

令和元年6月3日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17957

研究課題名(和文) 絹フィブロインの紡糸プロセスにおける吐糸直前の構造転移の解明

研究課題名(英文) The structural transition of the silk fibroin studied by solid state NMR

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、固体NMR法を用い絹フィブロインの紡糸プロセスにおける構造転移の解明を目指した。家蚕液状絹の $^{13}\text{C}$ 安定同位体ラベルの最適化を行い、 $^{13}\text{C}$  U-glucoseを混ぜた人工試料を5齢3日目から3日間投与することで最もラベル率の高い液状絹が得られることを明らかにした。固体NMR法のマジック角回転で試料にかかる遠心力により誘起される構造変化を経時的に観測することで、液状絹の構造転移を詳細に評価した結果、まずSilk I成分の運動性が徐々に減少し、ある時点から急激にSilk IIへの構造転移が起こる2段階の構造転移であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、液状絹の $^{13}\text{C}$ 安定同位体ラベル最適条件の確立により、今後、各種NMR法を用いた絹フィブロインの構造解析における感度向上・試料調製および測定時間短縮という学術的意義が得られた。また、液状絹から絹繊維が形成される過程で、家蚕絹糸腺内において少なくとも2段階の構造転移が起こることを明らかにした。これは、蚕の省エネルギーで環境負荷の低い紡糸プロセスを模倣し、絹のみならず合成繊維の紡糸システムにも適用する上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The structural transition of Bombyx mori silk fibroin at the fiber spinning process was studied by solid state NMR. The preparation of  $^{13}\text{C}$  stable isotope labeled liquid silk was optimized. We found that administering the  $^{13}\text{C}$  U-glucose mixed with artificial diets during 3rd to 5th at 5th instar silkworms gave the highest  $^{13}\text{C}$  labeled liquid silk. Then, the structural transition of liquid silk caused by the centrifugal force of the magic angle spinning installed in the solid state NMR instrument. This study revealed that the structural transition composed of at least two steps. At first, the mobility of Silk I component was gradually decreased. After that, the conformation was changed rapidly from Silk I to Silk II which is mainly an anti-parallel beta-sheet structure.

研究分野：天然高分子材料の構造解析

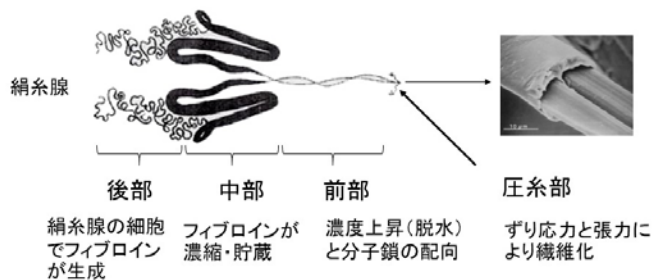
キーワード：シルクフィブロイン 固体NMR マジック角回転 構造転移

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カイコは、絹フィブロイン水溶液から圧糸部でのずり圧力と頭部運動による延伸により高強度高弾性な絹繊維を作り出す。合成繊維の紡糸では有機溶媒や熱、高压が用いられることが多く、既存の紡糸技術に代わる低エネルギーでクリーンな紡糸技術としてカイコの紡糸プロセスの解明とその模倣が期待されている。また、絹フィブロインは近年医療材料としての研究が進められており、絹水溶液を成形加工する際に、有機溶媒への浸漬などにより絹フィブロインの立体構造を変化させ、凝集・不溶化させる必要がある。高度に最適化されたカイコの紡糸プロセスを理解し、材料開発に活かすためには、カイコ体内における絹フィブロインの構造転移を明らかにすることが不可欠である。

カイコ体内の絹フィブロインの流れを図1に示す。絹フィブロインは、後部絹糸腺で作られ→中部絹糸腺で水溶液で貯蔵され→細い前部絹糸腺をとおり→圧糸部でずり圧力を受け→繊維となって体の外に出る。フィブロイン溶液の濃縮およびずり圧力によるフィブロインの構造転移が予想されるが、その詳細は解明されていない。



### 2. 研究の目的

そこで本研究では、絹糸腺各部位における絹フィブロインの立体構造と構造転移の詳細を明らかにすることを目的とした。これまでの研究から、家蚕絹フィブロインの結晶部繰り返し領域(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)<sub>n</sub>は、繊維化前構造 (Silk I) はタイプIIβターンの繰り返し構造を含み、繊維化後構造 (Silk II) は主に逆並行βシート構造であることが、X線回折、溶液 NMR, 固体 NMR 測定等から明らかとなっている。

本研究では、絹糸腺各部における絹フィブロインの立体構造の解明と、ずり圧力下での Silk I から Silk II への経時的な構造転移を、各種固体 NMR 法を用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 超高速 MAS1mm プローブを用いた前部絹糸腺中の絹フィブロインの構造解析

絹フィブロインに機械的作用がかかり構造転移が起こる場である前部絹糸腺の直径は0.05~0.3mm と極めて細く (中部絹糸腺の 200 分の 1)、測定に必要なサンプル量を得ることが困難であった。そこで、微量試料の高感度な測定ができる超高速 MAS1mm プローブを用いることで前部絹糸腺での絹フィブロインの立体構造の評価を行った。

#### (2) 固体 NMR 高速 MAS を用いた家蚕液状絹の構造転移の経時的観測

家蚕絹フィブロインの結晶部繰り返し領域(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)<sub>n</sub>は、繊維化前構造 (Silk I) はタイプIIβターンの繰り返し構造を含み、繊維化後構造 (Silk II) は主に逆並行βシート構造であることが、X線回折、溶液 NMR, 固体 NMR 測定等から明らかとなっている。この構造転移が、どのように起こっているかを原子レベルで追跡する手段として、本研究では、固体 NMR 法のマジック角回転(MAS)で試料にかかる遠心力により絹フィブロインの構造転移を誘起し経時的に観測することとした。

運動性の高い成分と低い成分の両方を観測可能な固体 NMR 測定を連続的に行うことで、液状絹フィブロインの構造転移を解析した。カイコ体内から取り出した液状絹フィブロインを固体 NMR 試料管につめ MAS の遠心力によりフィブロインの構造変化を促し、連続測定により各ピークの経時変化を追跡することで構造転移を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 固体 NMR 超高速 MAS1mm プローブを用いた前部絹糸腺中液状絹の構造解析

前部絹糸腺は直径 0.05~0.3mm と極めて微量であるため、必要な試料がわずか 0.8 ul と 3.2mm プローブの 60 分の 1 のみである固体 NMR 超高速 MAS1mm プローブを使用した構造解析に取り組んだ。初めに、直径 1mm 長さ 1cm 弱という非常に小さな試料管に顕微鏡下で試料を詰めるトレーニングを行い、次に、福井大学に新規導入された超高速 MAS1mm プローブのセッティングを行った。グリシンを測定試料とし、MAS 回転速度 70kHz 下での  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR および  $^1\text{H}$  NMR 測定の各種パラメータのセッティングを行い、 $^{13}\text{C}$ 、 $^1\text{H}$  とともに良好なスペクトルが得られることを確認した。

次に、前部絹糸腺の固体  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR 測定を行った結果、70kHz で試料管が安定に回転し良好なスペクトルが得られた。スペクトル解析の結果、AlaC $\beta$ のメインピークは 19.4ppm で中部絹糸腺・後部絹糸腺とほぼ同じ化学シフトであったが、21.6ppm に新規ピークが観測された。さらに、AlaCO ピークでも、178.5ppm に加えて 176.5ppm に新規ピークが観測された。これらのピークは、化学シフトから $\beta$ シート構造由来であると推測され、前部絹糸腺で一部 $\beta$ シート構造が形成されていることが明らかとなった。

しかし、1mm プローブは試料体積当たりの感度は良いものの試料が極微量のため、通常の 3.2mm プローブに比べ  $^{13}\text{C}$  の感度が十分でなく、炭素核の安定同位体ラベルが必要であることが明らかになった。そこで、カイコ飼育において 2g の人工飼料に 200mg の  $^{13}\text{C}$ -glucose を混ぜ、5 齢 3,4 日にそれぞれ与えた。熟蚕のカイコを解剖し絹糸腺を取り出して絹糸腺とセリシンを除去し、フィブロイン柱を乾燥させて固体  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR 測定を行った。その結果、ノンラベル液状絹と比較して 10-12 倍の感度を得ることができた。

(2) 固体 NMR 高速 MAS を用いた家蚕液状絹の構造転移の経時的観測

家蚕絹フィブロインは、S-S 結合で結合した 2 本のポリペプチド H 鎖 391kDa, L 鎖 26kDa から構成され、H 鎖のアミノ酸組成は、Gly 45.9%, Ala 30.3%, Ser 12.1%, Tyr 5.3%, Val 1.8%、その他 15 種のアミノ酸合計 4.7%からなる。3.2mm プローブに  $^{13}\text{C}$  ラベル中部絹糸腺液状絹を詰め、MAS 速度 8kHz で連続測定を行った。 $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR 測定および  $^{13}\text{C}$  DDMAS NMR 測定を交互に繰り返し、各々、運動性の高い構造と低い構造を評価した。

図 2 に経時的に測定した  $^{13}\text{C}$  DDMAS および  $^{13}\text{C}$  CP/MAS スペクトルを示す。測定 1 回目では、DDMAS,CPMAS スペクトルとも観測されたすべてのアミノ酸で Silk I 構造(Ala C $\beta$  17.2ppm, Ser C $\beta$  62.0ppm)を示した。経時的に、DDMAS 測定では Silk I のピーク強度が減少し、CPMAS 測定では Gly, Ala, Ser の各アミノ酸残基で Silk II 構造(Ala C $\beta$  20.8ppm, Ser C $\beta$  64.0ppm)のピークが出現した。このことから、MAS による Silk I から Silk II への構造転移が確認された。

$^{13}\text{C}$  CPMAS における Silk II ピークの積分強度の経時変化をプロットしたところ、Gly, Ala, Ser とともに測定開始から約 70h 後に Silk II への構造転移が開始された。一方 DDMAS では、Silk I のピーク強度が 70h 前後まで緩やかに減少し、その後減少の傾きが大きくなった。このことから、Silk II への構造転移が起こるまで Silk I 成分は徐々に運動性が減少し、ある時期を境に急激に Silk II への構造転移が起こる 2 段階からなる構造転移であることが明らかとなった。

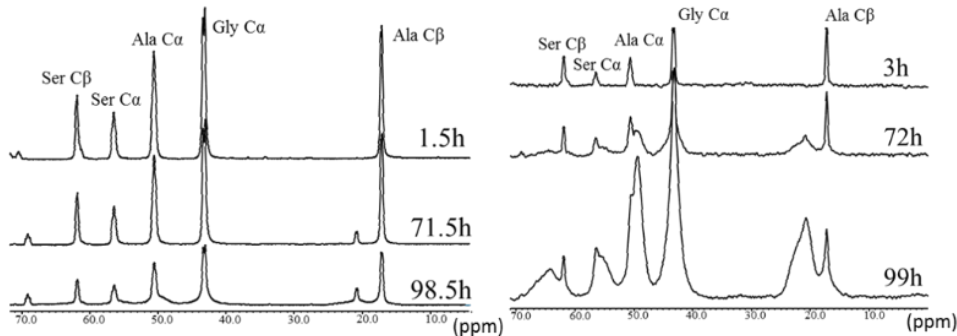


図 2 (左) 測定開始から 1.5h, 71.5h, 98.5h 後の  $^{13}\text{C}$  DDMAS NMR スペクトル。経時的にピーク強度が減少。(右) 測定開始から 3h, 72h, 99h 後の  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR スペクトル。経時的に  $\beta$  シート構造由来の新規ピークが出現。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- [1] Tasei, Y., Nishimura, A., **Suzuki, Y.**, Sato, T. K., Sugahara, J., and Asakura, T., NMR Investigation about Heterogeneous Structure and Dynamics of Recombinant Spider Silk in the Dry and Hydrated States, *Macromolecules*, 50 (20) 8117-8128, **2017** 査読有
- [2] **Suzuki, Y.**, Structures of silk fibroin before and after spinning and biomedical applications *Polymer. J*, 48, 1039-1044, **2016** 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- [1] 森江将太・**鈴木悠**, 固体NMRを用いた加圧下における家蚕液状絹の構造転移解析, 高分子学会北陸支部若手研究発表会 2018/11/17 富山
- [2] **鈴木悠**・森江将太・東孝憲, 固体NMR法を用いたシルクタンパク質溶液の構造および運動性解析, 平成30年度繊維学会秋季研究発表会 2018/11/2 福井
- [3] **鈴木悠**・森江将太・東孝憲, 固体NMR法を用いたシルクタンパク質溶液の構造および運動性解析, 第67回高分子討論会, 2018/9/12 札幌
- [4] **鈴木悠**, NMR法を用いたバイオ材料の立体構造および相互作用解析 FAMCO Workshop'18, 名古屋, 2018/8/24
- [5] **Suzuki, Y.**, Conformation and dynamic properties of silk fibroin in a silk gland, 255<sup>th</sup> ACS national meeting, 2018/3/22, New Orleans, USA
- [6] **鈴木悠**, 天然液状絹のNMR構造解析, 第62回固体NMR・材料フォーラム, 2017/10/26, 京都
- [7] **鈴木悠**, 朝倉哲郎, 天然液状絹のNMR構造解析, 第66回高分子討論会, 2017/9/22, 松山
- [8] **Suzuki, Y.** and Asakura, T., Conformation of silk fibroins stored in silk glands studied by solution NMR, *Sheffield Silk Conference*, 2017/7/25, Sheffield, UK

[図書] (計 3 件)

- [1] Asakura, T., Kametani, S., **Suzuki, Y.** *Encyclopedia of Polymer Science and Technology; Silk*, 1-19, Wiley, **2018**
- [2] Asakura, T., **Suzuki, Y.**, and Nishimura, A., *ACS Books "Stereochemistry and Global Connectivity: The Legacy of Ernest Eliel"*; Chapter 11 Solution NMR Structure and Conformation of Silk Fibroins stored in *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* Silkworms, 191-206, American Chemical Society, **2017**
- [3] **鈴木悠**, 家蚕およびエリ蚕液状絹の立体構造, 1 (6) 70-73, アグリバイオ, 2017

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。