# 

## 絹フィブロイン超薄膜の2次構造の温度変化

#### 山田和志

(受取日:2009年6月26日, 受理日:2009年8月24日)

### Thermal Transformation of Secondary Structure on Ultrathin Fibroin Films

Kazushi Yamada

(Received June 26, 2009; Accepted August 24, 2009)

In this topic transition of the molecular conformation in ultrathin fibroin films induced by thermal treatment is explained.  $Bombyx\ mori$  silk fibroin was fixed on mica substrates by cast of aqueous fibroin solutions and the microscopic morphologies of the samples were revealed with the atomic force microscope. Optimizing the method to prepare the solution we successfully formed two dimensional thin films in which a network of fibroin molecules developed over the substrate. The film consisted of fibroin molecules in the random coil structure. After the thermal treatments, which are known to convert the secondary structure of fibroin from the random coil to the  $\beta$ -sheet type, the network morphology disappeared and characteristic island-like morphologies appeared. Tendency of formation of  $\beta$ -sheet crystals was confirmed by the fact that the fibroin solution temporally evolved the gel state. Based on these results it was concluded that the islands consist of  $\beta$ -sheet crystals. Of particular interest is the observation that all of the islands had a common thickness value of 1.3 nm. In an overview of related research mica-protein interactions frequently result in characteristic morphology or self-organized patterns of protein aggregates. Such specific interactions between the mica substrates and the fibroin are suggested in the present study.

Keywords: silk fibroin; AFM; ultrathin film; crystallization; thermal treatment; monolayer

#### 1. はじめに

近年のナノテクノロジーの急速な発展に伴って、様々な物質の構造をマイクロ・ナノレベルで制御いすることが可能となり、さらにそれらに対して新しい機能を発現させる技術の開発が要求されてきている。従来、高分子やタンパク質の分子構造は、光散乱などの散乱法や、粘度測定法など様々な方法で検討されてきたが、いずれも分子構造を間

接的にある平均分子量や構造モデルを通して評価するものであった。高分解能な顕微鏡を用いることにより直接分子構造を観察することができれば、高分子の分子レベルでの構造と物性を結びつけることが可能となる。

このような観点から、タンパク質分子などが振る舞う現象をナノレベルで理解することは、今後の科学技術の発展においても大変興味深く、また重要であると考える。

ここではとりわけ、代表的なタンパク質の1つである絹

© 2009 The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis.



**Fig.1** SEM image of silk fiber. Fibroin is core parts of this fiber.

フィブロイン(以下,単にフィブロインという)を例として取り上げ、その薄膜および超薄膜での熱測定と2次構造の変化をAFMおよびFT-IR測定による測定,分析結果とあわせて、みていきたい。

#### 2. フィブロインの構造

一般的に良く利用されている「絹」は、フィブロインとセリシンの2成分から構成されており、これらの主成分であるフィブロインは身近で代表的な単純タンパク質の1つである。Fig.1に代表的な絹糸の電子顕微鏡(SEM)写真を示す。中心部の三角形に見える2つの部分がフィブロインである。フィブロインは非常に単純な一次構造

#### Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser

(Gly: グリシン, Ala: アラニン, Ser: セリン)

を持ち、赤外分光法やX線回折、電子顕微鏡、NMR などによりその構造や物性、機能などについて古くから研究されてきた。 $^{2-7}$ 

フィブロインの主要成分はGly, Ala, Serであり、それ らで全体の約96%を占め、その組成比は3:2:18,9)である。 フィブロインの結晶形について清水10)とKratky11)らは、蚕 体内の液状絹フィブロインを乾燥固化することによって、2 つの結晶形の存在を見出しSilk IとSilk IIと名付けた。フ ィブロインの二次構造にはランダムコイル型(非晶), Silk I型 (α型結晶), Silk II型 (逆平行βシート型結晶) の3つの構造がある。様々な外部摂動によりこの二次構造の転移 を誘起させる研究が行われてきた。12-16) 二次構造の転移に は、ランダムコイル  $\rightarrow \alpha$  型、ランダムコイル  $\rightarrow \beta$  型、 $\alpha \rightarrow$  $\beta$ 型転移の3種類がある。例えばウェットプロセスの1つと して、フィブロイン薄膜をメタノール中または水/メタノ ールの混合溶媒中に浸せきすることによりランダムコイル 型から逆平行βシート型構造に転移させることができる。3) またドライプロセスの1つとして、熱処理(アニーリング 法) による方法もある。この研究によれば、190 ℃、1 分間 または170 ℃、30 分間の熱処理でランダムコイル型から逆 平行βシート型に二次構造の転移が起こることが知られて

いる。13)

#### 3. ナノ構造観察へのアプローチ

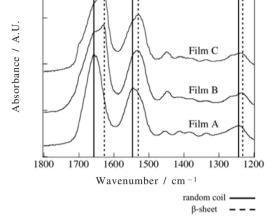
従来、天然高分子や合成高分子の分子構造は、光散乱や中性子散乱等の散乱法、粘度測定等様々な方法で検討されてきたが、いずれも分子構造を間接的に、あるいは平均分子量や3次元構造モデルを通して評価するものである。もし、顕微鏡で直接高分子の構造を観察することができれば、高分子の分子レベルにおける構造と物性を結びつけることへと繋がり、高分子科学にとって新たな発展が期待できる。しかし、SEM、TEMでサブナノメートルの分解能で高分子系を観察しようとしても、その電子の大きな運動エネルギーのために観察対象の破壊を防ぐことは困難である。

近年では、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) を利用するこ とによって、従来では観察出来なかったポリマーの表面構 造観察やミクロ構造の観察などが盛んに行われている。そ の中でも最も幅広く利用されているのが原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic Force Microscope) である。SPM やAFM は、先端を鋭く尖らせた探針を固体表面から1ナノメート ル程度まで接近させ、それを2次元的に走査することで薄 膜や固体表面の凹凸や原子配列、さらには表面構造の違い を画像表示することができる。また、その分解能が原子1 個を区別できるまでに達しており、真空中だけでなく大気 中, ガス中, 液体中など様々な雰囲気下で動作するという 従来の顕微鏡にない特徴を持っている。近年では、超高速 AFM 観察により1分子の動きをも観察できるということが 報告されている。そこでこのAFM 測定技術をフィブロイン 薄膜へ応用し,17)熱処理温度変化における高分子薄膜の2次 構造変化測定、また2次構造変化に伴うフィブロイン薄膜 の表面形状変化について検討する。

AFMによりナノレベルで分子鎖を観察するためには、試料作成に注意が必要である。従来の研究では、その多くが有機・無機試験片、基板や高分子フィルム等の膜表面全体を観察しているおり、分子レベルでの構造観察に至っていない。原子間力顕微鏡の分解能としては、分子を観察できる能力を持っているはずであるが、その能力を最大限に発揮できる環境を作り出すことができなければ、高分子の分子像を観察することはできない。言い換えれば、最適な測定環境を準備することこそが重要である。

高分子を分子レベルで観察するためには、分子鎖が重なり合わないことが重要である。一般的な高分子溶液からのキャストフィルムやスピンコートフィルム作製条件とは異なり、高分子の超希薄溶液を準備し、キャスト法や吸着法を適用させることにより、高分子の稀少な状態を作り出すことができれば、AFMを用いて高分子の2次元膜あるいは分子構造の観察を行うことが期待できる。

amide III



amide II

Fig.2 FT-IR absorption spectra of thick fibroin films; Film A, B, and C. Film A is a cast fibroin film, and Film B and C were obtained after thermal and methanol treatment of Film A, respectively. The peak positions peculiar to the random coil and the β-sheet structures are marked by solid and broken lines, respectively.

#### 4. フィブロインの温度変化に伴う構造変化

本研究で主に使用しているフィブロインは、市販のフィ ブロイン(Bombyx-Mori)パウダーを濃厚中性塩水溶液 (CaCl<sub>2</sub>, またはLiBr) に溶解し、3~7日間透析した後、フ ィブロイン水溶液を調製した。その水溶液をマイカなどの 基板上にキャストし、自然乾燥後、フィブロイン薄膜試料 を得た。一般的に、二次構造の転移には、ランダムコイル  $\rightarrow \alpha$  型, ランダムコイル  $\rightarrow \beta$  型,  $\alpha \rightarrow \beta$  型転移の3 種類が ある。例えばウェットプロセスの1つとして、フィブロイ ン薄膜をメタノール中または水/メタノールの混合溶媒中 に浸せきすることによりランダムコイル型から逆平行βシ ート型構造に転移させることができる。3) またドライプロ セスの1つとして、熱処理(アニーリング)でランダムコ イル型から逆平行βシート型に二次構造の転移が起こるこ とが知られている。13)一方、フィブロイン水溶液から得ら れるキャスト膜はランダムコイル型のアモルファス薄膜に なることが一般的に良く知られている。そこで,これら作 製した薄膜試料を熱処理(210℃, 10分)することにより、 逆平行βシート型結晶の二次構造を持つ試料を作製するこ とを試みた。Fig.2に、フィブロイン薄膜のFT-IR測定結果 を示す。

**Fig.2** に示すFT-IR 測定用サンプルの膜厚は $\sim 10 \, \mu \text{m}$  である。キャストフィルムのFT-IR スペクトルをFilm A, 熱処

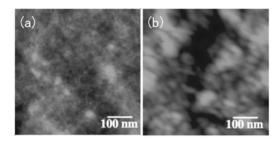


Fig.3 AFM images of fibroin films, (a) non-treatment and (b) after thermal treatment (210 °C, 10 min).

理フィルムのFT-IR スペクトルをFilm B, 比較対照サンプルとしてメタノール溶媒処理したフィルムのFT-IR スペクトルをFilm Cに示す。熱処理またはメタノール処理を行うことによって,ランダムコイル型構造から逆平行 $\beta$ シート型構造に2次構造が転移したことがわかる。

Fig.3(a)にフィブロインのキャスト薄膜のAFM像を示す。スキャンサイズ500 nm, 高さレンジ10 nm と高解像度であるが,フィブロイン薄膜の滑らかな表面構造のみしか観察することはできない。またFig.3(b)に熱処理後のAFM像を示す。FT-IR などから熱処理前は非晶質なランダムコイル型構造であり,熱処理後にはそれらが結晶の逆平行 $\beta$ シート型構造に変化したことは確認した。しかしながら,観察できるAFM像からは,表面の凝集構造とラフネスの増加のみであることがわかる。

では、なぜ高分解能にしても分子レベルで観察できないのだろうか。Fig.3 に示す様な分厚い膜では、基板表面上に一面に分子があることは認識しているが、個々の分子を特定し、識別することは不可能である。しかしながら、膜厚がサブnm程度の単分子膜あるいは擬2次元膜を創製することができれば、個々の高分子鎖を認識し、画像化できると考えられる。

そこで、稀薄フィブロイン水溶液( $\sim$ 7.5  $\times$  10  $^{-9}$  g L  $^{-1}$ )を調製した。その稀薄溶液をマイカ基板上 $\sim$ 0.02 mL cm  $^{-2}$  滴下し、自然乾燥させることによりキャスト膜を作製した。その際のAFM 観察像を Fig.4 に示す。その結果,多数の鎖状物がマイカ基板上に2 次元的にネットワークを形成していることが確認された。ここで,試料作製条件から,5  $\times$  5  $\mu$ m²の走査エリア内で観察されるフィブロイン分子の数を見積もると,キャストしたフィブロイン水溶液の濃度は $\sim$  10  $^{-9}$  g L  $^{-1}$ ,フィブロインの分子量は3.5  $\times$  10 $^{5}$  と 2.5  $\times$  10 $^{4}$  のうち前者の方が大半をしめているので前者の値を採用すると,20  $\mu$ L の溶液を1  $\times$  1 cm² のマイカ基板上にキャストした場合,8.5  $\times$  10 $^{3}$  程度のフィブロイン分子が走査エリア内で観測されると期待される。この値は,Fig.4 のAFM像から判断して大きく矛盾せず,またその分子ネットワー

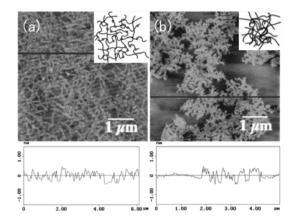


Fig.4 AFM images of fibroin fixed on mica substrates.

(a) was obtained by casting of the aqueous fibroin solution prepared with calcium chloride. (b) was obtained by casting of the aqueous fibroin solution prepared with lithium bromide.

クの高さは0.2~1.0 nm 程度であり、単一フィブロイン分子鎖のロッド状の高さに近く、ネットワークを構成する1本の糸状構造はフィブロイン分子に対応していると考えられる。一般的に超薄膜は、主にLB(Langmuir-Blodgett)法などにより作製されるが、ここでは、原子レベルで平坦であることの知られているマイカ基板上に稀薄フィブロイン水溶液をキャストすることにより、フィブロインの擬二次元薄膜を作製することができることを示す。

Fig.4(a)はCaCl2水溶液から調製したフィブロイン超薄膜であり、Fig.4(b)はLiBr水溶液から調製したフィブロイン超薄膜のAFM像である。いずれのAFM像においても、鎖の高さは約0.5 nmであり、これはランダムコイル型のフィブロイン分子鎖の高さに対応すると考えられる。この様にマイカ表面上でフィブロイン超薄膜がネットワーク状に形成されるのは、マイカ表面( $\delta$ -)とフィブロイン分子鎖( $\delta$ +)との静電的な相互作用が、フィブロイン分子鎖同士の凝集力または相互作用を上回るためであると考えられる。また、これら(a)と(b)の形状が異なるのは、溶解させた際のCa<sup>2</sup>+とLi+のイオン価数の違いによるものと考えられる。すなわち、Ca<sup>2</sup>+イオンがフィブロイン分子鎖中の官能基(-COO-)との架橋剤の役割を果たすために、一様なネットワーク状構造を形成している。

次に、 $CaCl_2$ 水溶液から調製したランダムコイル型超薄膜に対して熱処理( $210 \, \mathbb{C}$ ,  $10 \, \mathcal{G}$ )を行い、AFM 観察を行った結果を**Fig.5** に示す。

これらの図からわかるように、Fig.4で示したランダムコイルのネットワーク状構造が熱処理により収縮し、円盤状アイランド構造を形成したことがわかる。一方で、凝集し

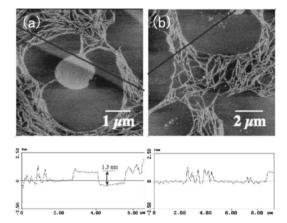
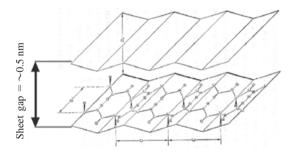


Fig.5 AFM images of fibroin films, This film was obtained by the thermal treatment of cast film at 210 ℃. (a) The island-like morphology is seen in the center area surrounded by the shrinking network. A cross section of the island is also shown. (b) The network is shrinking. The images of (a) and (b) were taken at different point in the same sample.



**Fig.6** Schematic of  $\beta$ -sheet structure of silk fibroin. The gap of two sheets is according with about 0.5 nm.

たフィブロイン鎖がアイランド状構造を形成できない場合には、 $\mathbf{Fig.5(b)}$ に示すようにネットワークが収縮した形状を取り、観察されたほとんどはこれら2つのパターンであった。また、この円盤状アイランドの厚みは約1.3 nmとなっており、熱処理によって形成された様々なアイランドの厚みを測定すると $1.25\sim1.3$  nm の整数倍の厚み、すなわち、2.5 nm、3.75 nm、5 nm となっていたことがわかった。逆平行 $\beta$ シート型構造のモデルを $\mathbf{Fig.6}$ に示す。

2枚の平均シート間距離はおよそ $0.5\sim0.6$  nmであり,アイランドの厚みはシート2枚分に相当することがわかる。 FT-IRで示したようにアモルファスが逆平行 $\beta$ シート型構造に転移することができる熱処理温度および時間を与える

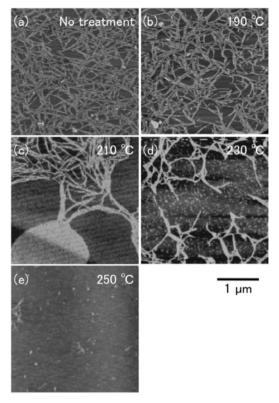


Fig.7 AFM images of fibroin films for thermal treatment, applying temperature is 190, 210, 230, 250 ℃ for 10 min.

ことにより、マイカ基板上に一定の厚みを持ったナノ構造が一様に形成されたことから、これらの円盤状構造は、フィブロインの逆平行 $\beta$ シート型結晶構造であると推定できる。

一方,作製したフィブロイン超薄膜の熱処理時の温度を 190、210、230、250  $\mathbb{C}$ に変化させた際の結果を  $\mathbf{Fig.7}$  に示す。いずれも熱処理時間は 10 分間である。フィブロインのガラス転移温度( $T_g=\sim190$   $\mathbb{C}$ )で熱処理した際のAFM像が  $\mathbf{Fig.7(b)}$  である。未処理のAFM像(a)と比較して,若干,分子鎖間が凝集している様にも見て取れるが,全体的にはほぼ変化が観察されなかった。熱処理温度 =210  $\mathbb{C}$  ででは,  $\mathbf{Fig.5}$  と同様に凝集および円盤状アイランド構造を形成した。熱処理温度 230  $\mathbb{C}$  ( $\mathbf{Fig.7(d)}$ ) では,凝集構造部分と小さな粒々状の形状が観察され,また全体的に観察された分子鎖の領域も(a)、(b) および(c) と比較して減少していた。さらに高温である 250  $\mathbb{C}$ で熱処理した結果を  $\mathbf{Fig.7(e)}$ に示す。この時には,フィブロイン分子のアイランド構造や凝集構造はほとんど観察されなかった。J. NAM らの報告 18 によれば,再生フィブロインのDSC 測定より熱分解温度は約285

でであるが、その吸熱ピークは230 ℃付近から生じている。今回示したフィブロイン超薄膜の熱処理温度230 ℃の結果 (Fig.7(d)) において粒状のものが多数観察され、また全体的にフィブロイン分子鎖の量が減少していたのは、部分的に熱分解が生じていたことが示唆される。従来、分光法や散乱、熱測定によってフィブロインの2次構造の同定が行われてきたが、この様に、AFMを駆使することにより、分子が変化していく様子を実空間で視覚的に観察出来ることを示すことができるのは大変興味深いことであり、今後のナノ制御およびナノ計測、特にナノレベルでの熱測定にこれらの知見を応用することを目指して行きたい。

#### 5. おわりに

ここでは、マイカ基板上におけるフィブロイン超薄膜の 温度変化時のAFM像のみを示したが、時間変化との相関を 検証できれば、今後のナノ計測に役立っていくものである と考える。

従来,高分子の物性測定は,分光法や熱測定をはじめとして,バルク平均で測定しているものが大半であった。近年,ナノテクノロジーの発展により,微細化や高機能化が急速に進んでいるが,高分子材料,特にタンパク質や生体分子においては,単分子レベルでの挙動や性質に対する知見がまだまだ少ない。

本解説で示したように,高分子は温度などの外場変化に 敏感な材料であり,また超薄膜などの極限られた空間へ分 子を束縛することにより,バルク状態とは異なった形状や 構造を示す。

この様に、超薄膜という特殊な束縛条件下の物質に対して動的熱変化を与えることにより、ナノレベルで物質の構造変化を捉えることに成功した事は非常に重要であり、今後の科学的知見に大いに役立つものであると考えている。

#### 文 献

- K. Yamada, T. Itoh, and Y. Tsuboi, Appl. Phys. Ex. 1, 087001 (2008).
- 2) 馬越 淳, 高分子論文集 31, 648 (1974).
- 3) 馬越 淳, 高分子論文集 31, 765 (1974).
- 4) C. X. Liang and K. Hirabayashi, *Sen-i Gakkaishi* **46**, 535 (1990).
- 5) M. Tsukada, Sen-i Gakkaishi 41, T-265 (1985).
- M. Tsukada, G. Freddi, N. Minoura, and G. Allara, J. Appl. Poly. Sci. 54, 507 (1994).
- 7) 北條舒正編, 続絹糸の構造, 信州大学繊維学部, 277 (1980).
- 8) 北條舒正編, 続絹糸の構造, 信州大学繊維学部, 276 (1980).

- 3) 北條舒正編,続絹糸の構造,信州大学繊維学部,335 (1980).
- 10) 清水正徳, 蚕試報 10, 475 (1941).
- O. Kratky, E. Schauenstein, and A. Sekoda, *Nature* 165, 319 (1950).
- 12) 馬越 淳, 高分子化学 30, 580 (1973).
- 13) 馬越 淳. 高分子論文集 31, 463 (1974).
- 14) 馬越 淳, 高分子論文集 30, 649 (1973).
- M. Tsukada, G. Freddi, P. Monti, A. Bertoluzza, and N. Kasai, J. Poly. Sci. Pt.B 33, 1995 (1995).
- G. Freddi, P. Monti, M. Nagura, Y. Gotoh, and M. Tsukada, J. Poly. Sci. Pt.B 35, 841 (1997).
- 17) K. Yamada, Y. Tsuboi, and A. Itaya, *Thin Solid Films* 440, 208 (2003).
- 18) J. Nam, and Y. H. Park, J. Appl. Polym. Sci. 81, 3008 (2001).

#### 要旨

本トピックでは、熱処理によって誘起されるフィブロイン超薄膜の分子コンフォメーションの変化について解説する。絹フィブロイン水溶液をキャストすることによってマイカ基板上に固定化し、その微視的なモルフォロジーの状態をAFMで観察した。最適な条件でフィブロイン水溶液からキャスト膜を準備することにより、我々はマイカ基板上にランダムコイルからなる一様な2次元ネットワーク状のフィブロイン超薄膜を作製することに成功した。それら超

薄膜に対して、フィブロインの二次構造をランダムコイルから $\beta$ シート結晶へ転移させることが可能な温度で熱処理すると、ネットワーク状構造は消え、特徴的なアイランド状構造が形成された。 $\beta$ シート結晶形成の傾向は、フィブロイン水溶液が一時的にゲル化状態へと進展するという事実によって確かめられる。これらの結果を基にして、アイランド状構造は $\beta$ シート結晶であると結論づけられる。また、特に興味深い結果はすべてのアイランドが約1.3 nmという厚みを示したということであり、さらに、マイカータンパク質間相互作用が、特徴的なモルフォロジーまたはタンパク質の自己組織化を誘引していると考えられる。本研究において、我々はその様なマイカ基板とフィブロイン分子との間の特定の相互作用を提案する。



山田和志 Kazushi Yamada 京都工芸繊維大学伝統みらい研究セン ター, Future Applied Conventional Technology Center, Kyoto Institute of Technology, TEL. 075-724-7850, FAX. 075-724-7844, e-mail: kazushi@kit.ac.jp

研究テーマ: 高分子薄膜のナノ構造制 御に関する研究

趣味:ドライブ,写真