

(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
2021年1月28日(28.01.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/015153 A1

(51) 国際特許分類:

D01F 4/02 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)

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).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/027991

(22) 国際出願日: 2020年7月20日(20.07.2020)

(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 2019-133771 2019年7月19日(19.07.2019) JP

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(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: ▲莊▼▲郁▼▲群▼(Chuang Yu Chun);
〒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).

(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, IT, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) Title: MODIFIED FIBROIN

(54) 発明の名称: 改変フィブロイン

(57) Abstract: This invention relates to a modified fibroin which includes a domain sequence represented by formula 1, [(A)_nmotif-REP]_m, or formula 2, [(A)_nmotif-REP]_m-(A)_nmotif. In the (A)_n motif, the total number of alanine residues in repetitions of six or more residues is at least 20% of the total number of amino acid residues in the entire motif, the hydrophobicity of REP is -1.0 or greater, and the total number of amino acid residues in the entire motif is 580 or greater.

(57) 要約: 本発明は、式1: [(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2: [(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインであって、上記(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上であり、REPの疎水性度が、-1.0以上であり、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上である、改変フィブロインに関する。



WO 2021/015153 A1

明 細 書

発明の名称： 改変フィブロイン

技術分野

[0001] 本発明は、改変フィブロインに関する。

背景技術

[0002] フィブロインは、繊維状のタンパク質の一種であり、 β プリーツシートの形成につながるグリシン残基、アラニン残基及びセリン残基を最大90%含有する（非特許文献1）。フィブロインとして、昆虫及びクモ類が産生する糸を構成するタンパク質（絹タンパク質、ホーネットシルクタンパク質、スパイダーシルクタンパク質）等が知られている。

[0003] 絹タンパク質は、優れた機械的特性、吸湿特性及び消臭特性を有し、衣服原料として広く用いられている素材である。また絹糸は免疫寛容な天然繊維であり、生体親和性が高いため手術用縫合糸等の用途にも用いられている。

[0004] クモには最大7種類の絹糸腺が存在し、それぞれ性質の異なるフィブロイン（スパイダーシルクタンパク質）を産生する。スパイダーシルクタンパク質は、その源泉の器官にしたがって、高い靱性を有する大瓶状スパイダータンパク質（major ampullate spider protein、MaSp）、高度な伸長力を有する小瓶状スパイダータンパク質（minor ampullate spider protein、MiSp）、並びに鞭状（flagelliform（Flag））、管状（tubuliform）、集合（aggregate）、ブドウ状（aciniform）及びナシ状（pyriform）の各スパイダーシルクタンパク質と命名されている。特に、優れた強度と伸度を有することにより高い靱性を有する大瓶状スパイダータンパク質において構造的な研究が集中して行われている（特許文献1及び特許文献2）。

[0005] フィブロインに特異的な構造の一つとして、GPGXX、アラニン残基に

富んだ伸長領域（ $(A)_n$ 又は $(GA)_n$ ）、GGX、及びスペーサーに分類されるアミノ酸モチーフが反復した構造が知られている（非特許文献2）。また、 $(GA)_n$ モチーフを $(A)_n$ モチーフで置換することにより伸度は減少するが引張り強度が増すこと、GPGXXモチーフの数を増加させることにより伸度が増加すること、GPGXXモチーフのいくつかを $(A)_n$ モチーフで置換することにより引張り強度が増加することが報告されている（特許文献2）。また、GGX及びGPGXXモチーフは、糸に弾性を与える可撓性のらせん構造をとると考えられている（特許文献3）。

[0006] 組換えスパイダーシルクタンパク質、及び組換え絹タンパク質は、いくつかの異種タンパク質生産系で産生されている。例えば、ヤギ、カイコ、植物、哺乳類細胞、酵母、カビ、グラム陰性細菌及びグラム陽性細菌等を宿主とした組換えタンパク質生産系による組換えフィブロイン生産が多数報告されており一定の成果が得られている（非特許文献3、特許文献4及び5）。

[0007] 近年、自動車、電気・電子等あらゆる産業分野において、耐熱性材料の需要が高まっている。フィブロインからなる絹は、優雅な風合いと美しい光沢、着心地の良さを持つ一方、水にぬれると縮む、黄変するなどの欠点があり、アイロンも160℃までの中温でかけることが推奨されるなど、一般的には耐熱性の低い繊維であると考えられている。耐熱性複合材料の素材として用いるためには、まず、絹タンパク質自体の耐熱性を向上させることが求められる。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開2012-55269号公報
特許文献2：特表2005-502347号公報
特許文献3：特表2009-505668号公報
特許文献4：特表2014-502140号公報
特許文献5：国際公開第2015/042164号

非特許文献

[0009] 非特許文献1: Asakuraら, Encyclopedia of Agricultural Science, Academic Press: New York, NY, 1994年, Vol. 4, pp. 1-11

非特許文献2: Microbial Cell Factories, 2004年, 3: 14

非特許文献3: Science, 2002年, 295巻, pp. 472-476

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] フィブロインからなる天然のクモの糸は、引張強度、靱性及び伸展性等の物理的な変化に対する特性に優れ、高い生体適合性及び生分解性を有し、さらに、耐熱性にも優れている。しかし、天然糸を産業上利用するカイコと相違し、クモは大量飼育が困難であるところから、クモの糸を模倣した人工合成繊維を製造し、前記物理的な変化に対する特性、並びに、生体適合性及び生分解性を有する糸、敷布等の素材や材料への応用が試みられているが、耐熱性について天然のクモ糸に匹敵する人工繊維の製造は、成功していない。

[0011] したがって、本発明は、熱安定性が向上された改変フィブロインの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、フィブロイン中に存在する(A)_nモチーフの中におけるアラニン連続配列のアラニン含有量を増加させることにより、熱安定性が向上されたフィブロインが得られることを見出した。本発明はこの新規な知見に基づく。

[0013] すなわち、本発明は、例えば、以下の各発明に関する。

[1]

式1: [(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2: [(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインであって、

上記(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上であり、

REPの疎水性度が、-1.0以上であり、

全体のアミノ酸残基の総数が、580以上である、改変フィブロイン。

[式1及び式2中、(A)_nモチーフは4~27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A)_n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が80%以上である。REPは10~200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10~300の整数を示す。複数存在する(A)_n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。]

[2]

REPの疎水性度が、0以上である、[1]に記載の改変フィブロイン。

[3]

上記(A)_nモチーフにおいて7残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上である、[1]又は[2]に記載の改変フィブロイン。

[4]

配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3で示されるアミノ酸配列、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、改変フィブロイン。

[5]

更に、N末端及びC末端のいずれか一方又は両方にタグ配列を含む、[1]~[4]のいずれかに記載の改変フィブロイン。

[6]

上記タグ配列が、配列番号4又は配列番号5で示されるアミノ酸配列を含む、[5]に記載の改変フィブロイン。

[7] 配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配

列、又は配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、改変フィブロイン。

[8]

熱分解温度(T_d)が268℃以上である、[1]～[7]のいずれかに記載の改変フィブロイン。

[9]

[1]～[8]のいずれかに記載の改変フィブロインをコードする核酸。

[10]

[9]に記載の核酸の相補鎖とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ式1: [(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2: [(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインをコードする核酸。[式1及び式2中、(A)_nモチーフは4～27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A)_n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が80%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在する(A)_n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。]

[11]

[9]に記載の核酸と90%以上の配列同一性を有し、かつ式1: [(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2: [(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインをコードする核酸。

[式1及び式2中、(A)_nモチーフは4～27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A)_n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が80%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在

する (A)_n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。]

[12]

改変フィブロインの製造方法であって、

改変フィブロイン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工程を含み、

上記改変フィブロインが、[1]～[8]のいずれかに記載の改変フィブロインである、製造方法。

[13]

式1：[(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインの熱安定性を向上させる方法であって、

改変前のフィブロインにおける少なくとも1つの(A)_nモチーフ又はREPに、1又は複数のアラニン残基を挿入するか、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換することにより、少なくとも1つの(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させることを含み、

改変前のフィブロインと比較して、改変後のフィブロインの熱分解温度(T_d)が5℃以上高い、方法。

[式1及び式2中、(A)_nモチーフは4～27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A)_n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が80%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在する(A)_n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。]

〔14〕

改変前のフィブロインが、天然由来のフィブロインである、〔13〕に記載の方法。

〔15〕

上記天然由来のフィブロインが、昆虫又はクモ類由来のフィブロインである、〔14〕に記載の改変フィブロイン。

〔16〕

上記天然由来のフィブロインが、クモ類の大瓶状スパイダータンパク質（MaSp）又は小瓶状スパイダータンパク質（MiSp）である、〔15〕に記載の改変フィブロイン。

〔17〕

〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の改変フィブロインを含み、
繊維、糸、フィルム、発泡体、粒体、ナノフィブリル、ゲル及び樹脂からなる群から選択される、製品。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、熱安定性が向上された改変フィブロインの提供が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]クモ類フィブロインのドメイン配列の一例を示す模式図である。
[図2]PRT380及びPRT525の熱分解温度を比較した結果を示したグラフである。
[図3]PRT380及びPRT525のガラス転移点を比較した結果を示したグラフである。
[図4]PRT1068、PRT1069及びPRT1070の熱分解温度を比較した結果を示したグラフである。
[図5]PRT525及びPRT1070の熱分解温度を比較した結果を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を実施するための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。

[0017] 「改変フィブロイン」 本発明に係る改変フィブロインは、式1： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。改変フィブロインは、ドメイン配列のN末端側及びC末端側のいずれか一方又は両方に更にアミノ酸配列（N末端配列及びC末端配列）が付加されていてもよい。N末端配列及びC末端配列は、これに限定されるものではないが、典型的には、フィブロインに特徴的なアミノ酸モチーフの反復を有さない領域であり、100残基程度のアミノ酸からなる。

[0018] 本明細書において「改変フィブロイン」とは、そのドメイン配列が天然由来のフィブロインのアミノ酸配列とは異なるフィブロインを意味する。本明細書でいう「天然由来のフィブロイン」は、そのアミノ酸配列が自然に存在する昆虫又はクモ類等が産生するフィブロインと同一であるフィブロインを意味する。天然由来のフィブロインもまた、式1： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。

[0019] 「改変フィブロイン」は、本発明で特定されるアミノ酸配列を有するものであれば、天然由来のフィブロインに依拠してそのアミノ酸配列を改変したもの（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を改変することによりアミノ酸配列を改変したもの）であってもよく、また天然由来のフィブロインに依らず人工的にアミノ酸配列を設計及び合成したもの（例えば、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所望のアミノ酸配列を有するもの）であってもよい。なお、改変フィブロインのアミノ酸配列を改変したものも、そのアミノ酸配列が天然由来のフィブロインのアミノ酸配列とは異なるものであれば、改変フィブロインに含まれる。

[0020] 本明細書において「ドメイン配列」とは、フィブロイン特有の結晶領域（典

型的には、アミノ酸配列の(A)_nモチーフに相当する。)と非晶領域(典型的には、アミノ酸配列のREPに相当する。)を生じるアミノ酸配列であり、式1: [(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2: [(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるアミノ酸配列を意味する。ここで、(A)_nモチーフは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基数は4~27である。(A)_nモチーフのアミノ酸残基数は、4~20、8~20、10~20、4~16、5~10、6~12、6~18、7~10、7~14、8~16、又は11~16であってもよい。また、(A)_n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80%以上である。REPは10~200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10~300の整数を示す。複数存在する(A)_n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。

[0021] (A)_nモチーフは、(A)_n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が80%以上であればよく、85%以上であることが好ましく、90%以上であることがより好ましく、95%以上であることが更に好ましく、100%であること(アラニン残基のみで構成されることを意味する)が更に好ましい。ドメイン配列中に複数存在する(A)_nモチーフは、少なくとも7つがアラニン残基のみで構成されることが好ましい。アラニン残基のみで構成されるとは、(A)_nモチーフが、(A|a)_k(A|aはアラニン残基を示し、kは4~27の整数、好ましくは4~20の整数、より好ましくは4~16の整数を示す。)で表されるアミノ酸配列を有することを意味する。

[0022] 本実施形態に係る改変フィブロインは、(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上であり、REPの疎水性度が、-1.0以上であり、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上である。

- [0023] 本実施形態に係る改変フィブロインは、(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上である。(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計とは、6残基以上連続するアラニン残基の残基数のみカウントした場合の、アラニン残基の残基数の総数を意味する。したがって、5残基のみ連続するアラニン残基の残基数はカウントされない。また、(A)_nモチーフにおいて、アラニン残基間に他のアミノ酸残基が存在することで、アラニン残基が連続して6残基以上存在しない場合にも、そのアラニン残基の残基数はカウントされない。
- [0024] (A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計は、例えば、全体のアミノ酸残基の総数の21%以上、22%以上又は23%以上であってもよい。また、(A)_nモチーフにおいて7残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、例えば、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上、21%以上、22%以上又は23%以上であってもよい。
- [0025] 本実施形態に係る改変フィブロインは、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上である。全体のアミノ酸残基の総数は、例えば、590以上、600以上、610以上又は620以上であってもよい。
- [0026] 本実施形態に係る改変フィブロインは、REPのアミノ酸配列中に、GGXモチーフ及びGPGXXモチーフ（Gはグリシン残基、Pはフェニルアラニン残基、Xはグリシン残基以外のアミノ酸残基を示す。）から選ばれる少なくとも1つのモチーフが含まれていることが好ましい。REP中にこれらのモチーフが含まれることにより、改変フィブロインの伸度を向上させることができる。
- [0027] 本実施形態に係る改変フィブロインが、REP中にGPGXXモチーフを含む場合、GPGXXモチーフ含有率は、通常1%以上であり、5%以上であってもよく、10%以上であるのが好ましい。これにより、改変フィブロインの伸度をより向上させることができる。GPGXXモチーフ含有率の上限に特に制限はなく、50%以下であってもよく、30%以下であってもよい。

- [0028] 本明細書において、「G P G X Xモチーフ含有率」は、以下の方法により算出される値である。
- [0029] 式1： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むフィブロインにおいて、最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列に含まれる全てのREPにおいて、その領域に含まれるG P G X Xモチーフの個数の総数を3倍した数（即ち、G P G X Xモチーフ中のG及びPの総数に相当）を x とし、最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除き、更に $(A)_n$ モチーフを除いた全REPのアミノ酸残基の総数を y としたときに、G P G X Xモチーフ含有率は x/y として算出される。
- [0030] G P G X Xモチーフ含有率の算出において、「最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」を対象としているのは、「最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列」（REPに相当する配列）には、フィブロインに特徴的な配列と相関性の低い配列が含まれることがあり、 m が小さい場合（つまり、ドメイン配列が短い場合）、G P G X Xモチーフ含有率の算出結果に影響するので、この影響を排除するためである。なお、REPのC末端に「G P G X Xモチーフ」が位置する場合、「XX」が例えば「AA」の場合であっても、「G P G X Xモチーフ」として扱う。
- [0031] 図1は、改変フィブロインのドメイン配列を示す模式図である。図1を参照しながらG P G X Xモチーフ含有率の算出方法を具体的に説明する。まず、図1に示した改変フィブロインのドメイン配列（「 $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ 」タイプである。）では、全てのREPが「最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」（図1中、「領域A」で示した配列。）に含まれているため、 x を算出するためのG P G X Xモチーフの個数は7であり、

xは $7 \times 3 = 21$ となる。同様に、全てのREPが「最もC末端側に位置する(A)_nモチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」(図1中、「領域A」で示した配列。)に含まれているため、当該配列から更に(A)_nモチーフを除いた全REPのアミノ酸残基の総数yは $50 + 40 + 10 + 20 + 30 = 150$ である。次に、xをyで除すことによって、 x/y (%)を算出することができ、図1の改変フィブロインの場合 $21/150 = 14.0\%$ となる。

[0032] 本実施形態に係る改変フィブロインは、グルタミン残基含有率が9%以下であることが好ましく、7%以下であることがより好ましく、4%以下であることが更に好ましく、0%であることが特に好ましい。これにより、本発明による効果をより一層顕著に奏することができる。

[0033] 本明細書において、「グルタミン残基含有率」は、以下の方法により算出される値である。

[0034] 式1: [(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2: [(A)_nモチーフ-REP]_m - (A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含むフィブロインにおいて、最もC末端側に位置する(A)_nモチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列(図1の「領域A」に相当する配列。)に含まれる全てのREPにおいて、その領域に含まれるグルタミン残基の総数をwとし、最もC末端側に位置する(A)_nモチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除き、更に(A)_nモチーフを除いた全REPのアミノ酸残基の総数をyとしたときに、グルタミン残基含有率は w/y として算出される。グルタミン残基含有率の算出において、「最もC末端側に位置する(A)_nモチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」を対象としている理由は、上述した理由と同様である。

[0035] 本実施形態に係る改変フィブロインは、そのドメイン配列が、改変前のフィブロインと比較して、REP中の1又は複数のグルタミン残基を欠失したこと、又は他のアミノ酸残基に置換した

ことに相当するアミノ酸配列を有するものであってよい。

[0036] 「他のアミノ酸残基」は、グルタミン残基以外のアミノ酸残基であればよいが、グルタミン残基よりも疎水性指標の大きいアミノ酸残基であることが好ましい。アミノ酸残基の疎水性指標については、公知の指標 (Hydrophathy index: Kyte J, & Doolittle R (1982) "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein", J. Mol. Biol., 157, pp. 105-132) を使用する。具体的には、各アミノ酸の疎水性指標 (ハイドロパシー・インデックス、以下「HI」とも記す。) は、下記表1に示すとおりである。

[0037] [表1]

アミノ酸	HI	アミノ酸	HI
イソロイシン(I)	4.5	トリプトファン(W)	-0.9
バリン(V)	4.2	チロシン(Y)	-1.3
ロイシン(L)	3.8	プロリン(P)	-1.6
フェニルアラニン(F)	2.8	ヒスチジン(H)	-3.2
システイン(C)	2.5	アスパラギン(N)	-3.5
メチオニン(M)	1.9	アスパラギン酸(D)	-3.5
アラニン(A)	1.8	グルタミン(Q)	-3.5
グリシン(G)	-0.4	グルタミン酸(E)	-3.5
スレオニン(T)	-0.7	リシン(K)	-3.9
セリン(S)	-0.8	アルギニン(R)	-4.5

[0038] 表1に示すとおり、グルタミン残基よりも疎水性指標の大きいアミノ酸残基としては、イソロイシン (I)、バリン (V)、ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、システイン (C)、メチオニン (M) アラニン (A)、グリシン (G)、スレオニン (T)、セリン (S)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、プロリン (P) 及びヒスチジン (H) から選ばれるアミノ酸残基を挙げるができる。これらの中でも、イソロイシン (I)、バリン (V)、ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、システイン (C)、メチオニン (M) 及びアラニン (A) から選ばれるアミノ酸残基であることがより好ましく、イソロイシン (I)、バリン (V)、ロイシン (L) 及びフェニルアラニン (F) から選ばれるアミノ酸残基であることが更に好まし

い。

[0039] 本実施形態に係る改変フィブロインは、REPの疎水性度が、 -1.0 以上であればよく、 -0.9 以上であることが好ましく、 -0.8 以上であることがより好ましく、 -0.7 以上であることが更に好ましく、 0 以上であることが更に好ましく、 0.2 以上であることが更に好ましく、 0.3 以上であることが更に好ましく、 0.4 以上であることが特に好ましい。REPの疎水性度の上限に特に制限はなく、例えば、 1.0 以下であってよく、 0.7 以下であってよい。REPの疎水性度は、例えば、 -1.0 以上 1.0 以下であってよく、 0 以上 0.7 以下であってよい。

[0040] 本明細書において、「REPの疎水性度」は、以下の方法により算出される値である。

[0041] 式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-\text{REP}]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-\text{REP}]_m - (A)_n\text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むフィブロインにおいて、最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列（図1の「領域A」に相当する配列。）に含まれる全てのREPにおいて、その領域の各アミノ酸残基の疎水性指標の総和を z とし、最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除き、更に $(A)_n$ モチーフを除いた全REPのアミノ酸残基の総数を y としたときに、REPの疎水性度は z/y として算出される。REPの疎水性度の算出において、「最もC末端側に位置する $(A)_n$ モチーフからドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」を対象としている理由は、上述した理由と同様である。

[0042] 本実施形態に係る改変フィブロインは、改変フィブロインを構成する全てのアミノ酸残基の疎水性指標（HI）の総和を求め、次にその総和を全アミノ酸残基数で除した値（平均HI）が、 -1.0 以上であることが好ましく、 -0.9 以上であることがより好ましく、 -0.8 以上であることが更に好ましく、 -0.7 以上であることが更に好ましく、 0 以上であることが更に

好ましく、0.2以上であることが更に好ましく、0.3以上であることが更により好ましく、0.4以上であることが特に好ましい。改変フィブロインの平均HIの上限に特に制限はなく、例えば、1.0以下であってよく、0.7以下であってよい。改変フィブロインの平均HIは、例えば、-1.0以上1.0以下であってよく、0以上0.7以下であってよい。

[0043] 天然由来のフィブロインは、式1：[(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含むタンパク質であり、具体的には、例えば、昆虫又はクモ類が産生するフィブロインが挙げられる。

[0044] 昆虫が産生するフィブロインとしては、例えば、ボンビックス・モリ (*Bombyx mori*)、クワコ (*Bombyx mandarina*)、天蚕 (*Antheraea yamamai*)、柞蚕 (*Antheraea pernyi*)、楓蚕 (*Eriogyna pyretorum*)、蓖蚕 (*Pilosamia Cynthia ricini*)、樗蚕 (*Samia cynthia*)、栗虫 (*Caligula japonica*)、チュッサー蚕 (*Antheraea mylitta*)、ムガ蚕 (*Antheraea assama*)等のカイコが産生する絹タンパク質、スズメバチ (*Vespa similima xanthoptera*)の幼虫が吐出するホーネットシルクタンパク質が挙げられる。

[0045] 昆虫が産生するフィブロインのより具体的な例としては、例えば、カイコ・フィブロインL鎖 (GenBankアクセッション番号M76430 (塩基配列)、AAA27840.1 (アミノ酸配列))が挙げられる。

[0046] クモ類が産生するフィブロインとしては、例えば、オニグモ、ニワオニグモ、アカオニグモ、アオオニグモ及びマメオニグモ等のオニグモ属 (*Araneus*属)に属するクモ、ヤマシロオニグモ、イエオニグモ、ドヨウオニグモ及びサツマノミダマシ等のヒメオニグモ属 (*Neoscona*属)に属するクモ、コオニグモモドキ等のコオニグモモドキ属 (*Pronus*属)に属するクモ、トリノフンダマシ及びオオトリノフンダマシ等のトリノフンダマ

シ属 (*Cyrtarachne* 属) に属するクモ、トゲグモ及びチブサトゲグモ等のトゲグモ属 (*Gasteracantha* 属) に属するクモ、マメイタイセキグモ及びムツトゲイセキグモ等のイセキグモ属 (*Ordgarius* 属) に属するクモ、コガネグモ、コガタコガネグモ及びナガコガネグモ等のコガネグモ属 (*Argiope* 属) に属するクモ、キジロオヒキグモ等のオヒキグモ属 (*Arachnura* 属) に属するクモ、ハツリグモ等のハツリグモ属 (*Acusilas* 属) に属するクモ、スズミグモ、キヌアミグモ及びハラビロスズミグモ等のスズミグモ属 (*Cytophora* 属) に属するクモ、ゲホウグモ等のゲホウグモ属 (*Poltys* 属) に属するクモ、ゴミグモ、ヨツデゴミグモ、マルゴミグモ及びカラスゴミグモ等のゴミグモ属 (*Cyclosa* 属) に属するクモ、及びヤマトカナエグモ等のカナエグモ属 (*Chorizopes* 属) に属するクモが産生するスパイダーシルクタンパク質、並びにアシナガグモ、ヤサガタアシナガグモ、ハラビロアシダカグモ及びウロコアシナガグモ等のアシナガグモ属 (*Tetragnatha* 属) に属するクモ、オオシロカネグモ、チュウガタシロカネグモ及びコシロカネグモ等のシロカネグモ属 (*Leucauge* 属) に属するクモ、ジョロウグモ及びオオジョロウグモ等のジョロウグモ属 (*Nephila* 属) に属するクモ、キンヨウグモ等のアズミグモ属 (*Menosira* 属) に属するクモ、ヒメアシナガグモ等のヒメアシナガグモ属 (*Dyschiriognatha* 属) に属するクモ、クロゴケグモ、セアカゴケグモ、ハイイロゴケグモ及びジュウサンボシゴケグモ等のゴケグモ属 (*Latrodectus* 属) に属するクモ、及びユープロステノプス属 (*Euprosthenops* 属) に属するクモ等のアシナガグモ科 (*Tetragnathidae* 科) に属するクモが産生するスパイダーシルクタンパク質が挙げられる。スパイダーシルクタンパク質としては、例えば、MaSp (MaSp1及びMaSp2)、ADF (ADF3及びADF4) 等の牽引糸タンパク質、MiSp (MiSp1及びMiSp2) 等が挙げられる。

[0047] クモ類が産生するフィブロインのより具体的な例としては、例えば、fib

roin-3 (adf-3) [*Araneus diadematus* 由来] (GenBankアクセッション番号AAC47010 (アミノ酸配列)、U47855 (塩基配列))、fibroin-4 (adf-4) [*Araneus diadematus* 由来] (GenBankアクセッション番号AAC47011 (アミノ酸配列)、U47856 (塩基配列))、dragline silk protein spidroin 1 [*Nephila clavipes* 由来] (GenBankアクセッション番号AAC04504 (アミノ酸配列)、U37520 (塩基配列))、major ampullate spidroin 1 [*Latrodectus hesperus* 由来] (GenBankアクセッション番号ABR68856 (アミノ酸配列)、EF595246 (塩基配列))、dragline silk protein spidroin 2 [*Nephila clavata* 由来] (GenBankアクセッション番号AAL32472 (アミノ酸配列)、AF441245 (塩基配列))、major ampullate spidroin 1 [*Euprosthenops australis* 由来] (GenBankアクセッション番号CAJ00428 (アミノ酸配列)、AJ973155 (塩基配列))、及びmajor ampullate spidroin 2 [*Euprosthenops australis*] (GenBankアクセッション番号CAM32249.1 (アミノ酸配列)、AM490169 (塩基配列))、minor ampullate silk protein 1 [*Nephila clavipes*] (GenBankアクセッション番号AAC14589.1 (アミノ酸配列))、minor ampullate silk protein 2 [*Nephila clavipes*] (GenBankアクセッション番号AAC14591.1 (アミノ酸配列))、minor ampullate spidroin-like protein [*Nephilengys cruentata*] (GenBankアクセッション番号ABR37278.1 (アミノ酸配列)) 等が挙げられる。

[0048] 天然由来のフィブロインのより具体的な例としては、更に、NCBI GenBankに配列情報が登録されているフィブロインを挙げることができる。例えば、NCBI GenBankに登録されている配列情報のうちDIVISIONとしてINVを含む配列の中から、DEFINITIONにspidroin、ampullate、fibroin、「silk及びpolypeptide」、又は「silk及びprotein」がキーワードとして記載されている配列、CDSから特定のproductの文字列、SOURCEからTISSUE TYPEに特定の文字列の記載された配列を抽出することにより確認することができる。

[0049] NCBI GenBankにアミノ酸配列情報が登録されているフィブロインを例示した方法により確認したところ、663種類のフィブロイン（このうち、クモ類由来のフィブロインは415種類）が抽出された。抽出された全てのフィブロインのうち、式1：[(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む天然由来のフィブロインは129種類存在した。このうち、更に上述の方法により算出されるGPGXXモチーフ含有率が10%以上である天然由来のフィブロインは下記表2に示す6種類であった。表2に示した6種類の天然由来のフィブロインのグルタミン残基含有率は、いずれも9.2%以上であった。

[0050] [表2]

アクセッション番号	GPGXXモチーフ含有率	グルタミン残基含有率	REPの疎水性度
DQ059135	22.13%	9.27%	-1.08
AF350276	22.88%	9.30%	-1.08
AF350278	26.26%	13.83%	-1.31
NEPFIBPR	22.24%	12.83%	-0.29
ADU47855	24.79%	19.21%	-1.40
AB829892	14.54%	13.80%	-0.11

[0051] 本実施形態に係る改変フィブロインは、例えば、改変前のフィブロインのドメイン配列において、(A)_nモチーフ又はREPに1又は複数のアラニン残

基を挿入すること、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換したことに相当する改変に加えることにより、得ることができる。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があってもよい。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。

[0052] 本実施形態に係る改変フィブロインは、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に対して、(A)_nモチーフ又はREPに1又は複数のアラニン残基を挿入すること、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換することに相当する変異を加え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に対して(A)_nモチーフ又はREPに1又は複数のアラニン残基を挿入すること、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換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。

[0053] 本発明に係る改変フィブロインの分子量は、特に限定されないが、例えば、40kDa以上700kDa以下であってよい。本発明に係る改変フィブロインの分子量は、例えば、40kDa以上、50kDa以上、60kDa以上、70kDa以上、80kDa以上、90kDa以上、又は100kDa以上であってよく、600kDa以下、500kDa以下、400kDa以下、300kDa以下、又は200kDa以下であってよい。

[0054] 本発明に係る改変フィブロインのより具体的な例として、(i)配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む、改変フィブロイン、又は(ii)配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

改変フィブロインを挙げることができる。

[0055] (i) の改変フィブロインについて説明する。配列番号1で示されるアミノ酸配列 (Met-PRT1069) は、天然由来のフィブロインである *Nephila clavipes* (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、(A)_nモチーフ中のアラニン残基が連続するアミノ酸配列をアラニン残基が連続する数を6つにし、QQを全てVFに置換し、かつ残りのQをIに置換する等のアミノ酸の改変を行ったものであり、REPの疎水性度は0.21である。

[0056] 配列番号2で示されるアミノ酸配列 (Met-PRT1070) は、配列番号1で示されるアミノ酸配列の各(A)_nモチーフにおいて、アラニン残基を1残基挿入することにより、連続するアラニン残基数を増加させたものであり、REPの疎水性度は0.21である。

[0057] 配列番号3で示されるアミノ酸配列 (Met-PRT1076) は、配列番号2で示されるアミノ酸配列のREPにおいて、いくつかのアミノ酸残基を欠失させたものであり、REPの疎水性度は0.21である。

[0058] 配列番号1、配列番号2及び配列番号3で示されるアミノ酸配列は、いずれも6つ以上連続するアラニンの含有率は20%以上である(表3)。

[0059] [表3]

改変フィブロイン	I. 各(A) _n モチーフにおける連続するアラニンの残基数	II. Iの残基数の連続するアラニンが存在する(A) _n モチーフの数	III. 全体のアミノ酸数残基の総数	VI. Iの残基数の連続するアラニンの全体に対する割合(%) ※
Met-PRT1069	6	21	616	20.45
Met-PRT1070	7	21	637	23.08
Met-PRT1076	7	21	597	24.62

※ (I × II / III) × 100により算出

[0060] (ii) の改変フィブロインは、配列番号1、配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むものである。(ii) の改変フィブロインもまた、式1: [(A)_nモチー

フーREP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフーREP]_mー(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含むタンパク質である。上記配列同一性は、80%以上であってもよく、85%以上であってもよく、95%以上であることが好ましい。

- [0061] 上述の改変フィブロインは、N末端及びC末端のいずれか一方又は両方にタグ配列を含んでいてもよい。これにより、改変フィブロインの単離、固定化、検出及び可視化等が可能となる。
- [0062] タグ配列として、例えば、他の分子との特異的親和性（結合性、アフィニティ）を利用したアフィニティタグを挙げることができる。アフィニティタグの具体例として、ヒスチジンタグ（Hisタグ）を挙げることができる。Hisタグは、ヒスチジン残基が4から10個程度並んだ短いペプチドで、ニッケル等の金属イオンと特異的に結合する性質があるため、金属キレートクロマトグラフィー（chelating metal chromatography）による改変フィブロインの単離に利用することができる。タグ配列の具体例として、例えば、配列番号4又は配列番号5で示されるアミノ酸配列（Hisタグを含むアミノ酸配列）が挙げられる。
- [0063] また、グルタチオンに特異的に結合するグルタチオンーSートランスフェラーゼ（GST）、マルトースに特異的に結合するマルトース結合タンパク質（MBP）等のタグ配列を利用することもできる。
- [0064] さらに、抗原抗体反応を利用した「エピトープタグ」を利用することもできる。抗原性を示すペプチド（エピトープ）をタグ配列として付加することにより、当該エピトープに対する抗体を結合させることができる。エピトープタグとして、HA（インフルエンザウイルスのヘマグルチニンのペプチド配列）タグ、mycタグ、FLAGタグ等を挙げることができる。エピトープタグを利用することにより、高い特異性で容易に改変フィブロインを精製することができる。
- [0065] さらにタグ配列を特定のプロテアーゼで切り離せるようにしたものも使用することができる。当該タグ配列を介して吸着したタンパク質をプロテアーゼ

処理することにより、タグ配列を切り離した改変フィブロインを回収することもできる。

[0066] タグ配列を含む改変フィブロインのより具体的な例として、(iii) 配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む、改変フィブロイン、又は(iv) 配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、改変フィブロインを挙げることができる。

[0067] 配列番号6、配列番号7又は配列番号8で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1、配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列のN末端に配列番号4又は配列番号5で示されるアミノ酸配列(Hisタグを含む)を付加したアミノ酸配列を有する。

[0068] (iii) の改変フィブロインは、配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0069] (iv) の改変フィブロインは、配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むものである。(iv) の改変フィブロインもまた、式1: $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 、又は式2: $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。上記配列同一性は、80%以上であってもよく、85%以上であってもよく、95%以上であることが好ましい。

[0070] 配列番号6で示されるアミノ酸配列(PRT1069)、配列番号7で示されるアミノ酸配列(PRT1070)及び配列番号8で示されるアミノ酸配列(PRT1076)で示されるアミノ酸配列は、いずれも6つ以上連続するアラニンの含有率は20%以上である(表4)。また、いずれもREPの疎水性度は0.21である。

[0071]

[表4]

改変フィブロイン	I、 各(A)モチーフ 一つにおける 連続するアラ ニンの残基数	II、 Iの残基数の連 続するアラニン が存在する(A) モチーフの数	III、 全体のアミノ酸 数残基の総数	VI、 Iの残基数 の連続する アラニンの 全体に対す る割合(%) ※
PRT1069	6	21	627	20.10
PRT1070	7	21	648	22.69
PRT1076	7	21	606	24.26

※ $(I \times II / III) \times 100$ により算出

[0072] 上述の改変フィブロインは、組換えタンパク質生産系において生産されたタンパク質を宿主の外部に放出するための分泌シグナルを含んでいてもよい。分泌シグナルの配列は、宿主の種類に応じて適宜設定することができる。

[0073] [熱安定性] 熱安定性（耐熱性）の評価の指標としては、例えば、熱分解温度（Td）及びガラス転移点（Tg）が挙げられる。熱分解温度は、材料の熱分解が開始する温度であり、ガラス転移点は、材料が結晶から液体に変化する温度である。熱分解温度及び／又はガラス転移点が高い程、熱安定性が高いと言える。本発明の改変フィブロイン等のタンパク質の熱分解温度は、例えば、加熱に伴う試料の質量変化を観察する、熱重量分析により測定することができる。また、本発明の改変フィブロイン等のタンパク質のガラス転移点は、例えば、高分子のガラス転移、結晶化、融解現象を熱流変化として検出する分析法である、示差走査熱量分析により、測定することができる。熱分解温度及び／又はガラス転移点の測定は、例えば、示差熱-熱重量同時測定装置（DTG-60H、島津製作所製）等を用いて行うことができる。例えば、高温でも一般特性が維持される及び高温に長時間さらしても一般特性が維持されることが挙げられる。本発明の改変フィブロイン等のタンパク質繊維の熱安定性は、例えば、長時間の高温処理に伴う試料の物性変化を観察する、試験片に一定の伸びを与えたときの抵抗力の大きさを測定する熱機械分析（TMA）ができる。

[0074] 本実施形態における改変フィブロインは、熱分解温度が、268℃以上、270℃以上、272℃、280℃又は290℃以上であってよい。また、本

実施形態における改変フィブロインの熱分解温度は、改変前のフィブロインと比較して、5℃以上、8℃以上、10℃以上又は12℃以上高いものであってよい。

[0075] 本実施形態における改変フィブロインは、ガラス転移点（T_g）が、185℃以上、190℃以上、192℃以上又は195℃以上であってよい。また、本実施形態における改変フィブロインのガラス転移点は、改変前のフィブロインと比較して、5℃以上、8℃以上、10℃以上又は12℃以上高いものであってよい。

[0076] 〔核酸〕 本発明に係る核酸は、本発明に係る改変フィブロインをコードする。核酸の具体例として、配列番号1、配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む改変フィブロイン、又はこれらのアミノ酸配列のN末端及びC末端のいずれか一方若しくは両方に配列番号4又は配列番号5で示されるアミノ酸配列（タグ配列）を結合させた改変フィブロイン等をコードする核酸が挙げられる。

[0077] 一実施形態に係る核酸は、本発明に係る改変フィブロインをコードする核酸の相補鎖とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ式1：[(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインをコードする核酸である。当該核酸によりコードされる改変フィブロインは、上記(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上であることが好ましい。また、当該核酸によりコードされる改変フィブロインは、REPの疎水性度が、-1.0以上であることが好ましい。また、当該核酸によりコードされる改変フィブロインは、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上である。であることが好ましい。

[0078] 「ストリンジентな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。「ストリンジентな条件」は、低ストリンジентな条件、中ストリンジентな条件及び

高ストリンジेंटな条件のいずれでもよい。低ストリンジेंटな条件とは、少なくとも85%以上の同一性が配列間に存在する時のみハイブリダイゼーションが起こることを意味し、例えば、0.5% SDSを含む5×SSCを用い、42℃でハイブリダイズする条件が挙げられる。中ストリンジेंटな条件とは、少なくとも90%以上の同一性が配列間に存在する時のみハイブリダイゼーションが起こることを意味し、例えば、0.5% SDSを含む5×SSCを用い、50℃でハイブリダイズする条件が挙げられる。高ストリンジेंटな条件とは、少なくとも95%以上の同一性が配列間に存在する時のみハイブリダイゼーションが起こることを意味し、例えば、0.5% SDSを含む5×SSCを用い、60℃でハイブリダイズする条件が挙げられる。

[0079] 他の実施形態に係る核酸は、本発明に係る改変フィブロインをコードする核酸と90%以上の配列同一性を有し、かつ式1： $[(A)_n \text{モチーフ} - REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ} - REP]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含む改変フィブロインをコードする核酸である。当該核酸によりコードされる改変フィブロインは、上記 $(A)_n$ モチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上であることが好ましい。また、当該核酸によりコードされる改変フィブロインは、REPの疎水性度が、-1.0以上であることが好ましい。また、当該核酸によりコードされる改変フィブロインは、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上であることが好ましい。上記配列同一性は、80%以上であってもよく、85%以上であってもよく、95%以上であることが好ましい。

[0080] [宿主及び発現ベクター] 本実施形態において、発現ベクターは、本発明に係る核酸配列と、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。調節配列は、宿主における組換えタンパク質の発現を制御する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合配列、転写終結配列等）であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。発

現ベクターの種類は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、フォスミドベクター、人工染色体ベクター等、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

- [0081] 本発明に係る宿主は、本発明に係る発現ベクターで形質転換されたものである。宿主として、原核生物、並びに酵母、糸状真菌、昆虫細胞、動物細胞及び植物細胞等の真核生物のいずれも好適に用いることができる。
- [0082] 発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製が可能、又は宿主の染色体中への組込みが可能で、本発明に係る核酸を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが好適に用いられる。
- [0083] 細菌等の原核生物を宿主として用いる場合は、本発明に係る発現ベクターは、原核生物中で自立複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明に係る核酸及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。
- [0084] 原核生物としては、エシェリヒア属、ブレヴィバチルス属、セラチア属、バチルス属、ミクロバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属及びシュードモナス属等に属する微生物を挙げることができる。
- [0085] エシェリヒア属に属する微生物として、例えば、エシェリヒア・コリ BL 21 (ノバジェン社)、エシェリヒア・コリ BL 21 (DE 3) (ライフテクノロジーズ社)、エシェリヒア・コリ BL R (DE 3) (メルクミリア社)、エシェリヒア・コリ DH 1、エシェリヒア・コリ G 1 6 9 8、エシェリヒア・コリ HB 1 0 1、エシェリヒア・コリ JM 1 0 9、エシェリヒア・コリ K 5 (ATCC 23506)、エシェリヒア・コリ KY 3 2 7 6、エシェリヒア・コリ MC 1 0 0 0、エシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 (ATCC 47076)、エシェリヒア・コリ No. 49、エシェリヒア・コリ Rosetta (DE 3) (ノバジェン社)、エシェリヒア・コリ TB 1、エシェリヒア・コリ Tuner (ノバジェン社)、エシェリヒア・コリ Tuner (DE 3) (ノバジェン社)、エシェリヒア・コリ W 1 4 8 5、エシェリヒア・コリ W 3 1 1 0 (ATCC

27325)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue、エシェリヒア・コリ XL2-Blue等を挙げる
ことができる。

[0086] ブレヴィバチルス属に属する微生物として、例えば、ブレヴィバチルス・アグリ、ブレヴィバチルス・ボルステレンシス、ブレヴィバチルス・セントロポラス、ブレヴィバチルス・フォルモサス、ブレヴィバチルス・インボカツス、ブレヴィバチルス・ラチロスポラス、ブレヴィバチルス・リムノフィルス、ブレヴィバチルス・パラブレビス、ブレヴィバチルス・レウスゼリ、ブレヴィバチルス・サーモルバー、ブレヴィバチルス・ブレビス47 (FERM BP-1223)、ブレヴィバチルス・ブレビス47K (FERM BP-2308)、ブレヴィバチルス・ブレビス47-5 (FERM BP-1664)、ブレヴィバチルス・ブレビス47-5Q (JCM8975)、ブレヴィバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087)、ブレヴィバチルス・チョウシネンシスHPD31-S (FERM BP-6623)、ブレヴィバチルス・チョウシネンシスHPD31-OK (FERM BP-4573)、ブレヴィバチルス・チョウシネンシスSP3株 (Takara社製)等を挙げる
ことができる。

[0087] セラチア属に属する微生物として、例えば、セラチア・リクエファシエンシス (*Serratia liquefacience*) ATCC14460、セラチア・エントモフィラ (*Serratia entomophila*)、セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*)、セラチア・フォンティコーラ (*Serratia fonticola*)、セラチア・グリメシ (*Serratia grimesii*)、セラチア・プロテアマキュランシス (*Serratia proteamaculans*)、セラチア・オドリフェラ (*Serratia odorifera*)、セラチア・プリムシカ (*Serratia plymuthica*)、セラチア・ルビダエ (*Serratia rubidaea*)等を挙げる
ことができる。

- [0088] バチルス属に属する微生物として、例えば、バチルス・サチラス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) 等を挙げるができる。
- [0089] ミクロバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354等を挙げるができる。
- [0090] ブレビバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14020、ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14067) ATCC 13826, ATCC 14067、ブレビバクテリウム・インマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*) ATCC 14068、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869) ATCC 13665, ATCC 13869、ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC 14066、ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240、ブレビバクテリウム・アルバム ATCC 15111、ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC 15112等を挙げるができる。
- [0091] コリネバクテリウム属に属する微生物として、例えば、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*) ATCC 6871, ATCC 6872、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14067、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC 13870、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806、コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC 21511、コリネバクテリウム・カル

ナエATCC15991、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13020、ATCC13032、ATCC13060、コリネバクテリウム・リリウムATCC15990、コリネバクテリウム・メラセコーラATCC17965、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12340 (FERMBP-1539)、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868等を挙げる事ができる。

[0092] シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物として、例えば、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・ブラシカセラム (*Pseudomonas brassicacearum*)、シュードモナス・フルバ (*Pseudomonas fulva*)、及びシュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) D-0110等を挙げる事ができる。

[0093] 上記宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394号公報)、又はGene, 17, 107 (1982) やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げる事ができる。

[0094] ブレヴィバチルス属に属する微生物の形質転換は、例えば、Takahashiらの方法 (J. Bacteriol., 1983, 156:1130-1134) や、Takagiらの方法 (Agric. Biol. Chem., 1989, 53:3099-3100)、又はOkamotoらの方法 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61:202-203) により実施することができる。

[0095] 本発明に係る核酸を導入するベクター (以下、単に「ベクター」という。) としては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれも

ベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600号公報)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene社製)、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400) より調製、特開昭60-221091号公報]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091号公報]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製) 等を挙げる事ができる。

[0096] 宿主としてEscherichia coliを用いる場合は、pUC18、pBluescript II、pSupex、pET22b、pCold等を好適なベクターとして挙げる事ができる。

[0097] ブレヴィバチルス属に属する微生物に好適なベクターの具体例として、枯草菌ベクターとして公知であるpUB110、又はpHY500 (特開平2-31682号公報)、pNY700 (特開平4-278091号公報)、pHY4831 (J. Bacteriol., 1987, 1239-1245)

、pNU200（鵜高重三、日本農芸化学会誌1987、61：669-676）、pNU100（Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 30：75-80）、pNU211（J. Biochem., 1992, 112：488-491）、pNU211R2L5（特開平7-170984号公報）、pNH301（Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58：525-531）、pNH326、pNH400（J. Bacteriol., 1995, 177：745-749）、pHT210（特開平6-133782号公報）、pHT110R2L5（Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 42：358-363）、又は大腸菌とブレビバチルス属に属する微生物とのシャトルベクターであるpNCO2（特開2002-238569号公報）等を挙げる事ができる。

[0098] プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであれば制限されない。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌又はファージ等に由来するプロモーターを挙げる事ができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター（Ptrp×2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

[0099] リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明に係る発現ベクターにおいて、本発明に係る核酸の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

[0100] 真核生物の宿主としては、例えば、酵母、糸状真菌（カビ等）及び昆虫細胞を挙げる事ができる。

[0101] 酵母としては、例えば、サッカロマイセス（Saccharomyces）属、シゾサッカロマイセス（Schizosaccharomyces）属

、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、ヤロウシア属及びハンゼヌラ属等に属する酵母を挙げることができる。より具体的には、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリベロマイセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クリベロマイセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シワニオマイセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*)、シワニオマイセス・オシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、キャンディダ・ユーティリス (*Candida utilis*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・アングスタ (*Pichia angusta*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・ポリモルファ (*Pichia polymorpha*)、ピキア・スティピチス (*Pichia stipitidis*)、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等を挙げることができる。

[0102] 酵母を宿主細胞として用いる場合の発現ベクターは通常、複製起点（宿主における増幅が必要である場合）及び大腸菌中でのベクターの増殖のための選抜マーカー、酵母における組換えタンパク質発現のためのプロモーター及びターミネーター、並びに酵母のための選抜マーカーを含むことが好ましい。

[0103] 発現ベクターが非組込みベクターの場合、さらに自己複製配列 (ARS) を含むことが好ましい。これにより細胞内における発現ベクターの安定性を向上させることができる (Myers, A. M., et al. (1986))

Gene 45 : 299-310)。

- [0104] 酵母を宿主として用いる場合のベクターとしては、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37419)、Ylp、pHS19、pHS15、pA0804、pHIL301、pHIL-S1、pPIC9K、pPICZ α 、pGAPZ α 、pPICZ B等を挙げるができる。
- [0105] プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば制限されない。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1プロモーター、pGAPプロモーター、pGCW14プロモーター、AOX1プロモーター、MOXプロモーター等を挙げるができる。
- [0106] 酵母への発現ベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 (Methods Enzymol., 194, 182 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163 (1983))、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法等を挙げるができる。
- [0107] 糸状真菌としては、例えば、アクレモニウム (Acremonium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ウスチラーゴ (Ustilago) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、ノイロスポラ (Neurospora) 属、フザリウム (Fusarium) 属、フミコーラ (Humicola) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、マイセリオフトラ (Myceliophthora) 属、ボトリティス (Botrytis) 属、マグナポルサ (Magnaporthe) 属、ムコア (Mucor) 属、メタリチウム (Metarhizium) 属、モナスカス (

Monascus) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、及びリゾムコア属に属する菌等を挙げることができる。

[0108] 糸状真菌の具体例として、アクレモニウム・アラバメンゼ (Acremonium alabamense)、アクレモニウム・セルロリティカス (Acremonium cellulolyticus)、アスペルギルス・アクレアツス (アキュレータス) (Aspergillus aculeatus)、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori)、アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・サケ (Aspergillus sake)、アスペルギルス・ゾジエ (ソージャ) (Aspergillus sojae)、アスペルギルス・テュビゲンシス (Aspergillus tubigenensis)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、アスペルギルス・ニデュランス (Aspergillus nidulans)、アスペルギルス・パラシチクス (Aspergillus parasiticus)、アスペルギルス・フィクム (フィキュウム) (Aspergillus ficuum)、アスペルギルス・フェニクス (Aspergillus phoenicis)、アスペルギルス・フォエチダス (フェチダス) (Aspergillus foetidus)、アスペルギルス・フラーブス (Aspergillus flavus)、アスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus)、アスペルギルス・ヤポニクス (ジャポニカス) (Aspergillus japonicus)、トリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride)、トリコデルマ・ハージアヌム (Trichoderma harzianum)、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei)、クリソスポリウム・ルクノエンス (Chrysosporium lucknowense)、サーモアスクス (Thermoascus)、スポロトリクム (Sporotrichum)、スポロトリクム・セルロフィルム (Sporotrichum cellulophilu

m)、タラロマイセス (*Talaromyces*)、チエラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、チラビア (*Thielavia*)、ノイロスポラ・クラザ (*Neurospora crassa*)、フザリウム・オキシスポーラス (*Fusarium oxysporus*)、フザリウム・グラミネラム (*Fusarium graminearum*)、フザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*)、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ペニシリウム・クリゾゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・カマンベルティ (*Penicillium camemberti*)、ペニシリウム・カネセンス (*Penicillium canescens*)、ペニシリウム・エメルソニ (*Penicillium emersonii*)、ペニシリウム・フニコロスム (*Penicillium funiculosum*)、ペニシリウム・グリゼオロゼウム (*Penicillium griseoroseum*)、ペニシリウム・パープロゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、ペニシリウム・ロケフォルチ (*Penicillium roqueforti*)、マイセリオフトラ・サーモフィルム (*Myceliophthora thermophilum*)、ムコア・アンビグス (*Mucor ambiguus*)、ムコア・シルシネロイデス (*Mucor circinelloides*)、ムコア・フラギリス (*Mucor fragilis*)、ムコア・ヘマリス (*Mucor hiemalis*)、ムコア・イナエキスポラス (*Mucor inaequisporus*)、ムコア・オブロンジエリプティカス (*Mucor oblongiellipticus*)、ムコア・ラセモサス (*Mucor racemosus*)、ムコア・レクルバス (*Mucor recurvus*)、ムコア・サトゥルニナス (*Mucor saturninus*)、ムコア・サブティリススミウス (*Mucor subtilissimus*)、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea poly*

lymorpha)、ファネロケーテ・クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium)、リゾムコア・ミーヘイ (Rhizomucor miehei)、リゾムコア・プシルス (Rhizomucor pusillus)、リゾプス・アルヒザス (Rhizopus arrhizus) 等を挙げるができる。

[0109] 宿主が糸状真菌である場合のプロモーターとしては、解糖系に関する遺伝子、構成的発現に関する遺伝子、加水分解に関する酵素遺伝子等いずれであってもよく、具体的には amyB、glaA、agdA、glaB、TEF1、xynF1 tannase gene、No. 8AN、gpdA、pgkA、enoA、melO、sodM、catA、catB等を挙げるができる。

[0110] 糸状真菌への発現ベクターの導入は、従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、Cohenらの方法 (塩化カルシウム法) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168:111 (1979)]、コンピテント法 [J. Mol. Biol., 56:209 (1971)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

[0111] 昆虫細胞として、例えば、鱗翅類の昆虫細胞が挙げられ、より具体的には、Sf9、及びSf21等のスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 由来の昆虫細胞、並びに、High 5等のイラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) 由来の昆虫細胞等が挙げられる。

[0112] 昆虫細胞を宿主として用いる場合のベクターとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等のバキュロウイルス (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman

an and Company, New York (1992)) を挙げる
ことができる。

[0113] 昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・
イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual
, W. H. Freeman and Company, New York
(1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に
記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。すなわち
、組換え遺伝子導入ベクター及びバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して
昆虫細胞培養上清中に組換えウイルス（発現ベクター）を得た後、さらに組
換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができ
る。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pV
L1392、pVL1393、pBlueBac111（ともにInvit
rogen社製）等を挙げるができる。

[0114] 組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクター
とバキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（
特開平2-227075号公報）、リポフェクション法（Proc. Nat
l. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)）等を挙げる
ことができる。

[0115] 本発明に係る組換えベクターは、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝
子をさらに含有していることが好ましい。例えば、大腸菌においては、選択
マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン
等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。栄養要求性に関与
する遺伝子変異を相補できる劣性の選択マーカーも使用できる。酵母におい
ては、選択マーカー遺伝子として、ジェネティシンに対する耐性遺伝子を用
いることができ、栄養要求性に関与する遺伝子変異を相補する遺伝子、LE
U2、URA3、TRP1、HIS3等の選択マーカーも使用できる。糸状
真菌においては、選択マーカー遺伝子として、niaD (Biosci. B

iotecnol. Biochem., 59, 1795-1797 (1995)), argB (Enzyme Microbiol Technol, 6, 386-389, (1984)), sC (Gene, 84, 329-334, (1989)), ptrA (Biosci Biotechnol Biochem, 64, 1416-1421, (2000)), pyrG (Biochem Biophys Res Commun, 112, 284-289, (1983)), amdS (Gene, 26, 205-221, (1983)), オーレオバシジン耐性遺伝子 (Mol Gen Genet, 261, 290-296, (1999)), ベノミル耐性遺伝子 (Proc Natl Acad Sci USA, 83, 4869-4873, (1986)) 及びハイグロマイシン耐性遺伝子 (Gene, 57, 21-26, (1987)) からなる群より選ばれるマーカー遺伝子、ロイシン要求性相補遺伝子等が挙げられる。また、宿主が栄養要求性変異株の場合には、選択マーカー遺伝子として当該栄養要求性を相補する野生型遺伝子を用いることもできる。

[0116] 本発明に係る発現ベクターで形質転換された宿主の選択は、本発明に係る核酸に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション及びコロニーハイブリダイゼーション等で行うことができる。当該プローブとしては、本発明に係る核酸の配列情報に基づき、PCR法によって増幅した部分DNA断片をラジオアイソトープ又はジゴキシゲニンで修飾したものをを用いることができる。

[0117] [改変フィブロインの製造方法] 本発明に係る改変フィブロインは、本実施形態に係る発現ベクターで形質転換された宿主により、本発明に係る核酸を発現させる工程を含む方法により、製造することができる。一実施形態に係る改変フィブロインの製造方法は、本発明に係る改変フィブロイン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工程を含む。

- [0118] 発現方法としては、直接発現のほか、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞により発現させた場合には、糖又は糖鎖が付加されたポリペプチドとして改変フィブロインを得ることができる。
- [0119] 本発明に係る改変フィブロインは、例えば、本発明に係る発現ベクターで形質転換された宿主を培養培地中で培養し、培養培地中に本発明に係る改変フィブロインを生成蓄積させ、該培養培地から採取することにより製造することができる。本発明に係る宿主を培養培地中で培養する方法は、宿主の培養に通常用いられる方法に従って行うことができる。
- [0120] 本発明に係る宿主が、大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物である場合、本発明に係る宿主の培養培地として、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源及び無機塩類等を含有し、該宿主の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。
- [0121] 炭素源としては、該宿主が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、及びこれらを含む糖蜜、デンプン及びデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸及びプロピオン酸等の有機酸、並びにエタノール及びプロパノール等のアルコール類を用いることができる。
- [0122] 窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム及びリン酸アンモニウム等の無機酸又は有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びにペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物を用いることができる。
- [0123] 無機塩としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅及び炭酸カルシウムを用いることができる。
- [0124] 大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物の培養は、例えば、振盪培養又は深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行うことができる。培養温度は、例え

ば、15～40℃である。培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中の培養培地のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。培養培地のpHの調整は、無機酸、有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム及びアンモニア等を用いて行うことができる。

[0125] また、培養中必要に応じて、アンピシリン及びテトラサイクリン等の抗生物質を培養培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

[0126] 昆虫細胞の培養培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (PharMingen社製)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社製)、ExCell 400、ExCell 405 (いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) 等を用いることができる。

[0127] 昆虫細胞の培養は、例えば、培養培地のpH6～7、培養温度25～30℃等の条件下で、培養時間1～5日間とすることができる。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培養培地に添加してもよい。

[0128] 宿主が植物細胞の場合、形質転換された植物細胞をそのまま培養してもよく、また植物の器官に分化させて培養することができる。該植物細胞を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、又はこれらの培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

[0129] 動物細胞の培養は、例えば、培養培地のpH5～9、培養温度20～40℃等の条件下で、培養時間3～60日間とすることができる。また、培養中必

要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0130] 本実施形態に係る発現ベクターで形質転換された宿主を用いて改変フィブロインを生産する方法としては、該改変フィブロインを宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法がある。使用する宿主細胞、及び生産させる改変フィブロインの構造を変えることにより、これらの各方法を選択することができる。

[0131] 例えば、改変フィブロインが宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法（*J. Biol. Chem.*, 264, 17619（1989））、ロウらの方法（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8227（1989）、*Genes Develop.*, 4, 1288（1990））、又は特開平5-336963号公報、国際公開第94/23021号等に記載の方法を準用することにより、改変フィブロインを宿主細胞外に積極的に分泌させるように変更させることができる。すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、改変フィブロインの活性部位を含むポリペプチドにシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、改変フィブロインを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

[0132] 本実施形態に係る発現ベクターで形質転換された宿主により生産された改変フィブロインは、タンパク質の単離精製に通常用いられている方法で単離及び精製することができる。例えば、改変フィブロインが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、宿主細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁した後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー及びダイノミル等により宿主細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、タンパク質の単離精製に通常用いられている方法、すなわち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等

のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の方法を単独又は組み合わせて使用し、精製標品を得ることができる。

[0133] 上記クロマトグラフィーとしては、フェニルトヨパール(東ソー)、DEAEトヨパール(東ソー)、セファデックスG-150(ファルマシアバイオテック)を用いたカラムクロマトグラフィーが好ましく用いられる。

[0134] また、改変フィブロインが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に宿主細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として改変フィブロインの不溶体を回収する。回収した改変フィブロインの不溶体は蛋白質変性剤で可溶化することができる。該操作の後、上記と同様の単離精製法により改変フィブロインの精製標品を得ることができる。

[0135] 改変フィブロイン、又は改変フィブロインに糖鎖の付加された誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から改変フィブロイン又はその誘導体を回収することができる。すなわち、培養物を遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0136] 〔人造改変フィブロイン組成物〕 本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、本発明に係る改変フィブロインを少なくとも含むものである。

[0137] 人造改変フィブロイン組成物における、改変フィブロインの含有量は、人造改変フィブロイン組成物全量を基準として、30~100質量%であってよく、35~100質量%であるのが好ましく、40~100質量%であるのがより好ましい。

[0138] 本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、その形態、用途等に応じて、更に他の添加剤を含むものであってもよい。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、及び合成樹脂が挙げられる。添加剤の含有量は、改変フィブロインの全量100質量部に対して、50質量部以下であってよい。

[0139] 本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、粉末状、ペースト状、液状（例えば、懸濁液、溶液）のいずれの形態であってもよい。また、本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、原料組成物（例えば、タンパク質粉末、ドープ液）の形態の他、当該人造改変フィブロイン組成物を含む、又は当該人造改変フィブロイン組成物からなる成形体（例えば、繊維、糸、フィルム、発泡体、粒体、モールド成形体）の形態であってもよい。

[0140] （ドープ液） 本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、ドープ液の形態であってもよい。本実施形態に係るドープ液は、改変フィブロインと、溶媒とを少なくとも含む。本実施形態に係るドープ液は、更に溶解促進剤を含むものであってもよい。本実施形態に係るドープ液はまた、更に改変フィブロイン以外のタンパク質を含むものであってもよい。

[0141] 溶媒としては、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）、ギ酸、並びに尿素、グアニジン、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、臭化リチウム、塩化カルシウム及びチオシアン酸リチウム等を含む水溶液等を挙げることができる。これらの溶媒は、1種単独で使用してもよく、2種以上を混合して使用してもよい。

[0142] ドープ液における改変フィブロインの含有量は、ドープ液の全質量を基準として、15質量%以上、30質量%以上、40質量%以上又は50質量%以上であってよい。改変フィブロインの含有量は、ドープ液の製造効率の観点から、ドープ液の全質量を基準として、70質量%以下、65質量%以下、又は60質量%以下であってよい。

[0143] 溶解促進剤としては、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が挙げられる。ルイス塩基としては、例えば、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、シアン酸イオン等が挙げられる。ルイス酸としては、例えば、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、錯イオン等が挙げられる。ルイス酸とルイス塩基とからなる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。

[0144] 溶解促進剤の含有量は、改変フィブロインの全量100質量部に対して、1.0質量部以上、5.0質量部以上、9.0質量部以上、15質量部以上又は20.0質量部以上であってよい。溶解促進剤の含有量は、改変フィブロインの全量100質量部に対して、40質量部以下、35質量部以下又は30質量部以下であってよい。

- [0145] 本実施形態に係るドープ液の製造時に、30～90℃に加温してもよい。使用する溶媒、改変フィブロインの種類等に応じて溶解可能な温度を適時設定すればよい。溶解を促進するために振盪、攪拌してもよい。
- [0146] 本実施形態に係るドープ液の粘度は、ドープ液の用途等に応じて適宜設定してよい。例えば、本実施形態に係るドープ液を紡糸原液として使用する場合、その粘度は、紡糸方法に応じて適宜設定してよく、例えば、35℃において100～15,000cP（センチポイズ）、40℃において100～30,000cP（センチポイズ）等に設定すればよい。紡糸原液の粘度は、例えば京都電子工業社製の商品名“EMS粘度計”を使用して測定することができる。
- [0147]（タンパク質繊維） 本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、タンパク質繊維の形態であってよい。タンパク質繊維は、例えば、フィブロインの紡糸に通常使用されている方法で上述したドープ液（紡糸液）を紡糸することにより、得ることができる。
- [0148] 紡糸方法としては、本発明に係る改変フィブロインを紡糸できる方法であれば特に制限されず、例えば、乾式紡糸、熔融紡糸、湿式紡糸等を挙げることができる。好ましい紡糸方法としては、湿式紡糸を挙げることができる。
- [0149] 湿式紡糸では、ドープ液を紡糸口金（ノズル）から凝固液（凝固液槽）の中に押出して、凝固液中で改変フィブロインを固めることにより糸の形状の未延伸糸を得ることができる。凝固液としては、脱溶媒できる溶液であればよく、例えば、メタノール、エタノール及び2-プロパノール等の炭素数1～5の低級アルコール、並びにアセトン等を挙げることができる。凝固液には、適宜水を加えてもよい。凝固液の温度は、0～30℃であることが好ましい。紡糸口金として、直径0.1～0.6mmのノズルを有するシリンジポンプを使用する場合、押し出し速度は1ホール当たり、0.2～6.0ml／時間が好ましく、1.4～4.0ml／時間であることがより好ましい。凝固液槽の長さは、脱溶媒が効率的に行える長さがあればよく、例えば、200～500mmである。未延伸糸の引き取り速度は、例えば、1～20m

／分であってよく、1～3 m／分であることが好ましい。滞留時間は、例えば、0.01～3分であってよく、0.05～0.15分であることが好ましい。また、凝固液中で延伸（前延伸）をしてもよい。低級アルコールの蒸発を抑えるため凝固液を低温に維持し、未延伸糸の状態でもよい。凝固液槽は多段設けてもよく、また延伸は必要に応じて、各段、又は特定の段で行ってもよい。

[0150] 上記の方法で得られた未延伸糸（又は前延伸糸）は、延伸工程を経て延伸糸とすることができる。延伸方法としては、湿熱延伸、乾熱延伸等をあげることができる。

[0151] 湿熱延伸は、温水中、温水に有機溶剤等を加えた溶液中、スチーム加熱中で行うことができる。温度としては、例えば、50～90℃であってよく、75～85℃が好ましい。湿熱延伸では、未延伸糸（又は前延伸糸）を、例えば、1～10倍延伸することができ、2～8倍延伸することが好ましい。

[0152] 乾熱延伸は、電気管状炉、乾熱板等を使用することができる。温度としては、例えば、140℃～270℃であってよく、160℃～230℃が好ましい。乾熱延伸では、未延伸糸（又は前延伸糸）を、例えば、0.5～8倍延伸することができ、1～4倍延伸することが好ましい。

[0153] 湿熱延伸及び乾熱延伸はそれぞれ単独で行ってもよく、またこれらを多段で、又は組み合わせて行ってもよい。すなわち、一段目延伸を湿熱延伸で行い、二段目延伸を乾熱延伸で行う、又は一段目延伸を湿熱延伸行い、二段目延伸を湿熱延伸行い、更に三段目延伸を乾熱延伸で行う等、湿熱延伸及び乾熱延伸を適宜組み合わせて行うことができる。

[0154] 延伸工程における最終的な延伸倍率は、未延伸糸（又は前延伸糸）に対して、例えば、5～20倍であり、6～11倍であることが好ましい。

[0155] タンパク質繊維は、延伸した後、タンパク質繊維内のポリペプチド分子間で化学的に架橋させてもよい。架橋させることができる官能基は、例えば、アミノ基、カルボキシル基、チオール基及びヒドロキシ基等が挙げられる。例えば、ポリペプチドに含まれる

リジン側鎖のアミノ基は、グルタミン酸又はアスパラギン酸側鎖のカルボキシル基と脱水縮合によりアミド結合で架橋できる。真空加熱下で脱水縮合反応を行なうことにより架橋してもよいし、カルボジイミド等の脱水縮合剤により架橋させてもよい。

[0156] ポリペプチド分子間の架橋は、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等の架橋剤を用いて行ってもよく、トランスグルタミナーゼ等の酵素を用いて行ってもよい。カルボジイミドは、一般式 $R_1N=C=NR_2$ (但し、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立に、炭素数 1~6 のアルキル基、シクロアルキル基を含む有機基を示す。) で示される化合物である。カルボジイミドの具体例として、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC)、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) 等が挙げられる。これらの中でも、EDC 及び DIC はポリペプチド分子間のアミド結合形成能が高く、架橋反応し易いことから好ましい。

[0157] 架橋処理は、タンパク質繊維に架橋剤を付与して真空加熱乾燥で架橋するのが好ましい。架橋剤は純品をタンパク質繊維に付与してもよいし、炭素数 1~5 の低級アルコール及び緩衝液等で 0.005~10 質量%の濃度に希釈したものをタンパク質繊維に付与してもよい。架橋処理は、温度 20~45 °C で 3~42 時間行うのが好ましい。架橋処理により、タンパク質繊維に更に高い応力 (強度) を付与することができる。

[0158] (フィルム) 本実施形態に係る人造改変フィブロイン組成物は、フィルムの形態であってよい。フィルムは、例えば、上述したドープ液を基材表面にキャスト成形し、乾燥及び/又は脱溶媒することにより得ることができる。

[0159] ドープ溶液の粘度は 15~80 cP (センチポアズ) であることが好ましく、20~70 cP であることがより好ましい。

[0160] ドープ溶液を 100 質量%としたとき、本発明に係る改変フィブロインの濃

度は3～50質量%であることが好ましく、3.5～35質量%であることがより好ましく、4.2～15.8質量%であることがさらに好ましい。

[0161] ドープ溶液調製時に、30～60℃に加温して行ってもよい。溶解を促進するために振盪、攪拌してもよい。

[0162] 基材は、樹脂基板、ガラス基板、金属基板等であってよい。基材は、キャスト成形後のフィルムを容易に剥離できる観点から、好ましくは樹脂基板である。樹脂基板としては、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ることがより好ましい。

[0163] 具体的な手順を説明すると、まずドープ液を基材表面に流延し、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（例えば、乾燥及び／又は脱溶媒後の厚さで1～1000μm）の濡れ膜を作製する。

[0164] 乾燥及び／又は脱溶媒は、乾式又は湿式で行うことができる。乾式で行う方法としては、真空乾燥、熱風乾燥、風乾等を挙げることができる。湿式で行う方法としては、キャストフィルムを脱溶媒液（凝固液とも言う）に浸漬して溶媒を脱離する方法等を挙げることができる。脱溶媒液として、水、メタノール、エタノール、2-プロパノール等の炭素数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等を挙げることができる。脱溶媒液（凝固液）の温度は0～90℃であることが好ましい。

[0165] 乾燥及び／又は脱溶媒後の未延伸フィルムは、水中で1軸延伸又は2軸延伸することができる。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、好ましくは1.

0.1～6倍、より好ましくは1.05～4倍である。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、20～90℃の水温で行われることが好ましい。延伸後のフィルムは、50～200℃の乾熱で5～600秒間熱固定することが好ましい。この熱固定により、常温における寸法安定性が得られる。なお、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。

[0166]〔人造改変フィブロイン組成物の製造方法〕 本発明に係る人造改変フィブロイン組成物は、本発明に係る改変フィブロインを用意する工程を含む方法により、製造することができる。本発明に係る人造改変フィブロイン組成物の製造方法は、本発明に係る改変フィブロインを含有する改変フィブロイン溶解液（例えば、ドープ液）を調整する工程を更に含むものであってもよい。

[0167]〔改変フィブロインの熱安定性を向上させる方法〕 本実施形態に係る、式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n\text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含む改変フィブロインの熱安定性を向上させる方法は、改変前のフィブロインにおける少なくとも1つの $(A)_n$ モチーフ又はREPに、1又は複数のアラニン残基を挿入するか、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換することにより、少なくとも1つの $(A)_n$ モチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させることを含む。改変前のフィブロインと比較して、改変後のフィブロインの熱分解温度（Td）は5℃以上高い。なお、改変前のフィブロインには、天然由来のフィブロイン及び改変フィブロインが含まれる。

[0168] ここで、 $(A)_n$ モチーフは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基数は4～27である。 $(A)_n$ モチーフのアミノ酸残基数は、4～20、8～20、10～20、4～16、5～10、6～12、6～18、7～10、7～14、8～16、又は11～16であってもよい。また、 $(A)_n$ 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80

%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在する(A)_n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。

[0169] (A)_nモチーフは、(A)_n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が80%以上であればよく、85%以上であることが好ましく、90%以上であることがより好ましく、95%以上であることが更に好ましく、100%であること(アラニン残基のみで構成されることを意味する)が更により好ましい。ドメイン配列中に複数存在する(A)_nモチーフは、少なくとも7つがアラニン残基のみで構成されることが好ましい。アラニン残基のみで構成されるとは、(A)_nモチーフが、(A|a)_k(A|aはアラニン残基を示し、kは4～27の整数、好ましくは4～20の整数、より好ましくは4～16の整数を示す。)で表されるアミノ酸配列を有することを意味する。

[0170] 本実施形態に係る方法は、改変前のフィブロインにおける少なくとも1つの(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させることを含む。また、本実施形態に係る方法は、改変前のフィブロインにおける少なくとも2つ以上の(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させるものであってもよく、改変前のフィブロインにおける少なくとも5つ以上の(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させるものであってもよく、改変前のフィブロインにおける少なくとも6つ以上の(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させるものであってもよく、改変前のフィブロインにおける少なくとも7つ以上の(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させるものであってもよく、改変前のフィブロインにおけるすべての(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させるものであってもよい。これにより、当該改変フィブロインの熱安定性を向上す

ることができる。少なくとも1つの(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させることは、改変前のフィブロインにおける少なくとも1つの(A)_nモチーフ若しくはREPに、1若しくは複数のアラニン残基を挿入すること、及び／又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換することによるものであってよい。なお、改変前のフィブロインは、天然由来のフィブロインであってもよく、改変フィブロインであってもよい。

[0171] 本実施形態に係る方法は、改変前のフィブロインにおける少なくとも1つの(A)_nモチーフ若しくはREPに、1若しくは複数のアラニン残基を挿入すること、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換する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加えることを含んでもよい。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。

[0172] 本実施形態に係る方法は、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に対して(A)_nモチーフ又はREPに1又は複数のアラニン残基を挿入すること、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換することに相当する変異を加えることを含むことができる。改変後のフィブロインは、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列に対して(A)_nモチーフ又はREPに1又は複数のアラニン残基を挿入すること、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換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。

[0173] 本実施形態に係る方法における改変後のフィブロインは、(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸

残基の総数の20%以上であることが好ましい。(A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計とは、6残基以上連続するアラニン残基の残基数のみカウントした場合の、アラニン残基の残基数の総数を意味する。したがって、5残基のみ連続するアラニン残基の残基数はカウントされない。また、(A)_nモチーフにおいて、アラニン残基間に他のアミノ酸残基が存在することで、アラニン残基が連続して6残基以上存在しない場合にも、そのアラニン残基の残基数はカウントされない。

[0174] (A)_nモチーフにおいて6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計は、例えば、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上、21%以上、22%以上又は23%以上であってもよい。また、(A)_nモチーフにおいて7残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、例えば、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上、21%以上、22%以上又は23%以上であってもよい。

[0175] 本実施形態に係る方法における改変後のフィブロインは、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上であることが好ましい。全体のアミノ酸残基の総数は、例えば、580以上、590以上、600以上、610以上又は620以上であってもよい。

[0176] 本実施形態に係る方法における改変後のフィブロインは、REPの疎水性度が、-1.0以上であることが好ましく、-0.9以上であることがより好ましく、-0.8以上であることが更に好ましく、-0.7以上であることが更に好ましく、0以上であることが更に好ましく、0.2以上であることが更に好ましく、0.3以上であることが更に好ましく、0.4以上であることが特に好ましい。REPの疎水性度の上限に特に制限はなく、例えば、1.0以下であってもよく、0.7以下であってもよい。REPの疎水性度は、例えば、-1.0以上1.0以下であってもよく、0以上0.7以下であってもよい。

[0177] 本実施形態に係る方法において、改変前のフィブロインと比較して、改変後のフィブロインの熱分解温度(T_d)が5℃以上高ければよく、例えば、8

℃以上、10℃以上又は12℃以上高いものであってよい。変更前のフィブロインが、天然由来のフィブロインであることが好ましく、昆虫又はクモ類由来のフィブロインであることがより好ましく、クモ類の大瓶状スパイダータンパク質（MaSp）又は小瓶状スパイダータンパク質（MiSp）であることが更に好ましい。

[0178] また、本実施形態に係る方法において、変更前のフィブロインと比較して、変更後のフィブロインのガラス転移点（T_g）が、例えば、5℃以上、8℃以上、10℃以上又は12℃以上高いものであってよい。

[0179] 本実施形態に係る方法におけるフィブロインタンパク質の変更は、変更フィブロインの実施形態として説明した好ましい態様となるように実施することができる。

[0180] 〔製品〕 本発明に係る変更フィブロイン又は人造変更フィブロイン組成物は、繊維（長繊維、短繊維、マルチフィラメント、又はモノフィラメント等）又は糸（紡績糸、撚糸、仮撚糸、加工糸、混織糸、混紡糸等）として、織物、編物、組み物、不織布等に応用できる。また、ロープ、手術用縫合糸、電気部品用の可撓性止め具、さらには移植用生理活性材料（例えば、人工靭帯及び大動脈バンド）等の高強度用途にも応用できる。

[0181] また、本発明に係る変更フィブロイン又は人造変更フィブロイン組成物は、繊維及びフィルム以外にも、発泡体、粒体（球体又は非球体等）、ナノフィブリル、ゲル（ヒドロゲル等）、樹脂及びその等価物にも応用でき、これらは、特開2009-505668号公報、特許第5678283号公報、特許第4638735号公報等に記載の方法に準じて製造することができる。

[0182] 本実施形態に係る製品は、本発明の変更フィブロインを含み、繊維、糸、フィルム、発泡体、粒体、ナノフィブリル、ゲル及び樹脂からなる群から選択される。

実施例

[0183] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は

以下の実施例に限定されるものではない。

- [0184] [(1) 改変フィブロインをコードする核酸の合成、及び発現ベクターの構築] 天然由来のフィブロインである *Nephila clavipes* (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6~12で示されるアミノ酸配列を有するフィブロイン及び改変フィブロインを設計した。
- [0185] 配列番号9で示されるアミノ酸配列 (PRT380) は、上記天然由来のフィブロインの各 (A)_nモチーフ中のアラニン残基が連続する数を5つになるよう欠失させ、REP中の全てのGGXをGXに置換し、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) を付加したものである。
- [0186] 配列番号10で示されるアミノ酸配列 (PRT525) は、上記天然由来のフィブロインのN末端側からC末端側に向かって2つおきに (A)_nモチーフ ((A)₅) を欠失させ、更にC末端配列の手前に [(A)_nモチーフ-REP] を1つ挿入し、REP中の全てのGGXをGXに置換し、各 (A)_nモチーフのC末端側に2つのアラニン残基を挿入し、更に一部のグルタミン (Q) 残基をセリン (S) 残基に置換し、PRT380の分子量とほぼ同じとなるようにC末端側の一部のアミノ酸を欠失させ、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) を付加したものである。
- [0187] 配列番号11で示されるアミノ酸配列 (PRT1068) は、配列番号12で示されるアミノ酸配列 (PRT564) に基づいて、各 (A)_nモチーフのC末端側に1つのアラニン残基を欠失させ、REP中のQをVFIに置換させたものである。
- [0188] 配列番号6で示されるアミノ酸配列 (PRT1069) は、PRT1068の各 (A)_nモチーフのC末端側に1つのアラニン残基を挿入したものである。
- [0189] 配列番号7で示されるアミノ酸配列 (PRT1070) は、PRT1068の各 (A)_nモチーフのC末端側に2つのアラニン残基を挿入したものである。

[0190] 設計した配列番号6～12で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸をそれぞれ合成した。当該核酸には、5'末端にNdeIサイト、終止コドン下流にEcoRIサイトを付加した。これら5種類の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。

[0191] [(2) タンパク質の発現] 配列番号6～12で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸を含むpET22b(+)発現ベクターで、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2mL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100mLのシード培養用培地(表5)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。

[0192] [表5]

シード培養用培地	
試薬	濃度(g/L)
グルコース	5.0
KH ₂ PO ₄	4.0
K ₂ HPO ₄	9.3
Yeast Extract	6.0
アンピシリン	0.1

[0193] 当該シード培養液を500mLの生産培地(表6)を添加したジャーフェーマンターにOD₆₀₀が0.05となるように添加して形質転換大腸菌を植菌した。培養液温度を37℃に保ち、pH6.9で一定に制御して培養した。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持するようにした。

[0194]

[表6]

生産培地	
試薬	濃度(g/L)
グルコース	12.0
KH_2PO_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
アデカノール(アデカ, LG-2959)	0.1(mL/L)

[0195] 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。培養液温度を 37°C に保ち、pH 6.9 で一定に制御して培養した。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の 20% に維持するようにし、20 時間培養を行った。その後、1 M のイソプロピルー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 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用いて SDS-PAGE を行い、IPTG 添加に依存した目的とするタンパク質サイズのバンドの出現により、目的とするタンパク質の発現を確認した。

[0196] [(3) タンパク質の精製] (1) 遠沈管 (1000 mL) に改変フィブロインのタンパク質を発現している大腸菌の菌体約 50 g と、緩衝液 A I (20 mM Tris-HCl、pH 7.4) 300 mL を添加し、ミキサー (IKA 社製「T18 ベーシック ウルトララックス」、レベル 2) で菌体を分散させた後、遠心分離機 (クボタ製の「Model 7000」) で遠心分離 (11,000 g、10 分、室温) し、上清を捨てた。

[0197] (2) 遠心分離で得られた沈殿物 (菌体) に緩衝液 A I を 300 mL と、0.1 M の PMSF (イソプロパノールで溶解) を 3 mL 添加し、前記 IKA 社製のミキサー (レベル 2) で 3 分間分散させた。その後、高圧ホモジナイザー (GEA Niro Saovi 社製の「Panda Plus 2000」) を用いて菌体を繰り返し 3 回破碎した。

- [0198] (3) 破碎された菌体に、3 w/v%のSDSを含む緩衝液B (50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、pH 7.0) 300 mLを加え、前記IKA社製のミキサー (レベル2) で良く分散させた後、シェイカー (タイテック社製、200 rpm、37°C) で60分間攪拌した。その後、前記クボタ製の遠心分離機で遠心分離 (11,000 g、30分、室温) し、上清を捨て、SDS洗浄顆粒 (沈殿物) を得た。
- [0199] (4) SDS洗浄顆粒を100 mg/mLの濃度になるよう1 Mの塩化リチウムを含むDMSO溶液で懸濁し、80°Cで1時間熱処理した。その後、前記クボタ製の遠心分離機で遠心分離 (11,000 g、30分、室温) し、上清を回収した。
- [0200] (5) 回収した上清に対して3倍量のエタノールを準備し、エタノールに回収した上清を加え、室温で1時間静置した。その後、前記クボタ製の遠心分離機で遠心分離 (11,000 g、30分、室温) し、凝集タンパク質を回収した。次に純水を用いて凝集タンパク質を洗浄し、遠心分離により凝集タンパク質を回収するという工程を3回繰り返した後、凍結乾燥機で水分を除き、凍結乾燥粉末を回収した。
- [0201] [(4) 熱分解温度 (Td) 及びガラス転移点 (Tg) の測定] 島津製作所社製の示差熱重量同時測定装置 (DTG-60H) を用い、製造元により提供されるマニュアルに従い、測定を行った。各サンプルとして10 mgのタンパク質粉末、基準物質として20 mgのアルミナ粉末を用いた。基準物質とサンプルを別個のアルミ容器に入れて、アルミカバーで覆った。窒素雰囲気中、10°C/分で、目標温度300°Cまで加熱した。ソフトウェアTA60 (島津製作所社製) を用いて、熱分析測定グラフの分析を行った。
- [0202] 熱分解温度 (Td) は、示差熱分析 (DTA) 曲線を接線交点分析することにより、測定した。ガラス転移点 (Tg) は、DTA曲線を接線交点分析することにより、測定した。
- [0203] [(5) 結果] PRT380及びPRT525のアミノ酸配列の特徴を表7に示す。また、PRT380及びPRT525の熱分解温度及びガラス転

移点を比較した結果をそれぞれ図2及び図3に示す。PRT380と比較してPRT525の方が、高い熱分解温度及びガラス転移点を示した。

[0204] [表7]

変換フィブロイン	I. 各(A) _n モチーフにおける連続するアラニンの残基数	II. Iの残基数の連続するアラニンが存在する(A) _n モチーフの数	III. 全体のアミノ酸数残基の総数	VI. Iの残基数の連続するアラニンの全体に対する割合(%) ※
PRT525	7	18	576	21.88
PRT380	5	28	608	23.03

※ $(I \times II / III) \times 100$ により算出

[0205] PRT1068、PRT1069及びPRT1070のアミノ酸配列の特徴を表8に示す。また、PRT1068、PRT1069及びPRT1070の熱分解温度を比較した結果を図4に示す。各(A)_nモチーフにおける連続するアラニンの残基数を増加させることで、熱分解温度が上昇する傾向がみられた。

[0206] [表8]

変換フィブロイン	I. 各(A) _n モチーフにおける連続するアラニンの残基数	II. Iの残基数の連続するアラニンが存在する(A) _n モチーフの数	III. 全体のアミノ酸数残基の総数	VI. Iの残基数の連続するアラニンの全体に対する割合(%) ※
PRT1068	5	21	606	17.33
PRT1069	6	21	627	20.10
PRT1070	7	21	648	22.69

※ $(I \times II / III) \times 100$ により算出

[0207] 各(A)_nモチーフにおける連続するアラニンの残基数が7である、PRT525（配列番号10）及びPRT1070（配列番号7）の熱分解温度（Td）を比較した結果を図5に示す。なお、PRT525のREPの疎水性度は-1.32であり、PRT1070のREPの疎水性度は0.21である。

[0208] REPの疎水性度が高いPRT1070の方が、PRT525に対してより高い熱分解温度を示した。

請求の範囲

- [請求項1] 式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m-(A)_n\text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含む改変フィブロインであって、前記 $(A)_n\text{モチーフ}$ において6残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上であり、REPの疎水性度が、 -1.0 以上であり、全体のアミノ酸残基の総数が、580以上である、改変フィブロイン。[式1及び式2中、 $(A)_n\text{モチーフ}$ は4~27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ $(A)_n\text{モチーフ}$ 中の全アミノ酸残基数に対するアラニン残基数が80%以上である。REPは10~200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10~300の整数を示す。複数存在する $(A)_n\text{モチーフ}$ 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。]
- [請求項2] REPの疎水性度が、0以上である、請求項1に記載の改変フィブロイン。
- [請求項3] 前記 $(A)_n\text{モチーフ}$ において7残基以上連続するアラニン残基の残基数の合計が、全体のアミノ酸残基の総数の20%以上である、請求項1又は2に記載の改変フィブロイン。
- [請求項4] 配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3で示されるアミノ酸配列、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、改変フィブロイン。
- [請求項5] 更に、N末端及びC末端のいずれか一方又は両方にタグ配列を含む、請求項1~4のいずれか一項に記載の改変フィブロイン。
- [請求項6] 前記タグ配列が、配列番号4又は配列番号5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の改変フィブロイン。

- [請求項7] 配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列、又は配列番号6、配列番号7若しくは配列番号8で示されるアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、改変フィブロイン。
- [請求項8] 熱分解温度（Td）が268℃以上である、請求項1～7のいずれか一項に記載の改変フィブロイン。
- [請求項9] 請求項1～8のいずれか一項に記載の改変フィブロインをコードする核酸。
- [請求項10] 請求項9に記載の核酸の相補鎖とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n\text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含む改変フィブロインをコードする核酸。〔式1及び式2中、 $(A)_n$ モチーフは4～27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ $(A)_n$ 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が80%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在する $(A)_n$ 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。〕
- [請求項11] 請求項9に記載の核酸と90%以上の配列同一性を有し、かつ式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n\text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含む改変フィブロインをコードする核酸。〔式1及び式2中、 $(A)_n$ モチーフは4～27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ $(A)_n$ 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が80%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在する $(A)_n$ 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。]

[請求項12] 改変フィブロインの製造方法であって、改変フィブロイン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工程を含み、前記改変フィブロインが、請求項1～8のいずれか一項に記載の改変フィブロインである、製造方法。

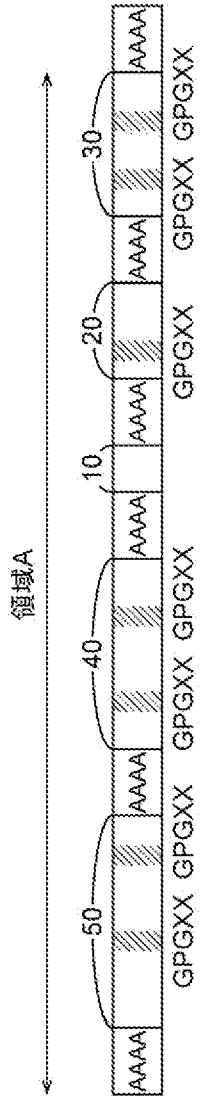
[請求項13] 式1：[(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含む改変フィブロインの熱安定性を向上させる方法であって、改変前のフィブロインにおける少なくとも1つの(A)_nモチーフ又はREPに、1又は複数のアラニン残基を挿入するか、又はアラニン残基と隣り合う他のアミノ酸残基をアラニンに置換することにより、少なくとも1つの(A)_nモチーフ中の連続するアラニン残基のアラニン残基数を増加させることを含み、改変前のフィブロインと比較して、改変後のフィブロインの熱分解温度(T_d)が5℃以上高い、方法。[式1及び式2中、(A)_nモチーフは4～27アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示し、かつ(A)_n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が80%以上である。REPは10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは10～300の整数を示す。複数存在する(A)_n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。]

[請求項14] 改変前のフィブロインが、天然由来のフィブロインである、請求項13に記載の方法。

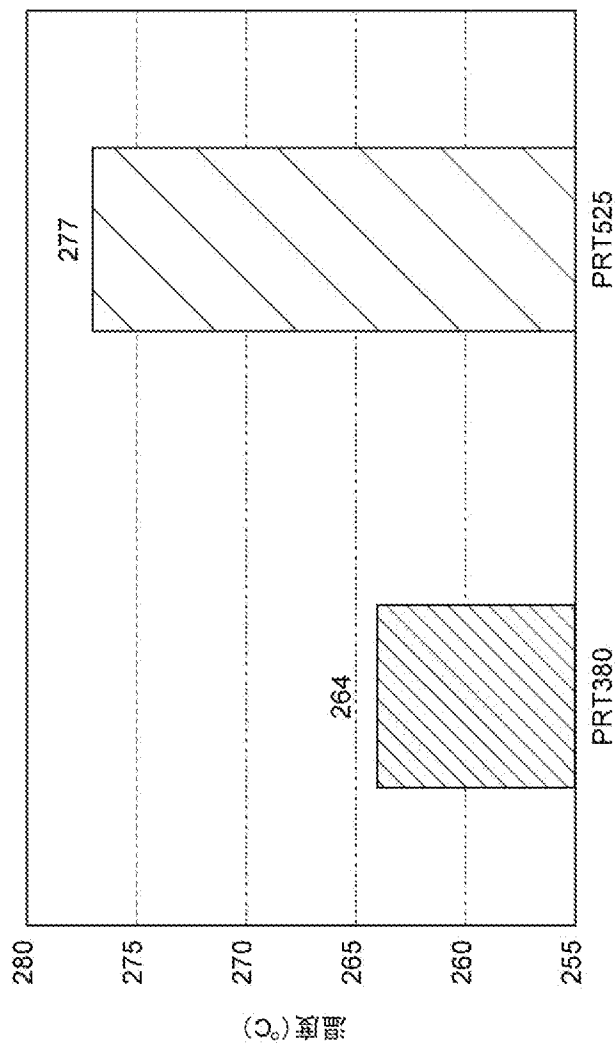
[請求項15] 前記天然由来のフィブロインが、昆虫又はクモ類由来のフィブロインである、請求項14に記載の改変フィブロイン。

- [請求項16] 前記天然由来のフィブロインが、クモ類の大瓶状スパイダータンパク質（MaSp）又は小瓶状スパイダータンパク質（MiSp）である、請求項15に記載の改変フィブロイン。
- [請求項17] 請求項1～8のいずれか一項に記載の改変フィブロインを含み、繊維、糸、フィルム、発泡体、粒体、ナノフィブリル、ゲル及び樹脂からなる群から選択される、製品。

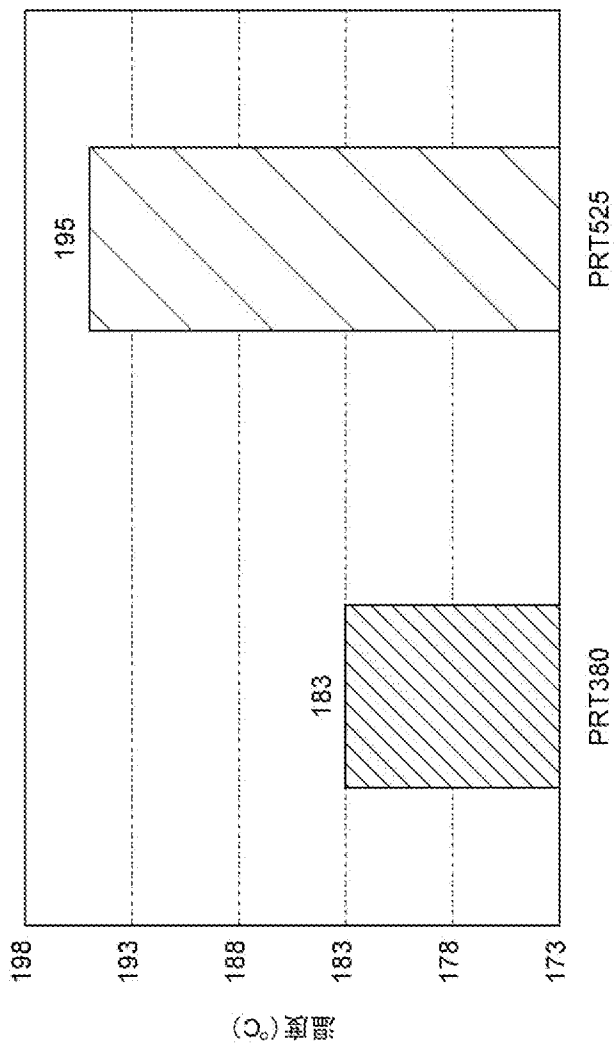
[図1]



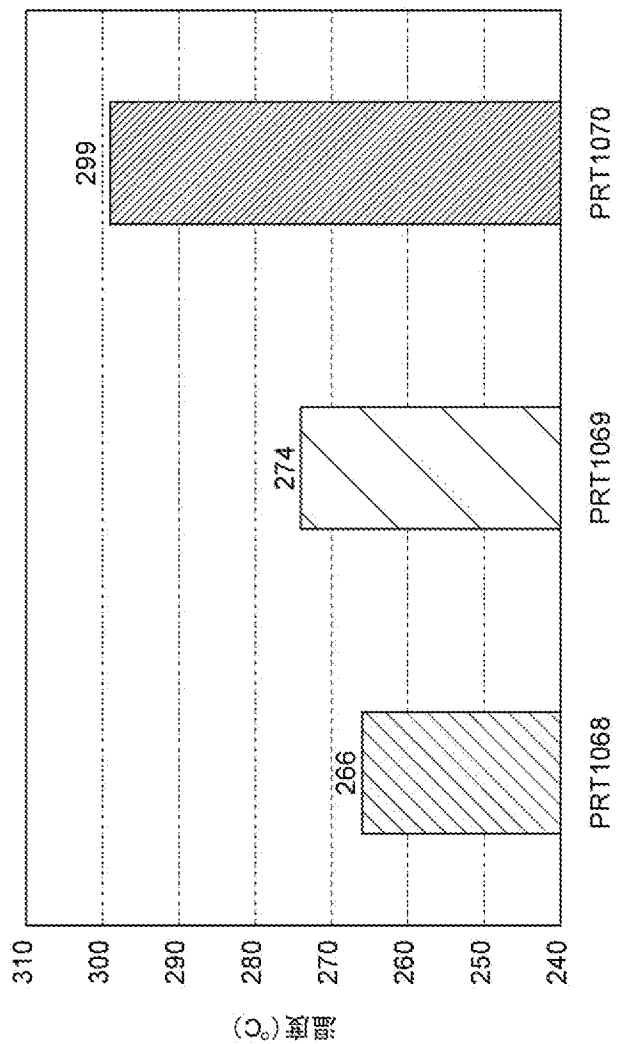
[図2]



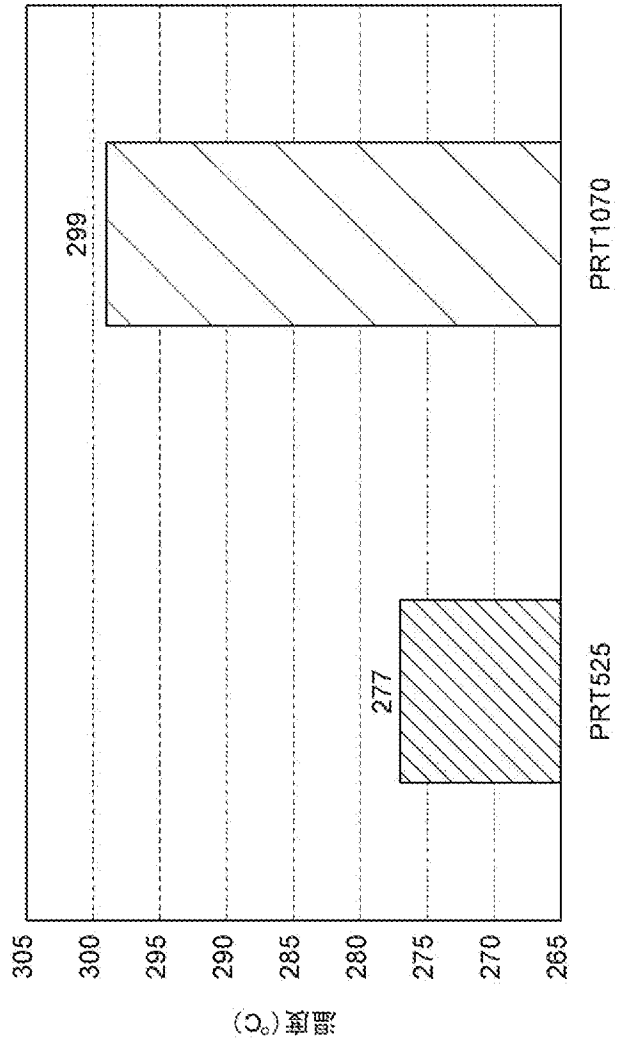
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/027991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

D01F 4/02(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i

FI: C12N15/12 ZNA; C07K14/435; C12P21/02 C; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; D01F4/02

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)

D01F4/02; C07K14/435; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/12; C12P21/02

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2019/022163 A1 (SPIBER INC.) 31.01.2019 (2019-01-31) claims, paragraphs [0007], [0012], [0013], [0036], [0117]-[0118], examples, in particular, test example 1	1-12, 17 13-16
Y	DAO, A. T. N. et al., "Multilateral characterization of recombinant spider silk in thermal degradation", Polymer Chemistry, 2017, vol. 8, no. 6, pp. 1049-1060, DOI 10.1039/C6PY01954D, Introduction, Conclusions	13-16
A	WO 2017/200659 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 23.11.2017 (2017-11-23) claims, examples	1-17

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
15 September 2020 (15.09.2020)

Date of mailing of the international search report
29 September 2020 (29.09.2020)

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
Information on patent family members

International application no.
PCT/JP2020/027991

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2019/022163 A1	31 Jan. 2019	US 2020-0207817 A1 claims, paragraphs [0007], [0020], [0021], [0091], [0175]-[0176], examples, in particular, test example 1	
WO 2017/200659 A2	23 Nov. 2017	EP 3660036 A1 JP 2019-519596 A US 2019/0117834 A1 KR 10-2019-0008210 A CN 109640694 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>D01F 4/02(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i FI: C12N15/12 ZNA; C07K14/435; C12P21/02 C; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; D01F4/02</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>D01F4/02; C07K14/435; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/12; C12P21/02</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> <p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019/022163 A1 (Spiber株式会社) 31.01.2019 (2019-01-31) 請求の範囲、段落0007、0012、0013、0036、0117-0118、実施例、特に試験例1</td> <td>1-12, 17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>13-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>DAO, A. T. N. et al., Multilateral characterization of recombinant spider silk in thermal degradation, Polymer Chemistry, 2017, Vol. 8, No. 6, P. 1049-1060, DOI 10.1039/C6PY01954D Introduction, Conclusions</td> <td>13-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017/200659 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 23.11.2017 (2017-11-23) 請求の範囲、実施例</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	WO 2019/022163 A1 (Spiber株式会社) 31.01.2019 (2019-01-31) 請求の範囲、段落0007、0012、0013、0036、0117-0118、実施例、特に試験例1	1-12, 17	Y		13-16	Y	DAO, A. T. N. et al., Multilateral characterization of recombinant spider silk in thermal degradation, Polymer Chemistry, 2017, Vol. 8, No. 6, P. 1049-1060, DOI 10.1039/C6PY01954D Introduction, Conclusions	13-16	A	WO 2017/200659 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 23.11.2017 (2017-11-23) 請求の範囲、実施例	1-17
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															
X	WO 2019/022163 A1 (Spiber株式会社) 31.01.2019 (2019-01-31) 請求の範囲、段落0007、0012、0013、0036、0117-0118、実施例、特に試験例1	1-12, 17															
Y		13-16															
Y	DAO, A. T. N. et al., Multilateral characterization of recombinant spider silk in thermal degradation, Polymer Chemistry, 2017, Vol. 8, No. 6, P. 1049-1060, DOI 10.1039/C6PY01954D Introduction, Conclusions	13-16															
A	WO 2017/200659 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 23.11.2017 (2017-11-23) 請求の範囲、実施例	1-17															
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“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</p> <p>“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)</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>15.09.2020</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>29.09.2020</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員 (特許庁審査官)</p> <p>齊藤 貴子 4B 4509</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/027991

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2019/022163	A1	31.01.2019	US	2020-0207817	A1	
				特許請求の範囲、段落0007、0020、0021、0091、0175-0176、実施例、特に試験例1			
				EP	3660036	A1	
WO	2017/200659	A2	23.11.2017	JP	2019-519596	A	
				US	2019/0117834	A1	
				KR	10-2019-0008210	A	
				CN	109640694	A	