

14. タンパク質の定性反応

〔目的〕呈色、沈殿、凝固反応を通して、タンパク質の性質や構成アミノ酸の反応性を知る。

〔解説〕

タンパク質はアミノ酸が脱水縮合してできた、分子量1万以上の高分子である。アミノ酸とは、アミノ基(-NH₂)とカルボキシル基(-COOH)とをもつ分子の総称であり、同一の炭素原子にその両方が結合しているものをα-アミノ酸と呼ぶ。その一般式はR-CH(NH₂)-COOHと書ける。置換基RがH(つまりグリシン)の場合を除き、α-アミノ酸は不斉炭素原子をもち、光学異性体が存在する。生体に含まれるのは、そのほとんどがL型のα-アミノ酸である。タンパク質を構成するアミノ酸は20種類あるが、その構造を下の表に示した。生体内でもアミノ酸が合成されるが、全部の種類のアミノ酸が合成されるわけではない。生体外から補給する必要のあるアミノ酸を特に必須アミノ酸と呼ぶ。

カルボキシル基とアミノ基とが脱水縮合してできた結合(-CO-NH-)を、一般にアミド結合と呼ぶ。ただし、タンパク質やポリペプチドに限っては、ペプチド結合とも呼ばれる。

表 タンパク質を構成するアミノ酸

グリシン	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	L-チロシン	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
L-アラニン	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-プロリン	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} & \text{CH}_2 \\ & \\ \text{H}_2\text{C} & \text{C} \text{---} \text{H} \\ & \\ \text{N} & \text{H} \\ & \\ \text{H} & \text{COOH} \end{array}$
○ L-バリン	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 & & \\ >\text{CH} & -\text{CH} & -\text{COOH} \\ & & \\ \text{CH}_3 & & \text{NH}_2 \end{array}$	L-グルタミン酸	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
○ L-ロイシン	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 & & \\ >\text{CH} & -\text{CH}_2 & -\text{CH} & -\text{COOH} \\ & & & \\ \text{CH}_3 & & \text{NH}_2 & \text{NH}_2 \end{array}$	L-アスパラギン酸	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
○ L-イソロイシン	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-グルタミン	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
L-セリン	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-アスパラギン	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
○ L-トレオニン	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	○ L-リシン	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
L-システイン	$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-アルギニン	$\text{HN}=\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{NH}}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
○ L-メチオニン	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-ヒスチジン	$\begin{array}{c} \text{HC}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{N}=\text{C}(\text{H})-\text{NH} \end{array}$
○ L-フェニルアラニン			
○ L-トリプトファン			

1. ○印はヒトの場合の必須アミノ酸を示す。

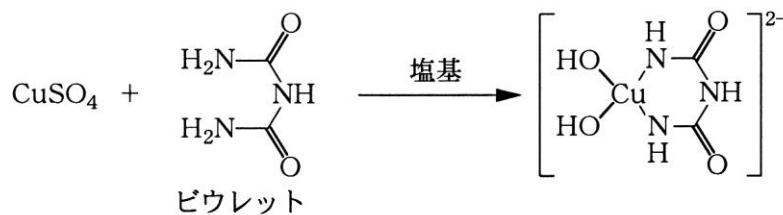
2. システインは不安定なため、空気によって酸化され、2分子がS-Sで結合してシスチンとなる。

〔実験〕タンパク質試料として、卵白アルブミン水溶液を各実験に約1mlずつ使用する。

(A) 呈色反応

1) ピウレット反応 (Biuret reaction)

2M NaOHを2滴加え、よく振り混ぜた後、1%硫酸銅 (CuSO_4) 溶液を1~2滴加えると、赤紫色または青紫色を呈する。この名前の由来は、尿素を加熱したときに生じるピウレットが、同様の反応を示すことがある。この反応は、タンパク質中のペプチド結合 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 等と銅との錯体形成により呈色する。

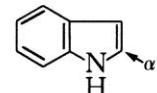


2) キサントプロテイン反応 (Xanthoprotein reaction)

濃硝酸を2~3滴加えて加熱すると黄色を呈する。さらに、これを冷却し、アンモニア水で塩基性にすると橙色になる。この反応は、ベンゼン核をもつアミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンなど）が存在するときにおこり、その色はベンゼンのニトロ誘導体の色である。

3) ホプキンスコール反応 (Hopkins-Cole reaction)

Adamkiewicz reaction (アダムキーヴィツ反応)ともいう。グリオキシル酸試薬を1ml加えて、よく振り混ぜ、試験管を傾け、器壁に沿って濃硫酸を2~3ml静かに少量ずつ注ぎ、静置する。このとき、硫酸と試料溶液との界面に青紫色の環を生じる。この環が見えにくい場合、少し試験管を揺らす。この反応は、グリオキシル酸がインドール核の α 位に結合して生成した色素に基づき、構成アミノ酸にトリプトファンが存在することを示す。



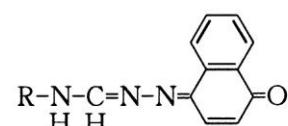
インドール

4) 硫化鉛反応 (Lead sulfide reaction)

酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 溶液を2~3滴、および2M NaOHを2ml加え、生成した沈殿が溶解した後に煮沸すると、黒褐色の硫化鉛 (PbS) が生成する。この反応は含硫黄アミノ酸であるシステインの存在による。

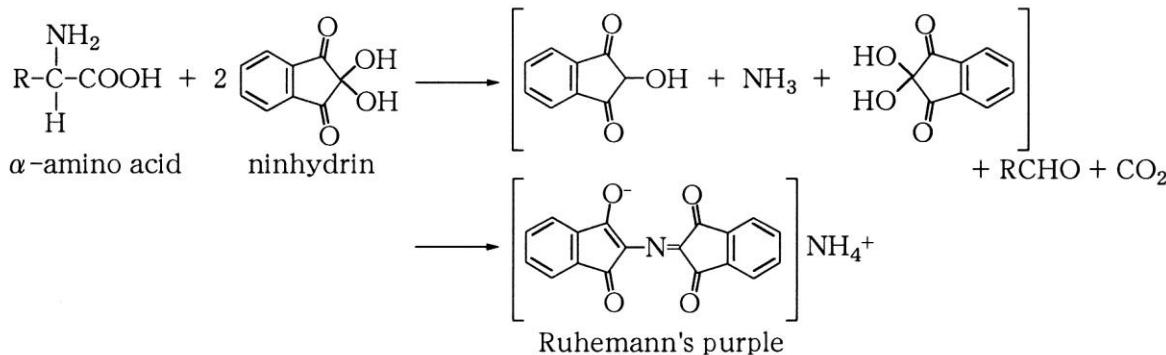
5) 坂口反応 (Sakaguchi's reaction)

2M NaOH 1滴と5%次亜塩素酸ナトリウム溶液5滴を加え、よく振り混ぜる。これに、 α -ナフトール試薬を6~7滴加えると、赤橙色を呈する。この反応はアルギニンなどグアニジノ基 ($\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})\text{NH}-$) をもつ化合物の呈色反応である。この色調は不安定なため、数分後に最高になり、以後退色する。



6) ニンヒドリン反応 (Ninhydrin reaction)

Abderhalden's reaction (アプデルハルデン反応)ともいう。ニンヒドリン試薬を数滴加えて加熱すると青紫色になる。アミノ酸の呈色反応であり、ニンヒドリンとアミノ酸の縮合生成物 (Ruhemann's purple) に基づくものと考えられている。



(参考) ミロン反応 (Millon's reaction)

ミロン試薬（水銀を発煙硝酸に加熱溶解させ、その上澄みを水で希釀したもの）を数滴加えると白濁するが、加熱により沈殿は赤褐色に変わる。これはフェノール性水酸基（OH）に特有の反応であり、構成アミノ酸にチロシンが存在することを示す。

(B) 沈殿反応

タンパク質は分子の形状から纖維状タンパク質（ケラチン、コラーゲンなど）と球状タンパク質とに分類される。試料の卵白アルブミンなど、一般の水溶性タンパク質は、球状タンパク質である。これは、アミノ酸が連なったポリペプチド鎖がらせん構造をつくり、それがさらに折れ曲がって球状になっている。以下に示すような試薬を加えると、その立体構造が変化したり、電荷が中和されたりするため、凝析する。

(濃硝酸) 濃硝酸を2～3 ml入れた試験管を傾けて持ち、試料を約1 ml静かに加えると、2液の界面にタンパク質が凝固する。液を振り混ぜると全体に白濁する。

(有機溶媒) 水とよく混和する有機溶媒（メタノール、アセトン等）を加えると沈殿する。低温での沈殿は直ちに分離した後、再び水を加えると溶解する。しかし、室温以上で沈殿したものは不可逆変性により難溶性となる。

(重金属塩) 重金属塩類 (CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 等) の水溶液を1～2滴加えると沈殿する。この反応は、中性～弱酸性において鋭敏であり、強酸性では沈殿しない場合がある。

(有機酸) タンニン酸、ピクリン酸、スルフォサリチル酸等により沈殿する。

(無機酸) リンモリブデン酸、リンタンゲステン酸等により沈殿する。

(塩析) 多量の塩化ナトリウム等により沈殿する。

(C) 凝固反応

タンパク質はそれぞれ一定の凝固温度をもち、熱変性を受ける。このときの凝固物は、中性の溶媒に不溶性である。試料の卵白アルブミンの凝固温度は、60～70°Cである。