

シルク研究の新しい展開

東京農工大学 工学部生命工学科

教授 朝倉 哲郎

1. はじめに

絹は、従来、衣料としての利用が中心であったが、合成繊維などに比べて環境や人にやさしく、しかもその構造を変えることによって、特性のより優れたものに改変、あるいは各種の機能性をもつ絹を創成でき、新たな利用分野の展開と需要拡大が期待される。絹繊維の優れた特性は、基本的には絹タンパク質の構造に起因するが、その構造や関連する物性の相関については、まだ十分に解明されていない。

そこで、当研究室では、絹タンパク質の結晶及び非晶構造を原子レベルで徹底的に解析し、絹タンパク質の構造と機能の関係を明らかにするとともに、それらの知見に基づいて、新たな絹を分子設計、遺伝子組み換え法等によって作成し、新たな機能を持つ絹繊維を開発することを目指して研究をすすめてきた。幸いにして、1997年4月から2002年3月まで、5年間の生研機構の大型プロジェクトとして採用され、研究費等、生研機構の協力的な支援の下、多くの成果を得る事ができた。ここでは、その成果についてまとめるとともに、今後の絹研究の展望について述べる。

2. 家蚕絹繊維化前の構造の決定

カイコは、絹の水溶液から、室温で極めて短時間に強い糸を作成する。しかもその糸は、生分解性を有する。人類が、同程度の強度の繊維を作成しようとするれば、濃硫酸等の有害な有機溶媒を用い、極めて高温で紡糸しなくてはならない、しかも、合成繊維は釣り糸に用いられれば、環境を破壊する。すなわち、我々は、環境を意識した新しい繊維の開発にあたって、カイコによる絹の巧みな繊維化の機構を、見習うことが必要であろう。そのためには、絹の繊維化前後の構造がどのようなになっているかを詳細に知ることが必要である。

家蚕絹の繊維化前の構造はSilk Iと呼ばれ、繊維化後の構造であるSilk IIと区別される。絹、正確には絹フィブロインのアミノ酸組成は、グリシンとアラニンが大部分であり、絹フィブロインは、グリシンとアラニンの交互共重合体と考えることができる。これまで、実験的にSilk I構造の解析は困難であったが、その理由は、精度の高い構造情報を得ようとして配向を試みると、Silk I型は容易にSilk II型に変化してしまうことである。従って、Silk I型構造の解明のためには、配向しない高分子系でも詳細に構造解析できる解析手法の開発が不可欠であり、我々は、最新の固体NMRを中心とする新たな構造解析法を用いて、初めて、その構造を解明することができた。研究においては、固体NMRの最新の構造解析手法の開発

が大きなウェイトを占めるが、それについて興味の有る方は、我々の論文を参考にさせていただくこととし、ここでは解明された絹の繊維化前の構造、Silk I構造とその意義について述べる。

我々が、決定したSilk I構造を図1に示した。全く新しい構造であり、“繰り返し β ターン構造”と名付けた。分子鎖に沿って、分子内水素結合と分子間水素結合が、交互に形成された構造をとっている。このSilk I構造によって、繊維化の機構が容易に説明できる。すなわち、紡糸の際、糸の先端を固定した後のカイコの首振り運動によって、繊維軸方向への延伸がかり、分子内水素結合が

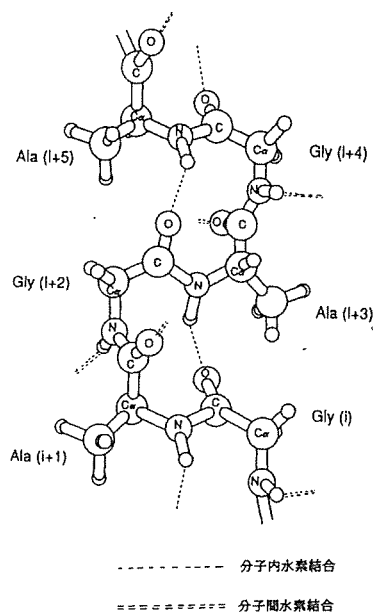


図1a 絹繊維化前の構造 (Silk I型の部分構造)

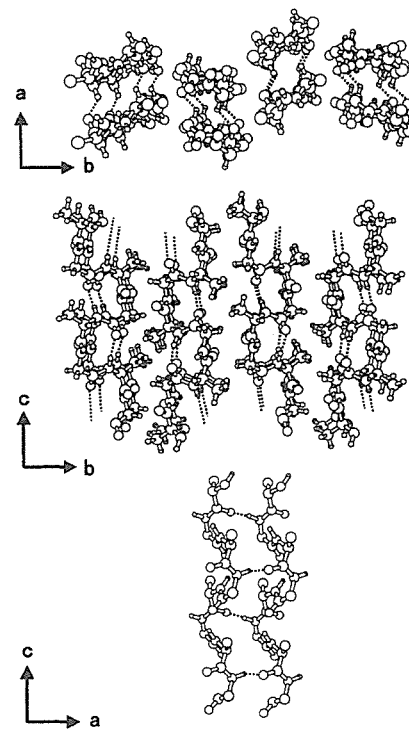


図1b Silk I型の全体構造

切れ、分子間水素結合に移ることによって、全て、分子間水素結合に変わる。その際、その分子間水素結合の方向は、繊維軸に垂直であり、繊維軸に対する横方向からの力に抗する分子間水素結合のネットワークが、瞬時に作成される。Silk I構造のフィルムはDSC測定の結果によると、 270°C 以上で構造転移が起こることを示しており、極めて安定である。しかしながら、繊維軸方向に延伸がかかると構造転移を起こしやすく、これは、本Silk Iモデルから容易に説明できる。特に興味深いのは、この β ターン構造では、3番目の残基の位置Gly(i+2)に仮に側鎖があると、2番目の残基Ala(i+1)のカルボニル酸素と立体障害を起こすので、3番目の残基は、グリシン残基でなくてはならない点である。すなわち、タイプII型の β ターン構造が繰り返すためには、グリシンが分子鎖に沿って、一個おきに存在する必要がある、かくして家蚕絹の一次構造は、グリシンの交互共重合体となったわけである。

さらに明らかにしなくてはならないのは、何故、Silk I型構造の絹は水に溶けているのか、という点である。その役目を担っている残基の一つがチロシンである。アラニンとグリシンの交互共重合体は基本的に水に不溶である。しかし、その中にチロシン残基が存在すると急激に可溶となる。さらに、バリン残基が加わっても水に溶ける。これは、非常に興味深い。すなわち、アラニンとグリシンの交互共重合体中のアラニンが一部、セリンに置き換わっても水に不溶である。一方、チロシンは、単独では水に難溶である。しかしながら、アラニン

とグリシンの交互共重合体中に、効果的に、チロシンが入る事によって、 β 構造が壊されて、水に溶けるようになる。家蚕絹の一次構造中には、かくして周期的にチロシン残基が存在する領域が存在する。以上のように、Silk I 型構造や各残基の役割が解明されてくると、その巧みな構造転移の機構等を利用して新しい絹様物質を作成するためには、どのように繊維化前の分子を設計しなくてはならないかが、明らかとなる。

3. 家蚕絹繊維化後の構造の解明

家蚕絹繊維、すなわち、Silk II型の構造モデルとしては、1955年にMarsh, Corey, Paulingらが絹繊維のX線構造解析結果に基づいて提案した、逆平行 β シート構造がよく知られており、教科書にも引用されている。しかしながら、彼らの提案した構造モデルは、絹繊維のX線回折像において、赤道線上の6個の回折強度のみについての定量的な評価と赤道線上と子午線上の24個の回折強度に関する定性的な評価が、もとになっている。しかも、実測のX線回折強度と構造モデルに基づく強度との一致はあまりよくない (R factor = 37%)。この構造モデルは約半世紀前のモデルであり、現在、より精密なSilk II型構造を検討する時期に來たと言えよう。そこで、Silk I構造の決定に威力を発揮した新しい固体NMRの方法を駆使して、Silk II型の詳細な構造を決定した。

図2の絹繊維（全体の55%を占める結晶部分）のアラニンC β ピークは3本のピークから成り、Silk II構造が不均一であることを示している。繊維化前のSilk I構造のピークはシャープであり、その構造は均一であったので、明らかに異なる構造である。図2からわかるように、結晶部の73%は逆平行 β シート構造となっているが、さらに、それは、分子間構造の異なる2種類のグループからなり、構造Aのように、アラニン残基の側鎖メチル基がシート間で平行になっ

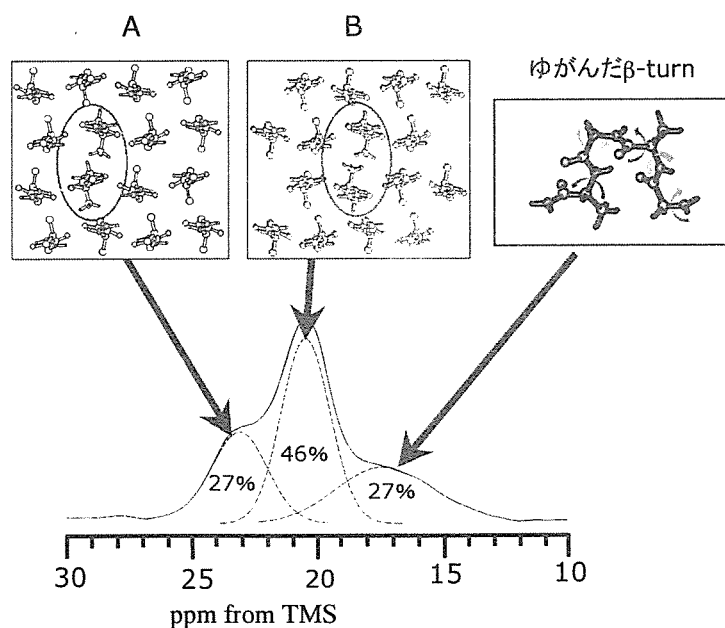


図2 絹繊維結晶部 (Silk II 型) の構造

ているグループと向かい合っているグループ（構造B）が存在する。その割合は27%と46%である。結晶部のうち、残りの27%は、ゆがんだ β ターン構造である。一方、ここでは示していないが、絹の残りの45%を占める非晶部は、半分がゆがんだ β シート構造、半分がゆがんだ β ターン構造である。これらの不均一構造は、あきらかに絹繊維の優れた物性と関連するはずであるが、その解明はこれからである。

1. で得られたSilk I型構造を出発点として、水の存在とカイコ体内で絹に作用する“延伸力”や“ずり”を考慮した分子動力学計算によって、2. で得られたSilk II型の不均一構造を定量的に再現する事ができた。今後、これらの繊維化機構に学んで、新しい絹や絹様物質を創る事が可能になる。

4. エリ蚕絹繊維化前の構造

一方、エリ蚕やサク蚕といった野蚕は、一次構造中にクモと同様のモチーフを有する。すなわち、図3に示したように、“アラニン連鎖領域”と“グリシンを多く含む領域”の二つの領域の繰り返しとなる。アラニン連鎖の長さが違うという相違点はあるが、優れた物性を有するといわれるクモの絹の一次構造と、野蚕絹フィブロインの一次構造が、同様のモチーフを有しているということは非常に興味深い。

エリ蚕絹の繊維化後の構造は、家蚕絹繊維と同様に、不均一構造をとることがわかってきたが、こ

こでは、紙面の都合で、特に、エリ蚕絹の繊維化前の特徴的な構造について述べてみたい。

“アラニン連鎖領域”と“グリシンを多く含む領域”の二つの領域が、約100回、繰り返されるので、その基本構造の二領域を含む30残基のペプチドを合成し、詳細な構造解析を行なった。得られた繊維化前の構造を図4に示した。アラニン連鎖部分は、典型的な α ヘリックス構造であるが、その両端部分は、より巻きのきつい、すばまった構造であることがわかった。これは、なにを意味するのであろうか。

クモ(*nephila clavipes*)牽引糸MaSp1の一次構造

```

AAAAAA GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGGLGGQGAGAV
AAAAAA GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGQGAG
AAAAAA GGAGQRGYGGLGNQGAGRGGGLGGQGAG
AAAAAAA GGAGQGGYGGLGNQGAGRGGQG
AAAAAA GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGQGAG
AAAAAA VGAGQEGIRGQGAGQGGYGGLGSQGSGRGGGLGGQGAG
AAAAAA GGAGQGGLGGQGAGQGAG
AAAAAA GGVRQGGYGGLGSQGAGRGGQGAG
AAAA GGAGQGGYGGLGGQGVGRGGL

```

エリ蚕絹フィブロインの一次構造

```

AAAAAAAAAAAAA GGAGSGYGGGYGHGYGSDGG
AAAAAAAAAAAAA GGAGGGYGGDGG
AAAAAAAAAAAAA GGAGSGYGGGARGGYGHGYGSDGG
AAAAAAAAAAAAA GSGGGYGGDGG
AAAAAAAAAAAAA GGAGGGYGGDGG
AAAAAAAAAAAAA GAGSGYGGGYGHGYGSDGG
AAAAAAAAAAAAA GGAGGGYGGDGG
AAAAAAAAAAAAA GGAGSGYGGGARGGYGHGYGSDGG
AAAAAAAAAAAAA GGAGSGYGGGSWHSYGSDSG
AAAAAAAAAAAAA GGAGDGYGAGS

```

図3 クモ牽引糸とエリ蚕絹の一次構造の比較

一般に、アラニン連鎖からなるヘリックス部分は、すぐβ化し、不溶化しやすい。それは、蚕にとっては、絹を吐くことができなくなり、アミノ酸過剰症となって死ぬことを意味する。そこで、ヘリックス構造の両末端がすばまった構造をとることにより、アラニン連鎖部分のヘリックス構造を、体内で安定化させているのではないかと推測される。この仕組みは、新しい絹を分子設計し、作成する上で参考となる貴重な情報である。

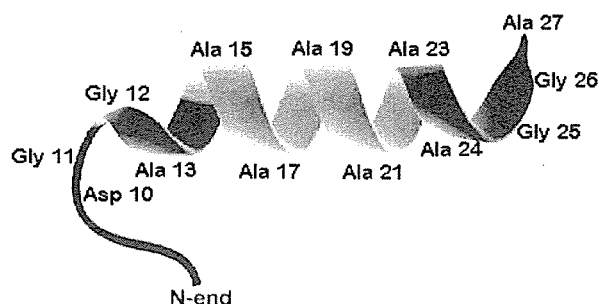


図4 エリ蚕絹のヘリックス部分の二次構造

5. 大腸菌による新規絹様物質の生産

我々は、これらの蓄積されてきた絹の構造情報を基礎にして、全く新しい絹様物質を分子設計し、大腸菌等による遺伝子組み換え法によって、その絹様物質を生産することを試みてきた。

家蚕絹フィブロイン、野蚕絹フィブロインならびにフィブロネクチンの機能部位モチーフを各種選択して機能性絹様タンパク質を設計した。図5にまとめたように、この繰り返し配列を有する機能性絹様タンパク質に関して、発現ベクター、宿主大腸菌の選択及び発現条件を最適化することにより大量生産法を確立した。遺伝子組み換え法により、発現に成功した絹様物質の一部を以下に示した。

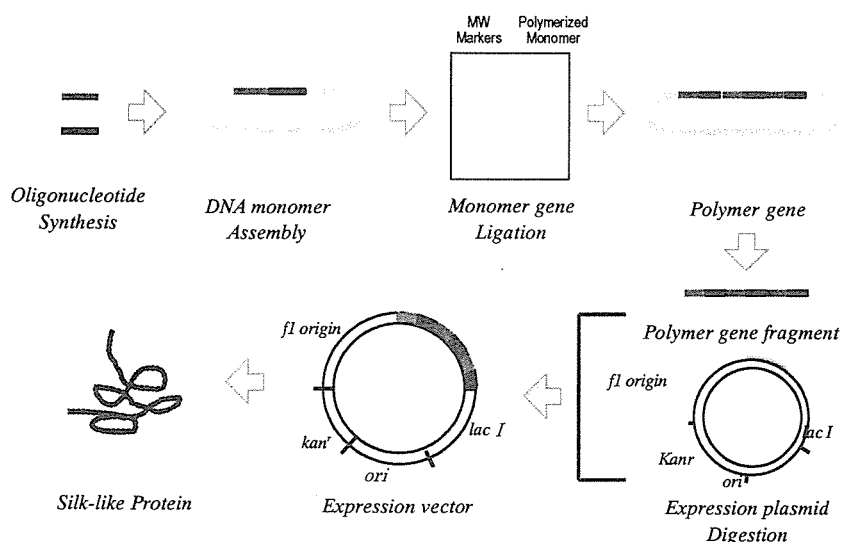


図5 遺伝子組み換え法による新規絹様物質の作成手順

1) 家蚕結晶部と野蚕非晶部のハイブリッド絹様物質

(TS (GGAGSGYGGGYGHGYGSDGG) (GAGAGS)₃AS)_n n = 2, 4, 6

2) 家蚕非晶部と野蚕結晶部のハイブリッド絹様物質

(AS (A)₁₈TSGVGAGYGAGAGYGVGAGYGVGAGYGVGAGAGYTS)_n n = 4, 8

3) フィブロネクチンの細胞接着部位を導入した絹様物質

(AS (TGRGDSPAGG (GAGAGS)₃TS)_n n = 5

現在、より、多種類の絹様物質の生産と多量にこれらの絹様物質を作成することを試みている。

6. 再生絹の繊維化プロセッシング技術の開発と絹繊維および絹不織布の作成

今後、各種新規絹様物質を設計し、遺伝子組み換え技術によって、それを発現していくことは、益々、重要になると予想される。一方、本操作によって、大腸菌により発現する新規絹様物質は、一般に水溶液やゲル、粉末の形で得られる。今後、これらの絹様物質を広く利用していく上では、十分な強度を有する絹様繊維やフィルムを得るためのプロセッシング技術を十分に開発することが必要である。実際、繊維化プロセスが最適化されるかどうかによって、最終的な絹様繊維の物性が大きく左右される。

我々は、家蚕絹の紡糸溶媒を詳細に検討した結果、ヘキサフルオロアセトン（以下、HFA と略）が、特に適している事がわかった。引き続き、溶液紡糸の条件を詳細に検討した結果、十分優れた物性を有する再生家蚕絹繊維を得る事ができた。

一方、エリ蚕絹やエリ蚕と家蚕のハイブリッド絹様物質の場合には、この紡糸溶媒を用いても、溶液紡糸では繊維を得る事はできなかった。そこで、さらに、エリ蚕絹やエリ蚕と家蚕のハイブリッド絹様物質の繊維を得るために、エレクトロスピンニング

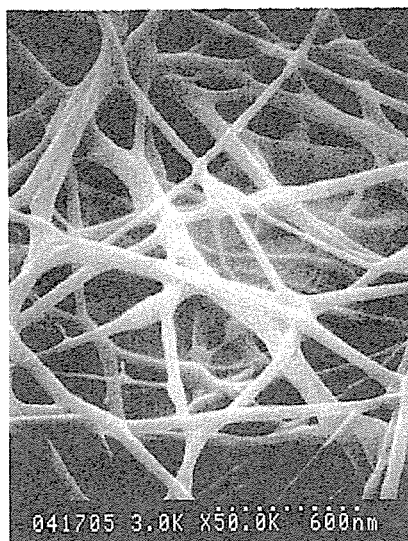


図6 エレクトロスピンニング法により作成した新規絹様物質の不織布

の装置を開発し、それによって最終的に、不織布状の絹繊維を得ることができた。SEM写真（図6）で示したように、直径がナノスケールの極めて細い繊維が得られた。今後、微粒子の捕捉等の目的に十分に使用できることがわかった。

7. おわりに

本稿は、筆者が1997年4月から2002年3月まで、5年間にわたって、研究代表者として行なってきた生研機構の基礎的研究事業のプロジェクト“絹タンパク質の原子レベルでの構造－物性相関の解明と新しい絹繊維等の開発”の成果の一部である。生研機構ならびに蚕糸科学研究所等の内外の共同研究者に深く感謝したい。

尚、最近の我々の研究論文をまとめたので、興味のある方は参照いただきたい。

参考文献

- 1) J. D. van Beek, L. Beaulieu, H. Schafer, M. Demura, T. Asakura, B. H. Meier, *Nature* **405**, 1077 (2000).
- 2) T. Asakura, J. Ashida, T. Yamane, T. Kameda, Y. Nakazawa, K. Ohgo and K. Komatsu, *J.Mol.Biol.*, **306**, 2, 291 (2001)
- 3) T. Asakura, T. Yamane, Y. Nakazawa, T. Kameda and K. Ando, *Biopolymers*, **58**, 521 (2001)
- 4) C. Zhao and T. Asakura, in: J. W. Emsley (Ed.), *Progress in NMR Spectroscopy*, Elsevier, London, **39**, 301 (2001).
- 5) T. Asakura, R. Sugino, J. Yao, H. Takashima and R. Kishore, *Biochemistry*, **41**, 4415 (2002).
- 6) Y. Nakazawa and T. Asakura, *Macromolecules*, **35**, 2393 (2002).
- 7) J. Yao, H. Masuda, C. Zhao and T. Asakura, *Macromolecules*, **35**, 6 (2002).
- 8) T. Kameda and T. Asakura, in: G. A. Webb and I. Ando (Eds.), *Annual Reports in NMR Spectroscopy*, Academic Press, London, **46**, 101 (2002).
- 9) T. Kameda, Y. Nakazawa, J. Kazuhara, T. Yamane and T. Asakura, *Biopolymers*, **64**, 80 (2002).
- 10) T. Asakura, R. Sugino, T. Okumura and Y. Nakazawa, *Protein Sci.*, in press (2002).