

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18361

研究課題名(和文) 酵素触媒フラグメント合成を用いた高強度バイオポリアミドの開発

研究課題名(英文) Development of high strength bio-polyamide via chemoenzymatic synthesis of polypeptide fragments

研究代表者

土屋 康佑 (Tsuchiya, Kousuke)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：40451984

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)：本申請課題では、100%バイオマス由来の高性能バイオポリアミド材料を創製することを目的として化学酵素重合法により様々なポリペプチドの合成を行った。非天然アミノ酸であるナイロンユニットをポリペプチドへ導入することで、ポリペプチドへ融点が発現し、新規機能性を付与することが可能であった。また、テレケリック構造のような非天然構造を導入したポリペプチドや、ポリペプチドへ周期的に導入した配列を合成することで、特異的な高次構造形成により材料物性を向上することに成功した。合成したポリペプチドをビルディングブロックとして、縮合剤を用いた後重合によりマルチブロックポリペプチドを合成することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学酵素重合を利用したポリペプチド合成において、トリペプチドをモノマーとして利用することにより、非天然アミノ酸ユニットを含めた様々な周期的配列を簡便に合成する手法を開発した。これにより、繰り返し配列を多く含む構造タンパク質を模倣したアミノ酸配列を合成できるようになり、二次構造の制御による材料物性の向上や非天然ユニット導入による新規機能性の創出等、高機能バイオポリアミド創製へ向けた有用な新規合成法であると考えられる。また、酵素を利用したポリペプチド合成は環境低負荷かつ温和な条件で合成が可能であり、クリーンなバイオポリマー合成法として将来の持続可能な工業プロセス構築に大きく貢献できる技術である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed the synthesis of polypeptide fragments based on bio-resource materials via chemoenzymatic polymerization using proteases as a catalyst. The purpose of this study is fabricating 100% bio-based polyamide materials with high mechanical and thermal properties for bio-based alternative to petroleum-based polymeric materials. Introduction of nylon units into a polypeptide backbone resulted in the addition of melting point to polypeptide materials. Furthermore, the novel polypeptides containing unnatural structures such as a telechelic structure and aromatic amino acids enabled the polypeptides to construct specific secondary structures which high mechanical strength and high thermal stability. The synthesized polypeptide fragments could be used for building blocks to create multi-block polypeptides by post-polycondensation using condensing agents.

研究分野：高分子化学

キーワード：ポリペプチド 酵素 ポリアミド ナイロン 芳香族

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナイロンやアラミドに代表される高機能樹脂としてのポリアミド材料はアジア市場を中心に需要量が増加しており、高耐熱性や高強度、電気的な絶縁特性などの優れた性質から電気・電子分野や自動車分野などで高機能性樹脂材料として様々な応用展開がなされている。一方、近年の低炭素社会の実現へ向けた要請により、枯渇資源から環境負荷の低い再生可能資源への転換は急務であり、従来石油由来の原料モノマー（環状ラクタムやジカルボン酸・ジアミン類）ではなく天然資源由来モノマーを用いたバイオポリアミドの合成が報告されてきている。例えば、非可食性のバイオマスとして知られるひまし油から得られる 11-アミノウンデカン酸（ナイロン 11 の原料）や 1,10-デカンジカルボン酸 / 1,10-ジアミノデカン、バガスの発酵により得られる 4-アミノ酪酸（ナイロン 4 の原料）などをバイオモノマーとして脂肪族バイオポリアミドが合成されている。これらのバイオポリアミドは主鎖の炭素数の違いによって異なる材料物性を示し、用途に合わせた様々な材料設計がなされている。しかしながら、バイオマス原料の制約から炭素数の多い主鎖骨格を持つものが多く寸法安定性や耐水性は良いものの引張強度や曲げ強度などの力学特性が低く既存の石油由来材料の代替となる用途は限られている。特に高強度や高耐熱性が必要となる自動車の車体材料やタイヤコードといった用途に用いられるポリアミド材料（主にナイロン 6 や芳香族ポリアミド）は、代替となる 100%バイオマスから成るバイオポリアミドはいまだに合成されていない。

以上のような背景から、高い力学特性および耐熱性を示すポリアミド材料をバイオマス原料から合成することができれば、産業的な付加価値も高く、また持続可能社会の実現に向けた大きな一歩となる。

2. 研究の目的

本申請課題では、従来石油から合成されていたポリアミド材料のうち、現在達成されていない 100%バイオマス由来の高強度および高耐熱性バイオポリアミド材料を創製することを目的とする。機能性を持つペプチドモチーフに対して非天然のアミノカルボン酸（ナイロンユニットや芳香族アミノカルボン酸）モノマーや特殊構造を組み込んだ様々な特殊ペプチドフラグメントを化学酵素重合により合成する。得られたフラグメントを重縮合により（共）重合することにより高分子化を行い、高力学特性（高強度・高タフネス）および高耐熱性を有する新規バイオポリアミドを創製する。

3. 研究の方法

申請者は化学酵素重合により様々なポリペプチドを基盤とするポリアミド材料の合成を行っている。化学酵素重合は、パパインなどの加水分解酵素の逆反応を利用してアミノ酸エステルからポリペプチドを合成する手法であり、申請者の所属する研究室ではこれまでに様々なアミノ酸エステルからペプチド材料を合成している。この合成法は、水系を溶媒として用いることができる、バイオマス由来の酵素触媒およびモノマーがバイオマス由来の原料である、温和な条件下で混合するのみの簡便な操作で重合が可能、副生成物がアルコールのみであり原子価利用効率が高い（アトムエコノミカル）、といった利点を有しており、環境負荷の低いグリーンなポリペプチド重合法である。予備的な知見としてアミノ酸以外の非天然なアミノカルボン酸を導入することができることが分かっており、例えばナイロンの単位ユニットである ϵ -アミノアルカン酸のエステル誘導体を用いることでナイロンユニットをポリペプチドへ導入することが可能である。本研究課題では、2種類の特殊ペプチドフラグメントを化学酵素重合により合成した。まず、クモ系の結晶性モチーフであるポリアラニンをもととして特殊な構造（テレケリック型構造）を有する新規ポリペプチドフラグメントを合成した。さらに、非天然アミノ酸としてナイロンユニットや芳香族アミノ酸ユニットを導入したポリペプチドフラグメントの合成を行った。これらのポリペプチドフラグメントの構造および物性を評価し、最終的に縮合反応を用いてマルチブロックポリペプチドを合成した。

4. 研究成果

(1) テレケリック型構造を持つポリペプチドフラグメントの合成

クモ系タンパク質の結晶性モチーフであるポリアラニン配列は、クモ系中で配向したベータシート結晶を形成することで糸に高強度を付与する。本研究では、ポリアラニンモチーフに特殊な非天然構造を組み合わせた機能性ペプチドフラグメントとして、高強度を付与することが期待されるテレケリック型ポリアラニンを化学酵素重合法により重合した。得られたテレケリック型ポリアラニン(T-polyA)は同じポリアラニンモチーフを持つ天然の構造タンパク質と同様の逆平行ベータシート構造を形成するが、通常のポリアラニン(L-polyA)と比べて特異的な高アスペクト比を持つナノファイバー状の結晶を構築することが原子間力顕微鏡(AFM)から明らかとなった(図1a,b)。クモ由来シルクタンパク質から作製したフィルムに対して、合成したテレケリック型ポリアラニンを添加剤として用いたコンジットフィルムを作製した結果、

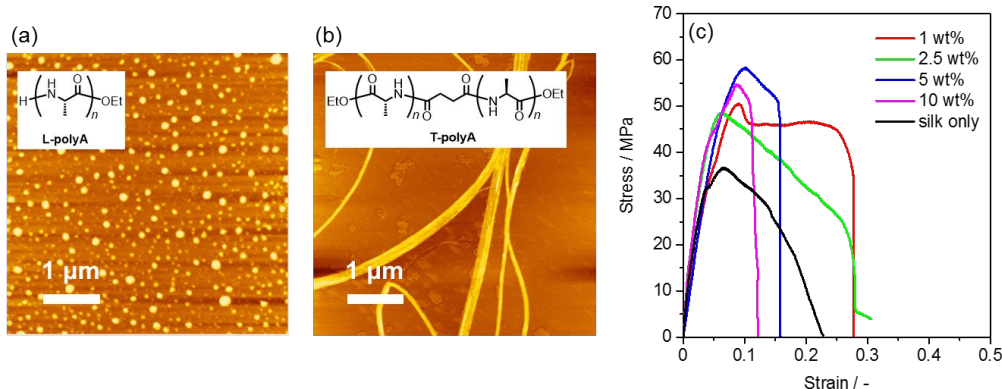


図 1 . マイカ基板上における L-polyA (a) および T-polyA (b) の結晶を原子間力顕微鏡 (AFM) 位相像により観察した図。(c) クモ糸シルクフィルムへ T-polyA を 1 ~ 2.5 wt% 添加することにより、引張強度 (stress) および伸び (strain) が向上した。

1 ~ 2 . 5 wt % のテレリック型ポリアラニンを加えたフィルムにおいて引張強度および伸びが向上し、シルクフィルムの高強度化および高タフネス化に成功した (図 1 c)。広角 X 線散乱 (WAXD) による構造解析の結果から、テレリック型ポリアラニンがフィルム中で効果的にベータシート結晶を形成しており、特殊構造を有するポリペプチドフラグメントが材料の力学特性の付与に効果的であることが示唆された (図 2)。

(2) 非天然アミノ酸ユニットを含むポリペプチドフラグメント

非天然アミノ酸ユニットであるナイロンモノマーや芳香族アミノ酸を組み込んだ機能性ポリペプチドフラグメントを設計し、化学酵素重合法による合成を行った。これらの非天然アミノ酸は酵素による認識能が低いため単独重合およびアミノ酸と共重合によるポリマー化は困難であったが、非天然アミノ酸の両末端ヘグリシンやアラニンなどの天然アミノ酸を導入したトリペプチドエステルをモノマーとして用いて化学酵素重合を行うことで、酵素の基質特異性由来する非天然アミノ酸の低親和性を克服し重合体を得ることが可能であった (図 3)。トリペプチドモノマーの重合によって合成された機能性ポリペプチドは非天然アミノ酸ユニットを周期的に有しており、ポリペプチドへ融点の付与などの新たな性質を付与することが可能であった。特に、芳香族ユニットを周期的に導入したポリペプチドは特異的な 2 次構造を形成することが X 線構造解析から明らかとなり、ランダムに芳香族ユニットを導入したポリペプチドと比べて高い熱的物性を示すことが分かった。このことは、トリペプチドを酵素により重合することで得られる周期的配列が新規機能付与や材料物性の向上に効果的であることを示す結果である。また、合成したポリペプチドフラグメントは、縮合剤を用いた後重合を行うことでマルチブロックポリペプチドを合成することが可能であった。

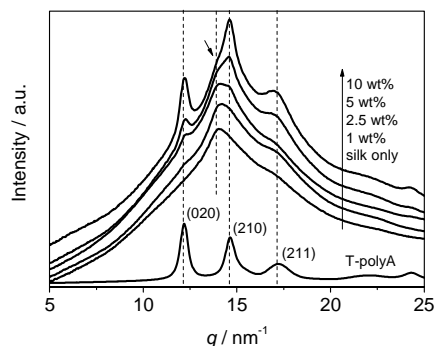


図 2 . T-polyA を含有するクモ糸シルクフィルムの広角 X 線散乱プロファイル。シルク由来 (矢印) と T-polyA 由来のシート結晶のピークが観測された。

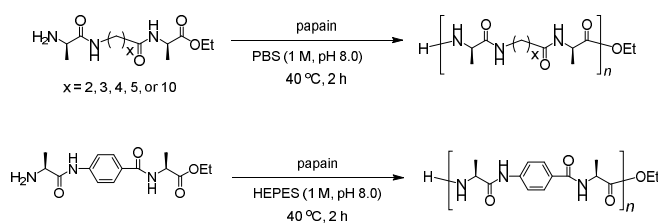


図 3 . ナイロンユニット (上) および芳香族ユニット (下) を含むトリペプチドエステルをモノマーとして用いた化学酵素重合。

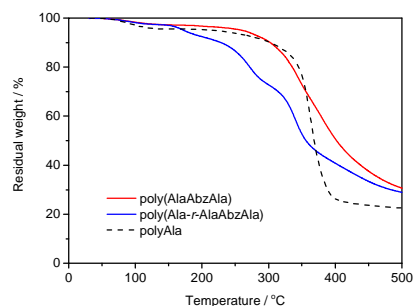


図 4 . 芳香族ユニットを有するポリペプチドの熱重量分析結果。芳香族を周期的に導入すると (赤線) ランダムに導入したポリペプチド (青線) よりも高い耐熱性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- 土屋康佑、沼田圭司、プロテアーゼを利用した構造タンパク質モチーフの化学合成—簡便かつグリーンなポリペプチド合成法。 *化学と生物* **2019**, 57, 76-77. 査読有
- 土屋康佑、沼田圭司、化学酵素重合を利用した機能性ポリペプチドの合成。 *化学工業* **2018**, 69, 929-934. 査読無
- 土屋康佑、沼田圭司、“化学酵素重合法”による高機能タンパク質素材の合成。 *バイオサイエンスとインダストリー* **2018**, 76, 386-389. 査読無
- 土屋康佑、沼田圭司、クモ糸の分子構造を模倣する 酵素を利用した天然タンパク質モチーフの化学合成。 *フレグランスジャーナル* **2018**, 6月号, 46-50. 査読無
- Prashant G. Gudeangadi, Kousuke Tsuchiya, Takamasa Sakai, Keiji Numata, Chemoenzymatic synthesis of polypeptides consisting of periodic di- and tri-peptide motifs similar to elastin. *Polym. Chem.* **2018**, 9, 2336-2344. DOI: 10.1039/C8PY00034D. 査読有
- Kousuke Tsuchiya, Takaoki Ishii, Hiroyasu Masunaga, Keiji Numata, Spider dragline silk composite films doped with linear and telechelic polyalanine: Effect of polyalanine on the structure and mechanical properties. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 3654. DOI: 10.1038/s41598-018-21970-1. 査読有
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chemoenzymatic Synthesis of Polypeptides for Use as Functional and Structural Materials. *Macromol. Biosci.* **2017**, 17, 1700177. DOI: 10.1002/mabi.201700177. 査読有
- 土屋康佑、沼田圭司、化学酵素重合による天然を模倣したポリペプチド材料の合成。 *化学と工業* **2017**, 70, 485-487. 査読無
- 土屋康佑、化学合成手法によるクモ糸を模倣したポリペプチド材料の開発。 *化学経済* **2017**, 7月号, 30-35. 査読無

〔学会発表〕(計13件)

- 土屋康佑、化学酵素重合によるクモ糸タンパク質の構造を模倣したポリペプチド材料の創製、近畿化学協会、**2018**.
- Kousuke Tsuchiya, Chemoenzymatic synthesis of functional polypeptides, SmaSys2018, **2018**.
- 土屋康佑、Prashant G. Gudeangadi、沼田圭司、構造タンパク質を模倣したポリペプチド材料の合成、第67回高分子討論会、**2018**.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chemoenzymatic synthesis of polypeptides containing aromatic amino acid units, MoDeSt2018, **2018**.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chemoenzymatic synthesis of telechelic polyalanine and its use as a reinforcing agent for silk materials, 256th ACS National Meeting, **2018**.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Enhancing mechanical property of silk materials by polypeptide additives, 25th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society (BEPS), **2018**.
- 土屋康佑、Prashant G. Gudeangadi、沼田圭司、非天然アミノ酸導入によるポリペプチドの熱物性制御、平成30年度繊維学会年次大会、**2018**.
- 土屋康佑、黒川成貴、沼田圭司、化学酵素重合を利用した主鎖に芳香環を有するポリペプチドの合成、第67回高分子年次大会、**2018**.
- 土屋康佑、石井孝興、沼田圭司、ポリアラニンモチーフによるクモ糸シルク材料の高強度化、第66回高分子討論会、**2017**.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chemoenzymatic polymerization of unnatural amino acids (invited), 254th ACS National Meeting, **2017**.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chemical synthesis of spider-silk-like multiblock polypeptides, Sheffield Silk Conference, **2017**.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chemoenzymatic synthesis of telechelic type polypeptides and their application, ICBP2017, **2017**.
- 土屋康佑、沼田圭司、化学酵素重合を利用した非天然アミノ酸ユニットを含有するポリペプチドの合成、第66回高分子年次大会、**2017**.

〔図書〕(計2件)

- Kousuke Tsuchiya, Yu Miyagi, Takaaki Miyamoto, Prashant G. Gudeangadi, Keiji Numata, Chapter 8. Synthesis of polypeptides. *J. Green Chemistry and Sustainable Technology: Enzymatic Polymerization towards Green Polymer Chemistry*, Springer, **2019**, 233-266.
- Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata, Chapter 7. Protease-catalyzed polymerization of tripeptide esters containing unnatural amino acids: α,α -Disubstituted and *N*-alkylated amino acids. *Green Polymer Chemistry: New Products, Processes and Applications*, American Chemical Society, **2018**, 95-105.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：ポリアミノ酸又はペプチドが反復配列したタンパク質、およびその化学合成法
発明者：沼田圭司、土屋康佑
権利者：同上
種類：特許権
番号：特願 2016-074289
出願年：2016 年
国内外の別： 国内

名称：フィブロイン様タンパク質を含むコンポジット成形組成物及びその製造方法
発明者：沼田圭司、土屋康佑、菅原潤一、石井孝興、遅弘放
権利者：同上
種類：特許権
番号：特願 2016-169012
出願年：2016 年
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://enzyme.riken.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：沼田 圭司

ローマ字氏名：(NUMATA, keiji)

研究協力者氏名：グデアングァディ プラシャント G.

ローマ字氏名：(GUDEANGADI, prashant G.)

研究協力者氏名：増永 啓康

ローマ字氏名：(MASUNAGA, hiroyasu)

研究協力者氏名：引間 孝明

ローマ字氏名：(HIKIMA, takaaki)

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。