絹の精密構造解析と再生医療材料への応用

Structural Analysis of Silk and Application of Silk to Biomaterials

朝 倉 哲 郎・中 澤 靖 元

1. はじめに

近年、急速な進歩を遂げつつある構造解析技術やバイオテクノロジーを駆使した遺伝子組み換え技術の発展などの基盤技術の確立によって、絹の利用は衣料にとどまらず、様々な用途への展開を見せている。本稿では、固体 NMR 法を用いた絹の精密構造解析と再生医療分野への応用に関して、著者らの最近の研究成果を中心に紹介する。

2. 家蚕絹フィブロイン結晶部の構造解析

一般的によく知られている家蚕の生産する絹フィブロイン H 鎖の一次構造は、2000 年、Zhou らによって、以下のように完全に決定された¹⁾(図 1)。

図 1 家蚕絹フィブロイン H 鎖の一次構造

この一次構造の情報から、家蚕絹フィブロインは Ala-Gly の交互共重合部分が大半を占めており、その中に Ser 残基が存在する「結晶領域」、Tyr や Val 残基がかわりに存在する「準結晶領域」、荷電性アミノ酸残基を中心に構成される約 30 残基の「非晶領域」に分類することができる。家蚕絹フィブロインは繊維化前後に劇的な構造変化を遂げることによって、高強度・高弾性繊維となるが、家蚕体内

に存在する繊維化前の構造は「Silk I」型、繊維化後の構造は「Silk II」型と呼ばれている。Silk I 型構造に関しては、図 2 に示すように“タイプ II 型の繰り返し β ターン構造”をとるが、構造モデル提案の経緯も含め、詳細は、既に、繊維学会誌をはじめとして総説を書いているので、それを参照いただきたい²⁾。

図 2 家蚕絹フィブロインの Silk I 型構造

一方、繊維化後の構造である Silk II 型構造に関しては、1955 年に Marsh、Corey、Pauling らが絹繊維の X 線構造解析結果に基づいて提案した逆平行 β シート構造がよく知られており、長年にわたって教科書にも引用されてきた³⁾。しかしながら、この構造モデルは約半世紀前のモデルであり、より精密な Silk II 型構造を検討する時期に來たと言えよう。著者らは Silk I 型構造の決定に威力を発揮した新しい固体 NMR の方法を駆使して、Silk II 型の詳細な構造を検討してきた^{4,5)}が、本稿では、結晶部のモデル化合物 (Ala-Gly)₁₅ を用いたラメラ構造の発生を中心とする最近の構造解析の結果について述べる。

TETSUO ASAKURA
東京農工大学 大学院共生科学技術研究院
教授 工学部附属繊維博物館館長 博士
(工学)
〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16
Tel: 042-388-7025 Fax: 042-383-7733
E-mail: asakura@cc.tuat.ac.jp
〈専門〉高分子 NMR 構造解析、絹の基礎と応用
〈趣味〉囲碁、テニス、サッカー

YASUMOTO NAKAZAWA
東京農工大学 工学部附属繊維博物館
助教 博士(工学)
〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16
Tel: 042-388-7163 Fax: 042-383-7163
E-mail: yasumoto@cc.tuat.ac.jp
〈専門〉ペプチド化学(合成・構造解析)
〈趣味〉絵画鑑賞

Silk II 型構造は繊維構造の基本となる β -sheet 構造と一部、残基の内部回転角の分布の大きい β -turn 構造から構成されていることが、これまでの解析によって明らかとなっている⁴⁾。そこで、Ala C β 炭素を順次、¹³C ラベル化した 15 種類の (Ala-Gly)₁₅ を合成し、固体 NMR を用いて Ala C β ラベル部位のスペクトル変化を詳細に検討した(図 3)。

図 3 部位特異的安定同位体ラベル (Ala-Gly)₁₅ ペプチドの¹³C CP/MAS スペクトル (Ala C β 領域を拡大)。

低磁場側の 2 本のピークは、 β -sheet 構造由来、高磁場側の (灰色) 1 本のピーク (16.7ppm) は、ランダムコイルおよび、ゆがんだ β -turn 部位である。ラベル部位によって、この β -sheet とランダムコイルおよび β -turn の分率は、かなり異なることがわかる。

図 4 に、高磁場の 16.7ppm のピークの分率をまとめた。1-7 残基、ならびに、25-29 残基の間では、N 端と C 端に近いほど、その分率が大きくなり、特に N 端の方が増加は著しい。これは、ペプチド末端部分でのランダムコイルの増加による。

図 4 安定同位体ラベル (Ala-Gly)₁₅ ペプチドの 16.7ppm ピーク分率の Ala 部位依存性。

さらに、分子鎖内部では、11 位と 19 位の 2 箇所が増加する傾向にある (図中の矢印)。これは、 β -sheet 構造が、一部、 β -turn 部位の出現によって、ターンした「ラメラ構造」の出現を意味する。そこで (Ala-Gly)₁₅ について、統計力学的計算⁶⁾を用いてラメラ構造の詳細を検討した。計算は以下の仮定のもとで行った。

- (1) ペプチド中の異なる 1 カ所または 2 カ所に β -turn 構造を有する。
- (2) 分子鎖中の β -turn 構造の後には、少なくとも 1 組の

分子内水素結合を有し、 β -sheet 構造を形成する。

- (3) β -turn 構造は「Ala-Gly」であり、Ala 残基は奇数の残基番号に存在する。

80 個の構造モデルを発生させ、検討を行った。ここで、 β -sheet 構造の水素結合形成に関与しない Ala 残基 (j) の存在確率 $P(j)$ を、水素結合形成に伴う安定化エネルギー ΔE_H の関数として、以下の式によって算出した。

$$P(j) = \sum \delta(ij) \exp(-n(i) \Delta E_H / kT) / \sum \exp(-n(i) \Delta E_H / kT)$$

図 5 に存在確率をまとめたように、 ΔE_H が、-0.3kcal/mol より減少すると中央に 2 つのピークが出現し、 ΔE_H が、-0.36kcal/mol の場合に、実測分布と計算結果がより一致する⁷⁾。図 6 に具体的な構造モデルの例を示したが、 β -turn 構造が 2 箇所存在する場合の確率が高い。

図 5 (Ala-Gly)₁₅ モデルペプチド中の各 Ala 残基におけるランダムコイルもしくは β -turn 構造を形成する存在確率。

図 6 (Ala-Gly)₁₅ ペプチドのラメラ構造モデル

3. クモ牽引糸ならびにエリ蚕絹フィブロイン結晶部の構造解析

家蚕以外の他の蚕が生産する絹フィブロインはどのような構造を形成しているのだろうか。インド原産のエリ蚕 (学名: *Samia cynthia ricini*) の絹フィブロインは、図 7 (b) に代表的な一次構造の一部を示したように、Ala 連鎖領域と Gly リッチ領域のブロックが交互に繰返された構造を有し、家蚕絹フィブロインとは異なる一次構造を有する。また、Ala 連鎖領域と Gly リッチ領域のブロックは、より高強度・高弾性を有するクモ牽引糸にも見られるが、Ala 連鎖の鎖長は、エリ蚕絹フィブロインの約半分である (図 7 (a))⁸⁾。

図7 (a)クモ(*Nephila clavipes*)牽引糸および(b)エリ蚕絹フィブロインの一次構造(抜粋)

特に Ala 連鎖領域が形成する β -sheet 構造はエリ蚕絹フィブロイン繊維やクモ牽引糸の結晶部を形成し、その強度に深く関与すると考えられている⁹⁾。そこで著者らは、Ala 連鎖領域について、 β -sheet 構造のパッキングの違いを考慮に入れた詳細な構造解析を目標とし、アラニンオリゴマー(3 量体から 12 量体)をモデルペプチドとして固体 NMR を用いて解析した。Ala 3 量体(Ala₃)は、溶媒処理によって 100% 逆平行(AP)および 100% 平行(P) β -sheet 構造を形成しうることが報告されている^{10,11)}ことから、2 種類の β -sheet 構造に特有な固体 NMR パラメータを見出すことができれば、絹の β -sheet 構造を詳細に検討できる。Ala 3 量体について、¹³C CP/MAS NMR スペクトルとスピン-格子緩和時間(T_1)の測定を行なうことにより、構造とダイナミクスの両方を評価するとともに、Ala 連鎖の鎖長を増加させて検討を進めた。

Ala₃ の AP と P 構造の¹³C CP/MAS スペクトルは、特に C β ピーク域が大きく異なることがわかる(図 8)。

詳細なピークの帰属を行った後¹²⁾、 T_1 値を測定し、比較した結果、P 構造の方が C β 炭素で 2.8 倍、C α 炭素で 2.6 倍、そして C=O 炭素で 2 倍、長いことがわかった。このことから、P 構造の方が AP 構造よりもペプチド鎖全体の運動性が高いことが示唆され、前者の方が、より弱

図8 Ala₃ ペプチドの¹³C CP/MAS NMR スペクトルおよび T_1 値。(a)逆平行(AP) β -sheet 構造 (b)平行(P) β -sheet 構造

い分子間水素結合のネットワークを形成することとよく一致する¹²⁾。

そこで Ala C β ピークに着目し、[3-¹³C]Ala ラベルされたエリ蚕絹繊維の T_1 測定を行なった(図 9)。

少なくとも 4 成分に分離できる(22.9, 21.2, 19.8ppm: β -sheet, 16.7ppm: ランダムコイル)が、本研究では、特に β -sheet 構造由来の 3 成分について違いを検討した。22.9ppm のピークは、19.8ppm と 21.2ppm のピークよりも T_1 がそれぞれ 3 倍、2.5 倍と長く観測されたため、Ala 3 量体の T_1 値の検討結果を反映させれば、P 構造に帰属できる。

図9 [3-¹³C]Ala ラベルを施したエリ蚕絹フィブロインの¹³C CP/MAS NMR スペクトル(Ala C β 域)および、各成分の T_1 値

図10 Ala オリゴマーの¹³C CP/MAS NMR スペクトル(Ala C β 域)および T_1 値(Ala7~Ala12 の T_1 値は表 1 参照)

21.1ppm と 19.8ppm ピークは、シート間パッキングの異なる AP 構造と推察できる。さらに、Ala₄、Ala₅、Ala₆、Ala₇、Ala₈、Ala₁₂ の¹³C CP/MAS スペクトル (AlaCβ 領域) を T₁ 値とともに図 10 に示す (Ala₇ 以降は表 1 参照)。

表 1 Ala₇, Ala₈, Ala₁₂Cβ ピークの¹³C T₁ 値 (msec)

	22.7ppm (Peak 1)	21.1ppm (Peak 2)	19.6ppm (Peak 3)
Ala ₇	950	370	330
Ala ₈	1280	190	410
Ala ₁₂	1330	440	430

Ala₆ で末端の効果はほとんどなくなることがわかる。また T₁ 値も、Ala₆ までは Ala₃ の AP 構造と同様な値である。しかし Ala₇ からは、エリ蚕絹繊維と類似した線形が得られ、T₁ 値もエリ蚕絹繊維のデータに近づくことがわかった。

以上の結果より、アラニンオリゴマーは、Ala 連鎖が 7 以上で AP および P 構造が混在した不均一な β-sheet 構造を形成しうることがわかる。このような絹構造の不均一性と物性との相関研究は今後の研究課題である。

4. 再生医療に向けた家蚕絹フィブロインの応用

絹は従来、縫合糸として長年にわたって用いられてきた経緯がある。高齢化社会に向け急務な再生医療材料を創製するため、絹をベースとした一連の技術、すなわち、①絹の一次構造を遺伝子組み換え法を駆使して再生医療用に改変する技術、②絹ならびに改変絹を、繊維、フィルム、スポンジ等に成形するプロセッシング技術、③ *In vitro*・*in vivo* での再生医療材料評価技術を開発、それを駆使して、血管、眼角膜ならびに耳軟骨の再生を試みている¹³⁾。

4.1 絹を各再生医療材料に合わせて成形するプロセッシング技術

絹繊維の本体は絹フィブロインであるが、繭の場合に、その周りを覆っている絹セリシンはアレルギー源になると言われ、例えば、体内に埋め込まれて用いられる絹縫合糸の作成にあたっては、十分に絹セリシンを除くことが必要である。絹フィブロインを濃厚な臭化リチウムや塩化カルシウム等の中性塩に溶解後、蒸留水に対して透析することによって、絹フィブロインの水溶液を得ることができる。絹フィルムや粉末は、それを乾燥させることによって作成される。一方、十分な強度を有する再生絹繊維を水溶液から作成することは難しい。そこで、一旦、凍結乾燥によってスポンジ状とし、再度、ヘキサフロイソプロパノール (HFIP) 等のフッ素系溶媒に溶解、凝固浴にメタノールを用いる溶液紡糸によって、天然絹繊維に匹敵する十分な強度を有する再生絹繊維を作成することができる¹⁴⁾。また、絹の HFIP 溶液を原料とし、エレクトロスピンニングの手法を用いて、表面積の大きな極細 (サブマイクロメートル以下) の絹不織布を作製することもできる^{15,16)}。

図11 絹フィブロインを用いた様々なプロセッシング。

一方、絹のスポンジを作成する場合は、絹の溶液に蔗糖や塩を添加した後に固化させ、蔗糖や塩を除くことによって作成する。以上のようにして、図 11 にまとめたように、様々な形状に加工することができる。新しい絹様タンパク質を原料とする場合も、基本的にプロセッシングの方法は同じである。

4.2 再生医療材料(血管、眼、耳)の開発

絹ならびに新しい絹様タンパク質について、再生医療材料としてのスクリーニング実験を各種の細胞の培養系を用いて行うとともに、具体的に各再生医療材料の開発を行っている。

4.2.1 絹を用いた人工血管の開発

人工血管は、通常、ポリエステル繊維やポリフッ化エチレン (PTFE) などの素材で作られており、人体移植後も異物反応等は少なく広く用いられている。ポリエステル系は、主に内径が 10mm 以上の大きな血管用に用いられる。内径がより小さい場合は、PTFE 系が用いられるが、4mm 以下の場合は、血栓が生じやすい等の問題があった。また、ポリグリコール酸やポリ乳酸等の生体吸収性高分子を用いて作成した人工血管の場合、耐圧性に問題があり、動脈系に用いた場合は動脈瘤形成や破裂の危険性があり、肺動脈や静脈などの低圧系にしか使用できなかった。そこで高強度を有する絹縫合糸について、径 1.5mm の動脈用小口径人工血管を作製、ラット腹部大動脈に移植した。PTFE 製の人工血管についても同様の実験を行い比較した所、絹の場合の方が格段に開存性に優れていることがわかった。さらに、移植後、24 週を経過した絹の人工血管の断層像では、絹繊維中に細胞が遊走し、密な血管構造を構成していた。内腔側内皮細胞や、その周辺の平滑筋細胞も整然と配列されており、外膜の栄養血管も形成され、本来の血管に近い構造となっていた (図 12)。

図12 一例として示したラットに移植後 24 週の絹フィブロイン人工血管。開存(a)すると、自己の細胞により内皮や中膜が形成されていることがわかる (b)。

4.2.2 絹を用いた人工角膜および人工耳軟骨の開発

不可逆な角膜の疾患による視力障害を起こした場合、提供者の死後、アイバンクにより提供を受けた角膜を移植する以外に視力を回復する方法はない。しかし、十分な供給が得られている米国以外の国では、日本を含め、提供者が圧倒的に不足しているのが現状であり、再生医療による代替技術の開発が求められている。角膜は、主たる三つの層、すなわち上皮細胞層、角膜実質、内皮細胞層から成るが、上皮細胞層については、角膜輪部上皮細胞を基にした再生角膜上皮シートの作成や口腔粘膜上皮を用いた角膜再生の研究が活発に行われている。著者らは、十分な強度と透明性ならびに酸素透過性の高い絹フィルムの特徴を生かして、上皮シート移植材料の開発を行っている。得られた絹フィルムは図 13 に示したように、上皮細胞が重層化されており、移植実験に用いることができる。

図13 絹フィルムを用いた角膜上皮細胞の培養結果 (H.E. 染色、ポリエチレングリコール 10w/w%)。

一方、先天的あるいは後天的な疾患によって失われた外耳ならびに中耳の機能を、細胞と絹フィブロインをハイブリッド化した人工外耳ならびに中耳で代替えることを目的として研究を進めている。コンピュータグラフィックス技術を用いて外耳や中耳の耳型枠を作製、耳型の形状の絹スポンジを前述した方法で作成、耳軟骨細胞で培養後、培養細胞とともにハイブリッド型人工外耳および中耳を作製している。

5. 将来に向けて

絹の詳細な構造解析の成果の蓄積を基盤として、様々な

機能を付与した新しい絹様材料が分子設計され、大腸菌やトランスジェニック蚕で生産することが可能となってきた。今後、一次構造や高次構造を自由にコントロールして、希望する物性や機能を有する新しい絹の創製が可能となると考えられる。

謝 辞

これらの研究成果は、特に、血管再生(東京大学医学部循環器内科 佐田准教授)、角膜再生(慶應義塾大学医学部眼科教室 坪田教授・榛村講師)、耳軟骨再生(国立病院機構災害医療センター形成外科 寺田医長)、トランスジェニック蚕(農業生物資源研究所 田村博士)との共同研究を通して得られた。お礼申し上げる。

References

- 1) Zhou, C.; Confalonieri, F.; Medina, N.; Zivanovic, Y.; Esnault, C.; Yang, T.; Jacquet, M.; Janin, J.; Duguet, M.; Perasso, R.; Li, Z. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2413-2419(2000).
- 2) 朝倉哲郎 繊維学会誌, **60**, 543-546(2004).
- 3) Marsh, R. E.; Corey, R. B.; Pauling, L. *Biochem. Biophys. Acta.*, **16**, 1-34(1955).
- 4) Asakura, T.; Yao, J.; Yamane, T.; Umemura, K.; Ulrich, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8794-8795(2002).
- 5) Asakura, T.; Yao, J. *Protein Sci.*, **11**, 2706-2713(2002).
- 6) Flory, P. J. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*; Wiley & Sons, Inc.: New York(1969).
- 7) Asakura, T.; Sato, H.; Moro, F.; Nakazawa, Y.; Aoki, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5703-5709(2007).
- 8) Nakazawa, Y.; Asakura, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7230-7237(2003).
- 9) Simmons, A. H.; Michal, C. A.; Jelinski, L. W. *Science*, **271**, 84-87(1996).
- 10) Fawcett, J. K.; Camerman, N. *Acta Cryst.*, **31**, 658-665(1975).
- 11) Hempel, A.; Camerman, N.; Camerman, A. *Biopolymers*, **31**, 187-192(1991).
- 12) Asakura, T.; Okonogi, M.; Nakazawa, Y.; Yamauchi, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6231-6238(2006).
- 13) 朝倉哲郎 未来材料, **7**, 38-44(2007).
- 14) Ha, S. W.; Asakura, T.; Kishore, R. *Biomacromolecules*, **7**, 18-23(2006).
- 15) Ohgo, K.; Zhao, C. H.; Kobayashi, M.; Asakura, T. *Polymer*, **44**, 841-846(2003).
- 16) Yao, J.; Masuda, H.; Zhao, C.; Asakura, T. *Macromolecules*, **35**, 6-9(2002).