

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17913

研究課題名(和文)レジリンモデルポリペプチドから成る超弾性繊維の創製及び機能制御

研究課題名(英文)Development of highly elastic biomaterials based on resilin-like polypeptides

研究代表者

福岡 徳馬 (Tokuma, Fukuoka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・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) 3,300,000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、レジリンの代表的な繰り返しアミノ酸配列が8～32回繰り返される人工ポリペプチドを大腸菌に過剰生産させることに成功した。さらに、各々の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得ることに成功した。これらのレジリン模倣ポリペプチドはHisタグタンパク質としてアフィニティーカラムで回収できることを確認し、その分離精製条件を確立した。

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. The obtained polypeptides were readily isolated and purified by affinity chromatography as His-tag polypeptides.

研究分野：高分子化学

キーワード：タンパク質 弾性繊維 バイオベース材料

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^{1,2)}。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、従来に無い超高弾力性、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。

2. 研究の目的

本研究では、生物学的重合法により、昆虫の外骨格を形成する超高弾性タンパク質の一種である「レジリン」をモデルとした人工ポリペプチドを設計・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、超高弾性繊維・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項目に分かれる。(1) レジリンモデルポリペプチド発現用プラスミドの設計・構築、(2) 目的ポリペプチドの合成(大腸菌発現系での目的ポリペプチド合成) 生産条件の最適化、(3) 生成ポリペプチドの酸化カップリングおよびフィルム・ゲルの作製と物性評価。

(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、キイ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(GYSGRRPGGQDLG) 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、まず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数種類合成すべく、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。

(2) 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。今回は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以上と設定し、最適な培養条件の検討を進めた。

得られたポリペプチドはHisタグタンパク質としてアフィニティ カラムで回収、精製を行った。

(3) 得られたポリペプチドに対して、酵素的酸化カップリング反応によりチロシン残基間の架橋を行う。今回はDNA塩基配列の最適化等、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(3)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) プラスミドの構築

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(Exon I: GGRPSDSYGAPGGGN, Exon III: GYSGRRPGGQDLG, Ag: AQTPSSQYGAP)をコードするDNA断片を依頼合成によって用意し、これを出発物として図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2~32回まで繰り返されるDNA断片を構築した。

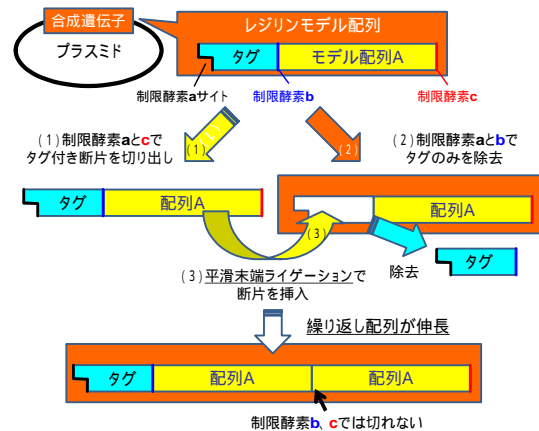


図1. プラスミドの構築

さらに、上記手法を応用することで、例えばExon I配列とExon III配列が各々16回ずつ繰り返された断片同士が連結したハイブリッド型のDNA断片等の構築にも成功した。

得られた各種DNA断片を搭載したpETプラスミドを大腸菌に導入し、遺伝子を発現誘導することで目的のポリペプチドの生産培養試験を行った。

(2) ポリペプチドの生産培養

上記遺伝子組み換え大腸菌について、LB培地中で培養を行い、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の添加により遺伝子の発現誘導を行うことでポリペプチドの生産試験を行った。培養条件を変えて菌体の増殖傾向を確認するとともに、得られた菌体を回収し、菌体破砕液のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、目的ポリペプチドの生成を確認した。

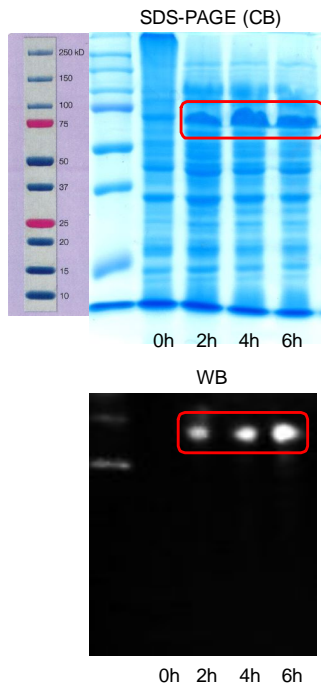


図 2. Ag(AQTPSSQYGAP) x32 量体ポリペプチドの生産試験結果

培養試験の一例として、Ag x32 量体ポリペプチド（分子量理論値：37,362 Da）の生産試験結果を図 2 に示す（培養温度：37℃）。

IPTG 添加 2 時間後から過剰に生成している一つのバンドのポリペプチドの存在が確認された。また、目的ポリペプチドは設計時に N 末端側に His タグを付加させており、ウェスタンブロットの結果から過剰生産されているポリペプチドが目的のポリペプチドであることが確認された。得られたポリペプチドの分子量はマーカー（左列）との比較から約 70 kDa と推測され、目的ポリペプチドが 2 量化して検出されているものと推測される（原因不明）。

同様にして、Exon I、Exon III、Ag 配列の 8、12、16、24、32 量体の生産試験を各々行い、一部の低分子量体（Exon I x8 量体）を除き、全ての配列のポリペプチドが生産可能であることを確認した。

SDS-PAGE 上で目的ポリペプチドのバンドの強度を確認した限りでは、ポリペプチドの生産性は Ag 配列 > Exon III 配列 > Exon I 配列であることが推測された。今後は精製ポリペプチドの実際の回収量を比較することで上記の傾向を確認する予定である。

(3) ハイブリッドポリペプチドの生産培養

続いて、ハイブリッド体の生産試験を行った。結果の一例として Ag x12 量体 + Exon I x12 量体のハイブリッドポリペプチド（分子量理論値：31,564 Da）の生産試験結果を図 3 に示す（培養温度：37℃）。

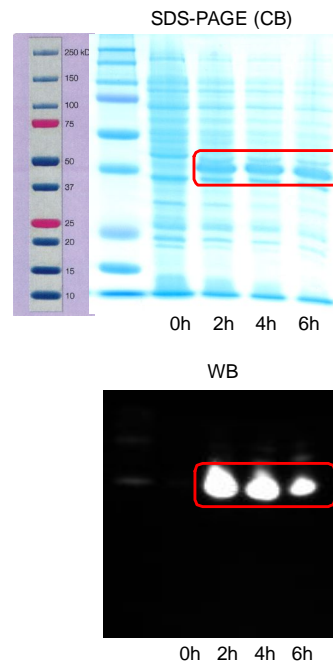


図 3. Ag(AQTPSSQYGAP) x12 + Exon I (GGRPSDSYGAPGGGN) x12 量体ハイブリッドポリペプチドの生産試験結果

(2) で示した結果と同様に、目的のポリペプチドが IPTG 添加 2 時間後から過剰に生成していることが確認された。得られたポリペプチドのバンドは分子量 37 kDa 付近に見られており、先述の Ag x32 量体ペプチドのような 2 量化は確認されなかった。一方、同じ配列の組み合わせが N 末端側と C 末端側で逆転している Exon I x12 量体 + Ag x12 量体のハイブリッドポリペプチドの生産試験結果では、2 量化していると推測されるバンドが確認されており、得られるポリペプチドの C 末端側の配列がペプチド鎖の立体構造に何らかの影響を与えるものと推測される。今後、精製ポリペプチドを用いて構造解析等を進めることにより、これらの仮説について検証を進める予定である。

(4) ポリペプチドの回収・精製

今回合成した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ク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、菌体破碎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。

< 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).

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福岡 徳馬 (FUKUOKA, Tokuma)
産業技術総合研究所・機能化学研究部門・
主任研究員
研究者番号: 90415737

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()