

# 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—

竹田 邦雄

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

(2014年9月1日受付、2014年11月6日受理)

## 1. 界面活性剤とタンパク質

### 1-1 界面活性剤

界面活性剤は、水のような部分（親水基）と油のような部分（疎水基）が化学結合した化合物である。界面活性剤を模式的に表すとき、マッチ棒（オタマジャクシでもいい）の形がよく使われる。マッチ棒の頭（オタマジャクシの頭）が親水基、軸（オタマジャクシのしっぽ）が疎水基として、万国共通に通じる。界面活性剤の身近な例は、家庭で使われる石けんである。界面活性剤は、水と油というように、全く相反するものの関係に使われる“水”と“油”がくっついたような化合物である。従って、界面活性剤なるものは、他のあまたの化学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されている。“水”と“油”がくっついた界面活性剤の特徴を、この語源はよく物語っている。

実際、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製造業でも、界面活性剤はいろいろなものの製造過程で使われている。界面活性剤は、洗剤やシャンプーなどを別として、製品になったらその製品の主役になることは少ないが、製造過程では黒子的に重要な役割をしていて、界面活性剤なしではできなかつたであろうという製品は非常に多い。例えば、高層ビルを建設する際のコンクリートにも、現在ある種の界面活性剤が役立っていることなどは一般には知られていない。これに使われる界面活性剤は、コンクリートの流動化に役立っていて、高いところや遠いところへ液状のコンクリートを長いパイプを使って流すことを可能にしている。この界面活性剤を使用しなくても高層ビルはできるだろうが、手間暇がもっとかかってしまうに違いない。

界面活性剤は親水基と疎水基をもつので、どちらの性質が強いかで、その界面活性剤が水によく溶けるか、油によく溶けるかが決まる。こういうことから、界面

活性剤を両親媒性物質と呼ぶ場合もある。家庭用の石けんなどの界面活性剤は水に溶かして使うので、親水性がある程度強くないといけないことになる。

界面活性剤の親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になじむ親水性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。界面活性剤は、疎水性部分をもっているため、1つひとつがばらばらに溶けているのはごく低濃度のときだけである。界面活性剤がある特定の濃度、臨界ミセル濃度（critical micelle concentration: CMC）を超えると、ミセルと呼ばれる会合体を形成して溶ける。このミセルは、大体50から100前後の数の界面活性剤が集まって、疎水基を内側に、親水基を外側に、多くの場合球状に形成されている。その大きさは、直径数nmである。著者は、後で簡単に触れるように、大学院時代のほとんどをこの界面活性剤のミセル形成の速度論に携わっていた。

ちなみに、今も昔も、“研究”にもっともよく使われている代表的な界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulfate: SDS）である。意外に知られていないが、このSDSは、時にラウリル硫酸Naの名称で、歯磨きに1%前後含まれているので、多くの人が毎日接している界面活性剤でもある。

### 1-2 タンパク質

タンパク質、英語のproteinの語源になったギリシア語のproteiosは“主要な”という意味をもつそうである。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を構築している。酵素という単語も日常的によく耳にするが、タンパク質のある種のもの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、わずか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、その種類の多様性を可能にしている。アミノ酸の並んだ順番をタンパク質の一次構造と言う。この一次構造のルールは各生物のDNAに保

存されていて、そのルール通りに各生物の各部分に最適のタンパク質が作られるようになっている。

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。アミノ酸は、水に溶けやすいものも水に溶けにくいものもあり、その組成によって、タンパク質も水に溶けやすいものも水に溶けにくいものもある。多くの水溶性のタンパク質は、数百というアミノ酸からできているが、水に接するタンパク質表面の方に水に溶けやすいアミノ酸がうまく並び、水に溶けにくいアミノ酸はほとんど水に接しないようにタンパク質内部に折りたたまれている。この折りたたまれていることを英語ではfoldingと言うが、この英語に適当な日本語は「折りたたみ」くらいしかなく、このfoldingは日本語に訳して使われることはほとんどない。水溶性のタンパク質のfoldingの状態は、界面活性剤のミセルと似ている。数十年前、ある化学者が「水溶性のタンパク質は極性のコートを着た油滴」と称したが、まさにその通りである。この折りたたみ方も、タンパク質の内部には水分子程度の大きさのものが2つ3つしか入らないくらいに、非常に密に詰められている。

タンパク質がこのように折りたたまれると、アミノ酸は並んだ順番通りに表面にあったり、内部にあたりしなない。このようにタンパク質が折りたたまれた状態の構造を三次構造と言う。タンパク質が折りたたまれるとき、一次構造のある部分でローカルに作っている構造を二次構造と言ひ、何種類かの二次構造がある。タンパク質は、あっちこちで作っている二次構造が折りたたまれているとみることできる。

## 2. 界面活性剤とタンパク質の相互作用

タンパク質の研究は、分野によって種々のタンパク質をターゲットとして今も多くの研究者によって広範に行われている。その中で、物理化学的興味からの研究対象には、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) というタンパク質が半世紀以上に渡ってもっとも多く選ばれて来ている。タンパク質と界面活性剤の相互作用の研究にも、このBSAと上述のSDSの組み合わせがもっとも多い<sup>1-6)</sup>。BSAは、代表的なあるいは標準的なタンパク質として扱われていることも少なくないが、このタンパク質は相当個性豊かなものである。本稿では、ページ数の制限のためできるだけ図表は使わずに記述しようとしているが、あえてBSAの一次構造を図1に模式的に示す<sup>7)</sup>。このタンパク質は、583個のアミノ酸から成る1本鎖ポリペプチドでありながら、このポリペプチドの途中は17組のS-S架橋でかなり規則的に連結されていることが分かるであろう。

著者も、この数十年BSAとSDSの系を中心に、この間の相互作用によって、タンパク質の構造がどの程度、

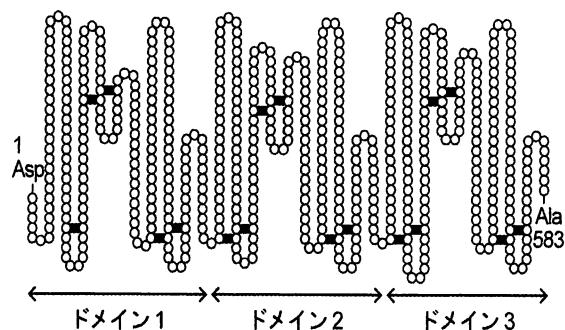


図1 BSAの一次構造の模式図

図中の■は、17組のS-S架橋の位置を示す。

どれくらいの速度で変わるかを研究して来た<sup>1-6)</sup>。この系の研究を続ける中で、BSAのS-S架橋の存在を無視してか知らずか、そのポリペプチドがSDSのミセルのまわりに巻きついた界面活性剤-タンパク質複合体のスケッチを無頓着に描いた論文の審査がまわって来たり、中には著者に審査がまわって来ない類似の論文が出版までされるようになったりして、一度怒りの警鐘を鳴らしたことがあった<sup>4,8)</sup>。図1のBSAの一次構造を左右に3分割した部分をこのタンパク質のドメインと呼ぶが、ドメインが相互によく似ていることもこのタンパク質の特徴である。

界面活性剤とタンパク質の組み合わせは、通常ありえないように思えるかもしれないが、例えば、生体膜はまさに界面活性剤とタンパク質の系と言って差し支えない。また、生化学分野でよく利用されるタンパク質の分子量の簡便な定量法であるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (通称SDS-PAGE) でも、SDSといっしょにBSAを含む数種のタンパク質が基準分子量のタンパク質として使われている。このSDS-PAGEでは、SDSは、そのdodecyl sulfate (DS) イオンが多量にタンパク質に結合し、タンパク質固有の表面電荷が電気泳動に影響しないようにする役割をしている。

### 2-1 界面活性剤のタンパク質への結合

著者が、SDS-BSAの系に取り組み始めた1970年代後半、この関係の論文を調べていくと、この結合の問題は1950年代1960年代にやり尽くされているように思えた<sup>1,5)</sup>。戦後、SDSとBSAが手に入れば、SDSのBSAへの結合等温線は半透膜を使った平衡透析で安価に作成できたようで、その結果は一流ジャーナルにたくさん発表されている。しかし、過去の結果には弱点があった。タンパク質を扱う場合、pHを一定に保つために緩衝溶液を使うが、この緩衝溶液の電解質の濃度がすべて高かった。無機物でも有機物でも (一部例外があるが) SDSのようなイオン性界面活性剤に共存すると、ミセル

を形成し易くし、CMCを低下させる。一方、界面活性剤のタンパク質への結合は、ミセルを作らないCMC以下の界面活性剤濃度でのみ進行する。従って、過去の高い電解質濃度の緩衝溶液を使った研究では、CMCが低下し、界面活性剤の結合が進行するその濃度領域が極端に狭くなり、結合の進行が細かく観察できていなかった。

著者らは、些細なことながら、この点に留意して、緩衝溶液の電解質の濃度をできるだけ低くして、CMCをある程度高い濃度で維持するようにして、結合の進行を過去の事例の約5倍広い界面活性剤濃度域で検討した<sup>1-5)</sup>。その結果、SDSのBSAへの結合は、大きく分けて2段階に進行することが分かった。後に、BSA分子のフラグメント (BSA分子の断片)<sup>9)</sup> へのSDSの結合も2段階に起こり、ドメイン単位で結合のし易い部分とそうでない部分をもつことを明らかにした。これは、SDSによるBSAの構造変化にも大いに関係してくる。

## 2-2 界面活性剤によるタンパク質の構造変化

タンパク質の構造変化を、二次構造の1つであるヘリックス (らせん状) 構造の増減を中心に円偏光二色性 (CD) 測定で検討してきた。SDSによってBSAのようなヘリックス構造の多いタンパク質のヘリックス構造は一部壊されるが、ヘリックス構造の多くないタンパク質にはSDSによってヘリックス構造が形成される。

液相中のタンパク質の二次構造の研究には、CDがもっともよく使われ、そのデータの信頼性も高い。しかし、著者がCD測定を始めてしばらくして、そのデータが半定量的な使い方がされていないことに気づいた。つまり、二次構造の1つであるヘリックス構造が多いとか少ないとか、ヘリックス構造ができたとか壊れたとかいう程度の使い方がされていない。

タンパク質の二次構造には、ヘリックス構造の他に、 $\beta$ 構造やランダムコイルなどがある。縦軸にCDの強度 (平均残基楕円率)、横軸にCDの光の波長をとってできる曲線グラフ、つまりCDスペクトルが、これらの構造によって異なる。著者は、これらの構造によるスペクトルの違いを利用して、二次構造をもっと定量的に (数値的に) 検討できないかと思うようになった。

それで、タンパク質が、CD強度も大きく、主要な二次構造でもあるヘリックス構造、 $\beta$ 構造、ランダムコイルをそれぞれ100%形成したときのある波長における固有の平均残基楕円率を $[\theta]_{\alpha}$ 、 $[\theta]_{\beta}$ 、 $[\theta]_{c}$ とし、さらにこれらの構造をタンパク質が実際に形成している割合を、それぞれ、 $f_{\alpha}$ 、 $f_{\beta}$ 、 $f_c$  ( $f_{\alpha} + f_{\beta} + f_c = 1$ ) とすると、測定で得られる平均残基楕円率 $[\theta]_{\text{obs}}$ は、いずれの波長でも次の関係で表せると仮定してみた。

$$[\theta]_{\text{obs}} = f_{\alpha} [\theta]_{\alpha} + f_{\beta} [\theta]_{\beta} + f_c [\theta]_c$$

この関係を想定して、実際に測定によって得られる

50nmくらいの波長範囲のCDスペクトルにもっとも近似するスペクトルを1nmきざみで合成し、最適の $f_{\alpha}$ 、 $f_{\beta}$ 、 $f_c$ を求めることを試みた<sup>1-5, 10, 11)</sup>。 $f_{\alpha}$ 、 $f_{\beta}$ 、 $f_c$ が分かると、そのタンパク質の構成アミノ酸の何個がこれらの構造を作っているかが推定できるわけである。

これは新規な試みであると思いながら、この作業に具体的にとりかかりつつ文献を調べてみると、少数ではあるが既にアメリカで先駆的にやっている人がいることに気づいた。しかも、最初にやっていたのは、当時ハガキによる論文の別刷り請求がある頃で、著者らの論文が出版される度に別刷り請求をしてくれていた教授のグループ<sup>12)</sup>であった。これで、先の仮定や試みが的外れでないことは分かった。この手法は、国内ではまだほとんどされていない時代であった<sup>1)</sup>。

このシミュレーションによって、BSAのヘリックス構造を形成しているアミノ酸の数のみならずSDSによるその含量の増減、BSAフラグメントのSDSによる同様のヘリックス含量の増減や、BSAとBSAフラグメントへのSDSの結合等温線の様子からSDSによってBSAのどの部分のヘリックス構造が崩壊するかなどの議論が可能になった<sup>1-5, 9-11)</sup>。一連の仕事の中で、著者らはまずBSAのヘリックス構造を形成しているアミノ酸は総アミノ酸数の66%と推定した<sup>1-5, 11)</sup>。最近では、CDの各波長における $[\theta]_{\text{obs}}$ の値を、装置のパソコンから計算するパソコンに簡単に転送でき、データの入力に時間は全くかからなくなっているが、当初はパソコンに各波長における $[\theta]_{\text{obs}}$ の値を1つひとつ手で入力するのに時間がかかった。その後、1990年頃、BSAと酷似し、585個のアミノ酸から成るヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) のX線解析がされ、そのヘリックスを形成するアミノ酸は総数の67%と発表された<sup>13)</sup>。このX線解析に使われたHSAの結晶は、地球を離れて、スペースシャトル内で作成されたものであった。BSA分子単体のX線解析は未だされていないが、HSAに酷似しているBSAに対して著者らが求めた66%のヘリックス含量は結構妥当なものであったと思われる。

BSAとHSAの研究の歴史は長いですが、それらの構造に関しては、X線やCDのデータが全くない時代に、一次構造だけから立体構造を予測したBrownの研究<sup>7)</sup>が、その後の研究の土台になっていることを付記しておく。

界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化をこの手法で取り扱ったのは、私のところがある発表ができた<sup>1-6, 9-11)</sup>。著者らは、さらにBSAのドメイン1.5個分相当 (BSA分子の半分) やちょうどドメイン1個分のフラグメントの研究<sup>9)</sup>から、各ドメインは、ミニBSA分子とも言うべき挙動をすることや、ドメイン間を結ぶ2か所の連結部分は、溶媒に露出していて、種々

の影響を受けやすいことを明らかにした。また、血液中で輸送タンパク質として働くBSAやHSAは、ドメイン単位で輸送される物質をつかむ機能をもつのではないかという示唆も得られた。

### 2-3 タンパク質の構造変化の速度論

著者の学位論文(1976年)は、“界面活性剤のミセル形成・崩壊反応の速度論”であった。1秒以下で起こる速い反応、いわゆる高速反応の測定は、1967年にノーベル賞を受賞したドイツのEigen教授が化学緩和法を確立することによって大きく開花した。著者らは、この速度論に界面活性剤として当然のごとくSDSを対象とした。手間のかかる高速反応の測定を繰り返し、最終的に、マイクロ秒オーダーの時間でモノマー状態の界面活性剤イオンが会合してミセルを形成し、このミセルに界面活性剤イオンのモノマーがミリ秒オーダーの時間で出入りする過程を想定して、複雑な速度式に取り組んだ<sup>14)</sup>。本学に奉職後、この内容の一部を理大通信にも紹介したことがある<sup>15)</sup>。2-1の界面活性剤の説明で述べたように、ミセル形成はあらゆる添加物の影響を受け、純粋にミセルの形成・崩壊を見ようとすれば水に界面活性剤だけを溶かした水溶液で検討するしかないが、当時高速反応の測定は、装置の都合上、電解質や色素を添加して行われていた。著者は、運よく、電気伝導度検出の圧力ジャンプ法によって、水にSDSだけを溶かした溶液でミリ秒オーダーの緩和過程を見ることに成功した<sup>16)</sup>。これは、その後の界面活性剤水溶液のミリ秒オーダーの緩和過程の研究で、この圧力ジャンプ法の測定が主流になるきっかけになった。

従って、著者が界面活性剤によるタンパク質の構造変化に手をつけたときから、この構造変化の速度論を手がけることは念頭にあった。しかし、理大に就職して籍をおいた研究室はまだ新しく、他を見回しても速度論をやっている研究室も、タンパク質を扱っている研究室もなかった。この構造変化の速度論は、当時の機械理学科の工作室に通い、当時は全く市販されていない装置を自作することから始まった。

この構造変化の速度論の測定には、化学緩和法ではなく、主に2液を急速混合するstopped-flow法を使った。界面活性剤によるタンパク質の二次構造変化をCD強度の変化で、タンパク質の三次構造変化を近紫外部の吸光度の変化で速度論的に(横軸が時間で)追跡しようとした。もちろん、界面活性剤の主役はSDS、タンパク質の主役はBSAであった。二次構造が関与するCDの特性波長が190~220nmで、速い時間で速度論的に検出するには、CDの信号強度は弱く、逆にノイズは大きかった。しかし、データは積算回数を重ねてきれいにし、世界で最短波長のCD強度の経時変化も測定できた。この測

定結果は、世界最短波長で成功したという記録としてはなく、どういう構造変化を追跡しているかを実証する明確な根拠になった。この速度論で、タンパク質以外に、アミノ酸の1つのリジンだけがつながったポリ-L-リジン<sup>1, 6, 17)</sup>、リジンに非常に近い構造をした非天然のアミノ酸から成るポリ-L-オルニチン<sup>1, 6, 18)</sup>のSDSまたは類似の界面活性剤溶液中の二次構造変化も検討した。これらホモポリペプチドの界面活性剤による二次構造変化の速度論も世界初であった。

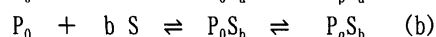
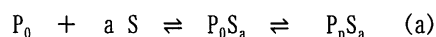
結論が出るまでには、何年か要したが、予想外の結果が続出した<sup>1, 6, 17-21)</sup>。当初の目論見は外れて、タンパク質の二次構造変化と三次構造変化は同時に起こり、時間的に区別できないことがまず分かった。また、界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化は遅かった。界面活性剤によるヘリックス構造の崩壊は数十ミリ秒で、界面活性剤によるヘリックス構造の形成は秒オーダーの時間で起こった。

さらに、界面活性剤の結合量が増加して構造変化が大がかりになるほど、構造変化の速度は速くなるという結果に出くわした<sup>1, 6, 17-21)</sup>。後述するタンパク質の熱変性で温度上昇に伴い構造変化も大がかりになるように、界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化も、界面活性剤溶液の濃度が高くなるにつれ、つまり界面活性剤の結合量が増加するにつれ大がかりになる。しかし、界面活性剤の結合量が増加して構造変化が大きくなると、構造変化の速度は速くなるわけである。これは、界面活性剤が飽和結合すると、タンパク質の構造は、結合量が飽和前の段階の構造を中間体として經由せずに変化すると考えざるをえない。なぜなら、界面活性剤によるタンパク質の構造変化の程度が小さい方が、その速度は遅いからである。

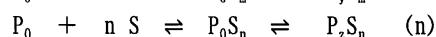
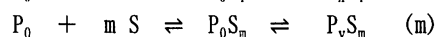
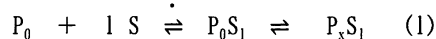
界面活性剤はタンパク質に対して数十から数百個レベルで結合する。界面活性剤の大部分はその疎水性の性質を使って、タンパク質の疎水性部分やすでにタンパク質に親水性部分で結合している界面活性剤の疎水性部分に結合する<sup>4)</sup>。この結合速度は、界面活性剤のミセル形成・崩壊の研究で経験<sup>14, 16)</sup>した時間オーダー、遅くともミリ秒以下であると予想できる。界面活性剤-タンパク質複合体はミセル状に形成され、その表面はミセルに酷似していると考えられている。岡山で手作りした電気伝導度検出の圧力ジャンプ装置でSDS-BSA複合体の系にミリ秒オーダーの緩和過程を見つけた<sup>22)</sup>。これは、思いがけないことに、界面活性剤のミセル形成・崩壊反応の速度論で、ミセルへの界面活性剤イオンのモノマーの出入りがミリ秒オーダーで起こると想定したことの妥当性を裏付けた。同時に、タンパク質の構造変化に伴い、そのタンパク質に結合している界面活性剤イオンが結合場所を移動しながら出入りして

いることも示唆してくれた。

これらの結果や推定を踏まえて、界面活性剤 (S) によるタンパク質やポリペプチド ( $P_0$ ) の構造変化は次のような化学式で表せると仮定した<sup>1, 2, 6, 19-21)</sup>。



⋮



1段階目 2段階目

ここで、小文字のアルファベットは $P_0$ への界面活性剤の結合量 ( $a < b < \dots < l < m < n$ ) を示す。 $P_0 S_a \sim P_0 S_n$  はある量の界面活性剤が $P_0$ に結合した複合体で、タンパク質の構造はまだ変わっていない。 $P_p \sim P_z$  は結合量に応じて構造が変化したタンパク質やポリペプチドを示し、 $P_0 S_a \sim P_0 S_n$  からそれぞれ $P_p S_a \sim P_z S_n$  に変わる2段階目で構造変化は起こる。 $P_z S_n$  が、界面活性剤が飽和結合したタンパク質やポリペプチドで、それらの構造変化がもっとも大きい複合体を示す。界面活性剤の結合量によって、それぞれ違う反応経路で構造変化は起こる。(a) ~ (n) は各過程を示すのに便宜的に付けたが、これらは全反応としての表示で、各過程に二重衝突の素反応があり、2段階目が反応の律速段階になる。

タンパク質やポリペプチドへの界面活性剤の結合が2段階目の構造変化より速ければ、構造はすでに結合している界面活性剤をくっつけたまま変わることになる。タンパク質やポリペプチドの構造が変われば、結合している界面活性剤は結合場所も移動しなければならぬだろう。これを界面活性剤の再配列 (rearrangement) と名付けた。この界面活性剤の再配列を伴うタンパク質やホモポリペプチドの構造変化は、重い手かせ足かせをつけられたような状態での動きになるに違いない。

また、速度論ではないが、SDS-BSA複合体の光散乱電気泳動測定<sup>23)</sup> とキャピラリー電気泳動測定<sup>24)</sup> から、この反応メカニズムを補完する思いがけない結果も得られた。これらの測定で、BSA単体である $P_0$ とSDSが飽和結合したBSAである $P_z S_n$  はたしかに単一の状態として検出される。しかし、飽和結合しない界面活性剤の低濃度域では、界面活性剤の結合量が違う複数の状態の複合体が共存することが分かった。これは、先の $P_p S_a \sim P_z S_n$  の $a \sim n$  が決して連続的な数値ではなく、特定の不連続な数値であることを意味した。また、これは、複合体を形成する途中の段階では、 $P_x S_l$  と $P_y S_m$  のような準安定な複合体が共存し、界面活性剤の濃度増加に伴い $P_x S_l$  が徐々に減り $P_y S_m$  が徐々に増えていくような過程があることも実証した。

以上のような一連の構造変化の速度論から、一般的

なタンパク質の変性や構造変化のメカニズムについて、思いがけない問題点があることに気づいた。タンパク質の変性や構造変化は一般的には次のような化学式、すなわち化学平衡で書かれる。



Nというのはnative状態ということで天然の状態または構造、Dというのはdenatured状態ということで変性した状態または天然状態とは違う構造を示す。ちなみに、“変性”とはタンパク質や酵素の本来の性質や構造が変わることを広く指す。この $N \rightleftharpoons D$ 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年くらいは使われている。また、中間体 $D'$ を想定して、 $N \rightleftharpoons D' \rightleftharpoons D$ と表す反応モデル (three-state model) もある。しかし、大問題は、中間体を想定しても、スタートのNとゴールのDは変わっていないことである。界面活性剤によるタンパク質の構造変化の $N \rightleftharpoons D$ のD状態も構造変化の過程も界面活性剤の濃度・結合量によって明らかに異なる。最近タンパク質の熱変性による構造変化も検討しているが、50°Cで熱変性したときと100°Cで熱変性したときとDが同じであるはずがない。また、さらに100°Cで熱変性したときに、必ず50°Cで熱変性したときのD状態を中間体 $D'$ として経由するかは甚だ疑問である。また、後述するように、 $N \rightleftharpoons D$ の可逆性はタンパク質に固有の限定的な温度範囲でしか成立しない。にもかかわらず、多くの研究者がタンパク質の構造変化などの温度依存性から平然と $N \rightleftharpoons D$ の平衡をベースにもっともらしく論文中で議論している。この議論の前提は、50°Cでも100°CでもD状態は同じで、可逆性もあるということであるが、そんなはずがなく、そういう前提で議論することは無意味と著者は思っている。

タンパク質が完全に変性しない、あるいは完全に構造変化しない条件下では、 $N \rightleftharpoons D$ のD状態まで進まずに、その途中の状態のものが、しかも多くの場合それが複数共存することを前提にすべきである<sup>23, 24)</sup>。また、タンパク質の熱変性であろうと、変性剤による変性であろうと、容易ではないが、 $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡が成立する条件をおさえて、議論すべきである。

#### 2-4 例外的な小さなタンパク質の場合

ハチの毒成分として含まれるタンパク質をメリチンと言う。このメリチンは、たった26個のアミノ酸から成り小さく、26個のアミノ酸中6個もプラスに帯電したアミノ酸をもち、マイナスに帯電したアミノ酸は全くもたないおもしろいタンパク質である。このメリチン

に興味をもって調べてみると、このタンパク質はSDSミセルのマイナスの電荷をもつ表面上でヘリックス構造を形成することを、アメリカのYang教授らが発表していた<sup>25)</sup>。このYang教授は、この分野をリードして来た研究者の一人だが、彼からレーガンがアメリカ大統領になった頃、「アメリカではこの種の基礎研究ができなくなったので、これからは日本の研究者がやってくれ」と手紙をもらったことがある。上述したように、一般に界面活性剤によるタンパク質の構造変化は、タンパク質に結合していない界面活性剤イオンの平衡濃度がCMC以下で起こり、ミセルを形成するようになってからは、界面活性剤のタンパク質への結合も起こらなくなる。しかし、この小さなタンパク質のメリチンは、SDSのCMC以上でミセルの表面において劇的な構造変化をすることを著者らも検証した。

著者らは、メリチンがマイナスの電荷をもつSDSのミセル表面上でヘリックス構造を形成するなら、表面にマイナスの電荷をもつ高分子の鎖上ではどうか検討した。その結果、アミノ酸のグルタミン酸（側鎖部分が中性pHではマイナスの電荷をもつ）ばかりが繋がったホモポリペプチドのポリ-L-グルタミン酸の鎖上でも、非天然のアミノ酸のD-グルタミン酸ばかりが繋がったポリ-D-グルタミン酸の鎖上でも、メリチンはヘリックス構造を形成することが明らかになった<sup>26)</sup>。これらの結果は、電荷をもつミセル表面やホモポリペプチドの鎖上がある種のタンパク質や酵素の独特の反応場になることを示唆している。

ついでながら、著者らは、プラスの電荷をもつ陽イオン性界面活性剤の場合も、CMC以上でメリチンがヘリックス構造を形成することを見つけた<sup>26)</sup>。この場合、ミセル表面で構造変化するはずはなく、ミセルの中に可溶化された状態でヘリックス構造を形成すると考えざるをえなかった。

このように界面活性剤のCMC以上で顕著な構造変化をするメリチンは、界面活性剤との相互作用における例外的なタンパク質である。これは、上に紹介したメリチンの特殊な電荷状態と小さなサイズによるとしか考えられない。

## 2-5 界面活性剤-タンパク質複合体

界面活性剤がタンパク質に結合してできる複合体の表面は、ミセル表面に似ている。ミセル表面がある種の反応場になることに関連して、界面活性剤-タンパク質複合体の表面電位やそのサイズの変化を一時期検討した<sup>23, 24)</sup>。

その頃まで、界面活性剤とタンパク質が結合した複合体の電気泳動速度やサイズをある特定の条件で測定した例はあったが、この系の本格的な系統的測定は著

者らが最初と言っていると思う。界面活性剤イオンがタンパク質に結合する場合、大部分の界面活性剤イオンはその疎水部でタンパク質に結合する。そのため、界面活性剤の親水部の電荷をタンパク質表面上に持ち込むことになり、界面活性剤のタンパク質への結合の進行と共に複合体の電荷状態は変わる。BSAは583個のアミノ酸からできているが、プラスに帯電したアミノ酸よりマイナスに帯電したアミノ酸が相対的に多いため、タンパク質全体としては本来マイナスの電荷をもっている。従って、BSAだけを電気泳動させると、このタンパク質はプラスの電極の方に泳動する。BSAにDSイオンが結合していくと、複合体はマイナスの電荷を多くもつようになるので、プラス電極への泳動速度は速くなった。一方、親水部にプラスの電荷をもつ界面活性剤イオンの結合が進むと、BSA本来の過剰なマイナスの電荷は少なくなり、ある量の界面活性剤イオンが結合したとき、プラス、マイナスのどちらの電極に向かって泳動しなくなり、泳動速度はゼロになった。親水部にプラス荷電をもつ界面活性剤がさらに結合していくと複合体はプラスの電荷をもつようになり、マイナスの電極の方に泳動するようになった。

このような複合体の電気泳動速度の変化は、説明してきたようにある程度予測できるものであったが、SDS（実際はDSイオン）が飽和結合したSDS-BSA複合体の電気泳動速度は、SDSミセルの電気泳動速度に近くなり、複合体表面とミセル表面の類似性を表面電荷の比較から実証できた。

界面活性剤とタンパク質が結合した複合体の大きさ、つまりサイズの変化については予測できなかった。DSイオンが結合すれば、複合体はコンパクトになるのか、DSイオンが結合した分ふくらむのか、どちらも考えられた。SDS-BSA複合体のサイズを、BSAにくっつけた蛍光色素の蛍光寿命のBSA分子の動きに伴う変化から測定しようと試みたことがあった。この試みでは、SDS低濃度しか検討できなかったが、DSイオンの結合に伴い複合体のサイズは大きくなる傾向が見られていた<sup>27)</sup>。その数年後、動的散乱法によってDSイオンの結合に伴いSDS-BSA複合体のサイズは大きくなることを定量的に知ることができた<sup>23)</sup>。予想以上に、DSイオンの結合に伴い複合体の直径はBSAの1.5倍くらいまで大きくなる。これは、タンパク質への界面活性剤の結合様式を考える上で貴重な知見になった。

## 2-6 逆ミセル中のタンパク質

ある種の界面活性剤を油のような非極性溶媒の中に入れると、冒頭で述べたミセルとは逆に、親水基を内側に疎水基を外側にした会合体を簡単に形成する。これを“逆ミセル”と言う。大きさによって、マイクロ

エマルションという場合もある。ちなみに、エマルションは牛乳のように水の中でできるタイプとバターのように油の中でできるタイプがあり、ここでは油の中でできるタイプの方の話である。

油の中でできる逆ミセルの内側の親水基の集まっている場所には少量の水を含み、この水部分をwater poolと呼ぶ。water poolの直径は数nmくらいで、小さなタンパク質が入ってもいっぱいになる。一般的に、water poolの水は界面活性剤の親水基周辺(water poolの外側)の“固定水”とwater poolの中央部分の“自由水”に分けて考えられる。“固定水”と言われる水は、界面活性剤の親水基の電荷に引き付けられている。これは水合イオンと同じで、逆ミセルを作る界面活性剤の親水基がマイナス荷電をもてば、 $H_2O$ のHの方を向けて電氣的に相互作用することによって固定されている(厳密には固定というほどではないが)と考えられている。“自由水”の方は、界面活性剤の親水基の電荷の影響を受けず、普通の水と同じと考えられがちであるが、界面活性剤の親水基の電荷の影響が消えるほどwater poolは大きくはなく、著者はやはり“異常水”のままだと思う。

逆ミセルのwater poolにBSAを入れて、逆ミセルの大きさを動的光散乱法で測り、またwater poolの大きさの変化に伴うBSAの構造変化をCDで検討した<sup>28)</sup>。小さいwater poolにBSAを入れる場合、water pool自身が拡がらないとBSAは入らない。BSAを含む逆ミセルのwater pool内の水は、逆ミセルを構成する界面活性剤の親水基の電荷の影響だけでなく、タンパク質表面に出ているアミノ酸のプラスやマイナスの電荷の影響も受け、“超異常水”の状態と思われる。逆ミセルのwater poolの大きさの変化に伴いタンパク質の構造も変化し、それはwater poolの異常水が変化するためと考えられる。

動物の細胞膜もある種の界面活性剤(リン脂質)で作られている。細胞内は逆ミセルの中とあまり変わらないと推定される。細胞内のタンパク質や酵素は、普通の水とは違う異常な水の中で生命維持のために活動しているに違いない。

## 2-7 界面活性剤によるタンパク質の構造の保護

上述して来たように、界面活性剤はタンパク質の構造を大なり小なり変える。しかし、他の要素で壊されるタンパク質の構造を界面活性剤は保護するように機能することがある。この課題は、1990年頃研究室の雑誌会で、修士の学生が1948年出版のアメリカのDugganとLuckの論文<sup>29)</sup>について発表したことが発端になった。彼らは、BSAと尿素の系にSDSを加えた溶液の粘度測定(尿素はすごく濃い濃度で使うので、粘度はほとんど尿素の粘度のはず)によってこの現象を発見していた。

これは、おもしろい発見であったのに、長い間注目されず、HSA-尿素系へのSDSの添加効果を旋光分散測定によって検討した論文がその後1960年代に2報出ているだけであった。

“尿素”は昔からタンパク質の変性剤としては使われている代表的なものである。今さら尿素でタンパク質の変性や構造変化を云々しても新鮮さは全くないと当初思った。しかし、不思議なことに、尿素で変性したタンパク質にSDSを加えると、尿素変性を受けていないタンパク質にSDSを加えたときは全く違う影響をその構造に与えることが分かって来た。著者らは、まずBSA-SDS系に尿素を添加してこの現象をCDで追跡した<sup>3, 5, 30, 31)</sup>。尿素変性によって壊されるはずのBSAの構造を、すごく低いSDS濃度で、すなわちごく少ないDSイオンの結合によって保護することが分かった。さらには、DugganとLuckの結果<sup>26)</sup>からは予想もできない結果を得た。尿素変性によって壊されたBSAの構造がごく少ないDSイオンの結合によって再形成されることも新たに分かった。タンパク質の再生の実験も広範に行われているが、これは新たなタンパク質の再生の手法になると思われた。このSDSの保護効果は、次の熱変性で壊されるタンパク質の構造に対しても観測される。

## 2-8 130℃までのタンパク質の熱変性

この測定は、某メーカーが100℃以上でも測定可能なCDのセルホルダーを試作しているとの情報を得たことから始まった。早速、そのメーカーから試作途中のステンレス製の製品を取り寄せ、温度計測器などはこちらでとり付けて、測定にこぎつけた。

タンパク質のヘリックス構造の骨格部分は、氷を作る水分子間と同じ水素結合で形成されている。水素結合は、水 $H_2O$ のH-O-Hの結合角度が104.5度で、結合の性質から $H_2O$ のOはごく微量のマイナス電荷を、2つのHはごく微量のプラス電荷をもつため、電氣的に相互に引き合うことを言う。“氷”は1つの $H_2O$ の周りに4つの $H_2O$ をこの水素結合で引き付けている状態である。引き付けられている各 $H_2O$ も同じように自分の周りの4つの $H_2O$ を水素結合で引き付け、氷の中の $H_2O$ はすべて水素結合でつながる規則的な構造をとっている。氷の水分子間の水素結合は0℃で切れ、氷は液体の水になり、100℃になると水分子はお互い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している水素結合は、室温や体温付近では切れない。温度が100℃以上まで上げられるとなれば、高温になるとタンパク質のヘリックス構造を形成している水素結合が“どこまで”切れるか？あるいはヘリックス構造を形成している水素結合は温度が何度まで上がると切れるか？100℃になったら完全に切れるか？を世界で真

っ先に試してみたかった<sup>4, 32-36)</sup>。

この水素結合が高温になると“どこまで”切れるかは、興味があるだけでなく、重要な意味をもつ。上述したように、一般的にタンパク質の変性や構造変化の研究は、 $N \rightleftharpoons D$ のような化学平衡を想定して行われる。この化学平衡というのは、左右どちら方向にも反応は可逆的に進行することを前提にしている。言うまでもなく、 $N$ 状態と $D$ 状態はタンパク質によってみな違う。 $D$ 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来る。変性剤を使ってタンパク質を変性させることも多くされるが、その変性剤で“どこまで”変性させたものを $D$ 状態とするか、さらに、果たしてその $D$ に対して $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡は成り立っているかは常に懐疑的である。熱変性においても、この事情は同じである。温度が $100^{\circ}\text{C}$ 以上まで上げられるとなれば、 $D$ 状態は高温になるとどこまで変わるか、さらにどの程度の温度まで $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡が成立するか、興味深々であった。

タンパク質はBSAを使い、熱変性に対する保護効果を見るための界面活性剤はSDSを使った<sup>4, 32, 36)</sup>。BSA以外のタンパク質<sup>4, 34, 35)</sup>も検討したが、結論的には、 $130^{\circ}\text{C}$ にしてもどのタンパク質のヘリックス構造も完全には壊れなかった。すなわち、この構造を維持している“そう強くないはずの水素結合”は高温でもすべては切れないことが分かった。 $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡が成立する温度範囲は、タンパク質によってはかなり高温まで広がるが、もちろんタンパク質によって違った。界面活性剤によるタンパク質の構造変化で、 $N \rightleftharpoons D$ の化学平衡の $D$ 状態は界面活性剤濃度によって違うと述べたが、もちろん熱変性においても同じことで、 $D$ 状態は温度によって違う。

また、 $90^{\circ}\text{C}$ くらいまでの熱変性に対してBSAの構造をSDSは低濃度で強く保護する効果を示した。DSイオンの分子量はBSAの分子量の250分の1以下である。この熱変性に対しても、先の尿素変性に対しても、少ない場合はBSAにDSイオンが10個前後結合することによって、このタンパク質の構造を保護している。界面活性剤イオンが親水性と疎水性の両親媒性であることを活用してタンパク質分子内に架橋することによって保護すると著者らは考えている。リン脂質のような生体内に存在する界面活性剤は、両親媒性の機能を発揮して、生体膜を作る以外にも、意外な働きをしている可能性がある。

### 3. おわりに

著者らが、界面活性剤はSDSを、タンパク質はBSAを使って、界面活性剤-タンパク質混合系で掘り起こした現象を中心に述べた。本稿で、唯一例外的なタンパク

質としてメリチンに触れたが、ここで触れなかったタンパク質についても、時々思いがけない結果に出くわした。界面活性剤とは無関係に、光照射によってタンパク質の二次構造が壊れる現象にも出くわした。これは、CD装置のトラブルが発端であった。当時新しく購入したCD装置の信号強度が不安定だった。原因は、測定対象のタンパク質の構造が光源になっているキセノンランプ光の照射の影響を受けているためのものであった。急速、“光照射によるタンパク質の二次構造変化”の実験を始め、急いでアメリカのジャーナルに速報として投稿した<sup>37, 38)</sup>。一方、メーカーの方は、早速その後の装置の光の通路にシャッターを付け、実質的な測定時間以外はサンプルに光が当たらないように改良した。光学機器である限り光を当てずに測定はできないから、実際に測定する時間以外はシャッターを付けるなどして光の照射をさえぎるべきである<sup>37-41)</sup>。この件は、特に強度の強い光源を使う光学機器には共通して言えることである。今から考えてみて、著者にとってはこれが唯一の具体的な社会貢献だったと思う。

これらの仕事は、言うまでもなく、決して著者一人でできたわけではない。博士課程を修了した5名の卒業生、修士課程を修了した数十名の卒業生、卒論をした数百名の卒業生の協力のおかげである。

### 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) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) K. Takeda, *Conformational Analyses of Poly(L-lysine) Induced by Various Surfactants*, Bull. Chem. Soc. Japan, 58, 1210-1214 (1985).
- 11) 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).
- 12) N. Greenfield and G. D. Fasman, *Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation*, Biochemistry, 8, 4108-4116 (1969).
- 13) X. M. He, and D. C. Carter, *Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin*. Nature, 358, 209-215 (1992).
- 14) 安永達也, 竹田邦雄, “界面活性剤のミセル形成と緩和”, 表面, 14, pp.190-206 (1976).
- 15) 竹田邦雄, “昔そして今、私の場合”, 岡山理科大学通信, pp.5-9 (1981).
- 16) K. Takeda and T. Yasunaga, *Kinetics of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle Dissociation by a Pressure-jump Method*, J. Colloid Interface Sci., 40, 127-128 (1972).
- 17) 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).
- 18) K. Takeda, *Kinetics of Coil to  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -Structure Transitions of Poly(L-ornithine) in Low Concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate*, Biopolymers, 24, 683-694 (1985).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) S. Kubota and J. T. Yang, *Conformation and Aggregation of Melittin: Effect of pH and Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate*, Biopolymers, 25, 1493-1504 (1986).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) 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).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) 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).
- 33) 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).
- 34) 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).
- 35) Y. Moriyama, N. Kondo, and K. Takeda, *Secondary Structural Changes of Homologous Proteins, Lysozyme and  $\alpha$ -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).
- 36) 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).
- 37) 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).
- 38) Y. Moriyama, T. Takehi, and K. Takeda, *Changes of  $\alpha$ -Helical and  $\beta$ -Structural Conformations of Polypeptides Caused by the Irradiation of Xenon Lamp in the Current Circular Dichroism Apparatus,* *Anal. Biochem.*, 219, 378-380 (1994).
- 39) 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).
- 40) 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).
- 41) 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).

## Structural Changes of Proteins by Surfactants

Kunio TAKEDA

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

(Received September 1, 2014; accepted November 6, 2014)

The interaction of an ionic surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), with proteins was reviewed. Bovine serum albumin (BSA) was mainly selected as a counterpart of SDS. The SDS-induced secondary structural changes of some proteins including BSA and homopolypeptides, poly(L-lysine) and poly(L-ornithine), were quantitatively examined by the curve-fitting method of circular dichroism (CD) spectra. The structural change of BSA molecule was discussed in detail on the basis of the investigation of the structural changes of BSA fragments corresponding 1.5, 1, and 0.5 domains. The first kinetic studies of the structural changes of these proteins and homopolypeptides caused by the surfactants were also made by applying CD stopped-flow method. The proposed mechanism put forward an important question against the general understanding of the chemical equilibrium of protein denaturation. Recent studies of the thermal denaturations of proteins up to 130 °C also showed that the chemical equilibrium of  $N \rightleftharpoons D$  of each protein exists only in a restricted temperature range.

**Keywords:** surfactant; protein; Sodium dodecyl sulfate; Bovine serum albumin; circular dichroism; secondary structure; protein structure.