

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28年度

研究開発課題名：

高機能タンパク質素材の高機能発現メカニズムの解明

研究開発機関名：

国立大学法人 東京農工大学

研究開発責任者

朝倉 哲郎

## 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

選択的に安定同位体ラベル化した家蚕絹や野蚕絹の延伸に伴う構造変化、ならびに含水に伴う構造変化を、新たに開発した固体 NMR 解析法を用いて詳細に検討し、新たなリコンビナントクモ糸の配列を分子設計するための指針を得る (① NMR による構造タンパク質繊維の構造解析)。

一方、リコンビナントクモ糸絹について、紡糸によって高強度・高弾性の物性を得るとともに、含水状態での寸法安定性の改善を図るための紡糸技術の開発を行う。鋭意、紡糸溶媒中のクモ糸絹構造や得られた再生クモ糸繊維の固体 NMR 構造解析の結果を併用して開発を進める (② NMR による構造タンパク質の紡糸溶液中の構造ならびに延伸処理に伴う構造変化の検討)。

### 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 NMR による構造タンパク質繊維の構造解析

##### 1. 安定同位体ラベル構造タンパク質の取得

リコンビナントニワオニクモ糸絹の安定同位体ラベル化は、PJ1-②参画機関において、鋭意、遂行中であるが、本年度の研究開始早々、全ラベルしたクモ糸についてサンプルを提供していただく予定である。それ以外の絹繊維のラベル化は、終了している。

##### 2. 安定同位体ラベル構造タンパク質の固体 NMR 構造解析

安定同位体ラベル家蚕および野蚕絹の延伸に伴う構造変化、ならびに含水に伴う構造変化について、固体 NMR を用いて詳細に追跡した。延伸や含水に伴い、結晶部や非晶部のアミノ酸残基が、どのように構造転移を引き起こすかが明らかとなり、新たな絹を分子設計する上での指針が得られた。同様の実験を、安定同位体ラベルされたモデル化合物についても行い、分子間構造の変化を含む詳細な構造解析を行った。

#### ② NMR による構造タンパク質の紡糸溶液中の構造ならびに延伸処理に伴う構造変化の検討

##### 1. 紡糸溶媒の検討

従来の紡糸溶媒である、ジメチルスルフォキシド (DMSO) ならびにヘキサフロロイソプロピルアルコール (HFIP) に加えて、新たな紡糸溶媒 (溶媒 A) を提案し、リコンビナントニワオニクモ糸絹の紡糸を行った。次に述べるように、従来の再生クモ糸絹繊維と比較して、多くの点で優れた物性を有することがわかった。

##### 2. 紡糸と化学加工ならびに得られたクモ糸絹の固体 NMR 構造解析

HFIP および溶媒 A を紡糸溶媒として用い、紡糸条件を系統的に変えて、多くの再生クモ糸絹を作製、その都度、力学物性データ (応力-ひずみ曲線) や走査電顕で形態観察像を測定した。さらに、一層の高強度・高弾性の物性を得るとともに含水状態での寸法安定性の改善を図るために、塩化シアヌル処理等の化学加工処理を行った。これらの実験は、絶えず、含水状態を含む試料の固体 NMR 構造解析を併用して行った。紡糸実験を行って得られた再生クモ糸絹のサンプル数は、合計、500 を超える。

以上の成果については、適宜、関連の学会で発表するとともに国際雑誌への投稿を行った。従って、昨年度の進捗状況は順調であると言える。特に、溶媒 A に関する成果は、リコンビナントニワオニクモ糸絹の従来の紡糸法を一変する程の成果を挙げ、化学加工処理と合わせて、現在、鋭意、追加研究に取り組んでいる。

## 2-2 成果

特筆すべき NMR の成果について、まとめる。

### 1. エリ蚕絹フィブロインの延伸に伴う構造変化とアラニン連鎖を含む絹の分子設計

Ala 連鎖と Gly リッチな領域の繰り返し配列から構成されるエリ蚕絹フィブロインは、クモ糸絹と同様の特徴的な配列を有するので、延伸に伴うエリ蚕絹の構造変化を解析することは、新たなクモ糸絹を分子設計し、生産する上で有用な情報を与える。本研究では、エリ蚕絹フィブロインの結晶部の Ala 連鎖と非晶部の Gly リッチ領域の中で鍵となる Ser 残基と Tyr 残基の局所構造の延伸に伴う変化を詳細に追跡した。すなわち、これらの残基に選択的に  $^{13}\text{C}$

ラベリングを施して感度と選択性の向上を図った液状絹をエリ蚕体内から取り出し、延伸処理に伴う構造変化を固体 NMR と組み合わせて解明した (図 1)。繊維化前の Ala 連鎖部位は  $\alpha$  ヘリックス構造を有し、延伸に伴い  $\beta$  シート構造に転移する (上から下へ) が、特に、5 倍延伸から、その構造変化が急激に起こる様子が Ala 残基のスペクトル変化から観察された (図 1)。また、スペクトルシミュレーションによる二次構造の分率決定から、一例として、Ala 連鎖近傍にある Ser 残基は、その構造変化に伴い  $\beta$  シート構造に巻き込まれる事、一方、Tyr 残基は、巻き込まれずに、徐々に構造変化を起こすことがわかった (図 2)。このように、エリ蚕絹の延伸による繊維化に伴う各残基の局所構造変化を一次構造の配列と対応させることができ、新たなクモ糸絹を分子設計するための指針が得られた。

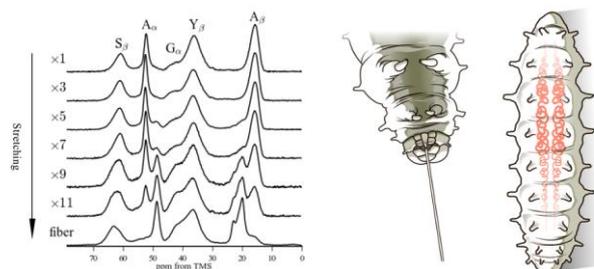


図 1 エリ蚕絹の延伸に伴う  $^{13}\text{C}$  固体 NMR スペクトルの変化

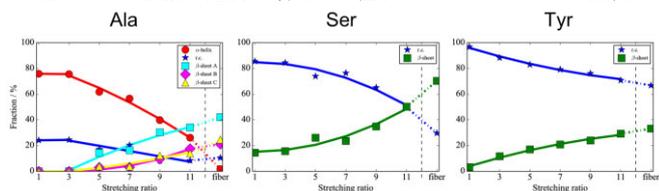


図 2 エリ蚕絹の延伸に伴う Ala, Ser, Tyr 残基の二次構造分率変化

### 2. 新規溶媒の検討と提案

従来の紡糸溶媒である DMSO、HFIP と比較して、より高い物性を得ることを目的として、新たな紡糸溶媒 A を採用し、紡糸延伸条件を検討した。その結果、DMSO 法で必要となる溶解助剤塩が溶媒 A 法では不要で、脱塩プロセスが省略できることがわかった。溶媒 A 法より得られた繊維は、物性において DMSO 法を凌駕することを明確にした。また、この溶媒 A 法は、延伸環境とその条件の巧妙な組み合わせによっては物性をさらに改良できる可能性があることも明確にできた。このように、リコンビナントニワオニクモ絹に対して、従来の DMSO 紡糸法に代わる新たな紡糸法として溶媒 A 法が極めて有望であることを見出し、提案した。

### 3. 化学加工処理による耐水性と物性改善の検討

リコンビナントニワオニクモ絹繊維の耐水性と物性を化学加工処理によって改善できないかを検討した。化学加工法として、紡糸繊維の親水性に関わる Tyr-OH 基 (および Ser-OH 基) を塩化シアヌルで化学加工することを試みた。その結果、アルカリ水溶液系での繊維の化学加工によって、塩化シアヌルを Tyr-OH 基に導入できること、およびその導入率を固体 NMR で定量的に解析可能であるこ

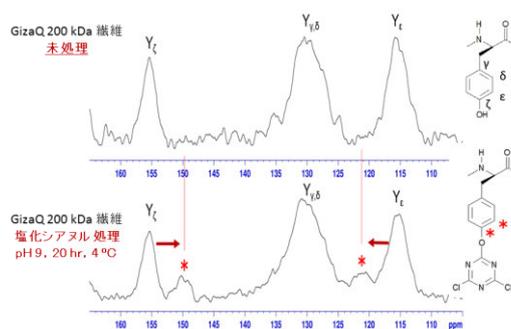


図 7 リコンビナントニワオニクモ絹繊維の塩化シアヌル化学加工前後の固体 NMR スペクトル [Tyr 芳香環炭素]

とを示した(図7)。また、モルホリン塩誘導体の合成等によって塩化シアヌルの Cl 基を CH<sub>3</sub> 基や C<sub>6</sub>H<sub>13</sub> 基に変えたトリアジン基を Tyr-OH 基に導入し、より疎水化を図った化学加工繊維も作製し、これら一連の化学加工繊維の耐水性と物性を評価した。結果は、リコンビナントニワオニクモ絹繊維に対しては、基本的には耐水性は改善できなかった。また、水溶液系での繊維化学加工となるため、収縮による影響を受け、強度低下と大幅な伸度増加という物性特性を与えることもわかった。逆の考えに立てば、一連の繊維化学加工の検討により、Tyr-OH 基(および Ser-OH 基)を疎水化にしても耐水性は改善できないことが明確となった。すなわち、アミノ酸含有率の高い親水性の Gln 残基の側鎖 CONH<sub>2</sub> 基が耐水性に影響を与えている可能性が極めて高いと推定でき、これは今後の分子設計のための新たな指針となった。

### 2-3 新たな課題など

1. 溶媒 A 法は、DMSO 紡糸法に代わる新たな紡糸法として極めて有望であることを見出したが、紡糸後のリコンビナントクモ糸絹の一層の物性の向上と寸法安定性の向上を図る必要がある。
2. 新たなリコンビナントクモ糸絹の作製に向けて、分子設計するための情報を蓄積する必要がある。

### 3. アウトリーチ活動報告

なし