

初心者のためのカロリメトリー

XIV. 生化学におけるカロリメトリー

高橋克忠*, 深田はるみ*

1. はじめに

生化学分野のカロリメトリーでは、生体物質の機能に関連した分子レベルでの測定とその解析が主であるが、それ以外にも微生物や細胞、組織レベルから生物個体レベルまで生物の持つ階層性に応じた多種多様の特徴ある測定が行われている。後者は、熱発生を指標とする分析手段としての応用が主流を占めるので、本稿では、熱力学量を得るという本来の意味でのカロリメトリーの対象となる生体高分子の生物的機能の発現・維持を理解するために行われる測定系について述べる。

生化学カロリメトリーといっても、その原理はこれまで本講座で解説されてきた方法論を逸脱するものではない。ただ、取扱う試料の量的、質的な違いから多少特殊性を免れ得ない面もあるであろう。タンパク質などの生体高分子については、mgのオーダーしか得られないことが決してまれではない。さらに、不安定であることが多い。また、ほとんどの試料が水溶液の状態であり、したがって、微量の希薄溶液で迅速に測定することの可能なマイクロカロリメーターが必要である。

生化学の熱測定では、酵素反応をはじめとする生体物質に固有の特異的の反応を対象とする例が多く、各種反応の熱力学量の集積がすすめられている。とはいえ、現実に熱測定が実施されたものは今日認められている生体物質、生体反応系の中ではほんのわずかの比率でしかない。1970年代以後の生化学における各種技術の進展は目覚しく、タンパク質等生体高分子の立体構造の解明や、タンパク質をコードしている核酸に関する情報がかなり明確に体系化されつつあり、それと並行してそれらの構造と生物的機能との関係を理解するための研究が急速に展開されている。その中で生体反応の定量的基礎データの収集も重要課題となる。反応熱のみならず、生体物質の構造の解明と相俟って走査カロリメトリーによる構造安定性の解析データも必要になってきた。この稿では、生体物質の構造ならびに機能との関連において熱力学的性質の解明を目的とした測定について、走査カロリメトリーおよび等温カロリメトリーの両面から解説する。

* 大阪府立大学農学部生物物理化学研：堺市百舌鳥梅町4 丁目591

2. 走査カロリメトリー

タンパク質をはじめとする生体物質試料はほとんどが水溶液の状態に取り扱われる。熱容量の絶対値よりもむしろ構造転移(変性)に伴う過剰熱容量の測定が機能との関連性からも重視される。この立場の測定では、溶媒である水の熱容量が大きいので、溶媒の熱容量との差を示差的に観測する熱容量差測定が常である。この目的のための装置としてはPrivalovの開発した断熱型示差走査マイクロカロリメーター^{1,2)}が現在もっとも優れたものとされている。

2.1 断熱型示差走査カロリメーター

熱容量を厳密に決定するには段階的に温度を上げて完全な平衡系で測定しなければならない。微量試料について、 1 mg cm^{-3} 或いはそれ以下という希薄溶液で、しかも溶質の熱容量だけをめきだして測定することは、静的な立場の熱容量測定法では感度に限界がある。その点、実用的に平衡系とみなせる範囲内の速い速度 ($0.1 \sim 1 \text{ K min}^{-1}$) で連続的に昇温させる動的立場での方法は測定対象を拡大させる。

Privalovのカロリメーターは、溶液を対象とし、微量試料で精度良く熱容量差を連続的に測定できるように設計されている。Fig. 1がその原理図である。試料および比較セルは二重の断熱制御壁で囲まれており、両セルに設けられている等価のヒーターで連続的に昇温させて

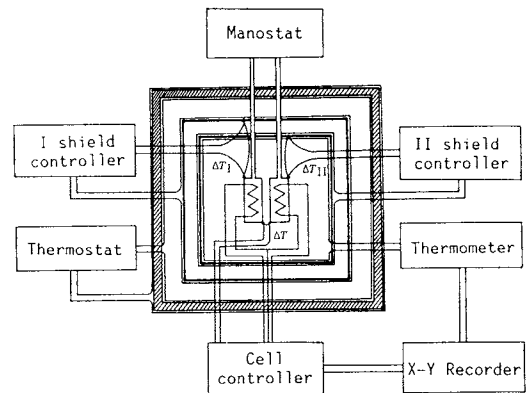


Fig. 1 Adiabatic differential scanning calorimeter designed by Privalov¹⁾.

いく。一般の DSC 装置がセルを取り囲む炉体の温度をヒーターで変化させているのに対し、このように試料自体を直接加熱する方式であることが高感度検出を保障している大きな要因であることを良く理解して頂きたい。

試料に熱容量の変化が生じ、二つのセルの間に温度差が生じるとそれを熱電対で検出し、ヒーター電流 I を $\pm \Delta I$ だけ加減させて常に同一温度を保つ。このときの ΔI がセル間の熱容量の差に比例する。

$$R(I + \Delta I)^2 - R(I - \Delta I)^2 = 4RI \cdot \Delta I \propto C_{p,ex} \quad (1)$$

この値を昇温速度で割れば熱容量差を与えることがわかる。実際の較正は、セルに取付けられた較正用ヒーターに通電して行う。X-Yレコーダーによりセル温度(実際には内部断熱壁温度)を X 軸、 ΔI を Y 軸にとって記録させる。セルは、当初、試料・比較側ともに内容積 1 cm^3 、直径 20 mm の金製円盤状であったが、最近、容積 0.5 cm^3 、内径 0.8 mm の白金製チューブからなるものに改良された。セル開口部は前者が各 1 つであるのに対し、後者ではスパイラルに巻かれたチューブそのものがセルを構成し、チューブの両端にあたる各二つの開口部がセルブロックの外側にでている。この改良された構造では溶液の注入が非常に楽になったことのほか、溶液のセル内における対流が抑制され、熱伝導の時定数も小さくなった。その結果、感度もかなり向上し、タンパク質溶液の場合、 0.01% の濃度での測定も可能となった。測定は -10°C から 120°C くらいの温度範囲で実施できる。この装置は現在、(株)真空理工が輸入特約を結び、国内でも購入できるようになっている。

同様の原理よりなる装置としてはアメリカの Microcal 社から発売されている走査カロリメーターがあり³⁾、アメリカ国内を中心に普及しつつある。

2.2 DSC

一般に DSC という場合には、断熱制御壁を持たないものを指し、多くの市販装置がある。それらの測定原理については本講座 III に詳しいのでここでは触れないが、生体物質系に適用する場合に注意すべき点を簡単に述べる。水溶液系を測定の対象とする DSC 装置も市販され、微量で迅速に測れることから、簡便に転移や変性を観測する手段として用いられている。しかし、タンパク質溶液などでは $1\sim$ 数% 或いは 10% 以上という高い濃度で測定されており、変性のみならずそれに伴っておこる凝集(会合)過程も同時に測定されているはずである。断熱型のものに比べて感度が不足するため、試料濃度を高くして測定する結果、このような二次的な非特異的会合が

ひきおこされる。このことを十分に認識した上でデータの取扱いをすべきである。さらにセルが固定型でないため、セル設置の接触部位における熱抵抗の再現性がベースラインの再現性を制限している。市販装置では多くのものがコンピューターを接続し、ソフト的にベースラインの曲がりを補正するような方式を採用しているが、そのような立場で得られた結果の有意さの範囲も十分わきまえておくべきである。

結晶の融解・転移、生体組織中の水の分析、高濃度試料におけるゲル化など、有効に利用される対象も数多くあるが以上のような装置条件をわきまえた上、慎重に取り組んで頂きたい。

2.3 転移の熱力学量の決定

タンパク質の熱変性などのように 10 K 以上の温度幅にわたって徐々に平衡がずれる場合、ベースラインの決め方が熱力学量の評価の信頼性を大きく左右する。特にタンパク質では変性前後の熱容量が Fig. 2 のように大きく異なるのが普通である。その差は変性に伴う熱容量変化 $\Delta C_{p,d}$ である。変性前後のベースラインを直線近似し、それらの直線間に細線で示すように転移曲線を描いて過剰熱容量を示す領域のベースラインとする。このピーク面積が転移エンタルピー ΔH_d を与える。ピーク温度 T_p はほぼ転移中点温度 $T_{1/2}$ に対応する。

いま、中間状態を含まないような二状態転移を想定し、A、B をそれぞれ転移前後の状態とすると、それらの熱力学関数は以下のように表される。

$$\begin{cases} H_A(T) = \int_{T_0}^T C_p^A dT \\ S_A(T) = \int_{T_0}^T \frac{C_p}{T} dT \\ G_A(T) = H_A(T) - TS_A(T) \end{cases} \quad (2)$$

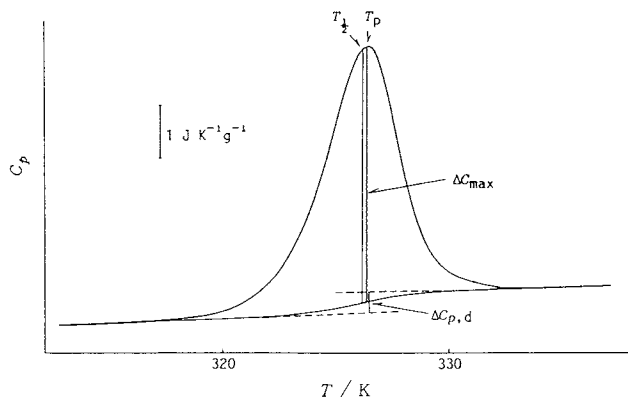


Fig. 2 Excess heat capacity curve observable with thermally induced conformational transition of biopolymers.

$$\begin{cases} H_B(T) = \Delta H_d(T_d) + \int_{T_d}^T \Delta C_{p,d} dT + H_A(T) \\ S_B(T) = \frac{\Delta H_d(T_d)}{T_d} + \int_{T_d}^T \frac{\Delta C_{p,d}}{T} dT + S_A(T) \\ G_B(T) = H_B(T) - T S_B(T) \end{cases} \quad (3)$$

ここで T_d は転移温度である。転移に基づく変化量は A, B の熱力学関数の差で与えられるから、

$$\Delta H_d = H_B(T) - H_A(T) = \Delta H_d(T_d) + \int_{T_d}^T \Delta C_{p,d} dT \quad (4)$$

$$\Delta S_d = S_B(T) - S_A(T) = \frac{\Delta H_d(T_d)}{T_d} + \int_{T_d}^T \frac{\Delta C_{p,d}}{T} dT \quad (5)$$

$$\Delta G_d = \Delta H_d - T \Delta S_d \quad (6)$$

式(4), (5), (6)により、転移の熱力学量の温度プロファイルを描くことができる。このうちとくに ΔG_d は任意の温度における熱力学的安定性を表す量として重要であり、それを実験的に導くことができるのが走査カロリメトリーの重要な役割である。

ただし、これらの式はあくまで二状態転移の系についてのみ適用できるものであることに注意しなければならない。多くの球状タンパク質の熱変性は実験誤差範囲内で二状態転移とみなしうるとされている^{4,6)}が、ドメイン構造をもつタンパク質や、サブユニット構造をもつタンパク質では中間状態を経て転移することが直感的に予測される。事実、二状態転移では説明されないような過剰熱容量曲線を示す球状タンパク質も数多く報告されており^{6~8)}、そのような系で curve resolution (curve deconvolution) の手法により、三状態あるいはそれ以上の多状態転移の立場で解析されている例が増えている^{9~11)}。

2.4 van't Hoff エンタルピーとの比較

二状態間の転移



において、平衡定数 K は次式で与えられる。

$$K = \frac{\{B\}}{\{A\}} = \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (8)$$

ここで $\{A\}$, $\{B\}$ は A, B の平衡濃度、 α は転移率 (fractional conversion) である。

A, B 間の平衡が温度によって変化することが van't Hoff の式

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad (9)$$

によって定式化されている。ここで ΔH_{vH} は平衡定数の温度依存性を示す尺度で、van't Hoff エンタルピーと呼び、直接カロリメトリーによって得られるエンタルピー

変化 ΔH_{cal} (calorimetric enthalpy) と区別して表すことにする。

過剰熱容量測定は ΔH_{cal} を導く手段でもあるが、その値と ΔH_{vH} を比較することは転移の性質を考える上で重要な意味をもっている。走査カロリメトリーが各温度において平衡状態を観測しているのであれば、過剰熱容量曲線からも ΔH_{vH} を導くことができる。

(9) 式より ΔH_{vH} を転移率 α を用いて表すと

$$\Delta H_{vH} = \frac{RT^2}{\alpha(1-\alpha)} \frac{d\alpha}{dT} \quad (10)$$

となる。 $K=1$, すなわち転移中点 ($\alpha=1/2$) の温度を $T_{1/2}$ とすると (10) 式は

$$\Delta H_{vH} = 4 RT_{1/2}^2 \frac{\Delta C_{ex}(T_{1/2})}{\Delta H_d(T_{1/2})} \quad (11)$$

となる ($C_{ex}/\Delta H(T) = d\alpha/dT$ の関係が成り立つ)。中点温度における過剰熱容量 $\Delta C_{ex}(T_{1/2})$ と実測のエンタルピー変化 $\Delta H_d(T_{1/2})$ を用いて ΔH_{vH} が計算によって得られる。

実際には $T_{1/2}$ でなく ΔC_{ex} が最大値を与える温度 T_p (ピーク温度) を用いる方が便利である。 T_p の条件は

$$\frac{d\Delta C_{ex}}{dT} = 0 \quad (12)$$

であるから、この関係を用いて、ピーク温度における転移率 α_p を求めると

$$\alpha_p = \frac{1}{2} - \frac{RT_p}{\Delta H_{vH}} \left(1 - \frac{\Delta C_{p,d} \cdot T_p}{\Delta H_d(T_p)} \right) \quad (13)$$

となる。

タンパク質の熱転移でこれまで知られている値を導入して考えると (13) 式右辺の第二項は無視しう程小さいことがわかる。すなわち

$$\alpha_p \approx 0.5 \quad (14)$$

の関係が成り立ち、二状態転移を示すタンパク質においては走査カロリメトリーで観測される過剰熱容量曲線のピーク温度がほぼ転移中点を与えることが数学的に導かれる。したがって (11) 式の代わりに次式

$$\Delta H_{vH} = 4 RT_p^2 \left(\frac{\Delta C_{max}}{\Delta H_d(T_p)} \right) \quad (15)$$

を用いて van't Hoff エンタルピーを計算するのが普通である。ただし ΔC_{max} はピーク値である。

過剰熱容量曲線の性格から近似的に

$$\Delta H_{vH} = 7.0 T_p^2 / \Delta T_{1/2} \quad (16)$$

によっても ΔH_{vH} が導かれる。ここで $\Delta T_{1/2}$ は過剰熱容量曲線が示す半値幅である。

真に二状態転移である場合、上のようにして得られた ΔH_{vH} はピーク面積から直接得たエンタルピー変化 ΔH_{cal} と一致するはずである。 Privalov が行った系統的な実験によると多くの小さな球状タンパク質では 5% 位の偏

差内で ΔH_{vH} と ΔH_{cal} は一致し、したがって、これらの熱転移は実際上二状態転移であると考えて差支えないと結論されている⁴⁾。

これに対し、 ΔH_{cal} に比べて ΔH_{vH} の方が大きい場合 ($\Delta H_{vH} > \Delta H_{cal}$)、複数の分子が協同的に転移することを意味している。この種の典型としては脂質二重層の液晶転移があげられる。ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) やジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) のような純粋脂質で構成した脂質膜の熱転移では van't Hoff エンタルピーと実測エンタルピーの比は $\Delta H_{vH} / \Delta H_{cal} \approx 200 \sim 300$ となり、およそ 200~300 個の脂質分子が熱力学的な転移挙動単位 (cooperative unit size) となっていることがわかる¹²⁾。

球状タンパク質の熱変性に対して $\Delta H_{vH} > \Delta H_{cal}$ の関係が見出されたとするならば、熱転移に際し、タンパク質分子間に相互作用が働いていると考えるのが妥当である。もっと特異的な作用として、モノマーとして見ていたタンパク質が実はダイマーあるいはテトラマーなどとして存在していたということが解析上得られることもありうる。

van't Hoff エンタルピーが大きい場合のもっとも極端な例として氷の融解があげられる。この系では 1 atm, 0 °C で転移の協同性は全ての H₂O 分子におよび、したがって過剰熱容量は無限大であり、 ΔH_{vH} も無限大となる。

逆に、 ΔH_{cal} に比べて ΔH_{vH} が小さい場合 ($\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$) は、コラーゲンのような繊維状タンパク質の熱転移において経験される。このような系では長い分子鎖の中に熱力学的な転移挙動単位が複数個あると考える。例えば一様なホモポリマーである重合度既知のポリペプチドでヘリックス・コイルの熱転移を走査カロリメトリーを用いて観測したとする。そのときのポリペプチド分子中の転移挙動単位の数 n は $\Delta H_{cal} / \Delta H_{vH}$ で与えられる。

最近、身近にある球状タンパク質で、その熱変性が $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$ の関係にあるものがよくみとめられている。このような場合には、共有結合でつながれているとはいえ、分子内にほぼ独立した熱力学的安定性を示す単位が複数個存在すると考える。

タンパク質の X 線による結晶構造解析から得られた立体構造中にはコンパクトに折りたたまれた区別できる構造単位がしばしば認められ、それらはドメインと称されている。このようなドメインがほぼ独立した転移挙動を示すとしても不思議はない。実際、ドメイン構造をもつタンパク質の過剰熱容量測定では $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$ の関係にあるものがほとんどである。

以上のようにドメイン構造と転移挙動単位とを対応づけて、タンパク質構造の安定性が議論されているが、必

ずしも両者が 1 : 1 で対応するものでなく、ドメイン間にも協同性が働いていたり、逆にドメイン中にさらに独立した転移を示す単位が複数個存在する場合もありうる。いずれにせよ、 $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$ となる系では完全な二状態転移でその転移を説明することはできず、“熱力学的に区別し得るような単位”が分子内にいくつか含まれていて、それぞれがタンパク質分子の安定性に寄与しているものと考えなければならない。

ドメインが非常に明確に区別しうるような状態で存在し、しかもそれぞれが熱力学的安定性においても顕著な差を示す場合には、その分子の熱転移の過剰熱容量曲線にもそれが反映されてくる。たとえば、二つのドメインよりなる酵素ヘキソキナーゼの熱変性に際しては、Fig. 3 に示すように過剰熱容量曲線は二つのドメインの変性に対応する二つのピークが観測される⁶⁾。

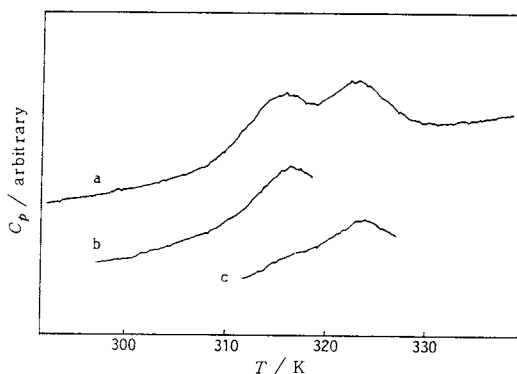


Fig. 3 Excess heat capacity curves observed with thermal denaturation of hexokinase at pH 8.5⁶⁾. Scan rate 1 K min⁻¹. Protein concn. 2.35 mg cm⁻³. a) heated up to 75°C; b) heated up to 60°C; c) rescan of sample in b) after cooling down to a room temperature.

複数個のドメインよりなる分子があり、それらが構造的に明確に区別されるようなものであっても、それらの間に熱力学的安定性の違いが殆どないならば、熱転移に際して観測される過剰熱容量曲線は単一のピークを示すことになる。このような場合には X 線による構造解析の結果と照合させる意味において curve resolution (あるいは curve deconvolution) の手法により観測された過剰熱容量曲線をいくつかの成分に分解して解析することがしばしば行われる。このことについては次節で触れる。

2.5 過剰熱容量曲線の理論と curve resolution

再び完全な二状態転移を示す系



(7)

について考えることにする。AおよびBのエンタルピーを $H_A(T)$, $H_B(T)$ とすると、転移率 α における系のエンタルピーは

$$H(T) = (1-\alpha)H_A(T) + \alpha H_B(T) \quad (17)$$

である。これを温度で微分すると熱容量 $C(T)$ は

$$C(T) = \frac{dH(T)}{dT} = \Delta H_d(T) \frac{d\alpha}{dT} + (1-\alpha)C_A + \alpha C_B \quad (18)$$

で与えられる。ここで、

$$\Delta H_d(T) = H_B(T) - H_A(T) \quad (19)$$

$$C_A = dH_A(T)/dT \quad (20)$$

$$C_B = dH_B(T)/dT \quad (21)$$

である。

(18)式は転移に伴う過剰熱容量を数学的に表したものにほかならない¹³⁾。また右辺の第二項と第三項の和は Fig. 2 に示したベースラインに対応するものであることは容易に理解されるであろう。

転移率 α は(8)式より

$$\alpha = \frac{K}{K+1} \quad (22)$$

で与えられる。

一方、van't Hoff エンタルピー ΔH_{vH} が与えられていると任意の温度における平衡定数 K は(9)式より

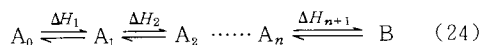
$$K = K_0 \exp \left\{ \frac{\Delta H_{vH}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (23)$$

である。ここで K_0 は温度 T_0 における平衡定数であり、 T_0 を転移温度、すなわち転移の中間温度とすると $K_0 = 1$ となる。

転移温度と van't Hoff エンタルピーが与えられた系について(22), (23)式を用いて α を求め、それを(18)式に代入して $C(T)$ を温度の関数として演算することができる¹³⁾。そのようにして得られた $C(T) - T$ 曲線は完全な二状態転移を示す系において観測されるであろう過剰熱容量の理論曲線にほかならない。Fig. 4 は大豆トリプシンインヒビターの熱変性において観測された過剰熱容量の値 (○印) と上述の関係を用いて得た理論曲線である¹⁴⁾。

このように走査カロリメトリーによって得られる生体高分子熱転移の過剰熱容量曲線には明確な理論的背景がある。

(15)式で計算された ΔH_{vH} が実測のエンタルピー ΔH_{cal} よりも小さく ($\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$)、転移を三状態以上の多状態転移で考えなければならない場合、



観測される過剰熱容量曲線 C_{obs} は独立したいくつかの二

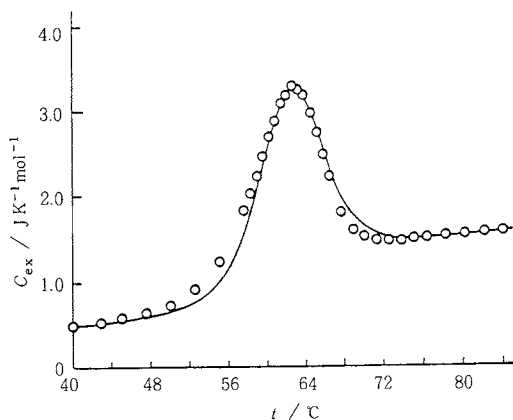


Fig. 4 Excess heat capacity values observed for the thermal denaturation of soybean trypsin inhibitor at pH 7.0 (○) and theoretical curve drawn on the basis of a two-state model described in the text¹⁴⁾.

状態転移が示す過剰熱容量曲線の総和

$$C_{obs} = \sum^n C_i \quad (25)$$

で与えられるとみなすことができる。

このような立場から過剰熱容量曲線を数学的に各成分に分解する curve resolution あるいは curve deconvolution が行われており、Biltonen らの提唱した分配関数を基本とする方法が知られている¹⁵⁾。

ここでは筆者らのグループが用いている van't Hoff 式に基づく方法について簡単に紹介する¹⁶⁾。

(24)式において各ステップは全て理想的な二状態転移であるとすると、 i 番目のステップの平衡定数は(23)式に対応して

$$K_i = K_{i0} \exp \left\{ \frac{\Delta H_i}{R} \left(\frac{1}{T_{i0}} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (26)$$

であり、そのステップが単独で示すであろう過剰熱容量は(18)式に対応して

$$C_i = \Delta H_i \frac{d\alpha_i}{dT} + \alpha_{i-1} C_{A_{i-1}} + \alpha_i C_{A_i} \quad (27)$$

となる。ここで α_i は温度 T における A_i のモル分率である。

このように各ステップが van't Hoff 式を満足するという仮定のもとに、そのステップの過剰熱容量 C_i を求め、それらの総和

$$C_{tot} = \sum^n C_i \quad (28)$$

として観測されるであろう過剰熱容量曲線 ($C_{tot} - T$ 曲線) を描くことができる。

簡単のために $n=1$ 、すなわち中間状態を1個含む三

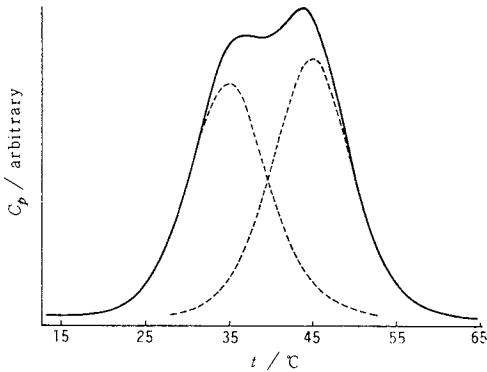


Fig. 5 Model calculation showing curve resolution. Solid curve is the observed excess heat capacity curve which was resolved on the basis of a three-state model according to the method described in the text. The two resolved curves are shown in dashed lines.

状態転移の場合について計算した例を Fig. 5 に示す。

具体的な手続きとしては ΔH_i , T_{i0} , $\Delta C_{p,di}$ を変動パラメーターとして

$$\Delta H_{\text{cal}} = \sum_{i=1}^n \Delta H_i \quad (29)$$

を満足するような条件で、最小二乗法により C_{tot} が C_{obs} に適合するような上記パラメーターの最適値を決める。ここで $\Delta C_{p,di}$ は $T = T_{0i}$ における i 番目のステップの熱容量変化である。

この方法で注意すべきことは、 n 値 (ステップ数で表せば $n+1$) が大きくなればなるほど適合性が良くなることである。最小二乗法を採用している以上、必然的についでまわることである。したがって、過剰熱容量曲線にピークが複数個あらわれるような場合には問題はないが、単一のピークしか示さないような転移において、多状態転移の立場で curve resolution を行う際には、分光学的立場で中間状態の存在が認められているとか、X線構造解析でドメインやサブドメイン構造が認められているなど、別の角度からの裏付けがあることが条件である。

3. 等温カロリメトリー

反応熱測定のための等温カロリメトリーは幅広い生体物質反応系でなされているが、現在、主な測定対象としてあげられるのは、機能性タンパク質と特異的に相互作用する反応系である。使用される装置はほとんどの場合、伝導型カロリメーターであるが、これの原理については本講座Ⅱに述べられているので、それを参照されたい。装置の構造上、バッチ型とフロー型に大別される。試料が不安定なために迅速な測定を強いられることが多く、

その場合にはフロー型が使用されている。短時間に多くの測定データが得られることが最大の利点だからである。一方、必要な試料量がバッチ型の方がやや少量ですむこと、さらに粘度の比較的大きい試料溶液についても混合効率がよいことなどのために、バッチ型もよく使用されている。フロー型に比べて時間は少し余計にかかるが、精度は多少優っている。

タンパク質を試料とする場合、溶液接触部分は吸着や反応性のない材質を選ぶべきであり、金、白金、テフロン、ガラスなどを加工した反応セルやチューブが使われている。伝導型カロリメーターの特性として、時定数の短いことが高感度の条件である。その意味で熱量計セルは金をその材質とすることがもっとも望ましい。

3.1 バッチ型カロリメーター

セル容器の中に仕切りがあり、二種の反応液を分離して保持し、それを回転させて混合する型のカロリメーターが一般的である。現在もっとも広く使われているLKB社製のマイクロカロリメーター (LKB-10700) では 4 cm^3 と 2 cm^3 の溶液が混合できる金製のセルが用意されている¹⁷⁾。

生化学反応系では $100 \mu\text{J}$ という微小な熱量変化を測定することが多い。そのため誤差の要因となる条件に留意しておく必要がある。溶液の攪拌熱は大きく寄与する。特に粘度の高い溶液ではその寄与を正しく差し引くことが重要である。タンパク質の変性剤による変性など溶媒の密度が非常に異なる場合、混合の効率を上げるとともに攪拌熱による誤差の導入をできるかぎり抑制するという工夫が要る。セルを含む熱ダマ (ヒートシンク) を回転する際、機械的な力がセンサーに影響をおよぼすこともベースラインの乱れを誘う原因となる。またバッチ型ではセル内に溶液のほか気相部も含まれる。回転混合型セルでは混合に伴うわずかな蒸気圧の変化が熱変化を与える。同じ理由でセルが外気に対して開放されていると混合に際して溶液の気化がおり、その蒸発潜熱がしばしば大きな誤差の原因になる。

混合開始に先立って十分温度平衡のための時間をとることも精密な測定には重要な意味をもっている。大抵の装置は双子型構造になっていて、比較セルとの差を検出する方式を採用しているが、みかけ上、ベースラインが一定になって温度平衡に達したかのようにみえても、試料溶液を含むセル内部に温度の不均一な分布が残されていることがよくある。精度よい測定をするコツはあせらず十分時間をかけて安定化を待つことである。

3.2 フロー型カロリメーター

筆者らの用いているフロー型カロリメーターを Fig. 6 に示す¹⁸⁾。円柱状 (径 12 cm × 高さ 24 cm) のアルミプロ

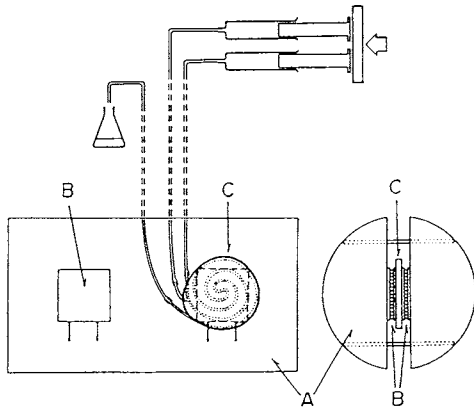


Fig. 6 Schematic drawing of a flow calorimeter designed by the present authors¹⁸⁾.

ック中央にサーモモジュールではさまれた試料・比較セルが位置している。比較側は試料セルと熱容量を同一にした銅製円盤である。試料セルは金製チューブ(内径0.8 mm, 長さ1.8 m)から成る。Y字型の部分が混合点で、溶液はその部分に到達するまでにヒートシンク外側に巻かれたテフロンチューブを通過し、その間温度平衡に達する。この熱量計本体を潜水容器におさめ恒温水槽中に沈めてある。恒温水槽の温度制御が ± 0.02 K程度でも実用的な感度を保持している。検出体としてメルコア社のサーモモジュール(CP 1.4-71-06)を使用しており、 $100 \mu\text{W}$ の定常的な熱流があるときの熱量計出力は $8 \mu\text{V}$ である。

フロー型カロリメーターにおける送液方法には定常フロー法(continuous-flow procedure)とストップフロー法(stopped-flow procedure)の2方式がある。前者が一般的に用いられ、一定の流速で反応液を送り込んで混合し、シグナルが定常値を示したときの値を読む。この時、精度を支配するのは送液ポンプの定常性である。できるかぎり脈流のないポンプを用いなければならない。流速を加電圧変化で調節する方式のポンプはあまり適切でない。変速はギア変換による方が定常流を得る上で有利である。またこの定常フローの方式ではその原理から、定常値に達するまで送られた溶液は全く無駄になってしまう。その点、ストップフロー方式では、一定時間送液したときに得られるシグナルの面積を熱量に換算するため、液量はかなり少なくすむ。定常値に達するには5~6分かかるが、ストップフローでは送液時間は1~3分程度で十分である。このようにストップフロー方式では、混合様式としてはフロー法であるが、熱量の読み取りはバッチ法と共通しており、面積評価によっている。

送液には2本のシリンジを用い、定量性の高いポンプで押す。筆者らは医学用に開発された灌流ポンプを使用して好結果を得ている。

Fig. 7にタンパク質反応熱測定を行ったときのチャートを開始¹⁹⁾。反応液を流速 $0.137 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ で3分間送り、↓印のところでポンプを止めた。この測定に要する液量は 0.4 cm^3 でよいことになる。希釈熱の測定には試料調製に際して使用した溶媒を用いる。これは多くの場合、緩衝液であり、タンパク質溶液調製時に用いる透析外液がもっとも適切である。

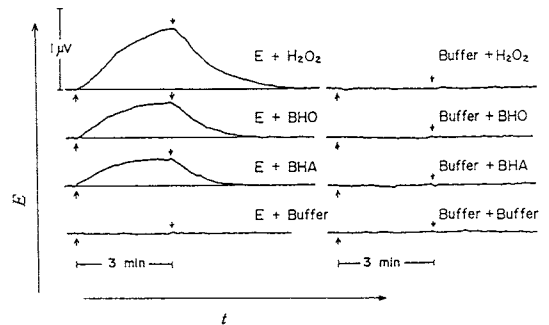


Fig. 7 Typical calorimetric signals observed by the stopped-flow procedure for peroxidase-ligands interactions. E, peroxidase; H_2O_2 , hydrogen peroxide; BHO, benzhydroxamic acid; BHA, benzhydrazide. (See ref. 19 for details)

上述のように、送液ポンプの精度がかなり大きく効くため、通常は7~9回の測定を繰り返して平均値をとる。反応液をセルまで送り込むためのテフロンチューブは約 3 cm^3 の容量があり、希釈熱測定に要する容量を入れると、反応エンタルピーの決定にはタンパク質溶液が計7~ 10 cm^3 程度必要である。濃度を $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$ として 10 cm^3 の溶液を使用するとなると 300 nmol の試料が必要な計算になる。これは分子量50,000のタンパク質では 15 mg に相当する。このことから生化学用のカロリメーターとしてはさらに微量化が望まれている。

3.3 滴定型カロリメーター

反応の平衡定数を同時に測定できる装置として、反応液の一方を外部から逐次送り込む滴定型のカロリメーターがある²⁰⁾。タンパク質と特異的に結合するメタリイオンの反応を対象としてこの種の装置を用いたエンタルピー測定がしばしば行われている。

滴定カロリメトリーにおいては滴下液による熱容量の増加分を正しく補正する必要がある。また、溶液の滴下で熱容量の増加とともに問題となるのは酸化熱である。限られた容積の内部で溶液量が変化すると気相部の容積

も変化し、それに伴って気化・凝縮平衡が影響を受ける。そのため、蒸発潜熱が大きな誤差の原因となり、装置の構造によってはこのことが熱量計の精度を制限することになる。このため注入する反応液と同量の溶液を同時に抜き去るという装置も工夫されている²¹⁾。

3.4 データの精度、確度

生物物質の特異的の反応系で行われている等温カロリメトリーでは通常 100 μJ~1 mJ の熱量を検出している。実際に測定している熱量の範囲はセンサーが検出している温度差で表すと 0.0001~0.00001 K である。したがってデータの精度におよぼす条件としては、どの方式で測定するにせよ、恒温槽の制御に注意を払うことは共通して重要である。フロー型のものについてはポンプの定量性が精度を支配するものとして重要なことはすでに述べた。

一般にタンパク質の関与する反応について、得られた結果を文献値と比較する場合、1~数 kJ mol⁻¹ の違いであれば差はないと考える。というのはタンパク質試料の純度の点から、タンパク質の量で規定されるような反応であれば数 kJ mol⁻¹ の相違が生じても当然であるからである。この点、純粋な化学物質系における ΔH の厳密さとは少し区別して考えねばならない。

精度において許される幅はこのように少し広いが、確度という立場からは、測定に伴う系統エラーを出来るだけ小さく抑える配慮が必要である。装置のキャリブレーションは簡便とはいえ、ヒーターによる電気的加熱による方法は採らない方がよい。熱測定はあくまで comparative な方法として位置づけ、試料反応系と同じ程度の反応熱を与える標準反応系を用いるべきである。筆者らは 0.002 N-HCl と 0.04 N-NaOH の中和反応を装置のキャリブレーションのために採用している¹⁸⁾。

3.5 ΔH の温度依存性

タンパク質反応系においては ΔH は温度によってかなり変化するのが普通である。すなわち

$$\left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T}\right) = \Delta C_p \quad (30)$$

の関係でわかるように、反応に伴い大きな熱容量変化を示す場合が一般的である。これは、タンパク質表面の疎水性、あるいは構造変化、構造のゆらぎとも関係すると解釈される。一般的に特異的に相互作用する分子(リガンドと呼んでいる)が結合すると負の熱容量変化を与える(Fig. 8)。タンパク質同士の相互作用ではそれが概して大きいようである²²⁾。熱容量の変化について考察を加える上で重要なことは、タンパク質の状態間の平衡である。タンパク質のとらうる状態が温度により明らかに異なる場合、観測された ΔH には状態間の平衡過程も含ま

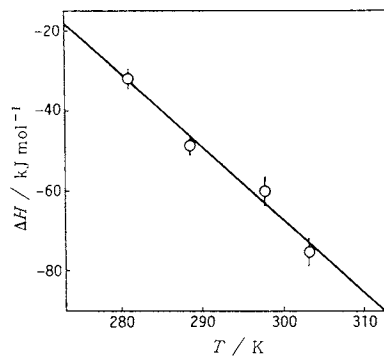


Fig. 8 Temperature dependence of enthalpy change for the binding of L-arabinose to arabinose-binding protein from *E. coli* at pH 7.4³³⁾.

れるために温度によって大きく変わることになる。たとえば、オリゴマー構造が温度によってモノマーになっている場合が考えられる。さらにタンパク質あるいはリガンドのプロトン解離状態の違いのみで ΔC_p およびその温度依存性を説明した例もある。このような状態の変化についてはその存在を他の手段で確認すべきである。

マクロな状態変化の無い系について、熱力学量に含まれる情報を解析するための経験式が提案され、中でもエントロピー変化と熱容量変化が重要であるとされている²³⁾。この方法では熱力学量に影響を与える因子として疎水性相互作用と分子内振動に基づく自由度の変化が大きな役割を演ずるとして、それぞれの寄与の程度を見積る式が示されている。

タンパク質とリガンドの結合反応系においては、ΔC_p が負になることが多いが²²⁾、これは疎水性基が分子内部に埋もれるような変化が大きく寄与していると解釈され得る。さらに複合体がより rigid な構造に変化する傾向もみられる。タンパク質の変性の場合にはその熱容量変化 ΔC_{p,d} が正であることが多く、このことと対照的である。タンパク質の変性では疎水性基の露出と分子内自由度の増大がもたらされる⁴⁾。

4. 緩衝液について

生化学反応系においては必ずといって良いほど緩衝液を使用する。これは、脱水素酵素反応のようにプロトン自体が反応物質あるいは生成物質の一員であることのほか、タンパク質等生物物質のコンホメーションあるいは機能発現に関する解離基の状態が pH によって変化するのが普通であるからである。このような反応系でカロリメトリーを行う場合、緩衝液の側におけるエンタルピー変化を常に考慮に入れておく必要がある。

反応に伴ってプロトンの解離状態が変化する場合を考える。そのとき、反応系にプロトンの出入りが起こり、それに共役して緩衝液組成のプロトン授受反応を生じる。カロリメトリーにおいては系の状態変化に含まれるすべてのエネルギー変化が観測されるため緩衝液組成へのプロトン結合または解離に伴う熱量変化も共に測定値の中に含まれる。真の反応エンタルピーを ΔH_0 とすると、観測されたみかけのエンタルピー変化 ΔH_{obs} は

$$\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H_0 + n \Delta H_i \quad (31)$$

として与えられる。ここで n は反応系が取り込むプロト

ン数、 ΔH_i は緩衝液のプロトン解離エンタルピーである。通常 n の値はそれ程大きくないため、 ΔH_i が0に近いような場合、補正をしなくても差支えない。しかし、正確な ΔH_0 を得るには、 n をpHスタット法などにより別に求めるか、あるいは ΔH_i の異なる複数の緩衝液を用いてそれぞれ ΔH_{obs} を測定する。後者の場合、 ΔH_0 と n が同時に評価できる。条件によってはこのようにして得た n が前者の場合より精度がよく、さらに、この方法によらなければ n の決定が困難な系もある。その例として、熱変性過程の ΔH_{obs} 測定結果をFig. 9aに示す。さらに、

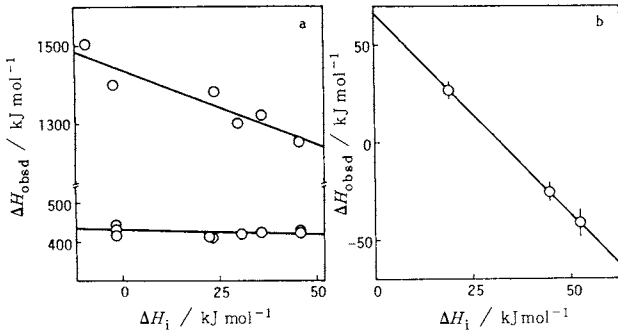


Fig. 9 Observed enthalpy change as a function of ionization enthalpy of buffer components. a) Denaturation enthalpies of amylase inhibitor (upper) and of trypsin inhibitor (lower); b) Enthalpy change of reduction of insulin. (See text for details).

Table 1 Apparent thermodynamic parameters for the ionization of various buffer substances in 0.1 mol dm⁻³ KCl at 298 K.

Buffer	pK	$\frac{\Delta H}{\text{KJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta C_p}{\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}}$
Acetate	4.7	0.48	-127
Cacodylate	6.1	-1.96	-78
MES	6.1	15.53	16
Glycerol 2-phosphate	6.3	-0.72	-179
ACES	6.7	31.41	-27
PIPES	6.8	11.45	19
Phosphate	6.8	5.12	-187
BES	7.0	25.17	2
MOPS	7.1	21.82	39
Imidazole	7.2	36.59	-17
TES	7.4	32.74	-33
HEPES	7.4	21.01	49
EPPS	7.9	21.55	56
Triethanolamine	7.9	33.59	48
Tricine	8.0	31.96	-43
Tris	8.2	47.44*	-73*
Bicine	8.2	27.06	2
TAPS	8.3	41.49	-22
CAPS	10.3	48.51	33

* Grenthe, et al., *Acta Chem. Scand.* 24, 1067 (1970)

タンパク質S-S結合の還元反応をフロー型熱量計で測定したときの $\Delta H_{\text{obs}} - \Delta H_i$ プロット(Fig. 9b)から n を得た例もある。それを基に還元されて生成するSH基のpK値が9.2と決定された²⁴⁾。熱測定が非特異的な測定法であることを逆に利用したよい実験例であろう。

生化学系でよく利用される緩衝液の ΔH_i をTable 1に示す²⁶⁾。緩衝液のpHは温度によって変化する。温度によるpK変化に応じてpHも変わるのである。このことを考慮せずに行った実験報告をよくみかける。たとえばもっともよく用いられる緩衝液の一つであるトリス緩衝液では、計算上0°CでpH=8.5のものが100°CではpH=6.0まで下がる。温度を変えて測定する場合には十分注意しなければならない。特に走査カロリメトリーの場合、温度変化の幅が大きいので、かなりpHが変わり得る。pHの温度依

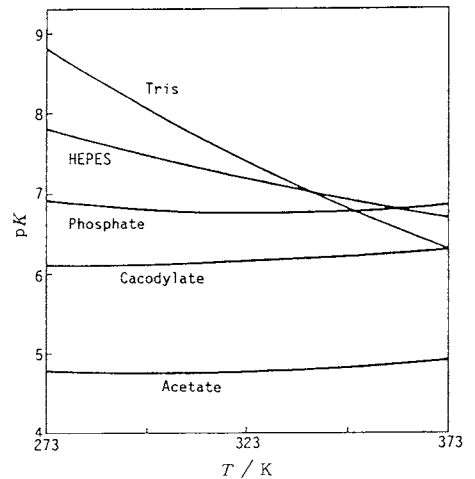


Fig. 10 Temperature dependence of buffer pK. Each curve was calculated on the basis of a van't Hoff relation by using the values of ΔH_i and ΔC_{p_i} which were calorimetrically determined²⁵⁾.

存性は主として ΔH_i で決まる。従って、 ΔH_i が 0 に近い緩衝液種を選択すべきであろう。 ΔH_i の大きいものを使わざるを得ないときには、転移温度で pH を調整するような工夫が必要となる。Fig. 10 に pH の温度依存性の一例を示す²⁶⁾。

5. 生体高分子のカロリメトリー

5.1 転移の pH 依存性

タンパク質構造の安定性は pH により大きく変わる。pH を変えて熱容量差測定を行った結果を Fig. 11 に示す。変性温度 T_d の pH 依存性は次式のように与えられる。

$$\frac{\partial 1/T_d}{\partial \text{pH}} = -\frac{2303R}{\Delta H_d} n \quad (32)$$

n は変性に伴ってタンパク質に結合するプロトン数である。Fig. 9a の方法以外に、この式を使い、pH を変えて測定することによっても間接的に n の値を得ることができる。もっとも熱安定な pH では $n=0$ となり、プロトンの出入りのないことがわかる。このような pH では、使用する緩衝液の種類によらず観測された熱量は真のエントルピー変化を与える。

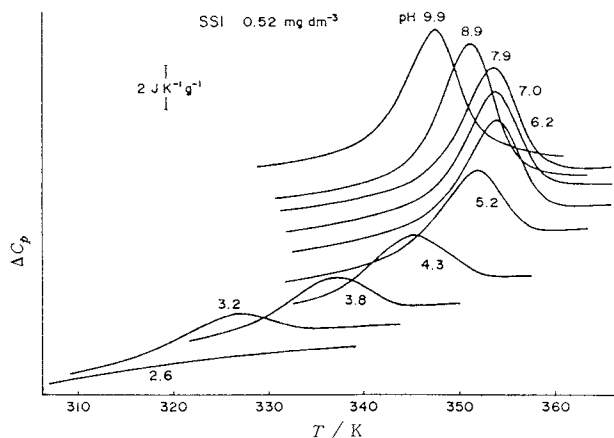


Fig. 11 Excess heat capacity curves observed for the thermal unfolding of *Streptomyces subtilisin* inhibitor at various values of pH indicated.

5.2 解離を伴う転移

タンパク質にはサブユニット構造をもつものが多い。そのようなタンパク質の熱変性は、分子内相互作用で折りたたまれた構造にあるポリペプチド鎖がほどけた状態 (unfolded state) に変化すると同時に、サブユニットへの解離が起こるのが一般的である。解離を伴う場合、みかけの変性平衡が濃度の関数となり、転移ピークが濃度に応じて移動する。 n 個のサブユニットからなるオリゴマーが転移と同時にモノマーに解離すると考える。



タンパク質濃度を C とすると

$$\begin{aligned} \ln C &= -\frac{1}{n-1} \frac{\Delta H_{vH}}{RT} - \frac{1}{n-1} \ln \frac{\alpha^n}{1-\alpha} + \text{const.} \\ &= -\frac{1}{n-1} \frac{\Delta H_{vH}}{RT_p} + \text{const.} \end{aligned} \quad (34)$$

の関係が成立し、 $\ln C - 1/T_p$ プロットから ΔH_{vH} が得られる¹³⁾。また、 ΔH_{vH} は

$$\Delta H_{vH} = \frac{n-(n-1)\alpha}{\alpha(1-\alpha)} RT^2 \left(\frac{C_{\text{ex}}}{\Delta H_{\text{cal}}} \right) \quad (35)$$

によっても求められる²⁶⁾。

変性に際して解離をおこすのはオリゴマータンパク質に限らない。モノマータンパク質に特異的にリガンドが結合した複合体についても同様である。リガンドが非常に強固に結合した複合体では上式がそのまま適用できる。さらに、溶媒中に同じリガンドを過剰に添加したとき、その濃度を C_L とすると

$$\ln C_L = -\frac{\Delta H_{vH}}{RT_p} + \text{const.} \quad (36)$$

が成立する。ただし、リガンドは 1 分子のみ結合すると仮定した。 C_L が増大すると T_p が高温側へ移行する (Fig. 12²³⁾)。みかけ上、タンパク質がより熱安定性を増すようにみえるが、タンパク質構造そのものが変化したのではなく、ル・シャテリエの原理に基づき、単にみかけの平衡がずれたにすぎないことに注意しなければならない。

ヘムタンパク質をはじめ、リガンドとの特異的な反応により複合体を形成するタンパク質は多い。単離精製した状態ですでに複合体である場合もある。試料濃度を変えて測定し、ピークの移動が観測されたならば、試料がすでに複合体を形成しており、転移に伴ってリガンドが解離する過程も含まれている可能性が高い。このことを十分確認してからデータの解析に移るべきである。

5.3 転移の可逆性

走査カロリメトリーで生体高分子の熱転移をみると、その熱力学的解析は、転移が可逆で平衡状態にあるときのみ適用できる。ところが、現実の系では可逆平衡転移系よりもそうでない例の方が圧倒的に多い。タンパク質の転移が不可逆であるのは変性したタンパク質分子同士が二次的に凝集 (会合) するためであることが多い。實際上、無限希釈の状態で測定を行うことは不可能であるから、可逆的な転移を示す系というのはむしろ条件に恵まれた例外的なケースといえる。そこで、現時点では、厳密には可逆系でなくても、実用的意味合いに

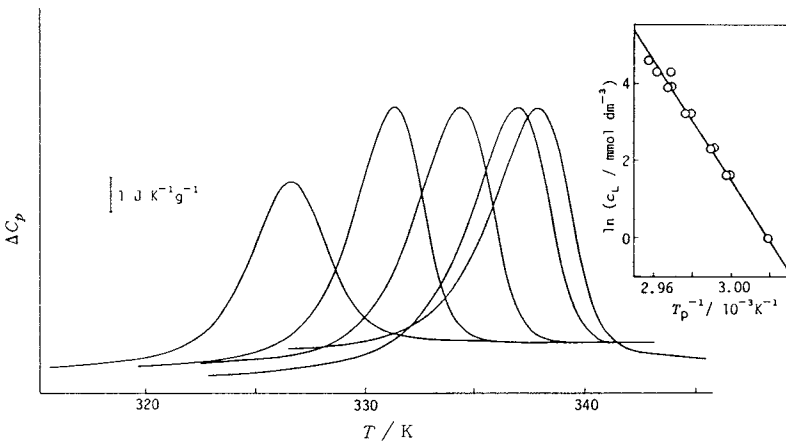


Fig. 12 Excess heat capacity curves observed for the thermal unfolding of arabinose binding protein in the presence of various amounts of L-arabinose. pH 7.4. Protein concn. 0.87 mg cm^{-3} .³³⁾

において可逆的な取扱いが適用されて解析されているのが実状である。ただし、会合に伴う明らかな発熱現象 (C_{ex} の急激な減少) がみられる場合にこれを適用してはならない。会合のおこり易さは試料濃度の何乗かに比例するから、不可逆的なシグナルが観測された場合、希釈して測定を仕直す可逆性を示すようになることがある。一般的に二次的な会合を最小にするためにはタンパク質の濃度は 1 mg cm^{-3} 以下を標準的な目安として考えておけばよい。勿論それ以下の濃度で会合をおこすものもある。

転移の逆過程すなわちタンパク質の巻き戻り過程は比較的長時間を要するから、温度走査速度も可逆性を確かめる上で重要である。

可逆性を確かめるには、一旦昇温させた後すぐに冷却して再度昇温させたときの熱容量差曲線の再現性をみる。さらに、昇温速度を変えて測定し、ピーク温度がずれないかどうかをみる。昇温速度を遅くした場合、理論的にピーク面積は速度の平方根に逆比例して小さくなる。実際に測定してみると、理論値よりも面積が小さく、ピーク温度がやや低温側に観測されることがある。これは、変性過程以外に不可逆的な発熱過程、たとえば会合がおこっていることを意味する。

タンパク質の熱転移(変性)の場合には昇温速度が 1 K min^{-1} であれば実用的に平衡を追っているとみなして差支えないようであるが、個々のタンパク質によって異なるのでやはり注意しなければならない。また、核酸の場合には 0.5 K min^{-1} 以下の方が良いようである。リン脂質の相転移は狭い温度幅で転移がおこるため常に低い昇温速度が採用されている。 0.25 K min^{-1} が標準的である。デンプンの糊化を市販のDSCで解析する場合、 0.5 K min^{-1} 以下の昇温速度であればDSCシグナルが平衡状態を反

映しているとみなしうることが詳細な昇温速度依存性から確かめられた²⁷⁾。

5.4 核酸の融解

DNAは塩基対間に形成された水素結合により二重らせんを構築している。熱的に誘起される二重らせんの融解は一種の相変化であり、これについて走査カロリメトリーを行うとやはり融解に伴う過剰熱容量が観測される。塩基対のうちアデニン・チミン対(AT)は2本の、グアニン・シトシン対(GC)は3本の水素結合で結ばれており、その含量に

応じて熱安定性を異にする領域がある。熱容量差測定で得られる過剰熱容量曲線は、タンパク質の熱転移の場合とは異なり、Fig. 13 aのようにメインピークの中にいくつかの小さなピークが現れる。この微細構造はDNAに固有の塩基配列を反映したものである。これに紫外線を照射するとチミンダイマーが生成し、その周辺の塩基対にも影響をおよぼし、高次構造が部分的に崩壊する。Fig. 13 bは紫外線(15 W殺菌灯)を10 cmの距離から30分間照射した試料の融解に伴う過剰熱容量曲線である。

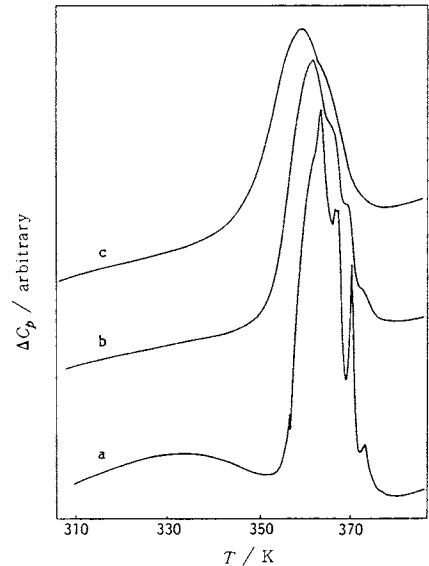


Fig. 13 Excess heat capacity curves observed for the thermal unfolding of calf thymus DNA at pH 7.0 with 150 mM NaCl. UV irradiation; a) 0 h, b) 0.5 h, and c) 2 h.²⁸⁾

メインピークの低温側への移動とともに微細構造のかなりの消失がみられる。すなわち紫外線照射で DNA 構造が大きく変化していることが窺える。この微細構造は照射をさらに続けると Fig. 13 c に示すようにほとんど消失した。このような立場の実験は、核酸の融解における走査カロリメトリーが発癌機構とも関連して DNA 損傷を定量化してみる手段として利用できることを示している²⁸⁾。

t-RNA についてもいくつか論文が発表され、曲線を解析して構造との関連が検討されている^{29, 30)}。これらは 2.4 で述べた curve resolution を適用したもので、観測された融解の過剰熱容量曲線をいくつかの成分に分解し、それらと X線構造解析で知られている t-RNA 分子中のドメインとの対応づけを行ったものである。

近年の遺伝子工学の発展に伴い、塩基配列が既知の小さな DNA 分子が入手できるようになった。分光学的測定から融解温度とその構造との相関が詳細に研究され、塩基配列がわかればその安定性が予知できることがほぼ明らかになっている³¹⁾。タンパク質ほどの多様性がないので、大きな近似を用いる必要がなく、理論的な立場からのより詳細な解析が可能であるため、現在タンパク質系で行われている以上の展開をみせることもそう遠くはないと思われる。

6. おわりに

生化学という分野は余りにも幅が広く、また奥行きも深いので、特異な生物的機能を持つ生体高分子を対象とした研究法にかぎり、走査カロリメトリー、等温カロリメトリーの両面から解説した。おわりに一言付け加えたのは、この二つの相補的な関係についてである。異なった方法論とはいえ、熱力学情報を導くという立場では共通しているから、二つの方法で独立に得られた結果に矛盾があってはならない。可能なかぎり二者を併用し、それぞれの間に熱力学的整合性が成り立つことを実験的に示すことは重要なことである^{32, 33)}。

なお、走査カロリメトリーとしてタンパク質の変性を対象とする最近の研究は文献 34) にまとめられている。また生化学全般についてのカロリメトリーのデータは文献 35) が最新のものを網羅し、集録している。

文 献

- 1) P. L. Privalov, V. V. Plotnikov, V. V. Filimonov, *J. Chem. Thermodyn.* **7**, 41 (1975).
- 2) P. L. Privalov, *Pure and Appl. Chem.* **52**, 479 (1980).
- 3) W. M. Jackson and J. F. Brandts, *Biochemistry* **9**, 224 (1970).
- 4) P. L. Privalov, *FEBS Letters* **40**, S140 (1970).
- 5) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979).
- 6) K. Takahashi, J. L. Casey, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **20**, 4693 (1981).
- 7) E. I. Tiktopulo and P. L. Privalov, *FEBS Letters* **91**, 57 (1978).
- 8) C. O. Pabo, R. T. Sauer, J. M. Sturtevant, and M. Ptashne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 1608 (1979).
- 9) S. P. Manly, K. S. Matthews, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 3842 (1985).
- 10) H. Fukada, K. Takahashi, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 5109 (1985).
- 11) V. Edge, N. M. Allewell, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 5899 (1985).
- 12) S. Mabrey and J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3862 (1976).
- 13) K. Takahashi and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **20**, 6185 (1981).
- 14) K. Takahashi and H. Fukada, *Thermochim. Acta* **88**, 229 (1985).
- 15) E. Freire and R. L. Biltonen, *Biopolymers* **17**, 463 (1978).
- 16) C. H. Spink, K. Muller, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **21**, 6598 (1981).
- 17) I. Wadsö, *Sci. Tools* **21**, 18 (1974): LKB Catalog 2107-111.
- 18) K. Takahashi and H. Fukada, *Biochemistry* **24**, 297 (1985).
- 19) H. Nakatani and K. Takahashi, *Biochemistry* **25**, 3515 (1986).
- 20) J. J. Christensen, R. M. Izatt, and L. D. Hansen, *Rev. Sci. Instr.* **36**, 779 (1965): Tronac Short Form Catalog SF-1 (1976).
- 21) 田之倉 優, 山田和廣, 熱測定 **11**, 157 (1984).
- 22) H.-J. Hinz, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 285 (1983).
- 23) J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 2236 (1977).
- 24) H. Fukada and K. Takahashi, *Biochemistry* **21**, 1570 (1982).
- 25) H. Fukada and K. Takahashi, unpublished data.
- 26) K. Takahashi, "Protein Protease Inhibitor—The Case of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor (SSI)", K. Hiromi, K. Akasaka, Y. Mitsui, B. Tonomura, and S. Murao, eds.), Elsevier, Amsterdam, Oxford and New York (1985), p. 106.
- 27) T. Shiotsubo and K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **48**, 9 (1984).
- 28) 高橋起世子, 岸 証, 前園明一, 高橋克忠, 深田はるみ, 阿久津秀雄, 第 22 回熱測定討論会要旨集, p. 76 (1986).

- 29) H.-J. Hinz, V. V. Filimonov, and P. L. Privalov, *Eur. J. Biochem.* **72**, 79 (1977).
- 30) P. L. Privalov and V. V. Filimonov, *J. Mol. Biol.* **122**, 447 (1978).
- 31) A. Wada and A. Suyama, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **47**, 113 (1986).
- 32) T. Shiotsubo and K. Takahashi, *Carbohydr. Res.* in press.
- 33) H. Fukada, J. M. Sturtevant, and F. A. Quioco, *J. Biol. Chem.* **258**, 13193 (1983).
- 34) 深田はるみ, 熱測定の新進 **2**, 67 (1984).
- 35) H.-J. Hinz, "Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, and Tokyo (1986).

プラスチックの熱的特性試験規格

国際標準化機構 (ISO) や米国材料試験協会 (ASTM) の試験法の規格には, TG や DTA, DSC を用いて, 分解温度, 質量増減, 残分, 融解・転移温度, 融解・転移熱, ガラス転移温度などを測定する方法が規定されている。わが国でもこれらの試験法を JIS 化する動きがあり, このための検討が (財) 高分子素材センターで進められている。JIS 原案作成に先立ち, 20 を越える公的機関や民間会社で多くの共通試料と標準物質を用いて, 上記の試験法の共同試験が行われた。

この共同試験に先立って, これらの試験の実態が調査されたが [熱測定 **13**, 50 (1986) 参照], 熱容量測定もかなり実際に行われており, 成形加工などの点でも必要とされることから, わが国独自のものとして熱容量測定の試験規格も検討され, 共同試験が行われた。

プラスチック, ICTA-NBS の標準物質, 純金属の共

同試験結果は, 詳しく解析され, その結果にもとづいて, JIS 化のための試験法原案が作成された。この報告書は 11 月に完成され, 高分子の熱分析に関係している人はもちろん, その他の分野の熱分析研究者にとっても有用なものと思われる。

この報告書をご希望の方は下記へ代金 (送料込み) 1,000 円を添えてお申込み下さい。

報告書題名「有機・複合系新素材の試験・評価等補助事業報告書

高分子の熱分析手順とデータ解析 —
JIS 化の基礎資料」

申込先 〒113 東京都文京区湯島 1-5-31

第一金森ビル 日本熱測定学会
電話 03-815-3988