代表的アニオン界面活性剤の各種タンパク質 に対する変性作用

芋 川 玄 爾・葛 見 衛

花王石鹼株式会社産業科学研究所（和歌山市湊薬種畑 1334）

Denaturing Action of Typical Anionic Surfactants on Several Proteins

Genji IMOKAWA and Mamoru KATSUMI

Industrial Research Laboratories, Kao Soap Co., Ltd.
(1334, Minato Yakushubata, Wakayama)

The denaturing action of typical anionic surfactants, alkyl sulfate (AS), alkyl benzene sulfonate (LAS), α -olefin sulfonate (AOS) and sodium alkane sulfonate (SAS), on four different proteins, keratin, albumin, enzyme and lysosome membrane has been investigated by measuring liberation of sulfhydryl group and by enzyme inhibition. The results indicate that in general these surfactants have high denaturing potency for such proteins in the decreasing order of $LAS \geq AS > AOS \geq SAS$, although the potency varies considerably with the alkyl-chain length of the surfactants. Moreover, a relationship between the denaturing potency and the skin irritating action of these surfactants has been discussed.

1 緒 言

界面活性剤は、洗剤、シャンプー、リンス、菌みがき、食器用洗浄剤、柔軟仕上げ剤等、多方面にわたって使用され、生体との接触の機会も多く、界面活性剤に基因する障害も、決して少なくない現状である。

したがって、界面活性剤の生体に対する種々の作用を明らかにしておくことは、現存する界面活性剤の生体安全性に関する評価、および、より安全性の高い界面活性剤の開発のためにも、重要である。

次に、界面活性剤は、生体に対し種々の作用を引き起こすものと予想されるが、生体の構成成分が、主にタンパク質より成り立っていることを考えると、まず、界面活性剤のタンパク質に対する基礎的挙動を知ることが、重要と考えられる。

一方、タンパク質には、多くの種類があり、界面活性剤は、必ずしも、すべてに同じ作用を示すとは限らない。そこで、著者らは、生体構成タンパク質を大別して、繊維タンパク質、球状タンパク質、酵素タンパク質、および、膜タンパク質の四つに分類し、それぞれの代表として、皮膚ケラチン、ウシ血清アルブミン、酸性ホスファターゼ、リゾソーム膜を選び、それらに対する代表的

アニオン界面活性剤のタンパク質変性作用を、SH 基遊離性、および、酵素に関しては、酵素阻害性より比較検討した。また、生体安全性の中でも、比較的重要な皮膚障害性との関連も、最後に検討を加えた。

SH 基の遊離作用は、タンパク質の変性に伴う高次構造の unfolding に基づくことが知られており^{13,23}、タンパク質変性作用を調べる上で便利な尺度であり、また、酵素阻害性も、非競争阻害の場合は、酵素タンパク質の変性と関係が深いこと²³も、よく知られている。

2 実 験

2.1 界面活性剤

アニオン界面活性剤は、すべて前報¹³と同じものを用いた。

2.2 Callus 粉、ウシ皮粉の調製

Callus 粉の調製は、前報¹³と同様に行い、ウシ皮粉は、Hide Powder（和光純薬）をそのまま使用した。

2.3 SH 基遊離量の測定

マーキュリーオレンジ法²³を使用した。すなわち、マーキュリーオレンジ（1-(4-chloro mercuriphenyl azo)-naphthol-2 Dajac Laboratory）を用い、細型遠心管に調製した Callus 粉、またはウシ皮粉を、20 mg、または

30 mg ひょう取し、さらに各種界面活性剤水溶液 (pH 7.0 に調節) を 10 ml 加え、40°C にて 2 hr、または 4 hr、かくはんした。かくはん終了後、界面活性剤を除去するため、遠心及びイオン交換水による洗浄を 4 回以上繰り返し、かつリン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄、遠心のち、一定量の緩衝液を残したまま、マーキュリーオレンジのイソアミルアセテート溶液 ($OD_{470} \approx 0.85$) 5 ml を加え、1 hr 強くかくはんし、Callus 粉または、ウシ皮粉の遊離 SH 基との反応を行った。反応終了後、15 min 遠心 (3000 rpm)、及びイソアミルアセテートによる洗浄を 4 回繰り返した。洗浄終了後、イソアミルアセテート 5 ml を加え、さらに濃塩酸 2 ml を加え、1 hr 強くかくはんし、タンパク SH 基に結合しているマーキュリーオレンジのイソアミルアセテート溶液への再溶解を行った。かくはん終了後、上澄み液イソアミルアセテートに再溶解したマーキュリーオレンジ量を OD_{470} で測定し、検量線より遊離 SH mol 量を算出した。なお、検量線は、SH 試薬としてグルタチオンを使い、上述と同様な操作により作製した。

ウシ血清アルブミン使用の場合は、アルブミン 1 g/100 ml、界面活性剤一定濃度混合水溶液 (pH 6.0 に調節) を、2 hr、または 18 hr、30°C にて放置した後、また酸性ホスファターゼの場合は、酸性ホスファターゼ 1 g/100 ml、界面活性剤 1 g/100 ml 混合緩衝溶液 (酢酸緩衝液 pH 6.0) を 20 min、29°C にて放置したのち、リゾソーム分画使用の場合は、リゾソーム分画 1 ml に、界面活性剤各種濃度水溶液 (pH 6.0 に調製) を加え、1 hr、37°C でインキュベートしたのち、それぞれ、その混合溶液 1 ml を用い、上述と同様に SH 基量を測定した。ただし、マーキュリーオレンジと反応させるに先だて、界面活性剤の洗浄除去は行わず、界面活性剤を含んだままで反応を行った。

2.4 リゾソーム分画の分離

ハムスター移植後 2 週間目の悪性黒色腫 (Fortner の melanotic melanoma) を、はさみにて摘出し、脂肪組織、および肉芽組織をとり除いたのち、細片し、0.25 M スクロースを組織 1 g 当たり 5 ml 加え、ホモジナイズし、ホモジネートを、700×g、10 min 遠心した上澄み分画を、さらに 12000×g、10 min 遠心し、その沈殿をリゾソーム分画として使用した。また、得られたリゾソーム分画のタンパク量は、Lowry 法⁶⁾ にて定量した。

2.5 酸性ホスファターゼ阻害性の測定

酸性ホスファターゼは、Acid Phosphatase Wheat Germ (生化学工業) を使用、基質としては、*p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム (東京化成工業) を使用、緩衝液としては、Dotite, tricine (tris hydroxy methyl-

glycine) を使用した。

酸性ホスファターゼ 0.321 mg/ml の tricine 緩衝液 (pH 6.0)、および *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム 0.4 g/100 ml の同緩衝液を調製したのち、酸性ホスファターゼ溶液 2 ml に、各種濃度の界面活性剤緩衝溶液 (pH 6.0) を 2 ml 加え、29°C に保温し、20 min 後、29°C に保温した *p*-ニトロフェニルリン酸液 2 ml を加え、直ちに紫外分光光度計、 $\lambda=440$ nm、29°C にて、*p*-ニトロフェノールの初期生成速度を測定した。阻害 % は、界面活性剤の入っていない場合をブランクとし、その場合の初期生成速度を R_B 、界面活性剤の入った場合のそれを R_S とすると、 $(R_B - R_S/R_B) \times 100$ で表される。

2.6 皮膚刺激性試験

1.0 g/100 ml 濃度の各種界面活性剤水溶液 (pH 6.0) を、鳥居薬局製ミニテストプラスターに注射器にて、0.03 ml しみこませ、被験者の前膊内側部に、24 hr の閉塞貼布を行った。皮膚反応の判定は、パッチ除去後 2 hr および 24 hr に行い、以下の判定基準を用いた。

－：反応なし ±：かるい紅斑 ＋：紅斑 ++：紅斑＋浮腫 +++：紅斑＋浮腫＋丘疹、しょう液性丘疹、小水ほう、

また、それぞれに ±：0.5 ＋：1.0 ++：2.0 +++：3.0 の得点を与え、平均刺激指数を求めた。

3 結 果

3.1.1 Callus 粉に対する作用

Callus 粉 30 mg と各種アルキルサルフェート溶液 (pH 7.0) を 40°C、2 hr インキュベートした際に、遊離してくる SH mol 量を界面活性剤濃度に対しプロットした結果を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 Sulfhydryl group liberated from isolated callus by the action of alkyl sulfate in 2 hr. incubation at 40°C.

いずれも、0.2 g/100 ml 界面活性剤濃度より SH 基の増加が認められ、0.8 g/100 ml 濃度までには、SH 基の遊離は飽和に達している。またアルキル鎖長の違いにより、SH 基の遊離量は異なり、 C_8 AS は 1.0 g/100 ml 濃度近くになっても、ほとんど SH 基の遊離は認められないのに対し、 C_{12} AS では、強い遊離作用を示している。各界面活性剤間の SH 基遊離量は、 C_{12} AS $>$ C_{14} AS $>$ C_{10} AS $>$ C_8 AS の順であり、 C_{12} AS が最も多い。

SH 基の遊離が、ほぼ飽和に達する 1.0 g/100 ml 界面活性剤濃度における、各種アニオン界面活性剤の SH 基遊離作用を、callus 粉 20 mg、界面活性剤水溶液 10 ml、2 hr、40°C インキュベートの条件で検討した結果を Fig.

Fig.-2 Sulfhydryl group liberated from isolated callus by the action of various anionic surfactants in 1.0 g/100 ml concentration at 40°C for 2 hr.

Fig.-3 Sulfhydryl group liberated from bovine hide powder by the action of various anionic surfactants in 1.0 g/100 ml concentration at 40°C for 4 hr.

-2 に示す。

本界面活性剤の中では、LAS が比較的強い SH 基遊離作用を示し、次に AS、SAS の順に弱く、AOS は、ブランク（水使用）の SH 基量に比べ、むしろ減少傾向が認められる。また、同じ界面活性剤系列では、ほぼアルキル鎖長の増加と平行して、SH 基遊離作用も強くなる傾向を示している。

3.1.2 ウシ皮粉に対する作用

ウシ皮粉 20 mg と各種アニオン界面活性剤水溶液を、40°C、4 hr 処理し、SH 基遊離量を測定した結果を Fig.-3 に示す。

ウシ皮粉の場合も、callus 粉と同様に、SH 基の遊離が認められ、全般に callus の場合より SH 基遊離性は強くなっている。アルキル鎖長の変化の影響は、LAS のみについて検討したが、callus の場合と同様、アルキル鎖長の増加に伴い、SH 基遊離作用も強くなる傾向を示している。また、各アニオン界面活性剤間の SH 基遊離作用は、LAS $>$ AS $>$ AOS $>$ SAS の順に弱くなる傾向であり、AOS と SAS の順序が逆転している点を除けば、全般的に、callus 粉とほぼ同じ挙動である。

3.2 ウシ血清アルブミンに対する作用

各種アルキルサルフェイトをウシ血清アルブミンに、30°C、18 hr 処理した際に、遊離してくる SH mol 量を界面活性剤濃度に対しプロットした結果を、Fig.-4 に示す。

Fig.-4 Sulfhydryl group liberated from bovine serum albumin in the presence of alkyl sulfates in 18 hr incubation at 30°C.

C_8 AS は、全く SH 基の遊離が認められないが、 C_{10} 、 C_{12} 、 C_{14} 、いずれのアルキルサルフェートも、強い SH 基の遊離作用を示し、ほぼ $1.0 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 界面活性剤濃度で飽和に達している。

各種アニオン界面活性剤 $1.0 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 、 30°C 、18 hr インキュベート、及び $1.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 、 30°C 、2 hr インキュベートの条件での、SH 基遊離量を、各界面活性剤のアルキル鎖長に対しプロットした結果を、それぞれ、Fig. -5, 6 に示す。

Fig.-5 Sulfhydryl group liberated from bovin serum albumin by the action of various anionic surfactants in $1.0 \text{ g}/100 \text{ ml}$ concentration at 30°C for 18 hr.

Fig.-6 Sulfhydryl group liberated from bovin serum albumin by the action of various anionic surfactants in $1.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ concentration at 30°C for 2 hr.

Fig.-5, 6 より、ウシ血清アルブミンにおいても、アニオン界面活性剤は、いずれも SH 基遊離作用を示し、その強さは、ほぼ $\text{LAS} \geq \text{AS} > \text{AOS} \geq \text{SAS}$ の順に弱い傾向であり、LAS, AS が C_{12} でピークを示すのに対し、AOS, SAS では、アルキル鎖長の影響が、AS, LAS と異なり、ほぼ C_{14} で極小値を示している。

3.3 リゾソーム膜タンパクに対する作用

Fig.-7 に、リゾソーム分画 (0.25 M サッカロースに再懸濁したもの) に、各種アルキルサルフェイト水溶液 ($\text{pH } 7.0$) と 1 hr, 37°C で処理した際に、遊離してくる SH 量を測定した結果を示す。

Fig.-7 Liberation of SH group in lysosome fraction induced by the action of alkyl sulfates.

$0.005 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 界面活性剤濃度までは、SH 基の遊離作用は認められないが、 $0.05 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 濃度より、SH 基の遊離が認められ、 $0.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 濃度では、さらに強い遊離作用を示している。 $0.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 濃度での SH 遊離量は、各界面活性剤間で、 $C_{14} > C_{12} > C_{10} > C_8$ の順に少なくなる傾向を示し、 $C_8\text{AS}$ では、逆に SH 基量の減少が認められる。

なお、ここでは、詳しく述べないが、リゾソーム膜ゼイ弱化に基づく、リゾソーム酵素 (酸性ホスファターゼ、 β -D-グルクロニダーゼ等) の遊離は、SH 基の遊離がみられる濃度よりも、さらに低い $5 \times 10^{-4} \text{ g}/100 \text{ ml}$ 付近でも認められる⁷⁾。

3.4 酸性ホスファターゼに対する作用

酵素タンパク質に対する、変性作用に関しては、SH 基遊離作用よりむしろ、酵素阻害作用の方がより適当と考えられるので、ここでは、SH 基遊離作用のほかに、酵素阻害作用も検討した。

酸性ホスファターゼに、各種アルキル鎖長をもつアニオン界面活性剤を、 29°C 、20 min 処理した際の遊離 SH 量をアルキル鎖長に対してプロットした結果を、Fig.-8 に示す。

SH 基遊離作用は、アルキル鎖長により相当変動するが、ほぼ $\text{LAS} \geq \text{AS} > \text{AOS} > \text{SAS}$ の順に弱い傾向を示し、LAS, AS, SAS は、ウシ血清アルブミンの場合と、ほぼ同じ挙動に対し、AOS は C_{14} に極大をもつなど、異なる傾向を示している。

$C_{12}\text{AS}$ による酸性ホスファターゼの阻害性を、初速度-基質濃度曲線より検討した結果を Fig.-9 に示す。

図より、 $C_{12}\text{AS}$ による酸性ホスファターゼの阻害性は、 V_{max} が変化し、 k_m がほとんど変化していないこ

Fig.-8 Sulfhydryl group liberated from acid phosphatase by the action of various anionic surfactants in 1.0g/100 ml at 29°C for 20 min.

Fig.-9 Inhibition of acid phosphatase caused by C₁₂ AS shown in initial rate-substrate concentration curves.

とより、ほぼ非競合阻害であることがわかる。

Fig.-10, 11 に、各種アニオン界面活性剤による、酸性ホスファターゼ阻害%の測定結果を示す。

阻害性は、アルキル鎖長の変化と共に大きく変化し、いずれのアニオン界面活性剤においても、アルキル鎖長の増加に伴い、酵素阻害性も増加する傾向が認められ、いずれの界面活性剤濃度でも、LAS>AS>AOS の順に、酵素阻害作用は、弱くなる傾向を示している。

3.5 アニオン界面活性剤の皮膚刺激性

24 hr closed patch test の結果を Fig.-12 に示す。

Fig.-10 Inhibition of acid phosphatase caused by various anionic surfactants in 6.67×10^{-2} g/100 ml surfactant concentration.

Fig.-11 Inhibition of acid phosphatase caused by various anionic surfactants in 6.67×10^{-3} g/100 ml surfactant concentration.

図より、アニオン界面活性剤の刺激性は、全般に AS>SAS≥AOS≥LAS の順に弱くなる傾向を示し、AS および AOS は、アルキル鎖長の変化により、皮膚刺激強度も変化が大きく、AS では C₁₂、AOS では C₁₄ に極大がみられるのに対し、LAS では、あまりアルキル鎖長の影響はみられない。

4 考 察

アニオン界面活性剤は、そのアルキル鎖長の長さにより、程度は異なるが、全般に、比較的強いタンパク質変性作用、および、酵素阻害作用をもち、また、タンパク質の種類によっても、界面活性剤のもつ相対的タンパク質変性力の評価が、異なる場合もみられた。

まず、セラチンタンパク質に対しては、callus, ウシ

1: 2 hr after removal of patch, 2: 24 hr after removal of patch.

Fig.-12 Cutaneous reaction of human forearm skin following 24 hr closed patch test using 28 subjects.

皮粉ともに、アニオン界面活性剤の変性作用は、界面活性剤の疎水部の増加とともに、強くなる傾向が認められる。また、界面活性剤イオン基と、タンパク質イオン基とのイオンの相互作用に基づくものと予想される callus への界面活性剤の吸着力は、すでに報告したように⁹⁾、ほぼ、AS>LAS>AOS の順に減少し、また、同じ界面活性剤系列では、ほぼ C₁₂ で吸着量が極大を示すことがわかっており、この傾向は、変性作用の序列とは、一致していない。したがって、この種のタンパク質の場合、界面活性剤と接触するタンパク表面は、疎水性領域が多いものと予想され、イオンの相互作用よりも、界面活性剤疎水部とタンパク表面疎水部との疎水的相互作用が、タンパク変性の発現に重要であることを示している。

次に、ウシ血清アルブミンの場合、SH 基遊離作用は、LAS≥AS>AOS≥SAS の順に弱くなる傾向にあり、この点では、ケラチンタンパク質での挙動とよく似ているが、同じ界面活性剤系列では、アルキル鎖長の増加に伴い、変性度に極大または、極小が示されることより、界面活性剤の適度な疎水性と親水性のバランスが、タンパク変性に強く寄与しているものと考えられる。

酸性ホスファターゼにおける SH 基遊離作用は、ほぼ、ウシ血清アルブミンの場合と、アニオン界面活性剤の序列は似ているが、AOS のみは、酸性ホスファターゼの方でより変性が強く現れている。

一方、酵素阻害作用は、SH 基遊離作用とは挙動が異なり、各界面活性剤の相対的阻害性は、LAS>AS>AOS の順に弱くなること、アルキル鎖長の増加に平行して、阻害性も強くなる点より、ケラチンタンパク質に対する作用と、よく似た傾向である。つまり、同じ酵素タンパク質においても、SH 基遊離作用に対しては、界面活性剤の疎水性と親水性のバランスが強く変性に寄与し、酵素阻害作用には、界面活性剤の疎水部とタンパク疎水部

間の相互作用の寄与が強い結果が示されている。

したがって、酸性ホスファターゼ阻害に関しては、阻害作用が発現する界面活性剤濃度は、ミセル形成濃度以下であることより、界面活性剤の可溶化作用等に基づく変性作用は考えにくく、酵素表面の疎水ポケットへの界面活性剤の疎水結合がより重要な相互作用と考えられる。また、その際、界面活性剤のイオン基は、タンパク質の疎水部のまわりのイオン種とのイオンの結合により、疎水結合をより強固にするように、働くものと予想される。

これに反し、ウシ血清アルブミンや酸性ホスファターゼでの、SH 基遊離に基づく変性作用の場合、界面活性剤の作用濃度はミセル形成濃度以上であるため、界面活性剤の可溶性能等がタンパク変性に寄与し、疎水性と親水性の適度なバランスが、タンパク変性の発現に強く寄与するものと考えられる。もちろん、ウシ血清アルブミンにおいても、より界面活性剤濃度の低い段階では、酵素阻害での挙動と同様に、タンパク質の疎水部と界面活性剤疎水部に、疎水結合が働くことは、すでに知られている⁹⁾。

次に、リゾソーム分画への作用は、アルキルサルフェイトで検討しただけなので、充分な考察はできないが、酵素タンパク質および、ケラチンタンパク質に対する挙動と傾向は似ている。

以上、アニオン界面活性剤の相対的タンパク変性力を、主に、SH 基遊離性の点より検討したが、タンパク変性作用は、いずれのタンパク質でも、界面活性剤/タンパク質 g 比で、約 0.2 付近より発現し、1.0 付近で飽和に達する。また、その飽和値でのアニオン界面活性剤の相対的変性力は、全般に、LAS≥AS>AOS≥SAS の順に弱くなる傾向であるが、アルキル鎖長の影響は、タンパク質の水に対する溶性、不溶性の性質により異なり、前者では変性作用がアルキル鎖長の増加に平行して強まるのに対し、後者では、アルキル鎖長との一定の相関は、認められない。また、酵素阻害性は、溶性タンパク質よりむしろ、不溶性タンパク質での界面活性剤の変性力の序列とよく似た傾向である。

最後に、生体安全性の 1 つとして、皮膚障害性と、タンパク変性との関連を検討するため、各種アニオン界面活性剤の皮膚 1 次刺激性を 24 hr closed patch test で調べた。その結果、皮膚刺激性は、ほぼ、AS>SAS≥AOS≥LAS の順に弱くなる傾向であり、同界面活性剤系列では、C₁₂ 付近で刺激性は、極大を示している。また、

皮膚荒れ性は、すでに報告したように、AS>LAS>AOSの順に弱くなり、同界面活性剤系列では、C₁₂で極大を示すことが明らかになっている⁴⁾。以上の皮膚障害性の知見と、今までに得られたタンパク変性の知見を比較してみると、同界面活性剤系列での、皮膚障害性に対するアルキル鎖長の影響は、両者でよく似た傾向をもっているが、異なる界面活性剤系列では、皮膚障害性とタンパク変性の知見は、必ずしも一致していない。

これは、皮膚障害性が、必ずしも、タンパク変性作用1つの因子のみならず、吸着作用、浸透作用等も含む結果と考えられるが、タンパク変性力をより強く低下させることは、セッケンなどの例からも、皮膚障害性をより弱める方向に働く可能性が考えられる。

終わりにあたって、ハムスター悪性黒色腫組織をいただいた、和歌山県立医科大学、三島豊教授に、深く感謝の意を表します。
(昭和50年6月18日受理)

文 献

- 1) A.E. Mirsky, *J. Gen. Physiol.*, **24**, 709 (1941)
- 2) H. Neurath, J.P. Greenstein, F.W. Putnam, J. Erickson, *Chem. Revs.*, **34**, 157 (1944)
- 3) J.I. Harris, *Nature*, **177**, 471 (1956)
- 4) 芋川, 栖村, 葛見, 油化学, **23** (11), 17 (1974)
- 5) P. Flesch, E. Kun, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **74**, 249 (1950)
- 6) O.H. Lowry, N.J. Rowe, A.L. Farr, Randall, *Anal. Biochem.*, **9**, 401 (1964)
- 7) 芋川, 三島, 日本皮膚科学会中部支部学術集会発表 昭和49年9月(京都)
- 8) J. Fletcher, A. Spector, J. Ashbrook, *Biochemistry*, **9**, 4580 (1970)