

生体膜の走査カロリメトリー

生体膜は膜構造の内部環境を保護するばかりでなく、物質透過、酸素作用等重要な生体機能発現の場である。生体膜の基本構造は運動性に富んだリン脂質二重層に各種蛋白質が埋めこまれたモザイクで、膜の内側と外側では蛋白質、脂質共に組成、構造のことなる非対称性を示している。走査カロリメトリーによる生体膜の研究は主としてリン脂質二重層の温度転移に関するもので人工膜モデルと生物膜との研究に大別できる。

人工膜モデルは生体膜の重要成分であるリン脂質を主体に調製した多重層リポソームまたはベジクルで、脂肪酸組成のわかった合成リン脂質が用いられる場合が多い。

初期には主にDSCが用いられたが近年 Ackerman¹⁾, Biltonen²⁾, Sturtevant³⁾等の熱測定グループで各種リン脂質およびその二成分混合系のモデル膜について熱容量差測定が行われている。その結果およびX線回折、スピラベルESR, NMR, フリーズフラクチュアー電子顕微鏡観察等の研究データを総合すると、純粋な合成リン脂質でも相転移は連続的で、理想的な一次転移とはことなり転移中に液晶相とゲル相の二層が共存する相分離の状態を経過する。さらにしばしば主な転移の前後に前融解、前凍結と名付けられる副転移が見られる。またpH、無機イオンの存在、調製方法によって転移温度、転移エンタルピーも変化することが明らかになった。二成分以上の混合系の場合はさらに複雑でサーモグラムのピークの帰属も不明なものがあり、評価された熱力学量に対する定量的な議論は特に慎重にしなければならない。モデル膜の熱測定で生物学的に興味あるのは脂質と蛋

Table 1 Summary of effects of different proteins on several properties of phospholipid bilayers and monolayers⁽⁴⁾

Group	Protein	(A) Area per molecule in mono- layers	(P) Vesicle permeability to sodium	(ΔH) Enthalpy of acyl chain melting	(T_c) Temperature of acyl chain melting
1	Ribonuclease	None	small increase	increase	none
	Polylysine	—	small increase	increase	increase
2	Basic myelin protein (A1)	Increase	large increase	decrease	decrease
	Cytochrome c	Increase	large increase	decrease	decrease
3	Major myelin proteolipid (N-2)	Increase	large increase	decrease	none
	Gramicidin A	Increase	large increase	decrease	none

Table 2 Summary of the differential scanning calorimetry and enzymatic activity data⁽⁶⁾

	Transition midpoint temperature	Width of transition	Enthalpy of melting	Discontinuity temperature in Arrhenius plot	Activation energy (E_A /kcal mol ⁻¹)	
	T_m /°C	ΔT /°C	ΔH_m /mcal mg ⁻¹	T_K /°C	Below T_K	Above T_K
Microsomes	≈ 28	≈ 22	≈ 0.21	≈ 21	13.7	5.9
Mitosomes + Δ^1 -THC	≈ 26	≈ 20	≈ 0.05	—	8.6	—
Extracted lipids	≈ 16	≈ 11	≈ 0.24			
Extracted lipids + Δ^1 -THC	≈ 16	≈ 11	≈ 0.16			

Δ^1 -THC, Δ^1 -tetrahydrocannabinol.

筋肉タンパク質の関与する反応 のエンタルピー変化 (I)

白質の相互作用⁴⁾、麻薬等薬剤の作用機構⁵⁾の研究である。PapahadjopoulosらはDSCを用いてリン脂質膜に対する蛋白質の作用をしらべている。Table 1は基礎的な研究結果をまとめたものである⁴⁾。DSC測定, 単分子膜の面積変化, ベジクルのナトリウム透過性等多方面の観察から蛋白質と脂質の相互作用を以下の三つに分類した。(1)はリボヌクレエース, ポリリジンで蛋白質は二重層表面に静電的に結合している。(2)はチトクロームCおよびミエリンのA1蛋白質で結合は静電的であるが結合した後一部分二重層内に入るか, または二重層を変形する。(3)はミエリンのプロテオリピッドN-2, グラミシジンAで二重層内部に埋め込まれ, 周囲の脂質と疎水結合しているが大部分の二重層の構造は乱していない。現在酵素処理, 化学修飾, 電顕像等により赤血球膜等にこの様な存在様式の蛋白質があることが確認されている。

生物膜の熱測定では膜の生物機能の温度依存性と脂質二重層の温度転移との対応が研究されている。Table 2はBackらのDSCによる肝ミクロゾーム膜の実験結果を示したものである⁶⁾。抽出した脂質と膜では転移温度, 転移エンタルピー共に非常にことになっており, 二重層の構造の相違—主として蛋白質の影響—を示すものと思われる。鎮静剤 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールを添加すると脂質, 膜の転移エンタルピーが減少し, 酵素活性のArrheniusプロットの折れ曲がりが見えなくなるのは興味深い。生物膜の酵素活性の温度特性は直接には酵素蛋白質のミクロな脂質環境によって制御されており熱測定で観察される二重層のマクロな転移とは必ずしも対応しないがこの場合は良く一致している。

文 献

- 1) A. Blume, T. Ackermann, *FEBS Letters* **43**, 71 (1974)
- 2) Y. Barenholz, J. Suurkusk, D. Mountcastle, T. E. Thompson, R. L. Biltonen, *Biochemistry* **15**, 2441 (1976)
- 3) S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3862 (1976)
- 4) D. Papahadjopoulos, M. Moscarello, E. H. Eylar, T. Isac, *Biochim. Biophys. Acta* **401**, 317 (1975)
- 5) J. Frenzel, K. Arnold, P. Nuhn, *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 185 (1978)
- 6) D. Bach, I. Bursuker, R. Goldman, *Biochim. Biophys. Acta* **469**, 171 (1977)

(藤田暉通)

筋収縮は化学エネルギーが機械的エネルギーに変換される過程であるから, その機構を理解する上でのエネルギー論的解析は不可欠である。

筋肉の熱発生の研究は100年以上も前にHelmholtzによって初めて試みられたが, 今世紀になって英国のA. V. Hillが熱電堆と検流計の改良を行ってから精密な測定が可能となり, 以後Hillを中心に詳細な研究が積み重ねられてきた。しかし, 筋収縮の主役となる筋タンパク質についての熱量測定は, 1970年代になってようやく始められるようになった。これは, 微量熱量計の開発・改良に負うばかりでなく, 筋肉の生理・生化学的知見の確立によって測定対象がはっきりしてきたことによるところが大きい。

主としてミオシンから構成されている太いフィラメントとアクチン・トロポミオシン・トロポニンから構成されている細いフィラメントが筋肉の基本構造である。太いフィラメントから出ている突起と細いフィラメントのアクチンとのATP存在下での相互作用によって張力が発生する。

ATPを分解する実体はミオシンであるが, その活性はきわめて弱い。アクチンの役割はこの活性を数百倍から千倍に高めることである。筋肉細胞内では, 細胞質の Ca^{++} 濃度が低いときには, このようなミオシンATPaseの活性化はおこらない。しかし, Ca^{++} 濃度が 10^{-6} M以上になると, Ca^{++} がトロポニンに結合して細いフィラメントの構造が変化する。その結果, ミオシン-アクチン相互作用, すなわち, 太いフィラメントと細いフィラメントとの相互作用が可能になる。

現在までのところ, トロポニンと Ca^{++} の結合^{1,2)}, ミオシンATPase反応中間過程のひとつであるADPのミオシンおよび活性サブフラグメントからの解離^{3,4,5)}については熱量測定によって ΔH が求められ, 後者の場合にはさらに他の熱力学的パラメーターもえられ, 別の方法で求められている値と比較できる。ミオシンATPase反応中間過程の ΔH 評価は山田ら⁶⁾によって初めて試みられた。単離されたアクチンとミオシンは, ヌクレオチドが存在しないときに強く結合する。この相互作用の ΔH 評価もすでにエンタルピー滴定法で行われている³⁾。

トロポニンへの Ca^{++} の結合

トロポニンは筋肉100 gあたり約7 μ mol含まれている分子量80,000の球状タンパク質である。三つのサブユニット, TN-T(分子量 $\approx$ 40,000), TN-I($\approx$ 23,000), TN-C($\approx$ 18,000)から構成されている。これらのサブ

ユニットはそれぞれ単離、精製することができる。

山田ら¹⁾はまずトロポニンへの Ca^{++} の結合をRhesca製回転型微量熱量計で調べた。1分子のトロポニンは4個の Ca^{++} を結合するが、そのうちの2個の結合定数は $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、他の2個については $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ である。加える Ca^{++} 濃度を変えてhigh affinity siteとlow affinity siteへの結合熱を分別測定して、前者について -39 kJ mol^{-1} 、後者について -74 kJ mol^{-1} の値をえた(pH 7.0, 10°C)、熱量測定と同条件下では、 Ca^{++} 結合に伴う H^+ の遊離はほとんどないので、これらの値は Ca^{++} 結合反応の正味の ΔH である。ついで、山田(*Biochim. Biophys. Acta*, in press)は実際に Ca^{++} を結合するサブユニットTN-Cへの Ca^{++} 結合の熱発生をpH 8.4, 10°C で測定した。この実験では、同じTN-C溶液に Ca^{++} を少しずつ加えていき、その度毎の発熱量の測定を行い(エンタルピー滴定)、得られた結果について、結合定数 K と ΔH をパラメータにしてCurve fittingを行った。 K の確定した値をえることは困難であるが、約 10^6 M^{-1} と推定された。 ΔH 値が -20 kJ mol^{-1} (H^+ の遊離はやはりない)であるので、 Ca^{++} のTN-Cへの結合に伴い著しいエントロピーの増大のあることが示唆される。 Ca^{++} 結合に伴って、TN-Cはより固くコンパクトになることが、他の物理化学的研究によって示されている。したがって、 Ca^{++} 結合による結合環の形成それ自体はエントロピーを減少させるが、タンパク分子周辺の水分子がより自由になることによって大きな秩序の乱れがひきおこされて、全体としてはエントロピーが増加するのであらうと考えられる。

最近Potterら²⁾は同じ反応を 25°C においてLKB微量熱量計で測定して、 $\Delta H = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$ と報告している。この値は山田のえた値より大きいが、測定温度が高いことを考慮すると、TN-Cの Ca^{++} 結合は大きな負の熱容量変化を伴っていることを示唆し、“エントロピー増加= Ca^{++} 結合に伴う水分子の遊離”という解釈と矛盾しない。

筋肉が刺激されたとき、実際に張力を発生する前にみられる活動化熱は筋肉1gあたり約4mJであり、これまでその起源が不明であった。しかし、トロポニンへの Ca^{++} 結合が著しい発熱反応であることが見出されて、活動化熱の少なくとも一部はこの相互作用に由来すると考えることができるようになった。

文 献

- 1) K. Yamada, H. Mashima, S. Ebashi, *Proc. Japan Acad.* **52**, 252 (1976)
- 2) J. D. Potter, F. Hsu, H. J. Pownall, *J. Biol. Chem.* **252**, 2452 (1977)
- 3) R. C. Woledge, “Calorimetric studies of muscle and muscle proteins” in *Applications of calorimetry in Life Sciences* (I. Lamprecht, ed.), Walter de Gruyter, Berlin (1977)
- 4) T. Kodama, R. C. Woledge, *J. Biol. Chem.* **251**, 7499 (1976)
- 5) T. Kodama, I. D. Watson, R. C. Woledge, *J. Biol. Chem.* **252**, 8085 (1977)
- 6) Y. Yamada, H. Shimizu, H. Suga, *Biochim. Biophys. Acta* **305**, 642 (1973)

(児玉孝雄)