一般報文

(平成2年2月5日受理)

羊毛の細胞間充填物およびケラチンの銅イオン
共存による電子移動担体としての機能

福井大学工学部 田畑 功・堀 照夫・中村 良治

ELECTRON TRANSFER FUNCTION, IN THE PRESENCE OF CUPRIC IONS,
OF THE INTERCUTICULAR CEMENT MATERIAL AND THE KERATEINE
COMPONENT IN WOOL FIBER

By Isao Tabata, Teruo Hori, and Yoshiharu Nakamura

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Fukui University, Bunkyo, Fukui, 910 Japan

ABSTRACT: Regarding the electron transfer function of the intercuticular cement material (δ) and of the kerateine component (RK) of wool in the presence of cupric ion, cyclic voltammetry of aq. mixed solutions of methylviologen (MV) and various amino acid-cupric complexes were carried out on a bare carbon electrode. Cyclic voltammetry of MV aq. solution was also done using electrodes modified with δ -Cu²⁺ and RK-Cu²⁺. The occurrence of electron exchange between MV⁺ and cupric complex of basic amino acid (His and Arg) and of δ or RK was evidenced. These suggest that the electron transfer function of δ and RK results from the shift of the standard redox potential of Cu²⁺/Cu⁺ to more negative values by forming cupric complex with His and Arg residues in polypeptides of δ and that the cysteine residue in RK could also function as an electron carrier.

(Received February 5, 1990)

1. 緒 言

羊毛繊維は細胞の集積体からなること、およびその構成ポリペプチドにシスチン残基が多く含まれることに特徴がある。シスチン残基は羊毛の成長過程においてシステインの酸化により形成されるが、これに関し細胞間充填物(δ)が電子移動担体(EC)として関与することが先の研究によって明らかにされた[1]。また、羊毛から抽出された δ 成分およびケラチン(RK)をそれぞれ包括しCu²⁺イオンをドーブした膜を介して、メチレンブルー(MB)のチオグリコール酸(TGA)による還元を進むことが見出された[2]。一方、Burley[3]は銅が欠乏した飼料で生育した羊から刈り取った羊毛の低い機械的強度を説明するため、システインおよびシスチン含量を調べた結果、強度を高めるシスチン含量が少ないことを見いだした。この事実は銅イオンが羊毛のケラチン化過程に、すなわち、上記電子伝達に密接に関与している可能性があることを意味している。

なお、ヘムタンパクの酸素運搬機能が代表するよう

に、生体内のタンパク-金属錯体が生体の生命維持において重要に機能することはよく知られた事実である。特にタンパク-金属錯体の電子伝達機能については、チトクローム鉄[4]やブルー銅タンパク[5]について詳細に研究されており、後者ではメチオニンやシステインのイオウとヒスチジンの窒素が銅イオンに配位してレドックス反応に関与していることが見いだされている。

従って、先のRKおよび δ においても、これらを構成するポリペプチドのアミノ酸残基と銅との錯体が電子伝達活性点となりEC機能が生じていると推測できる。そこで本研究では、はじめにモデル実験として、種々のアミノ酸-銅錯体と還元体メチルビオロゲン(MV⁺)との間の電子交換性をサイクリックボルタンメトリー(CV)法により調べ、ついで親水性 δ (δ_H)と銅イオンを含む溶液、または疎水性 δ (δ_L)またはRKと銅イオンとを表面に修飾させた電極を用いて、同様にMV⁺との電子交換性を調べた。その結果、一部の塩基性アミノ酸-銅錯体、および δ -銅錯体がMV⁺から電子を受け取り、再生されたMV²⁺が再び電解還元されるという、いわゆる

turnover 挙動が生じることを見いだした。本報では、これらの現象およびそれに基づいて羊毛の電子伝達機能の発現を検討する。ここで、MV をメディエータとして用いたのは、これが CV において可逆的のレドックス波を生じること、およびその標準酸化還元電位が TGA/TGA_{ox} のそれより若干負に大きく、上記膜を介しての MB の TGA による還元過程のモデル系を構成し得ることによる。

2. 実験

2.1 試薬

メチルビオロゲン(MV), グリシン(Gly)および L-塩基性アミノ酸としてのヒスチジン(His), アルギニン(Arg), およびリジン(Lys)はナカライテスク社製特級試薬を用いた。その他の試薬もすべて市販品の特級試薬をそのまま使用した。

2.2 δ および ケラチン成分の調製

羊毛の細胞間充満物の δ 成分(δ_L, δ_H)およびケラチン成分の抽出は、前報[2] に準じメリノ羊毛64'sを用いて行った(スキーム 1)。また δ_H の比較として毛髪から抽出した nonkeratinous プロテイン(NKP)[6] も試料とした。

Scheme 1 The procedure for the extraction of δ and RK components from wool fiber.

2.3 修飾電極の作成

作用電極の先端表面に 1% RK 尿素溶液または 1% δ_L ギ酸溶液を付着させ、これを 0.5M KH₂PO₄ 水溶液に静かに浸漬することにより RK または δ_L を沈着させ、RK 修飾電極および δ_L 修飾電極を作成した。次に Cu²⁺ イオンを吸着させるため、これらの修飾電極を 0.5M CuSO₄ 水溶液に 10 分間浸漬した後水洗した。これらを、RK-Cu²⁺ 修飾電極および δ_L-Cu²⁺ 修飾電極とする。

2.4 CV 測定装置及び測定条件

2.4.1 装置

サイクリックボルタモグラム(CV グラム)の作成には

ポテンシオスタット(北斗電工 HA301)およびファンクションジェネレータ(北斗電工 HB104)を用いた。作用電極、対極および参照電極には、それぞれグラッシカーボン(GC)電極(ヤナコスベック, φ = 3 mm), 白金線および飽和カロメロ電極を用いた。

2.4.2 未修飾電極での測定

未修飾 GC 電極を用いて溶液系での CV 測定を行った。測定液は、アミノ酸-Cu²⁺-MV 混合水溶液および親水性ポリペプチド-Cu²⁺-MV 混合水溶液の 2 系列で、それぞれ 12mM のアミノ酸または 0.3g/L のポリペプチドと 1 mM の Cu²⁺ および 0.5mM の MV, さらに支持塩として 0.5M Na₂SO₄ を含む。また、水酸化銅の生成を避けるため、混合液は H₂SO₄ で pH を 4.0 に調整し N₂ ガス通気により十分除酸素を行い測定した。なお、掃引速度依存性を調べるため、掃引速度を 10–500mV/s の範囲で変化させた。

2.4.3 修飾電極での測定

RK または δ_L 修飾電極を用いた測定は、1 mM の MV を含む 0.1M のリン酸緩衝溶液で行った。この測定では、NaOH で測定液を pH 4.0–7.7 に調整し、十分除酸素した後測定した。ここでの掃引速度は、すべて 50mV/s とした。

3. 結果および考察

3.1 アミノ酸-Cu²⁺-MV²⁺混合水溶液の CV

MV は式 1 に示すような 2 段階のレドックス反応を起こすことが知られている[7]。

本研究で用いた未修飾 GC 電極での MV の CV 曲線を図 1 に示す。

図 2 には Cu²⁺ 単独および各アミノ酸過剰存在下での Gly-Cu²⁺ 錯体および His-Cu²⁺ 錯体の CV 曲線を示す。これらは、掃引回数に伴う波形の変化が生じなくなる第 6 掃引での曲線である。いずれの場合も、Cu²⁺ とアミノ酸の間で錯体を形成すると Cu²⁺ の第 1 還元電位が負にシフトし、特に His-Cu²⁺ 錯体でそれが著しい(この還元電位のシフトは、アミノ酸が 1 価の銅とよりも 2 価の銅と、より安定な錯体を形成するため、錯体中の Cu²⁺ が Cu⁺ に還元されにくくなることによる[8])。

図 3 は、アミノ酸-Cu²⁺-MV²⁺ 混合水溶液の 1.0–−1.5V vs. SCE の広い電位幅で測定した第 6 掃引の CV グラムである。曲線は、MV の 4 つのレドックス波にア

Fig. 1. A cyclic voltammogram of MV using the bare GC electrode. 1 mM MV^{2+} in 0.1 M phosphate buffer aqueous solution at pH 7.0. Scan rate, $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Fig. 2. Cyclic voltammograms of amino acid- Cu^{2+} complexes by using the bare GC electrode. 1 mM Cu^{2+} and 12 mM amino acid in 0.5 M Na_2SO_4 aqueous solution at pH 4.0. Scan rate: (a) – (c), $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; (d), $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (a) Cu^{2+} ($E_p = -0.30 \text{ V vs. SCE}$); (b) Gly-Cu^{2+} ($E_p = -0.40 \text{ V vs. SCE}$); (c) His-Cu^{2+} ($E_p = -0.84 \text{ V vs. SCE}$); (d) Arg-Cu^{2+} (2nd $E_p = -0.70 \text{ V vs. SCE}$).

Fig. 3. A cyclic voltammogram of aq. mixed solution of MV^{2+} and His-Cu^{2+} complex on the bare GC electrode obtained at the 6th scan. Scan rate $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Fig. 4. The scan rate dependence of cyclic voltammogram for aq. mixed solution of MV^{2+} and His-Cu^{2+} complex obtained at the 1st scan.

ミノ酸- Cu^{2+} のレドックス波が加わり複雑であるが、MVの第1還元波(I)に相当する波が特に大きいことが分かる。このI波の増大をより詳細に調べるため、 $+0.4 \sim -0.9 \text{ V vs. SCE}$ の電位幅で単掃引法でのCVグラムを種々の掃引速度で測定した。His- Cu^{2+} - MV^{2+} 系で得られたCVグラムを図4に示す。単掃引では、負電位方向への掃引でまずアミノ酸-銅錯体の第1還元波が現れ、続いてMVの第1還元波が生ずる。これらのCVグラムから錯体のみのCVグラムを用いて錯体のレドックス波を差し引き、MVのI波とIV波の正味のピーク電流 I_p を算出した。通常 I_p はレドックス活性種の拡散係数 D と掃引速度 v との間に

$$I_p \propto (Dv)^{1/2} \quad (2)$$

の関係がある[12]、これらの I_p を $v^{1/2}$ に対しプロットし

Fig. 5. Effect of scan rate on the peak current of MV waves in the presence of amino acid- Cu^{2+} complex. Bare GC electrode was used. ●, ○: obtained for the 1st reduction wave of MV^{2+} (I in Fig. 1) and the 2nd oxidation wave of MV^0 (IV in Fig. 1). a, Gly- Cu^{2+} ; b, His- Cu^{2+} ; c, Arg- Cu^{2+} ; d, Lys- Cu^{2+} .

たのが図5である。ここで、図中の点線はアミノ酸を含まないMV溶液の場合であり、直線関係の得られたことから拡散支配であることが分かる。さらに、4種のアミノ酸-銅錯体試料のうち、His- Cu^{2+} およびArg- Cu^{2+} では、掃引速度が速いほどMVの第1還元波を増大させることが分かる。このような特定のアミノ酸によるMV第1還元波の増大とその掃引速度依存性を、次のように解釈した。

図4のHis- Cu^{2+} 錯体の例から分かるように、最初に現れるアミノ酸-銅錯体の第1還元波は、掃引速度の増大とともに負の電位にシフトする。このためMVの第1還元が生ずる電位では、掃引速度が速いほど電極表面における未還元のアミノ酸-銅錯体が多く存在するようになる。この未還元銅錯体と電解還元で生じた MV^+ とがスキーム2のような電子交換反応を起こし、この MV^{2+} のturnoverによりI波の増大が生じたものと言える。

Scheme 2 A schematic view of electron exchange between MV^+ and amino acid-cupric complex on bare electrode.

一方、GlyおよびLysの Cu^{2+} 錯体でもこのような掃引速度の増大に伴う還元波のシフトが見られたが、これらの錯体では MV^{2+} へのturnoverは生じない。この現象を説明するため、図2の波形安定後のCVグラムから得られる各錯体の還元電位とMVの第1還元電位を比較すると、Gly- Cu^{2+} の還元電位は負にシフトするとは言え、 MV^{2+} のそれよりもかなり正側に位置していることが分かる。またLys- Cu^{2+} 錯体の還元電位もGly- Cu^{2+} 錯体のそれと同程度であった。従って、これ

Table 1 Composition Ratio and Stability Constant of Various Amino Acid- Cu^{2+} Complexes

Amino acid	Molar ratio to Cu^{2+}	Stability constant, $\log \beta$
Gly	2	14.87 ^[9] ($\mu=0.1$, 25°C)
His	2	18.53 ^[10] ($\mu=0.5$, 25°C)
Lys	2	13.90 ^[11] ($\mu=0.1$, 25°C)

らの錯体は MV^{2+} が還元される電位では直接電解還元を受けるため、 MV^+ から電子を受け取る機会が少ない。

一方、Arg- Cu^{2+} 錯体の第1還元電位は50mV/sの掃引速度では図2のGly- Cu^{2+} と同程度であったが、200mV/sの速い掃引速度で測定すると約-0.70V vs. SCEの電位に錯体による新たなピークが現われる(図2・d)。これより、Arg- Cu^{2+} 錯体は掃引速度の増大と共に還元電位が負へシフトし、直接電解還元を受けるよりも MV^+ と電子交換を行なう方が容易になると言える。

さらに、表1に示した各アミノ酸-銅錯体の安定度定数を比較すると、 MV^{2+} へのturnoverを誘起したHis- Cu^{2+} 錯体が最も安定な錯体を形成することが分かり、また安定度定数が不明のArg- Cu^{2+} 錯体も構造上かなり安定であることが期待され、以上の考察が妥当と言える。なお、図2の(c)に示されるようにHis- Cu^{2+} 錯体の場合酸化波も小さいが、これはこの錯体の高い安定性のため遊離の銅イオンの量が少ないこと、および還元電位の著しい負へのシフトのため第2還元による0価の銅までの還元が進行していないことによると考えられる。

3.2 親水性ポリペプチド- Cu^{2+} - MV^{2+} 混合溶液のCV

アミノ酸の代わりに δ_{11} またはNKPを溶解して調製した親水性ポリペプチド- Cu^{2+} - MV^{2+} 混合溶液でのMV第1波の I_p の掃引速度依存性を図6に示した。 δ_{11} を含む系ではHisの場合と同様な I_p の増大が見られるが、NKPではこの増大はわずかである。この相違は、両ベ

Fig. 6. Effect of scan rate on the peak current of MV waves in the presence of $\delta_{\text{H}}\text{-Cu}^{2+}$ (a) and NKP-Cu^{2+} (b). Bare GC electrode was used. ●, ○: obtained for the 1st reduction wave of MV^{2+} (I in Fig. 1) and the 2nd oxidation wave of MV^0 (IV in Fig. 1).

Table 2 Amino Acid Content of the δ Components in Wool and the Nonkeratinous Protein in Human Hair

Amino Acid	δ_{L}	δ_{H}	NKP
Nonpolar	50.4	46.1	66.5
Basic	9.1	12.5	7.1
Lys	2.9	2.5	2.7
His	1.0	1.9	1.5
Arg	5.2	1.9	1.5
Acidic	14.1	12.5	15.0
Polar	25.1	26.5	11.4
1/2 Cys	1.3	2.4	0

in mol %

プチドを構成するアミノ酸残基の相違によるものと考えられる。そこで、これらのペプチドのアミノ酸分析結果[1]を表2に示す。 MV^{2+} への turnover が見られた塩基性アミノ酸に注目すると、 δ_{H} にはNKPよりも多量のArgが含まれることが分かり、このArg残基と Cu^{2+} との錯体がMVのI波の増大に寄与していた可能性が大きい。

3.3 RK/ δ_{L} 修飾電極によるMVのCV

図7に RK-Cu^{2+} 修飾電極を用いてpH7.0で測定した MV^{2+} 水溶液のCV曲線を示す。第1掃引ではMVの第1還元波の著しい増大が見られるが、第2掃引以後この増大はほとんど見られない。しかし、測定後この電極を1Vで10分間保持した後再測定すると図8のようにMVのI波の増大が再現した。一方新たに作成した RK-Cu^{2+} 修飾電極を用いて MV^{2+} を含まないブランク水溶液中で測定したCVグラムには、ほとんどレドックス波が現れないことから、このMVのI波の増大は単に RK-Cu^{2+} の還元波が加算されて生じたものではない。このMVのI波の増大の原因を調べるため、pH4.0–

Fig. 7. Cyclic voltammograms of 1 mM MV^{2+} solution using the RK-Cu^{2+} modified GC electrode at pH 7.0. Broken line is for an unmodified GC electrode.

Fig. 8. Reproduction of 'MV turnover' after keeping the electrode used in the experiment in Fig. 7 at 1.0 V for 10 min.

7.7の範囲でpHを変化させRK修飾電極および RK-Cu^{2+} 修飾電極でMVのCV曲線を測定した。得られた曲線よりMVのI波の I_p を読みとり、pHに対してプロットしたのが図9である。破線は未修飾電極での結果である。

RK-Cu^{2+} 修飾電極ではpHの増大に伴い I_p が増大し、pH7.0以上ではほぼ一定となる。このpH依存性は、恐ら

Fig. 9. Dependence of the peak current of the 1st reduction wave I on pH for the RK modified GC electrode. ○, RK; ●, RK-Cu²⁺; △, unmodified.

く RK を構成するアミノ酸残基と銅との錯体の形成が pH が高いほど進行するために生ずると思われる。すなわち pH が高い程アミノ酸残基に配位結合する Cu²⁺ イオンの量が増大し、スキーム 2 で示したような電子交換反応が一層進行すると推測される。またこの turnover が第 2 掃引以降見られないことから、一度銅イオンが還元体になると、連続掃引時の短い電解酸化では容易に酸化体に戻れず、MV²⁺ の再酸化に関与できなくなるようである。しかし、pH 7.0 以上ではその後の電極の 1 V 保持により turnover が再現され、この銅錯体の還元体は電極反応により酸化体に戻ることが分かった。

一方 RK 修飾電極では pH が低くなるに従い MV の 1 波の I_p が小さくなった。これは測定液が酸性になるに従いタンパク中のアミノ酸残基のうちプロトン化しているものが増大し、この正の電荷により電極表面層に MV²⁺ が近づきにくくなるためと解釈できる(未修飾電極では pH 4 でも MV の 1 波の I_p 値の低下は見られない—図 9 破線)。

なお、図 7 のように MV の IV 波に相当する酸化波も大きくなっている。この酸化波の増大は RK 修飾電極を用いた場合も生じることより、銅錯体によるものではなく RK 自身と MV との相互作用によるもので[1]、スキーム 3 のように RK の構成アミノ酸システインから MV²⁺ へ電子が渡されるためと考えられる。

Scheme 3 A schematic view of the electron exchange reaction on the RK modified electrode.

Fig. 10. Dependence of the peak current of the 1st reduction on pH for the δ_L modified GC electrode. ○, δ_L ; ●, δ_L -Cu²⁺; △, unmodified.

Fig. 11. Cyclic voltammograms of 1 mM MV²⁺ solution using δ_L -Cu²⁺ modified GC electrode at pH 7.0. Broken line, after keeping the tested electrode at 1.0 V for 10 min.

δ_L および δ_L -Cu²⁺ 修飾電極についても同様な CV 測定を行なった。種々の pH で測定した第 1 掃引における MV の第 1 波の I_p を図 10 に示す。また、一例として pH 7.7 での δ_L -Cu²⁺ 修飾電極による CV グラムを図 11 に示す。RK と同様 Cu²⁺ を吸着することで pH の増大に伴う 1 波の増大が見られ、その後の 1 V の電位保持による 1 波増大の復元も見られた。 δ_L を構成するアミノ酸残基を調べると、表 2 に示すように塩基性アミノ酸のうち Arg が比較的多いので、この Arg 残基と銅との錯体と MV²⁺ とが電子交換し、1 波の増大をもたらすと考察できる。一方、銅を含め系では RK で見られたようなタンパク自体が直接関与する MV のレドックス反応は見ら

れなかった。これは、 δ_L にはシステインが殆ど含まれないためである。

3.4 銅吸着 RK/ δ の電子移動担体としての機能の評価

RK- Cu^{2+} または δ - Cu^{2+} を包括したウレタン膜を介してのチオグリコール酸(TGA)によるメチレンブルー(MB)の還元退色実験から、これら膜中の担体に電子伝達機能のあることを既に報告した[2]。このような担体の電子伝達は、これらを構成するポリペプチドのアミノ酸残基と銅との錯体が、スキーム4のようなレドックス

Scheme 4 A schematic view of electron transfer processes across the δ /RK immobilized and Cu^{2+} doped membrane.

サイクル連鎖を構成するためと推測される。この電子伝達系に関連するレドックス種の pH 7 での標準酸化還元電位 E_0' は、 $\text{TGA}_{\text{ox}}/\text{TGA}$ 系で -0.401V vs. NHE, $\text{MB}_{\text{ox}}/\text{MB}_{\text{red}}$ 系で $+0.011\text{V}$ vs. NHE[13], $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ 系(非錯体)で -0.153V vs. NHE[14] であるが、これらの値と CV 測定より確かめた His および Arg の配位による銅のレドックス電位の負へのシフトを考慮すると、いずれのアミノ酸-銅錯体も TGA から電子を受け取れるが、MB への電子授与については His および Arg の銅錯体でのみ可能と言える。従って、 δ_L - Cu^{2+} や RK- Cu^{2+} の電子伝達にはアミノ酸残基のうち His や Arg と銅との錯体が関与していた可能性が大きい。さらに RK の場合、銅不在下でもある程度電子伝達機能があることから、システイン残基のジスルフィド交換反応[15] も関与していることが考えられる。

4. 結 論

アミノ酸-銅錯体と MV との電子交換性を CV 法により調べた結果、His および Arg の銅錯体と $\text{MV}^{\cdot+}$ との間で電子交換が生じることを見いだした。さらに RK- Cu^{2+} または δ - Cu^{2+} 修飾電極による CV 測定により、pH が高い程これらの修飾材と $\text{MV}^{\cdot+}$ との間で電子交

換が生じやすくなることを見いだした。これらの電子交換反応は、銅のレドックス電位が His や Arg の配位により負にシフトするために生じたもので、このシフトが電子移動担体としての機能発現に必要であると結論した。

文 献

1. Y. Nakamura, K. Kosaka, T. Tada, K. Hirota, and T. Hori, *Proc. 7th Int. Wool Text. Res. Conf. Tokyo*, **1**, 171 (1985)
2. Y. Nakamura, M. Yamada, J. Miura, K. Hirota, and T. Hori, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **27**, 2883 (1989)
3. R. Burley, *Text. Res. J.*, **30**, 473 (1960)
4. R. Bechtold, M. B. Gardineer, A. Kazmi, B. Hemelryck, and S. S. Isied, *J. Phys. Chem. Soc.*, **90**, 168 (1980)
5. E. I. Solomon, J. W. Hare, D. M. Dooley, J. H. Dawson, P. J. Stephens, and H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 168 (1980)
6. S. Kanetaka, K. Miyata, and Y. Nakamura, *J. Soc. Cosmet. Chem., Japan*, **24**, 5 (1990)
7. E. Steckhan and T. Kuwana, *Ber. Bunsenges, Phys. Chem.*, **78**, 253 (1974)
8. 坂口武一, 上野景平編; 「金属キレート [I]」, 南江堂, p. 52 (1965)
9. D. L. Leusing and K. S. Bai, *Anal. Chem.*, **40**, 575 (1968)
10. M. A. Doran, S. Chaberek, and A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2129 (1964)
11. S. Nyberg and M. Cefola, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 327 (1965)
12. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964)
13. 井村伸正, 大島泰郎, 黒川正則, 永井克孝, 三浦謹一郎, 水島昭二編, 「生化学ハンドブック」, 丸善, p. 356 (1984)
14. 日本化学会編, 「化学便覧 基礎編 II」, 丸善, p. 1205 (1975)
15. F. Sanger, *Nature*, **171**, 1025 (1953)