

# セリシタンパク質の熱特性について

浅田 聡\*\*  
浜岡 容\*\*\*  
小山 林\*\*  
山崎 正\*\*\*\*

セリシタンパク質の熱特性（凍結乾燥法及び噴霧乾燥法）について検討したところ、

- 1) セリシタンパク質の保存条件によりセリシタンパク質の熱特性が異なる。
  - 2) 水分によりセリシタンパク質の熱特性が影響される。
- ことがわかった。

## 1 はじめに

シルクセリシを絹精練排液から分離回収し易くする方法として、水のみによる絹の高温精練法（無薬剤精練法）が考えられる。

更に得られたセリシン抽出液（溶液）からセリシを単離する方法として、凍結乾燥法及び噴霧乾燥法が効果的である。

そしてこの方法により得られたセリシタンパク質の熱的性質を調べることは、セリシタンパク質の有効利用法及び保存方法を検討する上で重要である。そこで、凍結乾燥法及び噴霧乾燥法により得られたセリシタンパク質を熱分析することにより、その熱的特性について検討した。またセリシン抽出液（溶液）の長期保存方法としてエタノールの添加が効果的であるが、このエタノール添加セリシンについても検討を加えた。また精練温度の違いによるセリシタンパク質についても検討を行った。

## 2 方 法

### 2. 1 試 料

- (1) 凍結乾燥セリシン：生糸（平均繊度30.39D日本産繭）をn-ヘキサンで8時間ソックスレー抽出し油分を除去した後、耐熱びんに浴比が1：50となるように生糸と蒸留水を入れ、高圧蒸気処理装置（日阪製作所製）中で120℃、60分間処理してセリシを抽出した。この抽出液をクールパイプ（EYELA東京理化工機製）で凍結させた後、凍結乾燥機（EYELA東京理化工機製）で約3日間乾燥させ試料を得た。

またセリシン抽出液に濃度が2, 10<sup>-1</sup>%となるようにエタノールを加え、以下同様にしてエタノール添加セリシを得た。

- (2) 噴霧乾燥セリシン：セリシン抽出液を噴霧乾燥機（EYELA東京理化工機製、温度約120℃、流速100

ml/h）で乾燥させ、試料を得た。またセリシン抽出液に濃度が2, 10<sup>-1</sup>%となるようにエタノールを加え、以下同様にしてエタノール添加セリシを得た。

- (3) 精練温度変化セリシン：高圧蒸気処理装置中の温度を100、105、110、115、125、130、140℃として精練したセリシン抽出液をそれぞれ凍結乾燥し、試料を得た。

### 2. 2 試 薬

n-ヘキサン、エタノールは、いずれも片山化学工業製試薬特級をそのまま用いた。

### 2. 3 測定装置

示差走査熱量計（熱分析装置）として、セイコー電子工業製DSC6100を用いた。

### 2. 4 測定方法

アロジン処理済アルミ製簡易密封容器に試料を3.5mg入れ、基準物質としてアルミ板5mgを用い、昇温速度2℃/minで示差走査熱量（DSC）を測定した。

## 3 結果と考察

### 3. 1 タンパク質の一般的性質

タンパク質はその立体的な形状から、ケラチンやコラーゲンなどの繊維状タンパク質と、それ以外の球状タンパク質に分類され、セリシタンパク質は前者に属する。タンパク質分子はそれぞれ固有の立体構造をとっており、その立体構造がそれぞれの機能にとって必要不可欠なものである。タンパク質分子は生物細胞の主要な構成成分であり、その立体構造は細胞内の生理的条件下で維持されている（天然状態）。しかし、極端な温度やpH、あるいは高濃度の変性剤の存在下などの環境下におかれると、その固有の立体構造は破壊される。このような現象は変性と呼ばれている。示差走査熱量計によるDSCの測定では、このようなタンパク質の変性過程を測定すること

\* 平成8年度技術開発研究費補助事業の一部である。  
\*\* 技術課 技師  
\*\*\* 技術課 主査  
\*\*\*\* 技術課 主任研究員

ができる。

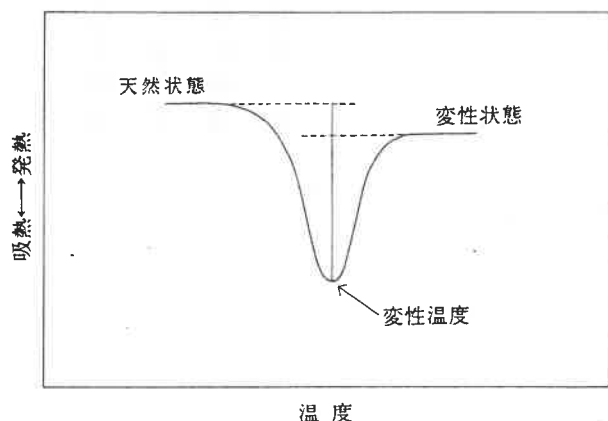


図1 熱変性によるDSC曲線

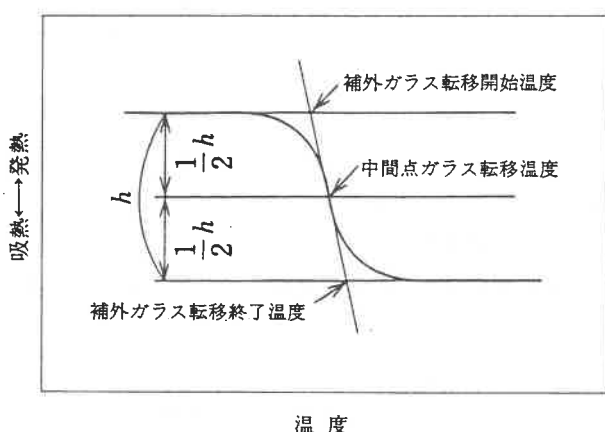


図2 ガラス転移によるDSC曲線

図1は示差走査熱量計を用いた典型的なタンパク質の熱変性によるDSC曲線である。一般にタンパク質の熱変性は熱の吸収を伴い、DSC測定では温度上昇に伴う吸熱ピークとして観測される。そしてピーク温度がほぼ変性温度に対応する。また無定形部分を有する高分子物質では、加熱による温度上昇に伴い、ガラス状のかたい状態からゴム状に変わる現象が起こることがあり、この現象はガラス転移と呼ばれている。セリシタンパク質も無定形部分を有する高分子物質であり、ある温度範囲においてガラス転移が起こる。示差走査熱量計によるDSCの測定でもこのようなガラス転移を測定することができる。図2は典型的な無定形部分を有する高分子物質のガラス転移によるDSC曲線である。ガラス転移によりベースラインの急激なシフトが起こり、階段状のDSC曲線が観測される。ガラス転移温度は図のように3種類あり、補外ガラス転移開始温度と中間点ガラス転移温度が用いられることが多い。

### 3. 2 凍結乾燥セリシンと噴霧乾燥セリシンのDSC測定

#### (1) 測定条件

タンパク質はその状態により、熱特性が異なる。そこで凍結乾燥セリシンと噴霧乾燥セリシンのDSC測定において、試料を次のような条件で測定した。

A：乾燥直後

B：恒温恒湿室（温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度65%RH  $\pm 2\%$ ）に4日間保管後

C：温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ のデシケータ中に5日間保管後

#### (2) 測定結果と考察

凍結乾燥セリシンを測定条件A、B、Cで測定した結果を図3、4、5に、また噴霧乾燥セリシンを測定条件A、B、Cで測定した結果を図6、7、8に示す。図中のパーセントはエタノール添加セリシンのエタノール濃度を示す（ただし0%はエタノールの入っていないセリシンを示す）。図4、7ではセリシタンパク質の熱変性によるピークが見られ、図3、5、6、8ではガラス転移が見られる。そこで各DSC曲線より求めた中間点ガラス転移温度と変性温度を表1に示す。

表1 凍結乾燥セリシンと噴霧乾燥セリシンの測定条件の違いによる中間点ガラス転移温度と変性温度

| 凍結乾燥セリシン  |                                  |                            | 噴霧乾燥セリシン  |                                  |                            |
|-----------|----------------------------------|----------------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------|
| サンプル      | 中間点ガラス転移温度( $^{\circ}\text{C}$ ) | 変性温度( $^{\circ}\text{C}$ ) | サンプル      | 中間点ガラス転移温度( $^{\circ}\text{C}$ ) | 変性温度( $^{\circ}\text{C}$ ) |
| 凍結乾燥直後    | 0%                               | 83.3                       | 噴霧乾燥直後    | 0%                               | 81.2                       |
|           | 2%                               | 80.3                       |           | 2%                               | 79.1                       |
|           | 10%                              | —                          |           | 10%                              | 69.8                       |
| 恒温恒湿室保管4日 | 0%                               | —                          | 恒温恒湿室保管4日 | 0%                               | —                          |
|           | 2%                               | 38.4                       |           | 2%                               | 39.3                       |
|           | 10%                              | 39.1                       |           | 10%                              | 39.8                       |
| デシケータ保管5日 | 0%                               | 38.3                       | デシケータ保管5日 | 0%                               | 40.6                       |
|           | 2%                               | 73.5                       |           | 2%                               | 88.6                       |
|           | 10%                              | 84.5                       |           | 10%                              | 81.8                       |
|           |                                  | —                          |           |                                  | 64.5                       |

エタノールを10%添加した凍結乾燥セリシンでは、測定条件AとCでガラス転移が見られないが、噴霧乾燥セリシンではガラス転移が見られる。また噴霧乾燥セリシンでは測定条件A、Cともにエタノール濃度が高くなるにつれて、中間点ガラス転移温度が低くなる。タンパク質分子は分子間で水素結合を形成しており、この度合いが多くなるとタンパク質の平均分子量が大きくなる。しかし、エタノールのような水酸基をもつ極性分子が存在すると、水素結合は切断されタンパク質の平均分子量は小さくなる。またタンパク質のガラス転移は、分子鎖の自由運動が大きくなることにより

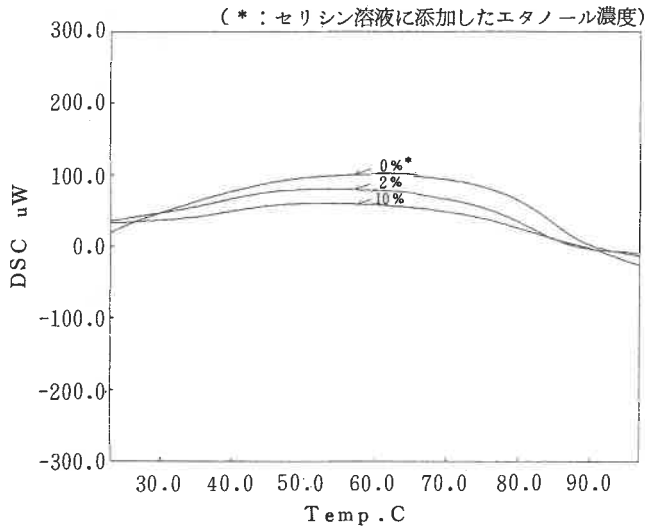


図3 凍結乾燥セリシンを乾燥直後に測定したDSC曲線

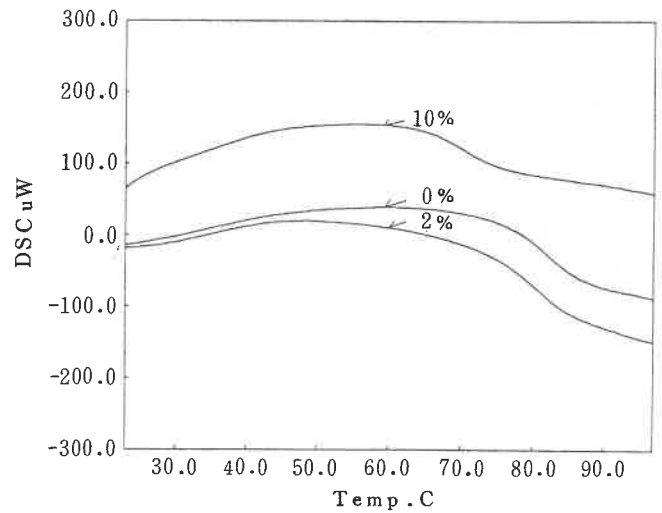


図6 噴霧乾燥セリシンを乾燥直後に測定したDSC曲線

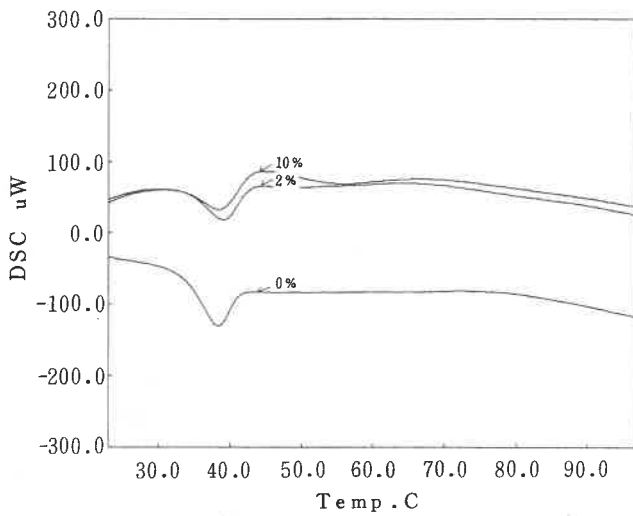


図4 凍結乾燥セリシンを恒温恒湿室に4日間保管後、測定したDSC曲線

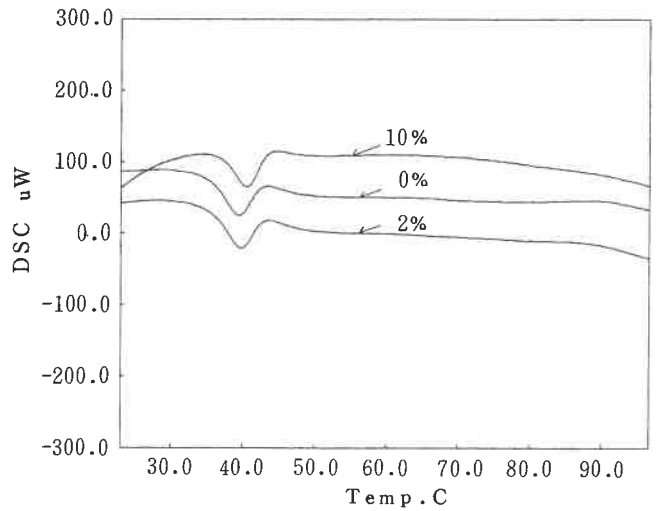


図7 噴霧乾燥セリシンを恒温恒湿室に4日間保管後測定したDSC曲線

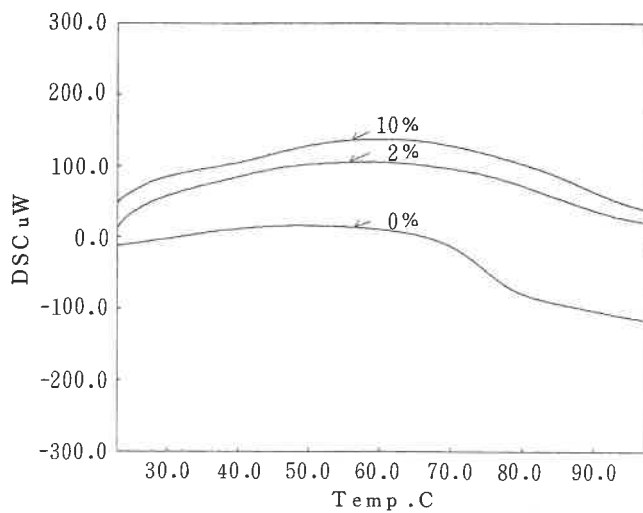


図5 凍結乾燥セリシンをデシケータに5日間保管後測定したDSC曲線

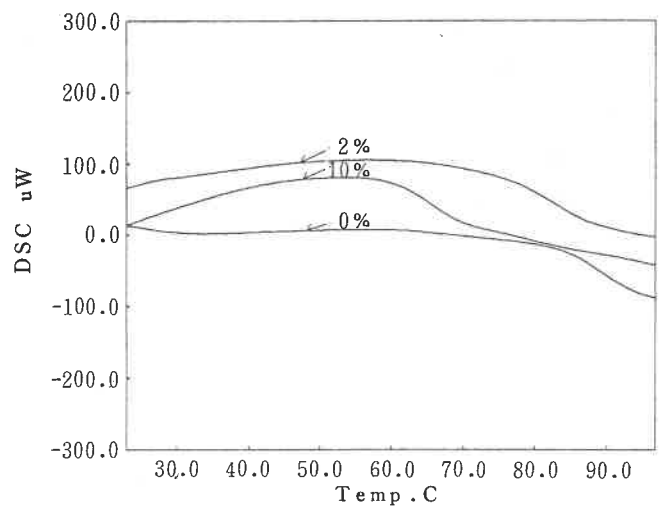


図8 噴霧乾燥セリシンをデシケータに5日間保管後測定したDSC曲線

起こり、タンパク質の平均分子量が大きくなるとこの運動は起こりにくくなり、ガラス転移をするためには多くのエネルギーを必要とする。すなわち、タンパク質の平均分子量が大きくなると、ガラス転移温度が高くなると考えられる。したがって、噴霧乾燥セリシン中にエタノールが残存していると仮定した場合、エタノール濃度が高くなるにつれ、噴霧乾燥セリシンの平均分子量が小さくなるため、中間点ガラス転移温度も低くなると考えられる。

また、凍結乾燥セリシン及び噴霧乾燥セリシンともに、測定条件Bにおいてのみ熱変性によるピークが見られる。測定条件AとCでは、セリシタンパク質は乾燥しており、測定条件Bでは水分の多い状態にある。したがってセリシタンパク質の熱変性は、水の存在により大きな影響を受けると考えられる。水溶液中でのタンパク質は共通の構造として、中心部に非極性基（疎水性基）からなる高い充填密度をもつ疎水性の核を形成し、その周りに極性基からなる極性の殻が形成されており、その殻が水と疎水性の核との境界となり、全体として安定な構造が保たれている。これは主として疎水性基の水との隔離による疎水性相互作用によるものである。そしてPrivalovら<sup>(1)(2)</sup>は、極性基の水和は天然状態で安定なタンパク質の構造を不安定化させるとしている。

そこで、凍結乾燥や噴霧乾燥により乾燥したセリシタンパク質は、水中での疎水性相互作用による安定な構造が維持された状態にあるが、測定条件Bのような湿度の高い環境におかれると、タンパク質中の水分が増加し、水溶液中での状態に近づくため、セリシタンパク質分子の極性残基が水合され、タンパク質の構造が不安定化される。

このため、凍結乾燥セリシン及び噴霧乾燥セリシンともに、測定条件Bにおいてのみ熱変性によるピークが見られたと考えられる。

一般にタンパク質の変性は可逆的であるが、120℃の高温で処理され抽出されたセリシタンパク質でも、上述のようにある条件では熱変性が見られることから、セリシタンパク質においてもその変性は可逆的であると言える。

### 3. 3 凍結乾燥セリシンの熱特性の経時変化

#### (1) 測定条件

恒温恒湿室（温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $65\% \text{RH} \pm 2\%$ ）で4日間保管された凍結乾燥セリシンでは、DSC測定によって熱変性によるピークが見られた。

そこで、この熱変性によるピークがどのように形成されるのか調べるため、エタノール濃度0、2、10%の凍結乾燥セリシンについて、乾燥直後から恒温恒湿室保管4日目まで1日毎にDSCを測定した。

#### (2) 測定結果と考察

エタノール濃度0、2、10%の凍結乾燥セリシンの測定結果を、それぞれ図9、10、11に示す。また図9、10、11から求めた熱変性温度と恒温恒湿室保管日数との関係を図12に示す。

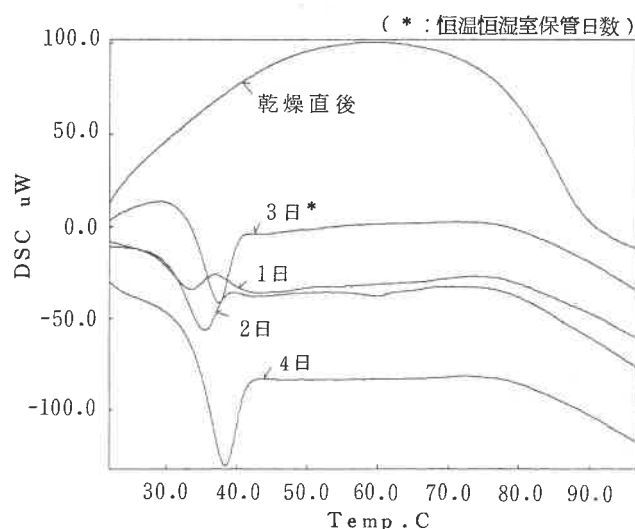


図9 恒温恒湿室保管エタノール0%の凍結乾燥セリシンを4日間連続測定したDSC曲線

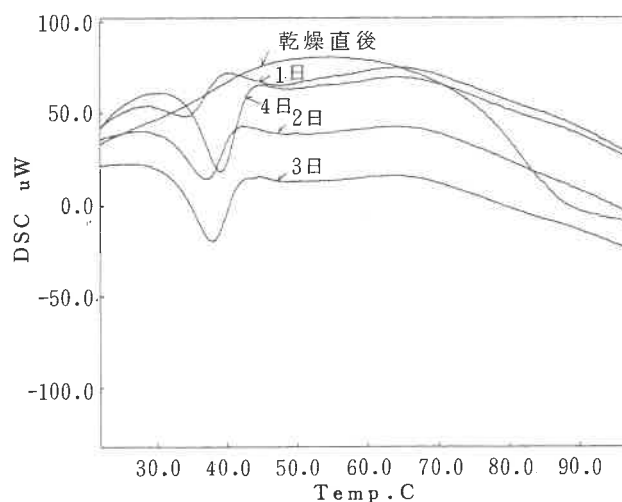


図10 恒温恒湿室保管エタノール2%の凍結乾燥セリシンを4日間連続測定したDSC曲線

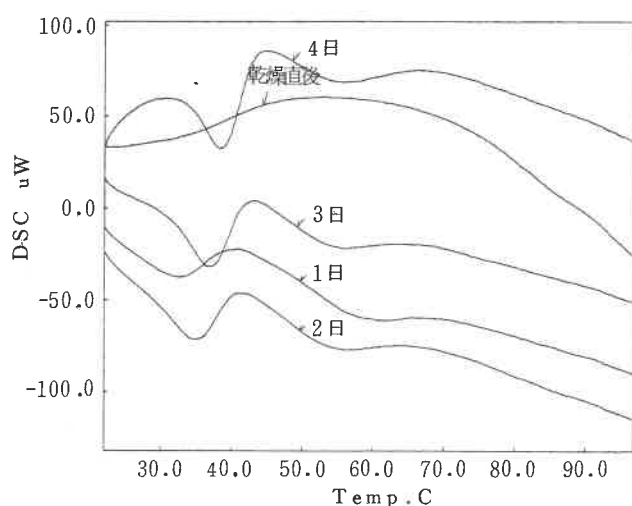


図11 恒温恒湿室保管エタノール10%の凍結乾燥セリシンを4日間連続測定したDSC曲線

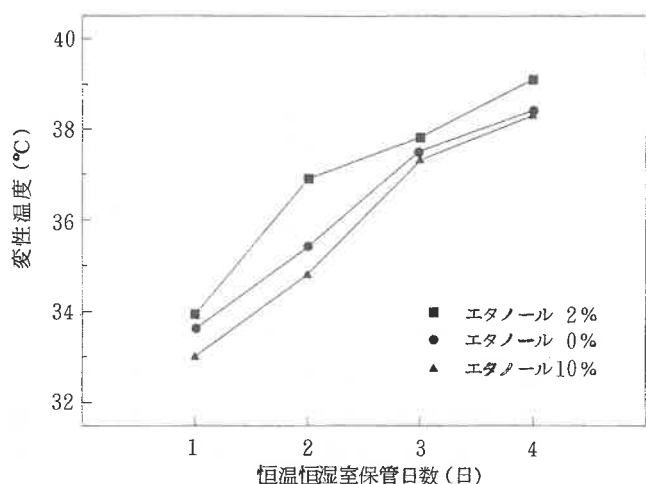


図12 エタノール濃度の異なる凍結乾燥セリシンの恒温恒湿室保管日数と変性温度との関係

図9、10、11より、各エタノール濃度の凍結乾燥セリシンとも、恒温恒湿室保管1日目で熱変性によるピークが見られ、ピークの面積が日毎に増加している。

また図12より、各エタノール濃度の凍結乾燥セリシンとも、恒温恒湿室保管日数が増えるほど、熱変性温度が高くなっている。

タンパク質の2次構造 ( $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ 構造) は、ポリペプチド主鎖のC=OとN-Hとの間の規則的な水素結合によって形成されているが、このほかにも、主鎖と側鎖、側鎖と側鎖の間にも水素結合を形成していることが多い。そしてこの水素結合は、タンパク質の2次構造の安定化にとって、重要な役割を果たしている。すなわち、水素結合が多く形成されればされるほど、タンパ

ク質の2次構造は強固なものとなり、タンパク質の変性が起こりにくくなる。

またタンパク質中に水分子が存在すると、この水分子とポリペプチド主鎖又は側鎖との間に水素結合が形成され、水分子はタンパク質内において架橋的な役割を果たし、タンパク質内に水素結合網が張りめぐらされる。

これによりタンパク質の2次構造は更に強化され、その立体構造は非常に安定なものとなり、タンパク質の変性が起こるには非常に多くのエネルギーが必要となる。

凍結乾燥セリシンの恒温恒湿室保管日数の増加に伴うピーク面積の増加や、熱変性温度の上昇は、セリシンタンパク質の変性に要する熱エネルギーの増加を意味している。したがって、恒温恒湿室に保管された凍結乾燥セリシンは、そのタンパク質中の水分が増加し、タンパク質分子の極性残基の水和による立体構造の不安定化が生じているが、それと同時に水分子の水素結合によるタンパク質の2次構造の安定化が大きく寄与しているため、凍結乾燥セリシンの恒温恒湿室保管日数の増加に伴い、ピーク面積の増加や熱変性温度の上昇が見られたと考えられる。また熱変性温度の上昇には、水分子によるタンパク質2次構造の変化も起因していると考えられる。更にタンパク質中の水分の増加は、タンパク質内の疎水性相互作用を強めるため、熱変性エネルギーの増加をもたらすとも考えられる。

### 3. 4 精練温度変化セリシンのDSC測定

#### (1) 測定条件

精練温度変化セリシンのDSCを測定するため、試料を次のような条件で測定した。

D：室温でデシケータに30日間保管後

E：恒温恒湿室（温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度65%RH  $\pm 2\%$ ）に1日保管後

F：恒温恒湿室に12日間保管後

#### (2) 測定結果と考察

精練温度変化セリシンを測定条件D、E、Fで測定した結果を、それぞれ図13、14、15に示す。また図中の温度は、精練した温度を示す。

図13よりそれぞれの精練温度変化セリシンにおいて、ガラス転移が見られる。そこで図より求めた中間点ガラス転移温度とガラス転移前後の比熱容量差を表2に示す。

また図14、15では、熱変性によるピークが見られる。そこで図より求めた熱変性温度と精練温度変化セリシンとの関係を図16に示す。

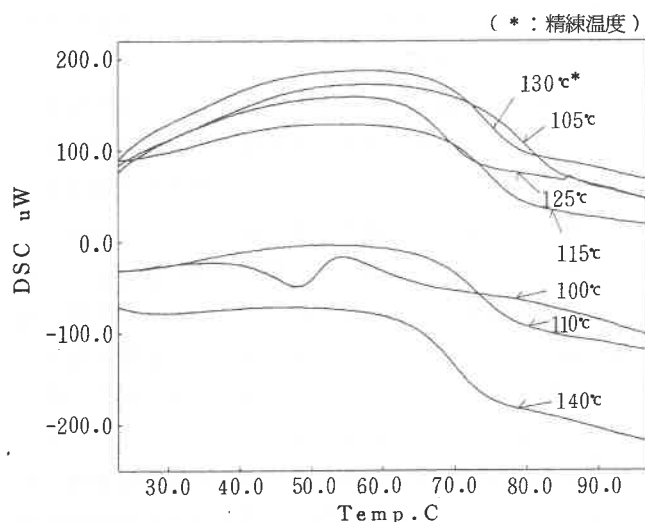


図13 精練温度変化セリシンをデシケータに30日間保管後測定したDSC曲線

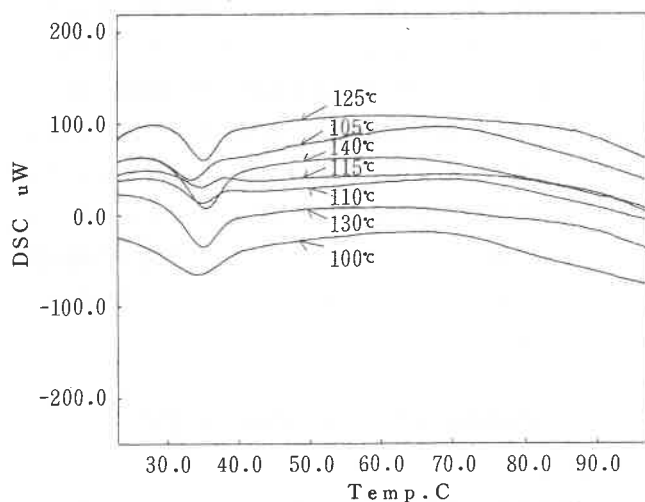


図14 デシケータに30日間保管した精練温度変化セリシンを1日恒温恒湿室に保管後測定したDSC曲線

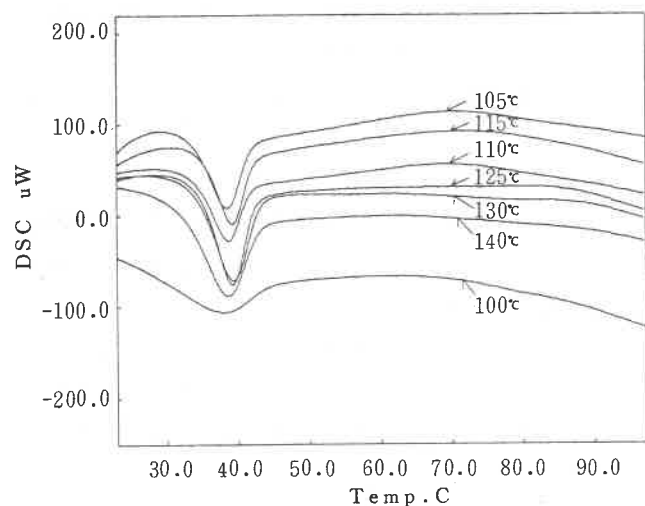


図15 デシケータに30日間保管した精練温度変化セリシンを12日間恒温恒湿室に保管後測定したDSC曲線

表2 デシケータに30日間保管した精練温度変化セリシンの中間点ガラス転移温度と比熱容量差

| 精練温度<br>(°C) | 中間点ガラス転移温度<br>(°C) | 比熱容量差<br>(mJ/deg・mg) |
|--------------|--------------------|----------------------|
| 105          | 78.0               | 0.666                |
| 110          | 72.7               | 0.665                |
| 115          | 73.7               | 0.730                |
| 125          | 67.7               | 0.612                |
| 130          | 73.0               | 0.720                |
| 140          | 69.0               | 0.694                |

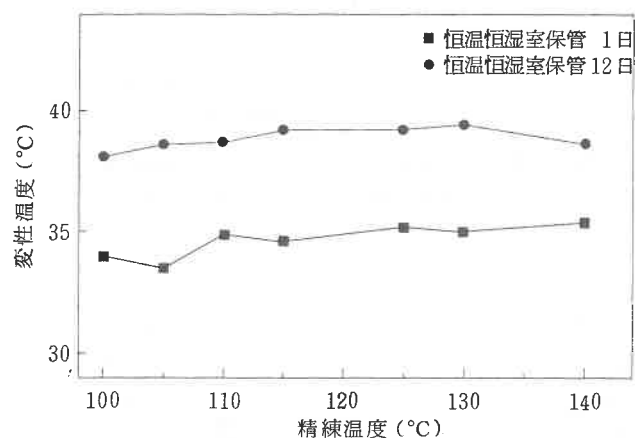


図16 恒温恒湿室保管1日と12日の精練温度変化セリシンと変性温度との関係

図13より精練温度が105℃から140℃のセリシンタンパク質については、はっきりとしたガラス転移が見られるが、精練温度100℃のものについては、DSC曲線の形状が他のものと異なる。これは2つのガラス転移が生じたためではないかと考えられる。次に図14、15より、恒温恒湿室保管日数の増加に伴い、熱変性によるピーク面積の増加と、変性前後におけるベースラインの差の増加が見られる。このベースラインの差は、変性前後で熱容量が異なることを意味しており、変性状態の熱容量が天然状態の熱容量よりも大きいことを示している。この熱容量の相異についてPrivalov<sup>(3)</sup>は、タンパク質分子内の疎水性基の露出による水との相互作用（疎水性水和）が、主たる要因であるとしている。すなわち、熱変性により崩壊したタンパク質の立体構造は、ランダムコイルに近い状態であり、タンパク質分子の疎水性基が露出された状態にある。疎水性基が露出すると、その周りの水分子は規則正しく配列し、疎水性基を閉じこめるように鳥かご状の空隙をもった網目構造が作り上げられる。このような構造を作る水分子は純水中の水分子よりも不安定な状態で疎水性基と水素結合を形成しているため、異常に高い熱容量

状態にあると考えられている<sup>(4)</sup>。このため変性状態の熱容量が天然状態の熱容量よりも大きくなると考えられる。

また、恒温恒湿室保管日数の増加による変性前後におけるベースラインの差の増加は、タンパク質分子内の疎水性基の露出による水との相互作用が、水分の増加により強められたためではないかと考えられる。

次に図16より、各精練温度変化セリシンとも、恒温恒湿室保管日数の増加により熱変性温度が高くなっているが、この理由については、水分子の水素結合によるタンパク質2次構造の安定化及び構造変化、そして水分の増加によるタンパク質内の疎水性相互作用の強化等が考えられる。

#### 4 まとめ

- (1) 凍結乾燥セリシン及び噴霧乾燥セリシンとも、乾燥状態でDSCを測定した場合、ガラス転移が見られ、恒温恒湿室（温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $65\% \text{RH} \pm 2\%$ ）で4日間保管し、DSCを測定した場合、熱変性が見られる。

また、凍結乾燥セリシンでは、恒温恒湿室保管日数の増加とともに熱変性温度が高くなる。

- (2) エタノールを添加した噴霧乾燥セリシンでは、エタ

ノール濃度が10%までは、濃度の増加に伴い中間点ガラス転移温度が低くなる。

- (3) 精練温度を変えた凍結乾燥セリシン（精練温度変化セリシン）でも、乾燥状態でDSCを測定した場合、ガラス転移が見られ、恒温恒湿室に1日以上保管し、DSCを測定した場合、熱変性が見られる。

また、恒温恒湿室保管日数の増加とともに熱変性温度が高くなり、変性状態の熱容量が大きくなる。

#### 文 献

- 1) Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. : J. Mol. Biol. , 232, 639—659 (1993)
- 2) Privalov, P. L., Makhatadze, G. I. : J. Mol. Biol. , 232, 660—675 (1993)
- 3) P. L. Privalov : Stability of proteins : Small globular proteins, Adv. Protein Chem. . 33, 167—241 (1979)
- 4) 江口至洋：タンパク質工学の物理・化学的基礎
- 5) 郷 信広ら：蛋白質の時代 構造・物性・機能研究の新局面
- 6) 日本熱測定学会・応用熱測定研究グループ：応用熱分析
- 7) 日本熱測定学会：熱分析の基礎と応用 第3版