(昭和57年2月15日受理)

家蚕絹フィブロインの分子形態

農林水産省蚕糸試験場 塚田 益 裕
東京農工大学工学部 平 林 潔

MOLECULAR CONFORMATION OF *Bombyx mori* SILK FIBROIN

By Masuhiro Tsukada and Kiyoshi Hirabayashi*¹

(Sericultural Experiment Station, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki, Japan)

*¹ (Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan)

The molecular conformation of silk fibroin was investigated by infrared spectroscopy (IR) and circular dichroism method (CD). The silk fibroin in the liquid phase was found to have random coil structure containing a small amount of α helix. The α helix content of silk fibroin, dispersed in pure water, increased with increasing the periods during fifth instar of silkworm larvae. This fact was related to the increase of the water content in liquid silk fibroin. Silk fibroin hydrolyzed by aqueous HCl solution showed the strong IR absorption band assigned to β structure as well as the weak band at 620 cm^{-1} (amide V) attributing to α helix. The results of IR and CD suggest that the peptide chains consisting of α helix do not exceed several units, taking into account the x-ray diffraction pattern exhibiting no α -helical chains.

(Received February 15, 1982)

1. 緒 言

飯塚¹⁾, 平林ら²⁾および片岡³⁾は絹糸腺内液状絹を用いて、絹糸が形成される際の機械的変性機構あるいは絹フィブロイン中に見出される β 核発生のメカニズムを明らかにしてきた。しかしながら、繊維化機構あるいはSilk Iの構造解析など未解決の問題が依然として残されている。これら未解決の問題を検討する上で絹フィブロインの分子形態を詳細に究明することは極めて重要であろうと考える。

本研究では溶液中および固体状態における絹フィブロインの分子形態を分光分析測定により検討し、絹フィブロインに α -ヘリックスの形態をとるものが含まれることを明らかにする。

2. 試料および実験方法

2.1 試 料

再生絹フィブロイン溶液; 絹糸を臭化リチウム飽和溶液中で溶解させた後、十分透析をおこない Li^+ を完全に除去して作成した。水溶液濃度 (0.03 mol/l) は平均アミノ酸残基の分子量 (88.9) を基にして算出したものである。

絹フィブロイン水溶液; 5 齢 1 日目および 3 日目の家蚕体内より後部絹糸腺を摘出し、十分水洗した後、絹糸腺内の液状絹フィブロインを蒸留水に希釈分散させた。絹フィブロイン水溶液を調製した直後に CD 測定をおこなった。

加水分解処理試料; 絹糸の加水分解処理は 0.6 N 塩酸水溶液を用い 98°C で 5 時間おこなった。ガラスフィルター (3 G) により処理溶液を濾過し、加水分解残留物を十分洗浄した後、105°C で 2 時間乾燥させた。

2.2 実験方法

円偏光二色性；日本分光社製 J-20 型自記旋光分散計を用い、0.1 mm 石英セル中で測定した。

赤外吸収スペクトル；日本分光社製 IR-G 型回折格子型分光光度計を用い、波数 1800—400 cm^{-1} の範囲で測定した。

3. 実験結果

3.1 溶液中における絹フィブロインの分子形態

絹糸フィブロインを臭化リチウム水溶液中で溶解して得た再生絹フィブロインの分子形態を明らかにするため、円偏光二色性(CD)測定をおこなった。再生絹フィブロイン水溶液の CD スペクトル(図 1)には 198 nm に負のピークが観察される。これがランダムコイル構造を有するポリ-L-リジンに特徴的な CD 曲線⁷⁾と類似していることから、再生絹フィブロインの主要な分子形態はランダムコイル^{4~6)}であるものと考えられる。次に臭化リチウム水溶液に絹フィブロインを溶解させることなく、家蚕の絹糸腺内容物を直接蒸留水に希釈分散せたいわゆる未変性絹フィブロインの分子形態の特徴を検討するため、5 齢 1 日目(図 2(a))および 3 日目(図 2(b))の後部絹糸腺内より取り出した未変性状態における絹フィブロインの CD 測定をおこなった。5 齢 1 日目の絹フィブロインの CD 曲線には、ランダムコイル構造⁷⁾に帰属し、200 nm に谷を有するブロードな吸収が観察される。また 5 齢 3 日目で得られた試料の CD 曲線の 208 nm および 222 nm 付近には α -ヘリックスに帰属する負のバンドが観察された。図 2 の結果により、絹フィブロインの α -ヘリックス含量は熟蚕の経過日数につれて増加するなど α -ヘリックス量の差を確認することができた。

Fig. 1. Circular dichroism (CD) spectra of regenerated silk fibroin in aqueous solution.

Fig. 2. CD spectra of native silk fibroin in aqueous solution. Spectra were recorded immediately after dissolving the liquid silk fibroin in pure water.

- (a) silk fibroin specimen for the first day of 5th instar silkworm larvae.
- (b) specimen for the 3rd day of 5th instar silkworm larvae.

3.2 固体状態における絹フィブロインの分子形態

水溶液中における未変性絹フィブロインに α -ヘリックスの形態をとるものが含まれることを明らかにしたが、吐糸過程を経た後、この α -ヘリックスはどのような分子形態変化を受けるのかを検討するため、絹フィブロイン繊維および加水分解処理試料の赤外吸収スペクトル測定をおこなった(図 3)。加水分解処理前の赤外吸収スペクトル(図 3(a))にはアミド I バンドが 1630 cm^{-1} に、アミド II バンドが 1530 cm^{-1} に、アミド V バンドが 700 cm^{-1} に観察される。これらのバンドはいずれも β 構造特有⁸⁾のバンドであることが知られている。加水分解処理した絹フィブロイン試料の赤外吸収スペクトルを図 3(b)に示す。加水分解処理試料(b)の赤外吸収スペクトルにはアミド I バンドが 1695 cm^{-1} 、1630 cm^{-1} に、アミド II バンドが 1525 cm^{-1} に、およびアミド V バンドが 700 cm^{-1} に観察される⁸⁾ため試料の分子形態の大勢は逆平行 β 構造であることが示唆された。 α -ヘリックスに帰属する吸収⁸⁾がアミド V バンドの 620 cm^{-1} に見出されることから、絹フィブロインには α -ヘリックスの分子形態をとるものが含まれるものと考えられる。それゆえ未変性絹フィブロイン水溶液中で観察された α -ヘリックスは絹糸が形成された後の繊維状試料の中でも依然として見出されることが明らかとなった。

Fig. 3. Infrared spectra of silk fibroin.
(a) degummed silk fibroin thread.
(b) specimen obtained by hydrolyzing the degummed silk fibroin in the HCl solution.

4. 考 察

絹フィブロインの分子形態には α -ヘリックスをとるものが含まれずランダムコイル構造を主体とした構造であると考えられてきたが⁴⁻⁶⁾、未変性絹フィブロインの水溶液には α -ヘリックスが存在することおよび α -ヘリックスの含有率は熟蚕の経過日数につれて次第に増加することなどを本実験で確めることができた。なおこの相違は試料作製条件の違いによるものと考えられる。すなわち、臭化リチウム水溶液処理により得られた、絹フィブロイン試料を用いた従来の方法⁴⁾に対して、本実験では未変性絹フィブロインを用いているのが特徴的である。臭化リチウム処理により試料中の α -ヘリックスの水素結合が溶媒の作用で切断されることにより、ランダムコイル構造を呈するように変化したものと考えればこの相違を矛盾なく説明できる。蛋白質におよぼす臭化リチウムの作用はhydrophobicなアミノ酸残基の相互作用を弱めるものではないが、分子のヘリックス構造を破壊するものであるとする浜口³⁾の考察は上記の推定の妥当性を示唆するものであろう。

著者¹⁰⁾は家蚕絹糸腺内の液状絹を蒸留水中に浸漬した際、分散時間が経過し絹フィブロインの溶出がはじまると、水溶液中では α -ヘリックスの含有率が増加することを明らかにした。絹フィブロインに α -ヘリックスの形態をとるものが含まれるとする本実験の結果は前報¹⁰⁾の実験事実と符合するものと考えられる。 α -ヘリックスの含有率の変化に関連して、片岡¹¹⁾は、家蚕絹フ

ィブロインおよび柞蚕絹フィブロイン水溶液中で見出されるヘリカルな構造^{*1)}は濃度依存性のあることを旋光分散(ORD)および円偏光二色性(CD)測定の結果より明らかにしている。すなわち、柞蚕絹フィブロインでは高濃度でヘリカル構造を示すが、約5%より低濃度ではヘリカル構造が増加するという。ところで5齢1日目および3日目の未変性絹フィブロイン水溶液のCD曲線に差が見られたが、これは絹糸腺に含まれる水分率の微妙な変化により絹フィブロイン濃度依存性にもとづいて α -ヘリックスが観察されたものと考えられよう。絹糸腺内の水分率の測定によれば5齢1日目での水分率は93.8%であるが、3日目では85.4%にまで減少することが知られている¹²⁾。絹糸腺内の水分率の減少すなわち絹フィブロイン濃度の増加により、5齢3日目の試料に α -ヘリックスの増加が観察されたものと考えられる。

α -ヘリックスは上記で述べたとおり絹フィブロイン水溶液中で観察されるばかりでなく、絹フィブロイン繊維中でも存在することが加水分解処理試料の赤外吸収スペクトルの測定結果から示唆された。絹フィブロイン繊維(図3(a))の赤外吸収スペクトルにはアミドVバンドが極めて幅の広い吸収となって現われているため、620 cm^{-1} の吸収の有無は必ずしも明らかでなかった。しかし、加水分解処理により、非結晶領域におけるランダムコイル部分を構成する分子鎖が除去されるにつれて¹³⁾、絹フィブロインに本来存在していた α -ヘリックスの含有量が相対的に増加するため、試料の赤外吸収スペクトル(図3(b))に見られたとおり620 cm^{-1} 近辺に吸収が現われたものと推定される。著者¹⁰⁾は赤外領域における絹フィブロイン繊維の多重反射(ATR)スペクトルの測定により、ATRスペクトルにはアミドVバンドが620 cm^{-1} に極めて明瞭に観察されることを報告した。ATRスペクトルについて測定上の特徴は、解析する上で比較的良好な分解能が得られること、および測定試料はKBr錠剤法によらず繊維状のまま用いるため試料の内部構造の破壊程度が少ないこと¹⁴⁾などであった。さらにまた図3の結果からも明らかなように加水分解処理試料の赤外吸収スペクトルの測定により α -ヘリックスの存在が確認されたが、この試料のX線回折写真には α -ヘリックスにもとづく回折は見出されなかった。これは家蚕絹フィブロイン中の α -ヘリックスの単位格子の繰返し数が少なく、かつ α -ヘリックスは極端に少ないで存在するためであろう。結晶を構成する単位格子が9個以下だと、この構造単位にもとづく回折は見られず単なるハローパターンになってしまうことがX線結晶回折理論^{13,14)}によ

*1 家蚕絹フィブロインのヘリカル構造は α -ヘリックスであると断定はしていない

り明らかにされている。したがって家蚕絹フィブロインの加水分解処理試料のX線回折写真に α -ヘリックスにもとづく回折が観察されないという従来の実験結果は試料中の α -ヘリックスを構成する分子鎖の繰り返し単位が数個程度であるためによるものと考える。

5. 結 論

溶液状態および固体状態における絹フィブロインの分子形態を検討した結果、以下の知見が得られた。

1. 水溶液中における再生絹フィブロインおよび未変性絹フィブロインの分子形態は異なる。再生絹フィブロインの主要な分子形態はランダムコイルであるのに反し、未変性絹フィブロインには α -ヘリックスの形態をとるものが含まれ、その含有率は5齢の経過日数につれて増加する。

2. 加水分解処理試料の赤外吸収スペクトルには逆平行 β 構造に帰属する吸収の他に、 α -ヘリックスに特有な 620 cm^{-1} (アミドV)の吸収が見出される。

3. X線回折写真には α -ヘリックスにもとづく回折が全く見出されないことから、 α -ヘリックスを構成する分子鎖の繰り返し単位は数個程度であろうと推定される。

文 献

- 1) E. Iizuka; *Biorheology*, **3**, 141 (1966)
- 2) 平林 潔, 石川 博, 笠井暢民, 角戸正夫, 工化,

73, 1381 (1970)

- 3) 片岡紘三, 織学誌, **34**, 80 (1978)
- 4) 飯塚英策, 生化学, **39**, 1 (1967)
- 5) 馬越 淳, 笠井暢民, 角戸正夫, 高分子論文集, **30**, 649 (1973)
- 6) 片岡紘三, 植松市太郎, 高分子論文集, **33**, 453 (1976)
- 7) N. Greenfield, G. D. Fasman; *Biochemistry*, **8**, 4108 (1969)
- 8) T. Miyazawa, E. R. Blout; *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 712 (1961)
- 9) 浜口浩三, 生体高分子I, 生物物理学講座4, 日本生物物理学会編, 吉岡書店, 京都, p.183 (1965)
- 10) M. Tsukada, T. Komoto, T. Kawai; *Polym. J.*, **6**, 503 (1979)
- 11) 片岡紘三, “昆虫学最近の進歩”, 石井象二郎編, 東京大学出版社, 東京, p.516 (1981)
- 12) 荻原清治, “蚕繭学”, 島田書籍KK, 上田市, p.61 (1951)
- 13) 桐山良一, “X線結晶学”, 上巻, 仁田 勇編, 丸善, 東京, p.729 (1959)
- 14) 角戸正夫, 笠井暢民, “高分子X線回折”, 丸善, 東京, p.37 (1968)
- 15) 石川 博, 祖父江 寛, 松崎 啓, 信大織研報, **10**, 176 (1960)
- 16) 塚田益裕, 石黒善夫, 平林 潔, 織学誌, **36**, 314 (1980)