

農業生物資源研究所特待研究員

馬越 淳

「エネルギーミニマム型高分子形成
システム技術の開発」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

1. 研究実施の概要

1.1 基本構想

21世紀中期には世界の人口が100億人を超えると予想されており、地球に存在する有限資源やエネルギーは今後の急激な人口増加により枯渇化が予想される。また、今日、人類が合成繊維やプラスチックを作るためには、莫大な有限である石油とエネルギーが必要であり、無限資源とエネルギーの必要性が拡大している。さらに、エネルギー消費による二酸化炭素の増加が大気や水質汚染などを引き起こし、地球環境の悪化と温暖化が問題となっている。

一方、生物は太陽エネルギー、水、酸素、二酸化炭素や金属イオンを有効に利用し、環境低負荷型生産システムで生体高分子を形成している。生物が行なう高分子形成は、多量の有限資源を必要としない。植物は酵素の作用でセルロースやデンプンを合成し、動物は植物を摂取、または、動物を摂取し、低エネルギーでタンパク質を合成する。昆虫のカイコもまた、太陽エネルギーや水で育った桑の葉を食べ、常温で繭繊維を形成している。

人類にとって地球環境との共存と持続的発展を目指すためには、生物が作る超機能性高分子の構造形成メカニズムを解明し、地球環境を守る技術として、生物の構造形成を模倣した「エネルギーミニマム型高分子生産システム技術の創出と確立の必要性がある」というのがこの研究の発想の原点である。

本プロジェクトは生物が行う低エネルギー型高分子形成のモデルシステムとして、カイコや植物の繊維形成に注目し、カイコを用いて絹タンパク質の繊維形成メカニズムの解明や、植物細胞のプロトプラストを用いてカロース繊維形成のメカニズムを解明した。さらに、これらのメカニズムの解明から環境低負荷型高分子構造形成のシステム技術の開発を試みた。

1.2 実施と成果

生物が行っている低エネルギー型高分子構造形成の解明と高分子形成システム技術開発を遂行するために、太陽エネルギーを有効に利用している動物や植物の構造形成に注目した。本プロジェクトでは、紡糸生物が行なっている巧妙な紡糸の研究、特に、カイコが作るタンパク質の自己集合制御、精密分子配列制御した繊維形成のメカニズムの研究、昆虫の生成物と大気中の二酸化炭素に関する研究、植物細胞のプロトプラストによる二酸化炭素を利用したカロース繊維形成機構に関する研究、生体系類似の合成ポリペプチドの合成方法の確立と液晶の構造形成機構の研究を実施した。

この研究プロジェクトは三つの分野で構成した。1) 紡糸生物のタンパク質の構造形成

機構と自己凝集制御、2) 木材成長のカロースの高分子構造形成機構と自己凝集制御、3) バイオリキッドクリスタルの高分子液晶の構造形成の解析である。

紡糸生物（カイコ）の低エネルギー型高分子形成機構を解明するために、カイコの繊維形成や紡糸方法を研究した結果、カイコの生合成したタンパク質を巧みに制御し、合成繊維の紡糸方法より総合的で巧みな高分子形成によって、繊維形成を行っていることを明らかにした。つまり、カイコは乾式紡糸、複合紡糸、高速紡糸、液晶紡糸、イオン制御紡糸、捲縮紡糸、ボールベアリング紡糸、ゲル-ゾル転移紡糸、多孔質紡糸、傾斜紡糸、ノズル制御紡糸、絡み合い紡糸、ゾーン延伸、再延伸、常温紡糸など多くの紡糸方法を巧みに利用して、フィブロイン分子鎖を精密に配向制御し、低エネルギーで繊維形成していることを解明した。

カイコの繊維形成機構の解明の中で、カイコやクモが大気中の二酸化炭素を絹糸の中に取り込んでいることを定量的に証明し、二酸化炭素が絹糸タンパク質の構成成分であるアミノ酸に炭素として取り込まれていることを世界で初めて実証した。今まで、大気中の二酸化炭素を利用できるのは植物と光合成細菌やサンゴなどの一部の微生物だけと考えるだけでなく、動物が利用できることを突き止めたことは生物学、昆虫学の新たな発見である。カイコやクモが絹糸に取り込む二酸化炭素の量は、植物の光合成による固定量より規模は小さいが、昆虫の環境適応能力を利用した環境調和型社会への技術として重要な発見をした。

カイコ体内より取り出した未変性のフィブロイン水溶液の光散乱、粘弾性から金属イオンの種類、濃度が紡糸の支配因子であることを証明した。絹フィブロイン溶液は中の分子は水溶液中では単一鎖として存在せず、すべて分子はクラスターとして存在し、そのクラスターが集合することにより、さらに、大きな集合構造を形成することを明らかにした。また、絹フィブロイン溶液は擬塑性流動を持つ弾性ゲルで、系全体にわたって大きな網目を持ち、力学的に弱い網目構造を形成している溶液であることを解明した。

カイコは繭を形成する際、金属イオンの作用により、多量の絹タンパク質が絹糸腺にゲル状態として貯蔵し、ゲル状タンパク質は、そのままでは、細長い前部絹糸腺の管には通過できないため、金属イオンの濃度の変化で、ゲル状をゾル状水溶液にする。すなわち、桑の葉から摂取したカルシウムやカリウムイオンを利用して、ゲル状の液状絹をゾル状態に転移させる。ゾル状フィブロインは自己凝集し、流動配向によって液晶状態を形成させ、粘度を低下させることが明確となった。ゾル状フィブロイン溶液は、紡糸管中にあるキチン質ノズルでしっかりと把持され、把持された溶液はカイコ自身の力で繊維として、牽引されることを明らかとなった（合成繊維の場合には溶液を把持することは困難である）。

すなわち、カイコの高分子構造形成から、カイコは長い疎水性の分子鎖に親水性の短い分子鎖を架橋させ、無機イオンでゲル、ゾル状態を分子制御し、自己凝集と液晶状態で、精密に分子配列制御し、高配向の繊維形成を明らかにし、低エネルギーでの高分子形成のシステム技術の基礎知見が得られた。

植物の細胞壁形成過程の解析において、樹木のプロトプラストを用い、高カルシウム濃度、高濃度の二酸化炭素を加えるという植物細胞にストレスを与えることにより、プロトプラストが細胞分裂を行わず、細胞外に高次構造を持つ巨大な繊維が生成され、分泌することを初めて見出した。

生物が作る組織構造は、らせん配列した棒状タンパク質が多く存在し、自己凝集しながら液晶形成する。そこで、棒状高分子の液晶形成に着目し、棒状高分子を持つ典型的な合成ポリペプチドのポリグルタミン酸エステルを用いて、液晶相が連続的に異なる構造形成機構を明らかにした。すなわち、液晶相の連続変化は低エネルギー構造形成システム技術の開発に結びつくものと考えられる。また、ポリペプチドの合成において、アミノ酸NCA法によって、低エネルギー型の合成方法を確立した。

以上のことから、カイコの繊維形成メカニズム、植物細胞のプロトプラストの巨大カロール繊維の発生メカニズム、バイオリキッドクリスタルなどの構造形成機構の解明より、低エネルギー型高分子構造形成システム技術開発のための高分子の構造因子は、親水基を有した水溶性で、剛直な部分を持つ棒状高分子、分子内で会合性が強く両親溶媒性高分子電解質であることが必要であることを解明した。

このような構造を有する高分子は、容易に自己凝集、流動配向、液晶形成することが期待され、イオン濃度変化を利用することで、ナノオーダーの会合体形成が制御できる。さらに、精密重合方法により分子量、分子量分布、立体構造が制御することができれば、制御されたナノオーダー構造を有し、環境低負荷型高分子材料の実現が可能となる。

(1) カイコグループの研究成果

カイコの紡糸方法と繊維形成メカニズムの解明において、カイコは種々の紡糸方法を取り入れた総合的な紡糸方法で、繊維形成を行っていることを明らかにした。カイコ体内の絹糸腺より生成された液状絹は、金属イオンによってタンパク質濃度を高め、フィブロイン分子鎖をネットワーク状態に形成させる。物理的ゲル状態になったフィブロインは金属イオンの作用により、物理的架橋点の絡み合いを解除し自己凝集する。その後、流動配向によって、フィブロイン分子鎖が配向しネマチック液晶状態をとり、カイコの手で延伸され、高配向の繊維が形成されるという一連の高分子構造形成のシステムを明確にした。

絹糸腺中のフィブロインのゲル-ゾル転移機構を明らかにするために、絹糸腺中に含まれる無機イオン濃度の測定、希薄絹フィブロイン水溶液の粘弾性測定、絹フィブロインの塩溶液の拡散速度解析より、カルシウムとカリウムイオン濃度変化によって異なることを明らかにした。このことにより、カイコはカルシウムイオンによってゲルを安定的に保存し、カリウムイオンによってゲル-ゾル転移を起こしていることを明らかにした。

カイコの中部絹糸腺から得られる未変性絹フィブロイン水溶液、ならびに繭から熱的・化学的処理により調製した再生絹フィブロイン水溶液の構造とダイナミックスを、光散乱・粘弾性手法を用いて系統的に調べ、溶液構造と分子運動の関係を明らかにするとともに、絹糸腺中の各部・区に存在する金属イオンの種類・濃度変化がカイコの紡糸機構の支配的な因子であることを解明した。

すなわち、絹フィブロイン溶液は中の分子は水溶液中では単一鎖として存在せず、すべてクラスターとして存在し、そのクラスターが集合することにより、さらに、大きな集合構造を形成することを明らかにした。また、絹フィブロイン溶液は擬塑性流動を持つ弾性ゲルで、系全体にわたって大きな網目を持ち、力学的に弱い網目構造を形成している溶液であることを解明した。

カイコやクモが絹糸を形成する際、大気中の二酸化炭素を絹タンパク質の構成成分であるアミノ酸のカルボニル基として取り込むことを明確にした。

エリ蚕フィブロインタンパク質の構造形成過程を解明から織物状の構造が観察された。この構造はラミンタンパク質が生物の細胞を形成する際にその形態を支える細胞骨格と呼ばれる構造と類似する。このような構造物を人工的に作り出すことで医療材料などに利用でき、あらたな生体材料が開発されることも期待される。

絹糸中の金属イオンの解析において、繭繊維や絹糸を260～300℃で加熱処理すると、繊維中に孔が形成されることを観察した。絹繊維や繭繊維を高温度で熱処理することにより、絹タンパク質の中空糸が得られることを明らかにした。

高結晶性セルロースを酸で処理した微結晶性懸濁液と、フィブロインを中性塩溶液に溶解し透析した水溶液を、それぞれ混合し常温で乾燥すると、得られた混合フィルムの強度とヤング率は単一フィルムのものより増加した。フィブロイン分子鎖が、低エネルギーで高結晶性セルロース分子に結晶面配向することを明らかにした。

カイコの構造形成の特徴は繊維の構造形成を終了する前に、必ず、水分子を簡単に排除するとともに、すぐに、強固な水素結合を作り、ガラス転移温度を高温度に上げ、寸法安定な繊維を作っていることが分かった。

絹糸の中の金属イオンを解明する時に、繭繊維や絹糸を260～300℃で加熱処理すると、繊維の中に孔が作られることを走査型電子顕微鏡で観察された。絹繊維や繭繊維を高温度で熱処理することにより、中空糸が作られることを見つけ出した。

高結晶性のセルロースを酸で処理し、微結晶性懸濁液と塩溶液にフィブロインを溶解し、透析した混合水溶液を、常温で乾燥すると、フィブロイン分子鎖が高結晶性のセルロース分子に面配向したために、フィルムの強度とヤング率が増加した。このことによりフィブロイン分子鎖が低エネルギーでセルロース結晶面配向することを明らかにした。

(2) 木材グループ

植物体の高分子形成機構を解明するために、シラカバから得られたプロトプラストに過剰のカルシウムを加え、pHを変化させ、過剰の二酸化炭素の環境下で約3ヶ月間培養すると、プロトプラストよりカロース繊維が細胞外へ生産することを見出した。これはプロトプラストの再生過程で、細胞分裂が行われず、プロトプラストの細胞壁よりカロースの高次構造が生合成され、巨大な繊維が形成していることを示している。巨大なカロース繊維はカロースが充填しているのではなく、中空状であることが確認された。これらの実験から細胞の壁面にカロース合成酵素が存在し、繊維状のカロースの高次構造形成は、過酷な条件下で発現することが明らかとなった。

(3) バイオリキッドクリスタルグループ

生物は省エネルギー、省資源で組織構造を行っている。これは生体系において液晶形成能を持つ棒状高分子が多く存在し、自発的に多様な構造が発生し、液晶状態をとり、ナノオーダーで構造制御を行っている。生物の高分子構造形成機構を模倣するために、モデル物質として棒状の形態を持つ合成ポリペプチドのポリグルタミン酸エステルを用いて、その合成条件や液晶形成条件や構造形成について研究した。また、ポリシランの棒状高分子がネマチック液晶、スメチック液晶、カラムナ-液晶へと逐次相転移し、自発的に構造形成することを明らかにした。さらに、液晶の構造創成において生物が段階的に組織構造創成をしていることを、モデル化合物ポリペプチドを使用して明らかにし、高分子液晶材用を利用し、生物が創成する構造色よりも美しく、かつ実効的なサイズを作り上げた。

ポリペプチドの低エネルギー型合成方法の検討において、アミノ酸NCAの有効な合成方法を確立した。アミノ酸NCAの重合条件を低含水率、低温で行なうと結晶性の高い単結晶が得られることを明らかにした。

2. 研究構想

2.1 研究開始時から目指した目標

生物は太陽エネルギー、水、二酸化炭素を巧みに利用しながら、酵素の活動などにより、植物、動物、微生物の高分子構造形成を行っている。つまり、生物は生体高分子を規則正しい構造にして、自己凝集によって生物自身を形成している。本研究が目指した目標は、生物の巧みな生体機能を人工的に模倣することで、有限資源に頼らず、環境に低負荷型で高分子形成する生産システムを開発することである。

2.2 立案した5年間の研究計画

本研究の研究計画は、初年度より紡糸生物のタンパク質の構造形成機構や自己凝集制御の解明、木材成長のカロースの高分子構造形成機構と自己凝集制御の解明、合成ポリペプチドをモデルとした液晶構造の制御方法の解明を行う。3年度より低エネルギー高分子構造形成のシステム化について、最終年度は低エネルギー型高分子構造形成のシステム化と技術開発の確立である。

5年間の研究の進め方

生物が行なっている高分子の構造形成について、生物自身の構造形成を解明するために、カイコやクモ、木材を材料として、カイコや木材のプロトプラストの繊維形成のメカニズムの解明と合成ポリペプチドの構造形成の解明を5年間行なった。その内容を下記に示す。

本研究は3つの内容に分かれて研究を遂行する。

- 1) 紡糸生物のタンパク質の構造形成機構と自己集合制御の解明（初年度～5年度）
- 2) 木材生長のカロースの高分子構造形成と自己集合制御の解明（初年度～5年度）
- 3) バイリッキドクリスタル高分子液晶の構築（初年度～5年度）

1) 紡糸生物のタンパク質の構造形成と自己集合制御の解明（初年度～5年度）

実験材料として糸を作る生物、特にカイコを主として、カイコが環境低負荷型高分子構造形成メカニズムを解析し、どのようにして天然タンパク質が自己集合制御し、繊維形成されるかを解明する。

1. 紡糸生物の繊維化機構の解明（初年度～4年度）
2. 紡糸生物体内の絹糸腺のイオン濃度変化の解明（初年度～4年度）
3. 紡糸生物のタンパク質合成メカニズムの解明（初年度～5年度）
4. 紡糸生物のタンパク質のゲル→ゾル転移の解明（初年度～5年度）
5. 紡糸タンクのタンパク質の濃縮方法の解明（2年度～4年度）
6. 紡糸生物の傾斜、複合紡糸メカニズムの解明（初年度～4年度）
7. 紡糸生物のゾーン延伸、高速紡糸メカニズムの解明（初年度～4年度）
8. 紡糸生物のゲルの構造解析（初年度～5年度）
9. 紡糸生物の希薄溶液における分子構造の解明（初年度～5年度）
10. 紡糸生物の濃厚溶液における分子構造の解明（初年度～5年度）

11. 紡糸生物のカルシウムイオン制御機構の解明（初年度～5年度）
12. 紡糸生物の紡糸口とノズルの機能解明（初年度～4年度）
13. 紡糸生物の絹糸腺内のタンパク質のアミノ酸の分析（初年度～4年度）
14. 紡糸生物の高次構造の解明（初年度～5年度）
15. 紡糸生物の紡糸中の生理現象の解明（初年度～5年度）
16. シルクの表面構造の解明（初年度～5年度）
17. 生物紡糸のタンパク質の自己集合制御と構造形成機構の解明（初年度～5年度）
18. 紡糸生物の低エネルギー型タンパク質構造形成機構の解明（初年度～5年度）
19. 紡糸生物の総合紡糸機構（初年度～5年度）
20. 生物紡糸の高分子形成システムの構築（2年度～5年度）

2) 木材成長におけるカロースの高分子構造形成機構の解明（初年度～5年度）

木材は太陽エネルギーを効率的に利用し、天然高分子の構造形成を行っている。この機構を模倣し、環境低負荷型高分子を構築するために、木材の細胞壁形成機構を解明する。

1. 細胞壁形成メカニズムの解明（初年度～5年度）
2. カロースの結晶成長機構の解明（初年度～5年度）
3. カロースの液晶構造形成機構の解明（初年度～5年度）
4. カロースの自己集合制御機構の解明（2年度～5年度）
5. カロースの高次構造形成機構の解明（2年度～5年度）
6. カロースの自己複製機構の解明（3年度～5年度）
7. 環境低負荷型のカロース高分子形成制御方法の探索（初年度～3年度）

3) バイオリキッドクリスタルの高分子液晶形成における制御方法の解析（初年度～5年度）

生物は省エネルギー、省資源で組織構造を形成している。すなわち、昆虫や孔雀、モルフォチョウなどは巧妙な方法を用いて、羽や体を形成している。これは液晶形成能を持つ棒状高分子が多く存在し、自発的に多様な構造が発生し、液晶状態をとり、ナノオーダーで構造制御を行って構造形成をしている。生物の高分子構造形成の機構を模倣するために、ポリペプチドを構造形成のモデルとして、生体高分子をバイオリキッドクリスタル状態にし、高分子を自己集合制御させて、組織構造の形成機構の解明と、その制御方法の解析を行う。さらに、低エネルギーによる合成ポリペプチドの合成と構造の解析を行う。

1. 昆虫のキチン・キトサンなどの液晶構造形成機構の解明（初年度～5年度）
2. 昆虫のメゾ相の解析と液晶構造の動的変化の解析（初年度～5年度）
3. 高分子形成における無機イオンの相互作用（初年度～5年度）
4. バイオリキッドクリスタルのダイナミックスの解析（3年度～5年度）

5. バイオリキッドクリスタル形成における制御方法の構築の探索 (2年度~5年度)
6. 低エネルギーによる合成ポリペプチドの合成と構造解析 (3年度~5年度)

将来への展望と研究成果の寄与

カイコグループの研究において、カイコが大気中の二酸化炭素を繊維の中に固定することを世界で初めて明らかにした。このことより、大気中の二酸化炭素が取り込まれるメカニズムを解明し、人工的に取り込む方法を模倣する技術の開発が新たな研究課題として期待できる。

液晶に代表されるような高分子が規則正しく配列した構造をとるためには、高分子が柔軟なランダムコイル状態ではなく、剛直なロッド状の構造を持つことが必要であることが明確になった。今後の展開として、環境低負荷型高分子形成システムの技術開発には、高分子が自然に配向構造（自己配向）を形成し、水溶性高分子であるような高分子構造の設計、二酸化炭素を高分子に固定する技術を確立することが新たな研究目標として呈示できる。

エリ蚕フィブロインタンパク質の構造形成過程を解明から織物状の構造が観察された。この構造はラミンタンパク質が生物の細胞を形成する際にその形態を支える細胞骨格と呼ばれる構造と類似する。このような構造物を人工的に作り出すことで医療材料などに利用でき、あらたな生体材料が開発されることが期待される。

カイコ体内の絹糸腺の各部分から得られる未変性フィブロイン水溶液ならびに、繭から熱的・化学的処理して調製した絹フィブロイン水溶液の構造とダイナミックスの光散乱・粘弾性測定より、金属イオンの種類・濃度変化が絹フィブロインタンパク質の構造形成機構の支配的条件因子であった。これは、今後の低エネルギー型紡糸技術開発において、基礎データとして重要であり、生体高分子物性学および高分子工学の発展に寄与する。

カイコグループの研究成果

カイコの紡糸方法と繊維形成のメカニズムの研究結果、カイコは種々の約20種類の紡糸方法を総合的に取り入れて繊維形成を行っていることが明らかになった。さらに、カイコ体内の絹糸腺より作られた液状絹は金属イオンによって、タンパク質の濃度を高め、フィブロイン分子鎖をネットワーク状態に形成する。物理的ゲル状態になったフィブロインは金属イオンの作用により、物理的架橋点の絡み合いを解除し、自己凝集を形成しやすい状態にする。その後、流動配向によって、フィブロインの分子鎖が配向し、ネマティック液晶を作り、カイコの手で延伸され、高配向の繊維が形成されることを明らかにした。

セリシンを除いた絹糸の中のフィブロインタンパク質の構造はP25タンパク質のまわりに6本のH鎖タンパク質が水素結合で結ばれ、H鎖タンパク質とL鎖タンパク質がS—S結合で結ばれることを明らかにした。

絹糸腺のフィブロインのゲル—ゾル転移を明らかにするために、絹フィブロインの水溶液への拡散速度は解析し、カルシウムとカリウムイオンでは異なっていたことを明らかにした。このことにより、カイコは二価のイオンのカルシウムイオンによってゲルを安定的に保存し、一価のイオンのカリウムイオンによってゲルをゾル化していることを明らかにした。

カイコ絹糸腺中の主として中部の各区から直接採取した未変性絹フィブロイン水溶液ならびに繭から熱的・化学的処理により再生した絹フィブロイン水溶液の構造とダイナミクスを光散乱・粘弾性手法を用いて系統的に調べ、溶液構造と分子運動の関係を明らかにした。絹糸腺中の各部・区に存在する金属イオンの種類・濃度がカイコの紡糸機構の支配因子であることを解明した。絹フィブロイン溶液は中の分子は水溶液中では単一鎖として存在せず、金属イオンの作用で、すべて分子同士がクラスターを形成し、そのクラスターが集合することにより、さらに、大きな集合構造を形成することを明らかにした。また、絹フィブロイン溶液は擬塑性流動を持つ弾性ゲルで、系全体にわたって大きな網目を持ち、力学的に弱い網目構造を形成している溶液であることを解明した。

カイコやクモが絹糸を作る時、大気中の二酸化炭素を利用して絹糸の中のタンパク質に取り入れることを見つけた。

絹糸の中の金属イオンを解明する時に、繭繊維や絹糸を260～300℃で加熱処理すると、繊維の中に孔が作られることを走査型電子顕微鏡で観察された。絹繊維や繭繊維を高温度で熱処理することにより、中空糸が作られることを見つけた。

高結晶性のセルロースを酸で処理し、微結晶性懸濁液と塩溶液にフィブロインを溶解し、透析した混合水溶液を、常温で乾燥すると、フィブロイン分子鎖が高結晶性のセルロース分子に面配向し、この面配向でフィルムの強度とヤング率が増加した。この結果、フィブロイン分子鎖が低エネルギーでセルロース結晶面配向することを明らかにした。

木材グループ

植物体の高分子形成機構を解明するために、シラカバから得られたプロトプラストに過剰のカルシウムを加え、pHを変化させ、過剰の二酸化炭素の条件下で培養すると、プロトプラストが約3ヶ月で巨大なカロース繊維を細胞外に向かって生産し始めることを見つけ出した。これはプロトプラストが再生していく過程で、細胞分裂を行わず、プロトプラストの細胞壁からカロースの高次構造が形成され、巨大な繊維が生合成される。巨大なカロース繊維はカロースが充填しているのではなく、中空状であることが確認された。これらの実験から細胞の壁面にカロース合成酵素が存在し、カロースの高次構造形成が過酷な条件下では、常温で繊維状に発現することが明らかとなった。

バイオリキッドクリスタルグループ

バイオリキッドクリスタルグループでは、水溶性ポリペプチドを用いて、生物が行なっている自己凝集と液晶相形成過程を模倣することができ、液晶を使った繊細な色彩を可能にした。

生体系には液晶形成能を持った棒状の高分子が多く存在し、多様な構造が自発的に構造発生し、液晶状態を作る。そこで、生物の高分子構造形成を模倣するために、棒状形態を持つ合成ポリペプチドのポリグルタミン酸エステルを用いて、液晶条件を研究した。このポリシランの棒状高分子がネマチック液晶、スメチック液晶、コラムナ-液晶へと逐次相転移し、自発的に構造形成がことを明らかにした。

さらに、高分子液晶の構造創成において生物が段階的に組織構造創成をしていることを、モデル化合物ポリペプチドを使用して明らかにし、高分子液晶材用を利用し、生物が創成する構造色よりも美しく、かつ実効的なサイズを作り上げた。

ポリペプチドの低エネルギー型合成方法の研究において、アミノ酸NCAの有効な合成方法を確立した。アミノ酸NCAの重合条件を低含水率、低温で行なうと結晶性の高い単結晶が得られることを明らかにした。低エネルギーでの巨大な単結晶作成方法を確立し、バイオリキッドクリスタルの合成や組織構造形成や制御方法の解明に寄与した。

2.6 その後の新展開から生まれた目標等

カイコグループが行なった研究から、カイコが大気中の二酸化炭素を繊維の中に固定することが世界で初めて明らかにした。このことにより、二酸化炭素が取り込むメカニズムを解明し、この大気中の二酸化炭素を取り込む方法を、人工的に模倣する研究が新たな目標となった。

液晶に代表されるような高分子が配向した構造をとるためには、高分子が柔らかい

ランダムコイル状態ではなく、剛直なロッド状の構造が必要であることが解析されたので、今後の展開として、低エネルギー高分子形成システムの技術の開発は高分子がエネルギーを使わずに自然に配向構造を作る（自己配向）ような高分子設計と水溶性高分子と二酸化炭素を高分子に固定する技術が新たな目標が生まれた。

カイコ絹糸腺中の主として中部の各区から直接採取した未変性絹フィブロイン水溶液ならびに繭から熱的・化学的処理により再生した絹フィブロイン水溶液の構造とダイナミクスを光散乱・粘弾性手法から、金属イオンの種類・濃度がカイコの紡糸機構の支配因子であり、今後、人工的に低エネルギー紡糸の基礎データとして重要で、生体高分子物性学および高分子繊維工学に寄与する。

さらに、木材グループでは樹木のプロトプラストからカローズ繊維を作り出すことが出来、カローズを合成する酵素を見つけ出した。今後、酵素を細胞膜状に並べ、同時に繊維やフィルム形成を行なう方法の開発を目指す糸口になった。

バイオリキッドクリスタルグループでは生物が行っている自己凝集と液晶形成を模倣し、色彩への研究と発展し、研究の一部の成果は高く評価された。さらにタンパク質の重合では低エネルギーによる巨大な単結晶が作成され、低エネルギーでの構造形成が可能となった。

3. 研究内容

3.1 カイコの繊維形成のメカニズム（カイコグループ）

植物、動物、微生物など生物はエネルギーを極めて有効に利用し、常温で生体高分子を形成し、カイコも同様に低エネルギーでの高分子構造形成を行なっている。この巧みな構造形成を解明するために、カイコの繊維形成と自己凝集のメカニズムを解明した。

カイコは巧みな方法で繊維を形成する。カイコは孵化してから4回脱皮する。5 齢熟蚕（カイコが繭繊維を作る直前）になると、桑の葉を食べなくなり、カイコの体が透明になり、カイコの体内にある絹糸腺が肥大化し、繭を作る。カイコは単にタンパク質を吐き出すのではなく、非常に巧妙な方法で繊維を作ること明らかにした。

3.1.1 絹糸腺

カイコは二種類のタンパク質を合成する。一つは絹の原料となる絹フィブロインタンパク質、もう一つはセリシントタンパク質である。両者のタンパク質は絹糸腺内で作られる。絹糸腺は後部絹糸腺、中部絹糸腺、前部絹糸腺の3つの器官に区分され(図1.1)、絹の原料となるフィブロインは後部絹糸腺で作られる。このフィブロインはゲル状の水溶液で、濃度は12%、分子形態がランダムコイルである。

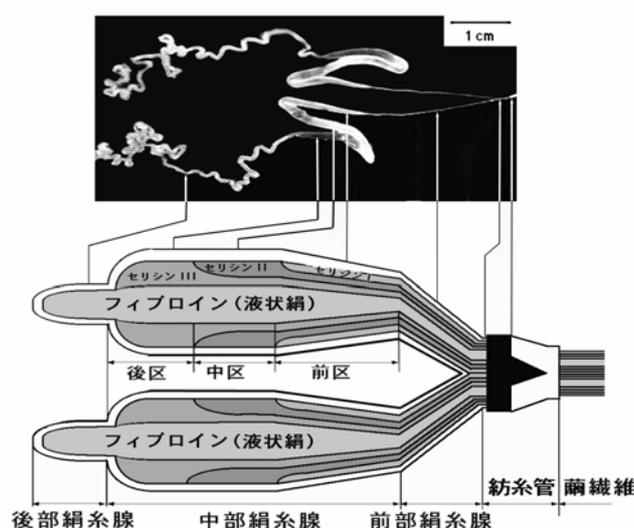


図1.1 家蚕絹糸腺の写真と絹糸腺のモデル図

セリシンは中部絹糸腺で合成される。中部絹糸腺は後区、中区、前区に分かれ、セリシンにはセリシンIV、III、II、Iの4種類があり、そのアミノ酸の組成はそれぞれ異なる(傾斜紡糸)。セリシンは中部絹糸腺の中は中心にフィブロイン、周りにセリシンがある2層構造である(複合紡糸)。二種類のタンパク質は相分離を起こし、混合することはない。ここにカイコの絹フィブロインとセリシン溶液の特徴がある。中部絹糸腺内のフィブロインの濃度は25%のゲル状、通常、液状絹と呼んでいる。分子形態はランダムコイルであるが、 α 型構造の結晶核を多く含んでいるゲル状の水溶液である。中部絹糸腺の前方にある前部絹糸腺の役目はゲル状の液状絹をゾル状に変化し、フィブロイン分子を前部絹糸腺の中を流れ易くし、フィブロイン分子が配向させる役割をする(流動配向)ことを明らかにした。

3.1.2 液状絹からの繊維形成と高速紡糸

カイコは液状絹を早い速度で延伸する。中部絹糸腺の中の液状絹を速い速度で延伸すると繊維化し、また、前部絹糸腺の溶液をピンセットで掴んで速い速度で引っ張ると繊維化が起こる(図1.2)、引張り速度が遅いと繊維化は生じない。この実験結果を、さらに、詳しく調べてみると、液状絹の繊維化は速度依存性がある。延伸速度が50cm/min以上であると、液状絹は β 型に繊維配向する。しかし、これ以下の速度においては液状絹が伸長流動のみが起こり、繊維化は生じない。このことから繊維形成するには一定の引張りの速さ(50cm/min)が必要である。丁度、この引張り速度はカイコの紡糸速度(60cm/min)とほぼ同じ速度であり、カイコが8の字の首振り運動がこの延伸速度に相当する。

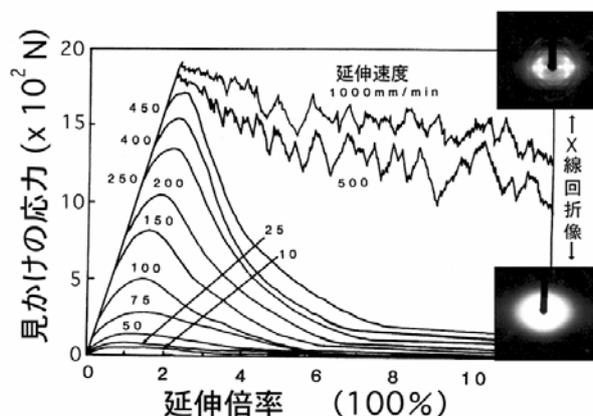


図1.2 液状絹の強伸度曲線の引張り速度依存性とX線回折像

さらに、紡糸中のカイコ体内の絹糸腺の太さと紡糸口の関係を調べると、紡糸倍率を直径の比（紡糸口の太さ/中部絹糸腺中区の太さ）で測定すると150倍で、合成繊維の高速紡糸と同じ倍率であることから、カイコは非常に速い速度で糸を作っている（高速紡糸）。しかし、人為的にゲル状液状絹を延伸すると元の長さの約20倍しか延伸できない。これはゲル状態で延伸するからである。また、カイコが作った絹繊維と人的に作った繊維の動的ヤング率を比較するとカイコが作った絹繊維の動的ヤング率の約半分であることから、カイコはゲル紡糸では絹繊維を作らないことを明らかにした。

3.1.3 液晶紡糸（前部絹糸腺内の溶液）

カイコ体内の後部、中部絹糸腺で作られたゲル状の液状絹は前部絹糸腺の細い長い管をゲル状では通過できない。そこで、カイコは素晴らしい方法でゲル状液状絹を細長い管の中を通過させている。その方法とは、合成高分子と同じように液晶状態（溶液の中で分子が配列している状態）を作って粘度を下げている。

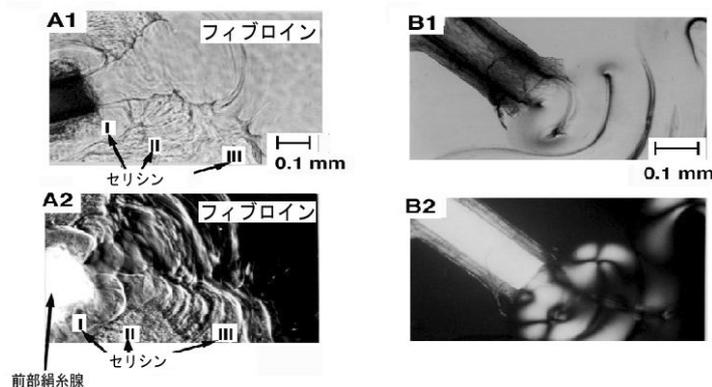


図 1.3 家蚕およびクス蚕の前部絹糸腺からの液状絹の写真

A1:家蚕前部絹糸腺の液状絹の普通顕微鏡写真、A2:A1の偏光顕微鏡写真、
B1:クス蚕前部絹糸腺の液状絹の普通顕微鏡写真、B2:B1の偏光顕微鏡写真、

そこで、絹繊維を作っている最中のカイコ体内の前部絹糸腺を切断し、偏向顕微鏡で観察すると光学異方性を持った流動状の液状絹が認められる（図 1.3）。しかし、前部絹糸腺内の液状絹の断面を観察すると光学異方性を示さないことから、1軸配向性のネマチック相の存在する液晶であると考えられる。前部絹糸腺内の液状絹の構造はある程度の乱れをもったネマチック相であることを明らかにした。さらに、

この液状絹を水中に浸漬した後、偏向顕微鏡で観察すると光学異方性が無くなることから、この液晶は水に溶けるリオトロピックの構造をとっていることが分かった。カイコは液晶を作ることにより液状絹の粘度を低下させて、フィブロイン溶液を細長い前部絹糸腺の中を通過しやすい状態にしている。野蚕の柞蚕、天蚕、クス蚕、エリ蚕などやクモもカイコと同様に、細長い管を溶液が通過するために、液晶状態を作っている。これは細長い管の中をゾル上の液状絹が流れ、絹分子が流動配向するためである。

3.1.4 ゲル-ゾル転移と自己凝集（イオン自動制御紡糸）

カイコが優れている点はゲル状のフィブロインをゾル状の溶液に転移させることである。カイコ体内の絹糸腺の細長い前部絹糸腺の管の中はゲル状態では通過できないので、金属イオンを用いながらゲルを液晶状態にして粘度を下げ、通過し易いようにしてゲル-ゾル転移を起こす。

5 齢熟蚕のカイコ体内の金属イオンを調べると、カルシウムイオンとカリウムイオンが多く含まれている。中部絹糸腺後区にはカルシウムイオンが多く含まれ、中部絹糸腺中区からカリウムイオンが増加し、中部絹糸腺前区ではカリウムイオンが増加する。このことにより、カルシウムイオンの増加によりフィブロイン分子鎖と物理的なキレート結合を作り、中部絹糸腺中区の液状絹の濃度を高めるその後、カリウムイオンが増加することにより、物理的に結合されていた部分が、切断され、粘度を低下させて流動配向をしやすくすることを明らかにした。

モデル実験として、液状絹を希薄にし、カルシウムとカリウムイオンの濃度を変化させ、粘度を測定すると、イオンの濃度を高くなるに従い、ある濃度で粘度が急激に低下する。このことにより、カイコ体内の液状絹の中のカルシウムやカリウムイオンが増加することにより、液状絹の粘度を低下させ、ゲル-ゾル転移が起こることが分かる。

さらに、フィブロイン希薄溶液をマイカーの上で乾燥し、原子間力顕微鏡 (AFM) で表面を観察すると、1本のフィブロイン分子が観察される。フィブロイン濃度を高めると、分子が自己凝集し、お互いに長い絡み合いの状態になる。このことにより、フィブロイン分子鎖は延伸により繊維化が簡単に起こる。そのために、フィブロイン分子が前部絹糸腺の中を通過することにより、流動配向により、液晶状態になることが分かる (図 1.4)。また、昇温過程における融解熱を DSC の熱測定で調べると、液状絹の分子間の水素結合は後部絹糸腺、中部絹糸腺 (後区、中区、前区) 内の液状絹の融解エネルギーが 270、210、190、189 mJ/mg と低くなり、不凍水が 6.9、11.8、16.8、17.6% と高まり、自由水の割合が低下し、繊維形成をする前は分子間や分子内の水素結合が

多くなっていることを明らかにした。カイコはこのような素晴らしい分子設計により、カルシウムとカリウムイオンの作用で巧みにゲル-ゾル転移と液晶状態を作り、高配向度の超感性を持った繊維を形成する。

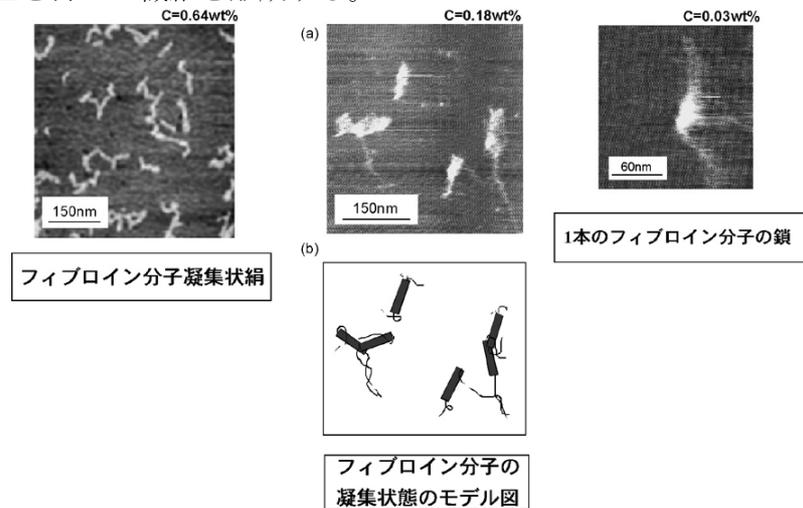


図1.4 希薄な絹フィブロイン水溶液を雲母上で乾燥したAFM像

3.1.5 紡糸管（複合・自動制御紡糸、ゾーン延伸）

繊維化はカイコ体内のどこの器官で起こるか。それは前部絹糸腺の前方に紡糸管で繊維化をする。紡糸管は共通部、圧糸部、紡糸口の3つの器官から成っている（図1.5）。その役割はシルクの溶液を把持し、無配向フィブロイン分子を配向 β 型に引っ張り出す。

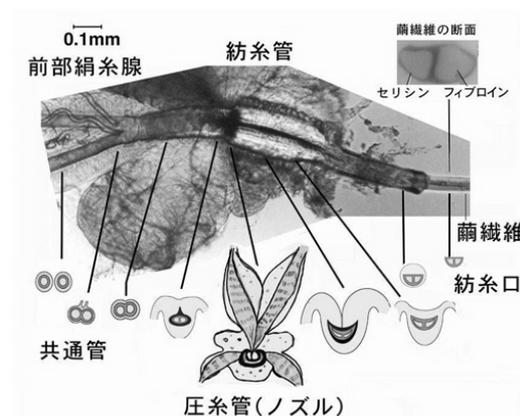


図1.5 家蚕体内の紡糸管の写真とその断面のモデル図

共通部は2本の絹糸腺が合流するところで、2本の液状絹が1本になり、合成繊維の複合紡糸に相当する（ここでは円の断面）。この液状絹が合流することにより、繭繊維は2本のフィブロインで構成され、半円の断面になった液状絹は圧糸部（合成繊維のノズル）に移動する。

圧糸部は凹状のキチン板を通過する際に三角形の断面になる。大きさを開閉する4つの筋肉から連結するノズルの形状を変化することが出来る。液状絹が圧糸部を通過する際に、溶液である液状絹を把持し、その筋肉を動かして管孔の太さを調節する（自動制御紡糸）。この場所から繊維化が起こる。

カイコの紡糸の一つの優れた点はこのフィブロインタンパク質溶液を把持することにある。しかしながら、合成高分子の紡糸は溶液を把持することはしない。カイコは圧糸部の先端にある紡糸口の先で糸を固定し、圧糸部を移動させながら、カイコの頭部を動かし、カイコの力で引き伸ばして（ゾーン延伸）繊維化を行う。この紡糸口までは水分の蒸発が起らないことを明らかにした。

3.1.6 紡糸管内の水（乾式・超多孔質紡糸、捲縮加工）

カイコの紡糸は湿式紡糸ではなく乾式紡糸で行われている。中部絹糸腺内には約70%の水分が含まれ、圧糸部では水が入ったままの状態では液状絹が延伸される。カイコの紡糸口から繊維が外にでると、初めて繊維内の水は蒸発する。水が入ったまま延伸されるので、繭繊維内の水分が蒸発すると多くの超細孔を形成し（多孔質紡糸）、繭繊維は収縮する（捲縮紡糸）。また、カイコは8の字に紡糸し固定するので、糸には捲縮加工がなされる。繭繊維内の細孔は、絹繊維の超機能性を有する高い吸湿性、ドレープ性、多彩な染色、軽い比重、保温性、光沢などに貢献することが分かった。

3.1.7 カイコの繭作り（自力・移動紡糸）

カイコは卵、幼虫、さなぎ、成虫と完全変態昆虫で、幼虫時代に4回脱皮をする。5齢熟蚕に成長した後に繭を作るが、卵が孵化（蟻蚕、ぎさん）するとすぐに糸を桑の葉に接着し、自分の力で糸を引き出す（自力紡糸）。この時も糸を吐き出さずに糸を引きだす（牽引紡糸）。幼虫時期にもすでに糸を作り出す器官（絹糸腺）を備えている。1齢、2齢、3齢、4齢の脱皮前も糸を作るが、カイコの脱皮を助けるためである。カイコが作る繊維の固体構造は作る時のカイコの齢によって異なっていることをX線回折像から明らかにした。

カイコが糸を多量に作るのは、孵化してから約18日間、5齢期で盛んに桑の葉を食べて絹糸を作る器官（絹糸腺）が、急激に大きくなる。その後1日程、桑の葉を食べず、体が透明になり、熟蚕（カイコが糸を作る前の時期）になり、紡糸行動を開始する。

3.1.8 紡糸の最初の一滴

映画でモスラが糸を吐き出して繭を作っているのを鑑賞した人は多いが、口から吐

き出すのではない。カイコは体内の排泄物をだして糸の作る準備をする。準備が終わったカイコは繊維が固定されるまで、セリシタンパク質をポンプで押し出し、身近な物に液状絹を付着させる。その後、カイコ頭部の紡糸口から液状絹を引き出す。この吐出した物質は、糸ではなく無配向の構造の糊状態のセリシタンパク質である。

セリシタンパク質をポンプで押し出すと同時に、絹糸の原料となるフィブロインも同時に流れ出る（図1.6）。最初に吐出し接着した点が原点となり、繭繊維を引き出す（牽引する）。常に連続的に糸を固定しながら牽引し、カイコの頭部運動で紡糸口から糸を引っ張り出す。

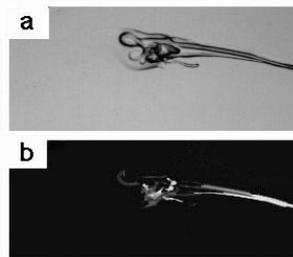


図1.6 カイコが繭を形成する時に、最初に、ポンプで押し出す液状絹、最初は繊維を形成しない。(a)、普通顕微鏡写真 (b)：偏光顕微鏡写真

カイコの糸作りは、カイコが絹糸を口から吐くのではなく、紡糸口から蚕自身の力で、絹繊維を引っ張りだす自力紡糸である。次々に繊維が固定されると、カイコは頭を振り運動で固定端を連続的に移動させ、繊維を牽引する。カイコの頭を8の字を書く運動で糸が形成され、8の字の軌跡のまま糸が作られるので、繊維がカールする。カイコの糸作りをよく観察すると、カイコの口から繊維が出てくるように思えるが、カイコは連続的に繊維を固定している。

実験的にカイコの頭部を固定し、紡糸口をどこにも接触させた状態にすると、わずかな液状絹は吐出するが繊維は出てこない。この物質はX線回折から無配向の物質であり、カイコは絹を紡糸口から吐き出していないことが分かる。接着点がない場合は、何回もポンプで押し出すために、繊維形成は起こらず、数珠玉状のものが観察されることを初めて証明した。

生物の紡糸は、合成繊維の紡糸方法とは異なり、常に繊維が固定され、ノズルが移動することである（移動紡糸）。この移動方式と8の字運動とが絹繊維に捲縮を与え、絹繊維が集まると繊維間にバルキー性のふくらみを与え、絹の保温性と吸湿性、手触りなどの効果を生み、シルクの繊維性能を高めている。

このことにより、カイコは口から糸を吐き出すのは誤りであり、百科事典や教科書を

訂正しなければならない。

3.1.9 繭の形状（糸の再延伸）

カイコは頭を8の字運動で俵状あるいは楕円状に繭を形成する。繭形はカイコの大きさと頭部の運動の範囲で決まる。カイコの後部にある8本の腹脚と2本の尾脚で体を固定し、頭部の運動で両端は球状になる。さらに10本の足を反対側に移動させながら首振り運動をするので、繭の形は楕円状か俵状になる。カイコが糸を紡糸するとすぐに糸は収縮を始めるために繭の表面は収縮し、シボと呼ばれるしわが観察される（図1.7a）。繭を作る途中を観察すると、内部に張られた糸は約 200 g/cm^2 のお腹の力で押し上げ（図1.7b）、収縮した糸を再延伸し、繭の内部の空間を出来るだけ広げて繭層を堅持する。このようにして絹の分子鎖は再度延ばして繊維の強度を高めている。

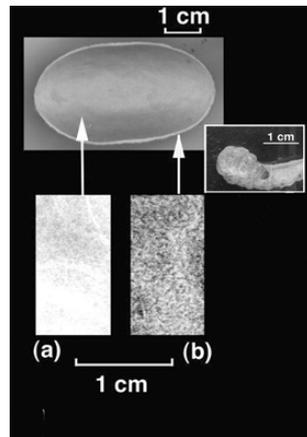


図1.7 カイコは腹で押し出して繭の中の繊維を再延伸している写真 a: 繭の内側の写真, b: 繭の内側, c: 繭の表面, d: カイコが腹で押し出す写真

3.1.10 セリシンの効果（傾斜紡糸）

セリシンの役割はフィブロインの液晶を保護しながら流れやすいような潤滑剤の役目を果たしている。すなわち、カイコの自力紡糸の際に繊維を固定するための糊の役割および、フィブロイン繊維を保護している。セリシンとフィブロインが混合しないのはお互いに相分離を起こしている。また、セリシンはフィブロイン繊維を中心とした円心状に内側と外側とでは成分が異なり、成分が連続的に傾斜している。このセリシンがシルクのラウジネス（毛羽）を抑えている。

3.1.11 総合紡糸

生物の紡糸は、単に口やお尻から糸を吐くのではなく、生物の紡糸口から、数十種の紡糸方法が精密に制御された超ハイテク技術でスーパー繊維を作っている。乾式・

複合・液晶・捲縮・多孔質・高速・ゲル-ゾル転移・イオン制御・自力・自動制御・傾斜紡糸、ゾーン延伸、低エネルギー紡糸などの幾つもの紡糸方法が巧みに組みあわさり、フィブリン分子を精密に自動制御配向させながらシルクを作っている(図1.8)。これは合成繊維が数種の方法で、高いエネルギーを用いるのに反し、生物は非常に合理的な、巧妙な方法で、タンパク質をうまく制御しながらエネルギーの消費の少ない方法で糸を作っていることを明らかにした。

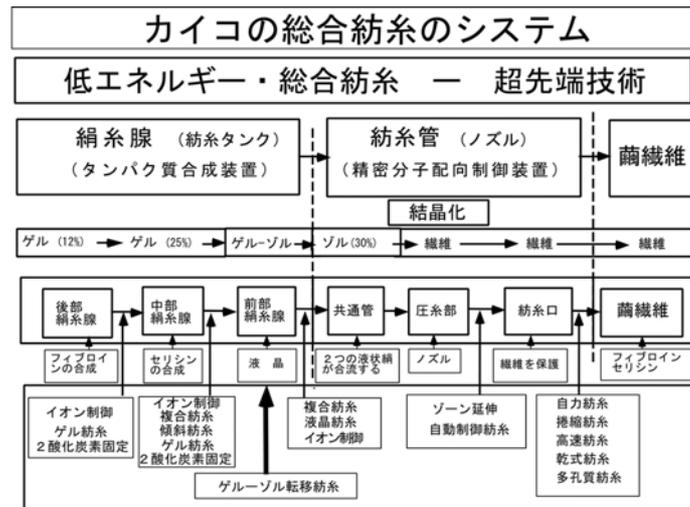


図1.8カイコの繊維形成のシステム図とカイコの紡糸技術

3.2 絹タンパク質の理化学的性質

絹タンパク質における構造形成のメカニズムの解明を目指し、絹タンパク質をモデル物質としたエネルギーミニマム型での高分子構造形成する分子の設計に適用できる物性情報を検討し、さらに、高分子構造形成のシステム化への技術開発へと発展させることを目標として研究した。その内容は、絹フィブリンの結晶化のメカニズム、カイコの中の無機成分の重要性、絹フィブリンの二酸化炭素の影響などに注目し、カイコが絹糸を形成するメカニズムの解明し、絹タンパク質の物理化学分析という側面からフィブリンの構造と物性を検討した。

3.2.1 フィブリン水溶液の熱的性質(液状絹、水溶液の熱的性質)について

家蚕絹フィブリンの構造形成を明らかにするために、絹フィブリンの溶液の熱的性質を調べた。家蚕の液状絹のDSC曲線(図2.1)には、68°C付近に弱い吸熱ピークが見られ、液状絹の各部位による違いは、若干、融解熱が変化するのみで、ピーク温度には変化が認められなかった。家蚕のMA(中部絹糸腺前区)、MM(中部絹糸腺中区)、MP(中部絹糸腺後区)のピーク温度、融解熱は、68.6、67.8、68.2°Cで、0.25、

0.42、0.36J/gであった。

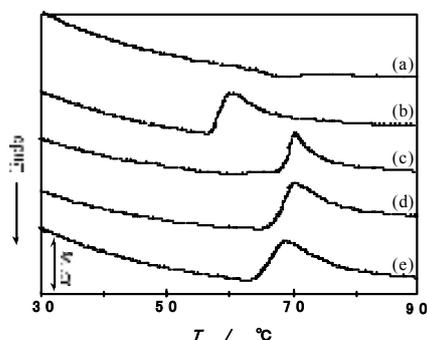


図2.1 家蚕と野蚕の液状絹フィブロインのDSC曲線

(a) 家蚕、(b) エリ蚕、(c) クス蚕、(d) 柞蚕、(e) 天蚕

つぎに、セリシン蚕のセリシタンパク質について熱測定をした。通常の家蚕はフィブロインを多く分泌しているが、家蚕の突然変異種であるセリシン蚕は、フィブロインよりもセリシンの方が多く分泌している。このセリシン蚕の液状絹のDSC曲線には、何のピークも見られなかった。家蚕の吸熱ピークは、フィブロインタンパク質に起因しており、フィブロインタンパク質の α 型結晶の水素結合の崩壊であると考えられる。種々の野蚕の液状絹は、70°C付近に明確な発熱ピークが見られた。これは、 α 型から β 型への構造転移を示しており、そのピーク温度は、品種、部位によって異なっていた。これらの違いは、液状絹の配向による結晶サイズか水素結合の違いによると考えられる。これらの転移挙動は、不可逆的であった。家蚕と野蚕の絹糸腺での液状絹の状態の違い、液状絹の延伸性の違い、熱的性質の違いを比較検討すると、家蚕の結晶化は、ずり応力、脱水などで起きやすく、温度変化では起きにくい構造である。野蚕の結晶化は、その逆であると考えられる。これらの性質の違いは、タンパク質のアミノ酸組成や配列によるものが大きいであろう。

ここで、一般的にDSC測定では、昇温速度を大きくすると、ピークが極大となる温度は高い方にずれ、シャープになるが、ピークの分解能は悪くなってしまふ。上述の結果は、5°C/minで測定したが、見掛けの転移温度でしかない。そこで、昇温速度を変化させて熱測定を行い、転移温度の昇温速度依存性を調べた。昇温速度は、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0、10.0°C/minで行った。試料には、家蚕の中部絹糸腺の中区を用いた。吸熱ピークの開始温度、ピーク温度をそれぞれTs、Tpとした。昇温速度10°C/minでは、

試料の温度分布が大きく、ピーク温度が不明確となり、同試料で再測定した結果をベースラインとして引かなければならず、液状絹の熱測定に不適當であることがわかった。また0.5°C/min以下では、感度が良くなるが、ノイズが大きくなってしまうので、この場合も不適當である。昇温速度とピーク温度の関係より外挿した転移温度を求めた。液状絹の転移開始温度は57.9°Cであることがわかった。この値は、小林らによるパルスNMRスペクトルの結果である58°Cと一致した。

絹フィブロインをモデル物質としたエネルギーミニマム型高分子の構築を目指すにあたって、その分子が持つべき高分子の熱的性質に関する手がかりを示すことができた。

3.2.2 フィブロインの結晶化について

野蚕絹フィブロインの液状絹の結晶化条件を明らかにするために、野蚕体内から液状絹を取り出し、その熱的性質を検討した。野蚕の液状絹を一定温度で等温結晶化させると、時間とともに絹フィブロインの球晶が成長するのが観察された（図2.2）。蚕の種類に関係なく球晶が観察された。祖父江らによって家蚕やセリシン蚕の球晶形成が報告されており¹¹⁾、家蚕の球晶は成長しにくいことが分かっている。これは家蚕と野蚕の絹フィブロインのアミノ酸組成と配列の違いによると考えられる。

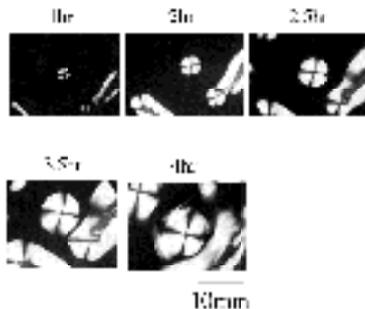


図2.2 柞蚕絹フィブロインの液晶成長

サク蚕の絹フィブロインの球晶成長速度を求め、それは結晶化温度、時間に依存していた。結晶化温度の増加とともに、球晶の成長速度が増加していた（図2.3）。しかし、65°C以上では、絹フィブロインの球晶は観察することができなかった。球晶成長速度において成長過程の変化する転移点が存在することが明らかとなった。この転移は絹フィブロインの結晶化によるものと考えられる。絹フィブロインの延伸によって、液状絹中に含まれる水分が延伸した絹フィブロイン表面より押し出されるのを観察した。延伸物の水分率の変化と熱分析より、自由水、凍結水、不凍水の割合の変化を求めることができた。孔体積分布曲線による近似式を用いて、延伸後の表面の見掛け細孔サイズを求めた。パルスNMRスペクトル測定と熱分析より液状絹中の水の構成成分比を求めることができ、絹タンパク質20wt%、不凍水10wt%とすると、自由水30

wt%、凍結水40wt%であった。

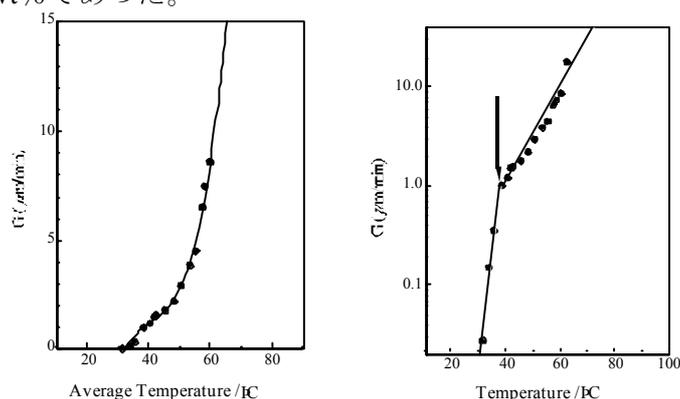


図2.3 柞蚕液状絹フィブロインの球晶の成長曲線

II-1) H. Sobue, H. Ishikawa, Kogyo Kagaku Zasshi, 64,1320 (1961).

3.2.3 液状絹、繭中の無機物の定量と変化について

家蚕や野蚕の絹糸には多くの金属イオンが含まれている。この金属イオンはカイコ体内の液状絹のゲルやゾル状態を形成する時に重要は存在であるので、カイコの液状絹に含まれる金属イオンを測定した。

家蚕と野蚕の繭層中の無機成分は、尾藤らによって報告されている^{III-1)}。家蚕と野蚕における繭層中の無機成分は、野蚕の方が多く含まれていることが知られており、これは、営繭時における蚕の生態行動の違いが大きい。しかし、無機成分の役割について、未だ不明なところが多い。そこで、無機成分に注目し、家蚕の繭を灰化した試料をエレメントアナライザーで測定すると、主に9種類の無機成分が含まれていることが分かった。さらに、家蚕の糞、または餌である桑の葉にも約9種類の無機成分が含まれており、試料による無機成分の種類の違いは見られなかった。しかし、試料中に含まれる無機成分の総量は、糞が一番多く、次が桑の葉であった。繭中に含まれる無機成分の総量は極端に少ないことが明らかとなった。しかし、全無機成分中に含まれる各無機成分の割合、重量分率を比較すると、繭中に含まれるK、Caの量は、特異的に多かった。つまり、Caが繭中に選択的に取り込まれている、または、存在していることが明確となった。

次に、絹糸腺中の絹フィブロインの各部位における無機成分について測定した。中部前区、中区、後区を比較すると、紡糸口に近づくにつれ、無機成分の含有量の合計が増加している。Mg、Kは無機成分の総量の傾向と同様であるが、Caは中部中区において高くなっており、前区では減少している。これは、中部中区で絹フィブロインがゲル状であることと対応しており、前区ではCaがゲル→ゾル転移の要因になっている可

能性を示している（図2.4）。

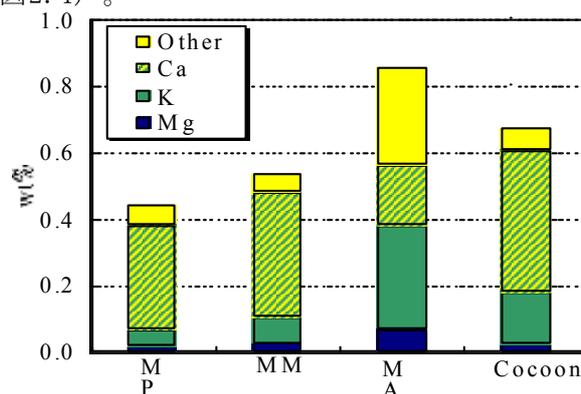


図2.4 家蚕の絹糸腺内液状絹と繭の金属イオンの量

通常の前練方法とは、繭を炭酸ソーダ+マルセル石鹼で洗浄→炭酸ソーダで洗浄（セリシンの除去）→ベンゼン：メタノール=2：1で抽出（Waxの除去）の操作を行う。また、セリシン除去のみなら、沸騰水で抽出する方法がある。以上のことをふまえ、下記の条件の試料を作製した。前練途中の絹糸、炭酸ソーダ処理のみ、マルセル石鹼処理のみ、沸騰水処理のみの操作を行い得られた絹糸について無機成分の組成を測定した。前練によってセリシンを除去した絹糸中の無機成分の組成を測定すると、未処理の繭と比較して、Naが増加しKが減少した。さらにWax成分を除去した絹糸には、Naがさらに増加しCaが減少した。炭酸ソーダ処理した絹糸では、Kが減少し、マルセル石鹼処理したものでは、Naが増加し、K、Caが減少した。さらに沸騰水処理したものでは、Kが減少した。今まで、K、Caなどの無機成分は、セリシンに多く含まれていると報告されている^{III-2)}が、以上の結果から、Kはセリシンに多く含まれており、CaはWax中に含まれていることが明確になった。また、前練、特にマルセル石鹼処理によって絹糸中のCaがNaに置換、または含有されることが分かった。

次にWax成分中には、Na、Si、Caが多かった。このWaxをメタノールに溶解させ、抽出物と沈殿物を分離させた。この抽出物には、K、Caが多く含まれており、沈殿物には、Si、Caが含まれていた。Wax成分は、炭化水素（C31程度）^{III-3)}、エステル（酢酸エステル）^{III-4)}、遊離アルコール^{III-4)}、遊離脂肪酸^{III-3)}であり、少量のリン酸脂質、色素を含むと言われており、メタノールに溶解する成分が多く含まれている。従って、沈殿物はWax成分に含む主な無機成分だと考えられる。また、Waxは絹糸腺内でゲル→ゾル転移が起こる部分で、セリシンとともに分泌されていると考察されている^{III-4)}。さらに、Waxはフィブリンミセルのlamella間隔を埋めて、層となし、絹糸への柔軟性、フィブリン分子の球状→繊維への転移に関係するのではないかと考えられている^{III-5)}。つまり、Wax成分中に含まれる無機成分、Caは繊維形成において、重要な役割を担

っていることが示唆された。

保存蚕品種の日本種（在来種）の繭における無機成分の測定結果をまとめた。主にMg、P、S、K、Caが含まれている。特に、S、K、Caが大部分を占めている。ここでKとCaに注目すると、 K_2O+CaO の重量分率は、約70wt%付近に集中している。中国種（在来種）の繭中の無機成分においては、70wt%以上であった。 K_2O とCaOの関係よりKとCaには相関関係が存在し、一定の割合で繭中に含まれていることが分かった。日本種、中国種で比較すると、日本種の方が、Kが少なくCaが多い。中国種では、その逆の傾向であった。これらの繭より得られた絹糸の力学的性質と無機成分の関係を比較検討すると、日本種、中国種では、繭糸長、織度、強度に差が見られなかった。しかし、灰分、伸びには違いが見られた。これよりCaとKが絹糸の伸びに関係していることが明らかとなった。

種々の無機塩水溶液に液状絹を浸漬すると、液状絹の溶解性が異なることが定性的に明確になった。さらに種々の無機塩水溶液中に浸漬後、延伸すると、pHが高いKの無機塩水溶液においては、液状絹が溶解してしまい、延伸性が低かった。しかし、Caの無機塩水溶液に浸漬した場合には、pHが変化しても延伸性はそれほど変化がなかった。KCl、 $CaCl_2$ 水溶液において浸漬時間、無機塩濃度を変化させた実験では、KClの場合は延伸性に変化がなく、高濃度の $CaCl_2$ の場合、延伸性が悪かった。これは、Caイオン強度が高すぎるとフィブロイン分子同士の柔軟な部分に存在するCaイオンが多すぎて、構造形成に重要な架橋点の形成よりも、フィブロイン分子同士のスリップが起こってしまうためだと考えられる。フィブロインの構造形成には、KとCaの平衡関係か、交換の必然性が示唆された。

III-1) Shozo Bito, Annual Report of Natural Science and Home Economics, 11, 49(1971).

III-2) 伊藤武男、京都高等蚕糸学校学術報告、2、72(1941).

III-3) 奥 正己、農化、5、344(1929).

III-4) Keiichi Komatsu, Bulltein of Sericultural Experiment Station , 23, 499(1969).

III-5) 伊藤武男、絹糸の構造、千曲会出版部、425(1957).

3.2.4 カイコが大気中の二酸化炭素を繊維の中に固定

カイコやクモが糸を形成する際に大気中の二酸化炭素を糸に取り込むことを、世界で初めて明らかにした。従来から、大気中の二酸化炭素を利用できるのは、植物、光合成細菌と一部の微生物だけと考えられていただけに、動物も同様のことができることを突き止めたことは、低エネルギー高分子構造形成に重要な研究であり、生物学、

昆虫学の新たな発見である。

ドライアイスを用いて二酸化炭素雰囲気下にしたデシケーター中に、絹糸腺の各部位より調整した水溶液を7日間放置した。二酸化炭素雰囲気下への放置前では透明な水溶液であったが、放置後には不均一、白濁の凝集物が沈殿、またはゲル化する。これは、気体である二酸化炭素が絹フィブロイン水溶液に溶解込み、水溶液が酸性となり、絹フィブロインが変性したためである。空気中の二酸化炭素を絹フィブロイン水溶液中に取り込むことができる可能性を示している。これは、「炭酸ガス固定化用タンパク質材料と炭酸ガス固定化方法」という名称で特許を出願した。

窒素ガスを用いて窒素雰囲気下、ドライアイスを用いて二酸化炭素ガス雰囲気下にしたデシケーター中で、絹糸腺の各部分から作製した水溶液をキャストし、36時間放置後、デシケーターより取り出し乾燥固化させることで絹フィブロインフィルムを作製した。窒素ガス雰囲気下に放置して作製したフィルムは、均一で透明であったが、二酸化炭素ガス雰囲気下で作製したフィルムは、脆く不均一、不透明であった。二酸化炭素ガス雰囲気下に放置することによって、上述と同様に、気体である二酸化炭素が絹フィブロイン水溶液に溶解込み、水溶液が酸性となり、絹フィブロインが凝集する。その後乾燥するので、脆く不均一なフィルムが形成される。以上のことから、絹フィブロインのフィルムを作製する時には、二酸化炭素の影響を考える必要があることを示すことができた。これは、「絹タンパク質フィルムとその製造方法」という名称で特許を出願した。

^{13}C ラベルした炭酸バリウムとリン酸を反応させて調製した $^{13}\text{CO}_2$ 雰囲気下のデシケーター中に蚕を数頭入れ、営繭させた。対照実験として、大気中の空気雰囲気下のデシケーター中にも蚕を入れ、営繭させた。3日間放置後、繭を取出し、繭層の外から外層、中層、内層の3層に分けた。それらを質量スペクトルで測定し、試料中に含まれる ^{13}C の同位体存在比を調べた結果、蚕の種類に関係なく、対照実験のものと比較して、内層の ^{13}C 同位体存在比が増加していた。これは、気体である $^{13}\text{CO}_2$ が繭層中に含まれていることを示している。また、蚕の絹糸だけでなく、ジョロウグモの糸にも $^{13}\text{CO}_2$ が含まれていることがわかった。二酸化炭素濃度の増加の影響を確かめるために、 ^{13}C と ^{12}C の存在比が既知である炭酸バリウム ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}=94.2/5.8$) とリン酸を反応させて調整した $^{12}\text{CO}_2$ 雰囲気下のデシケーター中にも蚕を入れ営繭させた。全 CO_2 濃度は0.2wt%で、 $^{13}\text{CO}_2$ 濃度は101ppmであった。対照実験の同位体存在比とほぼ同様の値であり、二酸化炭素濃度の増加による影響はないことが明らかとなった。以上のことより、大気中の二酸化炭素が絹糸中に取り込まれていることを定量的に明確にすることができた (図2.5)。蚕の絹糸はフィブロインとセリシンの2種類のタンパク質からなっているので、試料を10時間煮沸することによって、それぞれを分離精製した。ここで、水溶性物質

をセリシン、不溶性物質をフィブロインとした。内層の ^{13}C 同位体存在比が高い傾向は、絹糸の時と同様であったが、セリシンに多く含まれていることが分かった。さらに ^{13}C O_2 がセリシンにどのように含まれているかを調べるために、内層のセリシンの ^{13}C CP/MAS NMR測定を行った。その結果、絹タンパク質構成アミノ酸のカルボニル基のNMRスペクトル強度が増加していた。従って、蚕は大気中の $^{13}\text{CO}_2$ をカルボニル基の形で繭層中に、主にセリシンに取込んでいることを明らかにした。

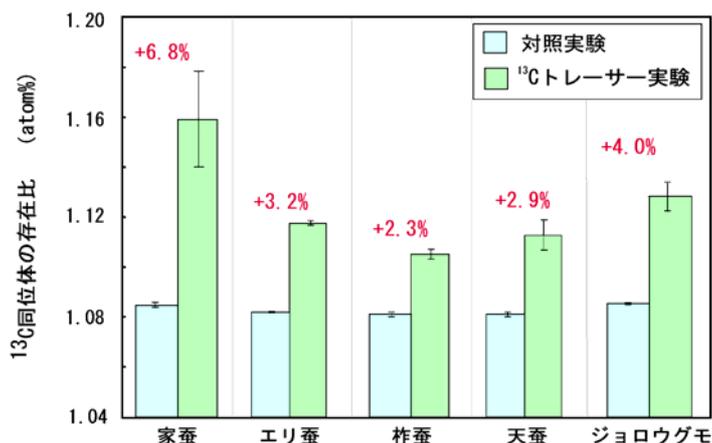


図2.5 家蚕、野蚕、クモが作る糸の中の ^{13}C の量

次にどのアミノ酸のカルボニル基に存在するかを確定するために、繭から分離した内層部分のセリシンを、塩酸で酸加水分解させて、NMRスペクトル測定を行った。対照試料も同様の処理を行い、それぞれのスペクトル強度を比較した。その結果、アミノ酸のAla、Asp、Ser、Glyのカルボニル基とAspの C_γ が、大気中の二酸化炭素の炭素であることが、NMRスペクトルの相対強度から明らかになった。試料の相対強度を得るためには、Tyrの C_ξ とAlaの C_β のスペクトルを基準とした。また、内層部分のフィブロインにおいても同様の実験を行った結果、アミノ酸組成が異なるため、NMRスペクトルはセリシンとは違っていたが、対照実験の相対強度の差からセリシンと同様な結果が得られた。これらのアミノ酸 (Ala、Asp、Ser、Gly) と蚕のアミノ酸合成について考察してみると、これまで数多くの代謝回路が知られており、また家蚕、エリ蚕には、TCA回路 (tricarboxylic acid cycle、トリカルボン酸回路) が存在することが報告されている。ここで、ある一つのモデルを提案する。まず、二酸化炭素は、TCA回路のオキサロ酢酸からAsp、Gluに取り込まれる。さらに、内層に取り込まれる二酸化炭素の量が多いことと、営繭時に蚕は栄養を摂取しないことから、生合成におけるグルコース欠如によって、L-リンゴ酸を経た代謝経路を用いて、Ala、Ser、Glyに大気中の二酸化炭素が取り込まれると推測した。

絹フィブロインの分泌量が少ないセリシン蚕の繭においても、内層に大気中の二酸

化炭素が含まれていることが分かった。さらにセリシン蚕の5齢の脱皮殻や蛹殻についても測定を行ったが、蛹殻にも二酸化炭素が含まれていた。通常では営繭時であるが、二酸化炭素処理の時期を変化させて、営繭後脱皮前と後に二酸化炭素処理を行うと、二酸化炭素処理を行った時期後より得られる試料（蛹殻、卵）中に二酸化炭素が取り込まれることを明確にした。しかし、これらの試料中に取り込まれるメカニズムはまだ不明である。

二酸化炭素ガス雰囲気中に放置する時間を営繭前の家蚕を用いて、20、40、50、60、70時間と変化させた。その後、大気中の空気雰囲気下で営繭させた。放置時間の違いによる二酸化炭素の取込み量を検討した。放置時間が短時間の場合は、内層に多く取り込まれ、長時間の場合では、中層に多く取り込まれることが分かった。二酸化炭素ガス雰囲気下での放置時間を長くしても、大気中の二酸化炭素が取り込まれる量は、比例しなかった。これは、二酸化炭素の処理が長時間になると、二酸化炭素濃度が高くなり過ぎる、および血液中の二酸化炭素と大気中との空気の交換が早すぎることによると推測した。

また、5齢3-4日目の家蚕を二酸化炭素ガス雰囲気下に24時間放置した後、すぐ絹糸腺を摘出し、各部位の絹フィブロインと組織膜中に含まれる¹³C同位体存在比を比較すると、大気中の二酸化炭素は、後部絹糸腺や中部絹糸腺後区に多く、絹糸腺組織膜には、あまり含まれないことが明らかになった。よって、大気中の二酸化炭素は、後部、中部絹糸腺から絹フィブロインに取り込まれていることが明確になった。

さらに、家蚕の繭の内層をフィブロイン、セリシンと2成分に分けるだけでなく、様々な抽出方法を用いて、繭成分を分別し、種々の成分中に含まれる¹³C同位体存在比を比較した。クロロホルム抽出物（高分子量のセリシン）、クロロホルム抽出物（低分子量のセリシン）、吸湿性クロロホルム抽出物（セリシン中の無機物、ペプチド）、再生フィブロイン、Wax成分（フィブロイン中の無機物）、Cpフラクション（フィブロイン酵素分解物）、Cpフラクションの残留物（フィブロイン酵素分解物の残留物）の試料を作製し、¹³C同位体存在比を比較した。二酸化炭素は、繭成分のタンパク質へ取り込まれるが、炭化水素、遊離脂肪酸などからなるWax成分中には、取り込まれないことが分かった。以上のことから、大気中の二酸化炭素はタンパク質合成時に取り込まれていることがより明確になった。

3.2.4 成長における蚕の重量と齢別の絹糸の直径の変化について

カイコは孵化するとすぐに繊維を紡糸する。各齢においても繊維と作る。また、卵から孵化した蚕は、1齢から5齢までに4回脱皮を繰り返し、熟蚕へと成長する。家蚕の人工飼料における蚕1頭の重量変化を測定し、以前に報告されている1齢の蚕を1とした

重量分率の変化を比較検討すると、眠（脱皮時）から眠への間は、ほぼ6倍で重量が増加し続け、最終的には孵化した蚕の重量と比較して、約650-700倍近くに増加している。以前の報告との比較では、同じような曲線を示し、よい再現性が得られた。

眠、つまり脱皮時の絹糸の直径において、齢別の違いによる変化を比較した。絹糸は2本のフィブロイン部分の周りにセリシンが取り囲んでいる構造を持っている。そこで、絹糸を水酸化ナトリウムに浸漬し、セリシンを溶解させた後、絹糸の直径を（フィブロインの直径）を偏光顕微鏡で測定した。家蚕、野蚕は同じような傾向を示し、1-4齢では直径はほとんど変化しないが、5齢の絹糸では急激に増加している。これは、1-4齢の絹糸は蚕自身の体を支えるためだけのものであり、5齢の絹糸は体全体を覆って、蛹を保護するために用いるという用途の違いからくるのであろう。また1齢の絹糸において、野蚕のものは2本に分かれるが、家蚕の場合は、2本に明確に分かれなかった。家蚕の1齢だけ異なる構造形成システムを使っている、または構造状態（結晶化度など）が異なる可能性が示唆された。5齢以外の齢の蚕でも、既に絹糸を形成する機能は備わっていることが示された。齢別の蚕の変化を明確にすることで、絹フィブロインの高分子構造形成のメカニズムを解明する一端を担えた。

3. 3 フィブロインタンパク質の分離精製と性状解析

絹の繊維形成を解明するために、絹フィブロイン溶液の自己凝集状態、分子の大きさ、相互作用と結合様式などを解析することは非常に重要である。

そこで、家蚕(*Bombyx mori*)フィブロインタンパク質の分離、精製、及び野蚕フィブロインタンパク質の分離を試みた。野蚕には人工飼料での飼育が確立されているエリサン(*Samia cynthia richini*)を主な材料として、テンサン(*Antheraea yamamai*)、サクサン(*Antheraea perni*)のフィブロインタンパク質の成分調査と分子量の測定を行った。また、フィブロインのゲルゾル転位についてゾル化という観点から考察を行った。その中でも特に絹糸腺内に多く含まれるCa²⁺とK⁺に着目し、これらのイオンとフィブロインタンパク質の関係について研究した。

3.3.1 家蚕フィブロインの分離

ゲル濾過カラムに溶解したフィブロイン溶液を通した結果、二つのピークが見られ、その間に少し分離の悪いマイナーピークが見られた（図3.1）。これは流速や試料の濃度を変えて試してみたが、どの場合でもほぼ同じであった。また、繭から調整したフィブロイン溶液においても同様のパターンを示した。得られた各フラクションについて含まれるタンパク質をSDS-PAGEにて確認した（図3.2）。ピーク1の各フラクションのバンドは均一で300kDa以上の分子量を持っているため、フィブロインH鎖だと思われる

る。ピーク 2 のフラクションでは25kDa程度のバンドとマイナーな30kDa程度のバンドが見られ、それぞれフィブロインL鎖、P25だと思われる^{I-1)}。ゲル濾過カラムにおいてはこれ以上の分離は不可能だと思われた。

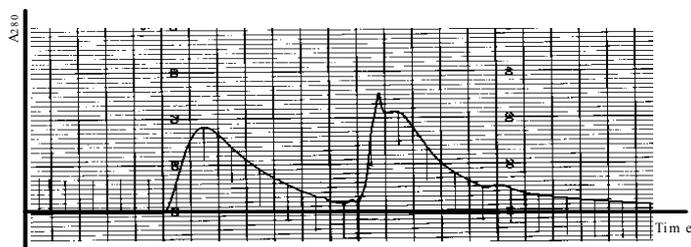


図 3.1 家蚕フィブロイン溶液のゲル濾過カラム溶出パターン



図 3.2 ゲル濾過カラムより得られた各フラクションの SDS-PAGE

A : ピーク 1 のフラクション B : ピーク 2 のフラクション。

主にフィブロインの結晶部分の大多数を占めるのがH鎖であるため、このフラクションを回収、濃縮し、一部を蒸留水に対して透析を行ったところ、白い繊維状の沈殿物が見られた。この水透析溶液と濃縮した尿素溶液のフィブロインをSDS-PAGEにて分析したところ、水透析溶液にはタンパク質が含まれていないことが解った。このことからH鎖タンパク質は単一では非常に溶解性が低く、凝集しやすいことを示している。

I-1) K. Tanaka, N. Kajiyama, K. Ishikura, S. Waga, A. Kikuchi, K Ohtomo, T. Takagi, S. Mizuno, *Biochimica et Biophysica Acta*, 268, 6429(1999)

3.3.2 野蚕フィブロインの解析

エリサンの吐糸直前の幼虫より絹糸腺を取り出し、後部絹糸腺と中部絹糸腺よりフィブロイン溶液を調整した。溶液は蒸留水と20mM Tris-HCl (pH8.0)/5M 尿素溶液の両方に溶出させた。しかしながらタンパク質量を十分確保できるように濃度を高くすると24時間後には両溶液に溶解させたフィブロインは白濁、沈殿した。またエリサンフィブロイン水溶液及び20mM Tris-HCl (pH8.0)/5M 尿素溶液に終濃度30mMになるようにDTTを加えると、室温において非常に安定的に保存出来ることが判った(図3.3)。これら調整した

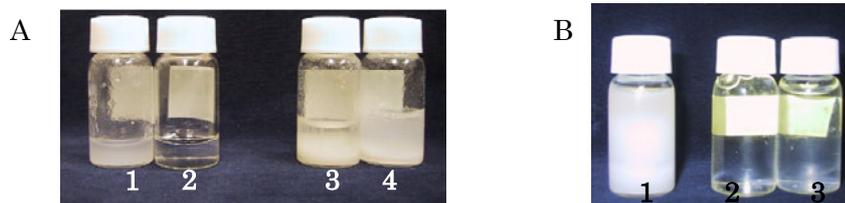


図 3-3 エリサン及び家蚕の絹フィブロイン溶液の状態
 A : 家蚕及びエリサンのフィブロイン溶液 1 ; 家蚕フィブロイン水溶液 2 ; 家蚕 20mM Tris-HCl (pH8.0)/5M 尿素溶液 3 ; エリサンフィブロイン水溶液 4 ; エリサン 20mM Tris-HCl (pH8.0)/5M 尿素溶液
 B : DTT 添加の効果 1 ; エリサンフィブロイン 20mM Tris-HCl (pH8.0)/5M 尿素溶液 2 ; エリサンフィブロイン水溶液+30mM DTT 3 ; エリサンフィブロイン 20mM Tris-HCl (pH8.0)/5M 尿素溶液+30mM DTT

フィブロイン溶液をSDS-PAGEで分析を行った(図3-4)。後部絹糸腺においては、DTT未添加の試料では約300kDaのタンパク質と約80kDaのタンパク質の2種類しか観察されなかった。より高感度にタンパク質を染色できる銀染色を行ってもこれら以外のタンパク質バンドを確認することは出来なかった。DTT添加の試料においては約160kDaのタンパク質と80kDaのタンパク質の2種類であった。この事よりDTT未添加の試料でみられた約300kDaのタンパク質はDTT添加の試料でみられた約160kDaタンパク質のホモ2量体ではないかと考えられる。

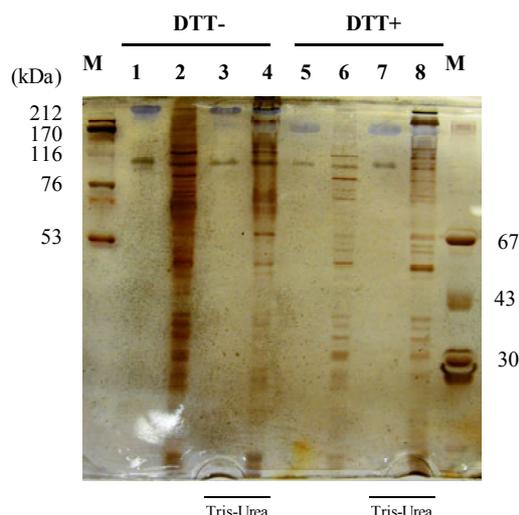


図 3.4 エリサン絹糸腺内容物の SDS-PAGE
 1, 3, 5, 7 ; 後部絹糸腺からの抽出物、2, 4, 6, 8 ; 中部絹糸腺からの抽出物
 1, 2, 4, 6 は蒸留水で抽出したフィブロイン溶液

中部絹糸腺では後部絹糸腺でみられたタンパク質バンド以外にも多くのバンドが観察された。DTT添加、未添加では約50kDa付近と約35kDa付近で違いが見られたが他の部分では違いはなかった。中部絹糸腺で多くのタンパク質が出現する点は家蚕と共通であり、セリシンを含め多くのフィブロイン以外のタンパク質が中部絹糸腺から合成、分泌されていることを示している。またテンサン、サクサンにおいてはDTT未添加では約500kDa程度、DTT添加では約250kDaのバンドが確認された。以上の事から家蚕においては、H-L構造を取っているが、野蚕においてはH-H鎖構造を取っていることが推測された。

3.3.3 精練絹糸におけるフィブロインタンパク質の構成比

家蚕絹糸（精練した生糸）におけるH鎖：L鎖：P25のモル比を測定のためまず生糸をアルカリ精練した。その結果3種類供に17～26%程度の精練歩合であった（表3.1）。これはほぼ通常通りの値であった。ELISA法で測定した結果、絹糸腺内や繭と同様にP25を1としたときにH鎖、L鎖とP25のモル比は6:6:1であることが解った（表3.2）。このことはフィブロインの基本構造が絹糸腺内と同様に^{III-1}最終的にもH鎖とL鎖そし

Breed	Weight (g)		Percent of materials lost by degumming*
	Before ^a Degumming	After ^b	
J-138	0.3169	0.2616	17.45
Sekko	0.1254	0.0924	26.32
Turkish yellow cocoon	0.2248	0.1805	19.71

* $\frac{(a-b)}{a} \times 100 (\%)$

表3.1 3種類の絹糸の精練歩合

てP25の3成分であることを示しており、精練作業などによりその存在比が変化しないことを示している。現在、これらの結果を基に、家蚕フィブロインの細胞内から分泌されたフィブロインタンパク質は絹糸腺内において図3.5に示すような構造を取っていることが考えられている。この構造はあくまでも液状絹内の推定構造であり、結晶化したとき、もしくは繊維化したときにも同様な構造を取っているかどうか現段階では解らない。エリサンをはじめとする野蚕のフィブロインの構造はH鎖自体の分子量の違いはあるが、H鎖分子のホモダイマー構造を取っていると考えられる。しかしな

Breed	A 490			ng/100ng protein			pmol			Molar ratio	
	H-chain	L-chain	P25	H-chain	L-chain	P25	H-chain	L-chain	P25	H-chain:L-chain:P25	
J-138	0.677	0.375	0.168	89.2	6.6	1.3	2.55x10 ⁴	2.55x10 ⁴	4.33x10 ³	5.89±0.08	5.89±0.02:1
Sekko	0.684	0.377	0.166	90.1	6.6	1.3	2.57x10 ⁴	2.55x10 ⁴	4.33x10 ³	5.94±0.08	5.88±0.05:1
Turkish Yellow cocoon	0.669	0.371	0.164	88.1	6.5	1.3	2.52x10 ⁴	2.51x10 ⁴	4.33x10 ³	5.82±0.14	5.80±0.04:1

n= 6 times, ±: standard deviation

表3.2 精練した絹糸におけるH鎖、L鎖、P25のモル比

がら、これらが単独で液状絹に含まれているのかどうか、また家蚕のようなP25が含まれているのかどうかに関しては不明であり、何かを介して分子が集合するのか、何分子集まるのかも不明であり、これから究明を待たれる所である。

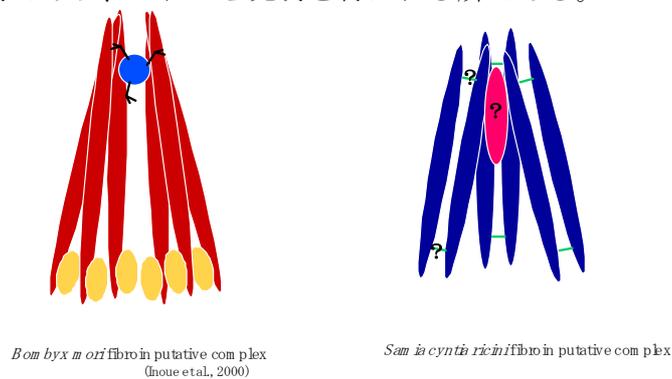


図3.5 家蚕とエリサンの推定されるフィブロイン複合体のモデル

III-1) S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, S. Mizuno, J. Biol. Chem. 275, 40517 (2000)

3.3.4 液状絹のゾル化に対する無機イオンの影響

CaCl₂、及びKCl溶液中での液状絹3区（前区MA、中区MM、後区MP）における溶液中へのタンパク質の溶解量を測定した。その結果、3区分すべてにおいてCaCl₂が2mM存在するだけで0mMと比較して溶出量とスピードが減少した（図3.6）。その後塩濃度が上昇するに従いタンパク質の溶出量も減少し、MM及びMPでは16mMで最も溶出量が少なかった。しかしながらMAでは8mMで溶出量が最も少なかった。これはMA液状絹内におけるタンパク質濃度とカルシウム塩濃度の違いによるものと考えられる。そしてMAでは16mM、MM及びMPでは32mM以上でタンパク質の溶出量が増加し、100mMでは0mMより

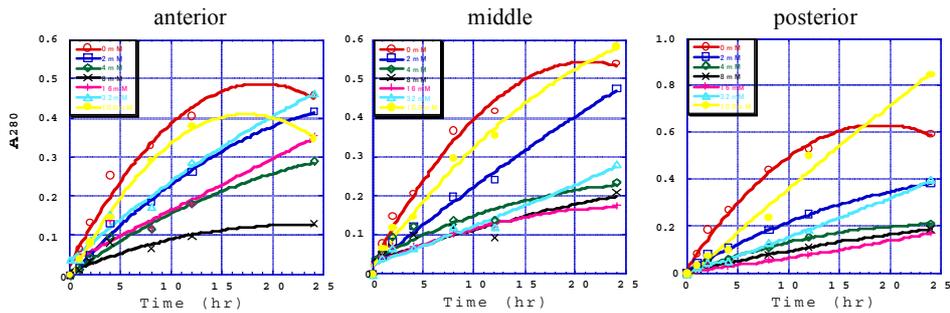


図 3.6 各濃度の CaCl_2 溶液に侵せきした液状絹の溶解曲線
 anterior ; 中部絹糸腺前区 middle ; 中部絹糸腺中区 posterior ; 中部絹糸腺後区

も最終的な溶出量が増えることもあった。これはフィブリン水溶液の粘性が、100mM のカルシウム塩によって一時的に低下し、混合、拡散が速やかに行われた結果であると考えられる。

同様にしてKCl溶液で実験を行ったところ、KClにおいても塩濃度の上昇と共にタンパク質の溶出量が減少する傾向が見られた（図3.7）。しかしながら、 CaCl_2 の場合と

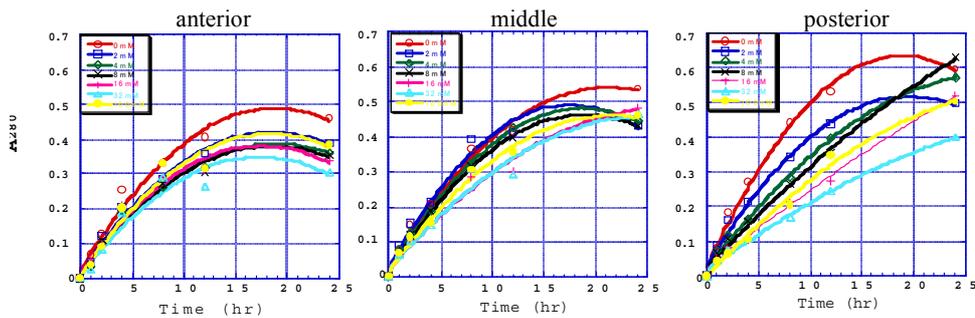


図 3.7 各濃度の KCl 溶液に侵せきした液状絹の溶解曲線
 anterior ; 中部絹糸腺前区 middle ; 中部絹糸腺中区 posterior ; 中部絹糸腺後区

違って、濃度による減少量は少なかった。最も溶出量が少なかったのは32mMであり、100mMになると再び溶出量は増加した。 MgCl_2 と NaCl にて同様の実験を行ったところ、 MgCl_2 ではほぼ CaCl_2 と同様の結果になったのに対し、 NaCl では塩濃度が高くなるに従い、タンパク質の溶出量が減少するという結果になった。

レオロジーや光散乱などの結果からも、ある濃度の CaCl_2 をフィブリン希薄水溶液に添加すると分子間のネットワークが強まり、大きな会合体が確認され^{IV-2)}、ゲル的挙動をとることが示されている^{IV-2)}。いずれにおいても、非常にハッキリと塩濃度依存性が観察され、カルシウムにおいて効果が非常に強いことは共通している。これらのことからカルシウムがフィブリン分子間の繋がりを強める働きがある事が推測される。

3.3.5 フィブリン溶液のCD測定及びフィブリンフィルムのFT-IR測定

カルシウムイオンがフィブリンの構造に対してどのような影響を及ぼしているのか

を調べるためにCD分光測定にて各塩濃度におけるフィブロイン溶液の測定と、FT-IRでのフィブロインフィルムの測定を行った。フィブロインタンパク質は通常、中部絹糸腺内、及び溶液状態ではランダムコイル構造をとっており^{IV-3)}、CDスペクトルもランダムコイル構造に特徴的な波形を示した(図3.8A)。CaCl₂濃度が上昇するに従い、200nmから195nmの間に見られるランダムコイル由来の負のピークが無くなっていく現象が観察された。カルシウムイオン濃度が上昇するに従い、ランダムコイル由来の負のピーク

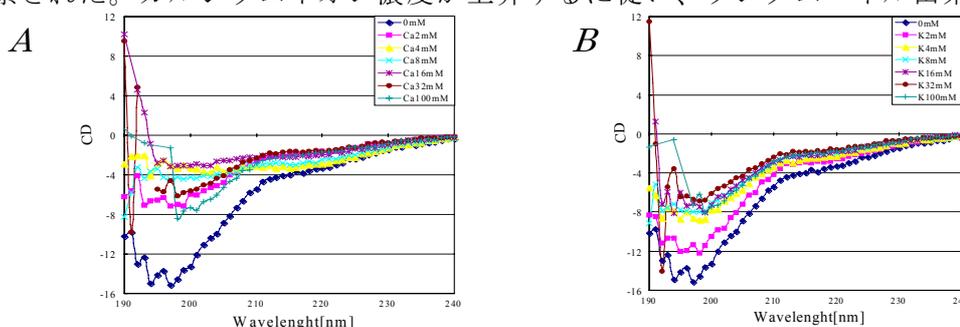


図 3.8 フィブロイン溶液の円二色性赤外分光スペクトル (CD スペクトル)
 A ; CaCl₂ 各濃度溶液で調整したフィブロイン溶液
 B ; KCl 各濃度溶液で調整したフィブロイン溶液

ークがフラットになる傾向は観察されたが、明確な α -ヘリックス及び β -シート由来のピークの出現は観察されなかった。このカルシウム塩によるランダムコイルピークの減少は16mMの時に最大になり、32mM、100mMの時には再びピークが復活するような現象が見られた。同様にKCl溶液でもスペクトルを測定したところ、CaCl₂同様にランダムコイルピークの減少が見られた(図3.8B)。しかしながらこのピークの減少の幅は、CaCl₂と比べて少なく、カリウム塩の効果が小さいことがここでも観察された。ピークが最も強く減少したKCl濃度は、液状絹溶解実験で溶出量が最も少なかった32mMと一致しており、100mMになるとランダム構造が再び見られる結果となった。これらCaCl₂及びKCl各濃度溶液で調整したフィブロイン溶液のピーク変化は、タンパク質溶出量と非常に良く適合しており、フィブロインタンパク質の構造変化と溶出量の変化が密接な関係にあることが推測される。

さらにCa²⁺及びK⁺イオンの影響がフィブロインタンパク質に与える影響を調査するために、各濃度溶液で調整したフィブロインフィルムをFT-IRで測定した。

CaCl₂の各濃度でMPの液状絹を溶液にし、フィルムを作成した後、透過光で測定を行った。測定結果より特に差が顕著だった1800cm⁻¹から1400cm⁻¹の間の波形を比較した。フィブロインフィルムを0mM溶液(水溶液)にて調整した時には1655cm⁻¹と1620cm⁻¹付近のピークと1535cm⁻¹にピークが見られた(図3.9A)。1655cm⁻¹は α -ヘリックス構造を持っていることを示す。また1620cm⁻¹では β -シート構造を持つことを示している。これ

らの情報はCDスペクトルの結果と異なっているが、CDスペクトルでは溶液時の情報であり、フィルムにして水分が抜けた状態になったときに変化したものと考えられる。しかしCaCl₂が2mMになると1620cm⁻¹付近のピークは消え、1655cm⁻¹のピークのみとなった。塩濃度がさらに上昇すると8mMでは1649cm⁻¹に、16mM及び32mMになると、1640cm⁻¹へとシフトした。100mMの時の波形が他の波形と若干違っているが、これはCaCl₂により水分蒸発が充分で無かったため明確に分離しなかったと思われる。よってピークシフトが32mM等と同じであるのかどうかハッキリしないが、0mMの波形に似ているようにも見える。また、0mMの時には1535cm⁻¹にピークが見られた。しかしCaCl₂が2mM

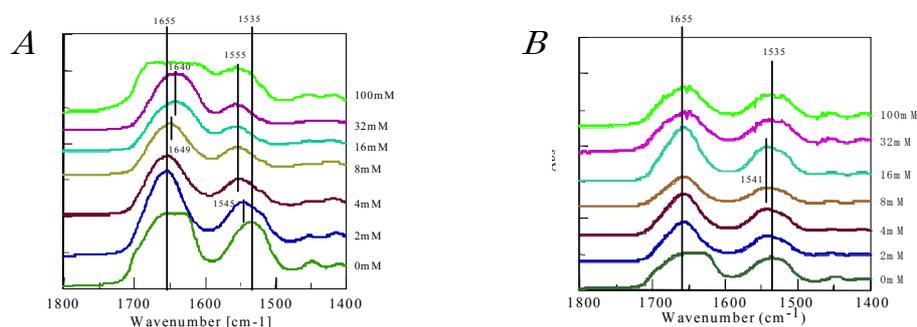


図 3.9 各濃度の塩溶液で調整したフィブロインフィルムの FT-IR スペクトル
A : CaCl₂ 各濃度溶液で調整 B : KCl 各濃度溶液で調整

時に1545cm⁻¹へとシフトし、4mM以上になると1555cm⁻¹へとシフトした。これらは0mM時においてランダム構造であったものが、2mM時に α -ヘリックスの構造となり4mM以上で β -シート構造を取っていることが推測される。KCl溶液から調整したフィルムについてはCaCl₂同様に、1620cm⁻¹のピークは消え、1655cm⁻¹のピークのみとなった。しかし塩濃度が上がっても1655cm⁻¹のピークのシフトは見られず、32mM及び100mMで若干シフトしているのみであった(図3.9B)。また、1535cm⁻¹のピークが8mMの時に1541cm⁻¹にシフトし、32及び100mMでは再び1535cm⁻¹に戻った。これらはCaCl₂の時と比較して非常に変化が少なく、ほぼ0mMの時と変わらない様に見えた。CDスペクトルにおいてもCaCl₂と比較すると変化が小さいのは共通しているが、溶解実験及びCDスペクトルに共通して見られるような32mMの中心に変化する様子は観察されなかった。

ペプチド結合である-C=O-NH-の部分のアミド基もしくはカルボキシル基に、Ca²⁺が存在すると、共有結合、もしくは水素結合する。さらに、もう一方で近隣のアミド基もしくはカルボキシル基と結合、すなわち架橋を行う。このことにより、フィブロイン分子内及び、分子間の距離が縮まる。そして分子間距離が縮まり、架橋していることにより、分子間結合力が強くなり、ゲル強度が上がる=溶出量が減少する結果になる

と思われる。それ以上のCa²⁺が存在した場合には、飽和した状態になり、分子内の隣り合ったアミノ酸同士の分子間結合力が弱まる、もしくは反発しあって、分子間、分子内の距離が広がると考えられる。このことにより、溶出スピード、量が再び増加し、溶解度も増すものと考えられる（図3.10）。クモのフィブロインにおいては、Ca²⁺やMg²⁺ではフィブロインの分子形態には影響はなく、K⁺によって、ランダム構造がβシート構造へと変化することが最近報告されている^{IV-4}。しかし、カイコフィブロインではCa²⁺によって構造変化を起こし、ゲルゾル転位に非常に強く関わっている様に見られた。実際昆虫の様々な組織において、V-ATP依存型プロトンポンプの存在が確認されており、クモの絹糸腺やカイコ絹糸腺^{IV-5}においても存在が確認されている。クモの糸は、K⁺によって強く構造に影響を受けるため、このプロトンポンプを上手く利用してpHとK⁺濃度、そして水分量をコントロールし、フィブロインを排出したり、流れを止めたりするものと考えられる。一方、カイコにおいては、前部絹糸腺にその存在が確認されているため、K⁺の濃度が絹糸腺前部に行くほど高くなり、pHを高くしてゲル架橋を弱くしている事は容易に想像出来る。

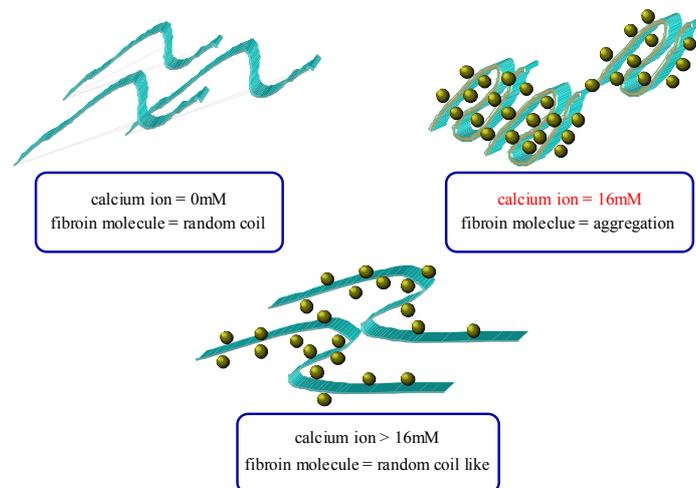


図3.10 フィブロイン分子とCa²⁺の相互作用と、分子形態の変化。リボン状の図がカイコフィブロイン分子を、丸がCa²⁺を示す。

しかし、Ca²⁺の濃度勾配を説明付ける、いわゆる能動輸送機構的なものは見つからない。絹糸腺内では各部分において、タンパク質量や水分量、pH等も変化している^{I V-3}。実際に絹糸腺内でカルシウムイオン濃度の勾配が出来ており、試験管内でカルシ

ウムイオンを添加する事により、構造変化を起こすということは、何らかの単一もしくは複数の機構が存在し、相互効果によって絹糸腺の内部において実際のゲル/ゾル転位に関わっていると考えている。

IV-1) A. Ochi, K. S. Hossain, J. Magoshi, N. Nemoto, *Biomacromolecule*, 3, 187 (2002)

IV-2) M. Kobayashi, T. Tanaka, S. Inoue, H. Tsuda, J. Magoshi, Y. Magoshi, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 26, 577 (2001)

IV-3) J. Magoshi, Y. Magoshi, M. A. Becker, S. Nakamura, *Polymeric Materials Encyclopedia*, 1 (A-B), 667 (1996)

IV-4) X. Chen, D. P. Knight, Z. Shao, F. Vollrath, *Biochemistry*, 41, 149444 (2002)

IV-5) M. Azuma, Y. Ohta, *J. Exp. Biol.*, 201, 479, (1998)

3.4 絹フィブロインの粘弾性と光散乱

絹繊維は風合い、しなやかさ、光沢など優れた機能性を持つカイコ由来の天然繊維であり、石油化学工業の発展に伴い開発された種々の合成繊維の最終目標とされているが、絹繊維を凌駕するものは依然として得られていない。この原因として、絹繊維の材料である繊維状タンパク質絹フィブロインの分子構造・分子間相互作用が特異的であること、またカイコが体内の絹糸腺中で行っている一連の紡糸工程、特に絹糸腺後部における絹フィブロインの合成から中部への物質輸送・貯蔵、前部でゲル/ゾル転移後の液晶紡糸に到るまでの過程を支配する因子が不明であることが挙げられる。この紡糸工程は、現在の紡糸技術では達成されていないエネルギー消費を極度に抑えたエネルギーミニマム型の洗練された技術に基づいており、環境調和型社会の構築へ向けて新たな革新的技術を生み出すためにもカイコが行っている紡糸機構の分子論の立場からの解明が強く望まれている。

本研究はカイコ絹糸腺中の種々の部位から採取した未変性絹フィブロイン水溶液ならびに繭から熱的・化学的処理により再生した絹フィブロイン水溶液を試料とし、光散乱・粘弾性法を用いて溶液構造と分子運動の関係を明らかにすることにより、絹糸腺中の各部・区に存在する金属イオンの種類・濃度がカイコの紡糸機構の支配因子であることを解明したものである。

家蚕絹糸腺の後部からとったフィブロインの希薄溶液物性を調べた。動的な光散乱測定から、2つの拡散モードが存在することがわかり、無限希釈状態で速いモード、遅いモードそれぞれに対応する流体力学半径RHとして16nmおよび240nmが得られた。速いモードはフィブロイン分子鎖の拡散、遅いモードは試料中に少量存在するCa²⁺によっ

てフィブロイン分子が会合して形成した会合体に帰属された。散乱光強度の角度分布の解析から、会合体の重量平均分子量 M_w と慣性半径 R_g の値としてそれぞれ 1.6×10^7 と 331 nm が得られた。形状因子 $P(q)$ を求め理論と比較した結果、会合体は7-8本の腕を持つ多分散星形枝分かれ高分子と考えるのがもっとも適当であることが判明した。

絹糸線中部の3つの部位MP、MM、MA領域から取り出したフィブロイン試料の溶液に対し動的光散乱およびレオロジー測定を行った。3試料とも3つの減衰モードが存在し、速いモードおよび中間のモードは拡散過程であり、遅いモードは非常に大きな散乱体の濃度揺らぎを観測していることがわかった。MP域では後部と同様にフィブロイン分子鎖と会合体が存在しているが、MM域ではフィブロイン分子は単独では存在せず、会合体がさらに集まり非常に大きな凝集体を形成しているものと推測された。MM域からの試料は降伏値を持つ塑性流動挙動並びに線形粘弾性域では G' が平坦弾性率を示すというレオロジー挙動を示し、動的光散乱データとよく対応する結果を与えた。

合成繊維の乾式紡糸においては、紡糸時の溶媒は揮発性の高いものであることが要求され、また、紡糸時には加熱、加圧が不可欠であるとされる上に、モノマー重合時、紡糸時を通じて同じ溶媒を使用する乾式紡糸法は開発されていない。しかしながら、カイコは体内でフィブロイン分子を合成し、加圧または加熱の必要なくただカイコ自らの首振り運動のみにて水溶液からの乾式紡糸により繊維化を行っている。また、カイコの低エネルギー紡糸の鍵を担っているのは、*in vivo*におけるフィブロイン分子の存在状態であると考えられているが、フィブロイン分子の生合成から紡糸までのメカニズムは不明である。そこでカイコの低エネルギー紡糸のメカニズムを解明することを目的としてその鍵を担っている、*in vivo*における絹フィブロイン水溶液の構造とダイナミクスについて検討した。

絹フィブロインの繊維化における中部絹糸腺中区(M部)の役割を解明することを目的として、M部各区(後部から順にMP、MM、MA区)から採取した絹フィブロイン水溶液についてレオロジー測定、光散乱測定を行いM部各区における絹フィブロイン水溶液の溶液構造の相違を考察した。絹フィブロイン水溶液は0.1wt%付近の濃度域においても、フィブロインと糖タンパク質P25が比率6:1でつくる複合体(EU)がさらに集合したクラスターを形成して存在しており、測定を行った全散乱角域(散乱ベクトル q)において減衰速度 Γ が散乱ベクトルの3乗に比例するモードが観測され、系全体にわたる構造が形成されていると考察できた。EUの並進拡散運動に相当するmediummodeの流体力学半径はMPからMAへ進むにつれてよりコンパクトになっており、MAではEUは異方性を持って多かれ少なかれ配列していると考えられた。貯蔵および損失弾性率、また降伏応力は同程度の濃度において、MMに比べてMAの方が低くこれは Ca^{2+} の減少および、 K^+ の増加によるものと考えられた(図4.1)。MM由来絹フィブロイン水溶液へCa塩を添加

すると、貯蔵弾性率 G' が Ca^{2+} 添加量に比例して増加したことから、EUを構成している絹フィブロイン分子中の COO^- 基と Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの2価の金属イオンとのイオン結合によって粘弾性網目が形成されていることが明らかとなった。MM区では Ca^{2+} 濃度が最も高いことから絹フィブロインの貯蔵庫としての役割を、MAでは Ca^{2+} と K^+ との置換を引き起こし、ネットワーク構造の架橋点を減少させ細いA部を通過し、最終的に紡糸に備えるために不可欠であると考えられた。

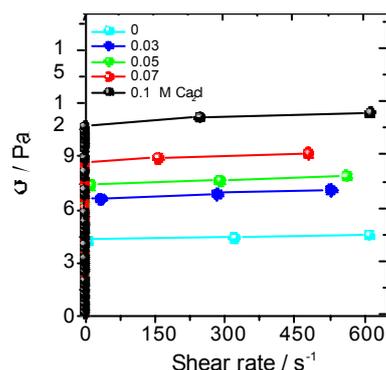


図4.1カルシウムイオンを加えた絹フィブロイン水溶液の剪弾応力

繭から熱的および化学的処理により再生した絹フィブロインの純水溶液ならびに4つの金属イオンをそれぞれ単独で添加した添加塩溶液を調製し、溶液構造の再構成が可能かどうか、また、添加した金属イオンの効果について動的光散乱測定、流動測定を行い検討した。動的光散乱測定の結果、再生絹フィブロイン水溶液には3つの拡散モードが観測されたが(図4.2)、ネイティブ絹フィブロイン水溶液において観測されたような全測定 q 域で観測された $\Gamma \sim q^3$ のモードは存在しなかった。よって再生絹フィブロイン水溶液は試料全体に広がる集合体を形成しないことがわかった。金属イオンの有無および添加した金属イオンの種類及び添加濃度の測定結果への影響は光散乱測定、レオロジー測定においても観測されず、流動測定においてただ濃度のみに依存して流動後の粘度が大きくなっているのが観測されただけであった。よってネイティブ絹フィブロイン水溶液中のEUは再生絹フィブロイン水溶液中の会合体とは異なり、P25と絹フィブロイン分子との特異的相互作用によって形成されており秩序ある構造を持っていると考えられ、このEUが金属イオンとの相互作用を可能にしていると推察された。

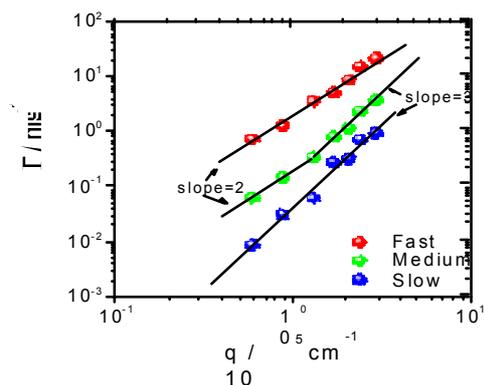


図 4.2 希薄再生絹フィブロイン水溶液の動的散乱

希薄域における絹フィブロイン水溶液について動的および静的散乱およびレオロジー測定を行いその構造とダイナミクスについて考察した結果を踏まえ、より *in vivo* に近い高濃度域での絹フィブロイン水溶液の物性を調べることを目的として高濃度試料を調製し、レオロジー測定を行い検討した。絹フィブロイン水溶液は濃度が高くなるのにもない、その溶液構造を維持するためにより多くの金属イオンによる架橋点を必要とする。ネイティブ絹フィブロイン水溶液は低周波数側に擬平衡弾性率を持つ動的粘弾性を示した。タンパク質複合体 (EU) 単位とし絹フィブロインの持つカルボキシル基と 2 価イオンとのイオン結合によって網目を形成することがこの粘弾性挙動を生じさせていることを明らかにした。高濃度試料について測定した場合、角周波数域中間付近で観測された粘弾性挙動は他の EU に属する絹フィブロイン分子間のからみあいによって生じると考えられた。

絹糸腺中部の各区 (MP, MM, MA) からそれぞれ採取したフィブロイン水溶液について動的散乱測定を行い、散乱光強度の時間相関関数の減衰モード・減衰速度分布の解析に基づいて、MP区からMA区に進むにつれEUのサイズが減少しMA区では円筒状の異方性形態をとることを明らかにするとともに、0.1wt%の低濃度域においても系全体にわたる大きな溶液構造が形成されていることを立証している。さらに、これらすべての溶液は降伏応力 s_y を持つ擬塑性流動挙動および角周波数に依存しない擬平坦弾性率 G_{plat} を持つ弾性ゲル的挙動を示すことから、溶液構造が力学的に弱い網目構造であることを実証している。

Ca^{2+} イオンの添加により s_y および G_{plat} が単調増加すること、また Ca^{2+} イオン濃度が低く K^+ イオン濃度が高いMA区の s_y がもっとも小さいというデータに基づき、フィブロイン鎖の末端に存在するアスパラギン酸およびグルタミン酸の C00-基と 2 価の Ca^{2+} イオン間での分子間イオン結合が架橋点となり架橋寿命が有限な粘弾性網目を形成すると提唱している。

繭から熱的・化学的処理により再生したフィブロイン純水溶液ならびに4つの金属イオンをそれぞれ単独に添加した添加塩溶液の光散乱・流動測定結果を未変性フィブロイン溶液結果と比較検討し、EUというフィブロイン独特の複合体が金属イオンとの相互作用を可能にしていることを明らかにしている。*in vivo*に近い高濃度領域において、MM区からの未変性フィブロイン水溶液は低角周波数側・高角周波数側の2つの領域において擬平坦弾性率 G_{plat} を持ち、前者はフィブロイン鎖のCOO-基と2価の Ca^{2+} イオン間での分子間イオン結合による網目に、後者はEUが重なり合うことにより生じるからみあい網目に帰属されることを明らかにしている。またこの網目の熱レオロジー挙動から、EU構造が熱的に準安定であり、高温ではEU構造の破壊が生じ均一な網目構造へと不可逆的に変化することを見いだしている。

3. 5 自己組織化による絹糸タンパク質の高次構造形成

本研究ではフィブロインタンパク質の絹糸の構造形成過程に注目した。これを生体高分子の構造形成過程という観点から見れば未だに未解明な部分を多く残す分野であるのみならず、生体の構造形成や生命現象への関与といった重要なテーマにつながる研究である。さらには構造形成過程の解明から工学的な応用、あるいは新たな生体材料の開発へとつながる可能性を十分に持っている。

この研究においてはまず、フィブロインタンパク質の分子に注目した。絹糸の最小構成単位である分子がどのように集まって構造体を形成し、それがマクロな絹糸の構造とどのように関連しているのかを調べることにより、絹糸タンパク質の構造形成過程を明らかにするのが目的である。

3.5.1 AFMによるフィブロインタンパク質分子および分子会合体の直接観測

原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope, AFM)は微小な探針を試料表面において三次元的に走査し、試料表面の立体的な像を画像化することが可能な装置である。装置の分解能は最大、試料の平面方向ではおよそ5から10nm垂直方向には0.1nmという高い性能を持つ。試料表面を走査する際に探針が試料に及ぼす力は $10^{-10}N$ 程度と小さいため、生体高分子のようなやわらかい試料でも測定によって試料が変形あるいは劣化する恐れがない。また、試料が生体内にある場合と近い条件で測定することが可能であるが、これは測定のために金属などを蒸着する必要のある電子顕微鏡などに比べて大きな利点である。本研究ではAFMによる分子レベルの画像観測を主たる手段として実験を行った。

試料として用いたのは家蚕(*Bombyx mori*)のフィブロインタンパク質である。営繭直前のカイコより絹糸腺を取り出し、絹糸腺組織を取り除いた後にゲル状の内容物を純

水で洗浄後、被覆している不純物や別種類の水溶性タンパク質を取り除く。このようにして得られたフィブロインタンパク質を純水に分散させることにより水溶液を得る。この水溶液をさらに純水で希釈し、雲母へき開面に展開、乾燥させて試料とした。

AFMによる観測の結果、試料表面には多数の棒状粒子が観測された。観測された物体のほとんどが棒状粒子であること、大きさにばらつきが少なく、均一であることからこの棒状粒子がフィブロインの単一分子であると考えられる。図5.1にフィブロイン分子のAFM像を示す。図からはフィブロイン分子の長さは約60nm、高さ1nm、幅約10nmと取れるが、AFMの装置特性として、極端に幅の狭い物体は探針の直径程度に観測されてしまうため、分子の真の幅は高さと同じと考えられる。以上より、フィブロインタンパク質は長さが約60nm、直径1nmの細長い円柱状の形態を取っていることが明らかになった。この大きさはフィブロインタンパク質の分子量(350kDa)がヘリックスなどの剛直な構造をとっていると仮定した場合に計算される値と良い一致を示しており、この事実からも分子の形態と大きさが確認されることになる。

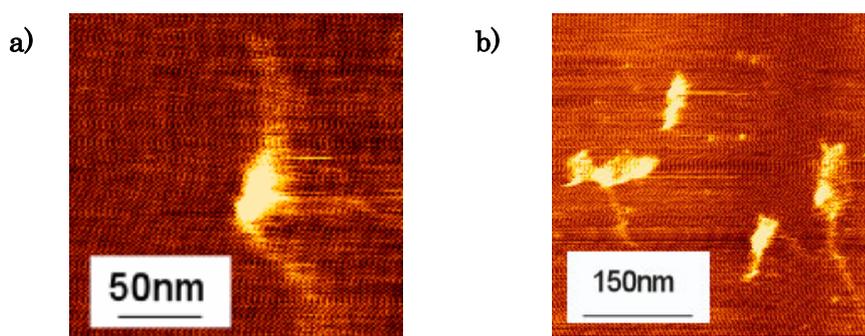


図5.1 AFMによる家蚕フィブロインタンパク質分子像：0.02%水溶液
a) 0.02%水溶液 b) 0.16%水溶液

図5.1.aの測定に用いられた試料は、濃度が0.02%のフィブロイン水溶液を基盤に展開して作成されたものである。このような低濃度において分子はお互いに絡み合わず、孤立して水溶液中に存在しているが、より濃度の高い場合には分子は会合した状態で存在していると考えられる。図5.1.bはフィブロイン濃度0.16%の水溶液から作成された試料のAFM像である。分子の会合体が観測されているが、分子の両端間同士で会合していることがわかる。さらにフィブロイン濃度の高い水溶液(0.64%)から作成した試料のAFM像を図5.2に示す。会合が分子の両端で起こるため、一次元的に長く伸びた会合体が形成されているのがわかる。また、形成された会合体の太さはみなほとんど同じでおよそ1nmである。これは分子の直径と等しく、この事実もまた分子が両端間相互作用により会合体を形成していることを支持している。もし、それ以外の会

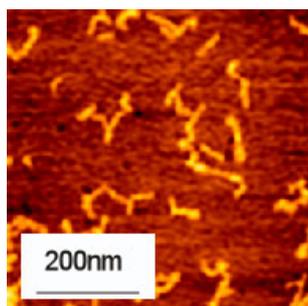


図 5.2 AFM によるフィブロイン分子の会合体像：0.64% 水溶液

合形態をとる場合、会合体の直径はより大きく、より幅広く分散したものになると考えられるからである。

分子形態が細長い棒状であることから、フィブロイン水溶液がリオトロピック液晶相を示すことが容易に理解される。さらに分子の形態自体に異方性があれば、分子の集合体が繊維を形成することが容易に理解できる。これらのことから、本研究で得られた結果は妥当なものであると考えられる。

3.5.2 酵素処理およびAFMを用いたフィブロイン分子の解析

前節に述べた研究の結果、フィブロイン分子は棒状の形態をしており、分子両間の相互作用によって一次的に長い、繊維状の会合体を形成することが明らかになった。しかしながら前節の実験だけでは分子がどのような機構によって会合体を形成するのか、に関しては明らかになっていない。分子の会合体形成機構を明らかにするためには、分子がどのような相互作用によって会合するのかを知る必要があり、そのためには分子の内部構造に踏み込んだ議論が必要となる。

酵素を用いたフィブロイン分子の分子構造の推測と、会合体形成機構との関連について述べる。今回用いた酵素は α -キモトリプシン (α -Chymotrypsin) であり、フィブロインタパク質の分子鎖を切断することが出来るものである。フィブロインタパク質のアミノ酸配列はすでに明らかにされており、またキモトリプシンの切断認識配列も既知である。キモトリプシンにフィブロインタパク質を消化させることにより、消化可能なアミノ酸残基が分子内において消化可能な立体配置に存在しているかを知ることが出来ると期待される。

フィブロインタパク質を家蚕から採取し、濃度およそ 1% のフィブロイン水溶液を作成する。作成したフィブロイン水溶液に 5mg/ml の割合で α -キモトリプシンを加え、37°Cで24時間静置する。生成される沈殿物が Chymotrypsin Precipitate Fraction と呼ばれるものであるが、以下ではCPと略する。まずCPの分子量を測定するため

にSDS-ゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。またCPがフィブロインタンパク質由来のものであるかを確認するため、免疫抗体反応による確認を行った。またCPは酵素消化されたフィブロインの沈殿成分であるので、タンパク質の疎水的な部分であると予想される。この部位の形態を観測するため、AFMによるCPの分子像観測を試みた。

図5.3.aにSDS-PAGEによるCPの分子量測定の結果を示す。測定されたCPの分子量はおよそ170kDaであり、これは酵素処理されない通常のフィブロイン分子の分子量(350kDa)のおよそ半分である。免疫抗体による反応もCPにおいても同様に観測されており(図5.3.b)、CPがフィブロイン分子の一部であることはこのことから確認される。一方、AFMによるCPの分子像観測の結果は図5.4.aに示されたとおりである。図5.1に示されたものと同様な大きさを持つ棒状の物体が観測される。棒状物体は長さおよそ50nm、直径1nmであり、酵素処理されないフィブロイン分子の分子像に比べやや小さい。一方、CPの会合体像はフィブロイン分子の会合体と比べて大きく異なる。

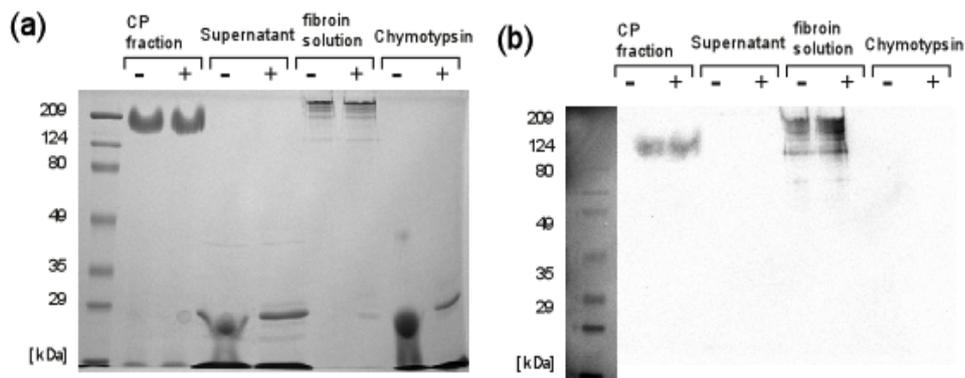


図5.3 絹フィブロインの電気泳動写真 (a) SDS-PAGE (b) 免疫抗体反応の結果

分子会合体は細長く、会合体の直径は常に分子直径と等しい(1nm)が、CPの会合体はこれと異なり、会合体の直径は一から数十ナノメートルとさまざまである。

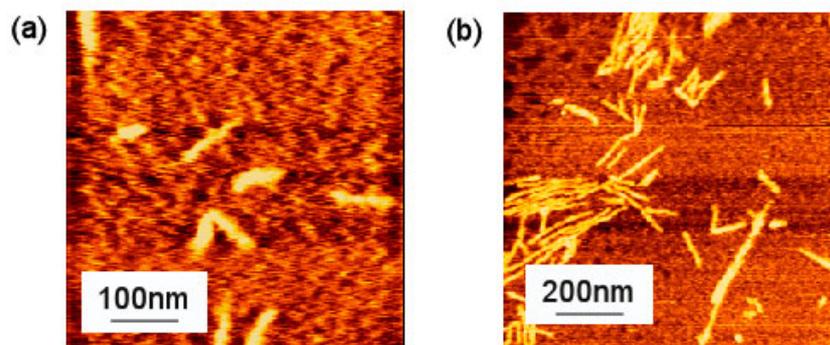


図5.4AFMによる (a) CPの分子像および (b) その会合体像

以上の実験結果をフィブロイン分子の構造という面から考察を加える。フィブロインタンパク質のアミノ酸配列は既知であり、キモトリプシンが消化できるアミノ酸残基が分子鎖中のどの位置にあるかを特定することが出来る。チロシン、フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、トリプトファンの5種類の残基がこれに相当するが、これらは一分子中にあわせて327残基存在し、また分子鎖中にほぼ均一に存在している。そのためキモトリプシンにより完全消化されると予想されるが、実際にはCPはフィブロイン分子の半分程度の分子量を持ち、また形態もフィブロイン分子と比較して極端に小さくなっているわけではない。このことはすなわち、消化可能なアミノ酸残基のうちの多くは実際には消化されずに残っていることを示している。

この理由としては、分子鎖の高次構造による立体障害が考えられる。これは分子鎖が単なる自由鎖ではなくヘリックス構造や β -シート構造といった高次の構造をとっている場合、その構造内に取り込まれている残基には酵素が到達できず、消化できないというものである。

フィブロイン分子において棒状の部分が常に同じ形態で観測されることはすなわち、この棒状部分がある剛直であることを示している。また、分子が自由鎖の状態で観測されるのであればより細いものとして観測されるはずであるため、この棒状部分における分子鎖はある強固な構造を持っていることが示唆される。一方フィブロインタンパク質のアミノ酸配列から、グリシンやアラニンといった疎水性の残基は主に分子鎖の中央部にあり、乖離基を持つグルタミン酸、アスパラギン酸などの親水性の残基はほとんどすべてが分子鎖のN末端およびC末端に存在していることが分かる。これらの事実から、フィブロイン分子に関して次のようなことが考えられる。

フィブロイン分子は中央部分と両端部分とから構成される。中央部分は疎水性のアミノ酸残基を多く含むために疎水的である。その一方で両端部分は親水性アミノ酸残基を多く含む親水的である。中央部分の疎水性残基はお互いの疎水性相互作用あるいは他の相互作用によって強固な構造を取り、これによる立体障害のためにこの部分は酵素による消化を受けない。これに対して両端部分は親水性であるために分子鎖は自由な形態を取り、たやすく酵素による消化を受けることになる。疎水的な中央部分は固まって強固な構造を取るために表面積が減少し、分子全体としての親水性に寄与することになる。これを模式的にあらわしたものが図5.5である。フィブロイン分子間の相互作用は電荷を介した静電的相互作用によるものであると考えられているが、乖離基を持つ荷電したアミノ酸残基が両端部分にのみ存在することはすなわち、分子同士の相互作用が両端間のみで働くことを示しており、これまでの考察とよく一致する。

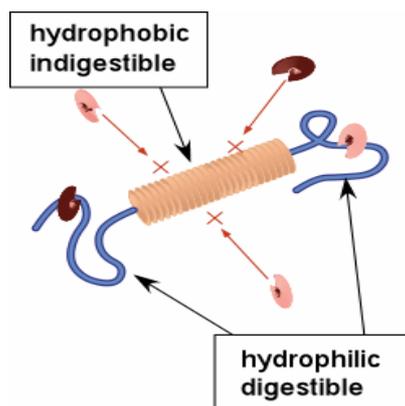


図 5.5 : フィブロインタンパク質分子の模式図

3.5.3 フィブロイン分子の自己組織化による高度な秩序を持った微小構造の形成

フィブロインは多種多様なカイコ、クモの生産するタンパク質の総称であり、カイコやクモは種ごとにそれぞれ異なったフィブロインを生産する。これらのフィブロインはゲル状態から液晶への転移、繊維化と多様な変化を経て徐々に秩序だった構造を取るようになるが、このような変化においては外部からの要因によらず、分子自らの相互作用によって構造を形成する、いわゆる自己組織化が重要な過程を担っているものと考えられる。本研究では野生の蚕の一種であるエリ蚕 (*Samia cynthia ricini*) から得られるフィブロインを試料とし、自己組織化による構造形成が実際に行われているのか、もし行われているのであればどのような構造体が形成されるのか、ということに注目し、AFMによる分子レベルの構造体の観測を行った。

この研究においてはエリ蚕から得られたフィブロインを試料とした。蚕を解剖して体内よりフィブロインを取り出し、純水に溶解させて水溶液を作成する。水溶液の作成直後に目の粗い(5 μm)フィルターで濾過し、さらに目の細かい(0.5 μm)フィルターで濾過した直後に雲母基板上に展開、乾燥させた試料Aを作成する。同様に2回の濾過後、24時間静置した後に雲母基板上に展開、乾燥させた試料Bを作成する。これらをAFMにより観測し、エリ蚕フィブロインの高次構造が形成されているかどうかを観測する。

これと平行してエリ蚕フィブロインタンパク質のゲル電気泳動による分子量測定を行った。このタンパク質の分子量が未だに測定されていないため、分子のキャラクター化に必要な情報がこれにより得られると考えられる。

図5.6にエリ蚕フィブロインタンパク質の SDS-PAGE 実験結果を示す。主要なバンドは分子量 330kDa の位置にあり、これはタンパク質を採取した条件にかかわらず常に観測されることからこれがフィブロインタンパク質によるものであることは明らかである。また、そのほかのバンドがごく微かにしか観測されないことから試料の純度は高く、不純物が少ないことも分かる。メルカプトエタノール処理したフィブロインの

場合、330kDa のバンドは消失し、160kDa のバンドが出現する。メルカプトエタノールは還元作用を持ち、タンパク質中に存在するジスルフィド結合を切断する。この結果は、エリ蚕フィブロインタンパク質が 160kDa のタンパク質二つがジスルフィド結合によって結合されたものであることを示している。

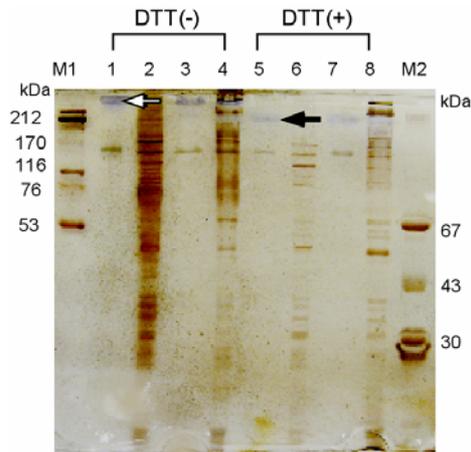


図5.6 エリ蚕フィブロインタンパク質の SDS-PAGE 実験結果

AFMによる実験結果を以下に示す。図5.7. aは試料AをAFMにより観測したものである。棒状の物体が多数観測されており、長さはおよそ 300nm、幅およそ 10nm、高さ 0.3nm であって大きさはどれもほぼ同じである。大きさがそろっていることからこれがエリ蚕フィブロイン分子であると考えられる。第1節で述べたのと同様な理由から、このタンパク質も直径が 0.3nm の棒状である。

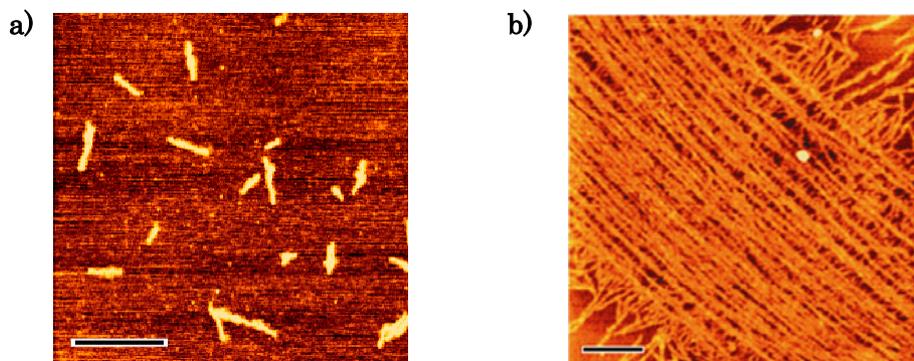


図 5.7 : AFM によるエリ蚕フィブロインタンパク質の分子像 : bar = 500nm
a) 濾過直後 b) 濾過後 24 時間静置

エリ蚕フィブロインタンパク質は特徴としてアラニンを多く含み(45%)、また疎水性アミノ酸残基の割合が高く親水性残基をごくわずかしき含まない。アラニンの多くは分子鎖中に連続して存在し、 α -ヘリックス構造を取っていることが知られている。連続したアラニンが α -ヘリックス構造を取る場合の直径は0.3nmと計算されており、これは観測された分子の直径とよく一致している。またSDS-PAGE実験により測定された分子量から長さを見積もるとこれも観測された値とよく一致する。

図5.7. bに試料BのAFMによる像を示す。織物状の高度な秩序を持った高次構造体が形成されているのがわかる。この構造体のおおきさはおよそ $2\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ であり、幅の広い帯状になっている。構造体は帯の長さ方向に規則的に並んだ「縦糸」と、それと垂直に交わっている「横糸」とから成り立っている。縦糸同士の感覚はおおよそ60から80nmであり、横糸のそれもほぼ同じである。縦糸、横糸ともに直径は0.3nmであり、これはエリ蚕フィブロイン分子の直径と等しい。

この試料を作成するタンパク質水溶液の純度はSDS-PAGE実験で示されたように大変高く、この構造体が不純物により構成された可能性は低い。またAFMの異なる観測モードで観測を行った場合もこの構造が観測できるため、測定の際の人為的な操作によって構造体が形成されることは考えられない。このことから図5.7. bの高次構造体はエリ蚕フィブロインタンパク質により構成される高次構造体であることは明らかである。

観測された高次構造体はフィルター目(5 μm , 0.5 μm)よりもはるかに大きく(2 $\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$)、生体内で構成されたものではない。濾過した直後に作成された試料Aでは高次構造体は観測されず、しばらく静置された後に作成された試料Bではこれが観測されたことはすなわち、構造体は水溶液中で自己組織化されたものであることを示している。

観測された構造体の縦糸、横糸の太さがタンパク質分子の直径と等しいことはすなわち、エリ蚕フィブロインタンパク質においても分子同士は両端間の相互作用によって縦に長い会合体を形成することを示している。現段階ではエリ蚕フィブロインタンパク質のアミノ酸残基配列は明らかにされていないため、前節までで行ったような解析法を適用して構造形成過程を考察することは不可能である。しかしながらアミノ酸残基組成がお互いに良く似ていること、分子形状が類似していること、物理的な挙動(ゲルの粘性、液晶への転移、繊維形成など)に共通する点が多いことなどから構造形成過程も類似しているであろう事が推測される。すなわち、エリ蚕フィブロインタンパク質分子においても分子は剛直な棒状部分を持ち、その両端の親水部分同士の電荷を介した相互作用により秩序の高い会合体を形成するものと考えられる。

この研究において観測された高次構造体と類似の構造が以前に報告されている。これは中間径フィラメントの一種であるラミンと呼ばれるタンパク質の作り出す構造体

である。ラミンは生物の細胞を形成する際にその形態を支える細胞骨格と呼ばれる構造を構成する重要なタンパク質であるが、このラミンによる高次構造も今回観測されたものと類似した織物状の構造体である。現段階ではラミンの高次構造形成過程は明らかにされていない。エリ蚕フィブロインタンパク質の構造形成過程を解明することにより生体内の細胞骨格の構造形成過程が解明されることが期待されるのみならず、このような構造物を人工的に作り出すことで医療材料などに利用できる、あらたな生体材料が開発されることも期待される。

タンパク質が自己組織化によって高度な秩序を持った高次構造を形成することが見出された。高次構造の形成過程を解明することは生体の構造形成過程の解明への大きな手がかりとなること、また生体材料としての応用なども考えられることが示された。

3.6 絹繊維や繭の熱的性質と繭繊維の中の無機イオン

カイコが作る絹繊維は光沢性、保温性、吸湿性、優しいドレープ、豊かな触感などの特徴を持ち、合成繊維が模倣できないほどの超感度の機能を有している。繭繊維の熱的特性は 180°C から熱分解が始まることは良く知られている。繭繊維の熱特性を解明することは絹織物の加工、染色を行う時に重要である。そこで、繭繊維を異なる温度で熱処理し、繭繊維の重量変化、微細構造の変化を観察した。繭糸はフィブロインおよびセリシンの二つのタンパク質からなる純粋に近いタンパク質繊維であるが、なお炭水化物、ロウ質物、無機物などを少量含み、これらも繭糸の形成過程、繊維の構成要素として意義をもっていると考えられる。これらの無機物は繭糸タンパク質の構造形成に関与する役割を解明するため、走査型電子顕微鏡など光学的手段で、絹・繭の微細構造特性と金属イオンの関係を研究する。

3.6.1 繭の重さ、繭に含まれた無機物の成分および無機物含量について

家蚕繭20種（日本在来種、中国在来種）の重さおよび無機成分の含量(表6.1)を調べた結果、家蚕繭の種類によって無機物の量は異なっていた。しかし、繭の重さの変化には無機物の量は依存しないことが解析された(図6.1)。無機物の約25%がカルシウムとカリウムで占めていることが分かった(図6.2)。

表 6.1 品種の異なる繭の無機成分組成と含量

品種	元素							合計
	Ca	K	S	P	Si	Mg	Na	
青熟	21.50	7.66	5.34	1.46	0.27	1.24	0.33	37.80
千曲	17.90	7.37	4.82	0.76	0.23	1.49	0.00	32.57
角又	17.90	8.59	5.08	0.89	0.22	1.20	0.22	34.10
又昔	19.40	4.63	5.22	1.10	0.26	1.71	0.16	32.48
紫蚕	17.30	7.22	5.09	1.22	0.22	1.89	0.11	33.05
鬼縮	18.80	4.80	5.05	1.30	0.27	1.67	0.00	31.89
琉球	19.80	6.29	6.02	1.10	0.28	2.52	0.25	36.26
青白	20.30	1.86	4.79	0.99	0.27	3.44	0.16	31.81
只見蚕	21.70	5.17	4.55	1.23	0.34	1.26	0.12	34.37
玉無飛白	17.90	6.67	4.84	1.12	0.29	1.04	0.30	32.16
アモイ	16.00	6.17	4.47	0.96	0.20	1.10	0.12	29.02
漢口	13.40	13.80	4.40	0.97	0.25	2.36	0.39	35.57
黄波	19.00	6.52	4.58	1.16	0.17	1.19	0.00	32.62
蓮心	14.50	9.10	4.54	0.82	0.17	1.73	0.25	31.11
角支那	16.90	2.66	4.08	1.06	0.30	1.93	0.25	27.18
鳥毛	20.60	8.03	4.50	0.95	0.25	1.55	0.33	36.21
C球	14.90	8.53	4.45	0.98	0.00	1.30	0.05	30.21
錫元	20.20	8.15	4.85	0.97	0.17	1.61	0.21	36.16
213	19.90	4.21	4.41	0.94	0.33	2.16	0.00	31.95
261	17.50	3.90	4.55	1.01	0.43	1.82	0.22	29.43

(wt%)

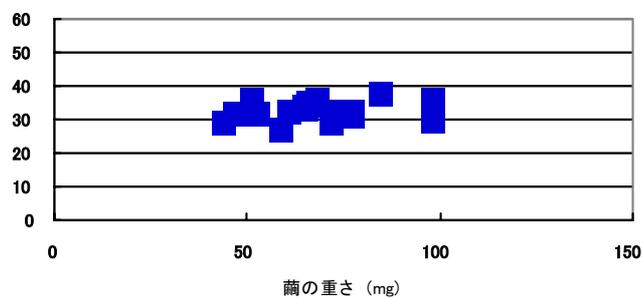


図 6.1 1粒繭の重さと無機成分含量との関係

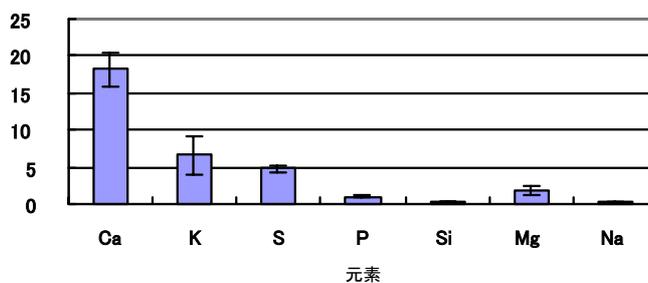


図 6.2. 家蚕繭に含まれている無機成分の組成

一方、エリ蚕の無機物成分含量は灰分の約63.2%であり、クス蚕および家蚕の2倍であり、その中で、カルシウム成分はクス蚕および家蚕の2倍であった。クス蚕の無機物成分含量は家蚕とほぼ同様で、灰分は約29.54%であった。各無機物成分を調べた結果、クス蚕のカリウムの含量は極めて少なく、一方マグネシウムの含量はカイコ及びエリ蚕の繭に比べて多く含んでいた。

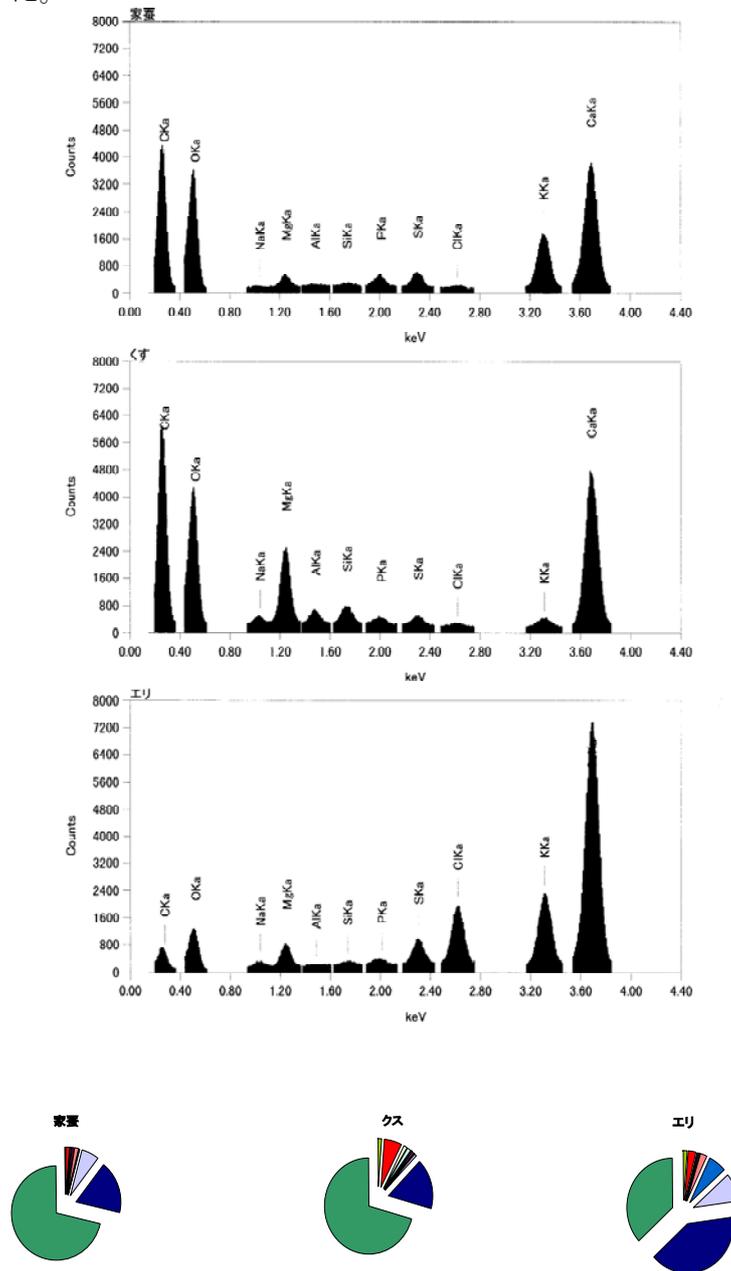


図 6.3 エネルギー分散蛍光 x 線分析システムによる測定した繭灰分のスペクトル

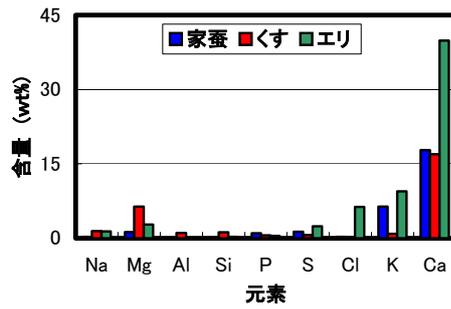


図 6.4 家蚕及び野蚕の繭に含まれる無機成分の組成

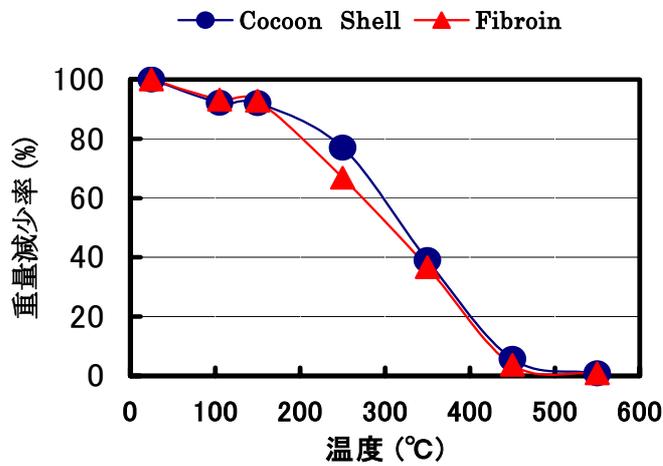


図 6.5 加熱温度の上昇による繭およびフィブロインの重量変化。

3.6.2 熱処理による家蚕および野蚕繭の重量変化

実験結果から、フィブロイン（試薬）および繭の熱特性は異なることが分かった（図 6.5）。フィブロインは150度から250度の温度範囲内に重量の減少が顕著になっていたが、フィブロインとセリシンの二つタンパク質を含んでいる繭は150度から250度の温度範囲内で重量の減少率が相対的に緩く、250度から350度の温度範囲内で重量減少率はフィブロイン（試薬）に比べ早くなり、構造変化が始まった（図 6.5）

一方、クス蚕繭の重量減少は150℃以上の温度から始まり、エリ蚕の場合は250度前後からの重量変化が見られ、野蚕は家蚕より高い温度側の重量変化を示した（図 6.6）。

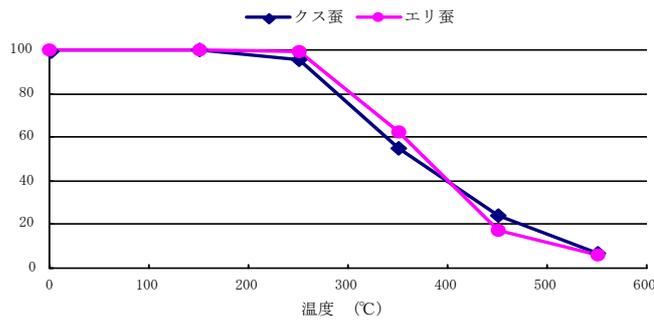


図 6.6 加熱温度の上昇による野蚕の重量変化

3.6.3 繭糸の熱分解

TG-DTA-FTIRシステムを用いて、25°Cから550°Cまでの繭糸の熱特性を分析した。その結果を図6.7. a)に示した。TG曲線では、最初の105°C前後に約9%の重量が減少し、これは繭糸に含まれている水分の蒸発によるものと考えられる。次に、190°C付近から繭糸の熱分解が始まり、280°Cから320°Cまでに重量減少は激しくなった。DTA曲線では、280°C付近からの吸熱変化が見られ、308°C付近に吸熱ピークが現れた。これは熱処理による繭糸の構造分解が始まっていると考えられる。さらに、320°Cから繭糸の重量は緩やかに減少し続け、550°Cまで灰分として繭糸の約1%しか残らなかった。

図6.7. b)にFTIR装置で20°Cから580°Cまで10°C・min⁻¹の昇温速度条件で測定した繭糸のスペクトルを示す。308°Cの2380cm⁻¹のピークは-OH吸収バンドに帰され、346°Cの1760 cm⁻¹のピークはC=Oの吸収バンド、328°Cの1530cm⁻¹のピークはN-Hの吸収バンド、357°Cの1085cm⁻¹のピークはC-Nの吸収バンド、342°Cの965cm⁻¹のピークは-NH₂の吸収バンドに帰される。これらの成分は加熱により繭糸の内部の構造を分解され、ガスを発生したと推測される。

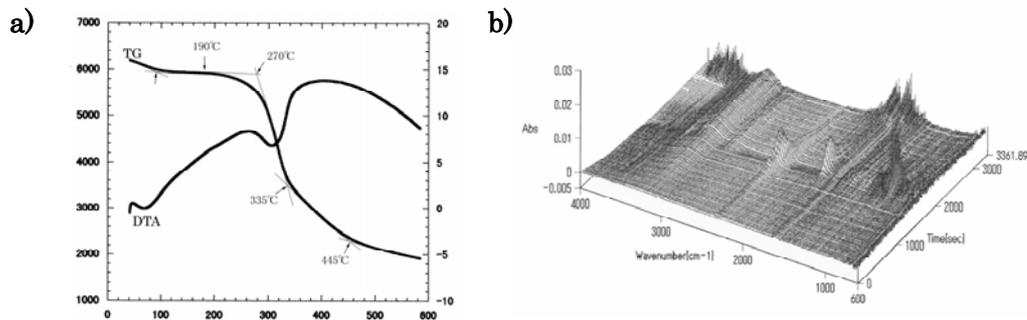


図 6.7 繭糸の a)TG-DTA 曲線 b) IR スペクトル

6.3.4 熱処理による繭糸の微細構造の変化

異なる温度処理後の家蚕繭色、繭のサイズおよび形の変化を図6.8に示した。繭色は150℃前後から軽い黄色に変化始め(図6.8.b)、190℃前後に黒くなり始めた(図6.8.c)。繭色の変化に伴い、繭の形を保持しながら繭のサイズは縮んでいくことがみられた。500℃前後から繭色は再び白色になった(図6.8.f)。

走査型電子顕微鏡による熱処理前後に家蚕および野蚕繭の構造を観察した。図6.9では、家蚕繭の熱処理前後の走査型電子顕微鏡写真を示す。350℃で3時間熱処理後に繭糸は膨らんでいる様子が見られた(図6.9.b)。同様に、繭糸の断面写真では、中心部に空洞が見られ(図6.9.d)、約10 μ m直径の空洞が糸の中心部に形成された。熱処理による繭糸の微細構造変化は繭糸の内部から熱分解の開始によることが判明した。

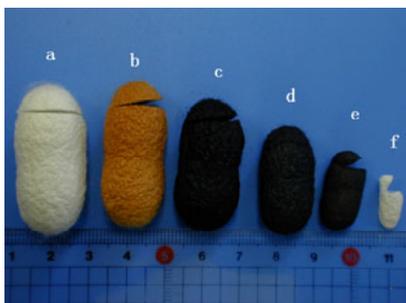


図6.8 異なる温度における繭の形の変化
a : 未処理、 b : 150℃処理、 c : 250℃処理、
d : 350℃処理、 e : 450℃処理、 f : 550℃処理

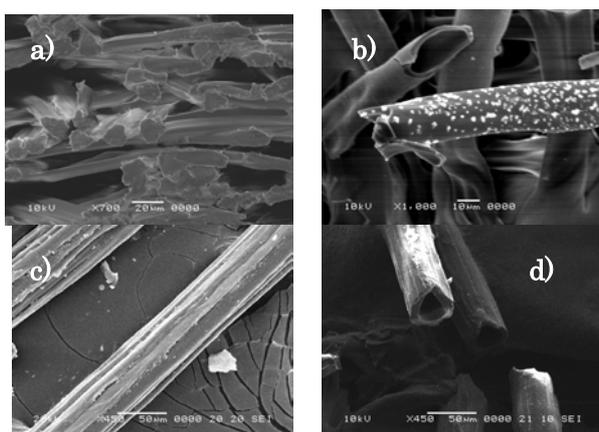


図6.9 SEMによる熱処理後家蚕の微細構造変化の観察
a : 繭の断面 b : 350℃で熱処理後 c : 生糸 d : 350℃で熱処理後

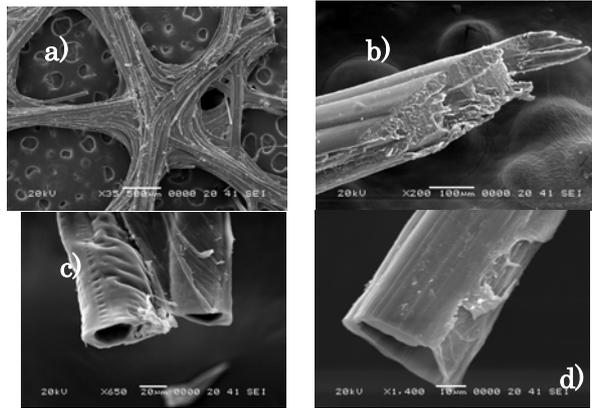


図6. 10 SEMによる熱処理前後クヌエの微細構造変化の観察。

(a)表面、(b)断面 (c)、d) 350℃処理後の断面

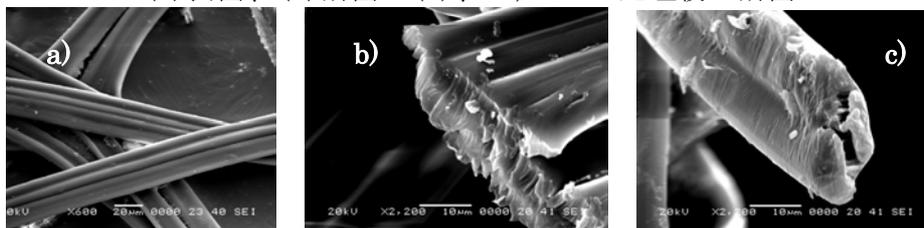


図6. 11 SEMによる熱処理前後エリ蚕の微細構造変化の観察。

(a)表面、 (b)断面、 (c)熱処理後の断面

クヌエおよびエリ蚕においても、家蚕の熱処理結果と同じように、繭糸の断面写真では、中心部に空洞が見られ（図6. 10と図6. 11）、ここでも熱処理による繭糸の微細構造変化は繭糸の内部から熱分解により始まることと判明した。

試料として家蚕およびエリ蚕を用いた。von Kossa カルシウム検出法を利用して、カルシウムを本来の結合から切り離し、それを重金属陽イオンに置換する。過剰の重金属塩を水洗その他の操作で除去し、次いで写真用現像液を作用させ、濃黒褐色を呈する金属銀に還元発色させる。そして、走査型電子顕微鏡および高倍率デジタルカメラで繭糸の微細構造およびカルシウムの分布を観察した（図6. 12）。家蚕およびカルシウムを多く含むエリ蚕の繭を染色した結果、家蚕繭の場合は濃黒褐色を呈するカルシウムの分布が見当たらないが、エリ蚕糸の表面には濃黒褐色を呈するカルシウムの分布が見られた。このことは、染色法による繭糸に含まれているカルシウム、カリウムなど無機物分布可視化が可能であると考えられる。

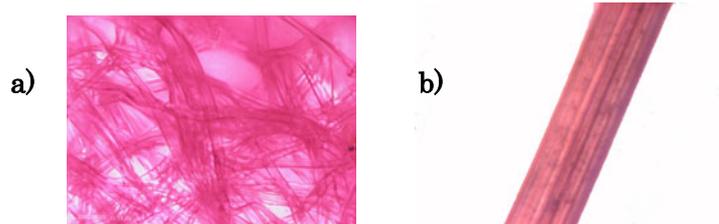


図 6. 1 2 染色後の繭表面 (a) および繭糸 (b) の写真

3. 7 高結晶性セルロースと絹との複合フィルム (カイコグループ)

紙パルプ・綿・麻という天然繊維の直接利用を別とすれば、現在人類が使用している高分子材料のほとんどは化石資源由来の合成物質である。天然高分子、とくにセルロース由来の半合成高分子は、高分子工業の生成期に重要な役割を果たしたが、1970年代以降は産業的な比重が低下しつつある。しかしながら天然高分子、とくに多量に得られる生物資源である多糖類はその構造上の特質から結晶化しやすく、その特質が生物体の構造形成と強度維持に対して重要な意義を持っている。

本研究では最も豊富な生物材料資源であるセルロースとキチンについて、天然の微結晶形態を生かし、あるいは模倣することによって、従来の合成化学技術では得られなかった高性能・高機能の材料を創成することを目指した。そこで本研究では複合材料と錯体形成の側面から研究を行った。

3. 7. 1 多糖結晶のエピタキシ効果による絹フィブロインの構造形成

セルロースとフィブロインのコンポジットを調製する試みがいくつか報告されているが、これらは両方のポリマーを共通溶媒に溶かして分子的に混合するものであった。本研究ではセルロース微結晶のすぐれた物理的特性に着目し微結晶形態を残したままフィブロインと複合化し、セルロースの秩序構造がフィブロインの高次構造に及ぼす影響を調べた。

図 7. 1 にセルロース-フィブロイン混合系の透過電顕像を示す。この状態ではフィブロインは連続相になっており見えないが、セルロース微結晶は良く分散した棒状粒子として観察される。粒子は軸比が大きいためキャストによって水平に積層するが、面内での配向はランダムである。力学試験および赤外スペクトル用の試料もこれと同じ構造をとっていると考えられる。

図 7. 2 と 7. 3 に複合フィルムのX線回折図を示す。フィブロインのみの試料は $2\theta = 12.2^\circ$ および 19.5° 、すなわち 0.72 nm および 0.44 nm に明瞭な反射を与え、これ

はSilk Iのパターンである。セルロースのみの試料は明瞭なセルロースI β のパターンを与えた。混合試料においては、両成分間に特別の相互作用がなければこれら二つのパターンの重ね合わせになるはずであるが、実際のパターンではフィブロインの回折は不明瞭になった。これはセルロースの存在がフィブロインの結晶化を阻害していることを示唆する。

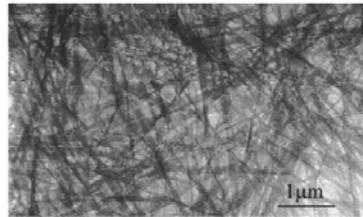


図 7.1 ブレンド比率 50/50 で混ぜたフィブロインとセルロースフィルムの透過電子顕微鏡写真

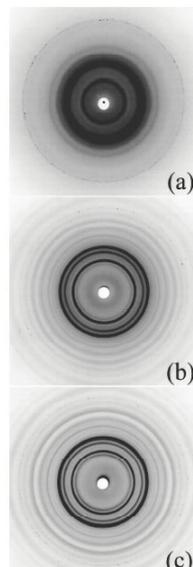


図 7.2 X 線回折パターンの写真 a)絹フィブロイン、b)フィブロイン/セルロース 50/50、c)セルロース

図 7. 4 に複合フィルムのスペクトルを示す。フィブロインの 1654 cm^{-1} のバンド (図 7. 4a) はSilk I あるいはランダムコイル型のフィブロインのアミドIに帰属される。セルロースはこの領域に吸収を持たないので、フィブロイン含量が減るにしたがってこのバンドの強度は低下する。しかしフィブロイン含量が30-10%になるとこの吸収が 1625 cm^{-1} へと顕著なシフトを示した (図 7. 4 e-g)。同時に 1540 cm^{-1} のアミドIIのバンドは 1530 cm^{-1} へとシフトした。これらの変化はフィブロインの β 構造 (Silk II) のものであることが知られている。

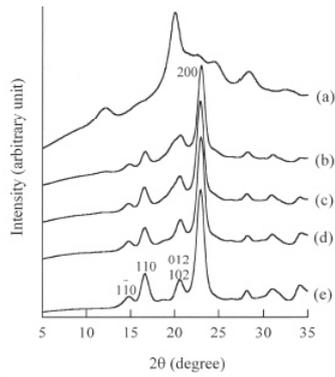


Figure 3 X-ray diffraction profiles of silk fibroin-cellulose whisker composite films. Silk fibroin/cellulose ratio: (a) 100/0; (b) 70/30; (c) 50/50; (d) 30/70; (e) 0/100. Unit cell conversion follows Woodcock and Sarko.¹⁷

図 7.3 絹フィブロイン/セルロースブレンドフィルムの X 線回折パターン
フィブロイン/セルロースの割合は a) 100/0 b) 70/30 c) 50/50 d) 30/70 e) 0/100

したがって上記の結果はセルロース微結晶との相互作用によってフィブロインが β 化したことを示している。この結果は一見 X 線回折の結果と矛盾するように見える。しかしフィブロインと微結晶の接触は後者の表面においてのみ起こるので、実際に β 化するフィブロインは数分子層に限定されるであろう。このような大きさでは X 線回折での結晶性の検出は通例困難である。フィブロイン-セルロース微結晶複合フィルムのヤング率は混合比に対してほぼ線形の依存性を示した (図 7.5)。

しかし破断強度には顕著な異常性が現れた (図 7.6)。フィブロイン単独およびセルロース単独のフィルムは 30~50 MPa の強度であったが、混合フィルムのそれははるかに大きく、セルロース 70~80% のところでは最大値 160 MPa を与えた。

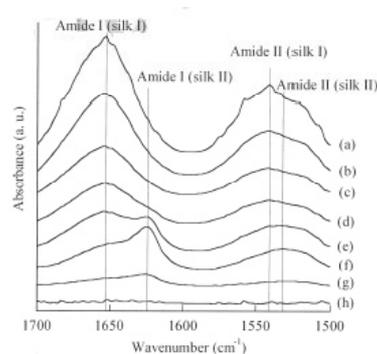


図 7.4 フィブロイン/セルロース混合フィルムの FT-IR スペクトル フィブロイン/セルロースの割合は a) 100/0 b) 80/20 c) 60/40 d) 40/60 e) 30/70 f) 20/80 g) 10/90 h) 0/100

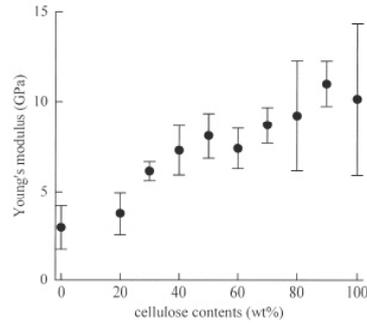


図 7.5 フィブロイン／セルロース混合フィルムのヤング率

これはセルロース-フィブロインの分子混合フィルムについて報告されている45 MPa、キトサン-フィブロインの90 MPa と比べ顕著に大きい。先述のとおりヤング率は混合比に対して線形の依存性なので、破断強度の増加は破断伸びの増加に起因することは明らかであり、実測もそのようになっている（図7.6）。

このような効果がセルロース微結晶とフィブロインという組合せに特異的なものであることを確認するため、フィブロインの代りにポリビニルアルコールをマトリクス

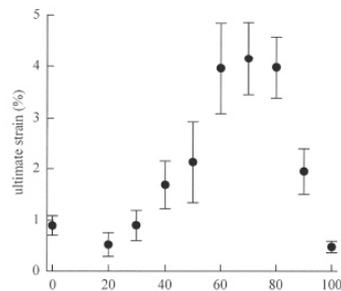


図 7.6 フィブロイン／セルロース混合フィルムの破断強度

としてセルロース微結晶複合フィルムについて力学試験を行ったところ、このような効果は見られなかった。また再生セルロース（低結晶性のセルロースII）の粒子とフィブロインの複合フィルムでも同じであった。したがって図7.6のような強度発現効果はフィブロインに対するセルロース微結晶の特異な効果を示している。そしてそれは赤外スペクトルで示されたフィブロインの β 化に起因することは明らかである。水溶液中のフィブロインがずり変形や延伸変形で β 化することはよく知られている。ここで見られた挙動は、セルロース微結晶の秩序表面がフィブロインの β 構造形成を誘起することを示している。

セルロース微結晶とフィブロインの複合フィルムはフィブロイン含量20-30%のときに、各々単独の場合の約5倍という高い破断強度および破断伸びを与える。赤外スペクトルにおけるアミドIとアミドIIのピーク位置の変化から、この異常性はフィブロインの β 化に起因すると考えられる。この挙動はセルロース微結晶の秩序表面がフィブロインの構造形成を誘起することでもたらされる。

3.7.2 β キチンの包接現象を利用する特異構造高分子の形成

調べたすべてのアミン、すなわちC3からC8のモノアミンとC2からC7までのジアミン（いずれも一級アミン）が β キチンと錯体を形成した。この錯形成は完全に可逆的であり、錯体を水洗・乾燥すると元の β キチンに戻った。図7.7にn-ヘキシルアミンとの錯体のX線回折図を示す。赤道上一番内側にある β キチンの010面の反射が錯体形成により大きく内側にずれている。錯体でのこの面間隔はゲスト分子の鎖長にしたがって特徴的な変化を示す。ゲストのアルキル基の炭素数に対してプロットすると図7.8のようになる。すなわち全体として二本の直線Line IとLine IIに乗る。そこでこれらに対応して錯体をType IとType IIとして分類する。表7.1にゲストの種類と錯体の型の対応を示す。

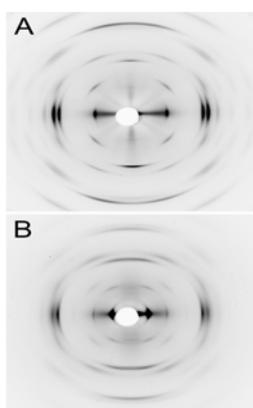


図 7.7 β -キチンと錯体の X 線回折写真
A: 無水 β -キチン B: n-ヘキシルアミン錯体 (吸引乾燥)

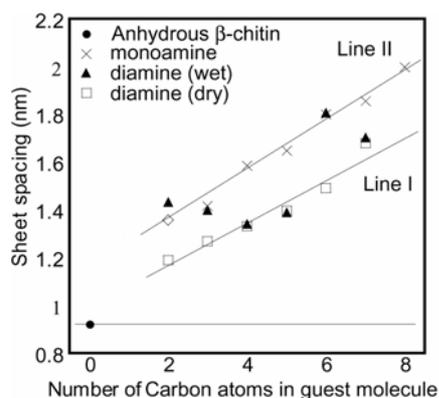


図 7.8 ゲスト分子長の面間隔への作用

表7.1 モノアミンとジアミンによる錯体の型

炭素数	ゲスト	錯体型	2時間吸引後の錯体の型	沸点 °C
3	propylamine	II	free chitin	49
4	butylamine	II	II~free chitin*	78
5	pentylamine	II	II~free chitin*	104
6	hexylamine	II	II	129
7	heptylamine	II	II	155
8	octylamine	II	II	179
2	ethylenediamine	II	I + II	117
3	trimethylenediamine	II	I + II	135
4	tetramethylenediamine	I	I	158
5	pentamethylenediamine	I	I	180
6	hexamethylenediamine	II	I + II	100
7	heptamethylenediamine	I	I	224

* : ゲストアミンは長い吸引により減少した.

すべてのモノアミンは湿潤（飽和）条件では Type II錯体を作る。長いアミン（n=6～8）のType II錯体は2時間の真空乾燥後も同じ構造であったが、短いもの（n=3～5）は部分的に無水キチンに戻った。さらに長時間真空乾燥すると次第にゲストが離脱した。これに対し、ジアミン錯体の型はアミンの種類と乾燥条件で異なった。Type I錯体の面間隔は同じ炭素数のType IIのそれより小さい。これはゲスト分子の充填状態が大きく異なっていることを示唆する。X線回折から求めた010面間隔を表7.2に示す。

まず決定すべきことは錯体の組成すなわちホストとゲストの量比である。そこで錯体の熱分解の挙動を熱重量分析およびX線回折で調べた。ヘキシルアミン錯体の段階的な加熱による変化は、1.79 nmに相当する反射は140～180°Cで消失し（図7.9A）、無水βキチンのそれに戻った（ヘキシルアミンの沸点は129°C）。エチレンジアミン錯体については、最初はType IとType IIの混合物であったが、180°CまででType Iのみになり、220～280°Cで無水βキチンに戻った（エチレンジアミンの沸点は117°C、図7.9B）。β-キチンの熱重量分析曲線は図6Aのようであり、200～360°Cの範囲、とくに300～360°Cではほぼ一段階で起こる。これに対しヘキシルアミン錯体（Type II）は図7.10Bのようにゲストの離脱による階段状の変化を示す。200°Cまでの減少は元の33%であり、こ

れは図7.9Aにおける Type IIから無水 β キチンへの転移に対応する。この減量からゲストの量を計算すると キトビオース単位あたりのアミン分子数は1.98となる。ホスト-ゲスト比は単位格子の体積と液体アミンの密度からも見積もることができる。表7.2のデータからヘキシルアミンについて計算すると1.89となる。またエチレンジアミンではType IIが2.27、Type Iが1.03となる。 β -キチンとアミンの錯体形成は以前に報告されている脂肪族アルコールのそれと基本的に類似している。

表 7.2 n-ヘキシルアミンとエチレンジアミンによる単位セルパラメータとゲスト分子の数

試料	<i>a</i> , nm	<i>b</i> , nm	<i>c</i> , nm	γ , deg	キトビオース辺りのゲスト分子 *	
					Nv	Ntg
無水 β -キチン	0.483	0.925	1.033	97.4	0	0
ヘキシルアミン錯体 (Type II)	0.475	1.807	1.029	96.8	1.91	1.98
エチレンジアミン錯体 (Type II)	0.479	1.450	1.037	96.7	2.31	ND
エチレンジアミン錯体 (Type I) **	0.476	1.183	1.024	90.6	1.07	ND

* Nv, 単位セルタイプ ; Ntg : 熱重量分析

** Approximated as one-chain monoclinic. Actual system may be two-chain monoclinic or one-chain triclinic.

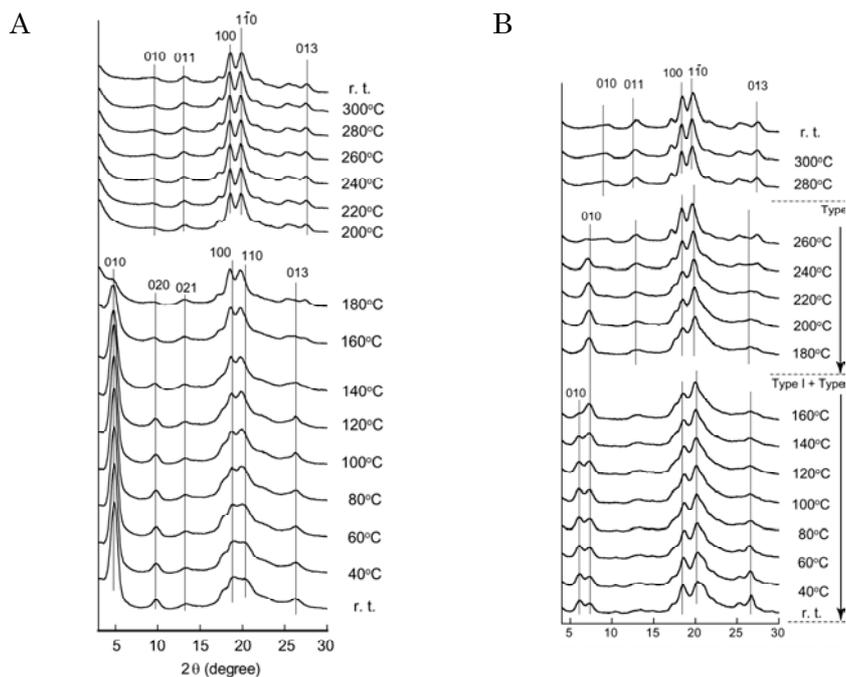


図 7.9 昇温温度 5°C/分における錯体の X 線回折波形
 A : n-ヘキシルアミン錯体 B : エチレンジアミン錯体

しかし後者がHCl 膨潤の前処理を必要としたのに対し、アミンでは液体に直接浸漬するだけで容易に錯体を形成する。これはアミノ基とキチン分子との強い相互作用によるものと思われる。

アルコールの場合もアミンの場合も錯体中のキチンシート面間隔はゲストの炭素数にほぼ比例して増加する。そして増加幅 Δd は分子鎖長とほぼ一致する。例えばヘキシルアミンの場合 C_6N の長さは0.80 nm (原子の中心から中心) に対して Δd は 0.88 nmである。このことからType II錯体の構造として図 7.10Aのモデルが考えられる。

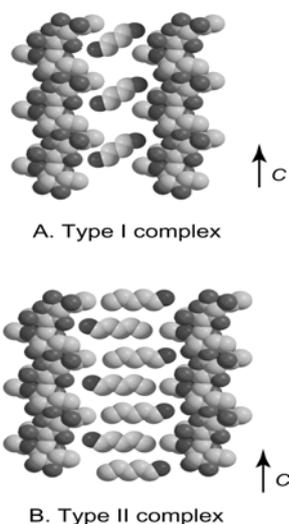


図 7.10 錯体中のゲスト分子の取りうる構造 A : Type I B : Type II

他方 Type I 錯体の Δd は同じ炭素数のゲストでの Type II の Δd の $1/2 \sim 1/3$ であり、これはホスト-ゲスト比が $1:1$ であることに対応する。したがってゲストの充填状態も大きく異なっているはずである。これから我々は図7.10Bのモデルを提案する。ゲストの種類および処理条件（湿潤/真空乾燥）により2種類の錯体ができるという点はキチンの包接現象における新しい知見である。キチン分子はC2にアセトアミド基を持つので、ゲスト分子の充填状態はキチンのアセトアミド基+水酸基とゲストのアミノ基の間の水素結合、およびアルキル基間のファンデルワールス力のバランスに支配されるであろう。 β -キチンの構造の特異性と錯体形成挙動は古くから注目されていたが、その研究は入手困難な試料のために遅れている。本研究では培養珪藻からの試料を用いてこの包接現象の新しい側面、すなわちアミンの強力な作用と2種類の錯体の存在を明らかにすることができた。これまでのところ液体アミンへの直接浸漬処理のみを調べてきたが、予備的知見によれば溶液からでも取り込まれる

ケースがあるようだ。またキチンに入りやすいものの錯体を中間体として、直接には入りにくいものを入れられる可能性もある。他方キチンと近縁のセルロースもアミンと錯体を作り、その現象は繊維の改質はセルロースの可溶化に利用されている。したがってキチンへの低分子の可逆的取込み現象は新しい材料や工業プロセスへの足がかりとなる可能性がある。

3. 8 プロトプラストが分泌する巨大カロース繊維（木材グループ）

前世紀に生じた化石燃料の枯渇危機や二酸化炭素量の増加が、今世紀に入って、さらなる環境悪化への引き金になると考えられている。環境負荷低減を目指すための対策として、持続的使用可能な生物資源としてバイオマス資源を利用することは不可欠であり、加えて、環境負荷を低減するために生物の機能を利用することは極めて有効である。生物は、穏和な条件下において速やかにかつ選択的に物質を生合成することから、生物の物質生合成機構をモデル化し、そのシステムをさらに人工的に高次構造形成制御を含めて改良することが可能となれば、低エネルギーの物質生産システムの構築に直結する。

本研究では、試料として樹木プロトプラスト(細胞体)を用いた。プロトプラストは、細胞壁を持たないことから、再生していく過程での細胞壁形成を経時的に追跡することが可能である。したがって、プロトプラストにさまざまな方法でストレスを加え培養を続けた。その結果、細胞壁形成の有無というより、さらに興味深く、顕著な現象が観察された。

3. 8. 1 高濃度カルシウムイオン下でのプロトプラストの繊維生産現象

ストレス下における細胞壁の形成過程を観察するため、試料としてシラカンバ(*Betula platyphylla* var. *japonica*)葉由来のプロトプラストを用いた。得られたプロトプラストは、1/2(Murashige&Skoog)MS基本培地に分化・増殖を誘導するための植物ホルモンを添加した条件下で培養すると、約2週間後には変形肥大が、約1ヵ月後には細胞分裂が観察され、さらに、約2ヵ月後にはコロニー形成を経て最終的には植物体へまで再生する能力を有している。本研究では、その培地条件に種々のストレスを付与するため、pHを、3.5~5.7の幅で変化させ、同時に、各種イオン(Na⁺,K⁺,Ca²⁺,Mg²⁺)を添加し、それらの添加量(0~500mM)に対する代謝挙動を調べた。その結果pH、イオン添加量を変化させるに伴いプロトプラストは約2ヵ月後、繊維状の物質を細胞の外へ向かって生産し始めた(図8.1)。

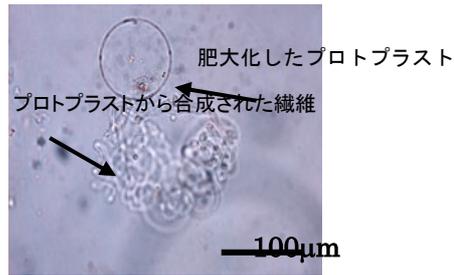


図8.1 巨大化したシラカバプロトプラストの光学顕微鏡写真

繊維を生産している細胞は分裂が抑制されており、繊維の生産を開始する時にはその直径が単離直後の約5倍にまで異常に拡大していた。この肥大細胞は、通常の細胞分裂過程において培養の初期に見られるような変形肥大(成長)したものではなく、図8.1に示したように球形の状態を保っていた。

繊維が生産される現象は、酸性下、高カルシウムイオン濃度において顕著に認められた。イオン特異性ならびにpH依存性を、図8.2に示す。繊維生産は、どのpH条件においてもカルシウムイオン濃度100mMから観察され、300mMまでは確認されているが、このうちでは200mMの条件が最も適していた。pH条件においては、細胞分裂やカルス誘導などの培養条件には通常pH5.7-5.8付近が適しているが、繊維生産にはpH3.5が適していた。一方、イオン添加量が低濃度の場合、コロニーを形成することが観

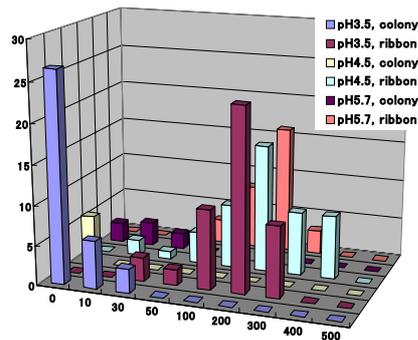


図8.2 繊維生産におけるCa²⁺とpHの濃度

察され、細胞分裂が生じていることが解った。このことから本条件における細胞分裂の抑制には、高濃度のカルシウムイオンの存在が必要であると考えられる。なお、カルシウムイオン以外に添加した各種イオン(Na⁺, K⁺, Mg²⁺)では、繊維形成はほとんど認められず、コロニー形成においてはカルシウムイオンと同様、イオン添加量の増加と共に抑制されていた。このことは培地中に添加したカルシウムイオンだけでなく他のイオンの場合にも高濃度で分裂が抑制され、細胞の生命活動へ過剰な負荷がかかったこ

とを示している。つまり、過剰の塩の添加やpHの変化により浸透圧や細胞内外のイオン濃度の変化が生じて、それが代謝や細胞分裂の機構へ影響し、繊維が生産されるまで細胞分裂が抑制されていると考えられる。したがって、本来ならば分裂が開始されるはずの時期にそれが抑制されたため、細胞内の代謝機構に負荷を与え、その反作用としてこのような現象が生じた可能性が推察される。

さらに、共焦点レーザー顕微鏡による像を図8.3に示す。図8.3a,bの細胞から外側へ向かった矢印は繊維の生産方向を示し、図8.3bはa像を45度傾けた像である。これらの像から、細胞膜表面より生産され、かつ、細胞のある一箇所から細胞外へ分泌されている繊維が確認できる。細胞壁の再生過程は、セルロースマイクロフィブリルが細胞膜表面のセルロース合成酵素群より生合成され、細胞表面を覆うように堆積する繊維形成を含む一連の過程であるが、本研究における細胞からの繊維生合成の場合、生合成直後から、その高次構造を保ちながら細胞外へと分泌されていることが特徴である。上記の観察像より、この繊維生合成が細胞膜表面より生産されていると確認されることから、繊維形成以前の段階である分子鎖の生合成も、その合成場は細胞膜の表面ではないかと推定される。したがって、セルロースマイクロフィブリル形成と同様に細胞膜上の合成酵素群により生合成される機構が本カロー繊維形成機構にも適応できるかもしれないと考えられる。

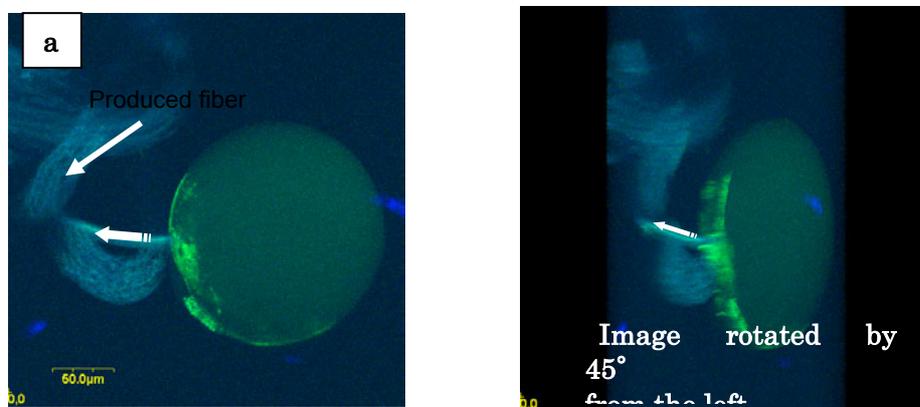


図8.3 繊維を分泌する巨大細胞の共焦点レーザーイメージ

植物組織内での細胞壁形成においては、隣接する細胞との隙間にセルロースマイクロフィブリルが堆積して壁となっていくため、本研究のような単独の分泌繊維には成り得ない。また、本研究のようにプロトプラストを用いて細胞膜表面におけるマイクロフィブリルの生合成機構と生合成物質の解析を行った研究においても、マイクロフィブリルは、ある一箇所からではなく細胞膜表面全体に生合成されていたことから、本研究での一箇所から繊維を細胞外に分泌する現象は特異的であるといえる⁴⁾。

3. 8. 2 分泌繊維の同定

プロトプラストが細胞外へ分泌するこの繊維状物質を同定するために組織化学染色、酵素処理により検討した。組織化学染色では β -グルカンを染色するカルコフロール、 β -1,3-グルカンを選択的に染色するアニリンブルー、シロフロアーを用いた。繊維はカルコフロール(図8.4)、アニリンブルー、シロフロアー(図8.5)により染色されたことから、この繊維状物質の主要構成要素は β -1,3-グルカン鎖からなるカロースであると考えられた。一方、酵素処理には、粗酵素ではなく選択的に結合を分解する β -1,4-glucanaseと β -1,3-glucanaseを用いた結果、繊維は β -1,4-glucanaseによっては分解されず、 β -1,3-glucanaseによってのみ分解された。

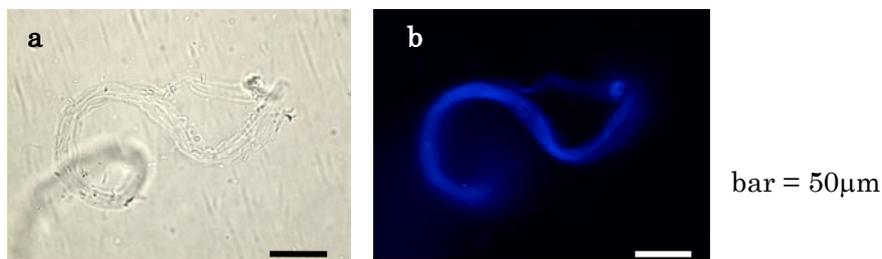


図8.4 β -グルカンを示すカルコフロールによる繊維の染色

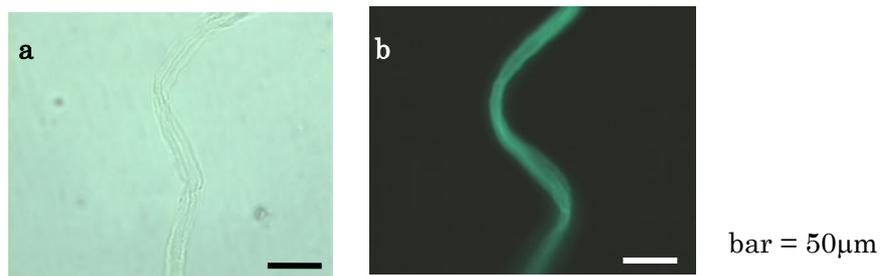


図8.5 β -1,3-グルカンを示すシロフロアーで染色された繊維

さらに、この繊維状物質を回収して薄切片を作成し、カロース抗体と反応させた。その結果、抗体が結合したシグナルとして明瞭な蛍光像を得た(図8.6)。これらのことから、この繊維状物質は、セルロースではなく、 β -1,3-グルカン鎖からなるカロースであることが明らかとなった⁵⁾。

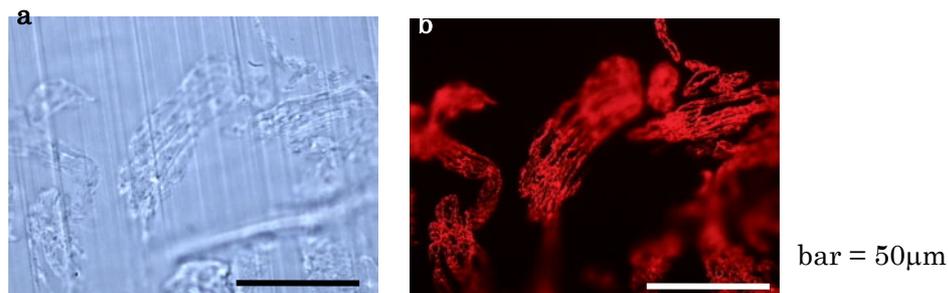


図8.6 カロース抗体で染色した繊維の薄切片

3. 8. 3 プロトプラストのカロース繊維生産 -速度とその繊維幅の測定-

プロトプラストが生産するカロース繊維は、光学顕微鏡観察時において約20~30 μm の繊維幅を有していた。まず、このような構造体がどのように細胞から作り出されているのか、そして、その時、細胞はどのような状態であるのか等、動きを含んだ情報を、タイムラプス光学顕微鏡観察法を用いて解析した。この手法は、経時的に現象を追跡し続けることが可能である。繊維が生産され、細胞外へ分泌されている様子を図8.7に示す。画像の取り込みは、顕微鏡(Leica DMRE)にCCDカメラを装着し、60秒間隔とした。得られたタイムラプス画像からの動画作成には、Adobe Premire 6.0を用いて30フレーム/秒とした。図8.7に示した写真の間隔は40分ごとの抜粋である。これら一部の写真からでも、細胞が繊維を生産することにより、繊維が伸長して細胞は画面の外へと押し出されていることがわかる

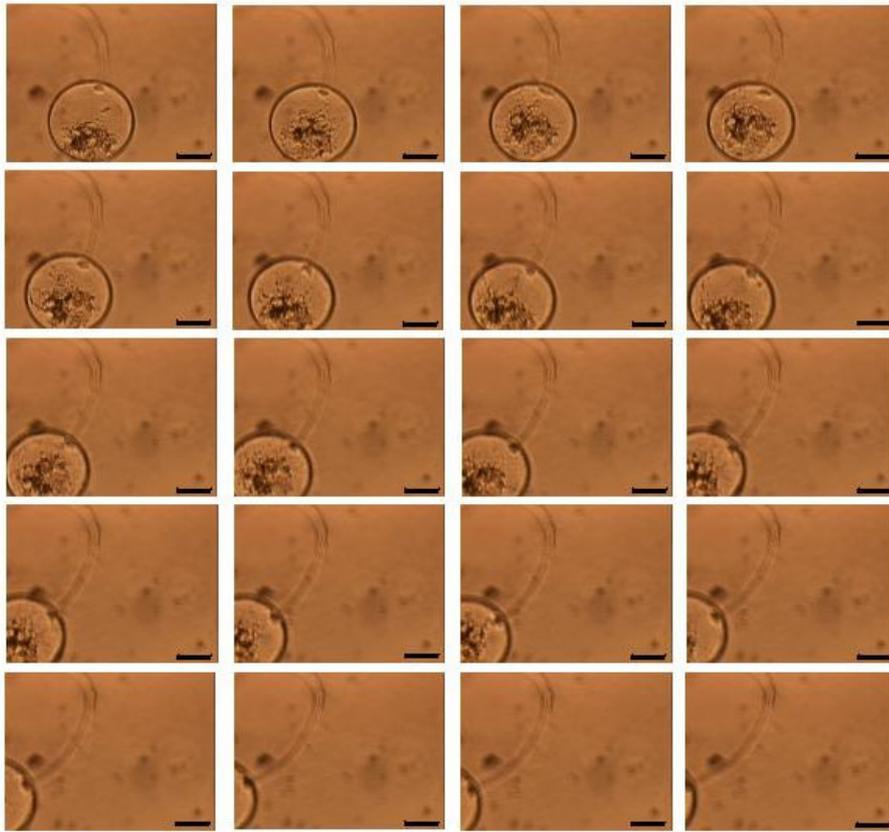


図8.7 時間経過によるカローズ繊維生産の様子

。

このようにして撮影した画像からの解析より、繊維の生産速度は、約 $0.3\mu\text{m}(300\text{nm})/\text{min}$ であり、繊維幅は約 $30\mu\text{m}$ の一定の繊維幅を維持して生産されることが明らかとなった（図8.8）。これらの値は植物が生合成するセルロースマイクロフィブリル($3\text{-}5\text{nm}$)や酢酸菌が分泌するセルロースリボン($\sim 100\text{nm}$)などと比べると、非常に巨大であった。

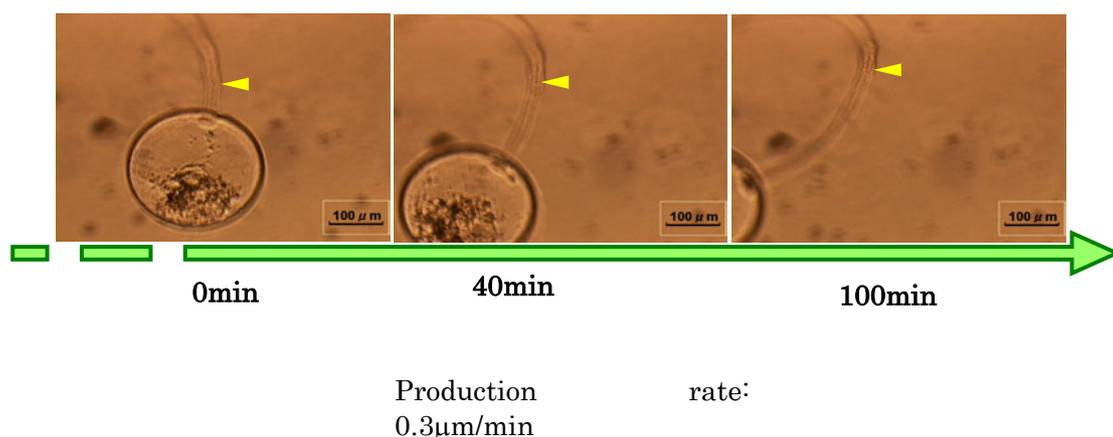


図8.8 プロトプラストから分泌される巨大カロース繊維

一方、この繊維の生産速度は、酢酸菌が生産するバクテリアセルロース生産速度 (2.5μm/min) と比べて遅いが、植物体としてはtabaccoのプロトプラストを用いた細胞膜表面でのマイクロフィブリル生合成について研究した例で報告されている620nm/minと比べるとほぼ同等である⁴⁾。また、根の成長に伴う細胞壁形成についての例では、セルロース合成酵素群(rosette)からのエレメンタリーフィブリルの生産速度が、maizeでは931nm/min、cressでは1283nm/min、という報告もある⁶⁾。本系において、細胞が分泌するβ-1,3-グルカン鎖からなるカロース繊維は、比較的、細胞が物質を生産する能力としては高いと考えられる。

3. 8. 4 原子間力顕微鏡 (AFM) によるカロース繊維の観察

本研究のカロース繊維は、タイムラプス観察により約30μmの幅を有していることが明らかとなり、生物が生合成するセルロースマイクロフィブリルやバクテリアセルロースリボンのような繊維状物質より非常に巨大であることがその特徴の一つである。そこで、このような巨大な構造体が、どのように構築されているのかを明らかにするため、原子間力顕微鏡(AFM)を用いてカロース繊維の表面構造を解析することにより、この繊維を構成する基本単位のサイズを求めた。この繊維表面には生産方向に沿って溝が刻まれたような構造が光学顕微鏡観察により見られたことから、AFMの利点を生かして繊維表面の構造を解析した。

カロース繊維は、培養液中より回収し、蒸留水で洗浄した後にスライドグラス上で乾燥させ試料とした。AFMは、NanoScope IIIa (Digital Instruments)を用い、タッピングモードにより観察した。その結果、AFMにより得られた像は、光学顕微鏡観察により見られたそれと同様に、生産(長軸)方向に沿ってほぼ平行に溝が刻まれているような表

面構造を有していた(図8.9)。よって、この繊維は、一本の巨大な繊維ではなくサブフィブリルが集合して形成されていると推察した。

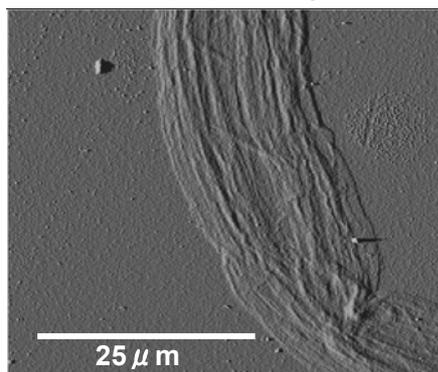


図 8.9 合成された繊維の表面構造の AFM 像

そこで、AFM観察から高さ方向の値より得られたスペクトルを二次微分法により解析し、繊維を構成しているサブフィブリルのサイズを求めたところ、約400-500nmの幅であった(図8.10)。ここで、タイムラプスによる観察から、生合成されている繊維と細胞との接点である細胞膜表面には円形(図8.7、8.8では楕円形)の像が観察されることから、細胞外へ分泌されているカロース繊維は円柱状であると考えられる。

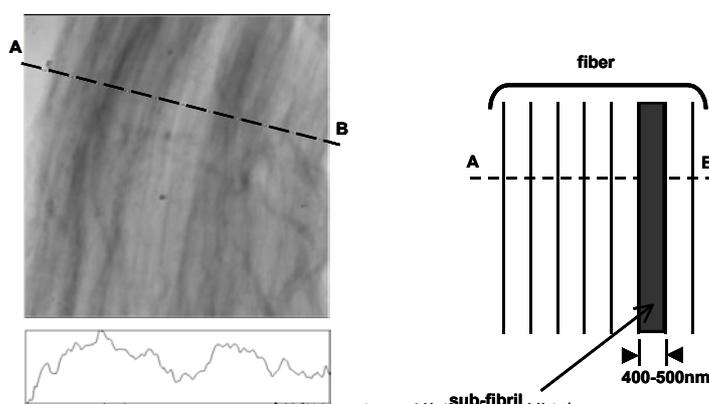


図 8.10 AFM 観測による繊維表面構造

しかし、AFMで用いた試料は、乾燥により非常に薄状(約300nm)となっていたことから、この繊維は水分含量が高いと考えられた。そこで、このサブフィブリルがどのように集合し、この繊維を構成しているのかを明らかにすることによってAFM像からの解析結果を裏付けることができるのではないかと考え、このサブフィブリルの構造をより詳細に解析するために電子顕微鏡を用いた。

3. 8. 5 カロース繊維の構造解析のための電子顕微鏡を用いた検討

AFMを用いた観察によりカロース繊維はサブフィブリルから形成されていることが推

察された。そこで、どのようなサブフィブリルがどのように集合して、巨大な繊維を作り上げているのかを明らかにするため、特にその形状を観察するために電子顕微鏡を用いた。繊維に対する断面を図8.11に、その横方向と縦方向の両断面の観察像を図8.12a,bに示す。横方向の断面では円形状または楕円形状に電子密度の高い像が得られた(図8.12a)。そして、縦方向の断面では層状の像が観察された(図8.12b)。このことは、カロース繊維は円柱状をしたサブフィブリルが束状に集合して構成されていることを示唆する。さらに、この結果は、カロース繊維がサブフィブリルより形成されているのではないかというAFM観察により得られた結果を支持するものである。そこで、繊維上においてカロースがこのサブフィブリルのどの部分に存在しているのかを明らかにするため、カロース抗体を反応させた。図8.13,bで示されるカロース抗体を用いた免疫染色において、カロースは、図12の電顕像で黒く線状に見られる電子密度の高い部分に沿って局在して

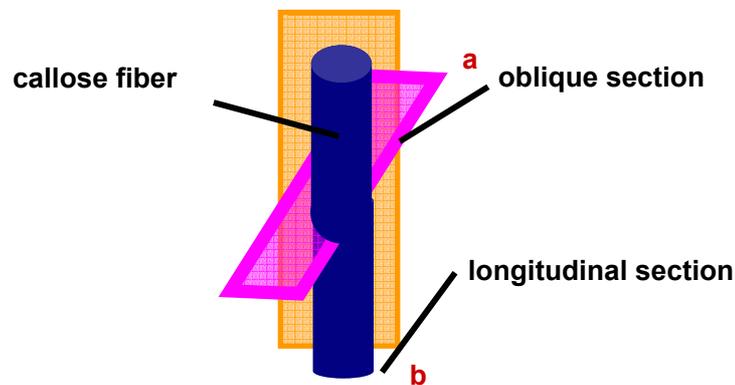


図8.11 超薄切片による繊維断面のイメージ

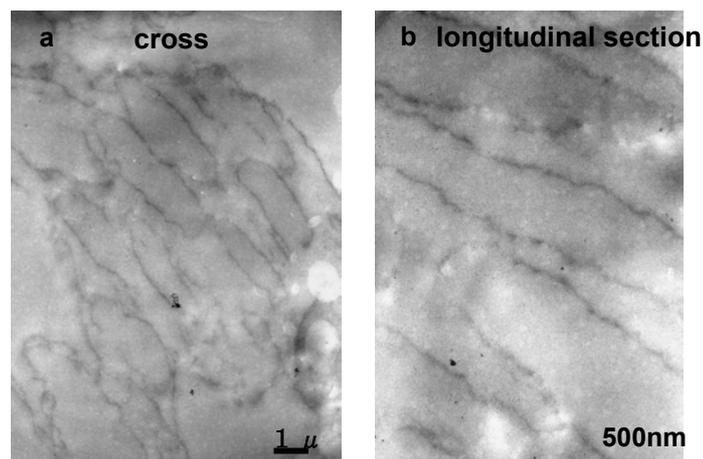


図8.12 カロース繊維断面のTEM像

いたことから、繊維を構成しているサブフィブリルは、カロースが充填している円柱状ではなく中空状の構造であることが示唆された。以上の結果は、図5bに示した蛍光顕微鏡観察の段階では、繊維の縦方向の断面が層状である可能性を示していたが、電子顕微鏡によ

り観察したことによって蛍光顕微鏡像から得られた結果を裏付けることとなった。そこで、電顕像よりそのサイズを求めたところ、この中空状のサブフィブリルは約 $1\text{-}2\mu\text{m}$ の径であったが、均一ではなく、中には $10\mu\text{m}$ に近い径のものも観察された。ここで、サブフィブリルの径の値が電子顕微鏡による解析結果とAFMによるそれとが一致しなかった要因としては、サブフィブリルが不均一であることと、AFMに用いた試料は乾燥させたため、中空状のサブフィブリルがつぶれ、重なり合って薄状になったことが考えられる。このように、AFMの解析から得られた値は、サブフィブリル一つではなく重なりあった可能性がある。

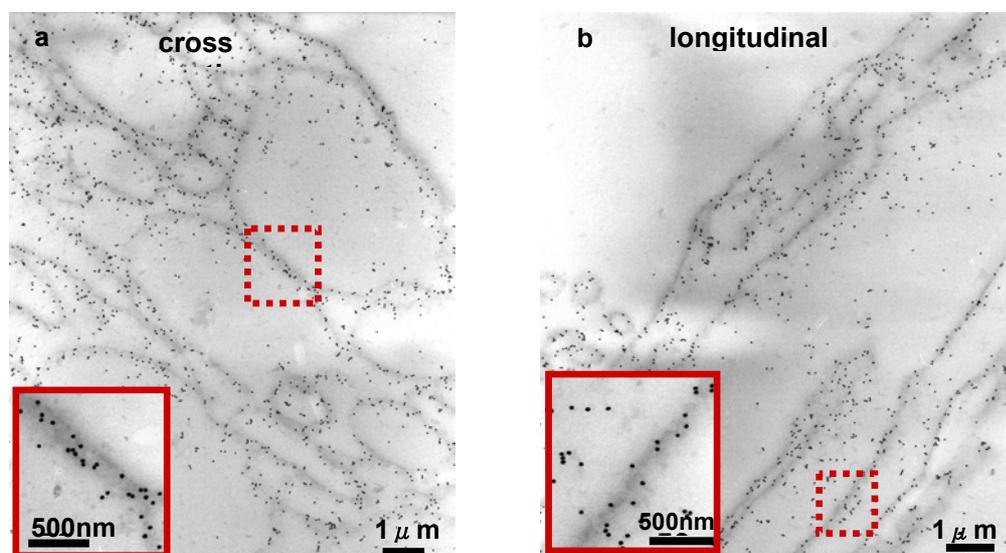


図8.13 抗カロース抗体染色後、金コロイド2次抗体にて染色したTEM像

プロトプラストから高次構造を有する巨大繊維が生合成されることは、極めて新規な現象である。

加えて、その構成分子がカロースであることが明らかとなったことから、本研究の重要性が一層高まったと考えられる。植物においてカロースは、細胞分裂初期の細胞板や花粉管成長に伴い生成・堆積する物質である。また、植物が機械的外傷あるいは病原体からの障害を受けた時の修復あるいは防衛反応として生合成される障害応答性多糖として知られている。カロースの生合成を誘導する物質としては、キトサンなど菌類の細胞壁成分に反応することが知られている⁸⁾。これは、植物体内に侵入した菌類の存在を認識するためである。そして、誘導の機構としては、外界からの進入に伴ってキトサンなどの誘導物質が細胞膜上に結合すること、または、細胞が機械的傷害を受けることによって細胞内のカルシウムイオン濃度が一時的に急上昇し、この急激な濃度変化がカロース合成酵素の活性を高めると考えられている。カルシウムイオン濃度

は、通常、細胞外では非常に低く保たれていることから、この場合、細胞内のカルシウムイオンは二次的な伝達物質としての役割を果たしている。これは、カロースの生合成とカルシウムイオンは密接な関連があることを示す一例である。また、細胞壁が除去されているため、プロトプラストは、再生の初期にカロースを生合成し細胞表面を覆うことが知られている。このカロース生産は、細胞壁を溶解酵素によって分解されたために受けた一種の傷害に対する修復機構であると考えられている。細胞壁溶解酵素によって傷害を受けたプロトプラストが、自己を修復しようとしてカロースを生合成する働きと、カロース生合成を促進あるいは誘導する働きを持つカルシウムイオンが培地中に多量に添加されている効果が相乗的にあいまっているかもしれない。このような巨大繊維の生産は、これまでの組織培養または*in vitro*でのカロース生合成研究においてカルシウムイオンを添加した場合には認められておらず、添加量もごく微量である⁸⁻¹⁰⁾。さらに、プロトプラストから再生を誘導する際に、細胞壁形成を抑制すると細胞分裂が生じないことが知られ、細胞壁形成が分裂促進に重要であることを示唆していることから、本研究の高濃度のカルシウムイオンを添加した条件下において、細胞分裂を抑制されたプロトプラストがセルロースではなくカロースを生合成したことは非常に興味深い。そして、そのカロースがプロトプラスト表面を覆うように生合成されたのではなく、繊維構造を形成することが本研究の特異性を示しており、材料形成プロセスの観点からも新展開が期待される。

繊維構造形成しながら生合成する例としてセルロースのミクロフィブリル形成が挙げられる。その場合と比較して考えると、本研究におけるカロース繊維生産は、プロトプラストの細胞膜表面に、ある配列パターンを有するカロース合成酵素の集合体が存在し、酵素による生合成直後に分泌されてくるカロース分子が配向自己凝集し、そして繊維構造形成するという過程を促進するのではないかと推定している。サブフィブリルが集合して繊維を形成するというこの階層構造が、いつ、どのように作られていくのかを明らかにすることが今後の課題である。また、電子顕微鏡観察から得られた興味深い結果として、中空状のサブフィブリル形成があり、それにカロースがどのようにして堆積あるいは沈着しているのかを解明することも重要である。

1. Y. Kataoka and T. Kondo, Changing cellulose crystalline structure in forming wood cell walls. *Macromolecules*, **29**, 6356-6358 (1996).
2. Y. Kataoka and T. Kondo, FT-IR Microscopic Analysis of Changing Cellulose Crystalline Structure during Wood Cell Wall Formation, *Macromolecules*, **31**(3), 760-764 (1998).
3. Y. Kataoka and T. Kondo, Quantitative Analysis for the Cellulose I α Crystalline Phase in Developing Wood Cell Walls, *Int. J. Biol. Macromol*, **24**, 37-41 (1999).

4. N. Hirai, S. Sonobe, and T. Hayashi, *In Situ* synthesis of β -glucan microfibrils on tobacco plasmamembrane sheets, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 15102-15106 (1998).
5. 近藤ら、特願2000-220419 (2000).
6. B. Schneider and W. Herth, Distribution of plasma membrane rosettes and kinetics of cellulose formation in xylem development of higher plants, *Protoplasma*, **131**, 142-152 (1986).
7. K. Okuda, *et al*, β -Glucan synthesis in the cotton fiber, *Plant Physiol.*, **101**, 1131-1142(1993).
8. H. Kauss, W. Jeblic, and A. Domard, The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharsanthus roseus*, *Planta*, **178**, 385-392 (1989).
9. Josephine L. K. Him, *et a*, Biosynthesis of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan (callose) by detergent extracts of a microsomal fraction from *Arabidopsis thaliana*, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4628-4638(2001).
10. T. Hayashi, *et al*, UDP-Glucose(1 \rightarrow 3)- β -Glucan synthases from mung bean and cotton, *Plant Physiol.*, **83**, 1054-1062(1987).
11. Yadomae T., Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans, *Yakugaku Zasshi*, **120**(5), 413-431(2000).

3. 9 液晶場における生体高分子の自発的構造発展を利用した多機能構造の創成 (バイオリキッドグループ)

生物自身が作り出す作り出す組織構造は巧みな方法、すなわち、物理、化学の原則に則り、省エネルギー、省資源で行っている。しかも、ナノオーダーの制御で、緻密な構造形成を行っている。また、生体系には、液晶形成能を持った棒状高分子が多く存在する。蛋白質、キチン質、セルロースなどであり、植物の細胞壁、昆虫の最外郭表皮、卵の殻、骨、目の角膜など生体の骨格組織内にフィブリルとして含まれている。その組織構造は特徴的で、フィブリルがらせん配列したアングルプライラミネートとして機能しており、コレステリック液晶場での自発的な構造発生を想起させる。最近の研究は、このような生体棒状高分子が、スメクチック、カラムナー柱状相も形成し得ることを示しており、生体系の多様な構造様式の自発的な生成のメカニズムを解明する足がかりとなることが期待される。

生体系において、液晶を形成する分子は大きく二つの群に分けられる。両親媒性分子と棒状高分子である。前者の両親媒性分子は、細胞膜に代表され、棒状高分子は一般に生体の骨格部であるハードな構造部位に存在し、一見液晶とは無縁のように見え

る。しかし、その固体あるいは半固体の組織構造体の形成に至るプロセス（希薄から濃厚溶液、そして固体に至るプロセス）では、常に液晶の形成があり、組織構造の自発的な発生の場となっていると考えられる。本研究では、後者の棒状高分子群に着目して生物と液晶の相関について研究を進め、自発的構造発展を利用した材料創成の方法を提言する。

3.9.1 自発的組織化による精緻ならせん構造の創成とその応用用途に関する研究

生体を形成する基本高分子は、タンパク質、キチン質、セルロースである。そしてそのいずれもが棒状形態を持つ。タンパク質はアミノ酸の繰り返し鎖部分に二つの自由回転可能な結合を含むため、本来は屈曲性高分子であるが、その二次構造として α -ヘリックスと呼ばれる棒状形態を持つ。棒としての持続長は1500 Å程度である。キチン質、セルロースは多糖類であるが、これも持続長が100 Å程度の棒として振る舞う。

一方、生体高分子は光学活性である。このことも生体高分子の重要な特徴の一つである。繰り返し単位中、タンパク質では2個、そしてキチン質とセルロースでは32個の光学異性体があり、その内、唯一の異性体が生体内では取捨選択されてきている。従って、液晶はコレステリック液晶となる。合成ポリペプチドのリオトロピックおよびサーモトロピック・コレステリック液晶を用い、特にらせんピッチの濃度依存性、温度依存性を、物理的、化学的視点から集中的に行い、らせんピッチの温度依存性は高く、らせんねじれのセンスまで温度により反転し、また、高分子濃度の増大、すなわち分子間距離の減少とともに、らせんねじれは増大する、などの特徴を認めてきた。このような特徴は、ポリペプチドに限らずセルロースでも観測され、棒状高分子特有の斥力が引力と協同的に作用した結果現れるものであると説明されている。

生体の組織構造は、分子の自発的構造発生により構築されているという謙虚な立場に立てば、これらの実験データを基盤にして、生体系での棒状高分子の振る舞いを容易に想像できる。すなわち、セル内で合成された棒状で光学活性な高分子は、セル外で濃度を高めコレステリック液晶を形成し、らせんピッチを減少させながら固体組織構造へと推移していく。そしてもしこれが事実であるとすれば、生体の組織構造部位にはらせん構造あるいはすくなくとも、らせんの軌跡が存在するはずである。

例えばカナブンの美しい緑色である。このカナブンを、円偏光子に通して観測すると、右円偏光子では変わらず光輝いているが、左円偏光子に通すと全く彩色は消えてなくなり、金属色に似た輝きが円偏光の選択反射によるものであることが解る。このような円偏光の反射特性は、分子のらせん凝集構造によってのみ生み出され、らせん構造を形成しえる場は唯一コレステリック液晶のみである。実際、生体組織体を形成

する基本高分子、タンパク質、キチン質、セルロースのいずれもが棒状形態でかつ光学活性を持ち、コレステリック液晶を形成する能力がある。またそのことは実験室的にも確かめられてきている。おそらく、細胞内で合成された生体棒状高分子は、細胞外で濃度を高めコレステリック液晶を形成し、らせんピッチを減少させながら固体組織構造へと推移していき、最終的にらせん構造を残してきたと推論するに足るものである。

そこで以下の方法により、実験的に再現を試みた。すなわち、1) リオトロピック系（溶液として液晶を示す系）の液晶溶液を乾燥、固化する。2) サーモトロピック系（温度変化により液晶を示す系）の液晶を急冷、ガラス化する。3) 液晶素材あるいは溶媒を光重合などにより重合架橋し、固定する。という以上3種の方法を用いた。溶液キャスト法は、溶媒を蒸発させるプロセスで蒸発速度、温度が微妙な調整因子となるため、らせんピッチの定量的な調整が難しく、好ましい方法ではない。本研究では、ガラス化の手法と重合架橋する手法で、ポリペプチド、セルロースのリオトロピック液晶を用いて、固定化を試みてきている。その成功の代表的な例は、サーモトロピックポリペプチドである。ポリペプチド分子は α -ヘリックス棒状形態をとり、分子長軸が優先的に面配向するため、らせんがフィルム面に垂直に、均一に成長した単一ドメイン組織が得られる。また、らせんピッチに高い温度依存性が見られ、同一試料で200nm以上のピッチを持つコレステリック液晶を任意に調製でき、さらに液晶-結晶転移点は100℃前後にあるため、この温度以下への急冷でコレステリック構造を固定化することができる。図9.1に円偏光反射スペクトルとコレステリックフィルムの垂直切片のTEM写真を示した。完全配向のモノドメインらせんを見ることができる。そして図9.2には、このようにして作成したカラーフィルムを、各種カナブンと比較した。

問題は、社会的、産業的ニーズに応えるために、いかに安価で優れた光学素材を提供できるである。そして、高分子素材の物性（耐熱性、耐光性）とそのコレステリック液晶特性（らせんピッチの大きさ、その温度依存性、らせん構造の相関長、ガラス化温度）に関する基盤データをもとに、社会的、産業的ニーズに対する適材適所の光学機能素材を作り上げてきた。そのニーズとして、プリントカラー素材、バンドパスフィルター、赤外、紫外線カットフィルター、液晶ディスプレイの光位相差板などがあり、これらの応用開発は現在まで着実に進行してきているし、光位相差板に関してはすでに工業化され、我々の研究成果が反映されて来た。

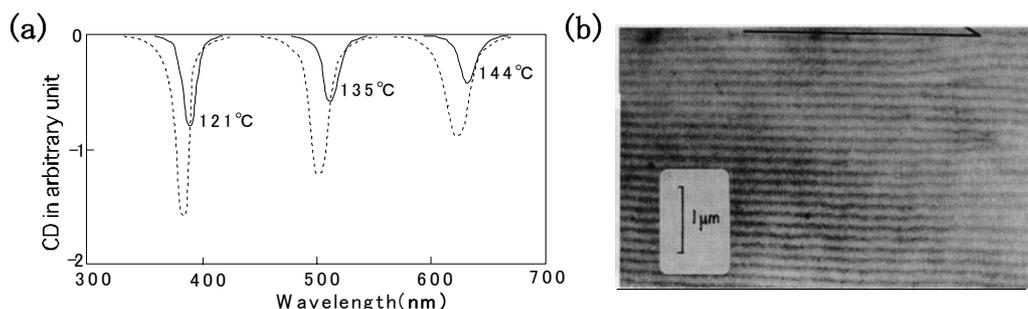


図 9.1 ベンジルグルタメートとドデシルグルタメートの共重合体のサーモトロピックコレステリック液晶を急冷して得た抗体フィルムの(a)円偏光反射スペクトルと(b)超薄切片のTEM像



図 9.2 コレステリックカラーフィルムと色々なカナブンとの比較

3.9.2 コレステリック相から高次液晶相への逐次相転移の発見

生体系の組織構造部位はらせんだけではない。むしろ、らせんを含まない組織構造の方が多く考えた方がよい。コレステリック相はスメクチック相（高分子の末端を揃えた相）へ、そしてさらにはカラムナー相（高分子の軸に垂直な方位に二次元の位置の秩序を持つ相）へ転移し、自発的に構造発展する。棒状高分子のこの逐次相転移がさらにまた多くの構造を自発的に生み出すことになる。

その先駆けは理論によってなされた。最も代表的なものに、Frenkelらによる環状円柱モデルについてのシミュレーションがあり、等圧モンテカルロ法によりシミュレートされた相図はスメクチック相だけではなく、カラムナー相が現れることも予言している。このように、理論においては、単に斥力のみでスメクチック相やカラムナー相が出現することを強く示唆するものとなった。これらの理論的検討とほぼ時を同じくして、逐次液晶相転移に関する実験結果が相次いで報告されてきた。我々は、poly(γ -phenylpropyl L-glutamate) を棒状高分子素材に用い、広い濃度範囲で相図を作製し、コレステリック相からカラムナー相への相転移が比較的低濃度（30%~50%）でおこることを、確認し、また長鎖アルキル基を側鎖に有するポリペプチドのサーモトロピ

ック液晶系では、カラムナー相がコレステリック相よりも高温側に現れ、相系列が逆転しているという不可思議さはあるが、カラムナー相が明らかに液晶であることを示す結果を得た。

さらに理論と符合する典型的な系を見つけた。光学活性メチルブチル鎖とデシル鎖の二種の側鎖を有するポリシランである。二種のアルキル鎖の導入は、骨格のSi-回りの最低エネルギー状態を、トランス位置から左右に $\pm 15^\circ$ ずれた位置に変え、また光学活性基の導入はその二つのうちのいずれか一方を安定にさせる。このようにして、らせん形態が生まれる。実際、最安定エネルギーを持つ高分子のらせん形態は、7ユニットで3回転し、1ユニットの軸方位への進みが 1.96 \AA のヘリックスであり、これはまったく実測されたものと一致している。興味深いのは、その持続長が数千 \AA もあり、ポリペプチドの剛直性とあまり大差がないことである。おそらく個々のユニットの右ねじれと左ねじれのエネルギー差は小さくとも、高分子全体にわたったエネルギー差は大きくなるために安定化したのであろう。

さらにこの高分子は、含まれている元素が単純でSi、C、Hのみであり、無極性高分子である。そのメリットの一つとして、溶液中で強い分子会合がなく、沈殿分別法という単純な分別手法で簡単に分子量分別ができる。以降にも述べるが、我々はこの手法で、分子量10,000から50,000で、分子量分布 (M_w/M_n) が1.02–1.30のポリシランを自由に調製している。加えてもう一つのメリットは、液晶場では非常に弱いファンデアワールス力しか働かないため、分子間力として斥力相互作用（排除体積効果）が支配的になるということである。したがって、排除体積効果を基盤にして逐次転移を取り扱ってきた上記理論と対照させる上で、非常に好都合なモデルとなる。そして最後の特徴として、上記ポリシランは長鎖アルキル側鎖を持っており、サーモトロピック液晶を形成する。棒状高分子の液晶の逐次転移を明らかにするには、最適の試料である。ポリシランの温度を上げると、分子量に依存した温度域で流動性のある、また複屈折性を維持した液体に変わる。たとえば、分子量10,000程度の試料では、その温度は $60 \sim 70^\circ\text{C}$ ぐらいである。そして相挙動は分子量分布に依存するが、一般的にはこの流動相はコレステリック液晶である。らせんピッチの温度依存性は高く、また分子量に強く依存する傾向が見られる。

理論によれば、間違いなくスメクチック相が存在するはずであり、スメクチック相を生じるには分子量分布を狭くする必要がある。こんな予想を实践すべく、分子量分布を狭くすると、確かにコレステリック液晶は消え、あるいは高温域へシフトし、別の明確な液晶相が現れる。ファン組織、またそれをずり配向させたときに現れる配向フォーカルコニック組織は低分子と同様に美しく、紛れもなくスメクチック相である。ずり配向方向に対してフォーカルコニック組織が垂直に並ぶのも層構造を強く示唆し

た。もっとも決定的なのが、層反射の観測であり、小角X線法により明確に捉えることができ、また各種分子量の異なる試料で求めた層周期は、分子長と一致する。これがスメクチックA液晶である。もちろん、層構造の安定性は分子量分布と密接に相関し、ある臨界値（1.1-1.2）より狭い分子量分布を持つ試料がスメクチック相を形成する。また、その臨界値は分子量が大きくなるほど高くなる。さらにこの臨界値近傍の値を持つ試料では、温度変化により、一つの試料でスメクチック、コレステリック相の逐次転移が起こることも認められる。最低温相のカラムナー相を含めれば、Frenkelのシミュレーションの示す通りであり、棒が排除体積効果のみで逐次転移を起こすこと、また高分子がその末端をきちんと並べてオーダリングすることを実験的に明確に示した最初の例ということになる。

3.9.3 極性液晶の発見

最後に、“ヘリックス棒状高分子は極性軸を持つ”という特徴に触れておかなければならない。例えば、ポリペプチドの α -ヘリックスでは、繰り返し単位あたりの双極子モーメントは3~4デバイであり、これがヘリックス軸方位に重合度分だけ加算される。この巨大な極性に関わる棒状高分子液晶が近年議論され始めだした。今までの議論が、主に異方的な棒の形に基づく斥力相互作用によるものであるとすれば、ここでは、非常に大きな双極子-双極子相互作用が基盤となっている。結論から言えば、高分子の双極子モーメントがある臨界値を超えれば、双極子が自発的に同じ方向を向いた強誘電ネマチック液晶を形成するということである。例えば、コレステリックらせん構造を残すポリペプチドフィルムに関して二次的非線形光学効果（SHG）を観測すると、SH光の強度はピッチが532nm（入射光の半波長）の時、著しく増大する（図9.3）。

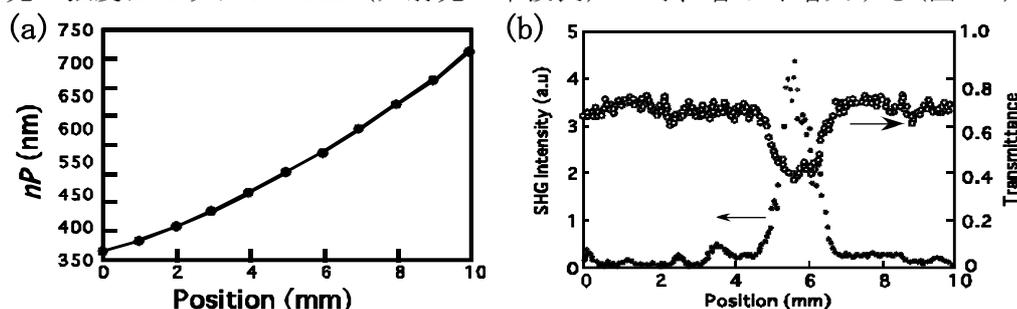


図 9.3 (a)固体中に残るコレステリック液晶のらせん構造のピッチの場所依存性。(b)にはその場所から生じるSH強度をプロットしてある。

この効果はヘリコイダルキャビティ効果によるもので、コレステリック液晶が図9.4に示すようなタイプの極性を持った液晶であることを示す。ポーリング(電場印加)を必要としない極性構造の自発的な発生は、今後機能構造材料の創成に向けて、興味ある展開を引き起こすものと考えられる。

ポリシランの棒状高分子がネマチック液晶、スメチック液晶、カラムナ-液晶へと逐次相転移し、自発的に構造形成することを明らかにすることにより、生物が段階的に組織構造創成をしていることを、モデル化合物ポリペプチドを使用し、液晶の構造創成において、繊細な色彩を得られることを明らかにした。さらに、高分子液晶材用を利用し、生物が創成する構造色よりも美しく、かつ実効的なサイズを作り上げた。

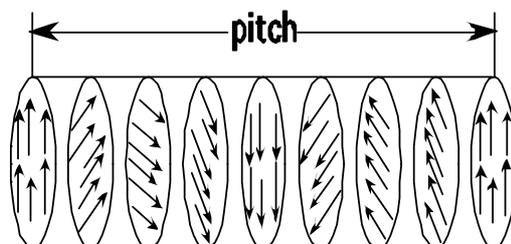


図 9.4 極性コレステリック液晶の模式図

3.10 高分子量タンパク質の常温合成（バイオリキッドグループ）

生体材料としてのタンパク質の重要性は大いに認識されている。タンパク質がアミノ酸の縮合体であることは、1902年のドイツのE. Fisherの報告に初めて見られるといわれる¹⁾。タンパク質またはそのモデルを材料として用いる場合には、できる限り、容易にかつ大量に製造する技術が必要となる。現在、タンパク質の合成法にはアミノ酸の縮合に加えて、Merrifieldの固相合成法、生物工学的手法、アミノ酸無水物（アミノ酸NCA）法等がある。アミノ酸NCA法が、高分子量のタンパク質またはそのモデルの大量生産に適しているが、構造の規制が困難な問題がある。アミノ酸NCAの重合は1930年代後半から多くの研究者によって研究されてきた。

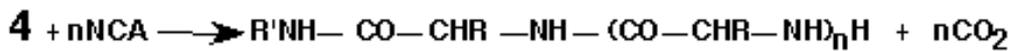
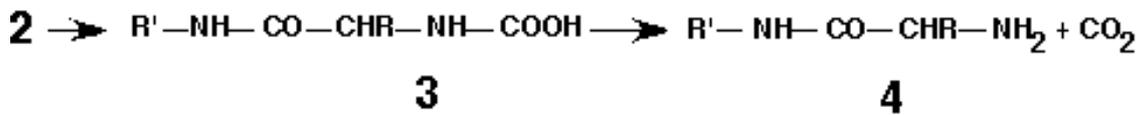
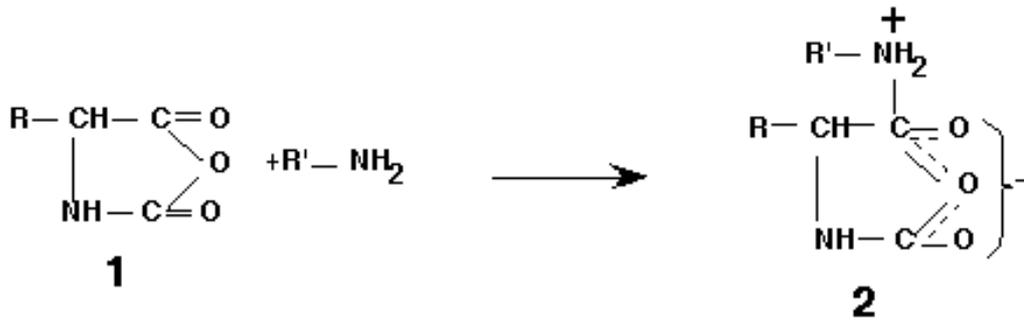
最近、アミノ酸NCAの合成法と精製法を追及した結果、高純度のアミノ酸NCAを製造することが可能となった。その結果、固相の方がこれまで行われてきた溶液反応よりも圧倒的に重合活性が高いことがわかった。高純度のアミノ酸NCAは、溶液重合の仕込み以前に、自然重合を起こしやすく、その結果、溶液重合が活性になると判断した。本研究は省エネルギー合成法であるアミノ酸NCAの重合法についてより厳密な検討を行った。

1) E. Fisher, Chem. Z., 26, 940 (1902)

3.10.1 γ -ベンジル-L-グルタメートNCA (BLGNCA) の反応性と重合速度

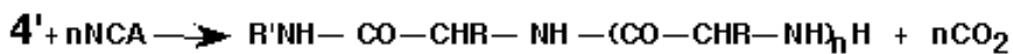
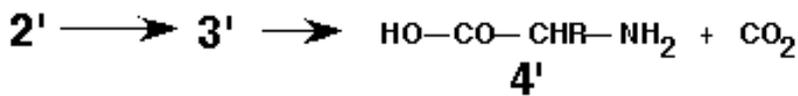
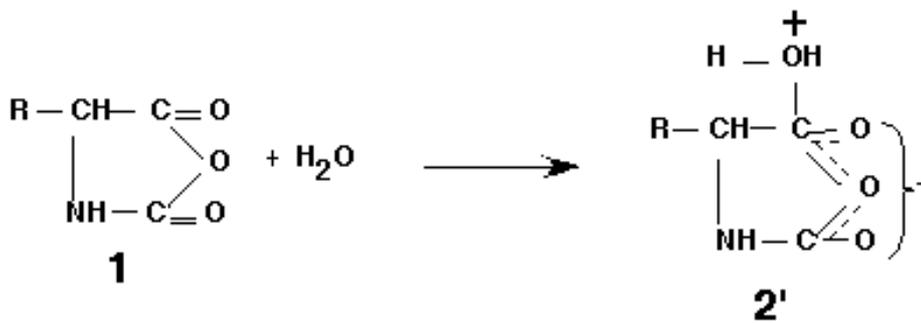
アミノ酸NCAの重合機構は、図10.1のように考えられている。このような逐次開環反応が固相で起こるとしても、ほとんど関心もたれなかった。これまで、BLGNCAの重合はアミンを開始剤として、ジオキサンを溶媒とした溶液重合が行われており、現在も主流である¹⁻¹⁾。しかし、本研究では、BLGNCAの結晶の純度をあげるべく合成法を工夫し、精製法を工夫した結果、高純度の結晶が得られるようになった。但し、文献によると、「塩素含量はMohr法による0.05w/w%以下が望ましい」¹⁻²⁾とか、「電導度滴定で0.01w/w%のNCAを用いることが望ましい」¹⁻³⁾とされているが、それは、滴定法や分光法で測定したためであり、イオンクロマトグラフィーで測定したところ、アミノ酸NCAの塩素含量を、0.02w/w%以下の程度にすることは、不可能であった。実際、現段階では、塩素含量0.02w/w%程度が達成しうる限界であった。

(1) Polymerization mechanism of amino acid NCAs by a primary amine



5 (polypeptides)

(2) Polymerization mechanism of amino acid NCAs by water



5 (polypeptides)

図 10.1 アミノ酸 NCA の重合機構

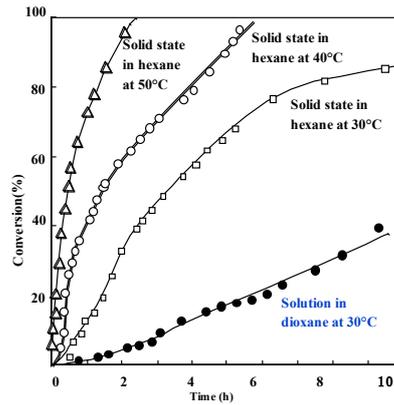


図 10.2 BLG NCA の固相及び溶液重合
 BLG NCA の塩素含量=ap.0.021%.
 $[NCA]/[Butylamine]=200$.

このことは、更に追及せねばならない。そこで、同じ条件で製造したBLGNCAを用いて、固相重合と溶液重合を行った。図10.2はNCAの塩素含量約0.02%、図10.3はNCAの塩素含量約0.16%の場合である。この結果から次の二つのことが言える。1) 同温度下では、固相の方が溶液反応よりも圧倒的に速い。これは、これまで常識を覆す結果である。固相反応は特に塩素含量の影響を受け、塩素含量が少ないと、反応性は極めて高くなる。なお、不純物の多いアミノ酸NCAは重合しにくく、溶液にしても暫くは重合しないため、予め起こる重合の影響を受けないが、本来の反応性を見ることができない。

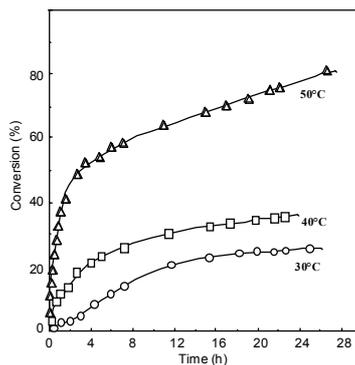


図 10.3 BLG NCA のヘキサン中の固相重合
 BLG NCA の塩素含量=ap.0.18%. $[NCA]/[Butylamine]=200$

これらの結果は、これまでの報告の常識を覆すものであった。その理由は、本実験では、最終的精製と重合の仕込みにおける水分の混入に細心の注意をしたからである。つまり、これまでのアミノ酸NCAの重合の報告には、水分の効果が大きかったと推測される。また、塩素含量の低下を追求することによって、より速い反応速度が期待でき、その結果、高分子量のポリペプチドが合成されたと考えられる。ただし、これまでの単純な再結晶化では、高純度のアミノ酸NCAを得ることは困難であり、さらに、結晶化そのものの研究が必要である。なお、結晶状態における重合の方が、溶液よりも有利なのは、分子間距離が近いこと、反応すべきNCAの5員環が、同一の層内にあるためと考えた。BLGNCAの結晶構造については、以前にX線構造解析を行った、その構造は図10.4に示す。

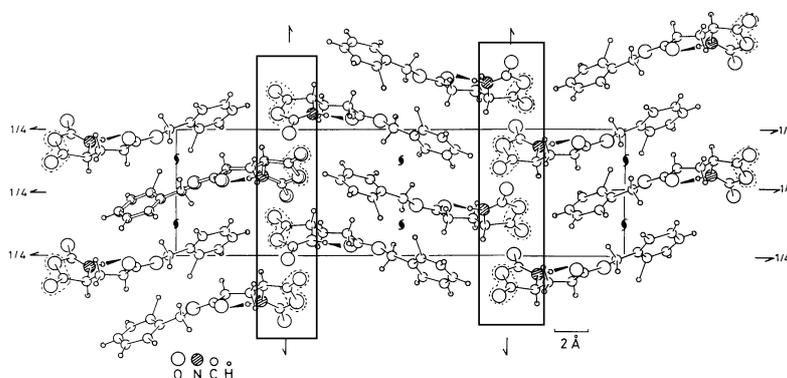


図 10.4 BLG NCA の c 軸からみた結晶構造図

- I-1) 日本化学会編, 大屋, 片貝担当, “新実験化学講座 19”, 171(1978)
 I-2) M. Idelson and E.R. Blout, J. Am. Chem.Soc., 79 p.3948(1957)
 I-3)) 日本化学会編, “新実験化学講座 19”, 248(1978)

3.10.2 生成ポリマーの分子量およびその分布

3ヶ月間、 -20°C で自然重合して得られたタンパク質モデルの分子量が177,000(Mw)で、分子量分布が狭いことがわかった ($M_w/M_n=1.38$)。この反応を追及し、さらに、高分子量、単分散に近いPBLGを追及できそうである。そのためには、水分混入に細心の注意が必要である。図10.5の、このポリマーのGPCチャートを示す。分布に小さいピークがあるのは、低温で遅く重合が進んだためと考えられる。

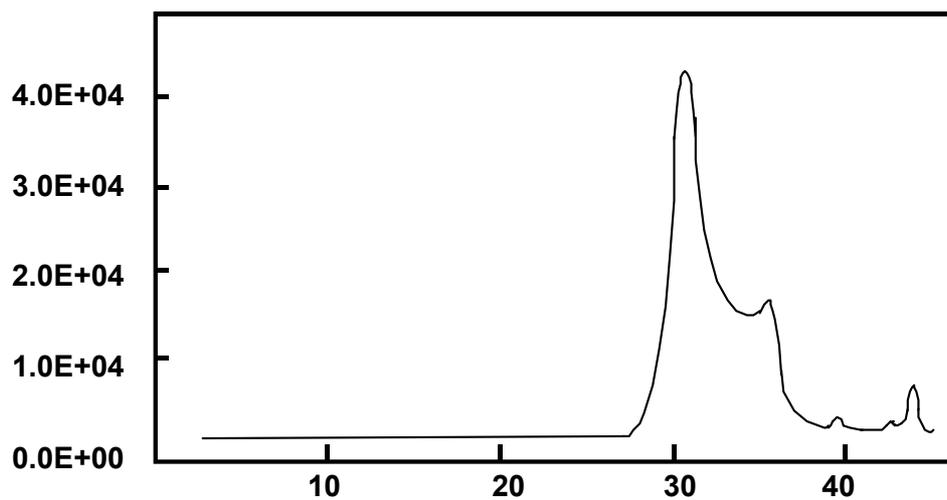


図 10.5 -20°C で3ヶ月間重合して得られた PBLG の GPC
 $M_w=177,000$ and $M_w/M_n=1.38$.

3.10.3 重合したBLGNCAの走査型電子顕微鏡観察

1個のBLG NCA結晶が空気中の水分で固相重合してできたポリマーの走査型電子顕微鏡写真（図10.6）には、重合による変化、二酸化炭素の抜けた跡が見られる。

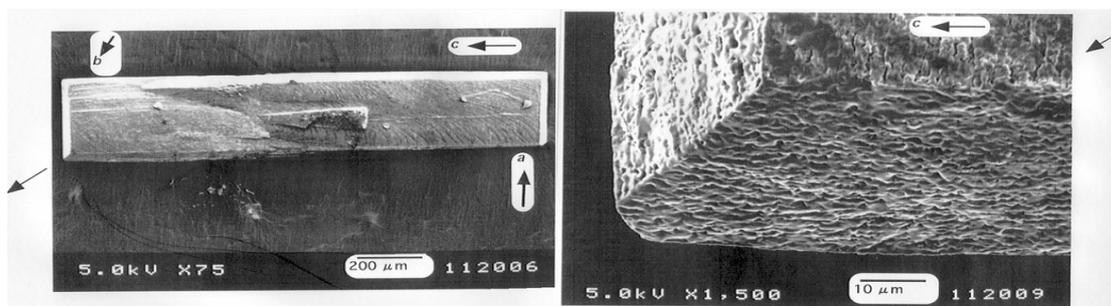


図 10.6 重合した BLGNCA の SEM 像

3.10.4 BLGの重合における重合仕込み時のモル比[NCA]/[amine]と生成ポリマーの重合度の関係

一定のサイズ分布を持つ結晶を用いて、100%重合後、生成ポリマーの分子量を粘度法により測定し、重合度に換算した。結果を表10.1に示す。元来、NCAの溶液重合にお

ける重合物の重合度は、仕込みのモル比[NCA]/[amine]に一致すると考えられるが、本固相重合では、その値に関係なく、一様に高いことがわかった。これと同様の検討を以前に行ったが、その場合は、空気中の水分を取り込むような条件下で実験を行ったため、今回のデータより低い。この結果は、重合の開始が、結晶の表面に限られることを示唆している。従って、結晶のサイズを大きく、かつ均一にそろえることにより、より大きな分子量で、分子量分布のそろったポリマーの出来ることは十分に期待できる。

表 10.1 固相重合で得られた 100%重合率での PBLG の平均重合度と仕込み時の [NCA]/[Butylamine] の関係

[NCA]/[I]	50	200	2000
\overline{DP}_n	300	400	450

3. 10. 5 β -ベンジル-L-アスパルテートNCA (BLA NCA) の反応性

BLA NCAについても、最終的な結晶化と、反応の仕込中に吸着する水分に注意して、BLGNCAと同様に反応性を検討した。但し、この場合は室内のドライボックス中で行ったので、BLGNCAのように低温で処理すれば、さらに真の反応性が見られるであろう。図10.7に、30°Cにおける固相、ジオキサン溶液、アセトニトリル溶液における重合結果を示す。

通常行われるジオキサン溶液での重合速度が、最も小さいことは注目すべきことである。すなわち、水分の混入に注意すれば、この場合も、溶液より固相重合の方がはるかに活性が高いことが解った。これは、結晶が反応に有利な条件を有することを示

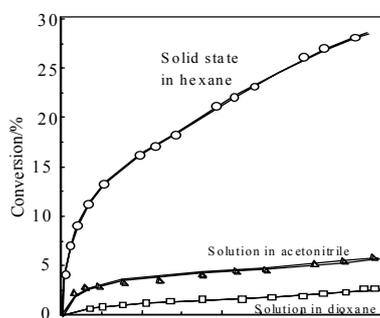


図 10.7 BLA NCA の 30°C での重合

す。なおアセトニトリル溶液では、生成ポリマーは沈殿して白濁する。この溶液における一連の重合研究があるが、今回においては、重合率100%に達することはなかった。重合物の成長末端が埋もれてしまい、重合の進行が止まると考えるのが自然であろう。

重合率100%に達する結果が得られたのは、水の混入によると考えざるを得ない。以前の実験でも、BLGNCAはアセトニトリル中で活性であったが、間違いであったと考える^{V-1)}。なお、図10.7の場合、NCAの塩素含量は、あまり純度が高いとは言えない程度である(0.1%程度)。

V-1) H. Kanazawa, Polymer, 33, 2557 (1992)

3.10.6 結晶構造解析

BLANCAの結晶は剥片状になりやすく、また、重合も起こりやすいため、結晶が割れやすくなり、そのX線構造解析では、反射数を多く取ることが困難であった。約40回にわたる測定の結果、結晶構造解析が達成された^{VI-1)}。図10.8には、分子と番号付けを示し、図10.9には、結晶構造と結晶学データを示す。この場合も反応すべき五員環は一つの層内に収まり、その層が、側鎖の層と交互に並んでいる。この層は、図10.9では直方体のボックスで示した。このような構造を、サンドイッチ構造と呼び、反応に有利な構造と考えた。なお、BLANCA結晶の立体図を図10.10に示す。重合したBLGNCAの走査型電子顕微鏡写真を図10.11に示す。BLGNCAに類似の変化を示している。

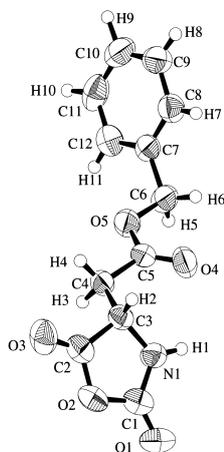


図 10.8 BLANCA 分子模式図

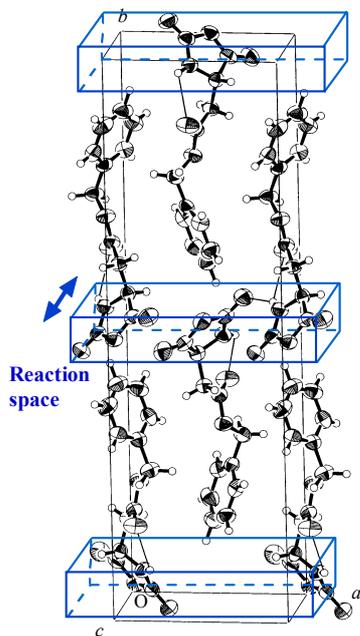


図 10.9 BLANCA の結晶構造; $P2_12_12_1$ 、 $a=7.995(3) \text{ \AA}$ 、 $b=26.611(5) \text{ \AA}$ 、 $c=5.4348(7) \text{ \AA}$ 、 $V=1156.3(5) \text{ \AA}^3$ 、 $Z=4$ 、分子間水素結合 : $N1-H1 \dots O1$ ($-1/2-x$ 、 $-1-y$ 、 $-1/2+z$)、 $N1 \dots O1 = 2.922(4) \text{ \AA}$ 、 $H1 \dots O1 = 2.11(4) \text{ \AA}$ 、角度 $N1-H1 \dots O1 = 155(3)^\circ$; 分子内水素結

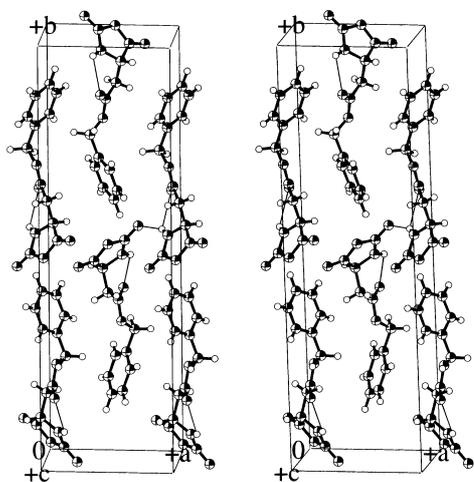


図 10.10 BLANCA 結晶の立体透視図

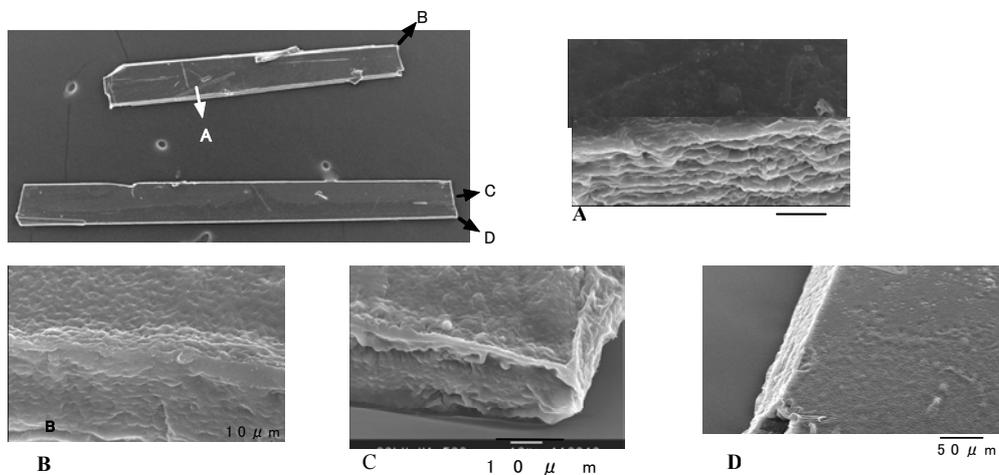


図 10.11 重合した BLANCA の SEM 像

VI-1) H. Kanazawa, *Polymer*, 33, 2557 (1992)

3. 10. 7 その他のアミノ酸NCAの反応性

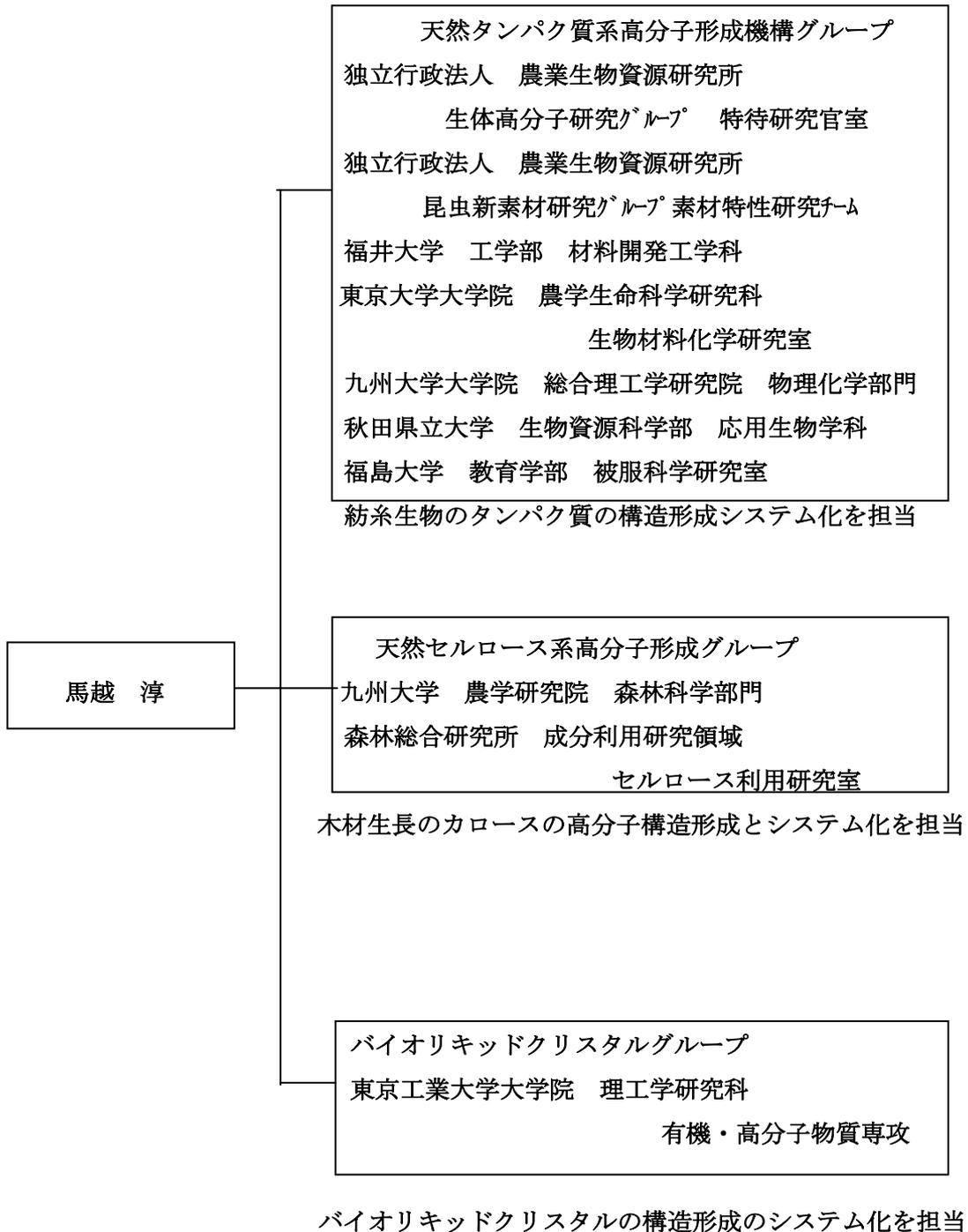
L-アラニンNCA、L-ロイシンNCAについて、アセトニトリル溶液とヘキサン中の固相重合について、湿気を避け、低温下で仕込んだうえで、重合速度を測定した。その結果、両方のNCAとも、固相の方が、圧倒的にアセトニトリル中の重合よりも速いことがわかった。Iwakuraらのアセトニトリル中のL-アラニンNCAの重合の研究報告があるが、^{VII-1)} それは水の影響を受けていたものと考えざるを得ない。例えば、30℃において4時間で50%の重合率を経て、100%に達すると言われるが、同条件の実験を、厳密に行うと40%程度以上には上がらない。また、著者自身の結果も、固相重合の不活性は水の影響による誤解であったと考える^{VII-2)}。

VII-1) Y. Iwakura, K. Uno and M. Oya, *J. Polym. Sci.*, A-1, 6, 2165 (1968)

VII-2) H. Kanazawa and T. Kawai, *J. Polym. Sci.*, Polym. Chem. Ed., 18, 629(1980)

4. 研究の実施体制

(1) 体制



5. 研究参加メンバー

研究グループ名： 天然タンパク質系高分子形成機構グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
馬越 淳	農業生物資源研究所 (観音台)	室長	紡糸生物のタンパク質の構造形成	平成10年10月～平成15年11月
前田 美紀	同上	主任研究員	紡糸生物のタンパク質の構造形成	平成10年10月～平成15年3月
富山 雅光	同上	主任研究員	タンパク質の形成解明	平成10年10月～平成14年3月
石丸 健	同上	研究員	タンパク質の構造解析	平成10年10月～平成15年11月
田中 稔久	同上	JST 研究員	絹タンパク質の物理化学分析	平成11年4月～平成15年6月
井上 俊一	同上	JST 研究員	絹タンパク質の構造形成	平成11年8月～平成15年8月
小林 将俊	同上	JST 研究員	絹タンパク質のゲルと NMR 解析	平成12年4月～平成14年4月
山田 豊	同上	研究補助員		平成11年4月～平成12年3月
藤島 朋美	同上	研究補助員		平成11年4月～平成12年3月
平野 藍子	同上	研究補助員		平成11年4月～平成12年3月
庄司 恵子	同上	研究補助員		平成11年4月～平成12年12月
賀 夏梅	同上	研究補助員		平成13年1月～平成15年10月
小河原 友子	同上	研究補助員		平成12年1月～平成15年8月
笠原 美江	同上	研究補助員		平成11年4月～平成13年10月
大倉 泰子	同上	研究補助員		平成12年4月～平成14年8月
浅野 博子	同上	研究補助員		平成12年10月～平成14年8月
小林智香子	同上	研究補助員		平成12年10月～平成14年8月
市川亜都子	同上	研究補助員		平成11年1月～平成15年11月
野上 美恵子	同上	研究補助員		平成13年10月～平成14年9月
鈴木 くみ子	同上	研究補助員		平成13年11月～平成15年11月
馬越 芳子	農業生物資源研究所 (大わし)	研究員	絹の紡糸・形成機構の光学的解明	平成10年10月～平成15年11月

津田 英利	同 上	JST 研究員	絹糸腺内容物の分画・精製	平成10年10月～ 平成15年11月
秦 珠子	同 上	主任研究員	絹の紡糸・形成機構の解明	平成12年4月～ 平成14年12月
丸山 泰子	同 上	研究補助員		平成11年4月～ 平成15年3月
Mary A. Becker	福井大学	講師	絹タンパク質のアミノ酸組成 の解明	平成10年10月～ 平成15年11月
空閑 重則	東京大学大学院	教授	β シリンに包接された分子の 反応性	平成10年10月～ 平成15年11月
和田 昌久	同 上	助手	β シリンの低分子包接挙動	平成10年10月～ 平成15年11月
西山 義春	同 上	助手	珪藻 β シリンの調整	平成13年10月～ 平成15年11月
斉藤 幸恵	同 上	助手	同錯体の電子顕微鏡観察、 電子線回路	平成10年10月～ 平成14年3月
高木 さつき	同 上	研究補助員		平成13年4月～ 平成13年9月
根本 紀夫	九州大学大学院	教授	希薄溶液の物性	平成10年10月～ 平成15年11月
ホセン・カンタ ^o カール サダト	同 上	JST 研究員	希薄溶液の物性	平成11年7月～ 平成15年3月
張 函	秋田県立大学	助手	繭繊維の構造と金属イオン の解明	平成12年10月～ 平成15年11月
金澤 等	福島大学	教授	紡糸生物のタンパク質の 構造構造形成の解明	平成12年10月～ 平成15年11月

研究グループ名： 天然セルロース系高分子形成グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
近藤 哲男	九州大学大学院	助教授	セルロースの高次構造形成	平成10年10月～ 平成15年11月
戸川 英二	森林総合研究所	主任研究官	人工系セルロースの結晶化	平成10年10月～ 平成15年11月
菱川優香子	同 上	主任研究官	セルロース系物質の分光分析	平成10年10月～ 平成15年11月
片岡 厚	同 上	主任研究官	細胞壁セルロースの結晶化	平成10年10月～ 平成12年3月
野尻 昌信	同 上	主任研究官	セルロースと酵素の相互作用	平成10年10月～ 平成12年3月
林 徳子	同 上	主任研究官	電子顕微鏡解析	平成10年10月～ 平成12年3月
安部 久	同 上	研究員	細胞培養ならびにプロトプラ ストからの繊維物質生産	平成10年10月～ 平成15年3月
笠井 稚子	同 上	研究補助員		平成10年10月～ 平成13年3月
岩村 深幸	同 上	研究補助員		平成11年1月～ 平成14年6月

研究グループ名： バイオリキッドクリスタルグループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
渡辺 順次	東京工業大学 大学院	教授	高分子液晶の構造・物性	平成10年10月～ 平成15年11月
川内 進	同 上	助手	生体高分子のコンフォメーション解析	平成10年10月～ 平成15年3月
田中 康之	同 上	博士課程学生	タパク質の自己凝集構造の解析	平成10年10月～ 平成11年3月
坂尻 浩一	同 上	博士課程学生	タパク質の自己凝集構造の解析	平成12年4月～ 平成13年3月
大越 研人	同 上	博士課程学生	液晶の合成、構造の解明	平成11年4月～ 平成14年3月
武藤 国昭	同 上	修士課程学生	タパク質の自己凝集構造の解析	平成11年4月～ 平成12年3月
佐野奈緒子	同 上	修士課程学生	タパク質の自己凝集構造の解析	平成13年4月～ 平成14年3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
1999年 4月20日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	15	研究方針についての 研究 打ち合わせ
1999年 10月12日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	16	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2000年 4月20日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	15	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2000年 7月6日	天然蛋白質系高分子形成 機構グループ研究打ち 合わせ	農業生物資源研究所 (つくば市)	11	天然蛋白質系高分子 形成機構グループの研究 報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2000年 10月4日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	18	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2001年 3月14日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	14	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2001年 6月27日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	13	領域シンポジウムにつ いて打ち合わせ
2001年 8月23日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	11	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2002年 3月8日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	19	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2002年 8月21日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	12	領域シンポジウムの 発表について打ち合 わせ
2003年 3月12, 13日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	12	研究報告と研究方針に ついて打ち合わせ
2003年 8月21日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	8	領域シンポジウム発表 について打ち合わせ
2003年 11月28日	研究チーム打ち合わせ 会議	農業生物資源研究所 (つくば市)	11 (予定)	終了報告会について の打ち合わせ会議

(2) 招聘した研究者等
なし

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表

ホシノ・カンダ^{カール} サダト、Dynamic and Static Light Scattering of Dilute Aqueous Solutions of Silk Fibroin Collected from *Bombyx mori* Silkworms, Langmuir (Vol. 15, No. 12, 1999)

ホシノ・カンダ^{カール} サダト、Rheological Study on Aqueous Solutions of Silk Fibroin Extracted from the Middle Division of *Bombyx mori* Silkworm、NIHON REOROJIGAKKAISHI (Vol. 27, No. 2, 1999)

馬越 淳、Crystallization of silk fibroin from solution、Thermochimica Acta, (352-353, 165-169, 1999)

馬越 淳、カイコの紡糸、バイオミメティックスハンドブック(1016-1021, 2000)

馬越 淳、生物から学ぶ生体高分子の構造形成、繊維学会誌(No. 19, 2000)

馬越 淳、植物体のガラス転移と植物の保存、食品とガラス化・結晶化技術(49-54, 2000)

井上 俊一、Atomic Force Microscopy: Bombyx mori Silk fibroin molecules and their higher order structure, Journal of Polymer Science part B: Polymer Physics、(1436-1439, 2000)

ホシノ・カンダ^{カール} サダト、Rheological Study on Aqueous Solutions of Silk Fibroin、レオロジー学会誌(Vol. 27, No. 2, 2001)

渡辺 順次、Distinct Formation of a Chiral Smectic Phase in Achiral Banana-Shaped Molecules with a Central Core Based on a 2,7-Dihydroxynaphthalene Unit、American Chemical Society、(No. 122, 2000)

渡辺 順次、Conformational Analysis by IR and Birefringence Measurements for Poly(β -Phenylpropyl L-aspartate) Exhibiting a Helical Sense Inversion in the Solid State、Polymer Journal、(Vol. 32, No. 9, 2000)

渡辺 順次、生物と液晶、液晶(第5巻, 第1号, 2001)

渡辺 順次、Study on Helical Structure of the B4Phase Formed A chiral Banana-Shaped Molecule、(No. 122, 2000)

渡辺 順次、Columnar Hxagonal Phse Observed in Lyotropic Solutions of Poly(γ -octadecyl-L-glutamate)Dessolved in Amphiphilic Solvents, Such as Octadecylamine, Octadecyl Alcohol, and Octadecanoic Acid、Macromolecular Chemistry and Physics、(202, No. 5, 2001)

馬越 淳、コーン種子タンパク質生分解性プラスチック高分子、環境融合高分子・ウッドヘッド出版社(247-257, 2001)

馬越 淳、BIOSPINING(FIBER FORMATION OF SILK)、国際羊毛学会誌(SF-P3, 1-7, 2001)

馬越 淳、CRYSTALLIZATION OF SILK FIBROIN)、国際羊毛学会誌(SF-P 4, 1-6, 2001)

馬越 淳、植物体の熱測定、熱測定学会誌(Vol. 29, No. 2, 2001)

田中 稔久、柞蚕フィブロインの球晶—構造、熱的性質、成長速度(SPHERULITES OF TUSSAH

- SILK FIBROIN)、Journal of Thermal Analysis and Calorimetry、(Vol.64, 2001)
- 小林 将俊、金属イオンによる絹フィブロインのゲル-ゾル転移の制御(Control of Gel-Sol Transition of Silk Fibroin by Metal Ions)、Transactions of the Materials Research Society of Japan(Vol.26, No.2, 2001)
- 渡辺 順次、Distinct Complex Precipitating from Racemic Solution of Poly (β -benzyl L-aspartate) and Poly (β -benzyl D-aspartate)、Macromolecules (Vol.34, 2001)
- 渡辺 順次、Effect of chiral dopant on a helical Sm 1 phase of banana-shaped N-n-O-PIMB molecules、Journal of Materials Chemistry(No.11, 2001)
- 渡辺 順次、昆虫の輝きを演出するコレステリック液晶、O plus E(新技術コミュニケーションズ)、(Vol.23, No.3, 2001)
- 馬越 淳、Effect of processing temperature on the morphology of silkmembranes、Polymer(Vol.43, 2002)
- 馬越 淳、Smectic Liquid Crystal Observed in Thermotropic System of Rigid-Rod(γ -Otdadecyl L-glutamate)、Jpn J. Appl. Phys、(Vol.41, 2003)
- 馬越 淳、THERMAL PROPERTIES OF SEED PROTEINS、J. Therm. Anal. Cal、(Vol.70, 2002)
- 馬越 淳、植物体の熱測定 Thermal Analysis of Plant、Netsu Sokutei、(Vol.29 No.2, 2002)
- 田中 稔久、Thermal Properties of *Bombyx Mori* and Several Wild Silkworm Silks Phase Transition of liquid silk、J. Therm. Anal. Cal、(Vol.70, 2002)
- 田中 稔久、Biospinning:Change of Water Contents in Drawn Silk、J. Poly. Science Part B: Polymer Vol.41 Issue 3, 2002)
- 空閑 重則、Influence of Reagent Addition on Carbodiimide-Mediated Amidation for Poly (Ethylene Glycol) Grafting、J. Appl. Poly. Science、(Vol.85, 2002)
- 空閑 重則、Mechanical Properties of Silk Fibroin-Microcrystalline Cellulose Composite Films、J. Appl. Poly. Science、(Vol.86, 2002)
- 渡辺 順次、Computation Analysis of Side Chain Conformations in Polyaspartates Solids Exhibiting Reversible Helical Sense Journal of Molecular Structures (Vol.610, 2002)
- 渡辺 順次、Enhancement of Twisting Power of Chiral Nematic Phase by an Introduction of Achiral banana-Shaped Molecules Journal of American Chemical Society (Vol.124, 2002)
- 渡辺 順次、液晶が演出する昆虫の美ー自然界のらせん構造ー、現代化学、(378, 2002)
- 渡辺 順次、AFM study of two-dimensional epitaxial arrays of poly(L-glutamate) with long n-alkyl side chains on Graphite、Macromolecules、(2002)
- 渡辺 順次、バナナ型液晶分子ー形が誘起する強誘電性とキラリティー Journal of the Society of Rheology, Japan (Vol.30, No.5, 2002)

ホヰン・カヅダカール サヅト、 Rheological Behaviors of Aqueous Solution of Silk Fibroin 絹フィブ
ロインの水溶液のレオロジー、 Journal of the Society of Rheology, Japan、 (Vol.30, No.5, 2002)

ホヰン・カヅダカール サヅト、 Rheology and Dynamic Light Scattering of Silk Fibroin Solution
Extracted from the Middle Division of *Bombyx mori* Silkworm、 Biomacromolecules、
(Vol. 3, No. 6, 2002)

ホヰン・カヅダカール サヅト、 Dynamic Light Scattering of Native Silk Fibroin Solution Extracted
from Different Parts of the Middle Division of the Silk Gland of *Bombyx mori* Silk
worm、 Biomacromolecules、 (2002)

ホヰン・カヅダカール サヅト、 Dilute Solution Properties of Regenerated Silk Fibroin、 Journal
of Physical Chemistry B (2003)

張 函、 Microstructure of Cocoon Fiber、 熱測定学会誌 (Vol. 3, No. 2, 2002)

馬越 淳、天然高分子の性質、第6版化学便覧 応用化学編(2002)

馬越 淳、植物体の熱測定、熱測定学会誌 (Vol. 29, No. 2, 2002)

馬越 芳子、料絹の構造と組成について、日本美術の保存修復と装演技術その式(2002)

馬越 芳子、 Similarities in the Physical and Chemical Properties of Silk from Various
Strains of *Bombyx mori* Silkworms、 ICWES JAPAN (2002)

Mary A. Becker、 Light Stable Isotopes of Silk 、 ICWES JAPAN(2002)

張 函、熱処理による繭繊維の微細構造の変化、熱測定学会誌 (Vol. 30, No. 2, 2003)

田中 稔久、 Uptake of Atmospheric Carbon Dioxide into Silk Fiber by Silkworms、
Biomacromolecules (Vol. 4 2003)

田中 稔久、カイコの液状絹の熱分析—家蚕、セリシン蚕および野蚕の液状絹について—、
熱測定学会誌 (Vol. 30, No. 3, 2003)

田中 稔久、 Effect of methanol treatment on drawing of liquid silk fibroin in
domestic silkworm, *Bombyx mori* 、 Biomacromolecules (投稿中)

井上 俊一、 Textile-Fabric-Like Nanostructure Formation of Silk Protein by Self
Assembling、 Transactions of the Materials Research Society of Japan (Vol. 28, No. 3,
2003)

井上 俊一、 Synchrotron X-ray diffraction of single silk fiber spun by younger instar
silkworm larvae、 Photon Factory Activity Report (Vol. 20, part B, 2003)

井上 俊一、 Nanostructure of Natural Fibrous Protein: In Vitro Nanofabric Formation
of *Samia cynthia ricini* Wild Silk Fibroin by Self-Assembling、 Nano Letters (Vol. 3,
No. 10, 2003)

渡辺 順次、コレステリック液晶が創る美しい昆虫の翅の色、繊維と工業(2月号, 2003)

渡辺 順次、 AFM Study of Two-Dimensional Epitaxial Arrays of Poly(g-L-glutamates)
with Long n-Alkyl Side chains on Graphite、 Macromolecules (March, 2003)

渡辺 順次、 Polarization-Modulated Smectic Liquid Crystal Phase、 Science (29 Aug.
2003)

渡辺 順次、Structure and dynamics of rodlike polyester with long n-alkyl side chains over a wide range of temperatures by solid state ^{13}C NMR、J. Mol. Struct (accepted 3 Feb. 2003)

渡辺 順次、The Christiansen effect of brightly colored colloidal dispersion with an amphiphilic polymer、Journal of Colloid and Interface Science (accepted 22 Mar. 2003)

根本 紀夫、Dilute-Solution Properties of Regenerated Silk fibroin、The Journal of Physical Chemistry B(Vol.107, No.32, 2003)

金澤 等、N-Carboxy-L-aspartic anhydride benzyl ester、Acta crystallographica, Section C(29 Feb. 2003)

(2) 口頭発表

①招待、口頭講演 (国内25件、海外16件)

発表者 (所属)、タイトル、学会名、場所、月日

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸、繊維学会、幕張 1999. 5. 10

馬越 淳、農業生物資源研究所、Biospinning of Silkworm, Bombyx mori、繊維学会、幕張 1999. 5. 12

馬越 淳、農業生物資源研究所、クモの糸の構造、日本接着学会、つくば、1999. 6. 2

馬越 淳、農業生物資源研究所、Biospinning、バイオロジー学会、ハンガリー、1999. 7. 21

馬越 淳、農業生物資源研究所、Biospinning-Fiber Formation of Silk、先端繊維材料国際学会、信州大学、上田、1999. 10. 5

馬越 淳、農業生物資源研究所、Biospinning -Low Energy Spinning、国際高分子学会、横浜、1999. 10. 28

馬越 淳、農業生物資源研究所、成長過程における植物体の熱測定、熱測定討論会、東京大学 1999. 11. 11

馬越 淳、農業生物資源研究所、Fiber Formation of Silk、国際繊維工業における生物工業シンポジウムポルトガル 2000. 5. 5

馬越 芳子、蚕糸昆虫農業技術研究所、天然染料染め絹織物の退色度の数値化、日本蚕糸学会信州大学 1999. 4. 26

馬越 芳子、蚕糸昆虫農業技術研究所、The UV Degradation of Silk、The Science of Silk 「絹の科学」アメリカ スミソニアン研究センター、2000. 3. 23

近藤 哲男、森林総合研究所、セルロースの新規な高次構造：“Quasi-tactic”、セルロース学会、北海道大学、1999. 6. 15

近藤 哲男、森林総合研究所、セルロースの新らたな高次構造 “Quasi-tactic” における分子鎖像、高分子学会、京都国際会議場、1999. 6. 27

近藤 哲男、森林総合研究所、Recent Advance of Cellulose Structures、第1回韓国セルロース学会、韓国江原国立大学林科大学校、1999. 10. 4

近藤 哲男、森林総合研究所、樹木細胞壁セルロースの結晶形成機構の動的解析、組織と材料研究会’99秋期シンポジウム、北海道大学百年記念館、1999. 11. 2

片岡 厚、森林総合研究所、植物細胞壁におけるセルロース高次構造の形成（1）、高分子学会、京都国際会議場、1999. 6. 27

田中 稔久、理化学研究所、カイコの液状絹の熱分析一家蚕、セリシン蚕および野蚕の液状絹について、第 52 回高分子討論会、山口大学 吉田キャンパス、2003.9.24

小林 将俊、農業生物資源研究所、絹フィブロインタンパク質のゲルゾル転移に関する研究、第 1 2 回高分子ゲル討論会、東京大学、2001. 1. 19

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、劣化絹織物の評価法、日本蚕糸学会、東京大学 2000. 4. 5

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、セリシン固定糸絹織物の視覚的評価、繊維学会、京都、2000. 6. 9

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、カイコの糸づくりのメカニズム、繊維学会、京都、2000. 6. 9

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、紫外線劣化各種絹織物、文化財保存修復学会、別府、2000. 6. 11

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、セリシン固定糸絹織物の視覚的評価、日本蚕糸学会
関東支部、群馬、2000. 11. 16

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、BIOSPINNING-FIBER FORMATION OF SILK、第 10 回国際羊毛学会、ドイツ 2000. 11. 26

笠井 稚子、森林総合研究所、位置選択的置換長鎖アルキルセルロースエステルからの単分子膜、セルロース学会第 7 回年次大会、東京大学、2000. 7. 13

渡辺 順次、東京工業大学、Polar Liquid Crystals Formed from Polar Rigid-Rod Polyester Based on Hydroxy Benzoic Acid and Hydroxy Naphthoic Acid、2000 年度環太平洋国際化学会議、ハワイ 2000. 12. 14

ホシノ・カンダ・カール サグト、九州大学大学院、絹フィブロインの水溶液のレオロジーに関する研究、第 13 回国際レオロジー集会、イギリス、H12. 8. 21

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸—絹の繊維形成 Biospinnig-Fiber Formation of Silk、PPI 国際高分子科学集会、ポルトガル、2002. 6. 18

馬越 淳、農業生物資源研究所、野蚕のフィブロイン結晶化、PPI 国際高分子科学集会、ポルトガル、2002. 6. 18

馬越 淳、農業生物資源研究所、家蚕糸の生物紡糸、第 4 回国際絹ワークショップ、フランス、2002. 6. 22

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸、第 19 回国際液晶学会、イギリス、2002. 7. 4

馬越 淳、農業生物資源研究所、カイコの紡糸のメカニズム第 50 回レオロジー討論会長岡 2002. 10. 10

馬越 淳、農業生物資源研究所、植物を中心として熱測定が生体系への応用、第 38 回熱測定討論会、金沢市、2002. 10. 26

馬越 淳、農業生物資源研究所、バイオスピニングーカイコの精密分子配列制御、繊維学会主催

繊維基礎講座、京都工芸繊維大学、2002. 11. 25

井上 俊一、農業生物資源研究所、酵素処理したフィブロインタンパク質分子の構造、第51回高分子学会年次大会、横浜、2003. 5. 30

馬越 芳子、農業生物資源研究所、熱分解生繊維複合絹織物の構造変化、蚕糸学会72回大会、九州大学、2002. 4. 3

馬越 芳子、農業生物資源研究所、生物紡糸 (Biospinning)、第4回国際絹ワークショップ、リヨン
フランス、2002. 6. 22

津田 英利、農業生物資源研究所、絹糸腺内フィブロインタンパク質の溶出様相、蚕糸学会72回大会、九州大学、2002. 4. 3

近藤 哲男、森林総合研究所、樹木プロトプラストからの巨大からの巨大カローズ繊維の生産、日本植物学会第66回大会、京都大学、2002. 9. 21

渡辺 順次、東京工業大学、Well-defined phase sequence including cholesteric, smectic A and columnar phases observed in thermotropic LC system of simple rigid-rod helical polysilane、International Symposium on Polymer Physics、中国、2002. 7. 3

渡辺 順次、東京工業大学、Well-defined phase sequence including cholesteric, smectic A and columnar phases observed in thermotropic LC system of simple rigid-rod helical polysilane、Joint Symposium on Liquid Crystals、イタリア、2002. 7. 9

ホセ・カンダカール サダト、九州大学大学院、Solution Properties of Native Silk Fibroin、International Symposia on Polyelectrolytes; Polyelectrolytes2002、スウェーデン、2002. 6. 17

②ポスター発表 (国内35件、海外21件)

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸ー精密制御紡糸ー、高分子学会、京都 1999. 5. 27

馬越 淳、農業生物資源研究所、Thermal Properties of Various Silk Solutions、熱測定学会つくば1999. 6. 3

馬越 淳、農業生物資源研究所、Aspect of morphology of some spider silks-Observation of microstructure by SEM and TEM、アメリカ化学会、アメリカ サンフランシスコ、1999. 8. 25

馬越 淳、農業生物資源研究所、カイコの紡糸機構、高分子学会、新潟大学、1999. 10. 6

馬越 淳、農業生物資源研究所、Biospinning -Low Energy Spinning、国際高分子学会、横浜、1999. 10. 28

馬越 淳、農業生物資源研究所、Biospinning-Fiber Formation by Silk Worm, Bombyx mori 環太平洋国際高分子会議、中国・広州、1999. 12. 9

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸 (イオン制御によるゲルゾル転移転移)、アメリカ化学会、アメリカ サンフランシスコ 2000. 3. 28

田中 稔久、農業生物資源研究所、絹フィブロインの結晶化について、高分子学会、新潟大学
1999. 10. 6

田中 稔久、農業生物資源研究所、Crystallization of Silk Fibroin、先端繊維材料国際学会、信州大学・上田、1999.10.5

馬越 芳子、蚕糸昆虫農業技術研究所、絹水溶液からの結晶化、国際分子構造生物学会議、1999.9.11

馬越 芳子、蚕糸昆虫農業技術研究所、Structure of filament Spinned by silk worm in defferent stage, Bombyx mori and wild silk、アメリカ化学会、アメリカ合衆国 サンフランシスコ、2000.3.29

張 函、秋田県立大学、Inorganic composition of cocoon shell in Chinese and Japanese narive species、環太平洋国際高分子会議、中国・広州 1999.12.9

菱川 裕香子、森林総合研究所、重水素化赤外によるマーセル化処理 Quasi-tactic セルロースフィルム解析、高分子学会、京都国際会議場、1999.6.27

戸川 英二、森林総合研究所、Quasi-tactic セルロースの結晶化によるセルロースの高次構造制御、高分子学会、京都国際会議場、1999.6.27

馬越 淳、農業生物資源研究所、カイコの紡糸—無機成分による制御、第49回高分子学会年次大会名古屋 2000.5.29

馬越 淳、農業生物資源研究所、絹の繊維形成と結晶化、世界高分子会議IUPAC、ポーランド、2000.7.12

馬越 淳、農業生物資源研究所、Crystallization of Silk 絹の結晶化第12回国際熱測定学会、コペンハーゲン 2000.8.14

馬越 淳、農業生物資源研究所、Spinning of Silkworm, *Bombyx mori* 国際高分子物理会議、中国・黄山市 2000.9.14

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸—イオン制御—高分子ミレニアル 2000 国際集会ハワイ 2000.12.11

田中 稔久、農業生物資源研究所、Spherulities of Tussah Silk Fibroin: Structure, Thermal Properties and Growth Rates 第12回国際熱測定学会コペンハーゲン 2000.8.16

田中 稔久、農業生物資源研究所、生物紡糸—カルシウムイオンによる制御 Biospinning-Control of Calcium Ions Polycondensation 2000、東京、2000.9.20

田中 稔久、農業生物資源研究所、野蚕絹フィブロイン中の金属イオンに関する研究、第49回高分子学会年次大会、仙台、2000.9.27

井上 俊一、農業生物資源研究所、AFMによる家蚕フィブロインタンパク質分子の観察、第49回高分子学会年次大会、仙台、2000.9.27

小林 将俊、農業生物資源研究所、絹フィブロインたんぱく質のゲル—ゾル転移に関する研究、第12回日本MRS学術シンポジウム、川崎 2000.12.7

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、CRYSTALLIZATION OF SILK FIBROIN、第10回国際羊毛学会、ドイツ 2000.11.26

馬越 芳子、蚕糸・昆虫農業技術研究所、いもどり繭糸を利用した絹織物、蚕糸学会、つくば、2001.3.23

大越 研人、東京工業大学、Columnar Hexagonal phase observed in the lyotropic liquid-crystal system of poly(L-glutamate) derivatives dissolved in amphiphilic molecules、2000 年度環太平洋国際化学会議、ハワイ、2000.12.15

柿ノカダカール サト、九州大学大学院、絹フィブロイン希薄水溶液の光散乱、第49回高分子討論会仙台 2000.9

柿ノカダカール サト、九州大学大学院、絹フィブロインの希薄水溶液のレオロジー、第49回高分子討論会、仙台、2000.9

張 函、秋田県立大学、Structural Characterization and Inorganic Composition of Cocoon Shell Fibers(*Bombyx mori*)、国際高分子物理シンポジウム 2000、中国、2000.9.16

馬越 淳、農業生物資源研究所、生物紡糸 Biospinning、第51回高分子学会、パシフィコ横浜、2002.5.29

馬越 淳、農業生物資源研究所、絹の繊維形成(生物紡糸)、国際高分子結晶化シンポジウム、東レ研究センター・三島、2002.6.9

馬越 淳、農業生物資源研究所、蚕の絹糸生体高分子形成、IUPAC 国際純正化学会議、中国、2002.7.9

田中 稔久、農業生物資源研究所、絹フィブロインの延伸における無機塩の影響、第223回アメリカ化学会、2002.4.7

田中 稔久、農業生物資源研究所、家蚕の絹のフィブロインの延伸における無機塩の影響に関する研究、第51回高分子学会年次大会、横浜、2002.5.29

田中 稔久、農業生物資源研究所、家蚕と野蚕の絹フィブロインの熱的性質、UPAC 国際純正および応用化学連合高分子会議 京都 2002.12.4

井上 俊一、農業生物資源研究所、FT-IR および X 線散乱による稚蚕繊維の構造、第51回高分子討論会、九州工業大学、2002.10.4

井上 俊一、農業生物資源研究所、絹蛋白質の自己組織化による織物状ナノ構造体の形成、第14回日本MRS 学術シンポジウム、東京工業大学、2003.2.20

小林 将俊、農業生物資源研究所、ポルスNMR法による液状絹の構造とダイナミックスの研究、第223回アメリカ化学会、オランダ、2002.4.7

馬越 芳子、農業生物資源研究所、Biospinning、PPS18、ポレットガル、2002.6.18

馬越 芳子、農業生物資源研究所、Silk Fibroin Liquid Crystals、第19回国際液晶学会、エジンバラ・イギリス、2002.7.2

津田 英利、農業生物資源研究所、Different behavior of elution profile of silk fibroin on existence of calcium ion and potassium ion、第223回アメリカ化学会、オランダ・アメリカ合衆国、2002.4.7

津田 英利、農業生物資源研究所、カイコフィブロインタンパク質のイオン存在量における溶解、第51回高分子学会年次大会、横浜、2002.5.29

柿ノカダカール サト、九州大学大学院、絹フィブロインの希薄水溶液物性、第51回高分子学会年次大会、横浜、2002.5.29

柿ノカダカール サト、九州大学大学院、絹フィブロインの水溶液物性、高分子基礎研究会 FSP2003、三

重県、20023. 2. 1

張 函、秋田県立大学、Thermal Properties and Inorganic composition of Silk Fibroin、アメリカ農学工学会、シカゴ・アメリカ合衆国、2002. 7. 29

張 函、秋田県立大学、Thermal Properties and Inorganic composition of Cocoon Fibroin、CONGRESS 2002

39th International symposium on Macromolecules、北京、2002. 7. 10

金澤 等、福島大学、アミノ酸NCAの固相重合17アスパラギン酸ベンジルエステルNCAの結晶構造と重合性、繊維学会年次大会、東京、2002. 5. 22

田中 稔久、農業生物資源研究所、カイコの液状絹の熱分析一家蚕、セリシン蚕および野蚕の液状絹について一、第52回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、2003.5.28

田中 稔久、理化学研究所、Uptake of Atmospheric Carbon Dioxide into Silk Fiber by Normal and Mutant Domestic Silkworms、1st IUPAC International Conference on Bio-based Polymer、理化学研究所、2003.11.13

田中 稔久、理化学研究所、Structural Formation in Nano-order and Mesophase by Silkworm、1st IUPAC International Conference on Bio-based Polymer、理化学研究所、2003.11.13

井上 俊一、産業総合技術研究所、放射光により絹糸の単繊維回折、第52回高分子討論会、山口大学、2003. 9. 26

津田 英利、農業生物資源研究所、家蚕液状絹のカルシウム及びカリウムイオンが同時に存在したときの融解挙動、第52回高分子年次大会、名古屋国際会議場、2003. 5. 30

金澤 等、福島大学、アミノ酸 N-カルボキシ無水物の反応性の再考ーグルタミン酸ベンジルエステルNCAの反応性を見直す、第52回高分子年次大会、名古屋国際会議場、2003. 5. 29

根本 紀夫、九州大学大学院、絹フィブロインのゲルゾル転移における金属イオン効果、第40回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2003. 7. 5

根本 紀夫、九州大学大学院、絹フィブロイン水溶液のレオロジー挙動への塩効果、第51回レオロジー討論会、奈良女子大学、2003. 9. 18

③プレス発表

発表課題名：大気中の二酸化炭素をカイコやクモが糸に取り組むことを世界で初めて実証

ー生物学の常識を覆すカイコやクモの特性に関する新たな知見ー

発表記者會：つくば学園研究学園都市記者會、農政記者クラブ、農林記者會

発表場所：農林交流センター（セミナー室）

発表年月日：2003. 8. 27

新聞社と題名：・日本工業新聞、カイコとクモが糸を作るとき大気中のCO₂取り込む

- 平成15年8月28日掲載
- ・ 日刊工業新聞、カイコやクモはCO₂が命—大気から取り込み糸に—
平成15年8月28日掲載
 - ・ 朝日新聞、カイコ・クモ二酸化炭素も利用
平成15年8月28日掲載
 - ・ 産経新聞、カイコの繭、クモの巣—CO₂し、糸の材料
平成15年8月28日掲載
 - ・ 毎日新聞、カイコもCO₂摂取
平成15年8月28日掲載
 - ・ 毎日新聞、カイコの糸CO₂も材料に
平成15年8月28日掲載
 - ・ 日本農業新聞、蚕、クモ温暖化防止に一役—糸に二酸化炭素吸収
平成15年8月28日掲載
 - ・ 日本農業新聞、四季
平成15年8月28日掲載
 - ・ 化学工業日報、カイコ、クモなどの昆虫糸作成時にCO₂取り込む
平成15年8月31日掲載
 - ・ 赤旗新聞、カイコとクモ酸化炭素活用糸をつくっている。
平成15年8月31日掲載
 - ・ 農業共済新聞、蚕は繭を作るとき二酸化炭素を取り込む
平成15年9月3日掲載
 - ・ 科学新聞、大気中の二酸化炭素吸収—カイコやクモ
平成15年9月12日掲載
 - ・ 世界、カイコやクモも大気中の二酸化炭素を利用
生物、昆虫学上の新発見
平成15年9月23日掲載
 - ・ 日本経済新聞、蚕が糸の中に二酸化炭素固定
平成15年9月28日掲載
 - ・ 常磐新聞、CO₂をつぐむ昆虫、
平成15年10月13日掲載

(3) 特許出願

発明の名称：絹タンパク質フィルムとその繊維の製造方法

発明者：馬越 淳

種類：国内特許

特許等登録番号：特願 2001-400222

登録日：2001年12月28日

発明の名称：炭酸ガス固定化用タンパク質と炭酸ガス固定化方法

発明者：田中 稔久

種類：国内特許

特許等登録番号：特願 2001-392777

登録日：2001年12月25日

発明の名称：中空タンパク質繊維とその製造方法

発明者：張 函

種類：国内特許

特許等登録番号：特願 2001-379281

登録日：2001年12月25日

発明の名称：植物プロトプラストによる非セルロース繊維体の産生方法とカロース繊維体

発明者：近藤哲男、安部久、笹本浜子、(森林総合研究所)

種類：国内特許・国際特許

特許等登録番号：国内 特願 2000-220419

国際 PCT/JP01/02818

登録日：国内 2000年7月21日

国際 2001年3月30日

発明の名称：セルロース結晶と絹と高強度・高弾性の複合材料の製造方法

発明者：空閑重則、和田昌久、西山義春、野一色泰友(東京大学大学院)

種類：国内特許

特許等登録番号：特願 2001-305757

登録日：2001年10月1日

7. 結び

このプロジェクトを進めるのにあたり、生物の構造形成は非常に複雑な方法で行なわれているが、生物を構成しているのは分子、高分子、超分子であり、これらの分子の集合体である。しかし、生物は常温で自己凝集状態を巧みに利用して構造形成を行なっている。研究目標は構造形成を解明することに、重点を置いたために、技術開発に欠ける面があった。研究目標などから見た達成度は研究全体の半分ぐらいであると思う。得られた成果については生物がいかにも巧みに構造形成を行なっているかを多くの研究者に理解していただいたのは幸いであった。

動物であるカイコが二酸化炭素を固定することを世界で初めて実証した点、植物プロトプラストからの巨大繊維の作成、低温度のポリペプチドの巨大単結晶の作成、逐次自発的液晶の作成での面での成功し、国内外の多くの研究者は高く評価をした。また、動物のカイコやクモが行なっている二酸化炭素固定について、このメカニズムを解明し、模倣していく技術化することに今後の研究が期待できる。

生物は省エネルギー、省資源で組織構造を作り上げている。これは生物が巧みな方法で構造形成を行っているが、自然の法則、物理、化学的な法則に基づき、分子またはナノオーダーの制御を行っている。この生物が行っている構造形成を研究者一つ一つ解明することが非常に重要である。我々の研究チームはカイコや植物の構造形成を詳細に調べ、合成高分子の省エネルギー構造形成に役立ったと思われる。しかし、生物は分子を精密に制御し、高次構造を作り上げている。ここで重要なことは、生物の構造形成を更なる研究を進めていくことが必要である。

このプロジェクトを立ち上げるのに少し時間がかかり過ぎたことと、研究所の実験スペースが狭く実験装置を組み立てるのにも時間がかかり過ぎた。さらに研究スペースでは研究所の協力があまり得られなかった。この原因は研究所が植物の遺伝子組み換えの研究機関であることが大きな原因であった。

このプロジェクトを進めるにあたり、研究総括の平田賢先生、アドバイザーの先生の方々、宍戸研究参事、斎藤事務参事、事務所の方々、このプロジェクトに携わった多くの研究者、事務職員、臨時職員の方々に感謝いたします。