薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
86 (11) 1077~1081 (1966)

UDC 612.398.13 : 615.778.25-011

177. 寺田 弘：医薬品とタンパク質との結合に関する物理化学的研究
(第5報^{*1}) 水晶体タンパク質の分光滴定について

Hiroshi Terada : Physicochemical Studies on the Binding of
Chemicals with Proteins. V. Spectrophotometric
Titrations of Lens Proteins.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University^{*2})

In order to examine how the structures of α - and β -crystallins, the main proteins of lens cortex, change with pH, spectrophotometric titration of thyrosin group, considered to play an important part in the steric configuration of these proteins, was carried out in solutions of various ionic strengths (KCl), at 297 m μ . The titration curves were simple S-shape in both proteins, dissociation of thyrosin group in the proteins was the same, and hardly any difference was observed between the two proteins in dissociation characteristics. In the titration, however, some time-dependency was observed in β -crystallin regarding changes in absorbance, although such dependency was not observed in α -crystallin. The same result was obtained in 8M urea solution, indicating that β -crystallin has a structure less liable to undergo decoiling than α -crystallin. Dissociation of thyrosin group in both proteins was found to be unaffected by other dissociating groups or presence of potassium chloride, under any conditions.

(Received February 24, 1966)

水晶体皮質タンパク質中主要な水溶性タンパク質である α -crystallin, β -crystallin とメチルオレンジとの結合は Langmuir 型の式に従い、かつこれら両タンパク質の荷電に大きく影響をうけることが明らかになったのであったが、¹⁾ これら両タンパク質の荷電と pH 値との関係を明らかにする目的で前報において両タンパク質の酸、アルカリによる滴定曲線を描きあわせて酸性領域における両タンパク質の構造を研究した。²⁾ 本報においては、さらにタンパク質の解離状態および立体構造に重要な役割を果していると考えられるチロジン基の解離の研究を α -crystallin, β -crystallin についておこなった。チロジン基の解離は 290 m μ 付近において、この基特有の吸収が認められることを用いて吸光度の変化より研究することができ現在までに卵アルブミン、³⁾ リボヌクレアーゼ、⁴⁾ ヘモグロビン、⁵⁾ など数多くのタンパク質について研究がなされているが、 α -crystallin, β -crystallin についてはまだ研究がなされていない。またこれらタンパク質に対する尿素の影響もあわせて研究した。

理論および方法

チロジンの OH 基は pH 8.5 以上の pH 領域で解離し、その際解離した phenoxide ion は未解離のものよりも吸収スペクトルは長波長側に移行し 293 m μ 付近に新しい吸収をしめし、この吸光度を測定することによりチロジンの定量をおこなうことができる。⁶⁾ タンパク質中のチロジン基の解離についても同様の方法により研究することができる。³⁾

いまチロジン基が未解離状態におけるタンパク質の比吸光係数を E_0 とし、全てのチロジン基が解離したときのタンパク質の比吸光係数を E_∞ 、ある pH 値におけるタンパク質の比吸光係数を E とすると、タンパク質に存在するチロジン基のある pH 値における解離度 α は (1) 式より求めることができる。

*1 第4報：本誌，86，849 (1966)。

*2 Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 中垣，古賀，寺田：本誌，86，447 (1966)。

2) 中垣，古賀，寺田：本誌，86，849 (1966)。

3) J. L. Crammer, A. Neuberger : Biochem. J., 37, 302 (1943)。

4) D. Shugar : Ibid., 52, 142 (1952)。

5) J. Hermans : Biochem., 2, 453 (1963)。

6) T. W. Goodwin, et al. : Biochem. J. (London), 40, 628 (1946)。

$$\alpha = (E - E_0) / (E_{\infty} - E_0) \quad (1)$$

α を種々の pH 値について求めることによりチロジン基の滴定曲線を求めることができる。

前報において、水晶体皮質タンパク質中主要な水溶性タンパク質である α -crystallin (α -c), β -crystallin (β -c) における解離基の解離は他の解離基などにより影響をうけることが明らかになったが、その際 (2) 式が用いられる。

$$\log \frac{r}{n-r} = -m \text{ pH} + \frac{\log e}{RT} (-\Delta\mu_{\text{H}^+}^0 - \psi F) \quad (2)$$

ここで n はタンパク質 1 g. 当りの全チロジン基の数であり, r はある pH 値における未解離状態のチロジン基の数であって

$$(n-r)/n = \alpha \quad (3)$$

の関係を有する. m はチロジン基に対する H^+ 結合の他解離基からの影響をしめす係数であって, 他解離基からの影響がまったく認められない場合には $m=1$ の値とする. また $\Delta\mu_{\text{H}^+}^0$ は H^+ のタンパク質に対する結合親和力であり, ψ はタンパク質の表面電位, F は Faraday 定数である。

実験結果および考察

屠殺直後のウシ眼球より前報にもちいたと同じ方法によって等イオン α -c, β -c を得て, これを試料とし 20° でそれぞれのタンパク質の紫外吸収スペクトルをタンパク質のチロジン基が未解離であると考えられる pH 6.9 とすべてのチロジン基が解離したと考えられる pH 12.7 において画き, 両者の差スペクトルをあわせて記したのが Fig. 1, 2 である。

Fig. 1. Absorption Spectra of α -crystallin of pH 6.9 and pH 12.7 [A] and Their Difference Spectrum [B]

Fig. 2. Absorption Spectra of β -crystallin of pH 6.9 and pH 12.7 [A] and Their Difference Spectrum [B]

これから明かなようにチロジン基の解離によって生じる phenoxide ion の吸収は α -c, β -c においてともに $297 \text{ m}\mu$ に λ_{max} を有している. したがって両タンパク質におけるチロジン基の解離を (1) 式にもとずき種々のイオン強度 (KCl), 20° で $297 \text{ m}\mu$ において測定した. 各タンパク質におけるチロジン基の解離度 α ならびに比吸収係数 E と pH 値との関係を Fig. 3, 4 にしめす. なお pH 値は CO_2 不含の $0.1N \text{ KOH}$ で定めたが, この際

KOH 添加以後時間による吸光度の変化は α -c においてはいずれの pH 値でも認められなかったが、 β -c においては全てのイオン強度において pH 10.7 付近より pH 12.2 付近の範囲にわたり時間の経過とともにいずれも吸光度が増大し、この変化は 1 次反応式に従った。これより反応開始時 ($t=0$) の吸光度を求め、これを Fig. 4 に記した。また吸光度の変化が認められなくなったとき ($t=\infty$) の E ならびに α の値を $\mu=0.2$ についてもあわせて記した。このように β -c においてある pH 域で吸光度は時間によって変化するが、 α -c においては時間依存性が認められないことは α -c において phenoxide ion の出現による構造上の変化はただちに生じるが、 β -c においては徐々に起こることをしめしていると考えられる。なお β -c において pH 12.2 以上で時間依存性が認められないのは高 pH 域で β -c の構造変化が直ち

Fig. 4. Spectrophotometric Titration Curves of β -crystallin at a Wave Length of 297 m μ

- : in $\mu=0.05$ solution (time=0)
- ◐: in $\mu=0.10$ solution (time=0)
- : in $\mu=0.20$ solution (time=0)
- : in $\mu=0.20$ solution (time= ∞)
- ⊙: back titration
- : in 8M urea solution

Fig. 3. Spectrophotometric Titration Curves of α -crystallin at a Wave Length of 297 m μ

- : in $\mu=0.05$ solution
- ◐: in $\mu=0.10$ solution
- : in $\mu=0.20$ solution
- : back titration ($\mu=0.2$)
- : in 8M urea solution

に生じるためであると考えられる。

Fig. 3, 4 よりあきらかなように α -c, β -c のチロジン基の解離は単純な S 字型の曲線を書いており、ともに解離に対するイオン強度の影響はほとんど認められない。このことは両タンパク質の酸、アルカリ滴定においてアルカリ性領域では KCl の濃度が解離にほとんど影響を与えないという結果と一致する。²⁾

α -c においてチロジン基は pH 9.5 以上より解離を開始し (E_0 : 2.12×10^3), pH 12.5 付近で解離可能な全てのチロジン基の解離が終了しており (E_∞ : 5.84×10^3) みかけの pKa は 11.20 である。この際の E の変化は 3.72×10^3 である。 β -c においては pH 9.2 付近より (E_0 : 2.96×10^3), pH 12.5 (E_∞ : 7.62×10^3) の間でチロジン基の解離がおこなわれており、みかけの pKa も 11.15 であって α -c とほぼ同じ値であるが、 E の変化は 4.66×10^3 であり α -c よりもかなり大きな値をしめしている。

以上のことより α -c, β -c では例えばリボヌ

クレアーゼ⁷⁻⁹⁾ 中のチロジン基のように2つの異った解離性を持つものとは異り、全て解離性の等しいチロジン基よりなっているものと考えられ、両タンパク質間の差も解離性に関しては認められない。両タンパク質におけるチロジン基の状態が等しいとすると1g. 当りのチロジン基の含有量は β -cの方が α -cよりも大であることがわかる。

$\mu=0.2$ における α -c, β -c 溶液をそれぞれ pH 12.6 にして 30 分放置後、これを HCl で逆滴定した結果もあわせて Fig. 3, 4 に記した。 α -c においては全体として KOH による滴定曲線よりも E は大きな値をしめしているが pH 10.1 付近以下では KOH による滴定曲線よりも小さな値をしめしている。この逆滴定曲線によるチロジン基のみかけの pK_a は 10.55 と先の結果よりも小さな値をしめしている。このことは変性に際してチロジン基の周囲の環境に変化が生じたことに起因しているものと考えられる。

Fig. 5. Time Dependence of Change in Specific Absorption Coefficient $[E]$ of α - and β -crystallin at 297 $m\mu$ in 8M urea solution [A] and Rate of change of ΔE with Time for β -crystallin [B]

尿素変性タンパク質のチロジン基の解離は Fig. 3, 4 に他の滴定曲線とあわせ記した。尿素溶液中における滴定曲線は溶媒効果等の吸収スペクトルにおよぼす影響が水溶液の場合と異っているので、水溶液における滴定曲線の場合と全く同一にとりあつかうことはできないが、^{8,10)} α -c の場合には逆滴定曲線とほぼ一致したものが得られ、8M 尿素溶液中では完全に変性しているものと考えられる。しかし β -c においては一致せず、滴定、逆滴定の場合の中間の値をしめした。このことは 8M 尿素溶液中において β -c は完全には変性されないことをしめしているものと考えられる。これらのことは滴定、逆滴定において同型の滴定曲線を描き reversible であるとされている α -キモトリプシン¹¹⁾ などとは異った態度を α -c, β -c ともにしめしていることがわかる。

このような態度をしめすアルカリ性領域においてチロジン基は他解離基からの静電的な影響を受けずに解離

295 $m\mu$ においてリボヌクレアーゼのチロジン基 1 個当りの分子吸光係数の変化は 2630 であり、血清アルブミンでは 2430 とタンパク質により異っている。⁷⁾ この差はチロジン基のタンパク質中における状態の相違に起因するものと考えられる。 α -c の逆滴定曲線において認められる中性付近の E の低下、みかけの pK_a の減少は変性した α -c を逆滴定によって native な状態に回復させようとした場合、これが十分に回復することができないことに起因しているものと考えられる。 β -c における逆滴定曲線は高 pH 域では $t=\infty$ の曲線とほぼ一致しておりみかけの pK_a 値は 10.45 である。 β -c においても変性されたものは native な状態には完全に回復しないことがわかる。

次に α -c, β -c の尿素溶液中における態度を研究し、297 $m\mu$ における吸光度の時間による変化を測定した。この結果を Fig. 5 にしめす。

8M 尿素溶液中において α -c はただちに E の減少がみられ変性の際の時間依存性が認められなかったが、 β -c においては認められた。この β -c の変化は Fig. 5 より明らかなように 1 次反応式に従った。この尿素変性に対する各タンパク質の態度はアルカリによる変性の際の態度と一致する。この

7) C. Tanford, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., **77**, 6409 (1956).

8) O. Olga, *et al.*: Arch. Biochem. Biophys., **76**, 97 (1958).

9) C. Y. Cha, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., **82**, 54 (1960).

10) 今西: 蛋白質, 核酸, 酵素, **9**, 58 (1964).

11) B. H. Hausteen: J. Am. Chem. Soc., **84**, 448 (1962).

することが考えられるが、これを明らかにする目的で (2) 式にもとずき α -c, β -c の $\log \frac{r}{n-r}$ と pH との関係を $\mu=0.2$ の滴定, 逆滴定の場合について Fig. 6, 7 に記した。

Fig. 6. Plot of Data of α -crystallin According to Equation 2

○ : $\mu=0.2$ solution
● : back titration

Fig. 7. Plot of Data of β -crystallin According to Equation 2

○ : in $\mu=0.2$ solution (time=0)
● : back titration

これから明かなように α -c, β -c とともにいずれの場合についても H^+ 結合におよぼす他解離基からの影響をしめす定数 m は 1 であり, 滴定, 逆滴定の際には $(-4\mu^0_{H^+} - \psi F)$ に関する差異が存在することが明らかになった。すなわち α -c, β -c においてチロジン基が解離する際には, 他解離基からの影響や, 酸性領域において認められた Cl^- の影響²⁾ が認められず, タンパク質間, もしくは変性の度合による解離性の差異は, その状態におけるタンパク質中のチロジン基固有の性質によるものであることがわかった。

以上の結果から α -c, β -c は変性の際に異った態度をしめすほか, 両者の間に差はほとんど認められず, 各タンパク質中におけるチロジン基の解離性は全て等しく, その解離には共存 KCl やタンパク質中の他解離基からの影響をうけないことが明らかになった。

実 験 の 部

1. 試 料 a. 水晶体皮質タンパク質：前報²⁾と同様の方法を用いて α -c, β -c をウシ水晶体皮質より得て Lowry¹²⁾の方法にしたがい定量を行なった。

b. 塩化カリウム：メルク社製分析用試薬の塩化カリウムを使用した。

c. 水酸化カリウム：市販試薬特級の水酸化カリウムを Armstrong¹³⁾の方法でもって精製し, CO_2 不含の 0.1N 水酸化カリウム溶液 (f: 0.988) を調整し, フタル酸水素カリウムを用いて標定を行なった。

d. 塩酸：市販試薬特級の塩酸を希釈して 0.15N 塩酸溶液 (f: 1.109) をつくり, これを使用した。塩酸の標定は炭酸水素カリウムを滴定して行なった。

e. 尿素：市販試薬特級の尿素を用時調整して使用した。

2. 分光滴定 0.049% のタンパク質溶液 (各 KCl 溶液) 11 ml. をとり, これを Metrom 社製 Dosimat, E412 電動ビュレットを用いて 0.1N KOH (f: 0.988) で滴定し 297 m μ における吸光度を測定した。吸光度の測定は Hitachi Photo-Electric Spectrophotometer Epu-2 を用いた。逆滴定, 尿素溶液中における滴定もこれに準じて行なった。

本研究に際し終始御指導下さった本学 中垣正幸教授, 種々御教示下さいました第一製薬 古賀直文博士に深甚の謝意を表します。

京都大学薬学部

12) O. H. Lowry, *et al.*: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).

13) A. Albert, E. P. Serjeant: イオン定数, 21 (1962) 丸善株式会社。