タンパク質とルテインとの結合性について

高 木 茂 明

(岡山大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 8 月 8 日 受 理

Interaction of Lutein to Protein in Aqueous Solution

Shigeaki TAKAGI

Department of Agricultural Chemistry, Okayama University, Okayama

An interaction between protein and carotenoid was investigated. When ethanol solution of lutein was added to aqueous solution of azuki protein, a combined product which might be considered to a complex between protein and lutein was produced in the form of solution or precipitation. In this case lutein was completely combined to protein till the quantitative ratio of lutein to protein was reached to 8.8×10^{-3} . pH effected to the formation and the precipitation of the complex. At an isoelectric point heterogeneous precipitants were produced, which were composed of both colored complex and colorless subjected protein. Above this pH homogeneous complex was produced, the molecular weight of which was estimated to be 507,000 by gel filtration and was not varied by the quantities of added lutein. The complex formation was not appreciably effected by the ionic concentration, and the precipitation of complex easily occurred at higher ionic concentration than 0.05 M.

Nonionic detergents accerated the formation of complexes while anionic detergents inhibited. The complex formation was strongly inhibited by dissociation agents, both urea and guanidine.

Proteins other than Azuki protein, that is, casein, ovalbumin and soy 11S protein, were also similarly combined to lutein to produce complexes.

From these results it was considered that lutein combined to the hydrophobic parts on the protein surface followed by association to produce complex.

(Received August 8, 1977)

緒 言

色素とタンパク質との相互作用については、高次構造研究に関連して報告があり⁽¹⁻⁴⁾, allosteric 変化をプロムチモルブルーなどの色素を使って検討している。いっぽう天然の色素-タンパク質複合体については、クロロフィルタンパク質がシロツメ草の葉から結晶として得られており⁽⁵⁾, 1分子のリポタンパク質に2分子のクロロフィルが結合している。カロチノイドもタンパク質と結合して自然界に存在し、甲殻類、魚類のアスタキサンチンがよく知られている。

著者はさきにホウレンソウリポキナーゼ活性にルテインが影響を及ぼすことを報告した⁽⁶⁾が、この活性阻害はルテインとタンパクとの直接的結合によって起ると考えなければならない。この点を追求する目的で数種の

タンパク質とルテインを水系で混合した場合の相互作用と複合体生成について基礎的現象を調べたので報告する。

材 料 と 方 法

1. タンパク質 アズキタンパク質は著者らの方法⁽⁷⁾に従って調製した $C_3P^{H_2}$ を用い、ダイズタンパク質は常法⁽⁸⁾による冷沈画分を、卵アルブミンは常法⁽⁹⁾に従って卵白から結晶させたもの、またカゼインは市販品(メルク製 Hammerten 法による)を用いた。

2. ルテイン ホウレンソウ葉から結晶単離⁽¹⁰⁾したものである。

3. タンパク濃度測定 Lowry の方法⁽¹¹⁾に準じて比色定量した。

4. ルテイン濃度測定 島津 MPS 型自記分光光度

計および島津-Bausch-Lomb スペクトロニック 70 型分光光度計を用いて O.D.₄₄₆ (エタノール溶液の場合の $\lambda_{\max}$ であり, $E_{1\text{cm}}^{1\%}=2344$) あるいは O.D.₃₉₀ (水溶液の場合の $\lambda_{\max}$) を測定して求めた。

結 果 と 考 察

1. タンパク-ルテイン複合体生成の予備実験

この実験のタンパク試料にはアズキタンパク質を用いた。0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.0 に溶解させたタンパク質 (1.276%) 1 ml を試験管に取り, これに 0.02% ルテインエタノール溶液 0.2 ml を加えて軽く振り混ぜると直ちに黄色の沈澱を生じる。遠沈後, 沈澱を 0.2 M 磷酸緩衝液, pH 8.0 に溶かし, 10 ml にする。溶けにくいときは少量の Triton X-100 を加えた。上澄も同じ緩衝液で 10 ml とする。外観は沈澱区が黄色透明, 上澄区は無色透明である。沈澱区とルテインエタノール溶液の可視吸光スペクトルを比較すると Fig. 1 のようになる。沈澱区の $\lambda_{\max}$ は 391 nm と大きく低波長に移動し, 色調も黄色が強い。

同様の現象が界面活性剤によってルテインを可溶化させたときにも起こることから⁽¹²⁾, これは溶媒の極性が強まったために移動したものと考えられるが, 通常 $\pi \rightarrow \pi^*$ によるスペクトルは溶媒の極性が大きくなれば長波長側に移動するとされているので, むしろルテイン分子が拘束された形で π 電子が励起しにくくなったためではないかと考えられる。界面活性剤を用いて可溶化した場合, 可溶化直後は $\lambda_{\max}$ がエタノール溶液のそれと変ら

ずに微細構造が崩れるだけであるが, 時間が経つにつれて約 30 nm の浅色移動が認められ吸収強度も大きくなっている⁽¹²⁾, これはルテインのポリエン構造が活性剤の疎水基と接近した結果, 複雑なスペクトルを生じたもので, 水の溶媒効果だけとは考えられない。同様のことがこの場合にもいえ, 青色移動はルテインがタンパク質と結合したために起った現象と考えられ, これに水の効果も加わっているかもしれない。またタンパク質の UV 吸収スペクトルはルテイン結合前後で変わらず, また 280 nm の吸収強度も変わらないことから, ルテインが結合することによってタンパク質の構造に大きな変化が起ったとは考えられない。

沈澱と上澄中のタンパク質およびルテイン量を求めるとルテインとタンパクは共に 90% 以上が沈澱中にある。沈澱生成は後述のようにタンパク濃度, ルテイン濃度が小さく, また塩濃度が大きく, pH が 7.0 以上の場合には起らないこともあり, 必ずしも複合体生成の必須現象ではない。しかし複合体の溶解性は低いので, アズキタンパク質の場合は蒸留水に透析すると容易に沈澱を生じる。

2. タンパク-ルテイン結合の量的関係

1 の実験をタンパクとルテインの量比を変えて行くと Table I の結果となる。ルテインのタンパクに対する比が 5.0×10^{-3} 以上になると供試タンパクおよびルテインの大部分が沈澱するが, ルテイン量がそれ以下のときは約 20% のタンパクがルテインと結合した形で溶液となっており, ルテインの多少によって複合体の溶解度は異なる。なお反応系のエタノール濃度は 16.7% であり, ルテインを除いた場合に沈澱を生じない。

3. 複合体生成に及ぼす pH の影響

pH の異なる 0.3% のアズキタンパク溶液 4 ml に 0.0371% ルテインエタノール溶液 0.3 ml を加えて振り混ぜ, 30 min 後に 660 nm で濁度を測定し, 複合体

Fig. 1. Absorption Spectra of Lutein Ethanol Solution (B) and Lutein-Protein Complex Aqueous Solution (A). $\lambda_{\max}$ of A is 391 nm while that of B is 446 nm.

Table I. Effects of Lutein Quantities on the Formation of Complexes

Quantitative ratio of lutein to protein subjected	Recoveries of protein in complex ppt (%)	Recoveries of lutein in complex ppt (%)
2.5×10^{-3}	76.8	80.0
5.0	94.0	92.2
6.3	97.2	91.3
7.5	100.0	94.8
8.8	103.4	95.5

Fig. 2. Effects of pH on the Formation (precipitation) of Complex between Azuki C_3^{ppt} Protein and Lutein. 0.1 M phosphate buffer is used in pH 5.2, 6.1, 6.5, 7.0 and 8.0, while 0.1 M borate buffer in pH 9.1. 0.037% lutein ethanol solution was added to each 0.3% protein solution at 29°C.

生成の尺度とした。

結果を Fig. 2 に示す。pH が酸性側では沈澱量は急激に増大し、pH 5.4 では多量の沈澱を生じた。この混合液を 3°C に冷却すると酸性では完全に沈澱するが、アルカリ側では濁る程度となる。このとき生じた沈澱の外観は pH 5.4 区を除いてすべて均一に着色している。pH 5.4 区は黄色と白色の 2 種類の沈澱の混合物であり、これはルテインを結合しているかないかの違いである。酸性において不均質な複合体を生成する理由として、等電点に近いタンパク分子の会合が起りやすく、微量のルテインによっても沈澱を生じ、それによってルテインと結合すると思われる疎水性部分がカバーされたことが考えられる。さらに pH 5.4 区を除く全区に 1 M 酢酸を加えて pH 5.4 に調節したとき生じた沈澱の外観はすべて均一に着色していた。このことから、低い pH では複合体生成は妨害されるが、pH 6.0 以上で 1 度生成させた複合体は pH を低下させても解離しないことがわかる。したがって、複合体生成に最適の pH は微酸性から微アルカリ性であるといえる。

4. 塩濃度の複合体生成に及ぼす影響

アズキタンパク質を塩濃度の異なる磷酸緩衝液 pH 7.0 に溶解させ (1.276%), その 2 ml にルテインアルコール溶液 (0.012%) 0.2 ml を加えて混合する。そのときの外観、濁度および沈澱と上澄の分析結果を Table II, III に示す。なお、ルテインを除いた場合は、いずれの区においても沈澱を生じない。塩濃度が低いと複合体は沈澱しにくい。0.05 M 以上の塩濃度では沈澱を生ずる

Table II. Effects of Ion Concentration on the Complex Formation

Ion concentration ^{a)} (M)	Appearance ^{b)}	Turbidity (O.D. ₆₆₀)
0.005	Clear	0.178
0.010	"	0.185
0.050	Turbid	Impossible to estimate
0.100	"	"

^{a)} Phosphate buffer system was used. Ethanol concentration in reaction mixture, 9.1%. ^{b)} Either mixtures with no lutein were clear.

Table III. Distribution of Protein and Lutein in Each Fraction of Varied Ion Concentration

Fraction	Protein distribution ratio (%)	Lutein distribution ratio (%)
0.1 M buffer-ppt	59.3	96.6
" -sup	40.7	3.4
0.05 M buffer-ppt	61.8	88.9
" -sup	38.2	11.1
0.01 M and 0.005 M-whole	100.0	100.0

0.2 ml of 0.012% lutein alc. solution was added to 2 ml of 1.276% protein solution, at pH 7.0.

が、その範囲で塩濃度が低いと沈澱へのルテイン分配率は低下する。この点をゲル濾過法によってさらに検討した。

0.95 cm × 25 cm の Sephadex G-25 カラムに上記複合体試料 2 ml をのせ 0.2 M 磷酸緩衝液, pH 8.0 を用いて溶出させた。Fig. 3 に 0.01 M 区, Fig. 4 に 0.05 M 区の結果を示す。いずれの場合もルテインはタンパク質と挙動を共にしている。0.01 M 区のゲル濾過における回収率はタンパク質が 100% であるが、ルテインのそれは 61.2% である。ゲル濾過時に少量のルテインがカラム上部に残存しており、このことは可溶化されているルテインの中にはタンパクと複合体を作らずに、subunit の形の複合体が会合を行う際に内部に抱き込まれているもののあることを示唆する。0.05 M 区のルテイン回収率が 42% と低いのは高塩濃度においてタンパクとルテインの相互作用が阻げられるかまたは前記の会合体に抱き込まれているルテインの多いことを示すものと考えられる。

次に Sephadex G-200 カラムによるゲル濾過を行ったが、この場合に前処理としてアズキタンパクのゲル濾

Fig. 3. Gel Filtration of the Complex Formed in 0.01 M Ionic Concentration with Sephadex G-25. Column, 0.95×25 cm. Elution solvent, 0.2 M phosphate buffer, pH 8.0. Protein recovery, 100%. Lutein recovery, 61%. Solid line shows protein (O.D.₇₅₀) and dotted line lutein (O.D.₃₉₀). 1 fraction, 2 ml.

Fig. 4. Gel Filtration of the Complex Formed in 0.05 M Ionic Concentration with Sephadex G-25. Experimental conditions were the same as Fig. 3. Protein recovery of ppt, 100%. Lutein recovery, 42.0%. Solid line shows protein and dotted line lutein. 1 fraction, 2 ml.

過による分別を行うと V_o の異なる 2 つのピークに分れる (Fig. 5). これを A, B として分取したのち, おのおのについてルテインを作用させたときの挙動の変化を見た (Fig. 6). 複合体生成は 0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.3 に溶解させたタンパク溶液 2 ml に 0.02% ルテインエタノール溶液 0.2 ml を加えて行わせている. A, B 共に複合体になったときの V_o はもとのタンパクのそれより小さく, 標準タンパク質を用いて Sephadex G-200 に

Fig. 5. Gel Filtration of Azuki C₃PPT Protein with Sephadex G-200 Column. 1 fraction, 7 ml. Column, 2.4 cm×37 cm. Elution solvent, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3.

Fig. 6. Gel Filtration of Protein A, B (both fractions in Fig. 5), Protein A-Lutein Complex and Protein B-Lutein Complex with Sephadex G-200. V_o of complexes were smaller than those of the corresponding proteins. Column, 0.95×25 cm. 1 fraction, 1 ml. Elution solvent, 0.5% triton X-100 in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. ○—○, protein; ●—●, complex; ●—●; lutein.

よるゲル透過を行ったときの推定分子量は A が 376,000, ルテインとの複合体が 507,000 となっている (Fig. 7). 複合体の K_{av} は締出し限界に近く確実なものではない. また B は K_{av} が分画範囲よりはるかに小さいため算出不能であった.

参考までに卵アルブミンとルテイン複合体の測定結果を掲げておく. OVA の分子量 45,000 に対し複合体のそれは 240,000 であった (Table VI の実験). なお複

Fig. 7. Determination of the Molecular Weight of Protein-Lutein Complex by Gel Filtration with Sephadex G-200. Standard protein were purchased from Boehringer-Manheim GmbH Biochemia. Mw of Azuki protein A-lutein complex was about 507,000, while that of protein A 376,000. Mw of OVA-lutein complex was 240,000 against 45,000 of OVA.

合体クロマトグラムにおいてはルテインピークはタンパクピークと常に一致している。

このゲル濾過実験によって、ルテインがタンパクと結合していること、およびルテインが結合することによって V_0 が小さくなること、すなわち複合体のみかけ分子量はもとのアズキタンパクよりも大きいということが確認された。

5. 界面活性剤の複合体生成への影響

ルテインとタンパク質が複合体を形成することは共沈現象、およびゲル濾過における挙動によって明らかである。この生成に際し、ルテインがタンパク質の非極性部分と疎水結合しているであろうと考えられるが、次にこの反応系に界面活性剤を加えて複合体生成に対する影響を調べた。界面活性剤には非イオン性 2 種、陰イオン性、陽イオン性各 1 種を用い、反応混合液中の最終濃度をいずれも 0.2% とした。混合方法は 0.1 M 磷酸緩衝液に溶かしたアズキタンパク質 (1.276%) 1 ml に 2.6% の界面活性剤 0.1 ml を加えて混合したのち、さらにルテインエタノール溶液 0.2 ml を加えるものである。

その結果 (Table IV), 陽イオン性活性剤はタンパクと共沈するためにルテインとの反応はできなかったが、他の 2 種の場合は複合体を作る。界面活性剤の存在下では複合体は沈澱せず、透明な着色溶液の状態であるので、そのままゲル濾過を行った。

Table IV. Recovers of Protein and Lutein for Gel Chromatography of Complexes Formed in the Presence of Detergents

Detergent	Protein recovery ^{a)} (%)	Lutein recovery (%)
None	99.7	67.5
SDS	89.7	34.1
CDBAC ^{b)}	—	—
Tween-80	96.4	90.5
Triton X-100	100.5	91.8

a) Whole protein of Azuki C_8^{ppt} was subjected. b) Cetyldimethylbenzylammonium chloride.

Table V. Effects of Urea and Guanidine on the Interaction between Lutein and Azuki Protein

Dissociating agent	Protein recovery ^{a)} (%)	Lutein recovery ^{a)} (%)
3 M Urea	99.3	15.0
5 M Urea	95.3	13.5
2 M Guanidine HCl	97.4	16.8
4 M Guanidine HCl	97.0	14.6

0.3 ml of 0.015% lutein alc. solution was added to 3 ml of each 2% protein solution containing each dissociating agent with the prescribed concentration.

a) Chromatographic recoveries with Sephadex G-200.

活性剤のパターンは対照区のそれと似ているが、タンパクと一緒に溶出するルテイン量が陰イオン性の場合に減少し、非イオン性の場合には逆に多くなっている。

このことから陰イオン界面活性剤はルテインのタンパクへの結合を妨げ、非イオン性活性剤は促進するということがわかる。これは供試タンパクの表面電荷が負であることから陰イオン活性剤と反発し合うということが考えられるが、それ以外にタンパク質の会合を陰イオン活性剤が阻止すること^(13,14)、およびルテインそのものを可溶化する能力の低いこと⁽¹²⁾がその理由として挙げられる。

6. 複合体生成に及ぼす尿素とグアニジンの影響

界面活性剤の場合と、同様にして解離剤である尿素とグアニジン高濃度溶液中で、どのような挙動を示すか調べた。混合液の解離剤濃度は尿素が 3 M と 5 M, グアニジン塩酸塩が 2 M と 4 M である。所定量の解離剤をメスフラスコに入れ、これにアズキタンパク溶液 3 ml を加えて溶解させた後、ルテインエタノール溶液 0.3 ml を加えた。外観的には、沈澱は生じず、少し乳濁した程

Table VI. Interaction between Another Protein and Lutein, and the Behavior in Gel Filtration with Sephadex G-25

Protein	Appearance of mixture	Recovery of protein (%)	Recovery of lutein (%)
Casein	Clear	95.8	78.0
Ovalbumin	Slightly cloudy	91.7	76.5
Soy protein 11 S	Clear	97.5	82.7

度であり、ルテインによる着色度も赤みが強い。この混合液を Sephadex G-25 を使ってゲル濾過を行った。その結果ルテインの大部分はカラムベッドに留まり回収率は低い、タンパクはほとんどが流出されている。

(Table V)。また G-200 ゲル濾過においては、Aピークが複合体となっていない状態で溶出することが認められる。このことからルテインとタンパクとの結合は尿素、グアニジン塩酸塩のいずれの解離剤によっても妨害されており、したがってルテインはタンパクの非極性部分に結合して、複合体を形成すると同時に会合を行なわせるということが出来る。

7. アズキタンパク以外のタンパク質とルテインとの相互作用

これまでは会合性タンパク質であるアズキタンパク C₃^{ppt} 画分のみを用いてルテインとの相互作用を調べたが、その他の種類のタンパクについてもゲル濾過法により同様の点を調べた。結果を Table VI に示す。カゼイン、卵アルブミンは比較会的会合性の弱いタンパクであるが、この結果からはアズキタンパクの場合よりも高率でルテインと結合し、可溶化していることが明らかである。このうち卵アルブミンが複合体になったときの分子量変化を Fig. 7 に示している。このことからルテインとタンパクとの結合性に対してはタンパク分子間の相互作用の強弱は関係がないようにみえる。

したがって上記のことから、会合タンパクの非極性会合部にルテインが入り込んで複合体を生成するというよりも、タンパク分子の表面にある非極性部にルテインが結合して、その結果タンパク複合体の会合が起ると考えるのがよいであろう。

ま と め

タンパク質とカロチノイドとの結合性を調べるためにルテインと数種のタンパク質との結合性について基礎的

研究を行った。アズキタンパク質水溶液にルテインのエタノール溶液を加えると直ちに複合体が形成され、沈澱を生じる。ルテインのタンパク質に対する量比が 8.8×10^{-3} までは加えたルテインはタンパクと完全に結合する。pH は沈澱性に影響を持ち、等電点付近では不均質な沈澱を生じており、これは複合体および供試タンパクそのものの混合沈澱である。それ以上の pH では均質な複合体が形成されるが、この複合体の分子量はルテインの多少によって変らず、ゲル濾過法により約 50 万と推定される。塩濃度は複合体形成に大きな影響を与えないようであるが、塩濃度が低いと複合体の沈澱が生じにくい。

界面活性剤の複合体生成に対する影響をみると、非イオン活性剤は複合体の生成を促進し、陰イオン活性剤はそれを阻害する。解離剤の尿素およびグアニジンはいずれも複合体形成を強く阻害している。

さらにアズキタンパク質以外の会合性のあまり強くないタンパク質について調べると、同様の複合体形成が認められる。

以上のことから、ルテインはタンパク質表面にある非極性部分に結合し、その際タンパクが会合を行うことによって複合体が形成されるものと考えられる。

- (1) A. Vlman, P. R. Vagelos and J. Monod: *B. B. R. C.*, **17**, 86 (1964).
- (2) M. E. Kirtley and D. E. Koshland, Jr.: *ibid.*, **23**, 810 (1966).
- (3) M. Burr and D. E. Koshland, Jr.: *Proc. N. A. S.*, **52**, 1017 (1964).
- (4) P. Cuatrecasas, H. Edelhoch and C. B. Anfinsen: *ibid.*, **58**, 2043 (1967).
- (5) S. Takashima: *Nature*, **169**, 182 (1952).
- (6) 高木茂明, 松上道雄: 農化, **51**, 489 (1977).
- (7) 高木茂明: 農化, **34**, 357, 930 (1960).
- (8) W. J. Wolf and D. A. Sly: *Cereal Chem.*, **44**, 653 (1967).
- (9) S. P. L. Sørensen, M. Z. Hørup: *Z. Physiol. Chem.*, **103**, 15 (1918).
- (10) 高木茂明: 岡大農学報, **44**, 44 (1974).
- (11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. L. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (12) 高木茂明: 岡大農学報, **43**, 75 (1974).
- (13) M. F. Emerson, A. Holtzer: *J. Phys. Chem.*, **71**, 1898 (1967).
- (14) J. A. Reynolds, S. Herbert, H. Polet and J. Steinhardt: *Biochem.*, **6**, 937 (1967).