

生物物理化学Ⅰ

—基礎と演習—

E.A.トーズ著

中馬一郎・岩坪源洋 訳
山野俊雄・久保秀雄



生物物理化学 I

— 基礎と演習 —

〔増訂第6版〕

E. A. ドー 中 局 岩 坪 山 野 久 保	ズ 著 郎 源 洋 俊 雄 秀 雄
--------------------------------------	-------------------------------

訳



共立全書

519

TPANΣ

—— 著 者 紹 介 ——

中 馬 一 郎

大阪大学教授、医学博士

故 岩 坪 源 洋

元パリー生物物理化学研究所主任研究員、元大阪大学
助教授、医学博士

山 野 俊 雄

大阪大学教授、医学博士

久 保 秀 雄

大阪大学名誉教授、医学博士

生物物理化学 I

—基礎と演習—

増訂第6版

「共立全書 519」

¥ 2200

(全2冊)

TPANΣ



昭和35年1月5日 初版1刷発行
昭和38年6月1日 初版4刷発行
昭和39年7月15日 増訂版1刷発行
昭和42年1月15日 増訂版5刷発行
昭和43年6月15日 増訂版3刷発行
昭和45年11月10日 増訂版5刷発行
昭和48年4月25日 増訂版5刷1刷発行
昭和55年9月25日 増訂版5刷13刷発行
昭和58年4月25日 増訂版6刷1刷発行

著者代表 中 馬 一 郎

発行者 南 條 正 男
東京都文京区小日向4丁目6-19

印刷者 福 田 三 郎
東京都渋谷区猿蓑町19-2

発行所 東京都文京区小日向4丁目6-19
電話東京(947) 2511(代表)
損害口番 東京157035番

共立出版株式会社

印刷 真実社 製本 中経製本
(NDC 491 41)

Printed in Japan

内部交流

F177/85 (日2-8/211-1)

生物物理化学 I

B0001110

日本訳第 6 版への序文

本書“Quantitative Problems in Biochemistry”の日本訳第 6 版への序文を書くことは私にとってこの上もない喜びである。本書は五つの外国語に翻訳されているが、こんなに版を重ねたのは日本訳だけである。新版翻訳の労をふたたびとられた畏友中馬一郎教授の変わらぬ関心と助力に対し深謝する。

新版では改訂と削除を大幅に行ない、新しい章として生体膜エネルギー論を設けた。“新しい”ペントースサイクルの導入も行なった。この新版が日本の学生と研究者諸氏にとって、教科書および研究室におけるリファレンスブックとして役立つことを念願している。

E. A. Dawes

序 文

本書“Quantitative Problems in Biochemistry”の第6版を上梓する機会に、内容を改訂すると共に本の体裁も新しくした。本書は改訂ごとにページ数が増加しているが、このことは初版以後の生化学の画期的進歩を反映したものである。この“中年太り”の原因になっている材料を若返えらせるという困難に取り組むために、第5版に減量体操を行なわせながら改訂と新しい資料の導入を計ることにした。近年、印刷、出版費が異常に高騰しているので、ページ数をへらすということは経済的にも好都合なのである。

新しい章としては「生体膜エネルギー論」の章を設け、その代りに「検圧法」の章を削除した。実験方法として最近ほとんど用いられないからである。これら以外の章には従来どおりの題名を付けてあるが、学部課程ではあまり必要でない古い資料やトピックスを削除して、内容をより簡潔なものにしてある。第9章で“新”ペントースサイクルについて言及したが、生化学の教科書でこのサイクルを取り上げたのは、原稿を印刷に付した時点では、本書が嚆矢であると信ずる。生化学の標準的な書物が、このサイクルを熟殺することを申し合わせているかのようにみえるのは不可解である。今後は、他の著者達もこの先鞭に従われ、この回路の意義を正当に承認されるであろう。旧版に対するコメントとして、統計学の章がないということが数人の批評家から寄せられていたので、ここでこのことは熟慮の結果決定したものであることを強調しておきたい。統計学についての基本的知識は、統計学の教科書によって習得すべきである、というのが私の見解である。したがって、統計学については、ごく基礎的な事項を第9章で放射性崩壊過程を統計学的に考察する際に簡単に述べるに止めた。

この新版を執筆するにあたって数々の友人と同僚から受けた建設的な批判と暖かい援助に対し、再度深甚の謝意を表したい。とくに、George W. Crosbie 博士、F. Mark Dickinson 博士、Charles A. Fewson 博士、I. Gwyn Jones 博士、および Melvin Midgley 博士の親切な御助力に対して厚く御礼申し上げます。Graham J. Hart 博士と Nigel J. Horan 氏には練習問題の解答のチェックに絶大の援助を仰いだ。多くの大学からは試験問題の再録を許可していただいた。これらの大学名は本文中に記載してある。この新版が、旧版の持っていた実用性を堅持しており、学生に対する教科書と研究室におけるリファレンスブックという二つの役割を果たし得るものであることを望んでいる。

新版のタイトルページに書かれている出版社名は前版と異なっている。Churchill-Livingstone 社と Longman 社が合併し、版權が前者の医学部門から後者の科学部門へ移譲されたからである。Longman 社編集部員の方々の印刷原稿作成に対する親切な御協力に感謝し、Graham J. Hart 博士に校正を手伝っていただいたことを深謝する。

訳 者 序 文

本書第1版の邦訳を出版したのが昭和35年で、以後すでに20年以上経過した。その間多数の方々から好意ある御批評や御注意をいただいたことに対して、まず心から御礼申し上げる。

本書は20年余の間に5回版を改め、今回は第6版である。

とくに、第5版の誤植などについて御指摘をいただいた京都府立医科大学 吉崎和男博士に深謝する。

第5版までは、改訂ごとにページ数と練習問題の著しい増加がみられたが、今回の改訂では思い切った削除がなされて、総ページ数はむしろ減少した。おもな改訂箇所は原著者序文に述べられているが、かなりの数の練習問題が削除されたことは淋しい気持がしないでもない。わが国ですでに固定した読者層を獲得した本書の新版が、旧版同様読者諸氏にとって役立つことを期待している。

第6版の訳出は、第2版以後と同様全部中馬が行なった。前版同様、読者諸賢の御叱正をお願いする次第である。最後に、日本版への序文をいただいた畏友 Dawes 教授、出版に際し御配慮、御尽力いただいた共立出版の斉藤英明氏に厚くお礼申し上げます。

昭和58年3月

大阪大学医学部にて
中 馬 一 郎

謝 辞

過去の試験問題を再録することを許可していただいた Hull 大学に感謝の意を捧げる。練習問題の解答については著者に全責任があることを、ここに明記しておく。

Quantitative problems in biochemistry

Edwin A. Dawes

Reckitt Professor of Biochemistry, University of Hull

Sixth Edition



Longman

London and New York

© E. & S. Livingstone Limited 1956, 1962, 1965, 1967

© Longman Group Limited 1972, 1980

Japanese translation rights arranged with
Longman Group Ltd., Essex, England
through Tuttle-Mori Agency, Inc., Tokyo

目 次

第 1 章 分子量の決定

化学組成からの分子量の計算	2
元素およびアミノ酸分析	2
末端基分析	4
物理化学的方法	5
浸透圧	8
沈降	12
拡散	21
ゲル濾過	26
光散乱	29
文献と参考書	34
練習問題	36

第 2 章 酸-塩基関係とアミノ酸およびタンパク質 の電解質としての挙動

酸-塩基平衡	49
水のイオン積	53
緩衝液	59
指示薬	61
アミノ酸の双極イオン型と電解質としての挙動	61
タンパク質の電解質としての挙動	69
タンパク質の電気泳動	71
文献と参考書	73
練習問題	74

第 3 章 熱力学と生化学的エネルギー論

熱力学の第 1 法則	81
第 2 法則	87

第3法則 (Nernst の定理)	99
文献と参考書	102
練習問題	103

第4章 平 衡

可逆化学反応	107
配位子結合	112
平衡定数に及ぼす温度の影響	116
活量と濃度	117
見掛けの平衡定数	117
共役反応 (coupled reaction)	119
文献と参考書	122
練習問題	123

第5章 反応速度論

0 次 反 応	131
1 次 反 応	134
2 次 反 応	137
高 次 反 応	139
継 起 反 応	141
反応速度に及ぼす温度の影響	143
反応速度の衝突説	144
絶対反応速度論	145
文献と参考書	149
練習問題	150

第6章 酵素反応速度論

Michaelis-Menten の理論	159
多基質系 (multi-substrate system)	167
酵 素 阻 害	176
阻害に対する一般式の導出	178
拮 抗 阻 害	179

反結抗阻害	180
非結抗的阻害	182
混合型阻害	183
アロステリズムと酵素活性の調節	187
酵素活性の単位	193
文献と参考書	194
練習問題	195
練習問題の解答	217
索引	i ~ vii

II 巻 内 容

- 第 7 章 光学のおよび測光分析法
- 第 8 章 酸化還元電位
- 第 9 章 同位元素の生化学への応用
- 第 10 章 細菌の増殖
- 第 11 章 膜の生体エネルギー論：輸送系と化学浸透圧説

第1章 分子量の決定

低分子物質の分子量はその溶液の束一性 (colligative property) : 沸点上昇, 氷点および蒸気圧降下, 浸透圧などの測定から決定される。多くの生体物質, たとえばタンパク質や多糖類は高分子であって, 分子量がきわめて大きいから測定しうるのはごく希薄な溶液に限られる。この点は次の例から明らかであろう。低分子物質の分子量決定は通常 $0.01 \sim 0.1 \text{ M}$ 溶液について行なわれる。ところが, 分子量 $75,000$ のタンパク質の 0.01 M 溶液といえは, 1 l に対して 750 g のタンパク質を溶解せねばならず, これは物理的に不可能である。最も溶けやすいタンパク質 (ある種のアルブミン) でもこの程度には水に溶解しないであろうし, たとえ溶解したとしても, そのような溶液は分子量測定にはまったく不適当である。というのは, 溶液の束一性は単位容積中の分子の数によって定まり, 分子の大きさには無関係であるから, 低分子物質が不純物としてごく微量にでも存在すれば, それがタンパク質と同等あるいはそれ以上の効果を示すからである。束一性の中で高分子の分子量決定に用いることができるのは浸透圧だけである。浸透圧測定では, 適当な条件さえ選べばタンパク質と共存する低分子およびイオンの影響を除きうる。さらに, 氷点降下法では降下度が小さすぎて最も鋭敏な熱電対や熱抵抗計でも正確に測定できない場合でも, 浸透圧は十分測定できることがある。したがって, 一般には高分子物質の分子量決定は, 束一性以外の方法によらねばならない。それには次のおもな二つの方法がある。

1. 化学組成に基づくもの 分子中に含まれる特定の元素またはアミノ酸の分析値, あるいは結合量から求める。

2. 物理化学的方法 沈降, 拡散, 流動複屈折, 浸透圧, 光散乱などから求める。なお, 分子量既知の同様な化合物について, あらかじめ校正しておけば, 粘度測定, ゲル濾過, および電気泳動も用いることができる。

現在ではこれらの方法が最も広く用いられている。

ここで, 生化学の文献では分子量をどのように表現しているのかについて注意しておく必要がある。というのは, 近年とくに分子生物学者の間

でドルトン(dalton)を質量の単位として用いることが慣例化されつつあるからである。ドルトンは、炭素の同位体 ^{12}C 1原子は12ドルトンの質量をもつ、として定義することができよう。したがって、1ドルトンは Avogadro 数を N とすると、 $N^{-1}\text{g} = 1.663 \times 10^{-24}\text{g}$ である。これは明らかに原子質量単位(unified atomic mass unit)に等しい。

ところで、分子量は物質の相対的な分子質量、すなわちある物質1分子がもつ質量の ^{12}C 1原子の質量の1/12に対する割合として定義されるから、分子量は単なる数で、次元をもたない。

モル質量(molar mass) M は 0.012 kg の ^{12}C 中にある炭素原子の数と同数の素子(elementary units)(明確に式、たとえば $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 、で示す)を含む物質の量であると定義される。それゆえ、モル質量は通常 g mol^{-1} で表現され事実、沈降、浸透圧およびその他の束一性から決定された分子量はこれで表現される習慣である。ドルトン単位で表わした質量は、数量的には g mol^{-1} で表現したモル質量と等しいことは明らかである。しかし、ドルトン単位の質量は分子量の承認されている定義とは異なるものであるから、分子量を表わすために用いてはならない。

しかしながら、ドルトン単位の一つの長所は、“分子量”という語が明らかに不適当である構造、たとえばミトコンドリアやリボソーム、ウイルスなどの細胞器官で諸種の分子からなる複雑な有機化された構造の大きさを、生化学者が表現することができることである。

化学組成からの分子量の計算

元素およびアミノ酸分析

タンパク質のような物質の分子量は、その元素組成が知られれば計算できる。化合物は、分析によって検出された各元素を少なくとも1原子は、その分子中に含まねばならぬから、その元素の1グラム原子に相当する化合物の質量が最小分子量となる。いいかえれば、分子量はこの値より小さくはなりえない。化合物がこの元素を1原子以上含む場合には、分子量は1原子存在するものと仮定して算出した最小分子量の整数倍となる。ある物質の元素百分率がわかれば、最小分子量は次式によって与えられる。

$$\text{最小分子量} = \frac{\text{元素の原子量}}{\text{化合物中の元素の百分率}} \times 100 \quad (1.1)$$

$$\text{真の分子量} = n \times \text{最小分子量} \quad (1.2)$$

n はこの物質 1 分子中に存在する元素の数である。

【例 1-1】 セリンの窒素含量は 13.33 % である。最小分子量を計算せよ。

$$\text{【解】} \quad \text{最小分子量} = \frac{14}{13.33} \times 100 = 105$$

セリンは 1 原子の窒素を含むから、 $n=1$ 、ゆえに真の分子量も 105 である。

【例 1-2】 リシンは 19.17 % の窒素を含んでいる。最小分子量はどれほどか？

$$\text{【解】} \quad \text{最小分子量} = \frac{14}{19.17} \times 100 = 73$$

リシンは 2 原子の窒素を含むから、真の分子量は 146 である。

したがって、真の分子量を求めるには、 n の値を知る必要がある。 n の値は通常他の方法、たとえば、その化合物溶液の束一性の一つを測定して求める。 n の値が増加するほどその値の決定は困難になる。というのは、 n の値が増すにつれて最小分子量が小となり、ついには n を決めるための束一性測定の実験誤差内にはいつてしまうからである。正確を期するには、分子中に比較的少量しか含まれず、かつ正確に定量できる元素を選ばなければならない。

タンパク質の最小分子量の決定に使用されてきた元素は、イオウとか配合群中の金属、たとえばヘモグロビンの鉄、であったが、最近では含有百分率の小さいアミノ酸が好んで用いられる。最小分子量には少なくともこのアミノ酸 1 分子が含まれるはずである。アミノ酸分析が正確ならば、この方法にはさらに次の長所がある。それは元素とは異なって、アミノ酸がタンパク質中に不純物として混在することはほとんどありえないという点である。この目的のために用いられるアミノ酸は、チロシン、ヒスチジン、およびアラニンである。ただし、これらのアミノ酸の定量精度は高くない。なお、分析に先立ってタンパク質を加水分解する

際に、ある種のアミノ酸が分解する可能性もあるが、これらの損失は補正することができる。

タンパク質の最小分子量を決定するより新しいもう一つの方法は、ペプチド地図法 (peptide mapping) である。ペプチド鎖に存在する特定のアミノ酸に対し特異性の高いタンパク分解酵素を用いると、ペプチド鎖の切断がこの特定アミノ酸残基のところで起こり、得られるペプチド断片の数はこのアミノ酸残基の数に1を加えたものである。トリプシンは、ペプチド鎖をリシンかアルギニンのカルボキシル側のみで切断するので、この目的に広く用いられている。トリプシン分解で得られる比較的少数のペプチドは濾紙またはセルロース薄層の2次元電気泳動/クロマトグラフィー法で分離される。これが“フィンガー・プリンティング”として知られる地図作りの手技である。この方法によると、タンパク質の全体としてのアミノ酸分析と関連して、リシンとアルギニンを含むペプチドの数から、最小分子量を決めることができる。サブユニットから構成されているタンパク質では、サブユニットに解離してから調べなければならない。各サブユニットの組成が違うかも知れないからである。

【例 1-3】 1本鎖のタンパク質のアミノ酸分析の結果、タンパク質 100,000 g あたり 24 のリシン残基と 45 のアルギニン残基が測定された。このタンパク質をトリプシン消化して2次元電気泳動を行なうと、36 個の特有のペプチドが得られた。最小分子量はどれほどか？

【解】 トリプシンがペプチド鎖を切断するのは、リシンかアルギニン残基のところだけであるから、このタンパク質中にはこれらの残基が総計 (36-1) 個あることになる。一方、タンパク質 100,000 g あたり $24 + 45 = 69$ のリシンとアルギニン残基があるから、最小分子量は

$$100,000 \times \frac{35}{69} = \underline{50,725}$$

である。

末端基分析 (end-group analysis)

この方法は分子単位の構造がわかっているか、またはある構造が仮定されることを前提とし、それをもととして実験結果を解釈する、という

論法をとる。したがって当然、応用範囲が非常に制限される。のみならず、直線状の連鎖構造を仮定した場合に、もし枝状構造があれば、それを定量的に算定しない限り大きな誤差を招くことになる。末端基分析の古典的な例は Haworth とその共同研究者によるセルロースの連鎖の長さの測定である。セルロースが β -1,4 結合で連なったグルコース分子の直線状連鎖であると仮定し、セルロースをできるだけ温和な方法で完全にメチル化したのち、グルコース間の結合のみが切断され、メチル基は分解されないような条件で加水分解する。各セルロース連鎖の一端は2,3,4,6-テトラメチルグルコースとなるが、ほかは全部2,3,6-トリメチルグルコースとなるはずである。したがって、加水分解物を分析すれば連鎖の長さが算出できるわけである。このような実験から、セルロースの連鎖は 300~15,000 個の β -グルコース単位、分子量にすれば 50,000~2,500,000 からなることが明らかとなった。この方法のもう一つの難点は、メチル化の過程で連鎖が切断される可能性のあることで、得られた値は最小限のものであると考えねばならない。

末端基分析はペプチドやタンパク質の最小分子量の決定にも使用できる。N 末端基は 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンまたは塩化ダンシルと反応して、それぞれ着色性または蛍光性の誘導体を生成する。そこで既知濃度のこのペプチドを加水分解し、モノ置換アミノ酸の割合を分析すると、最小分子量が知られる。N 末端がリシンであるときは、2 置換の α , ϵ -アミノ誘導体が得られる。それ以外の場所のリシンはモノ置換の ϵ -アミノ置換体を生成する。

物理化学的方法

分子運動論に基づく方法であって、次のおらな 2 種類に分けられる。

(1) 溶液の束一性、すなわち一定容積中に存在する分子単位 (molecular unit) の数に依存する性質に基づく方法、(2) 存在する分子単位の重量に依存する性質から求める方法。数平均法には浸透圧、凝縮分子膜法、および末端基定量法があり、一方、重量平均法には沈降平衡法と光散乱法がある。

数平均分子量 (number-average molecular weight) M_n は