

酸化抽出羊毛ケラチンの分画とアミノ酸組成

Fractionation and Amino Acid Composition of Wool Keratin Solubilized by Oxidation

野澤 繁夫*

Shigeo Nozawa

(1993年10月29日受理)

Concerning oxidative extraction of keratin protein from wool, an attempt was made to determine the optimum extraction conditions for industrial use and this purpose was achieved to a certain extent.

Wool keratin was solubilized by oxidation with peracetic acid. The effects of the concentration of peracetic acid, durations of the oxidation reaction and alkaline treatment, and the temperature of these treatments were investigated on the solubilization efficiency.

The optimum conditions for the most efficient solubilization were determined. In order to elucidate the effects of oxidation under those conditions, the distribution of molecular weight and the amino acid composition were determined for the protein (keratose) oxidatively extracted by the present method designed by regarding the efficiency as most important. In addition, the properties of two fractions obtained by fractionating the oxidation products were investigated.

Thus, it was found that the protein extracted by the present method for industrial use had no marked deterioration although there appeared some effects of oxidation such as a reduction of tyrosine content.

1. はじめに

廃棄羊毛の再資源化の一例に、タンパク質素材としての応用が考えられる。しかしながら、羊毛のケラチンタンパク質としての利用研究は非常に少なく、羊毛ケラチンの有効利用のための基礎・応用研究を行う必要がある。著者は、羊毛からタンパク質を抽出する方法の一つである酸化抽出法に着目し^{1,2)}、工業化のための最適抽出条件を検討した。すなわち、過酢酸酸化による羊毛ケラチンの可溶性抽出において、溶解率に対する過酢酸濃度および酸化処理時間の影響、アルカリ処理時間の影響、処理温度の影響等を検討した結果、効率的に最大溶解率を得るための最適条件を見出した³⁾。そこで、本研究では、効率を重視した方法によって得られた酸化抽出タンパク質(ケラトース)の性状に関して、そのような条件下における主として酸化の影響を明かにするため、分子量分

布ならびにアミノ酸組成を検討した。さらにその抽出物の分画を行い、各画分の性状についても、同様に検討した。

2. 実験方法

(1) 羊毛試料

メリノ種羊毛トップを細かく裁断し、ソックスレー抽出器を用いてエーテルとエタノールでそれぞれ8時間ずつ抽出精製した。これを蒸留水で十分に洗浄したのち、乾燥させ、試料として用いた。

(2) 酸化抽出

羊毛からの酸化生成物の調製および分画のレサイブを図1に示す。すなわち、粉碎羊毛を過ギ酸あるいは過酢酸溶液によって酸化処理したのち、不溶残留物に対しては、0.05M炭酸ナトリウム水溶液を用いてアルカリ処理を行った。酸化処理濾液とアルカリ抽出液からそれぞれ酸化処理抽出物と未分画のアルカリ処理抽出物を得た³⁾。元の試料羊毛の重量と最終不溶残留物の重量から計算し

* 生産技術部 繊維加工技術研究室

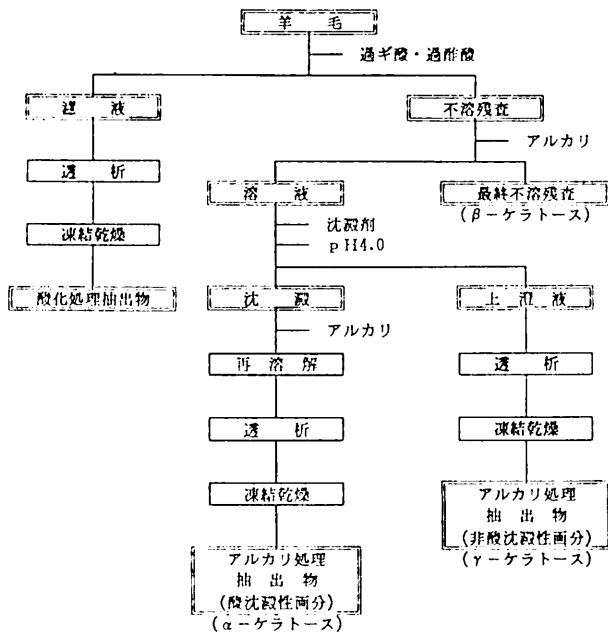


図1 酸化生成物の調製および分画

Preparation and fractionation of oxidized product from wool

て最終溶解率を求めた。回収率については、元の試料羊毛の重量と回収された可溶化抽出タンパク質の重量から算出した。

(3) 酸化生成物の分画¹⁾

アルカリ抽出液に沈澱剤として0.1Mとなるように硫酸カリウムを溶かしたのち、氷酢酸を加えて溶液をpH 4.0まで酸性化した。一晚放置後、生じた白色凝乳状沈澱と無色透明の上澄液を濾別した。その濾液を透析用セロハンチューブを用いて蒸留水に対して透析し、次いで凍結乾燥することにより非酸沈澱性画分(γ-ケラトース)を得た。一方、濾取した沈澱を0.05M炭酸ナトリウム水溶液に溶かしたのち、同様に再沈させて回収し、再び0.05M炭酸ナトリウム水溶液に溶かしてから、透析用セロハンチューブを用いて蒸留水に対して透析した。これを凍結乾燥することにより、酸沈澱性画分(α-ケラトース)を得た。

(4) 高速ゲル濾過

羊毛から得られた抽出タンパク質の分子量分布を、TSKgelG2000SWXLカラム(東ソー製、排除限界分子量⁵⁾:100,000)を用い、高速ゲル濾過法により測定した。測定試料は、抽出タンパク質の凍結乾燥品を溶離液(0.2Mリン酸緩衝液, pH6.9)に溶かし、不溶分を遠心分離によって除去したのち、マイクロポアフィルター(孔径:0.45μm)で濾過精製したものを用いた。測定条件を表1に示すとともに、ベーリンガー社製分子量既知標準タンパク質キットのうち、牛血清アルブミン(分子量68,000)、卵アルブミン(分子量45,000)、キモトリプシノーゲンA(分子量25,000)、チトクロムC(分子量12,500)

表1 高速ゲル濾過クロマトグラフィーの測定条件
Conditions for gel filtration HPLC

機器: 高速液体クロマトグラフィー装置(東ソー製)
カラム: TSKgelG2000SWXL 7.8mmID×30cm,
TSKguardcolumnSWXL 6.0mmID×4cm
溶離液: 0.2Mリン酸緩衝液(pH6.9)
流速: 1.0ml/min
温度: 30℃
検出: UV(280nm)
濃度: 約1mg/ml
注入量: 100μl

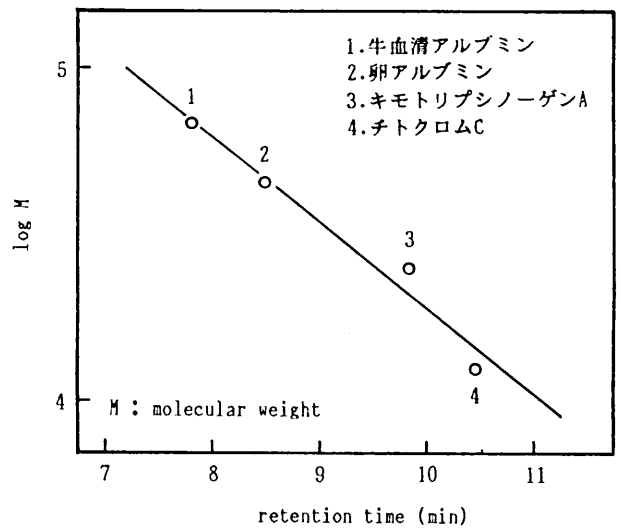


図2 高速ゲル濾過の検量線

Calibration curve for determination of molecular weights of oxidized products from wool

を同様に分析に供した結果得られた検量線を図2に示す。

(5) アミノ酸分析

タンパク質構成アミノ酸の分析は、TSKgelAminopakカラム(東ソー製)を用い、OPA-NaClO₂法によって行った。試料0.5mgに6N塩酸を加え、減圧封管状態とし、110℃で24時間加水分解した。その加水分解物の希釈溶液について、アミノ酸組成を測定した。

3. 結果と考察

(1) 酸化抽出羊毛ケラチンの分子量分布

羊毛から抽出されたタンパク質の分子量分布については、還元抽出された生成物に関してよく研究され、低硫黄含有画分(Low-S)~50,000、高硫黄含有画分(High-S)10,000-30,000、高グリシン・チロシン含有画分(High-GT)7,000-13,000の結果⁶⁾が現在受け入れられており、羊毛ケラチンの分子量の代表的な数値とされている。一方、酸化抽出タンパク質の分子量分布に関する研究例は、還元抽出タンパク質に比べて少なく、一般に認められているような報告はみられない。著者らが参照できたこの種の文献はわずかであったが、例えば、

O'DonnellとWoods⁷⁾は、低硫黄含有画分である α -ケラトースを、粘度法、沈降法等によって調べ、測定条件により変動がみられるとした上で、分子量45,000-50,000の均一なタンパク質であるとの判断を示した。また、Haylettら⁸⁾は、高硫黄含有画分である γ -ケラトースを低速ゲル濾過で調べた結果、分子サイズに関して不均一であるとの考察を述べるに留まった。

(A) 穏和な条件によって得られた酸化生成物の高速ゲル濾過

著者は、羊毛タンパク質の分子サイズならびに化学構造を保持できるように、できるだけ穏和な条件で抽出を行い、それによって得られた酸化生成物の分子量分布を高速ゲル濾過法を用いて求め、これを基準の分布とした上で、著者の最適条件によって得られた酸化生成物の分子量分布との比較を行った。

酸化抽出法においては、主として過ギ酸あるいは過酢酸が酸化剤として用いられ、これらによってシスチン結合を酸化開裂し、羊毛ケラチンを可溶化することができる。さらに、過酢酸に比べて過ギ酸の方が、酸化開裂の特異性に優れ、ペプチド鎖を切断しにくいとされている^{1,2)}。著者は、最適抽出条件の検討においては、実用化の観点から判断した結果、酸化剤として過酢酸を選択した³⁾。しかしながら、基準の分布を求めため、標品としての酸化生成物を調製することにおいては、過ギ酸酸化抽出と過酢酸酸化抽出の二つの方法によって穏和な条件による抽出を行った。

過ギ酸酸化抽出については、酸化処理において0℃といった低温条件を用いることが一般的であり、本研究ではO'DonnellとThompson⁴⁾の方法に準じた。一方、過酢酸酸化抽出についても、最適抽出条件を基本とした上で、処理温度をなるべく低温とし、その代わりに処理時間を延長した方法を採用した。両者の抽出条件を表2に示す。ただ、過ギ酸酸化抽出においては、濃厚なギ酸によって酸化処理羊毛が著しく膨潤することが原因であると思われるが、酸化処理後の濾液と不溶分との分離が非常に困難となった。このため、O'DonnellとThompson¹⁾

表2 穏和な条件による羊毛ケラチンの酸化抽出

Oxidation extraction of wool keratin under the mild conditions

過ギ酸酸化抽出	過酢酸酸化抽出
1)酸化処理： 過ギ酸(約99%ギ酸：30% 過酸化水素=9：1(V/V))、 溶比1：30、0℃、24時間	1)酸化処理： 過酢酸(氷酢酸：30%過酢 酸化水素=7：3(V/V))、 溶比1：30、10℃、24時間
2)アルカリ処理： 0.05M炭酸ナトリウム、 溶比1：100、5℃、24時間	2)アルカリ処理： 0.05M炭酸ナトリウム、 溶比1：100、10℃、24時間

の方法により、酸化処理後の混合物を透析用セロハンチューブに移し込み、蒸留水に対して透析したのち、これを凍結乾燥し、その乾燥品に対してアルカリ処理を行った。したがって、過ギ酸酸化抽出においては、操作上の理由により、可溶化タンパク質としてはアルカリ処理抽出物のみを回収した。これに対し、過酢酸酸化抽出では、酸化処理後の分離が容易であるため、酸化処理抽出物とアルカリ処理抽出物のそれぞれで可溶化タンパク質を回収した。ただ、過酢酸酸化抽出においては、抽出条件に依存するものの、酸化処理におけるタンパク質の溶出量が比較的少なく、主としてアルカリ処理においてタンパク質が抽出されることから、主生成物であるアルカリ処理抽出物についてのみ分子サイズに関する検討を行った。

穏和な条件による抽出を行った結果、過ギ酸酸化抽出では、最終溶解率が68.6%、可溶化タンパク質の回収率が57.8% (4点のデータの平均値)、過酢酸酸化抽出では、最終溶解率が54.7%、可溶化タンパク質の回収率が41.6% (2点のデータの平均値)であった。なお、過酢酸酸化抽出における可溶化タンパク質の回収率の構成は、酸化処理抽出物が2.2%、アルカリ処理抽出物が39.5% (2点のデータの平均値)であった。

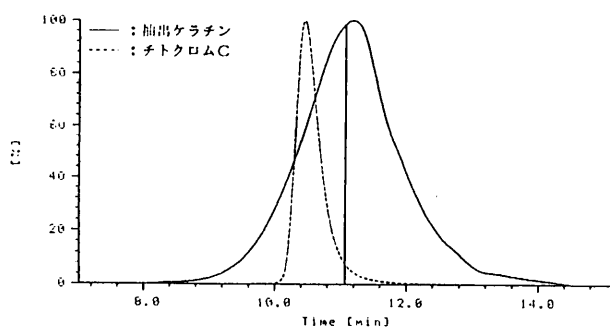


図3 過ギ酸酸化抽出ケラチンの高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curve of performic acid-oxidized product

(処理条件)

試料：未処理羊毛(メリノ)

酸化処理：過ギ酸(約99%ギ酸：30%過酸化水素=9：1(V/V))、溶比1：30、0℃、24時間

アルカリ処理：0.05M炭酸ナトリウム、溶比1：100、5℃、24時間

図3、4は、穏和な条件による過ギ酸酸化抽出と過酢酸酸化抽出のそれぞれで得られた酸化生成物(未分画のアルカリ処理抽出物)の高速ゲル濾過による溶出曲線である。参考のため、ペーリンガー社製分子量既知標準タンパク質キットのうち、チトクロムC(分子量12,500)の溶出曲線を点線で重ねて示し、検量線から求めた分子量1万に相当する溶出位置に垂線を付した。ところで、著者の測定条件によれば、実試料の溶出パターンは次の

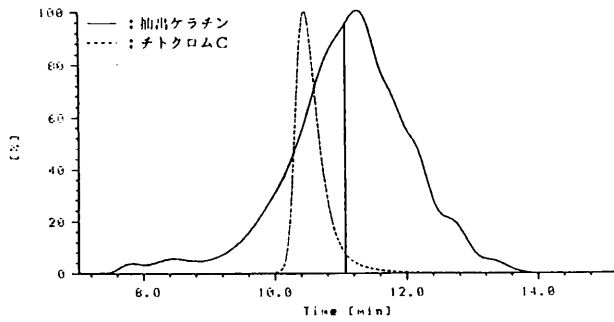


図4 過酢酸酸化抽出ケラチンの高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curve of peracetic acid-oxidized product

(処理条件)

試料：未処理羊毛(メリノ)
 酸化処理：過酢酸(氷酢酸：30%過酸化水素=7：3 (V/V))，溶比1：30，10℃，24時間
 アルカリ処理：0.05M炭酸ナトリウム，溶比1：100，10℃，24時間

ような挙動を呈した。すなわち、抽出タンパク質を溶離液に溶かした直後の測定においては、タンパク質分子の凝集によるものと考えられるが、排除限界ピークを含む高分子量域にわたった幅広の分布がみられた。しかしながら、その後、同一試料溶液からの経時的なサンプリング及び測定を行ったところ、溶出パターンは、形状変化を伴った低分子量側への移動を示したのち、安定化した。図3、4の溶出曲線は、ともにそのような安定化がみられた状態における測定結果である。この挙動については、タンパク質分子の凝集が、溶離液である緩衝溶液中において経時的に緩和することを意味し、タンパク質分子の分解による低分子化を表すものではないと考えられる。なぜなら、溶出パターンの低分子側への移動は、安定化を示した後には起こらず、ほぼ中性付近に調製された緩衝液が分解を促進する媒体とは考えられないからである。O'DonnellとWoods⁷⁾も同様な凝集の緩和について言及している。図3、4の対比から明かなように、どちらも分子量にして6万から数千にわたるほぼ同じような幅広の分子量分布を示し、分布の中心が1万程度ないし1万より少し小さな位置にあることがわかった。また、羊毛ケラチンの分子量に関するこれまでの報告と比べ、やや低分子側に分布していることがわかった。

(B) 最適条件によって得られた酸化生成物の高速ゲル濾過

図5は、表3に示した過酢酸酸化による最適抽出条件に準じて抽出された酸化生成物(未分画のアルカリ処理抽出物)の高速ゲル濾過による溶出曲線であり、前項で示した基準の分布と同様、溶出パターンが低分子側へ経時変化したのち、安定化した状態における測定結果であ

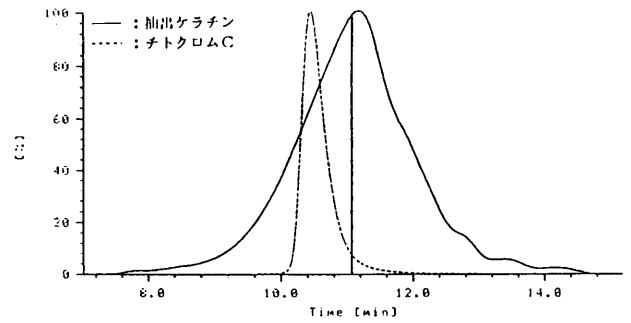


図5 過酢酸酸化抽出ケラチンの高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curve of peracetic acid-oxidized product

(処理条件)

試料：未処理羊毛(メリノ)
 酸化処理：過酢酸(氷酢酸：30%過酸化水素=7：3 (V/V))，溶比1：30，50℃，5時間
 アルカリ処理：0.05M炭酸ナトリウム，溶比1：100，50℃，5時間

表3 最適条件による羊毛ケラチンの酸化抽出

Oxidation extraction of wool keratin under the optimum conditions

酸化処理	アルカリ処理
酸化剤：過酢酸(氷酢酸：30% 過酸化水素=7：3 (V/V))	アルカリ：0.01~0.05M炭酸 ナトリウム
溶比：1：30	溶比：1：100
温度：50℃	温度：25℃
時間：2~3hr	時間：1~2hr

る。参考のため、ペーリンガー社製分子量既知標準タンパク質キットのうち、チトクロムC(分子量12,500)の溶出曲線を点線で重ねて示し、検量線から求めた分子量1万に相当する溶出位置に垂線を付した。本条件により、得られた最終溶解率は90%程度に達し、可溶化タンパク質の回収率は約80%(酸化処理抽出物：約20%、アルカリ処理抽出物：約60%)であった。

図5からわかるように、最適条件によって得られた酸化生成物の分子量分布は、前項で示した総和な条件で得られた酸化生成物の分子量分布、すなわち基準の分布に対して、大きな違いを示さなかった。したがって、最適条件では、効率重視のために酸化処理を高温で行うものの、その酸化生成物が分子サイズにおいて著しい劣化を被ることはなかったと考えられる。なお、著者らが測定した高速ゲル濾過クロマトグラムは、かなり幅広で不均一性の高いパターンを示すに留まっていることから、仮に試料である抽出タンパク質が本来的に均一な分子量分布を必ずもつものとするれば、分子サイズの評価としては非常に不明確であり、主として相対的な溶出パターンの

比較に役立つものとして捉えなければならないであろう。

(C) 酸化生成物の α -, γ -画分の高速ゲル濾過

最適条件によって得られた酸化生成物（未分画のアルカリ処理抽出物）から酸沈澱法によって調製した二画分の分子量分布についても検討した。未分画のアルカリ処理抽出物の状態ではなく、分別された成分の状態ではどのような分子量分布が得られるのかを検討することにより、新たな知見が得られるものと思われたからである。表3の最適条件に準じて抽出を行い、アルカリ抽出液から α -, γ -画分を分別し、それぞれについて高速ゲル濾過による測定を行った。なお、 α -, β -, γ -画分（あるいはケラトース）という用語は、Alexanderら³⁾によって導入された命名法であり、はっきりとした化合物を表すというよりも、むしろ実験操作上の区別としての定義である。しかしながら、 α -画分は低硫黄含有成分（低シスチン含量成分）であり、 γ -画分は高硫黄含有成分（高シスチン含量成分）であるといった二画分間の化学的性質の違いや、 β -画分は抵抗性細胞膜、非ケラチン質のエンドクチクル細胞、そして細胞核残留物等に由来する最終不溶分であるということは、すでに知られている^{1,2)}。

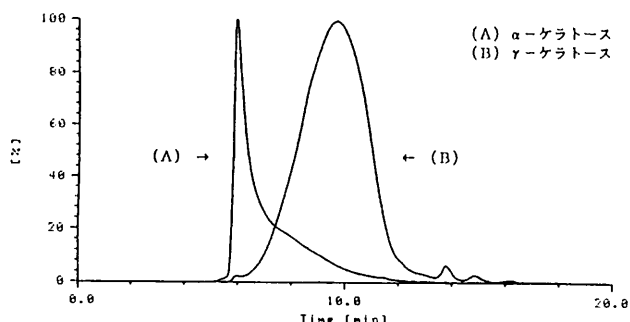


図6 過酢酸酸化抽出ケラチンの高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curves of peracetic acid-oxidized products

(処理条件)

試料：未処理羊毛(メリノ)

酸化処理：過酢酸(氷酢酸：30%過酸化水素=7：3 (V/V))，溶比1：30，50℃，5時間

アルカリ処理：0.05M炭酸ナトリウム，溶比1：100，25℃，5時間

最終溶解率：88.7%

画分回収率：36.8%(α -画分)，23.0%(γ -画分)

図6は、最適条件による酸化生成物から図1の調製法によって得られた α -, γ -画分の高速ゲル濾過による溶出曲線であり、試料タンパク質を溶離液に溶解させた直後の測定結果である。また、図7は、図6の二画分を得るために用いたのとまったく同一条件で抽出を行って回収された未分画のアルカリ処理抽出物を、高速ゲル濾過で測定した結果であり、溶離液への溶解直後のパター

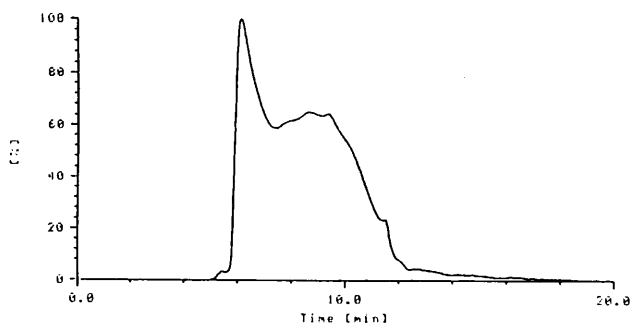


図7 過酢酸酸化抽出ケラチンの高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curve of peracetic acid-oxidized product

(処理条件)

試料：未処理羊毛(メリノ)

酸化処理：過酢酸(氷酢酸：30%過酸化水素=7：3 (V/V))，溶比1：30，50℃，5時間

アルカリ処理：0.05M炭酸ナトリウム，溶比1：100，25℃，5時間

ンである。これらの図からわかるように、まず、 α -, γ -画分の分子量分布は、溶離液への溶解直後の測定において、特徴的な相違を示した。すなわち、 α -画分は、排除限界位置に鋭いピークを呈したのち、低分子量域にまで至る広範なテーリング状の分布を与え、 γ -画分は、排除限界位置には大きなピークがみられないものの、高分子量域から低分子量域にわたる非常に幅広な分布を示した。このことより、 α -画分が塩水溶液中においてきわめて凝集しやすいとのO'DonnellとWoods⁷⁾の報告に合致する結果が得られたといえ、同時に、分画操作の結果が高速ゲル濾過クロマトグラムに明確に表されたといえる。また、図7に示した未分画のアルカリ処理抽出物の溶出パターンは、図6における α -, γ -画分の溶出パターンの重ね合わせにほぼ相当することも、洞察できるのである。

図8, 9は、3.(1)(A), 3.(1)(B)で述べた溶出パターンの低分子側への経時変化に関して調べるため、図6で示した α -, γ -画分の測定試料について時間的に追跡した結果である。図10は、同様の目的により、図7で示した未分画のアルカリ処理抽出物の測定試料について追跡した結果である。図8, 9, 10ともに、図中の(1)から(4)の順序が時系列となっており、(4)の溶出曲線が分布の安定化の状態を表す。これらの図からわかるように、分画せずに回収したアルカリ処理抽出物とその α -, γ -画分の分子量分布は、みな低分子側への経時変化を示し、最終的には、分子量にして6万から数千にわたるほぼ同じような幅広のパターンで安定化した。ただ、ここで示した追跡結果に関する限り、安定化した状態における分布形状が不規則であること、排除

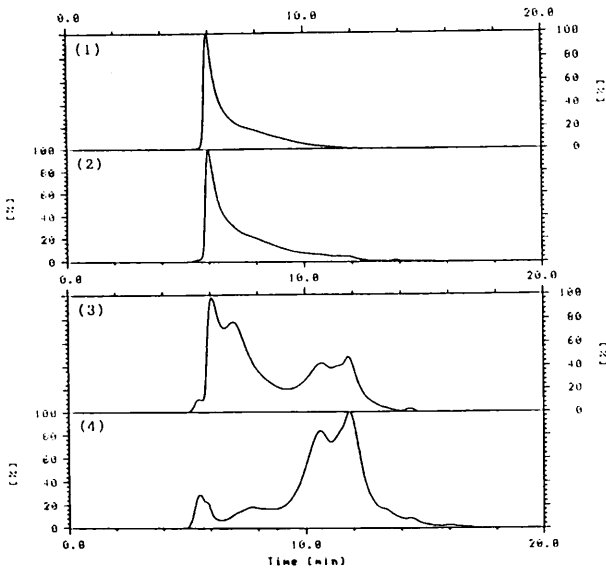


図8 過酢酸酸化抽出ケラチン (α -ケラトース) の高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curves of α -keratose obtained by peracetic acid oxidation

(処理条件)

試料: 未処理羊毛(メリノ)
 酸化処理: 過酢酸(氷酢酸:30%過酸化水素=7:3 (V/V)), 溶比1:30, 50°C, 5時間
 アルカリ処理: 0.05M炭酸ナトリウム, 溶比1:100, 25°C, 5時間
 最終溶解率: 88.7%
 画分回収率: 36.8%(α -画分), 23.0%(γ -画分)

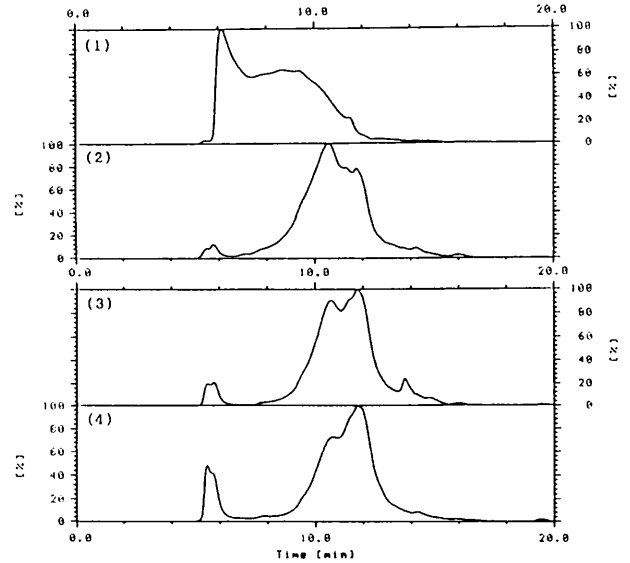


図10 過酢酸酸化抽出ケラチンの高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curves of peracetic acid-oxidized product

(処理条件)

試料: 未処理羊毛(メリノ)
 酸化処理: 過酢酸(氷酢酸:30%過酸化水素=7:3 (V/V)), 溶比1:30, 50°C, 5時間
 アルカリ処理: 0.05M炭酸ナトリウム, 溶比1:100, 25°C, 5時間

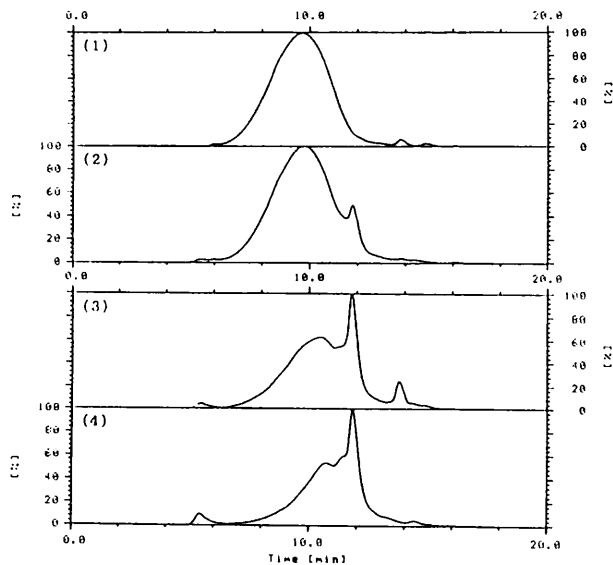


図9 過酢酸酸化抽出ケラチン (γ -ケラトース) の高速ゲル濾過による溶出曲線

GFC elution curves of γ -keratose obtained by peracetic acid oxidation

(処理条件)

試料: 未処理羊毛(メリノ)
 酸化処理: 過酢酸(氷酢酸:30%過酸化水素=7:3 (V/V)), 溶比1:30, 50°C, 5時間
 アルカリ処理: 0.05M炭酸ナトリウム, 溶比1:100, 25°C, 5時間
 最終溶解率: 88.7%
 画分回収率: 36.8%(α -画分), 23.0%(γ -画分)

限界位置を含む高分子量域にピークの残留がみられること、さらに安定化の時点で排除限界ピークが少し高まりを示すこと等、更に検討を必要とする問題点があることは、否めない。

(2) 酸化抽出羊毛ケラチンのアミノ酸組成

(A) 未分画のアルカリ処理抽出物のアミノ酸分析

低温条件による過ギ酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)と最適条件による過酢酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)とのアミノ酸組成の比較を行った。その結果を、抽出用の試料である未処理羊毛の分析値とともに表4に示す。同表において、シスチン含量(1/2 Cys)については、半シスチン換算で表し、もともと半シスチン換算であるシステイン酸含量(CySO₃H)をシスチン含量と合わせた項目(CySO₃H+1/2 Cys)も併記した。

同表からわかるように、過ギ酸酸化生成物における結果は、未処理羊毛の実測値とたいへんよく一致していた。未処理羊毛のアミノ酸組成との対比において、過ギ酸酸化生成物と過酢酸酸化生成物に共通していえることは、シスチンが検出されなくなった代わりに、その含量を補償するようにシステイン酸が検出されていることと、酸化に対して脆い含硫アミノ酸であるメチオニンが検出されなくなっていることである。これらについては、酸化処理の段階で進行するシスチン結合の酸化開裂反応ならびにそれに伴う副反応を表しているものと考えられる。

表4 羊毛ケラチンの酸化生成物^{a)}のアミノ酸組成^{b)}

Amino acid analyses of performic and peracetic acid-oxidized products from wool

アミノ酸	未処理羊毛(メリノ種)		過ギ酸酸化抽出 ^{c,e)}	過酢酸酸化抽出 ^{c,f)}
	実測 ^{c)}	文献 ^{d)}		
Ala	5.6	5.3	5.5	6.6
Arg	6.2	6.8	6.3	6.3
Asp	6.3	6.4	6.5	8.2
CySO ₃ H	0.2	0.1	12.1	10.9
1/2 Cys	10.3	10.5	—	—
CySO ₃ H+1/2 Cys	10.5	10.6	12.1	10.9
Glu	11.9	11.9	11.5	15.6
Gly	8.9	8.6	9.4	6.1
His	1.3	0.9	1.3	1.3
Ile	2.7	3.1	3.0	2.9
Leu	7.4	7.7	7.5	8.3
Lys	2.3	3.1	2.0	2.9
Met	0.4	0.5	—	—
Phe	2.6	2.9	2.8	1.6
Pro	7.8	5.9	6.6	6.2
Ser	11.4	10.2	10.8	10.2
Thr	6.2	6.5	6.6	6.3
Tyr	3.5	4.0	2.9	1.5
Val	4.9	5.5	5.2	5.0

a) 酸化処理後、アルカリ抽出によって得られた可溶性タンパク質。

ただし、未分画(α -+ γ -画分)。

b) アミノ酸100残基当りの残基数。

c) 減圧した密閉容器中、6N塩酸を用い、110°Cで24時間加水分解。

d) J.H.Bradbury and J.D.Leeder, Aust. J. Biol. Sci., 23, 843 (1970)。

e) [酸化処理]: 過ギ酸(約99%ギ酸:30%過酸化水素=9:1(V/V)), 浴比1:30, 0°C, 24時間。

[アルカリ処理]: 0.05M炭酸ナトリウム, 浴比1:100, 5°C, 24時間。

f) [酸化処理]: 過酢酸(氷酢酸:30%過酸化水素=7:3(V/V)), 浴比1:30, 50°C, 5時間。

[アルカリ処理]: 0.05M炭酸ナトリウム, 浴比1:100, 25°C, 5時間。

また、過ギ酸酸化生成物と過酢酸酸化生成物との比較では、アミノ酸残基全般にわたり、組成の傾向にほぼ一致がみられるものの、若干の差異もみられた。すなわち、個々のアミノ酸残基について詳しく検討すると、過酢酸酸化生成物の方が、チロシン、フェニルアラニン、グリシンに関しては含量が低減しており、逆にグルタミン酸、リシンに関しては含量が高くなっているといった相違がみられた。このような結果については、アミノ酸組成そのものが、測定試料のタンパク質中における相対的な評価であることから、表4のデータだけでは断定的な結論付けができないものの、抽出条件による影響が関与しているものと思われた。

(B) 酸化生成物の α -、 γ -画分のアミノ酸分析

表5は、低温条件による過ギ酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)と最適条件による過酢酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)をそれぞれ分画して得られた α -、 γ -画分のアミノ酸組成の測定結果である。著者の実測値は、いずれも過去の報告にみられる結果とほぼ一致していた。

また、 α -画分(Low-S成分)の方が γ -画分(High-S成分)に比べ、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、リシン、ロイシン、チロシンの含量が高く、逆にシスチン、スレオニン、セリン、プロリンの含量が低くなっており、このような特徴的な相違点が二画分の間にもみられることについても、Gillespie¹⁰⁾とCorfield¹¹⁾の報告と一致していた。なお、過酢酸酸化生成物における文献値は、著者の最適条件に比べてより穏和な条件で得られた抽出物に対するアミノ酸分析結果である。一方、過ギ酸酸化生成物における文献値は、著者が参照した抽出条件によって得られた抽出物に対するアミノ酸分析結果であり、抽出方法はほとんど同じである。

前項では、分画せずに回収したアルカリ処理抽出物について調べたところ、過酢酸酸化生成物の結果において、酸化の影響を受けやすいとされるチロシン残基の含量の低減を含め、アミノ酸組成の微妙な差異が過ギ酸酸化生成物の結果との対比でみられた。表5からわかるように、分画して α -、 γ -

画分とした状態においても、やはり同様な組成の相違がみられた。

(C) 過酢酸酸化における酸化処理抽出物のアミノ酸分析

表6は、過酢酸酸化の影響をより明かにするため、過酢酸酸化抽出で回収された酸化処理抽出物に着目してアミノ酸分析を行った結果である。すなわち、過酢酸酸化抽出において、酸化処理温度を10°Cと50°Cで行ったときのそれぞれで得られた酸化処理抽出物およびアルカリ処理抽出物のアミノ酸組成の測定結果を示した。酸化処理温度を10°Cとした方は、3.(1)(A)における穏和な条件による過酢酸酸化抽出とまったく同じ抽出条件であり、酸化処理温度を50°Cとした方は、過酢酸酸化による最適条件に準じた抽出条件である。また、同表で併せて示した δ -画分とは、羊毛繊維の過ギ酸酸化に関する研究として、酸化処理浴への溶出タンパク質について検討した報告の中で、Brunner¹²⁾が命名したタンパク質成分である。この報告によれば、羊毛繊維を9:1の過ギ

表5 酸化抽出羊毛ケラチンの α -、 γ -画分のアミノ酸組成^{a)}Amino acid analyses of α - and γ -keratoses from performic and peracetic acid-oxidized wool

アミノ酸	過ギ酸酸化抽出				過酢酸酸化抽出			
	α -画分		γ -画分		α -画分		γ -画分	
	実測 ^{b,c)}	文献 ^{d)}	実測 ^{b,c)}	文献 ^{d)}	実測 ^{b,c)}	文献 ^{f)}	実測 ^{b,c)}	文献 ^{f)}
Ala	6.4	6.5	3.3	3.7	8.3	6.9	4.0	3.5
Arg	6.5	7.5	5.7	7.0	6.9	7.5	5.0	6.4
Asp	9.0	8.0	3.0	3.1	11.5	9.0	2.9	2.4
CySO ₃ H	7.5	7.7	22.1	18.4	4.8	5.3	23.1	19.6
1/2 Cys	—	—	—	—	—	—	—	—
CySO ₃ H+1/2 Cys	7.5	7.7	22.1	18.4	4.8	5.3	23.1	19.6
Glu	14.1	13.4	7.6	8.3	19.5	15.6	8.5	7.9
Gly	10.6	9.8	7.5	6.8	5.2	7.4	7.6	6.7
His	1.6	0.7	1.2	0.8	1.7	0.6	1.3	0.7
Ile	2.5	2.9	2.5	2.9	3.0	3.6	2.1	2.9
Leu	9.6	9.4	4.0	4.2	11.4	10.5	3.6	3.5
Lys	2.7	3.3	0.7	0.6	3.9	3.3	0.8	0.7
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	3.3	3.3	2.0	2.0	2.0	2.8	1.3	1.6
Pro	3.9	4.2	11.3	12.5	2.6	3.9	11.6	13.3
Ser	9.6	9.1	13.7	13.1	7.7	9.6	13.9	13.1
Thr	4.5	4.4	9.0	9.4	4.4	4.9	8.8	10.1
Tyr	3.9	4.6	1.6	2.0	1.9	3.5	0.7	1.9
Val	4.3	4.9	4.8	5.1	4.9	5.7	4.7	5.6

a) アミノ酸100残基当りの残基数。

b) 減圧した密閉容器中、6N塩酸を用い、110℃で24時間加水分解。

c) [酸化処理]: 過ギ酸(約99%ギ酸:30%過酸化水素=9:1(V/V)), 溶比1:30, 0℃, 24時間。

[アルカリ処理]: 0.05M炭酸ナトリウム, 溶比1:100, 5℃, 24時間。

[最終溶解率]: 65.9%。

[画分回収率]: 27.3%(α -画分), 24.8%(γ -画分)。

d) Gillespie,J.M., O'Donnell,I.J., Thompson,E.O.P. and Woods,E.F. J.Textile Inst. 51, T703 (1960)。

e) [酸化処理]: 過酢酸(氷酢酸:30%過酸化水素=7:3(V/V)), 溶比1:30, 50℃, 5時間。

[アルカリ処理]: 0.05M炭酸ナトリウム, 溶比1:100, 25℃, 5時間。

[最終溶解率]: 88.7%。

[画分回収率]: 36.8%(α -画分), 23.0%(γ -画分)。

f) Corfield,M.C., Robson,A. and Skinner,B. Biochem.J. 68, 348 (1958)。

酸(約99%ギ酸:30%過酸化水素=9:1(V/V))により、0℃のもと、溶比1:30で0.5時間酸化処理し、溶出タンパク質を含む過ギ酸溶液を蒸留水に対して透析したのち、透析チューブ内で沈澱するタンパク質成分を回収しており、このようにして得られた抽出物を δ -画分と定義している。なお、酸化処理浴に溶出するタンパク質量は、元の乾燥羊毛重量に対して約4~5%であり、さらに透析によってその約80%が沈澱することから、過ギ酸酸化処理のごく初期段階に溶出してくる少量の成分が δ -画分ということになる。 δ -画分を興味ある画分として取り上げた理由はそのアミノ酸組成にあり、表6からわかるように、グリシンの組成が著しく高く、システイン酸として検出されているものの、比較的高いシステイン含量をもち、チロシン、フェニルアラニンといった芳香族アミノ酸については高含量であるが、逆にリシンとグルタミン酸については低減した組成をもつ。このような評価は、表4の未処理羊毛に関するデータとの対

比により、明白である。

著者は、 δ -画分と呼ばれる前述のようなタンパク質成分の存在に基づき、酸化処理時に溶出しやすい成分にはその組成に顕著な特徴があるため、酸化処理におけるタンパク質の溶出量が、主生成物であるアルカリ処理抽出物のアミノ酸組成に変動を与える可能性があるとの仮説を立てた。以下では、表6に示した実測値によってその仮説の検証を試みる。まず、酸化処理温度10℃の穏和な条件による酸化処理抽出物に関しては、アミノ酸組成が δ -画分とかなり類似していることがわかる。すなわち、グリシンについては δ -画分と同程度に著しく高い組成であり、チロシンについては δ -画分ほどではないもののやはり高含量といえ、フェニルアラニン、システインとともに比較的高い含量となっている。また、グルタミン酸とリシンが著しく低減した組成になっている点についても類似しているといえる。この酸化処理抽出物の回収率は、3.(1)(A)でも述べたように2%程度であ

表6 羊毛ケラチンの過酢酸酸化生成物のアミノ酸組成^{a)}
Amino acid analyses of peracetic acid-oxidized products from wool

アミノ酸	実 測 ^{b)}				δ - 画分 ^{c)}
	酸化処理温度：10℃ ^{c)}		酸化処理温度：50℃ ^{d)}		
	酸化処理抽出物	アルカリ処理抽出物	酸化処理抽出物	アルカリ処理抽出物	
Ala	2.3	4.9	4.0	6.6	2.1
Arg	5.2	6.0	5.8	6.3	5.6
Asp	4.3	6.1	5.3	8.2	4.0
CySO ₃ H	6.3	11.5	12.2	10.9	7.5
1/2 Cys	—	0.3	—	—	—
CySO ₃ H+1/2 Cys	6.3	11.8	12.2	10.9	7.5
Glu	2.6	11.3	6.9	15.6	3.4
Gly	23.2	9.4	14.3	6.1	24.2
His	1.7	1.9	1.3	1.3	0.9
Ile	0.9	2.7	2.4	2.9	0.9
Leu	6.3	7.2	6.4	8.3	6.6
Lys	0.3	1.8	1.1	2.9	0.7
Met	—	—	—	—	—
Phe	8.5	2.4	4.1	1.6	7.9
Pro	6.8	8.3	9.0	6.2	4.6
Ser	14.6	11.7	13.0	10.2	13.0
Thr	4.3	6.9	6.6	6.3	3.2
Tyr	9.8	2.5	2.5	1.5	13.2
Val	3.0	5.0	5.0	5.0	2.3

a) アミノ酸100残基当りの残基数。

b) 減圧した密閉容器中，6N塩酸を用い，110℃で24時間加水分解。

c) [酸化処理]：過酢酸(氷酢酸：30%過酸化水素=7：3(V/V))，溶比1：30，10℃，24時間。
[アルカリ処理]：0.05M炭酸ナトリウム，溶比1：100，10℃，24時間。

d) [酸化処理]：過酢酸(氷酢酸：30%過酸化水素=7：3(V/V))，溶比1：30，50℃，5時間。
[アルカリ処理]：0.05M炭酸ナトリウム，溶比1：100，25℃，5時間。

e) Brunner,H., Brunner,A. and Gerendás,J. Appl. Polym. Symp. 18, 55 (1971)。

り，酸化処理において溶出しやすい成分として，δ-画分とほぼ同様な抽出物であると考えられる。なお，穏和な条件によるアルカリ処理抽出物の分析結果は，表4で示した過酢酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)の分析結果とたいへんよく一致している。次に，酸化処理温度50℃の最適条件による酸化処理抽出物については，先ほどの酸化処理温度10℃の穏和な条件による酸化処理抽出物についての測定結果が，δ-画分と同様な特徴をもっていたことと比較するならば，そのような著しい特徴が幾分緩和されたアミノ酸組成を示していると思われる。実際，グリシンについては依然として高含量であるとはいえ，δ-画分ほどではなく，フェニルアラニンも未処理羊毛における値よりも若干高いぐらいであり，チロシンに関してはむしろ未処理羊毛における値からやや低減している。さらに，シスチン含量が，ケラチン質として標準的な値になっていることも読み取ることができる。また，グルタミン酸とリシンに関しては，やはり未処理羊毛での値に比べて低いものの，δ-画分のように著しいわけではない。以上のような測定結果を説明するには，最適条件による酸化処理抽出物の回収率に着目すべきで

あると考えられる。すなわち，その回収率は，3.(1)(B)でも述べた通り，約20%に達しており，確かにアルカリ処理抽出物が主生成物であることは変わらないとしても，無視し得るものではないであろう。したがって，酸化処理の初期段階では，δ-画分のように顕著なアミノ酸組成をもつタンパク質が，溶出しやすい成分として処理浴中に抽出され，やがて条件に依存して，羊毛ケラチン全体としての平均的なアミノ酸組成をもったタンパク質の溶出が圧倒的となり，初期の溶出タンパク質の特徴的な組成が緩和されるものと推測される。Brunnerら¹²⁾は，実験データによって，ここでいう組成の緩和について論証している。このような見方によれば，3.(2)(A)においてすでに言及したことであるが，表6における最適条件によるアルカリ処理抽出物での結果(表4の過酢酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)に関するデータの再掲)と表4における低温条件による過酢酸酸化生成物(アルカリ処理抽出物)での結果との微妙な相違に関しても，解釈することができる。すなわち，チロシン，フェニルアラニン，グリシンといったアミノ酸残基が豊富であり，逆にグルタミン酸，リシンといったアミノ酸

残基が少ないタンパク質成分が酸化処理時に溶出することにより、後で回収される主生成物であるところのアルカリ処理抽出物においては、チロシン、フェニルアラニン、グリシンについては含量が低減し、グルタミン酸、リシンについては含量が高くなるといった説明が可能である。しかしながら、これまで述べたようなタンパク質の溶出に伴う組成の変動だけでなく、酸化の影響を受けやすいとされるチロシン、フェニルアラニンの酸化分解もやはり起こっているものと推測される。

4. おわりに

著者は、羊毛繊維からケラチンタンパク質をより簡便かつ安価な方法で最も効率的に、しかもできるだけ元の状態を保持したまま抽出することを目標とした。そこで、過酢酸酸化による最適抽出条件を求め、それによって得られたタンパク質に対して分子サイズならびにアミノ酸組成に関する評価を行った。その結果、酸化の影響がチロシン含量の低減等で若干みられるものの、著者の実用的な抽出法によれば、その抽出タンパク質に顕著な劣化は認められないことがわかった。

参 考 文 献

- 1) 高分子学会高分子実験学編集委員会編, 天然高分子, 東京, 共立出版, 1984, p.127-141. (高分子実験学, Vol.8)
- 2) Bradbury, J.H. Adv. Protein Chem. Vol.27, p.111-211 (1973)
- 3) 野澤繁夫, 上甲恭平. 大阪府立産業技術総合研究所報告技術資料, No.2, p.101-106 (1992)
- 4) O'Donnell, I.J. and Thompson, E.O.P. Aust. J. Biol. Sci. Vol.12, p.294 (1959)
- 5) 泉 美治, 小川雅彌, 加藤俊二, 塩川二郎, 芝 哲夫監修, 機器分析のてびき, 増補改訂版, 京都, 化学同人, 1987, p.41-42. (第2集)
- 6) Fraser, R.D.B. and MacRae, T.P. Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides. New York and London, Academic Press, 1973, p.469.
- 7) O'Donnell, I.J. and Woods, E.F. J. Polymer Sci. Vol.21, p.397-410 (1956)
- 8) Haylett, T., Joubert, F.J., Swart, L.S. and Louw, D.F. Text. Res. J. Vol.33, p.639-649 (1963)
- 9) Alexander, P. and Hudson, R.F. Wool: Its Chemistry and Physics. London, Chapman and Hall, 1954.
- 10) Gillespie, J.M., O'Donnell, I.J., Thompson, E.O.P. and Woods, E.F. J. Textile Inst. Vol.51, p.T703-T716 (1960)
- 11) Corfield, M.C., Robson, A. and Skinner, B. Biochem. J. Vol.68, p.348-352 (1958)
- 12) Brunner, H., Brunner, A. and Gerendás, J. Appl. Polym. Symp. No.18, p.55-64 (1971)