

紫外吸収差スペクトルによる ウシ血清アルブミンの尿素変性についての研究

村 田 護 *

Ultraviolet Absorption Difference Spectra Studies on Urea Denaturation of Bovine Serum Albumin

Mamoru MURATA

要 旨 5M尿素によるウシ血清アルブミンの変性による構造変化を紫外吸収差スペクトルで調べた。変性によるスペクトル変化は瞬間的に起こる変化と、ひきつづき付加的に起こる変化があり、付加的变化はスルフヒドリル基とジサルファイド基の交換反応によることを示した。差スペクトルの形からチロシン残基の周囲の環境変化があることが観察されたが、トリプトファン残基については不明であった。反応の可逆性、システインの影響を検討した。

1. 結 言

著者ら¹⁾は先にウシ血清アルブミン(以下BSAと略記する)の尿素変性について主にポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて検討した。その結果尿素変性は尿素添加後直ちに起こるBSA分子の膨脹または膨潤の過程と、ひき続く分子間および分子内のスルフヒドリル基とジサルファイド基の交換反応による分子の重合および変形単量体を生ずる過程を含んでいることを示した。ゲル電気泳動法は後者の過程を調べるには有効であったが、尿素添加後直ちに起こる変化については何らの知見も与えなかった。紫外吸収差スペクトルによるBSAの尿素変性の研究はGlazerら²⁾によって行われている以外にはあまりみられないが、差スペクトル法は変性の初期の変化を調べるのに有効と考えられる。

本研究はpH9, 5M尿素中でのBSAの差スペクトルを測定し、尿素変性によるBSAの構造変化についての知見を得ることを目的とした。

2. 実 験

結晶ウシ血清アルブミンはArmour社のものを脱脂せずにそのまま使用した。BSA水溶液の濃度測定は紫外分光光度計を用いて279m μ の吸光度を求め、 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = 6.67の値から計算する方法で行なった。尿素その他の

試薬は市販の特級品をそのまま使用した。

BSAのスルフヒドリル基をブロックするためには1当量ないし2当量のヨードアセトアミドを用いた。反応はpH8.9, 0.083Mトリス・0.004MEDTA・0.013Mホウ酸(合計モル数0.1M, 以下合計モル数で濃度を表示する)緩衝液中で24時間行なった。過剰のヨードアセトアミドを透析することはしなかった。

紫外吸収差スペクトルの測定は日本分光のORD/U V5および日立EPS-3型自記分光光度計を使用して行なった。タンパク質濃度は0.33%とし、緩衝液はpH8.9, 0.1Mトリス・EDTA・ホウ酸緩衝液を用いた。セルは1cmセルを使用した。試料溶液の調製においては、試料と対照溶液のタンパク質濃度の差がないように十分注意を払った。

3. 結 果

pH8.9でBSAを5M尿素にさらすと、尿素添加直後に279m μ の吸収極大の青色移動が起こる。同じpHのnativeなBSAを対照とした差スペクトルは280m μ に肩をもつ287~288m μ のするどい極小が観察された。また300m μ 付近に巾の広いなだらかな極大がみられた(図1)。この差スペクトルはGlazerら²⁾がpH5.1, 7M尿素中のBSAについて得たものと一致した。これらの極小、極大は時間とともに変化し、差吸収は増大した。 $-dA_{287-288}$ と時間との関係を図2に示した。 $-dA$ の値は尿素添加後90分までは比較的速く増加し、それ以後は徐々に増加した。

BSAのスルフヒドリル基(SH基)をヨードアセトアミドでブロックし、その効果を調べてみた。SH基をブロックしたBSA(以下B-BSAとも略記する)をBSAの場合と同様にpH8.9で尿素にさらし、尿素を含まない同じpHのB-BSAを対照とする差スペクトルをとると、やはり尿素添加直後にBSAと同じ極大、極小が観察され

* 応用化学科

た(図1)．しかし時間ともなう差スペクトルの変化は全くなかった．尿素添加直後の ΔA_{288} の値はSH基をブロックしない場合とほとんど同じであった(図2)．

5 M尿素中の BSAを 試料とし、同じく5M尿素中の B-BSA を対照とする差スペクトルは、上の結果から予想されるように時間とともに 287~288 μ の極小を生じる．しかし 300 μ 付近の極大は観察されなかった(図3)．

0.02Mのシステインを加えると BSA およびB-BSAの 5M尿素中の差スペクトルは、ともに287~288 μ での極小が異常に大きくなる．尿素添加5分後の最初の測定ですでにシステインを加えない場合の3.7倍にも達した．40~50分後までわずかな増大を示すがそれ以後はほとんど変化しなかった．それに対して 300 μ 付近の極大はシステインを加えない場合と変わらないかむしろ小さかった(図1および図2)．また 275 μ 以下のスペクトルはシステインが存在しない場合に比較して大きく異なっており、252 μ 付近に極小があらわれた．

反応の可逆性を検討するため尿素濃度の希釈による効果を調べてみた．1% BSA またはB-BSAを一定時間5M尿素にさらした後に、緩衝液で尿素濃度を3分の1に希釈して 1.6Mとし、対照溶液として1.6M尿素中の BSA または B-BSA をとって測定した差スペクトルの1例を図4に示す．差スペクトルは5 M尿素中で測定したもの

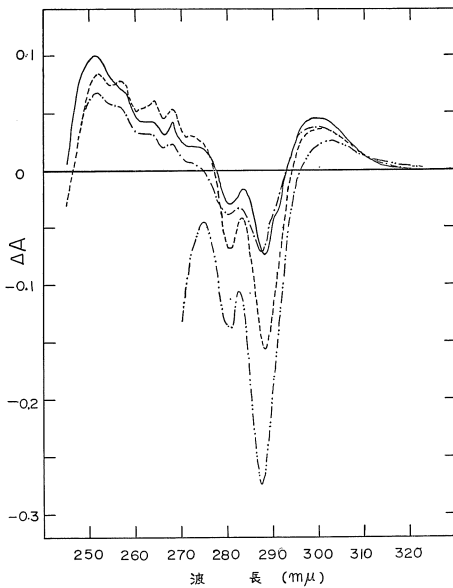


図1 5M尿素中でのBSAの差スペクトル
 —— : BSA, 尿素添加後5分,
 - · - : SH基をブロックしたBSA, 60分,
 --- : BSA, 24時間
 ···· : BSA+0.02システイン, 5分,
 BSA濃度0.33%

より著しく小さくなった．BSA については、はじめの尿素処理の時間によって形および ΔA_{288} の大きさが異なり、長時間のものほど ΔA_{288} の値が大きかった． $-\Delta A_{288}$ の値と時間の関係が図2に示されている．希釈後の時間の経過によっても付加的に $-\Delta A_{288}$ の値が小さくなった．B-BSA の場合は予期した通り、尿素濃度の希釈によって青色移動から赤色移動に変わるという結果を得た．これは尿素添加後の経過時間に無関係であった．これらの結果は BSA については反応に不可逆的過程が含

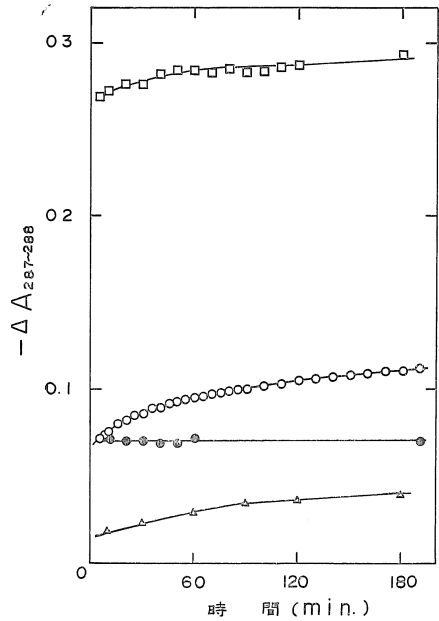


図2 $-\Delta A_{287-288}$ の時間ともなう変化

- : 5M尿素中の BSA (0.33%)
- : 5M尿素中のSH基をブロックしたBSA (0.33%)
- : 5M尿素中の BSA (0.33%) + 0.02Mシステイン
- △ : 5M尿素中に10~180分さらした BSA の尿素濃度を1.6Mに希釈して5分後、対照溶液は 1.6M尿素中の BSA

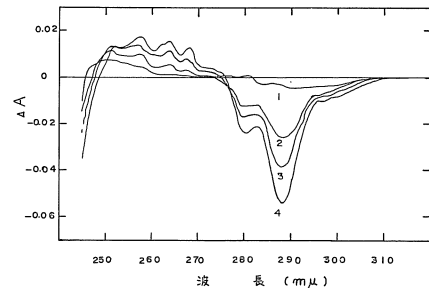


図3 5M尿素中の BSA と SH基をブロックしたBSA (対照) の差スペクトル
 1 : 11分, 2 : 60分, 3 : 120分,
 4 : 300分, BSA濃度0.33%

まれており、B-BSA の場合は完全に可逆的変化であることを示した。

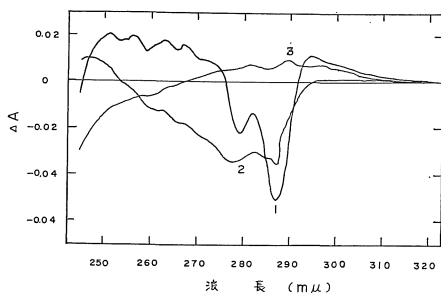


図4 尿素濃度の希釈による差スペクトルの変化

- 1 : BSA, 5M尿素に250分さらした後に尿素濃度を希釈, 希釈後 5分
- 2 : BSA, 5M尿素中5分, 希釈後 5分
- 3 : SHをブロックしたBSA, 5M尿素中60分, 希釈後 5分
BSA濃度0.33%, 対照溶液1.6M尿素中のBSA

3. 考 察

5M尿素中のBSAについて観察される差スペクトルの280m μ に肩をもつ287~288m μ の極小は明らかにチロシン残基近傍の環境の変化によるものである。これはBSAの酸性領域で観察される差スペクトルと類似している²⁾³⁾。このいわゆる変性による青色移動の原因は水素結合の切断と考えられたこともあったが、現在では変性によってタンパク質分子の内部が崩壊して、そこに存在していた発色団がより屈折率の低い溶媒に露出するためと解釈されている。

300m μ 付近の中の広い極大は赤色移動によるものとはかならずしもいえない。この波長付近での尿素中のBSAの吸収スペクトルと native な BSA の吸収スペクトルを比較すると、前者の吸収強度が大きくなっている。この部分だけが赤色移動を起こしているかのように見えるが、単に吸収強度が変化したものかもしれない。300m μ 付近のこのピークはリゾチームの尿素変性⁵⁾、あるいは塩酸グアニジンによる変性⁶⁾および温度差スペクトル⁷⁾で顕著に観察される。またpH4.5~3.5でのBSAの差スペクトルでもみられるが、その原因は十分議論されていない。トリプトファン残基の環境変化によるピークは普通294m μ にみられるので波長のずれがある。図1と図4の曲線1を比較してみると、尿素濃度を希釈した場合の差スペクトルはこの極大の位置が294m μ に移動している。したがってもともとこの極大は294m μ にあって、チロシン残基の極小が大きいために打ち消されて、みかけ上は300m μ に極大があるように見えるのかもしれない。

250m μ ~270m μ の波状の差スペクトルはフェニルアラ

ニン残基の環境変化によるものと考えられる。フェニルアラニンのpH8.9, 5M尿素中の差スペクトルはBSAの差スペクトルと異なって山と谷が逆になる。また吸収スペクトルのシフトはなく、強度変化のみ観察される。したがって5M尿素中のBSAの250~270m μ での差スペクトルは尿素の溶媒効果によって生じるものではない。やはり変性による立体構造の変化に帰因するものであろう。

尿素中のBSAとSH基をブロックしたBSAについて得られた結果の相異から、BSAの差スペクトルの時間による変化にはSH基が関係していることが知られた。SH基とSS基の交換反応がBSAの尿素変性の第2段階で起こることは早くから報告されていたが⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾、十分な確認はなされていなかった。著者らは先の研究で分子間の交換反応でBSAが重合し多量体を形成するとともに、分子内交換反応で変形単量体を生じることを確認した¹⁾。いずれの場合もBSA分子を抱束している分子内SS結合の切断が起こる。そしてSS結合の切断はチロシン残基を露出させると考えられる。SS結合切断の効果は0.02Mシステインを添加することによって一層明確になった。この場合の $\Delta\epsilon_{288}$ は $-6000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ である。トリプトファン残基の寄与を無視し、チロシン残基1個が露出するときの $\Delta\epsilon$ に対する寄与を -700 とすると¹¹⁾、8~9個の新たな露出があったことになる。同様の計算から5M尿素にさらした直後では2個、一昼夜さらしたものは4個のチロシン残基が露出されたことになる。ただしこの計算はトリプトファン残基の寄与を全く無視したものであるから、およそのめやすを示すにすぎない。

Foster¹²⁾は血清アルブミンのモデルとしてサブユニットモデルを提案した。それによるとペプチド鎖は積み重なったように平な4つのサブユニットに折りたたまれた状態にあり、2つの疎水界面と1つの親水界面がサブユニット間に存在する。血清アルブミンのN-F異性化はこの界面がひらくことで説明されている。またHerskovitzら¹³⁾、およびLaskowsky¹⁴⁾は solvent perturbation difference spectrumにより、血清アルブミン分子に裂け目が存在し、N-F異性化はその裂け目が開くことに相当することを見出した。彼らはこの裂け目が開くことがFosterのサブユニットモデルの界面が開くことと一致すると解釈した。Herskovitzらはその界面の間に3~5個のチロシン残基が存在し、N-F異性化によって露出すると考えた。N-F異性化による $\Delta\epsilon_{288}/\epsilon_{279}$ の値はSH基がブロックされたBSAを5M尿素にさらしたときの $\Delta\epsilon_{288}/\epsilon_{279}$ とほぼ同じ程度である。したがって5M尿素という比較的緩和な変性条件ではN-F異性化と同程度の構造変化が起こるものと考えられる。

尿素濃度を希釈することにより、BSAについては差スペクトルのピークが小さくなり、SH基をブロックし

たBSAでは赤色移動に変わることは、尿素変性の第1段階すなわち尿素添加直後に起こる大きな変化は全く可逆的な変化であることを示している。そしてSH基とSS基の交換反応が起きてはじめて不可逆な過程が進行する。しかし交換反応の結果引き起こされる変化にも一部可逆的な変化が含まれていることは、尿素濃度の希釈によるスペクトルの変化が希釈後の時間にわずかながら依存していることによって示される。これはSS結合の回復が部

分的に起こるためであろう。

今回はpH8.9, 5M尿素という限られた条件下での実験であったため十分な議論ができなかった。現在、血清アルブミンのN-F異性化, 酸膨脹などの関係を明らかにするためpHおよび尿素濃度の影響を検討中である。

最後に、本研究を進めるにあたって御指導をいただいた岐阜大学工学部の青木幸一郎教授に深く謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 青木幸一郎, 村田 護, *Anal. Biochemistry* 投稿中
- 2) A. N. Glazer, H. A. McKenzie, R. G. Wake, *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 240 (1963)
- 3) M. Sogami, J.F. Foster, *Biochemistry*, **7**, 2172 (1968)
- 4) S. Yanari, F. A. Bovey, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2818 (1960)
- 5) J. W. Donovan, M. Jr. Laskowski, H. A. Scheraga, *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 455 (1958)
- 6) K. Hamaguchi, A. Kurono, *J. Biochem.*, **54**, 111 (1963)
- 7) J. G. Foss, *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 569 (1961)
- 8) C. Huggins, D. F. Tapley, E. V. Jensen, *Nature*, **167**, 592 (1951)
- 9) V. D. Hospelhorn, B. Cross, E. V. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2827 (1954)
- 10) H. K. Frensdorff, M. T. Watson, W. Kauzman, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5167 (1953)
- 11) C. C. Bigelow, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1706 (1961)
- 12) J. F. Foster, "The Plasma Proteins" F. W. Putnam Ed., Acad. Press, New York, N. Y., vol 1, 221pp (1960)
- 13) T. T. Herskovitz, M. Jr. Laskowski, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2481 (1962)
- 14) M. Jr. Laskowski, *Federation proc.*, **25**, 20 (1966)