

## セリシン溶液の光散乱について : 第1報 セリシン-A 溶液調製法の検討

林, 勝哉  
九州大学農学部

小田, 純子  
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21433>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 16 (2), pp.239-246, 1957-11. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

# セリシン溶液の光散乱について

## 第1報 セリシン-A溶液調製法の検討

林 勝哉・小田 純子

### Light scattering by sericin solution (Part I)

Katuya Hayasi and Junko Oda

#### 緒 言

繭層から抽出されるセリシンは分離法によつて数個の成分に分けられており、各成分の性質は主としてアミノ酸組成の決定<sup>1)</sup>或はコロイド的性質の測定等から<sup>2,3)</sup>追及されているが、夫々の成分の定義、分離法は研究者により区々であり統一されていない。<sup>4,5)</sup>ただ明確なことは、各成分はもとの native なセリシン（絹糸腺中に存在する型のもの）が分離手段によつて分解して生じたものであらうと考えられることであり、繭層から抽出する場合、native なものに極めて近い或は native なもの自体と考えられているところのゲル生成能をもつセリシン-B が、熱により水溶性の成分である A に変換し、A は更に 50~70% アルコール可溶の D 成分に変換することが知られており、その変換の量的関係、アミノ酸組成の変化等は多く報告されている。しかしここで、物理化学的立場から見て疑問として残されていることは、(1) native なセリシンと云うものは果して単一成分であるか、(2) 部分分解物と考えられる A 成分が、加熱を加えない抽出条件でも出現することから、A 成分は繭層中或は絹糸腺中にも存在すると云う見方もあるが、果してこの見解は正しいものか、(3) B 成分から A 成分、更に D 成分への分裂、転換と云うことは蛋白分子がどんな形式で変化することを意味しているものか、即ち分子量や分子型がどんなに変化するものであるか、(4) 従来各成分に分けられているが、夫々の成分は物理化学的に見て単一成分であるのか、(5) B 成分が分裂して A, D 成分に変換する場合に考えられることは、分裂成分は広い分子量分布を有するのではないか、等である。筆者らは先に、超遠心法によつて分離したセリシン- $\alpha$  について報告し、<sup>7,8)</sup>セリシン- $\alpha$  は超遠心的に単一で、電気泳動的には数個の近似した成分の混合物であり、その分子量は 3~4.5 万であることを見出したが、その後検討の結果、生繭を銅-エチレンジアミン溶液で処理して得たセリシン- $\alpha$  溶液は、低イオン強度 ( $\mu=0.01$ ) に於ける電泳から、易動度が極めて近接している 2 成分から成ることを見出した。<sup>9)</sup> 又一方、生繭から熱抽出したセリシン- $\alpha$  の光散乱による重量平均分子量は約 6 万であることを報告した。<sup>10)</sup>

本報ではこれらの問題を詳しく追及する目的で、先づ繭層の熱抽出法を光散乱により調べ、あわせてその結果の考察を試みた。

Table 1. Extracting conditions of sericon-A.

	Sample taken (g)	Water added (ml)	Boiling time (min)	Residue (Dry matter) (g)	Yields (%)
1	8.95	100	30	8.34	93.2
2	8.95	100	60	7.95	88.8
3	4.47	50	120	3.83	85.7
4	4.47	50	180	3.79	84.7
5	4.47	50	300	3.61	80.6
6	4.47	1 M KCl 50	180	3.76	84.0
7	4.47	0.1 M KCl 50	180	3.73	83.3
8	4.47	0.01 M KCl 50	180	3.77	84.2
9	4.47	50	300*	3.82	85.3
10	4.47	0.001 M KCl 50	180	3.74	83.5
11	4.47	50, pH 6.0	180	3.80	85.0
12	4.47	50, pH 7.5	180	3.78	84.6
13	4.47	50, pH 9.0	180	3.70	82.6

\* heating in water bath.

## 実 験

### 1) 試料調製

生菌層を細切し、第1表に示すような条件で抽出し、抽出液を常温に冷却する。続いて抽出液のpHを4.1としてセリシン-B区分を沈澱せしめ、冷蔵庫に一夜放置した後、3,000rpmで遠心分離し、沈澱を除去してセリシン-A溶液を得た。この水溶液をM/20 phosphate buffer pH 7.5に4日間透析し、No 4 glass filterで濾し次に20,410rpmで1時間超遠心し、<sup>(1)</sup>透析中に沈澱した区分及び微細な混在物を除去し、再びglass filterで濾過して光散乱の供試液とした。

### 2) 光散乱

Brice Phoenix Light Scattering Photometer<sup>(2)</sup>を用いて測定し、屈折計にはPhoenix Differential Refractometer<sup>(3)</sup>を使用した。測定法の詳細は他に記述した。

散乱強度と重量平均分子量の間には

$$HC/\tau = \frac{1}{M} + 2B_2C$$

$$H = \frac{32\pi^3 n_0^2}{3\lambda^4 N_0} \left( \frac{n - n_0}{C} \right)^2$$

なる関係があるので、濃度を変えて外挿し $(HC/\tau)_{C \rightarrow 0}$ の値を求め分子量を得た。ここでCは濃度、g/ml、 $\tau$ は濁度、 $B_2$ は第2 virial 係数で相互作用の函数、 $n_0$ は溶媒の屈折率、 $n$ は溶液の屈折率、 $\lambda$ は光の波長、 $m\mu$ 、 $N_0$ はAvogadro数である。

又  $B_2$  は Scatchard 等<sup>1)</sup> の蛋白分子間相互作用函数  $B$  と次の関係

$$B_2 = \frac{BM}{1000} ,$$

があるので,  $HC/\tau$  の傾斜から相互作用函数  $B$  が求められる. 即ち

$$B = \frac{1000}{M} \times \frac{\text{傾斜}}{2} .$$

この函数は分子論的には, 蛋白質の解離基数, 分子型, 分子量, 溶媒の種類によつて決定される量である.

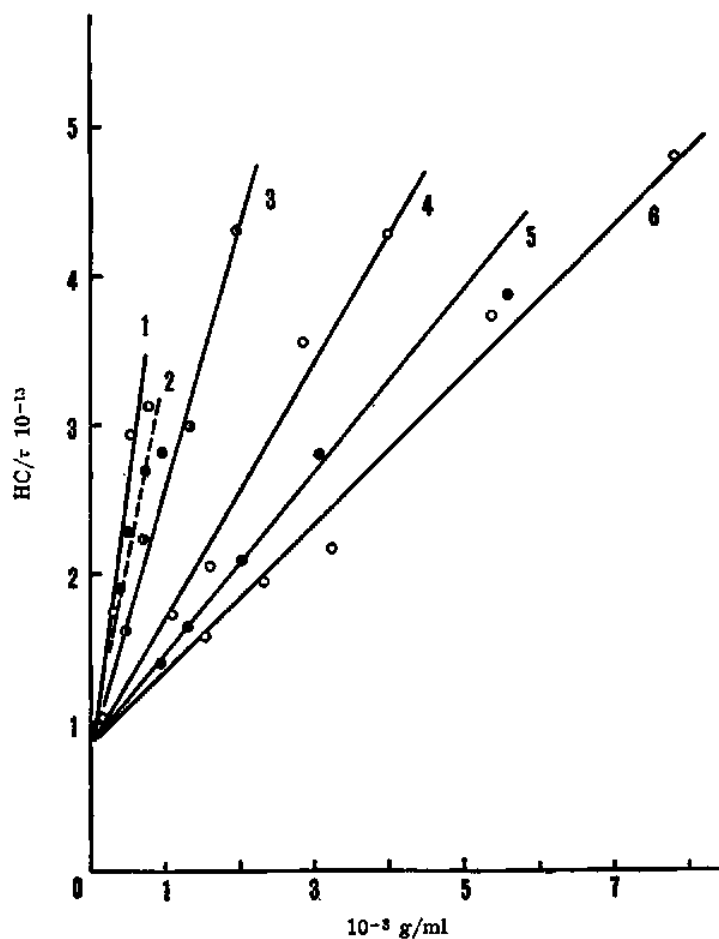


Fig. 1. Light scattering of sericin-A against concentration with extracting hours.

- 1 : 30 min., gentle boiled. ; 2 : 60 min., gentle boiled.  
 3 : 120 min., gentle boiled. ; 4 : 300 min., in water bath.  
 5 : 180 min., gentle boiled. ; 6 : 300 min., gentle boiled.

## 結 果

## 1) 溶解時間変化

菌層からセリシンを完全に除去するには常圧加熱では長時間を要する。<sup>4)</sup> その加熱時間中に  $B \rightarrow A \rightarrow D$  転換が進行する。加熱時間が短いほど溶出全量に対する  $B$  の割合は増加する。溶出に用いた時間を変えて光散乱を測定した結果を第 1 図に、相互作用函数と加熱時間の関係を第 2 図に示した。

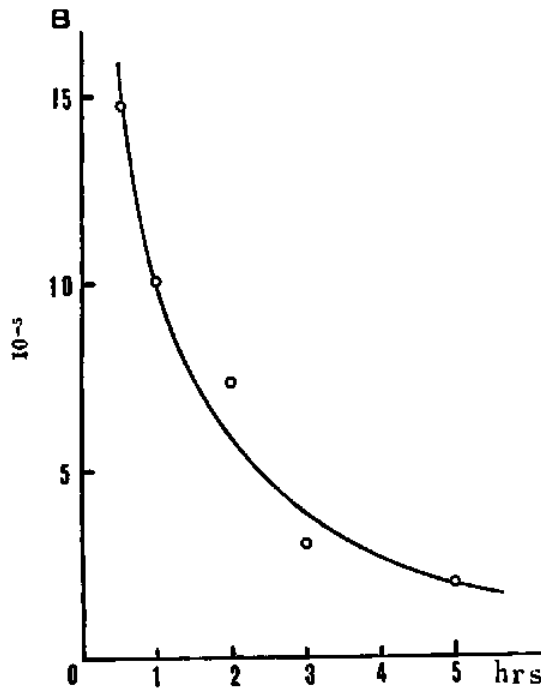


Fig. 2. Protein interaction constants with extracting hours.

## 2) 抽出液のイオン強度変化

抽出液として普通純水が用いられるが、水に塩化加里を加え別表の濃度にした溶液で抽出し、磷酸緩衝液で光散乱を測定した結果を第 3 図にまとめた。

## 3) 抽出液の pH 変化

抽出液として水に稀アルカリを添加し pH を変えた溶液を使用して抽出し、磷酸緩衝液で測定した結果を第 4 図に示した。尚各種抽出に於ける菌層の減量を第 1 表に併記した。

抽出液の pH を 4.1 として  $B$  区分を除いた水溶液部分は、緩衝液に透析中多少の沈澱を生じた。水に不溶のものは  $B$  区分とするためこの沈澱も  $B$  区分に入れなければならない。このために正確な  $B$  区分の量は測定出来なかつた。

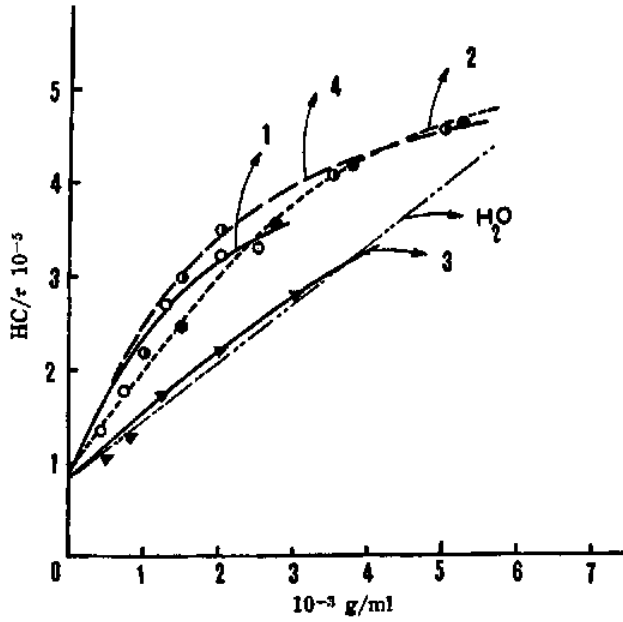


Fig. 3. Scattering intensity of various ionic strength solutions.  
 1.  $\mu=1.0$  2. // 0.1 3. // 0.01 4. // 0.001

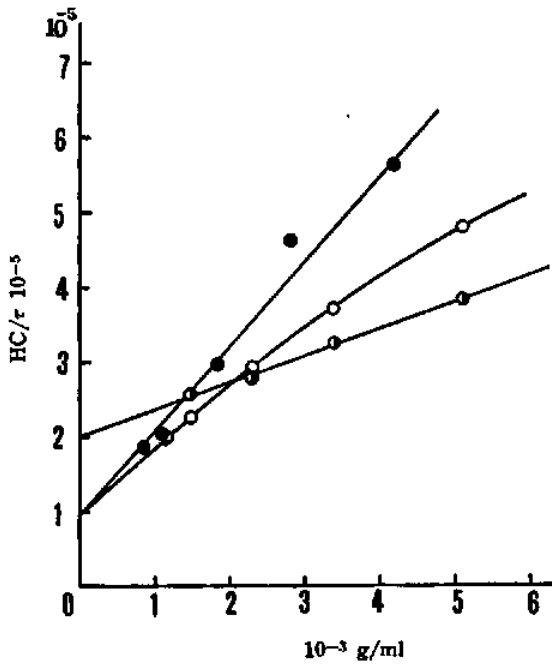


Fig. 4. Effects of pH value.  
 —●—●— pH 9.0, —●—●— pH 7.5, —○—○— pH 6.0

## 考 察

アルカリ抽出の場合を除いてすべての場合  $(HC/\tau)_{c \rightarrow 0} = 8.5 \times 10^{-6}$  なる値を得た。これを分子量で表わせば 118,000 になる。アルカリで抽出した場合は  $(HC/\tau)_{c \rightarrow 0} = 2.0 \times 10^{-6}$  で、分子量  $M = 50,000$  となり約 1/2 の値を得た。又  $HC/\tau$  と  $C$  の曲線は 0.3~0.5% 近傍より緩やかになるが、この部分の外挿値はアルカリの値と一致する。このことは低濃度で 2 分子が会合することを意味するとも考えられるが今後詳細に検討したい。

測定に供した試料はすべて透析中に多少の沈澱を生じたので、超遠心分離で除塵して測定したが、測定後放置すれば更に徐々に沈澱を生ずる。しかるに何れの場合にも同一の分子量を得た。この結果から、ゲル化能力をもつ分子乃至は沈澱を生成する分子の分子量には差はないものと考えられる。この考えを進めれば  $B$  成分も  $A$  成分も分子量的には差はないと推定されるが明白ではない。

抽出に要する加熱時間を長くすれば、 $B$  は転換し  $A$  成分、 $D$  成分が増加する。この転換は、古くから、連続的で  $B$  は徐々に解重合を起し  $A$  成分になり、 $A$  成分も徐々に分子量が小さくなり  $D$  成分に至り、そのため  $A$  成分として分離されるものは大きい分子量分布をもつと考えられていた。しかるに測定結果から加熱時間に拘らず同一分子量が得られる。したがって  $A$  の分子量分布が大きいと云う考えは成立しない。更に  $A$  から  $D$  への転換は、 $A$  成分の末端の小分子量のペプチド或はアミノ酸の分裂を意味し、 $A$  の分子量には影響を与えないような転換が起ると推定出来る。

$A$  成分の分子量は加熱によつては変化しないが、第 1 図、第 2 図から明らかなように分子間相互作用は加熱時間の増加によつて著しく減少する。相互作用の算出は同一緩衝液、同一分子量について行つたもので、結局加熱による相互作用の減少は、分子の荷電の減少又は分子の型が球状に近くなるように変化することを意味している。分子のゾル又はゲル生成能は、荷電量、分子の軸比及び水素結合量に定性的に比例することを併せ考えると、 $B$  分子より  $A$  分子への変換はこれらの量の変化と云える。native に最も近い  $B$  分子は、線状の分子型とそれに伴つて多くの水素結合及びイオン結合をもち、それぞれの分子は熱に不安定なエーテル結合の如きもので軸方向に結合しており、その結果強いゲル化能力と加熱により溶解する能力を有すると考えられる。 $A$  分子は加熱により荷電の或る部分を失い、分子は球状化し、水素結合並びにエーテル結合は切断され、更に末端の一部が切れ（恐らくセリン残基のところでは切れる）その結果水溶性を得るが、分子量分布は小さく極めて徐々に水素結合が復活し、ゲル化又は沈澱を起す。 $D$  成分は極性の強いペプチド、アミノ酸誘導体からなり溶解性が大きいと推定出来る。事実  $D$  区分に多量のセリンが存在することが見出されている。<sup>15)</sup> 又アルカリ処理して中和した場合は、 $A$  に比して変化の度が弱く  $A$  成分と  $B$  成分の中間のゲル化能を有するものと推定している。

アルカリ抽出の場合には、明かに、溶出したセリシン- $A$  は加水分解をうけるものと思われる。分子量は約 1/2 に減少する。セリシン分子にはセリン含量が多く加水分解を受け易いので、極めて稀薄なアルカリでも強く加水分解をうける。

抽出液のイオン強度変化は  $A$  分子の荷電量を規制する目的で行つたもので、荷電量を

保護することによりゲル生成能を保持することを企図したが、セリシン-Aの生成及びその分子の大きさは抽出液のイオン強度によつて変化はなかつた。ただ同一条件での蒸溜水抽出の場合に比して、 $HC/\tau$  と  $C$  のカーブの傾斜がかなり大きくなる傾向があり、分子間相互作用の増大を示すものと考えられるが、殆ど変化のない場合もある。このことが何を意味するものであるかは未だ確言出来ない。

最後に、光散乱図にみられるように、 $HC/\tau$  と  $C$  のプロットに於て  $HC/\tau$  の値の直線からのずれが大きき、今回行つた測定では何れの場合もこの揺れは、筆者らが数種の球状蛋白質について測定を行つた結果に比して大きいものである。このため  $HC/\tau$  の値の濃度零への外挿に若干の不明瞭さを免れなかつた。この実験値の揺れが果して実験誤差のみによるものか否かは明かでないが、その揺れ方には何らかの規則性を有するとも考えられ、会合-解離現象その他の問題も含まれていると推察されるのであるが、斯様に複雑な現象について明確な知見を得るには尚検討を必要とする。

## 文 献

- 1) 佐々木周郁, 宮内正人: J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 9, 167 (1949).
- 2) 金子英雄: 農化誌, 9, 1052, 1104 (1933).
- 3) 宮内正人, 小林 啓: 福女大生活科学, 3, 83 (1955).  
宮内正人, 小林 啓: 福女大生活科学, 3, 131 (1956).
- 4) H. Mosher: Am. Dyestuff Rep., 21, (1932): Am. Silk and Rayon J., 53, 43 (1938).
- 5) 伊藤武男: 農化誌, 13, 12 (1937).
- 6) 金子英雄: 農化誌, 9, 45 (1933).
- 7) 林 勝哉, 小田純子: 農化誌, 30, 661 (1956).
- 8) 林 勝哉, 小田純子: 農化誌, 30, 751 (1956).
- 9) 林 勝哉: 日化, 79, 1351 (1957).
- 10) 林 勝哉: 信州大学編, 絹糸の郡造 P. 340 (1957).
- 11) 林 勝哉: 化学の領域, 10, 923 (1956).
- 12) B. A. Brice, M. Halwer, R. Spicer: J. Opt. Soc. Am., 40, 768 (1950).
- 13) B. A. Brice, M. Halwer: J. Opt. Soc. Am., 41, 1033 (1951).
- 14) G. Scatchard, A. C. Batchelder, A. Brown, J. A. C. S., 68, 2320 (1946).
- 15) 宮内正人: 未発表.



### Summary

The light scattering by sericin-A solution applied to the criterion for its preparing conditions: time required for extraction, ionic strength and pH of extracting medium, were determined in  $\frac{M}{20}$  phosphate buffer pH 7.5, and we obtained the following results:

1) Molecular weights of sericin-A, cooling water soluble fraction, when extraction from raw cocoon is carried in water solution at 100°C were not altered by heating periods,  $M=118,000$  for water extraction and 50,000 for extraction by water adjusted with dilute NaOH to pH 9.0. Although molecular weights are unchangeable with heating period the protein interactions,  $B$ , referred by Scatchard were decreased owing to increasing of heating periods. Since the quantity of interaction is proportional to charge and axial ratio of protein molecule, the decreasing of interaction implies that the decreasing of charge and axial of sericin-A have been raised with heating in water solution.

2) We concluded that conversion of sericin-B, most similar fraction to native sericin existing in silk worm gland and having strong gel forming ability, to A was caused by the loss of net charge and globulizing of B molecule with heat energy. On the contrary it is noteworthy that the depolymerizations of A molecule were not observed in heating period by light scattering.

3) In extraction of alkali solution pH 9.0, extracted B are easily subjected to translation to A and simultaneously degraded to small molecule having half molecular weight.

4) The ions of neutral salt in extracting medium, if salt solution is used for extraction, provide the decreasing of dissociation and avoid the decomposition on protein charged groups, but in experimental result we obtained at present that this effects not appeared and consequently all values by light scattering are same to one of water extraction.