

ウシ血清アルブミンの尿素変性におよぼす ドデシル硫酸ナトリウムの影響

村 田 護 *

Effects of Sodium Dodecyl Sulfate on Urea Denaturation of Bovine Serum Albumin

Mamoru MURATA

要 旨 ウシ血清アルブミン (I) の尿素変性におよぼすドデシル硫酸ナトリウム (II) の変性抑制効果を II/I の結合比を変えて調べた。II/I が 4 までの結合が変性抑制に効果的な役割を果たしており、結合比 8 ではほぼ完全に I の尿素による変性を抑制することを見出した。また尿素変性による後続反応が進行中の I に II を加えることにより、反応を停止することができ、このとき II は I の単量体に強く結合するものと推定した。II の I に対する 12 個の結合に、3 つの不均一な結合の組が存在すると推定した。

1. 緒 言

少量のドデシル硫酸ナトリウムが血清アルブミンの熱変性、尿素変性を著しく抑制することは古くから知られてきた¹⁾。また血清アルブミンとドデシル硫酸ナトリウムは化学量論的に結合することが多くの研究者によって研究された。その結果、数種の結合の組が存在し、第 1 の結合の組は 10~12 個のドデシル硫酸ナトリウムが連続的にアルブミンに結合することが知られた^{2) 3) 4)}。そしてアルブミンの変性をもっともよく抑制するのはアルブミンに 12 個のドデシル硫酸ナトリウムが結合した場合とされ、Markus ら⁵⁾ はヒト血清アルブミンとドデシル硫酸ナトリウムについて、その尿素変性抑制の機構を検討して、界面活性剤はその親水基でタンパク質の ϵ -アミノ基と結合し、疎水基はタンパク質の疎水部に結合するためにタンパク質分子をひきしめる効果をもつ結果尿素による変性を抑制すると推定した。この考えはおおむね支持されている。従来は 10~12 個のドデシル硫酸ナトリウムは同等に結合するとされてきたが、最近この 10~12 個の結合にも不均一性があることが指摘されるようになってきた。

本研究はウシ血清アルブミンに対するドデシル硫酸ナトリウムの結合が尿素変性を抑制する効果について、その結合数との関係を調べることを目的とし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および紫外吸収差スペクトル法を用いて検討してみた。

2. 実 験

2.1 試 薬

結晶ウシ血清アルブミン (以下 BSA と略記する) は

Armour 社の Lot NO. D71209, E71503, E71601, F71703, G71812, H72009 を脱脂肪酸をせずにそのまま用いた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析で Lot NO. によって 8~14% の重合体が認められた。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、精製したものを譲り受けて使用した。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンは Sigma 社のもの、アクリルアミドと N, N'-メチレンビスアクリルアミドは Eastman 社および生化学工業のものを使った。他の試薬はすべて市販の特級試薬であった。

2.2 試料の調製

BSA の尿素処理の方法は、電気泳動および表面張力測定の場合は 3% または 4% BSA 溶液に 7.5M または 8M 尿素溶液を加え、BSA 濃度を 1%, 尿素濃度を 5 または 6 M とし、よく攪拌したのち $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ の恒温槽中に所定時間放置した。差スペクトルの試料ははじめの BSA 濃度を 1% とし、同様に尿素を加えて最終の BSA 濃度を 0.33% とした。

BSA 溶液の濃度決定は、279m μ での $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を 6.67 として、分光光度計により吸光度を測定して算出した。

緩衝液は pH8.9, 0.083M トリス-0.004M EDTA-0.013M ホウ酸緩衝液 (以下 0.1M トリス緩衝液と略す) を用いた。

BSA のスルフヒドリル基 (SH 基) をブロックするためには、pH8.9, 0.1M トリス緩衝液に溶かした BSA にヨードアセトアミドを加え 24 時間反応させた。反応後過剰のヨードアセトアミドを透析によって除いた。

試料調製には脱イオンした蒸留水を用いた。

2.3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

5%ポリアクリルアミドゲルを用い、平板水平法で行った。アクリルアミドとビスの重量比は95対5とした。pH8.9, 0.1M トリス-EDTA-ホウ酸緩衝液による連続緩衝液系とし、試料は20 μ lをマイクロシリッジにとりスロットに注入した。電流はゲル断面積1 \times 0.3cmにつき1.4~1.5 mA で、15~18 時間室温で泳動させた。泳動後ゲルを0.5%アミドブラック 10B で染色し、拡散法で脱色した。ゾーンの濃度は明日香工業製の OZUMOR82 型のデンストメータで定量した。

2.4 紫外吸収差スペクトル

差スペクトルの測定は日本分光のORD/UV-5および日立 EPS-3 型自記分光光度計を使用し、室温で行なった。タンパク質濃度はすべて0.33%とし、緩衝液は pH 8.9, トリス緩衝液を用いた。セルは1 cmセルを用い、試料溶液はタンパク濃度の差がないよう十分注意した。

2.5 表面張力の測定

表面張力測定には duMoüy の表面張力計を使用した。試料液の量が少ないため、測定容器に時計皿を用い、器壁による誤差を少なくした。測定温度は 23 \pm 0.5 $^{\circ}$ C であった。

3. 結 果

3.1 ゲル電気泳動による解析

BSAを尿素にさらした試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると native な BSA は1つのゾーンを与えるだけであるが、変性した BSA は移動度の遅い新しい数個のゾーンを与える。これらの新しいゾーンの成分は変性の結果生じる変形単量体および重合体である⁶⁾。各ゾーンの濃度をデンストメータで定量すれば、各成分の存在率を求めることができ、残っている単量体の量から変性の程度を知ることができる。

SDS と BSA のモル混合比をいろいろ変えたものを尿素で処理した場合の結果を図1に示す。pH8.9, 6M 尿素で2時間変性した場合、残存する単量体の量はモル混合比が増加するにつれて急激に増大し、モル比4の点で折れ曲がる直線の変化を示した。そしてモル比8ではほぼ完全に変性を抑制することが知られた。このときの単量体の百分率が100%にならないのは、はじめから多少の重合体が存在するためである。緩衝液を用いず、5 M 尿素で変性したときもほぼ同じ結果を得たが、モル比2でもわずかに変化がみられた。

つぎに尿素濃度と SDS の変性抑制作用の関係を調べた結果を図2に示す。上の結果から5~6 M 尿素では変性をおこさないモル比10のBSA-SDS複合体 (AD₁₀)

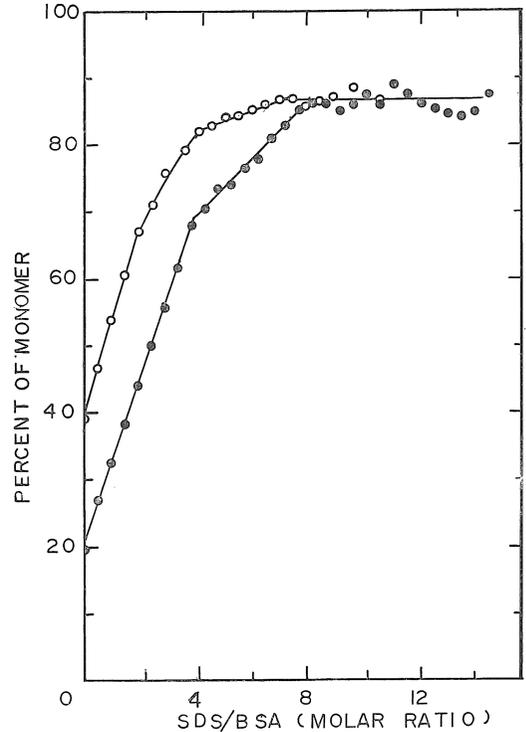


図1 BSA単量体の存在率とモル比の関係

●: 6M尿素, pH8.9, 2時間, 25 $^{\circ}$ C
○: 5M尿素, PH6.32, 24時間, 25 $^{\circ}$ C

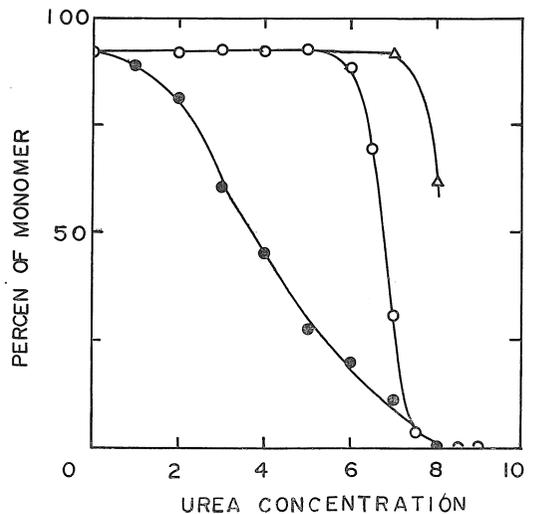


図2 尿素濃度の影響

○: AD₁₀, 24時間 △: AD₁₀2時間
●: BSA, 24時間
pH8.9, 0.1Mトリス-EDTA-ホウ酸緩衝液
25 $^{\circ}$ C

に 1~9 M 尿素を作用させた場合、2 時間では尿素濃度が 7 M を越えると単量体は減少し、24 時間では 6 M でもわずかに変化があり、8 M 尿素では完全に SDS の変性抑制効果が失われた。図 2 には比較のため SDS を加えない場合の曲線が示してある。

3.2 紫外吸収差スペクトルによる解析

3.2.1 5 M 尿素中での SDS-BSA 複合体の差スペクトル

SDS/BSA (モル比) を 1~16 まで変えた混合物を 5 M 尿素に 12 時間さらし、尿素が存在するままの溶液を試料とし、尿素処理をしない SDS-BSA 混合液を対照溶液として測定した差スペクトルを図 3 に示す。差スペクトルは前報⁷⁾と同じ特徴をもつが、モル比が増すにつれて変化し、モル比 5 までは 280 m μ および 287~288 m μ で極小を示す。モル比 6 を境界としてモル比 7 以上では逆に

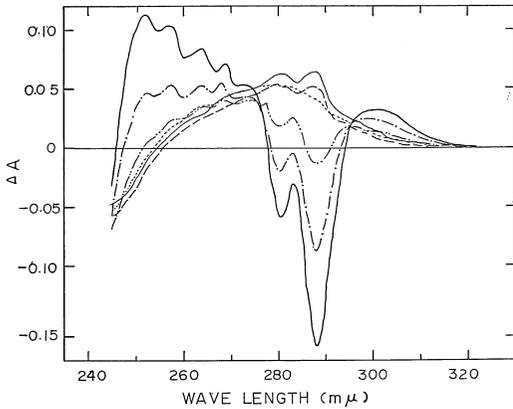


図 3 5M 尿素中の BSA-SDS 複合体の差スペクトル

— : BSA, - · - AD₂, - · · - : AD₄,
- - - : AD₆, — — — : AD₈, — — — : AD₁₁
BSA 濃度 0.33%, 尿素添加後 12 時間

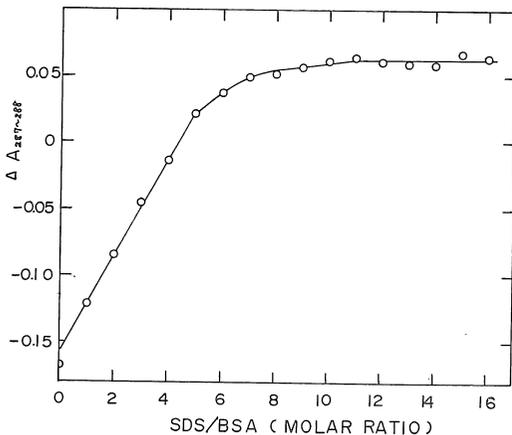


図 4 5M 尿素中の BSA-SDS 複合体の差スペクトル

$\Delta A_{287-288}$ とモル比の関係
BSA 濃度 0.33%, 尿素添加後 12 時間

極大に変わる。差スペクトルが 287~288 m μ で極大になるか極小になるかは、BSA に変性が起きているか否かを示す指標となり、 $\Delta A_{287-288}$ の大きさは変性の大きさの尺度となる。 $\Delta A_{287-288}$ と SDS/BSA (モル比) の関係は図 4 のようになった。SDS/BSA が 4 までは ΔA は負であり、値は直線的に変化する。モル比 5 以上では

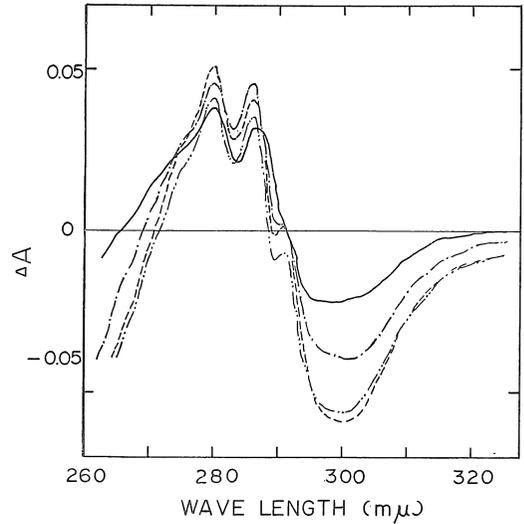


図 5 BSA-SDS 系の差スペクトル

— : SDS/BSA=4
- · - : SDS/BSA=7
- · · - : SDS/BSA=11
- - - : SDS/BSA=14
pH 8.9, 0.1M トリス-EDTA-ホウ酸緩衝液
BSA 濃度 0.33%

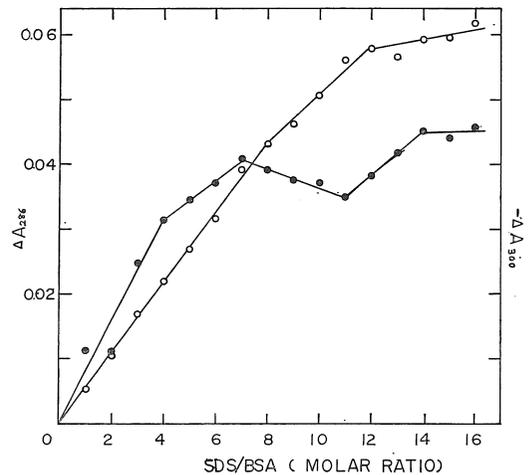


図 6 BSA-SDS 系の差スペクトルの ΔA_{286} と

ΔA_{300} とモル比
● : ΔA_{286} ○ : $-\Delta A_{300}$
BSA 濃度 0.33%

ΔA は正となり、10でほぼ一定となった。

3.2.2 BSA—SDS系の差スペクトル

pH8.9でのBSA—SDS複合体を試料とし、対照として同じpHのnativeなBSAを用いてその差スペクトルを測定した。その例を図5に示す。pH8.9, 0.1M トリス緩衝液中でのBSA—SDS系の差スペクトルは、BigelowとSonenbrg⁸⁾によって観察されたpH6.1, 0.025Mリン酸緩衝液中でのBSA—SDS系の差スペクトルおよびRayとReynolds⁹⁾ら、PoletとSteinhardt¹⁰⁾によって得られた差スペクトルと多少異なっている。彼らは302m μ 付近に肩をもつ294m μ の極小と、287m μ の極小を観察しているが、本実験では294m μ 付近には明瞭な極小はみられず、295~305m μ にわたる巾の広い極小がみられた。この傾向はSDSとBSAのモル比が大きくなるにつれてより顕著になった。また280m μ および286m μ にはっきりした極大をもち、レッドシフトがあることを示している。図6に ΔA_{286} および $-\Delta A_{295-300}$ とSDS/BSAの関係を示した。 ΔA_{286} はSDS/BSAが4, 7, 11の点で顕著に変化し、 $\Delta A_{295-300}$ はモル比が8, 12で少し変化するように見える。 ΔA_{286} の変化する点は図1の単量体百分率の変化点とほぼ対応している。

3.2.3 SDSによる変性停止効果

はじめにBSAを5M尿素にさらし、一定時間放置後にSDSをモル比10~12になるように加えて、それを試料

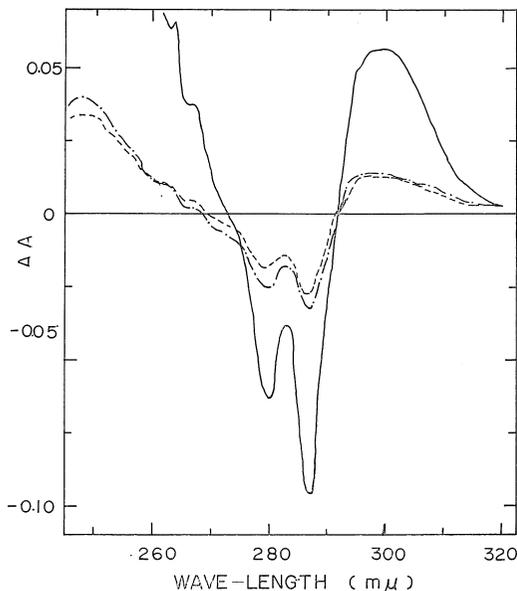


図7 SDSの尿素変性停止効果、差スペクトルの変化

— : 5M尿素中のBSA, SDSなし
 - - - : 5M尿素に2分さらし, SDSを添加後3分
 - · - : 5M尿素に2分さらし, SDSを添加後60分

とし、対照側の尿素のないBSA溶液にも同じようにSDSを加えて両者の差スペクトルを調べると、図7に示すように瞬間的にスペクトルが変化し、 $-\Delta A_{288}$ の値は大きく減少し、SDS添加後の時間とともに付加的に変化する。このことはSDSを加える順序を逆にしてもSDSはBSAの尿素変性を抑制する効果をもつことを示している。またSDS添加による差スペクトルの変化は、BSAを尿素にさらした時間にも依存している。図8は尿素添加後からSDS添加までの経過時間と、SDSを添加したときの $-\Delta A_{288}$ の値を示したものである。比較のためにSDSが存在しないときの値と尿素濃度を希釈した場合の値を前報⁷⁾から引用して示してある。

尿素添加直後(2分以内)にSDSを加えると差スペクトルは瞬間的に変化し、 $-\Delta A$ の値は小さくなる。しかし変性の進行(SH基とSS基の交換反応による後続反応⁶⁾⁷⁾)とともにこの効果は失われてくる。ヨードアセトアミドでSH基をブロックしたBSAでは、尿素添加後の時間に関係なく、より一層差吸収は小さくなった。

3.2.4 5M尿素中のBSA—SDS複合体溶液の表面張力

5M尿素中の1%BSA—SDS溶液の表面張力を緩衝液を用いずに等イオン点(pH 6.32)で測定した。結果を図9に示す。SDS/BSAが4までは表面張力は増加し、

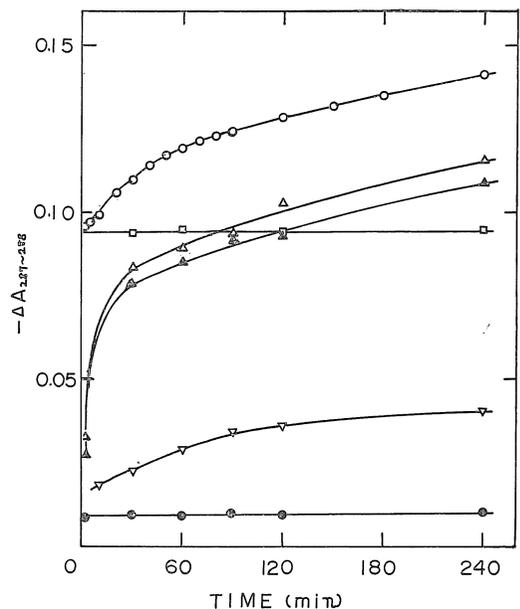


図8 尿素添加後の経過時間との関係

○ : 5M尿素中のBSA
 □ : 5M尿素中のSH基をブロックしたBSA
 △ : 5M尿素中のBSAにSDSを添加して5分後
 ▲ : 同60分後
 ▽ : 5M尿素中のBSAの尿素濃度を1.6Mに希釈して5分後
 ● : 5M尿素中のSH基をブロックしたBSAにSDSを添加して5分後

4 を越えると減少した。SDSの濃度は $1.45 \times 10^{-4} \sim 1.6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ の範囲であった。

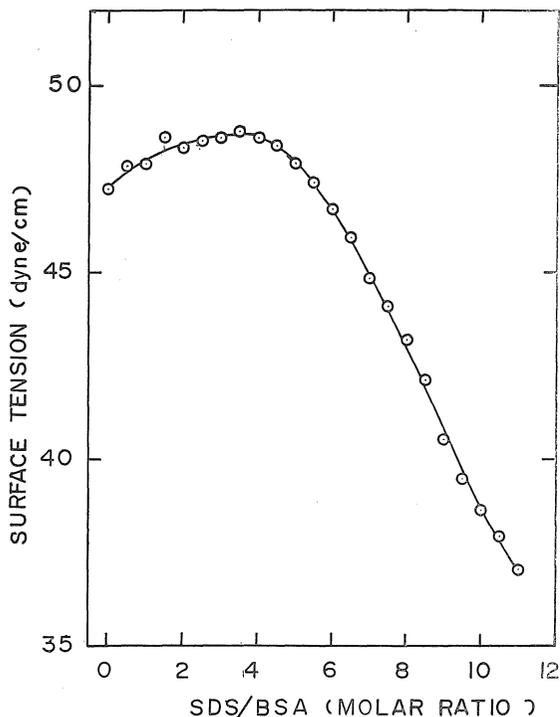


図9 5M尿素中のBSA-SDS複合体の表面張力
BSA濃度1%, pH6.32, 緩衝液なし
 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$

4. 考 察

少量のSDSがBSAの尿素による変性を抑制する効果について、SDS/BSAモル比を0~12の範囲で検討した電気泳動および差スペクトルの結果は、いずれもはじめの4個のSDSの結合が非常に効果的に変性を抑制することを示した。さらに8個までのSDSの結合で5~6M尿素中でのBSAの変性はほぼ完全に防止されることが知られた。これらの事実は注目すべきことである。従来SDSはBSAに1個から10~12個までは連続的に結合し、BSAをA, SDSをDで表わすとき、 AD_1 から AD_{12} の複合体を形成することが知られてきた^{2) 3) 4)}。このSDSがBSAに結合する10~12個のsiteは全く同等で、相互に影響をおよぼさないとされていた。このことからSDSによる変性抑制効果は本実験結果に示されたようなモル比4および8での変化はないものと予想された。しかし結果は明らかに、すくなくとも尿素変性の抑制におよぼすSDSの効果が、結合数によって異なることを示した。このことから12個の結合siteは結合エネルギーや結合機構に差異があるのではないかと疑問をもった。

pH8.9, 0.1Mトリス緩衝液中でのBSA-SDS系の差

スペクトルの結果は12個の結合が同等でないことを暗示している。図3にみられる280m μ および286m μ の極大はあきらかにチロシン残基近傍の環境変化を示すものである。一般にチロシン残基に無極性溶媒が接近するときの溶媒効果は屈折率の増加によってレッドシフトをおこすとされている。SDSは臨界ミセル濃度以上ではアミノ酸のチロシンについてわずかにレッドシフトを起こすことが知られている¹¹⁾。しかしながらここで議論するような臨界ミセル濃度よりはるかに低濃度のSDSが溶媒効果でレッドシフトを起こすようなことは考えられない。RayとReynoldsら⁹⁾はBSA-オクタノール系の差スペクトルおよびBSA-SDS系の差スペクトルとともに297m μ にブルーシフトを観察しているが、BSA-SDS系での280~280m μ での差スペクトルの極大は明確には観察されていない、BSA-ドデカネート系の差スペクトルでは280~286m μ にレッドシフトのみが観察されている^{12) 13) 14)}。本実験の280m μ と286m μ の極大はこれと類似している。いずれにせよ、SDSの結合によるBSA分子の構造の微小な変化によるものと考えられ、変性とは逆の分子をひきしめるような効果と推定される。図4において $4A_{286}$ の値がSDS/BSAが4, 7および11の点で変化することは10~12個の結合siteのうち、異なる結合siteの組が存在することを示しているように考えられる。エネルギー的に高い10~12個の結合siteの組にも、さらに不均一な結合siteの組が存在するとする報告が近年いくつか出されるようになった。RayとReynoldsら^{9) 12)}は透析平衡の実験からSDSのBSAにたいする強い結合siteは8個であると報告している。またMarkusら⁵⁾もヒト血清アルブミンにたいするSDSの結合が、はじめの8個と2番目の数個の組とは違い、8個までの結合は6M尿素の存在あるいはpHを高くすることによる影響を受けないが、2番目の組のsiteとの結合はこれらの条件によって弱められると報告している。結合がpHによって影響をうけるのは結合のイオン性を意味すると考えられる。またRayとReynoldsら⁹⁾はドデカノールがBSAと結合するsiteの数を4~5個と報告しているの、4~5個の疎水性の強い結合siteが存在すると考えられる。最近のHalfmanとNishida^{15) 16)}の報告はSDSのBSAにたいする結合において、4個の強い結合siteとさらに8個のすこし弱い結合siteの2つの組があることを示した。Takenakaら¹⁷⁾も4個の疎水性の結合を示唆した。またHabeebはヒト血清アルブミンについて、pH9.0では15個、pH9.5では4個のSDSがアミノ基に結合することを見出した^{18) 19)}。本実験における5M尿素中のBSA-SDS溶液の表面張力測定の結果からも、モル比4以上において表面張力が低下し、遊離のSDSが増加すると考えられた。そしてモル比4までの結合でむしろ表面張力を増加させることから、4個のSDSの結合

が非常に強いと考えられる。

以上の文献と本実験の結果からつぎのようなことが考えられる。

(1)12個の結合siteのうち3つの異なる性質の結合 site の組が存在する。(2)第1の組は、はじめの4個までの結合で、BSAの ϵ -アミノ基とSDSがイオンの結合すると同時に疎水的にも強く結合し、したがってMarkusら⁵⁾が提唱したように、BSA分子をひきしめるために尿素による変性を著しく抑制する。(3)第2の組は5~8個までの結合で、このときも結合はイオンのかつ疎水的であるが、siteの位置がはじめの4個と異なる。変性の抑制に多少の効果をもつ。(4)第3の組は9~12個までの結合でイオンの結合が支配的である。変性の抑制にはほとんど効果をもたない。

SDSによるBSAの変性停止効果の実験からはつぎのことが考えられる。青木と著者は先に同様な実験をゲル電気泳動で試みたが、この場合単量体の減少をSDS添加の時点で停止するとともに、SDS添加後の時間とともに変形単量体から正常な単量体への逆反応が部分的に起こることを観察した²⁰⁾。このこととあわせて考えると、尿素処理後にSDSを加えるとき、 $-d_{288}$ の値を小さくするようなBSAとSDSの結合は、主として残存している単量体とSDSの結合であろう。なぜならば、たとえば尿

素添加後30分のもにSDSを加えるときの $-d_{288}$ の減少は、SH基をブロックしたBSAの場合の約3分の1であり、このときの単量体の量ははじめの納30~35%になっているからである。単量体は尿素中で分子が膨張しているだけと考えられるから、SDSがイオンのかつ疎水的に結合しうる。それに対して、SH基とSS基の交換反応によって生じた変形単量体および多量体は、SS結合が切断されることによって分子が大きくほぐれているため、あるいはFosterによって提唱されたサブユニットモデルの疎水界面が大きく開いているため、疎水的結合はできなくなり、したがって変性抑制効果もないと考えられる。このことは今回の実験からだけでは推定に過ぎないが、それぞれの成分を単離してSDSの効果調べることを現在検討中である。

本研究で使用したBSAは脱脂脂肪酸処理を施していないため、その影響が懸念されるが今回はその影響を調べることができなかった。

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。また実験に協力していただいた井戸杉雄君、増田久俊君に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) E. L. Duggan, F. M. Luck, *J. Biol. Chem.*, **172**, 205 (1948)
- 2) J. T. Yang, J. F. Foster, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5560 (1953)
- 3) J. T. Yang, J. F. Foster, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1588 (1954)
- 4) M. Pallansch, D. R. Briggs, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1396 (1954)
- 5) C. Markus, R. L. Love, F. C. Wissler, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3687 (1964)
- 6) 青木幸一郎, 村田 護, *Anal. Biochemistry*, 投稿中
- 7) 村田 護, 愛知工大研報, **9**, 69 (1974)
- 8) C. C. Bigelow, M. Sonenberg, *Biochemistry*, **1**, 197 (1962)
- 9) A. Ray, J. A. Reynolds, H. Polet, J. Steinhardt, *Biochemistry*, **5**, 2606 (1966)
- 10) H. Polet, J. Steinhardt, *Biochemistry*, **7**, 1348 (1968)
- 11) J. W. Donovan, M. LasKowski, Jr, H. A. Sheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2686 (1961)
- 12) J. Reynolds, S. Herbert, J. Steinhardt, *Biochemistry*, **6**, 937 (1967)
- 13) K. Zakrzewski, H. Goch, *Biochemistry*, **7**, 1835 (1968)
- 14) J. A. Reynolds, S. Herbert, J. Steinhardt, *Biochemistry*, **7**, 1357 (1968)
- 15) C. J. Halfnan, T. Nishida, *Biochim. Biophys. Acta*, **243**, 294 (1971)
- 16) C. J. Halfman, T. Nishida, *Biochemistry*, **11**, 3493 (1972)
- 17) O. Takenaka, S. Aizawa, Y. Tamaura, J. Hirano, Y. Inada, *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 696 (1972)
- 18) A. F. S. A. Habeeb, *Anal. Biochemistry*, **14**, 328 (1966)
- 19) A. F. S. A. Habeeb, *Canadian. J. Biochem.*, **46**, 789 (1968)
- 20) 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)