卵白アルブミン溶液のケイ光スペクトルについて

守 康 則

広島大学教育学部福山分校

Fluorescence Spectrum of Ovalbumin Solution

Yasunori Mori

Fukuyama Branch, Faculty of Education, Univ. of Hiroshima

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 25 (7), 525~531 (1972)

In order to get a clue to detect the change of protein structure by degradation, the fluorescence spectra of the aqueous ovalbumin solution were estimated in relation to the denaturation of protein by temperature, acid (pH), light illumination, urea and guanidin-hydrochloride, and the browning of protein with glucose and xylose.

The maximum increase of the fluorescence intensity of the ovalbumin was observed at the first stage of the thermal treatment (1—5 minutes) at 60°C. Its thermal increase of the fluorescence intensity was highest at Tyr residue spectrum. The fluorescence intensity of the ovalbumin was heigher between neutrality and alkaline region (pH 10) and lower at the acidic pH region, expecially, the maximum decrease of fluorecence intensity was observed at both pH 4.0 and pH 12. The increase of fluorescence of the ovalbumin were observed at Try residue at the first stage of ultra violet rays illumination in the presence of riboflavin, and then its fluorescence intensity was remarkably decreased with illumination time.

The maximum decrease of the fluorescence intensity of ovalbumin with urea (8 M) and guanidin-hydrochloride (0.4 M) was observed at Tyr and Try residue. The quenching effect of fluorescence intensity by guanidin-hydrochloride were greater than that of urea.

The maximum increase of the fluorescence of the ovalbumin with glucose and xylose was observed at the first stage of the browning reaction (4 days) and then diminished accompanying elevation the browning of the protein.

(Received April 13, 1972)

たん白質溶液は一般に 250~320 m μ 間のいずれかの波長で励起すると、その波長に応じてトリプトファン (Try), チロシン (Tyr), フェニルアラニン (Phe) 残基にもとづくケイ光スペクトルを与える^{1)~4)}。ケイ光スペクトルにおける極大の位置およびケイ光の量子収量はたん白質の種類によって異なるが、たん白質分子のケイ光は、たん白質の構造と密接な関係を持ち、Try, Tyr, Phe などケイ光性アミノ酸残基のたんぱく質分子内部での存在状態に鋭敏に左右されるので適当な実験方法と解析手段を用いると、紫外外部吸収スペクトルと同様に変性などによるたんぱく質分子の内部構造の変化の解明の強力な手段となりうる。事実、たんぱく質分子構造とケイ光との関係については比較的多くの報文がみられ、Cowgill はとくにヘリックス構造 (Helical confor-

mation) をもつ筋肉たん白質 meromyosin⁵⁾, paramyosin⁶⁾ さらにリボヌクレアーゼ A⁷⁾ について尿素変性、熱変性、酸変性、イオン強度などの環境変化に基づくヘリックスの変化、トリプシン消化によるヘリックスの崩壊をもとにケイ光との関係を追究し、たん白質分子のヘリックスのランダムコイルの変化は Try, Tyr のケイ光強度の減少や消光をもたらし、たん白質のケイ光はたん白質の構造変化を知る上の実験的尺度となりうることを指摘している。太田ら⁸⁾ も酵母のアルコール脱水素酵素について、また Kaplan ら⁹⁾ はアルコール脱水素酵素および乳酸脱水素酵素について、それぞれ尿素変性、熱変性に際しての酵素のケイ光強度の減少と酵素たん白質のヘリックスの unfolding とが密接な関係をもつことを示唆している。

これらの見地よりたん白質の変性や劣化にともなうたん白質構造の微細な変化を知る方法の一つとしてケイ光スペクトルの変化に注目し、卵白アルブミン水溶液を試料として尿素、熱、pH、光などによるたん白質の変性とケイ光スペクトルの関係、さらにグルコースおよびキシロースとたん白質との褐変化とケイ光スペクトルとの関係を追究した。なお本実験と並行してたん白質変性度をSH基についてEllman法¹⁰⁾に基づいて測定したが、本実験の卵白アルブミン濃度において、濃度が希薄なためSH基の測定はできなかった。

実験方法

卵白アルブミン溶液：卵白アルブミン（メルク製）を用い、水あるいは0.1Mクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液、0.1Mクエン酸ナトリウム・塩酸緩衝液にそれぞれ溶解し、0.05%溶液として実験に供した。

ケイ光スペクトルの測定：ケイ光スペクトルは島津製自記ケイ光分光光度計GSF-16型を用い、励起波長280m μ にてケイ光スペクトルを求め、ケイ光強度はケイ光エネルギーの相対値(R.E)をもって示した。なお実験結果図表中に示すcoarseおよびfineのnumberは、ケイ光分光光度計の直流増幅器の感度段階を表わす数値である。

実験結果および考察

1. 卵白アルブミンおよび芳香族アミノ酸のケイ光スペクトル

0.05%卵白アルブミン水溶液および0.05%Try, Tyr, Phe水溶液のケイ光スペクトルを求めた。結果はFig.

1-1に示されるごとく卵白アルブミン水溶液(pH 6.8)は285m μ , 340m μ , 570m μ および660m μ にそれぞれ $\lambda_{\max}$ を示した。Phe, Tyr, Tryのそれぞれの芳香族アミノ酸のケイ光スペクトルはFig. 1-2に示されるごとくPheは290m μ , 560m μ に、Tyrは305m μ と595m μ に、Tryは360m μ , 680m μ に $\lambda_{\max}$ がみとめられる。Pheのケイ光強度はTyrおよびTryに比較してきわめて小さい。たん白質のケイ光強度はそれに含まれるケイ光性アミノ酸(Phe, Tyr, Try)の配位状態に左右されるため、これらのアミノ酸の含量とは必ずしも比例せず、波長も単独のアミノ酸とは若干ずれる場合が多い¹¹⁾。Teale¹²⁾, Weberら¹³⁾のリボスクレアーゼ、インシュリンおよび球状たん白質のケイ光強度と $\lambda_{\max}$ に関する実験結果より一般にケイ光アミノ酸を2種以上含むたん白質分子はケイ光の $\lambda_{\max}$ の位置が単独アミノ酸溶液の場合より短波長側へshiftすることが示唆されている。Weberらの実験結果を参照し、Fig. 1-1に示される卵白アルブミンのケイ光スペクトルにおいて285m μ と570m μ に $\lambda_{\max}$ をもつものはTyr残基に、340m μ と660m μ に $\lambda_{\max}$ をもつものはTry残基によるものと推考される。

2. 卵白アルブミンのケイ光スペクトルと温度

0.05%卵白アルブミン水溶液10mlを内径(18×170mm)の硬質無色試験管に入れ、暗所下に60°Cの小型定温水槽に保持し、そのケイ光スペクトルの変動を経時的に求めた。加熱温度は卵アルブミンの熱凝固性より60°Cを限度とした。また0.05%の未変性卵白アルブミンのケイ光スペクトルをあわせ求め対照とした。結果はFig. 2に示されるごとく、とくにTyr残基($\lambda_{\max}$: 285

Fig. 1-1. Fluorescence spectrum of aqueous ovalbumin solution.

Excitation wave length: 280m μ , S*: coarse 5, fine 8.
S* (number of coarse and fine) shows the step of the sensitivity on the amplification meter of Shimazu spectro fluorometer GSF-16.

Fig. 1-2. Fluorescence spectrum of aqueous aromatic amino acid solution.
 curve 1: Phe, curve 2: Tyr, curve 3: Try, curve 1': Phe
 Curve 1, 2, 3 was assayed at excitation wave length 280 mμ with coarse 6, fine 8 and curve 1' was assayed at excitation wave length 280 mμ with coarse 10, fine 8 of the amplification meter.

Fig. 2. Thermal dependence of the fluorescence spectrum for aqueous ovalbumin solution.
 curve 1: 0 min, 2: 1 min, 3: 5 min, 4: 15 min, 5: 30 min, 6: 1 hr.
 Excitation wave length: 280 mμ, S: coarse 4, fine 8.

mμ, 570 mμ) において1分, 5分, 15分と比較的短時間にケイ光強度の急激な増加がみられ, その後は30分, 1時間と加温時間とともにケイ光強度の減少がみられる。Try 残基 ($\lambda_{\max}$: 340 mμ, 660 mμ) も Tyr 残基とほぼ同様のケイ光スペクトルの変化がみとめられるが, ケイ光強度の変動は比較的小さい。これらの結果より温度は卵白アルブミンの構造変化に著しい影響を与え, 反応初期のケイ光強度の増大はたん白質の高次構造の unfolding に基づく Tyr 残基, Try 残基のケイ光増大によるものと考えられ, さらに加温 30 分後のケイ光強度の減少は一度ほぐれた構造が水素結合の再生などによ

り再びアトランダムに aggregation されるものと考えられる。したがってたん白質溶液のケイ光強度は著しい温度効果がみられ, ケイ光強度の観察は加熱によるたん白質構造の微細な変化, 変性を検出する上の鋭敏な手段となりうる。

3. 卵白アルブミンのケイ光スペクトルと pH

卵白アルブミンのケイ光スペクトルの pH 依存性を卵白アルブミンを 0.05% 濃度に 0.1 M クエン酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 3.0~5.0), 0.1 M-クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液に溶解し pH 3~12 の範囲にて検討した。結果は Fig. 3 に示されるごとくとくに Try 残基

Fig. 3. The pH dependence of the fluorescence spectrum for ovalbumin.

R. E. was assayed at 340 mμ emission wave length.

Excitation wave length: 280 mμ, S: coarse 7, fine 8.

($\lambda_{\max}$: 340 mμ) のケイ光強度についてみると全般的に中性よりアルカリ性域 (pH 10) においてケイ光強度は高く、酸性域においては pH の低下に伴って減少消光がみられる。なお pH 12.0 の強アルカリ性域においてはケイ光強度の著しい消光が目される。White¹⁴⁾ も Try と Tyr および誘導体のケイ光量子収量に対する pH の影響をしらべ、Try および Tyr ともに酸性域において減少消光すると報告している。

4. 卵白アルブミンのケイ光スペクトルと光照射

0.05%卵白アルブミン水溶液に光増感剤としてリボフ

ラビン (反応液中の濃度 10^{-5} M) を添加し、内径 (18×170 mm) の硬質無色の試験管に入れ、室温 (20°C) にて、光源として 100 V, 15 W×2 の紫外線殺菌灯を用い、光源より試験管までの距離 4cm にて照射処理を行ない、卵白アルブミンのケイ光スペクトルの変化を経時的に求めた。結果は Fig. 4 に示されるごとくケイ光スペクトルの著しい変化を示し、Tyr 残基 ($\lambda_{\max}$: 285 mμ, 570 mμ) および Try 残基 ($\lambda_{\max}$: 340 mμ, 660 mμ) は照射初期 30 分間はわずかにケイ光強度の増大を示すが、その後照射時間とともにケイ光強度の著しい減少がみとめられる。照射初期段階のケイ光強度の増大は加温処理 (実験結果 Fig. 2 参照) の場合と同様卵アルブミンの立体構造がはぐれケイ光性アミノ酸残基が遊離状態もしくは露出状態 (exposed state) におかれるためと推考され、これらのアミノ酸残基もその後照射時間とともに光分解を受けケイ光強度も著しく減少することが考えられる。

5. 卵白アルブミンのケイ光スペクトルと尿素およびグアニジン処理効果

尿素および塩酸グアニジンを 0.05% 卵白アルブミン水溶液に添加、最終濃度尿素 8 M, 塩酸グアニジン 0.4 M とし、37°C にて反応せしめ、卵白アルブミンのケイ光スペクトルの変化を経時的に求めた。結果は Fig. 5-1 Fig. 5-2 に示されるごとく、尿素変性、グアニジン変性ともに Tyr 残基 ($\lambda_{\max}$: 285 mμ, 570 mμ) において反応時間とともにケイ光強度の著しい減少がみられ、Try 残基 ($\lambda_{\max}$: 340 mμ, 660 mμ) においても Tyr 残基と同様に全般的にケイ光強度の減少がみられる。なお

Fig. 4. Effect of the ultraviolet rays illumination on the fluorescence spectrum of ovalbumin in the presence of riboflavin.

Illumination time

curve 1: 0 min, 2: 30 min, 3: 1 hr, 4: 2 hr, 5: 4 hr, 6: 6 hr, 7: 8 hr, concn. of riboflavin: 10^{-5} M.

Excitation wave length: 280 mμ, S: coarse 6, fine 5.

Fig. 5-1. Effect of urea on the fluorescence spectrum of ovalbumin. incubation time at 37°C, pH 6.8

Curve 1: without urea, 2: 0 min, 3: 30 min, 4: 1 hr, 5: 2 hr, 6: 4 hr, concn. of urea: 8 M.

Excitation wave length: 280 mμ, S: coarse 7, fine 5.

Fig. 5-2. Effect of guanidine hydrochloride on the fluorescence spectrum of ovalbumin. incubation time at 37°C

Curve 1: without guanidine hydrochloride 2: 0 min, 3: 30 min, 4: 1 hr, 5: 2 hr, 6: 4 hr, concn. of guanidine hydrochloride: 0.4 M.

Excitation wave length: 280 mμ, S: coarse 7, fine 5.

塩酸グアニジンは溶解度の関係より 0.4 M 濃度にとどめた。これらの結果より Tyr 残基のケイ光強度は Try 残基よりも尿素、グアニジンによる影響を受けやすく、また同じモル濃度についてみると、塩酸グアニジンが尿素よりケイ光強度に著しい効果をもつことが推考される。なお太田ら⁸⁾も酵母のアルコール脱水素酵素について尿素濃度の増大に伴って Tyr 残基に基づくと思われるケイ光の減少を報告している。

6. 卵白アルブミンのケイ光スペクトルとたん白質褐変化の効果

たん白質の遊離アミノ基は還元糖やカルボニル化合物と反応し、反応の初期段階はたん白質の物理的性質はほとんど変化はないが、遊離基の 50% 以上が糖と結合するとたん白質は褐変化し栄養価を低下する。糖-アミノ酸の褐変反応には必ずケイ光が発生するが、ケイ光生成機構およびケイ光性物質の本体については明らかでな

い。Burton ら¹⁴⁾は、ケイ光物質は不飽和カルボニル化合物で、メラノイジンの中間体であると報告しており、また最近五明ら¹⁵⁾はグリシン-キシロース系より調製したメラノイジンの化学的性質について、メラノイジンは加熱(90°C)によって解重合脱色がみられ、ケイ光は増大し、ケイ光物質の生成を指摘している。これらの見地よりアミノ-カルボニル反応におけるケイ光反応は食品の褐変化において重要視される。したがって卵白アルブミンのケイ光スペクトルに及ぼす糖-たん白質褐変化の影響

をしらべた。すなわちグルコース、キシロースを0.05%卵白アルブミン水溶液にそれぞれ添加、最終濃度0.25 Mにて37°Cに反応せしめ卵白アルブミンのケイ光スペクトルの変化を経時的に求めた。結果はグルコースのときはFig. 6-1に示されるごとく Try 残基($\lambda_{\max}$: 340 m μ , 660 m μ)については反応初期においては、わずかにケイ光強度の減少を示すが4日目にケイ光強度の急激な増大が目され、さらに褐変化の増大に伴ってその後再び反応時間とともにケイ光強度は減少する。Tyr 残基

Fig. 6-1. The fluorescence spectrum of the browning ovalbumin with glucose.
incubation time at 37°C

Curve 1: 0 day (not browned), 2: 1 day (not browned), 3: 4 day (light brown), 4: 8 day (brown), 5: 10 day (brown), concn. of glucose: 2.5 M.

Excitation wave length: 280 m μ , S: coarse 6, fine 5

Fig. 6-2. The fluorescence spectrum of the browning ovalbumin with xylose.
incubation time at 37°C

Curve 1: 0 day (not browned), 2: 1 day (not browned), 3: 4 day (light brown), 4: 8 day (brown), 5: 10 day (brown), concn. of xylose: 2.5 M.

Excitation wave length: 280 m μ , S: coarse 6, fine 5.

($\lambda_{\max}$: 285 m μ , 570 m μ) においては反応1日目にケイ光強度の増大がみられその後ケイ光強度は減少を示す。キシロースのときは Fig. 6-2 に示されるごとくグルコースのときはほぼ同様の結果がみられ、Try 残基については反応4日目にケイ光強度の著しい増大がみられ、褐変化の増大に伴って再び反応時間とともにケイ光強度は減少を示す。これらの結果よりメラノイジンへの褐変化の中間体に最も強いケイ光反応がみとめられることが推考される。

要 約

たん白質の変性や劣化に伴うたん白質分子構造の変化をそのケイ光反応より知る目的から、卵白アルブミン水溶液について、加熱、酸(pH)、光照射、尿素、塩酸-グアニジンを作用せしめ、たん白質の変性段階におけるケイ光スペクトルの変動をしらべ、また糖-たん白質の褐変化に伴うケイ光スペクトルの変動をグルコースおよびキシロース・たん白質系についてしらべた。

1) 卵白アルブミン水溶液は 60°C の温度処理において、反応 1~5 分間の比較的短時間にケイ光強度に急激な増大がみられ、とくにチロシン残基に基づくケイ光強度の上昇が著しい。

2) 卵白アルブミンのケイ光強度は中性より pH 10 のアルカリ性域において増大し、酸性域においては pH の低下に伴って減少消光する。なお pH 12.0 の強アルカリ性域においてはケイ光強度の減少がみられる。

3) リボフラビンの存在において、紫外線照射処理により卵白アルブミンはトリプトファン残基、チロシン残基ともに照射時間に伴ってケイ光強度の著しい減少がみられる。

4) 尿素 (8 M) および塩酸グアニジン (0.4 M) は卵白アルブミンのチロシン残基に基づくケイ光強度を著しく減少せしめ、塩酸グアニジンは尿素に比較してケイ光

の消光効果が大きい。

5) 卵白アルブミンはグルコース、キシロースとの褐変反応 (37°C, pH 6.0) において褐変反応初期段階はケイ光強度の急激な増大がみられ、その後褐変反応の進行にともなってケイ光強度の減少がみとめられる。

これらの結果よりたん白質のケイ光スペクトル分析はたん白質の変性や劣化に伴うたん白質分子構造の微細な変化を知る有力な手段となりうる。

本研究は堀川春代、山岡雅子嬢の協力に負うところが大きい。ここに深謝の意を表する。

文 献

- 1) 太田ゆみ子, 太田隆久, 和田昭允: たんぱく質, 核酸, 酵素, 8, 362 (1963)
- 2) Steiner, R. F. and Edelhoch, H.: *Biochem. Et. Biophys. Acta*, **66**, 341 (1963)
- 3) Weber, G.: *Biochem. J.*, **75**, 235 (1960)
- 4) Teale, F.: *Biochem. J.*, **76**, 381 (1960)
- 5) Cowgill, R. W.: *Biochem. Et. Biophys. Acta*, **163**, 431 (1968)
- 6) Cowgill, R. W.: *Biochem. Et. Biophys. Acta*, **168**, 417 (1968)
- 7) Cowgill, R. W.: *Biochem. Et. Biophys. Acta*, **120**, 196 (1966)
- 8) Ohta, T. and Ogura, Y.: *J. Biochem.*, **58**, 73 (1965)
- 9) Brand, L., Everre, J. and Kaplan W. O.: *Biochemistry*, **1**, 423 (1962)
- 10) Ellman, L. G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
- 11) Velick, S. F.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1455 (1958)
- 12) Teale, F. W. J.: *Biochem. J.*, **76**, 381 (1960)
- 13) Weber, G.: *Biochem. J.*, **26**, 381 (1960)
- 14) Burton, H. S., Mcweeny, D. J. and Pandhi, P. N.: *Nature*, **196**, 948 (1962)
- 15) Gomyo, T., Kato, H., Udaka, K., Horikoshi, M. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 125 (1972)

(昭和 47 年 4 月 13 日受理)