



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結乾燥による蛋白の変性 I : ミオシンおよびカタラーゼ凍結乾燥と添加物質の影響
Author(s)	花房, 尚史; HANAFUSA, Naofumi
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 11-22
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17746
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p11-22.pdf



凍結乾燥による酵素蛋白の変性 I*

ミオシンおよびカタラーゼの凍結乾燥と添加物質の影響

花房尚史
(低温科学研究所)
(昭和44年9月受理)

I. 緒言

生体高分子の高次構造と機能が、水の構造、あるいは状態と密接な関係があることについては、これまでいくつかの報告がなされている¹⁻⁴⁾。

高次構造と機能の変化、即ち変性を起させる種々な要因の中で、凍結、あるいは凍結乾燥は、低温で且つ化学的因子なしで直接溶媒の水の構造、状態を変化させるという点で特徴的な方法であると考えられる。

蛋白質の構造、機能と水との相互作用という見地から、著者はこれまでミオシンなどの棒状蛋白、カタラーゼ等の球状蛋白について、凍結融解による変性をいくつかの物理化学的方法で調べその結果を報告してきた⁵⁻⁹⁾。

一方、凍結乾燥は、一般に蛋白質の精製、保存のための比較的安全な方法として汎く用いられているが、凍結乾燥は凍結に比べるとほとんど完全な脱水なので、もし凍結による水の構造、状態の変化が、凍結融解による変性の主な原因であるなら、凍結によって変性するような蛋白は、凍結乾燥によってよりはげしい変性をうけると予想される。

事実、これまでに凍結乾燥による蛋白の変性についていくつか報告されており、ミオシンでは主として ATPase 活性が失活すること、蔗糖が失活を阻止することが報告されており¹⁰⁾、カタラーゼではサブユニットへの解離と活性の低下等が報告^{7,11,12)}されている。しかし、ミオシンでの高次構造の変化の有無や、カタラーゼの解離の詳しい様子などはよく判っていない。

この報告は、ミオシンおよびカタラーゼを用い、酵素活性の変化と、二・三の物理化学的性質の変化を調べ、凍結融解による変性と比較し、又、二・三の添加物質の変性に対する影響を調べ、これらの結果から凍結乾燥による変性の機構の考察を試みたものである。

II. 材料と方法

材料：ミオシンの抽出、精製は既報^{6,8)}と同様、ウサギ骨格筋より抽出、蛋白濃度 2~3%、0.5 M KCl 溶液として 0°C で保存、抽出後 14 日以内に使用した。

カタラーゼは、シグマ Co. 製、3 回結晶標品 (Lot No. 18 B-8040) を再結晶したものを

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 998 号

NaOH で pH 7.0 に調整し水溶液として使用した。

卵白アルブミンはキンダ化学製卵白アルブミンの粗結晶標品を、M/15 磷酸緩衝液に溶解、遠心して上清を用いた。

これらは全て使用直前に、12,000 r.p.m. 10 分間の遠心の後、不溶性の部分を除いて用いた。

方法：ミオシンの ATPase 活性およびカタラーゼ活性の測定条件、方法は前報と同様である。

差スペクトルおよび酵素活性測定のための吸収測定には、日立-パーキン・エルマー型分光光度計を使用した。セルは 1 cm 石英セルを用いた。

旋光分散の測定には、島津 QR 50 型分光光度計に、同社製旋光分散測定装置を附属して 100 mm セルを使用して行なった。得られた $[\alpha]$ から、モフィットとヤンの式¹³⁾で b_0 を計算した。 $\lambda_0 = 221 \text{ m}\mu$ を用いた。

超遠心分析は、日立 UCA-1 型分析用超遠心機を使用した。

凍結乾燥標品の残存水分量測定には、京都電子製カール・フィッシャー水分測定装置を使用した。カール・フィッシャー試薬は、ミツビシ K.F 試薬 (力価 0.5 mg/cc) を用いた。

蛋白濃度は、ミオシンについては、マイクロエルダール法で検量したビュレット法で決定し、カタラーゼについては吸収から $\epsilon_{278} \times 10^{-5} = 4.0$, $\epsilon_{405} \times 10^{-5} = 3.1$ を用いて決定した。

凍結乾燥の方法は、試料 2 ml を径 2 cm, 高さ 5 cm のガラス製試料びんにとり、所定の温度で凍結後、 -196°C (液体窒素) に 10 分間おき終末温度をそろえてから直ちに油回転ポンプ附凍結乾燥機に取付け、室温で 6 時間乾燥した。乾燥した試料は、使用直前まで 0°C で保存した。

III. 結 果

ミ オ シ ン

蛋白濃度 1% で凍結および溶媒条件を変えて凍結乾燥した後、0.02 M トリス緩衝液 (pH 6.9) で再び終濃度 1% となるように溶解した。この時、緩衝液又は蔗糖が存在する時は容易に溶けるが、KCl のみの時は時間を要するので、いずれも溶媒を加えて 6 時間氷室中に放置した後測定に使用した。

第 1 表は、旋光分散、紫外部の差スペクトルおよび酵素活性を測定した結果で、この表にみられるように、0.5 M KCl 中での凍結乾燥では、 $-b_0$ 値のはなはだしい減少と、 $-\Delta O \cdot D_{278m\mu}$ の増加、酵素活性の著しい減少がみられ、非常に大きな変性を起していることを示している。 $-b_0$ 値から、50~60% のらせん構造が破壊されているとみられる。緩衝液存在下でも、約 35% のらせん構造が破壊されており、凍結融解による変性と比べかなり大きな値を示しているが、酵素活性の減少はほぼ同じ程度である。凍結温度の比較についてみると、緩衝液の有無に拘らず、酵素活性はほとんど変わらないが、 $-b_0$ 値、 $\Delta O \cdot D_{278m\mu}$ の値から -80°C 凍結の方が変性の程度が大きい傾向を示している。変性に対する保護物質としての蔗糖は、0.01 M ではほとんど効果は認められないが、0.1 M で失活をほとんど阻止し、高次構造の破壊も $-b_0$ 値からみてかなりおさえられている。

第1表 凍結乾燥したミオシンの諸性質の変化

No.	溶媒	凍結温度 (°C)	ヘリックス パラメーター $-b_0$	$\Delta O \cdot D_{278m\mu}^a$	ATPase 比活性 (%)
対照	{0.5 M KCl 0.02 M トリス-HCl	—	353	—	100
1	0.5 M KCl	- 80	138	-0.56	30
2	”	-196	186	-0.33	30
2	{0.5 M KCl 0.02 M トリス-HCl	- 80	223	-0.30	67
4	”	-196	230	-0.29	66
5	{0.5 M KCl 0.1 M 蔗糖	- 80	272	-0.15	92
6	{0.5 M KCl 0.01 M 蔗糖	- 80	249	-0.13	30

凍結乾燥時の蛋白濃度 1%

^a 蛋白濃度 0.12% で測定

これ等の試料について、超遠心で沈降を測定した結果、沈降図、沈降常数ともにほとんど変化なく、解離会合は起していないのは明らかである。

凍結乾燥による変性に対する保護物質として、蔗糖が効果があることが判ったので、他に糖、アミノ酸、無機塩のいくつかの影響を調べた。ピロリン酸ナトリウム (以下 Na-PPi) を用いたのは、ミオシンの熱変性に対して保護効果を示すこと¹⁴⁾、凍結融解して変性したミオシンにデオキサンと共に Na-PPi を加えると破壊されたヘリックスが復元する⁶⁾ ことなどのためである。第2表はその結果であるが、0.2 M の糖、又はアミノ酸を加えた場合、酵素活性については、80~90% を保持してかなりの保護効果を示し、高次構造もかなり保護されている。しかし NaCl や、特に Na-PPi は全く効果がみられず、むしろ変性を促進するような傾向を示した。

これらの試料について、超遠心分析をおこなった結果、沈降図、沈降常数共に変化はみられなかった。

第2表 ミオシンの凍結乾燥に対する添加物質の影響

No.	添加物質 ^a (0.2 M)	ヘリックス パラメーター $-b_0$	$\Delta O \cdot D_{278m\mu}^b$	ATPase 比活性 (%)
対照	なし	338	—	100
1	なし	187	-0.32	76
2	NaCl	197	-0.37	56
3	Na-PPi	238	-0.25	46
4	蔗糖	280	-0.14	92
5	葡萄糖	260	-0.13	89
6	グリシン	280	-0.21	88
7	グルタミン酸ソーダ	263	-0.22	74

凍結乾燥時の蛋白濃度 1%; 溶媒, 0.5 M KCl, 0.02 M トリス-塩酸溶液 (pH 6.9); 凍結温度, -80°C (対照を除く)

^a 0.5 M KCl, 0.02 M トリス-塩酸に溶解

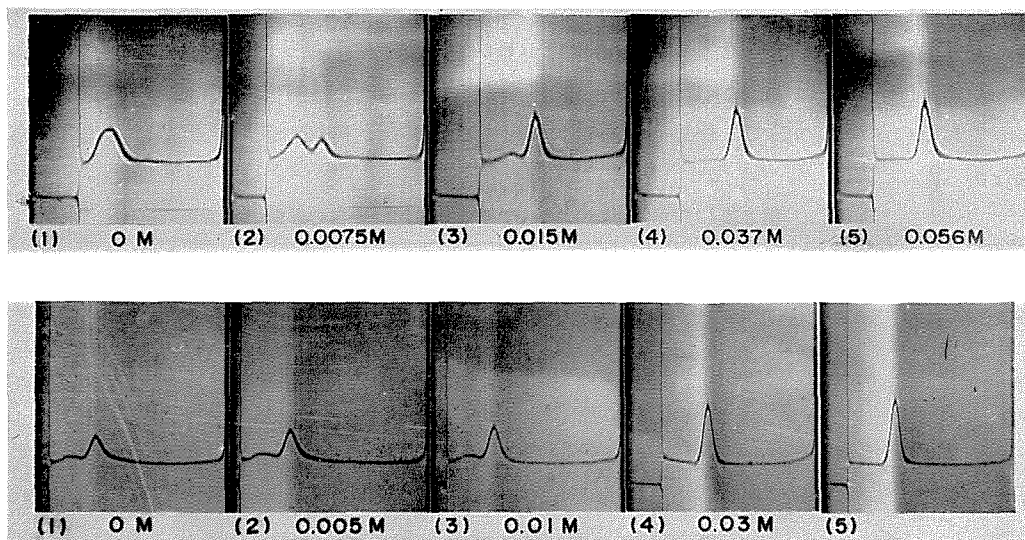
^b 測定時に 0.12% に稀釈

以上のように、ミオシンは凍結乾燥により、酵素活性の低下と共に著しい分子内の高次構造の変化を示すが、緩衝液の存在でこの変性はある程度阻止され、又、糖、アミノ酸で比較的良好に保護されることが判った。

カタラーゼ

前報^{7,8)}で、カタラーゼ水溶液が凍結乾燥によって3.8Sサブユニット単一成分に解離することを報告したが、解離は当然、溶媒条件によって影響されることが予想されるので、カタラーゼ濃度0.5%で、溶媒として磷酸緩衝液(pH 7.0)を用い、その濃度を変えて凍結乾燥した後、終濃度がM/15になるように磷酸緩衝液(pH 7.0)で溶解して、最初の溶媒の濃度の影響を調べた。第1図上段はその沈降図、第2図は紫外部およびソーレー帯の差スペクトルで、第3表はこれらの結果をまとめたものである。これらの結果から判るように、前報と異なり今回は、蒸留水単独の場合、全て凍結乾燥によって5.9Sサブユニット単一成分に解離し、これと対応したソーレー帯に吸収の大きな変化、即ち長波長側への移動がみられ、紫外部領域でも明らかな青方移動を示している。酵素活性は1/10に減少した。磷酸緩衝液が共存すると、5.9S成分の他に、ネーチーフな分子とみられる11S成分が共存し、緩衝液濃度の増加と共に5.9S成分の割合は減少し、ネーチーフな成分が増加する。差スペクトルの値もそれと対応して減少し、酵素活性はネーチーフの値に近づく。0.056Mではほとんど11S成分のみとなり、差スペクトルの変動はほとんどなく、活性の8割が保持されている。

一般に、蛋白の変性の程度は、蛋白濃度が小さいほど大きくなる傾向があるので、ここで用いる物理化学的諸測定の可能性の範囲として、カタラーゼ濃度を0.1~1%の範囲で変えて凍結



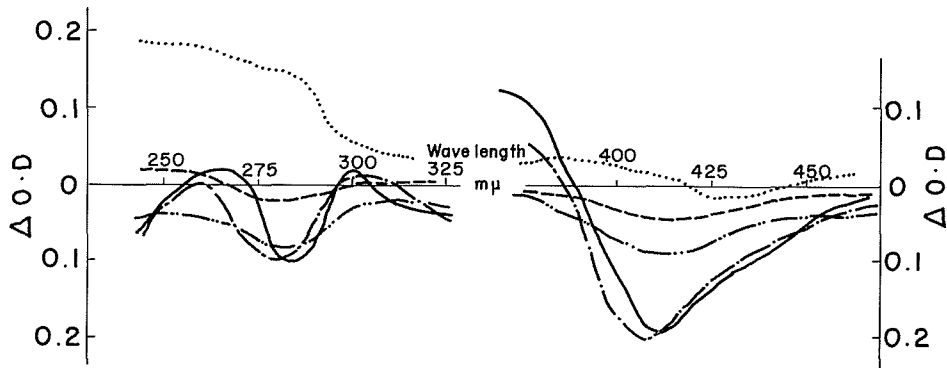
第1図 凍結乾燥したカタラーゼの超遠心沈降図 I

上段： 磷酸緩衝液の濃度の影響

下段： 蔗糖濃度の影響

1×10^{-2} M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) が共存, (5) は未処理の対照

凍結温度: -80°C 測定条件: 蛋白濃度, 0.42%; 溶媒, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0); 55,430 r.p.m., 20°C , 整定回転数到達後 24 分



第2図 凍結乾燥したカタラーゼの差スペクトル I

磷酸緩衝液の濃度の影響

磷酸緩衝液濃度：——，0；- - -， 7.5×10^{-3} M；- · - ·， 1.5×10^{-2} M；- · - · - ·， 3.7×10^{-2} M；
 ·····， 5.6×10^{-2} M。蛋白濃度，0.14%；溶媒，M/15 磷酸緩衝液；対照，未処理のカタラーゼ

第3表 凍結乾燥によるカタラーゼの解離に対する
 磷酸緩衝液 (pH 7.0) の濃度の影響

No.	磷酸緩衝液濃度 (M)	S _{20,w}	$\Delta O \cdot D_{260m\mu}^a$	$\Delta O \cdot D_{410m\mu}^a$	カタラーゼ比活性 (%)
対 照	5.6×10^{-2}	11.6	—	—	100
1	0	5.9	-0.10	-0.20	12
2	7.5×10^{-3}	{ 11.8 5.1	-0.20	-0.20	52
3	1.5×10^{-2}	{ 11.5 6.0	-0.08	-0.09	62
4	3.7×10^{-2}	{ 12.5 8.1	-0.02	-0.04	74
5	5.6×10^{-2}	12.0	+0.15	+0.01	81

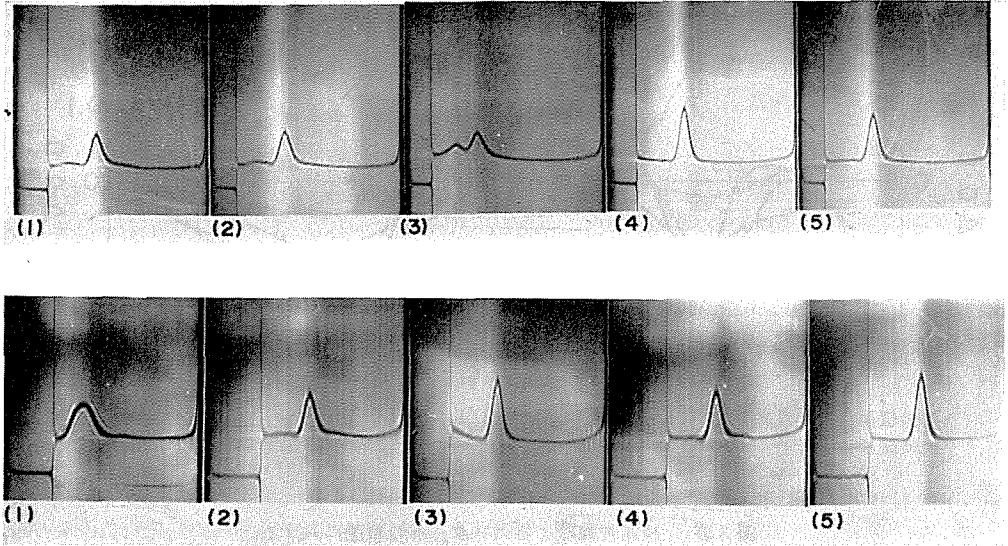
凍結乾燥時の蛋白濃度 0.5%；凍結温度，-80°C (対照を除く)

^a 測定時の蛋白濃度 0.12%

乾燥し、前と同様な方法で調べたが、この範囲内では変性の濃度依存性はほとんどみられなかった。

ミオシンについての結果で述べたように、蔗糖はミオシンの凍結乾燥による変性を阻止する効果を示したので、カタラーゼに対しての効果調べた。第1図下段は、蔗糖濃度を変えてその影響を調べた結果である。但しこの場合は、凍結乾燥によって一部がサブユニットに解離する条件である 0.01 M 磷酸緩衝液が共存している。図にみられるように、濃度が 0.01 M までは、11.5 S のネーチャーな成分の他に、5.8 S の解離したサブユニットの小さなピークがみられるが、0.03 M で解離は完全に阻止され、11.5 S のネーチャーな成分のみとなる。差スペクトルおよび酵素活性もほぼこれと対応した結果を示した。

更に、ミオシンの場合と同様に、他の糖、アミノ酸、無機塩の効果も、0.01 M 磷酸緩衝液共存下に調べた結果が、第3図上段および第4表である。無糖の場合、0.03 M で効果があるので、濃度は全て 0.03 M で比較した。これらの結果にみられるように、糖類はほぼ完全に解離



第3図 凍結乾燥したカタラーゼの超遠心沈降図 II

上段: 1×10^{-2} M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) の共存下での 3×10^{-2} M 添加物質の影響

(1), なし; (2), NaCl; (3), Na-PPi; (4), 蔗糖; (5), グルタミン酸ナトリウム

下段: 3×10^{-2} M 各添加物質水溶液の影響

(1), なし; (2), KCl; (3), イノシット; (4), グリシン; (5), 未処理の対照

凍結温度: -80°C

測定条件: 蛋白濃度, 0.42%; 溶媒, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0)

55,430 r.p.m., 20°C , 整定回転数到達後 24 分

第4表 凍結乾燥によるカタラーゼの 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 共存下での解離に対する添加物質の影響

No.	添加物質 ^a (0.03 M)	$S_{20,w}$	$\Delta O \cdot D_{280m\mu}^b$	$\Delta O \cdot D_{450m\mu}^b$	カタラーゼ 比活性 (%)
対照	なし	11.9	0	0	100
1	なし	{13.0 6.2}	-0.12	-0.18	57
2	NaCl	{11.5 6.4}	0	-0.13	56
3	Na-PPi	{11.3 6.5}	0.06	-0.26	56
4	蔗糖	11.5	0	-0.05	96
5	葡萄糖	11.7	0.03	-0.04	95
6	ラクトース	12.3	0.03	-0.06	95
7	グリシン	12.8	0	-0.09	87
8	グルタミン酸ナトリウム	12.1	0.04	-0.07	95
9	卵白アルブミン	{13.1 (3.8)}	—	-0.17	66

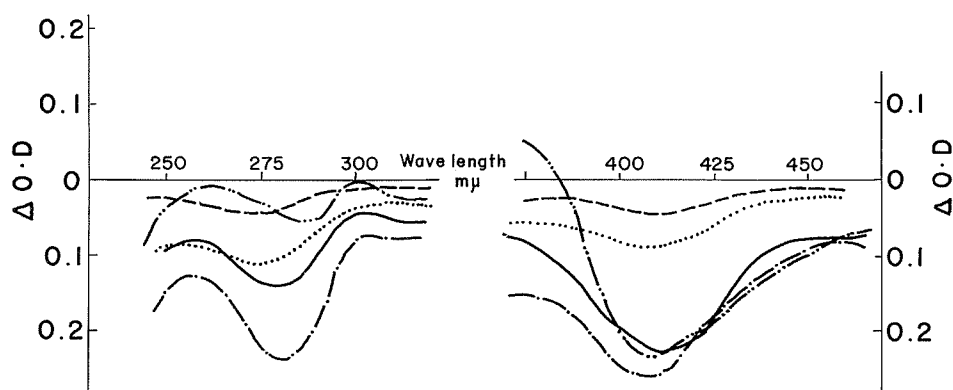
凍結乾燥時の蛋白濃度 0.5%; 凍結温度 -80°C (対照を除く)

^a 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 溶液

^b 測定時の蛋白濃度 0.12%

と失活を阻止し、アミノ酸は、超遠心的にはかすかに 5.9 S 成分の痕跡がみられるのもあるが、酵素活性および差スペクトルの上では、糖の場合とほとんど同じような保護効果がみとめられる。これに対し、NaCl は全く効果はみられず、Na-PPi は 6.5 S 成分の比が非常に増加し、ミオシンの場合と同様に変性を促進する傾向を示している。又、微生物などで凍結乾燥の保護物質として用いられる卵白アルブミンはほとんど効果を示さなかった。

第 3 図下段、および第 4 図、第 5 表は、磷酸緩衝液が共存しないときの、これらの添加物質 0.03 M での影響を調べた結果である。この結果にみられるように、糖は完全に解離を阻止し、アミノ酸の場合ある程度 6 S 成分の痕跡が残る場合もあるが、いずれも差スペクトル、酵素活性は対照のものに非常に近い値を示していることから、糖やアミノ酸が単独で保護効果を示すことが判った。これに対し、無機塩類は全く効果は認められなかった。



第 4 図 凍結乾燥したカタラーゼの差スペクトル II

添加物質 (0.03 M): —, なし; - - -, NaCl; - · - ·, Na-PPi;

---, 蔗糖; ·····, グルタミン酸ナトリウム

蛋白濃度, 0.14%; 溶媒, M/15 磷酸緩衝液; 対照, 未処理のカタラーゼ

第 5 表 凍結乾燥によるカタラーゼの解離に対する添加物質の影響

No.	添加物質 ^a (3×10^{-2} M)	S _{20,w}	$\Delta O \cdot D_{280m\mu}^b$	$\Delta O \cdot D_{410m\mu}^b$	カタラーゼ 比活性 (%)
対照	なし	11.8	—	—	100
1	なし	6.2	-0.14	-0.23	13
2	NaCl	{ 12.2 8.0	-0.14	-0.23	34
3	KCl	{ 11.4 5.4	-0.20	-0.20	38
4	NaPPi	5.7	-0.10	-0.23	10
5	蔗糖	12.0	-0.04	-0.05	85
6	イノシット	12.3	-0.11	-0.18	71
7	グリシン	12.4	-0.05	-0.11	91
8	グルタミン酸ナトリウム	11.9	-0.10	-0.07	90

凍結乾燥時の蛋白濃度 0.5%; 凍結温度 -80°C (対照を除く)

^a 全て水溶液

^b 測定時の蛋白濃度 0.12%

以上述べたように、カタラーゼの凍結乾燥による解離と失活は、溶媒条件に依存し、燐酸緩衝液 0.05 M で解離は阻止されること、蛋白濃度 1~0.1% の範囲内では、解離の蛋白濃度への依存性はみられないことが判った。又、0.03 M の糖、又はアミノ酸の添加によって、解離と失活は阻止されるが、無機塩は効果がなく、特に Na-PPi は解離を促進することが判った。

蛋白の含水量に対する各種添加物質の影響

ミオシンやカタラーゼの凍結乾燥による変性で、糖、アミノ酸が保護効果を示すのに比べ無機塩類が全く効果を示さないことの説明として、これらの有機物質が水に対して非常に親和性が強いため、一定量の水分を保持することによって変性を防ぐのではないかと考えられる。この点を確かめるため、卵白アルブミンをモデル蛋白として用い、蛋白濃度 1%、添加物質の濃度 0.03 M とし、他の条件はカタラーゼの場合と全く同様にして凍結乾燥し、直ちに乾燥空気を流入後開封して、カール・フィッシャー水分測定装置で残存水分量を測定した。

その結果、蔗糖濃度 0~0.25 M の間では残存水分量はほとんど濃度に関係なく、測定値として 0.75~0.67 mg の値を示し、むしろ、蔗糖の存在しない時の方がやや高い傾向を示した。他の糖やアミノ酸、無機塩等の残存水分量に対する影響を調べた結果からも、全ての場合にほとんど対照と同じ値を示し、これらの保護物質の保護作用を示す有効濃度と残水量の相関を示すような結果は得られなかった。このとき蛋白 1 mg 当り約 0.038 mg の残存水分量を示したが、これは卵白アルブミンの分子量を 45,000 とすると、この条件下での凍結乾燥では、乾燥後も尚、蛋白 1 分子当り約 100 個の水分子が残っていることになる。

IV. 考 察

ミオシンは、凍結融解によって、凍結条件に依存して、その高次構造の破壊と、酵素活性の低下を起すことを報告した^{6,8,9)}。例えば、-196°C で 25% のらせん構造の破壊と、50% 近くの失活を示した。今回の結果で示したように、凍結乾燥すると、0.5 M KCl+0.02 M トリス-塩酸の条件下で 35% のらせん構造が破壊され、50% の活性が失われること、0.5 M KCl のみの条件下では 50% のらせん構造の破壊と 70% の失活がみられた。即ち、凍結乾燥、いわば完全な脱水によって、ミオシンは著しく変性することがわかった。

又、前報⁷⁻⁹⁾で、カタラーゼは、凍結融解では、失活のみで高次構造は変化しないに拘らず、凍結乾燥すると 3.8 S サブユニットの単一成分に解離しほとんどの活性が失われることを報告したが、今回は全く同一の溶媒、凍結乾燥の条件下で、全て 5.9~6.2 S の単一成分への解離と、残存活性 10% 程度という結果を示した。凍結乾燥によるサブユニットの解離に関して、Tanford 等¹¹⁾は 7.6 S と 4.2 S の 2 成分への解離を、Dounce 等¹²⁾は 5.8 S の単一成分への解離を報告している。著者の結果での、6 S 成分は、Dounce 等の 5.8 S サブユニット (Dounce の命名では成分 I) と同一とみられ、3.8 S サブユニットの二量体であると思われる。このような解離の型式の差、特に著者の場合のように、全く同一の溶媒、乾燥条件であるに拘らず、3.8 S と 6 S の二つの場合が起る原因は、現在の所判らない。一方、解離したカタラーゼで、紫外部領域の差スペクトルは、明らかに青方移動を示しており、疎水領域の溶媒環境の変動を示している。そして、解離の度合の大きいほど、 $-40 \cdot D_{280}$ の値は大きくなっている。このことは、

解離したカタラーゼの逆染色法による電顕像の観察¹⁵⁾から、正常なカタラーゼ分子が規則的な多角形の像を示すのと比べ、非常に不規則な形状を示していることと考へ併せると、この疎水領域の変動は単に解離によって新しく疎水基が露出したためだけでなく、解離したことによってサブユニットの高次構造自体が不安定になり、破壊されたことをも示しているものと思われる。

凍結乾燥による変性に対して、ミオシンでは0.02 M トリス緩衝液が、カタラーゼに対しては0.05 M 磷酸緩衝液がそれぞれかなりの保護効果を示しているにも拘らず、他の無機塩が全く効果を示さなかったことは、これらの緩衝液の作用が単なるイオン強度の問題だけではないことを示している。又、単純塩の方が、緩衝液よりも、凍結の過程でのpHの変動は少ないと考えられるので、凍結での変性が凍結過程でのpH変動に起因するという説¹⁶⁾は、凍結あるいは凍結乾燥過程の変性の機構の説明として、必ずしも一般的でないことを示している。ミオシンの熱変性に対する保護剤であり¹⁴⁾、又凍結変性でも特異的な影響を示す⁶⁾ Na-PPiが、カタラーゼや、更にミオシンでもむしろ変性を促進する効果を示すのは、ピロ磷酸基の非常に強い荷電の影響と考えられるが、これらの無機塩、緩衝液の作用機作については、今後の検討にまたねばならない。

凍結乾燥によるこれらの変性、即ちミオシンの二次・三次構造の破壊と失活、カタラーゼのサブユニットへの解離と失活の機構としては、凍結乾燥がほぼ完全な脱水操作であることを考えると、それによる疎水結合の破壊が主要な原因であると考えてよいと思われる。三次構造は勿論、二次構造の維持や、サブユニット構造のいわゆる四次構造に対しても、疎水結合が主要な働きをしていることについて、最近いくつかの報告^{17,18)}がある。疎水結合は、水の存在によって始めて成立するものであり、疎水結合周辺の環境が非水化されることによって結合が破壊されるのは当然考えられることであり、それが契機となって、二次構造を維持するもう一つの要因である分子内水素結合も影響を受け、高次構造全体の破壊にいたると考えられる。即ちまず最初の凍結の段階で、周囲の水の氷晶化に伴う、疎水結合周辺のいわば不完全な非水化に伴う疎水結合の弱体化と、氷晶と水和水との相互作用による分子内水素結合の変動によって、ある程度の変性を受け、それが更に乾燥の段階で完全に破壊されるものと思われる。しかし、凍結融解や凍結乾燥に対して安定な蛋白質も多く存在し、これらの方法は、蛋白質の精製、保存に汎く利用されている。同じように水素結合、疎水結合で維持されながら、凍結、乾燥に対する安定性の相違が、蛋白質のどのような特異性に基づくかということは、蛋白質の構造、機能に対する水分子の寄与を考える上で、今後に残された重要な問題であるが、一つには、分子内S-S結合などが高次構造の骨格的役割を果している場合も考えられる。

細胞のレベルで、糖やアミノ酸が、凍結、乾燥による障害に対して保護作用を示すことは古くから知られていた。酵素蛋白では、例えば糖や多価アルコールがミオシン-ATPaseの凍結による失活を防ぎ¹⁹⁾、又、凍結乾燥によるミオシン-ATPaseの失活を糖が阻止すること¹⁰⁾が報告されている。しかし今回の結果から、アミノ酸もほぼ同じような効果を示すことが明らかになった。Yasui¹⁰⁾は、糖の保護作用について、その作用機作が、誘電率と関係すると示唆しているが、弱電解質であるアミノ酸も保護効果を示すことは説明が付き難い。これらの作用機

作については、現在の段階では明らかではないが、アルブミンをモデル蛋白として、凍結乾燥後の残存水分量を測定比較した結果から、これらの添加物質が一定量の水を保持して保護するという機構は考えにくい。又、単純な化学反応でないことも明らかである。しかし、これらの保護効果を示す物質は、いずれも強い水素結合能をもっていることから、Webb²⁰⁾が微生物の乾燥に於ける保護物質の作用機作について述べたのに近い機構が考えられる。即ち、これらの保護物質は水和水を保護するのではなく、その強い水素結合能で、本来、水和水（種々な型式のものと考えられるが、そのいずれにせよ）が吸着していた場所に、可逆的に置換結合することにより、吸着の場の露出を防ぐのではないかということが考えられる。これと関連して、これらの物質の変性阻止のための有効濃度が、ミオシンとカタラーゼで異なり、蛋白分子当りに計算するとミオシンで 4×10^6 M、カタラーゼで 7×10^5 M とミオシンの方が1桁高い。これはあるいは棒状蛋白と球状蛋白の高次構造の形成に寄与する水分子の役割の差異を反映しているのかも知れない。

V. 摘 要

ミオシンおよびカタラーゼの、凍結乾燥による変性と、それに対する二・三の添加物質の影響を酵素活性および二・三の物理化学的方法で調べた。

その結果、ミオシン (0.5 M KCl 溶液) は凍結乾燥によって、凍結融解の場合より更に著しい高次構造の破壊と酵素活性の失活を示した。この変性は、0.02 M トリス緩衝液 (pH 6.9) の存在である程度阻止され、0.2 M の糖又はアミノ酸の共存で失活はほぼ完全に阻止され、又高次構造も非常によく保護された。しかし無機塩、特にピロリン酸ナトリウムはむしろ変性を促進させた。

カタラーゼ (水溶液) は、凍結乾燥によって 5.9 S サブユニットに解離し、活性はほとんど失なわれる。この解離は、リン酸緩衝液 (pH 7.0) の共存によって、その濃度に依存して阻止され、0.056 M でほぼ完全に阻止される。又、リン酸緩衝液の有無に拘らず、0.03 M の糖、アミノ酸は解離と失活を阻止し、無機塩類はこのような保護効果を示さない。

これらの添加物質を卵白アルブミンに加え、凍結乾燥直後に残存水分量を測定した結果、これらの有無に拘わらず残存水分量の差はみられず、変性の保護効果と残水量との相関はみられなかった。

これらの結果から、サブユニット間の結合に疎水結合が大きな役割を果していること、凍結乾燥による変性は、高次構造の形成に寄与する疎水結合の完全な脱水による破壊が主要な原因であると考えられる。

又、糖、アミノ酸の変性に対する保護作用は、水分の保持によってではなく、それらが水和水の吸着の場に可逆的に置換結合するのではないかと想像される。

文 献

- 1) Némethy, G. and Scheraga, H. A. 1962 The structure of water and hydrophobic bonding in protein. *J. Phys. Chem.*, **66**, 1773-1789.
- 2) Tanford, C. 1962 Contribution of hydrophobic interaction to the stability of the globular

- conformation of protein. *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4220-4249.
- 3) Klotz, I. M. 1964 Role of water structure in macromolecule. *Fed. Proc.* **24**, Suppl. 15, 24-33.
 - 4) Brandt, J. F. 1968 Heat effect on proteins and enzymes. *In Biological Macromolecules* (G. D. Fasman, *ed.*), Vol. I, Marcel Rekker Inc., New York, N.Y., 24-74.
 - 5) 花房尚史 1962 凍結融解による myosin B の変性. 低温科学, 生物篇, **20**, 81-94.
 - 6) 花房尚史 1964 凍結融解による myosin A の変性. 低温科学, 生物篇, **22**, 119-131.
 - 7) 花房尚史 1966 凍結融解および凍結乾燥による catalase の変性. 低温科学, 生物篇, **24**, 57-66.
 - 8) Hanafusa, N. 1967 Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms.* (É. Asahina, *ed.*), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 33-50.
 - 9) Hanafusa, N. 1968 Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing and freeze-drying. *In, Freezing and Drying of Microorganism.* (T. Nei, *ed.*), Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 117-129.
 - 10) Yasui, T. and Hashimoto, Y. 1966 Effect of freeze-drying on denaturation of myosin from rabbit skeletal muscle. *J. Food Sci.*, **31**, 293-299.
 - 11) Tanford, C. and Lovrien, R. 1962 Dissociation of catalase into subunits. *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 1892-1896.
 - 12) Deisseroth, A. and Dounce, A. L. 1966 Nature of the change produced in catalase by lyophilization. *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 671-692.
 - 13) Moffit, W. and Yang, J. T. 1956 The optical rotatory dispersion of simple polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **42**, 596-605.
 - 14) 安井 勉 1959 ミオンン ATPase の熱変性. 蛋白質・核酸・酵素, **4**, 339-340.
 - 15) 松坂理夫・花房尚史 未発表.
 - 16) Chilson, O. P., Costello, L. A. and Kaplan, N. O. 1964 Effects of freezing on enzymes. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. 15, 55-65.
 - 17) Tanford, C. 1964 Cohesive forces and disruptive reagents. *In Subunit Structure of Protein.* Brookhaven Natl. Lab., Upton, N.Y. 154-173.
 - 18) Perutz, M. F., Muirhead, H., Cox, S. M. and Goaman, L. C. G. 1968 Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: The atomic model. *Nature*, **219**, 131-139.
 - 19) Shikama, K. 1963 Denaturation of catalase and myosin by freezing and thawing. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, **B 29**, 91-106.
 - 20) Webb, S. J. 1965 Bound Water in Biological Integrity. Charles C. Thomas Publisher, Illinois, 187 pp.

Summary

To investigate the denaturation of enzyme proteins by freeze-drying, the alteration of enzymatic activity and some physicochemical properties of freeze-dried myosin and catalase were examined. The effect of several additives on the denaturation was also examined.

Extreme disruption of molecular conformation and decrease of enzymatic activity were observed, when myosin was freeze-dried without a buffer solution. Even with 0.02 M Tris-HCl buffer (6.9), the conformational changes and the reduction of enzymatic activity were found to be greater in freeze-dried myosin than that freeze-thawed. An addition of 0.2 M sugars or amino acids showed a protective effect, but inorganic salts showed no protection.

In aqueous solutions of catalase, a complete dissociation of molecules into 5.9S subunits and the loss of enzymatic activity were found after freeze-drying, while, in 0.056 M phosphate buffer (pH 7.0) added samples, no change occurred. Such changes caused by freeze-drying were protected by an addition of 0.03 M sugars or amino acids, but not by inorganic salts.

There was no difference in the water content of the freeze-dried specimens of egg albumin with or without organic and inorganic additives.

It was conjectured that the denaturation of myosin and catalase by freeze-drying might be caused by the disruption of hydrophobic bonds, sustaining the conformation of protein molecule, which resulted from complete dehydration. Regarding the protective activity of sugars and amino acids, it may be said that these substances play some role on the mode of dehydration of proteins.

低温科学生物篇 第27輯 訂正

頁	行		誤	正
11	英文タイトル	1	Freeze Drying	Freeze-Drying
15	下から	2	無糖	蔗糖
45	上から	6	<u>4</u>	<u>6</u>
64	下から	10	<u>4</u>	<u>6</u>
78	下から	16	林部	材部
110	下から	16	第3図	第2図
122	上から	2	Escherichia Coli	Escherichia coli
130	第4表		側芽	副芽
131	第6表		側芽	副芽
131	第7表		側芽	副芽
132	第8表		側芽	副芽
159	下から	7	Supercoold	Supercooled
159	下から	9	Supercoold	Supercooled
159	下から	11	低温化学	低温科学