

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年3月19日(19.03.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/054873 A1

- (51) 国際特許分類:  
C08J 3/02 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
D01F 4/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/036241
- (22) 国際出願日: 2019年9月13日(13.09.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2018-172728 2018年9月14日(14.09.2018) JP
- (71) 出願人: S p i b e r 株式会社(SPIBER INC.)  
[JP/JP]; 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 Yamagata (JP).
- (72) 発明者: 工藤 久弘(KUDO Hisahiro); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 S p i b e r 株式会社内 Yamagata (JP). 石井 秀人 (ISHII Hideto); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 S p i b e r 株式会社

内 Yamagata (JP). 足達 龍輝(ADACHI Tatsuki); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 S p i b e r 株式会社内 Yamagata (JP). 岡田 亮二(OKADA Ryoji); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 S p i b e r 株式会社内 Yamagata (JP).

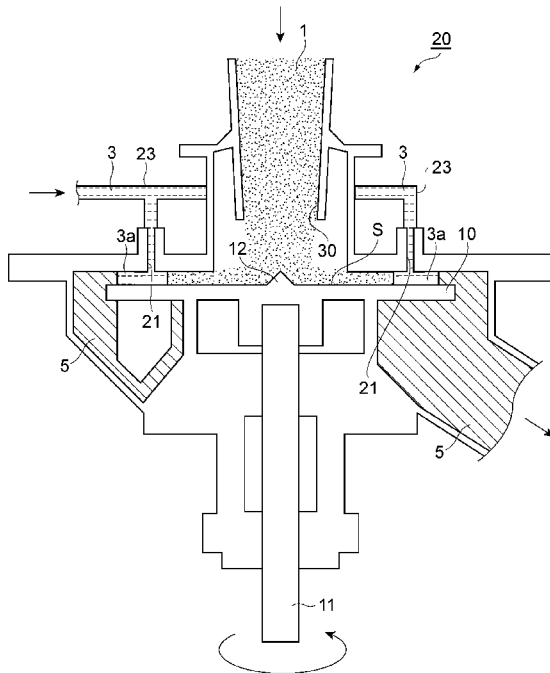
(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING FIBROIN SOLUTION AND METHOD FOR PRODUCING PROTEIN MOLDED BODY

(54) 発明の名称: フィブロイン溶液を製造する方法、及びタンパク質成形体を製造する方法

【図1】



(57) Abstract: Disclosed is a fibroin solution production method that comprises: a step for continuously introducing fibroin-containing protein powder into a thin film of a solvent-containing dissolving liquid, while causing the thin film to drift therein, so as to form a slurry comprising the dissolving liquid and the protein powder dispersed therein; and a step for forming a fibroin solution by causing the protein powder included in the slurry to be dissolved in the dissolving liquid.

(57) 要約: 溶媒を含有する溶解液の薄膜を流動させながら、該薄膜に、フィブロインを含むタンパク質粉体を連続的に導入し、それにより溶解液及び溶解液中に分散したタンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程と、スラリー中のタンパク質粉体を溶解液に溶解させることにより、フィブロイン溶液を形成する工程と、を備える、フィブロイン溶液を製造する方法が開示される。

WO 2020/054873 A1

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称：

フィブロイン溶液を製造する方法、及びタンパク質成形体を製造する方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、フィブロイン溶液を製造する方法、及びタンパク質成形体を製造する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子改変フィブロインは、石油資源を代替し得る素材としての利用が期待されている。例えば特許文献1では、遺伝子改変フィブロインを適切な溶媒に溶解し、得られたフィブロイン溶液を紡糸原液として用いて繊維を得る技術が提案されている。

[0003] ところで、ポリマー材料の溶液を製造する方法に関連して、例えば特許文献2は、アクリルニトリル系重合体が分散したスラリーを得た後、アクリルニトリル系重合体を溶解させる方法を教示している。特許文献2は、溶媒を冷却することによりアクリルニトリル系共重合体の溶解性を低減させることによって、継粉を抑制しながらスラリーを得ることも言及している。また、特許文献3では、アクリル繊維を製造するための紡糸溶液の調製方法に関連して、溶媒の溶解能力を低減させることが提案されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0004] 特許文献1：特開2014-129639号公報  
特許文献2：特開2015-078451号公報  
特許文献3：特開2015-132040号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0005] フィブロインを含む粉体を溶媒に分散させてスラリーを得た後、粉体を溶媒に溶解させる方法によって、高濃度のフィブロイン溶液を効率的に製造で

きることが期待される。しかし、その場合、スラリーを形成する工程における継粉の発生が問題となり得る。

[0006] しかし、フィブロイン溶液の製造において、スラリーを形成する工程における継粉の発生を十分に抑制する実用的な方法は、従来知られていなかった。フィブロインの場合、実用的に適用できる良溶媒はジメチルスルホキシド（DMSO）及びギ酸等の融点の高い溶媒に限られているため、特許文献2に言及される、溶媒の冷却による溶解性の制御による方法は、適用が困難である。また、貧溶媒の併用によって溶媒の溶解性を低下させると、ゲルが発生し易くなる傾向がある。貧溶媒を用いる場合、スラリーを形成した後、貧溶媒を含む溶媒にフィブロインを溶解させるために高温での加熱が必要となるという問題もある。高温での加熱を経ると、タンパク質成形体の物性が低下する可能性がある。

[0007] 本発明の一側面の目的は、良好な物性のタンパク質成形体を与え得るフィブロイン溶液を、スラリーの形成における継粉の発生を抑制しながら効率的に製造する方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明の一側面は、溶媒を含有する溶解液の薄膜を流動させながら、該薄膜にフィブロインを含むタンパク質粉体を連続的に導入し、それにより前記溶解液及び前記溶解液中に分散した前記タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程と、

前記スラリー中の前記タンパク質粉体を前記溶解液に溶解させることにより、フィブロイン溶液を得る工程と、を備える、フィブロイン溶液を製造する方法を提供する。

[0009] 本発明の別の側面は、上記方法によってフィブロイン溶液を得ることと、前記フィブロイン溶液を成形用原液として用いた成形によって、フィブロインを含有するタンパク質成形体を得ることと、を含む、タンパク質成形体を製造する方法を提供する。

### 発明の効果

[0010] 本発明の一側面に係る方法によれば、良好な物性のタンパク質成形体を与え得るフィブロイン溶液を、スラリーの形成における継粉の発生を抑制しながら、連続的且つ効率的に製造することができる。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程の一実施形態を示す模式図である。

[図2]タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程の一実施形態を示す模式図である。

[図3]タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程の一実施形態を示す模式図である。

[図4]スラリーからフィブロイン溶液を形成する工程の一実施形態を示す模式図である。

### 発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明のいくつかの実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0013] (フィブロイン溶液を製造する方法)

フィブロイン溶液を製造する方法の一実施形態は、溶解液の薄膜を流動させながら、該薄膜に、フィブロインを含むタンパク質粉体を連続的に導入し、それによりスラリーを形成する分散工程と、スラリー中のタンパク質粉体を溶解液に溶解させることにより、フィブロイン溶液を得る溶解工程とを備える。

[0014] 図1は、タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程（分散工程）の一実施形態を示す模式図である。図1に示す方法では、回転面Sを有する回転駆動可能な板状の回転体10を備えた混合装置20が用いられる。回転体10を回転させながら、タンパク質粉体1及び溶解液3が、それぞれ回転体10の回転面S上に供給される。溶解液3は回転面S上でその外周方向に向けて流下することにより、流動する薄膜3aを形成する。流動する薄膜3aとタンパク質粉体1とが回転面S上で混合される。その結果形成されるス

ラリー5は、溶解液及び溶解液中に分散したタンパク質粉体を含有する。図1では、便宜上、溶解液の薄膜3aとラリー5との明確な境界が示されている。ただし、タンパク質粉体が導入された薄膜3aは流動しながら徐々にラリー5を形成するため、通常、薄膜3aとラリー5との間に明確な境界が形成されることはない。

[0015] 回転体10は円盤状である。回転面Sは円形の平面である。回転面Sの中央部に、粉体の流動を制御する円錐形の制御部12が設けられている。ただし、回転体の形状はこれに限定されない。例えば回転面が円錐形であってもよい。その場合、通常、溶解液の薄膜は螺旋状に流動する。回転体が、円柱状であってもよい。回転面が任意の凹凸を形成していてもよい。図1の実施形態のように、円形の回転面S及び制御部12を有する円盤状の回転体10は、分散効率、処理効率及び装置のエネルギー消費の点で有利である。回転体10は、モーター等の駆動装置に接続されたシャフト11によって回転駆動される。回転体10の回転速度は、特に制限されないが、例えば50～1000rpmであってもよい。回転面Sの幅は、特に制限されないが、例えば50～1000mmであってもよい。

[0016] 図1の実施形態の場合、溶解液3は、回転面Sの近傍に設けられた2つの溶解液投入口21に接続された導入管23中を移動し、次いで溶解液投入口21から回転面Sに供給される。供給された溶解液3は、回転面S上で流動する薄膜3aを形成する。形成された溶解液3の薄膜3aに対して、回転面S上をその中央部から外周方向に向けて流動するタンパク質粉体1が直ちに合流する。これにより、流動している薄膜3aにタンパク質粉体1が導入される。流動している溶解液3の薄膜3aにタンパク質粉体1を導入することにより、タンパク質粉体1が特定の位置に集中することなく、速やかに均一に分散される。その結果、継粉の発生を抑制しながら、タンパク質粉体1を効率的に溶解液3中に分散させることができる。

[0017] 溶解液3は、フィブロインを溶解する溶媒を含有する。汎用のポンプで溶解液3を送液しながら、その流量を計測し制御してもよい。流量の変動を抑

制するという観点からは、定量ポンプによって溶解液3を連続的に供給してもよい。定量ポンプの例としては、ギヤポンプ、及び一軸偏心ねじポンプが挙げられる。流量の制御精度の点からは、ギヤポンプがより優れている。溶解液3の流量は、例えば1～3000kg/時であってもよい。

[0018] 溶解液3中の溶媒は、例えば、ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）、ヘキサフルオロアセトン（HFA）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N，N-ジメチルホルムアミド（DMF）、及びギ酸からなる群より選ばれる少なくとも1種を含んでもよい。フィブロインの溶解性の観点から、溶媒は、ジメチルスルホキシド、ギ酸、ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）、又は、これらの組み合わせを含む混合溶媒であってもよい。

[0019] 溶解液3は、溶媒に溶解した1種又は2種以上の無機塩を更に含有してもよい。無機塩によってフィブロインの溶解を促進することができる。無機塩は、例えば、以下に示すルイス酸とルイス塩基とからなる無機塩であってもよい。ルイス塩基の例としては、オキソ酸イオン（硝酸イオン、過塩素酸イオン等）、金属オキソ酸イオン（過マンガン酸イオン等）、ハロゲン化物イオン、チオシアン酸イオン、及びシアン酸イオンが挙げられる。ルイス酸の例としては、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン等の金属イオン、アンモニウムイオン等の多原子イオン、及び錯イオンが挙げられる。

[0020] 無機塩の具体例としては、塩化リチウム、臭化リチウム、ヨウ化リチウム、硝酸リチウム、過塩素酸リチウム、及びチオシアン酸リチウム等のリチウム塩、塩化カルシウム、臭化カルシウム、ヨウ化カルシウム、硝酸カルシウム、過塩素酸カルシウム、及びチオシアン酸カルシウム等のカルシウム塩、塩化鉄、臭化鉄、ヨウ化鉄、硝酸鉄、過塩素酸鉄、及びチオシアン酸鉄等の鉄塩、塩化アルミニウム、臭化アルミニウム、ヨウ化アルミニウム、硝酸アルミニウム、過塩素酸アルミニウム、及びチオシアン酸アルミニウム等のアルミニウム塩、塩化カリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、硝酸カリウム、過塩素酸カリウム、及びチオシアン酸カリウム等のカリウム塩、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、過塩素酸

ナトリウム、及びチオシアン酸ナトリウム等のナトリウム塩、塩化亜鉛、臭化亜鉛、ヨウ化亜鉛、硝酸亜鉛、過塩素酸亜鉛、及びチオシアン酸亜鉛等の亜鉛塩、塩化マグネシウム、臭化マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、硝酸マグネシウム、過塩素酸マグネシウム、及びチオシアン酸マグネシウム等のマグネシウム塩、塩化バリウム、臭化バリウム、ヨウ化バリウム、硝酸バリウム、過塩素酸バリウム、及びチオシアン酸バリウム等のバリウム塩、並びに、塩化ストロンチウム、臭化ストロンチウム、ヨウ化ストロンチウム、硝酸ストロンチウム、過塩素酸ストロンチウム、及びチオシアン酸ストロンチウム等のストロンチウム塩が挙げられる。無機塩は、塩化リチウム、塩化カルシウム又はこれらの組み合わせであってよい。

[0021] 無機塩の含有量は、溶解液の全質量に対して、0.1質量%以上、1質量%以上、4質量%以上、7質量%以上、10質量%以上、又は15質量%以上であってよく、20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってよい。無機塩の含有量は、溶解液の全質量に対して、0.1質量%以上で20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってもよく、1質量%以上で20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってもよく、4質量%以上で20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってもよく、7質量%以上で20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってもよく、10質量%以上で20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってもよく、15質量%以上で20質量%以下、16質量%以下、12質量%以下、又は9質量%以下であってもよい。

[0022] タンパク質粉体1は、例えばフィーダーにより、回転面Sの上方に設けられた粉体投入口30から回転面Sの中央部に向けて連続的に供給される。これにより、溶解液で濡れた部分に接触することなく、タンパク質粉体1が溶解液3の薄膜に導入される。溶解液の薄膜に導入される前のタンパク質粉体が回転体上で少量の溶解液と接触すると、タンパク質粉体が回転体等に付着

し、これが連続的な分散の妨げとなる可能性がある。

[0023] タンパク質粉体 1 を供給するためのフィーダーは、定量フィーダーであってもよい。定量フィーダーを用いることにより、フィブロインの濃度が安定したフィブロイン溶液が得られ易い。フィブロインの濃度の変動は、タンパク質繊維等のタンパク質成形体の品質に顕著に影響し得る。タンパク質粉体 1 の供給速度は、例えば 1 ~ 1000 kg / 時であってもよい。

[0024] タンパク質粉体 1 を構成する個別の一次粒子の形状は、特に限定されない。一次粒子が粒状物であってもよい。一次粒子の粒子径が小さいと、継粉が発生しやすい傾向があるが、その場合でも、本実施形態によれば継粉の発生を抑制することができる。

[0025] スラリー 5 が形成される過程で熱が発生することがある。そのため、混合装置を冷却してもよいし、供給される溶解液 3 を予め冷却してもよい。混合装置は、例えば装置を囲むジャケットにより冷却することができる。ジャケット及び溶媒の冷却温度は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以上 $30^{\circ}\text{C}$ 以下、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以上 $20^{\circ}\text{C}$ 以下、 $0^{\circ}\text{C}$ 以上 $15^{\circ}\text{C}$ 以下、又は $5^{\circ}\text{C}$ 以上 $10^{\circ}\text{C}$ 以下であってもよい。

[0026] 図 2 は、タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程（分散工程）の他の一実施形態を示す模式図である。図 2 に示す混合装置 20 は、回転面 S の上方に設けられた環状の滞留槽 25 を有する。滞留槽 25 は、回転面 S と対向する底面 25 A と、回転面 S の中央部の上方に開口を形成する内周面 25 B とを有する。溶解液 3 は、滞留槽 25 内で滞留した後、内周面 25 B の上部から内周面 25 B 上を薄膜 3 a を形成しながら流下し、内周面 25 B の下部で回転面 S 上に供給される。タンパク質粉体 1 が、回転面 S の上方に設けられた粉体投入口 30 から回転面 S の中央部に向けて連続的に供給され、回転面 S 上の内周面 25 B の下部の位置で溶解液 3 の薄膜と合流する。

[0027] 図 3 も、タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程（分散工程）の他の一実施形態を示す模式図である。図 3 に示す混合装置 20 は、回転面 S の上方に設けられた環状の滞留槽 25 を有する。滞留槽 25 は、回転面 S と対向する底面 25 A と、回転面 S の中央部の上方に開口を形成する内周面

25Bとを有する。溶解液3は、滞留槽25内で滞留した後、内周面25Bの上部から内周面25B上を薄膜3aを形成しながら流下し、内周面25Bの下部で回転面S上に供給される。

[0028] 図3の混合装置20は、回転面Sの中央部から粉体投入口30に向けて延びた柱状部15を更に有している。柱状部15の先端に、タンパク質粉体1の流動を制御する円錐形の制御部12が設けられている。タンパク質粉体1は、粉体投入口30から制御部12に向けて連続的に供給される。制御部12によって方向を変えて流動するタンパク質粉体1が、内周面25B上を流動する、回転面S上に到達する前の薄膜3aに合流する。これにより、タンパク質粉体1が溶解液3の回転面S上の薄膜3aに導入される。

[0029] 図2及び図3の実施形態のその他の構成は、図1の実施形態と同様である。

[0030] 以上例示した方法に用いられる混合装置の例としては、株式会社粉研パウテックス製のフロージェットミキサー（型式MW-J-300）がある。

[0031] 図4は、スラリーからフィブロイン溶液を形成する工程（溶解工程）の一実施形態を示す模式図である。図4に示されるインラインミキサー40は、配管41と、配管41の内部に收容されたスタティックミキサーエレメント43と、配管41の外周面を覆うジャケット45とを有する。ジャケット45は、熱媒入口45a及び熱媒出口45bを有している。所定の温度に加熱された熱媒が熱媒入口45aから熱媒出口45bにかけて流動する。これにより、インラインミキサー40を通過するスラリー5が加熱される。

[0032] スラリー5は、配管41の一方の端部から導入され、配管41内でスタティックミキサーエレメント43によって攪拌されるとともに、ジャケット45から伝わる熱によって加熱される。これにより、スラリー5中のタンパク質粉体が溶解液に溶解して、フィブロイン溶液7が形成される。形成されたフィブロイン溶液7が配管41の他方の端部から排出される。

[0033] ジャケット45に導入される熱媒の温度（加熱温度）は、インラインミキサーから排出されるフィブロイン溶液が目的の温度に到達するように調整さ

れる。インラインミキサー40から排出されるフィブロイン溶液7の温度は、20℃以上120℃以下、30℃以上100℃以下、40℃以上90℃以下、又は50℃以上80℃以下であってもよい。この温度が20℃未満であると、未溶解のフィブロインが多く残る傾向がある。この温度が120℃を越えると、フィブロインが熱分解する可能性がある。

[0034] インラインミキサー40の配管41の内径及び長さ、並びに、スタティックミキサーエレメント43の数は、タンパク質粉体が溶解液に良好に溶解するように、選択される。スラリー5が配管41を通過する時間、すなわち溶解時間は、10秒以上300秒以下、は20秒以上200秒以下、30秒以上120秒以下、又は40秒以上90秒であってもよい。溶解時間が10秒以上であると、タンパク質粉体を十分に溶解し易い。300秒の溶解時間は、十分な溶解のために通常十分である。過剰に長い溶解時間は、不必要に巨大な装置を必要とする。

[0035] スラリー中のタンパク質粉体を溶解液に溶解させる方法は、図4に例示されるインラインミキサーを用いる方法に限定されない。例えば、攪拌槽内での加熱、溶媒の追加、混合溶媒の使用、塩の添加、又はこれらの組み合わせによって、タンパク質粉体を溶解液に溶解させてもよい。

[0036] フィブロイン溶液を製造する方法は、フィブロイン溶液を濾過することにより、不溶物を除去する工程を更に備えていてもよい。溶解工程のインラインミキサーから排出されたフィブロイン溶液を、インラインミキサーの下流に設けられたフィルターによって濾過してもよい。フィブロイン溶液を、その温度が高い間に濾過すると、溶液の粘度が低いために圧力損失が少ない。

[0037] フィブロイン溶液を製造する方法は、フィブロイン溶液を脱泡する工程を更に備えていてもよい。溶解工程のインラインミキサーから排出されたフィブロイン溶液を、インラインミキサーの下流に設けられた脱泡装置によって脱泡してもよい。フィブロイン溶液を、その温度が高い間に濾過すると、溶液の粘度が低いために気泡の移動速度が大きい。脱泡の方法の例としては、密閉容器の内部にフィブロイン溶液を封入し、密閉容器を減圧する方法、フ

フィブロイン溶液を減圧下で薄膜状にする方法、及び、遠心力により気液分離する方法が挙げられる。

[0038] フィブロイン溶液を製造する方法は、フィブロイン溶液を、インラインミキサーで攪拌しながら冷却する工程を更に備えていてもよい。フィブロイン溶液を製造する方法がフィブロイン溶液から不溶物を除去する工程、及び／又はフィブロイン溶液を脱泡する工程を含む場合、これら工程の後、フィブロイン溶液を冷却してもよい。冷却後のフィブロイン溶液の温度は、0℃以上40℃以下であってもよい。フィブロイン溶液の粘度は、温度の依存して大きく変化するが、その温度が10℃以上であれば、フィブロイン溶液を容易に送液できる傾向がある。フィブロイン溶液の温度が40℃以下であれば、フィブロイン溶液が長時間保持されたときであっても、フィブロインの分解が十分に抑制され易い。フィブロインの分解が抑制されると、より優れた物性を有するタンパク質成形体を得られる。同様の観点から、冷却後のフィブロイン溶液の温度は、5℃以上30℃以下、10℃以上25℃以下、又は15℃以上20℃以下であってもよい。

[0039] 製造されるフィブロイン溶液におけるフィブロインの濃度は、特に制限されないが、例えば、フィブロイン溶液の質量を基準として、5～50質量%、10～50質量%、20～50質量%、又は25～50質量%であってもよい。フィブロインを高い濃度で含有するフィブロイン溶液は、より高い曳糸性を有することができ、また、タンパク質成形体としての繊維を形成する場合に、より高い延伸倍率による延伸を可能にする。高い延伸倍率は、高い強度の繊維を得ることを可能にする。本実施形態に係る方法によれば、継粉の発生及び溶け残りの量が少ないため、高い濃度のフィブロイン溶液を容易に得ることができる。製造されたフィブロイン溶液は、そのまま成形工程に供してもよいし、貯蔵タンクに貯蔵してもよい。

[0040] (タンパク質成形体を製造する方法)

上述の実施形態に係る方法によって得られたフィブロイン溶液を成形用原液として用いた成形によって、フィブロインを含有するタンパク質成形体を

製造することができる。製造されるタンパク質成形体は、例えば、フィルム又は繊維であることができる。

[0041] 製造されるタンパク質成形体は、フィブロインを主成分として含む成形体である。タンパク質成形体の全質量のうちフィブロインの割合は、50質量%以上、60質量%以上、65質量%以上、70質量%以上、75質量%以上、80質量%以上、又は90質量%以上であってもよく、100質量%以下であってもよい。

[0042] フィブロイン溶液を紡糸原液として用いた紡糸によって、タンパク質繊維を製造することができる。以下、成形工程の一例としての紡糸工程について説明する。

[0043] 紡糸原液としてのフィブロイン溶液は、必要に応じて、各種の添加剤を更に含有してよい。添加剤としては、例えば、可塑剤、レベリング剤、架橋剤、結晶核剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、着色剤、フィラー、合成樹脂が挙げられる。添加剤の含有量は、紡糸原液中のフィブロイン全量100質量部に対して、0質量部以上50質量部以下であってよい。

[0044] 紡糸工程では、フィブロイン溶液が紡糸口金から吐出され、次いでフィブロイン溶液の溶媒を除去することで繊維形状に賦形される。フィブロイン溶液は、貯蔵タンクから定量ポンプで紡糸口金へ送液してもよい。紡糸口金の形状、ホール形状、ホール数などは特に限定されるものではなく、所望の繊維径及びフィラメント数に応じて適宜選択できる。

[0045] 紡糸口金のホール形状が円形である場合、その孔径は0.03mm以上0.6mm以下であってもよい。孔径が0.03mm以上であると、圧力損失を低減することができ設備費用を抑えられる。孔径が0.6mm以下であると、繊維径を細くするための延伸操作の必要性が低減され、吐出から引き取りまでの間で延伸切れを起こす可能性を低減できる。

[0046] 紡糸口金を通過するフィブロイン溶液の温度、及び紡糸口金の温度は、特に限定されるものではなく、フィブロイン溶液中のフィブロインの濃度及び粘度、溶媒の種類等により適宜調整される。紡糸口金を通過するフィブロイ

ン溶液の温度は、フィブロインの劣化等を防止するという観点から、0℃～70℃であってもよい。紡糸口金を通過するフィブロイン溶液の温度は、溶媒の揮発による圧力上昇、紡糸原液の固形化による配管内の閉塞が発生する可能性を低減するという観点から、溶媒の沸点未満の温度であってもよい。これにより工程安定性が向上する。

[0047] 紡糸口金から吐出されたフィブロイン溶液の溶媒を除去する方法は、特に限定されない。例えば、気相中で熱風により溶媒を揮発させてもよい。フィブロインを溶解せず、且つフィブロイン溶液の溶媒と混合しうる貧溶媒を含む液相中で溶媒を除去してもよい。液相中でフィブロイン溶液から溶媒を除去する場合、フィブロイン溶液を、紡糸口金から気相を経て液相中に吐出してもよいし、気相を経ずに液相中に直接吐出してもよい。

[0048] 溶媒の除去により形成された繊維を、延伸してもよい。延伸倍率は、形成された繊維を最初に引き取るローラーを通過する時点を基準として、2倍以上で30倍以下、15倍以下又は10倍以下であってもよく、3倍以上で30倍以下、15倍以下又は10倍以下であってもよく、4倍以上で30倍以下、15倍以下又は10倍以下であってもよく、4倍以上で30倍以下、15倍以下又は10倍以下であってもよく、5倍以上で30倍以下、15倍以下又は10倍以下であってもよく、6倍以上で30倍以下、15倍以下又は10倍以下であってもよい。本実施形態に係る方法によって、継粉の発生を抑制しながら形成されるフィブロイン溶液は、より高い延伸倍率での紡糸を可能にする傾向がある。延伸倍率は、所望の繊維の太さ、機械物性などの特性が得られる範囲で、調整される。延伸は一度に行なってもよいし、段階的に数回に分けて行なってもよい。延伸を液中で行なってもよく、乾燥後に行なってもよい。

[0049] 形成されたタンパク質繊維に対して、乾燥及び巻き取りの前に、必要に応じて収束性、帯電抑制、潤滑性を付与するための油剤を付与してもよい。付与する油剤の種類及び付与する量等は、特に限定されるものではなく、繊維の用途及び取扱い性等を考慮して適宜調整することができる。

- [0050] 形成されたタンパク質繊維は、通常の方法で乾燥される。その後、タンパク質繊維はワインダーで巻取ってもよい。ワインダーでの適宜張力及び接圧等の巻取り条件は、任意に調整される。
- [0051] フィブロインフィルムは、例えば、フィブロイン溶液をドープ溶液として用い、これを基材表面にキャスト成形することと、形成された塗膜を乾燥する、及び／又は脱溶媒することを含む方法により得ることができる。
- [0052] フィブロインフィルムを製造するためのドープ溶液の粘度は15～80 cP（センチポアズ）、又は20～70 cPであってもよい。フィブロインの濃度は、ドープ溶液全量を100質量%として、3～50質量%、3.5～35質量%、又は4.2～15.8質量%であってもよい。
- [0053] 基材は、樹脂基板、ガラス基板、金属基板等であってもよい。基材は、形成されたフィルムを容易に剥離できる観点から、樹脂基板であってもよい。樹脂基板は、例えば、ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム、ポリテトラフルオロエチレン等のフッ素樹脂フィルム、ポリプロピレン（PP）フィルム、又はこれらのフィルム表面にシリコン化合物を固定化させた剥離フィルムであってもよい。基材は、HFIP、DMSO溶媒等に対して安定であり、ドープ溶液を安定してキャスト成形でき、成形後のフィルムを容易に剥離できる観点から、PETフィルム又はPETフィルム表面にシリコン化合物を固定化させた剥離フィルムであってもよい。
- [0054] キャスト成形の一例は、ドープ液を基材表面に流延することと、塗膜の厚さをアプリケーション、ナイフコーター、バーコーター等の膜厚制御手段を使用して所定の厚さに調整することを含む。所定の厚さは、塗膜の乾燥及び／又は脱溶媒後の厚さが、例えば1～1000 μmとなる範囲で設定される。
- [0055] 塗膜の乾燥及び脱溶媒は、乾式又は湿式で行うことができる。乾式で行う方法の例としては、真空乾燥、熱風乾燥、風乾を挙げることができる。湿式で行う方法の例としては、塗膜を脱溶媒液に浸漬する方法を挙げることができる。脱溶媒液の例として、水、メタノール、エタノール、2-プロパノール

ル等の炭素数 1～5 の低級アルコール等のアルコール液、水とアルコールとの混合液を挙げることができる。脱溶媒液の温度は 0～90℃であってもよい。

[0056] 乾燥及び／又は脱溶媒後、形成されたフィブロインフィルムを、水中で 1 軸延伸又は 2 軸延伸してもよい。2 軸延伸は、逐次延伸でも同時 2 軸延伸でもよい。2 段以上の多段延伸をしてもよい。延伸倍率は、縦、横ともに、1.01～6 倍、又は 1.05～4 倍であってもよい。この範囲であると応力-歪のバランスがとりやすい。水中延伸は、例えば 20～90℃の水温で行うことができる。延伸後のフィブロインフィルムを、50～200℃で 5～600 秒間の乾熱処理により、熱固定してもよい。この熱固定により、常温における寸法安定性に優れたフィブロインフィルムが得られる。通常、1 軸延伸したフィルムは、1 軸配向フィルムとなり、2 軸延伸したフィルムは 2 軸配向フィルムとなる。

[0057] (フィブロイン)

フィブロイン溶液及びタンパク質成形体の製造のために用いられるフィブロインは、天然フィブロインであってもよいし、天然フィブロインに由来する改変フィブロインであってもよい。フィブロインは、遺伝子組換え技術により微生物等により製造されたものであってもよく、化学的に合成されたものであってもよく、天然由来のフィブロインを精製したものであってもよい。

[0058] フィブロインは、例えば、絹フィブロイン、クモ糸フィブロイン、及びホーネットシルクフィブロインからなる群より選択される 1 種以上であってもよい。特に、フィブロインは、絹フィブロイン、クモ糸フィブロイン又はこれらの組み合わせであってもよい。絹フィブロインとクモ糸フィブロインとを併用する場合、絹フィブロインの割合は、例えば、クモ糸フィブロイン 100 質量部に対して、40 質量部以下、30 質量部以下、又は 10 質量部以下であってもよい。

[0059] 絹フィブロインとしては、セリシン除去絹フィブロイン、セリシン未除去

絹フィブロイン、又はこれらの組み合わせであってもよい。セリシン除去絹フィブロインは、絹フィブロインを覆うセリシン、及びその他の脂肪分などを除去して精製したものである。精製した絹フィブロインは、凍結乾燥粉末であってもよい。セリシン未除去絹フィブロインは、セリシンなどが除去されていない未精製の絹フィブロインである。

[0060] クモ糸フィブロインは、天然クモ糸フィブロイン、又は天然クモ糸フィブロインに由来する改変クモ糸フィブロイン（人造クモ糸フィブロイン）であってもよい。

[0061] 天然クモ糸フィブロインとしては、例えば、大吐糸管しおり糸タンパク質、横糸タンパク質、及び小瓶状腺タンパク質が挙げられる。大吐糸管しおり糸タンパク質は、結晶領域と非晶領域（無定形領域とも言う。）からなる繰り返し領域を持つため、高い応力と伸縮性を併せ持つ。一方、横糸タンパク質は、結晶領域を持たず、非晶領域からなる繰り返し領域を持つという特徴を有する。横糸タンパク質は、大吐糸管しおり糸タンパク質と比べると応力は劣るが、高い伸縮性を持つ。

[0062] 大吐糸管しおり糸タンパク質は、クモの大瓶状腺で産生され、強靱性に優れるという特徴も有する。大吐糸管しおり糸タンパク質としては、例えば、アメリカジョロウグモ（*Nephila clavipes*）に由来する大瓶状腺スピドロインMaSp1及びMaSp2、並びにニワオニグモ（*Araneus diadematus*）に由来するADF3及びADF4が挙げられる。ADF3は、ニワオニグモの2つの主要なしおり糸タンパク質の一つである。天然クモ糸フィブロインに由来する改変クモ糸フィブロインは、これらのしおり糸タンパク質に由来する改変クモ糸フィブロインであってもよい。ADF3に由来する改変クモ糸フィブロインは、比較的合成し易く、強伸度及びタフネスの点で優れた特性を有する。

[0063] 横糸タンパク質は、クモの鞭毛状腺（*flagelliform gland*）で産生される。横糸タンパク質としては、例えばアメリカジョロウグモ（*Nephila clavipes*）に由来する鞭毛状絹タンパク質（

flagelliform silk protein) が挙げられる。

[0064] 改変クモ糸フィブロインは、組換えクモ糸フィブロインであってよい。組換えクモ糸フィブロインとしては、天然型クモ糸フィブロインの変異体、類似体又は誘導体等が挙げられる。このような改変クモ糸フィブロインの好適な一例は、大吐糸管しおり糸タンパク質の組換えクモ糸フィブロインである。例えば、組換えクモ糸フィブロインは、いくつかの異種タンパク質生産系で産生されており、その製造方法として、トランスジェニック・ヤギ、トランスジェニック・カイコ、又は組換え植物若しくは哺乳類細胞が利用されている。

[0065] 組換えクモ糸フィブロインは、例えば、クローニングした天然由来のフィブロインの遺伝子配列から  $(A)_n$  モチーフをコードする配列の1又は複数を欠失させることにより得ることができる。また、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から1又は複数の  $(A)_n$  モチーフが欠失したことに相当するアミノ酸配列を設計し、設計したアミノ酸配列をコードする核酸を化学合成することにより得ることもできる。いずれの場合においても、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から  $(A)_n$  モチーフが欠失したことに相当する改変に加え、更に1又は複数のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入及び／又は付加したことに相当するアミノ酸配列の改変を行ってもよい。アミノ酸残基の置換、欠失、挿入及び／又は付加は、部分特異的突然変異誘発法等の当業者に周知の方法により行うことができる。具体的には、Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982)、Methods in Enzymology, 100, 448 (1983)等の文献に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0066] 大吐糸管しおり糸タンパク質の組換えクモ糸フィブロイン及びカイコシルクに由来する改変クモ糸フィブロインとしては、例えば、式1： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質が挙げられる。ここで、式1中、 $(A)_n$ モチーフは、Aはアラニン残基を示し、nは2~27、2~20、4~27、4~20、8~20、10~20、4~16、8

～16、又は10～16の整数であってよい。また(A)<sub>n</sub>モチーフ中の全アミノ酸残基数に対するアラニン残基数の割合は40%以上であればよく、60%以上、70%以上、80%以上、83%以上、85%以上、86%以上、90%以上、95%以上、又は100%（アラニン残基のみで構成されることを意味する。）であってもよい。REPは2～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは2～300の整数を示す。式1で表されるアミノ酸配列中に含まれるグリシン(Gly)、セリン(Ser)及びアラニン(Ala)の合計残基数がアミノ酸残基数全体に対して40%以上が好ましく、60%以上、又は70%以上であってよい。複数存在する(A)<sub>n</sub>モチーフは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。複数存在するREPは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。大吐糸管しおり糸に由来する改変クモ糸フィブロインの具体例としては、配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質を挙げることができる。

[0067] 横糸タンパク質に由来するフィブロインとしては、例えば、式2：[REP2]。で表されるドメイン配列を含むタンパク質（ここで、式2中、REP2はGly-Pro-Gly-Gly-Xから構成されるアミノ酸配列を示し、Xはアラニン(Ala)、セリン(Ser)、チロシン(Tyr)及びバリン(Val)からなる群から選ばれる一つのアミノ酸を示す。oは8～300の整数を示す。）を挙げることができる。横糸タンパク質に由来するフィブロインとしては、式2：REP2で示されるアミノ酸配列の単位を10以上、好ましくは20以上、より好ましくは30以上含むタンパク質が挙げられる。横糸タンパク質に由来するフィブロインは、大腸菌等の微生物を宿主とした組み換えタンパク質生産を行う場合、生産性の観点から、分子量が500kDa以下、300kDa以下、又は200kDa以下であってもよい。具体的には配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質を挙げることができる。配列番号3で示されるアミノ酸配列は、NCBIデータベースから入手したアメリカジョロウグモの鞭毛状絹タンパク質の部分的な

配列（NCBIアクセッション番号：AAF36090、GI：7106224）のリピート部分及びモチーフに該当するN末端から1220残基目から1659残基目までのアミノ酸配列（PR1配列と記す。）と、NCBIデータベースから入手したアメリカジョロウグモの鞭毛状絹タンパク質の部分配列（NCBIアクセッション番号：AAC38847、GI：2833649）のC末端から816残基目から907残基目までのC末端アミノ酸配列を結合し、結合した配列のN末端に配列番号4で示されるアミノ酸配列（タグ配列及びヒンジ配列）が付加されたものである。

[0068] フィブロインは、例えば、所望のタンパク質をコードする核酸配列と、当該核酸配列に作動可能に連結された1又は複数の調節配列とを有する発現ベクターで形質転換された宿主により、当該核酸を発現させることにより生産することができる。

[0069] 所望のフィブロインをコードする核酸の製造方法は、特に制限されない。例えば、天然フィブロインをコードする遺伝子を利用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などで増幅しクローニングする方法、又は、化学的に合成する方法によって、当該核酸を製造することができる。核酸の化学的な合成方法も特に制限されず、例えば、NCBIのウェブデータベースなどより入手した構造タンパク質のアミノ酸配列情報をもとに、AKTA oligo pilot plus 10/100（GEヘルスケア・ジャパン株式会社）などで自動合成したオリゴヌクレオチドをPCRなどで連結する方法によって遺伝子を化学的に合成することができる。この際に、タンパク質の精製及び／又は確認を容易にするため、上記のアミノ酸配列のN末端に開始コドン及びHis10タグからなるアミノ酸配列を付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸を合成してもよい。

## 実施例

[0070] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0071] 1. 改変クモ糸フィブロイン製造

(1) プラスミド発現株の作製

ネフィラ・クラビペス (*Nephila clavipes*) 由来のフィブロイン (GenBankアクセッション番号: P46804.1, GI: 1174415) の塩基配列及びアミノ酸配列に基づき、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する改変クモ糸フィブロイン (以下、「PRT799」ともいう。) を設計した。配列番号5で示されるアミノ酸配列は、ネフィラ・クラビペス由来のフィブロインのアミノ酸配列に対して、生産性の向上を目的としてアミノ酸残基の置換、挿入及び欠失を施したアミノ酸配列と、そのN末端に付加された配列番号6で示されるアミノ酸配列 (タグ配列及びヒンジ配列) とを有する。また、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有する改変クモ糸フィブロイン (以下「PRT966」ともいう。) も設計した。

[0072] PRT799又はPRT966をコードする核酸を合成した。当該核酸には、5'末端にNdeIサイト及び終止コドン下流にEcoRIサイトを付加した。当該核酸をクローニングベクター (pUC118) にクローニングした。その後、同核酸をNdeI及びEcoRIで制限酵素処理して切り出した後、タンパク質発現ベクターpET-22b (+) に組換えて発現ベクターを得た。

[0073] (2) タンパク質の発現

得られたpET22b (+) 発現ベクターにより、大腸菌BLR (DE3) を形質転換した。当該形質転換大腸菌を、アンピシリンを含む2 mLのLB培地で15時間培養した。当該培養液を、アンピシリンを含む100 mLのシード培養用培地 (表1) に、OD600が0.005となるように添加した。培養液温度を30℃に保ち、OD600が5になるまでフラスコ培養を行い (約15時間)、シード培養液を得た。

[0074]

[表1]

シード培養用培地

試薬	濃度 (g/L)
グルコース	5.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4.0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	9.3
Yeast Extract	6.0
アンピシリン	0.1

[0075] 当該シード培養液を、500 mLの生産培地（表2）を添加したジャーファーマンターに、OD600が0.05となるように添加した。培養液温度を37℃に保ちながら形質転換大腸菌を培養した。培養液のpH6.9に維持し、培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持した。

[0076] [表2]

生産培地

試薬	濃度 (g/L)
グルコース	12.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	9.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.4
Yeast Extract	15
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04
GD-113 (消泡剤)	0.1 (mL/L)

[0077] 生産培地中のグルコースが完全に消費された直後に、フィード液（グルコース455 g/1 L、Yeast Extract 120 g/1 L）を1 mL/分の速度で添加した。その後、培養液温度を37℃に保ちながら、pH6.9で培養を20時間継続した。培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持した。

その後、1 Mのイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を培養液に対して終濃度1 mMになるよう添加し、目的のタンパク質を発現誘導させた。IPTGを添加後、20時間経過した時点で、培養液を遠心分

離し、菌体を回収した。IPTG添加前とIPTG添加後の培養液から調製した菌体を、SDS-PAGEで分析した。IPTG添加に依存した目的とするクモ糸フィブロインのサイズのバンドの出現により、目的とする改変クモ糸フィブロイン「PRT799」又は「PRT966」の発現を確認した。

[0078] (3) タンパク質の精製

IPTGを添加してから2時間後に回収した菌体を20mM Tris-HCl buffer (pH7.4)で洗浄した。洗浄後の菌体を約1mMのPMSFを含む20mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4)に懸濁させ、高圧ホモジナイザー (GEA Niro Soavi社製)で細胞を破碎した。破碎した細胞を遠心分離し、沈殿物を得た。得られた沈殿物を、高純度になるまで20mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4)で洗浄した。洗浄後の沈殿物を100mg/mLの濃度になるように8M グアニジン緩衝液 (8M グアニジン塩酸塩、10mMリン酸二水素ナトリウム、20mM NaCl、1mM Tris-HCl、pH7.0)に懸濁した。懸濁液を60℃で30分間、スターラーで攪拌して、沈殿物を溶解させた。溶解後、透析チューブ (三光純薬株式会社製のセルロースチューブ36/32)を用いて、水で透析を行った。透析後に得られた白色の凝集タンパク質を遠心分離により回収した。回収した凝集タンパク質を凍結乾燥機で乾燥して、改変クモ糸フィブロイン「PRT799」又は「PRT966」を含むタンパク質粉体を得た。

[0079] 2. フィブロイン溶液及びタンパク質繊維

2-1. PRT799

(実施例1-1)

分散工程

混合用の円盤状の回転体を有する混合装置 (フロージェットミキサーMW-J-300-S、株式会社粉研パウテックス製)を準備した。この混合装置の回転体を900rpmの回転速度で回転させながら、回転体の回転面上

にDMSO及び4質量%の塩化リチウムを含む20℃の溶解液を連続的に供給し、それにより回転面上で溶解液の薄膜を流動させた。回転面の上方の粉体投入口からPRT799を含むタンパク質粉体を供給し、これを回転面上で溶解液に導入した。溶解液はギャポンプによって15kg/時の流量で供給した。タンパク質粉体はフィーダーによって5kg/時の速度で供給した。これにより、流動する溶解液とタンパク質粉体とを連続的に混合して、これらを含むスラリーを形成させた。

#### [0080] 溶解工程

得られたスラリーを、一軸偏心ねじポンプを用いて、80℃に保持されたインラインミキサー（株式会社ノリタケカンパニーリミテド社製スタティックミキサー：型式SMHEDM-25A(24)/SL）に送液した。スラリーの流量は0.3L/分とした。インラインミキサーには、予め24個のスタティックミキサーエレメントを装着した。インラインミキサー中でスラリーは攪拌されるとともに加熱され、それによりタンパク質粉体が溶解液に溶解した。スラリーがインラインミキサーを通過する時間は1分であり、インラインミキサーから排出されたフィブロイン溶液の温度は70℃であった。

#### [0081] 濾過、脱泡及び冷却

得られたフィブロイン溶液を、目開き1μmの焼結金属フィルターで濾過して、不溶物を除去した。次いで、-0.1MPaの減圧下で60分保持することでフィブロイン溶液を脱泡した。その後、フィブロイン溶液を、10℃に保持したインラインミキサー（同上の型式）に送液するところにより、フィブロイン溶液を15℃まで冷却した。冷却されたフィブロイン溶液を貯蔵タンクへ送液した。

#### [0082] 紡糸（タンパク質繊維）

冷却後のフィブロイン溶液を紡糸原液として用いた乾湿式紡糸により、改変クモ糸フィブロインを含むフィラメントを得た。乾湿式紡糸の条件は以下のとおりである。

- ・凝固液（メタノール）の温度：5～10℃
- ・総延伸倍率：5倍
- ・乾燥温度：80℃

[0083]（実施例1-2）

DMSO及び4質量%の塩化リチウムを含む溶解液に代えて、ギ酸を溶解液として用いたこと以外は実施例1-1と同様の分散工程及び溶解工程により、フィブロイン溶液を調製した。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例1-1と同様にフィラメントを作製した。

[0084]（実施例1-3）

溶解工程に用いるスタティックミキサーエレメントの数を10に変更したこと以外は実施例1-1と同様にして、フィブロイン溶液を調製した。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例1-1と同様にフィラメントを作製した。

[0085]（実施例1-4）

実施例1-1と同様の分散工程により得られたスラリーを、パドル型攪拌翼を備えた100Lのタンクに供給した。タンクジャケットに80℃の温水を通液した。スラリーを攪拌翼で攪拌しながら60分間加熱することによりタンパク質粉体を溶解液に溶解させて、フィブロイン溶液を得た。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例1-1と同様にフィラメントを作製した。

[0086]（比較例1-1）

パドル型攪拌翼を備えた100Lのタンクに、16kgのタンパク質粉体、及びDMSO及び4質量%の塩化リチウムを含む64kgの溶解液を投入した。これらをタンク中で60分間攪拌して、スラリーを得た。得られたスラリーを用いて、実施例1-1と同様の溶解工程によってフィブロイン溶液を得た。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例1-1と同様にフィラメントを作製した。

[0087]（比較例1-2）

比較例 1 と同様にして、スラリーをタンク内に形成させた。続いて、タンクのジャケットに 80℃の温水を通し、スラリーを攪拌しながら 60 分間加熱することによりタンパク質粉体を溶解液に溶解させて、フィブロイン溶液を得た。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例 1-1 と同様にフィラメントを作製した。

[0088] 2-2. PRT966

(実施例 2-1)

PRT799 を含むタンパク質粉体に代えて、PRT966 を含むタンパク質粉体を用いたこと、及び、溶解液としてギ酸を用いたこと以外は実施例 1-1 と同様の分散工程により、タンパク質粉体及び溶解液を含むスラリーを形成させた。溶解液及びギ酸の供給量を、スラリーにおけるタンパク質の濃度がスラリーの質量を基準として 31 質量%となるように調整した。

得られたスラリーを、一軸偏心ねじポンプを用いて、80℃に保持されたインラインミキサー（株式会社ノリタケカンパニーリミテド社製スタティックミキサー：型式 SMHEDM-25A (24) / SL）に送液した。スラリーの流量は 0.3 L / 分とした。インラインミキサーには、予め 24 個のスタティックミキサーエレメントを装着した。インラインミキサー中でスラリーは攪拌されるとともに加熱され、それによりタンパク質粉体が溶解液に溶解した。スラリーがインラインミキサーを通過する時間は 1 分であり、インラインミキサーから排出されたフィブロイン溶液の温度は 70℃であった。

得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例 1-1 と同様にフィラメントを作製した。

[0089] (実施例 2-2)

実施例 2-1 と同様の分散工程により得られたスラリーを、パドル型攪拌翼を備えた 100 L のタンクに供給した。タンクジャケットに 40℃の温水を通液した。スラリーを攪拌翼で攪拌しながら 60 分間加熱することによりタンパク質粉体を溶解液に溶解させて、フィブロイン溶液を得た。得られた

フィブロイン溶液を用いて、実施例 1-1 と同様にフィラメントを作製した。

[0090] (比較例 2-1)

パドル型攪拌翼を備えた 100 L のタンクに、31 kg のタンパク質粉体、及び 69 kg のギ酸を投入した。これらをタンク中で 60 分間攪拌して、スラリーを得た。得られたスラリーを用いて、実施例 2-1 と同様のインラインミキサーを用いた溶解工程によってフィブロイン溶液を得た。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例 1-1 と同様にフィラメントを作製した。

[0091] (比較例 2-2)

比較例 2-1 と同様にして、スラリーをタンク内に形成させた。続いて、タンクのジャケットに 40℃ の温水を通し、スラリーを攪拌しながら 60 分間加熱することによりタンパク質粉体を溶解液に溶解させて、フィブロイン溶液を得た。得られたフィブロイン溶液を用いて、実施例 1-1 と同様にフィラメントを作製した。

[0092] 3. 評価

(1) 継粉発生率

目開き 2 mm の焼結金属フィルターが下部に装着された容量 1 L の容器に、1000 g のスラリーを入れた。容器内を 0.05 MPa の窒素で加圧することにより、スラリーにフィルターを通過させた。スラリー中の継粉は、フィルターを通過しなかった。フィルターを通過したスラリーの質量  $W_1$  (g) を測定した。式：継粉発生率 =  $\{(1000 - W_1) / 1000\} \times 100$  によって継粉発生率を算出した。

[0093] (2) 溶解状態 (濾過率)

焼結金属フィルターで濾過される前のフィブロイン溶液におけるタンパク質粉体の溶解状態を、濾過率に基づいて評価した。1000 g のフィブロイン溶液を、40℃ で保持しながら定量ポンプを用いて送液し、濾過面積 4.7 cm<sup>2</sup>、目開きが 1 μm である焼結金属フィルターによって濾過した。フィル

ターを通過したフィブロイン溶液の質量 $W_2$  (g) を測定した。式：濾過率 =  $(W_2 / 1000) \times 100$  により、濾過率を算出した。濾過率が大きいことは、フィブロインの未溶解分の量が少ないことを意味する。

[0094] (3) フィブロイン溶液の粘度

冷却後のフィブロイン溶液の粘度を、粘度測定機（型番：EMS-01S、京都電子工業社製）を用いて測定した。測定条件は以下のとおりである。

- ・ 温度：40℃
- ・ 測定時間：2分
- ・ プローブ回転数：2000rpm

[0095] (4) 繊維の強度及び伸度

フィラメントの両端をそれぞれ、試験紙片に接着剤で固定した、つかみ治具間の距離20mm、引張速度10cm/分条件で、引張試験機（インストロン社製、型式：3342）を用いて引張試験を行った。引張試験は、温度20℃、相対湿度65%の環境下で行った。得られた応力-歪み曲線から、強度（破断応力）及び伸度（破断伸度）を求めた。表3に示される強度及び伸度は、比較例1-2を基準とする相対値である。表4に示される強度及び伸度は、比較例2-2を基準とする相対値である。

[0096] [表3]

	実施例 1-1	実施例 1-2	実施例 1-3	実施例 1-4	比較例 1-1	比較例 1-2
改変フィブロイン	PRT799	PRT799	PRT799	PRT799	PRT799	PRT799
溶媒	DMSO	ギ酸	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
分散工程	薄膜	薄膜	薄膜	薄膜	タンク内攪拌	タンク内攪拌
溶解工程	装置	インラインミキサー	インラインミキサー	インラインミキサー	タンク内攪拌	インラインミキサー
	エレメント数	24	24	10	24	24
	時間	1分	1分	1分	60分	1分
継粉発生率 [質量%]	0	0	0	0	18	24
溶解状態 (濾過率, [質量%])	99	99	99	98	76	71
溶液粘度 [mPa·s]	25000	15000	24000	21000	16000	9000
繊維	強度	167%	213%	160%	133%	120%
	伸度	194%	83%	194%	106%	183%

[0097]

[表4]

		実施例 2-1	実施例 2-2	比較例 2-1	比較例 2-2
改変フィブロイン		PRT966	PRT966	PRT966	PRT966
溶媒		ギ酸	ギ酸	ギ酸	ギ酸
分散工程		薄膜	薄膜	タンク内攪拌	タンク内攪拌
溶解工程	装置	インラインミキサー	タンク内攪拌	インラインミキサー	タンク内攪拌
	エレメント数	24		24	
	時間	1分	60分	1分	60分
継粉発生率 [質量%]		0	1	20	28
溶解状態 (濾過率, [質量%])		99	97	73	66
溶液粘度 [mPa·s]		40900	38900	29200	18800
延伸倍率		7倍	6.5倍	6.2倍	6倍
繊維	強度	123%	120%	118%	100%
	伸度	54%	87%	110%	100%

[0098] 表3及び表4に示される評価結果から、溶解液の薄膜を流動させながらスラリーを連続的に形成する分散工程を含む実施例の方法によれば、スラリーの形成における継粉の発生が十分に抑制されることが確認された。また、各実施例では、スラリー中のタンパク質粉体を溶媒に溶解させて、未溶解分の少ないフィブロイン溶液を容易に得ることができた。さらに、各実施例のフィブロイン溶液から、良好な機械物性を有するタンパク質繊維を形成することができた。タンパク質繊維の機械物性は、溶解液の薄膜を流動させながらスラリーを形成する分散工程と、インラインミキサーによる溶解工程との組み合わせによる実施例1-1～1-3のフィブロイン溶液を用いたときに特に優れていた。

[0099] PRT966の繊維の場合、実施例2-1, 2-2において、比較例2-1, 2-2と比較して伸度が低下する傾向が認められ、これは、実施例2-1, 2-2における延伸倍率が相対的に大きいことに主に由来すると考えられる。実施例2-1, 2-2の場合、フィブロインの溶解性向上にともなって延伸性が向上し、そのために延伸倍率を高くすることができた。延伸倍率が高いと、より高い強度を有する繊維を得ることができる。実施例2-1, 2-2において延伸倍率をより低く設定することによって、より高い伸度を

有する繊維が得られると考えられる。

### 符号の説明

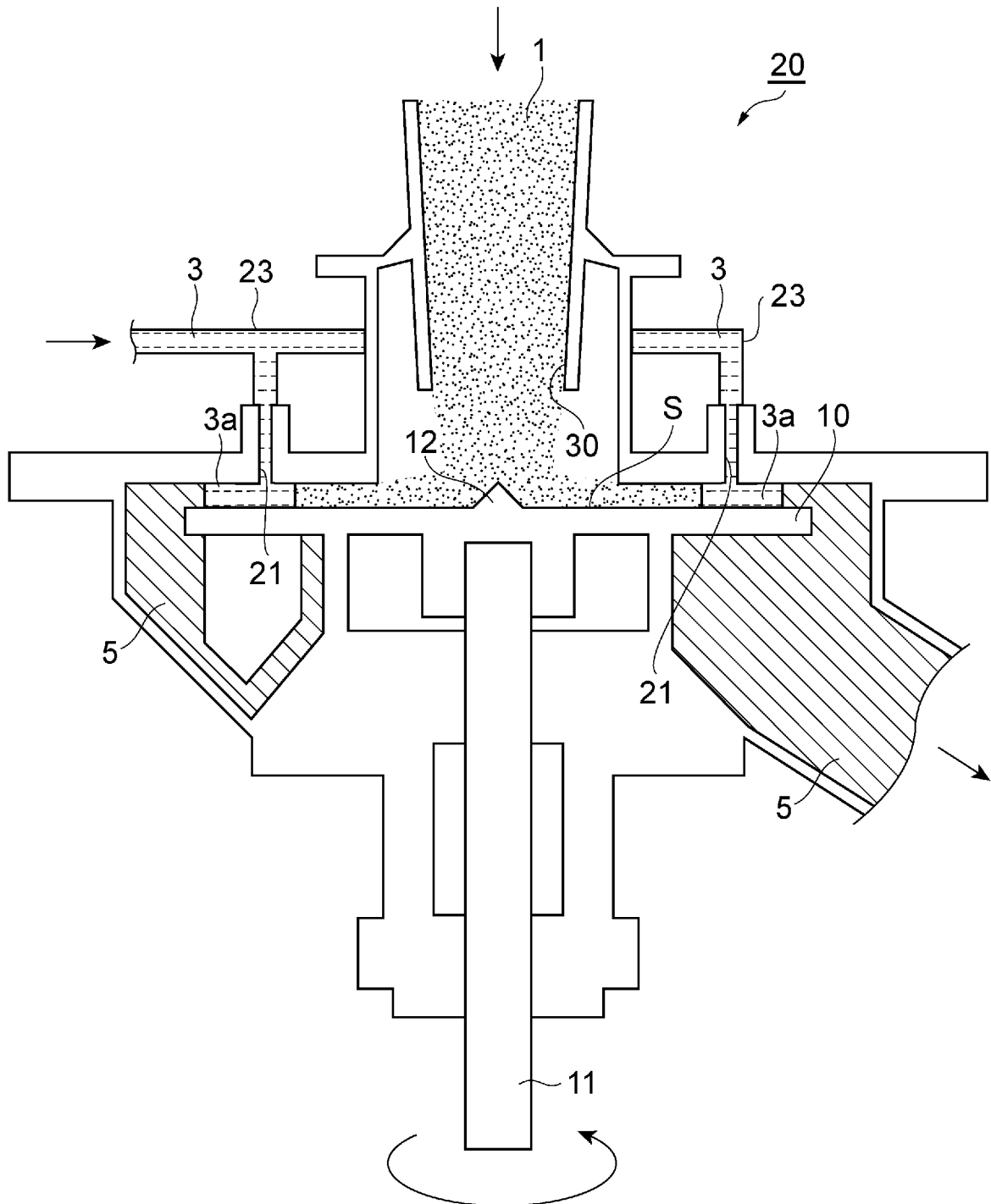
[0100] 1…タンパク質粉体、3…溶解液、3 a…薄膜、5…スラリー、7…フィブリン溶液、10…回転体、11…シャフト、12…制御部、20…混合装置、21…溶解液投入口、23…導入管、25…滞留槽、25 A…底面、25 B…内周面、30…粉体投入口、40…インラインミキサー、41…配管、43…スタティックミキサーエレメント、45…ジャケット、45 a…熱媒入口、45 b…熱媒出口、S…回転面。

## 請求の範囲

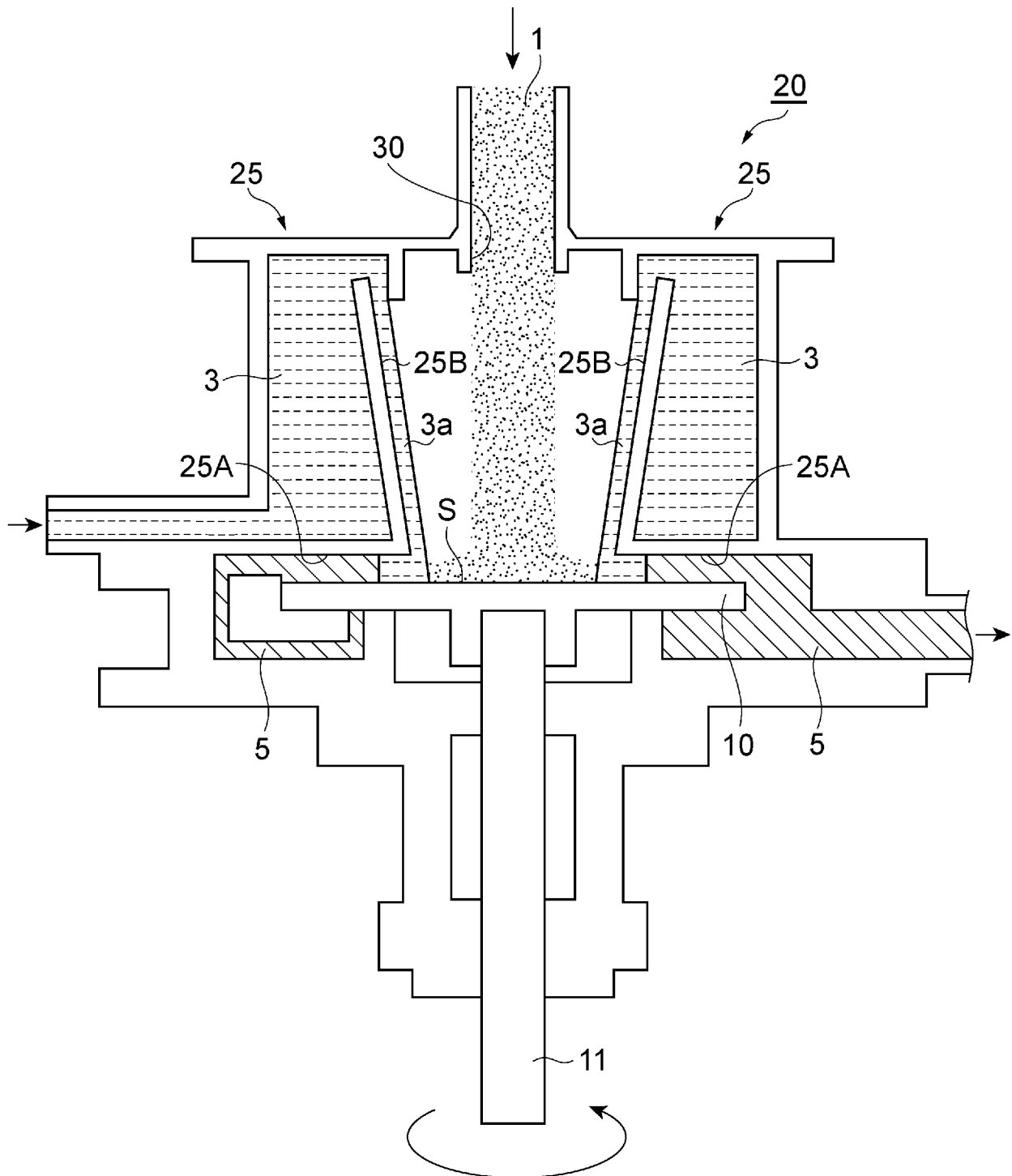
- [請求項1] 溶媒を含有する溶解液の薄膜を流動させながら、該薄膜に、フィブロインを含むタンパク質粉体を連続的に導入し、それにより前記溶解液及び前記溶解液中に分散した前記タンパク質粉体を含有するスラリーを形成する工程と、
- 前記スラリー中の前記タンパク質粉体を前記溶解液に溶解させることにより、フィブロイン溶液を形成する工程と、を備える、
- フィブロイン溶液を製造する方法。
- [請求項2] 前記溶解液を面上に連続的に供給することにより、前記溶解液の薄膜を前記面上で流動させる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記スラリーを形成する前記工程が、
- 前記溶解液を、定量ポンプにより回転体の回転面上に連続的に供給し、それにより前記回転面上で前記溶解液の薄膜を流動させることと、
- 、
- 前記タンパク質粉体を定量フィーダーにより連続的に供給し、それにより前記タンパク質粉体を前記回転面上の前記薄膜に連続的に導入することと、
- を含む、
- 請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記スラリーをインラインミキサーで攪拌しながら加熱することにより、前記スラリー中の前記タンパク質粉体を前記溶解液に溶解させる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記フィブロイン溶液を、インラインミキサーで攪拌しながら冷却する工程を更に備える、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記フィブロイン溶液を脱泡する工程を更に備える、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記フィブロイン溶液を濾過することにより、不溶物を除去する工程を更に備える、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項8] 前記溶媒が、ジメチルスルホキシド、ギ酸及びヘキサフルオロイソプロパノールからなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 前記溶解液が無機塩を更に含有する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 前記フィブロインが改変フィブロインである、請求1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 前記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインである、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 請求項1～11のいずれか一項に記載の方法によってフィブロイン溶液を得ることと、  
前記フィブロイン溶液を成形用原液として用いた成形によって、フィブロインを含有するタンパク質成形体を得ることと、  
を含む、タンパク質成形体を製造する方法。
- [請求項13] 前記タンパク質成形体がタンパク質繊維である、請求項12に記載の方法。

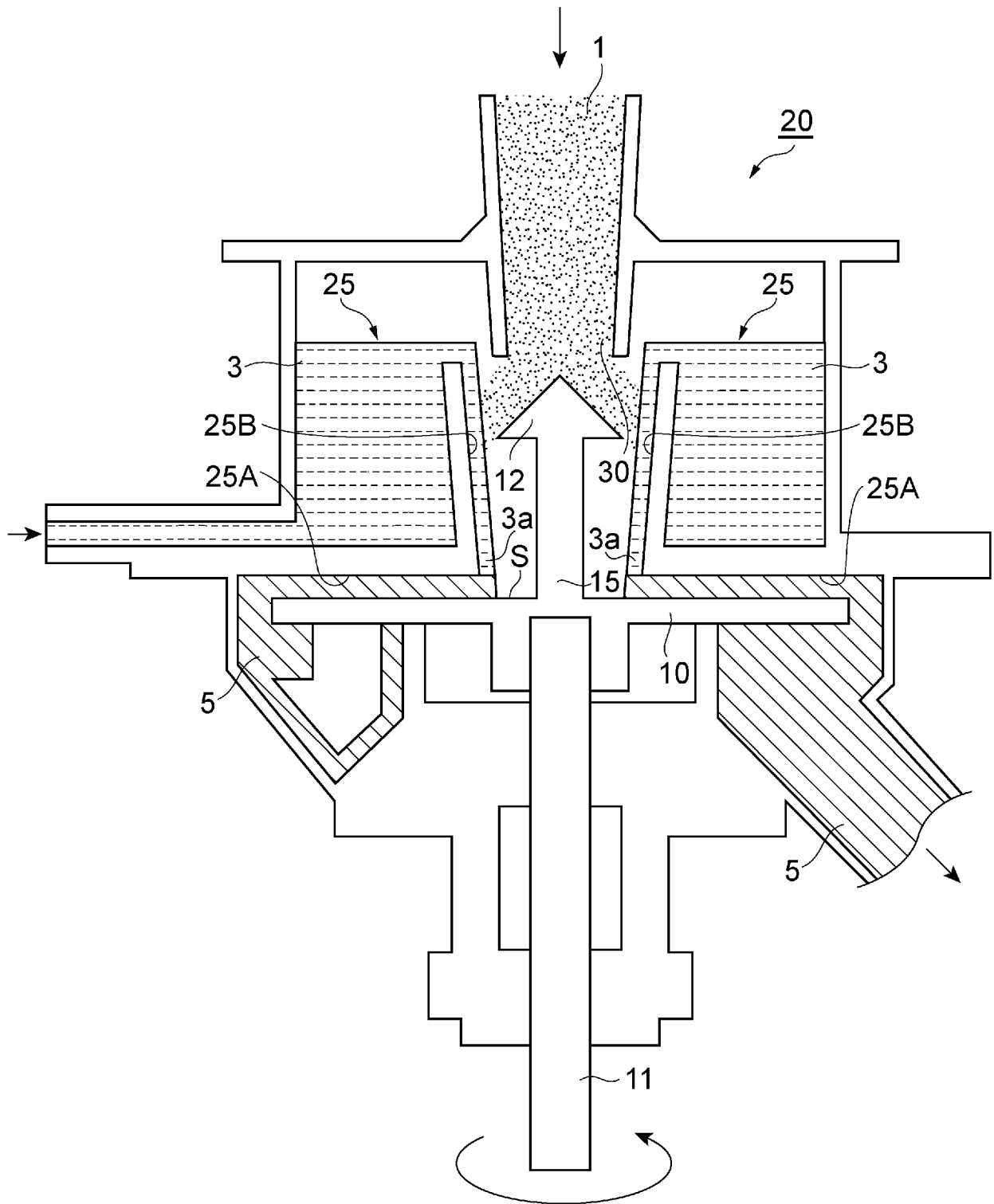
[図1]



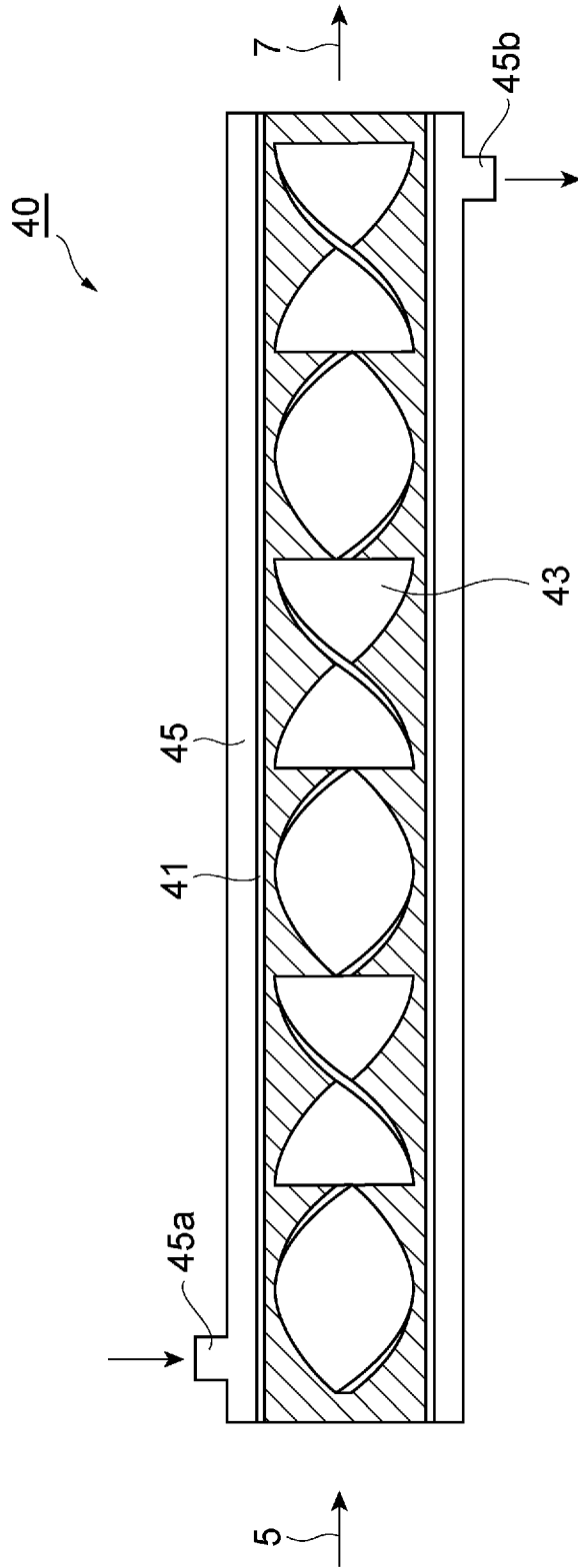
[図2]



[図3]



[図4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/036241

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C08J3/02 (2006.01) i, C07K14/435 (2006.01) i, D01F4/02 (2006.01) i,  
C12N15/10 (2006.01) n, C12N15/12 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C08J3/02, C07K14/435, D01F4/02, C12N1/10, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/094722 A1 (SPIBER INC., KOJIMA PRESS INDUSTRY CO., LTD., TEKUNOHAMA CO., LTD.) 08 June 2017, claims 1, 4, 7, paragraphs [0019], [0055], [0060]-[0062], [0065], [0082] & US 2018/0355120 A1, claims 1, 4, 7, paragraphs [0021], [0057], [0062]-[0064], [0067], [0101] & EP 3385305 A1 & CN 108368271 A	1-13
Y	JP 7-222918 A (TOKUSHU KIKA KOGYO CO., LTD.) 22 August 1995, claim 1, paragraphs [0001], [0017], [0025], [0033] (Family: none)	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 November 2019 (13.11.2019)

Date of mailing of the international search report  
26 November 2019 (26.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/036241

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2017-119647 A (MATSUDA SILK FARM CORPORATION INC.) 06 July 2017, claim 1, paragraphs [0012], [0038] (Family: none)	7
A	JP 2010-13743 A (SHINANO KENSHI CO., LTD.) 21 January 2010, claim 1, paragraph [0016] (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C08J3/02(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, D01F4/02(2006.01)i, C12N15/10(2006.01)n, C12N15/12(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C08J3/02, C07K14/435, D01F4/02, C12N15/10, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2017/094722 A1 (S p i b e r 株式会社、小島プレス工業株式会社、テクノハマ株式会社) 2017.06.08, 請求項 1、4、7、[0019]、[0055]、[0060] ~ [0062]、[0065]、[0082] & US 2018/0355120 A1 claims1,4,7, [0021], [0057], [0062]-[0064], [0067], [0101] & EP 3385305 A1 & CN 108368271 A	1-13
Y	JP 7-222918 A (特殊機化工業株式会社) 1995.08.22, 請求項 1、[0001]、[0017]、[0025]、[0033] (ファミリーなし)	1-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 13.11.2019	国際調査報告の発送日 26.11.2019
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 安積 高靖 電話番号 03-3581-1101 内線 3430	4 F	3848
--	--	-----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2017-119647 A (株式会社松田養蚕場) 2017. 07. 06, 請求項 1、[0012]、[0038] (ファミリーなし)	7
A	JP 2010-13743 A (シナノケンシ株式会社) 2010. 01. 21, 請求項 1、[0016] (ファミリーなし)	1-13