

小特集：DSCによる熱容量測定
 〈コメント1〉

生物試料を対象とするDSC法と熱容量測定

高橋 克忠*

DSC法はダイナミックな立場での分析法であるとの観方が現在定着している。確かに今日広く普及している市販のDSC装置は殆どの場合、そのような立場で使用されている。けれども、生化学者、生物物理学者の間で用いられているDSC法という用語には平衡熱力学の立場での測定法という認識があることをここでまず述べておきたい。

生物系における scanning calorimetry はそれが開始された時点から“熱容量測定”(Heat Capacity Calorimetry)であった。すなわち、生体物質を対象とするDSC装置は比熱容量を示差的に測ることを目的として開発がすすめられたのである^{1~4)}。生体物質の比熱容量測定では、それが常に水溶液もしくは水を含む状態の系であり、非常に大きな水の熱容量と区別して、希薄に存在する溶存状態或いは水和状態の試料の熱容量を精度よく検出するために示差的方法を採用せざるを得ない。このため当初から熱容量差測定法としてのDSC法が適用されてきたのである。ところが1963年Perkin-Elmer社がDSC-1を商品化して以来、10年余を経てから、この簡便な装置が一部の生化学者の間に広まり、水の蒸発を防ぐ密封試料セルを用いて生体試料のDSC測定がなされるようになった。そして、ついにはその原理を十分にわきまえないで物理化学的な解析におよんだため、あるタンパク質の変性実験について、一つのDSCサーモグラムから活性化エネルギーとvan't Hoff エンタルピーを同時に評価する、という矛盾した研究論文が一流の生化学雑誌に公表されるまでにいたった⁵⁾。著者や論文審査にあたったレフェリーの誤りであるといってしまうまでもない。方法論に飢えている研究者が新しい装置に安易に飛びつくことにより生まれた笑えぬ喜劇であるが、今もこのことの理解が一部の研究者に浸透していないという事態が残念ながら続いている。

生体物質でこのDSC法が適用されるのは主として生

体高分子の相転移現象である。生体高分子の生物的機能はそれが空間で占める三次元構造と深くかかわっている。したがって比熱容量測定といっても水溶液中にあるこれらの溶質分子の熱容量を広い温度範囲で観測するのではなく、限られた温度領域でおこる構造転移に伴う過剰熱容量を観測することにより、その転移の性質が解析されている。具体的にはタンパク質の温度変性、DNAらせん構造の融解、或いは生体膜脂質二重層の液晶転移等の過程である。

この種の目的で設計された装置はいくつか知られているが^{1~4)}、このうちソ連のPrivalov教授およびアメリカのBrandts教授により設計されたものが商品化され、それぞれDASM-1M、Microcal MC-1として知られている。Microcal社のものはアメリカを中心にここ2,3年の間にその使用が急激に増えているが、性能の点ではPrivalov型のものの方がやや評価が高い。最近これに改良を加えたものがDASM-4として製造されており、我が国でも、(株)真空理工が一台保有している。

一般のDSCとの大きな違いは、試料容器が断熱制御されていることと、温度走査が炉体を加熱する方式でなく、試料溶液自体を加熱する方式をとっていることである。試料および対照セルにはそれぞれ等価の抵抗値 R を持つヒーターが組まれていて、一定電流 I を通じ昇温させていく。試料側の熱容量が(温度転移等のため)対照側のそれに比べて低くなり、両者の間に温度差が生じると、サーボ機構が働いて、二つのセルヒーターに流れる電流を一方は $I+\Delta I$ 、他方を $I-\Delta I$ となるように変化させ、セル間に生じた温度差を消去させる。この時の二つのセルの電気的加熱速度の差は

$$R(I+\Delta I)^2 - R(I-\Delta I)^2 = 4R \cdot I \Delta I$$

であり、二つのセル間の熱容量の差は温度差を打ち消すために余分に流した電流 ΔI に比例することがわかる。したがって、X-Yレコーダーを用い、温度をX軸に、 ΔI をY軸にとり、熱容量差-温度曲線を描かせることができる。図1はズブチリシンインヒビター-SSIと α -キモトリプシンの複合体の温度変性に伴うDSC曲線である⁶⁾。この例に示すように縦軸の単位は熱容量または比熱容量の単位で与えるのが一般的であり、この点一般のDSCサーモグラムでは endothermic heat flow とい

*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4 〒591

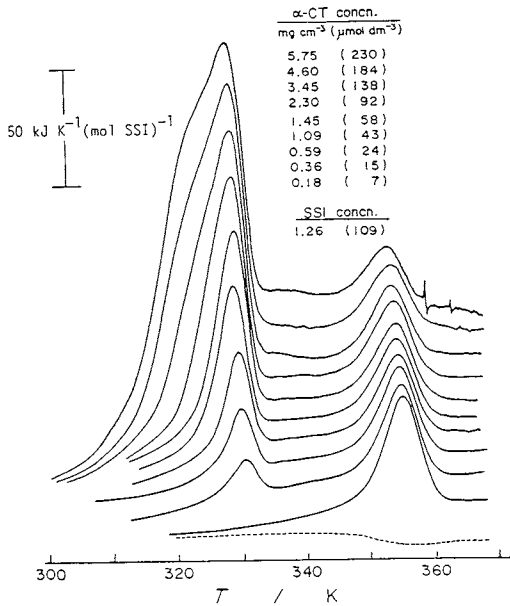


図1 タンパク質溶液のDSC法による熱容量差測定の一例

放線菌の生産するプロテアーゼインヒビター(SSI)とα-キモトリプシン(α-CT)の混合系の温度変性における過剰熱容量曲線⁹⁾⁾

う用語で $J s^{-1}$ という時間のスケールを含む単位で表示してあるのと大きな違いがあることに注目して頂きたい。

タンパク質の温度変性をみるとき昇温速度は $1 K min^{-1}$ を採るのが標準的である。この条件ではDASM-1Mを用いて測定する際の精度はごく控え目に見積って約 $80 \mu J K^{-1}$ (試料 $1 cm^3$) である。過剰熱容量 $c_{p,ex}$ の大きさは転移の midpoint 温度付近で極大値を持つが、その大きさはタンパク質の種類、溶媒の pH、イオン強度によって差があるとはいうものの、大体 $c_{p,ex}(max) = 2 \sim 4 JK^{-1}g^{-1}$ の大きさである。したがって、このような過剰熱容量を示す転移の過程を $\pm 5\%$ 程度の偏差内で求めるためには試料濃度は $0.2 \sim 0.1\%$ 以上でなければならないことになる。しかしタンパク質の物性をみるという立場からする実験条件としてはこの濃度は高すぎるとするのが普通である。分子間の相互作用も含めて評価してしまうためである。この点、改良型のDASM-4ではDASM-1Mに比べ5

倍程度感度が改善されていると筆者はその使用体験からみている。

尚、このようにして得られるDSC曲線は平衡熱力学の立場での状態を反映したものであり、したがって van't Hoff 式を基本にして理論的にDSC曲線を描くことも可能である。実際そのような立場から観測されたDSC曲線の curve fitting や curve deconvolution をもとにして転移のメカニズムをさらに詳しく解析するということが盛んにおこなわれており^{6~10)}、この分野への展開は益々広がる気配をみせている。

生物物質のDSC法による熱容量測定は上に述べたような現状にあるが、一般のDSC装置(断熱制御されていない、如体加熱方式のもの)が生体試料系において全く役に立たないのかというそうではない。ただ、その装置の性質をよく知り、それによって得られるシグナルから何が何処までいえるかを十分にわきまえておかないと先に述べた喜劇を繰り返すことになる。

熱容量差測定によるタンパク質の熱変性の研究については深田による優れた総説¹¹⁾があるのでより詳しいことはそれを参照されたい。

文 献

- 1) S. J. Gill, K. Beck, *Rev. Sci. Instr.* **36**, 274 (1965).
- 2) R. Danforth, H. Krakauer, J. M. Sturtevant, *Rev. Sci. Instr.* **38**, 484 (1967).
- 3) W. M. Jackson, J. F. Brandts, *Biochemistry* **9**, 224 (1970).
- 4) P. L. Privalov, V. V. Plotnikov, V. V. Filimonov, *J. Chem. Thermodyn.* **7**, 41 (1975).
- 5) A. L. Jacobson, H. Braun, *Biochim. Biophys. Acta* **493**, 142 (1977).
- 6) K. Takahashi, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **20**, 6185 (1981).
- 7) C. H. Spink, K. Muller, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **21**, 6598 (1982).
- 8) S. P. Manly, K. S. Matthews, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 3842 (1985).
- 9) H. Fukada, K. Takahashi, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 5109 (1985).
- 10) V. Edge, N. M. Allewell, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 5899 (1985).
- 11) 深田はるみ, 熱測定の進歩 **2**, 67 (1984)