(昭和42年1月5日受理)

絹フィブロインの微細構造に関する研究

第3報 柞蚕フィブロインにおける α -Helixの確認信州大学繊維学部 近藤慶之・平林 潔
飯塚英策・呉 祐吉STUDIES ON THE FINE STRUCTURE OF SILKFIBROIN
(III) CONFIRMATION OF THE PRESENCE OF α -HELICAL CONFORMATION
IN ANTERAEA PERNYI SILK FIBROIN

By Yoshiyuki Kondō, Kiyoshi Hirabayashi, Eisaku Iizuka and Yukichi Go

(Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda City, Nagano Prefecture, Japan)

The presence of α -helical conformation in *Antheraea pernyi* silk fibroin was confirmed by means of X-ray diffractometry, infrared spectroscopy and optical rotatory dispersion as follows:

1. Spacings of 7.4 and 3.7 Å in the X-ray patterns of fibroin gel correspond to the two specific leading spacings in the powder diagram of α -helical poly-L-alanine.
2. In Amide V region of IRS, the fibroin film gives 620cm^{-1} band typical of α -helix as well as 650cm^{-1} band typical of random coil, both diminishes in their intensity upon deuteration.
3. The fibroin in aqueous solution at neutral pH shows the Cotton effects typical of α -helix, a trough at $232\text{m}\mu$ and a peak at $198\text{m}\mu$ with a shoulder around $210\text{m}\mu$. The helical content is 10 to 20%.

(Received January 5, 1967)

1. 緒 言

われわれは前報において、poly-L-alanineの粉末および繊維試料と柞蚕絹糸腺内凝固フィブロイン（風乾絹糸腺内凝固フィブロイン）および柞蚕テグスの比較検討から α -Helixの存在を推定した。そこで本報ではつぎのような実験を行ない、固体試料における α -Helixの存在とさらに溶液における α -Helixの存在を確認したので報告する。

まずX線の研究により、柞蚕絹糸腺内凝固フィブロインおよび純水に分散させて風乾した試料のX線写真に現われる7.4 Åおよび3.7 Åに相当する干渉環はpoly-L-alanineの α -Helixの粉末図形に相当することを次のような方法で確めた。すなわち、L. Brownが配向 α -Helixの模型について各干渉の位置と強度とを計算した結果を用いて α -Helixの粉末図形を予想し、これと比較したのである。これは後に述べるように柞蚕フィブロインにおいては α -helicalな部分があるとしても延伸により十分に配向させることが困難で配向 α -Helixの繊維図形を得ることができず、すでに明らかにされている

poly-L-alanineのそれと比較できないからである。つぎに柞蚕絹糸腺内に α -Helixが存在するならば、これらフィブロイン分子を純水に分散させたとき、水溶液中にも α -Helix状の分子が存在することが考えられたので、その旋光分散の測定を行なった。ほかにフィルムについては赤外吸収スペクトルを測定し、 α -Helixに特有の吸収bandの有無を調べた。

2. 試料および実験方法

2.1 試 料

柞蚕フィブロインは家蚕フィブロインと異なり、熟蚕より取り出した絹糸腺内凝固フィブロインは、常温（約20°C）においては、4時間位で蒸留水に完全に溶解する。家蚕絹糸腺内凝固フィブロインは、清水の α 型結晶形態をとるため、全然水に分散しないものと考えられる。

そこで、われわれは、昨年度、松本蚕業試験場で飼育した柞蚕の熟蚕の恵予を受け、吐糸寸前解剖し、純水で数回水洗したのち風乾し、保存試料とした。この乾燥試料を用い、水溶液およびフィルムを作製した。なお、柞蚕糸より家蚕糸と同様な方法で再生絹フィブロイン水溶

液をつくることは、かなりむずかしい。すなわち家蚕は LiBr, 銅エチレンジアミンなどの濃厚溶液に溶解したのち透析することにより、再生絹フィブロイン水溶液が得られるが、柞蚕の場合は、これらの溶媒に溶解しない。なお ZnCl_2 の濃厚水溶液には溶解するが、透析の過程でフィブロインの凝固が起こることがわかっている。

2.2 X 線 法

緒言に述べたような考えに基づく poly-L-alanine の粉末図形と柞蚕フィルムの X 線図を比較検討した。実験装置、方法は前報と同様である。

2.3 旋光分散法

柞蚕フィブロイン水溶液 (約 1%) は、塩濃度が 0.1 M 以下であれば中性 pH 付近で安定である。ちなみに柞蚕絹糸腺内フィブロインの pH は 6.7 であり、体液のそれは 8.3 である。測定は、風乾した後柞蚕絹糸腺を純水に溶解した水溶液について、日本分光 ORD/UV 5 型自記旋光分散計を用い、中性 pH、波長領域 600~200m μ において、100, 10, 1 および 0.1mm セルを用いて行なった。濃度範囲は 0.6~0.1g/ml であった。

2.4 赤外吸収スペクトル

前報の同一のフィルムについて、日本分光 DS-301 型赤外分光光度計を用い測定した。長波長領域 (800~400 cm^{-1}) は、DS-402G 型回折格子赤外分光光度計を用いた。

3. 実験結果および考察

3.1 X 線 法

柞蚕フィブロインにおいては、風乾絹糸腺およびフィルムは延伸によつて必要程度に配列した α -Helix 構造をとらせることが困難で、また poly-L-alanine において見いだされたような方法 (ジクロル柞蚕中に β 型をとった延伸糸を浸せきした後原長を保つたまま真空乾燥する) で配列した α -Helix 繊維をつくることができないので、すでに L. Brown らにより明らかにされている配向 α -Helix 型繊維図形と比較して α -Helix の存在を確認することができない。また α -Helix の 1 アミノ酸残基当りの Helix 軸方向の繰り返し約 1.5 Å に相当する干渉点が子午線上にわずかに柞蚕テグスの X 線図に認められるが、非常に弱いため確証として提出できない。そこで L. Brown らの解析した poly-L-alanine の α -form (α -Helix) の粉末図形を描き (第 1 表, 第 1 図) それと柞蚕フィブロインフィルムの X 線図の比較を行なったが、確かに 7.4 Å と 3.7 Å の干渉環が poly-L-alanine の粉末図形と一致するので、柞蚕フィブロインに見いだされ

Table 1. Calculated intensities of α -poly-L-alanine (by L. Brown et al.)

Index	$ F ^2$	$d(\text{\AA})$
10 $\bar{1}$ 0	86.0	7.40
11 $\bar{2}$ 0	13.6	4.27
20 $\bar{2}$ 0	15.0	3.70
21 $\bar{3}$ 0	8.35	2.80
11 $\bar{2}$ 5	4.18	4.09
20 $\bar{2}$ 5	4.92	3.58
21 $\bar{3}$ 8	3.48	2.67
30 $\bar{3}$ 8	4.15	2.37
10 $\bar{1}$ 13	5.74	4.37
10 $\bar{1}$ 21	3.16	3.05

Fig. 1. Schematic X-ray diffraction pattern of α -poly-L-alanine, powdered. The values shown in the spacing in Å unit.

Fig. 2. Comparison of *Antheraea pernyi* silk gut and poly- α -alanine powdered.

- (a) *Antheraea pernyi* silk gut
(b) poly-L-alanine powdered

るこれら2本の幅広い干渉環は α -Helix の粉末図形によるものであるといつても差つかえないものと判断した。この両者を比較したものを第2図にあげる。計算から図式化したものは細い干渉環の集合したものであるが、微結晶の大きさが小さいかあるいは L-alanine 以外のアミノ酸が結晶内に混在するために起こる結晶格子の乱れのために柞蚕フィロンの場合には、多数の干渉環は融合して非結晶に近い二つの干渉として観測されるものと考えられる。

3.2 旋光分散法

家蚕フィブリン水溶液の旋光分散については、最近、飯塚ら²⁾によつて報告されている。それによると、家蚕フィブリン水溶液中では、フィブリン分子は、 α -Helix や β -form のような規則性はもたないが、非常に compact な形態をとり、これにメタノール、ジオキサンなどの溶媒を混合してゆくと β -form をとるということが赤外スペクトルの吸収曲線とともに確められ、 α -Helix は存在しないようである。しかし今回、われわれはX線法より推定された柞蚕フィブリン中の α -Helix の確認として、柞蚕絹糸腺の風乾試料を純水に溶解して旋光分散の測定を行ない、random coil と α -Helix の共存を認めた。第3図にその旋光分散曲線を、また第4図にその Moffitt-Yang plot を示す。第3図より 232m μ に trough (負の peak) がみられるが、 α -Helix は 233m μ とされている。これは α -Helix 含量の低いことがその原因であろうと考えられる。210m μ 付近に shoulder が

Fig. 3. Ultraviolet rotatory dispersion of silk fibroin in aqueous solution. (*Antheraea pernyi*)

Fig. 4. Moffitt-Yang plot of *Antheraea pernyi* fibroin.

出ること、peak (正の peak) が 200m μ 以下に期待されることは、 α -Helix 構造が存在する証拠である。旋光分散のデータを解析すると $[m']_{232} = -3,790$ Moffitt 式のパラメータについては $b_0 = -105$, $a_0 = -186$ となり、 $[m']_{232}$ または b_0 値から Helix % を求めると、それぞれ 13% または 22% となる。すなわちポリグルタミン酸の測定結果³⁾⁴⁾から類推して $[m']_{232}$ はランダムコイルで $-2,000$, 100% Helix で $-16,000$, b_0 値はそれぞれ 0 および -630 とし、

$$\% \text{ Helix} = 100 \times \frac{[m']_{233} - [m']_{233}^R}{[m']_{233}^H - [m']_{233}^R}$$

$$\text{または,} \quad = 100 \times \frac{b_0}{b_0^H}$$

にそれぞれの値を入れて Helix 含量を求めた。ここに添字 R および H はそれぞれ 100% ランダムコイルおよび 100% α -Helix を表わす。ちなみに分子旋光度 $[m'] = \frac{M}{100} \cdot \frac{3}{n^2 + 2} \cdot \frac{\alpha}{l \cdot c}$ である。

ここに M , n , α , l および c はそれぞれ平均残基量 (柞蚕フィブリンについては 85), 溶媒の屈折率, 旋光の角度 (degree), デシメートルで表わした光路長, および g/cc で表わした溶質濃度である。また Moffitt 式は

$$[m'] = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

と書かれ、タンパク質や合成ポリペプチドは多くの場合、 $\lambda_0 = 212\text{m}\mu$ になると、その旋光分散をよく表わすことができる。 $[m']_{233}$ や b_0 値は分子の形態 (conformation) ばかりでなく残基の旋光性にも多少左右されると考えられるので、完全なるランダムコイルや α -Helix の場合の値とし前記のような値を仮定したことに問題が残る。 $[m']_{233}$ から求めた Helix 含量と b_0 からきめた含量とが異なるのはそのためである。元来、このようにして求められた Helix 含量には最大 $\pm 10\%$ の誤差は認めなければならないように考えられるので、このような値に

Fig. 5. Infrared spectra of *Antheraea pernyi* fibroin.

なつても当然と考えられる。

3.3 赤外吸収スペクトル

柞蚕絹糸腺を蚕体内から取り出し、後部糸腺を純水に溶解させ、ポリエチレン皮膜上に静置して作製した柞蚕フィブロインフィルムの赤外吸収スペクトルを第5図に示す。これより、アミドⅠのC=O伸縮振動は $1,660\text{cm}^{-1}$ 、アミドⅡのNH変角振動は $1,540\text{cm}^{-1}$ に吸収を示すが、これからは、random coilか α -Helixか区別することはできない。宮沢⁶⁾によると、ポリペプチドについ

Fig. 6. Infrared spectra of *Antheraea pernyi* fibroin (—) and deuterated fibroin (---) Fig. 7. Infrared spectrum of *Antheraea pernyi* fibroin film. Full line, E vector parallel to the direction of orientation; Broken line, E vector perpendicular to the direction of orientation.

てはアミドⅢ領域で $1,270\text{cm}^{-1}$ に α -Helix、 $1,240\text{cm}^{-1}$ に random coil、 $1,220\text{cm}^{-1}$ に β -formにそれぞれ特異的な吸収を示すと推定されている。柞蚕フィブロインフィルムには $1,240\text{cm}^{-1}$ と $1,270\text{cm}^{-1}$ の吸収バンドが認められるのでこのフィルムには random coilと α -Helixの共存していることがうかがわれる。この裏付けとして長波長領域($800\sim 400\text{mc}^{-1}$)の測定をし、アミドⅤの吸収をしらべた。第6図にそのスペクトルを示す。図から明かなように 620cm^{-1} 付近と 650cm^{-1} 付近にそれぞれ broad な吸収が認められる。これらアミドⅤの吸収帯はNH基の重水素化によって同図にみられるように強度をいちじるしく減ずるので、ともにアミドⅤバンド(NH面外振動)であることが明らかであり、合成ポリペプチドにおける結果⁶⁾を参照して、それぞれ α -Helixおよび random coilに対応するものとみなされる。なお、確証として、柞蚕フィブロインフィルムの赤外二色性を測定した。柞蚕フィブロインフィルムは延伸すると亀裂を生ずるので、柞蚕絹糸腺内凝固フィブロインを純水に分散させたのち、約2% PVA水溶液を等量(体積比)加えて製膜し、PVAに可塑剤の役目をもたせて延伸した。延伸に当つては水蒸気をかけつつ行なつた。3倍に延伸した皮膜の二色性スペクトルを第7図に示す。図からわかるようにアミドⅠバンドは $1,660\text{cm}^{-1}$ に平行二色性、アミドⅡは $1,545\text{cm}^{-1}$ に垂直二色性を示している。これは $\text{CO}\cdots\text{HN}$ の水素結合の方向が延伸

方向に平行であることを意味し、 α -Helix の存在を示すものである。しかしその二色比の低いことは、X線法の項で記したようにX線法による α -Helix の存在の確認に十分なほどの配列をしていないことを示している。ケラチンに見られる場合と類似して、柞蚕フィブロインにおいても α -Helix 構造が random coil 型分子に混在していることを示すものと考えられる。

4. 結 言

X線の研究で、柞蚕絹糸腺内凝固フィブロインは 7.4 Å と 3.7 Å の幅広い干渉環が見出されることから、それが poly-L-alanine のそれと一致する故に α -Helix の存在を推定したが、なお確証を得るため旋光分散、赤外吸収スペクトルを測定し、 α -Helix の存在を証明した。すなわち柞蚕フィブロイン水溶液の旋光分散をしらべ 232m μ に trough が、210m μ 付近に shoulder が

出ること、peak が 200m μ 以下に期待されることから α -Helix が約 20% 位含まれていることを確めた。つぎに柞蚕フィブロインフィルムの赤外二色性を測定し、アミド I が平行二色性、アミド II が垂直二色性を示すこと、およびアミド V の吸収の検討をして α -Helix の存在を確認した。

文 献

- 1) L. Brown and I. F. Trotter ; *Trans. Faraday Society*, 52, 537 (1956)
- 2) E. Iizuka and Tsi Yang ; *Biochemistry*, 55, 1177 (1966)
- 3) N. S. Simmons, E. R. Blout et al. ; *J. Ame. Chem. Soc.*, 83, 4766 (1961)
- 4) E. Iizuka and Yang ; *Biochemistry*, 4, 1249 (1965)
- 5) 宮沢辰雄 ; 化学と工業, 15, 2 号 (1962)
- 6) T. Miyazawa, Y. Masuda and K. Fukushima ; *J. Polym. Sci.*, 62, S 62 (1962)