

## セリシンの分子量分布の測定について

技師 岡 川 逸 郎

## 1 はじめに

セリシンは生糸の20%強を構成する天然蛋白質である。蛋白質の各種の性質・構造に関する研究は、最近の生化学・医学の領域のめざましい研究開発によって、急速な進展を遂げ、その中でも分子量・分子形態の測定・分析に関しては、電気泳動を利用する方法、ゲルろ過、超遠心法など多岐にわたりその理論的解明が試みられ着々と成果があがっている。

蛋白質は、一般に生体活動によって形成される物質で、他の高分子物質に比較すると、非常に複雑な構造と多様な性質をもっており、生糸を構成するセリシンの分子量分布の測定についても、その測定方法・計算方法によって得られた分子量の値にして、数万ないし数十万という大きな開きがあり、真のセリシン分子量分布については未だ解明されていないのが現状であろうと考えられる。

本稿では、上記のゲルろ過法のうちでも、比較的・能率的なGPCによる分子量分布の測定を試み、興味ある結果が得られたので以下に報告する。

## 2 実験の目的

GPC(ゲルパーミエーションクロマトグラフィー)において、最も重要なことは、分子量較正曲線の作製である。そのためには、可能な限り分布範囲の狭い標準物質を多種にわたって必要とする。GPCに関する理論的解明は、ポリスチレンによってかなり詳しく報告されているがポリスチレンの場合は、これが典型的な合成高分子であり、単分散型の精度の高い標準物質を入手しやすいという利点がある。その点、蛋白質の場合は非常に困難であり、もし適当な標準物質が得られても測定しようとするセリシン蛋白質とは、性質・構造が大きく異っている場合が多い。

また、分子形態においても、蛋白質によって多種・多様であり、目的とするセリシン蛋白質は、GPC分析対象の理想である球形からかなり外れて、むしろ線状に近いと言われている。

更に、蛋白質の末端基がもっているイオン性、等電点など、これらの諸条件を克服し、セリシン蛋白質の分子量分布の測定法の確立のための知見を得ることを目的として実験をすすめた。

## 3 実験の方法

### 3-1 GPC分画条件

Column : Waters Protein 1-125

Solvent : 尿素 4 mol, リン酸 1 ナトリウム, リン酸 2 ナトリウムそれぞれ 0.05 mol.  
を蒸留水に溶かして 1 ℓ とする。

Flow : 2.0 ml/min

Pressure: 2,000 psi

Detector: UV 280 nm

### 3-2 校正曲線作製用標準試料

クロマトグラフィー用 Calibration proteins (Boehringer)

Cytochrome C (12,500), Chymotrypsinogen A (25,000)

Albumin (68,000), Aldolase (158,000), Ferritin (450,000)

試薬特級 L-Tyrosine (181)

### 3-3 測定用試料

セリシン蛋白質

日 134 号 × 支 135 号, 昭和 55 年春蚕の繭 (蚕糸試験場関西支場産) を石油エーテルにて 8 時間脱脂し、蒸留水、珪酸ソーダ 16°Bé 5 ml/ℓ で所定の時間 125°C でセリシン抽出し、尿素を加えて 4 mol soln. とし、45 μ のメンブランフィルターでろ過し、GPC 分画用試料とした。

### 3-4 データ解析

Waters Data Module によった。

## 4 実験結果と考察

### 4-1 実験条件に関する検討結果

測定用カラムについては、蛋白質分析用として国産品が数種類市販されているが、本実験では Waters 社製 Protein 1-125 を用いた。充填剤は、シリカゲルにイオン化のためのコーティングを施したものであるという以外は企業秘密である。標準使用法は、リン酸緩衝液 PH 7.2 を Solvent とするもので、PH 2~8 の範囲を適用範囲と定めている。セリシンは、水溶液の状態では非常に不安で、そのまま放置すると、ゲル化を起したり、数個の分子が会合したり、あるいは加水分解が進行すると言われている。従って、一般に電気泳動などで扱う場合は変成剤である尿素の濃厚溶液 (6 mol~8 mol) としている。しかも、セリシン分子は、ある程度線上に

近い形態をもっているため、流体力学的実効体積を論じる場合、変性剤水溶液中における規則性の低い球状に近い状態で取り扱われるのが常である。Tanford のグループが提唱した尿素水溶液中での  $[\eta] \cdot M$  とポリペプチド鎖の重合度  $n$  との間における  $[\eta] \cdot M = 76 \cdot n^{1.66}$  (8 mol 尿素溶液) という関係式によって分子量と実効体積とが関連づけられ、尿素中におけるゾルゲ過によって分子量の推定が可能であるという原理が確立されている。従って GPC においても移動層 Solvent 中に尿素の添加が必要とされる。

また、セリシンの等電点は 4.0 近であり、その電氣的性質を考慮する場合、カラム内の充填剤のイオン化との関連化にリン酸緩衝液による PH 調整も必要となる。これらの条件を検討するため、尿素添加量、緩衝剤による PH 調整を予備的にチェックして、最も再現性の良い移動層条件を上記のように定めたものである。

PH が低い場合は、ピークに鋭さが欠ける。また尿素を加えない場合は、分子の会合にもとづくと思われる再現性の悪さが目立つ。また、尿素量は、流路系における取扱いもさることながらりん酸塩の溶解度をも考慮して 4 mol 程度にとどめた。

## 4-2 分子量較正曲線の作製

現在、最も信頼性が高いといわれているクロマトグラフ用蛋白質(ペリンガー社製)を標準試料として、上記の分画条件でクロマト展開し保持時間  $R_T$  と、分子量  $MW$  の値を表 1 に得た。

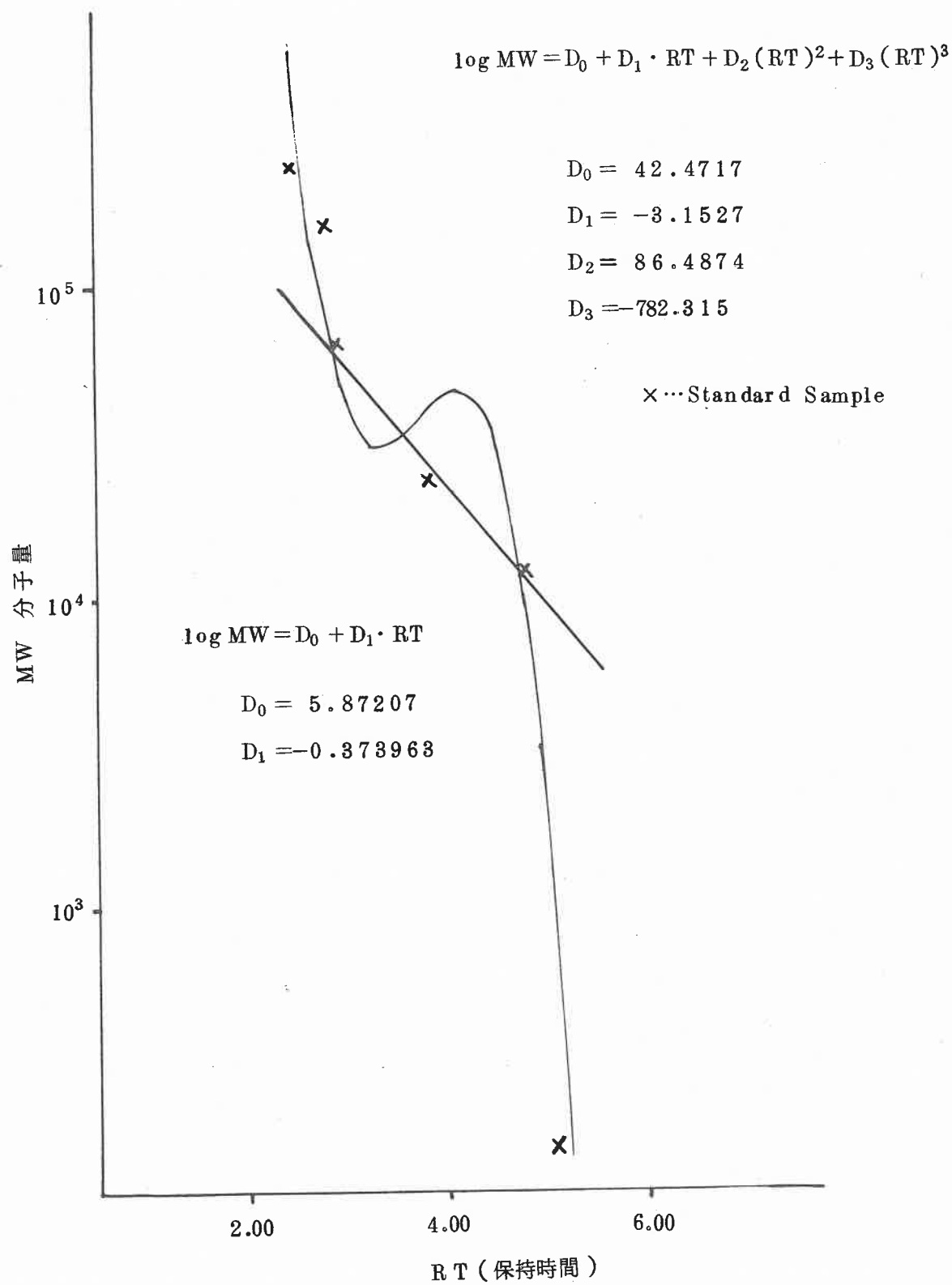
表 1 標準蛋白質試料の保持時間

|                   | $R_T$ | $MW$    |
|-------------------|-------|---------|
| Ferritin          | 2.40  | 450,000 |
| Aldolase          | 2.70  | 158,000 |
| Albumin           | 2.85  | 68,000  |
| ChymotrypsinogenA | 3.81  | 25,000  |
| Cytochrom C       | 4.82  | 12,500  |
| Tyrosine          | 5.20  | 181     |

表 1 に示す 6 点をプロットし、三次関数近似したものと、測定に多様する中央の 3 点の一次関数近似したものを図 1 に示した。

GPC 分画は、分子ふるいにもとづく分子量推定法のひとつで、分子量の対数は、保持時間の一次式、あるいは三次式で近似される場合が多い。

図1 三次関数近似と一次関数近似

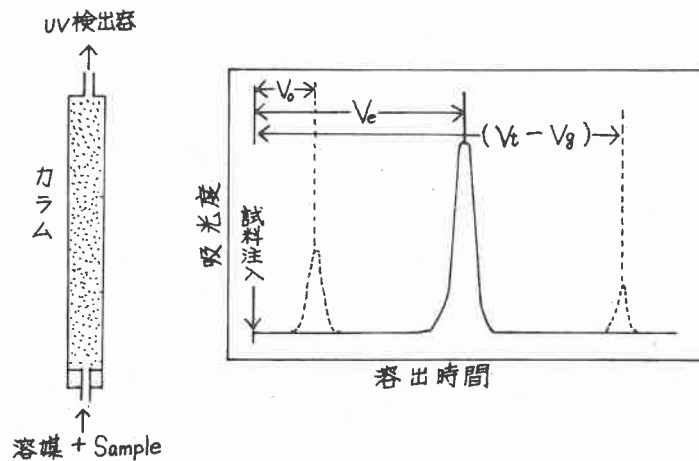


$$\log MW = D_0 + D_1 \cdot RT \quad \text{----- (1)}$$

$$\log MW = D_0 + D_1 \cdot RT + D_2 \cdot (RT)^2 + D_3 \cdot (RT)^3 \quad \text{----- (2)}$$

ある大きさをもつ溶質が注入されピークが現われるまでの溶出液の体積  $V_e$  が  $RT$  に対応する。一般には充填剤の種類によって異なるが、一定限界以上の大きさをもつ溶質は一定の溶質容積  $V_0$  ですみやかに溶出してくる。また他方、充分小さい溶質は、カラム内で溶媒が占め得る全容積に等しい溶出容積、この値はカラムの全容積  $V_t$  と、その中で充填剤ゲルの実質体積  $V_g$  との差に等しい、すなわち  $V_t - V_g$  である。(図2参照) 従って、ある大きさをもつ分子の保持時間

図2. GPCカラムとクロマトグラム



$RT$  は、 $V_0 < V_e (V_t - V_g)$  で示される  $V_e$  に関連づけられる。

図1のように、一次関数近似の場合は、分子量の中程度のものの近似には好都合であるが、分子量の大きいものと小さいものの近似には不適である。逆に三次関数による近似の場合は、分子量の大きいものと小さいものの近似には好都合だが、中程度のものには不適である。

表1に示す6種の標準試料では、試料数が少なすぎるため、十分な近似ができない。

セリシン蛋白のように分子量分布が広範囲にわたるものを試料とする場合は、分子量広範囲にわたる適切な近似を行い、校正曲線を作製する必要がある。蛋白質の標準試料は、あまり多くを望めない。従って、(1), (2)の両近似式を複合し、GPC展開の原理に合った近似を試みた。ここで注意しなければならないのは、上記6種の蛋白質標準試料の三次曲線近似で中位の分子量をもつ蛋白質の保持時間が理論的には必ず右下りにならねばいけないにもかかわらず、グラフで逆転しているところがあることである。これを是正し、適正な校正曲線を得るため、分子量大の部分グラフの左側と小の部分、グラフの右側では、三次曲線から得られる  $RT$  と  $MW$  の値を、そして分子量中程度、グラフの中央では、一次関数から得られる  $RT$  と  $MW$  の値を拾ってそれらの値から三次曲線を作製する。

|                      | R T  | MW      |
|----------------------|------|---------|
| 三次近似式からの値            | 2.42 | 584,800 |
| 分子量 <sup>大</sup> の部分 | 2.62 | 147,800 |
|                      | 2.82 | 63,600  |
|                      | 2.52 | 267,400 |
|                      | 2.72 | 91,630  |
| 三次近似式からの値            | 4.86 | 5,349   |
| 分子量 <sup>小</sup> の部分 | 5.06 | 1,076   |
|                      | 5.26 | 120     |
|                      | 4.91 | 3,763   |
|                      | 5.11 | 6,590   |
| 一次近似式からの値            | 2.85 | 64,010  |
| 分子量 <sup>中</sup> の部分 | 3.05 | 53,880  |
|                      | 3.25 | 45,360  |
|                      | 3.45 | 38,180  |
|                      | 3.65 | 32,140  |
|                      | 3.85 | 27,050  |
|                      | 4.05 | 22,770  |
|                      | 4.25 | 19,170  |
|                      | 4.45 | 16,140  |
|                      | 4.65 | 13,580  |

得られた三次曲線  $\log MW = D_0 + D_1 \cdot RT + D_2 \cdot (RT)^2 + D_3 \cdot (RT)^3$

$D_0$       35.3911256

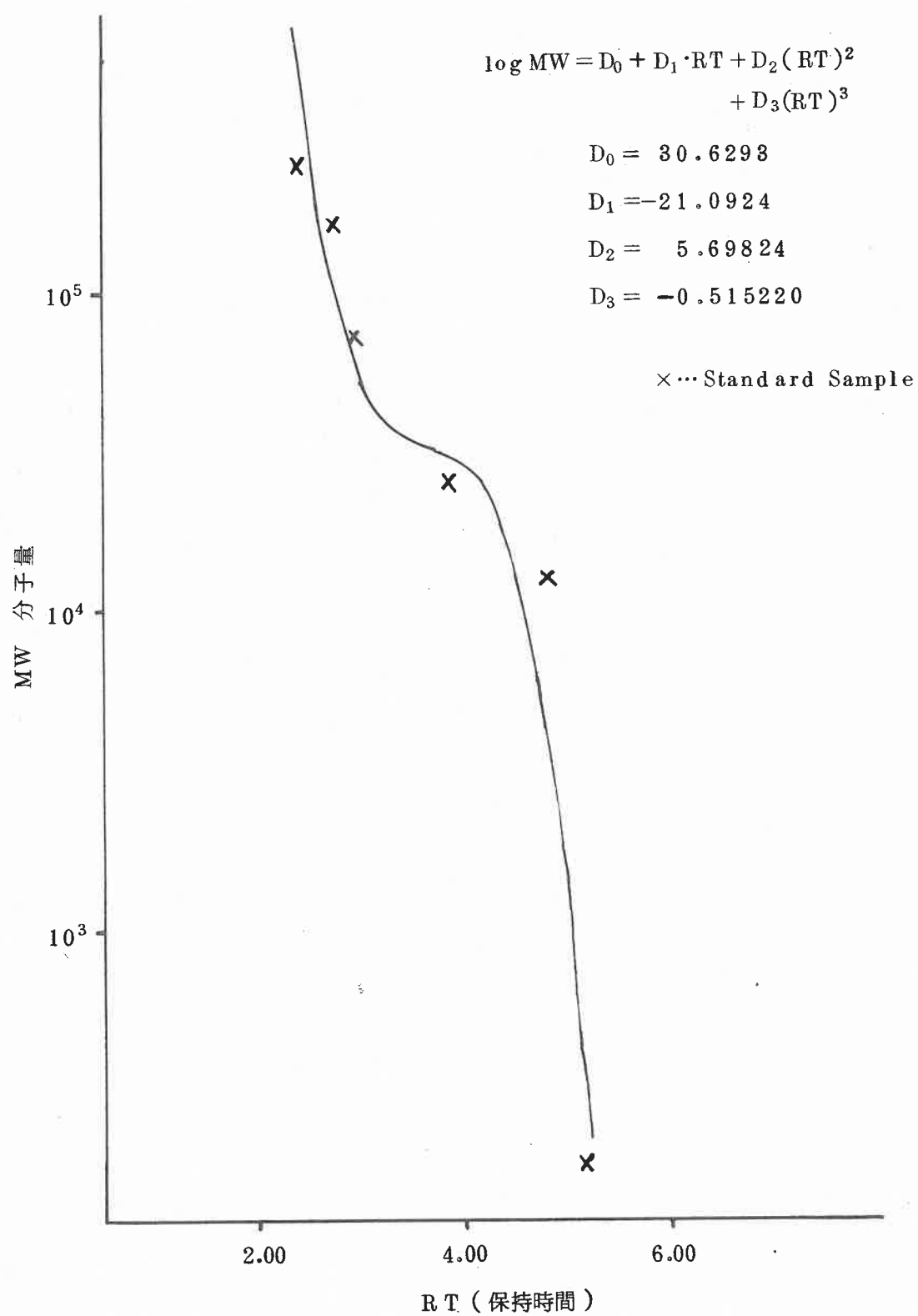
$D_1$       - 25.1956265

$D_2$       6.8347661

$D_3$       - 0.6166514

得られた三次曲線と、図1の一次式との間で同様の操作をくり返す。これを3回くり返して得られた較正曲線を図3に示す。得られた較正曲線によってセリシン蛋白質の分子量分布を評価した。

図3 校正曲線



### 4-3 セリシン蛋白質の分子量分布の測定

上記の条件でサンプルを調整し、各種溶解条件下におけるセリシン蛋白質の分子量分画を行い、分子量分布曲線、数平均分子量  $M_n$ 、重量平均分子量  $M_w$ 、Z 平均分子量、分散度  $d$  を算出した。

算出は、Waters 社の Data modul にて、上記校正曲線を用いて行った。(次頁参照)

最大分子量をもつ標準蛋白質である Ferritin の R T 付近の 2.30 から、最小分子量をもつ標準蛋白質 Tyrosin の R T 付近の 5.30 までの間で 30 等分、スライス幅 0.10 として分画したものである。

表 2

|            | $M_n$   | $M_w$   | Z-M     | $d$     |
|------------|---------|---------|---------|---------|
| 蒸留水で 5分抽出  | 116,894 | 227,250 | 377,655 | 1.94406 |
| 〃 20分 〃    | 70,525  | 183,285 | 402,770 | 2.59883 |
| 〃 60分 〃    | 54,332  | 142,305 | 441,162 | 2.61916 |
| 〃 120分 〃   | 7,871   | 62,936  | 286,682 | 7.99593 |
| 珪酸ソーダで5分 〃 | 57,668  | 145,405 | 383,885 | 2.52141 |
| 〃 20分 〃    | 5,195   | 84,424  | 412,163 | 16.2487 |
| 〃 60分 〃    | 3,984   | 38,656  | 200,113 | 9.70254 |
| 〃 120分 〃   | 2,410   | 30,492  | 141,219 | 12.6524 |

ただし、

$$M_n = \sum M_p X_p = \frac{\sum M_p N_p}{\sum N_p} \quad \text{数平均分子量}$$

$$M_w = \sum M_p w_p = \frac{\sum M_p^2 N_p}{\sum M_p N_p} \quad \text{重量平均分子量}$$

$$M_z = \frac{\sum M_p^3 N_p}{\sum M_p^2 N_p} = \frac{\sum M_p^2 w_p}{\sum M_p w_p} \quad \text{Z 平均分子量}$$

重合度  $P$  の分子種の分子量を  $M_p$ 、分子数を  $N_p$ 、その分子種のモル分率  $X_p$ 、重量分率  $w_p$  とする。

$$d = \frac{M_w}{M_n} \quad \text{多分散度}$$

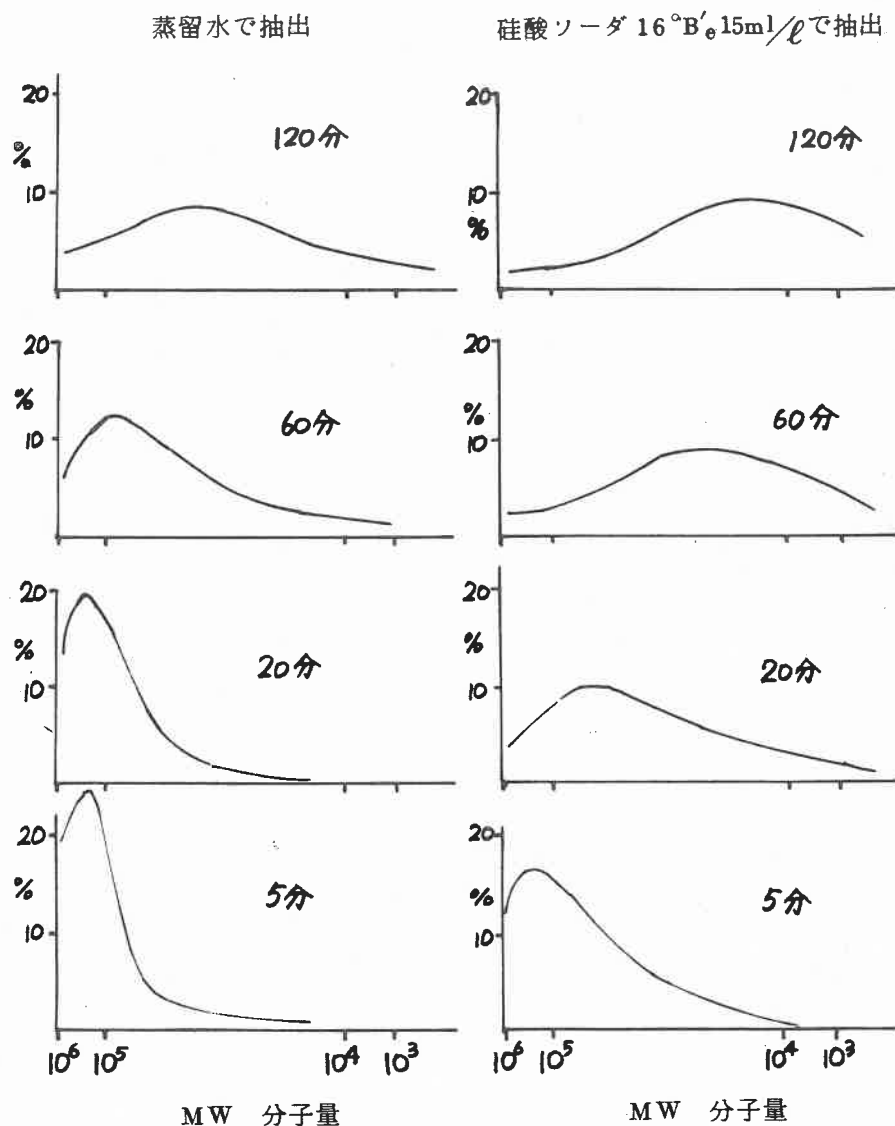
繭層セリシンを水のみで溶解するときは、125℃で20分程度であれば、分子量に大きな違いはないが、60分、120分と抽出を続けると徐々に分解が進み、分子量にして数万程度のものが増えると思われる。一方、実際の絹精練のようにアルカリを用いてセリシンを溶解するときははじめの数分で溶解と同時に分解が始まり、20分以後では、すでに分子量にして数万程度のもの

のが多くなる。

また上記の結果から、繭層セリシンの分子量は、数十万と推定される。

更に分子量の分布の目安であるdの値(多分散度)を見ると、蒸留水のみで抽出したものも、アルカリを添加したものも、抽出時間が長くなるほど、大きな値となり、繭層を形成しているときのセリシン分子がだんだん加水分解され、低分子量のものが多くなっていることが推定される。繭層におけるセリシンの多分散度は、2.0以下と考えられ、一般の蛋白質の多分散度と大差ないと思われる。

図4 分子量分布曲線 (Slice width 0.10)



## 5 総 括

本稿では、高速液体クロマトグラフィーによる分子量分画法で、セリシン蛋白質の各種水溶液中での分子量分布を測定し、繭層セリシンの分子量の推定を行ったところ、繭層セリシンの分子量は数十万程度であり、これを水またはアルカリで溶解すると、分解がすすみ、一般に水溶液として存在しているときは、分子量は数万程度の場合が多いことが判明した。

また、GPC展開においては、変成剤である尿素 4 mol とし、りん酸緩衝剤によって PH7.04 に調整した溶液を移動層溶媒とし、そのような環境中ではセリシン分子は、理想的な球形であるという仮定のもとに論じたものである。なお、本研究をすすめるにあたり終始御指導を賜った京都工芸繊維大学の武内民男先生に深く謝意を表します。

### 【参考文献】

生化学実験講座 1, タンパク質の化学 (日本生化学会編)

蛋白分離システム (日本ウオーターズリミテッド)

ゲルパーミエーションクロマトグラフィー 森, 武内著 (丸善)

絹糸の構造 信州大学千曲会出版部