

## 生体エネルギー論と熱測定

中村 隆雄\*

### Calorimetries in Bioenergetics

Takao Nakamura\*

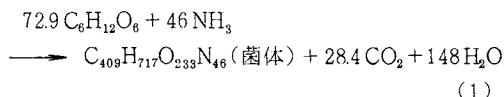
Since the time of pioneer work of Lavoisier in 18th century, calorimetry have been one of the fundamental approaches in the study of bioenergetics. A review of the historical background of the calorimetric investigations in the field of bioenergetics was briefly described. Our recent construction of a twin-type microcalorimeter equipped with rapid response microthermistors and oxygen electrode, which allows simultaneous recording of heat production and oxygen consumption in a small volume (5 cm<sup>3</sup>) of biochemical reaction systems, was introduced. Performance of the apparatus was tested with acid base neutralization reaction and some enzymatic reactions. Results from the measurements of the energy balance in the energy transducing reactions of rat liver mitochondria under various respiratory states were described with special interest on the mechanism and control of heat production in mitochondria by long chain unsaturated fatty acids.

生物体は多種類のタンパク質、核酸、多糖類、脂質その他の高分子、低分子量物質から構成されていて、これら物質はそれぞれ特異的な構造と反応性をもって細胞下構造、細胞、組織、器官さらに個体をつくり上げ、代謝、生長、運動などの生物活動を維持するための反応を行っている。これらの反応にはエネルギーの変換と流れを伴うので、エネルギー代謝の面からする生化学反応、生理的現象の解析(生体エネルギー論)は生物科学の重要な一分野をなしている。生体反応の熱測定は現代生体エネルギー論の一つの重要な研究手段であるが、他方筋肉の運動など生理現象に伴う熱発生を観察は古くMayer, Helmholtzらによるエネルギー保存則の確立のための重要な動機ともなった。

18世紀にLavoisierは動物が呼吸に際しO<sub>2</sub>を吸収しCO<sub>2</sub>を排出することを確かめ、氷カロリメーターによって動物の発熱量を測り、呼吸と燃焼とは同一の現象であることを示した<sup>1)</sup>。のち、Rubner(1892)は犬を熱量計の中にとじこめてO<sub>2</sub>消費量、CO<sub>2</sub>発生量と発熱量を測定し、食物がO<sub>2</sub>と化合(燃焼)して発する熱エネルギーの計算値と実測発熱量が一致することをみている。

1930年代に田宮らはコウジカビの菌体形成に伴う熱収支を研究した<sup>2)</sup>。それによればまず乾燥菌体を元素分

析して菌体を構成する物質の原子数比を求める。微量無機成分を無視すれば例えばグルコースを炭素源としたときの発育(同化)の過程は次の式であらわされる。



一方発育に必要なエネルギーもグルコースの消費(酸化)によって供給されるがそのグルコース量は生育中呼吸により消費されるO<sub>2</sub>量から求められる。そこで乾燥菌体の燃焼熱を測定し窒素代謝に関係する量を補正して(1)式の発育過程の熱収支が乾量グラム当り+0.7 kcalと計算された。またジュワーびん型熱量計の中で実際にカビを生育させ温度上昇から発熱量が実測された。O<sub>2</sub>消費量の測定から呼吸による発熱量を計算し実測値から差引いて(1)式の発育過程の熱収支を求めたところ乾量グラム当り+633 calの値が得られ計算値とよい一致を示した。即ち以上の実験からカビの菌体形成反応が全体として一つの発熱反応であることが明らかにされたのである。

動物の組織レベルでの熱測定としては、筋肉の運動や神経の刺激伝達などの生体活動に伴う熱発生を測定しようとする試みが古くHelmholtzらによりはじめられ、1910年以後Hillによって重要な発展がなされた<sup>3)</sup>。熱電堆を検出器として用い光電管をふくむ増幅器により測定が行われ、筋肉では一回の収縮で $3 \times 10^{-3}$  cal g<sup>-1</sup>程度の発熱量、神経ではその1,000分の1程度の発熱量が

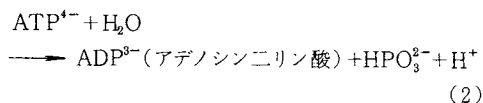
\*大阪大学理学部生物学科：豊中市待兼山町

Department of Biology, Faculty of Science,  
Osaka University, Toyonaka, Osaka 560

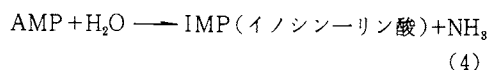
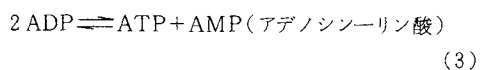
観察された。この研究はさらにその後の研究者によりうけつがれ、最近では筋肉から抽出精製された収縮性タンパク質ミオシンとATP(アデノシン三リン酸)との反応についてそのメカニズムとの関係で詳細に追究されている。しかしこの問題に関しては他の解説を期待してここではこれ以上ふれないこととする。

分子のレベルでみた生体エネルギー変換において中心的な役割をもつものはいわゆる高エネルギーリン酸化合物である。酵母抽出液による醗酵の際、糖のリン酸化が起こることはHarden, Youngらによって見出されていたが、はじめこれは単に以後の反応に適合するための修飾と考えられていた。しかしクレアチンリン酸が発見されこの物質が筋肉の収縮に伴って分解され特にモノヨード酢酸によって解糖反応を阻止した筋肉で分解が著しいこと、クレアチンリン酸が消費されつくすと共に筋肉は活動を停止することが見出された。さらに筋肉のなした仕事量とクレアチンリン酸減少量の間比例関係が存在することなどの観察からクレアチンリン酸が筋肉の運動のエネルギー源として働いていることが認められた。1927年Meyerhofはジュワーびん、反応槽、熱電堆とがルバノメーターの組合せでクレアチンリン酸の加水分解に伴い大きな熱発生があることを観測し、ここにエネルギー貯蔵庫としてのリン酸化合物、高エネルギーリン酸化合物または高エネルギーリン酸結合の概念が生れた<sup>4)</sup>。Meyerhofは他の多くのリン酸化合物(エステル)についてその加水分解の反応熱を測定したが、ATPなどいくつかの化合物については同様の大きな熱発生(8~12 kcal mol<sup>-1</sup>)を測定している<sup>5)</sup>。

Meyerhofの得た値は高エネルギーリン酸結合の考えを産み出すのに十分なものであったが、実はその値を求める過程には一つの重大な見過しがあつた。ATPはpH 8.0で加水分解するとき、



でこのときほぼ1:1で遊離される水素イオンは反応系に共存する緩衝液アニオン、酵素タンパクのアミノ酸残基の解離基(ヒスチジンのイミダゾールなど)に結合するので、観測される全発熱量にはこれらアニオンのプロトン結合熱が加算されている。これはMeyerhofの測定では考慮されていなかった。またMeyerhofがATPの分解に用いた反応系は酵素として筋肉抽出液をそのまま用いているので、その反応はATPの末端リン酸基の加水分解のみでなく



などの反応をふくむ複雑なもので反応(3)の $\Delta H$ に対する補正はなされていなかった。Podolski, Morales<sup>6)</sup>は筋肉から精製したミオシンをATP分解酵素として用い、加水分解により遊離されるオルトリン酸と水素イオン(pH 8.0でATP/モル当り1.0)の定量を発熱量測定と平行して行い、共存する緩衝剤アニオン(リン酸, グルシグリン, トリス)の水素イオン結合熱に対する補正を行った。その結果、 $\text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP}^{3-} + \text{HPO}_4^{2-}$ に対する値として $\Delta H = -4.7 \pm 0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ を得ている。pH 8.0ではさらに、 $\text{ADP}^{2-} \longrightarrow \text{ADP}^{3-} + \text{H}^+$ ,  $\Delta H < 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ が起こるがこの反応段階の $\Delta H$ は上の値の誤差範囲内の大きさである。ピロリン酸の加水分解についてはpH 7.3で $\Delta H = -5.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ が得られていて、これにくらべてもATPの加水分解の $\Delta H$ はむしろ小さい。このようにしてMeyerhofの得た $\Delta H$ 値は大きく修正されたが、しかしそのことを考慮しても高エネルギーリン酸結合の概念、ATPのリン酸結合の生体エネルギー変換反応における重要性は変らない。

生体エネルギー論研究における熱測定は、酵素反応、ミトコンドリア、クロロプラスト、ミクロソームなどの細胞下微細構造、細胞、器官など種々のレベルで最近急速にその重要性を増しつつある。ここではそのうちミトコンドリアのエネルギー代謝研究についての応用例を述べたい。ミトコンドリアは大きさ2~3 $\mu\text{m}$ の細胞内小器官でチトクロームの電子伝達系、多くの酵素系をふくみ細胞内の重要な物質代謝とエネルギー変換(ATP生産)、熱産生のものである。とくに熱産生についてのべれば、恒温動物における体温保持の機構は熱放散の調節と熱産生の調節とから成り立っている。寒冷時の熱産生の促進は筋肉のふるえによるATPの浪費とミトコンドリアの代謝亢進によっている。後者は特にいわゆる褐色脂肪組織<sup>7)</sup>に顕著で、この組織は幼生動物、寒冷にさらされた動物の頸~肩にかけての皮下に発達し動物の重要な熱源の一つであり断熱材でもある。この組織では脂肪層の中に電子伝達系成分含量の多いミトコンドリア(褐色)と毛細血管系、神経系が発達し寒冷刺激による神経系の興奮—アドレナリンの分泌による脂肪の分解、脂肪酸の遊離によりミトコンドリア呼吸系の活性化が起こり発熱量が増大してここを流れる血流を温める。あざらしの幼児は極寒の氷原上に産み落されてもこの機構による熱産生によって体温の保持が可能であるという。他の臓器のミトコンドリアでも同様に脂肪酸による代謝の亢進が起こるが、このとき著しい発熱の増大がみられることが筆者らにより確かめられた。以下述べる実験ではミトコンドリアに

において基質(食物)の酸化によって得られるエネルギーを利用したADPのリン酸化(酸化的リン酸化)が起こるときエネルギーがどのような効率でATPの形で蓄えられてゆくのか、またその熱産生の調節のメカニズムを明らかにするためサーミスターと酸素電極を併用したカロリメーターによりミトコンドリアの呼吸に伴う熱産生を種々の条件で研究した。

細胞からとり出されたミトコンドリアは浸透圧を調節したpH緩衝液中に置いて非常に不安定でその活性は変化しやすいから、その呼吸熱測定のためには、測定セルへの試料の導入、セル中の試料へ試薬の添加が容易で、しかも十分に感度が高く、変化の時間経過の記録ができる装置が必要である。図1はこのような目的のため作られた恒温壁熱量計で、反応セルとして5 cm<sup>3</sup>の小型ジュワーびん、検出器として、微小サーミスターを用いている<sup>8,9)</sup>。セルは気密としサーミスターと共に微小白金電極(0.2 mmφ)を挿入して試料溶液中の温度変化と酸素消費速度を同時に記録できる。セル部は全体を発泡スチロールで包んで硬質ビニール円筒に収め恒温水槽中に設置する。セルは双子型で一つを試料一つを対照としてそれぞれに特性の等しいサーミスターを用いてブリッジ回路の二つのアームとし温度ドリフトを補償する。ミトコンドリア浮遊液は調製したら実験直前まで氷冷保存の要がありそれでも2~3時間以内に使うことが望ましい。注射器にとった浮遊液を熱交換のため細いステンレスパイプを通してセルに注入し直ちに測定を開始する。温度平衡のため長い間置くとミトコンドリアの内蔵基質のためゆっくり呼吸が進み溶存酸素が使い切られてしまう。試薬添加時の混合およびサーミスターの自己加熱による局部的温度上昇を防ぐためマグネチックスターラーでセル内容を攪拌する。攪拌の機械的エネルギーは極く僅かであり、またブリッジ回路の電源に1.3 Vの水銀電池を用いたときサーミスターの自己加熱による溶液全体の温度上昇は10<sup>-6</sup> K s<sup>-1</sup>程度で無視できる。サーミスターは0.2~

0.3 mmφの芝浦電子製のもので薄いガラス被覆をもっている。B=3.400でΔT=0.01 Kに対しブリッジ回路の出力は20℃で140 μV 応答時間  $t_{1/2}$  = 50 msを得た。この応答時間は普通の条件でのミトコンドリアの呼吸熱の時間経過の測定には十分のものである。応答時間はサーミスター素子の粒子の大きさに依存し約1 mmφのものでは秒のオーダーとなる。空気飽和の溶液中の溶存酸素(常温で約250 μmol dm<sup>-3</sup>)を消費しつくすまでには0.01~0.1 Kの温度上昇があるから熱電堆による測定記録もできる。1967年Poeら<sup>10,11)</sup>がはじめてミトコンドリアの呼吸熱の測定に用いた装置では5対の銅コンスタンタン熱電対を用いて温度変化を記録している。しかし塩類をふくむ反応液に直接挿入する必要上合成樹脂の被膜を用いたため応答時間は数秒となっている。普通の実験条件ではミトコンドリアが溶存酸素を消費しつくすまでの時間は数分であるが反応は複雑な経過をたどるので応答の速い検出器を用いて時間経過をできるだけ忠実に記録する必要がある。またサーミスターを用いたときは条件により対照が設定し難いときでも簡便に温度変化が記録できる。酸素濃度の測定のためにはセルロス被膜をつけた白金電極と塩化銀電極の組合せが用いられる。ほかに必要に応じ各種のイオン電極も併用できる。

セル中の水はジュワーびんの管壁やスターラーのバーに接触しているから、その熱容量はこれらの部分への伝導による損失だけ大きい。セル中の水のみかけの熱容量はNaOH + HClの中和反応によって求められる。22.5℃でセルに20 ミリモル濃度のNaOH水溶液5 cm<sup>3</sup>を入れ187 ミリモル濃度のHCl水溶液20 mm<sup>3</sup>を添加すると図2 Aのように混合時間1~2秒で急激な温度上昇が記録される。希釈および反応のエンタルピー変化、ΔH = [-0.8 + (-56.4)] kJ mol<sup>-1</sup>と濃度から発熱量を計算し、(0.0428 J mol<sup>-1</sup>)、実測された温度上昇(0.0082 K ± 3%)から見かけの熱容量5.21 ± 0.16 J cm<sup>3</sup> K<sup>-1</sup>が得られた。以下この値を用い、実験は20~25℃の温度範囲でのみ行うから水の熱容量の温度変化は無視する。直接接触するジュワーびん壁への熱伝導は速く、みかけ上水の熱容量

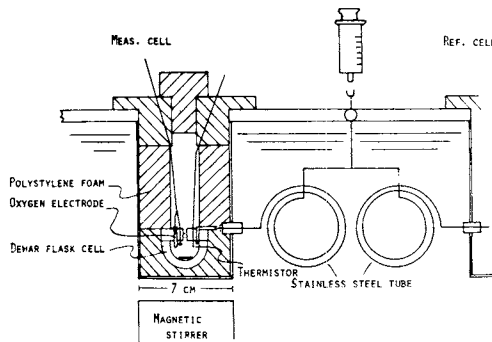


図1 カロリメーターの構成図

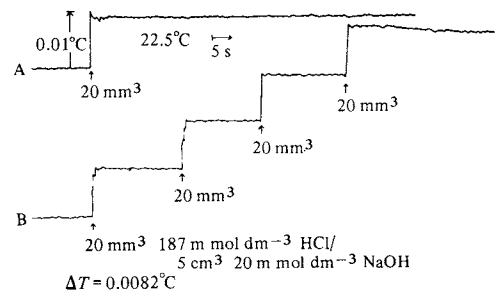
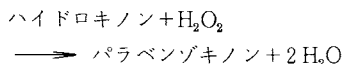


図2 図1の装置による中和反応の記録

は上のような大きさの値となるが周囲への熱漏洩は僅かで  $\Delta T \geq 0.01$  K のとき 3%/100s であった。但し  $\Delta T$  がこれより大きいとき (図 2B) はもっと大きな値をとる。以下の実験は全温度変化 0.01 K 以下、一つの発熱反応過程が 100 秒以内で実験し熱漏洩は無視する。以下酵素反応を用い二、三の検定実験を行った。

ハイドロキノン電子供与体とするペルオキシダーゼ反応



を測定した (図 3)。10 mol dm<sup>-3</sup> ハイドロキノン, 0.03 μmol dm<sup>-3</sup> ペルオキシダーゼをふくむ 0.1 mol dm<sup>-3</sup> クエン酸緩衝液 (pH 5.6) 5 cm<sup>3</sup> をセルに入れて 70 mol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mm<sup>3</sup> をマイクロピペットで添加すると反応が始まり、加えた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が消費しつくされるまでの発熱の経過が記録される。全温度変化 0.0107 K とときに求めた見かけの熱容量からこの反応の  $\Delta H = -2.0 \times 10^2$  kJ mol<sup>-1</sup> を得る。一方ハイドロキノン, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, パラベンゾキノン, H<sub>2</sub>O の生成熱の差から計算されるこの反応の  $\Delta H = -207$  kJ mol<sup>-1</sup> でよい一致と考えられる。この反応では pH 5.6 では水素イオンの生成消滅はないので緩衝イオンのプロトン結合熱は考慮しなくてよい。また緩衝液の熱容量は水と等しいとみなした。また上の計算ではハイドロキノン, ベンゾキノンの溶解熱に対する補正はしていない。

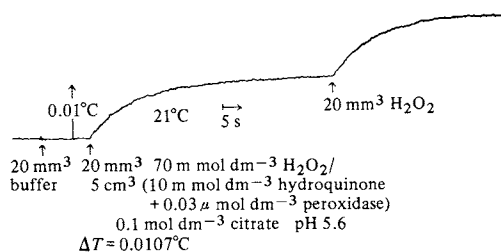


図 3 ペルオキシダーゼ反応の記録

グルコースオキシダーゼ反応を同じセルで発熱と酸素消費により平行記録した。

グルコース + O<sub>2</sub> → δ-グルコノラクトン + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 5 mol dm<sup>-3</sup> のグルコースをふくむ空気飽和の 0.1 mol dm<sup>-3</sup> クエン酸緩衝液 (pH 5.6) 5 cm<sup>3</sup> をセルに入れ 8 μmol dm<sup>-3</sup> グルコースオキシダーゼ 20 mm<sup>3</sup> をマイクロピペットで添加する。結果は図 4 のように反応開始後 6 秒おきに温度上昇を酸素消費量に対してプロットすれば挿入図のようになる。直線関係が得られてその傾斜からこの反応の  $\Delta H$  を求めると  $-1.5 \times 10^2$  kJ mol<sup>-1</sup> となった。ここで用いたグルコースオキシダーゼ溶液には酵素標品中に多量に含まれていた Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> が透析しても除ききれずに残

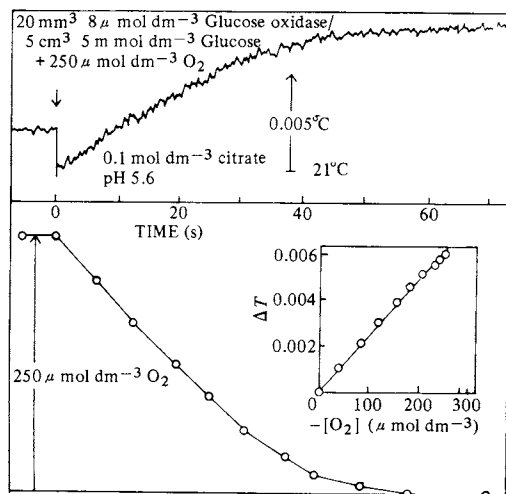
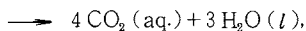
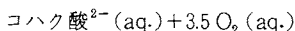


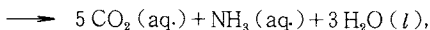
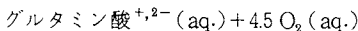
図 4 グルコースオキシダーゼ反応の記録  
 上は温度、下は酸素濃度の時間変化を示す。

っており、そのため図から明らかなように反応液に酵素液を添加した瞬間、希釈熱による急激な温度低下が記録される。しかしサーミスターの応答時間が十分速いためこの温度低下は以後の反応による発熱とは図上にはっきり区別できる。検出器の応答が遅いときはこのような区別は不明瞭となる。

図 5 はミトコンドリア浮遊液について行った呼吸と発熱の同時記録の例である。(a) は呼吸基質コハク酸の添加により呼吸・発熱が促進されること、(b), (c) では ADP またはジニトロフェノール (DNP) 添加により両活性がさらに亢進することを示している。(c) のようにある呼吸状態における発熱量と O<sub>2</sub> 消費量を求め、これから消費酸素 1 グラム原子当りのみかけのエンタルピー変化  $\Delta H_a$  を計算した (表 1)。DNP により脱共役したミトコンドリアの呼吸では  $\Delta H_a$  の値は用いた呼吸基質の燃焼熱にはほぼ等しかった。



$$\Delta H = -220.4 \text{ kJ/O}$$



$$\Delta H = -228.5 \text{ kJ/O}$$

脱共役していない条件では  $\Delta H_a$  は上の値の約 50% で、かなりの部分のエネルギーが何等かの形で熱として観測されない形に変化している。ペンタクロロフェノール (PCP) その他の脱共役剤もミトコンドリアの呼吸速度と  $\Delta H_a$  に対し DNP と似た効果を示す。ADP を添加すると ATP 合成反応のため  $\Delta H_a$  はさらに抑制される。この差額のエネルギーは O<sub>2</sub> が消費されてから反応液に DNP を加えミ

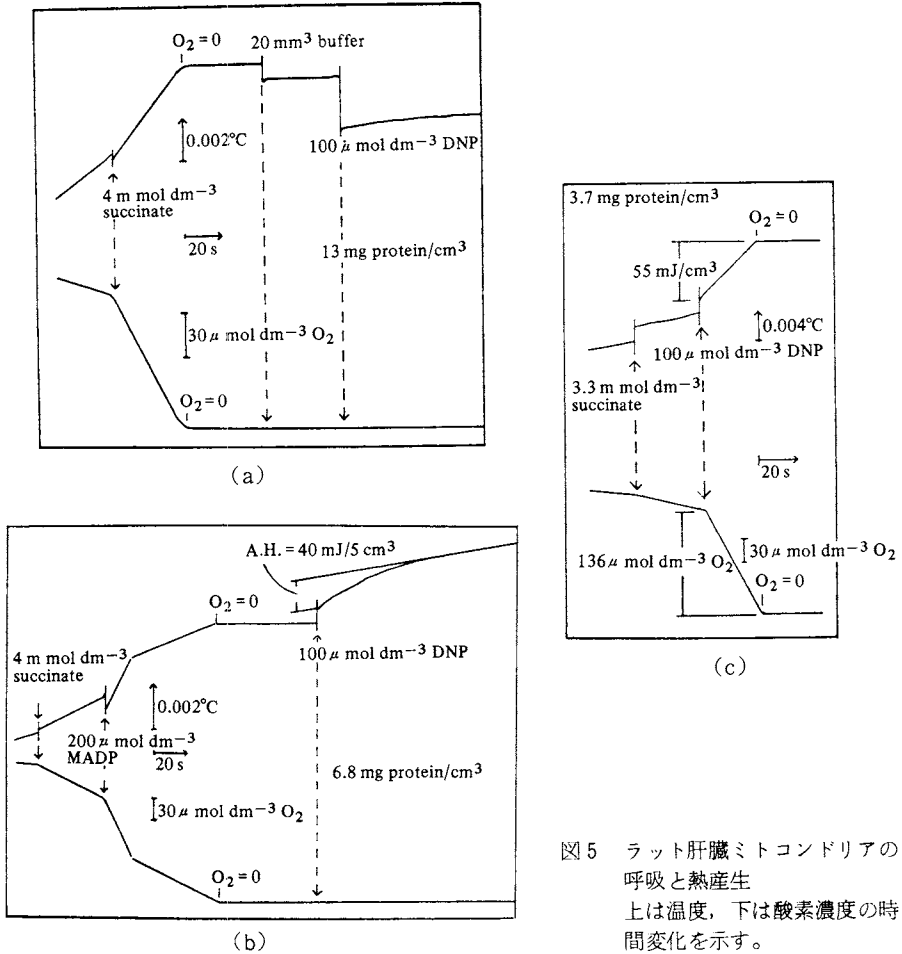


図5 ラット肝臓ミトコンドリアの呼吸と熱産生  
上は温度，下は酸素濃度の時間変化を示す。

表1 ラット肝臓ミトコンドリアの呼吸熱

基質	ADP	脱共役剤	$\Delta H_a$ (kJ/O)	摘要
コハク酸	-	-	-112±11	RCR <sup>a</sup> > 4.0
"	+	-	- 84± 9	ADP/O=1.7
"	-	DNP (100 μ mol dm <sup>-3</sup> )	-206±14	呼吸促進倍率 5.9
"	-	PCP (4.2 μ mol dm <sup>-3</sup> )	-165	" 2.0
"	-	バリノマイシン (0.23 μ mol dm <sup>-3</sup> )	-164	" 3.9
"	-	ラウリン酸 (1.3 m mol dm <sup>-3</sup> )	-230	" 2.9 (U <sub>80</sub> <sup>b</sup> =0.3 m mol dm <sup>-3</sup> )
"	-	ミリスチン酸 (5 m mol dm <sup>-3</sup> )	-222	" 2.5 (2 m mol dm <sup>-3</sup> )
"	-	オレイン酸	-213	" 2.4 (55 μ mol dm <sup>-3</sup> )
"	-	リノール酸	-245	" 2.8 (60 μ mol dm <sup>-3</sup> )
"	-	リノレン酸	-234	" 2.6 (50 μ mol dm <sup>-3</sup> )
グルタミン酸	-	-	-122±11	RCR = 5.1
"	+	-	- 68	ADP/O=2.4
"	-	DNP (100 μ mol dm <sup>-3</sup> )	-237±15	呼吸促進倍率 6.5

<sup>a</sup>呼吸調節比 (ADP添加による呼吸促進倍率)

<sup>b</sup>最大呼吸促進度の1/2を与える脂肪酸濃度

トコンドリアのATPaseを活性化させれば合成されたATPの加水分解が起こって再び熱として放出される(図5(b)のA.H.)。ミトコンドリアの熱発生は $\text{Ca}^{2+}$ イオンの添加によっても亢進される<sup>12)</sup>。イヌやヒトに $\text{Ca}^{2+}$ またはDNPを静脈注射すれば著しい発熱が起こることはよく知られている通りである。(DNPはかつて“やせ薬”として用いられたこともあるが強い副作用のため勿論現在はそのような目的には使われていない。)

ミトコンドリアのATPaseは長鎖脂肪酸の添加によって活性化されその結果呼吸の促進が起こることが知られている<sup>13,14)</sup>。種々の飽和および不飽和脂肪酸をミトコンドリアに加えると呼吸が促進されると共に $\Delta H_a$ も著しく増大することが知られた(表1)。不飽和脂肪酸は飽和のものにくらべミトコンドリアに対する親和性が高く、また血清アルブミンを添加して脂肪酸を除去すれば亢進した代謝速度は元のレベルに戻り、生きた細胞内で脂肪酸によるミトコンドリアの呼吸・発熱の調節メカニズムが存在することを示している。

#### 文 献

1) ラボアジエ, “化学のはじめ”(田中豊助, 原田紀子訳), 内田老鶴圃新社, 東京(1973)

2) 田宮 博, “熱・温度測定と熱分析” p. 19, 科学技術社, 東京(1975)

3) A. V. Hill, *Trails and Trials in Physiology*, Edward Arnold (Publishers) Ltd. London (1965)

4) F. Lipman, *Advances in Enzymology* **1**, 99 (1941)

5) O. Meyerhof, K. Lohman, *Biochem. Z.* **253**, 431 (1932)

6) R. J. Podolski, M. F. Morales, *J. Biol. Chem.* **218**, 945 (1955)

7) T. Flatmark, J. I. Pedersen, *Biochim. Biophys. Acta* **416**, 53 (1975)

8) T. Nakamura, I. Matsuoka, *J. Biochem.* **84**, 39 (1978)

9) T. Nakamura, *J. Biochem.* **83**, 1077 (1978)

10) M. Poe, H. Gutfreund, R. W. Estabrook, *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 204 (1967)

11) M. Poe, R. W. Estabrook, *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 320 (1968)

12) M. Poe, *Arch. Biochem. Biophys.* **132**, 377 (1969)

13) B. C. Pressman, H. A. Lardy, *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 458 (1956)

14) E. C. Slater, J. Rosing, A. Mol, *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 534 (1973)