

Title	SDS-蛋白質ポリペプチド複合体の実態の再評価 : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関連して
Author(s)	饒, 平凡
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36390
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	らお 饒	びん 平	ふあん 凡
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	8 5 7 1	号
学位授与の日付	平成元年3月24日		
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	SDS-蛋白質ポリペプチド複合体の実態の再評価 — SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関連して —		
論文審査委員	(主査) 教授 高木 俊夫	(副査) 教授 濱口 浩三	堀尾 武一

論文内容の要旨

1. はじめに

生化学分野における蛋白質の分離・分析に陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は極めて多くの人々によって使用されている。その代表例が SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動である。このような分離・分析法において対象としている実体は、SDSと蛋白質、多くの場合は変性している、との間に形成される複合体 (SDS-蛋白質ポリペプチド複合体) である。これらの方法の原理を明らかにするためには、このような複合体の実態を明らかにすることが必要である。応用の広がりと比較すると、極めて僅かではあるが、この種の複合体に関する研究が行われてきている。それらの成果として、SDS-蛋白質ポリペプチド複合体について、幾つかのモデルが提案されてきている。しかし、残念ながら、複合体のモデル構築の基礎となっている実験データの多くは信頼出来ないと我々は判断した。さらに、多くのモデルは単一の実験手段によって得られた限られた知見を根拠としているために、複合体についての理解は断片的・孤立的な段階に留まっている。この様に、複合体についての理解の程度は、生化学の現場における実験結果の解釈に役立つレベルに達していない。本研究では SDS-蛋白質ポリペプチド複合体を研究するための実験方法を整備・開発することにより新しい基礎を築いた上で、それらを活用して在来の複合体についての研究結果を慎重に再評価し、その上で複合体の実態について新たな観点からの検討を加えようとして開始された。

2. 測定方法の整備・開発

粘度測定の精度・能率の向上のために自動計時の粘度計を自作した。その結果、粘度データの精度は十倍に向上し、測定能率は飛躍的に向上した。SDSの蛋白質への結合量の測定精度を、示差屈折検出

器を用いるHPLC法を開発することにより、従来の十倍に向上させた。また、複合体の溶液物性とポリアクリルアミドゲル中での挙動とを関連付ける有力の手段としてシュリーレン光学系を導入した。これにより、ゲル中での電気泳動をリアルタイムで追跡することが可能となった。

3. 結 果

自作の自動粘度計を活用して、広く受け入れられてきた複合体の棒状モデルの基礎となった粘度測定実験を慎重に追試した。その結果、低いイオン強度においては、複合体はホモポリマー的な挙動を示さず、棒状モデルの基礎とされた実験結果は再現性を欠けていることが明らかになった。その原因を探り、試料の調製法およびデータ処理に問題点があることを明らかにした。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の通常条件下においては、粘度測定の結果は、複合体が棒状ではなく、巨視的にはフレキシブルなコイル状を示していることを強く示唆する結果が得られた。

さらに、緩衝液濃度の上昇に伴う複合体の溶液物性の変化を分子量を可成り異にする3種の蛋白質について検討した。

塩濃度の増大ともなって複合体の流体力学的実効体積が次第に減少することがSDS-BSA複合体について動的光散乱測定による拡散定数の決定から明らかになった。これは複合体がフレキシブルな高分子電解質の性格を持っているとする我々の推論を支持している。動的光散乱法よりも遥かに鋭敏な粘度測定においては、予想外の挙動が検出された。それは固有粘度が起伏しながら次第に減少して行く現象である。それはSDS-BSA複合体において最も顕著であり、卵白アルブミン(OVA)そして β -ラクトグロブリンと小分子量となると共に顕著でなくなった。

SDSの結合量は緩衝液濃度の増大とともに、段階的に増大する傾向が認められ、これも分子量の高い蛋白質の複合体においてより顕著であった。複合体における結合量が温度の上昇と共に減少することが初めて明らかになった。さらに、三種の蛋白質について、SDS結合量は広く信じられてきた値、1.4g/gを大きく上回り、蛋白質の種類によって様々であることが明らかになった。上記の固有粘度の起伏とSDSの結合量の階段状の増大の間には、結合量の増大~粘度の増大そして結合量の頭打ち~粘度の減少の相関が認められた。

上記の二つの物性にみられる変動はさらに複合体のゲルクロマトグラフィーおよび自由境界電気泳動における挙動の緩衝液濃度依存性との間に相関を示した。

SDS-蛋白質ポリペプチド複合体の参照系として、SDS-ポリエチレンオキッド複合体のSDS結合量と固有粘度の緩衝液濃度依存性が調べた。SDS結合量の塩濃度の増大に伴う段階的増大、及び高い緩衝液濃度におけるそれと固有粘度との相関は、SDS-BSAと同様に認められた。SDS-蛋白質ポリペプチド複合体が示す溶液挙動はその複合体に限らず、SDS-ポリエチレンオキッドの様な典型的な無荷電の合成高分子にも同様に観察されることが確認された。

4. 論 議

本研究の第一の意義は広く信じられているSDS-蛋白質ポリペプチド複合体についての棒状モデルが誤った再現できない実験データの上に築かれた砂の上楼閣的な構築物であったことを明示し、それと対立してきたフレキシブルな高分子電解質の性格を保有するネックレスモデルの妥当性を再確認した点に

ある。さらに、積極的に以下のような新たな特性を複合体に見出し、その実態にさらに一步迫る手がかりを作ったことが本研究の第二の意義である。

塩濃度の増大がフレキシブルな高分子電解質様の性格を持つと考えられる複合体の流体力学的有効体積の減少を引き起こすという現象は予想通りに観察された。しかし、結合量と固有粘度にそれぞれ観察された、段階そして起伏状の変動は予想せざるものであり、この種の複合体の性状への新たな洞察の端著となり得ると考えている。動的光散乱法による拡散定数の測定では検知されない現象の実態解明の多くは今後の問題である。現在では差し当たり次のように考えている：塩濃度の増大に伴う高分子電解質様の複合体の実効体積の減少と SDS 結合量の増大に起因するそれらの増大という二つの逆の効果を持つ要因が SDS の結合量の階段状の増大と共に、優劣を交替するために固有粘度に起伏が現れる。これらの現象が複合体の蛋白質部分の分子量に依存する事実は、この種の複合体を単純にホモポリマー的な同族体と見なすことが、特に低分子領域では妥当でないことを示唆している。SDS-蛋白質複合体が示す二つの系の比較によって、SDS-蛋白質ポリペプチド複合体が SDS-ポリエチレンオキシド複合体と多くの特性を共有している事実は、それらの特性がポリペプチドと言う特殊な高分子鎖と関連したもので無いことを示す点で興味深い。

本研究で得られた以上の新しい事実に基づいて複合体について高木らが提唱してきたネックレスモデルを修正した新しいバージョンを提案した。そのモデルにおいては、SDS はミセル状で蛋白質ポリペプチドに結合する。塩濃度の増大に伴う複合体のコンフォメーション及び SDS の階段的結合の増大はポリペプチド鎖に結合しているミセル状のクラスター間の静電的相互作用の所産によるものと考えられる。比較的的低分子量の蛋白質と SDS との間に形成される複合体の場合には、ポリペプチド鎖に結合する SDS のミセルクラスターの数が限られているので、このミセル間の相互作用は顕著でなく、その溶液挙動は分子量の大きい蛋白質が関与する複合体の場合とは異なると考えられる。

論文の審査結果の要旨

蛋白質の多くものは水溶性であるが分子鎖がほどければ不溶化する。それに大量に結合することによって、解けた状態を安定化し大量のマイナス荷電を持ち込んでくれるのが陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（略称、SDS）である。難水溶性の蛋白質に対しても同様の効果を示す。この様にして生じた SDS-蛋白質複合体（略称、複合体）は高度に荷電しているために、電場のもとで速やかに泳動し、媒体としてポリアクリルアミドゲルを用いるとサイズにしたがっての効率の良い分離が可能となる。この手法は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（略称、SDS-PAGE）と呼ばれ、今日の生物科学分野の研究に欠かせないものとなっている。

饒平凡君の研究の目的は、上記の複合体の溶液物性を検討することにより、同法を日毎に活用している極めて多くの研究者の指針となる基礎的知見を与えることであった。同君は本研究の開始に当たって、この種の研究の実施に基本的に重要であるにも関わらず、測定法が旧態依然たる状態にあった粘度と結合量

の測定法をそれぞれ自作装置の製作とHPLC手法の導入により、何れも在来の十倍の精度が得られるように改善した。

それらを活用することにより、得られた結果の要点は以下の通りである：①複合体について提案されてきた幾つかのモデルの基礎となってきた粘度・SDS結合量に関する実験データの多くが再現できないと言う重要な事実を明かにした；②この種の複合体は硬い棒状の構造をとっていると通説であったが、新たに得られた粘度測定の結果は、複合体が棒状ではなく巨視的にはフレキシブルなコイル状であることを強く示唆するものであった；③複合体の性状の緩衝塩濃度依存性を検討し、その増大につれてSDS結合量は段階的に、固有粘度は波打ち状に変化し、他の幾つかの溶液部性もそれらの変化と相関のある変化を示すことを見出した；④以上の結果は複合体モデルの中であってマイナーと考えられてきていたネットワークモデル（フレキシブルなポリペプチド鎖にSDSがミセル状に結合していると想定）に有力な支持データを提供するものである；⑤さらに饒君は塩濃度の増大にもなるの諸変化をもSDSのミセル状の結合量の増大とそれらの間の静電的相互作用でもって説明出来るように上記モデルを精細化した；⑥さらに複合体の性状に分子量依存性が存在すると言う全く気付かれていなかった事実を明らかにし、複合体の性状研究に新たな視点を導入した。

以上の研究成果はSDS-蛋白質ポリペプチド複合体の性状に関しての在来の定説を明確に否定し、その実態に迫ることに成功し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の利用者に有益な情報を提供するという所期の目的を達成したものである。従って、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。