

(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  
2016年10月13日(13.10.2016)

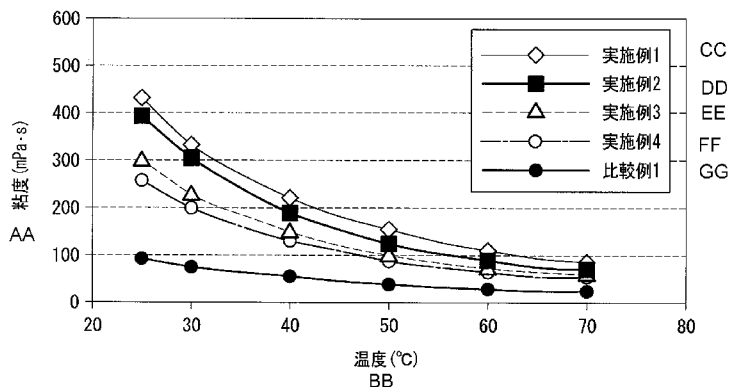


(10) 国際公開番号  
WO 2016/163336 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 14/435 (2006.01) D01C 3/00 (2006.01)
  - (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061025
  - (22) 国際出願日: 2016年4月4日(04.04.2016)
  - (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 2015-080226 2015年4月9日(09.04.2015) 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水上234番地1 Yamagata (JP). 小島プレス工業株式会社 (KOJIMA INDUSTRIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒4718588 愛知県豊田市下市場町3丁目30番地 Aichi (JP).
  - (72) 発明者: 石田花菜 (ISHIDA Kana). 山本博規 (YAMAMOTO Hironori). 鈴村寛昭 (SUZUMURA Hiroaki). 関山和秀 (SEKIYAMA Kazuhide).
  - (74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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), ユーロパ (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))

(54) Title: POLAR SOLVENT SOLUTION AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) 発明の名称: 極性溶媒溶液及びその製造方法

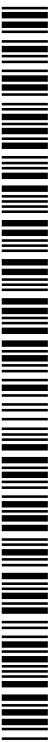


AA Viscosity  
 BB Temperature  
 CC Example 1  
 DD Example 2  
 EE Example 3  
 FF Example 4  
 GG Comparative example 1

(57) Abstract: This polar solvent solution comprises a polyaminoacid-containing solute dissolved in a polar solvent, wherein, defining the solution as 100 mass%, the water content in the solution is less than 5 mass%. This production method involves adjusting the viscosity of the solution by changing the water content in the solution. Further, the production method involves increasing the viscosity of the solution by decreasing the water content in the solution. By this means, the present invention provides a polar solvent solution, and a production method thereof, which, used as a dope solution for spinning or for films, etc., enables stable spinning and casting without reduction in viscosity.

(57) 要約: 本発明の極性溶媒溶液は、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液であって、前記溶液を100質量%としたときの前記溶液中の水分含有量が5質量%未満とされている。本発明の製造方法は、前記溶液中の水分含有量を変えることにより、前記溶液の粘度を調整する。また、本発明の製造方法は、前記溶液中の水分含有量を減少させることにより、前記溶液の粘度を増加させる。これにより、本発明は、紡糸やフィルムなどのドープ液などとして使用する際に、粘度低下することがなく、安定した紡糸やキャストができる極性溶媒溶液及びその製造方法を提供する。

り、前記溶液の粘度を増加させる。これにより、本発明は、紡糸やフィルムなどのドープ液などとして使用する際に、粘度低下することがなく、安定した紡糸やキャストができる極性溶媒溶液及びその製造方法を提供する。



WO 2016/163336 A1

## 明 細 書

**発明の名称**： 極性溶媒溶液及びその製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、溶液の粘度を高く保つことが可能な極性溶媒溶液及びその製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] ジメチルスルホキシド（DMSO）などの極性溶媒はポリマーなどの物質を溶解しやすいことから、アクリル繊維の重合、紡糸液、又はポリイミドの重合溶媒などとして使用されている。本出願人はクモ糸タンパク質及びシルクタンパク質などのポリペプチドの溶媒として前記極性溶媒の適用を特許文献1～2で提案している。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0003] 特許文献1：特許第5427322号公報

特許文献2：特許第5584932号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、クモ糸タンパク質及びシルクタンパク質などのポリペプチドを溶解させたジメチルスルホキシド（DMSO）などの極性溶媒溶液は、管理の仕方によっては粘度低下することがあり、紡糸やフィルムなどのドープ液として使用する際に、安定した紡糸やキャストを行うという観点からは、改善の余地があった。

[0005] 本発明は、紡糸やフィルムなどのドープ液として使用する際に、粘度低下することがなく、安定した紡糸やキャストができる極性溶媒溶液及びその製造方法を提供する。

#### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液で

あって、前記溶液を100質量%としたときの前記溶液中の水分含有量（水分含有率）が5質量%未満であることを特徴とする極性溶媒溶液に関する。

[0007] 本発明は、また、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液の製造方法であって、前記溶液中の水分含有量を変えることにより、前記溶液の粘度を調整することを特徴とする極性溶媒溶液の製造方法に関する。

[0008] 本発明は、また、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液の製造方法であって、前記溶液中の水分含有量を減少させることにより、前記溶液の粘度を増加させることを特徴とする極性溶媒溶液の製造方法に関する。

### 発明の効果

[0009] 本発明の極性溶媒溶液は、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液の水分含有量が5質量%未満とされていることで、格段の粘度低下が防止され、それにより、紡糸やフィルムなどのドープ液として使用した際などに、安定した紡糸やキャストイングができる。また本発明の製造方法では、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液中の水分含有量を変えて、前記溶液の粘度を調整することにより、安定した紡糸やキャストイングが可能な極性溶媒溶液を得ることができる。また本発明の製造方法では、前記溶液中の水分含有量を減少させて、前記溶液の粘度を増加させることにより、安定した紡糸やキャストイングが可能な極性溶媒溶液を得ることができる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は本発明の幾つかの実施例と比較例における温度変化に対する粘度変化を調べたグラフである。

[図2]図2は本発明の別の幾つかの実施例における湿度管理の有無とタンパク質濃度と温度を変えたときの粘度変化を調べたグラフである。

[図3]図3は絶乾状態のクモ糸タンパク質（粉体）を大気に暴露したときの含水率の変化を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

- [0011] 本発明者らは、ポリアミノ酸（特に、ポリペプチド）自体も、前記ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液も吸湿しやすく、吸湿すると粘度低下などが問題となることを見出した。このため、本発明は、ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液において、前記溶液を100質量%としたときの前記溶液中の水分含有量が5質量%未満（0質量%以上、5質量%未満）とされる。好ましい水分含有量は0質量%以上、3質量%以下であり、更に好ましくは0質量%以上、1.5質量%以下である。前記の範囲であれば、極性溶媒にポリアミノ酸（特に、ポリペプチド）は膨潤した状態で溶解し、極性溶媒溶液の粘度が高く維持される。水分含有量が5質量%以上となると粘度が格段に低下し、紡糸やフィルムなどを作製するためのドープ液などとして使用した際に紡糸性やキャスト性が低下する。本明細書においては、前記極性溶媒溶液をドープ液と言う場合もある。以下、主として、ポリアミノ酸の代表例であるポリペプチドを例に説明する。
- [0012] 本発明で使用される極性溶媒は、(i) ジメチルスルホキシド（DMSO）、(ii) N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）、(iii) N,N-ジメチルアセトアミド（DMA）、及び(iv) N-メチル-2-ピロリドン（NMP）からなる群から選ばれる少なくとも一つの非プロトン性極性溶媒を含むものが好ましい。これらの非プロトン性極性溶媒はポリペプチドを含む溶質を溶解させやすいからである。また、本発明で使用される極性溶媒には、前記した非プロトン性極性溶媒を含むものの他、ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）やギ酸、各種のアルコール（例えば、メタノール、エタノール、2-プロパノールなどの炭素数1～6の低級アルコール）などのプロトン性極性溶媒を含むものも含まれる。なお、前記極性溶媒は、前記極性溶媒の全体を100質量%としたとき、前記(i)～(iv)なる群から選ばれる少なくとも一つの非プロトン性極性溶媒の合計量の割合が10～100質量%の範囲内の値であることが望ましい。これによって、ポリペプチドを含む

溶質の溶解度が高められる。

[0013] 本発明で使用される溶質は、ポリアミノ酸（特に、ポリペプチド）を含むものであればよく、特に限定されない。本明細書において、ポリアミノ酸とは、複数のアミノ酸のアミノ基とカルボキシル基とがアミド結合して重合したポリアミド化合物を言う。ポリアミノ酸としては、ポリアミド化合物を構成するアミノ酸が、15以上であることが好ましく、20以上であることがより好ましく、30以上であることがさらに好ましく、100以上がよりさらに好ましく、500以上が特に好ましい。ポリアミノ酸としては、6000以下であることが好ましく、5000以下であることがより好ましく、3000以下であることがさらに好ましく、2000以下であることが特に好ましい。本明細書で使用される溶質は、例えば、ポリアミノ酸を単独で用いてもよく、或いは例えば炭水化物や合成樹脂等のポリアミノ酸以外のもののうちの1種又は2種以上とポリペプチドとを組み合わせ用いてもよい。また本明細書で使用される溶質は、例えば、ポリペプチドを単独で用いてもよく、或いは例えば炭水化物や合成樹脂等のポリペプチド以外のもののうちの1種又は2種以上とポリペプチドとを組み合わせ用いてもよい。前記ポリペプチドは、構造タンパク質であることが好ましく、更に結晶領域を含むものが好ましい。このようなポリペプチドは繊維やフィルムにしたときに高い強度やタフネスを発揮できる。なお、構造タンパク質とは、生物体の構造に関わるタンパク質、或いは生物体が生み出す構造体を構成するタンパク質を言い、例えば、フィブロイン、セリシン、コラーゲン、ケラチン、エラスチン、レシリンなどが挙げられる。

[0014] また、前記ポリペプチドは、クモ糸タンパク質やシルクタンパク質などのフィブロインが好ましく、その中でも特にクモ糸タンパク質が好ましい。クモ糸タンパク質は極性溶媒と親和性が高く、溶解しやすいからである。

[0015] 本発明の極性溶媒溶液を100質量%としたとき、溶質（例えば、クモ糸タンパク質）の濃度は2～50質量%であることが望ましく、更に好ましくは3～40質量%であり、特に好ましくは5～30質量%である。このよう

な濃度とすることによって、極性溶媒溶液の粘度の低下や過剰な上昇を効果的に防止できる。

[0016] 本発明の極性溶媒溶液は、粘度が、好ましくはゴミなどの不要物や泡などを取り除いた状態で $10 \sim 100000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とされることが望ましく、更に好ましくは $15 \sim 20000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とされ、特に好ましくは $100 \sim 10000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とされる。このような範囲内の粘度の極性溶媒溶液をドープ液として用いることで、良好に湿式紡糸したりフィルムキャスト成形したりすることができる。

[0017] 本発明の製造方法は、前記極性溶媒溶液中の水分含有量を変えることによって、前記極性溶媒溶液の粘度を調整するものである。また、本発明の製造方法は、前記極性溶媒溶液中の水分含有量を減少させることにより、前記極性溶媒溶液の粘度を増加させるものである。これらの製法では、前記極性溶媒溶液中の水分含有量を、前記極性溶媒溶液を $100$ 質量%としたときに、好ましくは $5$ 質量%未満、より好ましくは $0 \sim 3$ 質量%、更に好ましくは $0 \sim 1.5$ 質量%となるように調整する。そうすることで、紡糸やフィルムのドープ液などとして使用した際に安定した紡糸やキャストイングが可能な極性溶媒溶液を得ることができる。

[0018] 本発明の製造方法においては、前記溶液中の水分含有量を減らすための調整が、例えば、前記溶質や溶媒を予め加熱乾燥したり、真空乾燥したり、前記溶液の製造時と貯蔵時のうちの少なくとも何れか一方における雰囲気相対湿度を調整したり、若しくは製造された前記溶液を加熱して水分を蒸発させたり、ゼオライトを始めとした各種の吸湿剤（吸湿材）などを用いて吸湿したりすることなどによって、又はそれらの操作を適宜に組み合わせたりすることなどによって実現される。なお、前記溶液中の水分含有量を減らすための調整方法としては、前記溶質を前記溶媒に溶解させる前に乾燥させる方法が好適に採用される。これによって、前記溶液中の水分含有量をより確実かつ効率的に減らすことができる。また、雰囲気相対湿度の調整によって前記溶液中の水分含有量を変える場合には、前記溶液の製造時と貯蔵時のう

ちの少なくとも何れか一方における雰囲気相対湿度が、有利には1.3%RH以下の条件に保たれる。雰囲気を相対湿度1.3%RH以下の条件に保つには、溶液作製や保存などの処理をいわゆるドライルーム内であるのが好ましい。

[0019] 本発明において、ポリペプチドを含む溶質を溶解する極性溶媒として好適に用いられるDMSOは、例えば、クモ糸タンパク質を含む溶質を溶解する溶媒として、特に有利に使用される。DMSOは融点18.4℃、沸点189℃であり、従来法で使用されているヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)の沸点59℃、ヘキサフルオロアセトン(HFAC)の沸点-26.5℃に比べると、沸点ははるかに高い。また、DMSOは、一般産業分野においてもアクリル繊維の重合、紡糸液として使用され、ポリイミドの重合溶媒としても使用されていることから、コストも安く安全性も確認されている物質である。

[0020] 本発明において溶質に含まれるポリペプチドとして例示されるクモ糸タンパク質は、天然クモ糸タンパク質と、天然クモ糸タンパク質に由来又は類似(以下、由来と言う。)するものであればよく、特に限定されない。また、ここで言う天然クモ糸タンパク質に由来するものとは、天然クモ糸タンパク質が有するアミノ酸の反復配列と同様乃至類似のアミノ酸配列を有するものであって、例えば組換えクモ糸タンパク質や天然クモ糸タンパク質の変異体、類似体又は誘導体などが挙げられる。前記クモ糸タンパク質は、強靱性に優れるという観点からクモの大瓶状腺で産生される大吐糸管しおり糸タンパク質やそれに由来するクモ糸タンパク質であることが好ましい。前記大吐糸管しおり糸タンパク質としては、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やMaSp2、ニワオニグモ(*Araneus diadematus*)に由来するADF3やADF4などが挙げられる。

[0021] 上記クモ糸タンパク質は、クモの小瓶状腺で産生される小吐糸管しおり糸タンパク質やそれに由来するクモ糸タンパク質であってもよい。上記小吐糸管

しおり糸タンパク質としては、アメリカジョロウグモ (*Nephila clavipes*) に由来する小瓶状腺スピドロイン MiSp1 や MiSp2 が挙げられる。

[0022] その他にも、上記クモ糸タンパク質は、クモの鞭毛状腺 (*flagelliform gland*) で産生される横糸タンパク質やそれに由来するクモ糸タンパク質であってもよい。上記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*) などが挙げられる。

[0023] 前記大吐糸管しおり糸タンパク質に由来するクモ糸タンパク質 (ポリペプチド) としては、例えば、式 1 : REP1-REP2 (1) で示されるアミノ酸配列の単位を 2 以上、好ましくは 4 以上、より好ましくは 6 以上含む組換えクモ糸タンパク質が挙げられる。なお、前記組換えクモ糸タンパク質において、式 (1) : REP1-REP2 (1) で示されるアミノ酸配列の単位は、同一であってもよく、異なってもよい。

[0024] 前記式 (1) において、REP1 は、主としてアラニンにより構成され ( $X1$ )<sub>p</sub> で表されるポリアラニン領域を意味し、好ましくは REP1 はポリアラニンを意味する。ここで、p は特に限定されるものではないが、好ましくは 2~20 の整数、より好ましくは 4~12 の整数を示す。X1 は、アラニン (Ala)、セリン (Ser)、又はグリシン (Gly) を示す。(X1)<sub>p</sub> で表されるポリアラニン領域において、アラニンの合計残基数が該領域のアミノ酸の合計残基数の 80% 以上であることが好ましく、より好ましくは 85% 以上である。前記 REP1 において、連続して並んでいるアラニンは、2 残基以上であることが好ましく、より好ましくは 3 残基以上であり、さらに好ましくは 4 残基以上であり、特に好ましくは 5 残基以上である。また、前記 REP1 において、連続して並んでいるアラニンは、20 残基以下であることが好ましく、より好ましくは 16 残基以下であり、さらに好ましくは 12 残基以下であり、特に好ましくは 10 残基以下である。前記式 (

1)において、REP2は10~200残基のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、前記アミノ酸配列中に含まれるグリシン、セリン、グルタミン、プロリン及びアラニンの合計残基数がアミノ酸残基数全体に対して40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上である。

[0025] 前記REP1は繊維内で結晶 $\beta$ シートを形成する結晶領域に該当し、前記REP2は繊維内でより柔軟性があり大部分が規則正しい構造を欠いている無定型領域に該当する。そして、前記[REP1-REP2]は、結晶領域と無定型領域からなる繰り返し領域(反復配列)に該当し、しおり糸タンパク質の特徴的配列である。

[0026] 前記式1: REP1-REP2(1)で示されるアミノ酸配列の単位を2以上含むクモ糸タンパク質としては、例えば、配列番号1、配列番号2及び配列番号3の何れかに示されているアミノ酸配列を有するADF3由来の組換えクモ糸タンパク質が挙げられる。配列番号1に示されるアミノ酸配列は、N末端に開始コドン、His10タグ及びHRV3Cプロテアーゼ(Human rhinovirus 3Cプロテアーゼ)認識サイトからなるアミノ酸配列(配列番号4)を付加したADF3のアミノ酸配列において、第1~13番目の反復領域をおよそ2倍になるように増やすとともに、翻訳が1154番目アミノ酸残基で終止するように変異させたものである。配列番号2に示されているアミノ酸配列は、NCBIデータベースから入手したADF3の部分的なアミノ酸配列(NCBIのGenebankのアクセッション番号: AAC47010、GI: 1263287)のアミノ酸配列のN末端に開始コドン、His10タグ及びHRV3Cプロテアーゼ(Human rhinovirus 3Cプロテアーゼ)認識サイトからなるアミノ酸配列(配列番号4)を付加したアミノ酸配列である。配列番号3に示されるアミノ酸配列は、N末端に開始コドン、His10タグ及びHRV3Cプロテアーゼ(Human rhinovirus 3Cプロテアーゼ)認識サイトからなるアミノ酸配列(配列番号4)を付加したADF3のアミノ酸配列において、第1~13番目の反復領域をおよそ2倍になるように増やし

たものである。また、前記式 1 : REP 1 - REP 2 (1) で示されるアミノ酸配列の単位を 2 以上含むクモ糸タンパク質としては、配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 の何れかに示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、結晶領域と無定型領域からなる繰り返し領域を有するクモ糸タンパク質を用いてもよい。

[0027] 上記小吐糸管しおり糸タンパク質に由来するクモ糸タンパク質（ポリペプチド）としては、例えば、式 2 : REP 3 - REP 4 - REP 5 (2) で示されるアミノ酸配列を含む組換えクモ糸タンパク質が挙げられる。上記式 2 において、REP 3 は (G | y - G | y - Z) m で表されるアミノ酸配列を意味し、REP 4 は、(G | y - A | a) l で表されるアミノ酸配列を意味し、REP 5 は (A | a) r で表されるアミノ酸配列を意味する。REP 3 において、Z は任意の一つのアミノ酸を意味するが、特に A | a、T y r 及び G | n からなる群から選ばれる一つのアミノ酸であることが好ましい。また REP 3 において、m は 1 ~ 4 であることが好ましく、REP 4 において l は 0 ~ 4 であることが好ましく、REP 5 において r は 1 ~ 6 であることが好ましい。

[0028] クモ糸において、小吐糸管しおり糸はクモの巣の中心から螺旋状に巻かれ、巣の補強材として使われたり、捉えた獲物を包む糸として利用されたりする。大吐糸管しおり糸と比べると引っ張り強度は劣るが伸縮性は高いことが知られている。これは小吐糸管しおり糸において、多くの結晶領域がグリシンとアラニンが交互に連なる領域から形成されているため、アラニンのみで結晶領域が形成されている大吐糸管しおり糸よりも結晶領域の水素結合が弱くなりやすいためと考えられている。

[0029] 上記横糸タンパク質に由来する組換えクモ糸タンパク質（ポリペプチド）としては、例えば、式 3 : REP 6 (3) で示されるアミノ酸配列を含む組換えクモ糸タンパク質が挙げられる。前記式 3 において、REP 6 は (U 1) n、又は、(U 2) n で表されるアミノ酸配列を意味する。REP 6 にお

いて、U1は、G l y - P r o - G l y - X - X（配列番号12）で表されるアミノ酸配列を意味し、U2は、G l y - P r o - G l y - G l y - X（配列番号13）で表されるアミノ酸配列を意味する。また、U1及びU2において、Xは任意の一つのアミノ酸を意味するが、A l a、S e r、T y r、G l n、V a l、L e u及びI l eからなる群から選ばれる一つのアミノ酸であることが好ましく、A l a、S e r、T y r、G l n及びV a lからなる群から選ばれる一つのアミノ酸であることがより好ましく、複数あるXは、同一であっても異なってもよい。またREP6において、nは少なくとも4以上の数字を表し、好ましくは10以上、より好ましくは20以上である。

[0030] クモ糸において、横糸は結晶領域を持たず、無定形領域からなる繰り返し領域を持つことが大きな特徴である。大吐糸管しおり糸などにおいては結晶領域と無定形領域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と推測される。一方、横糸については、大吐糸管しおり糸に比べると応力は劣るが、高い伸縮性を持つ。これは横糸の大部分が無定形領域によって構成されているためだと考えられている。

[0031] 前記組換えクモ糸タンパク質（ポリペプチド）は、組換えの対象となる天然型クモ糸タンパク質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターで形質転換した宿主を用いて製造することができる。遺伝子の製造方法は特に制限されず、天然型クモ糸タンパク質をコードする遺伝子をクモ由来の細胞からポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などで増幅してクローニングするか、若しくは化学的に合成する。遺伝子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天然型クモ糸タンパク質のアミノ酸配列情報をもとに、AKTA oligopilot 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などで連結して合成することができる。この際に、タンパク質の精製や確認を容易にするため、前記のアミノ酸配列のN末端に開始コドン及びH i s 10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遺伝子を合成してもよい。前記発現ベクターとしては、DNA配列からタンパク質を発現し得るプラスミド、ファージ、ウイルスなどを用いることができる。前記プラスミド型発現ベクターとしては、宿主細胞内で目的の遺伝子が発現し、かつそれ自体が増幅することのできるものであればよく、特に限定されない。例えば宿主として大腸菌 *Rosetta* (DE3) を用いる場合は、pET22b (+) プラスミドベクター、pColdプラスミドベクターなどを用いることができる。中でも、タンパク質の生産性の観点から、pET22b (+) プラスミドベクターを用いることが好ましい。前記宿主としては、例えば動物細胞、植物細胞、微生物などを用いることができる。

### 実施例

[0032] 以下実施例を用いて、本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

[0033] <各測定方法>

(1) 粘度：京都電子工業株式会社製のEMS粘度計 (EMS-01S) を使用して測定した。

(2) 相対湿度：実験環境の温度と露点温度を測定し、公知の計算式にて算出した。

(3) ドープ液中の水分率：京都電子工業株式会社製のハイブリッドカールフイッシャー水分計 (MKH-700) を使用して測定した。

[0034] (実施例1～4、比較例1)

#### 1. クモ糸タンパク質の準備

<遺伝子合成>

(1) ADF3 Kai の遺伝子の合成

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ADF3 (GI:1263287) の部分的なアミノ酸配列をNCBIのウェブデータベースより取得し、同配列のN末端に開始コドン、His10タグ及びHRV3Cプロテアーゼ (Human rhinovirus 3Cプロテアーゼ

) 認識サイトからなるアミノ酸配列 (配列番号4) を付加したアミノ酸配列 (配列番号2) をコードする遺伝子を、GenScript社に合成委託した。その結果、配列番号5で示す塩基配列からなるADF3Kaiの遺伝子が導入されたpUC57ベクター (遺伝子の5'末端直上流にNde Iサイト、及び5'末端直下流にXba Iサイトあり) を取得した。その後、同遺伝子をNde I及びEcoR Iで制限酵素処理し、pET22b (+) 発現ベクターに組み換えた。

[0035] (2) ADF3Kai-Largeの遺伝子の合成

ADF3Kaiを鋳型にT7プロモータープライマー (配列番号8) とRep Xba Iプライマー (配列番号9) を用いてPCR反応を行い、ADF3Kaiの遺伝子配列における5'側半分の配列 (以下、配列Aと記す。) を増幅し、同断片をMighty Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を使用して、予めNde I及びXba Iで制限酵素処理をしておいたpUC118ベクターに組み換えた。同様に、ADF3Kaiを鋳型にXba I Repプライマー (配列番号10) とT7ターミネータープライマー (配列番号11) を用いてPCR反応を行い、ADF3Kaiの遺伝子配列における3'側半分の配列 (以下、配列Bと記す。) を増幅し、同断片をMighty Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を使用して、予めXba I、EcoR Iで制限酵素処理をしておいたpUC118ベクターに組み換えた。配列Aの導入されたpUC118ベクターをNde I、Xba Iで、配列Bの導入されたpUC118ベクターをXba I、EcoR Iでそれぞれ制限酵素処理し、ゲルの切り出しによって配列A及び配列Bの目的DNA断片を精製した。DNA断片A、B及び予めNde I及びEcoR Iで制限酵素処理をしておいたpET22b (+) をライゲーション反応させ、大腸菌DH5 $\alpha$ に形質転換した。T7プロモータープライマー及びT7ターミネータープライマーを用いたコロニーPCRにより、目的DNA断片の挿入を確認した後、目的サイズ (3.6 kbp) のバンドが得られたコロニーからプラスミドを抽出し、

3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたシーケンス反応により全塩基配列を確認した。その結果、配列番号6に示すADF3Kai-Largeの遺伝子の構築が確認された。なお、ADF3Kai-Largeのアミノ酸配列は配列番号3で示すとおりである。

[0036] (3) ADF3Kai-Large-NRSH1の遺伝子の合成

前記で得られたADF3Kai-Largeの遺伝子が導入されたpET22b (+) ベクターを鋳型に、PrimeStar Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いた部位特異的変異導入により、ADF3Kai-Largeのアミノ酸配列 (配列番号3) における1155番目のアミノ酸残基グリシン (Gly) に対応するコドンGGCを終止コドンTAAに変異させ、配列番号7に示すADF3Kai-Large-NRSH1の遺伝子をpET22b (+) 上に構築した。変異の導入の正確性については、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたシーケンス反応により確認した。なお、ADF3Kai-Large-NRSH1のアミノ酸配列は配列番号1で示すとおりである。

[0037] <タンパク質の発現>

前記で得られたADF3Kai-Large-NRSH1の遺伝子配列を含むpET22b (+) 発現ベクターを、大腸菌Rosetta (DE3) に形質転換した。得られたシングルコロニーを、アンピシリンを含む2mlのLB培地で15時間培養後、同培養液1.4mlを、アンピシリンを含む140mlのLB培地に添加し、37℃、200rpmの条件下で、培養液のOD<sub>600</sub>が3.5になるまで培養した。次に、OD<sub>600</sub>が3.5の培養液を、アンピシリンを含む7Lの2×YT培地に50%グルコース140mlと共に加え、OD<sub>600</sub>が4.0になるまでさらに培養した。その後、得られたOD<sub>600</sub>が4.0の培養液に、終濃度が0.5mMになるようにイソプロピルーβ-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加してタンパク質発現を誘導

した。IPTG添加後2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タンパク質溶液をポリアクリルアミドゲルに泳動させたところ、IPTG添加に依存して目的サイズ（約101.1kDa）のバンドが観察され、目的とするタンパク質が発現していることを確認した。

[0038] <精製>

(1) 遠沈管(1000ml)にADF3Kai-Large-NRSH1のタンパク質を発現している大腸菌の菌体約50gと、緩衝液A(20mM Tris-HCl、pH7.4)300ml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(11,000g、10分、室温)し、上清を捨てた。

(2) 遠心分離で得られた沈殿物(菌体)に緩衝液Aを300mlと、0.1MのPMSF(イソプロパノールで溶解)を3ml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。

(3) 破碎された菌体に、3w/v%のSDSを含む緩衝液B(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、pH7.0)300ml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、200rpm、37℃)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(11,000g、30分、室温)し、上清を捨て、SDS洗浄顆粒(沈殿物)を得た。

(4) SDS洗浄顆粒を100mg/mlの濃度になるよう1Mの塩化リチウムを含むDMSO溶液で懸濁し、80℃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(11,000g、30分、室温)し、上清を回収した。

(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（11,000g、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。得られた凍結乾燥粉末における目的タンパク質ADF3Kai-Large-NRSH1（約56.1kDa）の精製度は、粉末のポリアクリルアミドゲル電気泳動（CBB染色）の結果をTotal lab（nonlinear dynamics ltd.）を用いて画像解析することにより確認した。その結果、ADF3Kai-Large-NRSH1の精製度は約85%であった。

[0039] 2. ドープ液の調整と粘度測定

前記で得られたクモ糸タンパク質（粉体）を真空乾燥（絶乾）した後、この絶乾状態のクモ糸タンパク質を、予め所定量ずつ準備しておいた5つのDMSO溶媒にそれぞれ濃度15質量%の割合で添加し、その後、それらクモ糸タンパク質が添加された5つのDMSO溶媒のうちの4つに、互いに異なる量の純水を添加し、混合して、水分含有量（水分率）が下記表1に示す値となる5種類のドープ液を作製した。それら5種類のドープ液のうち、水分含有量が0質量%、0.75質量%、1.5質量%、3質量%のものはそれぞれ実施例1、実施例2、実施例3、実施例4であり、水分含有量が5質量%のものは比較例1であった。なお、それら実施例1～4と比較例1の5種類のドープ液の作製に際しては、シェイカーを用いて、クモ糸タンパク質を5時間溶解した後、ゴミと泡を取り除いた。この処理はすべて相対湿度1.3%RH以下のドライルームで行った。保存も相対湿度1.3%RH以下のドライルームで行った。そして、実施例1～4のドープ液と比較例1のドープ液のそれぞれについて、温度を変えたときの粘度変化を調べた。それらの結果を下記表1と図1に示した。

[0040]

[表1]

温度(°C)			粘度 (mPa・s)					
			70	60	50	40	30	25
実施例1	H <sub>2</sub> O	0質量%	82	110	153	221	333	434
実施例2	H <sub>2</sub> O	0.75質量%	67	89	124	193	306	393
実施例3	H <sub>2</sub> O	1.5質量%	56	73	100	150	232	299
実施例4	H <sub>2</sub> O	3質量%	49	63	89	132	199	261
比較例1	H <sub>2</sub> O	5質量%	23	30	39	53	76	92

[0041] 表1及び図1から明らかとなっており、ドーブ液中の水分含有量が5質量%未満の実施例1～4は、ドーブ液中の水分含有量が5質量%である比較例1に比して、温度に関係なく粘度が高くなっており、温度低下に伴う粘度の上昇率も明らかに大きくなっている。また、実施例1～4のドーブ液の中でも、水分含有量が低いほど粘度が高く、水分含有量0質量%の実施例1の粘度が最も高くなっている。しかも、室温に近い25°Cの温度では、実施例1～4の粘度が、比較例1の粘度に対して2.8～4.7倍の極めて大きな値となっている。これらの結果は、ドーブ液中の水分含有量を5質量%未満とすることによって、粘度を増大させ得ることを如実に示している。なお、実施例1～4のドーブ液を用いたときに安定した紡糸やキャストができることも確認した。

[0042] (実施例5～9)

この実験は、湿度管理の有無とクモ糸タンパク質濃度と温度を変えたときの粘度変化を調べたものである。まず、前記で得られたクモ糸タンパク質(粉体)を真空乾燥(絶乾)した後、雰囲気相対湿度1.3%RH以下のドライルーム内で、絶乾状態(水分含有量が0質量%)のクモ糸タンパク質(粉体)を下記表2に示す濃度となるようにDMSO溶媒に溶かして、クモ糸タンパク質濃度が互いに異なる4種類のドーブ液(実施例5～8)を製造し、その後、それら実施例5～8の4種類のドーブ液を相対湿度1.3%RH以下のドライルーム内に24時間保存した。また、湿度管理していない通常の実験室内(大気中)で、絶乾状態のクモ糸タンパク質(粉体)を濃度が22.0質量%になるようにDMSO溶媒に溶かして、ドーブ液(実施例9)を

製造した。この実施例9のドーブ液は、湿度管理していない通常の実験室内に24時間保存した。各条件は次の表2のとおりであった。そして、実施例5～9のドーブ液の温度と粘度の関係を調べた。その結果を図2に示した。

[0043] [表2]

	実施例5	実施例6	実施例7	実施例8	実施例9
タンパク質濃度(質量%)	19.5	20.0	20.5	21.5	22.0
ドライルーム内調整の有無	あり	あり	あり	あり	なし
ドライルーム内保管の有無	あり	あり	あり	あり	なし

[0044] 図2に示すように、実施例9（湿度管理をしていない環境で製造・保存したタンパク質濃度22.0質量%）のドーブ液の温度と粘度の関係は、実施例7（ドライルームで製造・保存したタンパク質濃度20.5質量%）のドーブ液の温度と粘度の関係と略同様なものとなっている。これは、実施例9のドーブ液を製造・保存している間に、大気中の水分が実施例9のドーブ液中に混入したためであると考えられる。これらの結果から、ドーブ液の製造時や保存時に、雰囲気相対湿度を低くして、ドーブ液の吸水を抑えることによりドーブ液の粘度を高く維持できることが確認された。

[0045] （参考試験1）

前記で得られたクモ糸タンパク質（粉体）を真空乾燥（絶乾）した後、絶乾状態のクモ糸タンパク質（粉体）を温度25℃、相対湿度72%RHの大気に暴露し、含水率の変化を調べた。その結果を図3に示した。図3から明らかとなお、絶乾状態のクモ糸タンパク質（粉体）は、約20分で水分率は約13質量%（平衡水分率）に達していた。このことから、粉体のクモ糸タンパク質を真空乾燥してからドーブ液とすることは重要であることが分かった。真空乾燥しないと、室温や相対湿度が高い環境下で保存したクモ糸タンパク質の粉体に吸着した水分がそのままドーブ液に入ることになる。

[0046] （参考試験2）

ドーブ液中への水分の混入によるドーブ液の粘度低下が、単なるドーブ液の水分による希釈に起因するものでないことを確認するために、以下の試験

を行った。先ず、温度50℃での粘度が、実施例1のドープ液と同程度である食器用洗剤を準備した。次いで、準備した食器用洗剤を100質量%としたときの食器用洗剤中の水分含有量が3質量%となるように、食器用洗剤に対して水分を添加し、温度50℃で粘度を測定して、水分の添加前と後での粘度の変化率を調べた。

[0047] その結果、水分を添加する前の食器用洗剤の温度50℃での粘度は143 mPa・sで、水分添加後の食器用洗剤の温度50℃での粘度は133 mPa・sであった。食器用洗剤の水分添加による温度50℃での粘度の低下率は7%となっていた。これに対して、実施例1のドープ液の温度50℃での粘度は153 mPa・sで、水分添加により水分含量が3質量%とされた実施例4のドープ液の温度50℃での粘度は89 mPa・sであった。クモ糸タンパク質を溶解したドープ液の水分添加による温度50℃での粘度の低下率は42%となっていた。これらのことから、クモ糸タンパク質などのポリペプチドを溶解してなる極性溶媒溶液中への水分混入による粘度低下が単なる水分による希釈に起因するものでないことが明確に認識された。

[0048] ポリペプチドの極性溶媒溶液の粘度が溶液中への水分の混入（含有）によって極端に低下するのは、以下のような理由によるものと考えられる。タンパク質（ポリペプチド）の分子を構成するアミノ酸は多様な側鎖を有している。そのため、タンパク質の極性溶媒溶液中に水分子が入り込むと、タンパク質分子の側鎖間で水素結合が形成されて、タンパク質分子が凝集する。それにより、タンパク質の溶解性が低下して、タンパク質の極性溶媒溶液の粘度が低下すると考えられる。従って、その逆に、タンパク質の極性溶媒溶液中から水分子を除去すれば、タンパク質分子の凝集を抑制して、極性溶媒溶液へのタンパク質の溶解性を高めることが可能となり、その結果、極性溶媒溶液の粘度を上昇させ得るようになると考えられる。

### 産業上の利用可能性

[0049] 本発明の極性溶媒溶液は湿式紡糸、フィルムキャスト、ゲル、パーティクル、メッシュ体、各種成形物に有用である。

## 配列表フリーテキスト

- [0050] 配列番号 1～4、12、13 アミノ酸配列  
配列番号 5～7 塩基配列  
配列番号 8～11 プライマーシーケンス

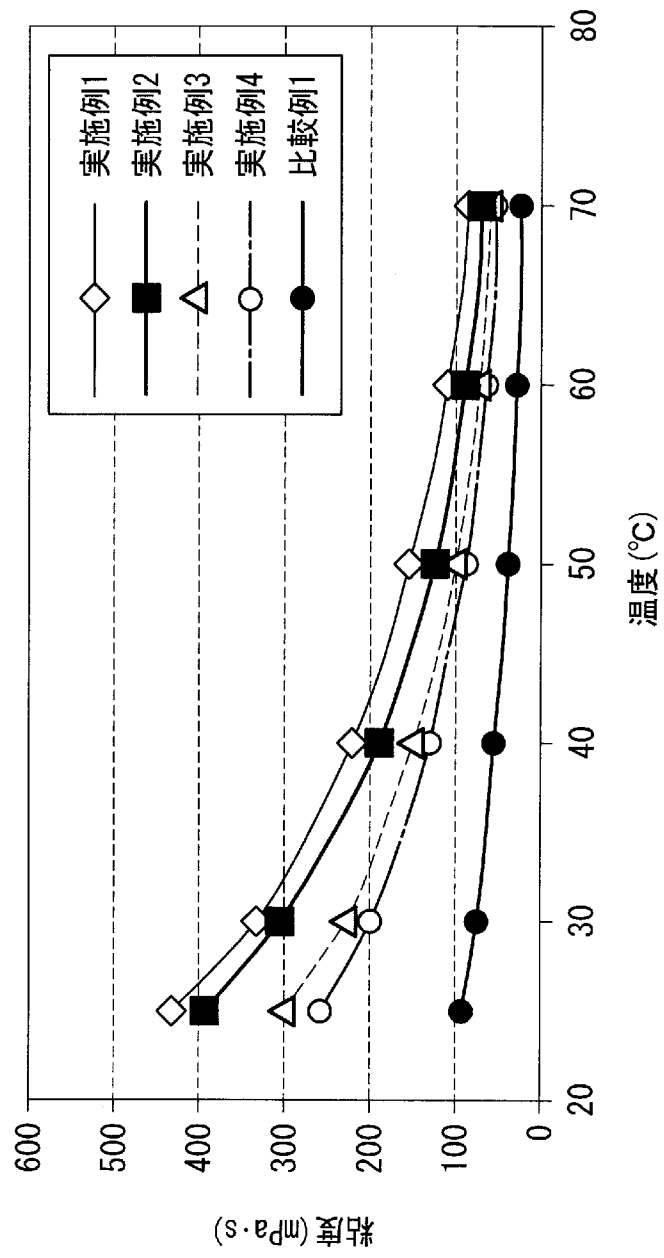
## 請求の範囲

- [請求項1]           ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液であって、前記溶液を100質量%としたときの前記溶液中の水分含有量が5質量%未満であることを特徴とする極性溶媒溶液。
- [請求項2]           前記ポリアミノ酸は、ポリペプチドである請求項1に記載の極性溶媒溶液。
- [請求項3]           前記極性溶媒は、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、及びN-メチル-2-ピロリドン(NMP)からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むものである請求項1又は2に記載の極性溶媒溶液。
- [請求項4]           前記ポリペプチドは、構造タンパク質である請求項2又は3に記載の極性溶媒溶液。
- [請求項5]           前記構造タンパク質は、結晶領域を含むものである請求項4に記載の極性溶媒溶液。
- [請求項6]           前記ポリペプチドは、クモ糸タンパク質である請求項2～5の何れか1項に記載の極性溶媒溶液。
- [請求項7]           ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液の製造方法であって、前記溶液中の水分含有量を変えることにより、前記溶液の粘度を調整することを特徴とする極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項8]           ポリアミノ酸を含む溶質を極性溶媒に溶解した極性溶媒溶液の製造方法であって、前記溶液中の水分含有量を減少させることにより、前記溶液の粘度を増加させることを特徴とする極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項9]           前記ポリアミノ酸は、ポリペプチドである請求項7又は8に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項10]           前記溶液を100質量%としたときの前記溶液中の水分含有量を5質量%未満とするようにした請求項7～9の何れか1項に記載の極性

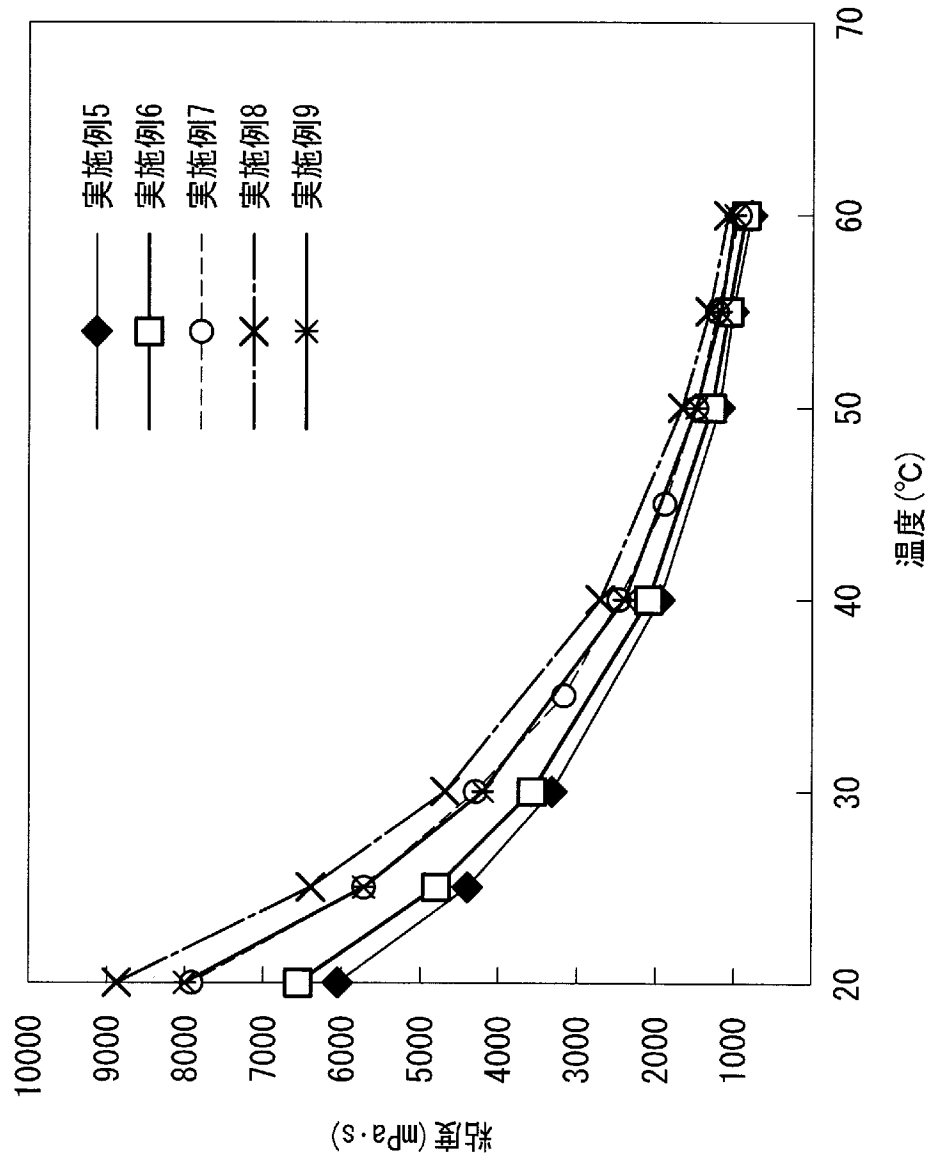
溶媒溶液の製造方法。

- [請求項11] 前記極性溶媒は、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、及びN-メチル-2-ピロリドン(NMP)からなる群から選ばれる少なくとも一つを含むものである請求項7～10の何れか1項に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項12] 前記ポリペプチドは、構造タンパク質である請求項9～11の何れか1項に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項13] 前記構造タンパク質は、結晶領域を含むものである請求項12に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項14] 前記ポリペプチドは、クモ糸タンパク質である請求項9～13の何れか1項に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項15] 前記ポリアミノ酸を含む溶質を乾燥させた後、前記極性溶媒に溶解させることによって、前記溶液中の水分含有量を変えるようにした請求項7～14の何れか1項に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項16] 前記溶液の製造及び／又は貯蔵の際に雰囲気相対湿度を調整することによって、前記溶液中の水分含有量を変えるようにした請求項7～15の何れか1項に記載の極性溶媒溶液の製造方法。
- [請求項17] 前記溶液の製造及び／又は貯蔵の際に雰囲気相対湿度を1.3%RH以下に調整する請求項16に記載の極性溶媒溶液の製造方法。

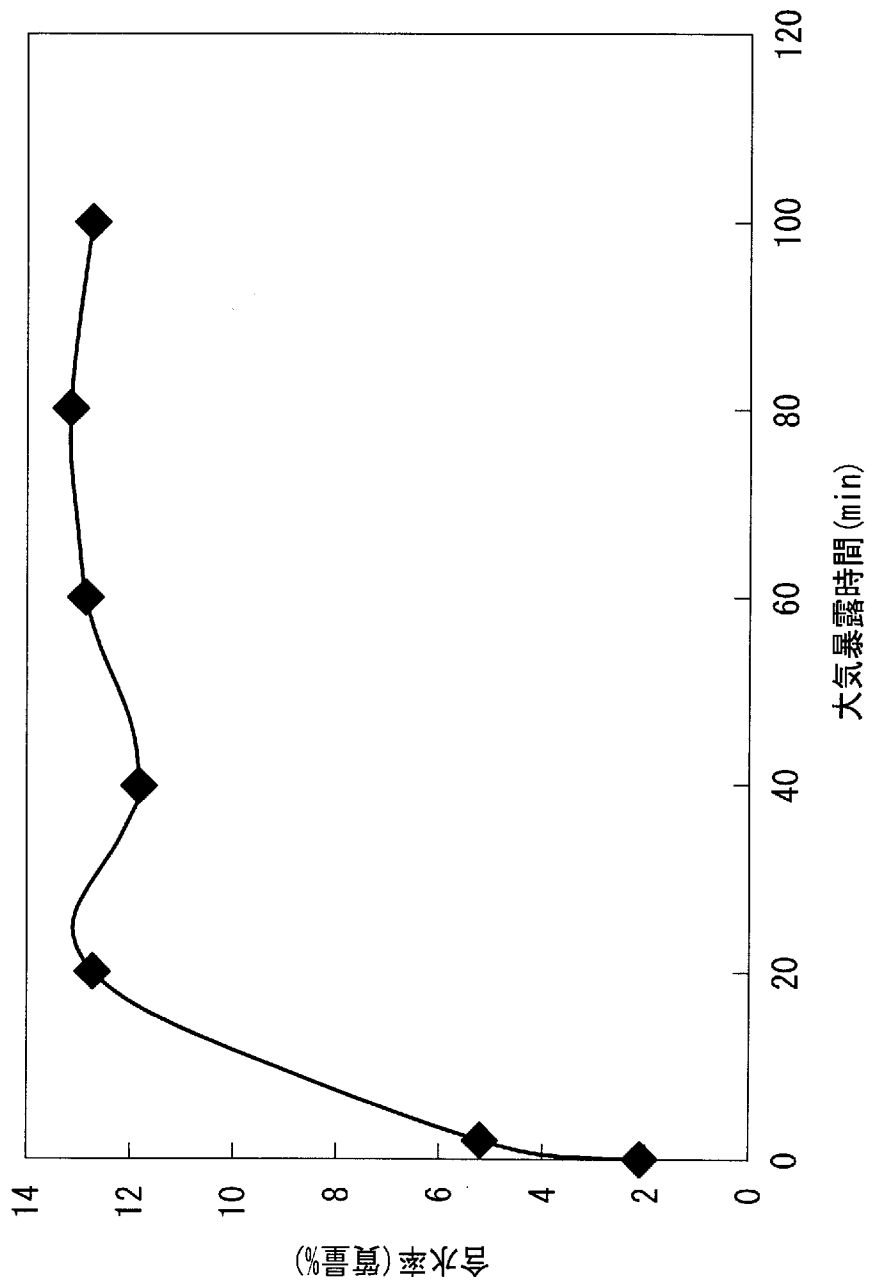
[図1]



[図2]



[図3]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/435(2006.01)i, D01C3/00(2006.01)i		
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) C07K14/435, D01C3/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	TERAMOTO, H. et al., Chemical Modification of Silk Sericin in Lithium Chloride/Dimethyl Sulfoxide Solvent with 4-Cyanophenyl Isocyanate, Biomacromolecules, 2004, 5(4), pp. 1392-1398, "Materials", "Preparation of Regenerated Sericins"	1-5, 7-13, 15-17/6, 14-17
Y/A	WO 2013/065650 A1 (Spiber Inc.), 10 May 2013 (10.05.2013), claims; examples & JP 5427322 B & US 2014/0245923 A1 claims; examples & EP 2774934 A1 & CN 103827139 A	6, 14-17/1-5, 7-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "T" 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 22 June 2016 (22.06.16)		Date of mailing of the international search report 05 July 2016 (05.07.16)
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/JP2016/061025

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2013/065651 A1 (Spiber Inc.), 10 May 2013 (10.05.2013), claims; examples & JP 5584932 B	6, 14-17/1-5, 7-13
X/A	DESAI, U. R. and KLIBANOV, M., Assessing the Structural Integrity of a Lyophilized Protein in Organic Solvents, Journal of the American Chemical Society, 1995, 117(14), pp. 3940- 3945, "Abstract", "Experimental Section"	1-3/4-17
A	WAYBRIGHT, T. J. et al., Overcoming Problems of Compound Storage in DMSO: Solvent and Process Alternatives, Journal of Biomolecular Screening, 2009, 14(6), pp.708-715, Fig. 3	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/435(2006.01)i, D01C3/00(2006.01)i		
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. C07K14/435, D01C3/00		
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 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
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
X/ Y	TERAMOTO, H. et al., Chemical Modification of Silk Sericin in Lithium Chloride/Dimethyl Sulfoxide Solvent with 4-Cyanophenyl Isocyanate, Biomacromolecules, 2004, 5(4), pp. 1392-1398, "Materials", "Preparation of Regenerated Sericins"	1-5, 7-13, 15-17/ 6, 14-17
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.06.2016	国際調査報告の発送日 05.07.2016	
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) 星 浩臣 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 5374

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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/ A	WO 2013/065650 A1 (スパイバー株式会社) 2013.05.10, 請求の範囲、実施例 & JP 5427322 B & US 2014/0245923 A1, 請求の範囲, 実施例 & EP 2774934 A1 & CN 103827139 A	6, 14-17/ 1-5, 7-13
Y/ A	WO 2013/065651 A1 (スパイバー株式会社) 2013.05.10, 請求の範囲、実施例 & JP 5584932 B	6, 14-17/ 1-5, 7-13
X/ A	DESAI, U. R. and KLIBANOV, M., Assessing the Structural Integrity of a Lyophilized Protein in Organic Solvents, Journal of the American Chemical Society, 1995, 117(14), pp. 3940-3945, "Abstract", "Experimental Section"	1-3/ 4-17
A	WAYBRIGHT, T. J. et al., Overcoming Problems of Compound Storage in DMSO: Solvent and Process Alternatives, Journal of Biomolecular Screening, 2009, 14(6), pp.708-715, Fig. 3	1-17