

ESR法による絹セリシン/ポリビニルアルコールならびに絹セリシン/ポリビニルピロリドン膜中でのスピンプローブ分子の運動性

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	塚田, 益裕 朝倉, 哲郎 吉水, 広明
巻/号	57巻6号
掲載ページ	p. 460-465
発行年月	1988年12月

ESR 法による絹セリシン/ポリビニルアルコールならびに 絹セリシン/ポリビニルピロリドン膜中での スピンプローブ分子の運動性

塚田益裕¹⁾・朝倉哲郎²⁾・吉水広明²⁾

- 1) 茨城県つくば市・農林水産省蚕糸試験場 (〒305)
- 2) 東京都小金井市・東京農工大学工学部 (〒184)

(1988年2月19日 受領)

MASUHIRO TSUKADA,¹⁾ TETSUO ASAKURA²⁾ and HIROAKI YOSHIMIZU²⁾: ESR study on the mobility of spin probes in sericin/polyvinylalcohol and sericin/polyvinylpyrrolidone blend membranes

The mobility of spin probes having different functional groups in sericin/polyvinylalcohol (PVA) and sericin/polyvinylpyrrolidone (PVP) blend membranes in swollen state was investigated by means of ESR spectroscopy. The four kinds of spin probes used were 4-oxo-TEMPO, 4-hydroxy-TEMPO, 4-amino-TEMPO and 3-carbamoyl-PROXYL. The mobilities of all spin probes decreased in the swollen PVA or sericin/PVA membranes compared with those in the PVP or sericin/PVP membranes, corresponding to the decrease of water content in the membranes. The mobility of 3-carbamoyl-PROXYL decreased when sericin was contained in the membrane contrary to the case of another spin probes, indicating that the carbamoyl group interacted with the side chains of silk sericin through hydrogen bond formation. ¹⁾*Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305*; ²⁾*Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184*

ポリビニルアルコール (PVA) あるいはポリビニルピロリドン (PVP) を可塑剤として用い、これに絹セリシンを加えて作製したブレンド膜における、ニトロオキサイドスピンプローブ分子の運動性を、ESR 法を用いて検討した。用いたスピンプローブ剤は、4-oxo-TEMPO, 4-hydroxy-TEMPO, 4-amino-TEMPO および 3-carbamoyl-PROXYL である。スピンプローブの運動性は、PVA 膜ならびに絹セリシン/PVA ブレンド膜の方が PVP ならびに絹セリシン/PVP 膜中よりも低下しており、これは、膜の含水率の違いを反映していた。3-carbamoyl-PROXYL の運動性は、PVA 膜中に絹セリシンが含まれると、特異的に低下することから、セリシンの分子側鎖とプローブの C=O(NH₂) との間で水素結合が形成されていると推察された。

絹蛋白質の幅広い利用技術を開発するに際しては、衣料用の繊維素材として全く利用されていない絹セリシンの高度な利用法を考えることが重要である。絹セリシンを構成するアミノ酸には、絹フィブ

ロインに比べて、側鎖に極性基を持ったアミノ酸が多い(小松, 1975)。したがって、セリシンの高い反応性に着目し、担体結合法(千畑, 1985)により酵素を固定化することができれば機能性を生かした絹

セリシンの利用法が期待できる。しかしながら、例えば絹セリシンを膜の状態 で用いる場合、絹フィブロンと異なり十分な膜強度が得られない。したがって、可塑剤としてポリビニルアルコール (PVA) あるいはポリビニルピロリドン (PVP) 等を用い、絹セリシンとのブレンド膜を作製することにより、反応性に富み十分な強度を持った膜を作製すること (石川・奈倉, 1983; 石川ら, 1987) が可能となろう。

Kuzuhara *et al.* (1987) はグルコースオキシダーゼを絹フィブリンで固定化することで、酵素の熱ならびに pH に対する安定性が増加することを見出し、その原因は絹フィブリンが持っている物理的機能特性、ならびに含水系での膜の不均一構造によるものと考察した (朝倉, 1987a, b)。今後、更に絹の用途を拓くには、膜が基質または酵素とどのような相互作用 (Hamada *et al.*, 1987) を有するかを、ダイナミックスを含めた分子レベルで十分検討し、基礎的所見を集積しておくことが重要である。

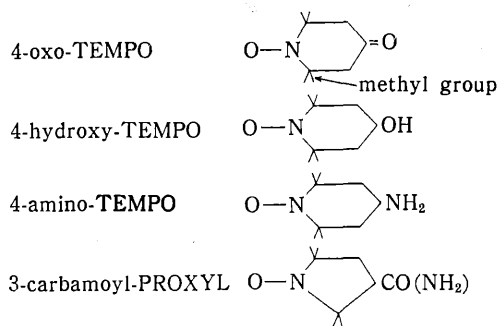
本研究では、カルボニル基、水酸基、アミノ基、アミド基をそれぞれ有する 4 種類のスピンプローブ分子を含んだ絹セリシン/PVA 膜、ならびに絹セリシン/PVP 膜についてその ESR スペクトルを測定し、含水状態におけるこれらのスピンプローブ分子の運動性の違い、ならびに各官能基と膜構成分子間の相互作用を検討した。

材料と方法

1. 材料

絹フィブリンの合成機能を持たないセリシン蚕 (*Nd-s* 蚕) (堀内ら, 1963) の中部絹糸腺内の液状絹セリシンから、0.3% の絹セリシン水溶液を作成した。分子量 2,000 の粉末状 PVA (和光純薬工業) を 80°C の蒸留水に溶解し、1% PVA 水溶液を調製した。同様にして、PVP (和光純薬工業) の 1% 水溶液を調製した。上記セリシン水溶液と PVA 溶液 (あるいは PVP 溶液) との等量混合液に、Table 1 に示した 4 種類のスピンプローブ分子、すなわち、4-oxo-tetramethyl-piperidinyloxy (4-oxo-TEMPO), 4-hydroxy-TEMPO, 4-amino-TEMPO および 3-carbamoyl-tetramethylpyrrolidin-1-yloxy (3-carbamoyl-PROXYL) を各々加え (3×10^{-6} mol/g 膜)、ポリエチレンフィルム上、25°C で蒸発乾燥

Table 1. Spin probes having different functional groups



TEMPO: tetramethyl-piperidinyloxy

PROXYL: tetramethylpyrrolidin-1-yloxy

させることによりスピンプローブ分子を含んだ絹セリシンと PVA (あるいは PVP) ブレンド膜を調製した。比較用に、スピンプローブ分子を含む PVA あるいは PVP 膜を調製した。

2. 方法

電子スピン共鳴 (ESR) 測定には日本電子製 (JEOL), JES-FE1X を用いた。スピンプローブ分子を含んだ約 20 mg の膜状試料を短冊型に切断し、石英製 ESR 用試料管に詰め、25°C、65% 恒湿度下に一晚静置した。つづいて、試料膜に直接水が触れないように留意しながら、試料管の上部を 0.02 ml の蒸留水を含ませた脱脂綿で栓をし、ESR スペクトルの時間変化の測定を行った。なお、ESR の実験開始直後と水分率が平衡状態に達したこれらの膜の含水率を、乾燥処理前後の重量比より求めた。

3. 計算

ESR スペクトルから、スピンプローブ分子の回転相関時間 (τ_c) を次式によって決定した (朝倉ら, 1987)。 τ_c の範囲により、 τ_c の評価の式が異なるので、次のように分けて計算した。

I. 10^{-9} sec $<$ τ_c $<$ 10^{-7} sec の場合 (Goldman *et al.*, 1972)

ESR スペクトルから求められる最大分離幅 (W_{max}) から、次式によって τ_c を決定した。

$$\tau_c = a \times (1 - S)^b \quad S = W_{max} / W_{lim} \dots (1)$$

ただし

$$a=1.10 \times 10^{-9} \quad b=-1.01$$

W_{lim} は, rigid limit の最大分離幅で, ここでは絹フィブロイン膜を -100°C で測定して得られた値, 71.75G を用いた (朝倉ら, 1987)。

II. $10^{-11} \text{ sec} < \tau_c < 10^{-9} \text{ sec}$ の場合 (石津ら, 1981)

次式から τ_c を求めた。

$$\tau_c = a \times W_0 \times (\sqrt{h_0/h_1} + \sqrt{h_0/h_{-1}} - 2) \quad (2)$$

ただし

$$a = 7.1 \times 10^{-10}$$

W_0 は, 3本線からなるニトロキシドラジカルの ESR スペクトルにおいて, 中央のピークの見積り値を, また h_1, h_0, h_{-1} は各々3本線の各強度を示す。

結果と考察

1. 絹セリシン/PVA, 絹セリシン/PVP 膜中のスピンプローブ分子の ESR スペクトル

25°C , 相対湿度 65% の恒温恒湿室に2週間放置し, 吸湿量が平衡状態に達した一連の試料膜の ESR スペクトルは, スピンプローブ分子の回転相関時間, τ_c が (1) 式の適用される $10^{-9} \sim 10^{-7} \text{ sec}$ の範囲にあることを示している (Fig. 1)。しかしながら, 詳細に検討すると, 各グループ間でその ESR スペクトルが異なることがわかる。一連のスピンプローブの ESR スペクトルの最大分離幅 (Fig. 1, A 矢印間) は, 絹セリシン/PVP ブレンド膜の方が, 絹セリシン/PVA ブレンド膜の場合よりも狭く, スピンプローブ分子の運動性は, 前者の方が高いことがわかる。この傾向は, スピンプローブ分子の種類に依存していない。これは, 25°C , 相対湿度 65% 下での絹セリシン/PVA ブレンド膜の吸湿率が 9.6% であるのに対して, 絹セリシン/PVP ブレンド膜では 19.1% と約 2 倍に増加したことに起因すると考えられる。

次に, 吸湿量が平衡状態にあるこれらの膜を更に加湿した場合 (実験の項を参照) の時間変化のスペクトルを追跡した。一例として, 4-amino-TEMPO を含む絹セリシン/PVA ブレンド膜についての結果を Fig. 2 に示した。加湿処理後, 短時間の試料膜中のスピンプローブの ESR スペクトル (a, b) は,

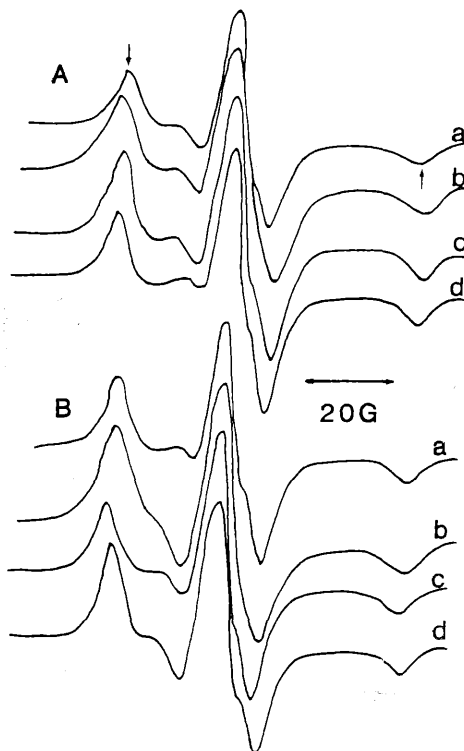


Fig. 1. ESR spectra of the spin probes, a-d in sericin/PVA (A) and sericin/PVP (B) blend membranes. The membranes were kept for 2 weeks at 25°C and a relative humidity of 65% after sample preparation.

Spin probe: a: 4-oxo-TEMPO, b: 4-hydroxy-TEMPO, c: 4-amino-TEMPO, d: 4-carbamoyl-PROXYL.

主に運動性の低い成分のみからなる。加湿時間が30時間を越えると運動性の早い成分が明瞭に出現し (c, d, e), 試料膜の ESR スペクトルは運動性の遅い成分と早い成分とから成る。更に, 水で十分膨潤した試料膜のスピンプローブは極めて高い運動性を示した (f)。このように, スピンプローブ分子の運動性は吸湿量の増加につれて次第に向上し, 十分に吸水した状態に達すると, 水中での運動性と同程度になった。平衡状態に達した場合の含水率は, 絹セリシン/PVA ブレンド膜で 57%, 絹セリシン/PVP ブレンド膜で 99% であった。吸湿初期の場合と同様に, 後者の膜中のプロープ分子の運動性の方がかな

り高い。初期の状態と含水量が平衡状態となった時のプローブ分子の τ_c を Table 2 に、また加湿時間経過に伴う τ_c の変化をスピンプローブ毎に Figs. 3-6 にまとめた (いずれも (1) または (2) 式を用いて τ_c

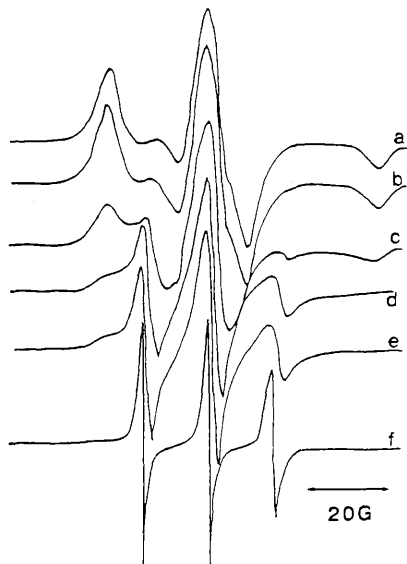


Fig. 2. Time dependence of the ESR spectra of 4-amino-TEMPO in sericin/PVA membrane after it was exposed to the moisten atmosphere. The spectrum of the water-immersed membrane (f) was also shown. Details are given in the text.
Time (hr): a: 0, b: 7, c: 30, d: 70, e: 94.

を計算した)。

2. 4-oxo-TEMPO の膜中の分子運動

PVA あるいは PVP 膜、及び絹セリシンとのブレンド膜中の 4-oxo-TEMPO の分子運動性の吸湿に伴う経時変化を検討した (Fig. 3)。最大分離幅より求めたスピンプローブの τ_c の値は、他のスピンプローブと比較して小さい値となる。 τ_c は加湿時間の経過につれて次第に減少するが、絹セリシンを含む PVA 系の方が、絹セリシンを含まない系の場合よりもその減少の割合が小さい。また、PVP あ

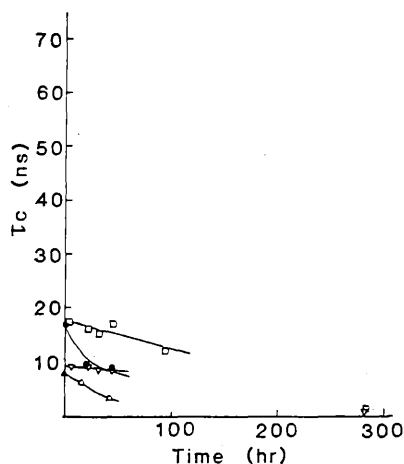


Fig. 3. Time dependence of the rotational correlation time of 4-oxo-TEMPO in various kinds of membranes.
Membrane: ● PVA, □ sericin+PVA, △ PVP, ▽ sericin+PVP.

Table 2. The rotational correlation time (in ns) of different kinds of spin probes in PVA (PVP) and sericin/PVA (PVP) membranes. The membranes were kept for different periods of time at 25°C, after they were exposed to the moisten atmosphere.

Time (day)	PVA membrane		Sericin/PVA membrane		PVP membrane		Sericin/PVP membrane	
	0	80	0	80	0	80	0	80
4-oxo-TEMPO	18 ¹⁾	0.31 ²⁾	18	0.36	8.6	0.15	9.8	0.22
4-hydroxy-TEMPO	47	0.47	40	0.63	11	0.31	15	0.33
4-amino-TEMPO	53	0.46	33	0.34	14	0.56	17	0.26
3-carbamoyl-PROXYL	38	0.55	34	0.56	14	0.30	18	0.68

¹⁾ The rotational correlation time was calculated from the equation (1).

²⁾ The rotational correlation time was calculated from the equation (2).

るいは絹セリシン含有 PVP 膜の τ_c の値は、PVA 膜の場合よりも膜の吸水率の増加を反映して小さい。これらの結果は、4-oxo-TEMPO の場合に、他の3種のスピンプローブに比較して、その官能基 C=O と、膜素材 (PVA, PVP あるいは絹セリシン) との間の相互作用が比較的弱いことに起因していると考えられる。

3. 4-hydroxy-TEMPO の膜中の分子運動

次に、4-hydroxy-TEMPO を含む各種の膜中のスピンプローブの分子運動性を検討した (Fig. 4)。PVA あるいは絹セリシン含有 PVA 膜の場合、加湿時間が経過すると τ_c が減少するが、対応する2種類の PVP 膜の場合に比較して、その減少の程度は急激である。更に、吸湿量の少ない場合には、PVP 膜中に比較して、絹セリシン含有 PVP 膜の方が、スピンプローブの τ_c が大きくなる。これらの結果は、吸湿量の少ない膜では、スピンプローブ分子の OH 基が、PVA 分子と分子間水素結合を形成していることを示唆するものと思われる。加湿程度が高まると、 τ_c が急激に低下した。すなわち、プローブ分子の運動性が急激に増加することから、OH 基のかかわる水素結合は、水の導入により交換が激しくなり、急激に弱まったものと考えられる。

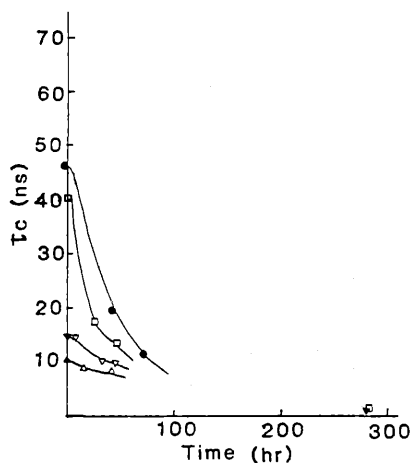


Fig. 4. Time dependence of the rotational correlation time of 4-hydroxy-TEMPO in various kinds of membranes.
Membrane: ● PVA, □ sericin+PVA, △ PVP, ▽ sericin+PVP.

4. 4-amino-TEMPO の膜中の分子運動

加湿処理に伴う膜中の 4-amino-TEMPO の分子運動性の変化を検討した (Fig. 5)。4-hydroxy-TEMPO の場合 (Fig. 4) と同様、加湿処理前の PVA あるいは絹セリシン含有 PVA 膜中のスピンプローブの τ_c は大きな値を示した。これは、OH 基同様に NH_2 基をもつスピンプローブ分子が、PVA 分子と分子間水素結合を形成することによるものと考えられる。そして、OH 基の場合と同様に加湿処理により試料膜が水を多く含むと、スピンプローブ分子と PVA 分子との相互作用が急激に弱まり、その結果プローブの運動性が向上したのと考えられることができる。

5. 3-carbamoyl-PROXYL の膜中の分子運動

最後に、3-carbamoyl-PROXYL を含有する試料膜中のスピンプローブ分子の運動性を検討した (Fig. 6)。加湿程度の異なる試料については、いずれも PVA 膜のみの場合よりも、セリシンを含んだ場合の方がスピンプローブの τ_c は大きくなる傾向にある。これは、OH 基または NH_2 基を有するスピンプローブの場合とは異なる点である。すなわち、C=O(NH_2) 基の場合では、セリシンとの間での水素結合が他のプローブに比較してより強く、あ

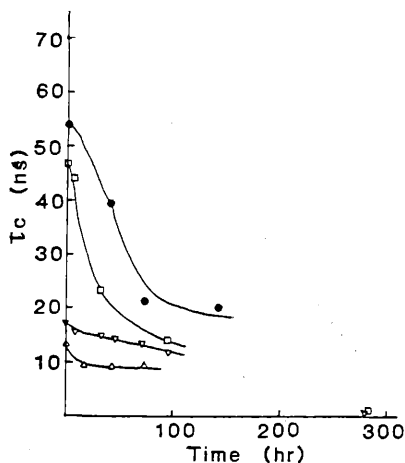


Fig. 5. Time dependence of the rotational correlation time of 4-amino-TEMPO in various kinds of membranes.
Membrane: ● PVA, □ sericin+PVA, △ PVP, ▽ sericin+PVP.

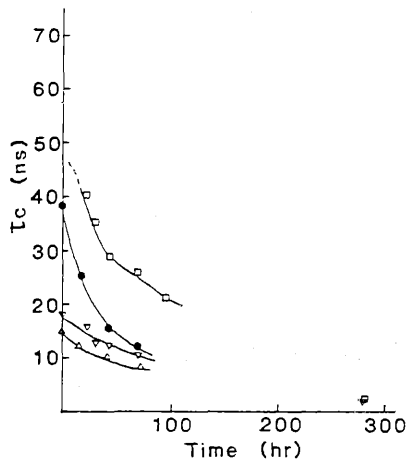


Fig. 6. Time dependence of the rotational correlation time of 3-carbamoyl-PROXYL in various kinds of membranes.

Membrane: ○ PVA, □ sericin+PVA, △ PVP, ▽ sericin+PVP.

るいはより多いためと考えられる。

6. セリシンとスピンプローブ分子間の相互作用

PVP のみの膜と絹セリシンと PVP のブレンド膜の場合を比較すると、スピンプローブの運動性は、プローブの種類にかかわらず、すべて後の方が低下していた。この原因としては、2種類の膜の吸湿量を測定してないため現時点では断言できないが、絹セリシンを含むことによる膜の吸湿量の低下か、プローブとセリシン分子との特別な相互作用かの2つの場合が考えられる。本実験の範囲内では、必ずしも一義的にこれに対応した原因を特定できないが、運動性の低下がプローブの種類に依存して起こっていない点を考慮すると、前者の可能性が高いよ

うに思われる。特に興味深いことは、総じて、PVA膜中よりも、絹セリシン/PVAブレンド膜中の方が、3-carbamoyl-PROXYLの運動性が低い点であり、4-hydroxy および 4-amino-TEMPO の場合と逆である。これは、O=C(NH₂) グループと絹セリシン間の分子間水素結合の形成を示唆している。絹セリシンのどの残基あるいは官能基が、スピンプローブとの相互作用に関与するかについては、今後、モデル化合物を用いて検討しながら解析する必要がある。

文 献

- 朝倉哲郎 (1987a) : 繊維学会 昭和 62 年度年会要旨集, 71.
 朝倉哲郎 (1987b) : バイオインダストリー, 4, 878-886.
 朝倉哲郎・吉水広明・塚田益裕・瀬戸山幸一・光田慶一 (1987) : 織学誌, 43, 335-342.
 GOLDMAN, S. A., BRUNO, G. V. and FRED, J. H. (1972) : J. Phys. Chem., 76, 1858-1960.
 HAMADA, K., IJIMA, T. and MCGREGOR, R. (1987) : J. Polym. Sci. Polym. Phys., 25, 1299-1310.
 堀内彬明・波島千恵子・中村晃三 (1963) : 日蚕雑, 32, 195-196.
 石川 博・奈倉正宣・土屋陽一郎 (1987) : 織学誌, 43, 283-287.
 石川 博・奈倉正宣 (1983) : 織学誌, 39, 353-363.
 石津和彦編 (1981) : 実用 ESR 入門, 講談社サイエンティフィック, p.151. 講談社, 東京.
 小松計一 (1975) : 蚕試報, 26, 135-256.
 KUZUHARA, A., ASAKURA, T., TOMODA, R. and MATSUNAGA, T. (1987) : J. Biotech., 5, 199-207.
 千畑一郎編 (1985) : 固定化生体触媒, pp.12-134. 講談社サイエンティフィック, 東京.