

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2016
課題番号：26660265
研究課題名(和文) エラスティックシルク創製のための基礎研究

研究課題名(英文) Study for development of elastic silk

研究代表者

玉田 靖 (TAMADA, Yasushi)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：70370666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：シルクの弾性率制御を目的に、構造因子としてフィブロインの結晶領域に注目し結晶領域の乱れを誘起すると期待される緩和分子(ペプチド)を設計合成し、緩和分子と結晶領域との結合性の検証を行い、さらにフィブロイン水溶液に緩和分子を混合しナノファイバー不織布を紡糸して引張り試験を実施した。設計した緩和分子の結晶配列への結合性を確認し、その緩和分子によりシルク繊維の弾性率が低下させることが出来た。一方、結晶領域の長さや数を変化させた遺伝子組換えフィブロインでは、弾性率の制御は出来なかった。

研究成果の概要(英文)：Some disturbing molecules, which are to inhibit the formation of the crystal structure in silk fibroin fiber, were designed and synthesized for controlling the modulus of silk fiber in order to use the silk fibroin materials in tissue engineering field as the cell scaffold for soft tissue reconstitution. A novel peptide, RP3R-15, was able to decrease the tensile modulus of the electrospun fibroin nano-fiber non-woven mat. A single fiber of several transgenic fibroins which are contained the crystal regions with various length and number were evaluated the tensile and compressive modulus. However no effects were observed in this study.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：シルク弾性率制御

1. 研究開始当初の背景

シルクの再生医療用細胞足場材料等の医療用材料として研究開発が活発化しており、シルクの新しい利用展開として期待が持たれていた。PubMed による「silk x tissue engineering」のキーワードでは、2000 年から年平均 15%の伸び率で公表論文数が増加している状況であった。再生医療としてのターゲット組織は多様であるが、シルクを足場材料として利用する研究の多くは、骨や軟骨という荷重組織の再生を目的としている。これはシルクの持つ力学的強度を活かした足場素材のターゲットとして荷重組織が適切と考えられたからと思われる。しかし、組織再生が望まれるターゲットは、皮膚、角膜、心臓、肝臓等の軟組織も含まれる。これらの組織は、シルク繊維の弾性率と比較して数桁低い弾性率を持つ (表 1)。

表 1 各種組織の弾性率

	silk	collagen	skin	tendon	ligament	liver	heart
Modulus (GPa)	10	0.0046	0.00085	0.45	0.138	0.00068	0.00055

足場材料としてターゲット組織との力学的適合性も重要な因子であるため、シルクが十分に活用できない状況であった。生体軟組織に対応できるシルク足場材料を創出するためには、シルクの低弾性率化が必要であった。

シルクの力学的物性を改変する試みも、遺伝子組換えカイコ技術を利用して検討されていた。例えば、クモ糸タンパク質がシルクに複合化されたスパイダーシルクが開発され、野生型シルク繊維の 1.5 倍の強靱性の向上に成功している。このように、シルクの高強度化や高弾性率化の研究が行われていた一方で、シルクの低弾性率化の研究は、本研究課題の研究開始当初から皆無であり、新たな技術開発研究が必要と考えられた。

2. 研究の目的

再生医療における組織再生足場としてシルクの利用を拡大するために、シルク材料の弾性率の制御技術を開発することを本研究の目標とした。シルクの弾性率制御については、全くの未知の課題であるため、まず弾性率制御に有効に働く構造因子を明らかにすることを目的に、シルクの高強度や高弾性率を支持するフィブロイン H 鎖タンパク質の結晶領域に注目し、結晶形成過程の制御を行い、シルクの弾性率制御 (低弾性率化) が可能であるかを明らかにすることとした。

① 緩和分子による弾性率制御

結晶形成過程の制御のために、結晶領域に結合する結晶形成を阻害あるいは結晶構造の緩みを惹起すると推察できる分子 (緩和分子や弾性架橋分子) を設計し、結晶領域への結合性の有無、緩和分子を複合化したシルク繊維の物性の変化を評価することを目的とした。(図 1)

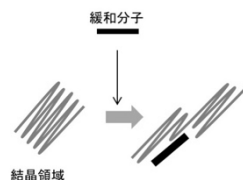


図 1 緩和分子による結晶領域緩みの想定図

② 遺伝子組換えシルクによる弾性率制御

農業・食品産業技術総合研究機構において、遺伝子組換えカイコ技術によりフィブロイン H 鎖タンパク質の結晶領域の繰り返し配列の長さや個数を変えたフィブロインの作出に成功したため、それらの遺伝子組換えシルクにより弾性率の改変が可能であるかを評価することを目的とした。

③ 改変シルク材料の細胞親和性の評価

再生医療用材料としての応用を目的としているために、細胞毒性や細胞親和性についての評価を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

シルクの主成分であるフィブロインは、分子量 300KDa の H 鎖と分子量 27KDa の L 鎖が C 末端でジスルフィド結合をしているヘテロ 2 量体をとる。フィブロイン H 鎖タンパク質がシルクの高強度や高弾性率を支持する成分であることが知られており、H 鎖中の (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser/Tyr) の 6 残基の繰り返しからなる配列が β シート構造を形成し結晶領域となるとされている。

① 緩和分子による弾性率制御

結晶形成を阻害あるいは結晶構造に緩みを惹起する緩和分子として結晶配列の一部を構造破壊アミノ酸であるプロリンに置き換えたペプチドや結晶配列間にプロリンを挿入したペプチドを設計・合成した。(表 2)

表 2 緩和分子の配列

略号	配列
b_R1_Cy_15	NH ₂ -CSSESDFGSGAGAGS-COOH
RP3R_15	NH ₂ -SGAGAGPPPGAGAGS-COOH
RP2_13	NH ₂ -SGAPAGSGAPAGS-COOH

これらのペプチドの結晶配列との結合性の評価を行うために、水晶発振子微量天秤 (QCM) や表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて行った。結晶配列として末端にシステインを持つペプチドを設計し、それぞれの金蒸着セル基板上にスピコートにより金-チオール結合により固定化した。

結晶配列への結合性あるいは非結合性が確認された緩和分子をシルクフィブロイン水溶液に混合し、エレクトロスピンニング法によりナノファイバー不織布を作製し、引張り試験により弾性率を測定した。

② 遺伝子組換えシルクによる弾性率制御

農研機構で作製された結晶領域の長さが異なるフィブロンを含有する繭 (表 3-1, 2) の提供を受け、実験品種系統 (W1pnd) の繭は、

精練、9M 臭化リチウムでの溶解、水での透析により水溶液を調製し、エレクトロスピンング法によりナノファイバー不織布を作製し、引っ張り試験により弾性率を測定した。実用品種系統(中 515)では、精練後の絹糸を単繊維として、引っ張り試験および微小圧縮試験を行った。

表 3-1 遺伝子組換えシルク(W1pnd)

略号	組み換え	長さ	結晶領域数
WT	-	-	-
AH2	H chain	31	-
AH3	H chain	213	1(3 rd &4 th)
AH4	H chain	396	1(9 th)
AH5	H chain	475	1(5 th)
AH9	H chain	788	2(9 th)
AH14	L chain	396	1(9 th)

表 3-2 遺伝子組換えシルク(C515)

略号	組み換え	長さ	結晶領域数
cWT	-	-	-
cAH1	H chain	-	-
cAH3	H chain	213	1(3 rd &4 th)
cAH11	L chain	-	-
AH5+15	H+L chain	475	2(5 th)

③ 改変シルク材料の細胞親和性評価

ペプチド含有フィブロインあるいは遺伝子組換えフィブロインの水溶液を細胞培養用ディッシュにコーティングし、それらの基材上で NIH3T3 細胞を培養し、細胞接着性や細胞増殖性について評価を行った。

4. 研究成果

① 緩和分子における弾性率制御

1) 緩和分子の結晶配列への結合性の検証

結晶配列を有する bR1_cy_15 ペプチドを QCM の金基板に固定し、結晶配列を有する RP3R_15 と結晶配列中の Gly を Pro に変えた RP2_13 ペプチドの結合性について評価した。それぞれのペプチドの吸着(結合)挙動は、Langmuir 型吸着式に適合していたので、それぞれのペプチドの結晶配列への結合性を見積もるために解離定数 Kd を算出した。結果を図 2 に示した。

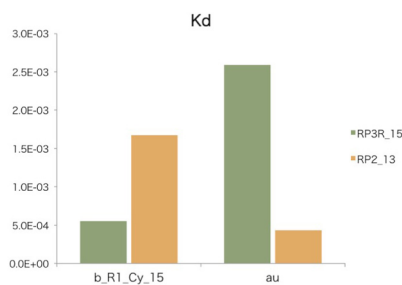


図 2 緩和分子の結晶配列への結合性

ペプチドの非特異的吸着についても評価するために金基板への吸着についても測定した結果も示した。図 2 より明らかなように、結晶配列を含む RP3R_15 は、結晶配列に特異的な

結合を示すが、結晶配列中に Pro が挿入された RP2_13 では、非特異的な吸着が強いことが分かり、当初の設計を支持する結果となった。しかし、QCM の特性上分子量の小さいペプチドの結合を再現良く評価することが困難であったため、SPR 法による結合性の評価を行った。センサグラムを図 3 に示したが、RP3R_15 の結合性を再確認できたものの、RP2_13 においても結合する結果となった。

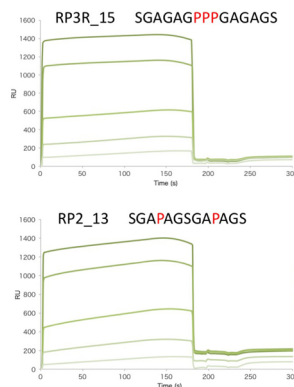


図 3 緩和分子の結晶配列への結合性、SPR のセンサグラム

表 2 に示した RP2_13 の配列を見ると、Pro に挟まれた部分に結晶配列の一部が含まれていることが分かる。この部分が結晶配列と特異的に結合している可能性が考えられたため、新たなペプチド RP1_7 (SGAPAGS) を合成し、結晶配列との結合性を調べたところ図 4 に示したように結合しないことが分かった。同時に作製したペプチド R_7 (SGAGAGS, 結晶配列) は、結合することが確認されたので、結晶配列中の Pro により結晶配列への結合が阻害されていることが確認できた。

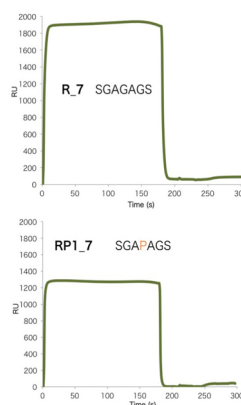


図 4 変異導入結晶配列ペプチドの結合性、SPR のセンサグラム

そこで、結晶領域に結合して結晶構造を緩めると推察できる RP3R_15 を用いて、実際に弾性率を変化させることができるかについて検討した。

2) ペプチド含有シルクの力学物性の変化

開発したシルク水溶液からのエレクトロスピンニング法によるナノファイバー不織布作製において、紡糸液であるフィブロイン水溶液に PR3R_15 を混合し、エレクトロスピンニングを行った。円板あるいは円筒の回転電極を用いることで、配向繊維としての評価を試みたが、紡糸が困難であったため、平面不織布を水浴中で撚ることで試料とした。得られた結果を図 5 に示した。図より明らかなように、RP3R_15 を混合することで有意に弾性率が低下することが確認できた。この結果は、RP3R_13 の結晶配列部がフィブロインの結晶部分に結合し、RP3R_15 の Pro によって結晶間の緩みを形成したと推察している。また、弾性率を制御するための構造因子として結晶構造の制御が有効であるということも確認された。

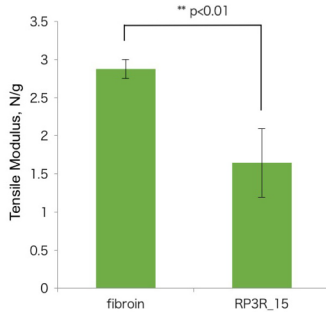


図 5 緩和分子導入によるフィブロインナノファイバー不織布の引っ張り弾性率の変化

今後は、RP3R_15 によりフィブロインの結晶構造に緩みが生じたかについて、X 線回折や固体 NMR 法等によって確認し、ペプチドの設計にフィードバックする。また、遺伝子組換えカイコ技術を利用して、カイコにおいてフィブロインとともにペプチドを共産生させて、得られた絹糸の物性変化について検討を行う予定である。

② 遺伝子組換えシルクによるシルクの弾性率制御

1) 実験用品種の遺伝子組換えシルクによる評価

実験用カイコ品種である W1pnd 系により表 3-1 に示した結晶領域の長さや個数を変えたフィブロインを含む繭が提供された。これらのシルクを引っ張り試験に供すべく絹糸を調製したが、実験品種のため絹糸自体が非常に弱くバラツキも大きいため、直接的な評価が不可能であった。そこで、これらの遺伝子組換えシルクのフィブロイン水溶液を調製し、エレクトロスピンニング法により紡糸した後に、力学物性の測定を試みたが、紡糸時にビーズが発生してしまい、この状態では正確な力学物性の評価は困難であると判断した。そこで、試料種は少ないものの、実用品種による遺伝子組換えシルクの提供を受けた。

2) 実用品種の遺伝子組換えシルクによる力学物性の評価

表 3-2 に示した実用品種による結晶領域の数や長さを変えた遺伝子組換えシルクについては、精練しさらに単繊維としても力学物性測定が可能な試料とできることが確認できた。繊維の弾性率を求める上で繊維断面積が大きく関与する。シルクのような天然繊維では、1本の繊維においても合成繊維のように均一な断面ではなくかつその大きさもゆらぎがある。そこで、新たに繊維を樹脂に包埋し、薄層切片を作製してその断面の写真から画像処理により断面積を算出する手法を開発した。(図 6)

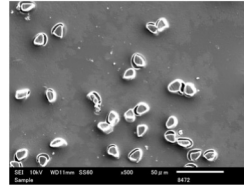


図 6 繭糸の断面

遺伝子組換えシルク各試料につき 3 粒の繭から 10 本の単繊維を準備して引っ張り試験を行い、先に算出した断面積から弾性率を算出した。その結果を図 7 に示した。各試料の繭の個体間でバラツキが若干あるが、平均値としては各試料間で有意差は観察されなかった。

また、シルク繊維の繊維軸と垂直方向の弾性率を求めるために微小圧縮試験装置を用い、各試料単繊維の圧縮弾性率を測定した。結果を図 8 にまとめたが、引っ張り弾性率と同様に各試料間での有意差は観察されなかった。

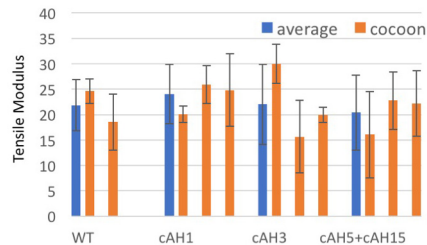


図 7 遺伝子組換え絹糸単繊維の引っ張り弾性率

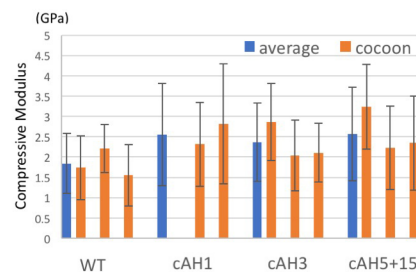


図 8 遺伝子組換え絹糸単繊維の圧縮弾性率

これらの結果は、結晶領域の長さや個数、あるいは結晶-非晶のバランスの変化は、シルク繊維の弾性率に影響を与えないことを示唆

している可能性を示している。あるいは、今回使用した遺伝子組換えシルクでは、組み換えフィブロインタンパク質は、フィブロイン全体のためか10%程度の産生量と見積もられていることから、その効果が十分に発現されなかった可能性も高い。今後の検討課題とした。

③ 改変シルク材料の細胞親和性評価

1) 緩和分子複合シルクフィルムへの細胞親和性評価

RP3R_15 を複合化したシルクフィブロインをコーティングした基材に NIH3T3 細胞を播種し、3 時間後の基材への接着数を、シルクフィブロイン基材と細胞培養用ディッシュと比較した。図 9 に結果を示したが、RP3R_15 を複合化しても細胞接着数に影響を与えないことが分かった。よって、緩和分子である RP3R_15 により、シルクの細胞親和性を損なうことなく弾性率を低下できることが示された。

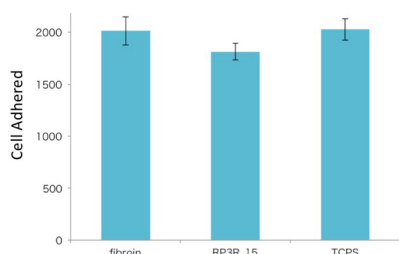


図 9 緩和分子を複合化したフィブロインフィルムへの NIH3T3 細胞の接着

2) 遺伝子組換えシルクの細胞親和性

W1pnd 系で作製した遺伝子組換えシルク水溶液からコーティングフィルム基材を作製し、NIH3T3 細胞の増殖試験を行い、対数増殖期での倍加時間を各試料で算出し、その結果を表 4 にまとめた。倍加時間が短いほど増殖性が高いことを意味する。表 4 より AH-9 (長い結晶領域が 2 つタンデムに繋がっている組み換えフィブロイン) 上では若干増殖性の低下が見られるが、他の試料においてはコントロール基材と同等の増殖性を示すことが分かる。今回の遺伝子組換えシルクは、細胞親和性に大きな影響がないことを示唆している。AH-9 試料については、今後の検討課題とした。

表 4 遺伝子組換えフィブロインフィルム上での NIH3T3 細胞の増殖性

	doubling time (hour)
TCP	21.99
AH-Control	23.58
AH-2 (153 bp)	23.35
AH-3(639 bp)	23.34
AH-4(1188 bp)	24.36
AH-5(1425 bp)	25.55
AH-9(1188×2 bp)	28.80
AH-14(1188bp : L chain)	24.77

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kishimoto Y, Kobashi T, Morikawa H, Tamada Y., Production of three-dimensional silk fibroin nanofiber non-woven fabric by wet electrospinning, J. Silk Sci. Tech. Jpn., 25, 49-57, 2017, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 稲垣まり子、小橋尚教、玉田靖、フィブロイン由来ペプチドによるシルク改変の試み、第 64 回日本シルク学会研究発表会、2017. 5. 18、つくば、つくばイノベーションプラザ

② 鷲見拓哉、内野恵郎、小島桂、玉田靖、結晶-非晶バランスを変化させた遺伝子組換えシルクフィルム上での細胞培養、第 63 回日本シルク学会研究発表会、2016. 7. 22、東京、東京農工大学工学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 靖 (TAMADA, Yasushi)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：70370666