

ウシ血清アルブミンのpH-溶解度曲線におよぼす ドデシル硫酸ナトリウムと尿素の影響

村 田 護 *

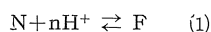
Effects of Sodium Dodecyl Sulfate and Urea on pH-Solubility Profiles of Bovine Serum Albumin

Mamoru MURATA

要 旨 ウシ血清アルブミンの3M KCl 中でのpH-溶解度をドデシル硫酸ナトリウムおよび尿素の存在で調べ、血清アルブミンのN-F異性化におよぼすこれらの物質の影響を再検討した。pH-溶解度曲線はドデシル硫酸ナトリウムの存在でモル混合比4までは酸性側にシフトしたが、4を越えると急に効果が無くなった。1~4 Mの尿素の存在でpH-溶解度曲線は大きく高いpH側にシフトした。平衡の水素イオン依存性は尿素の無いとき12次、尿素の存在で5次であった。

1 緒 言

ウシ血清アルブミンが等電点の酸性側の狭いpH領域(pH4.5~3.5)でN-F異性化とよばれる可逆的な立体構造の変化を起こすことはよく知られている。青木とFosterは電気泳動法を用いて血清アルブミンのN-F異性化について詳細に検討し、この異性化平衡がつぎの式に従っていることを見出した。¹⁾



ここでNはpH4.5以上で存在する正常な状態の分子(N型)を表わしており、Fは水素イオンの結合によって立体構造の変化した分子(F型)である。nの値は2~3である。pH3.5以下ではF型のみになり、またpH3.5以下ではF型が酸膨脹することも見出した。Fosterと青木はさらにN-F異性化におよぼす各種の陰イオン¹⁾、界面活性剤²⁾および尿素の影響³⁾を調べ、これらの物質の添加が平衡の位置を変えることを示した。

その後、血清アルブミンの高濃度塩中での溶解度がN-F異性化と同じpH領域で変化することが知られた。この溶解度の変化は本質的にN-F異性化と同じであると考えられ、pHを下げるとN型は沈殿しないがF型は沈殿すると結論づけられた。⁴⁾

高濃度塩中でのウシ血清アルブミンのpH-溶解度の挙動については、界面活性剤の影響についてはSogamiとFosterによって部分的になされているが、⁵⁾尿素の影響についての報告はみあたらない。

本実験はpH-溶解度法が電気泳動と比較して実験が容

易であり、また正確であることを利用し、3M KCl溶液中でのウシ血清アルブミンの溶解度におよぼすドデシル硫酸ナトリウムおよび尿素の影響を調べ、N-F異性化の平衡の位置について電気泳動によって得られている結果と比較検討してみた。

2 実 験

結晶ウシ血清アルブミン(以下BSAと略記する)は、Armour社のLotNO. J 72104を脱脂肪酸することなくそのまま用いた。ドデシル硫酸ナトリウム(以下SDSと略記する)は岐阜大学工学部合成化学教室で合成された高純度のもを、同教室青木幸一郎教授の好意で得た。他の試薬はすべて市販の特級試薬を使用した。

pH-溶解度の測定法はSogamiとFosterの方法に準じて行なった。すなわち、まず3.3M KCl 200mlに1% BSA水溶液 20mlを加え、タンパク質濃度を0.091%、KCl濃度を3Mとした原液を調製する。この原液各10mlをピペットで共栓試験管にとり、0.1N HClをマイクロシリンジで必要量加えpHを調整する。これを振り混ぜ機で4時間以上振り混ぜたのち、溶液のpHを正確に測定する。pH測定後直ちに遠心分離管に移し、15,000~16,000rpmで10分間遠心分離して沈殿を取り除く。上澄液を試験管にとり、1N KOH 10μlを加える。ついで分光光度計を用いて279mμでの吸光度を測定し、上澄液中のBSAの濃度を求める。吸光度の値について加えた0.1N HClおよび1N KOHの量による差を補正する。

尿素の影響を調べる場合には、必要とする濃度の1.1倍の濃度を含む3.3M KCl溶液を調製しておき、BSA溶

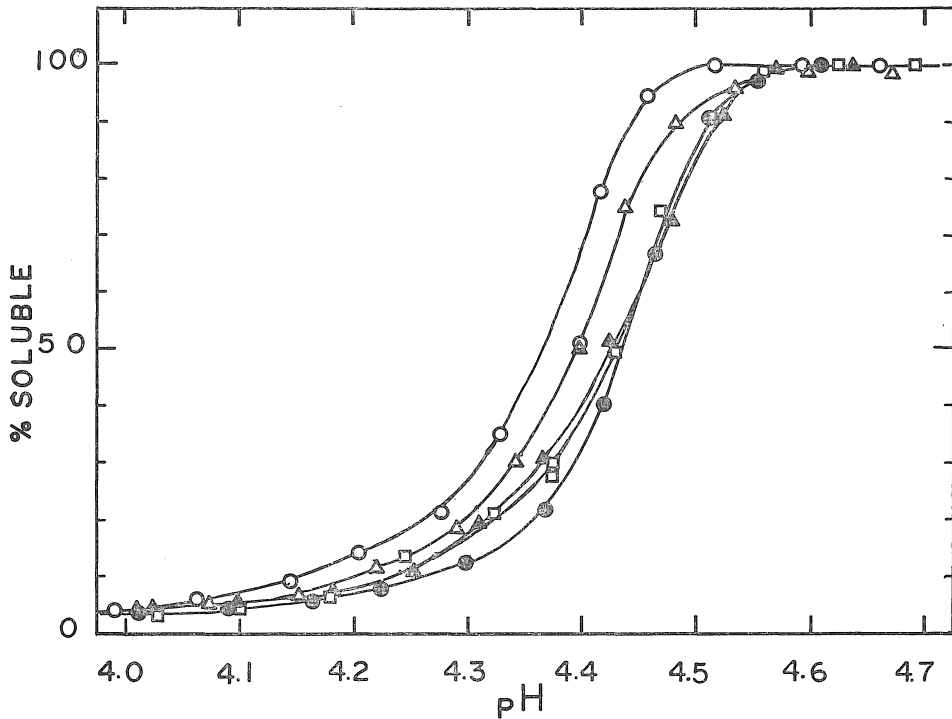


図1 3M KCl 中でのBSA-SDS複合体のpH-溶解度曲線 ($10 \pm 1^\circ\text{C}$)

- : nativeBSA (AD₀) △ : モル混合比2 (AD₂) ○ : モル混合比4 (AD₄)
 □ : モル混合比5 (AD₅) △ : モル混合比12 (AD₁₂)

液と混合した。SDSの影響を調べる場合は2%BSA水溶液とSDS溶液とを等量混合して所定のモル混合比にしたBSA-SDS複合体を用いた。この場合、BSAの分子量は69,000と仮定した。

使用したpHメータは日立一堀場F-7ss型。分光光度計は日立EPS-3型自記分光光度計。遠心分離機は佐久間製作所のものであった。

3 結果と考察

3.1 ドデシル硫酸ナトリウムの影響

BSAとSDSの混合物のpH-溶解度をSDS/BSAモル混合比を0~12の範囲に限定して調べてみた。図1はそのpH-溶解度曲線の例であり、図2はpH4.4での沈殿しないBSAの百分率とモル混合比の関係を示したものである。SDSが存在しない場合に比較してSDSを添加するとpH-溶解度曲線は酸性側に移動する。モル混合比が4まではこの傾向が増大する。しかしモル混合比が4を越えると急にこの傾向が失われ、pH-溶解度曲線はSDSが存在しない場合とほとんど変わらないものになった。ただし曲線の中点より低いpHの部分ではわずかに曲線がシフトする傾向があった。

Fosterと青木はN-F異性化におよぼすSDSの影響を電気泳動で調べた結果、SDSは平衡をNの方向に顕著に

移動する効果をもつことを報告している。このことと本実験のSDSがpH-溶解度曲線を酸性側に移動させる傾向は、すくなくともモル混合比が4までは一致している。しかしながら、混合比が4を越えるところの効果が全く無くなる事実は予想外のことであった。電気泳動の結果はモル比12までSDSの効果を認めている。Sogamiらの溶

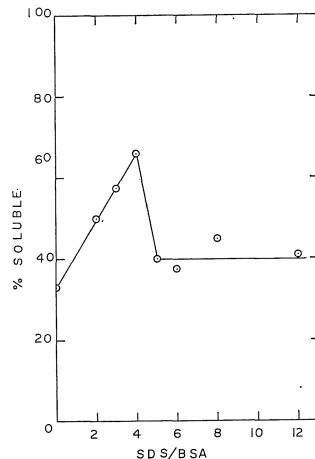


図2 SDS/BSA (モル混合比) と溶解成分の百分率 pH4.4, $10 \pm 1^\circ\text{C}$

溶解度の実験はモル比5までの範囲であり、この範囲ではほぼ一致しているが、それ以上のモル比については検討されていないので比較できない。この実験において、モル混合比が4~5を越えるときの3M KCl中でのSDSの溶解度の低下が原因とも考えられる。事実モル混合比が6以上では3M KClの存在で溶液にわずかながら濁りが観察される。しかしSDSとBSAの強い結合がN-F異性化平衡をシフトさせる原因であるとするれば、3M KCl中でのこの結合が全く無くなることは考え難い。他の原因が考慮されなくてはならないだろう。この場合、BSA—SDS混合物が等電点の酸性側で沈殿する（KClが存在しなくても）という事実は、この程度の低いモル比では起こり得ないので考慮する必要は無いであろう。

従来BSAとSDSはこの実験のモル混合比の範囲ではADm（A：血清アルブミン，D：陰イオン活性剤）なる複合体を形成し、mの値は1から連続的に増加し、最高10~12に達するが、この10~12個の結合sitesは全く同等で、相互に影響をおよぼさないと考えられてきた⁶⁾。しかし著者らは先にBSAの尿素変性におよぼすSDSの変性防止効果について結合数との関係を検討した際に、結合数4までと、それ以上のSDSの結合では結合の強さ、性質が異なるのではないかという疑問をいただいた。最近この考えを裏づけるいくつかの報告がだされている^{8,9)}。これらの報告はいずれもSDSとBSAの結合において、はじめの4個の強力な結合を認めている。今回の実験結果とあわせて考えると、4個の結合によって何か協同的变化がBSAの構造におこり、その結果として溶解度に影響が現われるのかもしれない。いずれにせよ12個の結合のsitesのうち、いくつかの異なる結合sitesの組が存在することが今回の実験結果を解釈するカギにな

ると考えられるが、これ以上の考察はいまのところできない。

3.2 尿素の影響

1~4Mの尿素を加えた3M KCl溶液中でのBSAのpH-溶解度について調べた結果を図3に示した。1~4M尿素の添加で、pH-溶解度曲線は高いpH側に大きく移動した。また尿素中でのpH-溶解度曲線は尿素が存在しない場合よりなだらかな曲線となった。

N-F異性化平衡が(1)式に従うとすれば平衡定数Kはつぎのようになる。

$$K = \frac{[F]}{[N][H^+]^n} \quad (2)$$

ここで[N]はN型の濃度、[F]はF型の濃度である。[F]/[N]=1となる点、すなわちF型とN型が等濃度で存在する点のpHをpH-溶解度曲線から求め、nの値を適当に仮定して描いた理論曲線と実測曲線の比較からnの値を決定することができる。同時に平衡定数Kの値も求められる。表1にその結果を示した。

尿素が存在しない場合のnの値は12であり、尿素中では4~5である。これはFosterと青木が電気泳動の結果から求めたn=2~3の値と大きく異なっている。BSAの滴定曲線から求められるN型およびF型に結合する水素イオンの平均数の差は約12個であると報告されている¹⁾。尿素が無いときのn=12の値はこの事実と一致している。また尿素が存在する場合のN型とF型の電荷の差は6電荷単位と報告されている²⁾したがって1~4M尿素の存在でn=5となったことはこのこととほぼ一致している。Fosterらは電気泳動の結果から得られたnの値と、滴定曲線と電気泳動移動度から予想されたnの値の大きな相異を解釈するのに、BSAは4つのサブユニット

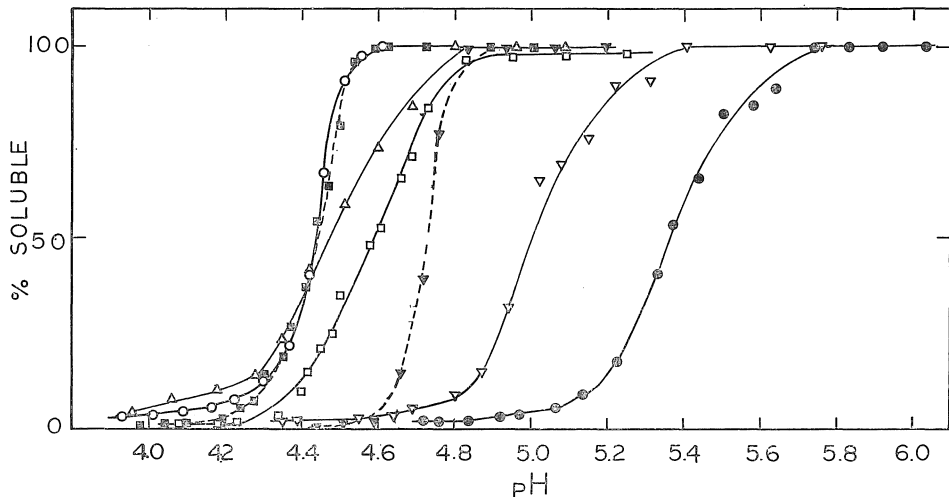


図3 3MKCl中でのpH-溶解度曲線、尿素の影響

○ : 0M; △ : 1M; □ : 2M; ▽ : 3M; ● : 4M ▣ : 2M, AD4; ▼ : 3M, AD4

表 1 N—F異性化平衡の定数

尿素濃度 (M)	中点のpH	n	K
0	4.43	12	$10^{53.2}$
1	4.47	5	$10^{22.4}$
2	4.55	5	$10^{22.8}$
3	5.01	5	$10^{25.1}$
4	5.37	4~5	$10^{21\sim 27}$
2 (AD ₄)	4.43	12	$10^{53.2}$
3 (AD ₄)	4.73	12	$10^{56.8}$

ニトからなるというモデルを想定し、N—F 転移が 4 段階に起きると仮定して説明した。しかし本実験から得られた結果からは、そのような 4 段階の転移を仮定する必要がない。高濃度の電解質の存在での N—F 転移と、低いイオン強度での N—F 転移では転移機構が大きく異なる可能性がある。同じように議論することには問題があるが、いまあるデータだけではこれ以上解釈できない。尿素の存在での pH-溶解度曲線の移動の大きさは、4 M 尿素で 0.94pH 単位である。電気泳動からは 2M 尿素で約 0.9pH 単位の移動があると報告されているので、3M KCl 中での N—F 転移の pH の移動は全般にかなり小さい。3M KCl という高濃度の電解質の存在では BSA に対する尿素の作用が大きく抑制される可能性がある。

参 考 文 献

- 1) K. Aoki, J. F. Foster, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3538 (1956) ; *ibid.*, **79**, 3385 (1957) ; *ibid.*, **79**, 3539 (1957)
- 2) J. F. Foster, K. Aoki, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5215 (1958)
- 3) J. F. Foster, K. Aoki, *ibid.*, **80**, 1117 (1958)
- 4) M. R. Rachinsky, J. F. Foster, *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 283 (1957)
J. F. Foster, M. Sogami, H. A. Petersen, W. J. Leonard, Jr., *J. Biol. Chem.*, **240**, 2495 (1965)
- 5) M. Sogami, J. F. Foster, *Biochemistry*, **7**, 2172 (1968)
- 6) 青木幸一郎, 油化学, **17**, 184 (1968)
- 7) 青木幸一郎, 村田 護, 第22回コロイドおよび界面化学討論会要旨集, 119 (1969, 仙台)
- 8) C. J. Halfman, T. Nishida, *Biochim. Biophys. Acta*, **243**, 294 (1971)
- 9) C. J. Halfman, T. Nishida, *Biochemistry*, **11**, 3493 (1972)
- 10) O. Takenaka, S. Aizawa, Y. Tamaura, J. Hirano, Y. Inada, *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 696 (1972)
- 11) J. F. Foster, K. Aoki, *J. Phys. Chem.*, **61**, 1369 (1957)

また電気泳動の結果からは、pH-溶解度曲線に、組成が pH に依存しない部分すなわち平坦部分が存在するであろうと予想されたが、このような平坦部分は全くみられなかった。この相異が何に帰因するのか分らない。電気泳動の結果が尿素中での N—F 異性化平衡を正しく反映していないようにも考えられる。

3.3 AD₄複合体の尿素中でのpH-溶解度

SDS 添加の影響の結果から、もっとも pH-溶解度曲線を酸性側にシフトさせる SDS/BSA モル比が 4 の場合、すなわち AD₄ 複合体の 3M KCl 中での溶解度を 2M, 3M 尿素の存在で調べてみた。結果は 2M および 3M 尿素で、SDS が存在しない場合と比較して曲線の中点がそれぞれ 0.12pH および 0.28pH 単位だけ低い pH 側に移動した。同時に平衡の水素イオン依存性は 5 次 (n=5) から 12 次 (n=12) になった。(図 3 の波線で示した曲線および表 1)。この場合の SDS の効果は、SDS が BSA の尿素変性を抑制する効果をもつことと同じであると解釈される。尿素中で水素イオン依存性が低下することは尿素による BSA の変性または他の構造変化に帰因しており、SDS の存在で、その作用が抑制されるためであると考えられる。

最後に本研究に協力された天野景元君に謝意を表します。