

# 〔報告〕 膠の主成分ゼラチンの蛍光特性変化について —濃度依存性と硫酸アルミニウムカリウムの影響—

吉田 直人

## 1. はじめに

光を吸収し基底状態から励起状態となった分子が内部緩和過程を経た後、再び基底状態に戻る際に放射する蛍光の検出は、文化財材料調査では比較的早くより有機化合物の存在把握に用いられている（無論、全ての有機化合物が蛍光現象を示すものではなく、無機化合物にもこの現象を示すものが少なからず存在することは十分留意すべきである）。さらに、励起・蛍光波長と強度との関係をマッピングする三次元蛍光スペクトルは、色材の定性分析に有用なことが多くの先行研究によって示されている<sup>1-3)</sup>。これは、対象となる文化財の種類や技法に準じた比較サンプルとのスペクトル同一性を根拠とするものである。

一方、化学構造によって程度の差はあるが、同一物質でも蛍光特性は温度、pH、極性、粘性等、溶媒の液性によって変化し、強度変化やスペクトルシフトが生じることが知られている。また、タンパク質等高分子の蛍光特性変化は構造変化や変性と関連付けられるため<sup>4)</sup>、生理的条件下でのダイナミクス研究における有用な情報となっており、その応用として、細胞内の自家蛍光や合成蛍光プローブによる病理診断技術の開発が急速に進んでいる。

筆者は、このような性質を利用することにより、蛍光性文化財材料の分析を定性のみならず、定量分析や物性等の状態分析、さらには媒材や媒染剤といった周辺物質の同定に応用できる可能性があると考え、文化財の技法に準じた条件での検討に着手した。現在、その一つとして、膠の主要成分であり、動物性タンパク質であるゼラチンの蛍光特性について実測を通じた検討を行っており、これまでに水溶液での濃度変化、また滲み止めとして支持体に塗布する“どうき”として使用する際に添加する硫酸アルミニウムカリウム（明礬）の存在と濃度変化に応じて、蛍光と励起スペクトルの波長シフトが起こることを見出した。本報は、その結果を示すとともに原因を考察し、この知見から文化財材料としての膠の科学的調査への応用可能性について議論を行うものである。

## 2. 測定・結果

### 2-1. 試料、および励起・蛍光スペクトル測定

ゼラチン末（鹿特級，関東化学）10gに純水を加え、全量を100mlとし、沸騰しないように加熱攪拌しながら溶解させた10%（w/w）水溶液をベースとして、適宜濃度調整を行った。

励起・蛍光スペクトル測定は日本分光製蛍光光度計 FP-6500により、ゲル化していない状態の溶液を1 cm 角のプラスチック製セル（UV透過タイプ）に測定のための必要量（3 ml）を加えて室温下で行った。測定時のスリット幅（励起側 3 nm，蛍光側 3 nm）と検出感度（medium）は全ての測定で統一した。

### 2-2-1. ゼラチン水溶液の濃度と蛍光・励起スペクトルとの関係

蛍光測定に先立ち、純水をリファレンスとした250～400 nmにおけるゼラチン水溶液の吸収

スペクトル測定を、島津製作所製ダブルビーム型分光光度計 UV-3101PC によって行った。その結果、この波長域で吸光度は 1～10% の範囲でゼラチン濃度にほぼ比例し、Lambert-Beer 則に従っていること、また 300 nm 付近を境に、短波長側で吸収が急激に増大することを認めた(図 1)。

この吸光特性をもとに、まず励起波長 275 nm のもと、300～500 nm における蛍光スペクトル測定を行ったところ(図 2)、1% 水溶液では 312 nm 付近、および 388 nm 付近をピークとする 2 つの強い蛍光バンド、さらに 460～475 nm に比較的弱いバンドが観測された。これらの蛍光バンドのうち 312 nm 付近のものは、ゼラチン濃度の上昇につれてブロード化する傾向があり、10% ではほとんど確認できない状態となった。このバンドについては、濃度変化に伴うシフトはみられなかったが、一方、388 nm 付近のバンドは 5% 水溶液では 397 nm 付近、10% 水溶液では 410 nm 付近と、それぞれ約 9 nm、22 nm 長波長側へのシフトがみられた。さらに、濃度上昇につれて、この波長域全体の蛍光強度が大きく減少する傾向がみられたが、その理由として、吸光度が高く、励起光の減衰が大きいこと、また、蛍光の再吸収がこの波長域で起こっていることなどが考えられる。また、312 nm の蛍光バンドに対して、長波長側の蛍光バンドの高さが濃度上昇につれて相対的に大きくなる理由については、これらの蛍光の帰属とあわせて次章で考察する。

続いて、300 nm 未満と比較して吸光度が低い波長域(300～400 nm)で励起した 1% 水溶液の蛍光スペクトル測定を行った。その結果(図 3)、この波長域で励起することによって 2 つの蛍光バンドが検出され、長波長側のピークは励起波長に関わらず、470 nm 付近であった。一方、短波長側は励起が長波長になるほど、蛍光ピークも長波長側にシフトする現象がみられた。ここで、両バンドの強度が同程度である 375 nm 励起における蛍光スペクトルのゼラチン濃度依存性を調べたところ(図 4)、1% 水溶液ではそれぞれ 445 nm 付近にピークのあるバンドのピークは濃度上昇につれて若干の長波長側へのシフトが起こったが、470 nm 付近がピークのバンドにシフトはみられなかった。これらの蛍光がどのバンドにおける光吸収によるかを把握するために、両バンドがクロスする 460 nm における励起スペクトルを測定したところ、2 つの励起バンドがみられた(図 5)。1% 水溶液では、ひとつは 300 nm 付近、もう一方は 340 nm 付近をピー

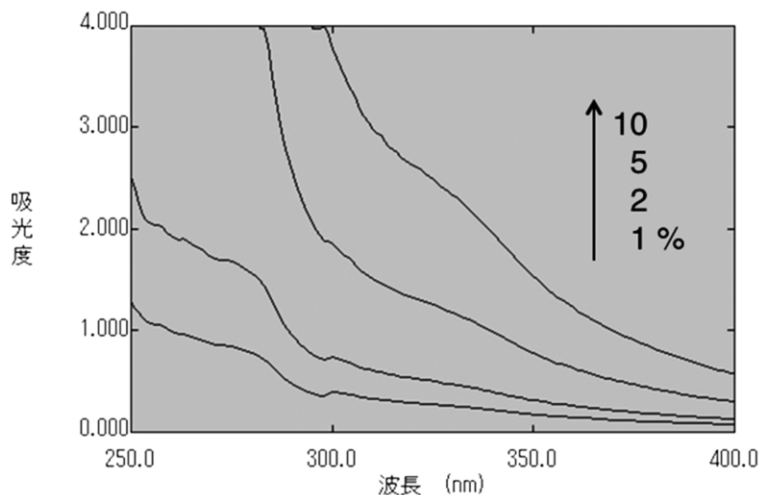


図 1 ゼラチン水溶液の吸収スペクトル

くとするものであった。吸収スペクトル (図1) ではこれらのバンドが確認できなかった。これは、蛍光現象が起こらない部分の光吸収が大きく寄与しており、励起スペクトルによってはじめて、蛍光部位の吸収バンドが抽出されるためである。また、300 nm 付近をピークとする励起バンドに濃度上昇に伴うシフトはみられなかったが、もう一方のバンドは5%水溶液では約20 nm, 10%では約35 nm 長波長側に大きくシフトした (図5)。

以上の測定は、ゼラチン水溶液がゲル化していない状態で行った。一昼夜静置したのち再測定を行ったところ、特に5%と10%水溶液は完全にゲル化していたが、スペクトルには特に変化が認められなかった。また、市販の粒膠や膠液でも同様の測定を行ったところ、原料コラーゲンの種類の違いを反映しているのか、波長に多少の相違はあるものの、同程度のシフトがみられた。また、膠液には防腐剤などの添加物の存在が図1と同じ波長域に光吸収として現れたが、蛍光には影響していなかった。

### 2-2-2. 硫酸アルミニウムカリウム添加による蛍光挙動の変化

1%ゼラチン水溶液に硫酸アルミニウムカリウム (関東化学) をそれぞれ0.1%, 0.5%となるよう添加し、蛍光と励起スペクトル測定を行って、0%に対する変化の有無を検討した。その結果、275 nm 励起での300~500 nm, 375 nm 励起での400~500 nm の蛍光スペクトルには硫酸アルミニウムカリウムの添加に伴うシフトはほとんど見られなかった (図6, 7)。一方、硫酸アルミニウムカリウム無添加時に、蛍光波長 460 nm での励起スペクトルで観測される340 nm 付近のピークは、同物質の添加と濃度上昇にともない長波長側にシフトし、0.1%では

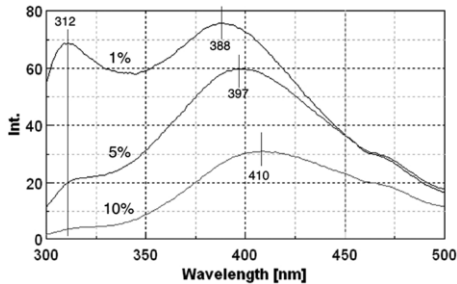


図2 ゼラチン水溶液の蛍光スペクトル (励起波長: 275 nm)

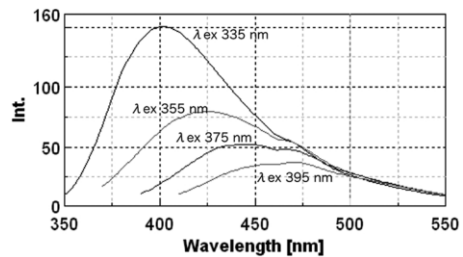


図3 1%ゼラチン水溶液の蛍光スペクトル (励起波長: 335, 355, 375, 395 nm)

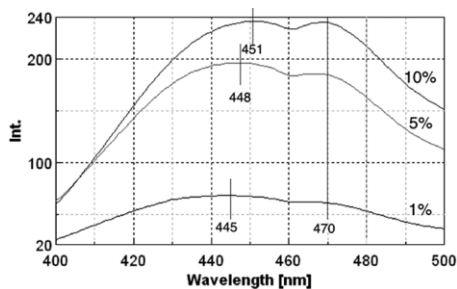


図4 ゼラチン水溶液の蛍光スペクトル (励起波長: 375 nm)

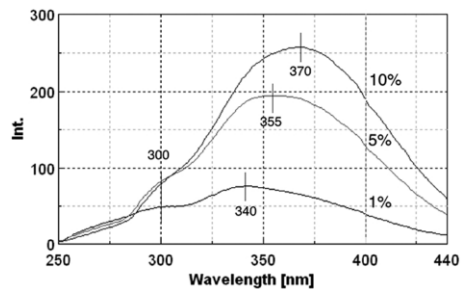


図5 ゼラチン水溶液の励起スペクトル (蛍光波長: 460 nm)

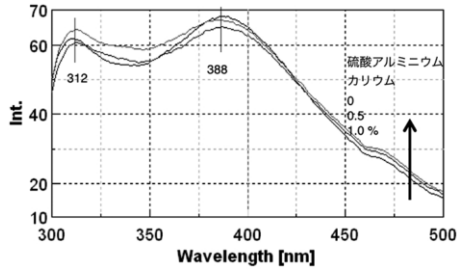


図6 硫酸アルミニウムカリウム添加時の1%ゼラチン水溶液蛍光スペクトル (励起波長: 275 nm)

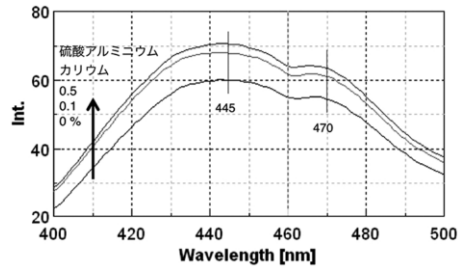


図7 硫酸アルミニウムカリウム添加時の1%ゼラチン水溶液蛍光スペクトル (励起波長: 375 nm)

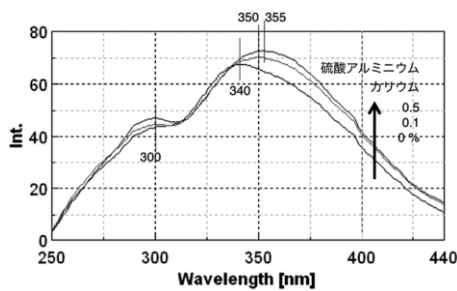


図8 硫酸アルミニウムカリウム添加時の1%ゼラチン水溶液励起スペクトル (蛍光波長: 460 nm)

350 nm, 0.5%では355 nm 付近に移動した(図8)。1%になるとさらなるシフトは認められなかった。また、ゼラチン濃度5%でも同様の傾向がみられ、硫酸アルミニウムカリウム濃度0%, 0.5%でそれぞれピーク波長が355 nm, 365 nm 付近であった。1.0%ではそれ以上のシフトはみられなかった。また、これらの結果は、市販されている画材用の明礬でも同様に再現された。

### 3. 考察—発色団の帰属とスペクトルシフトの原因について—

1%ゼラチン水溶液での4つの蛍光バンド, および460 nm 付近の蛍光の由来となる2つの励起バンドを基準とすると, 濃度変化, および硫酸アルミニウムカリウム添加による波長シフトの有無は表1のようにまとめられる。ここで, それぞれの蛍光バンド, 励起バンドのゼラチン中での由来部位(発色団)と, スペクトルシフトの原因について考察したい。

表1 観測された蛍光, 励起ピーク波長とシフトの有無

	蛍光スペクトル				励起スペクトル	
	励起波長275 nm		励起波長375 nm		蛍光波長460 nm	
1%ゼラチン水溶液でのピーク波長	312 nm	388 nm	445 nm	470 nm	300 nm	340 nm
ゼラチン濃度増大に伴う長波長側シフト	なし	大きい	小さい	なし	なし	大きい
硫酸アルミニウムカリウム添加に伴う長波長側シフト	なし	なし	なし	なし	なし	大きい

一般に、天然タンパク質中で蛍光現象を起こす発色団は、3種類の蛍光性アミノ酸残基 [トリプトファン (Trp), チロシン (Tyr), フェニルアラニン (Phe)] の単量体 (monomer), また高濃度状態において近接し、分子間力によって形成される二量体 (dimer) や三量体 (trimer) など、また立体構造や分子間の近接によって p 軌道が重なった部分 (共役系) などに分類され、それぞれが特異的な吸光や蛍光特性を示す<sup>4)</sup>。

ゼラチンは、疎水性タンパク質であるコラーゲンの三本鎖構造を熱処理によって解いて水溶性にしたものであり、温水中で溶解させた水溶液を冷却することにより、徐々にゲル化する性質を持っている。その際、ゼラチン分子は複雑に絡み合った網目状の構造となり、一本鎖を維持した部分、コラーゲンと同様の三本鎖構造を形成した部分、また、層状のミセル構造を有する部分がそれぞれ混在していると考えられている。また、周囲の水は自由水として存在することが知られている<sup>5)</sup>。

コラーゲンの構造と蛍光特性に関する先行研究<sup>6-8)</sup>を参考にすると、1%ゼラチン水溶液での4つの蛍光バンド (ピーク波長312 nm, 388 nm, 440 nm, 470 nm 付近) に帰属される発色団について、312 nm, 388 nm の2つは両者とも Tyr であり、312 nm のバンドは monomer, 388 nm のバンドは主に dimer の蛍光であると考えられ、濃度上昇に伴う後者の長波長側へのシフトは、dimer よりも蛍光波長の長い trimer の割合が増えたためと考えられる。これは、312 nm のバンドの蛍光強度が濃度上昇とともに相対的に下がることから裏付けられる (図2)。つまり、濃度上昇による Tyr 残基の近接による dimer, さらには trimer の形成を表しているものである。また、312 nm のバンド、つまり monomer の Tyr からの蛍光がシフトしないのは、このアミノ酸が親水性であることから、自由水側に配向しており<sup>9)</sup>、濃度に関わらず同じ溶媒和の状態を保っていることが理由として仮定される。

また、長波長側の2つの蛍光バンドは、三本鎖構造において形成された共役系に発色団が帰属されると考えられる。このうち、440 nm の蛍光バンドの由来と考えられる335 nm 付近の励起バンドのシフトについては、この発色団が三本鎖構造の親水側、つまり外側に局在し、濃度上昇とともに三本鎖構造部分同士が近接し、p 軌道の重なりが増大することが理由ではないかと現時点では仮定している。この仮定が正しいとすれば、一方の470 nm 付近の発光バンドは、その由来となる300 nm の励起バンドにシフトが起こらないことから、近接による p 軌道重なりが増大が起こりにくい三本鎖構造の内側、つまり疎水性の高い環境に発色団として存在していると推定できる。

硫酸アルミニウムカリウムの添加によってシフトを起こすのは335 nm 付近の励起バンドのみであり、その理由は現時点では明言できないが、ゼラチン濃度上昇時と同じ現象であること、どうさが滲み止めとして作用する要因として、疎水性ゲルの生成とする説を考えると、同物質のいずれかのイオンが三本鎖構造の増大に寄与している可能性が指摘できる。

#### 4. 今後の展望—膠への応用可能性について—

これまで、文化財材料の分析における蛍光現象の応用は、もっぱらスペクトルの類似性、つまり変化が少ないことを前提にした定性分析であった。従って、自ずと対象もその前提が成り立つものに限られていた。今回、膠の原料であるゼラチン水溶液から複数の蛍光バンドと励起バンドを検出し、その一部が濃度上昇に伴って一方向への波長シフトを起こすことを確認したことは、スペクトル測定とピーク波長の検出が絶対濃度の定量、また濃度と密接に関連する粘性、さらにシフトの原因がゼラチンの挙動変化によるものであると推測できることから、これと関連付けられる諸物性を非破壊、非接触的に把握する可能性を持つことを示すものであり、

これを主成分とする文化財材料としての膠への応用が期待できる。また、硫酸アルミニウムカリウムの存在によってもシフトが起こることを確認したことは、大気条件では蛍光 X 線法では元素検出が出来ないどうきの存在確認手段として利用することが可能であることを示唆している。

今回は、純物質としての蛍光特性を評価することを目的としたために、精製ゼラチンを使用した。今後は、実際に使われる材料や製法による膠での測定を重ね、蛍光特性にどの程度相違が生じるのかを把握する必要がある。また、今回はゼラチン水溶液での結果であり、これが直接応用できるといえるのは、現時点では溶いた状態のものに限られることは言うまでもない。これを、実資料への応用につなげるためには、塗布後の乾燥過程と硬化、薄膜化、また乾燥後の環境条件に依存した含有水分量などの要素を勘案したゼラチンの分子挙動とスペクトル変化との関連を詳細に調べる必要があり、今後解明すべき課題は少なくない。

#### 参考文献

- 1) 三好正毅, 松田泰典: 赤色及び紫色天然染料による染色絹布のレーザー誘起蛍光と反射スペクトル, 古文化財の科学, **32**, 47-53 (1987)
- 2) 下山進, 野田裕子: 三次元蛍光スペクトルによる古代染織遺物に使用された染料の非破壊的同定法の再検討, 分析化学, **43**, 475-480 (1994)
- 3) S. Shimoyama, Y. Noda, S. Katsuhara: NON-DESTRUCTIVE ANALYSIS OF UKIYO-E PRINTS: Determination of Plant Dyestuffs used for Traditional Japanese Woodblock Prints, Employing a Tree-Dimensional Fluorescence Spectrum Technique and Quartz Fibre Optics, *Dyes in History and Archeology*, **15**, 27-42 (1997)
- 4) 木下, 御橋編「蛍光測定 生物科学への応用」(日本分光学会 測定法シリーズ3), 学会出版センター (1983)
- 5) 日本にかわ・ゼラチン工業組合「改訂版 にかわとゼラチン—産業史と科学技術」丸善 (1997)
- 6) Z. Deyl, et al.: Fluorescence of collagen — properties of tyrosine residues and another fluorescent element in calf skin collagen, *FEBS LETTERS*, **5** (3), 187-191 (1969)
- 7) JM. Menter: Temperature dependence of collagen fluorescence, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 403-410 (2006)
- 8) Y. Pu, et al.: Changes of collagen and nicotinamide adenine dinucleotide in human cancerous and normal prostate tissues studied using native fluorescence spectroscopy with selective excitation wavelength, *J. Biomed. Opt.* **15** (4), 047008-047008-5 (2010)

キーワード: ゼラチン (gelatin), 膠 (glue), 蛍光 (fluorescence), スペクトルシフト (spectral shift), 非破壊分析 (Non-destructive analysis)

## **Fluorescence and Excitation Spectral Shift of Gelatin, the Main Ingredient of Glue: Effect of Its Concentration and Addition of Potassium Alum**

Naoto YOSHIDA

Fluorescence and excitation spectra of aqueous solution of gelatin, the main ingredient of glue, under concentration of 1-10%, and the addition of potassium alum of 0.1-1% were measured. As a result, fluorescence band at maximum of 388 nm, excited at 275 nm, showed significant red-shift with increase in gelatin, which is considered to be due to the formation of tyrosine dimer and trimer. In addition, the excitation band at maximum of 340 nm for 460 nm fluorescence shifted to 370 nm. This is supposed to be due to an increase in the conjugated system in the triple-helical structure domain formed in the gelatin network. Moreover, the same excitation band also showed red-shift with increase in potassium alum from 340 nm (0%) to 355 nm (1.0%) in 1% gelatin solution.

These phenomena indicate that the observation of the spectral shift of fluorescence and excitation spectra of gelatin can give some physical and chemical information about glue, a traditional material of cultural objects.