— 論 文 —

アミノ酸、ペプチド、酵素の自動分析

(昭和43年11月28日受理)

駒野 照弥^{*1}・奥山 典生^{*2}

生体成分の分離分析を目的として、アミノ酸、ペプチド、酵素の自動分析に関する研究—とくに発色系の検討を行なった。アミノ酸、ペプチド類では、アミノ基の反応としてトリニトロベンゼンスルホン酸法、グアニジノ基の反応として坂口反応、イミダゾール基の反応としてバウリ反応、チオエーテル基の反応としてトリナトリウムペンタシアノアンミンフェロエート反応、インドール基の反応としてエールリッヒ反応を行なった。

一方、酵素反応の自動分析の例としては、加水分解酵素として *p*-ニトロフェニルリン酸を用いてホスファターゼの活性測定を、酸化還元酵素として *o*-ジアニジン-ペルオキシダーゼ法によりジアミン酸化酵素の活性測定を行なった。

これらについて、自動分析の流路図とその結果を報告する。

1 緒 言

Spackman, Stein, Moore¹⁾ によるアミノ酸分析計の成功以来、自動クロマトグラフィーによる生体成分の分離分析を目的とした研究が蓄積されつつある。著者らは低分子の生体成分としてアミノ酸、ペプチド、高分子のそれとして酵素の自動分析に関する研究を行なってきた。

タンパク質化学者にとって、ペプチド分析は重大な関心事であり、Jones²⁾ はアミノ酸分析計を用いて、Catravas³⁾ は Technicon 社のオートアナライザーを用いて、ニンヒドリン反応によるペプチドの自動分析を行なった。とくに後者はアルカリ分解前後のニンヒドリン反応を行なった。一方、奥山⁴⁾ はやはりオートアナライザーを用いて、ペプチドのニンヒドリン、坂口、バウリ反応の同時記録を行なった。著者らはこの 2、3 年来、簡易型流動分析計の試作を行なってきたが、これを用いて、ペプチド分析計試作の一環として、主にアミノ酸側鎖の呈色反応の自動化に関する研究、とくに発色系の検討を行ない、一応の成果を収めたので報告する。ここに報告する反応は、アミノ基の反応としてトリニトロベンゼンスルホン酸法、グアニジノ基の反応として坂口反応、イミダゾール基の反応としてバウリ反応、チオエーテル基の反応としてトリナトリウムペンタシアノアンミンフェロエート反応、インドール基の反応としてエールリッヒ反応である。

上記の各種の呈色反応の外にチロシンのフェノール基、トリプトファンのインドール基はそのまま 280 mμ に吸収をもっており、したがって、これらのアミノ酸残基を含むタンパク質は 280 mμ に吸収を示し、その吸収を利用する自動分析計がすでにいくつか製品化されており、広く用いられている。

一方、酵素活性の測定にもいろいろの呈色反応が工夫されている。このような呈色反応にも自動分析法を適用することが可能であり、上述のような流動分析計で分析することをこころみた。こ

こでは加水分解酵素としてホスファターゼ、酸化還元酵素としてジアミン酸化酵素について研究を行なった結果を報告する。

2 実 験

2.1 装置の構成

カラムは外套管付のものを用いて、恒温水を還流させた。プロポーションポンプは図1に示すリール型のものを試作した。ローラーおよび受皿は硬質塩化ビニル製である。日本サーボ、インダクションモーター IM8S 7 (1 rpm) を用い、スプロケットにより回転を伝えた。実験によっては、ミツミ科学製のベリスタポンプ、またはそれを研究室で改良したものを用いた。流動比色計として、コタキ AKA 比色計の光学系に手製のフローセルを装着し、検出部には CdS セルを用いて乾電池 2 個で 3 V の電圧をかけ、電流変化を 1 kΩ 抵抗を直列にはさんで電圧変化にかえ、東亜記録計 EPR 10 A に記録させた。液体の流路にはポリ塩化ビニル、ポリエチレンのチューブを用い、反応管にはポリエチレン管をコイルに巻いて用いた。流路の合流、分流にはポリアクリルニトリルのブロックにドリルで穴を明け、チューブをさしこんだものを用いた。図2に装置全体の写真を示した。その詳細は結果の項に流路図で示す。各部と構成の詳細については別⁵⁾に報告した。

図1 プロポーションポンプの一例

3.2.1 に述べる実験には東京都立大学理学部丸山洋一氏の設計製作したプロポーションポンプを用いた。また流動比色計として、日立 034 形多波長流動光度計と日立 EPO-B 形光光度

5) 奥山典生、駒野照弥，“新しいクロマトグラフィー”（波多野博行編），化学の領域増刊，南江堂（印刷中）。

*1 Teruya KOMANO 東京大学応用微生物研究所：東京都文京区弥生。

*2 Tsuneo OKUYAMA 東京都立大学理学部化学教室：東京都世田谷区深沢。

1 D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958).

2) R. T. Jones, *Cold Spring Harbor Symp.*, 29, 297 (1964).

3) G. N. Catravas, *Anal. Chem.*, 36, 1146 (1964).

4) T. Okuyama, K. Takio, K. Narita, *J. Biochem.*, 62, 624 (1967).

図 2 簡易型流動分析計の全景

計に手製のフローセルを装着したものを用いた。記録計として、日立 QPR₈₈ 形打点記録計を用いた。

また、3・1・1 に述べる実験には Technicon 社のオートアナライザーを一部用いた。

2.2 試薬

2.2.1 トリニトロベンゼンスルホン酸反応の試薬

0.02% トリニトロベンゼンスルホン酸溶液：トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム（東京化成）の 0.02% 水溶液に塩酸を少量加えて微酸性にした。

発色用緩衝液：0.05 mol/l ホウ酸ナトリウム-0.25 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液に固体ホウ酸を加えて pH を 9.6 に調整した。

2.2.2 坂口反応の試薬

0.02% 8-オキシキノリン溶液：200 mg の 8-オキシキノリンを 10 ml のメタノールに溶かし、990 ml の 3 N 水酸化ナトリウム水溶液に加えた。

次亜臭素酸ナトリウム溶液：100 ml の 1.5 N 水酸化ナトリウム水溶液に 0.65 ml の臭素を加えた。使用時、脱イオン水で 10 倍に希釈した。

2.2.3 パウリ反応の試薬

0.25% スルファニル酸溶液：1 g のスルファニル酸を 17 ml の濃塩酸に添加し、脱イオン水で 400 ml とした。

0.7% 亜硝酸ナトリウム溶液：7 g の亜硝酸ナトリウムを 1 l の脱イオン水に溶かした。

2 N 水酸化ナトリウム溶液：80 g の水酸化ナトリウムを 1 l の脱イオン水に溶かした。

2.2.4 トリナトリウムペンタシアノアンミンフェロエート反応の試薬

0.1% トリナトリウムペンタシアノアンミンフェロエート溶液：東京化成の試薬の 0.2% 水溶液と 6 N 酢酸を使用時、1:1 (V/V) に混合した。混合液は不安定で青色を帯びてくる。約 10 時間位しか使用できない。

0.5% 亜硝酸ナトリウム溶液：5 g の亜硝酸ナトリウムを 1 l

の脱イオン水に溶かした。

2.2.5 エールリッヒ反応の試薬

エールリッヒ試薬：1 g の *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒドを 100 ml の濃塩酸に溶かした。

0.1% 亜硝酸ナトリウム溶液：1 g の亜硝酸ナトリウムを 1 l の脱イオン水に溶かした。

2.2.6 ホスファターゼの活性測定のための試薬

3 mmol/l *p*-ニトロフェニルリン酸溶液：酸性緩衝液として、0.01 mol/l 塩化マグネシウムを含む 0.1 mol/l 酢酸緩衝液 (pH 4.5) と、アルカリ性緩衝液として、0.01 mol/l 塩化マグネシウムを含む 0.1 mol/l ベロナル緩衝液 (pH 8.5) をつくり、100 ml の緩衝液に 111 mg の *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム（第一化学）を溶かした。これに Tween-80 を一滴加えた。保存は -20°C に凍結した。

0.3 N 水酸化ナトリウム溶液：12 g の水酸化ナトリウムと 7.6 g のエチレンジアミン四酢酸四ナトリウム塩を 1 l の脱イオン水に溶かした。

2.2.7 ジアミン酸化酵素の活性測定のための試薬

o-ジアニシジン-基質溶液：35 mg のカダベリン二塩酸塩（和光純薬）を 200 ml の 0.2 N リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶かし、5 ml の 0.5% *o*-ジアニシジン-メタノール溶液を加えた。これは白濁を生じたが、そのまま用いた。

セイヨウワサビペルオキシダーゼ溶液：Boehringer and Soehne Gmb H 製（精製数約 0.6⁶⁾、2 mg を 50 ml の脱イオン水に溶かした。

3 結 果

3.1 アミノ酸、ペプチドの呈色反応

3.1.1 アミノ基の反応 アミノ基の反応としてはふつうニヒドリン反応が用いられている。ニヒドリン反応は多くのアミノ酸分析計に用いられているとはいえ、反応に 100°C の加熱を必要とするとか、空気酸化されやすい等、自動化に難しい点がある。この反応系については別⁷⁾に述べる。著者らはアミノ基の反応としてトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法を用いた。

TNBS 法の自動化に関しては、すでに、佐竹ら⁸⁾の報告があるが、今回若干の改良を加えた。すなわち佐竹らは発色用緩衝液として 0.1 mol/l ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を用いているが、著者らはさらに pH が高く、緩衝価の高いホウ酸緩衝液を用いた。これを用いることにより、ある程度濃度の高いピリジン-酢酸緩衝液をも用いることができた。

図 3 TNBS 反応の流路図

6) H. Theorell, *Acta. Chem. Scand.*, 4, 422 (1950).

7) 小林貞美, 奥山典生, 日本化学会第 21 年会 (大阪 1968), 7403.

8) K. Satake, T. Take, A. Matsuo, K. Tazaki, Y. Hiraga, *J. Biochem.*, 60, 12 (1966).

図3に TNBS 反応の流路図を示した。ポンプで緩衝液をカラムに送りこむ。カラムからの溶離液はプロポーションングポンプで一部発色系に引きこみ, 残りは必要ならフラクションコレクターに分取する。試料に緩衝液試薬を加え, 空気で隔壁をつくり混合管で混合と反応をさせる。反応液は脱泡管で脱泡したのち, 430 m μ のフィルターを装着した比色計にひきこみ, 流動比色を行ない, 記録計に記録した。

図4は Dowex-50 を用いてアミノ酸分析を行なった結果である。カラムが短かく, 樹脂もよくないので, 分離は不完全である。各アミノ酸を 0.2 μ mol 添加して, その約 1/50 を発色系に導いているので, 実際には約 4 n mol の発色であり, 非常に感度のよいことがわかる。

図4 TNBS 法によるアミノ酸分析

最初の矢印のところで試料の添加を行ない, 第2の矢印のところで, 高濃度の緩衝液に切換える。

カラム: Dowex 50 $\times$ 8 0.6 $\times$ 17 cm 溶出液: 0.2 mol/l クエン酸ナトリウム pH3.1, カラム温度 45°C 試料: アミノ酸混合物各 0.2 μ mol

また, 図5に Technicon 社のオートアナライザーを用いて6時間法でアミノ酸分析を行なった結果を示した。このさい, ベーラインは十分安定しているが, 芳香族。塩基性アミノ酸が溶出する部分でベースラインが上がってきている。

図6はピリドキシルリジンを分離分析した結果である。

図5 TNBS によるアミノ酸分析

Technicon 社のオートアナライザーによる。使用したイオン交換樹脂はクロモビーズタイプ C₂。

図6 TNBS 法によるピリドキシルリジンの検出

ウシグロビンをピリドキサルと反応させ, NaBH₄ で還元し, 6 N 塩酸で 24 時間加水分解したのち, 塩基性アミノ酸分析の条件下で分析した。

カラム: Dowex 50 $\times$ 4, 0.6 $\times$ 20 cm
試料: pyr-globin の塩酸加水分解物 (15 mg)

図7はオボアルブミンの限定分解によって生ずるプラクアルブミンとオリゴペプチドをセファデックス G-15 のカラムで分離したものを TNBS 法で発色させた例である。ニンヒドリン反応ではプラクアルブミンのような大きな蛋白質は沈殿を生じて測定できない。一方, アラニルアラニンと考えられるペプチドは紫外部の吸収では測定できない。これは TNBS 反応の有用な点である。

TNBS 法の最大の欠点は, プロリンが発色しないことであったが, β -ナフトキノ-4-スルホン酸 (NQS) がプロリンと反応して赤色を呈することがわかったので, 発色試薬として 0.025% TNBS-0.025% NQS を用いた。図8は混合試薬によるプロリンの発色を示している。

図7 オボアルブミンの限定分解物 (プラクアルブミンとアラニルアラニン) の分離

カラム: Sephadex G-15 0.9 $\times$ 100 cm 溶出液: 1% 酢酸
試料: ovalbumin の限定分解物 流速: 12.6 ml/hr

図8 TNBS-NQS 混合試薬によるプロリンの検出

カラム: Dowex 50 0.6 $\times$ 20 cm
緩衝液: 0.2 mol/l クエン酸ナトリウム (pH 3.1)
試料: (A) Asp, Gly, Ala, Ser, Glu, Pro
(B) Pro
試薬: (A) TNBS+NQS, (B) NQS

3.1.2 グアニジノ基の反応 グアニジノをもつアミノ酸はアルギニンであり, その特異反応として坂口反応がよく知られている。その自動化にはすでに奥山ら⁴⁾の方法があるが, これに準拠して行なった。図9にその流路図を示した。図10はクルペインのトリプシン分解ペプチドをアンバーライト CG-50 を用いて安

図9 坂口反応の流路図

- 9) T. Ando, S. Ishii, M. Kimura, *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 255 (1959).

図 10 坂口反応によるクルペインのトリプシン分解物のクロマトグラフィー

カラム: Amberlite CG-50 type II 0.9×19 cm

オートグラード使用

- 1 室: 0.1 mol/l NaCl } になるように NaCl を 0.1 mol/l ホウ
2 室: 0.1 mol/l NaCl } 酸ナトリウム (pH 8.0) に加えた。
3 室: 2.0 mol/l NaCl

図 11 坂口反応によるストレプトマイシン類のクロマトグラフィー

カラム: Amberlite CG-50 type II 0.9×43 cm

オートグラード使用

- 1 室: 5% NaCl } になるように NaCl を 0.1 mol/l ホウ
2 室: 5% NaCl } 酸ナトリウム (pH 8.0) に加えた。
3 室: 30% NaCl

藤ら⁹⁾の系にもつき分離を行なった際の分離図形である。試料が多すぎて、ピークが頭打ちになっているが、実際はクルペイン 10 mg 相当量を用いており、十分感度のよいことが理解される。これとはほぼ同じクロマトグラフ系を用いて、アルギニン、ストレプトマイシン- α -アミノ酪酸、ジヒドロストレプトマイシンの分離分析を行なった結果が図 11 である。ベースラインも安定しており、きわめて明瞭に分離している。

3.1.3 イミダゾール基の反応 イミダゾール基をもつアミノ酸はヒスチジンであり、このアミノ酸の特異反応として、パウリ反応がよく知られている。この自動分析もすでに奥山ら¹⁰⁾によって行なわれたが、幾分改変し、著者らの流動分析計に適用した。その流路図が図 12 に示してある。パウリ反応の際は空気を入れない方がベースラインが安定した。奥山らの方法との主な相違点は発色用の炭酸ナトリウムのかわりに水酸化ナトリウムを用いた点である。この系を *N*-アセチルヒスチジン、ヒスチジン、ヒス

図 12 パウリ反応の流路図

図 13 パウリ反応によるヒスチジン類のクロマトグラフィー

カラム: Dowex 50×8 0.6×20 cm

0.2 mol/l 酢酸ナトリウム (pH 5.2) から 0.2 mol/l 水酸化ナトリウム+0.2 mol/l 塩化ナトリウムまでの直線濃度勾配法で溶出

タミンの分離分析に用いたものが図 13 である。アセチルヒスチジンのピークが二つに分かれているが、前にでるのは混入する不純物である。この反応によればチロシンのようなフェノール基をもつアミノ酸も発色するはずであるが、感度が低い。

3.1.4 チオエーテル基の反応 チオエーテル基をもつアミノ酸はメチオニンである。この特異反応として従来からニトロプルシッドナトリウムを用いる反応が知られているが、この反応はシステインのようなスルフヒドリル基をもつアミノ酸とも反応することが知られている。そこで、これよりもチオエーテル基に特異性があるといわれているトリナトリウムペンタシアノアンミンフェロエート (TPF) による反応を用いた。その流路図を図 14 に示す。この系を塩基性アミノ酸分離用のクロマトグラフ系に応用したのが図 15 中段である。アミノ酸の混合物をカラムに添加しているが中性アミノ酸の分離区分にのみ発色がみられる。

図 14 TPF 反応の流路図

図 15 短カラムによるアミノ酸混合物の分析

上段: TNBS 反応 中段: TPF 反応 下段: 坂口反応

カラム: Dowex 50×8 0.6×16 cm

溶出液 0.8 mol/l クエン酸ナトリウム (pH 5.4), カラム温度 40°C

3.1.5 インドール基の反応 インドール基をもつアミノ酸はトリプトファンであるが、遊離のトリプトファンはハロゲンにより赤紫色に簡単に発色することが知られているが、ペプチド中に存在するトリプトファンはこの反応によっては発色しない。そこで *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒドを用いる反応を適用した。その流路図は図 16 に示した。1% *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒド濃塩酸溶液を送るタイゴン管は、濃塩酸に侵されやすいた

図 16 エールリッヒ反応の流路図

図 17 エールリッヒ反応によるウシグロビンのトリプシン分解物のクロマトグラフィー

カラム：セフデックス G 151. 0×143 cm, 溶出液：1% ギ酸
矢印のところで試料 (30 mg) を添加。

め、あまり長時間にわたって使用することはできない。この反応系をウシグロビンのトリプシン分解物に応用したのが図 17 である。

3.2 酵素作用の測定

3.2.1 ホスファターゼの測定 ホスファターゼの分析は、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とし、加水分解されて遊離する *p*-ニトロフェノールをアルカリ性下、比色した。図 18 に流路図を示した。カラムからの溶離液は 3 本に分流され、1 本は東洋科学産業製ユニコンで 280 mμ の透過率を測定し、フラクションコレクターに分取した。他の 2 本はプロポーショニングポンプで分析系に引き込み、酸性およびアルカリ性ホスファターゼの活性を測定した。これらは打点記録計に同時記録した。図 19 に黒コウジカビの無細胞抽出液の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった結果を示した。

図 18 ホスファターゼの活性測定のための流路図

図 19 黒コウジカビの細胞内ホスファターゼの分析
カラム：DEAE-セルロース 0.9×20 cm
溶出液：0.01 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に 0 から 0.4 mol/l までの塩化ナトリウムを濃度勾配的に添加。

3.2.2 ジアミン酸化酵素の活性測定 ジアミン酸化酵素の活性測定は鈴木¹⁰⁾による *o*-ジアニシジン-ペルオキシダーゼ法によった。すなわち、

のように、基質が酸化される際に生ずる過酸化水素により、セイヨウワサビペルオキシダーゼの存在下に、*o*-ジアニシジンを酸化させ、生ずる褐色の酸化型色素を比色した。図 20 にその流路図を示した。ふつう、このような複雑な酵素反応の測定には透析器等が用いられてマニホールドが複雑になるが、このマニホールドはきわめて簡略化されている。事実減少するアミンの量を透析器を用いて TNBS 法で測定することによっても本酵素の活性測定

図 20 ジアミン酸化酵素の活性測定のための流路図

図 21 ブタ腎臓のジアミン酸化酵素の分析

上段は 254 mμ の波長で吸光度の変化を記録 (タンパク質量)

下段は 430 mμ 波長で *o*-ジアニシジンの発色量を記録 (酵素活性)

カラム：DEAE-セルロース 1.0×34 cm

溶出液：0.01 mol/l リン酸ナトリウム、2 番目、3 番目の矢印のところでそれぞれ 0.07 mol/l、1.0 mol/l NaCl を添加。

試料：ブタ腎臓抽出物 流速：ca. 10 ml/hr

ができることが観察された。図 21 にブタ腎臓の熱抽出液を硫酸処理、透析したものの DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果を示した。

4 考 察

TNBS 法の自動化に関してはすでに佐竹らの報告⁸⁾がある。これに比べて、今回は反応の pH を高くし、反応速度を早くして、しかも緩衝価の高い緩衝液を用いることができた。また本法の最大の欠点であったプロリンの発色は、ナフトキノンスルホン酸を用いることによって解決された。ナフトキノンスルホン酸の場合、ふつうのアミノ酸での発色とイミノ酸での発色とは吸収極大がちがうので、アミノ酸とイミノ酸の分別定量ができる。例えば、N 末端にプロリンをもつペプチドのみの検出も可能である。タンパク質の検出は一般に 280 mμ の吸収で行なわれているが、ゼラチン等は 280 mμ の吸収がない。このようなタンパク質の定量にも本法は有効である。とくに図 7 に示したように、タンパク質とペプチド、あるいはアミノ酸を同時に検出するのに適している。

含硫アミノ酸の分析の自動化に関しては、Barber¹¹⁾によるニトロプルシッド法の自動化がある。ここではメチオニンに特異性の高い LaRue¹²⁾ のトリナトリウムペンタシアノアンミンフェレート反応によった。ニトロプルシッド法と組み合わせれば、メチオニンと、システイン、シスチンの分別が可能となる。

エールリッヒ反応は Neubauer-Rhode の反応¹³⁾と報告されているものは酸性 *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒドの反応である。これは感度が低く、亜硝酸ナトリウムを加えた改良法¹⁴⁾は感度が高くなった。

ペプチド分析計においては、3.2.1 で述べたように、同一カラ

11) C.W.Barber, "Automation in analytical chemistry 1966, Vol. 1", Mediad Inc. New York (1967) p. 401.

12) T.A.LaRue, *Anal. Biochem.*, 10, 172 (1965).

13) E.Rhode, *Z. physiol. Chem.*, 44, 161 (1905).

14) M.X.Sullivan, W.C.Hess, *J. Biol. Chem.*, 155, 441 (1944).

ムからの溶離液をいくつかに分けて、異なった反応をさせ、同時記録することが可能である。そのようにすると、ペプチド分析の段階で、あるペプチドのアミノ酸組成について、ある推定を下すことができるようになる。また、ペプチドの大きさは加水分解前後の TNBS 法である程度知ることができよう。それらは従来行なわれてきたフィンガープリント法にかわり、信頼度の高いタンパク質の同定手段となることも期待できる。

p-ニトロフェニルリン酸を用いた酵素の活性測定は他の多くの合成基質を用いた酵素の活性測定にほとんどそのまま応用できる。例えば、Beck ら¹⁵⁾は *p*-ニトロフェニルリン酸、2-オキシ-

5-ニトロフェニル硫酸、*p*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、*p*-ニトロフェニル- β -D-グルクロニド、*p*-ニトロフェニル *N*-アセチル- β -D-グルコサミニドを酵素の活性測定に用いている。これらの基質はそのまま自動分析法に応用できる。

また、*o*-ジアニシジン-ペルオキシダーゼ法は、ここに述べたジアミン酸化酵素だけでなく、グルコース酸化酵素をはじめ、多くの過酸化水素を生成する酵素反応に応用できる。

これらの酵素反応の自動化は、インチームの生物学的意義の解明等、多くの生物学的問題の解明に役立つものと考えられる。

15) C. Beck, A. L. Tappel, *Anal. Biochem.*, 21, 208(1967).

絹フィブロイン銅錯体の二次構造

(昭和 43 年 10 月 17 日 受理)

北条 舒正・白井 汪芳・高山 公子・大和 公子^{*1}

絹フィブロイン錯体の生成反応を種々の pH 領域で検討した。フィブロインは LiBr に溶解し、透析により、LiBr を除き調製した。この溶液を種々の pH で銅イオンと反応させた。溶液の変化は、pH 滴定曲線、紫外可視スペクトル、粘度から検討した。pH 8.5 以下では、可視部 700 m μ に吸収をもち、分子内錯体の生成が認められる。常温で放置すると、pH 6.5 から 7.5 付近でゲル化が起こるのが視察される。このゲルを 30°C で乾燥して、X 線回折、IR スペクトルから調べると、クロス β 構造であることが判った。pH 8.5 以上の溶液では可視部 540 m μ に吸収をもってくる。これは Cu $\leftarrow$ N 結合に基づくものと考えられる、粘度は低下し、X線回折から、ランダム構造であることが明らかになった。

1 緒 言

高分子化合物に金属イオンを配位させ、高分子錯体を生成させることによって、その特異な性質を研究した例はすでに多い¹⁾。絹繊維に金属イオンを吸着させると、繊維の非結晶部分などに金属が配位し、その強度、耐薬品性などが向上する²⁾。高分子化合物では配位結合、配位構造の他に金属の配位による分子の二次形態の変化が性質を支配する場合も考えられる。ポリペプチド溶液は金属イオンの存在によって、その形態を変える³⁾ことはすでに種々の例で知られた事実である。したがって金属の配位によって特定形態の高分子キレートを生じさせることも可能である。このような可能性を絹繊維に適用する基礎研究として、絹フィブロイン水溶液と銅イオンの錯体生成による種々の溶液の変化やフィルム等の二次構造についてしらべることを目的とした。このような錯体生成は、pH による依存性が大きい。したがって生成する錯体が異なるものであれば、それによる 2 次構造も当然異なってくるものと考えられる。本実験では特に pH による違いを中心に検討した。

2 実 験

2.1 フィブロイン水溶液の調整

信州大学繊維学部繊維農学科昭和 41 年春蚕 2.4 $\times$ 5.4 のマユ

を温湯中でほぐして、ビーカーにとり、無水量の 25% に相当する純マルセルセッケンを無水量の 50 倍に相当する蒸留水に溶解して加え、沸騰湯煎中に浸漬して間接に 40 分間加熱精練する。さらに一回同一濃度の新しいセッケン液で同様処理する。精練液をロ別した後、炭酸ナトリウム水溶液にて浸漬、しばらく放置後脱液乾燥し、エーテルにて 48 時間抽出して、ロウ物質を除去し、純フィブロインを得る⁴⁾。乾燥した純フィブロイン約 2.4 g を 9.3 mol の臭化リチウム 150 g に 40°C で溶解し、硝酸銀試験で臭素イオンが出なくなるまで約 4 日間透析を純水で行なった。フィブロイン分子を $-(\text{Gly-Ala})_n$ 構造と近似的に仮定して⁵⁾、 $-\text{Gly-Ala}-$ 残基濃度で 0.02 mol に相当するように純水で注意深くうすめた。この溶液は蛋白質濃度で 0.25% に相当する。

2.2 銅錯体溶液の調整

例えば、表 1 に示したように 0.02 mol フィブロイン水溶液 40 ml に 0.02 mol 硝酸銅水溶液をモル比でフィブロイン対銅イオンが 20 対 1, 20 対 2, 20 対 3 の割合で加え、イオン強度が 0.1 になるように硝酸カリウムの濃厚水溶液を加える。0.1 N 水酸化カリウムを 0 から 4 ml 加え、全量を 80 ml となるように蒸留水を入れる。別に硝酸銅溶液を入れなくて他はまったく同様組成の試料を調整して、フィブロイン空試料溶液とする。これらの試料は密栓した三角フラスコに入れ、25°C の恒温槽、または恒温室で一夜放置して平衡に達せしめ、以下の測定に供する。

*1 Nobumasa HOJO, Hirofusa SHIRAI, Kimiko TAKAYAMA, Kimiko OWA 信州大学繊維学部繊維工業化学科：長野県上田市常入。

1) 北条舒正, 工化, 61, 778 (1958) など。

2) 北条舒正, 絹糸の構造, 千曲会出版部 (1959) p. .

3) 北条舒正, 深津和彦, 早川忠男, 日本化学会第 21 年会講演予講集, 4 (1968) p. 2824.

4) 清水正徳, 福田紀文, 桐村二郎, 蛋白質化学 V, 共立出版 (1957) p. 331.

5) 桐村二郎, 蛋白質化学, 5, 共立出版 (1957) p. 339.