

絹フィブロインの酸化剤による崩壊に関する研究

古 賀 克 也

Studies on the Degradation of Fibroin with the Oxidizing Agents

Katsuya KOGA

(Laboratory of Sericultural Chemistry)

目 次

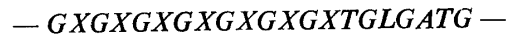
第1章 緒 言.....	2頁	第4節 酸化フィブロイン溶液の光散乱	
第2章 絹フィブロイン水溶液の過マンガン酸加里による酸化.....	6	第5節 酸化フィブロイン溶液の電気泳動	
第1節 過マンガン酸加里溶液滴加時のフィブロイン水溶液の性状		第6節 小 括	
第2節 Mn-fibroin complex 溶液の光散乱		第6章 異種酸化剤で処理されたフィブロインの N-末端基量.....	39
第3節 小 括		第1節 光電比色法による酸化フィブロインの N-末端基定量	
第3章 絹フィブロイン繊維の過マンガン酸加里溶液による酸化.....	11	(i) 2,4-dinitrofluorobenzene の合成	
第1節 フィブロイン繊維の過マンガン酸加里消費量および重量変化		(ii) DNP-glycine の吸収曲線およびその濃度と吸光度との関係	
第2節 酸化着色繊維に対する過酸化水素および修酸の作用		(iii) DNP フィブロインおよび DNP 酸化フィブロインの加水分解, エーテル抽出後の吸収スペクトル	
第3節 酸化脱色繊維の強力および伸度		第2節 過マンガン酸加里酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化	
第4節 全窒素, チロシンおよびヒドロキシアミノ酸含量の変化		第3節 次亜塩素酸塩酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化	
第5節 酸化フィブロイン溶液の粘度および粒子軸比		第4節 過酸化水素酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化	
第6節 酸化フィブロイン溶液の光散乱		第5節 酸化フィブロインの O-DNP-tyrosine 量の変化	
第7節 酸化フィブロイン溶液の電気泳動		第6節 小 括	
第8節 小 括		第7章 酸化フィブロインの Cu-En 溶液への不溶解化原因の検討.....	50
第4章 絹フィブロイン繊維の次亜塩素酸カルシウム溶液による酸化.....	22	第1節 酸化フィブロインの Cu-En 溶液への不溶解化原因に対する従来の考え	
第1節 フィブロイン繊維の次亜塩素酸カルシウム消費量および重量変化		第2節 ドーパの酸化抵抗性および酸化フィブロイン中における検索	
第2節 酸化フィブロイン繊維の強力および伸度		第3節 酸化フィブロイン溶液の紫外吸収スペクトル	
第3節 全窒素, チロシンおよびヒドロキシアミノ酸含量の変化		第4節 フィブロイン酸化時の溶液の性質	
第4節 酸化フィブロイン溶液の粘度および粒子軸比		第5節 フォルマル化フィブロインおよび酸化フィブロインの溶解性の変化	
第5節 酸化フィブロイン溶液の光散乱		第6節 酸化フィブロインのメチレンブルー吸収および pH 滴定曲線	
第6節 酸化フィブロイン溶液の電気泳動		第7節 Millon-Lugg 改良法と Br 吸収法とから求めた酸化フィブロインのチロシン含量の比較	
第7節 小 括		第8節 小 括	
第5章 絹フィブロイン繊維の過酸化水素溶液による酸化.....	31	第8章 稀酸, 稀アルカリによる微細構造の溶出速度の解析.....	66
第1節 酸化フィブロイン繊維の強力および伸度			
第2節 フィブロイン繊維の過酸化水素消費量, 全窒素, チロシンおよびヒドロキシアミノ酸含量の変化			
第3節 酸化フィブロイン溶液の粘度および粒子軸比			

第1節 稀酸による酸化フィブロインの溶出速度	第3節 小 括	
第2節 稀アルカリによる酸化フィブロインの溶出速度	第9章 綜 合 考 察	76
	第10章 総 括	86

第1章 緒 言

線状蛋白質である絹フィブロイン繊維の脆化には加水分解崩壊と酸化分解崩壊とがあるがこれらの崩壊様式、生成物を研究することは蛋白質構造研究の一足場ともなるものである。蛋白質の複雑な構造および性質のため一般にその酸化分解を系統的に取扱つた研究は加水分解を取扱つたものに比し遙かに少い。

フィブロインは古典的な意味で精製が簡単で多量に入手できるので古くから蛋白質の研究試料として用いられている。フィブロイン繊維の微細構造として結晶領域が存在することが HERZOG & JANKE¹⁾により明らかにされ BRILL²⁾はこの結晶部のX線干渉図を詳細に研究し4個の glycine と alanine 残基を含む結晶単位胞を提唱したがその配列については何等言及しなかつた。その後 MEYER & MARK³⁾⁴⁾は単位胞の大きさを決定し、それは単斜晶系に属しフィブロイン分子の peptide 連鎖群の中4個の glycy-alanine 残基より成るとして立体構造模型を出している。この模型ではすべてのフィブロイン分子鎖が繊維軸の方向に対して同じ向きであるが BRILL⁵⁾ や志村⁶⁾は交互に反対方向の連鎖配列を提案しこれによれば polypeptide 連鎖間の N-H……O=C による水素結合もほとんど完全に飽和されるものとして表わされる。フィブロイン中のアミノ酸配列は週期的であるとの仮説が BERGMANN ら⁷⁾により出されたが MEYER⁸⁾⁹⁾はX線解析による資料に基き次の如き構造説を提唱している。



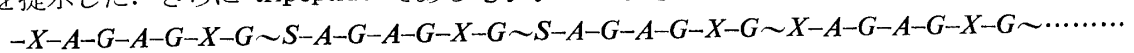
part of lattice, amorphous

G=glycine, X=alanine or serine, or perhaps even glycine,

T=tyrosine, L=lysine, A=arginine

この構造模型とくに結晶部のアミノ酸配列はしばしば成書にも引用され研究者の論争の対象におかれている。村瀬¹⁰⁾は前田¹¹⁾や PHILLIPら¹²⁾が繊維素の結晶領域定量に適用した加水分解法を修正してフィブロイン繊維の稀酸加水分解による結晶、準結晶、非結晶領域の定量法を提唱し中西¹³⁾もこれを支持している。さらに中西¹³⁾は緩慢な条件でのアルカリ加水分解により非結晶領域は分解様式の異なる2成分より成ると述べている。祖父江¹⁴⁾、村瀬¹⁵⁾¹⁶⁾は種々の時間における稀酸加水分解残渣中の tyrosine 含量が原絹中のものと相異なることを見出し、tyrosine は結晶部、非結晶部ともに一様に分布していると推定している。岡本¹⁷⁾¹⁸⁾も本法の妥当性を支持し稀酸加水分解に伴うアミノ酸の溶出状態を調べ結晶部には glycine, alanine とともに tyrosine, valine, leucine なども peptide 連鎖に加わつて存在すると推定している。かつフィブロインは結晶領域を包んで非結晶領域が可成り明瞭な形で包圍しているという見解を述べている。

LEVY 等¹⁹⁾²⁰⁾は KESTON²¹⁾がアミノ酸定量に用いた同位元素誘導体法をペプチド分析に適用し酸部分加水分解物中より alanyl-glycine を glycy-alanine の2倍量および glycy-glycine の微量を検出している。両 peptide 中の alanine と遊離 alanine との和はフィブロイン中の alanine 量に等しいことを見出し、alanine はすべて glycine と結合しているとして $-X-A-G-A-G-X-G-$ なる最小週期単位を提示した。さらに tripeptide である glycy-alanyl-glycine を定量し次の模型を出している。



G=glycine, A=alanine, S=serine, X=amino A. except glycine, alanine and serine

その他 IOFFE²²⁾も部分加水分解物中の peptide を分離し新構造模型を考えた。LUCAS²³⁾も chymotrypsin 消化で生ずる結晶性部分に相当する区分のアミノ酸の比率および部分加水分解研究より—G—A—G—A—G—[—S—G—(A—G)_n]₈—S—G—A—A—G—T—………, T=tyrosine なる配列様式を提示している。

かように加水分解崩壊研究はアミノ酸の配列あるいは結晶部におけるアミノ酸の組成を直接目的としたものが多い。佐々木ら²⁴⁾²⁵⁾はフィブロインの稀酸, 稀アルカリによる崩壊機構について溶出状態を速度論的に研究し, フィブロインは結晶部, 中間部, 無定形部とも言う部分に分けられるが溶出反応の主要な支配因子は究極的には peptide 結合に対するイオンの接触の難易であるから X線解析による量とは同一視することは困難だとしている。種々の peptide 結合の加水分解に対する反応速度論的研究²⁶⁾からもこのことは肯定できる。従つて少量のアミノ酸の存在の有無を MEYER の X線の結晶部へ導入することは必ずしも妥当でない。事実 X線的に得られる結晶部の量より他の研究者および著者が稀酸加水分解法で求めた結晶部の量(本文)は多い。X線の結晶性部分を微視的結晶領域とすれば化学的に対象としている部分は巨視的結晶領域とでも言えるという見解²⁷⁾はフィブロインの崩壊機構研究上も極めて有用である。以上の加水分解崩壊のほか酸化分解の面からも直接構造問題を取扱つたものがある。

Goldschmidt ら²³⁾²⁹⁾は次亜臭素酸々化のさいの酸化剤の消費量曲線型からフィブロインは少くとも2つの組成成分より成りこの組成成分は異つた酸化速度で崩壊されると考えた。次いで酸化崩壊物のアミノ酸組成が alanine と glycine のみから成りその組成比が約 3:1 あるいは 2:1 という結果を得た。これはフィブロイン中における割合とは著しく異なるが彼等はその崩壊物が天然絹と同じ複屈折および X線図を示すので結晶部は alanine と glycine より成ると述べている。赤堀ら³⁰⁾は硫酸鉄を触媒とし 10% H₂O₂ でフィブロインを酸化しその不溶解の酸化崩壊粉末(約 35% 収量)のアミノ酸組成および X線干渉図から結晶部に関しては Goldschmidt と同じような推定をなしている。その後成田³¹⁾は前報の結果を基礎として結晶部分を考え, フィブロインの過酸化水素酸化崩壊物を濃塩酸で部分加水分解し glycyL-alanine, alanyl-glycine の他に少量ではあるが glycyL-glycine および alanyl-alanine を検出し結晶部は Meyer 説の如く glycine および alanine (または serine) の交互配列のみではなく一部, glycyL-glycine および alanyl-alanine の如き結合状態も存在すると主張している。これらは共に過度に酸化した試料であり, たとえ tyrosine 残基の如き易酸化性のアミノ酸が結晶領域に存在していたとしても崩壊物中には当然検出されてこない。従つて結晶領域中に易酸化性の tyrosine などが含まれないと速断することはできないとの異論がある。¹⁷⁾³²⁾また成田³³⁾は COLEMAN ら³⁴⁾³⁵⁾の方法によつて得られる水溶性フィブロインは少くとも電気泳動的に 2 成分より成り, しかも水溶性に変える場合に加水分解が起らないことを確かめこの 2 成分はフィブロイン分子内でそれぞれ別個の peptide 連鎖として存在すると述べた。フィブロイン水溶液に rivanol を添加することにより分別した silk fibrin と silk plastin との研究からも再び上述の点を主張している。³⁶⁾しかし本研究に用いている試料はそもそもの基本的なフィブロイン調製条件が過激なため分解しており,³⁷⁾³⁸⁾緩和な調製ではフィブロインは単一であること³⁹⁾を著者も認めている。(本文)

これらの酸化崩壊研究では極度に酸化し原蛋白質とは遙かに異隔した分解物を取扱い直接結晶部へのアミノ酸の関与およびアミノ酸配列を目的としている。酸化剤処理によるフィブロイン繊維の色調および形態変化を取扱つたものとしては例えば中島⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾は過マンガン酸加里, ハロゲン酸素酸等を用いて酸化した場合のフィブロイン繊維の色調および形態変化を詳細に記述しており, 奥⁴⁴⁾はクロム酸酸化による tyrosine 含量の変化と繊維分裂切断の顕微鏡的な様相を調べフィブロイン分子の脆弱点是非晶質の tyrosine 残基部にあると述べている。村瀬³²⁾は過酸化水素, 過マンガン酸加里,

次亜臭素酸で処理したフィブロイン繊維の **tyrosine** 含量と塩縮との関係を調べ、何れの場合にも酸化度の進行と共に **tyrosine** は減少し、それと平行的に繊維の塩縮も抑制されることを認めている。その結果塩縮は **tyrosine** の作用による¹⁵⁾ことを再確認している。そのさい前述の赤堀³⁰⁾とほぼ同量(36%収量)の過酸化水素酸化崩壊物中になお4%程度の **tyrosine** の存在を認め、この点からも赤堀らの主張を疑問視している。

Alexander & Gough⁴⁵⁾によれば羊毛ケラチン中の **tyrosine** 残基は酸化剤に対する抵抗性の差異から2種の **group** に分けられ、フィブロイン中の **tyrosine** 残基は酸化剤に対し等しく挙動するとされている。しかし彼等は種々の *pH* 値における酸化後の **tyrosine** を定量したのみでありかつ研究の主要対象を羊毛ケラチンにおいている。CADWALLADER & SMITH⁴⁶⁾はフィブロインを種々の条件で亜硝酸、次亜塩素酸塩および紫外線照射処理を行い、その場合の着色変化および **cupriethylene diamine** 溶液への溶解挙動を観察し、酸化条件の如何によつては不溶解化する現象を見出し詳細に報告している。酸化フィブロインについては何等の分析研究を行つていないが、上記定性的実験の観察と他の研究者により示されているアミノ酸単独の酸化機構とを関連させて不溶解化原因を新しい共有結合による **cross-linkage** 形成に基くものと想像している。しかしこの想像は実験的根拠を基盤とせずフィブロイン分子の酸化崩壊をアミノ酸分解から類推しており仮定的領域を脱していない。また EARLAND & STELL⁴⁷⁾は酸化されたフィブロイン溶液の粘度から主鎖切断を決定しようと考え、次亜塩素酸塩、過マンガン酸加里、過酢酸および沃度でフィブロインを酸化したところ過酢酸以外のもので処理されたものは程度の差こそあれ、塩化カルシウム—蟻酸溶媒系に不溶解になることを認めた。従つて彼等も主として酸化度の相異による不溶解量と溶解部分の粘度測定を行つたにすぎない。その結果粘度の値からみて一般に溶解している部分は崩壊していると述べている。結論としては酸化剤処理によりフィブロインが不溶解化することが認められ、その原因は **tyrosine** 残基のベンゼン核における酸化あるいは置換によるだろうと推定している。

著者らはフィブロインの主要構成アミノ酸6種類および類似構造物質6種類を選定し過マンガン酸加里による酸化速度の序列を決定した。⁴⁸⁾ その結果フィブロインの過激な酸化の場合にはアミノ酸残基の酸化速度の差異に起因し酸化剤溶液中に色々な中間生成物の溶出が考えられるので、その検索を行い遊離の修酸および若干の **peptide fraction** を分離した。⁴⁹⁾ その中に比較的酸度の高い **peptide** の存在を認め、これは SANGER⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾ が **insulin** の酸化により得た酸性 **peptide** とは酸度の異なる構造が全く異なり、主鎖末端に **amide** 結合をして位置する修酸残基によることを見出した。かように両端に **-COOH** 基を有する **peptide** の生成は全く新しい発見であり、その構造は次の如きものであることを確認しこれに “**oxalyl peptide**” と命名した。⁵³⁾



かような酸化中間物質の生成はフィブロイン分子主鎖の切断に対し新しい考え方を示唆するものである。以上の如く酸化剤処理によるフィブロインの崩壊研究は極めて断片的なものが多い。

SITCH & SMITH⁵⁴⁾はフィブロインに対する過酢酸および過酸化水素の作用を主鎖および側鎖切断の面から研究した。これらの酸化剤による崩壊程度はフィブロインの **cupri-ethylene diamine** 溶液の流動性⁵⁵⁾および重量変化から評価している。過酢酸酸化のものは過酸化水素酸化のものに比し、一定の流動性増加に対応する重量損失が相当少ないことを認めフィブロイン主鎖に対しては過酢酸は一般的に作用し、過酸化水素は主鎖の末端近くに特異的に作用し短鎖長の溶出物質を生ずると推定している。過酢酸酸化フィブロインは **methylene blue** 吸収法によれば過酸化水素酸化のものより酸性基

の形成が多く、さらに **methylene blue** 吸収率増加は **tyrosine** 含量の低下に対し直線関係であることを認め **tyrosine** 側鎖は酸化されて酸性基になるだろうと述べている。彼等が用いた酸化剤はたまたまフィブロインを溶媒に不溶解化しないものである。また一般合成高分子と同一概念からフィブロイン溶液の流動性増加を主鎖切断によるものとしているが必ずしもかように速断されるものではない。酸化作用の如く側鎖変化をもたらす場合はむしろ分子連鎖間の相互作用により、主鎖切断が惹起されなくても流動性増加をきたす可能性は大きい。主鎖切断の論議は直接、末端基定量あるいは分子量測定の結果に俟たねばならない。酸化剤による崩壊研究に対する一方フィブロインの光酸化については実用的必要性からも **DOORE**,⁵⁶⁾ **EGERTON**⁵⁷⁾ を始め多くの研究がなされている。

西⁵⁸⁾⁵⁹⁾はフィブロインを紫外線照射し水分の多いことは繊維の強力低下を著しくし粘度低下および溶解度上昇におよぼす影響は少いと述べている。とくに湿潤照射の場合照射初期では粘度の僅少の増加あるいは長時間照射に比し低下度の小なることから、光照射を受けて活性基の増加を来し僅かながらフィブロイン分子の **aggregation** が起つていると推定している。本研究では粘度測定の場合のフィブロインの塩化亜鉛溶液中での安定性の検討、濃度の厳密な測定が行われてなく、また落下速度表示であり前述の推定は妥当でないように考えられる。線状蛋白質の場合は **aggregation** が起ればその分子型から考えてむしろ粘度は相当低下すべきであり前述の推定は極めて論拠が弱い。

中西⁶⁰⁾は日光曝露によるフィブロインの崩壊を強伸度、微細構造変化、溶解量、染着量および **tyrosine**、ヒドロキシアミノ酸含量測定的面から水素結合の切断、**tyrosine** の酸化に続いて非結晶領域の崩壊さらに結晶格子の崩壊が起つて強伸度の低下が起ると推定している。

また脆化に伴い **tyrosine** 量は減少しヒドロキシアミノ酸量は変化がないので酸化分解と共に湿気存在のため加水分解も惹起されると述べている。また光照射によるフィブロインの黄褐変等の変質の主因としては従来の研究者間のほぼ一致した見解は **tyrosine** 残基の酸化によるとなつておりその防止には **tyrosine** の活性基封塞が有効と考えられている。

RUTHERFORD⁶¹⁾ は **tyrosine** の OH 基の **methyl** 化を **ABDERHALDEN & BROCKMAN**⁶²⁾ は **acetyl** 化を村瀬,⁶³⁾ 奥⁶⁴⁾ は **formaldehyde** 処理を行い強化改善を試みている。岡本はこれらの方法は満足な結果を得たものでなく研究段階の域を出ていないのでその原因はなお再検討の余地があるとして黄褐変機構の研究を詳細に行つている。⁶⁵⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾

その結果 **tyrosine** と黄褐変並びに照射 **tyrosine** と **Ehrlich** 反応との間には特別な相関関係を認めず中条の **tyrosine**→**indol** 化合物→有色物質の経路⁶⁹⁾は考え難いとしている。遊離 **tryptophan** は微量でも **tyrosine** に比し迅速かつ顕著に黄褐変することや **Ehrlich** 反応陽性物質を生成することを認め黄褐変の主因は **tryptophan** であると推定している。

さらにフィブロインの部分加水分解物中より分離した **peptide** 区分の光照射を行い **tyrosine** を含むだけでは黄褐変の原因にならないことを確め、また黄変因子は **tryptophan** であり褐変因子は **tyrosine** と酸性アミノ酸または塩基性アミノ酸の共存によるものと推定している。

脆化機構については末端アミノ酸の定性定量、染料吸着および滴定曲線の変化の面から、中西⁶⁰⁾とは逆に光による **peptide** 結合の切断は起らないと述べている。⁷⁰⁾ **MITCHELL & RIDEAL**⁷¹⁾⁷²⁾ **CARPENTER**⁷³⁾ の光照射による **peptide** 結合開裂の証明は **250 mμ** 以下の波長の紫外線の場合であり、太陽光線 (**280 mμ** 以上) の場合は妥当でない論述している。さらに稀酸加水分解法による結晶領域が照射時間に伴い減少するので光エネルギーにより水素結合が開裂し結晶領域→準結晶領域→非結晶領域への変化が起ると考えている。

以上縷述した研究を通覧すると光酸化の面ではフィブロインの分子崩壊、微細構造の変化を含めた

系統的研究があるが、酸化剤による崩壊については軽度の酸化あるいは極度の酸化試料につき異つた研究者により断片的に研究されているのみで結果の系統的集約をすることが出来ない。なかならず、ファイブロン繊維の物理的性質変化と有機化学的および溶液論的面からの構造変化、さらにそれらの微細構造変化等との関連性をもつて研究した業績はほとんど見当たらない。従つて著者はかような観点からファイブロンの酸化剤による崩壊研究を行つた。

酸化剤は主として大別すれば過酸化水素系と塩素系のものがあるが著者はその中より任意に代表的なものとして過マンガン酸加里と次亜塩素酸カルシウムおよび過酸化水素を選定した。過酸化水素系である過酸化水素は他の酸化剤と異なり分解後、金属イオンの生成がなく、また繊維の光化学的酸化に対し生成する過酸化水素が一役割を演ずるとする見解⁵⁷⁾もあるため用いた。これらの酸化剤により崩壊度の異なるファイブロンを調製し、そのさいの酸化剤の消費量、液中への溶出物質の検索、液の pH 変化、および酸化ファイブロン繊維の強力、伸度、重量変化、二三のアミノ酸含量、アミノ末端基量、色素吸収量、滴定曲線および臭素吸収量の測定、稀酸、稀アルカリによる微細構造溶出の速度論的解析を行つた。さらに酸化ファイブロン溶液の粘度、光散乱、電気泳動、吸収スペクトル等の溶液状態での挙動面からの構造変化を研究した。

前述した SITCH⁵⁴⁾ の流動性テスト以外には従来溶液論的研究は全然行われていない。それは EARLAND⁴⁷⁾ や CADWALLADER⁴⁶⁾ らのように酸化剤処理によるファイブロンの溶剤への不溶解化現象に直面するからである。しかるに著者は強く攪拌を続けると特殊な状態変化を経て溶解分散する現象を見出し溶液論的研究の可能なことを認めた。著者が行つたファイブロンの酸化崩壊に対する一般分析法と高分子化学的方法による系統的研究は従来行われなかつた分野であり得られた種々の結果は酸化崩壊に対し新知見を与えるものとする。

第 2 章 絹ファイブロン水溶液の過マンガン酸加里による酸化

三平、足立⁷⁴⁾ は 137 種の薬品を用いて色々の繊維に対する影響を調査し過マンガン酸加里液では各繊維中絹糸が最も着色度は大きいと報告し阿久根⁷⁵⁾ は絹の着色度は合成繊維、人絹と著しく異なりこれら繊維との簡易識別法にも利用され得ると述べている。その着色は主として繊維に附着した二酸化マンガンであると考えられている。⁷⁶⁾ 従来の酸化研究はすべて固体状態すなわちファイブロン繊維を試料としたものであるので酸化反応を均一に行わせるため、さらには過マンガン酸加里の還元による生成金属イオンと蛋白質との相互作用を知るため溶液状態での酸化を行つた。

第 1 節 過マンガン酸加里溶液滴加時のファイブロン水溶液の性状

生糸をその無水糸量の 18% に相当するマルセル石鹼、3% に相当する炭酸ソーダおよび 50 倍の水から成る精練浴で逆流冷却器を附し 3 時間煮沸し、その後温水、冷水で充分洗滌後風乾してファイブロン繊維を得た。COLEMAN & HOWITT の方法³⁴⁾³⁵⁾ により本繊維を Cupri-ethylene diamine (12:16) (以下 Cu-En と略す) 溶液に蛋白濃度 10% になるように常温で 3 分間攪拌を続けて溶解させ 1.25N-CH₃COOH で正確に中和し次いで流水透析および蒸留水透析を行いファイブロン水溶液とする。なお Cu-En (12:16) は水酸化第二銅 12g と ethylene diamine 16g を水で溶かし 100 cc とした濃度を表わす。

かようにして得るファイブロン水溶液の濃度はおよそ 1% である。酸化は 0.1 N-KMnO₄ 滴加法によつたがある濃度以上のファイブロン水溶液はゲル化することが認められた。

ゲル化テストに用いるファイブロン水溶液の 1% より高濃度液の調製には透析により得たファイブロン水溶液をセロファン膜に入れたまま吊し扇風機による送風濃縮を行つた。

アラビヤゴムによる脱水濃縮はセロファン膜内壁に部分的濃縮によるフィブロイン膜形成が起り適当でない。フィブロイン水溶液の濃度測定は BRICE PHOENIX DIFFERENTIAL REFRACTOMETER⁷⁷⁾を用い屈折率増加率 (dn/dc) は 0.179⁷⁸⁾($C=g/ml$ として) を使用した。色々の濃度の水溶液 10 cc に 0.1 N-KMnO₄ を数滴、滴加すれば直ちに過マンガン酸加里を消費し第 1 表の如く 2.5 % 溶液迄は褐色化するのみで異常なく 3.3 % 溶液ではゲル化した。およそ 3 % 程度が安定限界のように思われる。

Table 1. The stability of the fibroin aqueous solution at the dropping of 0.1 N-KMnO₄

Concn. of fibroin (%)	1.6	1.8	2.2	2.5	3.3
Gelation	—	—	—	—	+

Several drops of 0.1 N-KMnO₄ were added to 10 cc. of each sample solution drop by drop.

また約 2 % 溶液 60 cc に徐々に滴加すれば 30 cc 加えてもゲル化せず褐色液のままである。しかしながら滴加時のゆるやかな振盪により機械的変性作用が起り微細繊維の析出が認められる。フィブロイン分子構成 アミノ酸の中では tyrosine 残基が最も酸化速度が大であるので³²⁾⁴⁰⁾⁴⁸⁾ tyrosine および同様に還元性基をもつ phenol, glucose, rhamnose 水溶液の過マンガン酸加里滴加時の性状を調べた。0.02 M-tyrosine および phenol 水溶液 5 cc, 1 % glucose および rhamnose 5 cc に 0.1 N-KMnO₄ を 1 乃至 4 cc それぞれ滴加した。さらに fibroin, albumin, polypeptone, gelatin, 溶性澱粉のそれぞれ 1 % 水溶液 5 cc にも同様に滴加して性状を調べた。tyrosine および phenol 水溶液は迅速に過マンガン酸加里を消費し, Mn^{VII}イオンの桃色は消失し第 2 表の如く上澄透明で黒褐色沈澱を生ずる。

glucose, rhamnose も消費速度が遅いのみで同様の性状を示す。fibroin, albumin および polypeptone 水溶液は tyrosine 水溶液と同じく直ちに Mn^{VII}イオンの桃色を消失させて濃褐色の溶液となるが gelatin および溶性澱粉水溶液では Mn^{VII}イオンの消失速度は緩慢である。澱粉の場合はとくに緩慢である。しかし何れも濃褐色溶液となるのみで沈澱を生じない。

Table 2. The quality changes of organic low and high molecules aqueous solutions by the dropping of 0.1 N-KMnO₄

(A)					
Sample solution	Tyrosine		Phenol	Glucose	Rhamnose
Quality	transparent solution, black-brown ppt. production		same the left	same the left	same the left
(B)					
Sample solution	Fibroin	Albumin	Polypeptone	Gelatin	Soluble starch
Quality	black-brown solution, no ppt.	same the left	same the left	same the left	same the left
Quality after 10 days, at 10°C	gelation	invariable	invariable	invariable	invariable

Disappearance velocity of pinkish Mn^{VII} ion when 0.1 N-KMnO₄ was dropped onto the sample solution was the following series;

fibroin, albumin, polypeptone » gelatin > soluble starch.

5 cc. of 1 % solution except for 5 cc. of 0.02 M tyrosine and phenol were taken as sample solution, and then 1 to 4 cc. of 0.1 N-KMnO₄ were dropped onto them.

これらの酸化された褐色の高分子溶液はセロファン膜に入れ水を外液として透析しても外液への有色物質の拡散を認めない。従て還元された Mn^{IV} は高分子と complex を形成していることが確認される。フィブロイン水溶液は常温放置すれば約 10 日間でゲル化するが第 2 表の如く過マンガン酸加里酸化フィブロインも類似の挙動をとる。他の酸化高分子溶液は全く安定である。この現象はフィブロイン分子は過マンガン酸加里の軽酸化により分子主鎖が優先的に開裂して polypeptone 様と

なり Mn-complex を形成しているのではないことを示唆する。成田⁸³⁾はフィブロインを Cu-En に溶解後中和する迄の時間を延ばして得るフィブロイン水溶液は主鎖崩壊を受けたため1ヶ月以上もゲル化しないことを認めている。

過マンガン酸加里溶液を過剰に滴加する場合すなわち酸化度が進行する場合には MnO₂ 様の沈殿が生成するがこれは第2表(A)の性状からフィブロインの tyrosine 残基の phenol 核開裂により生成する低分子あるいはその部位を起点とした主鎖切断のために溶出する短鎖長 peptide 等の酸化によると考えられる。

第2節 Mn-fibroin complex 溶液の光散乱

前節で Mn-fibroin complex の生成を確認したので酸化度の異なる complex 溶液につき光散乱法⁷⁹⁾⁸⁰⁾により平均分子量を測定した。フィブロイン水溶液に種々の量の過マンガン酸加里溶液を滴加し Mn-fibroin complex 溶液を作製したがそのさい著者の既報⁴⁹⁾を参考にして tyrosine 残基が消費する過マンガン酸加里量を算定しその範囲内で滴加量を区分した。1.73% フィブロイン水溶液 60 cc を試料液とした。フィブロインの tyrosine 含量を 11% とすれば溶液中の tyrosine としての量は 115 mg である。0.02 M tyrosine 溶液 5 cc は常温で 0.1 N-KMnO₄ 25 cc を滴定消費するので上記試料液に対しては約 160 cc を要する。しかるに滴定消費値 25 cc の中、最初の 10 乃至 12 cc 迄は Mn^{VII} イオンの消失速度が迅速であり phenol 核酸化の第一段階の反応には 160 cc × 1/2 = 80 cc 程度を要すると推定される。なお透析により溶液の着色は全然減ぜられないし濃厚にすぎれば光の吸収値が高くなり散乱強度の測定も不可能となるので滴加量は 0.1 N-KMnO₄ 10, 20, 30 cc および 0.4N-KMnO₄ 20 cc とした。各 complex 溶液は 0.1 M carbonate buffer (pH=10, μ=0.22) を外液としセロファン膜を使用して3日間透析次いで 5 M-urea per liter-0.1 M-carbonate buffer (pH=10, μ=0.22) を外液とし3日間透析した。その後 Spinco Model-E 超遠心分離機を用い 15.220 r.p.m. 60分を要し除塵後さらに No. 4 硝子フィルターを静かに通し(表面変性をさけるため)光散乱用セルに濾し込む。分子量測定には Brice Phoenix Light Scattering Photometer と Differential Refractometer を用いた。⁸¹⁾ 溶液が着色しているため scattering ratio に対する補正を行つたが吸光係数の求め方および補正係数は BRICE らの報告⁸²⁾を参照した。各 complex 溶液の dn/dc は不明であるため濃度は重量法で決定した。

測定原液の一定量 10 cc~15 cc をセロファン膜中に入れ蒸留水を外液として冷蔵庫に保存し3日置きに外液を更新して約40日間透析する。この処理により尿素および塩類は完全に透析されることを確認した。その後内容液をガラス製時計皿に移し湯煎上で蒸発乾涸後デシケーター中で放冷し秤量した。溶液の溶媒に対する屈折率増加は別に Differential Refractometer で求めこの値と濃度から次式により dn/dc を算出した。

$$n-n_0/dn/dc=C$$

n ; 溶液の屈折率, n_0 ; 溶媒の屈折率, dn/dc ; 屈折率増加率, C ; 濃度 (%)

各 complex 溶液の dn/dc は第3表の通りである。

分子量算出は次式によつた。

$$\frac{HC}{\tau} = \frac{1}{M} \quad H = \frac{32 \pi^3 n_0^2}{3 N \lambda^4} \left(\frac{n-n_0}{C} \right)^2$$

M ; 分子量, n, n_0 ; 前記の通り, λ ; 光源波長, N ; Avogadro 数,

π ; 円周率, C ; 濃度 (g/ml) τ ; 濁り度 (turbidity)

各試料溶液について種々の稀釈濃度で光散乱強度を測定し得られた HC/τ 値を濃度に対しプロッ

Table 3. Refractive index increment of Mn-fibroin complex solution

Complex soln.	A	B	C	D	E
dn/dc	0.179	0.174	0.1706	0.168	0.1412

A: untreated fibroin.

Preparation of complex solution; 10, 20 and 30 cc. of 0.1 N-KMnO₄ were respectively added to each 60 cc. of 1.73 % fibroin aq. solution (sign; B, C and D), 20 cc. of 0.4 N-KMnO₄ added to same fibroin aq. solution (E). Each solution was dialyzed against 5 M-Urea per liter of 0.1 M. carbonate buffer (pH; 10, μ ; 0.22), centrifuged 15220 r.p.m. for 60 mins and dn/dc was measured.

トすると第1図および第2図の如き光散乱曲線を得る。図より $(HC/\tau)_{c \rightarrow 0}$ 値を求め平均分子量を算出すると第4表の如き結果が得られる。

無処理フィブロインの平均分子量は 41×10^4 であるのに対し 0.1 N-KMnO₄ を 10 cc 滴加して酸化したものは 17×10^5 となり軽度の酸化で著しい増大を示す。それ以上の滴加量の増加すなわち酸化度の進行に伴う分子量の増加度は小さい。このことは tyrosine 残基の酸化に基づく Mn-fibroin complex 形成を意味する。林⁸³⁾⁸⁴⁾⁸⁵⁾ 86)はフィブロインの粒子量は外圍条件により変化することを認め分子の会合-解離系を明かにしている。それによればフィブロインは pH=9.0~11.0 では2分子会合体として挙動し 5 mol urea per liter 0.1 mol carbonate (pH=10) で

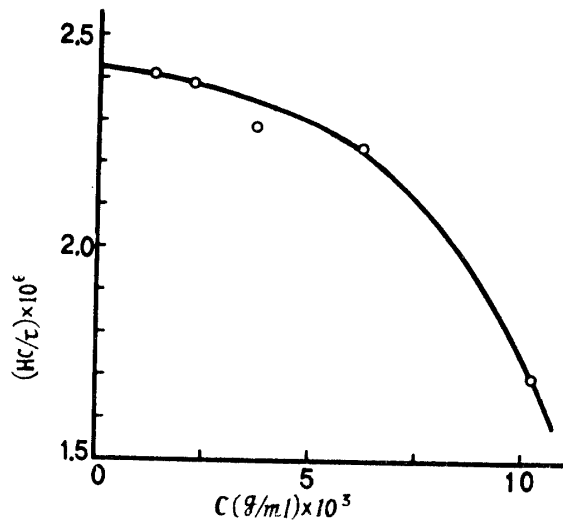


Fig. 1. The relation between light scattering intensity and concentration of untreated fibroin in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer (pH=10.0 μ =0.22)

Table 4. Average molecular weight of Mn-fibroin complex determined by light scattering

Sample	Solvent	$(HC/\tau)_{c \rightarrow 0} \cdot 10^{-7}$	M.W.
Fibroin (A)	5 M. urea/l-carbonate	24.2	41×10^4
Mn-fibroin complex-B	" "	5.9	170×10^4
" " C	" "	5.0	200×10^4
" " D	" "	4.8	210×10^4
" " E	" "	4.0	250×10^4

Complex represented by each sign is same as Table 3.

は単位分子 (M.W.= 12×10^4 あるいは 13×10^4) となる。従つて著者は粒子量測定にはすべてこの溶媒を用いた。その後多価イオンを含む緩衝液中での測定結果から最小分子量は 6×10^4 に訂正された⁸⁷⁾が著者の研究では最小分子量値を目的とせず酸化による分子量変化を相対的に調べるので差支えない。なおフィブロインの調製法および溶解法により分子量は変化し表面活性剤を用いた精練の場合には活性剤分子が結合吸着されて残存し分子量は大きくなる。⁸⁷⁾ 従つて無処理フィブロインの粒子量が大きく現われているのは石鹼分子の一部が結合吸着されているためと見做される。

金属と蛋白質との complex については種々の報告があるが Cu^{II} や Fe^{III} の如き酸化還元電位の高い金属は蛋白質分子中の SH 基を酸化し, complex を形成する傾向がある。⁸⁸⁾ 金属-蛋白質 complex には各々の金属イオンが1個の ligand group と結合する complex と2あるいは3個の ligand group

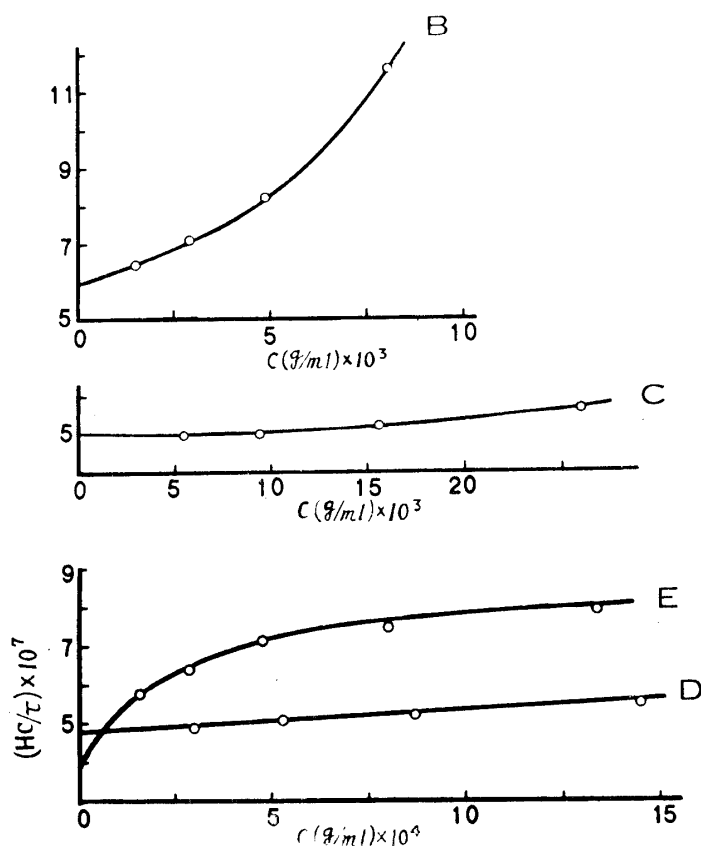


Fig. 2. The relation between light scattering intensity and concentration of Mn-fibroin complex in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$ $\mu=0.22$)
Preparation of each complex solution was mentioned in the marginal notes of Table 3

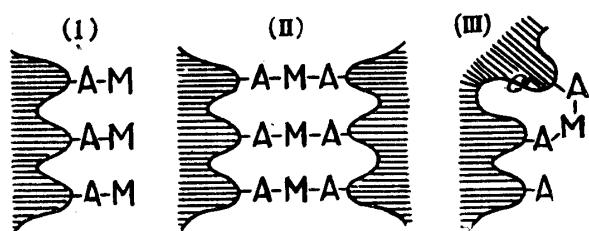


Fig. 3. Diagram showing postulated types of metal-protein complexes
A; Individual group in the protein molecule
M; Metal

と結合する chelating complex とがある。その結合様式は第 3 図の通りである。⁸⁹⁾

0°Cでの血漿 albumin と Zn との complex は (I) 型であり Zn は SH 基と反応する。⁹⁰⁾ HUGHES は 2 分子の血漿 albumin と Hg 1 原子の dimer を見出し 1 モル当り 1 個の SH 基をもつ albumin を得て mercapt albumin と命名している。⁹¹⁾ この Hg-血漿 albumin の dimer は (II) 型に属し血液 plasma 中の $(Fe^{III})_2$ -transferrin は (III)

型に属する。⁹²⁾⁹³⁾ (II) 型の chelating complex の場合は側鎖 A が活性に富めば三次元 aggregation を生じうる。⁸⁹⁾ また金属が存在すると有機低分子と蛋白質との結合が容易になり⁹³⁾かような結合の橋渡しとして有効に働らく金属は Hg, Cu, Ag, Ni, Co, Mn がある。⁹⁴⁾ フィブロイン水溶液に稀薄過マンガン酸加里溶液を滴加してえられる Mn-fibroin complex は無処理フィブロインに比し分子量の著しい増大を示すので明らかに (II) 型の chelating complex でありしかも分子量の増大傾向より三次元 aggregation を生じていることを認める。蛋白質の金属 complex 確認には吸収スペクトル測定,⁹⁵⁾⁹⁶⁾ pH 滴定曲線作製⁹⁷⁾⁹⁸⁾ が利用されているが著者が得た結果によれば (II) 型 chelating complex の生成確認には光散乱法が極めて有利なことが認められた。

第3節 小 括

(1) 還元性基を有する tyrosine, phenol, glucose, rhamnose 等の有機低分子と fibroin, albumin, polypeptone, gelatin および可溶性澱粉等の高分子水溶液に稀薄過マンガン酸加里を滴加して性状を調べた。tyrosine および phenol は迅速に酸化され上澄透明となり黒褐色沈澱 (MnO_2) を生成する。glucose および rhamnose は上記二者に比し酸化速度は遅いが同様の性状を示す。

fibroin, albumin および polypeptone 水溶液は tyrosine 水溶液と同様に迅速に酸化されるが沈澱を生成せず4価マンガンを基く黒褐色溶液に変わる。tyrosine を含まない gelatin および可溶性澱粉水溶液は酸化速度が遅いのみで漸次黒褐色溶液に変わる。これらの溶液は透析を行つても外液への有色物質の拡散を認めない。以上のことから tyrosine 残基部を起点とする Mn-fibroin complex の生成を確認した。さらにゲル化テストからフィブロインは主鎖開裂して polypeptone 様となり Mn-complex を形成しているのではないことが推定できた。

(2) フィブロイン水溶液に種々の量の稀薄過マンガン酸加里溶液を滴加し酸化度の異なる Mn-fibroin complex 溶液を作製した。光散乱法でこれらの試料の平均分子量を測定したところ無処理フィブロインに比し著しく分子量が増大している。以上のことからフィブロイン水溶液は過マンガン酸加里酸化により、tyrosine 残基を基点とし Mn^{IV} を架橋媒体とする chelating complex を生成することを認めた。

第3章 絹フィブロイン繊維の過マンガン酸加里溶液による酸化

第1節 フィブロイン繊維の過マンガン酸加里消費量および重量変化

14 denier の生糸を検尺器で 400 回宛て巻取り 1 個の試料繊維とする。それを林の精練方法³⁷⁾に準じ 60 倍の水を用いてオートクレーブ中で 1 気圧 1 時間 2 回蒸煮しその後 0.5% Na_2CO_3 40°C で洗滌、さらに充分水洗して風乾する。試料フィブロインの調製は以下全節に亘り同様である。このフィブロイン束糸 (550 mg 前後) を 50 cc の水に充分浸漬し硝子棒で押し気泡を除き次いで良く搾り一定重として 0.1 N- $KMnO_4$ 40 cc 中に投入し常温酸化する。処定時間経過後直ちにガラスフィルター (No. 3) で濾過、一定量の水 50 cc で洗滌する。洗液、濾液を合わせ 20% H_2SO_4 30 cc を加え 70°C に加温後 0.1 N- $(COOH)_2$ で滴定脱色しさらに 0.1 N- $KMnO_4$ で逆滴定して消費量を求める。酸化されたフィブロイン繊維は光沢のある褐色状を呈し酸化前よりも増量する。フィブロイン 1 gm 当りの 0.1 N- $KMnO_4$ 消費量を酸化時間に対しプロットすると第4図の如き消費量曲線を得る。酸化剤の液量を増せば消費量は全体的に多くなるが時間経過による傾向は類似する。

このことはフィブロイン分子中の易酸化性の tyrosine 残基の phenol 核が比較的容易にかつ急激に分解されることを示唆する。

酸化前後の繊維の無水物量の差から重量増加率を求めてその時間経過による変化を図示すれば第5図の如き曲線を得る。図から判る如く消費量曲線と重量増加率曲線は類似型を呈する。フィブロイン繊維の過マンガン酸加里酸化による褐色化は従来、 MnO_2 によるものとされているが⁷⁶⁾第2章の結果から固体状態でも ligand group と Mn との結合が推定されるので酸化繊維を顕微鏡で観察したところ MnO_2 の粉末沈着を認めなかつた。また増量は還元された Mn 量に由来すると考えられるので $KMnO_4$ -消費量値より還元された Mn 量 (mg/g-フィブロイン) を算出し実際の増量値 (mg/g-フィブロイン) と比較するとこの値が遙かに多い。従つて増量と還元された Mn 量の比を求めたところ各酸化時間のものはそれぞれ、ほぼ一定値すなわち平均恒数 1.69 を示した。その詳細を第5表に示している。この結果は Mn 原子が単独では chelating complex 形成に関与していないことを示す。

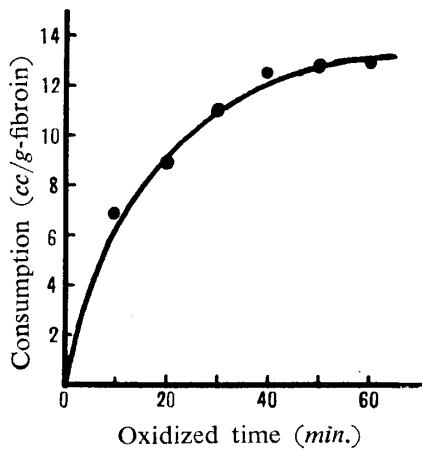


Fig. 4. Variation of 0.1 N-KMnO₄ consumption by fibroin with the oxidized time

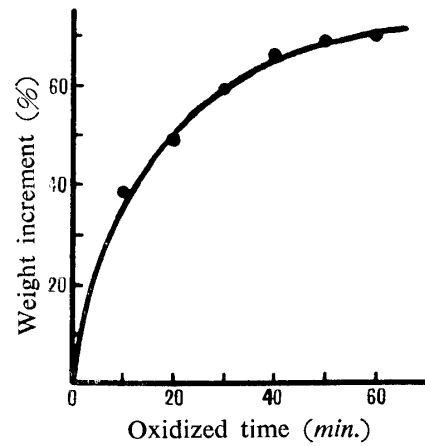
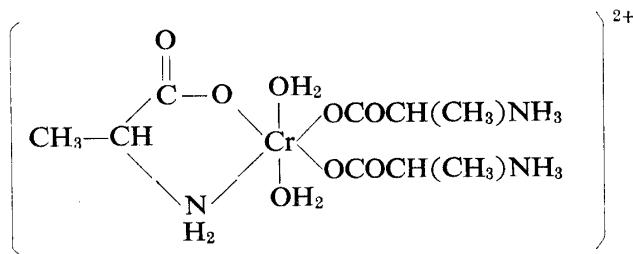


Fig. 5. The relation between weight increment of fibroin and time in 0.1 N-KMnO₄ oxidation

Table 5. Reduced Mn values and weight increment values of fibroin in 0.1 N-KMnO₄ oxidation

Oxid. time (min)	KMnO ₄ consumption (mg/g. fibroin)	Reduced Mn (mg/g. fibroin)	Weight increment (mg/g. fibroin)	Weight increment Reduced Mn
10	121.94	42.39	69.4	1.64
20	153.32	53.29	88.5	1.66
30	188.34	65.47	111.2	1.70
40	209.74	72.91	126.5	1.73
50	218.40	75.92	128.9	1.70
60	220.00	76.47	129.4	1.69
				Average 1.69

通常 complex 形成には Fe は mono oxide の形で関与しても Mn は oxide 型では関与しない. 種々の Mn-oxide と Mn との比を算出しても MnO₂/Mn=1.58, Mn₂O₃/Mn=2.87, Mn₃O₄/Mn=4.17 という値を示し, この値からも oxide 型で関与することは不適當だとみなされる. Green et al⁹⁹⁾ は alanine の Cr^{III} complex は次図の如きものであることを証明している. peptide complex の場合に



は peptide 結合中 C-O の部分の O が金属への配位に関係がありこの場合他の配位基は peptide 結合の直ぐ隣りにあるアミノ基であることが知られている.¹⁰⁰⁾ 酸化剤によるフィブロインの酸化の場合には Sitch⁵⁴⁾ および著者の研究 (第 7 章第 6 節参照) から tyrosine 残基の phenol 核開裂による -COOH 基の新生増加が推定される. 種々の有機錯塩の例を参照し Mn の配位数は 6 価であるので Mn-fibroin chelating complex に第 6 図の如き形を想定した.

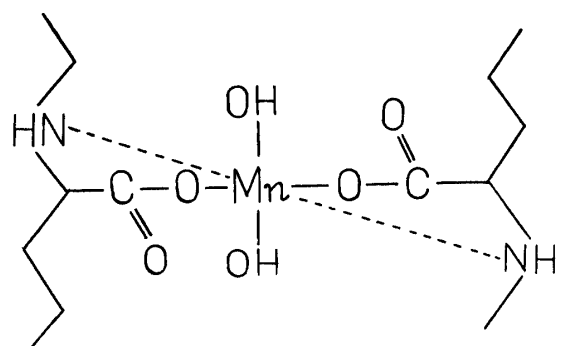


Fig. 6. Diagram postulated as to Mn-fibroin chelating complex

かような想定では Mn の原子価は 4 価であり酸化繊維の褐色化とも合致する。しかも増量がこの型式の cross-linkage によるものとして HO-Mn-OH/Mn の比を算出すると 1.62 となり前記の恒数値 1.69 とほぼ一致する。従つて酸化初期の褐色化は第 6 図の如き Mn-complex 生成によるものと推定できる。酸化により生成される -COOH 基と還元された Mn との間にイオン結合が起り -OH 基は溶媒中より供与されるものと推定できる。さらに Mn と peptide 結合の N 原子あるいはまた側鎖中の N 原子との間に配位結合が起るだろう。ファイブロイン繊維を過マンガン酸加里溶液で酸化するさい肉眼的にも溶液中に MnO₂ の生成を認めるがこれは第 2 章第 1 節でのべた如く phenol 核開裂に伴ない生成する低分子の酸化によるものと推定できる。セルローズや澱粉も酸化により -COOH 基含量を増加することが認められている。¹⁰¹⁾¹⁰²⁾ 大橋ら¹⁰³⁾ は中性過マンガン酸加里を澱粉に作用させると褐色の MnO₂ が生成しそれ以上は酸化剤として作用しないと述べているが前章の澱粉溶液の酸化、ファイブロインの溶液および固体酸化時の Mn-complex 形成から澱粉の固体酸化の場合にも一部 complex 形成が起ると推定される。

第 2 節 酸化着色繊維に対する過酸化水素および修酸の作用

第 1 節で記述した如くファイブロイン束糸(600 mg 前後)を水浸後 0.02 N, 0.04N, および 0.1N-KMnO₄ 溶液 40 cc 中に投入し常温で 20 分間酸化させて Mn-fibroin complex 繊維を得た。そのさいの消費量および着色度は第 6 表の通りである。着色繊維の脱色すなわち脱マンガンは過酸化水素水および修酸で行うことができる。すなわち 3% H₂O₂ 150 cc あるいは 1% (COOH)₂ 70~80 cc 中に数時間浸漬すれば脱色する。この場合 H₂O₂ 水による脱色は発熱反応であり脱色に長時間を要するが修酸による場合は発熱はなく前者に比し割合速かに脱色が行われる。Mn^{IV} の色の脱色された繊維はなお微黄色を呈し、この色調は色々な有機溶媒で処理しても変化なくまた稀塩酸処理でも変化しない。

無処理ファイブロイン繊維は濃塩酸に入れると Liebermann 反応に基づく堇色を呈するが修酸で脱色したものは濃塩酸中に入れると淡褐色を呈する。従つて脱色後の微黄呈色はファイブロイン繊維中における微量の Mn^{IV} の残留によるものではなくアミノ酸残基の酸化改修によるものである。

酸化度を異にした着色繊維および脱マンガン後の繊維の強力、伸度の値を第 6 表に示す。測定は Suter's SERI GRAPH によつた。脆化率は着色繊維の強、伸度を基礎に算出したものである。3%

Table 6. Tensile strength and elongation of both the oxidized brownish fibroin fibre and the decolourized (demanganesed) fibre

KMnO ₄ concn.	Oxidized time	KMnO ₄ consumed (cc./g-fibroin)	Colour of fibre	Brownish fibre	
				Strength (g/d)	Elongation (%)
0.1 N	20 mins.	42.55	Deep brown	1.54	4.5
0.04N	20 "	44.68	Brown	2.55	6.0
0.02N	20 "	49.34	Light brown	3.04	13.5

Decol. fibre with H ₂ O ₂		Degree of weakening(%)		Decol. fibre with oxalic A.		Degree of weakening (%)	
Strength (g/d)	Elongation (%)	Strength	Elongation	Strength (g/d)	Elongation (%)	Strength	Elongation
0.83	0	46.1	100.0	1.40	3.2	9.1	28.9
1.61	0	36.9	100.0	2.45	7.0	3.9	(-)16.7
2.23	7.3	26.6	45.9	3.03	13.5	0.3	0

Brownish fibre was decolourized by soaking with 3% H₂O₂ or 1% oxalic A.

H_2O_2 による脱色は稀薄濃度にも拘らず著しい強力、伸度の脆化をきたす。

フィブロイン繊維はかような稀薄 H_2O_2 水溶液中に 1 昼夜常温浸漬しても全く脆化しないので結合マンガンの存在が触媒効果を示したものである。一方、修酸による脱色繊維の脆化率は著しく小さい。幾分脆化しているのは Mn による架橋結合が除去切断されたためと考えられる。三平ら¹⁰⁴⁾によれば 2% (COOH)₂ で 1~2°C で 30 分処理した富士絹および練羽二重は保存中一部褐変せる箇所あり、その部分は強力が減少していると述べられている。しかし上記の脱色処理による脆化は脱色後充分水洗しているのて修酸自体の作用によるのではないと考えられる。

Table 7. Weight change of the decolourized fibroin fibre after oxidation against the untreated fibre

Oxidized time (min)	10	20	30	40	50	60
Weight change (%)	-1.3	-2.2	-1.6	-2.5	-2.4	-2.0

Oxidant; 0.1 N-KMnO₄. After-treatment; decolourized with 1% oxalic A.

次に 0.1N-KMnO₄ で 10 分乃至 60 分間酸化して 1% (COOH)₂ を用いて脱マンガンした繊維の重量変化を測定したところ第 7 表の如くほとんど変化は認められず短時間酸化すなわち軽酸化ではフィブロイン分子は溶出する程の短鎖長化は起らないことを示している。

第 3 節 酸化脱色繊維の強力および伸度

酸化後強力および伸度を測定する場合には生繭層より得たフィブロイン繊維は処理中に絡交して不適當であり、すべて生糸を精練したものを試料としている。この点は以下各章においても同様である。0.1 N-KMnO₄ で各時間常温酸化したフィブロイン繊維を 1% (COOH)₂ で脱色し水洗後風乾して強力、伸度を測定した。その結果を第 8 表に示す。繊維の強力および伸度の変化は著しく、わずか 10 分間の酸化で無処理強力値 3.48 g/d が 1.40 g/d へと低下し約 60% の脆化率を示しており、伸度は無処理のもの値 22% より 4.5% へと激減し約 80% の脆化率を示している。しかし 20 分間酸化以後のものでは時間経過とともに緩慢な脆化率増加を示す。短時間の酸化では極度の主鎖切断は考え難く上述の結果は分子の配列状態の変化によることを推察させる。

Table 8. Tensile strength and elongation of the oxidized fibroin fibre

Oxidized time (min.)	Strength (g/d)	Elongation (%)	Degree of weakening (%)	
			Strength	Elongation
0	3.48	22.0	0	0
10	1.40	4.5	59.8	79.5
20	1.32	4.2	62.1	80.9
30	1.09	3.3	68.7	85.0
40	0.97	2.8	72.1	87.3
50	0.76	2.7	78.2	87.7
60	0.75	2.5	78.4	88.6

Fibroin fibre was oxidized by 0.1 N-KMnO₄ and demanganed with 1% oxalic A., and then strength and elongation were measured by Suter's SERI GRAPH at R. H. 75%.

第 4 節 全窒素、チロシンおよびヒドロキシアミノ酸含量の変化

過マンガン酸加里溶液で常温酸化後、修酸で脱色し水洗したフィブロインについて全窒素, tyrosine, serine および threonine 含量を求めた。なお、この場合 0.1 N-KMnO₄ 酸化試料は第 3 節で述べた強力および伸度測定後のものを用い、0.01 N-KMnO₄ 酸化試料は平均 3 denier の生繭層を精練し

たものより作製した。生糸より得たフィブロイン試料は若干合糸および撚糸されて織度が大きいため繭層より得た単糸よりも酸化速度はやや緩慢である。生繭層フィブロインを試料とした場合は 1 gm を水浸後硝子棒で圧して搾り一定重量 (4 gm) として 0.01 N-KMnO₄ 200 cc 中に投入酸化した。

窒素定量はケールダール法によつた。

tyrosine 定量は Block & Bolling による Millon-Lugg 改良法¹⁰⁵⁾によつた。serine および threonine の定量は蛋白質の加水分解物を過沃素酸酸化によつて生ずる HCHO および CH₃·CHO を沃素滴定により求める方法によつた。¹⁰⁶⁾ その結果を第 9 表および第 10 表に示す。

Table 9. Total nitrogen content of the oxidized fibroin

Oxidized time (min)	0	10	30	60	120
Total-N (%)	18.9	18.7	18.6	18.8	18.8

Oxidant; 0.1 N-KMnO₄, Sample; Demanganed fibroin after oxidation.

Table 10. Tyrosine, serine and threonine contents of the oxidized fibroin

(i) 0.1 N-KMnO₄-oxidation

Oxid. time (min)	0	10	20	30	40	50	60	90
Tyrosine (%)	11.63	9.16	8.49	8.10	7.82	7.55	7.14	6.80
Degree of diminishing (%)	0	21.24	27.00	30.35	32.76	35.08	38.61	41.53

(ii) 0.01 N-KMnO₄ oxidation

Oxidized time (min)	0	10	30	60	120	240
KMnO ₄ consumed (cc/g-fibroin)	0	83.38	138.2	162.4	200.8	217.0
Tyrosine (%)	10.65	9.56	9.05	8.86	8.41	8.34
Serine (%)	12.82	12.11	12.82	12.65	12.82	12.82
Threonine (%)	1.57	1.47	1.47	1.47	1.60	1.41

Sample; Demanganed fibroin with 1% oxalic A. after oxidation.

tyrosine 含量は酸化に伴ない減少するが全窒素, serine および threonine 含量にはほとんど変化を認めない。全窒素含量に変化を認めないのは主鎖末端あるいは側鎖末端の -NH₂ 基が酸化に対し安定であることを示すのではなく, phenol 核開裂による脱炭酸が優先されるためである。著者らが既に報告している過マンガン酸加里による比較的強酸化条件下の CO₂ および NO₂ の生成量変化でも CO₂ 発生量は mg 単位であるのに対し NO₂ 発生量は r 単位であり,⁴⁹⁾このことは上述の見解を支持するものである。serine および threonine 含量に変化がないのは酸化剤はアルコール性 OH 基よりも phenol 性 OH 基に accessible であることを指示している。tyrosine 含量の酸化時間に伴う減少を図示すれば第 7 図および第 8 図の如き曲線となる。tyrosine 含量は最初の短時間の酸化で比較的多く減少しその後の減少は緩慢である。この減少曲線の形状は第 1 節の KMnO₄ 消費量曲線 (第 4 図) および増量率曲線 (第 5 図) と対称相をなしている。

しかし tyrosine 含量を還元された過マンガン酸加里の量 (cc/g フィブロイン) に対しプロットすれば 0.1 N-KMnO₄ および 0.01 N-KMnO₄ 酸化の何れの場合でも第 9 図および第 10 図の如き直線関係が得られる。従つて過マンガン酸加里による酸化初期の反応は主として tyrosine 残基に起こることが窺知される。0.1 N-KMnO₄, 10 分間酸化のフィブロインの tyrosine 減少率は 21.24% で 60 分

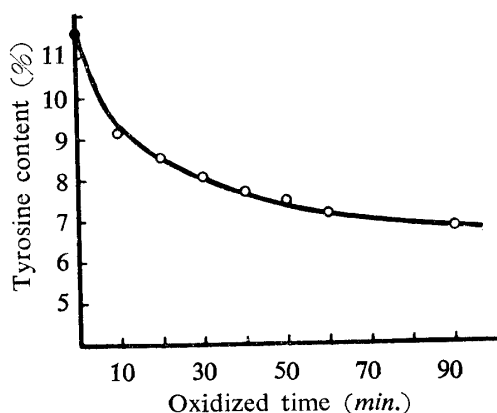


Fig. 7. The relation between tyrosine content of fibroin and time in 0.1 N-KMnO₄ oxidation

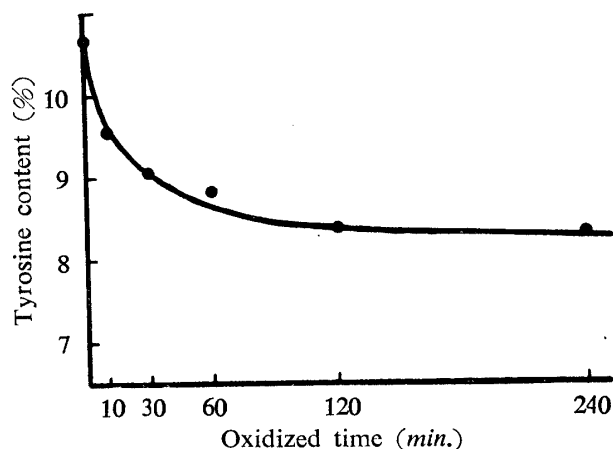


Fig. 8. The relation between tyrosine content of fibroin and time in 0.01 N-KMnO₄ oxidation

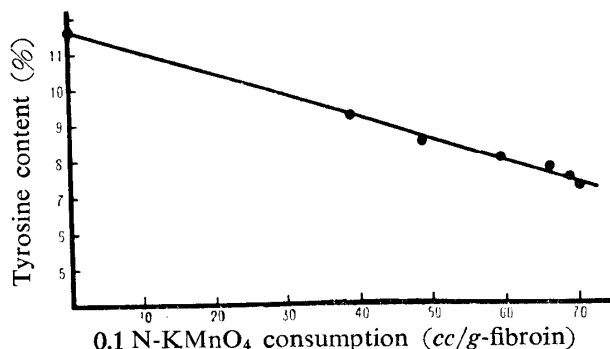


Fig. 9. The relation between tyrosine content of fibroin and oxidant consumption in 0.1 N-KMnO₄ oxidation

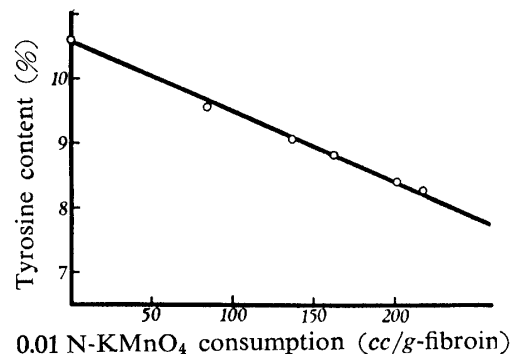


Fig. 10. The relation between tyrosine content of fibroin and oxidant consumption in 0.01 N-KMnO₄ oxidation

間酸化のものでは 38.61% へと約 2 倍近い減少率になるが前節で認められたようにこの場合の強力脆化率は 59.8% から 78.4% へ、伸度脆化率は 79.5% から 88.6% へと増加し tyrosine 量の減少率変化の方が大きい。しかし短時間の酸化では tyrosine 減少率に対して物理的性質の脆化は遙かに大きいことを示している。このことは前節で述べた推察すなわち軽酸化によるフィブロイン分子の配列状態の乱れをより強く裏付けるものである。

第 5 節 酸化フィブロイン溶液の粘度および粒子軸比

酸化フィブロインに対する溶液論的研究は従来ほとんどなされていない。わずかに酸化フィブロインの溶液について粘度測定結果から分子崩壊を考察した SITCH et al⁵⁴⁾と EARLAND et al⁴⁷⁾の報告があるのみである。フィブロイン繊維の溶剤には LiBr, LiSCN, NaBr,¹⁰⁷⁾ Cu-En³⁵⁾ 等があるが SIGNER et al¹⁰³⁾はフィブロインは Cu-En 中では速やかに崩壊してゆき、また精練絹は η_{sp}/C が 0.8 乃至 3.0 の分子を含み高度に polydisperse であるから崩壊せずに精練することはできないと述べている。EARLAND¹⁰⁹⁾は 90% HCOOH に無水 CaCl₂ を 10% になるようにと化した溶液をフィブロインの新溶剤として提唱し、AMBROSE¹¹⁰⁾はジクロル醋酸を推奨している。この両溶剤はともにフィブロインに対する崩壊作用が少ないとされている。その後林⁸⁷⁾はフィブロインの Cu-En への溶解時間、量比および温度等を詳細に区分して光散乱法で分子量変化を調べ溶液論的研究の基本条件を定めている。従つて著者は溶剤としては Cu-En を用いた。0.1 N-KMnO₄ で色々の時間酸化後、脱色したフ

イブロン繊維を Cu-En に溶かす場合は極めて興味ある挙動を呈する。無処理フィブロイン繊維は 1:10 の量比で Cu-En 溶液中に投入し攪拌すれば常温で 3 分間以内に完全に溶解分散するが酸化フィブロインは全く異なる。酸化フィブロインを Cu-En 溶液中に量比 1:20 で投入すると直ちに溶剤を吸収しスポンジ様の膨潤状態となり僅少の時間では全く溶解の徴候を示さない。酸化時間 2 分のもも 60 分のももほとんど同様である。

膨潤状態のものを硝子棒で強く攪拌を続けると漸次 syrup 状となりその後遂には溶解分散する。この間約 25 分乃至 30 分を要す。量比 1:10 ではさらに長時間を要す。従来の研究者は無処理フィブロインと同じ観点から不溶解化現象に直面したため溶液論的研究を行わなかつたようである。SITCH et al⁵⁴⁾ がたまたま用いた過酸化水素および過酢酸の如き酸化剤はフィブロインを Cu-En へ不溶解化しないのである。EARLAND et al⁴⁷⁾ は過マンガン酸加里酸化フィブロインを CaCl₂-HCOOH 溶剤を用い量比 1:200 で 40 分間抽出して僅かに溶解した部分のみの還元粘度を測定しているにすぎない。著者は通常不溶解とみなされている酸化フィブロインを上記の処理方法で溶解分散させ 1.25 N-CH₃COOH で中和後、水次いで 5 mol urea per liter 0.1 mol carbonate buffer (pH=10, μ=0.22) で透析した。透析液は無処理フィブロインと異なり何れも淡褐色を呈する。その後遠心分離次いで濾過した。これを原液として種々の稀釈液を作り Ostwald の粘度計を用いて 30°C の恒温水槽中で還元粘度を測定した。その値を各種濃度に対してプロットすれば粘度曲線が得られる。濃度はここでは容積濃度 φ (ml/ml) を用いた。粘度を表示するには次の如き量が用いられる。

$$\eta_r(\text{相対粘度}) = \frac{d' t'}{d t} \quad \eta_{sp}(\text{比粘度}) = \eta_r - 1$$

$$[\eta](\text{固有粘度}) = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/C) \quad \eta_{sp}/C; \text{還元粘度}$$

$$v(\text{容積分率固有粘度}) = \lim_{\phi \rightarrow 0} (\eta_{sp}/\phi)$$

d', d ; 溶液および溶媒の密度, t', t ; 溶液および溶媒の落下時間

C ; 重量濃度 (g/100 ml), ϕ ; 容積濃度 (ml/ml), $\phi = CV/100$, V ; 偏比容

無処理および各種酸化フィブロイン溶液の粘度曲線を第 11 図および第 12 図に示す。フィブロインの 30°C における偏比容は 0.715 であつた。

POLSON¹¹⁾ は色々な蛋白質の分子量および拡散恒数測定から評価された形態と粘度測定から評価された形態との間には極めて良い一致が存在することを示している。POLSON による粘度と蛋白質の軸比との関係式は $v = 4.0 + 0.098(a/b)^2$ である。 a/b は軸比であり a は長軸, b は短軸を表わす。

第 11 図および第 12 図より v を求めその値より軸比を算出した。各酸化フィブロインの容積分率固有粘度および軸比を第 11 表に示す。酸化剤消費量と軸比との関係は第 13 図のようにほぼ曲線状となる。

すなわち酸化の進行とともに漸次軸比は小さくなり粒子形態が棒状より球状へ変化していることを示している。林ら¹²⁾ はフィブロイン溶液の沈降恒数と分子量から求めた軸比と, 拡散恒数と分子量から求めた軸比は 70 乃至 80 で良く一致するが POLSON 式によるものは 27 で約 1/3 に低下し

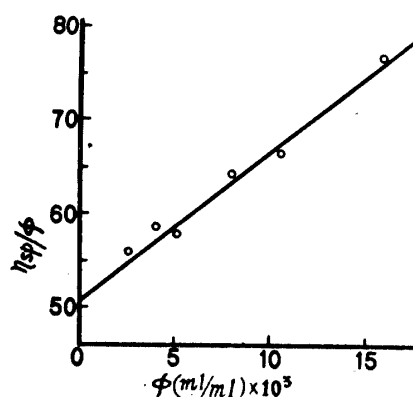


Fig. 11. The relation between viscosity and concentration of untreated fibroin in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer solution (pH=10.0 μ=0.22)

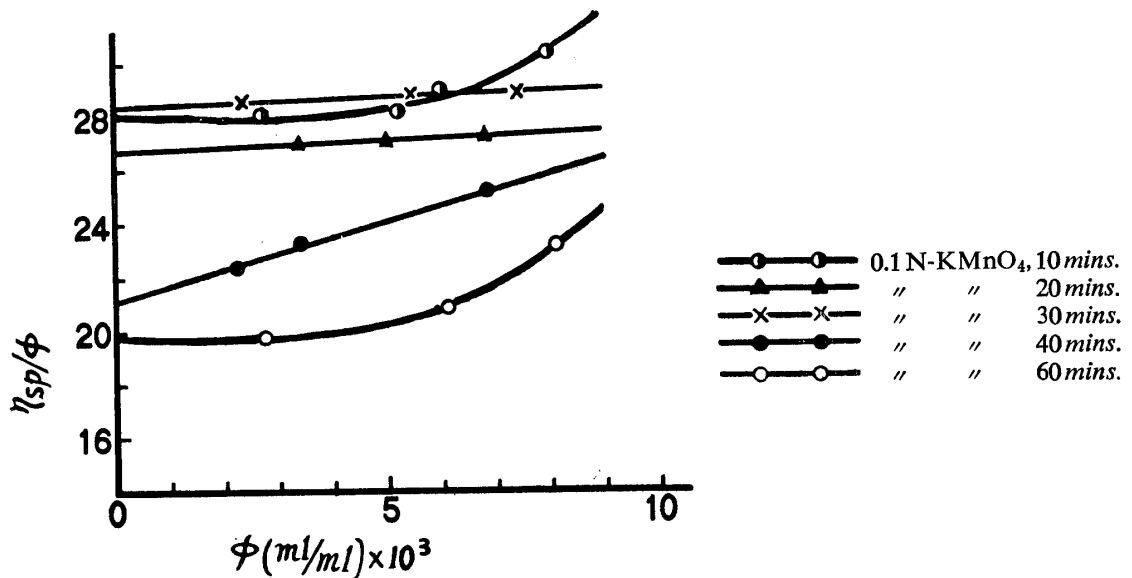


Fig. 12. The relation between viscosity and concentration of the oxidized fibroin in 5 M urea per 0.1 M carbonate buffer solution ($pH=10.0$ $\mu=0.22$)

Table 11. Volume fraction intrinsic viscosity and axis-ratio of the oxidized fibroin (in 0.1 N-KMnO₄ oxidation)

Oxidized time (min)	0	10	20	30	40	60
$\lim_{\phi \rightarrow 0} (\eta_{sp}/\phi)$	50.5	28.0	26.8	28.3	21.4	19.8
Axis-ratio	21.78	15.65	15.25	15.75	13.32	12.70

Demanganised fibroin after oxidation was dissolved in cupriethylene diamine (12-16) solution, dialyzed against the water and 5 M-urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.00$, $\mu=0.22$) and viscosity was measured.

ていると述べている。著者は軸比の絶対値を求めるのを目的とせず軸比変化の傾向を知るため本法を用いている。

第6節 酸化フィブロイン溶液の光散乱

第5節で述べた処理方法で酸化フィブロイン溶液を調製し種々の稀釈濃度における光散乱強度を測定した。Hc/τ の値を各種濃度に対しプロットすれば酸化フィブロイン溶液の光散乱曲線を得ることができる。それを第14図に示す。図より(Hc/τ)_{φ→0} 値を求め平均粒子量を算出しその値を第12表に示す。酸化フィブロインの

平均粒子量は何れも無処理フィブロインより増大しており、とくに短時間酸化のものではその増大が著しい。無処理フィブロインでは 9.5×10^4 の粒子量が 0.1 N-KMnO₄ 10 分間酸化で 33.3×10^4 と増大している。その後酸化度の進行とともに粒子量は漸次小さくなり、40 分間酸化のものでは 15.4×10^4 となる。しかるに 50 分乃至 60 分間酸化のものでは再び増大している。無処理フィブロインでも Cu-En 溶液中で溶解中和までの時間が 6 分以上経過すると加水分解を受けるので酸化フィブロイン

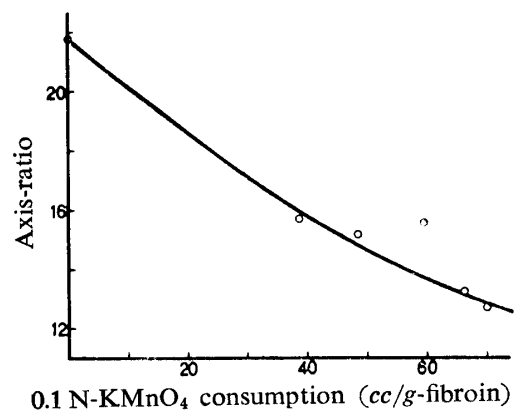


Fig. 13. The relation between the oxidation degree and axis-ratio of fibroin

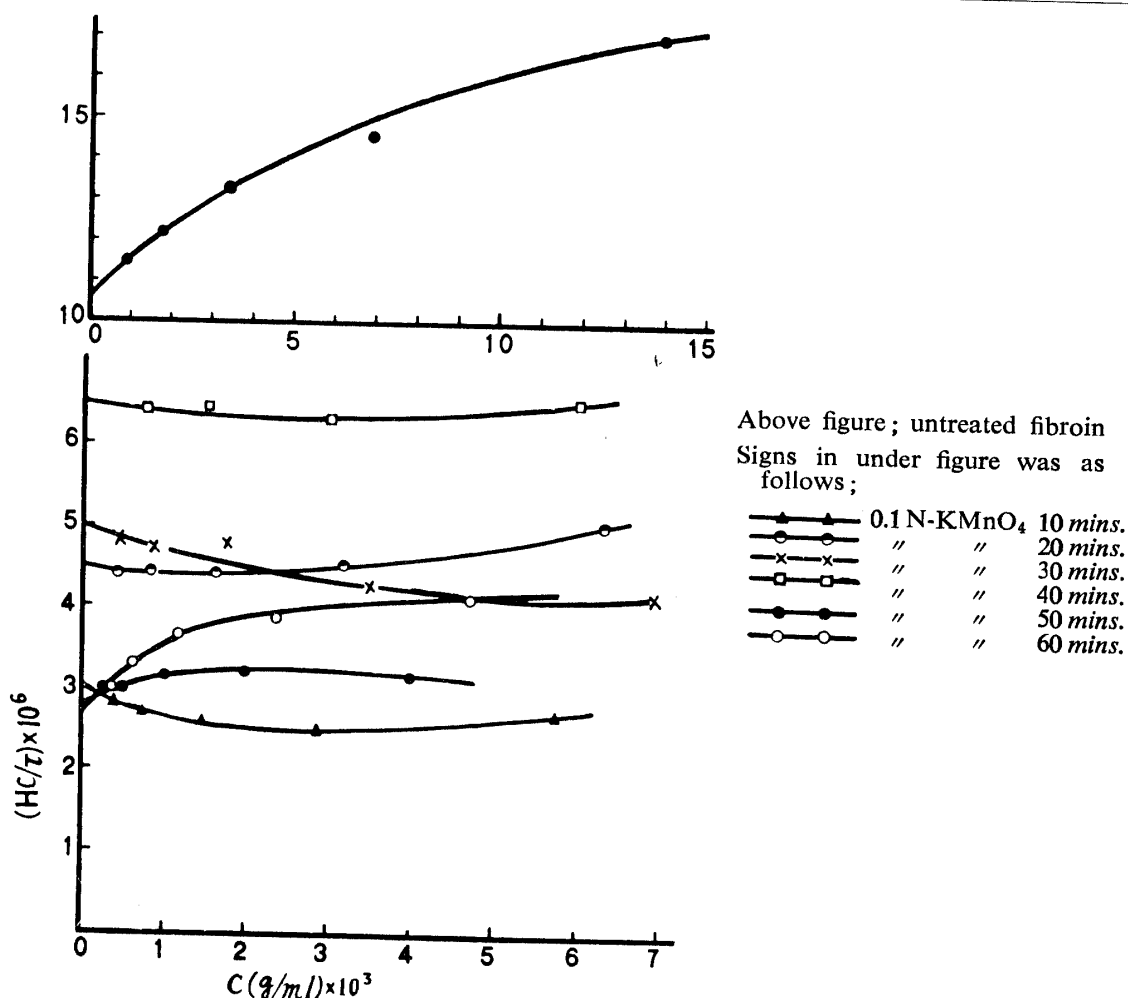


Fig. 14. The relation between light scattering intensity and concentration of untreated and oxidized fibroins in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$ $\mu=0.22$)

Table 12. Average molecular weight of the oxidized fibroin determined by light scattering

Oxidized time (min)	0	10	20	30	40	50	60
$(Hc/\tau)_{c \rightarrow 0} \times 10^{-6}$	10.5	3.0	4.5	5.0	6.5	2.8	2.8
M.W. (10^4)	9.5	33.3	22.2	20.0	15.4	35.7	35.7

Solvent; 5 M-urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$, $\mu=0.22$). Preparation of sample solution was the same as Table 11.

の溶液調製の場合には当然加水分解の惹起が推定される。それにも拘らず分子量の増大が認められることはつまり、フィブロインは過マンガン酸加里酸化により先ず Mn と complex を生成するが Mn が除去されたものには分子連鎖間結合の部分的強化あるいは新しい架橋結合形成が起つていることを示す。SITCH et al⁵⁴⁾は酸化フィブロイン溶液の流動度変化と重量変化より主鎖切断を論じ、EARLANDら⁴⁷⁾は酸化フィブロインの Cu-En に溶解した部分の還元粘度の低下から分子崩壊を考察しているが両者ともに一般高分子の概念から判断しており分子連鎖間の相互作用が粘度に及ぼす影響を考慮していない。酸化作用のごとく活性基に変化を及ぼす作用を受けた蛋白質溶液では粘度測定より得る値は分子形状の推移を知るのみであり直接主鎖の切断問題を論じるのは早計である。

フィブロインが酸化されて分子量の増大を示す事実はこのことを明らかに裏付けている。フィブロ

インは過マンガン酸加里酸化により固有粘度を減少し軸比低下を示すが、これは主鎖切断に基づくよりもむしろ分子の連鎖間結合強化による **aggregation** に基づくものである。粘度は酸化の進行とともに漸次低下しているが分子量は酸化初期急激に増大し、その後漸減しているのは上記見解と矛盾するようにも思われるがこの要因は次の様に考えられる。フィブロインの **tyrosine** 残基は酸化初期に急激に攻撃されるのでそこを基点とする連鎖間結合の部分的強化が起り、**Cu-En** に溶解後も一部の強い結合が残存して **aggregate** として挙動し酸化が進めば一部二次的に主鎖開裂を受けたものも **aggregate** として挙動するためだろう。かようにフィブロインが酸化により分子量の増大を示す事実は著者により初めて見出されたものである。またこのことは酸化フィブロインの溶剤への不溶解化原因研究（第7章）にも有用な資料となるものである。

第7節 酸化フィブロイン溶液の電気泳動

フィブロインが過マンガン酸加里溶液で酸化される時は酸化剤の消費量は最初の短時間で多く、繊維の強力や伸度の脆化率も大きい。それに対応してフィブロイン分子の形態変化および分子量変化も著しい。従つて 0.1 N-KMnO_4 で 10 分間酸化したフィブロインを既に述べた方法で溶液とし、日立製作所製 **Tiselius** 電気泳動装置を使用して泳動挙動を調べた。

緩衝液は 0.1 mol 炭酸塩、 $\text{pH}=10.08$ 、 $\mu=0.22$ を用い蛋白濃度は 0.9% であつた。泳動条件は 40 volt 、 5 mA 、 19°C 、2 時間乃至 3 時間である。同一濃度の無処理フィブロインについても同一条件で電気泳動を行つた。その泳動図を第 15 図および第 16 図に示す。成田³³⁾は電気泳動的にフィブロインは $\text{pH}=5.0$ では 1 成分の如く行動するが $\text{pH}=9.6$ および 10.6 では何れも明確な 2 成分を示すと述べている。

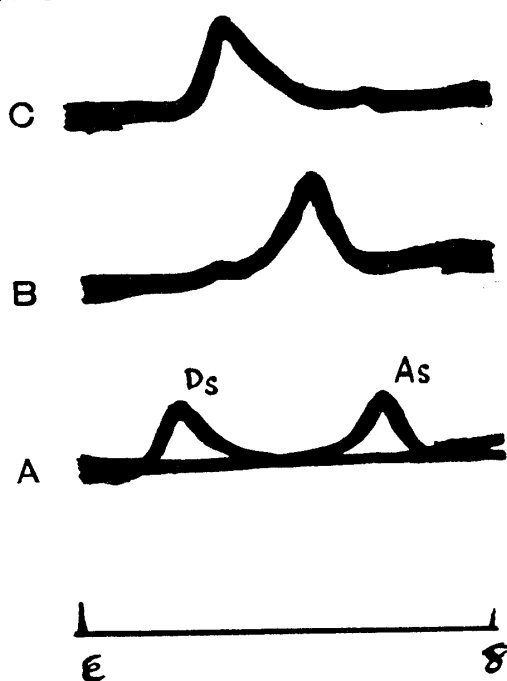


Fig. 15. Electrophoretic patterns of untreated fibroin in 0.1 M -carbonate buffer ($\text{pH}=10.0$ $\mu=0.22$) at 19°C , 40 volt , 5 mA .

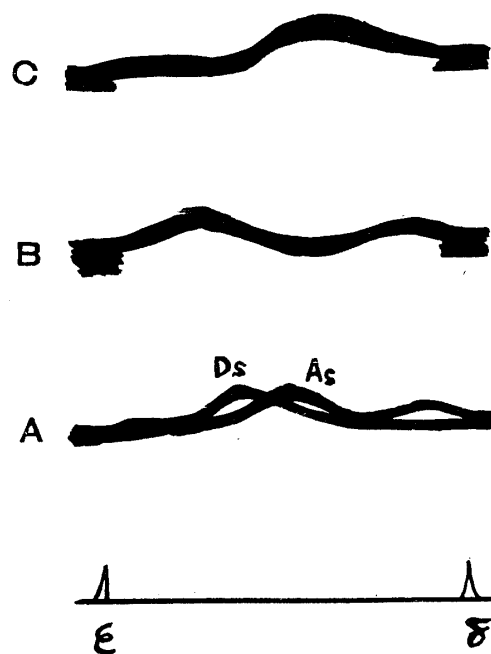


Fig. 16. Electrophoretic patterns of the oxidized fibroin (0.1 N-KMnO_4 , 10 mins) in 0.1 M carbonate buffer ($\text{pH}=10.0$ $\mu=0.22$) at 19°C , 40 volt , 5 mA .

A; Pattern after 2 hrs in both sides
 B; " " 3 hrs in ascending
 C; " " 3 hrs in descending

しかし清水,³⁵⁾ 具, 高木¹¹³⁾ は蚕の絹糸腺より直接フィブロインをとり出して電気泳動を行い1成分を示すことを認め **native** フィブロインは単一分子から成ると報告している. 成田のフィブロイン調製法は 0.5% NH_4OH で5時間宛3回精練を繰返したものであり, この条件ではある程度分子の解重合が起る.³⁷⁾ 著者も繭層フィブロインでは電気泳動的には一成分を認めた. 酸化フィブロイン溶液は無処理のもののように鋭い峰を示さないが2時間泳動の図で判る如く峰の数は1個である.

3時間泳動の図をみると酸化フィブロインは峰の高さが低くなり拡がり (**spreading**) が大きくなっている. 無処理フィブロインを **Cu-En** に溶かし中和するまでの時間を延長した場合は加水分解が起り, 泳動図には易動速度の早い1成分が明確に現われると言われる.³⁸⁾

従つて酸化フィブロインは泳動速度の近似した混合系より成り, そのため連続的な濃度勾配が生成したのであろう. また酸化による重量変化, 軸比および分子量変化等と合わせて考えると比較的類似の **aggregate** の混合系より成ると推定される. 第15図および第16図より無処理フィブロインの易動度を100とすれば酸化フィブロインの相対易動度は2時間では上昇側165, 下降側167となり, 3時間では平坦峰の中心部をとれば上昇側158, 下降側142となり酸化フィブロインの方が泳動速度が早い. このことから酸化フィブロインは(-)荷電が多くそれは **COOH** 基の増加(第3章第1節参照)によるものと推定される.

第8節 小 括

(1) フィブロイン繊維を稀薄過マンガン酸加里溶液で酸化するさいは酸化剤の消費量は短時間処理で比較的多くその後時間経過とともに緩慢に増加する. 酸化後の繊維は光沢性, 褐色状となり増量するが酸化初期のものには二酸化マンガンの沈着を認めない. さらに酸化剤の消費量曲線と繊維の増量率曲線は類似型を呈する.

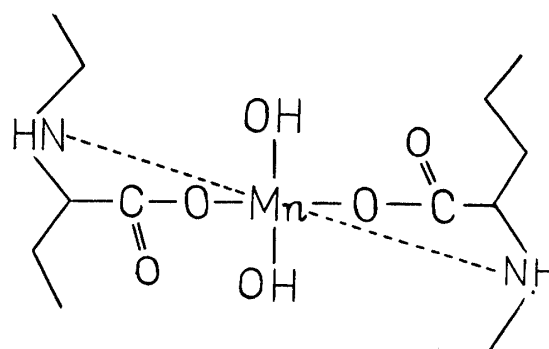
(2) 増量値は還元された **Mn** 原子の量よりも遙かに多く, その比は各酸化時間のものにおいてそれぞれ一定値すなわち平均恒数 1.69 であつた. 従つて酸化初期の褐色化および増量は **Mn-fibroin chelating complex** によることを確認しその架橋結合の様式を次の如く想定した.

(3) 酸化後の褐色繊維は稀薄な過酸化水素あるいは修酸で処理すると **Mn** が除去されて脱色されるが前者を用いると強力や伸度の着色繊維に対する脆化率が極めて大きく後者によれば極めて小さい. 脱色繊維の無処理繊維に対する重量変化はほとんど認められず, 緩和な酸化条件下では溶出する程の分子の短鎖長化は起らない.

(4) 酸化後修酸で脱マンガンされた繊維の強力や伸度の脆化率は短時間酸化のもので極めて大きくその後時間経過とともに漸増している.

(5) フィブロインの **tyrosine** 含量は酸化に伴ない減少するが全窒素, **serine** および **threonine** 含量は変化しない. **tyrosine** 含量の酸化時間経過に伴なう減少曲線は過マンガン酸加里消費量曲線および増量率曲線と対称相をなすが, **tyrosine** 含量を還元された過マンガン酸加里に対しプロットすると直線関係が得られる.

(6) 無処理フィブロインは **Cu-En** に易溶であるが酸化後脱マンガンされたフィブロインは同一



条件では不溶である。著者は酸化フィブロインの溶解分散条件を見出し溶液状態での研究を可能にした。

(7) 酸化フィブロインの容積分率固有粘度を求め軸比を算出したところ、軸比は酸化の進行とともに漸次小さくなることが認められた。

(8) 光散乱法により平均分子量を求めたところ酸化フィブロインは無処理フィブロインより大きく、とくに短時間酸化のものではその増大が著しい。従つて粘度および軸比減少はフィブロイン分子の主鎖切断に基づくよりもむしろ分子連鎖間結合の部分的強化による lateral aggregation すなわち分子型変化に基づくことが認められた。

(9) 酸化フィブロインの電気泳動図では界面の平坦化が認められ、酸化フィブロイン溶液は比較的類似の aggregate の混合系より成ると推定される。かつ泳動速度は無処理のものに比し早い。

第4章 絹フィブロイン繊維の次亜塩素酸カルシウム溶液による酸化

第1節 フィブロイン繊維の次亜塩素酸カルシウム消費量および重量変化

フィブロイン束糸あるいは単糸を第3章第1節に記したと同様に水浸後、硝子棒で搾り一定重量にして次亜塩素酸塩溶液中に投入する。規定時間経過後直ちにグラスフィルター (No. 3) で濾過し水洗後、硫酸酸性にして過剰の 10% KI を加えて遊離した沃度を澱粉溶液を指示薬として 0.1N-Na₂S₂O₃ で滴定する。硫酸濃度、KI の添加量は常法のヨードメトリーに準じた。なお反応時間中の有効塩素の自然損失を対照実験より求めて補正した。0.1 N-Na₂S₂O₃ 溶液の滴定値より次亜塩素酸塩溶液の消費量 (cc/g-フィブロイン) あるいは被還元塩素量 (mg/g-フィブロイン) を算出した。次亜塩素酸塩溶液の消費量は第13表および第17図、第18図に示している。

Table 13. Calcium hypochlorite amount consumed by fibroin fibre

(i) Reduced chlorine (mg/g-fibroin) in 0.01 N-Ca(OCl)₂ oxidation

Sample	Temp.	Oxid. time (min)				
		10	30	50	80	120
Cocoon layer fibroin	26°C	98	135	144	149	151
Reeling silk fibroin	26°C	67	125	141	148	149
Cocoon layer fibroin	16°C	46	86	116	134	144

(ii) Consumption in 0.02 N- and 0.04 N-Ca(OCl)₂ oxidation

Oxidized time (min)	10	30	60	120
0.02 N-Ca(OCl) ₂ (cc/g-fibroin)	249	429	608	915
0.04 N-Ca(OCl) ₂ (")	239	489	980	1015

Oxidized temperature; 20°C.

(iii) Consumption in 0.1 N-Ca(OCl)₂ oxidation

Oxidized time (min)	10	15	20	30	40	55	65
0.1 N-Ca(OCl) ₂ (cc/g-fibroin)	50.3	65.5	70.0	75.6	82.7	88.6	93.2

Oxidized temperature; 6~7°C.

第13表 (i) (ii) は風乾試料 200 mg を 80 cc の次亜塩素酸塩溶液中で酸化したものであり (iii) は単糸 10 denier の 400 回巻き束糸フィブロイン (500 mg 程度) を 6 乃至 7°C に保つた溶液 40 cc 中

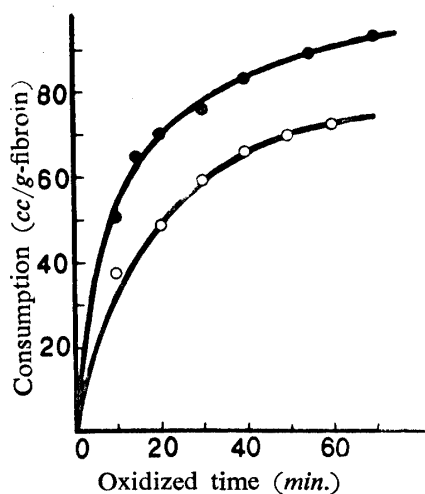


Fig. 17. Comparison between Ca(OCl)_2 solution and KMnO_4 solution consumed by fibroin
 —●— 0.1 N- Ca(OCl)_2 , 6°C
 —○— 0.1 N- KMnO_4 , 30°C

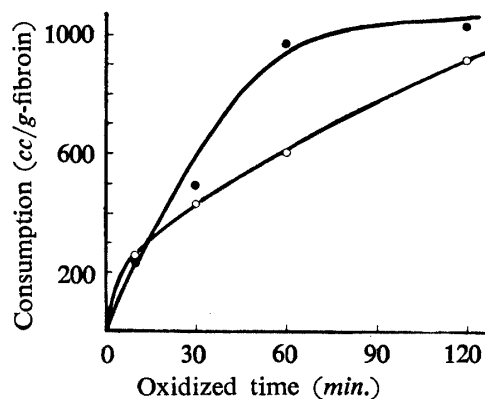


Fig. 18. Variation of Ca(OCl)_2 consumption by fibroin with the oxidized time (oxidized temp.; 20°C)
 —●— 0.04 N- Ca(OCl)_2
 —○— 0.02 N- Ca(OCl)_2

で酸化したものである。酸化剤の消費量は最初の短時間に急増し、時間経過とともに漸増することは前章の過マンガン酸加里酸化の場合と類似する。液量を増せば消費量は全体的に多くなるが時間経過による変化傾向は大體同一である。第 13 表から生繭層フィブロインは繊度が小さいので東糸フィブロインよりも短時間における消費量が多く、酸化速度は試料フィブロインの状態によつて異なることが判る。さらに短時間反応の場合は温度依存性が相当大きい。また第 17 図に示したように次亜塩素酸塩消費量は同一濃度の過マンガン酸加里消費量に比較し反応温度が低いにも拘らず遙かに多く、次亜塩素酸塩は過マンガン酸加里よりも反応速度が大きいことを示している。大橋ら¹⁰⁸⁾は澱粉に対しては漂白粉の作用力は過マンガン酸加里より遙かに弱いと述べているが彼等は酸化剤の規定濃度を同じくせず % 濃度を等しくして得た結果より論議しており無意味である。彼等の使用した溶液を規定濃度に換算すると漂白粉の方が相当小さい。酸化の進行とともに溶液中に CaCO_3 が生成し、濾過水洗してもフィブロイン繊維上に CaCO_3 が沈着するので酸化後の重量変化測定のさいは消費量測定後のグラスフィルター上の繊維を 2% NH_4Cl で充分洗滌後、水洗風乾して無水量を求めた。2% NH_4Cl の使用は予備実験で洗滌効果を確認して決定したものである。

酸化前後の繊維の無水量の差から重量変化を求めると第 14 表および第 15 表の如く次亜塩素酸塩酸化の場合には過マンガン酸加里酸化とは逆に著しい重量損失が認められる。この重量減少率を酸化時間に対してプロットすると第 19 図の如き逓減型増加曲線となる。

しかるに被還元塩素量に対してプロットすれば直線関係が得られる。第 20 図は 0.01N- Ca(OCl)_2 ,

Table 14. Weight change of the oxidized fibroin fibre against the untreated fibre (in 0.01 N- Ca(OCl)_2 oxidation)

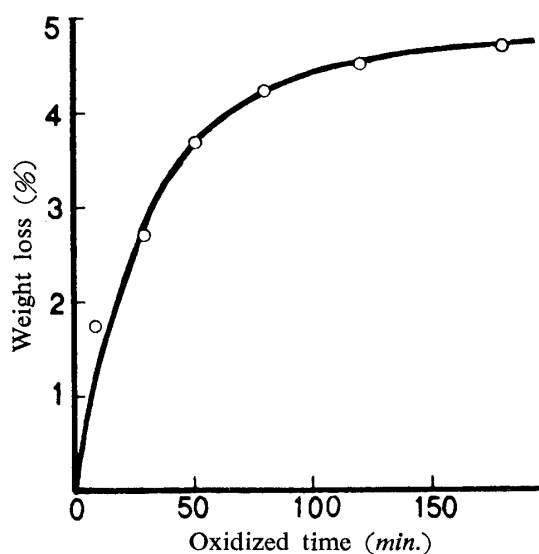
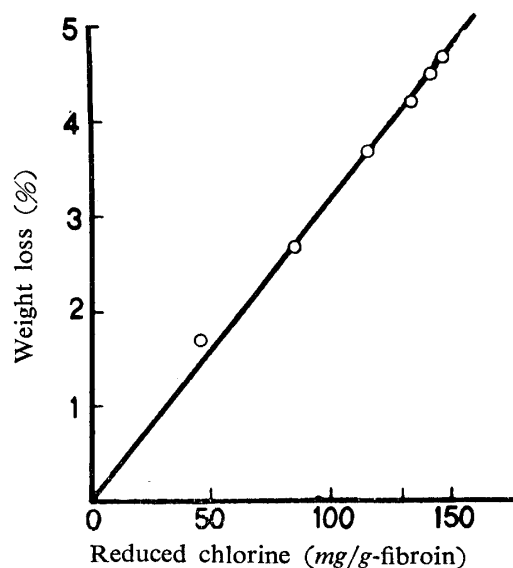
Oxidized time (min)	10	30	50	80	120	180
Reduced chlorine (mg/g-fibroin)	46	86	116	135	144	146
Degree of diminishing (%)	1.75	2.69	3.73	4.22	4.50	4.66

Oxidized temperature; 16°C.
 Oxidized fibroin was enough washed with 2% NH_4Cl to remove CaCO_3 and the change in weight was measured.

Table 15. Weight change of the oxidized fibroin fibre against the untreated fibre (in 0.02 N-Ca(OCl)₂ oxidation)

Oxidized time (min)	10	30	50	80	120
Reduced chlorine (mg/g-fibroin)	99	329	398	459	561
Degree of diminishing (%)	2.0	13.4	21.8	24.1	29.1

Oxidized temperature; 19°C.

Fig. 19. The relation between weight loss of fibroin and time in 0.01 N-Ca(OCl)₂ oxidationFig. 20. The relation between reduced chlorine and weight loss of fibroin in 0.01 N-Ca(OCl)₂ oxidation

16°C (浴比, 200 mg: 80 cc) で酸化した場合の直線関係のみを示したが第 15 表の値も図示すれば同様である。すなわち重量減少率は被還元塩素量 (mg/g-フィブロイン) の一次函数 ($y=ax$ 型) であることが認められた。y は重量減少率, x は還元された塩素量である。

セルロースの過酸化窒素酸化では glucose 残基の C⁶ 位置の第 1 級 alcohol 基が酸化され,¹¹⁴⁾ 重量増加を来すが次亜塩素酸酸化では偶然的にどの OH 基も酸化されて生成物は重量損失を来すという。¹¹⁵⁾ 上記の $y=ax$ 型の減量はフィブロインの次亜塩素酸塩による酸化も tyrosine 残基の単なる modification ではなく、主鎖切断を惹起することを示している。次亜塩素酸塩溶液により酸化度の異なるフィブロインを調製し第 3 章第 1 節で述べた方法で常温 30 分間酸化の場合の過マンガン酸加里消費量を測定したところ第 21 図の如き結果が得られた。

図示した如く酸化度の進んだもの程一定時間酸化時の過マンガン酸加里消費量が多い。

酸化の進んだもの程フィブロイン中の tyrosine 残基は減少しているが (本章第 3 節参照), それにも拘らず過マンガン酸加里消費量が多いことは次亜塩素酸塩酸化により活性基が増加したことを推定させる。酸あるいはアルカリ浸漬後のフィブロインは無処理のものより過マンガン酸加里消費量が多い事実⁷⁵⁾から考えると次亜塩素酸塩酸化の時は加水分解崩壊も併起することが予想される。

フィブロインを次亜塩素酸塩の溶液中に投入後 10 分位経過すると黄変し始め溶液は少し発泡する。次亜臭素酸, 沃度酸素酸で酸化する時は溶液中には Br⁻, I⁻ の還元型としては少量しか認められず幾分は還元された型で Br や I がフィブロインに結合していることが中島により報告されている。⁴⁰⁾

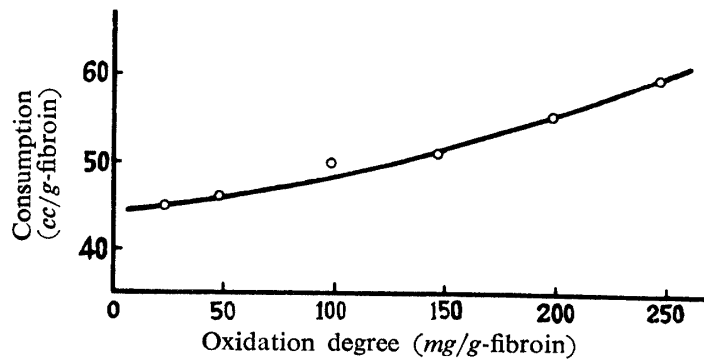


Fig. 21. 0.1N-KMnO₄ consumption of fibroin with different oxidation degrees
Oxidation degree of fibroin was represented as the chlorine amounts reduced in Ca(OCl)₂-oxidation

フィブロインの黄変も塩素化によることが考えられるので、Alexander⁴⁵⁾の羊毛における置換塩素定量法を用いて調べた。すなわち酸化後のフィブロイン繊維を附着している塩素イオンの反応がなくなる迄水洗し風乾した。それを硝酸銀飽和の濃硝酸溶液中に入れ煮沸溶解させたところ何れの試料も明らかにAgClの沈澱を生成した。このことから酸化反応とともに一部塩素置換反応も行われることが確認された。従つて黄変はこの塩素によるものである。

第2節 酸化フィブロイン繊維の強力および伸度

次亜塩素酸塩溶液で酸化されたフィブロイン繊維を沈着CaCO₃を除くため2% NH₄Clで充分洗滌後、水洗して風乾し強力および伸度を測定した。測定試料としては東糸フィブロインを用いたがその理由は既に第3章第3節で述べている。第16表に1例を示す如く強力および伸度の低下は著しく0.1N-Ca(OCl)₂溶液で6°C、10分間酸化された場合、無処理のものの強力3.73g/dが0.6g/dへ、無処理伸度17%が1.2%へと激減しその脆化率は実にそれぞれ84%および93%に及ぶ。その後の酸化繊維は過マンガン酸加里酸化の場合と同様に反応時間経過とともに緩慢な低下を示している。

ただ過マンガン酸加里酸化時と異なり前節で記述したように10分間酸化の分解溶出量が約2%近くあり、当然主鎖切断が考えられる。従つて酸化初期の強力や伸度の急激な低下も過マンガン酸加里酸化時とは幾分要因が異なるものと推定される。このことは次節のtyrosine減少率と強力および伸度の脆化率との関係から明白に判る。

Table 16. Tensile strength and elongation of the oxidized fibroin fibre
(in 0.1N-Ca(OCl)₂ oxidation at 6°C)

Oxidized time (min)	Strength (g/d)	Elongation (%)	Degree of weakening (%)	
			Strength	Elongation
0	3.73	17.0	0	0
10	0.60	1.2	83.9	92.9
20	0.43	1.1	88.5	93.5
30	0.37	0.7	90.1	95.9
60	0.19	0	94.9	100.0

Suter's SERI GRAPH was used for measuring.

第3節 全窒素、チロシンおよびヒドロキシアミノ酸含量の変化

次亜塩素酸塩溶液で酸化されたフィブロインを2% NH₄Cl 次いで水洗し、風乾したものについ

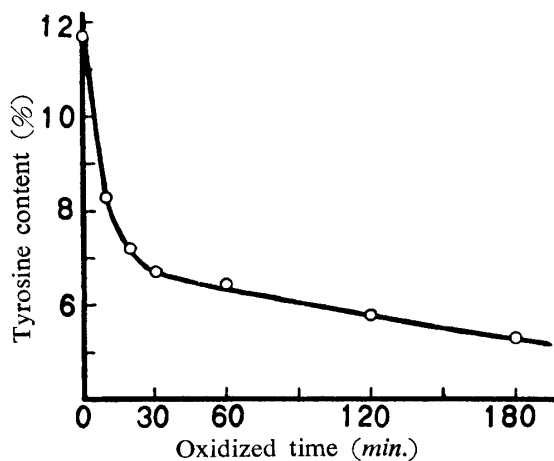
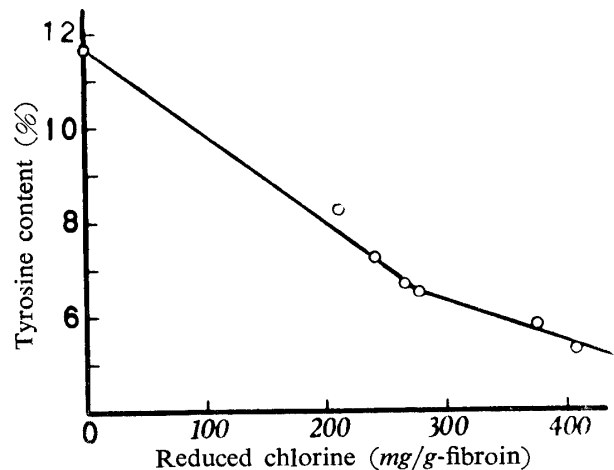
Table 17. Total nitrogen content of the oxidized fibroin (in 0.1 N-Ca(OCl)₂ oxidation)

Oxidized time (min)	0	10	30	60	120
Total-N (%)	18.7	16.9	16.5	16.4	16.7

Table 18. Tyrosine, serine and threonine content of the oxidized fibroin (in 0.1 N-Ca(OCl)₂ oxidation)

Oxidized time (min)	0	10	20	30	60	120	180
0.1 N-Ca(OCl) ₂ consumed (cc/g-fibroin)	0	211	239	266	276	378	407
Tyrosine (%)	11.6	8.32	7.22	6.65	6.52	5.85	5.30
Degree of diminishing of tyrosine (%)	0	28.28	37.76	42.67	43.79	49.57	54.31
Serine (%)	12.32	12.41	—	12.38	12.41	12.18	—
Threonine (%)	1.51	1.51	—	1.51	1.51	1.51	—

て全窒素, tyrosine, serine および threonine 含量を測定した. 第 17 表および第 18 表にそれらの結果を示す. 10 分間酸化されたフィブロインの全窒素は無処理のものより僅かに減少しているが, その後時間経過による変化はほとんど認められない. これは主鎖末端あるいは側鎖末端における酸化脱アミノ反応が酸化の初期に比較的迅速に行われることを示している. 第 22 図に示す如く tyrosine 含量は短時間酸化で急激に減少するがその後の変化は緩慢であり, これは消費量変化と対称関係をなしている. serine および threonine 含量にはほとんど変化を認めない. 次亜塩素酸塩酸化では同一濃度の過マンガン酸加里酸化に比し一定時間当りの消費量が多いが tyrosine 減少率も大きく酸化反応は tyrosine 残基に優先的に起つていることを示唆している. tyrosine 含量と被還元塩素量との関係は過マンガン酸加里酸化時とは異なり第 23 図のように完全な直線関係を示さない. これは溶出物質の酸化が副反応として併起するためだろう. 10 分間酸化されたフィブロインの tyrosine 減少率は 28.28% で 30 分間酸化のものでは 42.67% となり 1.5 倍近くあり, 前節で示したようにこの場合の強力脆化率は 83.9% から 90.1% へと変り 1.07 倍となつている. 伸度脆化率は 92.9% から 95.9% へと変り 1.03 倍となる. これは短時間酸化における強力や伸度の激減が tyrosine 残基の酸化による主鎖

Fig. 22. The relation between tyrosine content of fibroin and time in 0.1 N-Ca(OCl)₂-oxidationFig. 23. The relation between tyrosine content of fibroin and oxidant consumption in 0.1 N-Ca(OCl)₂ oxidation

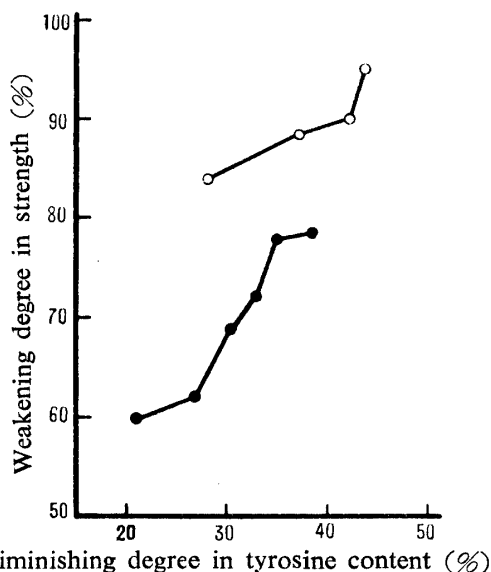


Fig. 24. The relation between degree of diminishing in tyrosine content and degree of weakening in tensile strength of the oxidized fibroin fibre

●—● 0.1 N-KMnO₄ treating
○—○ 0.1 N-Ca(OCl)₂ "

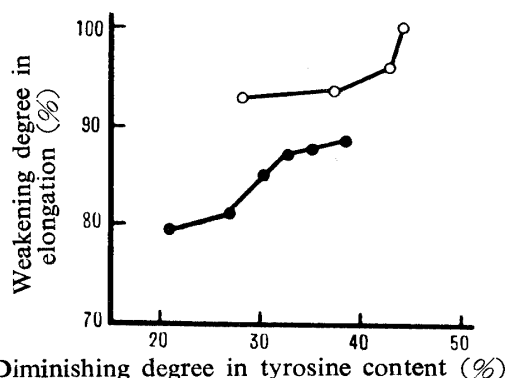


Fig. 25. The relation between degree of diminishing in tyrosine content and degree of weakening in elongation of the oxidized fibroin fibre

●—● 0.1 N-KMnO₄ treating
○—○ 0.1 N-Ca(OCl)₂ "

章で得た過マンガン酸加里酸化フィブロインとの両者で比較すると第 24 図および第 25 図の如く興味ある結果が見られる。

同一の tyrosine 減少率をもたらした酸化の場合、換言すれば tyrosine 残基のみにとっては酸化度が同じ場合には次亜塩素酸塩処理の方が過マンガン酸加里処理に比して遙かに多くの強力および伸度の脆化を惹起することが明白である。これは両酸化剤によるフィブロインの崩壊機構が異なることを示すものである。

第 4 節 酸化フィブロイン溶液の粘度および粒子軸比

第 3 章第 5 節で過マンガン酸加里酸化フィブロインは無処理フィブロインと同じ条件では Cu-En に溶解分散しないことを述べた。0.01 N 乃至 0.1 N-Ca(OCl)₂ 溶液を用いて種々の時間酸化したフィブロイン繊維も Cu-En に対する溶解抵抗性は著しく高く、その溶解挙動は過マンガン酸加里酸化のものと同様である。

すなわち酸化フィブロインを (12-16) Cu-En 溶液に量比 1:20 で投入すると直ちに溶剤を吸収しスポンジ様膨潤を呈し、その後強く攪拌を続けると漸次 syrup 状となり遂には溶解分散する。この間約 25 分乃至 30 分を要す。その後 1.25 N-CH₃COOH で正確に中和し、水次いで 0.1 mol carbonate buffer (pH=10, μ=0.22) で透析し粘度測定用の試料液とした。無処理フィブロインは炭酸塩溶液では微桃色であるが次亜塩素酸塩酸化のものは淡褐色を呈する。透析後の液は遠心分離し僅少の不溶解物を除きそれを原液として緩衝液を用いて種々の稀釈液を作り、30°C の恒温水槽中で Ostwald 粘度計を用いて落下時間を測定する。なお、別にそれぞれ密度を測定する。これらの値より還元粘度を求め、それを各種の濃度に対しプロットすれば粘度曲線を得ることができる。

酸化度の異なるフィブロインの粘度曲線を第 26 図に示す。この図より容積分率固有粘度を求めその値より POLSON の式を用いて軸比を算出した。各酸化フィブロインの容積分率固有粘度および粒子軸比は第 19 表の通りである。また酸化剤の消費量すなわち被還元塩素量と軸比との関係は第 27 図

開裂にのみ基づくものではないことを示唆している。

tyrosine 減少率と強力あるいは伸度の脆化率との関係を次亜塩素酸塩酸化フィブロインと前

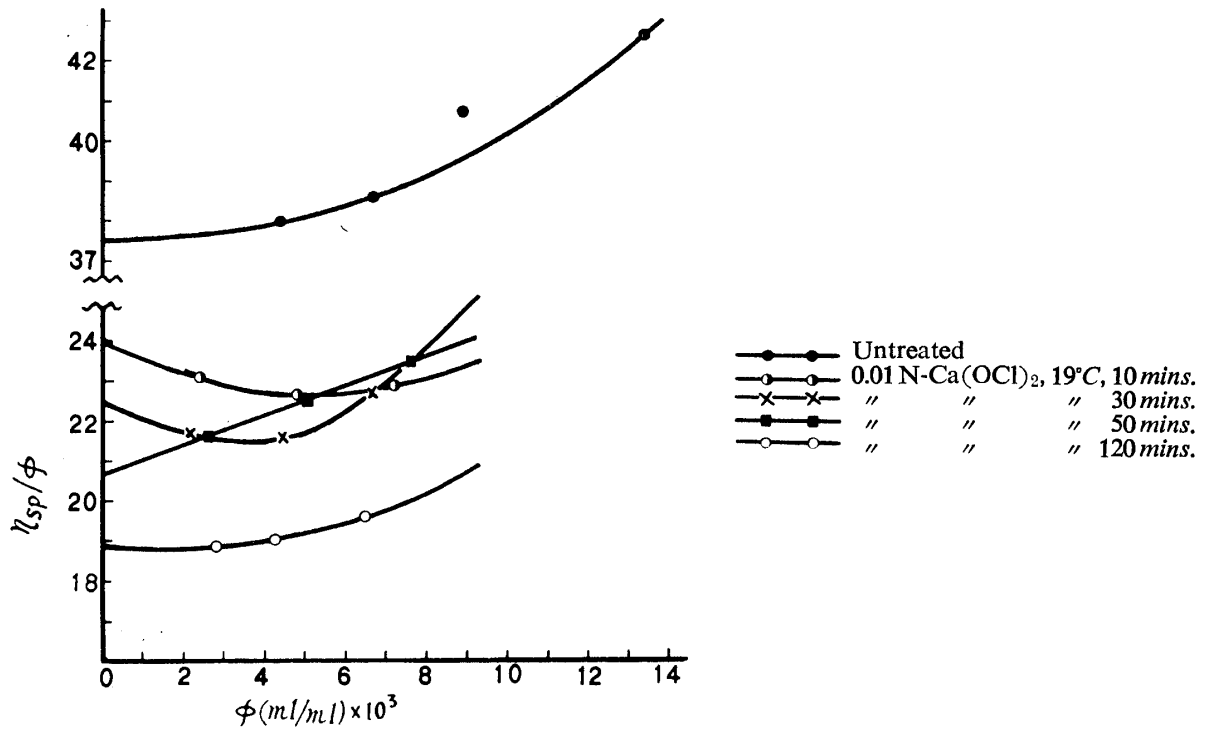


Fig. 26. The relation between viscosity and concentration of the untreated and oxidized fibroins in 0.1 M carbonate buffer solution ($pH=10.0$ $\mu=0.22$)

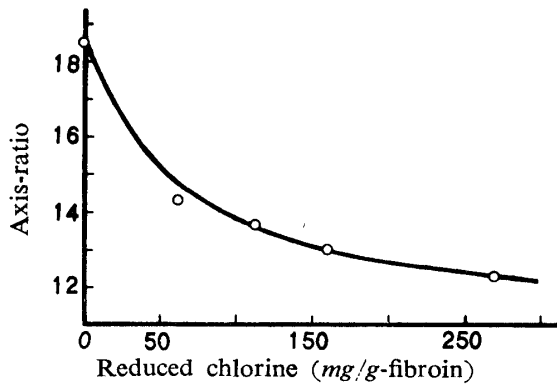


Fig. 27. The relation between the oxidation degree and axis-ratio of fibroin (in 0.01 N-Ca(OCl)₂ oxidation)

の如く凹型曲線となる。この関係図より酸化の進行とともに粒子軸比は漸次小さくなり粒子形態が棒状より球状へ向つて変形していることが判る。

無処理フィブロインの軸比が 18.5 と小さく現われているのは測定器械の都合で 5 mol urea を含まない炭酸塩溶液を溶媒に用いたためである。

尿素添加による解離現象は林の報告で認められており,⁸³⁾ フィブロインの如き線状蛋白の会合粒子では当然軸比は低下する。従つて上記の

Table 19. Volume fraction intrinsic viscosity and axis-ratio of the oxidized fibroin (in 0.01 N-Ca(OCl)₂ oxidation)

Oxidized time (min)	0	10	30	50	120
Reduced chlorine (mg/g-fibroin)	0	64	114	159	269
$\lim_{\phi \rightarrow 0} (\eta_{sp}/\phi)$	37.5	24.0	22.4	20.7	18.9
Axis-ratio	18.5	14.3	13.7	13.0	12.3

Oxidized fibroin was dissolved in Cu-En solution, dialyzed against the water and 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$, $\mu=0.22$).

18.5 という値も溶媒条件による会合粒子形成のためである。しかし著者は軸比変化の相対的傾向を知

るために該溶媒を用いたのであり研究上には何等の障害にはならない。

酸化フィブロインの軸比低下が前節で推定した主鎖切断に基因するかどうかは次節の分子量変化も加味して判断する必要がある。

第5節 酸化フィブロイン溶液の光散乱

酸化フィブロイン溶液を調製し種々の稀釈濃度における光散乱強度を測定した。試料フィブロインは生糸を精練した束糸を 0.1 N-Ca(OCl)₂, 6°C で酸化したものをを用いた。測定により得た Hc/τ 値を各種濃度に対しプロットすれば酸化フィブロイン溶液の光散乱曲線を得ることができる。それを第28図に示す。

図より (Hc/τ)_{c→0} の値を求め平均分子量を算出した。その値を第20表に示す。

酸化フィブロインの平均分子量は過マンガン酸加里酸化の場合と同様に何れも無処理フィブロ

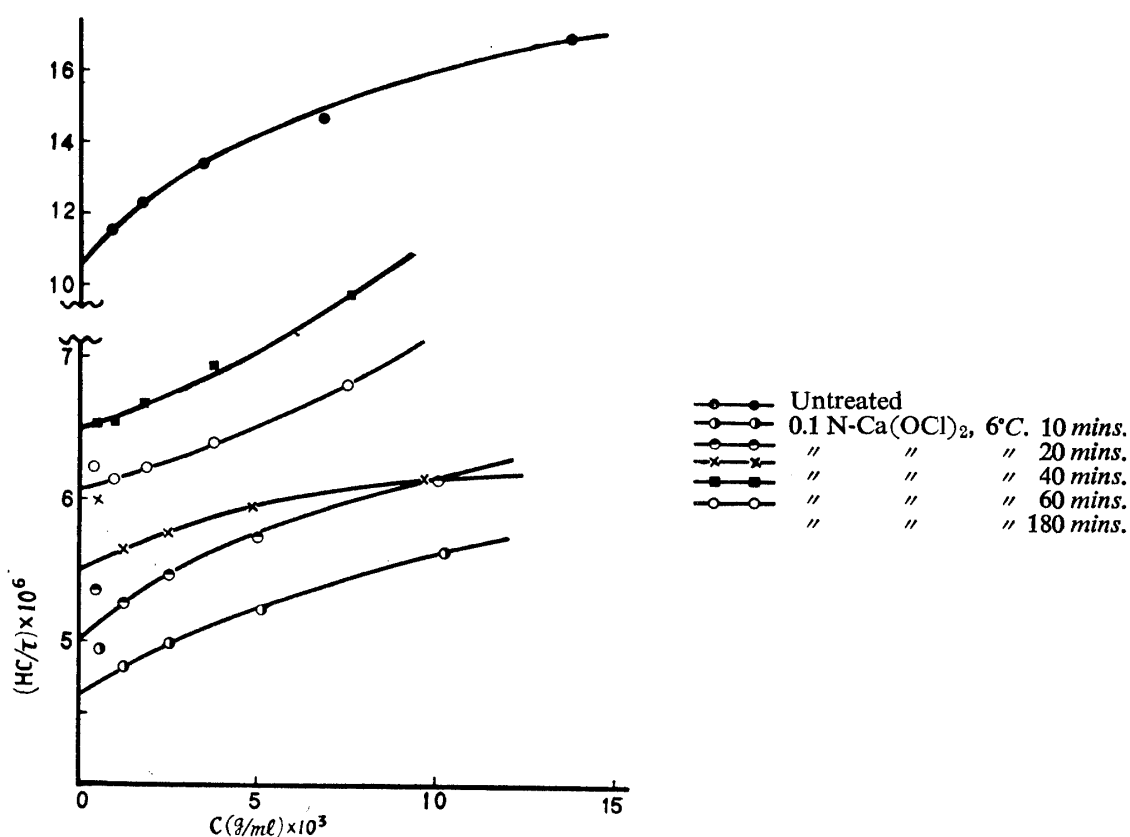


Fig. 28. The relation between light scattering intensity and concentration of the oxidized fibroin in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer (pH=10.0 μ=0.22)

Table 20. Average molecular weight of the oxidized fibroin determined by light scattering (in 0.1 N-Ca(OCl)₂ oxidation at 6°C)

Oxidized time (min)	0	10	20	40	60	180
Reduced chlorine (mg/g-fibroin)	0	178	248	293	323	437
(Hc/τ) _{c→0} · 10 ⁻⁶	10.5	4.7	5.0	5.5	6.5	6.1
M.W. (10 ⁴)	9.5	21.5	20.0	18.2	15.4	16.4

Solvent; 5 M-urea per liter 0.1 M-carbonate buffer (pH=10.0, μ=0.22).

インより増大しており、とくに短時間酸化のものでその増大が著しい。

無処理のものの分子量 10.5×10^4 が 0.1 N-Ca(OCl)_2 , 6°C , 10 分間処理により 21.5×10^4 へと増大しその後は酸化の進行とともに漸次分子量は低下している。本章第 1 節で酸化中における主鎖の切断を推定したが、そのほかに酸化フィブロイン溶液調製のさいにも一部分加水分解の起る可能性がある。(前章第 6 節参照)

それにも拘らず分子量の増大が認められるのは酸化による分子連鎖間結合の部分的強化あるいは CADWALLADER の想像する methylene bridge⁴⁶⁾ の如き新しい架橋形成が行われていることを示す。従つて次亜塩素酸塩酸化によるフィブロインの固有粘度の減少および軸比低下は主鎖切断と酸化分子の連鎖間結合強化による aggregation との 2 つの現象に基づくものであろう。このことは酸化フィブロインの溶剤への不溶解化原因研究にも有用な資料となるものである。

第 6 節 酸化フィブロイン溶液の電気泳動

フィブロインが稀薄次亜塩素酸塩溶液で酸化される場合、酸化剤の反応量は最初の短時間に急増し、繊維の強力および伸度の脆化率も大きい。それに対応してフィブロイン分子の形態変化および分子量変化も著しい。

従つて 0.1 N-Ca(OCl)_2 で 10 分間酸化したフィブロインを既に述べた方法で溶液とし Tiselius 電気泳動装置を用いて泳動挙動を調べた。

緩衝液、蛋白濃度および泳動条件は第 3 章第 7 節に記述したものと同一である。得られた泳動図を第 29 図に示す。

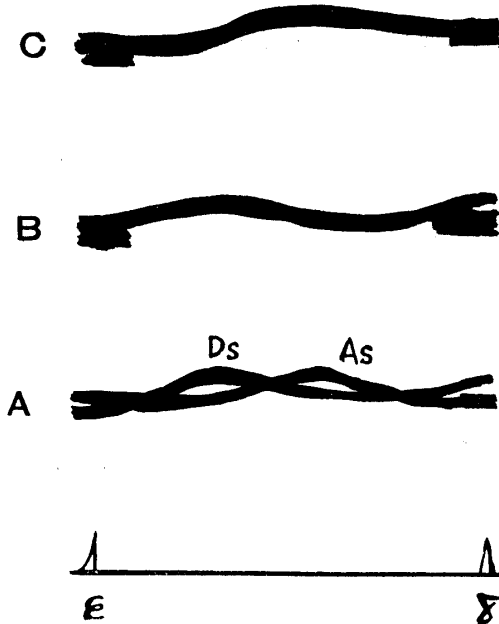


Fig. 29. Electrophoretic patterns of the oxidized fibroin (0.1 N-Ca(OCl)_2 , 10 mins.) in $0.1 \text{ M-carbonate buffer (pH=10.0 } \mu=0.22)$ at 19°C , 40 volt, 5 mA.

- A; Pattern after 2 hrs in both sides
 B; " " 3 hrs in ascending
 C; " " 3 hrs in descending

第 7 節 小 括

フィブロイン繊維を稀薄次亜塩素酸塩溶液で酸化して得た結果を要約すれば次の通りである。

(1) フィブロインの次亜塩素酸塩消費量は同一濃度の過マンガン酸加里消費量に比し反応温度が

この泳動図は前章に示した過マンガン酸加里酸化フィブロインの泳動図とほとんど同様である。すなわち無処理フィブロインに比し峰の高さが低化し裾の拡がりが大きくなっている。従つて前節の分子量増大の結果から判断して過マンガン酸加里酸化の場合と同様に酸化フィブロイン溶液は泳動速度の近似した aggregate の混合系より成り、そのため連続的な濃度勾配が現出したものと考えられる。第 15 図の無処理フィブロインの易動度を 100 とすれば本試料の相対易動度は 2 時間では上昇側 165, 下降側 162 となり, 3 時間では平坦峰の頂点部をとれば上昇側 150, 下降側 150 となり無処理に比し泳動速度が相当早い。

このことから次亜塩素酸塩による酸化フィブロインは無処理のものに比し (一) 荷電が多くそれは COOH 基の新生増加 (第 7 章第 6 節参照) によるものと推定される。

低くても遙かに多い。酸化フィブロイン繊維は微黄色を帯びるがこれは tyrosine 残基の phenol 核の塩素置換によることを証明した。

(2) フィブロインは酸化により重量損失を来すが減量率は被還元塩素量 (mg/g-フィブロイン) の一次函数 ($y=ax$ 型) である。これは tyrosine 残基の単なる modification だけではなく主鎖切断が惹起していることを示す。

(3) 次亜塩素酸塩により酸化度の異なるフィブロインを調製し一定時間当りの過マンガン酸加里消費量を求めると酸化の進行したもの程多く酸化による活性基の増加が示される。(2)の結果と合わせて加水分解崩壊の併起が予想される。

(4) 酸化フィブロインは強力および伸度の脆化率が極めて大きい。とくに稀薄濃度、短時間酸化で脆化は急激に起り、その後時間経過とともに緩慢に脆化は進む。

(5) フィブロインの全窒素は短時間酸化で無処理より減少するがその後酸化時間が延長されても変化を認め難い。tyrosine 含量は急激に減少するが serine および threonine 含量には変化を認めない。tyrosine 含量と被還元塩素量とは密接な関係を有するが過マンガン酸加里酸化時のように直線関係を示さない。

(6) tyrosine 減少率が同一の酸化フィブロインでは次亜塩素酸塩処理のものが過マンガン酸加里処理のものよりも強力および伸度の脆化率が遙かに大きく、両酸化剤によるフィブロインの崩壊機構が異なることを示している。

(7) 酸化フィブロインは無処理フィブロインと同一条件では Cu-En に不溶である。しかしこれも過マンガン酸加里酸化フィブロインと同様の処理条件で溶解分散することを見出した。

(8) 酸化フィブロインの容積分率固有粘度を求め軸比を算出したところ酸化の進行とともに漸次小さくなることを認めた。

(9) 光散乱法により平均分子量を求めたところ酸化フィブロインは無処理フィブロインより大きいことを認めた。分子量は短時間酸化で著しく増大しその後時間経過とともに漸減している。これは分子連鎖間結合の強化による aggregate 形成を示す。従つて(2)および(3)の結果とこの結果から軸比低下の現象はフィブロインの主鎖切断と酸化分子の lateral aggregation とに基因するものと結論づけられる。

(10) 酸化フィブロインの電気泳動図では界面の平坦化が認められ、酸化フィブロイン溶液は比較的類似の aggregate の混合系より成ると推定される。かつ泳動速度は無処理のものに比し早い。

第5章 絹フィブロイン繊維の過酸化水素溶液による酸化

第1節 酸化フィブロイン繊維の強力および伸度

フィブロイン繊維を 20% および 35% の高濃度過酸化水素溶液に常温 (30°C) で浸漬し 2, 4, 8, 16 および 20 時間放置して浸漬後の繊維の強力、伸度測定および溶液中の過酸化水素濃度を定量しても何等の変化も認めることが出来ない。かように短時日浸漬では過酸化水素溶液はほとんどフィブロインには反応しないが浸漬期間を延長するか、あるいは低濃度でも加熱処理を行えば徐々に酸化反応が起る。OH⁻イオンは過酸化水素の分解を促進するが H⁺イオンは分解速度を小さくするので試薬過酸化水素は酸性溶液として安定化してある。従つて長期間に亘る常温放置酸化を行う場合には試薬をそのままの状態で使用した。常温酸化のさいは 21 denier, 300 回巻きのフィブロイン束糸を水浸せず直接 35% H₂O₂, 50 cc 中に投入し、硝子棒で圧して充分気泡を除き溶液になじませ密栓して暗処に放置する。処定期間経過後 No. 3 のガラスフィルターを用いて濾過し充分洗滌する。洗滌は酸化フ

イブロインを水浸してその液が過マンガン酸加里を還元しなくなる迄行つた。

加熱酸化には過酸化水素濃度は $\text{SiTCH}^{54)}$ と同じく 1.9 mol を採用した。なおこの場合は 0.1 mol 燐酸塩緩衝液を用いて pH を 6.97 に調整して 70°C の恒温浴中で酸化した。酸化浴比は $1:100$ とした。なお分解して生ずる酸素ガスによるフィブロインの液面への浮遊を防ぐため硝子棒に繊維を巻きつけて逆流冷却器を付けた三角フラスコ中で色々の時間処理した。処理後の強力および伸度変化を第 21 表, 第 22 表, 第 23 表に示す。

Table 21. Tensile strength and elongation of the fibroin fibre treated with 15 % and 35 % H_2O_2 for 10 days, at room temperature

	Strength (g/d)	Elongation (%)	Degree of weakening (%)	
			Strength	Elongation
Untreated fibroin	3.73	16.5	0	0
Fibroin soaked in water	3.71	16.0	0.54	3.00
Fibroin soaked in 15 % H_2O_2	3.64	14.8	2.41	10.30
Fibroin soaked in 35 % H_2O_2	3.34	13.2	10.46	20.00

Suter's SERI GRAPH was used for measuring.

Table 22. Tensile strength and elongation of the fibroin fibre treated with 15 % and 35 % H_2O_2 for 30 days, at room temperature

	Strength (g/d)	Elongation (%)	Degree of weakening (%)	
			Strength	Elongation
Untreated fibroin	3.73	16.5	0	0
Fibroin soaked in water	3.10	15.0	16.9	9.1
Fibroin soaked in 15 % H_2O_2	2.24	7.8	39.9	52.7
Fibroin soaked in 35 % H_2O_2	1.56	5.0	58.2	69.7

Table 23. Tensile strength and elongation of the fibroin fibre treated with 1.9 M- H_2O_2 in 0.1 M phosphate buffer solution ($\text{pH}=6.97$) at 70°C

Oxidized time (hr)	Strength (g/d)	Elongation (%)	Degree of weakening (%)	
			Strength	Elongation
0	3.90	20.0	0	0
1	3.65	18.0	6.41	10.0
3	3.43	16.2	12.05	19.0
5	3.31	12.8	15.13	36.0
8	3.20	12.8	17.95	36.0

Suter's SERI GRAPH was used for measuring.

高濃度の 35 % H_2O_2 ($\text{pH}=1.30$) 中 10日間浸漬したフィブロイン繊維の強力脆化率は 10.46 %, 伸度脆化率は 20 % であり 30日間浸漬した場合の脆化率ですら強力において 58 %, 伸度において 70 % である。また 1.9 mol H_2O_2 燐酸塩緩衝液 ($\text{pH}=6.97$) 中 70°C で 8 時間酸化したものでも強力脆化率 18 %, 伸度脆化率 36 % にすぎない。第 3 章第 2 節に示した如く過マンガン酸加里で酸化された褐色状態の繊維は 3 % の低濃度過酸化水素溶液中に数時間常温浸漬するのみで可成りの強力および伸度脆化を示す事実からみれば, 触媒存在下でない過酸化水素はフィブロインには反応し難

いことを示している。さらに表示した結果より過酸化水素は過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩に比しフィブロインに対する酸化速度は遙かに小さいことが認められる。

毛髪は 30% H_2O_2 ($pH=2.6$) 中に常温で 6 日間浸漬するだけで melanin の酸化脱色が起り、同時に keratin の酸化解裂産物が得られる¹¹⁶⁾ がフィブロインに対する過酸化水素の酸化反応は易酸化性の tyrosine 残基の存在にも拘らず極めて緩慢である。

第 2 節 フィブロイン繊維の過酸化水素消費量、全窒素、チロシンおよびヒドロキシアミノ酸含量の変化

生繭層の精練フィブロインを共栓三角フラスコを用い、60 倍容の 35% H_2O_2 ($pH=1.30$) に浸漬し流水中で保持し (温度; $18^\circ C$)、10、20 および 30 日間放置した。そのさいのフィブロインの過酸化水素消費量、全窒素、tyrosine, serine および threonine 含量変化を測定した。その結果を第 24 表に示す。

Table 24. Hydrogen peroxide amount consumed by fibroin fibre and total nitrogen, tyrosine and hydroxy amino acid contents of the oxidized fibroin (in 35% H_2O_2 oxidation at $18^\circ C$)

Oxidized period (days)	0	10	20	30	30*
H_2O_2 consumed (g/g-fibroin)	0	1.20	1.69	2.69	4.35
Total-N (%)	18.80	18.73	18.68	18.68	18.70
Tyrosine (%)	10.65	9.20	8.61	8.03	7.00
Degree of diminishing (%)	0	13.62	19.15	24.60	34.27
Serine (%)	12.38	12.38	12.35	12.40	—
Threonine (%)	1.50	1.48	1.50	1.50	—

* Oxidized temperature; $30^\circ C$.

酸化後残存する過酸化水素の量は過マンガン酸加里滴定法により求めた。なお表示の過酸化水素消費量は同時に平行実験した過酸化水素溶液単独の自然分解値を差し引いて算出したものである。表中 ※ 印の 30 日間浸漬酸化のものは放置温度 $30^\circ C$ の試料である。第 1 節でも記載したように温度上昇が酸化速度に相当影響を及ぼすことを示している。全窒素, serine および threonine 含量には差を認め難く、酸化反応はほとんど tyrosine 残基に起ることが推定される。それは第 30 図の tyrosine 含量 (%) と過酸化水素の還元量 (g/g-フィブロイン) との関係図からも認められる。

次に 1.9 mol H_2O_2 磷酸塩緩衝液 ($pH=6.97$) に 1:100 の浴比で生繭層のフィブロインを入れ、 $70^\circ C$ 恒温で種々の時間酸化した時の過酸化水素の分解率を求めた。同時にフィブロインを入れない場合の分解率を求め、その差より過酸化水素の消費量を算出したが両者の分解率には差を認め難く数回実験を繰返しても一定の消費量を算出することはできなかった。

SITCH et al⁵⁴⁾ も過醋酸—過酸化水素混液

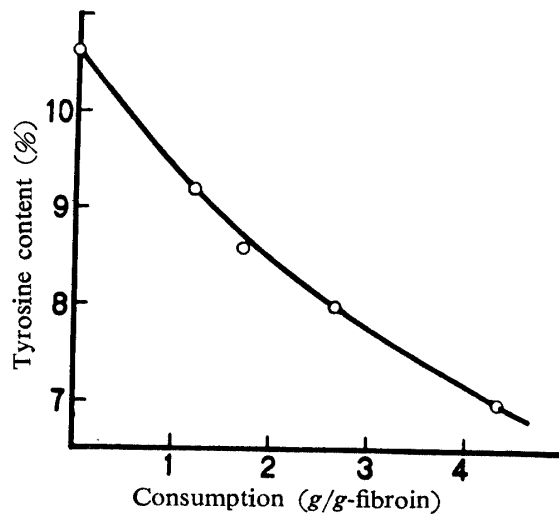


Fig. 30. The relation between tyrosine content of fibroin and oxidant consumption in 35% H_2O_2 oxidation

(*pH*; 2.0 前後) で 40°C および 98°C でフィブロインを酸化した場合の過醋酸および過酸化水素の分解率はフィブロインの有無に拘らず有意差を認めていない. 種々の時間過酸化水素で加温処理されたフィブロインの全窒素, **tyrosine** 含量およびヒドロキシアミノ酸含量を測定したところ, 上記の現象にも拘らず第 25 表のように **tyrosine** のみの減少が認められた.

Table 25. Total nitrogen, tyrosine and hydroxy amino acid contents of fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ in phosphate buffer solution (*pH*=6.97) at 70°C

Oxidized time (min)	0	30	120	300		
Total-N (%)	19.0	18.6	18.8	18.8		
Tyrosine (%)	10.65	10.25	10.00	9.38		
Degree of diminishing (%)	0	3.76	6.10	11.92		
Oxidized time (min)	0	10	30	60	120	240
Serine (%)	12.11	12.11	12.19	11.87	11.82	11.82
Threonine (%)	1.64	1.69	1.47	1.64	1.50	1.57

フィブロインの有無による過酸化水素の分解率差が認められないにも拘らず **tyrosine** 含量が減少することは次のことを推定させる. すなわち過酸化水素溶液は稀釈および温度上昇により分解が促進されるのでそのための励起酸素の一部により酸化反応が惹起されるものである. 過マンガン酸加里, 次亜塩素酸塩および過酸化水素で処理されたフィブロイン繊維の **tyrosine** 含量が同程度に減少した場合の繊維強力および伸度の脆化率を比較すると第 26 表の如き興味深い結果がみられる.

Table 26. Weakening of the tensile strength and elongation of fibroin fibres when tyrosine content was diminished in the same degree with different oxidative agents

Oxidizing agent	Oxidized time	Remained tyrosine (%)	Degree of weakening (%)	
			Strength	Elongation
35 % H ₂ O ₂	30 days	7.00	58.2	69.7
0.1 N-KMnO ₄	30 mins.	8.10	68.7	85.0
0.1 N-Ca(OCl) ₂	10 mins.	8.30	83.9	92.9

過酸化水素酸化フィブロインは **tyrosine** 量からみた酸化度が他の酸化剤処理のものに比し進行しているにも拘らず強力および伸度の脆化率は相対的にみて小さい. この事実から過酸化水素酸化による **tyrosine** 残基の構造変化の機構は他の酸化の場合とは異なることが確認される.

第 3 節 酸化フィブロイン溶液の粘度および粒子軸比

過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩溶液で酸化されたフィブロインは軽度の酸化状態でも無処理フィブロインと同一条件では **Cu-En** に溶解分散せず, 溶剂量を 2 倍にして強く攪拌し続けると約 25 分で溶解分散する. (第 3 章第 5 節, 第 4 章第 4 節参照)

しかるに 35 % H₂O₂(*pH*=1.30) で常温酸化したフィブロインおよび 1.9 mol H₂O₂(*pH*=6.97), 70°C で加温酸化したフィブロインは両者ともに **Cu-En** に対する溶解挙動は無処理フィブロインと同一条件の量比 1:10 でも, むしろ無処理よりも易溶である. 従つて無処理および過酸化水素酸化フィブロインを量比 1:10 で稀薄苛性ソーダ中に浸漬し, 1 昼夜放置後両者の膨潤状態をみたところ差異は認められず後者の **Cu-En** に対する易溶性は溶剤のアルカリ性に依存するものではないことが確認された.

この易溶性は過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインの場合とは異なる分子連鎖間の相互作用の存在を示唆する。

過酸化水素酸化フィブロインを量比 1:10 で Cu-En 中に投入すれば直ちに溶解するので3分間攪拌し 1.25 N-CH₃COOH で中和後、水次いで 0.1 mol 炭酸塩緩衝液 (pH=10, $\mu=0.22$) で透析し、それを原液とし種々の濃度における還元粘度を測定した。35% H₂O₂ および 1.9 mol H₂O₂ 酸化フィブロインについて得られた粘度曲線を第31図および第32図に示す。図より求めた容積分率固有粘度およびそれから算出した軸比を第27表と第28表に示す。

この結果から 35% H₂O₂ (pH=1.30) による常温酸化の場合および 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97) 加温酸化の場合は何れも酸化の進行とともに漸次、軸比は小さくなることが認められる。しかし軸比の低下度は過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化に比較して酸化度がほぼ等しい場合でも小さい。同時に測定した無処理フィブロインの軸比が約 18 と小さく現われているのは第4章第4節で述べたように溶媒条件に依存したフィブロイン分子の会合によるものである。

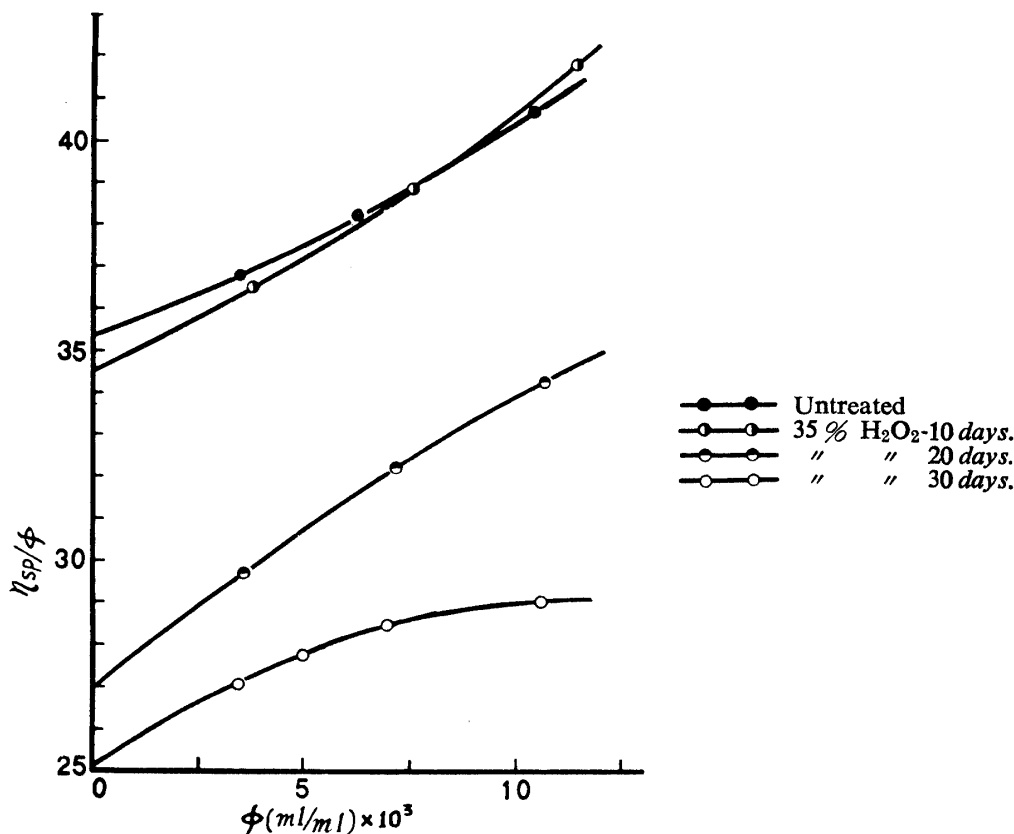


Fig. 31. The relation between viscosity and concentration of the oxidized fibroin in 0.1 M carbonate buffer solution (pH=10.0 $\mu=0.22$)

第4節 酸化フィブロイン溶液の光散乱

第3節で述べた方法で過酸化水素酸化フィブロインの溶液を調製し色々の稀釈濃度における光散乱強度を測定した。溶媒は 5 mol urea per liter 0.1 mol carbonate buffer (pH=10.10, $\mu=0.22$) を用いた。酸化度の異なるフィブロイン溶液の光散乱曲線を第33図および第34図に示す。各図より $(Hc/\tau)_{c \rightarrow 0}$ の値を求め平均分子量を算出してその値を第29表と第30表に示している。

35% 過酸化水素酸化フィブロインについてみると、無処理フィブロインの平均分子量 11.4×10^4

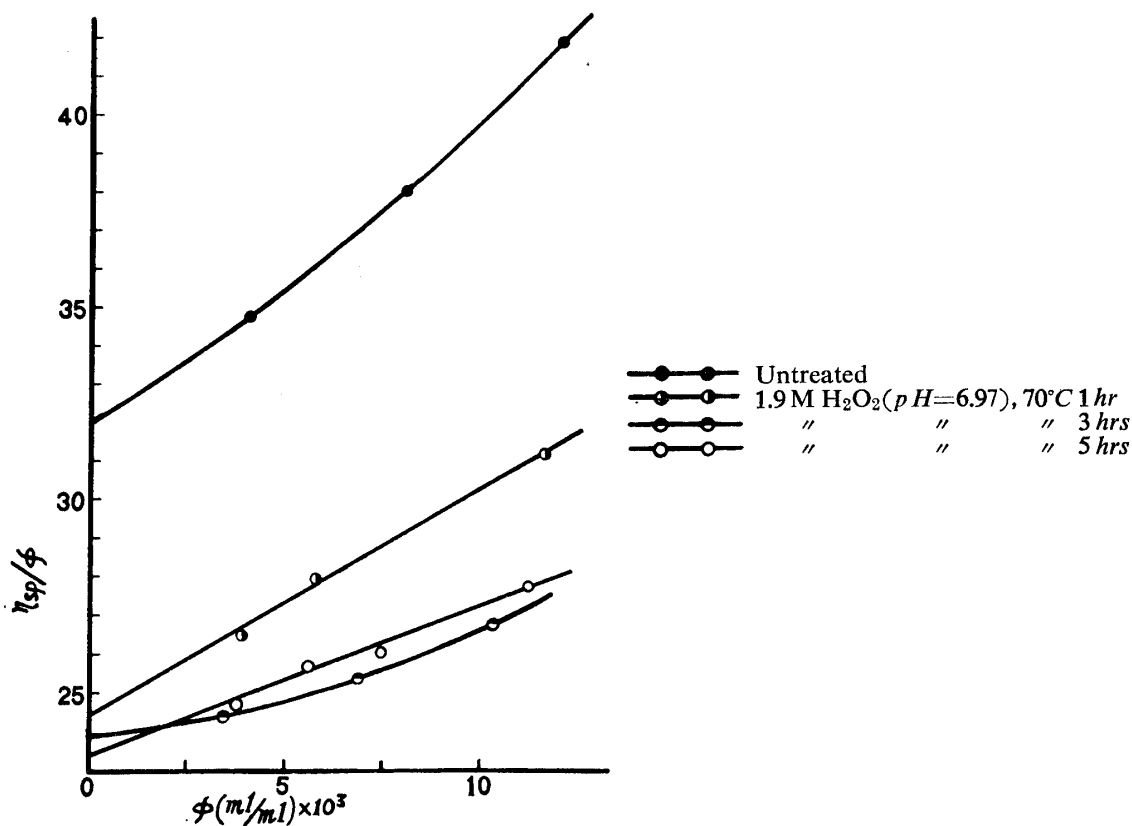


Fig. 32. The relation between viscosity and concentration of the oxidized fibroin in 0.1 M carbonate buffer solution ($pH=10.0$ $\mu=0.22$)

Table 27. Volume fraction intrinsic viscosity and axis-ratio of the oxidized fibroin (treated with 35 % H_2O_2 at $18^\circ C$)

Oxidized period (days)	0	10	20	30
$\lim_{\phi \rightarrow 0} (\eta_{sp}/\phi)$	35.4	34.6	27.0	25.1
Axis-ratio	17.9	17.67	15.32	14.67

Oxidized fibroin was dissolved in Cu-En solution, dialyzed against water and 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$, $\mu=0.22$).

Table 28. Volume fraction intrinsic viscosity and axis-ratio of the oxidized fibroin (treated with 1.9 M- H_2O_2 , $pH=6.97$ at $70^\circ C$)

Oxidized time (min)	0	60	180	300
$\lim_{\phi \rightarrow 0} (\eta_{sp}/\phi)$	31.9	24.4	23.8	23.4
Axis-ratio	18.04	15.78	15.60	15.50

Solvent; 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$, $\mu=0.22$).

に対し、10日間常温浸漬 (tyrosine 減少率 13.62%) のものは 17.9×10^4 と増加している。実験区内ではこれを最大値とし酸化度の進行とともに漸減している。フィブロインの tyrosine 減少率と平均分子量との関係を他の酸化剤処理のものと1例について比較してみると 0.1 N- $KMnO_4$ 、10分間処理のものは tyrosine 減少率 21.24%、分子量 33.4×10^4 であり、0.1 N- $Ca(OCl)_2$ 10分間処理のものは tyrosine 減少率 28.28%、分子量 21.5×10^4 (第3章および第4章記述) であるのに対し 35%

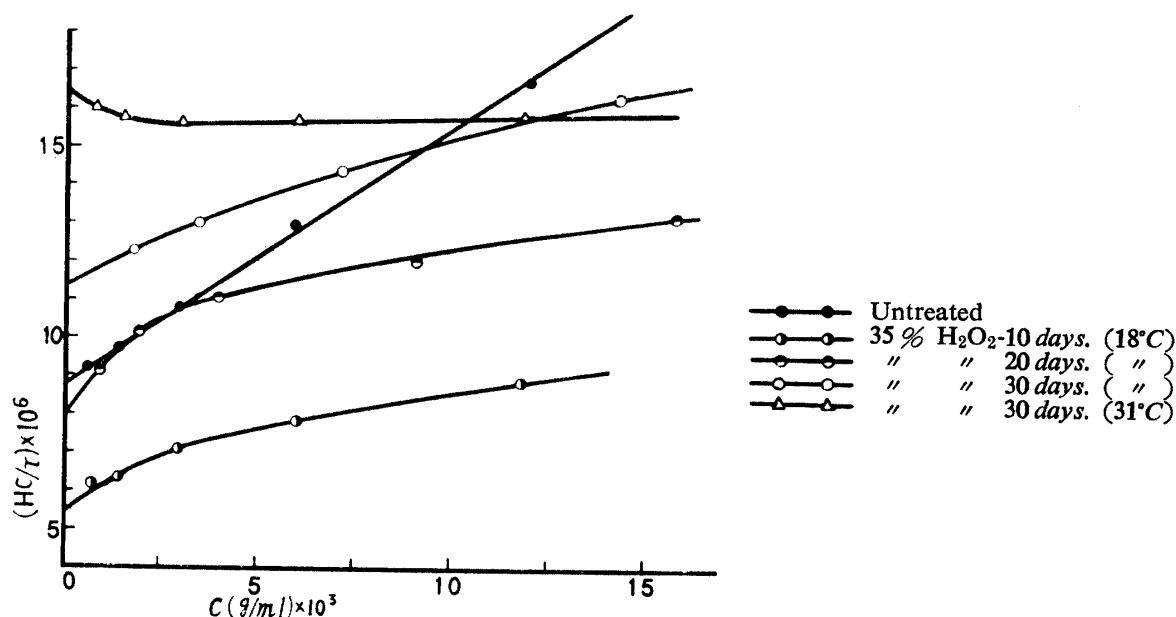


Fig. 33. The relation between light scattering intensity and concentration of the oxidized fibroin in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0 \mu=0.22$)

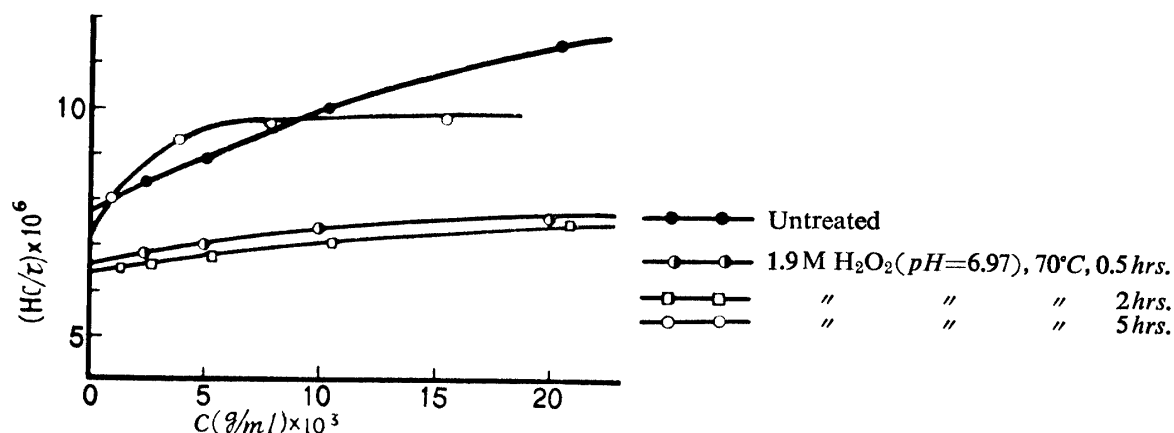


Fig. 34. The relation between light scattering intensity and concentration of the oxidized fibroin in 5 M urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0 \mu=0.22$)

Table 29. Average molecular weight of the oxidized fibroin determined by light scattering (in 35 % H_2O_2 oxidation at $18^\circ C$)

Oxidized period (days)	0	10	20	30	30*
$(Hc/\tau)_{c \rightarrow 0} \cdot 10^{-6}$	8.8	5.6	8.0	11.4	16.5
M.W. (10^4)	11.4	17.9	12.5	8.8	6.1

* Oxidized temperature; $30^\circ C$.

Solvent; 5 M-urea per liter 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0, \mu=0.22$).

H_2O_2 で 30日間処理のものでは tyrosine 減少率 24.60%, 分子量 8.8×10^4 である。この結果も 3種の酸化剤によるフィブロインの崩壊機構がそれぞれ異なることを示唆している。

35% H_2O_2 試薬中には安定剤として酸が共存しており長期間浸漬されたフィブロインには加水分解による主鎖切断が起るから(第6章第4節参照)第29表の分子量増大は酸化による分子連鎖間の部分的結合の強化に基づくものである。1.9 mol H_2O_2 ($pH=6.97$) 加温酸化のものは第30表から無

Table 30. Average molecular weight of the oxidized fibroin determined by light scattering (in 1.9 M-H₂O₂ oxidation, at 70°C)

Oxidized time (min)	0	30	120	300
$(H_c/\tau)_{c \rightarrow 0} \cdot 10^{-6}$	7.8	6.6	6.4	7.25
M.W. (10 ⁴)	12.8	15.2	15.6	13.8

Solvent; 5 M-urea per liter 0.1 M carbonate buffer (pH=10.0, $\mu=0.22$).

処理フィブロインより、やや分子量の増大が認められるがこの原因は不明である。しかし分子量的概念からみればこの増大は極めて小さく、また中性加温酸化ではフィブロインの加水分解崩壊は認め難いので(第6章第4節参照)この場合には連鎖間結合の強化はほとんど起らないと考えられる。

第5節 酸化フィブロイン溶液の電気泳動

35% H₂O₂ (pH=1.30) で30日間常温酸化したフィブロインと 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97), 70°C で1および5時間酸化したフィブロインの溶液を作製し Tiselius 電気泳動装置を用いて泳動挙動を調べた。緩衝液、蛋白濃度および泳動条件は第3章第7節に記述したものと同一である。得られた泳動図を第35図に示す。

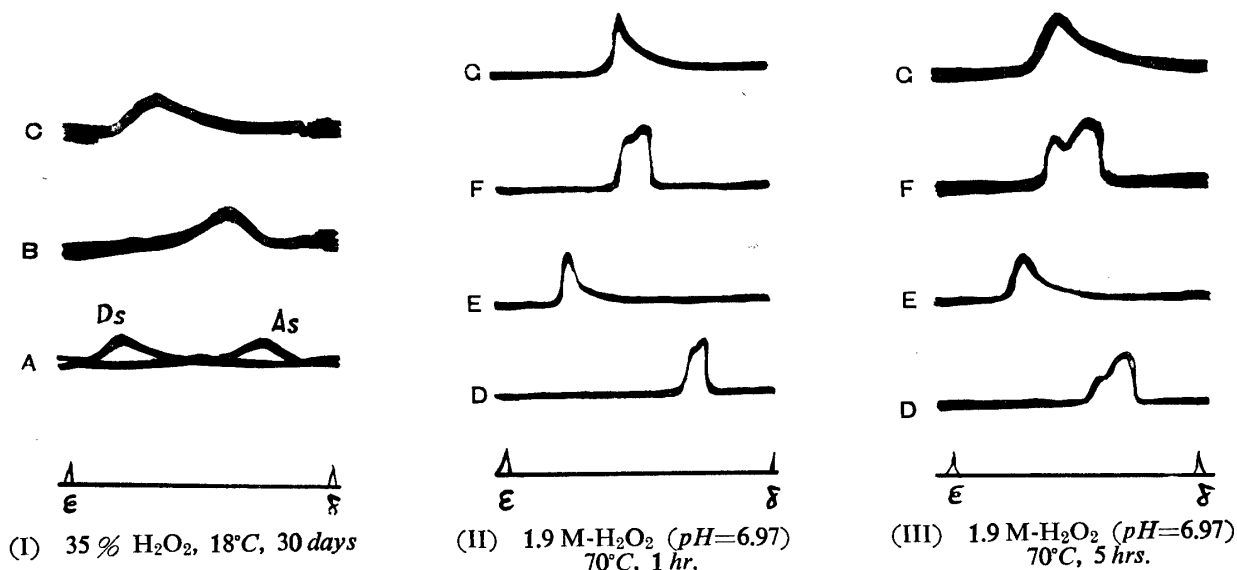


Fig. 35. Electrophoretic patterns of the oxidized fibroin (treated with 35%, 1.9 M-H₂O₂) in 0.1 M carbonate buffer (pH=10.0 $\mu=0.22$) at 19°C, 36 volt, 5 mA.

A; Pattern after 2 hrs in both sides
 B; " " 3 hrs in ascending
 C; " " 3 hrs in descending
 D; " " 2 hrs in ascending
 E; Pattern after 2 hrs in descending
 F; " " 3 hrs in ascending
 G; " " 3 hrs in descending

第3章第7節で示したように無処理フィブロインの電気泳動図は1個の明確な峰を示すが35% H₂O₂ 酸化フィブロインも同様であつた。第15図の無処理フィブロインの泳動の各時間における上昇、下降側の易動度を100とすれば本試料の相対易動度は2時間では上昇側96、下降側では91であり、3時間では上昇側95、下降側83であり無処理のものに比し泳動速度が遅い。これは酸化によりフィブロインの荷電量比が変化し酸化フィブロインは無処理のものよりも相対的に(+)帯電量が多いことを示唆する。

それに対し 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97), 70°C で1および5時間酸化したフィブロインでは下降側

は明確な 1 個の峰を示すが上昇側は峰の異常あるいは 2 個の峰への分離を生ず。しかし裾の拡がりは生じない。無処理フィブロインを基礎とした相対易動度は 1 時間酸化のものは泳動時間 2 時間では上昇側 100, 下降側 105, 3 時間では上昇側 110, 下降側 117, 5 時間酸化のものの泳動時間 2 時間では上昇側 100 と 126 の 2 峰, 下降側 119, 3 時間では上昇側 95, 125 の 2 峰, 下降側 106 であつた。35% H_2O_2 処理のものと異なり無処理フィブロインに比し泳動速度が早い。1.9 mol H_2O_2 中性加温酸化では無処理のものより相対的に (-) 帯電量が多いことが考えられる。35% H_2O_2 常温酸化と 1.9 mol H_2O_2 中性加温酸化とではフィブロイン分子に及ぼす荷電量比の変化が対称的である。ともあれ、これらの過酸化水素酸化フィブロインの泳動図は 0.1 N- KMnO_4 あるいは 0.1 N- $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ で酸化されたフィブロインのもの、すなわち界面の平坦化現象とは著しく異なる。またこれらの泳動図の平坦化現象の有無が酸化フィブロインの溶剤への溶解性の難易とも一致していることは興味深い。

第 6 節 小 括

(1) フィブロインを 35% H_2O_2 で常温酸化および 1.9 mol H_2O_2 ($\text{pH}=6.97$) 磷酸塩緩衝液で加温酸化を行つた。酸化フィブロインの強力および伸度の脆化率は稀薄過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩酸化の場合に比し遙かに小さい。とくに他の酸化剤処理にみられる酸化初期の激甚な脆化は認められない。

(2) フィブロインの全窒素, serine および threonine 含量にはほとんど変化は認められず, tyrosine 含量のみが酸化に伴い徐々に減少する。35% H_2O_2 酸化のさいは tyrosine 含量と過酸化水素消費量との関係は第 30 図のごとき曲線関係となる。1.9 mol H_2O_2 加温酸化のさいはフィブロインの有無による過酸化水素の分解率の差は認められないにも拘らず tyrosine 含量は漸減する。

(3) 過酸化水素酸化によるフィブロインの tyrosine 減少率が過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化の場合と同一値であつても、強力や伸度の脆化率は二者の場合より遙かに小さい。この事実から過酸化水素による tyrosine 残基の構造変化の機構が他の酸化剤処理の場合とは異なることが確認される。

(4) 過酸化水素酸化フィブロインは過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインとは Cu-En に対する溶解挙動を異にする。すなわち溶解抵抗性を示さず無処理フィブロインよりもむしろ易溶である。

(5) 容積分率固有粘度および軸比は酸化の進行とともに漸次小さくなる。しかしその低下度は酸化度が過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩酸化の場合と等しい時でも小さい。

(6) 平均分子量は 35% H_2O_2 処理の場合には短時間酸化により若干増大しその後漸減する。稀薄過酸化水素による中性加温処理の場合にはかような変化はほとんど認められない。

(7) 過酸化水素酸化フィブロインの電気泳動図では界面の平坦化現象は認められない。

35% H_2O_2 酸化フィブロインの泳動図は無処理のものと同様に 1 個の明確な峰を示し相対易動度から無処理のものに比し泳動速度が遅いことが認められる。1.9 mol H_2O_2 加温酸化フィブロインの泳動図は下降側では明確な 1 個の峰を示し上昇側では峰の異常あるいは 2 個の峰への分離を示す。しかし裾の拡がりは生じない。各峰の相対易動度から無処理フィブロインよりも泳動速度が早いことが認められる。

第 6 章 異種酸化剤で処理されたフィブロインの N-末端基量

酸化に伴うフィブロイン分子の N-末端基量あるいは C-末端基量の消長を調べることにより分

子鎖の加水分解開裂の有無を直接知ることができる。しかるに酸化剤で処理されたフィブロインに対してはこの問題を取扱つたものは従来皆無である。わずかに近年小幡ら¹¹⁷⁾¹¹⁸⁾が紫外線酸化した球状蛋白質につき DNP-アミノ酸の検索を行い、また岡本⁷⁰⁾が日光酸化フィブロインの DNP 化物につきその分解液の吸光度測定を行つたにすぎない。SITCH ら⁵⁴⁾は酸化剤で処理したフィブロインの重量変化と流動性 (fluidity) 変化との関係から主鎖切断を論じているが酸化作用の如く側鎖変化をもたらす場合はむしろ分子連鎖間の相互作用により形態変化が起り、主鎖切断が惹起されなくても流動性増加をきたす可能性が大きい。

このことは前章迄に記述した酸化による分子量増大の現象によつて肯定される。従つて DNP 法により N-末端基の量的変化を調べ酸化分解に伴う加水分解の有無および脱アミノ反応の有無を検討した。

第 1 節 光電比色法による酸化フィブロインの N-末端基定量

(i) 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) の合成

弗化加里と dinitrochlorobenzene (DNCB) とから合成する。そのさい DNCB の溶剤に nitrobenzene (NB) を用いる。合成方法は COOK & SAUNDERS の方法¹¹⁹⁾に準じたが生成物の収量および純度が悪かつたので一部変更した。

DNCB, 86.5 g を脱水 NB 200 g にとかしたものと粉状 KF 33 g を逆流冷却器, 攪拌装置, 温度計を付けた 1 liter 容の三口フラスコに入れ砂浴上で加熱し NB が沸騰する状態 (210°C) で強く攪拌しながら 3 時間反応させた。その後放冷し濾過して無機塩を除き充分 NB で洗い前と同量の KF を加えてさらに 3 時間反応させた。同様の処理をさらに 1 回繰返し通算 9 時間反応させた。反応終了後放冷濾過し 70°C の toluene で洗い, 濾液, 洗液を合したものに無水芒硝を加え一夜放置して脱水させる。これをガラスフィルターで濾過し油浴中で減圧画温蒸溜により toluene, NB を除去し最後に 188°C~190°C/43~45 mm Hg で DNFB を採取した。Cook et al の方法では DNCB と KF の mol 比は 1:2 で反応は 5 時間連続して行ふのみである。著者の処理では合計モル比は 1:4 である。得た製品は良好で収量は理論値の 75% 前後であつた。

DNFB の性状は文献¹²⁰⁾によれば微黄色の固体または液体で融点は 25°C であるが著者が得た製品は 25°C では液体であり振盪しても固化しない。冷蔵庫中に保存すれば固化する。

この点は Cook et al の報告と同様である。ただし Cook et al の方法に従つた場合は溜分が直ちに固化することがある。または液状に得られた溜分が強い振盪あるいは pipetting により固化することもある。DNCB の *m.p.* は 52~54°C であり予備実験によれば DNCB は DNFB とほとんど同じく 187~188°C/43 mm Hg で溜出することが認められた。従つて上述の固化原因は合成時の反応が不充分のため DNCB が混在していることによるものであり著者の一部修正法によれば製品の不良化をまぬがれ易い。

(ii) DNP-glycine の吸収 曲線およびその濃度と吸光度との関係

DNP アミノ酸類は濃度 50 μM 以下では Beer の法則に従い吸光度と濃度とは直線関係にある。¹²¹⁾従つて蛋白質の N-末端アミノ酸の定量は蛋白質を DNP 化してそれから分離した DNP アミノ酸についてそれぞれの吸収極大波長 (λ_{max}) における吸光度を分光光度計で測定することによつて行ふ。¹²²⁾しかし本研究では DNP アミノ酸の分離定量を目的としないので光電比色計を利用して末端基の量的多少を測定できれば簡便であると考えた。

比色標準の DNP アミノ酸としてはフィブロイン中最も高含量でかつ末端アミノ酸の 1 つである

glycine を選定し、先ず島津製作所製分光光度計を用い DNP-glycine の吸収曲線を作製した。DNP-glycine の調製は SANGER 法¹²³⁾ によつた。DNP-glycine の 1% NaHCO₃ 中および 0.6 N-HCl 中における吸収スペクトルは第 36 図の如き曲線となる。すなわち可視部には吸収極大はないが 420 m μ に shoulder を認める。

λ_{max} は 363 m μ (1% NaHCO₃ 中), 355 m μ (0.6 N-HCl 中) でありこのほかに両者共に 265 m μ 近傍に小さい peak を有する。DNP-alanine の 1% NaHCO₃ 溶液も 420 m μ 近傍に shoulder を有する。¹²⁴⁾

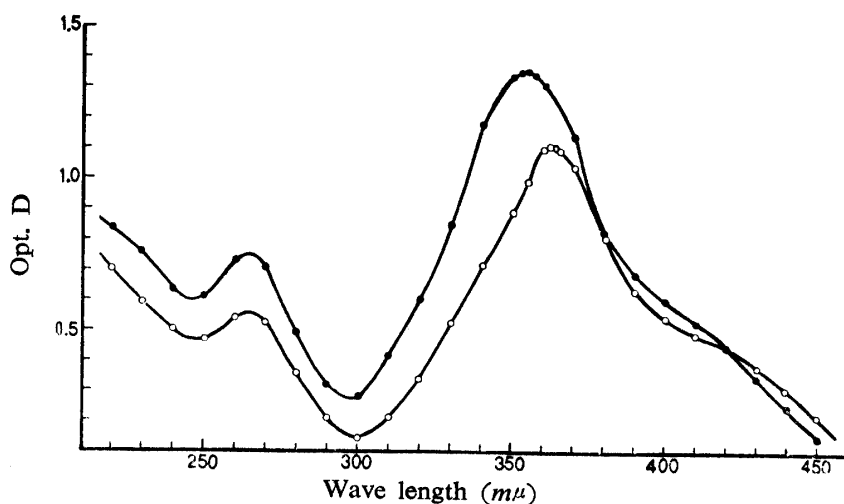


Fig. 36. Absorption spectrum of DNP-glycine
 ●—● 82.94 μ M-DNP-glycine, solvent; 0.6 N-HCl
 ○—○ 33.18 μ M-DNP-glycine, solvent; 1% NaHCO₃

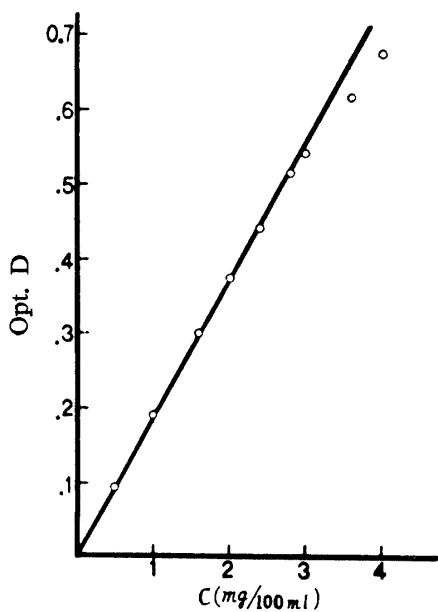


Fig. 37. The relation between concentration and optical density of DNP-glycine in 1% NaHCO₃

Electrophotometer (filter; S₄₂) was used for measuring.

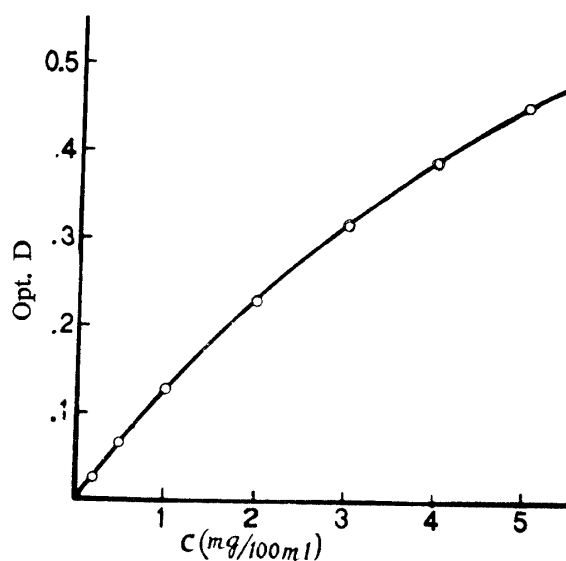


Fig. 38. The relation between concentration and optical density of DNP-glycine in 0.6 N-HCl

Electrophotometer (filter; S₄₂) was used for measuring.

従つて光電比色計（東京光電V新型）を用い、フィルター S_{42} を使用し DNP-glycine の濃度と吸光度との関係を求めると溶媒が 1% NaHCO_3 の場合は第 37 図の如く約 $100 \mu\text{M}$ 濃度以下では Beer の法則に従い直線関係が成立することを認めた。図の直線式は $y=0.186x$ で表わされる。y は吸光度、x は濃度（単位は $\text{mg}\%$ ）である。この式の適用範囲は濃度が $2.5 \text{mg}\%$ 迄である。なお $1 \text{mg}\%$ は濃度、 $41.47 \mu\text{M}$ に相当する。従つて各 DNP-酸化フィブロインの加水分解後のエーテル抽出部の DNP アミノ酸を適当に稀釈して比色定量した。

溶媒が塩酸の場合には直線関係は得られず第 38 図の如き曲線となる。従つて酸層部の DNP-アミノ酸の定量は吸光度を測定しこの図より算出した。

(iii) DNP フィブロインおよび DNP-酸化フィブロインの加水分解、エーテル抽出後の
吸収スペクトル

DNP フィブロインおよび DNP 酸化フィブロインの調製は SANGER 法¹²³⁾によつた。フィブロインあるいは酸化フィブロイン 500mg を 10% NaHCO_3 10cc あるいは 15cc に浸し、 0.5cc の DNFB を 10cc のエタノールにとかしたものを加え、暗処で 4 時間振盪させその後 0.1N-HCl 、水、エタノール、エーテルで順次洗滌し減圧デシケーター中に入れ暗処に保存する。試料が繊維であるため振盪時間を常法の 2 倍とした。また酸化フィブロインは無処理のものより酸性基の増加が考えられるので重曹溶液は多量に用いた。

DNP 酸化フィブロインの加水分解

試料 200mg を 6N-HCl 10cc 中に入れ閉管し暗所で 6 時間沸騰水浴中で加水分解し、その後 30cc 、 20cc 、 15cc のエーテルで 3 回抽出する。エーテル抽出液は暗所で減圧乾涸し 10% NaHCO_3 にとかし 100cc に稀釈する。これを濾過して比色定量する。エーテル抽出後の液は小幡¹¹⁷⁾のごとく減圧濃縮しメチルエチルケトン抽出法を試みたが著しく発泡し長時間を要した。従つて DNP アミノ酸の分解のおそれがあるのでこの方法は行わずエーテル抽出後一定量に稀釈して比色した。

加水分解後酸層部溶液の吸収スペクトル

無処理フィブロインの DNP 化物を加水分解しエーテル抽出した残りの酸層溶液は黄色を呈するが酸化フィブロインの場合には酸化度の大小に拘らず微黄褐色である。従つて、DNP-フィブロインおよび DNP 酸化フィブロインの 1 試料 ($35\% \text{H}_2\text{O}_2$, 30 日間浸漬処理のもの) につき加水分解物の酸層部の吸収スペクトルを $350 \text{m}\mu$ ~ $530 \text{m}\mu$ に亘り測定したところ、何れにも特異な peak は現われず $420 \text{m}\mu$ に shoulder のみを認めた。その吸収曲線を第 39 図に示す。 ϵ -DNP-lysine の 1N-HCl 溶液も $420 \text{m}\mu$ に shoulder を有する。¹²¹⁾ 測定用の両試料はともに DNP 化物 200mg を加水分解しエーテル抽出後の液を 100cc に稀釈したものであり溶媒の塩酸の濃度は 0.6N である。従つて各酸化フィブロインの酸層部についても同様の処理を行い S_{42} における吸光度を測定し定量した。

さらに短波長の吸収スペクトルを調べたところ第 40 図のごとく両試料液ともに $300 \text{m}\mu$ 近傍に λ_{max} を認めた。この場合は上記の溶液のままでは濃すぎるのでさらに 0.6N-HCl で 10 倍に稀釈して測定したものである。

第 40 図の吸収曲線とは異なり第 36 図に示した DNP-glycine の稀薄塩酸および重曹中の吸収曲線では $300 \text{m}\mu$ は吸収極小波長 (λ_{min}) であつた。DNP アミノ酸の大部分は $300 \text{m}\mu$ に λ_{min} をもつが O-DNP-tyrosine のみは稀薄塩酸中では吸収極大を有することが SANGER により見出されている。¹²¹⁾ di-DNP-tyrosine は稀薄塩酸不溶であるため 1% NaHCO_3 中における吸収スペクトルを測定すると第 41 図の如く λ_{max} ; $260 \text{m}\mu$, $356 \text{m}\mu$, λ_{min} ; $310 \text{m}\mu$ であつた。

従つて酸化に伴なう tyrosine 残基の phenol 性 OH 基の量的変化を知るため各 DNP-酸化フィ

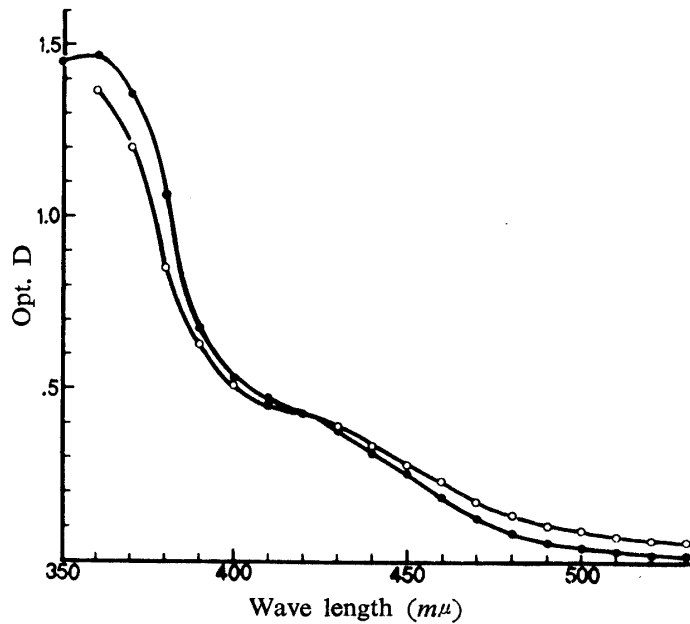


Fig. 39. Absorption spectrum of acid soluble part separated after hydrolysis of DNP-fibroin and DNP-oxidized fibroin Solvent; 0.6 N-HCl
 ●—●—● DNP-fibroin hydrolysate, acid soluble part
 ○—○—○ DNP-oxidized fibroin* hydrolysate, acid soluble part
 * 35 % H₂O₂, 30 days-soaked

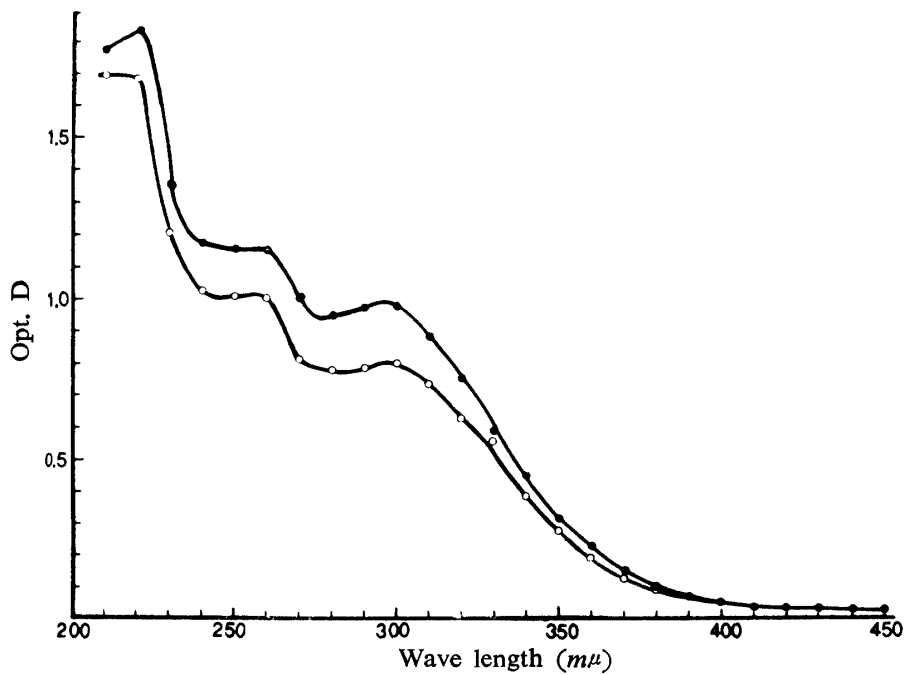


Fig. 40. Absorption spectrum of acid soluble part separated after hydrolysis of DNP-fibroin and DNP-oxidized fibroin Solvent; 0.6 N-HCl
 ●—●—● DNP-fibroin hydrolysate, acid soluble part
 ○—○—○ DNP-oxidized fibroin* hydrolysate, acid soluble part
 * 35 % H₂O₂, 30 days-soaked

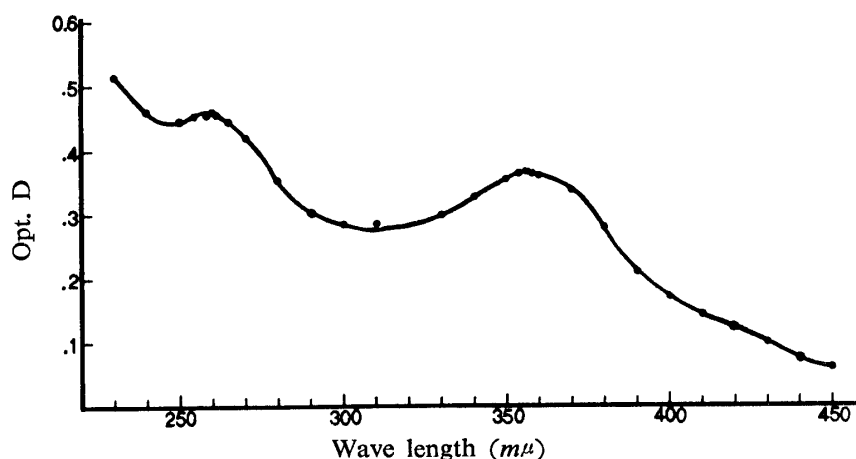


Fig. 41. Absorption spectrum of di-DNP-tyrosine in 1% NaHCO₃

ブロインの加水分解物の酸層分配溶液について 300 $m\mu$ の吸光度を測定した。

DNP-蛋白質の加水分解物からはほとんどすべての DNP アミノ酸がエーテル中に容易に抽出されるが DNP-arginine, DNP-cysteic acid, ϵ -DNP-lysine, O-DNP-tyrosine, Im-DNP-histidine 等, 極性基をもつものは水層中に残る.¹²⁵⁾ (O-; 水酸基, Im; イミダゾール基を意味する.) 従つて N-末端基量を知るためにはエーテル層 DNP アミノ酸の量を知るだけでも充分である. しかるにフィブロインには cysteic acid は含まれずまた O-DNP-tyrosine は無色であるので酸層の 420 $m\mu$ における吸光度測定により塩基性アミノ酸側鎖の量的変化を知ることができる。

第 2 節 過マンガン酸加里酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化

DNP-glycine を比色定量の標準アミノ酸として選定したが他のアミノ酸が N-末端であつても差支えないように N-末端基量表示にはモル濃度を用いた. 酸化フィブロイン $A mg$ を DNP 化し定量的に DNP 酸化フィブロイン $B mg$ を得ればこれを加水分解してエーテル抽出後, 前述操作で DNP アミノ酸を定量して得た値 $a \mu M$ (DNP 酸化フィブロイン 100 mg 中のモル数として) の B/A 倍値が試料の酸化フィブロイン 100 mg 中の N-末端アミノ酸モル数となる. しかるに酸化フィブロインの DNP 化物は調製時の洗滌処理のさい浮遊流去を免れず原試料より減量することがある. 無処理フィブロインではかような損失はなくほとんど定量的に DNP 化物を得ることができる. しかるに酸化フィブロインの場合には酸化度が進んだもの程 DNP 化物の収量減少度は大きい。

従つて末端アミノ酸のモル数は原フィブロイン中の μM 数としては表示せずそれぞれの DNP 酸化フィブロイン 100 mg 中のモル数で表わした. 成田¹²⁶⁾ もこのような表示法をとつている. しかしながら得られた結果は N-末端基量が増大するかあるいは減少するかにしても, むしろ B/A 倍, すなわち増量倍率だけ乗じた値が真の量であるので量的増減の傾向は一層大きいことになる. 第 3 章で述べた方法に準じ 0.1 N-KMnO₄ を用い種々の酸化フィブロインを調製しその DNP 化物について前節の処理方法でエーテル層および酸層部の吸光度測定を行い, 次いで N-末端アミノ酸のモル数を算出した. その結果を第 31 表に示す。

算出方法を 1 例について述べる. 無処理フィブロインのエーテル層の吸光度は 0.475 であるので前記 $y=0.186x$ より濃度 $x (mg \%)$ は 2.554 $mg \%$ となる. 従つてモル濃度に換算すれば 105.9 μM である. この測定液は DNP フィブロイン 200 mg を加水分解しエーテル抽出後 100 cc に稀釈したものであるから 100 cc すなわち 200 mg 中のモル数は $105.9 \times 100 / 1000$ である. 従つて DNP フィ

Table 31. N-terminal amino acid contents of fibroin* treated with 0.1 N-KMnO₄

Oxidized time (min)	0	10	30	60	120
O. D of ether soluble part	0.475	0.440	0.430	0.420	0.400
N-terminal amino A. (μ M)	5.30	4.90	4.79	4.68	4.46
O. D of acid soluble part	0.320	0.398	0.383	0.362	0.296
Diamino A. (μ M)	6.22	8.46	8.00	7.42	5.70

O. D; Optical density. DNP-amino acids were separated into ether and acid solution by extracting the hydrolysates of different DNP-oxidized fibroins with ether, and then each solution was diluted to a definite volume respectively. Dilution of ether soluble part was done with 1% NaHCO₃ after evaporation of ether. O. D of each solution was measured with electro-photometer using a filter S₄₂.

From each O. D, N-terminal content was calculated on the basis of the relation between the concentration and O. D of DNP-glycine. N-terminal was represented as the content in DNP-protein 100 mg.

* It was the one demanganised with 1% (COOH)₂ after treating.

ブロイン 100 mg 中のモル数は $10.59 \mu\text{M} \times 100/200 = 5.30 \mu\text{M}$ となる。

第 31 表から次のことが窺知される。

過マンガン酸加里酸化の場合はエーテル層移行の DNP アミノ酸は酸化の進行とともに漸減するし、酸層部 DNP アミノ酸は無処理のものより吸光度は高いが同じく漸減する。無処理のものより吸光度が高いのは DNP 酸化フィブロインの加水分解物の酸層部が微黄褐色を呈しているためであり、この褐色の原因はフミン系物質の混在によるものと考えられる。

酸化に伴うエーテル層 DNP アミノ酸の減少は主鎖末端における酸化脱アミノ反応の惹起を意味し酸層 DNP アミノ酸の減少は塩基性アミノ酸の側鎖の脱アミノ反応の惹起を意味する。

稀薄過マンガン酸加里水溶液によるフィブロイン分子の酸化崩壊は tyrosine 残基の phenol 核のみならず一部主鎖および側鎖末端部にも起るものであり加水分解崩壊を併起しないことが認められる。従つて主鎖切断は phenol 核開裂の結果二次的に起るものである。

第 3 節 次亜塩素酸塩酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化

第 4 章で記載した方法に準じ 0.04 N および 0.02 N-Ca(OCl)₂ で種々の酸化フィブロインを調製しその DNP 化物の加水分解物についてエーテル層および酸層部の吸光度を測定し N-末端基量を算出した。その結果を第 32 表および第 33 表に示す。

次亜塩素酸塩酸化の場合にはエーテル層移行 DNP アミノ酸は短時間処理のものすなわち酸化初期のものでは無処理のものより減少しその後酸化の進行とともに漸増している。酸層 DNP アミノ酸は短時間酸化のものでは減少し他のものはほとんど変化がない。短時間酸化のものエーテル層 DNP

Table 32. N-terminal amino acid contents of fibroin treated with 0.04 N-Ca(OCl)₂

Oxidized time (min)	0	10	30	60	120
O. D of ether soluble part	0.450	0.383	0.407	0.505	0.510
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	4.27	4.54	5.63	5.68
O. D of acid soluble part	0.320	0.283	0.280	0.295	0.295
Diamino A. (μ M)	6.22	5.45	5.30	5.70	5.70

Procedure for measuring was the same as Table 31.

Table 33. N-terminal amino acid contents of fibroin treated with 0.02 N-Ca(OCl)₂

Oxidized time (min)	0	10	30	60	120
O. D of ether soluble part	0.450	0.420	0.448	0.480	0.490
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	4.68	4.99	5.35	5.45
O. D of acid soluble part	0.332	0.280	0.280	0.280	0.296
Diamino A. (μ M)	6.64	5.30	5.30	5.30	5.70

Procedure for measuring was the same as Table 31.

アミノ酸の減少は主鎖および側鎖末端の酸化脱アミノ反応の惹起を意味し、またその後の DNP アミノ酸の増加は加水分解反応の惹起を意味する。

このことから次亜塩素酸塩水溶液によるフィブロインの酸化崩壊は tyrosine 残基の phenol 核のみならず一部主鎖および側鎖部にも起るが同時に加水分解による解重合も起ることが認められる。また表の結果から酸化の初期には脱アミノ反応が加水分解作用よりも優先するが酸化の進行に伴ない、逆の傾向になることが窺知できる。

第4節 過酸化水素酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化

第5章記載の方法に準じ 35% H₂O₂ (pH=1.30) で常温酸化したフィブロイン, 1.9 mol H₂O₂ (pH=2.74) 70°C, 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97), 70°C および 98°C で酸化した種々の酸化度の異なるフィブロインを調製した。それらの DNP 化物の加水分解物についてそれぞれエーテル層および酸層部の吸光度を測定し N-末端基量を算出した。それらの結果を第34表乃至第37表に示す。

35% H₂O₂ でフィブロインを常温浸漬して酸化した場合はエーテル層移行 DNP アミノ酸は10日間浸漬のものでは無処理のものより減少しその後浸漬期間の延長とともに漸増している。この傾向は前節の次亜塩素酸塩酸化の場合と同じく主鎖末端の脱アミノ反応が酸化初期には起りその後は加水

Table 34. N-terminal amino acid contents of fibroin treated with 35% H₂O₂ at 18°C

Oxidized period (days)	0	10	20	30
O. D of ether soluble part	0.450	0.370	0.432	0.461
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	4.13	4.81	5.14
O. D of acid soluble part	0.325	0.308	0.306	0.294
Diamino A. (μ M)	6.43	6.01	5.93	5.64

Procedure for measuring was the same as Table 31.

Table 35. N-terminal amino acid contents of fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ phosphate buffer solution (pH=2.74) at 70°C

Oxidized time (min)	0	10	30	120	300
O. D of ether soluble part	0.450	0.400	0.451	0.463	0.495
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	4.46	5.02	5.17	5.51
O. D of acid soluble part	0.320	0.320	0.300	0.288	0.264
Diamino A. (μ M)	6.22	6.22	5.80	5.50	4.89

Procedure for measuring was the same as Table 31.

Table 36. N-terminal amino acid contents of fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ phosphate buffer solution (*pH*=6.97) at 70°C

Oxidized time (<i>min</i>)	0	10	30	120	300
O. D of ether soluble part	0.450	0.450	0.415	0.337	0.318
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	5.02	4.62	3.75	3.55
O. D of acid soluble part	0.320	0.311	0.293	0.237	0.205
Diamino A. (μ M)	6.22	6.10	5.64	4.30	3.57

Procedure for measuring was the same as Table 31.

Table 37. N-terminal amino acid contents of fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ phosphate buffer solution (*pH*=6.97) at 98°C

Oxidized time (<i>min</i>)	0	10	30	60	120
O. D of ether soluble part	0.450	0.351	0.324	0.321	0.325
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	3.94	3.61	3.58	3.63
O. D of acid soluble part	0.330	0.299	0.204	0.163	0.100
Diamino A. (μ M)	6.59	5.81	3.55	2.74	1.60

Procedure for measuring was the same as Table 31.

分解反応が優先することを示している。しかるに酸層 DNP アミノ酸の変化は次亜塩素酸塩酸化の場合とは異なり酸化の進行(浸漬期間の延長)に伴い漸減しており、ジアミノ酸残基の側鎖の脱アミノ反応も徐々に起ることを示している。

35% H₂O₂ すなわち試薬過酸化水素(一級)には安定剤として微量の磷酸および硫酸が混入しているのでその酸度の影響を調べた。

任意に3社製の一級試薬を選んで試料に供した。酸度測定は4つの方法で行った。

(a) 東亜電波 K.K. 製のガラス電極 *pH* メーターによる *pH* 測定, (b) 試薬規格法¹²⁷⁾ に準じ試料液 10 cc を採り phenol-phthalein を指示薬として 0.1 N-NaOH による滴定, (c) 一定容量(10 cc) を採り蒸発乾涸させ水で稀釈後 0.1 N-NaOH による滴定, (d) 一定容量の試料液に過剰の一定量の 0.1 N-NaOH を加え逆流冷却器を付けた容器中で H₂O₂ を加熱分解させ冷却後 0.1 N-H₂SO₄ による逆滴定。得られた結果を第 38 表に示す。

(c) の方法により得た酸度は (b) および (d) 法により得た酸度より小さく現われており少量の揮

Table 38. Acidity of 35% H₂O₂ reagent (the first grade)

		Method			
		<i>pH</i> (a)	(b)	(c)	(d)
WAKO	Chem. Ind. Ltd.	1.15	0.025N	0.018N	0.023N
EDOGAWA	" " "	1.30	0.016N	0.009N	0.013N
ISHIZU	" " "	1.30	0.015N	0.007N	0.010N

a; *pH* was measured by glass electrode *pH* meter.

b; In accordance with the literature,¹²⁷⁾ sample 10 cc. was titrated with 0.1 N-NaOH as indicator phenolphthalein.

c; After evaporation of sample 10 cc., it was diluted with water and titrated with 0.1 N-NaOH.

d; Sample 10 cc. was heated with reflux in alkali to decompose the peroxide, and then titrated with 0.1 N-H₂SO₄.

発性酸の混在を示している。

一試料については磷酸含量を DENIGES 法¹²⁸⁾により測定したところ P_2O_5 として 130 p.p.m であつた。なお定性的に相当多くの SO_4^{--} 根の存在を確認したので試薬中の全酸度にほぼ相当する規定度すなわち 0.01 N- H_2SO_4 にフィブロインを 10日, 20日, 30日間 18°C で浸漬しその N-末端基量を測定した。その結果を第 39 表に示す。

Table 39. N-terminal amino acid contents of fibroin soaked in 0.01 N- H_2SO_4 at 18°C

Soaked period (days)	0	10	20	30
O. D of ether soluble part	0.450	0.460	0.538	0.609
N-terminal amino A. (μ M)	5.02	5.12	6.00	6.78
O. D of acid soluble part	0.325	0.346	0.346	0.345
Diamino A. (μ M)	6.43	6.97	6.97	6.95
O. D of acid soluble part at 300 $m\mu$	0.490	0.490	0.488	0.490

Procedure for measuring was the same as Table 31.

0.01 N- H_2SO_4 で浸漬されたフィブロインは浸漬期間の延長に伴ないエーテル層移行 DNP アミノ酸の増加がみられ加水分解が起きていることを明示している。なお酸層部の 300 $m\mu$ における吸光度は何等変化を示さない。フィブロインの N-末端アミノ酸は glycine, alanine および serine であるので¹²⁹⁾ 300 $m\mu$ の吸光度が不変であることは DNP-tyrosine の分配からみて tyrosine 残基は加水分解されず peptide 中に存在していることを示す。またフィブロインの加水分解崩壊起点は主として serine および threonine の peptide 結合部と考えられているので¹³⁰⁾ 上述のことから serine あるいは threonine 残基と tyrosine 残基の NH_2 基との結合形体はフィブロイン分子中には存在しないだろうと想像される。

フィブロインの稀硫酸浸漬後の N-末端基量測定の結果から 35% H_2O_2 酸化フィブロインで起きた加水分解は共存する酸によることを確認した。1.9 mol H_2O_2 磷酸塩緩衝液 ($pH=2.74$) による加温酸化フィブロインの N-末端アミノ酸量の変化も同様の傾向を示した。

第 36 表および第 37 表で判る如く 1.9 mol H_2O_2 中性溶液による加温酸化の場合はエーテル層移行 DNP アミノ酸および酸層 DNP アミノ酸は何れも酸化の進行に伴ない減少しているが、その減少度は後者が大きい。すなわち過酸化水素によるフィブロインの酸化崩壊は tyrosine 残基の phenol 核部位で起るのみならず主鎖末端および側鎖のジアミノ酸残基部においても脱アミノ反応が徐々に起る。この場合には加水分解崩壊を伴わない。従つて過マンガン酸加里酸化時と同じく主鎖切断は phenol 核開裂の結果二次的に起ると推定される。

第 5 節 酸化フィブロインの O-DNP-tyrosine 量の変化

DNP フィブロインを加水分解しエーテル抽出を行つたあとの酸層溶液の吸収曲線中 300 $m\mu$ に現われる吸収極大は peptide 連鎖中 tyrosine 残基の OH 基が DNP 化されたもの、すなわち O-DNP-tyrosine に基因する。従つてこの波長における吸光度測定は酸化による tyrosine 残基の変化が -OH 基以外の位置の単なる modification であるか否かを知る意味で価値がある。測定方法は本章第 1 節で述べた如く DNP 蛋白質 200 mg を 6 N-HCl で加水分解しエーテル抽出後の溶液を水で 100 cc に稀釈し、さらにその液の一定量 (0.5 cc) を採り 0.6 N-HCl で 20 倍稀釈して 300 $m\mu$ の吸光度を測定した。その結果を第 40 表に示す。

Table 40. Optical density of acid soluble part separated after hydrolysis of DNP-oxidized fibroin, at 300 $m\mu$ wave length

Oxidizing agent	Oxid. time (min)				
	0	10	30	60	120
0.1 N-KMnO ₄	0.510	0.331	0.256	0.217	0.196
0.04 N-Ca (OCl) ₂	0.510	0.395	0.371	0.362	0.345
0.02 N-Ca (OCl) ₂	0.510	0.412	0.404	0.394	0.366

Oxidizing agent	Oxid. period (days)			
	0	10	20	30
35 % H ₂ O ₂	0.510	0.440	0.430	0.410

Absorption at 300 $m\mu$ is attributed to the existence of O-DNP-tyrosine.

フィブロインの酸化分解反応は主として tyrosine 残基部に起ることをすでに 3種の酸化剤処理の場合について記載したが(第3章第4節, 第4章第3節, 第5章第2節参照)第40表の結果から何れの酸化剤の場合にも酸化の進行に伴ない phenol 性 OH 基が漸減することが認められた. この OH 基の減少は酸化時間別にみると最初の短時間処理の場合に著しい. このことはまた tyrosine 含量変化の傾向とも相似している. 従つて tyrosine 残基の変化は OH 基以外の位置の modification にはほとんど基因しないことを示している.

すなわち phenol 核開裂あるいは OH 基自体の modification を示唆する.

第6節 小 括

(1) DNP-glycine は 363 $m\mu$ (1% NaHCO₃ 中), 355 $m\mu$ (0.6 N-HCl 中) に吸収極大を有し, 可視部には 420 $m\mu$ に shoulder を有することが認められた. 光電比色計でフィルター S₄₂ を用い DNP-glycine の濃度と吸光度との関係を調べたところ溶媒が 1% NaHCO₃ の時は濃度 2.5 mg % 以下では直線関係が成立する. その直線は $y=0.186x$ で表わされる. y は吸光度, x は濃度(単位; mg %) である. 溶媒が 0.6 N-HCl の時は直線関係は成立せず第38図の如き曲線となる.

(2) DNP フィブロインおよび DNP 酸化フィブロインの加水分解物の吸収曲線も 420 $m\mu$ に shoulder を示す. 従つて各種の DNP 酸化フィブロインの加水分解物のエーテル移行層および酸層につき光電比色計(S₄₂)を用いて吸光度を測定し(1)で述べた DNP-glycine の濃度と吸光度との関係から N-末端基量を算出した.

なお酸層の吸収曲線は O-DNP-tyrosine の存在に基づく吸収極大(300 $m\mu$ 位置)を示すので酸化に伴なう tyrosine の OH 基の量的変化を知るため各種 DNP 酸化フィブロイン水解物の酸層につき 300 $m\mu$ の吸光度を測定した.

(3) 過マンガン酸加里酸化フィブロインではエーテル層 DNP アミノ酸量は酸化の進んだもの程漸減し, 酸層 DNP アミノ酸液は無処理のものより吸光度は高いが同じく漸減している. 吸光度が無処理のものより高いのはフミン系物質の混在によると思われる. 酸化に伴なうエーテル層 DNP アミノ酸量の減少は主鎖末端における酸化脱アミノ反応の惹起を示し酸層 DNP アミノ酸量の減少はジアミノ酸残基の脱アミノ反応の惹起を示す. すなわち稀薄過マンガン酸加里水溶液によるフィブロイン分子の酸化崩壊は tyrosine 残基の phenol 核のみならず一部主鎖および側鎖末端部にも起り, 加水分解を併起しない. 従つて主鎖切断は phenol 核開裂の結果二次的に起るものである.

(4) 次亜塩素酸塩酸化フィブロインについてみるとエーテル層 DNP アミノ酸量は短時間酸化の

ものでは無処理より減少しその後酸化の進んだもの程漸増している。酸層 DNP アミノ酸量は短時間酸化のものでは減少しその後のものではほとんど変化を認めない。従つて次亜塩素酸塩水溶液によるフィブロインの酸化崩壊は tyrosine 残基の phenol 核のみならず一部主鎖およびジアミノ酸側鎖部にも起るが同時に加水分解による解重合反応も起る。また酸化初期には脱アミノ反応が加水分解作用よりも優先するが酸化の進行に伴ない逆の傾向になる。

(5) 35% H_2O_2 で常温酸化されたフィブロインではエーテル層 DNP アミノ酸は短期間処理のものでは無処理より減少しその後酸化の進んだもの程漸増している。すなわち (4) と同様に主反応としては tyrosine 残基の酸化が起るが同時に酸化初期には主鎖末端の脱アミノ反応、後には加水分解が起ることが認められる。酸層 DNP アミノ酸の変化は (4) と異なり酸化の進行に伴ない漸減しジアミノ酸側鎖の脱アミノ反応が徐々に進行することを示している。この場合の加水分解は安定剤として共存する酸の作用によることを証明した。

中性過酸化水素溶液で酸化されたフィブロインではエーテル層および酸層 DNP アミノ酸は酸化の進行に伴ない減少しているがその減少度は後者が大きい。すなわち過酸化水素によるフィブロインの酸化は tyrosine 残基のほか主鎖およびジアミノ酸側鎖の末端にも徐々に起ることを認めた。従つて主鎖切断は、phenol 核開裂に次いで二次的に行われると推定される。

(6) 上記3種類の酸化剤でそれぞれ酸化されたフィブロインは酸化の進んだもの程 tyrosine 残基の phenol 性 OH 基が減少している。

この減少度は酸化時間別にみると初期に著しい。

第7章 酸化フィブロインの Cu-En 溶液への不溶解化原因の検討

無処理フィブロイン繊維は 1:10 の量比で cupriethylene diamine (Cu-En) 溶液中に投入し攪拌すれば常温で3分内外で完全に溶解分散するが、稀薄過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩処理の酸化フィブロインは同一条件では不溶解である。例えば 0.1 N- $KMnO_4$ あるいは 0.04 N- $Ca(OCl)_2$ で1分乃至2分のごとき短時間処理を行つても不溶解化する。酸化剤によるフィブロインの崩壊問題を取扱つた従来の研究者はこの不溶解化現象に直面し全く溶液論的研究を行つていない。著者は酸化フィブロインを量比 1:20 で Cu-En 溶液中に投入し強く攪拌を続けると最初はスポンジ様膨潤体となり、漸次シラップ状となり遂には溶解分散することを見出した。かようにして得た酸化フィブロインの溶液について第3章、第4章で記載したように粘度、光散乱および電気泳動等の測定を行うことができた。

従つて正確には難溶化であるが従来“insoluble”とされているので無処理フィブロインの易溶性との相対的比較上から不溶解という表現を用いた。この不溶解化原因については現在迄第1節の如き推定および想像のみがなされているが岡本の主張以外は実験的根拠を基盤とせず不十分なものである。なおまた、岡本の推定は日光酸化の場合でありこれが酸化剤処理の場合に果して適応するか否かは不明である。従つて第2節以下の色々な実験成績から従来の推定および想像を検討するとともに他の原因をも探究した。このことは同時に酸化によるフィブロインの tyrosine 残基の構造変化をも調べることになる。

第1節 酸化フィブロインの Cu-En 溶液への不溶解化原因に対する従来の考え

(i) 岡本 奨 (1959) の推定⁶⁸⁾¹³¹⁾ 岡本は日光酸化フィブロインの Cu-En 溶液に対する不溶解物中に dopa の存在を確認し、不溶解原因としてフィブロインの隣接連鎖の tyrosine 残基より酸化誘導された dopa 残基同志のエーテル結合あるいは dopa 残基と glutamic acid 残基間のエステル

結合形成による **cross-linkage** を推定している。

(ii) EARLAND & STELL (1957) の推定⁴⁷⁾ 彼等はフィブロインを数種の酸化剤と反応させて $\text{Ca-Cl}_2\text{-HCOOH}$ 溶媒系¹⁰⁹⁾ に不溶解になる結果を得て、その原因は **tyrosine** 残基の酸化による **modification** (改修) かあるいは **OH** 基の **hydrophobic group** との置換反応によるだろうと推定し、そのさいの構造は不明であると述べている。

なお赤外吸収スペクトル研究では **cross-linkage** の存在を認めることはできなかつたと記述している。

(iii) EARLAND & STELL (1957) の想像⁴⁷⁾ ALEXANDER et. al¹³²⁾ や DAS & SPEAKMAN¹³³⁾ により酸化蛋白質は指示薬挙動をとるから蛋白質中の **tyrosine** 残基は酸化されてキノン構造をとるだろうと想像されている。しかしこの直接的証明はなされていない。EARLAND らはこの想像が正当であればキノン残基は隣接アミノ群と反応して **cross-linkage** を生成する可能性があるかと述べている。

(iv) CADWALLADER & SMITH (1956) の想像⁴⁶⁾ フィブロインを色々な条件で亜硝酸、次亜塩素酸塩および紫外線照射処理を行い、条件如何によつては **Cu-En** 溶液に不溶解化する現象を見出した。その定性的実験と他の研究者により示されたアミノ酸単独の酸化分解機構に基づき、不溶解化原因は隣接鎖間の共有結合による **cross-linkage** 生成によるだろうと推定しその結合様式は不明だと述べている。しかるに次亜塩素酸塩による酸化については次の如く具体的な想像をなしている。

LANGHELD¹³⁴⁾ の遊離アミノ酸の酸化研究に基づき、アルカリ性次亜塩素酸塩はフィブロインと反応して先ず **HCHO** を生じそれが **tyrosine** の **phenol** 核と反応して **ortho hydroxy benzyl alcohol** 基となる。次いでフィブロイン分子の隣接鎖中の2個の **tyrosine** 残基が **methyl** 架橋あるいは **methylene ether** 架橋を形成して不溶解になるだろうと想像している。

この想像はアルカリ性次亜塩素酸塩の最初の作用は **peptide** 結合の若干を破壊し遊離アミノ酸を溶出させる。次いでその酸化生成物として **HCHO** の生成が起ることを前提とするという全く仮定的基盤に立脚している。

第2節 ドーパの酸化抵抗性および酸化フィブロイン中における検索

ARNOW¹³⁵⁾ は **tyrosine** 溶液の日光酸化で **dopa** が形成されることを推定し小幡ら¹³⁶⁾ は **tyrosine** 水溶液の光照射中間物として **dopa** を分離確認している。しかし SITCH et. al⁵⁴⁾ は **tyrosine** を過酸化水素で酸化する場合には **dopa** は認められないと述べている。フィブロインの構成アミノ酸をそれぞれ 0.1 N-KMnO_4 で常温で滴定しても **tyrosine** 以外のものはほとんど酸化されない。³²⁾ 0.02 mol tyrosine の硫酸酸性溶液 5 cc に 0.1 N-KMnO_4 を滴加すると最初は反応速度が大きく滴加するや否や Mn^{VII} イオンの桃色は消失して液の色は透明な微黄色となる。 10 cc 位滴加するとその酸化還元反応は緩慢となり 25 cc 位滴加すれば1滴加の色の消失に1分以上を要す。(第2章第2節参照) 村瀬,³²⁾ 中島⁴³⁾ はこの滴定数をもつて **tyrosine** の過マンガン酸加里消費量として表わしているが漸次放置するか加温すると脱色する。

著者はフィブロインの主要な構成アミノ酸およびそれに類似の構造物質を選定し 0.1 N-KMnO_4 加熱酸化を行い、酸化速度の序列を報告している。⁴⁵⁾ それによると **phenol** は **tyrosine** と同じく迅速に酸化される。**dopa** も構造上類似の挙動をとると考え **tyrosine** で行つたのと同方法で酸化抵抗性を調べた。

(i) 過マンガン酸加里滴加時の **dopa** 水溶液の性状

$0.02\text{ mol dopa } 5\text{ cc}$ に (1:4) H_2SO_4 10 cc を加え 0.1 N-KMnO_4 を滴加すると直ちに Mn^{VII} イオンの桃色は消失し **dopa** 水溶液は黄変する。このことは **tyrosine** と同一である。しかしその色調

(黄色)は $0.02 \text{ mol tyrosine}$ の場合より強い。滴加を続けると漸次この強い黄色は退色し 8 cc 位加えると無色となる。これ迄は Mn^{VII} イオンの色の消失は迅速であるがその後は緩慢になる。滴加量が 16 cc 乃至 17 cc に及ぶと桃色の消失に1分以上を要するが加温すれば直ちに消失する。

(ii) dopa の加熱酸化

既報⁴⁸⁾の *tyrosine*, *phenol* および他のアミノ酸類と比較するため加熱酸化を行い過マンガン酸加里消費量を求めた。 $0.02 \text{ mol dopa } 1 \text{ cc}$ に $20\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 10 cc および 0.1 N-KMnO_4 20 cc を加えて色々の時間 70°C で定温酸化した。一定時間後 0.1 N-(COOH)_2 で脱色しさらに 0.1 N-KMnO_4 で逆滴定して消費量を求めた。他の物質と比較するため消費量は $0.1 \text{ mol dopa } 5 \text{ cc}$ 当りになるように実験値を換算した。その結果を *tyrosine*, *phenol* および *serine* と同時に第42図に示す。

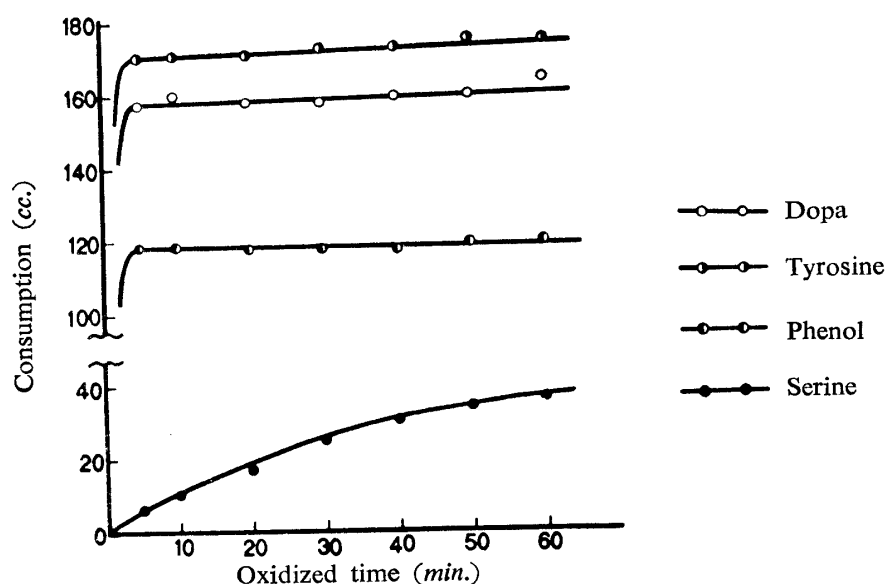


Fig 42. Variation of 0.1 N-KMnO_4 consumption by dopa, tyrosine, phenol and serine with the oxidized time
Consumption was represented as cc. per $0.1 \text{ M-solution } 5 \text{ cc}$.

過マンガン酸加里滴加時の *dopa* 水溶液の性状および第42図の曲線型から *dopa* は酸化剤共存下では *tyrosine* や *phenol* と同様に迅速に酸化されることを認めた。従つて酸化剤で酸化するさいには *tyrosine* 残基からの誘導体の *dopa* 残基が中間体として安定であるとは考えられず仮に生成したとしても直ちにその *phenol* 核は破壊すると推定される。

(iii) 酸化フィブリン中の dopa の検索

dopa-glutamic acid 残基間エステル結合が酸化剤処理フィブリン中に形成されておれば加水分解物中に *dopa* が検出されねばならない。

0.1 N-KMnO_4 , 0.1 N-Ca(OCl)_2 , 0.04 N-Ca(OCl)_2 , $1.9 \text{ mol H}_2\text{O}_2$ ($\text{pH}=6.97, 70^\circ\text{C}$), $35\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 等種々の時間処理された酸化フィブリンをそれぞれ 6 N-HCl とともに封管し 105°C , 10 時間加水分解し脱塩酸後 *paper chromatography* を行つた。展開溶媒は $n\text{-BuOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ ($4 : 1 : 2$) を用い, *dopa* の発色剤には 0.5% 赤血塩を用いた。種々の酸化フィブリンの加水分解液の *paper chromatogram* には全く *dopa* の spot は認められなかつた。常に微量の *dopa* を対照として用いたが, $R_f=0.43$ のところに明らかな橙色発色の spot を認めた。このことから *dopa-glutamic acid* 残基間のエステル結合形成による不溶解化は考えられない。通常エステル結合は加水分解され易いがエ

ーテル結合はそれに比し加水分解され難いので加水分解物中に **dopa** が検出されないことから **dopa-dopa** 残基間の **cross-linkage** の有無は判定し難い。従つて先ず **diphenyl ether** の吸収スペクトルを測定した。

溶媒はエタノールを用いた。第 43 図に示す如く $5 \times 10^{-4} \%$ という微小濃度でも $210 m\mu$ と $270 \sim 275 m\mu$ に明確な吸収極大が認められる。第 44 図は濃度を大きくして前図の $270 m\mu$ 近傍の吸収を詳細に測定したものである。

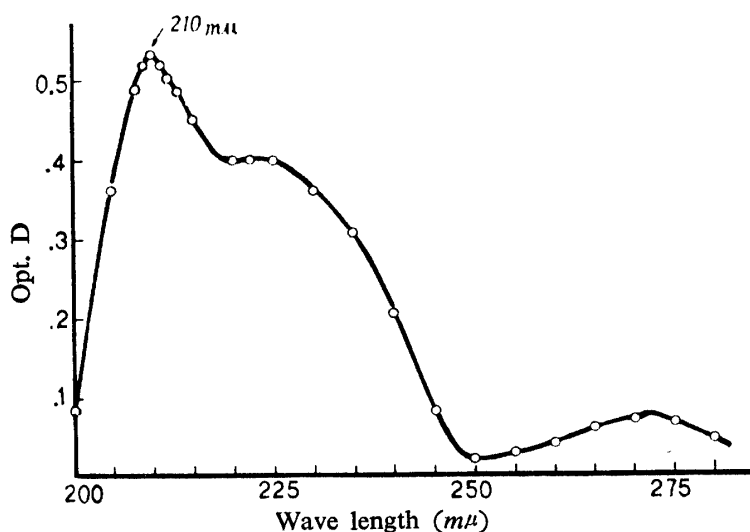


Fig. 43. Absorption spectrum of $5 \times 10^{-4} \%$ diphenyl-ether in ethyl alcohol

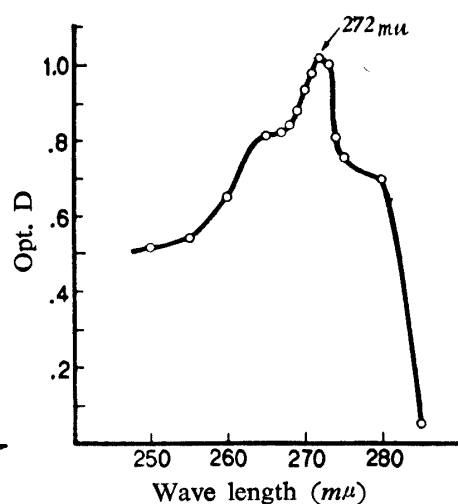


Fig. 44. Absorption spectrum of 0.01% diphenyl-ether in ethyl alcohol

その結果正確には吸収極大は $272 m\mu$ であることが認められた。その他 **diphenyl** (λ_{max} ; $245 \sim 250 m\mu$), **benzophenone** (λ_{max} ; $255 m\mu$) および **diphenyl** の核置換物例えば **p-phenyl-phenol** (λ_{max} ; $255 m\mu$) 等のように **diphenyl** 類似物質は $250 m\mu$ 近傍に λ_{max} を有することが知られている。¹⁸⁷⁾ しかるに次節の酸化フィブロイン溶液の吸収曲線第 45 図および第 46 図には **diphenyl ether** および類似化合物に該当するあるいは近似する吸収極大は全く認められない。このことから **dopa-dopa** 残基間のエーテル結合による **cross-linkage** の存在も考えられない。フィブロインでは光酸化の如き緩和な条件の場合には中間体として **dopa** が認められているが、酸化剤処理の場合は仮りに生成したとしても直ちに分解され **dopa** 残基を基点とした重合あるいは縮合は生成しない。従つて不溶解化原因は光酸化の場合と酸化剤処理の場合とは異なるものである。

第 3 節 酸化フィブロイン溶液の紫外吸収スペクトル

無処理フィブロイン、 $0.1 N-KMnO_4$ 、 $0.1 N-Ca(OCl)_2$ 、および 35% H_2O_2 でそれぞれ酸化されたフィブロインを **Cu-En** 溶液に溶解させ中和後、水次いで 0.1 モル炭酸塩緩衝液 ($pH=10.10$) で透析し遠心分離後濾過して一定濃度に調製した。

(溶液作製法の詳細は第 3 章第 5 節、第 4 章第 4 節および第 5 章第 3 節に記載した通りである。) これらの各溶液について $250 m\mu$ 乃至 $500 m\mu$ に亘る波長領域の吸収を詳細に調べた。短波長部分の吸収測定にはそれぞれ蛋白濃度を 0.04% とし長波長部分については 0.8% にした。それらの吸収曲線を第 45 図および第 46 図に示す。

無処理フィブロイン、 $0.1 N-KMnO_4$ 、 35% H_2O_2 -酸化フィブロインは $278 \sim 280 m\mu$ に λ_{max} を示し、 $0.1 N-Ca(OCl)_2$ 酸化フィブロインは此の位置に **shoulder** を示すのみであり、ほかには特異

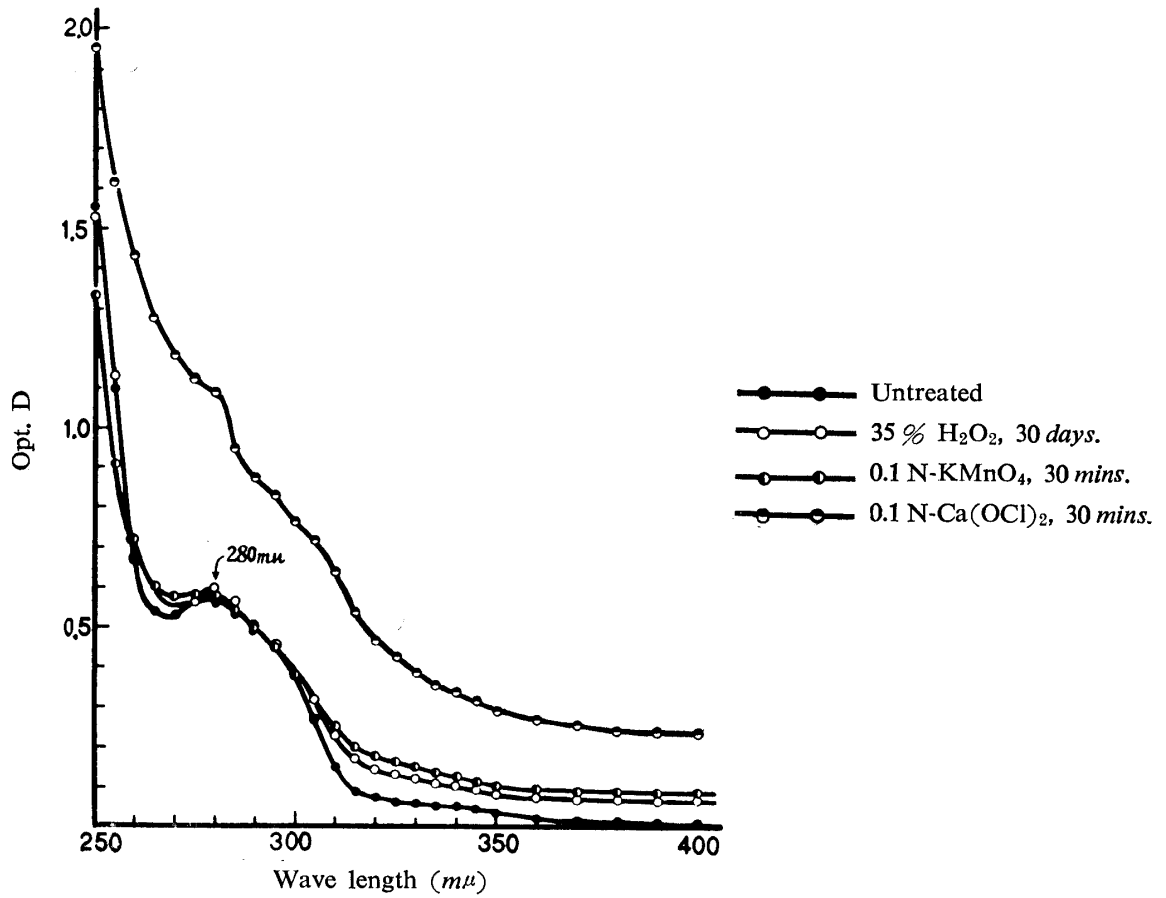


Fig. 45. Absorption spectrum of different oxidized fibroins in 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$) Concn.; 0.04 %

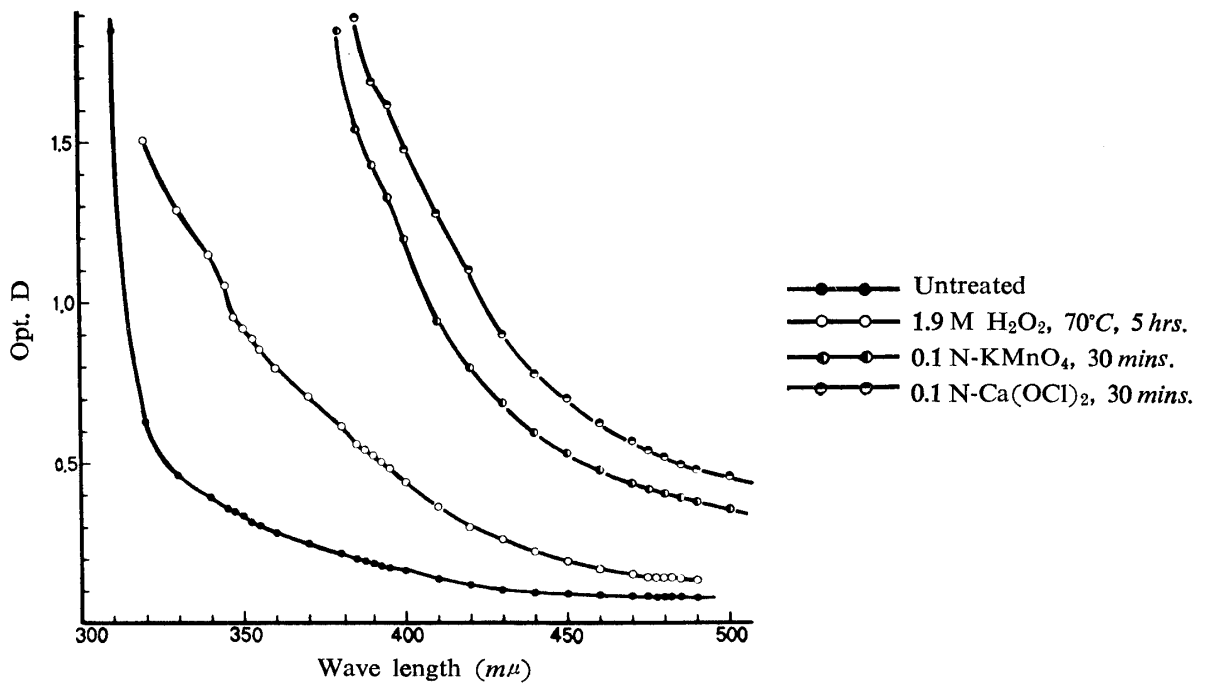


Fig. 46. Absorption spectrum of different oxidized fibroins in 0.1 M carbonate buffer ($pH=10.0$) Concn.; 0.8 %

な peak は全然認められない。図に示された peak は tyrosine 残基に基因するものと考えられる。

YASUNOBU et al¹³⁹⁾ は tyrosine を含む peptide を tyrosinase で酸化したものの紫外吸収スペクトルを調べ、3種の型に分けられることを見出している。すなわち、(1) dopachrome pattern (λ_{max} ; 305 $m\mu$, 480 $m\mu$) を示すもの。これは N-末端 tyrosine peptide の特徴である。(2) dopa-quinone pattern (λ_{max} ; 390 $m\mu$, o-quinone の吸収帯¹³⁹⁾ に基づく)、これは少量の C-末端 tyrosine peptide および tyrosine 誘導体の特徴である。(3) protein pattern (shoulder; 350 $m\mu$) tyrosine が peptide 内部に位置する高分子量の peptide でみられる。また ROSTON¹⁴⁰⁾ によれば dopa (λ_{max} ; 280 $m\mu$) は tyrosinase で酸化されると dopa-chrome (λ_{max} ; 480 $m\mu$) を経てのち melanin を形成する。酸化フィブロイン溶液では 305 $m\mu$, 390 $m\mu$ および 480 $m\mu$ には全然 peak を認めない。

EARLAND et al⁴⁷⁾ が想像する quinone 残基を経過する重合型では tyrosine 残基と lysine 残基との結合モル数は 1:1 である。従つて試料酸化フィブロインの tyrosine 残基の減少モル数とフィブロイン中の lysine 残基モル数とを比較したところ第 41 表に示す如く前者が遙かに多い。なお、フィブロイン中のジアミノ酸残基の全モル数と比較しても tyrosine 残基の減少モル数が多い。tyrosine 残基が酸化されて quinone 残基となりそれが lysine 残基との間に重合反応を起すとすればこの両者の差だけの quinone 残基が存在する筈であるが吸収曲線では該当する peak は認めなかつた。

従つて tyrosine 残基と lysine 残基間の重合型は妥当でないと考えられる。

Table 41. Comparison between diamino acid residues in fibroin molecule and tyrosine residue diminished with oxidation

(i)			
Content in fibroin	Amino A. residue (%)	Amino A. residue (mol.)	Diamino A. residue total (mol.)
Tyrosine	10.45	64.03×10^{-3}	} 13.8×10^{-3}
Lysine	0.67	5.2×10^{-3}	
Histidine	0.32	2.3×10^{-3}	
Arginine	0.99	6.3×10^{-3}	
(ii)			
Oxidized condition	Tyrosine residue remained (%)	Diminished mol. with oxid.	
0.1 N-KMnO ₄ , 30 mins.	7.21	19.85×10^{-3}	
0.1 N-Ca(OCl) ₂ , 30 mins.	5.94	27.63×10^{-3}	
35 % H ₂ O ₂ 30 days	7.23	19.73×10^{-3}	

GIESE et al¹⁴¹⁾ や MCLEAN et al¹⁴²⁾ は紫外線照射により tryptophan 溶液の吸収スペクトルは減少するが tyrosine, phenylalanine 溶液の吸収は増大することを認め、小幡ら¹⁴³⁾¹⁴⁴⁾ は tryptophan に比し tyrosine 含量の多い α -casein, β -lactoglobulin 溶液の紫外吸収スペクトルは全般的に上昇することを認めている。YASUNOBU & DANDLIKER¹⁴⁵⁾ も α -lactoalbumin が tyrosinase で酸化された時は全般的に吸収増大が起り、さらに 350 $m\mu$ に新 peak が現われることを見出している。何れも吸収増大の原因については言及していない。しかるに CARROLL,¹⁴⁶⁾ ALEXANDER¹⁴⁷⁾ によれば serum albumin 溶液を放射線照射した時も吸収スペクトルの増大がみられるがこの原因は aggregate 形成による光散乱増大に基づくものと解釈されている。

各種の酸化フィブロインの吸収スペクトルをみると同一濃度であるが波長全域に亘り酸化度の進行したもの程吸収増大が認められた。この点は上述の球状蛋白の溶液酸化の成績と全く同様である。この原因については著者も第 3 章第 6 節および第 4 章第 5 節に記述した如く酸化剤処理による平均分子量の増大すなわち aggregate の形成を見出したので、CARROLL や ALEXANDER の見解を支持す

るものである。

また EARLAND が推定している tyrosine 残基の modification あるいは hydrophobic group の置換を不溶解化原因とする考え方も著者が見出した攪拌継続により溶解分散する現象から先ず妥当でないと思われる。何となれば modification あるいは置換が攪拌継続処理により親水性の原型に回復するとは考えられないからである。またさらに第3章第6節および第4章第5節で述べたように軽度の酸化フィブロインいわゆる“insoluble”とされているものは無処理フィブロインより平均分子量が増大しており分子連鎖間結合の強化が認められるのでこの事実から単なる modification あるいは置換説は否定される。

第4節 フィブロイン酸化時の溶液の性質

フィブロインを 0.1 N-KMnO₄ あるいは 0.04 N-Ca(OCl)₂ で常温で種々の時間酸化しあるいは酸化剤が消費される迄放置した溶液につき遊離アミノ酸、アンモニアおよびアルデヒドの検出定量を行った。同時に酸化に伴う溶液の pH 変化を調べた。

(i) R·CHO について

0.1 N-KMnO₄ および 0.04 N-Ca(OCl)₂ をそれぞれ 10, 25, 50, 100 cc 宛採り水を加えて 100 cc となしそれにフィブロインを 500 mg 宛浸漬して酸化剤が消費される迄常温放置した。その後濾紙次いで酸性白土と振盪して濾過しその濾液の一定量を硫酸酸性にして蒸溜を行い、溜出液について schiff 試薬でアルデヒドを調べた。何れの処理液でも検出されなかつた。

(ii) 遊離アミノ酸について

(i) と同様の方法で得た酸化液の濾液を減圧濃縮し ninhydrin 試薬を用いて遊離アミノ酸の検出を行った。何れの処理液でも認められなかつた。

(iii) アンモニアについて

上述の酸化濾液をアルカリ性にして蒸溜を行い、溜出液について Nessler 試薬でアンモニアを検出したところその生成を認めた。従つて次の如き処理を行いアンモニアを定量した。フィブロイン 500 mg を水浸し 2 g となるように搾り、それを 0.1N-KMnO₄ 100 cc 中に浸漬し一定時間経過後濾過し濾液 20 cc を採り過マンガン酸加里消費量を求めた。別に濾液 10 cc を採り 0.1 N-(COOH)₂ を加えて脱色しアルカリ性としてケルダール装置を用いて蒸溜した。溜出液を 100 cc に稀釈後 20 cc を採り Nessler 試薬 1 cc を添加して発色したものを光電比色計（フィルター；S₄₂ 使用）により定量した。

0.04 N-Ca(OCl)₂ 酸化の場合にはフィブロイン 500 mg を 250 cc の溶液中に投入した。濾液 20 cc について次亜塩素酸塩消費量を求め別に 10 cc を採り過剰の KI 溶液を加え次いで 0.04 N-Na₂S₂O₃ を加えて遊離ヨードを消失させアルカリ性にして蒸溜した。溜出液を 50 cc に稀釈後 20 cc を採り前記同様に比色定量した。

その結果を第42表に示す。

酸化液中のアンモニアの生成は次亜塩素酸塩酸化の場合が過マンガン酸加里酸化時より多いことが認められる。フィブロインが過マンガン酸加里酸化を受ける時は tyrosine 残基を主点とするが同時に主鎖および側鎖末端の NH₂ 基も攻撃されるから（第6章第2節参照）アンモニアの生成はこれらの末端基に由来すると推定される。

次亜塩素酸塩酸化のさいは上記同様の攻撃のほかに加水分解作用をも受け酸化されたフィブロインは N-末端基量を増加するし（第6章第3節参照）また過マンガン酸加里酸化の場合とは異なり

Table 42. Ammonia amount produced in oxidizing solution when fibroin was treated with oxidizing agents

Oxidized time (min.)	10	30	60	120
0.1 N-KMnO ₄ consumed (cc./g-fibroin)	50.4	82.1	111.1	156.6
NH ₃ (mg/g-fibroin)	1.4	1.4	1.4	2.0
0.04 N-Ca(OCl) ₂ consumed (cc./g-fibroin)	201	567	724	736
NH ₃ (mg/g-fibroin)	6.8	9.5	13.9	17.8

Oxidizing condition; 500 mg of fibroin was treated with 100 cc. of 0.1 N-KMnO₄ and 250 cc. of 0.04 N-Ca(OCl)₂ at room temperature respectively.

分解溶出量が多い。(第4章第1節参照) 従つて酸化反応はこの溶出物質 (peptide 類) にも並行的に起るものでありアンモニアの生成はむしろこの溶出 peptide に由来するものと推定される。

(iv) pH 変化

フィブロイン繊維を 0.1 N-KMnO₄ 中に浸漬した状態で pH を測定すると溶出物質の拡散が不十分のため正確な値が得られなかつた。従つてフィブロイン 1 g を水浸して硝子棒で圧して十分に気泡を除き一定重量 (4.5g) として 0.1 N-KMnO₄ 200 cc 中に投入し所定時間経過毎に吸引濾過して濾液の pH を硝子電極 pH メーターで測定した。その結果を第 47 図に示す。0.1 N-Ca(OCl)₂ 酸化の場合はフィブロイン 1 g を水浸後 4.5 g として 1000 cc 中に投入して過マンガン酸加里酸化の場合と同様に処理後 pH を測定した。その結果を第 48 図に示す。

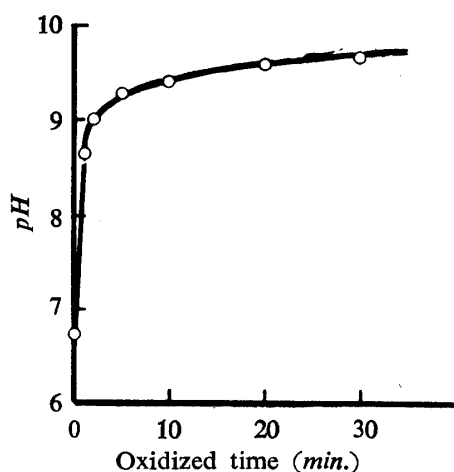


Fig. 47. Variation of pH of the solution during the oxidation of fibroin with 0.1 N-KMnO₄

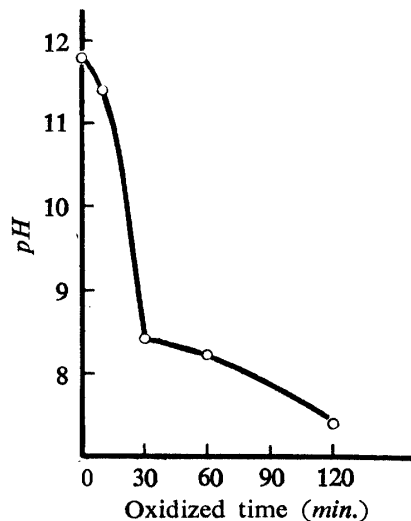


Fig. 48. Variation of pH of the solution during the oxidation of fibroin with 0.1 N-Ca(OCl)₂

酸化液の pH は酸化初期すなわち最初の短時間に著しい変化を示す。過マンガン酸加里液は最初急激に上昇しその後一定となる。

酸化により tyrosine 残基が開裂せず dopa 残基に誘導され次いで縮合するとか、また単に modify されるかあるいは hydrophobic group の置換が行われるのみとすれば過マンガン酸加里の還元により生成する苛性加里のために pH は漸増せねばならない。従つて第 47 図の結果から phenol 核開裂に伴う酸性物質の溶出が推定できる。そのため酸化液につき Overell¹⁴⁶⁾ の方法を参照して有機酸生成の有無を調べた。

フィブロイン 3 g を 0.1 N-KMnO₄ 550 cc 中に投じ、酸化剤が消費される迄放置して濾過する。濾液を Amberlite IRA-410 のカラム (3×20 cm) を通して有機酸を完全に補集させる。その後水洗し次いで 1 N-Na₂CO₃ を用い 1 分間 40 滴下の速度で溶出させれば交換剤に補集された有機酸イオンは過剰の炭酸イオンで追出され有機酸ナトリウムと過剰の炭酸ソーダが溶出する。その液を Amberlite IR-120 のカラムを通せば Na⁺ を完全に吸着し炭酸ガスが発生し有機酸のみが溶出する。かようにして得た溶液を減圧濃縮し 3 cc とした。その中、0.02 cc を試料として paper chromatography を行つた。濾紙は東洋濾紙 No. 50, 展開溶媒は EtOH : NH₄OH : H₂O = 20 : 1 : 4 を用いた。

同時に若干の芳香族および脂肪族の有機酸も展開した。展開時間は 15 時間である。発色剤は有機酸検出に鋭敏な 0.03 % methyl red-borate buffer (0.05 N, pH=8.0) を用いた。

試料からは Rf が 0 (原点部), 0.08, 0.25, 0.42 および 0.57 の 5 個の spot が認められた。

対照有機酸の Rf は安息香酸 0.72, フタル酸 0.40, 酒石酸 0.22, クエン酸 0.10, 乳酸 0.50, 修酸 0.08 であつた。酸化液中における修酸の存在は既に報告した如く結晶状に分離確認しているので、⁵⁸⁾ この場合も Rf からみて確実視される。フタル酸の存在も推定されるがなお他の方法からの検討を要する。

以上の結果から有機酸類の生成は確実である。従つて上記の pH 変化の様相は有機酸生成によると確認された。次亜塩素酸塩酸化の場合には過マンガン酸加里酸化に比し分解溶出量が遙かに多いので (第 4 章第 1 節参照) この溶出 peptide の並行酸化による酸性物質の生成も加わり第 48 図の如き pH 変化曲線を示すものと考えられる。

第 5 節 フォルマル化フィブロインおよび酸化フィブロインの溶解性の変化

フィブロインを HCHO 溶液に浸漬して “curing” を行えば Cu-En 溶液あるいは Schweizer 試薬に不溶解となることが CADWALLADER⁴⁶⁾ や奥ら⁶⁴⁾ により見出されている。CADWALLADER によればフィブロインを 0.05 % HCHO の酸性溶液に浸漬後 “curing” を行えば不溶解化するが中性では 1 % 以上でないと不溶解化しない。著者が行つた酸化研究では pH は中性あるいはアルカリ側であるので弱アルカリ性で HCHO 処理を施した。HCHO 濃度が 0.1, 0.5, および 0.8 % の炭酸塩緩衝液 (pH=10.2) 中にフィブロインを 10 分間浸漬後、水洗し風乾したもの (A) および浸漬後 100°C で 20 分 “curing” を行い水洗し風乾したもの (B) の Cu-En 溶液への溶解性を調べると第 43 表の如くなる。

Table 43. Solubility of formalized fibroin in Cupriethylene diamine (12-16) solution and tyrosine content

	Untreated fibroin	Sample A	Sample B		
			0.1 % CH ₂ O-treated	0.5 % CH ₂ O-treated	0.8 % CH ₂ O-treated
Sample: Cu-En	1 : 10	1 : 10	1 : 20	1 : 20	1 : 20
Dissolved time (min.)	3	3	30~35	60~70	90~100
Tyrosine (%)	11.6	11.6	11.6	11.6	11.6

Sample A; Fibroin was soaked in 0.1, 0.5 and 0.8 % CH₂O-carbonate buffer solution (pH=10.2) for 10 mins, and thereafter washed with water and air-dried.

Sample B; Fibroin soaked in the solution above-mentioned was cured at 100°C for 20 mins., and thereafter washed with water and air-dried.

表に示された如くフィブロインを HCHO 溶液に浸漬しても “curing” を行わないと無処理のものと同様に易溶である。curing したものは過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロイン

と同様に難溶である。0.1% HCHO 処理でも難溶性になるが濃度増加とともに難溶化も進み 0.8% HCHO 処理のものでは溶解するのに 100 分間程の攪拌を必要とする。これらのフォルマル化フィブロインは溶解挙動は酸化フィブロインと似ているが、溶解分散後中和し水透析を行うさいの析出繊維（微細沈澱）の量は酸化フィブロインに比し遙かに少量である。何れにしてもこの結果から HCHO は溶液中に存在しても curing の熱エネルギーに相当するエネルギー賦与がフォルマル化には必要であることが認められる。なお、フォルマル化フィブロインを加水分解し Block & Bolling による Millon-Lugg 改良法で定量した tyrosine 含量は何れも無処理フィブロインと同様であつた。

HCHO は蛋白質の芳香環、アルコール性 OH 基、NH₂ 基等と反応することが Fraenkel-Conrat¹⁴⁹⁾ により研究された。フィブロインのフォルマル化反応については村瀬ら⁶⁸⁾は分子連鎖間の tyrosine 並びに serine 残基間に架橋結合するものと考察し奥ら¹⁵⁰⁾は主として serine 残基間に methylene 架橋を形成し tyrosine 残基間に methylene 架橋する可能性は極めて稀であると主張している。ALEXANDER et. al¹⁵¹⁾はフォルマル化羊毛では tyrosine の phenol 核のオルソ位置と lysine 残基間の HCHO 介在による methylene bridge 形成を提唱し、この架橋化アルデヒドは加水分解されると methylol tyrosine として残りそれは Millon 試薬とは反応しないので tyrosine 含量は低下すると述べている。著者の結果ではフォルマル化フィブロインは何れも tyrosine 含量の減少を示さないで tyrosine 残基を一方の基点とした methylene bridge は含まないと推定される。

従つてフォルマル化フィブロイン中の架橋化型式については前記奥の主張を支持する。

0.1% HCHO でフォルマル化されたフィブロインは Cu-En 溶液への溶解時間は約 30 分を要するがこのフォルマル化フィブロインを酸化剤で処理するとその種類によつて溶解性が変化することを見出した。例えばフォルマル化フィブロインを 1.9 mol H₂O₂(pH=6.97), 70°C で 2, 4 および 6 時間酸化するとそれぞれ 1 分前後で溶解するようになる。これに反し 0.1 N-KMnO₄ で 10 分間あるいは 0.1 N-Ca(OCl)₂ で 5 分間酸化すれば溶解時間が延長し約 50 分を要するようになる。また過酸化水素酸化フィブロインは無処理フィブロインよりもむしろ易溶性であるが（第 5 章第 3 節参照）これは稀薄過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩で短時間酸化すれば難溶化する。例えば 1.9 mol H₂O₂(pH=6.97), 70°C で 2 時間酸化したものを 0.1 N-KMnO₄ で 10 分間酸化すると溶解時間は約 30 分を要するようになる。酸化剤の順序を逆にして 0.1 N-KMnO₄ で 10 分間酸化したフィブロイン（溶解時間は約 30 分を要する。第 3 章第 5 節参照）を 1.9 mol H₂O₂, 70°C で 2 時間および 4 時間酸化すれば溶解時間はそれぞれ 7 分および 1 分前後に減少する。

上述の結果から過酸化水素は酸化速度は小さいが methylene bridge を酸化切断して溶解性を増加させる作用があり、過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩は methylene bridge には作用せずむしろ tyrosine 残基を酸化して phenol 核を開裂させ連鎖間結合を一部分強化させることが判る。過マンガン酸加里酸化フィブロインおよびフォルマル化フィブロインはそれぞれ過酸化水素処理により同様に易溶化する事実から、酸化フィブロインの不溶解化原因の 1 つは隣接鎖の serine 残基間の methylene bridge 形成によると推定される。

酸化液中にはアミノ酸および HCHO は検出されないが生成した HCHO が瞬間的に架橋化反応に関与すれば何等不合理ではない。さらに無処理フィブロインのフォルマル化には熱エネルギーが必要であるが酸化エネルギーがそれに代つて架橋化反応を促進していると考えられる。

第 6 節 酸化フィブロインのメチレンブリュー吸収および pH 滴定曲線

phenol は過酢酸酸化により cis-cis-muconic acid となり,¹⁵²⁾あるいはバクテリアの酵素の酸化作

用を受けると開環してケト酸を経て蟻酸になる。¹⁵³⁾ フィブロインの tyrosine 残基も酸化剤処理の場合には phenol 核の開裂が予想されるので各種酸化フィブロインの methylene blue 吸収量変化を測定した。

methylene blue 吸収量の測定; methylene blue の稀薄溶液を作り光電比色計 (フィルター, S_{66} 使用) を用いて濃度と吸光度との関係を調べると濃度 $5 \times 10^{-1} \text{ mg \%}$ 以下では Beer の法則に従い吸光度は濃度の一次関数であることを認めた。その関係は $y=0.123x$ で表わされる。y は吸光度, x は濃度 (単位; 10^{-1} mg \%) である。従つてフィブロインの一定重量 (200 mg) を 48 mg % methylene blue 水溶液 20 cc に浸漬し 18°C 恒温で 125 時間放置した。その後濾過して 50 倍稀釈液として吸光度を測定し上式によりそれぞれ残存濃度を調べ無水試料 1 g 当りの吸収量を算出した。

0.1 N-KMnO₄, 0.04 N-Ca(OCl)₂, 35 % H₂O₂ (pH=1.30) で酸化されたフィブロインおよび 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97) で加熱酸化されたフィブロインの酸化に伴う methylene blue 吸収量変化を第 44 表, 第 45 表, 第 46 表および第 47 表に示す。

Table 44. Methylene blue absorption amount of fibroin* treated with 0.1 N-KMnO₄

Oxidized time (min.)	0	10	30	60	120	240
0.1 N-KMnO ₄ consumed (cc./g-fibroin)	0	59.42	101.0	134.8	173.2	204.2
M. B. absorption (mg/g-fibroin)	29.99	20.37	28.20	30.18	33.10	36.12

Sample 200 mg was soaked in $4.80 \times 10^{-2} \%$ methylene blue solution at 18°C for 125 hrs., filtered and diluted to a definite volume and the methylene blue concentration was determined by electro-photometer (filter; S_{66}).

* It was the one demanganised with 1 % (COOH)₂ after treating.

Table 45. Methylene blue absorption amount of fibroin treated with 0.04 N-Ca(OCl)₂

Oxidized time (min.)	0	10	30	60	120
Reduced chlorine (mg/g-fibroin)	0	316	407	1135	1340
M. B. absorption (mg/g-fibroin)	30.58	19.18	21.75	27.64	27.73

Procedure for measuring was the same as Table 44.

Table 46. Methylene blue absorption amount of fibroin treated with 35 % H₂O₂ (pH=1.30) at 18°C

Oxidized period (days)	0	10	20	30
H ₂ O ₂ consumed (g/g-fibroin)	0	1.20	1.69	2.69
M. B. absorption (mg/g-fibroin)	30.01	7.57	8.71	11.65

Procedure for measuring was the same as Table 44.

Table 47. Methylene blue absorption amount of fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂-phosphate buffer solution (pH=6.97) at 70°C

Oxidized time (min.)	0	10	30	60	120	300
M. B. absorption (mg/g-fibroin)	30.43	28.24	31.00	33.57	38.98	45.45

Procedure for measuring was the same as Table 44.

0.1 N-KMnO₄ 酸化フィブロインおよび 1.9 mol H₂O₂ 加熱酸化フィブロインはそれぞれ短時間酸化のものすなわち酸化初期のものは無処理のものに比し吸収量は少ないが酸化の進行とともに増加している。この initial fall の現象は SITCH et al⁵⁴⁾ の過酸化水素酸化フィブロインおよび西⁵⁵⁾ の日

光酸化繊維についても認められているが彼等もその原因については解釈を与えていない。0.04 N-Ca(OCl)₂ および 35% H₂O₂ 酸化のものは何れも無処理のものレベル迄吸収量は達していないがやはり酸化の進行とともに増加している。酸化繊維の微細構造の変化のため *methylene blue* の透過速度が異なり無処理繊維で決定した染着平衡時間 (125 時間) の不足の懸念もあるのでその点を検討した。すなわち 125 時間以上 720 時間迄浸漬時間を延長した。しかし何等吸収量の変化を認めない。その結果の 1 例を第 48 表に示す。

Table 48. Methylene blue absorption amount of the oxidized fibroin with the variation of soaking time

Oxidized condition	Soaked time (hrs.)			
	125	140	260	720
Untreated	29.99	29.99	29.99	29.99
0.1 N-KMnO ₄ , 10 mins.	20.37	20.37	20.37	20.37
" 60 mins.	30.18	30.18	30.18	30.18

Procedure for measuring was the same as Table 44.

表示した結果から無処理レベルに対する不足は染着平衡時間の不足にはよらないことが判る。1.9 mol H₂O₂ 加温処理以外のものでは酸化に伴う *methylene blue* 吸収量の変化は第 3 章、第 4 章および第 5 章の光散乱の節で述べた平均分子量変化と逆の関係を示している。

すなわち酸化初期減少しその後漸増している。また次亜塩素酸塩および 35% H₂O₂ 処理のものは吸収量が無処理レベルより低いが両者は酸化分解とともに加水分解を受け N-末端基が増加している点も同様である。何れにしても酸化に伴ない塩基性色素の吸収増加を示す点は一致しており COOH 基の新生増加を示唆している。このことは次の酸化に伴う繊維の pH 滴定曲線の変化から確認された。無処理繊維、過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化繊維についてそれぞれ北条の方法¹⁵⁴⁾ に準じて不連続法で滴定曲線を作製し活性基の消長を調べた。

不連続法による pH 滴定曲線作製；試料 1 g 宛を採り 0.05 N-HCl および 0.05 N-NaOH をそれぞれ 2, 4, 7, 10, 20 および 30 cc を加え全液量を 50 cc になるように水を加えて密栓し冷蔵庫中 3 乃至 5°C に放置し時々振盪して平衡に達せしめた後硝子電極 pH メーターで pH を測定した。平衡時間は 7 日間である。その結果を第 49 図および第 50 図に示す。

メチル化繊維の滴定曲線は無処理に比較するとアルカリ側では pH の高い方に移動し、樹脂加工絹の場合は酸側では pH の低い方にアルカリ側では高い方に移動し HCl-NaOH 滴定曲線に近くなる。⁹⁸⁾ これは活性基の "blocking" に基因する。また稀薄アルカリ処理繊維の場合は酸側では pH の高い方に、アルカリ側では低い方に移動し加水分解による NH₂ 基や COOH 基生成のため酸やアルカリを結合するためとされている。⁹⁹⁾

図示した如く、過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩で酸化された繊維の滴定曲線は酸側ではほとんど変化なく、アルカリ側では pH の低い方へ移動している。さらに酸化の進行したもの程低位置となつている。このことは酸化に伴う COOH 基の増加を明示している。*methylene blue* 吸収量変化では、initial fall の現象がみられたが滴定曲線からは 10 分間酸化の繊維でも明らかに無処理よりも COOH 基の増加を認めることができる。既に記述した如く酸化に伴う繊維の分子量変化では initial increase の現象がみられた。(第 3 章第 6 節、第 4 章第 5 節参照) すなわち酸化によつて分子連鎖間結合が一部強化されておるので酸化繊維の COOH 基の一部は *methylene blue* 吸収に対しては mask されていると見做される。

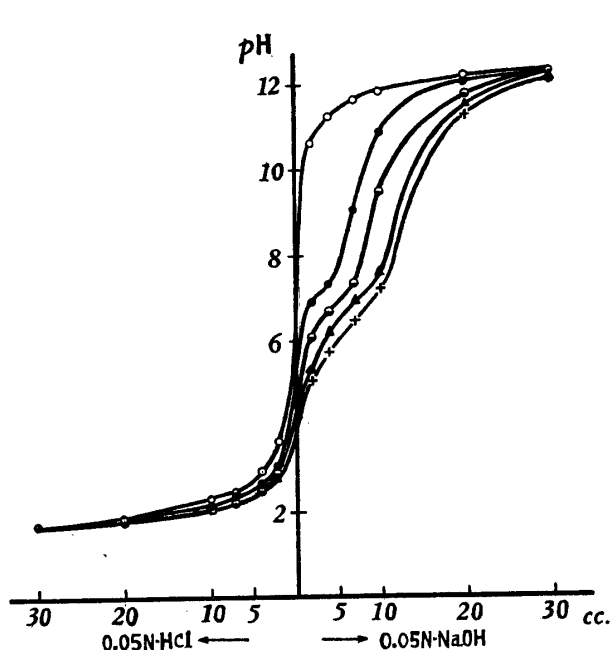


Fig. 49. *pH* titration curves of fibroin treated with 0.1 N-KMnO₄

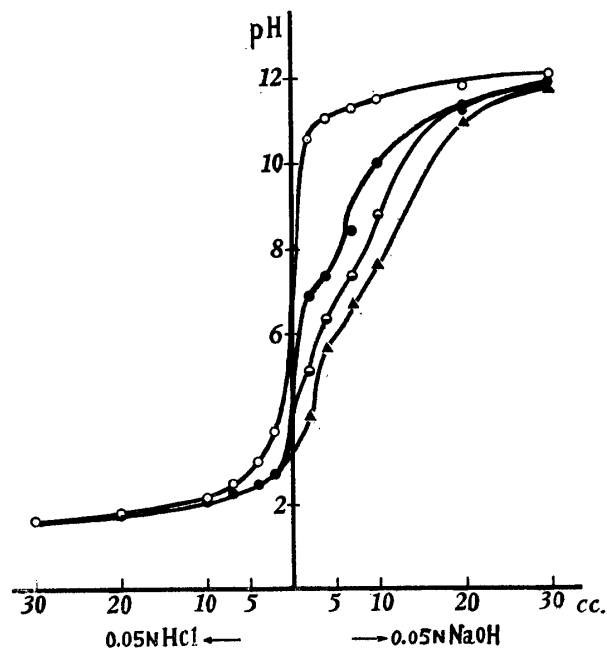
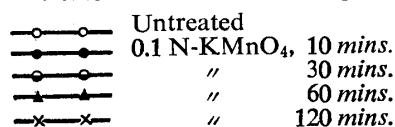
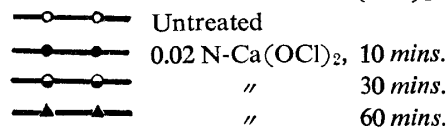


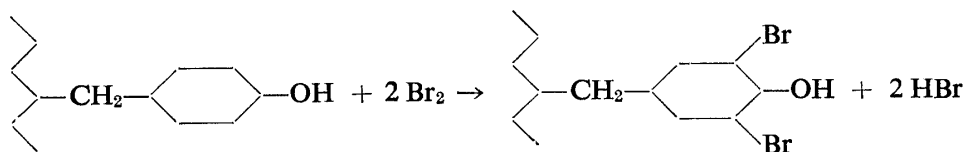
Fig. 50. *pH* titration curves of fibroin treated with 0.02 N-Ca(OCl)₂



酸化剤の還元量に対する tyrosine 減少の関係は直線状あるいは類似状態であるので主として CO-OH 基の新生増加は phenol 核開裂によるものと推定される。もちろん酸化脱アミノによる相対的な COOH 基の増加も一部寄与しているだろう。

第7節 Millon-Lugg 改良法と Br 吸収法とから求めた酸化フィブロインのチロシン含量の比較

フィブロイン中の tyrosine 残基は容易に臭素と反応して次記の如く OH 基に対しオルソ位置にある水素が臭素と置換する。



この反応を利用して tyrosine の量的変化を簡便に測定できる。本法によると tyrosine 相当量以上の臭素の吸収が認められる。すなわち Br 吸収量から換算した値は Folin & Malenz 法¹⁵⁾から求めた値よりも大きくなる。このことは tyrosine 残基以外の未知の少量のアミノ酸との結合あるいは絹糸の微細構造中での収着などに起因するものと考えられている。¹⁵⁾

酸化フィブロインについて Br 吸収量から求めた tyrosine 含量と Millon-Lugg 改良法¹⁰⁾とから求めた tyrosine 含量とを比較し、その結果からオルソ位置の blocking を検討した。

フィブロインの Br 吸収；実験方法は村瀬の方法¹⁵⁾に準じた。フィブロイン 100 mg を共栓三角フラスコ中に入れ水 60 cc, 0.00833 mol KBrO₃ 20 cc (0.02 N-Br 50 cc に相当する), 10% H₂SO₄ 10 cc を加え、充分周囲を氷冷して (約 1°C) 10% KBr 10 cc を添加して 60 分間経過後、過剰の KI 液を加え 0.02 N-Na₂S₂O₃ で滴定した。その滴定値より吸収臭素量を求め、さらに tyrosine 量に

換算した。

同一試料につき別に Millon-Lugg 改良法により tyrosine 定量を行つた。それらの結果を第 49 表、第 50 表および第 51 表に示す。

Table 49. Tyrosine content of 0.1 N-KMnO₄-oxidized fibroin determined by the modification of Millon-Lugg's method and Br absorption method

Oxidized time (min.)	0.02 N-Br absorption (cc/100 mg fibroin)	Tyrosine (%) calculated from the left	Tyrosine (%) by M-L. method	Adjustment of* value from Br-method
0	16.07	14.6	10.60	10.60
10	10.36	9.4	6.63	6.82
30	8.17	7.4	5.19	5.37
60	6.66	6.0	3.91	4.36
120	6.44	5.8	2.39	4.21

Sample fibroin was the one demanganed with 1% (COOH)₂ after oxidation.

* For simple comparison, the value of untreated fibroin obtained from Br absorption method was made to coincide with the value by the modification of M-L. method, and then the others were respectively adjusted.

Table 50. Tyrosine content of 0.04 N-Ca(OCl)₂-oxidized fibroin determined by the modification of Millon-Lugg's method and Br absorption method

Oxidized time (min.)	0.02 N-Br absorption (cc/100 mg fibroin)	Tyrosine (%) calculated from the left	Tyrosine (%) by M-L. method	Adjustment of value from Br-method
0	16.30	14.8	10.60	10.60
10	9.12	8.3	6.56	5.94
30	8.12	7.4	6.00	5.30
60	6.63	6.0	5.79	4.30
120	6.63	6.0	6.06	4.30

Table 51. Tyrosine content of 35% H₂O₂-oxidized fibroin determined by the modification of Millon-Lugg's method and Br absorption method

Oxidized period (days)	0.02 N-Br absorption (cc/100 mg fibroin)	Tyrosine (%) calculated from the left	Tyrosine (%) by M-L. method	Adjustment of value from Br-method
0	16.57	15.0	10.60	10.60
10	16.00	14.5	9.20	10.25
20	15.47	14.0	8.60	9.89
30	14.42	13.1	8.03	9.23

Millon-Lugg 改良法からの tyrosine 定量値は Folin-Malenz 法からの定量値よりもふつう大きくなるがその値よりも Br 吸収法からの値は無処理フィブロインではなお大きく現われることが表より判る。

過マンガン酸加里および過酸化水素酸化フィブロインでは Br 吸収量から換算した tyrosine 量はそれぞれ Millon-Lugg 改良法による定量値よりも大きい。これは Br 置換が tyrosine 残基以外のアミノ酸残基にも一部起るからその影響によるものである。しかるに次亜塩素酸塩酸化のものでは全く逆の関係を示している。無処理フィブロインの Br 吸収方法からの tyrosine 量を Millon-Lugg 改良法からの値 (10.6%) に一致させてその調整係数を酸化フィブロインの Br 吸収法からの値に乗じて比較した。その結果は第 51 図、第 52 図および第 53 図の如き関係となる。

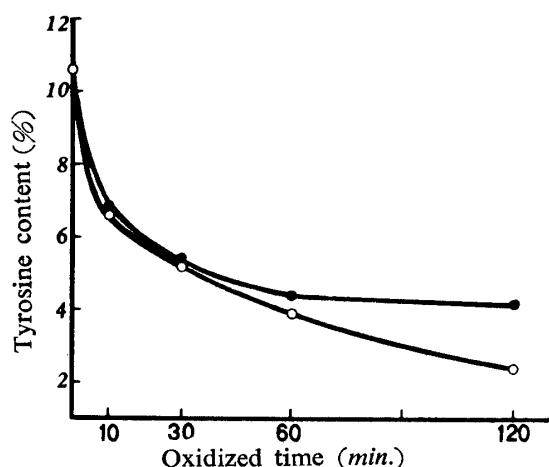


Fig. 51. The relation between tyrosine contents of 0.1 N-KMnO₄-oxidized fibroin determined by the modification of Millon-Lugg's method and the Br absorption method

○—○ M.L-modification method
●—● Br-absorption method

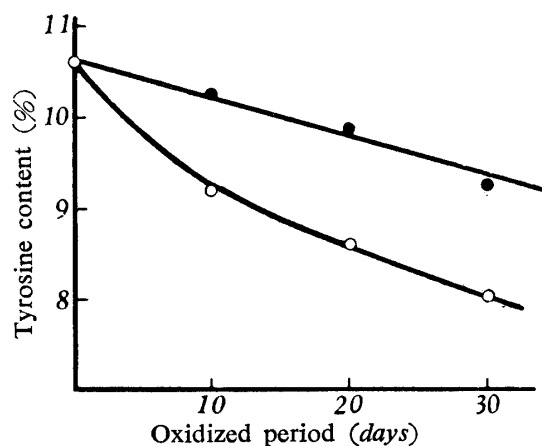


Fig. 52. The relation between tyrosine contents of 35% H₂O₂-oxidized fibroin determined by the modification of Millon-Lugg's method and the absorption method

○—○ M.L-modification method
●—● Br-absorption method

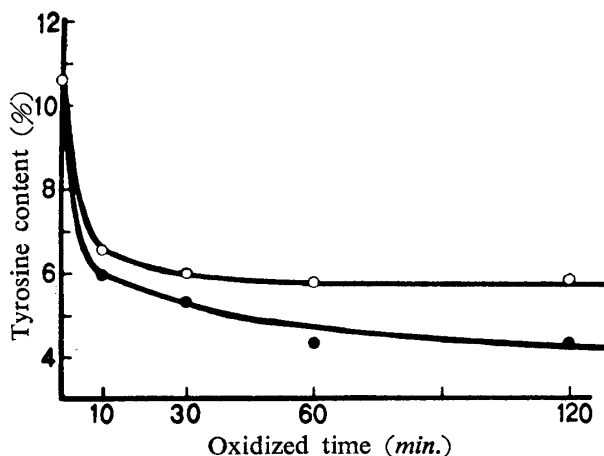


Fig. 53. The relation between tyrosine contents of 0.04 N-Ca(OCl)₂-oxidized fibroin determined by the modification of Millon-Lugg's method and the absorption method

○—○ M.L-modification method
●—● Br-absorption method

ALEXANDER¹⁵¹⁾によれば一方のオルソ位置のみがメチロール置換された methylol tyrosine は Millon-Lugg 改良法では発色しないことが認められている。

このことから次亜塩素酸塩酸化のさいに仮りに HCHO が生成するとしても phenol 核のオルソ位置を基点とする HCHO 介在による連鎖間結合は形成されないことがわかる。

次亜塩素酸塩酸化のさいは一部の tyrosine 残基は塩素化され 3,5-dichloro tyrosine 残基になるが(第4章第1節参照), これは Millon-Lugg 改良法では発色せずまた Br 吸収も行われない。

従つて2つの方法による tyrosine 含量の差異には塩素置換の現象は無関係である。さらに臭素化フィブロインおよび沃素化フィブロインを作り Cu-En 溶解性を調べたところ, 無処理と同様に易溶

いわゆる Millon 反応と総称される反応の発色機構は勝又¹⁵⁶⁾によれば phenol 核の一方のオルソとメタ位置が自由に置換できる状態であればならない。従つて次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは第53図の如く, Millon-Lugg 改良法からの定量値が Br 吸収法からの値よりも高いので一部の tyrosine 残基の phenol 核の一方のオルソ位置がすでに酸化中に置換または結合に与つていたことを示す。

そのため残存 tyrosine 残基の1部は1モルの tyrosine 残基に対し1モルの臭素しか置換できない。なおその一方のオルソ位置のみ Br 置換したのも Millon-Lugg 改良法では tyrosine として定量されているので, 他の一方のオルソ位置の結合様式(酸化中に形成されたもの)は加水分解により原型に還元しうるものである。

であつた。このことはオルソ位置の置換は溶解性に影響を及ぼさないことを示している。以上の結果から CADWALLADER の想像も妥当でないことが首肯される。

フィブロイン繊維の分子間結合は主として水素結合でありこれは繊維強力の重要な因子である。COLEMANN³⁴⁾によればこの結合は、Cu-En と peptide 結合の NH との complex 形成により破壊されるがそのさい Cu-En のアルカリ性は tyrosine 残基の OH 基と Cu-En との結合をもたらし連鎖の folding には proline 残基が意義をもっている。フィブロインの隣接連鎖間の距離は約 3.5 Å および 5.7 Å であり、長い方の距離は tyrosine の如き大きいアミノ酸残基の存在による。¹⁵⁷⁾従つて tyrosine 残基の phenol 核開裂が起れば部分的に立体障害が少なくなつて連鎖間の距離が小さくなり水素結合がより強化される。このことも Cu-En と peptide 鎖中の NH との結合を困難にするだろう。

以上縷述した結果と前章迄に得た結果とを総合して判断すれば不溶解化は過マンガン酸加里酸化の場合は隣接連鎖の serine 残基間における HCHO を媒体とした架橋形成並びに tyrosine 残基の phenol 核開裂に伴う連鎖間の副原子価結合の強化によると推定される。

次亜塩素酸塩酸化の場合には同様の理由のほかにさらに phenol 核のオルソ位置での主原子価による連鎖間結合（ただし HCHO 介在によらない）も一部寄与しているだろう。

第8節 小 括

酸化フィブロインの Cu-En 溶液への不溶解化原因に対する従来の考え方を検討するとともに他の要因をも探究した。同時にフィブロインの tyrosine 残基の構造変化も調べた。得られた結果を要約すれば次の通りである。

(1) dopa は tyrosine や phenol と同様に稀薄過マンガン酸加里溶液により極めて迅速に酸化される。稀薄過マンガン酸加里、次亜塩素酸塩および過酸化水素で種々の時間酸化されたフィブロインの加水分解物につき paper chromatography で dopa の検出を行つたが全然その存在を認めない。

(2) diphenylether は 210 $m\mu$ と 272 $m\mu$ に吸収極大が存在するが各種の酸化フィブロイン溶液にはこれに該当する吸収極大は認められない。

(3) 以上の結果から酸化剤で酸化されたフィブロイン分子中には dopa-glutamic acid 残基間のエステル結合あるいは dopa 残基同志のエーテル結合による cross-linkage は存在しないことが確認された。従つて不溶解化原因は光酸化と酸化剤酸化の場合とは異なるものである。

(4) 無処理フィブロイン、過マンガン酸加里および過酸化水素酸化フィブロインの溶液の吸収曲線は 280 $m\mu$ に吸収極大を示し次亜塩素酸塩酸化フィブロインは同波長に shoulder を示すのみである。すなわち dopa chrome pattern および dopa quinone pattern を示さない。

酸化によるフィブロインの tyrosine 残基減少モル数とフィブロイン中のジアミノ酸残基モル数とを比較すれば前者が多い。従つて不溶解化原因の可能性として想像されている tyrosine-lysine 残基間の重合も妥当でない。

(5) 各種の酸化フィブロインの同一濃度における吸収スペクトルは波長全域に亘り酸化の進行したものの程吸収増加が認められる。

これは aggregate 形成による光散乱度の増大に基づくものであろう。

(6) 酸化剤により酸化されたフィブロインの平均分子量増大の現象（第3章第6節、第4章第5節参照）から tyrosine 残基の単なる modification あるいは hydrophobic group の置換が不溶解化原因であるという推定も否定される。

(7) 酸化液中には遊離アミノ酸、アルデヒドは認められずアンモニヤが検出される。アンモニヤの生成量は次亜塩素酸塩酸化の場合が過マンガン酸加里酸化の場合よりも多い。過マンガン酸加里溶

液の pH は酸化初期急激に上昇しその後一定となる。このことも tyrosine の単なる modification あるいは置換を否定する。次亜塩素酸塩溶液の pH は酸化初期急激に低下しその後緩慢となる。これらの pH 変化は有機酸生成に基因する。

(8) フィブロインは稀薄 HCHO 溶液に浸漬しても “curing” を行わないと Cu-En 溶液には難溶化しない。curing したものは過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩酸化フィブロインと同様に難溶であり、その難溶化はアルデヒド濃度の増加とともに進行する。フォルマル化フィブロインにつき Millon-Lugg 改良法で tyrosine を定量したところ無処理と同一値であつた。フォルマル化フィブロインを稀薄酸化剤で処理するとその種類により Cu-En 溶液への溶解性に変化を起させることを見出した。すなわち過酸化水素は methylene bridge を酸化切断し溶解性を増加させ、他の2種の酸化剤は methylene bridge には作用せずむしろ連鎖間結合を強化させる。

(9) 酸化に伴うフィブロインの methylene blue 吸収量変化および pH 滴定曲線変化から COOH 基の新生増加を確認した。さらに酸化フィブロインの COOH 基の一部は連鎖間結合強化のため methylene blue 吸収に対しては mask されていると見做された。

(10) 過マンガン酸加里酸化フィブロインおよび過酸化水素酸化フィブロインでは Br 吸収量から換算した tyrosine 量は Millon-Lugg 改良法による定量値よりも大きい。しかるに次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは逆の関係である。この事実は次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは一部、phenol 核の一方のオルソ位置が block されておりそれは加水分解により原型に還元しうる結合型式であることを示す。

この結果から不溶解化原因として想像されている tyrosine 残基間の HCHO 介在による架橋結合形成も妥当でない。

以上要約した結果と前章迄に得た結果とから不溶解化は過マンガン酸加里酸化の場合は隣接連鎖の serine 残基間における methylene bridge 形成並びに tyrosine 残基の phenol 核開裂に伴う連鎖間の副原子価結合の強化によるものと推定される。次亜塩素酸塩酸化の場合は同様の理由のほかに、さらに tyrosine 残基の phenol 核のオルソ位置での主原子価による連鎖間結合も一部寄与している。

第8章 稀酸、稀アルカリによる微細構造の溶出速度の解析

一般に高分子物質の性質が分子配列により大きな影響をうけることは周知の事実であり再生繊維および合成繊維工業でも紡糸時の緊張、延伸操作等により分子配列が支配され、繊維の物理的性質が変つてくる。蚕児が吐糸するフィブロイン繊維についても同様のことが言える。

品種の相異によつて結晶量の差があり結晶領域量の多い品種の細繊維の高級絹糸は少ない品種の太繊維の絹糸よりも強力が大きく伸度が小である。¹⁵⁸⁾ また同一品種でも上簇条件が違えば結晶領域量が異なる。¹⁵⁹⁾ これらは営繭時における蚕児の吐糸口の運動すなわち延伸速度の差に基づく分子配列の相異によると考えられる。多湿時の吐糸終了に要する時間が低湿時より長いことは通常経験する事実である。前章迄に記述したようにフィブロインを酸化剤で処理するさい、その種類によつて酸化速度および機構が異なるがフィブロインの分子崩壊に次いで二次的に起る分子の集合状態の変化すなわち微細構造の変化にも差をきたすことが予想される。このことは酸化初期における強力や伸度の急激な減少とも関連が深いので微細構造の溶出状態を調べた。

第1節 稀酸による酸化フィブロインの溶出速度

稀酸加水分解によるフィブロイン繊維の結晶、準結晶および非結晶領域の定量法を村瀬¹⁰⁾が提唱し、

中西,¹³⁾ 岡本¹⁷⁾¹⁸⁾ もこれを支持している。しかるに佐々木ら²⁴⁾²⁵⁾ は稀酸, 稀アルカリによるフィブロインの溶出状態を速度論的に研究し本法で得られた量は X 線解析による量と同一視することは困難だと述べた。

その後石川¹⁶⁰⁾ は稀酸加水分解残渣の偏光顕微鏡的研究から本法の妥当性を主張している。このほかに X 線的結晶性部分を微視的結晶領域とすれば化学的に対象としている部分は巨視的結晶領域とも言えるという見解がある。²⁷⁾

著者は村瀬らの方法に準じて酸化フィブロインの稀酸加水分解を行つた。試料の酸化フィブロインとしてはすでに記述したごとく絹フィブロインを 0.1 N-KMnO₄, 0.01 N-Ca(OCl)₂ で常温酸化したもの, および 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97), 70°C で酸化したものをを用いた。前二者の場合はもちろん酸化後結合あるいは付着金属は除去したものをを用いた。各酸化フィブロイン 250 mg を正確に秤量し 2% H₂SO₄ 25 cc に充分浸漬し気泡を除き 96°C 恒温で 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 および 20 時間それぞれ加水分解し恒量既知の脚無しグラスフィルター (No. 3) で濾過した。一定量の水で洗滌後乾燥し残渣を重量法で求めた。溶出量は原試料無水量に対する百分率として第 52 表に示した。

Table 52. Soluble amounts (%) of different oxidized fibroins with 2% H₂SO₄ at 96°C (Volume ratio, 1:100)

Sample fibroin	Time (hrs)								
	2	3	4	6	8	10	12	15	20
Untreated fibroin	13.88	—	22.60	30.31	35.64	43.84	45.91	51.02	57.40
0.1 N-KMnO ₄ ·30 mins. oxid. fibroin	26.10	33.90	36.43	42.54	48.26	51.64	55.16	62.92	67.09
" 60 mins. "	25.69	36.90	39.52	45.01	51.46	55.74	59.31	61.34	67.18
" 120 mins. "	31.38	—	39.19	47.40	54.59	56.58	58.39	63.10	68.27
0.01 N-Ca(OCl) ₂ ·10 mins. oxid. fibroin	10.91	—	18.53	26.46	34.69	38.27	42.36	47.26	53.35
" 30 mins. "	11.21	—	20.42	28.68	31.35	37.16	41.16	41.71	52.21
" 60 mins. "	11.24	—	19.74	26.95	32.99	34.84	42.39	45.43	54.89
" 120 mins. "	10.26	—	21.23	27.45	34.46	—	39.94	45.34	51.91
1.9 M-H ₂ O ₂ ·70°C, 30 mins. oxid. fibroin	12.78	19.65	22.53	29.90	35.21	42.82	44.15	50.70	56.35
" 60 mins. "	16.18	23.30	27.85	32.30	38.38	43.95	45.61	48.43	54.56
" 120 mins. "	14.13	—	24.43	34.96	39.39	45.48	46.98	49.22	54.34
" 240 mins. "	13.16	19.47	23.03	30.71	36.32	40.53	46.75	51.14	53.59

同一加水分解時間当りの溶出量についてみると過マンガン酸加里酸化フィブロインは何れも無処理フィブロインに比し多くまた酸化の進行したもの程多い。すなわち加水分解抵抗性が酸化とともに小さくなっている。

これとは逆に次亜塩素酸塩酸化のものは何れも無処理に比し溶出量は少なくまた酸化度の進行はほとんど溶出量に影響を及ぼしていない。過酸化水素酸化のものは無処理とほとんど同様な溶出量を示す。

分解残渣量 (%) を R とし $\log R$ を対応する加水分解時間に対しプロットすれば酸化剤の種類によりそれぞれ 3 乃至 2 個の直線が得られる。その図を第 54 図 (I)——(XII) に示す。

過マンガン酸加里 および 過酸化水素酸化フィブロインの溶出速度曲線は無処理のものと同様に 2 個の屈折点を示すが次亜塩素酸塩酸化フィブロインのみは 1 個の屈折点しか示さない。前二者の第 1 屈折点は 2 時間乃至 3 時間位置に生ずるが後者の屈折点は 6 時間乃至 8 時間位置に生ずる。従つて溶

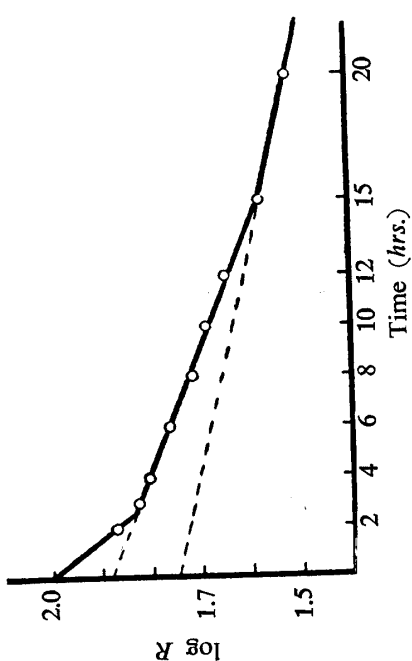


Fig. 54-(II). Fibroin treated with 0.1 N-KMnO₄ for 30 mins.

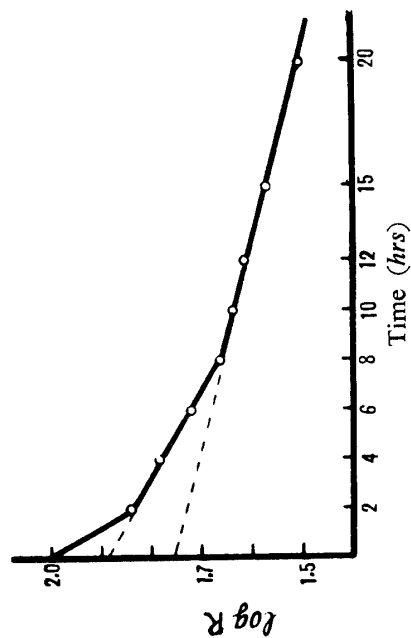


Fig. 54-(IV). Fibroin treated with 0.1 N-KMnO₄ for 120 mins.

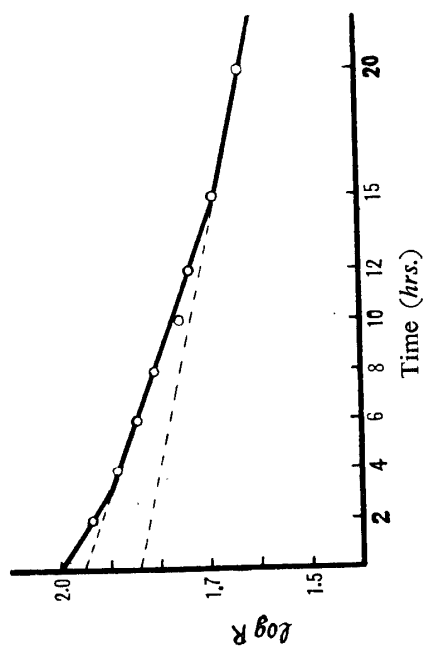


Fig. 54-(I). Untreated fibroin

Fig. 54-(I)-(XII). The relation between log R and hydrolyzed time of fibroin with different levels of oxidation R ; residual amount (%) Sample fibroin (250 mg) was hydrolyzed respectively with 25 cc. of 2% H₂SO₄ at 96°C. for various times and the residual amount was measured.

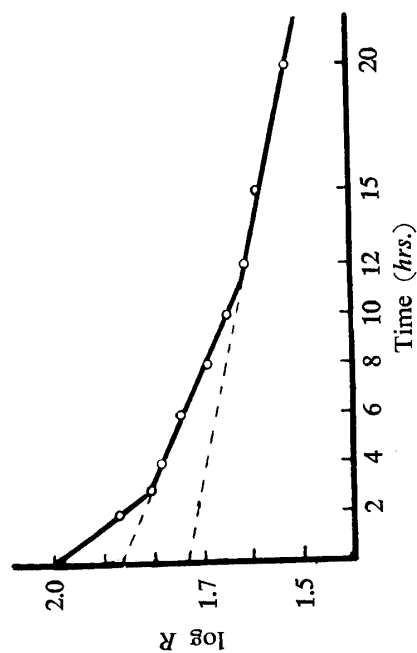


Fig. 54-(III). Fibroin treated with 0.1 N-KMnO₄ for 60 mins.

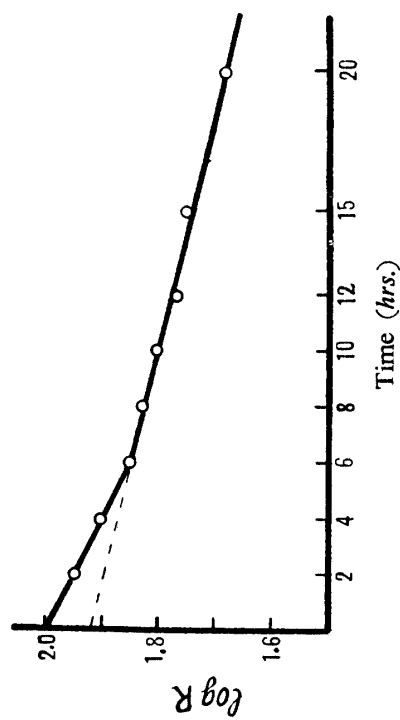


Fig. 54-(VI). Fibroin treated with 0.01 N-Ca(OCl)₂ for 30 mins.

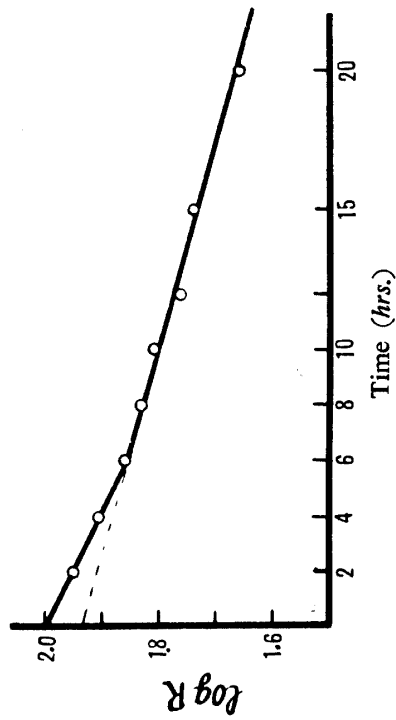


Fig. 54-(VIII). Fibroin treated with 0.01 N-Ca(OCl)₂ for 120 mins.

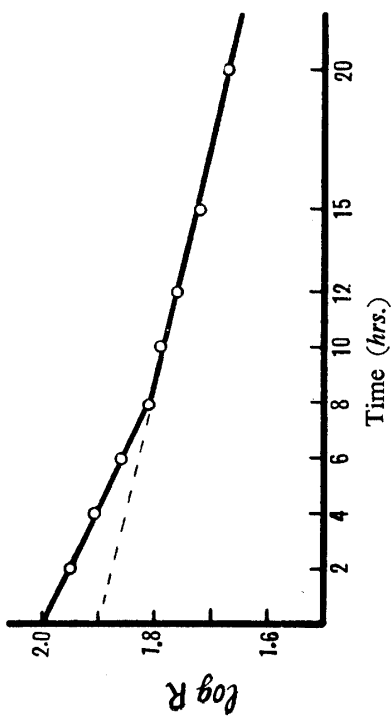


Fig. 54-(V). Fibroin treated with 0.01 N-Ca(OCl)₂ for 10 mins.

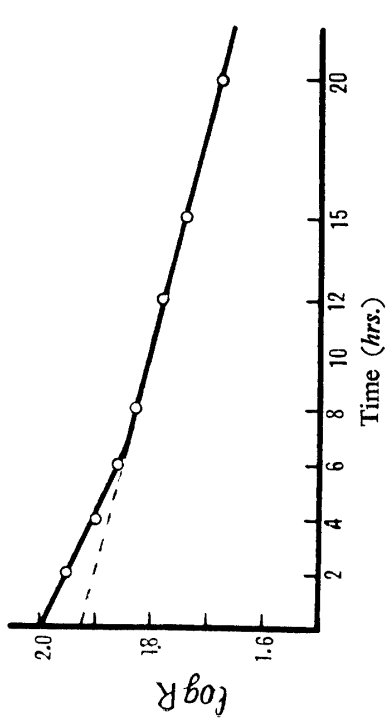


Fig. 54-(VII). Fibroin treated with 0.01 N-Ca(OCl)₂ for 60 mins.

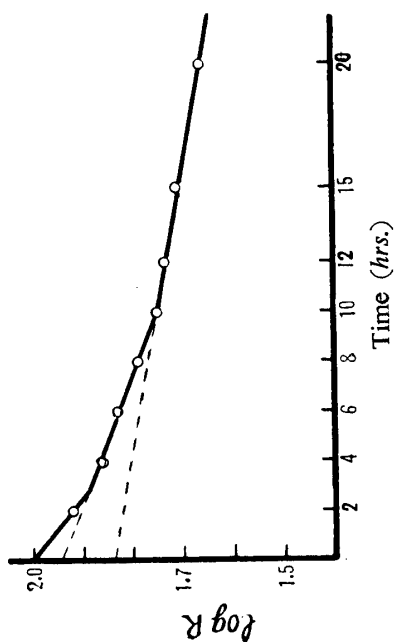


Fig. 54-(X). Fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ (pH=6.97), 70°C, for 60 mins.

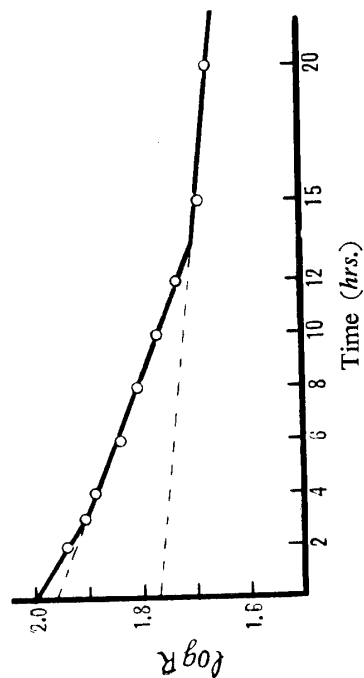


Fig. 54-(XII). Fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ (pH=6.97), 70°C, for 240 mins.

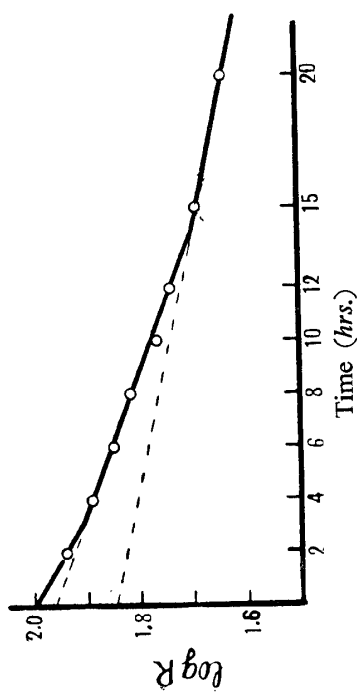


Fig. 54-(IX). Fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ (pH=6.97), 70°C, for 30 mins.

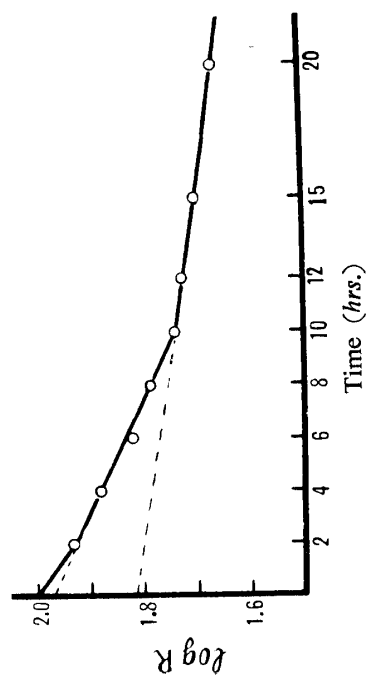


Fig. 54-(XI). Fibroin treated with 1.9 M-H₂O₂ (pH=6.97), 70°C, for 120 mins.

出初期からみて第1, 第2および第3直線すなわち非結晶, 準結晶および結晶の各領域に相当する部分の分解溶出速度恒数を次式により算出した.

$$K = \frac{1}{0.4343 t} \log \frac{a}{a-x}$$

K ; 稀酸による溶出速度恒数, a ; 原量, x ; 溶出量, t ; 分解時間

非結晶部に相当するものの溶出速度恒数を K_a , 準結晶部に相当するものの恒数を K_s , 結晶部に相当するものの恒数を K_c とする. a は amorphous, s は semicrystal, c は crystal の略記号である. K_s , K_c の算出には第1屈折点および第2屈折点部の残渣量を100とし加水分解時間を零時間として実験値をそれぞれ換算して行つた. その詳細につき無処理フィブロインを1例として第53表に示す.

Table 53. Data of soluble velocity constant of fibroin with 2% H₂SO₄ at 96°C

Time (hrs)	Residual amount, R (%)		log R	Soluble velocity constant	Average constant
2	86.12	100.00	1.935	0.075	0.075 (K_a)
4	77.40	89.86	1.889	0.054	
6	69.69	80.91	1.843	0.053	0.051 (K_s)
8	64.36	74.72	1.809	0.049	
10	56.16	65.20	1.749	0.054	
12	54.09	62.80	1.733	0.047	
15	48.98	91.04	1.689	0.031	0.030 (K_c)
20	42.60	79.18	1.629	0.029	

$$K = \frac{1}{0.4343 t} \log \frac{a}{a-x}$$

K ; Soluble velocity constant a ; Original amount
 x ; Soluble amount t ; Time of hydrolysis

K_a ; Constant of the part corresponding to the amorphous region
 K_s ; Constant of the part corresponding to the semicrystal region
 K_c ; Constant of the part corresponding to the crystal region

この表で示したと同様な方法で各酸化フィブロインについても溶出速度恒数の算出を行つた. その結果を第54表, 第55表および第56表に示す.

過マンガン酸加里酸化フィブロインの K_a は無処理のものに比し遙かに大であり 0.1 N-KMnO₄ で 30分間酸化したものでは2倍である. かつ酸化の進行したもの程その値は大きい. K_s , K_c の値はそれぞれ無処理のものと同様である. K_a の増大は酸化により非結晶部に相当する微細構造が酸の滲透および加水分解を受けて溶出され易い形に変化していることを示す. 前章迄の研究で

Table 54. Soluble velocity constant of 0.1 N-KMnO₄-oxidized fibroin with 2% H₂SO₄ at 96°C

Constant	Oxid. time (min.)	0	30	60	120
K_a		0.075	0.145	0.152	0.189
K_s		0.051	0.045	0.048	0.065
K_c		0.030	0.024	0.022	0.026

Table 55. Soluble velocity constant of 0.01 N-Ca(OCl)₂-oxidized fibroin with 2% H₂SO₄ at 96°C

Constant	Oxid. time (min.)	10	30	60	120
K_a		—	—	—	—
K_s		0.053	0.057	0.056	0.056
K_c		0.029	0.029	0.036	0.025

Table 56. Soluble velocity constant of 1.9 M-H₂O₂*-oxidized fibroin with 2 % H₂SO₄ at 96°C

Constant	Oxid. time (min.)	30	60	120	240
<i>K_a</i>		0.071	0.088	0.076	0.072
<i>K_s</i>		0.042	0.048	0.056	0.046
<i>K_c</i>		0.024	0.018	0.015	0.010

* 0.1 M phosphate buffer solution (pH=6.97), 70°C treated.

イブロン分子は酸化を受けて活性基の増加を来し分子構造が変化することを認めたので二次的に非結晶部が異質化していることが推定できる。ここで異質化とは無処理フィブロインの非結晶領域よりもさらに分子配列が乱れることを意味する。さらにまた *K_a* の増大は非結晶部の tyrosine 残基が酸化を受けて崩壊していることを示す。この非結晶部の異質化のためフィブリルの集合状態も悪化し強力や伸度の急激な低下を起すと考えられる。

次ぎに次亜塩素酸塩で酸化されたフィブロインは算出した恒数値から非結晶部に相当する領域が消失していることが認められる。

従つて過マンガン酸加里酸化のさいより強力や伸度の低下が急激なことも理解される。

次亜塩素酸塩酸化の場合には酸化崩壊と加水分解崩壊が併起し酸化による分解溶出量が多く(第4章第1節, 第6章第3節参照), この酸化溶出には非結晶部の1部分が関与しているものと推定される。*K_s*, *K_c* の値は無処理のものと同様であり準結晶および結晶領域は異質化していないことを示す。

1.9 mol H₂O₂(pH=6.97) 酸化フィブロインでは *K_a*, *K_s* および *K_c* ともに無処理のものと同様である。この場合にも tyrosine 含量は徐々に減少しているがそれによつて微細構造の異質化は起らないことが窺知される。

稀酸加水分解による結晶領域定量法については色々と論議されているが, 化学的に対象としている部分は巨視的結晶領域とでも言えるという見解がある。²⁷⁾ 従つて第54図から第65図迄の図でそれぞれの直線を零時間に外挿した値より各領域量を算出した。その結果を第57表から第59表に亘り示す。

第57表で示されたように無処理フィブロインの結晶領域量はほぼ69%でありX線的に求められた量²⁾よりは多い。フィブロイン繊維の結晶領域量は本章冒頭で述べた如く吐糸管繭時の延伸速度によつても差を生ずるが酸化フィブロインにおける変化は分子構造の変化に基因する。中西⁶⁰⁾によればフィブロインは日光曝露により結晶格子が無定形化し岡本⁷⁰⁾によれば結晶領域→準結晶領域→非結晶

Table 57. The fine structure amount of fibroin and 0.1 N-KMnO₄-oxidized fibroin

Fine structure amount	Oxid. time (min.)	0	30	60	120
Amorphous region (%)		10.87	24.10	26.20	23.27
Semicrystal region (%)		19.83	19.66	19.48	20.43
Crystal region (%)		69.30	56.24	54.32	56.30

Table 58. The fine structure amount of 0.01 N-Ca(OCl)₂-oxidized fibroin

Fine structure amount	Oxid. time (min.)	10	30	60	120
Amorphous region (%)		—	—	—	—
Semicrystal region (%)		10.87	16.80	13.90	15.87
Crystal region (%)		89.13	83.20	86.10	84.13

Table 59. The fine structure amount of 1.9 M-H₂O₂*-oxidized fibroin

Fine structure amount	Oxid. time (min.)	30	60	120	240
Amorphous region (%)		10.88	11.90	6.68	7.74
Semicrystal region (%)		18.32	18.92	28.00	33.24
Crystal region (%)		70.80	69.18	65.32	59.02

* 0.1 M phosphate buffer solution (pH=6.97), 70°C treated.

領域の経過を辿り崩壊するとされている。フィブロインの光酸化崩壊は酸化剤処理に比し緩和であり、また酸化による分解溶出現象がないので酸化試料の稀酸分解速度曲線の外挿により微細構造を定量されているが果たしてこれが妥当であるか否かを考えてみよう。便宜上仮りにフィブロインの微細構造を結晶領域と非結晶領域より成るとして解析する。(i) 試料 A, B がありその非結晶領域と結晶領域の量的割合のみが異なりそれぞれの加水分解溶出速度恒数は同一であるとする。

A の非結晶領域が B のそれより多いとすれば分解残渣量の対数と加水分解時間との関係図は第 55 図(I) の如く A の屈折点 m と B の屈折点 n は同一の第 1 直線上を移動した関係にある。かような場合はその m, n の縦軸への外挿値より結晶領域量が求められる。

(ii) 試料 A, B がありその非結晶領域と結晶領域との量的割合は同一で非結晶領域の水解溶出速度のみが異なり結晶部のものは同一であるとする。試料 A の非結晶領域の水解速度恒数を Ka_1 とし B のそれを Ka_2 とし $Ka_1 > Ka_2$ とすれば A の屈折点 m と B の屈折点 n は第 55 図(II) の如く同じ高さであり第 2 直線が横に平行移動した関係となる。かような場合には m, n の縦軸への外挿値より結晶領域量を算出することは妥当でないことが判る。

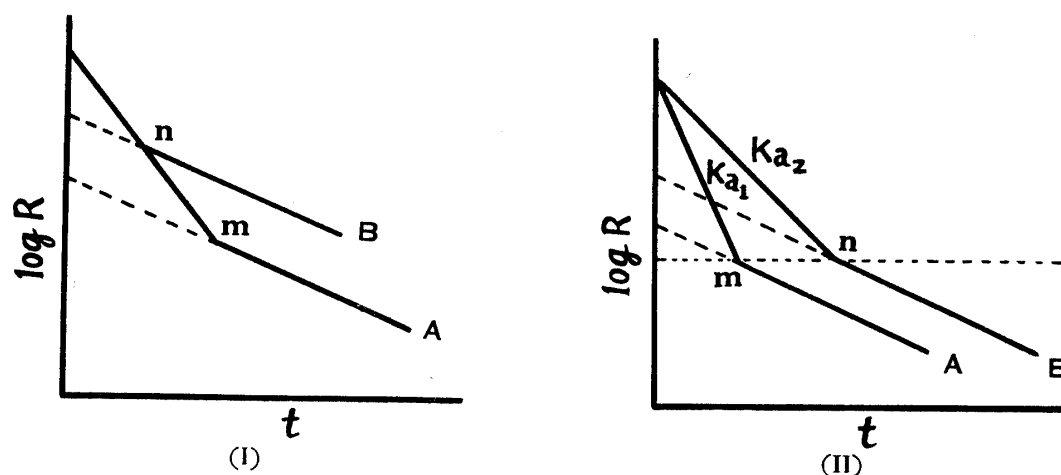


Fig. 55. Diagram to examine the adequacy of determination of fine structure amounts by dilute acid hydrolysis

- (I) Dissolution type when the soluble constants of A and B are equal, although fine structure amounts of the two are different.
- (II) Dissolution type when fine structure amounts of A and B are equal, although the soluble constants of the amorphous region of the two are different.

In order to make the analysis easy, fine structure was assumed to be composed of both amorphous and crystal part.

すなわち (II) 図から算出して試料 B が A よりも結晶領域が多いということは誤りとなる。屈折した三直線の場合もこのような関係は同様に考えることができる。

上記の解析結果から過マンガン酸加里酸化フィブロインのように Ka の値が酸化とともに増大し

たものに対しては求めた結晶領域量について考察が加え難い。1.9 mol H₂O₂ 加温酸化フィブロインでは **Ka**, **Ks** および **Kc** の値はそれぞれ無処理のものと同様であるので第 59 表の結果から酸化とともに結晶領域が崩壊し準結晶領域へと変形していることが推定される。次亜塩素酸塩酸化の場合は初期に非結晶領域の酸化がおり、この部分は一部分解溶出して一部は分子配列の準結晶化への転換も考慮される。何となれば短時間の酸化で非結晶部の完全溶出は考えられないから。

従来の観点からは次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは稀酸分解速度曲線は二直線となりその外挿値から求めた量を如何に取扱うか決定できないが、速度恒数を算出し無処理のものと比較すれば該当する領域を推定できる。

またこの恒数値の比較により微細構造の質的変化が判明する。従つて中西、岡本等が光酸化フィブロインで得ている成績も速度恒数算出結果と合わせて考察すべきである。

第 2 節 稀アルカリによる酸化フィブロインの溶出速度

各酸化フィブロイン 250 mg 宛をそれぞれ 0.1 N-NaOH 25 cc 中に充分浸漬し逆流冷却器をつけて 70°C 恒温で 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 時間加水分解を行い、恒量既知の脚無しグラスフィルター (No. 3) で濾過し一定量の水で洗滌後乾燥して残渣を重量法で求めた。溶出量は原試料無水量に対する百分率として第 60 表に示した。

Table 60. Soluble amounts (%) of different oxidized fibroins with 0.1 N-NaOH at 70°C (Volume ratio, 1 : 100)

Sample fibroin	Time (hrs)						
	1	3	4	6	7	8	9
Untreated fibroin	2.43	9.44	12.26	15.72	18.35	21.64	23.90
0.1 N-KMnO ₄ , 10 mins. oxid. fibroin	7.32	14.46	18.57	25.02	25.37	28.05	32.69
" 30 mins. "	14.42	24.85	26.60	34.62	37.03	39.65	41.98
" 60 mins. "	21.16	29.44	32.42	38.75	42.49	44.68	45.95
" 120 mins. "	28.13	39.15	44.68	55.35	53.75	56.17	58.29
0.01 N-Ca(OCl) ₂ , 10 mins.oxid. fibroin	2.10	8.48	10.33	17.00	19.00	21.18	24.89
" 30 mins. "	4.47	9.39	11.13	19.19	22.37	23.67	29.07
" 60 mins. "	5.30	12.83	15.90	23.76	23.94	27.21	30.26
1.9 M-H ₂ O ₂ ·70°C, 30 mins.oxid. fibroin	2.59	9.96	13.95	22.32	25.83	29.46	31.59
" 60 mins. "	3.39	11.69	16.34	27.73	25.77	29.18	32.12
" 120 mins. "	4.19	10.74	16.58	21.61	24.68	27.80	30.47
" 240 mins. "	6.50	14.72	17.44	24.53	28.60	31.67	34.41

中西¹³⁾によればフィブロインの極く緩和なアルカリ処理による溶解過程は溶解量の対数と分解時間との関係図の解析から分解様式を異にした 2 成分より成る非結晶領域の存在を示すとされている。酸化剤で処理されたフィブロインのように分子構造の攻撃を受けた場合は前節で示した理由により非結晶領域構成の 2 成分量を求めることは困難と思われる。従つて酸加水分解と同様にアルカリ溶出残渣量の対数と分解時間との関係図を作製した。0.1 N-KMnO₄ 処理の酸化フィブロインはそれぞれ加水分解 1 時間目に第 1 屈折点を有する二直線となるが次亜塩素酸塩および過酸化水素酸化フィブロインは屈折点なく一直線となる関係を得た。従つて各直線部の溶出速度恒数を前節と同様に次式により求めた。

$$K = \frac{1}{0.4343 t} \log \frac{a}{a-x}$$

K ; 稀アルカリ溶出速度恒数, a ; 原量, x ; 溶出量, t ; 分解時間

過マンガン酸加里酸化フィブロインの場合には最初の溶出部の恒数を K_{a1} , 次段階のものを K_{a2} として示す. K_{a2} の算出には前節と同様に第 1 屈折点すなわち加水分解時間, 1 時間目の残渣量を 100 とし分解時間を零時間としてそれぞれの実験値を換算して行つた. 他の酸化フィブロインの溶出速度恒数はすべて K_a として示す. その結果を第 61 表, 第 62 表および第 63 表に示す.

Table 61. Soluble velocity constant of 0.1 N-KMnO₄-oxidized fibroin with 0.1 N-NaOH at 70°C

Constant	Oxid. time (min.)	10	30	60	120
K_{a1}		0.076	0.155	0.238	0.330
K_{a2}		0.046	0.053	0.051	0.076

Table 62. Soluble velocity constant of 0.01 N-Ca(OCl)₂-oxidized fibroin with 0.1 N-NaOH at 70°C

Constant	Oxid. time (min.)	0	10	30	60
K_a		0.029	0.029	0.036	0.044

Table 63. Soluble velocity constant of 1.9 M-H₂O₂-oxidized fibroin with 0.1 N-NaOH at 70°C

Constant	Oxid. time (min.)	0	30	60	120	240
K_a		0.029	0.039	0.042	0.041	0.051

過マンガン酸加里酸化フィブロインの稀アルカリ溶出速度は無処理のものに比し大であり, とくに初期段階の溶出速度 (K_{a1}) においてその傾向が著しい. かつ酸化の進行したもの程大きく, これは前節で述べたように非結晶領域の異質化によるものと考えられる.

次亜塩素酸塩および過酸化水素酸化フィブロインも酸化の進行したもの程溶出速度は大である. 次亜塩素酸塩酸化フィブロインは稀酸分解速度からみれば非結晶領域に相当する部分の消失がみられ準結晶および結晶領域に相当する部分の速度恒数は無処理と同一値であつたが稀アルカリ溶出の場合には酸化の進んだもの程漸次恒数値が大きくなつている.

過酸化水素酸化フィブロインは非結晶および準結晶領域に相当する部分の稀酸溶出速度恒数は酸化の進行に拘らず同一値であつたが稀アルカリ溶出時の恒数は酸化の進んだもの程大きい. これらの結果は無処理フィブロインに対する酸とアルカリの溶出機構の差異¹⁶⁾ および酸化フィブロインの COOH 基含量の増加に基づくものと考えられる.

各種の酸化フィブロインに共通していることは何れも無処理フィブロインよりも溶出速度恒数が大きく, さらに酸化の進行とともに大きくなつていくことである. 過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインはアルカリ分解に対しては無処理フィブロインより抵抗性が弱いにも拘らず Cu-En 溶液に対する溶解抵抗性は逆に遙かに大きいことは興味深い現象である. 稀酸および稀アルカリ溶出速度恒数の算出結果から酸化による強力や伸度の急激な低下にはとくに非結晶領域の崩壊が関係深いことが首肯される.

過マンガン酸加里酸化フィブロインの酸化初期の強力や伸度の急激な低下は非結晶部に相当する分子連鎖の配列度の乱れ (非結晶領域の異質化) に基因し, 次亜塩素酸塩酸化フィブロインの場合にはこの領域の酸化による一部消失に基因すると考えられる. 過酸化水素酸化フィブロインの物理的性

質の変化は緩慢である。この場合は恒数値の異常をほとんど認めないので微細構造の領域量から判断すれば結晶領域の一部準結晶化によるためであろう。

第3節 小 括

稀酸および稀アルカリ加水分解法により稀薄過マンガン酸加里，次亜塩素酸塩および過酸化水素で種々段階酸化されたフィブロインについてその微細構造の溶出状態を調べた。

(1) 同一時間稀酸分解した時の溶出量をみると過マンガン酸加里酸化フィブロインは無処理フィブロインより多くかつ酸化の進んだもの程多い。これに反して次亜塩素酸塩酸化フィブロインは無処理に比し少なくかつ酸化度は溶出量にほとんど影響を及ぼさない。

過酸化水素酸化フィブロインは無処理と同様であった。

(2) 稀酸溶出残渣量の対数と分解時間との関係図は過マンガン酸加里および過酸化水素酸化フィブロインでは無処理と同様に3個の直線となるが次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは2個の直線となる。従つて溶出初期からみて第1，第2および第3直線部すなわち非結晶，準結晶および結晶の各領域に相当する部分の溶出速度恒数（順次 K_a , K_s , K_c と名づける）を求めた。

(3) 過マンガン酸加里酸化フィブロインの K_a は無処理の K_a に比し遙かに大きくかつ酸化の進行したもの程大きい。とくに短時間酸化のもの K_a の増大は著しく，その後のものでは漸増している。 K_s , K_c は無処理のものと同値である。

次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは恒数値からは非結晶領域に相当する区分の消失が認められる。 K_s , K_c は無処理のものと同値である。稀薄過酸化水素加温酸化フィブロインでは K_a , K_s および K_c ともに無処理のものと同値である。

(4) 速度恒数の面から微細構造溶出の解析を行つた結果，溶出速度恒数に変化を受けたフィブロインについては稀酸加水分解法による巨視的結晶領域定量法は妥当でないことが認められた。

(5) 稀アルカリ溶出残渣量の対数と分解時間との関係図は過マンガン酸加里酸化フィブロインでは2個の直線となるが次亜塩素酸塩および過酸化水素酸化フィブロインでは1個の直線となる。従つてそれぞれの溶出速度恒数を算出して比較した。

(6) 過マンガン酸加里酸化フィブロインのアルカリ溶出速度は無処理に比し遙かに大でありかつ酸化の進んだもの程大きい。次亜塩素酸塩および過酸化水素酸化フィブロインの溶出速度は無処理よりやや大であり，かつ酸化の進行したもの程漸増している。

以上の結果から酸化初期に起る強力や伸度の急激な脆化は過マンガン酸加里酸化の場合には非結晶領域に関与する分子配列の乱れに基因し，次亜塩素酸塩酸化の場合にはこの領域の酸化による一部消失に基因すると推定される。さらに稀薄過酸化水素加温酸化の場合には結晶領域の部分的準結晶化に基因するものと推定される。

第9章 綜 合 考 察

過マンガン酸加里，次亜塩素酸塩および過酸化水素の3種の酸化剤でフィブロインを段階的に酸化しそれらについて物理的性質変化，有機化学的および溶液論的面からの構造変化および微細構造変化等を系統的に調べた。

得られた結果を各章各節で詳細に記述したがそれらを相互に比較しつつ総合考察を行つてみよう。先ず第2章ではフィブロイン水溶液の稀薄過マンガン酸加里による滴加酸化について記述した。従来の酸化研究はすべて固体状態すなわちフィブロイン繊維を試料としたものであるので均一酸化反応を行わせるため，さらには過マンガン酸加里の還元による生成金属イオンと蛋白質との相互作用を知

るため溶液状態での酸化を行つたのである。還元性有機低分子 (tyrosine, phenol, rhamnose および glucose) と高分子 (fibroin, albumin, polypeptone, gelatin および soluble starch) の稀薄水溶液に稀薄過マンガン酸加里を滴加した場合はそれぞれ酸化速度の遅速はあるが特異点は前者は酸化後溶液が上澄透明となり、黒褐色沈澱を生成するのに対し後者は沈澱を生ぜず4価マンガンを基づく黒褐色溶液に変化することである。これらの溶液は透析を行つても有色物質の外液への拡散を認めない。以上のことから還元された Mn^{IV} は高分子との complex 形成に関与していることを確認した。

フィブロインの酸化溶液は10日間位放置するとゲル化するが他の酸化高分子溶液は全く安定である。この現象はフィブロイン分子は過マンガン酸加里による軽酸化を受けるさいは分子主鎖が優先的に切断して polypeptone 様となり Mn-fibroin complex を形成するのではないことを示唆する。フィブロイン水溶液に種々の量の稀薄過マンガン酸加里溶液を滴加し酸化度の異なる Mn-fibroin complex を作製し光散乱法で平均分子量を測定した結果、軽酸化のものでも無処理に対し著しい分子量増大を示す。(第2章第4表参照) 以上の結果からフィブロイン水溶液は過マンガン酸加里酸化により tyrosine 残基部を基点とし、 Mn^{IV} を架橋媒体とする chelating complex を形成することが確認された。蛋白質と金属との結合様式には第3図の如き3種の型があるが上述の結果は chelating complex の生成確認には光散乱法が極めて有利なことを明示している。

次に第3章ではフィブロイン繊維を稀薄濃度の過マンガン酸加里溶液で常温酸化を行つた場合の物理的性質、若干の組成分含量の変化および溶液論的面からの構造変化等を記述した。酸化後のフィブロイン繊維は褐色化し増量するが酸化初期のものには MnO_2 の沈着を認めない。さらに酸化剤の消費量曲線と繊維の増量率曲線は類似形を呈し密接な相関関係を有することが窺知された。前述溶液酸化で得られた結果から固体酸化時にも Mn-fibroin complex の形成が予想される。酸化繊維の増量が Mn 原子単独の形での結合に基因するとすれば増量値と還元された Mn 量とが実験誤差範囲内で一致すべきである。しかるに実際の増量値は還元された Mn 原子の量よりも遙かに多く興味あることには各酸化時間別の増量値と還元された Mn 量との比を算出すると、それぞれ同一値すなわち平均恒数 1.69 であつた。この値は $MnO_2/Mn=1.58$ に類似するが Mn は単独では complex 形成に関与しても oxide 形としては不可能である。

GREEN et al⁹⁹⁾ の Cr^{III} -alanine complex の構造および $Li^{100)$ の金属の peptide 結合への配位から第6図の如き Mn-fibroin complex を想定して増量要因となる形態と Mn 量との比を算出すると 1.62 であり上記恒数値 1.69 とほぼ近似値であつた。従つて酸化初期の褐色化および増量は従来云われている MnO_2 による⁷⁶⁾のではなく第6図の如き Mn-fibroin chelating complex によるものと推定した。もちろん酸化の進行に伴ない溶液は褐色になり MnO_2 生成による懸濁を認めるがこれは tyrosine 残基の phenol 核開裂に伴ない一部二次的に生成する低分子の酸化によるものであろう。(第2章第2表参照)

例えば酸化液中における有機酸類の生成が確認されたことから首肯できる。(第7章第4節参照) また一部主鎖および側鎖末端の酸化脱アミノ(第6章第2節参照)に伴ない過マンガン酸加里の還元も寄与していると考えられる。

褐色化繊維は稀薄な過酸化水素あるいは修酸浸漬により Mn が除去され脱色されるが後者の方が繊維を脆化させることなく良好である。(第3章第2節参照) 酸化後修酸で脱色洗滌された繊維の原試料に対する強力や伸度の脆化率についてみると短時間酸化のものでとくに大きく、その後酸化時間経過に伴ない徐々に脆化率を増加することが認められた。フィブロインの tyrosine 含量は酸化に伴ない減少するが全窒素, serine および threonine 含量は変化しない。tyrosine 含量の酸化時間経過

に伴う減少曲線は過マンガン酸加里消費量曲線および増量率曲線と対称相をなすが **tyrosine** 含量を還元された過マンガン酸加里量に対しプロットすれば直線関係が得られた。(第3章第9図および第10図) このことは脆化を支配する主要な酸化反応は **tyrosine** 残基部の反応であることを示唆している。しかし強力や仲度の脆化率に比し **tyrosine** 減少率は遙かに小さくまた原試料に対し脱マンガン後の繊維の重量変化がほとんど認められないことから軽酸化による急激な脆化は分子主鎖の切断によるとは考え難く分子連鎖の凝集力変化ひいては配列状態の乱れによると推察される。

このことは酸化フィブロインの N-末端基量変化および微細構造の溶出速度の解析結果から証明された。

無処理フィブロイン繊維は (12/16) Cu-En 溶液中に量比 1 : 10 で投入攪拌すれば常温で 3 分前後で完全に溶解分散するが過マンガン酸加里で酸化されたもの(脱マンガン後のもの)は全く異なる溶解挙動を示す。すなわち酸化フィブロインを Cu-En 中に入れると溶剤を吸収してスポンジ様の膨潤体となり短時間では全く溶解の徴候を示さない。しかしながら酸化フィブロインを量比 1 : 20 で Cu-En 中に入れ硝子棒で押しつつ強く攪拌を続けると漸次シラップ状となり、その後遂には溶解分散する。かような現象を発見し著者は初めて溶液論的研究を可能にしたのである。酸化剤によるフィブロインの崩壊問題を取扱った従来の研究者は無処理フィブロインと同一観点からこの不溶解化現象に直面し全く溶液論的研究を行っていない。もちろんかような処理によつて分子構造に全く破壊を及ぼさないとは考えないが溶液状態で初めて測定できる事項、たとえば粘度、光散乱、電気泳動、吸収スペクトル等を調べることにより少しでも構造変化を探究することができるので極めて価値があると信ずる。

CADWALLADER et al⁴⁶⁾ はフィブロインを亜硝酸、次亜塩素酸塩および紫外線酸化を行い、その後の Cu-En 溶液への溶解挙動を観察し、酸化条件の如何によつては不溶解化する現象を見出しているが酸化フィブロインについては何等の分析も行っていない。EARLAND⁴⁷⁾ は過マンガン酸加里および二三の酸化剤で処理したフィブロインを CaCl₂-HCOOH 溶剤に量比 1 : 200 で 40 分間抽出して僅かに溶解した部分の還元粘度を測定しその低下から分子崩壊を主張している。SITCH et al⁴⁸⁾ は酸化フィブロインの流動性変化と重量変化とから主鎖切断問題を論議しているが彼等の用いた酸化剤すなわち過酸化水素および過酢酸はたまたまフィブロインを溶剤に不溶解化しないものである。

また粘度法からの測定結果で分子主鎖切断を論ずるのは溶液中における分子間の相互作用を考慮していない点で早計に過ぎる嫌いがある。酸化作用の如く活性基とくに側鎖部に変化を及ぼす作用を受けた蛋白質については粘度測定結果からは型状の推移を知り得るのみであつて、主鎖切断を論ずるには末端基定量、分子量測定等と合わせて考察する必要がある。

酸化フィブロインを Cu-En 溶液にとかし水次いで炭酸塩緩衝液に透析したものについて粘度法により軸比を算出し、相対的な軸比変化を調べたところ、短時間の酸化で軸比は相当に小さくなりその後酸化の進行とともに漸次小さくなることを認めた。また光散乱法により平均分子量を測定して酸化フィブロインは無処理よりも大きくとくに短時間酸化のものが最も大きいことを見出した。(第3章第14表参照) 従つて粘度および軸比の減少はフィブロイン分子の主鎖切断に基づくよりも分子連鎖間結合の部分的強化による **aggregation** すなわち棒状型からより球状型への形態変化に基因することが認められた。かように種々の面で変化の著しい短時間酸化の試料について電気泳動挙動をみけると無処理に比し界面の平坦化現象が認められた。このことから比較的類似の **aggregate** の混合系が溶液中に存在すると推定された。

次に第4章に記述した希薄次亜塩素酸塩酸化フィブロインについて得られた結果の中、上記過マン

ガン酸加里酸化フィブロインとの類似点および相違点につき考察してみよう。

フィブロインの次亜塩素酸塩消費量は同一濃度の過マンガン酸加里消費量に比し反応温度が低くても遙かに多く次亜塩素酸塩は過マンガン酸加里よりも反応速度が大きいことを示している。大橋ら¹⁰³⁾は澱粉に対しては漂白粉の作用力は過マンガン酸加里よりも遙かに弱いと述べているが彼等は酸化剤の規定濃度を同一とせず百分率濃度を等しくして得た結果より考察しており妥当でない。何となれば彼等の使用した溶液を規定濃度に換算すると漂白粉の方が相当に小さい。

フィブロインは稀薄次亜塩素酸塩中に投入後 10 分位経過すると黄変し始める。これは塩素置換による 3,5-dichloro tyrosine 残基の生成によることを証明した。酸化フィブロインは過マンガン酸加里酸化の場合とは異なり重量損失を来すがこの減量率は被還元塩素量 (mg/g-フィブロイン) の一次函数、 $y=ax$ 型として表わされる。セルローズの過酸化窒素酸化では glucose 残基の C⁶-位置の第 1 級アルコール基が酸化され重量増加を来すが、¹¹⁴⁾ 次亜塩素酸塩酸化では偶然的にどの OH 基も酸化されて生成物は重量損失を来すと言われる。¹¹⁵⁾ tyrosine 残基の分子内配列が不明であるので上記の酸化溶出直線が如何なる因子に依存したものは不明であるが酸化崩壊は tyrosine 残基の単なる modification によるのではなく主鎖切断を惹起していることだけは確認される。

次亜塩素酸塩溶液により酸化度の異なるフィブロインを色々調製し一定時間当りの過マンガン酸加里消費量を求めたところ酸化度の進行したもの程多い。酸化の進んだもの程易酸化性の tyrosine 残基は減少しているにも拘らず過マンガン酸加里消費量が多いことは活性基の増加を推定させる。酸あるいはアルカリ浸漬後のフィブロインは無処理のものより過マンガン酸加里消費量が多い事実⁷⁵⁾から次亜塩素酸塩酸化の場合は加水分解崩壊も併起することが考えられる。このことは後記の N-末端基量の変化 (第 6 章第 3 節参照) から証明された。

酸化フィブロインの強力や伸度の低下は過マンガン酸加里酸化時よりも著しい。フィブロインの全窒素は極く短時間の酸化で無処理より減少するがその後時間経過してもほとんど変化を認めない。serine および threonine 含量には変化を認めないが tyrosine 含量は減少する。tyrosine 含量と被還元塩素量との関係は過マンガン酸加里酸化時のように直線関係を示さないがこれは溶出物質の酸化が副反応として進行するためと思われる。次亜塩素酸塩と過マンガン酸加里で酸化されたフィブロインの中 tyrosine 含量が同一のものすなわち tyrosine 含量からみれば酸化度が同一のものの強力および伸度の脆化率は前者で酸化されたものが遙かに大である。このことは両酸化剤によるフィブロインの崩壊機構が異なることを明示している。酸化フィブロインの Cu-En 溶液への溶解挙動は過マンガン酸加里酸化フィブロインと同様であつた。

酸化に伴う粘度、軸比および平均分子量、電気泳動図等の変化の傾向も過マンガン酸加里酸化の場合に類似していた。ただしこの場合は加水分解崩壊も併起しているので上記高分子化学的量的変化は過マンガン酸加里酸化の場合よりなお一層の分子連鎖間結合の強化に基因するものである。

第 5 章では過酸化水素によるフィブロインの酸化崩壊について記述した。フィブロインは 35% の高濃度の過酸化水素溶液中に 1 日乃至 2 日間浸漬しても酸化されない。もちろん金属触媒を共存させれば別である。従つて 35% H₂O₂ で長期間常温酸化および 1.9 mol H₂O₂ (pH=6.97) で種々の時間加温酸化をした場合の物理的性質、若干の組成成分の変化および溶液論的面からの構造変化等を調べた。

強力や伸度の脆化率は前記 2 種の酸化剤による酸化の場合と異なり酸化の進行に伴ない徐々に増加してゆき酸化初期の急激な脆化を認めない。tyrosine 含量のみが酸化に伴ない減少し全窒素、serine および threonine 含量には変化を認めないのは過マンガン酸加里酸化の場合と同様である。1.9 mol

H_2O_2 による加温酸化のさいはフィブロインの有無による過酸化水素の分解率の差が認められないにも拘らず処理フィブロインの **tyrosine** 含量は処理時間に伴ない漸減していた。過酸化水素水溶液は稀釈あるいは温度上昇により分解が促進されるのでそのため励起酸素の1部が酸化反応を惹起したものと推定される。

酸化によるフィブロインの **tyrosine** 減少率が過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインのものと同じの場合でも強力や伸度の脆化率は遙かに小さい。(第5章第26表参照) この事実は過酸化水素酸化による **tyrosine** 残基の構造変化が他の酸化剤処理の場合とは異なることを示している。また過酸化水素酸化フィブロインは他の酸化剤処理のものとは異なり **Cu-En** に対する溶解挙動を全く異にする。すなわち溶解抵抗性を示さず無処理と同一条件ではむしろ無処理より易溶である。これは他の酸化剤処理フィブロインとは異なる連鎖間作用力の存在を示すものである。粘度および粒子軸比は酸化とともに漸次小さくなるがその低下度は酸化度が他の2種の酸化剤処理の場合と同一の場合でも小さい。

分子量変化についてみると無処理の平均分子量が 11.4×10^4 であるのに対し 35% H_2O_2 10日間常温処理のものは 17.9×10^4 となり実験区内ではこれを最大とし酸化の進行に伴ない漸減している。35% H_2O_2 試薬中には安定剤として酸が共存しており加水分解による主鎖切断が惹起されるので(第6章第4節参照) この場合にも分子量変化からみて酸化により連鎖間結合の部分的な強化が起つていることが確認される。それは多分副原子価のみの強化によると考えられる。1.9 mol H_2O_2 加温酸化のものは無処理よりやや分子量の増大が認められる程度であり連鎖間結合の強化によるとは断定し難い。

電気泳動図は界面の平坦化現象を示さず 35% H_2O_2 酸化フィブロインは無処理と同様に1個の明確な峰を示し相対易動度から無処理より泳動速度が遅いことが認められた。1.9 mol H_2O_2 、加温酸化のものでは下降側は明確な1峰を示し上昇側では峰の異常あるいは2個の峰への分離を認めた。しかし他の酸化剤処理フィブロインの如く泳動像は裾の拡がりを示さない。各峰の相対易動度から泳動速度は無処理より早いことが認められた。三種の酸化剤で処理されたフィブロインの電気泳動図をみると界面の平坦化現象の有無が酸化フィブロインの **Cu-En** 溶解性の難易とも一致していることは興味深い。

酸化剤による酸化とは当然機構が異なると考えられるけれども蛋白質の放射線照射の場合に分子量変化について類似の現象が見出されている。**albumin** 溶液をX線照射すると平均分子量は著しく増加しこの上昇は小区分に崩壊せずに **aggregate** したものであり、それは **aggregate** の非常に広い **polydispersion** 形成によることが認められている。¹⁴⁶⁾¹⁴⁷⁾¹⁶²⁾

また溶液あるいは固体照射何れの場合でも **aggregate** の分子量分布が広く、固体照射ではとくに酸素の存在で不溶解化が促進される。¹⁴⁷⁾

ALEXANDER はこの **aggregation** には **secondary force** が関与しておりまた新しい **covalent** 結合による分子間架橋も形成されているかも知れないと述べている。¹⁴⁷⁾ さらにまた **cysteine** を含む蛋白質では **-SH** 基の酸化により **-S-S-** 結合ができ一部は **tyrosine** の **benzene** 核間の **diphenyl** 型架橋により分子量増大が起ることも想像されている。¹⁴⁶⁾ しかしこれらの研究では **tyrosine** あるいは **cystine** 量の変化を定量していない。

フィブロインの酸化の場合にはアミノ酸組成からみて **-S-S-** 架橋化は有り得ないしまた **diphenyl** 型架橋も後記する吸収スペクトル(第7章第3節参照)から否定される。**CARROLL et al**¹⁴⁶⁾ はX線照射 **albumin** では分子量変化が認められたものでも電気泳動には異常を認めず荷電量比の差異が生じなかつたものとしている。**BARRON**¹⁶²⁾ も 10^4r -X線照射では易動度の変化はないが 20^4r 照射では

その減少を認めている。これは 35% H_2O_2 で酸化されたフィブロインの分子量変化と泳動挙動変化とに類似している。坂村ら¹⁴⁴⁾は紫外線照射による β -lactoglobulin の変性を調べ電気泳動および超遠心沈降図より β -casein のように界面の平坦化を認め、 β -lactoglobulin が inhomogeneous なことを確認している。この inhomogeneous 化に伴い β -lactoglobulin からアンモニアの生成が認められるが電気泳動的に安定な α -casein からはその生成は認められていない。著者も過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは類似の現象を見出した。(第3章第7節, 第4章第6節および第7章第4節参照)

かように類似の現象が放射線および紫外線照射蛋白質でも認められるのは興味深い。

電子線廻折によれば蟻酸の水素結合の距離は 2.67 \AA で水の 2.76 \AA より小さく水素結合の強さが大きい。¹⁶³⁾ フィブロイン分子は水素結合により連鎖が屈曲させられており隣接鎖間の距離は約 3.5 \AA および 5.7 \AA であり長い方の距離は tyrosine の如き大きい側鎖を有するアミノ酸残基の存在による。¹⁵⁷⁾ 従つて tyrosine 残基の phenol 核開裂が起ればそれだけ部分的に立体障害が少なくなり連鎖間の距離は小さくなり水素結合が強くなる。分子量の増大すなわち aggregate 形成にはこの水素結合の強化も1要因をなしていると推定される。第7章の結果から過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインには連鎖間主原子価結合の形成が考えられるので上記のことは 35% H_2O_2 酸化フィブロインの場合には適応するものと思われる。

酸化に伴うフィブロイン分子の N-末端基量あるいは C-末端基量の消長を調べることにより分子主鎖の加水分解崩壊の有無を知ることができる。しかるに酸化剤で処理されたフィブロインについてはこの面の研究は従来皆無であると言つてよい。著者は DNP 法により N-末端基量の変化を測定し酸化分解に伴う加水分解および脱アミノ反応の有無を第6章で検討した。蛋白質の N-末端アミノ酸の定量は蛋白質を DNP 化してそれから分離した DNP アミノ酸についてそれぞれの吸収極大波長における吸光度を分光光度計で測定することが望ましいが本研究では光電比色計を利用して末端基の総和量を測定できれば簡便であると考えた。比色標準の DNP アミノ酸にはフィブロイン中最も高含量でかつ末端アミノ酸の1種でもある glycine を選定した。DNP-glycine は $363 m\mu$ (1% NaHCO_3 中), $355 m\mu$ (0.6 N-HCl 中) に吸収極大を有し可視部には $420 m\mu$ に shoulder を有することが認められた。(第36図参照) 従つて光電比色計でフィルター S_{42} を用い DNP-glycine の濃度と吸光度との関係を求めると溶媒が 1% NaHCO_3 の時は濃度 $2.5 \text{ mg} \%$ 以下では直線関係が成立した。(第37図参照) 溶媒が 0.6 N-HCl の時は直線関係は成立せず第38図の如き曲線となる。

DNP フィブロインおよび DNP 酸化フィブロインの加水分解物の吸収曲線も $420 m\mu$ に shoulder を示すので、各酸化フィブロインの加水分解後のエーテル層および酸層部分の DNP アミノ酸を一定量に稀釈して比色定量した。

さらに酸層の吸収曲線は O-DNP-tyrosine の存在に基づく吸収極大を $300 m\mu$ に認めるので酸化に伴う tyrosine 残基の phenol 性 OH 基の量的変化を知るため $300 m\mu$ の吸光度をも測定した。DNP 蛋白質の加水分解物からはほとんどすべての DNP アミノ酸がエーテル中に容易に抽出されるが DNP-arginine, DNP-cysteic acid, ϵ -DNP-lysine, O-DNP-tyrosine および Im-DNP-histidine 等の極性基をもつものは水層中に残る。¹²⁵⁾ しかるにフィブロインには cysteic acid は含まれず O-DNP-tyrosine は無色であるので酸層部の S_{42} における吸光度測定により塩基性アミノ酸側鎖量の消長を知ることができる。なお N-末端基量の変化は DNP 酸化フィブロイン 100 mg 中のモル数で表わしたがこの表示法は成田¹²⁶⁾も採用しており量的増減を示すには充分満足であることを示した。(第6章第2節参照)

N-末端基量の測定結果から稀薄過マンガン酸加里によるフィブロイン分子の酸化は tyrosine 残基の phenol 核のみならず一部分主鎖およびジアミノ酸側鎖末端部に起り加水分解崩壊を併起しないことが認められた。このことから酸化によるフィブロイン分子の主鎖切断は phenol 核開裂の結果二次的に起ることが解る。また過マンガン酸加里酸化によるフィブロインの初期の粘度および軸比低下は分子の短鎖長化によるのではなく分子連鎖間結合の強化によることが証明される。

次亜塩素酸塩によるフィブロインの酸化崩壊は tyrosine 残基の phenol 核のみならず一部主鎖およびジアミノ酸側鎖部にも起るが同時に加水分解による解重合反応も起る。なお酸化初期には脱アミノ反応が加水分解作用よりも優先するが酸化の進行に伴ない逆の傾向になることが認められた。N-末端基量および分子量変化の相互関係から次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは過マンガン酸加里酸化のものよりも連鎖間結合がより強化されていることが窺知される。35% H₂O₂ 常温酸化の場合には次亜塩素酸塩酸化と同様に主反応としては tyrosine 残基の酸化が起るが同時に酸化初期には主鎖末端の脱アミノ反応が起り後期には加水分解反応が起る。この場合にはジアミノ酸側鎖の脱アミノ反応は極めて徐々に進行することが認められた。なお加水分解は試薬中に安定剤として共存する酸の作用に基因することを証明した。

1.9 mol H₂O₂ 中性加温酸化の場合には N-末端基量は酸化に伴ない減少するが主鎖末端の -NH₂ 基の減少よりも側鎖-NH₂ 基の減少度が大きい。かつこの場合には加水分解崩壊は認められない。以上のことから過酸化水素自体の酸化作用は tyrosine 残基を主とし、そのほか主鎖および側鎖末端の -NH₂ 基にも徐々に起ることが認められる。従つて主鎖切断が起るさいは phenol 核に次いで二次的に行われるものと推定できる。3種類の酸化剤でそれぞれ酸化されたフィブロインは酸化の進んだもの程 tyrosine 残基の phenol 性 OH 基が減少しており、この減少度は酸化時間別にみると初期にとくに著しい。(第40表参照)

第7章では酸化フィブロインの溶剤への不溶解化原因の検討について詳細に記述した。

この不溶解化原因について従来報告されている岡本⁽⁶⁸⁾⁽¹³¹⁾の推定以外は実験的根拠に立脚せず想像の域を脱しない。従来の研究はこの原因を tyrosine 残基部を基点とする架橋化あるいは単なる modification に帰着せしめている。従つて本問題の検討は同時に tyrosine 残基の構造変化をも調べることになる。先ず第1節で不溶解化原因についての従来の考え方すなわち岡本の推定, EARLAND et al⁴⁷⁾の推定および想像, CADWALLADER et al⁴⁶⁾の想像を略述した。

tyrosine の光酸化中間物としては dopa が分離確認されており,¹³⁶⁾ 岡本も日光酸化フィブロイン中にこの存在を認め不溶解化原因として隣接連鎖中の dopa-glutamic acid 残基間のエステル結合あるいは dopa-dopa 残基間のエーテル結合を提唱している。著者は dopa が極めて迅速に酸化されることおよび酸化フィブロイン中に dopa が検出されないことを確認し dopa-glutamic acid 残基間の架橋化を否定した。

また diphenyl ether の吸収スペクトル測定結果 λ_{max} は 210 m μ および 272 m μ に存在することを認め酸化フィブロイン溶液にはこれに該当する何等の peak を認めないこと(第43図, 第44図, 第45図および第46図参照)から dopa-dopa 残基間のエーテル結合による架橋化も酸化フィブロイン中には存在しないことを主張した。すなわち光酸化の如き緩和な条件下では tyrosine 酸化の中間体として dopa が認められるだろうが酸化剤処理の場合には仮りに生成しても直ちに分解されると考えられる。

無処理フィブロイン, 過マンガン酸加里および過酸化水素酸化フィブロインの溶液の吸収曲線は 280 m μ に吸収極大を示し次亜塩素酸塩酸化フィブロインは同波長に shoulder を示すのみである。

(第45図, 第46図参照) YASUNOBU et al¹³⁸⁾ は tyrosine 含有 peptide を tyrosinase で酸化したものは吸収スペクトル研究から, (i) dopa chrome pattern (λ_{max} ; 305 $m\mu$, 480 $m\mu$), (ii) dopa quinone pattern (λ_{max} ; 390 $m\mu$), (iii) protein pattern (shoulder; 350 $m\mu$) の3型に分けられることを見出している. EARLAND⁴⁷⁾ が想像する tyrosine 残基が quinone 残基を経過する重合型では tyrosine 残基と lysine 残基との結合モル数は 1:1 である. 3種の酸化剤で処理された酸化初期の繊維の tyrosine 残基減少モル数と繊維中のジアミノ酸残基総モル数とを比較しても前者が遙かに多かつた. (第41表参照) しかるに酸化繊維の溶液では O-quinone の吸収帯に基因する 390 $m\mu$ の吸収 peak は認められない. これらの結果から EARLAND の想像も妥当でないことを認めた. すなわち tyrosine 残基の quinone 構造への変化は考えられない. また想像される重合型構造があれば Cu-En 溶液中 30分間程度の攪拌で切断されることも到底考えられない.

各種の酸化繊維の同一濃度における吸収スペクトルは測定波長 (250 $m\mu$ ~500 $m\mu$) 全域に亘り酸化度の異なるもの程吸収増加が認められる. tryptophan に比し tyrosine 含有量の多い α -casein, β -lactoglobulin 溶液の紫外線照射したもの¹⁴³⁾¹⁴⁴⁾ および α -lactoalbumin の tyrosinase 酸化のもの¹⁴⁵⁾ でも同様の現象が知られている. 酸化繊維の紫外吸収増加は前記分子量増大の結果から aggregate 形成による光散乱度の増大に基因するものと推定した. また酸化による平均分子量の増加から tyrosine 残基の単なる modification あるいは hydrophobic group の置換が不溶解化原因であるという EARLAND の推定も否定される.

稀薄過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩を用い酸化液が完全に消費される迄常温で反応させたものについてアルデヒド, 遊離アミノ酸およびアンモニアの検出を行ったところ前二者は認められずアンモニアのみの生成を認めた. アンモニアの生成量は次亜塩素酸塩酸化の場合が過マンガン酸加里酸化の場合よりも多い. この事実はアンモニア生成が過マンガン酸加里酸化の場合には主鎖および側鎖末端の脱アミノ反応に由来するが次亜塩素酸塩酸化の場合には同反応のほかに, 加水分解により溶出した高級 peptide の脱アミノ反応にも由来するためである.

酸化液の pH の変化を調べたところ過マンガン酸加里溶液の pH は短時間の酸化で急激に上昇しその後一定となる. 酸化により tyrosine 残基が開裂せず dopa 残基になり次いで縮合あるいは重合するとか, また単に modify されるのみとすれば過マンガン酸加里の還元により生成する苛性加里のため pH は漸増せねばならない. 従つてこの pH 変化は tyrosine 残基の phenol 核開裂に伴う酸性物質の溶出を示唆しており, それは有機酸の生成によることを証明した. 現在行つている tyrosine 単独の過マンガン酸加里酸化生成物の検索研究でも aspartic acid を確認しており phenol 核の開裂は確実視される.

次亜塩素酸塩溶液の pH は酸化初期急激に低下しその後緩慢に低下するがこれも同様の理由によると推定した.

繊維のフォルマル化には熱エネルギーが必要であり, フォルマル化繊維の Cu-En 溶液への溶解挙動は過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化繊維と類似していることを見出した. フォルマル化繊維の溶解時間は処理アルデヒドの濃度増加に伴ない長くなる. なお種々のフォルマル化繊維につき Millon-Lugg 改良法¹⁰⁵⁾ で tyrosine を定量したところ無処理繊維と同一値であつた.

繊維のフォルマル化反応については村瀬ら⁶⁸⁾ は分子連鎖間の tyrosine 並びに serine 残基間に架橋結合するものと推定し奥ら¹⁵⁰⁾ は主として serine 残基間に methylene 架橋を $\text{>CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-<}$ の如く形成し tyrosine 残基間に methylene 架橋する可能性は極めて稀である

と主張している。

ALEXANDER et al¹⁵¹⁾ は フォルマール化羊毛では tyrosine の phenol 核のオルソ位置と lysine 残基間の HCHO 媒体による methylene bridge 形成を提唱し、この架橋化に関するアルデヒドは加水分解されると methylol tyrosine として残り、それは Millon 試薬とは反応しないので tyrosine 含量は低下すると述べている。彼等はフォルマール化のさいのアルデヒド濃度の増加に伴ない tyrosine 定量値が減少することを見出している。著者の実験ではフォルマール化フィブロインの tyrosine 定量値は HCHO 濃度には関係ないことを認めた。従つてフォルマール化フィブロイン中の架橋型式については奥の主張を支持する。このフォルマール化フィブロインを希薄な酸化剤で処理すると酸化剤の種類によつて Cu-En への溶解性が変化することを見出した。すなわち過酸化水素処理では易溶性となり、これに反して稀薄過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩で短時間処理するのみで益々難溶化が進行する。

また過酸化水素酸化フィブロインは無処理よりも易溶性であるがこれを稀薄過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩で処理すると忽ち難溶化する。逆に過マンガン酸加里酸化フィブロインを過酸化水素で処理すれば易溶性になる。これらの事実から過酸化水素は methylene bridge を酸化切断して溶解性を増加させ、過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩は methylene 架橋には作用せずむしろ tyrosine 残基の phenol 核を酸化開裂させ連鎖間結合を強化させることが判る。従つて不溶解化原因の1つは隣接鎖の serine 残基間における methylene 架橋化によると推定した。酸化液中にはアルデヒドは検出されないが生成 HCHO が直ちに架橋化反応に関与すれば何等不合理はない。さらにフォルマール化には熱エネルギーを必要とするが酸化エネルギーがこれに代つて架橋化反応を促進せしめていると考えられる。次に tyrosine 残基の構造変化の一端を窺知するため酸化に伴なうフィブロインの methylene blue 吸収および pH 滴定曲線の変化を調べた。

過マンガン酸加里および中性過酸化水素酸化フィブロインはそれぞれ短時間酸化のもののみは無処理に比し methylene blue 吸収量は少ないがその後酸化の進んだものでは漸次増加している。次亜塩素酸塩および 35% H₂O₂ 酸化フィブロインの吸収は無処理レベルより低いが酸化試料間では同様に酸化の進んだもの程大きい。これらの現象は前述分子量変化と逆の関係である。

酸化フィブロインの pH 滴定曲線は無処理フィブロインに比較すると酸側では変化なくアルカリ側では pH の低い方に移動し酸化の進んだもの程低位置となる。(第 49 図および第 50 図参照) この事実により酸化に伴なう COOH 基の増加が証明された。また酸化フィブロインの COOH 基の一部は連鎖間結合強化のため methylene blue 吸収に対しては masking 挙動を呈していることが推定された。

Böseken¹⁵²⁾ は phenol の過酢酸による酸化生成物として cis-cis-muconic acid を得ており EVAN¹⁵³⁾ によれば phenol はバクテリアの酵素酸化で核開裂を起しケト酸を経て蟻酸になることが示されている。酸化剤の還元量に対する tyrosine 減少状態から主として COOH 基の新生増加は phenol 核開裂によるものと推定できる。もちろん一部分、脱アミノによる相対的な COOH 基の増加も寄与しているだろう。

フィブロインの Br 吸収量から換算した tyrosine 量は Folin & Malenzi 法¹⁵⁵⁾ で定量した値より大きくこれは tyrosine 残基以外の未知の少量のアミノ酸と Br との結合あるいは絹糸の微細構造中における Br の収着等に起因すると考えられている。¹⁵⁾ Millon-Lugg 改良法による tyrosine 定量値は Folin-Malenzi 法による定量値よりも通常大きいとその値よりもさらに Br 吸収法からの値は大きい。これも上述の理由によるものである。

過マンガン酸加里および過酸化水素酸化フィブロインでは **Br** 吸収量から換算した **tyrosine** 量は **Millon-Lugg** 改良法による定量値よりも大きい。次亜塩素酸塩酸化フィブロインのみでは全く逆の関係を認めた。

いわゆる **Millon** 反応と総称される反応の発色機構は **phenol** 核の一方のオルソ位置とメタ位置がともに自由に置換されうる状態でなければならない。¹⁵⁶⁾ 従つて次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは一方のオルソ位置がすでに酸化処理により置換または連鎖間結合にあずかっていることが認められた。このオルソ位置の **blocking** は加水分解すれば原型 ($-CH$) に還元する結合であることを知つた。

この結果も次亜塩素酸塩酸化フィブロインの不溶解化原因として **CADWALLADER** により想像されている **tyrosine** 残基間の **HCHO** 介在による架橋結合を否定する。

tyrosine 残基の **phenol** 核の 3, 5 位置にハロゲン置換が行われた臭素化フィブロインおよび沃素化フィブロインは無処理と同様に **Cu-En** 溶液に易溶であつた。このことは単なるオルソ置換のみはフィブロインの溶解性に影響を及ぼさないことを示している。次亜塩素酸塩酸化の場合はフィブロインの塩素化が起るが **dichlorotyrosine** は発色せず **Br** 吸収も行われぬ。また仮りに **monochlorine** 置換が起きて **Br** 置換が他方のオルソ位置に行われるので、この形のもは発色せず次亜塩素酸塩酸化フィブロインにおける上記の **tyrosine** 定量値の関係とは逆の現象にならねばならない。

従つて **phenol** 核の一方のオルソ位置の **blocking** は酸化による連鎖間主原子価結合の形成によるものと推定される。

以上の結果を総合して判断すれば不溶解化は従来の推定あるいは想像説によるものではなく、過マンガン酸加里酸化の場合は隣接鎖の **serine** 残基間における **methylene bridge** 形成並びに **tyrosine** 残基の **phenol** 核開裂に伴う連鎖間副原子価の強化によるものと推定される。次亜塩素酸塩酸化の場合は同様の理由のほかさらに **phenol** 核のオルソ位置での主原子価結合 (ただし **HCHO** 媒体にはよらない) も一部寄与しているだろう。従つて分子量増大の現象もかような連鎖間の主原子価結合あるいは副原子価結合の一部分が残存した状態で溶解分散したために現われたものである。易溶性の過酸化水素酸化フィブロインでみられる分子量増大の現象は連鎖間主原子価結合の存在によるのではなく副原子価結合の部分的強化に基因するものであろう。

フィブロインを酸化剤で処理するさい、その種類によつて酸化速度および崩壊機構が異なることを論述したが分子崩壊に次いで二次的に起る分子の集合状態すなわち微細構造の変化にも当然差が生ずることが予想される。

このことは酸化初期の物理的性質の急激な変化にもとくに関連が深いので稀酸、稀アルカリによる溶出速度の解析から本問題を研究した。中西、小林⁶⁰⁾ は **tyrosine** 残基の **phenol** 核開裂が強力および伸度の急激な低下を齎らすと考察しているのみで単に **tyrosine** の減少に基づいて推定しているにすぎない。著者は 3 種の酸化剤でそれぞれ種々の時間酸化されたフィブロイン繊維について稀酸および稀アルカリ加水分解法により¹⁰⁾¹³⁾ 微細構造の溶出状態を調べた。

稀酸溶出残渣量の対数と分解時間との関係図は過マンガン酸加里および過酸化水素酸化フィブロインでは無処理と同様に 3 個の直線となるが次亜塩素酸塩酸化フィブロインのみは 2 個の直線となる。

従つて溶出初期からみて第 1, 第 2 および第 3 直線部すなわち非結晶、準結晶および結晶の各領域に相当する部分の溶出速度恒数を一次反応式により算出した。それを **Ka**, **Ks** および **Kc** とする。過マンガン酸加里酸化フィブロインの **Ka** は無処理の **Ka** に比し遙かに大きく、その増大は短時間酸化のものでは著しくその後時間経過に伴ない漸増している。

Ks および **Kc** の値は無処理とほとんど同様である。**Ka** の増加傾向は前に述べた強力や伸度の脆化率変化と同様であり両者は相関関係をもつことが明らかである。**Ka** の増大は酸化により非結晶部分に相当する微細構造が酸の滲透および加水分解を受け溶出し易い形に変化していることを示す。著者はこのことを微細構造の“異質化”と称した。さらにまた上記結果から非結晶部の **tyrosine** 残基が酸化により崩壊していることが判る。

次亜塩素酸塩酸化ファイブロインは恒数値からは非結晶領域に相当する区分が消失していることが認められた。**Ks** および **Kc** は無処理と同様である。従つて過マンガン酸加里酸化のさいよりも強力や伸度の低下が急激に起ることも理解される。

またこの場合の酸化溶出には非結晶部の1部分が関与しているものと考えられる。過酸化水素(中性加温処理)酸化ファイブロインでは **Ka**, **Ks** および **Kc** とともに無処理と同様であり微細構造の異質化は起らないことが推定される。

ファイブロイン繊維の稀酸加水分解法による微細構造の領域定量法を村瀬¹⁰⁾が提唱し中西¹⁸⁾岡本¹⁷⁾もこれを支持している。佐々木ら²⁴⁾²⁵⁾は本法で得られる量はX線解析による量とは同一視できないと述べた。その後石川¹⁶⁰⁾は分解残渣の偏光顕微鏡的研究から本法の妥当性を主張した。さらに両見解のほかX線的結晶性部分を微視的結晶領域とすれば化学的に対象としている部分は巨視的結晶領域と言えらるという見解がある。²⁷⁾ 著者は速度恒数の面から微細構造溶出の解析を行つた結果(第8章第1節参照)溶出速度に変化を生じたファイブロインについては稀酸分解法による巨視的結晶領域定量法は妥当でないことを見出した。中西⁶⁰⁾によればファイブロインは日光照射により結晶格子が無定形化し、岡本⁷⁰⁾によれば結晶領域→準結晶領域→非結晶領域の経過を辿り崩壊するとされているがかかると見解も速度恒数の算出結果と合わせて考察されるべきである。

稀アルカリ溶出残渣量の対数と分解時間との関係図は過マンガン酸加里酸化ファイブロインでは2個の直線となるが次亜塩素酸塩および過酸化水素酸化ファイブロインでは1個の直線となる。従つて各直線部の溶出速度恒数を算出してみると過マンガン酸加里酸化ファイブロインの溶出速度は無処理に比し大であり、とくに溶出第1直線部の速度恒数は大きいことが認められた。酸化の進行に伴ない恒数値は大きくなつていくがこれは主として前記非結晶領域の異質化によると推定される。

次亜塩素酸塩および稀薄過酸化水素加温酸化ファイブロインの溶出速度恒数は無処理のものよりやや大きく酸化の進んだもの程漸増している。これは稀酸分解時の溶出速度の変化とは異なるがこの相異は中西¹⁶¹⁾が報告している酸とアルカリとの溶出機構の差異および酸化ファイブロインの **COOH** 基増加に基因すると考えられる。以上の結果から酸化初期の強力や伸度の急激な低下にはとくに非結晶領域の崩壊が関係深いことが首肯される。

すなわち過マンガン酸加里酸化ファイブロインの酸化初期の急激な脆化は非結晶領域に関与する分子連鎖の配列の乱れに基因し、次亜塩素酸塩酸化ファイブロインの場合には該領域の酸化による一部消失に基因すると推定される。希薄過酸化水素酸化の場合のファイブロインの緩慢な脆化は結晶領域の一部準結晶化によるためと考えられる。何となればこの場合には **Ka**, **Ks** および **Kc** の値がほとんど同じであるから脆化は微細構造の量的差に基因すると判断して差支えなからう。

第10章 総 括

過マンガン酸加里、次亜塩素酸塩および過酸化水素の3種類の酸化剤でファイブロインを段階的に酸化しそれらについて物理的性質変化、有機化学的および溶液論的面からの構造変化さらに微細構造変化等を系統的に研究した。

(1) 還元性有機低分子 (tyrosine, phenol, rhamnose および glucose) と高分子 (fibroin, albumin, polypeptone, gelatin および soluble starch) の稀薄水溶液に稀薄過マンガン酸加里を滴加した場合の性状変化およびその酸化溶液の透析挙動から還元された Mn^{IV} は高分子との complex 形成に参与していることを確認した。酸化度の異なるフィブロインの Mn-complex 溶液を作製し光散乱法で平均分子量を測定した結果、軽酸化のものでも無処理に比し著しい分子量増大を示すことを認めた。以上の結果からフィブロイン水溶液は過マンガン酸加里酸化により tyrosine 残基部を基点として Mn^{IV} を架橋媒体とする chelating complex を形成することを見出した。

(2) フィブロイン繊維を希薄過マンガン酸加里溶液で常温酸化すれば褐色繊維に変わり増量するがとくに酸化初期の褐色化および増量は二酸化マンガンの沈着によるのではなく、Mn-fibroin chelating complex によることを確認しその架橋様式図を想定した。酸化後の褐色繊維は稀薄な過酸化水素あるいは修酸で脱色されるが前者による脱色は可成りの脆化を伴う。稀修酸による脱色繊維は原試料に対する重量変化をほとんど示さずこの繊維の強力や伸度の脆化率は短時間酸化のものでも極度に大きくその後時間経過に伴い漸増することを認めた。フィブロインの tyrosine 含量は酸化に伴い減少するが全窒素およびヒドロキシアミノ酸は変化しない。tyrosine 含量を還元された過マンガン酸加里に対してプロットすると直線関係が得られた。酸化フィブロインは無処理フィブロインと同一条件では Cu-En 溶液には不溶であるが著者は溶解分散する条件を発見し溶液論的研究を可能にした。溶液論的研究からフィブロインの粘度、軸比は酸化に伴い漸減し平均分子量は増加することを認めた。ただし分子量は短時間酸化で著しく増大しその後漸減する。従つて粘度および軸比減少は主鎖切断に基づくよりも、むしろ分子連鎖間結合の部分的強化による aggregation すなわち棒状から、より球状への形態変化に基づくことを提唱した。電気泳動図の界面の平坦化現象からこの aggregate は単一のものではなく polydisperse であることを認めた。

(3) 次亜塩素酸塩は過マンガン酸加里よりもフィブロインに対する酸化速度が大きい。フィブロインを稀薄次亜塩素酸塩溶液で常温酸化すれば微黄色を帯び、重量損失を来すが着色は dichloro-tyrosine 残基の形成によることを証明した。また減量率は被還元塩素量の一次関数 ($y=ax$ 型) であることを見出した。酸化フィブロインの強力や伸度の脆化は過マンガン酸加里酸化時より著しいが脆化傾向は類似していた。tyrosine 含量は酸化に伴い減少するがヒドロキシアミノ酸含量は変化しない。全窒素は短時間酸化のものでは減少するがその後のものでは変化を認めない。tyrosine 含量と被還元塩素量とは密接な関係を有するが過マンガン酸加里酸化時のように直線関係ではなかつた。tyrosine 減少速度は過マンガン酸加里酸化時より大きい。酸化フィブロインの Cu-En 溶液に対する溶解挙動と酸化に伴う粘度、軸比、平均分子量および電気泳動図等の変化の傾向も過マンガン酸加里酸化の場合と同様であつた。従つて次亜塩素酸塩酸化フィブロインも溶液状態では aggregate の広範囲な多分散であることが認められた。

(4) 上記の2種の酸化剤に比し過酸化水素は酸化速度が著しく小さい。従つて 35% H_2O_2 で常温長期間酸化および 1.9 M- H_2O_2 ($pH=6.97$) で加熱酸化を行つた。強力や伸度の脆化は緩慢で軽酸化時の激甚な脆化を認めない。全窒素、ヒドロキシアミノ酸含量には変化を認めず tyrosine 含量のみが漸減する。加熱酸化の場合はフィブロインの有無による過酸化水素の分解率の差は認められないにも拘らず tyrosine 含量は漸減している。tyrosine 減少率からみて酸化度が同一の場合のフィブロインの強力や伸度の脆化率は次亜塩素酸塩酸化の場合が最大で過マンガン酸加里がこれに次ぎ過酸化水素酸化の場合是最小である。これは酸化剤による tyrosine 残基の構造変化および主鎖開裂の様式が異なることを指示している。酸化フィブロインの Cu-En への溶解性は他の2種の酸化剤処理のものより異なり無処理フィブロインよりむしろ易溶であることを認めた。粘度および軸比は酸化に伴い

漸減するがその減少度は酸化度が他の2種の酸化剤使用時と同一の場合でも小さい。分子量は無処理のものよりやや増加している。電気泳動図は界面の平坦化現象を示さず35% $\text{-H}_2\text{O}_2$ 酸化フィブロインでは無処理フィブロインと同様に1個の峰を示し、1.9 M $\text{-H}_2\text{O}_2$ ($\text{pH}=6.97$)加熱酸化フィブロインでは下降側は1個の峰を、上昇側は峰の異常あるいは2個の峰への分離を示した。また酸化フィブロインのCu-En溶液への溶解性の難易は泳動図の界面の平坦化現象に相関関係があることが認められた。

(5) 各種のDNP酸化フィブロインの加水分解物のエーテル層および酸層分配DNPアミノ酸の溶液につき光電比色計(フィルター; S_{42})を用い吸光度を測定し、DNP-glycineの濃度と吸光度との関係からN-末端基量を算出する簡便法を見出した。さらにO-DNP-tyrosineの存在に基づく酸層溶液の300 $m\mu$ の吸光度測定によりphenol性OH基の消長を調べた。

その結果次のことを見出した。

稀薄過マンガン酸加里によるフィブロイン分子の酸化崩壊はtyrosine残基のphenol核のみならず一部分主鎖およびジアミノ酸側鎖末端部にも起るが加水分解崩壊を併起しない。従つて主鎖切断はphenol核開裂の結果二次的に起るものである。稀薄次亜塩素酸塩による酸化崩壊はtyrosine残基のみならず一部は主鎖およびジアミノ酸側鎖末端部にも起るが同時に加水分解による解重合反応も惹起する。また酸化初期には脱アミノ反応が加水分解よりも優先するが酸化の進行に伴い逆の傾向になる。以上の結果と前述分子量の変化とから次亜塩素酸塩酸化のさいには連鎖間結合の強化は過マンガン酸加里酸化の場合より大きいことが認められた。過酸化水素による酸化崩壊は過マンガン酸加里酸化の場合と類似の進行様式であることが認められた。なお35% $\text{-H}_2\text{O}_2$ 酸化の場合には加水分解を伴うがこれは試薬中に安定剤として共存する酸の作用によることを証明した。3種類の酸化剤でそれぞれ酸化されたフィブロインは酸化の進んだもの程phenol性OH基が減少しており、この減少度は酸化時間別にみると初期程著しい。

(6) 酸化フィブロインのCu-En溶液への不溶解化原因について従来推定あるいは想像されている見解を検討するとともにtyrosine残基の構造変化を探究した。その結果次のことを見出した。

酸化フィブロイン中にはdopa-glutamic acid残基間のエステル結合あるいはdopa残基同志のエーテル結合による連鎖間架橋結合は存在しないことを認めた。酸化フィブロイン溶液の吸収スペクトル測定および二、三のアミノ酸残基の減少モル数の比較から連鎖間におけるtyrosine-lysine残基間の重合型架橋も存在しないことを認めた。各種の酸化フィブロインの同一濃度における吸収スペクトルでは波長全域に亘り酸化の進行したもの程吸収増加が認められるが、これはaggregate形成による光散乱度の増加に基づくものと推定した。酸化液の pH 変化と前記分子量増大からtyrosine残基の単なるmodificationあるいは疎水性基の置換が不溶解化原因であるという推定も否定される。また酸化液中におけるアンモニア、有機酸類の生成を認め、 pH 変化は有機酸生成に依存することを見出した。

このことはphenol核開裂を示唆している。フォルマル化フィブロインのCu-En溶液への溶解挙動は過マンガン酸加里および次亜塩素酸塩酸化フィブロインと類似していることを認め、このフォルマル化フィブロインを稀薄酸化剤で処理するとその種類によりCu-En溶液への溶解性に变化を起させることを見出した。また2種の酸化剤でフィブロインを連続酸化するさいはその順序によつても溶解性が変ることを見出した。すなわち過酸化水素はmethylene架橋を酸化切断して溶解性を増加させ、他の2種の酸化剤はmethylene架橋には作用せずtyrosine残基のphenol核を酸化開裂させ連鎖間結合を強化させることを認めた。

酸化フィブロイン繊維の **methylene blue** 吸収変化と *pH* 滴定曲線変化から酸化に伴うカルボキシル基の新生増加を確認した。さらに酸化フィブロインのカルボキシル基の一部は連鎖間結合強化のため **methylene blue** 吸収に対しては **mask** されていること、およびカルボキシル基の新生増加は **tyrosine** 残基の **phenol** 核開裂によることを推定した。**Millon-Lugg** 改良法と臭素吸収法とから求めた酸化フィブロインの **tyrosine** 含量の比較を行い、次亜塩素酸塩酸化フィブロインのみでは一部の **phenol** 核の一方のオルソ位置が **block** されており、それは加水分解により原型に還元しうる結合であることを認めた。これは連鎖間において **tyrosine** 残基間の **methylene** 架橋が存在しないことを証明している。以上の結果から不溶解化は従来の見解によるのではなく過マンガン酸加里酸化の場合には隣接連鎖の **serine** 残基間における **methylene** 架橋形成並びに **tyrosine** 残基の **phenol** 核開裂に伴う副原子価結合の強化によると推定した。また次亜塩素酸塩酸化の場合には同様の理由のほかに **phenol** 核のオルソ位置での主原子価による連鎖間結合（ただし CH_2O 媒体に基かない）も一部寄与していると推定した。従つて分子量増大もかような連鎖間主原子価結合あるいは副原子価結合の一部残存に基因する。

(7) 3種の酸化剤でそれぞれ酸化されたフィブロインについて稀酸および稀アルカリ加水分解法で微細構造の溶出状態を調べた。

稀酸溶出残渣量の対数と分解時間との関係図は酸化剤の種類によつて3個あるいは2個の直線となることが判明した。従つて各溶出速度恒数を算出した結果次のことを認めた。過マンガン酸加里酸化フィブロインでは非結晶領域に相当する部分の稀酸溶出速度恒数は無処理のものより遙かに大きい。準結晶、結晶領域部の恒数は変化しない。次亜塩素酸塩酸化フィブロインでは恒数値からは非結晶領域に相当する部分の消失を認めるが他の2領域の恒数値は変化しない。さらに過酸化水素酸化フィブロインでは3領域の恒数値はそれぞれ無処理のものと同様である。

これらの速度恒数の面から微細構造溶出の解析を行つた結果、恒数値に変化を受けたフィブロインについては稀酸分解法による巨視的結晶領域定量法は妥当でないことを認めた。稀アルカリ溶出残渣量の対数と分解時間との関係図は酸化剤の種類によつて2個あるいは1個の直線になることが判明した。従つてそれぞれの溶出速度恒数の算出結果次のことを認めた。3種の酸化剤で酸化されたフィブロインの溶出速度はそれぞれ無処理のものより大きくかつ酸化の進んだもの程漸増している。この変化は過マンガン酸加里酸化フィブロインにおいてとくに著しい。

以上の結果から過マンガン酸加里あるいは次亜塩素酸塩による酸化初期の強力や伸度の急激な脆化は非結晶領域に関与する連鎖配列の乱れあるいは非結晶領域の一部の酸化溶出に基因すると推定した。さらに過酸化水素酸化による脆化は結晶領域の一部準結晶化によるものと推定した。

終りに臨み本研究遂行上御指導、鞭達を賜つた九州大学農学部山藤一雄教授、阿久根了教授、船津勝教授、渡辺忠雄助教授、林勝哉助教授に深謝致します。また光散乱測定に助力された同大学林純子氏、吸収スペクトル測定に助力された鹿児島大学農学部富田裕一郎氏並びに終始実験に協力された本研究室福永隆生氏に感謝致します。

なお、本研究の一部は下記の学会において講演発表した。

昭和33年10月11日	日本農芸化学会西日本支部会（山口市で開催）
昭和34年12月2日	日本蚕糸学会九州支部会（鹿児島県湯之元町で開催）
昭和35年4月10日	日本蚕糸学会大会（東京都で開催）
昭和36年1月17日	日本蚕糸学会九州支部会（宮崎市で開催）
昭和36年4月1日	日本農芸化学会大会（福岡市で開催）
昭和36年11月10日	日本農芸化学会西日本支部会（松山市で開催）
昭和36年11月29日	日本蚕糸学会九州支部会（熊本市で開催）

文 献

- 1) R. O. HERZOG and W. JANCKE : Ber. Deu. Chem. Ges., **53** 2162 (1920)
- 2) R. BRILL : Ann. der. Chem., **434** 204 (1923)
- 3) K. H. MEYER and H. MARK : Ber. Deu. Chem. Ges., **61** 1932 (1928)
- 4) idem : Der Aufbau der Hochpolymeren Organischen Naturstoffe. p. 221 (1930)
- 5) R. BRILL : Z. Physik. Chem., B **53** 61 (1942)
- 6) 志村憲助 : 科学 **16** 66 (1946) 岩波書店
- 7) M. BERGMANN and C. NIEMANN : J. Biol. Chem., **122** 577 (1937)
- 8) K. H. MEYER, M. FULD and C. KLEMM : Helv. chim. Acta., **23** 1441 (1940)
- 9) K. H. MEYER : Natural & Synthetic High Polymers. p. 523 (1950) Intersci. Pub. Ltd. London
- 10) 村瀬良一 : 織誌 **5** 217 (1949)
- 11) 前田弘邦 : 織工試彙報 **14** 19 (1942)
- 12) H. J. PHILLIP, M. L. NELSON and H. M. ZIFFLE : Text. Res. J., **17** 585 (1947)
- 13) 中西正喜 : 織誌 **8** 616 (1952)
- 14) 祖父江寛・小西彦市 : 工化誌 **53** 168 (1950)
- 15) 村瀬良一 : 織誌 **6** 334 (1950)
- 16) idem : ibid., **7** 97 (1951)
- 17) 岡本 熒 : ibid., **7** 445 (1951)
- 18) idem : ibid., **8** 448 (1952)
- 19) M. LEVY and E. SLOBODIAN : J. Biol. Chem., **199** 563 (1952)
- 20) E. SLOBODIAN and M. LEVY : ibid., **201** 371 (1953)
- 21) A. S. KESTON, S. UDENFRIEND and R. K. CANNAN : J. Am. Chem. Soc., **71** 249 (1949)
- 22) 赤堀四郎・水島三一郎編 : 蛋白質化学 **5** 342 (1957) 中より引用
- 23) F. LUCAS, J. T. B. SHAW and S. G. SMITH : Nature, **178** 861 (1956)
- 24) 佐々木周郁・中西正喜・林勝哉 : 農化誌 **28** 657 (1954)
- 25) 林 勝哉・小林 啓・中西正喜 : ibid., **28** 661 (1954)
- 26) R. HIROHATA, Y. KANDA, M. NAKAMURA et al : Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem., **295** 368 (1953)
- 27) 赤堀四郎・水島三一郎編 : 蛋白質化学 **5** 363 (1957)
- 28) S. GOLDSCHMIDT and K. STRAUSS : Ann. d. Chem., **480** 263 (1930)
- 29) S. GOLDSCHMIDT, K. MARTIN and W. HEIDINGER : ibid., **505** 255 (1933)
- 30) 赤堀四郎・佐竹一夫・成田耕造 : 纖維科学研究所年報 **5** 75 (1949)
- 31) 成田耕造 : 日化 **75** 487 (1954)
- 32) 村瀬良一・坂口子平 : 織誌 **7** 497 (1951)
- 33) 成田耕造 : 日化 **75** 1005 (1954)
- 34) D. COLEMANN and F. O. HOWITT : Nature, **155** 78 (1945)
- 35) idem : Proc. Roy. Soc., A **190** 145 (1947)
- 36) 成田耕造 : 日化 **75** 1008 (1954)
- 37) 林 勝哉 : ibid., **78** 1351 (1957)
- 38) 清水正徳 : 生糸の品質と織物 p. 148 (1956) 技報堂
- 39) idem : 絹糸の構造 p. 445 (1957) 千典会出版部
- 40) 中島 茂 : 蚕糸科学研究所彙報 **2** 73 (1948)
- 41) 中島 茂・樺沢 敦 : ibid., **2** 76 (1948)
- 42) 中島 茂・卜部澄子 : ibid., **2** 79 (1948)

- 43) 中島 茂 : *ibid.*, **2** 83 (1948)
- 44) 奥 正巳・小出直人 : 織誌 **5** 335 (1949)
- 45) P. ALEXANDER and D. GOUGH : *Biochem. J.*, **48** 504 (1951)
- 46) C. J. CADWALLADER and S. G. SMITH : *J. Textile. Institute.*, **47** 489 (1956)
- 47) C. EARLAND and J. G. P. STELL : *Biochim. et Biophysica Acta.*, **23** 97 (1957)
- 48) 阿久根 了・古賀克也 : 鹿大農・学術報告 **2** 103 (1953)
- 49) 阿根久 了・古賀克也・福永隆生 : *ibid.*, **5** 133 (1956)
- 50) F. SANGER : *Biochem. J.*, **44** 126 (1949)
- 51) F. SANGER and E. O. P. Thompson : *ibid.*, **53** 353 (1953)
- 52) *idem* : *ibid.*, **53** 356 (1953)
- 53) 阿久根 了・古賀克也・福永隆生 : 日蚕誌 **26** 373 (1957)
- 54) D. A. SITCH and S. G. SMITH : *Shirley Institute Memoirs*, **30** 47 (1957)
- 55) C. H. GARRETT and F. O. HOWITT : *ibid.*, **17** 103 (1939)
- 56) DOORE : *J. Soc. Col.*, **33** 17 (1925)
- 57) G. S. EGERTON : *Photochemistry in relation to textiles* p. 180 (1949) *The Society of dyers and colourists.*
- 58) 西 寿巳 : 日蚕誌 **25** 357 (1956)
- 59) *idem* : *ibid.*, **25** 361 (1956)
- 60) 中西正喜・小林 啓 : 織誌 **10** 128 (1954)
- 61) H. A. RUTHERFORD : *J. Text. Res.*, **11** 394 (1941)
- 62) E. ABDERHALDEN and H. BROCKMAN : *Biochem. Z.*, **226** 209 (1930)
- 63) 村瀬良一・坂口子平・小松秀次 : 織工試彙報 **21** 68 (1951)
- 64) 奥 正巳・清水周 : 織誌 **10** 68 (1954)
- 65) 岡本 奨・木村利三 : *ibid.*, **10** 629 (1954)
- 66) 岡本 奨・今井其枝 : *ibid.*, **13** 139 (1957)
- 67) 岡本 奨・山谷恒夫 : *ibid.*, **13** 683 (1957)
- 68) 岡本 奨・永井 忠・山谷恒夫 : *ibid.*, **15** 800 (1959)
- 69) 中条紀三 : 日蚕誌 **23** 366 (1954)
- 70) 岡本 奨・菊池雅夫 : *ibid.*, **27** 367 (1958)
- 71) J. S. MITSHELL and E. K. RIDEAL : *Proc. Roy. Soc., A* **159** 206 (1937)
- 72) *idem* : *ibid.*, **A** 167 342 (1938)
- 73) D. C. CARPENTER : *J. Am. Chem. Soc.*, **62** 289 (1940)
- 74) 三平 文・足立修三・宮下孝美 : 絹業試験場彙報 **4** 46 (1936)
- 75) 阿久根 了 : 鹿大農・学術報告 (2) 91 (1953)
- 76) 菱山衡平 : 被服材料学 **87** (1956) 光生館
- 77) B. A. BRICE and M. HALWER : *J. Opt. Soc. Am.*, **41** 1033 (1950)
- 78) 林 勝哉 : 絹糸の構造 **357** (1957) 千典会出版部
- 79) *idem* : 化学の領域 **10** 13 (1956)
- 80) 赤堀四郎・水島三一郎編 : 蛋白質化学 **2** 400 (1954) 共立出版社
- 81) B. A. BRICE, M. HALWER and R. SPICER : *J. Opt. Soc. Am.*, **40** 768 (1950)
- 82) B. A. BRICE, G. C. NUTTING and M. HALWER : *J. Am. Chem. Soc.*, **75** 824 (1953)
- 83) 林勝哉 : 日化 **78** 1356 (1957)
- 84) *idem* : *ibid.*, **78** 1360 (1957)
- 85) *idem* : *ibid.*, **78** 1485 (1957)

- 86) *idem*: *ibid.*, **78** 1490 (1957)
- 87) *idem*: *ibid.*, **79** 212 (1958)
- 88) F. R. N. CURD and P. E. WILCOX: *Adv. Prot. Chem.*, **XI** 365 (1956)
- 89) *idem*: *ibid.*, **XI** 410 (1956)
- 90) I. M. KLOTZ, I. M. URQUHART and H. A. FIESS: *J. Am. Chem. Soc.*, **74** 5537 (1952)
- 91) W. L. JR. HUGHES: *ibid.*, **69** 1836 (1947)
- 92) H. EDELHOCH, E. KATCHALSKI, R. H. MAYBURY, W. L. JR. HUGHES and J. T. EDSALL: *ibid.*, **75** 5058 (1953)
- 93) I. M. KLOTZ and W. C. L. MING: *ibid.*, **76** 805 (1954)
- 94) T. R. HUGHES and I. M. KLOTZ: *ibid.*, **78** 2109 (1956)
- 95) I. M. KLOTZ, J. M. URQUHART, T. A. KLOTZ and J. AYERS: *ibid.*, **77** 1919 (1955)
- 96) J. T. EDSALL, G. FELSENFELD, D. S. GOODMAN and F. R. N. CURD: *ibid.*, **76** 3054 (1954)
- 97) 北条舒正・北条博史: *織誌* **14** 675 (1958)
- 98) 北条舒正: *絹糸の構造* **198** (1957)
- 99) R. W. GREEN and K. P. ANG: *J. Am. Chem. Soc.*, **77** 5482 (1955)
- 100) N. C. LI, B. E. DOODY and J. M. WHITE: *ibid.*, **79** 5859 (1957)
- 101) G. V. SCHULZ: *Chem. Ber.*, **80** 335 (1947)
- 102) 鈴木晴男・田村正義・武富 昇: *工化雑* **61** 1008 (1958)
- 103) 大橋一二・高橋梯蔵: *岐阜大農・研究報告* **1** 64 (1951)
- 104) 三平 文・足立修三・宮下孝美: *絹業試験場彙報* **4** 364 (1936)
- 105) R. J. BLOCK and D. BOLLING: *The amino acid comp. prot. and food.* 131 (1951) Charles C. Thomas. Publisher (U.S.A)
- 106) *idem*: *ibid.*, 267 (1951)
- 107) P. P. WEIMARN: *Rept. Imp. Ind. Res. Inst. Osaka*, **7** 5 (1926)
- 108) R. SIGNER and R. GLANZMANN: *Makromol. Chem.*, **5** 257 (1951)
- 109) C. EARLAND and D. J. RAVEN: *Nature*, **174** 461 (1954)
- 110) E. J. AMBROSE, C. H. BAMFORD, A. ELLIOTT and W. E. HANG: *ibid.*, **167** 264 (1951)
- 111) A. POLSON: *Kolloid Z.*, **88** 51 (1939)
- 112) 林 勝哉・小田純子: *農化* **30** 656 (1956)
- 113) 呉 祐吉・高木春郎: *絹糸の構造* **316** (1957)
- 114) T. P. NEVELL: *J. Text. Inst.*, **39** T 118 (1948)
- 115) 祖父江 寛・右田伸彦: *セルローズハンドブック* **254** (1958) 朝倉書店
- 116) 船津軍喜・船津 勝: *農化* **31** 874 (1957)
- 117) Y. OBATA and M. KOSHIKA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23** 107 (1959)
- 118) S. SAKAMURA and Y. OBATA: *ibid.*, **23** 116 (1959)
- 119) H. G. COOK and B. C. SAUNDERS: *Biochem. J.*, **41** 558 (1947)
- 120) *実験化学講座* **23** 169 (1959) 丸善株式会社
- 121) F. SANGER: *Biochem. J.*, **45** 563 (1949)
- 122) A. L. LEVY: *Nature*, **174** 126 (1954)
- 123) F. SANGER: *Biochem. J.*, **39** 507 (1945)
- 124) C. HASHIMOTO: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **28** 385 (1955)
- 125) G. L. MILLS: *Biochem. J.*, **50** 707 (1952)
- 126) 成田耕造: *日化* **75** 1014 (1954)
- 127) 三堀重光・石原平太郎・加藤保孝: *試薬註解* **1** 124 (1956) 南江堂

- 128) 農芸化学実験書 (京大) 上巻 85 (1952) 産業図書
- 129) 林 勝哉・小田純子・小林 啓: 農化 30 538 (1956)
- 130) M. J. BOYD and M. A. LOGAN: J. Biol. Chem., 146 279 (1942)
- 131) 岡本 奨: 高分子 8 671 (1959)
- 132) P. ALEXANDER, D. CARTER and R. F. HUDSON: J. Soc. Dyers. Colourists, 65 152 (1949)
- 133) D. B. DAS and J. B. SPEAKMAN: *ibid.*, 66 583 (1950)
- 134) K. LANGHELD: Ber. Dtsch. Chem. Ges., 42 2360 (1909)
- 135) L. E. ARNOW: J. Biol. Chem., 120 151 (1937)
- 136) 小幡弥太郎・坂村貞雄: 農化 27 769 (1953)
- 137) R. A. FRIEDEL and M. ORCHIN: Ultraviolet Spectra of Aromatic Compounds. 140, 161, 176 (1951)
Chapman & Hall, Ltd. London
- 138) K. T. YASUNOBU, E. W. PETERSON and H. S. MASON: J. Biol. Chem., 234 3291 (1959)
- 139) H. S. MASON: *ibid.*, 181 803 (1949)
- 140) S. ROSTON: *ibid.*, 235 1002 (1960)
- 141) A. C. GIESE, H. L. LIGHTON and R. BAILEY: Archiv. Biochem. Biophys., 40 71 (1952)
- 142) D. J. McLEAN and A. C. GIESE: J. Biol. Chem., 187 537 (1950)
- 143) 小幡弥太郎・坂村貞雄: 農化 32 158 (1958)
- 144) 坂村貞雄・小幡弥太郎: *ibid.*, 32 667 (1958)
- 145) K. T. YASUNOBU and W. B. DANDLIKER: J. Biol. Chem., 224 1065 (1957)
- 146) W. R. CARROLL, E. R. MITCHELL and M. T. CALLANAN: Archiv. Biochem. Biophys., 39 232 (1952)
- 147) P. ALEXANDER, M. FOX, K. A. STACEY and D. ROSEN: Nature, 178 846 (1956)
- 148) B. T. OVERELL: *ibid.*, 167 361 (1951)
- 149) H. L. FRAENKEL-CONRAT and H. S. OLCOTT: J. Biol. Chem., 174 827 (1948)
- 150) 奥 正巳・清水 周: 織誌 10 413 (1954)
- 151) P. ALEXANDER, D. CARTER and K. G. JOHNSON: Biochem. J., 48 435 (1951)
- 152) J. BÖSEKEN: Proc. K. Ned. Akad. Wet., 35 71 (1932) (54) より引用
- 153) W. C. EVANS: Biochem. J., 41 373 (1947)
- 154) 北条舒正: 織誌 13 103 (1957)
- 155) O. FOLIN and A. D. MALENZI: J. Biol. Chem., 83 89 (1929)
- 156) 勝又増幸: 生化学 27 565 (1955)
- 157) R. E. MARSH, R. E. COREY and L. PAULING: Biochim. Biophys. Acta., 16 1 (1955)
- 158) 中西正喜: 織誌 9 57 (1953)
- 159) *idem*: 繊維学報 1 1 (1952)
- 160) 石川 博: 絹糸の構造 411 (1957)
- 161) 中西正喜: 織誌 11 788 (1955)
- 162) E. S. BARRON and P. FINKELSTEIN: Archiv. Biochem. Biophys., 41 212 (1952)
- 163) 石川精一・間中和夫: 理論有機化学 105 (1957) 培風館

Résumé

The degradation of fibrous protein, "silk fibroin" is chiefly due to the hydrolytic and oxidative actions, however, apart from the considerable amount of work on the former action, little has been done systematically on the latter. Therefore, the author treated silk fibroin respectively with three oxidizing agents, i. e. potassium permanganate, calcium hypochlorite and hydrogen peroxide to obtain the different levels of degradation. Changes of physical, physico-chemical

and general-chemical properties and then fine structures of fibroin were studied systematically.

(1) The quality changes of dilute aqueous solutions of organic low molecules such as tyrosine, phenol, rhamnose and glucose and of high molecules such as fibroin, albumin, polypeptide, gelatin and soluble starch when 0.1 N potassium permanganate was dropped onto them each and the dialysis behaviors of those oxidized solution were observed, and the formation of complex due to the binding of reduced Mn to oxidized high molecules was recognized.

After preparing of Mn-fibroin complex with different levels of oxidation, the average molecular weight of these complex was determined by light scattering measuring and it was apparently recognized that the molecular weight of complex formed by the light level of oxidation was much larger than that of untreated fibroin and that increase with the progress of oxidation. The fact indicates the formation of chelating complex containing manganese and tyrosine residue as a cross linkage on the oxidation of fibroin aqueous solution with potassium permanganate.

(2) Fibroin fibre which was oxidized by dilute potassium permanganate solution at room temperature alters to brownish fibre and increases its weight. It was recognized that the colouring and weight increase in the light level of oxidation were due not to the adhesion of manganese dioxide but to the formation of Mn-fibroin chelating complex as the result of microscopic observation of oxidized fibroin fibre and the constant ratio of reduced Mn values to weight increment values and moreover the binding formula of cross-linkage was postulated.

Although brownish oxidized fibroin fibre was decolourized (demanganesed) by washing with dilute hydrogen peroxide or oxalic acid, the former being accompanied with a little degradation, while the latter little.

Demanganesed fibroin after oxidation of light level indicated scarcely the change in weight from that of the original, however, the degree of weakening in tensile strength and elongation was remarkable even in the substance which was oxidized in a short time and it was observed gradually increasing with the passage of time. During the oxidation, fall in tyrosine content and no change in total nitrogen and hydroxyl amino acid content were recognized and then a linear relationship between tyrosine content and reduced potassium permanganate was found by plotting the former against the latter. Although untreated fibroin is easy soluble in cupriethylene diamine (Cu-En), while demanganesed fibroin after oxidation is not the case under the same condition. Owing to this fact, it has been conceived to be insoluble in the solvent.

Finding out the solubilizing condition of oxidized fibroin, the author could perform his studies on them in solution state. From those investigations decrease in viscosity and axis-ratio and increase in molecular weight with oxidation were noticed, but increase in molecular weight was remarkable in a short time of oxidation and after a while the gradual decrease was observed.

Therefore, it was postulated that decrease in viscosity and in axis-ratio is to be attributed rather to the lateral aggregation of oxidized fibroin molecule due to partly tightening of the intramolecular binding, that is due to changes in molecular shapes than to the scission of main chains. Moreover, the aggregates were conceived to be polydisperse because of the flattening of electrophoretic patterns by oxidation.

(3) The oxidizing velocity of fibroin with calcium hypochlorite was shown to be larger than that of fibroin with permanganate. Fibroin fibre which was oxidized by dilute hypochlorite solution at room temperature turned yellowish and diminished its weight. It was proved that a yellowing was due to conversion of some tyrosine residues in peptide chains into dichlorotyrosine residues and it was found that the weight decrease was a simple function represented by $y=ax$ of the reduced chlorine.

The degree of weakening in tensile strength and elongation of oxidized fibre was larger than that in the permanganate oxidation, while the tendency of weakening was analogous. During the oxidation, fall in tyrosine content was observed but no change in hydroxyl amino acid con-

tent was noticed. In a short time of oxidation, total nitrogen content decreased but after that no change was recognized. The relationship between the tyrosine content and reduced chlorine value was not a linear one as it was when permanganate oxidation was applied, where a close connection between both values was observed and the diminishing velocity of tyrosine content was larger in the permanganate oxidation.

The solubilizing behavior of oxidized fibroin in Cu-En, the tendency of changes in viscosity, axis-ratio, molecular weight and electrophoretic patterns were the same as in the case permanganate oxidation. Therefore, it was recognized that the lateral aggregation of fibroin molecules occurred by hypochlorite oxidation and it was polydisperse.

(4) The oxidizing velocity of fibroin with hydrogen peroxide was much smaller than that with either of the other two agents above-mentioned. Fibroin was treated respectively with commercial 35 % hydrogen peroxide reagent at room temperature for a long period and with 1.9 mol peroxide in phosphate buffer ($pH=6.97$) at high temperature for several times.

In those cases the degree of weakening of fibres was very small, especially, initial severe fall in strength and elongation was not observed. During the oxidation, fall in tyrosine content and no change in total nitrogen and hydroxyl amino acid content were noticed and the diminishing rate of tyrosine with time was very small. Under the heating condition, in spite of no significant differences of decomposition of peroxide between the absence and presence of fibroin in the solution, the slow fall in tyrosine content was noticeable.

When the decrease of tyrosine content in fibroin treated respectively with three oxidizing agents was equal, while the degree of weakening in tensile strength and elongation of oxidized fibroin was the largest in hypochlorite treatment, larger in permanganate and the smallest in peroxide. This phenomenon indicates that the change of structure of tyrosine residue and the scission of main chain are varied with different kinds of oxidant.

Differing from two examples previously mentioned, the fibroin oxidized by peroxide was rather soluble than the original. When the decrease of tyrosine content by the attack of three oxidants was equal, the degree of fall in viscosity and axis-ratio of fibroin oxidized by peroxide was smaller than that of the others, while viscosity and axis-ratio diminished with time. Moreover, it was shown that the average molecular weight increases slightly in a short period oxidation and after a period decreases slowly under the application of 35 % peroxide and was not so variable under the warming dilute peroxide in neutral.

Electrophoretic studies showed no flattening of patterns. The electrophoretic diagram of fibroin oxidized by 35 % peroxide showed a sharp peak like the untreated fibroin and that of fibroin treated with warming dilute peroxide at $pH=6.97$ showed one peak on descending side but an abnormal or two peaks on ascending. From the facts mentioned above it can be estimated that the solubility of oxidized fibroin correlates with the shape of the patterns.

(5) A simple measuring method of the change of N-terminal contents was found. DNP-amino acids were separated into ether and acid solution by extracting the hydrolysates of different DNP-oxidized fibroins with ether several times, and then each solution was diluted to a definite volume respectively. Optical density of each solution was measured with electrophotometer using a filter S_{42} .

From each optical density, N-terminal content was calculated respectively on the basis of the relation between the concentration and optical density of DNP-glycine. Moreover, the absorption in acid solution due to the presence of O-DNP-tyrosine was measured at 300 $m\mu$ wave length, thereby the change of phenolic OH groups was clarified. The characteristics found were as follows:

When fibroin was treated with dilute permanganate solution, the oxidation occurred not only in the phenol groups of tyrosine residues but also in the N-terminal residues of the peptide chains, while the hydrolysis did not occur. Therefore, main chain scission may occur secondarily

after the splitting of phenol groups.

When fibroin was treated with dilute hypochlorite solution, the oxidation occurred in the phenol groups and N-terminal residues as above and additionally the hydrolysis occurred. In this case the oxidative deamination proceeded predominantly compared with hydrolytic action in a short time of the oxidation, however, after that it went inversely as the oxidation proceeded.

From these results and changes in molecular weight, the tightening of intramolecular binding caused by hypochlorite oxidation was recognized to be superior to that by permanganate. Especially, the oxidation by commercial 35 % peroxide reagent was accompanied with hydrolytic action, but it was proved to be due to the catalytic action of acid mixed in reagent as a stabilizer for preventing the decomposition of peroxide. The content of phenolic OH groups was observed decreasing with the progress of oxidation in each case and the degree of decrease was especially remarkable in an earlier time of oxidation.

(6) CADWALLADER (1956), EARLAND (1957) and OKAMOTO (1959) reported their presumption and conjection on the causes of insolubilization of oxidized fibroin. The author investigated the factor of insolubilization and the change of the structure of tyrosine residue. The following characteristics were found:

From the oxidizing velocity of dopa, chromatography of hydrolysate of oxidized fibroin and the absorption curves of diphenylether and oxidized fibroin solution, no existence of cross-linkage by ester bond between dopa and glutamic acid residues or by ether bond between the dopa residues in adjacent peptide chains of oxidized fibroin molecules was recognized.

From the absorption spectrum of oxidized fibroin solution and the comparing diminished mol numbers in some amino acid residues, no existence of cross-linkage by polymerization between tyrosine and lysine residues in adjacent chain was confirmed. Absorption of oxidized fibroin solutions at the same concentration increased with the progress of oxidation over the range of all wave lengths and this phenomenon was inferred to be attributed to the increase of light scattering due to the formation of aggregates. From the variation of *pH* of the solution during the oxidation with permanganate or hypochlorite and the change in molecular weight, it was not seen possible that modification or substitution in the benzene nucleus of the side chain might render fibroin insoluble.

The variation of *pH* was conceived to be due to the production of organic acid, because ammonia and organic acid were detected. This suggests the splitting of phenol group.

Solubilizing behavior of formalized fibroin in Cu-En were analogous to that of fibroin oxidized by permanganate or hypochlorite. When formalized fibroin was treated with dilute oxidizing agent, the solubility in Cu-En was found varied, depending upon the kinds of agent.

When fibroin was treated successively with such two agents as permanganate and peroxide, the solubility was found varied depending upon the order of agents. Therefore, it was recognized that peroxide attacks the methylene bridge of formalized fibroin and accelerated the solubilization, while permanganate or hypochlorite did not attack the bridge and preferably accelerated the tightening of intramolecular binding which was attributed to the splitting of phenol groups.

Increase in carboxyl group of fibroin with oxidation was recognized, judging from the variation of methylene blue absorption and *pH* titrate curve. Moreover, it was presumed that some carboxyl groups of oxidized fibroin had no base-binding capacity in consequence of the tightening of intramolecular binding and carboxyl increase resulted from the splitting of phenol groups.

Tyrosine contents in oxidized fibroin were respectively determined by Block and Bolling's modification of Millon-Lugg method and Br absorption method and both values were compared and consequently it was recognized that ortho blocking of the phenol nucleus in part of tyrosine residues remaining in fibroin oxidized by hypochlorite occurred and that the blocking was to be restorable to the original form with hydrolysis. This proves that no cross-linkage between the tyrosine residues in the peptide chains exists.

From these results it could be inferred that the insolubilization in permanganate oxidation is not due to the causes presumed previously by others, but to methylene bridge formation between the serine residues and additionally tightening of hydrogen bond resulting from the splitting of phenol groups.

On hypochlorite oxidation, besides causes above, some cross-linkages by principal valency between ortho positions of phenol groups in adjacent chains may be presumed to be attributed partly to the insolubilization. Increase in molecular weight of oxidized fibroin too is partly due to remaining of cross-linkage such as — principal valency bond or hydrogen bond — above-mentioned in soluble state.

(7) Oxidized fibroins treated with three agents respectively were hydrolyzed with dilute acid or alkali and the dissolution of fine structures was investigated. Plotting of the logarithm of the residual amounts during the acid hydrolysis against the hydrolyzed time indicated three or two straight lines. Therefore, each soluble velocity constant was calculated and the following descriptions were obtained:

In the fibroin treated with permanganate, the soluble velocity constant by dilute acid hydrolysis of the part corresponding to the amorphous region was larger than that in the untreated fibroin, while, the velocity constant of the semicrystal and crystal region being unchanged.

In the fibroin treated with hypochlorite, judging from the velocity constant, the disappearance of the part corresponding to the amorphous region was noticed, the constant of the other two regions being unchanged. Moreover, in the fibroin treated with peroxide, the velocity constant of three regions was respectively the same as that of the untreated one. Analyzing the dissolution of fine structures on the basis of the velocity constant, the determination method of the crystal region by dilute acid hydrolysis as to the fibroin with varied constant was not regarded as appropriate.

Plotting of the logarithm of the residual amounts during the dilute alkali hydrolysis against the hydrolyzed time showed two straight lines or one line, depending upon the kind of agent. Therefore, each soluble velocity constant was calculated and the following points were observed. The soluble velocity constant of the fibroin treated with three oxidizing agents respectively was found larger with the progress of oxidation than that of the untreated fibroin. This variation was especially remarkable as to the fibroin treated with permanganate.

On the basis of the results mentioned above variously, it was presumed that a rapid weakening of the tensile strength and elongation in an earlier time of oxidation with permanganate or hypochlorite solution was attributed to the disarrangement of molecular chains or the partial oxidative dissolution of the chains in the amorphous region and, moreover, a weakening of the strength and elongation in peroxide oxidation was attributed to partial conversion of the crystal region to the semicrystal region.