

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14540

研究課題名(和文)超弾性レジリンモデルハイブリッドポリペプチドの創製

研究課題名(英文)Design and preparation of recombinant resilin-like hybrid polypeptides

研究代表者

福岡 徳馬 (Fukuoka, Tokuma)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：90415737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では昆虫の外骨格を形成する高弾性タンパク質である「レジリン」をモデルとした人工ポリペプチドの創製に取り組んだ。遺伝子工学的手法により、八エヤカに由来する異なる種類のレジリンの代表的な繰り返しアミノ酸配列が連結したブロック共重合体状のハイブリッドポリペプチドを設計・合成することに成功した。また、これらのレジリン模倣ポリペプチドについて、配列の種類、繰り返しの回数(分子鎖長)により生産性に大きな差があることを確認した。得られたポリペプチドの水溶液からキャストフィルムを作成するとともに、ペプチド鎖中のチロシン残基の酸化カップリング実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、人工遺伝子を設計・合成し、宿主(大腸菌)内でこれを過剰発現させる「生物学的重合法」により、特定のアミノ酸配列を有する狙い通りの配列を持つポリペプチドの合成を行った。本手法によれば、鎖長(分子量)、連鎖配列、立体構造が厳密に制御された「『単一』機能性高分子(人工ポリペプチド)」が得られるため、高弾性タンパク質として知られるレジリンを模倣した異なる配列のポリペプチドを創出し、その構造-物性相関を明らかにすることができれば、新しいバイオ高分子弾性材料を提供する指針を得ることができる。

研究成果の概要(英文)：Resilin is an elastic protein expected as a highly elastic biomaterial to replace synthetic rubbers. In this study, to obtain a novel highly elastic artificial polypeptide by genetic technology, several artificial genes encoding repetitive amino acid sequences of resilin were designed, synthesized, and transformed to Escherichia coli. Production conditions of objective polypeptides were investigated by cultivation of recombinant bacteria. More than 40 homo- and copolypeptides with different sequence and chain length have been hitherto obtained, and Ag (= GAPAQTSSQY) segment-containing polypeptides showed higher productivity and water-solubility among of the other repeating motifs. These novel recombinant resilin-like "hybrid" polypeptides were isolated, purified, and characterized as His-tag polypeptides.

研究分野：高分子化学

キーワード：弾性タンパク質 人工ポリペプチド バイオエラストマー レジリン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

コラーゲン、エラスチン等に代表される弾性タンパク質は、合成ゴムをはるかに凌ぐ 90%以上の高いレジリエンス（復元力）を示すことから、近未来の超弾性繊維としての利用が注目されている。これらのバイオエラストマーの中でも、特に昆虫の骨格タンパク質である「レジリン」（分子量約 7 万）は、300%を超える高歪み性でありながら驚異的な復元率（97%）を示すことが報告されている<sup>1,2)</sup>。このレジリンの構造・機能を模倣した高分子素材が大量に得られれば、低弾性率の柔らかい素材でありながら、従来に無い高弾力性、高耐久性を示す繊維・ゴムが提供できるものと期待される。

レジリンのポリペプチド鎖中には特定のアミノ酸配列が複数回繰り返されるという特徴があり、代表的な配列（後述）が既に報告されている。研究代表者は、これらのアミノ酸配列のみが連続して繰り返されるモデルポリペプチドの分子設計、遺伝子の構築を行い、これらの最適な生産条件の検討に着手していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、レジリンの代表的な 3 種類の繰り返しアミノ酸配列（GGRPSDSYGAPGGGN 等）がそれぞれ単一で繰り返されるポリペプチド、さらに異種配列がブロック毎に繰り返されるハイブリッドポリペプチドを設計し、生物学的重合法により合成する。さらに、ペプチド鎖中のチロシン残基の酸化カップリングにより構造・機能を制御した超高性能バイオエラストマーの創製に取り組む。ポリペプチドの構造（分子量、組成、酸化カップリング度）と機能（強度、弾性率等）との相関を、フィルムやゲル等のマクロな素材レベルで明らかにし、超弾性繊維・ゴムとしての実用化を指向した最適構造の人工ポリペプチドを提供する基盤技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究は大きく次の 2 つの項目に分かれる。(1) 大腸菌発現系での目的ポリペプチドの合成と生産条件の最適化、(2) 生成ポリペプチドからのフィルム・ゲルの作製と酸化カップリング。

(1) レジリンには代表的な繰り返しアミノ酸配列が報告されており、キロショウジョウバエ由来レジリンの Exon I ドメイン（GGRPSDSYGAPGGGN）と Exon III ドメイン（GYSGRPGGQDLG）、ガンビエハマダラカ由来レジリンの配列（AQTPSSQYGAP）等が知られている。いずれの配列も、チロシン残基（Y）を一つ含むことが特徴である。実際のタンパク質中ではこれらの配列が一部残基を変えながら 10~20 回繰り返されている。

本研究では、これらの配列が複数回繰り返される人工ポリペプチドを合成すべく、配列をコードする人工遺伝子（プラスミド）を設計・構築した。具体的には、上記のアミノ酸配列を有する DNA 断片を出発とし、プラスミド上で挿入・増幅・切り出しを繰り返すことで任意の繰り返し回数のプラスミドを構築した（図 1）。

さらに、本手法を応用すれば、例えばショウジョウバエとハマダラカのアミノ酸配列が任意の順番で繰り返されるような非天然型のヘテロポリマーの合成が可能である。そこでこれらの異種配列がブロック共重合体状に繰り返されるハイブリッドポリペプチドを発現するプラスミドの構築も試みた。

続いて、上述の方法で構築したプラスミドを生産用宿主（大腸菌）に導入して目的ポリペプチドを過剰生産させる。目的ポリペプチドの目標生産量を 1 バッチ（約 6h）当たり 100 mg/L と設定し、生産系の最適化を進めた。生成ポリペプチドは His-Tag タンパク質として Ni アフィニティーカラムで回収・精製を行った。

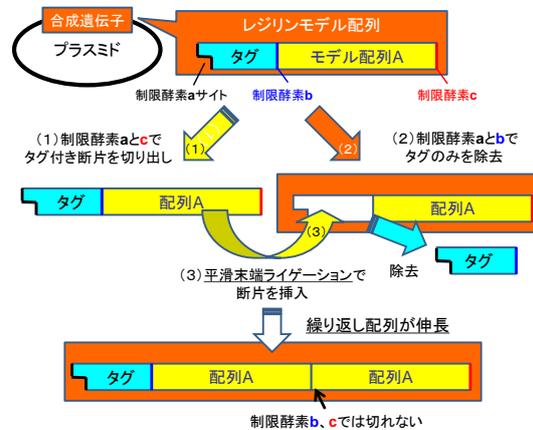


図 1. プラスミドの構築

(2) 得られたポリペプチドに対して、キャスト法によるフィルムの作製や、酵素的酸化カップリング反応によるチロシン残基間の架橋、ゲル化実験を行った。今回はポリペプチドの生産条件検討と得られたポリペプチドの同定に注力したため、本研究期間中では (2) の反応条件検討を十分に行うことができなかった。

### 4. 研究成果

#### (1) ①プラスミドの構築～ポリペプチドの生産培養

レジリン中に繰り返し現れる先述の 3 種類の代表的なアミノ酸配列（EI: GGRPSDSYGAPGGGN、EIII: GYSGRPGGQDLG、Ag: AQTPSSQYGAP）をコードする DNA 断片を出発物として図 1 に概要を記した方法で繰り返し配列を伸長させることにより、目的配列が 8~32 回まで繰り返される DNA 断片を構築した。さらに、例えば EI 配列が 8 回連続、EIII 配列が 8 回連続、それぞれのブロック

が連結したブロック共重合体状の遺伝子構築も行った。以上の結果、EI 配列、EIII 配列、Ag 配列がそれぞれ 8 回、12 回、16 回、20 回、24 回、32 回繰り返されるホモポリペプチド (3 x 6 = 計 18 種)、EI 配列 4 回と EIII 配列 4 回が連結したもの (EI4+EIII4 と表記) など、各配列 4+4、8+8、12+12、16+16 のハイブリッドポリペプチド (6 x 4 = 計 24 種) の合計 42 種のポリペプチドをコードするプラスミドを構築した。これらが大腸菌発現系で過剰発現させることで全ての目的ポリペプチドが生産可能であることを確認した。

今回合成した 42 種類のポリペプチドは全て N 末端側に His タグ (6x His) が結合したポリマーとして得られることから、Ni が配位した担体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー法によって分離精製することが可能である。実際に、イミダゾールを対配位子に用いる一般的な精製方法により、菌体破砕液から目的のポリペプチドを容易に精製・回収することができた。

#### (1) ②構造-機能相関の解明に向けたターゲットポリペプチドの選抜

菌体破砕液の SDS-PAGE 上での目的ポリペプチドのバンド強度、および精製ポリペプチドの実際の回収量を確認した結果、ポリペプチドの生産性は Ag 配列 > EI 配列 > EIII 配列であることが推定された。また、ハイブリッドポリペプチドの配列違いによる生産性の比較を行った結果、N 末端側の配列が生産性に強く影響を及ぼすことも確認された。

高分子材料としての利活用を念頭に、以降の検討を進める上では、分子量が 10<sup>4</sup> オーダーとなる 16 量体以上のポリペプチドが望まれる。また上記の生産性の結果を踏まえ、「生産性」と「構造比較」の観点から、本研究では Ag32、Ag16+EI16、EI16+Ag16 の 3 種類の配列の異なる 32 量体ホモポリペプチドおよびハイブリッドポリペプチドに絞り込んで検討を進めることとした。分離・回収後の各ポリペプチドの SDS-PAGE 像を図 2 に示す。

#### (1) ③目的ポリペプチドの収量向上

研究開始当初のポリペプチド回収量は最大でも 20 mg/L 強であり、ハイブリッドポリペプチドではさらに回収量が一桁低下するなど、目標値である生産量 100 mg/L には遠く及ばなかったことから生産性の向上は挑戦的な課題であった。LB 培地から TB 培地への変更により菌体増殖を約 4 倍に増加させ、培養液や菌体の粘度上昇に対応して菌体破碎・ポリペプチド抽出方法を改良することで、Ag32 (55.1 mg/L)、Ag16+EI16 (27.2 mg/L)、EI16+Ag16 (9.8 mg/L) 各ポリペプチドの回収量を当初から 2 倍以上に向上させることに成功した。さらに、自動タンパク質発現誘導システム (Overnight Express) を利用して、IPTG 不使用、一晚培養の省力プロセスにも取り組み、同等の効果を検証することができた。今回の取り組み内ではコドン最適化までは着手できず、また回収操作にも改善の余地があることから、ポリペプチドの生産性と回収率の更なる向上を目指して研究を継続する予定である。

#### (2) ポリペプチドフィルムの作製

今回得られたポリペプチドはホウ酸緩衝液に可溶であり、テフロン製の枠板に溶液を流し込み乾燥することでキャストフィルムを作製した。また同溶液に西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を加え、過酸化水素水を滴下することでペプチド鎖中のチロシン残基の酸化カップリングを行った。

今回はポリペプチドの量確保が十分にできず、取り組み内では反応前後のフィルムの物性比較まで行うことができなかった。ポリペプチドの分子構造 (アミノ酸配列) の違いや酸化カップリングの有無がフィルムの力学強度に及ぼす影響を調べることが最終目標であり、今後の大きな課題である。

#### <引用文献>

- 1) C. M. Elbin et al., Nature 437, 999-1002 (2005).
- 2) G. Quin et al., Nature Communications 3, Article number: 1003 (2012).

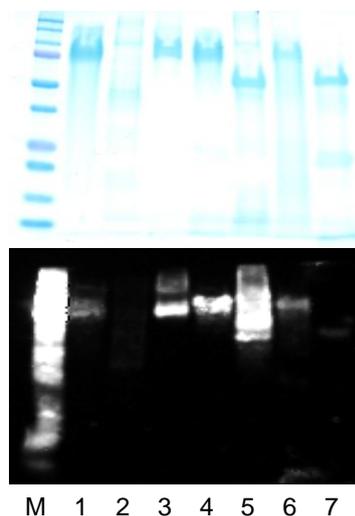


図 2. 回収後の目的ポリペプチドの SDS-PAGE 像  
(上: CB 染色、下: WB)  
レーン 3 : Ag32、4 : Ag16+EI16、6 : EI16+Ag16 (他レーンは無関係のため割愛)



図 3. 精製 Ag32 ポリペプチド (上) とキャストフィルムの作製 (下)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tokuma Fukuoka, Kazunori Ushimaru, Azusa Saika, Shun Sato, Tomotake Morita
2. 発表標題 Preparation of recombinant resilin-like elastic block copolypeptides
3. 学会等名 7th Asia-Oceania Conference on Green and Sustainable Chemistry (AOC7-GSC) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----