報 文

一般報文

(昭和59年7月30日受理)

異なる乾燥温度で作製した
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

MOLECULAR CONFORMATION OF *Bombyx mori*
SILK FIBROIN OBTAINED BY DIFFERENT CASTING CONDITIONS

By Masuhiro Tsukada

(Sericultural Experiment Station, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki, Japan 305)

In order to elucidate the molecular conformation and the morphology of silk fibroin obtained by casting from an aqueous silk fibroin solution, infrared spectroscopic and scanning electron microscopic observations were done. The lower the casting speed, the more the silk fibroin molecules gave a beta-rich conformation even if the casting temperature is high. The higher the casting speed, the more the silk fibroin molecules gave a random coil-rich form, indicating that the molecular conformation chiefly depends on the casting temperature and also on the casting speed. The optimum temperature for obtaining the spherulites from the silk fibroin solution (0.4%) was found to be about 25°C.

(Received July 30, 1984)

1. 緒 言

絹フィブロイン水溶液を乾燥固化させる際、乾燥温度が0~40℃では絹フィブロインは silk I 型に、50℃以上では silk II 型に結晶化することが知られている^{1~4)}。silk I 構造については単位格子の大きさが決っている程度で、その構造も推定の域を出ていない。これに対して silk II 構造は Marsh ら¹²⁾により詳細に検討され、逆平行 β 鎖を有するブリーツ状シート(antiparallel chain pleated sheet)が基本をなしていることが示された。馬越・中村⁵⁾は初期濃度と温度を変えた時の風乾によって出来る構造を検討し、試料濃度が希薄になるに従い silk I 型は出来にくく、極めて濃度が薄い場合でかつ温度が40℃以上では silk II 型しか出来ないことを見出している。

本研究では絹フィブロイン水溶液を異なる温度および乾燥速度で乾燥固化して得られた試料の分子形態ならびにモルロジーを明らかにし、特に球晶¹⁴⁾の存在について

絹セリシンのモデル物質ポリ-L-セリンの結晶析出物の検討結果⁶⁾と比較する。

2. 実 験

2.1 試 料

熟蚕2日前の家蚕(日132×支132)の体内より後部絹糸腺を取り出し、蒸留水で十分に水洗した後、絹糸腺細胞を除去した。その後、20℃の蒸留水中に浸漬し絹糸腺内容物を抽出したものを原試料として用いた。この水溶液を0.4%に希釈し、所定の温度に設定した恒温槽内に放置して球晶状析出物を成長させた。

2.2 測 定

赤外吸収(IR)スペクトルは日本分光工業(株)A-702型回折格子型分光計を用いて測定した。IRスペクトルの測定では0.4%家蚕絹フィブロイン水溶液を異なる温度で乾燥固化させたものを試料とした。なお絹フィブロイン水溶液の乾燥速度は硫酸調湿液の濃度を変えることによ

り変化させた。乾燥固化温度が60℃以上の場合では、乾燥器を用いて所定の温度に設定したミニケータ(桐山製作所製DE78-1)に試料を入れ、容器内を減圧にすることによって、乾燥湿度を調節した。さらにまた、70%家蚕絹フィブロイン水溶液を用いて上記と同様の実験を行った。

偏光顕微鏡写真は日本工学工業(株)製偏光顕微鏡POHを用いて撮影した。

走査型電子顕微鏡観察には日本分光工業(株)製走査型電子顕微鏡(JXA-733S)を用い、10分間の蒸着処理により金のコーティング⁷⁾を施した試料を加速電圧15kVで観察した。

3. 結果と考察

3.1 分子形態変化

絹フィブロイン試料の乾燥速度を変えるため異なる相対湿度の雰囲気下25℃で、家蚕絹フィブロイン水溶液を乾燥固化させて得られた試料のIRスペクトルの測定結果を図1に示す。なおIRスペクトル上700~600cm⁻¹

Fig. 1. Infrared spectra of the samples cast from a 0.4% aqueous solution of *Bombyx mori* silk fibroin at 25℃ at different humidities. (a) 20%, (b) 35%, (c) 50%, (d) 70%, (e) 85%.

のアミドVバンド付近では、サンプル支持台として用いた赤外線透過ガラスの吸収により透過光が減少し測定が困難であったので、ここでは特に論議の対象となるアミドI、IIおよびIIIの吸収帯を示した。乾燥速度が速いと思われる相対湿度の低い条件で得られた試料のIRスペクトル(a)にはランダムコイルに特徴的な吸収⁸⁾が1660cm⁻¹(アミドI)および1540cm⁻¹(アミドII)に観察された。試料作製時の相対湿度が20~70%では、1630cm⁻¹(アミドI)および1530cm⁻¹(アミドII)にβ構造に帰属する吸収⁹⁾が現われず、β構造の存在は観察されなかった。しかし、相対湿度が70~85%のところで作製した試料のIRスペクトルにはランダムコイルに基づく吸収の他に、β構造に由る吸収バンドが明瞭に認められた。このことから、乾燥固化法により試料を作製する際、相対湿度が70%以上となると分子形態的にみてβ構造への変化が明瞭に起っていることが明らかとなった。馬越⁸⁾は濃度0.8%以下の絹フィブロイン水溶液を乾燥させる場合、40℃以下で乾固処理した試料分子はランダムコイル形態をとるようになるが、40℃以上ではsilk II型になると報告している。著者は絹フィブロインの乾燥温度が40℃以上でも乾燥速度が速くなるとランダムコイルが形成される可能性があるものと予想し、これを確かめるため乾燥温度を40℃以上に設定して、乾燥速度を変化させたときに見出される絹フィブロイン分子の形態変化を検討した。乾燥温度が60℃、80℃および100℃で、乾燥速度が速い状態で作製した試料のIRスペクトル(図2 a, c, e)にはランダムコイルあるいはsilk II構造に相当するアミドIおよびアミドIIバンドの吸収がそれぞれ1660, 1540cm⁻¹に観察された。IRスペクトルの観察のみで、試料の分子形態がランダムコイルかsilk Iかを厳密に区別することはできないので、念のため乾燥温度を80℃に設定し乾燥速度を速くして作製した試料のX線回折写真を撮影した(図3)。試料のX線回折写真には無配向silk I構造に特徴的な7.6, 4.6, 3.7Åの面間隔に対応した回折環¹⁸⁾が観察されたが、その回折強度は小さいことが特徴的であった。図2および図3の結果から、乾燥速度を速くして得られた試料の主要な分子形態はランダムコイルであるが、結晶性の比較的低いsilk I構造も混在していることが明らかとなった。乾燥速度が遅くなると試料のIRスペクトル(図2 b, d, f)には上記の吸収のほか、β-構造に対応する吸収⁹⁾が1630および1540cm⁻¹に現われ、その吸収強度が増加していた。乾燥温度が低温になる程、水溶液の乾燥速度が遅くなるものと推定されるので、つぎに乾燥温度を20℃以下にしたときの絹フィブロインの分子形態変化をIR測定により検討した(図4)。5℃で乾燥固化した試料のIRスペクトルにはランダムコ

Fig. 2. Infrared spectra of the samples cast from a 0.4% aqueous solution of *Bombyx mori* silk fibroin at different temperatures.

- (a) 60°C, high casting speed,
- (b) 60°C, low casting speed,
- (c) 80°C, high casting speed,
- (d) 80°C, low casting speed,
- (e) 100°C, high casting speed,
- (f) 100°C, low casting speed.

イルに特徴的な吸収のほか、 β -構造に帰属する 1630 cm^{-1} (アミド I), および 1530 cm^{-1} (アミド II) の吸収が認められた。上記の結果は 0.4% 家蚕絹フィブロインについて乾燥固化温度を変えて作製した試料の実験結果であるため、ここで見出された傾向が特定の水溶液濃度においてのみ観察されたものか否かについては明らかでない。そこでつぎに、絹フィブロイン濃度を増加させて 7.0% に設定した溶液試料から得られたものを用いて同様の実験を行った。乾燥温度 60, 100°C において、乾燥速度を変えて作製した絹フィブロイン試料の IR スペクトルを図 5 に示す。60°C で乾燥固化した試料の IR スペクトルは 0.4% の絹フィブロイン水溶液を乾固して得られた試料の IR スペクトル (図 2) と全体的に類似していたが、100°C で

Fig. 3. X-ray diffraction pattern of the sample cast from a 0.4% aqueous solution of *Bombyx mori* silk fibroin at 80°C (high casting speed).

Fig. 4. Infrared spectrum of silk fibroin (*Bombyx mori*) cast on quartz cell at 5°C from 0.4% aqueous solution of silk fibroin.

乾燥固化した場合乾燥速度が速い時の試料 (図 5 c) には β -構造に基づく 1630 cm^{-1} の吸収が僅か現われていた。

以上のことから、絹フィブロインの分子形態は試料水溶液の乾燥温度の影響と同時に乾燥速度の違いによっても左右されることがわかった。

奈倉ら¹⁰⁾は固体状態における絹フィブロインについて silk I から silk II への構造転移は 200°C 以上の高温領域で、一旦ランダムコイル化した後、冷却過程ではじめて可能になるものと考察した。そのため絹フィブロイン水溶液が上記のような条件で乾燥固化する過程で形成される silk I あるいは silk II 型構造は、ランダムコイル形態

Fig. 5. Infrared spectra of the samples cast from 7% aqueous solution of *Bombyx mori* silk fibroin at different temperatures.

- (a) 60°C, high casting speed,
- (b) 60°C, low casting speed,
- (c) 100°C, high casting speed,
- (d) 100°C, low casting speed.

またはこれに近い分子形態から発生し、さらにこれが成長するものと推察される。そのため絹フィブロインの分子形態は、絹フィブロイン水溶液の乾燥状態の相違により敏感に影響を受ける。特に水と絹フィブロインが水素結合で結合しているとき、その水の蒸発速度の相違は分子形態が伸びた状態で結晶化するかあるいはそうでない状態で結晶化するかを決める主要な要因となり得るものと考えれば、本実験結果あるいはこれまで得られた実験事実を矛盾なく説明できるものと考ええる。

3.2 球晶析出物の光学性およびモルホロジー

0.4% 家蚕絹フィブロイン水溶液を異なる温度で処理して得られた球晶状析出物の偏光顕微鏡写真を図6に示す。偏光顕微鏡観察から判断すると、絹フィブロインの球晶状析出物が得られる処理温度の範囲は40℃～5℃であり、25℃付近が球晶状試料を作製するための最適温度であった。40℃以上になると絹フィブロインの球晶は得られ難い。なお試料の光学性については40℃付近では正の球晶

Fig. 6. Polarized optical micrographs of the samples cast from a 0.4% aqueous solution of *Bombyx mori* silk fibroin at different temperatures.

- (a) 40°C, (b) 25°C, (c) 5°C.

あるいは一部に負の球晶(図6 a)が、25℃付近では正の球晶(図6 b)が観察された。さらに5℃で得られた球晶(図6 c)は弱い正の光学性を有している。

つぎに球晶状試料を走査型電子顕微鏡により観察した(図7)。80℃処理により得られた試料には球晶状試料は全く観察されなかったが、60℃で処理した試料には微弱的な複屈折を有する結晶状析出物が見出された。固化温度40℃で得られた試料には14μm以上の直径を有する球晶状試料が認められた。20℃で処理した試料には球晶の初期的構造が明瞭に見出された。さらに乾燥温度が低温になると、再び球晶状試料の生長は観察されなかった。

Fig. 7. Scanning electron micrographs (SEM) of the samples cast from a 0.4% aqueous solution of *Bombyx mori* silk fibroin at different temperatures. (a) 80°C, (b) 60°C, (c) 40°C, (d) 25°C, (e) 5°C.

通常乾燥温度が低いとき絹フィブロイン水溶液の乾燥速度は遅く、また乾燥温度が高いときには乾燥速度は速くなるが、試料が結晶化するためには適当な乾燥温度が存在するはずであろう。事実、偏光顕微鏡写真(POM)あるいは走査型電子顕微鏡写真(SEM)からも明らかに球晶状析出物は40℃～5℃の温度範囲で得られたが、0.4%絹フィブロイン水溶液から球晶が生長するための最適温度は25℃付近であった。この温度で形成される球晶の光学性の測定結果が正であるということは大半の球晶の屈折率の長軸が球晶の半径方向を向いていることを示す。長軸の屈折率に寄与するのはペプチド鎖からは垂直に出るNHとC=Oによる水素結合および絹フィブロインを構成する主要なアミノ酸(Gly, Ala, Ser等)の分子側鎖の屈折率がペプチド鎖の屈折率より高いことを考えると、絹フィブロイン分子主鎖は球晶の半径

方向に対して垂直におりたたまれているものと考えられる。しかも球晶の中の分子は図1と4のIR測定結果から判断して silk II 型の β -シート構造をとっているものと推定される。そこで絹フィブロイン分子主鎖がこのようにおりたたまれる模様は著者ら⁶⁾が先に絹セリシンモデル物質について提案した cross β -構造の分子配位と類似している。この分子配位モデル⁶⁾が絹フィブロインの球晶の場合にも適応できるものと仮定すると、絹フィブロイン分子主鎖は分子側鎖が互に向いあうような形でおりたたまれ、分子間ではCO $\cdots$ NHによる水素結合によってシート構造が形成されていると予測される。絹フィブロイン水溶液の乾燥温度が5℃付近となると試料分子の熱運動性が低下する結果、分子シート鎖間のCO $\cdots$ NHの接触頻度⁹⁾は減少し、球晶の生長は抑えられることになろう。逆に乾燥固化温度が60℃以上となると、

分子鎖間の CO...NH 基間の接触頻度はその分だけ高まるが、分子の熱運動エネルギーが過剰となり、試料分子は不規則的におりたたまれることとなり球晶の形成は阻害されるものと考えられる。そこで、球晶が生長するためには、球晶の生長に見合った試料分子の熱運動エネルギー、例えば分子鎖間で CO...NH 基の接触頻度に対応したものが必要となる。このような考え方から、0.4%の絹フィブリン水溶液から球晶が生長するための最適温度が25℃付近となったものと考えられる。たとえ乾燥温度が高温の100℃となっても水溶液の乾燥速度を十分遅くするならば、分子間で水素結合を取り得るような時間的な余裕が与えられることとなり、試料が結晶化したものと説明できる。

謝 辞：本研究に際し種々ご検討いただいた信州大学繊維学部・奈倉正宣助教授ならびに、走査型電子顕微鏡写真の撮影にご助力いただいた蚕糸試験場・蚕育種部松村初太郎主任研究官にお礼申上げる。

文 献

- 1) 平林 潔, 石川 博: 織学誌, **24**, 449 (1968)
- 2) 馬越 淳, 笠井暢民, 角戸正夫: 高化, **30**, 649 (1973)
- 3) 青木一三, 石田善一, 武内民男, 有本 肇: 日蚕雑, **43**, 19 (1974)
- 4) 片岡紘三, 日蚕雑, **43**, 483 (1974)
- 5) 馬越 淳, 中村茂夫: 繊維学会昭和58年度年次大会研究発表要旨集, 152 (1983)
- 6) 塚田益裕, 奈倉正宣, 石川 博: 織学誌, **39**, T 278 (1983)
- 7) 松村初太郎: 続絹糸の構造(北條舒正編), 信教印刷, 上田 p.175 (1980)
- 8) T. Miyazawa and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 712 (1961)
- 9) 石川 博, 奈倉正宣: 織学誌, **39**, p. 353 (1983)
- 10) 奈倉正宣, 石川 博, 塚田益裕: 高分子論文集, **41**, 139 (1984)
- 11) "Maintaining constant relative humidity by means of aqueous solution" ASTM E 104-51.
- 12) R. E. Marsh, R. B. Corey, L. Pauling, *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 1 (1955)
- 13) 清水正徳, 蛋白質化学V, (赤堀四郎・水島三一郎編) 共立出版社, 東京, p.352 (1957)
- 14) J. Magoshi, *Polymer*, **18**, 643 (1977)