

プログラム名：超高機能構造タンパク質による素材産業革命

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 8 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

# I 当該年度における計画と成果

## 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、①-1 分子デザイン、② 発酵培養条件検討、③タンパク質精製条件検討、④-1 タンパク質溶解条件検討、④-2 加工条件検討（紡糸条件検討）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開発し、構造タンパク質研究のためのインフラ構築（①-2 構造タンパク質 DB 構築）も並行して進める。

### ①-1 分子デザイン仮説立案／遺伝子合成

天然に存在する遺伝子素材の採取及び人工合成したタンパク質素材について配列解析／構造解析／物性評価を行い、配列-構造-物性間のメカニズムの解明を行う。これらのメカニズムに関する知見を活用し、高物性を有するタンパク質の分子をデザインし、合成を行う。

#### 【H28 年度目標】

→ H. 28 年 6 月までに候補となる遺伝子の合成を完了する。また、H27 年度に設計／合成した分子と繊維時の物性比較を行い、仮説検証を行う。

### ①-2 構造タンパク質 DB 作成（全体計画書内 PJ1-①）

天然及び人工の構造タンパク質について、遺伝子配列／タンパク質の構造／物性に関するデータを統合することによって、世界初の構造タンパク質データベースの作成を行う。本データは本プロジェクトのインプットデータとして活用する。

#### 【H28 年度目標】

→ H. 28 年 3 月までに遺伝子配列データが 500 件格納されている。  
→ H. 28 年 3 月までに構造タンパク質の物性／構造データが 100 件格納されている。

### ③ 発酵培養条件検討

人工合成した遺伝子を組み込んだ微生物の発酵培養条件の検討を行い、高効率でタンパク質を生産する条件を見出す。培地組成／発現誘導のタイミング等の項目について検討を行い、最終的には大型培養槽で最も効率良く生産できる培養条件を決定する。

#### 【H28 年度目標】

→ H. 28 年 12 月までに②で合成した遺伝子について宿主の選定、及び発現系の構築が完了し、目標とした生産性を達成する。

### ④ タンパク質精製条件検討

現時点で得ている知見を活用し、目的の候補タンパク質を抽出できる基本的なプロセスを確立した後、固液分離方法の検討を行うことによって、精製効率向上を実現する。具体的には、菌体分離方法、目的タンパク質分離方法、処理量向上等の検討を行う。また、同プロセスのスケールアップ検討を行う。

**【H28 年度目標】**

・ 候補タンパク質精製の基本プロセスの確立

→ H. 28 年 12 月までに候補タンパク質について大規模精製フローが確立できている。

**⑤ タンパク質溶解条件検討**

安価かつ安全性の高い溶媒を用いて、素材化工程（紡糸工程）において高物性を実現できる溶解条件を検討する。

**【H28 年度目標】**

→ H. 29 年 3 月までに、高物性繊維を、大規模生産可能な溶解プロセスを確立する。

**⑥ 加工条件検討（紡糸条件検討）**

構造タンパク質の持つポテンシャルが最大限発揮される加工工程（紡糸工程）を検討すると同時に、高効率でタンパク質素材が製造できるプロセス開発を行う。

**【H28 年度目標】**

H. 29 年 3 月までに、下記(1)～(3)を両立するプロセスを確立する。

- (1) 高物性人工フィブロイン繊維の生産プロセス確立。
- (2) 川下メーカーの加工工程を通過可能な品質の繊維を実現する。
- (3) H. 29 年 3 月までに大規模生産プロセスを確立する。

## 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

**【①-1 分子デザイン】**

H27 年度 ImPACT の成果（奈良先端大・上久保チームによる検討）において、現在 Spiber で開発を進めている高生産性フィブロインは天然クモ糸が持つ本来のフィブリル形成能が低下している可能性が示唆されるデータが示された。今期は上記の課題を受け、生産性を担保しつつ、自己凝集性インデックスを天然配列に近づけることを目的に分子デザインを行い、その結果を評価した。

**【①-2 構造タンパク質 DB 作成】**

H28 年度は国内サンプリングを 18 回、海外サンプリングを 3 回にわたって行なった。採取した個体数は 1195 サンプル、RNA-Seq 用のサンプルとして 240 サンプルを ImPACT 共同研究先である慶應義塾大学の荒川研究室に送付し、目標とする 500 サンプルを達成した。2016 年度のサンプリングにより日本国内に生息しているクモ 64 科のうち 58 科を収集することができた。

## 【② 発酵培養条件検討】

新規遺伝子の生産性向上に向け、発現系の検討を行った。昨年度までの研究から、目的タンパク質遺伝子の mRNA 量を調整することで、目的タンパク質の生産性を向上させることができた。本年度は新規遺伝子に対して、mRNA 量を最適化する検討を進めた。まず、転写量の大半を担うメインとなるプロモーターを定めた。その上で同一の誘導条件でタンパク質の生産ができるように、メインのプロモーターの一部を改変して、亜種となるプロモーターを作成し、転写量の評価を進めた。ここで得られたプロモーターは元のプロモーターと比較して、転写量が半分から 100 分の 1 程度のもので、様々なものを得ることができた。次にメインプロモーターに対して、これらを様々なバリエーションで組み合わせ、最も生産性の高まるカセットを探索し、目的タンパク質の生産効率が高い組み合わせを見出した。

## 【③ タンパク質精製条件検討】

昨年度までの精製プロセスの検討により、新規遺伝子に対する精製プロセスのチューニングを行い、中規模程度の系を確立した。本年度は生産効率を高めるため、プロセス上のボトルネックとなっていた固液分離工程の改善と、反応釜容積を大幅に引き上げた系の確立を目指した。

今回、濾過時間を短縮するために、フィルタープレス式の濾過機を用いた精製条件の検討を行い、大規模精製工程を確立した。

## 【④ タンパク質溶解条件検討】

これまで Spiber 社では、DMSO+塩を良溶媒とした紡糸系を確立しプロセス開発を行ってきた。こうした中、より良い溶媒条件を模索すべく、各種良溶媒、貧溶媒を検討した結果、紡糸性に優れた新たな良溶媒、及びその最適凝固条件を見出した。その結果、今期目標とした数値を超える応力を示す繊維を得ることができた。

## 【⑤ 加工条件検討】

今年度前半は紡糸設備の大幅改修の最終段階と位置づけ、前年度に引き続き構造タンパク質の持つポテンシャルを最大限に発揮させるための紡糸設備の改修を行った。主な改修項目は延伸箇所の変更である。

今年度中盤は、繊維応力の最大化と繊維径の最小化を実現するための紡糸条件の大幅見直しを行った。検討手法には実験計画法を導入し短期間で効率的な実験の実現に注力した。具体的には、以下 6 つの紡糸条件 1) ノズル穴径、2) DOPE 粘度、3) 固化浴温度、4) 固化浴滞在時間、5) 固化浴組成、6) 洗浄浴温度が得られる繊維の応力と最大延伸倍率(≒繊維径)に影響しているかを調べた。その結果、ノズル穴径以外の 5 つの条件が影響因子であることが判明した。

今年度後半は、1) DOPE 溶媒の変更、2) 生産性の向上、2) 耐水性の付与を検討した。まず、DOPE 溶媒に関しては、前項に詳述した通り、これまでの DMSO+塩の溶媒から新規溶媒への変更し上述した最適紡糸条件を応用することで、応力は前年比 50%向上、繊維径は前年比 28%減を実現することができた。

生産性の向上に関してはノズルの多ホール化を中心に検討した。課題として吐出ムラによるホール間での DOPE 融着が挙げられるが、1)DOEP を均一に全ノズル穴まで分配する分配盤の導入、2)撥油剤のノズル穴周囲への塗布により解決した。

## 2-2 新たな課題など

### 【①-1 分子デザイン】

従来分子に比べフィブリル形成能の高い新規分子創出に着手した。一定の溶媒条件化で高いフィブリル形成能を示した一方、現行の紡糸条件時において繊維物性に大きな違いを見出すことができなかった。溶解・凝固条件を見直すことで、分子の自己凝集性を誘起するような条件を引き続き検討する必要がある。

### 【①-2 構造タンパク質 DB 作成】

H29 年度の目標である、これまでに収集した構造タンパク質遺伝子及び物性情報のデータ公開に向け、現在、ワークフローシステムに蓄積された個体情報や物性情報、ストレージに蓄積された配列情報の整理を行なっている。この中で、個体を採取した際に付与されたメタデータに不備がないか、配列情報と物性情報、個体情報に齟齬がないかということ进行调查し、必要であれば種の再同定や情報の修正を行なっている。

課題として、公開された際に参画機関、アカデミアにとって大きな価値のあるデータセットを利用しやすい形で公開できるか、そのためのデータベースが作成できるか、という点がある。

### 【② 発酵培養条件検討】

更に生産性を高めていく上で、タンクあたりの微生物量を増やすことが必要になると考えている。そのためには微生物への効率的な酸素供給が必須であるが、将来的な大規模生産を踏まえると、コンプレッサーでのエア供給量を増やしたり、泡を細くするための攪拌モーターを強力にすることは物理的な限界がある。したがってナノ・マイクロバブルによる酸素供給や、攪拌羽の形状変更などの検討に取り組む必要があると思われる。また微生物への酸素供給量が高まると、発酵熱が増加することによる生産速度の低下を防ぐため、強力な冷却も求められる。

### 【③ タンパク質精製条件検討】

様々な候補遺伝子の検討をしてきた結果、より高物性が期待されるような遺伝子ほど、溶媒に溶かし込める濃度が低くなり、またフィブリン抽出工程でのゲル化も起こり易いことがわかってきた。溶媒に溶かし込める濃度が低くなると、精製に必要な溶媒量が増加するため、原材料費や設備あたりの効率が落ちる。また、ゲル化が起こり易いとバッチごとの処理量が落ちてくる。したがって長期的にコストを落としていく場合、設備あたりの生産効率を高められるような溶媒の発見や、抽出系以外の精製法の開発も必要になるとと思われる。

#### 【④ タンパク質溶解条件検討】

今回 DOPE（良溶媒）及び凝固浴（貧溶媒）条件を見直したことで、従来よりも強度に優れた繊維を紡糸できる条件であることを見出した。今後、量産機における同条件での紡糸プロセス構築が課題となる。

#### 【⑤ 加工条件検討（紡糸条件検討）】

目標である応力 350MPa を達成することが大きな課題である。対策として以下 2 つの検討を並行して進めることを計画している。1) 高物性が実現している Lab 条件のスケールアップ、2) 2 次延伸工程の最適化。1) に関しては最近 Lab 条件のスケールアップ化を進めている。2) に関しては、これまでほぼ未着手の状態である原糸の 2 次延伸による高物性化を考えている。具体的には最適な温度域での湿熱や乾熱による 2 次延伸工程の導入により繊維内のフィブリン分子を繊維軸方向に配向させる条件の確立である。今後は 1) と 2) の 2 つのアプローチを駆使することで目標を達成したいと考えている。

### 3. アウトリーチ活動報告

なし