

セリシタンパク質誘導体の合成と応用に関する研究

浅井 紀夫*
 浜岡 容子*
 山崎 正夫**

種々の試薬を用いてセリシタンパク質誘導体を合成した。特に相間移動触媒を用いた新しい合成方法も試みた。更に合成した誘導体を用いてマイクロカプセルへの応用を検討した。その結果、酵素固定化担体としてセリシタンパク質誘導体は有望であることが判った。

1 はじめに

現在精練廃液として処分されているセリシタンパク質は親水性に富んではいるものの、その化学構造はフィブロインタンパク質と大差がない。フィブロインタンパク質は有用な天然素材として種々の応用が試みられているがその分離には濃厚中性塩に溶解した上に透析をしなければならず、またこの水溶液は不安定であるためフィブロインタンパク質を用いた開発の成功例は極めて少ない。一方、セリシタンパク質は水に若干溶解するものの有機溶媒には不溶であり、またこのタンパク質の入手が困難であることからフィブロインタンパク質以上に研究の例は少ない。しかし、フィブロインタンパク質に比べて分子同士の会合する力が小さく、その分子量も小さいため扱いやすいタンパク質であると考えられる。

そこで、セリシタンパク質を水に不溶化、有機溶媒に可溶化させるため、種々の試薬で処理しその誘導体を合成した。更にこれを用いたマイクロカプセル等の応用についても検討した。

2 実験方法

2.1 材料 セリシタンパク質は生糸をエタノール及び石油エーテルでそれぞれ8時間ソックスレー抽出し油分を除去した後、高圧鍋中、約110℃で60分間水のみで精練し、この精練水を凍結乾燥することにより粉末として得た。

2.2 試薬 パルミトイルクロライド、カプリルクロライド、ベンゾイルクロライド、トリブチルシリルクロライド、アセチルクロライド、アジポニトリル、エチレンジアミン、イソシアン酸ジトリレン、2,4-ジイソシアン酸トリレン、エチレングリコール、ピリジン、無水酢酸—和光純薬(株)特級試薬をそのまま用いた。市販樹脂としてエラストロ

ンF29、エラストロンC52、エラストロンF9(第一工業製薬)を用いた。酵素はグルコキシオキシターゼ、グルタミンサンデカルボキシラーゼ(和光)をそのまま用いた。染料はカヤノールミーリングレッドを用いた。オクチルブロマイド、テトラ-n-ブチルアンモニウムブロミド(TBAB)、NaOHも和光特級試薬をそのまま用いた。

2.3 溶媒 クロロホルム、ジメチルスルホキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)は和光純薬(株)特級試薬をそのまま用いた。

2.4 装置 紫外可視分光光度計はUV2200(島津製作所)を用いた。

二酸化炭素電極はバイオット(株)製を用いた。セリシタン酵素膜はセンサーの前面にシリコン栓をくりぬき、ここへ透析膜を固定して作製した。

2.5 方法

I) 合成実験は、セリシン粉末2gを四つ口フラスコへ入れ、窒素でパージしながら105℃で1時間乾燥し、その後、試薬0.2Mあるいは試薬0.2Mを含むクロロホルム溶媒を静かに滴下した。これを所定温度、所定時間反応させた。その後、化合物をろ過し、水、アセトンで注意しながら洗浄した。

II) 市販の樹脂との反応は20%樹脂水溶液中へセリシン粉末を溶解し、そのまま反応させた。その後I)と同様に処理した。

III) ナイロンとの共重合はセリシン粉末2gを100ccの0.2Mアジピン酸水溶液中に溶解し、これを0.2Mのアジポニトリルを含むクロロホルム上へ静かに滴下した。この界面をピンセットで引き紡糸を行なった。

IV) イソシアナートとの反応はセリシン粉末2gを0.2Mのエチレングリコール中で熱処理し、ここへイソシア

* 技術課技師

** 技術課主任研究員

ートを滴下し激しく攪拌させた。

V) 相間移動触媒反応はNaOHを25g、TBABを2.5g、セリシシ粉末2.5gを水25ccに溶解し、これにオクチルブロマイド25gを加え80℃で反応させた。

VI) 溶解試験はエマルジョン形成の可能性もあるため、目視判定を行った。

VII) マイクロカプセルはセリシシタンパク質コロイド水溶液中へ染料あるいは酵素を溶解し、これを凍結乾燥した後、試薬と反応させて作製した。

VIII) グルコースオキシターゼの活性はグルコース水溶液中へ酵素を溶解し、発生する過酸化水素を半量のフェノールでトラップし、これをパーオキシドを用いてキノ

ンイミンダイに変換し500nmにおける可視スペクトルを測定した。酵素単位^{*}は以下の計算式に従って算出した。

$$\text{酵素単位} = (\text{OD値 (サンプルの値} - \text{ブランクの値)}) \times 3.26 \times 1000 \times 2 \times 1000) \div (12.0 \times 1000 \times \text{反応時間})$$

3 結果と考察

3.1 セリシシタンパク質誘導体

表1のスキームで示されるa-hまでのセリシシタンパク質誘導体の有機溶媒への溶解度及び性状は表2のとおりである。

表1 セリシシタンパク質誘導体合成スキーム

セリシシタンパク質+パルミトイルクロライド	室温 1 hour クロロホルム	a
セリシシタンパク質+パルミトイルクロライド	室温 2 hour クロロホルム	b
セリシシタンパク質+パルミトイルクロライド	60℃ 1 hour クロロホルム	c
セリシシタンパク質+パルミトイルクロライド	60℃ 3 hour クロロホルム	d
セリシシタンパク質+パルミトイルクロライド	80℃ 3 hour NEAT	e
セリシシタンパク質+パルミトイルクロライド	80℃ 6 hour NEAT	f
セリシシタンパク質+カプロイルクロライド	室温 1 hour NEAT	g
セリシシタンパク質+カプロイルクロライド	室温 3 hour NEAT	h
セリシシタンパク質+ベンゾイルクロライド	60℃ 3 hour クロロホルム	反応せず
セリシシタンパク質+アセチルクロライド	室温 3 hour クロロホルム	i
セリシシタンパク質+イソシアン酸ジトリレン	室温 3 hour クロロホルム	j
セリシシタンパク質+無水酢酸	室温 3 hour NEAT	k
セリシシタンパク質+ピリジン	室温 6 hour NEAT	l
セリシシタンパク質+トシルクロライド	室温 6 hour NEAT	m
セリシシタンパク質+エラストロンF9、F29、C52	室温 1 hour	n, o, p
セリシシタンパク質+アジポニトリル+エチレンジアミン	界面重合 クロロホルム	q
セリシシタンパク質+エチレングリコール+2、4-ジイソシアン酸トリレン	室温	r

* D-グルコースを基質として、25℃において1分間に1μmolのD-グルノーσ-ラク톤を生成する酵素量を1単位とする。

表2 セリシタンパク質誘導体の性質

誘導体No	溶解性及び性状
a	水、クロロホルム、THFに可溶
b	水、クロロホルム、THFに可溶
c	水、クロロホルム、THFに可溶
d	水に難溶、クロロホルム、THF、DMSOに可溶
e	水に不溶、クロロホルム、THF、DMSOに可溶
f	セリン残基が消失(NMR)
g	粘性な粉末、水のみ可溶
h	粘性な粉末、水のみ可溶
i	水に難溶、溶媒にも不溶
j	水に不溶、溶媒にも不溶
k	水に微量溶解
l	水に難溶、溶媒にも不溶
m	水に難溶、溶媒にも不溶
n, o, p	すべて水に不溶
q	ナイロンより脆い、繊維状あるいは粉末
r	強靱なプラスチック状

セリシタンパク質は酸クロライドとは容易に反応した。特に長鎖の脂肪族系の誘導体はTHF等の溶媒に溶けるため化学処理による応用の可能性が期待できる。溶媒を用いず長期間反応させるとNMRでもセリン残基の消失が確認できた。溶媒のない条件の方が反応が促進されると判断できる。アセチル化反応は容易に起こることが判ったが、生成物が不安定なため誘導体を単離することなく次の反応に用いることが必要である。市販の樹脂との反応もスムーズに起こり、水に不溶の化合物が得られた。6, 6-ナイロンとの共重合も容易で、ナイロン繊維より脆いプラスチックが得られた。また逆にイソシアナートとエチレングリコールを共重合させると強靱なプラスチックが得られた。これらは天然-合成繊維として注目に値する。

3.2 相間移動触媒を用いた合成

著者らは繊維内の反応モデルとして相間移動触媒を用いる方法を開発してきた。セリシン粉末は見かけ上、繊維質ではないがれっきとした繊維タンパク質である。そこで相間移動触媒としてTBAB(テトラ-n-ブチルアンモニウムブロマイド)を用い、セリシンとオクチルブロマイドとの反応を試みた。75分間反応させると液は3層に分離した。上層：中層：下層の体積比は1:15:17であった。それぞれの層をガスクロマトグラフィーで分析し、セリシタンパク質の分配率を算出した結果

は、表3のとおりである。水溶液中に仕込んだセリシタンパク質の約半量が有機層へ移動した。しかもその大半は体積比の少ない上層へ分配した。上層はうす黄色の透明溶液でありセリシタンパク質がオクチルブロマイド溶媒中へ懸濁している可能性は極めて少ないと推察でき、セリシタンパク質のオクチルブロマイド誘導体が形成したと推定した。

表3 セリシタンパク質の分配率(%)

上層	45
中層	5
下層	50

3.3 セリシタンパク質誘導体のマイクロカプセルへの応用

セリシタンパク質誘導体の有効利用としてマイクロカプセルへの応用が期待される。そこで、もっとも簡単に得られるパルミトイルクロライドとの誘導体(室温3hour反応)を用いて染料をマイクロカプセル内へ閉じ込めた後、カプセルを水中へ分散させ、水中へ溶解した染料の紫外スペクトルを測定することによりカプセルの閉じ込め効果を検討した。比較のためマイクロカプセルを超音波で破壊した値を測定し、これを100%とした結果は、図1のとおりである。

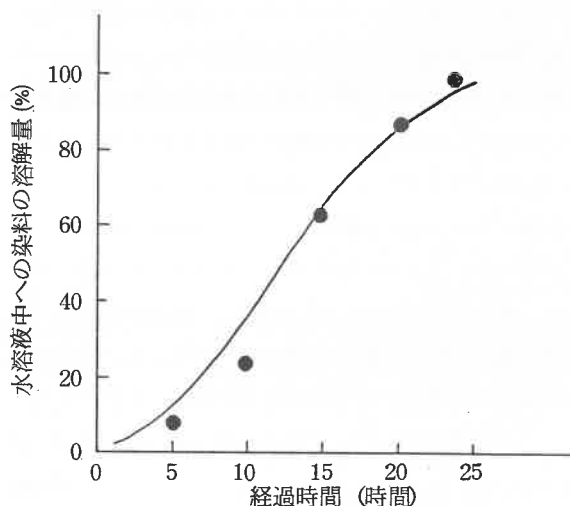


図1 マイクロカプセルの閉じ込め効果

染料分子は徐々に溶解し約24時間後にマイクロカプセル中の染料は完全に水溶液中へ溶解した。天然タンパク質であるセリシタンパク質は生体への適合性が期待でき、酵素固定化等の生化学分野への応用が考えられる。そこで一般的な酵素であるグルコースオキシターゼをマイクロカプセル中に閉じ込めることが可能かどうかを検討

した。グルコースオキシターゼはグルコースを分解し、過酸化水素を生成する。これを定量することにより酵素活性度を酵素単位で求めることが可能である。グルコースオキシターゼを前方法でマイクロカプセル化し、水及びアセトンで十分に洗浄した後、超音波でマイクロカプセルを破壊し、グルコースに作用させ、グルコースオキシターゼの活性を調べた結果は、表4のとおりである。

表4. 酵素活性度(単位)

そのまま	128
パルミトイル クロライド誘導体	88
エラストロンF9 誘導体	0
エラストロンC52 誘導体	0

酸クロライドを用いるとほぼ完全に酵素をマイクロカプセル内に取り込めた。一方、手軽に合成できるエラストロン誘導体を用いると水溶液は酵素活性を全く示さなかった。カプセルの洗浄に用いたアセトンや水からも酵素活性が全く認められなかったことから、エラストロン樹脂を構成しているウレタンが触媒毒となり酵素が失活したものと推測でき、酵素は親水性の環境下においてその活性度を長く保持する。セリシンのマイクロカプセル内は非常に親水性に富んでいると推測される。¹⁾従ってセリシンのマイクロカプセルが酵素の保持担体として応用できるのではないかと予想できる。グルコースオキシターゼは寿命も長く様々な固定化方法が開発されているが、L-グルタミン酸を分解する酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼは非常に不安定であり、これを用いたセンサーを製作することは困難であった。そこでセリシタンパク質のマイクロカプセルに閉じ込めたセンサーを図2のように作製し、裸の酵素を用いた場合と酵素活性を比較した結果は、図3のとおりである。裸の酵素は3日足らずでは完全に失活したが、セリシタンパク質で包みこんだ酵素は約半量の活性度が保持されていた。包み込む方法を工夫することにより更に酵素の寿命を長らえさせることが可能であると推測される。

4 おわりに

セリシタンパク質と種々の試薬との反応を試みその誘導体を導いた。更にこれを用いてマイクロカプセルの応用を試みた。その結果、酵素等の固定化に利用できることが判った。前述したようにセリシタンパク質は繊維タンパク質である。著者らはハイパーシルク技術を開

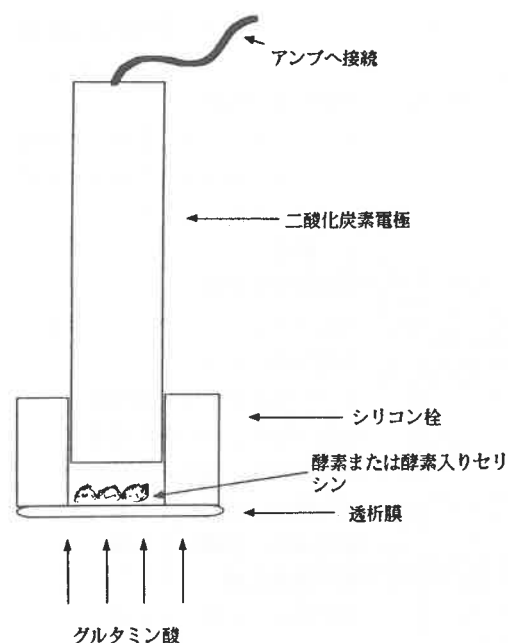


図2 グルタミン酸デカルボキシラーゼセンサー

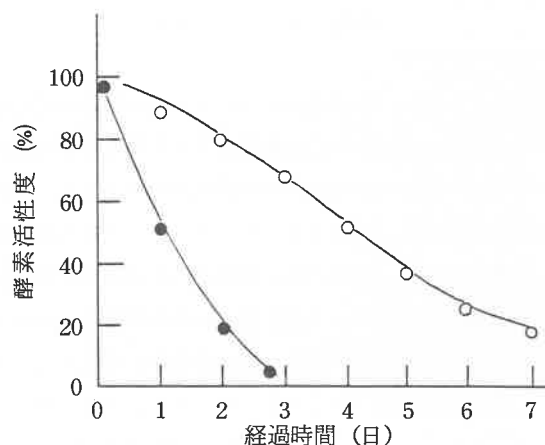


図3 グルタミン酸デカルボキシラーゼの酵素活性度

- セリシン保護された酵素
- 酵素単独

発すると同時にフィブリンにおける様々な知見を得、相間移動触媒や非プロトン性溶媒を用いた特殊な理論を確立してきた。²⁾これらをセリシタンパク質の有効利用への新しいアプローチとしていきたい。本研究を行うにあたり適切なご指導をいただきました京都工芸繊維大学林良之教授、東京家政大学村上和雄助教授、京都府中小企業センター早川潔氏に深く感謝いたします。

文献

- 1) 早川, 浅井 未発表
- 2) 浅井ほか: 京都府繊維物指導所研究報告 22 ~ 27