

羽毛ケラチンの電気泳動的挙動と
構造的特性に関する研究

乙第46号

横 手 よし子

羽毛ケラチンの電気泳動的挙動と
構造的特性に関する研究

横 手 よし子

目 次

| | | |
|--|-------|----|
| 緒 言 | ----- | 1 |
| 第 1 章 羽毛ケラチンの可溶性成分の分析化学的研究 | ----- | 7 |
| 第 1 節 可溶化ケラチンタンパク質のアミノ酸組成 および一次構造 | ----- | 8 |
| 第 2 節 羽毛ケラチンの電気泳動的挙動と種依存性 | ----- | 16 |
| 第 3 節 小活 | ----- | 29 |
| 第 2 章 羽毛ケラチン分光学的研究 | ----- | 31 |
| 第 1 節 FT-IR による羽毛ケラチンの 二次構造成分の研究 | ----- | 31 |
| 第 2 節 羽毛ケラチンの側鎖のラマンスペクトル | ----- | 41 |
| 第 3 章 羽毛ケラチンの熱的性質に関する研究 | ----- | 49 |
| 第 1 節 固体状態熱変性ミオグロビンの FT-IR による 二次構造研究 | ----- | 50 |
| 第 2 節 熱変性羽毛ケラチンの FT-IR による 二次構造研究 | ----- | 57 |
| 第 3 節 示差走査熱量測定による解析 | ----- | 62 |
| 第 4 節 小活 | ----- | 71 |

| | | |
|------|-------|----|
| 総括 | ----- | 73 |
| 略語表 | ----- | 77 |
| 謝辞 | ----- | 78 |
| 引用文献 | ----- | 79 |

緒 言

ケラチンは上皮系細胞の角質化による生産物で、毛髪、羽毛、角、蹄、表皮などを構成する構造タンパク質である。その役割は、主に外界からの刺激に対する、生体の保護にある。完全な成熟組織においては、生細胞としての機能は失われている。しかし、ケラチン本来の役割はこの状態で果たされている。

ケラチンの役割を生物進化の過程で考えると、脊椎動物の魚類はその生活圏が水中であるが、両生類を中間的な存在として爬虫類は完全に陸上に進出した。陸上生活に適応するには肺呼吸系の獲得と同時に、生体の乾燥を防ぐために表皮ケラチンが重要な役割を果たしている。魚類、両生類もケラチンを持つがまだ未熟で、生体の乾燥防御の役割を果たすにはほど遠いものである。さらに、鳥類、哺乳類は体温を一定に維持するシステムを獲得し、活動の場と時期を拡大し進化し、その体温維持に体毛、羽毛のケラチンが必須であった。特に、羽毛は体温維持のみでなく、独特の形態と物理的、化学的強靱さが飛翔を可能にし鳥類を独特な進化に導いたと言える。羽毛ケラチンの分子とその集合体の構造がどのようになっているか、さらに羽毛の形態形成における遺伝子の発現メカニズム等は興味ある問題である。

ケラチンは、X線回折によるタンパク質の立体構造の研究において、最初の材料として取り上げられ、先駆的役割を果たした。Astbury[1,2]は、羊毛ケラチンのネイティブ型の子午線反射 5.15\AA 、赤道反射 9.8\AA のものを α -パ

Table 1. Classification of Keratins

| Class | Name | X-ray diffraction pattern | Type | Source |
|--------------|---|---------------------------|-----------|--|
| Soft Keratin | Epidermis Stratum corneum Corns Calluses | α | α | mammals, birds, reptiles amphibians, fishes |
| Hard Keratin | Hair | α | α | mammals |
| | Hair stretched | β | - | mammals |
| | Nails | α | α | mammals |
| | Hooves | α | α | mammals |
| | Horns | α | α | mammals |
| | Feathers | feather(β -like) | φ | birds |
| | Beaks | feather(β -like) | φ | birds |
| | Claws | feather(β -like) | φ | birds, reptiles |
| | Scales | feather(β -like) | φ | reptiles |

ターン，温湯中で引き伸ばしたものの，子午線反射 3.3 Å，赤道反射 9.7 Å と 4.65 Å のものを β -パターンと命名した。また，羽毛の X 線回折は，子午線反射 3.1 Å，赤道反射 9.7 Å と 4.7 Å を示し， α -パターンを伸ばした β -パターンと似ているが，同一ではないとして，新たに羽毛パターン (ϕ -パターン) とした (Table 1) [3, 4]。これらは，後年 Pauling と Corey [5-7] により提唱された， α -helix と β -sheet 構造の基礎的データとなった。

ケラチンは，その X 線回折像に基づき， α 型と ϕ 型に区別される。 α -ケラチンは， α -helix 様の基本骨格を持ち，毛髪，羊毛に代表され，哺乳類の爪，角もこれに属する。一方鳥類の羽毛，嘴，爪，爬虫類のうろこ，爪等は ϕ -ケラチンに属し， β -sheet 様の基本骨格を持つと考えられている。また，Fraser ら [8] は X 線回折データと電子顕微鏡データに基づいて， α -型ケラチンには coiled-coil rope モデルを ϕ -型ケラチンには twisted-sheet モデルをそれぞれ提案した (Fig. 1)。このように，X 線回折による研究には早期に取り上げられたケラチンであるが，その後のケラチン構造に関する研究は少なく，X 線構造解析研究また，ケラチンの化学的研究は非常に立ち遅れている。その理由は，通常のタンパク質研究に用いられる溶媒には不溶で，タンパク質分解酵素の作用も受け難いなど，物理的，化学的に極めて安定な物質であることによる。したがって，直接ケラチンを分析しようとする試みは余り行われず，近年は遺伝子による研究に重点が置かれるようになってきた。

化学的研究として，羽毛ケラチンを比較的強い変性条件

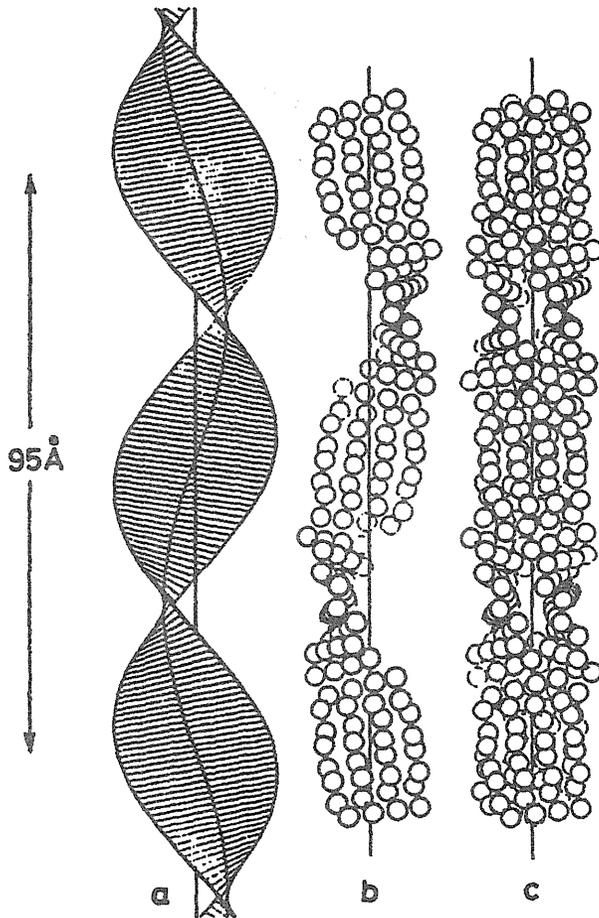


Fig. 1. (a) Left-handed helical ruled surface of pitch 95 Å. (b) Strand of pleated sheets distorted so as to lie in the left-hand ruled surface. Each sheet contains four sections of polypeptide chain eight residues long. Each residue is represented by a sphere. (c) Model for the framework of the feather keratin microfibril consisting of two strands of the type shown in (b) running in opposite directions. The two pleated sheets at each level are related by a horizontal diad. The primitive helix is right-handed and the pair of sheets at one level superpose on the pair at the level above if rotated 90° and advanced 23.6 Å in a right-handed sense.

で処理し、結合の一部を切断して、可溶化した場合、いずれも電荷的には不均一であるが分子量的には約 10kD 程度の均一な低分子タンパク質群が得られる[9-11]。この分子量値は他の繊維性タンパク質と比較して、異常に小さい。しかし、羽毛ケラチンの電子顕微鏡による観察では、羊毛ケラチンと同様に明らかな繊維性を示すことから[12, 13]、羽毛ケラチン分子の繊維形成は、他の繊維性タンパク質とは異なる独特なものであると推測される。従って、その構造的特徴は、アミノ酸配列にもある程度反映されているに違いない。タンパク質のアミノ酸配列はその働きの分子的機構を考える基礎であり、立体構造解明にも必要である。羽毛ケラチンから得られる分子量 10kDa 程度の可溶性成分について、これらの分離精製法は Akahane ら[14-16]によって既に確立されており、また、ニワトリ羽毛ケラチンの可溶性成分の主成分のアミノ酸配列も決定されてきた[17, 18]。このようにして同一個体、同一種、関連種の相同ケラチンタンパク質の一次構造データを蓄積し、比較すれば、タンパク質の働きと同時に、タンパク質の進化、それを持つ生物の進化についての知見が得られ、形態分類とあいまってさらなる発展が見込まれるであろう。

一方、羽毛ケラチンには、コラーゲンのような分子量が 285,000kDa、成分数 17 種、アミノ酸組成は 1/3 がグリシン、15~30%がプロリンと 4-ヒドロキシプロリンというような際立った特徴は見られないが、強い不溶性繊維を形成し、独特な羽毛の形態を保持している。そのような形態を研究するには、羽毛を化学的に破壊せずにそのまゝの状

態で情報を得る必要がある。本研究は IR から得られる二次構造情報を中心に、羽毛の Schroeder ら [19] (Fig. 2) の示した形態学的部位 barbs, calamus, rachis のネイティブ状態および熱変性状態におけるケラチンの挙動を調べた。

第 1 章では、羽毛ケラチンの可溶性低分子タンパク質に関する分析化学的研究をまとめて記述し、第 2 章では、固体状態のタンパク質に赤外分光 (FT-IR) が利用できることを確かめた後に羽毛ケラチンに応用し、また、ラマンスペクトルから得られた羽毛中の側鎖情報について記述する。第 3 章では羽毛ケラチンの熱的性質について、ミオグロビンを用いて、タンパク質変性を FT-IR で追跡できるかを検討した後、羽毛ケラチン (calamus) について得られた FT-IR 情報および示差走査熱量測定 (DSC) (barbs, calamus, rachis,) の情報を記述する。

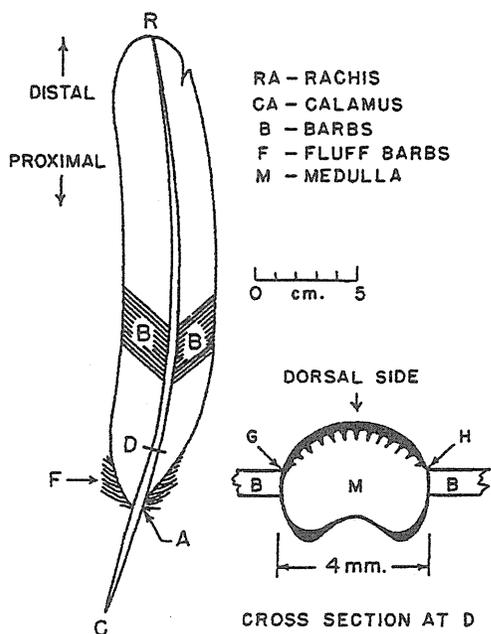


Fig. 2. —Anatomy of white turkey feather; view from dorsal side.

第1章 羽毛ケラチンの可溶性成分の分析化学的研究

第1章 羽毛ケラチンの可溶性成分の分析化学的研究

羽毛ケラチンは変性剤存在下で、還元処理すると、ジスルフィド結合が選択的に切れて可溶化成分が得られる。このことから、羽毛ケラチンの不溶性は-S-S-結合の存在が大きく影響していると思われる。しかし、-S-S-結合が切れても羽毛全部が完全に溶解するわけではなく、10～15%の量は、不溶性のまま残るので、-S-S-結合のみの原因とも断定できない。羽毛の溶解には変性剤の存在も大きく寄与しており、可溶性を維持するには、尿素濃度が4～8M必要であることがわかっている。また、その可溶性の低分子タンパク質の混合物をゲル濾過法およびイオン交換クロマトグラフィーにより単離精製する方法も確立している[14-16]。これらの手順について、各精製段階の概要を記述する。

第1節 可溶化ケラチンタンパク質のアミノ酸組成 および一次構造

1. ニワトリ羽毛の調製

全羽毛を非イオン性界面活性剤を用いて洗浄し、続いて流水で十分にすすぎ、最後にナノピュアー水で洗浄し、風乾した。乾燥羽毛をアセトンで2回脱脂した。羽毛はFig. 2に示した形態学的(Schroederら)に, barbs (羽枝), calamus (羽かく), rachis (羽軸) および medulla (羽髓) の4部位に切り分けた。この組成は質量比で, barbs 72%, rachis-medulla 24%, calamus 4%であった。

2. 試料の溶解

羽毛 barbs の溶解は, 8M 尿素-ホウ砂-リン酸緩衝液 (pH8.6), メルカプトエタノールで還元可溶化した。ついでモノヨード酢酸を加え, S-カルボキシメチル化した。barbs ケラチンは変性剤存在下で還元剤を加えることにより-S-S-架橋が切断され可溶性ポリペプチド鎖の混合物となり, 約85%が可溶化した。

3. ゲルおよびイオン交換クロマトグラフィー

可溶化物をSephadexG-75カラムにかけ, 4M 尿素-1M NaCl で溶離し (Fig. 3), 全体の80%を占める分子量約10kDaの主画分 (GF-3) を集め, DEAE セルロースで分離した。GF-3の溶離は4M 尿素-トリス-塩酸 (pH8.5), 0-0.2M KCl のリニアグラジェント法で行った (Fig. 4)。ケラチン分子は, 電荷が極端に少なく非常に凝集し易いため, 変性, 可

溶化の働きのある尿素の共存により、ケラチンモノマーとして分離することができた。各ピーク(B1~7)をDEAEセルロースで再クロマトグラフィーを行うことにより、barbsからのケラチン各成分を単離することができた。

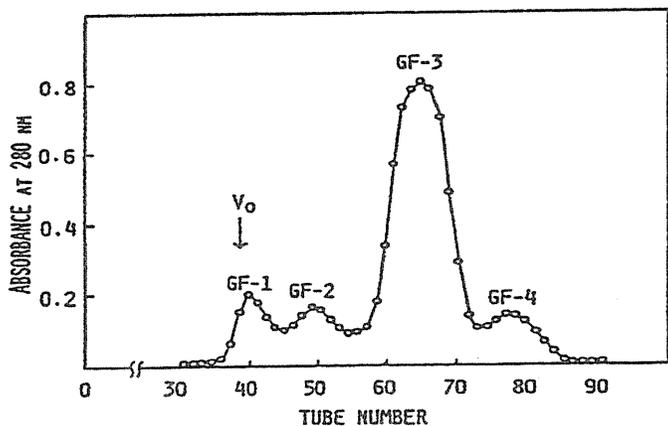


Fig. 3. Gel chromatography of SCM-proteins from whole fowl feathers.

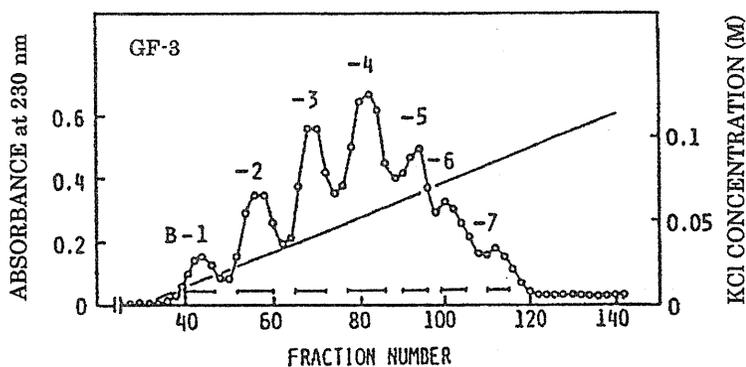


Fig. 4. DEAE-cellulose chromatography of the fraction separated from body feather barbs by gel chromatography.

4. Fig. 4 から得られた画分 B-1~7 および再 DEAE クロマトグラフィーで精製した画分 B-1~4 をディスクゲル電気泳動により調べた。Ornstein と Davis の方法に従い 4M 尿素を添加してゲル電気泳動を行い、各画分とも単一なバンドであることを確かめた。泳動後、10%トリクロロ酢酸で 1hr 処理し、0.04%クーマシーブリリアントブルー R-250 を含むメタノール：酢酸：H₂O(1:1:8)溶液で一昼夜タンパク染色した。脱色は、染色剤を除いた溶液を用いた。

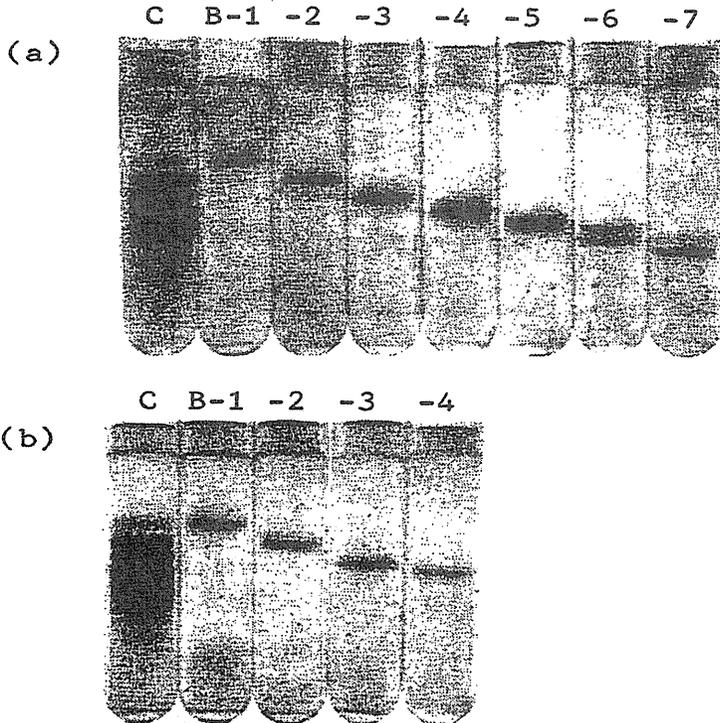


Fig. 5. Electrophoretic patterns of DEAE reactions (B1~7) and GF-3(C). a: initially chromatographed fractions, and b: rechromatographed fractions.

5. アミノ酸組成分析

装置は JEOL JLC-5AH アミノ酸分析機装置を用いた。Table 2 に全羽毛タンパク質，不溶性残渣と可溶化物を SephadexG-75 カラムで分離した画分 (GF-1~4) (Fig. 3) のアミノ酸組成を示した。表より溶解物はセリン，プロリン，そしてグリシンに富み，グルタミン酸，リジン，ヒスチジン，チロシン，メチオニンは不溶性残渣に比較的多く存在した。画分 (GF1~4) 中においてもアミノ酸の含有量の違いが見られ，GF-3, 4 にセリンが多く，GF-1 には少なかった。プロリンは GF-2 に多く，GF-1 は，やはり少なかった。GF-1 には他の画分と比較して，グルタミン酸，リジン，チロシン，そしてヒスチジンが多く存在していた。アスパラギン酸に関しても GF-2 では 100 残基当り 9.2，GF-3 では 100 残基当り 4.7 と偏りが見られた。GF-1 と不溶性残渣は類似した組成を示し，プロリン，セリン，グリシンが少なく，リジン，チロシンそしてメチオニンに富んでいた。リジン，チロシンそしてメチオニンなどはヘリックス構造を形成するのに好ましい残基とされており，これらの残基が不溶性画分には存在するが，主要成分である GF-3 には殆ど存在しないことから，羽毛タンパク質が α 型ではないことがわかる。

Table 2. Amino acid analyses of fowl body feather keratins and their fractions. Results uncorrected for destruction during hydrolysis; tryptophan not determined.

| Amino acid | Residues per 100 residues | | | | | | |
|---------------|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Whole feather | Insoluble residue | Whole extract | Fraction GF-1 | Fraction GF-2 | Fraction GF-3 | Fraction GF-4 |
| Lysine | 1.2 | 5.3 | 0.4 | 3.3 | 0.8 | 0.3 | 0.6 |
| Histidine | 0.3 | 1.4 | trace | 1.0 | trace | 0 | 0.6 |
| Arginine | 4.7 | 4.2 | 4.8 | 4.5 | 3.6 | 4.3 | 4.1 |
| SCM-Cysteine | 0 | 8.7 | 8.3 | 6.8 | 5.9 | 8.6 | 5.4 |
| Aspartic acid | 6.3 | 8.5 | 5.0 | 7.1 | 9.2 | 4.7 | 6.1 |
| Threonine | 5.3 | 6.2 | 4.5 | 5.2 | 4.9 | 6.1 | 4.7 |
| Serine | 15.7 | 8.1 | 14.6 | 9.8 | 13.4 | 16.4 | 16.4 |
| Glutamic acid | 8.6 | 11.3 | 7.7 | 11.3 | 8.2 | 7.5 | 8.3 |
| Proline | 11.7 | 7.5 | 11.8 | 8.7 | 12.8 | 11.4 | 11.5 |
| Glycine | 11.5 | 8.5 | 11.9 | 9.8 | 10.3 | 11.3 | 11.2 |
| Alanine | 5.6 | 5.8 | 5.3 | 6.3 | 5.8 | 5.2 | 4.7 |
| Cystine | 4.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Valine | 7.7 | 7.3 | 9.1 | 7.4 | 9.7 | 9.3 | 9.3 |
| Methionine | 0.3 | 1.2 | trace | 0.7 | trace | 0 | trace |
| Isoleucine | 4.3 | 4.0 | 4.9 | 4.4 | 4.7 | 5.0 | 4.7 |
| Leucine | 7.4 | 6.8 | 7.0 | 8.3 | 6.7 | 7.0 | 6.4 |
| Tyrosine | 1.6 | 2.8 | 1.2 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 2.5 |
| Phenylalanine | 3.6 | 2.4 | 3.5 | 2.9 | 3.0 | 3.4 | 3.5 |

Table 3. Amino acid composition of SCM-proteins fractionated from GF-3 of the body feather barbs of fowl. The values are given as residues of amino acid per 100 residues and are uncorrected for destruction during hydrolysis.

| Amino acid | Whole extract | GF-3 | B-1 | B-2 | B-3 | B-4 | B-5 | B-6 |
|---------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Lysine | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Histidine | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arginine | 4.6 | 4.5 | 5.0 | 4.8 | 4.8 | 4.7 | 4.6 | 4.3 |
| SCM-cysteine | 7.1 | 6.9 | 2.9 | 5.2 | 6.3 | 7.0 | 7.4 | 7.9 |
| Aspartic acid | 5.1 | 5.1 | 4.5 | 4.4 | 4.8 | 5.0 | 5.0 | 5.1 |
| Threonine | 5.0 | 5.1 | 5.1 | 4.8 | 4.8 | 4.9 | 4.9 | 5.1 |
| Serine | 17.3 | 17.7 | 18.6 | 18.3 | 18.3 | 17.9 | 17.7 | 17.3 |
| Glutamic acid | 7.7 | 7.7 | 8.1 | 7.7 | 7.8 | 7.7 | 7.6 | 7.6 |
| Proline | 12.1 | 11.9 | 12.3 | 11.8 | 11.6 | 11.6 | 12.1 | 12.5 |
| Glycine | 11.7 | 11.6 | 12.7 | 12.1 | 12.1 | 11.8 | 11.7 | 11.4 |
| Alanine | 4.9 | 4.8 | 5.5 | 5.2 | 5.1 | 4.9 | 4.9 | 4.7 |
| Valine | 7.8 | 7.8 | 8.0 | 7.8 | 7.5 | 7.7 | 7.8 | 7.8 |
| Methionine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isoleucine | 4.7 | 4.9 | 5.4 | 5.2 | 5.1 | 4.8 | 4.6 | 4.5 |
| Leucine | 6.9 | 7.0 | 7.1 | 7.0 | 7.3 | 7.3 | 6.9 | 6.8 |
| Tyrosine | 1.4 | 1.8 | 1.1 | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.3 | 1.5 |
| Phenylalanine | 3.5 | 3.6 | 3.7 | 3.6 | 3.7 | 3.7 | 3.6 | 3.4 |

3. 一次構造の比較

腹部 barbs の GF-3 画分を DEAE セルロースで分画し (B-1 ~6), 再クロマトグラフィーにより精製し一次構造の決定に用いた。そのアミノ酸組成を Table 3 に示す。各成分とも非常に良く似た組成を示していて, 羽毛ケラチンの可溶化物は極めて複雑な多成分系の低分子タンパク質混合物であることがわかった。ニワトリ, アヒル, ハト, トビ, キジの barbs (B-4) 成分について, 一次構造解析した結果を Fig. 6 に示す。五種羽毛の配列の比較から, 羽毛ケラチンの顕著な特徴が見出される。(1)シスチンが N 末端領域に局在している。すなわち, 半シスチンとして全体で 7~8 個のうち 6 個までが N 末端領域残基番号 (1~26) に集中している。(2)中央部領域残基番号 (30~80) はシスチンが全く存在せず, 疎水性アミノ酸が多く, 配列の相同性も非常に高い。(3)C 末端領域残基番号 (81~96) の配列は非常に変化に富んでおり, 類似性は 44% と低かった。以上のような, 一次構造上の特徴と Chou-Fasman [20, 21] による経験的な二次構造予測ソフト (GENETYX-SV/RC) を用いた結果を考え合わせると, 羽毛ケラチンのマイクロフィブリルを形成する領域は配列中央部の残基が関与しているものと思われる。

第2節 羽毛ケラチンの電気泳動的挙動と 種依存性²²⁾

前節で記述したように、可溶化羽毛ケラチンは分子量が約 10kDa と小さいが一分子中に 6~7 残基あるシステインが分子間架橋を形成して強固な構造を形づくっている。そしてそのジスルフィド結合を変性剤存在下に切断すると容易に可溶化し、それらは分子量的には均一であるがアミノ酸組成の類似した十数種以上の成分からなっていることが電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィーによる分析で明らかになっている[14-16]。さらに最近ニワトリ羽毛ケラチンの遺伝子の分析でケラチン遺伝子がファミリーを形成し、クラスターとして存在していることも明らかになってきた[23, 24]。

アミノ酸配列に関する研究では、これまでニワトリ[17]、ハトおよびカモ[18]、キジおよびトビ[25]の barbs とエミュー[26]、銀カモメ[27]の calamus の計 7 種の主成分に関するアミノ酸配列が報告されている。それらの約 100 アミノ酸残基の中央領域は疎水性残基に富み β シートを形成しやすい状態となっており、シスチン残基が N 末端領域に集中し、さらに C 末端領域にはアミノ酸置換が特に多いという共通した特徴を持っている。前節 Fig. 6 にまとめた 5 種の barbs ケラチンのアミノ酸配列の類似性は 82% であり、鳥類間での配列の違いは鳥類の進化と関係があるかもしれないと考えられた。そのような関連を調べるにはより多くのデータが必要であり、本研究では 23 種にわたる鳥類の羽毛ケラチンについてキャピラリー電気泳動で

の挙動を先ず調べた。その泳動パターンは種により異なり、ケラチンの多様性の程度が鳥類の進化を反映していること、および羽毛の形態学的に異なる部位のケラチンは別個の遺伝子群に由来していることがわかった。

1. 羽毛試料の調製

各部位に切断した羽毛約 10mg を小型試料管にとり、6M グアニジン塩酸／2mM EDTA／1.0M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) の 1ml に還元剤としてジチオスレイトール (DTT) 10mg を溶解して加えた。約 15 分間窒素ガスをパブリングして密栓をして、一夜 40°C 恒温水槽でインキュベートした。還元溶解した後モノヨード酢酸 24mg を加え 30 分間暗所に放置した。繊維状の不溶性残渣をピンセットで取り除き、溶液は透析チューブに入れて 4M 尿素に対して透析した。透析後、0.45 μ m のフィルター (Acrodisc, Gelman) でろ過して泳動用試料とした。実際の測定用試料の濃度は羽毛ケラチンの可溶性成分が 80~85%、さらに透析時の体積増加は約 0.5% (w/v) であった。

2. 装置および測定

装置は Waters 社 Quanta4000, 分離用キャピラリーとして内径 75 μ m, 長さ 60cm の熔融シリカチューブを用い、試料の注入は静水圧法 (10cm, 10sec) により約 15nl, 泳動電圧は 15kV, 検出は UV185nm で行った。泳動用緩衝液は 0.05M KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 緩衝液 (pH7.0) に 1.0M トリメチルアンモニウムプロピルスルホン酸 (AccuP-ure™ Z1-methyl, Waters) を添加したものをを用いた。測定を開始

する前にキャピラリーを 0.5M KOH で 5 分間、泳動用緩衝液で 10 分間平衡化し、さらに泳動用緩衝液で 20 分間予備泳動を行い、その後 20 検体連続分析を行った。ただし各検体の分析の前に 0.05M KOH 洗浄を 1 分間および緩衝液洗浄を 2 分間行った。

3. 結果と考察

3-1. ニワトリ羽毛ケラチンの分離

Fig. 7 にニワトリ barbs の泳動図を示してある。7 分から 10 分の間に現われているピークはケラチンのものであり小さいものまで含めると 13 ピーク程確認できる。また、6.5 分付近の大きなピークは 4M 尿素溶液のブランクテストから尿素そのもののピークであることが確認された。キャピラリー電気泳動によるこの分離パターンがイオン交換セルロースカラム (DE52, Whatman) から 4M 尿素 / トリス塩酸緩衝液で溶出したもの (Fig. 4) と殆ど同じであることは注目される。ケラチンは水溶性に乏しく、カルボキシメチル化した後でさえ尿素のない緩衝液で透析またはクロマトグラフィーをすると凝集し白濁してくる。したがってこれまでのケラチンの分離では試料溶液だけでなく使用する緩衝液中にも尿素の存在が必須であった。しかしキャピラリー電気泳動は緩衝液に尿素は存在せず、また試料溶液中の尿素は泳動中にケラチンと完全に分離していたにもかかわらず、ケラチンは凝集せずに理想的に分離した。これは分離が短時間で終了したことや、高濃度の両性電解質 (Z1 メチル) の存在が凝集を防ぐ役割をしていたためかもしれない。

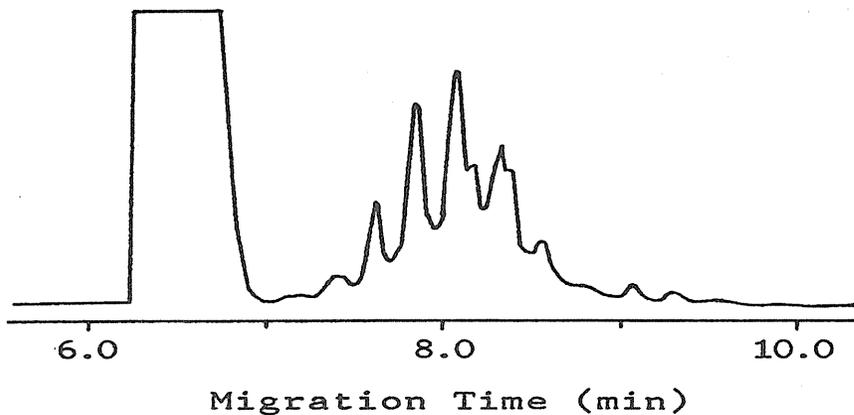


Fig. 7. Electrophoretogram of fowl feather barbs keratin by high performance capillary electrophoresis. The keratin sample solution (about 5mg/ml) was prepared by S-carboxymethylation in the presence of 6M guanidium hydrochloride and dialyzed against 4M urea solution. Electrophoresis conditions were as follows. Capillary : 75 μ m i.d. \times 60 cm, Buffer : 0.05M phosphate buffer (pH7.0) with 1.0M AccuPure™ Z1-Methyl reagent (Waters), Injection : 10sec hydrostatic (about 15nl), Voltage : 15 kV, Detection : UV 185 nm.

なお、還元アルキル化後 4M 尿素で透析せずそのまま分析した場合、ケラチンは分離せず幅広な一つのピークとして現われた。カルボキシメチル化に使用した高濃度の緩衝液および過剰の試薬の存在が分離に影響したと考えられる。

キャピラリー電気泳動法によるタンパク質の分析において、タンパク質のキャピラリー内壁のシラノール基への吸着は分離に悪影響を及ぼすことはよく知られている。本報告のカルボキシメチルケラチンは等電点が約3の酸性タンパク質であり、キャピラリーへの吸着はあまりないと考えられる。実際、pH7.0においてZ1メチルを添加した緩衝液としないものとの比較では分離に大きな違いはなかったが、添加したものの方が全体にピークが接近し、泳動時間もわずかに早かった。また、Z1メチルの添加により

泳動時間の再現性は大きく改善された（変動係数約 6%）。さらに安定したデータを得るためには初めにキャピラリーを十分にアルカリ洗浄した後 20 分間の予備泳動が効果的であった。

検出には 185nm の吸収を利用するのが有効であった。ケラチンにはトリプトファンがなく、10kDa の 1 分子中にチロシンが 1 個しか存在しないため紫外吸収が非常に弱い。185nm による検出感度は 214nm に比べて約 8 倍であった。

3-2. 各種鳥類 barbs の泳動パターンの特徴

測定した羽毛の鳥類名を Table 4 に載せてある。キジ目 4 種，チドリ目 6 種，スズメ目 7 種，ハト目，ガンカモ目

Table 4. List of 23 species tested of birds.

| Order | Species |
|---|---|
| キジ目 Galliformes | キジ Green Pheasant (<i>Phasianus versicolor</i>) |
| | ニワトリ Domestic Fowl (<i>Gallus gallus</i> var. <i>domesticus</i>) |
| | パラワンコクジャク Palawan Peacock-Pheasant (<i>Polyplectron emphanum</i>) |
| チドリ目 Charadriiformes | ライチョウ Rock Ptarmigan (<i>Lagopus mutus</i>) |
| | ウミネコ Blacktailed Gull (<i>Larus crassirostris</i>) |
| | ウトウ Hornbilled Puffin (<i>Cerorhinca monocerata</i>) |
| | ウミガラス Guillemot (<i>Uria aalge</i>) |
| | ウミスズメ Ancient Murrelet (<i>Synthliboramphus antiquus</i>) |
| | エトロフウミスズメ Crested Auklet (<i>Aethia cristatella</i>) |
| スズメ目 Passeriformes | ケイマフリ Spectacled Guillemot (<i>Cepphus carbo</i>) |
| | ハシブトカラス Jungle Crow (<i>Corvus macrorhynchos</i>) |
| | カケス Jay (<i>Garrulus glandarius</i>) |
| | オナガ Azurewinged Magpie (<i>Cyanopica cyana</i>) |
| | ムクドリ Grey Starling (<i>Sturnus cineraceus</i>) |
| | モズ Bull-headed Shrike (<i>Lanius bucephalus</i>) |
| | カワラヒワ Oriental Greenfinch (<i>Carduelis sinica</i>) |
| アオジ Blackfaced Bunting (<i>Emberiza spodocephala</i>) | |
| ハト目 Columbiformes | ハト Domestic Pigeon (<i>Columba livia</i> var. <i>domestica</i>) |
| ガンカモ目 Anseriformes | サケイ Pallas' Sandgrouse (<i>Syrhaptes paradoxus</i>) |
| | アヒル Duck (<i>Anas platyrhynchos</i> var. <i>domestica</i>) |
| コウノトリ目 Ciconiiformes | オンドリ Mandarin Duck (<i>Aix galericulata</i>) |
| キツツキ目 Piciformes | ゴイサギ Black-crowned Night Heron (<i>Nycticorax nycticorax</i>) |
| | アカゲラ Great Spotted Woodpecker (<i>Picoides major</i>) |

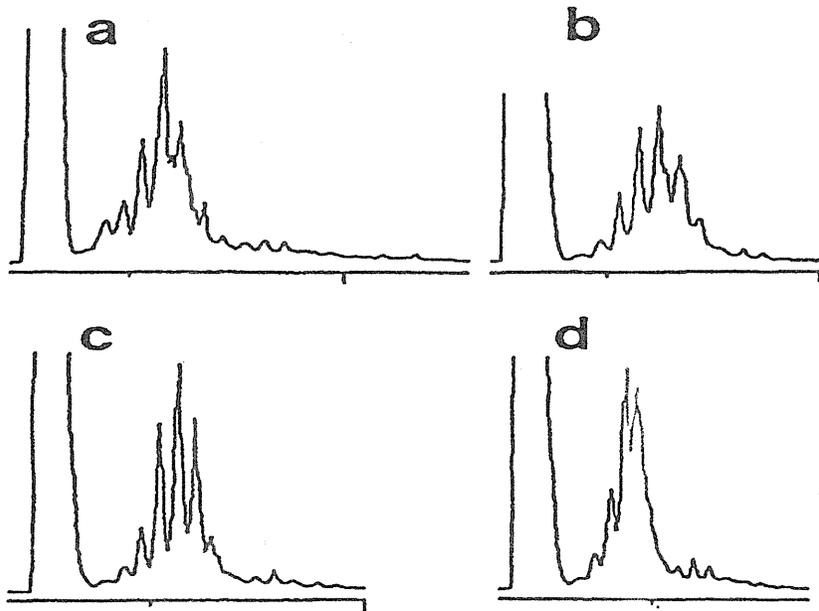


Fig. 8. Electrophoretograms of feather barbs keratins from birds in Galliformes. a : Green pheasant, b : Domestic fowl, c : Parawan peacock-pheasant, d : Rock ptamigan. Experimental conditions were the same as described in the legend to Figure 7.

各 2 種，コウノトリ目，キツツキ目各 1 種の 7 目 23 種の羽毛について測定した。

Fig. 8 にキジ目キジ科に属する 4 種の鳥類の泳動図を示す。ライチョウの泳動図 (Fig. 8d) は他のものよりピークが接近した形であるが、いずれも 5~6 の近接した主要ピークがあり、その 3 または 4 番目のピークが最大であることは類似している。さらに主要ピークの後に 5~6 の小さな成分が連続している。

Fig. 9 に 6 種のチドリ目鳥類の泳動図を示す。6 種のパターンはいずれもキジ目のものとはだいぶ異なっている。Fig. 9a に代表して示したように速く泳動される成分を F グループ、遅いものを S グループと名付けた。F グループ

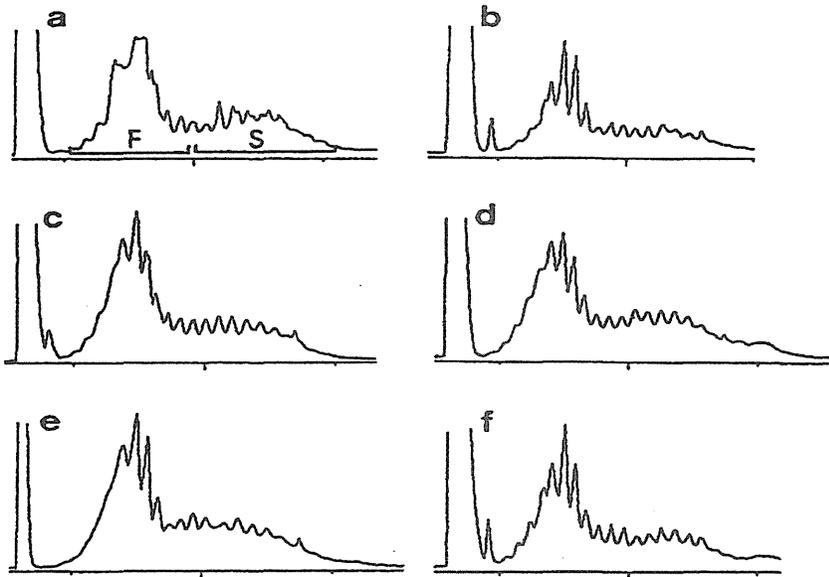


Fig. 9. Electrophoretograms of feather barb keratins from birds in Charadriiformes. a : Blacktailed gull, b : Hornbilled puffin, c : Guillemot, d : Ancient murrelet, e : Crested auklet, f : Spectacled guillemot. Bars in Figure 3a indicate Groups F and S. Experimental conditions were the same as described in the legend to Figure 7.

プの成分はキジ目の主要成分と同等の位置に現われているが、各成分の分布が異なり、前半は顕著なピークがなく徐々に昇り、後半にははっきりとしたピークが見られるのはキジ目と対照的である。また、Sグループのピークはキジ目よりかなり大きく約10成分のピークがほぼ同じ高さで現われている。6種のうちウミネコ (Fig. 9a) を除く5種はウミスズメ科に属し殆ど同一のパターンを示している。ウミネコのみがカモメ科でありFグループの分離がシャープでない。これがカモメ科の特徴である可能性があるがより多くのカモメ科のサンプルを検討する必要がある。

スズメ目 7 種の鳥類の泳動図を Fig.10 に示す。 Fig.9 と同様に Fig. 10a に代表して F グループと S グループの表示を示してある。 スズメ目はいずれも S グループのピークが顕著に大きくなっているのが特徴的である。 オナガ、カケス、ハシブトガラス (Fig.10a, b, c) は同じカラス科に属しパターンと成分比がよく似ている。 他の 4 種はすべて異なる科に属する。 アオジ (Fig.10g), モズ (Fig.10e) は明らかに F グループと S グループの成分比

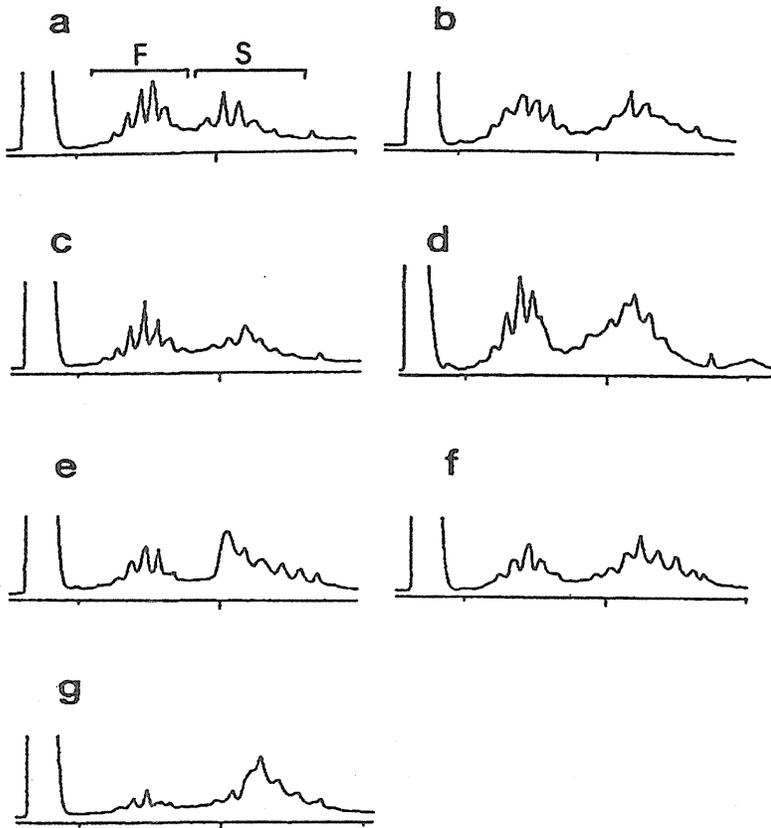


Fig. 10. Electrophoretograms of feather barbs keratins from birds in Passeriformes. a : Jungle crow, b : Jay, c : Azurewinged magpie, d : Grey starling, e : Bull-headed shrike, f : Oriental greenfinch, g : Blackfaced bunting. Bars in Figure 4a indicate Groups F and S. Experimental conditions were the same as described in the legend to Figure 7.

は逆転し、特にアオジは圧倒的にSグループの成分が多くなっている。スズメ目は基本的に類似した特徴を持っているながら、そのパターンはかなり多様性に富んでいる。これはスズメ目が鳥類ではもっとも進化が進み、種の多様性に富んでいることとも合っている。

Fig. 11 にハト目 2 種、ガンカモ目 2 種、その他の鳥類 2 種の泳動図を示す。アヒルとオシドリ (Fig. 11 c, d)

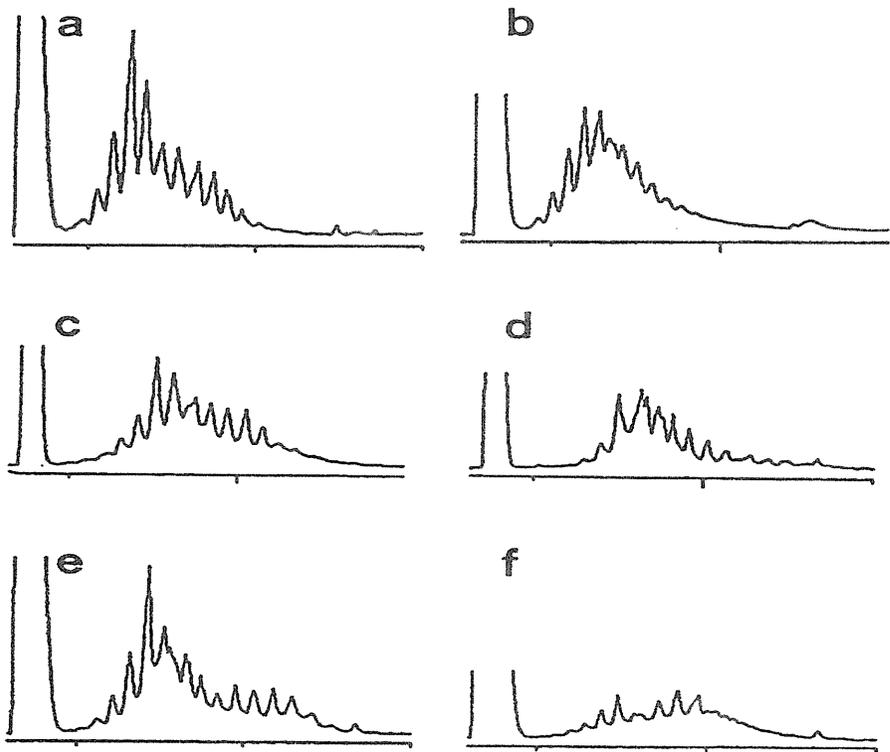


Fig. 11. Electrophoretograms of feather barbs keratins from other six birds. a : Domestic pigeon, b : Pallas' sandgrouse, c : Duck, d : Mandarin duck, e : Black-crowned night heron, f : Great spotted woodpecker. Experimental conditions were the same as described in the legend to Figure 7.

はキジ目と同様に S グループがないように見える。しかし F グループはキジ目のものより幅広で後半のピークがより顕著である。ハトとサケイ (Fig. 11a, b) はともにハト目で泳動パターンも基本的に類似している。しかし、科レベルではハト科とサケイ科と異なっており、同目同科のもの同士の類似性よりも劣っている。ゴイサギ (Fig. 11e) の S グループの現われ方はややチドリ目に似ているが F グループの前半のピークの分離がよい点は明らかに異なる。アカゲラ (Fig. 11) はまったく独特なパターンを示した。顕著な主成分が見当たらず小さなピークが連続している。そのケラチン分子または遺伝子はかなり独特なものかも知れない。

3-3. 各種鳥類羽毛 barbs の泳動パターンの比較

Fig. 12 にキジ目, チドリ目, スズメ目鳥類の泳動図を規格化およびパターン化して表してある。縦軸は全ピークの高さの総和に対する各ピーク高さのパーセント, 横軸は泳動距離を示す。各目ごとに S 成分の比率が顕著に異なることがわかる。更に Table 5 に F 成分と S 成分の比率を数値化してのせてある。全体に対する S 成分の比率はスズメ目 58.7%, チドリ目 37.9%, キジ目 14.6% となり明らかに有為な差が見られた。鳥類はキジ目, チドリ目, スズメ目の順に進化が進んでいると考えられている [28, 29]。そして S 成分の存在量が進化の程度に比例していることは明らかに S 成分が鳥類の進化を反映していると思われる。

また, S グループと F グループの主成分のアミノ酸配列分析からの比較においてはかなり置換が見られたが基本

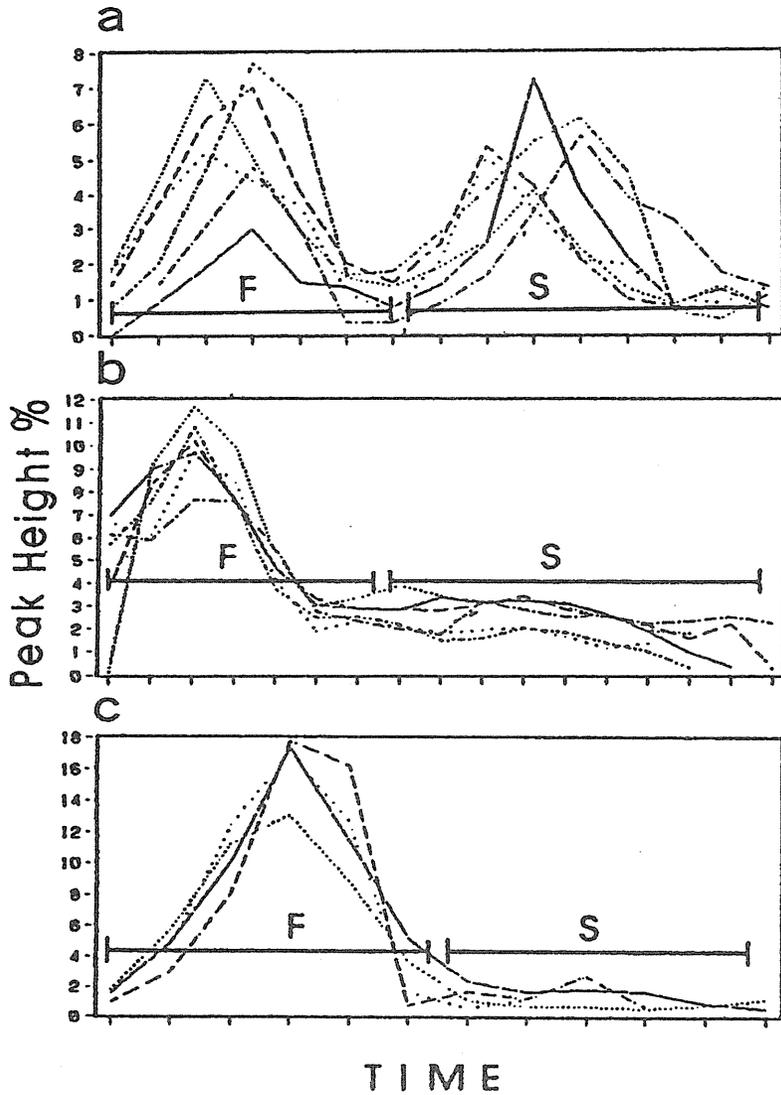


Fig. 12. Electrophoretic patterns of feather barbs keratins from birds of the three orders. a : Passeriformes, b : Charadriiformes, c : Galliformes. The vertical axis shows percentage of each peak height to total peak height. The horizontal axis is migration time of the peaks. Bars indicate the ranges of Groups F and S.

Table 5. Proportions of Groups F and S to total keratins. The values were obtained by summation of the values in the ranges of the bars F and S indicated in Figure 6.

| Order | Species | F(%) | S(%) |
|-----------------|----------------------|------|------|
| Passeriformes | Jungle Crow | 54.4 | 45.6 |
| | Jay | 56.6 | 43.4 |
| | Azurewinged Magpie | 54.3 | 45.7 |
| | Grey Starling | 39.9 | 60.1 |
| | Bull-headed Shrike | 28.3 | 71.6 |
| | Oriental Greenfinch | 38.6 | 61.4 |
| | Blackfaced Bunting | 19.5 | 83.3 |
| | Average | 41.7 | 58.7 |
| Charadriiformes | Blacktailed Gull | 60.5 | 39.5 |
| | Hornbilled Puffin | 63.8 | 36.2 |
| | Guillemot | 60.7 | 39.3 |
| | Ancient Murrelet | 59.8 | 40.2 |
| | Crested Auklet | 57.0 | 43.0 |
| | Spectacled Guillemot | 70.8 | 29.2 |
| | Average | 62.1 | 37.9 |
| Galliformes | Green Pheasant | 83.2 | 16.8 |
| | Domestic Fowl | 97.0 | 3.0 |
| | Peacock-Pheasant | 95.6 | 4.4 |
| | Rock Ptarmigan | 88.9 | 11.1 |
| | Average | 85.4 | 14.6 |

的なケラチンの特徴は保持していた(類似性:オナガ75%,モズ70%)。F成分はすべての鳥類が保有していること、および成分数においてSはFとほぼ同じことから考え、S成分は進化の過程で、F成分が重複したのかもしれない。タンパク質レベルでの存在量の差は遺伝子の数の差によるのか発現機構の違いによるのか又はその他の原因によるのかは遺伝子レベルでの解明を待たなければならない。

3-4. 羽毛の形態学的部位における差

ニワトリとムクドリ calamus の泳動図を Fig. 13 に示す。barbs の F グループとほぼ同じ位置に現れ泳動パターンもよく似ていた。barbs が鳥類の種間で顕著な差を示すのに対して calamus はパターンが単純で殆ど鳥類間の違いが見られない。特に barbs において見られた S グループの成分がスズメ目においてさえ見られなかったことは注目される。barbs の F 成分の泳動パターンと calamus のパターンは類似しているが同一遺伝子から由来するタンパク質分子ではない。実際、ニワトリ calamus の配列は barbs と異なっていた (未発表データ)。Presland ら [23, 24] はニワトリの羽毛ケラチン遺伝子 18 種がタンデムに並んでクラスターを構成していることを明らかにし、そ

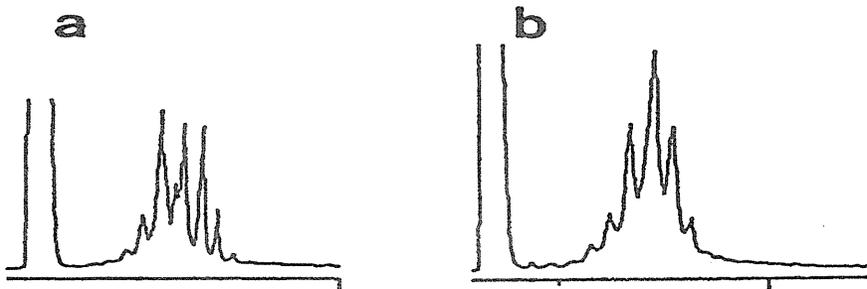


Fig. 13. Electrophoretograms of feather calamus keratins from fowl (a) and starling (b).

の内の 3 遺伝子の配列が barbs のものであることを明らかにした。ニワトリ barbs の成分数から考えて、それら 18 遺伝子はすべて barbs ケラチンのものであり calamus のものは含まれないと予想される。従って、calamus ケラチン遺伝子は別の遺伝子クラスターを構成し、羽毛発生の過程で発現調節も別に行われていると考えられる。

第3節 小括

羽毛タンパク質のジスルフィド結合を穏やかな条件で切断し、尿素存在下で可溶化してくる成分は以下の性質を示した。

ゲルろ過による主ピークは GF-3 である。この画分は可溶性成分のおよそ 70% を占めている。GF-3 画分は分子量的に均一で約 10kDa である。

各部位における GF-3 画分は、ディスクゲル電気泳動で確認すると主要成分が 4 種と少量成分が 17 種以上含まれていた。主要成分はゲルろ過、DEAE クロマトグラフィーを組み合わせることで完全に単離することが出来た。GF-3 画分を DEAE イオン交換クロマトグラフィーにかけ、単離した B-4 画分を一次構造解析に用いた。ニワトリ、ハト、アヒル、カモ、キジのアミノ酸配列を比較し (Fig. 6)、その中からニワトリ、ハト、アヒルの一次構造情報をまとめると Fig. 14 のようになる。

このように鳥類の可溶化物は類似性の高い低分子タンパク質の集まりであり、可溶化ケラチンはキャピラリー電気泳動によるパターン分析がケラチンを理解するうえで大変有効であった。分子進化を考察するには多くの種のタンパク質および遺伝子の配列を明らかにしなければならないが、それには多くの時間と労力が必要である。これまでデータ不足のためケラチンタンパク質と鳥類進化との相関があるのかどうか不明だったが、本研究の結果からかなり密接な相関がありそうであるということがわかった。また、ケラチンの構造解析をする場合イオン交換

クロマトグラフィーで精製する必要があるが、キャピラリー電気泳動で予め分離パターンを予測できることは大変有用である。

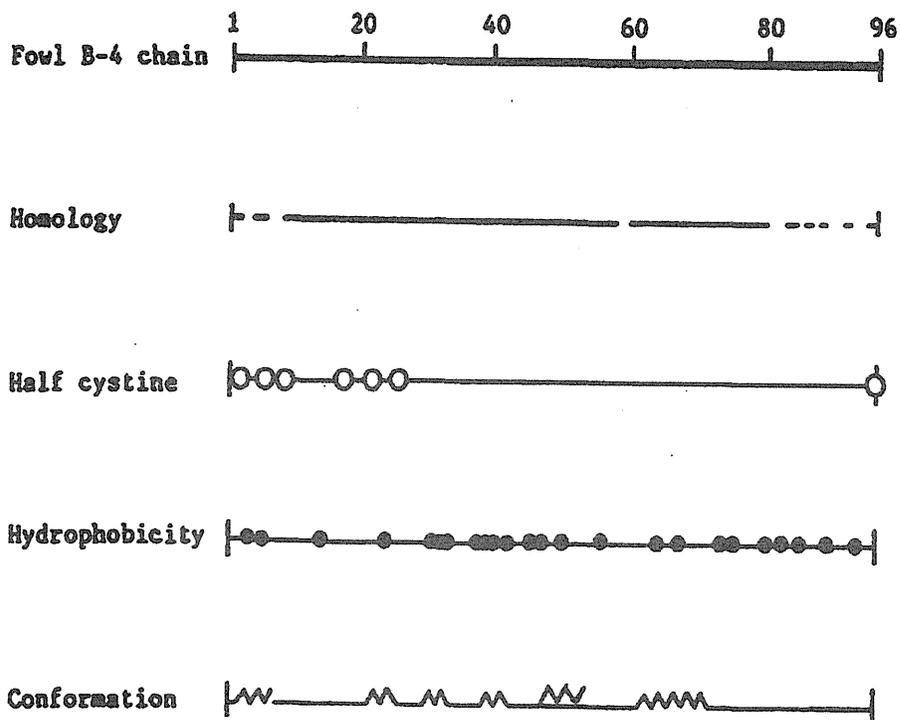


Fig. 14. Characterization of the primary structure of feather keratin. Homology; common amino acid residues among fowl, duck and pigeon B-4 are shown by bars. Half cystine; common half cystines among the above three species are shown by open circles. Hydrophobicity; hydrophobic residues (HI ≥ 3.0; Phe, Tyr, Val, Ile, Leu) in fowl B-4 sequence are shown by black dots. Conformation; Predicted β-sheets in fowl B-4 sequence are shown by zig-zag lines.

第2章 羽毛ケラチンの分光学的研究

第2章 羽毛ケラチンの分光学的研究

前章には羽毛ケラチンを化学的に処理し、ペプチド以外の結合を切断して可溶化したものについての研究をまとめた。生体におけるケラチンは多くの分子が集合することによって、物理的・化学的に強靱であるという特質を獲得している。従ってその特質を理解するには、試料を破壊せずに集合状態の高次構造を明らかにすることが重要である。

タンパク質の赤外吸収においてアミド I および II 吸収帯はタンパク質の二次構造を反映している。Susi ら [30, 31] は、球状タンパク質の水溶液の赤外吸収スペクトルを解析して X 線回折からの結果に近い二次構造成分を決定した。また、Fraser ら [8] は銀カモメの羽毛 rachis の X 線回折と赤外吸収分析から sheet model (Fig. 1) を提案している。

本章では結晶球状タンパク質の FT-IR 分析により得られた結果が、X 線回折の結果と比較して信頼できることを確かめ、羽毛 rachis および calamus に応用し、それらの定量的二次構造解析について記述する。また、rachis のラマン分光測定によりアミノ酸の側鎖および S-S 結合の存在状態について知見が得られたので記述する。

第1節 FT-IR による羽毛ケラチンの二次構造成分の研究

羽毛ケラチンの二次構造は、Lewis ら [32]、および

Chou-Fasman[20, 21]の方法により可溶性成分のアミノ酸配列データから推定した。アヒルの配列(Fig. 6)より β -sheet成分が約30%であり、銀カモメのrachis[8]とほぼ一致していた。ニワトリケラチンは、配列残基番号22-70の β -構造の多い領域に限ると β -sheet成分は約47%であった。そこで、羽毛ケラチンを化学的な処理をせずに直接測定する方法として、顕微FT-IRを選択し、モデルタンパク質として高次構造がよく分かっている球状タンパク質をとりあげ、タンパク質の二次構造を推測する手法としてFT-IRの有用性をまず検討した。次いで、羽毛ケラチンのFT-IRスペクトルから、二次構造成分を得たので記述する。

1. 試料の調製

羽毛は可溶化実験の前処理と同様洗浄、乾燥した。

ミオグロビン(Bovine Type II), リゾチーム(Chicken Egg White), コンカナバリンA(*Canavalia ensiformis*, Jack Bean)はSIGMA (St. Louis, MO)から購入したものをそのまま用いた。羽毛ケラチンcalamus, rachisはメスで注意深くスライスして、厚さ約 $10\mu\text{m}$ 以下を1枚のKBr結晶板(3mm x 3mm x 0.5mm)の上に載せ、その上にもう1枚のKBr結晶板を重ね合わせ、2枚の結晶板が剥がれない程度にハンドプレス機でシールした。

球状タンパク質は、試料量(約 0.01mm^2 , $0.5\mu\text{g}$)を上記と同様にKBr結晶板でシールした。

2. 装置および測定

装置は日本電子製フーリエ変換赤外分光光度計(JIR-5500), 顕微赤外ユニット(FI-IR-MAU110), 測定する前に分光部は乾燥空気で充填した。サンプルを顕微ステージ部分に置き, 口径(150 μm x 150 μm)に合わせて, KBr バックグラウンドを測定後, 試料の透過スペクトルを測定した。検知器は水銀カドミテルル(MCT)を液体窒素で冷却して用いた。測定パラメーターはビーム方式: シングル, 波数領域: 250~4200 cm^{-1} , 分解能: 4 cm^{-1} , スキャン回数: 500回, スキャン速度: 高速モード, アンプゲイン: オートゲインを用いた。

3. 結果と考察

3-1. 球状タンパク質の赤外スペクトルと解析

ミオグロビン(α パターン), リゾチーム($\alpha + \beta$ パターン), およびコンカナバリン A(β パターン)を代表タンパク質として IR スペクトルを測定し, Fig.15 に示した。

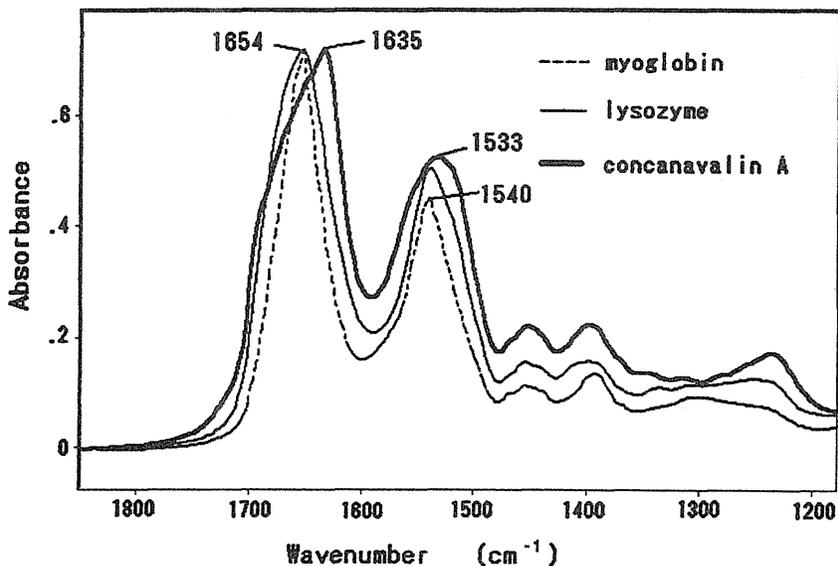


Fig.15. FT-IR spectra of myoglobin, lysozyme, and concanavalin A.

形状からもわかるように、ミオグロビンとリゾチームは 1654cm^{-1} に、コンカナバリン A は 1635cm^{-1} に極大吸収を示した。スペクトル解析には、骨格構造を形成するペプチド結合の C=O 伸縮振動をよく反映している、赤外アミド I 領域 ($1720\sim 1600\text{cm}^{-1}$) を用いた。

1) フーリエ・セルフ・デコンボリューション (FSD) による波形分離解析

FSD とは、見かけ上の分解能を上げ、幾つかの成分が重なり合っているバンドを個々の成分バンドに分解する方法である。Fig. 16 に FSD 処理したミオグロビンのスペクトルおよび Fig. 17 に、カーブフィットしたスペクトルを示した。それぞれの分離したピーク面積から成分比を算出する。

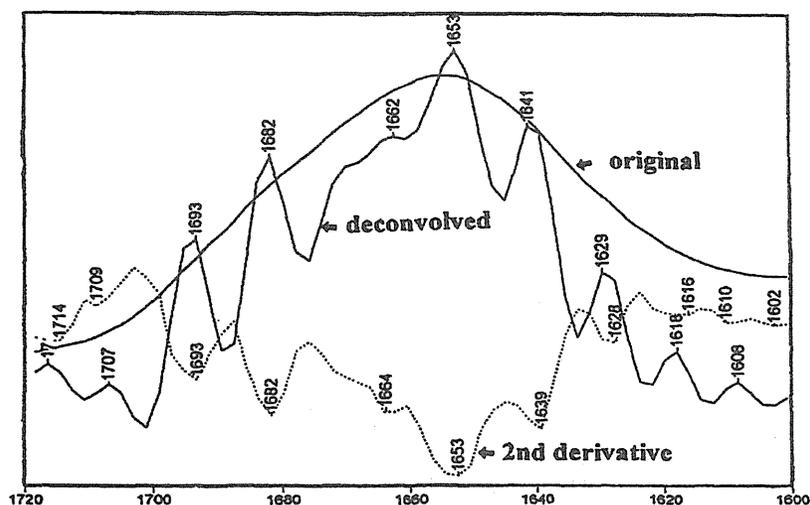


Fig. 16. FT-IR spectrum, deconvolved spectrum, and second-derivative spectrum of myoglobin.

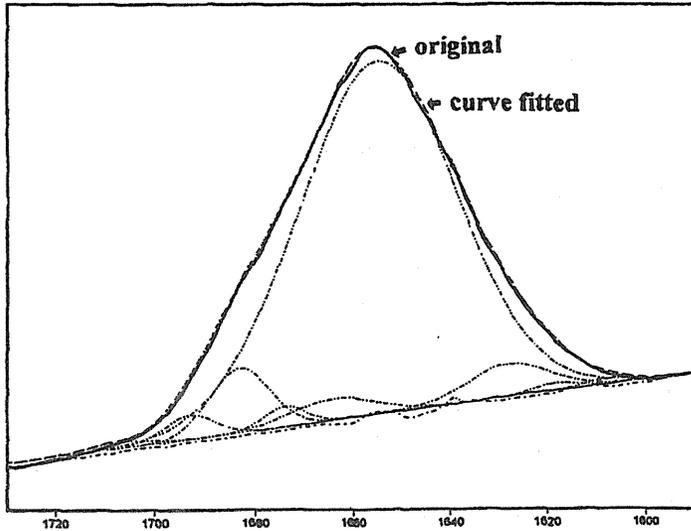


Fig. 17. Curve fitting carried out assuming Gaussian band shapes for deconvoluted components.

ミオグロビンのFSD処理に用いた各パラメータはアポダイゼーション関数, triangular; 半値幅(FWHH), 50cm^{-1} ; 分解能向上係数(K), 2.1である。FSD処理スペクトルを波形分離ソフトを用いて, ピークの数, 4; 形状, Gauss; 位置, 波数(cm^{-1}); 強度, 吸光度(absorbance); 半値幅を基に, 実測スペクトルと最もよく一致する値を, 最適化計算し, 個々のバンド成分を決定した。それらのバンド成分はDongら[33]の帰属(Table 6)に従った。ミオグロビンの成分は, α -helix 75.7%, β -sheet 7.6%, turn 16.7%であった。コンカナバリンAの成分も β -sheet 59.1%, turn 40.9%と主成分に関してはほぼ満足のいく値が得られた。しかし, FSDを用いた解析法はピーク位置を一意的に設定することができず, 解析に関し主観の入る可能性が生じた

ので、算術的に生じたピークを直接二次構造成分に帰属する二次微分法からも検討した。

Table 6. Estimation of the Secondary Structure of alpha, beta+extended, beta, turn, and other from Dong et al.

| mean frequencies | assignment | estimation |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 1610cm ⁻¹ | Phe | other |
| 1618cm ⁻¹ | Tyr | other |
| 1624cm ⁻¹ | β -sheet | β -sheet |
| 1627cm ⁻¹ | β -sheet | β -sheet |
| 1632cm ⁻¹ | β -sheet and extended chain | β -sheet |
| 1638cm ⁻¹ | β -sheet | β -sheet |
| 1642cm ⁻¹ | β -sheet | β -sheet |
| 1650cm ⁻¹ | unordered | other |
| 1656cm ⁻¹ | α -helix | α -helix |
| 1666cm ⁻¹ | turn | turn |
| 1672cm ⁻¹ | turn | turn |
| 1680cm ⁻¹ | turn | turn |
| 1688cm ⁻¹ | turn | turn |
| 1695cm ⁻¹ | β -sheet | β -sheet |

2) 二次微分解析

基本的には Fig. 16 から分かるように、FSD と殆ど同じ位置にピーク(谷)を検出した。このピーク高さ又は面積から成分比を算出する。二次微分法は Susi ら [30] により球状タンパク質のピーク高による算出が報告されている。ここでは、ピーク面積を用いて二次構造成分を算出した。

スペクトル解析には GRAMS/32, Ver. 5.0 を用い、スムーズは Savisky - Golay 関数 9 ポイントをかけ、更に二次微分は、Savisky - Golay 関数 7 ポイントをかけた。二次微分スペクトルにベースラインを引き、谷の面積を求めた。それらのバンド成分は先の Dong ら [33] の帰属に従い、ス

ペクトルを解析し、結果を Table 7 に示した。

Table 7. Secondary Structure Assignment of Protein Spectra.

| タンパク | α -helix | β -sheet | turn | other | 定量法 |
|----------------|-----------------|----------------|-------|-------|-----------|
| Myoglobin | 87 | 6 | 7 | ... | This Work |
| | 85 | 0 | 8 | 7 | X-線 |
| | 67~85 | 1~4 | 15~20 | 9~16 | CD |
| Lysozyme | 40 | 21 | 28 | 11 | This Work |
| | 45 | 19 | 23 | 13 | X-線 |
| | 29~45 | 11~39 | 8~26 | 8~60 | CD |
| Concanavalin A | 4 | 67 | 29 | ... | This Work |
| | 3 | 60 | 22 | 15 | X-線 |
| | 3~25 | 41~49 | 15~27 | 9~36 | CD |

結晶タンパク質から求めた二次構造の成分比は、X線解析の結果[33]とほぼ一致し、固体又は結晶状態のタンパク質に対してもFT-IR分析が信頼できることを示している。

このことより水溶液タンパク質の測定データに基づいたスペクトルの二次構造への帰属表が、固体試料に対しても適用できることが明らかになった。また、従来タンパク質の二次構造の簡便な測定法としてCDスペクトル法が使われてきた。Table 7にその値 Provencherら[34]も参考に載せた。 α -helixが圧倒的に多いmyoglobinに関してはX線回折の値に近いが、 β -sheetを含むタンパク質に対してはかなりの差が生じ、本研究の値の方がよい。このように近年のFT-IR装置の発達に伴い、赤外分光法は溶液のみでなく固体タンパク質に対しても信頼できる方法であることを示している。

3-2. 羽毛ケラチンの赤外分光測定

羽毛ケラチンの calamus と rachis の IR スペクトルを Fig. 18 に、二次微分スペクトルを Fig. 19 に示した。rachis および calamus のオリジナルスペクトルは非常によく似ており、アミド I 吸収帯の極大吸収が 1655cm^{-1} を示し、一見したところ β -sheet に富むコンカナバリン A よりも α -helix の多いミオグロビンに似ていた。しかし二次微分法による波形解析では球状タンパクの α -helix

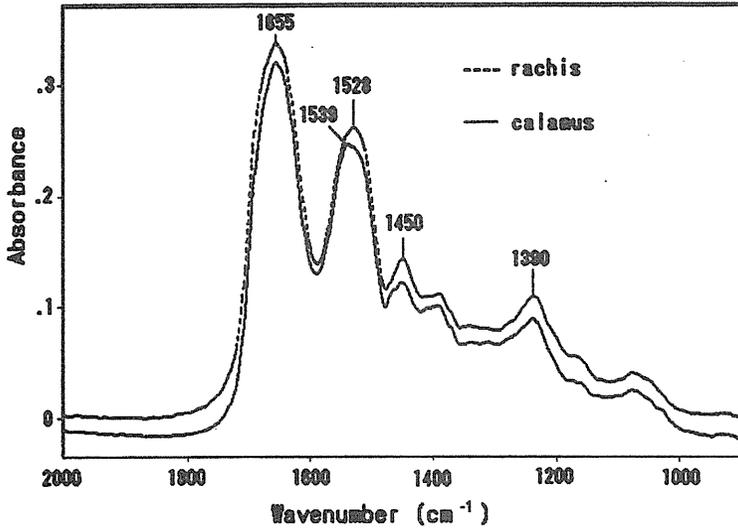


Fig. 18. FT-IR spectra of dry Rachis and Calamus.

成分とは異なっており、また羽毛ケラチンに α -helix は存在しないという X 線回折の報告 [8] を考慮して、二次構造は rachis に対して β -sheet; 80.5%, α -helix; 15.2%, turn; 3.1%, other; 1.1% calamus については β -sheet; 82.1%, α -helix; 15.6, turn; 0.4%, other; 2.0% と判定した。

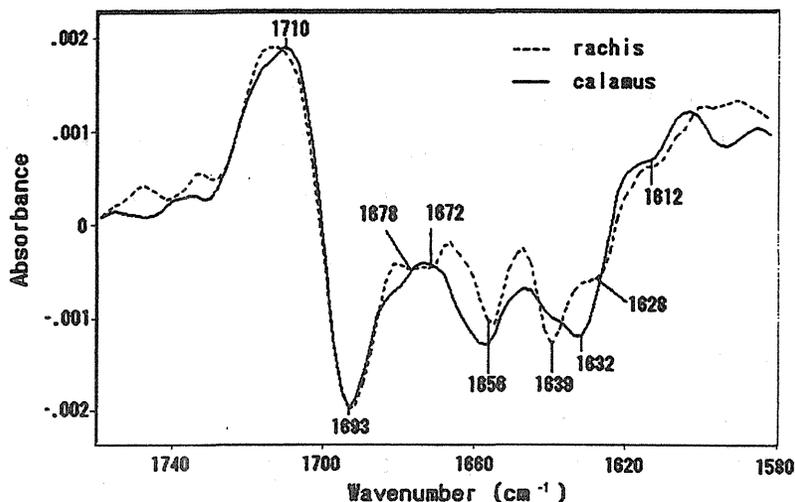


Fig. 19. Second-derivative FT-IR Spectra for dry Rachis and Calamus.

ここでは便宜的に β -sheet と述べたが明らかに羽毛ケラチンの β -sheet 構造は球状タンパク質のそれと同一ではない。Astbury [3]がX線回折データに基づいて羽毛のパターンを β パターンと区別して ϕ パターンと報告したが赤外吸収においても、それを裏付けるものとなった。また Fraser [8]は羽毛ケラチンのシートがらせん状にねじれている twisted-sheet model を提案しているが、本研究の α -helix 約 15% という値はその sheet の twist を反映しているのかもしれない。

Tsuboi ら [36] は羽毛 barbs を FT-IR で測定し、 β 成分を 50%, unordered 成分を 50% と報告おり、本研究の rachis および calamus の値とはかなり異なる。rachis および calamus は羽毛の軸を構成しており物理的強度は barbs より高い。それは高い β 分量に由来していると考えられる。また、第 1 章において述べたように、barbs から単離された B-4 に関して、Chou-Fasman 法による一次構造に基づいた二次構造の予測では β -sheet が約 30% で

あり, Tsuboi らの値とかなりの差がある。これには二つの可能性が考えられる。第一は予測法の信頼度の問題である。これはX線回折法により立体構造が明らかになったいくつかの球状タンパク質の二次構造中のアミノ酸存在確率に基づいている方法である。繊維状タンパクのケラチン等に用いることは適切ではないかも知れない。第二は barbs 中には一次構造が決定された以外の成分, 例えば不溶性部分などに β -sheet を高含量に持つ成分があるかも知れないことである。

第2節 羽毛ケラチンの側鎖成分のラマンスペクトル

タンパク質の芳香族アミノ酸側鎖は、高い特性ラマン光を与えることが知られている[37-41]。羽毛ケラチンの構造が、 β -構造で存在することは、X線回折や分光学的研究によって既に明らかにされている[8, 42-44]が、側鎖の構造についてのラマン研究はこれまで全く行われてこなかった。ここでは比較的配向性に富む構造[3]を持つことで知られている羽毛ケラチン rachis の側鎖の状態について調べた結果を記述する。

1. 実験

試料調製

第1章で調製した試料を、さらに乾燥エーテルで2日間還流して不純物である蛍光物質を抽出除去した。乾燥羽毛を形態学的部位に、rachis, barbs そして calamus に Schroeder ら[19]の述べた方法に従って切り分け、rachis を分析に用いた。なお重水素化は乾燥 rachis の 0.1 g を 5 ml の D_2O に浸け、真空封管アンプル中で $40^\circ C$ 7日間放置した。羽毛試料は、 $H \rightarrow D$ 交換に数日を要するという報告[45, 46]があるため、7日間重水素化処理後凍結乾燥した。

2. 装置及び測定

装置は JASCO NR-1800 ラマン分光計：励起光 488nm (Coherent Innoa 70 Ar^+ レーザー), 70mW, スリット幅 6 cm^{-1} , スキャタリング 90° を用いて測定した。試料の蛍光を減らすために測定する前に低出力レーザーで照射した。

3. アミノ酸分析

ネイティブ羽毛に 3%メルカプト酢酸を含む蒸留塩酸を加え、110°C、24、48そして72時間真空下で加水分解しそれぞれをアミノ酸分析計で測定した。トリプトファンは Penke ら[47]の方法により定量した。

4. 結果と考察

ネイティブ rachis と重水素化 rachis のラマンスペクトルを Fig. 20 に示し、帰属は Table 8 にまとめた。

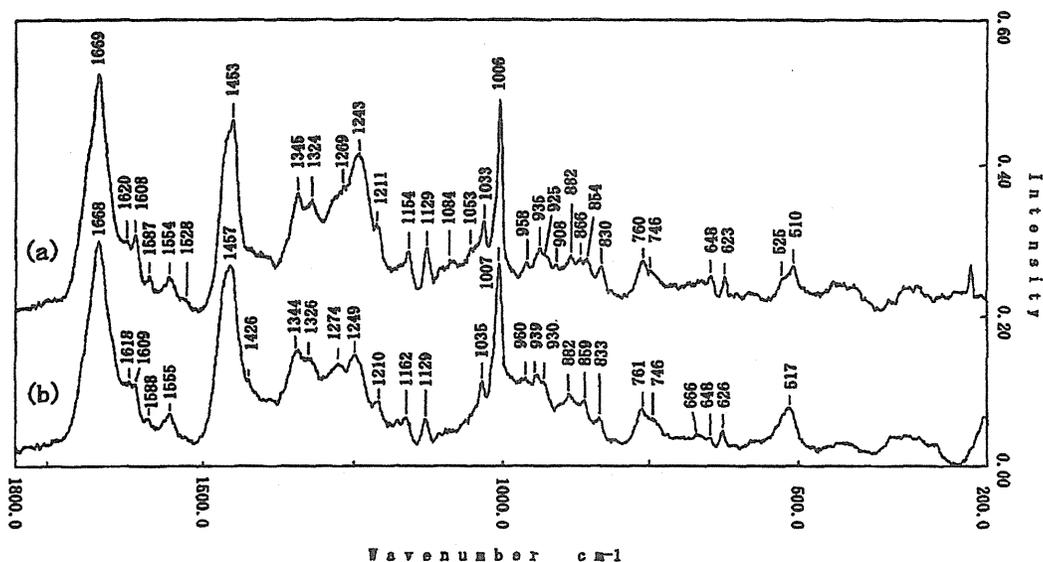


Fig. 20. Raman spectra of native (a) and deuterated (b) feather rachis in the solid state.

Table 8. Raman spectra of native and deuterated rachis from fowl feather

| cm ⁻¹ | | | | | | Tentative Assignment ^b |
|---------------------|----|----|-------------------------|----|----|--|
| Native ^a | | | Deuterated ^a | | | |
| 510 | M | br | | | | ν (S-S) { GGG GGT |
| | | | 517 | M | br | |
| 525 | W | sh | | | | Phe(F6b) Tyr(Y6b) |
| 623 | W | s | 625 | W | s | |
| 648 | W | sh | 648 | VW | sh | ν (C-S) { P _H P _C |
| | | | 666 | VW | br | |
| 746 | W | sh | 746 | W | br | Trp(W18) |
| 760 | M | br | | | | Tyrosinedoublet { (Y1) (2Y16a) |
| 830 | W | s | 832 | W | sh | |
| 854 | W | sh | 857 | W | sh | |
| 866 | W | | | | | |
| 882 | W | br | 882 | W | br | Trp(W17) |
| 908 | VW | | | | | ν (C-C) + Amide III |
| 925 | W | sh | | | | |
| 935 | W | br | 932 | W | br | |
| 958 | VW | br | 962 | VW | br | |
| 1006 | S | s | 1006 | S | s | Phe(F1) and Trp(W16) |
| 1033 | W | s | 1034 | W | s | Phe(F18a) |
| 1053 | VW | sh | 1053 | W | sh | ν (C-N) |
| 1084 | VW | br | 1095 | VW | br | |
| 1129 | W | | 1129 | W | s | |
| 1159 | W | br | 1160 | VW | br | ν (=C=C) (β-carotene) |
| 1211 | W | sh | 1210 | W | sh | Tyr(Y7a) and Phe(F7a) |
| 1243 | S | br | | | | |
| | | | 1249 | M | br | Amide III + Tyr(Y7a) |
| 1269 | M | sh | | | | |
| | | | 1274 | M | br | |
| 1324 | M | br | 1324 | | br | C-H deformation |
| 1345 | M | br | 1344 | M | br | |
| 1453 | S | s | 1454 | S | s | δ (CH ₂), δ (CH ₃) |
| 1528 | VW | br | | | | (-C=C-) (β-carotene) |
| 1554 | W | br | 1555 | W | br | Trp(W3) |
| 1587 | VW | br | 1588 | VW | br | Phe(F8b) |
| 1608 | W | s | 1611 | VW | sh | Phe(F8a) |
| 1620 | VW | | | | | Tyr(Y8a) and Trp(W1) |
| 1669 | S | s | 1668 | S | s | Amide I, Amide I' |

^a Abbreviations used in the table of Raman lines: intensity: S(strong), M(medium), W(weak), VW(very weak); shape: s(sharp), br(broad), sh(shoulder)

^b Vibration: ν (stretch), δ (deformation), Trp or W(tryptophan residue), Tyr or Y(tyrosine residue), Phe or F(phenylalanine residue)

Table 9. Amino acid analyses of fowl body feather parts

| Amino acid | Residues per 100 residues | | |
|------------|---------------------------|--------|-------|
| | Calamus | Rachis | Barbs |
| SCM-Cys | 6.01 | 6.60 | 6.98 |
| Tyr | 1.98 | 1.35 | 2.58 |
| Phe | 3.02 | 3.64 | 3.74 |
| Trp | 0.76 | 0.42 | 0.45 |
| His | 0.58 | 0.29 | 0.68 |

ペプチド骨格振動によるアミド I とアミド III の帰属は Hsu[48]に基づいて行った。ラマンスペクトルで強い振動が見られる芳香族側鎖はニワトリ腹部羽毛ケラチン中に4種あるが、シスチンの存在量とくらべて低い(Table 9)。

トリプトファン残基を含んだタンパク質の3置換インドールリングから現れるラマンバンドは、羽毛 rachis(Fig. 20a)から4つのトリプトファンピーク、即ち1620(チロシンのY8aがオーバーラップしたW1), 1554(W3), 882(W17) 760 cm^{-1} (W18)が観察された。W1~18と波数の帰属はFig. 21にまとめて示した[41]。

RachisのW3波数に対する絶対値の値をMiura[49, 50]らの関係式を用いて求めると約 103° であった。この高い値はアミノ酸骨格の C_α 原子とインドールリングの C_2 原子とは離れる方向に向いていることを示唆している。

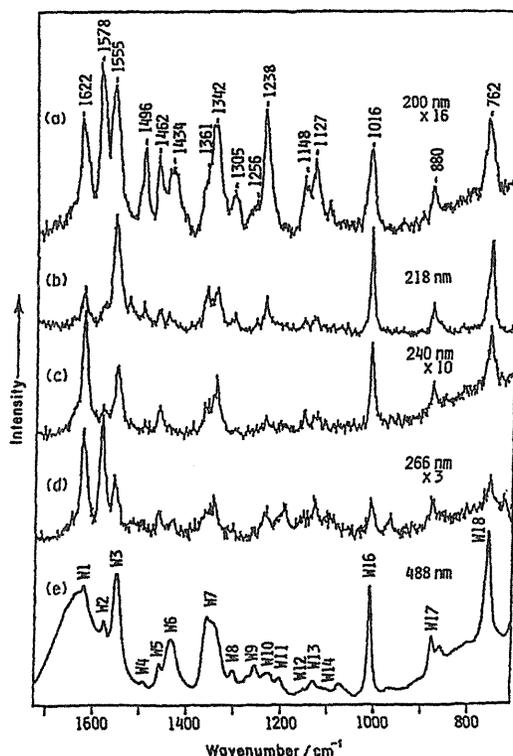


Fig.21. Resonance Raman spectra of aqueous L-tryptophan (1 mM) with (a) 200-, (b) 218-, (c) 240-, and (d) 266-nm excitation and (e) the Raman spectrum with 488-nm excitation (pH 6.8, 40 mM). Resonance Raman spectra reprinted with permission from Rava and Spiro, *J. Phys. Chem.*, **89**, 1856. Copyright (1985) American Chemical Society.

N_1H 振動は、rachis では 882 cm^{-1} に観察されたので、水素結合の形成は弱いものと思われる [51, 52]。 N_1 サイトを重水素化すると約 20 cm^{-1} シフトダウンするが、rachis の場合、試料を 7 日間重水素化したにも拘らず Fig. 20b に見られるように、 880 cm^{-1} 付近はそのまゝで、 20 cm^{-1} のずれが見られなかった。 このことから N_1 サイトは重水が置換できない環境構造を形成しているものと思われる。

羽毛 rachis の観測結果 (Fig. 20a) からは強度比 10:7 の

510 と 525 cm^{-1} (肩)の二つのバンドが見られた。タンパク質の-S-S-架橋結合の回転異性, X-C-S-S-C-YグループのS-S伸縮振動数の帰属は, ゴーシュ-ゴーシュ-ゴーシュ(GGG)形は約 510 cm^{-1} , トランス-ゴーシュ-ゴーシュ(TGG)形または(GGT)形は約 525 cm^{-1} ; トランス-ゴーシュ-トランス(TGT)形は約 540 cm^{-1} と Sugeta ら [53, 54]により報告されている。したがって, ネイティブ羽毛 rachis はモル比 10:7 のGGG と GGT(or TGG)形の二つのアイソマーを持つことが推測できた。羽毛 rachis を重水素化したときは, Fig. 20bに見られるように二つの S-S は合体して 517 cm^{-1} に一つの大きなピークとして現われた。波数と強度の変化はおそらく S-S 架橋の幾何学上の変化が重水素化の過程で生じたものと思われる。含硫アミノ酸, 即ちシスチン, システイン, メチオニンの三つは C-S 伸縮バンドを 630-760 cm^{-1} に与える。これら三残基のうち, 羽毛ケラチンにはシステインは存在せず, また, Table 9 に示してあるようにメチオニンは非常に少ない。この領域で観察されたバンドはシスチングループに帰属して差し支えないと思われる。トランス X-C-CH₂-S の構造とジアルキル-ジスルフィドの C-S 伸縮振動との相互作用から, X が水素(P_H)のとき, C-S 伸縮振動の波数は 630-670 cm^{-1} 付近に, X が炭素(P_C)のとき 700-745 cm^{-1} に現れる [41, 53, 54]。Fig. 20a より 746 cm^{-1} のショルダーは C-S 伸縮振動の P_Cに帰属でき, トリプトファンの W18 バンド 760 cm^{-1} とは, はっきりと分かれていた。重水素化によって, これら二つのバンドは合流してブロードなバンド 746 cm^{-1} になったと考えられる。

第3節 小括

球状タンパク質の結晶固体試料を FTIR で測定し、アミド I 領域の波形解析から二次構造の成分比を推定することが可能であった。その値は CD スペクトルからのものより結晶 X 線回折のデータに近いものが得られた。スペクトルの二次構造への帰属は水溶液試料に基づいたものを使用したのが固体試料に対しても有効であった。

羽毛 rachis と calamus の赤外吸収スペクトルは 1655cm^{-1} に極大吸収を持ち、 α -helix の多いタンパク質のものに似ていたが、波形解析し β -sheet 様構造と判定した。明らかに羽毛ケラチンの sheet 構造は球状タンパク質のものとは異なると考えられる。Rachis, calamus とも sheet 構造の成分比は約 80% と推定した。

また、rachis についてラマンスペクトル ($400 - 1800\text{cm}^{-1}$) を観測した。その中で、トリプトファンの W17 バンドは 882cm^{-1} に現れ、 N_1H 基のインドール環が弱い水素結合状態にあることがわかった。また、それが重水素により置換されなかったことより水分子が接近できない位置に存在していると考えられる。ケラチン分子の集合に重要な役割を果たしていると考えられるジスルフィド結合に関するピークも 510 および 525cm^{-1} に観測され、GGG 形と GGT (or TGG) 形が共存していると考えられた。初めてラマンスペクトルによるアミノ酸側鎖の情報が得られた。しかし、それらが羽毛ケラチンの全体構造の中でどのような役割を果たしているかは、明らかではなく、今後の研究を待たなくてはならない。

第3章 羽毛ケラチンの熱的性質に関する研究⁵⁵⁾

第3章 羽毛ケラチンの熱的性質に関する研究⁵⁵⁾

第2章で羽毛ケラチンには一般球状タンパクにみられる β -sheetとは異なる羽毛特有のsheet構造が多く存在していることを述べた。そしてそれが羽毛の物理的強靱さを維持する役割を果たしていると考えられる。本章では実際に羽毛ケラチンの構造安定性を測定する一方法として加熱による構造変化をFT-IRと示差走査熱量計(DSC)で検討した。FT-IRは試料室にホットステージを組み込むことにより、加熱による構造変化が赤外吸収の変化としてリアルタイムに観測でき、DSCは構造変化を反映する熱の出入りを直接観測できる点で最適である。

第1節では球状タンパク質の固体ミオグロビンをFT-IRで測定し、加熱による二次構造の変化を述べた。第2節では羽毛calamusの加熱FT-IRを行い、ミオグロビンの熱安定性と比較した。第3章ではDSCによりbarbs, rachis, calamusそれぞれについて乾燥、湿潤、尿素浸漬状態の試料を測定し、各部位の熱安定性の差と水および尿素の影響を述べた。さらに、湿潤試料を機械的に磨砕し、高次構造が変化するかどうかを試みた。

第1節 固体状態における熱変性ミオグロビンの FT-IR による構造研究⁵⁶⁾

1. 試料の調製

ミオグロビン(Bovine Type II)はSIGMA (St. Louis, MO)から購入したものをそのまま用いた。

試料調製は、第2章第1節の試料調製と同様にKBr結晶板に挟んでシールした。

2. 装置および測定

装置は第2章第1節に記したものにミクروسコープホットステージ(Mettler, FP-82)を組み合わせた。熱分析コントロールユニット(Mettler, FP-90)により温度調整した。

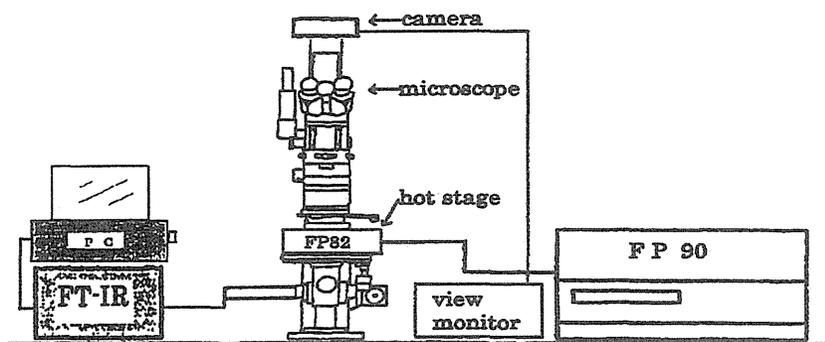


Fig. 22. Microscope FT-IR equipped with a thermo-optical FP82.

また、加熱分析システムの温度プログラムは Table 9 と Table 10 のバッチメニューを併用して 30–200°C におけるスペクトルを測定した。データ処理には、JEOL の JX ソフ

トウェア及び NEC PC9801RX を用いた Lotus 1-2-3 で行った。なお、SD、波形分析はそれぞれ Table 11, 12 に示してあるパラメータを用い実施した。

Table 10. Autostepwise Method

| | |
|-------------------|-------------|
| Start temp. | : 30.0°C |
| Rate | : 5.0°C/min |
| End temp. | : 200°C |
| Time iso | : 4.0min |
| Waiting | : 120sec |
| Stop after event | : Yes |
| Afterwards | : At T end |
| Link to method nr | : |

Table 11. FT-IR Automatic Analysis Batch

| | |
|-------------------|-----------------|
| 1. Wait C1, 120 | 6. Fill line |
| 2. Loop V1 | 7. Save file |
| 3. Measure sample | 8. Wait C2, 120 |
| 4. Move | 9. Loop end |
| 5. Option 25 | 10. End |

Table 12. Self deconvolution Parameter

| | |
|---------------------------|-----------|
| Apondazuation | |
| Full width at half-height | : 20.00cm |
| Length of interferograms | : 0.050cm |
| Enhancement factor (K) | : 2.100 |

Table 13. Wave-analysis parameter

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Absorption region | : 1750-1610cm ⁻¹ |
| Base region | : 1710-1480 cm ⁻¹ |
| Final fits | : 0.001 |

3. 結果と考察

Fig. 23a はミオグロビンの 30℃ から 200℃ までの温度範囲で測定したアミド I, II 領域の吸収スペクトル曲線を重ね書きしたものである。この重ね書き曲線を見ると、一見してミオグロビンの二次構造が熱変性を受けていることが分かる。アミド I 吸収バンドのスペクトル曲線は 80℃ で、 1654 cm^{-1} を頂点とする正規分布型を示しているが、温度上昇に伴い山の形は崩れ、やがて 1664 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} を頂点とする明りょうな二つのピークに分かれてい

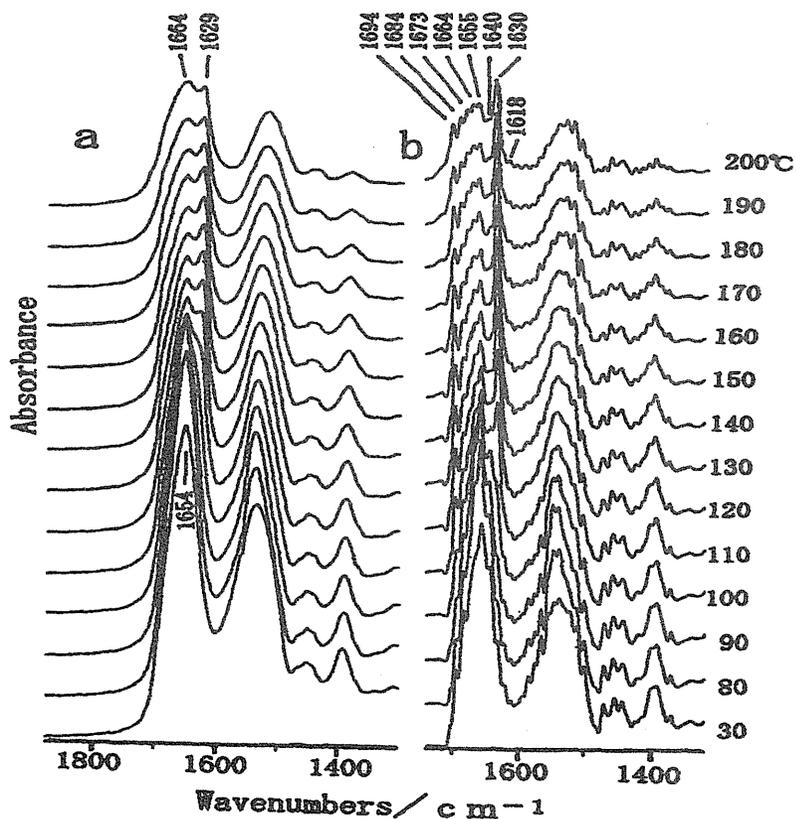


Fig.23. Temperature dependence of the amide I and II bands of myoglobin in the solid state
a: spectra without self-deconvolution; b: deconvolved spectra

る。

これは 1654cm^{-1} の吸収バンドが熱変性を受け低波数側の 1629cm^{-1} にシフトしたためと考えられる。そこで、この変化の過程をより明確なものとするため、 30°C で与えられているスペクトル曲線を対照とし、各温度における曲線の差スペクトルを描いた。これらの差スペクトルを多重表示したのが Fig. 24 である。Fig. 24 から温度依存性の高い吸収帯は 1653cm^{-1}

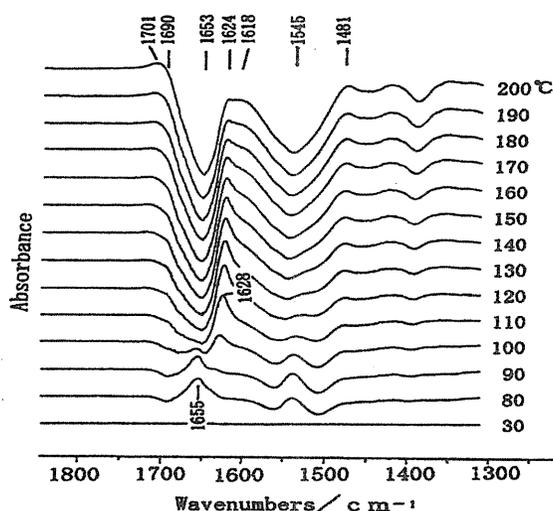


Fig. 24. Difference spectra in the amide I and II regions of myoglobin in solid state
The spectrum observed at 30°C was subtracted from the spectra observed at the temperatures indicated. Above 80°C temperature intervals were 10°C .

と 1628cm^{-1} の2つであることが分かる。 1653cm^{-1} の吸収帯は 30°C から 80°C 近くまで、いったん上昇し、その後、減少に転じている。もう一方の 1628cm^{-1} の吸収帯は 90°C 付近から上昇を始め、 130°C 近くまでその傾向は続き、 130°C を過ぎると

ピークの形が変わるとともに 1618cm^{-1} に肩バンドが見られるようになった。このことから、高温領域において、再度の変性が予測される。また、 α -helix の減少がアミド I 領域 (1653cm^{-1})、アミド II 領域 (1545cm^{-1}) でも生じていることから α -helix が変性していることが確認された。さらに定量性を持たせるために、 1628cm^{-1} 、 1653cm^{-1} の両ピーク高さの変化を 80°C から 200°C までのそれぞれ

れの温度に対してプロットした。これが Fig. 25 である。

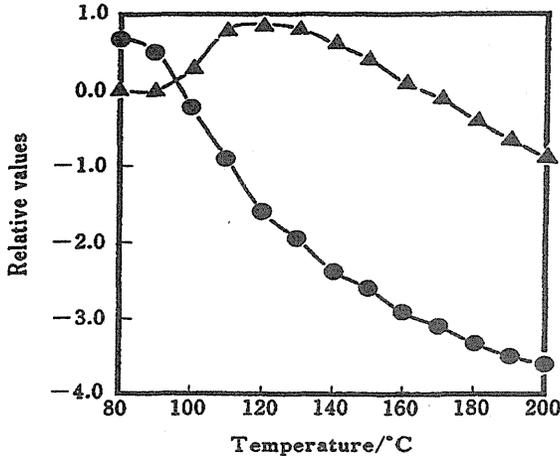


Fig. 25. Plots of the 1653 cm⁻¹ (●) and 1628 cm⁻¹ (▲) peak heights of difference spectra in Fig. 23. against temperature.

これをみると、1653 cm⁻¹ が 80°C 以上で一方向的に減少しているのに対し、1628 cm⁻¹ は 90°C 付近から上昇を始め、120°C で頂点に達し、以後下降線をたどっている。したがって、1628 cm⁻¹ のこの減少曲線は再度の変性が起き

ていることを示唆している。これらの結果より、ミオグロビンの固体状態における二次構造の変化は 1653 cm⁻¹ から 1628 cm⁻¹ へのシフトであり、90°C 付近から急激に進行していることが分かる。さらにまた、いったん生成した 1628 cm⁻¹ は 120°C 付近から再度の熱変性を受けていることが分かる。Yamamoto ら [57] のリボヌクレアーゼ A の溶液状態での変性が 58°C であることとは大きく相違している。次いで、ミオグロビンのアミド I 吸収帯をフーリエ・セルフ・デコンボリューション (FSD) 処理して、二次構造の推定を行った。FSD は見かけ上の分解能を上げ、幾つかの成分の重なり合っているバンドを個々の成分バンドに分解する方法であるが、波形分析に支障をきたさない程度の条件 (Table 12) で行った。Fig. 23b は FSD

処理した吸収スペクトル曲線を多重表示したものである。未変性状態 (30°) のアミド I バンドからは 1619 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} , 1664 cm^{-1} , 1672 cm^{-1} , 1682 cm^{-1} , 1693 cm^{-1} の波数位置に, それぞれ肩ピークが認められた。Dong ら[32]は, 水溶液タンパク質について, 二次微分と FSD 処理によって二次構造成分比を報告している。一方, Byler ら[30]によれば, ミオグロビンの X線解析からの二次構造の含有量はそれぞれ, α -helix: 87%, unordered: 8%, turn: 7% であり, FT-IR からの含有量はそれぞれ α -helix: 76%, extended chain: 24% であるという。 β -sheet を含まないということでは一致しているが, α -helix の含有量や extended chain 含有量において相違を見せている。したがって, FT-IR の結果

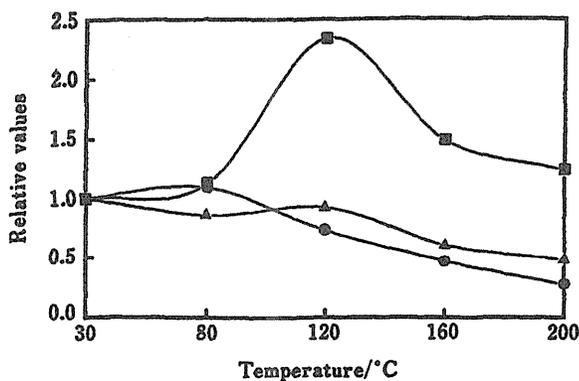


Fig.26. Plots of relative values of estimated conformational changes in α -helix (●), extended chain (■) and other structures (▲) against temperature.

を主に検討することにする。ミオグロビンの二次構造の帰属に基づき FSD 処理後のスペクトルを Curve Fitting 法で波形解析 (Table 13) して, 二次構造の相対含量を求めた。

30°C での各含量を 1 として各温度に対してプロットしたのが Fig.26 である。 Fig.26 の 3 本の曲線のうち 2

本は extended chain と α -helix にそれぞれ特定されているが、もう 1 本はこれら 2 つの構造以外をまとめて表わしたものである。1628 cm^{-1} (extended chain), 1653 cm^{-1} (α -helix) の 2 本の曲線の動きと、その他から総合的に判断すると、80°C未満の温度で増加を示した α -helix は、近傍の側鎖を巻き込み、 α 様の構造を示し、以後他の構造へ変化したものと思われる。ミオグロビンの固体状態での熱変性は、 α -helix の螺旋が熱によりやや延びた形の β -sheet に近い extended chain となり、更にこれが unordered など規則性のない形へと変換する 2 段階経路の変性が起こっているものと結論した。また、Fig. 23a から分かるように 200°C でもスペクトル曲線が描かれていることから、若干の規則性は維持されているものと思われる。

以上のミオグロビンの結果から、固体状態における FT-IR 測定は、タンパク質の高次構造の変化を評価する方法として有用であることがわかったので、羽毛ケラチンの熱的性質の検討に利用することにした。

第2節 熱変性羽毛ケラチンの FT-IR による 二次構造研究

1. 実験

1-1. 試料の調製

羽毛試料は、第1章の調製と同様に全羽毛を処理した。熱変性に使用したネイティブ羽毛 calamus はそれ以上の処理は行わず、測定に用いた。第2章第1節の試料調製と同様に KBr 結晶板に挟んでシールした。

1-2. 装置及び測定

装置は、前節 Fig. 22 に示したとおりである。calamus を前節の加熱手順で処理し、80-200°C の IR スペクトルを得た。測定条件はミオグロビン測定と同様にした。

1. 結果と考察

calamus の IR スペクトルと FSD スペクトルを Fig. 27 に示した。解析には、波数領域 $1600-1700\text{cm}^{-1}$ を用いて Dong ら [32] の方法に従い、次のように帰属した： 1655cm^{-1} , helix ; 1628cm^{-1} , β - sheet ; 1688cm^{-1} , turn。第2章第1節でも述べたように、 1656cm^{-1} は一般には α -helix に帰属されるが、sheet の twist 構造への帰属が妥当と考えられた。Fig. 27a に示したように、calamus は 80°C において、ミオグロビンに近いスペクトルを示し、熱変性後のピークは 1662cm^{-1} , 1630cm^{-1} に存在した。 1652cm^{-1} に見られるアミド I 領域については 120°C 付近から 1630cm^{-1} に小さなピークの出現が観測された。 180°C 以上でこのピーク

クは急激に減少し、さらにピーク形状も著しく変化し、高波数側へシフトした。

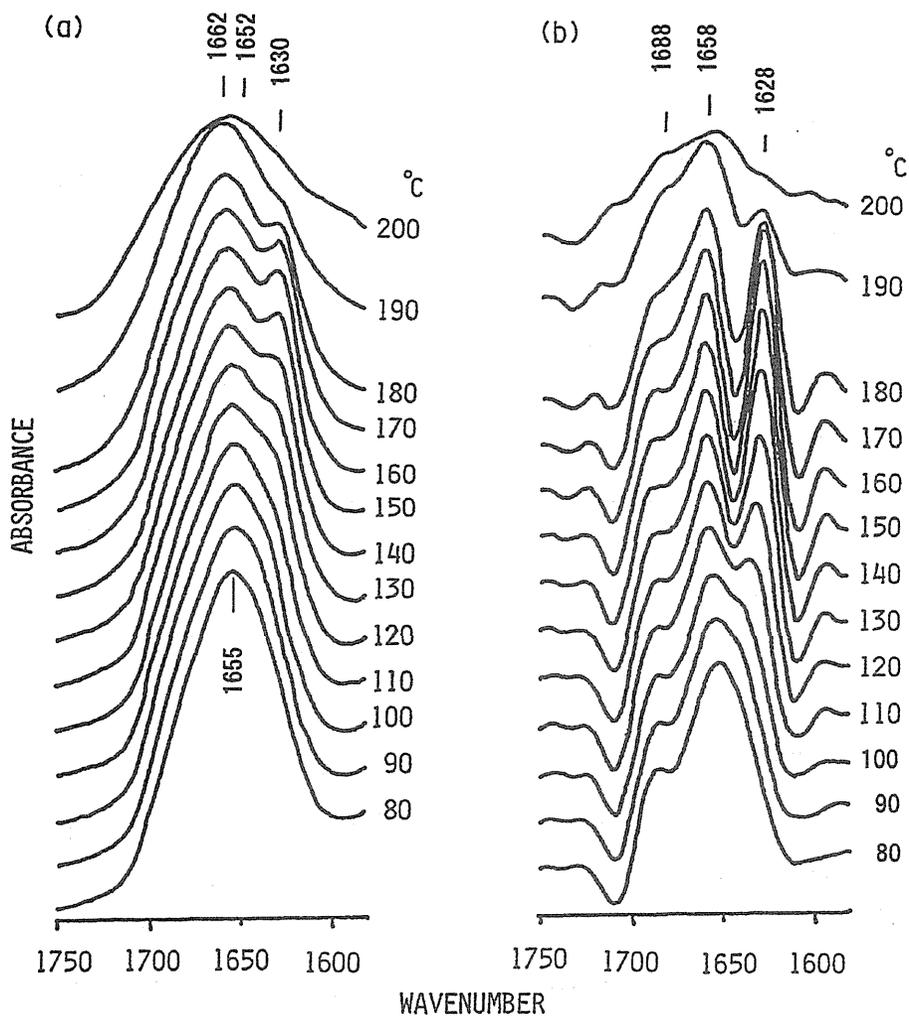


Fig. 27. Original FT-IR spectra(a) and deconvoluted spectra(b) of fowl feather calamus in the temperature range from 80 to 200°C.

また、Fig. 27b の FSD 処理したスペクトルから、calamus の変性は 110°C 付近から徐々に起こっていることが確認された。

1630 cm^{-1} の出現温度は、ミオグロビンでは 90°C であつたが、calamus では 110°C と 20°C 高い温度であつた。この変化の過程をより明確なものとするため、ミオグロビンの解析と同様に 30°C のスペクトルをリファレンスとした差スペクトルを多重表示したのが Fig. 28 である。Fig. 28 から温度依存性の高い吸収帯は 1647 cm^{-1} (unordered) と 1628 cm^{-1} (β -sheet) であることが分かる。その面積変化を 80°C から 190°C までそれぞれの温度に対してプロットしたのが Fig. 29 である。

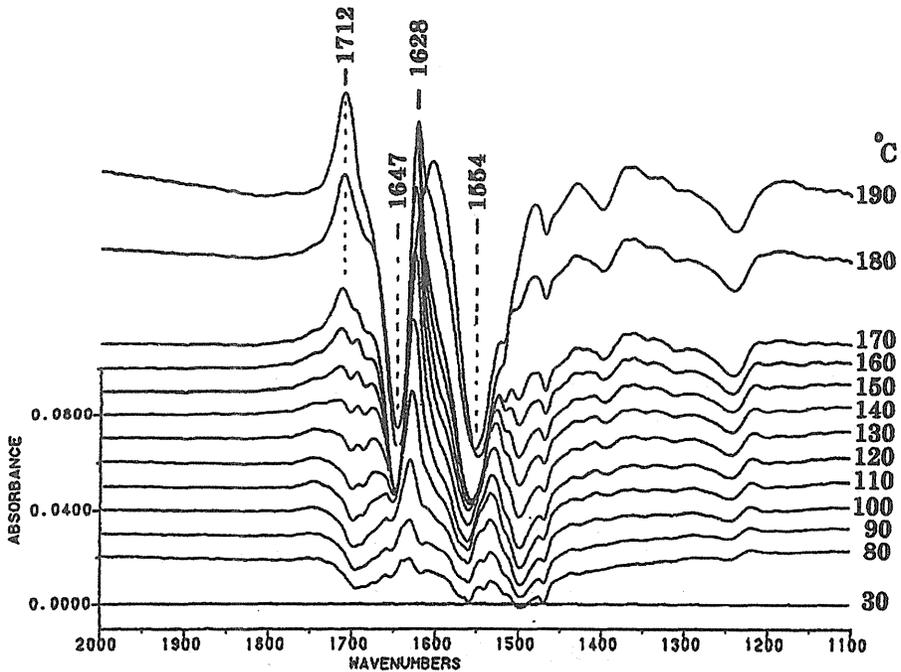


Fig. 28. Difference spectra in the amide I and II regions of calamus.

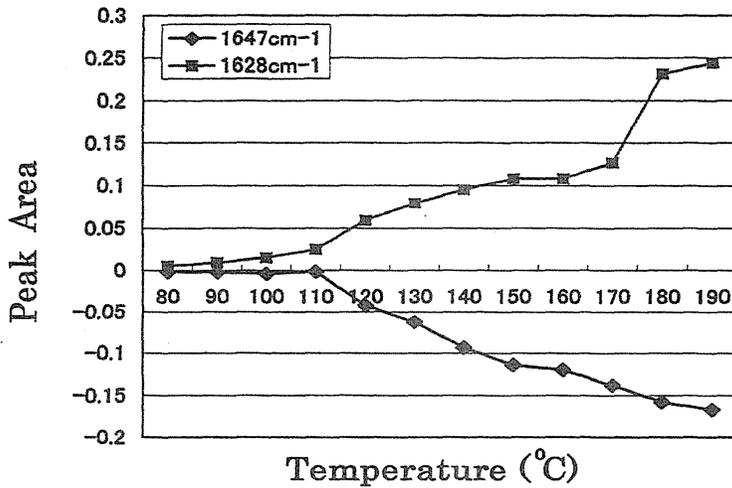


Fig. 29. Plots of the 1647cm^{-1} (◆) (unordered) and 1628cm^{-1} (■) (β -sheet) peak area of difference spectra against temperature.

Fig. 29 より 110°C までは、構造変化は見られなかったが、 110°C から 170°C までは温度に比例して 1647cm^{-1} は減少を示し、 1628cm^{-1} は増加を示した。球状タンパク質に基づいた Dong らの帰属表によれば 1650cm^{-1} 付近のピークは unordered とされるがケラチン特有の sheet 構造によるものと考えられる。 1630cm^{-1} 付近のピークは extended chain か β -sheet か紛らわしいが、Fig. 29 において温度上昇と共に規則的な構造を持った β -sheet がこれほど増加することは考えにくい。よって、 1628cm^{-1} のピークは extended chain と考えて間違いないであろう。即ち、羽毛 calamus の熱による構造変化は、 110°C 付近からケラチン特有の sheet 構造を保っているペプチド鎖間の水素結合が切れ始め、鎖間に結合のない引き延ばされた状態となり、温度上昇とともに、そ

れがさらに進行し、180-190°Cで頂点に達し、200°Cに至って急激に全く不規則な構造になると考えられる。さらに、Fig. 30 にこの構造変化を 2 次微分スペクトルからも確認したところ、 1628cm^{-1} (β -sheet) の存在が 180°C までは確かであったが、以後急激に減少していることが分かる。よって、calamus は 200°C までスペクトルが存在していたが、規則構造は破壊されているものと思われる。

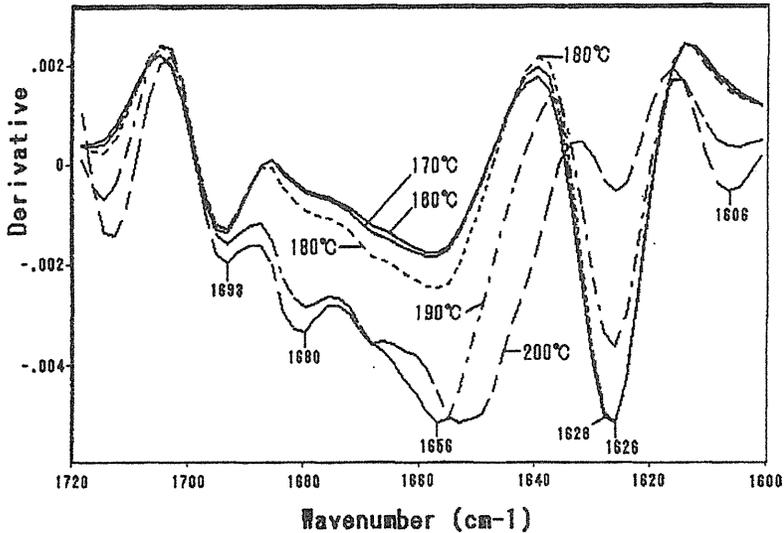


Fig. 30. Second-derivative FT-IR spectra for the dry fowl feather calamus with heating from 160°C to 200°C.

固体ミオグロビンの変性温度(90°C)は、水溶液におけるリボヌクレアーゼ A の変性温度(58°C) Yamamoto ら [57] と比較して約 30°C 以上高い。さらに、羽毛 calamus は、約 20°C 高いことになる。このことから、羽毛ケラチンは熱に対しても強い抵抗性を示すことが確認された。

第3節 示差走査熱量測定による解析

1. 試料

ニワトリの羽毛を鋏で3部位(barbs, rachis, calalus)に分け、前節と同様にエタノール処理、水置換を行った。水置換したものを湿潤試料とし、湿潤試料を凍結乾燥して乾燥試料とした。また、rachis湿潤試料を尿素(2-8M)に40℃、4h浸漬処理した。湿潤粉碎試料をPolytron(Kinematica, Switzerland)によって、氷冷下で24,000回転、30sec粉碎し、60sec休止する粉碎操作を10回繰り返す、フィルター(no.101, 濾紙, Advantech, Tokyo, Japan)を用いて濾過して調製した。本研究には、このように調製した乾燥試料、湿潤試料、湿潤粉碎試料および尿素処理試料を用いた。

2. 示差走査熱量測定(DSC)

湿潤試料、湿潤粉碎試料、乾燥試料および尿素処理試料のDSCは、SSC-5020DSC100(Seiko, Chiba, Japan)を用いて、5 K/minの昇温速度を用いたことを除いてはTakahashiら[58]の方法に従って測定した。

採取した各試料(乾燥重量、約3mg)をカプセル底部に密着させるために、銀板(厚さ0.2mm)をかぶせて試料を押し込めて密封した。湿潤試料および乾燥試料のリファレンスには、それぞれ水を封入したカプセルおよび空カプセルを用いた。DSC測定後、カプセルの蓋を清浄なニッパーで切除し、110℃で8h乾燥し、続いて、550℃で8h灰化した。カプセル中の試料重量は、灰化後の重量の減量

から求めた。

3. 結果と考察

3-1. ケラチンの水分量

湿潤試料を凍結乾燥して得た barbs, rachis および calamus の乾燥試料の水分は, それぞれ 6.3 %, 8.2 % および 9.2 % であった。

3-2. アミノ酸組成

乾燥試料の barbs, rachis, および calamus は, ヒドロキシプロリンとヒドロキシリシン (Table 14) が検出されず, 他のコラーゲンのような皮膚由来の硬タンパク質の混入がないことを確かめた。全ての試料は, シスチンが非常に高含量 (41-44 残基/1000 残基) であることを示した。シスチンから派生するランチオニンは検出されなかったの

Table 14. Amino Acid Compositions^a of Barbs, Rachis, and Calamus from Fowl Feather

| | Barbs | Rachis | Calamus | Whole ^b |
|-----|-------|--------|---------|--------------------|
| Hyp | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Asp | 53 | 51 | 59 | 63 |
| Thr | 48 | 45 | 44 | 53 |
| Ser | 152 | 151 | 143 | 157 |
| Glu | 87 | 83 | 83 | 86 |
| Pro | 121 | 124 | 104 | 117 |
| Lan | 0 | 0 | 0 | — |
| Gly | 115 | 113 | 136 | 115 |
| Ala | 57 | 56 | 74 | 56 |
| Cys | 44 | 43 | 41 | 42 |
| Val | 77 | 75 | 68 | 77 |
| Met | 3 | 5 | 0 | 3 |
| Ile | 48 | 45 | 35 | 43 |
| Leu | 72 | 70 | 87 | 74 |
| Tyr | 17 | 16 | 18 | 16 |
| Phe | 28 | 33 | 33 | 36 |
| Hyl | 0 | 0 | 0 | — |
| Lys | 9 | 8 | 10 | 12 |
| His | 5 | 4 | 5 | 3 |
| Arg | 47 | 46 | 47 | 47 |

^aResidues/1,000 residues.

^bAkahane *et al.*¹⁾

で、過酷な試料調製がなされていないことを示した。その他のアミノ酸組成は第1章第1節に述べた通りである。

3-3. 乾燥状態における熱挙動

乾燥状態で、ニワトリ羽毛 barbs, rachis, calamus (6.3-9.2%湿度)のDSCの吸熱ピークは、湿潤試料(約110-160°C)と比べ170-200°C (Fig. 31, Table 15)と著しく高い温度領域に認められた。通常の状態では生体高分子を

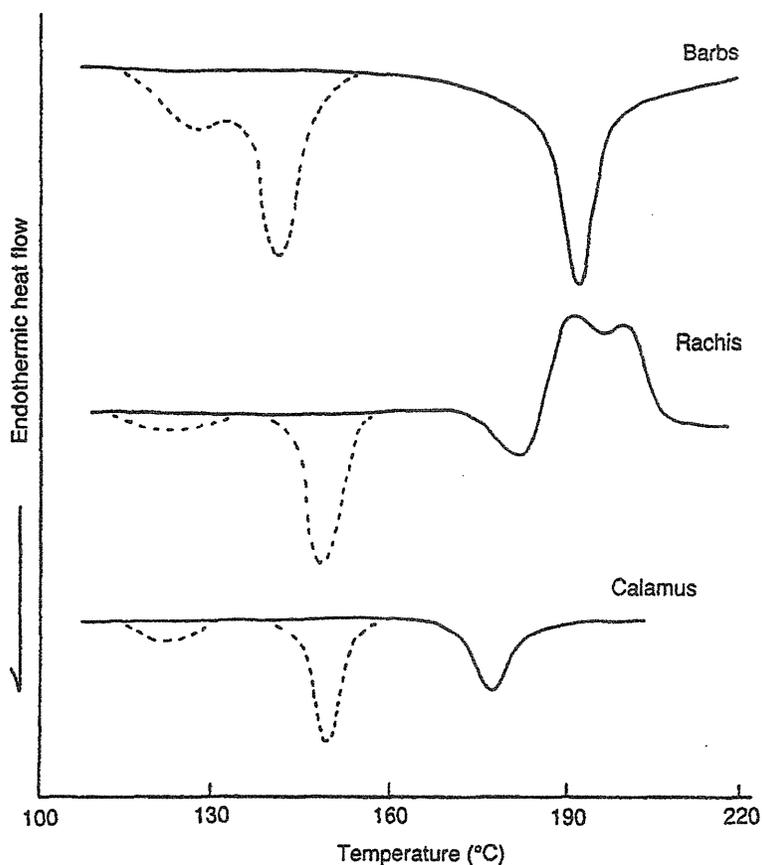


Fig. 31. DSC Curves for Dry Fowl Feather Barbs, Rachis, and Calamus as Compared with Those for the Wet Samples.

—, dry sample; ----, wet sample.

加熱すると、高い温度領域では、次のような反応が起こると考えられる。(1)高次構造の変化、(2)主鎖の切断、および/もしくはその限定的再結合(3)構成単位残基を含む生体高分子の熱分解、および/あるいは無制限な発熱を伴う酸化分解などである。

ニワトリ羽毛 barbs, rachis, calamus (2-3 mg) を DSC による反応終点の温度 (160°C) まで加熱し、室温の水 (50ml) で 2min 強く攪拌したが、各々の試料においてタンパクの溶解は認められなかった。ケラチンのペプチド結合は吸熱転移の間では実質的に分解されることはないので、吸熱ピークは高次構造の変化を検知したものと考えられる。

Table 15 Thermal characteristics of barbs, rachis, and calamus from fowl feather evaluated by DSC under the dry condition.

| | Peak 1 | | | | Peak 2 | | | |
|---------|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| | Transition temp. (°C) | | | Enthalpy (mJ/mg) | Transition temp. (°C) | | | Enthalpy (mJ/mg) |
| | T _o | T _p | T _c | | T _{p1} | T _{p2} | T _c | |
| Barbs | 188.4±0.8 | 191.8±0.8 | 195.8±0.9 | 28.0±2.3 | | | | |
| Rachis | 175.4±0.8 | 180.2±0.6 | 185.2±0.8 | 6.2±0.8 | 191.5±0.4 | 201.3±1.1 | 207.1±1.2 | 24.7±1.9 |
| Calamus | 172.3±2.1 | 176.6±2.0 | 182.1±1.8 | 10.0±0.7 | | | | |

T_o, Onset temp.; T_p, peak temp.; T_c, conclusion temp. Mean±S.D. (n=7).

3-4. 湿潤状態における熱挙動

湿潤状態での羽毛 rachis の吸熱転移は球状タンパク質やコラーゲンのようなタンパクより (Fig. 32, Table 16) 著しく高い温度領域 110-160°C に 2 つの吸熱ピークを示した。

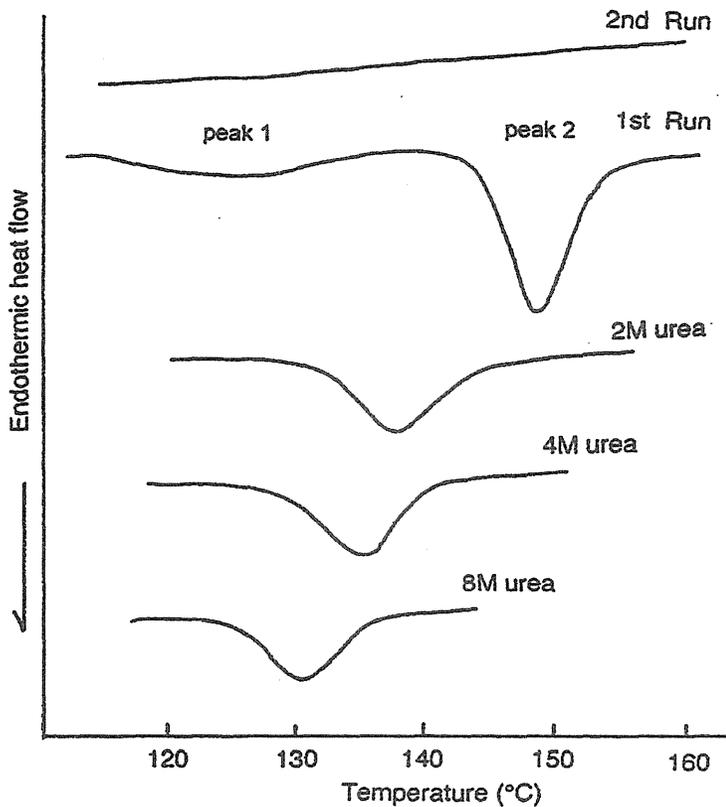


Fig. 32. DSC Curves for Wet Fowl Feather Rachis with and without the Presence of Urea.

After immersing rachis in 2-8M urea at 40°C for 4 h, DSC was carried out using an airtight silver sample capsule at a heating rate of 5 K/min.

Table 16. Thermal Characteristics of Barbs, Rachis, and Calamus from Fowl Feather with or without Urea-treatment, or with Pulverization Evaluated by DSC under the Wet Condition

| | Peak 1 | | | | Enthalpy (mJ/mg) | Peak 2 | | | |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| | Transition temp. (°C) | | | Enthalpy (mJ/mg) | | Transition temp. (°C) | | | Enthalpy (mJ/mg) |
| | <i>T</i> _o | <i>T</i> _p | <i>T</i> _c | | | <i>T</i> _o | <i>T</i> _p | <i>T</i> _c | |
| Barbs | | | | | | | | | |
| native | 116.2 ± 1.1 | 127.1 ± 1.4 | — | 7.2 ± 0.8 | — | 140.3 ± 1.3 | 147.6 ± 2.4 | 17.5 ± 0.7 | |
| pulverized | 130.2 ± 1.1 | 140.7 ± 0.4 | — | 2.0 ± 0.3 | — | 151.4 ± 0.8 | 157.0 ± 0.6 | 17.0 ± 0.9 | |
| Rachis | | | | | | | | | |
| native | 113.3 ± 1.7 | 124.0 ± 0.8 | 133.6 ± 0.5 | 4.1 ± 1.8 | 143.1 ± 0.9 | 148.3 ± 0.4 | 153.3 ± 0.5 | 18.4 ± 1.3 | |
| 2 M urea | — | — | — | — | 132.2 ± 0.5 | 137.3 ± 0.1 | 142.8 ± 0.7 | 10.2 ± 1.3 | |
| 4 M urea | — | — | — | — | 131.8 ± 0.6 | 135.4 ± 0.3 | 141.1 ± 0.3 | 10.9 ± 1.6 | |
| 8 M urea | — | — | — | — | 125.0 ± 0.3 | 129.8 ± 0.5 | 134.8 ± 0.8 | 9.4 ± 2.1 | |
| pulvrized | — | — | — | — | 146.4 ± 1.6 | 152.8 ± 0.7 | 158.5 ± 0.7 | 14.5 ± 1.4 | |
| Calamus | | | | | | | | | |
| native | 112.6 ± 1.1 | 122.2 ± 0.7 | 131.1 ± 0.4 | 2.6 ± 1.1 | 143.5 ± 1.2 | 148.1 ± 0.7 | 152.4 ± 0.9 | 9.8 ± 0.5 | |
| pulverized | 110.1 ± 2.3 | 126.8 ± 1.1 | — | 8.3 ± 0.9 | — | 146.5 ± 1.2 | 153.8 ± 1.9 | 20.5 ± 0.9 | |

*T*_o, onset temp.; *T*_p, peak temp.; *T*_c, conclusion temp. Mean ± S.D. (n = 7).

低い方のピーク(ピーク 1)は比較的弱くブロードで、高い方のピーク(ピーク 2)は強く鋭く、ピーク 2 のエンタルピーはピーク 1 の 4 倍を示した。したがって、ピーク 2 はニワトリ羽毛 rachis の主たる熱転移に相当すると考えた。はじめの DSC 測定後、引き続き室温まで急速に冷却し、再度同じ昇温速度で加熱したが、つぎの測定では吸熱ピークは認められなかった(Fig. 32)。したがって、ここで検知された吸熱転移は不可逆であると考えられる。2-8M 尿素に 40°C で 4h 浸漬した rachis は、尿素濃度の増加により転移温度とエンタルピーが著しく減少した(Table 16)。尿素濃度(X)と転移温度(ピーク温度, Y)の間には、 $Y = 0.311X^2 - 4.67X + 147.5$ ($R = 0.978$) で示される相関性の高い関係があることが認められ、エンタルピー(Y)の間にも、同様に $Y = 0.272X^2 - 3.16X + 17.4$ ($R = 0.902$) なる相関性があることが認められた。これは、おそらく尿素によって水素結合が破壊されて rachis の高次構造が不安定になったものと推定した。ニワトリ羽毛 barbs および calamus も、湿潤状態の DSC 曲線は 2 つの吸熱ピークを持ち rachis の熱変性と類似していた。barbs のピーク 2 は、rachis と calamus のそれより 8°C 低い吸熱ピークを示した(Fig. 31, Table 16)。barbs と rachis のエンタルピーは類似していたが、calamus はかなり低い値を示した(Table 16)。これは calamus のアモルファス成分が、rachis より高い割合を占めているためと考えられる。

3-5 粉碎による熱挙動の変化

Fig. 33 に水中で粉碎した試料の DSC 曲線を示す。粉碎した試料は、ネイティブ試料の結果と比較して低い方のピーク(ピーク 1)は rachis では減少又は消滅し、高い方のピーク(ピーク 2)は高い温度にシフトした(Table 16)。この

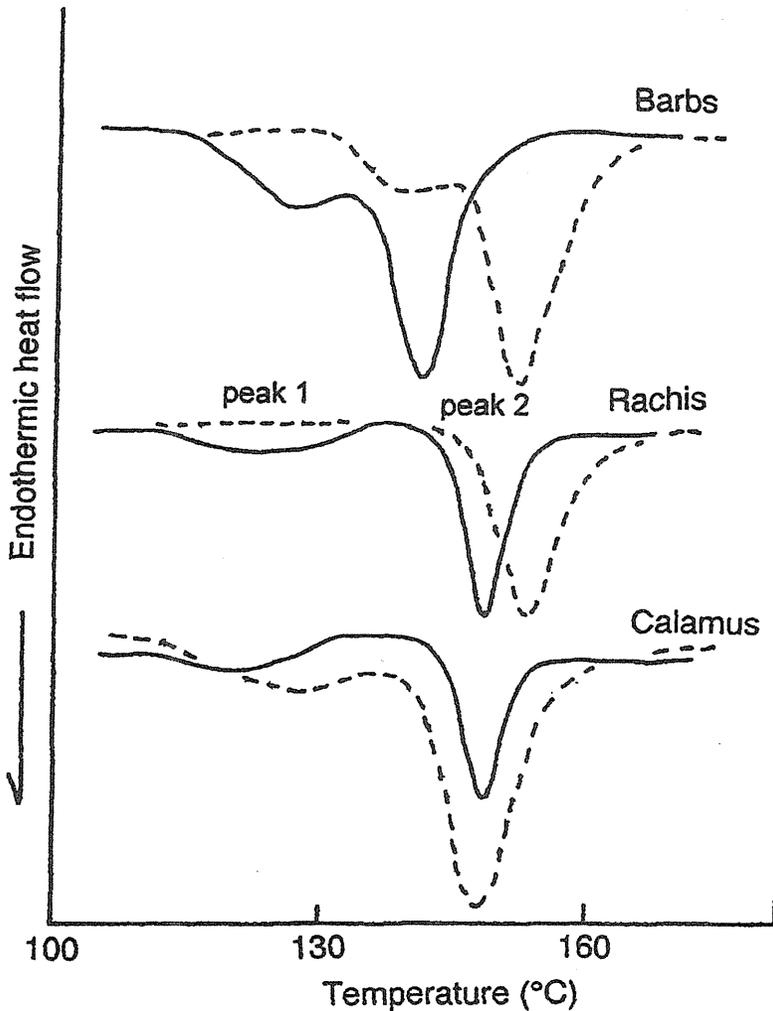


Fig.33. DSC Curves for Wet Fowl Feather Barbs, Rachis, and Calamus as Compared with Those for the Pulverized Samples.

—, native sample; ----, pulverized sample. See Materials and Methods for the DSC conditions.

ことは、粉碎による剪断力が加わり、ニワトリ羽毛ケラチン分子に規則的分子再配列をもたらし、わずかに高い安定性を与えたのかもしれない。calamusの場合、粉碎によって粉末部分と針状部分が形成されたが、粉末部分はろ紙に固着して取れず回収できなかった。その結果、粉碎calamus試料はほとんど針状部分のみであった。粉碎calamusの変性温度はネイティブに近い値を示したが、エンタルピーはネイティブの2倍高い値を示したので、これらの針状部分が規則構造の熱転移において重要な役割を担っていると考えられ、粉末部分は事実上アモルファスであると考えられた。barbsとrachisの粉碎試料のエンタルピーは、ネイティブのそれと類似していた。ケラチンのペプチド結合は吸熱転移の間ではほとんど分解されないため、吸熱ピークの存在は、高次構造の変化を検知したものと考えられる。また、熱転移における水の著しい効果は、種々のタンパク質[59, 60]、澱粉[61]でも報告されているが、繊維構造かつ不規則な高次構造のケラチンにおいても、水分による強い影響が認められた。羽毛ケラチンの熱変性挙動を検知して高次構造や形態学的差異を評価するうえで、DSCは有用であった。

第4節 小 括

本章は羽毛ケラチンの構造安定性を検討する一環として、熱的挙動を FT-IR と DSC により測定した。第1節に基礎的検討としてすでに高次構造の確定しているミオグロビンの構造変化を詳細に検討した。固体のミオグロビンは加熱により3段階にわたって構造変化を起こした。即ち、30 - 80°C ; α -helix の僅かな増加と unordered 構造の僅かな減少, 80 - 130°C ; α -helix の減少に伴う extended chain の急激な増加, 130 - 160°C ; extended chain の急激な減少, である。主要な変化は 90°C 付近から起こり, α -helix が壊れて伸びた状態になり 130°C 以上になるとそれが規則性のない形へと2段階で起きている。また, 200°C においても 1654cm^{-1} のピークは消失せず残っていることから熱安定性の高い helix も存在することがわかった。第2節では前節の方法を羽毛 calamus に適用し, 110°C 付近から構造変化を起こし, 180°C 以上でさらなる変化を起こすことがわかった。これはミオグロビンの場合より約 20°C 高く, ケラチンの構造安定性を示していた。

第3節は DSC により羽毛各部位の熱挙動および水, 尿素の影響を調べた。乾燥試料では吸熱ピークが barbs ; 約 190°C, rachis ; 約 185°C, calamus ; 約 180°C に現れた。湿潤試料ではいずれも 150°C 付近となり, 水分子の存在が構造変化を起こし易くしていた。尿素水溶液に浸した試料ではさらに転移温度は低くなり, また尿素濃度に依存していた。乾燥試料から得られた転移温度は FT-IR での測定の第2段階目の変化に対応していると思われるが, 第1段

階目の 110°C 付近の変化に対応する吸熱ピークは得られなかった。

総 括

ケラチンは生体保護物質として上皮系細胞の角質化による生産物である。羽毛ケラチンは表皮や毛髪と著しく異なり、身体の保護ばかりでなく飛翔の役割を担うため、非常に強固な形態を形成しているものと思われる。そして羽毛の独特な形態を見ても羽毛ケラチンの分子構造は、他の繊維タンパク質とは異なる特有なものであると予想される。その構造と性質を明らかにするための各種方法論の開発は、薬学研究も含めて広い研究分野に貢献するばかりでなく、鳥類の進化を研究する上でも重要なことであろう。本研究は一次構造と二次構造、さらに羽毛ケラチン分子の集合体の構造安定性を明らかにすることを目的に行った。

その構造的な特徴は、アミノ酸配列により裏付けられる。第1章にはその分離精製法、各精製過程における、タンパク質の種類、数を明らかにした。それらのアミノ酸、低分子タンパク質の特性について記述し、アミノ酸配列から、二次構造の推定を行った。また、その低分子タンパク質の数を簡便に調べる方法として、キャピラリー電気泳動が有効であり、その泳動パターンは、鳥類の種により異なり、最も進化したスズメ目は最も複雑な成分数を持ち、成分の多様性の程度が鳥類の進化を反映していること、また、羽毛の形態学的に異なる部位(barbs, calamus)のケラチンは別個の遺伝子に由来していることが明らかになった。さらに、ケラチンの構造解析をする場合イオン交換クロマトグラフィーで精製する必要がある、キャピラリー電気泳動

で予め分離パターンを予測できることは大変有用であることがわかった。

第2章は、固体タンパク質の二次構造とアミノ酸側鎖の状態を知るため立体構造が既知の球状タンパク質および羽毛の各部位をFT-IRとラマン分光法で測定した結果を述べた。固体ミオグロビン、リゾチーム、コンカナバリンAをFT-IRで測定し、解析した結果はいずれもX線データとよく一致し、タンパク水溶液に基づいたDongら[31]の二次構造帰属表が有効であった。羽毛calamusおよびrachisのスペクトルはともに α -helixに富むミオグロビンに似ていた。しかし、波形解析の結果、約80%の β -sheetが存在すると見積もられた。羽毛ケラチンのsheet構造は明らかに球状タンパク質中のそれとは異なることが分かった。ラマン分光からは、トリプトファンとS-S結合の存在状態が得られた。特に、7日間重水素化しても N_1H サイトのバンドシフトが生じなかったことは、トリプトファンが重水に接しにくい構造を形成していると推測される。

第3章では、羽毛ケラチンの構造安定性を調べるために、試料を加熱しその構造変化をFT-IRで観測し、またDSCで構造変化に伴う熱変化を測定した。

モデルタンパク質として高次構造がよく分かっているミオグロビンを用いて、顕微FT-IRに熱分析システムを組み込み、温度を連続的に変化させながら構造変化に対応するスペクトルをとり、その解析を試みた。ミオグロビンの構造変化は室温から80℃まで α -helix隣接部がわずかに巻き、その後130℃付近まで α -helixが引き延ばされ、

さらに温度が上がると不規則構造になるという3段階で進むと考えられる。この方法はタンパク質の熱的構造変化を観測するのに有効であった。羽毛 *calamus* に応用した結果、110°C付近から構造変化を起こし、180°C以上でさらに変化した。これはミオグロビンの場合より約20°C高く、ケラチンの構造安定性が高いことを示している。

DSCの測定では、乾燥状態における羽毛の吸熱ピークは、高い温度領域(170-200°C)に認められた。羽毛の各部位のうち *barbs* が他より約10°C高く、ピークのトップは190°Cであった。また、水分を含んだ状態における羽毛の吸熱転移は乾燥試料よりも低く、110-160°Cの範囲で2つの吸熱ピークを生じた。2つの吸熱ピークのうち高温側のピークのエンタルピーは、低温側のピークの約4倍であった。また、尿素存在下における転移温度は湿潤試料よりもさらに低くなり、尿素濃度に依存していた。当然の結果ながらタンパク質の構造変化に水分子および変性剤としての尿素の役割が大きかった。

FT-IRにおいても、DSCで吸熱転移に相当する温度180-200°Cにおいて1626-1628 cm^{-1} (β -sheet)は激的な減少を示した。ケラチンのペプチド結合は吸熱転移の間ではほとんど分解されないため、吸熱ピークの存在は高次構造の変化を検知したことを反映したものと考えられる。

DSCの結果において *barbs* の転移温度が *calamus*, *rachis* よりも高く、エンタルピーも2倍以上大きかったことは推測の外であった。触覚的には *barbs* は軟らかく、*calamus*, *rachis* は硬い。また、sheet構造の含有量が *barbs* は30-50%、*calamus* と *rachis* は80%である。規則構造が多

ければ高次構造は安定で物理的にも強固になると考えられる。しかし、熱に対する安定性は機械的な強度とは異なり分子配列の緻密さが重要であり、barbs は細くても強度を保つために緻密な組織なのではないだろうか。

本研究で鳥類特有の羽毛ケラチンの組織学的な部位が似た性質でありながら、タンパクの成分構成、構造的な違い、物性の差などがあることが明らかになった。羽毛の拡大図 Fig. 34 に示している[19]。鳥類がこのような微細構造を持った羽毛を進化の過程でどのように獲得して、どのように生体内で作り上げているのかという問題を明らかにするには、まだ多くの研究を必要とするであろうが、本研究がその一助となっていることを確信する。

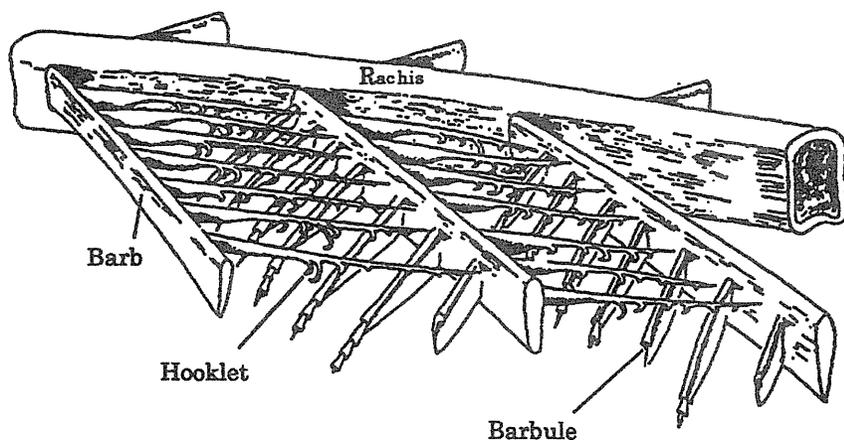


Fig. 34. Stereogram showing the structure of a representative feather

略 語 表

| | |
|--------|--|
| SCM | S-カルボキシメチル, S-carboxymethyl |
| DEAE | ジエチルアミノエチル, Diethylaminoethyl |
| CE | キャピラリー電気泳動, Capillary electrophoresis |
| Z1-メチル | トリメチルアンモニウムプロピルスルホン酸, Trimethylammoniumpropansulfonate |
| FT-IR | フーリエ変換赤外分光々度計, Fourier transform infrared spectroscopy |
| MCT | 水銀-カドミウム-テルル ($\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$), Mercury-Cadmium-Tellurium |
| FSD | フーリエ・セルフ・デコンボリューション, Fourier - Self - Deconvolution |
| DSC | 示差走査熱量測定, Differential scanning calorimetry |

謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬品分析化学教室 鮫島啓次郎 教授に深く感謝の意を表します。

実験研究ならびに本論文の作成にあたり有益なご助言、ご指導を賜りました城西大学理学部分析化学研究室 赤羽 競客員教授、元城西大学理学部分析化学研究室 新井 邦男 助教授、東京農工大学農学部 高橋 幸資 教授に深謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部 山田 紘一 教授並びに従二 和彦 教授に深く感謝致します。

さらに、この研究にご協力頂きました城西大学理学部分析化学研究室 高橋 理恵子 助手に深く感謝致します。

引用文献

1. Astbury, W. T., and Street, A., *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 230A, 75-101 (1931).
2. Astbury, W. T., and Woods, H. J., *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 333-394 (1933).
3. Astbury, W. T., and Marwick, T. C., *Nature*, 130, 309-310 (1932).
4. Bear, R. S., and Rugo, H. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 53, 627-648 (1951).
5. Pauling, L., and Corey, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 5349 (1950).
6. Pauling, L., and Corey, R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 37, 251-256 (1951).
7. Pauling, L., and Corey, R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 37, 261-271 (1951).
8. Fraser, R. D. B., MacRae, T. P., Rarry, D. A. D., and Suzuki, E., *Polymer*, 12, 35-56 (1971).
9. Jeffrey, P. D., *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 809-819 (1970).
10. Woodin, A. M., *Biochem. J.*, 57, 99-109 (1954).
11. Harrap, B. S., and Woods, E. F., *Biochem. J.*, 92, 19-26 (1964).
12. Filshie, B. K., and Rogers, F. E., *J. Cell Biol.* 13, 1-12 (1962).
13. Rogers, D. E., and Filshie, B. K., in "Ultrastructure of Protein Fibers" p.123, Academic Press. (1963).
14. Akahane, K., Murozono, S., and Murayama, K., *J. Biochem.*,

- 81, 11-18 (1977).
15. Murayama, K., Akahane, K., and Murozono, S., *J. Biochem.*, 81, 19-24 (1977).
 16. Murozono, S., Murayama, K., and Akahane, K., *J. Biochem.*, 82, 53-58 (1977).
 17. Arai, K., Murayama, K., Takahashi, R., Yokote, Y., and Akahane, K., *Eur. J. Biochem.*, 132, 501-507 (1983).
 18. Arai, K., Murayama, K., Takahashi, R., Yokote, Y., and Akahane, K., *Biochim. Biophys. Acta.*, 873, 6-12 (1986)
Elsevier
 19. Schroeder, W.A., Kay, L. M., Lewis, B. & Hunger, N. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3901-3908 (1955).
 20. Chou, P.Y., and Fasman, G.D., *Biochemistry* 13, 211-221 (1974).
 21. Chou, P.Y., and Fasman, G.D., *Biochemistry*, 13, 222-245 (1974).
 22. Arai, K., Terasawa, R., Yokote, Y., Takahashi, R., and Akahane, K., *Chromatography* (in Japanese), 15, 161-167 (1994).
 23. Presland, R. B., Gregg, K., Molloy, P. L., Morris, C. P., Crocker, L. A., and Rogers, G. E., *J. Mol. Biol.*, 209, 549-559 (1989).
 24. Presland, R. B., Whitbread, L. A., and Rogers, G. E., *J. Mol. Biol.*, 209, 561-576 (1989).
 25. Takahashi, R., Arai, K., Yokote, Y., and Akahane, K., *Sci. Bull. of Josai Univ.*, 1, 31-47 (1993).

26. O' Donnell, I. J., *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**, 415-437 (1973).
27. O' Donnell, I. J., and Inglis, A. S., *Aust. J. Biol. Sci.*, **27**, 369-382 (1974).
28. Sibley, C. G., & Ahlquist, J. E., *J. Mol. Evol.*, **26**, 99-121 (1987).
29. 山階 芳麿, "鳥類," p16-20, タイム ライフ ブックス (1977).
30. Susi, H., and Byler, D. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**, 391-397 (1983).
31. Byler, D. M., and Susi, H., *Biopolymers*, **25**, 469-487 (1986).
32. Lewis, P.N., Momany, F.A., and Scheraga, H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2293-2297 (1971).
33. Dong, A., Huang, P., and Caughey, W. S., *Biochemistry*, **29**, 3303 -3308 (1990).
34. Levitt, M., and Greer, J., *J. Mol. Biol.*, **114**, 181-239 (1977).
35. Provencher, S.W., and Glockner, J., *Biochemistry*, **20** 33-37(1981).
36. Tsuboi, M., Kaneuchi, F., Ikeda, T., and Akahane, K., *Can. J. Chem.*, **69**, 1752-1757 (1991).
37. Lord, R.C., and Yu, N. T., *J. Mol. Biol.*, **50**, 509-524 (1970).
38. Lord, R.C., and Yu, N. T., *J. Mol. Biol.*, **51**, 203-213 (1970).
39. Tu, A. T. Raman Spectroscopy in Biology: Principles and

- Applications. (John Wiley and Sons: New York, N. Y.) p448 (1982).
40. Tu, A. T. Spectroscopy of Biological Systems, *Advances in Spectroscopy*, Vol. 13, Clark, R. J. H., and Hester, R. E. eds., p47-112, Wiley Chichester (1986).
 41. Harada, I., and Takeuchi, H. Spectroscopy of Biological Systems, *Advances in Spectroscopy*, vol. 13, Clark, R. J. H., and Hester, R. F. eds, p113-175, Wiley, Chichester (1986).
 42. Fraser, R. D. B., MacRae, T. P., Rarry, D. A. D., and Rogers, G. E. Keratins - Their Composition, Structure, and Biosynthesis, p4-6; p121-131, Tomas, Springfield, Illinois. (1972).
 43. Woodin, A. M., *Nature*, 173, 823-824 (1954).
 44. Rudall, K. A., *Biochim Biophys. Acta.*, 1, 549-562 (1947).
 45. Parker, K. D., *Biochim. Biophys. Acta.*, 17, 148-149 (1955).
 46. Fraser, R. D. B., and MacRea, T. P., *J. Chem Phys.*, 29, 1024-1028 (1958).
 47. Penke, B., Ferenczi, R., and Kovacs, K., *Anal. Biochem.*, 60, 45-50 (1974).
 48. Hsu, S. L., Moore, W. H., and Krimm, S. *Biopolymers* 15, 1513-1528 (1976).
 49. Miura, T., Takeuchi, H., and Harada, I., *J. Raman Spectrosc.*, 20, 667-671 (1989).
 50. Miura, T., Takeuchi, H., and Harada, I., *Biochemistry* 27, 88-94 (1988).

51. Siamwiza, M. N., Lord, R. C., Chen, M. C., Takamatsu, T., Harada, I., Matura, H., and Shimanouchi, T., *Biochemistry*, 14, 4870-4876 (1975).
52. Takeuchi, H. Watanabe, N. Satoh, Y., and Harada, I., *J. Raman Spectrosc*, 20, 233 -239 (1989).
53. Sugeta, H., Go, A., and Miyazawa, T., *Chem. Lett.*, 83-86 (1972).
54. Sugeta, H., Go, A., and Miyazawa, T. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 46, 3407-3411 (1973).
55. Takahashi, K., Yamamoto, H., Yokote, Y., and Hattori, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1875-1881 (2004).
56. Akahane, K., Yokote, Y., Arai, K., and Takahashi, R., *Bunseki Kagaku* (in Japanese), 44, 815-819 (1995).
57. Yamamoto, T., and Tasumi, M., *Can. J. Spectrosc.*, 133, 133-138 (1988).
58. Takahashi, K., Shirai, K., and Wada, K., *J. Food Sci.*, 49, 1920-1921 (1988).
59. Takahashi, K., Shirai, K., Wada, K., and Kawamura, A., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, (in Japanese), 54, 357-359 (1980).
60. Fujita, Y., and Noda, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 567-1568 (1978).
61. Takahashi, K., Shirai, K., and Wada, K., *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2502-2511 (1982).

