

(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
2019年8月8日(08.08.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/151430 A1

(51) 国際特許分類:

D02G 3/02 (2006.01) D04B 1/04 (2006.01)
D01F 4/02 (2006.01) D04B 21/00 (2006.01)
D03D 15/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/003465

(22) 国際出願日: 2019年1月31日(31.01.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2018-015670 2018年1月31日(31.01.2018) JP

(71) 出願人: 株式会社島精機製作所(SHIMA SEIKI MFG., LTD.) [JP/JP]; 〒6418511 和歌山県和歌山市坂田85番地 Wakayama (JP). 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: 鳥越昌三(TORIGOE Shozo); 〒6418511 和歌山県和歌山市坂田85番地 株式会社島精機製作所内 Wakayama (JP). 下田誠治(SHIMODA

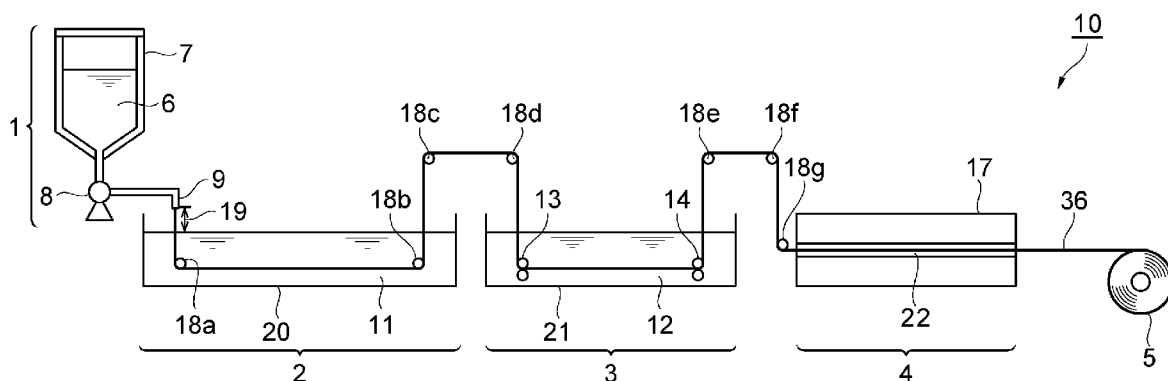
Seiji); 〒6418511 和歌山県和歌山市坂田85番地 株式会社島精機製作所内 Wakayama (JP). 尾関明彦(OZEKI Akihiko); 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 Spiber株式会社内 Yamagata (JP).

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

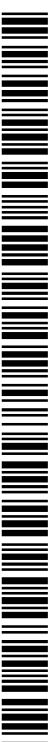
(54) Title: PROTEIN FIBER YARN, WOVEN BODY, METHOD FOR MANUFACTURING PROTEIN FIBER YARN, AND METHOD FOR MANUFACTURING WOVEN BODY

(54) 発明の名称: タンパク質繊維糸及び編織体、並びに、タンパク質繊維糸の製造方法及び編織体の製造方法



(57) Abstract: A protein fiber yarn, which is a single yarn that is one of a twist yarn containing modified fibroin fibers, a false twist yarn containing modified fibroin fibers, and a spun yarn containing modified fibroin fibers, wherein the moisture content thereof is reduced after being twisted.

(57) 要約: タンパク質繊維糸は、改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸であって、加撚が施された後に水分率を低下させられたものである。



WO 2019/151430 A1

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

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

明 細 書

発明の名称：

タンパク質繊維糸及び編織体、並びに、タンパク質繊維糸の製造方法及び編織体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、撚り加工履歴を有するタンパク質繊維糸及び編織体、並びに、タンパク質繊維糸の製造方法及び編織体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 良く知られているように、紡績糸、撚糸、及び仮撚糸等の、撚り加工の履歴を有する糸を単糸使いで編成すると、往々にして斜行が発生する。これは、撚りに起因する残留トルクが糸に生ずるためと考えられる。そのため、例えば、紡績糸を編成する際には、一般に下撚りをかけた単糸同士に、その下撚りとは逆の撚りをかけて双糸とし、下撚りに起因する残留トルクを低減している。この双糸を用いることで斜行の解消が図られている。ところが、双糸を得るには目標の糸番手の半分の細い番手の糸を準備する必要があり、細番手の糸の製造には手間がかかる。しかも、細番手の糸を得るのに必要な低織度の繊維は、その製造に高度な技術が必要となり、コストも嵩む。

[0003] 一方、織地を製造する場合も、一般には縦糸と横糸共に単糸が使用される。そのために、織地でも、単糸が有する残留トルクに起因した歪みが発生する場合がある。また、繊維製品の悩みの一つにピリングの発生が挙げられる、ピリングすなわち毛玉は、織物や編物を構成する糸に発生する毛羽が、摩擦によって移動して互いに絡み合うことによってできる。このピリングの発生原因となる糸の毛羽の長さや量等は、糸が有する残留トルクが大きくなると、それに応じた分だけ大きくなる。そして、そのような毛羽の長さや量が、ピリングの発生量等に大きく影響する。ピリングを抑制できる薬剤も知られているが、環境負荷の面から十分であるとは言えない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2006-52493号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、編地での斜行、織地での歪み、及び編地および織地におけるピリングが発生し難い、タンパク質繊維系及びその製造方法を提供すると共に、当該タンパク質繊維系を用いた編織体及びその製造方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の〔1〕～〔9〕に係わるものである。

〔1〕 改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸であって、加撚が施された後に水分率を低下させられた、タンパク質繊維系。

〔2〕 改変フィブロイン繊維を含む上記紡績糸の単糸であって、少なくとも上記改変フィブロイン繊維に加撚を施す加撚工程において第1の湿度環境に曝され、上記加撚工程の後に上記第1の湿度環境よりも低い湿度を有する第2の湿度環境に曝されて水分率を低下させられた、〔1〕に記載のタンパク質繊維系。

〔3〕 上記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインである、〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質繊維系。

〔4〕 〔1〕～〔3〕の何れかに記載のタンパク質繊維系を編成または製織してなる編織体。

〔5〕 改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸を製造するタンパク質繊維系の製造方法であって、改変フィブロイン繊維を含む繊維を撚ることで上記単糸を得る加撚工程と、上記加撚工程の後に実施され、上記単糸の水分率を低下させる水分率低下工程と、を備える、タン

パク質繊維系の製造方法。

[6] 改変フィブロイン繊維を含む紡績糸の単糸を紡績する紡績工程であって、第1の湿度環境下で上記改変フィブロイン繊維に加撚を施す上記加撚工程を含む紡績工程と、上記紡績工程の後に実施され、上記第1の湿度環境よりも低い湿度を有する第2の湿度環境下で上記単糸の水分率を低下させる上記水分率低下工程と、を備える、[5]に記載のタンパク質繊維系の製造方法。

[7] 上記第1の湿度環境下の湿度が60%以上であり、上記第2の湿度環境下の湿度が50%以下であり、上記水分率低下工程で上記単糸の水分率を15%以下（公定水分率換算）に低下させる、[6]に記載のタンパク質繊維系の製造方法。

[8] 上記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインである、[5]～[7]の何れかに記載のタンパク質繊維系の製造方法。

[9] [5]～[8]の何れかに記載のタンパク質繊維系の製造方法で製造された上記単糸を編成または製織する、編織体の製造方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、例えば、タンパク質繊維系のコーンアップ後の水分率が、少なくとも加撚工程を含むコーンアップ前の工程中における水分率よりも低下させられることにより、斜行や歪みの原因となり得る残存トルクを解消させることができる。また繊維中の水分コントロールで最終効果を見出すので、有害な化学物質を使わない。よって環境負荷の観点でも生産性の上でも、本発明は優れている。単糸使いが可能になるため、例えば通常の倍の目標番手で紡績できる。その結果、生産性が向上される。合糸加工が不要である。

[0008] 編織体が編地である場合、単糸使いで斜行が起こらないので、編地を薄くできるメリットがある。よって安価な商品を提供出来る。編織体が織物である場合、単糸使いでも歪みが生じないため、綺麗なシルエットの服を提供できる。さらには、本発明に係るタンパク質繊維系は残留トルクが小さいため

、毛羽が発生し難い。よってピリングの発生が抑制可能である。その結果、柔らかな風合いの糸及び製品が提供できる。

図面の簡単な説明

- [0009] [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3]図3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4]図4は改変クモ糸フィブロイン繊維を製造するための紡糸装置の一例を概略的に示す説明図である。
[図5]図5は実施例1の編地の写真である。
[図6]図6は比較例1の編地の写真である。

発明を実施するための形態

- [0010] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0011] [タンパク質繊維糸及び編織体]

本実施形態に係るタンパク質繊維糸は、改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸であって、加撚が施された後に水分率を低下させられたものである。本明細書においてタンパク質繊維糸とは、撚られた糸からなる紡績糸及び撚糸と、製造過程で撚り加工が施された仮撚糸等を意味する。言い換えれば、タンパク質繊維糸は、残留トルクの発生原因となる撚り加工が施された履歴を有する糸である。本実施形態に係る編織体は、本実施形態に係るタンパク質繊維糸を編成または製織してなるものである。

[0012] [タンパク質繊維糸の製造方法及び編織体の製造方法]

本実施形態に係るタンパク質繊維糸の製造方法は、改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸を製造するタンパク質繊維糸の製造方法であって、改変フィブロイン繊維を含む繊維を撚ることで上記単

糸を得る加撚工程と、上記加撚工程の後に実施され、上記単糸の水分率を低下させる水分率低下工程と、を備える。本実施形態に係る編織体の製造方法は、本実施形態に係るタンパク質繊維糸の製造方法で上記単糸を製造し、製造した上記単糸を編成または製織するものである。

[0013] 本実施形態は、タンパク質繊維糸の紡糸、捲縮、調合、紡績、コーンアップ後の水分変化工程を含むものである。

[0014] <改変フィブロイン>

本実施形態に係る改変フィブロインは、式1： $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。改変フィブロインは、ドメイン配列のN末端側及びC末端側の何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。

[0015] 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、そのドメイン配列が、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列とは異なるフィブロインであってもよく、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。本明細書でいう「天然由来のフィブロイン」もまた、式1： $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。

[0016] 「改変フィブロイン」は、本実施形態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、天然由来のフィブロイン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フィブロインの遺伝子配列を改変することによりアミノ酸配列を改変したもの）

であってもよく、また天然由来のフィブロインに依らず人工的に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。

[0017] 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： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m-(A)_n\text{モチーフ}$ で表されるアミノ酸配列を意味する。ここで、 $(A)_n$ モチーフは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を示し、 n は2～27である。 n は、2～20、4～27、4～20、8～20、10～20、4～16、8～16、又は10～16の整数であってよい。また、 $(A)_n$ 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%以上であればよく、60%以上、70%以上、80%以上、83%以上、85%以上、86%以上、90%以上、95%以上、又は100%（アラニン残基のみで構成されることを意味する。）であってもよい。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てもよい。REPは2～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。REPは、10～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列であってもよい。 m は2～300の整数を示し、10～300の整数であってもよい。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。

[0018] 改変フィブロインは、例えば、クローニングした天然由来のフィブロインの遺伝子配列に対し、例えば、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うことで得ることができる。アミノ酸残基の置換、欠失、挿入及び／又は付加は、部分特異的突然変異誘発法等の当業者に周知の方法により行うことができる。具体的には、Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982)

、Methods in Enzymology, 100, 448 (1983)等の文献に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0019] 天然由来のフィブロインは、式1：[(A)_nモチーフ-REP]_m、又は式2：[(A)_nモチーフ-REP]_m-(A)_nモチーフで表されるドメイン配列を含むタンパク質であり、具体的には、例えば、昆虫又はクモ類が産生するフィブロインが挙げられる。

[0020] 昆虫が産生するフィブロインとしては、例えば、ボンビックス・モリ (*Bombyx mori*)、クワコ (*Bombyx mandarina*)、天蚕 (*Antheraea yamamai*)、柞蚕 (*Antheraea pernyi*)、楓蚕 (*Eriogyna pyretorum*)、蓖蚕 (*Pilosamia Cynthia ricini*)、樗蚕 (*Samia cynthia*)、栗虫 (*Caligula japonica*)、チュッサー蚕 (*Antheraea mylitta*)、ムガ蚕 (*Antheraea assama*)等のカイコが産生する絹タンパク質、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。

[0021] 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)、及びAAA27840.1 (アミノ酸配列))が挙げられる。

[0022] 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 (*Ordgaria*属)に属するクモが挙げられる。

i u s 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 (A r g i o p e 属) に属するクモ、キジロオヒキグモ等のオヒキグモ属 (A r a c h n u r a 属) に属するクモ、ハツリグモ等のハツリグモ属 (A c u s i l a s 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 (C y t o p h o r a 属) に属するクモ、ゲホウグモ等のゲホウグモ属 (P o l t y s 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 (C y c l o s a 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 (C h o r i z o p e s 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 (T e t r a g n a t h a 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 (L e u c a u g e 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 (N e p h i l a 属) に属するクモ、キンヨウグモ等のアズミグモ属 (M e n o s i r a 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 (D y s c h i r i o g n a t h a 属) に属するクモ、クロゴケグモ、セアカゴケグモ、ハ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 (L a t r o d e c t u s 属) に属するクモ、及びユープロステノプス属 (E u p r o s t h e n o p s 属) に属するクモ等のアシナガグモ科 (T e t r a g n a t h i d a e 科) に属するクモが産生するスパイダーシルクタンパク質が挙げられる。スパイダーシルクタンパク質としては、例えば、MaSp (MaSp1及びMaSp2)、ADF (ADF3及びADF4) 等の牽引糸タンパク質、MiSp (MiSp1及びMiSp2) 等が挙げられる。

[0023] クモ類が産生するスパイダーシルクタンパク質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 (a

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

[0024] 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事ができ

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。

- [0025] 改変フィブロインは、改変絹（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）であってもよく、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）であってもよい。それらのうちでも改変クモ糸フィブロインが、好適に用いられる。
- [0026] 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、グリシン残基の含有量が低減された改変フィブロイン、 $(A)_n$ モチーフの含有量が低減された改変フィブロイン、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が挙げられる。
- [0027] 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としては、式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 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。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は、式1中、 n 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。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、20～7

5残基であることが更により好ましい。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は、式1： $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m$ 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。

[0028] 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は、式1： $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m$ 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14～16の何れかに示されるアミノ酸配列又は配列番号14～16の何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。

[0029] 配列番号14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15に示されるアミノ酸配列は、配列番号14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16に示されるアミノ酸配列は、配列番号14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。

[0030] 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のより具体的な例として、(1-i)配列番号17で示されるアミノ酸配列、又は(1-ii)配列番号17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。

[0031] 配列番号17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18) 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17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16で示されるアミノ酸配列と同一である。

[0032] (1-i)の改変フィブロインは、配列番号17で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0033] グリシン残基の含有量が低減された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。当該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ふことができる。

[0034] グリシン残基の含有量が低減された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。

[0035] グリシン残基の含有量が低減された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。

[0036] グリシン残基の含有量が低減された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。

[0037] グリシン残基の含有量が低減された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。グリシン残基の含有量が低減された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。

[0038] 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 $50 \times 3 = 150$ である。また、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。

[0039] グリシン残基の含有量が低減された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。

[0040] グリシン残基の含有量が低減された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、また z/w が50.9%以上になるように置換してもよい。また、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から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。

[0041] 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。

[0042] グリシン残基の含有量が低減された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3、配列番号4、配列番号10若しくは配列番号12で示されるアミノ酸配列、又は(2-ii) 配列番号3、配列番号4、配列番号10若しくは配列番号12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。

[0043] (2-i) の改変フィブロインについて説明する。配列番号3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1で示されるアミノ酸配列のREP中の全てのGGXをGXに置換したものである。配列番号4で示されるアミノ酸配列は、配列番号3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10で示されるアミノ酸配列は、配列番号4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4の分子量とほぼ同じとなるようにN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12で示されるアミノ酸配列は、配列番号9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Hisタグが付加されたものである。

[0044] 配列番号1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3で示されるアミノ酸配列、配列番号4で示されるアミノ酸配列、配列番号10で示されるアミノ酸配列、及び配列番号12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。また、配列番号1、3、4、10及び12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89.3%である。

[0045] (2-i)の改変フィブロインは、配列番号3、配列番号4、配列番号10又は配列番号12で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0046] (2-ii)の改変フィブロインは、配列番号3、配列番号4、配列番号10又は配列番号12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。

[0047] (2-ii)の改変フィブロインは、配列番号3、配列番号4、配列番号10又は配列番号12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。

[0048] 上述の改変フィブロインは、N末端及びC末端の何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。

[0049] 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5で示されるアミノ酸配列（Hi

s 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。

[0050] また、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。

[0051] さらに、抗原抗体反応を利用した「エピトープタグ」を利用することもできる。抗原性を示すペプチド (エピトープ) をタグ配列として付加することにより、当該エピトープに対する抗体を結合させることができる。エピトープタグとして、HA (インフルエンザウイルスのヘマグルチニンのペプチド配列) タグ、mycタグ、FLAGタグ等を挙げることができる。エピトープタグを利用することにより、高い特異性で容易に改変フィブロインを精製することができる。

[0052] さらにタグ配列を特定のプロテアーゼで切り離せるようにしたものも使用することができる。当該タグ配列を介して吸着したタンパク質をプロテアーゼ処理することにより、タグ配列を切り離した改変フィブロインを回収することもできる。

[0053] 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8、配列番号9、配列番号11若しくは配列番号13で示されるアミノ酸配列、又は(2-iv) 配列番号8、配列番号9、配列番号11若しくは配列番号13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。

[0054] 配列番号6、7、8、9、11及び13で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1、2、3、4、10及び12で示されるアミノ酸配列のN末端に配列番号5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。

[0055] (2-iii) の改変フィブロインは、配列番号8、配列番号9、配列番号11又は配列番号13で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0056] (2-iv) の改変フィブロインは、配列番号8、配列番号9、配列番号

11又は配列番号13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: $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。上記配列同一性は、95%以上であることが好ましい。

[0057] (2-iv)の改変フィブロインは、配列番号8、配列番号9、配列番号11又は配列番号13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。

[0058] 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。

[0059] $(A)_n$ モチーフの含有量が低減された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。当該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えることができる。

[0060] $(A)_n$ モチーフの含有量が低減された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。

[0061] $(A)_n$ モチーフの含有量が低減された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。

[0062] $(A)_n$ モチーフの含有量が低減された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。

[0063] (A)_nモチーフの含有量が低減された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。

[0064] (A)_nモチーフの含有量が低減された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。

[0065] 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。

[0066] 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 $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ 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REP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。

[0067] 次に各パターンについて、選択した隣合う2つの $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ 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。

[0068] 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 $1.8 \sim 11.3$ となる $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ ユニットの組を実線で示した。以下このような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 $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ ユニットの組は破線で示した。

[0069] 各パターンにおいて、実線で示した隣合う2つの $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ 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。

- [0070] 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。
- [0071] (A)_nモチーフの含有量が低減された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好ましく、75%以上であることが更に好ましく、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。
- [0072] (A)_nモチーフの含有量が低減された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好ましく、70%以上であることが更に好ましく、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。
- [0073] (A)_nモチーフの含有量が低減された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。また、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から、 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。

[0074] (A) n モチーフの含有量が低減された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2、配列番号4、配列番号10若しくは配列番号12で示されるアミノ酸配列、又は(3-ii)配列番号2、配列番号4、配列番号10若しくは配列番号12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。

[0075] (3-i)の改変フィブロインについて説明する。配列番号2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1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4で示されるアミノ酸配列は、配列番号2で示されるアミノ酸配列のREP中の全てのGGXをGXに置換したものである。配列番号10で示されるアミノ酸配列は、配列番号4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4の分子量とほぼ同じとなるようにN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12で示されるアミノ酸配列は、配列番号9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Hisタグが付加されたものである。

[0076] 配列番号1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2で示されるアミノ酸配列、及び配列番号4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10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12で

示されるアミノ酸配列における x/y の値は、89.3%である。配列番号1、2、4、10及び12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。

[0077] (3-i) の改変フィブロインは、配列番号2、配列番号4、配列番号10又は配列番号12で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0078] (3-ii) の改変フィブロインは、配列番号2、配列番号4、配列番号10又は配列番号12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: $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m$ 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。

[0079] (3-ii) の改変フィブロインは、配列番号2、配列番号4、配列番号10又は配列番号12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 $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ 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 $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]$ 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。

[0080] 上述の改変フィブロインは、N末端及びC末端の何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。

[0081] 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7、配列番号9、配列番号11若しくは配列番号13で示されるアミノ酸配列、又は(2-iv) 配列番号7、配列番号9、配列番号11若しくは配列番号13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。

[0082] 配列番号6、7、8、9、11及び13で示されるアミノ酸配列は、それ

ぞれ配列番号1、2、3、4、10及び12で示されるアミノ酸配列のN末端に配列番号5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。

[0083] (3-iii)の改変フィブロインは、配列番号7、配列番号9、配列番号11又は配列番号13で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0084] (3-iv)の改変フィブロインは、配列番号7、配列番号9、配列番号11又は配列番号13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： $[(A)_n\text{モチーフ-REP}]_m$ 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。

[0085] (3-iv)の改変フィブロインは、配列番号7、配列番号9、配列番号11又は配列番号13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 $[(A)_n\text{モチーフ-REP}]$ 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 $[(A)_n\text{モチーフ-REP}]$ 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。

[0086] 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。

[0087] 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。当該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、上述したグリシン残基の含有量が低減された改変フィブロインと、(A)_nモチーフの含有量が低減された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、グリシン残基の含有量が低減された改変フィブロイン、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で説明したとおりである。

[0088] 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のより具体的な例として、(4-i)配列番号4、配列番号10若しくは配列番号12で示されるアミノ酸配列、(4-ii)配列番号4、配列番号10若しくは配列番号12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4、配列番号10若しくは配列番号12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。

[0089] 他の実施形態に係る改変フィブロインは、そのドメイン配列が、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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 本実施形態に係る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、R E P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R E P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。

[0093] 本実施形態に係る改変フィブロインは、例えば、クローニングした天然由来のフィブロインの遺伝子配列からR E P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R E P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。また、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列からR E P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R E P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R E P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R E P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。

[0094] さらに他の実施形態に係る改変フィブロインは、式1： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{R E P}]_m$ 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R E P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。

[0095] 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。

[0096] [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

[0097] p/q の算出方法を更に詳細に説明する。算出には、式1: $[(A)_n \text{モチーフ} - REP]_m$ 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。そ

して、当該領域に含まれるアミノ酸残基の総数が p である。また、配列 A に含まれるアミノ酸残基の総数が q である。

[0098] 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 $20 \times 4 = 80$ である。また、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（ $p = 2 \times 4 - 1 = 7$ 。「-1」は重複分の控除である。）。例えば、図 2 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 $7 \times 4 = 28$ となる。また、例えば、図 2 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 2 の場合 $28/170 = 16.47\%$ となる。

[0099] 本実施形態に係る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。

[0100] 本実施形態に係る改変フィブロインは、例えば、クローニングした天然由来のフィブロインのアミノ酸配列を、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。また、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から上記の 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。

[0101] 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。

[0102] 改変フィブロインの別の具体的な例として、(5-i) 配列番号20、配列番号22若しくは配列番号23で示されるアミノ酸配列、又は(5-ii) 配列番号20、配列番号22若しくは配列番号23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。

[0103] (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、天然由来のフィブロインの(A)_nモチーフ中のアラニン残基が連続するアミノ酸配列をアラニン残基が連続する数を5つになるよう欠失したものである。配列番号20で示されるアミノ酸配列は、配列番号19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、かつ配列番号19で示されるアミノ酸配列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21で示されるアミノ酸配列は、配列番号19で示されるアミノ酸配列に対し、各(A)_nモチーフのC末端側に2つのアラニン残基を挿入し、更に一部のグルタミン(Q)残基をセリン(

S) 残基に置換し、かつ配列番号19で示されるアミノ酸配列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22で示されるアミノ酸配列は、配列番号21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23で示されるアミノ酸配列は、配列番号21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。

[0104] (5-i)の改変フィブロインは、配列番号20、配列番号22又は配列番号23で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0105] (5-ii)の改変フィブロインは、配列番号20、配列番号22又は配列番号23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。

[0106] (5-ii)の改変フィブロインは、配列番号20、配列番号22又は配列番号23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。

[0107] 上述の改変フィブロインは、N末端及びC末端の何れか一方又は両方にタグ配列を含んでいてもよい。

[0108] 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24、配列番号25若しくは配列番号26で示されるアミノ酸配

列、又は(5-i v)配列番号24、配列番号25若しくは配列番号26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。

[0109] 配列番号24、25及び26で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号20、22及び23で示されるアミノ酸配列のN末端に配列番号5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。

[0110] (5-i i i)の改変フィブロインは、配列番号24、配列番号25若しくは配列番号26で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0111] (5-i v)の改変フィブロインは、配列番号24、配列番号25若しくは配列番号26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-i v)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。

[0112] (5-i v)の改変フィブロインは、配列番号24、配列番号25若しくは配列番号26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。

[0113] 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。

[0114] さらに他の実施形態に係る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。

[0115] 本実施形態に係る改変フィブロインは、REPのアミノ酸配列中に、GGXモチーフ及びGPGXXモチーフ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。

[0116] 本実施形態に係る改変フィブロインが、REP中にGPGXXモチーフを含む場合、GPGXXモチーフ含有率は、通常1%以上であり、5%以上であってもよく、10%以上であるのが好ましい。GPGXXモチーフ含有率の上限に特に制限はなく、50%以下であってもよく、30%以下であってもよい。

[0117] 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。

式1： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むフィブロイン（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。

[0118] 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。なお、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。

[0119] 図3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3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3に示した改変フィブロインのドメイン配列（「 $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m-(A)_n\text{モチーフ}$ 」タイプである。）では、全てのREPが「最もC末端側に位置する $(A)_n\text{モチーフ}$ 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3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 $7 \times 3 = 21$ となる。同様に、全てのREPが「最もC末端側に位置する $(A)_n\text{モチーフ}$ からドメイン配列のC末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」（図1中、「領域A」で示した配列。）に含まれているため、当該配列から更に $(A)_n\text{モチーフ}$ 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3の改変フィブロインの場合 $21/150 = 14.0\%$ となる。

[0120] 本実施形態に係る改変フィブロインは、グルタミン残基含有率が9%以下であることが好ましく、7%以下であることがより好ましく、4%以下であることが更に好ましく、0%であることが特に好ましい。

[0121] 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。

式1： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n\text{モチーフ}-REP]_m-(A)_n\text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むフィブロイン（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 $(A)_n\text{モチーフ}$ 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3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 $(A)_n\text{モチーフ}$ 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 $(A)_n\text{モチーフ}$ 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。

[0122] 本実施形態に係る改変フィブロインは、そのドメイン配列が、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。

[0123] 「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。

[0124] 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。

[0125] 本実施形態に係る改変フィブロインは、REP の疎水性度が、 -0.8 以上であることが好ましく、 -0.7 以上であることがより好ましく、 0 以上であることが更に好ましく、 0.3 以上であることが更に好ましく、 0.4 以上であることが特に好ましい。REP の疎水性度の上限に特に制限はなく、 1.0 以下であってよく、 0.7 以下であってもよい。

[0126] 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： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ}-REP]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むフィブロイン（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1の「領域A」に相当する配列。）に含まれる全てのREPにおいて、その領域の各アミノ酸残基の疎水性指標の総和を 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。

[0127] 本実施形態に係る改変フィブロインは、そのドメイン配列が、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。

[0128] 本実施形態に係る改変フィブロインは、例えば、クローニングした天然由来のフィブロインの遺伝子配列から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。また、例えば、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列から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られることもできる。

[0129] 本発明に係る改変フィブロインのより具体的な例として、(6-i)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38若しくは配列番号39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38若しくは配列番号39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。

[0130] (6-i)の改変フィブロインについて説明する。

[0131] 配列番号4で示されるアミノ酸配列(Met-PR T410)は、天然由来のフィブロインである*Nephila clavipes*(GenBankアクセッション番号:P46804.1、GI:1174415)の塩基配列及びアミノ酸配列に基づき、(A)_nモチーフ中のアラニン残基が連続するアミノ酸配列をアラニン残基が連続する数を5つにする等の生産性を向上させるためのアミノ酸の改変を行ったものである。一方、Met-PR T410は、グルタミン残基(Q)の改変は行っていないため、グルタミン残基含有率は、天然由来のフィブロインのグルタミン残基含有率と同程度である。

[0132] 配列番号27で示されるアミノ酸配列(M__PR T888)は、Met-PR T410(配列番号4)中のQQを全てVLに置換したものである。

[0133] 配列番号28で示されるアミノ酸配列(M__PR T965)は、Met-PR T410(配列番号4)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。

[0134] 配列番号29で示されるアミノ酸配列(M__PR T889)は、Met-PR T410(配列番号4)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。

[0135] 配列番号30で示されるアミノ酸配列(M__PR T916)は、Met-PR T410(配列番号4)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。

- [0136] 配列番号31で示されるアミノ酸配列 (M_PRT918) は、Met-PRT410 (配列番号4) 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。
- [0137] 配列番号37で示されるアミノ酸配列 (M_PRT525) は、Met-PRT410 (配列番号4) に対し、アラニン残基が連続する領域 (A₅) に2つのアラニン残基を挿入し、Met-PRT410の分子量とほぼ同じになるよう、C末端側のドメイン配列2つを欠失させ、かつグルタミン残基 (Q) 13箇所をセリン残基 (S) 又はプロリン残基 (P) に置換したものである。
- [0138] 配列番号38で示されるアミノ酸配列 (M_PRT699) は、M_PRT525 (配列番号37) 中のQQを全てVLに置換したものである。
- [0139] 配列番号39で示されるアミノ酸配列 (M_PRT698) は、M_PRT525 (配列番号37) 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。
- [0140] 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38及び配列番号39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)。

[0141] [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4)	17.7%	27.9%	-1.52
M_PRT888(配列番号27)	6.3%	27.9%	-0.07
M_PRT965(配列番号28)	0.0%	27.9%	-0.65
M_PRT889(配列番号29)	0.0%	27.9%	0.35
M_PRT916(配列番号30)	0.0%	27.9%	0.47
M_PRT918(配列番号31)	0.0%	27.9%	0.45
M_PRT525(配列番号37)	13.7%	26.4%	-1.24
M_PRT699(配列番号38)	3.6%	26.4%	-0.78
M_PRT698(配列番号39)	0.0%	26.4%	-0.03

[0142] (6-i)の改変フィブロインは、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号16又は配列番号17で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0143] (6-ii)の改変フィブロインは、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 38 又は配列番号 39 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-i i) の改変フィブロインもまた、式 1 : $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m$ 、又は式 2 : $[(A)_n \text{モチーフ-REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。上記配列同一性は、95%以上であることが好ましい。

[0144] (6-i i) 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。また、(6-i i) 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。

[0145] 上述の改変フィブロインは、N末端及びC末端の何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。

[0146] 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-i i i) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 19 若しくは配列番号 20 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-i v) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 19 若しくは配列番号 20 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。

[0147] 配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 40 及び配列番号 41 で示されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 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 38 及び配列番号 39 で示されるアミノ酸配列の N末端に配列番号 5 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 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 40 及び配列番号 41 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)。

[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 32)	6.3%	27.9%	-0.07
PRT965(配列番号 33)	0.0%	27.9%	-0.65
PRT889(配列番号 34)	0.0%	27.9%	0.35
PRT916(配列番号 35)	0.0%	27.9%	0.47
PRT918(配列番号 36)	0.0%	27.9%	0.45
PRT699(配列番号 40)	3.6%	26.4%	-0.78
PRT698(配列番号 41)	0.0%	26.4%	-0.03

[0148] (6-i i i) の改変フィブロインは、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 40 又は配列番号 41 で示されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0149] (6-i v) の改変フィブロインは、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 40 又は配列番号 41 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-i v) の改変フィブロインもまた、式 1 : $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 、又は式 2 : $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるドメイン配列を含むタンパク質である。上記配列同一性は、95% 以上であることが好ましい。

[0150] (6-i v) 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。また、(6-i v) 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。

[0151] 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。

[0152] <改変フィブロインの製造方法>

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

[0153] 改変フィブロインをコードする核酸の製造方法は、特に制限されない。例

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

[0154] 調節配列は、宿主における改変フィブロインの発現を制御する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合配列、転写終結配列等）であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。プロモーターとして、宿主細胞中で機能し、改変フィブロインを発現誘導可能な誘導性プロモーターを用いてもよい。誘導性プロモーターは、誘導物質（発現誘導剤）の存在、リプレッサー分子の非存在、又は温度、浸透圧若しくはpH値の上昇若しくは低下等の物理的要因により、転写を制御できるプロモーターである。

[0155] 発現ベクターの種類は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、フォスミドベクター、人工染色体ベクター等、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製が可能、又は宿主の染色体中への組込みが可能で、タンパク質をコードする核酸を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが好適に用いられる。

[0156] 宿主として、原核生物、並びに酵母、糸状真菌、昆虫細胞、動物細胞及び植物細胞等の真核生物のいずれも好適に用いることができる。

- [0157] 原核生物の宿主の好ましい例として、エシェリヒア属、ブレビバチルス属、セラチア属、バチルス属、ミクロバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属及びシュードモナス属等に属する細菌を挙げることができる。エシェリヒア属に属する微生物として、例えば、エシェリヒア・コリ等を挙げることができる。ブレビバチルス属に属する微生物として、例えば、ブレビバチルス・アグリ等を挙げることができる。セラチア属に属する微生物として、例えば、セラチア・リクエファシエンス等を挙げることができる。バチルス属に属する微生物として、例えば、バチルス・サチラス等を挙げることができる。ミクロバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム等を挙げることができる。ブレビバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ブレビバクテリウム・ディバリカタム等を挙げることができる。コリネバクテリウム属に属する微生物として、例えば、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス等を挙げることができる。シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物として、例えば、シュードモナス・プチダ等を挙げることができる。
- [0158] 原核生物を宿主とする場合、タンパク質をコードする核酸を導入するベクターとしては、例えば、pBTrp2 (ベーリンガーマンハイム社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pUC18、pBluescript 11、pSupex、pET22b、pCold、pUB110、pNC02 (特開2002-238569号公報) 等を挙げることができる。
- [0159] 真核生物の宿主としては、例えば、酵母及び糸状真菌 (カビ等) を挙げることができる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス属、ピキア属、シゾサッカロマイセス属等に属する酵母を挙げることができる。糸状真菌としては、例えば、アスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属等に属する糸状真菌を挙げることができる。
- [0160] 真核生物を宿主とする場合、改変フィブロインをコードする核酸を導入するベクターとしては、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YE p24 (ATCC37051) 等を挙げることができる。上記宿主細胞への発

現ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、電トロポレーション法、スフェロプラスト法、プロトプラスト法、酢酸リチウム法、コンピテント法等を挙げることができる。

[0161] 発現ベクターで形質転換された宿主による核酸の発現方法としては、直接発現のほか、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

[0162] 改変フィブロインは、例えば、発現ベクターで形質転換された宿主を培養培地中で培養し、培養培地中に当該タンパク質を生成蓄積させ、該培養培地から採取することにより製造することができる。宿主を培養培地中で培養する方法は、宿主の培養に通常用いられる方法に従って行うことができる。

[0163] 宿主が、大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物である場合、培養培地として、宿主が資化し得る炭素源、窒素源及び無機塩類等を含有し、宿主の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

[0164] 炭素源としては、上記形質転換微生物が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、及びこれらを含有する糖蜜、デンプン及びデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸及びプロピオン酸等の有機酸、並びにエタノール及びプロパノール等のアルコール類を用いることができる。窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム及びリン酸アンモニウム等の無機酸又は有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びにペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物を用いることができる。無機塩類としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅及び炭酸カルシウムを用いることができる。

- [0165] 大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物の培養は、例えば、振盪培養又は深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行うことができる。培養温度は、例えば、15～40℃である。培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中の培養培地のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。培養培地のpHの調整は、無機酸、有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム及びアンモニア等を用いて行うことができる。
- [0166] また、培養中、必要に応じて、アンピシリン及びテトラサイクリン等の抗生物質を培養培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。
- [0167] 発現させたタンパク質の単離、精製は通常用いられている方法で行うことができる。例えば、当該タンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、宿主細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁した後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー及びダイノミル等により宿主細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、タンパク質の単離精製に通常用いられている方法、すなわち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社製）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法

等の方法を単独又は組み合わせて使用し、精製標品を得ることができる。

[0168] また、タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に宿主細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてタンパク質の不溶体を回収する。回収したタンパク質の不溶体はタンパク質変性剤で可溶化することができる。該操作の後、上記と同様の単離精製法によりタンパク質の精製標品を得ることができる。当該タンパク質が細胞外に分泌された場合には、培養上清から当該タンパク質を回収することができる。すなわち、培養物を遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、その培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0169] <改変フィブロイン繊維の製造方法>

改変フィブロイン繊維は、公知の紡糸方法によって製造することができる。すなわち、例えば、改変フィブロインを主成分として含む改変フィブロイン繊維を製造する際には、まず、上述した方法に準じて製造した改変フィブロインをジメチルスルホキシド（DMSO）、N，N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ギ酸、又はヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）等の溶媒に、必要に応じて、溶解促進剤としての無機塩と共に添加し、溶解してドープ液を作製する。次いで、このドープ液を用いて、湿式紡糸、乾式紡糸、乾湿式紡糸又は熔融紡糸等の公知の紡糸方法により紡糸して、改変フィブロイン繊維を得ることができる。好ましい紡糸方法としては、湿式紡糸又は乾湿式紡糸を挙げることができる。

[0170] 図4は、改変フィブロイン繊維を製造するための紡糸装置の一例を概略的に示す説明図である。図4に示す紡糸装置10は、乾湿式紡糸用の紡糸装置の一例であり、押出し装置1と、未延伸糸製造装置2と、湿熱延伸装置3と、乾燥装置4とを有している。

[0171] 紡糸装置10を使用した紡糸方法を説明する。まず、貯槽7に貯蔵されたドープ液6が、ギアポンプ8により口金9から押し出される。ラボスケールにおいては、ドープ液をシリンダーに充填し、シリンジポンプを用いてノズ

ルから押し出してもよい。次いで、押し出されたドープ液6は、エアギャップ19を経て、凝固液槽20の凝固液11内に供給され、溶媒が除去されて、改変フィブロインが凝固し、繊維状凝固体が形成される。次いで、繊維状凝固体が、延伸浴槽21内の温水12中に供給されて、延伸される。延伸倍率は供給ニップローラ13と引き取りニップローラ14との速度比によって決まる。その後、延伸された繊維状凝固体が、乾燥装置4に供給され、糸道22内で乾燥されて、改変フィブロイン繊維36が、巻糸体5として得られる。18a~18gは糸ガイドである。

[0172] 凝固液11としては、脱溶媒できる溶媒であればよく、例えば、メタノール、エタノール及び2-プロパノール等の炭素数1~5の低級アルコール、並びにアセトン等を挙げることができる。凝固液11は、適宜水を含んでもよい。凝固液11の温度は、0~30℃であることが好ましい。口金9として、直径0.1~0.6mmのノズルを有するシリンジポンプを使用する場合、押出し速度は1ホール当たり、0.2~6.0mL/時間が好ましく、1.4~4.0mL/時間であることがより好ましい。凝固した改変フィブロインが凝固液11中を通過する距離（実質的には、糸ガイド18aから糸ガイド18bまでの距離）は、脱溶媒が効率的に行える長さがあればよく、例えば、200~500mmである。未延伸糸の引き取り速度は、例えば、1~20m/分であってよく、1~3m/分であることが好ましい。凝固液11中での滞留時間は、例えば、0.01~3分であってよく、0.05~0.15分であることが好ましい。また、凝固液11中で延伸（前延伸）をしてもよい。凝固液槽20は多段設けてもよく、また延伸は必要に応じて、各段、又は特定の段で行ってもよい。

[0173] なお、改変フィブロイン繊維を得る際に実施される延伸は、例えば、上記した凝固液槽20内で行う前延伸、及び延伸浴槽21内で行う湿熱延伸の他、乾熱延伸も採用される。

[0174] 湿熱延伸は、温水中、温水に有機溶剤等を加えた溶液中、又はスチーム加熱中で行うことができる。温度としては、例えば、50~90℃であってよ

く、75～85℃が好ましい。湿熱延伸では、未延伸糸（又は前延伸糸）を、例えば、1～10倍延伸することができ、2～8倍延伸することが好ましい。

[0175] 乾熱延伸は、電气管状炉、乾熱板等を使用して行うことができる。温度としては、例えば、140℃～270℃であってよく、160℃～230℃が好ましい。乾熱延伸では、未延伸糸（又は前延伸糸）を、例えば、0.5～8倍延伸することができ、1～4倍延伸することが好ましい。

[0176] 湿熱延伸及び乾熱延伸はそれぞれ単独で行ってもよく、またこれらを多段で、又は組み合わせて行ってもよい。すなわち、一段目延伸を湿熱延伸で行い、二段目延伸を乾熱延伸で行う、又は一段目延伸を湿熱延伸行い、二段目延伸を湿熱延伸行い、更に三段目延伸を乾熱延伸で行う等、湿熱延伸及び乾熱延伸を適宜組み合わせて行うことができる。

[0177] 最終的な延伸倍率は、その下限値が、未延伸糸（又は前延伸糸）に対して、好ましくは、1倍超、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上のうちの何れかであり、上限値が、好ましくは40倍以下、30倍以下、20倍以下、15倍以下、14倍以下、13倍以下、12倍以下、11倍以下、10倍以下である。

[0178] <改変フィブロイン繊維>

本実施形態に係る改変フィブロイン繊維は、上述した改変フィブロインを紡糸したものであってもよく、この場合、上述した改変フィブロインを主成分として含む。

[0179] 改変フィブロイン繊維は、水に接触させて湿潤状態にしたときの収縮率Aが、例えば、2%以上となり、また、それを乾燥させた際の収縮率Bが、例えば7%以上となる。

ここで、収縮率Aは、下記式で定義される。

収縮率A = {1 - (水に接触させて湿潤状態にした人造フィブロイン繊維の長さ / 紡糸後、水と接触する前の人造フィブロイン繊維の長さ)} × 100 (%)

一方、収縮率Bは下記式で定義される。

$$\text{収縮率B} = \{ 1 - (\text{沸点未満の水に接触させることを含む収縮工程を経たタンパク質繊維の長さ} / \text{収縮工程を経る前のタンパク質繊維の長さ}) \} \times 100 (\%)$$

[0180] 本実施形態に係る改変フィブロイン繊維は、収縮率Aが、2.5%以上、3%以上、3.5%以上、4%以上、4.5%以上、5%以上、5.5%以上、又は6%以上であってよい。収縮率Aの上限は特に限定されないが、80%以下、60%以下、40%以下、20%以下、10%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、又は3%以下であってよい。一方、収縮率Bが、7%超であることが好ましく、15%以上であることがより好ましく、25%以上であることが更に好ましく、32%以上であることが更に好ましく、40%以上であることが更に好ましく、48%以上であることが特に好ましく、56%以上であることが特に好ましく、64%以上であることが特に好ましく、72%以上であることが最も好ましい。収縮率Aの上限は、通常、80%以下である。

[0181] <タンパク質繊維糸>

本実施形態に係るタンパク質繊維糸は、改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸である。編地の編成または織地の製織に用いられる原料糸であるタンパク質繊維糸は、主として改変フィブロイン繊維からなる。このタンパク質繊維糸は、改変フィブロイン繊維からなってもよい。タンパク質繊維糸は、改変フィブロインを主成分として含む。編地の編成に用いられる原料糸は、他の繊維を一部に含んでもよい。

[0182] 原料糸は、フィラメント（長繊維）の撚糸または仮撚糸であってよい。原料糸は、ステープル（短繊維）からなる紡績糸であってよい。本実施形態において編地の編成に用いられる原料糸は、単糸である。単糸が用いられることにより、編地において、双糸では得られない風合いが実現され得る。

[0183] 撚糸または仮撚糸または紡績糸の撚り方向は、S撚り（右撚）であってよ

く、Z撚り（左撚）であってもよい。

[0184] 本明細書において、編地または織地における斜行の発生が無い乃至は十分に抑制されていることを「無斜行」と言い、そのような編地を「無斜行編地」と言い、そのような織地を「無斜行織地」と言う。また、織地の歪みとは、織地において斜行と同様な不良状態を言う。斜行や歪みの有無は、編目または織目の目視によって判断され得る。

[0185] 撚糸または仮撚糸または紡績糸の織度は使用する編機のゲージまたは織機の適した番手である事が好ましく、それに合わせ紡績を行う。

[0186] 13～150Nmの番手を有する単糸は、双糸等に比べて細く、優れた風合いと軟らかさを有する。なお、単糸の糸番手は、特に限定されず、周知の紡績法で得られるあらゆる番手であってよい。糸撚り数は、特に限定されず、周知の紡績で用いられるあらゆる撚り数であってよい。

[0187] <単糸の製造方法>

単糸が撚糸である場合の単糸の製造方法は、改変フィブロイン繊維を含む複数の繊維を撚ることで撚糸（単糸）を得る加撚工程を備える。この製造方法は、繊維の撚りを維持した状態で、その糸を加熱する加熱工程と、を備えてもよい。加撚工程と、加熱工程と、は互いに独立した工程であってもよく、同時に行われる工程であってもよい。

[0188] 加撚工程では、改変フィブロイン繊維に撚りを加える。撚りを加える手段は、公知の手段を用いることができ、例えば、撚糸機などを使用できる。撚糸機としては、公知の各種の撚糸形式（アップ形式、ダウン形式、特殊棧形式、エア棧形式、リワイダ等）に対応した撚糸機、例えば、イタリー式撚糸機、ダブルツイスター、リング撚糸機、複合撚糸機、インタレス、パーンワインダ、ミュール精紡機等が挙げられる。加撚工程において、糸の撚数は、上記した好ましい範囲となるように調整される。撚数は、通常、撚糸機の設定値を変更することにより、調整することができる。

[0189] なお、単糸が撚糸である場合の単糸の製造方法において、加撚工程を含む工程、即ち加撚工程までの工程や、加撚工程後の巻き上げ工程までを含む工

程で、撚糸を高湿度環境（第1の湿度環境）に曝すことにより、撚糸の繊維中水分率を上昇させる水分付加・維持工程を実施してもよい。この場合の高湿度環境は、たとえば60%以上の湿度であってもよく、また60%~80%の湿度であってもよい。湿度は、65%~75%であることが好ましい。撚糸を高湿度環境に曝す時間は、特に限定されないが、1~48時間であってもよく、12~24時間であってもよい。

[0190] 単糸が仮撚糸である場合の単糸の製造方法は、改変フィブロイン繊維を含む複数の繊維を撚ることで撚糸（単糸）を得る加撚工程と、撚られた撚糸を解撚して仮撚糸を得る解撚工程と、を備える。この製造方法は、繊維の撚りを維持した状態で、その糸を加熱する加熱工程を備えてもよい。加撚工程と、加熱工程と、は互いに独立した工程であってもよく、同時に行われる工程であってもよく、好ましくは同時に行われる。

[0191] 仮撚糸の製造方法と、上記した撚糸の製造方法と共通する部分については、撚糸の製造方法において説明した条件等を適用することができる。ここでは、説明を省略し、第一実施形態と異なる部分について説明する。

[0192] 加撚工程では、改変フィブロイン繊維に撚りを加える。撚りを加える手段は、公知の手段を用いることができ、例えば、仮撚機などを使用できる。仮撚機としては、例えば、ピン仮撚機、フリクション仮撚機、ベルト仮撚機等が挙げられる。解撚工程では、加撚工程を経た糸を、加撚工程とは逆の方向へ撚る。解撚工程における撚数は、加撚工程における撚数と同等であってもよく、又は加撚工程における撚数以上であってもよい。解撚工程における撚数は、仮撚機の設定値を変更することにより、調整することができる。

[0193] なお、単糸が仮撚糸である場合の単糸の製造方法において、加撚工程を含む工程、或いは加撚工程と解撚工程を含む工程で、撚糸または仮撚糸を高湿度環境（第1の湿度環境）に曝すことにより、撚糸または仮撚糸の繊維中水分率を上昇させる水分付加・維持工程を実施してもよい。この場合の高湿度環境は、たとえば60%以上の湿度であってもよく、また60%~80%の湿度であってもよい。湿度は、65%~75%であることが好ましい。撚糸を

高湿度環境に曝す時間は、特に限定されないが、1～48時間であってもよく、12～24時間であってもよい。

[0194] 単糸が紡績糸である場合の単糸の製造方法は、改変フィブロイン繊維を含むフィラメント（長繊維）をカットするカット工程と、カット工程で得られるステープル（短繊維）を紡績する紡績工程と、を備える。この製造方法は、カット工程に先立って、フィラメントと水分とを接触させて縮れさせる捲縮工程を備えてもよく、若しくはカット工程後に、ステープルと水分とを接触させて縮れさせる捲縮工程を備えてもよい。これらの捲縮工程が、水分とフィラメントまたはステープルとの接触後にフィラメントまたはステープルを乾燥させる乾燥工程を含んでもよい。捲縮工程によれば、紡績糸の風合いがより一層優れたものとなる。

[0195] フィラメントを捲縮する方法（工程）としては、上記した、改変フィブロインからなるフィラメントを水分と接触（浸漬または暴露）させて縮れさせることで、捲縮（湿式捲縮）する方法（工程）以外に、フィラメントを機械捲縮する方法も用いられ得る。この機械捲縮方法としては、たとえば、機械押し込み加工または噴射押し込み加工等の公知の方法が採用され得る。これらの湿式捲縮と機械捲縮とを両方行ってもよいが、湿式捲縮のみ、または機械捲縮のみを行ってもよい。湿式捲縮と機械捲縮とを両方行う場合に、これらの実施順序は問わない。湿式捲縮が先に行われてもよく、機械捲縮が先に行われてもよいが、作業性等の点から機械捲縮を先に行うことが好ましい。また、特に、湿式捲縮を行うことにより、編成物である編地における斜行が抑制され得る。

[0196] 湿式捲縮における水分として、水を用いてもよく、スチームを用いてもよい。湿式捲縮は、バッチ式で行ってもよく、連続式で行ってもよい。フィラメントを水に浸漬させる場合、水の好適な温度範囲は、たとえば10～60℃である。水温を10℃以上とすることにより、縮れに要する時間を短縮でき、また水温を60℃以下とすることにより、繊維強度の低下を防止することができる。水温を調整することにより、捲縮量（収縮率）をコントロール

することができる。10～60℃の範囲において水温が高いほど、捲縮量（収縮率）は高くなる傾向にある。水への浸漬時間は、たとえば30秒以上であることが好ましく、より好ましくは1分以上である、1～10分であってもよい。浸漬時間を1分以上とすることにより、十分な捲縮効果が得られ、また浸漬時間を10分以下とすることにより、生産性の低下を防止することができる。水は、取扱性が高いので、湿式捲縮が容易である。

[0197] フィラメントにスチームを接触させる場合、スチームの好適な温度範囲は、100～230℃であってもよく、100～120℃であってもよい。スチームの温度を230℃以下とすることにより、タンパク質の分解を防止することができる。スチームを用いると、短い時間で大きな収縮率が得られる。

[0198] 湿式捲縮における水分が、揮発性溶媒を含んでもよく、油剤分散液を含んでもよい。水と、揮発性溶媒によれば、乾燥速度を向上させることができる。水と、油剤分散液によれば、湿式捲縮と油剤付着を同時に行うことができる。

[0199] 水を用いた湿式捲縮の一例としては、たとえば、ボビンからフィラメントを送り出しながら湯中に浸漬した後、熱風やホットローラでフィラメントを乾燥させ、その後、必要に応じてフィラメントを連続的にカットする、といった一連の工程が挙げられる。一方、機械捲縮には、公知の捲縮機が何れも使用可能である。

[0200] 紡績工程としては、公知の方法が採用され得る。たとえば、紡績糸が改変フィブロイン繊維からなる場合、紡績工程は、改変フィブロイン繊維からなるタンパク質捲縮ステープルを紡績する紡毛式紡績工程であってよい。この紡績工程は、たとえば、タンパク質捲縮ステープルを均一に混合して紡績溶剤を加える調合工程と、繊維を割きさばいてシート状に成形および積層し、更に細く分割して揉んで糸条の束を作成するカード工程と、糸状の束を伸ばして撚りをかけ、均整度の高い所望番手の糸を作成するミュール工程と、ミュール工程で得た紡績糸（単糸）を巻き上げる巻糸工程とを含んでもよい。

ミュール工程は、改変フィブロイン繊維を含む繊維を撚ることで単糸を得る加撚工程に相当する。巻糸工程では、公知のワインダが用いられ得る。巻糸工程は、円筒状のチーズや円錐状のコーンの状態に紡績糸を巻き上げる、いわゆるコーンアップを行う工程である。

[0201] また、紡績糸が改変フィブロイン繊維と他の繊維（異種繊維）からなる混紡である場合、紡績工程は、改変フィブロイン繊維からなるタンパク質捲縮ステープルと他の繊維との混綿を行う綿紡式紡績工程であってもよい。この紡績工程は、ラップを作成する開織工程と、繊維を平行に引き伸ばしてスライバを作成するカード工程と、数本のスライバを併合して太さを均一にしつつ繊維を更に平行にする練条工程と、スライバを引き伸ばし細くして、撚りをかけて粗糸を作成する粗紡工程と、粗糸を引き伸ばし、撚りをかけて所定の太さの糸を作成する精紡工程と、精紡工程で得た単糸を巻き上げる巻糸工程とを含んでもよい。精紡工程は、改変フィブロイン繊維を含む繊維を撚ることで単糸を得る加撚工程に相当する。巻糸工程では、公知のワインダが用いられ得る。巻糸工程は、円筒状のチーズや円錐状のコーンの状態に紡績糸を巻き上げる、いわゆるコーンアップを行う工程である。

[0202] なお、本明細書において他の繊維とは、改変フィブロインを含まない繊維等をいい、例えば、化学繊維や天然繊維が挙げられる。他の繊維と組み合わせて使用する場合には、改変フィブロイン繊維を含む繊維全量を基準として、改変フィブロインの含有量が、質量5%以上であることが好ましく、質量20%以上であることがより好ましく、質量50%以上であることがさらに好ましい。

[0203] 単糸が紡績糸である場合の単糸の製造方法において、少なくとも加撚工程では、即ち、加撚工程までの工程や、加撚工程後の巻き上げ工程までを含む工程で、紡績糸を高湿度環境（第1の湿度環境）に曝すことにより、紡績糸の繊維中水分率を上昇させる水分付加・維持工程を実施してもよい。この場合の高湿度環境は、たとえば60%以上の湿度であってもよく、また60%～80%の湿度であってよい。湿度は、65%～75%であることが好まし

い。撚糸を高湿度環境に曝す時間は、特に限定されないが、1～48時間であってもよく、12～24時間であってもよい。

[0204] 水分付加・維持工程では、繊維内水分率が低下しないように維持される。水分付加・維持工程は、加撚工程を含み、加撚工程よりも前の工程（たとえばカード工程など）や、加撚工程よりも後の工程（たとえばミュール工程や精紡工程、粗紡工程等）においても実施されてもよい。すなわち、水分付加・維持工程は、紡績工程の略全体で実施されてもよいし、紡績工程の一部（ただし加撚工程を含む）で実施されてもよい。

[0205] たとえば、紡績糸を製造する際には、静電気発生防止等のために収縮させた捲縮ステープルを紡績して、コーンアップ（コーンに巻き上げて編織に使用可能な状態とすること）までを高湿度環境（湿度65～75%）で行ってもよい。

[0206] 単糸が撚糸であるか、仮撚糸であるか、紡績糸であるかに関わらず、単糸の製造方法は、加撚工程の後（加撚が施された後）で且つ編地の編成工程または織地の製織工程の前に実施され、単糸の水分率を低下させる水分率低下工程を備える。水分率低下工程は、言い換えれば、単糸を乾燥させる乾燥工程である。水分率低下工程は、単糸の水分率を、加撚が施される前のタンパク質繊維の水分率に近づけるよう、単糸の水分率を低下させる工程である。ここで、加撚が施される前のタンパク質繊維とは、上記した紡糸装置10で紡糸された（乾燥装置4を経た）改変フィブロイン繊維である。単糸の水分率とは、公定水分率に換算したものである。

[0207] 以下、単糸が紡績糸である場合を例として、水分率低下工程について説明する。水分率低下工程では、紡績糸を低湿度環境（第2の湿度環境）に曝すことにより、紡績糸の繊維中水分率を低下させる。水分率低下工程は、たとえばコーンアップされた紡績糸を、所定の湿度に管理された室内に保管する工程である。低湿度環境は、高湿度環境よりも低い湿度を有し、たとえば50%以下の湿度である。低湿度環境は、30%以下の湿度であることが好ましく、20%以下の湿度であることがより好ましい。紡績糸を低湿度環境に

曝す時間は、特に限定されないが、1～24時間であってよい。

[0208] 水分率低下工程を経た紡績糸の水分率は、たとえば15%以下である。水分率低下工程を経た紡績糸の水分率は、10%以下であってもよい。水分率低下工程による水分率の低下率は、たとえば2～10%である。

[0209] 水分率低下工程では、コーンアップ後、編織に使用する前に、紡績糸を乾燥させて含水率を低下させる。このとき、紡績糸の含水率（水分率）を、紡績工程前の捲縮ステーブルの含水率と同意程度まで低下させることが好ましい。

[0210] 本実施形態の構造タンパク質繊維糸は、紡績中の繊維中水分率とコーンアップ後の繊維中水分率の変化で最終効果が得られるものである。紡績方法は、あらゆる公知の方法であってよい。最終効果が得られる繊維中水分変化率は、紡績中からコーンアップまでの工程中の水分率とコーンアップ後の水分率コントロールで、コーンアップ状態で水分率を低下させる事で得られる。最終効果が得られるのはコーンアップ状態で水分率を低下させてから（水分率低下工程の完了後）1～24時間以降である。

[0211] なお、水分率を低下させる方法は、上記に限られない。水分率低下工程は、熱での乾燥、気圧低下による乾燥、自然乾燥等のいずれであってもよい。また、水分率を低下させる方法として、紡績糸を有機溶剤に浸漬させてもよい。

[0212] <織生地、編地の製造方法>

上記のようにしてフィラメントから得られた撚糸もしくは仮撚糸、または、捲縮フィラメント若しくは捲縮ステーブルから得られた紡績糸を用いて、編成または製織を行う。公知の織機や編機が用いられ得る。

[0213] 編成生地は、公知の編成方法により得ることができる。使用される編成機としては、公知の織機、公知の編機全てで特に最終製品の形態で原料編地を製造可能であることから、無縫製編機の使用がより好ましい。

[0214] 以上説明した本実施形態のタンパク質繊維糸の製造方法および編織体の製造方法によれば、たとえば、含水率（水分率）を低下させた紡績糸を用いて

なる編織体では、斜行や歪みの発生が抑制される。これに対し、乾燥させずに高含水率のままの紡績糸を用いて編織した場合には、完成した編織体に斜行や歪みが発生する。本実施形態の紡績糸では、含水率の低下によって残留トルクが低減され、それによって、斜行が抑えられるが、それと同時に毛羽の量や長さの低減が図られる。その結果として、ピリングの発生も抑えられることとなる。

実施例

[0215] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

[0216] <改変クモ糸フィブロインの製造>

(1) プラスミド発現株の作製

ネフィラ・クラビペス (*Nephila clavipes*) 由来のフィブロイン (GenBankアクセッション番号: P46804.1, GI: 1174415) の塩基配列及びアミノ酸配列に基づき、配列番号13で示されるアミノ酸配列を有する改変フィブロイン (以下、「PRT799」ともいう。) を設計した。なお、配列番号13で示されるアミノ酸配列は、ネフィラ・クラビペス由来のフィブロインのアミノ酸配列に対して、生産性の向上を目的としてアミノ酸残基の置換、挿入及び欠失を施したアミノ酸配列を有し、さらにN末端に配列番号5で示されるアミノ酸配列 (タグ配列及びヒンジ配列) が付加されている。

[0217] 次に、PRT799をコードする核酸を合成した。当該核酸には、5'末端にNdeIサイト及び終止コドン下流にEcoRIサイトを付加した。当該核酸をクローニングベクター (pUC118) にクローニングした。その後、同核酸をNdeI及びEcoRIで制限酵素処理して切り出した後、タンパク質発現ベクターpET-22b (+) に組換えて発現ベクターを得た。

[0218] (2) タンパク質の発現

配列番号13で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核

酸を含む p E T 2 2 b (+) 発現ベクターで、大腸菌 B L R (D E 3) を形質転換した。当該形質転換大腸菌を、アンピシリンを含む 2 m L の L B 培地で 1 5 時間培養した。当該培養液を、アンピシリンを含む 1 0 0 m L のシード培養用培地 (表 4) に OD_{600} が 0. 0 0 5 となるように添加した。培養液温度を 3 0 ° C に保ち、 OD_{600} が 5 になるまでフラスコ培養を行い (約 1 5 時間) 、シード培養液を得た。

[0219] [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

[0220] 当該シード培養液を 5 0 0 m L の生産培地 (表 5) を添加したジャーファーマンターに OD_{600} が 0. 0 5 となるように添加した。培養液温度を 3 7 ° C に保ち、p H 6. 9 で一定に制御して培養した。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の 2 0 % に維持するようにした。

[0221] [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
GD-113 (消泡剤)	0. 1 (mL/L)

[0222] 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 4 5 5 g / 1 L 、 Yeast Extract 1 2 0 g / 1 L) を 1

mL／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。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持するようにし、20時間培養を行った。その後、1Mのイソプロピルーβ-チオガラクトピラノシド (IPTG) を培養液に対して終濃度1mMになるよう添加し、目的のタンパク質を発現誘導させた。IPTG添加後20時間経過した時点で、培養液を遠心分離し、菌体を回収した。IPTG添加前とIPTG添加後の培養液から調製した菌体を用いてSDS-PAGEを行い、IPTG添加に依存した目的とするクモ糸フィブロインサイズのバンドの出現により、目的とするクモ糸フィブロインの発現を確認した。

[0223] (3) タンパク質の精製

IPTGを添加してから2時間後に回収した菌体を20mM Tris-HCl buffer (pH7.4) で洗浄した。洗浄後の菌体を約1mMのPMSFを含む20mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) に懸濁させ、高圧ホモジナイザー (GEA Niro Soavi社製) で細胞を破碎した。破碎した細胞を遠心分離し、沈殿物を得た。得られた沈殿物を、高純度になるまで20mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) で洗浄した。洗浄後の沈殿物を100mg/mLの濃度になるように8M グアニジン緩衝液 (8M グアニジン塩酸塩、10mMリン酸二水素ナトリウム、20mM NaCl、1mM Tris-HCl、pH7.0) で懸濁し、60℃で30分間、スターラーで攪拌し、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、改変クモ糸フィブロイン「PRT799」を得た。

[0224] <改変クモ糸フィブロイン繊維の調製>

(1) ドープ液の調製

ジメチルスルホキシド (DMSO) に、上述の改変クモ糸フィブロイン (

P R T 7 9 9) を濃度 2 4 質量%となるよう添加した後、溶解促進剤として L i C l を濃度 4 . 0 質量%となるように添加した。その後、シェーカーを使用して、改変クモ糸フィブロインを 3 時間かけて溶解させ、D M S O 溶液を得た。得られた D M S O 溶液中のゴミと泡を取り除き、ドープ液とした。ドープ液の溶液粘度は 9 0 ° C において 5 0 0 0 c P (センチポアズ)であった。

[0225] (2) 紡糸

上記のようにして得られたドープ液と図 4 に示される紡糸装置 1 0 を用いて公知の乾湿式紡糸を行って、改変クモ糸フィブロインからなるフィラメントを得た。なお、ここでは、乾湿式紡糸を下記の条件で行った。

凝固液 (メタノール) の温度 : 5 ~ 1 0 ° C

延伸倍率 : 4 . 5 2 倍

乾燥温度 : 8 0 ° C

そして、このフィラメントをポビンに巻き取った。

[0226] <実施例 1 >

上記のようにして得られてポビンに巻き取られた改変クモ糸フィラメント (人工クモ糸フィラメント) を複数本束ねて、卓上型繊維裁断機で 3 8 m m の長さに裁断し、人工クモ糸ステープルを作製した。作製した人工クモ糸ステープルを 4 0 ° C の水に 1 分浸漬して縮れさせることで捲縮し、その後、4 0 ° C で 1 8 時間乾燥させて、捲縮ステープルを得た。この捲縮ステープルを同質量に対して紡績油剤として 4 % の水と油 2 % を散布した。密閉梱包状態で 1 2 時間置き紡績油剤を浸透させた。

[0227] 紡毛紡績機械 4 山カード機械でカーディングを行い後にミュール精紡機で伸ばしながら撚りをかけた、この時のドラフト率は 1 . 4 5、撚数 Z 3 4 0 で目標紡績番手は毛番 3 0 N m になるように紡績機械各部を調整した。出来たコップを繋ぎコーンアップを行った、この工程の間、工場内湿度を 7 5 % に調整して、繊維内水分率が下がらない様に管理した。この工程の間の繊維水分率は 1 4 ~ 1 2 % であった (公定水分率換算)。その後、コーンアップ

状態で24時間、庫内で室温20%の中に保管した。24時間後の繊維水分率は9%であった、(公定水分率換算)。出来上がった紡績糸を用いて、14Gの丸編み機械で天竺組織を編み、斜行が出るか確認した。得られた編地を図5に示す。

[0228] 図5に示されるように、人工クモ糸フィブロイン繊維からなる紡績糸(参考として、番手数:30Nm、撚数:340T/m)の単糸を横編み機で編成して編地を作製したところ、斜行は見られず、無斜行編地を得ることができた。番手数が30Nmである単糸は、細く、その編成物である編地は、優れた風合いと軟らかさを呈した。

[0229] <比較例1>

実施例1と同様の方法で、人工クモ糸ステープルを作製し、捲縮ステープルを得た。この捲縮ステープルを公知の紡績設備を用いて紡績し、18Nmの織度と340T/mの撚数を有する紡績糸の単糸を得、コーンアップした。コーンアップ後、紡績糸中の水分率を低下させるための特別な操作を行うことなく(すなわち長時間の保管をせずに1時間後に)、横編み機により、天竺編みにて編地を編成した。得られた編地を図6に示す。

[0230] 図6に示されるように、人工クモ糸フィブロイン繊維からなる、番手数:18Nm、撚数340T/mの紡績糸の単糸を横編み機で編成して編地を作製したところ、斜行が見られた。

産業上の利用可能性

[0231] 本発明によれば、例えば、タンパク質繊維糸のコーンアップ後の水分率が、少なくとも加撚工程を含むコーンアップ前の工程中における水分率よりも低下させられることにより、斜行や歪みの原因となり得る残存トルクを解消させることができる。さらには、本発明に係るタンパク質繊維糸は残留トルクが小さいため、毛羽が発生し難い。よってピリングの発生が抑制可能である。

符号の説明

[0232] 1…押し出し装置、2…未延伸糸製造装置、3…湿熱延伸装置、4…乾燥装

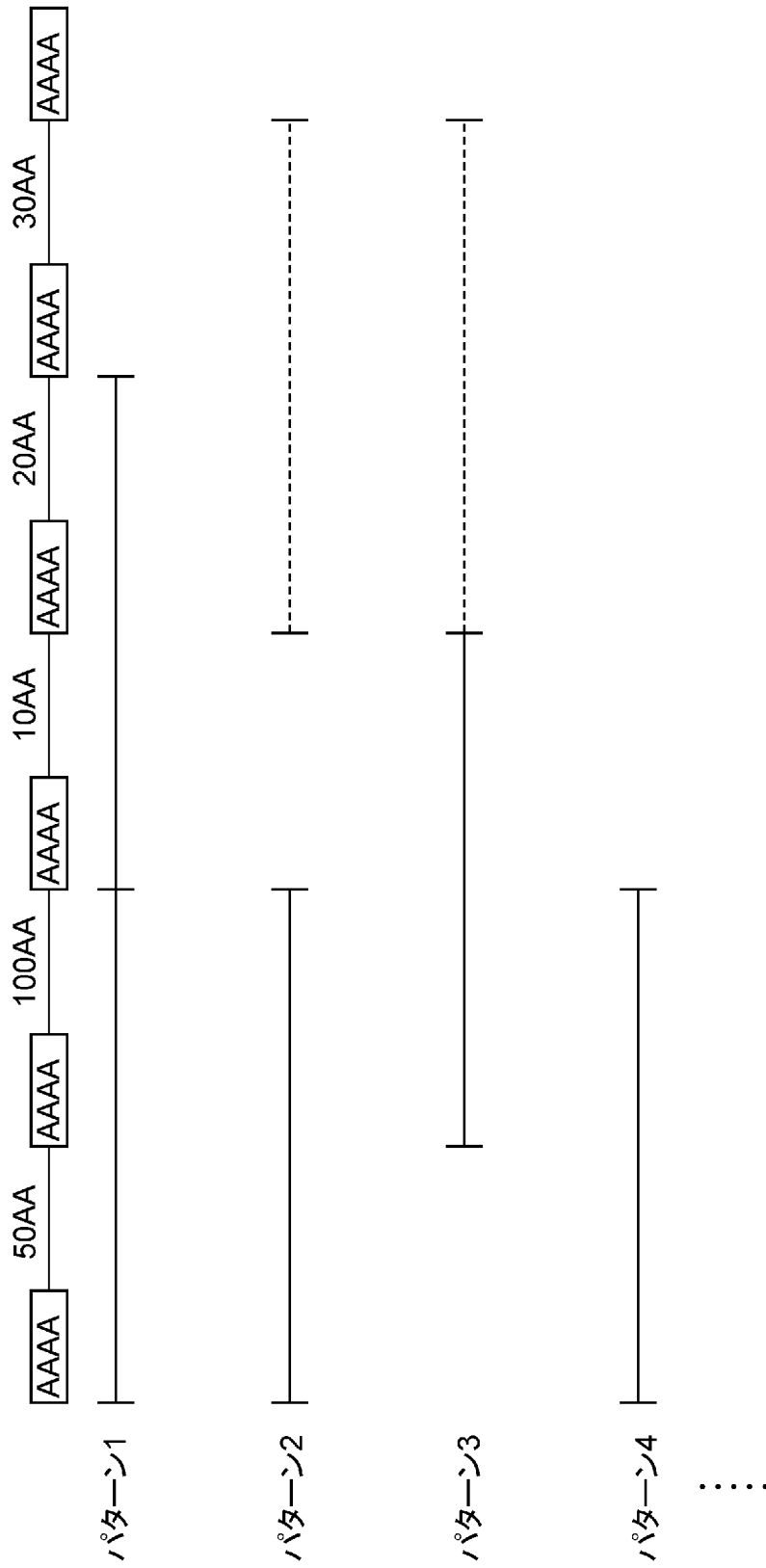
置、6…ドープ液、10…紡糸装置、20…凝固液槽、21…延伸浴槽、36…改変クモ糸フィブロイン繊維。

請求の範囲

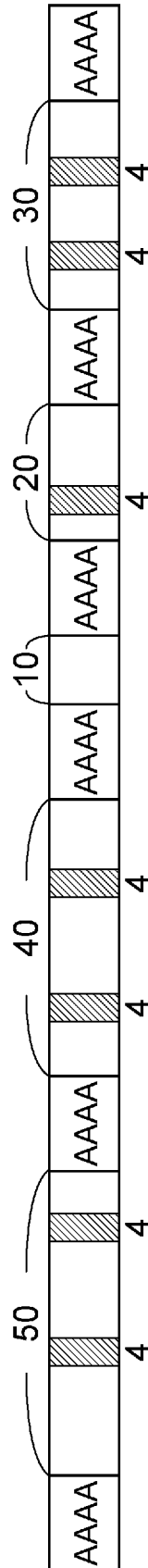
- [請求項1] 改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸であって、加撚が施された後に水分率を低下させられた、タンパク質繊維糸。
- [請求項2] 改変フィブロイン繊維を含む前記紡績糸の単糸であって、少なくとも改変フィブロイン繊維に加撚を施す加撚工程において第1の湿度環境に曝され、前記加撚工程の後に前記第1の湿度環境よりも低い湿度を有する第2の湿度環境に曝されて水分率を低下させられた、請求項1に記載のタンパク質繊維糸。
- [請求項3] 前記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインである、請求項1または2に記載のタンパク質繊維糸。
- [請求項4] 請求項1～3の何れか一項に記載のタンパク質繊維糸を編成または製織してなる編織体。
- [請求項5] 改変フィブロイン繊維を含む撚糸、改変フィブロイン繊維を含む仮撚糸、および、改変フィブロイン繊維を含む紡績糸のうちの何れかである単糸を製造するタンパク質繊維糸の製造方法であって、
改変フィブロイン繊維を含む繊維を撚ることで前記単糸を得る加撚工程と、
前記加撚工程の後に実施され、前記単糸の水分率を低下させる水分率低下工程と、を備える、タンパク質繊維糸の製造方法。
- [請求項6] 改変フィブロイン繊維を含む紡績糸の単糸を紡績する紡績工程であって、第1の湿度環境下で前記改変フィブロイン繊維に加撚を施す前記加撚工程を含む紡績工程と、
前記紡績工程の後に実施され、前記第1の湿度環境よりも低い湿度を有する第2の湿度環境下で前記単糸の水分率を低下させる前記水分率低下工程と、を備える、請求項5に記載のタンパク質繊維糸の製造方法。

- [請求項7] 前記第1の湿度環境下の湿度が60%以上であり、前記第2の湿度環境下の湿度が50%以下であり、前記水分率低下工程で前記単糸の水分率を15%以下（公定水分率換算）に低下させる、請求項6に記載のタンパク質繊維糸の製造方法。
- [請求項8] 前記改変フィブロインが改変クモ糸フィブロインである、請求項5～7の何れか一項に記載のタンパク質繊維糸の製造方法。
- [請求項9] 請求項5～8の何れか一項に記載のタンパク質繊維糸の製造方法で製造された前記単糸を編成または製織する、編織体の製造方法。

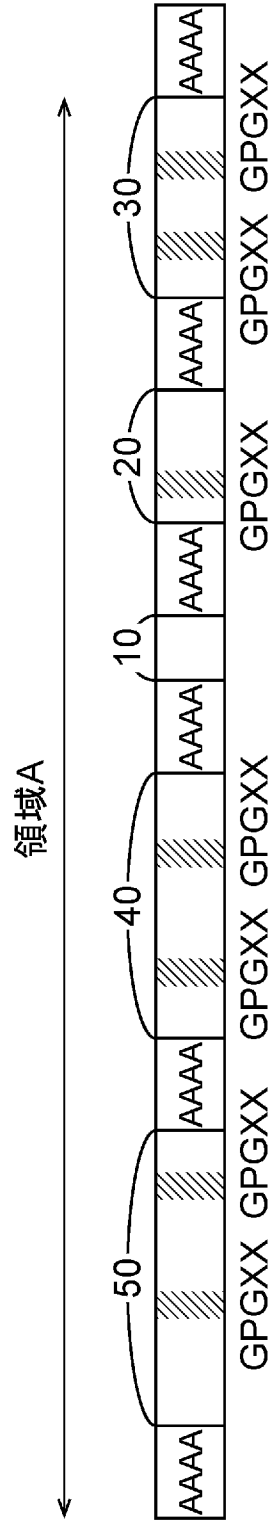
[図1]



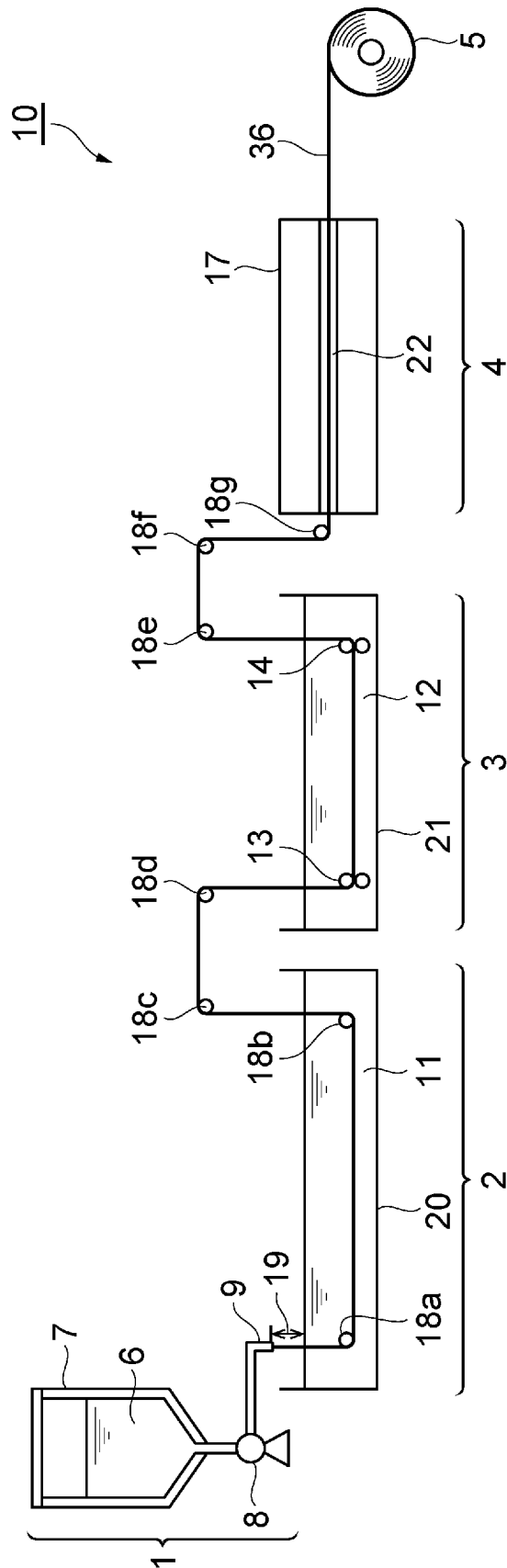
[図2]



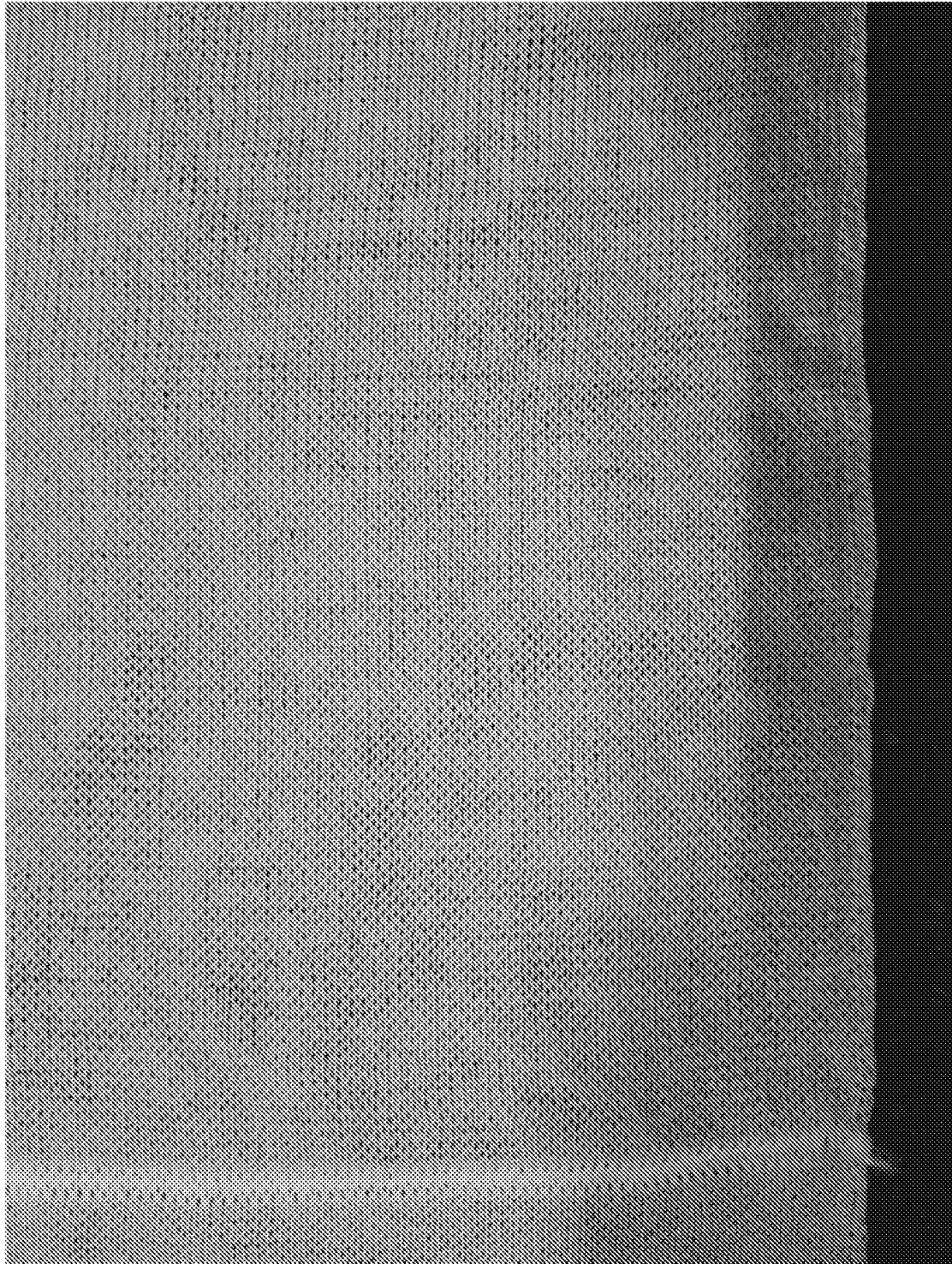
[図3]



[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/003465

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. D02G3/02(2006.01) i, D01F4/02(2006.01) i, D03D15/00(2006.01) i,
D04B1/04(2006.01) i, D04B21/00(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. D02G1/00-3/48, D02J1/00-13/00, D01F1/00-6/96, D01F9/00-9/04,
D03D1/00-27/18, D04B1/00-1/28, D04B21/00-21/20

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-294068 A (NOHASHI KK) 21 October 1994, claims,	1-2, 4-7, 9
Y	paragraph [0006], examples (Family: none)	3, 8
Y	WO 2012/165477 A1 (SPIBER INC.) 06 December 2012, claims (Family: none)	3, 8
A	WO 2016/201369 A1 (BOLT THREADS, INC.) 15 December 2016, claims, examples & JP 2018-521239 A & US 2018/0216260 A1 & EP 3307765 A1	1-9
A	JP 1-162875 A (KANEBO KABUSHIKI KAISHA) 27 June 1989, claims, examples (Family: none)	1-9
A	JP 1-183534 A (MIZUSHIMA, Shigezaburo) 21 July 1989, claims, examples (Family: none)	1-9

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
18 March 2019 (18.03.2019)

Date of mailing of the international search report
09 April 2019 (09.04.2019)

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

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. D02G3/02(2006.01)i, D01F4/02(2006.01)i, D03D15/00(2006.01)i, D04B1/04(2006.01)i, D04B21/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. D02G1/00-3/48, D02J1/00-13/00, D01F1/00-6/96, D01F9/00-9/04, D03D1/00-27/18, D04B1/00-1/28, D04B21/00-21/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 6-294068 A (野橋株式会社) 1994. 10. 21, 特許請求の範囲、段落 [0006]、実施例 (ファミリーなし)	1-2, 4-7, 9 3, 8
Y	WO 2012/165477 A1 (スパイバー株式会社) 2012. 12. 06, 請求の範囲 (ファミリーなし)	3, 8
A	WO 2016/201369 A1 (BOLT THREADS, INC) 2016. 12. 15, Claims, Examples & JP 2018-521239 A & US 2018/0216260 A1 & EP 3307765 A1	1-9

☑ 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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.03.2019

国際調査報告の発送日

09.04.2019

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 相田 元

4 S

3647

電話番号 03-3581-1101 内線 3474

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 1-162875 A (鐘紡株式会社) 1989. 06. 27, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 1-183534 A (水島 繁三郎) 1989. 07. 21, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9