

氏 名	佐 野 洋 さ の よう
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 101 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	ウシ血清アルブミンの変性と複合体形成に関する物理化学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 垣 正 幸 教 授 大 崎 健 次 教 授 岡 田 壽 太 郎

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質の変性および薬物との結合性は、抗炎症剤などの薬物の作用機構を基礎的な立場から解明するために欠くことのできない研究課題である。これまでこの方面の研究には、吸収スペクトルの変化の測定や膜平衡法による結合量の測定など、種々の方法が用いられているが、それらの研究方法のみでは必ずしも充分とはいえない。変性や薬物との結合によって、蛋白質の分子量や分子形態が変化し、これが薬効の発現に関係することが考えられるが、これに関する研究方法としては、光散乱法および粘度法が用いられる。また生体高分子と高分子性医薬品との相互作用に関しては、それらの間の結合量の測定に膜平衡法を用いることはできないが、光散乱法はこの目的にも用いられる。

本研究においては、まず生体高分子の混合溶液の研究に光散乱を応用する上での問題点について検討したのち、ウシ血清アルブミン (BSA) のグアニジン変性、尿素変性および熱変性について研究し、さらに BSA とコンドロイチン硫酸 (Chs) との相互作用についても研究した。

まず、多種類の高分子成分の混合溶液による光散乱について、混合溶質を単一の溶質成分のごとく取扱って画いた Zimm プロットから得られる見かけの分子量および慣性半径の値と、それぞれの成分の分子量、慣性半径および屈折率増分との間の理論的關係を求めた。さらにこの理論式を応用し、血漿増量剤として用いられているデキストランの水溶液についての研究を行ない、分子量の異なるデキストランを混合した場合に測定される見かけの分子量は、上記の理論式による計算値とよく一致することを認めた。一方、慣性半径の実測値は理論値よりも非常に大きくなったが、この値は各成分を加熱溶解したときの慣性半径の値を用いた計算値とよく一致することを見出した。このことより、分子量の異なるデキストランを単に混合するだけで溶解性が高まり、加熱溶解した場合と同様の良い溶解状態が得られることを結論した。

次に BSA の変性機構を知るために、まず種々の濃度のグアニジン塩酸 (GuHCl) による変性について研究したが、Zimm プロットはいずれの場合にも直線にならず、下に凸の曲線になった。そこで、散乱角 90° 方向における散乱比を測定することにより、高分子セグメントの光学異方性の補正を行なうと、正常

な慣性半径の値が得られた。また BSA-GuHCl 混合溶液を、これと膜平衡にある GuHCl 溶液で希釈して屈折率増分 ϕ_u を測定し、その結果から GuHCl の選択的結合が行なわれていることを結論した。この ϕ_u の値を用いて得られた分子量および慣性半径の値を用いて、分子の形および大きさを計算し、その結果を固有粘度の値と比較して次の結果を得た。すなわち BSA 分子は GuHCl 濃度が高くなるにつれて次第に細長くのびた形になること、変性した BSA 分子は GuHCl 濃度が 2M 付近で side-by-side に結合して 2 量体を形成すること、さらに GuHCl 濃度が高くなると、この分子間結合は再び切れて単量体になることなどを結論した。また、尿素変性についても研究し、その作用は GuHCl の場合よりもはるかに弱いこと、尿素濃度が 5.5M 以上では分子間会合が支配的であること、生じた会合体は太さが一定で細長くのびた形になることを結論した。

さらに熱変性について研究した。末変性蛋白質にのみ特異的に結合する HABA 試薬を用いて求めた変性度は、BSA 溶液の加熱時間が長く加熱温度が高いほど大きくなるが、このようにして変性させた BSA の固有粘度は熱処理の方法によらず、HABA 変性度のみによって定まり、その値ならびに屈折率増分、偏比容、分子量および慣性半径の値は、変性度が 0.85 以下では生 BSA の値とほとんど等しいが、0.85 を越えると急激に変化した。このことから、変性度が 0.85 以下では分子内変性が、0.85 以上では分子間会合がおこっていることを結論した。この会合体は棒状で、その太さは生 BSA の長軸の長さに等しく $140\text{\AA}$ で一定であるが、その長さは次第に増大し、完全に変性した状態では $2910\text{\AA}$ 程度に達し、378 分子の BSA が side-by-side で結合して棒状の会合体を形成していることを明らかにした。

以上の研究は BSA の自己会合および低分子変性剤との複合体形成に関するものであるが、さらに BSA に Chs を加えた混合溶液について、光散乱法および粘度法による研究を行ない、BSA と Chs の間で可溶性複合体が形成されることを結論した。そこで高分子混合溶液に関する理論式を応用して複合体分子自身の物性値を算出した。その結果、結合した BSA と遊離状態で存在する BSA 分子との間で Langmuir 型の式が成立すること、複合体は Chs 分子を芯にしてそのまわりに BSA が結合した棒状の分子を形成すること、Chs1 分子あたり最大約 21 分子の BSA が結合することなどを結論した。また、高分子混合系の固有粘度についての理論式を誘導し、この式を用いて複合体自身の固有粘度の値を求めた。この値と、光散乱法による測定値から計算した理論値との比較によって、複合体分子は細長い形をしており、BSA の最大結合状態に於ては、その長さは芯となっている Chs 分子の長さの約 1.3 倍、直径は約 6 倍であることなどを結論した。

以上のように本論文においては、まず高分子混合系の光散乱に関する理論式を導き、この式をデキストランの混合溶液に適用し、混合により溶解性が良くなることを見出した。次に BSA の変性機構について研究し、グアニジン変性の場合には BSA のセグメントが光学異方性を持つことを示し、かつ、グアニジン濃度の増大とともに BSA 分子は細長くなり、side-by-side に結合して 2 量体をつくり、さらに再び単量体に分れることを結論した。また熱変性については、まず BSA 分子の分子内変性がおこり、これにひきつづいて分子間会合がおこり棒状の会合体を生ずることを示した。さらに、Chs と BSA の混合系では Chs 分子を芯にして、そのまわりに BSA 分子が結合して細長い複合体分子を生ずることを結論した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生体内における医薬品の作用機構を考察するための基礎として重要な、血清アルブミンの変性と複合体形成に関するものである。

著者はまず、光散乱法を生体高分子の混合溶液の研究に応用する上での問題点について検討したのち、ウシ血清アルブミンのグアニジン変性、尿素変性および熱変性を光散乱法および粘度法によって研究し、種々の変性度における分子の形および大きさを求め、これにもとづいて変性は2段階に行なわれること、すなわち変性度の増大につれてまず分子内変性、次に分子間会合がおこることを結論した。次にウシ血清アルブミンとコンドロイチン硫酸ナトリウムとの相互作用について研究し、コンドロイチン硫酸ナトリウムの分子は水溶液中では細長い棒状とみなされ、その表面にウシ血清アルブミン分子が結合することによって複合体が形成されることを結論した。

以上の研究は薬品物理化学上有益であり、特に薬物の作用機構に関する物理化学的研究の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。