

絹糸 fibroin における tyrosine 分布問題について

小林 敏雄*・近藤 義和*・西沢 一俊*

Toshio KOBAYASHI, Yoshikazu KONDO and Kazutosi NITZAWA :

The problem of the Distribution of Tyrosine in Silk Fibroin.

(1953年9月15日受理)

絹糸 fibroin の化学構造に関しては古くから研究が続けられ、最近ではX線技術の進歩に伴い著しい進展をみた。

化学的実験によるアミノ酸分析から、BERGMANN等⁽¹⁾は絹糸 fibroin の peptide 鎖には glycine は1つおきに、alanine は4番目毎に、tyrosine は16番目毎に週期的に排列していることを提唱した。他方においては、MEYER 及び MARK⁽²⁾はX線の研究の結果、絹糸 fibroin は結晶性部分と非結晶性部分とからなり、その単位胞の大きさより結晶性部分は glycine, alanine 及び serine のみからなり、全アミノ酸中その11%にも及ぶ tyrosine はこの結晶性部分には含まれないと報告した。従つて、MEYER 及び MARK の説によれば絹糸 fibroin は均一蛋白質ではなく、amino 酸組成を全く異なる2つの部分に区別される。

其の後、MEYER 及び MARK の説を支持する様な報告が GOLDSCHMIDT 等⁽³⁾、金子⁽⁴⁾更に COLEMAN 等⁽⁵⁾に依りなされたが、就中、COLEMAN 及び HOWITT は copper ethylen diamine によつて得た fibroin を trypsin にて消化した結果、tyrosine を含まない glycine, alanine 及び serine のみからなる沈澱物を得、それが MEYER 及び MARK の結晶性部分に相当するものと報告した。尙 DRUCKER 及び SMITH⁽⁶⁾は此の結晶性部分に相当する沈澱物の分子量は約7000であると報告するに至つた。又赤堀・佐竹・成田等⁽⁷⁾は fibroin の過酸化水素酸化に依り、原料の約35%に相当する glycine 及び serine が得られたと報告し、更に赤堀等⁽⁸⁾は fibroin の電気泳動的研究の結果から絹糸 fibroin には2種の蛋白質が混在するものと推定した。

然しながら、非結晶部分のみ含まれていると考えられている tyrosine も沃素化、bromine 化、diazo 化などの反応によつても種々の差があり、その全部が反応するものでなく、如何にしても反応しない部分の存在することが知られている。つまり、従来非結晶部分のみに存在するとされていた tyrosine にも非常に不活性の部分

が存在するものであると考えられ、この事は奥等⁽⁹⁾のクロム酸酸化によつても確認されている。尙これより先きに清水⁽¹⁰⁾は絹糸 fibroin を塩酸処理して多くの分別沈澱をつくり、そのX線写真像及び tyrosine の定量の結果から結晶性部分に相当する沈澱物中にも尙 tyrosine を含むことを報告しているの、我々は最近絹糸 fibroin の非結晶性部分と結晶性部分とは MEYER, MARK の説の様に必ずしも確然とはしていないのではないかの疑問を強めるに至つた。この点を酵素を利用して検討する目的で COLEMAN の実験結果を追試した。

実験方法及び結果

[I] 供試絹糸 fibroin の調製

実験に供した絹糸 fibroin は、絹糸を精練洗滌後濃塩酸で室温にて処理し、充分洗滌、中和して得たものを乾燥し ball-meal にて 0.2~0.5 μ の粉末としたものである。

この粉末は水に懸濁しても無澱 ion を含まず、又遊離 amino 酸は ninhydrin 反応により僅かに認め得る程度のものであり、その電子顕微鏡写真は Fig. 1 に示した如くであり、塩酸無処理絹糸 fibroin との比較は第1表の如くである。

Table 1. Comparison of the Weight, Nitrogen and Tyrosine Contents of Silk Fibroin with Those of Silk Fibroin Treated with HCl.

	Weight (g)	N. contents %	Tyrosine contents %
Silk Fibroin (untreated)	100	17.3	11.2
Silk Fibroin (treated with HCl)	65	17.6	7.4

* 本実験に用いた silk fibroin powder は堀久三郎氏より分与して頂いたもので、此処に同氏に深謝の意を表する。

* 信州大学繊維学部化学研究室



Fig. 1

Electron Micrograph of Silk Fibroin Powder Treated with HCl
× 2400

〔II〕 Trypsin 溶液の調製

脂肪を除去した新鮮な豚の膵臓 450g を磨碎し、粥状にした後 1.5 l の水を加え、稀苛性曹達溶液にて pH 8.0 となし、toluene を添加 37°C に 15 時間放置し自己消化を行わせた後遠心分離し、その上澄液中の脂肪を ether にて除き、更に水道水にて透析したる後減圧濃縮して 150 c.c. としたものを酵素液として用いた。

〔III〕 Silk fibroin powder の trypsin による消化試験

我等は塩酸処理絹糸粉の trypsin による消化分別部分をつくる予備実験として、Table 2 の様な組成のもとに 37°C において消化試験を行つた。消化の程度は VAN SLYKE 法によつて測定し、分解の結果生じた遊離 amino 基の量をもつてした。

Table 2 Composition of the Enzyme Mixture

Test	Substrate	0.1 mol phosphate Buffer of pH 8.0	Enzyme solution*
1	Silk fibroin powder** 23.7mg	5 c.c.	5 c.c.
2	Casein 1.08g	5 c.c.	5 c.c.
Control	—	5 c.c.	5 c.c.

* Prepared from the swine pancreas.

** This is the one treated with conc. HCl.

その結果を示すと Table 3 及び Table 4 のようである。

他方においては、glass-fiber と絹糸 fibroin 粉末 1.8952g. を混じて 40 c.c. の pH 8.0 の緩衝液中にて粉末の沈降を防ぎながら消化を 43 日間行つた後、消化残渣を集めて充分水にて洗滌を行いその乾量を測定したところ、消化前のものの 28.4% が減少していた。これを更に

Table 3 Digestion of Casein by Trypsin

Reaction Time (hr.)	With Enzyme		Control	
	Increase of Amino N. (mg)	Split %	Increase of Amino N (mg)	Split %
4.5	1.3668	5.8	0.3260	0.00
17.0	2.2562	10.7	0.3260	0.00
29.0	2.7978	13.7	0.3262	0.00
47.0	2.9323	14.4	0.3263	0.00

Table 4 Exhaustive Digestion of Silk Fibroin by Trypsin

Reaction Time (hr.)	With Enzyme		Control	
	Increase of Amino N (mg)	Split %	Increase of Amino N (mg)	Split %
52	0.7276	10.26	0.3051	0.00
259	1.2539	23.00	0.3051	0.00
481	1.4762	28.03	0.3050	0.00
648*	1.5510	30.34	0.3052	0.00

* The digestion of fibroin is considered here to have almost stopped.

前記の trypsin 溶液を作用させても殆んど消化されなかつた。斯くして絹糸 fibroin は、塩酸処理の際その 35% を失い (Table 1)、その残りの 65% の中約 30% は酵素により消化され、結局絹糸 fibroin の約 47% が残つた訳で、而してこの残渣は最早消化され難いものであることから、恐らく MEYER 及び MARK の結晶性部分に相当すると思われる。

〔IV〕 絹糸粉末の trypsin 消化液から分離した各部分 tyrosine の含量

前の試験から絹糸粉末の trypsin 消化により充分消化させた残渣は、比較的結晶性の発達した部分が多いものと考えられるので、この中には tyrosine 等の分子の大きい amino 酸を含まない所謂結晶部分なるものも含まれている事を予想して、その残渣を alcohol にて数種に分別し、その各々について tyrosine 含量並に酵素に対する抵抗性を測定した。

tyrosine の定量には、蛋白質を alkali 加水分解し硫酸水銀及び亜硝酸にて MILLON 反応を行わしめる FOLIN

法を使用した。

7.8066g の絹糸粉末を glass-fiber に附着させ、前の子備試験に使用した酵素液の約1/2に低温濃縮した液70c.c. を加え pH 7.5, 37°C において12日間作用させ後 cellophane 紙を透析膜として、多量の蒸溜水で透析しながら更に消化作用をさせ、その間時々透析外液を取り換えて、低分子の透析可能な分解生成物を実験的には殆んど全部外液に移行させた。

全透析外液の減圧濃縮の結果生じた tyrosine の結晶は乾燥量 355.4 mg であつた。tyrosine 濾別後の残液からは更に蒸溜乾燥させることにより2.94g の固形物を得た。これは amino 態窒素を9.43%含み、加水分解後 paper chromatography により構成 amino 酸を定性した結果は、主として glycine と alanine からなる polypeptide であることが判つたが、Fig. 2 の如く尙僅かの tyrosine を含んでいた。

他方においては、消化残渣を次の如く各 fraction に

分別しその各々につき tyrosine 含量と酵素に対する抵抗性を測定した処、Fig. 2 並に Table 5 のような結果を得た。図中の数字は酵素のみの数値を差引いた値である。

Table. 5 Comparison of the Resistance of Each Fraction against Trypsin

Fraction	Substrate (mg)	Amino Nitrogen(mg)after	
		44hrs	91hrs
1	26.4	0.4122	0.4752
2	30.4	0.4172	0.4959
3	28.6	0.6764	0.9134
4	16.0	0.3856	0.4532
Enzyme only	—	0.4032	0.4085

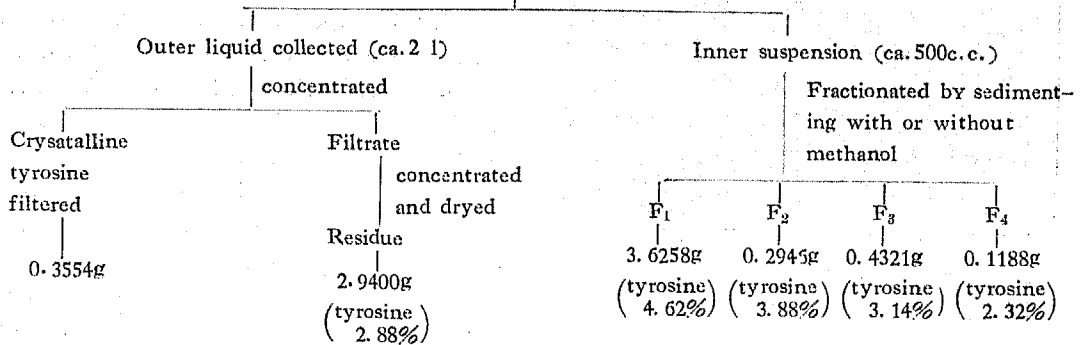
Note: Cleavability is measured under the same condition as in Table 3.

Fig. 2. Fractionation of Silk Fibroin Powder Digested by Trypsin

7.8066g of Silk Fibroin Powder

70c.c. of the enzyme solution added

Digestion are continued during 12 days at 37°C and at pH 7.5 in a cellophane sack against dist. water



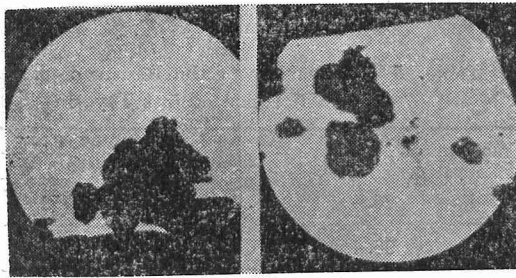
Fraction 1 (F₁) : The sediment formed after the digested silk fibroin, suspended in 500c.c. of water, has been kept in the room for 10 min.

Fraction 2 (F₂) : The sediment formed after the fibroin residue, removed from the fraction 1, has been kept in the room for further 2.5 hrs.

Fraction 3 (F₃) : The centrifuged sediment from the residual suspension of Fraction 2 after adding methanol up to 50%.

Fraction 4 (F₄) : The centrifuged sediment from that residue, after the removal of Fraction 3, which was concentrated and added with methanol up to 80%.

此等の沈澱物は methanol にて3回汎漉後乾燥させ、その重量を求め電子顕微鏡像及びX線干渉像を撮影した結果は Fig. 3 及び Fig. 4 のようである。



Silk Fibroin before Enzymic Attack.

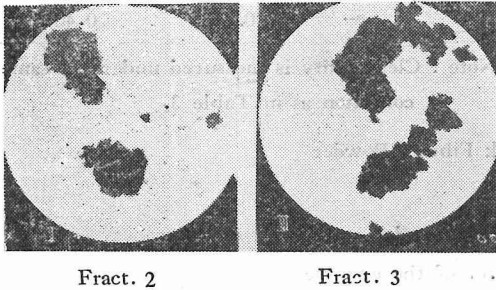
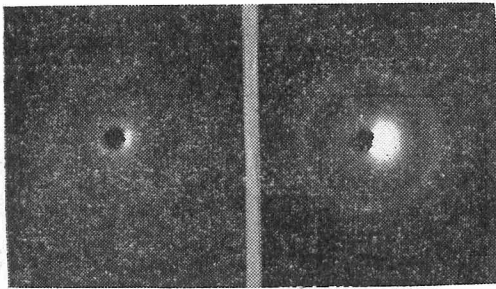


Fig. 3 Electron Micrograph of Each Fraction $\times 2400$



Silk Fibroin before Enzymic Attack. Fract. 3

Fig. 4 X-ray Diagram of Each Fraction

これらの結果を見ると、tyrosine 含量が僅かに2.32%の部分でも4.62%の部分でも酵素に対する抵抗性は殆んど同一で、何れも消化され難い部分であり、従つて相当結晶性の発達している部分と考えられるので、我々の実験においては tyrosine を含まない結晶領域を取り出すことは出来なかつた。またこれらの分割試料 (F₁~F₄) のX線干渉像からは、夫々 $R_1=4.31\text{\AA}$, $R_2=3.6$

1\AA なる値が得られ、これらは何れも fibroin の干渉点の A₃ 及び I₃ に相当しているものであつた。従つてX線像から見ればこれらの分別試料の間には特別な差異は認められない訳である。電子顕微鏡検査の結果においても、これらの試料は何れも同じような大きさ並に形状を示した。なおこれらの試料を塩酸にて加水分解し、paper chromatogram で検したところ、tyrosine の存在は極く僅かに認められる程度であつたが、glycine と alanine は比較的多く確認された。

考 察

酵素による消化試験から蛋白分子の構造を直接推論することは相当危険性のあることではあるが、然し我々の結果からは少くとも tyrosine の絹糸 fibroin 中の分布状態は推論出来ると思われる。即ち、結晶性の発達した所謂結晶領域と当然考えられる部分においても尙多少の tyrosine が含まれているものと考えられ、従つて少くとも MEYER 等の主張のような分子量の大きい amino 酸を含まないとは考えられない。このことはまた清水⁽¹⁰⁾の fibroin 塩酸処理実験の結果を支持しているものである。COLEMAN は trypsin 消化の結果 tyrosine を含まない結晶部分を得ているが、これに反し我々の現在の実験においては斯様な部分は得られなかつたが、然し trypsin 消化を更に充分行いもつと細い分別操作を繰返せば、或いは COLEMAN の得た様な部分も得られたかも知れない。然しながら COLEMAN の得た様な部分が仮令得られたとしても、それが MEYER 等の考えた結晶領域に相当するものとは思われぬ。何故ならば、我等の実験結果からは tyrosine が含まれていると考えられる所謂結晶領域なる部分からも、更にこれを分解すれば tyrosine を全く含まないような部分が取り出し得ることも推論出来るからである。

最後に本研究において、X線写真を撮影して載いた農林省蚕糸試験場清水正徳技官、その分析を御指導下さつた呉祐吉教授並に清水周氏、並に電子顕微鏡写真の撮影を煩わした本学部電子顕微鏡研究室に厚く感謝の意を表す。なお実験の際御助力下さつた市川能富子氏に深謝する。

総 括

塩酸処理の絹糸粉末に trypsin を作用させ、充分消化させた後 alcohol にて分別して各部分について tyrosine 含量を測定した結果、確かに結晶性部分と考えられる部分に尙少量の tyrosine が含まれていることが見出

された。このことから、絹糸 fibroin 中における所謂結晶領域と考えられる部分においても尙可成りの tyrosine が存在するものと推論される。

文 献

- (1) BERGMANN M. & C. NIEMAN : J. Biol. Chem., **123**, 577 (1937)
BERGMANN M. & C. NIEMAN : Chem. Rev., **22**, 423 (1938)
- (2) K. H. MEYER & H. MARK : Hochpolymere Chemie; **II**, 419 (1940)
- (3) SI. GOLDSCHMIDT u. STRASIS : Ann. **480**, 263 (1930)
- (4) 金子英雄 : 日農化, **13**, 215 (1937)
- (5) O. COLEMAN & F. O. HOWITT : Proc. Roy. Soc., A, **190**, 145 (1947)
- (6) S. G. SMITH & B. DRUCKER : Nature, **165**, 196 (1950)
- (7) 赤堀四郎, 佐竹一夫, 成田耕造 : 繊維科学研究所年報, **5**, 75 (1950)

- (8) 赤堀四郎, 成田耕造 : 繊維科学研究所年報, **6**, 54 (1952)
- (9) 奥正己, 小田直人 : 繊維学雑誌, **5**, 335 (1949)
- (10) 清水正徳 : 蚕糸品質向上理化学研究, 中間報告, **1**, 138 (1947)

Summary

After the silk fibroin powder treated previously with strong hydrochloric acid, had been exhaustively digested by pancreas trypsin, the residue was fractionated by alcohol into several parts and the tyrosine contents of them were determined. A small quantity of tyrosine was found even in a few fractions which is clearly considered to be crystalline. Hence it may be concluded that a appreciable quantity of tyrosine exists in the so-called crystalline part of the silk fibroin micells.

(Chemical Laboratory, Faculty of Textile and Sericulture, Shinshu University)