

絹フィブロイン酵素分解の研究開発

浅田 聡*
上野 義栄*

【要 旨】

従来の酸加水分解法では作成困難な絹ペプチド（フィブロイン由来ペプチド）の酵素分解による製法を検討したところ、天野エンザイム（株）製酵素ペプチダーゼ R 及びプロテアックスを用いることにより、分子量 1,000 ～ 2,200 の絹ペプチドを含む分解生成物が得られることがわかった。また、この分解生成物の凍結乾燥試料は、ペプチド特有の苦みがなく、新たな食品用素材として食品関連業界等で利用が期待できる。

1 はじめに

京都府丹後地域は、全国でも有数の絹織物の産地であり、絹を活用した新たな商品開発が進められている。そこで本研究では、絹精練後のフィブロインを利用した新たな食品の開発を目的として、酵素分解による絹ペプチド（フィブロイン由来ペプチド）の新たな製法の開発を試みた。

フィブロイン水溶液を透析用セルロースチューブ（透析膜 UC18-32-100, 三光純薬（株））に入れ、脱塩処理を行った¹⁾。次に、透析後のフィブロイン水溶液をメンブランフィルターにてろ過後、凍結乾燥を行い、酵素反応用フィブロイン試料を作成した。

2 実験方法

2. 1 酵素反応用フィブロイン試料の作成

40w/v%塩化カルシウム水溶液に精練済み絹糸を入れて煮沸溶解をさせた後、でき上がったフィ

2. 2 フィブロインの酵素分解

凍結乾燥フィブロイン試料を蒸留水で溶かしたフィブロイン水溶液 400 μ l (3mg/ml) に、緩衝液 700 μ l、及び酵素溶液 100 μ l (10mg/ml) を加え、表 1 の条件で 24 時間、分解反応を行った。

表 1 酵素反応条件

使用酵素（プロテアーゼ）	緩衝液	反応温度（℃）	プロテアーゼの種類
①ブロメライン F	トリス塩酸* ¹	50	アルカリ性
②ニューラーゼ F 3 G	酢酸* ²	37	酸性
③ペプチダーゼ R	リン酸* ³	37	中性
④プロテアックス	リン酸* ³	60	中性
⑤サモアーゼ PC10F	リン酸* ³	60	耐熱性
⑥プロテアーゼ N アマノ G	リン酸* ³	50	中性

* 1: トリス塩酸 : 50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.5)

* 3: リン酸 : 20mM リン酸緩衝液(pH7.0)

* 2: 酢酸 : 50mM 酢酸緩衝液(pH3.0)

* 応用技術課 主任研究員

なお、酵素については、天野エンザイム（株）から提供された酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリ性プロテアーゼ、及び耐熱性プロテアーゼを使用した。

2. 3 酵素反応液のアミノ酸分析

酵素分解後の反応液について、アミノ酸分析を行った。なお、アミノ酸分析は、（株）島津製作所製液体クロマトグラフ Prominence に、強酸性イオン交換樹脂カラム Shim-pack Amino-Na を用い、クエン酸三ナトリウム溶液を移動相、*o*-フタルアルデヒドを反応試薬として、蛍光波長（Ex=348nm、Em=450nm）により分析を行った。

2. 4 酵素反応液のゲルろ過による分子量測定

酵素分解後の反応液について、ゲルろ過による分子量測定を行った。なお、ゲルろ過は、（株）島津製作所製液体クロマトグラフ LC-10 に、シリカ系ゲルろ過カラム Shim-pack Diol-150 を用い、10mM リン酸緩衝液（pH7.0、含 0.1M NaCl）を移動相として、280nm の吸収波長により分析を行った。また、Bio-Rad 製ゲルろ過用スタンダード（Thyroglobulin（670kDa）、 γ -globulin（158kDa）、ovalbumin（44.0kDa）、Myoglobin（17.0kDa）、Vitamin B12（1.35kDa））を用いて

作成した検量線により、分子量を求めた。

2. 5 酵素反応時間及び温度の検討

フィブロインの分解に与える反応時間（24h、48h）及び温度（50°C）の影響を、反応液のアミノ酸分析及びゲルろ過による分子量測定を行うことにより調べた。

2. 6 酵素反応液の凍結乾燥試料の作成

酵素分解後の反応液をメンブランフィルターにてろ過後、凍結乾燥を行い試料を作成した。

3 実験結果及び考察

3. 1 酵素反応用フィブロイン試料の作成結果

絹精錬後のフィブロイン及び作成した凍結乾燥後のフィブロイン試料を写真1に示す。凍結乾燥により得られたフィブロイン試料は柔らかい綿状で、容易に水に溶けることから、絹精錬後のフィブロインとは物性が大きく異なっている。これは、フィブロインタンパク質の結晶構造に大きな変化が生じたためであると推測される。

3. 2 酵素反応液のアミノ酸分析結果

各酵素反応液のアミノ酸分析の結果から、主な遊離アミノ酸の割合（反応前のフィブロイン量に



絹精錬後



凍結乾燥試料

写真1 絹精錬後のフィブロインと凍結乾燥フィブロイン試料

表2 アミノ酸分析結果（酵素反応で生成した主な遊離アミノ酸の割合）

使用酵素	G l y (%)	A l a (%)	S e r (%)	T y r (%)
①ブロメラインF	0.1	0.4	0.1	0.2
②ニューラーゼF3G	0.1	0.1	0.1	0.3
③ペプチダーゼR	16.7	13.3	4.1	6.6
④プロテアックス	6.0	5.5	1.8	4.9
⑤サモアーゼPC10F	—	—	—	—
⑥プロテアーゼNアマノG	0.5	2.8	0.5	0.3

(—：不検出)

対する重量割合)を求めた結果を表2に示す。

表2の結果より、サモアーゼPC10F以外は、いずれの酵素もフィブロインからグリシン (Gly)、アラニン (Ala)、セリン (Ser)、チロシン (Tyr) を生成することがわかる。さらに、生成した遊離アミノ酸の割合から、中性プロテアーゼであるペプチダーゼR及びプロテアックスがフィブロインの分解に有効であることがわかる。

3. 3 酵素反応液のゲルろ過分子量測定結果

各酵素反応液のゲルろ過測定の結果を図1に示す。また、各測定で得られた最も大きいピーク(矢印部分)について、分子量を求めた結果を表3に示す。

表3 ゲルろ過分子量測定結果

使用酵素・フィブロイン	分子量 (M.W.)
①ブロメラインF	1,810
②ニューラーゼF3G	2,151
③ペプチダーゼR	1,252
④プロテアックス	1,247
⑤サモアーゼPC10F	1,783
⑥プロテアーゼNアマノG	1,533
⑦フィブロイン溶液	14,111

表3の結果より、各反応液中にはフィブロインの分解により生成したペプチド(分子量1,000~2,200)が含まれていることがわかる。特に、ペプチダーゼR及びプロテアックスの反応液中に含まれるペプチドの分子量が最も小さくなっていることから、この2つの酵素がフィブロインの分解に有効であることがわかる。

3. 4 酵素反応時間及び温度の検討結果

次に、ペプチダーゼR及びプロテアックスを用いて、2.2の酵素反応条件を基に、反応温度を微生物による腐敗が生じにくい50℃にして、24時間及び48時間の反応を行った。反応後は、反応液のアミノ酸分析とゲルろ過による分子量測定を行った。まず表4に、アミノ酸分析の結果から求めた主な遊離アミノ酸の割合(反応前のフィブロイン量に対する重量割合)を示す。

表4の結果より、ペプチダーゼR及びプロテアックスともに、48時間後の各遊離アミノ酸の割合は24時間後の各遊離アミノ酸の割合に対して、あまり変化していないことがわかる。このことは、反応開始後24時間で、酵素によるフィブロインの分解がほぼ終了していることを示している。また、37℃(ペプチダーゼR)及び60℃(プロテアックス)での酵素分解による遊離アミノ酸の結果(表2)と比較した場合、ペプチダーゼR

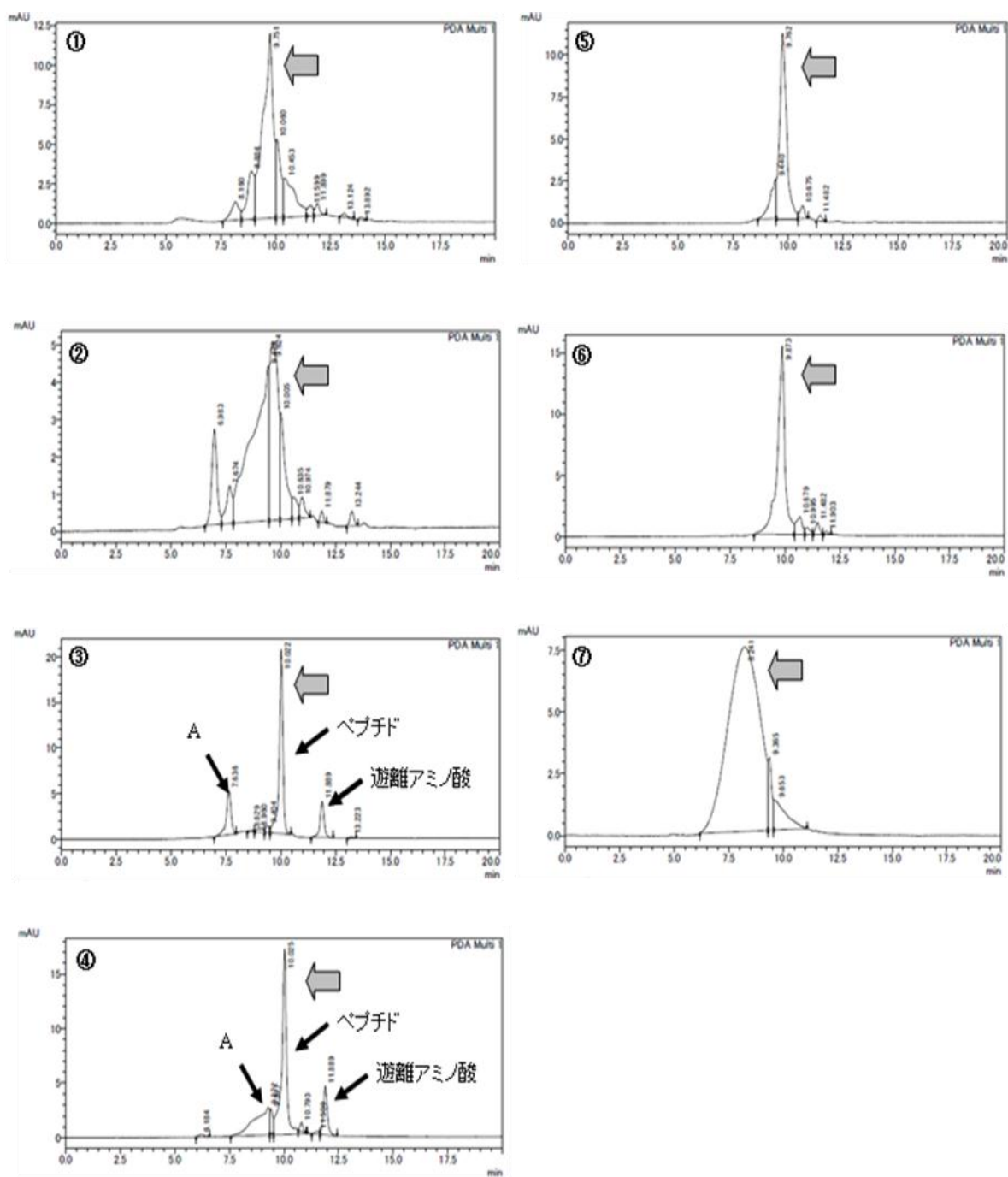


図1 フィブロンectin酵素反応液のゲルろ過測定結果

- ①: プロメラインF
- ②: ニューラーゼF3G
- ③: ペプチダーゼR
- ④: プロテアックス
- ⑤: サモアーゼPC10F
- ⑥: プロテアーゼNアマノG
- ⑦: フィブロンectin溶液

カラム: Shim-pack Diol-150
 移動相: 10mMリン酸緩衝液(pH7.0、含0.1M NaCl)
 流量: 1ml/min
 検出器: 280nm

表4 アミノ酸分析結果（酵素反応で生成した主な遊離アミノ酸の割合）

使用酵素	遊離アミノ酸	24時間後	48時間後
ペプチダーゼR	G l y (%)	28.5	28.3
	A l a (%)	32.3	32.9
プロテアックス	G l y (%)	26.3	27.7
	A l a (%)	30.8	33.0

及びプロテアックスともに 24 時間後の反応液中の遊離アミノ酸の割合が多くなっていることから、反応温度を 50℃にすることで、フィブロインの分解が促進されることがわかる。

次に、各酵素反応液（24 時間後）のゲルろ過測定の結果を図 2 に示す。37℃（ペプチダーゼ R）及び 60℃（プロテアックス）での酵素分解によるゲルろ過の結果（図 1）と比較すると、図 1 で見られる残存フィブロインのピーク（A部分）が図 2 では確認できず、分解生成物であるペプチドと遊離アミノ酸のピークが図 1 よりも大きくなっていることがわかる。このことも、ペプチダーゼ R 及びプロテアックスによる 50℃での反応により、フィブロインの分解がさらに促進されることを示している。

3. 5 酵素反応液の凍結乾燥試料の作成結果

3.4 で得られたプロテアックスによる 24 時間反応後の反応液をメンブランフィルターにてろ過後、凍結乾燥した試料を写真 2 に示す。酵素反応液の凍結乾燥試料は、粉末状で容易に水に溶け、ペプチド特有の苦みが全くないことが確認できた。このことから、今回作成した酵素反応液の凍結乾燥試料は、新たな食品用素材として食品関連業界での利用が期待できるとともに、その他シルク関連業界にお

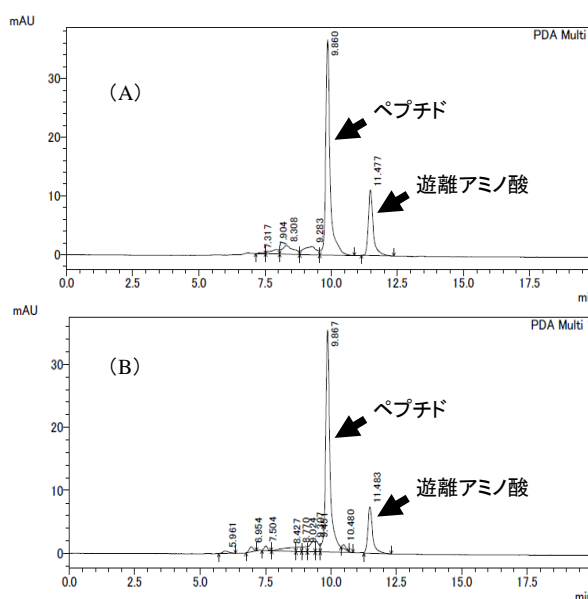


図2 反応条件 50℃、24 時間での酵素反応液のゲルろ過測定結果

(A) : ペプチダーゼ R (B) : プロテアックス

カラム : Shim-pack Diol-150
 移動相 : 10mM リン酸緩衝液
 (pH7.0、含 0.1M NaCl)
 流量 : 1ml/min, 検出器 : 280nm



写真2 酵素反応液の凍結乾燥試料

いても広く応用が期待できる。

また、酵素反応液の凍結乾燥試料中に含まれるペプチドについては、何らかの機能が期待できるため、今後、さらに検討を行う必要がある。

4 まとめ

絹ペプチド（フィブロイン由来ペプチド）の酵素分解による新たな製法を検討したところ、天野エンザイム（株）製酵素ペプチダーゼ R 及びプロテアックスを用いて、50℃、24時間、フィブロインを酵素分解することにより、グリシン、アラニンを主とする遊離アミノ酸と絹ペプチドを含んだ反応生成物が効率良く得られることがわかった。

また、酵素反応液の凍結乾燥試料は、ペプチド特有の苦みがないため、食品関連業界での利用が期待できるとともに、その他シルク関連業界においても広く応用が期待できる。

(参考文献)

- 1) 市毛優二, 富長 博, 茨城県工業技術センター研究報告, 第 33 号, p 40-41 (2005)