

α -キモトリプシンを作用させた絹フィブロインの構造

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	塚田, 益裕
巻/号	55巻2号
掲載ページ	p. 126-130
発行年月	1986年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



α -キモトリプシンを作用させた絹フィブロインの構造

塚田 益裕

茨城県谷田部町・農林水産省蚕糸試験場 (〒 305)
(1985年 8月10日 受領)

Masuhiko Tsukada: Effect of α -chymotrypsin on the structure of silk fibroin

Structure of the chymotrypsin-resistant fraction from regenerated (solubilized) silk fibroin (FLi·cp) and native silk fibroin (FN·cp) was studied by infrared spectroscopy, x-ray diffractometry, scanning electron microscopy and DSC measurement.

On the basis of the infrared spectra and x-ray diffraction micrographs, it was found that chymotrypsin-resistant FLi·cp and FN·cp exhibited the silk II and silk I crystalline form, respectively, suggesting that the crystalline structure of silk fibroin differed markedly as a result of the change of the specimen's preparation. The thermal decomposition temperature of FLi·cp shifted to a higher temperature compared to that of the coagulated silk fibroin with a silk II crystalline form, depending largely on the presence of highly organized crystallite and the removal of the random coil region resulting from the action of chymotrypsin. Scanning electron micrographs of FLi·cp revealed a granular form (0.3 μ m in diameter), differing significantly from that for FN·cp. (*Sericultural Experiment Station, Yatabe, Ibaraki 305*)

臭化リチウムによる溶解法で調製した再生絹フィブロイン水溶液あるいは家蚕の後部絹糸腺内容物を蒸留水に分散させた未変性絹フィブロイン水溶液にそれぞれ α -キモトリプシンを作用させて作製した異種の分解沈殿物 ELi·cp および FN·cp の構造を明らかにするため、赤外吸収 (IR) スペクトル、示差走査熱量測定の外、X線回折写真の撮影ならびに走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。

IR スペクトルおよびX線回折写真の観察結果から、FLi·cp および FN·cp はそれぞれ silk II, silk I 型の結晶形態を示すことが知られた。SEM によると、FLi·cp には粒状構造が FN·cp には方向性のある樹枝状構造が観察された。

清水 (1941) は家蚕絹フィブロインに silk I および silk II の2つの結晶形態があることを見出した。結晶の形態は乾燥温度、溶剤処理、乾燥速度、蛋白質濃度の違いにより影響を受けることが明らかとなっている。silk I の結晶構造は silk II の構造と異なり、現在のところ推定の域を出ていないものの、分子鎖全体はクランクシャフト型におれ曲った構造をとることが平林ら (1968)、小西・黒川 (1968) あるいは Lotz and Keith (1971) により検討された。最近、Asakura and Ando (1982) および Asakura *et al.* (1984) は ^{13}C NMR スペクトルの測定により Lotz and Keith (1971) が提案した silk I 型クランクシャフトモデルを修正した。小西・黒川 (1968) は絹フィブロイン繊維を銅エチ

レンジアミンに溶解したフィブロイン水溶液を α -キモトリプシンで分解沈殿させた Fcp およびこれを溶解再沈殿させて得た Fcp 1x 試料の結晶形態がそれぞれ silk II, silk I 型であることを明らかにし、さらに試料の結晶構造の解析を行ったが、この変化の原因は明らかでないとした。

Silk I 型結晶に関する上記の研究結果をふまえ、絹糸生成過程のメカニズムをこの構造との関連において明らかにすることは重要なことである (呉, 1981)。

本研究では、未変性絹フィブロイン水溶液あるいは臭化リチウム溶解法で調製した再生フィブロイン水溶液にそれぞれ α -キモトリプシンを作用させて作製した分解沈殿物の構造が異なることを明らかに

したので、詳細を報告する。

本文に入るに先立ち、走査型電子顕微鏡測定で多大なご協力を賜った熱帯農業研究センター・松村初太郎主任研究官に深謝する。

材料と方法

材料：桑葉育の家蚕（日124×支124）の繭層をマルセル石けん・炭酸ナトリウムを用いて精練した。精練絹糸を臭化リチウムの飽和水溶液に溶解させた後、炎色反応で Li^+ が検出されなくなるまで純水で十分に透析しこれを再生絹フィブロイン水溶液とした。これを 40°C 、 pH 7.8 に保持し、 α -キモトリプシン（Sigma Chemical Company, No. C-7762）を加えて25時間反応させた。分解後水溶液中の白色沈殿物を遠心分離後、凍結乾燥して粉末状試料を作製した（以下 FLi \cdot cp と略記）。また一方、5齢期の熟蚕体内より後部絹糸腺を取り出し、絹糸腺中の液状絹フィブロインを蒸留水に分散させて絹フィブロイン水溶液を作製し、これを pH 7.8 に保持して α -キモトリプシンを加え、上記の方法により粉末状試料を作製した（以下 FN \cdot cp と略記）。

赤外吸収スペクトルの測定：KBr 錠剤法により試料を作製し、日本分光工業製 IR-G 型回折格子型分光計を用いて測定した。

X線回折像の測定：理学電機(株)製 X線回折装置 RU-200 を用い、陰極管電流 50mA、陰極管電圧 50 kV、Ni で濾光した $\text{CuK}\alpha$ 線により回折写真を撮影した。

示差走査熱量測定(DSC)：理学電機(株)製 Thermoflex DSC-10A DSC 装置を用い、試料重量 1.8 mg、昇温速度 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 、DSC レンジ 2.5 mcal/sec、チャートスピード 10 mm/min で測定を行った。標準試料としては α -アルミナを用い、測定雰囲気は 400 cc/min の窒素ガスであった。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察：日本電子製 JXA-733S 型装置を用い、金のコーティングを施した試料を 15kV の加速電圧で観察した。

結果と考察

FLi \cdot cp および FN \cdot cp の分子形態を明らかにするため、赤外吸収 (IR) スペクトルを測定した。(Fig. 1)。FLi \cdot cp の IR スペクトル (a) にはアミド I バンドが 1630cm^{-1} の外、 1660cm^{-1} (肩状吸収)、

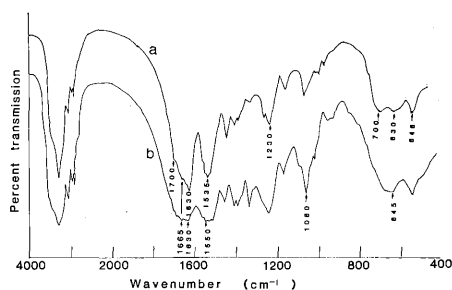


Fig. 1. Infrared spectra of chymotrypsin-resistant fraction from regenerated silk fibroin (FLi \cdot cp) (a) and from native silk fibroin (FN \cdot cp) (b) collected from the posterior division of silkgland.

1700cm^{-1} (肩状吸収) に観察される。またアミド II バンドが 1530cm^{-1} に、アミド V バンドが 700cm^{-1} に見出された。 1660cm^{-1} の吸収を除き、これらの吸収はいずれも silk II 型 (β -構造) に帰属している (Miyazawa and Blout, 1961)。したがって FLi \cdot cp の分子形態の大勢は silk II 型であるものと考えられる。分光学的に見て FLi \cdot cp が silk II 型構造を示したことは、基本的には Fcp に関する小西ら (1967) の IR スペクトルの測定結果と符合している。

絹糸腺内の絹フィブロイン水溶液に酵素を直接作用させた場合の報告は現在のところ見当たらないので、FN \cdot cp の分子形態を追究するため、IR スペクトルを測定した。FN \cdot cp の IR スペクトル (b) には 1665cm^{-1} を中心にしてアミド I バンドが、さらにアミド V バンドが $645\sim 660\text{cm}^{-1}$ の波数領域に現われている。FN \cdot cp の IR スペクトルは silk I 型試料の IR スペクトル (早川ら, 1980; 小西ら, 1967; 小西・黒川, 1968) と類似している。Fig. 1 から、 α -キモトリプシンが絹フィブロインに作用して分解沈殿させる際、沈殿物の構造は絹フィブロイン水溶液が再生試料であるか否かにより異なることが明らかとなった。

試料の結晶構造の特徴を明らかにするため X線回折写真を撮影した (Fig. 2)。FLi \cdot cp の X線回折写真 (Fig. 2 a) には 4.36, 3.67Å の面間隔に対応する回折環が現われており、この特徴は silk II 型試料 (清水, 1941) のそれと一致している。Fraser *et al.* (1966) および小西ら (1967) は α -キモトリプシンの加水分解作用で得られ、絹フィブロインの結

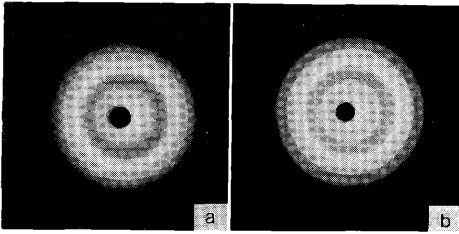


Fig. 2. X-ray diffraction photographs of chymotrypsin-resistant fraction.
a. FLi·cp, b. FN·cp

晶領域に対応する Fcp 分画の構造は silk II であるとしている。そこで、FLi·cp の構造に関しては Fraser *et al.* (1966) および小西ら (1967) の結果と対応しているものといえる。これに対して FN·cp の X線回折図形(b)には 7.55, 4.56, 3.67, 3.20, 2.25Å の面間隔に対応し, silk I 型構造に帰属(清水, 1941)する回折環が現われた。

次に試料が有する結晶構造の違いは熱的な特性にも反映するので、試料の DSC を行い得られた DSC 曲線を Fig. 3 に示した。FLi·cp の DSC 曲線 (a) には試料の熱分解による鋭い吸熱ピークが 298°C に現われた。一方、FN·cp(b) は 292°C に吸熱ピーク

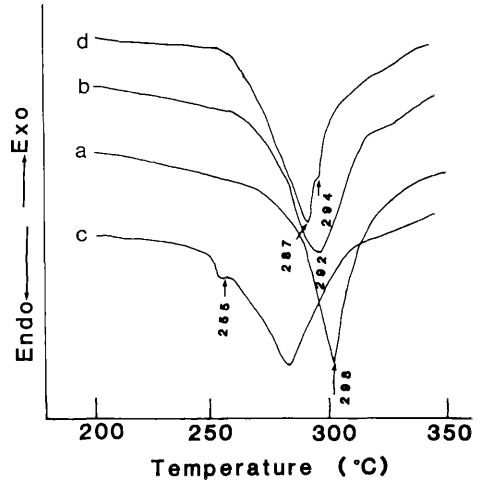


Fig. 3. DSC thermograms of silk fibroin.
a FLi·cp, b FN·cp, c silk fibroin with silk I crystalline form exhibiting unoriented molecular chains, d silk fibroin with silk II crystalline form exhibiting unoriented molecular chains.

を示しており、この吸熱ピーク温度は FLi·cp(a) より 5°C 程度低温側に現われていることが確認され

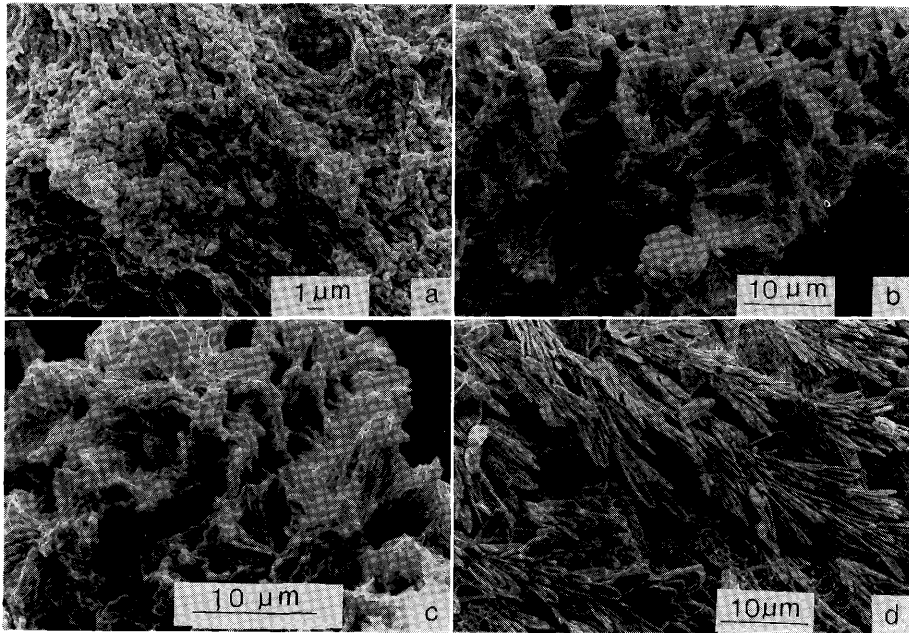


Fig. 4. Scanning electron micrographs of chymotrypsin-resistant fraction.
a FLi·cp, b-c FN·cp, d precipitates formed in the silk fibroin solution which was kept for 21 days at 5°C.

た。Figs. 1, 2 の結果から, FLi \cdot cp, FN \cdot cp の結晶構造はそれぞれ silk II, silk I であることが確かめられたので, この DSC 曲線 (Fig. 3 a, b) と絹糸腺内液状絹フィブロインを水に分散させることなく 45°C 前後の温度で乾燥固化させ, X線回折的に silk I あるいは silk II と確認された試料の DSC 曲線とを比較した。silk I 型凝固絹フィブロイン (c) では 255°C に肩状吸熱ピークが, 280°C に主要な吸熱ピークが観察される。これに対して silk II 型凝固絹フィブロイン (d) の吸熱ピークは 287°C に, また肩状吸熱ピークが 294°C に現われていた。この結果から, FLi \cdot cp (a) と silk II 型凝固絹フィブロイン (d) のように試料の結晶構造が同じでも DSC の測定結果からみて熱的な分解挙動に相違点のあることが明らかとなった。このことは, α -キモトリプシンの作用により, 試料中の安定な結晶領域以外の非晶領域が除去されたことによるものであろう。すなわち silk II 型結晶を有する試料であっても, 酵素を作用させずに乾熱処理法により作製した silk II 型凝固絹フィブロイン (d) では結晶のパッキング (分子凝集程度) が余りよくなく, 分子配列的にみても乱れた部分が多くさらに非晶領域も含まれているものと予想されるので, 試料の熱分解温度が FLi \cdot cp (a) のそれより低温側に現われたものと考えられる。これとは反対に, 酵素の分解作用により作製された FLi \cdot cp では非晶領域が除去され, その結果 silk II 型結晶が多く含まれることとなるため, 熱分解温度が高温側に移行したものと推定される。

小西ら (1967) は絹フィブロインの α -キモトリプシン分解により得た沈殿物の形態を電子顕微鏡により観察し, Fcp には粒状沈殿物の不規則な集団を, また Fcp 1x にはシート状に一部集合したフィブリル構造あるいは発達初期の球晶の構造を確認した。本実験で用いた FLi \cdot cp, FN \cdot cp は, それぞれ Fcp, Fcp 1x に対応するので, FLi \cdot cp, FN \cdot cp の形態を SEM により観察し, 小西らの結果と比較した (Fig. 4)。FLi \cdot cp の SEM (a) には直径 0.3 μ m 程度の粒状構造が確認された。FLi \cdot cp の粒状粒子の大きさは Fcp の大きさ (小西ら, 1967) よりも 1 ケタ大きな値を示した。しかし小西ら (1967) が Fcp で観察した棒状構造は全く見出されなかった。

絹糸腺内液状絹フィブロインを直接水に分散させたものに α -キモトリプシンを作用させて作製した

FN \cdot cp の SEM は, 球晶形成の初期過程でみられるような集合体 (b) のほか, 方向性をもった樹枝状の集合体が観察された。この未変性の絹フィブロイン水溶液に α -キモトリプシンを所定時間作用させた後, さらにこの水溶液の系を 5°C で 3 週間放置することで徐々に析出させた分解沈殿物には方向性のある松葉状の集合体 (d) が観察された。

飯塚 (1981) によれば再生絹フィブロインの主要な分子形態は不規則コイル型構造であるとしながらも, 施光分散・円偏光二色性の特徴から何等かの弱い規則性のあることが指摘されている。そこでこの弱い規則性を示す構造が, 分子の集合状態として比較的 silk II の結晶部分になりやすい性質をもった領域であると仮定すれば, α -キモトリプシンの作用で析出した沈殿物 (FLi \cdot cp) が silk II 型構造を取るに至ったものと推察できる。

これに対して, FN \cdot cp の構造が silk I となったことについてはおよそ次のように考察されよう。絹糸腺内絹フィブロイン水溶液中の分子形態に silk I 型が存在するとの報告は現在のところ全く見当たらないが, 馬越 (1975) はフィブロイン分子鎖には水溶液の乾燥過程において silk I 型結晶に生長する核となるような局部的構造をもった部分が存在するものと推定している。そこで, 絹糸腺内絹フィブロインに対して特殊な条件で結晶化が進行するとこの核が生長することとなり, その結果絹フィブロイン試料 (FN \cdot cp) が silk I 型結晶構造を取るに至ったものと推定される。

文 献

- ASAKURA T. and ANDO M. (1982): Makromol. Chem., Rapid Commun, **3**, 723-726.
- ASAKURA T. WATANABE, UCHIDA A. and MIYAGAWA H. (1984): Makromolekules, **17**, 1065-1081.
- FRASER R. D. B., MACRAE T. P. and STEWART F. H. C. (1966): J. Mol. Biol. **19**, 580-582.
- 呉 祐吉 (1981): 統絹糸の構造 (北條舒正編), 信教印刷, 上田, pp. 1-7.
- 早川忠男・近藤慶之・山本浩之・野口順蔵 (1980): 統絹の構造 (北條舒正編), 信教印刷, 上田, pp. 417-434.
- 平林 潔・石川 博・角戸正夫・呉 祐吉 (1968): 織学誌, **24**, 392-400.
- 飯塚英策 (1981): 統絹糸の構造 (北條舒正編), 信教印刷, 上田, pp. 293-311.
- 小西 孝・近藤宗夫・黒川昌孝 (1967): 織学誌, **23**, 64-

69.
小西 孝・黒川昌孝 (1968) : 織学誌, **24**, 550-554.
LOTZ, B, and KEITH, H. D. (1971) : J. Mol. Biol., 201-215.
馬越 淳 (1975) : 絹蛋白質の結晶化に関する研究 大阪
- 大学学位論文, pp. 1-20.
MIYAZAWA, T. and BLOUT, E. R. (1961) : J. Am Chem. Soc., **83**, 712-719.
清水 正徳 (1941) : 蚕試報, **10**, 475-496.