

# シルクフィブロインの結晶／非晶構造を利用した 抗菌性シルク素材の開発

## Immobilization of antibacterial molecules to silk fibroin materials

奈良女子大学大学院生活環境科学系衣環境学領域 助教 橋本 朋子

Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University, Tomoko Hashimoto

### 1. はじめに

シルクフィブロインは美しい光沢、優美な風合い、また高い吸湿性などの性質を示し、古来より高級繊維素材として重宝されている。またその高い生体適合性から、外科用の縫合糸としても長年の実績をもつ。近年では再生医療用の生体材料としての研究が数多く報告されている。生体材料として用いる場合、材料の殺菌・抗菌処理が必要不可欠となる。また近年では院内感染を引き起こす耐性菌の出現や一般消費者の清潔志向の高まりなどから、生体材料としてだけでなく、衣料としても抗菌性付与は重要な要素となってきた。現在、銀や銅など金属イオンをフィブロイン表面に保持し抗菌性を付与する (1)、または正電荷を示すポリマーを表面にグラフトするといった手法により作製された抗菌性を有するシルクフィブロイン材料が報告されている (2)。しかしながら、金属イオンの溶出による抗菌性の早期喪失や皮膚への刺激などが懸念される。

これまでに、筆者らは、シルクフィブロイン成形体への加熱滅菌処理が構造変化に与える影響について詳細に検討を行ってきた。シルクフィブロインスポンジを各滅菌法で処理し、固体 NMR 測定により構造解析を行った結果、水が存在するオートクレーブ処理後の成形体では、そのタンパク質二次構造のうち、シルク II 型が大きく増大するのに対し、水を完全に除去し行った乾熱滅菌では、全く構造変化が起きなかった。これらの結果より、シルクフィブロインのタンパク質二次構造変化に水が大きく寄与

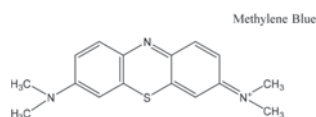
していること、また滅菌法によって構造を制御できることが示唆された。また、スポンジに続き、布帛を用いてオートクレーブ処理と構造変化の関連性を調べた結果、布帛においてもタンパク質二次構造の変動が示された (3)。

そこで、本研究では、構造変化が誘導されるオートクレーブ処理中に、水溶性の機能性分子を共存させることで、構造変化に付随し機能分子をシルクフィブロイン非晶部へ安定に固定化できるのではないかと考え、シルクフィブロイン布帛と機能性ペプチドを共存させた状態でオートクレーブ処理を行った。本研究で使用する抗菌性ペプチドは、機能配列にカチオン性残基を含むことから、浸潤後フィブロイン側鎖との静電的な結合も期待できる。フィブロインのタンパク質二次構造変化に伴ってペプチドを非晶部分へと浸潤させ、フィブロインへの安定的なペプチドの固定化を目指した。まず、抗菌性カチオンペプチドのモデル分子としてカチオン性染料を選択し、固定化量の定量、並びに固体 NMR 測定により構造変化、また分子運動性を解析し、固定化最適条件を検討した。得られた最適条件下で抗菌性ペプチドをシルクフィブロイン布帛へ固定し、抗菌性シルク布帛の創出を試みた。

### 2. 実験方法

シルクフィブロイン試料として市販の布帛（縞織、厚み約 160  $\mu\text{m}$ ）を、モデル分子としてカチオン性染料のメチレンブルー（図 1）を使用した。メチレンブルーの 1 mM 水溶液を

調整 (pH : 8.2)、シルクフィブロイン布帛を浴比 1:100 で浸漬し、処理温度 (121 度、132 度)、処理時間 (20 分~ 99 分) を変えてオートクレーブによる固定化処理を行った。常温で 30 分浸漬、または 60 度で 30 分加熱したシルクフィブロインを比較試料とした。



**Figure 1.** Chemical structure of model molecules.

モデル分子固定化処理後シルクフィブロイン布帛の測色はカラーリーダーを用いて行い、モデル分子の固着を CIE 標準表色系である XYZ 表色系により評価した。

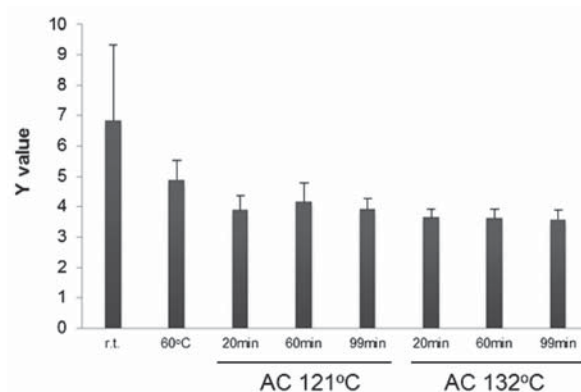
固体  $^{13}\text{C}$  Cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) NMR 測定により染料共存下での加熱処理によるシルクフィブロイン二次構造の変化を調べた。併せて、固体  $^{13}\text{C}$  Puls saturation transfer/MAS (PST/MAS) NMR 測定を行い、モデル分子固定によるシルクフィブロイン分子の運動性の変化を評価した。また固定化処理後シルクフィブロイン布帛の FE-SEM 観察を行い、水溶液中での加熱処理によるシルクフィブロイン布帛の表面形状へ与える影響を調べた。

抗菌性分子として、ウシ好中球から産生されることが知られる 12mer の抗菌性配列 RLCRIVVIRVCR (4) を選択した。N 末端側に蛍光分子 TAMRA をラベルしたペプチド (5 (6) -TAMRA-RLCRIVVIRVCR -CONH<sub>2</sub>) を用いて 10  $\mu\text{M}$  水溶液を調整、この水溶液にシルクフィブロイン布帛を浴比 1 : 100 で浸漬、121 度でのオートクレーブ処理により固定化を行った。固定化後試料の蛍光画像の観察により固定化の確認を行った。

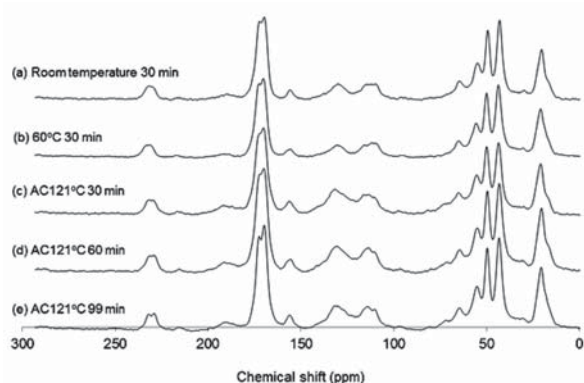
### 3. 結果と考察

モデル分子固定化後のシルクフィブロイン布帛を目視で観察した結果、室温や 60 度での処理では全体的に色むらが見られたのに対し、オートクレーブ処理した布帛では、ほぼ均一に固着していた。特に 121 度 60 分の条件で最も色むらなく濃く固定化されていた。

固定化の評価として色度測定を行った。メチレンブルーを共存させてオートクレーブ処理を行った各布帛の Y 値を図 2 に示す。今回使用した XYZ (Y<sub>xy</sub>) 表色系では、Y 値が明度を示し、完全白色の試料ではこの Y 値が 100 となる。未処理のシルクフィブロイン布帛の Y 値は 82.3 +/-0.59 であり、この Y 値が低くなる程、より多くのモデル分子がシルクフィブロイン布帛に固着したことを示す。図 2 より、室温浸漬または 60 度での加熱処理に比べ、オートクレーブ処理での Y 値が小さくなっており、すなわち、モデル分子をより濃く固定化できる結果が示された。色相・彩度を表す値である x、y 値の比較を行うと、室温浸漬に比べ、60 度での加熱処理やオートクレーブ処理による固定化処理条件において、より色むらが少なく固定化されていることが明らかとなり、目視での観察結果と同じ傾向が示された。



**Figure 2.** The Y values of silk fibroins after the fixation using methylene blue in the XYZ color specification system defined by CIE.

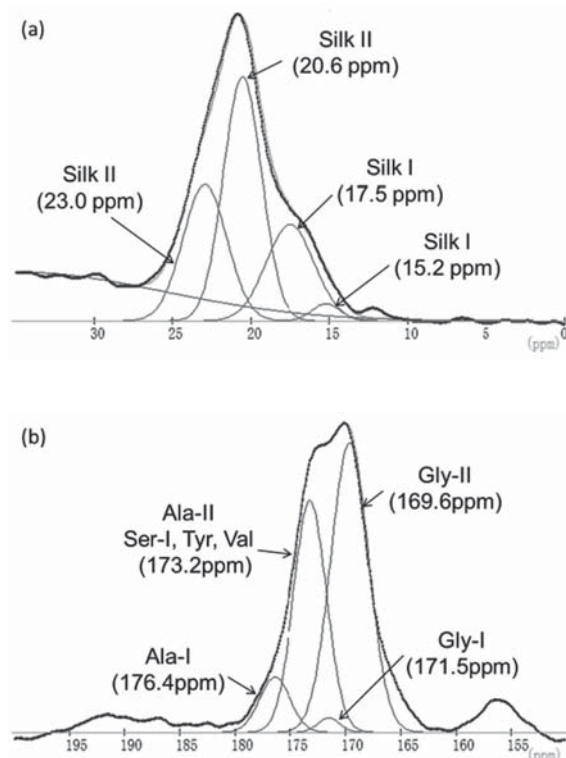


**Figure 3.** Solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra of methylene blue-fixed silk fibroin fabrics.

メチレンブルーを各条件で固定化した試料の固体  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR 測定結果を図3に示す。なお、今回モデル分子として使用したメチレンブルーの粉末、また未処理シルクフィブロイン試料の NMR スペクトルよりカチオン性染料そのものは固定化処理後試料のスペクトルに影響を与えず、スペクトル強度の変化は全てシルクフィブロイン分子の構造変化を差し示すことを確認している。

シルクフィブロインは繰り返し配列 “Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser” から成る結晶領域と非晶領域から構成されている。得られたスペクトルのうち、20ppm 付近の Ala  $\text{C}_\beta$  ピークはシルクフィブロインのタンパク質二次構造変化に敏感であり、また他の分子のピークと重ならず単独で現れる。そのためこの Ala  $\text{C}_\beta$  ピークを解析し、試料内のシルクフィブロイン構造の割合を求めた。図4 (a) にメチレンブルー水溶液内で 121 度 30 分処理した試料の Ala  $\text{C}_\beta$  ピークフィッティング結果を示す。このピーク解析を他のサンプルでも行い比較した結果、オートクレーブ処理によるシルクフィブロイン内のシルク I 型、II 型の増減が確認された。この結果は、モデル分子が共存している、シルクフィブロインのタンパク質二次構造がオートクレーブ処理により変動することを示し、この構造変化に伴って、共存分子の非晶領域への固定化はより進行するものと考えられる。

続いて 170ppm 付近の C=O 基 (図4 (b))

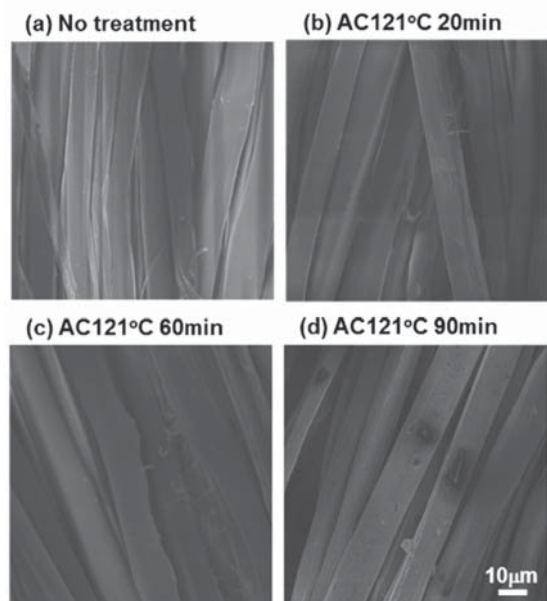


**Figure 4.** The spectral fittings of (a) Ala  $\text{C}_\beta$  and (b) C=O peak regions of the  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra. The silk fibroin fabric was autoclaved with methylene blue at 121°C for 30min.

に着目した。結晶領域を強調する CP/MAS NMR 測定で得た C=O 基のピーク強度と、非晶領域を強調する固体  $^{13}\text{C}$  PST/MAS NMR 測定より得た C=O 基のピーク強度の比である  $\text{C}=\text{O}_{\text{CP/PST}}$  値は、値が大きいほどその分子の運動性が低いことを示す。各固定化条件で得たシルクフィブロイン試料の NMR 測定結果より Ala I 型 (176.4ppm) の  $\text{C}=\text{O}_{\text{CP/PST}}$  値を求め運動性について評価した結果、未処理試料に比べるとモデル分子を固定化したいずれの条件でも C=O 基の運動性が低くなり、室温浸漬または 60 度での固定化処理よりも、オートクレーブ処理で得たシルクフィブロインの C=O 基でより大きく運動性の低下が示された。この C=O 基の運動性低下は、色度測定で得た Y 値の減少傾向と一致しており、これらをふまえると、モデル分子との相互作用により非晶領域の C=O 基の運動性が低下したものと考察している。



次に、モデル分子共存下でのオートクレーブ処理がシルクフィブロイン試料の表面形態に与える影響を調べるため、FE-SEM 観察を行った (図 5)。いずれの処理条件でも、顕著なフィブリル化などは確認されなかった。しかしながら、オートクレーブ処理試料において、繊維表面に微細な溝が観察され、オートクレーブの処理時間が長くなる程、この溝が大きくなっていった。



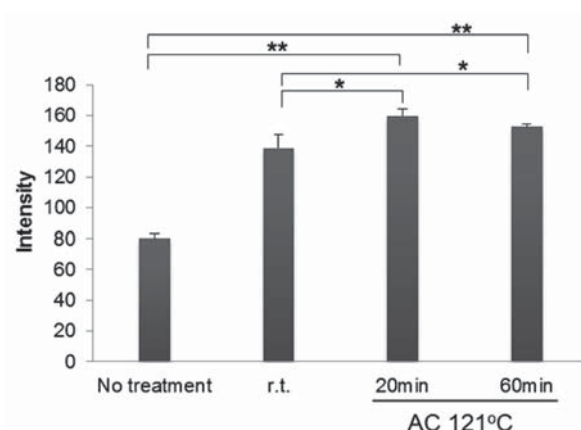
**Figure 5.** FE-SEM images of (a) the no treated silk fibroin fabric and autoclaved silk fibroin fabrics with methylene blue at 121°C for (b) 20min, (c) 60min, and (d) 90min.

以上のモデル分子を用いた検討より、分子を共存させた状態でのオートクレーブ処理を行うことで、シルクフィブロイン二次構造の変化と機能性分子の固定化が起こり、室温や 60 度での処理といった常温・常圧の条件に比べてより安定に多くの分子が固定されることが示された。オートクレーブの条件については、先の研究において、その処理時間が長くなるほど、また温度が高くなる程、シルクフィブロインの分子量が低下することが明らかとなっている (3)。このオートクレーブ処理による分子量への影響に加え、FE-SEM 画像で認められた表面形態への影響を考慮すると、オートクレーブの温度は 121 度、時間は 60 分以下の処理が物性に与

える影響を軽減し、かつ高い効率で固定化できる条件であると考えられる。

モデル分子を使った条件検討の結果をふまえて、121 度で 12mer の蛍光ラベル抗菌ペプチドをオートクレーブ処理により固定化した。励起光照射下での画像観察によりペプチド分子が布帛に均一に固定化されていることが認められた。固定化後試料の蛍光画像を画像解析ソフトにより解析し単位面積あたりの輝度を算出した。得られた各平均輝度を図 6 に示す。各試料の輝度を比較すると、オートクレーブ処理により蛍光ラベルペプチドを固定化した試料は室温浸漬の試料に比べ、高い輝度を示し、この結果はモデル分子を用いた結果と同様の傾向であった。

以上の評価より、オートクレーブ処理という水のみを使用する加熱によって、結晶/非晶構造をもつシルクフィブロイン布帛に抗菌性カチオンペプチドを効率よく固定化できることが示された。



**Figure 6.** Fluorescence intensities of silk fibroin fabrics. Silk fibroin fabrics were autoclaved in the presence of TAMRA-labeled peptide at 121°C for 20min and 60min.

\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.0001$

#### 4. まとめ

オートクレーブ処理中に水溶性分子を共存させることでシルクフィブロインに効率よく分子を固定化することができた。固体 NMR 測定による詳細な解析により、固定化された分子のシルクフィブロイン内の C=O 基との相互作用が

示唆された。本研究で得られた結果は、低環境負荷で安価な、オートクレーブ処理によるシルクフィブロインへの機能性分子固定化法の有用性を示した。本機能分子固定化法は、紡糸・成形前に予め混入させる、また成形後の後処理として薬剤や無機物との混合物を付与する、化学反応を施す、などの従来手法に比べ、シルクフィブロイン成形体の風合いや優れた性質を保持しながら、安定で高い抗菌性を提示できると考えられる。また、ペプチド配列を変化させることにより、今回評価に用いた抗菌性能のみならず、血管新生機能や細胞増殖機能など、様々な機能を有したシルクフィブロイン材料の開発につながる可能性を秘めている。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成いただいた公益財団法人京都技術科学センターに深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. Moazami A, Montazer M, Rashidi A, & Rahimi MK (2010) Antibacterial properties of raw and degummed silk with nanosilver in various conditions. *J Appl Polym Sci* 118 (1) :253-258.
2. Xing T, Hu W, Li S, & Chen G (2012) Preparation, structure and properties of multi-functional silk via ATRP method. *Applied Surface Science* 258 (7) :3208-3213.
3. Hashimoto T, *et al.* (*in preparation*) Structural changes of silk fibroin fabrics by the wet-heat treatment.
4. Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, & Gennaro R (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 263 (20) :9573-9575.