



Title	酵素蛋白の凍結乾燥における保護物質の役割
Author(s)	花房, 尚史; HANAFUSA, Naofumi
Citation	低温科学. 生物篇, 32, 1-8
Issue Date	1975-03-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17811
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p1-8.pdf



酵素蛋白の凍結乾燥における保護物質の役割*

花房尚史

(低温科学研究所)

(昭和49年10月受理)

I. 緒言

ある種の酵素蛋白、例えばミオシンやカタラーゼ等は、凍結乾燥によって著しく失活し、高次構造も破壊される。しかし、あらかじめ、0.2~0.02 M 程度の糖やアミノ酸を加えておくと、失活・変性をほぼ完全に阻止出来る^{1,2)}。これまでいくつか報告したように、凍結乾燥による変性は、脱水による疎水結合や水和層の破壊が主要な原因ではないかと推論されるが、糖やアミノ酸は、この場合の水分子の挙動に大きな影響を及ぼすのではないかと考えられた。従来、糖やアミノ酸は微生物の凍結乾燥に際して有効な保護物質として使用されており、これらの物質は親水性が大きいため、細胞の機能保持に必要な水を捕捉しておくことによって保護効果を示すものと考えられてきた。しかし、前報^{1,2)}に報告したように、酵素蛋白の凍結乾燥の場合は、卵アルブミンをモデル蛋白として凍結乾燥後の水分量を測定すると、有効な保護物質が存在する場合、残存水分量は必ずしも増加していないという結果を示したが、水分測定で用いたカール・フィッシャー法は、終点決定の際の測定誤差が避けられないため、はっきりした結論は得られなかった。

今回の報告は、やはりモデル蛋白として卵アルブミンを用い、各種の物質を加えて凍結乾燥したのち、直示式微量水分計で残存水分量を測定して保護効果と水分量の関係を明らかにし、又、各種の物質が存在する場合の残存水分と蛋白分子の相互作用の大きさを熱分析で測定し、保護物質の作用機構について考察したものである。

II. 材料および方法

材料: 卵アルブミンは、日本生化学 Co 製 2 回結晶標品を 20% 水溶液とし、遠心して不溶画分を除いて用いた。

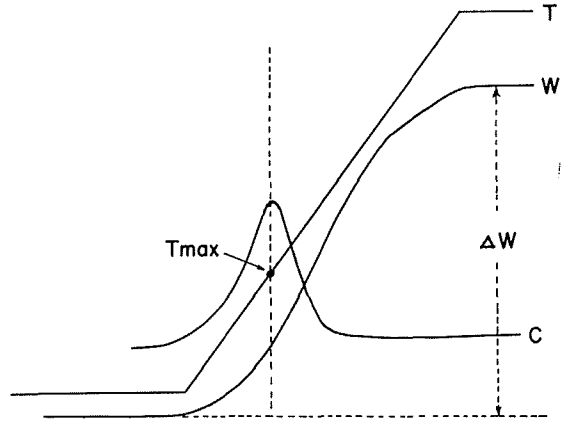
方法: 各種添加物質は全て水溶液として用いた。凍結乾燥の方法は既報と同様であるが、熱測定に用いる試料は、径 8 mm、深さ 2 mm の測定用セル (アルミカップ) に 850 μ l の試料を分注し、凍結乾燥用アンプルに入れて凍結乾燥した。

凍結乾燥後の残存水分量は、日立一平沼直示式微量水分計 AQ-1 により測定した。原理的にはカール・フィッシャー法の変法で、水と反応する I_2 の量を電量滴定で測定した電気量に換算し H_2O μ g で直接表示するものである。試料は約 20 mg を正確に秤量して装置に投入すると

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1350 号

約 15~20 分で終点に達し、水分量が表示される。

熱分析は、真空理工製差動走査熱量計 (DSC) Model DSC 1500 を用い、試料量は乾量 8 mg, 対照は同型の空のセルを用い、昇温速度 10°C/min で加熱昇温する過程で生じる熱変化のピーク位置の温度 (T_{max}) を測定した。又、データチェックのために用いた熱天秤は、真空理工製熱天秤 Model TGD 3000 を用いた。

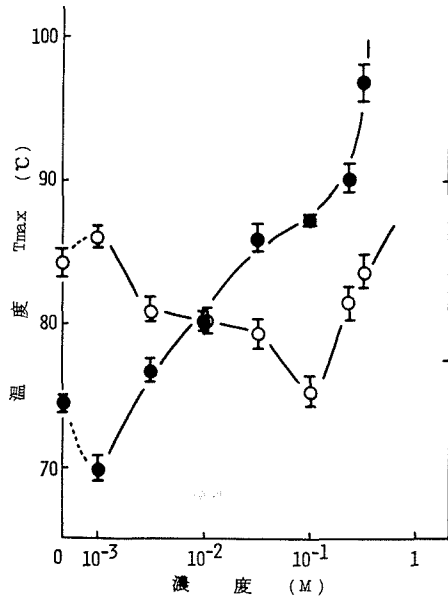


第1図 差動走査熱量計 (DSC) および熱天秤 (DTG) による凍結乾燥した卵アルブミンの熱分析の結果を示す模式図

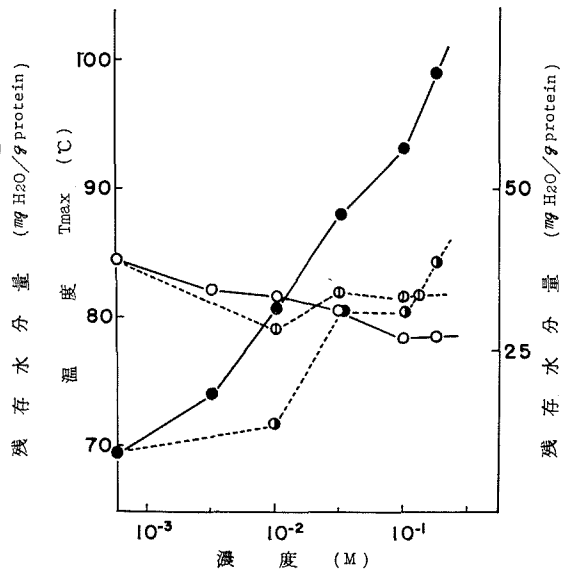
T, 試料の温度。右から左へ温度上昇
 C, 熱変化。上側が吸熱, 下側が発熱
 W, 試料の重量
 ΔW , 重量変化。試料の含水量に等しい
 T_{max} , ピークの極大位置での温度

III. 結果

添加物質のない対照としての凍結乾燥した卵アルブミンは、水分測定の結果、なお約 7% の水が残存している。この試料を DSC にかけて、熱分析を行うと、75°C 付近で一箇の吸熱ピークがみられる。このピークの高さ、形状は種々な条件でかなりの変動があるが、ピークの出現する温度 (T) は、



第2図 凍結乾燥した卵アルブミンの T_{max} 値、および残存水分量に及ぼすシロ糖濃度の影響
 ○, 残存水分量; ●, T_{max} 値

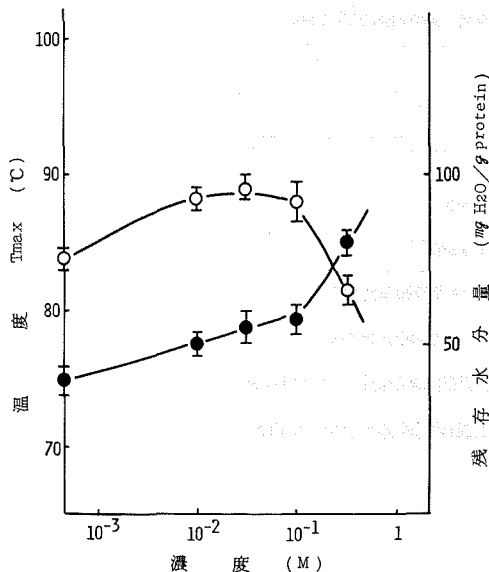


第3図 凍結乾燥した卵アルブミンの T_{max} 値および残存水分量に対する種々な濃度でのグルタミン酸カリおよびピロリロンの影響
 ○, グルタミン酸カリ存在下の水分量; ⊙, ピロリロンの存在下の水分量; ●, グルタミン酸カリ存在下の T_{max} 値; ⊙, ピロリロンの存在下の T_{max} 値

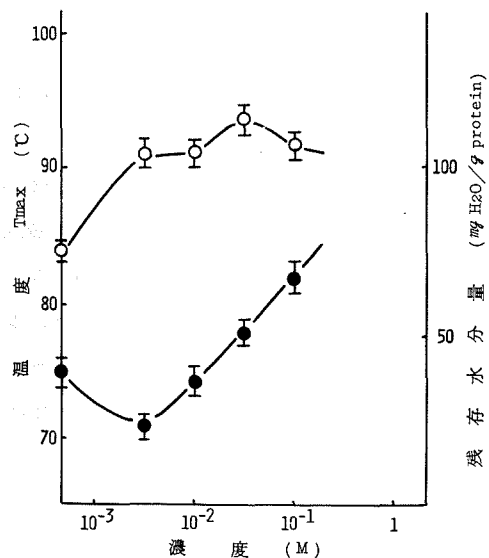
試料の量, 昇温速度, 装置の gain 等が一定である限り, 試料の種類によって常に一定の値を示す。更に同一試料を熱天秤を用いて熱分析を行うと, 第1図に模式的に示したように, この吸熱ピークの位置は, 試料の重量変化 ΔW のみられる温度と完全に一致する。又, この ΔW は, 水分計で測定した蛋白の含水量 (大部分が水和水と考えられる) とほぼ完全に一致している。従って, DSC で得られるこの吸熱ピークは, 変性熱の寄与もある程度は考えられるとしても, 大部分は, 加熱した結果蛋白の水和水が蛋白分子から離脱するときの熱変化, 即ち離脱熱と考えられる。そしてこのピーク位置 (以下 T_{max}) の変化は, 蛋白-水和水間の相互作用の強さの変動を示しているものと考えられる。

以上の結果に基づいて, 10% 卵アルブミン水溶液に各種濃度で種々な添加物質を加えて凍結乾燥したのちの, 残存水分量と T_{max} の値を測定した。用いた添加物質は, 前報で用いたのと同じで, 保護物質として有効な糖, アミノ酸, ある程度有効なリン酸緩衝液 (pH 7.0), 無効な, もしくは変性剤として働く塩類, 尿素である。

第2図は, 使用した中で最も有効であったシヨ糖での結果で, 残存水分量と T_{max} 値の, シヨ糖濃度への依存性を示したものである。図にあげられるように, シヨ糖濃度の増加と共に T_{max} 値が急激に増加する一方, 水分量は次第に減少し, 0.1M 付近で極小値に達する。 T_{max} 値はその後も増加し, 水分量は極小値に達したのち再び増加する。ブドウ糖, ソルビットでの結果も全く同様に, T_{max} 値の急激な増加と, 水分量が 0.1M 付近で極小値に達したのち再び増加というパターンがみられる。アミノ酸についてもまったく同じで, 第3図はその一つであるグルタミン酸カリと, 対照としてカタラーゼの場合変性促進に働いたピロリン酸の例を示してある。 T_{max} 値の増加の度合は全く異なり, グルタミン酸の場合は急激に増加する。水分量は前



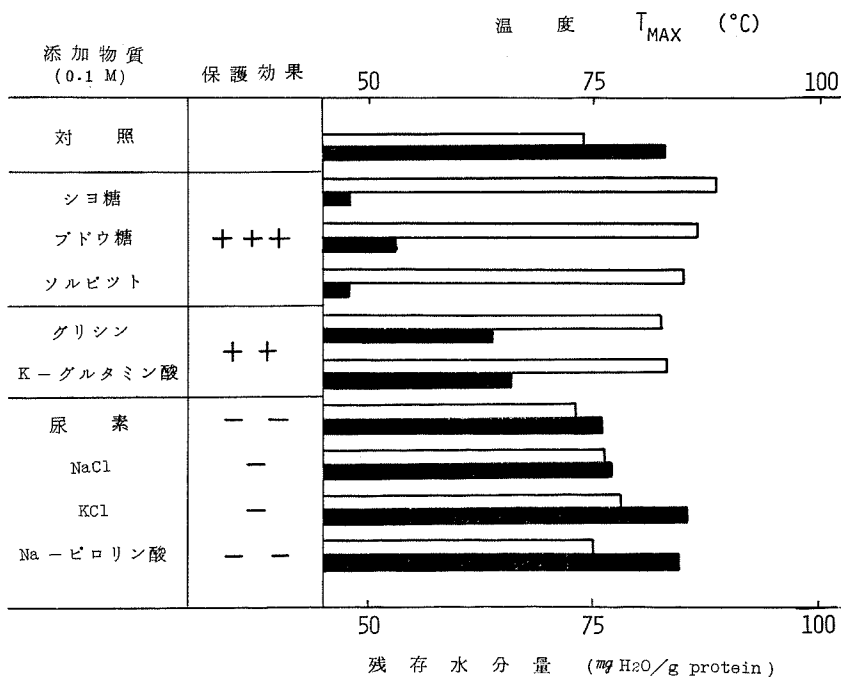
第4図 凍結乾燥した卵アルブミンの T_{max} 値および残存水分量におよぼす KCl の影響
○, 残存水分量; ●, T_{max} 値



第5図 凍結乾燥した卵アルブミンの T_{max} 値および残存水分量におよぼすリン酸緩衝液の影響
○, 残存水分量; ●, T_{max} 値

者ではやはり 0.1 M で極小値を示すのに対し、後者の場合はこの濃度付近まではほとんど変わらない。第 4 図は、保護効果を全く示さない塩の一つとしての KCl での結果を示したもので、 T_{\max} 値の増加の程度は小さく、水分量は 0.1 M 付近まではむしろ NaCl 濃度と共に増加している。NaCl も全く同様な傾向を示す。蛋白変性剤としてひろく用いられる尿素の場合は、水分量は 10^{-1} M 程度までは増加の傾向を示すが、それ以上の濃度では一方向きの減少の傾向を示す。しかしこの場合 T_{\max} 値はほとんど増加しない。第 5 図は、カタラーゼの場合に糖やアミノ酸より弱いがある程度の保護作用を示したリン酸緩衝液についての結果である。KCl 等の場合と同様に、水分量は濃度と共に増加の傾向を示し、一方、 T_{\max} 値の増加の程度は丁度、糖、アミノ酸等と塩や変性剤との中間となる。

以上の結果に示したように、糖、アミノ酸等の保護効果を示す物質は全て水分量が 0.1 M の濃度で極小値を示す。この、添加物質の濃度 0.1 M は、考察の項で述べるように、蛋白濃度当たりになると、カタラーゼの変性を阻止するのに必要な有効最小濃度と非常によく似た値である。そこで、ここで用いた各種の添加物質の濃度を 0.1 M にそろえ、卵アルブミン 10% 溶液で同一条件下で凍結乾燥した試料について、 T_{\max} 値と水分量を比較した値が第 6 図である。第 6 図中の「保護効果」の欄は、カタラーゼについての実際の保護効果の順位である。この図で明らかのように、対照（保護物質なし）と比較し、保護効果の順に、 T_{\max} 値の増加と残存水分量の減少がみられ、保護効果のない物質では、 T_{\max} 値、水分量ともに対照とほとんど変わ



第 6 図 種々な添加物質の保護効果と、添加物質 0.1 M 存在下での T_{\max} 値および残存水分量

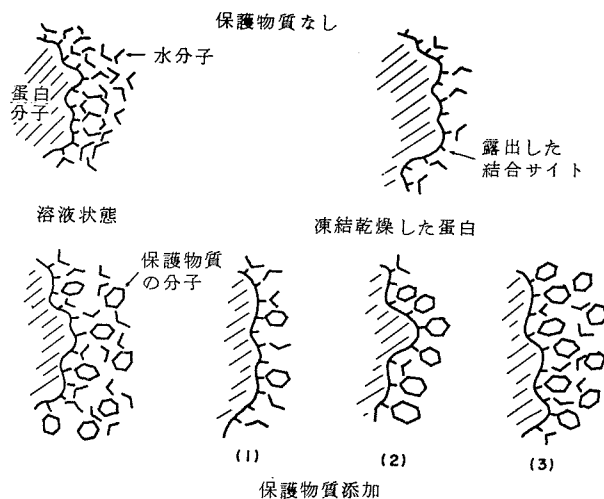
+, 保護効果あり; -, 保護効果なし
 □ T_{\max} 値; ■ 残存水分量

らない。この図には示していないが、リン酸緩衝液はアミノ酸の次の順位に相当している。

IV. 考 察

以上の結果にみられるように、保護物質として有効な糖やアミノ酸が存在すると、凍結乾燥した卵アルブミンの T_{max} 値、既ち残っている僅かな水和水が離脱する温度が上昇し、又、保護物質 0.1 M の濃度で残存水分量が極小になる。 T_{max} 値の増加、即ち水和水が蛋白から離脱する温度が上昇するということは、蛋白—水和水間の相互作用が強くなっていることを示している。この蛋白—水和水間の相互作用の程度が、蛋白の構造・機能と密接な関係にあることは、熱分析の方法を検討する中で、ヘモグロビン、RNase、リゾチームなどのいくつかの蛋白結晶の T_{max} 値を求めた結果、一般に熱安定性の高いものほど T_{max} 値も大きくなっていることから支持される。凍結乾燥後もなお残存している水分子は、双極子—双極子相互作用、主として水素結合のような弱い相互作用で蛋白分子表面の極性アミノ酸残基に結合しているものと考えられる³⁾。第6図の結果から計算すると、添加物質のない時、アルブミン1分子当たり約200箇、極性アミノ酸残基当たり⁴⁾0.75箇の水分子が残っていることになり、極性基が必ずしも全て蛋白表面に露出しているわけではないことや、測定精度等を併せて考慮すると、この場合、分子表面に露出している極性アミノ酸残基に1:1の割合で、つまり分子表面に単分子層吸着の形で水和水していると考えて大きな違いはないと思われる。0.1M ショ糖が存在すると、この水は蛋白当たり96箇、極性アミノ酸残基当たり0.36箇と減少することになる。

保護物質として有効な、糖やアミノ酸は全て非常に水素結合をつくり易い物質であり、これらが存在するとき、残存水分量を減少させるということは、蛋白表面の極性基についている



第7図 仮説としての保護物質の作用機構を示す模式図

斜線部分は蛋白分子、その上の「露出した結合サイト」は蛋白表面の水和水の結合し得る部分(恐らく極性アミノ酸残基)。右側上の図は保護物質のない時、凍結乾燥後はほぼ単分子吸着に近い形で水分子が残っていることを示し、右下側はそれぞれ(1)、保護物質の濃度の低い時、(2)保護物質が最大限水分子と置換し、水分子と保護物質が単分子吸着の形で蛋白表面に吸着し、水分量極小となった状態(0.1 M)、(3)は保護物質が過剰に存在し、いわば多分子吸着の形となり、水分量が再び増加する場合、等々を示す

水分と、これらの保護物質の分子が置換されて蛋白と結合することを示唆している。勿論、この結合は、水—蛋白間の結合と同様の弱い結合であり、水に再溶解すると再び解離して水分子と交代するであろう。このように考えると、保護物質濃度 0.1 M—このときの保護物質分子の数は、蛋白当たり 56 箇、極性アミノ酸残基当たり 0.21 箇となる—のとき水分量が極小値をとるということは、単分子層の形で、立体障害のない範囲で保護物質分子が水分子と最大限置換されたことを示していると思われる(第7図下2)。このとき、なお残っている水分子と保護物質、蛋白分子の三者間に水素結合等の相互作用のネットワークが形成され、その結合は非常に強化され、水分子を離脱させるのにより大きなエネルギーを必要とするであろう。これが、保護物質が存在すると T_{\max} 値が増加する理由と思われる。更に保護物質の濃度が増加すると、保護物質は極性アミノ酸残基に対して大過剰となり、多分子層吸着の形となり、今度はその間に捕捉結合する水分子が増加し、総体として残水量は増加し、 T_{\max} 値はますます増加することとなる(第7図下3)。このように考えれば、第2図、第3図の結果は非常によく説明出来る。この仮説を模式化したのが第7図である。

リン酸緩衝液は、弱いながらも保護効果を示すにも拘らず、 T_{\max} 値の増加も、水分量の減少もみられない。この場合の保護効果は、蛋白—水和水間の相互作用に対する影響よりも、リン酸基の荷電による静電的な相互作用が蛋白構造を安定化させるのに役立っているものと思われる。

無機イオンは、静電的相互作用によって水分子をその周囲に配向させ、水和層を形成する。恐らくそれに起因する拮抗的な作用と考えられるが、塩が存在すると蛋白の極性基周囲の水和構造が破壊されるという報告がある³⁾。ここでの結果で、 T_{\max} 値が増加しないのはこのような影響によるものと考えられ、又、残存水分量の増加は、無機イオン周囲に水和した水の寄与が効いているものと思われる。

前に述べたように、卵アルブミンは凍結乾燥後もなお、表面の極性アミノ酸残基当たり 1 箇の水分子と結合していると思積られる。しかし、この水和層は、凍結、乾燥の段階での、周囲の氷晶との相互作用や、その外層の水の完全な脱水によって著しく“生”の状態の構造と異なった形になっているものと思われる。そのことや、脱水による疎水結合の破壊等が、凍結乾燥による蛋白の変性をもたらすものと考えられる。糖やアミノ酸が、先に述べた推論によって、水分子の一部分と可逆的な置換結合をするものとする、水分子の一部分を排除しても、相互に強いネットワークを形成し、相互作用を強化することによって、見掛け上の、いわば偽似的な水和層を形成して、蛋白の高次構造を全体として安定化させ、変性防御作用をするものと考えることが出来る。

前報¹⁾で報告した、ミオンシ、カタラーゼに対する、糖やアミノ酸の変性防御の結果から、これらの保護物質の有効最小濃度は、ミオンシ 1% に対して 0.1 M、カタラーゼ 0.5% に対して 0.02 M であった。この有効最小濃度が、ここで水分量を最小にする濃度 0.1 M に担当すると仮定して計算すると、極性アミノ酸残基当たりの保護物質の分子の数は、カタラーゼで 0.5、ミオンシで 1.4 となる。カタラーゼは分子量でアルブミンの約 6 倍、4 箇のサブユニットを持ち、比表面積はアルブミンより大きいと考えられ、又、ヘムの影響も考えられる。又、ミオンシは

棒状の分子で球状分子より比表面積が大きく、又、非常に水和量が大い⁵⁾と考えられている。これらの要素を考慮すると、アルブミンの0.2とは著しい違いはなく、むしろ非常によく似た値と考えられ、このことはこの時保護物質分子が分子表面に露出した極性基に単分子層の形で最大限に水分子と置換した状態ではないかという推論を支持する結果の一つと考えられる。

V. 摘 要

1. カタラーゼ、ミオシン等の酵素蛋白の凍結乾燥による変性は、糖やアミノ酸を添加することによって阻止出来る。これらの保護物質の役割を調べるため、モデル蛋白としての卵アルブミンに各種の物質を加え凍結乾燥後、残存水分量と、この水分と蛋白分子の相互作用の程度 (T_{max}) を調べた。相互作用の強さは、残存水分を昇温過程で蛋白から離脱させるのに必要な温度を熱分析により測定した。
2. 糖やアミノ酸の濃度が増加すると、 T_{max} 値は著しく増加し、残存水分量は減少する。水分量は保護物質濃度0.1Mで極小値に達し、後再び増加する。この0.1Mの濃度で、有効な保護物質は水分量を著しく減少させ、 T_{max} 値を増加させ、その程度は保護効果に比例している。塩等の保護効果を示さない物質では全く逆の現象を示す。
3. 水分量が極小値を示すような保護物質濃度0.1Mで、極性アミノ酸残基当たりの保護物質分子の数は0.21である。この値は、カタラーゼやミオシンでの凍結乾燥による変性を阻止する保護物質の有効最小濃度での、極性アミノ酸残基当たりの数と近似した値である。
4. これらの結果から、保護物質として有効な糖やアミノ酸は、蛋白分子表面の水和水の一部と可逆的に置換し結合することによって、蛋白—水分子—保護物質間の相互作用を強める働きをするものと想像される。

文 献

- 1) 花房尚史 1969 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. 低温科学, 生物篇, **27**, 11-22.
- 2) Hanafusa, N. 1972 Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing and freeze-drying. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 17**, 1-38.
- 3) Bull, H. S. and Breeze, K. 1969 Protein hydration. I. Binding sites. *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 488-496.
- 4) Tristran, G. R. and Smith, R. H. 1963 The amino acid composition of some purified proteins. *Adv. Protein Chem.*, **18**, 227-318.
- 5) Szent-Györgyi, A. G. 1955 Bioenergetics. Academic Press, New York, 143 pp.

Summary

The denaturation by freeze-drying of some enzyme proteins, such as catalase and myosin, was protected by the addition of sugars or amino acids. The role of these additives was investigated by the measurement of residual water content and the extent of the strength of interaction between protein and residual hydration water in freeze-dried egg albumin, as a representative protein, with and without some additives. The

latter measurement was made by the determination of the temperature (T_{\max}) to liberate residual water molecule from freeze-dried protein during heating by thermal analysis.

As the additive concentration of sugars or amino acids in freeze-dried protein increased, the value of T_{\max} increased and the water content decreased. The water content reached to minimum value at 0.1 M of additive concentration and then increased. At this concentration, the effective additives decreased water content and increased the value of T_{\max} depending on the protective ability. Non-effective additives, such as urea and inorganic salts, showed opposite effects.

In the concentration of additives showing minimum water content, the mole ratio of additives per polar amino acids residues of albumin was 0.21. This value well agreed with the mole ratio of effective additives per polar amino acids residues in minimum effective concentration for protection of catalase and myosin against denaturation by freeze-drying.

From these results, it is reasonable to consider that effective protective additives substitute for some of hydration water in protein molecule and strengthen the interaction between protein molecule and residual water molecule.