(昭和55年12月12日受理)

羊毛ケラチン Low-sulfur 成分タンパク質膜の 延伸および熱処理に伴う構造変化^{*1}

京都工芸繊維大学繊維学部 坂部 寛
京都大学化学研究所 宮本武明・稲垣 博

STRUCTURAL CHANGES IN CAST FILMS OF THE LOW-SULFUR PROTEINS FROM WOOL ON STRETCHING AND HEATING

By Hiroshi Sakabe*, Takeaki Miyamoto** and Hiroshi Inagaki**

* (Faculty of Textile Fibers, Kyoto University of Industrial Arts
and Textile Fibers, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, Japan)

** (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji,
Kyoto, Japan)

Structural changes in cast films of α -helical protein fraction isolated from reduced and S-carboxymethylated wool keratin (SCMKA) were investigated by X-ray diffraction. Two types of SCMKA films were prepared from the aqueous and formic acid solutions. Stretching of the films was successfully performed up to about 300% extension in 70% aqueous ethyl alcohol. It was found that (i) in addition to α -helical structure, the film cast from the formic acid solution contained partly β -structure, (ii) stretching up to 100% caused only the orientation effect of coiled-coil α -helical structure in both types of the cast films and (iii) at 200% extension, the oriented β -structure appeared in the films. The results were discussed in relation of the stress-elongation curves of SCMKA films in aqueous alcohol solutions.

The formation of β -structure was also accelerated by heating the films in steam, and the oriented films were obtained by stretching in steam to about 300% extension. On the other hand, when heated in vacuo, both types of SCMKA films showed no change in the X-ray diffraction patterns at temperatures up to 100°C, suggesting that water molecules may play an important role on the β -structure formation by heating. If the heating was carried out at 200°C for 3 h in vacuo, the 5.1 Å reflection of coiled-coil α -helical structure vanished completely, while the 4.7 Å reflection characteristic of β -structure remained unchanged, indicating that the degradation temperatures of the two crystalline forms are different.

(Received December 12, 1980)

1. 緒 言

羊毛ケラチンを構成する成分タンパク質は、繊維のミクロフィブリル構成成分と考えられている Low-sulfur (Low-S) 成分および主として非晶マトリックスに由来する High-sulfur (High-S) 成分と High-glycine (High

-G) 成分に大別される^{1,2)}。α型のX線図形を与える羊毛繊維の延伸および熱処理に伴う構造変化、特にα-β転移に関する研究は古くから数多く行なわれてきたが^{3,4)}、羊毛ケラチンを構成する成分タンパク質個々の延伸あるいは熱処理に伴う構造変化に関する研究は比較的少なく、Crewtherら^{5,6)}による Low-S 成分とそのα-helical fragmentの凝集状態の電子顕微鏡観察、Suzukiら⁷⁾によるα-helical fragment 配向膜のX線回折およびAmiyaらの High-S⁸⁾ および High-G タンパク質⁹⁾のβ構造の生成に関する研究などがあるに過ぎない。

^{*1} この報文を「羊毛ケラチン Low-sulfur 成分タンパク質の構造に関する研究(第1報)」、Studies on the structure of the low-sulfur proteins from wool (part 1)」とする。

本研究では、羊毛ケラチンのLow-S成分、すなわち、 α -helix成分タンパク質の固体状態におけるコンホメーションを明らかにすることを目的として、還元羊毛ケラチンのS-カルボキシメチル化誘導体のLow-S成分タンパク質(SCMKA)を試料として用い、SCMKAキャスト膜の延伸および熱処理に伴う構造変化を主としてX線回折法を用いて詳細に検討した。

尚、羊毛ケラチンを研究の対象とする場合、“ α -ケラチンと β -ケラチン”という用語を“ α -helix構造と β 構造(あるいは α 型と β 型)”という用語と明確に区別しておく必要があるが、 β ケラチンとは、 α 型のX線図形を与える未延伸羊毛繊維(α -ケラチン)と区別するために、Astburyら¹⁰⁾により延伸羊毛繊維に対してつけられた呼称であるから、“ α -ケラチンと β -ケラチン”はケラチンタンパク質全体の状態に対して用い、“ α -helix構造と β 構造”はケラチンタンパク質中に存在する規則構造および規則構造相に対して用いるのが一般的である¹¹⁾。本論文では、後者の用語はX線干渉から同定できる結晶相(crystalline phase)に対しても同様に用いることにする。また、本研究で用いたケラチン成分タンパク質は、 α -helix成分といわれているLow-S成分であるから、X線干渉から同定できない非晶相(non-crystalline phase)は単に non-helical 部分と呼ぶことにする。

2. 実 験

2.1 羊毛試料および試薬

メリノ羊毛(64'S)を常法に従ってベンゼン-エタノールおよびエチルエーテルで精製し、試料として用いた。試薬は、市販特級品をそのまま使用し、用いた水はイオン交換樹脂で脱イオンした後、蒸留したものを使用した。

2.2 SCMKAの調製

S-カルボキシメチルケラチンのLow-S成分(SCMKA)はO'Donnellら¹²⁾の方法にしたがって、還元剤として2-メルカプトエタノールを用い、8M尿素水溶液(pH 10.3)中30℃で羊毛ケラチンを可溶化した後、ヨード酢酸を用いてS-カルボキシメチル化反応を行い、さらにDowlingらの方法¹³⁾によりHigh-SとHigh-G成分を沈殿分離することによって調製した。試料SCMKAは、溶媒として0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ を用い、溶解-等電点沈殿を繰り返すことによって精製し、最終的にはSCMKA水溶液をイオン交換水を用いて透析法により精製した後、凍結乾燥した。

2.3 製膜方法

SCMKAをギ酸および純水に濃度が1%になるように溶解し、各キャスト溶液を水銀面上のテフロン板に流延

し、風乾により製膜し、膜厚が約25 μ になるように調節した。

2.4 熱処理方法

試料膜をテフロンリングで固定し、水蒸気中で所定の時間湿熱処理した。他方、乾熱処理は、100℃～200℃の温度範囲で減圧下3時間行った。

2.5 X線回折

ニッケルフィルターで濾光したCu-K α 線($\lambda=1.54\text{\AA}$)を線源として用い、ラウエ平板カメラにより撮影した。撮影は、理学電機製X線発生装置(Ca.No.4001A)により35kV, 15mA, カメラ間距離30mmで行い、未延伸膜では膜面に垂直に、延伸膜では延伸方向に対して直角で膜面に垂直にX線を入射した。また、回折強度曲線を求めるために、島津自記X線回折装置GX-3Bを使用した。X線は前記と同様の条件で照射し走査角は5°～40°の範囲であった。

X線回折測定用のSCMKA延伸膜の調製は、アルコール水溶液中で手動延伸機を用い、膜の両端を一方へゆっくり引き伸ばして行い、延伸率は、延伸前後の延伸方向の膜寸法比で示す。

2.6 赤外吸収スペクトル分析

赤外吸収スペクトルは、Perkin-Elmer 521型赤外分光光度計を用いて、1700～1400 cm^{-1} の範囲で測定した。

2.7 引張り試験

荷重-伸長率曲線は東洋測器製テンシロンUTMII型を用いて測定した。測定は、膜の試料長10mm, 引張り速度10mm/min, 20℃で行った。アルコール水溶液中での測定は、試料膜を溶液に浸漬し、浸漬5分後に行った。

3. 結果と考察

3.1 SCMKAキャスト膜のX線回折

SCMKAはpH4.4に等電点を有し、等電点以上のpHを有する水溶液には比較的良好に溶解し、また、ジメチルスルホキシド(DMSO)などの極性有機溶媒には膨潤する程度にとどまるが、ギ酸、トリフルオロ酢酸、トリフルオロエタノールなどの有機溶媒にもよく溶解する。本研究では、キャスト溶媒として純水とギ酸を用いたが、SCMKAは、水溶液中(pH7.0)では約50%の α -helix構造を、ギ酸溶液中では不規則構造をとっていることが知られている¹⁴⁾。図1にこれらの溶液から調製したSCMKAキャスト膜のX線回折写真を示す。両膜とも結晶性は悪いが、約10 $\text{\AA}$ の面間隔上に相当する回折リングと約5 $\text{\AA}$ よりも短い面間隔上にハロー状回折が認められる。さらに、ギ酸キャスト膜についてのX線回折写真をよく観

Fig. 1 X-ray diffraction photographs for SCMKA films cast from formic acid (A) and aqueous solution (B).

Fig. 2 X-ray diffraction intensity curves of SCMKA films corresponding to Fig. 1.

察すると、4.7 Å 付近に回折リングがもう一つ現われていることが判った。そこで、これらの回折リングの面間隔を正確に測定するため、赤道方向におけるX線回折強度曲線を描いた(図2)。図から明らかなように、9.8 Å ピークより α -helix 構造を含有していることが判るが、ギ酸から調製した膜には β 構造に特徴的な 4.7 Å の回折も明瞭に存在し、 α -helix 構造と β 構造が共存していることを示す。しかしながら、面間隔 5.1 Å に相当する回折強度のピークから、両膜中の α -helix 構造は羊毛繊維と類似のいわゆる coiled-coil 構造^{3,7)}であると断定することは難しい。反射が非常にブロードで SCMKA 膜物質のもつハローのピークと解釈することも可能だからである。この問題については後述する。

一般に、ポリペプチド分子鎖の凝集状態は膜の調製条件、すなわち、溶媒、温度および溶媒蒸発過程などに依存することが知られているが¹⁶⁾、ギ酸溶媒は、ケラチン分子の β 構造生成に重要な役割を演じているものと思われる。事実、SCMK の High-S 成分もギ酸溶媒から調製した膜では、容易に β 構造を生成することが知られている⁸⁾。ケラチン分子はギ酸分子により水素結合が切断されて溶解し、溶媒蒸発過程において再び分子間水素結合の形成され易い応力がかかり β 構造を生成するものと

考えられる。

SCMKA 膜の性質に関連して、ここで付言しておきたい観察結果は、両膜の水に対する膨潤挙動が非常に異なったということである。すなわち、ギ酸溶媒から調製した膜は水に浸漬しても僅かに膨潤するのみであるが、水溶液から調製した膜は膨潤が著しく膜の形態が容易にくずれてしまった。しかしながら、この水に対する膨潤抵抗の相異は上記したケラチン分子鎖のコンホメーションの差異、特に β 構造の有無に基因するものか、あるいはケラチン分子の有する疎水性アミノ酸残基の膜表面における密度の違いによるのか現在のところ明らかではない。ギ酸のような有機溶媒から調製した膜では膜表面の疎水性が水溶液から調製した膜に比して非常に高いと考えられるからであり¹⁶⁾、このような膜の表面構造と水に対するケラチン膜の膨潤抵抗に関する問題は、主鎖のコンホメーションとの関連性とともに関係すべき課題である。

3.2 アルコール水溶液中における SCMKA 膜の荷重-伸長率曲線

乾燥状態での SCMKA 膜の延伸を試みたが、水溶液およびギ酸溶液から調製した膜は、いずれもその強度は非常に高く、かつ高々数%程度の延伸が可能であるに過ぎなかった。また、前述したように、水に浸漬すると水溶液から調製した膜は膨潤が著しく、膜の形態が保持されず、また、ギ酸溶液から調製した膜は僅かに膨潤するだけであるが、強度は非常に低く、数%程度の延伸で容易に切断してしまった。

一方、水-エチルアルコール混合液中での延伸を試みたところ、容易に延伸可能であることが判った。図3と図4にそれぞれギ酸および水から調製した膜のエチルアルコール水溶液中における荷重-伸長率曲線を示す。ギ酸から調製した膜は、アルコール濃度が20%から70%の範囲では、アルコール濃度の増加とともに膜は硬くなり、強度も大きくなり、特にアルコール濃度が40%から70%の間では伸度も200%、すなわち3倍延伸が可能であった。しかし、濃度が80%になると膜は非常に硬くなり、最高伸度も120%にとどまった。

他方、水溶液から調製した膜は、アルコール濃度が低い水溶液中では流動的な延伸挙動を示し、ギ酸溶液から調製した膜と比べて非常に弱い。しかしながら、ここで注目すべき点は、両膜ともアルコール濃度が70%の時、羊毛繊維と非常に類似した延伸挙動¹⁷⁾を示すことである。すなわち、 α -helix 成分タンパク質のみから調製した膜においても、その荷重-伸長率曲線は羊毛繊維に特徴的な三つの領域、弾性変形、降伏および後降伏領域を示すことが判る。初期弾性変形域を過ぎて、伸長率が約30

Fig. 3 Stress-elongation curves for an SCMKA film cast from formic acid solution, observed in aqueous ethyl alcohol solutions at 20°C. Numbers attached to each curve indicate volume % of ethyl alcohol.

Fig. 4 Stress-elongation curves for an SCMKA film cast from aqueous solution, observed in aqueous ethyl alcohol solutions at 20°C. Numbers attached to each curve indicate volume % of ethyl alcohol.

％付近から約150％までつくいわゆる典型的な降伏領域を示し、ギ酸から調製した膜では260％、水から調製した膜では280％まで延伸することが可能であった。なお、エチルアルコールを*n*-プロピルアルコールおよびエチレングリコールに変えて類似の延伸挙動を詳細に検討したが、延伸配向膜の調製を目的とする実験条件としては、エチルアルコール水溶液に比していずれの水溶液も劣ることが判明した。

3.3 SCMKA膜の延伸に伴う構造変化

図5に水溶液から調製した膜を70％エチルアルコール水溶液中で延伸したSCMKA延伸膜の広角X線回折写真

Fig. 5 Stress-elongation curve for an SCMKA film cast from aqueous solution in 70% ethyl alcohol solution and X-ray diffraction photographs of the film subjected to (A) 100% and (B) 200% extension.

とそれに対応する荷重-伸長率曲線を示す。未延伸膜では、図1に見られるようなブロードな5.1 Åと9.8 Åの回折リングを示し、結晶性の低い無配向状態の α -helix構造をとっていたが、100％延伸膜では、9.8 Åの回折は赤道上に5.1 Åの回折は子午線上にアーク状に集中しており、配向した α -helix構造をとることが明らかとなった。この膜は荷重-伸長率曲線において降伏領域¹⁷⁾における延伸膜に対応しており、上記の結果はこの領域で主として α -helix構造の配向が起っていることを示唆している。一方、200％延伸膜では、9.8 Åと5.1 Åの回折に加えて、 β 構造に特徴的な4.7 Åの回折が赤道上に明瞭に現われ、後降伏領域の延伸膜では β 構造が発現することが見出された。さらに、ここで付言すべき点は、膜中の α -helix構造は面間隔5.4 Åの回折ではなく、5.1 Åの面間隔に相当する回折を与え、羊毛繊維と類似のcoiled-coil構造^{8,7)}をとっていることを示しているということである。

ギ酸溶液から調製した膜についても類似の結果が得られた。図6にその結果を示す。すでに述べたように、ギ酸溶液から調製したキャスト膜は、 α -helixと β 構造が共存した構造をとっているが、100％延伸膜ではまだ β 構造の配向、すなわち4.7 Åの回折リングに変化は見られない。しかし、200％延伸になると β 構造の配向が認めら

Fig. 6 Stress-elongation curve for an SCMKA film cast from formic acid solution in 70% ethyl alcohol solution and X-ray diffraction photographs of the film subjected to (A) 100% and (B) 200% extension.

れ、4.7 Åの回折が赤道上にアーク状に集中したX線回折写真を示す。

このようなSCMKA膜の延伸に伴う β 構造の発現は、赤外二色性の測定からも確認された。図7にギ酸キャスト200%延伸膜の赤外吸収スペクトルにおけるアミドIとアミドIIの吸収帯を示す。1650 cm^{-1} と1520 cm^{-1} 付近に平行吸収帯および1545 cm^{-1} 付近にアミドIIの垂直

Fig. 7 Infrared spectra of stretched SCMKA film corresponding to Fig. 6B.

吸収帯を有し、 α -helix構造が存在することが判る。また、 β 構造が共存していることは、1630 cm^{-1} 付近にアミドIの垂直吸収帯を有することから明らかである^{11,18}。

3.4 SCMKA膜の熱処理による構造変化

羊毛ケラチンの熱転移に関しては、60℃付近に熱変性温度が存在し^{19,20}、その分解点は200℃～250℃付近に存在することが知られているが²¹、成分タンパク質個々の熱転移に関する研究は、Harrap²⁰による水溶液中の研究があるに過ぎない。本節では、SCMKA膜の湿熱および乾熱処理に伴う α -helixおよび β 構造の変化をX線回折法を用いて検討した。

水溶液から調製したSCMKA膜のX線回折写真は図1に見られるように、 α -helix構造が存在することを示すだけであったが、湿熱処理を1時間施した膜では、5.1 Åより短い面間隔上のハローな回折の中に4.7 Åに相当する回折リングが現われ、3時間処理膜では図8に示すごとくこの4.7 Åの回折リングは、非常に明瞭になり高度に β 構造化することが判った。ギ酸溶液から調製した膜についてもほぼ同じ結果であった。

次に、乾熱処理したSCMKA膜の構造変化を湿熱処理膜のそれと比較検討した。水溶液から調製した膜の場合、100℃で乾熱処理を長時間施してもX線回折からその構造変化は認められず、100℃以上で処理しても β 構造の生成は観察されなかった。逆に200℃では、羊毛繊維の場合と同様にSCMKA膜においても α -helix構造の破壊がはじまり、200℃3時間乾熱処理膜では図9(A)に示すごとく α -helix構造は完全に消滅した。ギ酸溶液から調製した膜、すなわち β 構造が共存している膜の場合も、乾熱処理に伴う α -helix構造の変化は、上記の水溶液から調製した膜の場合と同様であったが、 β 構造は200℃処理膜でも明瞭に存在し、この温度ではまだ β 構造の破壊は起らないことを示した。

以上の結果からSCMKA膜の熱処理による β 構造の発現には、水分子が重要な役割を演じていること、 α -helix構造の破壊温度は約200℃付近に存在するが、 β 構造は

Fig. 8 X-ray diffraction photograph of the film heat-treated in steam for 3 h.

Fig. 9 X-ray diffraction photographs of the SCMKA films heat-treated in vacuo at 200°C for 3 h. Casting solvent: (A) water and (B) formic acid.

この温度ではまだ安定に存在することが判った。

3.5 水蒸気中で延伸した SCMKA 膜の X 線回折写真

β -ケラチンの生成は水蒸気中で延伸することにより促進されることはよく知られている。そこで、SCMKA 膜についても同様に水蒸気中での延伸を試みたところ、約 4 倍(延伸 300%)まで延伸することが可能であった。図 10 は、4 倍延伸膜の X 線回折写真である。これは、我が得た SCMKA 膜のうち最も配向した構造を有する膜であるが、面間隔 4.7 Å の赤道上的回折に加えて、5.1 Å の子午線上の回折が明瞭に存在し、配向した α -helix 構造と β 構造が共存していることが判る。

しかしながら、羊毛繊維で見られるような高度に β 構造化した、いわゆる β -ケラチン³⁾と類似の構造を有する SCMKA 膜は得られなかった。いずれの処理膜も α -helix 構造と β 構造が共存した構造を有している。

終りに、本研究を行うに当り、種々のご協力を賜った京都工芸繊維大学繊維学部有本肇教授、小西孝助教授ら

Fig. 10 X-ray diffraction photograph of the SCMKA film stretched in steam to about 300%.

に深く感謝いたします。

付記：本研究の一部は、昭和 54 年 10 月の繊維学会秋季研究発表会(名古屋)で発表した。

文 献

- 1) J. H. Bradbury, *Adv. Protein Chem.*, **27**, 111 (1973)
- 2) W. G. Crewther, *Proc. Fifth Intern. Wool Text. Res. Conf.*, Aachen, Vol. 1, 1 (1976)
- 3) E. G. Bendit and M. Feuhelman, "Encyclopedia of Polymer Science and Technology", Vol. 8, H. Mark and N. G. Gaylord, Eds., Wiley, N.Y., pp 1-44 (1968)
- 4) R. D. B. Fraser and T. P. MacRae, "Conformation in Fibrous Proteins", Academic Press, N.Y. (1973)
- 5) W. G. Crewther, M. G. Dobb, L. M. Dowling and B. S. Harrap, "Symposium on Fibrous Proteins", Australia (1967), ed., by W. G. Crewther, p. 329, Butterworths, Sydney, Australia (1968)
- 6) M. G. Dobb, G. R. Millward and W. G. Crewther, *J. Text. Inst.*, **65**, 374 (1974)
- 7) E. Suzuki, W. G. Crewther, R. D. B. Fraser, T. P. MacRae and N. M. McKern, *J. Mol. Biol.*, **73**, 275 (1973)
- 8) T. Amiya, T. Miyamoto and H. Inagaki, *Biopolymers*, **19**, 1093 (1980)
- 9) T. Amiya, T. Miyamoto and H. Inagaki, *Sen-i Gakkaishi*, **36**, 479 (1980)
- 10) W. T. Astbury and H. J. Woods, *Phil. Trans. Roy. Soc.*, **A232**, 333 (1933)
- 11) E. G. Bendit, *Biopolymers*, **4**, 539 (1966)
- 12) I. J. O'Donnell and E. O. P. Thompson, *Aust. J. Biol. Sci.*, **17**, 973 (1964)
- 13) L. M. Dowling and W. G. Crewther, *Pre. Biochem.*, **4**, 203 (1974)
- 14) T. Amiya, T. Miyamoto and H. Inagaki, *Polymer Preprints, Japan*, **28**, 1402 (1979)
- 15) A. Nakajima, T. Fujiwara, T. Hayashi and K. Kaji, *Biopolymers*, **12**, 2681 (1973)
- 16) H. P. Schreiber and M. D. Croucher, *J. Appl. Polym. Sci.*, **25**, 1961 (1980)
- 17) B. M. Chapman, *J. Text. Inst.*, **60**, 181 (1969)
- 18) T. Miyazawa and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 712 (1961)
- 19) M. Feughelman, A. R. Haly and B. J. Rigby, *Text. Res. J.*, **29**, 311 (1959)
- 20) B. S. Harrap, *Biopolymers*, **8**, 187 (1969)
- 21) E. Menefee and G. Yee, *Text. Res. J.*, **35**, 801 (1965)