フィブロイン蛋白質の二次構造と近赤外スペクトル

宮澤 光博*・園山 正史**

*農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 つくば市大わし1-2 (〒305)

**東レリサーチセンター 大津市園山3-3-7 (〒520)

(1995年8月8日 受理)

NIR Studies of Fibroin Secondary Structures

Mitsuhiro MIYAZAWA* and Masashi SONOYAMA**

*National Institute of Sericultural and Entomological Science (*NISES*), Ohwashi, Tsukuba 305

**Toray Research Center, Inc., Sonoyama, Ohtsu 520

(Received August 8, 1995)

Keywords: NIR spectroscopy, Fibroin, Secondary structure, Protein

Near infrared (NIR) measurements have been carried out to investigate the molecular structures of fibroin cast films. Their FT-IR spectra have also been obtained to estimate the secondary structures from the amide I bands with curve-fitting procedures. Several spectral changes in NIR region were observed with the transition from α -helical form to β -sheet structure. In particular, the feature near 2170 nm was influenced by the secondary structural changes of fibroins. These observations indicated that NIR spectra were also sensitive to the secondary structure of proteins and polypeptides.

1. 緒 言

赤外 (IR) 分光法や核磁気共鳴 (NMR) 法などに代表される種々の分光法は、化学や物理学にたづさわる研究者により分子分光学として基礎が確立され、その測定法は工業分野や医療分野において材料評価や品質管理、さらに画像診断などの技術の1つとして幅広く活用されている。また近年は非破壊的に化学成分に関する情報を得る手段として近赤外 (NIR) 分光法の有用性が注目され、食品や石油産業においてすでに実用化がなされている。

基本的に NIR 領域に出てくるスペクトルは、IR 領域で現れる振動モードの結合音や倍音であるから、IR 領域と同様に分子のコンホメーションや配向に関する情報が含まれているはずである。しかしながら現在の

NIR 分光法は、測定試料成分の定性・定量的な情報を得ることに重点がおかれ、NIR スペクトルのポテンシャルを十分に活用しているとはいえない。このため分子の立体構造や相互作用に関する情報を得る手段として、NIR 分光法を見直すことも必要と思われる。本稿では、繊維蛋白質の1つであるフィブロインを対象に取り上げ、NIR スペクトルと蛋白質の二次構造の関連について現在得られている知見について報告する。

2. 実 験 法

振動スペクトルの解釈において、蛋白質の高次構造 (主に二次構造) に関係するバンドを特定するためには、単一の安定なコンホメーションを取るいくつかのポリペプチドをモデルとして解析するのが一般的である。しかし NIR 領域では、個々のアミノ酸の側鎖に由来する振

動モードがペプチドの二次構造を決める主鎖の振動モードとカップリングすることも考えられ、試料の二次構造が同じでも、アミノ酸の組成によりスペクトルが異なる可能性も出てくる。これより **NIR** 領域の解析には、異なる構造形態を取りうる1つの蛋白質を用いて検討を行うのが望ましい。

フィブロインはカイコガ上科幼虫体内の絹糸腺において、繭を造る原料として大量に分泌される。このフィブロインの高濃度溶液から調製するキャストフィルムの立体構造は、メタノール水溶液で処理することによって、容易に変化することが知られている。この性質を利用し、カサン (*Bombyx mori*) およびエリサン (*Samia cynthia ricini*) のフィブロインを用いて、**NIR** スペクトルの測定を行った。また **IR** 領域に関しても、同様な調製法にて得た試料を用いて測定を行い、アミド I 吸収帯から得られる情報と合わせて、**NIR** スペクトルと蛋白質の二次構造との関連について検討を行った。**NIR** の測定には島津製作所 UV-3100S 分光光度計を用いた。また **IR** 領域では Digilab FTS-60A/896 を用いて測定を行った。

3. 結果と考察

Fig. 1 に1800 から2450 nm までのカサン (*Bombyx mori*) フィブロインキャストフィルムの **NIR** スペクトルを示す。Fig. 1(A)において2050, 2169, 2260, 2288および2351 nm にフィブロインに由来すると思われるバンドが観察される。このとき **IR** 領域のアミド I 吸収帯は1651 cm^{-1} に最大吸収を持ち、カーブフィッティングの結果から、 α ヘリックスが最も多い二次構造成分であることが示された。Fig. 1(B)はメタノール水溶液によって処理を行った同一試料の **NIR** スペクトルである。2169 nm のバンドの相対強度が減少し、2189 nm に新しいバンドが現れるのが大きな特徴である。このときアミド I 吸収帯は1627 cm^{-1} に最大吸収を示し、カーブフィッティングの結果より α ヘリックス成分が減少し、 β シート成分が3倍近く増加したことが示された。これより2169 nm のバンドは α ヘリックスに帰属され、新しく現れた2189 nm のバンドは β シート構造に関連するものと考えられる。上敷領らは¹⁾種々の水溶性蛋白質の **NIR** 測定より、2170 nm のバンドの吸収強度が蛋白質の二次構造の変化によって変化することを報告しているが、フィブロインの場合においても同様な結果が示された。さらに2351 nm のバンドも、2365 nm へ大きく長波長シフトするのも構造変化に伴う大きな特徴である。

Fig. 1 **NIR** spectra of *Bombyx mori* (A) native and (B) treated fibroin cast films.

Fig. 2(A)はエリサン (*Samia cynthia ricini*) フィブロインキャストフィルムの **NIR** スペクトルである。アミノ酸組成はカサンと比べ、グリシンやアラニンの含有率に大きな差が見られるが、未処理のフィルムの **NIR** スペクトルは、カサンの場合と大きな違いは見られない。一方、Fig. 2(B)からはメタノール水溶液の処理による構造変化に伴い、2168 nm のバンドの相対強度が減少し、2208 nm に新しいバンドが現れるのが観察される。また2348 nm のバンドもカサンの場合と同様に長波長側へ大きくシフトするのが観察される。

Sadlar ら²⁾は蛋白質の二次構造に対して **NIR** スペクトルは感度が低いことを報告しているが、フィブロイン蛋白質の α ヘリックスから β シート構造への転移に関しては、2170 nm 付近のバンドは明瞭な変化を示す。新しく現れたバンドの波長の位置が2つの試料において異なる原因については今後さらに検討を重ねたい。一方、2050 nm のバンドは共に β シート構造に変化する際に、長波長側へシフトする傾向が見られる。Liu ら³⁾は温度変化の測定結果から、2050 nm のバンドはアミ

Fig. 2 NIR spectra of *Samia cynthia ricini* (A) native and (B) treated fibroin cast films.

ド基の水素結合状態に依存してシフトをすることを指摘しているが、フィブロインの場合に関しては異なる二次構造における水素結合の強度差が、スペクトルに反映されていると考えられる。また常温において1929 nmに吸収ピークを持つ水のバンドが、フィブロイン中においては10 nmほど長波長側にシフトした位置に現れる。これよりNIRスペクトルからは、蛋白質と結合水との相互作用に関する知見も得られると思われる。今後、蛋白質の二次構造とNIRスペクトルの相関が整理できれば、生命科学などの分野においてもNIR分光法の有用性がさらに広まると期待される。

文 献

- 1) H. Kamishikiryo, K. Hasegawa, and T. Matoba: J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. **38**, 850 (1991).
- 2) A. J. Sadler, J. G. Horsch, E. Q. Lawson, D. Harmatz, D. T. Brandau, and C. R. Middaugh: Anal. Biochem. **138**, 44 (1984).
- 3) Y. Liu, R. Cho, K. Sakurai, T. Miura, and Y. Ozaki: Appl. Spectrosc. **48**, 1249 (1994).