

球状蛋白質の多状態熱転移に関する 熱力学的研究

城 所 俊 一*

(昭和62年7月1日受理)

Thermodynamic Studies on the Multi-state Thermal Transitions of Globular Proteins

Shun-ichi Kidokoro

Some recent developments of the thermodynamic studies on the multi-state thermal transitions of globular proteins are reviewed. Emphasis has been placed to the statistical mechanical basis and new methods of the scanning calorimetry data analysis for the multi-state system. In the analyses, a thermodynamic state is defined as an ensemble of the microstates of the system, assuming the heat capacity function and two integral constants. Upon these assumptions, the multi-state system can be analyzed by deconvolution method even when the system includes self-dissociation/association process, using the relation between the partition function (or molar fraction function) and the enthalpy function. The obtained thermodynamic parameters are refined by non-linear least squares fitting. By the methods, the thermal transitions of porcine pepsinogen at various pH values are analyzed to be four-state transitions, and the thermal transition of *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin at pH7.0 are estimated to be three-state transition including dimer-monomer equilibrium.

1. はじめに

現在、多くの蛋白質、核酸の立体構造が、X線回折によって原子の大きさの分解能で明らかになってきている。これらの生体高分子の構造は、生体内での機能と密接に関係していると考えられ、機能の分子論的な理解に向けての研究がおこなわれている。

一方では、このような鎖状の分子が、自発的に、決まった立体構造をとる機構の解明が、蛋白質研究の大きなテーマの1つである。この機構が明らかになれば、アミノ酸の1次配列から、その立体構造を知ることができるであろう。これにより、現存する蛋白質のアミノ酸置換による立体構造の改変にとどまらず、全く新しい構造をもった蛋白質の創造が可能となろう。

この、まきもどりの機構の解明の為の1つの方法として、溶液中の蛋白質の高次構造の安定性を評価すること

がおこなわれる。すなわち、温度、pH、各種変性剤濃度等の溶液条件を、急激に、あるいは十分ゆっくりと変化させた時の構造変化を観測するのである。

生体高分子の溶液中での構造を調べる手段としては、NMR や吸光度、円偏光二色性、蛍光そしてラマン等のスペクトルによる分光学的手法が広く用いられている。一般に、生体高分子は、多くの分光学的なプローブを持っており、異ったプローブの変化を通して、その変化の原因となる、異った種類の構造変化を知ることができる。本稿のテーマである多状態熱転移に対しては、同一の試料について、多種類のプローブを、同時に、しかも高いデータ密度で測定することは、強力な手段である¹⁾。

一方、熱測定は、構造転移に伴う、熱力学量の変化を直接測定するという点で、分光学的手法とは違った長所を持つ。特に、熱転移の測定に用いられる走査熱量計は、エンタルピーを温度の関数として直接観測できるため、多状態熱転移に関しても、重要な熱力学的情報を与える。

本稿では、平衡論的な立場から、走査熱量計により得られた熱容量関数の解析法の統計力学的基礎と、それに

* 東京大学理学部物理学科：東京都文京区本郷 7-3-1
〒113

Department of Physics, Faculty of Science,
University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113

基づく解析法の検討に重点を置いて述べ、それをういた球状蛋白質の多状態転移の研究として、pepsinogen と hemolysin について調べる。

この研究には、希薄蛋白質溶液でも、精度よく、しかも再現性よく測定できる走査熱量計が不可欠である。走査熱量計の発展や、熱容量関数の測定の原理については、Privalov の論文に詳しい²⁾。また、球状蛋白質の多状態転移の実験に関しては、分光学的測定においても^{3,4)}、熱測定においても^{5,6)}、すぐれた総説が書かれているので参照されたい。

2. 熱測定における、球状蛋白質の熱力学的状態について⁷⁾

多状態熱転移について議論する前に、「状態」の意味について議論しておく必要がある。この節では、統計熱力学的立場から、熱力学的状態および熱力学関数と、微視的状态との関係を示す。これにより、「状態」の意味が明確になるとともに、多状態熱転移の解析の準備が与えられる。

2.1 熱力学的状態と微視的状态

水溶液中の蛋白質分子は、非常に多くの運動の自由度を持っている。アミノ酸鎖の2面角の回転、原子間の振動の他にも、水和水分子や対イオンの配向や振動、さらには、これらの全原子の量子力学的電子状態を考えると、蛋白質分子の記述には、量子統計力学的には、非常に多くの微視的状态を扱わねばならないことがわかる。

これに対して、熱力学的状態は、微視的状态の部分集合として定義される。例えば、考慮すべき全微視状態が N 個存在し(無限個であってもよい)、これを n 個の部分集合、すなわち熱力学的状態に分けるとする。この時、統計熱力学的に基本的な量であるカノニカル分配関数は、次式のように与えられる。

$$Z(T) = \sum_{\mu=1}^N \exp(-\epsilon_{\mu}/RT) \quad (1)$$

$$Z(T) = \sum_{i=1}^n \sum_{\mu \in i} \exp(-\epsilon_{\mu}/RT) \quad (2)$$

ここで、第 μ 番目の微視的状态の量子力学的エネルギーを ϵ_{μ} とし、エネルギーの縮退している単位にも、別々の番号を与えるものとする。また $\sum_{\mu \in i}$ は i 番目の熱力学的状態に属する全微視的状态についての和を意味する。

このように定義された熱力学的状態の熱力学関数は、以下のように定義される。ここでは、熱力学的状態には添字 $i, j \dots$ を、微視的状态には添字 μ, ν, \dots を用いる。

$$\exp(-G_i(T)/RT) = \sum_{\mu \in i} \exp(-\epsilon_{\mu}/RT) \quad (3)$$

$$H_i(T) = \sum_{\mu \in i} \epsilon_{\mu} f_{\mu}^i(T) \quad (4)$$

$G_i(T)$ は Gibbs 自由エネルギー、 $H_i(T)$ はエンタルピーである。 $f_{\mu}^i(T)$ は、 i 番目の熱力学的状態における、 μ 番目の微視的状态のモル分率であり、次式で定義される。

$$f_{\mu}^i(T) = \exp(-\epsilon_{\mu}/RT) / \sum_{\nu \in i} \exp(-\epsilon_{\nu}/RT) \quad (5)$$

(4)式から、 $H_i(T)$ は、 i 番目の熱力学的状態内の全微視的状态についてのエネルギーの期待値であることがわかる。このように定義された $G_i(T)$ と $H_i(T)$ は、よく知られた次の熱力学的関係式を満たす。

$$\frac{d}{dT} [G_i(T)/RT] = -H_i(T)/RT^2 \quad (6)$$

分配関数は、以上の関係式から

$$Z(T) = \sum_{i=1}^n \exp[-G_i(T)/RT] \quad (7)$$

と与えられる。従って、この系は、 N 個の微視的状态の代りに、 n 個の熱力学的状態により記述できる。

以上の議論では、微視的状态の熱力学的状態への分け方は、任意のやり方でよい。従って、単に、ある系が、「何ヶの熱力学的状態を含んでいるか」とか、「状態間の熱力学関数の差はいくらか」という問題は、熱力学的状態に関する前提がない限り無意味である。この前提は、微視的状态の熱力学的状態へのわりふり方を規定するものでなければならない。次節で議論するように、熱測定においては、熱容量関数と2つの積分定数の指定により、Gibbs 自由エネルギーを規定するという方法で、熱力学的状態を決めるのである。以下では、単に状態と言った時には、上で議論した熱力学的状態を指すものとする。

2.2 熱測定における熱力学的状態の仮定

Fig. 1 に、典型的な球状蛋白質の熱容量関数を示す。320 K 付近のピークの低温側と高温側に、それぞれ、温度の1次関数で記述できる部分が観測される。低温側の直線的な部分を高温側に外挿した熱容量関数 $C_i(T)$ を、ここでは、低温側の熱力学的状態の熱容量曲線と仮定する。多くの球状蛋白質では、native 状態あるいは熱変性状態の熱容量関数は、温度の1次関数で近似できることが知られている⁹⁾。

$C_i(T)$ が決まると、その状態のエンタルピー関数 $H_i(T)$ 、Gibbs 自由エネルギー関数 $G_i(T)$ は、次式および式(6)を用いて、2つの積分定数を仮定することにより決まる。

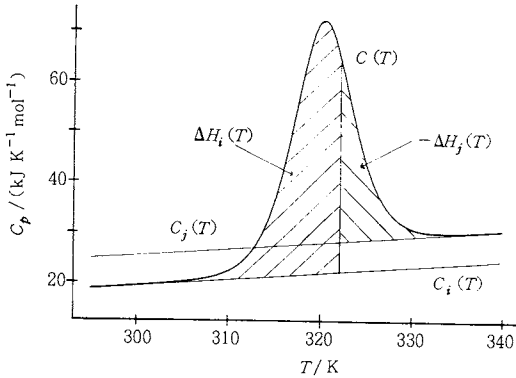


Fig. 1 Typical heat capacity function of a globular protein (thick line) simulating that of hen egg white lysozyme with the thermodynamic functions reported by Privalov et al.^{10,11} Two assumed heat capacity functions $C_i(T)$ and $C_j(T)$ are represented by thin lines. $\Delta H_i(T)$ and $-\Delta H_j(T)$ at $T=322\text{K}$ are represented by the hatched areas.

$$C_i(T) = \frac{d}{dT} H_i(T) \quad (8)$$

2つの定数は、ある温度でのエンタルピー、Gibbs自由エネルギーの値を与えることにより決まる。それらの絶対的な値よりは、むしろ状態間の差が問題となる場合が多いので、これらの定数の絶対値については、ここでは、これ以上議論しない。

系全体の熱容量関数、エンタルピー関数は、微視的状态を用いて

$$H(T) = \sum_{\mu=1}^N \epsilon_{\mu} f_{\mu}(T) \quad (9)$$

$$C(T) = \frac{d}{dT} H(T) \quad (10)$$

と定義される。 μ 番目の微視的状态のモル分率 $f_{\mu}(T)$ は、

$$f_{\mu}(T) = \frac{\exp(-\epsilon_{\mu}/RT)}{\sum_{\nu=1}^N \exp(-\epsilon_{\nu}/RT)} \quad (11)$$

で定義される。式(4)、(5)と比較すると明らかのように、上の定義は、微視的状态全部を1つの熱力学的状態とみなした時の熱力学関数の定義となっていることに注意されたい。このように定義すると、 $H(T)$ と分配関数とは、次式の、よく知られた関係を満たす。この関係式

$$H(T) = RT^2 \frac{d}{dT} \log Z(T) \quad (12)$$

に基づく熱容量曲線の解析法は、最初に、FreireとBiltonenによって与えられた¹²⁾。

i 番目の熱力学的状態を基準とした系全体の差エンタ

ルピー関数、差熱容量関数は、それぞれ

$$\Delta H_i(T) = H(T) - H_i(T) \quad (13)$$

$$\Delta C_i(T) = C(T) - C_i(T) \quad (14)$$

で定義される。Fig. 1にみるように、 $C(T)$ 、 $C_i(T)$ を、実験的に求め、 $\Delta H_i(T)$ を、

$$\Delta H_i(T) = \int_{T_i}^T \Delta C_i(T) dT + h_i \quad (15)$$

と計算できる。ここで h_i は $\Delta H_i(T_i)$ として仮定された定数である。 T_i は、理論的には任意の温度に設定できるが、 h_i の評価のためには、 $H(T)$ と $H_i(T)$ の差が充分小さくなるとみなし得る温度にとるのがよい。Fig. 1では、例えば $T_i = 295\text{K}$ とし、 $h_i = 0$ を仮定する。

$\Delta H_i(T)$ からは、 i 番目の熱力学的状態を基準とした分配関数 $Z_i(T)$ が

$$Z_i(T) = z_i \exp\left[\int_{T_i}^T \frac{\Delta H_i(T)}{RT^2} dT\right] \quad (16)$$

と計算できる。ここで z_i は $Z_i(T_i)$ として仮定された定数である。 $Z_i(T)$ は、 $Z(T)$ から

$$Z_i(T) = Z(T) \exp[G_i(T)/RT] \quad (17)$$

として定義される。 i 番目の熱力学的状態のモル分率 $f_i(T)$ は次式で定義され、それは $Z(T)$ と式(19)の関係がある。

$$f_i(T) = \sum_{\mu \in i} f_{\mu}(T) \quad (18)$$

$$f_i(T) = 1/Z_i(T) \quad (19)$$

従って、 $f_i(T_i) = 1$ とみなすことができれば、式(16)の定数 z_i は1と仮定できる。

NMRや円偏光二色性などの分光学的な測定においては、1つの熱力学的状態は、構造的に記述される。構造的に記述するとは、球状蛋白質分子の(全構成原子、電子の座標とその共役運動量で作る量子力学的な)位相空間の中の、ある部分空間を指定することである。位相空間の中の1点は、微視的状态に対応するから、部分空間を指定することは、上で議論した熱力学的状態の定義と本質的に同じである。このことは、分光学的な手法で観測された構造的な熱転移は、熱測定においても観測され得ることを示している。ただし、その際には、構造的に指定された熱力学的状態に対応する状態にまで、熱容量関数をdeconvoluteする必要がある。

3. 熱容量曲線の解析——解離・会合がおこらない系^{7,8)}

この節では、分子の解離・会合がおこらない場合の熱容量関数の解析について述べ、球状蛋白質 pepsinogenの熱転移に、この手法を適用する²⁾。

3.1 deconvolution 法

式(16)により実験的に求められる分配関数 $Z_i(T)$ は、その定義式(17)から、微視の状態を用いて

$$Z_i(T) = 1 + \sum_{\nu \in i} \exp\{-[\epsilon_\nu - G_i(T)]/RT\} \quad (20)$$

と書ける。ここで、 $\sum_{\nu \in i}$ は、 i 番目の熱力学的状態に含まれない全ての微視の状態についての和である。 i 番目の熱力学的状態に属する微視の状態の寄与は式(20)の右辺の最初の項 1 に全て含まれる。従って、 $Z_i(T)$ から 1 を差し引くことで、次式のように、 $Z_i^{(i)}(T)$ という分配関数が求められる。

$$Z_i^{(i)}(T) = Z_i(T) - 1 \quad (21)$$

この分配関数は、仮想的に、系が i 番目の熱力学的状態に属する微視の状態を含まなかったとした時の分配関数である。この分配関数とエンタルピー関数の関係式を用いることにより、この仮想的な系のエンタルピー関数、熱容量関数は、

$$H^{(i)}(T) = \frac{H(T) - H_i(T) f_i(T)}{1 - f_i(T)} \quad (22)$$

$$C^{(i)}(T) = \frac{C(T) - C_i(T) f_i(T)}{1 - f_i(T)} - \frac{\Delta H_i(T)^2 f_i(T)}{RT^2 [1 - f_i(T)]^2} \quad (23)$$

と与えられる。ここで、 $H^{(i)}(T)$ 、 $C^{(i)}(T)$ は次式で定義される。

$$H^{(i)}(T) = \sum_{\mu \in i} \epsilon_\mu f_\mu^{(i)}(T) \quad (24)$$

$$C^{(i)}(T) = \frac{d}{dT} H^{(i)}(T) \quad (25)$$

ここで、この系での μ 番目の微視の状態のモル分率 $f_\mu^{(i)}(T)$ は、

$$f_\mu^{(i)}(T) = \exp(-\epsilon_\mu/RT) / \sum_{\nu \in i} \exp(-\epsilon_\nu/RT) \quad (26)$$

で定義される。

以上の手続きを *single deconvolution* とよぶ。この解析法のポイントは、熱容量関数を仮定した熱力学的状態の寄与を、系の分配関数から差し引いてしまうことにある。

Fig. 1 で見たように、多くの場合、低温側と高温側と

で、熱容量関数が仮定できる。この場合には、2つの熱力学的状態の寄与を同時に差し引いてしまうことが可能である。すなわち、式(15)、(16)によって、それぞれ $\Delta H_i(T)$ 、 $Z_i(T)$ 、 $\Delta H_j(T)$ 、 $Z_j(T)$ を計算し、 $Z_i(T)$ から 1 と $Z_i(T)/Z_j(T)$ とを差し引けばよい。

$$Z_i^{(i,j)}(T) = Z_i(T) - 1 - Z_i(T)/Z_j(T) \quad (27)$$

なぜならば、次式のように、 $Z_i(T)/Z_j(T)$ は、 $Z_i(T)$ における、 j 番目の熱力学的状態に属する全ての微視状態の寄与に等しいからである。

$$Z_i(T)/Z_j(T) = \sum_{\mu \in j} \exp\{-[\epsilon_\mu - G_i(T)]/RT\} \quad (28)$$

ここで注目すべきことは、

$$Z_i(T)/Z_j(T) = \exp(-\Delta G_{ij}(T)/RT) \quad (29)$$

$$\Delta G_{ij}(T) = G_j(T) - G_i(T) \quad (30)$$

が成立することである。すなわち、熱容量関数の解析においては、中間状態の有無にかかわらず、低温側、高温側の2つの熱容量関数と、通常 $h_i = h_j = 0$ 、 $z_i = z_j = 1$ と仮定される、4つの積分定数を仮定するだけで、この2つの状態間の Gibbs 自由エネルギー差が計算できるのである。このことは、熱測定が、複雑な多状態熱転移の測定として有力なことの1つの証明である。

式(27)で得られた分配関数から、仮想的に i と j との両方の状態が存在しないとした時の系のエンタルピー関数、熱容量関数が、次式のように計算される。

$$H^{(i,j)}(T) = \frac{H(T) - H_i(T) f_i(T) - H_j(T) f_j(T)}{1 - f_i(T) - f_j(T)} \quad (31)$$

$$C^{(i,j)}(T) = \frac{C(T) - C_i(T) f_i(T) - C_j(T) f_j(T)}{1 - f_i(T) - f_j(T)} - \frac{\Delta H_i(T)^2 f_i(T) + \Delta H_j(T)^2 f_j(T) - \Delta H_{ij}(T)^2 f_i(T) f_j(T)}{RT^2 [1 - f_i(T) - f_j(T)]^2} \quad (32)$$

ここで $\Delta H_{ij}(T)$ は、

$$\Delta H_{ij}(T) = H_j(T) - H_i(T) \quad (33)$$

で定義され、実験的には

$$\Delta H_{ij}(T) = \Delta H_i(T) - \Delta H_j(T) \quad (34)$$

と計算される。この手法を *double deconvolution* と呼ぶ。以下に述べる pepsinogen のように、中間状態が2つ以上存在すると考えられる場合など、必要があれば、deconvolute された熱容量関数 $C^{(i)}(T)$ 、 $C^{(i,j)}(T)$ あるいは $H^{(i)}(T)$ 、 $H^{(i,j)}(T)$ を出発点にして、以上の手続きをくり返すことで、更に deconvolute を続けることができる。

Fig. 2 に、pH 7.6 の pepsinogen の熱容量関数を示す。図のように、低温側(N状態)、高温側(D状態)の熱容量

^{a)} S. Kidokoro et al., in preparation. pepsinogen の熱転移は、熱測定によって、2状態転移でないことが初めて示され¹¹⁾、後に、分光学的測定によっても中間状態が見い出された¹²⁾。熱容量関数は、従来3状態として解析されていた¹³⁾。

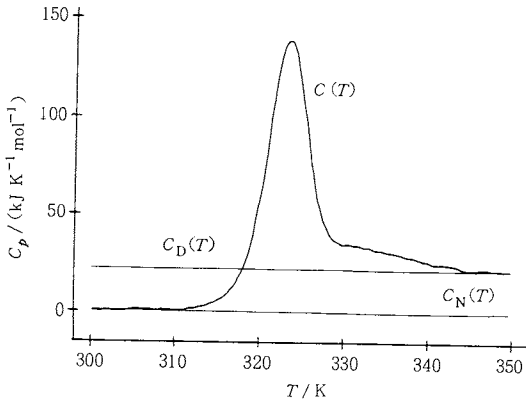


Fig. 2 Heat capacity function of porcine pepsinogen at pH 7.6 measured by DASM-1M differential adiabatic scanning microcalorimeter at a heating rate of 1K/min. Heat capacity is plotted as the excess value from the assumed heat capacity function of the native state $C_N(T)$. The heat capacity function of the heat denatured state $C_D(T)$ is assumed as it has the same temperature coefficient as $C_N(T)$.

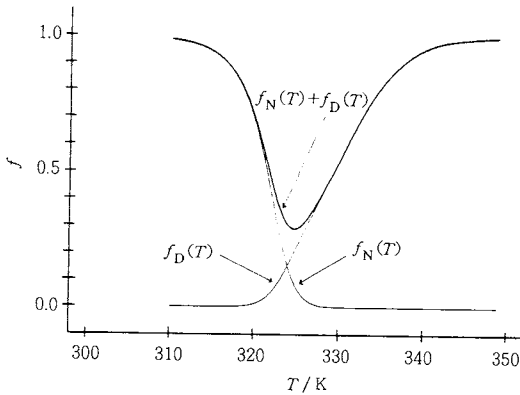


Fig. 3 Molar fraction function of the native state and heat denatured state of pepsinogen at pH 7.6 (thin lines). They are calculated by double deconvolution using the heat capacity functions in Fig. 2.

関数を仮定すると、両状態のモル分率が Fig. 3 のようになり、Fig. 4 のように、 $H^{(N,D)}(T)$ が計算できる。Fig. 3 から明らかなように、この系は、N, D 以外の中間状態が存在する多状態熱転移であり、Fig. 4 で $H^{(N,D)}(T)$ が転移型を示していることから、同図に示したような I_1, I_2 という 2 つの中間状態が存在する、



という平衡であることがわかる。

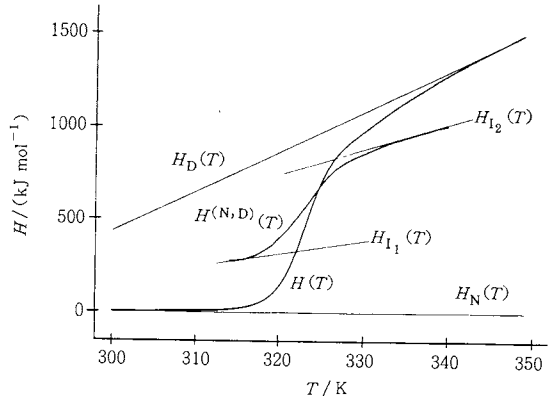


Fig. 4 Enthalpy function of pepsinogen at pH 7.6, $H(T)$, and the hypothetical enthalpy function $H^{(N,D)}(T)$ obtained by the double deconvolution analysis. Enthalpies are plotted as the excess values from the assumed enthalpy function of native state $H_N(T)$. $H_D(T)$ is calculated as the sum of $\Delta H_N(T)$ and $-\Delta H_D(T)$. The enthalpy functions of the two intermediate states, H_{I1} and H_{I2} are assumed.

3.2 最小 2 乗法による熱力学パラメタの最適化

前節で述べた deconvolution 法と、以下に述べる最小 2 乗法とは、互いに相補的な関係にある。

deconvolution 法には (1) 結果が、deconvolute する状態の熱容量関数のとり方に依存し、任意性が残る、(2) 式 (31), (32) 等は、低温側、高温側で発散し、中間状態の熱力学関数の決定に影響する場合がある、(3) 求められた熱力学関数の誤差の推定が難しい、等の問題点があり、一方最小 2 乗法には、モデル関数が熱力学パラメタに対して非線型になるため、反復計算が必要であり、適切なモデルやパラメタの初期値から出発しないと、途中で局所極小構造にとまってしまふ等の問題点がある。特に、多状態熱転移の解析においては、これらの問題は深刻である。

上記の問題点は、両方法を相補的に用いることで解決される。すなわち、(任意性を含んだ) deconvolution の結果から、モデルの状態数、熱力学的なパラメタとその初期値を決め、それらのパラメタの最適化を最小 2 乗法でおこなうのである。これにより、deconvolution 法では、1 部分のデータのみから決めていた各状態の熱容量関数が、全データに整合するように修正され、同時に積分定数も決定される。また、最小 2 乗法の誤差行列を用いて、決定したパラメタの推定誤差を求めることができる¹⁶⁾。deconvolution 法で決めた初期値から出発した場合、最小 2 乗法の収束は、ほとんどの場合、満足のいく

ものである。

もちろん、これで全ての問題が解決できるわけではない。最小2乗法の立場に立つと、状態数を増やし、パラメータを増やすほど残差は小さくなるし、残差が同程度のモデルの選択は問題である。一般的には、状態数やパラメータについては、実験データを誤差内で説明できる最小のモデルを選ぶべきである。実験的には、pHなどの溶液条件を変えた時に、同じモデルで説明可能か、またパラメータの溶液条件依存性は合理的か等で、モデルを吟味することが可能である。さらに、他の測定法の結果と

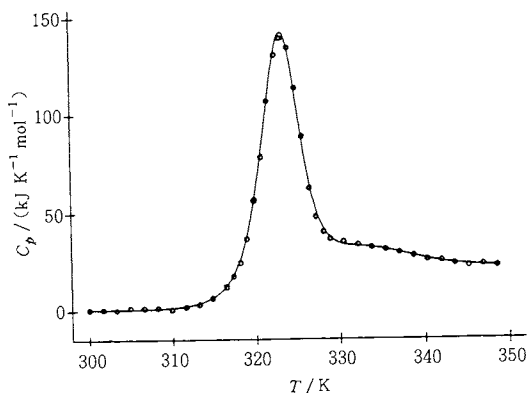


Fig. 5 The best fitted heat capacity function (solid lines) to the observed values of pepsinogen at pH7.6 (circles). The parameters of the model are restricted as all the Δa_{ij} s are fixed to zero. Heat capacity function is plotted as the excess value from the heat capacity function of the native state.

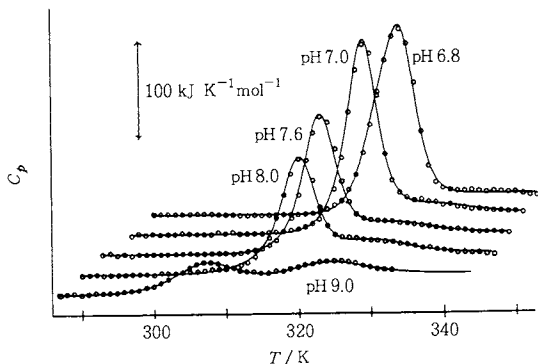


Fig. 6 Heat capacity functions of pepsinogen at the indicated pH (circles) measured by DASM-1M calorimeter at a heating rate of 1K/min. Protein concentrations are about 1mg/ml. Solid lines are their best fitted functions with a four-state model.

比較することで、モデルが妥当か否かが調べられる。

最小2乗法で使うモデル関数については4.2節で述べる。Fig.5は、この方法を用いて、pH 7.6のデータを、式(35)で与えられる4状態モデルでfittingしたものである。ここでは、各状態の熱容量関数は温度の1次関数で記述され、それらの温度依存性は同じであるという、2状態転移を示す比較的小さな球状蛋白質の知見をパラメータの制限としてとり入れている。Fig.6に示すように、同じ4状態モデルを使って、pH 6.8から9までのデータを説明することができる。

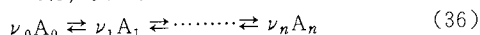
4. 熱容量関数の解析——自己解離・会合を含む系¹⁷⁾

この節では、熱転移に伴って、dimerからmonomerに解離する、あるいはdimerからtetramerに会合するなどの、自己解離会合過程を含む系の熱容量関数の解析法について述べる。従来、このような系に対しては、2状態を仮定した解析しかおこなわれてこなかった^{18,19)}。前節で述べた手法は、以下に見るように、この系に対してそのまま適用することはできない。

解離会合過程を含む系と含まない系の違いは、前者の系の熱容量関数が濃度依存性を持つことである。実験的には、濃度依存性を調べることで両者の区別が可能である。また、2状態解析^{b)}により、転移に分子間の協同性が観測される場合には、濃度依存性を調べるとともに、解離会合の可能性を検討すべきである。

4.1 モル分率とエンタルピーとの関係

ここでは、次に示すような一般的な平衡を考える。



ここで A_i は i 番目の状態を表わし、 ν_i は、その化学量論係数である。式(36)が意味しているのは、 $n+1$ けたの状態が平衡にあることだけであり、反応径路を示したものではない。平衡実験では、一般に、反応径路などの速度論的な情報は得られない。また、平衡論によれば、各状態のモル濃度(厳密には活量)は、Gibbs自由エネルギーで記述できる。すなわち、質量作用の法則から、

$$\frac{(A_j)^{\nu_j}}{(A_i)^{\nu_i}} = \exp\{-\Delta G_{ij}(T)/RT\} \quad (37)$$

が成立し、質量保存則から

$$\sum_{i=0}^n \frac{1}{\nu_i} (A_i) = M \quad (38)$$

が成立する。ここで (A_i) は状態 A_i のモル濃度である。 M は定数であり、ここでは換算モル濃度と呼ぶ。式(37)の $\Delta G_{ij}(T)$ は、状態 A_i のモル当りのGibbs自由エネルギー G_i 等を使って

^{b)} 付録A. 参照

$$\Delta G_{ij}(T) = \nu_j G_j(T) - \nu_i G_i(T) \quad (39)$$

で定義される。i 番目の状態のモル分率を

$$f_i = \frac{1}{M\nu_i} (A_i) \quad (40)$$

で定義すると、式(38)よりただちに

$$\sum_{i=0}^n f_i(T) = 1 \quad (41)$$

が導かれ、式(37)と(38)より、次式が導かれる^{c)}。

$$\frac{d}{dT} \{-\nu_j \log f_j(T) + \sum_{i=0}^n \nu_i f_i(T)\} = \Delta H_j(T) / RT^2 \quad (42)$$

ここで $\Delta H_j(T)$ は、式(43)で定義される換算モル当りの系全体のエンタルピー関数 $H(T)$ と、各状態の1モル当りのエンタルピー関数 $H_j(T)$ を使って式(44)で与えられる。

$$H(T) = \sum_{i=0}^n \frac{(A_i)}{M} H_i = \sum_{i=0}^n \nu_i f_i H_i \quad (43)$$

$$\Delta H_j(T) = H(T) - \nu_j H_j(T) \quad (44)$$

$\Delta H_j(T)$ は、実験的に、式(15)と同様に計算できる。

式(42)で、全ての ν_i を1とし、式(41)に注意すると、前節で議論した、解離会合を含まない系での関係式

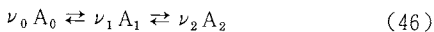
$$-\frac{d}{dT} \log f_j(T) = \Delta H_j(T) / RT^2 \quad (45)$$

が得られる。このように、この節の議論は、前節の議論を内包している。しかし、式(45)により、解離会合のおこらない系では、 $\Delta H_j(T)$ から、ただちに $f_j(T)$ が求められたのに対して、式(42)では、 $\Delta H_j(T)$ には、i 番目以外の状態のモル分率や、化学量論係数が関係しており、次節で示すように、適切なモデルをたてて計算する必要がある。

4.2 double deconvolution 法

この節では、前節で求めたモル分率とエンタルピー関数の関係式を用いて、自己解離会合過程を含む熱転移に対する double deconvolution 法について述べる。1つのみの熱容量関数を仮定する single deconvolution も可能だが、紙面の関係で省略する。

ここでは、次の平衡を仮定する。



今、0番目と2番目の状態の熱容量関数を仮定して、式(15)と同様に $\Delta H_0(T)$ と $\Delta H_2(T)$ を計算する。式(46)の系で、式(41)、(42)を書き下すと

$$\frac{d}{dT} (-\nu_0 \log f_0 + \nu_0 f_0 + \nu_1 f_1 + \nu_2 f_2) = \Delta H_0 / RT^2 \quad (47)$$

^{c)} 前節と同様に、系の分配関数からも導くことができる。付録B. 参照。

$$\frac{d}{dT} (-\nu_2 \log f_2 + \nu_0 f_0 + \nu_1 f_1 + \nu_2 f_2) = \Delta H_2 / RT^2 \quad (48)$$

$$f_0 + f_1 + f_2 = 1 \quad (49)$$

式(47)、(48)の f_1 を式(49)を用いて消去し、式(47)は T_0 から T まで、式(48)は T_2 から T まで両辺を積分すると、

$$\nu_0 \log(f_0/f_0^*) - (\nu_0 - \nu_1)(f_0 - f_0^*) - (\nu_2 - \nu_1)(f_2 - f_2^{**}) + F_0 = 0 \quad (50)$$

$$\nu_2 \log(f_2/f_2^*) - (\nu_0 - \nu_1)(f_0 - f_0^*) - (\nu_2 - \nu_1)(f_2 - f_2^*) + F_2 = 0 \quad (51)$$

となる。 $f_0^*, f_0^{**}, f_2^*, f_2^{**}$ は、それぞれ $f_0(T_0), f_0(T_2), f_2(T_2), f_2(T_0)$ として仮定された定数であり、通常 T_0, T_2 は、 $f_0(T_0), f_2(T_2)$ が1とみなせる温度にとるので、 $f_0^* = f_2^* = 1, f_0^{**} = f_2^{**} = 0$ と仮定される。 F_0, F_2 は

$$F_i(T) = \int_{T_i}^T \Delta H_i(T) / RT^2 dT \quad (52) \quad (i=0, 2)$$

で定義される。これらの式から、 f_0, f_2 に対して、それぞれ ($f_0^* = f_2^* = 1, f_0^{**} = f_2^{**} = 0$ と仮定すると)

$$\nu_0 \log f_0 - (\nu_0 - \nu_1)(f_0 - 1) - (\nu_2 - \nu_1) f_0^{\frac{\nu_0}{\nu_2}} \exp(-\Delta F_{02} / \nu_2) + F_0 = 0 \quad (53)$$

$$\nu_2 \log f_2 - (\nu_2 - \nu_1)(f_2 - 1) - (\nu_0 - \nu_1) f_2^{\frac{\nu_2}{\nu_0}} \exp(\Delta F_{02} / \nu_0) + F_2 = 0 \quad (54)$$

が成立する。ここで ΔF_{02} は次式で与えられる。

$$\Delta F_{02}(T) = F_2(T) - F_0(T) \quad (55)$$

各温度での式(53)、(54)の方程式の解が、 $f_0(T), f_2(T)$ を与える。実際の方程式の解法は、Gauss-Newton 法が使われる。

このように $f_0(T), f_2(T)$ が計算できると、0番目と2番目の状態を仮想的に除いた系のエンタルピー関数 $H^{(0,2)}(T)$ が、

$$H^{(0,2)}(T) = \frac{H(T) - \nu_0 H_0(T) f_0(T) - \nu_2 H_2(T) f_2(T)}{1 - f_0(T) - f_2(T)} \quad (56)$$

と計算できる。

解離会合を含まない系と同様に、中間状態がさらに多状態に分解される場合でも、その化学量論係数が同じであれば、上の方法を適用できる。この場合、deconvolute された系の状態は化学量論係数が同じであるから、第3節で扱った手法で解析できる。しかし、中間状態として、化学量論係数の異なる状態が複数存在する場合、double deconvolution 法は、誤ったモル分率や、エンタルピー関数を与える可能性があることに注意しなければならない。

4.3 最小2乗法

この節では、式(36)で表わされた多状態熱転移の系の持つ熱容量関数を、各状態の熱力学関数より計算する方法について述べる。解離会合過程を含まない系に対しては、以下の議論で、化学量論係数を全て1とすればよい。

各状態のGibbs自由エネルギー関数が与えられたとすると、式(37)と(40)、(41)から、次式を解くことにより、モル分率 $f_i(T)$ が計算できることがわかる。

$$\sum_{j=0}^n \frac{(\nu_i f_i)^{\nu_i/\nu_j}}{\nu_j} \exp\{-\Delta G_{ij}^a(T)/\nu_j RT\} = 1 \quad (57)$$

ここで ΔG_{ij}^a は、みかけのGibbs自由エネルギー関数であり、 ΔG_{ij} と、換算モル濃度 M を用いて、次式で表わされる。

$$\Delta G_{ij}^a(T) = \Delta G_{ij}(T) + (\nu_j - \nu_i)RT \log M \quad (58)$$

式(57)の方程式の解法には、Gauss-Newton法が使われる。全ての ν_i が1の時、式(57)は、

$$f_i(T) = 1 / \sum_{j=0}^n \exp\{-\Delta G_{ij}(T)/RT\} \quad (59)$$

となり、解析的に計算できる。

式(43)の両辺を T で微分すると

$$C(T) = \sum_{i=0}^n \nu_i C_i(T) f_i(T) + \sum_{i=0}^n \nu_i H_i(T) \frac{d}{dT} f_i(T) \quad (60)$$

となる。ここで式(37)より、

$$\frac{(\nu_j f_j)^{\nu_j}}{(\nu_i f_i)^{\nu_i}} = \exp\{-\Delta G_{ij}^a(T)/RT\} \quad (61)$$

が成り立ち、この式の両辺の対数微分をとったものを j について0から n まで和をとることにより

$$\frac{d}{dT} f_i(T) = \frac{-\sum_{j=0}^n \Delta H_{ij}(T) \frac{f_i(T) f_j(T)}{\nu_i \nu_j}}{RT^2 \sum_{j=0}^n \frac{f_j(T)}{\nu_j}} \quad (62)$$

が成立する。これを式(60)に代入することにより、

$$C(T) = \sum_{i=0}^n \nu_i C_i(T) f_i(T) + \frac{\sum_{i < j} \Delta H_{ij}(T)^2 \frac{f_i(T) f_j(T)}{\nu_i \nu_j}}{RT^2 \sum_{i=0}^n \frac{f_i(T)}{\nu_i}} \quad (63)$$

が導かれる。

上の式は、任意の熱力学関数で成立するが、実際には、各状態の熱容量関数を温度の1次関数として、各状態の熱力学関数を決める。すなわち、2つの定数 a_i 、 b_i を用いて、

$$\nu_i C_i(T) = 2 a_i T + b_i \quad (i=0, 1, 2, \dots, n) \quad (64)$$

と仮定する。この時、エンタルピー関数 $\Delta H_{ij}(T)$ は、

$$\Delta H_{ij}(T) = \Delta a_{ij} T^2 + \Delta b_{ij} T + \Delta c_{ij} \quad (65)$$

と表わされる。ここで Δa_{ij} などは、

$$\Delta a_{ij} = a_j - a_i$$

などと定義される。同様にGibbs自由エネルギー関数は、

$$\Delta G_{ij}^a(T) = -\Delta a_{ij} T^2 - \Delta b_{ij} T \log T + \Delta c_{ij} + \Delta d_{ij} T \quad (66)$$

と表わされる。

比較的小さな球状蛋白質で報告されているように、各状態の熱容量関数の温度依存性 a_i を同じとすれば、 Δa_{ij} は全て0となり、 n 状態モデルでは、パラメタの数は $3n-1$ ケとなる。

これらのパラメタから式(57)と(63)を用いて、熱容量関数を計算し、それと実験値との残差の2乗和が最小になるようにパラメタを調節することにより、各パラメタの推定値を計算する。これに用いる最小2乗法の汎用ソフトウェアとしては、SALSシステム²⁰⁾が有用である。以下に述べる hemolysin の解析の場合、double deconvolution で求めた初期値から出発した場合、東大大型計算機センターの日立M680H上で、300点程度のデータ数で、通常30秒程度で収束する。double deconvolution は、NECのPC9801シリーズのマイクロコンピュータで、データの入出力を含め30秒程度で計算できる。

自己解離会合過程を含む多状態熱転移の例として、腸炎ビブリオの hemolysin という球状蛋白質の熱容量曲線を解析した結果を示す⁴⁾。この蛋白質の熱容量曲線は、ピーク温度や形などが、蛋白質濃度依存性を示す。また、2状態解析⁹⁾から、最低2分子の協同性の単位を考えなければならぬ。また、double deconvolution と、その結果を用いた濃度依存性の解析¹⁾から、native状態ではdimer、熱変性状態ではmonomerであることが推定された。中間状態として、何種類かの集合状態を仮定して、全ての濃度のデータを、同じ熱力学パラメタを使って fitting した結果、最も残差2乗和が小さくなったのは、中間状態がmonomerのモデルを用いた時であった。この時、式(66)の Δd_{ij} に次式で与えられる混合エントロピーの補正をおこなった。

$$\Delta d_{ij}(M) = \Delta d_{ij}^* + (\nu_j - \nu_i)R \log M \quad (67)$$

ここで、 M は換算モル濃度、 Δd_{ij}^* は濃度に依存しない fitting パラメタである。

Fig. 7に、観測値と、



というモデルで上述のように fitting した結果を見かけ

⁴⁾ H. Uedaira et al., in preparation

⁹⁾ 付録A. 参照。

¹⁾ 付録C. 参照。

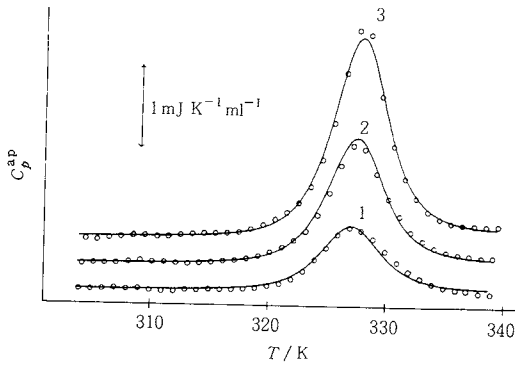


Fig. 7 Apparent heat capacity function of *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin at pH 7.0 measured by DASM-1M calorimeter at a heating rate of 1K/min. Protein concentrations are 0.21mg/ml (curve 1), 0.38mg/ml (curve 2), and 0.57mg/ml (curve 3). Observed data are plotted by circles, and the best fitted functions with three-state model $N_2 \rightleftharpoons 2I \rightleftharpoons 2D$ are shown by solid lines. Heat capacity functions are represented as the apparent values of the protein molecules dissolved in the 1ml solution of the cell.

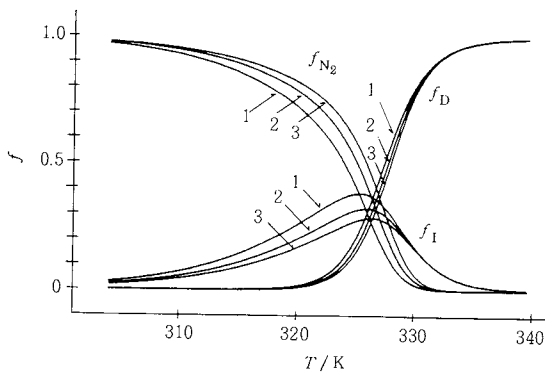


Fig. 8 Molar fraction functions of the three states of hemolysin at pH 7.0. They are calculated from the best fitted parameters of the three-state model. Protein concentrations are indicated by the same number as in Fig. 7.

の熱容量で表示した。これは、セルの体積 1ml の溶液中の蛋白質分子の熱容量であり、この単位で表わすことにより、濃度の異なるデータを、重じ重みで扱うことができる。この単位で表わした、平均的な残差 (Root mean square deviation) は $0.6 \mu\text{W/ml}$ であり、報告されている値²⁾と一致する。また、この蛋白質は native 状態で dimer で存在することが報告されており²¹⁾、熱測定の解析結果と符号する。

Fig. 8 に、各状態でのモル分率を示した。温度が上昇するにつれて、dimer から monomer への解離がおり、熱転移温度付近では、かなりの割合が monomer になっていることがわかる。

5. おわりに

球状蛋白質の多状態熱転移の研究は、最近の発展が著しい分野である。測定法の発達とともに、測定やデータの解析法の発展により、解析結果の定量性や信頼性が高まるばかりでなく、新しい現象の発見、解明につながるものと考えられる。さらに、熱測定の特徴を生かしながら、他の分光学的な手法等と精密に比較解析することにより、複雑な多状態熱転移の物理的解明が可能となるものと思う。

本研究は、東京大学理学部、和田昭允教授の御指導のもとでの博士課程の研究の一部をまとめたものである。熱測定法については、通産省繊維高分子材料研究所、上平初穂博士の御指導を受けた。和田教授、上平博士に深く感謝いたします。

付録 A. 2 状態解析

本文で示したように、熱容量曲線の解析において、2 状態を仮定することは、一般には、必要でない。しかし、この解析によって熱転移の協同性の大きさが推定できるため、deconvolution 法や、最小 2 乗法に先立って、この解析を行うことは有用である。ここでは、自己解離会合を含む系に対して、2 状態



を仮定した解析法を紹介する。解離会合過程を含まない系については、以下の式で、 $\nu_i = \nu_j = 1$ とすればよい。

2 状態解析においても、double deconvolution 法と同様に、低温側、高温側の熱容量関数を仮定して、 $\Delta H_i(T)$ 、 $\Delta H_j(T)$ を得る。これより、熱測定エンタルピー関数 $\Delta H^{\text{cal}}(T)$ は、

$$\Delta H^{\text{cal}}(T) = \Delta H_i(T) f_i(T) - \Delta H_j(T) f_j(T) \quad (\text{A. 2})$$

で定義される。これは $\Delta H_{ij}(T)$ と同じ関数である。(A. 1) 式より、系全体のエンタルピー関数 $H(T)$ が

$$H(T) = \nu_i H_i(T) f_i(T) + \nu_j H_j(T) f_j(T) \quad (\text{A. 3})$$

$$f_i(T) + f_j(T) = 1 \quad (\text{A. 4})$$

と表わされ、これより

$$\Delta H_i(T) = \Delta H_{ij}(T) f_j(T) \quad (\text{A. 5})$$

$$\Delta H_j(T) = -\Delta H_{ij}(T) f_i(T) \quad (\text{A. 6})$$

が成立する。(A. 1) 式の平衡定数 $K_{ij}(T)$ は

$$K_{ij}(T) = (A_j)^{\nu_j} / (A_i)^{\nu_i} \quad (\text{A. 7})$$

で与えられる。(A_i) は状態 A_i のモル濃度である。van't Hoff エンタルピー関数 $\Delta H^{\text{vH}}(T)$ は、次式で定義され

る。

$$\Delta H^{vH}(T) = RT^2 \frac{d}{dT} \log K_{ij}(T) \quad (A.8)$$

式(40)と、これらの式から、 $\Delta H^{vH}(T)$ は
 $\Delta H^{vH}(T)$

$$= RT^2 \left\{ \nu_j \frac{\Delta C_i(T)}{\Delta H_i(T)} - \nu_i \frac{\Delta C_j(T)}{\Delta H_j(T)} + (\nu_i - \nu_j) \frac{\Delta C_{ij}(T)}{\Delta H_{ij}(T)} \right\} \quad (A.9)$$

と計算される。 $\Delta H^{cal}(T)$ と $\Delta H^{vH}(T)$ が一致することは、この系が(A.1)式で記述できることの必要十分条件であることが証明できる。また、 $\Delta H^{vH}(T)$ が $\Delta H^{cal}(T)$ より大きい場合、(A.1)式で考慮した協同性の単位を、もっと大きくしなければならぬことを示す。 $\Delta H^{vH}(T)$ が $\Delta H^{cal}(T)$ より小さい場合、(A.1)式の協同性の単位が大きすぎるか、あるいは、多状態熱転移であることを示す。注意すべきことは、通常の van't Hoff プロットによる解析と同様に、(A.9)の右辺は、低温側、高温側で発散するため、発散の影響のない範囲で $\Delta H^{cal}(T)$ と比較する必要があることである。

付録B. 分配関数による式(42)の導出

式(3)で与えられる*i*番目の状態の全微視的状態の寄与を $J_i(T)$ とおき、*i*番目の状態にある分子の数を N_i とすると、全体の分配関数は、

$$Z(N_0, N_1, \dots, N_n, T) = \prod_{i=0}^n J_i(T)^{N_i} / N_i! \quad (B.1)$$

で与えられる。質量保存則より、

$$\sum_{i=0}^n \frac{N_i}{\nu_i} = N_r \quad (B.2)$$

が成立する。 N_r は換算分子数であり一定である。平衡状態では、(B.2)式を満たしながら分配関数を最大にする分子数 N_i が実現する。Lagrangeの未定乗数を λ とすると、次式で定義される*I*を最大にする N_i を求め

$$I = \log Z + \lambda \sum_{i=0}^n \frac{N_i}{\nu_i} \quad (B.3)$$

ことにより、 N_i は、

$$N_i = J_i(T) \exp(\lambda / \nu_i) \quad (B.4)$$

と決まる。いま、*i*番目の状態のモル分率を

$$f_i = \frac{N_i}{\nu_i N_r} = \frac{J_i(T) \exp(\lambda / \nu_i)}{\nu_i N_r} \quad (B.5)$$

と定義すると、式(B.2)、(B.5)より

$$\sum_{i=0}^n f_i(T) = 1 \quad (B.6)$$

が成立する。また、式(B.1)、(B.4)より

$$\log Z = \left\{ \sum_{k=0}^n J_k(T) \exp(\lambda / \nu_k) - \lambda N_r \right\} \quad (B.7)$$

と書ける。(B.5)を用いると

$$\log Z = N_r \left[\sum_{k=0}^n \nu_k f_k - \nu_i \log \frac{f_i \nu_i N_r}{J_i} \right] \quad (B.8)$$

と書ける。分配関数とエンタルピー関数の関係より、

$$H(T) = RT^2 \frac{d}{dT} \left[-\nu_i \log f_i + \sum_{k=0}^n \nu_k f_k \right] + \nu_i RT^2 \frac{d}{dT} \log J_i(T) \quad (B.8)$$

で与えられる。 $J_i(T)$ の定義から、上式右辺の最後の項は、 $\nu_i H_i(T)$ と等しく、最終的に次式が導出される。

$$\frac{d}{dT} \left[-\nu_i \log f_i + \sum_{k=0}^n \nu_k f_k \right] = \frac{\Delta H_i(T)}{RT^2} \quad (B.9)$$

付録C. 濃度依存性の解析

従来、熱容量曲線のピーク温度の濃度依存性より、エンタルピーを評価し、それと ΔH^{cal} を比較するという解析が行なわれているが¹⁹⁾、これは2状態転移の場合に、しかも近似的に成立するものであった。この節では、double deconvolutionの結果を用いて、多状態転移にも適用できる、濃度依存性の解析法を紹介する。

double deconvolutionにより、 $f_i(T)$ 、 $f_j(T)$ が計算されると、式(58)、(61)より、*i*、*j*状態間のGibbs自由エネルギー差 ΔG_{ij} が、換算モル濃度*M*を用いて、

$$\Delta G_{ij}(T) = -RT \log \frac{(\nu_j f_j)^{\nu_j}}{(\nu_i f_i)^{\nu_i}} - RT(\nu_j - \nu_i) \log M \quad (C.1)$$

と計算できる。 ΔG_{ij} は ΔG_{ij}^0 とは異なり、蛋白質濃度には依存しない関数であるから、(C.1)の右辺を、各濃度で計算し、その一致を調べることで、化学量論係数の仮定が妥当か否か判断できる。

さらに、式(53)、(54)より、(C.1)の右辺を $\Delta H_i(T)$ 、 $\Delta H_j(T)$ を用いて表わすと、

$$\Delta G_{ij}(T) = RT \left\{ \int_{T_j}^T \Delta H_j(T) / RT^2 dT + \nu_j - \nu_j \log \nu_j - \int_{T_i}^T \Delta H_i(T) / RT^2 dT - \nu_i + \nu_i \log \nu_i \right\} - RT(\nu_j - \nu_i) \log M \quad (C.2)$$

が成立し、 ΔG_{ij} の計算には、中間状態の化学量論係数の仮定は不要であることがわかる。この性質は、熱容量関数の濃度依存性から、化学量論係数を決める時、中間状態の化学量論係数を調べることなしにモデルを吟味できるという点で有用である。

同様に、中間状態についても、式(C.1)を用いることで、濃度依存性の解析を行うことができる。この場合、結果は、*i*、*j*両状態の化学量論係数に依存するため、 ν_i 、 ν_j をあらかじめ調べておく必要がある。

参考文献

- 1) 城所俊一, 猿渡 茂, 陶山 明, 和田昭允, 高分子 **34**, 966 (1985)
- 2) P. L. Privalov, *Pure & Appl. Chem.* **52**, 479 (1980)
- 3) P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 459 (1982)
- 4) M. Ohgushi, A. Wada, *Adv. Biophys.* **18**, 75 (1984)
- 5) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **35**, 1 (1982)
- 6) 深田はるみ, 熱測定への進歩 **2**, 67 (1984)
- 7) S. Kidokoro, A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987)
- 8) 上平初穂, 城所俊一, 和田昭允, 生物物理 **27**, 60 (1987)
- 9) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979)
- 10) N. N. Khechinashvili, P. L. Privalov, E. L. Tiktopulo, *FEBS Lett.* **30**, 57 (1973)
- 11) P. L. Privalov, N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **86**, 665 (1974)
- 12) E. Freire, R. L. Biltonen, *Biopolymers* **17**, 463 (1978)
- 13) P. L. Mateo, P. L. Privalov, *FEBS Lett.* **123**, 189 (1981)
- 14) A. Wada, Y. Saito, M. Ohgushi, *Biopolymers* **22**, 93 (1983)
- 15) P. L. Privalov, P. L. Mateo, N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **152**, 445 (1981)
- 16) S. Brandt, "Statistical and Computational Methods in Data Analysis", 2nd ed., North Holland, Amsterdam (1975)
- 17) S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, *Biopolymers* (submitted)
- 18) K. Takahashi, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **20**, 6185 (1981)
- 19) R. O. Calderon, N. J. Stolowich, J. A. Gerlt, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 6044 (1985)
- 20) T. Nakagawa, Y. Oyanagi, "Recent Developments in Statistical Inference and Data Analysis", K. Matusita ed., North Holland, Amsterdam (1980)
- 21) Y. Takeda, S. Taga, T. Miwatani, *FEMS Microbiol. Lett.* **4**, 271 (1978)

熱測定への進歩 第5巻

(熱・温度測定と熱分析 1987)

編集：日本熱測定学会

発行：(株)科学技術社

B 5 版 5,000円 (送料300円)

〒113 東京都文京区湯島 1-5-31
第一金森ビル Tel. 03-815-8163

〈目 次〉

- | | |
|-------------------------------|-----------------------|
| 1. 医薬品と熱分析 | (武田薬品試験分析センター) 仲町秀雄 |
| 2. 遷移金属硫化物の構造と不定比性 | (東工大) 谷口雅男 |
| 3. 金属酸化物の不定比性化学 | (東工大工材研) 丸山俊夫, 齋藤安俊 |
| 4. 高温度域における温度概念 | (東京農工大) 大沢敏彦 |
| 5. レーザーフラッシュ・カロリメトリーによる熱容量測定 | 高橋洋一 |
| 6. 高温カロリメトリー | (阪大工) 西脇 醇 |
| 7. MS, GC/MS, FTIR を用いた発生気体分析 | (島津製作所) 荻野和己, 沖野孝之 |
| 8. 光交流法熱測定装置の最近の進歩 | (真空理工) 前園明一, 加藤良三 |
| 9. 拡張熱機械測定装置と粘弾性測定 | (セイコー電子工業) 中村信隆, 寺本芳彦 |
| 10. 非接触超高温熱膨張計 | (理学計測) 鈴木左門, 中澤幸二 |
| 付. 熱測定関連機器資料 | |