

絹タンパク質の利用拡大

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 塚 田 益 裕

はじめに

カイコが作る絹は、優雅な風合いと優れた感性に富み繊維素材の女王に例えられている。吸湿性と染色性等の実用性能が良好な絹は理想的な衣料素材である。絹衣料が皮膚障害軽減に有効であるとの最近の報告がある(清水ら, 1995)。伝統的なこうした衣料材料としての利用とは別に、バイオ素材を始め各種の産業材料として絹を利用しようとの研究が進展するようになった。

純粋なタンパク質がカイコを通じて簡単に、しかも年間を通して随時入手することのできることは絹タンパク質を調達する上での利点である。絹を溶かした水溶液の蒸発速度を制御すると溶液状、粉末状、あるいは膜状など形の異なる素材が調整できる。水に対する絹素材の溶解特性を穏やかな条件で調節できることは、他の生体高分子にはない絹だけの長所である。絹製の縫合糸が古くから用いられてきたことは、絹が人体に対して安全な生体素材であることを意味しており、今後の絹利用を考える上で示唆するところが多い。

ここでは、絹素材の調整法と非衣料分野における利用拡大の実例を紹介し、今後の展開方向を見定めることにしたい。

I 絹タンパク質素材の調製方法

絹タンパク質繊維を塩化カルシウムや臭化リチウム等の濃厚な水溶液に溶かし純水で透析すると、利用価値の高い再生絹タンパク質水溶液が得られる。成熟したカイコ体内にある絹糸腺の内容物の分散水溶液も有効に利用できる。成熟したカイコを解剖して体内の様子を見たものが図-1である。蚕の体内には20 cm以上に及ぶ絹タンパク質の貯蔵器官の絹糸腺がある。絹フィブロインは後部絹糸腺で生合成されて順次前方へと移行し、中部、前部絹糸腺を経て吐糸口から繭糸へと変身する。再生絹フィブロイン溶液あるいは絹糸腺内容物を分散した水溶液をポリエチレン膜の上に薄く広げて試料水溶液を蒸発させると透明な絹膜ができる。絹膜は水溶性性であるが、メタノール水溶液で軽く処理するだけで水不溶性に変化してしまう。絹タンパク質はなんと不思議な特性

の変化を示すものである。

II 絹の利用拡大の実例

蚕糸・昆虫農業技術研究所では、絹タンパク質の構造と物性に関する基礎的な情報や絹の新しい利用技術を開発するために必要な知識を蓄積している。

1 細胞付着・増殖膜

有益な浮遊細胞を経済的に低コストで、しかも効率的に培養する技術を開発することは、免疫工学あるいは細胞工学といった関連分野においてはきわめて重要である。家蚕絹フィブロイン表面の化学構造と生体細胞の相互作用との相関を解明する研究が進んでいる。マウス由来の繊維芽細胞L929を用い、試料膜の表面上に10%の子ウシ血清を含んだ細胞浮遊液(約10万/ml)を加え、所定時間培養してフィブロイン膜上での細胞の付着・増殖の実験を試みた(MINOURA et al., 1995)。細胞付着率は、培養17時間後の値で、また細胞増殖率は50時間後の値で評価することにした。絹フィブロインは、従来、細胞の付着性が良好なコラーゲンに匹敵する優れた細胞付着・増殖能力を持っている。絹表面は生体細胞の足場

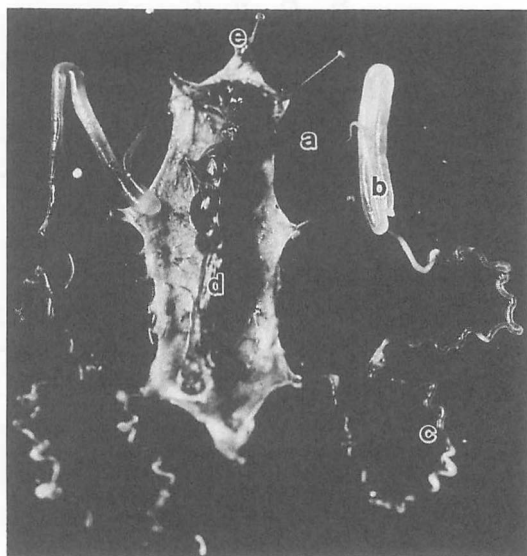


図-1 カイコ体内の解剖図

a: 前部絹糸腺, b: 中部絹糸腺 (絹が多量に蓄積されている), c: 後部絹糸腺 (フィブロインが生合成される部位), d: 中腸 (消化器官), e: 吐糸口

Exploitation of various kinds of silk protein-based materials. By Masuhiro TSUKADA

となり細胞の増殖を促進する材料となっているのであろう。また、家蚕の絹とは化学組成を異にする野蚕絹フィブリン表面で生体細胞の付着増殖性が良好なのは、野蚕の絹フィブリン遺伝子の cDNA の塩基配列に細胞接着活性ペプチド Arg-Gly-Asp (RGD) の配列を持つ部位が存在するためであろう。一方、家蚕絹フィブリン表面で細胞付着増殖性が良いのは、C 末端の塩基性領域によるものと考えられる。

2 絹フィブリンへの化学修飾加工

絹フィブリンに含まれるアルギニン (Arg) 残基は正の電荷を持つ面白いアミノ酸である。含量がわずか 0.4 mol% と微量であるにもかかわらず生体細胞の付着に深く関連している。Arg 残基の側鎖部分への化学修飾加工が検討されている (Gotoh et al., 1992)。絹フィブリン水溶液にホウ酸ナトリウムと 1,2-シクロヘキサジオン (CHD) を加え 37°C で反応させると絹の Arg 側鎖を CHD で修飾できる。修飾 Arg は、アミノ酸分析において、未反応 Arg と異なる位置に溶出するため、両者の溶出位置の比較により修飾率の評価が可能となる。反応 3 時間で絹フィブリンの Arg は完全に修飾されることが確かめられた。CHD 修飾絹フィブリンは、特徴ある生化学特性を示すことから、バイオ材料として付加価値の高い利用が可能となろう。

3 病原虫の貼付材と同定用貼付材

カイコを飼育する養蚕に重大な被害を及ぼす微粒子病原虫 (微胞子虫) 胞子の抗体をスチレンのラテックス粒子に結合させ、これと微粒子病原虫胞子との凝集反応の有無をみることによって微粒子病原虫が簡易に同定できる。蚕糸・昆虫農業技術研究所では、微生物や微粒子病原を顕微鏡で観察する際の貼付剤として利用できることを見だし、これを上述のラテックス法に応用することにより供試原虫の識別・同定を容易にした。

4 物質透過性絹フィブリン膜

バイオ素材は生体内という特殊な環境で用いられる。直接・間接的に生体に接触するので、人体に対する生体適合性、細胞付着性、酸素透過性の諸性質が優れていることは医用材料に望まれる特性である。絹フィブリン膜をアルコール処理すると水に溶けなくなる。アルコール溶液中での処理時間を変えることで絹フィブリン膜の酸素透過量が制御できることが明らかとなった。絹膜の酸素透過量は、コンタクトレンズ素材に多く用いられる 2-ヒドロキシエチルメタクリレート共重合体とほぼ同等である。

人工皮膚素材のいちばん大切な機能特性は、水蒸気透過性である。絹が人工皮膚として適する水蒸気透過性を

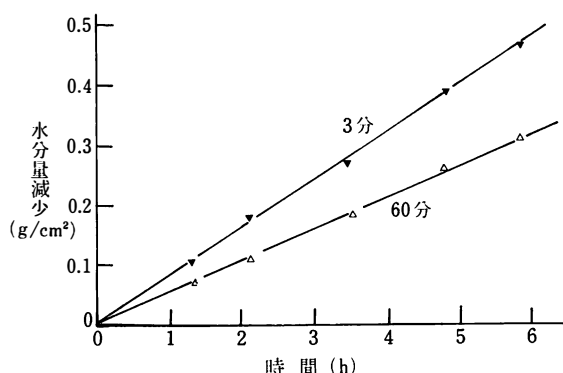


図-2 絹フィブリン膜における水蒸気透過量と不溶化時間の影響

不溶化時間 (分): ▼3, △60

持つか否かを調べてみた。図-2 は絹フィブリン膜に対する水蒸気透過性を調べたものである。メタノール処理による不溶化時間 3 分、60 分の試料膜の水分透過量は、1 日当りに換算するとそれぞれ 1 m² の膜で 19, 12 kg である。皮膚が損傷を受けたとき、患部の自己細胞が増殖するまでの間、浸出液が蒸発する程度の水蒸気透過性を持ち、微生物が通過しない機密性があり、かつ患部の治癒を促進する働きのある人工皮膚 (創復被覆剤) 素材に絹タンパク質が利用できるのではなかろうか。

5 絹の微細粉末

絹糸の微粉末は、繭糸等の繊維状試料を粉碎機により粉碎して調整できるが、こうした従来の方法では粒径が 20~70 μm 程度の大きいものしか得られなかった。再生絹フィブリン溶液の pH を 4 近辺にまで下げゲル状態にさせた後、凍結乾燥することにより絹の粉末を得ることができる。この凍結乾燥法をさらに改善したものに、「絹タンパク質の超微粉末の製造方法」(蚕糸・昆虫農業技術研究所, 特許第 1557142 号) がある。絹フィブリン水溶液にアルカリフォスファターゼ等の加水分解酵素を加えることで得られる沈殿物あるいは、上澄液をいったん凍結させた後、減圧下で乾燥することにより、粒径 3 μm 以下の超微粉末が得られる。絹の超微粉末の吸水性、吸湿性ならびに保水性を活かした化粧用の素材ができあがる。

6 グルコースセンサー

絹フィブリンは生体触媒である酵素に対して強い包括性を持っている。グルコースオキシダーゼ (GOD) を絹フィブリンで固定化した膜はグルコースを認識するためのバイオセンサーとして利用できる。酵素固定化絹膜を過酸化水素電極に装着し、これにグルコース溶液を

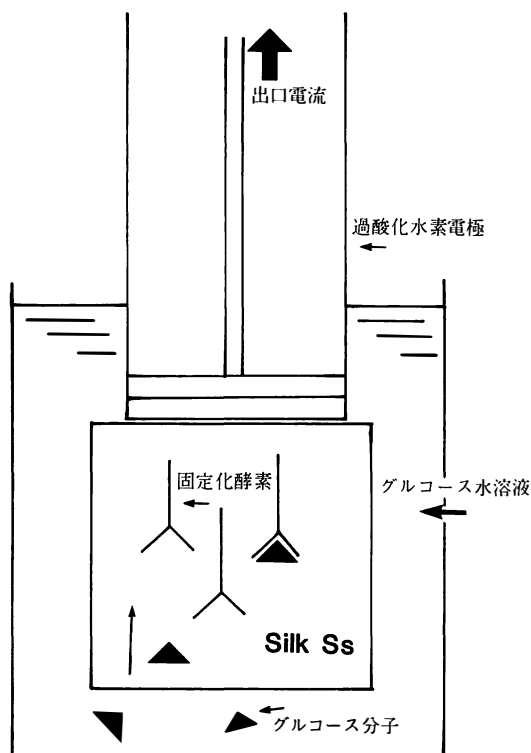


図-3 グルコースセンサーの構築原理図

接触させるとグルコースは固定化 GOD と反応してグルコン酸と過酸化水素が発生する。生ずる過酸化水素の量を過酸化水素電極で検出して電気信号量に変換することによりグルコース濃度が定量できる。これがグルコースセンサーの構築原理である。グルコースを定量する原理を図-3 に示す。

絹フィブロインを酵素固定化担体に用いて GOD を包括することにより、酵素活性の pH 領域が広くなり、膜の温度安定性が向上することから酵素固定化担体に絹を用いる効果がはっきり現れる。

7 抗血栓性医用材料

血液が接触しても血液凝固が起こり難い材料は血液適合性の良い医用材料として貴重である。抗血栓性機能を持つ素材は、医用材料を開発する上で必要不可欠である。絹フィブロイン膜の抗血栓性が、成犬を用いた *in vivo* 実験で確認されている。概要は次のとおりである。

細いポリエステル繊維表面に絹フィブロイン薄膜を被覆し、それを太い注射針を介して犬の大腿静脈内に挿入し、針だけを抜き取る。2 週間後に静脈を切開して材料表面での血栓付着の有無を観察したところ、血栓の形成が抑制されることが明らかとなった（坂部ら、1989）。

東京農工大学では、絹フィブロイン膜に血栓形成を阻害する酵素（ヘパリン）を包括させ、試料膜の環境 pH を制御することによりヘパリンを徐々に放出すること（徐放）が可能となることを見いだした。抗血栓性機能を付加した絹をヘパリンの徐放担体として利用することで、抗血栓性を付加した新たな利用が期待されている。

III 今後の展望

絹タンパク質は人体に対する生体適合性、細胞付着増殖性、酸素透過性、水蒸気透過性の諸点で優れた機能性を持ち、絹フィブロイン膜は湿潤状態で弾性的な特性を持つためバイオ材料として利用できる可能性が高い。将来的には、先端的な臨床化学分析用材料や高分子医療用材料としての利用も可能であろうし、人工肺や人工血管などの人工臓器用材料として絹を利用することも夢ではない。

絹フィブロインには、リジン、アルギニン、ヒスチジン等の化学反応性に富んだ塩基性アミノ酸が含まれているので、これに化学修飾をして天然にはない新たな機能を持つ医用素材をデザインすることができる。その結果、免疫工学や細胞工学といったバイオテクノロジーを支える先端産業の関連分野や先端医療分野への展開にも絹が大きく貢献できることを期待したい。先端材料として絹タンパク質を用いるためには、高分子化学、細胞学、免疫学、生物学、医学、薬学、生物学、基礎医学等の各種専門分野の研究者が境界領域の研究を効率的に進めることにより絹利用に関する新たな突破口がさらに開けるものと期待できる。

引用文献

- 1) GOTOH, Y. et al. (1992): Int. J. Biol. Macromol. 14: 198~200.
- 2) MINOURA, N. et al. (1995): Biochemical and Biophysical Research Communication 208: 511~516.
- 3) ——— et al. (1990): Biomaterials 11: 430~434.
- 4) 坂部寛ら (1989): 織学誌 45: 487~490.
- 5) 清水裕子ら (1995): 日蚕雑 64: 23~30.