

水溶液中におけるアミロースの conformation

中 森 裕 子, 矢 野 由 起*

The Conformation of Amylose in Aqueous Solution

Hiroko Nakamori, Yuki Yano

I 緒 言

アミロースがそのらせん内部に疎水性物質を取り込み、包接化合物を作ること古くから知られている。しかし、その包接機構およびアミロースそのものの溶液物性についてはその溶液が不安定なため、まだ不明な点が多い。

謝名堂ら¹⁾によれば、アミロースは 4M 尿素存在下で、炭化水素鎖を持つドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と安定な可溶性複合体を形成する。この複合体の会合定数は比較的大きく、0.1~0.5% SDS の存在下で電気泳動を行うと、明瞭なバンドを示した。分子量 4,000 の短鎖アミロースについての測定²⁾によれば、pH9.4 における SDS との結合定数 (K) は $5 \times 10^{-3} \text{M}$ (25°C) で、最大結合サイト数は 1 であり、更なるその包接化がエンタルピー駆動の過程であることが示唆された。しかし、pH12 における高分子アミロース (M. W. 16,000 以上) とオクチル基との相互作用は疎水結合性のものであると考えられている³⁾。

このようにアミロースの溶液中における conformation や疎水性物質との相互作用は、アミロースの分子量および溶媒の種類や pH に大きく依存すると考えられる。そこで本実験では、中性領域における疎水性物質の包接化に伴うアミロースの conformation 変化に注目し、分配係数 (K) の微小な変化に敏感な Differential frontal gel chromatography を用いて、相互作用の機構について調べることを目的とした。

II 方 法

1. 試料の調整

アミロースは水に難溶で、その水溶液は 4M 尿素が存在しない場合はきわめて不安定で、時間の経過と

ともに沈殿する。しかし、尿素は水の構造変化を通じて疎水性物質の包接化を妨げることが知られている。従って、溶媒として 1/5M リン酸緩衝液 (pH7.0) を、また試料としては水溶液中で比較的安定で扱いやすい短鎖アミロース (Amylose EX-1, DP 17, 林原) を用いることにした。

短鎖アミロースは加熱により容易に溶解するので、直接緩衝液に加熱溶解し、試料溶液とした。

使用した SDS と他の試薬はすべて特級試薬を用いた。

2. Differential frontal gel chromatography (DFC) 4),5),6),7)

i) 原理

A, B の 2 成分を含む相互反応のゲル透過によって得られる Frontal pattern (ヒタイ形溶出パターン) から、どのような情報が得られるかについて簡単な説明を加えておきたい。今、溶出パターンが平坦な部分 (plateau region) を与えるのに充分な量の (A+B) 混合液をカラムに加えた場合について考えてみる。ただし、 $K_A < K_B$ とする (K は分配係数)。この場合、B の先行界面を境にして A は B が存在しない α ゾーンと、

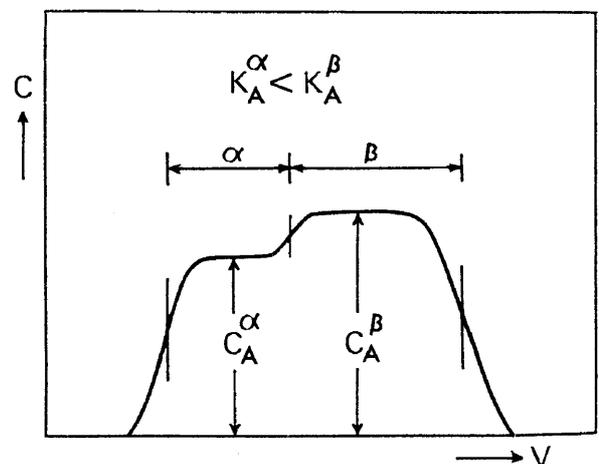


図 1 Differential frontal gel chromatography による フロントパターン例

Bが存在するβゾーンの2つの異なる溶媒雰囲気中を移動することになる。この際、もしAとBの相互作用によってAの分子ディメンジョンが変化するのであれば、Aのαゾーンとβゾーンにおける移動速度に差が生じ、その結果、高さ(濃度)の違う2つの平坦部(C_αとC_β)ができる(図1)。C_αとC_βの比はAのα及びβゾーンにおける分配係数の関数になる。即ち

$$K_A^\beta = \bar{K}_S - \frac{C_\alpha}{C_\beta} (\bar{K}_S - K_A^\alpha) \quad \text{---(1)}$$

ここで、K_A^αはアミロースの分配係数、K_A^βはSDS存在下のアミロースの分配係数、 \bar{K}_S はアミロース存在下のSDSの分配係数である。

ii) 方法

Frontal 分析の分析条件に合うよう Bio-Gel P-10を使用した。カラムは内径1cm、高さ34cmのもので、温度コントロールができるようにジャケット付のものを用いた。流速は5ml/hrに保ち、SF-100G型のミニフラクションコレクター (Toyo) を使って、0.5mlの分画を集めた。

アミロースの定量はフェノール硫酸法で、またSDSの定量はEpton法の改良法⁸⁾で行い、オクタノールはヘキサンで抽出後、ガスクロマトグラフィーによって検出した。

III 結 果

図2はアミロース単独の場合(a)と、アミロース(10μM)とSDS(300μM)の混合溶液30mlを流した時(b)

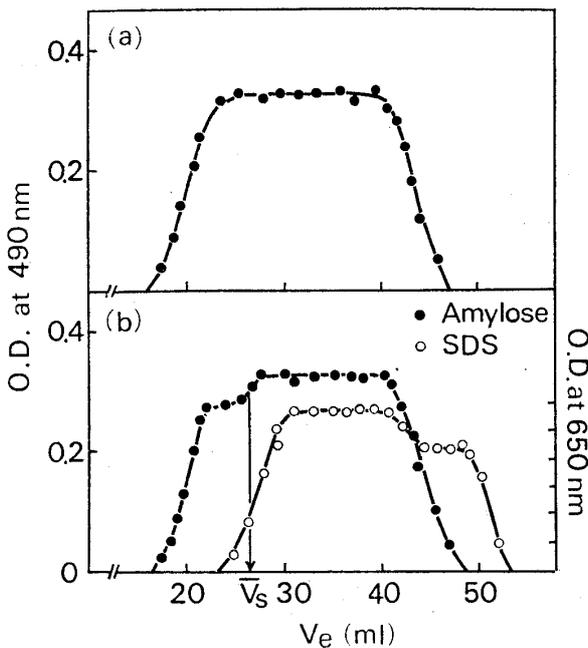


図2 アミロース単独(a), アミロース-SDS混合溶液(b)を流した時の溶出パターン

のDFCの結果である。このフロントルパターンから明らかのように、予想された通りアミロースは2つの平坦部に分かれた。溶出パターンの先行部にくぼみが生じていることから、アミロースはSDSとの相互作用の結果、分子のストークス半径を小さくするということがわかる(おそらく、包接化合物を形成するために、より安定なヘリックス化が起こるためであろう)。そこで両平坦部分のアミロース濃度(C_α, C_β)、および溶出容積(\bar{V}_S)を測定し、SDSが存在する場合の分配係数(K_A^β)を(1)式より求めた。

分配係数(K)の変化は、Ogston⁹⁾の式によってストークス半径(r)の変化に換算することができる。即ちOgstonによれば、Kとゲルの繊維濃度(l)およびγの間に次の式が成立する。

$$K = e^{-\pi r^2} \quad \text{---(2)}$$

K_A^αおよびK_A^βはそれぞれK_A^α=e^{-π(γ_A^α)²、K_A^β=e^{-π(γ_A^β)²と書けるから、この2つの式からγ_A^β/γ_A^αについて解けば}}

$$\frac{\gamma_A^\beta}{\gamma_A^\alpha} = \left(\frac{\ln K_A^\beta}{\ln K_A^\alpha} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{---(3)}$$

が得られる。表1にはこのように計算された結果が示

表1 SDS包接化に伴うアミロースのストークス半径の変化

SDS(μM)	C _A ^β (μM)	C _A ^α (μM)	\bar{V}_S (ml)	γ _A ^β /γ _A ^α
120	143.8	128.8	26.8	0.94
300	143.2	123.2	26.2	0.92
600	143.0	116.3	27.0	0.88

されている。また溶質濃度依存性を調べるため、SDS濃度をかえて(cmc以下)実験を行ったところ、SDS濃度に比例してC_A^β/C_A^αも大きくなり、ストークス半径はSDS 600μMで0.88倍になった。

図2(b)に示されるSDSの後続の平坦部は遊離形のSDS濃度を示すので、これより結合形のSDS量を求めることができる(表2)。このデータをもとに、lang-

表2 アミロースに結合するSDS量

Amylose(μM)	SDS(μM)	SDS _{free} (μM)	SDS _{bound} (μM)	SDS _{bound} /Amylose(g/g)
97	110	74	36	0.0384
101	270	220	50	0.0510
136	313	251	62	0.0570
114	493	419	74	0.0675

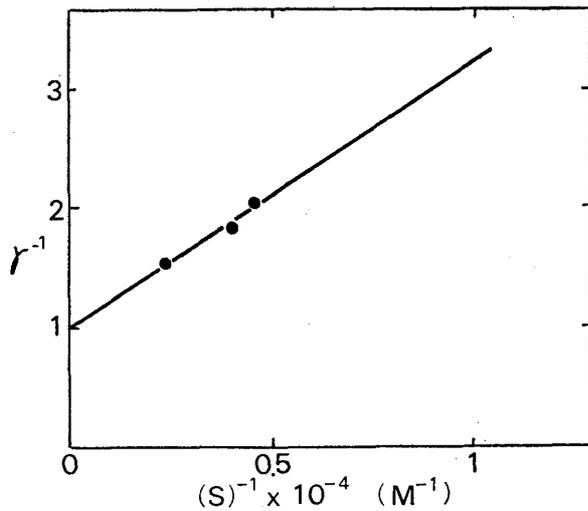


図3 Langmuir の逆数プロット

Langmuir plot を行ったのが図3である。ここで縦軸の切片(最大結合サイト数(n))は1となり、謝名堂ら²⁾のpH9.4における結果と一致した。

SDSの代わりに、非イオン性のオクタノールについて同様にゲル透過を行ったところ、SDSの場合と同じくアミロースのストークス半径は小さくなることがわかった(図4)。また、緩衝溶液とアミロース溶液(0.3%)に対するオクタノールの溶解度をガスクロマトグラフィーで測定したところ、それぞれ0.35mg/g H₂Oと0.44mg/g H₂Oとなり、アミロース溶液の方がオクタノールをよく溶かすことがわかった。このことは、オクタノールのアミロースによる包接化がエネルギー的に有利であるということを示している。

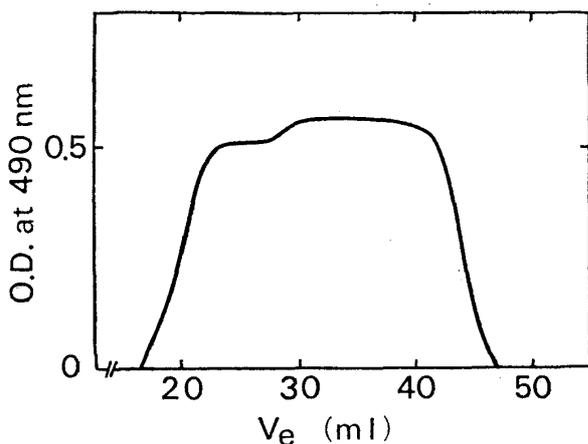


図4 アミロース-オクタノール混合溶液を流した時のアミロースの溶出パターン

次に塩による影響を調べるため、0.1M NaClおよび1M NaCl 中でフロンタル分析を行い、その結果を比較した。SDS濃度はcmc(臨界ミセル濃度, 0.13mM)

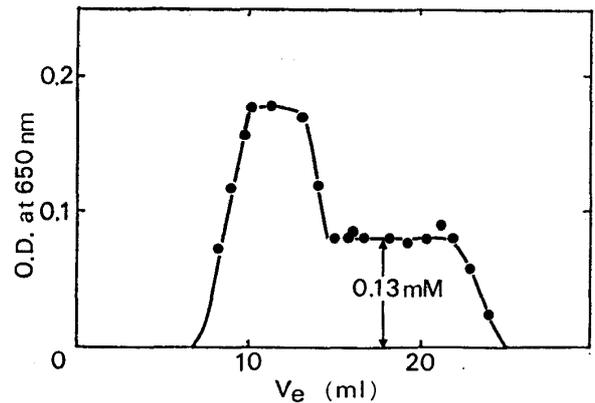


図5 SDSのcmcの測定
(25°Cにセットしたカラム(1cm×10cm)に0.5mMのSDS溶液10mlを流した。溶出溶媒は1MNaCl。後続のプラトーが遊離のSDS濃度(cmc)に相当する。)

より低い0.1mMで行った。(1M NaClにおけるcmcはBio-Gel P-2によるフロンタル分析より求めた¹⁰⁾(図5))。結果は図6に示すように、0.1Mの場合はアミロースの溶出パターンに明確な変化は見られないが、1Mの場合には明らかに K_A^B の増加が起る。このようなnonchaotropicな塩の効果はアミロースとSDSの相互作用が疎水結合性であることを示している。

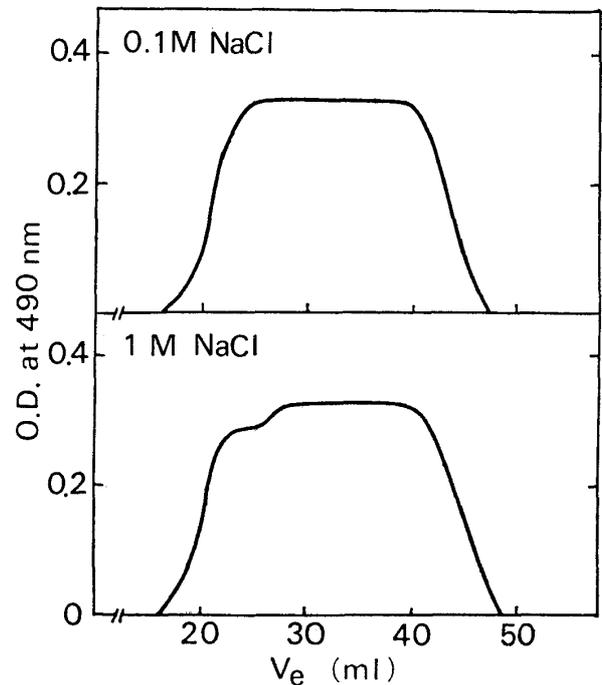


図6 アミロース-SDSのDFC(塩による影響)

IV 考 察

SDSモノマーとアミロース、およびオクタノールとアミロースの系が極めて類似した反応溶出パターンを与えることから、これらの疎水性溶質のアミロースとの相互作用は、SO₄²⁻基やOH⁻基ではなく、炭化水

素鎖にもとづくものと考えられる。この相互作用の結果として起るアミロースのストークス半径の減少 (0.88倍) は、包接化合物 (C) の形成によって構造的にルーズだったアミロース (R) のヘリックスが安定化するためであろう (図7)。即ち、アミロースのヘリックス内



図7 アミロースとSDSの結合モデル

部の疎水的な面と炭化水素鎖の間に疎水結合が形成されると同時に、ヘリックスが協調的に安定化するものと考えられる。もし、ヘリックスの状態が反応の前後において変化しないのであれば、デキストランとSDS^{11),12)}、デキストランと脂肪族アルコール¹³⁾およびマルトオリゴ糖とオクタノール¹⁴⁾の系と同じように、この反応系も吸熱過程あるいはエントロピー駆動の過程であろうと予想される。しかし、実際には温度の上昇とともに、アミロースとSDSおよびオクタノールとの相互作用は弱くなる。この結果は次のように説明することができる。即ち、もし $H_R > H_C$ 、 $S_R \gg S_C$ であれば、温度の増加とともに平衡は左の方へ傾き、ランダムコイルの生成がエネルギー的に有利になる。事実、林ら¹⁵⁾は蛍光偏光度の温度依存性から、中性溶液中のアミロースでは、60°Cでランダムコイル \rightleftharpoons ヘリックス転位が起ると結論している。pH9の溶液中における低分子アミロースとSDSとの複合物形成がエンタルピーの減少に基づくもの²⁾、結局は弱アルカリ中でランダムな状態にあったアミロースが包接化合物形成によって極端なエントロピー損失をきたす結果だと考えることができる。一方、アミロースの分子量が大きくなると (例えば16,000の場合)、複合物形成が強アルカリ中でも (pH12) エントロピー駆動になるが³⁾、それはおそらく、pH12でも高分子アミロースは可成りの程度、ヘリックスの形で存在していることを示唆するものであろう¹⁶⁾。即ち、長鎖のアミロースヘリックスの場合、ヘリックス構造がこわれたルーズな部分が何ヶ所かに形成されることによって、エントロピー的に可成り緩和され、結果的にはヘリックス含量が高い状態をとりうるであろう。

最後に塩の影響について簡単にふれておきたい。食塩のような nonchaotropic な塩は疎水基に対する塩析効果が極めて強い。従って、アミロースヘリックスに対するよりも炭化水素鎖に対する塩析効果によって、

包接化合物 (疎水結合) の形成を促進するものと考えられる。

終りに、本実験にあたり御指導下さいました謝名堂昌信教授に深く感謝致します。また、本研究の実験に直接携わった本研究室卒業研究生、中川章世さんに深く感謝致します。

参考文献

- 1) Shimada, K., Kido, S. and Janado, M. (1976) *Analytical Biochem.*, **72**, 664.
- 2) Nishimura, N. and Janado, M. (1975) *J. Biochem.*, **77**, 421.
- 3) 中森裕子, 井上恭子, 柴田陽子, 山崎喜美江 (1979) *京都女子大学食物学会誌*, **34**, 11.
- 4) Janado, M. and Onodera, K. (1972) *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2027.
- 5) Gilbert, G.A. (1966) *Nature*, **212**, 296.
- 6) Baghurst, P.A., Nichol, L.W., Richard, R.J. and Winzor, D.J. (1971) *Nature*, **234**, 299.
- 7) 謝名堂昌信 (1976) *蛋白質 核酸 酵素*, **21** (9), 736.
- 8) 辻井薫, 高木俊夫, *蛋白質 核酸 酵素*, **19**(No.9), 49.
- 9) Ogston, A.G. (1958) *Trans. Faraday Soc.*, **54**, 1754.
- 10) Janado, M., Yano, Y., Nakamori, H. and Nishida, T. (1979) *J. Biochem.*, **86**, 177.
- 11) Janado, M., Nakayama, R., Yano, Y. and Nakamori, H. (1979) *J. Biochem.*, **86**, 795.
- 12) Janado, M., Yano, Y. and Nakamori, H. (1980) *J. Chromatog.*, **193**, 345.
- 13) Yano, Y. and Janado, M. (1980) *J. Chromatog.*, **200**, 125.
- 14) Janado, M. and Nishida, T. (1981) *J. Solution Chem.*, **10** (8).
- 15) 林晁, 木下恭介, 宮宅康郎, 昭和56年農化年会要旨集, p. 490.
- 16) Erlander, R. and Stig Tobin, R. (1968) *Die Makromolekulare Chemie.*, **111**, 194.

付 録

アミロース (A) とSDS (S) の系について、質量保存則を適用すると次の式が導かれる。

$$C_A^\beta V_L = C_A^\beta (\bar{V}_A + V_L - \bar{V}_S) + C_A^\alpha (\bar{V}_S - V_A) \quad (2)$$

$$C_A^\alpha (\bar{V}_S - V_A) = C_A^\beta (\bar{V}_S - \bar{V}_A)$$

$$\therefore C_A^\alpha / C_A^\beta = \frac{\bar{V}_S - \bar{V}_A}{\bar{V}_S - V_A} \quad (3)$$

ここで

- C_A^α : SDSが存在しない所のアミロース濃度
- C_A^β : SDS存在下のアミロース濃度(初濃度)
- V_A : アミロースの溶出容積
- \bar{V}_A : SDS存在下のアミロースの溶出容積
- \bar{V}_S : アミロース存在下のSDSの溶出容積
- V_L : カラムに加えたサンプル量

(3)式が得られ、一般に $V_e = V_0 + K_{AV} V_i$ であることから

$$C_A^\alpha / C_A^\beta = \frac{\bar{K}_S - K_A^\beta}{\bar{K}_S - K_A^\alpha} \quad (4)$$

となり、ゆえに

$$K_A^\beta = \bar{K}_S - C_A^\alpha / C_A^\beta (\bar{K}_S - K_A^\alpha) \quad (1)$$

式(1)が導かれる。

ここで

- K_A^α : アミロースの分配係数
- K_A^β : SDS存在下のアミロースの分配係数
- \bar{K}_S : アミロース存在下のSDSの分配係数