

Title	人工クモ系の劣化機構の解明とその安定化技術の開発
Author(s)	中山, 超
Citation	
Issue Date	2020-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/16666
Rights	
Description	Supervisor: 谷池 俊明, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	中山 超		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 489 号		
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 25 日		
論文題目	Elucidation of Degradation Mechanism of Recombinant Spider Silk and Its Stabilization		
論文審査委員	主査 谷池俊明	北陸先端科学技術大学院大学	准教授
	篠原健一	同	准教授
	松村和明	同	准教授
	都英次郎	同	准教授
	水門潤治	産業技術総合研究所	グループ長

論文の内容の要旨

第 1 部: 研究内容

背景

遺伝子組換え技術の発展により、人工クモ糸タンパク質の大量生産が成し遂げられつつある[1]。高分子材料としてのクモ糸は、その優れた機械的特性（高靱性など）により、さまざまな分野への応用が期待されている[2]。一方で、材料としての広範な応用に欠かすことのできない加工や利用に際しての耐久性についてはこれまでほとんど議論されてこなかった。例えば、代表的な合成汎用樹脂であるポリオレフィンでは、熱や光によって生じたラジカルが酸化反応を引き起こし、分子鎖の切断や架橋を誘発することで物性の低下を招くことが知られており、劣化機構に基づく安定化剤の作用機構の理解も進んでいる[3]。クモ糸でも同様の検討が必要であるが、熱と光が誘起する劣化に加えて、クモ糸特有の課題として耐湿性の低さも挙げられる。環境中の水分子を構造中に取り込むことで低温でも構造緩和が引き起こされるため、実用性を担保するには耐湿性の向上も考慮に入れる必要がある。

そこで本論文では、人工クモ糸の熱酸化と光劣化機構を解明し、耐湿性も考慮に入れた種々の安定化技術の確立を目指した。

実験結果および考察

核磁気共鳴（NMR）、赤外（IR）分光法、X線回折（XRD）、化学発光（CL）法を含む多面的キャラクターゼーションに基づいて人工クモ糸の熱酸化劣化機構を系統的に研究した。人工クモ糸粉末を 200 °C の恒温オーブンに静置し、2 時間ごとに分析用検体をサンプリングした。多面的分析の例として、

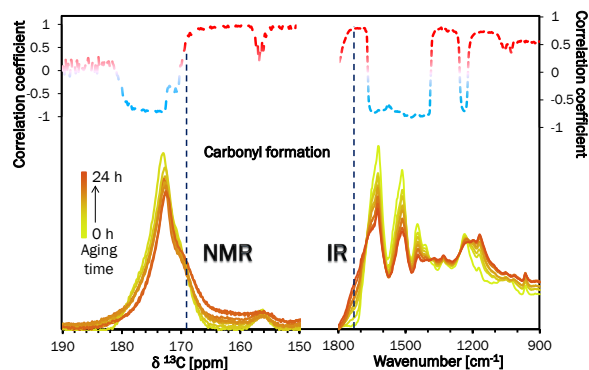


Fig. 1. Series of ^{13}C solid-state NMR (left) and IR (right) spectra for spider silk degraded at 200 °C under dry air and the corresponding correlation coefficient spectra.

Fig. 1 に劣化時間ごとの NMR・IR スペクトルと、強度の変化を相関係数として表した図を示す。NMR においては 170 ppm、IR においては 1750 cm^{-1} に劣化時間に応じた強度の増加が観測された。これは酸化反応によって新たに生じたカルボニル基に由来すると考えられる。その他の分析結果を総合的に評価することで、熱酸化劣化は主として①カルボニル種の形成、②非晶部における優先的な劣化、③芳香族化、④Tyr 二量化を伴うことを明らかにした。また、熱酸化の際に化学発光が放出されることからラジカル由来の劣化であることもわかった。人工クモ糸の化学発光挙動は、誘導期を持たず 480–520 nm のブロードなピークを示し、脂肪族ポリアミドのそれに類似していた。その他の分析結果も考慮すると、人工クモ糸の熱酸化劣化は主に主鎖の C_α 位でのヒドロペルオキシドの形成から始まり、その単分子分解により発光を伴いイミドまたは α -ケトアミド基に生成すると結論した。さらに、光劣化促進のために太陽光に類似した波長を有するキセノンランプを試料に照射し、12 時間ごとに IR、UV-Vis 測定を実施し光劣化機構を評価した。その結果、人工クモ糸は光照射に敏感であり、カルボニル種の形成や非晶部の優先的な劣化など、熱酸化劣化と類似した機構に従って劣化することがわかった。また、光劣化の進行に伴い黄変が進行し、400–450 nm 付近の吸光が増加することも明らかとなった。

人工クモ糸の熱安定性、耐光性の向上を目的として安定化剤の探索を行った。熱酸化劣化においては、化学発光法における最大発光強度時間を指標として安定化剤スクリーニングを実施した。その結果、人工クモ糸の熱酸化劣化に対して有効な一連の酸化防止剤 (E310, BHT, vitamin E, AO-30, AO-40, HP-10, Irganox 1098, Chimassorb 944FDL) を特定することができた。例えば、E310 や BHT を 0.3 wt% 添加することで、最大発光強度時間は約 20–30%、また、耐熱性が 5 $^{\circ}\text{C}$ 向上した。酸化防止剤の効能はカルボニル種の生成の抑制という形でも確認できた。さらに、複数の安定化剤を添加することによる相乗効果を検討し、Irganox 1098/HP-10 または Chimassorb 994FDL/AO-26 の組み合わせが単一安定化剤に比べて高い効果を発揮することを見出した (Fig. 2)。光劣化においては、キセノンランプ照射による黄変 (UV-vis の 400 nm の吸収) を指標として光安定化剤のスクリーニングを実施した。その結果、使用したほとんどの安定化剤で劣化の抑制を確認し、特に人工クモ糸のアミド基

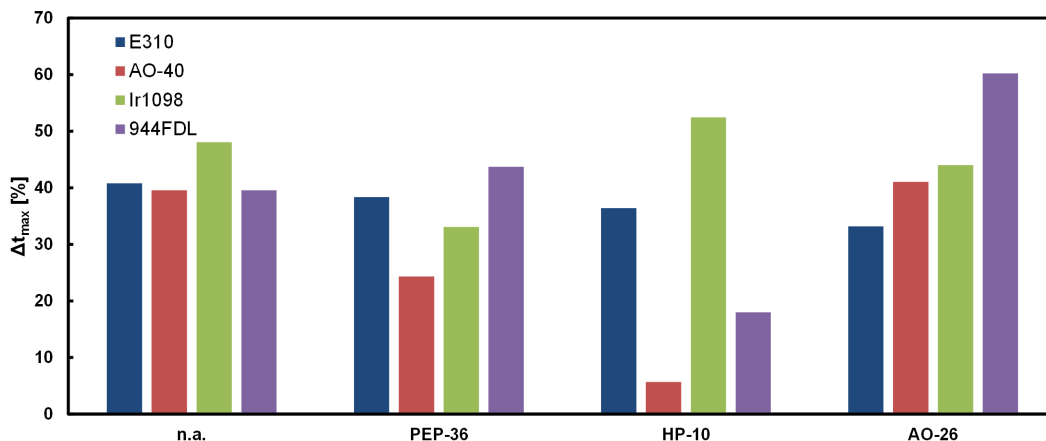


Fig. 2. Packages of stabilizers.

との相互作用が強いと考えられるアミノ基ないしはアミド基を有する Hostavin VSU, Hostavin PR-25 の効能が高かった。

耐湿性の向上を目指し人工クモ糸ナノコンポジットの開発を行った。ジメチルスルホキシド中で人工クモ糸およびフィラーを 80 °C で攪拌して調製したドープ溶液からキャスト法によってフィルム試料を調製した。未修飾および有機修飾モンモリロナイト、酸化グラフェン (GO)、球状シリカといった種々のフィラーを用いて検討を実施し、ドープ溶液中で分散性の高いフィラーを用いた場合、透明性、分散性およびヤング率の高いフィルムを調製することに成功した (Fig. 3)。中でも有機修飾モンモリロナイト (PEG-mMMT,

C18-mMMT) を用いたフィルムにおいては伸度の低下が抑えられ、強度が上昇した。以上のように無機フィラーとのナノコンポジット化は耐湿性以外の物性の改善にも有用であることが確認された。昇湿条件下での貯蔵弾性率における変形湿度を指標とした耐湿性の評価では、PEG-mMMT を 3.0 wt% の添加することで変形湿度が 6.6 RH% 改善した (77.1 から 83.7 RH%, 30 °C)。この効果は、板状フィラーによるガスバリア効果に起因するものと考えられた。さらに、これらの知見を発展させ、人工クモ糸/PEG-mMMT ナノコンポジットファイバー (0.5–3.0 wt%) についても検討した。0.5 wt% の添加において、フィルム同様に弾性率、強度、耐湿性の向上が認められた。これらの結果から、人工クモ糸ナノコンポジットの開発に成功し、その有効性について実証できた。

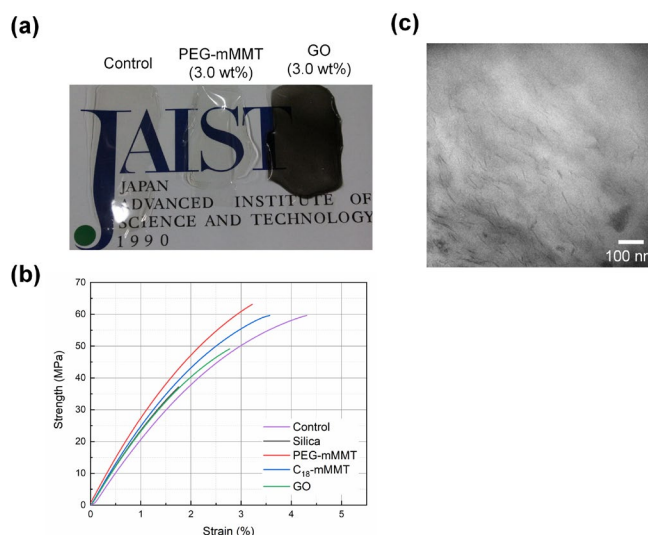


Fig. 3. a) Optical image. b) Tensile test results for recombinant spider silk and its nanocomposite films (3.0 wt%). c) TEM image of a recombinant spider silk/PEG-mMMT

References

- [1] H. Chung, T. Y. Kim, S. Y. Lee, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2012) 957–964.
- [2] C. Vepari, D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 991–1007.
- [3] R. Setnescu, S. Jipa, Z. Osawa, *Polym. Degrad. Stab.* 60 (1998) 377–383.

第 2 部: 研究の意義

生体高分子が注目される中、その工業化が進まない理由の一つに、熱、光や湿度への耐性

が低いため本来の魅力的な物性を保持できないことがあげられる。本研究では、人工クモ糸の熱酸化や光劣化機構を解明し、これらの抑制に有効な安定化剤を見出した。また、耐湿性の課題に対しては、分散性の高い板状のフィラーを用いたナノコンポジット化による改善法を示した。以上より、人工クモ糸の複雑な劣化機構の解明、劣化機構に基づいた安定化技術の開発、ナノコンポジットによる耐湿性の改善を通してタンパク質材料を構造材として利用するための材料設計指針を打ち出すことに成功した。

Contents of Dissertation

Chapter 1	General Introduction	1
Chapter 2	Elucidation of Thermo-Oxidative and Photo Degradation Mechanism of Recombinant Spider Silk	34
Chapter 3	Stabilization of Recombinant Spider Silk in Thermo-Oxidative and Photo Degradation	67
Chapter 4	Development of Recombinant Spider Silk/Clay Nanocomposites	90
Chapter 5	General Conclusions	113

第3部:研究業績

<刊行論文>

"Chemiluminescence from Recombinant Spider Silk under Thermo-Oxidative Degradation",
by **Koyuru Nakayama**, Anh Thi Ngoc Dao, Kengo Takeuchi, Jun'ichi Shimokata, Toshiaki Taniike,
Polym. Degrad. Stab. 144 (2017) 264-269.

他査読付き論文3報、査読無し会議録論文1報、総説論文1報、分担執筆1報

<国際学会>

"Chemiluminescence behavior and mechanism of recombinant spider silk under thermal oxidation",
by **Koyuru Nakayama**, Anh T.N. Dao, Jun'ichi Shimokata, Kengo Takeuchi, Toshiaki Taniike,
11th International Symposium on Weatherability, Gunma, Japan, Jan. 23-24, 2018
(Non-peer-reviewed).

他査読無し国際学会1報

Keywords : Polymer degradation, polymer stabilization, spider silk, nanocomposite, spinning

論文審査の結果の要旨

遺伝子組換え技術の発展により素材としての人工タンパク質の大量生産が成し遂げられつつある。その魅力は、豊富に存在するアミノ酸を構造単位とした配列制御が実現する多様性にある。特に人工クモ糸は、極めて高い韌性に代表される魅力的な物性を有し、未来の構造・機能材料と

して広く注目されている。一方で、実用に欠かすことのできない成形加工や利用に際しての耐久性については、これまでほとんど議論されてこなかった。そこで本論文では、人工クモ糸の劣化機構の解明と安定化技術の確立に関する研究を行った。

まず、種々の分析法を用いて人工クモ糸の熱劣化機構を研究した。ここで、複数のアミノ酸残基を含むタンパク質の複雑な劣化機構に鑑み、劣化時間に沿った核磁気共鳴・赤外分光・X線光電子分光スペクトルの変化の系統性を相関係数のスペクトル表示法によって分析した。これらの結果を総合すると、人工クモ糸は130度以上の高温において酸素とのラジカル的な反応を伴う自動酸化機構に従い劣化するものと結論された。酸化劣化は非晶領域において優先的に進行し、カルボニル化合物の生成や炭化などを伴う。また、主鎖のC α 位の酸化によって生成したヒドロペルオキシドが単分子分解することで、化学発光を伴いイミドないしは α -ケトアミド基を生成することが明らかとなった。光劣化についても同様な検討を行い、人工クモ糸の化学構造が光に敏感であり、熱劣化と類似した自動酸化機構に従って劣化することがわかった。以上の劣化機構に基づき、熱・光劣化を抑制する添加剤に関する検討を実施した。一般に高分子の耐久性設計に当たっては抗酸化剤・光安定化剤・紫外線吸収剤などの各種添加剤が処方されるが、タンパク質の酸化劣化を抑制可能な添加剤に関する前知見は存在しなかった。化学発光イメージング法などを用いた大規模なスクリーニングを実施し、少分子ないしはアミノアミド基を有する安定化剤が人工クモ糸の酸化劣化抑制に有効であることを明らかにした。さらに本論文では、有機修飾モンモリロナイトを用いた人工クモ糸ナノコンポジットの開発にも成功した。人工クモ糸中で剥離したモンモリロナイトは、グリシン・チロシン残基のC=Oと相互作用し、フィルム及び繊維状の人工クモ糸の耐湿性や強度を向上した。耐湿性の向上は、マトリックス中で配向した板状構造体がもたらす迷路効果と上記相互作用に基づく高分子鎖の運動抑制に基づくものと考えられた。

以上本論文では、人工クモ糸の劣化機構の解明に成功し、添加剤技術やナノコンポジット化によって素材としての耐久性の改善方法を提案した。本論文は、将来的な活用が期待される構造タンパク質の耐久性に関する指針を与えるものであり、学術的にも産業的にも非常に有用と考えられる。よって、博士(マテリアルサイエンス)の学位論文として十分価値あるものと認めた。