

新バイオ繭素材を活用した未分化胚性幹細胞培養技術の創成

京都工芸繊維大学応用生物学系・教授 小谷 英治

■ 目的

カイコの繭は、主に、後部絹糸腺で発現する内層の絹糸フィブロインと、中部絹糸腺で発現する外層のセリシンのタンパク質から成る。フィブロインは繭から煮繭や精練の工程を経てセリシンを除きつつ取り出され、シルク・繊維として利用される。一方、セリシンはこの工程でアミノ酸やペプチドのレベルまで壊され、捨てられてきた。しかし、セリシンはニカワのようなタンパク質であり、生分解性で免疫賦活性が弱く、細胞培養や生体応用に適したタンパク質である。これまでに、助成者は絹糸腺のタンパク質発現メカニズムを阻害し、絹糸フィブロインを生産しないカイコを生み出した。このカイコはセリシンだけでできた特殊な繭を形成するが、この繭からは分解を伴わないセリシンを抽出・利用できることがわかってきた。また、細胞増殖因子を含むセリシンを形成するカイコを生み出すことが可能であることもわかっている。そこで、農産部門の一つである養蚕の活性化につながるバイオテクノロジー技術の創成に向け、遺伝子組換え技術により ES 細胞の未分化維持に関わる細胞増殖因子を含むセリシン繭を開発することを目的とした。

■ 方法

遺伝子操作により LIF をセリシン層の中に発現するカイコを得た。このカイコは、セリシン遺伝子プロモーターを用いて LIF 遺伝子を発現し、絹糸腺内腔にセリシンを分泌して、LIF を含むセリシン層をつくることがわかった。すでに得ていたセリシン繭産生カイコ系統との交配により、LIF 含有セリシン繭をつくるカイコを得た。

抗体を用いたイムノブロット方法によりセリシン繭内の LIF を検出した。また、セリシンは高濃度カオトロピックイオン溶解と透析によって水溶液とした。この水溶液を静置したことによって起こるゲル化を阻止するために、ローテータを用いた室温下攪拌条件を検討した。得られる LIF セリシン懸濁液を培養用ポリスチレン容器の底面に加え、コートした。このコート上での ES 細胞株 (EB5 細胞) の培養を、LIF 非含有培地を用いて検討した。

■ 結果および考察

LIF セリシンのゲル化は、15 mL のセリシン水溶液を 50 mL 遠心チューブ内に入れ、二日間 45 rpm 垂直回転を続けた場合に完全に阻止できた。水溶液全体のゲル形成を適度な力が加わる物理的な攪拌処理の継続により、小粒子程度のゲル形成に留めることで、小粒子状セリシンの懸濁液を得ることができると考えられる。得られる LIF セリシンには、LIF 抗体と反応する約 4 ng 相当の LIF が 1 μ g セリシン繭に含まれることがわかった。セリシン懸濁液のコートの上で ES 細胞を培養したところ、未分化性の維持を示すドーム状の細胞塊を作りながら増殖することがわかった。LIF を含まない培地を用いて、セリシンコート上で ES 細胞を培養してもほとんど増殖しないが、LIF セリシンコート上ではコート内の LIF を利用しながら増殖した。しかも、この際の増殖は、LIF を加えた培地中にセリシン上で培養した細胞と同等であった。こうした結果から、LIF セリシンは、ES 細胞の未分化増殖に必要な足場を提供しつつ増殖の刺激となる LIF を供給する機能を持つことが示された。

■ 結語

LIF を内包するセリシンを用いた新たなバイオテクノロジー研究を展開していくことにより、未分化幹細胞培養のためのセリシン利用法の開発につながる。こうした取り組みを通じて、絹需要が低迷している現状においてカイコの新たな利用性を生み出すことにより、農産部門の一つである養蚕のリアルバリューへの貢献が期待される。