

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24860043

研究課題名(和文) 固体NMR測定によるシルクフィブロイン表面構造の評価

研究課題名(英文) Structural analysis of silk fibroin material surfaces by solid state NMR measurements

研究代表者

橋本 朋子 (Hashimoto, Tomoko)

奈良女子大学・生活環境科学系・助教

研究者番号：10589930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：シルクフィブロイン材料表面のタンパク質二次構造やその変動についての詳細な解析を進めた。フィブロイン系(布)、またはフィブロインスポンジを用い、湿潤加熱処理により構造変動を誘導した後、結晶領域を強調するCP/MAS法、または非晶領域を強調するPST/MAS法による固体¹³C NMR測定によりタンパク質二次構造解析を行った。初期構造の差異による水分子との異なる相互作用が湿潤加熱処理による構造変動や分子運動性にも影響を与えていることが示唆された。また、材料の含水率制御下での構造解析により、表面近傍に局在すると考えられているシルクIII型についても新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Structural analyses of wet-heated silk fibroin materials were performed by solid-state ¹³C CP/MAS NMR and ¹³C PST/MAS NMR measurements. It was revealed that the wet-heating treatments changed secondary structures of silk fibroin molecules in fabrics and sponges. It is thought that different initial structures of silk fibroin materials induced the different interactions between fibroin molecules and water near the surface during the wet-heating treatments, and different interactions influenced structural changes and molecular mobility of silk fibroin molecules. In addition, it was found that contents of the unknown structure, which was assumed to be silk III, were changed by wet-heat treatments and water contents.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：構造・繊維材料

キーワード：フィブロイン 固体NMR測定 生体材料

1. 研究開始当初の背景

材料の微小領域の弾性率を細胞が認識し、分化の方向が変わるという研究が近年報告され、分子レベルの材料物性と生体との関係が解明されてきている (Engler A.J. et al., *Cell* **126**, 677-689, (2006))。材料表面の微小領域の物性は、材料表面の分子構造が影響していると考えられ、材料表面の力学物性と生体との相互作用に関する報告が増えてきている。材料表面物性は原子間力顕微鏡、X線光電子分光法や赤外分光法など、種々の測定法により解析が進められている。

これまでに、玉田らは、シルクフィブロイン (以下フィブロイン) 多孔体を作成、その上で培養した軟骨細胞の顕著な組織再生や、皮膚細胞の有意な上皮化・組織再構築化を見出している (Kambe Y. et al. *Biomaterials* **31**, 7503-7511 (2010)、Hashimoto T. et al., *XXII nd Congress of the International Sericultural Commission in Chiang Mai, Thailand*, 13-18 December, 2011)。また、著者らは、フィブロイン表面上の細胞が顕著に高い運動性、そしてこの運動性に相関した細胞外マトリックスの発現を示すことを見出した (Hashimoto T. et al. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* **24**, 158-169 (2013))。このフィブロイン上の細胞の特異的な生物学的機能発現は、従来の表面評価項目である表面電位や接触角などでは説明ができない。

これまでの構造解析の結果より、フィブロインが主に非晶領域 (シルク I 型) と結晶領域 (同 II 型) から構成されるブロック共重合体であるゆえの相分離構造をとることが示唆されるため、この相分離構造が細胞との接着形態を変化させると考えられる。しかしながら、湿潤状態のフィブロイン表面近傍のみの構造の抽出は現在達成されていない。

これまでに、著者らはフィブロイン多孔体 (スポンジ) を作成し、その構造を詳細に解析してきた結果、それぞれシルク I 型、シルク II 型に加え、存在比は低いもののシルク III 型と考えられる二次構造が存在することを見出した。このような種類の異なる分子構造の混在が、先述の細胞の特徴的な生物学的機能発現につながると考えられる。また一方で、成形後のフィブロイン多孔体に水存在下で湿潤加熱処理を施すと、I 型 II 型への構造転換が見られた。この構造転換は水非存在下での加熱では見られないことから、水と触れている多孔体表面の分子のみが構造転換すると考えられる。さらに、II 型への転換を抑制した表面上の細胞運動性が II 型リッチな表面上に比べて劣る傾向も見られていることより、表面構造と細胞の運動性に相関性があることが示唆される。

2. 研究の目的

フィブロインを生体材料として用いた際に見られる細胞との特異的な相互作用は、従来の表面特性である表面電位や接触角だけ

ではなく、フィブロイン分子の表面構造が大きく影響していると考え、本研究課題では、固体核磁気共鳴 (以下 NMR) 測定によりフィブロイン分子の詳細な構造解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

シルク II 型の含有率が高いフィブロイン成形体として、市販のシルク布帛 (厚み: 約 160 μ m) を使用した。一方、シルク II 型の含有率が比較的低いフィブロイン成形体として、既報に従い 6% フィブロイン・1% DMSO 混合水溶液を凍結・融解することで作製したスポンジ、ならびに 1% フィブロイン水溶液から作製したキャストフィルムを用いた。

各フィブロインサンプルを純水に浸漬させた湿潤状態で所定時間加熱処理を行った。構造解析は、結晶領域を強調する固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定、また非晶領域を強調する PST/MAS NMR 測定により行った。

表面形態を FE-SEM 観察により確認した。アミロイドのベータシート構造を認識する蛍光剤として知られているチオフラビン T によりフィブロイン成形体を染色し、シルク II 型のみ表面局在を蛍光顕微鏡により観察した。また、チオフラビン T と同領域の励起・蛍光波長を有し、かつシルク II 型に特異性のない硫酸ベルベリン等の蛍光剤をコントロールとして使用した。

4. 研究成果

当初計画していた銅などの常磁体を含むさせたサンプルを用いた固体 NMR 測定は放電により測定が困難であったため、方針を転換し、Cross-polarization/magic angle spinning (CP/MAS) 法、並びに pulse saturation

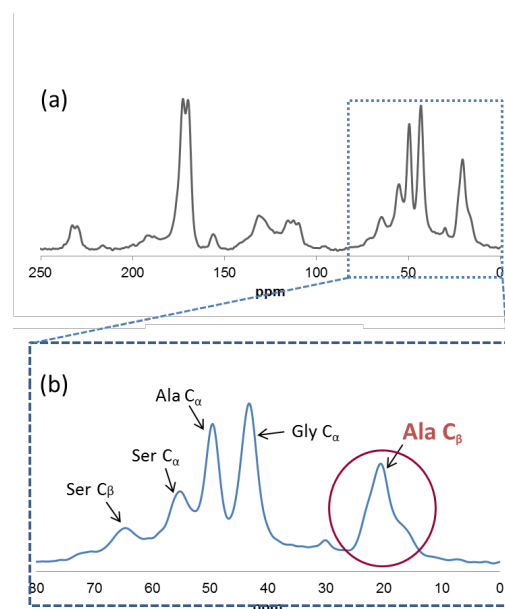


Figure 1. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of the non-treated fibroin. (a) Full spectrum and (b) expansion of the $\text{C}_\alpha/\text{C}_\beta$ region.

transfer/MAS (PST/MAS)法による固体 NMR 測定を主にして構造解析を進めた。

(1) 「固体 NMR 測定による構造解析」

未処理のフィブロイン布帛の固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定結果を図 1 に示す。繰り返し配列 (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser) の各炭素は図 1 のように帰属され、特に、Ala C_β は単独ピークでかつ構造変化に敏感であると知られている。よって固体 NMR 測定で得られた Ala C_β のピークフィッティングにより各タンパク質二次構造の割合を算出した(図 2)。121 度で所定時間湿潤加熱処理を行ったシルクフィブロイン布の固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定結果より、処理時間の増加に伴い可逆的に構造が変動することが明らかとなった(図 3)。また 121 度での処理による構造の変動は、132 度処理での変動よりも大きくなった。

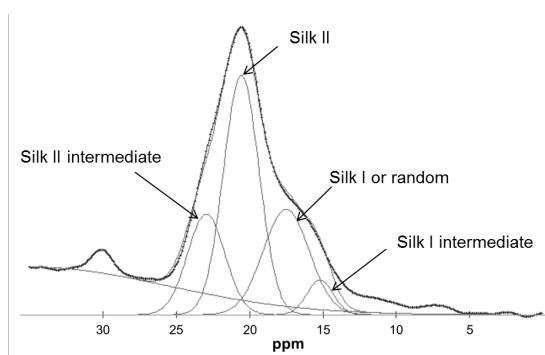


Figure 2. The spectral fitting of Ala C_β peak region of the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum for the non-treated silk fibroin fabric

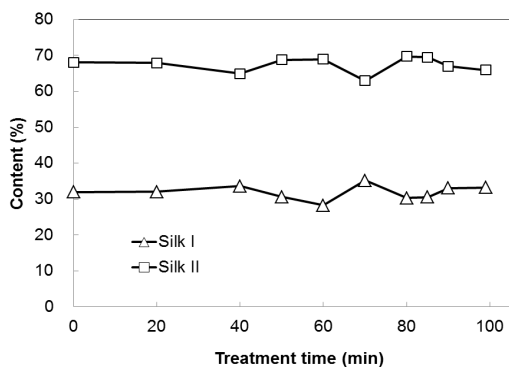


Figure 3. Relationships between the observed relative intensities of silk structure (silk I and silk II) and the treatment time at 121°C.

次に、固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定、固体 ^{13}C PST/MAS NMR 測定でそれぞれ得られたスペクトル強度比の比較により、シルク I 型、II 型というフィブロイン分子の各構造は条件により異なった運動性を示し、このフィブロイン分子の運動性が可逆的な構造変化に影響していることが示唆された。これまでの検討より、湿潤加熱により構造が変化するのは、

水と接する表面近傍のフィブロイン分子のみであることが示唆されていることから、異なった運動性を示す各構造は、フィブロイン成形体の表面に存在していると考察しており、フィブロイン分子の構造と運動性に関する新たな知見が得られた。

スポンジは形態と二次構造の割合が布帛とは異なる成形体である。作製したスポンジでも布帛と同様に温度・時間を変化させ湿潤加熱処理を行うと、シルク I 型、II 型間の構造変動が布帛とは異なる挙動を示した。初期構造の差異に加え、異なる表面積を有していることが、フィブロインと水との関わりに差異をもたらし、結果、湿潤状態加熱による表面構造の変動メカニズムに影響していると考えられる。

(2) 「表面構造可視化の試み」

表面局所的な構造解析のための新たな試みとして、蛍光顕微鏡観察による視覚評価を進めた。シルク II 型(ベータシート構造)を認識するチオフラビン T 水溶液を用いてフィブロインフィルムを染色し、蛍光顕微鏡下での観察を行った。得られた蛍光画像と明視野画像との重ね合わせより、相分離様の構造が見られる部分において、強度は弱いものの、蛍光剤の特徴的な蛍光が観察された。一方、チオフラビン T と同程度の蛍光物性を示すが、ベータシート構造への特異的な相互作用の性質をもたないベルベリン硫酸塩を用い、染色・蛍光顕微鏡観察を行ったフィルムにおいては蛍光発光は認められなかった。これらの結果は、フィルム表面において、シルク I 型/シルク II 型が相分離構造をとっている可能性を示唆するものであると考えられる。

また、様々な条件で湿潤加熱したフィブロイン布帛の FE-SEM 観察を行った結果、いずれの湿潤加熱条件においても、隆起や裂傷などの表面形態の大きな変化は認められなかった。

(3) 「シルク III 型の解析」

LB 膜の気液界面で見いだされたもう一つのシルク構造であるシルク III 型について、これまでにフィルムやスポンジにおいてその存在が示唆してきたが、その詳細は未だ明らかになっていない。このヘリックス構造をとるシルク III 型構造の存在も成形体の表面特性には大きな影響を与えられられることより、解析を進めた。ある一定の加熱時間・温度条件で湿潤加熱を行った布帛の固体 NMR 測定を行った結果、Ala C_β ピークに新たな成分が見られ、これまでに得てきた結果とあわせると、この新たなピーク X はシルク III 型に帰属されると推察される。湿潤加熱処理後に含水状態を変えて測定を行うと、このピーク X の強度比に変動が見られた(図 4、121 度 60 分処理後布帛)。湿潤加熱後のフィブロインの含水状態が、シルク III 型含有率に影響すると考察しており、この結果は、LB 膜

のような薄膜と同様に、布帛（糸）においてもシルク III 型がより水の影響を受けやすい材料の表面近傍に生じ、局在していることを示唆している。

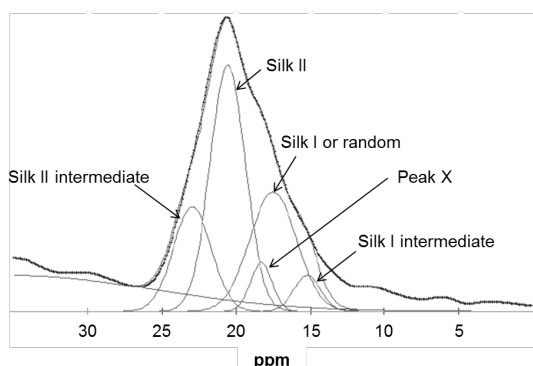


Figure 4. The spectral fitting of Ala C β peak region of the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum for the heat-treated (at 121°C for 60min) silk fibroin fabric in the wet condition.

以上の結果より、フィブロイン成形体としてシルク II 型の含有率の異なる布帛、スポンジ、フィルムを用いての詳細な構造解析より、構造に関する結果に加え、フィブロイン分子自体の運動性という非常に有用な知見を得ることができた。さらに、フィブロイン分子の構造変動が可逆的に起こっている可能性を見出すことができた。また、含水率を変化させた状態でのフィブロインの NMR 測定より、気液界面に存在すると言われているシルク III 型の構造について新しい知見を得た。表面特異的なフィブロインのタンパク質二次構造の解明・制御は、フィブロインが示す特異的な細胞との相互作用解明に大きく寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 10 件）

橋本朋子、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、シルク織物への湿潤加熱処理、日本シルク学会第 60 回記念大会、2013 年 05 月 30-31 日、蚕糸会館（東京都）

橋本朋子、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、発表標題、湿潤加熱シルクフィブロインの構造転移解析、平成 25 年度繊維学会年次大会、2013 年 06 月 12 日～2013 年 06 月 14 日、タワーホール船堀（東京都）

橋本朋子、玉田靖、シルクフィブロインフィルム上での細胞移動性 - フィブロイン-

次構造の影響 -、平成 25 年度繊維学会年次大会、2013 年 06 月 12 日～2013 年 06 月 14 日、タワーホール船堀（東京都）

橋本朋子、機能性シルク素材の開発、2013 年度 被服材料学会・被服衛生学会合同セミナー、2013 年 8 月 25 日、アクトシティ浜松研修交流センター（静岡県）招待講演

橋本朋子、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、機能性シルク材料開発のためのシルクフィブロイン物性制御、平成 25 年度繊維学会秋季研究発表会、2013 年 9 月 5 日～6 日、豊田工業大学（愛知県）

橋本朋子、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、機能性シルクマテリアル開発を目指したフィブロイン構造解析、第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日～13 日、金沢大学（石川県）

Tomoko Hashimoto, Yuki Taniguchi, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada and Hiromichi Kurosu, Structural change of silk fibroin by wet-heating treatment, Advanced Materials World Congress (AMWC 2013), 2013.9.16-19, Cesme, Izmir-Turkey

Tomoko Hashimoto and Yasushi Tamada, Cell mobility on silk fibroin film -Influence of fibroin primary sequence-, Advanced Materials World Congress (AMWC 2013), 2013.9.16-19, Cesme, Izmir-Turkey

橋本朋子、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、機能性シルク材料開発のためのフィブロイン構造解析、第 54 回 固体 NMR・材料フォーラム、2013 年 10 月 24 日、奈良女子大学（奈良県）

Tomoko Hashimoto, Yuki Taniguchi, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada and Hiromichi Kurosu, Structural and physical properties of heated silk fibroin biomaterials, 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, 2013.12.8-13, Auckland, New Zealand

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 朋子 (Tomoko Hashimoto)

奈良女子大学・生活環境科学系・助教

研究者番号：10589930