

Plastein反應에 의한 絹피브로인의 分子量變化

金東建·坂部 寬*·小西 孝**

東亞大學校 天然纖維學科

*農林水産省 橫兵 農林水産消費技術센터

**京都工藝纖維大學 纖維學部 高分子學科

Changes of Silk Fibroin Molecular Weight by Plastein Reaction

Dong Keon Kim, Hiroshi Sakabe* and Takashi Konishi**

Department of Natural Fiber Science, Dong-A University

*Yokohama Center for Quality Control and Consumer Service,

The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan

**Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Japan

ABSTRACT

Changes of silk fibroin molecular weight was studied by enzymatic proteolysis and reverse reaction of enzymatic proteolysis (plastein reaction) using chromatography, X-ray diffraction and thermal analysis methods. When the treatment of enzymatic proteolysis with α -chymotripsin to silk fibroin solution, a precipitate of Fcp fractions was formed. And, this was dissolved in LiBr aqueous solution, the precipitate of PIFcp fractions was obtained again. Fcp and PIFcp fractions showed silk II and silk I type structure, respectively. Fcp fractions was about 6,900 in molecular weight, PIFcp fractions obtained by plastein reaction on the precipitate of Fcp fractions increased molecular weight to about 15,000. The molecular weight of Fcp fractions was increased by plastein reaction, but Fcp fractions almost transited to silk I type crystal. The structure of silk I type of PIFcp fractions was steady identified by X-ray diffraction and thermal analysis. As molecular weight of Fcp fractions was gradually low, PIFcp fractions was become to macromolecule little by little.

Key words : Enzymatic proteolysis, Plastein reaction, Molecular weight, Silk I type, Silk II type

緒 言

絹 fibroin 水溶液을 蛋白質分解酵素에 의해 酵素加水分解를 하면 絹 fibroin의 結晶部分이라 할 수 있는 低分子量的 酵素加水分解物을 얻을 수 있다(小西 등, 1967; 塚田, 1986; 金 등, 1997). 이 酵素加水分解物은 絹 fibroin의 silk I型和 silk II型이라고 하는 서로 다른 結晶構造를 형성하며, 이중 silk II型에 대하여는 많은 研究가 행하여 지고 있다(小西 등, 1972).

酵素加水分解의 逆反應인 Plastein reaction(藤卷 등, 1975; 藤卷, 1975)은 蛋白質의 改質에 이용되어지고 있으며, 이것을 低分子量的 酵素加水分解物에 응용하면 acyl酵素中間體가 형성되고 이것이 한번 형

성되면 acyl基를 親核基로 轉移시켜 펩티드結合을 合成하는 것이 可能하게 되어 高分子量化되어진 再合成物이 얻어질 可能性이 있다. 이 再合成物은 silk I型的 結晶構造를 형성하며(小西 등, 1968), silk I型的 연구에 있어서 중요한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어서 silk I型的 結晶構造는 불안전하여 熱處理 또는 延伸등에 의해 silk II型으로 構造轉移를 용이하게 함으로 그 分子構造 및 分子配向등과 관련하여 silk I型的 研究에 중요한 정보를 제공할 것이다.

藤卷(1975)은 Plastein 反應의 조건이 基質濃도가 높을 것, 基質이 低分子量일 것, 反應系가 弱酸性일 것이 필요하다고 報告하였다. 그러나, Plastein反應을 이용한 絹 fibroin의 응용에 있어서는 疎水性 아미노산 잔기가

따라서 구체적인 연구가 실시되고 있지 않다.

본 연구에서는絹 fibroin의 基質分子량에 착안하여 條件이 다른酵素加水分解 시료를 製作하여 이것의 分子량과 동시에 Plastein 反應과의 關聯에 대하여 調査하였다.

材料 및 方法

1. 材料

日本 京都工藝纖維大學 纖維學部の 附屬農場에서 生産되어진 家蠶絹을 마르세유 비누에 精練한 것을 絹 fibroin으로 하였다(Kim, 1987).

2. 絹 fibroin 水溶液의 調整

精練한 絹 fibroin을 38°C의 10M Lithium Bromide 水溶液에 약3시간 溶解한 다음, 蒸溜水로 稀釋하여 透析用 셀룰로오즈 튜브에 넣어 pH7로 調整한 蒸溜水에 2일간 透析을 실시하였다. 透析 終了 後에 이 水溶液을 遠心分離하여 不純物을 제거한 것을 絹 fibroin 水溶液으로 하였다.

3. 酵素加水分解物(Fibroin crystalline part:Fcp)의 製作

絹 fibroin 水溶液에 同量의 phosphoric acid buffer (pH7.8)를 添加하고 여기에 酵素로서 α -chymotrypsin 40 mg을 넣어 38°C의 恒溫中에서 100시간 酵素加水分解를 실시하였다. 反應 終了 後, 遠心分離하여 분리되어진 沈澱物에 대하여 pH7로 調整한 蒸溜水로 약 3일간 透析을 실시하였다. 그 후, 이 용액을 遠心分離하여 白色의 沈澱物을 분리한 다음 수차례 에탄올을 가하여 脫水處理하였다. 그 후, 眞空乾燥를 실시하여 얻어진 白色의 固形物을 粉碎하여 酵素加水分解 粉末試料(Fcp)로 하였다. 이 과정 中에서 酵素加水分解反應을 24시간 동안 실시하여 얻어진 試料를 Fcp(1), 72시간 동안 실시한 試料를 Fcp(2), 그리고 72시간 경과후 재차 α -chymotrypsin 을 40 mg을 넣고 7일간 反應을 계속시킨 試料를 Fcp(3)으로 하였다.

4. 再合成物(Plastein-Fcp:PIFcp)의 製作

위에서 얻어진 Fcp試料를 38°C의 10M LiBr水溶液에 完全溶解시킨 다음 尿素를 8M이 되게 添加하였다. 이것을 pH5.5의 8M, 6M, 4M, 2M농도의 尿素水에 대해 하루씩 차례로 透析을 실시하였다(今堀 등, 1977). 각각의 이 용액을 20%로 濃縮한 후, 이 시료 용액에 α -chymotrypsin 24 mg을 添加하여 38°C의 恒

溫中에서 100시간 동안 反應을 시켰다. 反應 後, 遠心分離에 의해 白色의 gel狀 沈澱物을 分離하였다. 이것에 0.1N鹽酸을 가해 反應을 정지시킨 후, 遠心分離로서 鹽酸을 제거한 다음 蒸溜水를 가해 다시 遠心分離하였다. 분리된 沈澱物을 회석하여 pH7로 調整한 蒸溜水로서 약 3일간 透析을 실시하였다. 透析 後에 凍結乾燥하여 얻어진 것을 再合成物(PIFcp)로 하였다. 酵素加水分解物 試料의 Fcp(1), Fcp(2), Fcp(3)의 각각에 대하여 이 反應을 실시하여 얻어진 再合成物을 각각 PIFcp(1), PIFcp(2), PIFcp(3)로 하였다.

5. 고속 겔 여과 크로마토그래피

겔여과 장치로 칼럼은 직경 8 mm, 길이 300 mm의 YMC-Pack Diol-120을 사용하였고 장치는 633A 日立社의 고속액체 크로마토그래피를 사용하였다. UV는 日立社製의 日立波長可變流動光度計를 사용하여 280 nm에서 測定하였다. 칼럼의 檢量線을 작성하기 위하여 標準蛋白質試料로서는 Glucagon(MW:3500), Insulin(MW:5700), Cytochrome C(MW:12400)을 사용하였다. 分配係數는 式(1)로부터 算出하였다.

$$K(\text{분배계수}) = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (1)$$

여기에서, V_e 는 elution volume, V_t 는 total bed volume, V_0 는 void volume이다(Skoog & Leary, 1994).

또, 分配係數 K와 分子량 logMW사이에는 式(2)와 같은 直線關係

$$\log MW = a - bK \quad (a, b \text{는 계수}) \quad (2)$$

가 있어 (荻野, 1987), 식 (1), (2)로부터 칼럼의 檢量線을 作成하였다.

6. X線 回折

X線 回折은 理學電氣製의 X線 發生裝置(CaNo 4000A)를 사용하여 니켈 필터로 濾過한 $\text{Cu-K}\alpha(\lambda=0.154 \text{ \AA})$ 를 사용하였다. X線 回折 寫眞은 Laue 平板 카메라를 사용하여 카메라 距離 30 mm, 出力 35 kV, 15 mA로서 5시간 露出하여 撮影하였다.

7. 示差熱分析(DTA)

熱分析은 島津製의 示差熱分析裝置 DT-28B를 사용하여 試料 2 mg을 減壓下の 조건에서 昇溫速度 20 °C/min, 溫度範圍는 室溫에서 400°C까지 測定하였다.

結果 및 考察

1. Fcp(1)과 PIFcp(1)의 比較

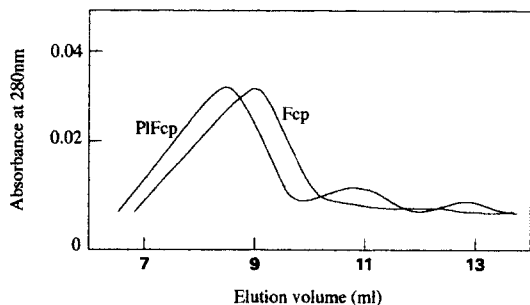


Fig. 1. Gel filtration chromatograms of Fcp and PIFcp fractions.

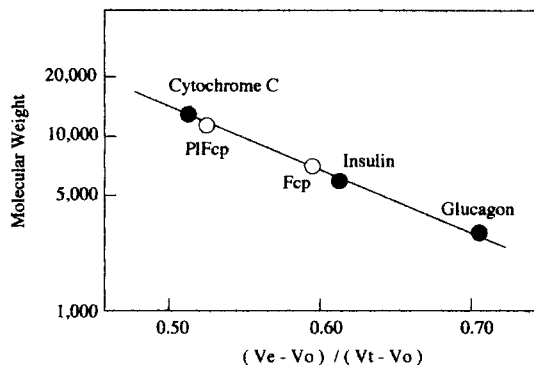


Fig. 2. Calibration curve of molecular weight by gel filtration.

24시간 酵素加水分解로 얻어진 Fcp(1)과 그의 再合成物인 PIFcp(1)의 겔여과곡선을 그림 1에 나타내었다. Fcp(1)에 比較하여 PIFcp(1)의 겔여과곡선은 좌측

에서 관측되어져 PIFcp(1)이 빨리 溶出되는 것을 알 수 있었다. 겔여과에서는 分子量이 적은 것은 겔입자의 網目構造中에 일시적으로 擴散되기 때문에 그 網目構造에 들어가기 어려운 큰 分子量에 비해서 칼럼으로부터 늦게 溶出된다(志村, 1979). 그러므로 PIFcp(1)의 分子量이 Fcp(1)의 分子量에 비해서 크다고 생각할 수 있다. 이것은 그림 2의 分子量檢量線(logMW=5.527-2.814K)에 나타내어져 있는 것과 같이 Fcp(1), PIFcp(1) 겔여과곡선의 最大吸收peak位置로부터의 分子量 계산 결과, 즉 Fcp(1)은 약6,900, PIFcp(1)은 약11,000으로 산출된 것과 결과적으로 일치하고 있다. 이것으로 絹 fibroin의 酵素加水分解物(結晶部分)은 plastein反應에 의해 再合成되어 高分子量化되는 것을 알 수 있었다. 또, PIFcp(1)의 겔여과곡선에 있어서 작은 peak가 Fcp(1)보다 低分子量側에 2개가 나타났다. 이것은 plastein 反應機構(藤卷, 1975)에 의하면 分子量이 增加하는 것과 동시에 올리고 펩티드와 遊離 아미노산등의 低分子量化에 起因하는 것이라고 생각할 수 있다.

絹 fibroin 酵素加水分解物(Fcp)과 再合成物(PIFcp)을 X線 回折法에 의해 촬영한 寫眞을 그림 3에 나타내었다. Fcp의 X線 回折에 있어서는 面間隔 4.41, 3.93 Å의 강한 Debye Scherrer ring狀의 回折이 나타났다. 이것은 silk II型의 結晶構造의 特征적인 회절패턴(Marsh et al., 1955)이며, Fcp의 結晶構造는 silk II型의 構造를 나타내는 것이 確認되어졌다.

한편, PIFcp는 silk I型 結晶構造의 特征적인 회절패턴(小西 등, 1968)인 面間隔 7.23, 4.41 Å의 강한 debye scherrer ring狀의 回折이 나타나는 것으로부터

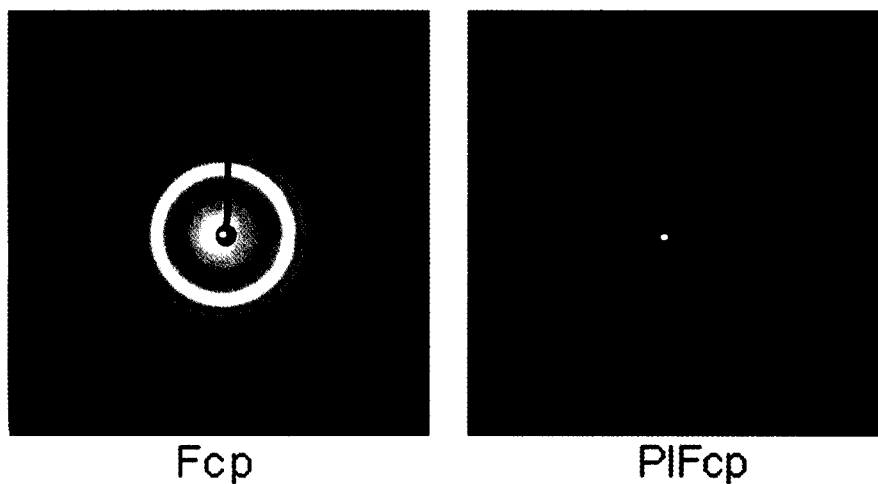


Fig. 3. X-ray diffraction patterns of Fcp and PIFcp fractions.

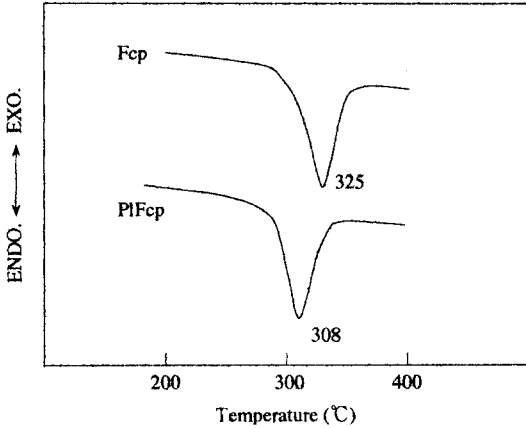


Fig. 4. DTA thermograms of Fcp and PIFcp fractions.

Fcp를 再合成한 PIFcp의 結晶構造는 silk I型을 나타내는 것이 確認되어 졌다(김 등, 1997).

그림 4에 나타내어져 있는 Fcp와 PIFcp의 DTA에 의한 熱分析에 의하면 Fcp와 PIFcp의 熱分解 peak는 각각 약 325°C와 약 308°C에 나타나 있다. 안정한 結晶構造라고 볼 수 있는 silk II型 結晶의 熱分解點은 약 320°C 전후, 불안정한 結晶構造이라고 볼 수 있는 silk I型 結晶의 熱分解點은 290°C 전후라고 알려져 있는 것을(石川 등, 1972) 감안할 때, 또한 PIFcp가 silk I型 結晶인 것은 그림 3의 X線回折에 의해 確認되어 졌기 때문에 이 plastein 反應에 의해 高分子量化 되어진 PIFcp는 어느 정도 안정한 silk I型 結晶이며, 이것은 主鎖結合力的 增大效果와 함께 urea處理를 함으로써 생각할 수 있는 펩티드構造에 있어서의 結晶構造 結合力的 增大效果가 더해졌기 때문이라고 생각할 수 있다.

2. 酵素 分解의 處理時間이 다른 Fcp의 比較

Fcp(1), (2), (3)에 대하여 겔여과를 실시하여 그림 5와 같은 曲線을 얻었다. 72시간 酵素分解한 後, α-chymotrypsin을 넣어 7일간 反應을 계속해서 얻어진 試料 Fcp(3)의 겔여과곡선이 제일 우측에서 보여지고 있어, 가장 늦게 溶出되었음을 나타내고 있다. 한편 24시간 酵素分解하여 얻어진 Fcp(1)이 가장 빨리 溶出되어 Fcp(1), (2), (3)의 순서로 分子量이 적게 분포하고 있음이 예상되어 졌다. 이를 그림 2와 같은 방법으로 겔여과곡선의 最大 peak位置로부터의 分子量檢出을 檢量線으로부터 구하여 표 1에 나타내었다. 결과 Fcp(1)은 약6,900, Fcp(2)는 약6,400, 그리고 Fcp(3)은 약4,500으로 나타나 分子量의 變化를 보여 주었다. 이것은 24시간의 反應에서는 아직 酵素加水分解

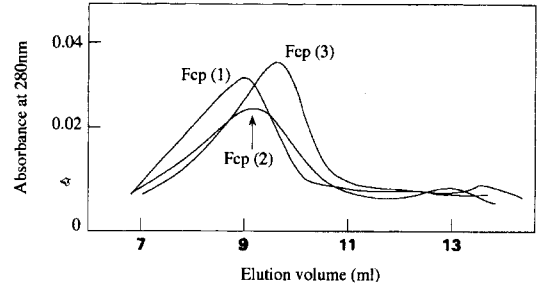


Fig. 5. Gel filtration chromatograms of Fcp (1), Fcp (2) and Fcp (3) fractions.

Table 1. Molecular weight of silk fibroin crystalline part (Fcp)

Time of proteolysis	Molecular weight
24h	6900
72h	6400
72h+7days	4500

가 충분하지 못하였으며, 反應時間을 길게 하고 여기에다 酵素인 α-chymotrypsin을 增加시키는 것에 의해 分解가 促進되었기 때문이라고 여기어진다.

3. 3種類의 다른 PIFcp의 比較

그림 6은 PIFcp(1), (2), (3)의 겔여과곡선을 나타내었다. Fcp의 겔여과곡선과 반대의 傾向으로 Fcp(3)으로부터 再合成한 PIFcp(3)의 겔여과곡선이 가장 좌측에서 보여지고 있어 가장 빨리 溶出되었으며 Fcp(1)로부터 再合成한 PIFcp(1)이 가장 늦게 溶出되었다. 이를 PIFcp(1), (2), (3)의 分子量을 표 2에 나타내었다. PIFcp(1)은 약 11,000, PIFcp(2)는 약12,000, PIFcp(3)에서는 약15,000으로 分子量이 增加하는 것을 알 수 있었다. 이 結果로부터 反應基質인 絹fibroin 酵素加水分解物 (結晶部分) Fcp의 分子量이

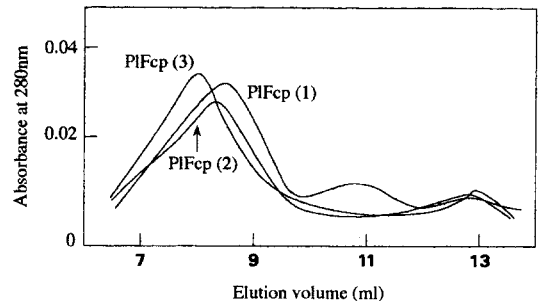


Fig. 6. Gel filtration chromatograms of PIFcp (1), PIFcp (2) and PIFcp (3) fractions.

Table 2. Molecular weight of plastein productivity(P 1Fcp)

Substrate time of proteolysis	Molecular weight
24h	11000
72h	12000
72h+7days	15000

적으면 적을수록, plastein反應에 있어서 效率이 上昇하여 再合成物인 P1Fcp의 分子量이 增加하는 것을 알 수 있었다. 이는 分子量이 적은 쪽이 反應의 活性部位가 많아졌기 때문에 分子量의 增大化가 이루어지는 것이라고 생각할 수 있다.

摘 要

絹 fibroin을 酵素加水分解하여 얻어진 低分子 結晶部分을 酵素加水分解의 逆反應(plastein reaction)을 이용할 경우 高分子量化되는 分子量變化를 檢討하였다. 즉, 絹 fibroin의 酵素加水分解物의 plastein反應에 의해 再合成하면 高分子量化된 再合成物을 얻을 수 있었다. 이 酵素加水分解物과 再合成物은 각각 silk II型和 silk I型の 結晶構造를 나타내었다. 또, 이 再合成物의 熱分析의 結果, 熱分解 peak가 308°C부근으로 나타나 비교적 안정한 silk I型の 結晶構造를 가지는 것을 알 수 있었다. 더욱이, plastein反應의 基質인 絹 fibroin 酵素加水分解物의 分子量이 적으면 적을수록 反應의 效率이 向上되어 再合成物의 分子量이 15,000정도의 高分子量化되는 것을 알 수 있었다.

引用文獻

- 荻野 一善(1987) 高分子化學. 東京化學同人. 73~76.
 D.A. Skoog and J.J. Leary (譯) 朴 基采(1994) 器機分析의 原理. 探求堂. 764~773.
 藤卷 正生(1975) タンパク質의 再合成. 高分子. **24**(5): 302~308.
 藤卷 正生·荒井 綜一·山下 道子(1975) 蛋白食糧의 改質とPlastein 反應. 蛋白質核酸酵素. **20**(10): 927~935.
 今堀 和友·小昌 陽之助·中野 準三(1977) 生體機能 高分子. 講談社. 29.
 石川 博·塚田 益裕·土井 詰功·近田 淳雄·平林 潔(1972) 絹フィブロイン의 DSC曲線. 纖維學會誌. **28**(4,5): 91~98.
 Kim B. H. (1987) Silk Textile Engineering. Moon-Hahk Pu.Co. 88~91.
 김동건·小西 孝 (1997) Silk I형 結晶을 얻기 위한 투석의 pH조건. 韓蠶學誌. **39**(1): 67~72.
 金 東建·崔 震浹·小西 孝(1997) 酵素反應에 의한 피브로인의 轉移. 韓蠶學誌. **39**(1): 73~78.
 小西 孝·近藤 宗夫·黒川 昌孝(1967) 酵素分解した フィブロイン의 構造 について. 纖維學會誌. **23**(2): 64~69.
 小西 孝·黒川 昌孝(1968) 絹フィブロイン-a의 結晶構造. 纖維學會誌. **24**(12): 550~554.
 小西 孝·黒川 昌孝(1972) フィブロインa型ならびに 型の 結晶ブレンド. 纖維學會誌. **28**(4,5): 83~90.
 R. E. Marsh, R. B. Coray and L. Pauling(1955) Investigation of the structure of silk fibroin, *Biochem. Biophys. Acta.* **16**: 1~34.
 志村 憲助·江尿 慎一郎·吉田 充輝·石原 弘章 (1979) ゲル濾過法. 學會 出版センター.
 塚田 益裕(1986) a-キモトリプシン을 作用させた絹フィブロイン의 構造. 日蠶雜. **55**(2): 126~130.