円偏光二色性による各種界面活性剤の タンパク質変性作用の評価

大部一夫・常名伸夫・宮島信幸・水島直樹・柏 一郎

ライオン株式会社第2応用研究所(東京都江戸川区平井 7-13-12)

Evaluation of Denaturation Property of Surfactants onto Protein as Measured by Circular Dichroism

Kazuo OHBU, Nobuo JONA, Nobuyuki MIYAJIMA, Naoki MIZUSHIMA,
and Ichiro KASHIWA

Applied Research Laboratory II, Lion Corporation
(Hirai 7-13-12, Edogawa-ku, Tokyo)

The well known property of surfactants to denature proteins was systematically reexamined to elucidate the molecular aspects of denaturation associated with the chemical structure of surfactants. Bovine Serum Albumin (abbreviated as BSA) was used for specimen. The degree of denaturation of protein was estimated as the change of molar ellipticity of BSA as obtained from CD spectra at 220 nm in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. The denaturation power of the commercially available surfactants were found to be in the order

LAS>SDS>DTMAC>AOS>AES>>Noionics≈Ampholytic

The ampholytic and nonionic surfactants hardly denatured BSA compared with those ionic surfactants. The effect of intramolecular electrical shielding is expected for ampholytic surfactant. The longer the oxyethylene chain of AES was, the less the BSA denaturation was. The AES with more than 6 oxyethylene chains does not cause any change in the CD spectrum of BSA. A remarkable effects was observed in inhibiting denaturation of BSA caused by anionic surfactants with the addition of cationic surfactant or amine oxide.

1 緒 言

タンパク質に対する界面活性剤の結合過程と、それに伴うタンパク質の変性に関しては、様々な側面からの検討結果が蓄積されつつあり^{1)~5)}、特に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるタンパク質と SDS との複合状態はかなり詳細に解明されている^{1)~3)}。タンパク質の高次構造と生理活性との関連性⁶⁾を基にすれば、球状タンパク質である血清アルブミンの界面活性剤による変性挙動は、生理活性タンパク質の変性過程にかかわるモデルとして興味深い。またタンパク質に対する界面活性剤の変性能力の大小と人の皮膚に対する影響、特に手荒れの程度とが相関するとの報告がある^{7),8)}。

以上のように種々の界面活性剤を応用する立場にある者にとって、個々の界面活性剤あるいは界面活性剤複合系におけるタンパク質変性作用の程度を知ることは重要である。タンパク質の立体構造を推定するための有力な手段である円偏光二色性(以下 CD と略す)⁹⁾により、

各種界面活性剤による牛血清アルブミンの変性をその二次構造に対応する波長領域において系統的に評価した結果について報告する。

2 実 験

2.1 試料

2.1.1 界面活性剤

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LASと略す。以下同様)は平均アルキル鎖長 11.7 の工業製品から常法¹⁰⁾により無機塩及び未反応アルキルベンゼンを除いて用いた。

疎水基の炭化水素鎖長 14 の α -オレフィンスルホン酸ナトリウム(AOS)は、粉末製品(リポラン 1400, ライオン(株))から無機塩を除いて用いた。

硫酸ドデシル=ナトリウム(SDS)は、純度 99%以上のドデシルアルコールより常法¹¹⁾に従って合成し、エチルアルコールから2回再結晶して用いた。

硫酸アルキルポリオキシエチレン=ナトリウム(AES)

は、アルキル鎖長 C_{12} 及び C_{13} からなる合成アルコールにアルカリ触媒により 平均 3 mol のエチレンオキシドを付加し、次いで硫酸エステル塩としたものである。アルキル=ポリオキシエチレン=エーテルの段階での $G \propto LC$ によれば、未反応アルコールが約 23% 含まれていた。

ドデシルトリメチルアンモニウム=クロリド (DTM=AC) は東京化成製試薬をアセトンから再結晶して用いた。混合モノアルキル (C_{16}/C_{18}) トリメチルアンモニウム=クロリドは、工業製品 (アーカード T-500) をアセトンから再結晶して用いた。

ドデシルジメチルアミン=オキシド (DDMAO) は、ドデシルジメチルアミン (東京化成, EP) を過酸化水素で酸化し、アセトンから再結晶して用いた。

平均オキシエチレン鎖長 $\bar{P}=10$ のドデシル=ポリオキシエチレン=エーテル ($C_{12}EO_{10}$) は日本エマルション (株) 製エマレックス 710 をそのまま用いた。

N -ドデシル- N,N -ジメチルベタイン (DBT) はドデシルジメチルアミンとモノクロ酢酸とから文献¹²⁾に従って合成し、アセトンから再結晶して用いた。

アルキル鎖長 (C_{12}) 及びオキシエチレン鎖長の一定な硫酸ドデシルポリオキシエチレン=ナトリウム ($SD \propto E_pS$) は、日光ケミカルズ (株) 製の単一鎖長製品 (BL-SY) を硫酸エステルとし、エチルアルコール/アセトン混合溶媒から再結晶して用いた。

2.1.2 牛血清アルブミン

牛血清アルブミン (BSA) はシグマケミカル社製 A-7638 (Substantially globulin free 分画品) をそのまま用いた。水溶液中の濃度は 280 nm における吸光度 $E_{1cm}^{1\%} = 6.54^{13)}$ を基準として求めた。また BSA の分子量は 64,300¹³⁾ とした。

2.2 測定方法

2.2.1 BSA 水溶液の CD

50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に BSA を 0.01 wt/vol% となるように溶解した試料について、日本分光 (株) 製 J-40 型円二色性分散計を用い、光路長 1 mm のセルにより、25°C にて 200~250 nm における CD スペクトルを測定した。BSA の分子楕円率 $[\theta]$ は次式¹⁴⁾ から算出した。

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta_{\text{obs}}}{C \cdot l} \quad (\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1})$$

ここで θ_{obs} は楕円率の測定値 (deg), C は BSA の濃度 (M), l はセルの光路長 (cm) である。

2.2.2 界面活性剤水溶液の cmc

BSA の CD 測定の場合と同一の緩衝溶液中での各種界面活性剤の cmc を滴容法による比表面張力の屈曲点から求めた。実験に用いた各種界面活性剤の cmc を Table-1 に示す。

Table-1 Critical micelle concentration of surfactants in the presence of 50 mM sodium phosphate at 25°C.

Surfactant	Abbreviation	cmc (wt/vol%)
Sodium alkylbenzenesulfonate	LAS	0.011
Sodium C_{14} α -olefinsulfonate	AOS	0.026
Sodium (C_{12-13}) alkylpoly (oxyethylene) sulfate	AES	0.013
Dodecyltrimethylammonium chloride	DTMAC	0.34
Mono (C_{16-18}) alkyltrimethylammonium chloride	C_{16-18} TMAC	0.0062
N -dodecyl- N,N -dimethylamine oxide	DDMAO	0.022
N -Dodecylbetain	DBT	0.086
Dodecyl poly(oxyethylene) ether ($p=10$)	$C_{12}EO_{10}$	0.019
Sodium dodecyl sulfate	SDS	0.058
Sodium dodecylmono(oxyethylene) sulfate	SDE ₁ S	0.019
Sodium dodecyl di (oxyethylene) sulfate	SDE ₂ S	0.014
Sodium dodecyl tri (oxyethylene) sulfate	SDE ₃ S	0.014
Sodium dodecyl tetra (oxyethylene) sulfate	SDE ₄ S	0.012
Sodium dodecyl hexa (oxyethylene) sulfate	SDE ₆ S	0.013
Sodium dodecyl octa (oxyethylene) sulfate	SDE ₈ S	0.017

2.2.3 2, 2, 4-トリメチルペンタン/界面活性剤水溶液間の界面張力

滴容法を用い、以下の式¹⁵⁾に従って界面張力を求めた。

$$\gamma = v(\rho_1 - \rho_2) \cdot \frac{g}{r} \cdot F$$

γ : 界面張力 (dyn/cm)

v : 液滴の容量 (ml)

ρ_1, ρ_2 : 水及び 2, 2, 4-トリメチルペンタンの密度 (g/ml)

25°C で $\rho_1 = 0.998$, $\rho_2 = 0.688^{16)}$

g : 重力定数

r : 毛管の半径

F : Harkins-Brown の補正項

3 結果と考察

3.1 界面活性剤による BSA の CD の変化

native な BSA と cmc 以上の濃度のアニオン界面活性剤とを共存させた時の BSA の 200~250 nm におけるスペクトルパターンを Fig.-1 に示す。タンパク質の二次構造中の α ヘリックス及び β 構造に起因する 2 つの極値 (208, 220 nm)¹⁷⁾ の絶対値はいずれも LAS あるいは AOS を加えることによって減少した。以下の検討における BSA の変性度の尺度として、220 nm にお

Fig. 1 Effects of added anionic surfactants on the CD spectrum of BSA (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0)

ける分子橢円率 $[\theta]_{220}$ の値を用いた。

3.2 各種界面活性剤の BSA に対する変性能力

3.2.1 アニオン及び非イオン界面活性剤

SDS 及び工業的に利用されることが多い 3 種のアニオン界面活性剤と非イオン界面活性剤の濃度と BSA の 220 nm における分子橢円率との関係を Fig. 2 に示す。グラフの横軸は各界面活性剤の濃度を Table 2 の cmc 値で除した値で表示してある。SDS, LAS, AOS では

Fig. 2 Molar ellipticity change of BSA by the addition of anionic or nonionic surfactants. (BSA 0.01 wt/vol%, 50 mM Sodium phosphate, pH 7.0)

cmc よりかなり低い濃度域から分子橢円率の変化が始まり, cmc 付近で分子橢円率はほぼ一定値に達している。これに対し AES の場合には分子橢円率の変化が始まる濃度は, 他のアニオン界面活性剤に比べて, より cmc に近く, 更に cmc 以上の濃度域でもなお BSA の分子橢円率は変化している。AOS は LAS や SDS と同じアニオン界面活性剤であるが, cmc 以下の領域での BSA の分子橢円率の変化のこう配が, LAS や SDS よ

り緩慢である。AOS のタンパク質に対する結合の過程に, その分子構造に由来する LAS や SDS との差が反映しているものと考えられる。

Imokawa らは界面活性剤による BSA の変性過程を 589 nm における比旋光度の変化から検討している⁸⁾が, 比旋光度が必ずしも界面活性剤の濃度に対して一様な変化をしないこと, またタンパク質の高次構造を変性させる能力が弱い⁴⁾とされている非イオン界面活性剤でも比旋光度が変化することなどが明らかにされている。CD による分子橢円率変化の測定は以上のような現象を伴わないので, 多くの界面活性剤の変性能力を比較するにはより好ましい方法と言えよう。

平衡に達した分子橢円率で各界面活性剤の変性能力を比較すると以下の順である。この順位は, 岡本ら¹³⁾によ

$$\text{LAS} \gg \text{SDS} > \text{AOS} > \text{AES} \gg \text{C}_{12}\text{EO}_{10} \approx \text{native}$$

るアニオン界面活性剤による手表皮の乾燥落せつ(屑)性変化の順位と一致している。しかし山川らによる乾燥落せつ性変化の順位¹³⁾とは, 硫酸アルキルエステル塩と LAS のみが相異している。

次に分布のない一定なオキシエチレン鎖をもつ SDE_pS の共存下での BSA の分子橢円率の測定結果を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 Molar ellipticity change of BSA as a function of SDE_pS concentration. (BSA 0.01%, 50 mM Sodium phosphate, pH 7.0)

$p=0$ すなわち SDS では cmc の約 1/4 の濃度 (0.5 mM) から BSA の分子橢円率の変化し始める。この濃度は BSA に対する SDS の結合が静電相互作用による複合状態から更に進んで疎水性相互作用による複合状態へ移行すると言われる濃度²⁾に相当している。

$p=1 \sim 3$ の SDE_pS は cmc より低い濃度域から BSA の分子橢円率に変化を起こさせる。しかし SDE_pS になると cmc を越えた濃度でわずかに変化を起こさせるだけであり, 更に $p=6$ 及び $p=8$ の場合には BSA の分子橢円率はほとんど変化しない。Triton X-100 のように, 生化学分野でタンパク質を変化させずに取り扱うために用いられる非イオン界面活性剤は, その cmc 以上で BSA の表在性の疎水領域に対してのみ結合するだけ

であって、SDS に代表されるアニオン界面活性剤特有の協同的な複合体形成を伴わないと言われている⁹⁾。従って Fig.-3 の結果は、 $p \geq 4$ の SDE_pS が著しく非イオン界面活性剤の性質を帯び、そのため BSA の構造内部への荷電のとり込みが減少していることを意味するものであろう。また SDE_pS になると、BSA に対する結合が表在性の疎水領域のみに限定されるものと考えられる。

ここで AES にはオキシエチレン鎖に分布があり、しかもかなり多くの硫酸アルキル塩が含まれているが、その濃度と BSA の分子楕円率との関係 (Fig.-2) は、Fig.-3 中の SDE_2S とほぼ類似した変化をしている。このことは構造の異なる界面活性剤の混合系では、BSA の変性過程に対して各構成成分が混合ミセルのような形で関与する可能性を示しているものであろう。

SDS、及び SDE_pS の cmc 以上で充分一定値まで低下した 2,2,4-トリメチルペンタン/界面活性剤水溶液間の界面張力と、分子楕円率との関係をプロットすると Fig.-4 の関係が得られる。 $p=3$ までは、ほぼ同一直線上にある。しかし、 $p=4$ 以上ではその延長から大きくはずれ、変性能が急激に低下している。Table-1 に示し

Fig.-4 Plots of molar ellipticity of BSA at above cmc vs interfacial tension at 2,2,4-trimethylpentane/aqueous solution.

たとわり $p=2 \sim 6$ の間で cmc はほとんど一定であり、油/水界面張力も $p=3 \sim 6$ の間で大きな上昇を示していない。従って AES のタンパク質変性作用が $p=4$ 以上で急激に低下する原因として、単純な AES 分子の疎水性相互作用力の変化以外に、疎水基と極性基との間が親水、疎水の複合されたオキシエチレン鎖²²⁾で隔てられていることも因子となり得るものと考えられる。

岡本は SDE_pS の皮膚に対する生理作用の p による変化を報告している²⁰⁾。それによれば表皮乾燥落せ性変化は $p=2$ 以上で大きく低下している。また細胞毒性については $p=3$ までは比べ $p=3 \sim 4$ 間にかかなり大きな不連続性を持って低下しており、この結果は我々の測定

した BSA の二次構造の変化と相関した傾向である。

3.2.2 両性及び半極性界面活性剤

N-ドデシル-N,N-ジメチルベタイン (DBT) 及び N-ドデシル-N,N-ジメチルアミノオキシド (DDMAO) の濃度と BSA の分子楕円率との関係を Fig.-5 に示す。

Fig.-5 Molar ellipticity change of BSA by the addition of N-dodecyl-N,N-dimethylbetain (DBT) and N-dodecyl-N,N-dimethylamineoxide (DDMAO).

DDMAO は cmc の 10 倍の濃度まで変性を示さなかった。これは pH 7 付近では DDMAO の極性基が非イオン性であることによる結果であろう。両性界面活性剤も反対荷電の極性基間の静電遮蔽効果によって非イオン界面活性剤と類似の挙動を示していると推定される。ただし、cmc 付近から高濃度側にみられる弱い変性作用は等電点 (pH 6)²¹⁾よりアルカリ側にあるために両性界面活性剤の示すアニオン性によるものであろう。

3.2.3 カチオン界面活性剤

アルキル鎖長の異なるモノアルキルトリメチルアンモニウム=クロリドの濃度と BSA の分子楕円率との関係を Fig.-6 に示す。長鎖アルキルトリメチルアンモニウ

Fig.-6 Molar ellipticity change of BSA by the addition of cationic surfactants.

ム塩の BSA に対する結合とその結果生じる BSA の光学の性質の変化についてはすでに詳細に知られている

5)。今回の結果もそれらの報告と同様の傾向であった。二種の界面活性剤間で分子楕円率 $-\left[\theta\right]_{220}$ が急に变化し始める濃度の比がおおのこの cmc の比と一致しており、カチオン界面活性剤の BSA との相互作用の中に協同的な疎水結合過程が含まれている⁵⁾ ことと対応している。また、cmc 以上で一定値に達した分子楕円率はおおよそ SDS と同程度である。

3.3 界面活性剤複合系の BSA に対する変性能

これまでの測定結果から、アニオン性 ($n=4$ を超えるオキシエチレン鎖を有する場合を除く)、カチオン性のいずれの界面活性剤も程度の差はあっても一様に BSA の二次構造を変性することが示された。これに対し非イオン界面活性剤、両性界面活性剤の変性能が極めて小さい。そこで以下アニオン界面活性剤と第二の界面活性剤との複合系における BSA の二次構造に対する変性能を検討した。

3.3.1 LAS に対する各種界面活性剤の複合効果

0.02 wt/vol% の LAS を含む BSA 溶液に更に各種の界面活性剤を共存させた時の $[\theta]_{220}$ の変化を Fig. 7 に示す。同一荷電の極性基を有する AES を加えた場合

Fig. 7 Effect of added surfactants on the molar ellipticity of BSA denatured by LAS.

には、AES の重量分率に応じて AES 共存下の分子楕円率に変わっていくだけである。自身は変性能がほとんどない両性界面活性剤も、大量に加えないと $[\theta]_{220}$ は回復しない。非イオン界面活性剤 $C_{12}EO_{10}$ は重量分率が 60% を超えると急激に LAS の変性能を低下させる。DDMAO 及び DTMAC は、いずれも重量分率約 50% 以内の添加で分子楕円率を native のレベルにまで回復させている。DDMAO/LAS 複合系において変性がほぼ回復する DDMAO の分率 50% は、LAS に対して D=DMAO が当量になる分率 (40%) よりも高い。一方 DTMAC/LAS 複合系における DTMAC の分率 32% は、当量に相当する分率 (43%) より低い。

3.3.2 AOS に対する各種界面活性剤の複合効果

0.04% の AOS を含む BSA 溶液に LAS の場合と同じく他の界面活性剤を共存させた時の分子楕円率の变

化を Fig. 8 に示す。

Fig. 8 Effect of added surfactants on the molar ellipticity of BSA denatured by AOS.

AES 及び DBT を加えた場合の分子楕円率の変化は LAS の場合と同様である。 $C_{12}EO_{10}$ を加えた場合には 30% 付近から分子楕円率が回復し始め 60% 以上ではほぼ native なレベルとなった。更に DDMAO 及び DTMAC の場合には 30% 以上共存させればほぼ native の分子楕円率になる。これらの重量分率は両複合系とも当量に相当する分率 (DDMAO, DTMAC とともに約 45%) より低い。

3.3.3 AES に対する半極性及びカチオン界面活性剤の複合効果

0.04% の AES を含む BSA 溶液に DDMAO 及び DTMAC を加えた時の、分子楕円率の変化を Fig. 9 に示す。両複合系において当量に相当する重量分率は

Fig. 9 Effect of added surfactants on the molar ellipticity of BSA denatured by AES.

ずれも約 35% である。DDMAO はほぼ当量に相当する量を加えた時に、DTMAC は当量の 1/2 以下でいずれも分子楕円率を native なレベルまで回復させている。

以上のようにアニオン界面活性剤に特定の分率以上の

反対荷電の界面活性剤あるいはアルキルアミノオキシドを共存させた複合系は BSA を変性しない。そして我々が検討したアニオン界面活性剤を含むいくつかの複合系において、共存する他方の界面活性剤の分率が当量以下であっても BSA の変性がみられなくなり、しかもアニオン界面活性剤自身の変性能が低ければそれだけ添加する界面活性剤の分率がより少ない領域で分子楕円率が native のレベルに回復している。これらの結果に対する解釈のためには今後なお様々な面からの検討が必要であるが、アニオン界面活性剤のタンパク質に対する変性作用が極性基とタンパク質中の特定部位との静電相互作用をきっかけとして引き起こされる協同的結合現象であることはよく知られている¹⁷⁻²¹⁾。従ってアニオン界面活性剤と反対荷電ないしはプロトネーションによって反対荷電となり得る極性基を有する界面活性剤との複合系が BSA の二次構造を変性しない理由のひとつとして、両界面活性剤間に静電結合が生じることが考えられる。これに関しては、例えば界面活性剤複合系の BSA に対する結合等温線の実測などによる確認が必要であろう。

次に従来から種々報告されている各種界面活性剤の生体への作用、特に皮膚に対する作用の強さと、今回我々が測定した BSA の二次構造に対する変性能との間にかんりの相関性がみられた。界面活性剤の分子レベルでのタンパク質に対する作用と臨床的症状の発現との間には多くの過程が含まれるであろうが、水溶性球状タンパク質の二次構造に対する変性能が、界面活性剤の生体に対する作用の程度を推定する尺度となり得る可能性を示していると言えよう。

本研究の発表を許可されましたライオン株式会社研究開発本部長、石渡孝博士に感謝致します。

第 18 回油化学研究発表会 (1979 仙台)、第 11 回洗浄に関するシンポジウム (1979 大阪) 講演。

(昭和 55 年 4 月 7 日受理)

文 献

- 1) 白浜啓四郎, 高木俊夫, 表面, **11**, 383 (1973)
- 2) 高木俊夫, 白浜啓四郎, 辻井 薫, 久保兼信, 蛋白質・核酸・酵素, **21**, 811 (1976)
- 3) 高木俊夫, 三宅 淳, 葉島健司, 表面 **15**, 447 (1977); **15**, 579 (1977)
- 4) 牧野志雄, 蛋白質・核酸・酵素, **21**, 972 (1976)
- 5) 平松宏一, 青木幸一郎, 蛋白質・核酸・酵素, **23**, 974 (1978)
- 6) 伊勢村寿三, 化学の領域, **24**, 1 (1970)
- 7) 芋川玄爾, 葛見 衛, 油化学, **25**, 24 (1976)
- 8) G. Imokawa *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 484 (1975)
- 9) 鯨島達也, 化学の領域, **24**, 34 (1970)
- 10) T.H. Liddicoet, S.A. Olund, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **40**, 5 (1963)
- 11) E.E. Dreger, G.I. Keim, G.D. Miles, L. Shedlovsky, J. Ross, *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 610 (1944)
- 12) 小森三郎, 榊原清三郎, 藤原 斌, 工化, **60**, 908 (1957)
- 13) N. Okabe *et al.*, *J. Biochem.*, **77**, 181 (1975)
- 14) 日本化学会編“新実験化学講座”丸善 (1977) Vol. 20, p. 243
- 15) 日本化学会編“実験化学講座”丸善 (1956) Vol. 7, p. 28
- 16) 日本化学会編“化学便覧基礎編Ⅱ”丸善 (1975) p. 684
- 17) 佐竹 巖, 表面, **15**, 511 (1977)
- 18) 岡本暉公彦, 油化学, **23**, 726 (1974)
- 19) 芋川玄爾, 榊村啓子, 葛見 衛, 油化学, **23**, 719 (1974)
- 20) 岡本暉公彦, 信州医学誌, **25**, 10 (1977)
- 21) 榊原清三郎, 倉田直次, 小森三郎, 工化, **60**, 1294 (1957)
- 22) H. Lange, *Tenside Deterg.*, **12**, 27 (1975)