

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：

繊維形成初期過程の解析と分子構造制御

研究開発機関名：

奈良先端科学技術大学院大学

研究開発責任者

上久保 裕生

# 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

本研究開発では、クモ糸の紡糸工程に蛋白質に特徴的な自己組織化プロセスを導入し繊維特性を向上させることを目的とする。そのために、クモ糸蛋白質が有する自己組織化能を評価すると同時に、紡糸工程を最適化し、更に得られた知見を紡糸工程に適切にフィードバックするために、紡糸工程でのクモ糸蛋白質前駆体形成・繊維形成の評価法の開発を行うことを計画している。平成 28 年度は、平成 27 年度に引き続き、①各種改変クモ糸蛋白質の自己組織化能の評価をすすめ、これらの構造評価、並びに、紡糸への展開を実現することを目的として、②クモ糸蛋白質前駆体形成・繊維形成の評価法の開発を進めた

## 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

平成 27 年度、当初計画通り、クモ糸蛋白質が、自己組織化的に長さが数 100nm 程度のナノファイバーが形成されることを明らかにした。平成 28 年度は、このナノファイバー特性を理解しクモ糸への展開を進めるために、

①の課題として、リピート配列 (RR) とナノファイバーの構造の相関解析、非リピート配列

(NR) による繊維状凝集体の安定化機構の解析を計画し実施した。紡糸に適したコンストラクト開発を目指し、NR 領域の中から機能ドメイン (PAIR) を抽出し、機能ドメインと RR からなるコンストラクトを作製し特性解析を計画し実施した。

②の課題として、ナノファイバー配向試料、ナノファイバー配向凝集性試料の調製を目的とした流路の開発を計画し進めてきた。マイクロ流路や多液混合チューブ流路を用い、ドープ組成及び、ナノファイバー固化の条件検討を進め、ナノファイバーを含有する有機溶媒ドープを用いることで、結晶性の高い糸状凝集体が得られることが明らかとなった。水系での紡糸方法を考案することを目的として、水中で形成されるナノファイバーの精密構造解析、水中で形成されるナノファイバーから調製した繊維状凝集体の構造評価を計画し実施した。①で作製した PAIR-RR コンストラクトは有機溶媒中での利用が期待できることから、PAIR 配列を有するコンストラクトの有機溶媒中での繊維形成過程の評価を計画し実施した。これに加え、当初計画していなかった内容として、有機溶媒を用いた紡糸へのナノファイバーの利用方法について検討を進めた。

### 2-2 成果

①の課題として平成 28 年度は、RR のアミノ酸配列とナノファイバー形成との関連性を明らかにし、紡糸に適した RR 配列の設計指針を提案するために、同程度の分子量を有するコンストラクトを用い、ナノファイバーの形成速度やモルフォロジーを系統的に比較した。その結果、いずれのコンストラクトもナノファイバーを形成するものの、得られたナノファイバーの凝集構造が異なることを見だし、ナノファイバーの形成には、配列上に繰り返し存在する自己凝集領域が関与していること、凝集構造は自己会合自由エネルギーに依存することを示した。この結果を受け、自己会合自由エネルギーを指標とした分子設計法を提案した。NR が繊維状凝集体形成に果たす役割を理解し、階層的自己組織化を活用した紡糸の有効性を示すために、NR のみからなるコンストラクトを作製し、様々な溶液条件における自己会合性の評価を行った。その結果、C 末端 NR は、それ自身構造を有さない変性状態で、すでに 2 量体形成能を有することがわかった。さらに、変

性状態で2量体を形成することによって化学結合の形成を促進していることが明らかとなった。化学結合に関与するアミノ酸はPAIR配列中に存在することから、変性状態での2量体形成にはPAIR配列が関与していると考えられることができる。検証のため、RRにPAIR配列を付加したコンストラクトを設計した。RRにPAIR配列を付加したコンストラクトについては、1種類のコンストラクトにおいてのみナノファイバー形成能とナノファイバー凝集性の評価を行った。本コンストラクトにおいて、C末端NR付加コンストラクトと同様のナノファイバー凝集能が見られ、自己組織化的にナノファイバーが凝集し、長い繊維状の凝集体を形成することが明らかとなった。この結果から、PAIR配列のみでNRの機能を模倣することが可能であることが示唆され、PAIR仮説の実証につながると同時に、大量生産に適した分子設計を示すことができた。

②の課題として水中での繊維状凝集体の構造解析を目的として、変性状態、貧溶媒A中で形成されるナノファイバー、貧溶媒B中で生じるナノファイバー凝集体の構造評価を行ってきた。その結果、ナノファイバー形成時にPoly-Ala結晶に固有の赤外吸収が観測された。さらに、貧溶媒B中でナノファイバーを沈殿させるだけで、Poly-Ala結晶の含有量の顕著な増大が確認された。この結果は、ナノファイバーは条件によって互いに相互作用することが可能であり、ナノファイバーの凝集によってさらにPoly-Ala結晶の成長が生じることが示唆された。マイクロ流路や多液混合チューブ流路を用い、有機溶媒ドープ、及び、ナノファイバー固化の条件検討を進めてきた。すでに、糸状凝集体の調製には成功しており、調製した試料に対して赤外吸収、X線散乱を測定した。貧溶媒中で得られたナノファイバーは有機溶媒中でも比較的安定で、ナノファイバー配合有機溶媒ドープを固化浴中で固化したところ、ナノファイバーを添加しない場合に比べ結晶性の向上が認められた。さらに、X線回折強度の詳細な分析から、特にPoly-Ala結晶中の $\beta$ ストランドのスタッキング方向に結晶サイズが増大していることが示唆された。 $\beta$ ストランドのスタッキング数の増加は、すなわち糸の強度に直接作用する物性であり、有機溶媒ドープに対してもナノファイバーを添加剤として用いることで糸の強度特性を向上させることが可能であることが示唆された。

### 2-3 新たな課題など

クモ糸蛋白質が示す自己組織化能やナノファイバーの特性解析が進み、天然クモ糸中での役割は解明されつつある。今後は、現在の紡糸に直接フィードバックできる知見の蓄積を進めると同時に、知財確保を進め、論文や学会で発表する必要がある。

## 3. アウトリーチ活動報告

我々の研究活動の一環を、読売新聞紙上のコラムにて紹介した。

2016年9月20日「天然繊維見直せば新素材」、読売新聞寄稿連載「ドキ★ワク先端科学」