

氏名・（本籍）	えび 蝦 名 な 惠 さとし
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 615 号
学位授与年月日	昭和54年11月28日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和47年3月 東北大学大学院理学研究科 (修士課程)生物学専攻修了
学位論文題目	蛋白質比濁定量法の分子論的検討
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦 教 授 樋 渡 宏 一 助 教 授 四 釜 慶 治

論 文 目 次

第一章	序 論
第二章	比濁法の生化学的検討
一節	序
二節	材料及び方法
三節	結果
第三章	芳香族スルホン酸類及び塩化酢酸類の非極性基の疎水の性質… Serum albumin との相互 作用の考察
一節	序
二節	材料及び方法
三節	結果
第四章	考 察

一節	結果の考察
二節	応用
第五章	要 約
	謝 辞
	引用文献

論文内容要旨

第一章 序 論

現在、主に尿蛋白質及び髄液蛋白質を対象として用いられている蛋白質定量法の一つである Sulfosalicylic acid (SSA) 及び trichloroacetic acid (TCA) による比濁法は、沈殿剤あるいは蛋白質の種類により、その定量値に差があることなど、いくつかの問題点が指摘されてきた。尿蛋白質については、SSA が TCA よりも高い濁度をあたえるという理由から SSA を用いた例が多いが、低分子量の蛋白質が主体であると思われる尿蛋白質の中には、SSA よりも TCA に、より鋭敏なものもあると報告されている。しかしながら、広い種類の蛋白質については、比濁法の検討はなされておらず、したがって比濁法の分子論的考察も皆無である。

本論文は、SSA を含む芳香族スルホン酸類及び TCA 及び dichloroacetic acid (DCA) の塩化酢酸類による種々の蛋白質の濁度を詳細に検討し、上述の諸問題点及び沈殿剤と蛋白質との相互作用と濁度の発現に分子論的検討を加えたものである。

第二章 比濁法の生化学的検討

蛋白質の諸性質と得られる濁度との関連性を検討した。用いた蛋白質は、lysozyme, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, α -chymotrypsinogen A, pepsin, ovalbumin, serum albumin, γ -globulin, fibrinogen, apo-myoglobin, 及び S-S 結合還元処理を施した serum albumin である。濁度は上記蛋白質の 0.5 mg/ml 溶液 1 ml に沈殿剤溶液 4 ml を加え、日立 101 型光電比色計で波長 500 nm にて測定した。沈殿蛋白質の定量は Lowry 法によった。また、光学顕微鏡による沈殿蛋白質の観察も行なった。

SSA 及び TCA による濁度の沈殿剤添加後の放置時間への依存性を調べたところ、濁度は放置時間によって変化することがわかった。同様に温度依存性を調べたところ、温度によって著しく異なることがわかった。そこで本実験では濁度はすべて放置時間 20 分、温度 20°C にて測定した。次に広い種類の蛋白質について比濁を行なったところ、濁度は蛋白質の種類によって著しく異なることがわかった。すべての蛋白質の濁度は、沈殿蛋白質量が一定であるにもかかわらず沈殿剤特に TCA の濃度によって異なった値を示した。光学顕微鏡下に於ける観察から、高い濁度を示す沈殿蛋白質は脱水状態にある黒色粒子からなり、一方低い濁度を示す沈殿蛋白質は水を多量に含む白色粒子からなることが明らかとなった。

上述の濁度の沈殿剤濃度依存性は、SSA では単峰性、TCA では二峰性を示した。TCA で得られる濁度の第一極大値は、SSA の場合の最大値と同様に蛋白質の種類による差が大きく、その値は被検蛋白質の分子量とは無関係で、主に等電点に支配されることが明らかとなった。しかし、

S-S結合還元処理をしない serum albumin は例外で, S S Aにより極めて高い濁度を示し, 一方S-S結合還元処理は serum albumin のこの様なS S Aに対する高い感度を著しく低下させた。Serum albumin のこの様な高い感度はS S Aのほか, 2-naphthalenesulfonic acid (NSA), toluenesulfonic acid (T S A)でもみられたが, D C Aでは観察されなかった。

T C Aで得られる濁度の第二極大値は, 蛋白質による差が小さく, すべての蛋白質で高い値を示した。同様の効果はD C Aによってもみとめられ, むしろT C Aよりも顕著であった。第二極大値での蛋白質と沈殿剤との相互作用は第一極大値での等電点依存性の相互作用以外のものを含み, その結果同一の蛋白質及び沈殿剤であるにもかかわらず第一極大値での沈殿と異なった沈殿が形成されるものと考えられる。

第三章 芳香族スルホン酸類及び塩化 酸類の非極性基の疎水的性質

… Serum albumin との相互作用の考察

前章で述べた, S-S結合還元処理をしない serum albumin が, S S Aなどで示した特異的に高い濁度の分子論的機構を探る目的で, 芳香族基及び塩化メチル基の疎水的性質を次に述べる二つの方法で比較検討し, さらに serum albumin とこれらの沈殿剤との間の疎水性相互作用の相違を考察した。

用いた第一の方法は, 水環境と疎水環境とで吸収スペクトルが異なる色素 pinacyanol の変色を利用して環境を知る方法である。日立 256 型光電比色計を用いて, 各種沈殿剤中の pinacyanol の吸収スペクトルを測定した。第二の方法は, 各種沈殿剤の希薄水溶液の電気伝導度からイオンとイオンの近傍の水分子との相互作用を知る方法である。

その結果, N S A, T S A, T C A及び benzenesulfonic acid (B S A)の非極性基の疎水性相互作用力はN S A > T S A > B S A > T C Aの順であり, T C Aの三塩化メチル基は疎水性相互作用力が極めて小さいことが pinacyanol を用いた実験から明らかとなった。一方, 電気伝導度の濃度依存性及び無限希釈度に於けるモル伝導度から, 塩化酢酸類 (monochloroacetate, dichloroacetate; trichloroacetate) 及びメチル酢酸類 (iso-butyrate, trimethylacetate) の非極性基の疎水性の定量化を試みたところ, 塩素基はメチル基とは van der Waals 容積が殆んど等しいにもかかわらず, その疎水性相互作用力はメチル基のものよりも極めて小さいことが明らかとなった。これらの結果から, 塩素基の疎水性相互作用は, 同程度の van der Waals 容積をもつ炭化水素基の疎水性相互作用よりもかなり弱く, かつ質的にも異なっていると結論された。したがって, 塩素基を含む非極性基と蛋白質の疎水部分との間の疎水性相互作用力は, 炭化水素生非極性基と蛋白質の疎水部分との間のものよりも著しく弱いものと考えられる。

第四章 考 察

温度、沈殿剤添加後測定までの時間、被検蛋白質の種類及び沈殿剤の種類、濃度などの諸要因は、いずれも蛋白質の濁度に強く影響を及ぼす。これら諸要因が一定の条件下では、比濁法の定量性及び再現性は良好であった。また、従来比濁法の沈殿剤として広く用いられてきたSSA及びTCAは、広い蛋白質を対象とした場合には必ずしも適当でないと結論された。

蛋白質の濁度を定める沈殿剤—蛋白質間相互作用について以下の分子論的考察を加えた。芳香族スルホン酸類及び塩化酢酸類いずれの場合も、はじめに沈殿剤アニオンが蛋白質の正電荷に吸着され、一方プロトンは蛋白質の負電荷に吸着される。その結果、高い等電点をもつ蛋白質は沈殿剤アニオンを多量に吸着する為、生じる沈殿は高度に脱水化されたものとなり、光の透過率は低い。一方、沈殿剤アニオンを少量しか吸着しない低い等電点をもつ蛋白質由来の沈殿は、水を多く含む光の透過率の高いものとなる。即ち、SSA及び低濃度のTCAによる濁度は主に被検蛋白質の等電点で決まると結論された。ただし、被検蛋白質が serum albumin の時は、芳香族スルホン酸アニオンの非極性基と serum albumin 表面の疎水領域との間に疎水性相互作用が生じ、その結果これらアニオンは極めて容易に serum albumin に吸着され、高い濁度を生じるものと考えられる。塩化酢酸アニオンの場合には、serum albumin でも低い濁度しか発現しない。その理由の一つとして、沈殿剤アニオンと相互作用をする serum albumin 表面領域の疎水性は、芳香族基の疎水性と質的に等しいが、塩化メチル基の疎水性とは異なっていることが指摘できた。塩化酢酸類は高濃度では、イオン型 ($R-CO_2^-$) の蛋白質正電荷への静電的吸着に加えて、未解理型 ($R-COOH$) が、カルボキシル—ペプチド及び側鎖カルボキシル間水素結合により吸着される。そのため低等電点蛋白質の塩化酢酸低濃度域における濁度は、高濃度域で増加する。

これらの考察は、芳香族スルホン酸—DCA混液は、尿蛋白質のスクリーニング法試薬として、現在一般に用いられているSSA及びTCAよりも、広い蛋白質に応用するという点で、更にすぐれたものである可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

本研究は、芳香族スルホン酸類および塩化酢酸類による蛋白質の濁度発現を詳細に検討し、沈殿剤による蛋白質濁度発現の分子論的解析を試み、さらに蛋白質定量の簡便法として用いられている比濁法に使用する沈殿剤の改良を指摘したものである。

本研究に用いた蛋白質は 11 種で、分子量 14,000 dalton から 34,000 dalton, 等電点は 1.0 から 11.1 までの広い範囲にわたるよう選択している。

まず、沈殿蛋白質量が同じでも、その濁度は沈殿剤濃度で異なり、スルフosalチル酸 (SSA) 濃度に対しては単峰性、トリクロロ酢酸 (TCA) に対しては二峰性を示すことと観察している。また濁度の SSA による最大値および TCA での第一極大値は蛋白質による差が大きく、その値は蛋白質の分子量に依存せず、等電点に支配されること、TCA による第二極大値は蛋白質による差は少なく、高い値を示すことを明らかにしている。SSA および低濃度 TCA による濁度と、高濃度 TCA による濁度を示す沈殿の状態は異なり、前者は抱水状態、後者は脱水状態の沈殿であることを光学顕微鏡で観察している。

次に低濃度 TCA では濁度が低いにもかかわらず、SSA で高い濁度を示し、S-S 架橋還元により、この SSA による高い濁度を示す性質を失う、ウシ血清アルブミンの濁度発現機構を解明すべく、沈殿剤の非極性基の疎水性相互作用力を検討している。まず、pinacyanol の吸収スペクトル変化を与える沈殿剤の濃度域を測定し、pinacyanol と三塩化メチル基間の疎水性相互作用は芳香族基間とのそれよりも弱いことを明かにし、また電気伝導度の濃度依存性およびモル伝導度から塩化酢酸類とメチル化酢酸類の疎水性の定量化を試み、えられた結果から塩素基はメチル基と van der Waals 容積が殆んど等しいにもかかわらず、その疎水性相互作用力はメチル基より小さく、また質的にも異ると結論している。

以上の実験結果に基づき、沈殿剤による蛋白質の濁度発現機構につき考察している。

まず、沈殿剤の静電的吸着による沈殿形成と濁度の強度の関係を論じ、TCA による濁度の二峰性は沈殿剤の静電的吸着に加えて非解離型 TCA の水素結合での蛋白質への吸着によると説明している。また、SSA で例外的に高い濁度を与えた血清アルブミンについては、芳香族スルホン酸と血清アルブミン表面の疎水領域間の疎水性相互作用により、沈殿剤が容易に吸着されるためであり、この血清アルブミン表面の疎水領域は塩化メチル基のとは性質が異なるため、塩化酢酸では低い濁度しか与えないと考察している。

また、これらの研究結果から、広い種類の蛋白質に対しては、芳香族スルホン酸とジクロロ酢酸の混液が比濁法の沈殿剤として有効であろうと示唆している。

以上の論文内容は、沈殿剤による蛋白質濁度発現機構の解明さらに、蛋白質沈殿剤として汎用されているトリクロロ酢酸による蛋白質沈殿生成機構の解明に重要な知見を与えるものであり、提出

者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって蝦名恵提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。