

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7198481号  
(P7198481)

(45)発行日 令和5年1月4日(2023.1.4)

(24)登録日 令和4年12月21日(2022.12.21)

(51)国際特許分類	F I
C 0 9 K 21/14 (2006.01)	C 0 9 K 21/14 Z N A
D 0 1 F 1/07 (2006.01)	D 0 1 F 1/07
D 0 1 F 4/02 (2006.01)	D 0 1 F 4/02

請求項の数 6 (全34頁)

(21)出願番号	特願2018-183251(P2018-183251)	(73)特許権者	508113022 S p i b e r 株式会社 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1
(22)出願日	平成30年9月28日(2018.9.28)	(74)代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(65)公開番号	特開2020-50805(P2020-50805A)	(74)代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
(43)公開日	令和2年4月2日(2020.4.2)	(74)代理人	100176773 弁理士 坂西 俊明
審査請求日	令和3年9月27日(2021.9.27)	(72)発明者	安部 佑之介 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番地1 S p i b e r 株式会社内
		審査官	中野 孝一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 難燃性付与剤、及び難燃性を付与する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

改変フィブロインを有効成分として含有し、  
前記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り、かつ前記ドメイン配列が、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列とは異なるものである、難燃性付与剤。

[式1及び式2中、 $(A)_n$ モチーフは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基数は2~27である。 $(A)_n$ 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%以上である。REPは2~200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは2~300の整数を示す。複数存在する $(A)_n$ モチーフは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。複数存在するREPは、互いに同一のアミノ酸配列でもよく、異なるアミノ酸配列でもよい。]

【請求項2】

前記改変フィブロインが、疎水性指標の平均値(平均HI)が0以下の改変フィブロインを含む、請求項1に記載の難燃性付与剤。

【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を含む、請求項1又は2に記載の難燃性付与剤。

【請求項4】

限界酸素指数（LOI）値が、26.0以上である、請求項1～3のいずれか一項に記載の難燃性付与剤。

【請求項5】

繊維の形態である、請求項1～4のいずれか一項に記載の難燃性付与剤。

【請求項6】

物品に難燃性を付与する方法であって、

前記物品に改変フィブロインを含有させる工程を備え、

前記改変フィブロインは、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り、かつ前記ドメイン配列が、天然由来のフィブロインのアミノ酸配列とは異なるものである、方法。

10

〔式1及び式2中、 $(A)_n$ モチーフは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基数は2～27である。 $(A)_n$ 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%以上である。REPは2～200アミノ酸残基から構成されるアミノ酸配列を示す。mは2～300の整数を示す。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。〕

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、難燃性付与剤、及び難燃性を付与する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

従来から、衣服、建材、電気電子製品等の様々な分野で難燃性材料が利用されている。難燃性材料には、材料自体が難燃性を有しているものと、難燃性を付与する難燃性付与剤が材料に添加されて難燃性が発揮されるものがある。

【0003】

難燃性付与剤にも数多くの種類があり、例えば、特許文献1には、合成樹脂製のフィルムに添加される合成高分子からなる難燃性付与剤が開示されている。また、特許文献1には、繊維製品に添加される天然鉱物からなる難燃性付与剤が開示されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】特開2005-305778号公報  
特開2003-20596号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従来用いられている難燃性付与剤には、それぞれ短所が存在する。すなわち、合成高分子からなる難燃性付与剤は、材料が、例えば、天然繊維等のように生分解性を有するもの等であると、難燃性付与剤を使用することによって生分解性の特徴が失われてしまうこととなる。また、天然鉱物等の天然物からなる難燃性付与剤は、工業的な合成品とは異なり、一定の品質のものを安定的に取得することが容易ではないため、材料に対して所望の難燃性を安定的に付与することが困難な場合もあった。このように、難燃性に関する需要者の多様なニーズを満たすためには、更なる選択肢の提供が必要である。

40

【0006】

本発明は、新規な難燃性付与剤を提供することを目的とする。本発明はまた、所定の物品に難燃性を付与する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】

【0007】

50

本発明者らは、改変フィブロインが優れた難燃性を有することを見出した。本発明は、この新規な知見に基づくものである。

【0008】

本発明は、例えば、以下の各発明に関する。

[1]

改変フィブロインを有効成分として含有する、難燃性付与剤。

[2]

上記改変フィブロインが、疎水性指標の平均値（平均HI）が0以下の改変フィブロインを含む、[1]に記載の難燃性付与剤。

[3]

上記改変フィブロインが、改変クモ糸フィブロインを含む、[1]又は[2]に記載の難燃性付与剤。

[4]

限界酸素指数（LOI）値が、26.0以上である、[1]～[3]のいずれかに記載の難燃性付与剤。

[5]

繊維の形態である、[1]～[4]のいずれかに記載の難燃性付与剤。

[6]

物品に難燃性を付与する方法であって、

上記物品に改変フィブロインを含有させる工程を備える、方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、新規な難燃性付与剤の提供が可能となる。本発明によればまた、所定の物品に難燃性を付与する方法の提供が可能となる。

【0010】

本発明によれば、例えば、生分解性を備えた材料に対して、本発明に係る難燃性付与剤を混ぜ込む等することにより、生分解性を損なうことなく、難燃性を付与することができる。本発明によればまた、所定の物品に含有させる改変フィブロイン（有効成分）の量を調節することにより、物品の難燃性の程度を調節することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】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】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】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】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】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。

【発明を実施するための形態】

【0012】

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。

【0013】

〔難燃性付与剤〕

本実施形態に係る難燃性付与剤は、改変フィブロインを有効成分として含有する。

【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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>、又は式2：[(A)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>-(A)<sub>n</sub>モチーフで表されるドメイン配列を含むタンパク質である。改変フィブロインは、ドメイン配列のN末端側及びC末端側のいずれか一方又は両方に更にアミノ酸配列（N末端配列及びC末端配列）が付加されていてもよい。N末端配列及びC末端配列は、これに限定されるものではないが、典型的には、フィ

10

20

30

40

50

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

10

【0016】

「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： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 、又は式2： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ で表されるアミノ酸配列を意味する。ここで、 $(A)_n$ モチーフは、アラニン残基を主とするアミノ酸配列を示し、アミノ酸残基数は2～27である。 $(A)_n$ モチーフのアミノ酸残基数は、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。

20

30

【0018】

本実施形態に係る改変フィブロインは、例えば、クローニングした天然由来のフィブロインの遺伝子配列に対し、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。

40

【0019】

天然由来のフィブロインは、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)

50

yamamai)、柞蚕(*Anteraea pernyi*)、楓蚕(*Eriogyna pyretorum*)、蓖蚕(*Pilosamia Cynthia ricini*)、樗蚕(*Samia cynthia*)、栗虫(*Caligula japonica*)、チュウサー蚕(*Anteraea mylitta*)、ムガ蚕(*Anteraea 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 similima xanthoptera*)の幼虫が吐出するホーネットシルクタンパク質が挙げられる。

#### 【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AA27840.1(アミノ酸配列))が挙げられる。

10

#### 【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、マメタイセキグモ及びムツガ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ピ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(*Poltyis*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、ハラピ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)等の牽引系タンパク質、MiSp(MiSp1及びMiSp2)等が挙げられる。

20

30

40

#### 【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(adf-4)[*Araneus diadematus*由来](GenBankアクセッション番号AAC47011(アミノ酸配列)、U47856(塩基配列))、dragline silk protein spidroin 1[*Nephila clavipes*由来](GenBankアクセッション番号AAC04504(アミノ酸配列)、U37520(塩基配列))、major ampullate spidroin 1[*Latrodectus hesperus*由来](G

50

enBank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 [Euprosthénops 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 [Euprosthénops 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。

10

## 【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。

20

## 【0025】

本実施形態に係る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、改変クモ系フィブロイン(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。改変フィブロインとしては、難燃性により優れることから、改変クモ系フィブロインが好ましい。

30

## 【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系管しおり系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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

40

## 【0027】

第1の改変フィブロインとしては、式1: [(A)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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)<sub>n</sub>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の整数が更に好ましく、4~16の整数が更に好ましく、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好ましく、

50

ましい。第1の改変フィブロインは、式1： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 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】

第1の改変フィブロインは、式1： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 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。

【0029】

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。

【0030】

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 ADF3 KaiLarge NRSH1)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。

【0031】

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。

【0032】

(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。

【0033】

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えることができる。

【0034】

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。

【0035】

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。

【0036】

第2の改変フィブロインは、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み、上記ドメイン配列から、最もC末端側に位置する(A)<sub>n</sub>モチーフから上

10

20

30

40

50

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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>モチーフ中の全アミノ酸残基数に対するアラニン残基数は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】

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。

#### 【0038】

z/wの算出方法を更に詳細に説明する。まず、式1: [(A)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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)<sub>n</sub>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。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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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】

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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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から明らかなどおり、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%)。

#### 【0040】

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%以下であってよい。

#### 【0041】

10

20

30

40

50



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、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。

10

## 【0042】

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。

20

## 【0043】

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-PR T380)、配列番号7(Met-PR T410)、配列番号8(Met-PR T525)若しくは配列番号9(Met-PR T799)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。

## 【0044】

(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-PR T313)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)<sub>n</sub>モチーフを欠失させ、更にC末端配列の手前に[(A)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

30

40

## 【0045】

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。また、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。

## 【0046】

50

(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。

【0047】

(2 - i 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 - i i) 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。

【0048】

(2 - i 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。

10

【0049】

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。

【0050】

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。

20

【0051】

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。

30

【0052】

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。

【0053】

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。

40

【0054】

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 - i i i) 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 - i v) 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。

【0055】

50

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。

【0056】

(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。

【0057】

(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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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。

10

【0058】

(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。

【0059】

第2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。

20

【0060】

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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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ることができる。

【0061】

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)<sub>n</sub>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。

30

【0062】

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)<sub>n</sub>モチーフ毎に1つの(A)<sub>n</sub>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。

【0063】

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)<sub>n</sub>モチーフの欠失、及び1つの(A)<sub>n</sub>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。

40

【0064】

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)<sub>n</sub>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。

【0065】

第3の改変フィブロインは、式1: [(A)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]ユニットのアミノ酸残基数を足し

50

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)<sub>n</sub>モチーフ中の全アミノ酸残基数に対するアラニン残基数は 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。

#### 【0066】

$x/y$  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)<sub>n</sub>モチーフ-第1のREP(50アミノ酸残基)-(A)<sub>n</sub>モチーフ-第2のREP(100アミノ酸残基)-(A)<sub>n</sub>モチーフ-第3のREP(10アミノ酸残基)-(A)<sub>n</sub>モチーフ-第4のREP(20アミノ酸残基)-(A)<sub>n</sub>モチーフ-第5のREP(30アミノ酸残基)-(A)<sub>n</sub>モチーフという配列を有する。

10

#### 【0067】

隣合う2つの[(A)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

20

#### 【0068】

次に各パターンについて、選択した隣合う2つの[(A)<sub>n</sub>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。

30

#### 【0069】

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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]ユニットの組は破線で示した。

#### 【0070】

各パターンにおいて、実線で示した隣合う2つの[(A)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

40

#### 【0071】

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。

#### 【0072】

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

50

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。

【0073】

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)<sub>n</sub>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。

10

【0074】

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

20

【0075】

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%)。

【0076】

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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

30

【0077】

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。

40

【0078】

(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)<sub>n</sub>モチーフを欠失させ、更にC末端配列の手前に $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]$ 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。

【0079】

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

50

: 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。

【0080】

(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。

10

【0081】

(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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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。

【0082】

(3-iii)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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

20

【0083】

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。

【0084】

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。

30

【0085】

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。

40

【0086】

(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。

【0087】

(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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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。

【0088】

50

(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  $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]$  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  $1.8 \sim 11.3$  となる隣合う 2 つの  $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]$  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。

【0089】

第 3 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。

10

【0090】

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。

20

【0091】

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。

30

【0092】

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。

【0093】

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。

40

【0094】

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。

【0095】

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

50

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。

【0096】

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。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。

10

【0097】

第5の改変フィブロインは、式1: [(A)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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。

20

【0098】

アミノ酸残基の疎水性指標については、公知の指標(Hydrophathy index: Kyte J, & Doolittle R (1982) "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein", J. Mol. Biol., 157, pp. 105-132)を使用する。具体的には、各アミノ酸の疎水性指標(ハイドロパシー・インデックス、以下「HI」とも記す。)は、下記表1に示すとおりである。

30

【0099】

【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

40

【0100】

p/qの算出方法を更に詳細に説明する。算出には、式1: [(A)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub>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)<sub>n</sub>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

50



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。

#### 【0101】

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 $7 \times 4 = 28$ となる。また、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)<sub>n</sub>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。

#### 【0102】

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。

#### 【0103】

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。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。

#### 【0104】

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。

#### 【0105】

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-PR T 7 2 0)、配列番号20(Met-PR T 6 6 5)若しくは配列番号21(Met-PR T 6 6 6)で示されるアミノ酸配列、又は(5-ii)配列番号19、配列番号2

10

20

30

40

50

0 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。

【0106】

(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-PR T 410) で示されるアミノ酸配列に対し、C 末端側の末端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-PR T 525) 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。

10

【0107】

(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。

【0108】

(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)<sub>n</sub>モチーフ-REP]<sub>m</sub> 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。

20

【0109】

(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)<sub>n</sub> 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)<sub>n</sub> 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。

30

【0110】

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。

【0111】

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 (PR T 720)、配列番号 23 (PR T 665) 若しくは配列番号 24 (PR T 666) 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。

【0112】

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。

40

【0113】

(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。

【0114】

(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

50

。(5 - 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。

【0115】

(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。

10

【0116】

第 5 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。

【0117】

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。

【0118】

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 GPGX X 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。

20

【0119】

第 6 の改変フィブロインが、REP 中に GPGX X モチーフを含む場合、GPGX X 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。GPGX X 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。

【0120】

本明細書において、「GPGX X モチーフ含有率」は、以下の方法により算出される値である。

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に含まれる全ての REP において、その領域に含まれる GPGX X モチーフの個数の総数を 3 倍した数 (即ち、GPGX X 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、GPGX X モチーフ含有率は  $s/t$  として算出される。

30

【0121】

GPGX X モチーフ含有率の算出において、「最も C 末端側に位置する  $(A)_n$  モチーフからドメイン配列の C 末端までの配列をドメイン配列から除いた配列」を対象としているのは、「最も C 末端側に位置する  $(A)_n$  モチーフからドメイン配列の C 末端までの配列」(REP に相当する配列) には、フィブロインに特徴的な配列と相関性の低い配列が含まれることがあり、m が小さい場合 (つまり、ドメイン配列が短い場合)、GPGX X モチーフ含有率の算出結果に影響するので、この影響を排除するためである。なお、REP の C 末端に「GPGX X モチーフ」が位置する場合、「XX」が例えば「AA」の場合であっても、「GPGX X モチーフ」として扱う。

40

【0122】

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 GPGX X モチーフ含有率の算出方法を具体的に説明する。まず、図 5 に示した改変フィブ

50

ロインのドメイン配列（「 $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m - (A)_n \text{モチーフ}$ 」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 $7 \times 3 = 21$ 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 $(A)_n \text{モチーフ}$ 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5の改変フィブロインの場合 $21 / 150 = 14.0\%$ となる。

10

【0123】

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。

【0124】

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： $[(A)_n \text{モチーフ} - \text{REP}]_m$ 、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 $(A)_n \text{モチーフ}$ 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 $(A)_n \text{モチーフ}$ 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 $(A)_n \text{モチーフ}$ 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」を対象としている理由は、上述した理由と同様である。

20

【0125】

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。

30

【0126】

「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。

【0127】

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。

40

【0128】

第6の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

50

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以下であってよい。

【0129】

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

10

【0130】

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。

20

【0131】

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。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ることもできる。

【0132】

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。

30

【0133】

(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。

40

50

## 【 0 1 3 4 】

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 - PRT 525) 中の Q Q を全て V L 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 Q Q を全て V L に置換し、かつ残りの Q を I に置換したものである。

## 【 0 1 3 5 】

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 - PRT 410) 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 Q Q を全て V F に置換し、かつ残りの Q を I に置換したものである。

## 【 0 1 3 6 】

配列番号 41 で示されるアミノ酸配列 (Met - PRT 917) は、配列番号 7 で示されるアミノ酸配列中の Q Q を全て L I 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 - PRT 1028) は、配列番号 7 で示されるアミノ酸配列中の Q Q を全て I F に置換し、かつ残りの Q を T に置換したものである。

## 【 0 1 3 7 】

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)。

## 【 0 1 3 8 】

## 【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

## 【 0 1 3 9 】

(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。

## 【 0 1 4 0 】

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

## 【 0 1 4 1 】

(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。また、(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。

【0142】

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。

【0143】

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 - i v) 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。

【0144】

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)。

【0145】

【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
PRT1028(配列番号44)	0.0%	28.1%	0.05

【0146】

(6 - i i i) 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。

【0147】

(6 - i v) 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 - i v) の改変フィブロインもまた、式1: [(A)<sub>n</sub>モチー

フ - R E P ]<sub>m</sub>、又は式 2 : [ ( A )<sub>n</sub>モチーフ - R E P ]<sub>m</sub> - ( A )<sub>n</sub>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。

【0148】

(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、G P G X Xモチーフ含有率が10%以上であることが好ましい。

【0149】

第6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。

10

【0150】

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よい。

【0151】

改変フィブロインとしては、難燃性により優れることから、親水性改変フィブロインであることが好ましい。本明細書において、「親水性改変フィブロイン」とは、改変フィブロインを構成する全てのアミノ酸残基の疎水性指標(HI)の総和を求め、次にその総和を全アミノ酸残基数で除した値(平均HI)が0以下である改変フィブロインである。疎水性指標は表1に示したとおりである。また、平均HIが0超である改変フィブロインを疎水性改変フィブロインと呼ぶこともある。

20

【0152】

親水性改変フィブロインとしては、例えば、配列番号4で示されるアミノ酸配列、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、配列番号13、配列番号11、配列番号14又は配列番号15で示されるアミノ酸配列、配列番号18、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、配列番号17、配列番号11、配列番号14又は配列番号15で示されるアミノ酸配列、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を含む改変フィブロインが挙げられる。

30

【0153】

疎水性改変フィブロインとしては、例えば、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33又は配列番号43で示されるアミノ酸配列、配列番号35、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41又は配列番号44で示されるアミノ酸配列を含む改変フィブロインが挙げられる。

【0154】

(改変フィブロインの製造方法)

上記いずれの実施形態に係る改変フィブロインも、例えば、当該改変フィブロインをコードする核酸配列と、当該核酸配列に作動可能に連結された1又は複数の調節配列とを有する発現ベクターで形質転換された宿主により、当該核酸を発現させることにより生産することができる。

40

【0155】

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フィブロイン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

50



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、改変フィブロインの精製及び/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改変フィブロインをコードする核酸を合成してもよい。

**【0156】**

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。

10

**【0157】**

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、改変フィブロイン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。

**【0158】**

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。

20

**【0159】**

原核生物の宿主の好ましい例として、エシェリヒア属、ブレヴィバチルス属、セラチア属、バチルス属、ミクロバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属及びシュードモナス属等に属する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。ブレヴィバチルス属に属する微生物として、例えば、ブレヴィバチルス・アグリ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。ブレヴィバクテリウム属に属する微生物として、例えば、ブレヴィバクテリウム・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。

30

**【0160】**

原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、pBTrp2（ベーリンガーマンハイム社製）、pGEX（Pharmacia社製）、pUC18、pBluescriptII、pSupex、pET22b、pCold、pUB110、pNC02（特開2002-238569号公報）等を挙げることができる。

40

**【0161】**

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。

**【0162】**

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、YEP13（ATCC37115）、YEp24（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

50

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)〕、エレク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。

【0163】

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。

【0164】

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、培養培地中に当該改変フィブロインを生成及び蓄積させ、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。

10

【0165】

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み、宿主の培養を効率的に行える培地であれば天然培地及び合成培地のいずれを用いてもよい。

【0166】

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、及びこれらを含みする糖蜜、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、コーンステープリカー、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。

20

【0167】

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。

30

【0168】

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-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。

40

【0169】

発現させた改変フィブロインの単離及び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、当該改変フィブロインが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、宿主細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁した後、超音波破碎機、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碎し、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

50

ス、D I A I O N H P A - 7 5 (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 - S e p h a r o s e F F ( P h a r m a c i a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で使用し、精製標品を得ることができる。

【 0 1 7 0 】

また、改変フィブロインが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に宿主細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として改変フィブロインの不溶体を回収する。回収した改変フィブロインの不溶体は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改変フィブロインの精製標品を得ることができる。当該改変フィブロインが細胞外に分泌された場合には、培養上清から当該改変フィブロイン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。

10

【 0 1 7 1 】

(難燃性付与剤)

本実施形態に係る難燃性付与剤は、改変フィブロインを1種単独で含有するものであってもよく、改変フィブロイン2種以上を組み合わせると含有するものであってもよい。

【 0 1 7 2 】

本実施形態に係る難燃性付与剤は、限界酸素指数(L O I)値が、18以上であってよく、20以上であってよく、22以上であってよく、24以上であってよく、26以上であってよく、28以上であってよく、29以上であってよく、30以上であってよい。本明細書において、L O I値は、消防庁危険物規制課長 消防危50号平成7年5月31日の粉粒状又は融点の低い合成樹脂の試験方法に準拠して測定される値である。

20

【 0 1 7 3 】

本実施形態に係る難燃性付与剤は、その形態、用途等に応じて、更に他の添加剤(有効成分以外の成分)を含むものであってもよい。添加剤としては、例えば、可塑剤、レベリング剤、架橋剤、結晶核剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、着色剤、フィラー、及び合成樹脂が挙げられる。添加剤の含有量は、難燃性付与剤の全量100質量部に対して、50質量部以下であってよい。

30

【 0 1 7 4 】

本実施形態に係る難燃性付与剤は、例えば、粉末状、ペースト状、液状(例えば、懸濁液、溶液)のいずれの形態であってよい。本実施形態に係る難燃性付与剤はまた、例えば、繊維、フィルム、ゲル、多孔質体、パーティクル等の形態であってよい。本実施形態に係る難燃性付与剤の形態は、難燃性を付与する対象(被難燃性付与物品)及びその用途に応じて適宜設定してよい。

【 0 1 7 5 】

本実施形態に係る難燃性付与剤は、改変フィブロインを主成分として含有するため、上述した任意の形態に成形することができる。当該成形体は、改変フィブロインそのものを成形したものであってもよく、改変フィブロインと他の材料とを組み合わせると成形したものであってもよい。

40

【 0 1 7 6 】

本実施形態に係る難燃性付与剤を粉末状の形態で調製する場合、例えば、上述した改変フィブロインの製造方法により得られるタンパク質を乾燥させて粉末状にしてもよい。タンパク質の粉末には、必要に応じて、他の添加剤を含有させてもよい。

【 0 1 7 7 】

本実施形態に係る難燃性付与剤を液状(例えば、溶液)の形態で調製する場合、例えば、上述した改変フィブロインの製造方法により得られるタンパク質を改変フィブロインを

50

溶解可能な溶媒で溶解させて液状（改変フィブロイン溶液）にしてもよい。改変フィブロイン溶液には、必要に応じて、他の添加剤を含有させてもよい。改変フィブロインを溶解可能な溶媒としては、例えば、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、及びヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）等が挙げられる。当該溶媒には、溶解促進剤として無機塩を添加してもよい。

#### 【0178】

本実施形態に係る難燃性付与剤を繊維の形態で調製する場合、例えば、上述した改変フィブロイン溶液をドープ液とし、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繊維（改変フィブロイン繊維）にしてもよい。繊維の形態としては、単一糸であってもよく、混紡糸、混織糸、混織糸、交織糸、合撚糸及びカバーリング糸等の複合糸であってもよく、不織布等であってもよい。

10

#### 【0179】

改変フィブロイン繊維は、短繊維であっても、長繊維であってもよい。また、改変フィブロイン繊維は、改変フィブロイン繊維単独であってもよく、又は他の繊維と組み合わされてもよい。すなわち、改変フィブロイン繊維のみからなる単独糸、改変フィブロイン繊維と他の繊維とを組み合わせる複合糸が、それぞれ単独で、又はそれらが組み合わされて用いられてもよい。上記単独糸及び上記複合糸は、短繊維を撚り合わせたスパン糸であってもよく、長繊維を撚り合わせた、又は撚り合せていないフィラメント糸であってもよい。また、改変フィブロイン繊維は、短繊維であっても、長繊維であっても、糸に加工することなく、単独で、又は他の繊維と組み合わせて、繊維のまま用いることもできる。他の繊維としては、例えば、ナイロン、ポリエステル等の合成繊維、キュプラ、レーヨン等の再生繊維、綿、麻等の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には、繊維全量を基準として、改変フィブロイン繊維の含有量が、20質量%以上であることが好ましく、30質量%以上であることがより好ましく、40質量%以上であることが更に好ましく、50質量%以上であることが更に好ましい。

20

#### 【0180】

本実施形態に係る難燃性付与剤をフィルム、ゲル、多孔質体、パーティクル等の形態で調製する場合、例えば、特開2009-505668号公報、特開2009-505668号公報、特許第5678283号公報、特許第4638735号公報等に記載の方法に準じて製造することができる。

30

#### 【0181】

〔物品に難燃性を付与する方法〕

本実施形態に係る物品に難燃性を付与する方法は、物品に改変フィブロインを含有させる工程を備える。本発明に係る改変フィブロインは、難燃性に優れているため、物品に含有させることで、物品に難燃性を付与することができる。

#### 【0182】

物品は、難燃性を付与すべきものであれば、特に制限はされない。具体的には、織物、編物、不織布、綿、スポンジ、フィルム、レジン、複合材料（本実施形態に係る難燃性付与剤の形態は問わない）等を挙げることができる。

#### 【0183】

改変フィブロインを含有させる工程では、上述した本発明に係る難燃性付与剤を含有させることにより、改変フィブロインを含有させる工程であってもよい。改変フィブロインを含有させる方法としては、特に制限はなく、材料（原料）に改変フィブロインを混合する方法であってもよく、上述した成形体の形態で調製した難燃性付与剤を他の材料（成形体等）と組み合わせて物品を形成する方法であってもよい。また、改変フィブロイン（必要に応じて他の添加物を含んでもよい。）そのものを成形することで物品（成形体）を形成する方法であってもよい。

40

#### 【0184】

物品における改変フィブロインの含有量は、物品全量を基準として、20質量%以上であることが好ましく、30質量%以上であることがより好ましく、40質量%以上である

50

ことが更に好ましく、50質量%以上であることが更に好ましい。改変フィブロインの含有量の上限は、物品全量を基準として、100質量%であってもよく、90質量%以下であってもよい。物品における改変フィブロインの含有量を調節することで、物品の難燃性を制御することができる。すなわち、本発明に係る改変フィブロインは、難燃性に優れているため、物品における改変フィブロインの含有量を高めるにつれて、物品の難燃性をより高くすることができる。

【実施例】

【0185】

以下、実施例等に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0186】

〔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15で示されるアミノ酸配列を有する改変フィブロイン(PRT799)を設計した。設計した改変フィブロイン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、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。

【0187】

(2) タンパク質の発現

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<sub>600</sub>が0.005となるように添加した。培養液温度を30 に保ち、OD<sub>600</sub>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。

【0188】

【表4】

シード培養用培地

試薬	濃度(g/L)
グルコース	5.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.3
Yeast Extract	6.0
アンピシリン	0.1

【0189】

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マンターにOD<sub>600</sub>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。また培養液中の溶存酸素濃度を、溶存酸素飽和濃度の20%に維持するようにした。

【0190】

10

20

30

40

50

## 【表 5】

## 生産培地

試薬	濃度(g/L)
グルコース	12.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.4
Yeast Extract	15
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.04
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.04
アデカノール(アデカ、LG-295S)	0.1(mL/L)

10

## 【0191】

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。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-β-D-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り、目的とする改変フィブロインの発現を確認した。

20

## 【0192】

## (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(GE Avanti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、改変フィブロイン(PRT799)を得た。

30

## 【0193】

## 〔タンパク質繊維の製造〕

4.0質量%になるようにLiClを溶解させたジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒として用意し、そこに改変フィブロインの凍結乾燥粉末を、濃度24質量%となるよう添加し、シェーカーを使用して3時間溶解させた。その後、不溶物と泡を取り除き、改変フィブロイン溶液(紡糸原液)を得た。

40

## 【0194】

調製した紡糸原液を90℃にて目開き5μmの金属フィルターで濾過し、次いで30mLのステンレスシリンジ内で静置し、脱泡させた後に、ニードル径0.2mmのソリッドノズルから100質量%メタノール凝固浴槽中へ吐出させた。吐出温度は90℃であった。凝固後、得られた原糸を巻き取り、自然乾燥させて改変フィブロイン繊維(原料繊維)を得た。

## 【0195】

## 〔編地の製造〕

50

得られた原料繊維（撚り合せたフィラメント系）を使用して、丸編機を使用した丸編みで編地を製造した。編地は、太さ 180 デニール、ゲージ数 18 とした。得られた編地から 20 g 切り出して試験片とした。

【 0 1 9 6 】

〔 燃 焼 性 試 験 〕

燃焼性試験は、消防庁危険物規制課長 消防危 50 号平成 7 年 5 月 31 日の粉粒状又は融点の低い合成樹脂の試験方法に準拠した。試験は、温度 22 、相対湿度 45 %、気圧 1021 hPa の条件下で実施した。測定結果（酸素濃度（%）、燃焼率（%）、換算燃焼率（%））を表 6 に示す。

【 表 6 】

酸素濃度(%)	燃焼率(%)	換算燃焼率(%)
20.0	39.1	40.1
27.0	48.1	49.3
28.0	51.9	53.2
30.0	53.6	54.9
50.0	61.2	62.7
70.0	91.1	93.3
100.0	97.6	100.0

【 0 1 9 7 】

難燃性試験の結果、改変フィブロイン（PRT799）繊維で編んだ編地の限界酸素指数（LOI）値は 27.2 であった。一般に LOI 値が 26 以上あれば難燃性があるとされる。改変フィブロインは、難燃性に優れていることが分かる。したがって、改変フィブロイン単独で、又は改変フィブロインを他の材料と混ぜ込む等して物品を製造することにより、難燃性に優れた物品を得ることができる。

10

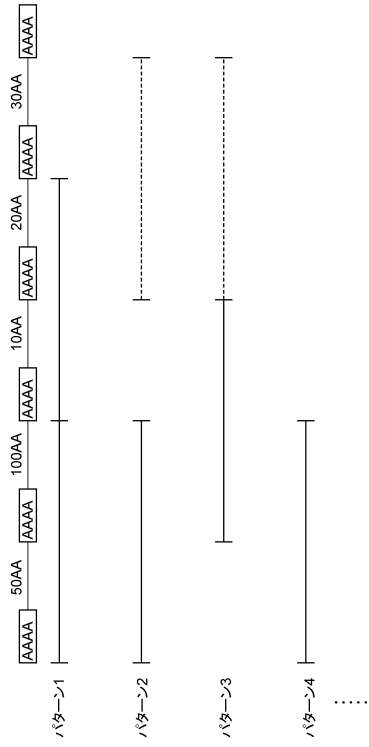
20

30

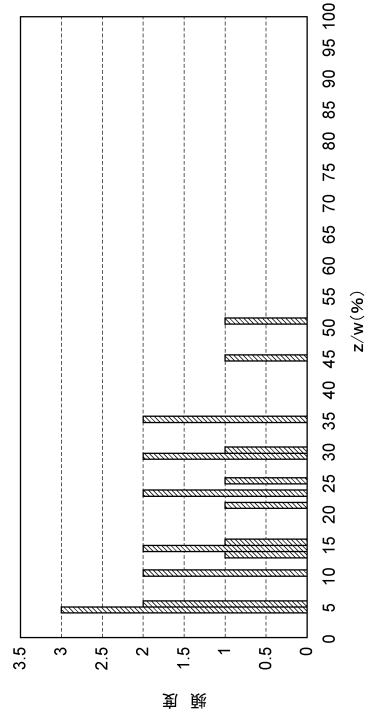
40

50

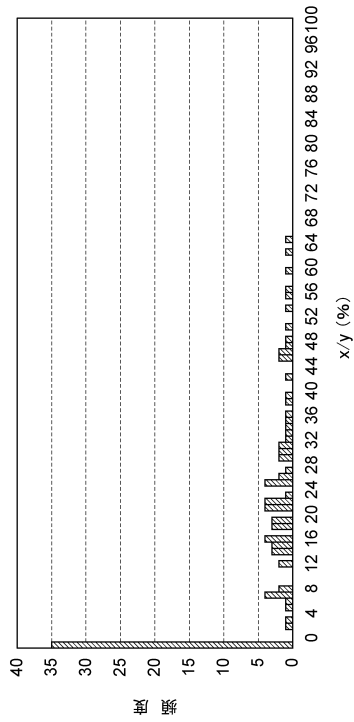
【図面】  
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

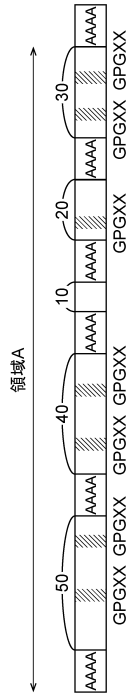
30

40

50



【 図 5 】



10

20

【 配列表 】

0007198481000001.app

30

40

50

---

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2018-525541(JP,A)  
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C09K21/00-21/14