

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25810124

研究課題名(和文) 繊維化プロセスにおける家蚕絹フィブロイン非繰り返しドメインの役割の解明

研究課題名(英文) The role of the terminal domains of Bombyx mori silk fibroin in the fiber formation process

研究代表者

鈴木 悠 (Suzuki, Yu)

福井大学・テニュアトラック推進本部・講師

研究者番号：90600263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、家蚕絹フィブロインの末端ドメインに着目し、繊維化プロセスにおける末端ドメインの役割の検討を行った。末端ドメインの立体構造解析を行うため、末端ドメインタンパク質のみの大腸菌発現系の構築を行った。絹フィブロインcDNAから末端ドメインのDNA配列をPCRによって取得し、プラスミドの構築に成功した。次にこのプラスミドをタンパク質発現用コンピテントセルE.coli BL21(DE3)に形質転換し、様々な条件で培養を行ったが目的タンパク質の生産は確認されなかった。現在、DNA配列の検討および異なるコンピテントセルや無細胞系でのタンパク質発現系の構築を進めている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was investigating the role of the terminal domains of Bombyx mori silk fibroin in the fiber formation process. For structure determination of the terminal domains, we worked on the expression system construction of the silk fibroin N-terminal domain. The pET28a plasmid vector containing the DNA sequence of N-terminal domain was constructed successfully. Then, this plasmid vector was introduced into the E.coli competent cell DH5a and the plasmid was amplified. After that, this plasmid was introduced into the E.coli BL21(DE3) which was the competent cell for protein expression and cultured but the N-terminal domain protein was not expressed. Currently, we are working on the protein expression by using the other kind of competent cells as well as the cell-free expression system.

研究分野：生物材料解析

キーワード：絹フィブロイン 組換えタンパク質 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 家蚕絹フィブロインの繊維化

家蚕絹フィブロインは、繊維化前の水溶液状態から常温常圧下において繊維化し、高強度・高弾性の繊維が形成されるという点で、合成高分子繊維に比べ環境負荷の低い繊維化メカニズムにより作製される。図1に示すように、絹フィブロインは後部絹糸腺で生産され、中部絹糸腺で水溶液状態で貯蔵され、吐糸口においてずり応力がかかり繊維化される。

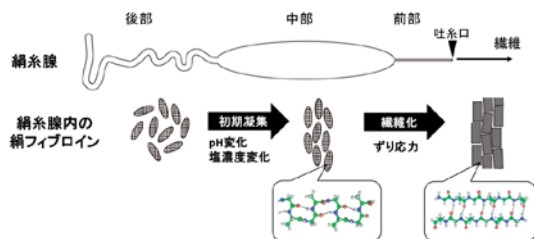


図1 家蚕絹フィブロインの繊維化模式図

(2) 絹フィブロインの非繰り返しドメイン

絹フィブロインは、特徴的な繰り返しモチーフが数百回繰り返された大きな繰り返しドメイン (H鎖中央部) が中心にあり、その両側に比較的小さな非繰り返しドメイン (H鎖N末端、C末端ドメイン、及びL鎖) がぶらさがっている。(図2)



図2: 家蚕絹フィブロイン (上)、クモ糸タンパク質 (下) の一次構造模式図

研究代表者を含む先行研究によって、繊維化による繰り返し領域の構造変化は、繊維化前が β -turnの繰り返し構造、繊維化後が逆平行 β -sheet構造と決定された。そして、吐糸口で加わるずり圧力により分子内から分子間への水素結合の組み換えが生じて β -sheet構造の繊維が形成されることが明らかとなってきている。

一方、絹糸腺内での初期段階の絹フィブロイン分子の凝集は、これまであまり解析が進んでいなかった。しかし近年、クモ糸タンパク質の末端ドメインの立体構造が5本の α -ヘリックスバンドル構造を持ったグロビュラータンパク質であることが明らかとなり、絹糸腺内で起こる pH 低下と塩濃度変化に伴い会合状態が変化することで、繊維化プロセスにおける水溶液から凝集体形成へのス

witchの役割を果たしていることが示された。

(Askarieh, G. et al, *Nature* 2010, Hagn, F. et al, *Nature* 2010) 一方、家蚕絹フィブロインでは原子レベルの構造解析が難しい初期の凝集メカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、家蚕絹フィブロイン非繰り返しドメインの繊維化プロセスにおける凝集メカニズムの解明に向けて、家蚕絹フィブロイン非繰り返しドメインの大腸菌大量発現系の構築を行った。特に、絹フィブロイン非繰り返しドメインのひとつであるN末端ドメイン(SFNt、分子量 151、アミノ酸配列は

```

10 20 30 40 50 60
MRVKTFLVILC CALQYVAYTN ANINDFDEY FGSDVTVQSS NITDEIIRDA SGAVIEEQIT
70 80 90 100 110 120
TKKMORKNKN HGLTGKNEKM IKTFVITTDG DGNESIVEED VLMKTLSDGT VAQSYVAADA
130 140 150
GAYSQSGPVV SNSGYSTHGG YTSDFSTSA V
    
```

図3参照)の立体構造解析に向け、SFNtの大腸菌による大量生産系の構築を行った。

図3 家蚕絹フィブロイン N 末端ドメインのアミノ酸配列

3. 研究の方法

家蚕絹フィブロイン末端ドメインの組換えタンパク質を得る為、大腸菌を用いたタンパク質発現系の構築を行った。絹フィブロイン H 鎖の cDNA を入手し、そこから N 末端ドメイン DNA 配列のみを PCR により増幅し、pET28a プラスミドに挿入して目的 DNA 配列を有するプラスミドを構築した。このプラスミドをプラスミド増幅用コンピテントセル *E.coli* DH5 α に形質転換し、培養してプラスミドを増幅した。次に、プラスミドをタンパク質発現用コンピテントセル *E.coli* BL21(DE3) に形質転換し、目的タンパク質の発現を試みた。培地、培養時間、発現誘導時間、発現誘導試薬濃度、コンピテントセルの種類等を調整し、発現条件を検討した。培養液は His-tag 精製カラムで精製し、一次抗体に His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングで目的タンパク質の発現を評価した。

4. 研究成果

(1) 絹フィブロイン N 末端ドメインのクローニング

入手した家蚕絹フィブロイン cDNA に N 末端ドメイン中にイントロンが含まれていたため、イントロンの除去を行った。具体的には、イントロンの両側配列に相補的な2つのプライマーを用いてイントロンを除く配列を PCR により増幅し、PCR 産物をセルフライゲーションさせ、イントロンを含まない DNA を作製した。アガロースゲル電気泳動により、イントロン除去を確認した。(図4)

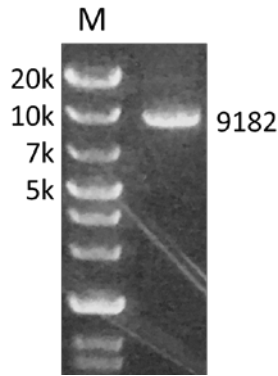


図4イントロンを除去した絹フィブロイン DNA のアガロースゲル電気泳動

(2) プラスミドの作製

SFNt 配列を含む大腸菌発現用プラスミドの作製を行った。SFNt DNA を PCR により増幅し、アガロース電気泳動により、目的 DNA の増幅を確認した。(図5) SFNt DNA と大腸菌発現用 pET28a を制限酵素 BamHI/NdeI を用いてライゲーションし、大腸菌発現用プラスミドを作製した。

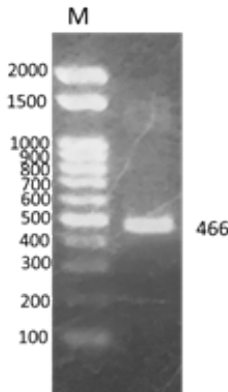
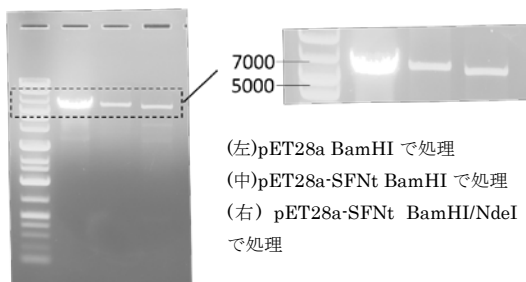


図5 PCR で増幅した SFNt DNA のアガロースゲル電気泳動

(3) コンピテントセルの形質転換

大腸菌コンピテントセル *E. coli* DH5a に SFNt プラスミドを導入した。混合液を氷上で5分間インキュベート、42℃で45秒間インキュベートし、LBプレートに移し均一に塗布し37℃で一晩インキュベートを行った。LBプレート上のコロニーを回収して LB 培地で培養し、ミニプレップ法により培養液からプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドはアガロース電気泳動で SFNt 配列を含むプラスミドであることを確認した。(図6) また、



(左)pET28a BamHI で処理
(中)pET28a-SFNt BamHI で処理
(右) pET28a-SFNt BamHI/NdeI で処理

図6 *E. coli* DH5a から抽出したプラスミドのアガロースゲル電気泳動

得られたプラスミドのシーケンス解析を行い、SFNt DNA 配列を含むことを確認した。

(4) 大腸菌発現系の構築

タンパク質発現用コンピテントセル *E. coli* BL21 (DE3) に SFNt プラスミドを形質転換した。BL21 (DE3) を培養し、 $OD_{550}=0.4 \sim 0.6$ で IPTG を加えて発現誘導 (IPTG 濃度 0.4mM) し、その後4時間培養して培養液を回収した。培養液を遠心し、沈殿した菌体を回収し、バッファーに溶解し-80℃で一晩冷凍した。その後超音波破碎し、遠心して上清・沈殿をそれぞれ回収した。

上清・沈殿 (尿素で溶解) をそれぞれ SDS-PAGE 電気泳動にかけた。その結果、本条件では、目的タンパク質の分子量付近 (18.5kDa) に明確なバンドは確認されなかった。(図7)

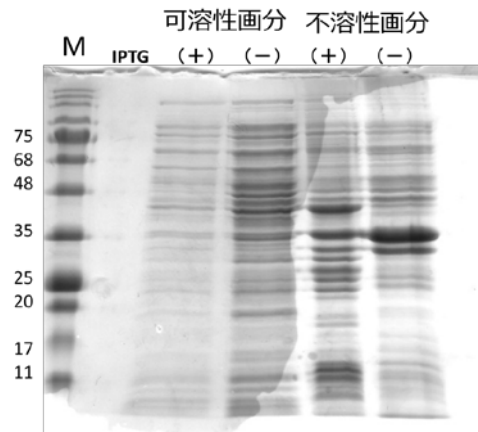


図7 形質転換した BL21(DE3) 培養物の SDS-PAGE 電気泳動

SOB 培地、SOC 培地を用いて同様に培養を行ったが、目的分子量付近にバンドは確認されなかった。

SFNt タンパク質は精製のため N 末端側に His-tag が付加されている。そこで、培養物を His-tag 精製し、SDS-PAGE で確認した。そ

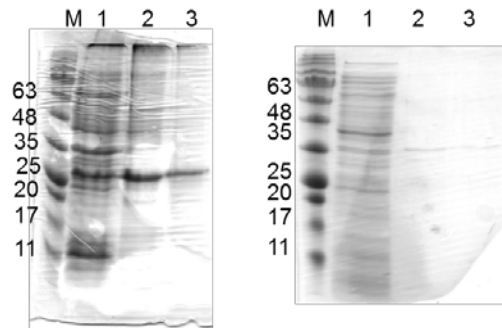


図8 SOB 培地 (左)、SOC 培地 (右) で発現した His-tag 精製後 SFNt の SDS-PAGE M:分子量マーカー、1:精製前の SFNt、2:溶出フラクション1、3:溶出フラクション2

の結果、LB, SOB, SOC 培地ともに、目的タンパク質の分子量にはバンドが確認されなかった。(図8)25kDa 付近にバンドが存在したが、これは、Ni²⁺に対して特異的な結合が確認されている SlyD と呼ばれるタンパク質であり SFNt タンパク質由来ではなかった。さらに、一次抗体として His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったが、目的タンパク質付近のバンドは確認されなかった。(図9)

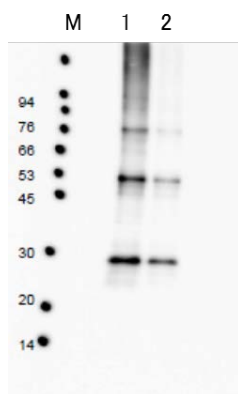


図9 His-tag 抗体を一次抗体としたウエスタンブロッティング M : 分子量マーカー、1 : His-tag 精製前試料、2 : His-tag 精製後試料

目的遺伝子は大腸菌のレアコドンを含むため、レアコドンによる発現量減少を改善したコンピテントセル Rosetta2 (DE3) を用いて、形質転換および培養を行った。培養物を SDS-PAGE 電気泳動したところ、目的タンパク質の発現は確認できなかった。

(5) まとめ

本研究により、家蚕絹フィブロイン H 鎖の N 末端ドメインの遺伝子をコードしたプラスミドの構築に成功した。DNA 配列はシーケンス解析により確認された。

SFNt 遺伝子を持つプラスミドを大腸菌に形質転換し、SFNt タンパク質の発現を試みたが、SFNt タンパク質付近の分子量を有するタンパク質の発現は確認できなかった。培地、大腸菌の種類を変えても同様の結果だった。

目的タンパク質配列のうち、N 末端側 21 残基がシグナルペプチドであるという報告がある。また、C 末端側 (127~151 残基) はフィブロイン H 鎖の繰り返し配列の間に存在する境界配列と類似しており、N 末端ドメインの立体構造形成には関与しないと予想される。そこで現在、これら両末端残基を除いた SFNt タンパク質発現系の構築を進めている。

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)

[雑誌論文] (計4件)

① Suzuki Y. Structures of silk fibroin before and

after spinning and biomedical applications. *Polym J*, 2016;48:1039-44. 査読有, DOI: 10.1038/pj.2016.77

② Suzuki Y., Kawanishi S, Yamazaki T, Aoki A, Saito H, Asakura T. Structural Determination of the Tandem Repeat Motif in *Samia cynthia ricini* Liquid Silk by Solution NMR. *Macromolecules*. 2015, 48(18):6574-9. 査読有, DOI: 10.1021/acs.macromol.5b01717

③ Suzuki Y., Yamazaki T, Aoki A, Shindo H, Asakura T. NMR Study of the Structures of Repeated Sequences, GAGXGA (X =S, Y, V), in *Bombyx mori* Liquid Silk. *Biomacromolecules*. 2014;15(1):104-12. 査読有, DOI: 10.1021/Bm401346h

④ Asakura T, Suzuki Y., Nakazawa Y, Holland GP, Yarger JL. Elucidating silk structure using solid-state NMR. *Soft Matter*. 2013; 9(48): 11440-50. 査読有 DOI: 10.1039/C3sm52187g

[学会発表] (計11件)

① 鈴木悠、繊維化プロセスにおける家蚕絹フィブロイン非繰り返しドメインの役割の解明、平成28年度繊維工業研究センター研究発表会、2017/3/10、福井

② 山本高寛、鈴木悠、家蚕絹フィブロイン N 末端ドメインの大腸菌による生産、平成28年度北陸地区高分子若手研究会、2016/11/11、福井

③ 鈴木悠、絹の繊維化メカニズムと医療材料への応用、福井大学工学部技術部特別講演会、2016/3/15、福井

④ 鈴木悠、絹のお話〜カイコの糸作りと医療材料への応用、バイオ・ライフ技術研究部会、2016/1/28、福井

⑤ Suzuki, Y., Saito, H., Kawanishi, S., Aoki, A., Asakura, T., Structure of *Samia Cynthia ricini* silk fibroin with polyalanine sequence studied by solution and solid state NMR, *Pacificchem2015*, 2015/12/16, Honolulu, Hawaii

⑥ 鈴木悠、齋藤準、河西秀和、青木昭宏、朝倉哲郎、NMR を用いたエリ蚕液状絹の立体構造解析、平成27年度日本化学界北陸地区研究発表会、2015/11/27、石川

⑦ 鈴木悠、家蚕および野蚕絹フィブロインの NMR 構造解析、平成27年度北陸地区高分子若手研究会、2015/11/13、石川

⑧ 鈴木悠、齋藤準、河西秀和、青木昭宏、朝

倉哲郎、アラニン連鎖領域を有するエリ蚕絹
フィブロインの NMR 構造解析、第 64 回高
分子討論会、2015/9/15、仙台

⑨鈴木悠、斎藤準、河西秀和、青木昭宏、朝
倉哲郎、アラニン連鎖領域を有するエリ蚕絹
フィブロインの構造に関する溶液および固
体 NMR 研究、平成 27 年度繊維学会年次大会、
2015/6/10、東京

⑩鈴木悠、河西秀和、青木昭宏、斎藤準、鈴
木不律、梶弘典、朝倉哲郎、アラニン連鎖領
域を有するエリさん絹フィブロインの構造
に関する溶液および固体 NMR 研究、第 64 回
高分子学会年次大会、2015/5/27、札幌

⑪河西秀和、鈴木悠、山崎俊正、朝倉哲郎、
野蚕絹中の α -helix 繰り返し構造と構造転
移に関する NMR 研究、第 63 回高分子学会年
次大会、2014/5/28、名古屋

〔図書〕(計 1 件)

① Suzuki Y, Asakura T. Silk Fibroin,
Encyclopedia of Polymer Nanomaterials:
Springer; 2014. p. 2228-33.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 悠 (SUZUKI Yu)

福井大学・テニユアトラック推進本部・講師
研究者番号：90600263