総説

蛋白質構造の安定性に及ぼす糖の作用

上 平 初 穂

1. はじめに

代表的な蛋白質である酵素は、反応の触媒として特異的な存在である。中性、常温の穏やかな条件で反応を進行させるだけでなく、反応の選択性が高い。二番目の特徴は高分子である事で、その天然の構造は、ポリペプチド鎖が各酵素分子に固有の一定の秩序をもって折りたたまれたものであり、この特定の高次構造が協同的にはぐれてポリペプチド鎖がランダムコイルになる(変性する)と、触媒活性も失われる。高次構造の保持は、活性発現に不可欠である。第三の特徴は、天然構造の状態から、変性状態への自由エネルギー変化は、ほとんどの場合、 (12 ± 5) kcal/mol 程度¹⁾に過ぎず、天然構造がほんの僅かしか安定でないために、わずかな環境条件の変化によって、蛋白質分子の安定性を変え得る事である。

蛋白質の高次構造安定化の因子とその条件、活性の維持法などの問題は、従来、学問的な興味と注目の対象であったが、近年、酵素等の生体高分子の工業的利用が盛んになるにつれて、技術的、経済的な面からも重要になってきた。蛋白質の高次構造の安定性と変性については秀れた総説が書かれており^{1)~6)}、高次構造を保つ力の中で、静電的相互作用⁸⁾、疎水性相互作用^{1,2)}の重要性なども、詳しく述べられている。

さて、蔗糖やグリセロールなどは、古くから蛋白質の高次構造を安定化させる物質として知られており、又、凝集剤としても生化学や医学の分野で広く用いられている。糖の作用は穏やかなものであるが、上に述べたように、蛋白質の天然状態が変性状態とわずかなエネルギー差しかないことが、蛋白質が糖の作用を受ける原因になっている。

蛋白質と糖の相互作用を考える前に、ここで、糖の水溶液について簡単にふれておくことにする。良く知られているように、糖は水溶液中で、鎖状、ピラノース環、フラノース環の混合状態で存在し、更に各々の環状型には、C-1のOH基の向きによって α と β の二つがある⁷⁾。糖のD₂O溶液の¹HのNMRの測定によって、溶液中の平衡混合状態におけるこれらのコンフォメーションの存在割合⁸⁾を知ることが出来る。この割合から、水溶液中に環状で存在する糖分子の、赤道方向を向いている水酸基(e-OH基)の数の平均値が計算できる。糖と溶媒の水との相互作用(水和)の強さが、このようにして求めたe-OH基の平均数が多い程大きい事が見出されている^{9,10)}。又、水溶液中の糖分子同志の相互作用の尺度である第二ビリアル係数は、分子量と比例関係にある^{9,11)}、など、糖が溶液中で上述したような複雑な混合物の平衡状態で存在するにもかかわらずいくつかの重要な性質が平均値や簡単なモデルで説明できるのは興味ある事実である。

この総説では、変性剤、蛋白質分解酵素、熱などを加えて蛋白質を変性させたり分解させたりする条件において、糖の存在がどのように影響するかをいくつかの例について述べ、また、蛋白質の水和や高次構造に対する糖の作用、および糖による安定化の機構を考える。

2. 蛋白質の変性に対する糖の影響

2.1 尿素の作用に対する影響

代表的な変性剤の一つである尿素によって、オバルブミンが変性する時に、蔗糖と多価アルコールの及ぼす影響を示したのが表1である¹²⁾。pH 7.6, 30℃でオバルブミンが丁度半分まで変性するのに要する時間の対数を、加えた糖の濃度で微分した値が最右欄に示されている。変性速度は、旋光度の変化によって求められた。蔗糖とグリセロールを加えた場合にこの値が正となり、変性速度を遅くする事がわかる。グリセロールに比較して、蔗糖の抑制作用ははるかに大きい。反対に一価アルコールが添加されると変性速度が早められる。ヘモグロビンも尿素によって変性するが、変性すると分子の大きさが広

The Effect of Sugars on the Stability of Protein Structure

HATSUHO UEDAIRA

Research Institute for Polymers and Textiles,
Yatabe-Higashi, Tsukuba, Ibaraki Pref., 305
Japan

繊維高分子材料研究所第1部生体高分子物理研究室
主任研究官(工博)

表1 尿素によるオバルブミンの変性速度に対する
蔗糖と多価アルコールの影響¹²⁾ (30℃)

物質	尿素濃度	$d \log t_{1/2} / dc$
蔗糖	8.9 M	2.6
グリセロール	8.9	0.5
エチレングリコール	8.9	-0.05
プロピレングリコール	7.3	-0.44
メタノール	7.3	-0.83
エタノール	7.3	-1.55

がり、溶液の粘度が高くなる。ヘモグロビン濃度 19.0 % w/v の溶液粘度は 7.5 cP であるが 4 M 尿素溶液では 9.7, 6 M 尿素溶液では 13.9 cP と上昇する¹³⁾。ところが同じヘモグロビン溶液に 0.1 M のグルコースを加えると粘度は 8.5 cP となるが、これに尿素を加えても粘度は大きな増加を示さず、6 M 尿素溶液で 9.7 cP にとどまる¹³⁾。0.1 M のグルコースによって、ヘモグロビンの unfolding が押えられている事を示す。

尿素は又、サブユニットの集合体からなる酵素を単分子状に解離させる作用がある。4 量体の L-アスパラギナーゼは、4.8 M 尿素によって単量体に解離するが、この溶液を、尿素濃度 1.9 M まで希釈した時、この系に糖や多価アルコールが添加されていると、再び集合して、活性のある 4 量体を作る。添加濃度が 0.019 g/ml のとき、尿素を 1.9 M に希釈してから約 30 分後において、再生された 4 量体のパーセントを沈降係数から求めたものは、表 2 の通りである¹⁴⁾。表には二つの糖の他に比較のために分子内の OH 基が 2~7 個の多価アルコールの結果もあげてある。生成した 4 量体の % を第 4 欄に示す。添加物濃度はすべて 0.019 mg/ml になっているので、これをモル濃度に直すと、第 3 欄のようになり、また、4 量体生成量が近似的に添加物濃度に比例するとして、1 モル濃度あたりの 4 量体の生成効果に換算すると、最右欄のようになる。そこで、この値を、添加物の分子内の OH 基の数(糖では e-OH 基の数⁹⁾) に対して図示すると、図 1

表 2 糖および多価アルコールの存在下で尿素有
希釈(4.8 M → 1.9 M)した時の、L-アスパ
ラギナーゼ 4 量体の生成量¹⁴⁾

No.	添加物	添加物の モル濃度	4 量体生成量 %	生成効果 %/モル
	なし	0	0	0
1	エチレングリコール	0.306	14	45.7
2	グリセロール	0.206	15	72.8
3	エリスリトール	0.155	44	284
4	アドニトール	0.125	56	448
5	ソルビトール	0.104	61	587
6	イノシトール	0.105	70	667
7	ペレセイトール	0.0968	68	702
8	グルコース	0.105	59	559
9	蔗糖	0.0555	54	973

図 1 糖および多価アルコールによる
L-アスパラギナーゼ 4 量体の
生成効果

図中の番号は表 2 の番号と同じ。

—○—: 多価アルコール; —□—: 糖

のようになる。糖は 2 例だけだが、多価アルコールよりも効果がやや大きい傾向にある。いずれの系列でも、分子内水酸基が 7~8 ケまでのデータでは、分子内に水酸基の数が多く存在するものほど、4 量体生成効果が大きいことがわかる。又、増加の程度は、分子内水酸基の数が 3 ケまでは顕著ではないが、4 ケ以上では、ほぼ直線的に増加している。多価アルコールの中でただ一つの環状のイノシトールは、鎖状のアルコールよりも 4 量体生成効果がやや大きく、糖の系列との中間の値を示す。4.8 M 尿素によって、L-アスパラギナーゼが単量体に解離したあと、同様に 0.019 mg/ml の添加物の存在下で尿素濃度を 1.7 M に薄めた場合は、再集合速度が上記の場合よりも早くなる。4 量体の生成量に応じて変化する 287 nm での吸収強度によって尿素濃度を薄めてから 1 分後の 4 量体生成量を求めると、図 1 と同様に分子あたりの OH 基の数が多いものほど 4 量体生成効果が大きい¹⁴⁾。

2.2 プロテアーゼ作用に対する影響

トリプシン、キモトリプシンの 2 種のプロテアーゼによる β -ラクトグロブリン A の加水分解反応に対する蔗糖の影響が研究されている¹⁵⁾。糖が存在しない時のプロテアーゼの加水分解反応の速度を v とし、蔗糖の存在下でこれが v_i となったとすると、 $i = 1 - v_i/v$ の値は、蔗糖による加水分解反応の抑制効果の尺度となる。プロテアーゼ濃度 1 mg/ml, pH 7, 35℃ で測定された i の値を表 3 に示す¹⁵⁾。1.5 M の蔗糖が存在すると、トリプシンによる分解は完全に抑制され、 α -キモトリプシンでは 83 % 抑制さ

表3 トリプシンおよび α -キモトリプシンによる β -ラクトグロブリンAの分解に作用する蔗糖の影響¹⁶⁾(β -ラクトグロブリン濃度 6.04 mg/ml)

蔗糖濃度	抑制効果 i (%)	
	トリプシン	α -キモトリプシン
0.45	23	27
0.8	58	51
1.5	100	83

れる。二つのプロテアーゼで、50%の抑制を示す蔗糖濃度は、0.7M付近である。この0.7Mの蔗糖溶液中と、蔗糖が存在しない場合とで、トリプシンによる分解反応の活性化のエンタルピー変化、 $\Delta H^\ddagger$ の差は、 ~ -200 cal/mol, 自由エネルギー変化の差は $+400$ cal/mol, エントロピー変化の差は、 -34 e.u.であった¹⁶⁾。もし、糖と β -ラクトグロブリンAが水素結合をするのであれば、 $\Delta H^\ddagger$ の差は正である筈なので、この結果は、おそらく疎水性相互作用による安定化があるだろうという事を示している。

2.3 熱変性に対する影響

次に、熱変性に際しての糖の作用についての例を述べる。Donovanら¹⁶⁾によればpH7に調製した卵白の蛋白質を熱分析装置によって測定すると、65℃(小)と84℃(大)にピークをもち、74℃に肩のような吸収をもったDSC曲線が得られる。他のデータと違って試料は単一の蛋白質ではなく、蛋白質混合物である。得られた吸熱ピークは低温から順にコンアルブミン、リゾチームおよびオバルブミンに対応する。pH7および9の両方の場合に、10%の蔗糖が存在すると、DSC曲線は形をほとんど変えずに、変性温度が約2℃余り上昇する。蔗糖を卵白と等重量まで加えると、変性温度は更に上昇し、蔗糖を加えない時よりも、13℃も高くなる¹⁷⁾。また、Backら¹⁸⁾は、精製したオバルブミン、リゾチーム、コンアルブミンおよび α -キモトリプシノーゲンの熱による変性を同様にDSCによって調べた。蔗糖、グルコース、ソルビトール、グリセロールを重量%で50%まで加えた時、添加していない場合に比較した変性温度の上昇分を表4

に示す。第3欄は糖の存在しない時の変性温度である。同じ濃度の同じ添加物による変性温度の上昇の度合は、蛋白質により異なり、リゾチームが最も影響が大きく、コンアルブミンと α -キモトリプシノーゲンはどの場合にも比較的小さい。添加物による作用の大きさの順序は、濃度を重量%で50%に固定した場合には、グルコース=ソルビトール $\geq$ 蔗糖 $>$ グリセロールとなる¹⁸⁾。重量%の割に、OH基の濃度が低い蔗糖の場合に見かけ上作用の大きさが小さく出ている。そこで表4の第8~11欄に、1mol濃度あたりに換算した温度上昇効果を示した。この値について図1と同様のプロットを行なうと、やはり分子内のOH基の数が多い添加物ほど安定化効果が大きく、又、糖の方が多価アルコールより効果が大きい傾向がみられる。Backら¹⁸⁾は、更にpH7において、11種の糖と9種の多価アルコール(濃度28%および50%)によって、オバルブミンの熱変性温度が何度上昇するかを測定している(図4参照)。糖および多価アルコールが50%もの高濃度で存在する時は、オバルブミンの変性温度の上昇分は10℃を越える場合が多く、グルコースでは15.5℃にも達する。一方多価アルコールでは、価数の少ないアルコールほど昇温効果が小さく28%のエチレングリコールでは逆に変性温度が下がっている。

pH5において、リゾチーム水溶液に種々の糖を加えた時の熱変性温度も糖によって上昇する¹⁹⁾。温度の上昇程度は後述するように糖によって異なるが、1mol濃度の糖では、約5℃程度まで安定化される。

このようにして、変性剤、プロテアーゼ、熱など、蛋白質の高次構造を壊す作用を加えたり、加水分解しようとする作用を加えたりすると、糖が蛋白質を保護する働きをする事がわかる。この影響がどのような機作によるものかを、次に考えてみる。

3. 糖による蛋白質構造の変化および結合の有無

糖による安定化作用は、糖と蛋白質との結合によるのか、又、高次構造の何らかの変化を伴うのかが問題となる。浜口ら²⁰⁾は、リゾチームの活性をpH5.6、30℃で

表4 糖および多価アルコールの蛋白質に対する熱安定化効果¹⁸⁾

蛋白質	pH	T_d (°C)	ΔT_d (°C) / 50% w/w				ΔT_d (°C) / モル			
			蔗糖	グルコース	ソルビトール	グリセロール	蔗糖	グルコース	ソルビトール	グリセロール
オバルブミン	7.0	77.0	11.0	15.5	14.0	1.5	3.8	2.8	2.6	0.14
リゾチーム	3.0	66.5	15.0	17.0	18.5	8.5	5.1	3.9	3.4	0.78
	7.0	71.0	14.5	15.0	17.0	8.5	5.0	2.7	3.1	0.78
コンアルブミン	7.0	63.5	9.0	11.0	11.0	0	3.1	1.2	2.0	0
α -キモトリプシノーゲン	3.0	48.5	8.0	9.0	11.0	3.0	2.7	1.6	2.0	0.28

測定して、グリセロールと蔗糖は、濃度 25% まで活性に変化を与えないが、エチレングリコールは濃度 20% において活性を 90% 程度に減少させる事を示した。グリセロールの 30% (v/v) 濃度まで、L-アスパラギナーゼの構造変化も顕著な活性変化もおこらない事が示されている¹⁹⁾。

β -ラクトグロブリンを、蔗糖の存在下で滴定すると、カルボキシル基のイオン化エネルギーが大きくなる事が見出されている¹⁶⁾。また、紫外スペクトルの吸収強度を蔗糖濃度に対して図示すると、蔗糖濃度 0.5~1.2 M のところで転移を示すような曲線が観察され、トリプトファンのある割合が溶媒に直接接触するようになると考えられる¹⁶⁾。リゾチームは 6 ケのトリプトファンを持ち、このうち 4 ケが表面に接している。トリプトファンおよびリゾチームの 292 nm 付近の吸光係数は、エチレングリコールおよび蔗糖を 10% まで加えたとき、一樣に変化して転移点を示さない²⁰⁾。しかし、リゾチームの吸光係数の変化量は、エチレングリコールではトリプトファンの 4 倍弱であるが蔗糖では 6.7 倍となって、表面に露出しているトリプトファン以外にも影響を与えている可能性がありながら活性が変化しない状態とは、どういう状態なのか、ゆらぎの研究を含めた今後の研究成果が待たれる。一価アルコールは蛋白質の高次構造に変化を与える事、特にヘリックス含量を増加させる事が知られているが⁹⁾。このような顕著な構造変化は糖の場合には報告されていない。

糖は蛋白質の特定部位に、又は非特異的に結合するのだろうか。 β -ラクトグロブリンと蔗糖の系では、pH 7, 35°C でコロジオン膜による透析平衡から、蔗糖二分子が β -ラクトグロブリンのモノマーに結合するという結果が得られているが、平衡定数は求められていない¹⁶⁾。リゾチームはムコ多糖の加水分解酵素であるため、N-アセチルグルコサミンの単糖~三糖も強く結合する。しかし、アセチル基のない糖に関しては結合があっても結合定数は 1 以下であり、小さい¹⁹⁾。反対に、pH 5 では、結合に基づくようなスペクトル変化は円二色性には現れず、糖とリゾチームの各々の吸収の和と混合物について測定された吸収が一致する¹⁹⁾。

他の多くの蛋白質についても、糖と結合していないというデータが得られている。Timasheff ら²¹⁾は、リボヌクレアーゼ、 α -キモトリプシン、チューブリン等の糖

表 5 蛋白質による糖水溶液の選択水和^{21, 22)}

蛋白質	化合物	$\frac{\partial g_s}{\partial g_p}$	A_w H ₂ O g/g	A_s モル / モル蛋白質
α -キモトリプシン	蔗糖	-0.106	0.24	0
"	グリセロール	-0.062	0.11	0
リボヌクレアーゼ A	蔗糖	-0.192	0.44	0
チューブリン	蔗糖	-0.075	0.27	0
オバルブミン	蔗糖		0.262	-0.22 ± 0.54
"	マンニトール		0.244	-0.10 ± 0.53
"	アドニトール		0.157	+0.13 ± 0.24

溶液の密度の測定から、選択水和の値を求めている。結果を表 5 に示す。表中の g_i は水 1 g あたりの成分 i のグラム数、 A_i は成分 i の蛋白質への選択吸着量、下つき s, p, w はそれぞれ糖、蛋白質、水を示す。 $\partial g_s / \partial g_p$ は蛋白質近傍における糖濃度が、バルクの溶液中に比較して過剰であるかどうかの尺度を与えるもので、表の上部の四つの蛋白質のすべての場合に負になっている事から、糖溶液中では、水が蛋白質に選択的に吸着され、糖は蛋白質表面から押し出されている事を示す。蛋白質 1 g あたりに結合した水分子の量、 A_w の値は、蛋白質によって差があるが、0.24~0.44 g/g の水が結合していることがわかる。Bull ら²²⁾も透析平衡によって、30°C におけるオバルブミンの吸着水を測定している。同じ表に結果を示す。オバルブミンに吸着する水の量は、蔗糖溶液で一番大きく、多価アルコールのマンニトール、アドニトールがアルコールの価数に応じて少なくなっている。実験誤差内でこれらのものはオバルブミンには吸着していないと考えられる。

一方、糖が蛋白質に特異的に結合する場合は、非常に希薄な濃度で蛋白質の安定性に大きな影響を与える。例えば N-アセチルグルコサミンの三量体の、pH 2 でのリゾチームとの結合定数は 5185 M^{-1} であり、 $1.38 \times 10^{-8} \text{ M}$ の濃度でリゾチームの変性温度を 5.3°C 上昇させる²³⁾。1 モル濃度あたりの熱安定化効果、 ΔT_d / モル、は 3800 にも達する。これに較べ、表 4 は 3~5.5 モルもの高濃度の糖で得られた結果であり、熱安定化効果は高々 5°C / モルにすぎない。N-アセチルグルコサミン三量体とリゾチームの場合に較べ、はるかに弱い相互作用が関与していると考えられる。

これらの結果から、蛋白質溶液に加えられた糖は、必ずしも天然構造の蛋白質に結合するのではなく、むしろ、天然状態の水和を強めていると考える方が妥当であろう。

4. 糖による安定化機構

4.1 モデル系

複雑な系を解明するために、より簡単なモデル系を用

表6 イオン対形成の自由エネルギー変化¹⁸⁾

溶 液	ΔG_{HI}° cal/モル	ΔG_{el}° kcal/モル
水	-366 ± 22	
1 M 庶 糖	-449 ± 41	1.5 ± 0.2
2 M 庶 糖	-559 ± 17	2.1 ± 0.1
3 M グリセロール	-483 ± 17	1.4 ± 0.1
6 M グリセロール	-429 ± 69	2.9 ± 0.5

いるのは有力な研究方法の一つである。以下に二、三のモデル系でのデータを示す。Backら¹⁸⁾は、ドデシルトリメチルアンモニウムカルボン酸に於てカルボン酸の炭素鎖を炭素数6から9まで変えて、溶液中のイオン対の形成に対する糖の影響を電気伝導度の測定によって求めた。イオン対形成の自由エネルギー変化の、疎水性部分の寄与($-\text{CH}_2-$ 基あたり), ΔG_{HI}° , および静電的寄与, ΔG_{el}° , を表6にのせる。 ΔG_{HI}° は糖やグリセロール水溶液中で水中より負の値をとり、又濃度が高い程一層負となる。一方、 ΔG_{el}° は正の値なので、糖溶液中では ΔG_{HI}° の効果により、イオン対が作られ易くなっている事を示している。

蛋白質を構成する疎水性アミノ酸の中で、側鎖が芳香族系のものと脂肪族系のものに分ける。前者のアミノ酸すなわち、フェニルアラニン(Phe), チロシン(Tyr), トリプトファン(Trp), およびそのアセチルエチルエステル(それぞれAPE, ATYE, ATRE)の水溶液中と糖溶液中の溶解度が測定されている。溶解度から、そのアミノ酸1モルが、水から糖溶液に移る際の自由エネルギー変化を計算した結果を表7に示す²⁴⁾。庶糖およびグルコース溶液への移動の自由エネルギー変化はすべて正となっている。同じ濃度では、グルコースよりも庶糖溶液へ移る場合に、より大きなエネルギーを必要とし、又、糖濃度が高い程大きな値となっている。このことから、天然状態の蛋白質において、蛋白質内部に存在する疎水基が、露出しまいとする傾向は、水中より糖溶液の方が強くなる結果、蛋白質の天然構造がより安定化されると考えられる。

表7 芳香族アミノ酸が、水から糖溶液に移動する際の自由エネルギー変化²⁴⁾
(28℃, 単位はcal/モル)

アミノ酸	庶 糖		グルコース	
	1 M	2 M	1 M	2 M
APE	205	580	140	290
ATYE	250	660	150	370
ATRE	125	305	110	260
Phe	110	200		
Tyr	95	190		
Trp	150	360		

アルキル基の側鎖をもったアミノ酸残基と、ペプチド基のモデルとして、 α -アミノ酪酸(α -ABA)とグリシルグリシン(glygly)の庶糖溶液中の活量係数が、等蒸気圧法によって測定されている²⁵⁾。この方法では、アミノ酸の活量係数を、庶糖濃度だけでなく、アミノ酸自身の

図2 グリシルグリシンの活量係数

—: 水中; ----: 庶糖溶液中。庶糖濃度: 1, 1.0m; 2, 2.0m; 3, 3.0m; 4, 4.0m; 5, 5.0m

図3 α -アミノ酪酸の活量係数

—: 水中; ----: 庶糖溶液中。庶糖濃度: 1, 1.0m; 2, 2.0m; 3, 3.0m; 4, 4.0m

濃度の関数として得ることができる。それらを図2および図3に示す。大ざっぱな傾向として、両者の活量係数は蔗糖濃度と共に増加する。しかし、glyglyの活量係数は、蔗糖濃度が2モル以下、glygly濃度が0.8モル以下では一旦負になってそれ以後増加する。一方、 α -ABAでは、測定したすべての濃度で活量係数が蔗糖によって増加し、その増加の程度は α -ABAの濃度が低い程大きくなる。蛋白質が変性する際に、球状構造からランダムコイル状態に広がる過程を、近似的に蛋白質を構成するアミノ酸の局所濃度が希釈される過程と考えてみる。希釈と共に溶質の化学ポテンシャルは減少するのが普通だが、図3から、化学ポテンシャルに対する活量係数の寄与をみると、水中では化学ポテンシャルが一層減少するように変化するが、蔗糖溶液中では α -ABAの比較的薄い領域では希釈と共にむしろ増加して、自由エネルギーの減少を抑制している。蛋白質の変性の過程でも蔗糖溶液中ではランダムコイル状に広がっていく際の自由エネルギーの減少が抑えられる可能性を示唆している。活量係数の値から、アミノ酸が水溶液から蔗糖溶液へ移動する際の自由エネルギー変化、 ΔG_t 、を求めると表8のようになる²⁶⁾。glyglyと α -ABAの ΔG_t の値は蔗糖濃度と共に増加し、その増加の程度は α -ABAの方がglyglyよりはるかに大きい。側鎖のないglyglyに比較してアルキル基の側鎖をもつ α -ABAの場合には、蔗糖溶液は水に比較してはるかに反発性の強い溶媒であることが明らかである。芳香族の側鎖をもつアミノ酸の場合と同様に、アルキル基の側鎖をもつアミノ酸が蛋白質分子内部から表面に露出するためには、まわりが水である場合よりも蔗糖溶液である場合の方が、はるかに大きな仕事を必要とする。蔗糖溶液中では水中に比較してアルキル基の側鎖をもつアミノ酸残基が蛋白質内に埋まり込むう

表8 グリシルグリシンおよび α -アミノ酪酸が水から蔗糖溶液に移動する際の自由エネルギー変化²⁶⁾ (cal/モル)

m_A	m_B					
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
グリシルグリシン						
0	-10.5	-9.62	12.8	45.5	76.6	103
0.2	-8.94	-7.48	13.8	43.9	72.5	98.9
0.5	-4.78	-0.62	22.9	53.2	83.0	
1.0	3.23	13.0	42.7	76.1	111	
1.5	7.21	18.3	44.8	71.0		
α -アミノ酪酸						
0	43.3	84.7	164	237	302	
0.2	33.5	65.8	128	189	244	
0.5	25.3	50.1	99.9	151	200	
1.0	23.3	46.3	92.8	141	188	
1.5	26.6	51.3	96.0			

とする傾向—いわゆる疎水性相互作用—が大きくなることがわかる。表8から得られるもう一つの結果は、ペプチド基をもつglyglyに対する蔗糖の作用の複雑さである。低濃度ではglyglyに対して蔗糖溶液の方が水よりも親和性があるが、高濃度ではより反発性となる。この事は、蔗糖濃度のあるところで、ペプチド基に対する作用が、逆になる場合がある事を示唆する。

4.2 蛋白質と糖の系

モデル実験によって、蔗糖やグルコース溶液では、蛋白質の疎水性相互作用が強められるとの結論を得た。又、糖の結合の実験から、糖水溶液中の糖は特殊な場合を除き、蛋白質に結合せず、むしろ水和を強めると考えられる。実際の蛋白質の変性において、モデル系での結論がそのまま成立するか、又糖の違いによる作用の強さの違いをどう説明できるかを次に述べる。

Timasheffら²¹⁾は、蔗糖による蛋白質の安定化作用を、蔗糖水溶液の表面張力が水に比較して大きい事で説明している。蛋白質が変性する際に蛋白質分子が広がって新しい表面ができる。蔗糖溶液中ではこの表面自由エネルギーが水中より大きいために、ランダムコイル状態に広がる過程で、より多くのエネルギーが必要となり、変性を抑えるという考えである。蔗糖溶液の表面張力の増加と蛋白質の表面積から計算したエネルギー増分が実験結果と良く一致している²¹⁾。しかし、水よりも表面張力の小さいグリセロール水溶液等でも安定化作用がある事を説明できない。

より一般的な説明を与えるものとして、糖や多価アルコールが水の分子配列をより秩序化させる強さ（いわゆるstructure-making効果）と、蛋白質に対する影響の強さとの間に強い関係がある事が示されている^{18, 19)}。溶質のstructure-making効果を表す尺度として、Oakenfullら²⁶⁾はその物質の水溶液中の無限希釈度における部分分子容、 $\bar{V}_2$ を用いた。すなわち、溶質のファンデルワールス体積を V_w とすると、 $(\bar{V}_2 - V_w)/V_w$ の値と、structure-making効果との間には逆の関係がある。実際に、濃度28%と50%の種々の添加物の溶液中でのオバלבミンの熱変性温度の水中の変性温度との差を縦軸に、上述の量を横軸にとって図示してみると、図4のようにほぼ直線になる¹⁸⁾。水に対してstructure-making効果の大きいもののほど、変性温度を上昇させると考えることができる。言いかえると、糖および多価アルコールが蛋白質の熱変性を抑制する作用は、間接的に水の構造に対する作用を通じて蛋白質の疎水性相互作用を強めることによる、という考えを実験的に支持している。しかし、図4の中で、添加物が糖である場合をみると、この直線性からのずれが見られる。

図4 糖および多価アルコールによるオバルブミンの熱変性温度の上昇と、 $(\bar{V}_2 - V_w)/V_w$ の関係

添加物濃度：—●—：28%；—○—：50%

添加物名：1, リボース；2, アラビノース；3, グルコース；4, ガラクトース；5, マンノース；6, フラクトース；7, 蔗糖；8, ラムノース；9, フィコール；10, エチレングリコール；11, グリセロール；12, エリスリトール；13, リビトール；14, キシリトール；15, ソルビトール；16, マンニトール

糖の影響を定量的に説明するには、溶液中の糖の存在状態について、もっと立入った議論が必要である。NMRによって求めた⁸⁾糖分子中のe-OH基の平均数と、1モル濃度の糖によるリゾチームの変性温度の上昇分の関係を図5に示す¹⁹⁾。図4の中の糖のデータ¹⁸⁾をもとに、同様のプロットをしてみると図6のようになる。縦軸の値は、近似的に、糖による変性温度の上昇分は糖濃度に比例するとして1モル濃度における温度上昇分に換算した値である。図5と同様にほぼ直線関係が得られ、その

図5 リゾチームの熱変性に対する糖の安定化効果

糖：1, デオキシリボース；2, リボース；3, リキソース；4, アラビノース；5, キシロース；6, フラクトース；7, グルコース；8, 蔗糖

図6 オバルブミンの熱変性に対する糖の安定化効果

糖濃度：—●—, 28%；—○—, 50%, 図中の番号は図4と同じ。

傾斜は図5よりやや小さく、表4の傾向と一致している。これらの図はe-OH基の数が多い糖ほど、変性温度を上げる効果が大きい事を示している。Kabayamaら²⁷⁾およびTaitら²⁸⁾によって、 β -D-グルコースのe-OH基の酸素間の距離が、水の構造中の酸素間距離と一致することが示されている。e-OH基を多数持つような分子構造をとる糖はstructure-making効果が強い¹⁰⁾ことから、図5, 6はstructure-making作用の強い糖ほど、蛋白質の変性温度を高める作用が強いことを示しており、モデル系での結論を実証している。

従来Nemethyら²⁹⁾によって、温度が高くなる程、疎水性相互作用が強くなると言われて来た。糖が加わると、水の三次元構造が強められるが、これは、より低温の水の状態に対応する。水の構造を強める糖の方が蛋白質の疎水性相互作用をより強めるという結論は、Nemethyらの理論と矛盾するように見える。しかし、糖のみならず他のアルコール水溶液の場合でも、水の三次元構造が最大になるような濃度で、疎水性相互作用が最大になるという実験結果もあり²⁶⁾、最近、Prattら³⁰⁾は、疎水性相互作用は、温度の上昇と共に弱められるという理論を出している。

5. おわりに

以上、糖による蛋白質の高次構造の安定化作用について概説したが、糖との関連が深い多価アルコールについては、部分的にしか触れなかった。蛋白質の熱変性に対する多価アルコールの作用に関しても図1のような関係が得られている³¹⁾、その多、モデル系での研究³²⁾、熱変性に対する影響³³⁾など多数の研究がある。多価アルコールの場合も、作用が激烈でないことが特徴であり、このような比較的穏やかな作用の物質と蛋白質との相互作用の研究が、今後、酵素などの生体高分子の反応を制御するために、ますます重要になるであろう。

文 献

- 1) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167 (1979).
- 2) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959).
- 3) M. F. Pertz, *Science*, **201**, 1187 (1978).
- 4) 蛋白質・核酸・酵素, 23 卷(1978), 高木俊夫, p. 1178; 猪飼 篤, p. 1181; 油谷克英, p. 1190; 浜口浩三, p. 1199; 中西 守, p. 1205; 大島泰郎, p. 1213.
- 5) C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121 (1968); *ibid.*, **24**, 1 (1970).
- 6) A. Ikegami, *Adv. Chem. Phys.*, **46**, 363 (1981).
- 7) 例えば, 河武喜美子, 生体物質論 II, 岩波講座現代化学(1956); 水野 卓, 西沢一俊, 糖質化学便覧, 共立出版(1971).
- 8) S. J. Angyal, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **8**, 157 (1969); S. J. Angyal and V. A. Pickles, *Aust. J. Chem.*, **25**, 1171, 1695 (1972).
- 9) F. Franks, in "Polysaccharides in Food", ed. J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell, Butterworths (1979).
- 10) 上平 恒, 化学総説, No. 11, 191 (1976).
- 11) H. Uedaira and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **42**, 2137 (1969).
- 12) R. B. Simpson and W. Kauzmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5139 (1953).
- 13) N. L. Simmons and R. J. Naftalin, *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 493 (1976).
- 14) S. Shifrin and C. L. Parrott, *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 426 (1975).
- 15) J. C. Metral and J. Yon, *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 340 (1968).
- 16) J. W. Donovan, C. J. Mapes, J. G. Davis and J. A. Garibaldi, *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 73 (1975).
- 17) J. W. Donovan, *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**, 571 (1977).
- 18) J. F. Back, D. Oakenfull and M. B. Smith, *Biochemistry*, **18**, 5191 (1979).
- 19) H. Uedaira and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 2451 (1980).
- 20) K. Hamaguchi, K. Hayashi, T. Imoto and M. Funatsu, *J. Biochemistry*, **55**, 24 (1964).
- 21) S. N. Timasheff, J. C. Lee, E. P. Pittz and N. Tweedy, *J. Colloid Interface Sci.*, **55**, 658 (1976).
- 22) H. B. Bull and K. Breeze, *Biopolymers*, **17**, 2121 (1978).
- 23) C. N. Pace and T. McGrath, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3862 (1980).
- 24) T. S. Lakshmi and P. K. Nandi, *J. Phys. Chem.*, **80**, 249 (1976).
- 25) H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 1298 (1977).
- 26) D. G. Oakenfull, D. E. Fenwick, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **75**, 636 (1979).
- 27) M. A. Kabayama, D. Patterson and L. Pishe, *Can. J. Chem.*, **36**, 557, 563 (1958).
- 28) M. J. Tait, A. Sugget, F. Franks, S. Ablett, and P. A. Quickenden, *J. Solution Chem.*, **1**, 131 (1972).
- 29) G. Nemethy and H. A. Sheraga, *J. Chem. Phys.*, **36**, 3382, 3401 (1962); *J. Phys. Chem.*, **66**, 1773 (1962).
- 30) L. R. Pratt and D. Chandler, *J. Solution Chem.*, **9**, 1 (1980).
- 31) S. Y. Gelsma and E. R. Stuur, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 337 (1972).
- 32) Y. Nozaki and C. Tanford, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3568 (1965).
日向邦彦, 野口 肇, 日本生物物理学会第 17 年会, (1979), 講演要旨, p. 303.
- 33) B. S. Harrap, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1**, 245 (1969); S. Y. Gelsma, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 150 (1970); Y. Fujita, A. Miyanaga and Y. Noda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 3569 (1979); 日向邦彦, 森川達也, 野口 肇, 日本生物物理学会第 17 年会, (1979), 講演要旨, p. 305.
(昭和 56 年 7 月 4 日受理)