Na-*p*-Aminosalicylate (PAS) による蛋白質の 変性に関する研究 (第 6 報)*

卵アルブミンと PAS との結合について

船 津 勝, 徳 安 清 親 (九州大学農学部生物化学教室)

昭 和 31 年 11 月 24 日 受 理

緒 言

PAS 変性蛋白質の分子内構造の変化をその旋光度の変化から窺い知る事が出来たがその際 PAS と蛋白質との結合がこの変化を支配するものである事を推論した⁽¹⁾。又 PAS 変性蛋白質の分子形態は棒状とならず寧ろ廻転軸に対し横に拡がった円盤状となり一種の膨潤に似たものとなる事も既に推論した⁽²⁾。之等の事実は蛋白質分子内に侵入した PAS がその極性によってペプチド鎖を部分的に解離し同時に何等かの形式で蛋白質と結合する事を示唆するものであった。ここに於て蛋白質と PAS との結合状態を追究する事が変性機構を一層精細に説明するために必要となった。本報に於ては PAS と卵アルブミンとの結合状態を追究した。

蛋白質に対する低分子イオンの結合に関しては多くの研究がなされている⁽³⁻⁹⁾。尿素に関しては最近 Dotz⁽¹⁰⁾ は 1 分子の血清アルブミンに pH 8 で 2000 個の尿素が結合し pH 3 では 3000 個の水が結合する事を報告している。然し他の研究者の報告している結合数は極めて少い⁽¹¹⁻¹⁶⁾。之等の結合は主として正或は負のイオンの静電結合に関するものであり、然も蛋白質の変性を伴わない場合が多い。然るに PAS は両性電解質である上蛋白質は PAS によって変性しペプチド鎖の解離を伴うため PAS 分子と蛋白質との結合は単純ではなく、然も結合もイオン結合より寧ろ水素結合によるものが多いと推定されるため、その結合状態は極めて複雑である。又 PAS の解離は pH との関連に於て複雑であり、然も蛋白質自身も pH によって複雑な解離を示すので、PAS と蛋白質との結合量は両者の pH による解離の相関関係によって決定されるものと考えられる。

蛋白質と他物質との結合量測定法は種々試みられている⁽¹⁷⁾。本報に於ては Klotz 等の透析平衡法⁽⁵⁾によって卵アルブミンに対する PAS の結合量を測定し主として結合に及ぼす PAS 濃度及び pH の影響より PAS 変性に於ける結合の意義を明らかにした。

実 験 方 法

透析平衡実験

Klotz の方法⁽⁵⁾に倣いコロジオン (石津製) を用い円筒状の薄膜を調製し透析膜とした。

卵アルブミンを M/20 燐酸塩或は M/10 炭酸塩緩衝液に約 0.5% の割合に溶解した溶液を透析内液として 10 cc 用いた。又外液として PAS を同上緩衝液に溶解した溶液 20 cc を用いた。透析は注意してしばしば振盪し乍ら 3~5° の低温室内で 5~7 日間行った(この期間で平衡に達する事を実験的に確めた)。又対照として内液に緩衝液のみ 10cc 入れたものを作り同様に透析を行った。

平衡に達して後外液の一定量を採り稀釈してその PAS 含有量を測定し対照との差から PAS の結合量を算出した。

最大結合量の決定

蛋白質 1 分子当りのイオンの最大結合数 n は Klotz⁽⁹⁾ により質量作用の法則から次式によって与えられた。

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{Kn} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{n}$$

但し K : イオンの結合の平衡恒数
 $[I]$: イオンの濃度 (モル)
 r : 蛋白質 1 分子当りの平均のイオン結合数
 $r = \frac{\text{結合イオン量 (モル)}}{\text{全蛋白質量 (モル)}}$

従って縦軸に $1/r$, 横軸に $1/[I]$ をとるとイオン結合が上式に従って行われる時には直線が得られ、この直線

* Studies on the Denaturation of the Proteins with Na-*p*-Aminosalicylate (PAS). Part VI.
 The Binding of PAS by Ovalbumin.
 By Masaru FUNATSU and Kiyotika TOKUYASU (Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

の勾配が $1/Kn$ 又直線が縦軸を切る点が $1/n$ を与える。

同様な原理に従い Scatchard^(18,19) は次式によって n を求めている。

$$r/[I] = Kn - Kr$$

即ち縦軸に $r/[I]$, 横軸に r をとって画かれた直線が縦軸及び横軸を切る点として夫々 Kn 及び n が与えられる。

PAS の定量

PAS の定量には種々の方法が考案されている⁽²⁰⁻²²⁾。本研究に於ては Tennet 及び Leland の方法⁽²³⁾を用い島津製光電比色計によって比色定量した。即ち *p*-nitroaniline を用いジアゾ反応によって PAS に結合せしめ呈する赤紫色をアルカリ性に於て 620 mμ で比色するもので 100 mg % 以下の濃度に於て測定した。従って試料は有効濃度内に希釈して測定に供した。

実 験 結 果

I. 結合量に及ぼす蛋白質濃度の影響

pH 7.5 の 0.95 M PAS 溶液 (M/20 磷酸塩緩衝液) を外液とし内液の蛋白質量を種々変化した時の結合量を求めた結果第 1 図に示す結果を得た。

即ち 0.95 M (20%) PAS 溶液中に於ては蛋白質量 1.6×10^{-6} M (約 0.75%) 迄は結合量は殆んど蛋白質濃

第 1 図 結合量と蛋白質濃度との関係
外液 20 cc, 内液 10 cc, pH=7.5

第 2 図 PAS の種々濃度に於ける結合量
外液 20 cc, 内液 10 cc, pH 7.4
蛋白質量 1.11×10^{-6} M

第 3 図 Klotz の方法による結合量

第 4 図 Scatchard の方法による結合量

第 5 図 pH と PAS 結合量との関係
外液 20 cc, 内液 10 cc, 蛋白質量 1.74×10^{-6} M

度の影響を受けないが 2×10^{-6} M 以上の濃度に於てはドナン効果のため結合量はやや増大する。従って実験は比較的低蛋白質濃度に於て行う必要があり、本研究に於ても 0.75% 以下のドナン効果を無視し得る蛋白質濃度に於て実験を行った。

II. 結合量に及ぼす PAS 濃度の影響

pH 7.4 に於て内液の蛋白質 1.11×10^{-6} M/10 cc に對して外液(20cc)中の PAS 濃度を 1.43, 0.95, 0.48, 0.24, 0.10 M 溶液とした時の結合量を求めると第 2 図に示す様になる。即ち PAS 低濃度に於て結合量は徐々に増加するが PAS 濃度 0.5×10^{-2} M 附近に於て増加度は非常に小となり宛も或程度の飽和に達するかに見えるが 1×10^{-2} M 附近より再び結合量は急増し 1.5×10^{-2} M に於て最大結合量に達する。曲線は 0.8×10^{-2} M 附近に変曲点を示すが、この事は PAS の結合様式に 2 段階ある事を示唆するものと考えられる。1 M の蛋白質に対する PAS の最大結合量は 1350 M であった。

又 Klotz 及び Scatchard の方法によって夫々 $1/r - 1/[PAS]_{\text{free}}$ 及び $r/[PAS]_{\text{free}} - r$ の関係図を画くと第 3 図及び第 4 図に示す様になり直線とならない。

これは PAS 高濃度に於て蛋白質が変性を蒙りポリペプチド鎖を部分的に解離し PAS がイオン結合以外水素結合によって不規則に結合し結合量が急激に増大する為めと考えられる。

III. 結合に及ぼす pH の影響

蛋白質濃度 1.737×10^{-6} M/10 cc, PAS 濃度 1 M に於て蛋白質と PAS との結合に及ぼす pH の影響を見るため pH 5.8, 6.6, 7.4 及び 8.6 の M/20 磷酸塩緩衝液 (1 M PAS 溶液) 及び pH 9.4 及び 10.5 の M/40 炭酸塩緩衝液 (1 M PAS 溶液) を外液として用い、夫々 PAS 結合量を測定した。その結果は第 5 図の様になった。

即ち r -pH 曲線は特殊な形を示し pH 8.5 前後に於て結合量は最低となりその両側に於て増大する。酸性側に於て特に大である。

考 察

第 2 図に示す如く卵アルブミンに対する PAS の結合には二段階あり低濃度に於て蛋白質が殆んど変性しないと考えられる場合の結合の段階と変性しポリペプチド鎖が部分的に解離した時の結合の段階とがあるものと考えられる。即ち蛋白質に変性が起らず PAS が蛋白質分子表面に主として結合する時結合量は一旦飽和に達する。然し同時に PAS の極性によってポリペプチド鎖が部分的に解離し、蛋白質分子は変形し、蛋白質分子内部に於ても PAS との結合が起るため、蛋白質の変性を伴わない、メチルオレンジと蛋白質との結合の様な場合と異なり、膨大な PAS が結合する事となる。然も水素結合によって PAS がペプチド結合と直接結合し得る事は結合量を一層増大する事となる。その結果蛋白質は膨潤に似た形態をとるものと考えられる。斯くの如く分子内に侵入結合した PAS によって一度解離したペプチド鎖が再び不規則に結び付けられる事は PAS 変性蛋白質の形態が unfolding のままの棒状とならず、横に拡張した円盤状となる事⁽²⁾及び軸比の増大度が 2 倍で分子形の変形が異常なものでない事⁽²⁾から推察する事が出来る。

pH の結合量に及ぼす影響は PAS 及び蛋白質の解離と結合との関連を示唆するものである。PAS 分子は両性電解質であり、種々の pH に於て次の 4 つの解離型をとるものと考えられる。

本実験条件では (1) 型は論外である。又 COOH

の pK は 2~3 と考えられるので (2) 型の関係する pH 領域も本実験の酸性側の極めて狭い範囲と考えられる。従って本実験に於て問題となるのは (3) 及び (4) 型である。

(3) 型の PAS はその NH_2 と OH によって蛋白質との間に水素結合を形成し同時に COO^- によってイオン結合を行い得る。従ってこの型に於て PAS は最も多く蛋白質と結合し得るものと考えられる。即ち PAS の極性によって解離したペプチド結合及び水素結合可能基との間の水素結合及び蛋白質の正電荷の基と COO^- との間のイオン結合が可能である。

(4) 型の PAS では水素結合を形成しうるものは NH_2 基のみである。若し PAS の OH の解離が小で、然も COO^- 及び O^- の結合相手の主要なものである蛋白質の正電荷の基の解離が不十分な pH に於ては蛋白質との結合は比較的起り難いものと考えられる。

この様な観点に立って PAS の結合量に及ぼす pH の影響を見ると、 pH 6~7.5 に於て PAS は (3) 型の解離を示しその大なる極性によって最大の変性を与え又 2 つの水素結合によって最大の結合量を与える。即ちこの様な pH 領域に於ては結合は主として水素結合によって行われるものと考えられる。然し恐らく pH 8.5 前後に於て PAS は (4) 型となるものと考えられる。即ち pH 7.5 以上に於ては水素結合による結合は減少し、分子内部に侵入結合する PAS 量は急激に減少し、その結果、蛋白質の unfolding 従って変性も極めて徐々に起るものと考えられる。然し、 pH 8.5~10 に於てアルカリ度が大きくなると、PAS の OH の解離が増大し、 COO^- の解離の増大と相俟ち蛋白質中の正電荷との結合が促進され、PAS の結合量は再び増大するものと考えられる。この様な pH 領域に於て、結合は主としてイオン結合に支配されるものと推察される。以上述べた事よりアルカリ側に於てペプチド鎖の解離が比較的困難であり、従って変性も徐々に起り、然も蛋白質と PAS との結合も又比較的困難なため一度部分的に解離したペプチド鎖が PAS との結合を通じて再び結合される速度は極めて遅いものと考えられる。この様な推論は前報⁽¹⁾に於て pH 8 以上のアルカリ側に於て変性初期に旋光度の低下が見られた事実をよく説明するものである。

以上の結果 PAS による蛋白質の変性及び之に伴う旋光度の変化を支配し決定するものは PAS と蛋白質との結合である事を推察する事が出来る。

要 約

透析平衡法によって卵アルブミンに対する PAS の結合量を種々の条件で測定し次の結果を得た。

1. 0.75% 以下の濃度の卵アルブミン溶液を用いるとドナン効果の影響を無視しうる。
2. PAS の結合は二段階に進行する。即ち低濃度 PAS 溶液に於ては変性が起らず結合は主として蛋白質表面で行われるが PAS 濃度の増大と共に変性が起り PAS は蛋白質分子内にも結合し結合量は急増する。 pH 7.4 に於て変性時の PAS の最大結合量は卵アルブミン 1 M に対し 1350 M であった。
3. 結合に及ぼす pH の影響は蛋白質及び PAS の解離に関連するもので、 pH 8.5 前後に於て結合量は最低となりその両側 pH に於て増大した。特に酸性側に於て結合量は大で PAS の NH_2 及び OH 基による水素結合に帰因する事を推論した。

以上の結果蛋白質の変性は PAS と蛋白質との結合に支配され、且つ一旦解離したペプチド鎖は PAS との結合を通じて再結合される事を推論した。

終始御懇篤なる御指導を賜った大島康義教授に深甚の謝意を表します。

(1) 船津 勝 : 本誌, 31, 52 (1957).	Soc., 70, 939 (1948).
(2) 船津 勝 : 本誌, 30, 304 (1956).	(8) I. M. Klotz, H. Triwush, F. M. Walker :
(3) I. M. Klotz, H. Neurath, K. Baily : <i>The</i>	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 70, 2935 (1948).
<i>Proteins</i> , II, 727 (1953).	(9) I. M. Klotz : <i>Arch. Biochem.</i> , 9, 109
(4) 水島三一郎, 赤堀四郎 : 蛋白質化学, II,	(1946).
321 (1954).	(10) P. Dotz, S. Katz : <i>Adv. in Protein Chem.</i> ,
(5) I. M. Klotz, F. M. Walker, R. B. Pivan :	6, 35 (1951).
<i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 68, 1486 (1946).	(11) H. Neurath, J. P. Greenstein, F. W.
(6) I. M. Klotz, F. M. Walker, R. B. Pivan :	Putnam, J. O. Erickson : <i>Chem. Rev.</i> ,
<i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 69, 1609 (1947).	34, 157 (1944).
(7) I. M. Klotz, H. G. Curme : <i>J. Am. Chem.</i>	(12) S. E. Bresler : <i>Biokhimiya</i> , 14, 180 (1949).

- (13) I. M. Klotz : *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2935 (1948).
 (14) G. G. Wright, V. Schomaker : *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 351 (1948); *J. Biol. Chem.*, 175, 169 (1948).
 (15) E. L. Duggand, J. M. Luck : *J. Biol. Chem.*, 172, 205 (1948).
 (16) H. Neurath, G. R. Cooper, J. O. Erickson : *J. Biol. Chem.*, 142, 249 (1942).
 (17) 水島三一郎, 赤堀四郎 : 蛋白質化学, IV, 15 (1956).
 (18) A. Chanutin, S. Ludewig, A. V. Masket : *J. Biol. Chem.*, 143, 737 (1942).
 (19) G. Scatchard : *Ann. New York Acad. Sci.*, 51, 660 (1949).
 (20) A. Schmitz, J. Wawer : *Beitr. Klin. Tuberk.*, 105, 178 (1951).
 (21) G. Haberland : *Arzneimittel Forsch.*, 1, 31 (1951).
 (22) G. Matta, M. L. Nunes : *Anais. Azevedos*, 2, 28 (1950).
 (23) D. M. Tennet, M. L. Leland : *J. Biol. Chem.*, 177, 873 (1949).

X線ディフラクトメーターによる澱粉の研究 (1)*

檜 作 進, 二 国 二 郎 (大阪大学産業科学研究所)

昭和 31 年 11 月 26 日 受 理

緒 言

天然澱粉粒子は繊維, ある種の蛋白質等と同様に微結晶構造を有する高分子物質である事は古くから知られている⁽¹⁾. Katz 等⁽²⁾は X 線による大きな研究により天然澱粉の結晶型に A, B, C の 3 種の Debye-Scherrer 図型を与える変態のある事, 加熱及びアリカリ処理等により微結晶構造が破壊され(糊化現象)新たに V-図型(Verkleisterungsspektrum)を与える α -澱粉に変化する事, 及び逆に α -澱粉を適当な条件下に放置すると天然澱粉様の Debye-Scherrer 図型を与える β -澱粉に変化する事(老化現象)等を示した. 我国でも桜田等^(3,4)及び二国等⁽⁵⁾により同様な研究が行われた. 此の方面の研究は Bear 等^(6,7), Rundle 等⁽⁸⁾によって更に発展され単位胞の決定が試みられ, 又 V-図型についても澱粉分子が螺旋構造を取っている事が推測された. Rundle 等⁽⁸⁾はアミロース成分を用いて始めてその薄膜及び繊維の調製に成功し, 繊維周期を定めると共に粉末図型の解析を行い単位胞を定めた. これに対し Kreger⁽⁹⁾の反論もあったが今日ではこの Rundle 等の結果が一番妥当なものと考えられている. 又澱粉とヨードとの反応が複合体の形成によるものである事が認められその際澱粉分子が螺旋構造を取りその中にヨード分子が入る事が明らかにされた⁽¹⁰⁾. 斯くて並行的に進んで来た酵素化学的及び化学的知見と共に澱粉の分子構造に関する基礎が明らかになって来たのである. 然し天然の澱粉粒子の微結晶構造の実体に就いては明らかにされておらず, 唯粒の中心より放射状に広がる繊維形の微結晶構造説が Meyer 等⁽¹¹⁾によって仮定されているだけである. しかもこの方面の研究は Bear 等, Rundle 等以来殆んど行われていない現状である. そこでこの点を明らかにする為に著者等は電子顕微鏡による研究と並行して一連の X 線による澱粉の微結晶構造の研究を再開した.

近年 X 線廻折装置が進歩し, X 線廻折計数装置(X-ray diffractometer)が市販された. これは X 線装置にゴニオメーター, ガイガー管, 記録装置を組合せたもので写真法の種々の欠点を解消し, 粉末結晶の混合物の定性及び定量的測定, 格子常数の精密決定, 結晶粒子の大きさの測定等に従来の写真法に比べて, 容易にしかも遙かに精しい数値を得る事が出来, 且つ分解能が高いという利点がある. そこで著者等はこの装置を澱粉に適用した結果これがその構造研究に有力な手段である事を知り, 且つ新しい廻折線を見出したのでここに報告する(尚この装置に就いては既に多くの解説がなされている^(12,13). 本報提出後植田等⁽¹⁵⁾の米澱粉の報告を知った).

実 験 の 部

試料 : 玉蜀黍及び馬鈴薯澱粉は市販品を数回蒸留水で洗滌し 37° で風乾した. 米澱粉は白米(大阪府立大学農学部 28 年度産粳米)よりアルカリ浸漬法により調製同じく 37° で風乾した. 湿润澱粉は長時間(約 7 日間)室温で水浸しグラスフィルターで水流ポンプ減圧下に濾過した.

* X-Ray Diffractometric Studies on Starches. I.

By Susumu HIZUKURI and Ziro NIKUNI (The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)