一般報文

(平成3年2月8日受理)

過酸化水素による銅(II)-部分アルキル化羊毛錯体の分解

熊本女子大学生生活科学部 深津 和彦・高園 智美

DEGRADATION OF Cu(II)-PARTLY ALKYLATED WOOL KERATIN COMPLEX
BY HYDROGEN PEROXIDE

Kazuhiko Fukatsu and Tomomi Takazono

Faculty of Living Science, Kumamoto Women's University, Kumamoto, 862 Japan

ABSTRACT: In order to obtain some information regarding the degradation or morphological components of wool keratin fiber brought about by hydrogen peroxide under conditions in which the Cu(II) ion is bound to wool keratin the degradation of partly alkylated wool keratin fiber prepared by alkylating the generated sulfhydryl groups with 2-vinylpyridine was studied for the Cu(II)-partly alkylated wool keratin complex / hydrogen peroxide system. At the early stage of the degradation, peptide fragments in the treatment solution were found to contain a large amount of s - β -(2-pyridylethyl) cysteine residue and the tyrosine content in the wool fiber residue, which belongs in quantity to high-glycine-tyrosine proteins of an amorphous matrix, increased as the initial degradation proceeded. These results suggest that the high-sulfur proteins were easily degraded in the peptide bond cleavage of these proteins, which are contained especially in the cuticle.

(Received February 8, 1991)

1. 緒 言

羊毛繊維による重金属イオンの吸着能に関する研究が、実用的観点[1,2]や結合機構[3,4]の面とからこれまでに数多く報告されている。我々も羊毛繊維の Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} などの重金属イオンに対する吸着能を検討し、報告した[5,6]。さらに Cu^{2+} イオンの吸着性については、変形 Bjerrum 法[7]を用いてその錯体生成機構を詳細に検討した[8]。一方、羊毛繊維の錯体化によって、羊毛繊維は力学的特性だけではなく、光の吸収、電気伝導性、耐水性、耐薬品性などが変化する、などの特異な性質が付与されることが示唆され、種々検討もなされている[9]。我々は前報[10]で羊毛繊維-金属錯体の過酸化水素による分解を検討し、羊毛ケラチンが牛血清アルブミン-金属錯体[11]と同様に、可溶性のペプチドフラグメントに容易に開裂し、分解することを報告した。しかしながら、これらの羊毛ケラチンの分解に関する研究は、過酸化水素や羊毛繊維の分解性に関するものであるが、羊毛繊維構造から見た定量的な知見は得られていない。羊毛ケラチンは、

繊維のマイクロフィブリル構成成分としての Low-sulfur (Low-S)成分、非晶マトリックスの構成成分である High-glycine-tyrosine(High-G-T)成分と非晶マトリックスとクチクルに由来する High-sulfur (High-S)成分に大別される。

本研究では、羊毛繊維-銅(II)錯体/過酸化水素系において、この三種のタンパク質に注目し、いずれのタンパク質が分解を受けやすいかを明らかにするとともに、どの組織構造が分解を受けやすいかを検討する。このため2-ビニルピリジンアルキル化羊毛を試料として用いて、分解後の分解液及び残渣羊毛の加水分解によって遊離したシステイン誘導体(S - β -(2-ピリジルエチル)-2-システイン)(2-PEC)及び残渣羊毛中のチロシン含有量をそれぞれ紫外外部吸収によって測定し、その分解性について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 羊毛試料および試薬

羊毛繊維は関西衣生活研究会より購入した実験用未加工羊毛モスリン(経糸、緯糸 1/48番手)を常法に従って

精練し、試料として用いた。試薬は2-ビニルピリジン(2-VP)を除き、試薬特級品をそのまま使用した。2-VPは試薬一級品を使用前に減圧蒸留によって、30 Torrで沸点68-71°Cの留分を分取し用いた。水はイオン交換樹脂で脱イオン化したものを使用した。

2.2 部分アルキル化羊毛の調製

2-VPによる部分アルキル化羊毛は、Ferreroの還元/アルキル化法[12]に従って、還元剤として亜硫酸ナトリウムを用いて行った。硫酸でpH4に調製した10 v/v% 2-VPのエタノール/水(40/60)混合溶媒に亜硫酸ナトリウムを濃度0.6 mol/Lで溶解し、窒素ガス置換した後、羊毛繊維を浴比1:100で浸漬した。室温にて時々振盪し48時間反応を行った。反応後、処理羊毛を熱水で数回洗浄し、最後にエタノール/水混合溶媒にて洗浄し風乾した後、50°Cで真空乾燥を行った。アルキル化羊毛0.3gを精秤し6N塩酸50 mL中に加え、加熱還流下8時間加水分解した後、イオン交換水を用いて1 Lメスフラスコ中で希釈した。この希釈液の263 nmにおける吸光度を島津製作所製紫外可視分光光度計(UV-260)を用いて測定した。そして2-PECのモル吸光係数($\epsilon=6747$)[13]を使って、式1により2-VP導入量を求めた。その結果、2-VP導入量は5.7%であり、アルキル化率は60%であった。

$$X(\%) = \frac{105 \cdot A}{W \cdot \epsilon \cdot l} \times 100 \quad (1)$$

X: 2-VP 導入量(%), A: 吸光度

W: 濃度(g/L), ϵ : 2-PECのモル吸光係数

l: セル長(cm), 105: 2-VPの分子量

2.3 部分アルキル化羊毛の銅(II)塩処理

所定濃度(0.5×10^{-3} , 2.5×10^{-3} mol/L)の硝酸第二銅溶液(pH 5.9酢酸緩衝液使用)に、2.2項で調製した部分アルキル化羊毛を浴比1:150で加え、室温にて時々振盪しながら72時間浸漬を行った。浸漬後、イオン交換水で洗浄し風乾した後、50°Cで真空乾燥を行った。銅(II)イオンの吸着量は銅(II)吸着部分アルキル化羊毛約0.25 gを精秤し、濃硫酸と発煙硝酸にて加熱分解し、イオン交換水で希釈した後、島津製作所製原子吸光分析装置(AA-610)を用いて波長324.8 nmにて銅(II)イオンの測定を行い吸着量を求めた。銅(II)イオンの吸着量を表1に示す。

2.4 過酸化水素による分解

銅(II)吸着部分アルキル化羊毛繊維0.25 gを50 mLの所定濃度(0.05, 0.1 mol/L)の過酸化水素を含むpH 5.9の酢酸緩衝液に浸漬し、恒温振盪器を用いて温度55°Cで所定時間反応を行った。反応後、ガラスフィルターで反応液をろ過し、残渣をイオン交換水で洗浄し風乾

Table 1 Cu(II) Uptake by Partly Alkylated Wool Fiber

Cu(II) ion concentration (mol/L)	Cu(II) uptake (mg/g)
0.5×10^{-3}	3.5
2.5×10^{-3}	10.8

した後、50°Cで真空乾燥を行い残渣重量を測定した。ろ液中の過酸化水素は2N硫酸10 mLを入れたコニカルビーカーにろ液1 mLを採取し、0.1 N過マンガン酸カリウム溶液で滴定して求めた。又、ろ液6 mLを試験管に採取し、さらに0.05 M硝酸第二銅溶液2 mLと1 N水酸化ナトリウム溶液2 mLを加え、良く攪拌し一昼夜放置した後、ろ過を行いろ液(biuret 反応液)の540 nmにおける吸光度をUV-260を用いて測定を行った。

2.5 残渣及びろ液中の2-PECの定量

前項の残渣及びろ液を6N塩酸で加水分解するため、残渣を精秤し6N塩酸50 mLに加え、ろ液はろ液と同容量の12N塩酸を加え、それぞれ加熱還流下8時間加水分解を行った。残渣の加水分解液は全量を200 mLにイオン交換水を用いて希釈した。263 nmにおける吸光度の測定は濃度を0.3 g/Lに調製し行った。残渣中及びろ液中のタンパク質(ペプチドフラグメント)の2-VP量は2.2項の式1に従って算出した。

2.6 残渣中チロシンの測定

2.5項の残渣加水分解200 mL希釈液を用いて、1-ニトロソ-2-ナフトール法[14]による比色測定によってチロシンの測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 過酸化水素による部分アルキル化羊毛の分解

金属イオン-高分子-過酸化水素系の反応は、金属酵素モデルとして数多く研究が行われてきた[15,16]。又、遷移金属イオンの存在下でタンパク質[17]や核酸[18]が過酸化水素によって主鎖開裂を生じ分解することが報告されている。そして、これらの分解には、過酸化水素と金属錯体間の反応によって生成するヒドロキシラジカルが大きく関与しているとみられている。我々の研究でも、金属イオン-羊毛錯体と過酸化水素との反応でヒドロキシラジカルの発生が予想されたが、今なおその確認は行われていない。図1に過酸化水素による銅(II)-部分アルキル化羊毛錯体の部分アルキル化羊毛繊維の重量減少を示す。ここでの部分アルキル化羊毛繊維の重量減少は、羊毛タンパク質分子のペプチド結合の切断により、水溶性ペプチドフラグメントが生成し、羊毛繊維から処理液中に抽出されるために起る重量減少を

Fig. 1. Amount of starting material remaining as a function of treatment time.

Fig. 2. Absorbance of biuret reaction solutions of Cu(II)-partly alkylated wool fiber complex degraded with H₂O₂ as a function of treatment time. ●, H₂O₂ 0.05 mol; ■, H₂O₂ 0.1 mol (Cu 10.8 mg/g in partly alkylated wool fiber).

示す。このことはビュレット反応が陽性を示し、分解時間の経過、すなわち重量減少の増加とともに吸光度が増大することから支持される(図2)。部分アルキル

Fig. 3. Amount of 2-VP content of peptide fragments in filtrate of Cu(II)-partly alkylated wool fiber complex degraded with H₂O₂ as a function of treatment time. Symbols are the same as in Fig. 1.

Fig. 4. Amount of 2-VP content of partly alkylated wool fiber residue of Cu(II)-partly alkylated wool fiber complex degraded with 0.05 mol H₂O₂ as a function of treatment time. ○, Cu 3.5 mg/g and ●, Cu 10.8 mg/g in Cu(II)-partly alkylated wool fiber complex.

化羊毛繊維の重量減少は、未アルキル化羊毛繊維と同様に羊毛繊維への銅(Ⅱ)イオンの吸着量と処理液中の過酸化水素濃度に大きく依存している。すなわち、銅(Ⅱ)イオンの吸着量が多く、過酸化水素濃度が高いほど、重量減少が大きく観測される。しかし、部分アルキル化羊毛は、未アルキル化羊毛[10]に較べて過酸化水素の分解能にはほとんど差は観測されなかったが、羊毛繊維の分

Fig. 5. Relationship between 2-VP contents in the filtrate and weight loss of partly alkylated wool fiber. Symbols are the same as Fig. 1.

Fig. 6. Relationship between 2-VP contents in the residue and weight loss of partly alkylated wool fiber. Symbols are the same as Fig. 1.

解による重量減少が小さく、分解され難いことを示唆している。これは銅(II)錯体と過酸化水素の反応において、還元剤の存在によってヒドロキシラジカルが生成することが知られており、羊毛中のチオール基が2-VPによってアルキル化されているため、フリーのチオール基の濃度が減少し、還元剤の作用が減少しているためと考えられるが詳細は不明である。

3.2 分解ろ液及び残渣中のアルキル化2-VP量

図3, 4に分解ろ液及び残渣中のアルキル化2-VP量をそれぞれ示す。羊毛繊維の各組織の構成タンパク質が

Fig. 7. Relationship between recovery of 2-VP and weight loss of partly alkylated wool fiber. Symbols are the same as Fig. 1.

本実験の分解条件において均一に分解するならば、分解ろ液及び残渣中の2-VP量は試料部分アルキル化羊毛の2-VP導入量5.7%の値を示すはずである。しかし、観測された2-VP量は一定値を示さず分解時間で大きく変化している。すなわち、残渣中の2-VP量は分解時間の経過とともに5.7%より減少し、一方、ろ液中の2-VP量は分解時間の初期では非常に高い値を示し、分解時間60分まで急激な低下が起るが、その後分解時間の経過とともに徐々に減少する傾向を示した。このことは、分解の初期においては2-VPでアルキル化されたタンパク質が優先的に分解され分解液中に溶出されることを示唆するものである。又、残渣中の初期の2-VP量の減少はこれに対応した減少と考えられる。分解条件が温和なほど、分解時間に対するろ液中の2-VP量は高い値を示している。

分解条件によって分解時間に対するろ液中の2-VP量が異なるのは、図1から明らかなように、分解による重量減少が分解条件によって大きく変わるためと考えられる。図5, 6に各分解条件における重量減少に対する分解ろ液及び残渣中のアルキル化2-VP量をそれぞれ示す。分解条件にはそれほど関係なくろ液中の2-VP量は、図から分るように、重量減少に依存して2-VP量の減少が観測される。すなわち、羊毛繊維の分解率が低いほどろ液中にはアルキル化2-VP量の値が高く観測され、2-VPでアルキル化されたタンパク質が分解されやすいことを示唆している。又、羊毛繊維の重量減少率約18%でろ液中のアルキル化2-VP量は5.7%に達し、そ

の後も低下し続け約3%までの低下が観測され、 S - β -(2-ピリジリエチル)システイン残基(2-PEC 残基)の分解が起っていることが示唆される。2-PEC 残基の安定性を検討するため、分解ろ液及び残渣中のアルキル化 2-VP の定量値から羊毛繊維の各重量減少における 2-PEC 残基の分解率を求めた。その結果を図 7 に示す。2-PEC 残基の分解率は羊毛繊維の重量減少にともなって高くなる傾向を示し、重量減少率 50% で分解率は 30% に達し、明らかに 2-PEC 残基が分解を受けていることが分かる。

しかし、ろ液中のペプチドフラグメントのアルキル化 2-VP 量が羊毛繊維の重量減少率の低い段階で高く観測されることは、ろ液中に 2-PEC 残基を多く含むペプチドフラグメントが多く存在することを示すものであり、この残基を多く含むタンパク質が本実験の系においては分解を受けやすいことが分かる。羊毛繊維の 2-VP アルキル化によって 2-PEC 残基を多く生成する成分タンパク質は、羊毛繊維構成タンパク質のうちの High-S 成分タンパク質である。このことより、High-S タンパク質を含む組織である表皮細胞及び皮質細胞の非晶マトリックスが分解を受けやすいものと推察される。

3.3 High-G-T 成分タンパク質の分解

表皮細胞と皮質細胞の非晶マトリックス中の High-S 成分タンパク質のうちどちらの High-S 成分タンパク質が分解を受けやすいか興味を持たれるところである。そこで非晶マトリックス中の High-G-T 成分タンパク質に注目し、非晶マトリックス中の High-S 成分タンパク質が分解を受けるならば、当然、High-G-T 成分タンパク質も分解を受け、羊毛繊維残渣中のチロシン含有量に変化が起るものと予想される。残渣羊毛繊維中のチロシンを比色法(1-ニトロソ-2-ナフトール法)で測定した結果を図 8 に示す。初期の重量減少において吸光度の上昇が観測され、重量減少の増加にともなって吸光度が減少することを示す。すなわち、残渣羊毛繊維中のチロシン含有量は重量減少によって変化し、初期の重量減少では High-G-T 成分タンパク質の分解が起りにくいため、残渣中のチロシン含有量の増加が観測されたものである。これにより非晶マトリックス成分は初期の重量減少ではほとんど分解を受けないものと推察される。初期の重量減少においては表皮細胞が分解される結果、表皮細胞の High-S 成分タンパク質を含むエキソクチクル層が分解され、ろ液中に High-S 成分タンパク質が多く検出されたものである。皮質細胞の非晶マトリックスの High-S 成分タンパク質がその後分解を受けてろ液中のアルキル化 2-VP 量の上昇が観測されない(図 3, 5)のは、試料羊毛繊維のアルキル化率が 60% 程度であり、表皮細胞の

Fig. 8. Absorbance of solutions colored by 1-nitroso-2-naphthol as a function of weight loss of partly alkylated fiber. Symbols are the same as Fig. 4.

High-S 成分タンパク質が主にアルキル化されているためと 2-PEC 残基の分解が進行するためと考えられる。非晶マトリックス成分が分解を受け難いのは、羊毛繊維は複雑な複合体構造を持ち表面は撥水性の表皮細胞で覆われ繊維内部への水などの浸透が容易でないためである。一方、表皮細胞にはクチクル層間親水性成分としての δ 層 [19] が存在し、皮質細胞間や皮質細胞-表皮細胞間の細胞膜複合体と区別して細胞間充てん物と呼ばれるこの層は $-\text{COOH}$ が多く含まれるアミノ酸組成であると指摘されている。このことは δ 層は銅(II)イオンと金属錯体を生成するために好都合であり、 ML^+ の形となった部分は、正の静電場を作り HOO^- などのアニオンを積極的に引き付け化学的に活性の高い雰囲気となり、表皮細胞が最初に分解されるものと考えられる。

4. 結 語

銅(II)-羊毛錯体と過酸化水素混合系における羊毛繊維の分解に関して、羊毛繊維の組織構造の分解挙動の知見を得るため、2-VP アルキル化羊毛繊維を用いて検討を行い、以下のことが明らかとなった。

分解の初期では分解液中に High-S 成分タンパク質が多く観測され、本実験の系では High-S 成分タンパク質が分解を受けやすいことが示唆された。また、残渣羊毛繊維中のチロシン含有量が初期の分解で上昇することにより、High-G-T 成分タンパク質を含む皮質細胞の非晶マトリックスは分解を受け難いものと考えられ、表皮細胞が最初に分解を受けその構成タンパク質である

High-S 成分が分解液中に溶出してくることがわかった。

文 献

1. R. E. Guthrie and S. H. Laurie, *Australian J. Chem.*, **21**, 2437 (1968)
 2. E. H. Hinton Jr., *Tex. Res. J.*, **44**, 233 (1974)
 3. S. Kokot, M. Feughelman, and R. M. Golding, *Tex. Res. J.*, **43**, 146 (1973)
 4. 門倉 暁, 伊藤 啓, 宮本武明, 稲垣 博, 繊維学誌, **38**, T-342 (1982)
 5. K. Fukatsu, *Sen'i Gakkaishi*, **44**, 238 (1988)
 6. K. Fukatsu, *Sen'i Gakkaishi*, **46**, 186 (1989)
 7. H. P. Gregor, L. B. Luttinger, and E. M. Loebel, *J. Phys. Chem.*, **59**, 34 (1955)
 8. K. Fukatsu, *Tex. Res. J.*, **58**, 91 (1988)
 9. 北條舒正, 白井汪芳, 「続・絹糸の構造」(北條舒正編) p. 463 (1980)
 10. K. Fukatsu, *Tex. Res. J.*, **59**, 405 (1989)
 11. S. P. Wolff and R. T. Dean, *Biochem. J.*, **234**, 399 (1986)
 12. F. Ferrero, *TINCTORIA*, **10**, 265 (1983)
 13. M. Friedman and S. Tillin, *Tex. Res. J.*, **44**, 578 (1974)
 14. G. Ceriotti and L. Spandrio, *Biochem. J.*, **66**, 607 (1957)
 15. I. Pecht, A. Leritzki, and M. Anbar, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 1587 (1967)
 16. H. Shirai, S. Higaki, K. Hanabusa, and N. Hojo, *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.*, **21**, 157 (1983)
 17. B. Cooper, J. M. Creeth, and A. S. R. Donald, *Biochem.*, **3**, 228, 615 (1985)
 18. S. H. Chiou, *J. Biochem.*, **94**, 1259 (1983)
 19. Y. Nakamura, K. Kosaka, M. Tada, K. Hirata, and S. Kunugi, *Proc. 7th Inter. Wool Text. Res. Conf. Tokyo*, **1**, p. 171 (1985)
-