(昭和 62 年 9 月 24 日受理)

^{13}C NMRによるエリ蚕絹フィブロインならびに そのモデル化合物, アラニン, β -アラニンコポリ マーの構造解析

関西鍼灸短期大学 檜 葉 均
東京農工大学工学部 朝 倉 哲 郎
東京工業大学工学部 甲 本 忠 史

THE STRUCTURE ANALYSIS OF *Philosamia cynthia ricini* SILK FIBROIN AND ITS MODEL COMPOUNDS, L-ALANINE/ β -ALANINE COPOLYMERS, BY MEANS OF ^{13}C NMR SPECTROSCOPY

By Hitoshi Kashiba*¹, Tetsuo Asakura*² and Tadashi Komoto*³

*¹ (Kansai College of Acupuncture Medicine, 990 Ogaito, Kumatori-cho, Sennan, Osaka 590-04)

*² (Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Nakamachi 2-chome, Koganei, Tokyo 184)

*³ (Faculty of Technology, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152)

The structures of *Philosamia cynthia ricini* silk fibroin and its model compounds, L-alanine/ β -alanine copolymers, were studied in organic solvents, dichloroacetic acid (DCA) or trifluoroacetic acid (TFA) by means of ^{13}C NMR spectroscopy. In DCA, the carbonyl region of a series of L-alanine/ β -alanine copolymers is divided into three peaks, corresponding to β -alanine (random coil), L-alanine (α -helix and random coil). On the other hand, the carbonyl region is more complex in TFA, indicating further splitting due to the primary structure in the coil state. Using the chemical shift data for the α -helix and random coil forms of the L-alanine residues of these copolymers in both solvents and statistical thermodynamic analysis for helix-coil transition, the spectra of the alanine carbonyl region of *P. c. ricini* silk fibroin in these solvents could be theoretically interpreted. Especially, the Lifson-Roig parameters in the thermodynamic treatment and the local helicity of each alanine residue of the $-(\text{Ala})_{22}$ - sequence were determined.

(Received September 24, 1987)

1. 緒 言

絹フィブロインを従来からの衣料材料としての用途以外に、酵素固定化材料等のバイオ材料として積極的に利用していくにあたり、その独特の構造と物性を詳細に検討することは重要である^{1~3)}。また、家蚕絹フィブロインに比較して、野蚕絹フィブロインの構造の検討は遅れており、素材を広く求める上でその検討は急務と言えよ

う。

我々は、野蚕の一種としてエリ蚕をとりあげ、水溶液中での絹フィブロインの ^{13}C 、ならびに ^{15}N NMRによる解析を行ってきた^{4~8)}。44%を占めるアラニン残基の78%が平均連鎖数22からなる α -ヘリックス部分を形成すること、外部環境の変化に伴いアラニン連鎖部分はヘリックス-コイル転移挙動を示すこと、他の残基はランダムコイルとなっており α -ヘリックス部分に巻き込

まれていること、グリシン残基を含むシーケンスは家蚕に比較してバラエティーに富んでいることを報告してきた。

この様にエリ蚕絹フィブロインの構造は、 α -ヘリックスの存在にその特徴を有しており、 α -ヘリックスを中心とする構造解析を更に進める必要がある。

本研究では、分子鎖中にアラニン連鎖を有する一連のアラニン、 β -アラニン合成コポリマーをエリ蚕絹フィブロインのモデルとして考え、ヘリックス-コイル転移に関する統計的手法を取り入れて ^{13}C NMR 構造解析を進めた。その知見に基づいてエリ蚕絹フィブロインの構造を検討した。特に、アラニン/ β -アラニンランダムコポリマー中の β -アラニンは、ランダムコンホメーションをとり、アラニン連鎖の形成する α -ヘリックスに巻き込まれないことから、エリ蚕絹フィブロインのモデルとして、これらのコポリマーは、適していると考えられる^{9,10}。

2. 試料と実験

アラニン(Aと略す)と β -アラニン(Bと略す)の組成が異なる6種類のランダムコポリマー⁹⁾ならびに、シーケンシャルコポリマー、 $-(\text{AB})_n-$ 及び $-(\text{AAB})_n-$ ¹⁰⁾、更にエリ蚕絹フィブロインを ^{13}C NMRの測定に供した。ランダムコポリマーはNCA法で、シーケンシャルコポリマーは液相法でそれぞれ合成したものであり、試料のキャラクタリゼーションを表1にまとめた。共重合組成比、重合度、ヘリックス含量はいずれもNMR法より求めた。アラニンと β -アラニンの組成は、29:71から99:1まで変化させたが、アラニン含量の増加に伴い、重合度、ならびにヘリックス含量は増加している。

Table 1. Characterization of L-alanine/ β -alanine random and sequential copolymers.

SAMPLE	Composition (%) ¹⁾			Helical Content	
	L-Ala: β -Ala	DP ²⁾		DCA- CDCl_3 ³⁾	TFA- CDCl_3 ⁴⁾
A1	29 : 71	33		.00	.00
A2	49 : 51	40		.00	.00
A3	67 : 33	45		.12	.06
A4	76 : 24	50		.29	.12
A9	88 : 12	52		.68	.43
A99	99 : 1	62		.92	.91
$(-\text{AB}-)_n$	50 : 50				
$(-\text{AAB}-)_n$	67 : 33				

1) Determined from the ^1H NMR spectra in DCA(5)- CDCl_3 (95) solvent system.

2) Degree of polymerization.

3) in DCA(80)- CDCl_3 (20) solvent system.

4) in TFA(80)- CDCl_3 (20) solvent system.

^{13}C NMRの測定は、JEOL FX-200, FX-90Qを用い、各々50 MHz, 225 MHzにて行った(濃度6w/v%, 温度50°C)。溶媒は、ジクロロ酢酸(DCA), トリフルオロ酢酸(TFA)の2種類を用い、体積比で20%のクロロホルム(CDCl_3)を加えた。尚、化学シフトの内部基準としてTMSを加えた。

3. 理 論

エリ蚕絹フィブロインについて、そのアラニンシーケンスの各残基のヘリシティを理論的に求め、実測スペクトルと対応させることを試みた。アラニンシーケンスのヘリックス形成に関与する因子として分子内水素結合の他に分子内疎水結合が考えられる。すなわち、分子内水素結合は*i*番目残基のアミノ基と*i*+4番目残基のカルボニル基が、また、分子内疎水結合は*i*及び*i*+3番目残基のメチル基同志が相互作用し、ヘリックスを安定化させると考えられる。

本研究においては、これらの二つの効果を考慮にいれ、ヘリックス-コイル転移理論を展開したBixonらのモデルを用いた¹¹⁾。すなわち、三残基続いたヘリックスまたはコイルのコンホメーションの組み合わせに対して、表2にまとめた統計重率を考える。*u*, *v*, *w*はそれぞれLifson-Roigのパラメーター¹²⁾、 σ は、疎水結合の効果を与える。

ここで*n*残基からなるアラニン連鎖部分の分配関数 Z_n は、

$$Z_n = e_1 W^n e_2$$

$$W = \begin{bmatrix} w\sigma & v & 0 \\ 0 & 0 & v \\ \alpha & u & u \end{bmatrix}$$

$$e_1 = (1 \ 1 \ 1)$$

$$e_2 = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix}$$

と表現できる。

また、連鎖末端からの*k*番目残基がヘリックス状態にある状態関数は

$$F_{nk} = e_1 W^{k-1} H W^{n-k} e_2$$

$$H = \begin{bmatrix} w\sigma & v & 0 \\ 0 & 0 & v \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

と表現できる。ここでマトリックス*H*は、マトリックス*W*において統計重率 α と*u*を0に置換したものである。

従って、*k*番目残基のヘリシティ

Table 2. The statistical weights of the first unit in the matrix by Bixon et al.¹¹⁾

Conformation (<i>i, i+1, i+2</i>)	Statistical weight of the first unit
h h h	$w\sigma$
h h c	v
h c h	v
h c c	v
c h h	α
c h c	u
c c h	u
c c c	u

h : helical state

c : coil state

 σ : effect of hydrophobic bond. $\alpha = 1 + v^{1/2}(\sigma - 1)$

は、

$$P_{nk} = F_{nk} / Z_n$$

連鎖平均のヘリシティは

$$P_n = 1/n \cdot \sum P_{nk}$$

で与えられる。

一方、NMR に出現するアラニン連鎖部分の化学シフトは、ヘリックスとコイル間の速い交換の平均を見ていることから、

$$\omega_k = \omega_h \cdot P_{nk} + \omega_c \cdot (1 - P_{nk})$$

と表現できる。 ω_h , ω_c はそれぞれ 100%ヘリックス及びコイルの化学シフトを表わす。モデル化合物の NMR スペクトルから得られた ω_h , ω_c を上式に代入することにより、エリ蚕絹フィブロイン中の n 残基からなるアラニン連鎖の k 番目残基の化学シフトを求めることができる。

以上のように、ヘリシティに関する理論的アプローチを基礎にし、実測スペクトルと比較することによってアラニン連鎖部分の詳細な解析を行った。

4. 結果及び考察

4.1 DCA 溶媒系でのアラニン、 β -アラニンコポリマーの¹³C NMR スペクトル

カルボニルピークは、ポリペプチドのシーケンス並びにコンホメーションの詳細な情報を与えるので、こ

の化学シフト域に着目し解析を進めた。

図 1 に、一連のランダムコポリマーの DCA 溶媒系 (CDCl₃ を 20% 含む) で測定したカルボニル域のスペクトル(左)と、そのピークシミュレーションの結果(右)を示した。ピークの線形をローレンチアンと仮定し、NMR スペクトルのピークのシフト位置、半値幅、高さを入力し、シミュレーションを行った¹⁸⁾。その結果、各々のピークの面積を決定し、ヘリックス含量を求めた。尚、A3, A4, A9 試料のスペクトルで観測される 176 ppm 付近のピークは、後に述べるように、ヘリシティの理論的計算から、 α -ヘリックスを形成したアラニン連鎖末端近傍と考えられるので、ヘリックス含量の計算の際には、それを考慮した。

各コポリマーのアラニン、 β -アラニンの相対量からそれぞれ図 1 に示すようにアラニン、 β -アラニン由来のピークを帰属することができた。アラニン含量の多い試料 A3~A99 に出現する最も低磁場側のピークは、DCA がポリ-L-アラニンのヘリックス溶媒であるこ

Fig. 1 ¹³C NMR spectra of the carbonyl region of L-alanine/ β -alanine random copolymers in the DCA(80)-CDCl₃(20) solvent system (left) and the simulated spectra (right). The numbers given to the peaks in the simulated spectra indicate percent fractions of the peaks. A and B denote peaks from L-alanine and β -alanine residues, respectively.

と¹⁴⁾と、そのピーク位置^{4,15)}からアラニン連鎖由来のヘリックスピークと帰属できる。このピーク強度はアラニン含量が増加するにつれて増加する。すなわち、ヘリックス含量が増加することがわかる。A99では、分子鎖末端の効果を考慮にいれるとほぼ100%、 α -ヘリックスを形成していると考えられる。

4.2 TFA溶媒系でのアラニン、 β -アラニン コポリマーの¹³CNMRスペクトル

図2に、ランダムコポリマーのTFA溶媒系(CDCl₃)

Fig. 2 ¹³C NMR spectra of the carbonyl region of L-alanine/ β -alanine random copolymers in the TFA(80)-CDCl₃(20) solvent system (left) and simulated spectra (right). The percent fraction of the peaks determined from the simulation are also shown. The relative area of the shaded portion corresponds to the α -helical fraction in the sample. A and B denote L-alanine and β -alanine residues, respectively. A and B denote peaks from L-alanine and β -alanine residues in successive two residues, e.g., AB; L-alanine residue of L-alanine- β -alanyl sequence.

を20%含む)で測定したカルボニル域(左)、及びそのピークシミュレーションの結果(右)を示した。ピークシミュレーションは、図1と同様に行ったが、ピーク線形はガウシアンと仮定して計算を行った。この仮定はピークがDCA溶媒系に比較して細かく分裂しているからである。ただし、A99についてはローレンチアンで合成スペクトルを計算した。

このように、DCA溶媒系に比べTFA溶媒系では、更にピークが分裂しているが、これは、DCAより強酸であるTFAによって試料が分解したためでなく、ランダムコイル状態でさらにシーケンスの違いによりピークが分裂したことを示している。A1, 2の試料について-(AB)_n-, -(AAB)_n-のシーケンシャルコポリマーのカルボニル域のピーク位置を参考に、図2に示すようにピークは高磁場側からそれぞれ、AA, AB, BA, BBと帰属した。例えばAAは、2個続いたアラニン残基のうちN端側のアラニンのカルボニルピークを表す。各々のピークはより高次のシーケンスを反映して更に分裂している。A3~A99の試料についても同様、アミノ酸の一次及び高次構造による分裂が生じ、ピークはより複雑になっている。

それぞれAAとAB, 及び BBとBAのピークを定量し以下の式を用いることにより、アラニン及び β -アラニンの平均連鎖長、各々 L_A 及び L_B を求めた¹⁶⁾。尚、ピークの定量結果は、図2中に載せた。

$$L_A = I_{\underline{AA}} / I_{\underline{AB}} + 1$$

$$L_B = I_{\underline{BB}} / I_{\underline{BA}} + 1$$

ここで、 $I_{\underline{AA}}$, $I_{\underline{AB}}$, $I_{\underline{BB}}$, $I_{\underline{BA}}$ は各々、AA, AB, BB, BAの各ピークの強度である。

A1のアラニンの平均連鎖長は2.5残基、 β -アラニンの平均連鎖長は3.4残基となる。また、A2ではアラニン及び、 β -アラニンの平均連鎖長はともに2.3残基と求められた。

A3, A4, A9の試料については、ピークの帰属が困難であるため、A, Bの平均連鎖長を求めることが出来なかったが、アラニン含量が増加するに従い、アラニン連鎖長も長くなる傾向が見られた。シミュレーションのスペクトルにおいて、そのピーク位置から、斜線部が α -ヘリックスピークと考えられる。コポリマー中のアラニン含量の増加につれてヘリックス含量も増加し、A99ではDCA溶媒系同様、ほぼ100%、ヘリックスを形成している。A3, A4, A9に関してそのヘリックス含量が、TFA溶媒系では、DCA溶媒系に

比較して減少する。

4.3 エリ蚕絹フィブロインの ^{13}C NMRスペクトル

エリ蚕絹フィブロイン中のアラニン連鎖は22残基と報告されている⁷⁾ので、連鎖末端の残基から中央の11番目残基までのヘリシティを、各残基毎に既に述べた統計的手法に基づいて計算した。図1, 2から、アラニン連鎖のヘリックスとコイルの化学シフトは各々、DCA溶媒系で、177.93, 174.19 ppm, TFA溶媒系で、179.39, 176.62 ppmと決定される。従って、ヘリシティの計算結果と両溶媒系でのヘリックスとコイルの化学シフト値から、エリ蚕絹フィブロインのアラニン連鎖について、各残基の化学シフト値を計算し表3にまとめた。また、最適の w 値を用いた時の計算結果は、棒スペクトルとして、エリ蚕絹フィブロインならびに、A99試料の実測スペクトルとともに図3に示した。尚、統計重率 v は、アラニン残基固有の値で、Platzerらが報告している値0.03を用いた¹⁷⁾。疎水結合の効果を与える統計重率、 σ はBixonらの文献値¹¹⁾を参考に1.7として計算を行った。 u は1とした。

DCA溶媒系の場合、エリ蚕絹フィブロインのアラニン連鎖、主ピークの位置は、ランダムコポリマーのアラニン、ヘリックスピークのそれと一致し、エリ蚕絹フィブロインのアラニン連鎖は、ほぼ完全なヘリックスを形成していると考えられる。また、主ピークの高磁場側に出現するいくつかのピークは、 $w=1.08$ で計算した棒スペクトルとの比較から、連鎖末端付近のアラニン残基由来のヘリックスピークと帰属できる。尚、アラニンの主ピークの低磁場側にみられるピークは、アスパラギン酸残基由来のピークである⁴⁾。また、174 ppm付近のピー

クはチロシン残基由来のピークである⁴⁾。

一方、TFA溶媒系の場合、アラニン連鎖由来のピークはランダムコポリマーのヘリックスピークとシフト位置を異にし、コイルピークの方にかなりシフトしている。これは、エリ蚕絹フィブロインのアラニン連鎖がTFA中で、かなりコイル部分を含んでいることを意味する。TFA

Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of the carbonyl region of A99 sample and *P. c. ricini* silk fibroin in the DCA(80)- CDCl_3 (20) and TFA(80)- CDCl_3 (20) solvent systems. In each solvent system, the upper is ^{13}C NMR spectrum of A99 and the lower is ^{13}C NMR spectrum of *P. c. ricini* silk fibroin. The stick spectra are the chemical shift of each residue of the $-(\text{Ala})_{22}-$ sequence calculated with the statistical weights, $w=1.08$ and 0.73 , theoretically (see text).

Table 3. The carbonyl chemical shifts of each residue of the $-(\text{Ala})_{22}-$ sequence of *P. c. ricini* silk fibroin calculated theoretically with $w=1.08$ (in DCA) and $w=0.73$ (in TFA), respectively (see text).

k -th residue	chemical shifts (ppm)	
	in DCA	in TFA
1 st	175.79	176.95
2 nd	176.73	177.17
3 rd	177.25	177.36
4 th	177.55	177.51
5 th	177.71	177.63
6 th	177.80	177.73
7 th	177.85	177.81
8 th	177.88	177.86
9 th	177.90	177.91
10 th	177.91	177.93
11 th	177.91	177.95

は、DCAより強酸であり、22残基からなるアラニン連鎖の場合、ヘリックス部分のランダムコイル化が進んだものと考えられる。実際、この高磁場シフトはDCA溶媒系の場合に計算したヘリックスを反映した統計重率 w の値(1.08)よりかなり小さい値(0.73)で再現することができる。アラニン連鎖部分のヘリシティもDCA溶媒系の0.88に比べるとTFA溶媒系では0.36と半分以下になる。尚、176 ppm付近のピークはチロシン残基由来のピークである。

以上のようにアラニン、 β -アラニンランダムコポリマーをエリ蚕絹フィブロインのモデル化合物として用い、統計的手法と組み合わせて、エリ蚕絹フィブロインのアラニン連鎖の詳細な解析を行うことができた。特に、DCA、TFA両溶媒系においてヘリックス-コイル転移に関する取り扱いにおけるLifson-Roigのパラメーターを決定すると同時に、各残基及び連鎖平均のヘリシティをそれぞれ決定することができた。

文 献

- 1) A. Kuzuhara, T. Asakura, R. Tomoda and T. Matsunaga: *J. Biotech.*, **5**, 199-207 (1987).
- 2) 朝倉哲郎, 吉水広明, 塚田益裕, 瀬戸山幸一, 光田慶一, *織学誌*, **43**, 335-342 (1987).
- 3) T. Asakura, H. Yoshimizu, A. Kuzuhara and T. Matsunaga: *J. Seric. Sci., Jpn.*, in press, (1988).
- 4) T. Asakura and T. Murakami: *Macromolecules*, **18**, 2614-2619 (1985).
- 5) T. Asakura, H. Suzuki and Y. Watanabe: *Macromolecules*, **16**, 1024-1026 (1983).
- 6) T. Asakura, Proceeding of the 7th International Wool Textile Research Conference, **1**, 354-363, 1985.
- 7) T. Asakura, H. Kashiba and H. Yoshimizu, *Macromolecules*, **21**, 644-648 (1988).
- 8) T. Asakura, H. Yoshimizu and T. Yoshizawa, *Macromolecules*, in press (1988).
- 9) T. Komoto: *Makromol. Chem.*, **178**, 2957-2961 (1977).
- 10) T. Komoto, Y. Minoshima and T. Kawai: *Colloid and Polymer Sci.*, **250**, 645-650 (1978).
- 11) M. Bixon, H. A. Scheraga and S. Lifson: *Biopolymers*, **1**, 419-429 (1963).
- 12) S. Lifson and A. Roig: *J. Chem. Phys.*, **34**, 1963-1974 (1961).
- 13) 加藤好治, 安藤 勲, 西岡篤夫, *高分子論文集*, **32**, 200-206 (1975).
- 14) A. Shoji, T. Kawai and A. Nishioka: *Macromolecules*, **10**, 1292-1298 (1977).
- 15) H. Saito, Y. Iwanaga, R. Tabeta, M. Narita and T. Asakura: *Chem. Lett.*, 427-430 (1983).
- 16) 高分子学会編, 「高分子科学の基礎」東京化学同人 (1978).
- 17) K.E.B. Platzer, V. S. Ananthanarayanan, R. H. Andreeta and H. A. Scheraga: *Macromolecules*, **5**, 177-187 (1972).