

生化学における熱測定研究法

III. マクロな状態を対象とする熱測定*

高橋 克忠**

生物現象の熱測定研究は、歴史的には生体のマクロな状態を対象とするものがその出発点にあった。よく知られているように、もっとも古くは18世紀のLavoisierの動物呼吸熱測定にさかのぼることができる。科学が近代化されてからでも、今世紀初頭のMeyerhof一派による細胞抽出液を用いた解糖反応の反応熱測定、Hillらによる筋肉収縮熱の研究などがしばしばその例として引用されるものである。

特異性に乏しい熱変化をみるこうした生体の研究法は、生命科学が分子論的理解の方向へ展開するにつれ、分光学的、磁氣的性質など、ミクロな情報を提供する有力な手段の出現のまえに、それ以降の発展がほとんど閉ざれてしまった。けれどもこのような状況は決してマクロな状態を対象とする熱測定が無益であることを意味しているのではない。むしろ生命科学の現状をみたとき、このような研究法がもつ役割をあらためて見直すべき時期にきているとさえみてよいのではないだろうか。もちろん分析的な方法論を基本とする今日の生命科学研究にあって、測定した熱量の分子論的な裏付けがなければ、単に熱変化を測ったにすぎない、という批判を受けることは覚悟しなければならない。けれども、部分をもって全体を知ることができないのもまた事実である。そのような立場から、試料に何ら損傷を与えずに測定ができるという特質をもつ熱測定を、生体のひとつの研究手段として位置づけ、その有効性、可能性をいろいろな分野で探ってみることも無意味ではない。以下にいくつかのマクロな状態の研究例を紹介するが、いづれにおいても、まだ系統的に整理して示す程にその研究法が確立されたものでないことをお断りしておく。

1. 細胞成分

1.1 ミトコンドリア

ミトコンドリアは生体のエネルギー代謝で重要な役割を演ずる細胞質顆粒である。細胞成分の分画技術が進歩するとともに、ミトコンドリア自体を損傷せずにとりだし、そこに含まれる一群の酵素反応系、電子伝達系の本来の状態を保持させたまま、エネルギー代謝の機構を探ろうとする研究が精力的におこなわれている。このような系で熱測定をおこなう場合には、複合酵素反応系であるので、観測した熱変化がどの反応系に対応するものであるのか、共役した反応系があって、副次的な反応の反応熱も含まれていないかどうか明確にしておかなければならない。

図3.1はPoeらが心筋細胞から調製したミトコンドリアの電子伝達系におけるNADHの酸化に伴う熱測定の結果である¹⁾。熱電対により温度変化を記録すると同時に、酸化に伴う酸素消費も記録してある。熱量計は50 cm³容のジュワーびんを用いた恒温壁型のもので、あらかじめ酸素で飽和した29 cm³の緩衝液に対し、ミトコンドリア懸濁液1.0 cm³を加え、さらに基質であるNADH

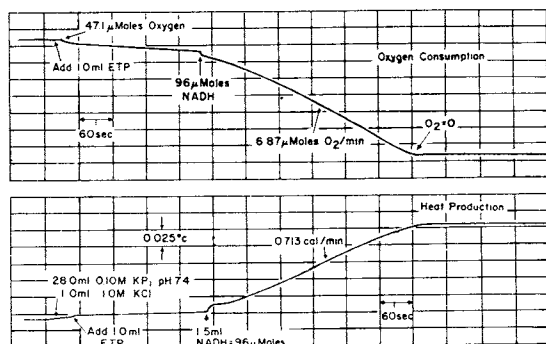


図3.1 ミトコンドリア電子伝達系(ETP)によるNADHの酸化過程の熱発生と酸素消費の模様¹⁾

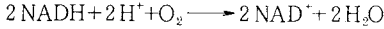
ジュワーびん中に緩衝液をとり熱平衡にする。酸素を5min通した後、ETP (30mg protein/cm³)とNADHをそれぞれ矢印のところで加え、以後の変化を記録してある。

* 生化学における熱測定研究法 I (上)熱測定4(2)67-75(1977); 同I(下)熱測定4(3)117-125(1977); 同II熱測定4(4)165-171(1977)

** 大阪府立大学農学部生物物理化学教室：堺市百舌鳥梅4丁

Katsutada Takahashi: Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Japan

96 μmol 添加したときの酸化反応



のエンタルピー変化を追っている。

酸化反応は一般に大きなエンタルピー変化を示し(この場合 $\Delta H = -61.6 \text{ kJ mol}^{-1}$)、この測定条件でも 0.1 K 程度の温度変化がみられるので、検熱体としてわずか 5 対の銅コンスタン熱電対を用いているにすぎないが、じょうぶな感度で検出が可能である。また反応は 10 分内外で完了するのに対し、熱交換の小さな銀メッキしたジュワーびんを用いているので、熱損失も考慮する必要はない。図 3.1 では発熱および酸素消費は基質である NADH の濃度がじょうぶな高いため、直線的に変化(零次反応)している。直線の傾斜はそれぞれ発熱速度および酸素消費速度であり、両者の比(発熱速度/酸素消費速度)は酸素 1 mol 当りの反応熱を与える。

この場合のように、反応を零次で進行させることが可能な系では、フロースルーセルを装備したフロー型熱量計を用いることにより、より好結果が得られるであろう。その理由は、ミトコンドリアは基質を添加しなくてもある程度酸素の消費を伴い発熱しているため、その量をフロー型熱量計ではベースラインとして容易に差し引くことができるからである。これに対し、バッチ型熱量計(ジュワーびん型)の場合には、基質添加前の発熱はベースラインの一定傾斜となってあらわれる。この関係を図示したのが図 3.2 である。熱量計セルにフロースルーセルを用いると、零次反応的な変化の場合には、熱伝導が定常状態に達した時点で熱量計シグナルは定常値に達す

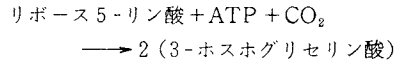
る。すなわち、熱変化が微分値で表示されることになるのである。

生体は電子が酸素へ伝達される際、ATP のリン酸エステル結合で化学的エネルギーを獲得しているが、ATP の生成を阻害すれば、本来化学エネルギーとして貯えられるべきエネルギーが熱エネルギーとして放出されることになるので、その分だけ熱発生が大きくなるはずである。ミトコンドリアの示す酸化のリン酸化の過程にジニトロフェノール(DNP)などの特異的な脱共役剤(uncoupler)を加え、その際遊離される熱エネルギーを詳細に検討することは意義あることと思う。また動物を低温に長時間さらしたときにあらわれる褐色脂肪体も生理学的立場から興味がある。これは生化学的には電子伝達系に富むミトコンドリアが多量に蓄積された皮下脂肪組織である。生物の適応現象を物理化学的なレベルで理解する上で、このようなミトコンドリア系のエネルギー代謝を明らかにすることも必要であろう。

1.2 クロロプラスト

緑色植物の細胞質顆粒の一つであるクロロプラストは光合成機能(光エネルギーによる炭酸ガスの固定)を持つものとして、ミトコンドリアと並び重要なエネルギー交換の場である。この系で熱測定が試みられた例は文献上はまだないが、筆者のグループの一人がおこなった予備的な実験を次に紹介する²⁾。

図 3.3 はジュワーびん型熱量計でホウレン草から分離したクロロプラストの緩衝液懸濁液に、光合成回路の一基質であるリボース 5-リン酸を添加したときの反応熱の記録である。光を与えないいわゆる暗反応条件での測定であるので、その経路は図 3.4 に示すように 3-ホスホグリセリン酸の段階で停止してしまう。したがってこの間の反応熱は



のエンタルピー変化であることになる。けれどもミトコンドリアと同様、複合酵素反応系であるので、副次的な反応が含まれると予想され、その有無や程度を確かめないと ΔH を評価することはできない。光照射の可能なフロースルーセルを工夫し、フロー型熱量計を用いて明反応についても測定すると、さらに興味ある解析ができるであろう。

1.3 生体膜

脂質二重層をマトリックスとして、ATPase に代表される酵素作用をはじめ、物質輸送、電子伝達、分極(刺激伝達)など、いろいろな生物的機能を持つ生体膜は、ミトコンドリア、ミクロソーム、神経細胞、赤血球、リンパ球、細菌細胞膜などの生化学研究では必ずとりあげ

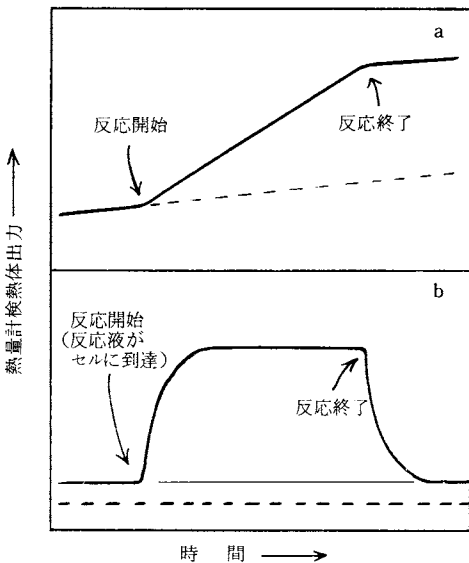


図 3.2 零次反応的な変化における熱量計シグナル
a) バッチ型 b) フロースルー型

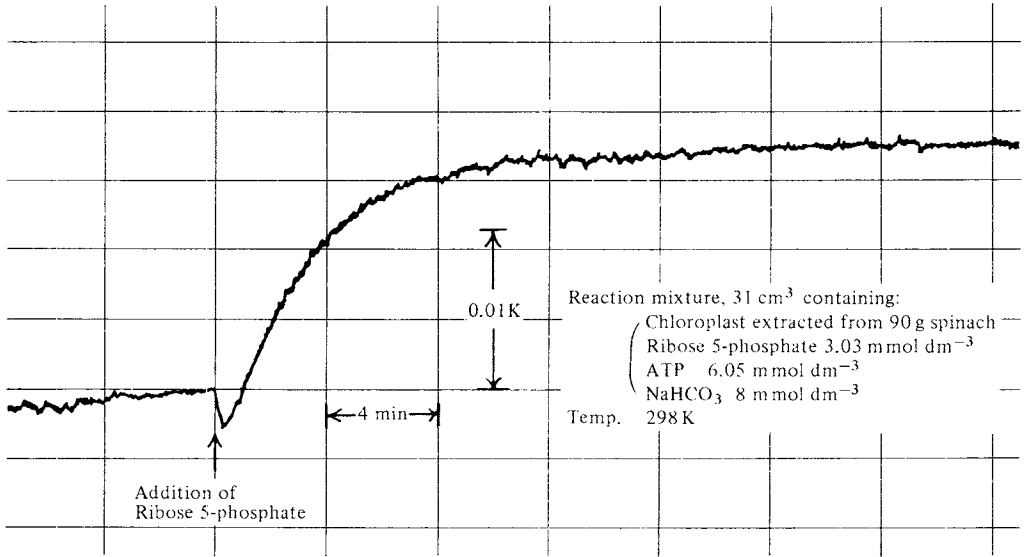


図 3.3 クロロプラストの暗反応における熱変化曲線²⁾

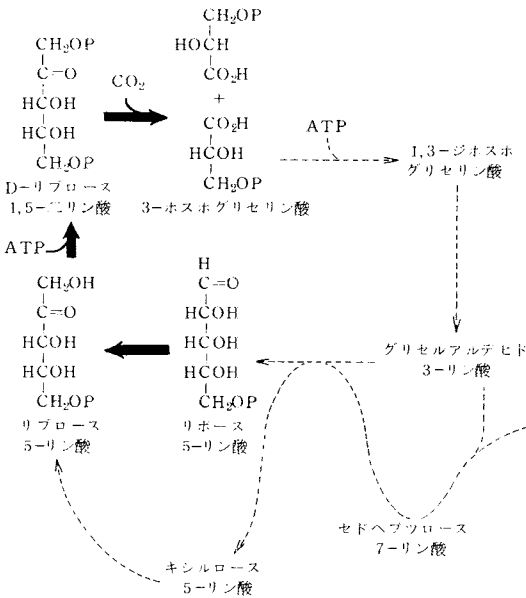


図 3.4 クロロプラストの暗反応 (太線)

られるものである。そうした機能の発現を保障する場としての脂質二重層が示す液晶性は、生物機能との関連できわめて重要な意味を持つものと考えられており、X線回折、NMR、スピラベルESRなどと並び、熱測定におけるscanning methodがその有力な方法として位置づけられている(本講座I(下))。現在では二重の脂質で構成した人工膜の転移エンタルピーを評価し、脂質の構成比を変えて転移平衡の相図を描くまでにはいたっており、

近い将来、任意の膜について、それを構成する脂質組成から、その膜の液晶転移挙動を予測することが可能になるかもしれない。

このような研究に対し、膜のもつ生物学的機能がそのマトリックスの転移(融解と呼ぶ人も多い)とどのように関わっているか系統的に整理するのはこれからの問題である。実際の膜は脂質分子の集合体である二重層の中に、生物活性を示すタンパク質が保持された状態にある。以下に生体膜の熱的性質の研究法における問題点を、主としてタンパク質との関連でとりあげてみる。

今日おこなわれている一般的な方法は、膜の機能、たとえばある特定の酵素活性に着目し、その温度依存性とマトリックスの転移の対応をみるものである。これをモデル的に示したのが図 3.5 である。酵素活性の発現がマトリックス構造に依存するものであれば、転移温度(T_t)を境に活性が不連続に変化することが予想される。これをより明確にみるため、活性の Arrhenius プロットをおこない、活性化エネルギーを比較することがよくおこなわれる(図 3.5 b)。酵素活性の対数を絶対温度の逆数に

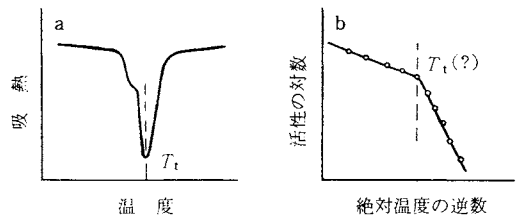


図 3.5 膜マトリックスの温度転移と膜活性の Arrhenius プロット

対してプロットすると折れ曲がり、あるいは不連続な点
があらわれる。プロットの傾斜は活性化エネルギーに相
当し、したがって折れ曲がり温度を挟んで異った活性化
エネルギーを持つ二種の反応様式があることになる。同
じ膜で、熱分析装置により温度転移をみると、高分子の
転移と同様な吸熱現象が観測される(図3.5 a) この温
度領域を境に、高温側ではマトリックスは半流動性をも
つようになり、したがってそこに含まれる酵素タンパク
も動き易い状態になるので、より活性が高くなると予想
される。事実活性の Arrhenius プロットは図3.5 bのよ
うに高温側で傾斜(の絶対値)が小さくなり、より小さな
活性化エネルギーを持つ様式に移行するのが普通である。

熱分析手段により転移挙動をみるのは、活性が急激に
変化する温度が膜マトリックスの“転移温度 T_t ”に対応す
ることが期待されるからである。転移温度を正確に知る
ためには精密な熱容量差測定法で過剰熱容量をもとめる
(I.3)のがもっとも妥当である。現在これが可能な市販
装置は Privalov の熱量計だけである(DASM-1M(コロ
ンビア貿易))。転移温度のみを知るだけで、精密な転移
エンタルピーの評価は当面必要でないため、一般には市
販の熱分析装置(たとえば第二精工舎 SSC-544 Perkin-
Elmer DSC-2 (日製産業), Mettler TA-2000 (シ
イベル機械), Du Pond 990 (第二精工舎))を用いて温
度転移が研究されている例が多い。ところが、現実には
転移温度を正確に決めることはなかなか困難である。そ
の理由は1)吸熱シグナルの解析にもとづくものと、2)
試料の性質にもとづくものの二つがある。

1)は一般の合成高分子の転移現象の場合と同様、吸
熱シグナルのどの部分を転移点とするかという根本的な
問題である。便宜的に吸熱シグナルのピーク温度を転移
温度 T_t としている場合が多い。転移の幅はマトリックス
の脂肪酸組成、タンパク質の存在状態により異なるが、15
~40 K程度であるのに対し、2~3 Kというわずかな転移
温度の差を論ずることがしばしばある。したがってピー
ク温度を転移温度とみるにしても、温度走査速度の選び
方によって、この2~3 Kというピーク温度のずれがアー
ティファクトとして観測される危険性は非常に高い。み
かけのピーク温度は温度走査速度に依存するが、筆者の
経験では少なくとも 0.2 K min^{-1} 以下の速度でなければ一
定とならない。

2)の試料にもとづく問題はさらに厄介である。細胞
から抽出して調製した脂質ラメラの温度転移の吸熱シグ
ナルは図1.15 にすでに示したように、単一の脂質で構成
した人工膜に比べ、温度転移の吸熱シグナルははるかに
ブロードになる。タンパク質その他の成分を含む生体膜
の状態になると、脂質分率が減少し、シグナルの強度は

希釈される。普通、タンパク質の含量は30~40% であ
るから、実質感度は3割ないし4割減少することになる。

タンパク質を含むことによって膜マトリックスの状態
も当然変化する。この点については、現在まだ定量的に
論ずるだけの実験が積まれていないが、膜の状態の転移
温度の方が脂質二重層のそれに比べ、やや高くなるので
はないかという予想がモデル実験から伺える。図3.6 は
フォスファチジルセリン(PS)およびジバルミトイルフ
ォスファチジルコリン(DPPC)で構成した小胞体(A,
B,D)とそれに神経細胞由来のミエリタンパク質リポ
フィリンを分散させたとき(C)のDSCサーモグラムで
ある³⁾。Aは純PS、Dは純DPPCでBは両者の30:70
の混合組成をもつ小胞体である。ここで注目すべきなの
は、タンパク質34%を含む小胞体Cではみかけのピー
ク温度が35°Cで、Bの28°Cに比べ、7 K程高くなっ
ていることである。この傾向はPSとDPPCの混合割合が
変わっても同様にみられる。タンパク質と脂質炭化水素鎖
の疎水性相互作用がマトリックスの熱安定性を増すこと
に寄与しているものと推定されるが、単一の脂肪系(PS
100%もしくはDPPC 100%)にタンパク質を加えた場
合には、ピーク温度は殆んど変わらないので、タンパク質
および脂質の種類による特異的な親和性も大きく寄与し
ているとみるべきであろう。実際の膜はもっと複雑であ
るので、そこに含まれるタンパク質のマトリックス安定
性への寄与を上のような人工的な膜モデル系での実験
から予測することはまだまだ無理である。たとえば
Mycoplasma の膜ではタンパク質が存在してもマトリ

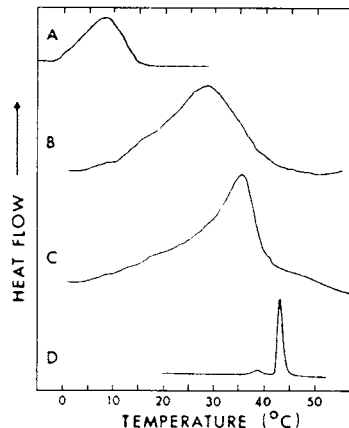


図3.6 フォスファチジルセリン(PS)、ジバ
ルミトイルフォスファチジルコリン
(DPPC)小胞体のDSCサーモグラム³⁾
(A)PS ; (B)PS/DPPC, 30:70 ; (C)PS/
DPPC, 30:70+34%リポフィリン ; (D)DPPC。
EDTA存在下。昇温速度 10 K min^{-1} 。試料の量お
よび感度が異なるので熱量は比較できない。

ックスの転移温度は変わらない⁴⁾が、肝マイクロゾームの膜ではタンパク質の影響が吸熱ピークにあらわれる⁵⁾というように試料による違いもみられる。

図3.6のBとCを比較すると、ミエリタンパク質の存在で吸熱シグナルがいくぶんすどくなっていることがわかる。大腸菌の膜系でも抽出した脂質ラメラよりもタンパク質を含む膜のままの状態の方が転移がすどくなるという結果が得られている⁶⁾。これらのことはタンパク質の存在がマトリックスの脂質分子の配列を大きく変化させていることを意味している。けれども、タンパク質の存在で転移がすどくなるということは前述の転移温度と同様、一般性のあることかどうかはまだ断言できない。

またタンパク質を含む膜では、タンパク質の熱変性にもとづく吸熱シグナルが非常に大きく、マトリックスの温度転移が埋れてしまい、その見極めが困難になるものもある。タンパク質の熱変性は320 K付近からはじまるので、特に転移がこのような高温側にある脂質組成の膜*ではみかけ上はタンパク質の熱変性による吸熱シグナルだけになってしまう。さらに細菌の膜のように試料調製時に核酸も混入してくる場合には、核酸の融解にもとづく吸熱も大きく効いてくる。

図3.7は肝マイクロゾームの膜系の測定例で⁹⁾、膜の状態(a)と抽出した脂質の状態(b)の比較から、(a)のタンパク質の吸熱が如何に大きいかわかるであろう。なおタンパク質の熱変性は一般に不可逆的であり、一度測定した試料も再度測定すると、二度目には殆んどタンパク質の吸熱ピークはみられなくなる。変性したタンパク質はマトリックス中での存在状態も、脂質との相互作用の状態も、もとのものと異なるため、膜系で同じ試料について二度繰り返し測定することは膜の生物活性という観点からは意味がない。タンパク質を含まない脂質だけの系でも詳細にみればサーモグラムに再現性はない**。これは熱をかけることにより脂質の並び方に再配列がおこるためであろう。このことは脂質ラメラもしくは小胞体で測定する場合には、その抽出条件によって生体中でのあり方と異なったものになってしまうことがありうることを意味している。

再び図3.5で述べた膜の生物活性とマトリックスの転移温度の対応に戻るが、これまでのところ、脂質二重層の相転移温度で活性が急激に変化するということは一般性のあることとして結論して差支えないようである。け

* 定性的には、脂質組成について飽和脂肪酸の含量が高いもの程、転移のおこる温度は高い。

** 数度の測定の繰り返しで、最終的には一定のサーモグラムに落ち着くようである。

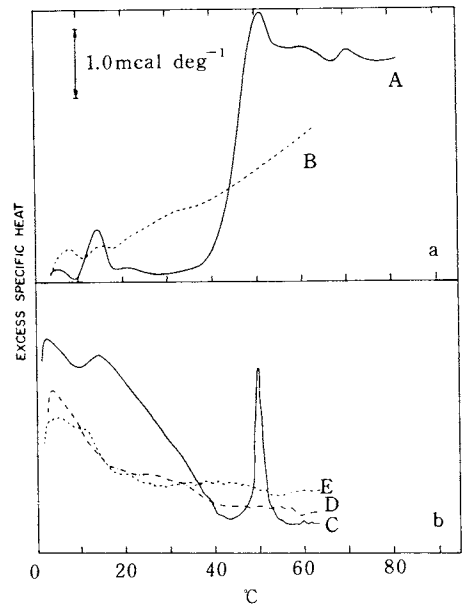


図3.7 肝マイクロゾーム膜系の熱容量差測定⁹⁾
(A)マイクロゾーム1回目の加熱；(B)マイクロゾーム2回目の加熱；(C)抽出した脂質1回目の加熱；(D)抽出した脂質2回目の加熱；(E)クロロホルム+メタノール(2:1)で二度抽出した脂質。
2~15°Cのピークは脂質にもとづくもの、50°C付近のピークはタンパク質の変性にもとづくもの。

れども、これとは逆に Arrhenius プロットが折れ曲がる点、すなわち活性が急激に変化する温度で吸熱現象がみられるかという点必ずしもそうではない。タンパク質の機能がマトリックスとは独立に変化することもありうるし、またタンパク質の機能に影響を与えるマトリックスの変化がローカルなもので、それに対応する吸熱現象が小さくて観察できないこともあるからである。このような意味で、膜機能の裏付けとして膜物性を調べるのに熱分析が一つの手段として有効であるにしても、それだけではじゅうぶんではないということも承知しておかなければならない。また熱測定の問題ではないが、熱分析でみた吸熱ピークから半ば意図的に Arrhenius プロットの折れ曲がり点を描くことのないよう注意が必要である。高分子を含む系で Arrhenius プロット (van't Hoff プロットの場合も同様) が直線とはならず、ゆるやかに曲がるのはむしろ普通のこととして認識されつつある。測定点の少ない Arrhenius プロットでは、そのような自然なまがりを二直線と誤認し、本来はないはずの折れ曲がり点を、熱分析の結果をみて、先入観にもとづいて作ってしまう可能性があるからである (図3.8)。

実際の測定操作は、遠心分離で得た膜分画を必要な塩溶液、緩衝液で洗浄した後、湿潤状態のまま 5~50 mg

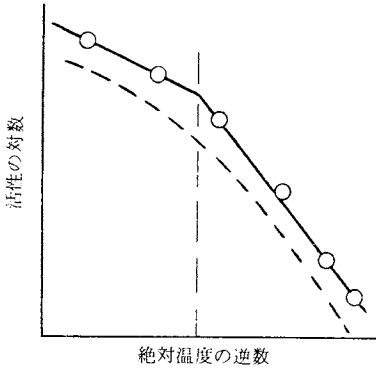


図3.8 Arrheniusプロットの自然な曲がり方を認識し、先入観にもとづいて折れまがり点を作ってしまうないように

を熱分析用の密封セルにとり測定する。装置としては先に上げた市販の定量DTA装置、DSC装置が用いられるが、生化学的に意義のある解析をすすめるためには、今後感度を少なくとも2ケタ上げることが必要であろう。

膜の機能はタンパク質の存在様式を抜きにして語ることはできない。そのような意味で、isothermal methodによる脂質とタンパク質の相互作用の熱測定研究^{7~10)}も始められようとしていることを付記しておく。

2. 細胞

細胞は物質酸化とそれによるエネルギー獲得という基本的な生物機能を一つの系として持ち合す最小の単位である。熱測定をこのような系に導入することは比較的容易であるが、それは酸化熱が一般に大きいためである。細胞内の物質酸化は複雑なステップよりなるが、全体としては非生物的な燃焼と同じ現象であり、大きなエンタルピー変化(燃焼熱)を伴う。熱測定には試料の状態を損わずに測れるという性質があることを初めに書いたが、それが利点としてもっとも活用されるのはこの細胞レベルでの測定であろう。ただし分子論的記述を必要とする今日の生命科学研究にあっては、特異性に乏しい熱変化の測定はミクロな情報を導くのに決して有効な手段ではない。得られた熱現象がどのような分子レベルのものに対応するか、慎重に解析しなければならない。実際の細胞は様々に機能分化しているが、もっとも身近なものとして赤血球および微生物細胞をとりあげる。

2.1 赤血球

赤血球は一般の細胞と比較して、核、ミトコンドリア、マイクロゾームなどが無く、したがってその中に含まれる生化学現象も主として解糖経路(グリコリシス)に限られている。大きさは直径8μ程で、円盤状をしており、懸濁液の状態ではフローセルを用い、フロー型熱量計

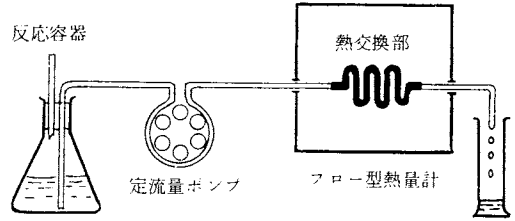
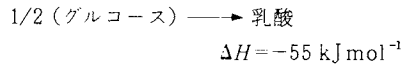


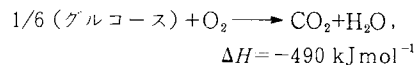
図3.9 フローセルによる測定原理

で測定するのが一般的である。図3.9にその原理を示してある。外部の容器で所定の代謝条件においた細胞懸濁液を定流量ポンプで熱量計に送り込み、熱発生を記録する。解糖反応が定常状態にあるときには熱発生は一定となるから(図3.2参照)、そのときの代謝産物(乳酸)を定量することにより、その反応に対応するエンタルピー変化を評価することができる。図3.10(a)は基質としてグルコース(10 mmol dm⁻³)を添加したときの解糖による赤血球熱発生を測定した例である¹¹⁾。途中でpHをいろいろに変化させ、そのときの懸濁液中の乳酸および他の主要な中間産物の生成量分析値を同時に示してある。解糖反応はpHに著しく依存し、生成する乳酸量も変化する。解糖系の阻害剤であるNaFを添加すると発熱はとまり、ベースライン(零でない)に戻る。乳酸生成量に対して熱発生量をプロットしたものが図3.10(b)で、その傾斜はみかけの乳酸生成のエンタルピー変化、 $\Delta H = -70 \text{ kJ mol}^{-1}$ を与えるが、これは解糖のエンタルピー変化として知られている値



と良く対応する。

図3.10(b)の縦軸の切片は、乳酸生成とは無関係な赤血球の発熱であり、その値は赤血球1個当りに換算すると約13 fWになる。この値は呼吸作用(酸素消費をとまなうエネルギー獲得)をもつ細胞に比べるとかなり小さい。赤血球は呼吸作用をもたないが、電子受容体としてメチレンブルーを添加すると酸素吸収がおこる。これはペントースサイクル(五炭糖分解経路)によるもので、このような状態での熱発生は約10倍に増加する。そのときの消費酸素1 mol当りの発熱量は約600 kJ (mol O₂)⁻¹であり、これはグルコースの燃焼熱



と対応させると興味ある結果である。

解糖経路にはいくつものステップが含まれるが、個々の反応についての熱力学量は殆んど集積されておらず、呈示されているものについても信頼できるものが少いの

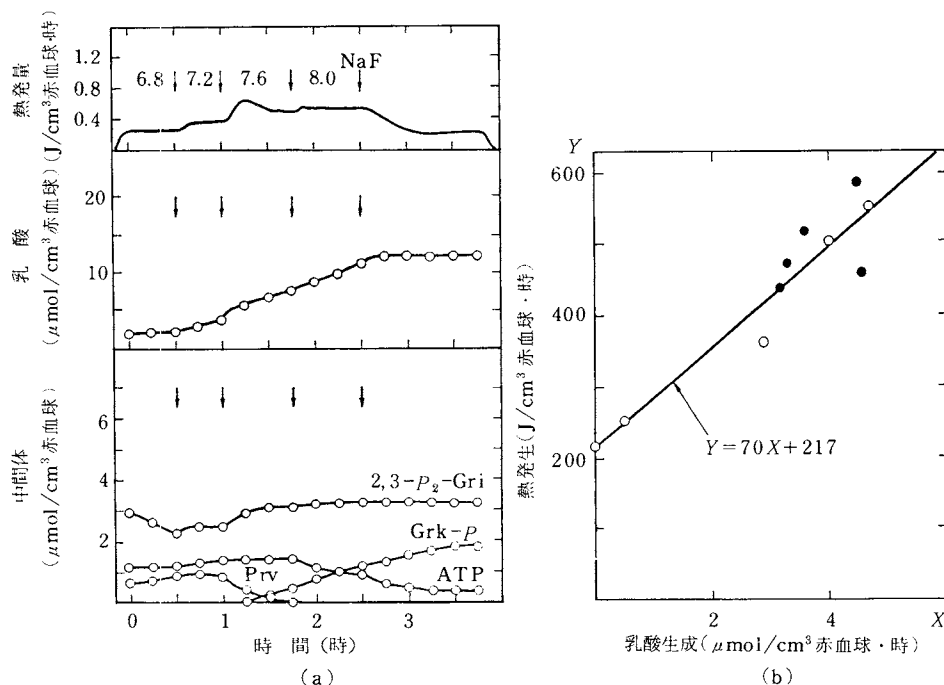


図3.10 赤血球の熱発生測定

- (a) グルコース (10 mmol dm⁻³) 添加による熱発生におよぼす pH の影響と乳酸および各種中間体の消長。
- (b) 熱発生と乳酸生成量の関係 (水上の総説より¹¹⁾)。

が現状である。この意味でまず単純した反応系で精度、確度の高い測定を積み重ねていかなければならないが、単純すれば反応系が破壊されることもあるので、赤血球そのものを対象にしなければならないこともあるだろう。いろいろな代謝中間物を添加するか、途中の酵素反応系に特異的な阻害剤を加えて反応を停止させる、などの系で熱測定をおこない、解糖の熱力学の主要を抑えていくという方法をとることも必要である。赤血球の熱発生と生化学については水上の総説¹¹⁾に詳しく述べられている。

2.2 微生物細胞

微生物細胞は生合成や細胞分裂という過程も含むために血球よりはるかに複雑であるが、生物個体としては最小単位のものであり、統計的に処理できるじゅうぶんな個体数を扱うことが可能である。したがって測定に際しての再現性が良く、定量的な解析も今後かなりすすめられるものと思われる。また条件により、物質代謝だけの系(非増殖系)および生合成、細胞分裂を伴う系(増殖系)において測定できるのが特徴的である。

一般的にいて細胞分裂に必要な最小限の基質を一つでも欠く場合、非増殖系になる。非増殖系の物質代謝熱をみるには、微生物細胞を緩衝液に懸濁し、適当な基質

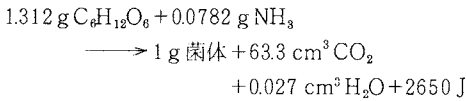
を添加してその熱変化を測定する。熱量計はバッチ型、フロー型のいずれでもよい。フロー型の場合には赤血球と同様、図 3.9 に示したのと基本的に同じ方式による。発熱量は当然、微生物の種類、培養の条件によるが、大体において添加する基質の燃焼熱と同じオーダーにあることを目安にしておけばよい。熱測定では発熱量とともに代謝速度も重要である。これも条件により異なるが、標準的なものとして酵母細胞の場合を例にあげると、細胞 1 個は 1 秒間に約 10¹¹ 個のグルコース分子を代謝する。いいかえれば、微生物は 1 秒当り自体重とほぼ同重量のグルコースを代謝することになり、このことは記憶しておくと便利である。

熱量についてもう少し詳しく述べると、添加した基質(グルコースを用いる場合が一般的である)と代謝産物の標準生成熱を用いて計算したエンタルピー変化は、熱測定で得た代謝熱の値と多くの場合、実験誤差範囲内で一致する。すなわち、系は複雑であるが、熱変化のみを限り副次的な反応系は無視できるのである。また特定の中間物を蓄積し、その後さらにそれが分解されるというように段階的な異化作用を示すものも多くみられる。代謝状態を正しく把握しておかないと熱発生の定量的な解析はできない。

細胞懸濁液は赤血球の場合と同様、エネルギー源を加えなくても熱発生がある。これは周囲から摂取した物質の異化のほかに細胞内成分の分解合成が常時おこなわれていることにもとづく。この生命維持のための生体成分の相互変換は非常に複雑であり、それが熱測定の対象として詳細に解析されるのはまだまだ先のことであろう。

増殖系を対象とする場合は、物質代謝という点では非増殖系の場合に比べて、細胞成分の合成という同化過程が大きな割合で含まれてくるため、その解析は一段とむづかしくなる。細胞生成におけるエンタルピー変化は田宮により糸状菌 (*Asp. oryzae*) の増殖系の熱測定からもとめられた¹²⁾。その詳細は文献 12 を参照して頂くことにして結果だけを記す。

ガラクトース ($C_6H_{12}O_6$) を基質として 1 g の糸状菌菌体が生成するときの熱化学方程式が次のように得られた。



細胞生成においても $\Delta H < 0$ となることは特に興味深いことである。またこの系では計算によると、実測された発熱量のうち、90% が異化過程、すなわちガラクトースの燃焼熱にもとづくものになる。このように増殖系であっても、非増殖系のところで述べたと同様、実際は大部分異化過程の熱変化をみていることになる。

増殖に伴う熱発生のパターン(増殖サーモグラム、growth thermogram)は増殖の様式に特異的であるため、これを菌種の同定、代謝様式の判定、生育速度論、醗酵管理などに利用することができる。微生物増殖系の熱測定の応用については、装置も含めて後にあらためて紹介する。

3. 組 織

細胞の集合体である組織も熱測定の対象としてとりあげられている。主として生理学的な立場からの研究であるが、筋肉と植物種子を中心に述べる。

3.1 筋 肉

化学エネルギーを機械エネルギーに変換する場である筋肉は、その収縮に際して熱を発生することが古くから知られており、その熱量を測定する試みはすでに 19 世紀に開始されている。生体組織である筋肉は静止時においても発熱がある(約 $250 \mu W g^{-1}$)。これに刺激を加えると収縮がおり、1 回の収縮でおよそ $10 \text{ mJ } g^{-1}$ 程度の熱を放出する。収縮弛緩の--周期は約 1 秒であるから(図 3.11)、その間の熱出力は $10 \text{ mW } g^{-1}$ であり、静止時のおよそ 40 倍に達することになる。

収縮に際しての熱発生は大別して、初期熱(initial heat)

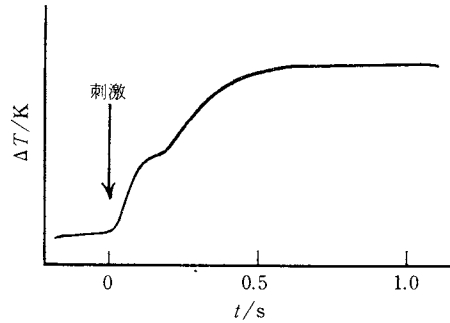


図 3.11 筋肉収縮の熱発生

および回復熱(recovery heat)にわけられる。前者は筋肉の形態的变化に先立つ活動化熱(activation heat)と呼ばれる急激な熱発生と筋肉の短縮ともなう短縮熱(shortening heat)、それに弛緩ともなう弛緩熱(relaxation heat)よりなる。後者は収縮によって消費された化学エネルギーの回復ともなうものであり、酸素消費をとまなうものと酸素消費をとまなわないもの、の二つの過程に分けることができる。全熱発生量に対するこれらの内訳は、筋の種類や条件により異なるものの、きわめて大まかには表 3.1 に示した通りである。

発熱は初期熱および回復熱でほぼ二分されていることになる。このうち、回復熱は酸素消費をとまなう過程によるものが大部分を占め、乳酸の酸化による ATP の再生率の場がこれに当ると考えられている。生理学者により熱測定の対象とされてきたのは主として初期熱の方であるが、収縮弛緩が秒単位の速さのものであり、その熱発生の時間経過を知る必要から、測定はきわめて時定数の短い検熱方式によらねばならない。今世紀初頭にはじまる A.V.Hill¹³⁾ の熱電対を検熱体とする装置が今日も採用されている。普通は 50 対程度の熱電対を用い、筋肉に直に貼りつけてその熱変化を測定する。補助的なものとして、筋肉に電気刺激を与えるための電極、校正用のヒーター等が装備される。その詳細は山田の総説¹⁴⁾ に述べられているのでそれを参照されたい。

1 回の収縮で約 $10 \text{ mJ } g^{-1}$ の熱を放出する(初期熱)。筋肉の熱容量はほぼ水のそれに等しいから、これに対応する筋肉の温度上昇は 0.003 K である。熱起電力 $40 \mu V K^{-1}$

表 3.1 筋肉収縮時の熱発生内訳

初期熱	活動化熱	20 %
	短縮熱	10
	弛緩熱	20
回復熱	酸素消費をとまなわない過程	5
	酸素消費をとまなう過程	45
全 熱 量		100

の熱電対を50対用いて検出しても熱電堆両端の電圧は6 μ Vにしかない。これは各種のノイズに対してかなり厳しい条件である。ミラー反射の検流計と写真記録が一般的な方法になっているが、オッシロスコープなどの技術を検出端にとり入れていくべきであろう。筋肉試料の形態が多様であるため、研究者が検出体周辺を自作して用いるのが普通であるが、熱発生生の生化学的対応がますます必要になってきている現状から、筋収縮研究用の一般性のある熱測定装置が機器メーカーにより開発されることを期待したい。

初期熱よりも回復熱、あるいは全熱量を問題にする場合には、検熱体の時定数を多少犠牲にしても、感度を高くして精度良い測定をすることの方が望ましい。市販の熱量計でもこの目的に利用できるものがある。ただ生化学熱測定一般が熱量、試料とも微量化の方向に向いつつあり、比較的大きな組織である筋肉を小容量の熱量計セルの中に持ち込むのがむづかしい場合が多い。

図3.12はLörincziらにより示された筋収縮熱測定用の熱量計である¹⁵⁾。検熱体としてコンスタンタン線に銅を電着する方法で製作した熱電対を組み、その対数は約5000対にも達する膨大なものである。時定数も145sと比較的短く、この種の目的には非常に巧妙に設計されたものといえよう。

近年、筋収縮の分子論的解明は急速に進められている。収縮熱をマイクロな反応系へ帰属させることができれば、その機構が一段と明らかとなることは疑いない。組織レ

ベルでの測定と平行して、単離した反応系でのエンタルピー変化測定を蓄積していかなければならない。クレアチンリン酸の加水分解、ATPaseによるATPの加水分解、トロポニンとCa⁺⁺の結合、その他かなりの系での熱測定例があるが、筋肉反応の全体像からすればまだまだ未知のものが多い。

上述のことと関連して、筋肉の熱発生生の検出が未知の反応の存在を予知する手段としてしばしば考えられてきた。ところが、エンタルピー変化が容易もしくは検知しえない程小さな反応もありうるから、熱発生である特定の反応系を予知することは慎重でなければならない。今後の研究方法のあり方の一つとして、赤血球の場合と同様、代謝系の阻害剤を用いて段階的に各反応系のエンタルピーレベルを詰めていくというのが有益であろう。Wolledgeはグリコリスの阻害剤としてヨード酢酸 (IAA)、クレアチンホスホトランスフェラーゼの阻害剤として1-フルオロ、2,4-ジニトロベンゼン (DNFB)を用いた実験例を紹介している¹⁶⁾。

筋肉と同じく興奮性の組織である神経繊維においても、刺激に対して熱発生がみられる。この場合の発熱は筋肉に比べて2ケタ位小さい。したがってさらに感度の高い測定が必要となるが、短時間の変化であるので、刺激を反復してその都度の熱電対出力を積算し、シグナルノイズ比を大きくするという工夫がなされている¹⁷⁾。

3.2 植物種子および切片

発芽機能を持つ種子は生合成(細胞分裂)をおこなうために多量のエネルギーを必要とし、そのため異化作用も盛んである。発芽にともなう熱発生も古くから観察されてきた¹⁸⁾。種子に対して適当な水分を滴下すると、初期に湿潤にともなう急激な熱変化(物理過程)があり、ついで7,8時間日頃から生化学代謝によるゆるやかな熱変化(生化学過程)を示す。図3.13はカルヴェの熱量計で小麦種子の発芽の熱変化をみたものであるが¹⁸⁾、このパターンは植物一般に共通している。図の横軸の時間からわかるように、熱変化は非常にゆるやかであり、サーモグラムは真の thermogenesis を与えるものとみなすことができる*。

植物種子の発芽の thermogenesis は基本的には図3.13のようであるが、その形状が植物種に特異的であることが小麦、トウモロコシ、セルリ、キャベツ等の種子を用いて示されている¹⁸⁾。生理学的立場での分析が今後平行して進められるようになれば、さらに新しい展開が期待されるが、まだそのような試みはあまり目立たない。

*熱伝導速度が熱発生速度に比べ著しく速いため、熱量計出力は熱量計内部の温度変化の微分型とみなして差支えない。

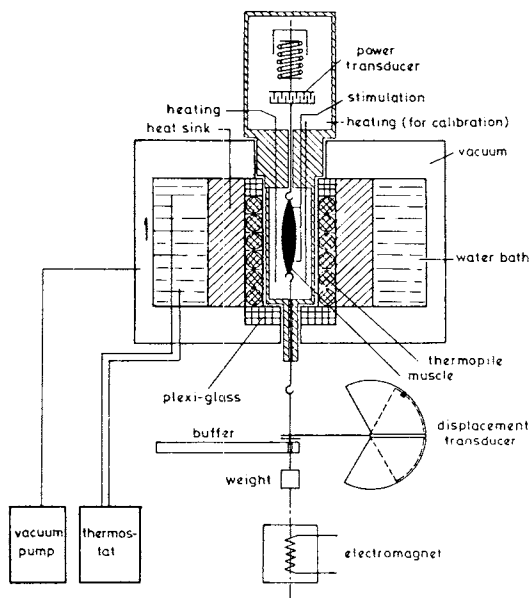


図3.12 Lörincziらの筋収縮熱測定用熱量計¹⁵⁾

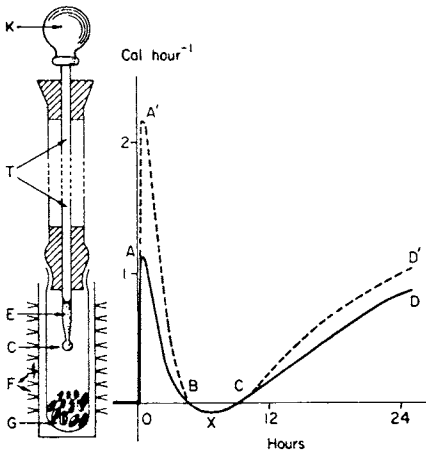


図 3.13 小麦種子の発芽の熱測定¹⁸⁾

カルヴェの熱量計使用。左側はセルの部分で、Tは1 cm³の水を含むガラス管、Kはゴムキャップ、Fは熱電対、Gは小麦種子1 g (32粒)。ゴムキャップを押して、Eの水をCから種子に滴下する。サーモグラムのOABは物理過程、BXCはラグ、CDは生化学過程、点線は脱水した小麦種子についてのもの。

有効な手段の一つとしてここでも代謝阻害剤を用いた実験が考えられる。呼吸系の阻害剤であるジニトロフェノール (DNP) で処理した種子の熱発生が、未処理のものに比べ吸収した酸素1 mol 当り約 300 kJ も高いという報告がある¹⁹⁾。これはATP生成系の脱共役因子であるDNPにより、本来ATPの形で貯えられるべきエネルギーが熱エネルギーとして放出されるためと推定され、その量は呼吸系のATP生成から理論的に予測されるエンタルピー変化と一致したオーダーにある。

図 3.14 はジャガイモ切片が示す呼吸熱である²⁰⁾。ジャガイモを一定厚さ、一定断面積になるよう切り抜き、熱量計セルに置く。気相部を窒素で置換しておいて熱平衡にした後、窒素を酸素で置き換えて、組織の呼吸(酸素吸収)にともなう熱発生を記録したものである。別個に測定したグルコース6-リン酸脱水素酵素(ペントースサイクルの入口に位置するもの)の活性の変動を同時に示してあるが、両者がよく対応しているのがわかる。また破線はタンパク質合成系の阻害剤であるクロロマイセチンで処理した切片の示すサーモグラムで、発熱が未処理のもののはほぼ2倍になる。生合成が殆んどおこなわれなくなり、組織が早く死に向うが、生体成分の相互交換がくずれて、化学エネルギーが熱エネルギーとして放出されるのであろう。

いくつかの例を筆者の勝手な選択にもとづいて紹介してきた。生化学に対する寄与という点では、まだまだ補

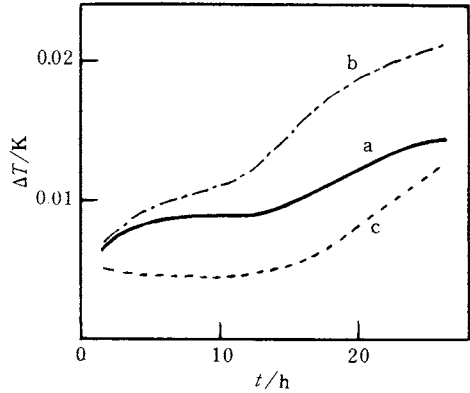


図 3.14 ジャガイモ切片が示す呼吸熱

試料ジャガイモ組織片直径 36 mm 厚さ 3 mm、温度 298 K。気相部をN₂からO₂へ置き換えた後の温度変化を記録。

a) 正常ジャガイモ、b) クロロマイセチン処理ジャガイモ、c) 別個に測定した正常組織中のグルコース6-リン酸脱水素酵素活性の変化。

助的な手段にすぎないし、熱変化がもつ非特異的な性質を欠点とみるかぎり、今後もそうした位置づけは続くだろう。けれども、生体をマクロにとらえる場合にこそ、このような非特異性が有効であるという見方もできる。身近な材料でその適用の可能性を検討して頂きたい。(つづく)

文 献

- 1) M. Poe, H. Gutfreund, R. W. Estabrook, *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 204 (1967)
- 2) 中野善行, 大阪府立大学農学部卒業論文(1976)
- 3) J. M. Boggs, D. D. Wood, M. A. Moscarello, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **16**, 2325 (1977)
- 4) D. L. Melchior, H. J. Morowitz, J. M. Sturtevant, T. Y. Tsong, *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 114 (1970)
- 5) S. Mabrey, G. Powis, J. B. Schenkman, T. R. Tritton, *J. Biol. Chem.* **252**, 2929 (1977)
- 6) 加藤京子, 高橋克忠, 尾藤行雄, 第13回熱測定討論会 東京(1977)
- 7) M. Y. Rosseneu, F. Soetewey, V. Blaton, J. Lievens, H. Peeters, *Chem. Phys. Lipids* **13**, 203 (1974)
- 8) M. Y. Rosseneu, F. Soetewey, V. Blaton, J. Lievens, H. Peeters, *Chem. Phys. Lipids* **17**, 38 (1976)
- 9) 滝沢俊治, 林 浩平, 第13回熱測定討論会 東京(1977)
- 10) M. Rosseneu, F. Soetewey, M. Lievens, R. Vercaemst, H. Peeters, *Eur. J. Biochem.* **79**,

- 251 (1977)
- 11) 水上茂樹, 蛋白質, 核酸, 酵素 **21**, 544 (1976)
 - 12) H. Tamiya, A. Yamamoto, *Acta Phytochimica* **7**, 245 (1933); A. Yamamoto, S. Yamagata, *ibid.* **8**, 245 (1935); 田宮 博. "熱・温度測定と熱分析 1975", p. 19, 科学技術社 (1975); 高橋克忠, "新実験化学講座" (日本化学会編) 2巻 p. 329, 丸善 (1977)
 - 13) A. V. Hill, "Trail and Trials in Physiology", Edward Arnold, London (1965)
 - 14) 山田和広, 生体の科学 **24**, 136 (1973)
 - 15) D. Lörinczi, Z. Futó, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 371 (1974); *ibid.* **9**, 383 (1974)
 - 16) R. C. Woledge, *Pestic. Sci.* **6**, 305 (1975)
 - 17) J. V. Howarth, R. D. Keynes, J. M. Ritchie, *J. Physiol. Lond.* **194**, 745 (1968)
 - 18) E. Calvet, H. Prat, "Récent Progrès en Microcalorimétrie", p. 113, Dunod, Paris (1958); H. Prat, "Biochemical Microcalorimetry", ed by H. D. Brown, p. 181, Academic Press, New York (1969)
 - 19) J. R. Lacher, A. A. Amador, *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci. (Paris)* **156**, 427 (1967)
 - 20) 高橋克忠, 小野宗三郎, 第3回熱測定討論会 大阪 (1967)

IUPAC 熱力学委員会の報告とお願い

"TEMPERED" Gibbs Energy について

IUPACの熱力学委員会では, "「物理・化学量および単位」に関する記号と述語の手引"(いわゆるグリーンブック)の補足として, "状態とプロセスの記号・化学熱力学における「標準」の意味・および熱力学関数表に用いられる関数についての注意"と題するAppendixの刊行を準備しているが, そのなかに, かなり問題があると思われる新しい用語の提案が含まれているので, ここに紹介し, 大方のご意見をいただきたく思う。

問題は, いわゆる自由エネルギー関数として知られている次の関数の名称と記号についてである。

$$-[G^\circ(T) - H^\circ(0)]/T \quad (1)$$

または

$$-[G^\circ(T) - H^\circ(298.15\text{K})]/T \quad (2)$$

この関数は, 1930年にGiauqueにより提案されて以来その有用性が認められ, JANAFのデータブックその他の熱力学データの表示に広く用いられてきているが, その正式な名称・記号をいまだ持っていないために, テーブルや論文中では(1), (2)式のまま記述せねばならず, はなはだ不便であった(しばしばfree energy functionの頭文字をとって *fef* と略記されるが, これは正式なものではない)。そこで, これに統一的な名称・記号を, ということで, 正式に提案されているのが, 「Tempered Gibbs Energy」という名称と, 記号 Φ° ((2)式を特に区別するときは Φ'° とする)である。これは米国の委員が米国カロリメトリー会議の決議の形で提案したもので, temper とは, 「温度で割る」意味と, 慣用されているギブスエネルギー (G) の最大の欠点である温度勾配の大きいことをゆるやかにした関数, との意味を併せ持たせたものだ, と説明されている。

これに対して, 記号 Φ についてはあまり強い異論はないものの, Temperedの語感, 特に日本語などへの適訳が見つかり難いことなどの問題が指摘された。しかし, 最近, 熱力学委員会委員長のLaffitte教授は, この問題にできるだけ早く結着をつけ, 強い異論がなければ, 原案通りに決定したい, との意向を示してきた。

筆者としては, 名称・記号の統一化には賛成であるが「Tempered」という語のなじみのなさや日本語として適訳をみつけ得るかどうか, という点で, 問題があるように思われるので, 若干の検討の日時を欲しい旨返答してある。根本的にこの語を採用しないこととするには, かなりの努力を要すると思われるので, でき得れば, この語への統一的な適訳を見出す努力をしたい, と考えている。熱測定学会会員諸賢のお知恵をお借しただければ幸いである。

なお, このほかの目新しい点としては, 熱力学関数を表示する場合に, 従来の C_p° , S° などにかわって, C_p°/R , S°/R , $\{H^\circ(T) - H^\circ(0)\}/RT$, Φ°/R , Φ'°/R などの無次元数として示すことが勧告されることになる。そしてこれらの名称は, rationalをつけて, たとえばrational entropyなどと呼ぶことが提案されている。この語についても, 統一的な訳語を決めることが望ましく, 機会を見て, アンケートその他で皆様のご意見を承りたく思っている。

以上, IUPAC委員会の報告を兼ねてのお願いを記しましたが, ご意見を下記までお寄せいただければ幸いです。

〒113 東京都文京区本郷 東大工学部原子力工学科
高橋洋一 (IUPAC熱力学委員会委員)