

NMR を用いた絹の構造解析と今後の展望

蚕やクモは、体内に蓄えた絹水溶液から常温・常圧下、短時間に高強力・高弾性の繊維を創出する。クモの命綱である牽引糸に至っては、同じ太さの鋼鉄線より強い。人類は、いまだ、このように環境に優しいプロセスによって高強力・高弾性の繊維を創出できていない。したがって、絹の優れた構造と繊維化の機構を徹底的に解明し、その知見を高強力・高弾性繊維の創出につなげることも大切であろう。本稿では、これまで筆者らが核磁気共鳴 (NMR) の特徴を最大限生かして解明してきた、家蚕やクモの絹の構造の詳細について紹介し、今後の NMR と材料研究の展望についても述べる。

朝 倉 哲 郎

1 はじめに

絹は、繊維の女王として良く知られており、人類とのかかわりは長く、数千年にわたる。また、近年、絹は衣料分野への用途にとどまらず、新たなバイオ素材として再生医療分野への応用など様々な用途の展開を見せている¹⁾。絹研究の歴史は長く、得られた構造の知見は、例えば、新たな合成高分子繊維の開発に絶えずフィードバックされてきた。しかしながら、その知見の多くはマクロな構造情報であり、原子座標レベルでのミクロな構造の解明はいまだ不十分であった。その構造情報を得るための分析手段の双璧は、X線解析とNMRであろう。従来のX線解析等を用いた原子座標レベルでの絹構造の解明は、絹が結晶化しないため限界があった。一方、固体NMRは、近年、原子座標レベルの構造解析を行うための様々な手法が開発され、結晶化しない繊維や粉末の原子座標レベルの構造解析に威力を発揮するようになってきた。

本稿では、家蚕絹の繊維化前後の構造および天然で最も強い繊維と言われるクモ牽引糸の精密構造を取り上げる。絹自身の安定同位体ラベル化ならびに選択的安定同位体ラベルモデル化合物の合成と各種NMR技術を駆使して行うことによって決定してきた絹構造について紹介する。

2 家蚕絹の蚕体内での構造

家蚕が創出する絹は、絹フィブロイン (SF) と絹セリシンと言う二種類の蛋白質^{たんぱく}で構成される。主成分であるSFのアミノ酸配列は2001年にZhouらによって解明された²⁾。N-末端とC-末端を有し、中心部は、AlaGlySerGlyAlaGly (AGSGAG) の繰り返しから成る結晶領域とAla, Gly以外にTyr, Valや親水性のアミノ酸残基が混在した非晶領域が、交互に11回出現する。

蚕糸試験場の清水によってSFの固体構造が繊維化前後で大きく異なることが指摘され³⁾、Kratkyによって繊維化前の固体構造を「Silk I」、繊維化後の構造を「Silk II」と名付けられた⁴⁾。その後、Marshらによって、Silk IIの構造は、逆平行 β シートと提案されてきた⁵⁾が、Silk Iは、わずかな外力によって容易にSilk IIに変わってしまうこともあって、その構造解析は進まなかった⁶⁾。

蚕体内に蓄積されたSFを取り出すことなく、その構造の知見が得られれば、それに勝るものはない。そこで、外径1cmの¹³C核測定用NMR管に繭を吐く直前の5齢期の蚕を入れると、ぴたりと収まる。したがって、生きた蚕をNMR管に入れ、直接、¹³C溶液NMRの測定を開始した。もちろんスピニングは行わない。一晚の積算で、中部絹糸腺に蓄えられた液状絹の見事な高分解能スペクトルが得られた (図1)⁷⁾。比較のために野蚕の一種であるエリ蚕についても同様にNMR測定を行った。エリ蚕液状絹は、分子鎖中にAla連鎖と孤立したAlaが存在するため、対応する α -ヘリックスとランダムコイルの2本のAlaピークが出現する。家蚕体内の液状絹のAlaピークは、エリ蚕液状絹のランダムコイルのピーク位置と一致することから、ランダムコイルに近い構造を取ると結論できた。しかしながら、液状絹が全くランダムな構造であれば、延伸しても絡まってしまう、高強度繊維が得られるとは考えられない。すなわち、Silk Iはランダムコイルに近い、何らかの特殊な構造と考えるべきであろう。

3 家蚕絹のSilk I構造 (繊維化前の構造) の決定

では、Silk Iは、どのような構造であろうか。SFの結晶領域は、SF全体の56%を占め、AGSGAGの繰り返し主である²⁾。そこで、筆者らは、選択的に¹³Cラベル化されたSFに加え、各種¹³Cラベルモデル化合物を合成し、様々な固体NMRの手法を組み合わせる Silk

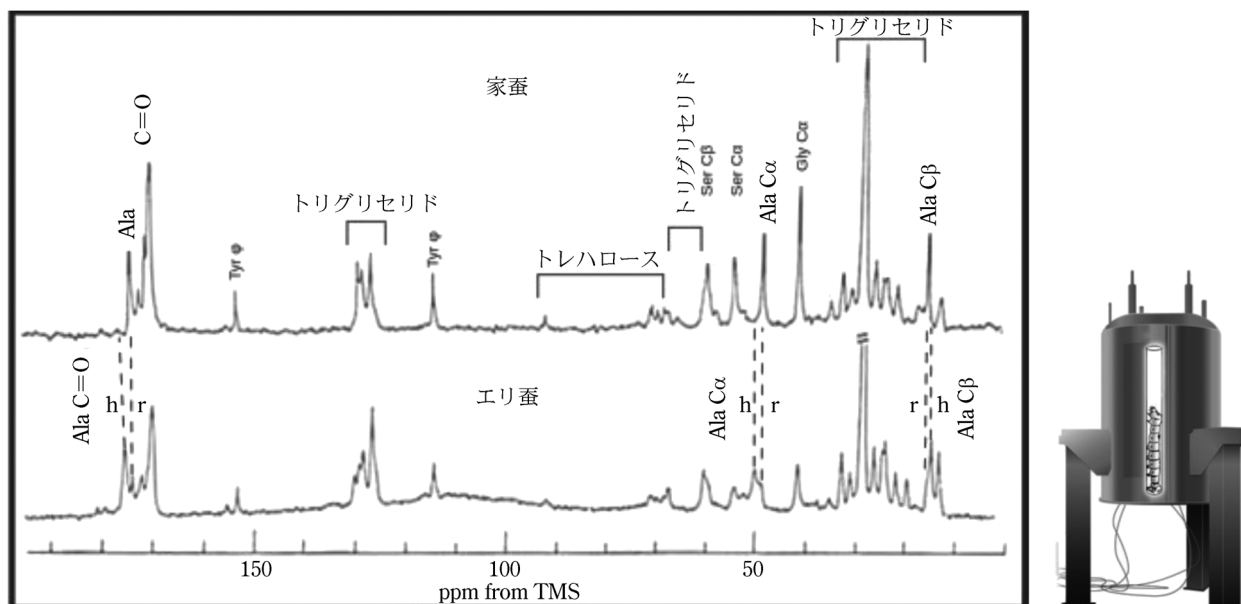


図1 繭を吐く直前の家蚕とエリ蚕を NMR 装置にセットし、一晩の積算後に得られた ^{13}C 溶液 NMR スペクトル。体内のトリグリセリドやトレハロースに混じて、中部絹糸腺に蓄えられた絹のピークが観測される。エリ蚕絹の Ala 残基の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ および $\text{C}=\text{O}$ ピークにおいて、h は α -ヘリックス、r はランダムコイルピーク。家蚕絹のピーク位置は、エリ蚕絹の Ala 残基のランダムコイルと一致する。

I の精密構造を決定してきた。図 2(a) は、絹生産が盛んな 5 齢期の家蚕に $[3-^{13}\text{C}]$ Ser および $[3-^{13}\text{C}]$ Tyr を経口投与した後、得られた液状絹（乾燥後）の ^{13}C 固体 NMR スペクトルである。 ^{13}C ラベル化しない場合は図 2(b) となる⁸⁾。いずれも Silk I 構造であるが、図 2(a) では、Ser および Tyr の $\text{C}\beta$ ピークの強度が増加する。Ala の $\text{C}\beta$ ピークも $[3-^{13}\text{C}]$ Ser からの蚕体内アミノ基転移反応によって、 ^{13}C ラベル化される。一方、図 2(c) は、同様に ^{13}C ラベル化された家蚕絹繊維 (Silk II 構造) の ^{13}C 固体 NMR スペクトルである。各ピークの化学シフトが Silk I と Silk II の間で大きく異なることが分る。

蛋白質中のアミノ酸残基の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ 化学シフトは、局所構造の違いによって異なることが経験的に知られている。そこで、化学シフトから絹のアミノ酸残基の内部回転角の取りうる範囲を決定することを試みた。精度の高い構造が決定されてきた 40 個の蛋白質を選び、プロテインデータベース (PDB) データベースから各アミノ酸残基について内部回転角を求めた。そして、対応する蛋白質のアミノ酸残基の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ NMR 化学シフトを用いて化学シフトの等高線マップを作成した⁹⁾。一例として、Ala 残基の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ 化学シフトの等高線マップを図 3 に示した。Silk I の Ala 残基の化学シフトの値から、このマップを用いて、内部回転角の範囲を $\phi = -80^\circ \sim -20^\circ$, $\psi = 90^\circ \sim 180^\circ$ と絞ることができた。同様にして、Ser, Gly, Tyr 残基の内部回転角の範囲も各残基ごとの化学シフトマップを用いて絞ることができた¹⁾。今後、蛋白質中の個々のアミノ酸残基の局所構造の推測に加えて、その内部回転角の取りうる範囲を絞る上で、NMR

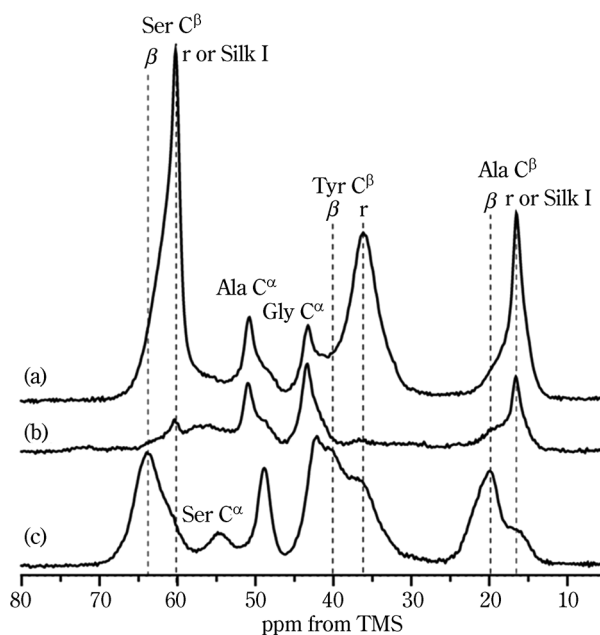


図2 Ser, Tyr, Ala 残基の $\text{C}\beta$ ピークが ^{13}C ラベル化された家蚕絹の(a) Silk I および(c) Silk II 構造の ^{13}C 固体 NMR スペクトル。r はランダムコイル、 β は β シートピーク。(b) は、 ^{13}C ラベル化されない場合の Silk I 構造の ^{13}C 固体 NMR スペクトル。

化学シフトの等高線マップは有効である⁹⁾。

さらに、固体 NMR の新たな手法を用いて、Silk I の Ala と Gly 残基の内部回転角の値を決定した¹⁰⁾。連続した 2 個のアミノ酸残基の各々の $\text{C}=\text{O}$ 核を ^{13}C ラベルし、その ^{13}C 核間のなす角度を決定する二次元スピン-

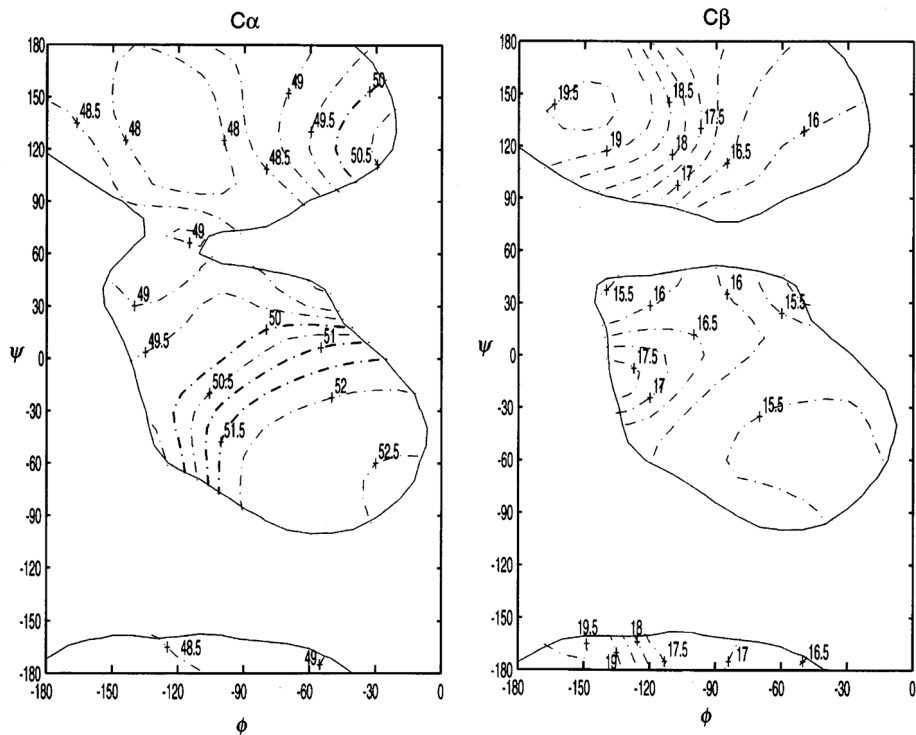


図3 40個の蛋白質中のAla残基について、Ala C α , C β NMR化学シフトを、対応するAla残基の内部回転角 ϕ , ψ の関数として表現した化学シフトの等高線マップ

ランダムコイルの化学シフトを、各々、50.0 ppm および 16.6 ppm としている。

拡散固体NMRの手法と、 ^{13}C と ^{15}N でラベルされた ^{13}C , ^{15}N 核間の原子間距離を決定する固体NMRのREDOR (Rotational Echo Double Resonance) 法を組み合わせて用いた¹⁰⁾。モデルペプチド、(AG) $_6$ A[1- ^{13}C]G 14 [1- ^{13}C]A 15 G(AG) $_7$ を合成、Silk Iとし、二次元スピナー拡散固体NMRを測定した。そのスペクトルシミュレーションから、中央のAla残基の内部回転角を $\phi = -60^\circ$, $\psi = 120^\circ$ と決定、同様に、 ^{13}C ラベル部位をずらした共重合体を用いて、Gly残基の内部回転角を $\phi = 70^\circ$, $\psi = 10^\circ$ と決定した(図4(a))。過去に提案されてきたSilk Iの構造モデルについて、そのAlaとGly残基の内部回転角を用いて、シミュレーションを行い、実測結果と比較するとどれも一致しない(図4(b))¹¹⁾。次に、REDOR法を用いた。(AG) $_6$ A[1- ^{13}C]G 14 A[^{15}N]G 16 (AG) $_7$ を合成、[1- ^{13}C]G 14 ...[^{15}N]G 16 核間の原子間距離を、また、(AG) $_7$ [1- ^{13}C]A 15 G[^{15}N]A 17 G(AG) $_6$ を合成、[1- ^{13}C]A 15 ...[^{15}N]A 17 核間の原子間距離を決定した。それらの原子間距離は、Silk Iの分子鎖のAlaおよびGly残基の内部回転角から計算された原子間距離と良く一致した¹¹⁾。これらの固体NMRの手法は、今後、分子鎖の固体構造を角度と距離情報から原子座標レベルで決定することができる点、極めて有効である。

以上のようにして決定したSilk IのAlaとGly残基の内部回転角の値を用い、さらにX線回折のデータ¹¹⁾を加味して、分子間構造までも含むSilk I構造を提案す

ることができた(図5(a))¹¹⁾。さらに、密度汎関数理論に基づく量子力学プログラムのCASTEP法を用い、Silk Iの分子間構造の座標に基づいて、 ^1H , ^{13}C および ^{15}N 核の化学シフトを理論計算した所、実測結果との極めて良い一致を得ることができた¹⁴⁾。材料の構造-物性相関を得るには、分子鎖のみならず、分子間構造までも要求されるが、固体NMR化学シフトのCASTEP計算による検証は有用である。

このSilk I構造によって、SFの繊維化の機構が合理的に説明できる。二種類の水素結合(分子内と分子間)が、分子鎖に沿って交互に形成されていることがポイントである。分子内水素結合の様子を強調したのが図5(b)、 90° 回転させて分子間水素結合の様子を強調したのが図5(c)である(緑の破線が水素結合)。家蚕は5齢期の熟蚕となると、繭を作ろうとする素材の端に絹繊維の一端をつけた後、頭部を8の字にふりながら、体内から絹を引き出し、延伸、繭を作っていく。その際、絹分子鎖は繊維軸方向に引き延ばされるので、交互に存在する分子内水素結合は切れる。ところが、分子間水素結合が維持されるため、隣に絹分子が残り、直ちに、分子内水素結合が切れたペプチド結合部分も新たに分子間水素結合を形成する。すなわち、繊維軸方向に引っ張るだけで、瞬時に、すべて分子間水素結合に替わり強い繊維が形成される、一種のマジックである。少しの力で高強度の繊維を作製するノウハウを内在する家蚕のSilk Iの構

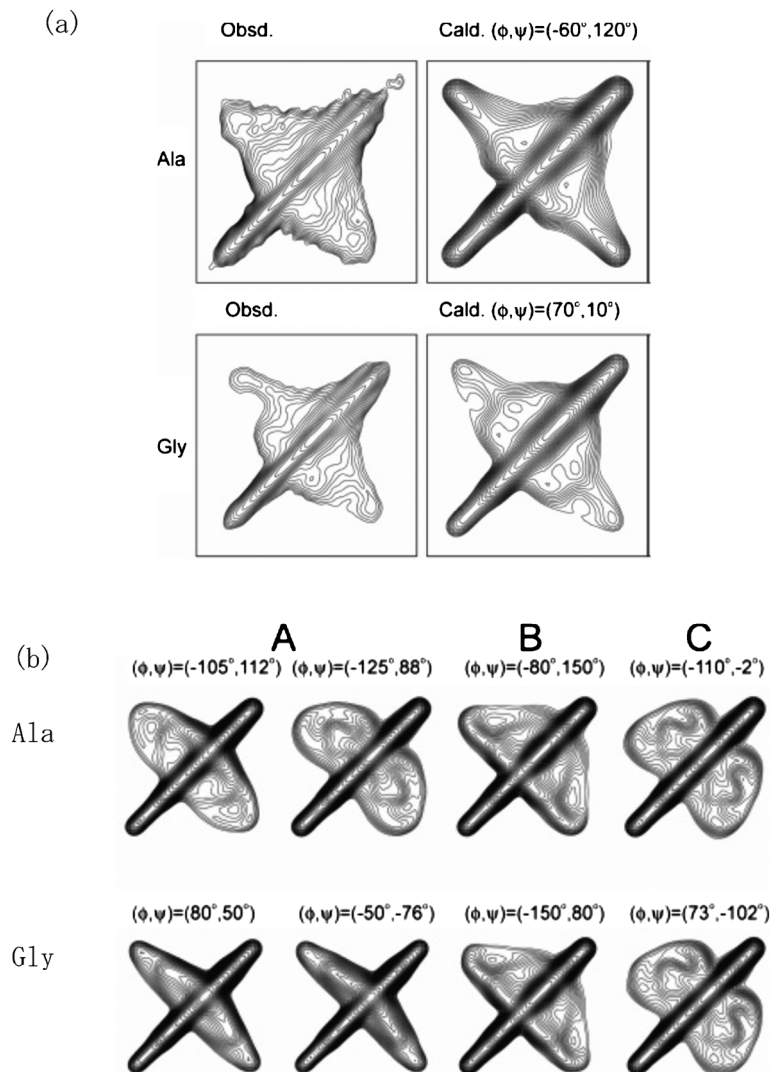


図4 (a) Silk I 構造を有する ^{13}C ラベル家蚕絹モデル化合物の ^{13}C 二次元スピナー-拡散固体 NMR スペクトルの実測結果 (Obsd.) と計算結果 (Cald.)

Ala および Gly 残基について、内部回転角の関数として一連のスペクトルパターンを計算し、最もよく一致する場合の内部回転角を選んだ。(b) これまで報告されてきた家蚕絹の Silk I 構造モデル、各々 (A) Ref.6), (B) Ref.12), (C) Ref.13) の内部回転角を用いて計算した場合のスペクトルパターン。いずれも実測結果との一致は悪い。

造は素晴らしい。また、この Silk I の β ターン構造では、Gly 残基の位置を、Gly 以外の側鎖を有するアミノ酸残基が占めると、分子鎖中の Ala 残基の C=O 基の酸素と立体障害を起こす。したがって、この β ターン構造が繰り返すためには、Gly 残基が分子鎖に沿って、一個おきに存在する必要がある。かくして、家蚕絹の一次構造が、何故、Gly の交互共重合体となっているかが、説明できる。

4 家蚕絹の Silk II 構造 (繊維化後の構造) の決定

一方、家蚕絹の繊維化後の構造は、半世紀以上前に Marsh らによって提案され、これまで、生化学の教科

書に必ずと言って良いほど引用されてきた⁵⁾。Ala と Gly の交互共重合体としてモデル化されており、分子鎖は伸びた β シート構造となり、それが分子間水素結合によって逆平行の分子間構造を形成する。その後、X 線解析の専門家によって、より不規則な構造が共存することが度々、指摘されてきた⁶⁾。そこで、Silk I 構造の決定に威力を発揮した固体 NMR の手法を用いて Silk II 構造の解明に着手した。

図 6 (a) は、家蚕絹繊維 (Silk II) の ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおいて、Ala メチルピークの拡大図である。Silk II は Silk I と異なり、極めて不均一な構造であることがわかる。家蚕絹の 56% を占める結晶部 (Cp fraction) をキモトリプシン処理沈殿部として取り出し、

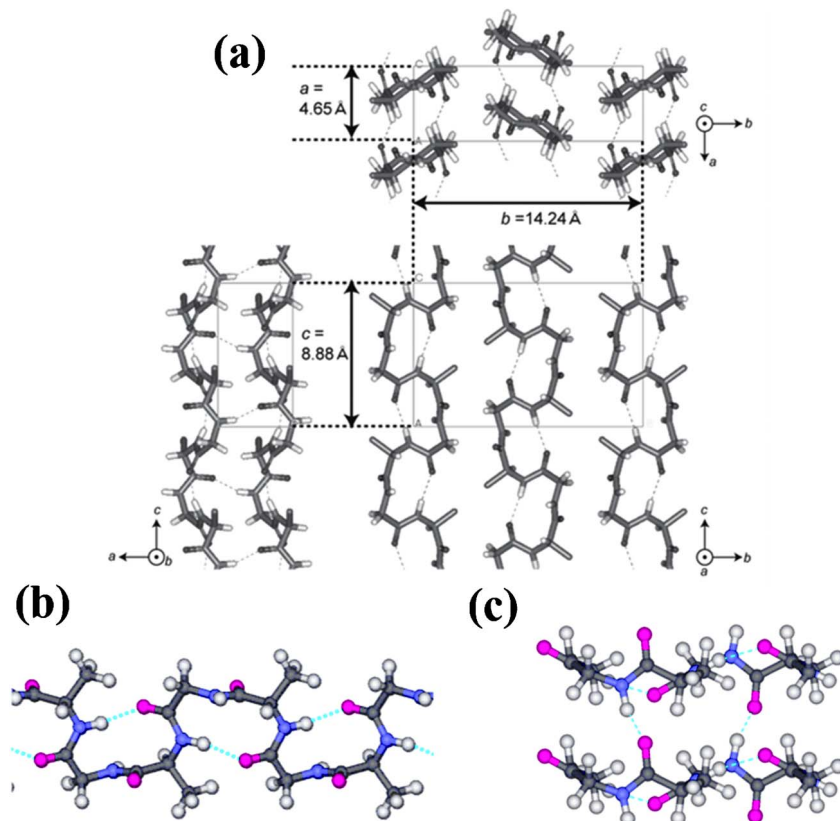


図5 家蚕絹の繊維化前の Silk I 構造 (a)：全体構造 (b)：横方向から見た分子鎖の拡大図 (c)：上方向から見た二本鎖の拡大図 (赤色：酸素 白色：水素 灰色：炭素 青色：窒素)
 蚕体内で絹の構造を安定化させる水素結合（緑色破線）が、(b)分子内と(c)90°ねじれた分子間で交互に繰り返されている。

^{13}C 固体 NMR を測定すると、主に、三成分から構成されることが分かる (図 6(b))¹⁾。最も高磁場ピーク (t) は、ゆがんだ β ターン構造で繊維化前の Silk I 構造に由来し、その割合は SF 全体の 18 % である。残りの部分は逆平行 β シート構造であり、二種類の構造 (A) と (B) から構成される。B, A, t の比を求めると約 1:2:1 であった。また、AGSGAG の繰り返し数を、4, 5, 8 と変化させたモデル化合物を合成し、Silk II 構造とし、B, A, t の比を求めると、約 1:2:1 であり、ほとんど変わらないことが分かる (図 6(b))¹⁾。これは、結晶部が同一の局所構造単位で繰り返されることを意味し、ラメラ構造の形成によって説明できる。尚、SF の残りの 44 % を占めるピーク (図 6(a) の赤線) は、非晶部由来であり、ゆがんだ β シートと β ターン構造から成る。

次に、結晶部の構造をさらに解明するために、[3- ^{13}C]Ala 残基の導入部位を系統的に変えて合成した 10 種類の (AGSGAG)₆ について、その ^{13}C Ala メチルピークの B, A, t の比を部位ごとに決定した (図 7)¹⁵⁾。(AGSGAG)₆ 分子鎖の末端部分を除けば、B, A, t の比は、1:2:1 の前後で変化する。その結果、Ala 残基が 11 と 19 部位で t のピークの分率が極大となることがわかった。同様に [3- ^{13}C]Ala 残基の導入部位を系統的に

変えて合成した 15 種類の (AG)₁₅ について、B, A, t の比の決定を行ったが、やはり、Ala 残基が 11 と 19 部位で t のピークの分率が極大となることがわかった¹⁶⁾。これらの結果から、SF 繊維の結晶部の構造モデルとして、図 8 にまとめたラメラ構造を提案することができた。8 残基で繰り返されるラメラ構造であり、B, A, t の比は、1:2:1 となる¹⁵⁾¹⁶⁾。今後、家蚕絹繊維の優れた力学物性の原子座標レベルでの構造との相関研究については、そのラメラ構造をベースに進展すると期待される。

5 クモ牽引糸の結晶部 (アラニン連鎖) の構造の決定

クモ牽引糸は、高強度、かつ、高弾性の優れた物性を有するタフで魅力的な絹繊維である。その特性を生かして実用化に向けた材料を創生しようという研究が世界中で始まっており、我国でも内閣府インパクトに採用され、大腸菌で生産したクモ糸を素材産業に応用しようとする研究が、活発に行われてきた¹⁷⁾。クモ牽引糸は、アラニン連鎖 (PolyAla) 領域と Gly-rich 領域が交互に繰り返されたアミノ酸配列をもつ。その高強度発現の源は β シート構造を取る PolyAla 領域に、また、高弾性

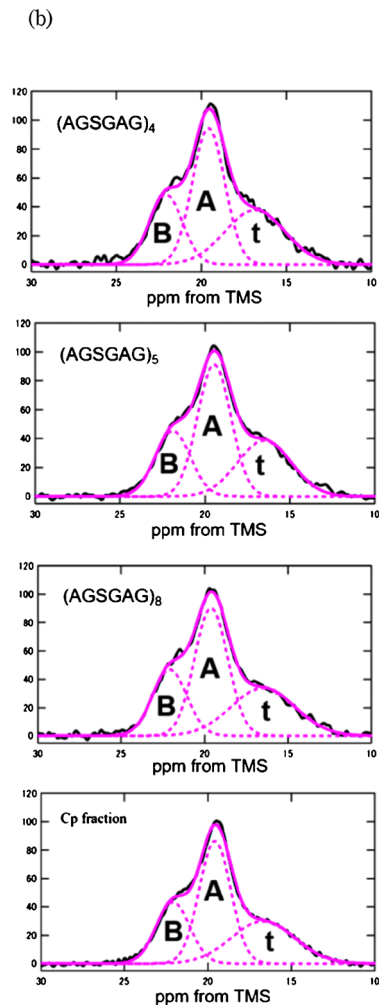
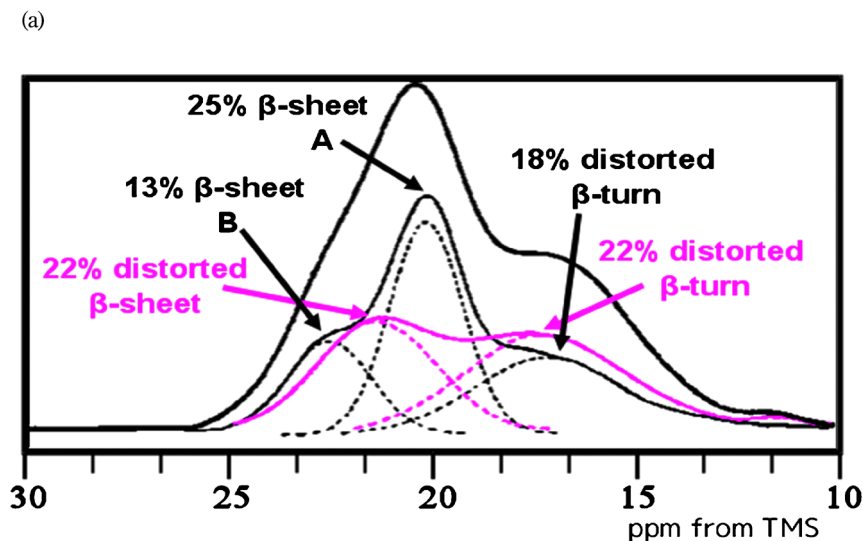


図 6 (a) 家蚕絹繊維の ^{13}C 固体 NMR スペクトル (Ala 残基のメチルピークを拡大)

家蚕絹の 56 % を占める結晶部の繰り返し領域 $(\text{AGSGAG})_n$ は、主に、三成分から構成される (実線)。最も高磁場側は、(t) distorted (ゆがんだ) β -turn 構造で繊維化前の Silk I 構造に由来し、その割合は 18 %。結晶部の他の部分は、逆平行 β -sheet 構造であり、A と B から構成される。残りの 44 % を占める非晶部 (赤線) は、distorted β -sheet 構造と distorted β -turn 構造が半々を占める。

(b) $(\text{AGSGAG})_{4,5,8}$ と結晶部 Cp fraction) の ^{13}C 固体 NMR スペクトル (Ala 残基のメチルピークを拡大)
B, A, t の強度比は、約 1:2:1 で、変わらない。

発現の源は非晶部の Gly-rich 領域に由来すると考えられてきた¹⁸⁾。しかしながら、クモ糸絹には非晶部が多く、例えば、X 線解析は十分に威力を発揮できないこともあって、分子レベルでの構造に関する知見は十分に得られていない。

図 9 は、女郎ゲモ (*N. clavata*) に $[3-^{13}\text{C}]$ Ala を経口投与し、得られた牽引糸の ^{13}C 固体 NMR スペクトルである¹⁸⁾。PolyAla 領域は主に β シート構造を取ることがわかるが、解析をさらにすすめるために、逆平行 β シート構造を有する一連の Ala オリゴペプチド ($(\text{Ala})_n$, $n=4\sim 8, 12$) を合成し、 ^{13}C 固体 NMR を測定した¹⁹⁾。図 10(a) に一連の $(\text{Ala})_n$ の Ala メチルピークの変化を示した。ピークパターンは、 $n=6$ までと 7 以上で著しく異なる。すなわち、 $n=6$ までは、中央の Ala 残基のメチル基はシングルピークであるが、 $n=7$ 以上では、両端にピークを持つ非対称なピークとなる。詳細な解析

を経て、前者は、Rectangular (R) Packing 構造、後者は Staggered (S) Packing 構造と結論された (図 10(b))¹⁹⁾。Packing 構造の違いは、PolyAla 領域の β シート構造のシート面の重なり具合の違いであり、シート面がずれない場合が R 構造、交互にずれた場合が S 構造である。そこで、 $[3-^{13}\text{C}]$ Ala クモ糸の PolyAla 領域のメチルピークについて、 $(\text{Ala})_6$ と $(\text{Ala})_7$ のピークパターンを用いてシミュレーションすると、乾燥状態では両方の Packing 構造が、半々混在していること (図 9 挿図)、含水状態では S 構造が、60 % と増加することが分った。クモ牽引糸は非晶の割合が多いために、X 線解析を用いた場合、これらの Packing 構造の情報は全く得られない。この実験結果は、分子動力学 (MD) 計算によって再現することができた²⁰⁾。

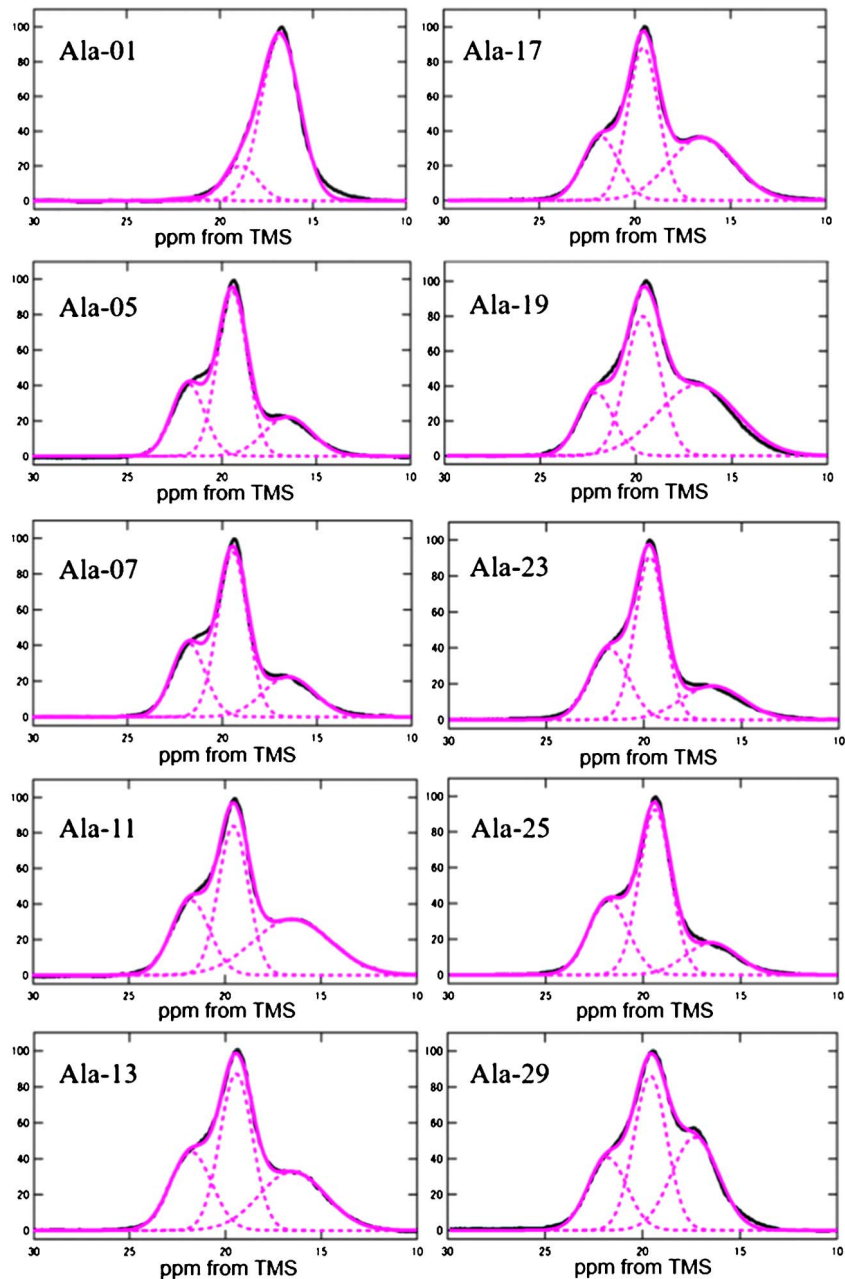


図7 [3-¹³C] Ala 残基の導入部位を系統的に変えて合成した 10 種類の (AGSGAG)₆ の ¹³C 固体 NMR スペクトル (Ala 残基のメチルピークを拡大)

ラベル部位は、各ピーク中の番号で表した、各 ¹³C Ala メチルピークについて、B, A, t の比を決定した。

6 クモ牽引糸の非晶部 (グリシンリッチ領域) の構造の決定

クモ牽引糸の Gly-rich 領域の代表的な連鎖の一次構造を有する 47 量体ペプチド (E)₄(A)₆GGAGQGGYG-GLGSQGAGRGGLGGQGAG (A)₆(E)₄ を合成し、Glu 連鎖を両端に導入して水溶性とし、pH を 4 に下げて沈殿させ、両端の (E)₄(A)₆ 部分を β シート構造として固体 NMR 解析を進めた (クモ糸の構造形成の機構を模倣)¹⁸⁾²¹⁾。一例として [1-¹³C] Gly [3-¹³C] Ala [2-¹³C]

Gly の連鎖単位を、Gly-rich 領域の異なる 3 か所に導入した 47 量体ペプチドを 3 種類合成、図 11 に、その ¹³C 固体 NMR スペクトルを示した。[1-¹³C] Gly [3-¹³C] Ala [2-¹³C] Gly の各 ¹³C ラベルピークのパターンは、47 量体中の導入部位によって、かなり異なることが分る。さらに、[1-¹³C] Gly を異なる位置に 7 か所に導入した 47 量体ペプチドのピークシミュレーションの結果を加え、Gly-rich 領域の ¹³C ラベル残基について、部位ごとにコンフォメーション分率を決定した²¹⁾。図 12 (a)にまとめたように、概して β シート構造を有する

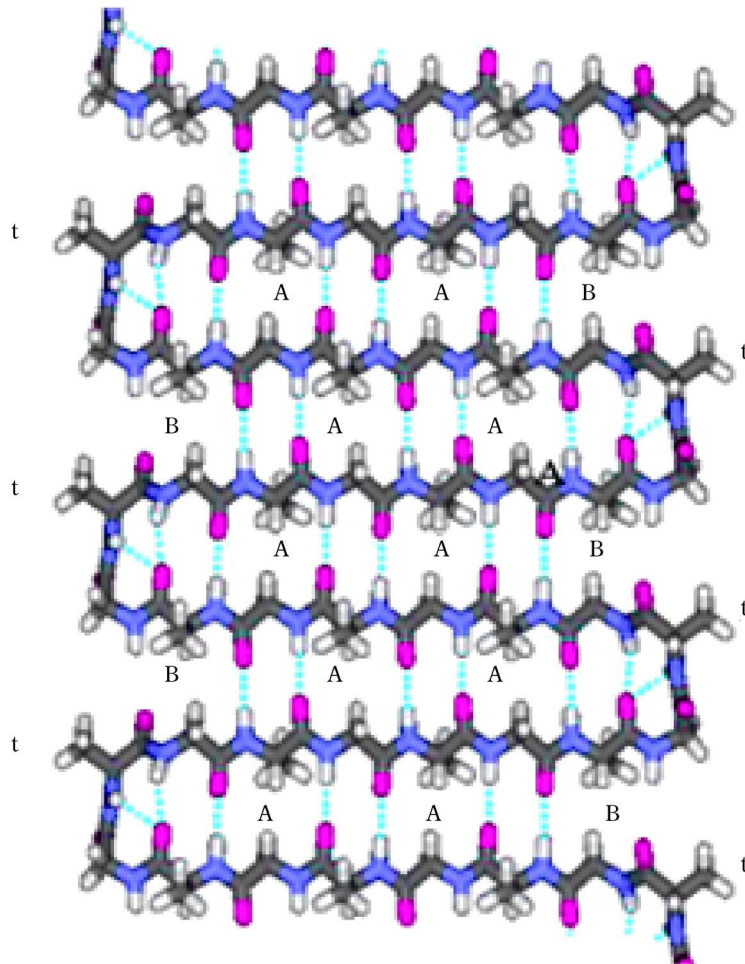


図8 家蚕絹結晶部の8残基周期のラメラ構造 (Silk II)
 (t) は、ゆがんだ β ターン構造, (A)と(B)は2種類の逆平行 β シート構造。B, A, tの比は1:2:1となる。

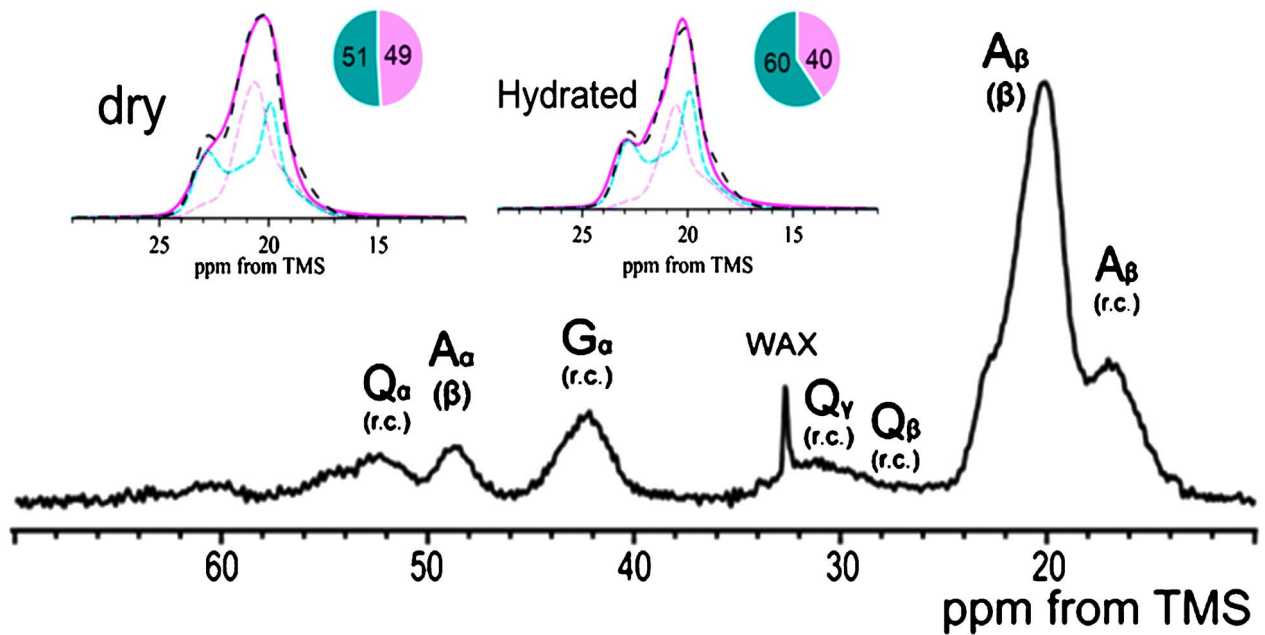


図9 $[3-^{13}\text{C}]$ Ala 女郎グモ糸牽引糸の ^{13}C 固体 NMR スペクトルとその帰属
 r.c. はランダムコイル, β は β シートピーク。AlaC β ピークから, β シートの割合が多いことが分る。さらに, AlaC β ピークにおいて, 高磁場のランダムコイル部分を引いた後の β シートのピークを, Rectangular Packing (赤色)と Staggered Packing (青色)から成るとしてピーク分離し, 割合を決定した(挿図)。乾燥状態では, 各 Packingの割合は同程度であるが, 含水状態では後者の方が20%多い。

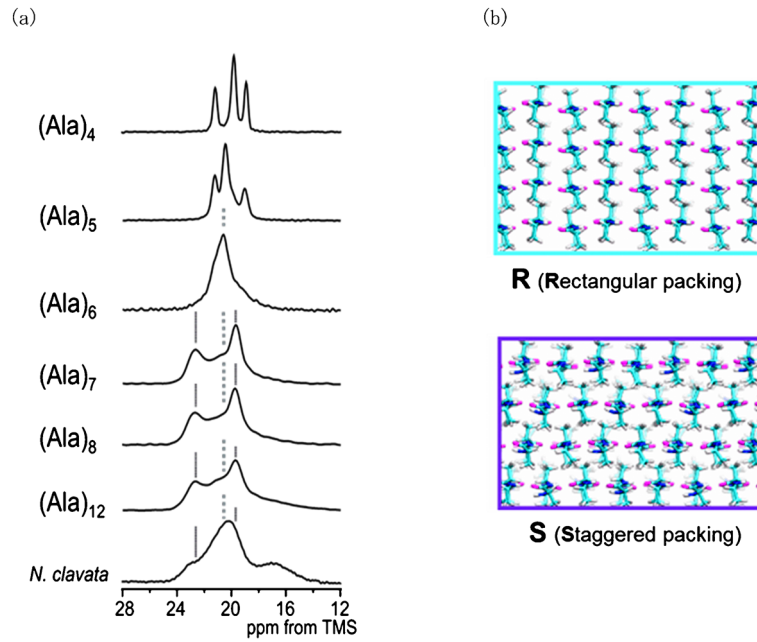


図 10 (a). $(\text{Ala})_n$ ($n=4-8, 12$) および $[3-^{13}\text{C}]$ 女郎グモ牽引糸の ^{13}C 固体 NMR スペクトル (Ala 残基のメチルピークを拡大)
 (b). **Rectangular Packing** (上) と **Staggered Packing** (下) 構造

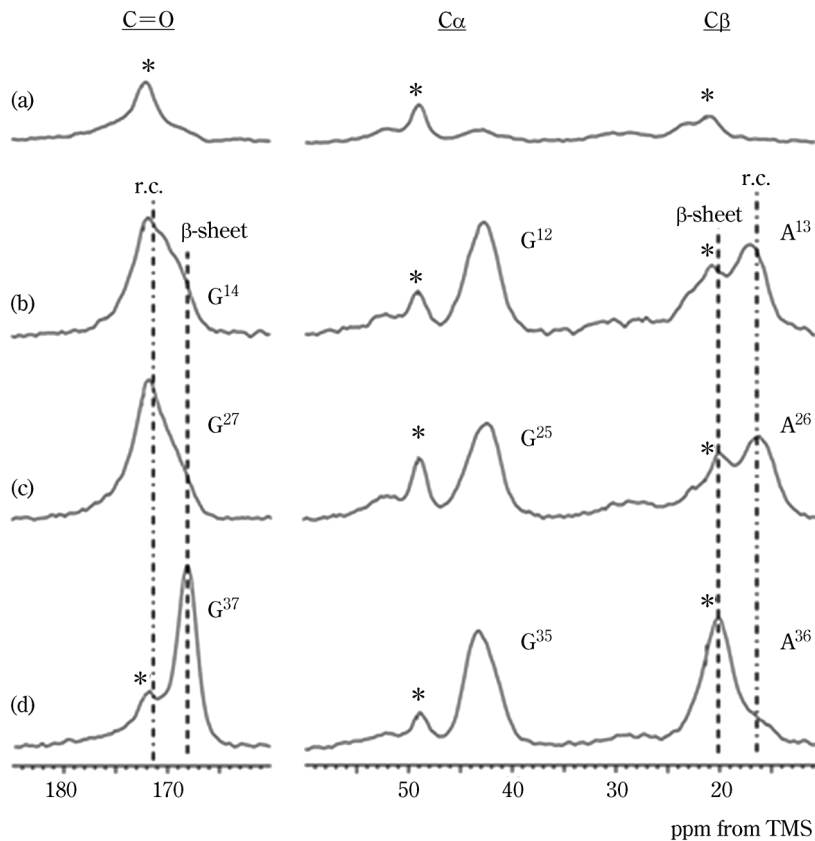


図 11 クモ牽引糸の **Gly-rich** 領域の代表的連鎖の一次構造を有する 47 量体ペプチド $(\text{E})_4(\text{A})_6\text{GGAGQGGYGGGLGSQGAGRRGGLGGQGAG}(\text{A})_6(\text{E})_4$ の ^{13}C 固体 NMR スペクトル
 (a) 47 量体ペプチドをラベルせず。
 (b) $[2-^{13}\text{C}] \text{Gly}^{12} [3-^{13}\text{C}] \text{Ala}^{13} [1-^{13}\text{C}] \text{Gly}^{14}$ -47 量体ペプチド。
 (c) $[2-^{13}\text{C}] \text{Gly}^{25} [3-^{13}\text{C}] \text{Ala}^{26} [1-^{13}\text{C}] \text{Gly}^{27}$ -47 量体ペプチド。
 (d) $[2-^{13}\text{C}] \text{Gly}^{35} [3-^{13}\text{C}] \text{Ala}^{36} [1-^{13}\text{C}] \text{Gly}^{37}$ -47 量体ペプチド。
 r.c. はランダムコイル, β は β シートピーク。* は、2 個の $(\text{Ala})_6$ 連鎖の $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ および $\text{C}=\text{O}$ ピーク。

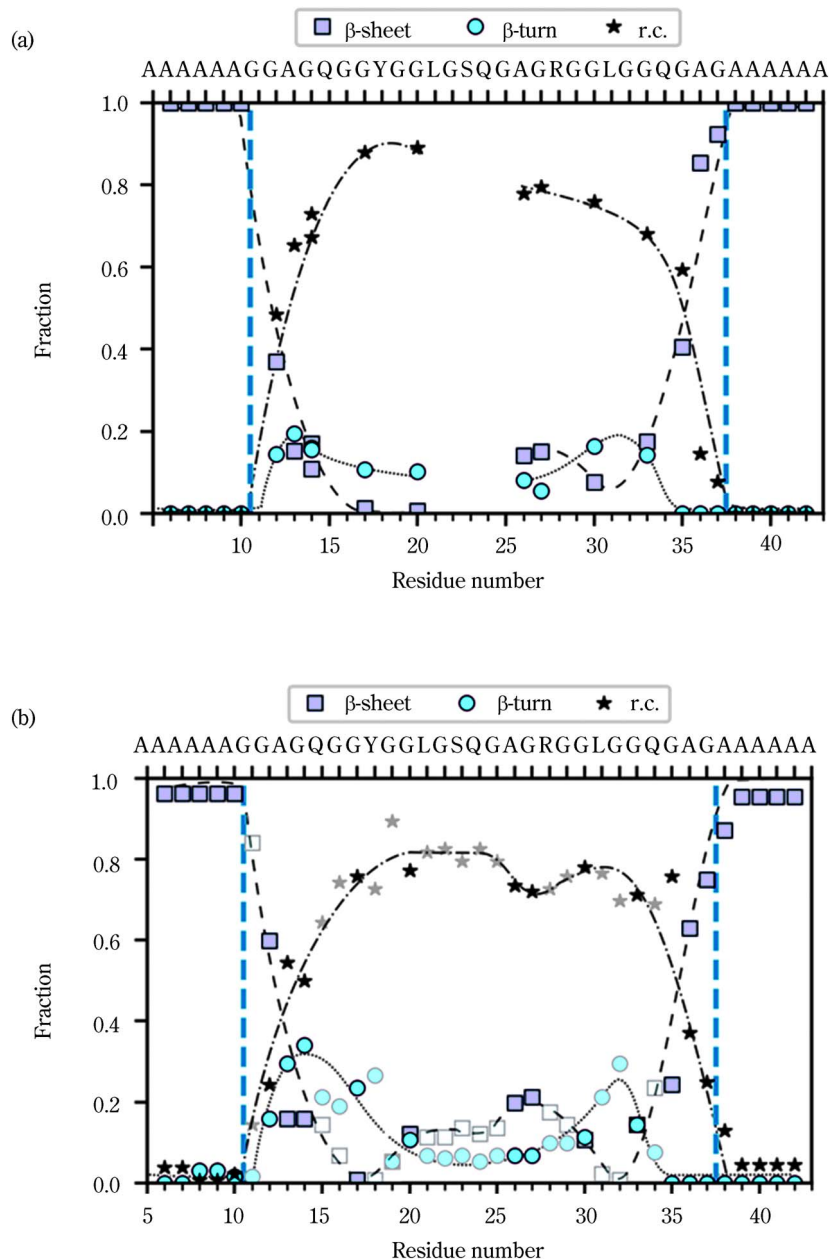


図 12 (a) クモ牽引糸の Gly-rich 領域の ^{13}C ラベル 47 量体ペプチド $(\text{E})_4(\text{A})_6\text{GGAGQGGYGGGLGSQGAGRGGLGGQGAG}(\text{A})_6(\text{E})_4$ の ^{13}C 固体 NMR スペクトルから決定した各残基部位毎のコンフォメーションの分率のプロット。(b) Gly-rich 領域の実験結果と同じ連鎖部位について、MD 計算によって決定した各残基部位ごとのコンフォメーションの分率のプロット
(b) の MD 計算によって、(a) のコンフォメーションの分率変化の実験結果が、よく再現されている。

PolyAla 領域の近傍の Gly 残基は、 β シートの割合が多く、中央の Gly 残基ほどランダムコイルの割合が多い。しかしながら、その割合の変化は一様ではなく、Gly-rich 領域のアミノ酸配列に依存して変化する。 β シートの割合も Gly-rich 域の N 端より C 端の方が明らかに多く、さらに β ターン構造も一定の割合で出現する。この実験結果の特徴は、MD 計算によって再現することができた (図 12 (b))²¹⁾。

7 今後の展望

筆者が絹と NMR をキーワードに研究を開始してから、早や、40 年経とうとしている。生きた蚕の溶液 NMR 測定が本研究のスタートであった。一晩のロック無しの積算で、体内の絹のスペクトルが見事に得られた時には、超電導 NMR 装置の進歩と威力に驚かされた。現在、生体中で蛋白質が機能している状態で、直接、高

分解能の溶液 NMR スペクトルが得られ、蛋白質の機能と構造や動的挙動との相関が活発に研究されてきている²²⁾。これは NMR 法の利点であり、今後、益々、*in situ* (その場) での研究が盛んになると思われる。一方、固体 NMR においては、超高速固体 NMR プローブ¹⁴⁾を用いた微量構造解析や動的核偏極 (DNP) を用いる高感度解析法²³⁾が開発され、絹の構造解析にも用いられてきた。今後、絹を含む材料の開発において重要な表面分析等に威力を発揮すると期待される。

今日、コンピューターの発達が目覚ましい。MD 計算等のプログラムを用いて、新たな材料の分子設計や改良に生かそうとする研究が今後益々盛んになると予想される。しかしながら、そのような計算を開始する前に、どのような構造モデルを設定するか計算結果は大きく依存する。また、計算結果が正しいかどうかを実験面から可能な限り検証することが必要である。今日用いられるほとんどの材料は、絹に限らず、結晶部と非晶部が共存する不均一構造である。固体 NMR 法は、そのような不均一構造を有する材料の構造や動的挙動の研究を原子座標レベルで行うことができ、計算結果の検証にも用いることができる。筆者らは、実際、クモ糸の構造に関する MD 計算と固体 NMR の解析結果がよく一致することを示し、それらを併用することの重要性を報告してきた^{19)~21)}。

また、このように分析化学から得られた情報を、いかに実用材料の創成に生かしていくかということが重要である。筆者らは、絹に関する構造解析の知見を生かして、小口径絹人工血管の開発を長年にわたって行っている²⁴⁾。特に、絹を含むバイオ材料は、一般に含水状態で用いられるので、含水状態での構造や動的挙動の知見は重要である。一般の分析手法は、乾燥状態での解析に限られることが多く、含水状態で原子レベルでの解析が可能な固体 NMR の手法は、バイオ材料の開発において貴重で重要な情報を与える。

文 献

- 1) T. Asakura, K. Okushita, M. P. Williamson : *Macromolecules*, **48**, 2345 (2015).
- 2) C.-Z. Zhou, F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z.-G. Li, J. Janin : *Proteins*, **44**, 119 (2001).
- 3) 清水正徳 : 蚕試報, **10**, 475 (1941).
- 4) O. Kratky, E. Schauenstein : *Discuss. Faraday Soc.*, **11**, 171 (1951).

- 5) R. E. Marsh, R. B. Corey, L. Pauling : *Biochim. Biophys. Acta.*, **16**, 1 (1955).
- 6) B. Lotz, F. C. Cesari : *Biochimie*, **61**, 205 (1979).
- 7) T. Asakura, H. Suzuki, Y. Watanabe : *Macromolecules*, **16**, 1024 (1983).
- 8) T. Asakura, Y. Sato, A. Aoki : *Macromolecules*, **48**, 5761 (2015).
- 9) T. Asakura, M. Iwadate, M. Demura, M.P. Williamson : *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 167 (1999).
- 10) T. Asakura, J. Ashida, T. Yamane, T. Kameda, Y. Nakazawa, K. Ohgo, K. Komatsu : *J. Mol. Biol.*, **306**, 291 (2001).
- 11) T. Asakura, K. Ohgo, K. Komatsu, M. Kanenari, K. Okuyama : *Macromolecules*, **38**, 7397 (2005).
- 12) S. A. Fossey, G. Némethy, K. D. Gibson, H. A. Scheraga : *Biopolymers*, **31**, 1529 (1991).
- 13) K. Okuyama, R. Somashekar, K. Noguchi, S. Ichimura : *Biopolymers*, **59**, 310 (2001).
- 14) T. Asakura, Y. Suzuki, K. Yazawa, A. Aoki, Y. Nishiyama, K. Nishimura, F. Suzuki, H. Kaji : *Macromolecules*, **46**, 8046 (2013).
- 15) T. Asakura, T. Ogawa, A. Naito, M.P. Williamson : *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 3974 (2020).
- 16) T. Asakura, A. Aoki, K. Komatsu, C. Ito, I. Suzuki, A. Naito, H. Kaji : *Biomacromolecules*, **21**, 3102 (2020).
- 17) 鈴木隆頌 : 高分子, **67**, 128 (2018).
- 18) Y. Tasei, A. Nishimura, Y.Y. Suzuki, T.K. Sato, J. Sugahara, T. Asakura : *Macromolecules*, **50**, 8117 (2017).
- 19) T. Asakura, Y. Tasei, A. Aoki, A. Nishimura : *Macromolecules*, **51**, 1058 (2018).
- 20) T. Asakura, A. Nishimura, A. Aoki, A. Naito : *Biomacromolecules*, **20**, 3884 (2019).
- 21) T. Asakura, A. Nishimura, Y. Tasei : *Macromolecules*, **51**, 3608 (2018).
- 22) 嶋田一夫 : 第 59 回 NMR 討論会講演要旨集, p.24 (2020).
- 23) H. C. Craig, S. J. Blamires, M.-A. Sani, M. M. Kasumovic, A. Rawal, J. M. Hook : *Chem. Commun.*, **55**, 4687 (2019).
- 24) T. Asakura, T. Tanaka, R. Tanaka : *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **5**, 5561 (2019).



朝倉哲郎 (Tetsuo ASAKURA)

東京農工大学 (〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16)。東京工業大学博士課程修了。工学博士。《現在の研究テーマ》絹の基礎と応用 (絹人工血管の開発)、高分子の NMR 構造解析。《主な著書》“広がる NMR の世界 : 40 人の研究者からの熱いメッセージ” (コロナ社)。《趣味》テニス、囲碁。
E-mail : asakura@cc.tuat.ac.jp