

パパインによる絹タンパク質フィブロインの消化性

Digestibility of Silk Protein Fibroin by Papain

源 川 博 久

Hirohisa Minagawa

The raw silk protein from the cocoons of silkworms, *Bombyx mori*, is composed of sericin (20-30%) and fibroin (70-80%). Fibroin, the protein of silk threads, has been used mainly in the textile industry. Recently, it has been used in other industries as well, particularly in the food industry, where silk fibroin degraded to amino acids has been used. In order to use silk fibroin as a food material, the digestibility of silk fibroin and the functionality of peptide derived from fibroin are important. In this study, I determined that the digestibility of water-soluble silk fibroin and silk fibroin by papain *in vitro*. The results showed that papain was highly digestible to water-soluble silk fibroin, but not to silk fibroin. It is suggested that the digestibility of silk fibroin is greatly affected by its physical properties. These results indicated that papain can easily prepare degradation products from water-soluble silk fibroin. Furthermore, peptides derived from water-soluble fibroin by papain are expected to be used as food materials.

はじめに

古来より、日本では主にカイコガ科の蚕である家蚕(*Bombyx mori*)の繭を製糸、繰糸した生糸を利用してきた。福島県では江戸時代から養蚕が盛んにおこなわれており、福島県農林水産部により作成された「令和4年度ふくしまの蚕糸」によると、福島県における上繭量は2022年度では全国第3位の8700kgである¹⁾。生糸は主にタンパク質で構成されており、家蚕の生糸のタンパク質はセリシンが20-30%、フィブロインが70-80%を占め、2本のフィブロインの周りをセリシンが覆った構造である²⁾。この生糸を精練にてセリシンを除去すると絹糸が得られる。絹糸を構成するタンパク質はほとんどがフィブロインであり、繊維状タンパク質に分類されるため水に不溶である。

日本における絹糸は、古来より主に繊維分野で用いられてきたが、近年では絹フィブロインの粉末が化粧品や食品分野などの非繊維分野で利用が拡大され、年々市場が拡大傾向にある³⁾。しかし、絹フィブロイン粉末の製造法やコスト面などの問題から、絹フィブロインを酸などで加水分解したアミノ酸分解物⁴⁾を使用しているのが現状である。

絹フィブロインの消化・吸収性に関する研究報告は少なく、陳らによる加水分解した絹蛋白

質の消化⁵⁾、平尾らによる気泡性フィブロインの消化性⁶⁾ならびに著者らによる水溶化した絹フィブロイン(以下、水溶性絹フィブロインと略す)のヒトタンパク質分解酵素の単独ならびに連続消化率が報告⁷⁾されているにすぎない。また、絹フィブロイン自体の消化性は報告されていない。

そこで、未だ不明である絹フィブロインと水溶性絹フィブロインの消化性を明らかにするために、植物由来タンパク質分解酵素の一つであるパパインによる消化性を*in vitro*にて検討した。

実験方法

1. 水溶性絹フィブロイン粉末ならびに絹フィブロイン粉末の調製

水溶性絹フィブロインの調製条件についてはいくつか抽出条件が報告されているが⁸⁾⁹⁾、収量的な問題と不溶物混入の問題を改善した著者らの抽出条件にておこなった⁷⁾。すなわち、10gの家蚕生糸(下村ねん糸、京都)を250mLの0.05%炭酸ナトリウム溶液にて60分精練をおこない、セリシンを除去した。絹糸を乾燥させた後、100mLの50%塩化カルシウム溶液にて45分間煮沸抽出し、抽出液を水道水で4日間透析して塩化カルシウムを除去した。透析内液を25,000×g、15分間、4℃にて遠心分離することで不溶物を除去し、凍結乾燥した上清をブレンダーにて粉末化したものを水溶性絹フィブロイン試料とした。

絹フィブロイン粉末の作製は、精練後の絹糸をハサミで1～2mm程度に切断したものを絹フィブロイン試料とした。

2. *In vitro*における人工消化試験

*In vitro*における人工消化試験は、小谷らの方法に準じておこなった¹⁰⁾。すなわち、ねじ口試験管に試料を100mg精秤し、pH7.0のリン酸緩衝液を9mL加えて攪拌した。これにパパイン(和光純薬)をリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した酵素液1mL加え、55℃、100rpmにて振とうしながら反応させた。反応終了後、50%トリクロロ酢酸 2mLを加えてよく攪拌し、氷水にて酵素反応を停止させ、全ての反応液を25,000×g、15分間、4℃にて遠心分離により上清と沈殿に分離した。この上清と沈殿をそれぞれセミマイクロ改良ケルダール蒸留法にて酵素反応後の未消化残渣窒素量を求め、その比率から消化率を算出した。

酵素量の検討では、水溶性絹フィブロインを基質として酵素液中のパパイン量を0、0.1、1、2、4、8mgとなるようにリン酸緩衝液で調製し、反応時間を180分でおこなった。また、消化時間の検討については、反応時間を0、10、15、30、60、180分でおこなった。

絹フィブロインの消化性の検討は、リン酸緩衝液(pH7.0)に16時間浸漬し、酵素量1mg、消化時間は0、15、30、60、180、300、1440分でおこなった。

なお、全ての消化試験は3連でおこない、結果は平均値で示した。また、同一の消化試験を2回おこない、再現性についても確認した。

結果および考察

1. 人工消化試験における酵素量の決定

水溶性絹フィブロインを基質とし、酵素量 0、0.1、1、2、4、8 mg、反応時間180分の消化率は酵素量 0 mgと比較していずれの酵素量においても高く、各酵素量における消化率は、0、77、83、86、86、91%であった(表 1、図 1)。酵素量0.1mg における消化率は77%で酵素量の増加に伴い消化率は若干増加がみられたが、ほぼ横ばいであった。そのため、酵素量0.1mgでも消化はほぼ終了していると考えられたが、消化率のばらつきがより小さい 1 mgを酵素量に決定した。

表1 消化時間180分における水溶性絹フィブロインのパパインによる消化率

Papain concentration (mg/10 mL)	0	0.1	1	2	4	8
Digestibility (%)	0	77	83	86	86	91

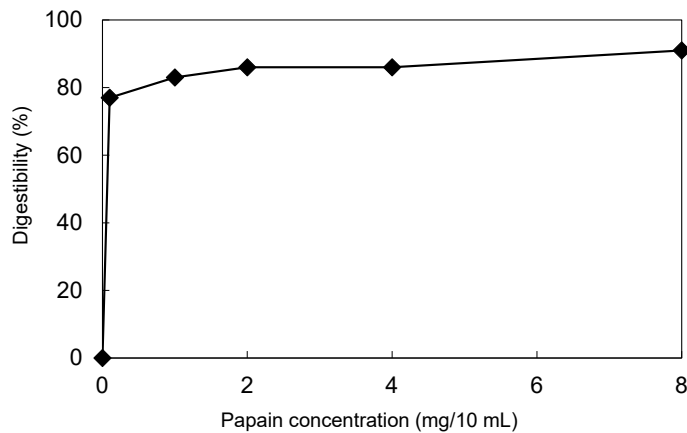


図1 消化時間180分における水溶性絹フィブロインの消化率と酵素量

2. 水溶性絹フィブロインにおけるパパイン消化性の経時的变化

酵素量 1 mg、反応時間 0、10、15、30、60、180分における水溶性絹フィブロインの消化率は、消化時間 0 分と比較していずれの消化時間においても消化率が高かった。各消化時間における消化率は、0、73、77、80、86、83%であった(表 2、図 2)。

表2 水溶性絹フィブロインのパパインによる消化率

Reaction time (min)	0	10	15	30	60	180
Digestibility (%)	0	73	77	80	86	83

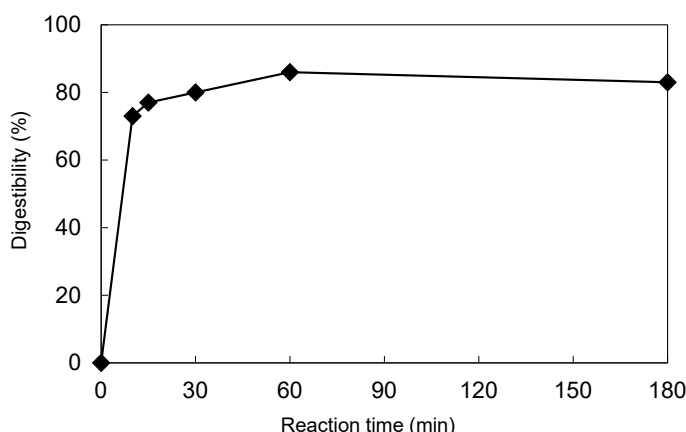


図2 水溶性絹フィブロイン消化率の経時的変化

3. 絹フィブロインにおけるパパイン消化性の経時的変化

酵素量 1 mgにおける絹フィブロインの消化率は、消化時間 0 分と比較していずれの消化時間においても消化率に差は認められず、各消化時間における消化率はいずれも 0 %であった(表 3)。

表3 絹フィブロインのパパインによる消化率

Reaction time (min)	0	15	30	60	180	300	1440
Digestibility (%)	0	0	0	0	0	0	0

近年、絹糸は繊維分野以外にも様々な分野で利用されている。しかし、絹糸のタンパク質であるフィブロインを食品素材として利用する上で重要となる消化性については、ヒトのタンパク質分解酵素以外の報告は極めて少ない。また、植物由来のタンパク質分解酵素で広く利用されているパパインによる消化性の研究報告はなされていなかった。そこで、パパインによる水溶性絹フィブロインと絹フィブロインの消化性を明らかにするために、*in vitro*における人工消化試験にて検討した。初めに消化試験の条件として酵素量の決定をおこない、酵素量を 1 mg と決定した。

パパインによる水溶性絹フィブロインの消化性は、消化時間10～180分において消化率は73～86%であった。最大消化時間の180分においても消化率に大きな変化は認められず、消化時間10分以降の消化率がほぼ横ばいであることから、最長30分でパパインによる水溶性絹フィブロインの消化が終了したことが推察される。著者らは、ペプシン10mg、消化時間180分における水溶性絹フィブロインの消化率が約28%と報告している⁷⁾。パパインによる消化はペプシンと比較して少ない酵素量と短い反応時間で終了したことから、パパインの水溶性絹フィブロイ

ンに対する消化性が高いことが示唆された。

一方、絹フィブロインにおけるパパインの消化性は、消化時間0～180分で0%であり、1440分においても0%であった。また、ヒトの生体内に存在するタンパク質分解酵素である、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンによる消化も同様であった(未発表)。これらのことから、絹糸のフィブロインはパパインやヒトのタンパク質分解酵素による酵素反応に対して非常に強い抵抗性を持つことが考えられ、絹フィブロインの消化性の低さは、基質である絹糸を構成するフィブロインの物理的構造や物理的性状の影響が大きいことが推察される。

また、パパインはヒトのタンパク質分解酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシンと同じエンド型のタンパク質分解酵素であるため、基質の内部の切断部位を認識して切断する。しかし、パパインの基質切断部位はペプシンなどとは異なる。パパインは基質特異性が広く、なかでも塩基性アミノ酸、グリシン及びロイシンと続くアミノ酸とのペプチド結合を切断するのに対し、ペプシンは酸性アミノ酸、芳香族アミノ酸残基と続く配列のN末端側を切断する¹¹⁾。水溶性絹フィブロインの構成アミノ酸は、グリシン35.8%、ロイシン1.1%、芳香族アミノ酸7.2%であるため⁷⁾、水溶性絹フィブロインにおけるパパインの切断部位はペプシンなどよりも多く存在することが示唆される。

さらに、家蚕は絹糸腺よりフィブロイン分解酵素であるフィブロイナーゼを分泌し、体内の残余フィブロインを分解することが知られている。フィブロイナーゼはカテプシンL様システインプロテアーゼであるが¹²⁾、パパインもシステインプロテアーゼである¹³⁾。そのため、絹糸を構成するフィブロインは、システインプロテアーゼによる消化性が高いことも考えられる。パイナップルのタンパク質分解酵素として知られるブロメラインもシステインプロテアーゼであるため、フィブロインのシステインプロテアーゼによる消化性を明らかにするにはフィブロインにおけるブロメラインの消化性を確認することも重要であると考えられる。

以上、パパインは絹フィブロインを消化することはできなかったが、水溶性絹フィブロインに対する消化性が高いことを明らかにし、その消化性の高さはパパインの切断部位がペプシンなどのタンパク質分解酵素よりも基質である水溶性絹フィブロインに多数存在すること、パパインがフィブロイナーゼと同じシステインプロテアーゼであることが推察される。今後はパパインの消化により派生するペプチドの栄養機能性を明らかにすることで、新たな食品素材としての利用が期待される。

参考文献

1. 福島県農林水産部：令和4年度ふくしまの蚕糸、<https://www.pref.fukushima.lg.jp/uploaded/attachment/567121.pdf>(2023年9月アクセス可)

2. 皆川基：絹の科学、関西衣生活研究会、大阪、p29-45(1981)
3. シルクサイエンス研究会編：シルクの科学、朝倉書店、東京、p.7-9、p.113-23(1984)
4. 陳開利、高野亮、平林潔：塩酸加水分解による水溶性絹粉末の作製とその物性、日本蚕糸学雑誌、60、358-362(1991)
5. 陳開利、井浦克弘、相沢龍司、平林潔：加水分解した絹蛋白質の消化、日本蚕糸学雑誌、60、402-403(1991)
6. 平尾和子、塚越幸子、五十嵐喜治：絹フィブロイン起泡粉末の給与がラットの血清コレステロール濃度に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会誌、52、219-223(1999)
7. 源川博久、前川昭男、山本祐司、田所忠弘：水溶性絹フィブロインの消化・吸収性、日本栄養・食糧学会誌、57(5)、215-220(2004)
8. 平林潔：絹の可溶化とその応用、Bio. Ind.、6、749-754(1989)
9. 安田勝利：絹蛋白質の新利用技術に関する試験(第1報)、岐阜蚕糸研要報、6、46-56(1996)
10. 小谷スミ子、粟津原宏子、加藤征江：未変性および熱変性オボアルブミンのペプシン、トリプシン、キモトリプシン消化による抗原性の変化、日本家政学会誌、48(8)、717-722(1997)
11. 森原和之：プロテアーゼの種類と基質特異性、日本醸造協会雑誌、70(9)、632-636(1975)
12. Pengchao Guo, Zhan Wang, Qian Wang, Huawei Liu, Yunshi Zhang, Haiyang Xu, Ping Zhao, Fibroinase and its physiological inhibitors involved in the regulation of silk gland development in the silkworm, *Bombyx mori*, Insect. Biochem. Mol. Biol., 106, 19-27 (2019)
13. Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN, Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for B and H, and stem bromelain, J. Mol. Biol., 182, 317-329 (1985)