

生体高分子の生物学的機能と熱測定研究

1. はじめに

高橋 克忠*

1965年大阪で開かれた第1回熱測定討論会において、呼びかけ人の一人である 関 集三阪大教授が、各国におけるカロリメリーの現況のレポートの中で、国際的に生物現象における熱力学データ集積の必要性が叫ばれていることを報告された。そしていま10年を経過したが、その間のこの分野における熱測定研究は大きく進歩している。あまりの勢いで進展をみせるので、たびたびあらわされる著作、総説の類¹⁻⁷⁾が、たちまちのうちに時代遅れになるという状態である。もちろん本稿も例外でなく同じ運命にあるに違いない。

ただ現時点からさかのぼると、とりわけ70年代に入ってからこの分野の展開は飛躍的とも表現できるほどである。ここ数年の間に生物現象の中でも、生物活性を持つ生体高分子の関与する諸反応が熱測定研究の対象として多方面でとりあげられるようになった。ここでは1970年前後から今日に至る研究例をひろい、酵素、たんぱく質を始めとする生体高分子系での熱測定を中心に紹介したい。

2. 生化学熱測定の整理

まず生化学熱測定を整理して、現在の中心的な課題である生体高分子の生物学的機能に関連した研究がどのような位置づけにあるかみておこう。

現状から生物現象を取り扱う熱測定を表1のように分類した。Ⅰの個体レベル、Ⅱの細胞、組織レベルのものは生体を巨視的にみる態度のもので、分子論的な記述が要求される現代の生化学の流れの中では余り重要な位置づけにあるとはいえない。この種の熱測定の意義が徐々に認識されつつあるとはいえ、それが一般的な研究手段として広くおこなわれるようになるのはまだかなり時間がかかるように思われる。これに対し、Ⅲの分子レベルのものは生体を構成する物質の熱力学的情報を導くものとして欠くことのできない研究方法となっているが、それをさらにⅢ-1生化学物質の一般的物理化学的性質と、Ⅲ-2生化学物質のもつ生物学的機能の物理化学的性質、の

二つに分けて考えてみた。このうち前者の一般的物理化学的性質に関する熱測定というのは、非生化学物質を対象とする時の研究態度と全く同じものを指しており、純生体物質の熱容量や種々の反応熱を問題とする分野である。一方後者の生物学的機能の物理化学的性質に関する熱測定というのは、非生体系ではみられない生体物質固有の性質を分子レベルから定量的に記述しようという態度のものを指している。この非生体系にみられない性質としては様々のものがあげられるが、現代の生化学知識からもっとも大きな特徴をあげるとするならば、生体反応のもつ調節制御ということがいえるだろう。すなわち反応速度論的および熱力学的におこりにくい反応を酵素と

表1 生化学熱測定の整理

Ⅰ	生物個体レベルの熱測定
	代謝熱
	呼吸熱 など
Ⅱ	細胞・組織レベルの熱測定
	複合系
	微生物細胞
	血球、臓器
	ミトコンドリア など
Ⅲ	分子レベルの熱測定
Ⅲ-1	生化学物質の一般的物理化学的性質
	熱容量
	酵素反応など生体反応系の反応熱
	生体物質の水和、溶媒和熱
	電離熱
	燃焼熱 など
Ⅲ-2	生化学物質のもつ生物学的機能の物理化学的性質
	酵素、たんぱく質とリガンドの相互作用
	たんぱく質同志の相互作用
	たんぱく質の特異的反応
	複合反応系
	生体高分子の構造の熱力学的安定性 など

* 大阪府立大学農学部生物物理化学研究室：堺市百舌鳥梅町

Katsutada Takahashi : Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture.

いう有機コロイド触媒の存在のもとでいともたやすくおこさせ、さらにそれらの総和として組み上げられた生物個体の現象が、各基本過程間の有機的なくあるいは非線形の)相互作用のもとでたくみに調節制御されているのである。この高能率の反応性と制御のたくみさは種々の因子にもとずいているが、究極的には酵素をはじめとする機能たんぱく質、それに遺伝情報の担い手である核酸という高分子物質の性質に由来するといつて差支えないであろう。そしてこれらの分子レベルでの調節制御はアロステリック現象という概念で統一して理解されようとしている。すなわち、非生体系と区別される生物現象の特徴としての高度な反応性とその調節制御は、このような生体高分子反応系における特異的な相互作用にもとづくものであり、このメカニズムの定量的な研究手段としての熱測定が一般的物理化学的性質の熱測定と対置されて広く関心を持たれているのである。このような位置づけをあたえた上で、生体高分子の関与する系の熱測定例を種々の分野にわたって紹介しよう。

3. 生体高分子の機能に関連した熱測定研究例

3・1 酵素、たんぱく質とリガンドの相互作用

酵素を主体とするたんぱく質とリガンドの特異的な結合過程の熱測定研究は、酵素の機能を明らかにする目的で広くおこなわれており、多くはリガンド結合に伴うたんぱく質のコンフォメーション変化にまで言及している。その方法論の概略は次のようである。

たんぱく質PとリガンドLの相互作用



の系で熱測定を行なう。

Pの濃度一定の条件で、Lの濃度を変え発(吸)熱量Qを測定すると図1-(a)のような縦軸に発熱量をあらわしたリガンド滴定曲線が描かれる。これは一種のエンタルピー滴定である。

(1)式の結合定数を K_{ass} とすると

$$K_{ass} = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (2)$$

全たんぱく質濃度 $[P_t]$ 、加えたリガンド濃度 $[L_t]$ とすると、一定量のリガンド結合に伴う発熱量Qは K_{ass} と次の関係であらわされることは滴定曲線の性質から容易に理解されるだろう。

$$K_{ass} = \frac{[P_t] - [P_t] Q/Q_m}{([L_t] - [P_t] Q/Q_m)} \quad (3)$$

ここで Q_m は全たんぱく質がリガンドと結合したときの飽和発熱量である。

(3)式は書き直すと

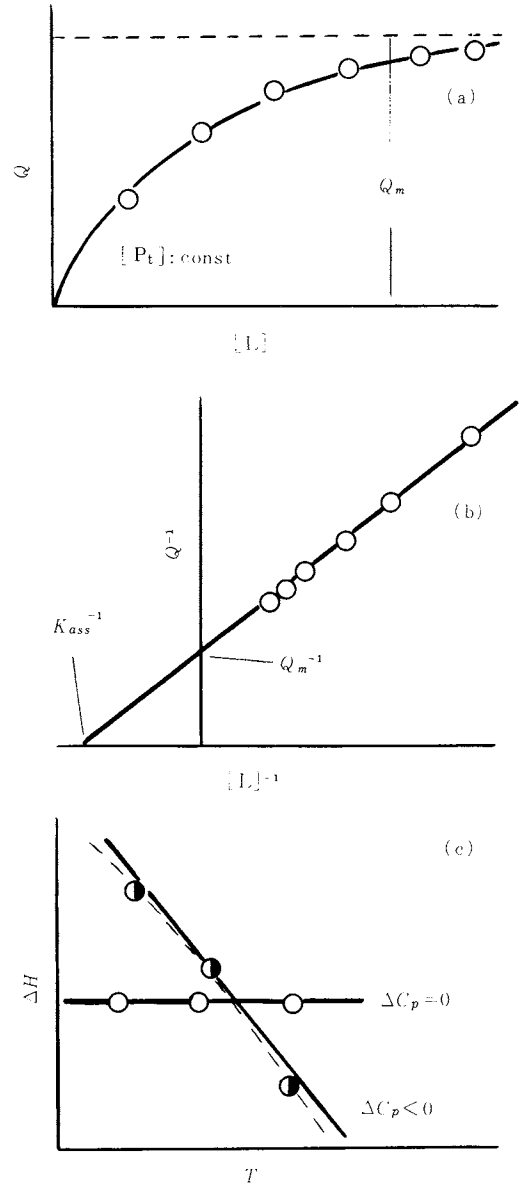


図1 リガンド結合のエンタルピー滴定解析

(a) 滴定曲線 (b) 逆数プロット (c) ΔC_p の評価

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{Q_m K_{ass}} \times \frac{1}{[L]} \quad (4)$$

となり、実測値 $1/Q$ を $1/[L]$ に対してプロットすると、図1-(b)のような直線になる。縦軸、横軸の切片から、 Q_m および K_{ass} がそれぞれ与えられ、熱力学量 ΔH 、 ΔG 、 ΔS が次のような手順で導かれる。

$$\Delta H = \frac{Q_m}{n} \quad (5)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_{ass} \quad (6)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (7)$$

ここで n は反応に参与したモル数（結合部位の数）である。

さらにこの測定を温度を変えておこなうと種々の温度における ΔH から熱力学の基本式

$$\left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p = \Delta C_p \quad (8)$$

を用いてリガンド結合過程における定圧熱容量変化 ΔC_p が求められる。図 1-(c) は ΔH の温度依存性と ΔC_p の評価を示してある。点線のように曲線を描くことが多いが、狭い温度範囲ではほぼ直線と見做して解析することができる。図 1-(c) が大きな負の勾配をもち、したがってリガンド結合過程が大きな負の熱容量変化を伴う場合がしばしば経験されている。そして ΔC_p の大きさからリガンド結合によるたんぱく質のコンフォメーション変化の大きさを推測したりする。

一つのたんぱく質分子に二つ以上のリガンド結合部位があったり、またたんぱく質分子がサブユニット構造をもち、サブユニット間の相互作用でリガンドとのみかけの親和力が変化する場合には滴定曲線の型が変わってくる。このときには予想されるリガンド結合様式について(2)、(3)式に相当する式を導き、どのようなアロステリック現象が含まれるかを考えたりする。以下にこのような方法の対象となった系をあげる。

3.1.1 キモトリプシン

キモトリプシンはこの種の測定系としては Canady ら⁸⁾により始めてとりあげられたものである。 α -キモトリプシンと基質アナログ（基質類似分子）であるヒドロ桂皮酸の結合熱を種々の pH で測定し、酵素の活性中心に通常の酸・塩基触媒基のほかに、基質と静電的な相互作用を示す荷電グループの存在することを予測した。この系はさらに安息香酸など多様な基質アナログを用いた実験から、ある種のコンフォメーション変化が α -キモトリプシン分子でおこっていると推定されている⁹⁾。

δ -キモトリプシン、 π -キモトリプシンへのヒドロ桂皮酸の結合熱は α -キモトリプシンの場合とあまり差はないようである¹⁰⁾。Shiao⁹⁾ はリガンド結合熱力学量を静電的相互作用、疎水性相互作用などいくつかの要素にわけて説明している。キモトリプシン系の特徴は ΔH 、 ΔS の大きな補償効果のあるリガンド結合にあるのかもしれない¹¹⁾。

East ら¹²⁾ による最近の研究ではチモーゲン（酵素前

駆体）と α -キモトリプシンのリガンド結合熱を解析して、リガンド結合部位がチモーゲンが 1 個であるのに対し、活性な酵素では 2 個存在することを推定している。

3.1.2 アルドラーゼ

糖代謝経路の中で重要な位置づけにあるアルドラーゼは Sturtevant ら¹³⁾ のグループにより詳細な研究がある。反応熱・リガンド濃度のエンタルピー滴定から得られる ΔG が 5℃～45℃の温度にわたってほぼ一定であるのに対して、 ΔH は同温度で 97.5 kJ/mol から -67.0 kJ/mol へと直線的に変化する。この ΔH の温度による変化は $\Delta C_p = 4.60 \pm 0.84$ kJ/mol K に相当し、リガンド結合によりアルドラーゼにコンフォメーション変化がおこることを示した。Crowder¹⁴⁾ らはさらに多種のリガンド結合系で、それらの熱力学量をリガンド構造による結合様式の違いで説明しようとしている。

3.1.3 リゾチーム

リゾチームは N-アセチルグルコサミン重合体が通常の基質であるが、重合度の低いオリゴマーについては酵素作用を受けにくいので、基質構成単位がそのままリガンド結合実験に用いられる。反応速度論的立場の阻害実験による研究が多いが熱測定としては Wadso^{15,16)} のもの、そして最近の報告として Rupley¹⁷⁾ らのものがある。N-アセチルグルコサミンの重合度 1, 2, 3 および 4 の四つのリガンドの結合熱測定で、重合度 3 までは重合度とともに直線的に ΔH 、 ΔG 、 $T\Delta S$ が大きくなるが、重合度 4 のものは異なった熱力学量を示し、X 線的に明らかにされているオリゴマーの結合様式とよく対応している¹⁶⁾。温度に対する ΔH の依存性から得た ΔC_p は 0.22～0.17 kJ/mol K となり、リガンド結合による熱容量変化はアルドラーゼの場合よりもかなり小さく¹⁶⁾、リゾチームが rigid な構造であるという X 線の結果ともよく対応しているようである。

3.1.4 フォスフォリラーゼ

フォスフォリラーゼ b とアロステリックエフェクターである AMP、IMP の結合熱測定がなされている^{18,19)}。フォスフォリラーゼに 2 個の AMP 結合部位があり、18℃での結合のエンタルピー、結合に伴う二量体から四量体生成のエンタルピーが評価されている。AMP により誘起されるサブユニットの会合はエンタルピー的なようだ。

3.1.5 乳酸脱水素酵素

四量体サブユニット構造を持つブタ心筋乳酸脱水素酵素への補酵素 NADH の結合は $\Delta H = -136.0 \pm 6.3$ kJ/mol と決定された。この場合のエンタルピー滴定曲線は 4 個のアロステリック部位が、同一種で相互に協同効果をもたないとしたときの理論曲線で説明されることが示されている²⁰⁾。

3.1.6 グルタミン合成酵素

大腸菌のグルタミン合成酵素は 12 量体構造をもっている。モノマー当り 2 個の $M_n^{H_2}$ 結合部位があり、細胞内の $M_n^{H_2}$ 濃度でその触媒活性が調節されている。二つの部位のうち高い親和性 ($\Delta G = 37.2 \text{ kJ/mol}$) を与える方の $M_n^{H_2}$ 結合では $\Delta H = +12.6 \text{ kJ/mol}$ と測定され、エントロピー的な寄与が非常に大きいリガンド結合である²¹⁾。

3.1.7 アヴィチン

各種酵素系の補酵素として生体に必須のビオチンはたんぱく質アヴィチンと結合して不活性になる。ビオチンのアヴィチンに対する結合は 25℃ で $\Delta H = -89.1 \text{ kJ/mol}$ となり、エンタルピーの温度依存性から $\Delta C_p = 975 \pm 50 \text{ J/mol}$ と求められている。さらにビオチンの水およびエタノールに対する溶解熱、溶解度の測定で、水溶液中から疎水性の環境へ移すときの熱力学量を求め、アヴィチン-ビオチン結合過程が疎水性相互作用で考えられるとしている²²⁾。

3.1.8 グリセロアルデヒド三リン酸脱水素酵素

酵母および兎筋より単離される二種のグリセロアルデヒド三リン酸脱水素酵素とリガンド NAD との結合が比較された。リガンド結合過程のエンタルピー測定は、どちらも四量体構造の酵素たんぱくでありながら、酵母のものは 4 個の結合部位が全く独立しているのに対し、筋肉起源のものは 4 個の部位がそれぞれ強いアロステリック相互作用をもつものであることが示されている²³⁾。

3.1.9 その他のたんぱく質

以上のほか、リボスクレアーゼ²⁴⁾、牛血清アルブミン^{25, 26)}、 β -ラクトグロブリン²⁷⁾、ヘモエリトリン²⁸⁾、アポカルボニクアンヒドラーゼ²⁹⁾などがこの種のリガンド結合の熱測定でとりあげられている。

3.2 たんぱく質同志の相互作用

小分子であるリガンド結合とともにサブユニット構造を持つたんぱく質のサブユニット間の相互作用による生物活性の調節が生化学的に大変重要な意義をもっている。サブユニットの解離会合状態がどのような熱力学的性質をもつか知ろうとするのがこの分野の熱測定である。たんぱく質には、このようなサブユニット構造をもつものが数多くみつがっているが、定性的な段階にあり、その定量的取扱い、とりわけ熱測定研究の例はまだ多くみられない。次のような例がある。

3.2.1 ヘモグロビン

ヒトヘモグロビンの α 、 β 鎖の会合の熱測定が Evans ら³⁰⁾によって示された。



の四量体生成のエンタルピーを $\Delta H = 29.3 \text{ kJ/mol dimer}$ と得ている。ただ熱測定値が α 、 β 鎖の混合比に

により大きく変わるのでまだ問題が残されているだろう。

3.2.2 ヘモエリトリン

ヘモグロビンと同じく酸素分子担体として無脊椎動物に含まれる呼吸系色素ヘモエリトリンではその八量体生成



のエンタルピーが pH 7.0 で $\Delta H = 4 \pm 2 \text{ kJ/mol monomer}$ pH 8.5 で $\Delta H = 0 \text{ kJ/mol monomer}$ と求められている²⁸⁾。

3.2.3 α -キモトリプシン

α -キモトリプシンの二量体生成のエンタルピーは $\Delta H = 148 \pm 9.6 \text{ kJ/mol dimer}$ と得られている³¹⁾。

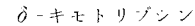
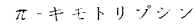
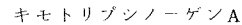
3.2.4 タバコモザイクヴィールスのたんぱく質

タバコモザイクヴィールスのたんぱく質同志の会合の熱測定がなされているが³²⁾、これはむしろヴィールスという生物を構成する重合反応というべきかもしれない。生成物の分子量測定と併わせて、結合単位当りのエネルギーを評価しているが、分子レベルの定量的な精度は低いと思われる。

3.3 その他のたんぱく質の特異的反応

3.3.1 酵素の活性化：キモトリプシノーゲン A

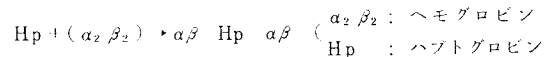
酵素キモトリプシンが不活性な前駆体（チモゲン）のキモトリプシノーゲン A より活性化される過程の熱測定が Beres らによりおこなわれた¹⁰⁾。阻害剤の存在下で、活性化のある段階で止めて測定するという工夫がされている。



の過程で、 $\Delta H_1 = 0 \pm 2.1 \text{ kJ/mol}$ 、 $\Delta H_2 = 8.4 \pm 4.1 \text{ kJ/mol}$ が示された。

3.3.2 ヘモグロビンとハプトグロビンの反応

異種たんぱく質間の特異的反応の一例である。ヘモグロビンは α 、 β 鎖の解離会合状態が変化するので、少し複雑になる。



の過程のエンタルピーは $\Delta H = 293 \text{ kJ/mol hemoglobin}$ (30℃) であり、また ΔH の温度依存性より $\Delta C_p = 9.62 \text{ kJ/mol K}$ という非常に大きい負の熱容量変化を伴うことが示されている。ハプトグロビンに対して 2 個の $\alpha\beta$ -dimer が結合するが、1 個目より 2 個目の結合の方がより強い親和力を示すというアロステリック効果のあることが熱測定結果でもでている³³⁾。

3.3.3 リボスクレアーゼの S-たんぱく質と S-ペ

プチドの結合

リボスクレアーゼを分解して得られる二成分の S-たんぱく質と S-ペプチドは混合するだけで強固に結合してリボスクレアーゼ活性を発現する性質をもっている。この S-たんぱく質と S-ペプチドの特異的結合も、 ΔH 、 ΔC_p とも非常に大きな負の値を持つことが示された³⁴⁾。また S-ペプチドの代りに、それを化学修飾したもののについて熱測定を比較したものがあ³⁵⁾。

3・3・4 血液反応

血液の凝固は古くから知られた血液たんぱく質フィブリン単量体の重合反応であるが、この熱測定は Sturtevant³⁶⁾によりかなり以前になされている。重合反応熱の pH 依存性を理論的に解析し、分子量 330,000 としたときのフィブリン単量体当り、19 個のヒスチジン残基と 19 個のチロシンもしくは ϵ -アミノ基間に水素結合が形成されると推定した。

3・3・5 免疫反応

抗原-抗体反応の熱測定は免疫化学の領域での物理化学的研究方法の一つにとりあげられようとしている。本質的にたんぱく質の特異的反応ではあるが、試料の単離がじゅうぶんなレベルに達していないので、多様な抗原-抗体反応としてはその熱測定例は少い³⁷⁾。

抗体に対してたんぱく質を含まない不完全抗原であるハプテンを用いた実験が DNP-抗体、TNP-抗体について測定されている^{38, 39)}。またモデル反応系としてイムノグロビン G の F_c -フラグメントを用いた測定例⁴⁰⁾があるが、共通していえることは反応が ΔH 、 ΔC_p とも大きな負の変化を伴うことであろう。

3・3・6 筋肉収縮

化学エネルギーが機械的エネルギーに変換される場の筋肉反応では、生化学的研究成果と組織学的な知見をもとに、その分子レベルでの収縮の機構はほぼ解明されているが、エネルギー的な側面からはじゅうぶん定量的な説明ができていない。

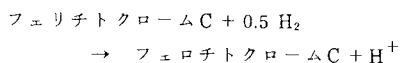
筋肉生化学に関する熱測定は古く、反応熱としてアデノシン三リン酸 (ATP) のエネルギー的性質⁴¹⁾、クレアチンリン酸の加水分解系⁴²⁾などが知られているが、最近の山田ら^{43, 44)}によるミオシン ATPase 系での熱測定は特に興味ある研究である。

筋肉たんぱく質のミオシン ATPase 系での ATP 加水分解の熱発生と、生成物生成の時間経過を注意深く解析して、加水分解のエネルギーはただちに放出されるのではなく、酵素-生成物複合体として一時的に保持されること、また差スペクトル測定から、この酵素-生成物複合体にある種のコンフォメーション変化のおこっていることを推論している⁴³⁾。

3・3・7 呼吸系たんぱく質の反応

これまであげた例にももちろん呼吸系のたんぱく質の反応も含まれるが、酸素分子担体としての呼吸系の機能に関連した反応系の熱測定としては次のようなものがある。すなわち、四量体ヘモグロビンへの O_2 分子の段階的結合⁴⁵⁾、ヘモエリトリンへの O_2 分子の結合²⁸⁾、ヘモエリトリン²⁸⁾、フェロチクローム C⁴⁶⁾の酸化、ヘモグロビン⁴⁷⁾、ミオグロビンへの CO の結合⁴⁸⁾、アポトランスフェリンへの Fe^{2+} の結合⁴⁹⁾などである。

このうちフェロチクローム C の酸化の研究では、



の ΔH が pH 6 ~ 11 の範囲でシグモイド様の分布をすることから、フェリチクローム C のプロトン化の過程でコンフォメーション変化すると推定されている⁴⁶⁾。

3・4 その他の生体高分子の性質

3・4・1 生体膜の性質

生体膜の研究は、それが持つイオンの能動輸送や、酵素活性などの生物学的機能の重要さと関連して、近年組織学的レベルから分子論的レベルに飛躍的に発展した。現在基本構造としてたんぱく質と脂質よりなる二層構造がほぼ定着しているが、この膜のもつ物理化学的性質が温度により構造転移をおこすことに着目して、主として非定温法での熱測定 (示差走査熱量測定または熱容量測定) でとりあげられている。

天然の生体膜における研究もあるが^{50~52)}、現在では試料調製上の問題からまだ人工膜によるモデル実験^{53~55)}で膜構造の基礎的な性質を知ろうとしている段階であろう。

最近の Hinz ら⁵⁴⁾による研究では、より感度の高い示差走査熱測定でレシチン人工膜の安定性、転移エンタルピー、転移における協同効果などに、天然の膜に必ず含まれるコレステロールの含量がどのように影響するか定量的に検討している。Kruyff⁵⁵⁾の研究もこのコレステロールの影響を調べたもので、極性度の異なる種々の脂質との膜状態での相互作用をみている。

3・4・2 核酸関連物質

後で述べる核酸および核酸モデル分子のらせん構造融解現象は別に、核酸関連物質の性質をみた研究はまだ少い。とりわけ核酸物質の特異的反応についての熱測定例はほとんどない。もっとも核酸は情報源として生体中に存在し、たんぱく質にみられるような生物学的な反応性はもともと少いからであろう。

核酸中に含まれる水和水が低温での熱容量測定を通じて調べられている。これは 0 °C 以下では遊離水は凍るが、水和水は凍らない点を利用し、熱容量の違いから精度よく水和水を評価したもので、DNA では 0.610 g H₂O/g

DNA⁵⁶⁾, t-RNAでは0.68 g H₂O/g t-RNA⁵⁷⁾となり分子が比較的小さいt-RNAではDNAやその他のたんぱく質にくらべて水和の量が大きいことが指摘されている。

同じ熱容量測定からChattorajら⁵⁸⁾はDNAのアルカリ金属塩の水和の状態を調べ、水和水が、Li-DNA, Na-DNA, K-DNA, Cs-DNA, Mg-DNAの順に低くなることを示している。そのほか、イオン強度によるRNA高次構造の変化⁵⁹⁾, 高いイオン強度でのグアニル酸のゲル形成⁶⁰⁾などの報告がある。

3・5 複合系の研究

単離した生化学反応系でなく、ある一連の生化学現象を含む系や、細胞レベルで取扱う複合系は生体をマクロにみるという意味で今後その熱測定研究もより重視されてくるものと思われるが、結果が分子論的な記述に至らない場合が多いので、現在ではまだ分析的手段 (Analytical Calorimetry) としての性格がより強い。

細胞内顆粒のミトコンドリア電子伝達系について基質であるNADHの酸化を熱発生と、酸素電極による酸素消費量の測定を併行して追跡したものは著明なものである⁶¹⁾。最近の実験として、同じintactなミトコンドリア系について酸化的リン酸化の過程でのuncoupler (脱共役物質)である2,4-dinitrophenolなどの存在下でATPの加水分解熱を測定した例がある⁶²⁾。

また肝臓、筋肉などの組織⁶³⁾, 微生物細胞⁶⁴⁾についての低温での熱容量測定から、その状態変化を調べたものもこの部類にあげられる。微生物の低温DSC⁶⁴⁾は生細胞の保存という応用的な分野で今後非常に重要な意味をもって来るように思われる。

血小板が塩溶液中で示す熱的性質の研究も臨床医化学的なものとして興味深い。Rossら⁶⁵⁾は血小板がトロンビンを含む塩溶液中で示す熱変化を阻害剤の存在下で測定し、初期の酸化的リン酸化および後期の糖分解の二つの過程にもとづく二段階の熱発生があることを推定している。

3・6 生体高分子の変性

たんぱく質や核酸の高次構造の破壊を、化学的にひきおこされる場合、および熱的にひきおこされる場合の二つにわけて考える。変化が可逆的なものも不可逆的なものもあるが、本来の生物活性を失うので変性(denaturation)と呼び、また高次構造がくずれ、分子がのびた状態になるのでunfoldingと呼んだりする。

生物活性を失うので、この点からは余り生化学的な興味はないようである。ただ活性を保持するための分子の三次元構造の熱力学的安定性についての知見を、完全に破壊された状態との比較で得るところに意義があると考えられる。といっても実際にはそれ程多くの三次構造の情報が得られるものでない。しかしいずれの生体

高分子にもみられる現象であり、変性の機序そのものの物性に興味もたれていて、数多くの熱測定研究例がある。

3・6・1 化学的におこる生体高分子の変性

酸変性、アルカリ変性などの熱測定は古くからおこなわれている^{66~69)}。また分子内の水素結合を破壊するとされている変性剤を用いたものが多い。リゾチームの塩酸グアニジンによる変性の熱測定はその例である^{70, 71)}。同じリゾチームでpH滴定をおこない、プロトンの解離を熱的に検出しているのは、たんぱく質の段階的な変性で変性機序をさらに詳細に知ろうとする工夫であり、各pH領域で滴定されるたんぱく分子中のアミノ酸残基の種類と数を求めている。しかし、これらはいずれもたんぱく質構造全体の破壊を伴うものであり、系が余り複雑すぎて三次構造の安定性を云々するのは実際上困難といわねばならない。この意味から、もっとたんぱく質に対し特異性のある化学的変性機構を熱測定系に持ち込まなければならぬ。

リゾチームのジチオスレイトールによる変性の熱測定はたんぱく質分子中の二次構造を形成しているジスルフィド結合を切断したときの変化を調べたものである⁷³⁾。変性環境でのS-S結合生成がエントロピー的な寄与によるものであることを結論している。

3・6・2 熱的におこる生体高分子の変性

たんぱく質の変性はそのコンフォメーション変化の大きさから予想されるように、一般に非常に大きな熱容量変化(ΔC_p)を伴う。したがって熱的におこる変性については熱容量測定または示差走査熱量測定(DSC)といういわゆる非定温での熱測定手段を用いて変性のエンタルピーを評価する。

化学的変性の場合にくらべ、温度以外の環境が変らないため、より系が簡単であり、現在生体高分子の熱的性質に関連してもっとも広くおこなわれている分野の一つである。

未変性-変性という二つの状態(two-state)を考え、その各フラクションの比の温度依存性からvan't Hoffの関係をを用いて変性のエンタルピーを評価することがしばしばおこなわれる。しかし直接熱測定による値が合わないこと、van't Hoffのプロットが直線とならないことがよくあり、このことからたんぱく質の変性が協同効果的(cooperative)である上に、二つ以上の状態変化を含むもの(multi-state transition)として考えなければならない場合もあり、その方がより実際的なようだ。

これまでの報告ではリゾチーム^{70, 74)}, キモトリプシン⁷⁵⁾, α -キモトリプシン⁷⁵⁾, ジメチオニンスルホキシドトリプシン⁷⁵⁾, リボヌクレアーゼA⁷⁶⁾などでtwo-state transitionで解釈できるという報告がある。

TsongらによるリボスクレアーゼAの熱変性の示差熱容量測定では $\text{pH} < 2$ では two-state であるが $\text{pH} > 2$ では two-state であわせないことが示されている⁷⁶⁾。

Karasz らはリゾチムの $\text{pH} 1, 46^\circ\text{C}$ 附近での熱変性実験から $\Delta H = 234 \pm 33 \text{ kJ/mol}$ を得て, van't Hoff のエンタルピー $\Delta H_{v.H.} = 264 \pm 25 \text{ kJ/mol}$ と実験誤差範囲内で一致することから, この条件での変性を two-state と推定している⁷⁴⁾。リゾチムの場合には塩酸グアニジン変性における実験でも two-state であるという報告がある⁷⁰⁾。

たんぱく質の会合状態に関するものとしては, 単鎖型の活性な β -トリプシンが二鎖型の α -トリプシンより熱的に安定であることをDSCを用いて調べたものがある⁷⁷⁾。

ヘリックス構造を持つものの変性すなわちヘリックス-コイル転移熱の測定としては, 二重らせん構造のDNA, 三重鎖のコラーゲンの研究がある。

AckermannのDNAについての報告⁷⁸⁾は塩基対組成の異なる各種DNAの融解熱容量測定から, 塩基の stacking のエンタルピーを $\Delta H = 15.1 \text{ kJ/mol}$, 塩基対の水素結合のエンタルピーを $\Delta H = 7.5 \text{ kJ/mol bond}$ という解釈の成り立つことを示していて興味深い。

コラーゲンの三重鎖ヘリックスの熱融解の非定温法による研究は新しい^{79,80)}。それによると起源や調製法に無関係にその融解エンタルピーはほぼ 4 kJ/mol であり, 三重らせんの安定性には水素結合以外のもの, おそらくは疎水性相互作用が寄与しているものらしい。

ところで, たんぱく質の非定温熱測定による熱変性の新しい考え方がPrivalov⁸¹⁾により示されているが, これはじゅうぶん考慮するに値するものであろう。キモトリプシンノーゲン, リボスクレアーゼ, ミオグロビンについての種々の pH での精密な熱容量測定による熱変性解析から, たんぱく質がエンタルピー的に高い, のびた状態に一挙に転移する“変性”に先立って, 密な構造のたんぱく質分子にゆるみが生じて, 溶媒との接触状態が変化する“前変性段階”のあることを推定している。この前変性段階も熱容量変化として測定されるが, これは溶液としてでなく, たんぱく質のみの状態変化による熱容量変化であるとの考え方に立っている。図2にPrivalovらによるキモトリプシンノーゲンの熱容量測定の典型的な結果を示してある。 pH が等電点に近い程, 安定化され, 変性のするどいピークが高温側に移動するが, 一方どの pH についても, 昇温開始直後の 28°C 附近からゆるやかな立ちあがりが見られる。

Privalovらのいう“前変性段階”の考えを支持するBoderら⁸²⁾のフラジェリンについての実験結果も興味深い。バクテリアの鞭毛たんぱく質であるフラジェリンの

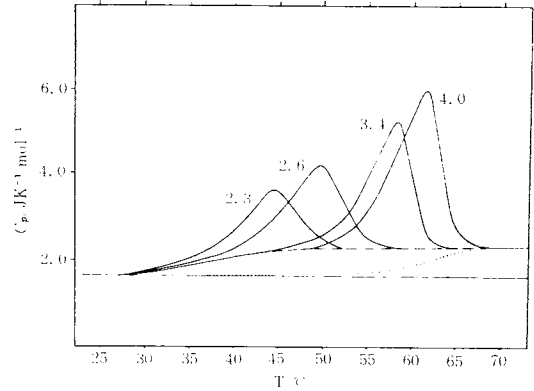


図2 種々の pH におけるキモトリプシンの熱容量温度依存性⁸¹⁾

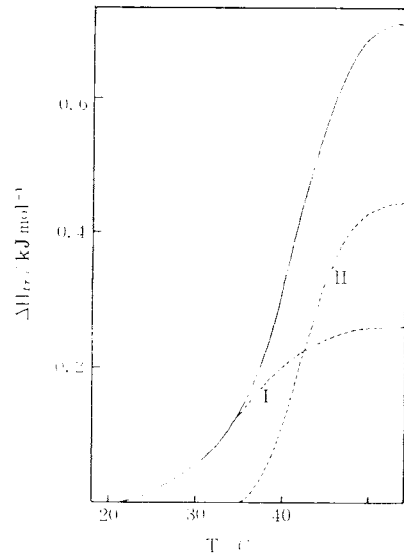


図3 フラジェリンの熱変性におけるエンタルピー増加(実線)と, それを二つの過程ⅠとⅡ(点線)に分解した図形⁸²⁾

熱変性を非定温法で追跡すると図2と同様にするどい吸熱ピークとともに, それより低温側でゆるやかな吸熱が観察される。この模様を系のエンタルピー増加のスケールに換算して示すと図3の実線のようにになるが, 二種類の転移が含まれるものとして考えるとⅠ, Ⅱの点線で示すような曲線に分解できる。それぞれの過程のエンタルピー変化は, 二種の異った波長での円二色性の温度依存性から two-state transition の理論により van't Hoff の関係から導いた二種のエンタルピーとそれぞれ一致する。すなわち, このフラジェリンの変性には, 少なくとも二種の転移が含まれるといえる (multi-state transition)。先に熱測定的に two-state transition で解釈できた

んばく質の例をいくつかあげた^{70, 74~76)}が、実験的な精度があがれば、これらの内のいくつかは、やはりmulti-state であるということになるかもしれない。いずれにしろ、非定温法による熱変性をみるとときには測定精度にじゅうぶん留意するとともに、安易に van't Hoff 式を適用して誤った結論を導かないよう注意しなければならない。

3・6・3 生体高分子モデルのヘリックス-コイル転移

最後に生体高分子モデル系のこともつけ加えておかなければならないだろう。生物活性は全くないが、天然の試料のモデルとして広くおこなわれてきた分野であり、Ackermann の著によくまとめられている⁸³⁾。

とりあげられた合成高分子試料は、たんばく質モデルとしてポリ- γ -ベンジル-L-グルタミン酸、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ-L-リジン、ポリ- ϵ -カルボベンゾキシ-L-リジン、ポリ- β -ベンジル-L-アスパラギン酸などが主要なものであり、また核酸モデルとしてはポリアデニン、ポリウリジンなどの系でヘリックス-コイル転移熱の測定がおこなわれている。転移の条件は定温法としては水溶液系でpHを変える場合、有機溶媒系で溶媒組成を変える場合などがあり、非定温法としては、熱変性または化学変性と熱変性を同時にとりあつた場合がある。

これらの合成試料がホモポリマーであるのに対して、生体高分子は完全なヘテロポリマーで、反応性における協同効果の程度は後者の方が圧倒的に大きい。いいかえれば、モデルとはいえ、天然の生体高分子とのへだたりは余りにも大きい。この理由で、生物試料を得ることの困難であった時代はともかく、いまではこの種の試料を用いた熱測定が無意味とはいわないまでも、少なくとも生物科学にとってそれ程有効とは思われない。生体高分子モデルを使った実験としては、コポリマーを用いるとか、あるいは別の何らかの方法で、生体高分子系との間のギャップを埋める工夫が今後必要となるであろう。

4. おわりに

生化学における熱測定として1970年前後から急速に展開している生化学的機能の発現に関連した熱測定研究を紹介した。古いものでも著明なものは含めたが、主として新しい研究を盛るよう努め、特に70年から74年3月にかけての研究報告は殆んど収録したつもりである。個々の熱測定データは詳しく記載していないが、最近の生化学熱測定の考え方、方法、対象の傾向など理解して頂けたら幸いである。

文 献

- 1) J. M. Sturtevant, "Experimental Thermochemistry"
Ed. by H. A. Skinner, Interscience Publishers, Inc.,

- New York (1962), p. 427.
- 2) 小野宗三郎, 高橋克忠, 化学の領域 増刊78 「熱・温度測定と示差熱分析」(関, 藤代編) 南江堂 (1967), p. 157.
- 3) 小野宗三郎, 高橋克忠, 熱・温度測定と示差熱分析 (関ほか編) 科学技術社 (1968) p. 65.
- 4) "Biochemical Microcalorimetry" Ed. by H. D. Brown, Academic Press, New York (1969).
- 5) 高橋克忠, 生物物理 **12**, 27 (1972).
- 6) I. Wadsö "Thermochemistry and Thermodynamics" Ed. by H. A. Skinner, Butterworth-University Park Press (1972), p. 1.
- 7) 藤田暉通, 化学と生物 **11**, 286 (1972).
- 8) W. J. Canada and K. J. Laidler, Can. J. Chem. **36**, 1289 (1958).
- 9) D. D. Shiao, Biochemistry **9**, 1083 (1970).
- 10) L. Beres and J. M. Sturtevant, Biochemistry **10**, 2120 (1971).
- 11) R. Lumry and S. Rajender, J. Phys. Chem. **75**, 1387 (1971).
- 12) E. J. East and C. G. Trowbridge, J. Biol. Chem. **248**, 7552 (1973).
- 13) H. J. Hinz, D. D. F. Shiao and J. M. Sturtevant, Biochemistry **10**, 1347 (1971).
- 14) A. L. Crowder III, C. A. Swenson and R. Barker, Biochemistry **12**, 2852 (1973).
- 15) C. Bjurulf, J. Laynez and I. Wadsö, Eur. J. Biochem. **14**, 47 (1970).
- 16) C. Bjurulf and I. Wadsö, Eur. J. Biochem. **31**, 95 (1972).
- 17) S. K. Banerjee, G. E. Vandenhoff and J. A. Rupley, J. Biol. Chem. **249**, 1439 (1974).
- 18) J. H. Wang, S. C. Kwok, E. Wirch and I. Suzuki, Biochem. Biophys. Res. Commun. **40**, 1340 (1970).
- 19) H. C. Ho and J. H. Wang, Biochemistry **12**, 4750 (1973).
- 20) H. Hinz and R. Jaenicke, Biochem. Biophys. Res. Commun. **54**, 1432 (1973).
- 21) J. B. Hunt, P. D. Ross and A. Ginsburg, Biochemistry **11**, 3716 (1972).
- 22) J. Suurkuusk and I. Wadsö, Eur. J. Biochem. **28**, 438 (1972).
- 23) S. F. Velock, J. P. Baggott and J. M. Sturtevant, Biochemistry **10**, 779 (1971).
- 24) D. W. Bolen, M. Flögel and R. Biltonen, Biochemistry **10**, 4136 (1971).
- 25) W. E. Klopfenstein, Biochim. Biophys. Acta **181**, 323 (1969).
- 26) W. E. Klopfenstein, Biochim. Biophys. Acta **187**, 272 (1969).
- 27) R. Lovrien and W. Anderson, Arch. Biochem. Biophys. **131**, 139 (1969).
- 28) N. Langerman, and J. M. Sturtevant, Biochemistry **10**, 2809 (1971).
- 29) R. W. Henkens, G. D. Watt and J. M. Sturtevant, Biochemistry **8**, 1874 (1969).
- 30) W. J. Evans, L. Forlani, M. Brunori, J. Wyman and E. Antonini, Biochim. Biophys. Acta **214**, 64 (1970).

- 31) D. D. F. Shiao and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **8**, 4910 (1969).
- 32) H. Stauffer, S. Srinivasan and M.A. Lauffer, *Biochemistry* **9**, 193 (1970).
- 33) E.C. Adams and M. R. Weiss, *Biochem. J.* **115**, 441 (1969).
- 34) R. P. Hearn, R. M. Richards, J. M. Sturtevant and G. D. Watt, *Biochemistry* **10**, 806 (1971).
- 35) R. Rocchi, G. Borin, F. Marchiori, L. Moroder, E. Peggion, E. Scoffone, V. Crescenzi and F. Quadrifoglio, *Biochemistry* **11**, 50 (1972).
- 36) J. M. Sturtevant, M. Laskowski, Jr., T. H. Donnelly, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6168 (1955).
- 37) R. F. Steiner and C. Kitzinger, *J. Biol. Chem.* **222**, 271 (1956).
- 38) B. G. Barisas, J. M. Sturtevant and S. J. Singer, *Biochemistry* **10**, 2816 (1971).
- 39) B. G. Barisas, S. J. Singer and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **11**, 2741 (1972).
- 40) J. Sjöquist and I. Wadsö, *FEBS Letters* **14**, 254 (1971).
- 41) R. J. Podolsky and J. M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.* **217**, 603 (1955).
- 42) M. Gellert and J. M. Sturtevant, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1497 (1960).
- 43) T. Yamada, H. Shimizu and H. Suga, *Biochim. Biophys. Acta* **305**, 642 (1973).
- 44) T. Yamada, H. Shimizu and H. Suga, *J. Phys. Soc. Japan* **34**, 1113, (1973).
- 45) L. Noll, B.G. Barisas and S.J. Gill, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **56**, 555 (1974).
- 46) G. D. Watt and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **8**, 4567 (1969).
- 47) J. B. Bateman and F. J. W. Roughton, *Biochem. J.* **29**, 2622 (1935).
- 48) S. A. Rudolph, S. O. Boyle, C. F. Dresden and S. J. Gill, *Biochemistry* **11**, 1098 (1972).
- 49) J. S. Binford, Jr. and J. C. Foster, *J. Biol. Chem.* **249**, 407 (1974).
- 50) J. M. Steim, M. E. Tourtellotte, J. C. Reinert, R. N. McEthaney and R. L. Rader, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 104 (1969).
- 51) D. L. Melchior, H. J. Morowitz, J. M. Sturtevant and T. Y. Tsong, *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 114 (1970).
- 52) W.M. Jackson, J. Kostyla, J.H. Nordin and J.F. Brandts, *Biochemistry* **12**, 3662 (1973).
- 53) B. D. Ladbrooke, R. M. Williams and D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 333 (1968).
- 54) H. Hinz and J. M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.* **247**, 3697 (1972).
- 55) B. D. Kruff, R. A. Demel, A. J. Slotboom, L. L. M. van Deenen and A. F. Rosenthal, *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 1 (1973).
- 56) G. M. Mrevlishvili and P. L. Privalov, "Water in Biological Systems" Ed. by L. P. Kayushin, Nauka Press, Moscow (1969) p. 63. [English Translation: Consultants Bureau, New York (1969).]
- 57) N. G. Bakradze, D. R. Monaselidze, G. M. Mrevlishvili, A. D. Bibikova and L. L. Kisselev, *Biochim. Biophys. Acta* **238**, 161 (1971).
- 58) D. K. Chatteraj and H. B. Bull, *J. Colloid Interface Sci.* **35**, 220 (1971).
- 59) S. Srinivasan and M.A. Lauffer, *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 568 (1972).
- 60) J. F. Chantot, *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 347 (1972).
- 61) M. Poe, H. Gutfreund and R. W. Estabrook, "Methods in Enzymology" Vol. X, Ed. by R. W. Estabrook and M. E. Pullman, Academic Press, New York (1967), p. 708.
- 62) R. Cereijo-Santalo, *Can. J. Biochem.* **49**, 721 (1971).
- 63) E. L. Andronikashvili, Y. Y. Roinishvili and N. N. Khechinashvili, *Biofizika* **15**, 484 (1970).
- 64) K. Gonda and S. Koga, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**, 393 (1973).
- 65) P. D. Ross, A. P. Fletcher and G. A. Jamieson, *Biochim. Biophys. Acta* **313**, 106 (1973).
- 66) J. M. Sturtevant, *J. Phys. Chem.* **58**, 97 (1942).
- 67) W. W. Forrest and J. M. Sturtevant, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 585 (1960).
- 68) J. Hermans, Jr. and G. Rialdi, *Biochemistry* **4**, 1277 (1965).
- 69) R. M. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 1472 (1942).
- 70) D. H. Atha and G. K. Ackers, *J. Biol. Chem.* **246**, 5845 (1971).
- 71) S. Lapanje, *FEBS Letters* **31**, 67 (1973).
- 72) C. Bjurulf, *Eur. J. Biochem.* **30**, 33 (1972).
- 73) S. Lapanje and J. A. Rupley, *Biochemistry* **12**, 2370 (1973).
- 74) J. M. O'Reilly and E. E. Karasz, *Biopolymers* **9**, 1429 (1970).
- 75) R. Biltonen, A. T. Schwartz and I. Wadsö, *Biochemistry* **10**, 3417 (1971).
- 76) T. Y. Tsong, R. P. Hearn, D. P. Wrathall and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **9**, 2666 (1970).
- 77) R. A. Beardslee and J. C. Zahnley, *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 806 (1973).
- 78) H. Klump and T. Ackermann, *Biopolymers* **10**, 513 (1971).
- 79) P. E. McClain and E. R. Wiley, *J. Biol. Chem.* **247**, 692 (1972).
- 80) A. Finch and D. A. Ledward, *Biochim. Biophys. Acta* **278**, 433 (1972).
- 81) P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili and B. P. Atanasov, *Biopolymers* **10**, 1865 (1971).
- 82) W. Bode and A. Blume, *FEBS Letters* **36**, 318 (1973).
- 83) T. Ackermann, "Biochemical Microcalorimetry", Ed. by H.D. Brown, Academic Press, New York (1969), p. 121.