

タンパク誤差現象におけるタンパク質-色素結合の 化学平衡の解析

鈴木 優 治*

(1993 年 4 月 1 日受理)

生物試料のタンパク質の定量に広く応用されているタンパク誤差の化学平衡について検討した。タンパク誤差の化学平衡に関する計算はそれがタンパク質分子の正荷電したアミノ基と解離した色素陰イオン間の相互作用により起こると仮定し、行った。又、タンパク質と色素の相互作用には、1 分子のタンパク質が数分子の色素と反応するので多くの平衡が存在すると言われているが、第一反応の平衡定数は他の平衡定数に比べて非常に大きく、第一反応以外のタンパク誤差に対する寄与は無視できると仮定した。これらの仮定のもとで計算された結果は種々の実験から得られた結果と定性的に一致し、タンパク質分子の正荷電したアミノ基と色素陰イオン間の相互作用がタンパク誤差の発現に重要な役割を担っていることを示唆していた。更に、色素タンパク質複合体の平衡定数が約 $10^6 \sim 10^7$ である場合、色素の電離定数が 10^{-7} より小さいならば、タンパク誤差はほとんど起こらないと考えられた。それゆえ、大きな電離定数を有する色素の検索と選択は生物試料のタンパク質の定量に適する色素を与えると考えられた。

1 緒 言

タンパク誤差は pH 指示薬を用いて pH を測定する際に見られる現象である。これはタンパク質の存在のみにより pH 指示薬が変色する現象であり、Sørensen により初めて報告された¹⁾。タンパク質により生じる色調変化はタンパク質濃度に比例するため、この現象はタンパク質の定量に広く用いられるようになった^{2)~7)}。タンパク質の定量用の pH 指示薬として、メチルオレンジ²⁾³⁾、ブロムフェノールブルー⁴⁾、ブロムクレゾールグリーン⁵⁾、ブロムクレゾールパープル⁶⁾、コマジープリリアントブルー G250⁷⁾ などが知られているが、その反応機構は十分に解明されていない。そのため、タンパク質の定量に用いる色素の検索及び選択は経験的になされているにすぎない。

色素とタンパク質の相互作用には、①非解離型色素とタンパク質との反応、②非解離型色素及び解離型色素陰イオンとタンパク質との反応、③解離型色素陰イオンとタンパク質の正荷電部位との反応などが挙げられているが、現実には程度の差はあるとしても、これらのすべてがタンパク誤差に関係していると考えられている⁸⁾。Chapman らはゼラチンと色素の結合について検

討し、この結合が化学量論に従い、結合色素量がタンパク質分子内のリジン、アルギニン、ヒスチジンの遊離アミノ基の含量に相関することを報告している⁹⁾。又、タンパク質による色調の変化は反応溶液 pH により著しい影響を受けることから¹⁰⁾¹¹⁾、その発現には pH の変化とともに変化するタンパク質の荷電が大きく寄与している可能性が推定される。そこで、著者はタンパク誤差が解離型色素陰イオンとタンパク質の正荷電部位との結合により起こると仮定し、その解析を試みた。その結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試 薬

2.1.1 緩衝溶液 緩衝溶液は pH 2.2~7.8 のものは 0.1 mol/l クエン酸溶液と 0.2 mol/l リン酸二ナトリウム溶液を混合し、調製した。又、pH 2.0 以下の溶液は塩酸溶液で調製した。pH の測定は堀場 M-8 型 pH メーターで行った。

2.1.2 ウシ血清アルブミン溶液 ウシ血清アルブミン (和光純薬工業) 100 mg を精製水に溶かし、100 ml とした。

2.1.3 色素溶液 コマジープリリアントブルー G250 (CBBG-250)、ブロムフェノールブルー (BPB)、ブロムクレゾールグリーン (BCG) 及びプロ

* 埼玉県立衛生短期大学: 埼玉県浦和市上大久保 519

ムクレゾールパープル (BCP) をそれぞれ 1 mmol とし、精製水に溶かし、1 l とした。

2・1・4 Brij 35 溶液 Brij 35 (和光純薬工業) 1.0 g を約 80 ml の温水に溶かし、冷却後に精製水を加えて 100 ml とした。

2・1・5 2 mol/l 塩化ナトリウム溶液 塩化ナトリウム (和光純薬工業製特級) 11.7 g を精製水に溶解し、100 ml とした。

2・2 測定操作

試験液はウシ血清アルブミン溶液 0.5 ml に緩衝溶液 5.0 ml, Brij 35 溶液 1.0 ml 及び色素溶液 0.1 ml を加え、よく混和し調製した。から試験液は精製水 0.5 ml に緩衝溶液 5.0 ml, Brij 35 溶液 1.0 ml 及び色素溶液 0.1 ml を加え、よく混和し調製した。又、タンパク誤差に対する陰イオンの影響は試験液とから試験液に 0~2.0 mol/l 塩化ナトリウム溶液 0.5 ml ずつを加え、検討した。

試験液の吸光度はから試験液を対照として島津ダブルビーム UV200 分光光度計で測定した。測定波長は CBBG-250, 600 nm, BPB, 590 nm, BCG, 620 nm, BCP, 590 nm とした。

3 結果及び考察

3・1 タンパク誤差現象における化学平衡

タンパク質と他の物質との結合に関しては Scatchard モデル、多重平衡モデル⁸⁾、Klotz らのモデル¹²⁾などがある。これらのモデルでは、タンパク質は複数の物質と結合することが仮定されており、解析は容易ではない。一般的には、多重平衡モデルが実際の様子に近いと考えられている⁸⁾。このモデルでは、タンパク質 1 分子に n 個の物質が結合する場合、結合は n 段階で進行し、それぞれの結合ごとに平衡定数 ($K_1, K_2, \dots, K_n$) が存在する。ここで、タンパク誤差に対する寄与はタンパク質と色素の第一段階の結合が最も大きく、他の段階の結合の寄与は小さく、無視できると仮定すれば、解析はすこぶる簡単になると考えられる。このような取り扱いによってもタンパク誤差の定性的な理解に結びつくであろう。そこで、タンパク誤差が次の条件の下で生じると仮定し、解析した。

① タンパク質は色素と結合する複数の反応点 (結合サイト) を持つが、各結合サイトは 1 分子の色素とのみ結合し、それぞれの結合は段階的に起こる。ただし、タンパク誤差に対する寄与は第一段階の結合で最も大きく、それ以後の反応段階の結合では、小さく無視できる

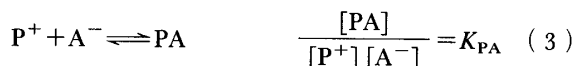
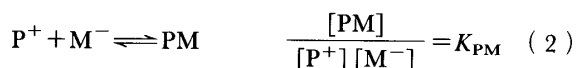
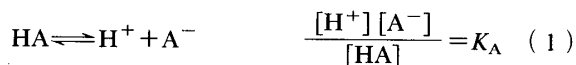
とする。

結合サイトは正荷電したアミノ基 ($-\text{NH}_3^+$) であり、反応する色素は解離型色素陰イオン (A^-) とする。

② pH の変化に伴うタンパク質の荷電の変化曲線とアミノ酸の荷電の変化曲線は類似している¹³⁾、タンパク質の荷電はアミノ酸の電離式から近似的に計算できるとする。

③ 反応溶液中に共存する陰イオン (M^-) もタンパク質の正荷電部位と結合する。

④ 反応溶液中の色素 (HA)、タンパク質 (P^+)、共存陰イオン (M^-) には次の平衡が成立する。



ここで、 K_A は色素の電離定数、PM 及び PA は陰イオンタンパク質複合体及び色素タンパク質複合体、 K_{PM} 及び K_{PA} は陰イオンタンパク質複合体及び色素タンパク質複合体の結合平衡定数を表す。又、 P^+ は正荷電したタンパク質を示す。

⑤ 生成した色素タンパク質複合体の吸収ピーク波長は非解離型色素の吸収ピーク波長から離れており、前者の吸収ピーク波長付近に後者の吸収はないものとする。又、陰イオンタンパク質複合体は可視部に吸収を示さないものとする。

反応溶液中の色素 (HA)、タンパク質 (P^+)、陰イオン (M^-) 総濃度をそれぞれ C_A, C_P, C_M とすると、

$$C_A = [\text{HA}] + [\text{A}^-] + [\text{PA}]$$

$$C_P = [\text{P}^+] + [\text{PA}] + [\text{PM}]$$

$$C_M = [\text{M}^-] + [\text{PM}]$$

色素タンパク質複合体濃度 (PA) は次のようになる。

式 (2) から、 $[\text{PM}] = K_{\text{PM}} [\text{P}^+][\text{M}^-]$ 、又、 $[\text{M}^-] = C_M - [\text{PM}]$ であるので、 $[\text{PM}] = [\text{P}^+](C_M - [\text{PM}]) \times K_{\text{PM}}$ 。

従って、陰イオンタンパク質複合体濃度は

$$[\text{PM}] = \frac{[\text{P}^+] C_M K_{\text{PM}}}{1 + [\text{P}^+] K_{\text{PM}}} \quad (4)$$

式 (1) 及び式 (3) を変形した式 (5) と式 (6) を組み合わせると、式 (7) が得られる。

$$[HA] = C_A - [A^-] - [PA] \quad (5)$$

$$[A^-] = \frac{[PA]}{[P^+]K_{PA}} \quad (6)$$

$$[HA] = C_A - \frac{[PA]}{[P^+]K_{PA}} - [PA] \quad (7)$$

式(1)と式(3)の積をとり、この式の $[HA]$ に式(7)の結果を代入すると、

$$\frac{[H^+][PA]}{[HA][P^+]} = \frac{[H^+][PA]}{\left(C_A - \frac{[PA]}{[P^+]K_{PA}} - [PA]\right)[P^+]} = K_A K_{PA} \quad (8)$$

式(8)を変形し、整理すると、

$$\begin{aligned} [H^+][PA] &= K_A K_{PA} \left(C_A - \frac{[PA]}{[P^+]K_{PA}} - [PA] \right) [P^+] \\ &= K_A K_{PA} C_A [P^+] - K_A [PA] - K_A K_{PA} [PA][P^+] \\ &= [P^+] (K_A K_{PA} C_A - K_A K_{PA} [PA]) - K_A [PA] \end{aligned}$$

これから、未反応のタンパク質濃度 $[P^+]$ は

$$[P^+] = \frac{[H^+][PA] + K_A [PA]}{K_A K_{PA} C_A - K_A K_{PA} [PA]} \quad (9)$$

式(4)と $[P^+] = C_P - [PA] - [PM]$ を組み合わせると、

$$\begin{aligned} [P^+] &= C_P - [PA] - [PM] \\ &= C_P - [PA] - \frac{[P^+]K_{PM}C_M}{1 + [P^+]K_{PM}} \end{aligned}$$

この式を整理すると、次式が得られる。

$$K_{PM}[P^+]^2 + [P^+](1 - K_{PM}C_P + [PA]K_{PM} + K_{PM}C_M) - C_P + [PA] = 0 \quad (10)$$

この式における未反応のタンパク質濃度 $[P^+]$ に式(9)の結果を代入すると、

$$\begin{aligned} &K_{PM} \left(\frac{[H^+][PA] + K_A [PA]}{K_A K_{PA} C_A - K_A K_{PA} [PA]} \right)^2 + \\ &(1 - K_{PM}C_P + [PA]K_{PM} + K_{PM}C_M) \times \\ &\left(\frac{[H^+][PA] + K_A [PA]}{K_A K_{PA} C_A - K_A K_{PA} [PA]} \right) - C_P + [PA] \\ &= 0 \end{aligned}$$

各項に $(K_A K_{PA} C_A - K_A K_{PA} [PA])^2$ を乗じ、展開し、 $[PA]$ 項でまとめると、 $[PA]$ に関する三次式が得られる。

$$\begin{aligned} &[PA]^3 (K_A^2 K_{PA}^2 - K_A K_{PA} K_{PM} [H^+] - K_A^2 K_{PA} K_{PM}) \\ &+ [PA]^2 (K_A K_{PA} K_{PM} C_A [H^+] + K_A K_{PA} K_{PM} C_A \\ &- K_A K_{PA} [H^+] - K_A K_{PA} K_{PM} C_M [H^+] - K_A^2 K_{PA} \\ &+ K_A^2 K_{PA} K_{PM} C_P - K_A^2 K_{PA} K_{PM} C_M + K_{PM} [H^+]^2 \\ &+ 2K_A K_{PM} [H^+] + K_A^2 K_{PM} - 2K_A^2 K_{PA} C_A \\ &- K_A^2 K_{PA}^2 C_P) + [PA] (K_A K_{PA} C_A [H^+] \\ &- K_A K_{PA} K_{PM} C_A C_P [H^+] + K_A K_{PA} K_{PM} C_A C_M [H^+] \\ &+ K_A^2 K_{PA} C_A - K_A^2 K_{PA} K_{PM} C_A C_P \\ &+ K_A^2 K_{PA} K_{PM} C_A C_M + K_A K_{PA} K_{PM} C_P [H^+] \\ &+ K_A^2 K_{PA} C_A^2 + 2K_A^2 K_{PA}^2 C_A C_P) - K_A^2 K_{PA}^2 C_A^2 C_P \\ &= 0 \end{aligned} \quad (11)$$

前述のごとく、解離型色素陰イオンと結合するのは正荷電したアミノ基($-\text{NH}_3^+$)であると仮定したので、式(11)の C_P は正荷電したアミノ基を有するタンパク質濃度を表すことになる。巨大分子であるタンパク質分子内には多数のカルボキシル基とアミノ基が存在するが、個々の基の電離に関する解析は不可能であると考えられる。しかし、仮定で述べたようにタンパク質の荷電は平均的にはアミノ酸の荷電変化と類似していると考えられる。そこで、タンパク質の荷電はアミノ酸の場合と同様に算出できるものと仮定した。このことから、反応溶液中の全タンパク質濃度を C_X 、タンパク質分子内のアミノ基の平均的な電離度を α とすると、正荷電したアミノ基を有するタンパク質濃度 C_P は次のように計算される¹⁴⁾。

$$C_P = \alpha C_X \quad (12)$$

ただし、 α は次のように表される。

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{K_W}{K_b [H^+]} + \frac{K_a K_W}{K_b [H^+]^2}}$$

ここで、 K_a 、 K_b はタンパク質分子内のカルボキシル基とアミノ基の平均的な電離定数を表す。又、 K_W は水のイオン積を表す。式(11)の C_P に式(12)の結果を代入し、 $[PA]$ についての三次方程式を解けば、この反応系で生成する色素タンパク質複合体濃度が得られる。

ところで、色素タンパク質複合体を含む反応溶液が示す特定の波長における吸光度 (E_P) は生成した色素タンパク質複合体 (PA) と未反応の解離型色素陰イオン (A^-) の吸光度の和 ($E_{PA} + E_{A^-}$) である。又、から試験溶液中の解離型色素陰イオン (A^-) の示す吸光度を E_B とすると、分光光度計でから試験溶液を対照として測定される色素タンパク質複合体を含む試験溶液の吸光

度 (E_Z) は次のようになる。

$$E_Z = E_{PA} + E_A^- - E_B \\ = \epsilon_{PA}[PA] + \epsilon_A[A^-] - \epsilon_A[A'^-] \quad (13)$$

ここで, ϵ_{PA} , ϵ_A は色素タンパク質複合体のモル吸光係数及び解離型色素陰イオンのモル吸光係数を表す。一方, $[A^-]$ と $[A'^-]$ は次のように算出される。

式(1)から, $[H^+][A'^-] = K_A[HA]$, 又 $[HA] = C_A - [A^-] - [A'^-]$ であるので $[H^+][A'^-] = K_A C_A - K_A[A^-]$ となる。従って,

$$[A'^-] = \frac{K_A C_A}{[H^+] + K_A} \quad (14)$$

又, $[H^+][A^-] = K_A[HA]$, $[HA] = C_A - [A^-] - [PA]$ であるので, $[H^+][A^-] = K_A C_A - K_A[A^-] - K_A[PA]$ となる。従って

$$[A^-] = \frac{K_A(C_A - [PA])}{[H^+] + K_A} \quad (15)$$

得られた $[A^-]$ 及び $[A'^-]$ の値を式(13)に代入すれば E_Z が求まる。更に, 求めた E_Z を全タンパク質が色素タンパク質複合体を形成すると仮定したときに示すと考えられる吸光度, $E_T = \epsilon_{PA} C_X$ で除すと, 反応溶液の吸光度の増加が何 % のタンパク質の反応に相当するかが求められる。

$$R = \frac{E_Z}{E_T} \times 100\% \\ = \frac{\epsilon_{PA}[PA] + \epsilon_A[A^-] - \epsilon_A[A'^-]}{\epsilon_{PA} C_X} \times 100\% \quad (16)$$

ϵ_{PA} 及び ϵ_A の値は不明であるので, とりあえず $\epsilon_A = \epsilon_{PA}$ と仮定し, 計算を進める。この仮定により, 式(16)は次のように色素タンパク質複合体及び解離型色素陰イオンのモル吸光係数とは関係のない式となり, $[PA]$, $[A^-]$, $[A'^-]$ を計算することにより R が求まる。

$$R = \frac{[PA] + [A^-] - [A'^-]}{C_X} \times 100\% \quad (17)$$

3・2 タンパク誤差現象の性質

前述のように色素とタンパク質との反応で生成する色素タンパク質複合体の生成量は式(11)で計算されることが分かった。式(11)から, 色素タンパク質複合体の生成量は色素の濃度及び電離定数, タンパク質の濃度及びアミノ基とカルボキシル基の電離定数, 共存陰イオンの濃

度, 色素タンパク質複合体及び共存陰イオンタンパク質複合体の平衡定数, 溶液 pH に依存している。そこで, 色素タンパク質複合体の生成量とこれらのうちの幾つかの因子との関係についてシミュレーションし, 観測結果と比較してみた。シミュレーションに当たって, 色素タンパク質複合体及び共存陰イオンタンパク質複合体の平衡定数は文献値⁸⁾を参考としてそれぞれ $K_{PA} = 10^5 \sim 10^7 \text{ mol}^{-1}$, $K_{PM} = 10^2 \text{ mol}^{-1}$ とした。又, タンパク質のカルボキシル基及びアミノ基の平均電離定数はそれぞれ $K_a = 10^{-4} \text{ mol/l}$, $K_b = 10^{-6} \text{ mol/l}$ とした。色素濃度, タンパク質濃度及び共存陰イオン濃度はそれぞれ実験で用いた濃度 $C_A = 1.52 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, $C_X = 1.10 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$, $C_M = 0.1 \text{ mol/l}$ とした。

3・2・1 色素タンパク質複合体の生成量と反応溶液 pH

試験溶液及びから試験溶液中の解離型色素陰イオン濃度である $[A^-]$ と $[A'^-]$ が溶液 pH によりどのように変化するかにについて計算した。その結果, $[A^-]$ と $[A'^-]$ は pH の値にかかわらず $[A^-] < [A'^-]$ であった。従って, から試験液を対照として測定される試験液の吸光度は正確には色素タンパク質複合体の生成による吸光度の増加を示すものではない。すなわち, 試験溶液の吸光度の増加と式(16)で求められる R は見掛けの

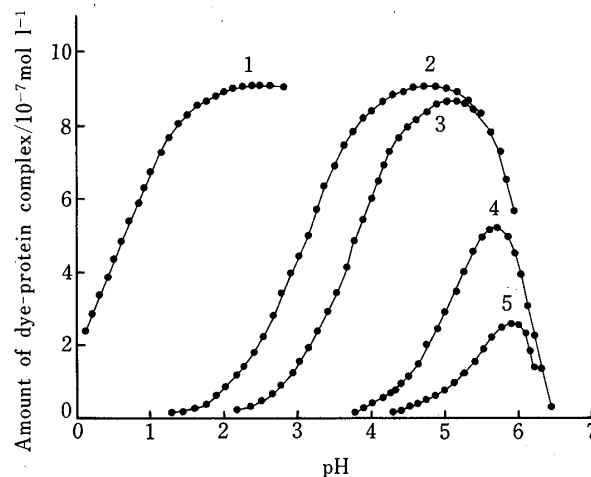


Fig. 1 Relation between the pH of a solution and the formation amount of a dye-protein complex for various pK_A values of dyes when the K_{PA} value of the dye-protein complex and concentrations of the dye (C_A) and protein (C_X) are 10^7 mol^{-1} , $1.52 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ and $1.10 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$, respectively (calculated result)

pK_A values of dyes in each curve are as follows: 1, $pK_A = 1.5$; 2, $pK_A = 3.98$; 3, $pK_A = 4.67$; 4, $pK_A = 6.3$; 5, $pK_A = 7.0$.

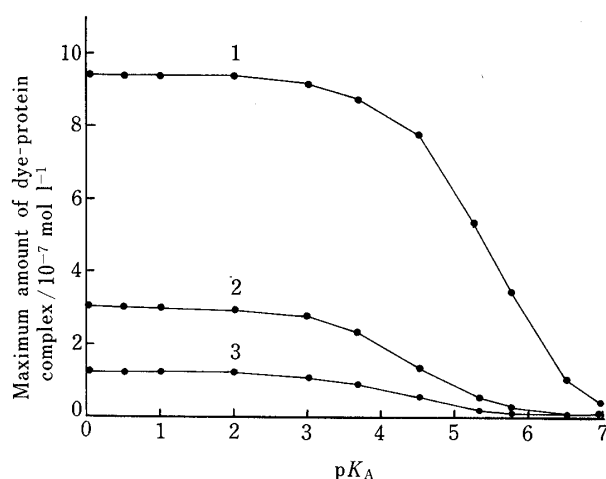


Fig. 2 Relation between the pK_A values of dyes and the maximum formation amount of a dye-protein complex with various K_{PA} values when the concentrations of the dye and protein are 1.52×10^{-5} mol/l and 1.10×10^{-6} mol/l, respectively (calculated result)

The association constants of dye-protein complex in each curve are as follows: 1, $K_{PA} = 10^7$; 2, $K_{PA} = 10^{5.5}$; 3, $K_{PA} = 10^5$ mol $^{-1}$ l.

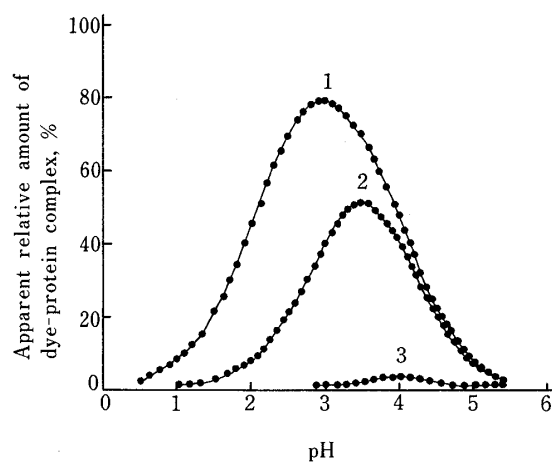


Fig. 3 Apparent relative formation amount of a dye-protein complex with various K_{PA} values when the pK_A values and the concentrations of the dye and protein are 3.98, 1.52×10^{-5} mol/l and 1.10×10^{-6} mol/l, respectively (calculated result)

The association constants of dye-protein complex in each curve are as follows: 1, $K_{PA} = 10^8$; 2, $K_{PA} = 10^7$; 3, $K_{PA} = 10^5$ mol $^{-1}$ l.

ものであることが分かる。

Fig. 1 は色素の pK_A を 1.5, 3.98, 4.67, 6.3, 7.0 とした

場合の色素タンパク質複合体の生成量と溶液 pH との関係を示している。図のように生成量は溶液 pH に依存し、これが最大となる pH が存在する。又、生成量は色素の pK_A により変化し、色素の電離定数が小さくなるほど減少する。又、式(16)から計算した見掛けの色素タンパク質複合体の生成率は反応溶液 pH に対し、最大値を有するつりがね状の変化を示し、色素の pK_A が大きくなるほど低下すると予想された。

3・2・2 色素タンパク質複合体の平衡定数及び色素の電離定数と複合体生成量

Fig. 2 は色素タンパク質複合体の平衡定数を $10^5 \sim 10^7$ mol $^{-1}$ l としたとき、Fig. 1 の各曲線のピークに相当する最大生成量が色素の pK_A とどのような関係にあるかを計算した結果を示している。図から明らかなように、最大生成量は pK_A 値が 0~3 ではほぼ一定値を示すが、それ以上の pK_A 領域では徐々に低下し、 pK_A が 7~8 の色素では極めて微量になると推定される。又、Fig. 3 は見掛けの色素タンパク質複合体の生成率と pH 及び色素タンパク質複合体の平衡定数との関係を表している。見掛けの生成率はその平衡定数の大きさにかかわらず pH に対し、最大値を有するつりがね状の変化を示した。しかし、見掛けの最大生成率を示す pH は色素タンパク質複合体の平衡定数が小さくなるほど、アルカリ側にシフトすると考えられた。

Fig. 1~3 で示した推定を検証するため、コマジープリリアントブルー G250 ($pK_A = 1.5$)、ブロムフェノー

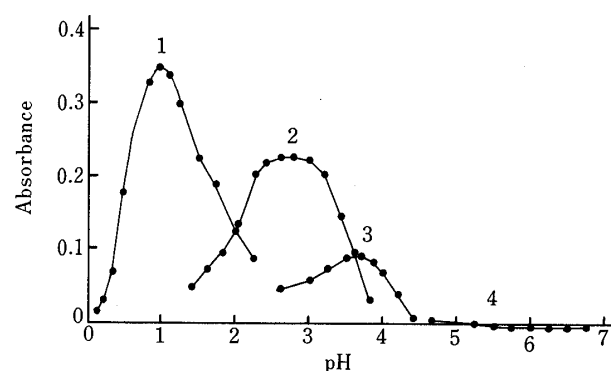


Fig. 4 Relation between the solution pH and the apparent amount of a dye-protein complex formed in four kinds of pH indicators when the concentrations of the dye and protein are 1.52×10^{-5} mol/l and 1.10×10^{-6} mol/l, respectively (experimental result)

The pH indicators in each curve are as follows: 1, CBBG-250; 2, BPB; 3, BCG; 4, BCP.

ルブルー ($pK_A=3.98$), ブロムクレゾールグリーン ($pK_A=4.67$), ブロムクレゾールパープル ($pK_A=6.3$) を用いて見掛けの色素タンパク質複合体の生成率を各 pH で測定した. Fig. 4 のように 3 種類の色素から生成した色素タンパク質複合体の見掛けの生成率には最大値が存在し, pH に対してつりがね状の変化が観測された. しかし, pK_A の大きいブロムクレゾールパープルでは見掛けの色素タンパク質複合体の生成はほとんど認められなかった. 以上のように, 4 種類の pK_A の異なる色素を用いて行った測定結果は Fig. 1~3 に示した推定結果と定性的には一致しており, タンパク誤差に対して先に述べた ①~⑤ の仮定が成り立つと考えられた.

3・2・3 色素タンパク質複合体の生成量と共存陰イオン濃度 色素タンパク質複合体の生成量が共存陰イオンによりどのように変化するかを $C_M=0\sim0.25$ mol/l の範囲で検討した. Fig. 5 は共存陰イオン濃度が $C_M=0$ のときの生成量を 100 とし, 各陰イオン濃度における相対生成量を計算した結果である. それぞれの曲線は色素タンパク質複合体の平衡定数が $K_{PA}=10^6, 10^{6.5}, 10^7$ mol $^{-1}$ l のときの変化を示しているが, いずれの場合にも共存陰イオン濃度が増加するほど, 生成量は減少すると考えられた. 又, その低下の割合は色素タンパク質複

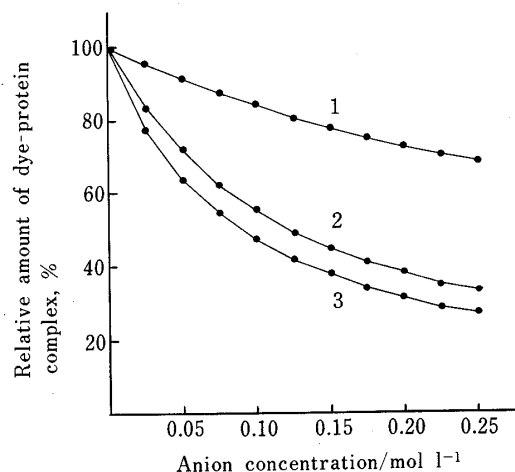


Fig. 5 Relation between the anion concentration of salt and the relative amount of the dye-protein complex formed (calculated result)

Each curve indicates the relative formation amount of a dye-protein complex with various K_{PA} values when the pK_A value and the concentrations of the dye and protein are 3.98, 1.52×10^{-5} mol/l and 1.10×10^{-6} mol/l, respectively. K_{PA} values of dye-protein complex in each curve are as follows: 1, $K_{PA}=10^7$; 2, $K_{PA}=10^{6.5}$; 3, $K_{PA}=10^6$ mol $^{-1}$ l.

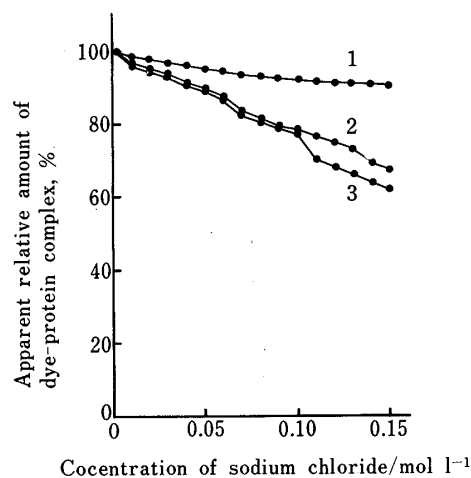


Fig. 6 Relation between the salt concentration and the apparent relative amount of the dye-protein complex formed in three kinds of pH indicators (experimental result)

The concentrations of the dye and protein are 1.41×10^{-5} mol/l and 1.01×10^{-6} mol/l, respectively. The pH indicators in each curve are as follows: 1, CBBG-250; 2, BPB; 3, BCG.

体の平衡定数が小さいほど大きくなると推定された.

Fig. 6 は前述の 3 種類の色素とタンパク質との反応に対する陰イオンの影響を調べるため, 反応溶液に塩化ナトリウムを $0\sim0.14$ mol/l の割合で添加したときに得られた見掛けの色素タンパク質複合体の相対生成量を示している. 図のように, いずれの色素でも陰イオンを生成する塩化ナトリウムの共存により生成量は低下することが分かった. 又, その低下の割合は色素により異なっていたが, これは先に推定したように各色素から生成した色素タンパク質複合体の平衡定数が異なることを示すものと考えられる.

3・2・4 色素タンパク質複合体の生成量と色素濃度 色素タンパク質複合体の平衡定数を $K_{PA}=10^6, 10^{6.5}, 10^7$ mol $^{-1}$ l, 色素濃度を $C_A=0\sim5\times10^{-5}$ mol/l とし, 複合体の生成量と $pK_A=3.98$ の色素の濃度との関係を計算した. その結果, タンパク質濃度が一定のときには複合体の生成量はその平衡定数が大きいほど大きくなると推定された.

Fig. 7 は CBBG-250, BPB 及び BCG 濃度を $4\times10^{-6}\sim3\times10^{-5}$ mol/l の範囲で変えて測定した見掛けの色素タンパク質複合体の生成量を示しており, 計算から得られた推定結果と類似していた.

又, 色素濃度を一定にし, タンパク質濃度を増加させ

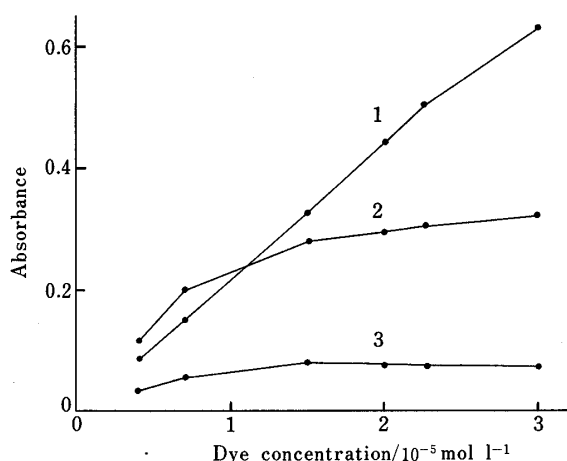


Fig. 7 Relation between the dye concentration and the apparent amount of the dye-protein complex formed in three kinds of pH indicators (experimental result)

The pH indicators in each curve are as follows: 1, CBBG-250; 2, BPB; 3, BCG.

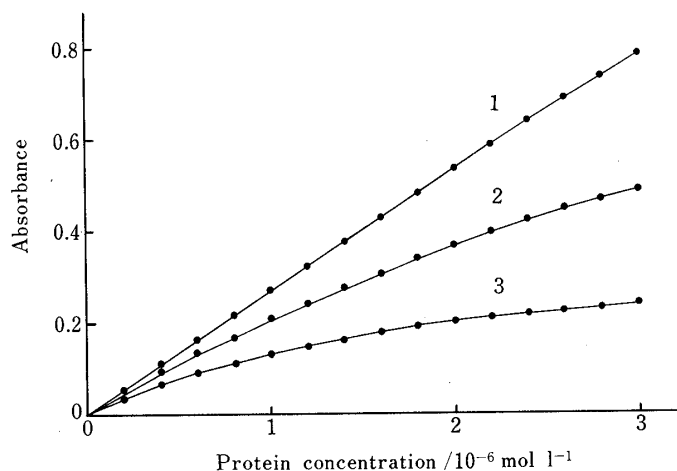


Fig. 8 Relation between the protein concentration and the amount of formation of the dye-protein complex (experimental result)

The dye (BPB) concentrations in each curve are as follows: 1, $C_A = 4.5 \times 10^{-5}$ mol/l; 2, $C_A = 1.5 \times 10^{-5}$ mol/l; 3, $C_A = 7.5 \times 10^{-6}$ mol/l.

ると色素タンパク質複合体の生成量は計算では色素濃度が高いほど多く、タンパク質濃度の低い領域ではタンパク質濃度に正比例し、正比例する領域は色素濃度が高いほど広がると考えられた。

実験でも予想されたように、Fig. 8 のように見掛けの色素タンパク質複合体の生成量は色素濃度が高いほど増

加し、又、その生成量がタンパク質濃度と正比例する領域は色素濃度が高くなるほど拡大した。

以上のように①～⑤の仮定に基づくタンパク誤差に関する化学平衡の解析から推定されたいくつかの結果は定性的ではあるが、 pK_A が異なる pH 指示薬を用いた実験により再現された。このことから、タンパク質誤差の発現には解離型色素陰イオンとタンパク質分子の正荷電したアミノ基 ($-\text{NH}_3^+$) との相互作用が重要な役割を担っていることが分かる。すなわち、pH 指示薬のタンパク誤差現象は両者の相互作用の結果と見なすことができる。

①～⑤の仮定が妥当とすれば、平衡定数が同じ程度の色素タンパク質複合体を生成する pH 指示薬では、電離定数の大きい pH 指示薬のほうが複合体の生成量は多くなると考えられる。生成する色素タンパク質複合体の平衡定数が $K_{PA} = 10^5 \sim 10^6 \text{ mol}^{-1}$ で、しかも、電離定数が $pK_A > 7 \sim 8$ となる pH 指示薬の場合には、複合体の生成は極めて小さく、観測されることはないと考えられる。このことより、タンパク質の定量に用いる色素の検索及び選定は pH 指示薬あるいは pH により色調が変化する pH 指示薬の特性を有する色素で、 K_A が大きい物質であることを条件の一つとして行えばよいと推測される。

(1991 年 11 月, 日本分析化学会第 40 年
会において一部発表)

文 献

- 1) S. P. L. Sørensen: *Ergeb., Physiol.*, **19**, 393 (1912).
- 2) J. S. Bracken, I. M. Klotz: *Am. J. Clin. Path.*, **23**, 1055 (1953).
- 3) L. V. Crowley: *Clin. Chem.*, **10**, 1131 (1964).
- 4) P. G. Scheurlen: *Clin. Chim. Acta*, **4**, 760 (1959).
- 5) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 6) 岡村研太郎: 臨床検査, **18**, 646 (1974).
- 7) M. M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 8) 青木幸一郎, 高木俊夫, 寺田 弘: “血清アルブミン”, p. 81 (1984), (講談社).
- 9) L. M. Chapman, D. M. Greenberg, C. L. A. Schmidt: *J. Biol. Chem.*, **72**, 707 (1927).
- 10) 鈴木優治, 入野 勤, 前畑英介: 衛生検査, **26**, 846 (1977).
- 11) 鈴木優治, 酒井伸枝: 臨床検査, **33**, 1803 (1989).
- 12) I. M. Klotz, W. C. L. Ming: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 805 (1954).
- 13) 島尾和男: 検査と技術, **7**, 208 (1979).
- 14) 澤谷次男: “基礎分析化学”, p. 198 (1972), (南江堂).



Studies concerning the chemical equilibrium of protein-dye binding regarding the phenomenon of protein error. Yuji SUZUKI (Saitama College of Health, 519, Kamiokubo, Urawa-shi, Saitama 338)

The chemical equilibrium regarding the phenomenon of protein error of the pH indicator, which has been extensively applied to the determination of protein in biological materials, has been studied. A calculation was performed based on the assumption that the phenomenon of protein error of the pH indicator occurs due to an interaction between a positively charged amino group ($-\text{NH}_3^+$) in the protein molecule and the dye anion. Although it has been reported that many equilibria exist in the interaction between a protein and a dye, since one molecule of protein reacts with several molecules of dye, it is assumed that the equilibrium constant in the first reaction is very large compared with the other equilibrium constants, and that the contribution of the reactions other than the first reaction to the protein error can be negligible. The results calculated under these assumptions accorded almost qualitatively with those obtained from various experiments, suggesting that the interaction of a positively charged amino group in a protein molecule with a dye anion play an important role in the protein error. In addition, it appeared that the phenomenon of a protein error of the pH indicator is almost not observed when the electrolytic dissociation constant (K_A) of the dye is less than about 10^{-7} and the association constant (K_{PA}) of dye-protein complex is about $10^6 \sim 10^7$. Therefore, the use of a dye with a large electrolytic dissociation constant should provide a suitable method for the determination of protein.

(Received April 1, 1993)

Keyword phrases

chemical equilibrium; protein error of pH indicator; protein determination; pH indicator; dye-protein complex.
