

熱と日光が真珠のコンキオリンに及ぼす影響と 真珠品質の非破壊による判定

平松 潤一*・永井 清仁

株式会社ミキモト真珠研究所

(2010年3月23日受付 2010年7月1日受理)

Non-destructive assessment of the effects of heat and sunlight on akoya pearl quality

Junichi Hiramatsu* and Kiyohito Nagai (*K.Mikimoto & Co., Ltd., Pearl Research Laboratory, 923 Osaki, Hazako, Hamajima-cho, Shima, Mie 517-0403*) *Seibutsu-kogaku* **88**: 378-383, 2010.

Various factors such as heat and sunlight cause the quality of akoya pearls to deteriorate. We examined the influence of heat and sunlight treatments on the nacreous shell matrix proteins (NSMPs) of akoya pearl by detecting changes in the reflectance (i.e. the ratio of reflectance at a wavelength of 254 nm and 282 nm) and fluorescence peak intensity (fluorescence intensity at 340 nm). Heat treatment at 100°C for up to 768 h caused a small decrease in reflectance value and a large decrease in fluorescence peak intensity, whereas sunlight at 250 W/m² for up to 768 h caused large decreases in both reflectance value and fluorescence peak intensity. Quantitative analysis of amino acid composition revealed that the only aromatic amino acid that decreased in content with heat treatment was tyrosine (by 18 %). Sunlight treatment decreased the tryptophan content by 78 % and tyrosine by 33 %. These results implied that the degeneration mechanisms of NSMPs by heat and sunlight treatments were different. By assessing these different changes in reflectance value and fluorescence peak intensity it may be possible to judge the two types of quality deterioration without the need to destroy the pearl.

[**Key words:** akoya pearl, nacreous shell matrix proteins, reflectance spectrum, fluorescence spectrum, tryptophan, tyrosine]

アコヤガイ真珠をはじめとする真珠層で構築された真珠は、炭酸カルシウムと貝殻に固有の有機物質として総称されるコンキオリンから成る¹⁾。真珠層中のコンキオリンについて、これまでに可溶性や不溶性のさまざまな真珠層基質タンパク質 (nacreous shell matrix proteins, NSMPs) が報告されている²⁻¹³⁾。中でも不溶性で絹フィブロイン様のNSMPsは、真珠層が強固な結晶構造を維持するために必要不可欠な物質であると考えられているが³⁾、タンパク質の精製がきわめて困難であり、その詳細はまだよく分かっていない。

正倉院保管宝物真珠の調査結果から、約1200年以上保管されていた真珠表面は浜揚げ真珠の表面とは異なって結晶粒が剥離しており、これは光のような環境因子によってコンキオリンが変質したためと推測されている¹⁴⁾。また、浜揚げ真珠は60°Cから100°Cの温度範囲に曝されるとコンキオリンが黄変し、水分が蒸発して亀裂を生ず

ることもある¹⁵⁾。さらに、化学薬品などの影響を受けてNSMPsが破壊された場合、結晶粒の剥離が生じるなどの真珠層の劣化も知られている¹⁶⁾。

真珠の品質評価は熟練した検査者によって目視評価で行われているが、真珠層中のコンキオリンの性状変化を非破壊で判定することは難しい。絹では、熱や光による変化の一つである黄変現象の数量化に黄変指数が用いられている¹⁷⁾。さらに、光照射による品質劣化の評価には伸度・強度が用いられ¹⁸⁾、この物性変化に芳香族アミノ酸のチロシンやトリプトファン¹⁹⁾の減少が関係していることが報告されている¹⁹⁾。一方、真珠層中のコンキオリンでは、これまでに報告されたほとんどのNSMPsで芳香族アミノ酸の含有が示されている²⁻¹¹⁾。特に真珠層形成に関与する不溶性で強いカルシウム結合能力を有したN16(パーリン)や^{4,5)}、炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶の成長を制御していると推察されている不溶性のN19

*連絡先 E-mail: kenkyujo@mikimoto.com

において、芳香族アミノ酸に富んだ特徴が見いだされている⁸⁾。一般的な芳香族アミノ酸の測定は、タンパク質の濃度定量法の一つにもなっている280 nmにおける吸光度の測定²⁰⁾が代用されている。また、トリプトファンの蛍光は、環境要因によって蛍光特性を変化させやすいことから²¹⁾、その蛍光測定がタンパク質の高次構造解析などに応用されている。たとえば、NSMPsの研究でも、パーリンのコンフォメーション変化を調べるのにトリプトファンの蛍光の測定が応用されている²²⁾。したがって、非破壊で真珠層中のコンキオリンの性状変化を判定する方法としては、真珠の芳香族アミノ酸に由来する分光特性や蛍光特性の変化の測定が有効な手段と考えられる。

これまでコンキオリンでは、分光光度計による反射スペクトル測定により280 nm付近に特異的な分光吸収が認められている^{14,23)}。また、窒素レーザー (Ex337.1 nm) で励起される発光スペクトルから、真珠の可視領域の蛍光がコンキオリンに由来する蛍光である可能性が高いことも報告されている²⁴⁾。しかしながら、280 nm付近の特異的な分光吸収の変化や真珠の蛍光変化と、コンキオリンの性状やアミノ酸組成との関係を論議した報告はない。

本研究では、熱と人工太陽光照射によって処理したアコヤガイ真珠の280 nm付近の分光吸収の変化と、280 nmの紫外線で励起されるトリプトファンに由来する紫外領域の蛍光強度変化、および真珠層に含有されるコンキオリンのアミノ酸組成の変化を詳細に調べ、分光吸収と蛍光の変化を指標としたコンキオリンの変質状態の評価について検討した。

実験方法

材料 供試材料には、直径6.0~7.0 mmのアコヤガイ真珠20個およびアコヤガイ貝殻真珠層より得た真珠層粉末試料を用いた。なお、約250 gの真珠層粉末試料は、人工採苗によって生産したアコヤガイ(3年貝)50個体分の貝殻より稜柱層と光輝層部分をグラインダーで完全に除去し、粒径0.3 mm未満となるまで粉碎して得た。試料の取り扱いは、基本的に冷暗所で遮光しながら行った。

反射スペクトルの測定 反射スペクトルは、積分球付き分光光度計(V-570, 日本分光)を用いて、200~550 nmの波長範囲を測定した。なお、測定には5 mmサイズのマスクを使用した。

蛍光スペクトルの測定 蛍光スペクトルは、分光蛍光光度計(FP-750, 日本分光)を用いて、300~400 nmの波長範囲を測定した。励起波長は280 nm、蛍光強度の測定には5 mmサイズのマスクを使用した。

熱および日光照射による処理実験 熱処理は(以下、熱処理区)、真珠試料10個と真珠層粉末試料30 gを60 mm×18 mmの円形ガラス製シャーレに入れて熱風乾燥機(プログラム温度調節器 E Type, いすず製作所)内に

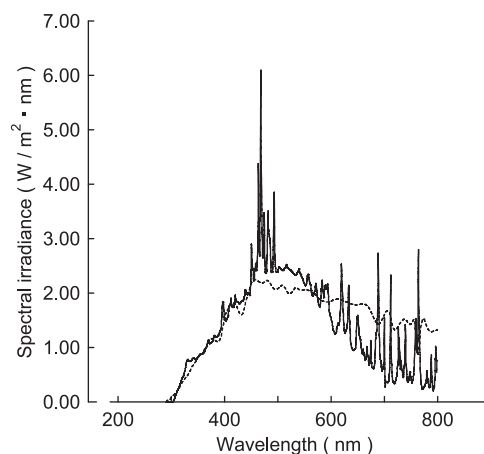


Fig. 1. Spectral irradiance distribution of artificial sunlight with xenon light source (solid line: Suntester XF-180CPS) and natural sunlight (dot line: CIE Publication No.85).

静置し、100°Cで768時間行った。真珠試料の反射スペクトルと蛍光スペクトルは、処理前と処理後6時間、12時間、24時間、48時間、96時間、192時間、384時間、768時間にそれぞれ測定した。なお、測定は試料が室温まで冷えてから行った。また、日光照射処理は(以下、日光照射区)、真珠試料10個と真珠層粉末試料30 gを、光が試料の同一面に照射されるようにキセノンテスター(Suntester XF-180CPS, 東洋精機製作所)に固定して、キセノンライト(200 V, 1.5 kW, 反射コーティング付石英ガラスおよび特殊UVフィルタを使用して放射光を太陽光のスペクトルに近似させた)を光源(Fig. 1)とする人工太陽光により、放射照度250 W/m²、35°Cの条件で768時間行った(ブルースケール8級に相当, JIS L-0841)。真珠試料における光照射面の反射スペクトルと蛍光スペクトルを、処理前と処理後12時間、24時間、48時間、96時間、192時間、384時間、768時間にそれぞれ測定した。

アミノ酸組成分析 未処理、および熱と日光照射による処理を施した真珠層粉末試料から各5~6 gを採取し、18種類のアミノ酸組成を改訂日本食品アミノ酸組成表の分析マニュアル²⁵⁾に従って、アミノ酸自動分析法と高速液体クロマトグラフ法によって分析した。

実験結果

反射スペクトルの変化 真珠試料における熱処理区と日光照射区の典型的な反射スペクトルの変化をFig. 2 A, Bに示す。処理前の真珠試料の反射スペクトルには、282 nmに吸収極大がそれぞれ認められた。熱処理区の反射スペクトルは、処理後6時間から250 nmよりも長波長側全域の分光反射率が高くなる傾向を示し、その後12時間以降は322 nm付近を中心とした300~450 nmの範囲の分光反射率と254 nmを中心とした248~282 nmの

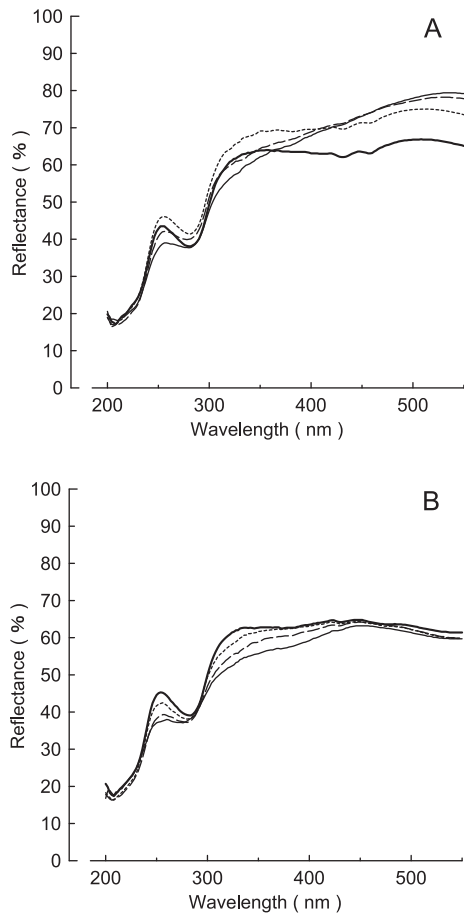


Fig. 2. Changes in reflectance spectra of pearls subjected to heat or sunlight treatment. (A) Heat treatment at 100°C. Solid line (bold), before treatment; dot line, after 6 h of treatment; dash line, after 192 h; solid line, after 768 h. (B) Sunlight treatment at 250 W/m². Solid line (bold), before treatment; dot line, after 24 h of treatment; dash line, after 192 h; solid line, after 768 h.

範囲の分光反射率がわずかに低下したのに対し、450 nm以上の可視領域の分光反射率は高くなる傾向にあった (Fig. 2A)。一方、日光照射区では、322~475 nmまでの分光反射率と254 nmを中心とした248~282 nmの範囲の分光反射率が徐々に低下し、処理前の真珠では明瞭に認められた280 nm付近の吸収極大がきわめて不明瞭となった (Fig. 2B)。そこで254 nmにおける分光反射率 R_{254} の値と282 nmにおける分光反射率 R_{282} の値の比 $R_{254/282}$ を求めて、熱と日光照射処理時間の経過にともなう254 nm付近の分光反射率の変化量を Fig. 3 に示した。熱処理区における $R_{254/282}$ は、処理後12時間までは顕著に減少したがそれ以降は緩やかな減少傾向を示した。それに対して日光照射区では、処理後48時間まで著しい減少が認められ、その後緩やかな減少傾向を示したが、熱処理区に比べて減少量は大きく、処理後192時間以降では1.0を下回る試料が増加し、768時間ではすべての試料が1.0を下回る値を示した。

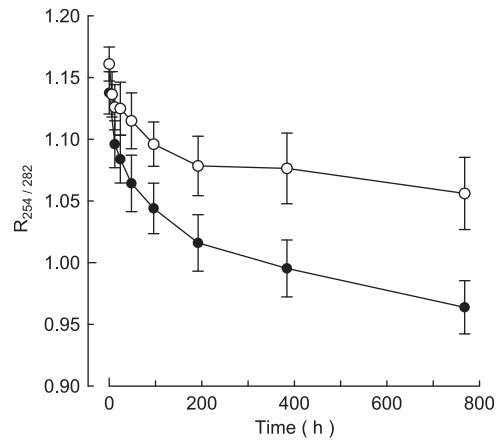


Fig. 3. Changes in $R_{254/282}$ (ratio of reflectance at a wavelength of 254 nm and 282 nm) of pearls subjected to heat or sunlight treatment. ○, Heat treatment at 100°C for up to 768 h; ●, sunlight treatment at 250 W/m² for up to 768 h. Data are presented as means \pm SD of 10 pearls.

蛍光スペクトルの変化

真珠試料における熱処理区と日光照射区の典型的な蛍光スペクトルの変化を Fig. 4 A, B に示す。処理前の真珠試料の蛍光スペクトルは、340 nm 付近の波長域に単一の蛍光極大を示した。熱処理区と日光照射区の蛍光スペクトルは、処理の経過とともに最大で5 nm程度蛍光ピーク波長がブルーシフトしながら蛍光強度が徐々に弱くなり、ほとんど同じ特徴の変化を示した (Fig. 4 A, B)。そこで両試験区における処理の経過にともなう340 nmの蛍光強度値 FI_{340} の変化を Fig. 5 に示す。その結果、 FI_{340} は熱処理区と日光照射区ともに処理後96時間までは同様の減少傾向を示し、120時間以降では日光照射区に比べて熱処理区の減少がやや小さめの傾向を示したが、試験終了時では両者間であまり差が認められなかった。

アミノ酸組成分析結果

熱および日光照射で768時間処理した真珠層粉末試料のアミノ酸組成の分析結果を Table 1 に示す。熱処理区では、セリン、スレオニン、リジンの減少率が32~43%と比較的大きく、芳香族アミノ酸のうち、チロシンには18%というわずかな減少が認められたものの、フェニルアラニンとトリプトファンは減少はほとんど認められなかった。一方、日光照射区では、リジンは減少率39%で熱処理区と同程度であったが、トリプトファンは78%の著しい減少が認められ、チロシンとメチオニンも各々33%、54%と大きく減少した。処理の違いによるアミノ酸組成の変化は異なり、特に芳香族アミノ酸で明らかな差が認められた。

考 察

一般的に、生体試料で認められる280 nm付近の分光吸収は、主として芳香族アミノ酸のチロシン、トリプトファンに由来するタンパク質の吸収とされている²⁰⁾。ま

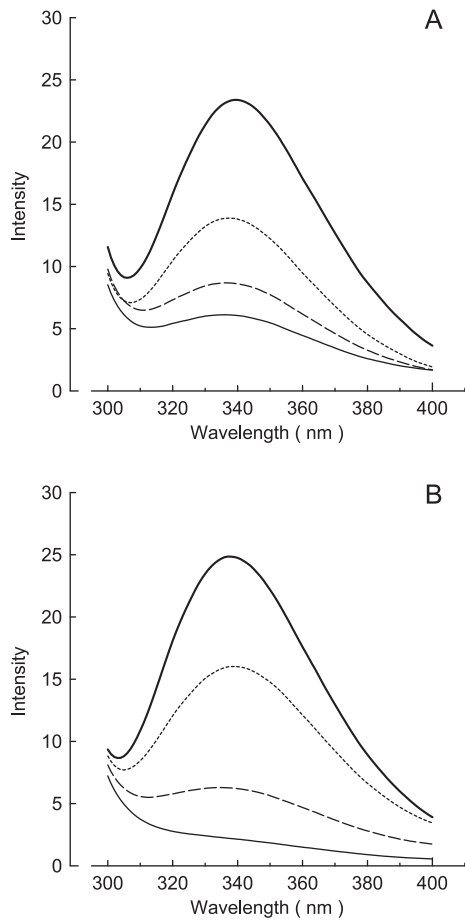


Fig. 4. Changes in fluorescence spectra of pearls subjected to heat or sunlight treatment. (A) Heat treatment at 100°C. Solid line (bold), before treatment; dot line, after 24 h of treatment; dash line, after 192 h; solid line, after 768 h. (B) Sunlight treatment at 250 W/m². Solid line (bold), before treatment; dot line, after 24 h of treatment; dash line, after 192 h; solid line, after 768 h.

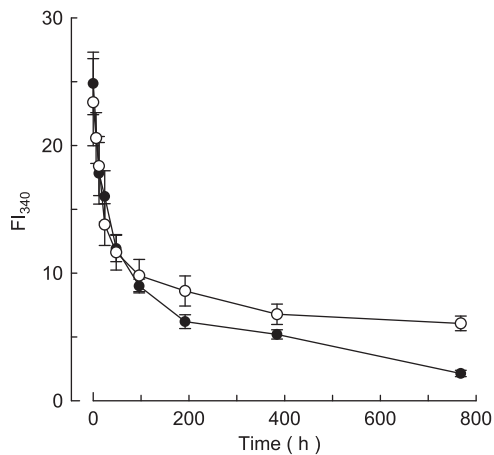


Fig. 5. Changes in FI₃₄₀ (fluorescence intensity at a wavelength of 340 nm) of pearls subjected to heat or sunlight treatment. ○, Heat treatment at 100°C for up to 768 h; ●, sunlight treatment at 250 W/m² for up to 768 h. Data are presented as means ± SD of 10 pearls.

Table 1. Changes in amino acid composition (mg/100 g) in nacreous layer of the pearl shell after 768 h of heat (100 °C) or sunlight treatment (250 W/m²).

Amino acid	Control	Heat	Sunlight
Arg	135	109	122
Lys	57	39	35
His	10	18	9
Phe	63	62	57
Tyr	83	68	56
Trp	18	19	4
Leu	152	149	139
Ile	30	28	27
Met	39	34	18
Val	47	47	44
Ala	399	415	404
Gly	462	459	447
Pro	37	36	31
Glu	77	77	75
Ser	113	64	108
Thr	20	12	19
Asp	255	249	251
Cys-Cys	35	26	25

た、タンパク質は、280 nm 付近の紫外線で励起され、340 nm 付近に蛍光極大を示すトリプトファン由来の蛍光を示すことが知られている²⁶⁾。

本研究では、従来の評価方法では困難だった真珠の劣化状態の差異をコンキオリンの性状から評価することを目的として、真珠の反射スペクトルにおいて認められる280 nm 付近の特異的な分光吸収に着目し、254 nm における分光反射率 R₂₅₄ の値と 282 nm における分光反射率 R₂₈₂ の値の比 R_{254/282} を280 nm 付近の分光吸収の変化量の指標として用いた。同様に280 nm の紫外線で励起されるトリプトワンの蛍光についても、蛍光極大波長が認められた340 nm の蛍光強度値 FI₃₄₀ を蛍光の変化量の指標として用いた。そして、これら R_{254/282} と FI₃₄₀ によって真珠の劣化状態に関する検討を行った。その結果、真珠を熱と日光照射によって処理したときのコンキオリンに含まれるチロシンとトリプトファンが示す R_{254/282} と FI₃₄₀ の変化について、ウィルクスの Δ 統計量を用いて熱処理区と日光照射区の2群で母平均の差を有意水準 $\alpha = 0.01$ で検定したところ有意な差が認められた (Fig. 6)。

真珠層と同等の成分である真珠層粉末試料に、熱および日光照射の処理を施してコンキオリンのアミノ酸組成の変化を調べた結果、熱処理区ではセリン、スレオニン、リジンが比較的大きく減少し、芳香族アミノ酸ではチロシンにわずかな減少が認められた (Table 1)。一方、日光照射区では、芳香族アミノ酸のトリプトファンに著しい減少が認められたほか、チロシン、リジン、メチオニン

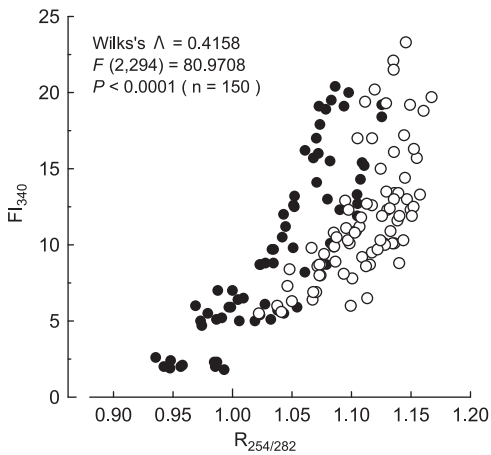


Fig. 6. Relationship between FI_{340} (fluorescence intensity at a wavelength of 340 nm) and $R_{254/282}$ (ratio of reflectance at a wavelength of 254 nm and 282 nm) of pearls. ○, Heat treatment at 100°C from 6 h to 768 h; ●, sunlight treatment at 250 W/m² from 12 h to 768 h.

も大きな減少をしていることから、熱と日光照射がコンキオリンに及ぼす作用機構には違いがあると考えられた。日光照射がタンパク質へ及ぼす影響として、日光に含まれる紫外線によってペプチド結合が切断される変性が知られている²⁸⁾。また卵アルブミンタンパク質や絹フィブロインタンパク質では、日光によって光酸化されたとき、チロシンとトリプトファンが大きく減少し、メチオニンやリジン、セリン、ヒスチジンがわずかながら減少することが示されている^{19,28)}。さらに紫外線で劣化した絹では、黄変や伸度・強度が低下することが報告されている^{19,29)}。本研究においても、日光照射区の真珠層粉末試料中のアミノ酸組成において著しいトリプトファンの減少と、チロシン、リジン、メチオニンの大きな減少が認められた。これらアミノ酸組成の変化は、真珠層のコンキオリンが紫外線による変性と光分解を受けた結果と考えられ、真珠の $R_{254/282}$ と FI_{340} に大きな低下をもたらした主要因と考えられた。また、試験終了後の日光照射区の真珠試料において認められた300 nm付近～450 nm付近までの分光反射率の減少は、真珠の黄変を示しており、紫外線で劣化した絹と同様に真珠でもこれらアミノ酸組成の変化が真珠層の黄変や脆弱性の増大に関与していることが推察された。

熱がタンパク質へ及ぼす影響としては、二次および三次構造を安定化している水素結合や疎水結合を切断し、高次構造を変化させる変性が知られている³⁰⁾。熱処理された絹では、繊維強度が低下し²⁹⁾、アミノ酸組成の変化でトリプトファンやチロシンはほとんど変化しないこと³¹⁾、またアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニンなどの酸性およびオキシアミノ酸が熱処理によって著しく破壊されることが報告され、これらアミノ酸の中でオキシアミノ酸が熱黄変の一因である可能性が示唆されて

いる³²⁾。さらに、乾熱処理された羊毛で認められる熱黄変の原因は、ε-アミノ基を持つリジンやカルボニルグループのメイラード反応によるものであることが知られている³³⁾。本研究においては、熱処理区ではトリプトファンの減少は認められなかったが、日光照射区と同様に真珠の黄変を意味する300 nm付近～450 nm付近までの分光反射率の減少と、チロシンや、セリン、スレオニン、リジンの減少が認められた。これら変化のうち、チロシンの減少は真珠の $R_{254/282}$ を低下させた主要因と考えられ、また、セリン、スレオニンといったオキシアミノ酸の減少やリジンの減少は、真珠においても熱黄変の一因となっていることが考えられた。一方、 FI_{340} は、トリプトファンの減少が認められなかったにもかかわらず、日光照射区と同様に大きな低下が観察された。一般的に、トリプトファンの蛍光は、タンパク質内部に置かれる環境要因に大きく影響されやすく、蛍光のピークシフトや消光(quenching)が生じやすいことがよく知られている。トリプトファンの蛍光ピークは、トリプトファン残基が置かれている溶媒環境によって左右され、極性環境下ではレッドシフト、非極性環境下ではブルーシフトすることが報告されている³⁴⁾。真珠では、熱処理区の蛍光ピーク波長が5 nm程度ブルーシフトしたことから、熱処理によってトリプトファン環境が非極性環境へ移行していることが推察される。また、トリプトファンの蛍光の消光には、プロトン移動消光(proton transfer quenching)、電子移動消光(electron transfer quenching)、共鳴エネルギー移動消光(resonance energy transfer quenching)、電荷移動消光(charge transfer quenching)、プロトン誘起消光(proton induced quenching)、pH依存性消光(pH dependent quenching)、溶媒消光(solvent quenching)、熱的消光(thermal quenching)、自己消光(self quenching)、動的消光(collision quenching)などが知られている³⁵⁻⁴¹⁾。熱処理区の真珠における FI_{340} が低下した原因については、真珠層中の結晶層間におけるコンキオリン中のトリプトファン環境において、pH依存性消光、溶媒性消光などの可能性は低いと考えられる。また、測定条件から考えて熱的消光が生じている可能性も低いと考えられる。ピルビン酸デカルボキシラーゼでは、熱処理によってコンフォメーションに変化が生じるとトリプトファンの蛍光が消光することが報告されており⁴²⁾、真珠においてもNSMPsの高次構造変化にともなう消光の可能性が考えられるが、NSMPsの変性に関する知見は少なく消光メカニズムの解明は今後の課題である。

本研究の結果から、 $R_{254/282}$ と FI_{340} を用いた真珠の劣化評価法は、主にコンキオリンに含有されるNSMPsの性状変化を評価していると考えられた。そしてこの評価法によって、従来方法では困難であった真珠の劣化状態の差異を判定することが可能であり、今後の真珠品質評価への応用に期待が持たれる。

要 約

アコヤガイ真珠をはじめとする多くの真珠では、熱や日光などのさまざまな要因による品質の劣化が知られている。本研究では、熱および日光がアコヤガイ真珠に含まれる真珠層基質タンパク質 (nacreous shell matrix proteins, NSMPs) に及ぼす影響を、254 nmにおける分光反射率 R_{254} の値と282 nmにおける分光反射率 R_{282} の値の比 $R_{254/282}$ の変化量と340 nmにおける蛍光強度値 FI_{340} の変化量を指標として調べた。その結果、日光照射による処理 (250 W/m², 768時間) では $R_{254/282}$ と FI_{340} が共に大きく減少した。また、熱処理 (100°C, 768時間) では $R_{254/282}$ の減少はさほど大きなものではなかったが、 FI_{340} の減少は日光照射による処理とほぼ同程度に大きなものであり有意な差が認められた。アミノ酸組成の分析結果からも、芳香族アミノ酸の変化として熱処理ではチロシンだけが18%減少したのに対し、日光照射処理ではトリプトファンが78%、チロシンが33%ときわめて大きく減少するといった違いがあることから、熱および日光照射がNSMPsに及ぼす影響の作用機作は異なっていると推察された。そして $R_{254/282}$ と FI_{340} を用いたNSMPsの性状評価を行うことによって真珠の劣化状態の差異を判定することが可能であることを示した。

文 献

- 1) 岩田圭示: 地質学雑誌, **81**, 155–164 (1975).
- 2) Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsushiro, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9657–9660 (1996).
- 3) Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., and Takahashi, T.: *Nature*, **387**, 563–564 (1997).
- 4) Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., and Akera, S.: *FEBS Lett.*, **462**, 225–229 (1999).
- 5) Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., and Matsushiro, A.: *Mar. Biotechnol.*, **2**, 409–418 (2000).
- 6) Zhang, Y., Xie, L., Meng, Q., Jiang, T., Pu, R., Chen, L., and Zhang, R.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, **135**, 565–573 (2003).
- 7) Zhang, C., Li, S., Ma, Z., Xie, L., and Zhang, R.: *Mar. Biotechnol.*, **8**, 624–633 (2006).
- 8) Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., and Miyamoto, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 158–163 (2007).
- 9) Yan, Z., Jing, G., Gong, N., Li, C., Zhou, Y., Xie, L., and Zhang, R.: *Biomacromolecules*, **8**, 3597–3601 (2007).
- 10) Ma, Z., Huang, J., Sun, J., Wang, G., Li, C., Xie, L., and Zhang, R.: *J. Biol. Chem.*, **282**, 23253–23263 (2007).
- 11) Huang, J., Zhang, C., Ma, Z., Xie, L., and Zhang, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 1037–1044 (2007).
- 12) Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., and Nagasawa, H.: *Science*, **325**, 1388–1390 (2009).
- 13) Wang, N., Kinoshita, S., Riho, C., Maeyama, K., Nagai, K., and Watabe, S.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, **154**, 346–350 (2009).
- 14) 和田浩爾, 赤松 蔚, 松田泰典: 正倉院紀要, **14**, 1–20 (1992).
- 15) 和田浩爾: 真珠の科学—真珠のできる仕組みと見分け方—, p.305–306, 真珠新聞社, 東京 (1999).
- 16) 和田浩爾: 真珠加工の知識, **2**, 10–21, 日本真珠輸出加工協同組合, 東京 (1968).
- 17) 瀬戸山幸一, 山口雪雄: 日蚕雑, **45**, 295–299 (1976).
- 18) 桑原 昂, 渡辺忠雄, 待田行雄, 今丸 眞: 日蚕雑, **39**, 277–280 (1970).
- 19) 菊池裕子, 齊藤昌子, 柏木希介: 家政学誌, **38**, 33–38 (1987).
- 20) Webster, G. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 371–373 (1970).
- 21) Velick, S. F.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1455–1467 (1958).
- 22) Matsushiro, A., Miyashita, T., Miyamoto, H., Morimoto, K., Tonomura, B., Tanaka, A., and Sato, K.: *Mar. Biotechnol.*, **5**, 37–44 (2003).
- 23) Miyoshi, T.: *Technology Reports, Yamaguchi University*, **5**, 23–30 (1992).
- 24) Miyoshi, T., Matsuda, Y., and Komatsu, H.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **26**, 578–581 (1987).
- 25) 科学技術庁資源調査会・資源調査所編: 改訂 日本食品アミノ酸組成表, p. 201–210, 大蔵省印刷局, 東京 (1986).
- 26) Teale, F. W. J.: *Biochem. J.*, **76**, 381–388 (1960).
- 27) Bovie, W. T.: *Science*, **37**, 373–375 (1913).
- 28) Gomyo, T. and Sakurai, Y.: *Agricultural and Biological Chemistry*, **31**, 1474–1481 (1967).
- 29) Kuruppillai, R. V., Hersh, S. P., and Tucker, P. A.: *Historic Textile and Paper Materials*, Advances in Chemistry series 212, Chapter 6, p. 112–127, American Chemical Society, Washington, DC (1986).
- 30) 安藤鋭郎, 今堀和友, 伊勢村寿三, 早石 修: タンパク質化学3 高次構造, p. 523–524, 共立出版, 東京 (1973).
- 31) 山口雪雄, 田中彰子: 蚕糸研究, **97**, 33–43 (1975).
- 32) 瀬戸山幸一: 日蚕雑, **51**, 365–369 (1982).
- 33) Duffield, P. A. and Lewis, D. M.: *Review of Progress in Coloration*, **15**, 38–51 (1985).
- 34) Vivian, J. T. and Callis, P. R.: *Biophys. J.*, **80**, 2093–2109 (2001).
- 35) Callis, P. R. and Liu, T.: *J. Phys. Chem. B*, **108**, 4248–4259 (2004).
- 36) Chen, Y. and Barkley, M. D.: *Biochemistry*, **37**, 9976–9982 (1998).
- 37) Shizuka, H., Serizawa, M., Shimo, T., Saito, I., and Matsuura, T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1930–1934 (1988).
- 38) Christov, C., Ianev, D., Shosheva, A., and Atanasov, B.: *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, **59**, 824–827 (2004).
- 39) Eftink, M. R. and Ghiron, C. A.: *Anal. Biochem.*, **114**, 199–227 (1981).
- 40) Permyakov, E. A. and Burstein, E. A.: *Biophys. Chem.*, **19**, 265–271 (1984).
- 41) Chattopadhyay, K., Elson, E. L., and Frieden, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2385–2389 (2005).
- 42) Ohba, H., Yasuda, S., Hirose, H., and Yamasaki, N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1581–1583 (1995).