

平成 27 年 3 月 31 日

プログラム名：革新的研究開発推進プログラム

PM 名：鈴木 隆領

プロジェクト名：大規模ゲノム情報を活用した超高機能タンパク質の設計及び製造

委 託 研 究 開 発  
実 施 状 況 報 告 書 ( 成 果 )  
平 成 2 6 年 度

研究開発課題名：  
超高機能構造タンパク質素材の創出  
研究開発機関名：  
Spiber 株式会社  
研究開発責任者  
菅原 潤一

## 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本プロジェクトでは、既存の素材を上回る性能を持った高機能構造タンパク質素材を創出することを目標としている。そのため、分子デザイン・遺伝子合成 / タンパク質の発酵生産・精製 / 素材化(繊維化) / 物性評価の全行程を考慮したプロセスの設計をしていく。また、天然及び人工の構造タンパク質の遺伝子配列 / 分子構造 / 物性を統合したデータベースを作成し、構造タンパク質研究のためのインフラ構築も並行して進める。

-1. 分子デザインにおいては、慶應義塾大学、理化学研究所と協力し、天然及び人工合成した構造タンパク質の解析データをインプットとして、分子デザインの仮説立案を行っていく予定である。平成 26 年度は当社のこれまでの知見を活かした分子設計を行うこととした。具体的には、高物性を実現するために重要と思われる分子量と結晶領域の長さについて、物性との関連性を明らかにすることを目指し、分子を設計した。最終的に当該年度は、分子設計された遺伝子のうち、1 種類以上の遺伝子について合成を行い、発現系の構築、培養及び、精製の各種条件出しを完了することを目標とした。-1. タンパク質溶解条件検討においては、10 種類以上の溶媒を検討し、紡糸性の高い構造タンパク質溶液を得られる溶媒及び溶解条件を見出すこと、また、-2. 加工条件検討においては、紡糸条件に影響を与える項目を洗い出すと共に、糸の延伸倍率が 2 倍以上となる加工条件を見出すことを目標とした。

-2. 構造タンパク質 DB 構築では、天然の構造タンパク質素材遺伝子を網羅的(最終数値目標 1,000 サンプル)に取得し、取得したサンプルから得られた天然構造タンパクの物性解析データ、及びタンパク質配列解析データを解析、さらにデータベース上で統合することにより、特定の物性を持つ構造タンパク質素材を生み出す遺伝子塩基配列を明らかにし、任意の構造タンパク質素材を設計可能にすることを目指す。担当研究開発課題としては、クモをはじめとした構造タンパク質を持つ生物のサンプリングを Spiber 社が行い、理研・沼田班及び慶應大学・荒川班に提供し、それぞれ物性データの取得と遺伝子配列の解析を実施する。理研及び慶應大学にて得られたデータは、Spiber 社で構築したデータベース・ワークフローシステムに格納し、プロジェクト関係者が利用できるようにする。平成 26 年度は、データ格納用サーバのセットアップ、及びデータベースのスキーマ定義を完了

させた後、遺伝子配列データ 50 件、構造タンパク質の物性解析データ 10 件の格納を目標とする。

## 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

### 2-1 進捗状況

#### 【 -1. 分子デザイン / 培養 / 精製 】

分子設計においては、分子量の異なるものと、結晶領域の長さが異なるものをそれぞれ複数個ずつ用意した。このうち、分子量を変えた分子については、共通した精製方法が適用可能と思われたため、こちらの分子から遺伝子の合成を開始した。当該年度においては分子量の異なる GEN#687 及び、GEN#691 の 2 種類の遺伝子合成を完了することができた。その後、これまで自社で実績のあるホストベクター系を用いて発現系を構築したところ、GEN#687 及び、GEN#691 とともにタンパク質の発現が確認された。発現系構築ができたため、高密度培養条件の検討を行った。各種培養条件の最適化を行い、普段当社で用いている標準遺伝子と同等の濁度を 1L ジャーによるラボ試験で実現した。また精製においては、標準遺伝子で用いているフィブロイン抽出法をベースに改良を行い、目的タンパク質を抽出する条件を見出した。

#### 【 -2. 構造タンパク質 DB 作成 】

本年度においては、国内 3 回、海外 2 回のサンプリングを行い、理研・沼田班および慶應大学・荒川班それぞれで行われる物性および配列解析のためにサンプル提供を行った。結果、各機関にて設定された目標を満たせる量のサンプルを提供できた。本年度に採取したサンプルの総数は、個体数として 378 個体、種としては 95 種であった。

また、国内および国外のサンプリングを行う際の手順に関しても、標準手順書に記された通りのサンプリングを行うことで、以後の実験が可能になり、データベースに登録するサンプルのメタデータを収集することが可能となった。これによって、国外および海外でサンプリングを行うための統一的な手順が確立された。

サンプリングから配列解析、物性解析を行い 1 つのクモに関するデータを得るまでには、複数の研究機関が複数の実験を行う。そのため、ワークフローは複雑であり、正確に個体から得られた実験データを統合するためにはシステムの介在が必要不可欠である。本年度では以後プロジェクト全体で利用される、サンプルに関するデータを蓄積するためのワークフローを含むアプリケーション(以後ワークフローシステム)の開発を行った。また、26 年度に得られた 50 の配列データおよび 10 の物性データの格納を行った。

## 【 -1.タンパク質溶解条件検討 / -2.加工条件検討】

過去に、工業的にスケールアップが可能な極性溶媒を選んで溶解実験を行った結果、人工フィブロイン粉末を溶解可能な溶媒を発見しているが、当該溶媒では高濃度のタンパク質溶液を作ることは不可能であった。そこで、溶媒条件を新たに探索し、且つ、攪拌力の高い溶解装置を用いることで、ドープ中に溶解するタンパク質濃度を飛躍的に上げられるかどうかを確かめた。10種類以上の条件で溶解検討を行った結果、特定の条件において従来法よりも溶解性とドープ粘度が大幅に向上することが確認された。

構造タンパク質繊維の生産性 / 物性向上のための条件検討を実施するにあたり、重要な検討項目の洗い出しを行った。生産性を上げるためには、紡糸装置の性能を大幅に改善する必要があるため、スケールアップのための各種設計を進めた。また、物性を向上させるためには、繊維軸方向における分子の配向を上げる必要があるため、最も効果的な延伸方法の条件検討を網羅的に行った。

## 2-2 成果

### 【 -1.分子デザイン / 培養 / 精製】

標準遺伝子で用いている宿主発現系が、高分子量の遺伝子にも適用可能であることが明らかとなった。これは、過去に得た知見、確立されている評価系、宿主への変異導入技術等を転用できることを意味している。更に宿主発現系が同じであれば、培養条件についてもこれまでの知見をベースにできることから、一から条件出しをする手間を省くことができる。したがって、これから遺伝子合成が完了する遺伝子についても、宿主発現系が同じものを用いることができれば、発酵培養条件検討を加速して対応することが可能と思われる。

精製については、当初の予想通り、ベースとした標準遺伝子と同等の精製方法を適用することが可能であるとわかった。フィブロイン遺伝子は反復配列であるため、分子量の大小で大きく化学的な性質が変わるものではないと推察される。したがって標準遺伝子に用いる精製方法の利用ができるようであるが、高分子化した場合、抽出過程でのゲル化速度が向上するような兆しが見られたため、各条件の検討は必要となる。

### 【 -2.構造タンパク質 DB 作成】

国内3回、海外2回のサンプリングを行い、95種378個体のクモのサンプリングを行った(表1)。また、クモの個体を採取したのちにRNA-Seq解析が可能な状態で輸送、保存する方法の確立を国内および海外にて行った。確立した手順は標準手順書という形で文書化し、以後プロジェクトにてサンプリングを行う場合に人員が増加しても対応できる状況が整っている。

サンプリング対象のクモおよび構造タンパク質を持つ生物種に関しても、国内および海外でサンプリングを行う対象としてリストアップが完了している。27年度は本年度に策定した計画に基づき、サンプリングを行う予定である。

表1. 平成26年度 サプリング結果

年月	採集地	種数	個体数
2014年12月	沖縄県北部地方	42	94
2014年10月	マレーシア、ベナン	6	27
2014年10月	藤沢市新林公園	23	38
2014年10月	鶴岡市内	45	86
2015年3月	マレーシア、ベナン	51	133

ワークフローシステムに関しても実装を行い、データの格納を行った。ワークフローシステムは多様な環境において利用されることを想定し、ウェブアプリケーションとして実装された。ワークフローシステムはSpiber株式会社に設置されたサーバに配備されており、現状は当該機関のネットワーク内で運用されている。ワークフローシステムはセキュリティを考慮し、IP-rangeの指定により隔離されたネットワークおよびHTTPS通信によってプロジェクト関係者以外のアクセスが行えないように設定しなければならない。このため、ワークフローシステムはセキュリティへの対応が行えるよう設計された。

#### 【 -1. タンパク質溶解条件検討 / -2. 加工条件検討 】

ある特定の溶解条件下において、人工フィブロイン粉末の溶解性が大幅に向上することを確認した。併せて、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、溶媒中に溶解したタンパク質分子の溶解状態を簡便に観察する手法も確立した。

繊維の生産性/物性を向上させるための検討項目を洗い出すため、現在の課題をリスト化した。生産性を向上させるにはノズルのマルチ化や、延伸や巻き取りなどを含む紡糸ラインの大幅な高速化が必要であるとの結論に至った。また、物性を向上させるためには高

速紡系ライン下において、繊維軸方向にタンパク質を十分に配向させる必要があるとの考えに至ったため、最適延伸条件の検討を行った。その結果、糸の延伸倍率を2倍以上にする条件を見出した。

## 2-3 新たな課題など

### 【 -1.分子デザイン / 培養 / 精製】

分子量の大きなフィブロイン遺伝子の場合、発酵及び/又は精製工程において分子の分解が生じている可能性が示唆された。詳細な分析により原因を追求し、目的分子量のタンパク質の割合を高める必要がある。さらに、今回は従来使用していた遺伝子を高分子量化した遺伝子であったため、従来と同様の精製方法が適用できたが、結晶領域を伸張した遺伝子はその性質が大きく変わる可能性が高いため、新規精製プロセスの構築を検討する必要がある。

### 【 -2.構造タンパク質 DB 作成】

国内におけるサンプリングではアクセスの容易さ、物流インフラの充実から非常に良い状態でクモを輸送することが可能だが、海外でのサンプリングでは RNA-Seq の実験が行える状態でクモを輸送することが難しい。現在、海外のサンプリングでは RNA の分解を抑える RNALater を用いたプロトコルを使用しているが、現在利用している手法は液体窒素の利用が前提となっている。海外かつ、液体窒素が手に入らない状況下で行われるサンプリングを想定したプロトコル開発は、現在検討中である。

### 【 -1.タンパク質溶解条件検討 / -2.加工条件検討】

今回、紡糸性の高いドープの調製方法を見出したが、ドープによっては簡単な環境変化でゲル化してしまうことも確認された。ドープのゲル化は長時間の連続紡糸を可能とする上において大きな障害となる。このようなドープのゲル化を防止するには、ドープの調製方法のみならず、ドープの保管方法も重要であり、ドープの性状を長時間に亘って良好にキープできるような設備環境を整える必要がある。

また、今後はより機械特性の高い繊維を作成するために、これまでよりも結晶領域の長い人工クモフィブロイン粉末を紡糸する必要性が出てくる。アミノ酸のアラニンが連続した結晶領域が長くなると、一般的に溶媒に溶けにくくなることが知られているため、今後は高物性用にデザイン・合成される新規分子も十分に溶解させられるような、強力な溶解能を持った溶媒を引き続き探索する必要がある。

### 3.アウトリーチ活動報告

なし