

紫外線によるタンパク質の変性

Changes in Proteins by Ultraviolet rays

千葉県立船橋高等学校普通科 3 年

宮本知世 澤原千晶 鈴木詩乃

はじめに

私たちの身の回りには、直射日光を避けて保存しなければならない食べ物がある。これは、食べ物に多く含まれ、変性しやすいタンパク質に紫外線が何らかの影響を及ぼしているからではないかと考えた。これを動機としてこの研究を始めた。

この研究ではタンパク質に焦点を当てている。タンパク質とは、多数のアミノ酸がペプチド結合で連なった高分子化合物の事である。タンパク質が変性するというのは、熱、酸、塩基などの刺激によりタンパク質の立体構造が壊れ、性質が変化することである。変性を起こすと疎水性が大きくなるので凝集しやすくなる。

また、この研究では紫外線を用いて実験を行った。紫外線は、波長が長い順に UV-A(400～315nm)、UV-B(315～280nm)、UV-C(280～100nm)とされており、今回は UV-B である 302nm と UV-C である 254nm の波長の紫外線を用いた。なお、UV-C は生物にとって最も有害だが、オゾン層と大気中の酸素分子で完全に吸収される為、地表には届かない。UV-B の一部は地表に届き、皮膚がんや日焼けを生じさせ、シミやそばかすの原因になることが知られている。オゾン層が 1%減ると、地上の UV-B 量は約 1.5%増えると言われている。

身近なものである食べ物に焦点を当てたことがきっかけだが、この研究では紫外線とタンパク質の関係を明らかにすることを目的としているため UV-B と UV-C を用いて実験を行った。またその際、フナコシ紫外線ランプ 6 ワットを使用した。

目的

紫外線によるタンパク質の変化および紫外線の波長の違いによる変化の度合いを明らかにし、変化の原因を考察すること。

1. 紫外線がタンパク質に与える影響について

方法

(実験 1) アルブミンの凝集度合の変化

0.1%卵白アルブミン水溶液に 254nm と 302nm の紫外線を 15, 30, 45, 60 分照射したものを用意し、各々に 0.1mol/L 硫酸銅(Ⅱ)水溶液を加え、20 分後に濁度を測定する。

* ここでは 600nm での吸光度を濁度として測定した。

* 濁度が大きいほど、アルブミンが塩類により多く凝集したことを示す。

(実験 2) 納豆の粘度の変化

水 150ml に納豆 1 パックを入れ, 10 分後に上澄みをとる。これに 254nm と 302nm の紫外線を照射し続け, 20 分ごとに粘度を測定する。

*納豆のネバネバは納豆菌によってつくられたポリグルタミン酸と, 多糖類のフルクタンによってできていると知られている。

*ポリグルタミン酸とは, グルタミン酸を重合単位とするポリペプチドの一種である。一般的なポリペプチドとは異なり, γ 位のカルボキシル基と α 位のアミノ基がペプチド結合を形成する。

*フルクタンとは, フルクトース分子の重合体のことである。

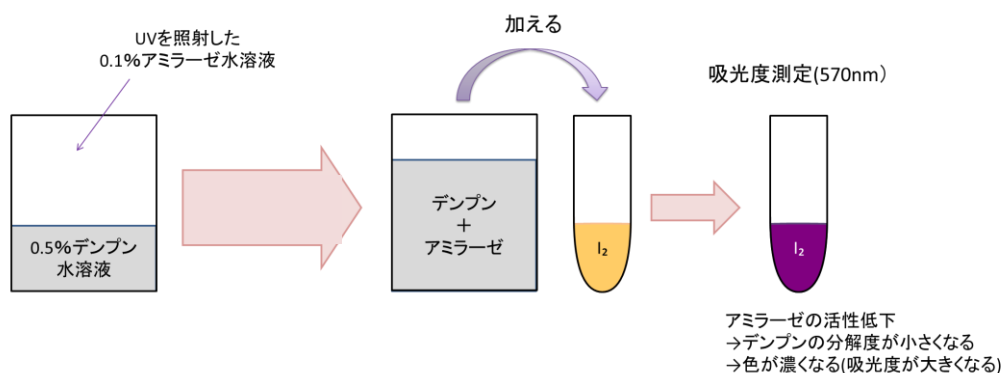
*粘度の測定には粘度計を用いた。

(実験 3) アミラーゼの酵素活性の変化

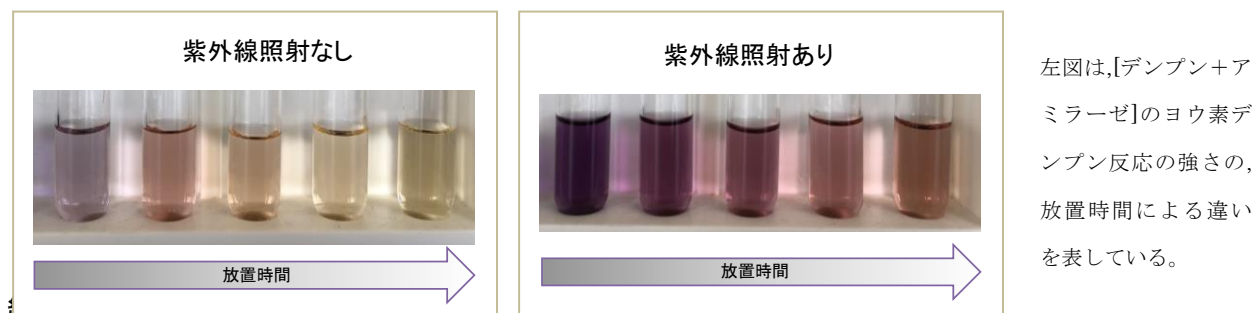
0.1%アミラーゼ水溶液に 254nm と 302nm の紫外線を 1 時間照射したものをそれぞれ用意し, ここに同量の 0.5%デンプン水溶液を混ぜる。混ぜてから 1 分ごとにこの水溶液を 2ml はかりとり, 0.06%ヨウ素溶液 2ml (HCl 含む) に加え, ヨウ素デンプン反応の呈色の吸光度を測定する (570nm)。

*変性によりアミラーゼの活性が低下するとデンプンの分解度が小さくなる。すなわち溶液中に分解されずに残っているデンプンの量が多くなるので, ヨウ素デンプン反応の呈色が濃くなり, 吸光度が大きくなる。

*アミラーゼはデンプンを糖に分解する酵素で, 主にだ液などに含まれる。

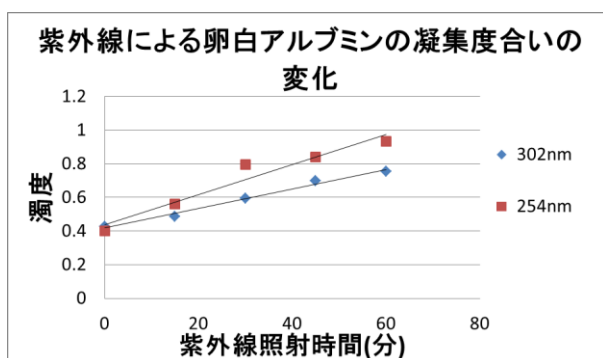


*以下の写真のように, 紫外線照射の有無によりアミラーゼの活性が異なる。



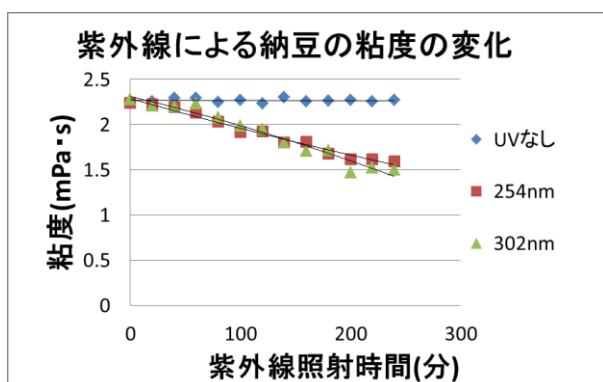
左図は, [デンプン + アミラーゼ] のヨウ素デンプン反応の強さの, 放置時間による違いを表している。

(実験1)



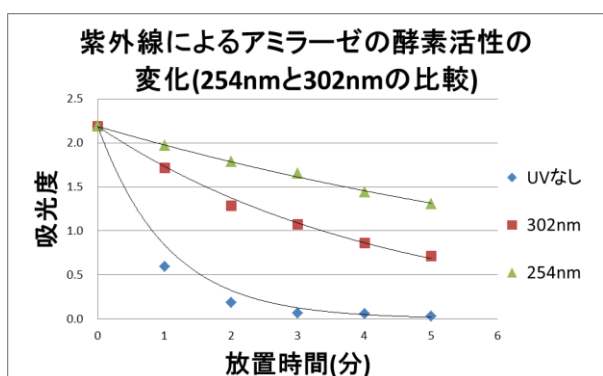
- ・紫外線照射時間が長いほど凝集が起こりやすくなっている。
- ・254nm を照射したほうが凝集が起こりやすくなっている。

(実験 2)



- ・紫外線照射時間が長いほど粘度が小さくなっている。
- ・波長による粘度の変化の違いは見られなかった。

(実験 3)



- ・放置時間が長くなるほど吸光度が小さくなった。すなわちデンプンの分解が進んだ。
- ・254nm のほうが吸光度の減少度合いが小さい。

考察

(実験 1)

- ・卵白アルブミンは紫外線照射時間が長いほど濁度が大きくなった。このことから、紫外線は卵白アルブミンを変性させて凝集させたということ、その変性の度合いは紫外線照射時間が長いほど大きくなると考える。
- ・302nm よりも 254nm のほうが卵白アルブミンを変性させる度合いが大きいと考える。

(実験 2)

・納豆は紫外線照射時間が長いほど粘度が小さくなった。このことから、紫外線は納豆に含まれるタンパク質様の物質であるポリグルタミン酸を変性または分解させたということ、その変性または分解の度合いは紫外線照射時間が長いほど大きくなるを考える。

・ポリグルタミン酸は一般的なタンパク質とは異なった構造をしているため、波長による違いが見られなかったのではないかと考える。

(実験 3)

・紫外線を当てたものは吸光度の減少度合いが小さくなっている、すなわちデンプンの分解度が小さくなっていることから、紫外線はアミラーゼの酵素活性を落とした、すなわちアミラーゼを変性または分解したと考える。

・302nm よりも 254nm のほうがアミラーゼを変性または分解する力が強いと考える。

ここまでの実験により、紫外線がタンパク質に何らかの影響を与えていることが分かった。

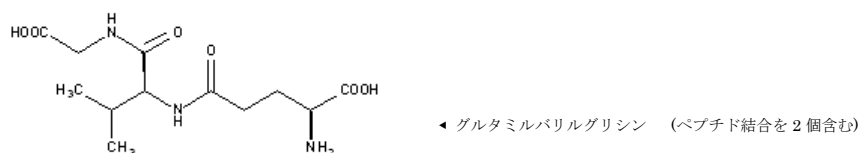
そこで、紫外線がタンパク質の構造のどの部分に影響を与えたのかを明らかにするために以下の実験を行った。

2. 紫外線によるタンパク質の構造の変化

方法

(実験 4) 紫外線がペプチド結合に与える影響

0.1%グルタミルバリルグリシン(トリペプチド)溶液に 254nm と 302nm の紫外線を 1 時間照射したものをそれぞれ用意する。—(1)



①(1)の 200nm 付近のペプチド結合による吸光度をそれぞれ測定する。

②(1)に硫酸銅(Ⅱ)水溶液と水酸化ナトリウム水溶液を加え、ビウレット反応の呈色を測定する。

＊ビウレット反応とは、タンパク質やポリペプチドを検出する方法の 1 つである。アミノ酸が 3 つ以上つながった(トリペプチド以上の)ペプチドは、ビウレットに似た構造を持つためアルカリ性溶液中で銅(Ⅱ)イオンに配位し、青紫～赤紫色に呈色する。

＊ペプチド結合が切れていると、ペプチド結合の数が減るためビウレット反応が弱くなる。

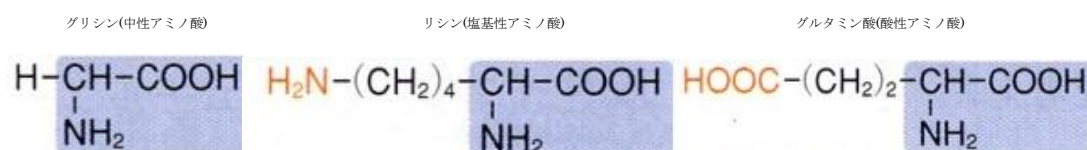
③(1)にニンヒドリン溶液を加え加熱し、ニンヒドリン反応の呈色を測定する。

＊ニンヒドリン反応とは、ニンヒドリンが、アミノ酸がもつアミノ基と反応して青紫～赤紫色(ルーヘマン紫)に呈色する反応のことである。ルーヘマン紫を生成するには試料であるアミノ酸から -NH_3^+ が脱離する必要がある。

＊タンパク質が加水分解を起こしていたら、アミノ基の数が増えるためニンヒドリン反応が強くなる。

(実験 5) タンパク質の基本構造(アミノ酸)に与える影響

0.001mol/L のグリシン, リシン, グルタミン酸溶液に 254nm と 302nm の紫外線を 1 時間照射したものを用意し, 各々のニンヒドリン反応の呈色の吸光度を測定する。



* グリシンはもっとも構造が単純なアミノ酸である。リシンは側鎖にアミノ基を, グルタミン酸は側鎖にカルボキシ基をもつ。

* ニンヒドリン反応はアミノ酸を検出する方法であり, もしここで反応に変化があれば, 紫外線がアミノ酸に何らかの影響を与えたことを示す。

結果

(実験 4)

	UV なし	254nm	302nm
①200nm 付近の吸光度	(197nm、2.276)	(198nm、2.269)	(199nm、2.282)
②ビウレット反応	(588nm、0.181)	(588nm、0.203)	(588nm、0.201)
③ニンヒドリン反応	(592nm、2.495)	(588nm、2.443)	(592nm、2.473)

大きな違いは見られない。

(実験 5)

	UV なし	254nm	302nm
①グリシン(15 分後)	(591nm、2.518)	(606nm、2.550)	(605nm、2.525)
②グルタミン酸(15 分後)	(568nm、1.709)	(568nm、2.251)	(569nm、2.336)
③リシン(4 分後)	(564nm、0.718)	(565nm、0.849)	(565nm、0.778)

グリシンでは大きな違いはないが, グルタミン酸とリシンでは, 紫外線を照射したほうが吸光度が大きくなった。

* リシンだけ 4 分後の結果を用いているのは, 反応速度が大きく, 15 分後だと違いを見ることができなかったからである。

考察

(実験 4)

- ・ ①②の結果よりペプチド結合は壊れておらず, ③よりペプチド結合が加水分解していることもないと考える。
- ・ すなわち, 紫外線はペプチド結合に影響を与えないと考える。

(実験 5)

- ・①では紫外線の影響がなく, ②③では紫外線を照射した溶液のほうが高い吸光度を示している。このことは側鎖の有無に関係すると考える。すなわち, α 炭素に結合するアミノ基-NH₂, カルボキシ基-COOH には紫外線の影響はないが, グルタミン酸やリシンの側鎖に含まれる-NH₂, -COOH などが紫外線の影響を受け, 反応度合いに影響を与えると考える。
- ・紫外線の波長による影響の差はアミノ酸により異なると考えられる。
- ・色の出方が異なることがあるから, 何らかの副反応も起こっていると考える。

結論

- ・紫外線は様々なタンパク質に影響を与える。その際, 水素結合など分子間の結合を壊す(変性), または側鎖の構造に影響を与えるが, ペプチド結合や α 炭素の-NH₂ や-COOH には影響をほとんど与えない。
- ・302nm より 254nm のほうがエネルギーが大きいので, タンパク質に与える影響は大きい。しかし, どちらもタンパク質を変性させるだけで, タンパク質の構造を破壊することはない。また, 側鎖に対する影響の与え方はそれぞれ異なる。

感想

以前から興味があったタンパク質についての理解を深めることができ, とても有意義な時間だった。限られた時間のなかで多くの実験を行い, 自分たちなりに考察を深めることができたと思う。アミノ酸への影響をこれ以上詳しく調べることができなかったのは残念だったが, いつか機会があったら調べてみたいと思う。