

絹フィブロイン膜を用いたタンパク質の検出反応

○二宮純子^A, 森田洋^B

○Ninomiya Junko^A, Morita Hiroshi^B

大分工業高等専門学校^A, 北九州市立大学国際環境工学部^B

【キーワード】 化学実験、フィブロン、タンパク質、呈色反応

1. はじめに

絹糸は、古くから人間生活の中で衣料素材として親しまれ、身近な物質である。また、絹糸の主成分である絹フィブロインは、純度の高いタンパク質からできているため、近年、食品や医療の分野において、機能性が高く、新しい素材として開発研究が進められている^①。

高等学校の「化学」で、絹フィブロインは、動物性の単純タンパク質の例として取り上げられ、絹糸やクモの巣の糸を構成し、溶媒に不溶、 β シート構造をもつ繊維状タンパク質と説明されている^②。高等学校段階において、タンパク質の検出反応として、卵白やゼラチンを用いたニンヒドリン反応、キサントプロテイン反応、ビウレット反応が行なわれることが多い。

そこで、これまでに教材としての報告がない絹フィブロインを用いたタンパク質の検出反応の実験教材化を目的に、生繭から作製した絹フィブロイン膜 (FF:Fibroin Film) を用いた呈色反応について検討を行った。また、天然高分子化合物である生繭からフィブロイン膜を再生する実験は、最先端の「ものづくり」を実感させる効果をもち、作製したフィブロイン膜は常温常圧下で長期保存が可能であるため、学生実験の試料に適していると思われる。

2. 実験方法

2-1 絹フィブロイン膜の作製

細かく切った生繭 5.5g を 0.50w/v% Na_2CO_3 (和光純薬、特級) 水溶液 300mL 中で1時間煮沸した後、60℃前後の脱イオン温水中に1時間浸した。その後、繭を脱イオン

水で洗浄した後に脱水、セリシンを除去した。

次に、100mLのビーカーに CaCl_2 (関東化学、特級) 25g を入れ、脱イオン水 25ml で溶解した後、精練脱水した生繭を入れ、加熱溶解しフィブロイン溶液を得た。溶解したフィブロイン溶液をセルロースチューブ (三光純薬、UC18-32-100) に入れ、脱イオン水中で2日間透析を行った。フィブロイン溶液の濃度は、ブラッドフォード法 (Bio-Rad) を用いて求めた。

6.5mg/mL に調整したフィブロイン溶液 1mL をシャーレ (PS 製) に分注し、ヘアードライヤーを用いて乾燥した。作製したフィブロイン膜はふた付きシャーレに入れ、常温常圧下で保存した。

2-2 タンパク質の溶出試験

ビーカーに脱イオン水 10mL を入れ、その中に絹フィブロイン膜 (フィブロイン溶液 1mL 乾燥した膜) を入れ、マグネットスターラーで攪拌した。サンプリングは、攪拌後 50 μ L ずつ行い、ブラッドフォード法を用いて溶出したタンパク質濃度を測定した。タンパク質溶出の変化は、式 1 から求められる溶出率で表した。

$$\text{溶出率 (\%)} = \frac{\text{サンプル液のタンパク質 (mg/mL)}}{\text{フィブロイン膜の全溶解 (mg/mL)}} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

2-3 タンパク質の呈色反応

絹フィブロイン膜を用いて、ニンヒドリン反応 (α -アミノ酸検出)、キサントプロテイン反応 (芳香族アミノ酸検出)、ビウレット反応 (2つ以上のペプチド結合) の3つの呈色反応を行った。

また、繊維識別の染色剤と多繊維織布 (ナリ

カ)を用いて、絹フィブロイン膜の染色を行い、繊維素材の違いによる発色の違いについて比較を行った。しかし、絹フィブロイン膜は水に可溶性であるため、堤らの報告に従い不溶化絹フィブロイン膜(IFF:Insoluble Fibroin Film)の作製を行った³⁾。6.5mg/mLに調整したフィブロイン溶液にグリセリン0.20v/v%になるように添加し、シャーレ(PS製、φ90mm)に1.0mL入れ、30℃、湿度70%RHのインキュベーター内で1日間乾燥した膜を用いて染色実験を行った。

3. 結果と考察

絹フィブロイン膜を自然乾燥した場合、室温(20～30℃)で約1日かかる。そこで、50分授業の実験を想定し、ヘアードライヤー(1200W)を用いてフィブロイン膜の乾燥を行ったところ、約10分で乾燥が終了した。自然乾燥した絹フィブロイン膜(FF)、ドライヤーで乾燥したフィブロイン膜(DFF)、不溶化した膜(IFF)の水に対する溶出試験の結果から、DFFは一部が不溶化していることが明らかとなった。乾燥条件によってフィブロイン膜の不溶化条件が変化し、フィブロインの結晶形態が変化することが、すでに報告されている⁴⁾。今回の結果から、DFFはフィブロインの一部が50-60℃になり、Silk I型(繊維化前の構造)からSilk II型(繊維化後の構造)へ転移したことが示唆された。

作製したDFFを用いたキサントプロテイン反応、ニンヒドリン反応、ビウレット反応では、いずれも鋭敏で鮮やかな呈色結果を得ることができた。

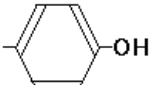
キサントプロテイン反応は、タンパク質に芳香族アミノ酸が少ない場合、橙黄色を呈しにくい。ため、高等学校の化学実験ではチロシンやフェニルアラニンを含む卵白などが用いられている。フィブロインを構成するアミノ酸にはチロシン5.5(mol%)含まれているため、明瞭な呈色反応の結果が得られた。今回の結果から、DFFは実験材料として適していることが明らかとなった(表1参照)。

染色実験では不溶化したIFFを用いて、多織交織布との発色違いについて観察を行った。染料のボーケンステイン試薬に対して絹フィブロイン膜IFFは、多織交織布(絹)の識別色と同じ発色を示した。再生した絹フィブロイン膜は、無色透明で絹とは異なる質感であるにもかかわらず、染料に対して絹糸と同様の染まり方をすることが明らかとなった。

4. おわりに

天然の生繭から絹フィブロインを分離、抽出、乾燥した膜の再生化は、高分子化合物の合成実験としてだけでなく、化学実験の基本操作を多く含み、「ものづくり」を通して化学に対する関心と探究心を高めるのに適した教材であると思われる。さらに、作製したフィブロイン膜は、高等学校「化学」の教科書で紹介されている代表的な3つのタンパク質の呈色反応の試料として適していることが確認された。

表1 フィブロインのアミノ酸組成

アミノ酸の名称(Rの構造)	分子量	モル%
グリシン Glycine —H	75	45.5
アラニン Alanine —CH_3	89	30.6
バリン Valine $\text{—CH—(CH}_3)_2$	117	2.3
セリン Serine $\text{—CH}_2\text{—OH}$	105	12.9
チロシン Tyrosine $\text{—CH}_2\text{—}$ 	181	5.5

出典：小松計一ら、続絹糸の構造、信州大学繊維学部(1980)

引用・参考文献

- (1) 独立行政法人 農業生物資源研究所、カイツツスゴイ虫！第2版、平成26年7月
- (2) 数研出版、高等学校 新課程 化学 306、平成27年度
- (3) 堤一代、小川あかね、福田翼、森田洋、フィブロイン膜の不溶化に係る諸要因の解明、日本食品工学会誌、11、No. 2、105-112(2010)
- (4) 平林潔、石川博、再生絹フィブロイン溶液からの結晶化、繊維学誌、24、449-450(1968)