

タンパク質および酵素におよぼす Cl^- の影響

The Effect of Cl^- on Protein and Enzyme

井 村 洋 一

Cl^- は負の水和性をもつといわれるので、この面から、タンパク質の水溶液の性質、さらに酵素の活性に対して、他のイオンとは異なる効果をもつことは当然であるが、これらのことについて実験を試みた。

1 8%ゼラチンの粘度におよぼす Cl^- の効果

1.1 実験目的

8%ゼラチン水溶液の粘度が、各温度における水の自由エネルギーに平衡しながら可逆的に変化することは、水の自由エネルギーの変化によるゼラチン分子の弛緩、収縮にもとづくものであり、ゼラチンのような解裂変性したタンパク質分子において、とくに著しく現われるものではあるが、一般に、自然のタンパク質分子の疎水結合においても、この傾向は存在するはずであることを前報¹⁾で述べた。

その他、一般にタンパク質分子は、直接、溶液の pH 変化による解離基の解離度の差によっても膨潤、収縮が起こり、この場合もその溶液の粘度に差が生じることが報告されている²⁾。

以上のような実験事実と関連して、負の水和性をもつ Cl^- の、8%ゼラチン溶液の粘度におよぼす Cl^- の影響について実験と考察を行なった。

1.2 実験および実験結果、その一 (30°C 恒温)

過熱しないように water bath の中で調製した、8%局法ゼラチン溶液を 30°C の恒温槽中に、約15時間放置して水との平衡に達させる。この溶液10mlを同じ恒温槽中に放置された試験管に採取し、水または各種の塩の 2 N 水溶液 0.5ml を添加し、数秒間じゅうぶん攪拌混合したのち、ただちにその 5 ml をとって、同じく 30°C

の恒温槽中でオストワルドの粘度計により粘度を測定した。

これらの液の粘度は、原液の 8%ゼラチンの調製の仕方によって多少の差があるが、その 10ml に対し 0.5ml の水を添加し攪拌混合した直後の液の粘度はほぼ一定の値を示し、同じ方法で水のかわりに塩の水溶液を添加した場合と比較するとき、じゅうぶん有意の比較値を得ることができた。

なお、上記の 30°C における 8%ゼラチン 10ml に水 0.5 ml が添加された直後の液の粘度は、原液の初期の調製の仕方によって多少の差があるが、水に対する比粘度として 14.0~16.2 の範囲の値を示した。

表 1 は、30°C 恒温において、8%ゼラチン 10ml に対し 0.5ml の水が添加された液の粘度を 1 とし、水のかわりに 0.5ml の PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- の K、 NH_4 、Na 塩の 2 N 水溶液が添加された液の比粘度を示す。

各数値は、いずれも 5 回以上の実験を行なったものの平均値である。ただし、表中の K、Na PO_4 は 2 N KH_2PO_4 と 2 N Na_2HPO_4 を 4.5 : 1 に混合して、8%ゼラチンの pH 6.0 に等しくなるように調整したものをを用いた。

表 2 は、 K_2SO_4 の 2 N 溶液が溶解度の関係で得られないため、 K_2SO_4 と Na_2SO_4 の 1 N 水溶液を作り、表

表 2 8%ゼラチンに K_2SO_4 、 Na_2SO_4 の 1 N 溶液が添加される場合の比粘度 (30°C 恒温)

塩の種類	H_2O	K_2SO_4	Na_2SO_4
比粘度	1.000	1.042	1.056

表 1 8%ゼラチンに塩が添加される場合の比粘度 (30°C 恒温)

塩の種類	H_2O	K, Na PO_4	Na_2SO_4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	CH_3COONa	KCl	NH_4Cl	NaCl
比粘度	1.000	1.043	1.073	1.056	1.044	1.024	1.023	1.037

表3 8%ゼラチンに塩が添加される場合の比粘度 (27.4°C恒温)

塩の種類	H ₂ O	K, NaPO ₄	Na ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	CH ₃ COONa	NaCl	NH ₄ Cl	NaCl
比粘度	1.000	1.059	1.097	1.181	1.109	0.940	0.965	0.954

1の場合と全く同じ方法で、8%ゼラチンの粘度におよぼすK⁺とNa⁺の影響を比較したものである。

1.3 実験および実験結果, その二 (27.4°C恒温)

前節と全く同じ方法であるが、30°C恒温のかわりに、27.4°Cの恒温を用いて、8%ゼラチン10mlに種々な塩の2N溶液0.5mlを添加する場合の粘度変化を測定した。

この温度は、30°Cと比較して僅か2.6°C低くだけであるが、8%ゼラチンの粘度は著しく増大する。また、とくに夜間の15時間中に、恒温槽に不可避免的に生じる±0.15°Cの温度差は、8%ゼラチンに対しては大きな粘度差となって現われる。この結果、基準となる、水が添加された8%ゼラチンの粘度もかなり大きく変動するが、塩添加のいずれの場合も、4回以上の実験を行なって平均値を求めることにより、有意の成績を得ることができた。

27.4°Cの場合、8%ゼラチン10mlに対し0.5mlの水が添加された液の、水に対する比粘度は、上記の恒温槽の条件から生じる原液の粘度の差にもとづいて、85~136の間に大幅に散らばるのが認められた。

表3は、27.4°C恒温において、1.2と全く同じ方法によって、水を添加したものを基準とした、各種の塩の2N溶液が添加された場合の8%ゼラチンの比粘度を示す。表1の成績と比較して、各塩の数値の順位に変動が見られるが、これは原液の粘度のばらつきにもとづくものである。

Cl⁻塩添加の比粘度だけが、1より小さいことが明瞭に認められる。

1.4 考察

表1, 表2に示した30°C恒温における実験結果は、8%ゼラチンの粘度に対する塩の効果が、対の陽イオン種によって異なる値を示すことは当然であるが、一括してCl⁻塩は、他のPO₄, SO₄, CH₃COO⁻塩と比較して粘度の増大が小さいことが認められる。

Cl⁻塩の場合でも、30°C恒温においては、水が添加される場合に比較して粘度が増大している。しかし、27.4°C恒温になると、表3に見られるように、8%ゼラチンに対するCl⁻の影響は、水の場合よりも粘度が減少するのが認められる。

一般に、タンパク質溶液の粘度は、液のpH、塩の添加による溶解度や解離度および極性基間の相互作用、さ

らに液の滲透圧や誘電率の変化等にもとづいて変化するといわれ、合成ペプチドを用いても検討されているが、これらの条件の関連性についての、統一的な見解はまだないようである。

また、この実験に用いた8%ゼラチンは、別に行なった実験によれば、27.0°Cに15時間放置することによって固化するので、27.4°Cという温度では、かなりミセルを形成していると考えられる。

したがって、これらの条件を考慮して、本実験を総合的に考察すると、Cl⁻はそれがもつ負の水和性のために、ゼラチン分子に対する収縮作用、ないし、液全体のミセル化に対する解膠効果をもつとしてよいであろう。

なお、一般に、タンパク質溶液の酸による粘度低下、および、アルカリによる粘度増大の性質は、8%ゼラチンにおいても、30°C恒温および27.4°C恒温において、ともに同じように認められたことを附記しておく。

2 市販の消化酵素剤およびα-アミラーゼに対するCl⁻の効果

2.1 実験目的

前章の8%ゼラチンによる実験結果から、Cl⁻は、タンパク質分子に対する収縮効果、または、nativeな状態への回復効果をもつと推測されたので、市販の複合酵素剤およびα-アミラーゼに対する、Cl⁻の賦活効果について検討を行なった。

2.2 実験材料

市販されている動物性の複合消化酵素剤は、動物の脾臓からの抽出物を、他の物質を添加して増量し、錠剤に成形したものであるが、アミラーゼの他に、タンパク質や脂肪の分解酵素なども同時に含有する。

実験にあたっては、この錠剤を乳鉢で碎き、水溶液(pH:6.0)として使用した。

α-アミラーゼについては試薬を使用した。

2.3 実験方法

酵素剤は10錠を碎いて10mlの水に溶解した懸濁液、α-アミラーゼは1%水溶液として調製し、これらの2mlづつを試験管にとり、これにマイクロシリンドリにより、100μlの水、または各種の塩、または酸の水溶液を添加したのについて、それらのデンプン分解能を比較した。

力価の測定は、5%デンプンを含有するpH:5.6の0.2

タンパク質および酵素におよぼす Cl^- の影響

Mリン酸緩衝液10mlに、試料100 μl を添加し、室温に近い恒温槽中で数分間分解を行ない、残留するデキストリンをヨードで発色し、光電比色計によって定量した。検量線は5%デキストリンを基準として作成したものをを用いた。

この方法は、未分解デンプンの多いところで誤差が大きいが、比較値を得るには簡便であるので、この方法によった。

2.4 実験および実験結果

酵素剤10錠と水10mlの割合で溶かした液、各2mlに対し、 H_2O および CH_3COONa 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2SO_4 、 Na_2SO_4 、 NH_4Cl 、 KCl 、 NaCl の2N溶液、各100 μl を添加したものに

ついて、2.3の方法により、それらのデンプン分解能を測定した。分解温度は $22 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、分解時間は12分である。

結果としては、さく酸塩および各硫酸塩については、水の添加の場合と全く等しく、 NH_4Cl 、 KCl 、 NaCl 添加の場合は、いずれも水の場合の2.6倍の力価を示し、かつ陽イオン種にもとづく差は認められなかった。

以上の実験結果にもとづいて、さらに他のハロゲン化合物の影響について同じ方法で検討した結果を表4に示す。

表5は、同じ酵素剤溶液2mlに対し、種々な酸の0.1N液2mlが室温で添加される場合、それぞれ添加5分後の力価を同じ方法によって測定したものである。この場合、5%デンプン溶液に対する試料の添加量は、前と同じく100 μl としたので、リン酸の緩衝力によって、デンプン溶液のpHは変わらない。

この実験においても、表5に見られるように、 HCl だけが他の酸と比較して、試料液のpH低下が大きいにもかかわらず、水の場合よりもむしろ大きい力価を示している。

さらに同じ方法により、試薬の α -アミラーゼ1%水溶液におよぼす Cl^- の影響を検討したが、この場合も2mlに対する2N NaCl 100 μl の添加は、水を添加したものに比較して1.12倍の力価を示した。この数値は、先の酵素剤中のアミラーゼに対する NaCl の賦活効果が力価として2.4(表4)ないし2.6であったのと比較して小さいが、これは前者が動物性のものであり、後者が植物性であることによるのであろう。

3 考察およびまとめ

前章1で、ゼラチンを用いた実験では、 Cl^- は CH_3COO^- 、 SO_4^{--} 、 PO_4^{---} と異なり、8%ゼラチンに対して粘度低下の作用をもつことが認められた。

表4 酵素剤のデンプン分解能におよぼすハロゲン化合物の影響

ハロゲン化合物	H_2O	NaCl	KBr	KI
力 価	1.0	2.4	1.5	0.7

温度： $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、分解時間：12min

表5 酵素剤のデンプン分解能におよぼす酸の影響

酸	H_2O	CH_3COOH	H_2SO_4	H_3PO_4	HCl
試料液の pH	6.0	4.1	3.6	4.2	3.6
力 価	1.00	0.56	約 0.00	0.64	1.08

温度： $21 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、分解時間：25min

また、後章2では、酵素であるアミラーゼに対しても、同じように Cl^- だけが著しい賦活効果を示し、他の陰イオンにはこの種の効果が全く存在しないことが、各種の塩や酸の添加から明らかにされた。

さらに、同じハロゲンイオンの中でも Cl^- の効果が最大であり、 Br^- がこれにつき、 I^- には効果がないことが解った。表4における KI の力価が H_2O の場合より小さくなっているのは、遊離した I_2 の酸化作用によるものではないかと考えるが、これについては明らかでない。

NaCl は、一般に、あまり濃厚でない範囲では、アミノ酸やタンパク質の溶解度を増大する効果があるが、これは Cl 塩に限られることなく、他の SO_4 塩などにも存在する性質である。したがって溶解度の面からだけでは本実験で認められた現象は説明できず、これは Cl^- が水の構造に対して示す、根本的な負の水和性にもとづくものと考えられる。

さらに、水溶液中のタンパク質の構造状態と、その生物活性との関係は複雑であって、これは単に微視的にタンパク質分子や酵素分子の構造について考えればよいだけでなく、巨視的に溶液全体の構造としても考えなければならぬ性質のものであろう。

一般に、乾燥状態として取出されたタンパク質や酵素は、いわゆる疎水結合が最大限に緩んだ状態にあるはずであって、自然のままの形とは著しく異なる構造をもつと推定される。

したがって、これらを水溶液の形にした場合でも、もとの自然の形に近く復元するためには、微視的にも巨視的にもいろいろな条件が必要であり、 Cl^- の添加は、それらの必要条件を満たす効果があったものと考えられる。

本実験は、酵素におよぼす電気的効果に関して、予備的な実験として行なったものである。

井 村 洋 一

文 献

1) 井村：本学紀要. 9 : 7, 1971

2) 今井宣久他：日本生物物理学会，一般講演会予講集.
11 : 267, 1972