

14. タンパク質の定性反応

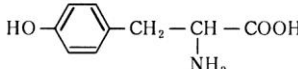
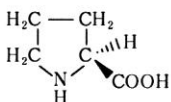
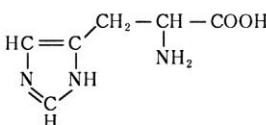
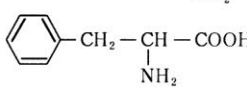
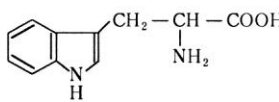
【目的】 呈色，沈殿，凝固反応を通して，タンパク質の性質や構成アミノ酸の反応性を知る。

【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（ $-\text{NH}_2$ ）とカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）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 $\text{R}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ 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。生体に含まれるものは，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（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）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

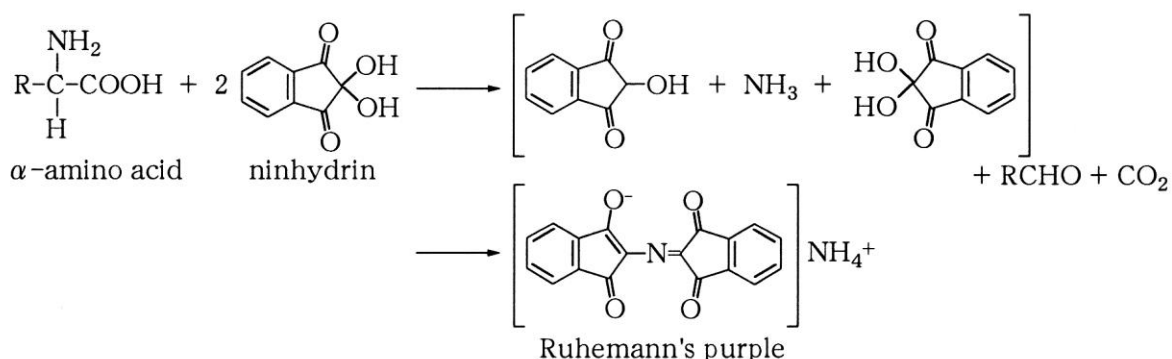
グリシン	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	L-チロシン	
L-アラニン	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-プロリン	
○ L-バリン	$\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-グルタミン酸	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
○ L-ロイシン	$\text{CH}_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	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	$\text{O}=\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
L-セリン	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	L-アスパラギン	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
○ 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	$\text{HN}=\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
○ 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	
○ 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。

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釈したもの) 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繊維状タンパク質 (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, リンタング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℃である。