

第9号

纖維研究所研究報告

2005

財団法人 衣笠会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

目次

報 文

- キトサン処理繊維の機能性に関する研究
—天然藍と合成インジゴ色素によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性—
加古 武 1
- メタクリルアミドによる絹のグラフト加工—グラフト重合挙動—
前川輝彦 9
- ドレープ波形の自動抽出
岡本次郎・弓削 治 15
- 人工飼料育したタイ原蚕種Nang-Laiの繭糸の性質
島袋順二・中川里紗・大槻良樹・古澤壽治 25
- ハスモンヨトウ類におけるTRN-1様遺伝子の発現解析
武藤清佳・小谷英治・森 肇・林 幸之 31
- 細胞内タンパク質発現を調節する
カイコRNA結合タンパク質の選択的スプライシング
小谷英治・林 幸之・三好 明 39
- カイコ抗菌タンパク質遺伝子転写制御因子のノックダウンに関する研究
森山悠子・田中博光・山川 稔・林 幸之・森 肇 45
- 家蚕裸蛹系統Ndのセリシンに関する研究
亀井加恵子・中島怜美・一田昌利・山崎 隆・三好 明 59
- ケナフ繊維の品種間比較
大柿麻衣・道満光生・島袋順二・古澤壽治・杉村順夫 71
- 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況 75

キトサン処理繊維の機能性に関する研究

—天然藍と合成インジゴ色素によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性—

加古 武*

Functional Properties of Chitosan-Treated Fibers —Dyeing Properties of Chitosan-Treated Tussah Silk Fabrics by Natural Indigo and Synthetic Indigo—

Takeshi KAKO*

*Faculty of Fashion and Design, Kobe University of Fashion and Design,
Meinan-Cho, Akashi-Shi, Hyogo, 673-0001, Japan

Abstract

In the saturation dyeing method of untreated and chitosan-treated fabrics using indian indigo (*Indigofera tinctoria* Lour), and synthetic indigo (Indigo pure), and six times by dyeing repetition method of the prepared indigo leaves (*Polygonum tinctorium* Lour), the depth of shade increased as the dye concentration increased for all dyes, and K/S value of the chitosan-treated fabrics were higher than those of the untreated fabrics for dye concentration of 1g/l and 4g/l (indian indigo 8~40%, synthetic indigo 26.7~34.2%, prepared indigo leaves 27.3~33.3%).

In fastness to rubbing, the wet fastness was lower than the dry fastness, and the wet fastness to rubbing of untreated and chitosan-treated fabrics dyed with the indian indigo 4g/l, synthetic indigo 1g/l, and the prepared indigo leaves six times dyeing were improved by treating with cationic agent and acetic acid (grade: untreated fabric 4~5, chitosan-treated fabric 4~5).

Key Words : Chitosan treatment, Tussah silk, Natural indigo, Dyeing property

1. まえがき

近年、自然志向や個性化・多様化などから、地球や人間にやさしい天然素材の繊維や色素を用いた衣料品が再評価されている。

藍は、茜、紫草、紅花などとともに古くから知られている植物染料で、天然藍は、蓼藍、琉球藍、インド藍、大青藍など藍草の葉にインジカンが含まれ、製藍されたインジゴ ($C_{16}H_{16}O_2N_2$) は、インジゴイド系のバット染料である。染色は、生葉藍、沈殿藍、すくも藍、藍玉、泥藍、藍澱などを用いる生葉染め法、発酵建て染法、薬品建て染

法により行われている。

藍については、天然藍による絹の染色[4,6]、天然藍と合成インジゴによる絹および木綿の染色性[2]、藍染めの総説[5]など多くの報告がある。

一般に、バット染料は、日光、洗濯が最高の堅ろう度を示し、絹の染色においても高い染色堅ろう度が得られるが、繊維の損傷や劣化などが生じやすいため、インジゴイド系染料が使われている。藍は、濃色では日光堅ろう度、洗濯堅ろう度が高いが、摩擦堅ろう度が低いことが指摘されている[6]。また、インジゴ色素類はインダンスレン染料(アントラキノン系)に比べ染着力や染色堅ろ

*連絡先：神戸ファッション造形大学、673-0001 兵庫県明石市明南町2丁目1番50号、
TEL 078-927-0771、FAX 078-927-0774

う度が低く、とくにインジゴ色素は親和力が極めて弱いといわれている[5]。

そこで、多量に廃棄されるカニおよびエビなど甲殻類の殻などから得られるキトサン（脱アセチル化ポリ-1,4,β-D-グルコサミン）は、繊維に抗菌性を付与したり、染着性を向上させたりすることなどがよく知られている。

今回、柞蚕絹織物をキトサン処理し、インド藍および合成インジゴ色素の飽和染法およびすくも藍染めの繰り返し染法によるキトサン処理柞蚕絹織物の染着性、色の三属性、染色堅ろう度などについて検討した。

2. 材料と方法

2.1 試料

前報[1]と同じ柞蚕絹織物（ポンジー）を用いた。

2.2 精練

前報[1]と同じセッケン・ソーダ法を用いた。以下、これを無処理織物とした。

2.3 キトサン処理

前報[1]と同じpad-dry法（150℃、10分間）により行った（キトサン付着率0.75%）。以下、これをキトサン処理織物とした。

2.4 染色

建て染め方法は、薬品建て法（ハイドロサルファイト建て）を用いた。

（1）インド藍および合成インジゴ色素の飽和染法による方法

インド藍（沈殿法）粉末10g、または合成インジゴ色素（インジゴピュア）粉末5gを少量のアルコール、熱湯を加えてよく練りあわせて泥状にし、水酸化ナトリウム（48%）10mlおよびハイドロサルファイト8gを加えて攪拌し、温湯を注加して1000mlとし、それぞれ貯蔵原液とした。つぎに、インド藍貯蔵原液40ml、または合成インジゴ色素貯蔵原液20mlに、水酸化ナトリウム

1gおよびハイドロサルファイト2gを加えて攪拌し、温湯を注加して1000mlとした。試料をインド藍、合成インジゴ色素の各染料溶液に浸漬し、室温で30分間（浴比1:100）ロイコ体インジゴ色素を吸収させて固く絞り、空気酸化後1%酢酸水溶液に浸漬し、十分水洗後自然乾燥した。また、インド藍、合成インジゴ色素の貯蔵原液を、それぞれ20ml、80mlを用い、前述の条件と同様に調整したインド藍、合成インジゴ色素の各染料溶液に試料を浸漬し、60℃、60分間（浴比：1:100）浸漬し、固く絞り空気酸化させ、1%酢酸水溶液に浸漬後、十分水洗し、自然乾燥した。

（2）蓼藍（すくも藍）の繰り返し染法による方法

乾燥した蓼藍（すくも藍）20gを、少量の温湯、アルコール30ml、水酸化ナトリウム1gおよびハイドロサルファイト2gで攪拌して溶解し、さらに温湯を注加して1000mlとした。試料をその溶液に室温で30分間浸漬して、攪拌し固く絞り空気酸化し、水洗後、20分間自然乾燥した。これを1～6回繰り返し、1%酢酸水溶液に浸漬して十分水洗後、自然乾燥した。

2.5 後処理

染色後、次の（1）、（2）、（3）の処理を行った。

（1）非イオン系活性剤処理

試料を非イオン系洗剤5ml/lの溶液に、20℃、10分間、浴比1:100でソーピング後、十分水洗し、自然乾燥した。

（2）セッケン処理

試料をマルセルセッケン5g/l、炭酸ナトリウム（無水）2g/lの溶液に、80℃、20分間、浴比1:50でソーピング後、水洗、自然乾燥した。

（3）カチオン系活性剤処理

試料をカチオン系活性剤12g/l、酢酸（99.7%）10ml/lの溶液に、90℃、30分間、浴比1:50で処理後、水洗、自然乾燥した。

2.6 染色物の染着濃度

島津製ダブルビーム型Spectrophotometer UV-

Table 1 Depth of shade (K/S values) of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics by the saturation dyeing method of indian indigo and synthetic indigo, and by the dyeing repetition method of the prepared indigo leaves

Dye	Times of dyeing	Chitosan-add-on (%)	Dye bath (g/l)	K/S value	Ratio (%)
Indian indigo	1	0	1	1.5	0
	1	0.75	1	2.1	40.0
	1	0	4	5.0	0
	1	0.75	4	5.4	8.0
Synthetic indigo	1	0	1	3.8	0
	1	0.75	1	5.1	34.2
	1	0	4	9.0	0
	1	0.75	4	11.4	26.7
Prepared indigo leaves	1	0	20	1.1	0
	1	0.75	20	1.4	27.3
	6	0	20	3.0	0
	6	0.75	20	4.0	33.3

Indian indigo : *Indigofera tinctoria* Lour

Synthetic indigo : Indigo pure

Prepared indigo leaves : *Polygonum tinctorium* Lour

210Aを用いて測定し、Kubelka-Munkの式よりK/S値を算出した。

2. 7 染色物の色差

日本電色製Color difference meter ZE-2000を用いて測定し、表色は、CIE 1976 L*,a*,b*表色系により行った。

2. 8 染色物の染色堅ろう度

JIS L規格により摩擦 (0849-1996、摩擦試験機Ⅱ形)、水 (0846-1996)、洗濯 (0844-1997、A-1)、汗 (0848-1996)、ドライクリーニング (0860-1996)、ホットプレッシング (0850-1994、A-3) および日光試験 (0841-1998、60時間露光) に準じて行った。

3. 結果と考察

3. 1 染着濃度

インド藍とすくも藍、および合成インジゴ色素によるキトサン処理柞蚕絹織物の染着濃度をTable 1に示した。

無処理織物、キトサン処理織物のインド藍およ

び合成インジゴ色素による飽和染法 (濃厚建て浴染法、1回染め法) および蓼藍 (すくも藍) による繰り返し染法については、いずれも、染着濃度 (K/S値) は、染料濃度や繰り返し回数が増加するにつれて大きくなり、キトサン処理織物のK/S値は、無処理織物より8~40%増加した。これらは、いずれも柞蚕絹フィブロイン分子、またはキトサンポリマー分子とロイコ体インジゴ色素分子との間に、直接染料の場合とほぼ同様な染着機構の非極性ファンデルワールス力および水素結合などの物理的作用が生じ[3]、その結合状態はキトサンポリマーが柞蚕絹フィブロインより多いことを示している。染料濃度1g/lのインド藍による無処理織物、キトサン処理織物のK/S値は合成インジゴ色素1g/lより、それぞれ60.5%、58.8%、染料濃度4g/lでは、55.6~47.3%減少し、インド藍のインジゴ色素含有量が合成インジゴ色素の約40~50%程度とかなり低いものと考えられる。合成インジゴ色素の染浴中の色素濃度が絹繊維への染着量に及ぼす影響については、染料濃度5%owf (0.5g/l、浴比1:100) 以上では染着量の増加はほとんど認められず、濃色を得るためには、多くの反復染色が必要であるといわれている[4]。

Table 2 Three attributes of color and color difference of untreated and chitosan-treated tussah silk fabric by the saturation dyeing method of indian indigo and synthetic indigo, and by the dyeing repetition method of the prepared indigo leaves

Dye	Dye bath (g/l)	Chitosan-add-on(%)	Times of dyeing	K/S value	L*	a*	b*	ΔE^*ab
Indian indigo	1	0	1	1.5	61.97	-5.14	-11.94	0
	1	0.75	1	2.1	56.48	-5.16	-12.96	5.6
	4	0	1	5.0	45.37	-2.93	-18.47	0
	4	0.75	1	5.4	41.31	-2.52	-18.10	4.1
Synthetic indigo	1	0	1	3.8	49.21	-3.13	-19.38	0
	1	0.75	1	5.1	44.81	-2.71	-19.45	4.4
	4	0	1	9.0	30.32	-0.01	-15.78	0
	4	0.75	1	11.4	29.63	0.11	-14.44	1.3
Prepared indigo leaves	20	0	6	1.1	64.85	-6.07	-4.97	0
	20	0.75	6	1.4	60.24	-6.13	-6.25	4.8
	20	0	6	3.0	50.76	5.28	-11.89	0
	20	0.75	6	4.0	46.32	-5.05	-10.96	4.6

すくも藍20g/lの1回染めの染着濃度は淡色であるが、6回繰り返し染めでは、約3倍になった。また、キトサン処理織物のK/S値が無処理織物よりそれぞれ26.4%、33.3%増加した。また、すくも藍(20g/l)の1回染めの染着濃度は、合成インジゴ色素1g/lよりそれぞれ71.1%、72.5%減少し、6回繰り返し染めは、合成インジゴ色素4g/lより66.7%、64.9%減少した。それらの無処理織物およびキトサン処理織物の染着性からすくも藍のインジゴ色素含有量が合成インジゴの約2%程度であり、すくも藍に含まれているインジゴ色素は数%といわれている[5]こととほぼ符号した。

3. 2 色の三属性および色差

インド藍とすくも藍、および合成インジゴ色素によるキトサン処理柞蚕絹織物の色の三属性をTable 2に示した。

色の三属性については、一般に天然藍は合成インジゴ色素に比べインドキシル配糖体インジカン(C₁₀H₇O₆N)のほか、類似体(インジルピン、インジゴ・エロー、インジゴ・ブラウン、インジゴ・グルテン、鉍物質など)が含まれているといわれている。色相は、無処理織物が、インド藍(染料濃度1g/lから4g/l)は紫みの青色から青紫色、合成インジゴ色素(1g/lから4g/l)は青紫色か

ら濃い青紫色、すくも藍(1回から6回繰り返し染め)は、すくもに含まれているフラボノイド系やタンニン系の色素が、緑み青~青色から紫み青色にそれぞれ変化し、いずれもキトサン処理によって濃度がさらに増加した。明度は、インド藍は合成インジゴ色素よりかなり高いが、キトサン処理によって低下した。これは染着濃度(K/S値)が増加したことによるものと考えられる。彩度は、インド藍は合成インジゴ色素より低濃度では低く、高濃度では高くなるが、キトサン処理による影響は、明瞭な傾向がみられなかった。色差(ΔE^*ab)は、一般に小さいが、インド藍は合成インジゴ色素より大きく、また、染料濃度が低いと大きく、染料濃度が高いと小さい傾向がみられた。無処理織物とキトサン処理織物の色差(ΔE^*ab)は、合成インジゴ色素4g/lの1.8を除き、5.0程度と明瞭であった。

3. 3 染色堅ろう度

インド藍とすくも藍、および合成インジゴ色素によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色堅ろう度をTable 3および4に示した。

一般に湿潤摩擦堅ろう度が乾燥摩擦堅ろう度より低下し、合成インジゴ色素4g/lの1回染め法、すくも藍染め6回繰り返し染め法は、他の方法よ

Table 3 Color fastness to rubbing of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics by the saturation dyeing method of indian indigo and synthetic indigo, and by the dyeing repetition method of the prepared indigo leaves

Dye	Dye bath (g/l)	Chitosan add-on (%)	Times of dyeing	K/S value	Rubbing					
					Dry		Wet			
					a	b	c	a	b	c
Indian indigo	1	0	1	1.5	5	5	5	4-5	4-5	5
	1	0.75	1	2.1	4-5	5	5	4-5	4-5	5
	4	0	1	5.0	4-5	5	5	4	4-5	4-5
	4	0.75	1	5.4	4	5	5	4	4	4-5
Synthetic indigo	1	0	1	3.8	4-5	5	4-5	4	4-5	4-5
	1	0.75	1	5.1	4	4-5	4-5	4	4	4-5
	4	0	1	9.1	4	4-5	4	2-3	3	4
	4	0.75	1	11.4	3-4	4	4	2-3	3	4
Prepared indigo leaves	20	0	6	1.1	5	5	5	4-5	5	5
	20	0.75	6	1.4	4-5	5	5	4-5	5	5
	20	0	6	3.0	4	4-5	4-5	3-4	4-5	4-5
	20	0.75	6	4.0	4	4-5	4-5	3-4	4-5	4-5

a : Treated with nonionic detergent 5ml/l at 20°C for 10min.

b : Treated with marsellius soap 5g/l and sodium carbonate 2g/l at 80°C for 20min

c : Treated with cationic agent 12g/l and acetic acid 10ml/l at 90°C for 30min

* Time of dyeing

Table 4 Color fastness to dry cleaning, hot pressing and light of untreated and chitosan-treated tussah silk fabrics by the saturation dyeing method of indian indigo and synthetic indigo, and by the dyeing repetition method of the prepared indigo leaves

Dye	Dye bath (g/l)	Chitosan-add-on (%)	Times of dyeing	K/S value	Dry cleaning		Hot pressing				Light (ΔE^*ab)	
					Staining		Dry		Wet			
					C	S	Staining	Change in color	Staining	Change in color		
					C	S	C	Change in color	C	Change in color		
Indian indigo	1	0	1	1.5	5	5	4-5	5	4	5	4-5	9.2
	1	0.75	1	2.1	5	5	4	5	4	5	4-5	11.5
	4	0	1	5.0	5	5	4	5	4	5	4	5.4
	4	0.75	1	5.4	5	5	4	5	3-4	5	3-4	7.3
Synthetic indigo	1	0	1	3.8	5	5	4-5	5	4	5	4	8.9
	1	0.75	1	5.1	5	5	4	5	4	5	4	10.6
	4	0	1	9.0	5	5	5	5	4-5	5	3-4	2.6
	4	0.75	1	11.4	5	5	5	5	4	5	4	3.6
Prepared indigo leaves	20	0	6	1.1	5	5	4-5	5	4-5	5	4-5	5.1
	20	0.75	6	1.4	5	5	4-5	5	4-5	5	4-5	5.7
	20	0	6	3.0	5	5	4-5	5	4-5	5	4	5.4
	20	0.75	6	4.0	5	5	5	5	4-5	5	4-5	7.3

C : Untreated cotton cloth for staining, S : Untreated silk cloth for staining

り若干低くなった。これは、後者が前者より染着濃度が高くなり、染料の還元性が染色性に大きく影響することなどが考えられる。インド藍、合成インジゴ色素の1回染め法の染料濃度が高く、また、すくも藍の繰り返し回数が多くなると染着濃度が高くなり、染色速度や濃度勾配が大きくなって、表面染色（分散吸着、集同吸着など）となり、色素の結合力が弱いことなどから、染料の離脱、脱落が増加するものと考えられる。乾燥摩擦堅ろう度では、キトサン処理織物は無処理織物よりやや低下したが、湿潤摩擦堅ろう度では、両者はほとんど変らなかった。また、染色後のソーピングによって、繊維表面の酸化された不安定な染料は離脱し、染着した染料が繊維構造内などに結晶化して大きな粒子となり、また、カチオン系活性剤処理によって、カチオン系活性剤と結合して難溶化し、湿潤摩擦堅ろう度が向上したものと考えられる（それぞれ3～5級、4～5級）。

洗濯、水および汗の堅ろう度は、綿、絹添付白布の汚染や変退色がみられず、無処理織物、キトサン処理織物は、いずれも5級と堅ろう度であり、ドライクリーニング堅ろう度も高い堅ろう性を示した。また、ホットプレッシング堅ろう度も、200℃、15秒間処理による綿、絹添付白布の汚染はみられなく、堅ろう性が高かったが、変退色は、乾燥、湿潤ともに両織物はやや退色し低下した（3-4～4-5級）。キトサン処理によって、変退色は合成インジゴ色素、すくも藍が堅ろう度がやや増加したが、インド藍はやや減少し、染料によって異なった。

耐光性については、60時間露光前後の色差（ ΔE^*ab ）は、染着濃度が高いほど堅ろう度が高く、染着濃度による堅ろう度の影響があらわれた。また、インド藍4 g/l、すくも藍6回繰り返しの堅ろう度は、合成インジゴ色素4 g/lより若干低かった。これらについては、一般に染色、酸化後のソーピングは、繊維表面に付着した染料の除去だけでなく、本来の色相や耐光性に影響すること、インジゴ色素はインダンスレン染料より耐光性が劣り、合成インジゴ色素は、天然インジゴ色素より耐光性が高いことのほか、インジゴ色素は、染

着後、アミノ基とカルボニル基などが水素結合によって結晶化し、濃色染めでは染色後、染料分子が会合して染着していることが多く、耐光堅ろう度は極めて高くなり、淡色になると、結晶化度が低下するため必ずしも高くない結果を示す[5]ことと同じ傾向を示した。カーボン・アーク灯光により20時間照射したキトサン処理絹は、同処理した無処理絹に比べて黄変度が小さいといわれている[7]が、インド藍、すくも藍、合成インジゴ色素の染色布の露光前後の色差（ ΔE^*ab ）は、無処理織物、キトサン処理織物ともに、合成インジゴ色素の値が最も小さいが、いずれの染料も色差（ ΔE^*ab ）はキトサン処理によってやや増加する傾向がみられた。

4. 摘要

インド藍とすくも藍、および合成インジゴ色素によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性について検討した。

インド藍、合成インジゴ色素による飽和染法およびすくも藍の繰り返し染法によるキトサン処理柞蚕絹織物のK/S値は、無処理柞蚕絹織物より増加した（それぞれ8～40%、26.7～34.2%、27.3～33.3%）。キトサン処理によって、飽和染法、繰り返し染法ともに、明度は低下したが、色相や彩度はほとんど変化がみとめられなかった。無処理織物、キトサン処理織物の洗濯、水、汗、ドライクリーニングおよびホットプレッシングの各堅ろう度は、いずれの方法も高かった。キトサン処理織物の乾燥摩擦堅ろう度は、無処理織物よりやや低下したが、湿潤摩擦堅ろう度は、ほとんど差がみられなかった。また、湿潤摩擦堅ろう度は、ソーピングによって高くなり（3～5）、カチオン系活性剤および酢酸処理によってに向上した（4～5）。日光堅ろう度は、合成インジゴ色素4 g/lが最も高かったが、いずれもキトサン処理によって若干低くなる傾向がみられた。

引用文献

- [1] 加古 武 (2001) : 直接染料によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性. 日蚕雑, 70(2), 117-122
- [2] 木村光雄 (1989) : 伝統工芸における染色技術 (9). 染色工業, 37(3), 136-141
- [3] 黒木宣彦 (1961) : 染色理論解説. 染色工業, 9, 789-803
- [4] 皆川 基, 吉田芳子, 松本加奈子 (1980) : 天然藍による絹の染色について. 大阪市立大
学生活科学部紀要, 28, 87-99
- [5] 坂川哲雄, 越田 均, 中山隆幸 (1991) : 藍染めと草木染めについて (1). 染色工業, 39(4), 24-34, 同(2), 39(6), 2-8
- [6] 吉岡常雄 (1978) : 天然染料の研究. p.69, 光村推古書院、京都
- [7] 和田哲夫 (1988) : 公開特許公報 (A). 昭和 63-159581

メタクリルアミドによる絹のグラフト加工 —グラフト重合挙動—

前川輝彦*

Graft Polymerization of Methacrylamide onto Silk Fibers —Polymerization Behavior—

Teruhiko MAEKAWA*

*Department of Clothing Science, Faculty of Liberal Arts, Osaka Shoin Women's University,
Hishiyanishi, 4-2-26, Higashi-osaka city, Osaka 577-8550, Japan

Abstract

Bombyx mori silk fibers were graft-copolymerized with methacrylamide in aqueous media, using potassium peroxydisulfate as an initiator. Polymerization behavior was investigated by varying reaction conditions such as liquor ratio, initiator concentration, pH, temperature and time, while keeping monomer concentration constant.

At constant monomer / initiator ratio, the initial graft-polymerization rate, R_p increased with increase of monomer concentration. Dependence of R_p on initiator concentration was lower than 0.5-order, suggesting participation of the primary radical, to a certain extent in the termination reaction.

Apparent activation energy of polymerization was estimated to be 82 kJ/mol. Formation of appreciable amounts of homopolymer was observed as well as graft-copolymer in this system.

Key Words : Silk fibers, Methacrylamide, Graft polymerization, Mechanism

1. 緒言

絹繊維へのビニルモノマーのグラフト重合に関する研究には、学術的および技術的側面がある。絹の加工技術として、グラフト加工は増量効果をはじめ防しわ性・寸法安定性・耐摩耗性・染色堅ろう度向上などを目的として工業化が行われている。初期にはビニルモノマーとしてスチレンが用いられたが、2-ヒドロキシエチルメタクリレートを経て現在はメタクリルアミドによる加工が主流となっている。学術的研究はグラフト加工絹の微細構造、機械的性質、熱的性質の変化、黄変など主に物性に焦点が絞られている[1-12]。

絹へのグラフト重合反応は主として水を媒体と

する不均一系で、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム、その他レドックス開始剤が主に用いられるが、動力学的な重合反応挙動についての研究は少ない。

本研究では、過硫酸カリウムを開始剤とするメタクリルアミドの絹へのグラフト重合について反応挙動を明らかにする。

2. 実験方法

2.1 試料

試料糸は21中/3×3の生糸を精練して用いた。モノマーのメタクリルアミド(MAA)は市販一級試薬(和光純薬工業製)をベンゼンによる再

*連絡先：大阪樟蔭女子大学学芸学部被服学科、577-8550 東大阪市菱屋西4-2-26、
E-mail : maekawa.teruhiko@osaka-shoin.ac.jp、TEL 06-6723-8181

Table 1 Effect of material to liquor ratio (monomer concentration) on the graft polymerization of MAA.

Liquor ratio	Monomer concentration (w/w%)	Reaction time (min)	Graft yield (%)	Initial rate of graft polymerization, Rp (%/min)
1 : 50	2.0	10	3.06	0.207
		30	6.68	
		60	12.4	
		120	21.4	
1 : 30	3.3	10	4.13	0.300
		30	6.23	
		60	18.0	
		120	23.2	
1 : 20	5.0	10	7.20	0.471
		30	14.1	
		60	24.0	
		120	38.5	
1 : 10	10.0	10	13.4	0.917
		30	38.7	
		60	50.0	
		120	56.8	

Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, KPS 5%owf, pH 3.8, 70°C.

結晶により精製して用いた。

開始剤のペルオキシ二硫酸カリウム（過硫酸カリウム、KPS）は市販特級試薬をイオン交換水による再結晶法により精製して用いた。pH調整には市販特級硫酸を用いた。

2. 2 グラフト重合反応

絹糸の存在下にKPSを開始剤としてMAAの重合をイオン交換水中で行った。100°Cで6時間乾燥した絹糸1g（精秤）を用い、以下に示す範囲で反応条件を変化してグラフト重合を行った。

MAA100%owf（一定）、KPS 1、3、5、10%owf、浴比1：10、1：20、1：30、1：50、pH3.5、3.8、4.5、5.0、6.0、温度60、70、80°C、反応時間10、30、60、120分。

反応後、グラフト絹糸をイオン交換水、石けん水で洗浄した後、温水で5回すすいだ。（この方法によりホモポリマー、未反応物が除去されることを、ソックスレーによる24時間熱水抽出によってもグラフト絹糸の重量減少のないことで確認した。）次いでマングルにて脱水し、100°Cで6時間乾燥し秤量した。

グラフト率（Graft yield）は次式により求めた。

$$\text{グラフト率} = \frac{W_g - W}{W} \times 100$$

W：未処理絹糸の重量

W_g：グラフト絹糸の重量

3. 結果および考察

3. 1 グラフト重合速度に及ぼす浴比の影響

絹糸1g、MAA濃度100%owf、KPS濃度5%owf、pH3.8、浴比1：20、70°Cを標準条件とし、浴比を1：10から1：50まで変化してグラフト重合した結果をTable 1およびFig.1-aに示す。グラフト率は反応時間とともに増加し、1：10において2時間で約57%となる。初期グラフト重合速度Rpは浴比の減少とともに大きくなる。浴比の減少はMAA濃度/KPS濃度比一定におけるモノマー濃度の増加でもあるので、RpとMAA濃度の関係としてとらえ、Fig.1-bに示す。ただし不均一系であるので反応溶液中のMAA濃度を見なしの濃度w/w%として表している。

Fig.1-bからRpはMAA濃度にはほぼ比例すること

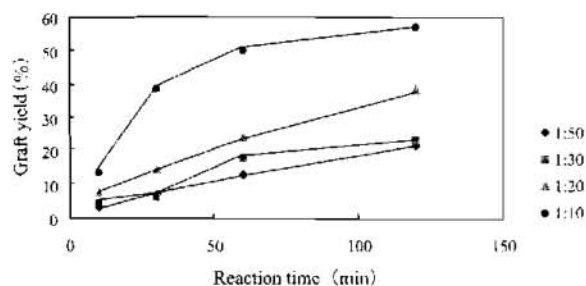


Fig.1-a Effect of liquor ratio on the graft polymerization of MAA. Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, KPS 5%owf, pH 3.8, 70°C.

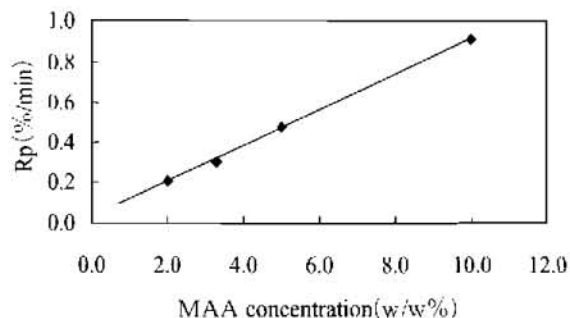


Fig.1-b Dependence of the rate of graft polymerization on the monomer.

Table 2 Effect of initiator concentration on the graft polymerization of MAA.

KPS concentration (%owf), (w/w%)	Reaction time (min)	Graft yield (%)	Initial rate of graft-polymerisation Rp (%/min)
1.0 (0.05)	10	1.81	0.315
	30	8.82	
	60	18.9	
	120	35.8	
3.0 (0.15)	10	3.66	0.417
	30	13.8	
	60	21.3	
	120	39.4	
5.0 (0.25)	10	7.20	0.471
	30	14.1	
	60	24.0	
	120	38.5	
10.0 (0.50)	10	7.69	0.567
	30	17.0	
	60	31.3	
	120	41.7	

Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, liquor ratio 1:20, pH 3.8, 70°C.

が示される。反応次数はMAA濃度に関してほぼ1次である。

3. 2 グラフト重合速度に及ぼす開始剤濃度の影響

KPS濃度を1.0から10.0%owfまで変化し、他は標準条件でグラフト重合した結果をTable 2およびFig.2-aに示す。RpはKPS濃度の増加とともに大きくなる。logRpとlogKPS濃度との関係をFig.2-bに示す。この図からRpのKPS濃度依存性として約0.26次の値が得られる。一般的なラジカル重合

における開始剤濃度依存性の0.5次からはかなり小さく、一次ラジカル停止の関与が示唆される。この点に関しては結論づけるにはなお詳細な検討が必要である。

3. 3 グラフト重合速度とpHの関係

Table 3およびFig.3-a、3-bにRpと反応溶液の初期pH値との関係を示す。

pH値が6.0から3.5まで低下するとともにRpは増大する。同様の結果は徳永らによって報告れ、KPSの分解速度がpHの低下により増大すること

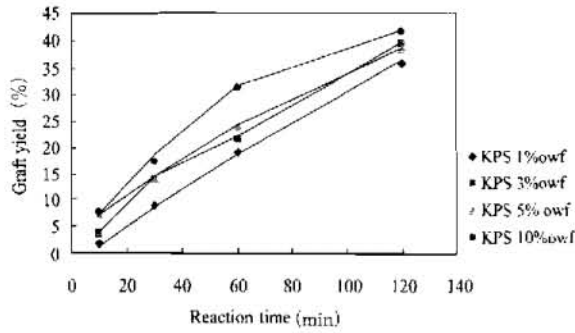


Fig.2-a Effect of initiator concentration on the graft polymerization of MAA. Silk fiber 1.0g, liquor ratio 1:20, MAA 100%owf, pH3.8, 70°C.

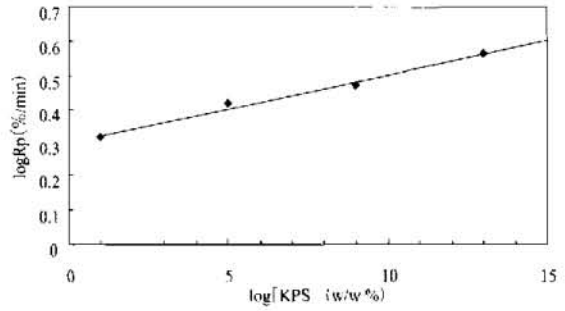


Fig.2-b Dependence of the initial rate of the graft polymerization on the initiator concentration.

Table 3 Effect of pH on the graft polymerization of MAA.

pH	Reaction time (min)	Graft yield (%)	Initial rate of graft polymerization, Rp (%/min)
3.5	10	9.55	0.620
	30	16.6	
	60	38.9	
	120	47.5	
3.8	10	7.20	0.471
	30	14.1	
	60	24.0	
	120	38.5	
4.5	10	6.58	0.420
	30	10.6	
	60	18.8	
	120	35.6	
5.0	10	6.08	0.373
	30	9.71	
	60	17.1	
	120	26.2	
6.0	10	2.50	0.174
	30	7.34	
	60	10.4	
	120	17.0	

Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, KPS 5%owf, liquor ratio 1:20, 70°C.

が一因としている[1]。また、pH3.8付近で最大のグラフト率が得られることが報告されているが、本実験ではpH3.5までの範囲でその様な現象は認められなかった。pHをさらに低くすることはフィ

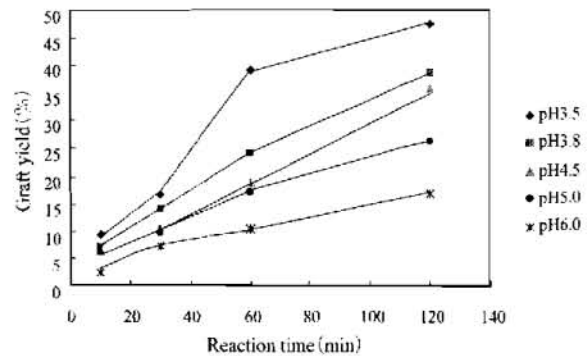


Fig.3-a Effect of pH on the graft polymerization of MAA. Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, KPS 5%owf, liquor ratio 1:20, 70°C.

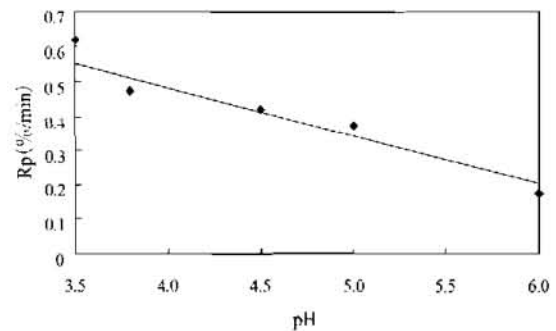


Fig.3-b Dependence of the rate of the graft polymerisation on pH.

ブロン分子の分解を考慮すると望ましくない。pHとRpとの関係には、絹繊維へのMAAおよびKPSの吸着、拡散速度、MAAの反応性、KPSの分解速度等のpHによる変化が複雑に影響するこ

Table 4 Effect of temperature on the graft polymerization of MAA.

Polymerization temperature (°C)	Reaction time (min)	Graft yield (%)	Initial rate of graft polymerization, Rp (%/min)
60	10	0.472	0.162
	30	4.87	
	60	11.15	
	120	18.1	
70	10	7.20	0.471
	30	14.1	
	60	24.0	
	120	38.5	
80	10	8.46	0.846
	30	17.5	
	60	31.8	
	120	44.7	

Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, KPS 5%owf, liquor ratio 1:20, pH 3.8

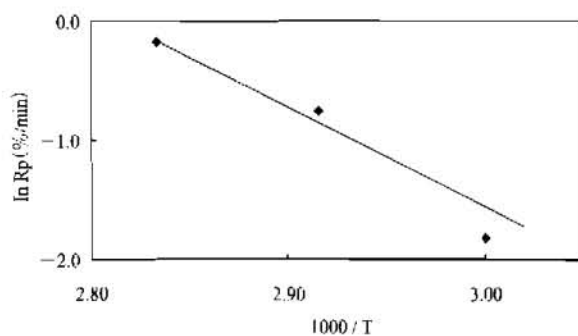


Fig.4 Arrhenius plot of Rp Silk fiber 1.0g, MAA 100%owf, KPS 5%owf, liquor ratio 1:20, pH3.8.

とが考えられ、今後の検討課題である。

3. 4 グラフト重合速度に及ぼす 重合温度の影響

Table 4に60、70、80℃における結果を示す。Rpは温度の増加とともに大きくなる。RpのアレニウスプロットをFig.4に示す。これより見かけの活性化エネルギー値として82kJ/molが得られた。ラジカル重合の活性化エネルギーとして妥当な値と考えられる。

3. 5 ホモポリマーの生成

グラフト重合後の反応溶液に生成しているホモポリマーの確認を行った。反応溶液を6倍量のメタノールに投入し、24時間室温で静置した後、沈

殿を得た。これをメタノールで洗浄後、室温で減圧乾燥した。この沈殿の赤外吸収スペクトルはMAAポリマーのものと一致した。前記標準反応条件ではホモポリマーの収率はグラフト枝ポリマーの収率（グラフト率）を越えることがわかった。グラフト枝の重合に単独重合を含めた総合的な重合挙動の詳細については現在検討中であり、結果は別報で報告する予定である。

Freddi[8]らは、グラフト絹繊維表面の走査顕微鏡（SEM）写真の観察を行ない、繊維表面が滑らかであることから、単独重合による沈着物、すなわちホモポリマーの量は無視しうる程度であると報告している。しかし、繊維表面には折出しないが、反応溶液中に生成し、溶存するホモポリマーを無視できない。その場合、グラフト効率は決して大きくならない。したがって、単独重合を含めたグラフト重合の反応メカニズムの解明は今後の重要な課題である。

4. 結言

KPSを開始剤とするMAAの絹糸へのグラフト重合について、その重合挙動を検討して以下の結果を得た。

1. 浴比の低下とともにグラフト率は増加する。
MAAとKPSの濃度比一定において、初期グ

ラフト重合速度 R_p はMAA濃度に比例して大きくなる。

2. R_p のKPS濃度依存性は0.5次より小さく、ある程度の一次ラジカル停止の関与を示唆している。
3. R_p は3.5から6.0の範囲でpH値の低下とともに増加する。
4. グラフト重合反応の見かけの活性化エネルギーは82kJ/molである。
5. グラフトポリマーのみならず、MAAホモポリマーが生成する。

したがって、ホモポリマーを含めた総合的なグラフト重合挙動の検討が今後の課題である。

引用文献

- [1] Tokunaga, T., and Ishiguro, Y. (1981) : Potassium persulfate initiated graft polymerization of methacrylamide onto silk fibroin fibers. *J. Sericult. Sci. Japan*, 50, 501-505
- [2] Tsukada, M. (1988) : Graft-copolymerization of styrene onto silk fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 35, 2133-2135
- [3] Tsukada, M., Freddi, G., Monti, P., Bertoluzza, A., and Shiozaki, H. (1993) : Physical properties of 2-hydroxyethyl methacrylate-grafted silk fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 49, 1835-1844
- [4] Tsukada, M., Freddi, G., Ishiguro, Y., and Shiozaki, H. (1993) : Structural analysis of methacrylamide-grafted silk fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 50, 1519-1527
- [5] Schindler, W., and Dietel, A. (1993) : Graft-polymerization of methacrylamide onto silk fibers. *Melliand Textilberichte*. 74, 81-84
- [6] Tsukada, M., Shiozaki, H., and Freddi, G. (1993) : Structural analysis of methyl methacrylate-grafted silk fibers. *Melliand Textilberichte*. 74, 778-781
- [7] Kawahara, Y., Shioya, M., and Takaku, A. (1995) : The modification of wild silk fibers with methacrylamide. *J. Soc. Dyers and Colourists*. 111, 382-384
- [8] Freddi, G., Massafra, M.R., Beretta, S., Shibata, S., Gotoh, Y., Yasui, H., and Tsukada, M. (1996) : Structure and properties of *Bombyx mori* silk fibers grafted with methacrylamide(MAA) and 2-hydroxyethyl methacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* 60, 1867-1876
- [9] Freddi, G., Ishiguro, Y., Kasai, N., Crighton, J.S., and Tsukada, M. (1996) : Properties of poly(styrene)-grafted silk fibers and molecular weight of poly(styrene). *J. Appl. Polym. Sci.* 61, 2197-2205
- [10] Tsukada, M., Imai, T., Freddi, G., Lenka, S., and Kasai, N. (1998) : Grafting of vinyl monomers onto silk using redox systems. Yellowing of silk. *J. Appl. Polym. Sci.* 69, 239-246
- [11] Tsukada, M., Arai, T., Freddi, G., Imai, T., and Kasai, N. (2001) : Grafting vinyl monomers onto silk using different initiators : Properties of grafted silk. *J. Appl. Polym. Sci.* 81, 1401-1409
- [12] Leksophee, T., Supansomboon, S., and Sombatsompop, N. (2004) : Effect of crosslinking agents, dyeing temperature and pH on mechanical performance and whiteness of silk fabric. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 1000-1007

ドレープ波形の自動抽出

岡本次郎*・弓削 治**

An Attempt to Automatic Extraction of Drape Figures

Jiro OKAMOTO* and Osamu YUGE**

*Appointed Professor, Faculty of Engineering, Osaka City University

**Emeritus Professor, Faculty of Human Life Science, Osaka City University

Abstract

The Human Hand evaluation (HE) values are very important factors for evaluating the goodness or property of fabrics. We reported previously that the drape image of a circular cut fabric hanged on a cylinder provides the HE values through neural network. This report describes a method to obtain the drape image automatically. We hope that the method is useful for other fields of fabric industries.

Key Words : Hand Evaluation, Drape, KES System, Fabric, Neural Network

1. まえがき

布の風合は布の性質を表すものとして、大変重要な尺度であり、その重要性や測定法については、最初川端らにより詳しく研究された。その成果はKESシステムとしてまとめられて報告され、それは心理的尺度である風合の物理的尺度として定量化を可能にした最初の文献となった[5,6]。現在使用されているKESシステムは、その発展した形である。

著者らはKESシステムに代わるものとして、ドレープ波形による簡易な風合測定法を提案し、このシステムの有効性を実験的に確かめ、本誌第6号に報告した[4]。この新システムは、まず、円形に切られた布を、垂直に立てられた半径5cmの円筒の上に、中心を合わせて自然に乗せ、次いで上面よりその円形布の周縁の輪郭波形、いわゆるドレープ図形を測定する。次いで、その図形の中心より波形の1点と振幅最大値までの角度を θ とし、 θ を横軸に、振幅を縦軸とした波形に変換

する。それをドレープ波形となづける。そのフーリエ変換スペクトルを求め、そのスペクトルまたは振幅そのものをニューラルネットワークの入力として加えることにより、自動的に風合値を求めるというシステムである。この原理はドレープの中に風合を表す全ての要素が含まれているという仮定に基づく。また、フーリエ変換スペクトルをドレープ波形を表すパラメータとして用いるのは、フーリエ変換スペクトルがドレープ波形の性質を表す独立な直交成分となるからである。このことについては先の報告で詳しく述べた[4]。

このフーリエ変換スペクトルをニューラルネットワークの入力として加え、風合値を出力として得るためには、あらかじめニューラルネットワークを、風合が既知な布のスペクトルを与えて、スペクトルと風合との関係を学習させておく必要がある。しかし、一旦ニューラルネットワークの学習が完了すると、上述した円形布のドレープ図形を上面よりビデオカメラで撮影し、そのドレープ図形を自動計測するだけで、簡単に風合値を求め

*連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、
E-mail : zai-kinugasakai@nifty.com、TEL 075-461-5949、FAX 075-463-6679

ることができるというのが本システムの特徴である。

本報告は著者らの提案したシステムに必要な、デジタルカメラで撮影された円形布の写真より、ドレープ波形を抽出する方法について述べたものである。

デジタルカメラで撮影された画像はRGBが256階調のフルカラー画像である。その画像をモノクロ画像を経て二値画像に変換する。次にラプラシアンオペレータと細線化処理により輪郭線を抽出する。次いでドレープ図形の中心をテンプレートマッチング法により求め、中心点と輪郭線との距離よりドレープ波形をうる。これらの処理を行うには相当の技術的工夫が必要である。

ここに述べた方法は、布のドレープ波形の抽出のためだけでなく、一般的に布の輪郭線抽出処理にとっても有効であると考え、報告する次第である。

2. ドレープ図形の自動抽出

円形に切られた布を円筒に乗せて得られた布の縁のドレープ図形を上向きから写真に撮り、ドレープ図形を自動的に抽出するための画像処理手順は、大きく分けると次の3つになる。

- (1) ドレープ図形から輪郭線を抽出する。
- (2) 布の中心点を抽出する。
- (3) ドレープ波形を抽出する。

これら3段階の処理を以下に順を追って詳述する。

2.1 入力画像

デジタルカメラ (Kodak DC280J ZOOM) で撮影された画像は640×425 [pixels] のフルカラー画像であり、JPEG (Joint Photographic Expert Group) 形式でセーブされている。これを、モノクロ256階調のPGM (Portable Gray Map) 形式に変換し、それを画像処理の原画像とする。本研究においては、画像サイズを640×425 [pixels] としたが、このサイズで求めたドレープ波形のスペクトルでも、本研究の目的にとっては十分な大きさであった。

2.2 ドレープ図形の輪郭線抽出

2.2.1 原画像の2値化

モノクロ256階調のPGM形式の画像をまず白(1)と黒(0)よりなる2値画像に変換する。そのためには、画像を撮影する際に、あらかじめ布(明るい部分)と背景(暗い部分)のコントラストを大きく取って、2値化がし易いように工夫して撮影する必要がある。2値化は原画像 $P_1(x,y)$ を適当な閾値 t によって、1と0とに分けることにより行なう。結果として布と背景とが明確に分離された2値画像が得られる。ここに x と y は離散化(整数値化)された空間座標を示し、 P_1 はその座標(点)の明るさを示す値である。黒を0とし、白が255であるが2値化後は1となる。

原画像より2値化画像 $P_2(x,y)$ を得るには、上述したように、次に示す2値画像への閾値変換処理を行う。

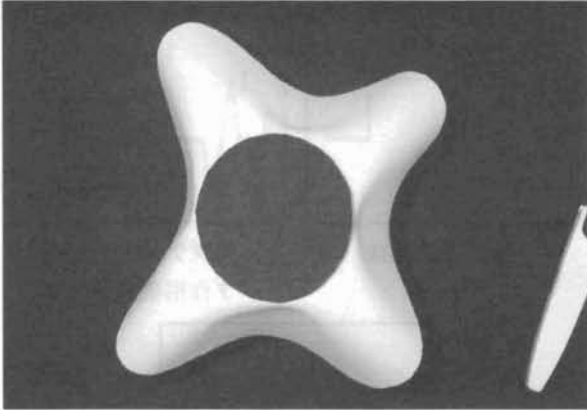
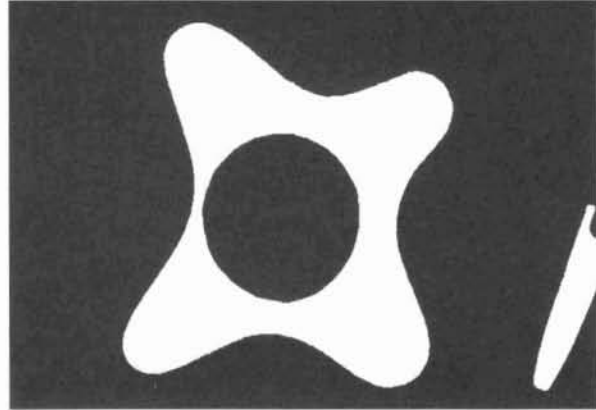
$$P_2(x,y) = \begin{cases} 1, & P_1(x,y) \geq t \\ 0, & P_1(x,y) < t \end{cases}$$

ここで問題となるのは閾値 t の決定方法である。Fig.2.1は実際に撮影された円形布のドレープの原画像を示す。

図に示すような、布と背景とのコントラスト比が高い場合の2値化に有効な閾値決定法としては、判別分析法 (discriminate analysis) というものがある[1,7]。以下に示す判別分析法の閾値を用いて2値化した画像をFig.2.2に示す。中央の黒い円盤は円形布の上に置かれた円筒と同じ直径の、布を固定する黒色の鉄の円盤である。右端の白い棒状のものはドレープ測定装置に付属しているレバーである。

2.2.2 判別分析法 (discriminate analysis)

判別分析法とは、濃淡画像の濃度のヒストグラムを閾値 t でもって2つのグループに分けたとき、グループ間の分散が最大になるように閾値 t を決める方法である[1,7]。この手法は "Ohtsu's method" と呼ばれる。この方法によると閾値 t は荷重分布の重心となり、荷重の重心を境に2値化するという、極めてシンプルな分割方法である。

Fig.2.1 原画像 $P_1(x,y)$ Fig.2.2 2値化画像 $P_2(x,y)$

以下原理を述べる。ある画像が m レベルの濃淡値を持ち、レベル i のピクセルの数を n_i とする。またその画像全体のピクセルの総数を N (本実験の場合画素総数は 640×425 となる) とすると、レベル i が発生する確率 $P(i)$ は次式のようになる。

$$N = \sum_{i=0}^m n_i$$

$$P(i) = \frac{n_i}{N}$$

もしヒストグラムを濃淡値レベル t において2つのクラス C_0, C_1 に分けたとすると、それぞれのクラスの発生確率 ω_0 と ω_1 、および、それぞれのクラスの平均値 μ_0, μ_1 は次のようになる。

$$\omega_0 = \sum_{i=0}^t p(i) \equiv \omega(t)$$

$$\omega_1 = \sum_{i=t+1}^m p(i) \equiv 1 - \omega(t)$$

$$\mu_0 = \sum_{i=0}^t ip(i) | C_0 \equiv \sum_{i=0}^t \frac{ip(i)}{\omega_0} = \frac{\mu(t)}{\omega(t)}$$

$$\mu_1 = \sum_{i=t+1}^m ip(i) | C_1 \equiv \sum_{i=t+1}^m \frac{ip(i)}{\omega_1} = \frac{\mu - \mu(t)}{1 - \omega(t)}$$

ここで、画像全体の平均濃淡レベルを μ 、および、 t までの平均濃淡値を示す関数 $\mu(t)$ を次式のように導入する。

$$\mu = \sum_{i=0}^m ip(i) = \omega_0 \mu_0 + \omega_1 \mu_1$$

$$\mu(t) = \sum_{i=0}^t ip(i)$$

すると、2つのクラス間の分散は以下のように

表せる。

$$\begin{aligned} \sigma^2(t) &= \omega_0(\mu_0 - \mu)^2 + \omega_1(\mu_1 - \mu)^2 \\ &= \omega_0 \omega_1 (\mu_1 - \mu_0)^2 \\ &= \frac{\{\mu \omega(t) - \mu(t)\}^2}{\omega(t)(1 - \omega(t))} \end{aligned}$$

ここで、 $\sigma^2(t)$ が最大となるような t を、閾値とするのである。 t は有限個なので、全ての t についてクラス間分散を上式に従って計算すれば、その最大値となる閾値 $t=T$ は求めることができる。判別分析法によって2値化された図形はFig.2.2に示した通りである。図から背景と目的物体とが白と黒で明確に区別されていることが分かるであろう。

2. 2. 3 エッジの検出

次に、背景と目的物とがはっきりと区別された図形より、エッジ（輪郭線）を抽出する作業に入る。一般に、エッジの検出には空間的な微分フィルタを用いる。そのための微分フィルタとして数種類あるが、その中でも、機構が簡単で最もはっきりとエッジの抽出が可能となる2次微分フィルタであるラプラシアンオペレータ（フィルタ）を用いることにした。ラプラシアンオペレータを用いたエッジの検出法を以下に示す[1,7]。

0	1	0
1	-4	1
0	1	0

Fig.2.3 ラプラシアンオペレータ

2. 2. 3. 1 ラプラシアンオペレータ
(Laplacian Operator)

2次微分はグラディエント（勾配）をもう一度微分したもので、そのエッジの強さ（コントラストの強さ）だけを検出するのに用いられる。ラプラシアンは以下に示すような差分近似として表わされる。

$$\begin{aligned} \nabla^2 f(x,y) &= \frac{\partial^2}{\partial x^2} f(x,y) + \frac{\partial^2}{\partial y^2} f(x,y) \\ &= \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial}{\partial x} f(x,y) \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial}{\partial y} f(x,y) \right) \\ &= \{f(x_{i+1}, y_j) - f(x_i, y_j)\} - \{f(x_i, y_j) - f(x_{i-1}, y_j)\} \\ &\quad + \{f(x_i, y_{j+1}) - f(x_i, y_j)\} - \{f(x_i, y_j) - f(x_i, y_{j-1})\} \\ &= f(x_{i+1}, y_j) + f(x_{i-1}, y_j) + f(x_i, y_{j+1}) + f(x_i, y_{j-1}) \\ &\quad - 4f(x_i, y_j) \end{aligned}$$

ここに (x_i, y_j) は座標 (i, j) を整数で表したとき、それぞれ i 番目の x 座標と j 番目の y 座標を表す。

最後の式より分かるように、関数 f にラプラシアンを掛けて輪郭を強調した画像を得るには、中心のピクセル（画素 $f(x_i, y_j)$ ）に対して、上下、左右のピクセル値を重み 1 で足して、中心のピクセル値の 4 倍を引いた値よりなる画像値を求める操作を行うことになる。この操作を全ての画素について並列的（同時に）行う。0 とそれ以外の値の境目（ゼロクロス）がエッジの輪郭になる。Fig.2.3 にラプラシアン演算子の重み係数を示す。

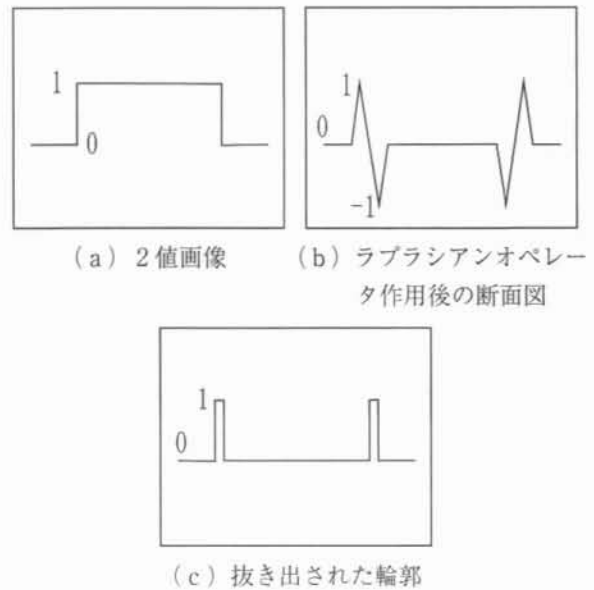


Fig.2.4 ラプラシアンオペレータの効果

Fig.2.4 はラプラシアンオペレータの効果を示したものであり、(a) は 2 値画像の断面図（明るさを縦軸）を示す。(b) は (a) の画像にラプラシアンオペレータを作用させた後の断面図を示し、(c) は (b) を次に述べる方法により 2 値化して輪郭線を抽出した結果の断面図である。ラプラシアンオペレータによる輪郭線抽出の様子が分かるであろう。

2. 2. 3. 2 細線化処理

ラプラシアンオペレータによって、濃度値が 0 と 1 の 2 値画像よりエッジのみが突出した画像を得たが (Fig.2.4 (b))、0 以上の画素を 1 とし、それ以下を 0 とすることにより、1 を輪郭線とする画像を得る (Fig.2.4 (c))。しかし、この輪郭線は線幅があるので、1 が連続した画像とするため、細線化処理を行う必要がある。本研究においては、一般的に良く用いられている Hilditch の細線化アルゴリズムを用いた [1,7]。

2. 2. 3. 3 Hilditch の細線化アルゴリズム

Hilditch の細線化法は、2 値 (0,1) 画像の図形画素の境界点 (0 と 1 の境界点) の階調値の 1 を、1 (図形画素) から 0 (背景画素) に逐次変換することによって、8 連結 (P_0 を中心にして周囲

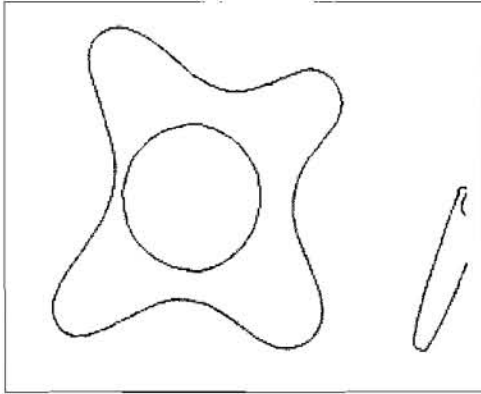


Fig.2.6 ラプラシアンオペレータで微分された画像 (白黒反転画像)

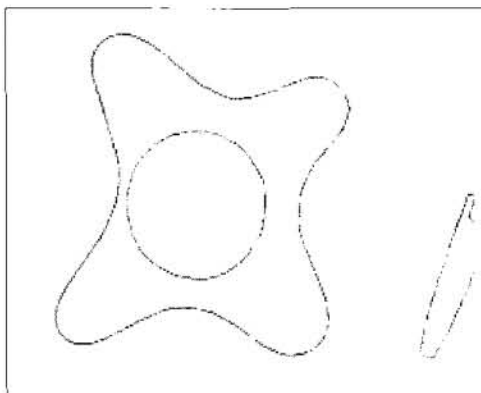


Fig.2.7 Hilditchの細線化法で細線化された画像 (白黒反転画像)

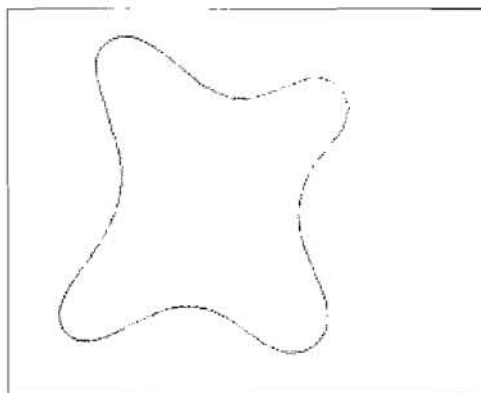
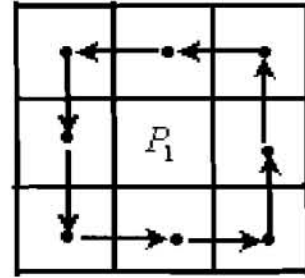


Fig.2.8 ドレープの輪郭線のみ抽出された画像 (白黒反転画像)

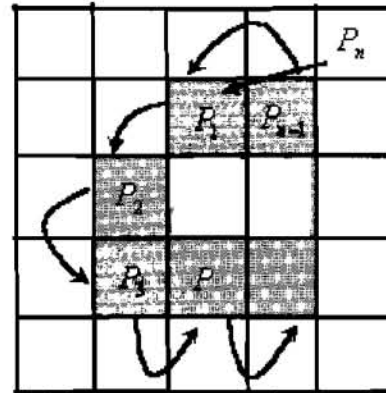
繰り返し、なくなれば処理を終了する。

2. 2. 4 ドレープ画像の輪郭線抽出

もとの原画像に、布以外の物体が写っている可能性があり、それが2値化によって布のドレープ画像と共に不要部分(ノイズ)として検出されてしまう。それらのノイズが布のドレープ画像の領



(a) 反時計方向の探索



(b) 追跡過程

Fig.2.9 反時計方向の輪郭線追跡処理

域よりも小さいという性質を利用して、ノイズを除去する。すなわち、布のドレープ領域を抽出するには、各領域の輪郭線の周囲長を求め、それが最も長い領域物体を布のドレープ領域と考えて抽出し、それより短い領域をノイズとして除去する。

Fig.2.6はラプラシアンオペレータを通過した画像であり、それを細線化したのがFig.2.7である。その中から上記の原理に基づいてドレープ画像の輪郭線のみを抽出したのがFig.2.8に示した画像である。ただし、各曲線がよく見えるようにするために白黒を反転して表示した。輪郭線追跡により周囲長を求める方法は以下に示すようにする。Fig.2.9 (b) の画素 P_1 を、原画像のラスタ走査において最初に検出された図形画素とする。このとき、同図 (a) のように、画素 P_1 を中心に反時計回りに探索し、最初に検出した図形画素を P_2 とする。次に P_2 に対しても同様に反時計回りの探索をする。以下同様に処理を繰り返し実行する。n 度目に検出された画素 P_n が最初の画素 P_1 に一致した時点で処理を終了し、 $P_1 \sim P_n$ ($=P_1$) まで

P_4	P_5	P_6
P_1	P_0	P_3
P_2	P_7	P_8

Fig. 2.5 画素 P_0 とその 8 近傍の画素 $P_1 \sim P_8$ と 4 近傍の画素 P_1, P_3, P_5, P_7

8 近傍に連結している意味、Fig.2.5参照)で線幅 1 の線図形を得る方法である。ある画素 $P_0(i,j)$ の階調値を $B(i,j)=B(P_0)$ と表記し、 P_0 の 8 近傍の画素を、Fig.2.5に示すように $P_k, k \in N_8 = \{1,2,3,4,5,6,7,8\}$ で表す。また、4 近傍を $N_4 = \{1,2,3,4\}$ 、 $N_{odd} = \{1,3,5,7\}$ と表記し、処理手順を以下に示す。

【手順 1】

原画像を TV 画面の走査方法と同様のラスタ走査、すなわち左上より、右下に向かって順次 1 行ずつ走査して処理を行う (逐次処理)。次に示す 6 つの条件が全て満たされたとき、 $B(P_0) = -1$ と置き換え、その他の場合は $B(P_0)$ の値は変化させない。

[条件 1 : 図形画素である] $B(P_0) = 1$ 。

すなわち、 $B(P_0) = 1$ の場合のみ 0 への変換の対象となる。 -1 の場合は手順 2 で 0 となるので、変換の対象としない。

[条件 2 : 境界点である]

$$\sum_{k \in N_4} B^*(P_{2k-1}) \geq 1, \text{ (for } B^*(P) = 1 - |B(P)| \text{)}$$

この式は、 P_0 が境界点上の画素 (-1) であるなら、 P_0 の 4 近傍画素 P_1, P_3, P_5, P_7 のうち、少なくとも 1 つの画素が 0 を含む必要があることを要求している。

[条件 3 : 端点を削除しない]

$$\sum_{k \in N_8} |B(P_k)| \geq 2$$

この式は、 $B(P_0) = -1$ の場合も考慮に入れた式であり、端点を保存するための条件式である。端点ならば、8 近傍のほとんどが 0 となるので、

端点でないためには、少なくともその内の 2 つ以上が 1 である必要があることを求めている。この条件がないと線は細線化の過程で短縮されてしまう。

[条件 4 : 孤立点を保存する]

$$\sum_{k \in N_8} C_k \geq 1, \quad C_k = \begin{cases} 1 & (B(P_k) = 1 \text{ のとき}) \\ 0 & (\text{その他のとき}) \end{cases}$$

この条件は、更新前の処理結果を用いて評価される (逐次処理方式)。 P_0 の 8 近傍のうち、少なくとも 1 つの画素の値が 1 であるとき、 P_0 は孤立点ではないので、削除可能であると判断する。

[条件 5 : 連結性を保存する]

画素 P_0 の連結度を次式のように $N_c^8(P_0)$ と定め、 $N_c^8(P_0) = 1$ であれば削除可能であるとする。

ここに、

$$N_c^8(P_0) = \sum_{k \in N_{8,i}} \{ C^*(P_k) - C^*(P_k) C^*(P_{k+1}) C^*(P_{k+2}) \},$$

$$C^*(P_{k,m}) = \begin{cases} 0 & (|B(P_{k,m})| = 1 \text{ のとき}) \\ 1 & (\text{その他のとき}) \end{cases}$$

この条件は画素 P_0 に連結する成分の数が 1 でなければならないことを示す。成分の数が 1 であるとき、画素 P_0 を削除しても近傍画素の成分の数は同じく 1 であり、連結性が損なわれることはない。端点は条件 3 で省かれるので短縮されることはない。

[条件 6 : 線幅 2 の線分の片側だけを削除する]

8 近傍の i について $B(P_i) \neq -1$ である (次の手順 2 で 0 とはならない。現在は 0 か 1)、あるいは、 $B(P_i) = -1$ か 1 のとき、 $B(P_i)$ を 0 と強制的に設定 (削除) したとき、 $\forall i \in N_8$ について $N_c^8(P_i) = 1$ となること。

この条件式は、 $B(P_i)$ を 0 としたとき、条件 5 で定められた画素 P_0 の連結数が 1 となること、すなわち、 P_0 の 8 近傍で -1 である画素と P_0 を同時に削除しても P_0 の連結度が 1 となり、連結状態を保つため、削除が可能であることを示している。

【手順 2】

i, j のすべての画素について 1 回目の逐次処理を行った後、 $B(i,j) = -1$ となっているすべての画素を $B(i,j) = 0$ にする。 $B(i,j) = -1$ なる画素が次の手順でなお存在する場合は【手順 1】を

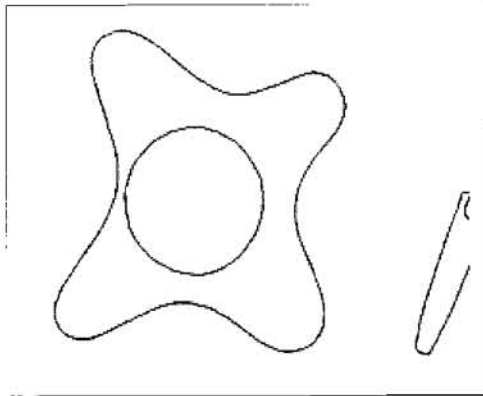


Fig.2.6 ラプラシアンオペレータで微分された画像
(白黒反転画像)

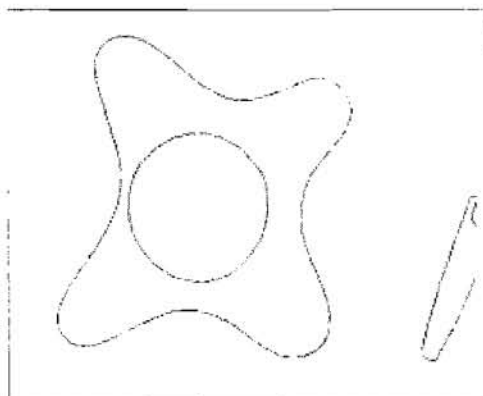


Fig.2.7 Hilditchの細線化法で細線化された画像
(白黒反転画像)

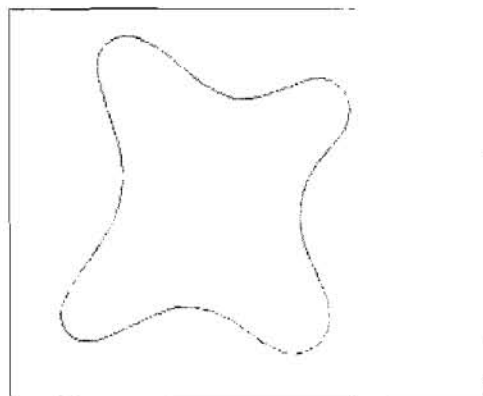
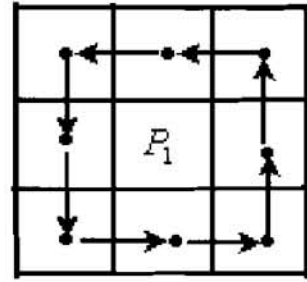


Fig.2.8 ドレープの輪郭線のみ抽出された画像
(白黒反転画像)

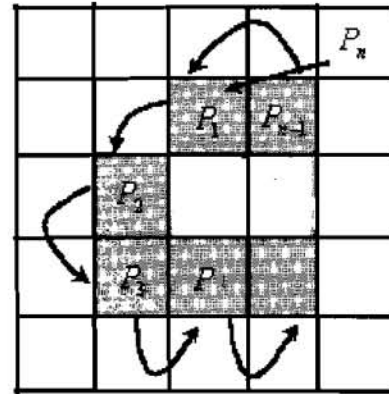
繰り返す、なくなれば処理を終了する。

2. 2. 4 ドレープ画像の輪郭線抽出

もとの原画像に、布以外の物体が写っている可能性があり、それが2値化によって布のドレープ画像と共に不要部分(ノイズ)として検出されてしまう。それらのノイズが布のドレープ画像の領



(a) 反時計方向の探索



(b) 追跡過程

Fig.2.9 反時計方向の輪郭線追跡処理

域よりも小さいという性質を利用して、ノイズを除去する。すなわち、布のドレープ領域を抽出するには、各領域の輪郭線の周囲長を求め、それが最も長い領域物体を布のドレープ領域と考えて抽出し、それより短い領域をノイズとして除去する。

Fig.2.6はラプラシアンオペレータを通過した画像であり、それを細線化したのがFig.2.7である。その中から上記の原理に基づいてドレープ画像の輪郭線のみを抽出したのがFig.2.8に示した画像である。ただし、各曲線がよく見えるようにするために白黒を反転して表示した。輪郭線追跡により周囲長を求める方法は以下に示すようにする。

Fig.2.9 (b) の画素 P_1 を、原画像のラスタ走査において最初に検出された図形画素とする。このとき、同図 (a) のように、画素 P_1 を中心に反時計回りに探索し、最初に検出した図形画素を P_2 とする。次に P_2 に対しても同様に反時計回りの探索をする。以下同様に処理を繰り返し実行する。n 度目に検出された画素 P_n が最初の画素 P_1 に一致した時点で処理を終了し、 $P_1 \sim P_n (=P_1)$ まで

を輪郭線の画素とし、 $n - 1$ を輪郭線の長さとする。

輪郭線追跡におけるノイズ除去の手順については以下のようにする。

1. 連結領域について輪郭線追跡を行い、輪郭線の周開長を求める。
2. 周開長の最も長い値を閾値とする。
3. 2. で決められた閾値以下の連結領域をノイズとみなして除去する。
4. 途中で途切れた輪郭線は除去する。

3. 布の中心点の抽出

ドレープ図形の中心点（円形布の中心点）を求め易くするために、あらかじめ画像を撮影する時に布の中心点と布の上にのせる円盤（円形のおもり）の中心点とが一致するように載せて撮影する。撮影された円盤の中心点を求め、それを布の中心点とする。

3. 1 円盤の輪郭線の抽出

2. 2. 4の細線化処理で得られた画像より、布の輪郭線を除去した画像を用いて、円盤の輪郭線の抽出を行い、ドレープ図形の中心点とする。ここでは、円盤の輪郭線抽出の手法としてテンプレートマッチング法を用いた。この手法は、Fig. 3.1に示す細線化後の円盤画像とFig.3.2に示す円盤のテンプレートとの2次元マッチング（縦方向と横方向の座標を変えて最大値を求める）を行い、相関が最も高いところに円盤があるものと判断し、その部分を円盤部として抽出する。次に、テンプレートマッチングによって得られた画像にも、円以外に微小なノイズが含まれている可能性があるため、ここでもドレープ画像抽出の時に用いたノイズ除去と同様の手法を用いて連結領域を輪郭線追跡してノイズ除去した。その後、スキヤニングにより円の重心を求め、その値を円の中心とする。

3. 1. 1 テンプレートの作成

ここで用いたテンプレートは、Fig.3.2に示したような円に幅をもたせたドーナツ型の円盤である。



Fig.3.1 円盤が細線化された画像



Fig.3.2 円のテンプレート画像

円盤に幅をもたせたのは、撮影の仕方によって円の大きさが変わってしまうことに対する許容幅を持たせるためである。円の幅の大きさはあらかじめ円の大きさの変化する範囲を調べておいて、その結果から適当な円の線幅を決定する必要がある。本実験の場合は円盤の線幅は7mm、直径は円筒の直径と同じく50mmとした（ピクセル数は撮影状態により異なる）。テンプレートのサイズは円の幅や原画像のサイズを考慮して、 249×165 [pixels]とした。

3. 1. 2 テンプレートマッチング

ある図形を画像中から検出したい場合、その図形の標準パターンをテンプレートとして用意し、対象画像との相互相関処理を用いて図形の識別を行なう。この方法は、一般にテンプレートマッチング法と呼ばれ、画像に対する最も基本的なマッチング操作である。

画像パターン f とテンプレートパターン g とが、それぞれFig.3.3に示すような大きさと位置関係にあるものとする。このとき、画像の点 (m,n) における f と g の相互相関係数 $R(m,n)$ （テンプレ-

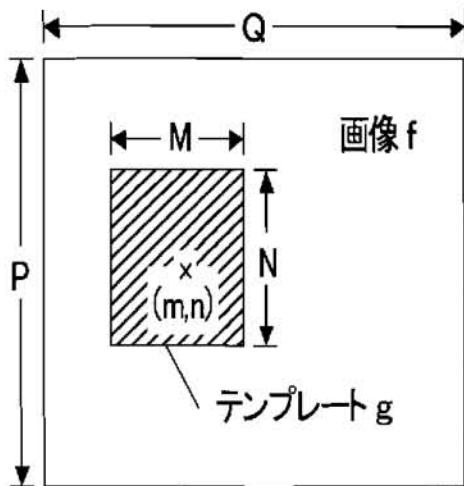


Fig.3.3 画像パターン f とテンプレートパターン g の大きさと位置関係

トの中心を点 (m, n) に置いて両画像をかさねたときの両画像の 1 が重なった画素数は、次式で表される。

$$R(m, n) = \sum_{(i, j) \in D} f(i, j)g(i - m, j - n)$$

ただし、領域 D は $|i - m| \leq \frac{M}{2}$, $|j - n| \leq \frac{N}{2}$ を満たす (i, j) の範囲である。 R の値は (m, n) の関数となり、その値が大きい（1 の重なりが大きい）ほど相関が強くなる。すなわち、相関値が最も大きい画像の点 (m, n) を中心として、テンプレートに近い図形が存在することを示す。この最大となる点を布の中心座標とする。

4. ドレープ波形の自動抽出

ドレープ波形は文献[4.2.3]で述べたように、布のドレープ画像の輪郭線と布の中心点によって求められるので、2. 2. 4で抽出したドレープ画像の輪郭線と3. 1. 2で得られた中心点を用いてドレープ波形を導きだすことができる。その結果をFig.4.1に示す。また、ドレープ波形を等間隔に32点サンプリングしたグラフをFig.4.2に示す。これはドレープ波形の $0 \sim 2\pi$ の範囲を最大振幅の点を起点として32等分の点でサンプリングしたものであり、FFT（高速フーリエ変換）の入力として用いる。

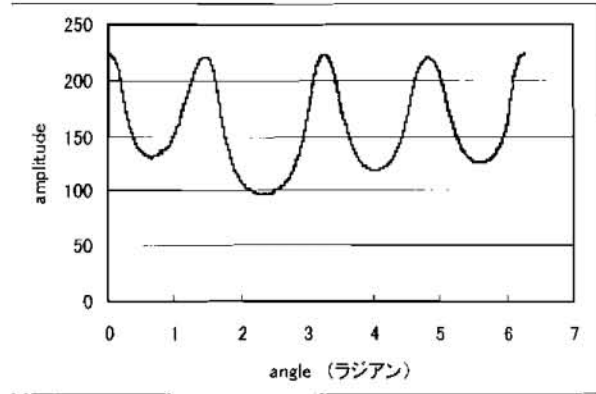


Fig.4.1 輪郭線より抽出されたドレープ波形

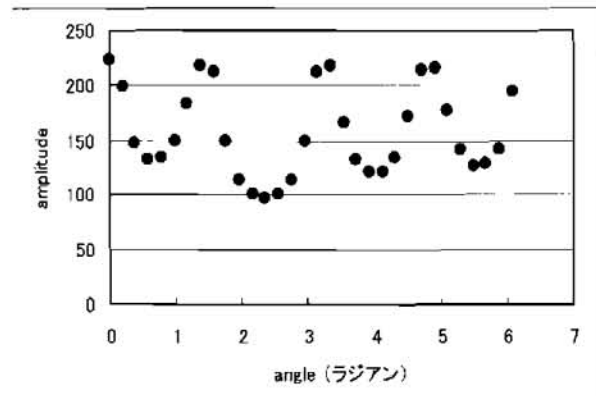


Fig.4.2 ドレープ波形の32点サンプリング画像

4. 1 ドレープ波形の抽出の手順

以下にドレープ波形の抽出手順について述べる。

1. テンプレートマッチングによって求めた中心 (m, n) から 2. 2. 4で求めた輪郭線までの距離を求める。
2. Fig.4.3に示すように、振幅最大点Aと中心点O (m, n) とを結んだ直線を基準線として、 $\angle AOB = \theta$ と定義する。B点を順次輪郭線に沿って左へ移動させながら、 θ を余弦定理により求める。すなわち、 $\cos(\theta) = (A^2 + B^2 - (AB)^2) / (2AB)$ より、 $\theta = \arccos((A^2 + B^2 - (AB)^2) / (2AB))$ 。
3. 2の操作によって求めた中心角 θ が、Fig.4.4に示すように時計回りとなる場合は、 $\theta = 2\pi - \theta$ として、反時計回りの角度になるように補正する。
4. 中心角を横軸に取り、その時の振幅を縦軸にとってドレープ波形を直交座標上のグラフで表す (Fig.4.1参照)。

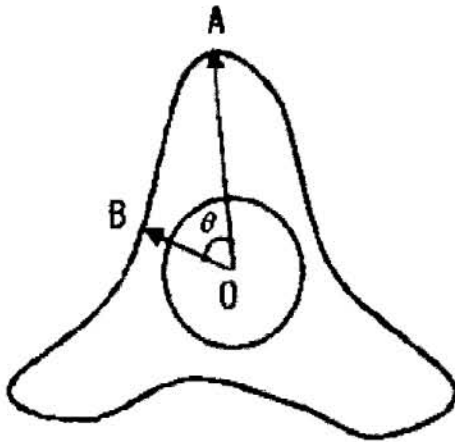


Fig.4.3 反時計周りの角度

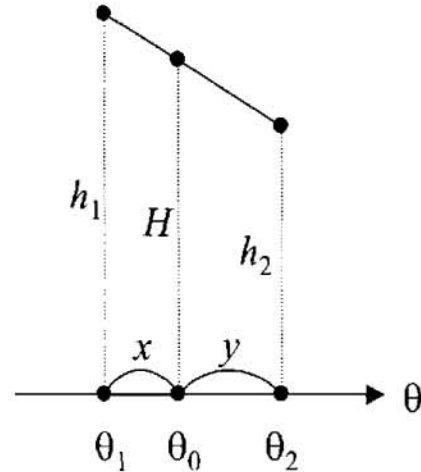


Fig.4.5 サンプル値の補間

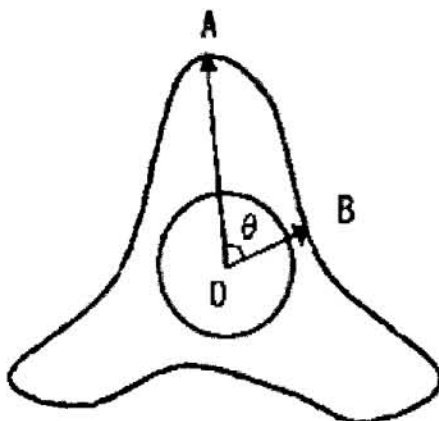


Fig.4.4 補正の必要な角度

5. θ の $0 \sim 2\pi$ の範囲を32等分サンプリングする。その際サンプリング値を次節4.2に述べる補間操作で修正する。

4.2 補間の手順

4.1の手順で求めたドレーブ波形は、連続波形ではなく離散波形であるため、サンプリングしたい角度 θ_0 の振幅値を求めるには補間操作をする必要がある。その補間方法は、Fig.4.5に示すように、求める点の最寄りの既知の2点 θ_1, θ_2 の振幅値 h_1, h_2 より、その2点を直線近似し θ_0 での補間振幅 H を次式を用いて求める。

$$H = \frac{yh_1 + xh_2}{x+y}$$

5. 全体処理の流れ

ドレーブ画像よりドレーブ波形を自動的に抽出するデータ処理の流れをFig.5に示す。風合を求めるニューラルネットワークの入力は最後に抽出された32点のドレーブ波形の振幅、または、それをFFTして得られたフーリエスペクトルを用いる。スペクトルは自乗してパワースペクトルとして入力しても、実部と虚部とをそれぞれ同時に入力してもよい。結果はパワースペクトルのみの場合よりも、実部と虚部とを同時に入力した方が、入力数が倍になるためか、やや結果はよくなるが、詳しくは今後の研究課題である[4]。

6. まとめ

布の風合値を自動的に求めるための一つの試みとして、円形布を円筒上に自然に垂らし、そのときに出来るドレーブを、上面よりカメラで観測し、その縁の輪郭（ドレーブ図形）を抽出し、それを直交座標上に置き換え、その波形の振幅、またはスペクトルをニューラルネットワークの入力として加えることによって、自動的に布の風合を測定する方法については先に報告した。本報告は、この風合を測定するための前処理として必要な、ドレーブ波形の抽出の方法と原理について詳述したものである。

まず、(1) デジタルカメラによる人力の仕

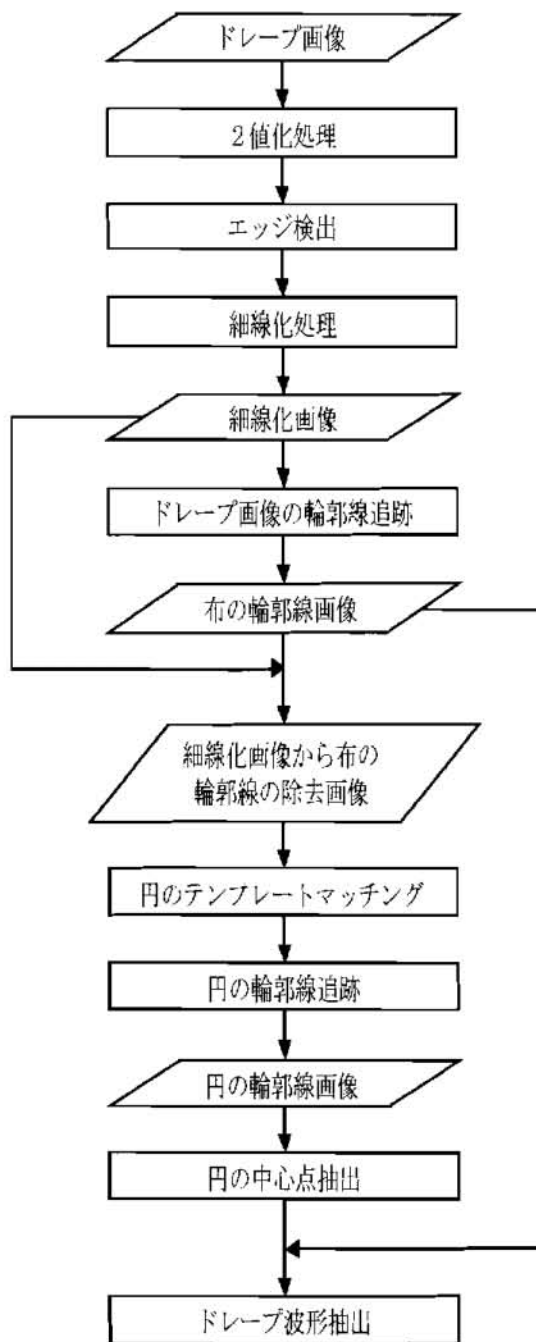


Fig.5 ドレープ波形抽出のためのフローチャート

方とその際の注意事項について述べ、順次(2)画像の2値化法、(3)ラプラシアンオペレータによる輪郭線の抽出、(4)抽出された輪郭線の細線化処理、(5)細線化画像よりノイズの除去、(6)相関関数による布の中心点の抽出、(7)ドレープ波形の抽出、(8)サンプリング点の補間、(9)処理の全体的な流れ図、について述べた。

本手法が一般の布の輪郭線の抽出に対しても、何らかの役に立てば幸いである。

引用文献

- [1] 安居院猛, 長尾智晴 (2001): 画像の処理と認識. 昭晃堂
- [2] Okamoto, J., Nakajima, S., and Hosokawa, S. (1996): Measurement of fabric hand evaluation values by neural network based on PCA of drape images, *Memories of the Faculty of Engineering Osaka City University*. 37, 89-99
- [3] Okamoto, J., and Yuge, O. (2001): Neural network to obtain physical parameters of fabrics from hand evaluation values "Fuai", *Memories of the Faculty of Engineering Osaka City University*. 42, 113-120
- [4] 岡本次郎, 弓削 治, 西村太良 (2002): ドレープ図を用いた簡易風合測定法と風合より布の物理量を推測するニューラルネットワークに関する研究. 繊維研究所研究報告(衣笠会), 23-35
- [5] 川端季雄 (1980): 風合い評価の標準化と解析(第2版). 日本繊維機械学会
- [6] Kawabata, S. (1980): *The Standardization and Analysis of Hand Evaluation*. The Textile Machinery Society of Japan
- [7] 八木伸行, その他 (1992): C言語で学ぶ実践画像処理. オーム社

人工飼料育したタイ原蚕種Nang-Laiの繭糸の性質

島袋順二*・中川里紗*・大槻良樹**・古澤壽治*

Properties of Cocoon Filament of a Thai-originated Race, Nang-Lai, Reared on an Artificial Diet

Junji SHIMABUKURO*, Risa NAKAGAWA*, Yoshiki OHTSUKI**
and Toshiharu FURUSAWA*

*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,
Ipponki-cho, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan

**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation,
29 Kitano Shimo-Hakubai-cho, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

To clarify the effect of the different diet on the cocoon qualities and the physical properties of the cocoon filament of a Thai-originated silkworm, Nang-Lai, the silkworms were reared on an artificial diet (AD), or on mulberry leaves (ML) throughout all stages, or on an artificial diet from 1st instar through 3rd instar, and then on mulberry leaves. The different diet did not affect the cocoon quality and the tenacity, elongation and stress in physical property, but affected the size and the Young's modulus. Namely, both values were lower in the silkworm on the artificial diet than in that on mulberry leaves. The hybridization of a race, 108, with the Nang-Lai resulted in the enhancement of the size.

Key Words : *Bombyx mori*, tropical race, cocoon quality, physical property, thread size

1. まえがき

タイ王国東北部ではタイシルクの90%以上を生産している。この地方の中心地であるマハサラカム近郊の養蚕農家は年1回の稲作に合わせてNang-LaiやNang-Noiなどの多化性品種の繭を生産している。これらの養蚕農家は生産した繭を生繰によって100~200個を一緒に繰糸し、太い織度の生糸を生産している。さらにこの生糸を巻き返し、カセ上げ、精練、2回の撚糸、整経、染色の工程を経た後、伝統的な文様を持つマットミー（緋）が生産されている。各工程は養蚕農家で完結され、

分業は行われていない。

このようなタイの養蚕農家における伝統的な生糸生産工程と日本のそれと比較するには問題があるが、日本では生糸生産には二化性交雑種の繭が用いられる。また養蚕農家が生産した繭は製糸業者が買取り、製糸業者は繭を乾燥して貯繭できる状態にした後、煮繭して繰糸する。繰糸は多くの場合7~8粒の繭を一緒に繰糸し、一定織度（約21デニール）の生糸を生産し、巻き返し、撚糸の工程の後に、撚糸、カセ上げ、精練の各工程を経て、様々な用途に用いられる。従って、生糸の生産工程を比べるとタイと日本では大きく異なる[1]。

*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : kbspace@kit.ac.jp、TEL 075-861-0735

**連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、
E-mail : zai-kinugasakai@nifty.com、TEL 075-461-5940

しかし、伝統的なマツミー製織に用いられているNang-Laiの生糸が日本の製織に合い、しかも本品種が持つ生糸特性が本来のものであるかについて検討することに端を発し、本報告では以下の目的でタイ原産蚕（Nang-Lai）を飼育した。

すなわち、日本ではこれまで動物繊維としての資源保存の観点から、約400系統の品種が継代保存されてきたが、近年、細織度の繭糸が求められ、特徴ある織物の生産が試みられている。しかし、細織度の繭糸を生産する品種は少なく、さらにこのような特徴ある糸を生産する系統を収集することによって、多種多様な天然繊維を供給できるよう継代保存しておく必要がある。現在、継代保存のためには、卵の長期保存技術が確立しつつあるが、非休眠性である多化性品種の保存は交配することによって卵を採取し、これを繰り返すことによって継代保存されている。しかし、日本ではこれらの系統は冬季には人工飼料による飼育によって年間を通して飼育することができる。

そこで、タイで飼育されている多化性品種（Nang-Lai）を桑育、人工飼料育および稚蚕期（1～3齢）を人工飼料育し、壮蚕（4～5齢）を桑育し、これらから採れた繭糸の性状と物理的特性を比較検討した。

2. 材料および方法

2.1 人工飼料および桑による蚕の飼育

Nang-Laiの人工飼料による飼育は、市販の人工飼料（無菌養蚕システム研究所、蚕用人工飼料全齢用 KIT-2515M12）を用い、飼料の2.2倍量で加水し練り合せ、115℃、40分間オートクレープで加熱した。飼育の違いにより、幼虫期の全期間を人工飼料育した蚕を全齢人工飼料育、1齢から3齢までを人工飼料で飼育し、4齢から桑飼育した蚕を1～3齢人工飼料・4～5齢桑飼育、幼虫期の全期間を桑育した蚕を全齢桑育とした。

交雑種（錦秋×鐘和）は、同じ市販の人工飼料を用いて、飼料の2.2倍量で加水し練り合せ、飼料調製専用の蒸煮器で100℃、60分間加熱した。飼育は幼虫期の1齢から3齢までを人工飼料育し、

4齢から桑で飼育した（1～3齢人工飼料・4～5齢桑飼育）。

Nang-Lai×108はマハサラカム大学・Silk Innovation Center（MSU/SIC）で飼育した。

2.2 繭調査

飼育で得られた繭を雌雄各20頭、繭調査した。雌雄ごとに全繭重、繭層重、繭層歩合を測定し、雌雄の平均を試験区の値とした。

2.3 織度の測定

各飼料で飼育したNang-Laiの繭を無作為に選び、55℃に90秒間、沸騰水に90秒間浸漬した。再び55℃に戻して90秒、そして沸騰水に90秒浸漬した後、55℃のウォーターバスに移して保温した。

繭糸は1粒毎に枠周40cmの4角型木枠に手動で50回転（20m）ごとに巻き取り、乾燥後、室内温度28℃、湿度58%の下で秤量することによって織度を求めた。なお、錦秋×鐘和の場合には、150回転（60m）毎に秤量することによって織度を求めた。

2.4 繭糸の物性調査

上記3に記載の通り繭（各区3粒）を煮ることによって、20m毎に5cm繭糸を採取、引張試験機（株）オリエンテック製卓上型材料試験機STA-1150）によって、応力、伸び、伸度、ヤング率を測定した。

3. 実験結果と考察

3.1 桑育および人工飼料育したNang-Laiの繭性状

Nang-Laiを本学生物資源フィールド科学教育研究センター（CBFS）で全齢桑育、全齢人工飼料育および1～3齢期間を人工飼料で飼育、次いで4齢から桑飼育（稚蚕人工飼料育・壮蚕桑育）した蚕の繭の性状と、MSU/SICで飼育したNang-Laiの繭の性状と比較検討した（Table 1）。

その結果、CBFSで飼育した全齢人工飼料育（No.1）、全齢桑育（No.2）、稚蚕人工飼料育・壮

Table 1. Properties of cocoon filament of Nang-Lai reared on artificial diet or mulberry leaves.

Examined Items	No.1	No.2	No.3	No.4
Length of Cocoon filament (m)	310	391	340	315
Weight of Cocoon Filament (cg)	7.5	11.2	9.4	5.8
Size of Cocoon Filament (d)	2.19	2.59	2.5	1.66
Non-broken Filament length (m)	259	373	334	224
Non-broken Filament Weight (cg)	6.3	10.7	9.2	4.1
Reelability Percentage (%)	84.7	95.4	98.1	71.2
Brushing Waste Percentage (%)	24.2	8.9	12.7	34.7
Elongation, Extension (%)	24.7	25.5	25.5	22.9
Tenacity (Elongation) (g/d)	3.6	4	3.7	3.9
Young's Modulus (kg/mm ²)	1105	1148	1121	1166
Degumming Loss Percentage (%)	18.9	21.3	20.4	18.7

No.1 : reared on an artificial diet throughout all stages (one feeding from 1st through 4th instar and one feeding in 5th instar) in CBFS

No.2 : reared on mulberry leaves in CBFS

No.3 : reared on an artificial diet from 1st through 3rd instar and then on mulberry leaves in CBFS

No.4 : reared on an artificial diet from 1st through 3rd instar and then on mulberry leaves in SIC of MSU

Table 2. Cocoon weight, cocoon shell weight and percentage of cocoon shell of Nang-Lai reared on an artificial diet (AD) and mulberry leaves (ML) in mass rearing system.

Diets	Cocoon weight (g)		Cocoon shell weight (g)		Percentage of cocoon shell (%)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
ML during all stages	0.81±0.04	1.05±0.08	0.114±0.01	0.118±0.02	14.1±0.76	11.2±0.82
AD from 1 st through 3 rd , then ML from 4 th through 5 th instar	0.70±0.09	0.90±0.07	0.099±0.02	0.104±0.01	14.0±0.95	11.5±0.83
AD during all stages	0.72±0.07	1.00±0.09	0.092±0.01	0.113±0.02	12.7±1.09	11.3±1.26

蚕桑育 (No.3)、加えてMSU/SICでの稚蚕人工・社蚕桑育 (No.4) について繭糸長は全齢桑育で最も長かったが、その他では大差なかった。また、伸張度、引張強度については飼料間では大きな差がみられなかった。これに対し、織度をみると No.1~No.3では2.2d~2.6dとほとんど差がみられなかったが、No.4では1.7dとなり、細い繭糸であった。すなわち、同じ品種を日本とタイで飼育した場合に、飼育温度、湿度などの違いに加え人工飼料や桑室の違いが織度に影響したものと考えられる。

以上のことから、Nang-Laiは人工飼料で難なく飼育できることから、全齢桑育、全齢人工飼料育

および1~3齢・人工飼料、その後4齢から桑の3つの方法で各区、10,000頭を飼育した。そして、それぞれの方法で飼育した蚕から得た繭の重量、繭層重、繭層歩合をTable 2に示した。

その結果、全齢を桑育した蚕の繭は全繭重1.11g、繭層重13.4cg、繭層歩合12.2%、1~3齢期間を人工飼料育、4齢から桑飼育した蚕の繭ではそれぞれ1.06g、13.0cg、12.4%になり、この2つの試験区はほぼ同じ結果となった。また全齢を人工飼料育した蚕の繭では、全繭重1.19g、繭層重15.7cg、繭層歩合13.5%となった。

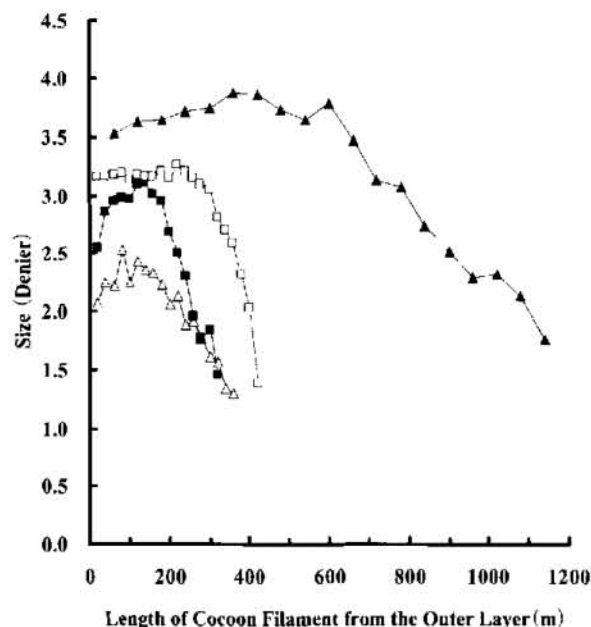


Fig.1. Curves of the size and length of the cocoon filaments of the Thai-originated race, Nang-Lai, and the hybrid race, Kinshu×Showa. The originated race was reared on an artificial diet (△) or mulberry leaves (□) during all stages, or reared on artificial diet from 1st through 3rd instar, then mulberry leaves (■). The Kinshu×Showa was also reared on the latter rearing method (▲)

3.2 桑育および人工飼料育したNang-Laiの繭糸の織度曲線

上記の繭から「材料及び方法」に記載の通り、「錦秋×鐘和」については60mごとに、またNang-Laiについては20m毎に繭糸を採り、織度を求め織度曲線をFig.1に示した。

その結果、交雑種「錦秋×鐘和」では外層から内層までの繭糸の長さは約1150mで、その平均織度は3.2であった。これに比べ、Nang-Laiでは350m~400mと交雑種の約3分の1であった。そして、織度は全齢桑育蚕(2.9d)、1~3齢人工飼料・4~5齢桑飼育蚕(2.6d)、全齢人工飼料育蚕(2.0d)の順で細くなった。

さらに、繭糸の外層から内層までの一定間隔ごとの織度を比較したところ、桑育した交雑種では繭糸全長の約50%は約3.5であり、その内層では急激に織度は小さくなった。全齢を桑育したNang-Laiでは全長の3分の2が約3.3dとほぼ一定の織度を示し、その内層では急激に小さくなった。1~3齢人工飼料・4~5齢桑飼育蚕では外層からは一旦織度が大きくなり全長の50%のところまで織度は3.2dと最大に達し、さらに内層に至るとともに織度は小さくなり、全齢桑育の場合とは異なり織度曲線は山型を示した。同様のことは全齢人工飼料育した繭においてもみる事ができた。桑

育と人工飼料育との織度曲線について、[3]は人工飼料育より桑葉育の方が織度は太く、繭糸長は長いと報告している。これらの結果は、飼料の違いが繭糸織度に影響を及ぼすことを示している。

3.3 桑育および人工飼料育したNang-Laiの繭糸の物理的性質

大量飼育したNang-Laiの繭糸の物理的性質をTable 3に示した。応力、伸長、および伸張度は、稚蚕期を人工飼料で飼育した後、壮蚕期を桑育した区ではいずれの調査項目においても、他の区よりも低かった。しかし、全齢を人工飼料で飼育したNang-Laiの応力、伸長、および伸張度は全齢桑育したそれとは大差なかった。繭糸長をみると全齢桑育に比べて人工飼料育では若干短く、さらにヤング率および織度は全齢桑育に比べて人工飼料育において小さかった。繭糸の織度とヤング率との間には相関があり[2]、また、人工飼料育蚕繭糸のヤング率は桑葉育より10%低いことが報告されている[3]。繭糸の物理的性質は、繊維の結晶性や配向性にも起因する[4]ことから、営繭の際の蚕の吐糸行動における牽引力なども大きく影響することが考えられるので、Nang-Laiが本来持つ繭糸の物理特性を決定付けることは無理があるといえる。

Table 3. Physical Properties of cocoon filament of Nang-Lai reared on artificial diet (AD) or Mulberry leaves (ML)

Diet (Strain)	Load (N)	Stress (N/text)	Elongation (mm)	Strain (%GL)	Young's modulus (gf/mm ²)	Size (d)	Length of Cocoon filament (m)
AD during all stages (Nang-Lai)	0.692	0.372	9.72	19.4	735180.9	2.02	320
AD from 1 st through 3 rd , then ML from 4 th through 5 th instar (Nang-Lai)	0.934	0.336	9.38	16.8	717035.1	2.56	300
ML during all stages (Nang-Lai)	0.117	0.386	9.8	19.6	815072.7	2.92	400
AD from 1 st through 3 rd , then ML from 4 th through 5 th instar (Kinshu×Showa)	0.121	0.344	9.8	19.8	822871.7	3.19	1040

Table 4. Properties of cocoon filaments of the original race (Nang-Lai) and its hybrid race (Nang-Lai×108)

Items	Nang-Lai (♀)	Nang-Lai (♂)	Nang-Lai×108	Kinshu×Showa
Cocoon wt. (g)*	1.08	0.8		
Shell wt. (g)*	0.11	0.11		
Percentage of cocoon shell (%)*	9.82	13.75		
Filament size (d)*	2.07	1.95	2	3.29
Tenacity (N/d)**	3.74×10 ⁻²		3.62×10 ⁻²	3.71×10 ⁻²
Strain (%)**	21.9		13.4	15.7

*Average value of cocoon weight of each 20 males and females

**Average value of 10 cocoons

3.4 原種 (Nang-Lai) とその交雑種 (Nang-Lai×108) の繭糸性質の比較

Nang-LaiとNang-Laiに「108」を交配した交雑種を桑育し、それぞれの繭の性状を調べた (Table 4)。その結果、繭重は0.8 (雄)~1.1g (雌)で、繭層歩合も9.8~13.8%であった。織度は約2dで、織度開差も小さく、比較に用いた交雑種 (錦秋×鐘和) に比べて細い。また、Nang-Laiに「108」を交配した交雑種 (Nang-Lai×108) (二化性品種) では、織度はほとんど変わらず、また引張強度も三品種ともにほぼ同じであった。しかし、「Nang-Lai×108」では伸張度は小さくなり、しかも交雑種 (錦秋×鐘和) とほぼ同程度となった。このことは、Nang-Laiに掛け合わせる品種によっては伸びの低下が引き起こされることを意味している。

謝辞

繭糸の物理的特性を試験するに当たりご指導いただいた本学デザイン経営工学科教授・西村太良氏に感謝の意を表します。

引用文献

- [1] 古澤壽治 (2005) : 熱帯性蚕Nang-Laiの繭糸の特徴. 野蚕, No.54, 7-9
- [2] Iizuka, E. (1996) : Size dependency of the physical properties of *Bombyx* silk. J. Seric. Sci. Jpn. 65, 102-108
- [3] 片岡紘三, 今井恒夫 (1986) : 桑葉育蚕と人工飼料育蚕の繭質および繭糸物性. 日蚕雑, 55, 112-117

- [4] 呂 群, 飯塚英策 (1994): 日本在来品種群
繭糸の物理的性質とその雌雄差. 日蚕雑, 63,
475-480

ハスモンヨトウ類におけるTRN-1様 遺伝子の発現解析

武藤清佳*・小谷英治*・森 肇*・林 幸之**

Molecular Characterization of the Gene of SPTRN-1, an RNA-binding Protein Belongs to the TIA-1 Family, from a Lepidopteran Insect, *Spodoptera litura* and Cultured Cells of *Spodoptera frugiperda*

Sayaka MUTOH*, Eiji KOTANI*, Hajime MORI* and Yoshiyuki HAYASHI**

*Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Kitano Shimo-Hakubai-cho,
Kita-ku, Kyoto606-8326, Japan

Abstract

A cDNA encoding TIA-1-type RNA-binding protein (SPTRN-1) was isolated from midgut cDNAs of the armyworm, *Spodoptera litura*, and cultured cells of *Spodoptera frugiperda*, via homologous cloning, in order to characterize its function. The deduced 294 amino acid sequence of SPTRN-1, most likely encoded by a single copy gene, has the repetitive structure at the N-terminal region homologous with human TIA-1 and TIAR, and silkworm BmTRN-1 known to function as important factors for either splicing or translation. However, SPTRN-1 was found not to retain the C-terminal region commonly conserved in the TIA-1 family. RT-PCR analysis showed that the SPTRN-1 gene was actively transcribed in the midgut at the gut purge stage, indicating a possible relation between the SPTRN-1 function and the physiological process in *S. litura* larval-pupal metamorphosis. It was also shown that inhibition of the SPTRN-1 gene expression by a transfected oligonucleotide encoding the antisense sequence caused a remarkable rise in protein expression from artificially constructed reporter cDNA encoded by the plasmid vectors in *Spodoptera* cultured cells. In addition, overexpression of the full-length SPTRN-1 open reading frame in the cultured cells was clearly shown to lead to decline of the reporter protein expression. From these results, it is demonstrated that SPTRN-1 is developmentally-regulated RNA-binding protein which could act as a regulator of the protein expression, possibly eliminating the transcripts in the authentic post-transcription process.

1. まえがき

タンパク質生合成に関する転写産物調節には、RNA-recognition motif (RRM) を有するRNA結合タンパク質群が特に重要な役割を担っている。RRM型RNA結合タンパク質は、N末端側に80-90個のアミノ酸からなるRRMドメインの繰り返し構造と、C末端側にRRMとは異なる独自の機能性

配列 (variable region) を持つという共通性が一般的に見られる [1,2]。この型のRNA結合タンパク質群の一つのサブグループとしてのTIA-1およびTIARは、哺乳類細胞を用いた先駆的な研究において、アポトーシス関連タンパク質のスプライシング調節およびストレス下での不完全転写産物の選択的排除に役割を果たすことなどがわかってきた [3-8]。

*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail : kotami@kit.ac.jp、TEL 075-724-7774、FAX 075-724-7760

昆虫種においても、TIA-1同属群のタンパク質が見ついている。例えばショウジョウバエから単離されたTIA-1同属群の相同性遺伝子 (Rox8) は、蛹期の卵形成過程に依存して強く発現することが知られている[9]。この他、カイコで発見されたTIA-1-related nucleolysin-1 (BmTRN-1) は、poly(A) およびpoly(U)RNA結合性の388アミノ酸配列からなり、アミノ末端側にはRox8およびTIA-1/Rと同様のRRM領域の繰り返しと、カルボキシル末端側にはvariable regionを有していることが示された[10]。BmTRN-1の人為的抑制化による培養細胞内外来タンパク質発現上昇も報告され、BmTRN-1は外来転写産物の排除機構に関連することが明らかとなった[10]。

チョウ目昆虫の細胞は、外来タンパク質発現の研究で頻繁に用いられ、プラスミドおよびウイルスベクターにより天然型に近い有用タンパク質生産が多方面で活用されてきた。チョウ目昆虫独特のタンパク質産生調節を解析することにより、今後の外来タンパク質発現系のさらなる改良がもたらされるはずである。TRN-1様RNA結合タンパク質のような性質を持つRNA結合タンパク質の働きを人為的に制御することが可能になれば、昆虫を用いた外来タンパク質発現系の改良に大きく役立つことも考えられる。

ヤガ科のハスモンヨトウ近縁種昆虫 (*Spodoptera frugiperda*) 由来細胞 (通称Sf9・Sf21等) は、培養増殖が速く、国際的にはカイコ由来細胞よりもタンパク質発現に汎用されている。このことから、ハスモンヨトウのTIA-1様タンパク質の遺伝子解析の必要性が生じ、本研究ではSf21細胞およびハスモンヨトウ*Spodoptera litura*の昆虫個体を用いてBmTRN-1様遺伝子 (SPTRN-1) の単離を行い、その細胞内機能を解析した。

2. 材料および方法

2.1 昆虫個体および細胞

ハスモンヨトウ*Spodoptera litura*は、農林水産省生物資源研究所から恵与された。昆虫の飼育は、人工飼料 (日本農産工業インセクタLS) を用い

て25℃で行った。

ハスモンヨトウ近縁種*Spodoptera frugiperda*由来Sf21細胞は、市販ESF921昆虫細胞培養液 (Expression System co.製) に14%の仔牛胎児血清を添加した混合培地を用いて、27℃下で培養した。

2.2 SPTRN-1のクローニング

ショウジョウバエRox8とカイコBmTRN-1のアミノ酸配列の相同性検索を行い、もっとも保存性の高いアミノ酸配列部分をコードするカイコcDNAの塩基配列を基に合成した5'-CTGGCCGCCATGAA-3'および5'-CGCGTTGACCAGTT-3'を用いてPCRを行った[9,10]。Sf21細胞の全RNAを鋳型にThermoscriptキット (Invitrogen製) を用いて合成した一本鎖cDNAからのPCR法により、約0.3 kbp断片を得た。このDNA配列を基に3' RACEおよび5' RACE (インビトロジェン製GeneRacerキット) により、末端までをコードするcDNA断片をクローン化した。得られたDNAの塩基配列を決定し、Blast解析システムにより日本DNAデータベースの塩基配列およびアミノ酸配列データとの相同性比較を行った。

2.3 SPTRN-1の細胞内機能解析

SPTRN-1のタンパク質発現への影響を調べる目的で、以下の操作を行った。

2.3.1 SPTRN-1の過剰発現

シャーレの単層細胞 (0.4×10^6) に、SPTRN-1の翻訳可能領域をクローニングサイト内に挿入したpIZ/Hisベクター (インビトロジェン製、 $0.5 \mu\text{g}/\text{dish}$) とレポーター遺伝子 (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 翻訳可能領域を昆虫細胞内で発現するpIZ/His-CATベクター ($0.5 \mu\text{g}/\text{dish}$) を同時にFuGENE6 (ロシュ社製) を用いてトランスフェクトした。対照として、レポーター遺伝子のみが発現する細胞ないしはレポーター遺伝子とともにカイコ高塩基性プロテアーゼ部分配列が発現する細胞についてもCATベクターを形質転換することにより作出した[10]。

発現産物はCATベクターから発現する際にC

末端に付加されるパラミクソウイルスV5アンチゲンに対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。

2. 3. 2 SPTRN-1ノックダウン細胞におけるタンパク質発現解析

SPTRN-1ノックダウン細胞はアンチセンスDNAを導入することにより作出した[11]。SPTRN-1全塩基配列(1961bp)の580-601部分に対して相補的な配列の5'末端をphosphothioateで修飾したオリゴヌクレオチド(配列は5'-GGTCGCGGACTATCCGACAATT-3')をノックダウン用アンチセンスDNAとして使用した。同様に5'部分を修飾したセンス鎖ヌクレオチド(塩基配列581-602部分)を対照実験に用いた。また、SPTRN-1遺伝子とは関係のない配列5'-GACTACTACGGGCCTTATCTC-3'のMock用DNAも用いた。

0.5 μ gの発現プラスミドベクターとFig.2に示した量のオリゴヌクレオチドを 0.4×10^5 の単層細胞に対してFuGENE6試薬を用いてトランスフェクトした。新しい混合培地中で25 $^{\circ}$ Cの培養を続けた後、Fig.2に示した時間に細胞を回収した。細胞内のCAT発現産物はウエスタンブロッティングにより検出した。

2. 3. 3 発現産物の検出

Hybond-Pメンブラン(アマシャム社製)上に移した電気泳動後のタンパク質を、ブロッキング剤を含むリン酸緩衝液pH7.4中で5000倍希釈の一次抗体および二次抗体のウエスタンブロッティング反応により検出した。検出にはアマシャム社製のECL-plusを用いた。

2. 4 SPTRN-1の中腸組織内発現解析

6齢(0日目~5日目)から蛹期(0日目~1日目)にかけてのハスモンヨトウを12時間ごとに3匹ずつ解剖し、中腸を採取した。採取した組織からIsogen(日本ジーン製)を用いて全RNAを抽出した。全RNA(1 μ g)を鋳型として、Thermo-X™ Reverse Transcriptase(Invitrogen社製)を用いてcDNA合成を行った。cDNA試料は、最終的

にTE緩衝液(pH8.0)に溶解させた。

合成したcDNAを鋳型として、SPTRN-1の405-489塩基部分を増幅するプライマーとKODポリメラーゼ(東洋紡製)を用いてPCR反応を行った。この際、熱変性反応を94 $^{\circ}$ Cで10分間行い、増幅のために94 $^{\circ}$ C30秒間、65 $^{\circ}$ C1分間、68 $^{\circ}$ C15秒間のサイクル反応を30回行った。

また、試料間の含有RNA量のばらつきを調べるため、ハスモンヨトウ28SリボソームRNAのcDNA増幅パターンを内部標準とした[12]。このため5'-ACCCCCGGGATTCAAGAGTACG-3'と5'-GTGTTTCAAGACGGGTCCTGCG-3'のそれぞれ22merのプライマーを使用した。混合液に対して熱変性のために94 $^{\circ}$ Cで10分間行い、増幅のために94 $^{\circ}$ C30秒間、61 $^{\circ}$ C1分間、68 $^{\circ}$ C15秒間のサイクル反応を30回行った。

3. 結果および考察

3. 1 SPTRN-1の一次構造的特徴

ハスモンヨトウ近縁種に由来するSf21細胞およびハスモンヨトウ個体中腸から、カイコのBmTRN-1と相同性を持つ遺伝子単離を行い、得られた完全長SPTRN-1の解析を行った。これら二つの近縁昆虫個体または細胞から得られたSPTRN-1は、ともに294アミノ酸配列をコードする翻訳可能領域を有していた。両者の間には、2個のアミノ酸置換(Thr²⁶⁵がAla、Thr²⁶⁸がIleにそれぞれ置換)が見られるものの、全体的にはほぼ同じアミノ酸配列をコードしていたため、両者は僅少な種間差異を持つ相同遺伝子であると考えられた。

データベースとのBlast比較の結果、SPTRN-1の推定アミノ酸配列にはBmTRN-1、Rox8およびTIA-1/Rとの間に有意な相同性があると判明した[3,9,10]。このSPTRN-1の特徴あるドメイン構造と、BmTRN-1ドメイン構造を模式図により比較した(Fig.1)。SPTRN-1において、N末端側に3つのRNA認識領域(RRM)の繰り返し構造についても保存されていた。BmTRN-1と比較すると、RRM1は94.2%、RRM2は97.4%、RRM3は92.1%という高い相同性を示した。RRMをコードする

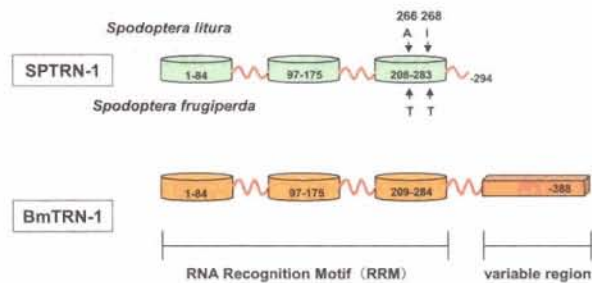


Fig.1. Comparison of the domain organization of SPTRN-1 with that of BmTRN-1. Numbers show the amino acid position, and arrow means position where the amino acid changes occur between the SPTRN-1 from *S. litura* and *S. frugiperda*.

遺伝子は広く動物種において系統発生的に保存されていると考えられる。また、SPTRN-1においてもBmTRN-1と同様、poly AおよびpolyU RNA結合に必要と推定されるRNP-1およびRNP-2の小領域に見られる重要な芳香族アミノ酸7個 (RRM1; Tyr¹¹, Tyr⁴⁸, Phe⁵⁰, RRM2; Phe⁹⁹, Tyr¹³⁹, Phe¹⁴¹, RRM3; Tyr²¹⁰) が完全に保存されていた[2]。これらの特徴的なドメインが保存されていると考えられることから、SPTRN-1もRNA結合活性を持ち、poly(A) およびpoly(U) に対する結合活性があると推察される。

一方、Fig.1に示されるように、他の類似タンパク質に共通して存在し、97-168個のアミノ酸から構成されているC末端側のvariable regionにあたる配列は、SPTRN-1では11個のアミノ酸 (GDNQVCIFMYR) しかコードされていなかった。また他の類似タンパク質には、グルタミンリッチであるという共通性やリソソーム移行シグナルとされる共通の配列 (YXXQ) がこのC末端領域に存在するが、SPTRN-1のC末端にはこうした特徴を示す配列が存在していなかった[3,4,9,10]。TIA-1のvariable regionには、不要転写産物をstress granuleへ輸送する上で必要なシグナルとしての働きがあるとされている[13]。SPTRN-1はvariable regionをもたないことから、RRM自体に特別な働きを有していることが考えられる。

3. 2 SPTRN-1の細胞内機能

3. 2. 1 SPTRN-1過剰発現が及ぼす細胞内外来タンパク質発現への影響

プロモーター配列下流にSPTRN-1全翻訳可能領域を組み込んだ細胞内発現用組換えプラスミドをSf21細胞にトランスフェクトし、処理から24時間後の細胞内タンパク質についてSPTRN-1抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した (Fig.2(a))。無処理の細胞およびプロモーター配列下流に人為的に遺伝子配列を組み込まなかった対照用発現ベクターを導入した細胞では抗体と強く反応する32.5Kタンパク質バンドが、無処理区、対照区および実験区全てに検出された。SPTRN-1遺伝子を組み込んだベクターを導入した細胞は、Fig.2(a) に示されるように、対照区と比べ過剰量の32.5Kタンパク質を含んでいた。mRNAの翻訳可能領域にコードされるタンパク質の推定分子量が32.5Kに相当することから、確かにSf21細胞でSPTRN-1タンパク質が過剰発現したことが確認された。

SPTRN-1の過剰発現が及ぼす外来CATタンパク質量への影響をウエスタンブロッティングにより調べた。Mock処理区であるカイコ高塩基性プロテアーゼの部分配列もしくはGFPを発現させた細胞と比べて、SPTRN-1過剰発現区ではCATタンパク質量の減少が見られ、この効果は処理から48時間まで継続した (Fig.2(b))。また、Fig.2(c) に示されるように、SPTRN-1翻訳可能領域を組み込んだプラスミドを導入した細胞において、CATタンパク質の発現量低下の程度は用いたプラスミド量に依存していた。

3. 2. 2 SPTRN-1の人為的抑制が及ぼす外来タンパク質発現への影響

SPTRN-1 mRNAの580-661塩基部分に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを取り込ませた細胞内で、外来CAT遺伝子を発現させたところ、対照区であるセンスオリゴヌクレオチドを取り込ませた細胞と比べてCATタンパク質量の増加がみられ、72時間までその量的増大効果は持続した (Fig.2(d))。また、SPTRN-1アンチセンスオリゴ

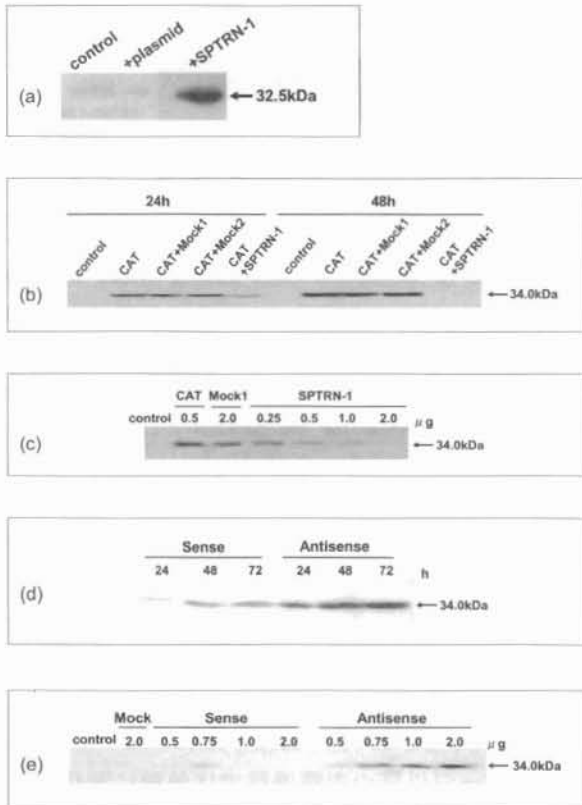


Fig.2. CAT protein production in SPTRN-1-overexpressing and SPTRN-1-downregulated Sf21 cells. (a) Western blotting of the SPTRN-1 protein in the non-treated Sf21 cells (control), cells transfected with pIZ/His plasmid containing no insert (+plasmid), and pIZ/His containing ORF of the SPTRN-1 (+SPTRN-1). (b) Western blotting of produced CAT protein in the cells transfected with only the vehicle for gene transfer and CAT-expressing plasmid (CAT), CAT-expressing plasmid (CAT, 0.5 μ g/dish) plus mock-expressing plasmid (GFP-expressing plasmid as mock1 and *Bombyx mori* HBP partial sequence-expressing plasmid [reference 10] as mock2, 0.5 μ g/dish), and plus SPTRN-1 whole ORF-expressing plasmid (0.5 μ g/dish) 24 and 48h after treatment. Control means cells without any treatments. (c) Western blotting of produced CAT protein in the cells transfected with only the vehicle for gene transfer and CAT-expressing plasmid (CAT, 0.5 μ g/dish), CAT-expressing plasmid plus mock-expressing plasmid (GFP-expressing plasmid as mock, 0.5 μ g/dish) and plus serial increasing amounts of SPTRN-1 whole ORF-expressing plasmids (0.25-2.0 μ g/dish) 48h after the treatment. Control means cells without any treatments. (d) CAT protein production in the SPTRN-1 knock down cells (Antisense, 0.5 μ g/dish) and in the cells transfected with sense nucleotide (0.5 μ g/dish) of SPTRN-1 mRNA sequence. Western blot of CAT protein was performed for each sample at 24, 48 and 72 h after the treatment. (e) CAT protein production in the SPTRN-1 knock down cells treated with the increasing amounts of SPTRN-1 antisense oligonucleotide (0.5-2.0/dish) and in the cells treated with the increasing amounts of sense nucleotide of SPTRN-1 mRNA sequence. Control means the non-treated cells. Mock-treated cells were prepared by the transfection of the same amount of oligo sequence being out of all relation to the SPTRN-1 mRNA sequence (5'-GACTACTACGGCCTTATCTC-3'). Arrows means the molecular mass for the target protein of western blotting.

ヌクレオチド量を段階的に変化させた細胞のCATタンパク質発現量を比較したところ、処理に用いたオリゴヌクレオチド量に依存してCATタンパク質の発現量は増大した (Fig.2(e))。この際、無処理、Mockもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドを取り込ませた対照区ではCATタンパク質の発現が低いレベルに留まった。このような結果から、SPTRN-1を少量ずつ発現し続けている平常細胞においてCATタンパク質の発現は抑えられており、SPTRN-1の発現を人為的に抑制したことによりCATタンパク質発現量が増加したことが示された。

SPTRN-1の過剰発現および人為抑制の処理を施した細胞内のCATタンパク質発現量の変化は、相互に矛盾を生じることなく、SPTRN-1が外来CATタンパク質発現の抑制に関与したことが明らかとなった。SPTRN-1がRNA結合タンパク質ホモログであることから、SPTRN-1が直接作用する標的はRNAであると考えられる。TIA-1同属タンパク質に特有であるRRM1、2、3の繰り返し配列を有し、特にRRM2の機能性アミノ酸配列が完全に保

存されていることから、SPTRN-1にもpoly(A)およびpoly(U)に特異結合する性質があるものと考えられる。一般にpoly(A)およびpoly(U)はタンパク質合成の鋳型となる転写産物の調節配列、すなわち5'-および3'-の非翻訳領域やpoly(A)テール部分に多く含まれている。特に、転写終結シグナルのすぐ上流にAU-rich配列が存在すると、そ

の転写産物の寿命が短くなることが知られている[14]。このような観点から、SPTRN-1はCATタンパク質発現制御においてCAT転写産物の非翻訳領域に存在する標的配列と相互作用したと推察される。これらを確認していくためには、本研究で行ったSf21細胞内のSPTRN-1過剰発現細胞における転写産物のノーザンブロットング等による量的解析を行い、リポータータンパク質量の変化とその転写産物存在量との直接的関連を示す必要性が残されている。

3. 3 SPTRN-1の中腸組織内発現解析

このSPTRN-1 mRNAの発現変動を調べるにあたり、事前の検討ではSPTRN-1がシングルコピー遺伝子であり、単一mRNA (約2.0kb) の発現量レベルが十分ではないことから、全RNAのノーザンブロットングによる解析は困難であることが考えられた (data not shown)。したがって、mRNAの部分配列を増幅するreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を利用した発現変動解析を進めた。6 齢0日目から蛹期1日目までのハスモンヨトウ中腸の全RNAを鋳型とするRT-PCRにより、SPTRN-1 mRNAの発現変動について調べた。なお、内部標準として28SリボソームRNAに対するcDNAを増幅するRT-PCRを同様に行った。電気泳動—エチジウムブロマイド染色のパターンから、用いたサンプル間でのリボソームRNA量にほぼ差異は認められなかった (Fig.3)。一方、6 齢2.5日目まではわずかなSPTRN-1 mRNAの発現がみられたが、3日目のガットパージ直前の時期から急にその発現量が増加し、3.5日目に極大となった。その後、蛹化0日目までにSPTRN-1 mRNAの存在量は減少していった (Fig.3)。

同じチョウ目のカイコにおいて、幼虫から蛹への変態過程における組織の経時的な構造変化や構成成分の変動についてはすでに調べられている。すなわち、ガットパージ直後より幼虫型旧皮膜細胞 (円筒および盃状細胞) は内腔への脱落が起こり、その後徐々に旧皮膜は退化する[15,16]。また、摂食期における幼虫の消化管では多量の消化

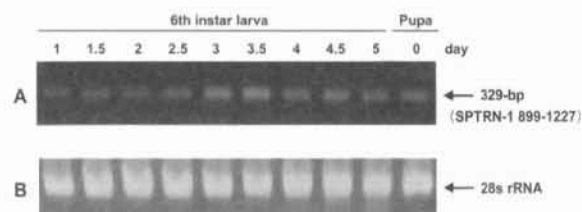


Fig.3. SPTRN-1 gene expression during the normal development of *Spodoptera litura* midgut tissues. Reverse transcriptase polymerase chain reaction method of total RNAs extracted from midguts on the indicated day of the 6th instar larva or pupa were performed by using the primers specific for the SPTRN-1 cDNA and the amplified DNA band was electrophoresed in an 1.2% agarose gel (panel A). For the internal standard, 28S ribosomal RNA band for each same RNA sample was separated in the agarose gel under the denaturing condition and detected with ethidium bromide (panel B).

酵素タンパク質遺伝子の活発な発現が見られるが、ガットパージ以降の変態過程では急激に消化管組織の幼虫期タンパク質と消化酵素タンパク質やそれらの転写産物の消失が観察され、これ以降は急激な消化管細胞の脱落や崩壊へと進む[15,17]。ハスモンヨトウ個体においても同様の変化が起こっているものと考えられる。中腸における SPTRN-1 mRNAの存在量が極大となるのはガットパージが起こる時期であり、SPTRN-1はハスモンヨトウ中腸の幼虫—蛹変態過程の旧ステージ転写産物が消失する時期においても、特に重要な役割、すなわちこの昆虫個体においてSPTRN-1は細胞内転写産物の排除に関連した役割を持つことが考えられる。さらにSPTRN-1が旧ステージの不要転写産物を効率的に排除し、速やかな新組織の構築に貢献していると推察される。

本研究で示された通り、SPTRN-1の人為抑制処理が有効であり、培養細胞内で外来タンパク質の発現が上昇する結果が示されたことは、今後昆虫の外来タンパク質発現系を改良していく上でも非常に重要である。これまでに、チョウ目昆虫の細胞は外来タンパク質発現系に広く用いられてきたが、バキュロウイルスの強力な転写プロモーターを用いた場合でも期待どおりの発現が得られない場合もあった。本研究で示したアンチセンスオリ

ゴヌクレオチドによるSPTRN-1の人為抑制は今のところ一過性なものであっても、確かに外来タンパク質発現の効率化に有効であることを示した。さらなるタンパク質発現の効率化を目指すためには、長期的にSPTRN-1を人為抑制した細胞を用いて高度発現ベクターからのタンパク質発現を検討しなければならない。長期にわたってSPTRN-1発現を抑制しようとするならば、その都度アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトし続ける手法に頼らず、SPTRN-1の部分配列をコードするショートヘアピン型RNAの塩基配列を挿入した発現ベクターを細胞へ導入することにより、SPTRN-1の発現レベルを低下させた細胞を作出することが必要であると考えられる。また、カイコやヤガ科昆虫に留まらず、他のチョウ目昆虫におけるTRN-1同属タンパク質が関係すると予想されるタンパク質産生機構の解明、また培養細胞における長期ノックダウン系を確立させることで、昆虫細胞発現系のさらなる改良が期待できる。

引用文献

- [1] Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994) : Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621
- [2] Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991) : RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220
- [3] Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1991) : A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629-639
- [4] Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1992) : Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8681-8685
- [5] Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P. (2001) : Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-1268
- [6] Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (2000) : RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431-1442
- [7] Gatto-Konczak, F.D., Bourgeois, C., Guiner, C.L., Kister, L., Gesnel, M.-C., Stevenin, J., and Breathnach, R. (2000) : The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell Biol.* 20, 6287-6299
- [8] Guiner, C.L., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., and Gatto-Konczak, F.D. (2001) : TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 40638-40646
- [9] Brand, S., and Bourbon, H.-M. (1993) : The developmentally-regulated *Drosophila* gene *rax8* encodes an RRM-type RNA binding protein structurally related to human TIA-1-type nucleolysins. *Nucleic acids Res.* 21, 3699-3704
- [10] Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K.B., Storey, J.S., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y., and Furusawa, T. (2003) : De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene* 320, 67-79
- [11] アンチセンスオリゴによる遺伝子発現の調節. 実験医学別冊, 細胞工学ハンドブック

- (黒木ら編), 160-168, 羊土社
- [12] Abraham, D., Ryrholm, N., Wittzell, H., Scoble, M.J., Holloway, J.D., and Lofstedt, C. (2001) : Molecular phylogeny of the subfamilies in Geometridae (Geometroidea : Lepidoptera). *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 65-77
- [13] Anderson, P., and Kedersha, N. (2002) : Stressful initiations. *J. Cell. Sci.* 115, 3227-3234
- [14] Shaw, G., and Kamen, R. (1986) : A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667
- [15] Waku, Y., and Sumimoto, K. (1974) : Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. II. Electron microscopy. *Tissue cell* 6, 127-136
- [16] 赤井 弘 (1976) : 昆虫超微形態学. 237-285, 東京大学出版会
- [17] Kotani, E., Niwa, T., Tokizane, M., Suga, K., Sugimura, Y., Oda, K., Mori, H., and Furusawa, T. (1999) : Cloning and sequence of a cDNA for a highly basic protease from digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 8, 299-304

細胞内タンパク質発現を調節するカイコRNA結合 タンパク質の選択的スプライシング

小谷英治*・林 幸之**・三好 明**

Alternative Splicing of the RNA-binding Protein, BmTRN-1, which is a Regulator of Cellular Transcripts in the Silkworm, *Bombyx mori*

Eiji KOTANI*, Yoshiyuki HAYASHI** and Akira MIYOSHI**

**Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Kitano Shimo-Hakubai-cho,
Kita-ku, Kyoto606-8326, Japan

Abstract

A TIA-1-type RNA-binding protein (BmTRN-1) identified from midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, has significant homology with human TIA-1 and TIAR recently reported to function as important factors for either splicing or translation. In addition to the full-length BmTRN-1 mRNA encoding the 388 amino acid sequence (42.5k TRN-1), a small type BmTRN-1 mRNA encoding 137 amino acid sequence (15.1k TRN-1) was expressed in the cultured cell line. Cloning and analysis of genomic DNA for BmTRN-1 locus showed that both of 42.5k TRN-1 mRNA separated by four exon and 15.1k TRN-1 mRNA separated by two exon have the splice donor/acceptor site in accordance with the GU-AG consensus rule. Overexpression of the 15.1k TRN-1 in the BmN4 cells caused reduction of the concomitant protein expressions from the reporter genes. From these experiments, it was indicated that 15.1k BmTRN-1 essentially functioned the control of the protein production and life-time of the transcripts in BmN4 cells.

1. まえがき

RNA認識配列 (RNA-recognition motif, 以後 RRMと略す) を持つRNA結合タンパク質群は、さまざまな生体内過程における機能性RNAの調節・制御に関わると考えられている[1,2]。RRM含有RNA結合タンパク質群の中で哺乳類から発見されたTIA-1およびTIARは、アポトーシス誘導性の細胞核崩壊機能を持つ顆粒内成分として同定され[3,4]、その後の詳細な研究から哺乳類翻訳機構、および細胞死関連遺伝子のmRNAスプライシングに関連した重要な働きを持つことも判明し

てきた[5-8]。

昆虫種では、ショウジョウバエからTIA-1同属群の相同性遺伝子 (*Rox8*) が単離されており、蛹期の卵形成に関わる可能性が示唆されている[9]。カイコでもTIA-1相同性遺伝子の単離が行われてきた (カイコTIA-1-related nucleolysin, BmTRN-1) [10,11]。Kotaniら (2003) が報告した遺伝子解析結果では、BmTRN-1は388個のアミノ酸配列からなり、N末端側には*Rox8*およびTIA-1と同様のRRM領域の繰り返しも存在した。また大腸菌を用いて調製した組換えタンパク質による解析から、BmTRN-1の1および2番目のRRM領域

* 連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail : kotani@kit.ac.jp、TEL 075-724-7774、FAX 075-724-7760

にpoly(A) およびpoly(U)RNAに対する結合活性が認められ、このRRM領域の組換えタンパク質をトランスフェクション法で取り込ませたカイコ培養細胞内においてDNA断片化が観察された[10, 11]。さらにBmTRN-1のmRNA存在量は幼虫-蛹変態期に上昇することも明らかとなった。加えて、BmTRN-1の培養細胞内における恒常的な発現を人為的に抑制した場合に、発現ベクターによる外来タンパク質の発現量増加および外来転写産物の存在量増加が認められた。これらの結果から、BmTRN-1は変態期に不要となるH組織の転写産物の効率的な排除に重要な役割を持つことが推察される[10]。

最近、詳細な遺伝子解析を繰り返した結果、カイコBmTRN-1遺伝子からすでに報告した約2.0kbのメッセンジャーRNAに加えて、選択的スプライシングにより低分子メッセンジャーRNAも発現していることが明らかとなった。このことから、2種類のBmTRN-1タンパク質が細胞内に生じ、これらが相互に関連した役割を持つと考えられる。そこで、新たに見出した低分子BmTRN-1 (15.1k TRN-1) の機能を明らかにするため、カイコ染色体遺伝子の解析と細胞内過剰発現の影響解析を行った。

2. 材料および方法

2.1 遺伝子解析

カイコ遺伝子ライブラリーから、翻訳可能領域にあたるBmTRN-1 cDNAの(-3)-300を増幅するPCR法を利用して、農林水産省生物資源研から提供いただいたBACライブラリーからこの領域をカバーするクローンを得た。BmTRN-1コード領域の塩基配列をすべて決定し、BmTRN-1のエキソン・イントロンの構成を調べた。

2.2 培養細胞内でのタンパク質発現解析

培養細胞にはカイコ胚山米BmN4細胞を用いた。細胞の継代には、ESF921 (Expression Biosystems co.社製) に14%仔牛胎児血清 (Gibco社製) を混和した培地を使用した。15.1k TRN-1のタンパク

質発現への影響を調べる目的で、以下の操作を行った。すなわち、シャーレの単層細胞 (0.4×10^5) に、低分子の15.1k TRN-1の翻訳可能領域全てをクローニングサイト内に挿入したpIZ/Hisベクター (インビトロジェン製、 $0.5 \mu\text{g}/\text{dish}$) とレポーター遺伝子 (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 翻訳可能領域を昆虫細胞内で発現するpIZ/His-CATベクター ($0.5 \mu\text{g}/\text{dish}$) を同時にFuGENE6 (ロシユ社製) をvehicleに用いてトランスフェクトした。対照として、レポーター遺伝子のみが発現する細胞ないしはレポーター遺伝子とともにカイコ高塩基性プロテアーゼ部分配列が発現する細胞についてもCATベクターを形質転換することにより作出した[10]。

また、タンパク質発現の強さを測るためのレポーター遺伝子として、もう一種類カイコ由来のタンパク質を用いた。すなわちカイコ独自のタンパク質に対するBmTRN-1の反応性を調べるために、すでに報告されたセリシンIA遺伝子の翻訳可能領域の細胞内発現を検討した[12]。セリシンIAはアミノ酸番号205番目以降にセリンに富む38アミノ酸から成るほぼ完全な繰り返し構造が8個含まれており、これが原因してPCRによる遺伝子断片の調製が不可能であった。このためアミノ末端から250残基までの分泌シグナルや1個目の繰り返しドメインを含む領域を細胞内で発現させた。またセリシンIA遺伝子は、九州大学農学部遺伝資源開発研究センターから提供いただいたNd系統の吐糸1日前の前部糸腺のcDNAを鋳型にPCR法で調製した。

発現産物はCATとセリシンIAともにベクターから発現する際にC末端に付加されるパラミクソウイルスV5アンチゲンに対する特異抗体を用いたウエスタンブロットティングで検出した。

2.3 発現産物の検出

(1) ウエスタンブロットティング

ウエスタンブロットティングにおいては、Hybond-Pメンブラン (アマシャム社製) 上のタンパク質を、ブロッキング剤を含むリン酸緩衝液pH7.4中で5000倍希釈の一次抗体および二次抗体の反応に

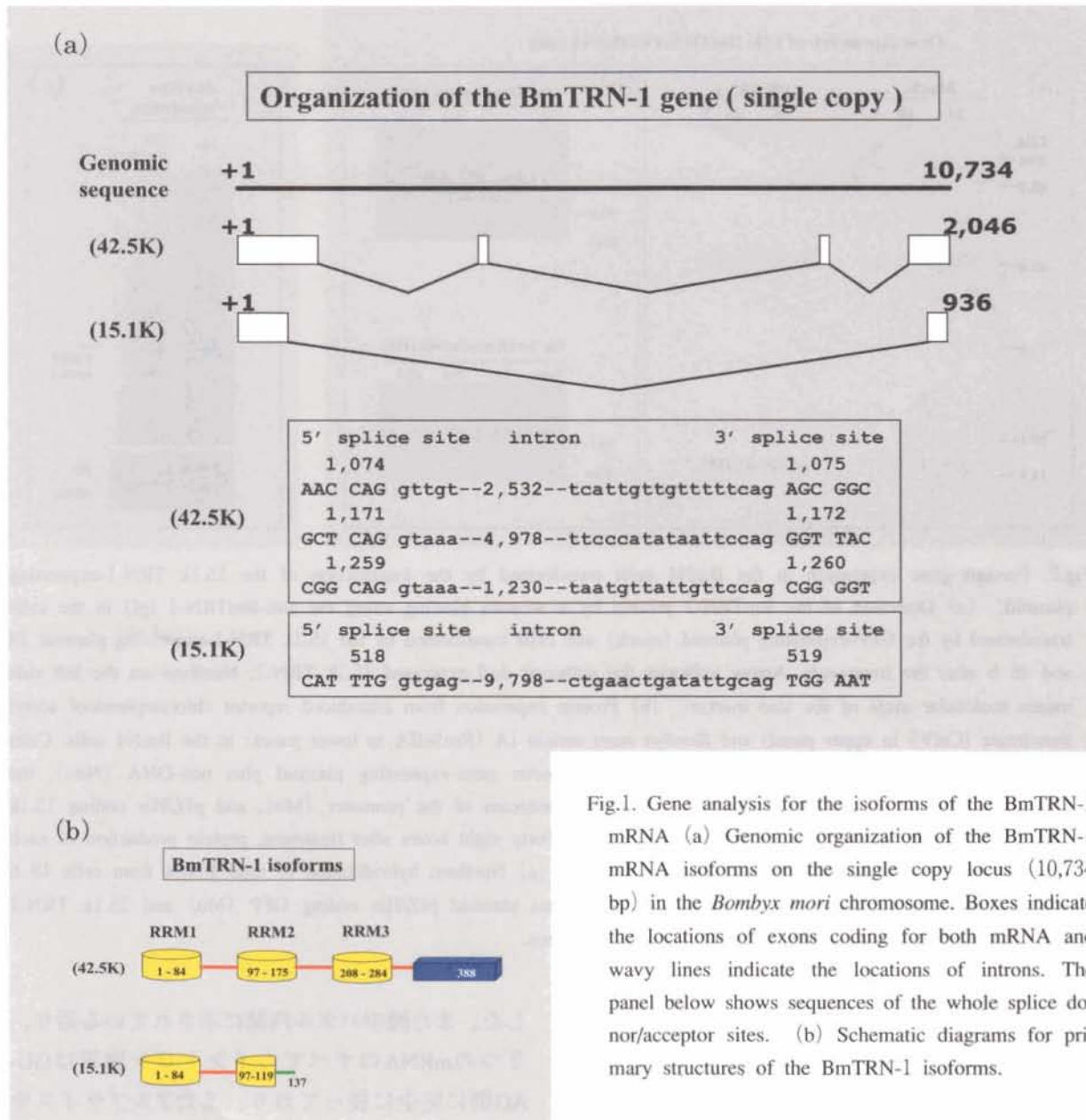


Fig.1. Gene analysis for the isoforms of the BmTRN-1 mRNA (a) Genomic organization of the BmTRN-1 mRNA isoforms on the single copy locus (10,734 bp) in the *Bombyx mori* chromosome. Boxes indicate the locations of exons coding for both mRNA and wavy lines indicate the locations of introns. The panel below shows sequences of the whole splice donor/acceptor sites. (b) Schematic diagrams for primary structures of the BmTRN-1 isoforms.

より検出した。検出にはアマシャム製のECL-plusを用いた。

(2) ノーザンブロッティング

CAT遺伝子発現過程にある細胞からトータルRNAを抽出し、CAT翻訳可能領域をコードするDNAプローブを用いてmRNA量を検討した。上述したトランスフェクト処理後の細胞からAGPC法によりRNAを調製し、10 μ g/laneの濃度で変性処理して得られるサンプルを変性ゲル中で電気泳動させた。ナイロンフィルター（アマシャム社製）上で泳動後の核酸と、ラベルしたプローブとを反応させ、ジーンイメージキット（アマシャム社製）

により特異バンドを発光させた。

3. 結果および考察

培養細胞BmN4からの抽出核酸を用いて、カイコBmTRN-1に関するPCR増幅によりcDNA解析を行う過程で、すでに報告した完全長BmTRN-1のcDNAに比べ明らかに低分子のmRNAがカイコ培養細胞や組織（中腸）に発現していることが判明した。この低分子性のBmTRN-1 mRNAの遺伝子解析を進めるとともに、さらにカイコ染色体のBmTRN-1遺伝子（全長10,734bp）の配列解析を

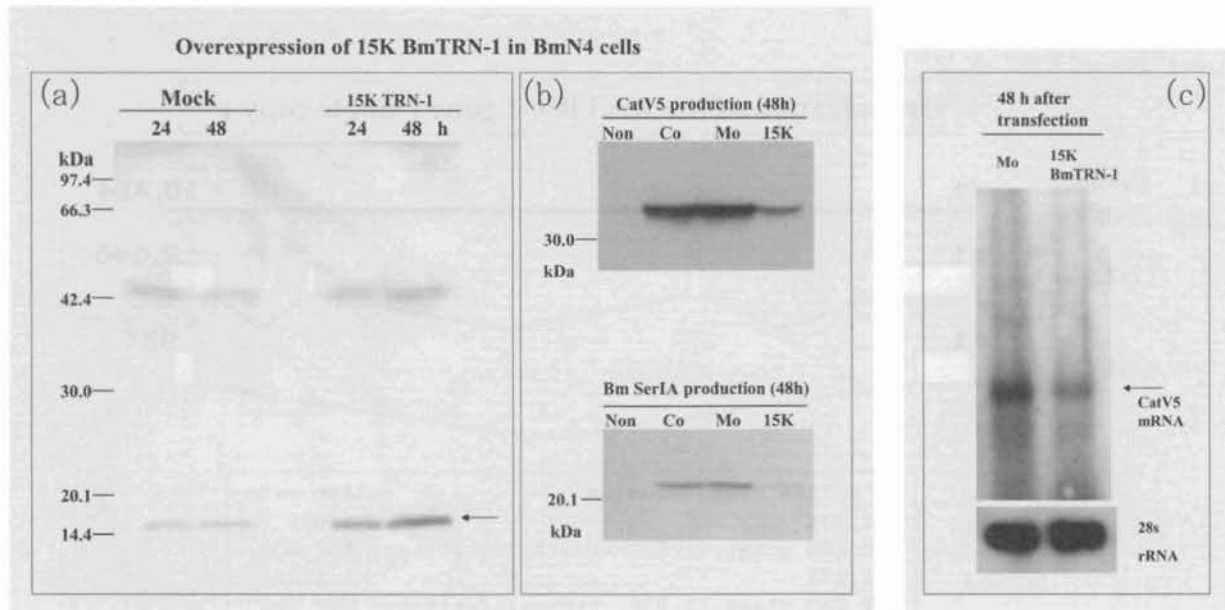


Fig.2. Foreign gene expression in the BmN4 cells transformed by the transfection of the 15.1k TRN-1-expressing plasmid. (a) Detection of the BmTRN-1 protein by a western blotting using the anti-BmTRN-1 IgG in the cells transformed by the GFP-expressing plasmid (mock) and cells transformed by the 15.1k TRN-1-expressing plasmid 24 and 48 h after the treatments. Arrow indicates the authentic and expressed 15.1k TRN-1. Numbers on the left side means molecular mass of the size marker. (b) Protein expression from introduced reporter chloramphenicol acetyl transferase (CatV5 in upper panel) and *Bombyx mori* sericin IA (BmSerIA in lower panel) in the BmN4 cells. Cells were treated with the FuGene6 vehicle containing reporter gene-expressing plasmid plus non-DNA (Non), the plasmid pIZ/His (Co), pIZ/His coding GFP at the downstream of the promoter (Mo), and pIZ/His coding 15.1k TRN-1 ORF at the downstream of the promoter (15k). Forty eight hours after treatment, protein production of each reporter gene was investigated by the western blotting. (c) Northern hybridization of total RNAs from cells 48 h after treatment with reporter gene-expressing plasmid plus plasmid pIZ/His coding GFP (Mo) and 15.1k TRN-1 (15k) by using a probe coding for CatV5 cDNA sequence.

行い、BmTRN-1のエクソン・イントロン構成を明らかにした。

Fig.1(a) に示されるように、BmTRN-1遺伝子からは分子量42.5kのタンパク質をコードする2046b (poly Aテールを除く) のmRNAと、936b mRNAの少なくとも2種類が転写されていることが判明した。Kotaniら (2003) の記述では、変態期中腸を試料とするRNA検出により2046b mRNAの1種類が見出されており、この際936b mRNAの存在は明らかにされなかった[10]。このことは、936b mRNAが変態期組織中では多量に存在しないことを示唆している。

2046b mRNAは4つのエクソンからなり、一方936b mRNAは2つのエクソンから構成され、2046b mRNAの第1エクソンと第4エクソンのコード領域中に936b mRNAのイントロン境界が存在

した。また図中パネル内部に示されている通り、2つのmRNAのすべてのイントロン境界はGU-AG則に完全に従っており、また3'スプライスサイトのCAGの配列の手前14baseがピリミジンに富むという点でも境界配列の特徴を示していた。

またFig.1(b) に示される通り、2046b mRNAにはすでに報告した388アミノ酸配列から成る完全長BmTRN-1 (42.5k TRN-1) がコードされており(上図)、936b mRNAには翻訳可能領域の欠失とアミノ酸読み枠のシフトを伴って生じた137アミノ酸配列 (15.1k TRN-1) が認められた。また15.1k TRN-1には、完全長42.5k TRN-1に存在する3つのRNA認識配列 (RRM配列) の繰り返しのうち、RRM2とRRM3が欠失していた。TIA-1ファミリーのRRMは活性の強さに違いがあるものの、RRM1とRRM2にpoly A・poly U結合活性がある

とされている。RRM配列の一次構造の違いから42.5kと15.1k TRN-1との間にはRNA認識において違いが生じていると推察される。また一般にTIA-1ファミリーのカルボキシル末端領域には細胞内局在化などに関する領域がある(図中のbox)とされているが[3,4,10]、15.1k TRN-1にはこれにあたる領域が見られず、したがって両アイソフォームの機能部位には隔たりがあることも示唆される。

この15.1k TRN-1を細胞内で強制発現させ、タンパク質発現調節機能について調べた。Fig.2(a)に示されるように、15.1k TRN-1アイソフォームを強制発現させた細胞区(24および48時間の細胞)ではmock処理区に比べ、明らかに強く15k付近のバンドが検出された。したがって、本実験操作で15.1k TRN-1過剰発現細胞が作出できたと判断される。15.1k TRN-1過剰発現細胞において顕微鏡観察で識別できるレベルの細胞死は検出できなかった。

15.1k TRN-1過剰発現細胞内でレポーター遺伝子の発現を試みたところ(Fig.2(b))、対照区のレポーター遺伝子導入区およびレポーター+mock遺伝子発現区ではCATタンパク質の発現が見られたが、15.1k TRN-1の同時強制発現によりこのCATタンパク質発現量は強く抑制された。

セリシンIAをレポーター遺伝子とした場合もCATの場合と同様に、15.1k TRN-1の強制発現により産物生産量は著しく抑えられた。このことは、カイク由来産物に対しても15.1k TRN-1の影響があることを示している。

また、CAT発現の実験に用いた細胞のRNAに対してノーザンブロッティングを行い、CAT転写産物量をmock導入区と比較した。その結果、タンパク質生産量の変化に対応するように、mockに比べて15.1k TRN-1過剰発現細胞ではCAT転写産物の存在量が低下していた。

こうした結果から、15.1k TRN-1にはタンパク質の転写産物の存在量を低下させることによりタンパク質発現を制御する働きがあることが示唆された。15.1k TRN-1タンパク質の一次構造には、RRM領域のみがコードされているため、完全長42.5k TRN-1とは異なる細胞内局在を示す可能性

があることをすでに述べた。RRM領域は塩基性が強く、核酸との親和性も強いことから、15.1k TRN-1は核内に局在することも考えられる。一方42.5k TRN-1は、カルボキシル末端にリソソーム移行シグナル相当配列も見られるため[10,11]、細胞質で働く可能性も考えられる。もしこの推察が正しければ、核に移行した15.1k TRN-1は転写産物が細胞質に移行する前にすでに転写産物調節機能を発揮することになり、したがって翻訳開始複合体形成の段階を阻害することにより翻訳効率を低下させ、転写産物の寿命を短縮させる働きを持つことも予想される。これに対し、細胞質で機能して転写産物制御に関わると考えられる42.5k TRN-1には、転写終了後の不要転写産物や不完全転写開始複合体のリソソームにおける効率的排除の機能をつかさどる可能性も考えられる。この推察を支持するように、42.5k TRN-1が中腸組織の変態期の過程で依存的に発現上昇する生体现象も示されている[10]。この考えを明らかにするためには、両者のTRN-1の細胞内局在性の違いを調べる必要性が残される。また、BmTRN-1アイソフォームを個別に人為抑制(ノックダウン処理)する系を構築して、タンパク質発現への影響解析を行うことにより、今後個体を用いたタンパク質発現系の効率化にBmTRN-1人為制御系を導入する上で重要な知見も得られることと期待される。

引用文献

- [1] Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994): Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621
- [2] Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991): RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220
- [3] Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1991): A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67,

- 629-639
- [4] Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1992) : Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8681-8685
- [5] Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P. (2001) : Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-1268
- [6] Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (2000) : RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431-1442
- [7] Gatto-Konczak, F.D., Bourgeois, C., Guiner, C.L., Kister, L., Gesnel, M.-C., Stevenin, J., and Breathnach, R. (2000) : The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell Biol.* 20, 6287-6299
- [8] Guiner, C.L., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., and Gatto-Konczak, F.D. (2001) : TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 40638-40646
- [9] Brand, S., and Bourbon, H.M. (1993) : The developmentally-regulated *Drosophila* gene *rox8* encodes an RRM-type RNA binding protein structurally related to human TIA-1-type nucleolysins. *Nucleic acids Res.* 21, 3699-3704
- [10] Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K.B., Storey, J.S., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y., and Furusawa, T. (2003) : De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene* 320, 67-79
- [11] Ohba, T., Saito, H., Sugimura, Y., Furusawa, T., and Kotani, E. (2004) : Induction of genomic DNA fragmentation by introduction of the BmTRN-1 RNA binding domain into cultured cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.* 73, 57-60
- [12] 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

カイコ抗菌タンパク質遺伝子転写制御因子の ノックダウンに関する研究

森山悠子*・田中博光**・山川 稔**・林 幸之***・森 肇*¹

The Down Regulation of Transcriptional Regulatory Factor of Antibacterial Peptide Genes in *Bombyx mori*

Yuko MORIYAMA*, Hiromitsu TANAKA**, Minoru YAMAKAWA**,
Yoshiyuki HAYASHI*** and Hajime MORI*¹

*Insect Biomedical Research Center, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8585, Japan

**National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

***Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, Shimohakubai-cho 29,
Kitano, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

RNA interference (RNAi) induces a silencing of a target gene and is available to identify of the gene function in many animals, leading to reverse genetics. The transgenic silkworm, *Bombyx mori*, was constructed by the method which couples recombinant baculovirus (AcNPV) with the use of the *piggyBac* transposable element. RNAi of a transcriptional factor BmCactus for antibacterial peptide genes was studied by real-time RT-PCR. Expression of antibacterial genes (Attacin, CecropinA, CecropinB, Moricin, Lbocin1.2, Lbocin3, and Lbocin4) and a transcriptional factor BmRel for antibacterial peptide genes was also analyzed by real-time RT-PCR. These expressions were normalized against 30K as an endogenous reference, because 30K protein is a major protein in silkworm. Repression of BmCactus induced the down regulation of expression of BmRel and expression of antibacterial peptide genes was also inhibited upon infection with gram-positive bacteria in transgenic silkworm in which BmCactus gene was repressed, suggesting that BmCactus interacts with BmRel. This interaction has also confirmed by Yeast two hybrid assay *in vivo* and GST pull down assay *in vitro*. Cactus inhibits antibacterial peptide genes and Rel (Dif) activates antibacterial peptide genes in *Drosophila*, whereas BmCactus interacts with BmRel in silkworm. The gene expression cascade of antibacterial peptides discussed in *Drosophila* may not be applied to the silkworm *Bombyx mori*.

Key Words : Silkworm, Knockdown, RNAi, antibacterial peptide

1. 緒言

昆虫の生体防御はすべて自然免疫によっておこなわれているが、その主要な防御反応として①血球細胞による貪食②血球細胞が貪食できない大形異物周囲での被囊形成③メラニン合成④血液凝固

⑤抗菌タンパク質の合成の5つが知られている。

この中で、注目されている研究として抗菌タンパク質遺伝子の発現が挙げられる。

昆虫の抗菌タンパク質の研究は、セクロピア蚕 (*Hyalophora cecropia*) からCecropin、Attacinが同定されたことによって始まった[1,2]。これらの

* 1 連絡先：京都工芸繊維大学昆虫バイオメディカル研究センター、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail : hmori@kit.ac.jp、TEL 075-724-7776

抗菌タンパク質は、微生物の感染によって大量に脂肪体（哺乳類における肝臓の役割をしている）で合成され、すぐに体液中に産出され侵入してきた微生物を殺す。その後、ショウジョウバエにおいて、微生物の感染によって転写量が過剰に増加するCecropin、Attacin、Defensin、Diptericin、Lysozymeといった抗菌タンパク質が発見され、その遺伝子が同定された[1,2]。さらに、これらの抗菌タンパク質遺伝子のプロモーター領域には、哺乳類における転写因子であるNF- κ Bの結合サイトが共通して見られたことから、NF- κ BホモログであるDorsalが同定された[2]。また、NF- κ B結合サイトに突然変異をもつショウジョウバエの研究で、Dorsalが抗菌タンパク質Diptericin、CecropinA1を調節していることが分ったこと[3,4]、および哺乳類で、NF- κ Bはサイトカインの産生といった自然免疫系の炎症反応を誘導する転写因子として知られていることで、ショウジョウバエにおいても、NF- κ Bが抗菌タンパク質の合成を誘導する因子であると考えられた。すでにショウジョウバエの抗菌タンパク質遺伝子の発現の仕組みについてはToll経路とImd経路の二種類の抗菌タンパク質遺伝子の発現経路の存在が知られている。Toll経路は主にグラム陽性菌に、Imd経路はグラム陰性菌による感染で抗菌タンパク質遺伝子の発現が活性化されると考えられている。Toll経路を介して活性化されるNF- κ BホモログはDorsal、Difであり、Imd経路を介して活性化されるNF- κ BホモログはRelishである。また、Toll経路ではDorsal、Difの抑制因子としてCactusが存在しており、Imd経路ではこのRelishが活性化と抑制の両方の機能を有している。

一方、カイコにおける抗菌タンパク質は脂肪体で合成されており、Cecropin、Attacin、Lebocin、Moricin、Lysozymeが報告されている。これら抗菌タンパク質のプロモーター領域の解析から、ショウジョウバエの抗菌タンパク質と同様に転写因子NF- κ Bの結合配列が存在していることが知られており、微生物感染によってカイコにおけるNF- κ BホモログがCecropin、Attacin、Lebocin、Moricinの発現に関わっていることが報告されている。

また、このカイコで見つかったNF- κ Bホモログは、Relタンパク質でありショウジョウバエと同様にNF- κ B/Relファミリーに属す転写調節因子で、抗菌タンパク質発現時に多く存在していることが知られており、カイコの抗菌タンパク質発現経路がショウジョウバエ、さらにはヒトの自然免疫系と類似なメカニズムを示していると予想される。近年、Toll、Cactus、Rel（ショウジョウバエではDorsal）、Relishに相同な遺伝子がカイコより単離された[5]。しかしながら、カイコにおける抗菌タンパク質遺伝子の発現誘導システムの全容は明らかにされていない。そこで、BmRel遺伝子をノックダウンしたトランスジェニックカイコでの解析がなされたが[6]、BmRelノックダウンカイコでは、すべての抗菌タンパク質遺伝子の発現が制御されていた。さらに、BmRelノックダウンカイコは、グラム陽性菌の投与により、転写量の増加が見られたことからBmRelはショウジョウバエのDorsalやDifと同様、Toll経路によって活性化される転写因子であると考えられた。また、BmRelには、alternative splicingにより2つのタイプのmRNA（BmRelAとBmRelB）転写されることが近年明らかになった。RelBはRelAと比べ5'側の241bpが欠損しており、その結果52個のアミノ酸が欠損している。RelAとRelBそれぞれがどの抗菌タンパク質遺伝子の発現に関与しているかは不明である。

本研究では、BmCactusノックダウンカイコを作製し、グラム陽性菌*Micrococcus luteus*によって抗菌タンパク質遺伝子発現を誘導した場合、BmCactusノックダウンカイコとコントロールカイコでは抗菌タンパク質遺伝子、およびその転写因子であるBmRelA、BmRelBの遺伝子発現にどのような影響が生じるのかをリアルタイムPCRを用いて解析した。

2. 材料及び方法

2.1 トランスファーベクター-pVLPigCactusの構築と精製

始めに、トランスポゾンpiggyBacとクラゲ由来

の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) の65番目のセリン残基をスレオニンに置換したEGFP (enhanced GFP) 遺伝子の配列を含むプラスミドpVLPigEGFPにカイコ細胞質アクチンプロモーター (以下A3プロモーター) 断片を挿入した[7]。まず、A3プロモーター断片は、A3プロモーターを含むプラスミドpBmEGFPを鋳型にして制限酵素EcoT22 I サイトを付加したプライマーA3Eco (5'-AAAAATGCATTGATAGCGTGCGCGTTACCA-3') と制限酵素Pst I サイトを付加したプライマー A3RPstI (5'-AAAACCTGCAGGAATGCGCACTGTTGAGCA-3') を用いて、94℃で2分間加熱した後、94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 60秒の温度周期を30回繰り返すPCR反応によりA3プロモーター領域を増幅した。PCRのポリメラーゼには、より増幅精度の高いKOD-Plus- (TOYOBO社製) を用いた。反応にはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社製) を使用した。増幅させたPCR産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて付属のプロトコール通りに精製し、40 μ lの滅菌水に溶出した。溶出したPCR産物は、制限酵素EcoT22 I とPst I で処理し、フェノール抽出した後、エタノール沈殿を行った。

エタノール沈殿後の反応液10 μ lに2 μ lの6 \times sample buffer (0.25% [w/v] Bromophenol blue, 30% [v/v] Glycerol) を加え、1% アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後、0.1% [w/v] エチジウムブロミド溶液で染色し、紫外線照射によって検出された約180bpの目的断片を含むゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて付属のプロトコールどおりにDNA断片を抽出し、エタノール沈殿後、10 μ lの滅菌水に溶解した。次に、pVLPigEGFPを制限酵素EcoT22 I とPst I で処理した後、フェノール抽出・エタノール沈殿を行い10 μ lの滅菌水に溶解した。さらに、このプラスミドの末端を脱リン酸化するためにBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理を37℃で1時間行った。

BAP処理後、等量のフェノール抽出、さらにジエチルエーテルによる抽出を繰り返し、この操作

を3回行った後、エタノール沈殿をして10 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。このプラスミドとインサートDNAとして前述のA3プロモーターのPCR産物を混合し、DNA Ligation Kit ver.2 (TaKaRa社製) 用いて16℃で3時間インキュベートし、ライゲーション反応を行なった。

ライゲーション反応後、適当に希釈した反応液をJM109 Competent Cells 50 μ lに混ぜて形質転換を行った。形質転換した大腸菌は2 \times TYプレートに蒔き37℃で一晩培養した。次いで、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5mlの2 \times TY培地で一晩振とう培養した。培養した菌体を遠心して集菌し、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega社製) を用いてプラスミドDNA、pVLPigEGFPA3を抽出した。インサートの確認は、DNAシーケンス解析によって行なった。シーケンスはABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製) を用いて、Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing法で行なった。反応にはBigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製) を使用しサンプルの調整はキットのプロトコールに従って行なった。なお、シーケンスに用いたプライマーは、Fig3-4 (5'-TCCAGAAACAACCTTTGGCAC-3') である。

次に、RNAiを誘導するヘアピン構造を構成するCactusの断片 (逆方向) をpVLPigEGFPA3に挿入した。まず、Cactusの断片は、カイコCactus (BmCactus) 遺伝子のcDNAがクローニングされたプラスミドpBSsk(-)/BmCactus (Tanaka *et al.*, under submission) を鋳型にして制限酵素サイトBgl II を付加したプライマーCACT-Bg (5'-AAAAAGATCTATGAGTGCCAAAAAAGATTC-3') とPst I を付加したプライマーCACT-Pst1-3 (5'-AAAACTGCAGGTTGTAGTTCTTCTGCTCCA-3') を用いて94℃で2分間加熱した後、94℃ 15秒、55℃ 30秒、68℃ 60秒の温度周期を30回繰り返すPCR反応により逆方向のCactusの領域を増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用いた。増幅された逆方向のCactusのDNA断片を含むPCR産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて精製した

後、エタノール沈殿して滅菌水に溶解した。そして、制限酵素 *Bgl* II と *Pst* I で処理を行いフェノール抽出、エタノール沈殿を行った後、1%アガロースゲルで電気泳動を行い約600bpの目的断片を含むゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いてDNA断片を抽出し、エタノール沈殿後、10 μ lの滅菌水に溶解した。次に、pVLPigEGFPA3を制限酵素 *Bgl* II と *Pst* I で処理を行った後、BAP処理をした後、等量のフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出を繰り返す操作を3回行った後、エタノール沈殿をして10 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。このプラスミドと前述のCactusのPCR産物をDNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションし、JM109 Competent Cellsへ形質転換した。形質転換した大腸菌は2 \times TYプレートに蒔き37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。そして、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5mlの2 \times TY培地で一晩振とう培養した。培養した菌体を遠心して集菌し、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプラスミドDNA、pVLPigEGFPA3CRを抽出した。インサートの確認は*Bgl* II と *Pst* I による制限酵素処理で行なった。

続いて、SV40ポリA付加シグナルの断片をpVLPigEGFPA3CRに挿入した。まず、SV40ポリA付加シグナル配列を含むpBmEGFPを鋳型にして制限酵素 *Bgl* II サイトを付加したプライマーSV40 *Bgl*2-1 (5'-AAAAAGATCTTCATAATCAGCCATACCACA-3') と SV40 *Bgl*-2 (5'-AAAAAGATCTCACTAGAAATGCAGTGAA-3') を用いて94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C 15秒、55 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 60秒の温度周期を30回繰り返すPCR反応によりSV40ポリA付加シグナルの領域を増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用いた。増幅されたPCR産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて精製した後、エタノール沈殿をして滅菌水に溶解し、制限酵素 *Bgl* II で処理を行いフェノール抽出、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、約200bpの目的断片を含むゲルを切り出してQIAquick Gel Extraction Kitを用いてSV40ポリA付加シグナルのDNA断片を抽出し、エタノール沈殿

後、滅菌水に溶解した。次に、プラスミドpVLPigEGFPA3CRを制限酵素 *Bgl* II で処理を行った後、BAP処理をした後、等量のフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出を繰り返す操作を3回行った後、エタノール沈殿をして10 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。このプラスミドと前述のSV40ポリA付加シグナルのPCR産物をDNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションし、JM109 Competent Cellsへ形質転換した。形質転換した大腸菌は2 \times TYプレートに蒔き37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。そして、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5mlの2 \times TY培地で一晩振とう培養した。培養した菌体を遠心して集菌し、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプラスミドDNA、pVLPigEGFPA3CRSVを抽出した。インサートの方向の確認はDNAシーケンス解析によって行なった。シーケンスに用いたプライマーは、EGFP-N (5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3') である。

最後に、RNAiを誘導するヘアピン構造を構成するCactus (正方向) の断片をpVLPigEGFPA3CR SVに挿入した。まず、逆方向のCactus断片の増幅にも用いたカイコCactus (BmCactus) 遺伝子のcDNAがクローニングされたプラスミドpBS/sk(-) BmCactusを鋳型にし、制限酵素 *Pst* I サイトを付加したプライマーCACT-*Pst*I (5'-AAAAGTGCAGATGAGTGCCAAAAAAGATTC-3') と CACT-*Pst*2 (5'-AAAAGTGCAGCCAGCCTCTCCCTATCGTCA-3') を用いて94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C 15秒、55 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 60秒の温度周期を30回繰り返すPCR反応に正方向のCactusの断片を増幅した。PCRのポリメラーゼにはKOD-Plus-を用いた。増幅したPCR産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて精製した後、エタノール沈殿を行い、滅菌水に溶解した。さらに制限酵素 *Pst* I で処理を行いフェノール抽出、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後、1%アガロースゲルで電気泳動を行い約700bpの目的断片を含むゲルを切り出した後、QIAquick Gel Extraction Kitを用いてDNA断片を抽出し、エタノール沈殿した後、滅菌水に溶解した。次に、プラスミドpVLPigEGFPA3

CRSVを制限酵素*Pst* Iで処理を行った後、BAP処理をした後、等量のフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出を繰り返す操作を3回行った後、エタノール沈殿をして10 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。このプラスミドと前述の正方向のCactusの領域のPCR産物をDNA Ligation Kit ver.2を用いてライゲーションし、JM109 Competent Cellsへ形質転換した。形質転換した大腸菌は2 \times TYプレートに蒔き37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。そして、コロニーを形成した大腸菌を拾って1.5mlの2 \times TY培地で一晩振とう培養した。培養した菌体を遠心して集菌し、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いてプラスミドDNAを抽出し、このプラスミドをトランスファーベクターpVLpigCactusとした。なお、インサートの方向の確認はシークエンス反応を用いた。シークエンスに用いたプライマーは、EGFP-N (5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3')である。

2. 2 リコンビナントウイルスAcpigCactusの作製

まず、2. 1で得られたトランスファーベクターpVLpigCactus 1.75 μ l (0.625 μ g)と線状化されたAcNPV (C6)由来のBaculogold[™] Baculovirus DNA 2.5 μ lをファルコンチューブ (15ml)で混合し、滅菌水21.75 μ lで調整した後、Lipofectin

Reagent 4.0 μ lを加え、室温で15分間静置した。次に、35mmシャーレにSf21細胞を吸着させて無血清のGrace培地で洗浄し、新たに無血清のGrace培地を2ml加えた後、先ほどファルコンチューブで混合した全反応液40 μ lをSf21細胞に接種した。その後、27 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、血清を含むGrace培地に交換して再び27 $^{\circ}$ Cで培養した。5日後、培養液を回収し、ファルコンチューブに入れて1,000rpm、5分間の遠心で細胞を沈殿させ、この上清ウイルス液を回収した。次に、新しい35mmシャーレのSf21細胞から培地を取り除き、さきほど回収したウイルス液200 μ lを入れた後、ウイルス液が全体に行渡るように27 $^{\circ}$ Cで1時間 (20分ごとに回しながら) ウイルスを細胞に感染させた。1時間後、2mlの血清培地を入れて27 $^{\circ}$ Cで培養し、4日後にウイルス液を回収した。さらに、ウイルス液を大量に増やすため、細胞培養フラスコ内で培養した細胞に回収したウイルス液を200 μ l接種し、27 $^{\circ}$ Cで4日間培養した。培養後の培養液をファルコンチューブに入れて1,000rpm、5分間の遠心し、上清を回収して、リコンビナントウイルスAcpigCactusを得た (図1)。

2. 3 カイコ卵へのリコンビナントウイルスの接種

産卵直後のカイコ非休眠卵に、2種類の組換え

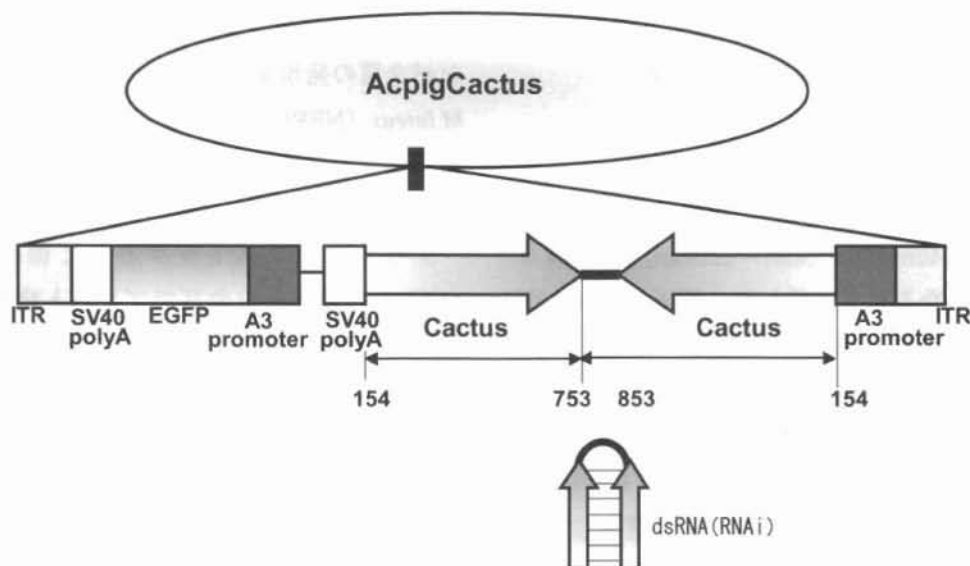


図1 BmCactusノックダウンカイコ作製用組換えウイルス

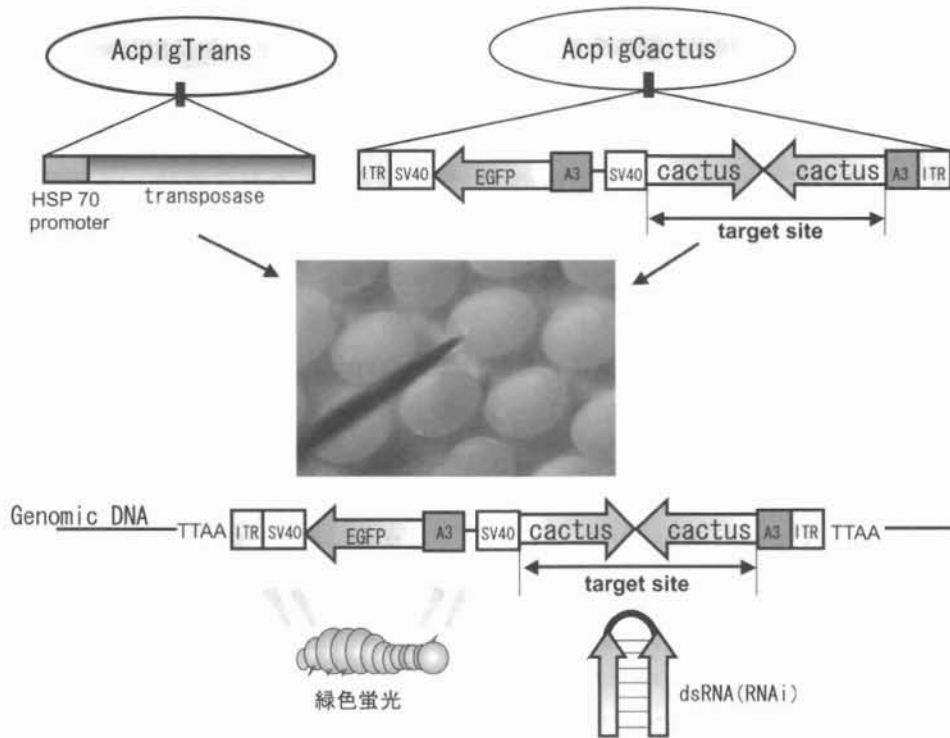


図2 BmCactusノックダウンカセットを作製するためのウイルス接種

ウイルスAcpigCactusとAcpigHspTransを棒鍼で先端を研磨したタングステン針の先端に付け、実体顕微鏡下で卵にインジェクションを行った(図2)。インジェクションした卵は、シャーレ内に湿らせた脱脂綿と共に25℃、暗条件で孵化2日前まで保管した。孵化する2日前にクリーンベンチ内で卵の消毒を行い、孵化した幼虫は4齢起蚕まで29℃で人工飼料育を行った。

2. 4 トランスジェニックカイコのスクリーニング

リコンビナントウイルスを卵にインジェクションしたカイコを4齢起蚕時に、消毒済みのプラスチック容器(45mm×160mm×220mm)に1箱あたり約50頭になるように移した。蛍光ユニットを伴った実体顕微鏡(OLYMPUS社製)を用いてカイコに490nmの紫外線長波長を照射し、EGFPの緑色蛍光の観察を行い、EGFP遺伝子を保有していると考えられる個体を蛍光強度の強いものから、Aクラス、Bクラス、Cクラスとして選抜した。A、Bクラスについてはそのまま飼育を続け、Cクラスや蛍光を示さなかったカイコはそこで飼育

を止めた。選抜したA、Bクラスの形質転換個体は、コントロールのカイコ(一般交雑種の錦秋×鐘和)と交配させ、次世代(F₁)のカイコを得た。さらに、飼育を続け、F₁世代のスクリーニングによって得られた形質転換個体同士を掛け合わせ、ホモ体とした蛹を実験試料として用いた。

2. 5 カイコ接種する菌体の準備

BmCactusノックダウンカイコにおける抗菌タンパク質の発現を見るためにグラム陽性菌である*M.luteus*(NBRC3333、製品評価技術基盤機構)の菌体をカイコに接種した。培地、菌体液の調整は以下のように行なった。

グリセロールストックとして保存してある*M.luteus*の菌体を白金耳でプレート培地に蒔き30℃で48時間かくせん培養した。形成したコロニーを拾って1.5mlの液体培地で30℃、48時間振とう培養した後、この培養液を10 μ lを3mlの液体培地に移し、菌体が対数増殖期に達するOD600=0.7~0.9になるまで約14時間30℃で振とう培養を行った。対数増殖期に達した培養液は、ファルコンチューブに入れ、5,000rpm、5分の遠心により

集菌し、上清を取り除いた後1.5mlのPBSで2回洗浄してから3mlのPBSに懸濁し、120℃で20分間オートクレーブ滅菌しこれを菌体液とした。

2. 6 *M. luteus*の菌体を接種したカイコ脂肪体からのトータルRNA抽出とcDNA合成
吐糸開始5日目のBmCactusノックダウンカイコの蛹に前述の*M. luteus*の菌体液を接種し、2時間後に解剖して脂肪体からRNAを抽出した後、cDNAを合成した。

2. 7 リアルタイムRT-PCRに用いる組換えプラスミドの作製

*M. luteus*で誘導した場合におけるBmCactus、BmRelA、BmRelBおよび各抗菌タンパク質遺伝子の転写量をリアルタイムRT-PCRで解析するために、30Kタンパク質遺伝子を含むプラスミドの作製と以下のそれぞれの遺伝子を導入した組換えプラスミドを作った。今回、導入した目的遺伝子は、抗菌タンパク質遺伝子Attacin (S78369)、CecropinA (D17394)、CecropinB (D11113)、Moricin (AB006915)、Lebocin1.2 (AB003036)、Lebocin3 (AB003035)、Lebocin4 (AB019538)およびRelBである。()内にはジーンバンクデータベースによるアクセッションナンバーを示した。導入配列としてのPCR断片の作製に用いたプライマーは以下に示した。

attacin1-F

(5'-GCTCGCTCTAGACAACGTAAACG-3')

attacin1-R

(5'-CTCAGGTCGTGGTTGTTATTGTG-3')

cecropinA1-F

(5'-CCGTCATAGGGCAAGCGAAATCC-3')

cecropinA1-R

(5'-CGGTCACTCTGAGAAAGGCAATGAC-3')

cecropinB1-F

(5'-GTACAGCGCCGCTTGTGTCTTAAC-3')

cecropinB1-R

(5'-CTTTAGCCGAACCAAGGACCTCG-3')

moricinF-1

(5'-GGCAATGTCTCTGGTGTTCATGTAG-3')

moricinR-1

(5'-CTGGCGATATTGATGGCTCTTAG-3')

lebocin1.2-F

(5'-GCGGCCGCTCAACATGTACAAG-3')

lebocin1.2-R

(5'-CAGTACTTGGCGCACGAGGAAC-3')

lebocin3-F

(5'-CTCGGTGGAAATCATCCCTTTGCC-3')

lebocin3-R

(5'-CTCCAGGTACATTGCAGTGTACTAG-3')

lebocin4-F

(5'-GGCAGTGAATCCGTCATTCCTAACC-3')

lebocin4-R

(5'-CTACAATGCTAACGGACTCGCGC-3')

RelBRT-F2

(5'-GCAGTCGTTCTTCGTGTGACATCG-3')

RelBRT-R2

(5'-CGGCGTCTCCAGCGTGAATG-3')

2. 8 リアルタイムRT-PCR

BmCactusノックダウンカイコとコントロールカイコに*M. luteus*の菌体液を投与して抗菌タンパク質遺伝子の発現を誘導した場合におけるBmCactus、BmRelA、BmRelBおよび各抗菌タンパク質遺伝子の転写量をリアルタイムRT-PCRで調査した。なお、リアルタイムRT-PCRについては、各遺伝子と内部標準30Kタンパク質遺伝子の転写量を比較し30Kの相対値として算出した。なお、これら反応には、組換えプラスミドを作製した時のものと同じプライマーを用いた。また、RelA遺伝子を含むプラスミドはBmRelノックダウンカイコの作製に用いたpBS(sk-)/BmRelAを使用した[6]。プライマーはRelART-F (5'-ACGTGTGTTTCATCCGCGAAGT-3')とRelART-R (5'-CACGAAACCGAAACGCACATT-3')を使用した。

2. 9 *M. luteus*の生菌を注入したときの蛹への影響

BmCactusノックダウンカイコは、*M. luteus*の誘導によってどのような影響が生じるのかを調べるために*M. luteus*の生菌を注入し、様子を観察する

ことでその影響を調べた。比較コントロールとして一般交雑種の錦秋×鐘和を用いた。まず、*M. luteus*の生菌の準備は、2.5で述べた方法を用いた。ただし、今回は生菌を用いるため、オートクレーブはかけなかった。得られた菌体液を原液と 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} に段階希釈したものをそれぞれBmCactusノックダウンカイコとコントロールの5齢1日目の幼虫5頭に50 μ lずつシリンジで投与した。このとき、コントロールとして何も投与しないカイコもそれぞれ用意した。そのまま5頭ずつ飼育をし、成虫まで観察し続け、生存数を調査した。

2.10 Yeast two hybrid 法

*in vivo*でBmCactusとBmRelの相互作用をYeast two hybrid 法で確認した。

まず、BmCactusのORFをコードしているcDNAをprey plasmidであるpGADT7に挿入し、pGAD-BmCactusとした。BmRelのRHDをコードしているcDNAをbait plasmidであるpGBKT7に挿入し、pGBK-BmRelRHDとした。pGAD-BmCactus (prey)とpGBK-BmRelRHD (bait)を酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, AH109)に形質転換した後、ロイシンとトリプトファンを欠損させた最小寒天培地で生育させた。生育した酵母3コロニーを回収し、これらをロイシン、トリプトファン、アデニン、ヒスチジンが欠損し、さらに20mg/mlのa-X-galが添加された最小寒天培地上で生育させた。同様に、ネガティブコントロールとしてSV40のラージT抗原cDNAをprey vectorに挿入したpGADT7-T (prey)とpGBK-BmRelRHD (bait)を形質転換させた場合、pGAD-BmCactus (prey)とマウスp53タンパク質cDNAをbait plasmidに挿入したpGBKT7-53 (bait)場合で行なった。さらに、ポジティブコントロールとしてpGADT7-T (prey)とpGBKT7-53 (bait)で行なった。

2.11 GST pull down 法

*in vitro*でBmCactusとBmRel、およびBmRelishの相互作用を確認した。

まず、BmRelタンパク質、あるいはBmRelishの

RHD領域とGSTの融合タンパク質を大腸菌で発現後、この抽出液にグルタチオン-アガロースビーズを加え、ビーズにGST融合タンパク質を吸着させた。ビーズを相互作用緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.0, 50mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF 1 mM DTT) で懸濁し、 35 S-メチオニンでラベルしたBmCactusタンパク質を加え、混合し、結合反応を行わせた。ビーズを洗浄回収後、SDS電気泳動を行い、泳動後、ゲルをBAS2500用のプレートに感光させBmCactusタンパク質の検出を試みた。

3. 結果

3.1 卵へのウイルスのインジェクション およびトランスジェニックカイコの スクリーニング

リコンビナントウイルスAcpigCactusとトランスポゼースをHSPプロモーター制御下で発現するヘルパーウイルスAcpigHSPTransとグリセロールを混合したウイルス液を産下直後の非休眠卵にインジェクションした (図2)。孵化した幼虫の飼育を続けて孵化率の算出を行ったところ孵化率は29.3%であった。なお、非休眠卵を用いたのは浸酸処理による卵への影響を避けるためである。孵化したカイコの飼育を続け、4齢起蚕時にEGFPが緑色蛍光発する490nmの励起波長を照射し、緑色蛍光を示す個体のスクリーニングを行い、より蛍光の強いものからAクラス、Bクラス、Cクラスに分けた。Aクラス、Bクラスについてはそのまま飼育を続けたが、Cクラスについてはノックダウンの期待が少ないため飼育を止めた。その後、EGFP遺伝子を持つと考えられる割合を算出したところ、その割合はAクラスで1.5%、Bクラスでは6.4%であった。これらのトランスジェニック個体については成虫まで飼育を行い、羽化後に正常なカイコと交配させF₁を得た。得られたF₁卵約100個より孵化直前にゲノムを抽出し、EGFP遺伝子を標的にPCRによって増幅させることで、EGFP遺伝子がカイコの染色体上に導入されているかを確認した。遺伝子導入が確認できたトラン

表1 BmCactusノックダウンカイコの選抜経過

実験区	注射した卵数	孵化した数	蛍光を発した個体数
F ₀	2825	830 (29.3%)	A 12/657 (1.5%); B 53/657 (6.4%)
F ₁	①	380	270 (71.1%) A 2/253 (0.7%) B 34/253 (12.6%)
	②	321	284 (88.5%) A 6/208 (2.1%) B 30/208 (10.7%)
	③	280	135 (48.3%) A 2/128 (1.5%) B 15/128 (11.1%)

スジェニック個体について飼育を行い、4 齢期にEGFPの緑色蛍光でスクリーニングを行った結果、EGFPをマーカーとしてBmCactusのdsRNAを発現する配列がF₁世代にまで伝達されたと期待される個体が選抜された(表1)。このトランスジェニックカイコは、BmCactus遺伝子がRNAiによってノックダウンされていることが期待された。

3. 2 リアルタイムRT-PCRによる

BmCactusのノックダウンの解析

BmCactus 遺伝子のノックダウンが期待されるトランスジェニックカイコにおいてBmCactus遺伝子がノックダウンされているのかを確認するために、リアルタイムRT-PCRによって転写量を解析した。鋳型となるcDNAは、カイコ5 個体を解剖し、免疫反応の中核である脂肪体からトータルRNA抽出後、オリゴdTによって合成した。比較するためのコントロールカイコは、一般交雑種の錦秋×鐘和を用いた。また、リアルタイムRT-PCRの内部標準には、カイコの体内に多く存在し、発育によって変化の少ない30Kタンパク質遺伝子を用いた。まず始めに、30Kタンパク質遺伝子を含むプラスミドを段階希釈することによって求めた検量線からcDNA 1 μ l中の30Kタンパク質遺伝子の転写量を求めた。その後、同様の方法でcDNA 1 μ l中のBmCactus遺伝子の転写量を求め、cDNA 1 μ l中に含まれるBmCactus遺伝子が30K遺伝子に対してどの程度発現しているかを30Kに対する相対値として算出することで、遺伝子レベルでBmCactusの量をBmCactusノックダウンが期待されるカイコとコントロールカイコで比較した。

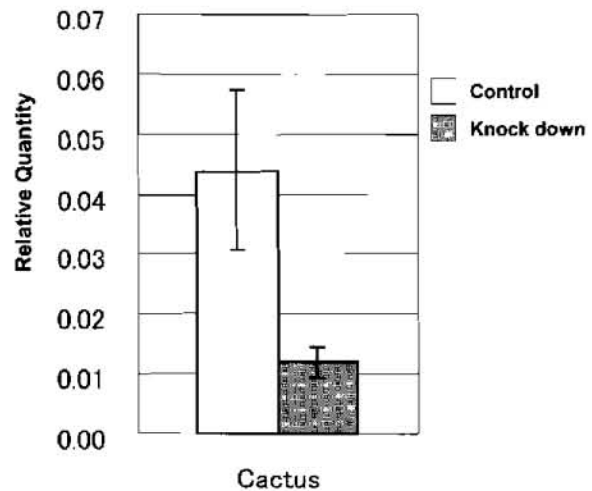


図3 BmCactusノックダウンカイコでのCactusの発現

その結果、BmCactusノックダウンカイコは、コントロールのカイコと比べてBmCactus遺伝子の転写量が約30%少なかったため、BmCactus 遺伝子が抑制された BmCactusノックダウンカイコが得られたと結論付けられた(図3)。

3. 3 リアルタイムRT-PCRによるBmRel

および各抗菌タンパク質の発現解析

BmCactusノックダウンカイコ及びコントロールのカイコについて蛹5 日目にグラム陽性菌として*M.luteus*の菌体液をカイコに投与し、2 時間後に脂肪体からトータルRNAを抽出した。さらに、オリゴdTによってcDNAを合成した後、リアルタイムRT-PCRによってBmCactus、抗菌タンパク質転写因子BmRel、そして抗菌タンパク質遺伝子Attacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin 1.2、Lebocin3、Lebocin4の転写量を算出した。なお、転写量は目的遺伝子を導入したプラスミドを

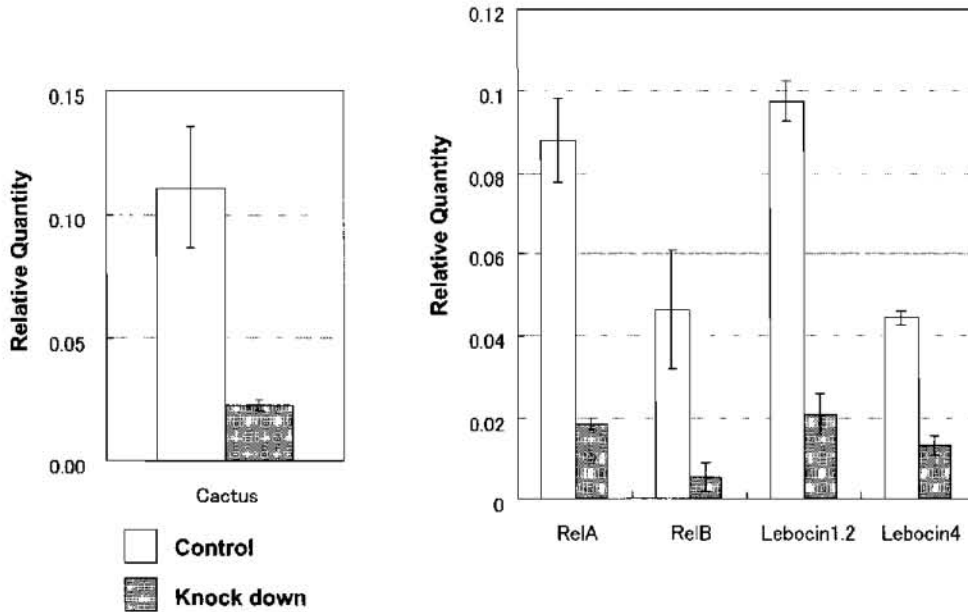


図4 グラム陽性菌*M.luteus*投与後のBmCactusノックダウンカイコにおけるRel及び抗菌タンパク質Lebocinの発現

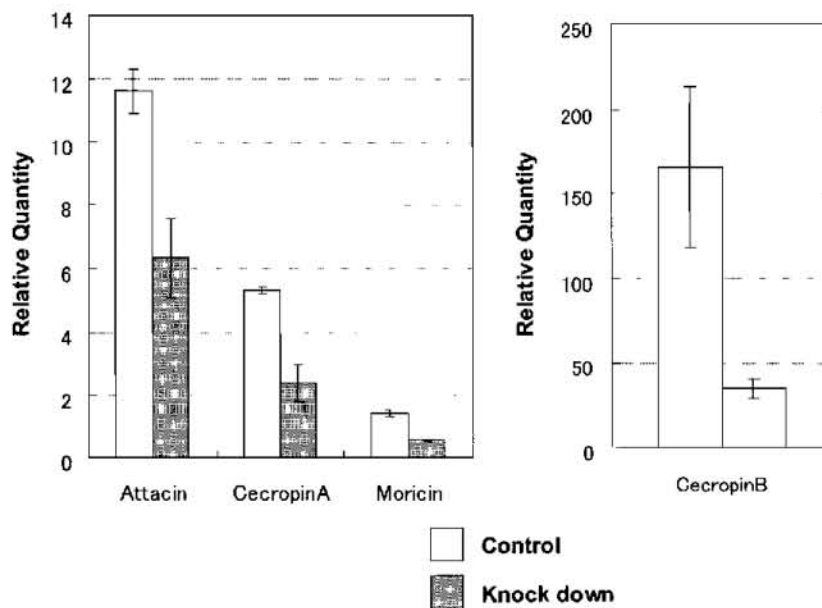


図5 グラム陽性菌*M.luteus*投与後のBmCactusノックダウンカイコにおける抗菌タンパク質Attacin, Cecropin, Moricin, の発現

段階希釈して縦軸にコピー数（転写量）、横軸にサイクル数とした検量線を作り、その検量線と未知試料であるcDNAのサイクル数からcDNA中にある目的遺伝子の転写量を算出し、内部標準30Kタンパク質遺伝子の転写量の相対値として算出した。その結果、BmCactusノックダウンカイコでは、BmCactus遺伝子の転写量はコントロールカイコの約40%であり、BmRelA、BmRelB遺伝子

においても、BmCactusと同様、コントロールカイコと比べて転写量が少なかった。さらに、Attacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin1.2、Lebocin3、Lebocin4すべての抗菌タンパク質遺伝子の転写量について調べたところ、どの抗菌タンパク質遺伝子もBmCactusノックダウンカイコの方がコントロールカイコに比べて転写量が少なかった（図4、5）。

表2 BmCactusノックダウンカイコへのグラム陽性菌*M.luteus*の生菌投与

希釈率	未接種	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Control (n = 5)	5	5	4	3	5	5
Knock down (n = 5)	3	0	0	1	2	2

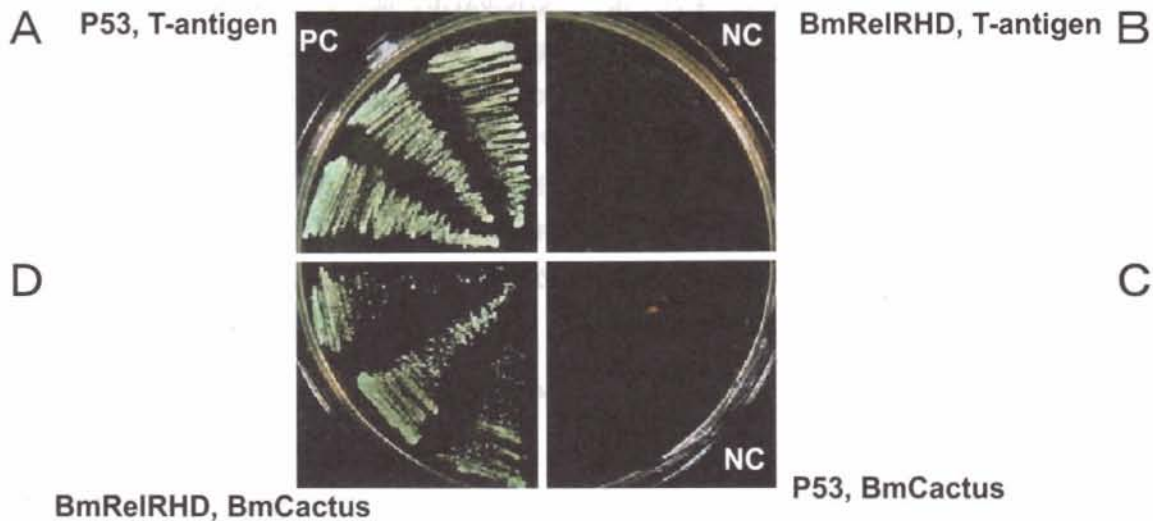


図6 酵母ツーハイブリッド法によるBmCactusとBmRelの相互作用の解析

3. 4 *M.luteus*の生菌を注入したときの蛹への影響

BmCactusノックダウンカイコとコントロールカイコの5齢1日目の幼虫5頭にグラム陽性菌として*M.luteus*の生菌液を投与し、それぞれ成虫までの生存数を調べた。その結果、菌の投与の無い場合、ノックダウンカイコは3頭、コントロールカイコ5頭だった。菌の原液を投与した場合は、ノックダウンカイコは0頭、コントロールカイコ5頭だった。 10^{-1} 希釈した菌を投与した場合は、ノックダウンカイコは0頭、コントロールカイコ4頭だった。 10^{-2} 希釈した菌を投与した場合、ノックダウンカイコは1頭、コントロールカイコ3頭だった。 10^{-3} 希釈した菌を投与した場合は、ノックダウンカイコは2頭、コントロールカイコ5頭だった。 10^{-4} 希釈した菌を投与した場合は、ノックダウンカイコは2頭、コントロールカイコ5頭だった(表2)。各実験区でノックダウンカイコが死亡した場合、繭を作れず、体がメラニン化している個体が多く観察された。

3. 5 Yeast two hybrid法による*in vivo*でのBmCactusとBmRelとの相互作用

BmCactusとBmRelの相互作用を*in vivo*で確認するためにYeast two hybrid法を供した。prey plasmidとbait plasmidの両プラスミドが形質転換された酵母だけが、この制限培地で生育するので、生育した酵母3コロニーを回収し、これらをロイシン、トリプトファン、アデニン、ヒスチジンが欠損し、さらに20mg/mlのX-galが添加された最小寒天培地上で生育させた。例えば、酵母の生体内でBmCactusタンパク質とBmRelのRHD領域(Rel様領域)が相互作用すれば、Gal4融合タンパク質が活性型として働き、酵母のゲノム中に挿入されている*HIS3*, *ADE2 lacZ*遺伝子の転写の活性化を起こすことで、こうした制限培地でも、生育が可能となり、青いコロニーが出現する。その結果、pGAD-BmCactus (prey)とpGBK-BmRelRHD (bait)を形質転換させた酵母では、いずれにおいても青いコロニーが出現し(図6D)、BmCactusタンパク質とBmRelのRHD領域が相互作用していること

が確認された。一方、ネガティブコントロール実験として、SV40のラージT抗原cDNAをprey vectorに挿入したpGADT7-T (prey) とpGBK-BmRel RHD (bait) を形質転換させた場合、あるいはマウスp53タンパク質cDNAをbait plasmidに挿入したpGBKT7-53 (bait) とpGAD-BmCactus (prey) を形質転換させた場合、いずれも制限培地でコロニーが出現しなかった(図6 B、C)。また、ポジティブコントロール実験として、pGADT7-T (prey) とpGBKT7-53 (bait) を形質転換させた場合、青いコロニーが出現し、ラージT抗原と53タンパク質の相互作用を確認できた(図6 A)。これらの実験は、すべてbait、preyプラスミドの入った酵母を3個ピックアップしてそれをストリークした。以上の結果から、BmCactusとBmRelのRHD領域は*in vivo*において相互作用していることが確認された。

3. 6 GST pull down 法による*in vitro*でのBmCactusとBmRelの相互作用

BmCactusとBmRelの相互作用を*in vitro*で確認するため、GST pull down法を供した。この方法は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) のカルボキシル末端と融合させた目的タンパク質を大腸菌で発現誘導し、グルタチオンアガロースビーズを利用して相互作用しているタンパク質を精製する方法である。始めに、BmRelおよびBm

RelishのRHD領域とのGSTの融合タンパク質を大腸菌で作らせSDS-PAGEで確認したところ、GST融合タンパク質が得られた(図7 A)。その後、³⁵S-メチオニンでラベルしたBmCactusを*in vitro*系で合成させ、これにBmRel、BmRelishのRHD領域とGSTとの融合タンパク質と結合反応させた後、グルタチオンでGST融合タンパク質を回収し、SDS-PAGEに供してからBASで感光させた。その結果、BmRelのRHD領域とGSTの融合タンパク質では、BmCactusタンパク質が結合したと考えられるバンドが検出され、BmRelish、GSTではバンドが見られなかった。以上のことから、BmRelとBmCactusは*in vitro*においても相互作用することが分かった(図7 B)。

4. 考察

ショウジョウバエにおける抗菌タンパク質遺伝子発現経路は、TollとImdという二種類の経路が存在することは、緒言にも述べた。Toll経路は、主にグラム陽性菌によって活性化される経路で、*M.luteus*をはじめとするグラム陽性菌に多く見られるリシン型ペプチドグリカンPGRP-SAが認識し、PGRP-SA/GNBP-1複合体となってプロテアーゼでSpätzleを活性化させた後、細胞膜に存在するTollが活性化することでシグナルを伝達させる。その後、アダプター分子dMyD88、アダプター分

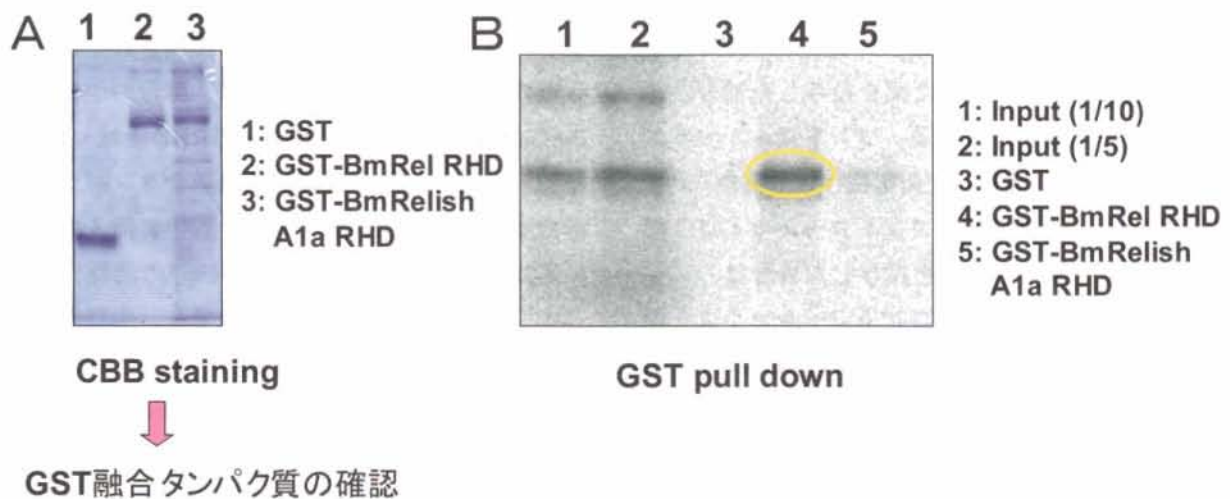


図7 プルダウンアッセイ法によるBmCactusとBmRelの相互作用の解析

子Tube、セリン/スレオニンキナーゼPelleの順にシグナルが伝達され、最後に抑制因子Cactusが分解され、転写因子DorsalやDifが活性化し、核内に移行して抗菌タンパク質遺伝子のNF- κ B結合サイトに結合することで抗菌タンパク質遺伝子の転写が活性化されると考えられている。このショウジョウバエのToll経路から推察するとRel抑制因子であるCactusをノックダウンすると常にRelが活性化し、抗菌タンパク質遺伝子が常に転写されている状態になり、BmCactusノックダウンカイコでは、BmRelおよび抗菌タンパク質遺伝子の転写量は増加すると考えられた。しかし、今回、BmCactusノックダウンカイコでBmRelA、BmRelBおよび各抗菌タンパク質遺伝子の転写量を内部標準30K遺伝子の転写量に対する相対値としてリアルタイムRT-PCRで解析した結果、BmCactusノックダウンカイコは、コントロールカイコと比べ、BmRelA、BmRelB、および抗菌タンパク質遺伝子Attacin、CecropinA、CecropinB、Moricin、Lebocin1.2、Lebocin3、Lebocin4すべての転写量が抑制されていた。この結果から、カイコにおいてCactusとRelの間には相互作用があるのではないかと考えられた。そこで次に、*in vivo*でタンパク質相互作用を確認するためにYeast two hybrid法

を行なった結果、青いコロニーが出現し、BmCactusとBmRelは*in vivo*で相互作用していることが確認された。次に、*in vitro*での相互作用を確認するため、GST pull down法を行なった。GSTを融合したBmRelタンパク質とBmRelishRHD領域タンパク質を³⁵S-メチオニンでラベルしたBmCactusタンパク質と反応させたところ、BmRelのRHD領域とGSTの融合タンパク質において、BmCactusタンパク質が結合したと考えられるバンドが検出された。このことから、BmCactusとBmRelは*in vitro*においても相互作用していることが明らかになった。さらに、BmCactusノックダウンカイコが、グラム陽性菌*M.luteus*の刺激に対してどのような反応を示すのか確認するため、*M.luteus*の生菌を5齢1日目のカイコ幼虫に投与し、その様子をコントロールカイコと比較して観察した。その結果、BmCactusノックダウンカイコはコントロールカイコと比べ菌の刺激に弱く、正常に成虫になることのできた個体が少なかったことからコントロールカイコに比べ、免疫機能が低下していることが示唆された。この結果から、BmCactusノックダウンによって抗菌タンパク質の生成が抑制され、バクテリアからの感染防除機能が低下していることが考えられた。

- Real Time RT-PCR で BmCactus 転写量が減少

→ BmCactus ノックダウンカイコが確認

- M.luteus* で誘導した場合: Real Time RT-PCR で BmCactus と共に BmRel および抗菌タンパク質遺伝子の転写量が減少
- M.luteus* 投与による影響: 生体防御機能の低下
- Yeast two hybrid assay : *in vivo* で相互作用
- GST pull down assay : *in vitro* で相互作用



◆ ショウジョウバエとカイコは、進化の過程や生活環境の違いにより免疫システムもそれぞれの種によって変化した

◆ これまで免疫システムのモデル生物としてショウジョウバエが主に用いられてきたが詳細な研究は各動物種でそれぞれに分けて行なわなければならない

図8 カイコにおける抗菌タンパク質遺伝子の発現制御のモデル

以上、リアルタイムRT-PCR、Yeast two hybrid法、GST pull down法、*M.luteus*の生菌投与の結果を総合して考えると、ショウジョウバエにおける抗菌タンパク質発現経路での予想に反し、カイコにおいてはBmCactusとBmRelが細胞内で相互に作用していることが確認された(図8)。このことから、これまでショウジョウバエで詳細に研究されてきた抗菌タンパク質遺伝子の発現の仕組みが、昆虫全般に適応されるものではないことを示した。ショウジョウバエとカイコは、同じ昆虫でも進化の過程や生活環境の違いにより、免疫システムもそれぞれの種によって変化したのではないかと考えられた。ゆえに、この結果は免疫システムの面から昆虫の多様性をあらわす一つの例として今後重要視されるものと期待された半面、これまで免疫システムのモデル生物としてショウジョウバエが主に用いられてきたが、詳細な研究は各動物種でそれぞれに分けて行なわなければならないことが想定された。

引用文献

- [1] Boman, H.G., Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y., and Lidholm, D.A. (1991) : Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* 201, 23-31
- [2] Hultmark D. (1993) : Immune reactions in *Drosophila* and other insects : a model for innate immunity. *Trends Genet.* 9, 178-83
- [3] Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gateff, E., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (1993) : Insect immunity. Two 17bp repeats nesting a kappa B-related sequence confer inducibility to the dipterecin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *EMBO J.* 12, 1561-1568
- [4] Engstrom, Y., Kadalayil, L., Sun, SC., Samakovlis, C., Hultmark, D., and Faye, I. (1993) : kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J Mol Biol.* 232, 327-33
- [5] Imamura, M., and Yamakawa, M. (2002) : Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576, 246-254
- [6] Tanaka, H., Yamamoto, M., Moriyama, Y., Yamao, M., Furukawa, S., Sagisaka, A., Nakazawa, H., Mori, H., and Yamakawa, M. (2005) : A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta.* 1730, 10-21
- [7] Yamamoto, M., Yamao, M., Nishiyama, H., Sugihara, S., Nagaoka, S., Tomita, M., Yoshizato, K., Tamura, T., and Mori, H. (2004) : New and highly efficient method for silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and piggyBac transposable elements. *Biotechnol Bioeng.* 88, 849-853

家蚕裸蛹系統Ndのセリシンに関する研究

亀井加恵子*・中島怜美*・一田昌利**・山崎 隆***・三好 明****

Studies on Silk Sericin of Nd Strain in *Bombyx mori*

Kaeko KAMEI*, Satomi NAKAJIMA*, Masatoshi ICHIDA**,
Takashi YAMAZAKI*** and Akira MIYOSHI****

*Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,
Matsugasaki, Kyoto 606-8585, Japan

**Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,
Ipponki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 616-8354, Japan

***3-A-506 Mukaijima New Town, 151-30 Mukaijima-ninomaru-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8141, Japan

****Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29 Shimohakubai-cho,
Kitano, Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

It has been reported that sericin possesses antioxidant activity, tyrosinase inhibitory activity, cell growth promoting activity, UV absorption property, moisture retention ability, and high biocompatibility. Due to these characters, sericin is being applied to cosmetics, medicine, functional food, and so on. The cocoon of silkworm Nd strain has advantage to the application of sericin, since it is formed by mainly sericin and less fibroin.

In this study, the properties of sericin from silkworm Nd strain were analyzed. Sericin of Nd possesses higher antioxidant activity than that of control silkworm Kinshu×Showa. The Nd sericin strengthens tyrosinase, one of melanin synthesizing enzymes.

Key Words : Sericin, Silkworm, Wildsilk moth, Antioxidant, Tyrosinase inhibition

1. まえがき

繭糸は主にフィブロインとセリシンの2種類のタンパク質から構成されているが、ロウ質、炭水化物、色素、無機物なども含まれている[1]。繊維状タンパク質フィブロインは繊維として古来より利用されてきたが、セリシンは精練の過程で除去され、廃棄されてきた[2,3]。しかし、近年になりセリシンが、保湿作用、紫外線吸収能、抗酸

化力、メラニン合成に関与するチロシナーゼの阻害活性、細胞増殖促進能などの種々の機能性を有している事が明らかにされた[4]。また、セリシンは生体適合性にすぐれており、それらの特性をいかして化粧品や医薬品、食品などへの応用が試みられ、すでにいくつかの企業によってセリシンを配合した基礎化粧品、入浴液、石鹸などが販売されている。

我々は、昨年、家蚕（春嶺×鐘月、輪月×漢川）

*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科、606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail : kame@kit.ac.jp、TEL 075-724-7553

**連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、
603-8326 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : ichida@kit.ac.jp、TEL 075-861-0741

***連絡先：612-8141 京都市伏見区向島二ノ丸町151-30 向島ニュータウン3-A-506

****連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、
E-mail : zai-kinugasakai@nifty.ne.jp、TEL 075-461-5949

および野蚕（サクサン、サクサンLY、テンサン、エリサン）のセリシンの機能について比較、検討した[5]。その結果、種の違いおよび同一種においては品種の違いによってセリシンの機能性が異なっていることを明らかにした。例えば、輪月×漢川セリシンはチロシナーゼの活性を阻害するが、逆にサクサンセリシンはチロシナーゼ活性を増強する。このように、種あるいは品種によってセリシンの性質が異なっており、それぞれのセリシンの機能性を理解することが重要である。

家蚕裸蛹系統Ndの繭は、フィブロインの含有率が非常に低く、大部分がセリシンで構成されている。したがって、セリシンの抽出効率が優れていると考えられ、セリシンを実用化するうえで優位性がある。しかし、Ndセリシンの機能性は明らかにされておらず、本研究では、Ndの繭糸の形状を明らかにするとともに、Ndセリシンについて溶解度、紫外線吸収能、アミノ酸組成、抗酸化力およびチロシナーゼ活性に与える影響について検討した。本研究では、Ndセリシンの他に、一般的な家蚕である錦秋×鐘和のセリシンをコントロールとして分析した。また、昨年報告した家蚕および野蚕の中から、サクサンと輪月×漢川のセリシンをコントロールとして用いた[5]。輪月×漢川セリシンはチロシナーゼ活性を阻害するが、サクサンセリシンはチロシナーゼ活性を促進する。また、サクサンセリシンは最も抗酸化力が強く、大きな紫外線吸収能を有することが明らかになっている。

2. 材料と方法

2.1 供試繭

京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源ワールド科学教育研究センターで飼育された家蚕裸蛹系統Nd、家蚕2品種（錦秋×鐘和、輪月×漢川）、野蚕1種（サクサン）の繭を用いた。Ndおよび錦秋×鐘和は白色繭であるのに対し、輪月×漢川は黄色繭、サクサンは薄褐色繭である。

2.2 繭糸の形状

裸蛹系統Ndと錦秋×鐘和の2系統の繭に関し、繭外層、内層及び断面の形状を走査電顕（SEM：TOPCON社製 SM-200）を用いて観察した。

2.3 繭糸のセリシン溶解度

裸蛹系統Ndと錦秋×鐘和の2系統の繭を用い、それぞれの繭層をハサミで約5×5mm四方の大きさにカットし、0.50gずつ秤量した。これらを予め沸騰水中で湯煎しておいた熱水、アルカリイオン水（ベスト工房社製）及び0.5%炭酸ナトリウム溶液各100mlが入った三角フラスコに入れ、湯煎を継続した。湯煎開始10分、20分、30分、40分後に各溶液から1mlずつ採取し、分光光度計を用いて波長280nmで吸光度を測定することにより、セリシンの溶解度を評価した。

2.4 セリシンの調製

裸蛹系統Nd、錦秋×鐘和、輪月×漢川およびサクサンの繭からセリシンを抽出した。それぞれの繭の毛羽を除去した後、ハサミで約5×5mm四方の大きさにカットし、秤量した。重量の20倍量の蒸留水を加え121℃で1時間加熱し、セリシンを抽出した。抽出液をろ紙でろ過した後、凍結乾燥して以後の実験（分子量測定、アミノ酸分析、吸収スペクトル測定、抗酸化力測定、チロシナーゼ活性測定）に供した。

2.5 分子量

裸蛹系統Nd、錦秋×鐘和、輪月×漢川およびサクサンのセリシンの分子量を測定した。適当量のセリシンに6M尿素および0.8M NaClを含む0.1M Tris-HCl、pH7.2を加えて、セリシンをほぼ完全に溶解した。遠心分離（15,000rpm、5分、4℃）後、フィルターろ過（0.20 μ m）して不溶物を除去し、FPLC（Amersham Pharmacia Biotech）を用いてSuperdex 75カラム（1×30cm、Amersham Pharmacia Biotech）でゲルろ過した。流速は0.2ml/min、チャートスピードは2.5mm/min、セリシンの検出は280nmの吸収によって行った。標準タンパク質（ β -ガラクトシダーゼ：分子量

116,000、牛血清アルブミン：分子量66,000、卵オボアルブミン：分子量45,000、大豆Kunitzuトリプシンインヒビター：分子量24,000、ニワトリ卵白リゾチーム：14,300、インシュリン：5,938、還元型グルタチオン：307)の溶出位置から作成した標準曲線を用いて分子量を算出した。

2. 6 アミノ酸組成分析

裸蛹系統Ndと錦秋×鐘和のセリシンに関してアミノ酸組成分析を行った。1 mgのセリシンに100 μ lの0.2% 3-(2-アミノエチル) インドールを含む4 Nメタンスルホン酸(和光純薬工業)を加え、真空封管した後、110℃で24時間加水分解した。500 μ lのサンプルバッファーを加えた後、50 μ lをアミノ酸分析計(L-8500A、日立)で分析した。

2. 7 吸収スペクトル

裸蛹系統Nd、錦秋×鐘和、輪月×漢川およびサクサンのセリシンに関して、各0.1%セリシン水溶液の吸収スペクトルを分光光度計(U-3300、日立)によって測定した。

2. 8 抗酸化力の測定

裸蛹系統Nd、錦秋×鐘和、輪月×漢川およびサクサンのセリシンに関して、その抗酸化力をDPPH(1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)を用いて評価した。2 mgのセリシンに800 μ lの蒸留水を加え、Vortex攪拌してセリシンを溶かした。遠心分離(15,000rpm、10分、4℃)によって不溶物を除去し、得られたセリシン溶液を蒸留水で段階希釈して使用した。

遮光した容器にDPPH溶液(1 mg DPPH/6.25 mlエタノール)を作製し、サンプル100 μ lに対してエタノール100 μ lおよびDPPH溶液50 μ lを加え、攪拌後、室温で30分間放置した。遠心分離(15,000rpm、5分、室温)を行い、析出した不溶物を除去した。混合溶液200 μ lを96穴マイクロプレート(Becton Dickinson Labware)に分注し、マイクロプレートリーダー(CORONA ELECTRIC MTP-120)を用い、550nmの吸収を測定し

た。セリシン量は反応溶液中の重量(μ g)で示した。DPPHは和光純薬工業社製を使用した。

2. 9 チロシナーゼ活性測定

裸蛹系統Nd、錦秋×鐘和、輪月×漢川およびサクサンのセリシンに関して、チロシナーゼ活性に与える影響を評価した。マッシュルームチロシナーゼ 45.1unit (sigma、終濃度9 unit)を含む1/15Mリン酸緩衝液(pH 6.5) 150 μ lに1/15Mリン酸緩衝液(pH6.5)に溶解したセリシン300 μ lを加え、25℃で5分間インキュベートした。続いて、300 μ lの1.25mM L-DOPA (dihydroxyphenylalanine、ナカライテスク、終濃度0.5 mM)溶液を加えて、分光光度計(U-3300、日立)を用いて波長475nmの吸収変化を測定した[4,6]。反応液中のセリシン終濃度は0.1% (w/v)になるように調製した。

3. 実験結果

3. 1 繭糸の形状

裸蛹系統Nd繭外層の形状を図1に、対照である錦秋×鐘和繭外層の形状を図2に示した。二つを比較するとNd繭は平板状で繊維が細く、いくつかの繊維が癒合しているとともに、500倍では繭糸表面にクラックが確認された(図1矢印)。

Nd繭内層の形状を図3に、対照である錦秋×鐘和繭内層の形状を図4に示した。二つを比較すると外層の場合と同様Nd繭は平板状で繊維が細く、多くの繊維においてセリシンが膜状に展開し、癒合している状態(図3矢印)が観察された。

Nd及び錦秋×鐘和の繭層断面を比較すると、錦秋×鐘和(図6)では断面形状が維持されていたが、Nd(図5)では断面形状が崩れ扁平構造となり、切断面もカッターによる変形が認められた。

3. 2 セリシンの溶解度

セリシンの溶解度曲線を図7に示した。10分後の溶解度をみるとNd 0.5%炭酸ナトリウム区>Nd アルカリイオン水区>錦秋×鐘和0.5%炭酸ナ

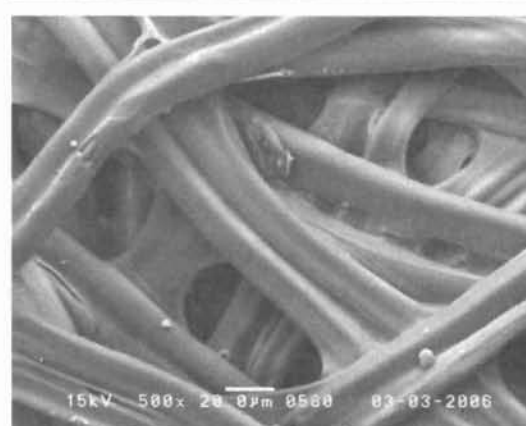
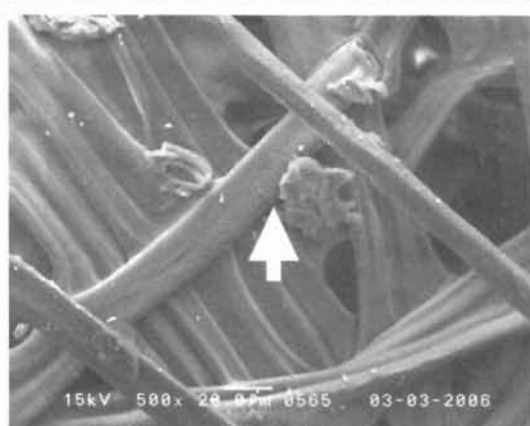
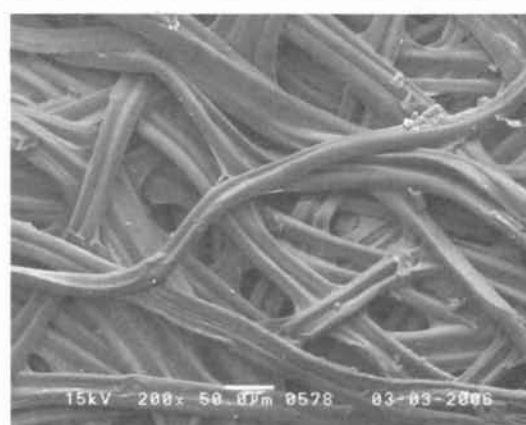
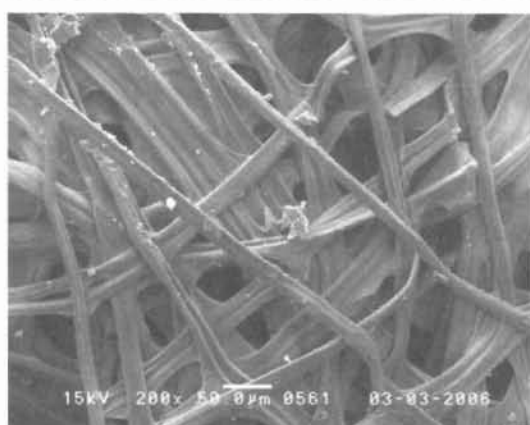
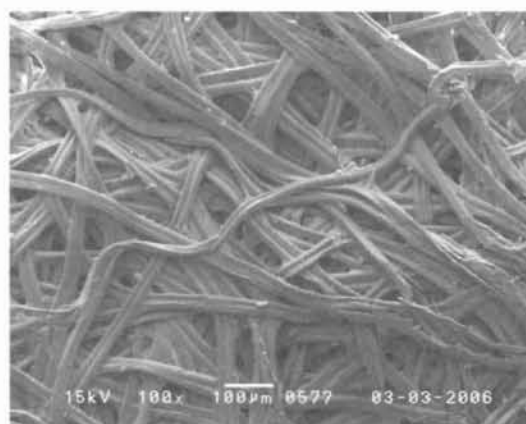
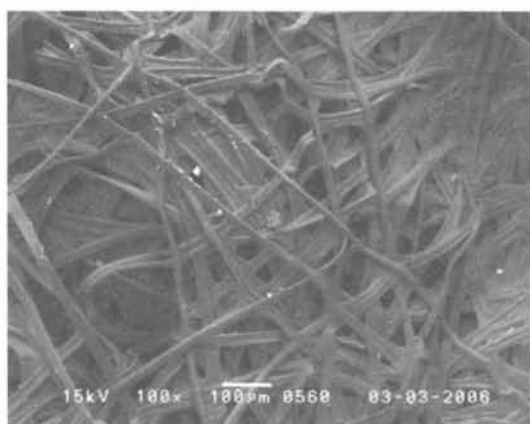
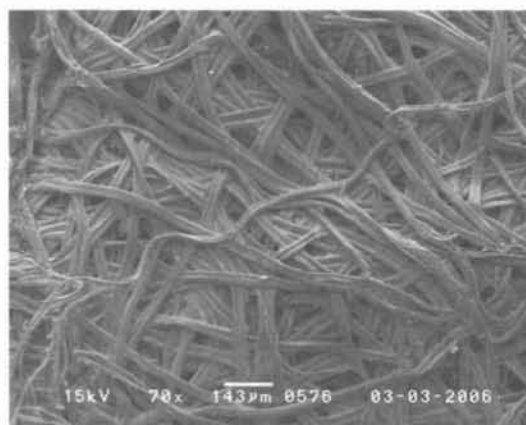
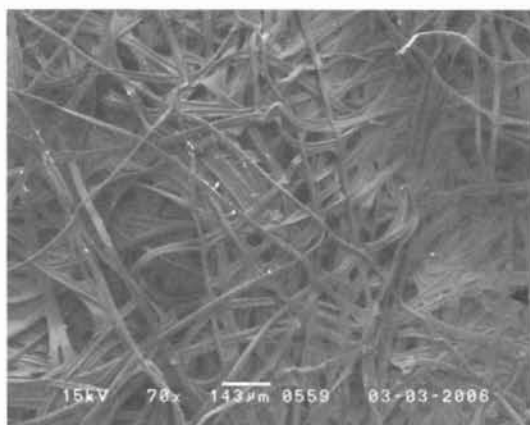


図1. Nd繭外層 矢印；クラック
上から順番に×70、100、200、500倍

図2. 錦秋×鐘和繭外層
上から順番に×70、100、200、500倍

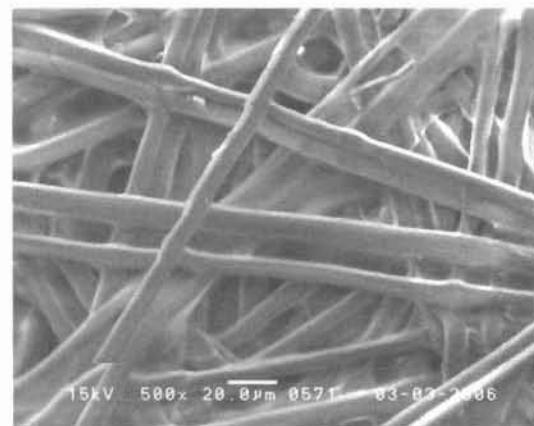
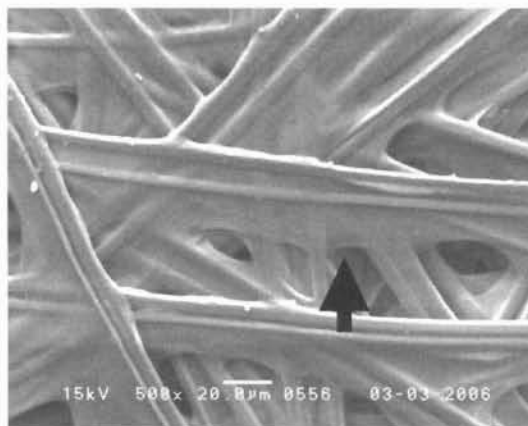
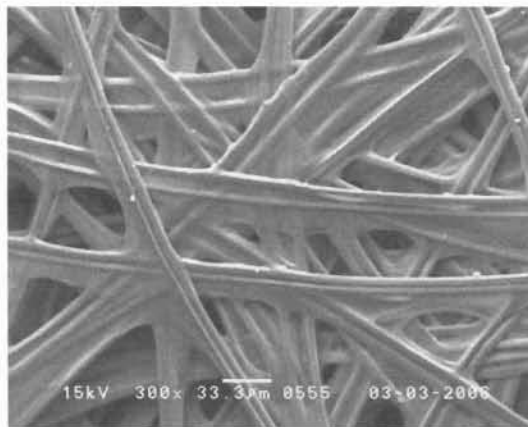
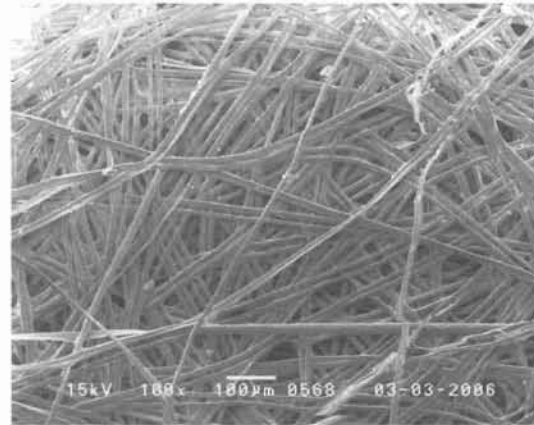
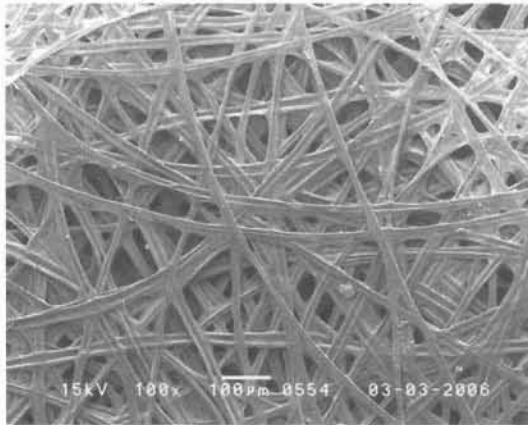
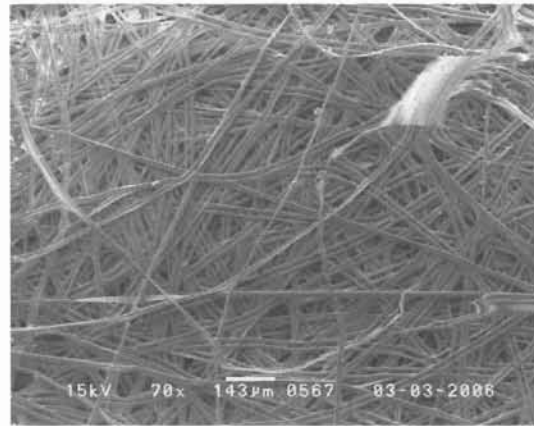
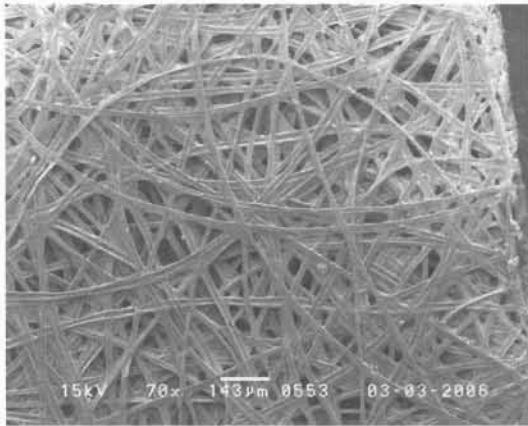


図3. Nd菌内層 矢印；癒合場所
上から順番に×70、100、300、500倍

図4. 錦秋×鐘和菌内層
上から順番に×70、100、500倍

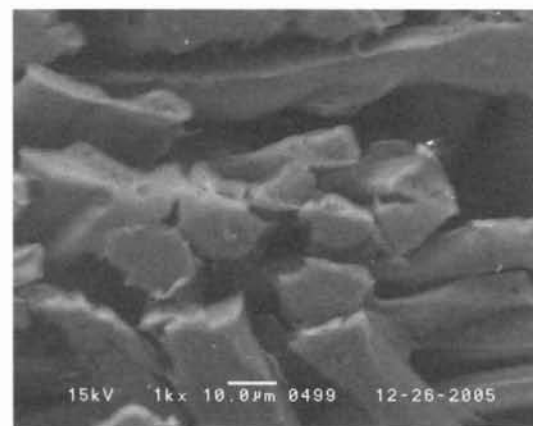
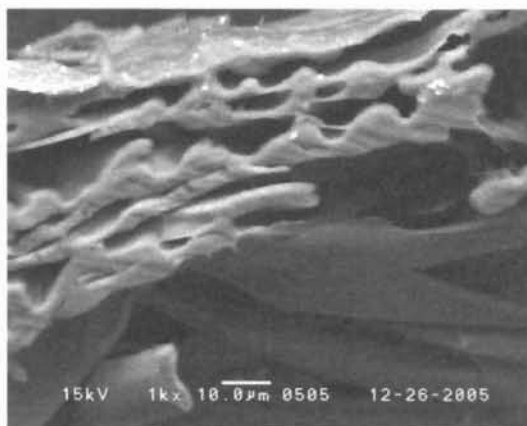
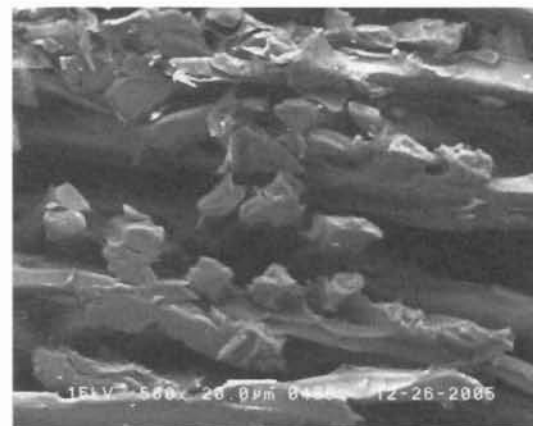
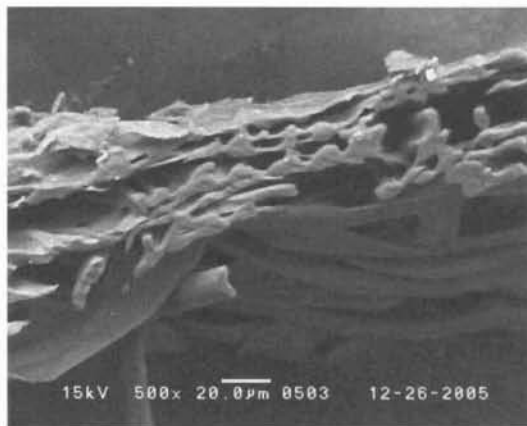
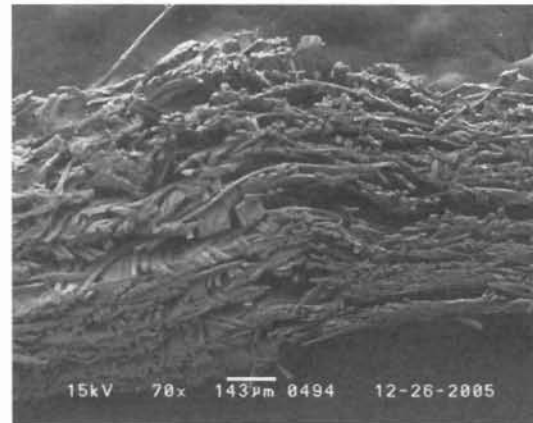
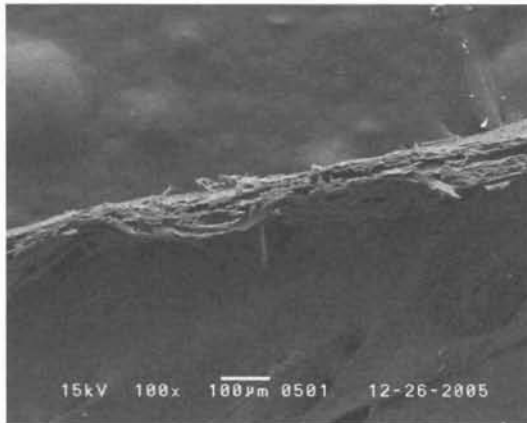


図5. Nd層断面
上から順番に×100、500、1000倍

図6. 錦秋×鐘和層断面
上から順番に×70、500、1000倍

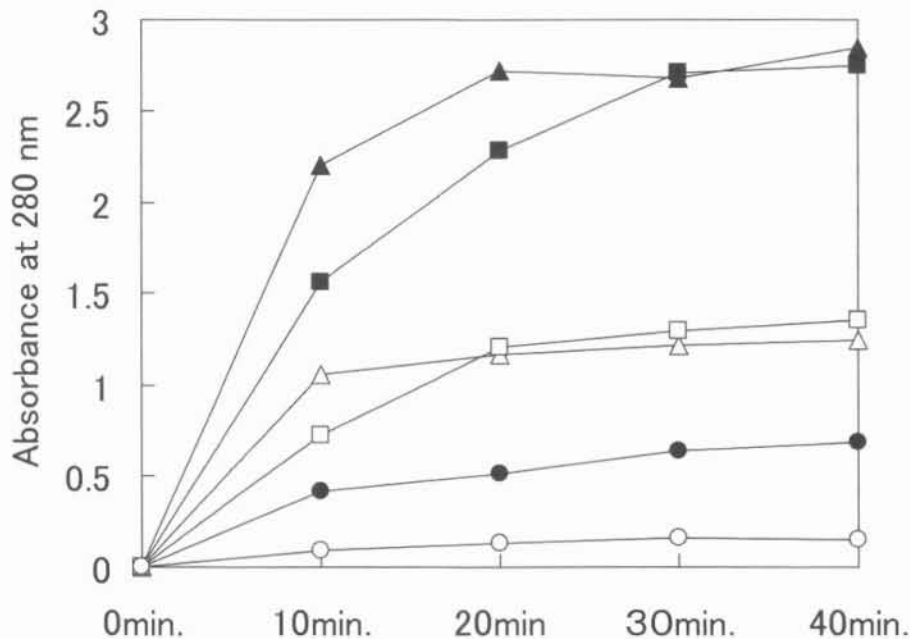


図7. Ndと錦秋×鐘和のセリシン溶解度

●;Nd 熱水、■;Nd アルカリイオン水、▲;Nd 0.5%炭酸ナトリウム溶液、○;錦秋×鐘和 熱水、□;錦秋×鐘和 アルカリイオン水、△;錦秋×鐘和 0.5%炭酸ナトリウム溶液。

表1. Ndと錦秋×鐘和における練減率の比較

	Nd	錦秋×鐘和
熱水処理	22%	14%
アルカリイオン水	78%	36%
0.5%炭酸ナトリウム	78%	34%

トリウム区>錦秋×鐘和アルカリイオン水区>Nd 熱水区>錦秋×鐘和熱水区の順であった。20分後及び30分後もほぼ同じ状況で溶解は進行し、最終的にはNd 0.5%炭酸ナトリウム区 \geq Nd アルカリイオン水区>錦秋×鐘和アルカリイオン水区 \geq 錦秋×鐘和0.5%炭酸ナトリウム区>Nd 熱水区>錦秋×鐘和熱水区の順となった。

40分後の練減率(表1)をみると、対照の錦秋×鐘和では熱水区14%、0.5%炭酸ナトリウム区34%、アルカリイオン水区36%となった。Ndでは熱水区22%、0.5%炭酸ナトリウム区78%、アルカリイオン水区78%となった。

3.3 分子量

カットした菌を熱水(121℃)中で1時間加熱することによってセリシンを抽出し、セリシンの

分子量をゲル濾過法によって測定した。標準タンパク質の溶出位置から作製した標準曲線をもとに算出した各菌のセリシンの分子量は、Nd 69,700、錦秋×鐘和 66,000、輪月×漢川 61,300、サクサン 59,500であった。

3.4 アミノ酸組成

アミノ酸組成分析の結果を表2に示す。Ndおよび錦秋×鐘和のセリシンを比較すると、Ndの方がセリシンの含有量がやや大きい、大きなアミノ酸組成の相違は認められなかった。

3.5 吸収スペクトル

各セリシン水溶液(0.1%)の吸収スペクトルを図8に示す。白色菌のNdおよび錦秋×鐘和のセリシンの吸収スペクトルを比較した結果、280nm付近の吸収はNdの方がやや大きかった。また、Ndおよび錦秋×鐘和の両セリシンは、サクサンや輪月×漢川セリシンと異なり、320nm以上の長波長側ではほとんど吸収が見られなかった。

表2. セリシンのアミノ酸組成 (モル%)

	Nd	錦秋×鐘和	輪月×漢川*	サクサン*
Asp	14.78	15.21	15.05	15.44
Thr	7.92	8.30	7.51	13.85
Ser	35.23	33.45	34.03	23.38
Glu	5.28	4.85	5.98	6.33
Pro	0.68	0.62	0.60	1.18
Gly	15.02	15.20	14.34	19.47
Ala	4.75	4.76	4.73	3.40
1/2Cys	0.84	1.37	0.64	0.30
Val	2.70	2.97	2.98	1.04
Met	0.25	0.59	0.56	0.21
Ile	0.55	0.70	0.82	0.58
Leu	1.03	1.22	1.33	0.67
Tyr	3.36	3.53	3.29	5.23
Phe	0.34	0.35	0.37	0.35
Lys	2.79	2.62	3.29	2.23
His	1.27	1.18	1.20	2.58
Trp	n.d.	n.d.	0.10	0.08
Arg	3.21	3.09	3.17	3.69
Total	100	100	100	100

*. 文献値[5] n.d.: 未検出

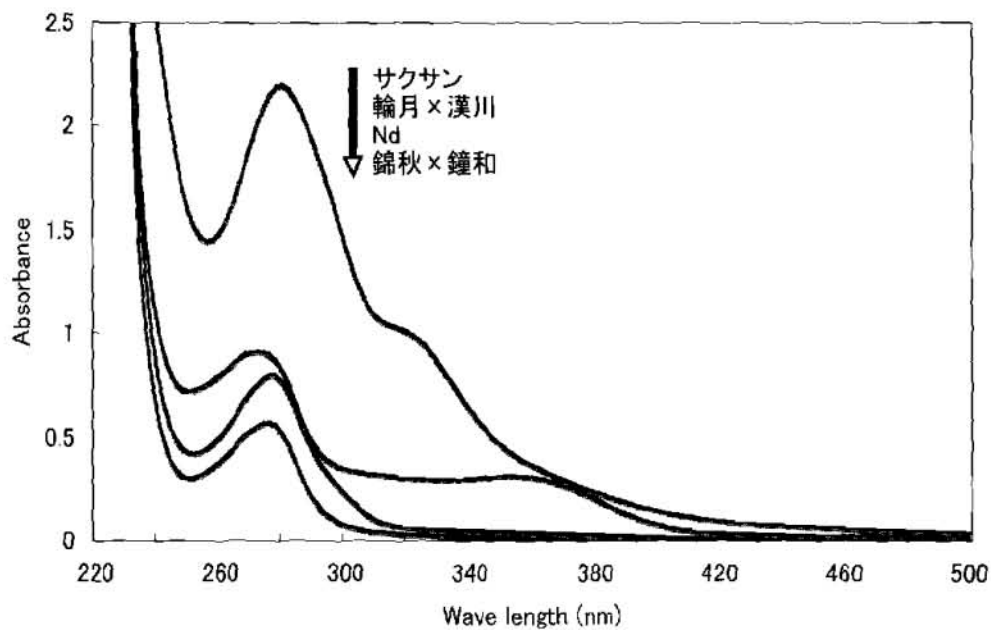


図8. セリシン水溶液の吸収スペクトル

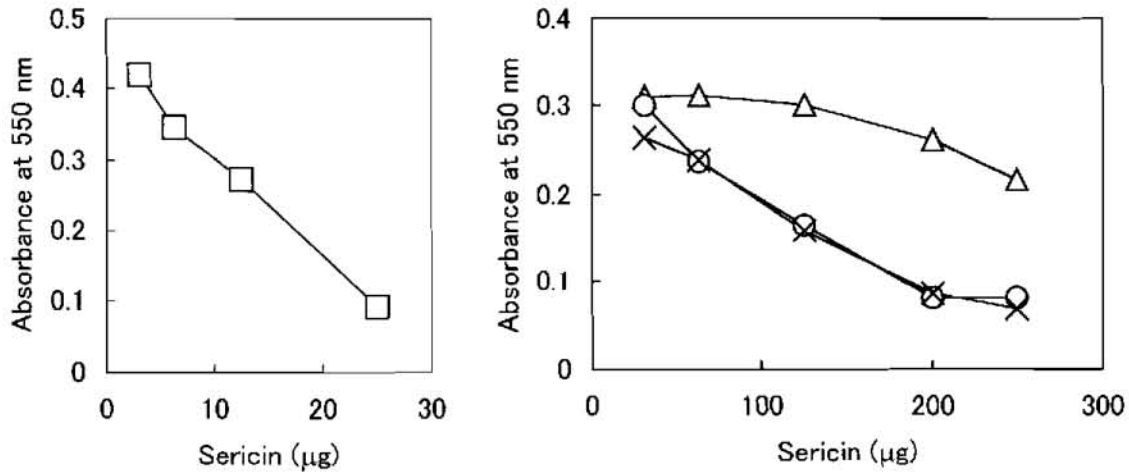


図9. セリシンのDPPHフリーラジカル消去法による抗酸化力測定

セリシンをDPPH溶液に加え、30分後、550nmの吸収を測定した。Nd (○)、錦秋×鐘和 (△)、輪月×漢川 (×)、サクサン (□)。

表3. DPPHラジカル消去率50%を与えたセリシン量 (μg)

蚕	錦秋×鐘和	Nd	輪月×漢川	サクサン
本研究	>200	140.09	136.55	15.68
文献値[5]	—	—	150.07	13.01

3.6 抗酸化活性 水溶液中でDPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) は紫色を呈する安定なフリーラジカルとして存在する。セリシンのフリーラジカル消去活性をDPPHフリーラジカル量の減少を測定することによって評価した。結果を図9に示す。セリシンを含まないコントロールの吸収の半値を与えるセリシン量、すなわちDPPHフリーラジカルを50%消去するのに必要なセリシン量を図9から計算し、表3に示した。Ndセリシンのフリーラジカル消去活性はコントロールとして用いた錦秋×鐘和より強く、輪月×漢川セリシンと同程度であった。

3.7 チロシナーゼ活性に与える効果

チロシナーゼに対するセリシンの効果を図10に示した。セリシンを加えないコントロールのチロシナーゼ活性に対し、Ndセリシンおよびサクサンセリシンを加えた場合、チロシナーゼはそれぞれコントロールの120.8%および126.2%の活性を示した。すなわち、Ndセリシンおよびサクサンセリシンによってチロシナーゼ活性が増強された。

一方、錦秋×鐘和セリシンはチロシナーゼ活性にほとんど影響を与えなかった。輪月×漢川セリシンはチロシナーゼ活性を阻害した。

4. 考察

裸蛹系統Nd系統は後部絹糸腺が退化あるいは機能しないため、ほとんどフィブロインを産生せず、繭層の大部分はセリシンで形成されていると考えられる。このことは、膜状構造が認められた繭層表面構造および変形し薄い断面の形状からもうかがえた。

裸蛹系統Ndを利用することによって多量に単独のセリシンを回収することが可能となると予想されが、溶解度を測定した結果から、Ndは熱水、アルカリイオン水、0.5%炭酸ナトリウム溶液のいずれの処理においても対照である錦秋×鐘和より高い値を示した。また、練減率についても熱水処理で22%、アルカリイオン水処理あるいは0.5%炭酸ナトリウム溶液を用いることで実に78%という驚異的な練減率を示した。このことから、セ

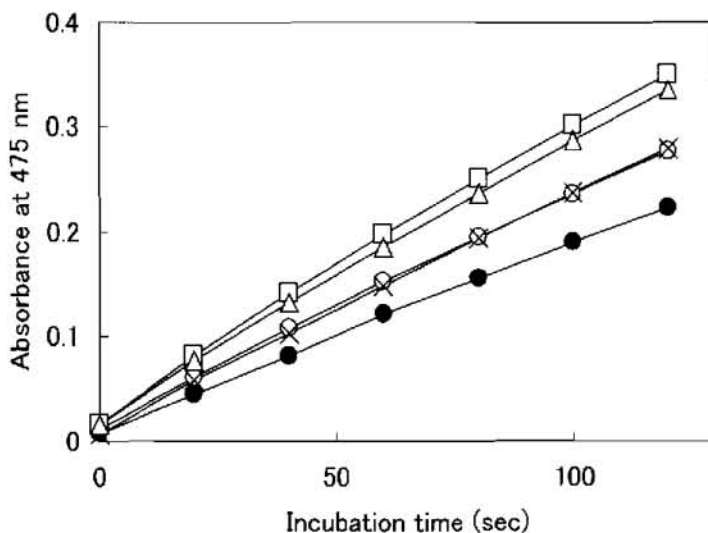


図10. セリシンのチロシナーゼ活性に与える効果

マッシュルームチロシナーゼにセリシン（最終濃度0.1%）を加えてインキュベート後、基質を添加、475 nmの吸収変化を測定することによりチロシナーゼ活性を測定した。コントロール（セリシン無し）（○）、Nd（△）、錦秋×鐘和（×）、輪月×漢川（●）、サクサン（□）。

リシンを比較的容易に抽出するために裸蛹系統Ndの利用は有効と考えられた。

セリシンの機能性を評価するために、繭の熱水抽出（121℃、1時間）によってセリシンを抽出した。セリシタンパク質は加熱によって分解する事が知られているので、実験に使用するセリシンの分子量を把握しておく必要がある。ゲル濾過の結果、セリシンの分子量はNd 69,700、錦秋×鐘和66,000、輪月×漢川61,300、サクサン59,500であった。したがって、Ndセリシンは他のセリシンに比べてやや大きい分子量を持つ事が示された。輪月×漢川およびサクサンのセリシンの分子量は、昨年報告した分子量（輪月×漢川51,000およびサクサン53,000）よりも大きかった。昨年と同条件でセリシンを抽出していることから、本実験で得られたセリシンの方が大きい値になった理由は不明である。

セリシンのアミノ酸組成を分析した。表2に示すように、Ndおよび錦秋×鐘和いずれのセリシンも、セリンが33%～35%（モル%）と最も多く含まれており、ついでグリシンおよびアスパラギン酸が15%程度であった。これまでに報告した家蚕（春嶺×鐘月、輪月×漢川）のセリシンとよく似たアミノ酸組成であることから、Ndセリシン

タンパク質は典型的な家蚕セリシタンパク質と言える[5]。なお、表2に本研究で用いた輪月×漢川セリシンおよびサクサンセリシンのアミノ酸組成（文献値）もあわせて掲載した[5]。

セリシンを化粧品に応用する場合、日焼け、皮膚ガン、しわなどの原因となる紫外線を吸収する能力は、非常に重要である。図8に示した吸収スペクトルから、Ndセリシンは錦秋×鐘和のセリシンよりもやや大きい紫外線吸収能を持つ事が分かった。Ndおよび錦秋×鐘和は白色繭であるのに対し、輪月×漢川は黄色繭、サクサンは薄褐色繭である。同じ白色繭の中ではNdのセリシンは比較的大きな紫外線吸収能を持つと言える。

セリシンの持つ抗酸化活性をDPPHフリーラジカル消去活性法によって測定した（図9）。セリシンを含まないコントロールの吸収の半値を与えるセリシン量、すなわちDPPHフリーラジカルを50%消去するのに必要なセリシン量を表3に示す。Ndセリシンのフリーラジカル消去活性は輪月×漢川セリシンと同程度であった。錦秋×鐘和は昨年報告した春嶺×鐘月と同様、200 μ gのセリシンを加えても、DPPHフリーラジカルを50%消去できなかった。したがって、白色繭を作る家蚕の品種間では、Ndセリシンは最も抗酸化力が大きく、

黄色繭の輪月×漢川セリシンに匹敵する事が分かった。

セリシンの抗酸化力にはセリシンに含まれるフラボノイドおよび尿酸の寄与が大きいとの報告[7]があり、これら品種間の抗酸化力の差異はフラボノイド色素の種類や量、尿酸の量の差異が反映しているものと考えられる。Nd繭は白色であることから、セリシンに含まれる呈色しない成分の差異を反映しているものと考えられる。一方、セリシタンパク質を構成するアミノ酸そのものも抗酸化力を持つ事が知られており、セリシタンパク質の抗酸化力への関与も存在すると考えられる[8]。

セリシンは、メラニン合成酵素チロシナーゼを阻害することが報告されている。本研究においても、昨年の報告と同様、輪月×漢川セリシンはチロシナーゼに対する阻害活性を示した。いくつかのフラボノイド類がチロシナーゼ阻害活性を有していることが報告されており[9]、輪月×漢川セリシンに含まれる桑葉由来のフラボノイドなどの色素成分が関わっている可能性がある。しかし、我々は、チロシナーゼ活性に対する効果は蚕品種によって異なっていることを報告している[5]。本研究においても、錦秋×鐘和セリシン(0.1%)はチロシナーゼ活性には影響を与えなかった。また、Ndセリシンは、サクサンのセリシンと同様、チロシナーゼ活性を増強した。セリシンにチロシナーゼの基質L-DOPAのみを加えた場合、L-DOPAの酸化反応は起こらなかったことから、熱水抽出して得られるサクサンセリシンはチロシナーゼ活性を有していないことが分かる。したがって、Ndおよびサクサンのセリシンがチロシナーゼを活性化した可能性があると考えられる。今後、より詳細な解析が必要である。

以上の結果から、Ndは錦秋×鐘和と同様、白色繭を作る家蚕であるが、セリシンの機能性には違いが見られた。Ndセリシンは、黄色繭の輪月×漢川セリシンと同レベルの抗酸化力を持ち、サクサンセリシンと同じようにチロシナーゼ活性を増強した。Ndセリシンのアミノ酸組成は、錦秋×鐘和や輪月×漢川など家蚕のセリシンの組成に

共通した特徴が見られたことから、Ndセリシンに特徴的な性質はセリシタンパク質以外の成分に起因している可能性が考えられる。今後、Ndセリシンの機能性をもたらず成分を同定し、その機構を明らかにすることが必要である。

引用文献

- [1] 皆川 基 (1981) : 絹の科学, pp.58-334, 関西衣生活研究会, 大阪
- [2] 羽賀篤信, 筒井亮毅, 渡辺忠雄 (1980) : 解じょ率の異なる蚕品種の絹糸腺セリシンの挙動. 九州蚕糸, 11, 65
- [3] 北野 実 (1977) : セリシンのモンモリロナイトへの吸着様式. 日蚕雑, 46(4), 363-364
- [4] 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(1), 145-147
- [5] 亀井加恵子, 田中慶利, 一田昌利, 山崎 隆, 三好 明 (2004) : 家蚕及び野蚕のセリシンの機能研究. 繊維研究所研究報告, 8, 13-20
- [6] Saboury, A.A., Karbassi, F., Haghbeen, K., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A.A., and Farzami, B. (2004) : Stabiliby, structural and suicide inactivation changes of Mushroom tyrosinase after acetylation by *N*-acetylimidazole. *Biol. Macromol.* 34, 257-262
- [7] 山崎昌良 (2002) : セリシン抽出物の抗酸化作用について. (財)大日本蚕糸会, シルクだより, No.10, 2-3
- [8] Masuda, T., Nakano, S., and Kondo, M. (1973) : Rate constants for the reactions of OH radicals with the enzyme proteins as determined by nitrosodimethylaniline method. *J. Radiat. Res.* 14, 339-345
- [9] Badria, F.A., and elGayar, M.A. (2001) : A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Boll. Chim. Farm.* 140(4), 267-271

ケナフ繊維の品種間比較

大柿麻衣・道満光生・島袋順二*・古澤壽治*・杉村順夫

Cultivarietal Comparison of Kenaf Fibers

Mai OHGAKI, Mitsuo DOHMAN, Junji SHIMABUKURO*,
Toshiharu FURUSAWA** and Yukio SUGIMURA

*Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology,
Matsugasaki Goshokaido-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan*

**Bioresource Field Science Center, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,
Ipponki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 603-8326, Japan*

Abstract

Histochemical observation of kenaf stem shown that phloem fibers are combined into a group termed bast fibers along the epidermal layer. The cell walls of the phloem fibers were very thick, which is a key factor governing physical characteristics of kenaf fibers separated. Fibers from 9 cultivarieties of kenaf plant were evaluated, showing that cultivarieties belonging to Cuba-kenaf strain produced similar fibers in physical strength, but fibers from Tai-kenaf strain is significantly weak.

Key Words : kenaf, phloem fiber, fiber evaluation

1. まえがき

ケナフの原産地は東部中央アフリカとされて、その野生種はアフリカの熱帯・亜熱帯地方に広く分布している。インドでも広い範囲で自生しており、栽培系統から野生化したと考えられている。インド以外の国々では、1940年代以降から導入され、ロシア、中国、タイ、南アフリカ、エジプト、メキシコ、キューバなどで栽培されたことが伝えられている。アメリカでは、1950年代に繊維・パルプ植物として可能性のある500種以上の植物が調査されたが、ケナフはもっとも可能性のある植物として選抜された。現在でもテキサス、オクラホマ、ミシシッピ、南部アメリカで研究開発がなされており、その用途は主として新聞紙用パ

ルプ植物として考えられている。一方、熱帯から亜熱帯地方では、ケナフ繊維は古くからロープ、編み物、バッグなどの生活密着製品の原料として利用されてきた。

近年、天然セルロースの結晶弾性率が極めて高いことから、複合材料の補強繊維として有望視されている。とりわけ、ケナフは生長速度が速く、二酸化炭素の固定化能力、水質浄化能力に優れていることから、工業用繊維植物として注目されている[5]。ケナフ繊維とポリ乳酸樹脂や熱可塑性樹脂と組み合わせた複合材料がつくり出され、マット、シート、ボード類などに加工され、自動車、建築、IC製品などへの応用が進展している[1,2,3]。従来のケナフ繊維の利用分野を大きく逸脱した工業用途の拡大が期待されている。この用途拡大

連絡先：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科、606-8354 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail : sugimura@kit.ac.jp、TEL 075-724-7762

*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : shimabukuro@kit.ac.jp、TEL 075-861-0741

**連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail : kbspace@kit.ac.jp、TEL 075-861-0714

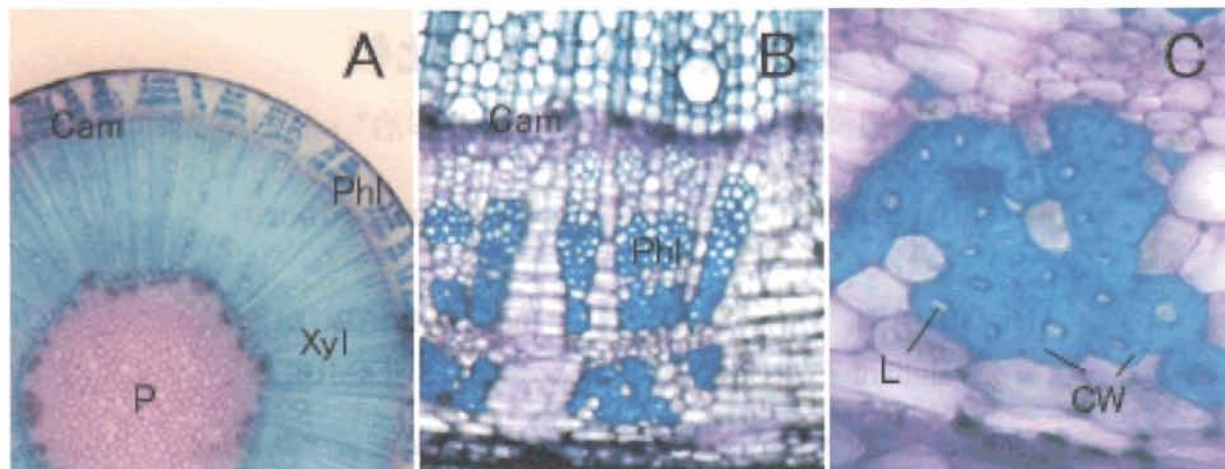


図1. ケナフ茎の内部形態

A: 横断面、B: 師部組織、C: 師部繊維細胞、P: 髓、Phl: 師部組織、Cam: 形成層、Xyl: 木部組織、L: 細胞内腔、CW: 細胞壁。

を支えるためには、高品質のケナフ繊維を安定的に供給できる栽培および繊維分離技術の開発が必要となる。しかしながら、ケナフの品種、栽培体系、栽培環境が繊維の収量と品質に及ぼす効果についての研究は大きく立ち遅れている。本報では、韌皮部に配列する師部繊維細胞を組織化学的に観察すると共に、ケナフ品種の繊維強度を比較した。

2. 材料および方法

2.1 供試植物の育成

京都工芸繊維大学繊維学部生物資源フィールド科学教育研究センターの圃場で、ケナフ (*Hibiscus cannabinus* L., *H. sabdariffa* Wester.) の9品種を栽培した。供試した品種は、同センターで保存・維持されていたEverglades 41 (アメリカ産)、Tainung 2 (台湾産)、晩熟 KB2 (中国産)、浙江中熟種 (中国産)、ローゼル (中国産)、中雑紅 305 (中国産)、ブルーケナフ、Tenshin (中国産)、浙江1号 (中国産)であった。2004年4月末からポット育苗し、5月末に圃場に定植した。栽植密度は90×30cmとし、試験株の周辺には環境設定株を定植し、試験株間の環境条件を均一にした。基肥として、牛糞堆肥を1.5a当たり10kgを投入した。草丈の伸長、茎の肥大化がほぼ停止した10月末～11月末に収穫した。

2.2 組織化学的染色と繊維の強度測定

生育中期の茎を切り出し、徒手切片を作成した。0.01%トルイジンブルー液で、切片を染色した。一方、収穫した韌皮部を水中に浸して、繊維を剥離した。得られた繊維束を室内で乾燥し、単繊維を調製した。2 cm長の単繊維について、その引張強度を測定した。各品種につき、10本の単繊維を温度25℃、湿度60%の環境下で測定した。繊維の形状は直径0.1mmの円とし、荷重の最大スケールを12N、引張速度を2.5mm/minに設定した。ロードセルとして50Nを使用し、引張強度試験機 (Orientec Universal Testing Machine STA-1150) を用いた。

3. 結果および考察

3.1 師部繊維細胞の観察

茎の中心部に髓があり、そこから放射状に維管束が表皮に向かって伸びていた (図1 A)。繊維となる師部繊維細胞の束が表皮に沿って規則的に配列していた (図1 B)。師部繊維細胞は中空で、分厚い1次、2次細胞壁で構成されていた (図1 C)。繊維特性は、この師部繊維細胞の細胞壁構造と細胞壁構成多糖の組成、細胞長に支配されている。

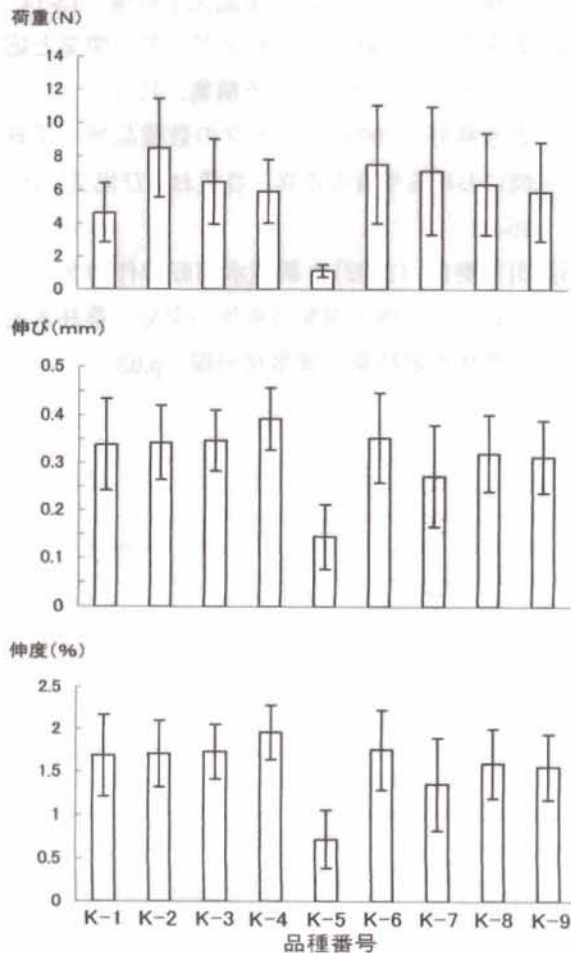


図2. ケナフ繊維の強度比較

K-1: Everglades 41、K-2: Tainung 2、
 K-3: 晩熟 KB2、K-4: 浙江中熟種、
 K-5: ローゼル、K-6: 中雑紅 305、
 K-7: ブルーケナフ、K-8: Tenshin、
 K-9: 浙江1号。

3. 2 品種間の繊維強度比較

繊維特性の評価項目として、繊維の破断荷重 (N)、伸び (mm)、伸度 (%) を測定した。その結果、Everglades 41、Tainung 2、晩熟 KB2、浙江中熟種、中雑紅 305、ブルーケナフ、Tenshin、浙江1号の破断荷重、伸び、伸度について、有意な差が認められなかった (図2)。しかし、ローゼル種については、他の品種と比べて有意に低かった。また、いずれの品種においても、測定値の変動幅が大きかった。この要因として、遺伝的な因子による繊維強度の強弱変動よりも、むしろ茎の生育と成熟度、茎からの繊維の単離部位などの因子が繊維強度に強く反映していると考えられる。

事実、茎の上部から得られる繊維は比較的柔軟性があり、師部繊維束から単繊維を分離することが容易であった。一方、茎の中部・下部から得られる師部繊維束は太く、且つ、単繊維の接着が強く、剛直な単繊維であった。また、繊維の色、手触り感も、同一品種でも個体間で相違が認められた。茎の発達は1個体でも上部と下部では大きく異なる。すなわち、上部では師部繊維細胞の発達が未熟であり、細胞壁の構造が成熟化されていないと考えられる。より均一な繊維を得るためには、茎の成熟度に関わる (1) 収穫時期の選択、(2) 茎の部位別収穫が必要である。

ケナフ品種は北方系 (キューバケナフ: *H. cannabinus*) と南方系 (タイケナフ: *H. sabdariffa* var. *altissima*) に大別される [4]。本試験で供試したローゼル種は、南方系タイケナフであり、形態的にも他の品種と異なっていた。すなわち、ローゼル種の茎は紅く、鋭い棘がない。この品種は植物学的にも異なっていることを確認すると共に、さらに繊維強度の評価結果からも、他の北方系キューバケナフと顕著に異なっていた。

これらの結果から、繊維強度に優れた北方系キューバケナフ品種を用いて、師部繊維細胞の発達プロセスと繊維物性の関連を調べるのが重要であると思われる。

4. 摘要

組織化学的観察から、束状集合した師部繊維細胞は表皮層に沿って配列されており、その細胞壁は極めて厚かった。この細胞壁構造が繊維物性を支配する因子であることが明らかになった。ケナフの9品種から得られた繊維について、それらの繊維強度を評価した結果、キューバケナフに属する品種では、繊維強度に有意な差異は認められなかった。しかし、タイケナフに属する品種では、繊維強度が低かった。

5. 謝辞

繊維強度の測定をご指導をいただいた京都工芸

繊維大学 西村太良教授、ケナフ繊維についてご教示いただいた河原 豊助教授に感謝いたします。

引用文献

- [1] 平田慎治 (2005) : 天然繊維 (ケナフ) を使った自動車用部品開発の現状と将来. ケナフ15周年記念予稿集, 15-16
- [2] 木村照夫 (2005) : ケナフ繊維と生分解樹脂の複合化. ケナフ15周年記念予稿集, 13-14
- [3] 奥平有三 (2005) : ケナフボードの開発と応用. ケナフ15周年記念予稿集, 17-18
- [4] 志水勝好 (2001) : ケナフの数種品種・系統間における生育の差異. 農業および園芸, 76, 16-20
- [5] 山本泰由 (2002) : 新規水田転作作物ケナフの栽培・収穫・調製技術等の開発. 農林水産省農林水産技術会議事務局編, p.63

財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

1. 平成17年度各種学会口答発表 (下線は財団理事及び評議員)

- 1) 加古 武: カルミン醗色素の後媒染によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.35, 2005, 福岡
- 2) 小谷英治・武藤清佳・中田香奈・森 肇: カイコRNA結合蛋白質BmTRN-1の選択的スプライシング. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.18, 2005, 福岡
- 3) 武藤清佳・小谷英治・森 肇: ハスモンヨトウ由来細胞におけるRNA結合蛋白質の機能解析. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.41, 2005, 福岡
- 4) 亀井加恵子・田中慶利・一田昌利・三好 明・山崎 隆: 家蚕及び野蚕の絹セリシンの比較研究. 日本野蚕学会第11回大会, p.6, 2005
- 5) 遠藤 太・藤井佳美・野口亜友美・河本愛美・一田昌利: 家蚕繭の紫外線蛍光発現と人工飼料桑葉含有率との関連. 日本蚕糸学会第61回九州支部・71回関西支部研究発表会, p.34, 2005, 福岡
- 6) 光澤滋美・前川輝彦: 糊付け布の通気性について—澱粉の場合—. 日本家政学会関西支部, 第27回研究発表会, 京都教育大学, 講演要旨集, p.14, 2005
- 7) 鳥袋順二・中川里紗・古澤壽治・大槻良樹 (2005): 熱帯性蚕 (Nang-Lai) の全齢人工飼料育. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.40, 2005, 福岡
- 8) 有松祐治・古澤壽治・鈴木英子・野島久美恵・長岡俊治・永松愛子・鈴木ひろみ、嶋津 徹・石岡憲昭: カイコ胚発育期の遺伝子発現に及ぼす重粒子線の影響. 日本宇宙生物科学会第19回大会, 予稿集, p.43, 2005
- 9) 有松祐治・古澤壽治・鈴木英子・野島久美恵・長岡俊治・永松愛子・鈴木ひろみ、嶋津 徹・石岡憲昭 (2005): カイコ個体での形質および重粒子線影響解析. 日本放射線影響学会第48回大会講演要旨集, p.139-140, 2005
- 10) 安田幸広・長岡純治・森 肇: 多角体を用いたタンパク質分子間相互作用の解析. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.39, 2005
- 11) 野津裕之・宿南知佐・開 祐司・森 肇: FGF2両相化多角体を用いた細胞の増殖誘導・分化制御への応用. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.37, 2005
- 12) 森山悠子・松本浩之・岡 崇史・山本真史・森 肇・田中博光・山川 稔: AcNPVとpiggyBacを用いた形質転換法によるカイコ*Cactus*遺伝子のRNAi. 日本蚕糸学会第61回九州支部・第71回関西支部合同研究発表会講演要旨集, p.38, 2005

2. 平成17年度各種学会誌投稿論文

- 1) 八並一寿・福田栄一・一田昌利・小野寺敏: 京都工芸繊維大学に保存されている桑保存品種の α -グルコシダーゼ阻害活性. 日本未病システム学会誌, 11(1), 167-169, 2005
- 2) 佐藤昌子・季 沅貞・前川輝彦・高橋重三: 絹糸の光反射特性に関する研究—生糸への撚り掛けの影響—. 日本繊維製品消費科学会誌, 46, 576-584, 2005
- 3) Kotani, E., Hayashi, Y., Sugimura, Y., and Furusawa, T.: Identification of novel double-stranded RNA produced in the midgut epithelia tissue of the silkworm, *Bombyx mori*, during infection by a cytovirus

1. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 74, 29-34 (2005)
- 4) 小谷英治・齋藤 準・林 幸之：昆虫培養細胞のRNA結合タンパク質人為抑制と外来タンパク質発言の効率. 生化学, 76, 56-59, 2005
- 5) Huang, J., Arimatsu, Y., Sadakane, K., Endo, Y., and Furusawa, T. (2005) : Gene expression and Localization of Trehalase during Embryonic Development of the Silkworm, *Bombyx mori*. Int. J. Wild Silkmoth & Silk, 100, 17-26
- 6) Kawahara, Y., Tadokoro, K., Endo, R., Shioya, M., Sugimura, Y., and Furusawa, T. (2005) : Chemically Retted Kenaf Fibers. Sen'I GAKKAISHI, 61, 115-117
- 7) Huang, J., Furusawa, T., Sadakane, K., and Sugimura, Y. (2006) : Purification and Properties of Two Types of Soluble Trehalase from Embryonic Larvae of the Silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnology & Sericology, 76 (印刷中)
- 8) 烏袋順二・中川里紗・大槻良樹・古澤壽治 (2005) : 人工飼料育したタイ原蚕種Nang-Laiの繭糸の性質. 衣笠繊維研究所研究報告, No.9 (印刷中)
- 9) Tanaka, T., Yamamoto, M., Moriyama, Y., Yamao, M., Furukawa, S., Sagisaka, A., Nakazawa, H., Mori, H., and Yamakawa, M. (2005) : A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. Biochim. Biophys. Acta. 1730, 10-21
- 10) Ikeda, K., Nakazawa, H., Shimo-Oka, A., Miyata, S., Hosokawa, Y., Matsumura, S., Masuhara, H., Belloncik, S., Alain, R., Nomura, N., Goshima, N., Morigaki, K., Kawai, A., Kuroita, T., Kawakami, B., Endo, Y., and Mori, H. (2006) : Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. Proteomics, 6, 54-66
- 11) Kato, Y. : Comparative Studies of Two-Dimensional Electrophoresis on Galactosidase Relating to *Bombyx* Lectin Activity. Journal of Contemporary Human Life Science, Tczukayama University, Vol.1, 3-12 (2005)

平成17年度講演活動報告

〔演 題〕 カイコの休眠の生理化学と宇宙生物学への応用

京都工芸繊維大学繊維学部教授

本財団 理事

古澤壽治

日時・場所 平成17年10月4日

京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド化学教育研究センター

対 象 者 日産自動車研究所研究員12名

講 演 要 旨 「日産自動車研究所セミナー」として上記の講演と施設見学を行った。講演の内容は、カイコの休眠に関する生理化学、特に糖代謝と律速酵素の精製について講演した。そして、蚕卵が1年以上休眠することから宇宙放射線影響を調べるのに最適な生物材料であることを、これまでの実験結果から説明した。

〔演 題〕 シルクと睡眠

京都工芸繊維大学繊維学部助教授

本財団 評議員

一出昌利

日時・場所 平成17年11月25日 綿業会館

対 象 者 日本睡眠環境学会会員および一般市民

講 演 要 旨 シルクの機能性の解説とシルクが睡眠に及ぼす影響の考察並びに新しいシルク寝具・寝装製品開発の可能性に関し講演

〔演 題〕 蚕を用いた遺伝子工学実験

京都工芸繊維大学繊維学部教授

本財団 理事

古澤壽治

日時・場所 平成18年12月2日 マハサラカム大学理学部

対 象 者 マハサラカム大学理学部学生、大学院生

講 演 要 旨 蚕の生理学、特に消化液からの酵素精製から遺伝子配列の決定と、その基礎となる分子生物学の基礎について講義した。

発行所 財団法人 衣笠会 繊維研究所
〒603-8326
京都市北区北野下白梅町29
TEL 075 461 5949
TEL/FAX 075-463-6679
E-mail zai-kinugasakai@nifty.com
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/kinugasa/>

会 長 林 幸 之

印刷所 為国印刷株式会社
〒604-8457
京都府京都市中京区西ノ京馬代町6-16
TEL 075-462-7889
FAX 075-464-3923

