「シルク研究の新しい展開」特集

シルクフィブロインの構造特性と酵素センサー膜への利用

朝倉 哲郎・出村 誠

1. はじめに

“シルク”……感性に訴える心地よいひびき……、それは、人類のあこがれであった。今、その構造を、最新の手法で解明し、得られた情報を巧みに活用することによって、古くて新しいバイオ素材としての“シルク”の可能性が開けてきた¹⁾。

本稿では、その“シルク”の主成分であるシルクフィブロインについて、構造特性を、NMR, ESR などの分光的手法を用いて解明した結果と、その成果を生かした酵素センサー膜への利用について述べる。

酵素は、水中、常温、常圧といったおだやかな条件下で容易に反応を進行させ、しかも、特定の基質に対して、特定の反応を進行させるきわめて優れた化学反応触媒である。しかしながら、反面、不安定で、熱、pH などの外部環境の変化に弱く、雑菌で失活、しかも有機溶媒中では使用できないなどの欠点を持っている。従って、酵素を幅広く生体外で利用していこうとする立場からは、これらの欠点をいかにして克服していくかということが重要となる。そのために、簡単な操作で多くの酵素についてその欠点を克服することが可能な、酵素の固定化が現時点では、実用上、最も有力である。その場合、酵素の固定化用担体として何をを使うかということが、得られた固定化酵素の性能と関連してポイントとなるが、本稿では、“シルク”が優れた酵素固定化材料であることを強調したい。

2. シルクフィブロインの構造領域と反応領域

図1は家蚕シルクフィブロイン水溶液のカルボニル域 ^{13}C NMR スペクトルである。—(Gly—Ala—Gly—Ala—Gly—Ser)— (Gly は、グリシン, Ala は、アラニン, Ser は、セリンを示す) からなる繰り返し単位中の6コのカルボニル炭素は、等強度のピークを与える。それらのピーク面積の和から、シルクフィブロインの約70%がこの繰り返し単位から構成されていることがわかる。しかしながら、大部分、このシーケンスからなるキモトリプシン処理沈殿部は、逆平行 β 構造をとり易く、水への溶解性は、著しく低下してしまう。すなわち、シルクフィブロインが水に溶けるのは、主鎖中に親水性のアスパラギン酸, Asp, グルタミン酸, Glu, などが微量共存するためであり、かろうじて、準安定状態で水に溶けていると考えることができよう。従って、メタノール, ジオキサン等の有機溶媒の添加, 凍結, 水溶液のpHの低下, 攪はん, さらに、膜状に成型した場合であっても、延伸, 高湿度下で放置等の処理によって容易に不溶化する。この Gly—Ala—Gly—Ala—Gly—Ser の繰り返し単位からなる領域を“構造領域”と呼ぶことができよう。シルクフィブロイン中では、この部分は、シャープな NMR ピーク (図1) を与えるが、これは、水溶液中での主鎖のセグメント運動の相関時間が 25°C で $2.2 \times 10^{-10}\text{s}$ と非常に小さい。すなわち、その運動性が低分子にも匹敵するほど極めて高いことに起因している。しかも、既述の如く簡単な操作で容易に構造転移を起こし、緻密な構造に変化するわけで、これらの構造特性

THE STRUCTURE OF SILK FIBROINS AND ENZYME-IMMOBILIZED MEMBRANE FOR BIOSENSOR USING SILK FIBROINS

筆者紹介 TETSUO ASAKURA, MAKOTO DEMURA

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184

朝倉哲郎：助教授、工学博士 出村 誠：教務職、薬学博士

筆者らは、高分子物理化学と磁気共鳴による高分子構造解析を専門とし、特にシルクの基礎と応用の研究に従事している。朝倉氏は桜田武記念賞と薬系学会進歩賞を受賞。

本稿では、シルクフィブロインをタンパク質としてとらえ、その独自の構造特性を生かし酵素センサー膜が開発できることを紹介して載いた。

図1 家蚕シルクフィブロインのカルボニル領域の ^{13}C NMR スペクトル。*印は、非晶領域のグリシンピーク

は、シルクフィブロインの包括法による優れた酵素固定化材料としての可能性を示唆している。

一方、これに対して、チロシン, Tyr, を中心として, Asp, Glu 等からなる部分を, 反応領域と呼ぶことができよう。たとえば, シルクフィブロインの Tyr の OH 基は, 水溶液中では分子内水素結合に関与しておらず²⁾, 反応性に富む状態にあり, 共有結合による酵素固定化の反応サイトとして用いることができる。

このようなシルクフィブロインの構造領域と反応領域の特徴を把握し, 巧みに使いわけることによって, 優れた酵素固定化担体の作製が可能となる。我々は, シルクフィブロインによる酵素固定化法として, 包括法と担体結合法の二つの方法を試みているが, 包括法は, “構造領域”の独自のシーケンスの構造転移を利用したものであり, 担体結合法は, “反応領域”の活性サイトを利用したものである。

3. 包括法によるシルクフィブロインへの酵素の固定化

包括法による酵素固定化膜の作製方法は, 図2にまとめることができる。特に強調したい点は, 膜の不溶化の際に, 酵素に対して悪影響を及ぼす可能性のあるグルタルアルデヒドなどの架橋試薬を用いていない点であり, 我々は, 80%メタノール浸漬, 延伸, 圧縮および高湿度処理等の物理的な方法による不溶化を試みてきた。酵素としては, グルコースオキシダーゼ, GOD を選んだが, これは, 医療ならびに, 発酵工業の分野で, 基質であるグルコース濃度の定量が, 大きな意味を持つからである。

メタノール浸漬処理によって作製した GOD 含有シルクフィブロイン膜中の酵素の活性収率は, 膜中の酵素量に依存するが, $3.76 \times 10^{-3}\text{U}$ の場合には, 活性が遊離

図2 酵素固定化家蚕シルクフィブロイン膜の作製法

酵素の場合とほとんど変わらない膜が得られた。また, 所定の pH のリン酸緩衝液に 1 時間浸漬後の GOD 含有シルクフィブロイン膜は, 高活性を有する pH 域が固定化によって広くなり, pH 安定性が増加した (図 3-a)。所定温度に 20 分放置後の膜の熱安定性も, 同様に増加した (図 3-b)。さらに, 膜中の酵素活性は, 1 カ月以上経過しても, ほとんど低下しないと同時に, 酵素の溶出も, きわめて少ない。家蚕とエリ蚕のシルクフィブロインの場合を比較すると, 前者の方が酵素の溶出率等の面で優れているが, 熱安定性に関しては, 若干, 後者の方が優れている。さらに, 比較のために, ゼラチンを用いて GOD を固定化した膜を作製し酵素活性を調べたとこ

図3 グルコースオキシダーゼ固定化家蚕(○)ならびにエリ蚕(△)シルクフィブロイン膜の酵素活性のpH安定性(a)と熱安定性(b)(●は遊離酵素)

ろ、膜作製時にグルタルアルデヒドによる架橋処理が必要であると同時に、酵素の溶出、安定性の面で、シルクフィブロイン膜に比較して著しく劣ることが明らかとなった。

以上のように、シルクフィブロイン膜は、優れた酵素固定化能を有するが、その原因は、架橋処理を施さない温和な条件下での酵素の固定化に加えて、膜の不均一構造に由来すると考えられる。実際、ニトロキシドラジカルでTyr側鎖をスピンドラベルした膜について、メタノール浸漬処理を施した後、膨潤状態で測定したESRスペクトルは、確かに表面の運動性の低下した部分と、内部の運動性の高い部分からなることが、観測された(図4)。

さらに、 ^{13}C CP/MAS NMR, ^1H パルス NMR, FT-IRなどのデータも加味して、図5に示した不均一構造モデルを考えることができる¹⁾。シルクフィブロイン膜のこのような不均一構造は、酵素などの大きな機能素子を包括固定した場合、膜外への溶出を防ぐとともに、良好な基質透過性、酵素の高い自由度を提供することになる。

さらに、延伸、圧縮、高湿度などの方法によって不溶化処理したGOD固定化シルクフィブロイン膜は、メタノール処理膜の場合と極めてよく似た酵素性能を保持していた。これらの膜のキャラクタリゼーションの結果(表1)は、不溶化処理を変えても、とくに内部に運動性の高い部分を有する不均一構造の特徴は、メタノール処理膜の場合同様、保たれることを示している。しかしながら、チロシン側鎖部分の運動性からみた各膜での不

均一構造の詳細は、かなり異なっている。また、乾燥状態の膜の ^{13}C CP/MAS NMRの測定結果は、メタノール処理膜では、 β シート構造(Silk II型)が70%を占めたが、高湿度処理膜では、むしろSilk I型²⁾が主であった。延伸処理膜では、Silk II型が、認められるものの、その量は、メタノール処理膜に比較して、かなり少ない。

以上のように、微視的に見れば、各不溶化処理膜の構造の詳細は異なっていると結論できる。にもかかわらず、特に興味深いのは、酵素をスピンドラベルして各種処理膜に包括した場合、ラベル部位の不均一状態の運動性は、互いに極めて良く似ている点である。すなわち、各種酵素固定化膜中の酵素の熱およびpH安定性は、不溶化の処理方法を変えても、概ね一致していたが、これは、膜の構造が異なっても固定化されている酵素の状態に大きな差異がないことに起因していると結論できる。このことは、シルクフィブロインを包括法による酵素固定化担体として使用する場合、酵素の性能を変えることがなしに、使用目的に応じて膜の作製方法を変えることが可能であることを示している。たとえば、メタノールに対して不安定な酵素の固定には、延伸、高湿度処理を、短時間で固定化したい場合は、メタノール処理を採用という具合に、不溶化の方法を変えることができよう。

4. シルクフィブロインの酵素センサー膜への応用

GODのような酸化還元酵素は、酵素反応に伴って酵素が消費されるため、GOD固定化膜のセンサーとして

図4 スピンラベルシルクフィブロインの ESR スペクトル (a)シルクフィブロイン水溶液 (b)シルクフィブロイン膜 (乾燥状態), (c)シルクフィブロイン膜 (メタノール水溶液で30秒間不溶化処理後, 水中で測定), (d)シルクフィブロイン膜 (メタノール水溶液で24時間不溶化処理後, 水中で測定), 下図は fast, slow, very slow の運動成分を仮定し, その割合をピークシミュレーションで求めた。

表面

膜内部
↓ β シート構造

結晶部基本シーケンス

- (GSGAGA)_n - T -

★表面反射IR

メタノール処理で β シート構造由来のピークが出現

★ESR, NMR

運動性の高い領域の存在が確認

 β シート構造は膜の表面に集中

図5 メタノール処理家蚕シルクフィブロイン膜の水中での不均一構造モデル(シルクフィブロイン膜のチロシン側鎖をスピラベルした試料のESR, NMR, 表面反射IRデータに基づく)

の応答特性は、酸素電極をデバイスとして用いることにより、容易に評価できる。図6-aは、GOD固定化シルクフィブロイン膜を酸素電極に装着した図である。酵素固定化膜の力学強度が低い場合、基質透過能のあるメッシュで、補強するのが一般的であるが、シルクフィブロインの場合、強度が十分に高いので、その必要はない。定常状態の出力をグルコース濃度に対してプロットすると(図6-b)、非常によい直線性が得られ、この応答は、イオン強度、pHの変化に対しても安定していた⁴⁾。また、膜厚23 μ mの酵素固定化膜の場合、90%応

答は8.5秒と、非常に速かった。さらに、微生物(*Pseudomonas fluorescens*)をシルクフィブロインに固定化し、酸素電極を用いる方法で活性を測定した。応答速度は、GODの場合と異なり、約1分で定常状態に達するものの、グルコース濃度に対するセンサー出力の直線性は、500mMまで達した⁵⁾。

一方、バイオセンサーは、近年小型化、高感度化が望まれ、その中で、酵素反応による化学発光の検出は、有効な方法の一つとして注目されている。酸化還元酵素では、反応による酸素消費とともに過酸化水素が発生する

表1 各種物理的処理によって作製した家蚕シルクフィブロイン膜の膨潤状態でのキャラクターゼーション

	延伸	高湿度	メタノール浸漬(3分)	
ESR フラクション(%) ^a				
スピラベルシルクフィブロン	fast	0.6	0	1.4
	slow	29.4	50.5	16.7
	very slow	70.0	49.5	81.9
スピラベルGOD	fast	0.7	0.7	1.8
	slow	54.9	54.9	54.7
	very slow	44.4	44.4	43.5
NMR フラクション(%) ^b		6.6	7.6	3.1
膨潤度(%)		52.4	53.3	56.4

a) 不溶化したスピラベルシルクフィブロイン膜の ESR スペクトルを測定し、ピークシミュレーションで fast, slow, very slow の運動成分に分けた。

b) 不溶化したシルクフィブロイン膜の高分解能¹³C NMR を測定し、その Ala Cβ ピーク強度から高運動性の割合を求めた。

図6 グルコースオキシダーゼ固定化シルクフィブロイン膜を用いたグルコースセンサー(a)酵素電極を用いた検出装置(b)グルコースセンサーの出力応答

ぜ、POD の触媒作用によって発光することが知られている。我々は、POD 固定化シルクフィブロイン膜を作製し、フォトダイオードを備えたフローセルに装着し、シールドボックス内で発光を測定した。過酸化水素の導入によって、pA オーダーの発光が観測され、数秒で最大値に達し、徐々に減衰した⁶⁾。今後、POD 固定化膜と他の酸化還元酵素とを組み合わせたバイオフィトセンサーの作製が、シルクフィブロインを用いて可能となろう。

このように、シルクフィブロインは、酵素を固定化するだけでセンサー素子として利用できることを示した。これらは、シルクフィブロインの構造領域の特性を生かした酵素の包括膜を利用したものである。さらに、シルクフィブロイン膜は、多孔質化処理により、その透過性を向上させて利用することも可能である¹⁾。また、シルクフィブロイン膜の両性電解質としての電気的特性を生かせば、固定化酵素の反応に依存した膜電位応答が検出できることも明らかとなった。さらに我々は、担体結合法によるシルクフィブロインへの酵素の固定化を試みているが、それについては、参考文献を参照いただきたい⁷⁾。

5. おわりに

今後、酵素固定化シルクは、化粧品分野はもちろん、食品、医薬品、化学工業の分野でのバイオリアクターとして、医療、分析の分野でのバイオセンサーとして、広く利用されていく可能性を秘めており、古くて新しい素材との認識の下に、活発な研究開発が行われていくものと考えられる。

参考文献

- 1) 朝倉哲郎, バイオインダストリー, 4, 36 (1987) CMC 社
- 2) T. Asakura, Y. Watanabe, A. Uchida and H. Minagawa, *Macromolecules*, 17, 1075 (1984)
- 3) T. Asakura and T. Yamaguchi, *J. Seric. Sci. Jp.*, 56, 300 (1987)
- 4) M. Demura and T. Asakura, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 598 (1989)
- 5) M. Demura, T. Asakura and T. Kuroo, *Biosensors*, in press.
- 6) M. Demura, T. Asakura, E. Nakamura and H. Tamura, *J. Biotechnol.*, in press.
- 7) T. Asakura, J. Kanetake and M. Demura, *Polym. Plast. Technol. Eng.*, 28, 453 (1989)

(平成元年 3 月 6 日受理)

が、ルミノールは、過酸化水素存在下、パーオキシダー