

論文審査の要旨及び担当者

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	中村 浩之
論文審査担当者	主 査	政策・メディア研究科委員	政策・メディア研究科 教授 兼環境情報学部 教授 荒川 和晴	
	副 査	政策・メディア研究科委員	政策・メディア研究科 教授 金井 昭夫	
		政策・メディア研究科委員	環境情報学部 教授 内藤 泰宏	
		京都大学大学院 工学研究科 教授 沼田 圭司		
学力確認担当者：				
中村浩之君の学位請求論文は、「Controlling Physical Properties of Artificial Spider Silk through Sequence-Property Relationships」と題され、全4章から構成されている。論文の邦題は「配列－物性相関を用いた人工クモ糸の物性制御」である。本論文では、近年合成繊維や天然繊維を代替する材料として注目を集めている人工クモ糸の物性をアミノ酸配列の設計によって制御する手法を確立することを目指している。このために、クモ大瓶状腺糸と小瓶状腺糸の物性およびタンパク質構成比率の比較を行った上で、人工クモ糸によるそれぞれの繊維の物性の違いの再現を行い、天然クモ糸に観察される配列－物性相関を人工クモ糸で再現することの妥当性を検証した。その上で、1,000種類のクモの配列－物性相関データから得られた物性と相関する配列モチーフを使って人工クモ糸遺伝子 BP1 のアミノ酸配列を改変し、天然クモ糸で強度と正もしくは負に相関するモチーフが、人工クモ糸においても強度を正、負に変化させることを示し、配列モチーフを利用して人工クモ糸の物性を制御が可能であることを示した。 第1章では、様々な動物が多様な目的のためにシルクを作ること、人類がそれらのシルクをいつから、どのような目的で利用してきたかを解説し、本論文の中心的な主題であるクモ糸の物性的および配列的多様性について詳説した上で、人工クモ糸の産業応用の現在の状況とその課題について論じている。現在、人類が使用する合成および天然繊維において、持続可能性の観点から様々な課題が議論されている。合成繊維が環境中で分解を受けづらく、海洋中にマイクロプラスチックとして蓄積することによる問題や、ウールやコットンなどの天然繊維がその高い環境負荷ゆえに持続的な利用に疑問が持たれているといった点である。人工クモ糸は環境分解性を持ち、ウールやカシミアと比較して環境中の資源を多量に使用しないことから、これらを代替する繊維として注目を集めている。一方で、現在の人工クモ糸は機械特性をはじめとした物性の制御に課題を持っており、応用範囲が限られている。天然のクモが様々な物性を持つ繊維をそれぞれの目的に合わせて使い分けていることから、人工クモ糸においてもクモが行っているように、タンパク質のアミノ酸配列による物性制御が可能なのではないかと考え、以下のリサーチクエスチョンを設定し、2章から3章にかけて実験的に検証を試みた。すなわち、(1) 天然クモ糸の配列－物性相関を用いて人工クモ糸の物性を制御可能なのか。(2) 天然クモ糸における複数の物性に対する配列－物性相関を用いて、人工クモ糸の物性をどの程度制御することが可能なのか。の2点である。 第2章では、オニグモ (<i>Araneus ventricosus</i>) とジョロウグモ (<i>Trichonephila clavata</i>) の				

大瓶状腺糸 (Major ampullate silk, MA-silk) と小瓶状腺糸 (Minor ampullate silk, MI-silk) の物性を比較し、プロテオーム解析によりタンパク質の構成比率を調べ、タンパク質構成比率とその配列的特徴が繊維の物性にどのように影響を与えるかを考察した。さらに、これらに含まれる Major ampullate spidroin 1 (MaSp1)、Major ampullate spidroin 2 (MaSp2)、Minor ampullate spidroin (MiSp) タンパク質の部分的な配列を用いて組換えタンパク質を設計、発現し、人工クモ糸繊維の作製とその物性の測定を行った。その結果、これまでの先行研究で示されていたとおり、MA-silk は MI-silk と比較して、水に浸漬した時の収縮現象 (超収縮と呼ばれる) が大きく、MI-silk では収縮が小さいことが確認された。また、ジョロウグモの MI-silk で観察された超収縮現象はオニグモの MI-silk よりも大きいことが明らかになった。さらに、プロテオーム実験によりタンパク質の構成比率を分析した結果、MA-silk には MaSp1、MaSp2、MaSp3 などの spidroin タンパク質と、SpiCE (Spider silk-constituting element) タンパク質が含まれる一方、MI-silk には MaSp1 及び MiSp タンパク質と SpiCE タンパク質が含まれることが明らかになった。また、オニグモの小瓶状腺糸は大部分が MiSp であり、MaSp1 は少量しか含まれていなかったが、ジョロウグモの小瓶状腺糸にはオニグモよりも多くの MaSp1 が含まれていることが明らかになった。これらの結果を元に、MaSp1、MaSp2、MiSp spidroin タンパク質の部分配列を用いて人工クモ糸を作製し、その物性を測定した。その結果、MI-silk を構成する要素である MaSp1、MiSp は MaSp2 よりも小さい超収縮を示していた。このことから、MA-silk と比較して MI-silk が小さい超収縮を示す理由は MaSp2 タンパク質の有無であることが明らかになった。この結果は、過去にアミノ酸分析の結果などから示唆されていた、MaSp2 が超収縮の大きな原因となるという予想を、タンパク質構成要素の分析によって初めて明らかにしたものである。また、オニグモ MI-silk とジョロウグモ MI-silk の両方に MaSp1 が含まれていた点については、過去に予想されていた、MaSp1 が MaSp2 に比較して祖先的な ampullate spidroin であることを示唆する結果となった。

第2章で得られた結果より、天然クモ MA-silk と MI-silk が異なる超収縮を示すことが、MaSp2 の含有率によって制御されていることが明らかになった。また、MaSp1、MaSp2、MiSp の人工クモ糸が異なる超収縮を示し、MaSp2 の超収縮が最も大きくなったことから、異なる配列を持つ人工クモ糸により、天然クモ糸で確認される物性の違いが再現するということが確認された。この研究成果は、1つ目のリサーチクエストを検証するものである。

第3章では、第2章で得られた結果をもとに、より大規模に配列—物性相関を利用した人工クモ糸の物性制御について検証を行った。人工的な MaSp2 タンパク質である BP1 をベースとして、1,000 種のクモから得られた配列と物性のデータベースである 1,000 spider silkome database を利用して、力学物性、構造的性質、水による超収縮に正もしくは負に相関するモチーフを抽出し、これらのモチーフを使用して置換による改変を行った。この結果、強度に正の相関を持つモチーフによって強度が 9.3% 向上し、負の相関をもつモチーフを導入により 5.1% 低下した。強度に関するモチーフでは天然のモチーフの効果が観察された一方で、伸度に関しては正に相関するモチーフを利用した改変により伸度が低下する結果が得られた。また、タフネスと正もしくは負に相関するモチーフを利用した改変によって、どちらもタフネスが向上するという結果が得られた。また、BP1 に含まれ得る QQ (ジグルタミン)モチーフを SQ (セリン-グルタミン)、PQ(プロリ

論文審査の要旨及び担当者

No.3

ン-グルタミン)に改変することによって、熱水による収縮率が低下するという現象が観察された。また、結晶化度に正もしくは負の影響を及ぼすモチーフを使って改変した変異体では、繊維の結晶化度が変化しないことが確認された。これらの結果によって、応力に関してはモチーフが天然と同様の効果を及ぼすこと、タフネスに関しては方向性が異なるものの、モチーフによってタフネスの改変が可能であること、伸度、結晶化度に関してはモチーフが天然と同様の効果を及ぼさないということが確認された。また、QQモチーフの改変により、熱水による収縮率を低下することが可能であった。これによって、2 つ目のリサーチクエストが検証された。伸度や結晶化度など、天然のモチーフを使用して改変を行った時に、人工クモ糸で効果が見られなかった点に関しては、天然クモ糸と人工クモ糸の紡糸プロセスの違い、もしくはアミノ酸配列の改変による予想しない構造の変化が原因だと考えられる。天然クモ糸では N 末端領域、C 末端領域によって繊維形成が行われ、延伸することによって結晶化が起こる。一方、人工クモ糸では末端の相互作用を使用せず、固化浴によって脱溶媒を引き起こし、結晶化を起こして繊維形成を行っている。また、改変にあたってはアミノ酸の含有率や配列をなるべく変化させないように、注意して改変を行ったが、改変によって想定されない構造変化が起こってしまっている可能性がある。これらの違いによって、天然クモ糸で見られる物性変化が、人工クモ糸で観察されなかったのではないかと考察している。

最後に第 4 章では、本研究で得られた知見を総括し、その意義について広く考察している。まず、これまでの MA-silk と MI-silk の研究で明らかになってきたことや、予想されていたことが、第 2 章の研究によって確認されたこと、新たに明らかになったことを議論している。次に、これまでの人工クモ糸の物性制御に関する研究を引用することで、第 3 章で確認された物性の変化が、これまでの物性の変化と大きく矛盾する結果ではなく、これまでに観察されていた配列の改変箇所と影響を与える物性の関係と一致する結果であったことを議論している。また、大規模なモチーフによる改変を通じて、天然クモ糸の配列—物性相関を用いて物性制御を試みた例が初めてであったこと、これによって改変が可能な物性と、影響を与えることが難しい物性が存在したこと、本論文の試みにより、人工クモ糸の配列—物性相関を用いた物性制御が可能であることが示されたことが議論されている。

以上のことから、請求者は独立した研究者として、科学的な課題設定から実験による検証、そして応用への展開まで、一連の研究プロセスを遂行する能力を有していると考えられる。ここに示された研究成果を総合的に判断すれば、本学位請求論文は博士（政策・メディア）の学位授与の要求水準を満たすものと認められる。