UDC 577.17 : 547.92 : 591.111.1

262. 滝川 決男：ステロイドホルモンと血清蛋白の関係（第6報）

蛋白結合ステロイドの物理化学的性質（3）

Hiroo Takikawa: Interaction of Steroidal Hormone with Serum Protein.

VI. Physicochemical Properties of Protein-bound Steroids. (3).

(Endocrinological Laboratories, School of Medicine, Gunma University)

Effect of infrared or ultraviolet irradiation on the combination of steroidal hormones with bovine serum albumin or globulin was examined. Ultraviolet irradiation resulted in decreased amount of the combination, with decrease of 2nd wave and increase of 3rd wave in polarogram, both with serum albumin and globulin. Irradiation of infrared ray effected marked decrease of the 2nd wave and combination with steroid was almost nil. The effect of ultraviolet ray on the 3rd wave was greater than that of infrared ray while the effect of the infrared ray was greater on the 2nd wave. Serum albumin was found to be affected more than serum globulin. The steroid combined with serum albumin was not separated by ultraviolet ray but was separated by infrared ray, but when it was combined with serum albumin free steroid combined with serum albumin was produced by both ultraviolet ray (especially that in a shorter wave-length region) and infrared ray. The amount of steroid generated by ultraviolet irradiation increases with length of irradiation time but no periodical increase was observed by infrared irradiation.

(Received September 18, 1957)

紫外線或いは赤外線の照射により蛋白質が変性を受けることはよく知られているが、その変性の機構については赤外線では熱線による熱変性を伴い¹⁾、紫外線ではそれと異なる²⁾と云われている。血清アルブミンは熱によっても紫外線によつても凝固するが熱変性ではアルカリに可溶性の蛋白が得られるのに対して、紫外線変形は不可逆的であり³⁾、紫外線の照射により蛋白分子内の芳香族アミノ酸残基にエネルギーが吸収され⁴⁾隣接するペプチッド結合が切れ⁵⁾特に 253.7m μ では酵素作用の不活性化およびシスチン-S-S-結合の分解を生ずることが報告されている⁶⁾。ステロイドホルモンのうちでテストステロン、プロゲステロン、デスオキシコルチコステロン、コルチゾン等の所謂 α , β 不飽和ケトステロイドはいずれも 240m μ 附近に紫外吸収極大をもっているで、血清蛋白と incubate する際にこの附近の波長の紫外線を照射してこれが結合量におよぼす影響をしらべた。また卵白アルブミンのアゾ色素結合量は熱変性により増大し⁷⁾、血清アルブミンでは低下する⁸⁾といわれているので血清蛋白を赤外線照射して変性させた際に生ずる効果を実験しステロイドと血清蛋白の結合物の紫外線、赤外線照射に対する性質を吟味して知見を得たので茲に報告する。

牛血清 第2報⁹⁾、第3報¹⁰⁾に記した硫酸分劃法で正常牛血清から分離精製した血清アルブミン（電気泳動純度：99.8%）、血清グロブリン（電気泳動純度：96.2%）を使用した。

ステロイドホルモン 第2報⁹⁾ Table II に記したステロイドのうちから紫外部 240m μ 附近に吸収極大をもつテストステロン、プロゲステロン、デスオキシコルチコステロンおよびコルチゾンを使用した。

1) E. G. Young: Proc. Roy. Soc. B, 93 (1922).

2) M. A. Spiegel: Biochem. Z. **186**, 181 (1927).3) J. S. Mitchell, F. K. Rideal: Proc. Roy. Soc. A, **167**, 342 (1939).4) D. J. McLean, C. G. Arthur: J. Biol. Chem. **187**, 537, 543 (1951).5) M. Rotheram, N. Todd, S. L. Whitcher; Naturwissenschaften **39**, 450 (1952).6) B. S. Richard: Biochim. et Biophys. Acta **16**, 444 (1955).

7) F. Haurowitz: "Chemistry and Biology of Protein" 189 (1950).

8) W. Fisch, G. H. Miller, C. Huggins: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **72**, 558 (1949).9) 第2報：本誌 **78**, 1274 (1958).10) 第3報：本誌 **78**, 1280 (1958).

Incubation 0.05M 磷酸塩緩衝液 (pH: 8.02, μ : 0.14) に血清アルブミン, グロブリンをそれぞれ 60mg/cc 濃度に溶解して, これに各ステロイド結晶を別々に 1mg/cc 濃度になるように添加して, $36 \pm 0.2^\circ$ に48時間 incubate した. アルブミン, グロブリン各試料1本宛を対照として残し, その他はこれを2群に分けて赤外線, 紫外線を照射した.

i) 結合量に及ぼす影響

紫外線照射 紫外線ランプ (GL-15, 200W, $\lambda_{\max}$. 253.7m μ , efficiency 65%) を使用して 30cm の距離から 30 分毎に 10 分垂直方向から $15 \pm 3^\circ$ で点滅照射を48時間継続した. incubate 後各試料について遊離ステロイド量を第2報⁹⁾ に記した紫外吸収スペクトル法で定量し, 添加量から差引いて結合ステロイド量を算出した. Table I に示すようにステロイドの結合量は無照射の対照に比較して遙かに低い値を示している.

赤外線照射 赤外線ランプ (LH-250, 250W, $\lambda_{\max}$. 11 μ , efficiency 83%) を使用して 30cm の距離から 30分毎に10分垂直方向から $15 \pm 3^\circ$ で点滅照射し48時間継続した. 光源と試料の間に厚さ 1cm の流動パラフィン層をおきフィルターとして熱線を吸収除去した. incubate 後24時間で各試料溶液は白濁して凝固沈澱を生じた. 48時間後にエーテルを加えて振盪し遠沈して沈澱を除き, エーテル層から遊離ステロイド量を定量して結合量を算出した. Table I に示すようにステロイドとの結合はほとんど認められない.

Table I. Effect of Ultraviolet and Infrared Irradiation on the binding Amount of Steroid to Bovine Serum Protein (mg./g.)

Steroid	Ultraviolet Irrad.		Infrared Irrad.		Control	
	Albumin	Globulin	Albumin	Globulin	Albumin	Globulin
Testosterone	2.02	6.60	0.02	0.18	4.90	12.60
Progesterone	3.21	5.42	0.06	0.09	8.00	15.52
Desoxycorticosterone	1.59	4.12	0.03	0.15	3.72	15.60
Cortisone	4.36	6.51	0.05	0.12	14.50	15.32

ポーラログラフィー 紫外線および赤外線照射の影響をポーラログラフ蛋白波からしらべた. 各試料 0.1cc に 0.25N 塩化アンモン・0.01M 塩化コバルト・0.2N アンモニア混液 (4:1:5) を加えて 2cc として 15° , $m=3.69\text{mg/sec.}$, $S=1/50$ で $-0.8 \sim -2.0\text{volt}$ の加電圧で第2波および第3波の波高 (mm) を比較した. 無照射対照 (ステロイドと血清蛋白) の波高を H_0 , 照射対照 (血清蛋白のみ) の波高を H_{uv-0} (紫外線照射), H_{ir-0} (赤外線照射) 試料の波高を H_{uv} (紫外線照射), H_{ir} (赤外線照射) とし第2波を $H-2$, 第3波を $H-3$ として試料と各対照との波高の比 H_{uv}/H_0 , H_{uv}/H_{uv-0} , H_{ir}/H_0 , H_{ir}/H_{ir-0} を計算した. Fig. 1~Fig. 4 に示すようにいずれの場合にも $H_{uv-3}/H_0-3 \gg H_{uv-3}/H_{uv-0}-3 \approx 1$, $H_{uv-2}/H_{uv-0}-2 < H_{uv-2}/H_0-2 < 1$, $H_{ir-3}/H_0-3 \approx H_{ir-3}/H_{ir-0}-3 \approx 1$, $H_{ir-2}/H_0-2 \ll H_{ir-2}/H_{ir-0}-2 \approx 1$ の関係が成立する. 波高比が近似するものおよび1に近いものは図に記載を省略した.

Fig. 1. Changes of Polarographic Ratio during Infrared and Ultraviolet Irradiation

Fig. 2. Changes of Polarographic Ratio during Infrared and Ultraviolet Irradiation.

Fig. 3. Changes of Polarographic Ratio During Infrared and Ultraviolet Irradiation.

Fig. 4. Changes of Polarographic Ratio during Infrared and Ultraviolet Irradiation

ii) 結合物質に及ぼす変化

試料 実験 i) と同様な条件で48時間 incubate したアルブミンおよびグロブリン試料をエーテルで3回、クロホルムで1回遊離ステロイドを抽出除去し、5°で24時間攪拌しながら透析してその間に5回透析外液をとりかえた。内容液を真空凍結乾燥してから各 60mg/cc 濃度に蒸留水に溶解して各試料1本宛を対照とし、赤外線、紫外線照射の2群に分けて $15 \pm 1^\circ$ で 30cm の距離から垂直方向に10時間連続照射した。熱線吸収用の流動パラフィン層フィルターは使用しないで試料容器の外部から恒温水を還流して冷却し、試料温度を上記範囲内に保持した。

照射用光源 紫外線の光源としては実験 i) に記した紫外線ランプの他に高圧水銀灯 (SHL-200, 200W, $\lambda_{\max}$ 365m μ) を使用し、これに Jenaer Farb. filter ($\lambda_{\max}$ 365m μ), Corning filter No. 5543 ($\lambda_{\max}$ 375m μ , Cut off 350m μ) を組合せて 240~280m μ および 360m μ 附近の波長を照射した。赤外線の光源としては実験 i) に記した赤外線ランプの他にネルンスト・グロワーランプ (Beckman) を使用して、これに silica filter (透過長波長限界: 3 μ), quartz filter (透過長波長限界: 4 μ), LiF plate (透過長波長限界: 7 μ) および CaF₂ plate (透過長波長限界: 10 μ) を組合せて 3~4 μ , 4~7 μ および 7~10 μ の波長でそれぞれ10時間照射した。

ペーパークロマトグラフィー 照射直前および照射後 1, 3, 5, 10時間に試料および対照溶液を採取して遊離ステロイドをペーパークロマトグラムから検索した。東洋濾紙 No. 51 (2×40cm) を用いて一次元上昇法でリグロイン・ヘキサン・メタノール・水 (5:5:6:4) を溶媒系として展開し $32 \pm 1^\circ$ で実験した。各遊離ステロイドは三塩化アンチモン飽和酢酸溶液を噴霧して螢光反応により検出した。光源にはマツダ超高圧水銀灯を、フィルターに Jenaer Farb. ($\lambda_{\max}$ 365m μ) を使用した。紫外線照射アルブミン試料では短波長部 (240~280m μ) 長波長部 (360m μ 附近) とともに遊離ステロイドは検出されない。グロブリン試料では短波長部照射の場合に 3時間でプロゲステロン、デスオキシコルチコステロンが、5時間でコルチゾン、テストステロンが試料 (原点) から遊離して検出された。長波長部照射では10時間後にデスオキシコルチコステロンが僅かに検出されたが、その他の試料からは遊離ステロイドは検出されなかつた。赤外線照射アルブミン試料では 3~4 μ の波長照射で3時間後にコルチゾンが、5時間後にテストステロンが検出された。4~7 μ では各試料とも殆んど遊離ステロイドは検出されず。7~10 μ で5時間後にコルチゾン、テストステロンが検出された。グロブリン試料では 3~4 μ で5時間後にコルチゾンが、10時間後にテストステロンが検出され、4~7 μ では5時間後にプロゲステロン、デスオキシコルチコステロンが、10時間後にコルチゾン、テストステロンが検出された。7~10 μ では10時間後にテストステロン、コルチゾンが検出された。各遊離ステロイドの Rf 値および螢光反応の色調はコルチゾン (0.11, yellowish green), デスオキシコルチコステロン (0.25, pink), テストステロン (0.38, yellowish green), プロゲステロン (0.82, green) であつた。また原点には残留する試料アルブミン、グロブリンにより blue の螢光が見られた。次に遊離ステロイドが検出された各ペーパークロマトグラムにテストステロン、プロゲステロン試料には 0.2% *m*-ジニトロベンゼン・6*N* 苛性カリエタノール溶液を、デスオキシコルチコステロン、コルチゾン試料には 0.2% トリフェニルテトラゾリウムクロライド・2*N* 苛性ソーダ水溶液を噴霧して、100°, 1分間加熱してから塩化ビニール No. 11 のトリクロールエチレン溶液 (1:5) 中に浸し¹¹⁾、室温で乾燥して光電比色計で 525m μ のフィルターを用いて吸光度曲線を作製した。Fig. 5 に示すように遊離ステロイド量は紫外線 (240~280m μ) 照射したグロブリン試料では照射時間の経過にしたがつて増加しているが、赤外線照射した試料では各波長領域でアルブミン、グロブリン各試料ともに殆んど増加していない。吸光度の測定には各ペーパークロマトグラムの原点から下方 3cm の部分を blank とした。

考察 Engelhard¹²⁾ らは牛血清アルブミンに紫外線を照射すると -SH 基が増加することを指摘し、Wenig¹³⁾, Schmidt¹⁴⁾, Volkova¹⁵⁾ は血清アルブミンの方が血清グロブリンよりも紫外線の影響を受け易いと云っている。本実験でもボーラグラム第3波から Fig. 1~4 に示すように $H_{uv-3}/H_0-3 \gg 1$ の関係にあり、第

11) 滝川, 平木: 生化学 **28**, 449 (1956).

12) H. Engelhard, K. R. Eikenberg: Z. Naturforsch. **10**, 622 (1955).

13) K. Wenig O. Jirovec: Biochem. Z. **295**, 405 (1938).

14) H. W. Schmidt: Ibid. **306**, 167 (1940).

15) M. S. Volkova, A. G. Pasynskii: Biokhimiya **20**, 470 (1955) (C. A.).

Fig. 5. Paper Photochromatogram of Liberated Steroid during
Infrared and Ultraviolet Irradiation

3波は蛋白分子内の-SH基或いはこれに還元される-S-S-結合に基因する¹⁶⁾と云われているので、照射による-SH基の増加がみられた。これに反して第2波は $H_{uv}-2/H_0-2 < 1$ の関係にあり紫外線の照射により減少しているが、照射試料と照射対照の比($H_{uv}-2/H_{uv-0}-2$)も1より小さく照射試料と無照射対照の比($H_{uv}-2/H_0-2$)よりも小さいので、第5報¹⁷⁾ Fig. 3に示したようなincubationの結果ステロイドと結合したことによる第2波の減少が認められた。通常のincubationではincubate後24時間以内には第2波の減少が殆んどみられない(第5報 Fig. 3)のに対して、紫外線を照射した場合には12時間以内に急速に減少しているのでおそらくステロイドと結合を生ずる以前に蛋白の活性基が会合して結合能力が減少するものと考えられる。赤外線照射の影響は第3波には殆んどみられず($H_{ir}-3/H_0-3 \approx H_{ir}-3H_{ir-0}-3 \approx 1$)、第2波に著しく、その変化は紫外線の場合よりも大きい。したがってステロイドとの結合は殆んどみられない。短波長部(240~280m μ)の紫外線照射でグロブリン試料から遊離ステロイドが検出されたことは、その波長が α , β 不飽和ケトステロイドの吸収極大および血清蛋白分子内のフェニルアラニン、チロジン、トリプトファン等の芳香族アミノ酸残基の励起される波長に相当しているので、これらの基による結合の開裂が推定される。また赤外線照射の際に3~4 μ の波長領域でアルブミン、グロブリン試料から4~7 μ でグロブリン試料から、7~10 μ でアルブミン試料からステロイドが比較的短時間の照射で検出されているが、これらの波長はそれぞれ-OH, C=O, C-OHの振動帯を含んでいるのでそれらの基相互間の影響が考察される。

総括 ステロイドホルモンと牛血清アルブミンおよびグロブリンをincubateする際の赤外線、紫外線照射が結合量におよぼす影響と結合物質の赤外線、紫外線照射に対する性質をしらべた。1) 紫外線の照射により血清アルブミン、グロブリンともにポーログラム蛋白波の第2波の減少と第3波の増加がみられるがステロイドとの結合量は無照射の場合に比べて減少する。2) 赤外線の照射によりポーログラム第2波の著しい減少がみられ、ステロイドとはほとんど結合しない。3) ポーログラム第3波に対しては紫外線の影響の方が赤外線の影響よりも大きく第2波に対しては赤外線の影響の方が大きい。また血清アルブミンの方が血清グロブリンよりも紫外線、赤外線の影響を受け易い。4) 牛血清アルブミンと結合したステロイドは紫外線照射により遊離しないが、赤外線照射では遊離する。5) 牛血清グロブリンと結合したステロイドは紫外線特に短波長部の照射で遊離し、赤外線によつても分離する。6) 紫外線照射によるステロイドの遊離量は照射時間の経過に従つて増加するが、赤外線照射では経時的増加はみられない。

本研究の費用の一部は文部省科学研究助成費によつた。謝意を表する。

群馬大学医学部内分泌研究所

16) R. Brdicka: Collection **5**, 148 (1933).

17) 第5報: 本誌 **78**, 1291 (1958).