C 湿潤条件で培養した。

### b) 細胞増殖活性測定

100 mm ディッシュ (グライナー社) で培養し、対数増殖期になった培養細胞から培地を取り除き、PBS(-)で洗浄した。2.5 % (W/W) トリプシンで浮遊させた細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml になるように新しい培地で希釈し、100 µl ずつ 96 Well マイクロプレート (岩城硝子社) に添加し、さらに 24 時間培養した。その後、終濃度が 0.1 % (W/V) になるように調整した試料を 11 µl/well, 同様ポジティブコントロールとして市販されているカイコ由来のピュアセリシン, 対照区には同量の PBS を添加して通常条件で 48 時間本培養した後、MTT 法 (Oka *et al.*, 1992) に従い、0.5 mg/ml の MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] を含む培

地を 100  $\mu$ l/well 添加後 4 時間培養した。その後、MTT を含む培地を取り除き、DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Wako) を 200  $\mu$ l ずつ加え、生成したホルマザンを溶解し、590 nm および 620 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。細胞増殖効果は Schneider S2 細胞培養試験と同様に算出し、評価した。

### (3) 免疫活性試験

#### a) 実験動物および培地組成

実験動物は、ICR 系マウス (4 週齢, オス, 日本 S1c 社) を用いた。細胞培養培地は 10 %ウシ胎児血清および 100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地 (日水製薬社) を使用した。

#### b) リンパ球細胞の調整

麻酔したマウスから脾臓を摘出し、PBS(-)が入ってるディッシュにリンパ細胞を採取した。溶血バッファ [(0.14 M 塩化アンモニウム, 17 mM トリシュー塩酸バッファ (pH 7.4)] および PBS 洗浄を 2 回ずつ行い、

十分に赤血球を除去した上，5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 時間インキュベートした．その後，細胞を 0.4 % トリパンブルーで染色し，ビュルケルチュルク血球計算盤で細胞数を計測した．

### c) 活性測定

リンパ細胞を細胞密度  $5 \times 10^6$  cells/ml になるように培地で調整し，96 well plate (岩城硝子社) に 100  $\mu$ l /well 添加した．その後，終濃度を 0.1 %，0.05 % (W/V) になるように調整した試料を 11  $\mu$ l/well，同様ポジティブコントロールとして市販されているカイコ由来のピュアセリシン (Wako)，対照区には同量の PBS を添加して 5 % CO<sub>2</sub> 存在下，37°C 湿潤条件で 48 時間培養した後，Schneider S2 細胞活性試験方法と同様に WST-1 溶液を 11  $\mu$ l/well 添加後 4 時間培養し，450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した．細胞増殖効果は Schneider S2 細胞試験と同様に算出し，評価した．



## 結 果

### 1. 天蚕繭層抽出液

本抽出工程の温水洗浄，70 %メタノール抽出により繭層に付着していた無機物質や大部分の色素が取り除かれた．さらに0.5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  による精練，ろ過，加温濃縮，透析過程を経て50 gの天蚕繭層から1.5Lの水溶液が得られ，これをセリシン溶液とした．さらに，実験、保存しやすいよう凍結乾燥機を用いて凍結乾燥し，1.38 gの天蚕セリシンパウダーが得られた．以降の実験を開始するまで $-20^\circ\text{C}$ のフリーザーで保存した．(Fig. 1).

### 2. HPLCによる目的タンパク質の分離精製

天蚕繭層由来セリシン抽出物をNative PAGEとTricine-SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いて解析した．CBB染色および銀染色でタンパク質を検出した結果，BN-PAGE電気泳動では41 kDa，Tricine-SDSポリアクリルアミド電気泳動では41 kDa付近で鮮明なバンド一本と30

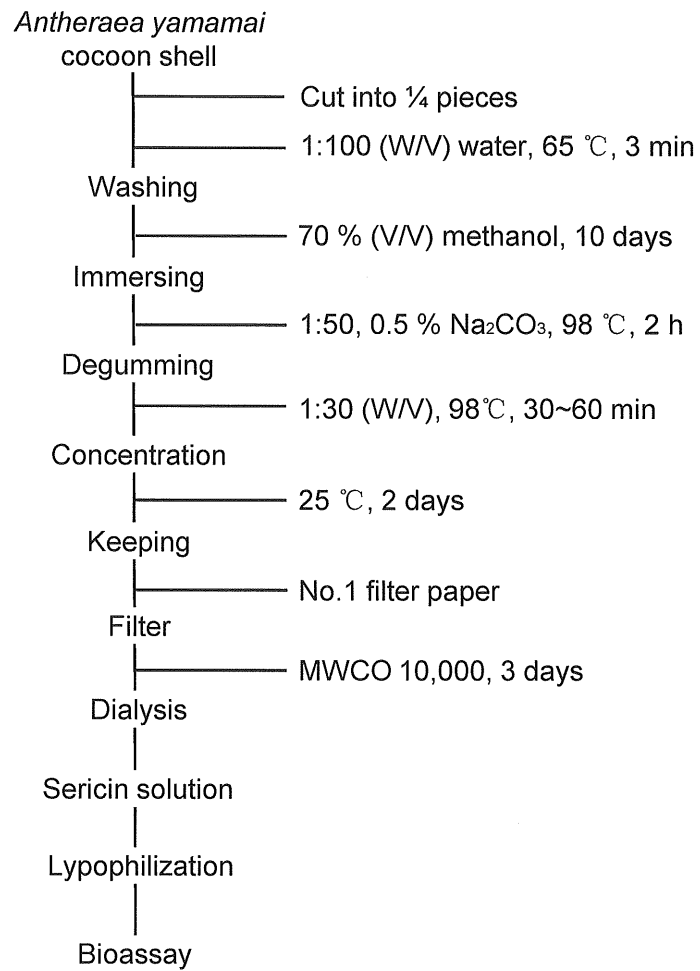


Fig. 1. The procedure of sericin extraction from the cocoons of *A. yamamai*. For details see the Materials and Methods.

kDa 領域にタンパク質スミアが検出された (Fig. 2A). さらに HPLC システムに接続したゲル濾過カラム TSK-gel G3000pw を用いて分離し、ピークごとに回収し BN-PAGE, Tricine SDS-PAGE で解析したところ、41 kDa タンパク質を含む画分は 18 分付近に溶出したピークと確認された (Fig. 2 A, B).

### 3. アミノ酸組成分析

天蚕繭層由来セリシンパウダー, 市販のカイコピュアセリシンパウダーおよび天蚕 41 kDa タンパク質のアミノ酸組成を分析したところ、天蚕セリシンパウダー, カイコピュアセリシンパウダーおよび天蚕 41 kDa タンパク質の主要アミノ酸組成はそれぞれ, グリシン (21.2 %, 14.3 %, 18.6 %), セリン (19.9 %, 37.9 %, 18.1 %), アスパラギン酸 (19 %, 17.4 %, 19 %), スレオニン (12.1 %, 9.2 %, 11.8 %), グルタミン酸 (7.3 %, 3.6 %, 8.1 %), イソロイシン (1.3 %, 0.8 %, 5.3 %), ロイシン (1.6 %, 0.7 %, 6.2 %) であった (Table 1).

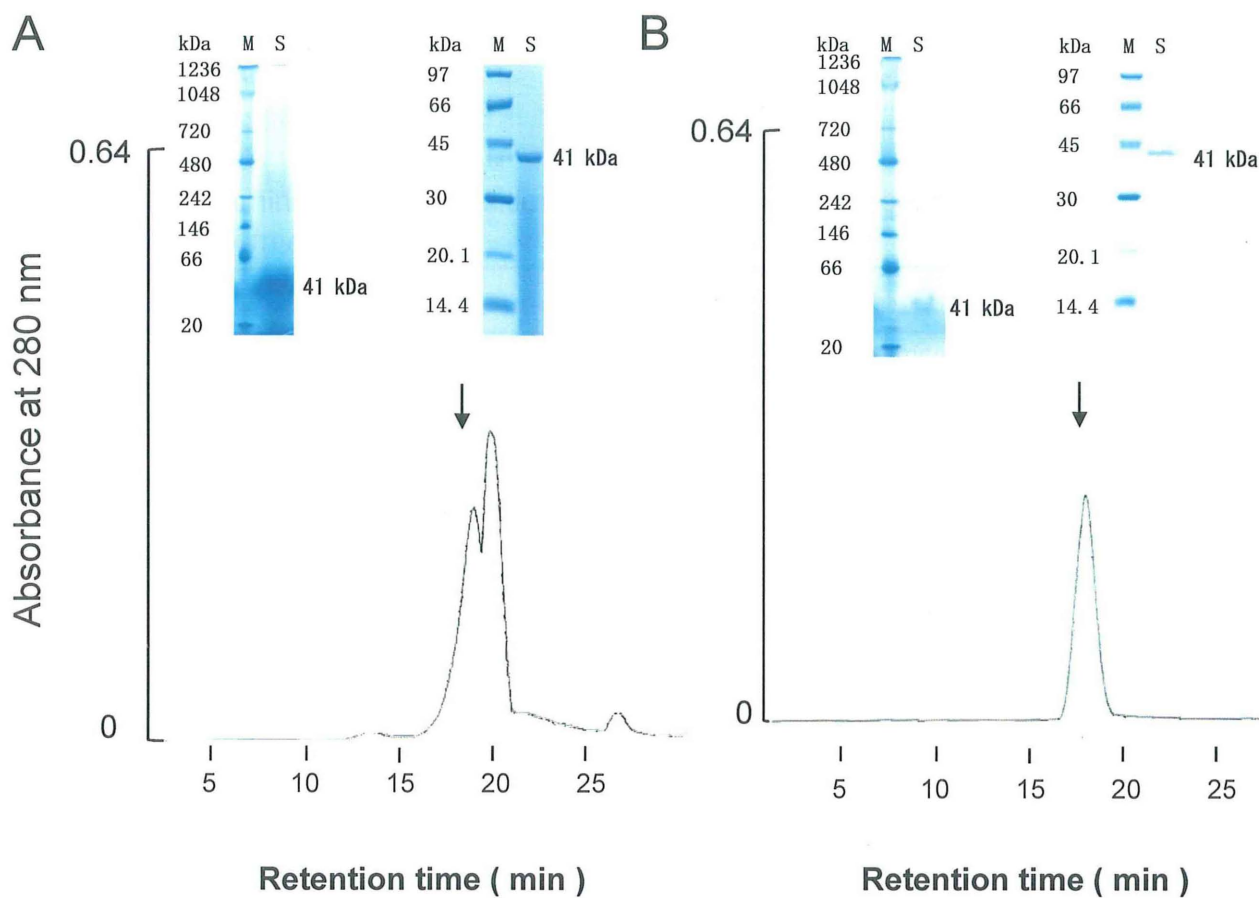


Fig. 2. Isolation of a 41 kDa protein from the *A. yamamai* sericin powder. A, The water-soluble sericin fraction was subjected to blue native PAGE (left, 60  $\mu$ g proteins per lane). HPLC on the TSKgel G3000pw column was carried out with a phosphate buffer (0.2 M, pH 6.8) at a flow rate of 0.5 ml/min. The peak eluted around at 18 min (marked by the arrow) was concentrated and run on tricine SDS-PAGE (right, 74  $\mu$ g proteins per lane) : a 41 kDa protein and a broad smeared band smear below 30 kDa (right) were revealed. B, The peak was collected, lyophilized, and chromatographed on a 2nd HPLC. The eluate at 18 min was concentrated and run on blue native PAGE (left) and tricine SDS-PAGE (right).

Table 1. Amino acid composition of 41 kDa protein and sericin powder derived from *A. yamamai*

Amino acid	Mol %		
	41kDa protein	Sericin powder	Commercial sericin From <i>B. mori</i>
Asp	19	19	17.4
Thr	11.8	12.1	9.2
Ser	18.1	19.9	37.9
Glu	8.1	7.3	3.6
Gly	18.6	21.2	14.3
Ala	6.3	4.1	4.7
Val	3.1	1.1	3.0
Ile	5.3	1.3	0.8
Leu	6.2	1.6	0.7
Tyr	3.5	5.5	3.7
Phe	Nd	0.5	Nd
Lys	Nd	2.8	1.8
Arg	Nd	3.3	3.0

Nd, Not determined.

#### 4. 抗酸化活性試験

天蚕繭層の天蚕セリシンパウダーと 70 %メタノール抽出で得られた色素の抗酸化活性を調べた結果、天蚕セリシンタンパク質を 0.5 %、1 % 添加した実験区では無添加の対照区に比べ 27 %、72.5 %のラジカル消去活性があり、同じく市販されているカイコ由来セリシンを添加した実験区では 23.2 %、50.2 %のラジカル消去活性があった。一方、70 %メタノール抽出物を 172  $\mu\text{g/ml}$  添加した実験区では 82.5 %のラジカル消去活性があった。50 %ラジカル消去に必要な量は天蚕天蚕セリシンパウダーでは 0.71 %、繭層色素では 73.4  $\mu\text{g/ml}$  であった (Fig. 3)。

#### 5. 41 kDa タンパク質によるショウジョウバエ Schneider S2 細胞増殖効果

天蚕 41kDa タンパク質の無脊椎動物由来ショウジョウバエ Schneider S2 細胞に対する活性を検証した結果、無脊椎動物由来 S2 細胞に対して市販されているカイコ由来セリシンを添加した対照区では PBS を添加した対照区との細胞増殖活性の差は認められなかったが、

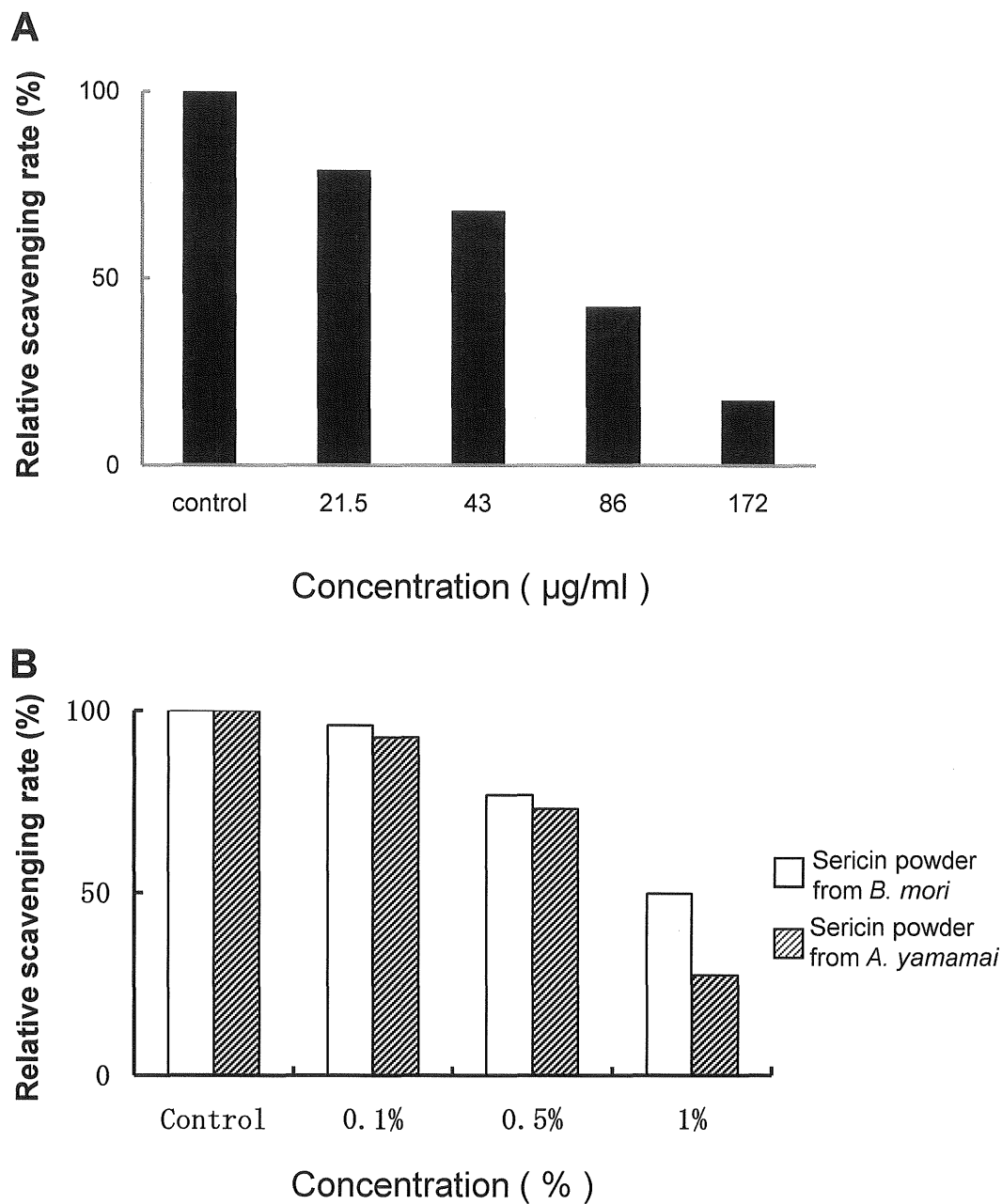


Fig. 3. Effects of the methanol extract and sericin on DPPH scavenging activity. Each 20  $\mu$ l of the sample solution was added to 180  $\mu$ l of 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.4) and the solution was rapidly mixed with the same volume of 500  $\mu$ M DPPH solution dissolved in ethanol for 20 min at room temperature. Scavenging capacity was measured by the absorbance of DPPH radical at 517 nm in a reaction containing the test sample and DPPH. A, extract in 70 % MeOH from the cocoons of *A. yamamai*. B, sericins prepared from *B. mori* and *A. yamamai*.

天蚕繭層由来 41kDa タンパク質を 0.05%添加した実験区では無添加の対照区に比べ 15 % ( $p < 0.01$ ) , 0.1 %を添加区では 48 % ( $p < 0.001$ ) 細胞増殖活性があり, 統計上の有意差が認められた (Fig. 4).

#### 6. ラット肝がん細胞 (dRLh84) に対する細胞活性

野蚕繭の新規機能性利用法を探索することを目的として, 天蚕 41 kDa タンパク質が脊椎動物の腫瘍細胞の一種であるラット肝がん細胞 (dRLh84) に対する活性を調べるた結果, ラット肝がん細胞での増殖活性は, ほとんどみられなかった (Fig. 5A).

#### 7. 41 kDa タンパク質によるマウスリンパ細胞増殖効果

同じく脊椎動物の細胞の一種であるマウス脾臓由来リンパ細胞に精製した 41 kDa タンパク質を添加し, リンパ細胞増殖活性を調べた結果, 市販されているカイコ由来セリシンを添加した対照区では PBS を添加した対照区との細胞増殖活性の差は認められなかったが, 天蚕 41 kDa タンパク質を 0.1 %添加した実験区では無添加対照区に比べ 16 % ( $p <$



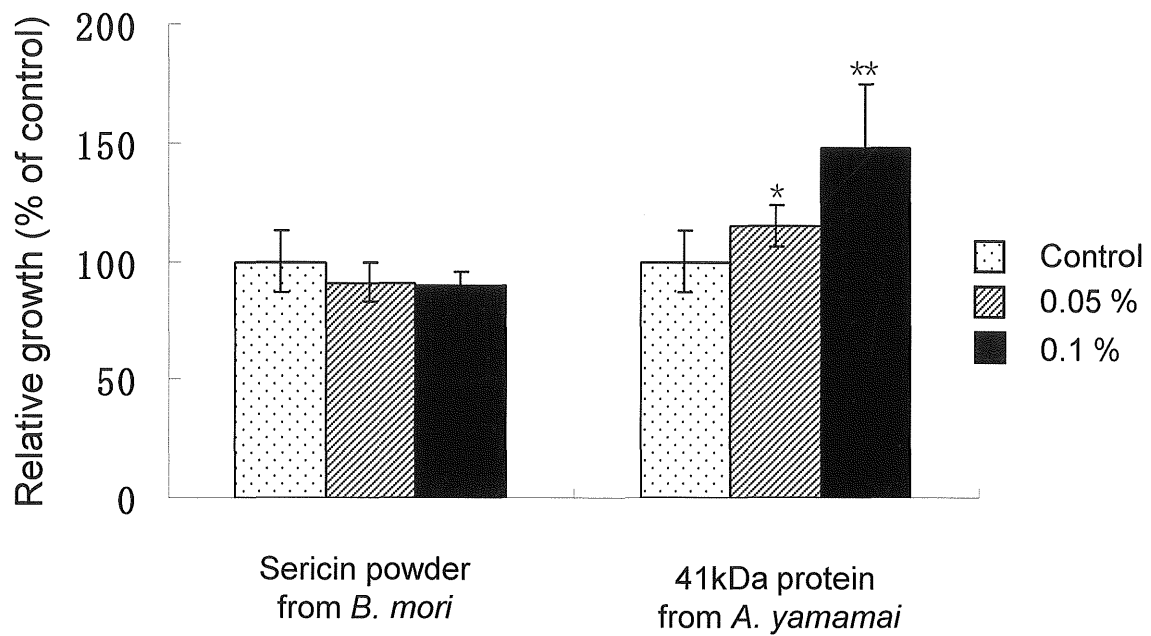


Fig. 4. Effects of the commercial *B. mori* sericin preparation and of the 41 kDa protein from *A. yamamai* sericin on the proliferation of Schneider S2 cells. The insect cells were cultured as described in the Materials and Methods. Cell proliferation was assessed with the WST-1 assay and relative growth (%) of the control was calculated from the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Significant differences from the control (\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ ) were estimated with the by Student's *t*-test.

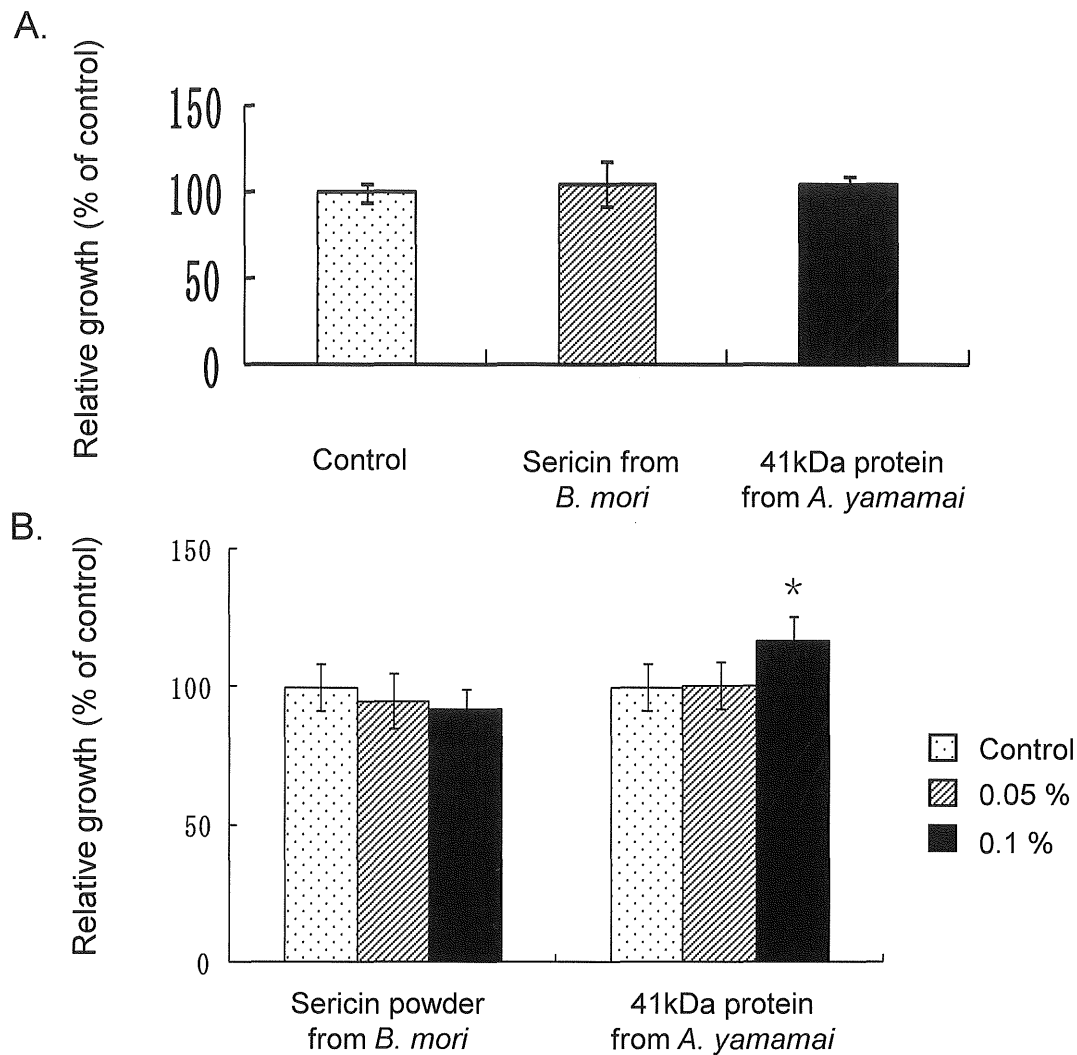


Fig. 5. Effect of the 41 kDa protein on the proliferation of mammalian cells. A, Rat hepatoma cells (dRLh84) were cultured as described in the Materials and Methods. The culture media supplemented with the 41 kDa protein (0.1 %), with a commercial *B. mori* sericin (0.1 %) or without either of them were incubated at 37 °C for 48 h in a humidified atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub>. Cell proliferation was assessed with the MTT assay and relative growth (%) of the control was calculated from the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. B, Lymphocytes from the mouse spleens were cultured as described in the Materials and Methods. The culture media supplemented with the 41 kDa protein (0.1 %), with a commercial *B. mori* sericin (0.1 %) or without them were incubated at 37 °C for 48 h in a humidified atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub>. Cell proliferation was assessed with the WST-1 assay and relative growth (%) of the control was calculated from the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Significantly different from the control (\**P* < 0.02) by Student's *t*-test.

0.02) 細胞増殖活性があり，統計上の有意差が認められた (Fig. 5B).

## 考 察

家蚕繭層からセリシンを抽出する方法は昔から知らされている熱水あるいは弱アルカリ水溶液による溶出方法のほか、8 M 尿素水溶液溶出方法、飽和 LiSCN/EtOH 混合溶媒に溶出方法、LiCl/DMSO 混合液を用いた抽出法などがある。その結果、すでに報告されているセリシンタンパク質の分子種や分子量はさまざま、主に分子量が 65 から 400 kDa に渡る 5-6 種類のポリペプチド (Engel *et al.*, 1987)、またセリシン P、A、M と名付けられた 150、250、400 kDa の 3 種類ポリペプチドにより構成されるとの報告がある (Takasu *et al.*, 2002)。そのほか、セリシンを合成する中部絹糸線前区からは 20-220 kDa に及ぶ少なくとも 15 種類のポリペプチド (Sprague, 1975)、中部絹糸線からは主に 80、134、145、177、309 kDa の 5 種類のポリペプチドからなるとの報告もある (Gamo *et al.*, 1977)。こうようにセリシンに含まれる分子種類数ならびにそれぞれの分子量が研究者により異なる原因としては抽出方法とセリシン成分間の結晶性の違いによるものと考えられる (高須ら, 2006)。したがって、今までに報告されているセリシンの物性や機能性に関する研究はセリシン分子種を分離・精製したものではなく、ほと

んどが混合物によるものである。一方野蚕繭の場合、幼虫は繭を構築する際に生体防御の一環として積極的に食樹から色素や無機化合物を繭に導入しているため、繭層からセリシタンパク質を抽出することは一層困難になっている。そのため、野蚕繭層セリシンの抽出法および利用法に関する知見は乏しく、本研究は野蚕繭層セリシン研究において重要な知見をもたらすと考えられる。

本研究では、新たに天蚕繭層からセリシン溶液を抽出する方法を再検討した (Fig. 1)。そのアミノ酸組成を調べたところ、グリシン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸が豊富に含まれており、この 4 種類のアミノ酸が全体アミノ酸組成の約 80 %を占めたことが判明した (Table 1)。また、化学修飾が比較的容易な側鎖アミノ基を持つアルギニン、カルボキシル基を持つグルタミン酸、アスパラギン酸、芳香族性水酸基を持つチロシンの存在は、この抽出物に機能性を付加することや物性改変により新しい利用用途が期待できる。そこで、蚕天蚕繭層由来セリシン抽出液に含まれているアミノ酸組成に着目し、電気泳動を行った結果、Tricine-SDS PAGE で 41 kDa タンパク質、BN-PAGE からも分子全体での大きさが約 41 kDa のバンドが検出された (Fig. 2)。BN-PAGE はタンパク質の高次構造や複合体構造を維持したまま分子全

体の大きさが測定できることから、抽出された天蚕セリシンは、熱と有機溶媒処理で高次構造を形成する H-H 結合や S-S 結合が切断されても 41 kDa タンパク質はこれ以上切断がなく、一定レベルに保っていることが示唆された。また、Tricine-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、天蚕セリシンには 41 kDa タンパク質ほか、30 kDa 以下のタンパク質スミアはサンプルを界面活性剤や SDS 処理した際生じた 41 kDa タンパク質の分解産物によるものと考えられる (Fig. 2A)。そこで、天蚕セリシン抽出液から 41 kDa タンパク質の精製を進めることにした。遠心分離とフィルター濾過で不純物を取り除いた天蚕セリシン溶液をゲル濾過クロマトグラフィー用カラムを接続した HPLC システムで精製することにより、41 kDa タンパク質を精製することができた (Fig. 2B)。興味深いことに、天蚕セリシン 41 kDa タンパク質と野蚕の一種であるタサールサンのセリシンから単離された 70 kDa タンパク質の主要アミノ酸組成を比較すると、スレオニン (11.8 %, 12.3 %)、セリン (18.1 %, 19.4 %)、グリシン (18.6 %, 19.2 %)、グルタミン酸 (8.1 %, 5.98 %) の組成比が類似している。70 kDa セリシンタンパク質はタサールサン特有のものであり、熱帯環境ストレスに対抗するため特異的に合成されたものと考えられる (Dash *et al.* 2006, 2007)。そのほか、天蚕 41 kDa

タンパク質はカイコと比べセリン（37.9 %， 18.1 %）の含有率が低い反面スレオニン（9.2 %， 11.8 %）、グルタミン酸（3.6 %， 8.1 %）、イソロイシン（0.8 %， 5.3 %）、ロイシン（0.7 %， 6.2 %）を高く含有していることが特徴である（Table 1）. 天蚕セリシン中に含まれている個々のアミノ酸の生理機能に対する効用を考察してみると，アラニンは天然保湿因子として化粧品に配合されており、界面活性剤の原料としても利用されている. グルタミン酸、イソロイシン、ロイシンはスポーツ栄養食品，健康食品の重要な成分であるほか，ロイシンはヘアケア製品にも利用されている. スレオニンは動物体内で合成されない必須アミノ酸で成長を促進する働きをする. それに加えて，細胞培養用の培地成分としてのアミノ酸の重要性から，糖、ビタミン、ホルモン、無機塩などと共に細胞の増殖に必要な栄養素を組み合わせた合成培地での使用が多くなりつつある.

近年，カイコセリシンの機能性が解析され，抗酸化作用による皮膚メラニン色素発生の抑制（Kato *et al.*， 1998），便秘改善、ミネラル吸収促進による大腸がん発生の抑制（Sasaki *et al.*， 2000），ヒトの繊維芽細胞の増殖促進効果，昆虫細胞（Sf 9）増殖促進（Takahashi *et al.*， 2003, 2005），乳酸脱水素酵素（LDH）の凍結保護作用（Tsujiimoto *et al.*，

2001)などの様々な生理機能が明らかになった。そこで、天蚕セリシンパウダーの抗酸化活性を調べた結果、1%添加区では72.5%のラジカル消去活性があり、同濃度のカイコセリシン(49.8%)にくらべラジカル消去活性が高いことが明らかになった。しかし、活性に必要な濃度が高いことから天蚕繭層の70%メタノール抽出物に抗酸化活性物質が存在する可能性が示唆されたため、抗酸化活性を調べた結果、70%メタノール抽出物の172 µg/ml濃度(0.02%)で82.5%ラジカル消去活性があった(Fig. 3)。近年の研究結果から、カイコ繭層の抗酸化活性は特にフラボノイド類色素による可能性が示唆されており(Kurioka and Yamazaki, 2002)、天蚕繭層のメタノール抽出物に抗酸化活性が高いことは繭層に含まれる色素によるものだと考えられる。

一方、ショウジョウバエ胚子由来 Schneider S2 昆虫細胞、マウス脾臓リンパ細胞、dRLh84 ラット肝がん細胞を用いて41 kDa タンパク質の細胞に対する機能について検討したところ、無脊椎動物由来 S2 細胞に対して天蚕繭層由来 41 kDa タンパク質 0.1 %添加区では48%、マウス脾臓リンパ細胞に対して0.1%添加区では無添加対照区に比べ16%細胞増殖効果が認められた。しかしラット肝がん細胞の増殖活性は、ほとんど認められなかった(Figs. 5, 6)。細胞増殖促進添加剤として市



販されているカイコ由来セリシンをポジティブコントロールに使用したが、増殖効果はみられなかった(Figs. 5, 6). このように天蚕セリシンとカイコセリシンでは細胞増殖作用機構が異なる可能性が示唆されたが、細胞レベルでの具体的な増殖メカニズムは不明点が多い. この点に関しては、カイコのセリシンは細胞培養基材の表面をコーティングすることで繊維芽細胞の増殖を促進すること、そして培地に添加することで血清飢餓の細胞死を抑制し、細胞増殖を促進すると考えられている (Terada *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2004). 従って、グリシン、セリン、アスパラギン酸、チロシンの繰り返し配列モチーフの存在が細胞分裂を促進しているのではないかと考える. 逆に、ラット肝がん細胞のような細胞に対しては増殖活性を表さないとの興味深い結果から、今後 41 kDa タンパク質の機能性を考える上で生物薬剤的解析が重要となる.

## 摘 要

1. 天蚕繭層から色素の抽出，精練，ろ過，濃縮，透析過程を経てセリシンタンパク質を抽出した．ゲル濾過カラム Tsk-Gel G3000pw 接続した HPLC を用いて 41 kDa タンパク質を単離・精製することができた．

2. 天蚕繭層由来セリシンパウダー，41 kDa タンパク質のアミノ酸組成を分析したところ，グリシン，セリン，アスパラギン酸，スレオニン，グルタミン酸などが検出され，親水性アミノ酸が多く含んでいることが明らかになった．

3. 天蚕 41 kDa タンパク質はショウジョウバエ胚子由来 Schneider S2 細胞とマウス脾臓リンパ細胞に対し増殖活性機能を示したが，dRLh84 ラット肝がん細胞では増殖活性を発現しなかった．

## 第二章 ウスタビガ繭層由来フィブロインパウダーからの

### 生理活性物質の機能解析

野蚕の一種であるウスタビガ (*R. fugax*) は日本全国に生息し、これまでに知られてる生活環では、越冬した卵が 4 月下旬に孵化し、幼虫は 6 月下旬から営繭し始める。幼虫はサクラ、ニレ、カシ、クリ、クヌギ、シイなどの葉を食べ、成熟幼虫の体長は 6 センチほどで、皮膚表面を刺激すると驚いて上半身を屈曲しキーキーと音をたてる上、幼虫の背面と腹面においては、明らかに体色の濃淡が違うことが挙げられる。そのほか、繭の上方は完全密閉ではなく、下の部分にも「雨水排出口」と思われる穴が開いていることなどの特徴がある。一方、その繭の外形が「かます」と似ていることから「やまかます」ともいわれ、岩手県藤沢町地域では古くからウスタビガの繭を「やまぴこ」と呼び、民間療法として繭を煮沸して中耳炎の治療素材として使用した事例が知られている。興味深いことに、ウスタビガは自然日長での蛹期間が 125.5 日であることが明らかになった(三田村・松本, 1999)。これは同じ野蚕である天蚕の 60 日、クスサン (*Caligula japonica*) の 90 日に比べはるかに長い。これは自然環境の中で蛹が危険に曝される

確率がほかの野蚕に比べ極めて高いことを意味する。そのためウスタビガの繭は厳しい自然環境に適応する生体防御システムを発達してきたと考えられる。従って、繭の機能性を明らかにするためには繭の主成分であるフィブロインタンパク質を溶解することが必要となる。しかし、野蚕のフィブロインは構造上カイコのフィブロインと異なり溶解することは難しいとされていた。本研究では、はじめに瓜田（未発表）によるウスタビガフィブロインの溶解化とパウダー化の方法を採用した。

そこで本章では、ウスタビガ繭には厳しい自然環境からウスタビガ蛹本体を保護する生理活性物質が存在していると推測し、ウスタビガ繭層由来のフィブロインパウダーに含まれている機能性物質を探索し、機能利用の視点から考察した。

## 材料と方法

### 1. 材料

ウスタビガ繭層由来のフィブロインパウダーは、福島県農業総合センターの瓜田章二博士より提供されたものを用いた。製造方法については Fig. 6 に示した。すなわち、ウスタビガの生繭（福島梁川，日本）を 1/4 大きさにカットした繭層をまず 30 倍量の 98°C の熱水で 10 分間洗浄した。その後、17G ガラスフィルター（Sibata 社）で固液分離し、得られた繭層を 50 倍量の 0.5 % (W/V)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液により 98°C，4 時間の精練処理を行った。17G ガラスフィルターを用いて上清を濾過し、得られた残渣を水道水による流水洗浄 3 日間，さらに純水で 1 日洗浄した後，3 日間電気透析をおこなった。以上の工程からは不純物、無機物質、セリシンが取り除かれた。続いて，残渣を 100 ml の銅エチレンジアミン溶液で 20°C，3 分間溶解させた後（水酸化第 2 銅 : エチレンジアミン = 6.0 : 8.6），銅解離剤として 1.24 N 硫酸を添加することで銅が解離された。得られたゲルは水道水流水で 2 日間、蒸留水で 1 日洗浄を行い，最後はゲルを風乾させ，卓上粉砕機で粉砕し、得

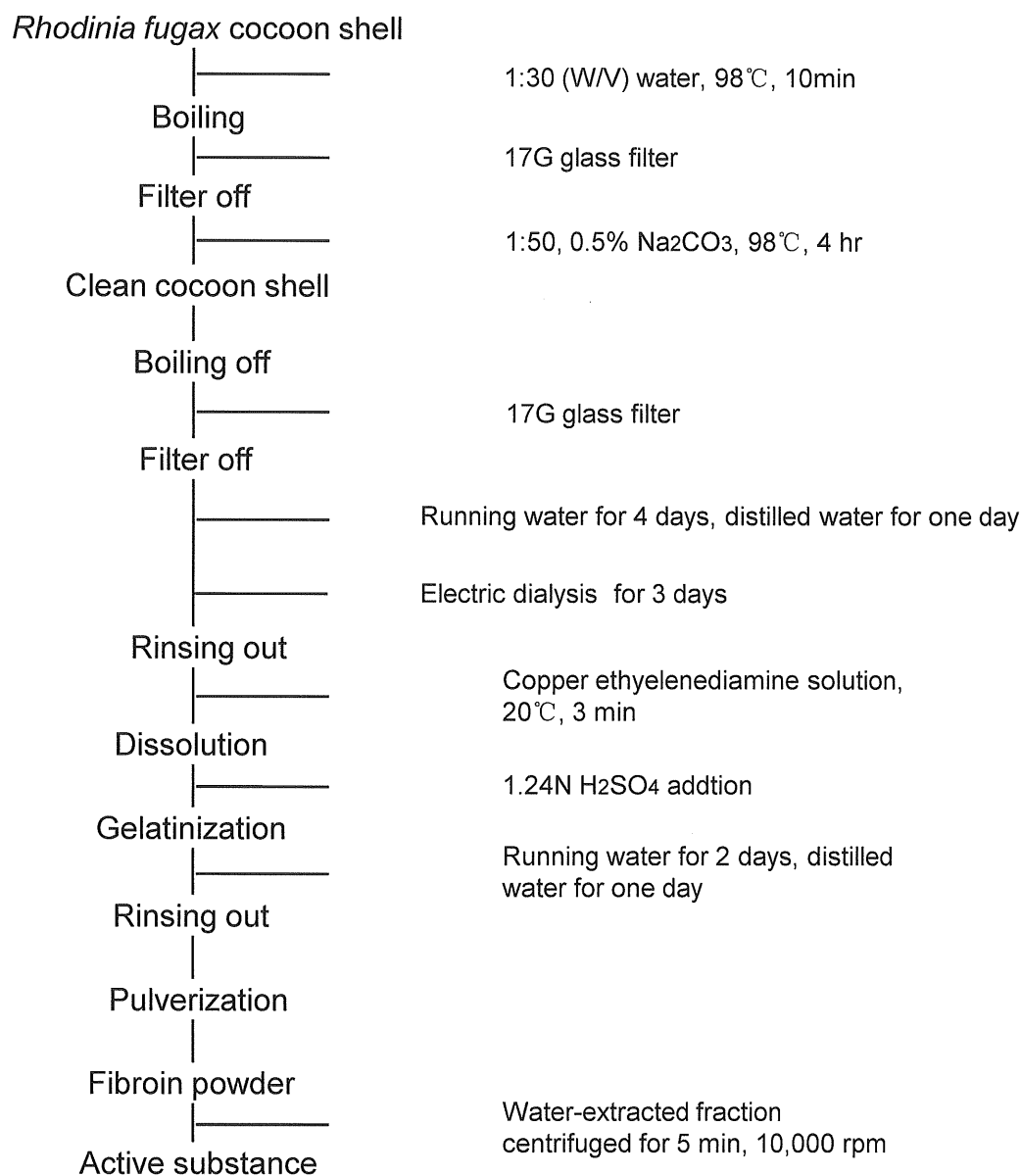


Fig. 6. A protocol of biologically active compounds prepared from fibroin powder of *R. fugax*

られた粉末をウスタビガフィブロインパウダーとした。製造したパウダーは使用するまで湿気を防止するためデシケーター内にシリカゲルを入れ、減圧保存した。

## 2. 元素分析

実験材料であるウスタビガ繭層由来のフィブロインパウダーを岩手医科大学サイクロトロンセンターに依頼し、微量元素類を同時に高感度で検出できる医療用小型サイクロトロンを用いた PIXE (Particle Induced X-ray Emission) 分析法 (世良, 1992) による元素分析をおこなった。

## 3. 活性物質の抽出

ウスタビガ繭層フィブロインパウダー 3 mg を 1ml の MQ 水と混合し、室温で 10 分間 Mixer (トミー精工) で攪拌しながら抽出後, 10,000 rpm, 5 分間遠心分離を行い, 上清を水抽出画分とし, 凍結乾燥後使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による同定

活性物質の分離には逆相クロマトグラフィー充填カラムである TSKgel ODS-80Ts カラム (4.5 × 250 mm, 東ソー) を用いた。入り口側にガードカラムを HPLC システム (LC-10A システム, 島津製作所) に接続し, 0.1 % TFA を含む 1 % アセトニトリルで平衡化した。分析用試料はウスタビガフィブロインパウダー 3 mg を 1 ml 蒸留水で調整後, フィルター (0.45 μm, Millipore 社) で濾過した。200 μl ずつカラムに注入し, 溶出は 0.1 % TFA の存在下でアセトニトリルの濃度を開始から 10 分までは 1 %, 10 分から 60 分までは 100 % のグラジエントをかけて行った。流速は 1.0 ml/min で, 溶出液の検出は 220 nm の吸収を測定し, レコーダー (C-R6A, 島津製作所社) で記録した。

#### 5. 活性物質の検出

精製した活性物質の検出は逆相薄層クロマトグラフィ (RP-18F254s, メルク社) を用い, 展開液は 0.1 % TFA を含む 1 % アセトニトリルを用いた。検出はエタノールで溶解した 0.7 % ニンヒドリン溶液を展開後



のプレートに吹き付き，ホットプレート（NA-1，アズワン）用いて，100℃の加熱により現像した．

## 6．抗カビ活性実験

### a． 供試菌

植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*, 岩手レース 007 菌株), イネ苗立枯病菌 (*Fusarium roseum*, F-48 菌株), リンゴ斑点落葉病菌菌 (*Alternaria mari*; AM 21- 9/5-2 菌株, 上山 1 菌株, T-08 菌株), リンゴ炭そ病菌 (*Colletotrichum acutatum*, APG1 菌株) を用いた．リンゴ斑点落葉病菌菌 (AM 21- 9/5-2 菌株) は(財)岩手県生物工学研究センターより, イネいもち病菌 (岩手レース 007 菌株), イネ苗立枯病菌 (F-48 菌株), リンゴ斑点落葉病菌 (上山 1 菌株, T-08 菌株), リンゴ炭そ病菌 (APG1 菌株) は岩手県農業研究センターより分与されたものを用いた．

培地はポテトデキストロース寒天培地 (PDA) を使用し, すべての菌株は斜面培養法により保存した．また, 予備段階での植物病原菌孢子採集試験の結果から孢子採集が可能であるリンゴ炭そ病菌はマイクロ

プレート法に従い抗カビ活性を調査し，マイクロプレート検定法に適さないほかの植物病原菌に対しては寒天ディスク法に従った抗カビ活性を調べた．

なお，実験に用いた試薬，器具は滅菌したものを使用し，実験操作は安全キャビネット内でおこなった．

#### b. 寒天ディスク法

##### (1) PDA 培地の調整

三角フラスコに細かくきざんだジャガイモ 200 g と MQ 水 1 L を入れ 20 分煮込み，ガーゼで濾過し得られた液をジャガイモ浸出液とした．その後，浸出液に 20 g のブドウ糖（和光），15 g の寒天粉末（市販）を加え湯煎してよく溶解した上，オートクレーブ（BS-245，トミ-精工）で高圧滅菌した．

##### (2) 前培養

8 ml PDA 培地を分注し，固化させたシャーレ（100×20 mm，Cellstar 社）に，白金耳で検定に用いる各植物病原糸状菌を培地中央に植菌し，25℃で培養した．この操作は生物検定の 14 日前に行った．

### (3) 試料の調整

冷凍保存していたウスタビガフィブロインパウダー水抽出物画分を MQ 水で 10 mg/ml になるように調整し，滅菌フィルター（0.22  $\mu\text{m}$ ，Millipore 社）で滅菌処理した．

### (4) 抗カビ活性検定

8 ml PDA 培地を分注したシャーレ（100×20 mm，Cellstar 社）に 50  $\mu\text{l}$ /dish の濃度で試料を PDA 培地中央に滴下し，対照区には同様に滅菌水 50  $\mu\text{l}$  滴下した．滴下した試料が培地表面で乾燥するのを待ってから，あらかじめ培養しておいた菌層の外縁部菌糸体を 5 mm コルクボーラーでくり抜き，それを PDA 培地中央部に置き 27°C で 48 時間培養し，12 時間ごとに，菌層の直径をノギス（タジマ社）で測定記録し，対照区との比較から生育抑制率を算出した．

### C. マイクロプレート検定

検定方法は Cammue *et al.* (1992) および Marcus *et al.* (1997) の方法に従っておこなった．

### (1) 孢子懸濁液の調整

あらかじめ培養しておいたリンゴ炭そ病菌の孢子を白金耳でこすり取り，滅菌水が入ったエッペンチューブに白金耳をつけて孢子をおとし，これを血球計算盤（萱垣製作所）を用いて孢子数を算出し，滅菌済みの液体合成培地 [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 Mm),  $\text{MgSO}_4$  (100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{FeSO}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CoCl}_2$  (0.2  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (0.2  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (4  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{KI}$  (0.2  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MnSO}_4$  (0.2  $\mu\text{M}$ ), Glucose (20 g/l), L-asparagine (2 g/l), L-methionine (40 mg/l), *myo*-inositol (4 mg/l), biotin (0.4 mg/l), thiamine-HCl (2 mg/l), pyridoxine-HCl (0.4 mg/l), を pH 7.62 になるように調製] 1 ml に孢子数が  $2.5 \times 10^4$  個になるように孢子を添加し，さらに抗生物質テトラサイクリン塩酸塩（和光）を 20  $\mu\text{g/ml}$  添加したものを孢子懸濁液とした。

### (2) 抗カビ活性測定

96-well マイクロプレート（岩城硝子）の各 well に 40  $\mu\text{l}$  の滅菌水で調整した試料液と 40  $\mu\text{l}$  の孢子懸濁液を入れ，対照区には試料の代わりに滅菌水を同量に添加し，27°C で 48 時間培養した。その後マイク

ロプレートリーダーで各 well の 590 nm 吸光度を測定した。得られた吸光度の変化から相対生長率 (%) (Relative growth) を求めた。すなわち, control wells の吸光度を  $\Delta C$ ; test well 吸光度を  $\Delta T$  とし, 相対生長抑制率 (%) =  $\Delta T / \Delta C \times 100$  で算出できる。

## 7. 抗細菌活性試験

添加試料濃度に対する抗菌活性の変動の判定は 96 well マイクロプレートを用いた液体希釈法 (Iwasaki *et al.*, 2006 を一部改変) および Minimum inhibitory concentration (MIC) 判定基準に従って行った (井上・岡本, 1998)。

### a. 試供菌

被検用グラム陰性菌である大腸菌 (*Escherichia coli*) ATCC25922, 緑膿菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923, グラム陽性菌である黄色葡萄球菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853 は岩手大学農学部獣医学課程食品安全研究室重茂克彦博士より分与されたものを用いた。

#### b. 細菌の調整

滅菌爪楊枝により単一コロニーをかきとって 5 ml LB 液体培地 (1% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract) に落とし, バイオシェーカー (BR-40LF, TAITEC 社) により 37°C, 120 rpm で 16 時間振盪培養後, 生理塩水で 0.5 McFarland units (約  $10^8$  CFU/ml) になるように調整した. これをさらに, 滅菌生理食塩水で菌数が約  $5.0 \times 10^6$  CFU/ml に希釈したものを菌液として用いた.

#### c. 試料の調整

TSKgel ODS-80Ts カラムにより溶出された各画分を滅菌水で終濃度が 18.8, 37.6, 94, 188  $\mu$ g/ml になるように調整し, 滅菌フィルター (0.22  $\mu$ m, Millipore 社) で滅菌処理した.

#### d. 抗細菌活性試験

96 well マイクロプレート (岩城硝子) の各 well に 100 $\mu$ l の感受性測定用培地 [ 23 g/L synthetic growth medium contains kasamino acid (16.5 g), heart extract powder (3.0 g), starch (1.5 g), glucose

(2.0 g), L-tryptophan (0.05 g), L-cysteine (0.05 g), biotin (5  $\mu$ g)] (日水製薬株式会社), 試料 10  $\mu$ l, 菌数を調整した菌液 2  $\mu$ l ずつ接種した. 対照区には試料の代わりに滅菌水を同量に添加し, 37°C で 24 時間インキュベートした. その後マイクロプレートリーダーで各 well の 590 nm 吸光度を測定し, 対照区との比較から生育抑制率を算出した. 培養 24 時間後, MIC の判定基準は肉眼で混濁または 1 mm 以上の沈殿が認められた場合は発育陽性と判断し, 肉眼で混濁または直径 1 mm 以下の沈殿が 1 個の場合を生育阻止と認め MIC 値とした.

なお, 使用した試薬及び器具はすべて滅菌したものを扱い, 実験操作は安全キャビネット内で行い, 微生物による汚染を防いだ.

## 8. ラット肝がん細胞 (dRLh84) 抑制試験

生物検定として, 第一章と同様な方法で細胞増殖抑制活性試験を行った. ただし, 試料の調整は TSKgel ODS-80Ts カラムにより分離された抗カビ、抗菌活性を有する画分を滅菌水で終濃度が 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ l になるように調整し, 滅菌フィルター (0.22  $\mu$ m, Millipore 社) で滅菌処理した.

## 9. $^1\text{H}$ NMR (Nuclear magnetic resonance) スペクトル測定

ウスタビガフィブロインパウダーから分離した活性物質の主成分を決定するため、大阪市立大学大学院物質科科学分子変換学研究室准教授・品田哲郎博士に $^1\text{H}$  NMR スペクトルの測定を依頼した。

## 10. LC/MS による活性物質の質量分析

イオン化法は大気圧化学イオン化法 (APCI) により、LC/MS (JMS-700V, 日本電子) を用いて活性物質の質量分析を行った。



## 結 果

### 1. 元素分析

PIXE 分析法を用いたウスタビガ繭層由来のフィブロインパウダー元素分析では硫黄元素が 20.188 mg/g、カルシウム元素が 156  $\mu\text{g/g}$ 、ケイ素元素が 217  $\mu\text{g/g}$  など多数の元素が同定された (Table 2).

### 2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による活性物質の精製

Fig. 6 に示したように、フィブロインパウダー化工程によって得られたサンプルを MQ 水で溶解し、遠心処理後の水抽出画分を使用した。活性物質の単離には逆相クロマトグラフィー充填カラム TSKgel ODS-80Ts カラムを用いた。その結果、*C. acutatum* APG-1 に活性を有するピークが同定された。活性物質は溶出開始から 3.2 分、アセトニトリル濃度が 1% のところで保持されることなく溶出された。逆相薄層クロマトグラフィー (RP-18F254s) を用いて活性物質を検出した結果、単一のスポットとして検出された (Fig. 7).

**Table 2.** Elemental composition in fibroin powder of *R. fugax* determined by PIXE (Particle Induced X – ray emission)

Main element	Content (µg/g)	
	<i>R. Fugax</i>	<i>A. yamamai</i>
Ca	156.0 ± 14.1	3166.9 ± 107.5 ※
Cu	402.0 ± 13.2	3846.2 ± 127.8
Fe	389.6 ± 15.3	259.3 ± 10.4
S	20187.7 ± 2144.6	5766.3 ± 268.3
Si	217.1 ± 65.3	429.7 ± 106.4
Br	67.9 ± 3.8	34.8 ± 4.1

※ The values are means ± S. E.

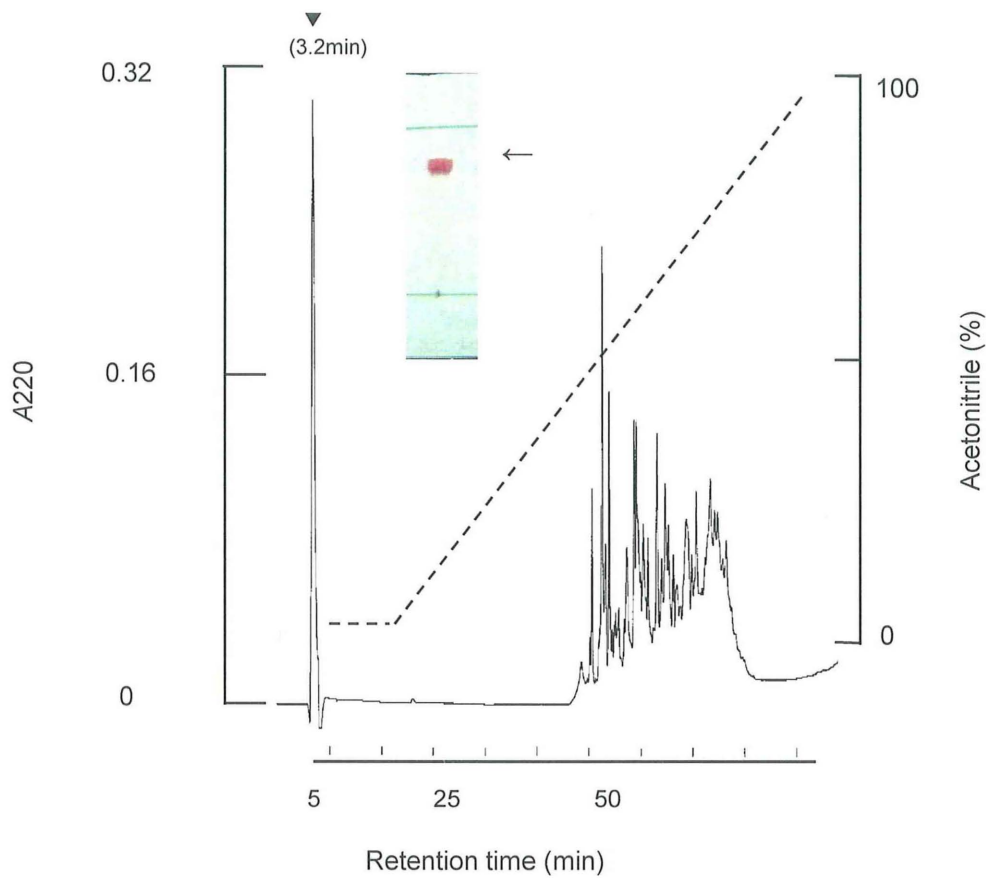
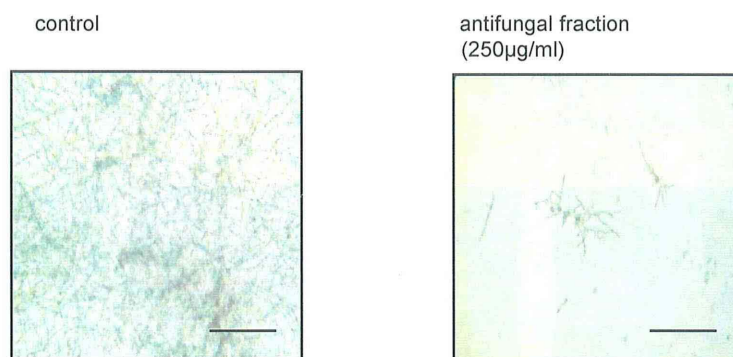


Fig. 7. HPLC elution profile and TLC pattern of the water-extracted fraction from fibroin powder of *R. fugax* cocoons. The water-extracted fraction was subjected to reversed phase HPLC by TSKgel ODS-80Ts column (4.5 x 250 mm) with a linear gradient of 1% to 100% acetonitrile with 0.1% (V/V) TFA. Black triangle shows the fraction contained antifungal activity by the microplate assay. Black arrowhead shows TLC plate development (RP-18F254S) of the bioactive fraction.

### 3. 抗カビ活性試験

寒天ディスク法により検討した結果，イネいもち病菌 (*M. grisea*, 岩手レース 007 菌株)，イネ苗立枯病菌 (*F. roseum*, F-48 菌株)，リンゴ斑点落葉病菌 (*A. mali*, AM 21- 9/5-2k 菌株；上山 1 菌株；T-08 菌株) に対しては，500  $\mu\text{g/ml}$  濃度のウスタビガフィブロインパウダー水抽出画分による抗カビ活性は確認されなかった (データ省略)。しかし，マイクロプレット検定でのリンゴ炭そ病菌 (*C. acutatum*, APG1 菌株) は試料 62.5, 125, 250  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で，菌糸生育率が濃度依存的に減少し，低濃度では菌糸の異常形態が引き起こされた。250  $\mu\text{g/ml}$  では 99 %の生育阻害活性が認められ，菌糸伸長抑制効果が確認できた (Figs. 8, 9)。HPLC による単離画分は，*C. acutatum* の生長に対して強い抑制活性を示した。188  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{IC}_{50} = 36.8 \mu\text{g/ml}$ ) の濃度では完全に孢子発育が阻止され，実体顕微鏡による観察では，Fig. 10 に示したように菌糸の伸長は認められなかった。

(A)



(B)

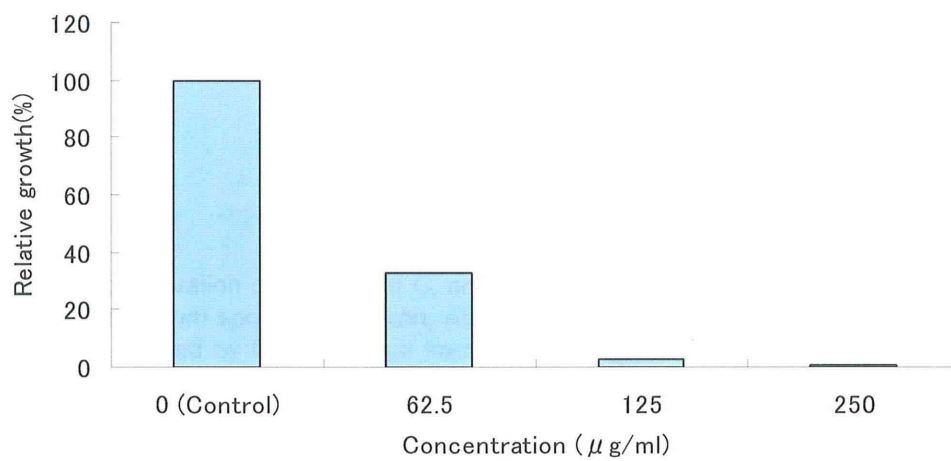


Fig. 8. Morphological changes of the hyphae of *Colletotrichum acutatum* (A) and dose-response effect of the antifungal fraction prepared *R. fugax* fibroin powder(B). The antifungal activity was measured by at 590 nm after incubation at 25 $^{\circ}$ C for 48 hr in (A) and (B). Scale bars = 2 mm.

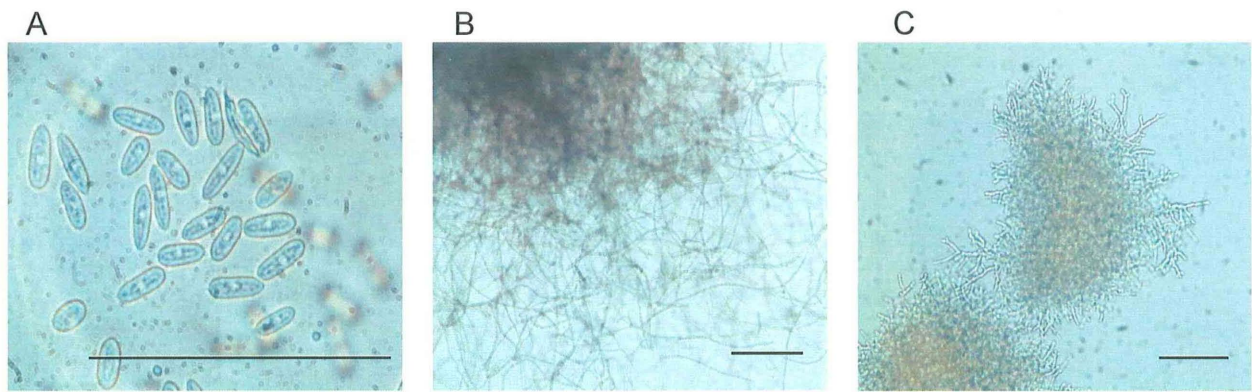


Fig. 9. Microscopic observation of mycelia of *C. acutatum*. Photomicrographs were taken after 24 h of incubation in *C. acutatum* spore suspension. Abnormal branching and hypertrophy of the hyphal of *C. acutatum* was caused by the antifungal fraction. Spore (panel A), Control (panel B) and test (panel C). Scale bars = 0.2 mm.

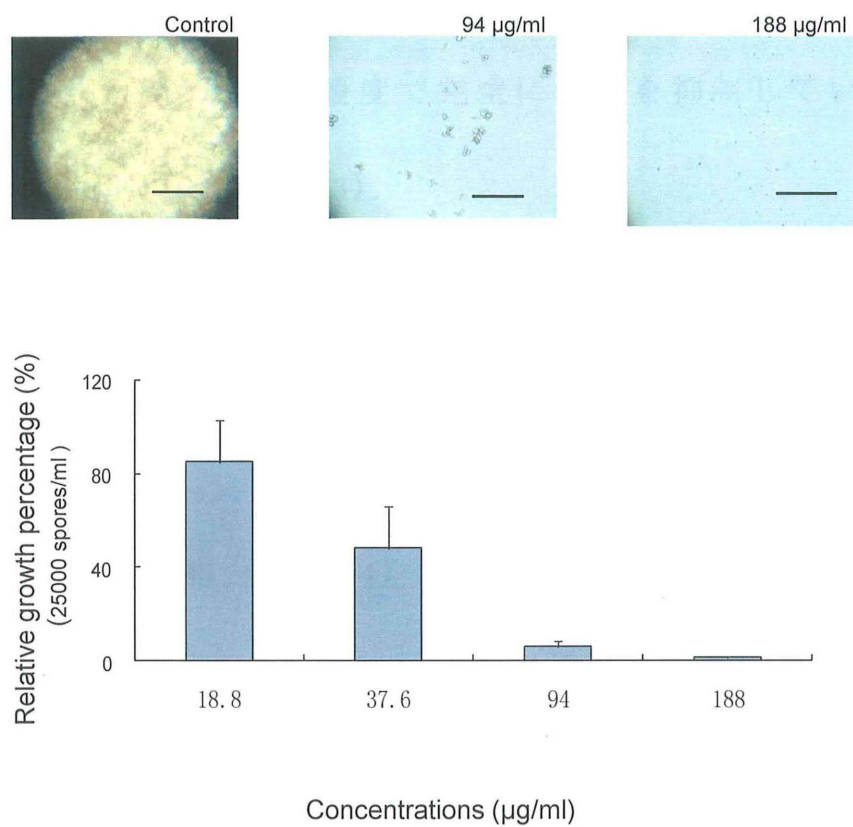


Fig. 10. Antifungal activity assay of an active fraction eluted by the HPLC on TSKgel ODS-80Ts column shown in Fig. 7. Morphological changes of the hyphae of *C. acutatum* ( $IC_{50}$ =36.8 µg/ml) were microscopically photographed. The antifungal activity was measured by at 590 nm after incubation at 25°C for 48 hr. Scale bars = 2µm.

#### 4. 抗細菌活性試験

3 種類の細菌に対する単離画分の特性を調べるため抗細菌活性を検討した。その結果大腸菌、黄色ブドウ球菌では最高濃度 2 mg/ml でも抗細菌活性を示さなかった，しかし，緑膿菌に対しては弱い抗細菌性活性を示し，2 mg/ml の濃度で完全に増殖を抑制していた（MIC = 2 mg/ml）（Fig. 11；Table 3）。

#### 5. 抗がん活性試験

ラット肝がん細胞（dRLh84）を用いて単離画分の抗がん活性を調べた結果，濃度依存的にがん細胞の増殖が抑制され IC<sub>50</sub> 値は 462.2 μg/ml であった。細胞の形態は対照の紡錘形から球形へと変化し細胞間の連結が観察されなかった（Fig. 12）。

#### 6. <sup>1</sup>H NMR スペクトル測定

逆相カラムである TSKgel ODS-80Ts カラムによって得られた単離画



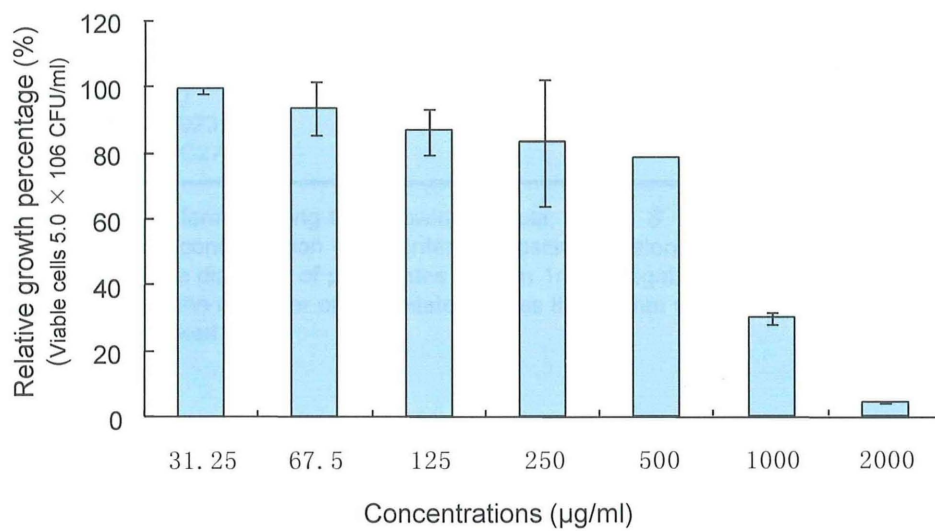
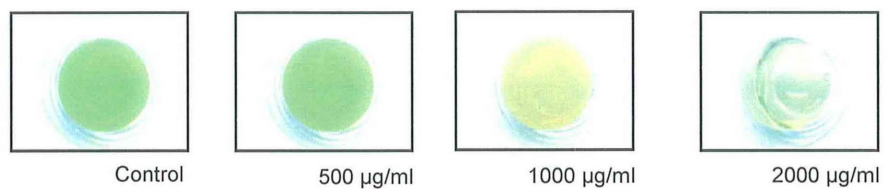


Fig. 11. Antimicrobial activities of an active fraction eluted by the HPLC on TSKgel ODS-80Ts column shown in Fig. 7. The percentage relative growth of *P. aeruginosa* was measured by measuring the absorbance at 590 nm after 24 h of incubation at 37°C.

**Table 3.** *In vitro* minimum inhibitory concentration (MIC) assay used an active fraction prepared purified from fibroin powders in *R. fugax* cocoons

Bacteria*	concentration of the active fraction
	mg / ml
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	> 2
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	> 2
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	2

\* Bioassays was performed using the following inocula; *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ( n = 4 ). Minimum inhibitory concentration (MIC) criterion: Positive development means there is turbidity or precipitation and the diameter of predpitates is upon 1mm. Negative development means there is no turbidit or when the diameter of precipitates is less than 1 mm such as the precipitation can not berecognized by naked eye.

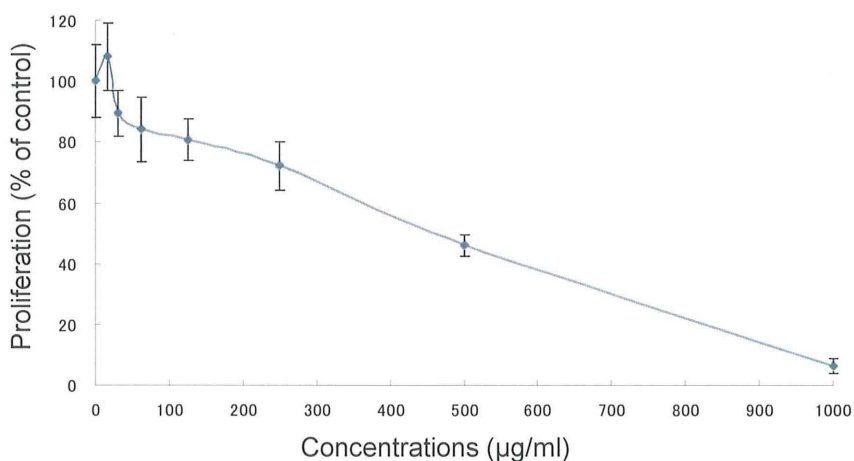
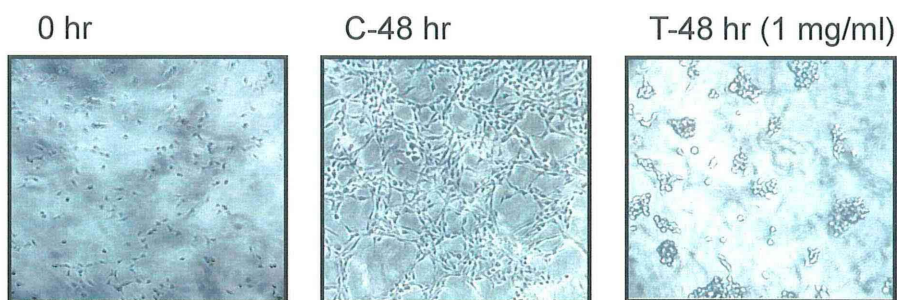


Fig. 12. micrographs rat hepatoma cells treated with an active fraction and dose-dependent cell grow suppressive effects on cells. The dRLh84 adherent cells were suspended in the culture medium (DMEM, 10% NBS, 4 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, 100 µg/ml kanamycin) at a density of  $5 \times 10^4$  cell/ml in to 96-well microtiter plate. One day later, sterile water or sterilized sample solution (100-1000 µg/ml) was added to the medium. After further incubation (48 h/37°C, 5% CO<sub>2</sub>), MTT assay was performed to measure their proliferation activity. Upper photographs show morphological changes of rat hepatoma cells (IC<sub>50</sub> = 462.2 µg/ml) after 48hr of incubation in a sample solution (1000 µg/ml). From left to right: cells before incubation (0h), control after 48hr incubation (C-48hr) and test (1000 µg/ml) after 48hr incubation (T-48hr).

分の構造解析のため、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル測定をおこなった（データ省略）。その結果、糖やペプチドのようなシグナルはほとんど検出せず化学シフトが 6.8～7 ppm 部分に 3 本のシグナルが検出された。

## 5. LC/MS による質量分析

大気圧化学イオン化法（APCI）により単離画分の質量分析を行った結果、 $m/z$  223.9 の物質の存在が示唆された (Fig. 13)。

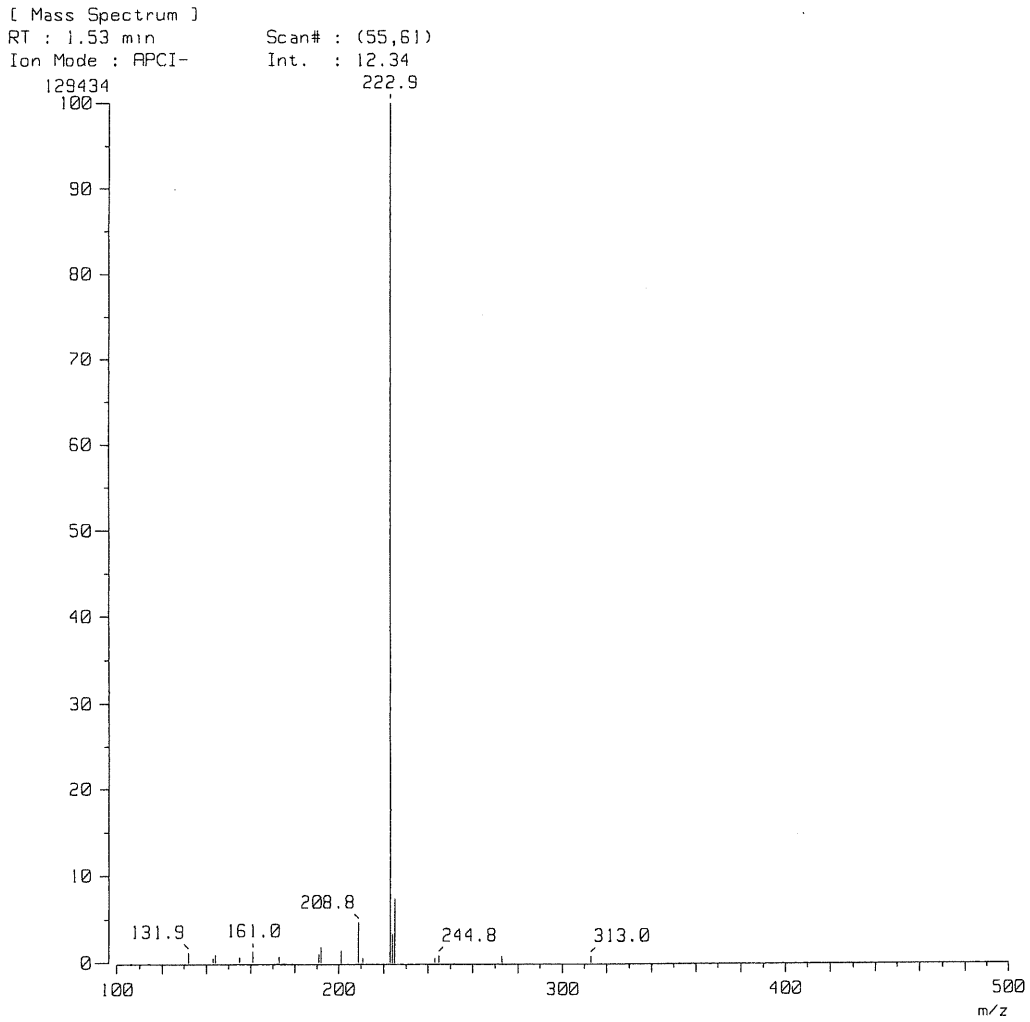


Fig. 13. LC/MS spectrum of the active fraction by eluted TSKgel ODS-80Ts column.

## 考 察

絹糸フィブロインタパク質は、カイコ繭の精錬によって得られる水に難溶な繊維タンパク質である。そのためフィブロインの分解方法として、化学的な中性塩溶液溶解方法 (Coleman and Howitt, 1946; Schade *et al.*, 1970)、物理的な超微粒粉末法 (坪内, 1995)、亜臨界高温高圧水反応蒸気溶解法 (栗岡・山崎, 2005) などが報告されている。しかし野蚕のフィブロインの場合、一般の中性塩溶液にはほとんど溶解しない。従って、野蚕のフィブロインを新しいバイオ素材として利用するためには、新たなフィブロインの溶解方法を必要とする。瓜田 (1994, 1997, 2007) による長年にわたる研究の結果、野蚕フィブロインタパク質は銅エチレンジアミン溶液に溶解することが見出され、水酸化第 2 銅とエチレンジアミンの混合比の改変によりウスタビガフィブロインを溶解する新しい方法が開発されたので、本研究ではその方法を活用することができた (Fig. 6)。ウスタビガフィブロインパウダーの水抽出物を用いて植物病原菌に対する抗菌活性を調べた。その結果、リンゴ炭そ病菌 (*C. acutatum* APG-1 菌株) に対する抗カビ活性を示したが (Figs. 8, 9)、他の 5 種類の菌株に対しては抗カビ活

性を示さなかった（データ省略）。本研究では，昆虫寄生性カビについては検討していないが，特定の植物感染性カビが昆虫に対して寄生する可能性があることが知られていることから（Tanaka *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2002），ウスタビガフィブロインパウダーにその生体防御物質の存在を示唆したことは意義深い。

続いて，フィブロインパウダー水抽出物から活性画分を単離することを試みた結果，リンゴ炭そ病菌（*C. acutatum* APG-1 菌株）に活性を有する単離画分は逆相カラム HPLC に保持されることなく溶出したが，この時点で他の混合成分は除去されていた（Fig. 7）。単離画分の抗カビ活性試験として，*in vitro* でリンゴ炭そ病菌（*C. acutatum* APG-1 菌株）に対する阻害活性を調べた結果，強い生長抑制活性を示した。188  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{IC}_{50} = 36.8 \mu\text{g/ml}$ ) の濃度で完全に孢子発芽が停止され，菌糸の伸長はほとんど観察されなかった（Fig. 10）。昆虫から単離され，昆虫寄生性カビに対しては効果が認められず植物感染性カビに対して菌糸の伸長を阻止するペプチドが知られている（Tanaka *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2002）。このペプチドは除草昆虫コガタリハムシの休眠期に特異的に生産されるもので，植物感染性カビに対する生体防御の一つかもしれない（鈴木・楊，2007）。従って，構造的な違い

はあるかもしれないが、厳しい環境下における植物感染性カビへの生体防御システムの点では共通性が認められる。

本研究ではさらに、3種類の細菌、大腸菌(ATCC25922)、緑膿菌(ATCC27853)、黄色葡萄菌(ATCC25923)を用いて単離画分の抗菌性を調べた結果、緑膿菌(*P. aeruginosa*)のみに抗細菌活性が認められた(Fig.10; Table. 3)。これまで昆虫から多くの抗細菌活性ペプチドが単離され、そのアミノ酸置換体ペプチドを利用しMRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)に対する治療薬開発を目指した研究が進められている(Yamada *et al.*, 2005)。昆虫抗細菌性ペプチドの効果的な濃度に比較して、本単離画分の濃度(1~2 mg/ml)は極めて高いので、そのリード化合物による生物薬剤開発の可能性は低いと考えられる。しかし、例え高濃度であっても抗細菌活性を有する成分が、ウスタビガフィブロインパウダーに認められたことは、生体防御システムの多機能性を意味することになる。さらにここで注目したい点は、単離画分には抗菌、抗カビ活性のみならず、哺乳類がん細胞にも増殖抑制活性を持つ点である(Fig.12)。この機能性を生体防御システムと微生物感染の点から考察することは現時点で困難



なことであるが，生物薬剤のためのリード化合物開発という点では構造決定が待たれる．

そこで本研究において単離画分の物性を明らかにするため PIXE 元素分析法、ICP/MS 定性分析法、LC/MS 質量分析、NMR スペクトル測定を駆使して活性物質の構造解析を行った．その結果，活性物質の構造を明らかにすることはできなかったものの，分析結果からこれまでに報告されている繭層由来活性物質の物性とは異なり，ウスタビガの幼虫期に餌植物から選択的に取り込んだ硫黄含有化合物が活性と関わっている可能性が示唆された．すなわち，パウダーの PIXE 元素分析ではヤマモユのフィブロインパウダーに比較して約 3.5 倍の硫黄元素が検出されている上 (Table 3)，LC/MS 質量分析で検出された同位体存在度パターンは硫黄の同位体存在度と類似すること，ミリマス分析では質量が 223.9587 になる分子式  $C_9H_6NS_3$  もしくは  $C_3H_4N_4O_4S_2$  の可能性が示唆された (Fig. 13; 未発表データ)．活性成分の構造解析は現在進行中であり，活性物質の構造を明らかにすることは，昆虫の二次代謝物質を新たに生物薬剤開発のリード化合物として利用する可能性を示唆するだけでなく，ウスタビガの幼虫が生体防御の手段の一環として積極的に食

餌植物から硫黄化合物を繭に取り込むメカニズムの解明にも繋がる極めて興味深い知見である。

## 摘 要

1. ウスタビガ繭層由来フィブロインパウダーを PIXE 分析法を用いて元素分析をおこなった結果、特に硫黄元素が 20.2 mg/g も含まれていることが明らかになった。

2. フィブロインパウダーの水抽出画分を逆相カラムの TSKgel ODS-80Ts HPLC に注入した結果、早い溶出ピークで単離画分を得ることができた。この生物検定においては抗カビ活性、抗細菌活性、抗がん活性などの特性が明らかになった。

3.  $^1\text{H}$  NMR スペクトル解析と、LC/MS 質量分析の結果から、活性物質は  $m/z$  224 の硫黄元素を含む化合物である可能性が示唆された。

## 総合考察

J. H. ファーブルが世界的名作「昆虫記」を完結させてから一世紀を経た今、昆虫は最大の未利用資源として注目され、昆虫学は単なる養蚕、養蜂、害虫防除といった生物学的な研究領域から脱却し、昆虫の機能性利用とするいわゆる昆虫テクノロジーへの新しい挑戦的な研究がひそやかに進展し始めた（鈴木，2005）。こういった時代の到来をいち早く予測し、地域貢献型の昆虫テクノロジーへの研究に力を注ぐと同時に昆虫およびその生産物を新規産業分野として生み出していくためには、産学官の連携が不可欠であるとの理念が提案された。一つの大きな流れとして、昆虫の遺伝子操作による有用物質の生産が展開している反面、昆虫および昆虫生産物から栄養機能素材や医薬品候補物質を開発研究し、ヒトの生活の質的（Quality of Life, QOL）向上を目指した流れもまた新しい展開である（鈴木ら，2006）。

そこで本研究では昆虫およびその生産物の機能性利用研究の一環として、第一章において、日本原産のヤマユ繭層から新規生理活性物質の探索、第二章では、ウスタビ繭層由来フィブロイン抽出物から新規生理活性物質の探索を行った。前述したように、野蚕繭の場合カイ

コと違って構造上セリシタンパク質の含量が少ない上，幼虫は繭を構築する際，生体防御の一環として積極的に食樹から色素や無機化合物を繭に導入していたため野蚕繭層から純粋なセリシタンパク質を抽出するのは困難とされていた．それに比べ，比較的セリシタンパク質の抽出が容易であるカイコの場合，今まで知られてるセリシンの主な生理機能は大きく分けると次のようになる．化粧品分野での応用が期待される抗酸化作用、保湿作用、美白作用（Kato *et al.*, 1998），それに，医薬品分野での応用が期待される大腸がん抑制作用、皮膚がん抑制作用、紫外線による皮膚障害の抑制作用（Sasaki *et al.*, 2000; Zhaorigetu *et al.*, 2001, 2003 a, b）が報告されている．さらに，細胞工学分野での応用が期待される動物細胞増殖促進作用（Takahashi *et al.*, 2003）や細胞の凍結保護作用（Tsujiimoto *et al.*, 2001）なども次々と報告された．その中で「ピュアセリシン」と命名されたセリシタンパク質は，すでに工業レベルでの製造が可能となり化粧品や細胞培養添加剤として商品化されている．一方，本研究では野蚕繭層セリシン抽出法および利用法に関する知見は乏しかったことから，未知の領域での探索をテーマとし研究を行った結果，ヤマユセリシタンパク質からカイコセリシンが持たさない 41 kDa 機能性タンパク

質を単離・精製することに成功し，機能性についていくつか興味深い知見を得た．本研究で解析した 41 kDa タンパク質はヤマユセリシタンパク質の一部でショウジョウバエ胚子由来 Schneider S2 細胞とマウス脾臓リンパ細胞に対しては増殖活性がある一方，ラット肝がん細胞（dRLh48）に対しては抑制も増殖もしないことが判明した．同じく市販されてるカイコ由来セリシンを用いた調査では，上記細胞に対し増殖活性が認められなかったことから野蚕のセリシタンパク質としては初めての知見である．最近，インド等に生息している野蚕の一種タサールサンのセリシン由来で熱帯環境ストレスに耐性を発揮すると考えられる 70~200 KDa のポリペプチドが，紫外線照射によるヒト皮膚細胞のアポトーシス化を抑制するとの報告がある（Dash *et al.*, 2007, 2008）．本研究での天蚕セリシン抽出方法から得られたセリシン溶液を配合した化粧水は紫外線吸収やしっとり感に優れていることから，本製作法は特許出願中でもある（鈴木，2007）．今後，こういった科学的根拠に基づき野蚕セリシンを細胞増殖添加剤、化粧品をはじめとする食品分野や医療等の分野に利用され，新しいシルク産業への展開が期待される．

さて，第二章で取り上げた野蚕の一種であるウスタビガ繭層由来フ

イブロインパウダーからはその水抽出物画分と単離画分において，抗カビ、抗細菌、抗がん活性物質の存在が確認された．作物における糸状菌はイネいもち病菌を始め農業・果樹生産に大きな被害を与えている．また，ヒトにおける糸状菌が原因となる真菌症は完治が難しいといわれている．今日まで昆虫および昆虫生産物から同定された抗菌性タンパク質が 200 種以上に達することに比べ，抗カビ性タンパク質の同定は極めて限定されている．例えば，ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から Drosomycin (Fehlbaum *et al.*, 1994), Metchinikowin (Levashina *et al.*, 1995), Cecropin A と B (Ekengren *et al.*, 1999), オオタバコガ (*Heliothis virescens*) から Heliomicin (Lamberty *et al.*, 1999), セクロピアサン (*Hyalophora cecropia*) から Cecropin A (Ekengren *et al.*, 1999), センチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) から AFP (Iijima *et al.*, 1993), そして，タイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) から Scarabaecin (Tomie *et al.*, 2003), ホロトリシン 3 (Lee *et al.*, 1995), カイコ体液抽出物からの抗カビ活性物質 (佐藤ら, 1999), コガタルリハムシ (*Gastrophysa atrocyanea*) からの Diapausin (Sato *et al.*, 2002) などが知られている．特に，昆虫由来ペプチド Scarabaecin は，細菌にはほとんど効果がないが，植

物病原糸状菌であるイネもん枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) やイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の増殖を抑制し、糸状菌の細胞壁のキチンと結合していることが明らかになった。また、キチン結合領域と推定される個所のアミノ酸配列を無脊椎動物や植物のものと比較したところ、非常に相同性が高かったことも明らかになった。そして、コガタルリハムシ (*G. atrocyanea*) からの抗菌性タンパク質 Diapausin は  $Ca^{2+}$  channel blocking 作用も明らかになった (Tanaka *et al.* 2003)。

本研究のウスタビガフィブロインパウダーの水抽出物はリンゴ炭そ病菌の菌糸伸長と増殖を阻止した。実体顕微鏡を用いて形態変化を観察した結果、菌糸の異常奇形が観察され、培養の初期段階では孢子の発芽、菌糸の増殖を抑えるものの時間が経過することにより菌糸が再び増殖を開始していることから、静菌作用で一時的に停止することによるものと考えられる。水抽出物を TSKgel ODS-80Ts カラムで分離し、活性を測定した上、菌糸の形態を観察した結果、188  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度で菌糸の生育が完全に停止し、94  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度では一定の増殖変化が見られだが、生育途中に異常形態となり停止していることが明らかになった。そのほか、院内感染に大きな問題となっている緑膿菌、ラット肝がん細胞についても活性を示した。こういったウスタビガフィブロインパ



ウダーから分離された活性物質の構造については明らかになっていないが、PIXE法による元素分析、LC/MS質量分析、<sup>1</sup>H NMRスペクトル分析結果を総合的に考察してみると、第二章の考察で述べたように質量が224である含硫化合物の可能性が高い。従って、他の昆虫由来の抗カビ、抗菌性、抗がん物質と同様に農業や医療分野で利用するためには、生理活性物質の構造決定、作用分子機構の解明、大量製造法の確立が不可欠であると考えられる。今後、農業および医療場面での活用について研究展開する必要がある。

近年、酸・酵素分解ならびに超臨界反応分解などの手法を用いて、カイコ由来の絹タンパク質の粉末化に成功している。絹タンパク質には肝臓機能を活発にするグリシン、アラニンなどのアミノ酸が豊富に含まれているため、抗がん作用を持つとされているキノコ、サルノコシカケの粉末と混合した機能性食品も開発されている。一方、天蚕およびウスタビガ繭層由来フィブロインパウダーにも同様、利用価値があるアミノ酸が豊富なおうえ、多種ミネラルが含まれているので、将来健康補助食品としての利用も期待される。しかし、現在使用されている野蚕繭層由来のフィブロインパウダーの製造法は工程が複雑な上、製造に要する時間も長く、有機溶媒処理による分子量の低下ならびに

人体に有害な試薬の使用などの欠点がある．健康補助食品としての利用を考えた場合には安全性の面から，消化吸收の面から配慮しなければならない．従って，より安全で安定した大量製造法の開発が不可欠である．

## 引用文献

赤池 学 (2003) 昆虫インダストリーバイオマテリアルの隠れた宝庫,  
6, pp. 86-93, 日経バイオビジネス出版.

Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R., Proost, P., Van Damme,  
J., Rees, S. B., Vanderleyden, J. and Broekaert, W. F. (1992)  
Isolation and characterization of a novel class of plant  
antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol.*  
*Chem.* 267, 2228-33.

Coleman, D. and Howit, F. O. (1947) Studies on silk proteins I.  
the properties and constitution of fibroin. the conversion of  
fibroin into a water-soluble form and its bearing on the  
phenomenon of denaturation. *Proc. R. Soc. London ser. A.* 190,  
145-169.

Dash, R., Mukherjee, S. and Kundu, S. C. (2006) Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Int. J. Biol. Macromol.* 38, 255-258.

Dash, R., Ghosh, S. K., Kaplan, D. L. and Kundu, S. C. (2007) Purification and biochemical characterization of a 70 kDa sericin from tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 147, 129-134.

Dash, R., Mandal, M., Ghosh, S. K. and Kundu, S. C. (2008) Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 311, 111-119.

Ekengren, S. and Hultmark, D. (1999) *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 965-972.

Engel, W., Hoppe, U., Pape, W. and Sauermann, G. (1987)

Eigenschaften eines sericinhaltigen, puffernden shampoos.

*Arztl. Kosmetol.* 17, 91-110.

Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.,

Hetru, C. and Hoffman J. A. (1994) Insect immunity. Septic

injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent

antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal

peptides. *J. Biol. Chem.* 269, 33159-33163.

Gamo, T., Inokuchi, T. and Laufer, H. (1977) Polypeptides of

fibroin and sericin secreted from the different sections of

the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 7, 285-295.

Iijima, R., Kurata, S. and Natori, S. (1993) Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.* 268, 12055-12061.

井上松久, 岡本了一 (1998) 微生物学実習提要 (第二版). pp. 84-85. 丸善 (株) 出版事業部.

Iwasaki, T., Sakanaka, H., Sagisaka, A. and Asaoka, A. (2006) A short peptide synthesized on the basis of coleopteracin a from *Allomyrina dichotoma* shows similar anti-*Escherichia coli* actin. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 75, 135-139.

Kadavy, D. R., Hornby, J. M., Haverkost, T. and Nickerson, K. W. (2000) Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4615-4619.

Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N. and Nomura, M. (1998) Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 145-147.

小松計一，山田政枝（1975）セリシンに関する化学的研究Ⅱ．野蚕のセリシンのアミノ酸組成．日蚕雑．44，105-110．

小松計一（1980）続絹糸の構造，pp. 357-358．信州大学繊維学部出版．

栗岡聡，山崎昌良（2005）高温高圧水処理による笹繭成分の分離・回収．日本蚕糸学会第75回学術講演会講演要旨集．p. 50．

Kurioka, A. and Yamazaki, M. (2002) Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (Sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1396-13969.

栗岡 聡, 石坂弘子, 山崎昌良, 遠藤美代子(1999) 繭の抗菌性試験. 糸絹研誌, 8, 57-60.

Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S. Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J. A. and Bulet, P. (1999) Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity, *J. Biol. Chem.* 274, 9320-9326.

Lee, S. Y., H. J., Kurata, S. and Lee, B. K. (1995) Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol. Pharm. Pharm. Bull.* 18, 1049-1052.



Levashina, E. A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J. M., Hetru, C. and Hoffmann, J. A. (1995) Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.* 233, 694-700.

Magoshi, J., Tanaka, T., Sasaki, H., Kobayashi, M., Magoshi, Y., Tsuda, H., Becker, M. A., Inoue, S. and Ishimaru, K. (2003) Uptake of atmospheric carbon dioxide into silk fiber by silkworms. *Biomacromolecules.* 4, 778-782.

Marcus, J. P., Goulter, K. C., Green, J. L., Harrison, S. J. and Manners, J. M. (1997) Purification, characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *Eur. J. Biochem.* 244, 743-749.

三田村敏正, 松木伸浩 (1999) 日長条件がウスタビガの蛹期間に及ぼす影響. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告, 24, 9.

村上毅，栗森茂治，野村圭市（1992）蚕糸学入門（日本蚕糸学会編），

大日本蚕糸会，pp. 1-13.

Ogawa, A., Terada, S., Kanayama, T., Miki, M., Morikawa, M., Kimura,

T., Yamaguchi, A., Sasaki, M. and Yamada, H. (2004) Improvement of islet culture with sericin. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 217-219.

Oka M., Maeda S., Koga N., Kato K. and Saito T (1992) A modified

colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes application to proliferation and cytotoxicity assays, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1472-1473.

Sasaki, M., Kato, N., Watanabe, H. and Yamada, H. (2000) Silk

protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine in mice. *Oncol. Rep.* 7, 1049-1052.

Sato, K., Tanaka, H., Saito, Y., Suzuki, K. (2002) Baculovirus mediated production and antifungal activity of a diapause specific peptide, diapausin, of the adult leaf beetle, *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Insect Biotech. Seric.* 71, 69-77.

佐藤有紀, 佐藤匡克, 清水崇之, 鈴木幸一 (1999) カイコ体液から調製した抗カビ性画分の生物検定. 日蚕雑. 68, 455-460.

Schade, W., Liesenfeld, I. and Ziegler, K. (1970) Fractionation of *Bombyx mori* silk fibroin. *kolloid-z. und z. polym.* 242, 1161-1164.

Schägger, H. and Jagow, G. V. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

世良耕一郎 (1992) PIXE 法の医学・生物学試料への応用. *Biomed. Res.*

*Trace. Elements.* 3, 1992.

Sprague, K. (1975) The *Bombyx mori* silk proteins: characterization

of large polypeptides. *Biochemistry* 14, 925-931.

鈴木幸一 (2005) 昆虫テクノロジー研究とその産業利用. pp. 3-11,

シーエムシー出版.

鈴木幸一, 山本圭一郎, 満月眞寿, 大内順子 (2006) 地域とQOL向上の

ための昆虫バイオテクノロジー. 蚕糸・昆虫バイオテック. 75,

97-102.

鈴木幸一 (2007) 天蚕で肌しっとり 鈴木岩手大教授が共同開発. 2007

年10月27日, 岩手日報.

鈴木幸一, 楊平 (2007) 休眠昆虫由来のペプチドによる細胞増殖と寿命の制御. バイオサイエンスとインダストリー. 65, 21-25.

Takahashi, M., Tsujimoto, K., Yamada, H., Takagi, H. and Nakamori, S. (2003) The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture. *Biotechnol Lett.* 25, 1805-1809.

Takahashi, M., Tsujimoto, K., Kato, Y., Yamada, H., Takagi, H. and Nakamori, S. (2005) A sericin-derived peptide protects Sf9 insect cells from death caused by acute serum deprivation. *Biotechnol. Lett.* 27, 893-897.

Takasu, Y., Yamada, H. and Tsubouchi, K. (2002) Isolation of the three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2715-2718.

高須陽子, 山田宏生, 坪内紘三 (2006) 結晶性の低い家蚕セリシン成分について. 蚕糸・昆虫バイオテック, 75, 133-139

竹田 敏 (2003) 昆虫機能の秘密 (工業調査会発行) . pp. 202-206, 工業調査会出版.

Tanaka, H., Sato, K., Saito, Y., Yamashita, T., Agoh, M., Okunishi, J., Tachikawa, E. and Suzuki, K. (2003) Insect diapause-specific peptide from the leaf beetle has consensus with a putative iridovirus peptide. *Peptides*. 24, 1327-1333.

Terada, S., Nishimura, T., Sasaki, M., Yamada, H. and Miki, M. (2002) Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology*. 40, 3-12.

Terada, S., Sasaki, M., Yanagihara, K. and Yamada, H. (2005)

Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 667-671.

Tomie, T., Ishibashi, J., Furukawa, S., Kobayashi, S., Sawahata, R., Asaoka, A., Tagawa, M. and Yamakawa, M. (2003) Scarabaecin, a novel cysteine-containing antifungal peptide from the rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *BBRC.* 307, 261-266.

坪内紘三 (1995) 日本国特許第2615440.

Tsujimoto, K., Takagi, H., Takahashi, M., Yamada, H. and Nakamori, S. (2001) Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J. Biochem.* 129, 979-986.

塚田益裕（1997） 昆虫産業—地上最大の未利用資源の活用—（梅谷献二編）， pp. 122-132， 社団法人農林水産技術情報協会．

瓜田章二（1994） 天蚕フィブロインの膜の調製と粉末化， 東北蚕糸・昆虫利用研究報告． 22， p. 32.

瓜田章二（1997） 天蚕フィブロインの調製膜および配合化粧水の特質， 日蚕講要． 67， p. 34.

瓜田章二（2007） 天蚕絹のセリシンから化粧水を作る方法， 福島県農業総合センター平成18年度農業総合センター試験成績概要．

Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F. and Okuda, T. (2002) Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.* 205, 2799-2802.



Yamada, M., Nakamura, K., Saido-sakanaka, H., Asaoka A., Yamakawa, M., Yamamoto, Y., Koyama, Y., Hikosaka, K., Shimizu, A. and Hirota, Y. (2005) Therapeutic effect of modified oligopeptides from the beetle *Allomyrina dichotoma* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* **67**(10), 1005-1011.

山崎昌良, 中村直子, 栗岡 聡, 小松計一 (1999) 笹繭のアル  
コール抽出物の抗酸化作用, 日蚕雑. **68**, 167-169.

Zhaorigetu, S., Sasaki, M., Watanabe, H. and Kato, N. (2001) Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2181-2186.

Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H., & Kato, N. (2003 a) Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha. *Oncol. Rep.* 10, 537-543.

Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H., and Kato, N. (2003 b): Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J. Photochem. Photobiol. B.* 71, 11-7.

Zhaorigetu, S., Sasaki, M., and Kato, N. (2007): Consumption of sericin suppresses colon oxidative stress and aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo).* 53, 297-300.