

タンパク質の疎水結合に存在する可逆性について

A Study on the Reversibility existing in the Hydrophobic-Bond of Protein

井 村 洋 一

Protein has a hydrophobic surface within its molecule, therefore the protein molecule dissolved in water is always being pressed by water; that is the Hydrophobic-Bond of Protein.

The molecular structure of native protein naturally unfastens and comes loose in water, physically and chemically, and becomes consequently to an equilibrium with water.

And in this degeneration process, there are an irreversible factor that is entropic, and a reversible one that is simply based on the thermal movements both of water and of protein molecule.

In this study, by measuring the viscosity of thick gelatin solution, it was proved approximately that the protein molecule, which is nearly become to the state of equilibrium with the free energy of water by its internal thermal movement, can be reversed by means of thermal or electric effect.

I 熱 的 方 法

1 緒 言

酵素には分子内に内部運動が存在するといわれるが、一般に、タンパク質と呼ばれる高分子内にはつねに熱的な内部運動が存在すると想像される。一方、水は分子運動にもとづく自由エネルギーをもつ。

したがって、タンパク質分子と水の間、熱運動に関する平衡が存在するとすれば、水の自由エネルギーを変化させることにより、タンパク質分子に可逆的な弛緩、収縮が生じる可能性が考えられる。

ゼラチンは解裂変性したタンパク質ではあるが、水溶液の温度を上昇させる場合、各温度において大きな粘度差を示すことと、粘度の一定値が容易に得られることから、その粘度変化と水の自由エネルギーの関係を、分子運動論的に解析することにより、以上の可能性の有無を検討した。

2 実 験 方 法

局法ゼラチン 8%, ゼラチン 8%ブドー糖 0.4M, ゼ

ラチン 8%シヨ糖 0.4M, ゼラチン 8%ブドー糖 0.8M の 4 種類の水溶液を、過熱しないように沸騰水中で調製し、30°C の恒温槽中に約12時間放置して、平衡状態に達しさせる。

各溶液について、30°C から 40°C まで、数個の点で粘度を測定しながら温度を上昇させたのち、再び、粘度を測定しながら 30°C まで下降させ、温度と粘度の関係をグラフに作り、これらのグラフを解析することによって、ゼラチンと水の平衡を検討する。

粘度は、各溶液の5mlをとって、オストワルドの粘度計（本器の 35°C における、水による通過時間は 5.5 秒である）によって測定し、単位は簡単のために、液の一定量が通過する時間（秒）で示した。

3 実験および実験結果

3.1 0.4M低分子物質添加の粘度曲線

図1は、30°Cから40°Cの温度範囲における、8%ゼラチン単純溶液と、これに非極性の低分子物質である、ブドー糖とシヨ糖を各0.4M添加された複合溶液の、温度と粘度の関係を表わすグラフである。点線は温度上昇、実線は温度下降の場合である。溶液の粘度は、温度

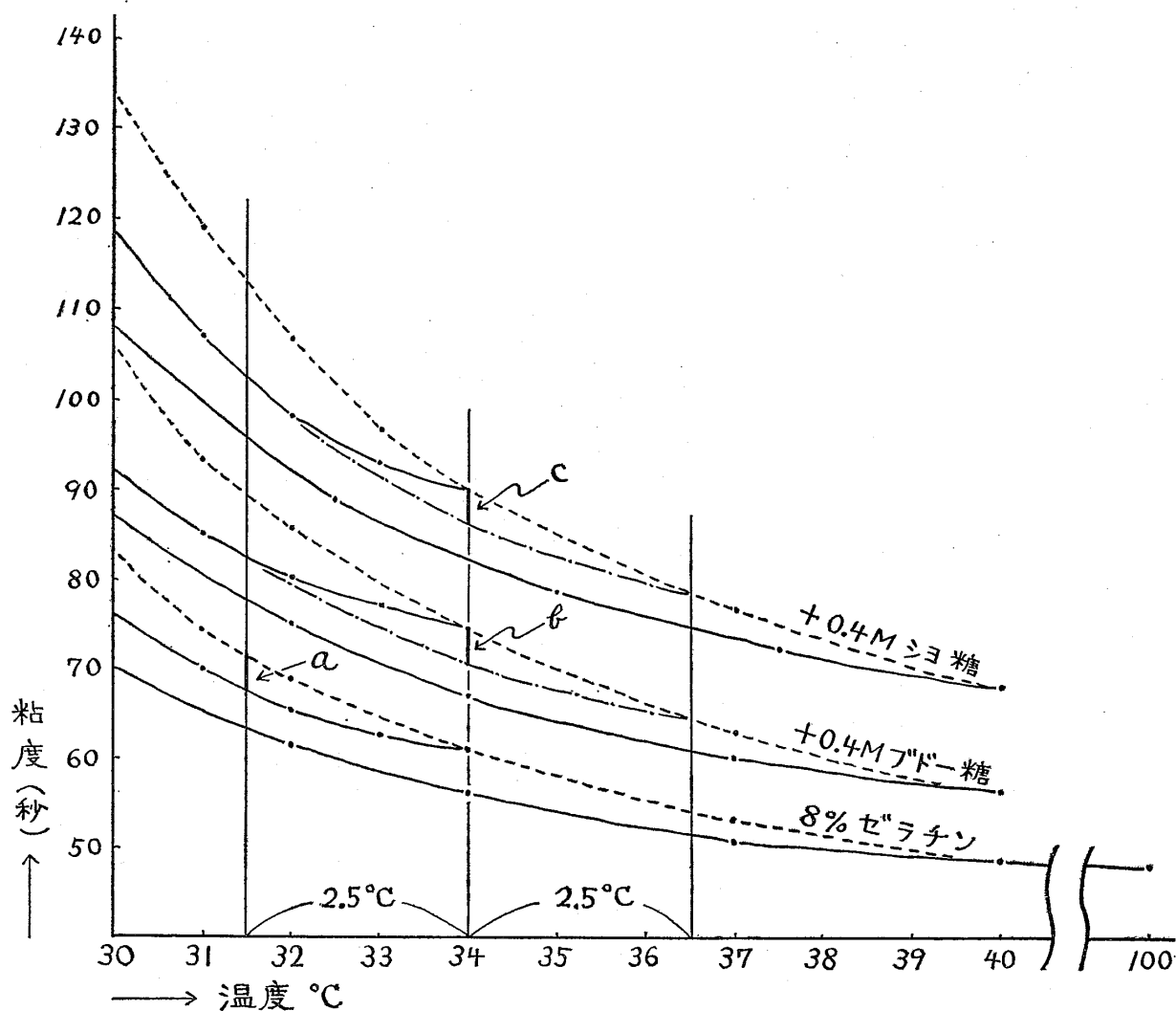


図1 8%ゼラチン, +0.4Mブドー糖, シヨ糖の温度と粘度の関係

上昇, 下降の場合とも, 各温度において約10分後には一定値を示した。

単純溶液が40°Cにおいて示す粘度は, これを沸騰水中で100°Cまで上昇させたのち, 再び40°Cに戻しても, 1秒程度の低下しか認められないので, 40°Cを粘度に関する限界点と考えた。他の2つの複合溶液の場合も, 曲線の形から考えて, これに準じた。

単純溶液のグラフにおいて, 34°Cから温度を下降させた場合の実線は, 限界点である40°Cからの実線に沿い, かつ, ほぼ平行しているが, その他の温度から下降させる場合も同じ形になる。

これに対して, 0.4Mの低分子物質を添加した複合溶液のグラフにおける34°Cからの実線は, 40°Cからの実線に沿わず, 平行にもならない。以上の傾向は, 次節の図2で, さらに明瞭に認められる。

ここで, 8%ゼラチンに対し, 0.4Mの低分子物質を添加する場合の水の自由エネルギーの低下と, 温度下降の関係について, 浸透圧の略式による計算を試みる。

すなわち, 水溶液中のゼラチンは約30%の結合水をとるので, 8%ゼラチン溶液における自由な水は約90%となり, したがって, 0.4Mのブドー糖またはシヨ糖は, 実際には約0.45Mとなる。ゆえに, 34°Cにおける, これら複合溶液の浸透圧は, ゼラチンのモル分率を無視して, 次のようになる。

$$\pi = R \times 307 \text{deg} \times 0.45 \text{mol/l} = 11.3 \text{atm}$$

ここで, R は気体恒数 ($R=0.082 \text{l} \cdot \text{atm}/\text{deg} \cdot \text{mol}$) したがって, 水の自由エネルギーの低下としては,

$$-\Delta G = -\pi \cdot V = 0.24 \text{l} \cdot \text{atm} \approx 5.0 \text{cal/mol}$$

である。ここで, V は34°Cにおける水の分子容 ($V=0.018 \text{l/mol}$) である。これを温度下降に換算すると,

$$-\Delta T = -\Delta G/R \approx 2.5^\circ\text{C}$$

となる。ここで, R は気体恒数 ($R=1.987 \text{cal}/\text{deg} \cdot \text{mol}$)。

すなわち, 0.4Mの低分子物質の添加は, 8%ゼラチン溶液に対して, 2.5°Cの温度下降に相当する。

したがって, 図1のように, 34°Cを中心にして両側

タンパク質の疎水結合に存在する可逆性について

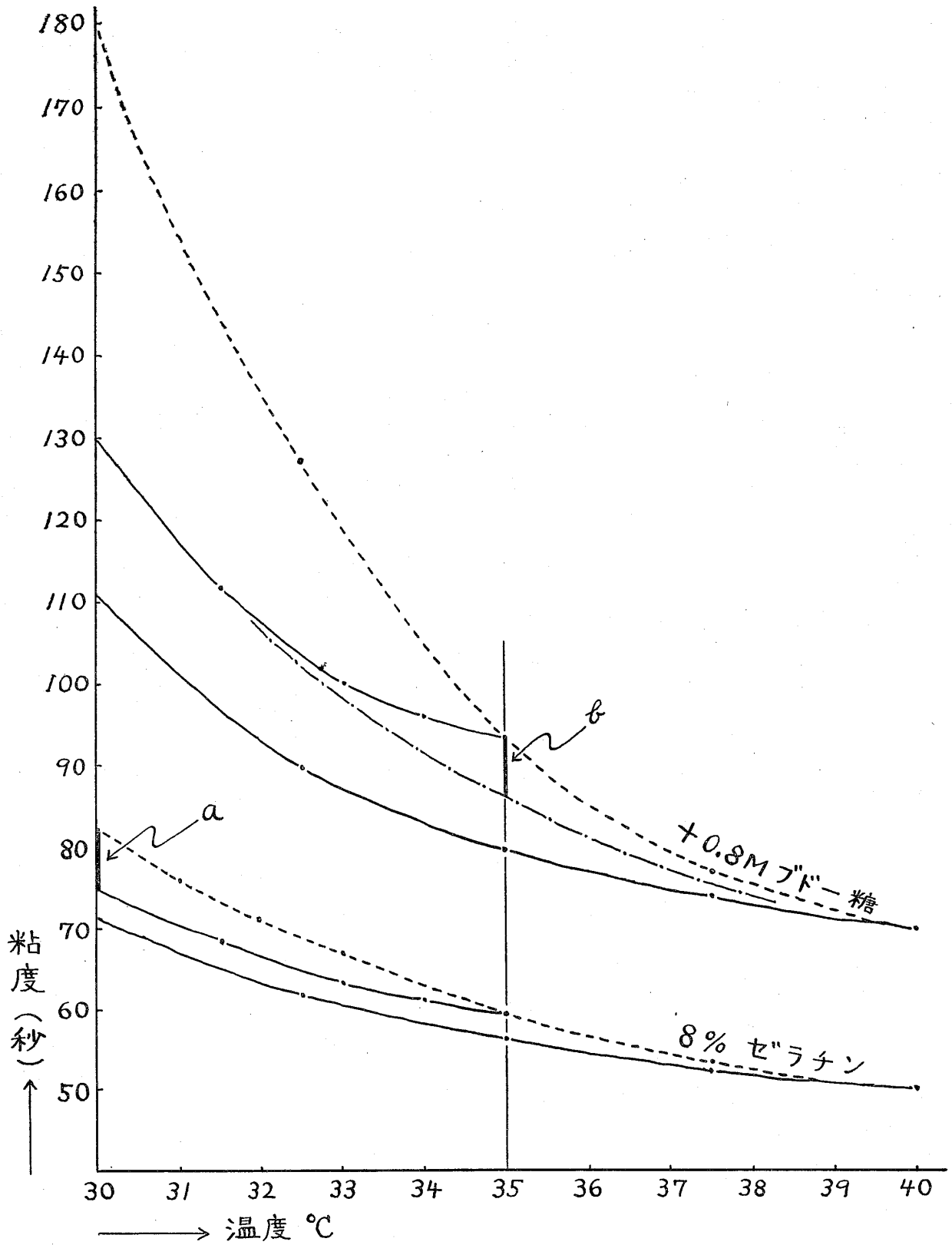


図2 8%ゼラチン, +0.8Mブドウ糖の温度と粘度の関係

に2.5°Cの間隔をとり、31.5°Cと36.5°Cの点から垂線をたて、左側の垂線が複合溶液の34°Cからの実線と交わる点、右側の垂線が各点線と交わる点、のそれぞれ2組の点をとると、これらの点はいずれも、0.4 Mの低分

子物質の添加が34°Cにおける水の自由エネルギーの低下と無関係な点となる。

したがって、単純溶液のグラフで認められた結果に従いがい、図のように40°Cからの実線に沿って、ほぼ平行

に、それぞれの2点を結ぶ鎖線のような内捜的な作図を行なうと、ゼラチンと水の熱運動以外の因子はすべて相殺されて、鎖線と点線が34°Cにおける垂線を挟む部分の粘度差は、単純溶液のグラフにおける粘度差と比較できることになる。

すなわち、太い実線で示す部分のbおよびcの長さは、いずれも、単純溶液において34°Cからの実線および点線が、31.5°Cにおける垂線を挟む部分の長さaに等しいことが解り、各温度において、水の自由エネルギーとゼラチン分子の内部運動が平衡することが認められる。

3.2 0.8M低分子物質添加の粘度曲線

図2は、8%ゼラチン単純溶液と、これに0.4Mの2倍の0.8Mブドウ糖を添加した複合溶液の粘度曲線を比較対照したものである。

0.8M低分子物質の添加は、前節と同じ計算法によれば、水の自由エネルギーに対して5°Cの温度下降に相当する。したがって、35°Cを中心とする5°Cの温度間隔は、グラフの縦軸と40°Cの限界点となる。

前節と同じ考え方で、複合溶液の35°Cからの実線が縦軸と交わる点から、40°Cの限界点まで、40°Cからの実線に沿って鎖線のような内捜的な作図を行なうと、この場合も、鎖線と点線が35°Cにおける垂線を挟む部分の長さbは、単純溶液において35°Cからの実線と点線が縦軸を挟む部分の長さaに等しく、かつ、図1の場合のほぼ2倍であることが認められる。

したがって、この実験においても、各温度における水の自由エネルギーとゼラチン分子の平衡が、再び認められたことになる。

3.3 温度操作におけるゼラチンの不可逆性

調製後、30°Cの恒温槽中に放置された8%ゼラチン溶液を40°Cに上昇させたのち、再び30°Cまで冷却する場合、その粘度は約7時間を要して始めの粘度の80%まで回復するが、それ以上の回復は認められなかった。

なお、この場合の回復の速度はきわめてゆるやかであって、温度上昇の場合における粘度が、約10分後に一定値に達するのと対照的である。また、3.1、3.2の実験のように、40°Cから粘度測定をくりかえしながら、すなわち粘度計の細管の中を液を流動させながら、30°Cまで温度下降を行なっても、上記のように40°Cからだちに30°Cまで下降させても、30°Cに達した直後の液の粘度にはほとんど差が認められなかった。

4 考 察

4.1 タンパク質の親水性と疎水性

タンパク質分子は、その高次構造の内部に、親水性と

疎水性の平面をもち、結晶状にとり出された場合でも、親水性の平面の間には強く結合した非回転性の結合水と、比較的ゆるやかに結合する水和水¹⁾と呼ばれる、2種類の水が存在する。

したがって、水溶液中のタンパク質分子は、図3に図解するように、外部の水からつねに一定の圧力を受けているが、これが本稿にとりあげた熱運動の面からの疎水結合である。

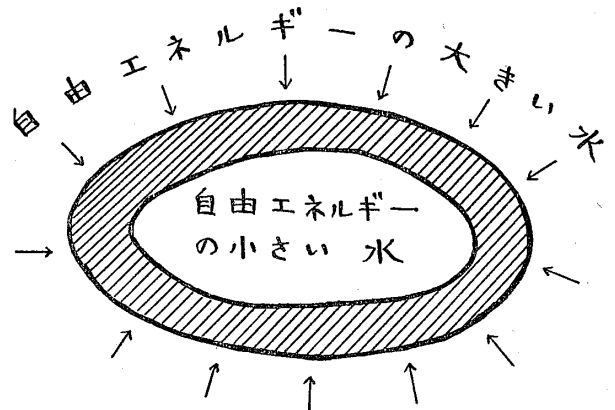


図3 タンパク質の可逆的な疎水結合に対する模型

4.2 ゼラチン溶液の粘性について

一般に、高分子溶液の粘弾性は、分子間のもつれ合い、分子に対する他物質の附加、分子の配向、分子自体の変形すなわち分子のふくれあがりや収縮等、種々な原因によって変化するが、これを熱力学的因子と直接結びつけることは一般に困難であるとされている。

しかし本稿では、ゼラチン溶液の粘度変化は、4.1に記したゆるやかな結合水の存在と、3.3の実験から、ゼラチン分子が外部の水の自由エネルギーの増減と、分子自体の内部運動によって、ふくれあがり、ないし弛緩や収縮をくりかえすことができる結果であると考えた。

そして、この考察は、物質の溶解現象が、溶質と溶媒との親和性と熱運動の、2つの面から論じられる²⁾ことによっても理由づけられる。

4.3 ゼラチン溶液の粘度の可逆性と不可逆性について

3.1および3.2の実験結果は、30°C~40°Cの温度範囲において、ゼラチン分子と水の間熱運動に関する2相の平衡が成立することを示し、したがって、この温度間では、ゼラチンの疎水結合に対する可逆的な温度操作が可能である。

しかし、3.3の実験において、一度40°Cまで上昇させたのち、再び30°Cへ戻されたゼラチン溶液は、初めの粘度の80%までしか回復しない。

以上の実験結果は、ゼラチンの疎水結合に対する温度操作に、一部の不可逆性が伴うことを示し、その意味

では、上記3.1, 3.2の実験的証明は近似的なものである。

4.4 自然のままのタンパク質の疎水結合について

ゼラチンは自然のタンパク質であるコラーゲンが、高温において、化学的にも物理的にも、水との平衡近くまで解裂変性したものであるが、一般の自然のままのタンパク質は強く結合した高次構造をもっていて、そのエネルギー的位置がどこにあるか明らかにしえないとしても、しだいに水との平衡へ推移する過程をとるものと考えられる。

そして、そこまで至る過程には、コラーゲンからゼラチンの生成、および、本実験のゼラチン溶液に対する温度操作が示唆するように、水との平衡までの距離に応じて程度の差はあるにせよ、熱運動に関する可逆的な因子と、エントロピー的な不可逆的な因子が同時に存在するわけである。

実験によれば、自然のタンパク質である卵白アルブミンの高濃度溶液を使用した場合には、ゼラチンにおけるような、各温度で粘度差を伴う粘度曲線は得られなかった。

したがって、おそらく、タンパク質の構造は自然に近いものほど不可逆性が強く、解裂変性して水との平衡に近づくほど、可逆性が強く現われるのであろうと考える。

II 電気的方法

1 緒言

Iにおいて、一般に水溶液中のタンパク質分子の構造は、始めの収縮した状態から、しだいにふくれあがった、または弛緩した形となり、最終的に、自分の内部運動とその温度の水の自由エネルギーが、熱的に平衡するような状態へ推移してゆくことを推定した。

そして、この過程の中には不可逆性と同時に、熱的操作による可逆性も存在することを実験的に証明した。

本編では、上記のタンパク質分子の疎水結合の可逆性について、これを、水の自由エネルギーを介する熱的操作ではなく、直接、電気的方法によって逆操作できることについて、同じく高濃度ゼラチンの粘度変化を測定する方法により、実験と考察を試みた。

2 実験および実験結果

2.1 沔紙電気泳動法における両性電解質分画の収縮現象

沔紙電気泳動法において、電解液のpHがアミノ酸の

等電点近くなると、アミノ酸分子は電極の方へ泳動せず、反対に両極から中央へ向って泳動する。

直流の通電後、ニンヒドリンで発色させると、図4のごとく、放置したものと比較して、その分画が収縮しているのが認められる。

タンパク質においても同様な現象が認められる。

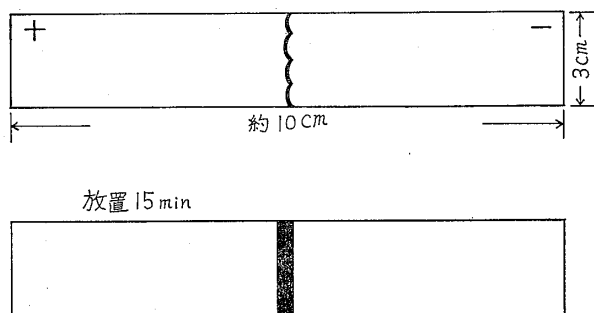


図4 沔紙電気泳動法におけるアミノ酸分画の収縮現象

直 流……200~300V, 15min, 1~4mA

電 解 液……pH=3.4(グルタミン酸の等電点)の0.1Mリン酸緩衝液

アミノ酸……0.1% グルタミン酸ソーダを同上電解液に溶解したもの

沔 紙……東洋沔紙No.51

電 極……白金電極を直接挿入

発 色……0.25%ニンヒドリン, 水—ブタノール溶液, 70°Cで発色

2.2 直流による高濃度ゼラチンの粘度低下

前節に記した現象は、タンパク質分子に対する電気的な加圧を意味するので、Iで論じたタンパク質の疎水結合に適用して、これを逆操作することを試みた。

すなわち、ゼラチン中にはわずかながら塩が含まれるので、高濃度ゼラチンに直流電流を作用させれば、ゼラチン分子は圧力を受けて収縮し、溶液の粘度は低下するはずである。

ただし、電流および遊離イオンの流れは一方的であるから、弾性体と考えられるタンパク質分子に対する、これと直角方向の圧力は、この場合も水の自由エネルギーとなる。また前節の現象は、本質的に静電的なものであるから、同時に遊離イオンの流れを必要とする動電的なものであるから、ジュール熱の発生により水の自由エネルギーが増大する。

以上の2つの条件を考慮に入れて、次の実験を行なった。

図5に示すように、両端を封じた、直径0.6cm、長さ25cmの2本のゴム管を用意し、1本は電極の挿入孔だ

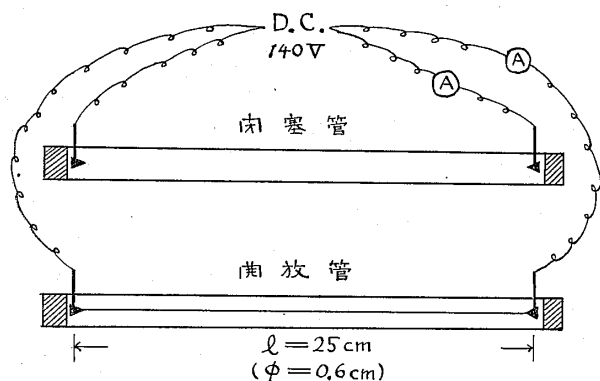


図5 水溶液の熱運動に関する閉塞管と開放管

けとし、他の1本は挿入孔の間に直線に鉄を入れる。すなわち、前者は内部に溶液を入れた場合、すべての熱運動に対して閉塞され、後者は大気中に開放される。

以上の2本のゴム管に、調製後室温に12時間放置された、8%または10%の種々のゼラチン溶液を注入し、白金線を両極として、室温で、1時間、約140Vの同じ直流電源から同時に通電を行なう。

通電後、液の粘度をオストワルドの粘度計により、室温で測定した結果を表1に示す。

表1 直流による高濃度ゼラチンの粘度低下に対する閉塞管と開放管の相異

ゼラチン溶液の種類	原液の粘度	閉塞管の粘度	開放管の粘度	室温(°C)	電流(mA)
8% 精製粉末	189	137	145	28	1.8→1.2
10% 粗製粉末	398	157	223	26	2.5→1.5
10% 板ゼラ	246	192	206	27	1.0→0.7

直流電圧：140V，通電時間：1時間

粘度は一定量の試料がオストワルドの粘度計を通過する時間(秒)で表わす。

閉塞管を使用した溶液の粘度は、開放管を使用したものと比較して、いずれも低い粘度を示すことが認められる。なお、表中の電流の項は別に測定したものである。

2.3 高濃度ゼラチンに対する脈流効果

表2は、直径0.2cm、長さ80cmのガラス製U字管に、調製後12時間室温に放置された、局法ゼラチン10%、食塩0.01規定の溶液を入れ、白金線を電極として、室温で10分間、直流および種々の波数の脈流を通電したのち、オストワルドの粘度計によって粘度を測定した結果である。使用した脈流は、発振器から5極管の2段階

幅によってとり出した。

表2 U字管内の高濃度ゼラチンに対する、直流と脈流の効果の相異

電流の種類	電圧(V)	電流(mA)	粘度(秒)
直 流	350	0.46	136.2
脈 流 20KHz	300	0.38	135.5
同 200KHz	330	0.43	134.5
同 2000KHz	350	0.46	134.0
対 照	—	—	138.8

溶液の粘度は、ゼラチン分子の内部運動と、水の自由エネルギーの平衡による弛緩と収縮にもとづくものであるから、脈流の方が直流よりも効果の大きいことは当然であるが、以上の実験結果は予期どおりの成績を示した。

3 考 察

3.1 2.1の現象について

2.1の現象は、アミノ酸またはタンパク質が等電点にあるときに現われるもので、本質的に両性電解質と遊離イオンに関する静電的な現象である。

したがって、本実験のごとく、この現象をタンパク質分子の収縮効果に応用する場合、もし溶液のpHが酸性またはアルカリ性である場合には、このまま通電したのでは効果が生じない。この場合は半透膜を使用して、これにタンパク質分子が静電的に圧迫されるように工夫すれば、同じ結果が得られるであろう。

つまり、溶液のpHには関係なく、タンパク質分子に対する本実験のごとき電気的操作はつねに可能であるということである。

3.2 直流と脈流の効果の相異

2.2の実験において、直流は、閉塞管の場合開放管よりも大きい粘度低下を示し、ゼラチン分子に対する収縮効果をもつことが認められるが、開放管における効果は不明である。なぜならば、開放管の粘度は対照の原液と比較して低値を示してはいるが、これは発生するジュール熱によるとも考えられるからである。

しかし、2.3の実験結果と、この現象がタンパク質分子の内部運動と粘弾性にもとづくことを考えれば、直流のかわりに脈流を使用すれば、開放管であっても、有効な収縮効果が得られるものとする。

3.3 水の自由エネルギーと電圧の関係

水の自由エネルギーを、気体の状態方程式から計算す

ると、

$$30^{\circ}\text{C} \text{では } G = pv = RT = 0.60\text{Kcal/mol}$$

$$100^{\circ}\text{C} \text{では } G = pv = RT = 0.74\text{Kcal/mol}$$

である。

水溶液中のゼラチン分子は、この水の自由エネルギーと平衡しているので、ゼラチンのモル分率と分子内部の水和水の自由エネルギーを無視すれば、分子の内部運動にもとづく疎水結合のエネルギーは上記の数値に等しいと考えてよい。

したがって、本実験のごとく、電流によってゼラチン分子の疎水結合を逆操作する場合、静電圧として作用する有効な電圧の限界は、 $1\text{eV} = 23\text{Kcal/mol}$ であるから、

$$30^{\circ}\text{C} \text{では } 0.60\text{Kcal}/23\text{Kcal} = 0.026\text{eV}$$

$$100^{\circ}\text{C} \text{では } 0.74\text{Kcal}/23\text{Kcal} = 0.032\text{eV}$$

となる。

しかし、タンパク質の高濃度溶液の誘電率は、純水の場合の1.2~2.0倍、すなわち100~160であるといわれるので、直流や脈流によってゼラチン分子を静電的圧力で収縮させる場合の有効な電圧の下限は、

$$30^{\circ}\text{C} \text{で } 0.026\text{eV} \times 160 = 4.2\text{eV}$$

$$100^{\circ}\text{C} \text{で } 0.032\text{eV} \times 160 = 5.1\text{eV}$$

程度であると考えられる。

3.4 静水圧とタンパク質の疎水結合について

熱運動的に水の自由エネルギーと平衡しているタンパク質分子の疎水結合を逆操作する方法としては、Iの熱的方法、すなわち温度上昇と、本編の電気的方法の2つの他に、いま1つ、溶液の静水圧に対して直接加圧する方法がある。

Eyring は、著書「反応速度論」³⁾において、酵素 Luciferase の溶液に476気圧を加圧した場合の、酵素の疎水結合の増大による活性の変化を論じている。

476気圧の加圧による水の自由エネルギーの増加を、温度上昇に換算してみると、

$$\Delta T = \Delta P \cdot V / R = 104^{\circ}\text{C}$$

に相当する。

ここで、 R は気体恒数 ($R = 0.082\ell \cdot \text{atm} / \text{deg} \cdot \text{mol}$)、 V は分子容 ($V = 0.018\ell / \text{mol}$) である。

III 総 括

生命の本質が、動植物を問わず、細胞中に約30%の濃度で含まれる各種のタンパク質に依存していることは論を待たないであろう。

すでに、Iの4で考察したように、水溶液中のタンパク質分子の構造は疎水的な性質をもち、物理的にも化学的にも自然に解裂して、最終的に水との平衡状態へ向う傾向がある。そして、この過程にはエントロピー的な不可逆性と同時に、単なる熱運動的な可逆性も存在する。

本研究は、以上のような性質をもつタンパク質分子の可逆性について、 $30^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度範囲でほとんど水との平衡状態を示す高濃度ゼラチンを使用し、その粘度を観測することにより、Iでは温度上昇により、IIでは電気的方法によって、これを逆に回復する方法があることを、実験の過程ですでに不可逆的な因子を含んではいるが、近似的に証明した。

本稿を草するにあたり、九大温研辻教授、ならびに理学部、君塚教授から多々御教示を戴きましたことを感謝致します。

本研究の要旨は、第8回(1969)日本生物物理学会学術講演会で報告した。

文 献

- 1) 蛋白質化学：水島，赤堀編.4：153，1956。（共立）
- 2) 藤代亮一：化学と工業.22：514，1969.
- 3) 反応速度論：長谷川，平井訳：76，1964。（共立）