

タンパク質の熱変性と界面活性剤

—界面活性剤の新規な機能—

竹田 邦雄・森山 佳子

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

(2017年10月6日受付、2017年12月4日受理)

1. はじめに

ギリシア語で“主要な”という意味の *proteios* が、日本語でタンパク質という英語の *protein* の語源になったそうである。タンパク質は、骨格や筋肉をはじめ内臓から皮膚・毛髪など生命体の多くの部分を構築している。ある種のタンパク質が酵素の機能をもち、酵素もタンパク質である。タンパク質は、このように生物の生命維持において主要な働きをしている。

さて、“熱変性”はよく知られたタンパク質の特性の1つである。極端な例ではあるが、卵をゆでるとその白身が白く固まることはタンパク質の熱変性の例としてよく取り上げられている。タンパク質は変性すると、その本来の機能をなくし、その役割を果たせなくなる。タンパク質の変性は熱だけでなく、他の要因によっても起こる。どういう要因で引き起こされようと、タンパク質は変性すると、天然の状態をとっている構造が大なり小なり変わり、その機能を失うわけである。

界面活性剤も、他の変性剤に比べ3ケタくらい低い濃度で、タンパク質の構造を壊すことが明らかになっている¹⁻¹¹⁾。ところが、界面活性剤がタンパク質の構造を他の要因による変性から保護するように作用することがあり¹²⁾、最近著者らはこの界面活性剤の保護作用に注目している。

本稿では、まず著者らが数年前から取り組んでいる水溶液状態のタンパク質を100℃以上まで加熱したときの構造変化を紹介し¹³⁻¹⁸⁾、タンパク質の変性における可逆性の問題について検討する。以下で具体的に述べるように、加熱後冷却したときのタンパク質の構造の完全な回復は、限定的な低い温度範囲でしか見られない。限定的な低い温度範囲で見られる構造の回復は、変性に可逆性があることを意味するものではない。残念ながら、タンパク質の変性は可逆的平衡にあるとして長年考えられ、そういうモデルで議論されて来ているが、決してそうではない。この否定は、これまで想定されていたタンパク質の変性のメカニズムに重大な問題を投げかけるものである⁸⁾。

続いて、熱変性のみならず、尿素変性からもタンパク質の構造を界面活性剤が保護する現象を紹介する。読者の理解を深めるために、まずタンパク質と界面活性剤について簡単に説明する。

2-1. タンパク質

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合という化学結合でつながった“ポリペプチド”と呼ばれる鎖である(アミノ酸の並ぶ順番をタンパク質の一次構造と呼ぶ)。多くのタンパク質は、大体数百個のアミノ酸がつながったものである。タンパク質の多様性は、20種類のアミノ酸がどういう順番で何個並ぶかによって可能になっている。

タンパク質の構成単位であるアミノ酸は、化学式では $H_2N-CHR-COOH$ と表記され、R (residue: アミノ酸残基の意味) の箇所が 20 種類変わる。この箇所の違いによって、水に溶解易いアミノ酸も水に溶けにくいアミノ酸もある。この R 部分は、一番単純なのは $-H$ で、2番目に単純なのは $-CH_3$ であるが、中にはやや複雑なものもある。アミノ酸は、 H_2N -部分の H と他のアミノ酸の $-COOH$ の部分の OH が水分子 H_2O になってとれて結合する(脱水縮合)。この結合をペプチド結合と呼び、アミノ酸は何個でもつながることができる。その結果、アミノ酸 $H_2N-CHR-COOH$ は $-HN-CHR-C=O-$ の形になってつながっている。アミノ酸の化学式の表記上 3 つのブロックになっている $H_2N-CHR-COOH$ の両端の共通するブロックはペプチド結合に使用する。唯一アミノ酸によって異なる中央のブロックの $-CHR-$ の R がアミノ酸の、またこれらがつながったポリペプチドすなわちタンパク質の特徴や機能を決定することになる。各タンパク質にこういうアミノ酸がどういう順番で何個並ぶかのルールは各生物の DNA に保存されている。そのルール通りに各生物の各部分に最適に作られたタンパク質が、生体中で有効に働き、生命を維持している。

このようなタンパク質は、その分子の各部分で規則的だったりランダムだったりする構造(タンパク質の

二次構造と呼ぶ)をとっている。規則的な二次構造では、 α -ヘリックス構造(以下では単にヘリックス構造とする)と呼ばれる右巻きのラセン構造が、測定できる信号強度も強く、種々の研究で二次構造の指標になっている。ヘリックス構造は、タンパク質のポリペプチドを構成するアミノ酸残基 -HN-CHR-C=O の -C=O (元 -COOH の CO 部分)の O と別のアミノ酸残基の -N-H (元 H_2N -の H が1つはずれたもの)の H の間に水素結合と呼ばれる弱い静電的相互作用(引っ張り合い)をしている。この水素結合をすることによって、タンパク質のヘリックス構造は3.6個のアミノ酸の並びでらせん状に1回転するように形成されている。この水素結合は、氷の中の水分子 H_2O の H と O と周りの水分子 H_2O の O と H の間で規則的に形成されているものと同じである。タンパク質のヘリックス構造というと、何かしっかり構築されている感じを受けるが、決してそうではなく、その骨格は化学結合の中でも弱い方の水素結合で作られている。

誰でも知っているように、氷の中の水分子の水素結合は 0°C で切れ、氷は液体の水になる。液体状態の水分子は瞬間的な水素結合を不規則に繰り返し、全体として弱い相互作用をしているが、 100°C になるとまわりの水分子同士は相互に何の関わりももたない気体になる。タンパク質のヘリックス構造を形成する水素結合は、室温や体温付近では切れたりしないが、高温になると“どこまで”切れるか? 100°C になったら完全に切れるか?は、非常に興味深い。これが、著者らがタンパク質の高温の熱変性にとりかかった動機でもある。

タンパク質は、その各部分でヘリックス構造のような規則的な二次構造や不規則な構造をとりながら、それぞれ固有の全体的な立体構造(三次構造と呼ぶ)をとり、その機能を発揮している。

2-2. 界面活性剤

界面活性剤は、水に溶けやすい親水性の部分と水に溶けにくい疎水性の部分をもつ化合物である。「水に溶ける、溶けない」と簡単に言っても、上で簡単にふれたように“水”は水で独特の性質をもつ物質である。水に溶けるということは、この水の特徴とうまく付き合えることが条件である。水の特徴は、まずは H_2O の H と O がそれぞれ弱いプラスとマイナスの電荷を帯びていることである。ごく微量の電荷をもつ水のような溶媒を“極性溶媒”と言う。こういう“水”に対して、“油”は、界面活性剤の疎水基に当たる部分と同じ炭素と水素だけから成る炭化水素鎖で、電荷をもたず、“非極性溶媒”と言う。親水性と疎水性の両方の性質を分子内にもつ界面活性剤は、固体・液体・気体のいずれか、または液体同士、固体同士が接触す

る界面で特徴的な挙動をし、界面活性剤と呼ばれている。界面活性剤のことを、英語でsurfactantと言う。これは、surface active agent(表面で活発な物の意味)のアンダーラインの部分をつないだ造語と言われ、界面活性剤の特徴をよく表している。極性溶媒にも非極性溶媒にも溶ける性質を強調して、界面活性剤は両親媒性物質とも呼ばれることもある。このように、界面活性剤は他の化合物や化学的物質とは明らかに違う性質・機能をもっている。

界面活性剤の特徴の最たるものの1つは、親水性か疎水性かどちらの性質が強いかで、水の中でも油の中でも会合体を形成することであろう。水の中の会合体はミセル(micelle)と呼ばれ、油の中の会合体は逆ミセル(reverse micelle)¹⁰⁾と呼ばれる。

家庭の洗濯などに使う石けんなど、つまりそういう類の界面活性剤は、親水性の方が強い。界面活性剤の水的な性質が強ければ、たしかに水にはよく溶けるが、界面活性剤の1つひとつの分子(多くの界面活性剤の水的な部分はイオン化していて、それを界面活性剤イオンと呼ぶ)の状態でも溶けるわけではない。疎水的な部分をもっているため、界面活性剤の1つひとつがばらばらに水に溶けるのは限界があり、モノマー状態で分散し溶けているのは界面活性剤が極めて低濃度においてだけである。それがなぜ水には大量に溶けるかということ、大体50から100前後の数の界面活性剤イオンが集まったミセルを形成して溶けるからである。

このミセルは、界面活性剤の極めて薄い濃度から作られる。界面活性剤のミセルは、水に溶けない油のような部分を内側に、水に溶け易い部分を外側にして、多くの場合球状に形成される。ミセル表面には、親水基の電荷が並び、プラスかマイナスの電荷をもつ大きなイオンの状態である。このようなミセルが、微量のプラスとマイナスの電荷をもつ水分子に取り囲まれ、水に溶けている。水分子に取り囲まれたイオンを“水和イオン”と言うが、ミセルも水和イオンと似た“水和ミセル”になりうるからよく溶けるのである。

界面活性剤がミセルを形成し始める濃度を臨界ミセル濃度(critical micelle concentration、略してCMC)と呼ぶ。この濃度を境に、どの界面活性剤溶液の性質も大なり小なりいろいろ変化する。

界面活性剤は、薬品、化粧品、食品などの製造業はもとより、はた目にはちょっと想像できないようないろいろなものの製造過程で実際使われている。界面活性剤は、洗剤やシャンプーなどの製品では主役であるが、製品になったらその主役にはならないが、多くの製品の製造過程で黒子的に重要な役割をしている。

さて、今も昔も界面活性剤として“研究”にもっともよく使われている代表的なものと言えば、ドデシル

硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate) で、通称 SDS である。本稿でも、界面活性剤としては SDS を使った結果を紹介する。

3. タンパク質の熱変性

タンパク質の変性の現象は、タンパク質に尿素やグアニジンなどの変性剤を加えたり、その溶液の pH を変えたりしても観察される。変性剤による場合、それらの溶解度ぎりぎりまで高濃度の条件でタンパク質を変性させるので溶液の調製は大変であるが、通常室温付近の一定の温度で測定するので装置の使用上の問題はあまりない。一方、タンパク質の熱変性は、タンパク質溶液の温度を変えて測定するだけで、溶液の調製上の問題はなく、普通の装置で 70℃ から 80℃ くらいまで温度を上げて従来行われていた。水溶液状態のタンパク質を扱い、水の蒸発を考慮すればこの辺の温度が限界であろう。しかし、タンパク質の熱変性はこの辺の温度領域では十分には起こっていないと著者らは考え、装置にも工夫してタンパク質水溶液を 100℃ 以上の温度まで加熱して最近検討するようになった。実際、以下に述べるように、タンパク質の熱変性を 100℃ 以上の温度まで観察して、熱による影響は 70℃ や 80℃ までの温度領域では中途半端にしか起こっていないことが明らかになった。

著者らが最近研究したタンパク質の高温までの熱変性による二次構造変化の結果を 2 つ示す。測定は、溶液状態のタンパク質の二次構造決定にもっとも信頼性が高い円偏光二色性 (circular dichroism: CD) 法¹⁹⁻²³⁾で行っている。図 1 は、ヒト血清アルブミン (HSA) の結果である¹⁸⁾。血清アルブミンは生体内でいろいろな物質を運ぶ輸送タンパク質で²⁴⁾、人体でその役割を担う HSA はタンパク質の研究でしばしば対象に選ばれ

ている。図 1 は、上述した二次構造の中でも典型的な規則的な構造であるヘリックス構造の含量の温度上昇に伴う変化を示す。ヘリックス構造含量は、CD スペクトルのカーブフィッティング²⁵⁻²⁸⁾によって求めたものである。この構造の含量は 50 から 100℃ にかけて著しく減少し、すなわちこの構造が壊れることを示している。興味深いことは、130℃ に加熱してもヘリックス構造は残っていて、この構造を構築している水素結合が完全には壊れていないことである。図 1 は、種々の温度 (横軸の温度) で加熱後、25℃ に冷却したときのヘリックス構造の含量も示す。45℃ 以下の温度での加熱後は、冷却すると元の含量まで回復している。しかし、50℃ を越えて加熱後は、冷却しても元の含量までは回復せず、加熱温度が高くなるにつれ回復の程度は低くなっている。

図 2 は、ヘリックス含量が HSA より高いタンパク質であるミオグロビンの熱変性の結果である¹⁵⁾。このタンパク質のヘリックス構造は、80℃ までは徐々に少ししか壊れないが、80 から 100℃ にかけて急激に壊れる。従来熱変性で測定されていた 70~80℃ の温度では、HSA のヘリックス構造は熱変性で壊れるはずの半分程度しか壊れず、ミオグロビンのそれはほとんど壊れていない。70 や 80℃ での熱変性では、HSA は熱変性の進行の途中であり、ミオグロビンの場合は本格的な熱変性は起こっていないことが明らかである。

ミオグロビンを熱変性後 25℃ に冷却したときも、先の HSA とは違いが見られる。75℃ までの加熱後は冷却するとヘリックス含量は回復し、つまりヘリックス構造は完全に元通りに再形成され、このタンパク質の構造は加熱に対するかなり強い耐性をもっている。

熱変性で、HSA とミオグロビンの二次構造は、このようにそれぞれ 50 と 75℃ 付近の温度を超えると大き

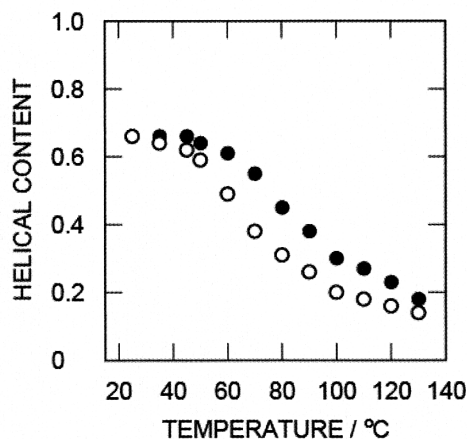


図 1. 種々の温度 (横軸の温度) における HSA のヘリックス構造含量 (○) と種々の温度で加熱後 25℃ に冷却したときの含量 (●)¹⁸⁾。

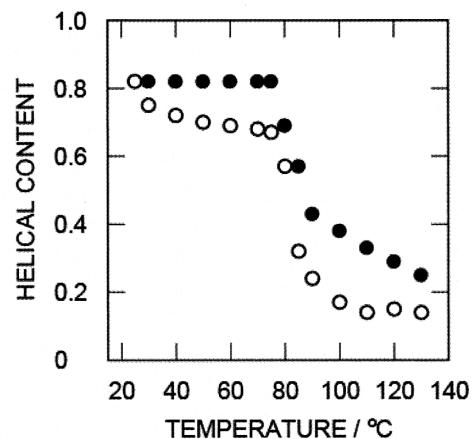


図 2. 種々の温度 (横軸の温度) におけるミオグロビンのヘリックス構造含量 (○) と種々の温度で加熱後 25℃ に冷却したときの含量 (●)¹⁵⁾。

く変化する。S-S 架橋を全くもたず、三次構造をほぼ疎水性相互作用によって形成・維持しているミオグロビンの二次構造の高い柔軟性・耐熱性に驚く。このタンパク質はヘム基を内包し、可視部のソーレー帯と呼ばれる特性波長域で独特の吸収スペクトルを示す。ミオグロビンの近紫外域からソーレー帯の吸収スペクトルも、温度上昇に伴ってかなり変化するが、75℃以下の熱変性後 25℃に冷却すると元のスペクトルにもどり、その温度以上で熱変性後はもどらない。ミオグロビンは、二次構造のみならず、ヘム周囲を含む三次構造も 75℃という高い温度まで冷却すると元通り回復する¹⁵⁾。

他のタンパク質の熱変性も検討している¹³⁻¹⁷⁾。いずれのタンパク質の場合も、図1と2から分かるように、100℃を越えてもヘリックス構造はまだわずかに壊れ続けるが、130℃でもヘリックス構造は完全には壊れない。すなわち、この構造を形成し維持している“そう強くないはずの水素結合”が 100℃でもすべては完全には切れないことを示している。

4. タンパク質の変性のメカニズム

一般的にタンパク質の変性や構造変化の研究は、天然状態のタンパク質の構造 (native から N 状態) と変性したときの構造 (denatured から D 状態) の間の



のような化学反応式にした化学平衡を想定して行われている。この平衡は“2 状態転移 (two-state model)”と呼ばれたりもしている。タンパク質の三次構造が立体的には折りたたまれていることに主眼をおいて、N の代わりに folding の F、D の代わりに“ほどけた”という意味で unfolding の U を使う表現も最近 20 年くらいはしばしば見られる。また、中間体 D' を想定して、



と表す反応モデル (three-state model) もある。中間体を想定しても、スタートの N とゴールの D は変わっていない点に注意すべきである。このようなモデルを使って、タンパク質の変性や構造変化は半世紀以上に渡って議論されて来ている²⁹⁾。しかし、このようなモデルや考え方には以下のような問題がある^{8, 18)}。

N=D のように表す化学平衡というのは、この反応に関与する化学種として一定の N と一定の D のみが存在し他の化学種は存在せず、両向きの矢印で反応は左右どちら向きにも可逆的に進行することを表している。

言うまでもなく、簡単に N=D と表記しても、N 状態と D 状態はタンパク質によってみな違う。N 状態の方の構造はそのまま測定すればいいから簡単に知ることができ、N 状態は一定である。しかし、D 状態の方は何

で“どこまで”変性させるかによって同じタンパク質でも違ってくる。熱変性においても、N 状態は多くの場合常温で、大体研究上は 25℃で、得られるが、D 状態はある温度以上では温度によって違う (例えば図1、2)。50℃で熱変性したときと 100℃で熱変性したときと D が同じであるはずがない。変性剤を使ってタンパク質を変性させても、変性剤濃度によって D 状態は異なる。だから、①N=D の D 状態は一定ではない。この点だけ注目しても、どの程度の温度まで熱変性させるか、どの程度の変性剤濃度まで変性させるかを考慮に入れず、温度や変性剤濃度に関わらず一定の D を想定した N=D のようなモデルでタンパク質の変性や構造変化を議論することには無理がある。

また、N=D の平衡を想定する限り、増減はあっても N と一定の D は常に存在していることが条件である。例えば 100℃で熱変性したとき、この想定は、変性前には 25℃の N²⁵ に混じって 100℃で変性した D¹⁰⁰ が共存し、100℃では D¹⁰⁰ に混じって N²⁵ が共存すること、25℃と 100℃の間の温度では N²⁵ と D¹⁰⁰ の割合が変化することを前提にしている。しかし、②25℃で N²⁵ に混じって D¹⁰⁰ が共存したり、100℃で D¹⁰⁰ に混じって N²⁵ が共存したりするとは考えられない。また、100℃で熱変性したときに、途中の 50℃などで熱変性したときの D 状態を中間体 D' として経由するかも甚だ疑問である。一方、界面活性剤によるタンパク質の変性において、界面活性剤濃度が高いほど、タンパク質の構造は壊れる¹⁻¹¹⁾。しかし、高濃度の界面活性剤でタンパク質の構造が壊れるとき、低濃度の界面活性剤濃度で壊れる構造を経由しないことを、著者らは速度論的に明らかにしている^{6, 8, 28, 30-36)}。熱変性においても、すべてタンパク質の構造はそれぞれの温度での D 状態へ変化していると考えの方が自然であろう。

さらに、③そのような D 状態に対して N=D の化学平衡は果たして成り立っているかも甚だ疑問である。上述したように、ある温度以上の熱変性で壊れたタンパク質のヘリックス構造は、冷却しても一部しか再形成しない。再形成するのは一部であって、変性温度が高くなるにつれ、冷却によって再形成するヘリックス構造の割合は本来のものより低くなっていく。この熱変性後の冷却で構造が一部回復する現象は、一定の温度・圧力下で成立する化学平衡における逆反応とは全く違う。従って、タンパク質の変性は逆反応があるような化学平衡にあるとは考えられない。

長年タンパク質の変性や構造変化が N=D の化学平衡をモデルとして議論されてきた一因は、タンパク質の再生実験^{37, 38)}が注目をあびたことにあると思われる。タンパク質の再生は、熱変性なら冷却によって、変性剤による変性なら変性剤濃度の希釈によって、pH によ

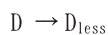
る変性なら pH を多くの場合中性に変えることによって行われる。タンパク質や酵素の再生実験は、Anfinsenらのリボヌクレアーゼの4つのS-S架橋の切断後条件の緩和による再結合^{37, 38)}が先駆的な役割をしたと思われる、彼らの実験は多くの生化学の教科書でも紹介されている。このような変性条件の緩和によって、タンパク質のS-S架橋に限らず構造等が一部でも回復すれば、定性的には再生していると研究者は評価する。一方、タンパク質の高次構造は、一次構造とどういう関係にあるかが興味をもたれるようになった。タンパク質を構成するアミノ酸が順次つながっていく途中の段階ではどういう構造をとり、その構造が一次構造の完成時にいかに最終的な構造に変わるのか、興味は尽きない。タンパク質の一次構造が二次、三次構造をいかに決定づけるかに関連させても、タンパク質の再生実験は現在でも盛んに行われている。

表現の問題でしかないが、この再生実験において変性条件の緩和によって変性した状態や構造が元のそれらに近づく現象が“可逆的 (reversible) である”とされてきている。条件の変化によってタンパク質の構造や機能が再生することに“可逆性 (reversibility) がある”とも表現されてきている。しかし、この再生実験で見られる可逆性は、化学平衡における可逆反応とは明確に使い分けるべきであった。再生実験における条件の緩和による“再生”と変性における“可逆性”や“逆反応”は、これからでも明確に区別されるべきである。そもそも変性の“可逆性”や“逆反応”は、多くの条件下で存在しないであろう。

どういう要因によるタンパク質の変性や構造変化であろうと、その要因によって決まるD状態に向かってNは変化する、すなわち



が起り、逆反応はないと考えるべきであろう。また、タンパク質の再生は、変性要因の緩和によって、D状態からより変性の程度が低いD_{less}への変化、



または



が起り、これらの逆反応もないと考えた方が自然であろう^{1, 6, 8, 18, 31, 32)}。

5. タンパク質の熱変性に対する界面活性剤の影響

界面活性剤とタンパク質の相互作用、さらにその中で界面活性剤のタンパク質の構造への影響は長年研究されて来ている^{1-8, 31-36, 39-43)}。これらの研究は、他の影響を受けていない、天然状態のタンパク質に対して行われて来ている。他の影響を受けている、非天然状態のタンパク質に対する界面活性剤の影響を最初に検討

したのはDugganとLuck¹²⁾であろう。彼らは、HSAを含む尿素溶液の粘度上昇をSDSが抑制する現象を基に、SDSがこのタンパク質の構造を保護すると1948年に論文を発表している。しかし、彼らが粘度測定によって見出した現象はその後ほとんど注目されることはなかった。その後も、界面活性剤とタンパク質の相互作用の研究には、相変わらず天然状態のタンパク質だけが依然使われ続けて来ている。著者らは、DugganとLuckの時代にはなかったCDを用いて、この現象を検討して来ている。その都度、DugganとLuckの論文¹²⁾は引用し、タンパク質の尿素変性^{44, 45)}と熱変性¹³⁻¹⁸⁾に対するSDSの保護効果等をつっ込んで検討して来ている。

ここでは、一例として、熱変性によるHSAの二次構造変化に対するSDSの保護効果を図3に示す¹⁸⁾。この図は、60~130℃におけるHSAのヘリックス構造含量のSDS濃度依存性でもある。図中の点線は、25℃におけるHSAのSDS変性によるヘリックス構造含量の変化で、このタンパク質のヘリックス構造は25℃で一部壊れ、66%あった含量は50%まで減少する。従って、ある程度以上の温度では、熱変性とSDS変性の両方の影響によってHSAのヘリックス構造は壊されるはずである。ところが、この図に見られるように、25℃でSDS変性がほとんど起こらないSDS低濃度でヘリックス構造の崩壊がある温度以下では抑えられている。例えば、70、80℃でSDSが共存しないとヘリックス構造含量は36~39%まで減少するが、わずかのSDSが共存すると含量は60%程度に維持されている。これらの温度でも、SDS濃度がさらに高くなるとヘリックス構造含量は減少し始め、SDSはこの構造を壊し、SDS変性が起きている。

熱変性で90℃以上になると、ヘリックス構造含量は

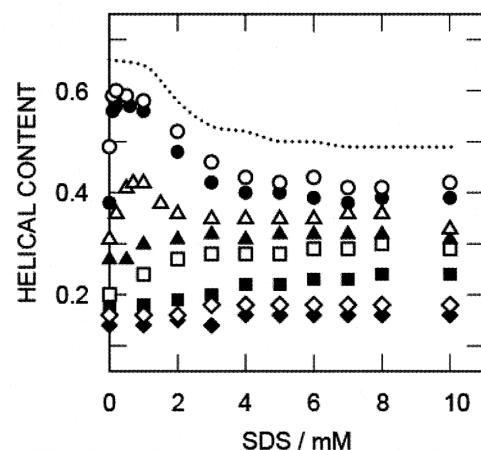


図3. 種々の温度 (○: 60℃, ●: 70℃, △: 80℃, ▲: 90℃, □: 100℃, ■: 110℃, ◇: 120℃, ◆: 130℃) におけるHSAのヘリックス構造含量に対するSDSの添加効果¹⁸⁾。点線は25℃でのSDS変性を示す。

SDS濃度の増加に伴い単調に徐々に高くなり、低濃度のSDSで保護効果は見られない。100℃では、20%まで減少していたヘリックス構造含量はSDS 6 mM以上では30%付近まで増加する。つまり、一定濃度以上のSDSが熱変性で壊れるヘリックス構造を保護するように働いている。

常温におけるSDS変性で、一般的にヘリックス構造含量の高いタンパク質のヘリックス構造は壊すが、ヘリックス構造含量が低いタンパク質にはヘリックス構造を形成する¹⁻¹¹⁾。90℃以上では、熱変性で壊れたHSAのヘリックス構造に対して後者のパターン¹⁸⁾の効果が現れているとみることできる。しかし、120、130℃になると、SDSによるヘリックス構造を形成する効果はほとんどなくなる。これらの高温では、SDSがタンパク質にほとんど結合できず、その間の相互作用自身がほとんどできていないと思われる。

図4は、60~130℃までの温度で熱変性後25℃に冷却したときのヘリックス構造含量を示す¹⁸⁾。SDSが共存しないとき、60、70℃に加熱後冷却してもヘリックス構造含量は元にはもどらない(図1)。しかし、0.5 mM以下のSDSの共存下では、これらの温度で加熱後冷却するとほぼ元の含量まで回復している。この傾向は、回復の程度は小さくなるが、80、90℃でも見られる。100℃以上の加熱後は、低SDS濃度での顕著な回復は見られないが、SDS濃度の増加に伴い回復の程度は徐々に大きくなる。SDS 3 mM以上では、100℃以下の温度で加熱後冷却すると25℃におけるSDS変性程度のヘリックス構造含量付近に落ち着いている。

図5に、60、70、80℃におけるSDS濃度1 mM以下の添加効果の様子を拡大したものを示す¹⁸⁾。HSA濃度10 μM

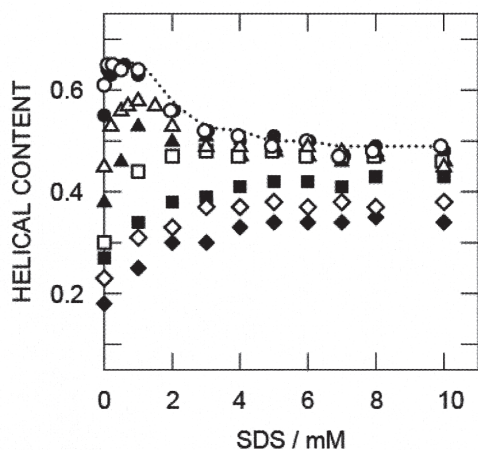


図4. 種々の温度(○: 60℃、●: 70℃、△: 80℃、▲: 90℃、□: 100℃、■: 110℃、◇: 120℃、◆: 130℃)での加熱後25℃に冷却したときのHSAのヘリックス構造含量に対するSDSの添加効果¹⁸⁾。点線は25℃でのSDS変性を示す。

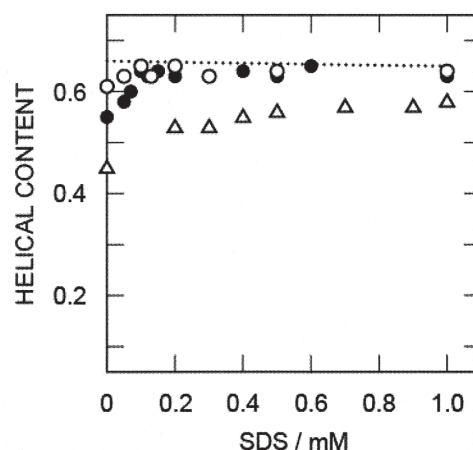


図5. 60℃(○)、70℃(●)および80℃(△)での加熱後25℃に冷却したときのHSAのヘリックス構造含量に対する低濃度のSDSの添加効果¹⁸⁾。点線は25℃でのSDS変性を示す。

に対して、60、70℃では0.1 mM付近の濃度のSDSの共存によって、80℃では0.7 mM付近のSDSの共存によって最大の保護効果を発揮している。ヘリックス含量が最大に保護されるとき[SDS]/[HSA]のモル混合比は、60、70℃ではおよそ10 mol/mol、80℃では70 mol/molである。モル混合比は、あくまで混合比で、高温でDSイオンの結合がどの程度進行するかは不明である(多分、高温の界面活性剤単独系でのミセルの存在もCMCも不明)。上でもふれたが、温度が高くなるほどタンパク質への界面活性剤の結合量は室温付近に比べると格段に少なくなるとと思われる。

熱変性におけるSDSの保護効果と比較するために、25℃で尿素変性したHSAに対するSDSの保護効果を図6に示す⁴⁵⁾。SDSの影響の仕方は、3つの尿素濃度領域に分けられる。

1つは、尿素濃度3 M以下で、この領域では、いわゆるSDS変性が尿素濃度に無関係に起こっている。尿素変性に対するSDSの保護効果の測定は、濃いリン酸緩衝溶液^{44, 45)}を使用し、図3-5に点線で示した25℃でのSDS変性が低いSDS濃度で起こっている。2つ目は、尿素濃度4 Mから8 Mの領域で、低SDS濃度でSDSの保護効果が現れる。3つ目は、尿素濃度9 Mである。

2つ目の尿素濃度領域では、熱変性に対してと同じく1 mM以下のSDS濃度で、この界面活性剤はHSAのヘリックス構造を保護している。全体的に、HSAに対するSDSの混合比10~30 mol/molで、タンパク質の構造を保護する。特に、尿素7M以下では、天然のヘリックス含量をSDSの混合比10 mol/mol以下で完全に保護している。一方、3つ目の尿素9 Mでは、SDSの濃度の増加に伴いヘリックス含量が増加している。この傾向は、高温の熱

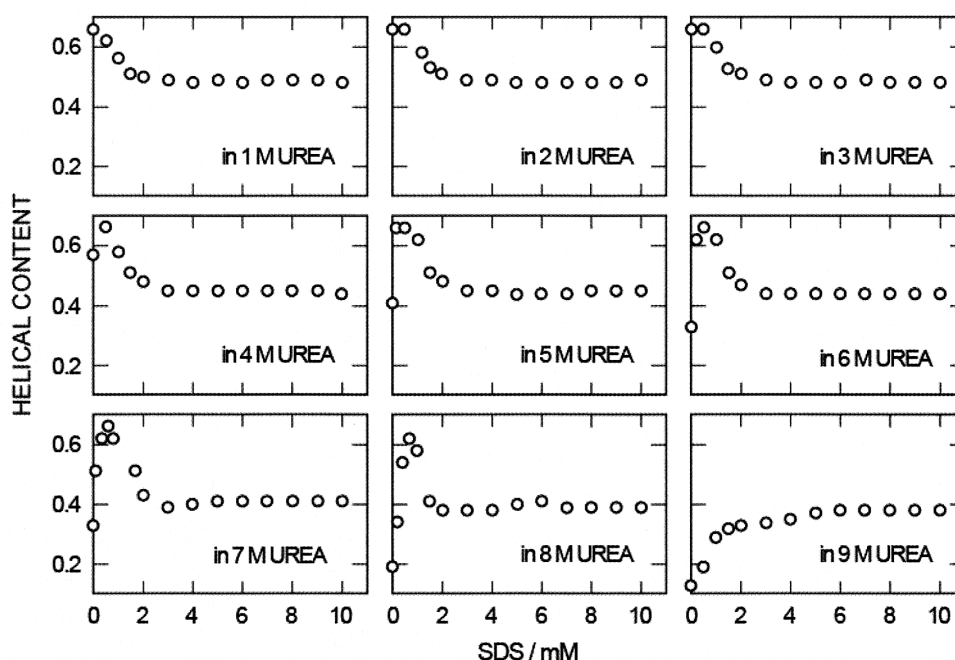


図6. 25°Cで尿素変性したHSAのヘリックス含量に対するSDSの添加効果⁴⁵⁾。尿素自身の影響は、3 M以下では見られない。

変性に対しても見られている(図3)。尿素9 M中や高温では、先に述べた一般的にヘリックス含量の低いタンパク質に対するSDS変性と同じ効果が現れている。

以上は、尿素変性する前のHSAにSDSを添加した場合の結果である。一方、同じ量のSDSを尿素変性したHSAに後から添加すると、ヘリックス構造を再形成する効果^{44, 45)}も見られる。再形成するヘリックス構造の含量のSDS濃度依存性は、保護する場合の図6の結果と同じである。

タンパク質のポリペプチド鎖は、大なり小なり部分的にヘリックス構造をとり、全体としては球状になるように折りたたまれている。HSAもミオグロビンも、分子内にヘリックス構造をあちこちで形成し、多くのヘリックス構造部分は対を成している。上述の効果が現れる混合比でHSAやミオグロビンに対してSDSが共存しても、各ヘリックス構造部分あたりに実際に相互作用しているDSイオンの数は限定的であると思われる。HSAの場合、部分的なヘリックス構造を、その長さは違うが、大体20箇所ととっている^{46, 47)}。これらのタンパク質内で多くのヘリックス構造部分は対を成して並行に並んでいる。従って、以上のような効果を引き起こすSDS濃度から推定すると、1対のヘリックス構造の組み合わせあたりに存在するDSイオンは計算上1~2個くらいである。

タンパク質には、プラスに荷電した側鎖をもつアミノ酸残基だけでなく、マイナスに荷電した側鎖をもつアミノ酸残基も同じくらいあり、陽イオン性界面活性

剤にも同じような効果が期待できる。しかし、これらのタンパク質のヘリックス構造を保護したり再形成したりする効果は、陽イオン性界面活性剤によっては見られず、陰イオン性界面活性剤によってのみ起こる⁴⁴⁾。

陰イオン性のDSイオンは、モノマー状態で親水部と疎水部をうまく活用して、ヘリックス構造を保護したり再形成したりしていると考えられる。著者らは、対になって並行に並ぶヘリックス構造部分の一方のプラスに荷電した側鎖をもつアミノ酸残基にDSイオンのマイナス電荷をもつ親水基が静電的に相互作用し、もう一方の対を成すヘリックス構造部分にある疎水性側鎖をもつアミノ酸残基にDSイオンの疎水基が疎水的相互作用することによって、並行に並ぶヘリックス構造部分の間に架橋し保護あるいはヘリックス構造の形成をするのではないかと考えている^{10-18, 44, 45)}。

6. おわりに

タンパク質をある温度以上で熱変性させると、その構造は冷却しても元にはもどらない。本文で議論したように、タンパク質の変性を可逆平衡で扱うことは無理である。一方で、SDS変性を起こさない微量のSDSが共存すると、本稿でタンパク質の典型的例としてとりあげたHSAをある温度以下で加熱したとき、そのヘリックス構造がほぼ保護される。ある温度以下で加熱後冷却したとき、微量のSDSが共存するとヘリックス構造が再形成される。尿素変性したHSAに同じく少量のSDSを添加するとヘリックス構造が保護されたり再形成さ

れたりする。これらの再形成は、タンパク質の変性が可逆平衡にあることを意味するものでは決していない。

この新規な界面活性剤の機能を、本稿の後半で紹介した。この界面活性剤の興味深い機能は、前述したように、DugganとLuckが粘度測定を基に発見し1948年に初めて論文発表¹²⁾はしたものだが、その後半世紀ほとんど注目されずに来てしまっていた。著者らは、この現象に二次構造の変化で迫り、以上のような具体的な掘り下げはしたと思っている。もちろん、さらに別の角度からの研究も待たれることは言うまでもない。

界面活性剤は、分子内に親水部と疎水部をもつ典型的な両親媒性物質である。両親媒性物質が、生体中にも種々存在し、それらが会合し細胞膜を構成していることはよく知られている。しかし、ここで述べて来たタンパク質に対する界面活性剤の保護効果や構造を再形成する効果は、界面活性剤イオンがモノマー単位で発揮しているとは考えられない。

水にも溶け油にも溶ける両親媒性物質である界面活性剤が、会合しないで、モノマー単位で未だ人間が気づいていない機能を生命体の中で発揮し、生命の維持に貢献している可能性もあるのではないだろうか。希薄な界面活性剤水溶液の実験は、種々の制限があり測定法も限られるが、界面活性剤の物性、タンパク質の構造についての新たな知見を得るためにさらなる研究が期待される。

参考文献

- 1) 竹田邦雄, “蛋白質や合成高分子のコンフォメーションは界面活性剤溶液中で実際どう変わるのか—*Conformational Changes of Proteins and Synthetic Polymers in Surfactant solutions; Conformational Analysis and Kinetics*”, 表面, 23, pp.351-368 (1985).
- 2) 竹田邦雄, “界面活性剤によるタンパク質の高次構造の変化”, 生物物理, 30, pp.1-4 (1990).
- 3) 竹田邦雄, 森山佳子, “イオン性界面活性剤が見せるタンパク質構造の保護と再形成”, 表面, 42, pp.1-10 (2004).
- 4) 竹田邦雄, 森山佳子, “界面活性剤とタンパク質の相互作用”, オレオサイエンス, 11, pp.3-10 (2011).
- 5) K. Takeda, Y. Moriyama, and K. Hachiya, *Interaction of protein with Ionic Surfactant (part 1): Binding of Surfactant to Protein and Protein Fragments and Conformational Changes Induced by Binding*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2558-2574 (2002).
- 6) K. Takeda, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Interaction of protein with Ionic Surfactant (part 2): Kinetics of Conformational Change of Protein Induced by the Binding of Surfactant; Dynamics of Protein-Surfactant Complexes; Interaction of Protein with Reverse Micelles*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2575-2592 (2002).
- 7) K. Takeda, and Y. Moriyama, *Comment on the Misunderstanding of the BSA-SDS Complex Model: Concern about Publications of an Impractical Model*, J. Phys. Chem., B 111, 1244-1245 (2007).
- 8) K. Takeda, and Y. Moriyama, *Kinetic Aspects of Surfactant-Induced Structural Changes of Proteins—Unsolved Problems of Two-State Model for Protein Denaturation*, J. Oleo. Sci. 64, 1143-1158 (2015).
- 9) 竹田邦雄, “界面活性剤によるタンパク質の構造変化—界面活性剤とともに40年余”, 岡山理科大学紀要, 50 A, pp.13-22 (2014).
- 10) 竹田邦雄, 森山佳子, “界面活性剤の逆ミセル中におけるタンパク質の構造—逆ミセルに可溶化した水(water pool)の異常性”, 岡山理科大学紀要, 51 A, pp.31-40 (2015).
- 11) 竹田邦雄, 森山佳子, “界面活性剤によるホモポリペプチドの構造変化—タンパク質のモデル系として”, 岡山理科大学紀要, 52 A, pp.25-34 (2016).
- 12) E. L. Duggan and K. Luck, *The Combination of Organic Anions with Serum Albumin: IV Stabilization Against Urea Denaturation*, J. Biol. Chem., 172, 205-220 (1948).
- 13) Y. Moriyama, E. Watanabe, K. Kobayashi, H. Harano, E. Inui, and K. Takeda, *Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in the Thermal Denaturation up to 130°C and Protective Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change*. J. Phys. Chem. B, 112, 16585-16589 (2008).
- 14) Y. Moriyama, Y. Tanizaki, and K. Takeda, *Protective Effect of Gemini Surfactant on Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in Thermal Denaturation up to 130°C*. J. Oleo Sci., 58, 573-579 (2009).
- 15) Y. Moriyama and K. Takeda, *Critical Temperature of Secondary Structural Change of Myoglobin in Thermal Denaturation up to 130°C and Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change*. J. Phys. Chem. B, 117, 2430-2434 (2010).
- 16) Y. Moriyama, N. Kondo, and K. Takeda, *Secondary Structural Changes of Homologous Proteins, Lysozyme and α -Lactalbumin, in Thermal Denaturation up to 130°C and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Effects on These Changes: Comparison of Thermal Stabilities of SDS-Induced Helical Structures in These Proteins*, Langmuir, 28, 16268-16273 (2012).
- 17) Y. Moriyama, Y. Kawasaka, and K. Takeda, *Protective Effect of Small Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate on the Helical Structure of Bovine Serum Albumin in the Thermal Denaturation*. J. Colloid Interface Sci., 257, 41-46 (2003).
- 18) Y. Moriyama and K. Takeda, *Secondary Structural Changes of Intact and Disulfide Bridges-Cleaved Human Serum Albumin in Thermal Denaturation up to 130°C—Additive Effects of Sodium Dodecyl Sulfate on the Changes*, J. Oleo Sci., 66, 521-529 (2017).

- 19) K. Takeda and Y. Moriyama, *Unavoidable Time-Dependent Ellipticity Changes of Proteins in the Current CD Measurements*, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 6700-6701 (1991).
- 20) Y. Moriyama, T. Kakehi, and K. Takeda, *Changes of α -Helical and β -Structural Conformations of Polypeptides Caused by the Irradiation of Xenon Lamp in the Current Circular Dichroism Apparatus*, *Anal. Biochem.*, 219, 378-380 (1994).
- 21) 竹田邦雄, 森山佳子, “CD 測定上の問題点—光照射によるタンパク質の構造変化”, *生物物理*, 34, p.45 (1994).
- 22) 竹田邦雄, 森山佳子, “CD 測定中に蛋白質が受けるフォト・ダメージ—光照射による蛋白質の構造破壊”, *蛋白質 核酸 酵素*, 39, pp.2837-2841 (1994).
- 23) 森山佳子, 竹田邦雄, “光照射によるタンパク質構造の破壊”, *J. Illum. Engng. Inst. Jpn.* (照明学会誌), 78, pp.65-67 (1994).
- 24) J. R. Brown, *Serum Albumin: Amino Acid Sequence, Albumin Structure, Function, and Uses*, V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild Eds., Pergamon Press, Oxford, pp.27-51 (1977).
- 25) N. Greenfield and G. D. Fasman, *Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation*, *Biochemistry*, 8, 4108-4116 (1969).
- 26) K. Takeda, M. Shigeta, and K. Aoki, *Secondary Structures of Bovine Serum Albumin in Anionic and Cationic Surfactant Solutions*, *J. Colloid Interface Sci.*, 117, 120-126 (1987).
- 27) K. Takeda, *Conformational Analyses of Poly(L-Lysine) Induced by Various Surfactants*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 58, 1210-1214 (1985).
- 28) K. Takeda, *Kinetics of Coil to α -Helix to β -Structure Transitions of Poly(L-Ornithine) in Low Concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate*, *Biopolymers*, 24, 683-694 (1985).
- 29) あまりに数が多い。初期の例を挙げれば C. Tanford, *Isothermal Unfolding of Globular Proteins in Aqueous Urea Solution*, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 2050-2059 (1964)。現在でも、審査依頼がある論文に何の躊躇もなくこれらのモデルが引用されている。
- 30) K. Takeda, A. Iba, and K. Shirahama, *Conformational Change of Poly(L-lysine) by Sodium Octyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroism Method*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 54, 1793-1796 (1981).
- 31) K. Takeda, *Conformational Change of Delta-chymotrypsin Caused by Sodium Dodecyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroic Method*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 55, 1335-1339 (1982).
- 32) K. Takeda, *A Kinetic Study of the Conformational Change of Bovine Serum Albumin by Sodium Dodecyl Sulfate*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 56, 1037-1040 (1983).
- 33) K. Takeda, A. Wada, K. Yamamoto, K. Hachiya, and P. P. Batra, *Secondary Structure Change of Myoglobin Induced by Sodium Dodecyl Sulfate and its Kinetic Aspects*, *J. Colloid Interface Sci.*, 125, 307-313 (1988).
- 34) K. Takeda, *A Kinetic Study of the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Bovine Serum Albumin by Means of a Pressure-jump Method*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 55, 2547-2550 (1982).
- 35) K. Takeda, H. Sasaoka, K. Sasa, H. Hirai, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Size and Mobility of Sodium Dodecyl Sulfate-Bovine Serum Albumin Complex as Studied by Dynamic Light Scattering and Electrophoretic Light Scattering*, *J. Colloid Interface Sci.*, 154, 385-392 (1992).
- 36) K. Sasa and K. Takeda, *Multiple Coexisting Species of Sodium Dodecyl Sulfate-Bovine Serum Albumin Complexes as Detected by Capillary Electrophoresis*, *J. Colloid Interface Sci.*, 157, 516-517 (1993).
- 37) M. Sela, F. H. White Jr., and C. B. Anfinsen, *Reductive Cleavage of Disulfide Bridges in Ribonuclease*, *Science*, 125, 691-692 (1957).
- 38) C. B. Anfinsen and E. Haber, *Studies on the Reduction and Re-formation of Protein Disulfide Bonds*, *J. Biol. Chem.* 236, 1361-1363 (1960).
- 39) K. Takeda, K., Takahashi, and P. P. Batra, *Kinetic Aspects of the Interaction of Horse Heart Cytochrome c with Sodium Dodecyl Sulfate*. *Arch. Biochem. Biophys.* 236, 411-417 (1985).
- 40) K. Takeda, A. Wada, T. Nishimura, T. Ueki, and K. Aoki, *Isolation of Domain-Sized Fragments of Bovine Serum Albumin by Limited Peptic Digestion and Their Secondary Structural Changes in Solutions of Urea, Guanidine Hydrochloride, and Sodium Dodecyl Sulfate*, *J. Colloid Interface Sci.*, 133, 497-504 (1989).
- 41) K. Takeda and Y. Moriyama, *Helix Formation of Melittin on Poly(L-glutamic acid) and Poly(D-glutamic Acid)*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1040-1041 (1991).
- 42) K. Takeda and K. Yamamoto, *Fluorescence Lifetime and Rotational Correlation Time of Bovine Serum Albumin-Sodium Dodecyl Sulfate Complex Labeled with 1-Dimethylaminonaphthalene-5-Sulfonyl Chloride: Effect of Disulfide Bridges in the Protein on These Fluorescence Parameters*, *J. Protein Chem.*, 9, 17-22 (1990).
- 43) K. Takeda, K. Harada, K. Yamaguchi, and Y. Moriyama, *Conformational Changes of Bovine Serum Albumin in an Aqueous Solution of Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate and in the Reverse Micelle of the Same Surfactant*, *J. Colloid Interface Sci.*, 164, 382-386 (1994).
- 44) Y. Moriyama, Y. Sato, and K. Takeda, *Reformation of the Helical Structure of Bovine Serum Albumin by the Addition of Small Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate after the Disruption of the Structure by Urea*, *J. Colloid Interface Sci.*, 117, 420-424 (1993).
- 45) Y. Moriyama and K. Takeda, *Reformation of the Helical Structure of Human Serum Albumin by the Addition of Small*

Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate after the Disruption of the Structure by Urea. A Comparison with Bovine Serum Albumin. Langmuir, 15, 2003-2008 (1999).
46) J. R. Brown, *Serum Albumin: Amino Acid Sequence, Albumin*

Structure, Function, and Uses, V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild Eds., Pergamon Press, Oxford, pp.27-51 (1977).
47) X. M. He, and D. C. Carter, *Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin.* Nature, 358, 209-215 (1992).

Thermal Denaturation of Protein and Surfactant

—A Novel Effect of Surfactant on Protein Structure—

Kunio TAKEDA and Yoshiko MORIYAMA

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Okayama University of Science
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received October 6, 2017; accepted December 4, 2017)

The secondary structural changes of proteins were examined in the thermal denaturations up to 130 °C. The profile of human serum albumin (HSA) was mainly introduced. Most of the helical structures of HSA, whose original helicity was 66%, were sharply disrupted between 50 and 100 °C. However, the 14% helicity remained even at 130 °C. The temperature dependence of the disrupted degree of helical structures was discussed in connection with questions about a general protein denaturation model. Furthermore, a novel effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the structural changes of HSA in the denaturation was examined. A slight amount of SDS protected the helical structures of HSA from the denaturations below 80 °C. Upon cooling to 25 °C after heat treatments at temperatures below 70 °C in the coexistence of SDS of low concentrations, the helical structures of HSA were reformed to the original level at 25 °C before heating.

Keywords: protein structure; human serum albumin; surfactant; sodium dodecyl sulfate; circular dichroism.