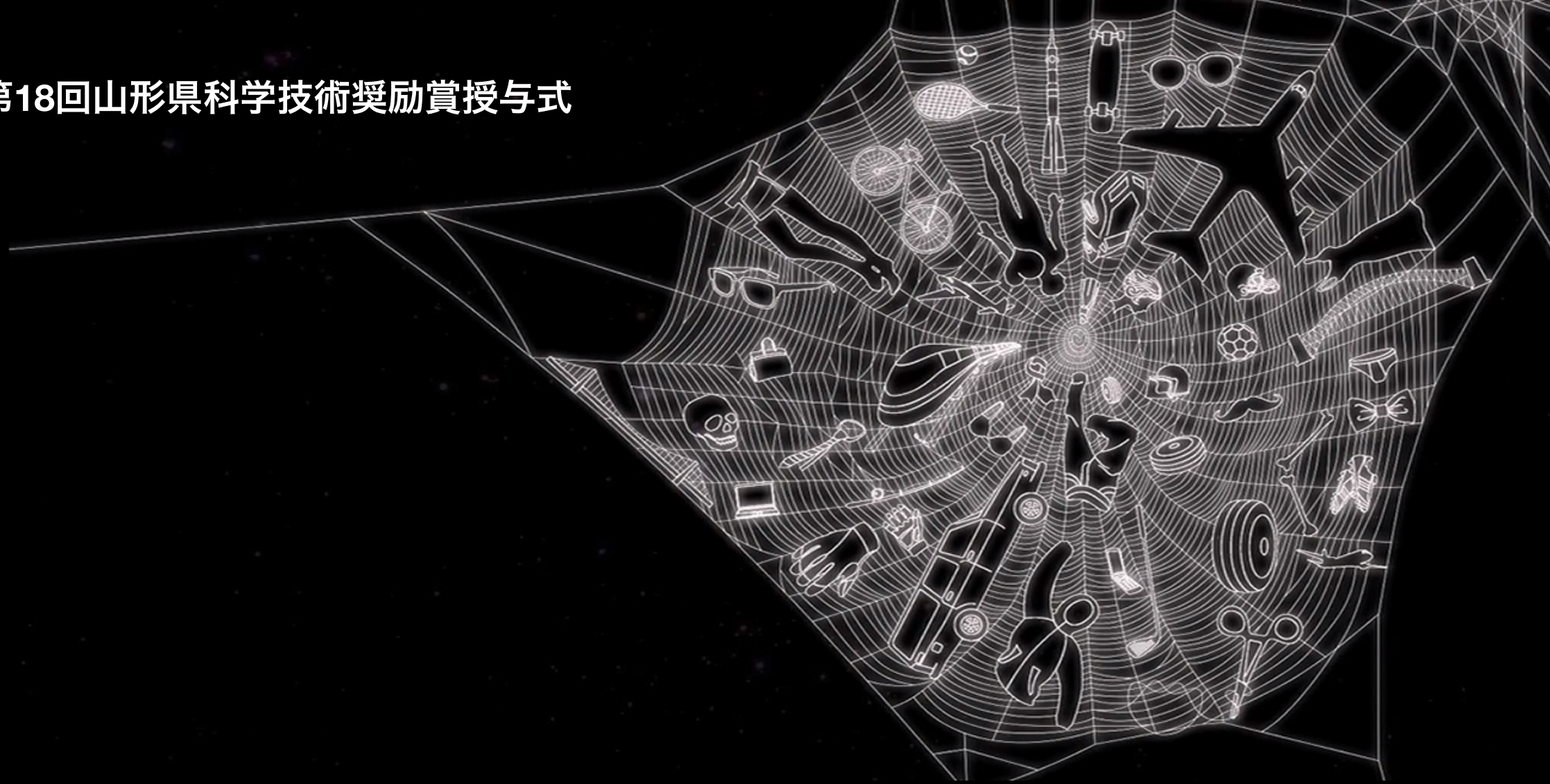
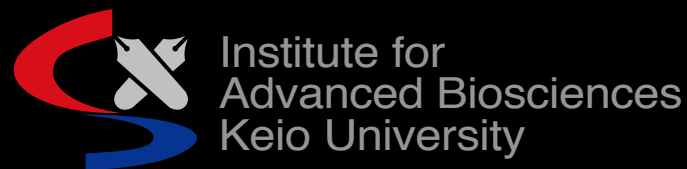


令和2年2月7日 第18回山形県科学技術奨励賞授与式

@山形県庁 講堂



天然ゲノムのデザイン原理から学ぶ次世代の タンパク素材活用戦略に関する研究



✕ 慶應義塾大学先端生命科学研究所

河野暢明 (Nobuaki KONO)

Acknowledgements

分類・系統解析



東京大学大学院農学生命科学研究科
生圏システム学専攻

谷川明男

宮下直



首都大学東京 (当時)

新津修平

新海明

採集



筑波大学
生命環境学群生物学類

鈴木佑弥



佐賀大学大学院
農学研究科生物資源科学専攻

藤田将平

市川武明



中村浩之

篠原麻夏

大利鱗太郎

Daniel A. Moran

物性測定



理化学研究所
環境資源科学研究センター

沼田圭司

MS測定



慶應義塾大学
先端生命科学研究所

森大

実験補助



慶應義塾大学
先端生命科学研究所

高井幸

石井菜穂子

斧澤佑紀

アドバイザー



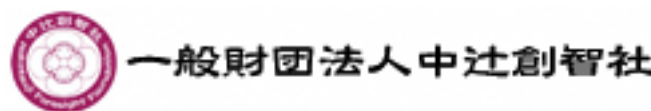
慶應義塾大学
先端生命科学研究所

荒川和晴

富田勝



Grants



そして、世界中の蜘蛛や昆虫達

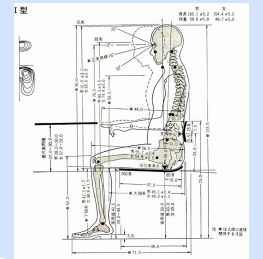
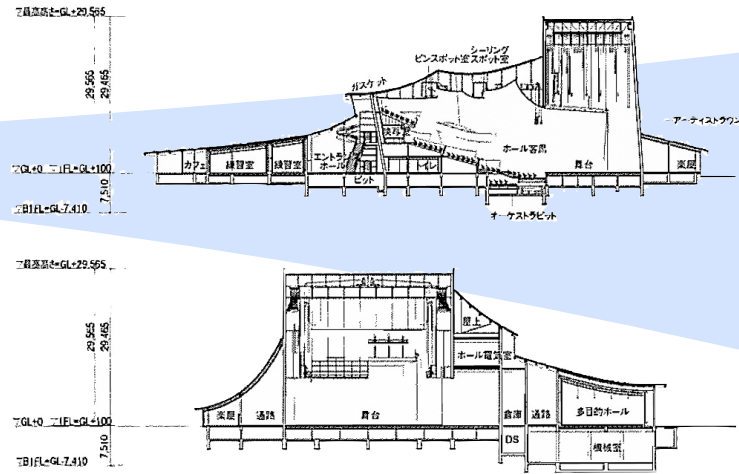
Design (my philosophy)

Blueprint

Rules

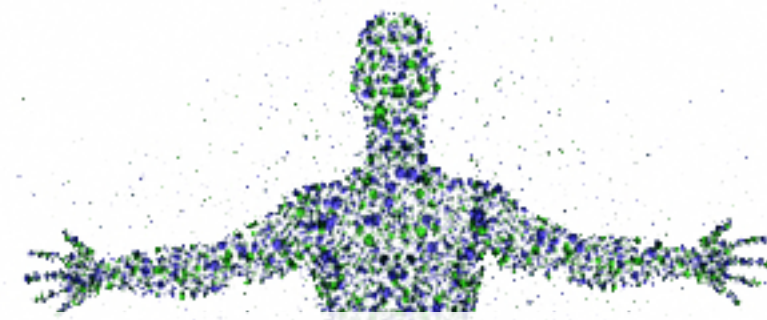


SHOGIN Tsuruoka Art Culture Terrace
TSURUOKA

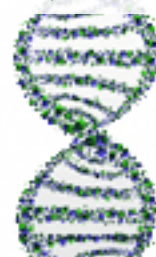


Design objective

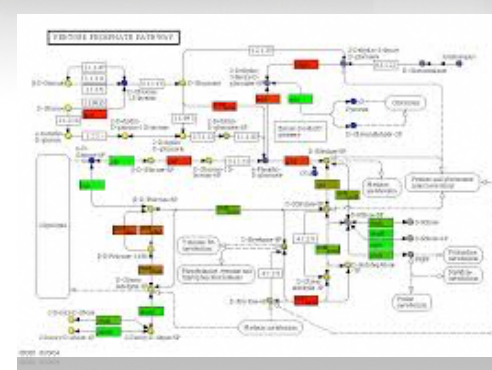
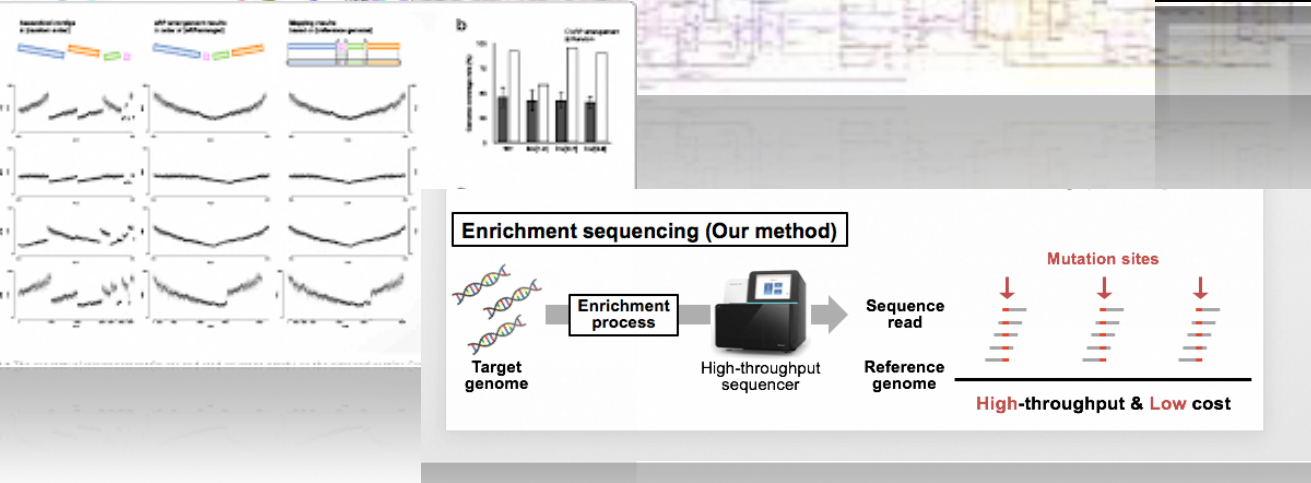
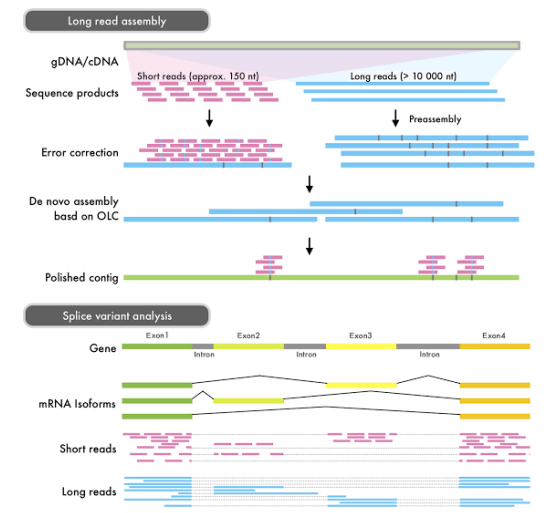
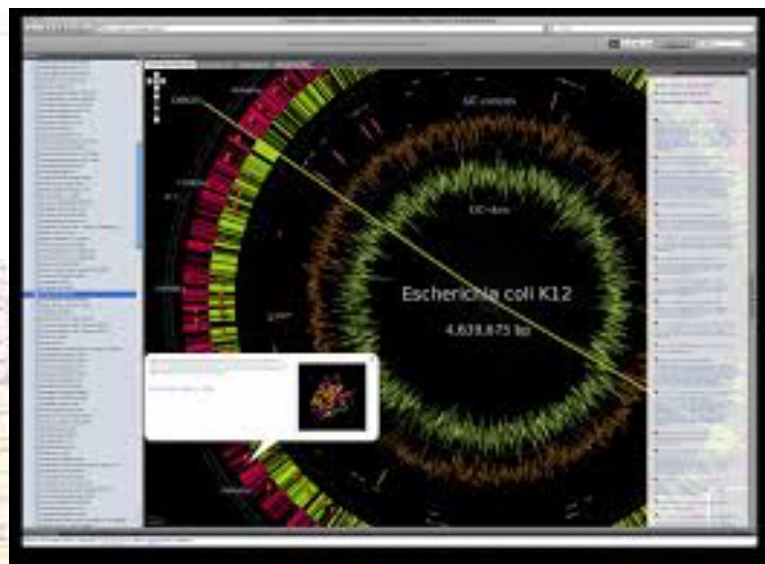
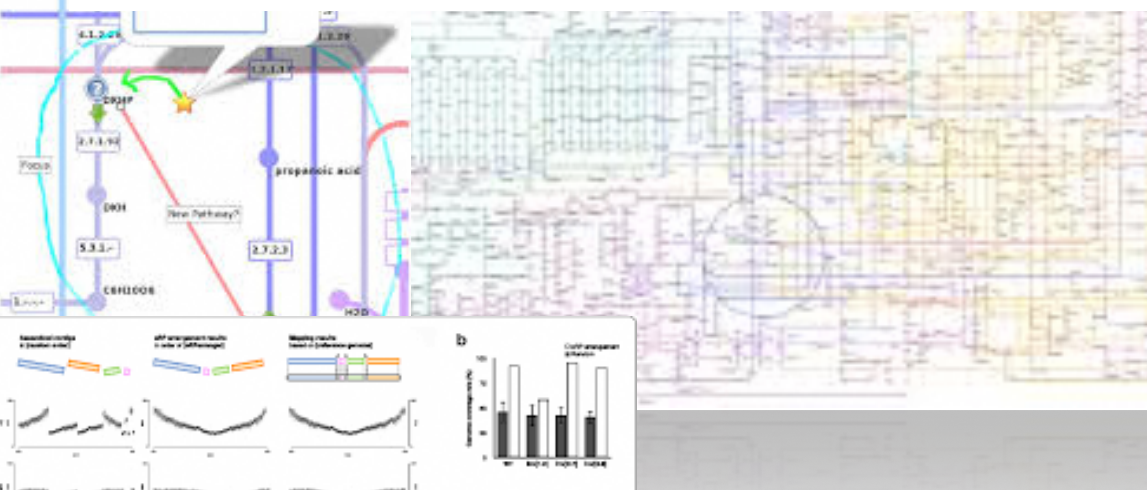
- Bacterial genome
- Synthetic biology
- Biomaterial
- Biomimetics
- Ant, Spider, Moth...
- Behavioural ecology
- Entomology



Genome
as a blueprint of LIFE

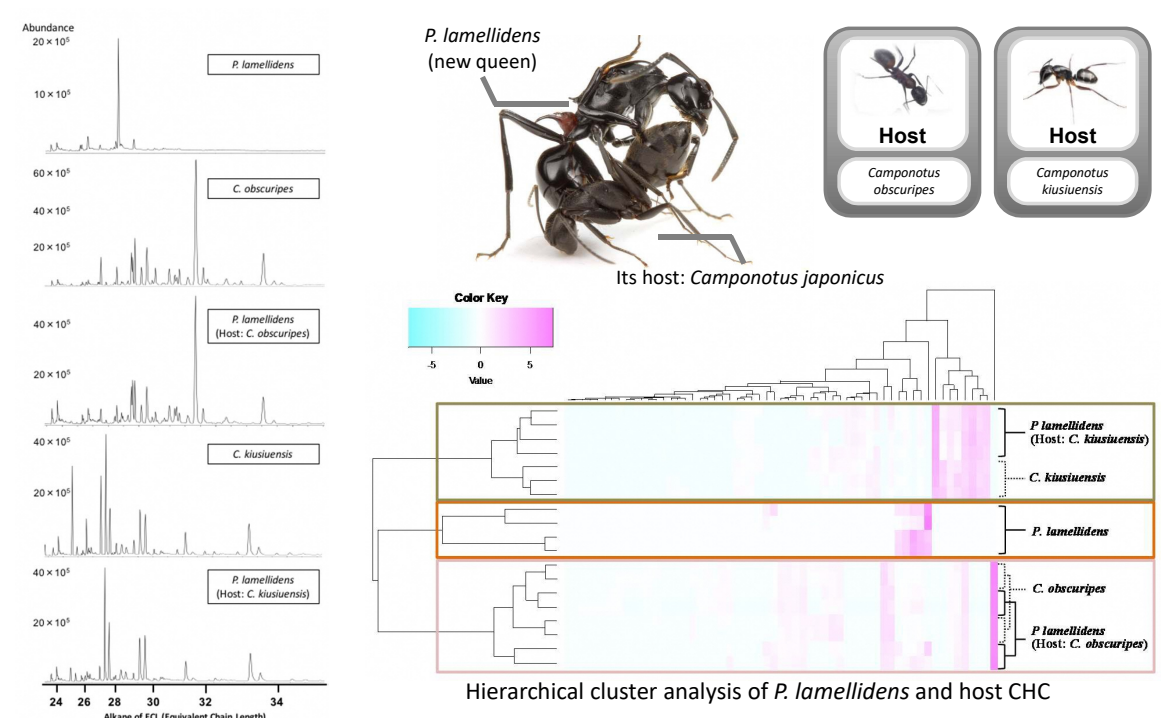


ソフトウェア開発 シーケンス技術の開発

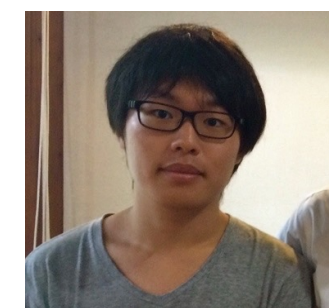


- Dev. Grow. Diff.* (2019)
- bio-protocol* (2019)
- PLoS ONE* (2012)
- BMC Bioinformatics* (2009)
- In silico biology* (2005)

トゲアリの寄生行動原理を定量的に理解する

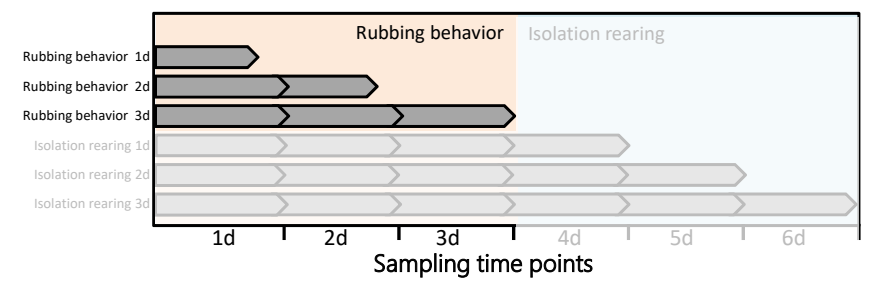
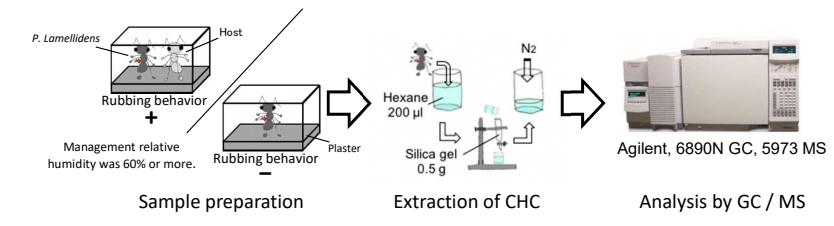


行動



D1
Hironori Iwai

生化学



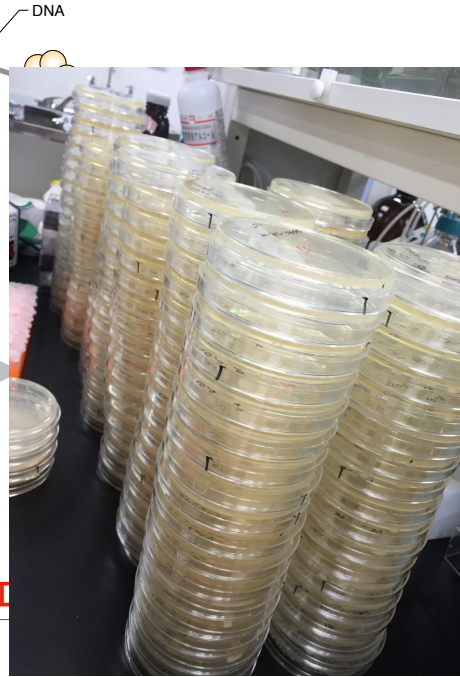
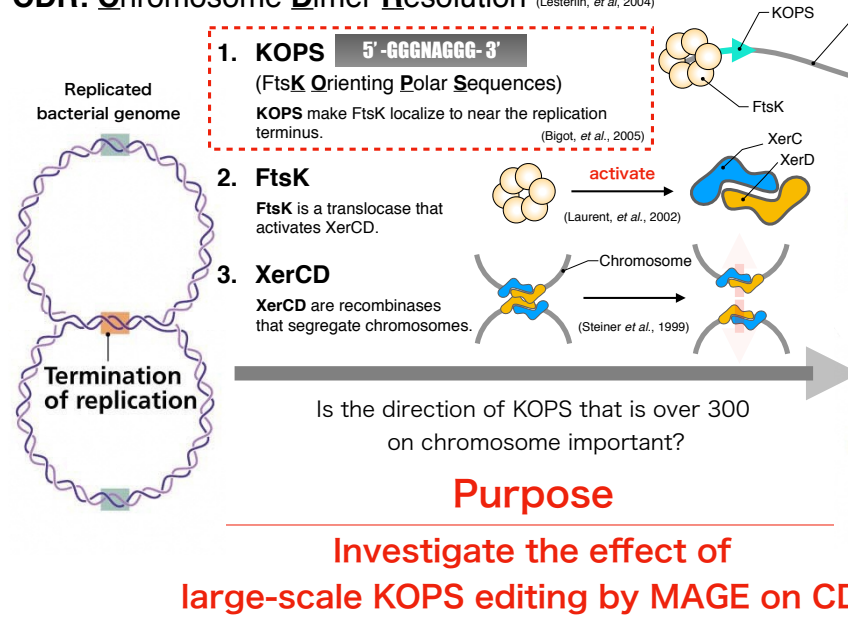
CHC chromatogram of *P. lamellidens* and host
P. lamellidens changes its cuticular hydrocarbon (CHC) profiles by rubbing behavior.

バクテリアゲノム構造のデザイン原理を定量的に理解する

Feasibility study of the whole genome editing technology for understanding the bacterial genome plasticity

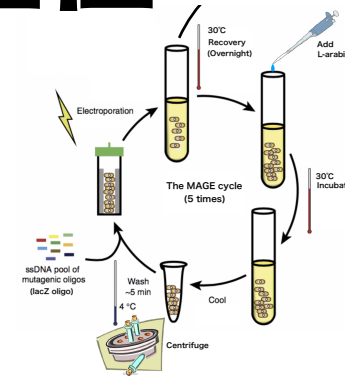
B2 Tomoki Takeda

CDR: **C**hromosome **D**imer **R**esolution (Lesterlin, et al, 2004)



ゲノム構造

可塑性



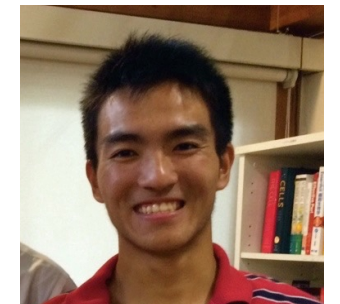
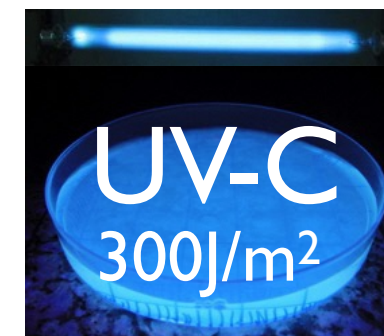
B3
Tomoki Takeda

Genome Biol Evol. (2018)
BMC Genomics (2017)
Nat Struct Mol Biol. (2015)
J Mol Biol. (2014)

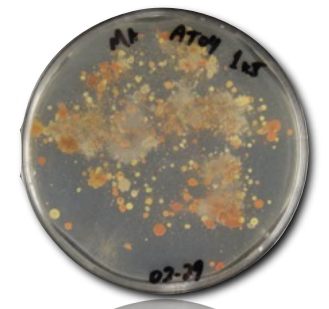
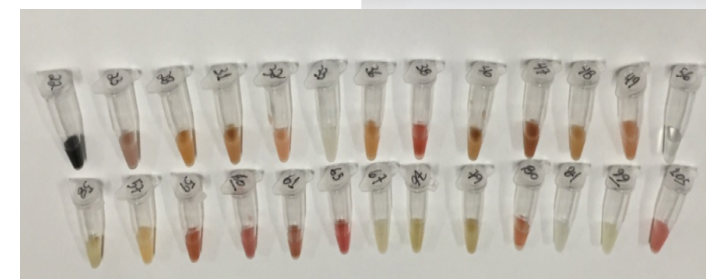
極限環境微生物からUV耐性能の保存性を探る



色素 進化

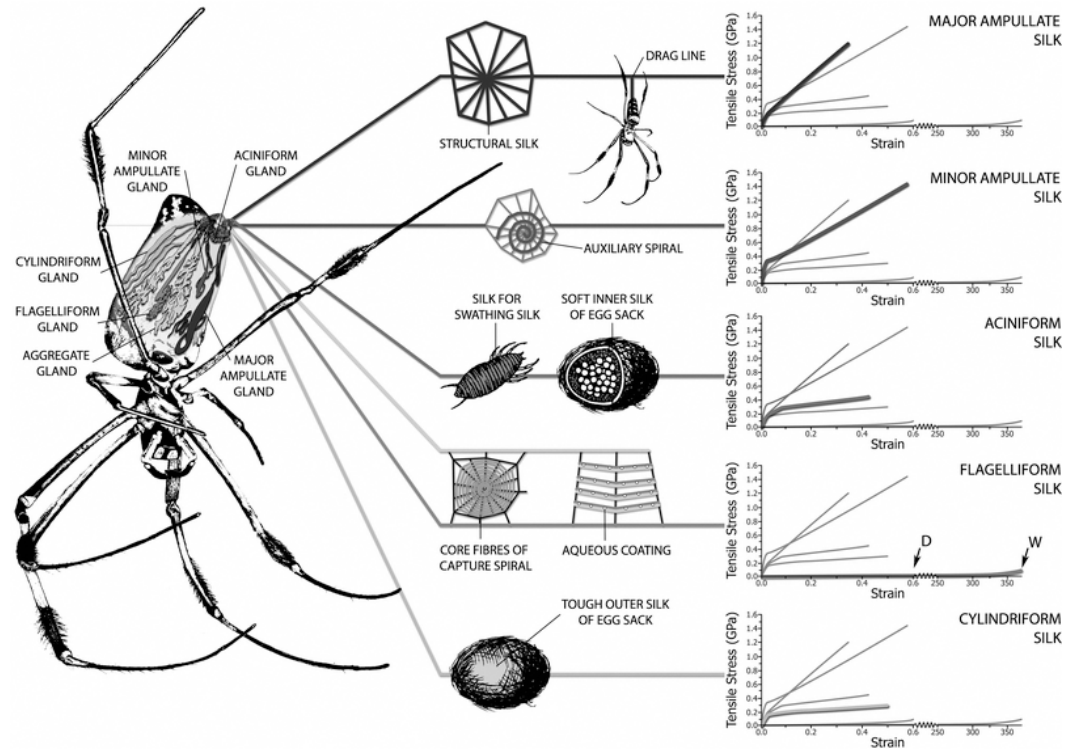


M2
Kounosuke Ii



Journal of Genomics (2019)

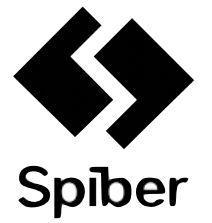
クモ糸遺伝子のデザイン原理を定量的に理解する



情報

GPGGYGPGQGGPQGGPSGYGPGSGP
 GSAAAAAAAAAGAGPGGYGPGQQQ
 GPGQQGPGSGYGPSGPGSGSATAV
 AAATGAGPGGYGPGQQGPGGYGP
 GQQGPGSGPGSAAAAAAAAA

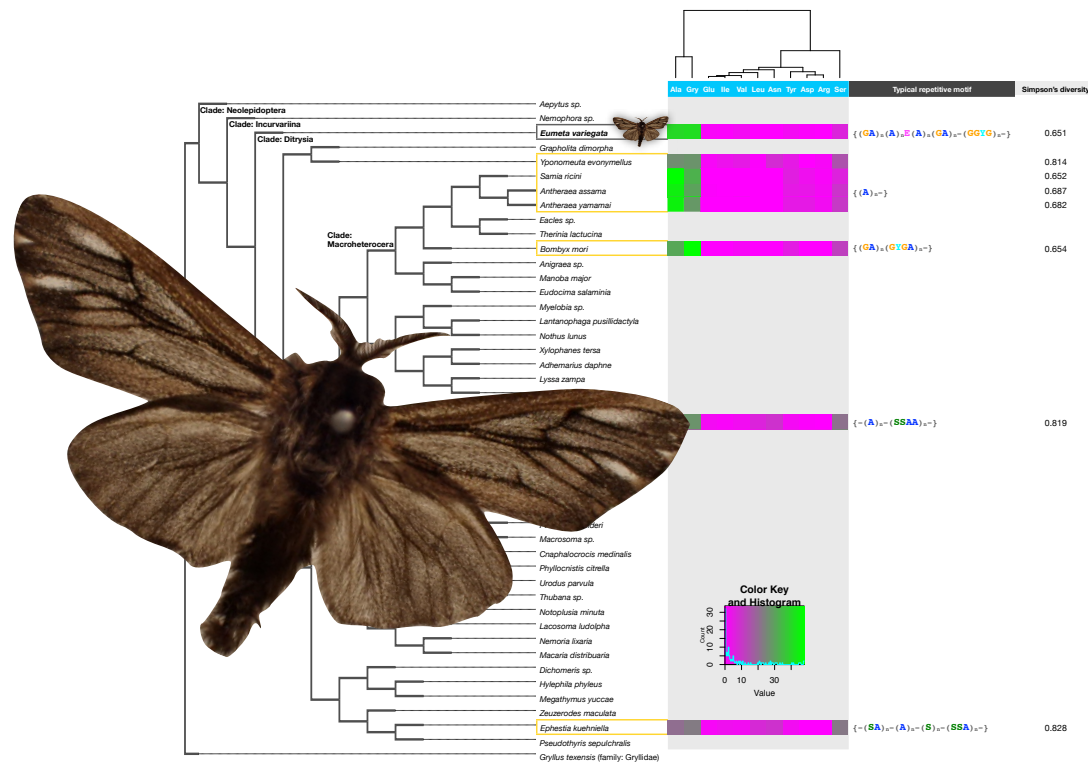
有機
 素材



Mol. Ecol. Res. (2016)

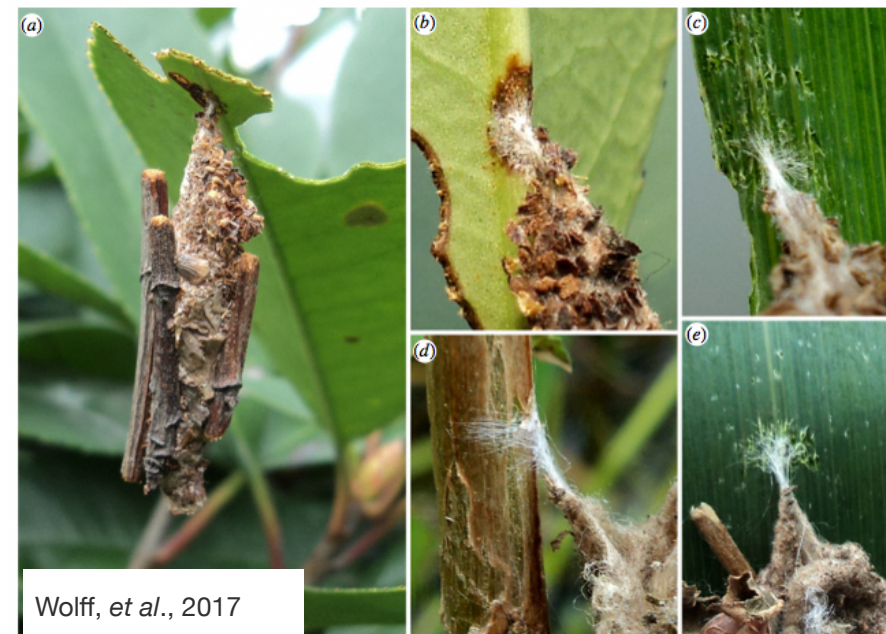
Sci. Rep. (2019)

ミノガゲノム比較解析で明かされる配列構造と物性の関係性



配列

物性

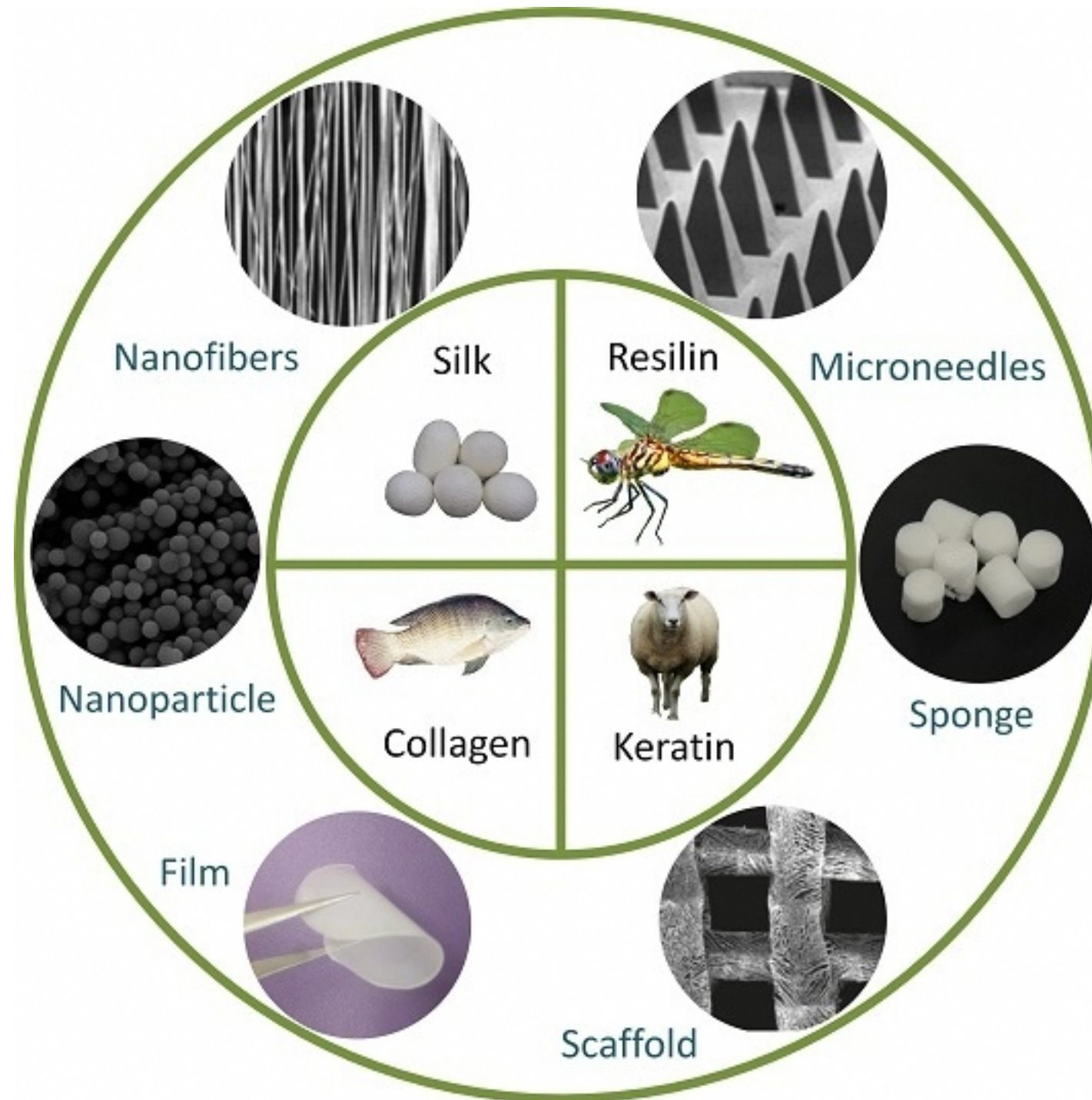


Wolff, et al., 2017



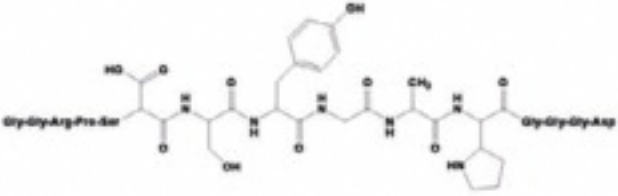

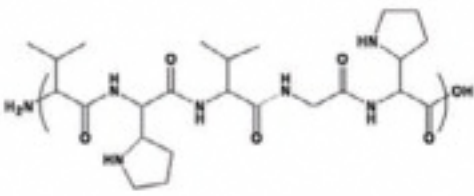

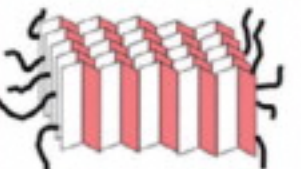


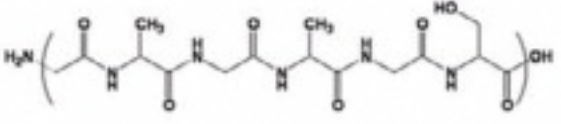

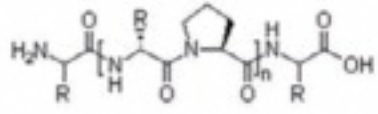
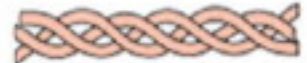
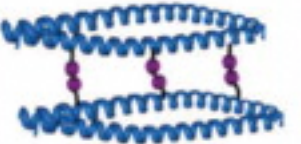

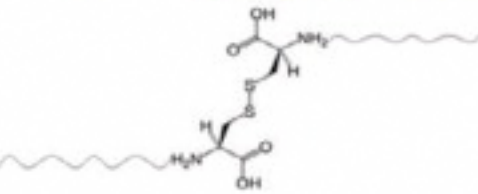

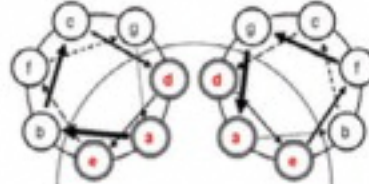

Communications Biol. (2019)

Design objective:

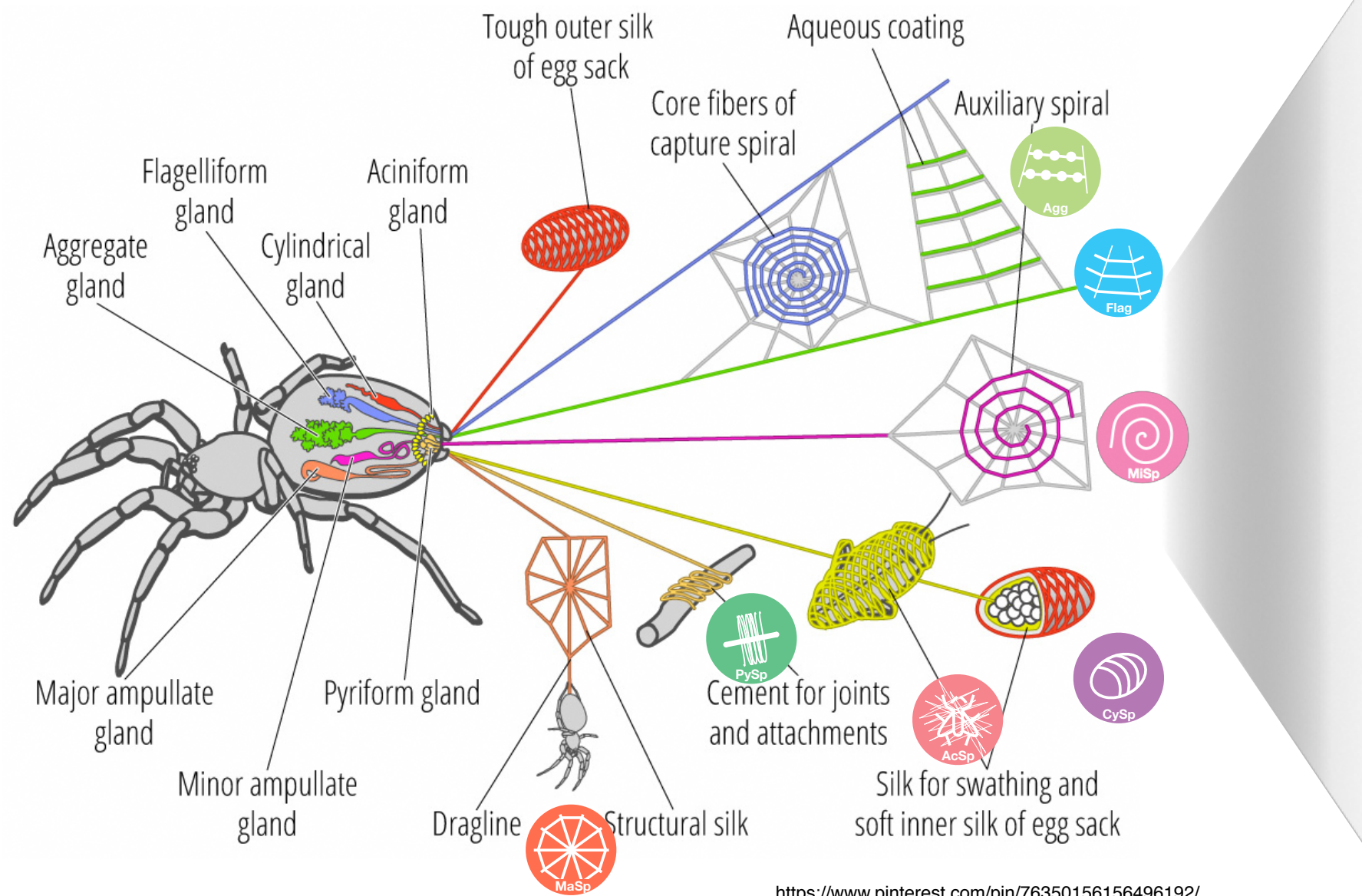
Protein-based composite materials



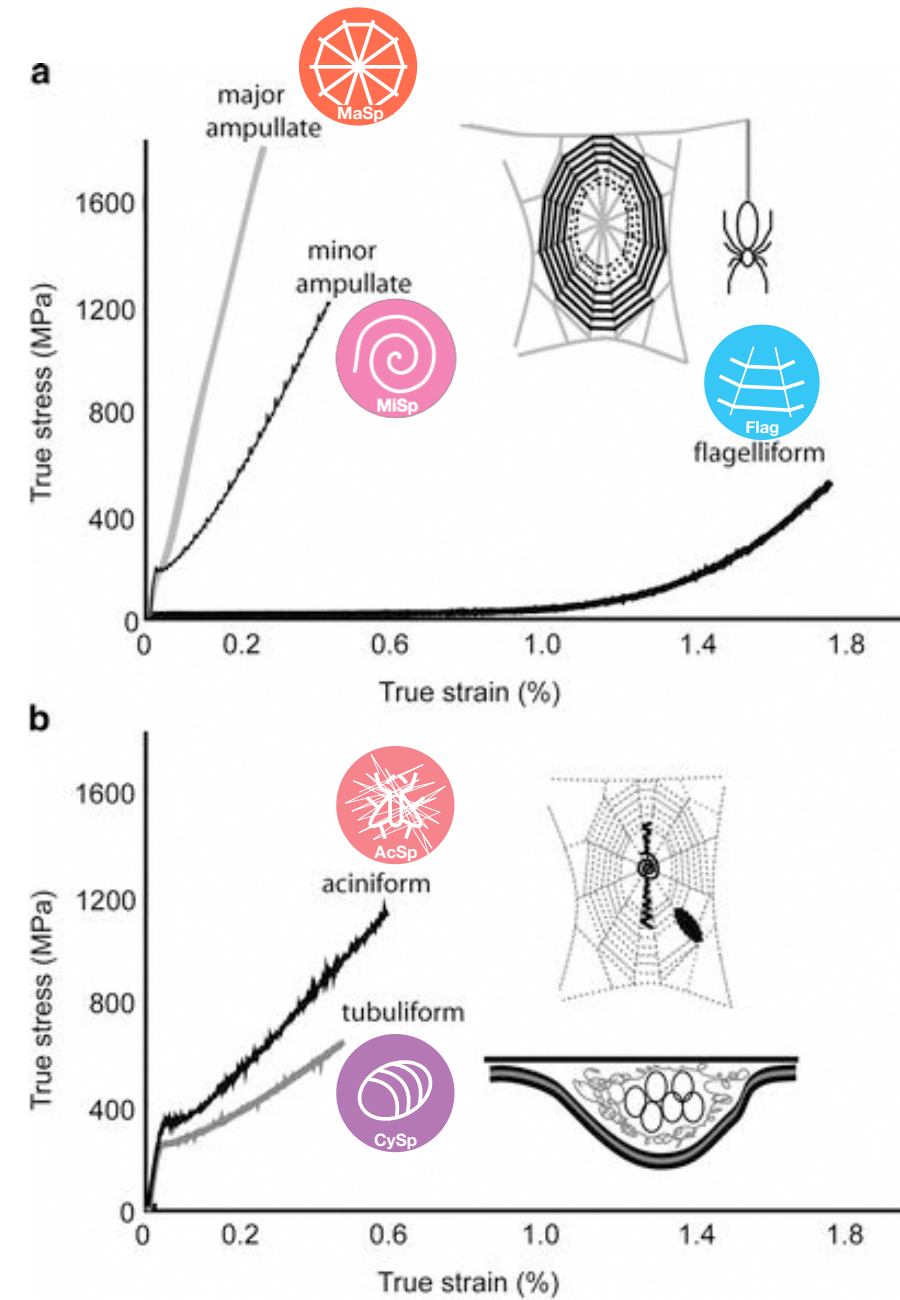
Protein-based composite materials

 <p>β-turns</p>	<p>Resilin</p>  <p>$[GGRPSDSYGAPGGGN]_n$</p> 	<p>Elastins</p>  <p>$[VPVGP]_n$</p> 	 <p>β-spirals</p>
 <p>β-pleated sheets</p>	<p>Silks</p>   <p>$[GAGAGS]_n$</p> 	<p>Collagens</p>  <p>$[GPX]_n$</p> 	 <p>Triple-helices</p>
 <p>Twisted-helices</p>	<p>Keratins</p>  <p>α-[abcdefg]_n or β-[GXG]_n</p> 	<p>Bee Silks</p>  <p>$[abcdefg]_n$</p> 	 <p>Coiled-coils</p>

Spiders can weave different types of silk



<https://www.pinterest.com/pin/76350156156496192/>



Blackledge, 2013, Spider Silk: Molecular Structure and Function in Webs

Approaches with Multiple-omics

ゲノムを読んで、遺伝子を決めて、タンパクを見る

Genome



Transcriptome



Proteome

Metabolome



Silk protein

Spider genomes

Fibroin gene

ジョロウグモ
Nephila clavata

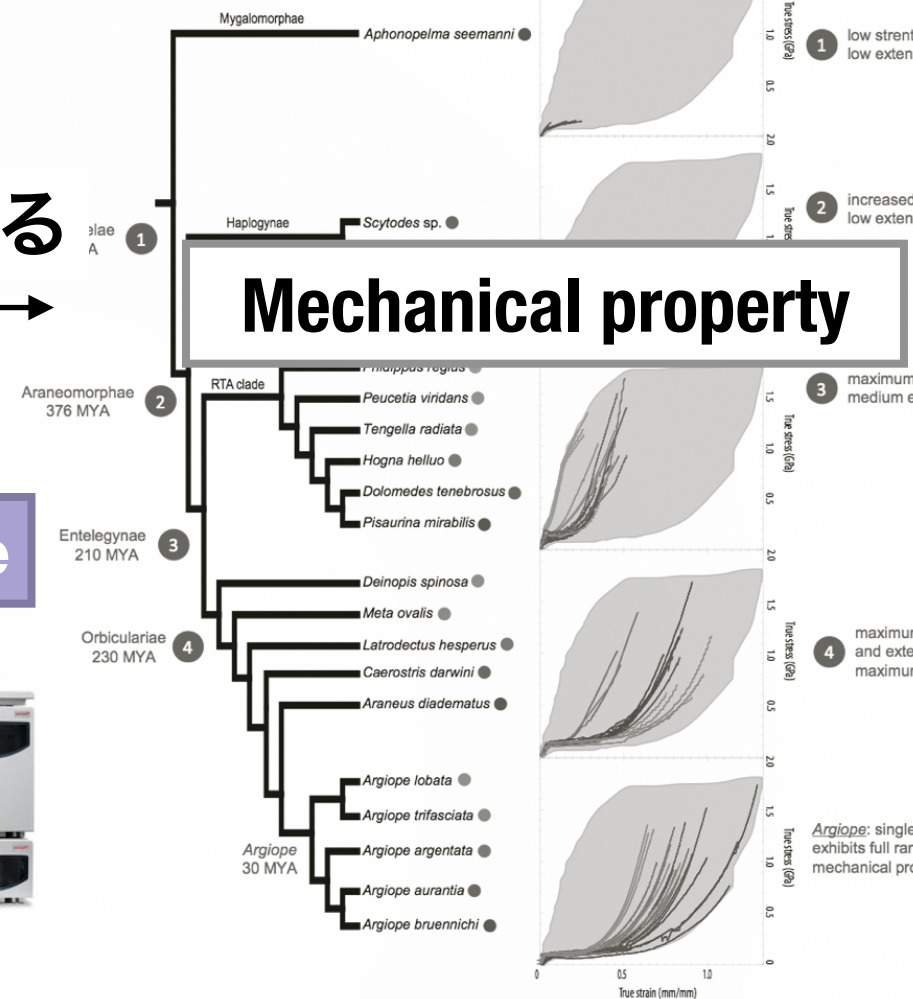


オニグモ
Araneus ventricosus



Bagworm Spiders

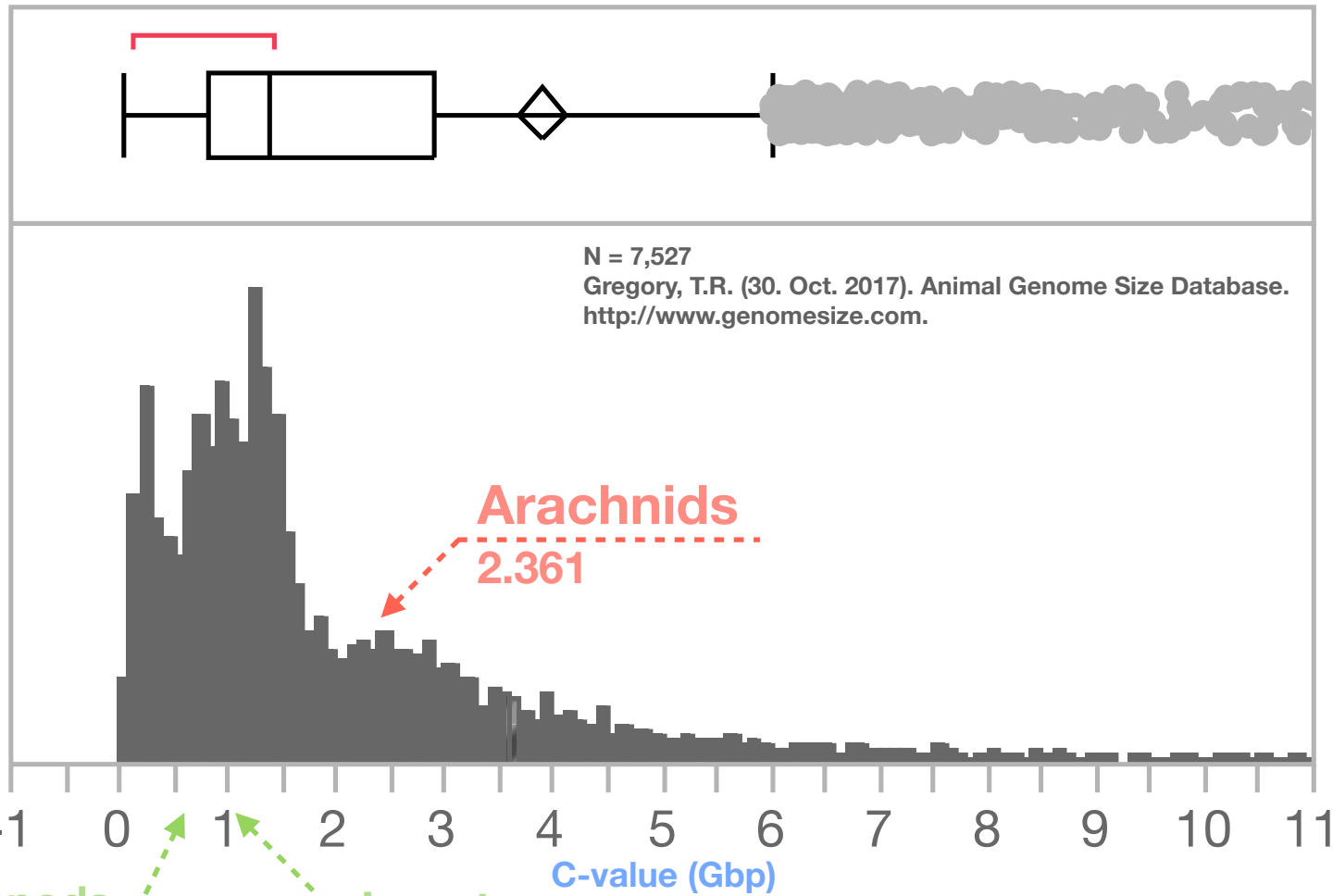
Mechanical property



オオミノガ
Eumeta variegata

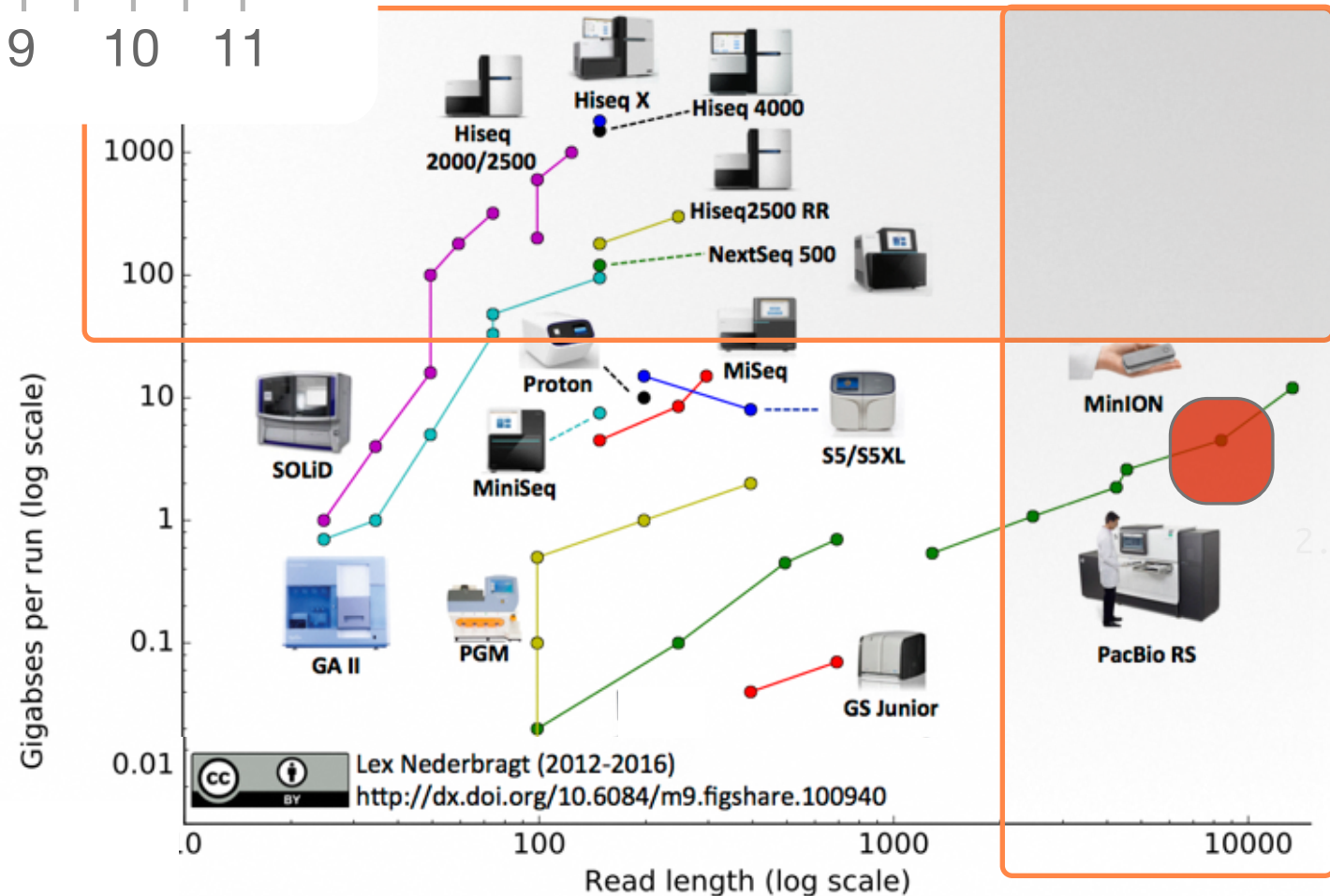


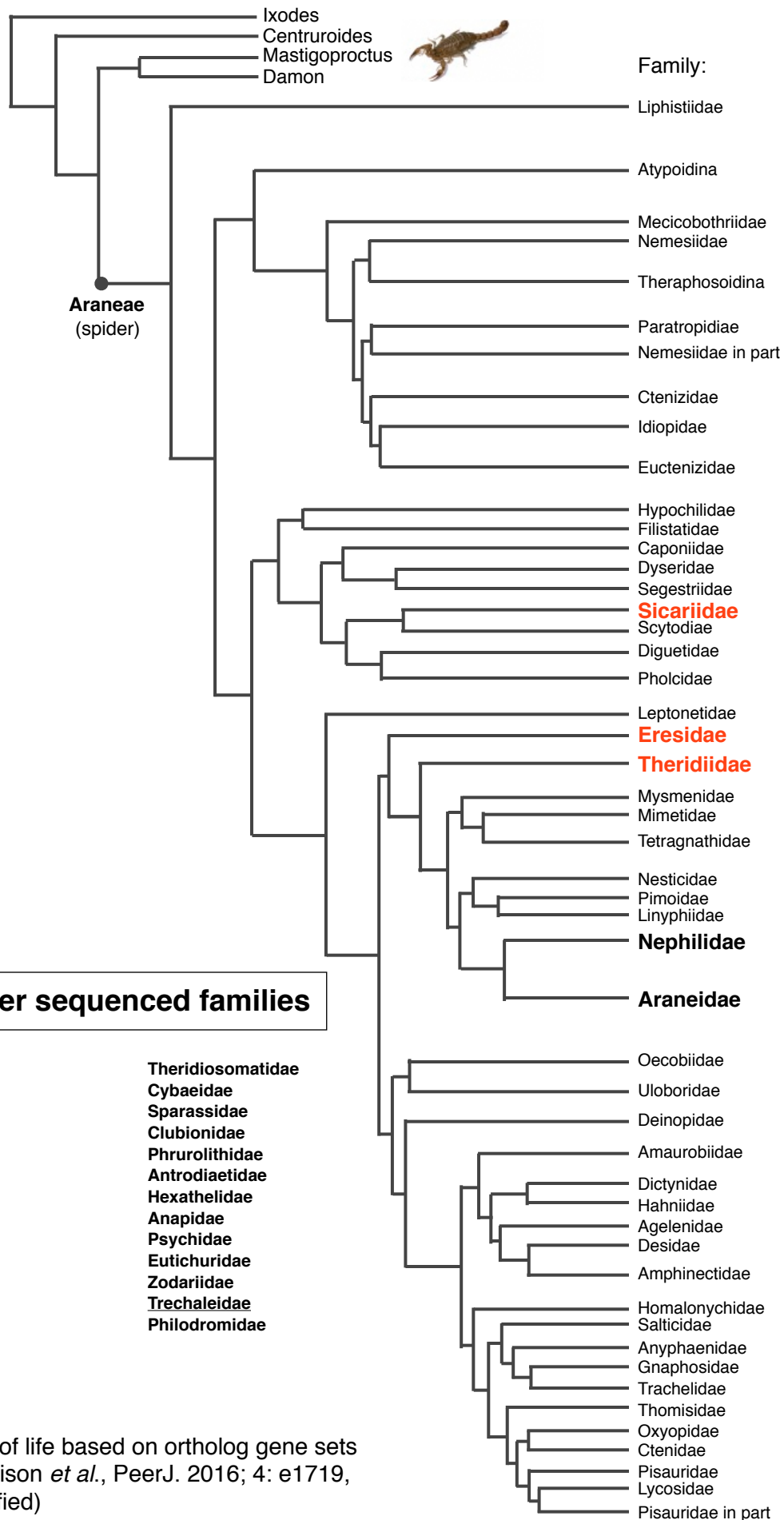
Animal genome size distribution



◀ 非常に大きなゲノムサイズ

複数のシーケンサーを組合わせた
 Hybrid sequencingが求められる▶



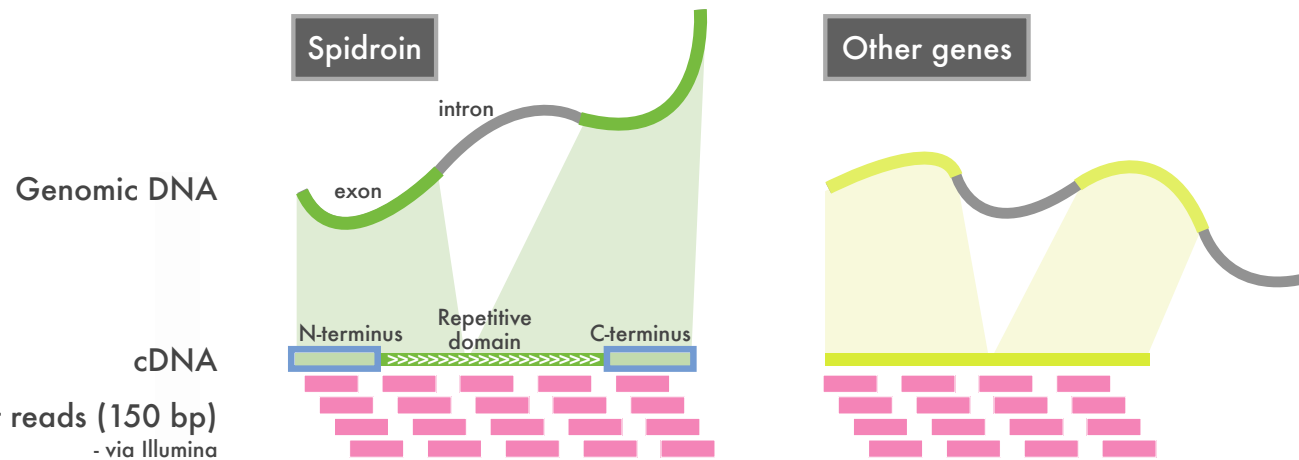


Genome sequenced spiders previously

Species	Reference	Genome size
<i>Loxosceles reclusa</i> (ドクイトグモ)	i5k initiative, 2015	3,262,478,678
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Sanggaard, <i>et al.</i> , 2014	2,738,704,917
<i>Latrodectus hesperus</i>	i5k initiative, 2014	1,137,104,656
<i>Parasteatoda tepidariorum</i> (オオヒメグモ)	i5k initiative, 2013	1,445,396,121
<i>Nephila clavipes</i>	Babb, <i>et al.</i> , 2017	

Tree of life based on ortholog gene sets (Garrison *et al.*, PeerJ. 2016; 4: e1719, modified)

Hybrid assembly for a long repeat spidroin genes



▶ **Short read**
NextSeq (Illumina)



de Bruijn graph assembly



▲ Assemble limitation of the de Bruijn graph with a short k-mer because of repetitive region

Candidate collection

BLAST search

Query: spidroin N/C-terminus

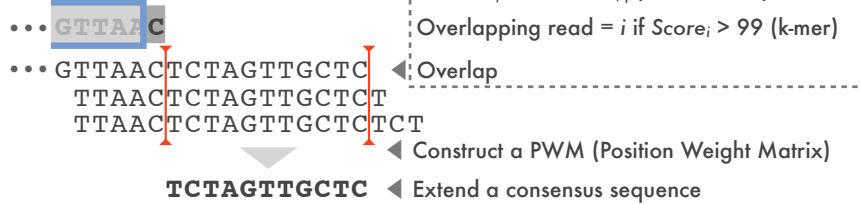


SMoC

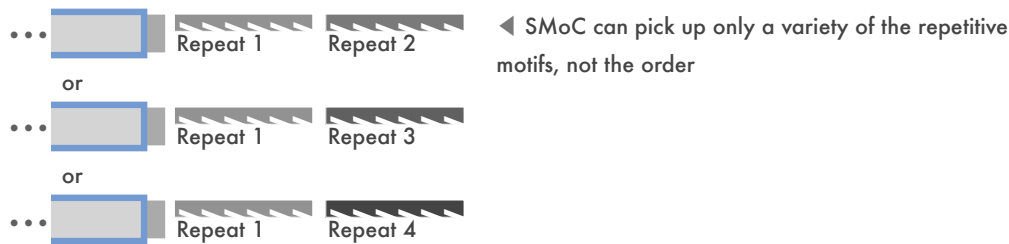
(Spidroin Motif Collection)

Based on an

OLC (Overlap-Layout-Consensus)

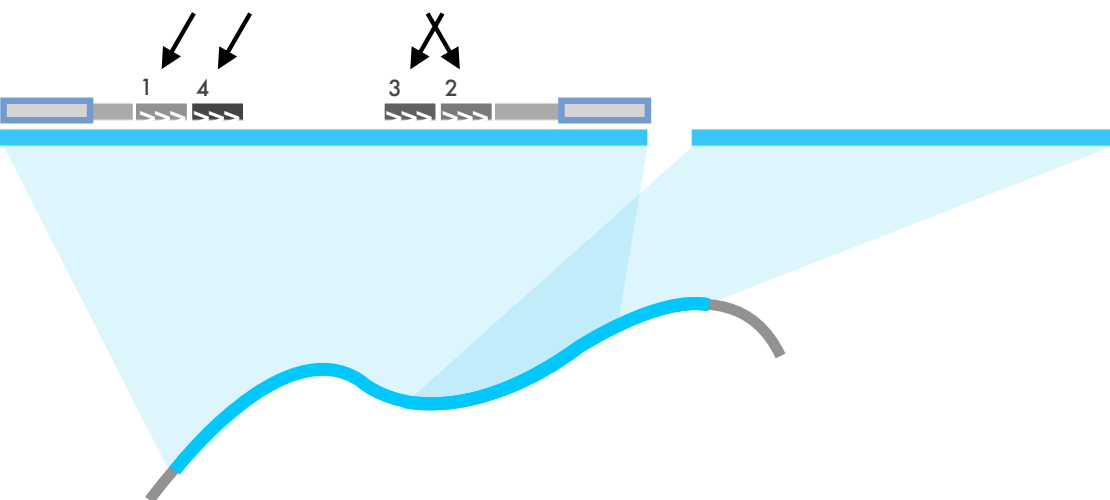


Collected repetitive cassettes



Long read scaffolding

Curated spidroin gene sequence



Long reads (> 10 kbp)

- via Oxford Nanopore Technologies

Genomic DNA

▶ 断片的にではなく、
長く綺麗に読む手法の開発

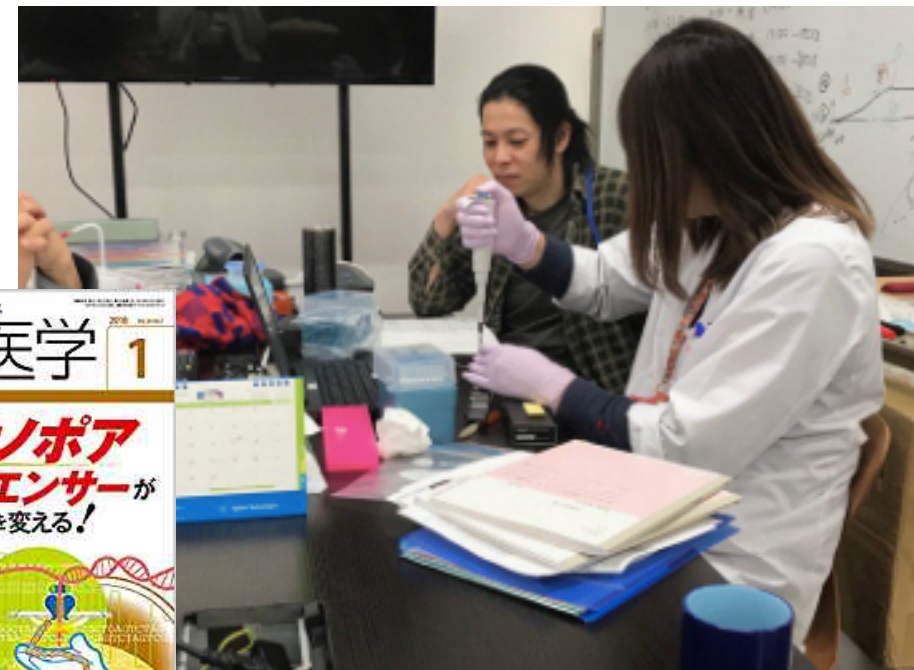
Kono, et al., (2019) Dev. Grow. Diff.

▶ **Long read**

PacBio RS II (Pacific Bioscience)

MinION (Oxford Nanoporetechnologies)





実験医学 2018年1月Vol. 36 河野

ミーティング中にもゲノムシーケンスができる時代

Zika

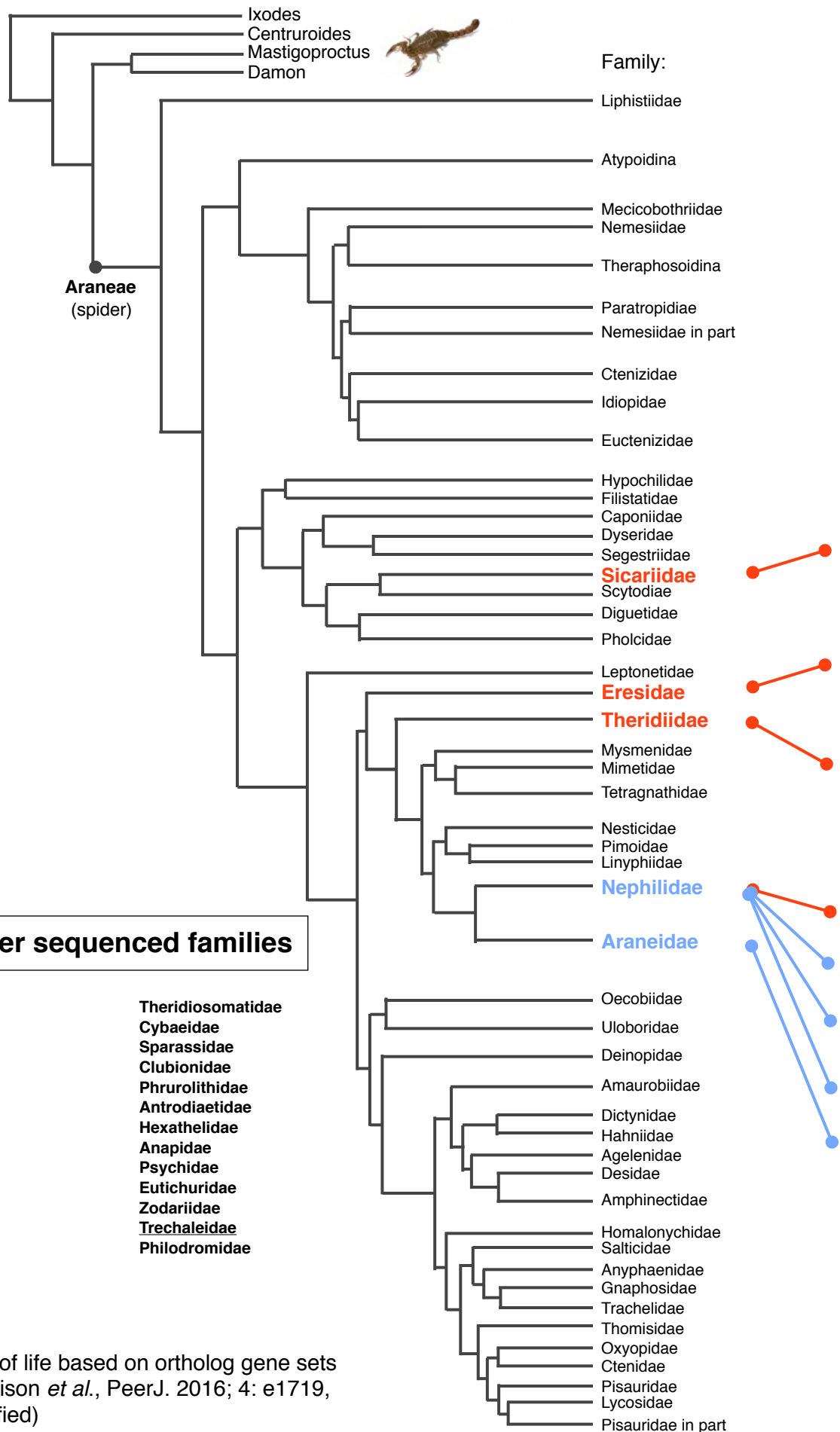


Faria, et al., 2016, Genome Med

Ebola

Quick, et al., 2016, Nature





Genome sequenced spiders previously

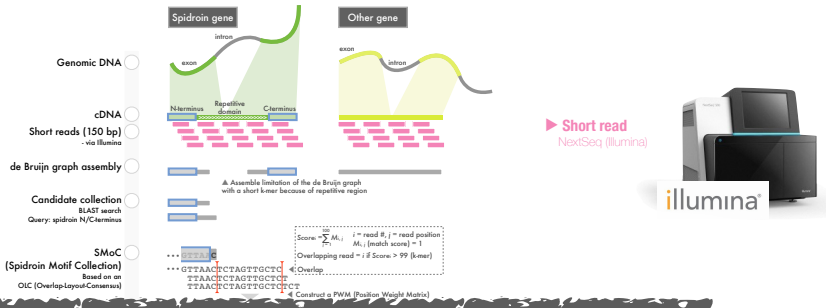
Species	Reference	Genome size
<i>Loxosceles reclusa</i> (ドクイトグモ)	i5k initiative, 2015	3,262,478,678
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Sanggaard, <i>et al.</i> , 2014	2,738,704,917
<i>Latrodectus hesperus</i>	i5k initiative, 2014	1,137,104,656
<i>Parasteatoda tepidariorum</i> (オオヒメグモ)	i5k initiative, 2013	1,445,396,121
<i>Nephila clavipes</i>	Babb, <i>et al.</i> , 2017	
<i>Nephila clavipes</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	2,596,959,803
<i>Nephila clavata</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	2,512,479,445
<i>Nephila pillipes</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	2,722,710,357
<i>Nephila inaurata</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	Approx. 3.0 GB
<i>Caerostris darwini</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	Approx. 2.5 GB
<i>Araneus ventricosus</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	3,060,247,623
<i>Araneus diadematus</i>	Institute for Advanced Biosciences Keio University	Approx. 2.5 GB

Genome sequenced spiders by this study



オニグモ
Araneus ventricosus

Hybrid assembly for high repetitive genes



1. 正確なゲノムを決定し、

Spidroin gene catalogue in *A. ventricosus* (オニグモ)



We found a novel spider silk gene (*MaSp3*)



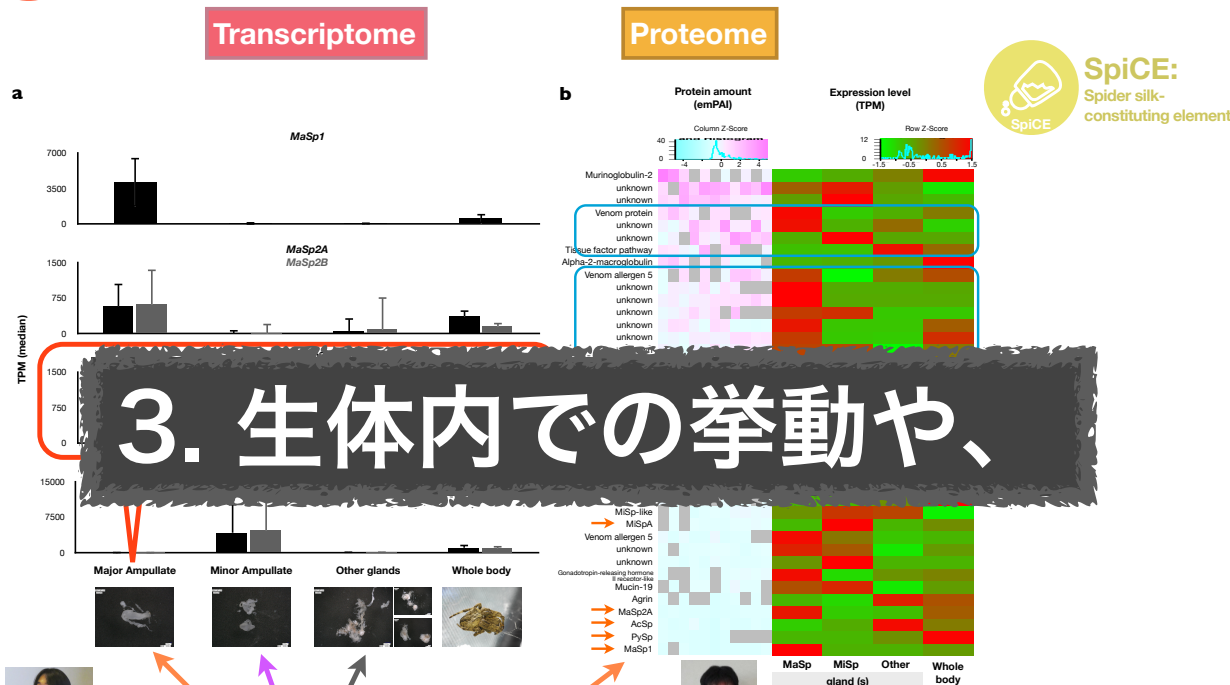
2. 新しい遺伝子を多く発見し、

Kono and Arakawa, 2019, *Dev Growth Diff*

Expression and proteome profiling

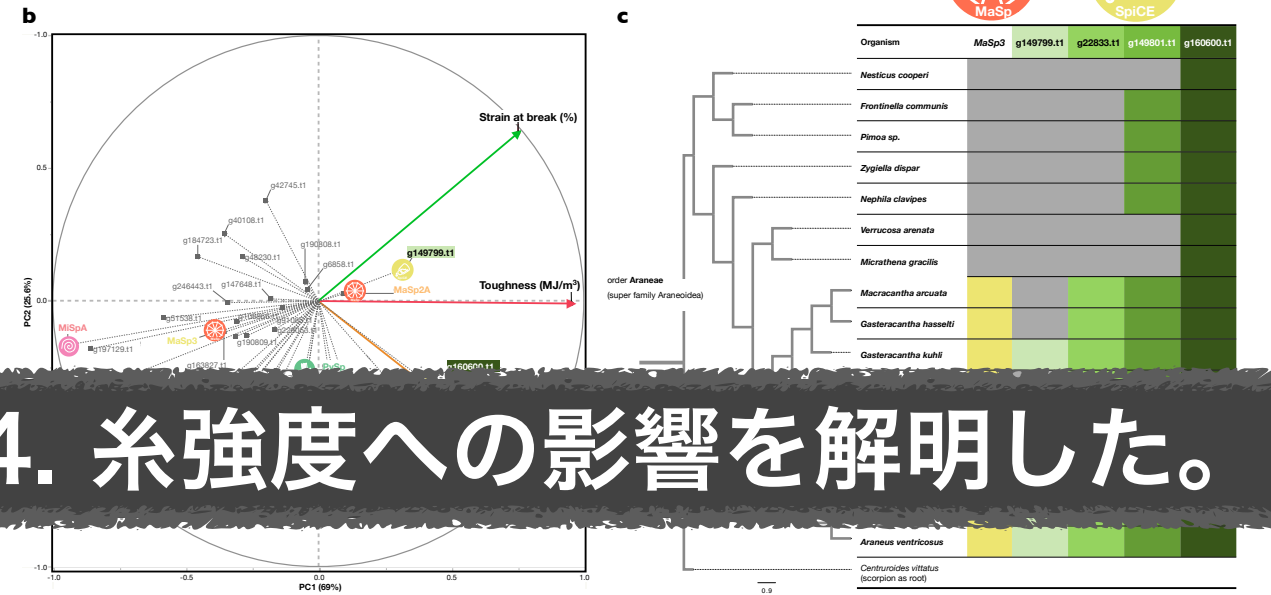


Novel spider silk gene (*MaSp3*)



3. 生体内での挙動や、

Relationship with mechanical properties



4. 糸強度への影響を解明した。

Obtained rules

- Rule 1: Certain variety of spider silk genes
- Rule 2: Complete spider silk gene catalogue
- Rule 3: Relationship between the SpiCE and mechanical property



Prof. Arakawa



Dr. Mori

■慶応義塾大学 河野暢明
 特任講師らは素材ベンチャーのスパイバー(山形県鶴岡市)と共同で、クモの全ゲノム(全遺伝情報)を解読し、糸のたんばく質に関する複数の遺伝子を特定した。人工合成したクモの糸の強度を高め、用途を広げるのに役立つと期待している。

クモの糸作る 遺伝子を特定

研究グループは最新のゲノム解析技術を使い、オニグモの全ゲノムを解読し、糸のたんばく質をつくる遺伝子11種類を特定した。それぞれの糸は1〜4種類の遺伝子の働きでできていた。クモが移動に使う最も強度の高い「けん引糸」には、これまで知られていなかったたんばく質のほか、別のたんばく質も使われていた。クモの糸を人工合成して使うには、複数のたんばく質を組み合わせる必要があるとみている。

クモ糸の配列構造解明



クモ糸の多様性についての研究対象となったオニグモ(慶応大先端生命科学研究所提供)

鶴岡・先端研 河野特任講師のグループ

タンパク質と遺伝子、世界初



慶応大先端生命科学研究所(鶴岡市、富田勝所長は18日、同研究所の河野暢明特任講師(33)は写真1)を中心とするグループがオニグモのゲノム(全遺伝情報)に基づき、クモ糸の種類ごとのタンパク質と関連遺伝子の配列構造を世界で初めて明らかにしたと発表した。糸の強さに関わるとみられる新たなタンパク質の存在も分かり、今後の人工構造タンパク質素材の開発に大きく貢献するとしている。

河野特任講師によると、クモは自身をつくる糸(けん引糸)や移動に使う糸(卵を包む糸など、最大7種類の糸)用途に応じて使い分けている。オニグモは日本に広く生息する大型のクモで、7種類ある糸の全てを使い分けることから研究対象に選んだ。合成クモ糸を織造する人工構造タンパク質素材の開発に取り組みスパイバー(同市)と共同で研究した。

河野特任講師らは、ヒトを上回るほど情報量が多いクモのゲノムについて独自の技術を用いて解読に取り組み、塩基配列を特定。そこから得られた情報や成分解析などから、7種類の糸に用いられる計11種類のタンパク質とそれぞれの遺伝子の配列構造を解明し、糸の種類ごとにまとめた。

このうち最も強靱なけん引糸については、従来から知られていた二つのタンパク質に加え、Masps3という新規のタンパク質と、SpicerEと名付けた低分子タンパク質群の存在も発見した。これらがクモ糸の強度に関わっている成分とみられる。

研究内容は英科学誌に掲載された。河野特任講師は「先端研が培ってきた、膨大なデータを一気に解析する技術が生きた。新たに見つかった成分や他の種類のクモについてさらに調べ、研究を充実させたい」と話している。

(三沢秀樹)

強い糸を作るクモ遺伝子

オニグモが強い糸を作り出す際に働いている3種類の遺伝子を突き止めた慶応大のチームが発表した。人工的に合成したクモの糸を使った工業製品や衣料品の開発に役立つと期待している。

クモは自分をつくる際、巣を作ったりする際に強度が異なる糸を使い分けている。さまざまなタンパク質がつながってできているが、どんな遺伝子が関係するかは不明な点があった。チームは体長2〜3センチのオニグモのゲノムを解析し、7種類の糸に関わる11種類の遺伝子を特定。調べると、クモが移動する際に使う最も強い糸は3種類の遺伝子が作るタンパク質でできていることが分かった。



日本に広く生息するオニグモ(慶応大提供)



1月 日曜 Eテレ 午後11時30分〜午前0時00分
 5日 サイエンスZERO 「挑戦者た



クモ糸の強さに関連 新規たんばく質発見
 慶応義塾大学先端生命科学研究所(慶大IAB)とSpiber(スパイバー)の産学研究グループは、オニグモのゲノムを解読し、多様なクモ糸たんばく質と、それに関連する遺伝子の全貌を世界で初めて明らかにした。新たな遺伝子や糸の強さに関するたんばく質が見つかった。今後、新素材開発を飛躍的に



ゲノム解読したオニグモ

に発展させることが可能になるとみられる。

オニグモは日本国内に広く分布する大型のクモ。自身を吊るす糸や移動に使う糸など行動場面に伴って、数種類の糸を使い分けており、それぞれの糸の強さ、伸びやすさといった性質が異なる。研究グループはサイエンスZEROの「挑戦者た」に出演し、クモ糸の強さや、たんばく質の働きについて解説した。

河野暢明さんは「今回の研究で、クモの糸の強さを高めるために、ON T社のdirect RN Aシーケンシングと、独自開発による解析アルゴリズムを組み合わせ、7種類のクモ糸を作るのに用いられる11種類の糸遺伝子のカタログ作成を完成させた。このカタログ整備により、移動時にクモが用いる強靱な牽引糸には既存の2つのたんばく質に加え、新たに「Masps3」も使われていることが分かった。

さらに、他の糸の成分

これまで知られていたクモ糸タンパク

MaSp1
MaSp2
MiSp
Flag
AgSp
AcSp
PySp
CySp

今回新たに存在を確認したクモ糸タンパク

MaSp1	unknown protein 1
MaSp2	unknown protein 2
MiSp	unknown protein 3
Flag	unknown protein 4
AgSp	unknown protein 5
AcSp	unknown protein 6
PySp	unknown protein 7
CySp	unknown protein 8
MaSp3	unknown protein 9
Murinoglobulin-2	unknown protein 10
Chitinase-like protein	unknown protein 11
Venom allergen 5	unknown protein 12
Venom protein	unknown protein 13
Acetylcholinesterase-1	unknown protein 14
Gonadotropin-releasing hormone II receptor-like	unknown protein 15
Tissue factor pathway inhibitor	unknown protein 16
Alpha-2-macroglobulin	unknown protein 17
Venom allergen 5	unknown protein 18
Mucin-19	unknown protein 19
Agrin	unknown protein 20



SpiCE:

Spider silk-constituting element

- Highly expressed in gland and silk
- Low molecular weight
- Different from spidroin gene sequence

Kono, et al., 2019

▶ 材料がやっとわかった

Transcriptomics

WORLD WIDE SAMPLING

Mar. 2019

67 科、373 属
1075 種
1679 サンプル

	1120		46
	140		13
	60		12
	30		

Identification

COI reference seq.
(Araneidae)

BARCODE

BLAST search (blastn)
Query: COI reference seq.
Database: Contigs

Assembled contigs

Reads

Read assembly
(Bridger v.2014-12-01)

COI candidate seq.

BLAST search (blastn)
Query: COI candidate seq.
Database:

BOLDSYSTEMS
<http://www.boldsystems.org>

Taxonomy
(Family, Genus, sp)
was decided by a simple majority
(not weighted)

World Spider Catalog Version 18.5

World spider catalog (2017.04.17)

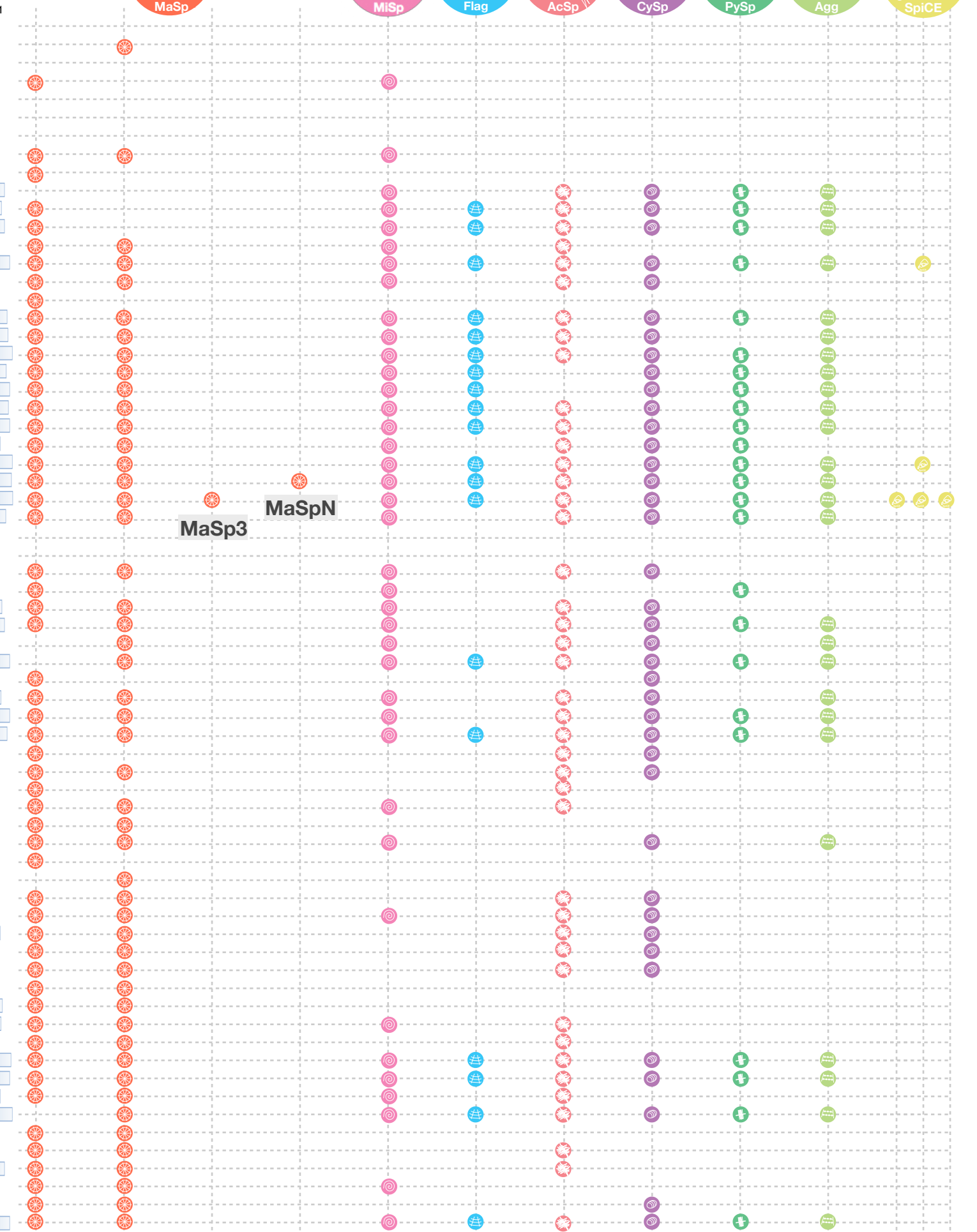
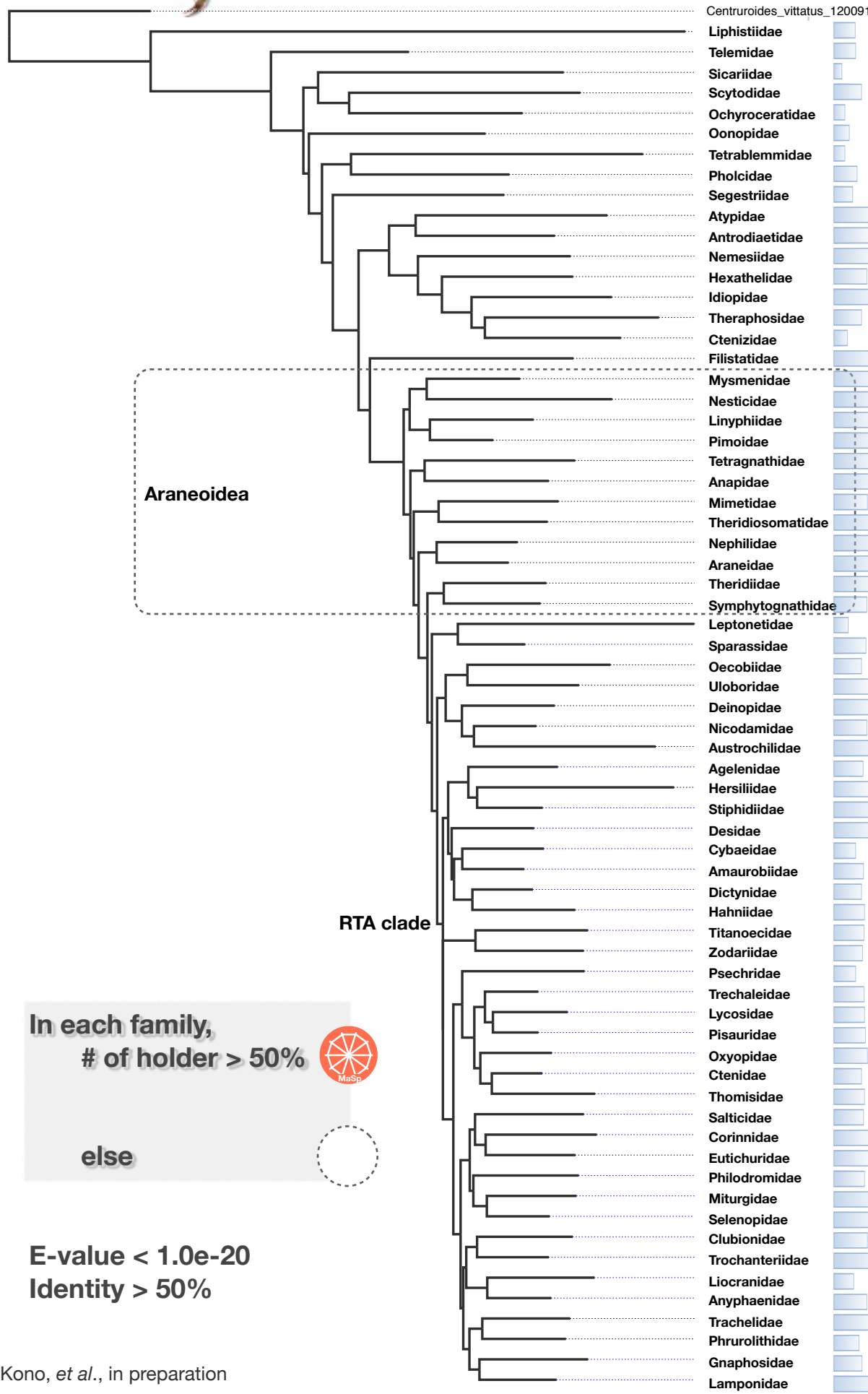
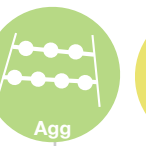
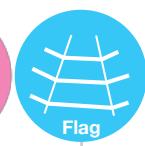
MORPHOLOGY



谷川明男先生
東京大学大学院
農学生命科学研究科生物多様性科学研究室



373 属 1,679 クモ



Araneoidea

RTA clade

MaSp3

MaSpN

In each family,
of holder > 50%



else



E-value < 1.0e-20
Identity > 50%



オオミノガ *Eumeta variegata*

Genome (estimated size = 700Mb)

Species	Eumeta variegata
Family	Psychidae
Japanese name	Oominoga
# of contigs	12,721
Total length (bp)	724,251,513
Average scaffold length (bp)	56,933
Longest scaffold length (bp)	2,266,462
Shortest scaffold length (bp)	501
N50 (bp) (# of scaffolds in N50)	324676 (#647)
N90 (bp) (# of scaffolds in N90)	42265 (#2778)



ミノムシの糸 ゲノム解析

鶴岡・先端研 河野特任講師



研究対象となったオオミノガのミノムシ (首都大学東京の新津修平博士撮影)

ミノムシは、糸を使って卵を作るミノガという方の幼虫。河野特任講師はミノガの中でも体長が大きいオオミノガを対象に、理化学研究所や、合成クモ糸繊維など人工構造タンパク質素材の開発に取り組むスパム解析により、カイコガや

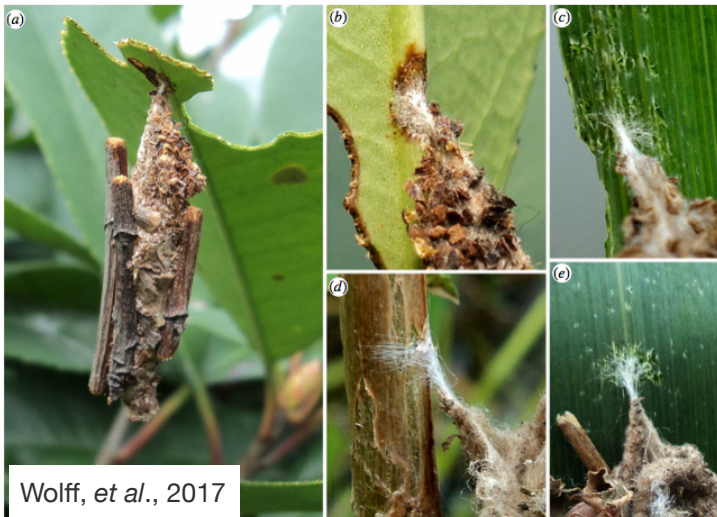
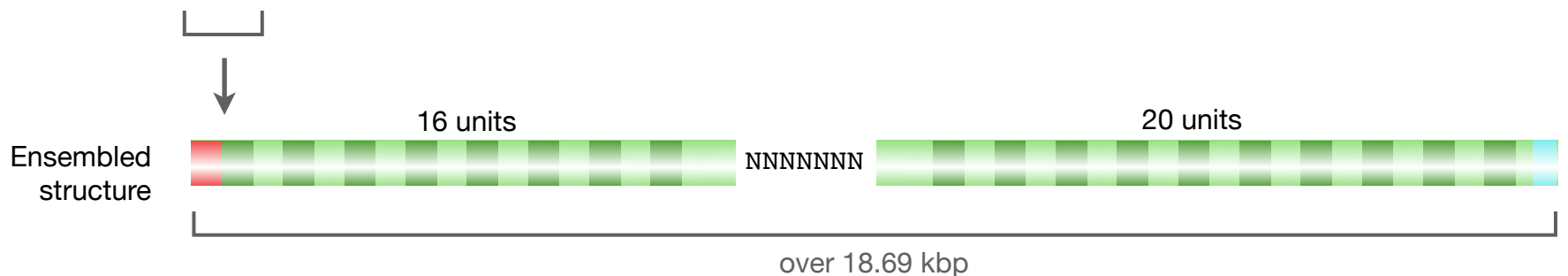
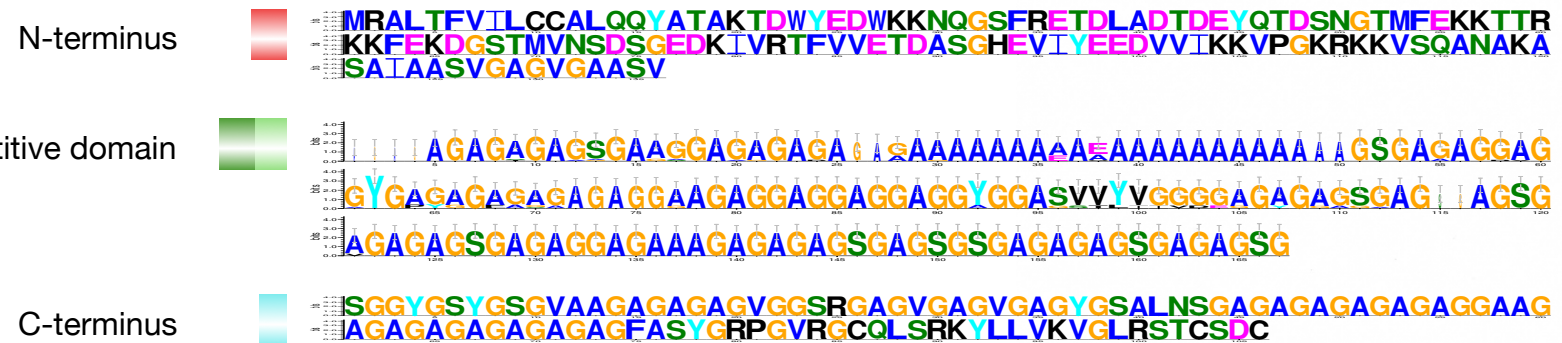
強度と遺伝子 比較解析

慶応大先端生命科学研究所 (鶴岡市・富田勝所長) は、研究所の河野暢明特任講師 (33) の写真だが、ミノムシの糸の強度や遺伝子配列の特性についてゲノム (全遺伝情報) から解析したと発表した。タンパク質でできている生体材料のミノムシの糸に、ゲノムレベルで強度と遺伝子の関係を比較解析した研究は世界初。英科学誌に研究内容が掲載された。

ヤマユギガの特徴を掛け合わせた遺伝子配列となっていて、その強さの要因となっている可能性を示した。







ミノムシは自重を糸だけで支えていることから、その物性にはクモ糸のような強さが期待されていた。河野特任講師は「遺伝子配列と物性の関係をさらに調べて、高性能タンパク質の研究開発などに役立てたい」と話している。

(三沢秀樹)

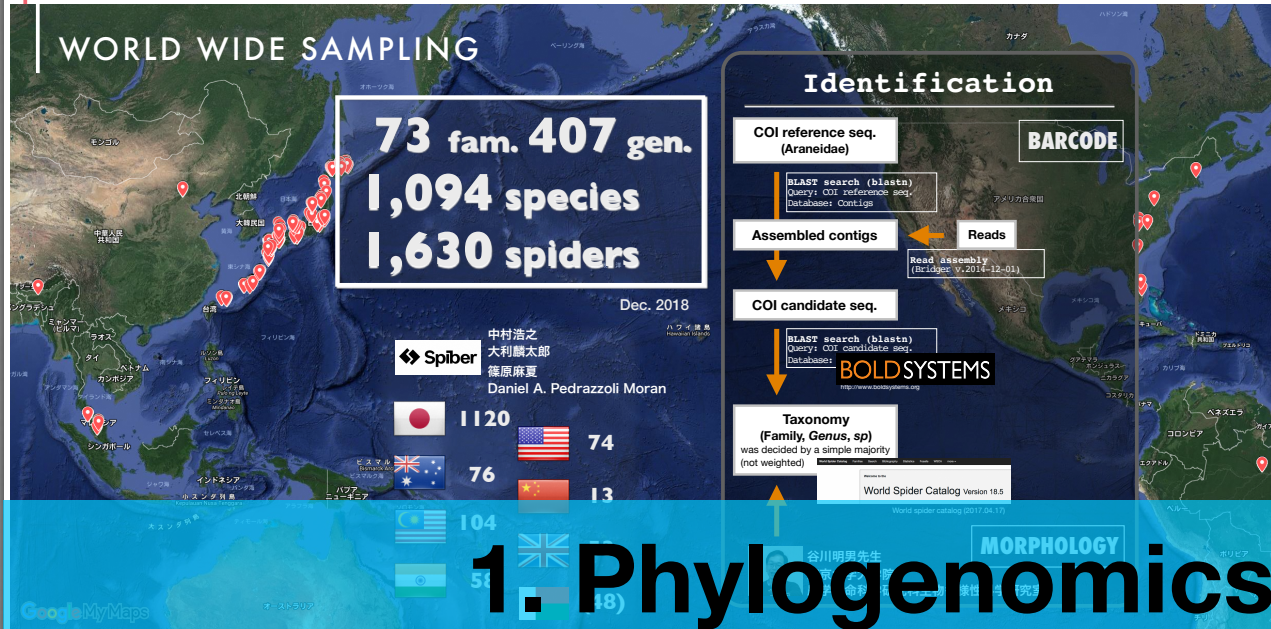
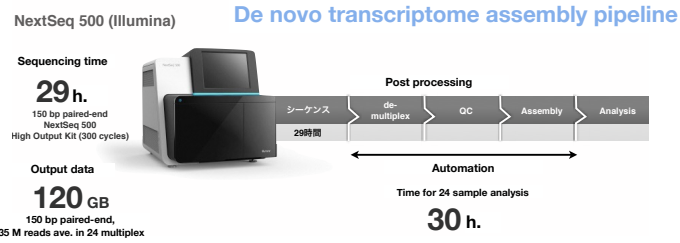


Wolff, et al., 2017

Fibroin genes in moths

強さ GPa	Repetitive motif	SpiCE		
0.52		AAAAAAAA	<p><i>Bombyx mori</i></p> <pre>{GAGAGSGAAS(GAGAGS)₂GAGAGYGAGVGAGYGAGYGAGAGAGY}, GTGSSGFGPYVANGGYSGYEYANSSSEDFGTGS</pre>	<p>カイコガ</p> 
0.34	GAGAGAG		<p><i>Samia cynthia ricini</i></p> <pre>AAAAAAAAAAAAAAAA GGAGSGYGGGS WHGYGSDSG AAAAAAAAAAAAAAAA GGAGDGYGAGS AAAAAAAAAAAAAAAA GGAGGGY GGDGG AAAAAAAAAAAAAAAA GGAGSGYGGGARGGYGHGYGSDGG</pre>	<p>ヤママユガ</p> 
0.63	GAGAGAG	AAAAAAAA	<pre>AGAGAGAGSGAAGGAGAGAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGSGAGAGGAGGYGAGAGAGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAG GYGAGVYVSAGGAGAGAGSGAGAGSGAGAGAGSGAGAGGA GAAAGAGAGAGSGAGSGSGAGAGAGAGSGAGAGSG</pre>	<p>オオミノガ</p> 
1.15	GAGAGAG	AAAAAAAA	 <pre>--AAGAGA-GAAA-A----- --ATGAGAGGAAA-A----- --AA--GA-GAAAAA-----</pre> <pre>----- GAS-GYGGSY GAADAYGGGA GAN-GYGGSY GASGGYGGGA</pre> <pre>-----V-SG-GA----- ---GAGAGVRSAGASA--- ---GAGAGAGAAGA----- ---GIGGGYGA----- ---S-AGAGAGAGA----- ---D-AGVAGTAGAGAGA---</pre>	<p>クモ</p>  

Transcriptomics



1. Phylogenomics

2015.4 - 2019.12
Arakawa, et al., in preparation

Summary of spidroin & SpiCE

Distribution of repetitive motifs found across spidroin genes



2. New spidroin

RNAiSpiCE*

Dissection

Multiple omics analysis
by NextSeq, nanoLC-MS

Reeling

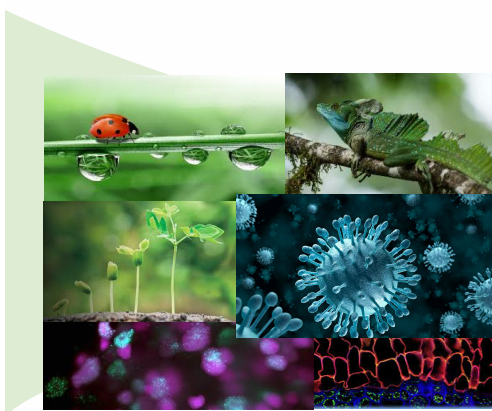
Silk morphology
by Atomic force microscope

Mechanical property
by Tensile testing

3. SpiCE ImPACT

Genomics

生命現象ありきで見るべき対象生物を選び、
モデル生物に頼る事なく生命の謎を解き明かす



Institute for Advanced Biosciences,
Keio University; Arakawa group