(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
2023年2月9日(09.02.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/013640 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C08J 9/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/029659

(22) 国際出願日： 2022年8月2日(02.08.2022)

(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 2021-126893 2021年8月2日(02.08.2021) JP

(71) 出願人：Ｓｐｉｂｅｒ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：加賀田 秀樹 (KAGATA Hideki)；〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上２３４番地１ Ｓｐｉｂｅｒ株式会社内 Yamagata (JP). 坂田 一樹(SAKATA Kazuki)；〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上２３４番地１ Ｓｐｉｂｅｒ株式会社内 Yamagata (JP).

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

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, 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, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

WO 2023/013640 A1

(54) **Title:** POROUS BODY AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称： 多孔質体及びその製造方法

(57) **Abstract:** The present invention relates to a porous material comprising a polypeptide derivative, wherein the polypeptide derivative comprises a block copolymer which has a first segment that includes a polypeptide skeleton and one or a plurality of second segments that bond to the first segment, the polypeptide skeleton being a recombinant polypeptide skeleton or a hydrophobic polypeptide skeleton, and the second segment including a molecular group that has a plasticizing function with respect to the polypeptide skeleton.

(57) 要約：ポリペプチド誘導体を含み、前記ポリペプチド誘導体が、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、前記第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有するブロック共重合体を含み、前記ポリペプチド骨格が、組換えポリペプチド骨格又は疎水性ポリペプチド骨格であり、前記第二のセグメントが前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体に関する。

明　細　書

発明の名称 ： 多孔質体及びその製造方法

技術分野

[0001]　本開示は、多孔質体及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002]　近年、環境保全意識の高まりに応じて、生分解性を有し且つ生産及び加工に際して必要なエネルギーが小さいタンパク質材料が注目を浴びている。そして、そのようなタンパク質材料は、例えば、繊維、フィルム、樹脂、ゲル、多孔質体等の様々な形態において、様々な分野での需要の増大が見込まれている。しかしながら、天然のタンパク質材料は、均質なものを大量に得ることが難しい。そのため、天然タンパク質材料の欠点を補い得る、人工タンパク質を含む材料が検討されてきている。

[0003]　例えば、特許文献１には、クモ糸タンパク質に由来するポリペプチド多孔質体であって、前記ポリペプチドは非水溶性ポリペプチドを含み、見掛けの密度が０．１ｇ／ｃｍ^{3}以下であることを特徴とするポリペプチド多孔質体が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０１４／１７５１７８号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　特許文献１に記載されるようなポリペプチド多孔質体には、品質、特に柔軟性において更なる改善の余地があった。本開示は、このような事情に鑑みてなされたものであり、柔軟性に優れる多孔質及びその製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006]　本開示の一側面は、ポリペプチド誘導体を含み、ポリペプチド誘導体が、

ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有するブロック共重合体を含み、ポリペプチド骨格が、組換えポリペプチド骨格又は疎水性ポリペプチド骨格であり、第二のセグメントがポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体を提供する。

[0007] 本開示の多孔質体は、上記第一及び第二のセグメントを有するブロック共重合体を含むポリペプチド誘導体を含むことによって、タンパク質同様にポリペプチド骨格を有する材料が用いられながら、柔軟性に優れている。上記ポリペプチド誘導体は、第一のセグメントと第二のセグメントとが直接結合したブロック共重合体を含むため、タンパク質に可塑剤を単純に混合する場合のようなマクロな相分離の発生が低減されている。

[0008] 上記第一のセグメントは、平均ハイドロパシー・インデックス（疎水性度：疎水性指標）が０．２２以上である疎水性ポリペプチド骨格を含んでいてよい。ポリペプチド骨格が上述のような疎水性ポリペプチド骨格であることによって、可塑化機能を有する分子団との第一のセグメントとの親和性が向上し、多孔質体の柔軟性が更に優れたものとなる。

[0009] 上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団の分子量は、上記ポリペプチド骨格の分子量を１００としたときに、１０以上であってよく、１００以下であってよい。

[0010] 上記第二のセグメントの合計の分子量は、上記第一のセグメントの分子量１００を基準として、１０以上であってよく、２０００以下であってよい。

[0011] 上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団は、ポリエーテル、ポリエステル、又はポリカーボネートであってよい。

[0012] 上記ポリエーテルは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はポリテトラメチレングリコール（ＰＴＭＧ）であってよい。

[0013] 上記ポリペプチド骨格が疎水性組換えポリペプチド骨格であってよい。

[0014] 上記ポリペプチド骨格が組換えタンパク質に由来する骨格を含んでもよい。

[0015] 上記組換えタンパク質が組換え構造タンパク質を含んでもよい。

[0016] 上記組換え構造タンパク質が改変フィブロインを含んでもよい。

[0017] 上記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインを含んでもよい。

[0018] 上記第二のセグメントの分子量が、上記第一のセグメントの分子量を１００としたときに１～４００の範囲内の値であってよい。これによって、ポリペプチド誘導体を含む多孔質体において、第一のセグメントの特性（例えば、高い機械的強度）を保持しつつ、多孔質体としての柔軟性を有利に高めることができる。

[0019] 上記第二のセグメントが、ポリエーテル、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリオール、ポリオフィン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリ（メタ）アクリレート、シリコーン、ポリウレタン、ポリアルキレンイミン、フェノール樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、及び多糖類からなる群より選択される少なくとも一種に由来する骨格を含んでもよい。

[0020] 上記第二のセグメントが、ポリエーテル基、ポリエステル基、ポリカーボネート基、ポリアミド基、ポリオール基、及び、修飾多糖基からなる群より選択される少なくとも一種を含んでもよい。

[0021] 上記第一のセグメントを複数有し、上記第二のセグメントの一部が２以上の上記第一のセグメントと結合してネットワーク構造を形成していてもよい。ネットワーク構造を有することで、靭性が更に向上し得る。

[0022] 上記第一のセグメントを複数有し、上記第一のセグメントと第二のセグメントとが交互に結合していてもよい。第一のセグメントと第二のセグメントとが交互に結合することによって、例えば、靭性が更に向上し得る。

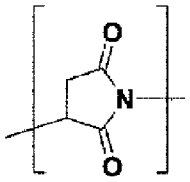
[0023] 上記第二のセグメントが複数の上記分子団を含み、複数の上記分子団が互いに連結していてもよい。第二セグメントの設計の幅をより広げることができ、多孔質体の柔軟性をより容易に調整できる。

[0024] 第二のセグメントがリンカーを更に含み、上記リンカーを介して上記分子団と上記ポリペプチド骨格とが結合していてもよい。

[0025] 上記リンカーが、下記式（１）で表される構造単位、下記一般式（２ａ）

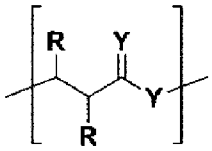
～（６）で表される構造単位、下記式（７）で表される構造単位、下記一般式（８ａ）～（９）で表される構造単位、下記一般式（１０）～（１１ｂ）で表される構造単位、及び下記一般式（１３）～（１６）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種を含んでもよい。

[0026] [化1]



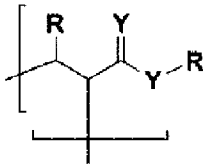
(1)

[0027] [化2]



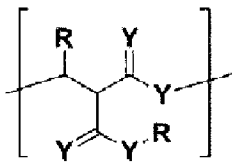
(2a)

[0028] [化3]



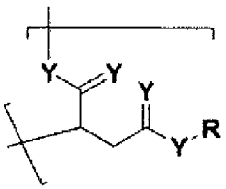
(2b)

[0029] [化4]



(3a)

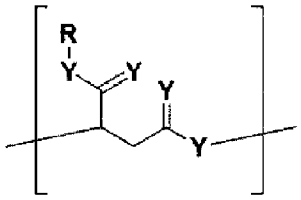
[0030] [化5]



(4a)

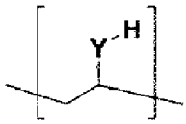
[0031]

[化6]



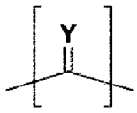
(4b)

[0032] [化7]



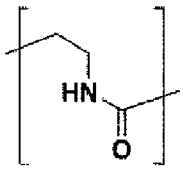
(5)

[0033] [化8]



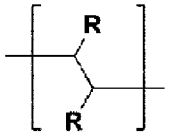
(6)

[0034] [化9]



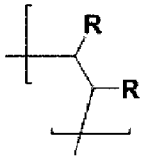
(7)

[0035] [化10]



(8a)

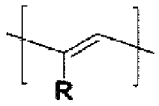
[0036] [化11]



(8b)

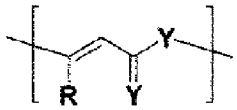
[0037]

[化12]



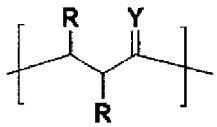
(9)

[0038] [化13]



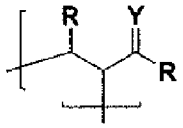
(10)

[0039] [化14]



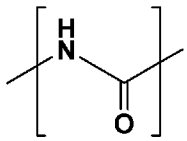
(11a)

[0040] [化15]



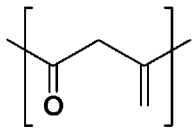
(11b)

[0041] [化16]



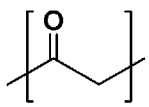
(13)

[0042] [化17]



(14)

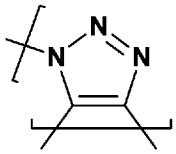
[0043] [化18]



(15)

[0044]

[化19]



(16)

[0045] 上記一般式（２ａ）、（２ｂ）、（３ａ）、（４ａ）、（４ｂ）、（５）、（６）、（１０）、（１１ａ）及び（１１ｂ）において、Ｙは、互いに独立に、酸素原子、硫黄原子、又はＮＲ[1]を示し、Ｒ[1]は、水素、炭化水素基、芳香族基、カルボニル基、又はスルホニル基を示し、上記一般式（２ａ）、（２ｂ）、（３ａ）、（４ａ）、（４ｂ）、（８ａ）、（８ｂ）、（９）、（１０）、（１１ａ）及び（１１ｂ）において、Ｒは、互いに独立に、水素、炭化水素基、又は芳香族基を示す。

[0046] 上記リンカーが、上記式（１）で表される構造単位、並びに、上記一般式（２ａ）、（３ａ）、（４ａ）、（４ｂ）及び（１０）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種であってよい。

[0047] 第一のセグメントが、ポリペプチド骨格中のチオール基、アミノ基及びヒドロキシ基からなる群より選択される少なくとも１種の官能基によって第二のセグメントと結合していてよい。

[0048] 本開示の他の一側面は、ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物をゲル化させる工程Ａと、ゲル化した混合物から溶媒を離脱させることにより、ポリペプチド誘導体を含む多孔質体を得る工程Ｂと、を含み、ポリペプチド誘導体が、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有し、ポリペプチド骨格が、組換えポリペプチド骨格又は疎水性ポリペプチド骨格であり、第二のセグメントがポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体を製造する方法を提供する。

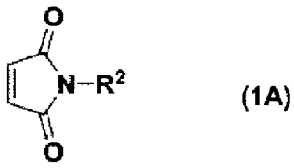
[0049] 工程Ｂにおいて、ゲル化した混合物を凍結乾燥させることにより、ゲル化した混合物から溶媒を離脱させてよい。

[0050] 上記多孔質体を製造する方法において、溶媒が有機溶媒であり、工程Ｂに

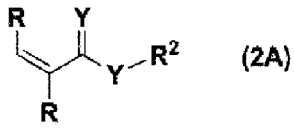
おいて、凍結乾燥させる前にゲル化した混合物中の溶媒を水に置換することを含んでいてよい。

[0051] 上記多孔質体を製造する方法は、ポリペプチド骨格を含む化合物と、下記一般式（１Ａ）～（１６Ａ）で表される化合物とを反応させることによってポリペプチド誘導体を得る工程を備えていてよい。ポリペプチド誘導体を得る工程において、ポリペプチド骨格は、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種を有していてよい。

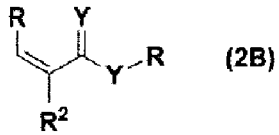
[0052] [化20]


(1A)

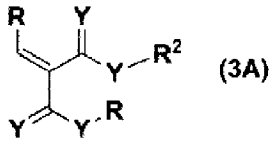
[0053] [化21]


(2A)

[0054] [化22]

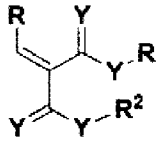

(2B)

[0055] [化23]


(3A)

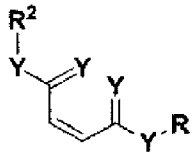
[0056]

[化24]



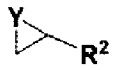
(3B)

[0057] [化25]



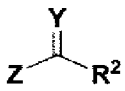
(4A)

[0058] [化26]



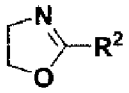
(5A)

[0059] [化27]



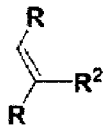
(6A)

[0060] [化28]



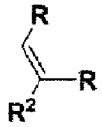
(7A)

[0061] [化29]



(8A)

[0062] [化30]



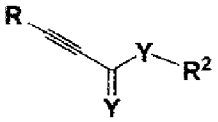
(8B)

[0063]

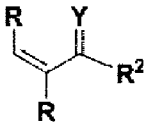
[化31]

(9A)

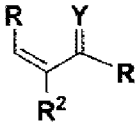
[0064] [化32]


(10A)

[0065] [化33]


(11A)

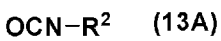
[0066] [化34]


(11B)

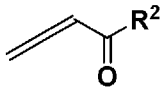
[0067] [化35]

(12A)

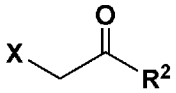
[0068] [化36]


(13A)

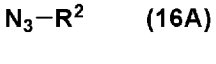
[0069] [化37]


(14A)

[0070] [化38]


(15A)

[0071] [化39]


(16A)

[0072] 上記一般式（１Ａ）、（２Ａ）、（２Ｂ）、（３Ａ）、（３Ｂ）、（４Ａ

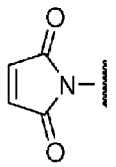
）、（５Ａ）、（６Ａ）、（７Ａ）、（８Ａ）、（８Ｂ）、（９Ａ）、（１０Ａ）、（１１Ａ）、（１１Ｂ）及び（１２Ａ）においてＲ^{2}は、上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を示し、上記一般式（２Ａ）、（２Ｂ）、（３Ａ）、（３Ｂ）、（４Ａ）、（５Ａ）、（６Ａ）、（８Ｂ）、（９Ａ）、（１０Ａ）、（１１Ａ）及び（１１Ｂ）において、Ｙは、互いに独立に、酸素原子、硫黄原子、又はＮＲ^{1}を示し、Ｒ^{1}は、水素、炭化水素基、芳香族基、カルボニル基、又はスルホニル基を示し、上記一般式（２Ａ）、（２Ｂ）、（３Ａ）、（３Ｂ）、（４Ａ）、（５Ａ）、（８Ａ）、（８Ｂ）、（９Ａ）、（１０Ａ）、（１１Ａ）及び（１１Ｂ）においてＲは、互いに独立に、水素、炭化水素基、又は芳香族基を示し、上記一般式（６Ａ）及び（１２Ａ）において、Ｚはハロゲン原子、スルホン酸エステル基、又は含フッ素カルボン酸エステル基を示し、上記一般式（１５Ａ）において、Ｘはハロゲン原子を示す。

[0073] ポリペプチド誘導体を得る工程では、特定の官能基を有するポリペプチド骨格を含む化合物と、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を有する、下記一般式（１Ａ）～（１６Ａ）で表される特定の化合物と、を反応させることによってポリペプチド誘導体を調製している。こうすることによって、得られるポリペプチド誘導体は、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を有し、タンパク質同様にポリペプチド骨格を有しながら、ポリペプチド誘導体全体として、柔軟性に優れる材料となっている。このため、柔軟性に優れる多孔質体を製造可能である。上記ポリペプチド誘導体は、第一のセグメントと第二のセグメントとが結合しているため、タンパク質に可塑剤を単純に混合する場合のようなマクロな相分離の発生が低減されている。

[0074] 上記多孔質体を製造する方法は、ポリペプチド骨格を含む化合物と、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物と、下記一般式（２－１Ａ）～（２－１６Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の構造単位を２つ以上有する化合物と、を反応させるこ

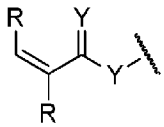
とによってポリペプチド誘導体を得る工程を備えていてよい。ポリペプチド誘導体を得る工程において、ポリペプチド骨格は、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種を有し、上記分子団を含む化合物は、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種を有していてよい。

[0075] [化40]



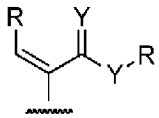
(2-1A)

[0076] [化41]



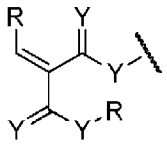
(2-2A)

[0077] [化42]



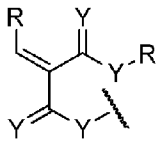
(2-2B)

[0078] [化43]



(2-3A)

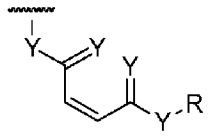
[0079] [化44]



(2-3B)

[0080]

[化45]



(2-4B)

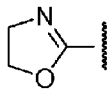
[0081] [化46]

(2-5A)

[0082] [化47]

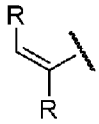
(2-6A)

[0083] [化48]



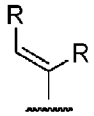
(2-7A)

[0084] [化49]



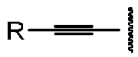
(2-8A)

[0085] [化50]



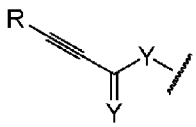
(2-8B)

[0086] [化51]



(2-9A)

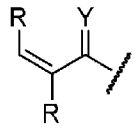
[0087] [化52]



(2-10A)

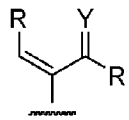
[0088]

[化53]



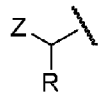
(2-11A)

[0089] [化54]



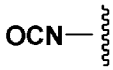
(2-11B)

[0090] [化55]



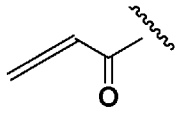
(2-12A)

[0091] [化56]



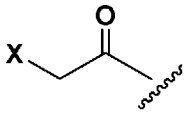
(2-13A)

[0092] [化57]



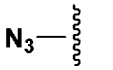
(2-14A)

[0093] [化58]



(2-15A)

[0094] [化59]



(2-16A)

[0095] 上記一般式（２－２Ａ）、（２－２Ｂ）、（２－３Ａ）、（２－３Ｂ）、（２－４Ａ）、（２－５Ａ）、（２－６Ａ）、（２－１０Ａ）、（２－１１Ａ）、及び（２－１１Ｂ）において、Ｙは、互いに独立に、酸素原子、硫黄原子、又はＮＲ[1]を示し、Ｒ[1]は、水素、炭化水素基、芳香族基、カルボニル基、又はスルホニル基を示し、上記一般式（２－２Ａ）、（２－２Ｂ）、（２－３Ａ）、（２－３Ｂ）、（２－４Ａ）、（２－８Ａ）、（２－８Ｂ）、

（２－９Ａ）、（２－１０Ａ）、（２－１１Ａ）、（２－１１Ｂ）、及び（２－１２Ａ）においてＲは、互いに独立に、水素、炭化水素基、又は芳香族基を示し、上記一般式（２－６Ａ）及び（２－１２Ａ）において、Ｚはハロゲン原子、スルホン酸エステル基、又は含フッ素カルボン酸エステル基を示し、上記一般式（２－１５Ａ）において、Ｘはハロゲン原子を示す。

[0096] ポリペプチド誘導体を得る工程では、特定の官能基を有するポリペプチド骨格を含む化合物と、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有し、特定の官能基を有する分子団を含む化合物と、一般式（２－１Ａ）～（２－１６Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の構造単位を２つ以上有する化合物と、を反応させることによってポリペプチド誘導体を調製する。こうすることによって、得られるポリペプチド誘導体は、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を有し、タンパク質同様にポリペプチド骨格を有しながら、ポリペプチド誘導体全体として、柔軟性に優れる材料となっている。このため、柔軟性に優れる多孔質体を製造可能である。上記ポリペプチド誘導体は、第一のセグメントと第二のセグメントとが結合しているため、タンパク質に可塑剤を単純に混合する場合のようなマクロな相分離の発生が低減されている。

発明の効果

[0097] 本開示によれば、柔軟性に優れる多孔質体及びその製造方法を提供できる。

図面の簡単な説明

[0098] [図1]図１は、改変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]図２は、天然由来のフィブロインのｚ／ｗ（％）の値の分布を示す図である。

[図3]図３は、天然由来のフィブロインのｘ／ｙ（％）の値の分布を示す図である。

[図4]図４は、改変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5]図５は、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6]図６は、実施例Ａの多孔質体の曲がり量の試験結果を示す写真である。

[図7]図７は、比較例Ａの多孔質体の曲がり量の試験結果を示す写真である。

[図8]図８は、実施例で調製したポリペプチド誘導体についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥの測定結果を示す図である。

[図9]図９は、実施例で調製したポリペプチド誘導体についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥの測定結果を示す図である。

[図10]図１０は、実施例で用いた加圧成形機の模式断面図である。

[図11]図１１は、図１０に示した加圧成形機の使用方法を示す模式図であり、（ａ）は組成物導入前、（ｂ）は組成物導入直後、（ｃ）は組成物を加熱及び加圧している状態、の加圧成形機の模式断面図である。

[図12]図１２は、実施例のポリペプチド誘導体を含む試験用成形体の外観を示す写真である。

[図13]図１３は、比較例の混合物を用いて成形した試験用成形体の外観を示す写真である。

[図14]図１４は、比較例の混合物を用いて成形した試験用成形体の外観を示す写真である。

[図15]図１５は、実施例１２で調製した繊維の外観を示す写真である。

[図16]図１６は、参考例２におけるＧＰＣ測定の結果を示すグラフである。

[図17]図１７は、参考例３における接触角測定の結果を示す写真である。

[図18]図１８は、実施例で作製したキャストフィルムの光学顕微鏡写真であり、図１８（ａ）及び図１８（ｂ）はそれぞれポリペプチド誘導体フィルム及び改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルムを１００倍に拡大して示す光学顕微鏡写真である。

[図19]図１９は、実施例で作製したキャストフィルムの走査型電子顕微鏡写真であり、図１９（ａ）及び図１９（ｂ）はそれぞれポリペプチド誘導体フィルム及び改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルムを１０００倍に拡大して示す走査型電子顕微鏡写真である。

[図20]図２０は、実施例で作製したポリペプチド誘導体及びその原料である

改変フィブロインのＧＰＣ測定の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0099] 以下、本開示を実施するための形態について、場合によって図面を参照し、詳細に説明する。ただし、以下の実施形態は本開示を説明するための例示であり、本開示を以下の内容に限定する趣旨ではない。

[0100] 本明細書において例示する材料は特に断らない限り、１種を単独で又は２種以上を組み合わせて用いることができる。組成物中の各成分の含有量は、組成物中の各成分に該当する物質が複数存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

[0101] 本明細書においてポリペプチド誘導体とは、第一のセグメントと第二セグメントとが結合したブロック共重合体を含む組成物を言う。ポリペプチド誘導体は、未反応の第一のセグメント（第一のセグメントを形成するための物質）、及び／又は、未反応の第二のセグメント（第二のセグメントを形成するための物質）を含んでいてもよい。本明細書におけるポリペプチド誘導体は、マクロ的な観察では、相分離なく、均一な状態である。マクロ的な観察は、例えば、光学顕微鏡又は走査電子顕微鏡等によって１００～３０００倍程度の倍率で実施される。マクロ的な観察によって、相分離なく均一な状態であることを確認する方法としては、観察対象となる物質のキャストフィルムを形成し、当該キャストフィルムを１００～３０００倍程度の倍率で光学顕微鏡又は走査電子顕微鏡によって観察することよって確認する方法が挙げられる。相分離なく均一な状態であることは、具体的には、後述する実施例に記載の方法によって確認することができる。本明細書におけるポリペプチド誘導体は、ミクロ的に（例えば原子間力顕微鏡を用いたサブミクロンスケールで）観察したときには相分離が認められ得るものである。

[0102] このようなポリペプチド誘導体を含む多孔質体は、第一のセグメントと第二セグメントとの混合物及び第一のセグメントと第二セグメントのうちの一方が他方に分散されてなる組成物を含む多孔質体とは異なって、ポリペプチド誘導体含有部（多孔質体の一部若しくは全部）の全体において、物理特性

乃至機械特性の均一化が有利に図られて、例えば、クラックの発生が有利に抑制され得る。透明性が確保され得るだけでなく、多孔質体の作製時に、ポリペプチド誘導体含有部の成形性が効果的に高められ得る。ポリペプチド誘導体に含まれる、第一のセグメントと第二セグメントとが結合したブロック共重合体のポリペプチド誘導体全体に対する含有量は、特に限定されるものではなく、例えば、重量基準で、３０％以上であってもよく、４０％以上であってもよく、５０％以上であってもよく、６０％以上であってもよく、７０％以上であってもよく、８０％以上であってもよい。ポリペプチド誘導体は、第一のセグメントと第二セグメントとが共有結合したブロック共重合体を主成分として含んでいることが望ましい。従って、ポリペプチド誘導体に含まれる上記ブロック共重合体のポリペプチド誘導体全体に対する含有量は、重量基準で、好ましくは５０％超であり、より好ましくは６０％以上であり、更に好ましくは７０％以上であり、更により好ましくは８０％以上であり、最も好ましくは８５％以上である。上記ブロック共重合体を５０％超の割合で含有するポリペプチド誘導体を含む多孔質体においては、ポリペプチド誘導体を含むことによって得られる柔軟性及び／又は靭性の向上効果がより高いレベルで達成され得る。

[0103] ［多孔質体］

本実施形態に係る多孔質体は、ポリペプチド誘導体を含む。当該多孔質体は、ポリペプチド誘導体を含んでいるため、柔軟性に優れている。

[0104] ＜ポリペプチド誘導体＞

ポリペプチド誘導体は、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、上記第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントを有するブロック共重合体を含む。上記第二のセグメントが上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む。第二のセグメントの数は、第一のセグメント１つに対して、一又は複数であり、好ましくは２以上であり、より好ましくは２～１０であり、さらに好ましくは２～８であり、さらに好ましくは２～６であり、最も好ましくは２～４である。

[0105] ポリペプチド誘導体に含まれるブロック共重合体としては、第一のセグメント及び第二のセグメントを有するものであればよく、例えば、１つの第一のセグメントに一又は複数の第二のセグメントが結合したものであってよく、第一のセグメントと、第一のセグメントに結合した第二のセグメントとを含むブロックが複数連結したものであってもよい。ブロック共重合体は、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントを主鎖とし、第二のセグメントを側鎖に有する高分子（例えば、グラフトポリマー等）であってよい。ブロック共重合体は、上記第一のセグメントを複数有し、上記第一のセグメントと第二のセグメントとが交互に結合していてもよい。第一のセグメントと第二のセグメントとが交互に結合することによって、例えば、上記ポリペプチド誘導体を含むことによって、多孔質体の靭性が更に向上し得る。

[0106] ポリペプチド誘導体に含まれるブロック共重合体は、上記第一のセグメントを複数有し、上記第二のセグメントの一部が２以上の上記第一のセグメントと結合してネットワーク構造を形成していてもよい。ネットワーク構造を有することで、上記ポリペプチド誘導体を含むことによって、多孔質体の靭性が更に向上し得る。

[0107] 第一のセグメントと第二のセグメントとの結合は、直接結合していてもよく、第一のセグメント及び第二のセグメントと結合できるような構造によって結合していてもよい。それらのいずれの結合形態においても、第一のセグメントと第二のセグメントとの結合は配位結合であってもよく、イオン的相互作用による結合であってもよく、共有結合であってもよい。それらの中でも共有結合が望ましい。

[0108] ＜第一のセグメント＞

第一のセグメントはポリペプチド骨格を含み、例えば、ポリペプチド骨格のみからなってもよい。第一のセグメントは、ポリペプチド骨格を構成するアミノ酸配列中の官能基（例えば、システインの有するチオール基等）によって第二のセグメントと結合していてよい。換言すれば、第二のセグメントと結合可能な官能基を有する組換えポリペプチド又は疎水性ポリペプチドで

あれば、上記のポリペプチド骨格として採用できる。この際、ポリペプチドが有する上記官能基の数は、例えば、１個以上、２個以上、又は４個以上であってよい。ポリペプチドが有する上記官能基の数は、例えば、３０個以下、２５個以下、２０個以下、１５個以下、１０個以下、又は８個以下であってよい。ポリペプチドが有する上記官能基の数は上述の範囲内で調整することができ、例えば、１～３０、１～２５、１～２０、１～１５、１～１０、１～８、又は２～８であってよい。第一のセグメントは、ポリペプチド骨格を構成するアミノ酸配列中の官能基に対して導入した官能基によって第二のセグメントと結合していてよい。

[0109] 上述のような官能基は、例えば、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、及びアミド基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、より好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、及びインドール基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、更に好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、及びフェノキシ基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、更により好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、及びカルボキシ基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、更によりまた好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、及びグアニジノ基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、特に好ましくは、チオール基、アミノ基、及びヒドロキシ基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、特により好ましくは、チオール基、及びアミノ基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、最も好ましくはチオール基である。アミノ基は、例えば、リジンが有するアミノ基であってよい。ヒドロキシ基は、例えば、セリンが有するヒドロキ

シ基、及びスレオニンが有するヒドロキシ基等であってよい。グアニジノ基は、例えば、アルギニンが有するグアニジノ基であってよい。カルボキシ基は、例えば、グルタミン酸が有するカルボキシ基、及びアスパラギン酸が有するカルボキシ基等であってよい。フェノキシ基は、例えば、チロシンが有するフェノキシ基であってよい。インドール基は、例えば、トリプロファンが有するインドール基であってよい。アミド基は、例えば、グルタミンが有するアミド基、及びアスパラギンが有するアミド基等であってよい。アルキニル基は、システインが有するチオール基に対してハロゲン化アセチレンを反応させて導入したアルキニル基であってよい。

[0110] 第一のセグメントの分子量は、例えば、好ましくは２００～１０００００であり、より好ましくは３００～９００００であり、更に好ましくは４００～８００００であり、更により好ましくは５００～７００００であり、更によりまた好ましくは６００～６００００であり、更に好適には１０００～６００００であり、更に好適には３０００～６００００であり、更に好適には５０００～６００００であり、更に好適には１００００～６００００であり、更に好適には５０００～１００００である。

[0111] 第一のセグメントの分子量が２００以上であると、可塑化機能を有する分子団を含む第二のセグメント（ソフトセグメント）に対してハードセグメントとして機能する第一のセグメントが充分な大きさになる。そうなった場合には、ポリペプチド誘導体を用いて成形される多孔質体の剛性が充分に大きくなり、多孔質体としてより使用しやすくなる。第一のセグメントの分子量が１０００００以下であると、連結反応の反応性の低下が抑えられ、化学工学的に素材として商業生産が可能な時間で反応を完遂させやすくなり、その結果、多孔質体内に残存した未反応の第二セグメントの局在化を抑制しやすくなる。

[0112] 第一のセグメントの分子量、及び第一のセグメントに含まれるポリペプチド骨格の分子量は、例えば、１０００以上、２０００以上、３０００以上、４０００以上、５０００以上、６０００以上、７０００以上、８０００以上

、９０００以上、１００００以上、２００００以上、３００００以上、４００００以上、５００００以上、６００００以上、７００００以上、８００００以上、９００００以上、又は１０００００以上であってよい。さらに、第一のセグメントの分子量、及び第一のセグメントに含まれるポリペプチド骨格の分子量は、４０００００以下、３６００００未満、３００００以下、又は２００００以下であってよい。

[0113] 第一のセグメント及びポリペプチド骨格は、分子量が小さい程、溶媒への溶解度が高まる傾向にある。それ故、ポリペプチド骨格及び／又は第一のセグメントの分子量が、例えば２００００以下、或いは１００００以下である場合には、ポリペプチド骨格を含む化合物を溶媒に溶解させて、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物と反応させることでポリペプチド誘導体を得る際に、目的とするポリペプチド誘導体の生成効率の向上が望まれ得る。そのようにして得られるポリペプチド誘導体を用いて形成された多孔質体においては、ある程度の強度を確保しつつ、柔軟性の向上が期待され得る。加えて、ポリペプチド骨格及び／又は第一のセグメントの分子量が、例えば２００００以下、或いは１００００以下である場合には、ポリペプチド誘導体の柔軟性を高めるために第二のセグメントの使用量を可及的に抑制し得ることが期待される。上記した第一のセグメントの分子量及びポリペプチド骨格の分子量は重量平均分子量である。

[0114] 本明細書における分子量は、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって測定される値である。かかる電気泳動は以下の手順にて実施される。すなわち、先ず、２ｍｇの粉末サンプルに２００μＬ、２M塩化リチウムＤＭＳＯ（富士フィルム和光純薬製）を加え、８０℃、６０分間、さらに９５℃、１０分間加熱しながら攪拌することで、サンプルを溶解させる。その後、１０Mウレア溶液でサンプルを５０倍希釈、試料用緩衝液（富士フィルム和光純薬製）でさらに２倍希釈し、９５℃、５分間加熱することで、タンパク質を変性させる。次いで、電気泳動装置（Bio－lad製）にＳＤＳ－ＰＡＧＥ用ゲル（Bio－lad製）を取り付け

、装置にＳＤＳバッファーを満たす一方、電気泳動装置を電源装置（Bio craft製）に繋ぐ。変性させたサンプルを１０μＬずつＳＤＳ－ＰＡＧＥ用ゲルの各ウェルに加え、３０ｍＡ／１枚、３０分間の条件で電流を流す。電気泳動終了後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ用ゲルを装置から取り出し、Ｏｒｉｏｌｅ蛍光ゲルステイン（Bio-lad製）に浸し、１時間振盪する。その後、ＵＶサンプルトレイ（Bio－lad製）にゲルをのせ、Gel Doc EZゲル撮影装置（Bio－lad製）で染色像を取得する。

[0115] ポリペプチド骨格を構成するアミノ酸残基数は５０以上であってよい。当該アミノ酸残基数は、例えば、１００以上、１５０以上、２００以上、２５０以上、３００以上、３５０以上、４００以上、４５０以上、又は５００以上であってよい。当該アミノ酸残基数は、例えば、５０００以下、４５００以下、４０００以下、３５００以下、３０００以下、２５００以下、２０００以下、１５００以下、又は１０００以下であってよい。アミノ酸残基数が少ない程、溶媒への溶解度が高まる傾向にある。それ故、本実施形態に係るポリペプチドのアミノ酸残基数が、例えば５０００以下、或いは２５００以下である場合には、ポリペプチド骨格を含む化合物を溶媒に溶解させて、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物と反応させることでポリペプチド誘導体を得る際に、目的とするポリペプチド誘導体の生成効率の向上が望まれ得る。そのようにして得られるポリペプチド誘導体を用いて形成される多孔質体においては、ある程度の強度を確保しつつ、柔軟性の向上が期待され得る。

[0116] ポリペプチド骨格は、組換えポリペプチド骨格又は疎水性ポリペプチド骨格であり、疎水性組換えポリペプチド骨格であってよい。

[0117] 組換えポリペプチドは、遺伝子組換え技術を使用して製造されたポリペプチドを意味する。ポリペプチド骨格が組換えポリペプチド骨格である場合、アミノ酸配列の設計変更が容易であることから、ポリペプチド誘導体の特性、物性等のコントロールが容易になる。ポリペプチド骨格が組換えポリペプチド骨格である場合、常に均一な分子デザインが可能であるため、目的に応

じたポリペプチド骨格を安定的に得ることができる。これによって、目的とするポリペプチド誘導体及び多孔質体の品質の安定化が有利に図られる。

[0118] ポリペプチド骨格が疎水性ポリペプチド骨格である場合には、可塑化機能を有する分子団の第一のセグメントとの親和性が向上し、より柔軟性に優れる多孔質体を製造できる。加えて、かかる多孔質体の耐水性が向上し、例えば、多孔質体が工業用の汎用材料として使用される場合に、使用寿命の延命化が有利に図られ得る。ポリペプチド誘導体は、例えば、第二のセグメントに含まれる、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団の疎水性乃至親水性をコントロールすることで、ポリペプチド誘導体全体の疎水性乃至親水性を任意に調整可能である。ポリペプチド骨格が疎水性ポリペプチド骨格である場合には、ポリペプチド骨格が親水性ポリペプチド骨格である場合に比して、ポリペプチド誘導体全体を疎水性側にシフトすることができ、以てポリペプチド誘導体全体の疎水性乃至親水性をより幅広い範囲にわたってコントロール可能となる。

[0119] 疎水性ポリペプチド骨格における疎水性は、後述する平均ハイドロパシー・インデックス（疎水性度：疎水性指標）の値を指標として推定することができる。疎水性ポリペプチド骨格の平均ハイドロパシー・インデックスの値は、例えば、０．００以上、０．１０以上、０．２０以上、０．２２以上、０．２５以上、０．３０以上、０．３５以上、０．４０以上、０．４５以上、０．５０以上、０．５５以上、０．６０以上、０．６５以上、又は０．７０以上であってよい。その上限値は特に制限されるものではないものの、例えば、１．００以下であってもよく、０．７以下であってもよい。

[0120] 疎水性ポリペプチド骨格は、６０℃における臭化リチウム水溶液（濃度：９Ｍ）に対する溶解性の低いものが好ましい。この溶解性は、上記疎水性ポリペプチド骨格に相当する化合物（ポリペプチド）又はポリペプチド誘導体を分解し疎水性ポリペプチド骨格のみ単離して得られたポリペプチドを用いて評価できる。６０℃における臭化リチウム水溶液（濃度：９Ｍ）に対して上記ポリペプチドを溶解させた場合の最大濃度が、例えば、３０質量％未満

、２５質量％未満、２０質量％未満、１５質量％未満、１０質量％未満、５質量％未満、又は１質量％未満であってよい。疎水性ポリペプチド骨格としては、６０℃における臭化リチウム水溶液（濃度：９Ｍ）に対して全く溶解しないものであってもよい。

[0121] 疎水性ポリペプチド骨格は、水の接触角が大きなものであることが好ましい。水の接触角は、基材上に上記疎水性ポリペプチド骨格に相当する化合物（ポリペプチド）又はポリペプチド誘導体を分解し疎水性ポリペプチド骨格のみ単離して得られたポリペプチドからなる膜を形成し、当該膜を用いて評価できる。当該膜に水を滴下して、５秒間経過後の接触角が５５°以上となるような膜を構成するポリペプチドが、上記疎水性ポリペプチド骨格として好ましい。上記接触角は、例えば、６０°以上、６５°以上、又は７０°以上であってよい。

[0122] 疎水性ポリペプチド骨格は、耐熱水性に優れたものであることが好ましい。対熱水性は、上記疎水性ポリペプチド骨格に相当する化合物（ポリペプチド）又はポリペプチド誘導体を分解し疎水性ポリペプチド骨格のみ単離して得られたポリペプチドを用いて評価できる。上記ポリペプチドと水とからなる分散液であって、上記ポリペプチドの含有量が５質量％である分散液を調製し、当該分散液を１００℃で５時間加熱処理しても分解しないようなポリペプチドが、上記疎水性ポリペプチド骨格として好ましい。

[0123] ポリペプチド骨格は、タンパク質に由来する骨格を含んでいてよく、タンパク質に由来する骨格のみからなっていてもよい。タンパク質は、組換えタンパク質であってよく、改変フィブロインであってよい。ポリペプチド骨格が組換えタンパク質に由来する骨格を含むことによって、ポリペプチド骨格を構成するアミノ酸配列中の官能基の数及び位置を任意に調節することできる。これによって、ポリペプチド誘導体の構造並びに特性をデザインすることが可能となる。

[0124] 組換えタンパク質としては、工業規模での製造が可能な任意のタンパク質を挙げることができ、例えば、工業用に利用できるタンパク質等を挙げるこ

とができる。工業用に利用可能とは、例えば、屋内又は屋外で使用される様々な汎用材料等に利用し得ることをいう。

[0125] 組換えタンパク質は、そのドメイン配列が、天然由来のタンパク質のアミノ酸配列とは異なるタンパク質であってもよく、天然由来のタンパク質のアミノ酸配列と同一であるタンパク質であってもよい。組換えタンパク質は、天然由来のタンパク質のアミノ酸配列をそのまま利用したものであってもよく、天然由来のタンパク質のアミノ酸配列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タンパク質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、天然由来のタンパク質に依らず人工的に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。

[0126] 組換えタンパク質は、天然タンパク質とは異なり、アミノ酸配列を自由に設計し得るものであることから、かかる組換えタンパク質に由来する骨格が、ポリペプチド誘導体に含有される場合には、組換えタンパク質のアミノ酸配列を適宜にデザインすることによって多孔質体の機能、特性、物性等を任意にコントロールすることができる。常に均一な分子デザインが可能であるため、目的タンパク質との相同性の高い、目的に応じたタンパク質を安定的に得ることができる。以て、目的とするポリペプチド誘導体、ひいてはそれを用いて得られる多孔質体の品質の安定化が有利に図られる。

[0127] ポリペプチド骨格は、組換え構造タンパク質に由来する骨格を含んでいてよい。構造タンパク質とは、生体の構造に関わるタンパク質、若しくは生体が作り出す構造体を構成するタンパク質、又はそれらに由来するタンパク質を意味する。構造タンパク質は、一定の条件下において自己凝集し、繊維、フィルム、樹脂、ゲル、ミセル、ナノパーティクル等の構造体を形成するタンパク質のことをいう。構造タンパク質の具体例としては、スパイダーシルク（クモ糸）、カイコシルク、ケラチン、コラーゲン、エラスチン及びレシリン、並びにこれら由来のタンパク質等を挙げることができる。組換え構造

タンパク質は、遺伝子組換えにより微生物生産した構造タンパク質である。組換え構造タンパク質は、成形性及び／又は生産性の観点からアミノ酸の配列を改良したものであってよい。

[0128] タンパク質を人工的に成形する際、側鎖の小さいアミノ酸ほど水素結合しやすく、強度の高い多孔質体を得やすい。アラニン残基及びグリシン残基は、側鎖が非極性のアミノ酸であるため、ポリペプチド生成における折りたたみの過程で内側に向くように配置され、αヘリックス構造又はβシート構造を取りやすい。よって、グリシン残基、アラニン残基、セリン残基等のアミノ酸の割合が高いことが望ましい。強度向上の観点から、アラニン残基含有量は、例えば、１０～４０％、１２～４０％、１５～４０％、１８～４０％、２０～４０％、又は、２２～４０％であってよい。強度向上の観点から、グリシン残基含有量は、例えば、１０～５５％、１１～５５％、１３～５５％、１５～５５％、１８～５５％、２０～５５％、２２～５５％、又は２５～５５％であってよい。

[0129] 本明細書において、「アラニン残基含有量」とは、下記式で表される値である。

アラニン残基含有量＝（ポリペプチドに含まれるアラニン残基の数／ポリペプチドの全アミノ酸残基の数）×１００（％）

グリシン残基含有量、セリン残基含有量、スレオニン残基含有量、プロリン残基含有量及びチロシン残基含有量は、上記式において、アラニン残基をそれぞれグリシン残基、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基及びチロシン残基と読み替えたものと同義である。

[0130] 加工性を向上させる観点では、加工時点において分子間の強固な水素結合を阻害することが重要であり、この観点から側鎖の大きいアミノ酸又は屈曲性を有するアミノ酸が一定程度、配列全体に均質に含まれていることが望ましく、具体的には、チロシン残基、スレオニン残基、プロリン残基が含まれるモチーフを繰り返して周期で入っていてもよい。例えば、任意の連続した２０アミノ酸残基の中、プロリン残基、スレオニン残基及びチロシン残基の

合計含有量が、５％以上、５．５％超、６．０％以上、６．５％超、７．０％以上、７．５％超、８．０％以上、８．５％超、９．０％以上、１０．０％以上、又は１５．０％以上であってよい。例えば、任意の連続した２０アミノ酸残基の中、プロリン残基、スレオニン残基及びチロシン残基の合計含有量が、５０％以下、４０％以下、３０％以下、又は２０％以下であってよい。

[0131] タンパク質は、セリン残基含有量、スレオニン残基含有量及びチロシン残基含有量の合計が、４％以上、４．５％以上、５％以上、５．５％以上、６％以上、６．５％以上、又は７％以上であってよい。セリン残基含有量、スレオニン残基含有量及びチロシン残基含有量の合計は、例えば、３５％以下、３３％以下、３０％以下、２５％以下、又は２０％以下であってよい。

[0132] タンパク質は、反復配列を有するものであってよい。すなわち、タンパク質は、配列同一性が高いアミノ酸配列（反復配列単位）が複数存在するものであってよい。反復配列単位のアミノ酸残基数は６～２００であることが好ましい。反復配列単位間の配列同一性は、例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上であってよい。反復配列単位の疎水性度（ハイドロパシー・インデックス）は、例えば、－０．８０以上、－０．７０以上、－０．６０以上、－０．５０以上、－０．４０以上、－０．３０以上、－０．２０以上、－０．１０以上、０．００以上、０．２２以上、０．２５以上、０．３０以上、０．３５以上、０．４０以上、０．４５以上、０．５０以上、０．５５以上、０．６０以上、０．６５以上、又は０．７０以上であってよい。反復配列単位の疎水性度の上限値は特に制限されるものではないものの、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。

[0133] タンパク質は、（Ａ）$_n$モチーフを含むものであってよい。本明細書において、（Ａ）$_n$モチーフとは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を意味する。（Ａ）$_n$モチーフのアミノ酸残基数は２～２７であってよく、２～２０、２～１６、又は２～１２の整数であってよい。（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４０％以上であってよく、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８３％以上、８５％以上、８６％以上、９０％以上、９５％以上、又は１００％（アラニン残基のみで構成されることを意味する。）であってもよい。

[0134] タンパク質には、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基と隣り合う位置に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していることが好ましく、グリシン残基と隣り合う位置に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していることがより好ましい。システイン残基はメルカプト基を（チオール基又はスルフヒドリル基ともいう）有し、メルカプト基の選択性によって、第二のセグメントとの結合を容易なものとすることができる。したがって、タンパク質におけるシステイン残基の挿入位置に応じて、第一のセグメントのポリペプチド骨格に対する第二のセグメントの結合位置を任意の位置とすることができる。システイン残基は、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基と、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基との間に位置していてよく、セリン残基と、グリシン残基との間に位置していてよい。

[0135] タンパク質は、疎水性アミノ酸残基と隣り合う位置に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していることが好ましい。この場合、分子間で疎水性アミノ酸残基同士が疎水的相互作用により固定される。システイン残基は、疎水性アミノ酸残基の隣に位置していてよく、疎水性アミノ酸残基と、疎水性アミノ酸残基以外のアミノ酸残基との間に、位置していてもよく、疎水性アミノ酸残基と、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基との間に位置していてよく、疎水性アミノ酸残基と、グリシン残基との間に位置していてよい。疎水性アミノ酸残基は、イソロイシン残基、バリン残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、メチオニン残基、及びアラニン残基からなる群より選択される１種であってよい。

[0136] タンパク質としては、フィブロインが好ましい。フィブロインとしては、例えば、天然由来のフィブロインが挙げられる。天然由来のフィブロインと

しては、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。

[0137] 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（Ａｎｔｅｒａｅａ　ｐｅｒｎｙｉ）、楓蚕（Ｅｒｉｏｇｙｎａ　ｐｙｒｅｔｏｒｕｍ）、蓖蚕（Ｐｉｌｏｓａｍｉａ　Ｃｙｎｔｈｉａ　ｒｉｃｉｎｉ）、樗蚕（Ｓａｍｉａ　ｃｙｎｔｈｉａ）、栗虫（Ｃａｌｉｇｕｒａ　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、及びスズメバチ（Ｖｅｓｐａ　ｓｉｍｉｌｌｉｍａ　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。

[0138] 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。

[0139] 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、並びにＭｉＳｐ（ＭｉＳｐ１及びＭｉＳｐ２）等が挙げられる。

[0140] 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、ｆｉｂｒｏｉｎ－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））、ｍａ

ｊｏｒ ａｎｇｕ１１ａｔｅ 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 ａｎｐｕｌｌａｔｅ 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））、並びに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。

[0141] 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。

[0142] タンパク質は、改変フィブロインであってよい。本明細書において「改変フィブロイン」とは、人為的に製造されたフィブロイン（人造フィブロイン）を意味する。改変フィブロインは、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であってもよく、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列と同一であるフィブロインであってもよい。

[0143] 改変フィブロインは、天然由来フィブロインに準ずる構造を有する繊維状タンパク質であってよく、天然由来フィブロインが有する反復配列と同様の配列を有するフィブロインであってもよい。「フィブロインが有する反復配列と同様の配列」とは、実際に天然由来フィブロインが有する配列であってもよく、それと類似する配列であってもよい。

[0144] 「改変フィブロイン」は、本開示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、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。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。改変フィブロインとしては、例えば、人工絹（シルク）フィブロイン（カイコが産生する絹タンパク質のアミノ酸配列を改変したもの）、及び改変クモ糸フィブロイン（クモ類が産生するスパイダーシルクタンパク質のアミノ酸配列を改変したもの）などが挙げられる。改変フィブロインは、好ましくは改変クモ糸フィブロインを含み、より好ましくは改変クモ糸フィブロインからなる。

[0145] 本実施形態に係る改変フィブロインの具体的な例として、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に由来する改変フィブロイン（第

１の改変フィブロイン）、グリシン残基の含有量が低減されたドメイン配列を有する改変フィブロイン（第２の改変フィブロイン）、（Ａ）$_n$モチーフの含有量が低減されたドメイン配列を有する改変フィブロイン（第３の改変フィブロイン）、グリシン残基の含有量、及び（Ａ）$_n$モチーフの含有量が低減された改変フィブロイン（第４の改変フィブロイン）、局所的に疎水性指標の大きい領域を含むドメイン配列を有する改変フィブロイン（第５の改変フィブロイン）、並びにグルタミン残基の含有量が低減されたドメイン配列を有する改変フィブロイン（第６の改変フィブロイン）が挙げられる。

[0146] 第１の改変フィブロインとしては、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるドメイン配列を含むタンパク質が挙げられる。第１の改変フィブロインにおいて、（Ａ）$_n$モチーフのアミノ酸残基数は、３～２０の整数が好ましく、４～２０の整数がより好ましく、８～２０の整数が更に好ましく、１０～２０の整数が更により好ましく、４～１６の整数が更によりまた好ましく、８～１６の整数が特に好ましく、１０～１６の整数が最も好ましい。第１の改変フィブロインは、式１中、ＲＥＰを構成するアミノ酸残基の数は、１０～２００残基であることが好ましく、１０～１５０残基であることがより好ましく、２０～１００残基であることが更に好ましく、２０～７５残基であることが更により好ましい。第１の改変フィブロインは、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるアミノ酸配列中に含まれるグリシン残基、セリン残基及びアラニン残基の合計残基数がアミノ酸残基数全体に対して、４０％以上であることが好ましく、６０％以上であることがより好ましく、７０％以上であることが更に好ましい。

[0147] 第１の改変フィブロインは、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるアミノ酸配列の単位を含み、かつＣ末端配列が配列番号１～３のいずれかに示されるアミノ酸配列又は配列番号１～３のいずれかに示されるアミノ酸配列と９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であるポリペプチドであってもよい。

[0148] 配列番号１に示されるアミノ酸配列は、ＡＤＦ３（ＧＩ：１２６３２８７

、ＮＣＢＩ）のアミノ酸配列のＣ末端の５０残基のアミノ酸からなるアミノ酸配列と同一であり、配列番号２に示されるアミノ酸配列は、配列番号１に示されるアミノ酸配列のＣ末端から２０残基取り除いたアミノ酸配列と同一であり、配列番号３に示されるアミノ酸配列は、配列番号１に示されるアミノ酸配列のＣ末端から２９残基取り除いたアミノ酸配列と同一である。

[0149] 第１の改変フィブロインのより具体的な例として、（１－ｉ）配列番号４（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｓｐｉｄｅｒ ｓｉｌｋ ｐｒｏｔｅｉｎ ＡＤＦ３ＫａｉＬａｒｇｅＮＲＳＨ１）で示されるアミノ酸配列、又は（１－ｉｉ）配列番号４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。配列同一性は、９５％以上であることが好ましい。

[0150] 配列番号４で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５）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、翻訳が第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４で示されるアミノ酸配列のＣ末端のアミノ酸配列は、配列番号３で示されるアミノ酸配列と同一である。

[0151] （１－ｉ）の改変フィブロインは、配列番号４で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0152] 第２の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、グリシン残基の含有量が低減されたアミノ酸配列を有する。第２の改変フィブロインは、天然由来のフィブロインと比較して、少なくともＲＥＰ中の１又は複数のグリシン残基が別のアミノ酸残基に置換されたことに相当するアミノ酸配列を有するものということができる。

[0153] 第２の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中のＧＧＸ及びＧＰＧＸＸ（但し、Ｇはグリシン残基、Ｐはプロリン残基、Ｘはグリシン以外のアミノ酸残基を示す。）から選ば

れる少なくとも一つのモチーフ配列において、少なくとも１又は複数の当該モチーフ配列中の１つのグリシン残基が別のアミノ酸残基に置換されたことに相当するアミノ酸配列を有するものであってもよい。

[0154] 第２の改変フィブロインは、上述のグリシン残基が別のアミノ酸残基に置換されたモチーフ配列の割合が、全モチーフ配列に対して、１０％以上であってもよい。

[0155] 第２の改変フィブロインは、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるドメイン配列を含み、上記ドメイン配列から、最もＣ末端側に位置する（Ａ）$_n$モチーフから上記ドメイン配列のＣ末端までの配列を除いた配列中の全ＲＥＰに含まれるＸＧＸ（但し、Ｘはグリシン以外のアミノ酸残基を示す。）からなるアミノ酸配列の総アミノ酸残基数をｚとし、上記ドメイン配列から、最もＣ末端側に位置する（Ａ）$_n$モチーフから上記ドメイン配列のＣ末端までの配列を除いた配列中の総アミノ酸残基数をｗとしたときに、ｚ／ｗが３０％以上、４０％以上、５０％以上又は５０．９％以上であるアミノ酸配列を有するものであってもよい。（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は８３％以上であってよいが、８６％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。

[0156] 第２の改変フィブロインは、ＧＧＸモチーフの１つのグリシン残基を別のアミノ酸残基に置換することにより、ＸＧＸからなるアミノ酸配列の含有割合を高めたものであることが好ましい。第２の改変フィブロインは、ドメイン配列中のＧＧＸからなるアミノ酸配列の含有割合が３０％以下であることが好ましく、２０％以下であることがより好ましく、１０％以下であることが更に好ましく、６％以下であることが更により好ましく、４％以下であることが更によりまた好ましく、２％以下であることが特に好ましい。ドメイン配列中のＧＧＸからなるアミノ酸配列の含有割合は、下記ＸＧＸからなるアミノ酸配列の含有割合（ｚ／ｗ）の算出方法と同様の方法で算出すること

ができる。

[0157] ｚ／ｗの算出方法を更に詳細に説明する。まず、式１：［（Ａ）$_{n}$モチーフ－ＲＥＰ］$_{m}$で表されるドメイン配列を含むフィブロイン（改変フィブロイン又は天然由来のフィブロイン）において、ドメイン配列から、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末端までの配列を除いた配列に含まれる全てのＲＥＰから、ＸＧＸからなるアミノ酸配列を抽出する。ＸＧＸを構成するアミノ酸残基の総数がｚである。例えば、ＸＧＸからなるアミノ酸配列が５０個抽出された場合（重複はなし）、ｚは５０×３＝１５０である。例えば、ＸＧＸＧＸからなるアミノ酸配列の場合のように２つのＸＧＸに含まれるＸ（中央のＸ）が存在する場合は、重複分を控除して計算する（ＸＧＸＧＸの場合は５アミノ酸残基である）。ｗは、ドメイン配列から、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末端までの配列を除いた配列に含まれる総アミノ酸残基数である。例えば、図１に示したドメイン配列の場合、ｗは４＋５０＋４＋１００＋４＋１０＋４＋２０＋４＋３０＝２３０である（最もＣ末端側に位置する（Ａ）$_{n}$モチーフは除いている。）。次に、ｚをｗで除すことによって、ｚ／ｗ（％）を算出することができる。

[0158] ここで、天然由来のフィブロインにおけるｚ／ｗについて説明する。まず、上述のように、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］$_{m}$で表されるドメイン配列を含み、フィブロイン中のＧＧＸからなるアミノ酸配列の含有割合が６％以下である天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から、上述の算出方法により、ｚ／ｗを算出した。その結果を図２に示す。図２の横軸はｚ／ｗ（％）を示し、縦軸は頻度を示す。図２から明らかなとおり、天然由来のフィブロインにおけるｚ／ｗは、いずれも５０．９％未満である（最も高いもので、５０．８６％）。

[0159] 第２の改変フィブロインにおいて、ｚ／ｗは、５０．９％以上であることが好ましく、５６．１％以上であることがより好ましく、５８．７％以上であることが更に好ましく、７０％以上であることが更により好ましく、８０％以上であることが更によりまた好ましい。ｚ／ｗの上限に特に制限はないが、例えば、９５％以下であってもよい。

[0160] 第２の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から、グリシン残基をコードする塩基配列の少なくとも一部を置換して別のアミノ酸残基をコードするように改変することにより得ることができる。このとき、改変するグリシン残基として、ＧＧＸモチーフ及びＧＰＧＸＸモチーフにおける１つのグリシン残基を選択してもよいし、ｚ／ｗが５０．９％以上になるように置換してもよい。例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から上記態様を満たすアミノ酸配列を設計し、設計したアミノ酸配列をコードする核酸を化学合成することにより得ることもできる。いずれの場合においても、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列からＲＥＰ中のグリシン残基を別のアミノ酸残基に置換したことに相当する改変に加え、更に１又は複数のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入及び／又は付加したことに相当するアミノ酸配列の改変を行ってもよい。

[0161] 上記の別のアミノ酸残基としては、グリシン残基以外のアミノ酸残基であれば特に制限はないが、バリン（Ｖ）残基、ロイシン（Ｌ）残基、イソロイシン（Ｉ）残基、メチオニン（Ｍ）残基、プロリン（Ｐ）残基、フェニルアラニン（Ｆ）残基及びトリプトファン（Ｗ）残基等の疎水性アミノ酸残基、グルタミン（Ｑ）残基、アスパラギン（Ｎ）残基、セリン（Ｓ）残基、リシン（Ｋ）残基及びグルタミン酸（Ｅ）残基等の親水性アミノ酸残基が好ましく、バリン（Ｖ）残基、ロイシン（Ｌ）残基、イソロイシン（Ｉ）残基、フェニルアラニン（Ｆ）残基及びグルタミン（Ｑ）残基がより好ましく、グルタミン（Ｑ）残基が更に好ましい。

[0162] 第２の改変フィブロインのより具体的な例として、（２－ｉ）配列番号６（Ｍｅｔ－ＰＲＴ３８０）、配列番号７（Ｍｅｔ－ＰＲＴ４１０）、配列番

号８（Ｍｅｔ－ＰＲＴ５２５）若しくは配列番号９（Ｍｅｔ－ＰＲＴ７９９）で示されるアミノ酸配列、又は（２－ｉｉ）配列番号６、配列番号７、配列番号８若しくは配列番号９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。

[0163] （２－ｉ）の改変フィブロインについて説明する。配列番号６で示されるアミノ酸配列は、天然由来のフィブロインに相当する配列番号１０（Ｍｅｔ－ＰＲＴ３１３）で示されるアミノ酸配列のＲＥＰ中の全てのＧＧＸをＧＱＸに置換したものである。配列番号７で示されるアミノ酸配列は、配列番号６で示されるアミノ酸配列から、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つ挿入したものである。配列番号８で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列の各（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、更に一部のグルタミン（Ｑ）残基をセリン（Ｓ）残基に置換し、配列番号７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たものである。配列番号９で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中に存在する２０個のドメイン配列の領域（但し、当該領域のＣ末端側の数アミノ酸残基が置換されている。）を４回繰り返した配列のＣ末端に所定のヒンジ配列とＨｉｓタグ配列が付加されたものである。

[0164] 配列番号１０で示されるアミノ酸配列（天然由来のフィブロインに相当）におけるｚ／ｗの値は、４６．８％である。配列番号６で示されるアミノ酸配列、配列番号７で示されるアミノ酸配列、配列番号８で示されるアミノ酸配列、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列におけるｚ／ｗの値は、それぞれ５８．７％、７０．１％、６６．１％及び７０．０％である。配列番号１０、配列番号６、配列番号７、配列番号８及び配列番号９で示されるアミノ酸配列のギザ比率（後述する）１：１．８～１１．３におけるｘ／ｙの値は、それぞれ１５．０％、１５．０％、９３．４％、９２．７％及び８９．

８％である。

[0165] （２－ｉ）の改変フィブロインは、配列番号６、配列番号７、配列番号８又は配列番号９で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0166] （２－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号６、配列番号７、配列番号８又は配列番号９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。（２－ｉｉ）の改変フィブロインもまた、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$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、９５％以上であることが好ましい。

[0167] （２－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号６、配列番号７、配列番号８又は配列番号９で示されるアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつＲＥＰ中に含まれるＸＧＸ（但し、Ｘはグリシン以外のアミノ酸残基を示す。）からなるアミノ酸配列の総アミノ酸残基数をｚとし、上記ドメイン配列中のＲＥＰの総アミノ酸残基数をｗとしたときに、ｚ／ｗが５０．９％以上であることが好ましい。

[0168] 第２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。

[0169] 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１１で示されるアミノ酸配列（Ｈｉｓタグ配列及びヒンジ配列を含むアミノ酸配列）が挙げられる。

[0170] タグ配列として、グルタチオンに特異的に結合するグルタチオン－Ｓ－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。

[0171] タグ配列として、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。

[0172] 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タグ配列として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。

[0173] 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、（２－ｉｉｉ）配列番号１２（ＰＲＴ３８０）、配列番号１３（ＰＲＴ４１０）、配列番号１４（ＰＲＴ５２５）若しくは配列番号１５（ＰＲＴ７９９）で示されるアミノ酸配列、又は（２－ｉｖ）配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４若しくは配列番号１５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。

[0174] 配列番号１６（ＰＲＴ３１３）、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１０、配列番号６、配列番号７、配列番号８及び配列番号９で示されるアミノ酸配列のＮ末端に配列番号１１で示されるアミノ酸配列（Ｈｉｓタグ配列及びヒンジ配列を含む）を付加したものである。

[0175] （２－ｉｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0176] （２－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５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。（２－ｉｖ）の改変フィブロインもまた、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$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、９５％以上であることが好ましい。

[0177] （２－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５で示されるアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつＲＥＰ中に含まれるＸＧＸ（但し、Ｘはグリシン以外のアミノ酸残基を示す。）からなるアミノ酸配列の総アミノ酸残基数をｚとし、上記ドメイン配列中のＲＥＰの総アミノ酸残基数をｗとしたときに、ｚ／ｗが５０．９％以上であることが好ましい。

[0178] 第２の改変フィブロインは、人工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。

[0179] 第３の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、（Ａ）$_n$モチーフの含有量が低減されたアミノ酸配列を有する。第３の改変フィブロインのドメイン配列は、天然由来のフィブロインと比較して、少なくとも１又は複数の（Ａ）$_n$モチーフが欠失したことに相当するアミノ酸配列を有するものということができる。

[0180] 第３の改変フィブロインは、天然由来のフィブロインから（Ａ）$_n$モチーフを１０～４０％欠失させたことに相当するアミノ酸配列を有するものであってもよい。

[0181] 第３の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、少なくともＮ末端側からＣ末端側に向かって１～３つの（Ａ）$_n$モチーフ毎に１つの（Ａ）$_n$モチーフが欠失したことに相当するアミノ酸配列を有するものであってもよい。

[0182] 第３の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、少なくともＮ末端側からＣ末端側に向かって２つ連続した（Ａ）$_n$モチーフの欠失、及び１つの（Ａ）$_n$モチーフの欠失がこの順に繰り返

されたことに相当するアミノ酸配列を有するものであってもよい。

[0183] 第３の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、少なくともＮ末端側からＣ末端側に向かって２つおきに（Ａ）$_n$モチーフが欠失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もよい。

[0184] 第３の改変フィブロインは、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるドメイン配列を含み、Ｎ末端側からＣ末端側に向かって、隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットのＲＥＰのアミノ酸残基数を順次比較して、アミノ酸残基数が少ないＲＥＰのアミノ酸残基数を１としたとき、他方のＲＥＰのアミノ酸残基数の比が１．８～１１．３となる隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットのアミノ酸残基数を足し合わせた合計値の最大値をｘとし、ドメイン配列の総アミノ酸残基数をｙとしたときに、ｘ／ｙが２０％以上、３０％以上、４０％以上又は５０％以上であるアミノ酸配列を有するものであってもよい。（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は８３％以上であってよいが、８６％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。

[0185] ｘ／ｙの算出方法を図１を参照しながら更に詳細に説明する。図１には、改変フィブロインからＮ末端配列及びＣ末端配列を除いたドメイン配列を示す。当該ドメイン配列は、Ｎ末端側（左側）から（Ａ）$_n$モチーフ－第１のＲＥＰ（５０アミノ酸残基）－（Ａ）$_n$モチーフ－第２のＲＥＰ（１００アミノ酸残基）－（Ａ）$_n$モチーフ－第３のＲＥＰ（１０アミノ酸残基）－（Ａ）$_n$モチーフ－第４のＲＥＰ（２０アミノ酸残基）－（Ａ）$_n$モチーフ－第５のＲＥＰ（３０アミノ酸残基）－（Ａ）$_n$モチーフという配列を有する。

[0186] 隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットは、重複がないように、Ｎ末端側からＣ末端側に向かって、順次選択する。このとき、選択されない［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットが存在してもよい。図１には、パターン１（第１のＲＥＰと第２のＲＥＰの比較、及び第３のＲＥＰと第４のＲ

ＥＰの比較）、パターン２（第１のＲＥＰと第２のＲＥＰの比較、及び第４のＲＥＰと第５のＲＥＰの比較）、パターン３（第２のＲＥＰと第３のＲＥＰの比較、及び第４のＲＥＰと第５のＲＥＰの比較）、パターン４（第１のＲＥＰと第２のＲＥＰの比較）を示した。なお、これ以外にも選択方法は存在する。

[0187] 次に各パターンについて、選択した隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニット中の各ＲＥＰのアミノ酸残基数を比較する。比較は、よりアミノ酸残基数の少ない方を１としたときの、他方のアミノ酸残基数の比を求めることによって行う。例えば、第１のＲＥＰ（５０アミノ酸残基）と第２のＲＥＰ（１００アミノ酸残基）の比較の場合、よりアミノ酸残基数の少ない第１のＲＥＰを１としたとき、第２のＲＥＰのアミノ酸残基数の比は、１００／５０＝２である。同様に、第４のＲＥＰ（２０アミノ酸残基）と第５のＲＥＰ（３０アミノ酸残基）の比較の場合、よりアミノ酸残基数の少ない第４のＲＥＰを１としたとき、第５のＲＥＰのアミノ酸残基数の比は、３０／２０＝１．５である。

[0188] 図１中、よりアミノ酸残基数の少ない方を１としたときに、他方のアミノ酸残基数の比が１．８～１１．３となる［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットの組を実線で示した。本明細書中、この比をギザ比率と呼ぶ。よりアミノ酸残基数の少ない方を１としたときに、他方のアミノ酸残基数の比が１．８未満又は１１．３超となる［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットの組は破線で示した。

[0189] 各パターンにおいて、実線で示した隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットの全てのアミノ酸残基数を足し合わせる（ＲＥＰのみではなく、（Ａ）$_n$モチーフのアミノ酸残基数もである。）。そして、足し合わせた合計値を比較して、当該合計値が最大となるパターンの合計値（合計値の最大値）をｘとする。図１に示した例では、パターン１の合計値が最大である。

[0190] 次に、ｘをドメイン配列の総アミノ酸残基数ｙで除すことによって、ｘ／ｙ（％）を算出することができる。

[0191] 第３の改変フィブロインにおいて、ｘ／ｙは、５０％以上であることが好ましく、６０％以上であることがより好ましく、６５％以上であることが更に好ましく、７０％以上であることが更により好ましく、７５％以上であることが更によりまた好ましく、８０％以上であることが特に好ましい。ｘ／ｙの上限に特に制限はなく、例えば、１００％以下であってよい。ギザ比率が１：１．９～１１．３の場合には、ｘ／ｙは８９．６％以上であることが好ましく、ギザ比率が１：１．８～３．４の場合には、ｘ／ｙは７７．１％以上であることが好ましく、ギザ比率が１：１．９～８．４の場合には、ｘ／ｙは７５．９％以上であることが好ましく、ギザ比率が１：１．９～４．１の場合には、ｘ／ｙは６４．２％以上であることが好ましい。

[0192] 第３の改変フィブロインが、ドメイン配列中に複数存在する（Ａ）$_n$モチーフの少なくとも７つがアラニン残基のみで構成される改変フィブロインである場合、ｘ／ｙは、４６．４％以上であることが好ましく、５０％以上であることがより好ましく、５５％以上であることが更に好ましく、６０％以上であることが更により好ましく、７０％以上であることが更によりまた好ましく、８０％以上であることが特に好ましい。ｘ／ｙの上限に特に制限はなく、１００％以下であればよい。

[0193] ここで、天然由来のフィブロインにおけるｘ／ｙについて説明する。まず、上述のように、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］$_m$で表されるドメイン配列で構成される天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から、上述の算出方法により、ｘ／ｙを算出した。ギザ比率が１：１．９～４．１の場合の結果を図３に示す。

[0194] 図３の横軸はｘ／ｙ（％）を示し、縦軸は頻度を示す。図３から明らかなとおり、天然由来のフィブロインにおけるｘ／ｙは、いずれも６４．２％未満である（最も高いもので、６４．１４％）。

[0195] 第３の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から、ｘ／ｙが６４．２％以上になるように（Ａ）$_n$モチーフをコードする配列の１又は複数を欠失させることにより得ることができる。例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から、ｘ／ｙが６４．２％以上になるように１又は複数の（Ａ）$_n$モチーフが欠失したことに相当するアミノ酸配列を設計し、設計したアミノ酸配列をコードする核酸を化学合成することにより得ることもできる。いずれの場合においても、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から（Ａ）$_n$モチーフが欠失したことに相当する改変に加え、更に１又は複数のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入及び／又は付加したことに相当するアミノ酸配列の改変を行ってもよい。

[0196] 第３の改変フィブロインのより具体的な例として、（３－ｉ）配列番号１７（Ｍｅｔ－ＰＲＴ３９９）、配列番号７（Ｍｅｔ－ＰＲＴ４１０）、配列番号８（Ｍｅｔ－ＰＲＴ５２５）若しくは配列番号９（Ｍｅｔ－ＰＲＴ７９９）で示されるアミノ酸配列、又は（３－ｉｉ）配列番号１７、配列番号７、配列番号８若しくは配列番号９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。

[0197] （３－ｉ）の改変フィブロインについて説明する。配列番号１７で示されるアミノ酸配列は、天然由来のフィブロインに相当する配列番号１０（Ｍｅｔ－ＰＲＴ３１３）で示されるアミノ酸配列から、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つ挿入したものである。配列番号７、配列番号８又は配列番号９で示されるアミノ酸配列は、第２の改変フィブロインで説明したとおりである。

[0198] 配列番号１０で示されるアミノ酸配列（天然由来のフィブロインに相当）のギザ比率１：１．８～１１．３におけるｘ／ｙの値は１５．０％である。配列番号１７で示されるアミノ酸配列、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列におけるｘ／ｙの値は、いずれも９３．４％である。配列番号８で示さ

れるアミノ酸配列におけるｘ／ｙの値は、９２．７％である。配列番号９で示されるアミノ酸配列におけるｘ／ｙの値は、８９．８％である。配列番号１０、配列番号１７、配列番号７、配列番号８及び配列番号９で示されるアミノ酸配列におけるｚ／ｗの値は、それぞれ４６．８％、５６．２％、７０．１％、６６．１％及び７０．０％である。

[0199] （３－ｉ）の改変フィブロインは、配列番号１７、配列番号７、配列番号８又は配列番号９で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0200] （３－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号１７、配列番号７、配列番号８又は配列番号９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。（３－ｉｉ）の改変フィブロインもまた、式１：［（Ａ）$_{n}$モチーフ－ＲＥＰ］$_{m}$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、９５％以上であることが好ましい。

[0201] （３－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号１７、配列番号７、配列番号８又は配列番号９で示されるアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつＮ末端側からＣ末端側に向かって、隣合う２つの［（Ａ）$_{n}$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットのＲＥＰのアミノ酸残基数を順次比較して、アミノ酸残基数が少ないＲＥＰのアミノ酸残基数を１としたとき、他方のＲＥＰのアミノ酸残基数の比が１．８～１１．３（ギザ比率が１：１．８～１１．３）となる隣合う２つの［（Ａ）$_{n}$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットのアミノ酸残基数を足し合わせた合計値の最大値をｘとし、ドメイン配列の総アミノ酸残基数をｙとしたときに、ｘ／ｙが６４．２％以上であることが好ましい。

[0202] 第３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上述したタグ配列を含んでいてもよい。

[0203] 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、（３－ｉｉｉ）配列番号１８（ＰＲＴ３９９）、配列番号１３（ＰＲＴ４１０）、配列番号１４（ＰＲＴ５２５）若しくは配列番号１５（ＰＲＴ７９９）で示されるアミノ酸配列、又は（３－ｉｖ）配列番号１８、配列番号１３、配列番号１４若しくは配列番号１５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。

[0204] 配列番号１８、配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１７、配列番号７、配列番号８及び配列番号９で示されるアミノ酸配列のＮ末端に配列番号１１で示されるアミノ酸配列（Ｈｉｓタグ配列及びヒンジ配列を含む）を付加したものである。

[0205] （３－ｉｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号１８、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0206] （３－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号１８、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５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。（３－ｉｖ）の改変フィブロインもまた、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$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、９５％以上であることが好ましい。

[0207] （３－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号１８、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５で示されるアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつＮ末端側からＣ末端側に向かって、隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットのＲＥＰのアミノ酸残基数を順次比較して、アミノ酸残基数が少ないＲＥＰのアミノ酸残基数を１としたとき、他方のＲＥＰのアミノ酸残基数の比が１．８～１１．３となる隣合う２つの［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］ユニットのアミノ酸残基数を足し合わせた合計値の最大値をｘとし、ドメイン配列の総アミノ酸残基数をｙとしたときに、ｘ／ｙが６４．２％以上であることが好ましい。

[0208] 第３の改変フィブロインは、人工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。

[0209] 第４の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、（Ａ）$_n$モチーフの含有量が低減されたことに加え、グリシン

残基の含有量が低減されたアミノ酸配列を有するものである。第４の改変フィブロインのドメイン配列は、天然由来のフィブロインと比較して、少なくとも１又は複数の（Ａ）$_n$モチーフが欠失したことに加え、更に少なくともＲＥＰ中の１又は複数のグリシン残基が別のアミノ酸残基に置換されたことに相当するアミノ酸配列を有するものということができる。すなわち、第４の改変フィブロインは、上述した第２の改変フィブロインと、第３の改変フィブロインの特徴を併せ持つ改変フィブロインである。具体的な態様等は、第２の改変フィブロイン、及び第３の改変フィブロインで説明したとおりである。

[0210] 第４の改変フィブロインのより具体的な例として、（４－ｉ）配列番号７（Ｍｅｔ－ＰＲＴ４１０）、配列番号８（Ｍｅｔ－ＰＲＴ５２５）、配列番号９（Ｍｅｔ－ＰＲＴ７９９）、配列番号１３（ＰＲＴ４１０）、配列番号１４（ＰＲＴ５２５）若しくは配列番号１５（ＰＲＴ７９９）で示されるアミノ酸配列、又は（４－ｉｉ）配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１３、配列番号１４若しくは配列番号１５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。配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１３、配列番号１４又は配列番号１５で示されるアミノ酸配列を含む改変フィブロインの具体的な態様は上述のとおりである。

[0211] 第５の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中の１又は複数のアミノ酸残基が疎水性指標の大きいアミノ酸残基に置換されたこと、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性指標の大きいアミノ酸残基が挿入されたことに相当する、局所的に疎水性指標の大きい領域を含むアミノ酸配列を有するものであってよい。

[0212] 局所的に疎水性指標の大きい領域は、連続する２～４アミノ酸残基で構成されていることが好ましい。

[0213] 上述の疎水性指標の大きいアミノ酸残基は、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）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い。

[0214] 第５の改変フィブロインは、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中の１又は複数のアミノ酸残基が疎水性指標の大きいアミノ酸残基に置換されたこと、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性指標の大きいアミノ酸残基が挿入されたことに相当する改変に加え、更に、天然由来のフィブロインと比較して、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。

[0215] 第５の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からＲＥＰ中の１又は複数の親水性アミノ酸残基（例えば、疎水性指標がマイナスであるアミノ酸残基）を疎水性アミノ酸残基（例えば、疎水性指標がプラスであるアミノ酸残基）に置換すること、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性アミノ酸残基を挿入することにより得ることができる。例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列からＲＥＰ中の１又は複数の親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸残基に置換したこと、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性アミノ酸残基を挿入したことに相当するアミノ酸配列を設計し、設計したアミノ酸配列をコードする核酸を化学合成することにより得ることもできる。いずれの場合においても、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列からＲＥＰ中の１又は複数の親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸残基に置換したこと、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性アミノ酸残基を挿入したことに相当する改変に加え、更に１又は複数のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入及び／又は付加したことに相当するアミノ酸配列の改変を行ってもよい。

[0216] 第５の改変フィブロインは、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるドメイン配列を含み、最もＣ末端側に位置する（Ａ）$_n$モチーフから上記ドメイン配列のＣ末端までの配列を上記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、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平均値が２．６以上となる領域に含まれるアミノ酸残基の総数をｐとし、最もＣ末

端側に位置する（Ａ）$_n$モチーフから上記ドメイン配列のＣ末端までの配列を上記ドメイン配列から除いた配列に含まれるアミノ酸残基の総数をｑとしたときに、ｐ／ｑが６．２％以上であるアミノ酸配列を有してもよい。

[0217] アミノ酸残基の疎水性指標については、公知の指標（Ｈｙｄｒｏｐａｔｈｙ ｉｎｄｅｘ：Ｋｙｔｅ Ｊ，＆Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ Ｒ（１９８２）“Ａ ｓｉｍｐｌｅ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｄｉｓｐｌａｙｉｎｇ ｔｈｅ ｈｙｄｒｏｐａｔｈｉｃ 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。

[0218] [表1]

アミノ酸	HI	アミノ酸	HI
イソロイシン(Ile)	4.5	トリプトファン(Trp)	-0.9
バリン(Val)	4.2	チロシン(Tyr)	-1.3
ロイシン(Leu)	3.8	プロリン(Pro)	-1.6
フェニルアラニン(Phe)	2.8	ヒスチジン(His)	-3.2
システイン(Cys)	2.5	アスパラギン(Asn)	-3.5
メチオニン(Met)	1.9	アスパラギン酸(Asp)	-3.5
アラニン(Ala)	1.8	グルタミン(Gln)	-3.5
グリシン(Gly)	-0.4	グルタミン酸(Glu)	-3.5
スレオニン(Thr)	-0.7	リシン(Lys)	-3.9
セリン(Ser)	-0.8	アルギニン(Arg)	-4.5

[0219] ｐ／ｑの算出方法を更に詳細に説明する。算出には、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$で表されるドメイン配列から、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末端までの配列を除いた配列（以下、「配列Ａ」とする）を用いる。まず、配列Ａに含まれる全てのＲＥＰにおいて、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平均値を算出する。疎水性指標の平均値は、連続する４アミノ酸残基に含まれる各アミノ酸残基のＨＩの総和を４（アミノ酸残基数）で除して求める。疎水性指標の平均値は、全ての連続する４アミノ酸残基について求める（各アミノ酸残基は、１～４回平均値の算出に用いられる。）。次いで、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平

均値が２．６以上となる領域を特定する。あるアミノ酸残基が、複数の「疎水性指標の平均値が２．６以上となる連続する４アミノ酸残基」に該当する場合であっても、領域中には１アミノ酸残基として含まれることになる。当該領域に含まれるアミノ酸残基の総数がｐである。配列Ａに含まれるアミノ酸残基の総数がｑである。

[0220] 例えば、「疎水性指標の平均値が２．６以上となる連続する４アミノ酸残基」が２０カ所抽出された場合（重複はなし）、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平均値が２．６以上となる領域には、連続する４アミノ酸残基（重複はなし）が２０含まれることになり、ｐは２０×４＝８０である。例えば、２つの「疎水性指標の平均値が２．６以上となる連続する４アミノ酸残基」が１アミノ酸残基だけ重複して存在する場合、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平均値が２．６以上となる領域には、７アミノ酸残基含まれることになる（ｐ＝２×４－１＝７。「－１」は重複分の控除である。）。例えば、図４に示したドメイン配列の場合、「疎水性指標の平均値が２．６以上となる連続する４アミノ酸残基」が重複せずに７つ存在するため、ｐは７×４＝２８となる。例えば、図４に示したドメイン配列の場合、ｑは４＋５０＋４＋４０＋４＋１０＋４＋２０＋４＋３０＝１７０である（Ｃ末端側の最後に存在する（Ａ）$_n$モチーフは含めない）。次に、ｐをｑで除すことによって、ｐ／ｑ（％）を算出することができる。図４の場合２８／１７０＝１６．４７％となる。

[0221] 第５の改変フィブロインにおいて、ｐ／ｑは、６．２％以上であることが好ましく、７％以上であることがより好ましく、１０％以上であることが更に好ましく、２０％以上であることが更により好ましく、３０％以上であることが更によりまた好ましい。ｐ／ｑの上限は、特に制限されないが、例えば、４５％以下であってもよい。

[0222] 第５の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アミノ酸配列を、上記のｐ／ｑの条件を満たすように、ＲＥＰ中の１又は複数の親水性アミノ酸残基（例えば、疎水性指標がマイナスであるア

ミノ酸残基）を疎水性アミノ酸残基（例えば、疎水性指標がプラスであるアミノ酸残基）に置換すること、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性アミノ酸残基を挿入することにより、局所的に疎水性指標の大きい領域を含むアミノ酸配列に改変することにより得ることができる。例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から上記のｐ／ｑの条件を満たすアミノ酸配列を設計し、設計したアミノ酸配列をコードする核酸を化学合成することにより得ることもできる。いずれの場合においても、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中の１又は複数のアミノ酸残基が疎水性指標の大きいアミノ酸残基に置換されたこと、及び／又はＲＥＰ中に１又は複数の疎水性指標の大きいアミノ酸残基が挿入されたことに相当する改変に加え、更に１又は複数のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入及び／又は付加したことに相当する改変を行ってもよい。

[0223] 疎水性指標の大きいアミノ酸残基としては、特に制限はないが、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）が好ましく、バリン（Ｖ）、ロイシン（Ｌ）及びイソロイシン（Ｉ）がより好ましい。

[0224] 第５の改変フィブロインのより具体的な例として、（５－ｉ）配列番号１９（Ｍｅｔ－ＰＲＴ７２０）、配列番号２０（Ｍｅｔ－ＰＲＴ６６５）若しくは配列番号２１（Ｍｅｔ－ＰＲＴ６６６）で示されるアミノ酸配列、又は（５－ｉｉ）配列番号１９、配列番号２０若しくは配列番号２１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。

[0225] （５－ｉ）の改変フィブロインについて説明する。配列番号１９で示されるアミノ酸配列は、配列番号７（Ｍｅｔ－ＰＲＴ４１０）で示されるアミノ酸配列に対し、Ｃ末端側の端末のドメイン配列を除いて、ＲＥＰ一つ置きにそれぞれ３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列（ＶＬＩ）を２カ所挿入し、更に一部のグルタミン（Ｑ）残基をセリン（Ｓ）残基に置換し、かつＣ末端側の一部のアミノ酸を欠失させたものである。配列番号２０で示されるアミ

ノ酸配列は、配列番号８（Ｍｅｔ－ＰＲＴ５２５）で示されるアミノ酸配列に対し、ＲＥＰ一つ置きにそれぞれ３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列（ＶＬＩ）を１カ所挿入したものである。配列番号２１で示されるアミノ酸配列は、配列番号８で示されるアミノ酸配列に対し、ＲＥＰ一つ置きにそれぞれ３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列（ＶＬＩ）を２カ所挿入したものである。

[0226] （５－ｉ）の改変フィブロインは、配列番号１９、配列番号２０又は配列番号２１で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0227] （５－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号１９、配列番号２０又は配列番号２１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。（５－ｉｉ）の改変フィブロインもまた、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$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、９５％以上であることが好ましい。

[0228] （５－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号１９、配列番号２０又は配列番号２１で示されるアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつ最も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、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平均値が２．６以上となる領域に含まれるアミノ酸残基の総数をｐ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いた配列に含まれるアミノ酸残基の総数をｑとしたときに、ｐ／ｑが６．２％以上であることが好ましい。

[0229] 第５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。

[0230] 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、（５－ｉｉｉ）配列番号２２（ＰＲＴ７２０）、配列番号２３（ＰＲＴ６６５）若しくは配列番号２４（ＰＲＴ６６６）で示されるアミノ酸配列、又は（５－ｉｖ）配列番号２２、配列番号２３若しくは配列番号２４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。

[0231] 配列番号２２、配列番号２３及び配列番号２４で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号１９、配列番号２０及び配列番号２１で示されるアミノ酸配列のＮ末端に配列番号１１で示されるアミノ酸配列（Ｈｉｓタグ配列及びヒンジ配列を含む）を付加したものである。

[0232] （５－ｉｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号２２、配列番号２３又は配列番号２４で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0233] （５－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号２２、配列番号２３又は配列番号２４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。（５－ｉｖ）の改変フィブロインもまた、式１：［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$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、９５％以上であることが好ましい。

[0234] （５－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号２２、配列番号２３又は配列番号２４で示されるアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつ最も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、連続する４アミノ酸残基の疎水性指標の平均値が２．６以上となる領域に含まれるアミノ酸残基の総数をｐ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いた配列に含まれるアミノ酸残基の総数をｑとしたときに、ｐ／ｑが６．２％以上であることが好ましい。

[0235] 第５の改変フィブロインは、人工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。

[0236] 第６の改変フィブロインは、天然由来のフィブロインと比較して、グルタミン残基の含有量が低減されたアミノ酸配列を有する。

[0237] 第６の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モチーフから選ばれる少なくとも一つのモチーフが含まれていることが好ましい。

[0238] 第６の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。ＧＰＧＸＸモチーフ含有率の上限に特に制限はなく、５０％以下であってよく、３０％以下であってもよい。

[0239] 本明細書において、「ＧＰＧＸＸ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。

[0240] 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（改変フィブロイン又は天然由来のフィブロイン）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ＧＰＧＸＸモチーフの個数の総数を３倍した数（即ち、ＧＰＧＸＸモチーフ中のＧ及びＰの総数に相当）をｓ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ｔとしたときに、ＧＰＧＸＸモチーフ含有率はｓ／ｔとして算出される。

[0241] ＧＰＧＸＸ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）、ＧＰＧＸＸ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。ＲＥＰのＣ末端に「ＧＰＧＸＸ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、「ＧＰＧＸＸモチーフ」として扱う。

[0242] 図５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５を参

照しながらＧＰＧＸＸモチーフ含有率の算出方法を具体的に説明する。まず、図５に示した改変フィブロインのドメイン配列（「［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$－（Ａ）$_n$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５中、「領域Ａ」で示した配列。）に含まれているため、ｓを算出するためのＧＰＧＸＸモチーフの個数は７であり、ｓは７×３＝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５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ｔは５０＋４０＋１０＋２０＋３０＝１５０である。次に、ｓをｔで除すことによって、ｓ／ｔ（％）を算出することができ、図５の改変フィブロインの場合２１／１５０＝１４．０％となる。

[0243] 第６の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。

[0244] 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。

[0245] 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（改変フィブロイン又は天然由来のフィブロイン）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５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ｕ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ｔとしたときに、グルタミン残基含有率はｕ／ｔ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。

[0246] 第６の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来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。

[0247] 「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は表１に示すとおりである。

[0248] 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ことができる。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。

[0249] 第６の改変フィブロインは、ＲＥＰの疎水性度（ハイドロパシー・インデックス）が、例えば、－０．８０以上、－０．７０、－０．６０以上、－０．５０以上、－０．４０以上、－０．３０以上、－０．２０以上、－０．１０以上、０．００以上、０．１０以上、０．２０以上、０．２２以上、０．２５以上、０．３０以上、０．３５以上、０．４０以上、０．４５以上、０．５０以上、０．５５以上、０．６０以上、０．６５以上、又は０．７０以上であってよい。ＲＥＰの疎水性度の上限に特に制限はなく、１．０以下であってよく、０．７以下であってもよい。

[0250] 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。

[0251] 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（改変フィブロイン又は天然由来のフィブロイン）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５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ｖ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ｔとしたときに、ＲＥＰの疎水性度はｖ／ｔ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。

[0252] 第６の改変フィブロインは、そのドメイン配列が、天然由来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、及び／又はＲＥＰ中の１又は複数のグルタミン残基を他のアミノ酸残基に置換したことに相当する改変に加え、更に１又は複数のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入及び／又は付加したことに相当するアミノ酸配列の改変があってもよい。

[0253] 第６の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からＲＥＰ中の１又は複数のグルタミン残基を欠失させること、及び／又はＲＥＰ中の１又は複数のグルタミン残基を他のアミノ酸残基に置換することにより得ることができる。例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列からＲＥＰ中の１又は複数のグルタミン残基を欠失したこと、及び／又はＲＥＰ中の１又は複数のグルタミン残基を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。

[0254] 第６の改変フィブロインのより具体的な例として、（６－ｉ）配列番号２５（Ｍｅｔ－ＰＲＴ８８８）、配列番号２６（Ｍｅｔ－ＰＲＴ９６５）、配列番号２７（Ｍｅｔ－ＰＲＴ８８９）、配列番号２８（Ｍｅｔ－ＰＲＴ９１６）、配列番号２９（Ｍｅｔ－ＰＲＴ９１８）、配列番号３０（Ｍｅｔ－ＰＲＴ６９９）、配列番号３１（Ｍｅｔ－ＰＲＴ６９８）、配列番号３２（Ｍｅｔ－ＰＲＴ９６６）、配列番号４１（Ｍｅｔ－ＰＲＴ９１７）若しくは配列番号４２（Ｍｅｔ－ＰＲＴ１０２８）で示されるアミノ酸配列を含む改変フィブロイン、又は（６－ｉｉ）配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号４１若しくは配列番号４２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。

[0255] （６－ｉ）の改変フィブロインについて説明する。配列番号２５で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列（Ｍｅｔ－ＰＲＴ４１０）中のＱＱを全てＶＬに置換したものである。配列番号２６で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＴＳに置換し、かつ残りのＱをＡに置換したものである。配列番号２７で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＶＬに置換し、かつ残りのＱをＩに置換したものである。配列番号２８で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＶＩに置換し、かつ残りのＱをＬに置換したものである。配列番号２９で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＶＦに置換し、かつ残りのＱをＩに置換したものである。

[0256] 配列番号３０で示されるアミノ酸配列は、配列番号８で示されるアミノ酸配列（Ｍｅｔ－ＰＲＴ５２５）中のＱＱを全てＶＬに置換したものである。配列番号３１で示されるアミノ酸配列は、配列番号８で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＶＬに置換し、かつ残りのＱをＩに置換したものである。

[0257] 配列番号３２で示されるアミノ酸配列は、配列番号７で示されるアミノ酸

配列（Ｍｅｔ－ＰＲＴ４１０）中に存在する２０個のドメイン配列の領域を２回繰り返した配列中のＱＱを全てＶＦに置換し、かつ残りのＱをＩに置換したものである。

[0258] 配列番号４１で示されるアミノ酸配列（Ｍｅｔ－ＰＲＴ９１７）は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＬＩに置換し、かつ残りのＱをＶに置換したものである。配列番号４２で示されるアミノ酸配列（Ｍｅｔ－ＰＲＴ１０２８）は、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＱＱを全てＩＦに置換し、かつ残りのＱをＴに置換したものである。

[0259] 配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号４１及び配列番号４２で示されるアミノ酸配列は、いずれもグルタミン残基含有率は９％以下である（表２）。

[0260] [表2]

改変フィブロイン	グルタミン残基含有率	GPGXX モチーフ含有率	REP の疎水性度
Met-PRT410(配列番号 7)	17.7%	27.9%	-1.52
Met-PRT888(配列番号 25)	6.3%	27.9%	-0.07
Met-PRT965(配列番号 26)	0.0%	27.9%	-0.65
Met-PRT889(配列番号 27)	0.0%	27.9%	0.35
Met-PRT916(配列番号 28)	0.0%	27.9%	0.47
Met-PRT918(配列番号 29)	0.0%	27.9%	0.45
Met-PRT699(配列番号 30)	3.6%	26.4%	-0.78
Met-PRT698(配列番号 31)	0.0%	26.4%	-0.03
Met-PRT966(配列番号 32)	0.0%	28.0%	0.35
Met-PRT917(配列番号 41)	0.0%	27.9%	0.46
Met-PRT1028(配列番号 42)	0.0%	28.1%	0.05

[0261] （６－ｉ）の改変フィブロインは、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号４１又は配列番号４２で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0262] （６－ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号４１又は配列番号４２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。（６－ｉｉ）の改変フィブロインもまた、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る。上記配列同一性は、９５％以上であることが好ましい。

[0263] （６－ｉｉ）の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い。（６－ｉｉ）の改変フィブロインは、ＧＰＧＸＸモチーフ含有率が１０％以上であることが好ましい。

[0264] 第６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。

[0265] 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、（６－ｉｉｉ）配列番号３３（ＰＲＴ８８８）、配列番号３４（ＰＲＴ９６５）、配列番号３５（ＰＲＴ８８９）、配列番号３６（ＰＲＴ９１６）、配列番号３７（ＰＲＴ９１８）、配列番号３８（ＰＲＴ６９９）、配列番号３９（ＰＲＴ６９８）、配列番号４０（ＰＲＴ９６６）、配列番号４３（ＰＲＴ９１７）若しくは配列番号４４（ＰＲＴ１０２８）で示されるアミノ酸配列を含む改変フィブロイン、又は（６－ｉｖ）配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４３若しくは配列番号４４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。

[0266] 配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４３及び配列番号４４で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号４１及び配列番号４２で示されるアミノ酸配列のＮ末端に配列番号１１で示されるアミノ酸配列（Ｈｉｓタグ配列及びヒンジ

配列を含む）を付加したものである。Ｎ末端にタグ配列を付加しただけであるため、グルタミン残基含有率に変化はなく、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４３及び配列番号４４で示されるアミノ酸配列は、いずれもグルタミン残基含有率が９％以下である（表３）。

[0267] [表3]

改変フィブロイン	グルタミン残基含有率	GPGXX モチーフ含有率	REP の疎水性度
PRT888(配列番号 33)	6.3%	27.9%	-0.07
PRT965(配列番号 34)	0.0%	27.9%	-0.65
PRT889(配列番号 35)	0.0%	27.9%	0.35
PRT916(配列番号 36)	0.0%	27.9%	0.47
PRT918(配列番号 37)	0.0%	27.9%	0.45
PRT699(配列番号 38)	3.6%	26.4%	-0.78
PRT698(配列番号 39)	0.0%	26.4%	-0.03
PRT966(配列番号 40)	0.0%	28.0%	0.35
PRT917(配列番号 43)	0.0%	27.9%	0.46
PRT1026(配列番号 44)	0.0%	28.1%	0.05

[0268] （６－ｉｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４３又は配列番号４４で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0269] （６－ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４３又は配列番号４４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。（６－ｉｖ）の改変フィブロインもまた、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る。上記配列同一性は、９５％以上であることが好ましい。

[0270] （６－ｉｖ）の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い。（６－ｉｖ）の改変フィブロインは、ＧＰＧＸＸモチ

ーフ含有率が１０％以上であることが好ましい。

[0271] 第６の改変フィブロインは、人工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。

[0272] 改変フィブロインは、第１の改変フィブロイン、第２の改変フィブロイン、第３の改変フィブロイン、第４の改変フィブロイン、第５の改変フィブロイン、及び第６の改変フィブロインが有する特徴のうち、少なくとも２つ以上の特徴を併せ持つ改変フィブロインであってもよい。

[0273] 本実施形態に係る改変フィブロインは、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ってよい。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。

[0274] 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。ｍは、２０～３００の整数であることが好ましく、３０～３００の整数であることがより好ましい。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。

[0275] 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、（ＡｌａＡｌａ）$_k$（ＡｌａＡｌａはアラニン残基を示す。）で表されるアミノ酸配列を有することを意味する。ｋは、好ましくは４～２７の整数、より好ましくは４～２０の整数、更に好ましくは４～１６の整数を示す。

[0276] ＲＥＰは、１０～２００アミノ酸残基から構成される。ＲＥＰを構成するアミノ酸残基の１以上が、グリシン残基、セリン残基、及びアラニン残基からなる群より選択されるアミノ酸残基であってよい。すなわち、ＲＥＰは、グリシン残基、セリン残基、及びアラニン残基からなる群より選択されるアミノ酸残基を含んでいてよい。

[0277] ＲＥＰを構成するアミノ酸残基の１以上が、疎水性アミノ酸残基であってよい。すなわち、ＲＥＰは、疎水性アミノ酸残基を含んでいることが好ましい。疎水性アミノ酸残基とは、疎水性指標がプラスであるアミノ酸残基を意味する。アミノ酸残基の疎水性指標（ハイドロパシー・インデックス、以下「ＨＩ」とも記す。）については、公知の指標公知の指標（Ｈｙｄｒｏｐａｔｈｙ ｉｎｄｅｘ：Ｋｙｔｅ Ｊ，＆Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ Ｒ（１９８２）“Ａ ｓｉｍｐｌｅ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｄｉｓｐｌａｙｉｎｇ ｔｈｅ ｈｙｄｒｏｐａｔｈｉｃ ｃｈａｒａｃｔｅｒ ｏｆ ａ ｐｒｏｔｅｉｎ”，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５７，ｐｐ．１０５－１３２）を使用する。疎水性アミノ酸残基としては、例えば、イソロイシン（ＨＩ：４．５）、バリン（ＨＩ：４．２）、ロイシン（ＨＩ：３．８）、フェニルアラニン（ＨＩ：２．８）、メチオニン（ＨＩ：１．９）、アラニン（ＨＩ：１．８）が挙げられる。

[0278] 本実施形態に係る改変フィブロインにおいて、ドメイン配列は、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中にシステイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0279] ドメイン配列は、ＲＥＰ中のグリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基と隣り合う位置に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していることが好ましく、ＲＥＰ中のグリシン残基と隣り合う位置に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していることがより好ましい。ＲＥＰ中のシステイン残基は、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基と、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基との間に位置していてよく、セリン残基と、グリシン残基との間に位置していてよい。

[0280] ドメイン配列は、ＲＥＰ中の疎水性アミノ酸残基と隣り合う位置に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していることが好ましい。この場合、分子間で疎水性アミノ酸残基同士が疎水的相互作用により固定される。ＲＥＰ中のシステイン残基は、疎水性アミノ酸残基の隣に位置していてよく、疎水性アミノ酸残基と、疎水性アミノ酸残基以外のアミノ酸残基との間に、位置していてもよく、疎水性アミノ酸残基と、グリシン残基、セリン残基、又はアラニン残基との間に位置していてよく、疎水性アミノ酸残基と、グリシン残基との間に位置していてよい。疎水性アミノ酸残基は、イソロイシン残基、バリン残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、メチオニン残基、及びアラニン残基からなる群より選択される１種であってよい。

[0281] ドメイン配列は、天然由来のフィブロインと比較して、ドメイン配列のＮ末端及び／又はＣ末端の近傍に位置するＲＥＰ中に、システイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していてよい。この場合、分子鎖を長くすることができる。本明細書において、ドメイン配列のＮ末端の近傍に位置するＲＥＰとは、ドメイン配列のＮ末端から１～３番目に位置するＲＥＰを意味する。例えば、システイン残基は、ドメイン配列のＮ末端から１～２番目に位置するＲＥＰ中に位置していてよい。本明細書において、ドメイン配列のＣ末端の近傍に位置するＲＥＰとは、ドメイン配列のＣ末端から１～３番目に位置するＲＥＰを意味する。例えば、システイン残基は、ドメイ

ン配列のＣ末端から１～２番目に位置するＲＥＰ中に位置していてよい。システイン残基は、ドメイン配列の最もＮ末端側及び／又は最もＣ末端側に位置するＲＥＰ中に位置していることが好ましい。

[0282] ドメイン配列は、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中の中央又は中央近傍にシステイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していてよい。本明細書において、ＲＥＰ中のアミノ酸配列の中央近傍とは、ＲＥＰの中央に位置するアミノ酸残基（中央に位置するアミノ酸残基が２つ存在する場合はＮ末端側のアミノ酸残基）からＮ末端側に向かって１～５番目の位置、又はＲＥＰの中央に位置するアミノ酸残基（中央に位置するアミノ酸残基が２つ存在する場合はＣ末端側のアミノ酸残基）から１～５番目の位置を示す。例えば、システイン残基は、ＲＥＰの中央に位置していてもよく、ＲＥＰの中央に位置するアミノ酸残基からＮ末端側、又はＣ末端側に向かって１～３番目又は１～２番目に位置していてもよい。ここにおいて、システイン残基が、例えば、ドメイン配列のＮ末端側とＣ末端側にそれぞれ一つずつ位置するように挿入されたポリペプチド骨格を含む第一のセグメントを用いる場合、そのような第一のセグメントと第二のセグメントとが交互に一つずつ位置するように連結させてなるポリペプチド誘導体を得ることができる。このポリペプチド誘導体を用いて得られる多孔質体では、靭性の更なる向上が期待され得る。システイン残基が、例えば、ドメイン配列のＮ末端側及び／又はＣ末端側よりも中央部側に位置するように挿入されたポリペプチド骨格を含む第一のセグメントを用いる場合、そのような第一のセグメントに対して第二のセグメントが連結されてなるポリペプチド誘導体では、溶媒に対する溶解度の向上が期待され得る。

[0283] 改変フィブロインは、ＲＥＰのアミノ酸配列中に、ＧＰＧＸＸモチーフ（Ｇはグリシン残基、Ｐはプロリン残基、Ｘはグリシン残基以外のアミノ酸残基を示す。）を含むことが好ましい。ＲＥＰ中にこ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。

[0284] 改変フィブロインが、ＲＥＰ中にＧＰＧＸＸモチーフを含む場合、ＧＰＧ

ＸＸ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、好ましくは１０％以上である。この場合、改変フィブロイン繊維の応力がより一層高くなる。ＧＰＧＸＸモチーフ含有率の上限に特に制限はなく、５０％以下であってよく、３０％以下であってもよい。

[0285] 本明細書において、「ＧＰＧＸＸモチーフ含有率」は、以下の方法によって算出される値である。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に含まれる全てのＲＥＰにおいて、その領域に含まれるＧＰＧＸＸモチーフの個数の総数を３倍した数（即ち、ＧＰＧＸＸモチーフ中のＧ及びＰの総数に相当）をｃ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ｄとしたときに、ＧＰＧＸＸモチーフ含有率はｃ／ｄとして算出される。

[0286] ＧＰＧＸＸ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）、ＧＰＧＸＸ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。ＲＥＰのＣ末端に「ＧＰＧＸＸ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、「ＧＰＧＸＸモチーフ」として扱う。

[0287] 図５は、フィブロインのドメイン配列を示す模式図である。図５を参照しながらＧＰＧＸＸモチーフ含有率の算出方法を具体的に説明する。まず、図５に示したフィブロインのドメイン配列（「［（Ａ）$_n$モチーフ－ＲＥＰ］$_m$－（Ａ）$_n$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５中、「領域Ａ」で示した配列。）に含まれているため、ｃを算出するためのＧＰＧＸＸモチーフの個数は７であり、ｃは７×３＝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５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ｄは５０＋４０＋１０＋２０＋３０＝１５０である。次に、ｃをｄで除すことによって、ｃ／ｄ（％）を算出することができ、図５のフィブロインの場合２１／１５０＝１４．０％となる。

[0288] 改変フィブロインは、ＲＥＰの疎水性度（ハイドロパシー・インデックス：疎水性指標）が、例えば、－０．８０、－０．７０、－０．０６以上、－０．５０以上、－０．４０以上、－０．３０以上、－０．２０以上、－０．１０以上、０．００以上、０．１０以上、０．２０以上、０．２２以上、０．２５以上、０．３０以上、０．３５以上、０．４０以上、０．４５以上、０．５０以上、０．５５以上、０．６０以上、０．６５以上、０．７０以上であってよい。ＲＥＰの疎水性度の上限に特に制限はなく、１．０以下であってよく、０．７以下であってもよい。

[0289] 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。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５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ｅ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ｆとしたときに、ＲＥＰの疎水性度はｅ／ｆ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。

[0290] ドメイン配列は、天然由来のフィブロインと比較して、ＲＥＰ中に１以上１６未満のシステイン残基が挿入されたことに相当するアミノ酸配列を有していてよい。つまり、ＲＥＰに挿入したことに相当するシステイン残基の総数は、１以上１６未満であってよい。ＲＥＰ中に挿入したことに相当するシステイン残基の総数は、１以上１２以下、１以上１０以下、１以上８以下、１以上６以下、又は２以上４以下であってもよい。ドメイン配列中のＲＥＰ一つあたりのシステイン残基数は、例えば、１～３であってよく、１～２であってよく、１であってよい。

[0291] 本実施形態に係る改変フィブロインのシステイン残基の総数は、１以上１６未満、１以上１２以下、１以上１０以下、１以上８以下、１以上６以下、又は２以上４以下であってもよい。

[0292] 本実施形態に係る改変フィブロインは、上述したＲＥＰ中のシステイン残基に関する改変に加え、天然由来のフィブロインと比較して、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更にあってもよい。

[0293] 本実施形態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、１０ｋＤａ以上７００ｋＤａ以下であってよい。本実施形態に係る改変フィブロインの分子量は、例えば、２ｋＤａ以上、３ｋＤａ以上、４ｋＤａ以上、５ｋＤａ以上、６ｋＤａ以上、７ｋＤａ以上、８ｋＤａ以上、９ｋＤａ以上、１０ｋＤａ以上、２０ｋＤａ以上、３０ｋＤａ以上、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、３６０ｋＤａ未満、３００ｋＤａ以下、又は２００ｋＤａ以下であってよい。

[0294] 本実施形態に係る改変フィブロインとしては、システイン残基が挿入され

たことに相当するアミノ酸配列を有することが好ましく、当該改変フィブロインのより具体的な例として、（ｉ）配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、又は配列番号５１で表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５２、配列番号５３、配列番号５４、又は配列番号５５で表され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。

[0295] 配列番号４６で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１）は、配列番号５６で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１１）に対し、ドメイン配列の最もＮ末端側に位置するＲＥＰに、システイン残基を１カ所挿入したものである。すなわち、配列番号４６で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１）におけるシステイン残基の総数は１である。

[0296] 配列番号４７で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２）は、配列番号５７で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１２）に対し、ドメイン配列の最もＮ末端側に位置するＲＥＰに、システイン残基を１カ所挿入したものである。すなわち、配列番号４７で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２）におけるシステイン残基の総数は１である。

[0297] 配列番号４８で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ３）は、配列番号５７で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１２）に対し、ドメイン配列の最もＮ末端側に位置するＲＥＰ及び最もＣ末端側に位置するＲＥＰに、システイン残基をそれぞれ１カ所挿入したものである。すなわち、配列番号４８で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ３）におけるシステイン残基の総数は２である。

[0298] 配列番号４９で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ４）は、配列番号５７で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１２）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側それぞれから１番目及び２番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。すなわち、配列番号４９で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ４）におけるシステイン残基の総数は４である。

[0299] 配列番号５０で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ５）は、配列番号５７で示

されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１２）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側それぞれから１～４番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。すなわち、配列番号５０で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ５）におけるシステイン残基の総数は８である。

[0300] 配列番号５１で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ６）は、配列番号５７で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１２）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側それぞれから１～８番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。すなわち、配列番号５１で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ６）におけるシステイン残基の総数は１６である。

[0301] 配列番号５２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ７）は、配列番号５８で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１３）に対し、ドメイン配列の最もＮ末端側及び最もＣ末端側それぞれに位置するＲＥＰに、システイン残基を１カ所ずつ挿入したものである。すなわち、配列番号５２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ７）におけるシステイン残基の総数は２である。

[0302] 配列番号５３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ８）は、配列番号５９で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１４）に対し、ドメイン配列の最もＮ末端側及び最もＣ末端側それぞれに位置するＲＥＰに、システイン残基を１カ所ずつ挿入したものである。すなわち、配列番号５３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ８）におけるシステイン残基の総数は２である。

[0303] 配列番号５４で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ９）は、配列番号５９で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１４）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側それぞれから１～４番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。すなわち、配列番号５４で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ９）におけるシステイン残基の総数は８である。

[0304] 配列番号５５で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１０）は、配列番号５９で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１４）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側それぞれから１～８番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。すなわち、配列番号５５で示さ

れるアミノ酸配列（ＰＲＴ１０）におけるシステイン残基の総数は１６である。

[0305] （ｉ）の改変フィブロインは、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、又は配列番号５１で示されるアミノ酸配列のみを有するものであってもよい。（ｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、又は配列番号５５で示されるアミノ酸配列のみを有するものであってもよい。

[0306] 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。これによって、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。

[0307] 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７０又は配列番号７１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。

[0308] タグ配列として、グルタチオンに特異的に結合するグルタチオン－Ｓ－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。

[0309] タグ配列として、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。

[0310] 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タグ配列として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。

[0311] 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６０（ＰＲＴ１５）、配列番号６１（ＰＲＴ１６）、配列番号６２（ＰＲＴ１７）、配列番号６３（ＰＲＴ１８）、配列番号６４（ＰＲＴ１９）、若しくは配列番号６５（ＰＲＴ２０）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６６（ＰＲＴ２１）、配列番号６７（ＰＲＴ２２）、配列番号６８（ＰＲＴ２３）、若しくは配列番号６９（ＰＲＴ２４）で示され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。

[0312] 配列番号６０（ＰＲＴ１５）、配列番号６１（ＰＲＴ１６）、配列番号６２（ＰＲＴ１７）、配列番号６３（ＰＲＴ１８）、配列番号６４（ＰＲＴ１９）、及び配列番号６５（ＰＲＴ２０）で示されるアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号４６（ＰＲＴ１）、配列番号４７（ＰＲＴ２）、配列番号４８（ＰＲＴ３）、配列番号４９（ＰＲＴ４）、配列番号５０（ＰＲＴ５）、及び配列番号５１（ＰＲＴ６）で示されるアミノ酸配列のＮ末端に、配列番号７０で示されるアミノ酸配列を含むタグ配列を導入したものである。配列番号６６（ＰＲＴ２１）、配列番号６７（ＰＲＴ２２）、配列番号６８（ＰＲＴ２３）、及び配列番号６９（ＰＲＴ２４）で示されるアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号５２（ＰＲＴ７）、配列番号５３（ＰＲＴ８）、配列番号５４（ＰＲＴ９）、及び配列番号５５（ＰＲＴ１０）で示されるアミノ酸配列のＮ末端に、配列番号７０で示されるアミノ酸配列を含むタグ配列を導入したものである。

[0313] （ｉｉｉ）の改変フィブロインは、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、又は配列番号６５で示されるアミノ

酸配列のみを有するものであってもよい。

[0314] 配列番号６０（ＰＲＴ１５）、配列番号６１（ＰＲＴ１６）、配列番号６２（ＰＲＴ１７）、配列番号６３（ＰＲＴ１８）、配列番号６４（ＰＲＴ１９）、又は配列番号６５（ＰＲＴ２０）で示されるアミノ酸配列を含む、改変フィブロインのＧＰＧＸＸモチーフ含有率は、それぞれ４０．２％、３９．９％、３９．９％、３９．７％、３９．３％、及び３８．６％であり、いずれも１０％以上である。

[0315] （ｉｖ）の改変フィブロインは、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、若しくは配列番号６９で示されるアミノ酸配列のみを有するものであってもよい。

[0316] 配列番号６６（ＰＲＴ２１）、配列番号６７（ＰＲＴ２２）、配列番号６８（ＰＲＴ２３）、又は配列番号６９（ＰＲＴ２４）で示されるアミノ酸配列を含む、改変フィブロインのＧＰＧＸＸモチーフ含有率は、それぞれ３９．９％、３９．９％、３９．３％、及び３８．６％であり、いずれも１０％以上である。

[0317] 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。

[0318] タンパク質は、当該タンパク質をコードする核酸を使用して、常法により製造することができる。当該タンパク質をコードする核酸は、塩基配列情報に基づいて、化学合成してもよく、ＰＣＲ法等を利用して合成してもよい。

[0319] （第二のセグメント）

上記第二のセグメントは、上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む。ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団とは、当該分子団同士の分子間力が、ポリペプチド骨格同士の分子間力よりも小さく、両者を混合した場合に、ポリペプチド骨格単体よりも素材の柔軟性を向上させることが可能な分子団をいう。ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団とは、ポリペプチド骨格よりも融点又はガラス転移温度が

低い分子団ともいえる。ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団は、例えば、ポリエーテル、ポリエステル、又はポリカーボネートであってよい。当該分子団としてのポリエーテルは、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はポリテトラメチレングリコール（ＰＴＭＧ）であってよい。可塑化機能とは、柔軟性の向上機能、或いは曲げ及び／又は引っ張りにおける破断伸度を高める機能ともいえる。ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団は、生分解性を有するもの、或いはバイオマス由来のものが好適に用いられる。それによって、多孔質体全体として生分解性、及び、バイオ価をより高めることが十分に期待され、更には多孔質体の製造エネルギーの更なる低減が図られ得る。

[0320] 上記第二のセグメントは、上記分子団を複数含んでもよい。そして、上記第二のセグメントが複数の上記分子団を含み、複数の上記分子団が互いに連結していてもよい。上記分子団同士の連結は、一部に分岐を有していてもよい。上記連結が一部に分岐を有することで、第二のセグメントは、複数の上記分子団による分岐構造を有することができ、分岐ごとに第一のセグメントとの結合を複数形成することもできる。すなわち、上記連結の一部に分岐を導入することによっても、第一のセグメントと第二のセグメントとのネットワーク構造を形成することができる。このように、第二のセグメントが複数の上記分子団を含み、それらの分子団が互いに連結するものであることによって、第二セグメントの設計の幅をより広げることができ、例えば、多孔質体の柔軟性をより容易に調整できる。第二のセグメントが上記分子団を一つだけ含んでいる場合には、複数の第二のセグメント同士を互いに連結させて、それら複数の第二のセグメントのうちの少なくとも一つを第一のセグメントに結合させてもよい。あるいは、複数の第二のセグメントを一つの第一のセグメントに結合させてもよい。複数の第二のセグメント同士を連結する場合には、複数の第二のセグメント同士の連結の一部に分岐を導入して、第二のセグメントのネットワークを形成してもよい。第二のセグメントは、生分解性の更なる向上等の観点から、ポリ（メタ）アクリレートに由来する骨格

を含んでいなくてよい。

[0321] 第二のセグメントは、例えば、ポリエーテル、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリオール（ポリビニルアルコール等）、ポリオレフィン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリ（メタ）アクリレート、シリコーン、ポリウレタン、ポリアルキレンイミン、フェノール樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、及び多糖類からなる群より選択される少なくとも一種に由来する骨格を含んでよい。

[0322] 第二のセグメントは、好ましくは、ポリエーテル基、ポリエステル基、ポリカーボネート基、ポリアミド基、ポリオール基（ポリビニルアルコール基等）、及び、修飾多糖基からなる群より選択される少なくとも一種の官能基を含んでもよく、エーテル基、エステル基、カーボネート基、アミド基、及び、修飾多糖基からなる群より選択される少なくとも一種の官能基を含んでもよい。第二のセグメントは、例えば、エーテル結合、エステル結合、炭酸エステル結合（カーボネート結合）、アミド基、シロキサン結合、ウレタン結合、ウレタン結合、又はウレア結合を有する構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の構造単位を含んでよく、アルキレン基、置換アルキレン基、オキシメチレン基、アルキレンイミン基、又は修飾多糖基を有する構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の構造単位を含むともいえる。

[0323] ポリエーテル基としては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、及びポリブチレングリコール（ポリテトラメチレングリコール（ＰＴＭＧ））等のポリアルキレングリコール類に由来する官能基が挙げられる。これらのポリエーテル基が第二のセグメントに含まれる場合、ポリエーテル基は、必要に応じて第二セグメントに含まれる、後述するリンカーが有するエステル基、チオエステル基、又はアミド基中のヘテロ元素（Ｏ，Ｎ，Ｓ）に直結していてもよい。あるいはポリエーテル基は、第一セグメントに含まれるポリペプチド骨格が有するエステル基、チオエステル基、又はアミド基中のヘテ

ロ元素（Ｏ，Ｎ，Ｓ）に直結していてもよい。この場合、ポリエーテル基全体がリンカー及び／又は第一セグメントから分離しやすくなり、その結果、ポリエーテル基の生分解速度が高められ得る。

[0324] ポリエステル基としては、例えば、ポリ乳酸、ポリ（３－ヒドロキシブタン酸）、ポリヒドロキシブタン酸／ヒドロキシバレリル酸共重合体、ポリヒドロキシブタン酸／４－ヒドロキシブタン酸共重合体、ポリヒドロキシブタン酸／ヒドロキシヘキサン酸共重合体、ポリトリメチレンテレフタラート、ブタンジオール／長鎖ジカルボン酸共重合体、ポリエチレンテレフタラート、ポリブチレンサクシネート、ポリブチレンサクシネート・アジペート共重合体、ポリブチレンアジペート・テレフタラート共重合体、ポリカプロラクトン、及びポリトリメチレンフランジカルボキシレート（Poly(trimethylene furandicarboxylate):PTF）等のポリエステル類に由来する官能基が挙げられる。ポリエステル基は、上述のポリエステル類の中でも、好ましくは、ポリカプロラクトン等のバイオマスプラスチック又は生分解性プラスチックに分類されるに由来する官能基である。

[0325] ポリカーボネート基としては、例えば、１，６－ヘキサンジオールポリカーボネート、１，５－ペンタンジオールポリカーボネート、及び１，１０－デカンジオールカーボネート等の脂肪族炭化水素鎖を主骨格として有するポリカーボネート類に由来する官能基が挙げられる。

[0326] ポリアミド基としては、例えば、ナイロン３、ナイロン４、ナイロン５、ナイロン６、ナイロン１１、及びナイロン６１０等のポリアミド類に由来する官能基が挙げられる。ポリアミド基は、上述のポリアミド類の中でも、好ましくは、バイオマスプラスチック又は生分解性プラスチックに分類されるに由来する官能基である。

[0327] ポリオール基（ポリビニルアルコール基等）としては、例えば、ポリビニルアルコール、エチレン・ビニルアルコール共重合体等のポリオール類（ポリビニルアルコール類等）に由来する官能基が挙げられる。ポリオール基は、上述のポリオール類の中でも、好ましくは、バイオマスプラスチック又は

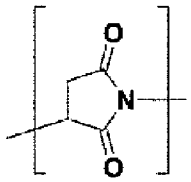
生分解性プラスチックに分類されるに由来する官能基である。

[0328] 修飾多糖類基としては、例えば、セルロース、デンプン、キチン、及びキトサン等を化学修飾した化合物に由来する官能基が挙げられる。上記化学修飾した化合物は、例えば、酢酸セルロース、エチルセルロース、酢酸デンプン、ヒドロキシプロピル化デンプン、カルボキシメチルキチン、及びカルボキシメチルキトサン等が挙げられる。

[0329] 第二のセグメントは、上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団に加えて、リンカーを更に含んでもよい。この場合、上記リンカーを介して、上記分子団と上記ポリペプチド骨格とが結合していてよい。リンカーは、例えば、下記式（１）で表される構造単位、下記一般式（２ａ）～（６）で表される構造単位、下記式（７）で表される構造単位、下記一般式（８ａ）～（９）で表される構造単位、下記一般式（１０）～（１１ｂ）で表される構造単位、及び下記一般式（１３）～（１６）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種を含んでよく、下記式（１）で表される構造単位、下記一般式（２ａ）～（６）で表される構造単位、下記式（７）で表される構造単位、及び下記一般式（８ａ）～（９）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種を含んでよく、生分解性を向上させる観点から、好ましくは、下記式（１）で表される構造単位、並びに、下記一般式（２ａ）、（３ａ）、（４ａ）、（４ｂ）及び（１０）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種を含む。リンカーは、上述の構造単位を複数含んでもよい。すなわち、リンカーは、上述の構造単位のみからなってもよく、上述の構造単位を複数有してもよい（リンカーの本体部に対して上述の構造単位が複数共有結合していてもよい）。リンカーの本体部は比較的分子量が小さいことが好ましい。リンカーが上述の構造単位を３つ以上有する場合、例えば、１つの第二のセグメントに対して、３つの第一のセグメントが結合することが可能であり、このような選択によっても上記ポリペプチド誘導体にネットワーク構造を導入することができる。上記ポリペプチド誘導体の製造に用いる原料の選択（ポリペプチド骨格を有

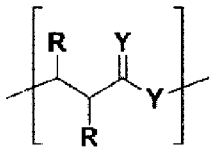
する化合物、及び、当該ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物の官能基を調整すること）によって、複数ある第二のセグメントの一部が互いに結合したブロック共重合体を含むポリペプチド誘導体とすることもできる。リンカーが上述の構造単位を複数有する場合、複数ある構造単位の少なくとも一つが上記ポリペプチド骨格と結合し、少なくとも一つが上記分子団と結合する構造であってよい。リンカーが、上述の構造単位のみからなる場合、リンカーを示す構造単位を表す式中に記載された二本の結合の一方にペプチド骨格、他方に上記分子団が結合する。例えば、上記リンカーが下記式（１）で表される場合、好ましくは、上記分子団が窒素（Ｎ）と結合し、他方がポリペプチド骨格と結合する。リンカーが上述の構造単位を複数有する場合、例えば、下記式（１）で表される構造単位の場合、好ましくは、リンカーの本体部に対して窒素（Ｎ）が結合し、他方が、上記ポリペプチド骨格及び上記分子団と結合する。

[0330] [化60]



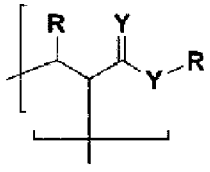
(1)

[0331] [化61]



(2a)

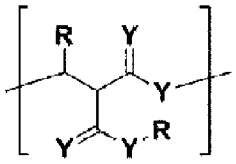
[0332] [化62]



(2b)

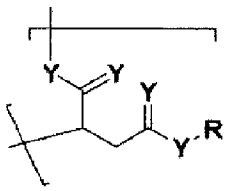
[0333]

[化63]



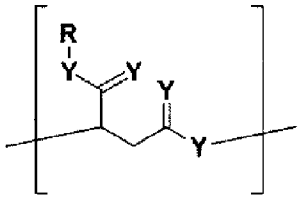
(3a)

[0334] [化64]



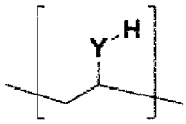
(4a)

[0335] [化65]



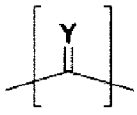
(4b)

[0336] [化66]



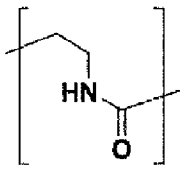
(5)

[0337] [化67]



(6)

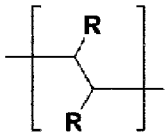
[0338] [化68]



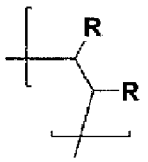
(7)

[0339]

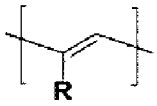
[化69]


(8a)

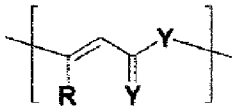
[0340] [化70]


(8b)

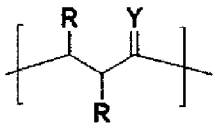
[0341] [化71]


(9)

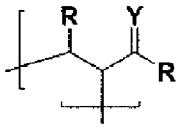
[0342] [化72]


(10)

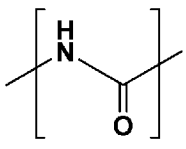
[0343] [化73]


(11a)

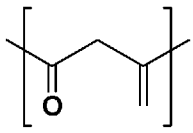
[0344] [化74]


(11b)

[0345] [化75]

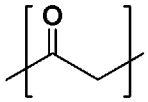

(13)

[0346] [化76]



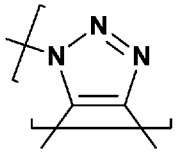
(14)

[0347] [化77]



(15)

[0348] [化78]



(16)

[0349] 上記一般式（２ａ）、（２ｂ）、（３ａ）、（４ａ）、（４ｂ）、（５）、（６）、（１０）、（１１ａ）及び（１１ｂ）において、Ｙは、互いに独立に、酸素原子、硫黄原子、又はＮＲ[1]を示す。上記ＮＲ[1]において、Ｒ[1]は、水素、炭化水素基、芳香族基、カルボニル基、又はスルホニル基を示す。上記一般式（２ａ）、（２ｂ）、（３ａ）、（４ａ）、（４ｂ）、（８ａ）、（８ｂ）、（９）、（１０）、（１１ａ）及び（１１ｂ）において、Ｒは、互いに独立に、水素、炭化水素基、又は芳香族基を示す。

[0350] 第二のセグメントの分子量（ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団）は、例えば、２００～５０００００、３００～４０００００、３５０～３５００００、４００～３０００００、５００～２０００００、６００～１０００００、７００～５００００、８００～１００００、９００～７５００、又は１００～５０００であってよい。

[0351] 第二のセグメントの分子量の分子量が２００以上である場合、分子の三次元構造内において可塑化機能を有する上記分子団の局在化を抑制しやすくなり、一定レベルの機能を発揮する為に導入しなければいけない可塑化機能を有する分子団の重量比率を充分に低くすることができる。その結果、ポリペプチド誘導体の製造における反応時間の短時間化、反応温度の低温化が実現できる可能性がある。

[0352] 第二のセグメントの分子量の分子量が５００００００以下である場合、分子量が適度な範囲になり、第一のセグメントに対する第二のセグメントの結合反応性の低下がより抑制されやすくなる。

[0353] 上記した第二のセグメントの分子量は、重量平均分子量であり、一般にはＧＰＣを用いた公知の方法で求められるものである。

[0354] 第一のセグメントの分子量（ポリペプチド骨格）に対する第二のセグメント（ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団）の分子量は、ポリペプチド誘導体の用途等に応じて、適宜調整することができる。第二のセグメントの分子量（第一のセグメント１つに対して２つ以上の第二のセグメントが結合している場合には、合計の分子量）は、第一のセグメントの分子量１００を基準として、例えば、好ましくは１～１００００であり、より好ましくは１．５～９０００であり、更に好ましくは２～８０００であり、より好ましくは３～７０００であり、更に好ましくは５～５０００であり、更により好ましくは７～３０００であり、更によりまた好ましくは１０～２０００である。

[0355] 第一のセグメントの分子量に対する第二のセグメントの分子量が１以上であると、ポリペプチド誘導体を用いて得られる多孔質体の柔軟性を更に高めることができる。第一のセグメントの分子量に対する第二のセグメントの分子量が１００００以下であると、充分な可塑性（柔軟性）を有するとともに、多孔質体の剛性を更に向上させることができる。第一のセグメントの分子量に対する第二のセグメントの分子量が上述の範囲内であることで、柔軟性により優れる多孔質体を製造することが可能である。

[0356] 第二のセグメントの分子量、及びポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団の分子量は、第一のセグメントの分子量、又は第一のセグメントに含まれるポリペプチド骨格の分子量を１００としたとき（好ましくは第一のセグメントに含まれるポリペプチド骨格の分子量を１００としたとき）に、例えば、１．４以上、１．５以上、１．６以上、１．７以上、１．８以上、１．９以上、２．０以上、５．０以上、１０以上、２０以上、３０以上

、又は４０以上であってもよい。その上限値は特に限定されるものではないものの、例えば、１０００以下、８００以下、６００以下、４００以下、２００以下、１００以下、８０以下、７０以下、６０以下、５０以下であってよい。さらに、第二のセグメントの分子量は、第一のセグメントの分子量を１００としたときに、望ましくは１～１０００の範囲内であり、より望ましくは１～８００の範囲内であり、更に望ましくは１～６００の範囲内であり、更により望ましくは１～４００の範囲内であり、更に望ましくは１～２００の範囲内であり、より望ましくは１～１００の範囲内であり、好ましくは１～７０の範囲内であり、より好ましくは１．５～６０であり、更に好ましくは１．５～５０であり、特に好ましくは２．０～５０である。第一のセグメント（ポリペプチド骨格）の分子量と第二のセグメント（ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団）の分子量との比が上記の範囲内の値である場合には、例えば、ポリペプチド誘導体を用いて得られる多孔質体において、ポリペプチド骨格を有していることによる第一のセグメントの特性（例えば、高い機械的強度）を十分に保持しつつ、柔軟性、或いは延伸性等を高めることが期待され得る。上記した、第一のセグメントの分子量を１００としたときの第二のセグメントの分子量の比率は重量平均分子量で求めたものである。

[0357] 第一のセグメント（ポリペプチド骨格）と第二のセグメント（可塑化機能を有する分子団）とのポリペプチド誘導体中の含有比率は、多孔質体の用途等に応じて、適宜調整することができる。かかる含有比率は、質量比で、第二のセグメントを１００としたときに、第一のセグメントが、例えば、５０以上、６０以上、７０以上、８０以上、９０以上、１００以上、１１０以上、１５０以上、２００以上、２５０以上、３００以上、３００以上、４００以上、４５０以上、５００以上、５５０以上、又は６００以上であってよい。かかる値の上限値は特に限定されるものではないものの、１０００以下、９００以下、８００以下、又は７００以下であってよい。第一のセグメントと第二のセグメントとのポリペプチド誘導体中の含有比率が上記の範囲内の

値とされていることによって、第二のセグメントの無駄な使用が抑えられて、ポリペプチド誘導体の製造コストの抑制が図られ得る。ポリペプチド誘導体中における、第一のセグメントに対する第二のセグメントの含有比率の低減は、例えば、第一のセグメントの分子量の低減等によって有利に実現され得る。

[0358] 上述の実施形態の説明においては、リンカーを第二のセグメントの構成要素として説明したが、第二のセグメントとは区別して取り扱ってもよい。リンカーを第一のセグメントの構成要素として扱うこともできる。リンカー部の分子量は上記ポリペプチド骨格及び上記分子団に比べて小さいが、リンカーを第二のセグメントとは区別して取り扱う場合、上述の第二のセグメントの分子量はリンカー部の分子量を差し引いた範囲を第二のセグメントの分子量の好適範囲であるものとして扱う。同様に、リンカー部を第一のセグメントの構成要素として扱う場合、上述の第一のセグメントの分子量はリンカー部の分子量を加えた範囲を第一のセグメントの分子量の好適範囲であるものとして扱う。

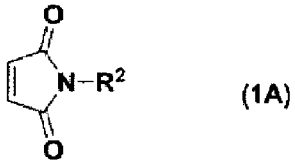
[0359] ＜ポリペプチド誘導体の製造方法＞

上述のポリペプチド誘導体は、例えば、ポリペプチド骨格を構成するシステインのチオール基（メルカプト基又はスルフヒドリル基ともいう）と、マレイミド又はマレイン酸誘導体の炭素－炭素二重結合との１，４－付加反応を利用して、チオエーテル結合を生成させることによって、上記分子団の有する官能基（例えば、ポリエーテル基、ポリエステル基、ポリカーボネート基、ポリアミド基、ポリオール基、及び、修飾多糖基からなる群より選択される少なくとも一種の官能基）を第一のセグメントに導入することで製造することができる。上述のポリペプチド誘導体は、上述の製造方法の一例を応用し、例えば、システインを有するポリペプチド骨格を含む化合物と、当該ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含み、且つチオール基を有する化合物と、マレイミド基を２つ以上有する化合物とを、上述のマレイミド基の１，４－付加反応を利用してチオエーテル結合を形成すること

によっても製造することができる。上述のポリペプチド誘導体は、その他、例えば、エポキシ基、又はイソシアネート基に対する付加反応、α－ハロカルボニル基に対する置換反応、アルキニル基とアジド基との間のＨｕｉｓｇｅｎ環化反応を利用して製造することもできる。

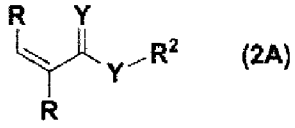
[0360] より一般的には、ポリペプチド誘導体の製造方法の一実施形態は、ポリペプチド骨格を含む化合物と、下記一般式（１Ａ）～（１６Ａ）で表される化合物の少なくとも１種とを反応させることによってポリペプチド誘導体を得る工程を備える。上記工程は、ポリペプチド骨格を含む化合物と、下記一般式（１Ａ）～（１２Ａ）で表される化合物とを反応させることによってポリペプチド誘導体を得る工程であってよい。上記ポリペプチド骨格は、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種を有し、好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、及びアミド基からなる群より選択される少なくとも一種を有する。ポリペプチド骨格を含む化合物と、下記一般式（１Ａ）～（１２Ａ）又は（１４Ａ）で表される化合物との反応がマイケル付加反応であってよい。

[0361] [化79]



(1A)

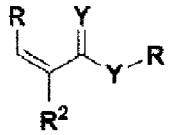
[0362] [化80]



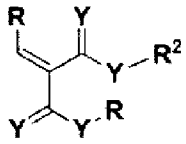
(2A)

[0363]

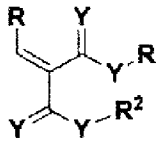
[化81]


(2B)

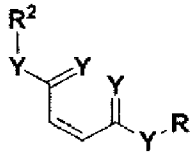
[0364] [化82]


(3A)

[0365] [化83]


(3B)

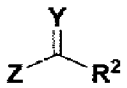
[0366] [化84]


(4A)

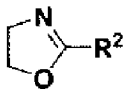
[0367] [化85]

(5A)

[0368] [化86]

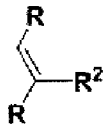

(6A)

[0369] [化87]

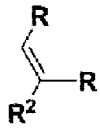

(7A)

[0370]

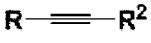
[化88]


(8A)

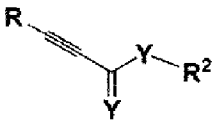
[0371] [化89]


(8B)

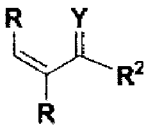
[0372] [化90]


(9A)

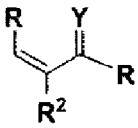
[0373] [化91]


(10A)

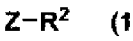
[0374] [化92]


(11A)

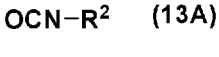
[0375] [化93]


(11B)

[0376] [化94]

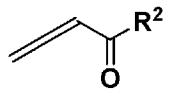

(12A)

[0377] [化95]

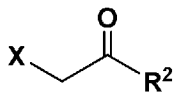

(13A)

[0378]

[化96]


(14A)

[0379] [化97]


(15A)

[0380] [化98]

(16A)

[0381] 上記一般式（１Ａ）、（２Ａ）、（２Ｂ）、（３Ａ）、（３Ｂ）、（４Ａ）、（５Ａ）、（６Ａ）、（７Ａ）、（８Ａ）、（８Ｂ）、（９Ａ）、（１０Ａ）、（１１Ａ）、（１１Ｂ）及び（１２Ａ）においてＲ^{2}は、上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を示す。上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団としては、上述のポリペプチド誘導体についての説明において例示したものを適用できる。

[0382] 上記一般式（２Ａ）、（２Ｂ）、（３Ａ）、（３Ｂ）、（４Ａ）、（５Ａ）、（６Ａ）、（８Ｂ）、（９Ａ）、（１０Ａ）、（１１Ａ）及び（１１Ｂ）において、Ｙは、互いに独立に、酸素原子、硫黄原子、又はＮＲ^{1}を示す。上記ＮＲ^{1}において、Ｒ^{1}は、水素、炭化水素基、芳香族基、カルボニル基、又はスルホニル基を示す。上記一般式（２Ａ）、（２Ｂ）、（３Ａ）、（３Ｂ）、（４Ａ）、（５Ａ）、（８Ａ）、（８Ｂ）、（９Ａ）、（１０Ａ）、（１１Ａ）及び（１１Ｂ）においてＲは、互いに独立に、水素、炭化水素基、又は芳香族基を示す。上記一般式（６Ａ）及び（１２Ａ）において、Ｚはハロゲン原子、スルホン酸エステル基、及び含フッ素カルボン酸エステル基を示す。上記一般式（１５Ａ）において、Ｘはハロゲン原子を示す。

[0383] ポリペプチド骨格を有する化合物一つ（第一のセグメント一つ）に対して導入されるポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団（第二のセグメント）の数は、ポリペプチド骨格を構成するアミノ酸配列に由来するチオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノ

キシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基（好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、及びアミド基）の合計官能基数以下となるが、例えば、１個以上、２個以上、又は４個以上であってよく、３０個以下、２５個以下、２０個以下、１５個以下、１０個以下、又は８個以下であってよい。ポリペプチド骨格を有する化合物一つ（第一のセグメント一つ）に対して導入されるポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団（第二のセグメント）の数は上述の範囲内で調整することができ、例えば、１～３０、１～２５、１～２０、１～１５、１～１０、１～８、又は２～８であってよい。

[0384] ポリペプチド誘導体の製造方法においては、例えば、溶媒中で、ポリペプチド骨格を有する化合物と一般式（１Ａ）～（１６Ａ）で表される化合物の少なくとも１種（好ましくは一般式（１Ａ）～（１２Ａ）で表される化合物）とを混合してもよい。反応が進行しにくい場合には、酸、塩基の添加、及び加温等を行ってもよい。反応温度は、通常、０～１５０℃であり、例えば、５０～１５０℃、７０～１２０℃、又は９０～１００℃であってよく、１０～１１０℃、２０～１００℃、又は２５～９０℃であってよい。使用される溶媒は、ポリペプチド骨格を有する化合物及び一般式（１Ａ）～（１６Ａ）で表される化合物を溶解することができ、所望の反応の進行を阻害しないものであればよい。このような溶媒としては、ヘキサフルオロイソプロピルアルコール（ＨＦＩＰ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、酢酸、ギ酸等が挙げられる。

[0385] 上述の反応によって得られる生成物（ポリペプチド誘導体を含む粗製物）は、例えば、再沈殿、順相カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、溶媒による洗浄等によって精製してもよい。

[0386] 上述のポリペプチド誘導体の製造方法の一実施形態は、ポリペプチド骨格

を含む化合物と、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物と、下記一般式（２－１Ａ）～（２－１６Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の構造単位を２つ以上有する化合物と、を反応させることによってポリペプチド誘導体を得る工程を備える。上記工程は、ポリペプチド骨格を含む化合物と、上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物と、下記一般式（２－１Ａ）～（２－１２Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の官能基を２つ以上有する化合物と、を反応させることによってポリペプチド誘導体を得る工程であってよい。

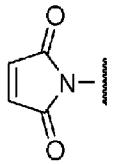
[0387] 上記ポリペプチド骨格は、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種を有し、好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、及びアミド基からなる群より選択される少なくとも一種を有する。

[0388] 上記分子団を含む化合物は、上記分子団以外に、下記一般式（２－１Ａ）～（２－１２Ａ）で表される構造単位と反応し得る反応性官能基を有する化合物であってよい。反応性官能基は、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、アミド基、アジド基、及びアルキニル基からなる群より選択される少なくとも一種であってよく、好ましくは、チオール基、アミノ基、ヒドロキシ基、グアニジノ基、カルボキシ基、フェノキシ基、インドール基、及びアミド基からなる群より選択される少なくとも一種である。上記分子団を含む化合物は、反応性官能基を２個以上有する化合物であってよく、反応性官能基を２個有する化合物であってよい。

[0389] ポリペプチド骨格が有する官能基と、上記分子団を含む化合物の有する官能基とは、一般式（２－１Ａ）～（２－１６Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の官能基を２つ以上有する化合物の官能

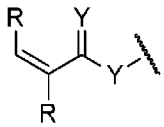
基の種類に応じて、選択することができ、同一であっても異なってもよい。ポリペプチド骨格が有する官能基と、上記分子団を含む化合物の有する官能基とが異なる場合、ポリペプチド誘導体の分子構造の制御をより容易に行うことができる。

[0390] [化99]



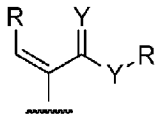
(2-1A)

[0391] [化100]



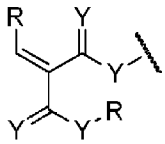
(2-2A)

[0392] [化101]



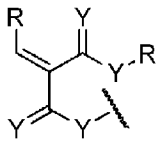
(2-2B)

[0393] [化102]



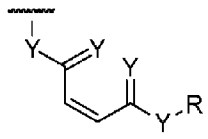
(2-3A)

[0394] [化103]



(2-3B)

[0395] [化104]



(2-4B)

[0396]

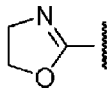
[化105]

(2-5A)

[0397] [化106]

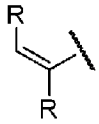
(2-6A)

[0398] [化107]



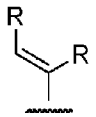
(2-7A)

[0399] [化108]



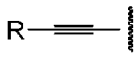
(2-8A)

[0400] [化109]



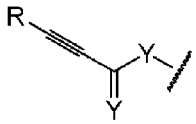
(2-8B)

[0401] [化110]



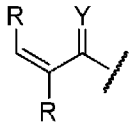
(2-9A)

[0402] [化111]



(2-10A)

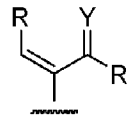
[0403] [化112]



(2-11A)

[0404]

[化113]

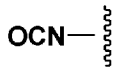


(2-11B)

[0405] [化114]

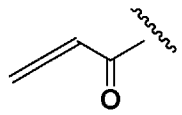
(2-12A)

[0406] [化115]



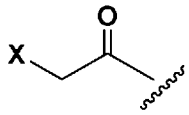
(2-13A)

[0407] [化116]



(2-14A)

[0408] [化117]



(2-15A)

[0409] [化118]

(2-16A)

[0410] 上記一般式（２－２Ａ）、（２－２Ｂ）、（２－３Ａ）、（２－３Ｂ）、（２－４Ａ）、（２－５Ａ）、（２－６Ａ）、（２－１０Ａ）、（２－１１Ａ）、及び（２－１１Ｂ）において、Ｙは、互いに独立に、酸素原子、硫黄原子、又はＮＲ[1]を示す。Ｒ[1]は、水素、炭化水素基、芳香族基、カルボニル基、又はスルホニル基を示す。上記一般式（２－２Ａ）、（２－２Ｂ）、（２－３Ａ）、（２－３Ｂ）、（２－４Ａ）、（２－８Ａ）、（２－８Ｂ）、（２－９Ａ）、（２－１０Ａ）、（２－１１Ａ）、（２－１１Ｂ）、及び（２－１２Ａ）においてＲは、互いに独立に、水素、炭化水素基、又は芳香族基を示す。上記一般式（２－６Ａ）及び（２－１２Ａ）において、Ｚはハロゲン原子、スルホン酸エステル基、又は含フッ素カルボン酸エステル基を示

す。上記一般式（２－１５Ａ）において、Ｘはハロゲン原子を示す。

[0411] ポリペプチド骨格を含む化合物及び上記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む化合物と、上述の特定官能基を２つ以上有する化合物との反応は、例えば、マイケル付加反応等であってよい。

[0412] 上記第二のセグメントは、好ましくは、上記分子団を含む化合物と、上記一般式（２－１Ａ）～（２－１２Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の官能基を２つ以上有する化合物との付加反応物（又は付加重合物）に由来する骨格を含んでいてよく、反応性官能基及びポリエーテル基を含む化合物と、上記一般式（２－１Ａ）～（２－１２Ａ）で表される構造単位からなる群より選択される少なくとも一種の官能基２つ以上、及び、ポリエーテル基を含む化合物との付加反応物（又は付加重合物）に由来する骨格を含んでいてもよい。

[0413] 第一セグメントに対する第二セグメントの重量比率を高くすれば柔軟性が向上可能である。そうするには、第二セグメントの高分子化が有効である。そして、そのためには、複数種類の可塑剤を結合させて、第二セグメントの高分子化を図ることが好ましい。

[0414] ポリペプチド誘導体を得る工程では、特定の官能基を有するポリペプチド骨格を含む化合物、及びポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有し、特定の官能基を有する分子団を含む化合物に対して反応する官能基を、特定の構造単位を２つ以上有する化合物として切り分けている。このような方法を取ることで、特定の官能基を有するポリペプチド骨格を含む化合物と、ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有し、特定の官能基を有する分子団を含む化合物との間で反応を進行させずに、反応溶液を調製することができる。混合しても反応が進行しないため、十分に均一な状態となるまで、例えば時間をかけることもできる。均一な反応溶液が調製された後、特定の構造単位を２つ以上有する化合物を配合することによって、反応を開始させることによって、反応系の制御をより容易に行うことができ、より均一なポリペプチド誘導体を調製することができる。このような方法は、ポリペプチド骨格及び

分子団の種類に応じて溶媒等へ溶解性が低いときに特に有用である。

[0415] ＜その他の成分＞

多孔質体は、ポリペプチド誘導体以外の成分（その他の成分）を含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。その他の成分としては、例えば、着色剤、平滑剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、染料、充填剤、架橋剤、艶消し剤、レベリング剤等が挙げられる。その他の成分を含有する場合、多孔質体全量に対するポリペプチド誘導体の含有割合は、例えば、５０質量％以上であってよく、９９質量％以下であってよい。

[0416] ＜多孔質体の用途＞

本実施形態に係る多孔質体は、従来の多孔質体に用いられた用途に使用することができる。本実施形態に係る多孔質体は、例えば、化粧品用途、医療用途、防水透湿層、衝撃吸収材、下着等に含まれるパッドとしての衣料用途等の用途に使用することができる。

[0417] ［多孔質体の製造方法］

本実施形態に係る多孔質体の製造方法特に限定されるものではないが、例えば、ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物をゲル化させる工程Ａと、ゲル化した混合物から溶媒を離脱させることにより、ポリペプチド誘導体を含む多孔質体を得る工程Ｂと、を含む方法によって、目的とする多孔質体を製造することができる。ポリペプチド誘導体については、上述したとおりである。

[0418] 工程Ａでは、ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物をゲル化させる。ゲル化は、例えば、ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物（溶液）を冷却することによって行うことができる。ゲル化のための温度は、溶媒の種類等に応じて、適宜設定することができる。ゲル化のための温度は、例えば、－１９６～２０℃であってよい。

[0419] 溶媒は、水、又は有機溶媒であってよい。有機溶媒としては、例えば、ジメチルスルホキシド、エタノール、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、ヘキサフルオロ－２－プロパノール、ギ酸、又はそれらの混合溶媒等が挙げられる

。

[0420] 混合物におけるポリペプチド誘導体の濃度は、例えば、混合物全量に対して、１質量％以上であってよく、３０質量％以下であってよい。混合物は、ポリペプチド誘導体及び溶媒以外を含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。

[0421] ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物をゲル化させる方法は、上述の方法の他、公知の相分離を利用したゲル化方法、例えば、熱誘起相分離法、重合誘起相分離法、非溶媒誘起相分離法等が採用可能である。

[0422] 工程Ｂでは、ゲル化した混合物から溶媒を離脱させる。これによって、ポリペプチド誘導体を含む多孔質体を得る。ゲル化した混合物から溶媒を離脱させる方法としては、例えば、混合物を凍結乾燥させる方法、加熱乾燥させる方法、真空乾燥させる方法、自然乾燥させる方法等の公知の乾燥方法が挙げられる。乾燥中にゲル化した混合物を加圧圧縮して溶媒を絞りだす操作を加えてもよい。

[0423] 工程Ｂにおいて、溶媒を離脱させる前に混合物中の溶媒（第１の溶媒）を他の溶媒（第２の溶媒）に置換してもよい。第１の溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド）を第２の溶媒（例えば、エタノール）に置換した後、混合物中の第２の溶媒を更に第３の溶媒（水）に置換してもよい。第２及び第３の溶媒は、上記例示した溶媒であってよい。

[0424] 工程Ｂでは、凍結乾燥させる前にゲル化した混合物中の溶媒を水に置換することを含むことが好ましい。凍結乾燥によって溶媒を離脱させる場合、溶媒を離脱させる直前の溶媒は水であることが好ましい。これによって、多孔質体の製造がより容易になる。

[0425] 本実施形態に係る多孔質体は、気泡を供給した混合物を加熱して少なくとも一部の溶媒を揮発させて、多孔質体を得る工程を含む方法によって製造することもできる。混合物及び溶媒については上述した態様を適用することができる。

[0426] 混合物の加熱温度は、溶媒の種類に応じて適宜設定することができる。例

えば、混合物の加熱温度は、１００℃以上であってよく、例えば、１００～１５０℃であってよい。

[0427] 本実施形態に係る多孔質体は、上述した方法に以外に、例えば、熱水等の溶媒に溶けやすい成分を供給した混合物を固化させた後、溶媒中でその成分を除去することによって多孔質体を得る工程を含む方法、発泡剤を供給した混合物を加熱して発泡と同時に溶媒を除去することで多孔質体を得る工程を含む方法等によって製造することもできる。混合物及び溶媒については上述した態様を適用することができる。

実施例

[0428] 以下、実施例等に基づいて本開示をより具体的に説明する。ただし、本開示は以下の実施例に限定されるものではない。

[0429] ＜改変フィブロインの製造＞

（１）発現ベクターの作製

配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロイン、配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロイン、及び配列番号６３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１８）を有する改変フィブロインを設計した。配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロインの平均ハイドロパシー・インデックスの値は０．４４であり、配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロインの平均ハイドロパシー・インデックスの値は０．４５であり、配列番号６３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１８）を有する改変フィブロインの平均ハイドロパシー・インデックスの値は０．４６である。

[0430] 配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）は、配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側のそれぞれから１番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。配列番号６２で示されるアミノ酸配列を有する改変フィブロインのシステイン残基の総数は２である。配列番

号６３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１８）は、配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）に対し、ドメイン配列のＮ末端側及びＣ末端側それぞれから１～２番目に位置するＲＥＰ中に、それぞれ１カ所ずつシステイン残基が挿入されたものである。配列番号６３で示されるアミノ酸配列を有する改変フィブロインのシステイン残基の総数は４である。

[0431] 配列番号６２、配列番号６３及び配列番号７２で示されるアミノ酸配列を有する改変フィブロイン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。

[0432] （２）タンパク質の製造

得られた発現ベクターで、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４）にOD_{600}が０．００５となるように添加した。培養液温度を３０℃に保ち、OD_{600}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。

[0433] [表4]

シード培養用培地

試薬	濃度(g/L)
グルコース	5.0
KH_2PO_4	4.0
K_2HPO_4	9.3
Yeast Extract	6.0
アンピシリン	0.1

[0434] 当該シード培養液を５００ｍＬの生産培地（表５）を添加したジャーファーメンターにOD_{600}が０．０５となるように添加した。培養液温度を３７℃に保ち、ｐＨ６．９で一定に制御して培養した。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。

[0435] [表5]

生産培地

試薬	濃度(g/L)
グルコース	12.0
KH_2PO_4	9.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.4
Yeast Extract	15
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.04
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.04
アデカノール（アデカ、LG-295S）	0.1(mL/L)

[0436] 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４５５ｇ／１Ｌ、Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ　１２０ｇ／１Ｌ）を１ｍＬ／分の速度で添加した。培養液温度を３７℃に保ち、ｐＨ６．９で一定に制御して培養した。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、１Ｍのイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を培養液に対して終濃度１ｍＭになるよう添加し、改変フィブロインを発現誘導させた。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改変フィブロインサイズのバンドの出現によって、目的とする改変フィブロインの発現を確認した。

[0437] （３）タンパク質の精製

ＩＰＴＧを添加してから２時間後に回収した菌体を２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｂｕｆｆｅｒ（ｐＨ７．４）で洗浄した。洗浄後の菌体を約１ｍＭのＰＭＳＦを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．４）に懸濁させ、高圧ホモジナイザー（ＧＥＡ　Ｎｉｒｏ　Ｓｏａｖｉ社製）で細胞を破砕した。破砕した細胞を遠心分離し、沈殿物を得た。得られた沈殿物を、高純度になるまで２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７．４）で洗浄した。洗浄後の沈殿物を１００ｍｇ／ｍＬの濃度になるように８Ｍ　グアニジン緩衝液（８Ｍ　グアニジン塩酸塩、１０ｍＭ　リン酸二水素ナトリウム

、２０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．０）で懸濁し、６０℃で３０分間、スターラーで撹拌し、溶解させた。溶解後、透析チューブ（三光純薬株式会社製のセルロースチューブ３６／３２）を用いて水で透析を行った。透析後に得られた白色の凝集タンパク質を遠心分離により回収し、凍結乾燥機で水分を除き、凍結乾燥粉末を回収することにより、粉末状の改変フィブロイン（ＰＲＴ１７、ＰＲＴ１８、ＰＲＴ２７）を得た。

[0438] ＜実施例Ａの多孔質体の製造＞

下記ａ），ｂ），ｃ）をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１４．２５ｇ（１２．９５ｍＬ）に投入後、窒素置換して１００℃、３００ｒｐｍで攪拌（１５ｍｉｎ）し、その後、室温で１０ｍｉｎ静置した。これにより、ＤＭＳＯ中でポリペプチド誘導体を合成して、ポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液（ポリペプチド誘導体濃度：５ｗｔ％）を調製した。

ａ）改変フィブロイン（ＰＲＴ：１７、数平均分子量５００００）：４５７ｍｇ

ｂ）ｍａｌ－ＰＥＧ－ｍａｌ（数平均分子量２００００）：２７６ｍｇ（バイオケムペグ社　ＨＯ０２２０２２－２０Ｋ）

ｃ）ＨＳ－ＰＥＧ－ＳＨ（数平均分子量２０００）：１７．０ｍｇ（バイオケムペグ社　ＨＯ０００３００３－２Ｋ）

[0439] ステンレス板上に敷いたテフロンシートの外周部に厚さ２ｍｍの枠状シリコンゴムシートを貼り付けた。その後、枠状シリコンゴムシートの内側にポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を垂らし、全体にいきわたらせた。次いで、ポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を４℃冷蔵庫で冷却してゲル化させた（一晩）。その後、エタノールを収容した容器内にゲルをシートごと投入し（エタノール置換）、３時間静置することで、テフロンシートを剥がすと共に、ＤＭＳＯをエタノールに置換した。次に、容器内のエタノールを捨ててＲＯ水を入れ２時間静置することでエタノールを水にＲＯ置換した。その後、ＲＯ水への置換が完了したゲルを－２０℃冷凍庫で凍結させた後、凍結乾燥機で一晩乾燥させた。これにより、多孔質体（実施例Ａ）を得た。

[0440] ＜比較例Ａの多孔質体の製造＞

改変フィブロイン（ＰＲＴ１７、数平均分子量５００００）３５０ｍｇをＤＭＳＯ４．６５ｇ（４．２３ｍＬ）に投入後、窒素置換して１００℃、３００ｒｐｍで攪拌（１５ｍｉｎ）し、その後、室温で１０ｍｉｎ静置した。これにより、改変フィブロインのＤＭＳＯ溶液（改変フィブロイン濃度：７ｗｔ％）を調製した。その後、ポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を用いる代わりに、上記改変フィブロインのＤＭＳＯ溶液を用いて、実施例Ａと同様にして、多孔質体（比較例Ａ）を得た。

[0441] ＜実施例Ｂの多孔質体の製造＞

下記ａ），ｂ），ｃ）をＤＭＳＯ４．２７５ｇ（３．８７ｍＬ）に投入後、窒素置換して１００℃、３００ｒｐｍで攪拌（１５ｍｉｎ）した。これにより、ＤＭＳＯ中でポリペプチド誘導体を合成して、ポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液（ポリペプチド誘導体濃度：５ｗｔ％）を調製した。

ａ）改変フィブロイン（ＰＲＴ１７、数平均分子量５００００）：２２５ｍｇ

ｂ）ｍａｌ－ＰＥＧ－ｍａｌ（数平均分子量２００００）：６０ｍｇ（バイオケムペグ社　ＨＯ０２２０２２－２０Ｋ）

ｃ）ＨＳ－ＰＥＧ－ＳＨ　（数平均分子量２０００）：４ｍｇ（バイオケムペグ社　ＨＯ０００３００３－２Ｋ）

[0442] ハンドブレンダーを用いて、ポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を１分間泡立てた。ステンレス板上に敷いたテフロンシートの外周部に６０×３０×２ｍｍの枠状シリコンゴムシートを貼り付けた。その後、枠状シリコンゴムシートの内側に泡立てたポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を垂らし、全体にいきわたらせた。その後、１２０℃でポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を１時間乾燥させた。これにより多孔質体（実施例Ｂ）を得た。

[0443] ＜比較例Ｂの多孔質体の製造＞

改変フィブロイン（ＰＲＴ１７、数平均分子量５００００）２２５ｍｇをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）４．２７５ｇ（３．８８６ｍＬ）に投入

後、窒素置換して１００℃、３００ｒｐｍで攪拌（１５ｍｉｎ）した。これにより、改変フィブロインのＤＭＳＯ溶液（改変フィブロイン濃度：５ｗｔ％）を調製した。その後、実施例Ｂでポリペプチド誘導体ＤＭＳＯ溶液を用いる代わりに、上記改変フィブロインのＤＭＳＯ溶液を用いて、実施例Ｂと同様にして、多孔質体（比較例Ｂ）を得た。

[0444] ＜柔軟性の評価＞

実施例Ａ及び比較例Ａの多孔質体を用い、それらを長さ方向一端部のみにおいて片持ち状態で支持し、このときの自重による曲がり具合を観察した。その結果を図６及び図７に示す。

[0445] 図６及び図７から明らかなように、実施例Ａは自重によって曲がりが発生しているものの、比較例Ａは自重による曲がりが生じていないことが確認される。これは、ポリペプチド誘導体を含む多孔質体が、ポリペプチド誘導体を含まない多孔質体に比して優れた柔軟性を有することを示している。

[0446] 実施例Ｂ及び比較例Ｂの多孔質体を用い、それら各多孔質体の長さ方向両端部を掴んで曲げた。実施例Ｂの多孔質体は亀裂等を生じさせることなく曲げることができた。比較例Ｂの多孔質体は長さ方向中央部付近に亀裂が発生した。このことからも、ポリペプチド誘導体を含む多孔質体が、ポリペプチド誘導体を含まない多孔質体よりも柔軟性に優れていることが分かる。

[0447] ＜成形時の外観及びブリードアウトの評価＞

（実施例１）

数平均分子量：５０００のメトキシポリエチレングリコールマレイミド（シグマアルドリッチ社製：第二のセグメント）を用いて、ポリペプチド誘導体を調製した。具体的には、ガラス容器に、上述のようにして調製した配列番号６３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１８）を有する、数平均分子量：５００００の改変フィブロイン（第一のセグメント）を２５００ｍｇ、上記メトキシポリエチレングリコールマレイミドを５００ｍｇ測り取り、更に溶媒として、ヘキサフルオロイソプロピルアルコール（セントラル硝子株式会社製、ＨＦＩＰ）を５０ｍＬ加え、撹拌することで、改変フィブロイン等を

溶解させ反応溶液を得た。その後、室温（２５℃）にて、反応溶液を２０時間撹拌することで反応を行った。

[0448] ２０時間が経過したところで、溶媒を留去し、粗生成物をメタノール（ナカライテスク株式会社製）で３回洗浄した。一回の洗浄にメタノール５０ｍＬを用いた。洗浄操作によって、メトキシポリエチレングリコールマレイミド等の未反応物を除去した。洗浄操作後、減圧乾燥を行うことによって、生成物（ポリペプチド誘導体）を得た。生成物に対するＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、分子量の増大を確認し、改変フィブロインに、ポリエチレングリコール鎖が導入されていることを確認した。得られたポリペプチド誘導体は、第一のセグメント一つに対して１～４個の第二のセグメントが結合したものとなっていることを確認した。図８にＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す。図８において、１及び７レーンが分子量特定のための標準サンプルであり、２，３が配列番号６３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１８）を有する改変フィブロインであり、４が実施例１で調製した上記ポリペプチド誘導体である。

[0449]（実施例２）

数平均分子量が１００００であるメトキシポリエチレングリコールマレイミド（シグマアルドリッチ社製）を用いたこと、メトキシポリエチレングリコールマレイミドの配合量を２０ｍｇとしたこと、改変フィブロインを５０ｍｇとしたこと、溶媒としてヘキサフルオロイソプロピルアルコール（セントラル硝子株式会社製、ＨＦＩＰ）を１ｍＬ加えこと、及び粗生成物の一回の洗浄にメタノール１ｍＬを用いた以外は、実施例１と同様にして、ポリペプチド誘導体を調製した。生成物に対するＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、分子量の増大を確認し、改変フィブロインに、ポリエチレングリコール鎖が導入されていることを確認した。得られたポリペプチド誘導体は、第一のセグメント一つに対して１～４個の第二のセグメントが結合したものとなっていることを確認した。図８において、５レーンが実施例２で調製したポリペプチド誘導体である。

[0450]（実施例３）

数平均分子量が７５０であるメトキシポリエチレングリコールマレイミド（シグマアルドリッチ社製）を用いたこと、及びメトキシポリエチレングリコールマレイミドの配合量を１．５ｍｇとしたこと以外は、実施例２と同様にして、ポリペプチド誘導体を調製した。生成物に対するＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、分子量の増大を確認し、改変フィブロインに、ポリエチレングリコール鎖が導入されていることを確認した。得られたポリペプチド誘導体は、第一のセグメント一つに対して１～４個の第二のセグメントが結合したものとなっていることを確認した。図８において、６レーンが実施例３で調製したポリペプチド誘導体である。

[0451]（比較例１）

比較のため、システインを有しない改変フィブロインを用いて同様の実験を行った。すなわち、ガラス容器に、上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：１００００）を２０ｍｇ、数平均分子量：５０００のメトキシポリエチレングリコールマレイミド（シグマアルドリッチ社製）を４ｍｇ測り取り、更に溶媒として、ヘキサフルオロイソプロパノール（セントラル硝子株式会社製、ＨＦＩＰ）を１ｍＬ加え、撹拌することで、改変フィブロイン等を溶解させ反応溶液を得た。その後、室温（２５℃）にて、反応溶液を２０時間撹拌することで反応を行った。

[0452] ２０時間が経過したところで、溶媒を留去し、粗生成物をメタノール（ナカライテスク株式会社製）で３回洗浄した。一回の洗浄にメタノール１ｍＬを用いた。洗浄操作によって、メトキシポリエチレングリコールマレイミド等の未反応物を除去した。洗浄操作後、減圧乾燥を行うことによって、生成物を得た。生成物に対するＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、分子量に変化がないことが確認され、改変フィブロインと、メトキシポリエチレングリコールマレイミドとの反応が進行してないことを確認した。図９にＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す。図９において、１レーンが分子量特定のための標準サンプルであり、６レーンが生成物であり、７レーンが配列番号７２で示されるアミ

ノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロインである。

[0453]（比較例２）

上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：１００００００）と、ポリエチレンオキサイドとの混合物を調製した。具体的には、容器に、上記改変フィブロイン１０ｇと、上記改変フィブロイン全量を１００質量％として、５質量％の重量となるように、ポリエチレンオキサイド（数平均分子量：４０００）を配合し、ビーズミル（日本コークス工業株式会社製、アトライター）を用いて回転数：１０００回／分の条件で１０分間、乾式混合させて、混合物を調製した。

[0454]（比較例３）

ポリエチレンオキサイドとして、数平均分子量２００００のポリエチレンオキサイドを用いた他、比較例２と同様にして、混合物を調製した。

[0455]（比較例Ｄ）

上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：１００００００）と、ポリエチレンオキサイドモノステアレート（４０Ｅ．Ｏ．、数平均分子量：２０００）との混合物を調製した。改変フィブロイン全量を１００質量％として、１０質量％の重量となるように、ポリエチレンオキサイドモノステアレートを配合し、エタノール（９９．５％）中で１５時間混合し、オーブンにて６０℃で５時間乾燥させて、混合物を調製した。

[0456]（評価）

実施例１～３で調製したポリペプチド誘導体、比較例２、３及び４で調製した混合物を用いて、それぞれ以下の条件で、加熱加圧成形によって成形体を調製した。成形には、図１０に示す加圧成形機１０を用いた。図１０は、加圧成形機の模式断面図である。図１０に示す加圧成形機１０は、貫通孔が形成され加温可能な金型２と、金型２の貫通孔内で上下動が可能な上側ピン４及び下側ピン６とを備えるものであり、金型２に、上側ピン４又は下側ピ

ン６を挿入して生じる空隙に、サンプルを導入して、金型２を加温しつつ、上側ピン４及び下側ピン６で組成物を圧縮することで、成形体を得ることができる。

[0457] 図１１を用いて、成形体を得る工程を説明する。図１１の（ａ）は組成物導入前、（ｂ）はサンプル導入直後、（ｃ）はサンプルを加熱及び加圧している状態の加圧成形機の模式断面図である。図１１の（ａ）に示すように、金型２の貫通孔に下側ピン６のみを挿入した状態で貫通孔内に組成物を導入し、図１１の（ｂ）に示すように、金型２の貫通孔に上側ピン４を挿入して下降させ、金型２の加熱を開始して、加熱加圧前のサンプル８ａを貫通孔内で加熱加圧する。あらかじめ定めた加圧力に至るまで上側ピン４を下降させ、図１１の（ｃ）に示す状態でサンプルが所定の温度に達するまで、加熱及び加圧を継続して、加熱加圧後の成形体８ｂを得る。場合によって、冷却器（例えばスポットクーラー）を用いて金型２の温度を下降させ、成形体８ｂが所定の温度になったところで、上側ピン４又は下側ピン６を金型２から抜き取り、成形体を得てもよい。加圧に関しては、下側ピン６を固定した状態で上側ピン４を下降させて実施してもよいが、上側ピン４の下降と下側ピン６の上昇の両方を実施してもよい。

[0458] 具体的にはまず、上記ポリペプチド誘導体又は上記混合物を０．６ｇ測り取り、図１０に示す加圧成形機１０の金型２（実施例１については、直径：１４ｍｍの円形状の貫通孔を有する円柱形状の金型を用い、比較例２，３及び４については、断面が３５ｍｍ×２５ｍｍの長方形状の貫通孔を有する円柱形状の金型を用いた。）の貫通孔内に導入した。この際、厚みが均等になるようにサンプルを加えていった。全てのサンプルを導入した後、金型２の加熱を開始するとともに、ハンドプレス機（ＮＰａシステム株式会社製、商品名：ＮＴ－１００Ｈ－Ｖ０９）を用いて、上側ピン４と下側ピン６を貫通孔内に挿入することでサンプルの加圧を行った。この際、サンプルの加圧条件が５０ＭＰａとなるように制御した。サンプルの温度が１５０℃に到達してから５分間経過したところで、加熱を中止し、スポットクーラー（トラスコ

中山株式会社製、商品名：ＴＳ－２５ＥＰ－１）で冷却して、サンプルの温度が５０℃になったところで取り出し、バリ取りを行った後、直径：１４ｍｍ×厚さ：３．０ｍｍの円盤状の成形体（比較例２，３及び４は、縦：３５ｍｍ×横：２５ｍｍ×厚さ：３．０ｍｍの直方体形状の成形体）を得た。成形に使用した、上記成形材料及び上記混合物の水分含有量は、加熱乾燥式水分計で測定したところ、いずれも７～９質量％であった。

[0459] 得られた成形体について、外観についての目視観察、及びブリードアウトに関しての指で触り観測を行い、以下の基準で評価した。結果を表６に示す。成形体の外観を図１２、図１３及び図１４に示す。

[0460] ［外観の評価基準］

Ａ：均一である。

Ｂ：均一であるが濁りがみられる。

Ｃ：不均一である。

[0461] ［ブリードアウトの評価基準］

Ａ：ベタツキがない。

Ｂ：成形直後にベタツキがあるが、ふき取った後はベタツキがない。

Ｃ：ふき取ってもべたつきが残る、又は再度ベタツキが発生する。

[0462] [表6]

	外観	ブリードアウト
実施例１	Ａ	Ａ
実施例２	Ａ	－
実施例３	Ａ	－
比較例２	Ｂ	Ａ
比較例３	Ｃ	Ａ
比較例４	Ｂ	Ｃ

[0463] 表６中、「－」は、測定を実施していないことを意味する。表６、図１２、図１３、図１４に示される結果から確認されるように、第一のセグメントと、第二のセグメントとが直接結合していることによって、実施例１～３では相分離等が確認されなかった。一方、改変フィブロインと、柔軟性の高分

子との混合物である比較例１～４では、相分離及び／又はブリードアウトが発生することが確認された。

[0464]（実施例４）

実施例１で調製した合成高分子、及び上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：１００００）を含むフィルムを成形した。具体的には、容器にジメチルスルホキシド４．４ｇ測り取り、ここに上記人工フィブロイン０．１５ｇを測り取り、窒素下で１２０℃の条件下で１５分間撹拌し上記人工フィブロインを溶解させた。上記人工フィブロイン０．１５を更に加え、窒素下で１２０℃の条件下で３０分間撹拌し上記人工フィブロインが合計０．３０ｇ溶解した溶液を調製した。上記溶液中に、上記合成高分子０．１５ｇを測り取り、窒素下で９０℃の条件下で１５分間撹拌し上記合成高分子を溶解させた。上記合成高分子０．１５ｇを更に加え、窒素下で９０℃の条件下で３０分間撹拌させることで、上記人工フィブロイン及び上記合成高分子がそれぞれ０．３０ｇずつ溶解したドープ液を調製した。ドープ液中において、合成高分子：人工フィブロイン：ジメチルスルホキシドが、６質量％：６質量％：８８質量％となるように混合比を調整した。

[0465] 上記ドープ液を８０℃の下、３０分間静置することで脱泡させた。コーター（株式会社井元製作所製）を用いて、脱泡後のドープ液からフィルムを成形した。まず、離型部材としてＰＥＴフィルム（１５０ｍｍ×２００ｍｍ）をコーター上に設置し、アプリケーター厚さ０．５ｍｍ、塗工スピード２０ｍ／分間の条件で、４０℃の温度条件下でドープ液の液膜を上記ＰＥＴフィルム状に設けた。その後、ドープ液の液膜をＰＥＴフィルムごと、送風オーブン内に静置し、１００℃の条件下で１５分間乾燥させ、更に真空オーブンに移し、８０℃の条件下で１５時間かけて真空乾燥させ、絶乾させることで、合成高分子及び人工フィブロインからなるフィルム状の成形体（フィルム）を調製した。

[0466] 調製されたフィルムは無色透明であり、柔軟性があることが確認された。

当該フィルムは曲げ応力を加えた場合であっても割れが発生しないことが確認された。

[0467]（実施例５）

上述のようにして調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００：第一のセグメント）２３００ｍｇと、数平均分子量２０，０００のポリエチレングリコールビスマレイミド、（Ｂｉｏｃｈｅｍｐｅｇ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ．製、ＨＯ０２２０２２－２０Ｋ：第二のセグメント）９００ｍｇをナスフラスコ内で１１５ｍＬの溶媒（ＤＭＳＯ、キシダ化学株式会社製）に溶解させた後、トリエチルアミン（ナカライテスク株式会社製）１２μＬを加え、８０℃で１７時間撹拌しながら反応を行なった。酢酸エチル（関東化学株式会社製）３００ｍＬ、さらにヘキサン（関東化学株式会社製）３００ｍＬを加え、２時間静置して生成物を沈殿させた。さらに遠心（１，０００ｇ×１０分）を行い、上清を除去した。未反応のポリエチレングリコールビスマレイミドを除去するため、酢酸エチルを再度添加、遠心、上清除去を３回繰り返した。更に、減圧乾燥を行う事により生成物を得た。調製された合成高分子は、人工フィブロイン（第一のセグメントに相当）の分子鎖末端に、ポリエチレングリコール鎖を有するＮ置換マレイミド（第二のセグメントに相当）が結合したブロックが複数繰り返された構造を有する。すなわち、当該合成高分子は、第二のセグメント、第一のセグメント、及び第二のセグメントの順に３つのセグメントが結合した分子となっている。

[0468] 上述のとおり調製した合成高分子を含むフィルムを成形した。具体的には、容器にジメチルスルホキシド４．５５ｇ測り取り、ここに上記合成高分子０．４５ｇを加え、窒素下で９０℃の条件下で３０分間撹拌させることで、上記合成高分子が溶解したドープ液を調製した。撹拌速度は１００ｒｐｍに設定した。ドープ液中において、合成高分子：ジメチルスルホキシドが、９質量％：９１質量％となるように混合比を調整した。

[0469] 上記ドープ液を用いて、実施例４と同様にしてフィルム状の成形体（フィ

ルム）を調製した。調製されたフィルムは無色透明であり、実施例４のフィルムよりもより柔軟性に優れることが確認された。当該フィルムは曲げ応力を加えた場合であっても割れが発生しないことが確認された。

[0470]（実施例６）

上述のようにして調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００：第一のセグメント）１４２４ｍｇと、数平均分子量２０，０００のメトキシポリエチレングリコールマレイミド、（Ｂｉｏｃｈｅｍｐｅｇ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ．製、ＭＦ００１０２２－２０Ｋ：第二のセグメント）１０７６ｍｇをナスフラスコ内で７１ｍＬの溶媒（ＤＭＳＯ、キシダ化学株式会社製）に溶解させた後、トリエチルアミン（ナカライテスク株式会社製）７．５μＬを加え、８０℃で１７時間撹拌しながら反応を行なった。酢酸エチル（関東化学株式会社製）２１０ｍＬ、さらにヘキサン（関東化学株式会社製）２１０ｍＬを加え、１７時間静置して生成物を沈殿させた。さらに遠心（１，０００ｇ×１０分）を行い、上清を除去した。未反応のメトキシポリエチレングリコールマレイミドを除去するため、酢酸エチルを再度添加、遠心、上清除去を３回繰り返した。更に減圧乾燥を行う事によって合成高分子を得た。調製された合成高分子は、人工フィブロイン（第一のセグメントに相当）の分子鎖の両末端に、ポリエチレングリコール鎖を有するＮ置換マレイミド（第二のセグメントに相当）が結合した構造を有する。すなわち、当該合成高分子は、第二のセグメント、第一のセグメント、及び第二のセグメントの順に３つのセグメントが結合した分子となっている。

[0471] 上述のとおり調製した合成高分子を含むフィルムを成形した。具体的には、容器にジメチルスルホキシド４．３０ｇ測り取り、ここに上記合成高分子０．７０ｇを加え、窒素下で９０℃の条件下で３０分間撹拌させることで、上記合成高分子が溶解したドープ液を調製した。撹拌速度は１００ｒｐｍに設定した。ドープ液中において、合成高分子：ジメチルスルホキシドが、１４質量％：８６質量％となるように混合比を調整した。

[0472] 上記ドープ液を用いて、実施例４と同様にしてフィルム状の成形体（フィルム）を調製した。調製されたフィルムは無色透明であり、実施例４のフィルムよりもより柔軟性に優れることが確認された。当該フィルムは曲げ応力を加えた場合であっても割れが発生しないことが確認された。

[0473]（実施例７）

両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール（バイオケムペグ社製、数平均分子量：２００００）と、システイン残基を２つ有する人工フィブロインとを反応させ、合成高分子を調製した。具体的には、上述のように調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００）４．０２２ｇと、両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール１．５６４ｇと、溶媒としてジメチルスルホキシド２０１ｍＬとをナスフラスコに測り取り、８０℃で４８時間撹拌し溶解及び反応させ、合成高分子の溶液を得た。得られた溶液に、酢酸エチル６０３ｍＬ、及びヘキサン６０３ｍＬを加えて２時間攪拌し、遠心分離を行った後、さらに酢酸エチルで３回洗浄した。その後、エバポレーターで乾燥させて、最後に室温で真空乾燥させて合成高分子の粉末を得た。

[0474]（実施例８）

両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール（バイオケムペグ社製、数平均分子量：２００００）と、システイン残基を２つ有する人工フィブロインとを、反応させ、合成高分子を調製した。具体的には、上述のように調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００）３４８ｍｇをステンレス容器に測り取り、溶媒としてジメチルスルホキシド２．１１ｍＬを加え、撹拌し溶解させてフィブロイン溶液を得た。両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール１３２ｍｇをガラス容器に測り取り、溶媒としてジメチルスルホキシド１．０９ｍＬを加え、撹拌し溶解させてポリエチレングリコール溶液を得た。得られたフィブロイン溶液とポリエチレングリコール溶液とを撹拌しながら混合し、１００℃で５分間撹拌しながら反応させた後、更に１

００℃で１０分間静置させ反応させることによって合成高分子を調製した。実施例８では、ジメチルスルホキシドに合成高分子が溶解したままの状態で、乾燥させることなく、後述するフィルム成形に供した。

[0475] （実施例９）

両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール（バイオケムペグ社製、数平均分子量：２００００）と、システイン残基を２つ有する人工フィブロインと、システイン残基を４つ有する人工フィブロインとを反応させ、合成高分子を調製した。具体的には、上述のように調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００、システイン残基の総数２）３３６ｍｇと、配列番号６３で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１８）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５３１００、システイン残基の総数４）４４ｍｇと、両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール１６０ｍｇとをガラス容器に測り取り、溶媒としてジメチルスルホキシド４．４２ｍＬを加え、撹拌しながら上述の成分を溶解させることで反応溶液を得た。得られた反応溶液を１００℃で１０分間撹拌しながら反応させた後、更に１００℃で５分間静置させ反応させることによって、合成高分子を調製した。実施例９では、ジメチルスルホキシドに合成高分子が溶解したままの状態で、乾燥させることなく、後述するフィルム成形に供した。

[0476] （実施例１０）

両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール（バイオケムペグ社製、数平均分子量：２００００）と、チオール基を２つ有する２、２’－（エチレンジオキシ）ジエタンチオール、システイン残基を２つ有する人工フィブロインとを反応させ、合成高分子を調製した。具体的には、上述のように調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００）３００ｍｇと、両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール２８４ｍｇとをガラス容器に測り取り、溶媒としてジメチルスルホキシド３．４２ｍＬを加え、撹拌し各成分

を溶解させることで反応溶液を得た。得られた反応溶液を１００℃で１５分間撹拌し反応させた後、２、２’－（エチレンジオキシ）ジエタンチオール１．５５ｍｇを更に加え、１００℃で１０分間撹拌させ反応させることによって、合成高分子を調製した。実施例１０では、ジメチルスルホキシドに合成高分子が溶解したままの状態で、乾燥させることなく、後述するフィルム成形に供した。

[0477]（実施例１１）

両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール（バイオケムペグ社製、数平均分子量：１０００）と、両末端にシステイン残基を有する（即ち、両末端にチオール基を有する）ポリエチレングリコール（バイオケムペグ社製、数平均分子量：２０００）と、システイン残基を２つ有する人工フィブロインとを反応させ、合成高分子を調製した。具体的には、上述のように調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００）３７８ｍｇと、両末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコールを７９ｍｇと、両末端にシステイン残基を有するポリエチレングリコール１４３ｍｇとをバイアル瓶に測り取り、溶媒としてジメチルスルホキシド４．４０ｍＬを加え、撹拌し溶解させることで反応溶液を得た。反応溶液を１００℃で１０分間撹拌しながら反応させたのち、更に１００℃で１０分間静置させ反応させることによって合成高分子を調製した。実施例１１では、ジメチルスルホキシドに合成高分子が溶解したままの状態で、乾燥させることなく、後述するフィルム成形に供した。

[0478]（比較例５）

実施例７～１１で調製された合成高分子との比較のために、上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する人工フィブロイン（分子量：１００００）を用い、類似の操作を加えた。具体的には、上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する人工フィブロイン（分子量：１００００）の粉

末６５０ｍｇをステンレス容器に測り取り、溶媒としてジメチルスルホキシド３．９５５ｍＬを加え、撹拌し分散液を得た。得られた分散液を１２０℃で、３０分間撹拌し溶解した後、更に１００℃で１０分間静置させた。比較例５では、ジメチルスルホキシドに人工フィブロインが溶解したままの状態で、乾燥させることなく、後述するフィルム成形に供した。

[0479] ＜成形体の評価＞

実施例７～１１で調製された合成高分子を用いて、以下の条件でフィルム状の成形体を作製した。実施例７で調製された合成高分子については、まず合成高分子の粉末５３０ｍｇをジメチルスルホキシド３．５３ｍＬに加え、９０℃で４０分間攪拌させることによって、上記粉末を溶解させてドープ溶液を調製し、次いで８０℃で３０分間静置し、脱泡させたものをフィルム成形に供した。実施例８～１１で調製された合成高分子は、ジメチルスルホキシドに溶解させたまま、乾燥させることなく、ドープ溶液としてフィルム成形に供した。比較例５の人工フィブロインも同様にジメチルスルホキシドに溶解したまま、乾燥させることなくドープ溶液としてフィルム成形に供した。

[0480] まず、離型部材としてＰＥＴフィルム（１５０ｍｍ×２００ｍｍ）を用意し、アプリケーターで厚さ０．４ｍｍとなるようにドープ溶液の液膜を、上記ＰＥＴフィルム上に設けた。その後、上記液膜をＰＥＴフィルムごと、送風オーブン内に静置し、６０℃の条件下で３０分間乾燥させ、更に真空オーブンに移し、８０℃の条件下で１５時間かけて真空乾燥させ、絶乾させることによって合成高分子又は人工フィブロインからなるフィルム状の成形体（フィルム）を調製した。

[0481] 調製された各フィルムに対して引張試験を行うことで、弾性率、引張強度、破断伸度、及びタフネスを評価した。結果を表７に示す。表７には絶乾状態におけるフィルムの膜厚も併記した。表７に示す破断伸度は、比較例５で得られた結果を基準とする相対値で記した。

[0482]

[表7]

	膜厚［μm］	弾性率	破断伸度	タフネス
実施例７	26	73	1292	639
実施例８	27	76	5400	2927
実施例９	22	63	8520	3120
実施例10	28	24	22332	7190
実施例11	59	38	436	217
比較例５	49	100	100	100

[0483] 表７に示されるとおり、実施例７～１１で得られたフィルムは、比較例５で得られたフィルムと比べて、破断伸度が極めて大きく、且つ弾性率が低く抑制されていることがわかる。このことからも、実施例７～１１で得られたフィルムは柔軟性に十分に優れることが確認できる。くわえて、実施例７～１１で得られたフィルムはタフネスも十分に優れたものとなっている。

[0484] 実施例７及び実施例８の結果から、一旦粉体として合成高分子を単離し再度溶解させてからフィルムを調製するよりも反応後の溶液から直接フィルムを成形することによって弾性率、破断伸度及びタフネスに優れるフィルムを調製できることが確認できた。実施例８、実施例１０及び実施例１１の結果から、第二のセグメントを構成する柔軟さを調製することによって、得られるフィルムの柔軟性を調製することができ、第二のセグメントを長くすることによって、その傾向が顕著となることが確認された。

[0485]（実施例１２）

上述のようにして調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する人工フィブロイン（数平均分子量：５００００：第一のセグメント）２１７７ｍｇと、数平均分子量２００００のポリエチレングリコールビスマレイミド、（Ｂｉｏｃｈｅｍｐｅｇ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．製、ＨＯ０２２０２２－２０Ｋ：第二のセグメント）８２３ｍｇを塩化リチウムの濃度が２Ｍのジメチルスルホキシド溶液（ＤＭＳＯ、キシダ化学株式会社製）１２０００ｍｇに溶解させた後、窒素下で、１００℃で４時間撹拌しながら反応させることで、上記合成高分子が溶解したドープ液を調製

した。撹拌速度は１００ｒｐｍに設定した。ドープ液中において、合成高分子：ジメチルスルホキシドが、２０質量％：８０質量％となるように混合比を調整した。得られたドープの１００℃における粘度は、１０９００ｍＰａ・ｓであった。調製されたドープ液中の合成高分子は、人工フィブロイン（第一のセグメントに相当）の分子鎖末端に、ポリエチレングリコール鎖を有するＮ置換マレイミド（第二のセグメントに相当）が結合したブロックが複数繰り返された構造を有する。

[0486] 上記ドープ液を用いて、以下に示す条件で乾湿式紡糸することによって、繊維を調製した。１００℃のドープ液をノズル（ノズル直径：０．１ｍｍ）からギアポンプによって窒素ガスと共に押出しし、第一凝固浴（第１浴）、第二凝固浴（第２浴）、及び延伸浴（第３浴）を通過させた後、６０℃に設定した加熱式ローラーによって巻き取った。延伸浴での延伸倍率は８．５倍に設定した。第１浴は０℃のメタノール浴とし、第２浴は２５℃のメタノール浴とし、第３浴は５４℃の水浴とした。得られた繊維は十分な伸張性を有することを確認した。得られた繊維の外観を図１５に示す。

[0487] ＜参考例１：構造タンパク質の疎水性評価（溶解性）＞

改変フィブロイン（人工フィブロイン）、シルクフィブロイン（平均ハイドロパシー・インデックスの値：０．２１）について、９Ｍ臭化リチウム水溶液への溶解性を評価した。シルクフィブロインとしては、ＫＢセーレン社製の「シルクパウダーＩＭ」を用い、改変フィブロインとしては、上述のようにして調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：５００００）、及び上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：１００００）を用いた。溶解性の評価は、具体的には、９Ｍ臭化リチウム水溶液にそれぞれシルクフィブロイン、改変フィブロインを所定量添加し、６０℃で３０分間撹拌した後の水溶液の外観を観察することによって、溶解性を評価した。結果を表７に示す。表７中、「Ａ」は添加したフィブロインが完全に溶解し、設定した濃度の溶液を調

製できたことを示し、「Ｂ」はフィブロインの解け残りが観察されたことを示す。すなわち、改変フィブロインは６０℃の９Ｍ臭化リチウム水溶液に対しても５質量％相当の量も溶解させることができない、疎水性の高いフィブロインであることが確認された。

[0488] [表8]

		フィブロイン濃度の設定値[質量%]								
		1	5	20	30	31	32	33	34	35
シルクフィブロイン		－	A	A	A	B	B	B	B	B
人工フィブロイン	PRT17	B	B	－	B	－	－	－	－	－
	PRT27	－	B	－	B	－	－	－	－	－

[0489] ＜参考例２：構造タンパク質の疎水性評価（耐熱水性）＞

改変フィブロイン（人工フィブロイン）、シルクフィブロインについて、熱水耐性試験を行い、耐熱水性を評価した。シルクフィブロインとしては、ＫＢセーレン社製の「シルクパウダーＩＭ」を用い、改変フィブロインとしては、上述のようにして調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：５００００）を用いた。フィブロインの含有量が５質量％となるように、ガラス容器にフィブロイン５０ｍｇ、溶媒としてＲＯ水を９５０ｍｇ加えて分散液を調製した。当該分散液を１００℃で５時間撹拌した。５時間が経過したところで、遠心分離によって溶媒を除去した。溶媒を除去後アセトンで２回洗浄し、遠心分離によってアセトンを除去した。洗浄操作後、減圧乾燥を行うことによって処理粉末を得た。処理粉末に対するＧＰＣ測定によって、分解の程度を確認した。ＧＰＣの結果を図１６に示す。図１６から明らかなように、シルクフィブロインは処理前に比べて分子量の減少が確認され、改変フィブロインにはそのような分子量の減少が確認されなかった。この結果から、上記の改変フィブロインはＲＯ水に対する親水性がシルクフィブロインよりも低かったためと推定される。換言すれば、上記改変フィブロインは疎水性が高いといえる。図１６中、配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：５００００）の結果をＰＲＴ１００と

記す。

[0490] ＜参考例３：構造タンパク質の疎水性評価（接触角）＞

改変フィブロイン（人工フィブロイン）、シルクフィブロインについて、水に対する接触角の測定及び評価を行った。シルクフィブロインとしては、ＫＢセーレン社製の「シルクパウダーＩＭ」を用い、改変フィブロインとしては、上述のようにして調製した配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：５００００）、及び上述のようにして調製した配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロイン（数平均分子量：１００００）を用いた。接触角の測定は、具体的にはまず、フィブロインの含有量が３質量％となるように、ガラス容器にフィブロイン３０ｍｇ、溶媒としてジメチルスルホキシド９７０ｍｇを加え、分散液を調製した。当該分散液を１００℃で１５分間撹拌してジメチルスルホキシド溶液を調製した。次に、スライドガラス上に、厚さ１００μｍのマスキングテープを貼り付けシムにして、上述のようにして調製したジメチルスルホキシド溶液をキャストし液膜を形成した。その後、スライドガラスごと、真空オーブン（東京理科危機社製、製品名：ＶＯＳ－２１０Ｃ）内に移動、静置し、８０℃で減圧乾燥を行うことでフィブロインのフィルム（膜）を形成した。当該フィルムに対して、２μＬのＲＯ水を滴下し、５秒間経過後の水の接触角を、接触角計（共和界面科学社製、製品名：ＤＭｓ－０６１）を用いて測定した。測定は各フィブロインに対して、６サンプルで行い、その平均値を評価に用いた。結果を表８及び図１７に示す。表８に示すとおり、シルクフィブロインに比べて改変フィブロインは水の接触角が大きく、疎水性が高いことが確認された。図１７中、シルクフィブロインの結果を左に示し、配列番号６２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ１７）を有する改変フィブロインの結果を右に示し、配列番号７２で示されるアミノ酸配列（ＰＲＴ２７）を有する改変フィブロインの結果を中央に示す。

[0491]

[表9]

		水の接触角[°] （平均値）
シルクフィブロイン		54.9
人工フィブロイン	PRT17	70.0
	PRT27	72.4

[0492] ＜参考例４：ポリペプチド誘導体の構造評価＞

下記２種類のキャストフィルム（ポリペプチド誘導体フィルム、改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルム）を作製した。２種類のキャストフィルムの光学顕微鏡１００倍観察結果と、走査型電子顕微鏡１０００倍観察結果をそれぞれ図１８及び図１９に示す。

[0493] 図１８（ａ）及び図１８（ｂ）はそれぞれポリペプチド誘導体フィルム及び改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルムを１００倍に拡大して示す光学顕微鏡写真である。図１９（ａ）及び図１９（ｂ）はそれぞれポリペプチド誘導体フィルム及び改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルムを１０００倍に拡大して示す走査型電子顕微鏡写真である。

[0494] ポリペプチド誘導体とその原料である改変フィブロイン（ＰＲＴ１７、数平均分子量５００００）のＧＰＣチャートを図２０に示す。

[0495] 図１８～２０より、ポリペプチド誘導体フィルムは顕微鏡観察では明確な相分離構造は確認されず、フィブロインとＰＥＧが化学的に結合した結果、分子量の増加が見られたことが確認された。

[0496] （ポリペプチド誘導体フィルムの作製）

下記ａ），ｂ）をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）０．９２ｇ（０．８４ｍＬ）に投入後、窒素置換して１００℃、３００ｒｐｍで攪拌（１５分）し、その後、室温で１０分静置した。これにより、ＤＭＳＯ中でポリペプチド誘導体を合成して、ポリペプチド誘導体溶液（ポリペプチド誘導体濃度：８ｗｔ％）を調製した。

ａ）改変フィブロイン（ＰＲＴ１７、数平均分子量５００００）：５８ｍｇ

ｂ）ｍａｌ－ＰＥＧ－ｍａｌ（数平均分子量２００００）：２２ｍｇ（バイ

オケムペグ社　ＨＯ０２２０２２－２０Ｋ）

ステンレス板に張り付けた離型紙上に、ポリペプチド誘導体溶液を垂らした後、ドクターブレードでならして、幅８０ｍｍ、厚さ４００μｍでキャストした。その後、キャストしたポリペプチド誘導体溶液を６０℃の送風オーブンで３０分乾燥した後、８０℃で１５時間、真空乾燥した。これにより、ポリペプチド誘導体フィルムを作製した。

[0497] （改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルムの作製）

下記ａ），ｂ）をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）０．９２ｇ（０．８４ｍＬ）に投入して混合溶液を調整する他は、上記のポリペプチド誘導体フィルムと同じ方法で改変フィブロイン＋ＰＥＧ混合体フィルムを作製した。

ａ）改変フィブロイン（ＰＲＴ２７、数平均分子量１００００）：５８ｍｇ

ｂ）ＰＥＧ（数平均分子量２００００）：２２ｍｇ（和光純薬工業株式会社）

産業上の利用可能性

[0498] 本開示によれば、柔軟性に優れる多孔質体を提供できる。本開示によれば、第一のセグメントに対して導入する第二のセグメントの選択によって、ポリペプチド誘導体の物性及び機能を調整することが可能である。ひいては、上記ポリペプチド誘導体を用いて調製される多孔質体の物性及び機能を調整し得る。

符号の説明

[0499] ２…金型、４…上側ピン、６…下側ピン、８ａ…サンプル、８ｂ…成形体、１０…加圧成形機。

請求の範囲

[請求項1] ポリペプチド誘導体を含み、

前記ポリペプチド誘導体が、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、

前記第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有するブロック共重合体を含み、

前記ポリペプチド骨格が、組換えポリペプチド骨格であり、

前記第二のセグメントが前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体。

[請求項2] ポリペプチド誘導体を含み、

前記ポリペプチド誘導体が、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、

前記第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有するブロック共重合体を含み、

前記ポリペプチド骨格が、疎水性ポリペプチド骨格であり、

前記第二のセグメントが前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体。

[請求項3] 前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団の分子量が、前記ポリペプチド骨格の分子量を１００としたときに、１０以上である、請求項１又は２に記載の多孔質体。

[請求項4] 前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団の分子量が、前記ポリペプチド骨格の分子量を１００としたときに、１００以下である、請求項３に記載の多孔質体。

[請求項5] 前記第二のセグメントの合計の分子量が、前記第一のセグメントの分子量１００を基準として、１０以上である、請求項１又は２に記載の多孔質体。

[請求項6] 前記第二のセグメントの合計の分子量が、前記第一のセグメントの分子量１００を基準として、２０００以下である、請求項５に記載の

多孔質体。

[請求項7] 前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団が、ポリエーテル、ポリエステル、又はポリカーボネートである、請求項１～６のいずれか一項に記載の多孔質体。

[請求項8] 前記ポリエーテルが、ポリエチレングリコールである、請求項７に記載の多孔質体。

[請求項9] 前記ポリペプチド骨格が疎水性組換えポリペプチド骨格である、請求項１～８のいずれか一項に記載の多孔質体。

[請求項10] 前記ポリペプチド骨格の平均ハイドロパシー・インデックスが０．２２以上である、請求項１～９のいずれか一項に記載の多孔質体。

[請求項11] 前記ポリペプチド骨格が組換えタンパク質に由来する骨格を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の多孔質体。

[請求項12] 前記組換えタンパク質が組換え構造タンパク質を含む、請求項１１に記載の多孔質体。

[請求項13] 前記組換え構造タンパク質が改変フィブロインを含む、請求項１２に記載の多孔質体。

[請求項14] 前記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインを含む、請求項１３に記載の多孔質体。

[請求項15] 前記第一のセグメントが前記ポリペプチド骨格中のチオール基、アミノ基及びヒドロキシ基からなる群より選択される少なくとも１種の官能基によって前記第二のセグメントと結合している、請求項１～１４のいずれか一項に記載の多孔質体。

[請求項16] ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物をゲル化させる工程Ａと、

ゲル化した前記混合物から前記溶媒を離脱させることにより、前記ポリペプチド誘導体を含む多孔質体を得る工程Ｂと、を含み、

前記ポリペプチド誘導体が、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、

前記第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有するブロック共重合体を含み、

前記ポリペプチド骨格が、組換えポリペプチド骨格であり、

前記第二のセグメントが前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体を製造する方法。

[請求項17] ポリペプチド誘導体及び溶媒を含む混合物をゲル化させる工程Ａと、

ゲル化した前記混合物から前記溶媒を離脱させることにより、前記ポリペプチド誘導体を含む多孔質体を得る工程Ｂと、を含み、

前記ポリペプチド誘導体が、ポリペプチド骨格を含む第一のセグメントと、

前記第一のセグメントに結合する一又は複数の第二のセグメントと、を有するブロック共重合体を含み、

前記ポリペプチド骨格が、疎水性ポリペプチド骨格であり、

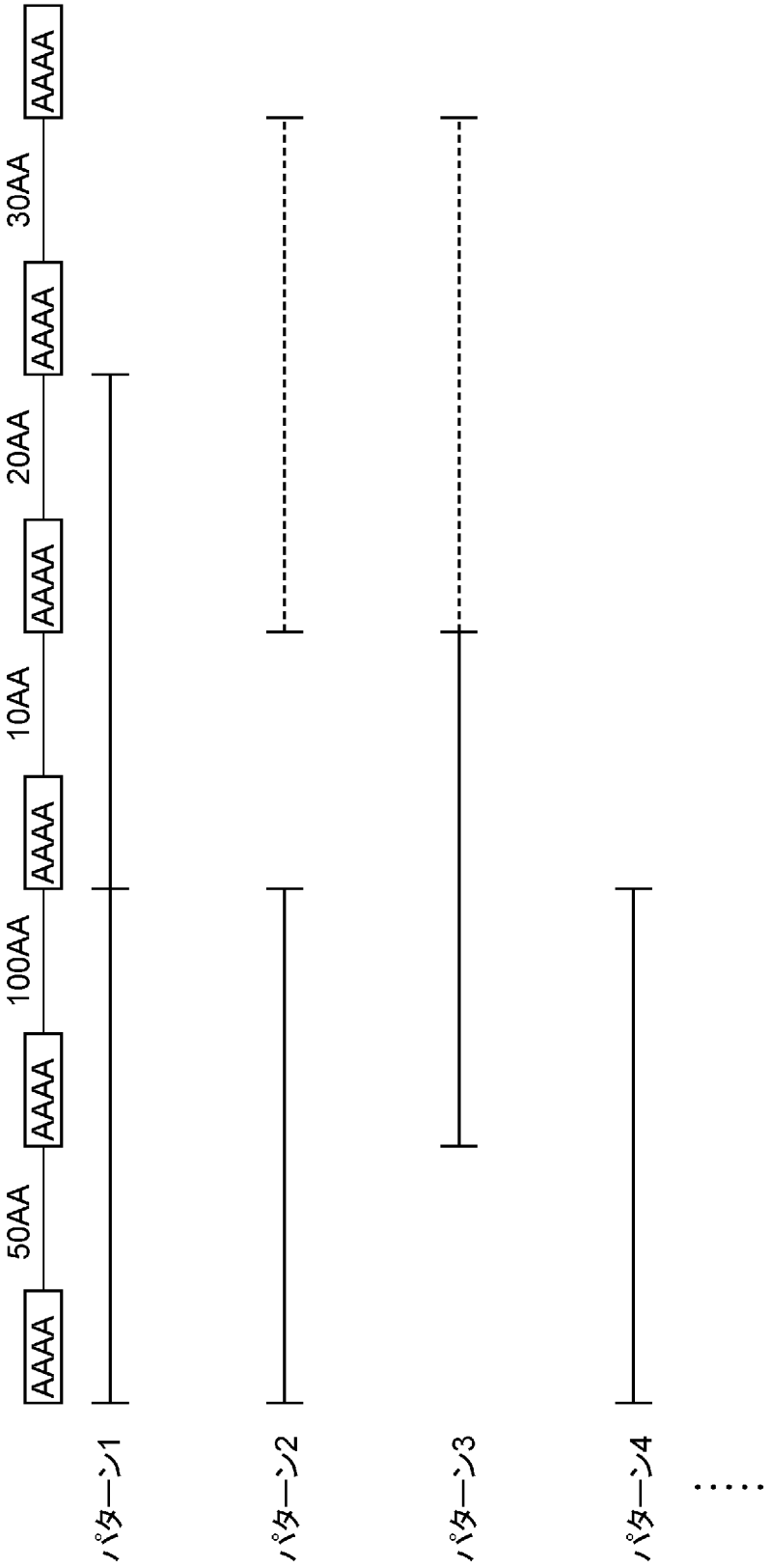
前記第二のセグメントが前記ポリペプチド骨格に対する可塑化機能を有する分子団を含む、多孔質体を製造する方法。

[請求項18] 前記工程Ｂにおいて、ゲル化した前記混合物を凍結乾燥させることにより、ゲル化した前記混合物から前記溶媒を離脱させる、請求項１６又は１７に記載の多孔質体を製造する方法。

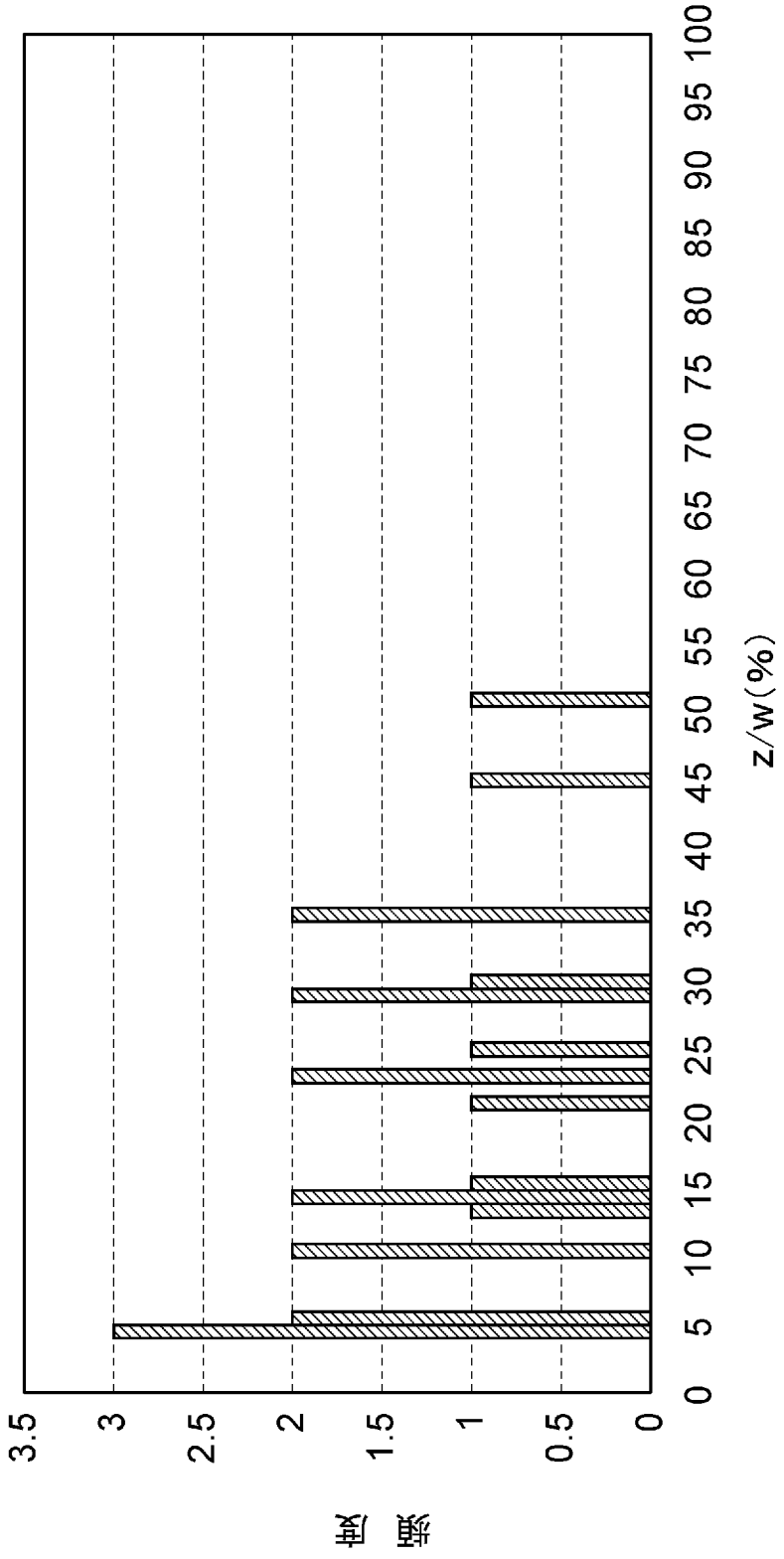
[請求項19] 前記溶媒が有機溶媒であり、

前記工程Ｂにおいて、凍結乾燥させる前にゲル化した前記混合物中の前記溶媒を水に置換することを含む、請求項１８に記載の多孔質体を製造する方法。

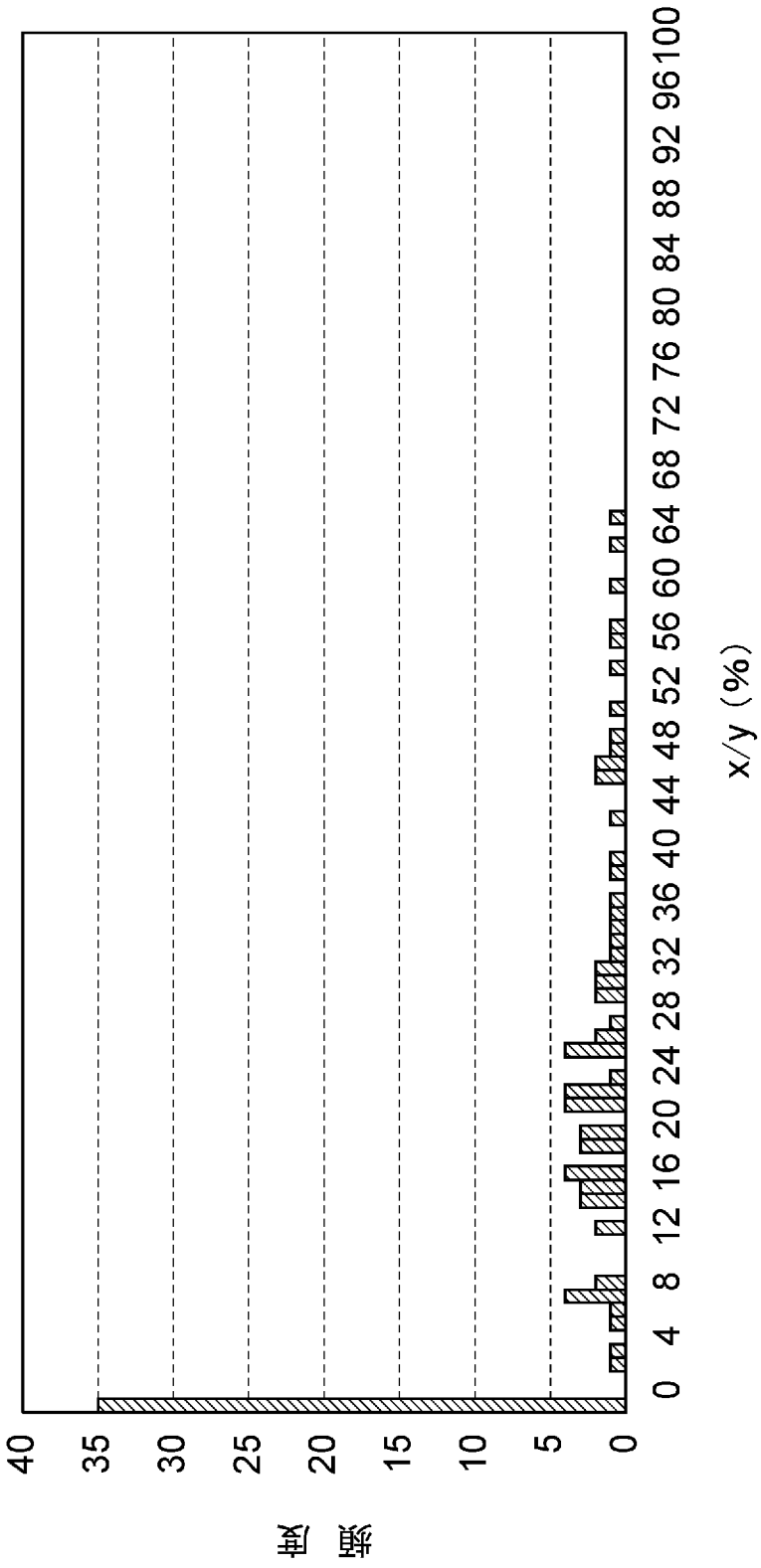
[図1]


AAAA
50AA
AAAA
100AA
AAAA
10AA
AAAA
20AA
AAAA
30AA
AAAA
パターン1
パターン2
パターン3
パターン4
・・・・

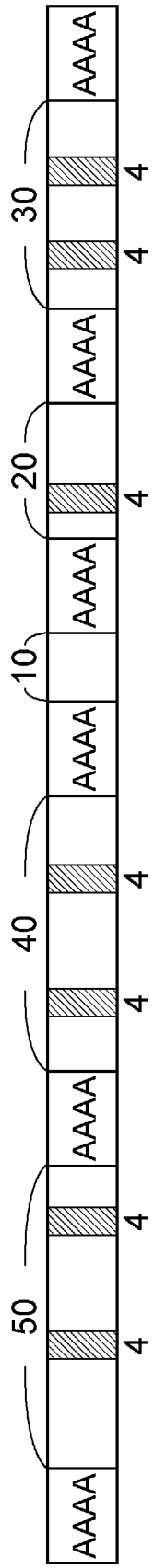
[図2]


頻度
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
z/w(%)

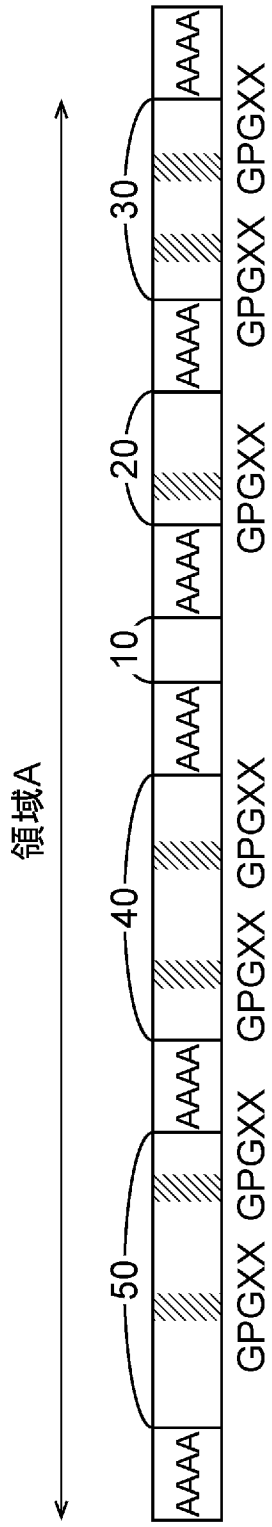
[図3]


頻度
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72 76 80 84 88 92 96 100
x/y（%）

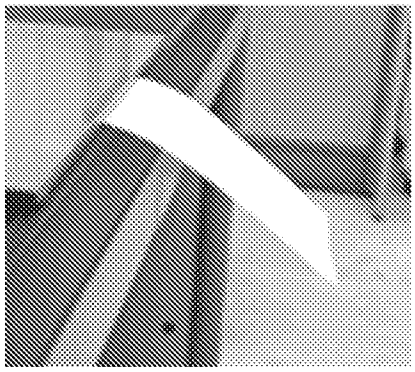
[図4]



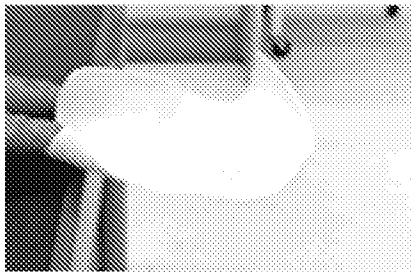
[図5]


領域A
AAAA
GPGXX
AAAA
GPGXX
AAAA
GPGXX
AAAA
GPGXX
AAAA
10
20
30
40
50

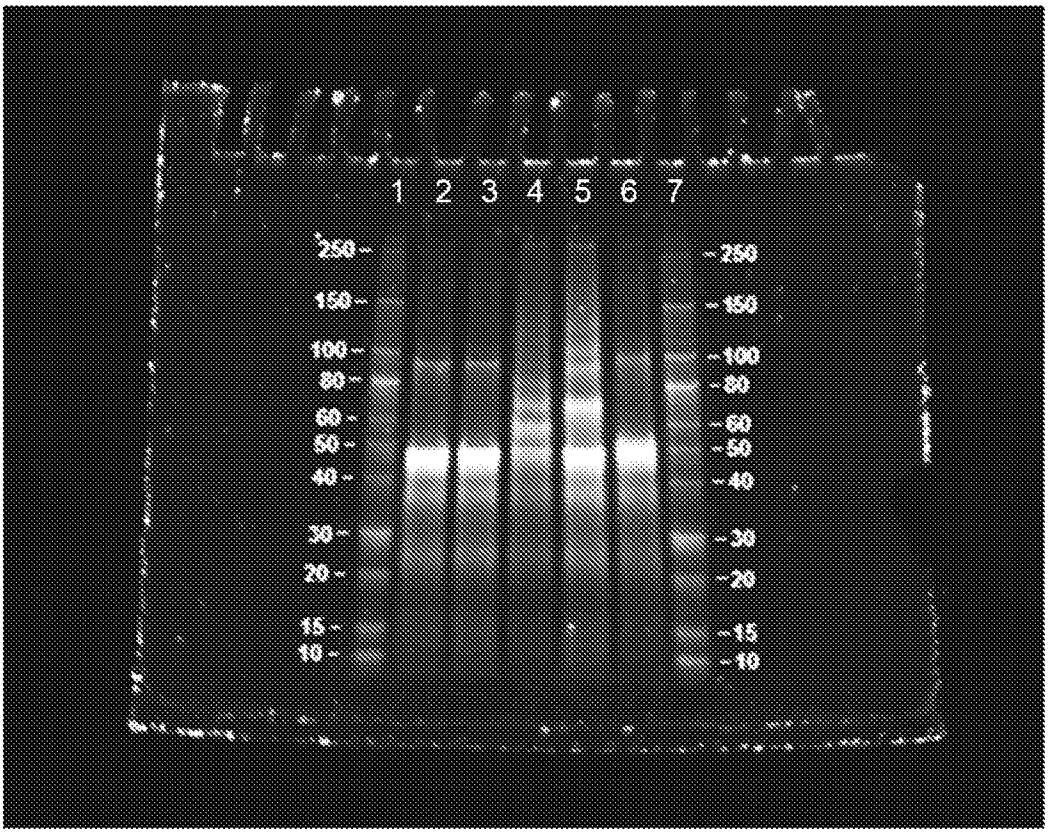
[図6]



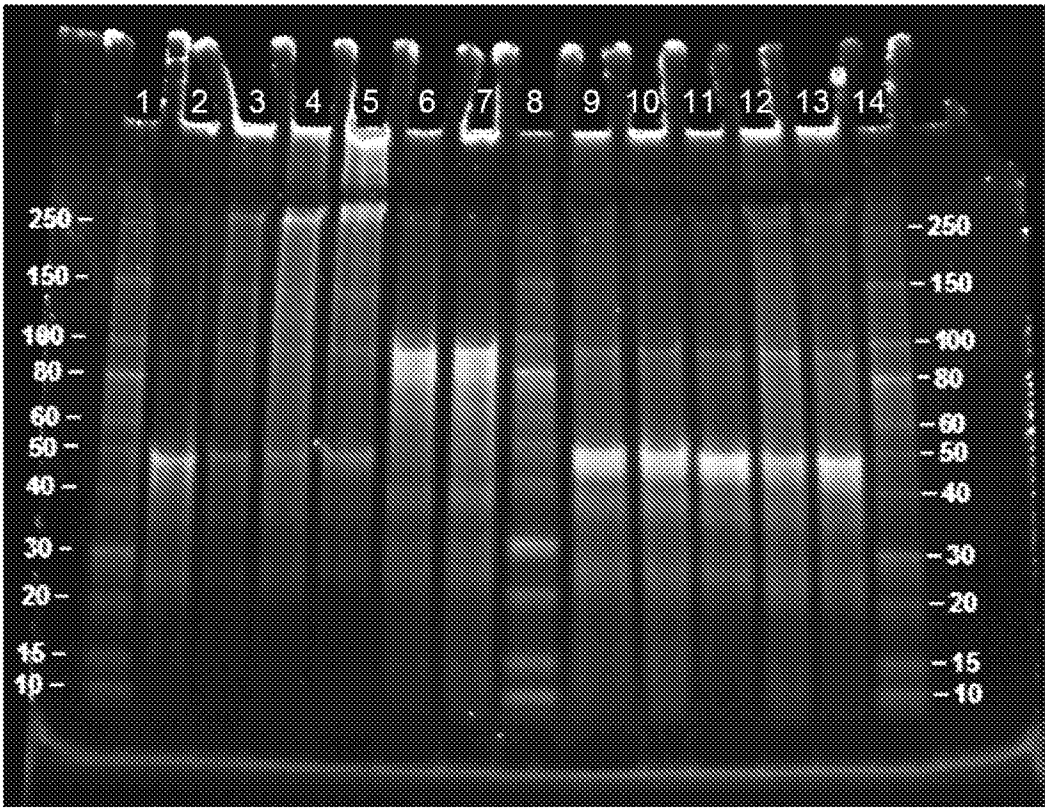
[図7]



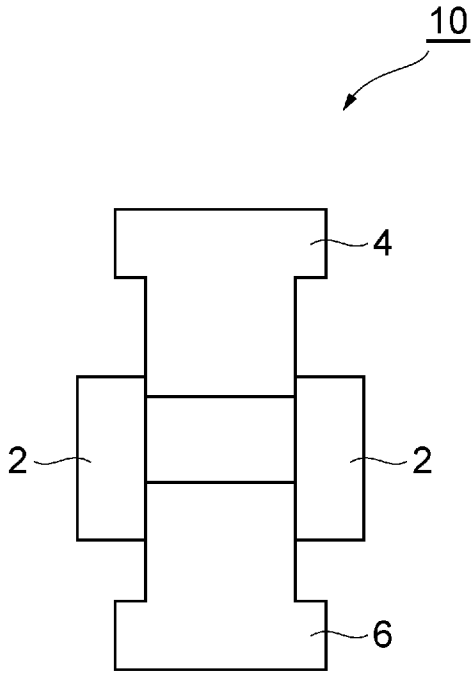
[図8]



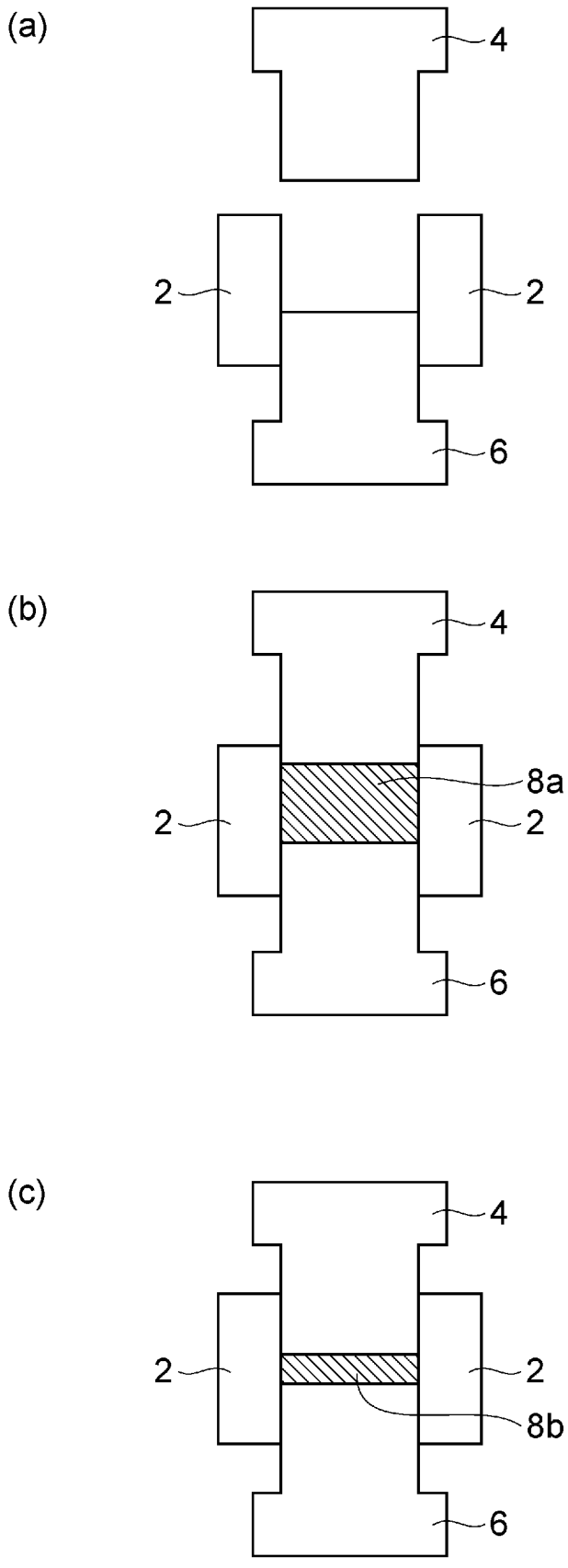
[図9]



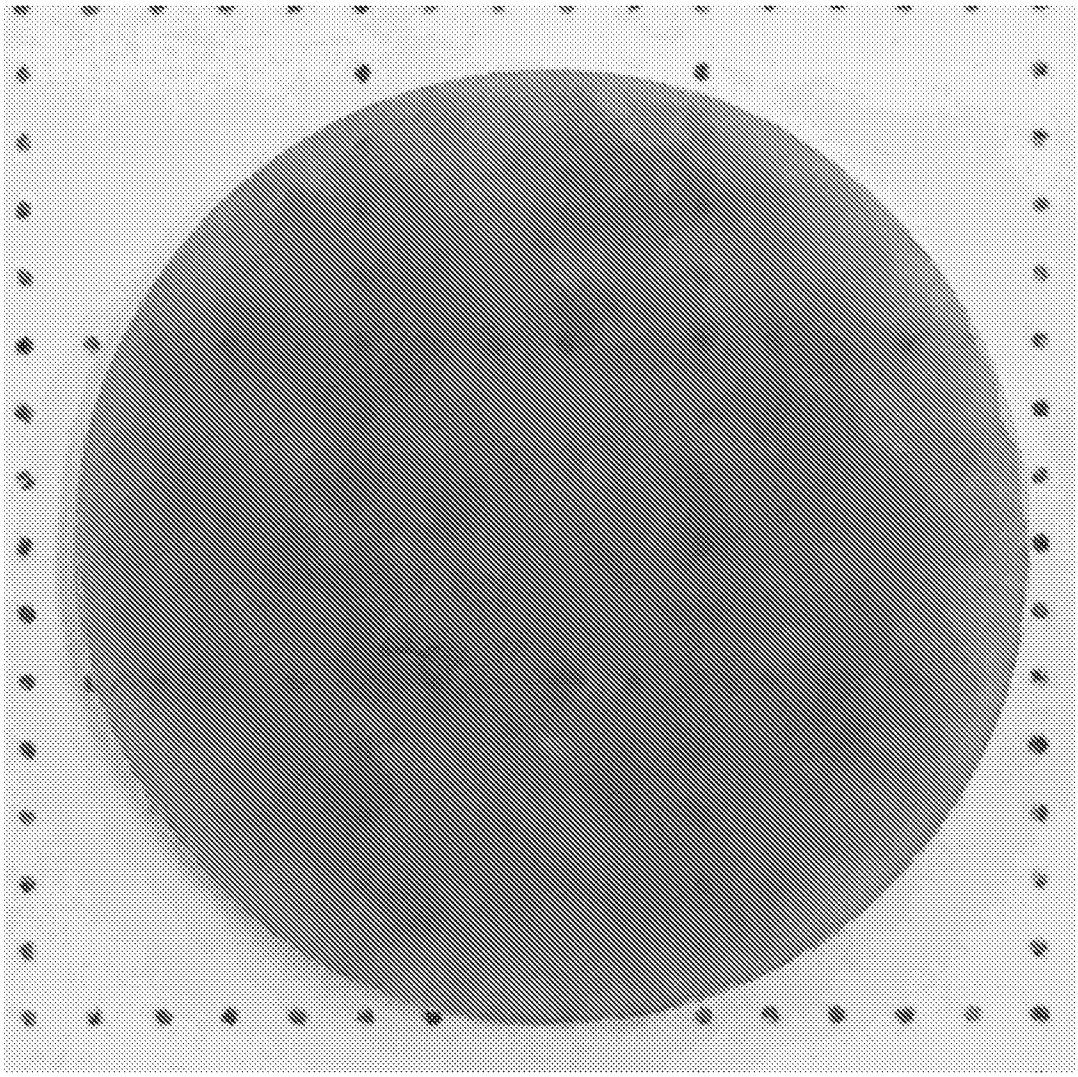
[図10]



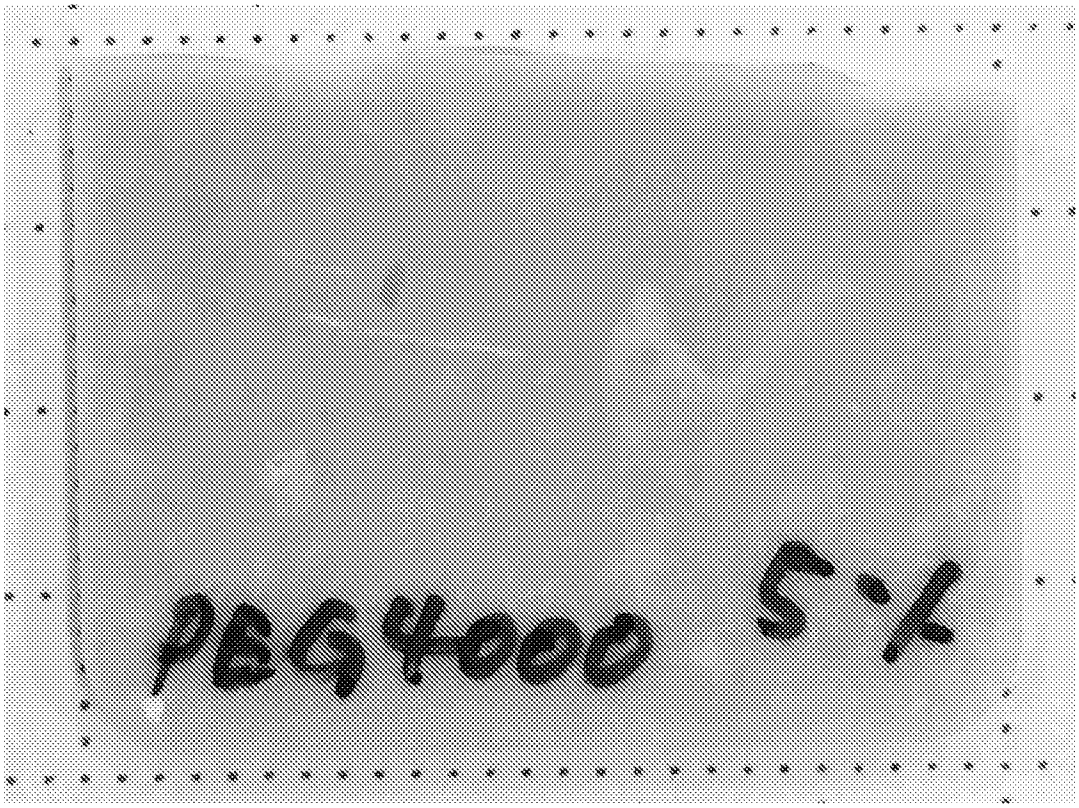
[図11]



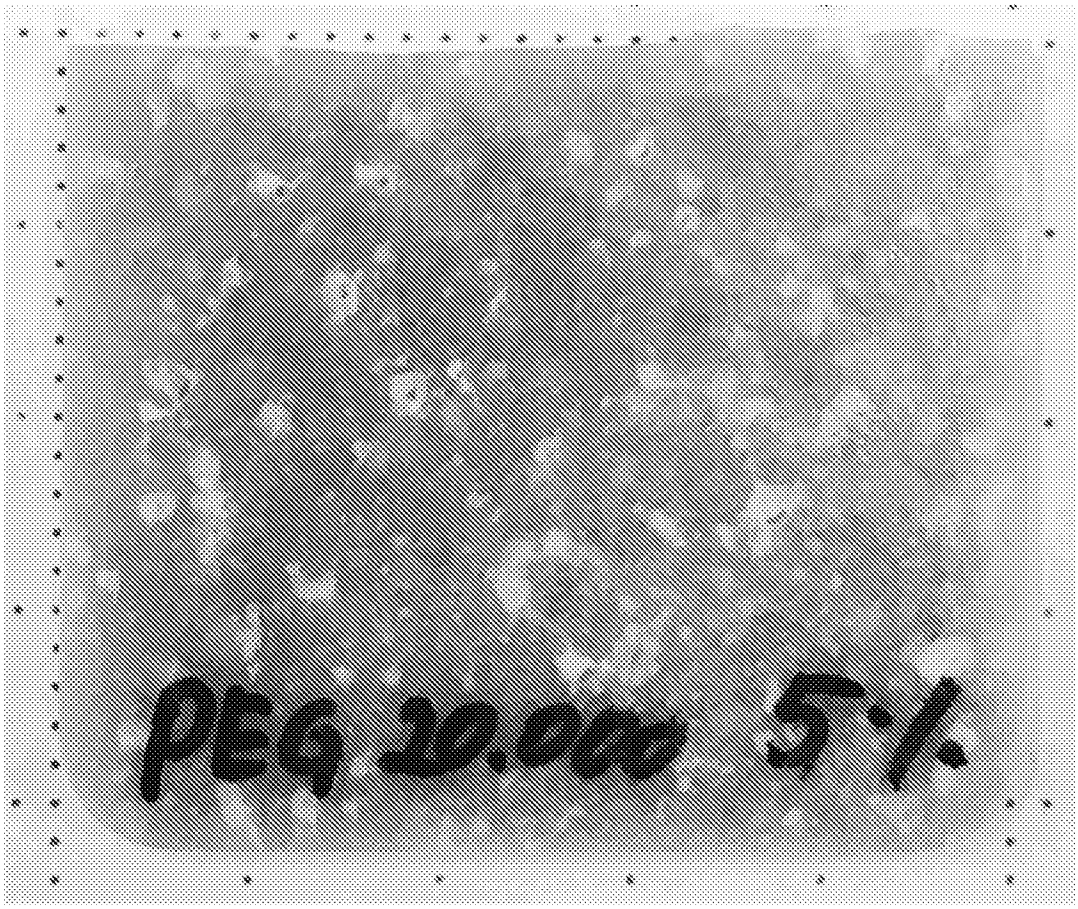
[図12]



[図13]

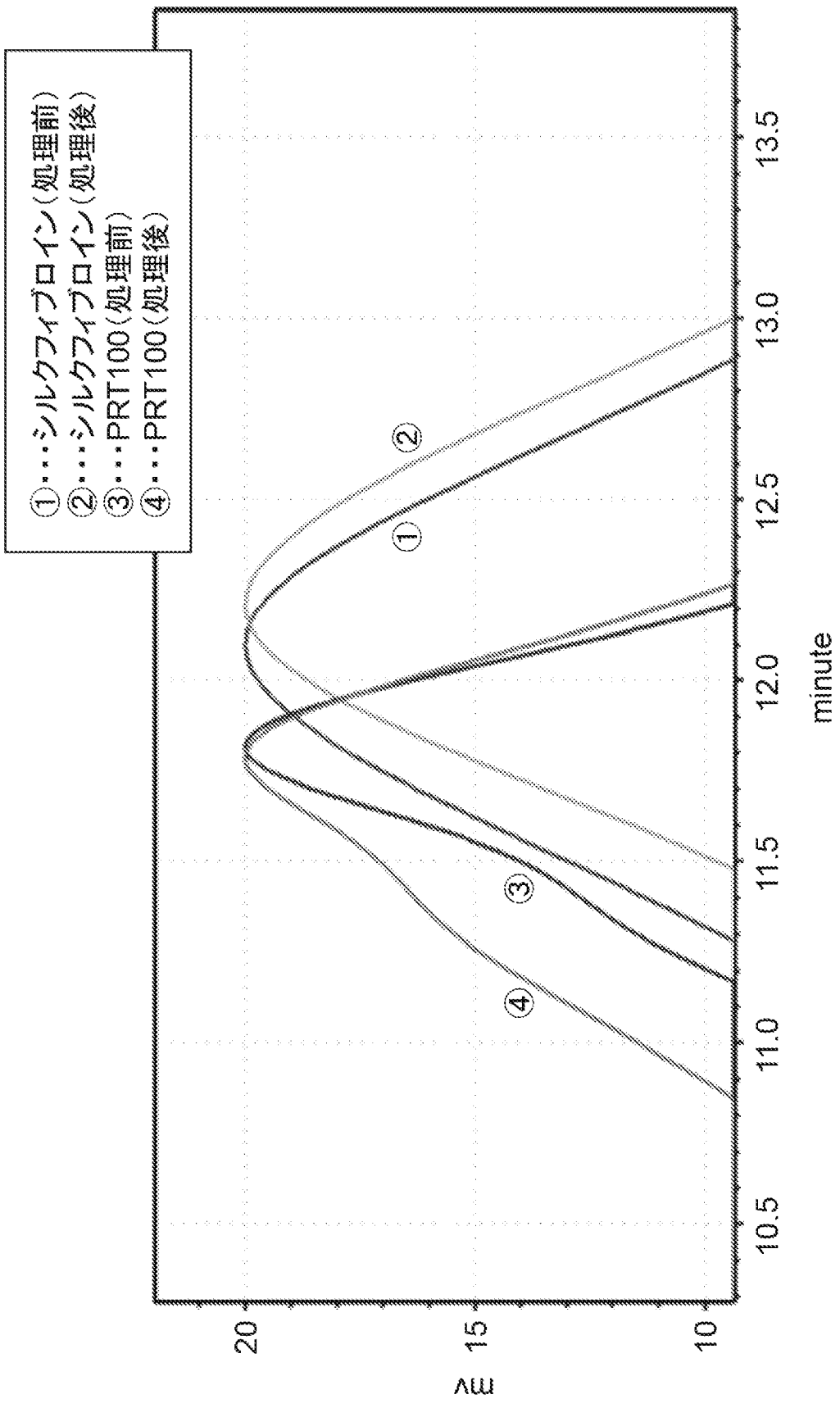


[図14]

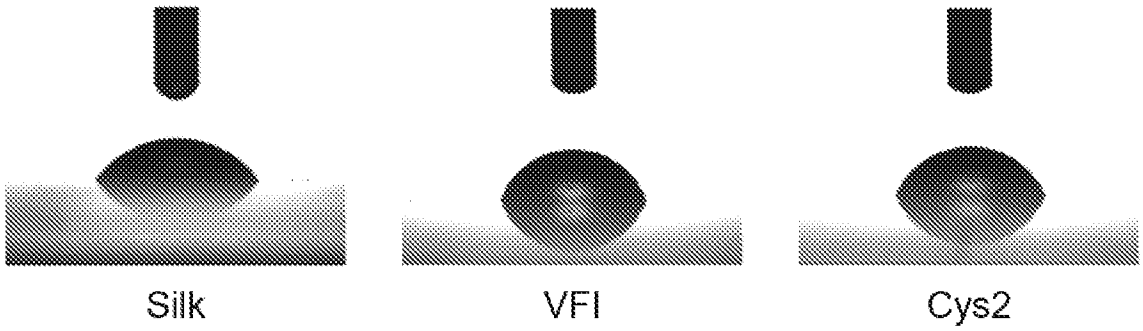


[図15]

[図16]

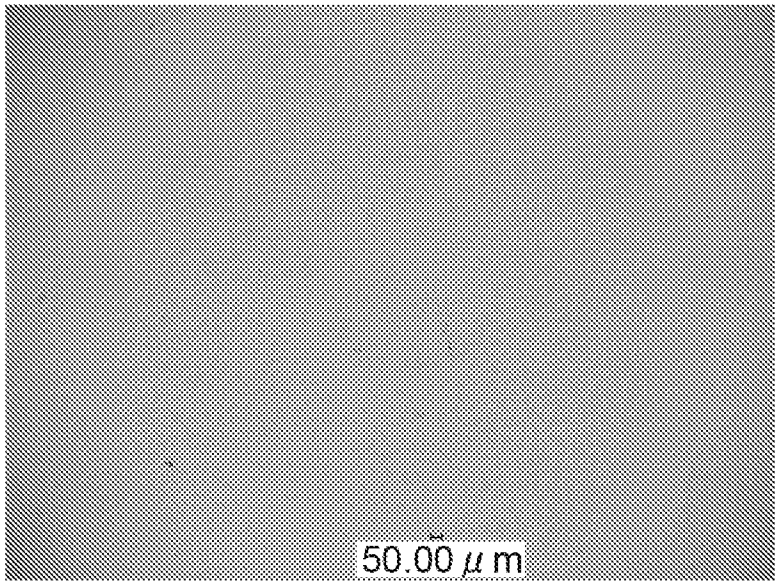

①・・・シルクフィブロイン（処理前）
②・・・シルクフィブロイン（処理後）
③・・・PRT100（処理前）
④・・・PRT100（処理後）
mV
20
15
10
minute
10.5
11.0
11.5
12.0
12.5
13.0
13.5
①
②
③
④

[図17]

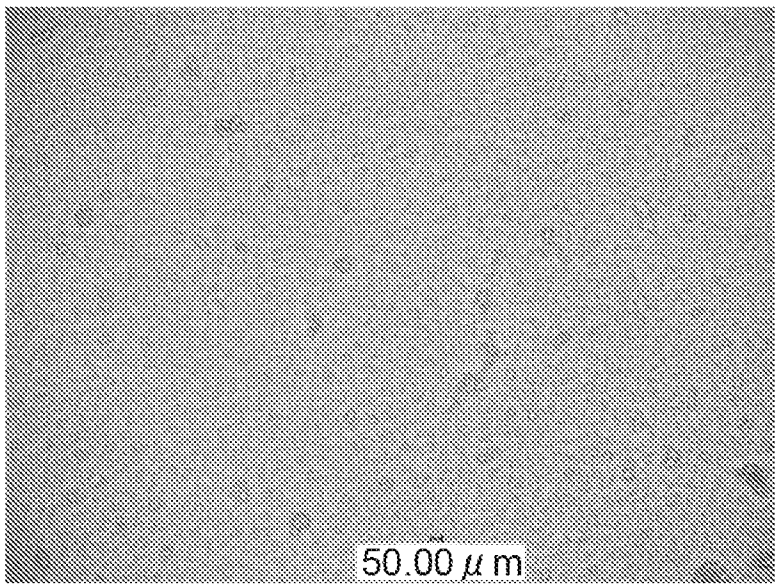


[図18]

(a)

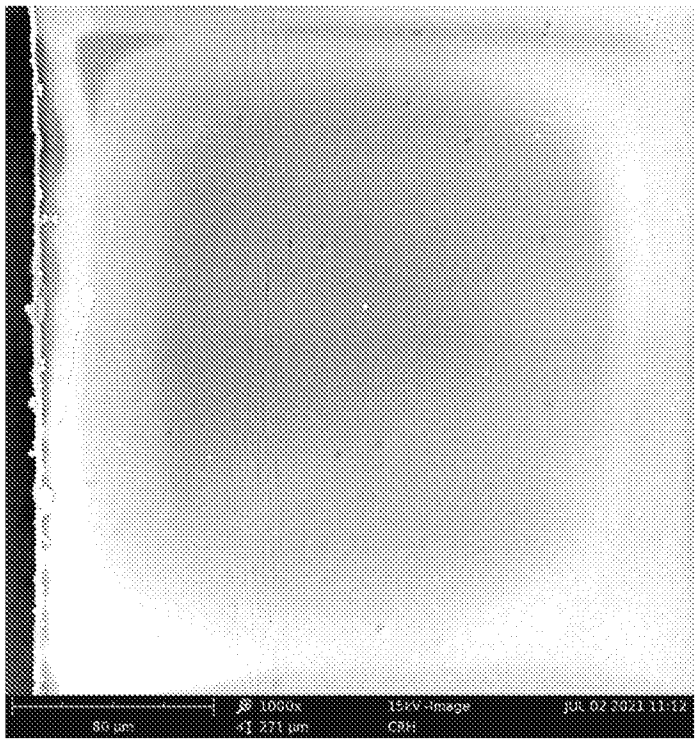


(b)

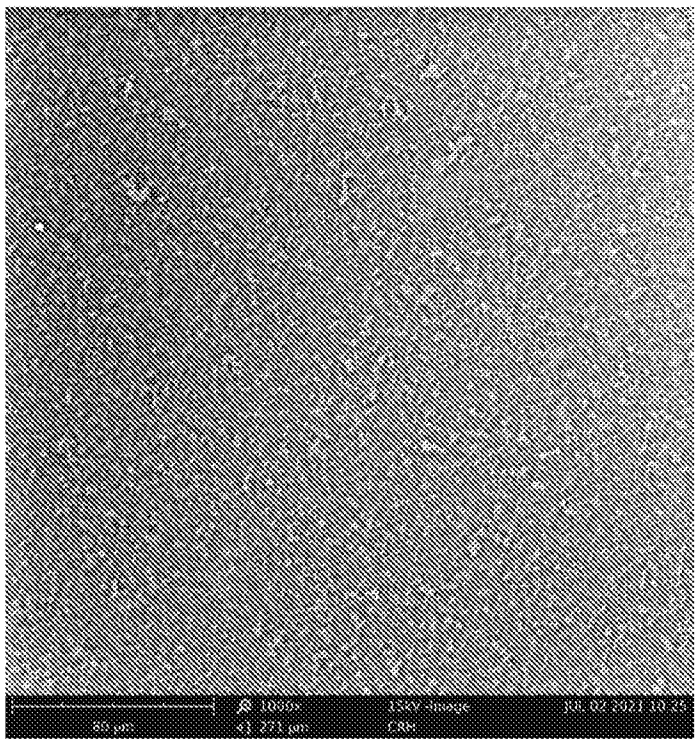


[図19]

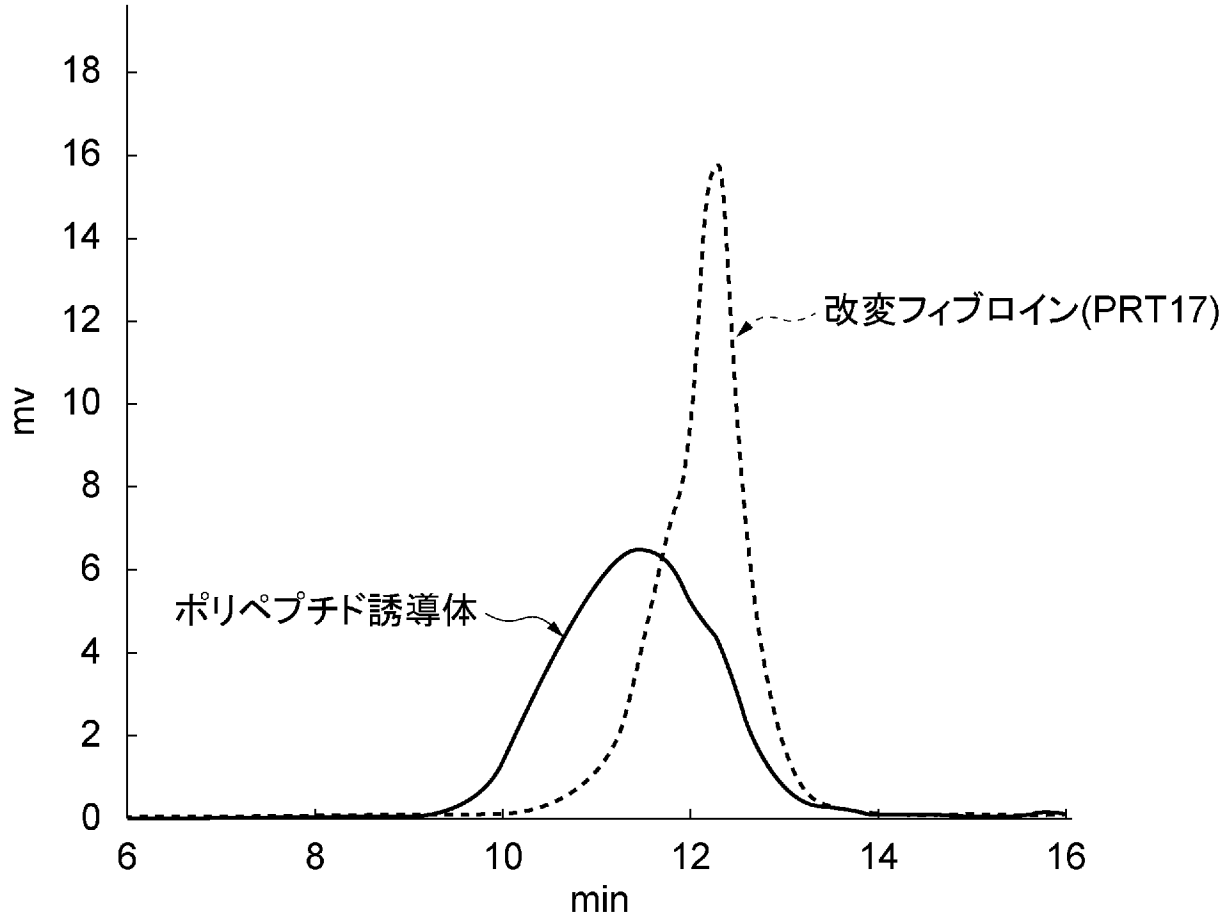
(a)


80 µm
1000x
271 µm
15kV Image
CRH
JUL 02 2021 11:12

(b)


80 µm
1000x
271 µm
15kV Image
CRH
JUL 02 2021 10:25

[図20]


18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
mv
6
8
10
12
14
16
min
改変フィブロイン(PRT17)
ポリペプチド誘導体

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/029659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435(2006.01)i; ***C08J 9/28***(2006.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i
FI: C07K14/435; C08J9/28; C12N15/12 ZNA

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; C08J9/28; C12N15/12

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/198264 A1 (ENCODIA, INC.) 01 October 2020 (2020-10-01) claims 127-129, paragraphs [0039], [0056], [0249]	1-7, 9-12, 15
Y	WO 2014/175178 A1 (SPIBER INC.) 30 October 2014 (2014-10-30) claims 5, 6, 8, paragraphs [0019], [0022], [0031]	1-19
Y	JP 2006-275769 A (SUMITOMO BAKELITE CO LTD) 12 October 2006 (2006-10-12) claims 1, 7, paragraph [0015]	1-19
Y	JP 2014-064572 A (AGENCY FOR SCIENCE TECHNOLOGY & RESEARCH) 17 April 2014 (2014-04-17) claims 1-4	1-19
Y	JP 2019-187440 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 31 October 2019 (2019-10-31) claim 5	1-19
Y	WO 2017/188430 A1 (SPIBER INC.) 02 November 2017 (2017-11-02) claims 1, 6, paragraphs [0002], [0013]	1-19

☐ 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
"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	Date of mailing of the international search report
30 August 2022	**20 September 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/029659

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/029659

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/198264 A1	01 October 2020	JP 2022-526939 A claims 127-129, paragraphs [0036], [0053], [0235]	
WO 2014/175178 A1	30 October 2014	US 2015/0361144 A1 claims 5, 6, 8, paragraphs [0023], [0026]	
JP 2006-275769 A	12 October 2006	(Family: none)	
JP 2014-064572 A	17 April 2014	US 2011/0053783 A1 claims 1-4	
JP 2019-187440 A	31 October 2019	US 2016/0008483 A1 claim 5	
WO 2017/188430 A1	02 November 2017	US 2019/0135881 A1 claims 1, 6, paragraphs [0002], [0017]	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/029659

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 14/435(2006.01)i; C08J 9/28(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i
FI: C07K14/435; C08J9/28; C12N15/12 ZNA

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））

C07K14/435; C08J9/28; C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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	WO 2020/198264 A1 (ENCODIA, INC.) 01.10.2020 (2020-10-01) 請求項１２７－１２９、［００３９］、［００５６］、［０２４９］	1-7,9-12,15
Y	WO 2014/175178 A1 (スパイバー株式会社) 30.10.2014 (2014-10-30) 請求項５、６、８、［００１９］、［００２２］、［００３１］	1-19
Y	JP 2006-275769 A (住友ベークライト株式会社) 12.10.2006 (2006-10-12) 請求項１、７、［００１５］	1-19
Y	JP 2014-064572 A (エイジェンシー・フォー・サイエンス，テクノロジー・アンド・リサーチ) 17.04.2014 (2014-04-17) 請求項１－４	1-19
Y	JP 2019-187440 A (ハンミ ファーム．カンパニー リミテッド) 31.10.2019 (2019-10-31) 請求項５	1-19
Y	WO 2017/188430 A1 (Ｓｐｉｂｅｒ株式会社) 02.11.2017 (2017-11-02) 請求項１、６、［０００２］、［００１３］	1-19

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“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
“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	国際調査報告の発送日
30.08.2022	20.09.2022

名称及びあて先
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

権限のある職員（特許庁審査官）
長谷川　強 4B 1783

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/029659

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「 ST.26形式」と読み替える。

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/JP2022/029659

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/198264 A1	01.10.2020	JP 2022-526939 A 請求項１２７－１２９、［００３６］、［００５３］、［０２３５］	
WO 2014/175178 A1	30.10.2014	US 2015/0361144 A1 請求項５、６、８、［００２３］、［００２６］	
JP 2006-275769 A	12.10.2006	（ファミリーなし）	
JP 2014-064572 A	17.04.2014	US 2011/0053783 A1 請求項１－４	
JP 2019-187440 A	31.10.2019	US 2016/0008483 A1 請求項５	
WO 2017/188430 A1	02.11.2017	US 2019/0135881 A1 請求項１、６、［０００２］、［００１７］	