

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05637

研究課題名(和文) レジリンを模倣するハイブリッドポリペプチドの創製と物性解析

研究課題名(英文) Development of resilin-like hybrid polypeptides

研究代表者

福岡 徳馬 (Fukuoka, Tokuma)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域 機能化学研究部門・研究グループ長

研究者番号：90415737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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を目標としている。これまでの研究で、遺伝子工学的手法により、ハエやカに由来する異なる種類のレジリンの代表的な繰り返しアミノ酸配列(EI、Agと呼称)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の設計・合成に成功した。その中で、分子量4万前後の3種類のポリペプチド(EI16-Ag16、Ag16-EI16、Ag32)を選定し、その生産効率の向上に向けた条件検討を行った。また、得られたポリペプチドのキャストフィルムやハイドロゲルの作製と物性解析に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、人工遺伝子を設計・合成し、宿主(大腸菌)内でこれを過剰発現させる「生物学的重合法」により、特定のアミノ酸配列を有する狙い通りの配列を持つポリペプチドの合成を行った。本手法によれば、鎖長、連鎖配列、立体構造が厳密に制御された「『単一』機能性高分子(人工ポリペプチド)」が得られるため、高弾性タンパク質として知られるレジリンを模倣した異なる配列のポリペプチドを創出できる。特に、異種のポリペプチドを自在に連結した非天然型のハイブリッドポリペプチドの設計・合成も可能となる。これらの構造・物性相関を明らかにすることができれば、新しいバイオ高分子弾性材料を提供する指針を得ることができる。

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. In particular, we focused on hybrid polypeptides in which Ag (= GAPAQTSSQY) and EI (GGRPSDSYGAPGGGN) sequences are linked like block copolymers, and prepared hybrid polypeptides in which each of Ag and EI sequences was repeated 16 times (Ag16-EI16 and EI16-Ag16). In addition, we attempted to compare the properties of these polypeptides and a homo-polypeptide in which the Ag sequence was repeated 32 times (Ag32).

研究分野：高分子化学

キーワード：弾性タンパク質 人工ポリペプチド バイオエラストマー レジリン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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<sup>1,2)</sup>。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、従来に無い高弾力性、高耐久性を示す繊維・ゴム材料が提供できるものと期待される。

レジリンのポリペプチド鎖中には必ずチロシン残基（Y）を含む特定のアミノ酸配列が複数回繰り返されるといふ特徴があり、代表的な配列が既に報告されている。研究代表者は、生物学的重合法（人工遺伝子を設計・合成し、宿主（大腸菌）内でこれを過剰発現させることで、特定のアミノ酸配列を有する狙い通りの配列を持つポリペプチドを得る手法）を用いて、レジリンのアミノ酸配列を模倣したモデルポリペプチドの創製に挑戦している。本研究の前段として（科研費若手 B：17K14540）、キイロシヨウジョウバエ由来レジリンの Exon I ドメイン（GGRPSDSYGAPGGN = EI 配列と呼称）と Exon III ドメイン（GYSGGRPGQDLG = EIII）、ガンビエハマダラカ由来レジリンの配列（AQTPSSQYGAP = Ag）に着目し、これらの配列のみが連続して繰り返されるモデルポリペプチドを合成した。具体的にはこれらの配列が 8～32 回連続して繰り返されるポリペプチド、さらには、例えば EI 配列と EIII 配列がそれぞれ 8 回連続、などのように、各配列がブロック毎に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の分子設計、遺伝子の構築、大腸菌発現系によるタンパク質合成に取り組み、アミノ酸配列と分子鎖長（分子量）の異なる計 42 種のポリペプチドを得ることに成功している。

### 2. 研究の目的

本研究では、(i) レジリンの代表的な上記 3 種類の繰り返しアミノ酸配列がそれぞれ単一で繰り返されるポリペプチド、および異種配列がブロック毎に繰り返されるハイブリッドポリペプチドを、生物学的重合法により合成する。続いて (ii) 酸化還元酵素またはそのモデル金属触媒等を用いて、得られたポリペプチド中のチロシン残基の酸化カップリングを行い、カップリング度の異なる種々の架橋ポリペプチドを得る。さらに (iii) 架橋前後のポリペプチドからフィルム及びハイドロゲルを作製し、熱物性、機械的強度の評価、粘弾性測定等に取り組む。これらの解析結果からポリペプチドの構造-物性相関を明らかにし、天然レジリン以上の高復元力、高耐久性を示す最適構造のポリペプチドを提供する指針を得る。

### 3. 研究の方法

本研究の前半では、これまで用いた 3 種類の繰り返しアミノ酸配列のうち生産性が最も優れる Ag 配列を主軸として、Ag 配列が 32 回連続して繰り返される構造のポリペプチド = Ag32 量体ポリペプチド（Ag32: His タグ配列等も含め、分子量約 37,000、図 1）、および Ag 配列 16 量体と EI 配列 16 量体が連結したハイブリッドポリペプチド



図 1. Ag32 ポリペプチドの外観

（Ag16-EI16 および EI16-Ag16：分子量約 41,000）の 3 種を選抜し、これらの生産条件のさらなる最適化と物性解析に向けたサンプル量の確保に重点的に取り組んだ。

後半では得られたポリペプチドの架橋反応によるフィルム、ゲルの調製と物性評価に取り組んだ。具体的には、酵素的酸化カップリング反応によりペプチド鎖中に存在するチロシン残基間

の架橋を行った（図 2）。例えば、ペルオキシダーゼを触媒とした場合、本反応は過酸化水素を滴下することで瞬時に進行するため、架橋とフィルム、ゲルの作製を同時に行うことが可能である。

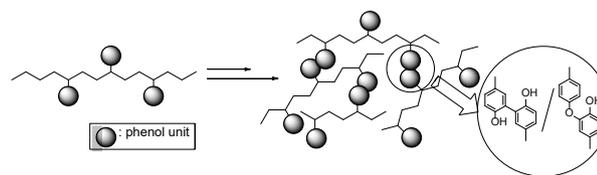


図 2. ポリペプチドの酸化カップリング

#### 4. 研究成果

今回大腸菌発現系で合成したポリペプチドは、菌体破碎液から His-Tag タンパク質として中性リン酸緩衝液中で Ni が配位した担体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー法によって分離精製が可能である。透析による脱塩と凍結乾燥を経ることで目的のポリペプチド粉末が得られた。一方、回収したポリペプチドは想定よりも水溶性が大幅に低下しており、分子間架橋反応に適した高濃度条件での酸化カップリング反応が困難であったため、好適な反応溶媒の検討を行った。種々の緩衝液や多くの有機溶媒に難溶であったが、その中で DMSO と高濃度尿素水溶液に高い溶解性を示したことから、これらの溶媒中で酸化カップリング反応を検討することとした。

まず西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を用いた酸化カップリング反応を試みた。20 mg/mL Ag32 ポリペプチド/2 M 尿素水溶液の酸化カップリング反応を行い、SDS-PAGE によりポリペプチド鎖のオリゴマー化を確認することができた（図 3）。しかし、HRP は 2 M 以上の高濃度尿素水溶液中で変性による酵素活性の低下が起こる<sup>3)</sup>ことから、これ以上の濃度で反応を進めることができず、ハイドロゲルの形成までには至らなかった。

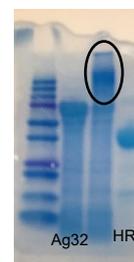


図 3. Ag32 反応生成物の SDS-PAGE 結果

そこで、変性状態で逆に高いペルオキシダーゼ活性が発現する<sup>4)</sup>シトクロム c を触媒とする酸化カップリング反応の検討を行った。シトクロム c はより高濃度の尿素水溶液中で良好な酵素活性を示し、50 mg/mL の Ag32 ポリペプチド/8 M 尿素水溶液中での反応により、直ちにハイドロゲルを得ることができた（図 4）。シトクロム c 自体の架橋はこの反応溶液濃度では起こらないことから、目的通りポリペプチド鎖の分子間架橋によってゲル化が進行していることが示唆された。



図 4. Ag32 架橋ハイドロゲル

以上より、酸化カップリング反応によってポリペプチドの架橋ハイドロゲルが得られることを確認できたが、ゲル中の高濃度尿素的残存による物性への影響が無視できないため、さらに異なる溶媒検討を進め、20%トリフルオロエタノール（TFE）/100 mM リン酸緩衝液（pH 8）中で HRP、シトクロム c とともに架橋反応の進行を確認することができた。また、40% TFE/リン酸緩衝液ではさらなる高濃度でのポリペプチド溶液調製が可能であり、架橋ハイドロゲルを得ることができた。現在キャストフィルムでの架橋前後のサンプル調製（図 5）も並行して進めており、微小サンプルでの評価法の確立が今後の課題として残されているが、ハイドロゲルの圧縮試験、キャストフィルムでの引張試験を行い、力学物性の評価を進めている。



図 5. Ag32 キャストフィルム

#### <引用文献>

- 1) C. M. Elbin et al., Nature 437, 999 (2005).
- 2) G. Quin et al., Nature Communications 3, Article number: 1003 (2012).
- 3) K. Nazari et al., Int. J. Biol. Macromol. 17, 43 (1995).
- 4) G. W. Canters, et al., Chembiochem, 6, 747 (2005).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------