

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 9 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

① **NMRによる構造タンパク質繊維の構造解析** 構造タンパク質（クモ糸絹、家蚕絹、野蚕絹）繊維のNMR構造解析を行い、物性発現メカニズムと深くかかわる各繊維の構造やダイナミクスを解明する。また、それらの知見に基づき、より機能性の高い繊維の創製を図るための指針を得、微視的・巨視的両方の観点から繊維構造を評価する。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** 紡糸溶液中の構造タンパク質の構造ならびに延伸処理に伴う構造変化について溶液および固体NMRを用いて検討、高機能タンパク質を創製するための紡糸溶液の選択や延伸処理の行程の検討を行う。本研究開発では構造タンパク質のNMR構造解析を目的としており、Spiber社より提供された<sup>13</sup>Cでラベルされた天然クモ糸（ADF3）ベースの構造タンパク質（以下ではリコンビナントクモ糸絹と記載）を使用している。

### 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 NMRによる構造タンパク質繊維の構造解析

###### 1. 安定同位体ラベル絹繊維および高延伸絹フィルムのNMR構造解析

構造タンパク質（家蚕絹、野蚕絹（エリ蚕絹）、リコンビナントクモ糸絹、クモ糸結晶部モデル化合物）の絹繊維（天然と再生）について、NMR構造解析を行った。特に、結晶部（アラニン連鎖）と非結晶部（セリンやチロシン）のアミノ酸残基等を安定同位体ラベルされた試料につき、残基ごとに微視的・巨視的両方の観点からの解析を行った。

###### 2. 絹繊維および高延伸絹フィルムの物性測定

絹繊維（天然と再生）について、物性（応力-ひずみ曲線および水での寸法安定性）を測定するとともに、適宜、化学処理を行い物性の改善を図った。

###### 3. 絹繊維および高延伸絹フィルムの含水状態での構造解析

物性の中で、特に寸法安定性の知見を得るために、含水状態での絹繊維ならびに化学処理絹試料についてNMR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. 構造タンパク質の紡糸溶媒中での溶液構造と固化状態でのNMR構造解析

構造タンパク質（家蚕絹、エリ蚕絹等の野蚕絹、リコンビナントクモ糸絹）の紡糸溶媒（ヘキサフロイソプロパノール、ギ酸、水等）中での構造および固化状態でのNMR構造解析を行った。

###### 2. NMRによる構造タンパク質の延伸処理に伴う構造変化および延伸繊維の物性測定

構造タンパク質（家蚕絹、エリ蚕絹等の野蚕絹、リコンビナントクモ糸絹）について、延伸過程の各段階において、固体<sup>13</sup>CNMRを用いて構造転移に伴う局所構造の変化を、結晶部（アラニン連鎖）と非結晶部（セリンとチロシン）のアミノ酸残基について、残基ごとに追跡、物性情報と合わせて、良好な紡糸、延伸行程に関する指針を得た。

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関連の国際雑誌への積極的な投稿を行った。昨年度の進捗状況は順調であったと言える。特に、クモ糸繊維の高強度の発現と関連して重要なポリアラニン結晶領域のパッキング構造を解明したことは特筆に値する。



に著しく変化し、逆平行βシート構造の割合が増加する。

### 3. 家蚕絹の含水状態での構造とダイナミクス

家蚕絹のセリン、チロシン、アラニン残基の各Cβの<sup>13</sup>Cラベル化を行い、乾燥状態で<sup>13</sup>CCP/MASNMRを、含水状態で<sup>13</sup>CCP/MASNMR, <sup>13</sup>CDD/MASNMR, <sup>13</sup>CINEPTNMRを測定することによって、各々、結晶部、非晶部、結晶部と非晶部、双方の構造およびダイナミクスの情報を選択的に得ることができた。

図4に、様々な処理によって得られた家蚕絹試料中の含水状態における各コンフォメーションの割合をまとめた。すべて、含水に伴い、運動性の高いランダムコイル部分(青)が出現する。

家蚕絹を水溶液から凍結乾燥によってスポンジ状とし、A. 高湿度処理およびB. メタノール処理に

よって不溶化した。前者は、含水に伴いセリン、アラニン残基で一部繊維化前のシルクI構造(緑)

が出現する一方、後者では、結晶部のセリン残基の方が、非晶部のチロシン残基よりもランダムコイル(黄)の割合が多く、βシート(ピンクと赤)の割合が少ないという結果が得られた。すなわち、含水状態は、残基が存在する結晶部と非晶部の環境の違いよりも、アミノ酸残基の親水性の違いに依存することを示している。

C, D, Eは、各々、再生絹繊維(未延伸)、(3.5倍延伸)、天然絹繊維の結果であるが、予想に反して、各試料間で著しい差異は認められない。Fはチロシン側鎖に疎水基を導入した場合であるが、含水に伴う運動性の高いランダムコイル部分は極めて少なくなる。

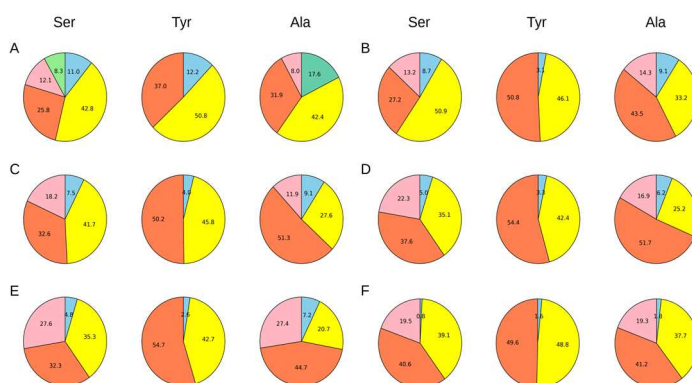


図4. 様々な処理を施すことによって得られた各種の家蚕絹試料について、含水状態での構造を決定

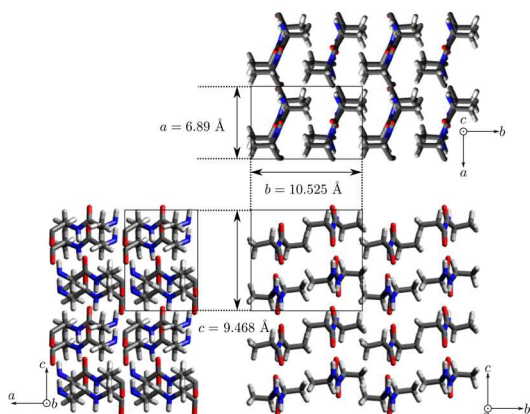


図5. 原子座標レベルで決定したエリ蚕絹繊維の詳細な構造

### 4. エリ蚕絹繊維のポリアラニン結晶領域のパッキング構造

野蚕の一種であるエリ蚕絹のアラニン約12残基の連鎖から成る結晶部の構造について、各種<sup>13</sup>Cラベル絹およびそのモデル化合物の作製と各種固体NMRの解析手法を駆使して、詳細に検討した。すなわち、アラニン12残基の連鎖を含む34量体ペプチドの合成と解析、エリ蚕絹繊維の<sup>13</sup>C均一ラベル化、DARR測定や<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>CNMR化学シフトの理論的計算を実施した。

その結果、アーノットにより決定されたポリアラニンの逆平行βシート構造のモデルをベースに改変し、図5にまとめたエリ蚕絹繊維の原子座標を決定することができた。その構造は、典型的なスタガード構造であり、クモ糸のパッキング構造の解析の際にも使用することができた。

## 2-3 新たな課題など

クモ糸絹繊維の結晶部アラニン連鎖部位の構造は決定できたが、さらに高弾性を発現するグリシンリッチ領域の構造やダイナミクス解析を進め、分子レベルで構造を完成させる必要がある。さらに、分子動力学計算等を通して、蓄積してきた固体NMRの構造解析の結果を、クモ糸の物性の予測に結び付けることを試みる。