

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32618

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K13808

研究課題名（和文）繊維基質上のタンパク質直接定量法における汎用条件の検討

研究課題名（英文）Study of Generalized Conditions in Protein Direct Determination on Fiber Substrates

研究代表者

塚崎 舞 (Tsukazaki, Mai)

実践女子大学・生活科学部・助教

研究者番号：50844924

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、布に付着したタンパク質汚れを、タンパク質比色定量法のBCA法によって呈色させ、表面反射率により直接定量する方法を確立することを目的とし、影響要因として考え得る、タンパク質および布の種類、さらに、実際の被服の汚れへの応用のため、界面活性剤や酵素、脂肪酸がタンパク質と共存するときの影響を検討した。その結果、布上のタンパク質量とK/S値に良好な相関性が得られ、検量線として直接定量が可能であることが明らかとなった。特定のアミノ酸基、布帛の水分保持性等によってある程度影響を受けるが、本定量法は界面活性剤の影響を受けにくく、汎用性が高いことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで検討されていない、布上の無色のタンパク質を高感度で簡便に直接定量する方法を明らかにし、洗浄研究への適用に向けた基礎的な知見を得ることができた。今後、さらに実際の汚れに近い条件の検討を進めていくことで、実験者の技量や、複雑で時間を要する機器・手順を必要とせず、数多くの試料を扱うことが容易となり、例えば、タンパク質汚れに特化した新規洗浄剤、防汚素材の開発を目指す、幅広い分野の研究者にとって、スピーディで精度の良い定量分析を行う手段として貢献できると考える。また、視覚的に被服の汚れを捉えやすく、色相でタンパク質汚れ量を推定する教材としての活用も期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop novel method for directly determining proteins adhering to fabric by measuring the reflectance of the BCA method color reaction. It also investigated the effect of the type of protein and the fabric used as the substrate; as possible factors influencing this determination method. Additionally, for application to cleaning research, it examined the effect of surfactants and enzymes contained in laundry detergents; and fatty acids compounded as sebum soil which coexist in this determination method. As a result, a good correlation was obtained between the amount of protein on the fabric and the K/S value, indicating that direct quantification of protein is possible as a calibration curve. Although affected to some extent by specific amino acid groups, moisture retention of the fabric, and other factors, it was found to be less affected by surfactants, and have highly versatility this quantification method.

研究分野：被服整理学、染色化学

キーワード：BCA法 タンパク質汚れ 定量 布 皮脂 界面活性剤 繊維 反射率

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被服に付着する汚れには、水溶性汚れ、粒子汚れ、油性汚れ、タンパク質汚れが挙げられる。タンパク質汚れにはヘモグロビン等の有色のもの、無色のものが存在し、特に無色のものは、布にどの程度付着しているかを目視で確認することは非常に困難である。タンパク質汚れが残留したままの被服を保管してしまうことで、それを栄養源とする微生物や酸化の影響により、布の黄ばみといった着色汚れ、悪臭等の問題が生じる。このようなタンパク質汚れを対象とし、被服整理学分野では、布に付着しているタンパク質の量を明らかにする定量分析の手法が多く用いられている。しかし、そのためには布からタンパク質を分離抽出し、液体試料として測定に用いる必要があり、長時間、複雑な手順が要求される。さらに、抽出過程において実験者により結果に差が生じやすいという難点がある。これまで、タンパク質の簡便な定量法を検討した例として、有色タンパク質であるヘモグロビンを用いて汚染布を作成し、反射率の測定によって質量単位でタンパク質を定量および洗浄効率を求める方法、ピシンコニン酸 (BCA) による呈色反応試薬をタンパク質汚染紙上で直接反応させ、反射率を測定して定量する方法が挙げられる。しかし、布を基質として、無色のタンパク質を対象とした定量法に関する研究は報告されていない。

2. 研究の目的

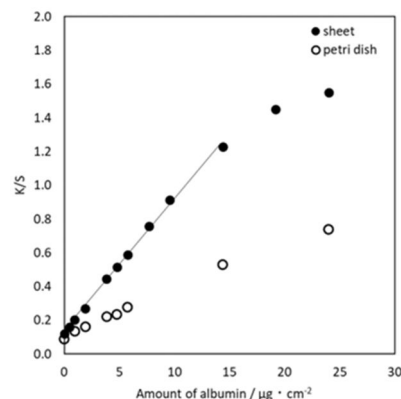
本研究では、布に付着したタンパク質を、タンパク質比色定量法として用いられている BCA 法によって呈色させ反射率の測定により直接定量する方法を確立することを目的とし、この定量法の影響要因として考え得る、タンパク質の種類、付着基質となる布の種類による影響の検討を行った。さらに、洗浄研究への適用のために、影響要因として考えられる、洗濯洗剤に含有される界面活性剤と酵素、皮脂汚れとしてタンパク質と複合する脂肪酸が共存するときの本定量法への影響を検討した。

3. 研究の方法

研究方法の基本条件を決定するため、タンパク質汚れのモデルとして、ウシ血清アルブミンを用いた。汚染基質となる試験布に、精練した綿金巾布を用い、2.5cm×2.5cm に裁断した。透明ポリエチレンシート上に試験布を置き、水、所定濃度としたアルブミン水溶液を滴下し、さらに BCA 法 C 液を滴下してシートを被覆し、25℃ 環境下で静置し、5 分毎に表面反射率を測定した。なお、実際のタンパク質汚れを想定し、タンパク質の水溶液を布上に滴下して付着させ、その後の時間経過による影響を確認したところ、約 2 週間以内では反射率に大きな変化は見られなかったことから、タンパク質試薬は実験時に滴下することとした。

4. 研究成果

(1) BCA 法を布上に用いて表面反射率の測定により定量を行う、タンパク質直接定量法の確立を試みた。溶液試料を用いる BCA 法を布上に適用するにあたり、反応を行う環境としてシャーレ内とする容器法、透明シートに挟みこむシート法を用いて、空気接触の影響を調べるとともに、試薬量、反応時間および温度の条件について検討を行った。その結果、シート法は空気接触による BCA 反応への影響が見られず、感度良くタンパク質量が反射率に表れた。反射率から求める K/S 値とアルブミンの検量線は、0.96 ~ 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲で相関係数が高く ($R^2=0.9974$)、容器法よりも傾きが大きくなり、タンパク質直接定量法として適することが明らかになった。このシート法の実験条件として、2.5cm×2.5cm の試験布に、湿潤水 50 μL 、タンパク質試薬 30 μL 、BCA 法の反応試薬である C 液を 0.1mL 滴下し、25℃ で 30 分間反応させることで、良好な定量性を有する方法を得ることができた。



(2) 綿白布に付着させるタンパク質の種類による反射率への影響およびタンパク質の定量性について検討した。ウシ血清アルブミンの他に、被服に付着するタンパク質汚れに含まれる、カゼイン、ゼラチン、ケラチンを選定し、水溶液または水分散液のタンパク質試薬として BCA 反応を行い、反射率と K/S 値を求め、タンパク質量との関係を検討した。その結果、タンパク質のアミノ酸組成による影響に注目すると、BCA 反応が起こりやすいとされる、システインやシスチン基等が比較的多く含まれるアルブミンおよびケラチンは他のタンパク質よりも反射率が低くなり、定量性が高くなった。一方、ゼラチンは他のタンパク質よりも呈色の色相がやや青みがかった特徴が見られ、また、システイン等のアミノ酸基を含まないことから反射率は比較的高く、定量性が低くなった。これらの結果は BCA 法の原著論文で報告されていることと共通するものであった。したがって、タンパク質中のアミノ酸基の種類が本定量法に影響を与えることがわかった。

(3) タンパク質を付着させる布帛について、織り組織や繊維種による反射率への影響およびタンパク質の定量性について検討した。綿金巾布を基準とし、織りと厚みが異なる綿白布 5 種（平織 2 種、パーケール、ツイル、サテン）、綿以外の繊維種 8 種（麻、銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロン、T/C 布、羊毛、絹）の平織布を試験布として選定した。試験布がぬれた状態の光学的な特徴を把握するため、紫色染料水溶液を滴下して反射率を測定したところ、表面構造により反射率がわずかに上昇したが、大きな影響はないことがわかった。一方で、タンパク質繊維である羊毛と絹、銅イオンの残留が推測される銅アンモニアレーヨンの 3 種は、繊維分子が C 液と反応して呈色することがわかり、本法は適さない布帛であることがわかった。また、綿平織布の一種では、繊維加工剤等の付着物と考えられる影響により呈色して反射率が大きく低下し、定量性が低くなることがわかった。その他の試験布については、綿繊維布および混紡布は定量性が高く、それ以外の布帛では綿より反射率は低くなるものの定量性は良好であることがわかった。これにより、布帛の試薬の保持性すなわち試薬液のぬれや滲出の程度も、定量性に影響を与える要因であることが明らかになった。こうした布帛性状の影響があることから、本定量法は被試験物と同一の布帛で検量線を作成することが必要であることがわかった。

(4) 本法の洗浄研究への適用に向け、洗剤成分に含まれる界面活性剤と酵素が、本定量法で用いる綿白布上に共存する場合の影響を明らかにするため、本定量法の湿潤水と同様に、共存物質試薬として滴下し、C 液に対する影響とタンパク質の定量性を検討した。用いた界面活性剤は、陰イオン界面活性剤 3 種、非イオン界面活性剤 1 種、脂肪酸ナトリウム 6 種であり、酵素はプロテアーゼを選定した。洗濯後に残留する量は浴比 1 : 15、すすぎ 1 回の洗濯条件から想定して、界面活性剤の試薬濃度は臨界ミセル濃度の 1/16 とし、プロテアーゼは 0.001 ~ 1% (v/v) 濃度として用いた。その結果、本実験で用いた共存物質試薬の濃度において、界面活性剤は C 液に対して影響を及ぼさず、プロテアーゼも付着量が $0.93\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下であれば問題がないことがわかった。次に、アルブミンのみの反射率を基準値 1.00 とし、界面活性剤 6 種（ドデシル硫酸ナトリウム、分鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレン(6)ラウリルエーテル、ラウリン酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム）または 0.01% (v/v) プロテアーゼ試薬が共存するアルブミンの反射率を比較し相対値を求めたところ、共存物質の種類によって異なる結果が得られたが、概してオレイン酸ナトリウム以外では相対値が高く、すなわちアルブミンのみの場合と比較して反射率が高くなった。特に、ドデシル硫酸ナトリウムは C 液中の銅()イオンとアルブミンに対しても結合し、BCA-Cu 錯体の形成を阻害していることが考えられた。これらの反射率から K/S 値を求めタンパク質の定量性を検討した結果、SDS とラウリン酸ナトリウムを除きアルブミン濃度 $19.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下の範囲で共存物質がない条件と近い定量性が確認できた。

(5) 実際の汚れでタンパク質と共存している皮脂汚れに着目し、皮脂に含まれる脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸、および人工皮脂油であるセバム油を用い、これらが共存する場合の影響を検討した。脂肪酸とセバム油による C 液への影響について、パルミチン酸は C 液への影響が見られなかったが、オレイン酸およびセバム油は付着量が $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上において反射率が低下し、影響が見られた。このことは、オレイン酸の分子構造に存在する二重結合部分が C 液と何らかの反応を起こし、BCA-Cu 錯体形成に影響を与えている可能性が示唆された。次に、オレイン酸で汚染した試験布を、陰イオン界面活性剤を用いて洗浄し乾燥させてからアルブミンを付着させ、本定量法によりタンパク質の定量性を検討した。オレイン酸の付着量が $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の布では、反射率がアルブミンの付着量に反して高くなり、オレイン酸が共存するとタンパク質量に相関した BCA 反応が起こりにくくなることがわかった。一方、オレイン酸の付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下では、共存物質が存在しないアルブミンのみの場合で作成された検量線と非常に近似した高い定量性が示され、この範囲の付着量であればオレイン酸が共存する場合でも本法は適用可能であることが明らかとなった。

本研究から、布帛に付着したタンパク質を、BCA 法を用いて直接定量する方法を確立したとともに、その定量性は、タンパク質の種類すなわち特定のアミノ酸基、布帛の試薬の保持性および繊維分子や繊維加工剤等の付着物によってある程度影響を受けるものの、汎用性が高いことがわかった。また、洗浄後の布帛に残留する界面活性剤および酵素の影響は、SDS とラウリン酸ナトリウムで影響が見られたが、その他の界面活性剤やプロテアーゼが共存する場合でも定量性が保持されることが明らかになった。さらに、脂肪酸であるオレイン酸とタンパク質が共存する場合、オレイン酸の付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下ならば影響はないことがわかった。以上より、これまでに検討されていない、布上の無色のタンパク質を高感度に直接定量する方法を明らかにし、洗浄研究への適用に向けた基礎的な知見を得ることができた。今後、より実際の被服の汚れに近い条件において本定量法を適用できるよう、例えば脂肪酸とタンパク質の複合汚れや、肌着として用いられている編地での検討、汚れ種類や被服の形態による汚染度カラスケールの作製、本定量法と従来法の天然汚染布上の汚れ定量を比較する等、さらなる検討を行うことで本定量法の汎用性と実用性をより一層高めていくことが必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 塚崎 舞、森田 みゆき、米山 雄二	4. 巻 Vol.40, No.3
2. 論文標題 布上でのタンパク質直接定量に及ぼす布帛種の影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 材料技術	6. 最初と最後の頁 23-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 谷 道子、雨宮 敏子、塚崎 舞、松田 美帆、森田 みゆき	4. 巻 71
2. 論文標題 ピシンコニン酸の還元反応による布帛上のたんぱく質汚れの直接定量	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本家政学会誌	6. 最初と最後の頁 464 - 469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11428/jhej.71.464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚崎舞、森田みゆき、米山雄二
2. 発表標題 布上でのBCA呈色反応に及ぼす脂肪酸汚れの影響
3. 学会等名 第54回洗浄に関するシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚崎舞、森田みゆき、米山雄二
2. 発表標題 布帛上タンパク質直接定量における試料布の織り・繊維種の影響
3. 学会等名 一般社団法人日本繊維製品消費科学会2022年年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松林真奈美、塚崎舞、森田みゆき
2. 発表標題 スキャナーを用いたピシニコニン酸呈色反応による布帛上タンパク質の簡易定量
3. 学会等名 一般社団法人日本家政学会第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚崎舞、森田みゆき、米山雄二
2. 発表標題 布帛上タンパク質の直接定量における共存物質とタンパク質種の影響
3. 学会等名 第53回洗淨に関するシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牟田緑、小山菜摘、塚崎舞、牛腸ヒロミ
2. 発表標題 茜染色における媒染剤と媒染方法の影響
3. 学会等名 一般社団法人繊維学会2021年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚崎舞、森田みゆき、船澤千穂、雨宮敏子、松田美帆
2. 発表標題 固相界面上のBCA還元反応による皮脂中タンパク質の広濃度領域直接定量
3. 学会等名 日本分析化学会第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 雨宮敏子、船澤千穂、塚崎舞、森田みゆき
2. 発表標題 天然汚染布上タンパク質のピシニコニン酸による簡易定量
3. 学会等名 一般社団法人日本家政学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎舞、落合詩歩、本多素子、牛腸ヒロミ
2. 発表標題 市販部屋干し用洗濯洗剤の性能評価 菌のコロニー数に及ぼす乾燥時間と洗浄効率の影響
3. 学会等名 一般社団法人日本家政学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎舞、岡田茉莉子、大川知子、牛腸ヒロミ
2. 発表標題 人の印象に及ぼす柔軟仕上げ剤の香りの効果
3. 学会等名 一般社団法人日本繊維製品消費科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎舞、都所紗理菜、稲垣サナエ、牛腸ヒロミ
2. 発表標題 酸処理と機械的処理をした羊毛繊維によるアンモニアの消臭
3. 学会等名 一般社団法人繊維学会2020年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎舞、米山雄二、森田みゆき
2. 発表標題 BCA 還元反応を利用したタンパク質の基質直接定量への布帛種による影響
3. 学会等名 一般社団法人繊維学会2020年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------