

時間分解熱測定—ストップフロー熱量計の開発とミオシンATPase反応の解析

児玉孝雄*

(昭和62年9月7日受理)

Time-resolved Calorimetry: Construction of a Stopped-flow Calorimeter and Kinetic, Thermodynamic Analysis of Myosin ATP Hydrolysis

Takao Kodama

A thermal stopped-flow method and its application to biochemical studies are described. The instrument, which was recently constructed for this purpose, consists of a flow-through calorimetric cell, a double two-jet type mixer, and a rapid solution delivery device. Special features of the instrument are: a high sensitivity and a rapid response with the use of a small thermopile consisting of 100 constantan/chromel couples per cm (a thermal sensitivity of $5.9 \text{ mV K}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); a good thermal equilibration between the cell and reactant solutions; and an accurate, reproducible control of flow rate of reacting solution. Using this stopped-flow calorimeter it is now possible to resolve the heat change accompanying a pre-steady state of ATP hydrolysis by myosin into three phases under certain conditions (e.g., at 15°C , pH 7.0 or at 0°C , pH 8.0): a rapid heat burst which is complete before the flow stop; a fairly rapid heat absorption; and a very slow heat production. On the basis of kinetics and other biochemical evidence, these heat changes are assigned respectively to those for ATP binding to myosin, splitting of bound ATP into bound ADP + Pi, and release of Pi from myosin.

1. はじめに

溶液化学反応の時間経過を観測する手段としての熱あるいは温度変化の測定は、1920年代初期のHartridgeとRoughton¹⁾によるヘモグロビン(Hb)と一酸化炭素(CO)の結合速度測定まで遡ることができる。その方法は連続フロー法といわれるもので、測定管内を定速で流れる溶液中で進行するHbとCOの結合による温度変化を熱電対によって検出する。しかし、この連続フロー法では、溶液を流したままで測定をしますので、莫大な量の試料が必要であり、測定対象が極限されてしまう。その後、ストップフロー法(次項参照)が開発されて、この試料の経済性の問題は解決されたが、ほぼ同時期に実用化された光電管や、後に開発された高感度の光電子倍

増管を用いた分光学的方法が反応検出の主流となり、感度、時間応答特性で劣る熱電対は殆どかえりみられなくなった。

周知のように、その後、このストップフロー法をはじめとする迅速反応研究法の開発・改良によって、酵素反応の前定常状態、非定常状態の解析が広く行われ、反応機構の動力学的な知見は著しく深められた²⁾。しかし、酵素反応機構の理解には、熱力学的な知見も欠かせないことから、1960年代以降、米国のBergerを初めとする、多くの研究者たちがサーミスタなどの検出器や観測室の構造を工夫して、ストップフロー熱測定装置の試作を行ったが³⁾⁻⁵⁾、酵素反応の研究に汎く応用されるには至っていない。

一方、英国の生理学者A. V. Hill(1886-1977)によって始められた熱電堆を用いた筋肉の熱産生測定は、筋収縮機構研究の重要な解析方法である⁶⁾。ここでは、力学的測定と共におこなわれるミリ秒(ms)領域の時間分解熱測定が、収縮系の熱力学的状態に関する貴重な知

* 岡山大学歯学部口腔生化学教室：岡山市鹿田町2-5

見をもたらしている⁷⁾。現在では、単一筋繊維の熱産生性測定も可能なほど⁸⁾、高感度の小型熱電堆が開発されている。1974年以来、ミオシン*によるATP加水分解の熱力学的解析を行ってきた筆者は⁹⁾、この点に着目して、ここ数年来、大分医科大学の米谷快男児博士と協同で、筋肉熱産生測定用の熱電堆を利用したストップフロー熱測定装置の開発にとりくんでいる。本稿ではその概要と、これを用いて行ったミオシンATPase反応の前定常状態解析^{10),11)}について簡潔に述べてみたい。この小文が、時間分解熱測定の新たな発展につながれば幸いである。

2. ストップフロー熱測定の対象と特徴

ストップフロー測定法は、2種の溶液を急速に流して混合することによって反応を開始した後、反応溶液が観測室を満たしたところで、流れを急速に停止して、そのまま反応を進行させ、これを、(通常は)分光学的な方法で検出記録する。ストップフロー熱測定も反応検出手段として熱電堆を用いる外は、原理的には変わりがない。しかし、検出する温度変化は、ミリ度(mK)レベルあるいはそれ以下の微小熱測定である。したがって、装置の設計に際しては、反応溶液を高速で流して混合する部分と反応の進行を検出する部分、および装置を収納する恒温槽のそれぞれに特有の工夫が必要である。これらの点を説明するためには、ストップフロー熱測定の対象について考えてみる必要がある。

2.1 速い熱変化と遅い熱変化

ストップフロー測定においては、反応溶液が混合装置から検出装置に流れ至る間に進行した反応の時間経過は観測されない。反応が観測されないこの時間を不感時間(dead time)という。流速が大きいほど、不感時間は短い。われわれの装置では、流速を制限しているために(3.2参照)、不感時間は10msである。この間に完了してしまう速い反応ともなう熱変化の時間経過は追跡できない。しかし、このような速い熱変化(h_{fast})も、その大きさは正確に評価する必要がある。これに対して、経時変化の観測される遅い熱変化(h_{slow})は、その速

* 筋肉を構成する主要タンパク質。筋収縮において、ATPの化学エネルギーが力学的仕事に変換されるときに、ATP分解酵素として重要な役割を果たす。このミオシンをタンパク質分解酵素で成理してえられるサブフラグメント1(SF-1, 相対分子質量 $M_r=1 \times 10^5$)は、酵素的な性質がもとのミオシンと変わらない上に、生化学的取扱いが容易なので、動力学的な研究に汎用される。本文では、ミオシンとSF-1を特に区別しないで用いている。

度と大きさを測定することが研究の目標となる。

われわれの当面の研究課題であるミオシンとATPの反応を例にとってみよう。この反応の主な中間過程は、ミオシンへのATPの結合、結合したATPの加水分解(ミオシン・ADP・Pi複合体の形成)、Piの遊離、ADPの遊離、の4段階である。このうち後半の2つの過程は比較的遅く、以前にKodamaとWoledgeによって開発された迅速熱量計¹²⁾でも観測することができる。これに対して、第一段階のATPの結合は非常に速く、通常のストップフロー法(不感時間<5ms)でも、その時間経過の一部分しか観測されない。すなわち、ATP結合にともなう熱変化は、 h_{fast} である。次のATPの加水分解も速い反応であるが、その速度は測定条件によって大きく変わる。したがって、設定された測定条件によっては、ATPの結合と加水分解を、熱測定的に分離できる可能性がある。

2.2 測定に影響を与える因子

これらの各反応中間過程の反応熱の出入りは、これまでの熱測定の経験に基づく⁹⁾、 50 kJ mol^{-1} 前後と推定される。これは、反応開始後のSF-1濃度を 10 g dm^{-3} ($100 \mu\text{M}$)とすると、 5 J dm^{-3} の熱変化に対応し、周辺への熱損失を無視することができれば、温度変化は 1.2 mK となる。この程度の温度変化そのものは、熱電堆で比較的容易に測定できる。しかし、実際の熱測定では、次のような要因が、中間過程反応熱の高精度測定を困難にしている。

- (a) 混合前の溶液と観測室の温度差 $\Delta\theta$
- (b) Work heat (h_{work})—反応開始のために、溶液を高速で流すときに流体になされる仕事が熱に変化することに由来し、大きさは流速の自乗に比例する—(Fig.5参照)のばらつき
- (c) センサー(熱電堆)の熱容量 C_d
- (d) 観測室からの熱損失

反応開始直後(h_{slow} と熱損失が無視できる時間内)の温度変化 ΔT は、次式で表される：

$$\Delta T = \frac{h_{fast} + h_{work} + h_{dil}}{C_r + C_d} + \Delta\theta$$

ここで、 h_{dil} はSF-1の希釈熱(ATPの希釈熱は、溶液調製に注意すれば、無視できるほど小さい)、 C_r は反応溶液の熱容量である。この式は、 h_{fast} を観測するには、SF-1とATPの混合の外に、SF-1を、ATPを除いた外は同組成の緩衝液と混合して、 $h_{work} + h_{dil}$ を評価する必要があることを示している。この一組の実験で、 $\Delta\theta$ 、 h_{work} が一定しないと、 h_{fast} の測定精度は低下する。一方、 h_{slow} の測定においては、時間経過そ

のものは、 $\Delta\theta$ 、 h_{work} の影響は直接受けないが、これらのばらつきは基線の変化をもたらす、大きさの評価を困難にする。 C_d を小さくすることは、装置の感度と時間応答特性を向上させるための必須条件である。また、観測室からの熱損失（壁材の熱容量・熱伝導）が大きいと、熱変化曲線の歪が大きくなる。これらの問題を考慮して開発したストップフロー熱測定装置の全体の概念図をFig. 1に示す¹³⁾。

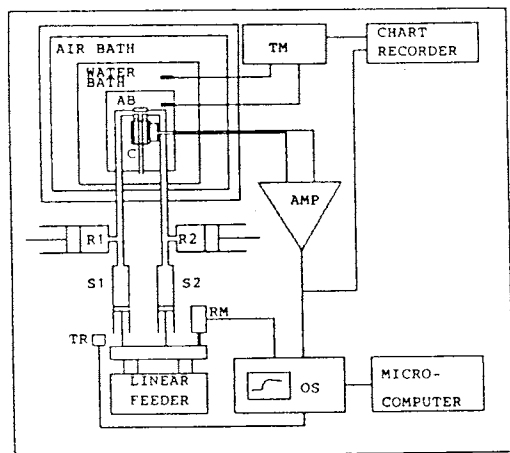


Fig. 1 Block diagram of thermal stopped-flow system.

3. ストップフロー熱量計

3.1 観測室／混合装置

観測室 (Fig. 1 C) は、通常の熱量計の反応容器に相当する部分であるから、材質の熱伝導度、熱容量を考慮する必要がある。また、ストップフロー測定装置としては、耐圧性と不感時間が可及的に短くなる構造が要求される。現在の装置の観測室は、肉薄のテフロンチューブ (外径 2.6 mm/内径 2.0 mm) の中央部に、反応溶液の流れる方向に沿って温接点が配列するように、熱電堆を挿入したものである。混合室は、double T-jet 型の単純な構造であるが、十分な混合効率がえられる。その中心部から熱電堆接点配列中心までの距離は 15 mm なので、溶液流速 1.5 ms^{-1} のとき、不感時間は 10 ms である。

温度センサとしては、当初は^{10),11)}、銀/コンスタンタン熱電堆 (温接点密度, 120 cm^{-1} ; 熱起電力, $3.6 \text{ mV K}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^{14),15)}), 最近では、より高感度のコンスタンタン/クロメル熱電堆 (温度接点, 100 cm^{-1} ; 熱起電力, $5.6 \text{ mV K}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 英国 Plymouth 臨海生物学研究所の Dr. J. V. Howarth の考案) を用いている。これらの

熱電堆、絶縁材として厚さ $10 \mu\text{m}$ のポリイミドフィルムが使用されているので、熱容量が小さく、熱伝導性が良いため、きわめて時間応答特性がよい (時定数 $\leq 5 \text{ ms}$)。

3.2 溶液駆動装置

通常のストップフロー装置では、不感時間を短縮するために、溶液は 5 m/s 以上の高速で駆動される。しかし、ストップフロー熱測定では、熱電堆の強度・圧変化感受性、 h_{work} の大きさ (Fig. 5 参照) を考慮すると、流速は 2 ms^{-1} が限界である。重要なことは、2. で述べたように、流速を制御して、 h_{work} のばらつきを最小限にすることである。われわれの装置では、溶液駆動用注射器 (Fig. 1 S1/S2, なお R1/R2 は溶液溜) のプランジャーを、油圧ダンパ制御のガス駆動シリンダ (Fig. 1 LINEAR FEEDER, 西ドイツ Fest 社製) によって推進し、反応溶液を混合装置を通して、一定速度で観測室に送り込んでいる。推進速度を、linear potentiometer (Fig. 1 RM) で測定して、流速を計算する。

3.3 恒温槽

式(1)の $\Delta\theta$ とそのばらつきを最小限にするためには、観測室と混合装置を同温度の環境におくとともに、その温度ドリフトをできるだけ小さくする必要がある。これを実現するために、これらの熱量計心臓部をアルミニウムブロック 2 枚構成のハウジングに入れて (Fig. 1 AB)、空気恒温槽 (東京理工製、温度制御精度 $\leq \pm 0.01 \text{ K}$) 内に静置した水槽に沈める。このように観測室・恒温槽を入れ籠構造にして (Fig. 1 参照)、外部から熱攪乱を与えないで 10-15 時間放置すると、基線が安定して、 h_{fast} の高精度測定が可能となる。

3.4 信号処理

熱電堆からの出力は、増幅器 (Fig. 1 Amp, チョップ安定化アンプ Ancom 15c3a, またはオペアンプ PMI OP27+OP07) と遮断中心周波数 300 Hz の 8 次ベッセル特性低域通過フィルタ (NF 回路ブロック設計) を通して、デジタルストレージオシロスコープで取り組む。次に、パーソナルコンピュータに転送し、時間熱変化曲線の減算、加算平均、平滑化処理、熱損失補正などの演算処理を行う。

4. 装置の較正と h_{fast} の測定

熱感度較正のために、半当量中和した 0.2 M Tris 溶液を $2-8 \text{ mM}$ の HCl と混合したときの熱量計の出力を測定する (Fig. 2)。どの HCl 濃度でも、フローが停止したときには、熱量計の出力はほぼ最大に達しており、その後徐々に減衰する (熱損失)。熱損失曲線は、いくつかの指数関数の線形和として近似できる。主な 2 つの

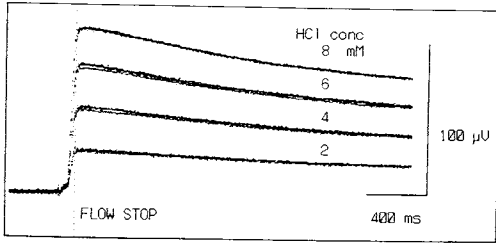


Fig. 2 Calibration of stopped-flow calorimeter. Four traces of heat records were superimposed for each concentration of HCl mixed with half-neutralized 0.2 M Tris. All concentrations refer to those before mixing. Temperature, 15°C. Flow rate, 1.5 ms⁻¹.

成分の時定数は、10秒と20秒である。出力の最大値をHCl濃度に対してプロットすると、直線なり、その傾きとTrisの中和熱(-47.5KJ mol⁻¹ 16)から、熱感度が計算される。この装置で評価した他のpH緩衝液の中和熱(Fig. 3), RNase Aへの3'-CMP結合熱、結合定数(Fig. 4)はいずれも文献値とよく一致した。言うまでもなく、これらの熱変化はいずれも微小な h_{fast} である。このような h_{fast} の高感度測定を正確に行うことができたり、Fig. 5のように、 h_{work} が実際に流速の自乗に比例することが示されたことは、本装置においては、 $\Delta\theta$ および h_{work} が精度良く制御されていることを反映している。

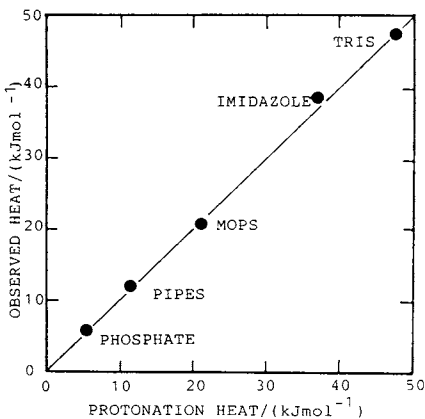


Fig. 3 Measurement of protonation heat of buffers by the stopped-flow calorimeter calibrated as described in Fig. 2. Observed values were plotted against those given in Ref. 17.

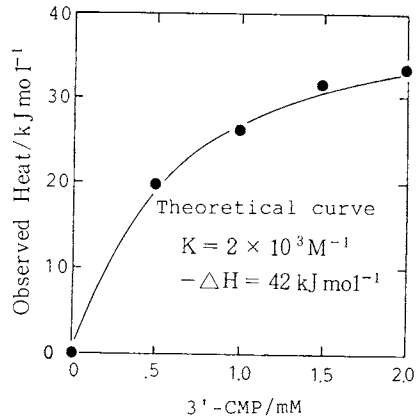


Fig. 4 Measurement of heat of 3'-CMP binding to RNase A at 25°C. Conditions: 50 mM Na-acetate buffer (pH 5.5), 0.03 mM RNase A. The line was fitted according to an equation, $h_{obs} = (-\Delta H) \cdot K \cdot C / (1 + K \cdot C)$ where h_{obs} is observed heat, ΔH heat of 3'-CMP binding to RNase A, K binding constant, and C 3'-CMP concentration, and ΔH and K are adjustable parameters for an iterative least squares analysis. The best fit values are -42 kJ mol⁻¹ and 2×10^3 M⁻¹, respectively, which are in good agreement with those given by Eftink *et al.* 18).

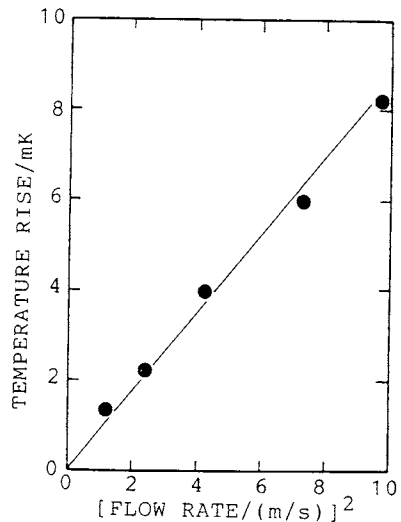


Fig. 5 Work heat as a function of flow rate in stopped-flow calorimetry. The same two solutions of 0.2 M Tris (pH 8.0) were mixed in the stopped-flow calorimeter, and the maximum outputs of the calorimeter were plotted against flow rates.

5. ミオシンATPase 反応解析

5.1 迅速熱量計による解析

ミオシン(SF-1) ATPase 反応中間過程の熱力学的解析は, Yamada ら¹⁹⁾ によって始められ, Woledge と筆者によって迅速熱量計を用いた研究に引き継がれた⁹⁾. その結果, 2.で述べた4つの主な中間過程のうち, これまでに, ミオシンATP Pi 複合体からのPiの遊離とそれに続くADP遊離の2つの過程の反応熱が評価されている。しかし, 迅速熱量計¹²⁾を用いた測定では, その応答速度(〜1s)に較べて, 結合したATP加水分解過程はるかに速いため, 先行するATP結合と熱測定的に分離されず, Fig. 6のような熱変化曲線がえられる。すなわち, 反応開始直後に速やかな発熱があり, その後指数関数的な遅い発熱がある。この遅い発熱過程の時定数が, 別の方法で測定されたPi遊離過程の時定数に等しいことから, 先行する速い発熱がATPの結合

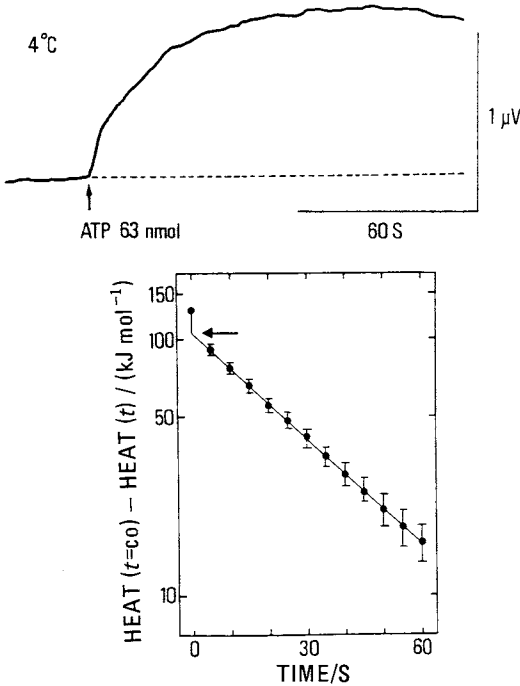


Fig. 6 Time course of heat production on mixing of ATP with excess myosin subfragment-1 with ATP at 4°C, pH 8.0 in a rapid response calorimeter¹²⁾. A: experimental record from the calorimeter. B: semilogarithmic record. The arrow shows the intercept of an extrapolation of the linear part of the plot on the heat axis. Heat is expressed per mol of ATP.

と加水分解の両過程に対応すると考えられる。これら2つの過程を熱測定的に分離することが, 筆者がストップフロー熱量計の開発に取り組んだ最大の目的であった。前述のように, 装置の性能と信頼性が向上した最近になって, この目標をほぼ達成することができた。

5.2 ストップフロー熱測定による解析

Fig. 7は, 25°C, pH 8.0におけるSF-1とATP, ADP, ATPγS(ATPアナログで, 加水分解過程の速度がATPの場合の1/1000)相互作用のストップフロー熱測定の結果である。この条件下では, ATPの加水分解が速い(>200s⁻¹)のために, ATPの結合と加水分解は不感時間内に完了してしまう。したがって, 反応初期には, 速い発熱のみが見られる(ここでの時間スケールでは, Pi遊離にともなう発熱はほとんど認められない)。これに対して, ATPγSの場合には, 加水分解過程の速度が非常に遅いかわりに, 生成物の遊離が非常に速いために, 不感時間内に完了する速い, 大きな発熱の後にゆっくりした発熱がみられる。この発熱速度は, 加水分解の速度にはほぼ等しい。興味深いことは, 先行する速い発熱の大きさは, ADP結合にほぼ等しく, ATPの場合の速い発熱よりずっと大きいことである。

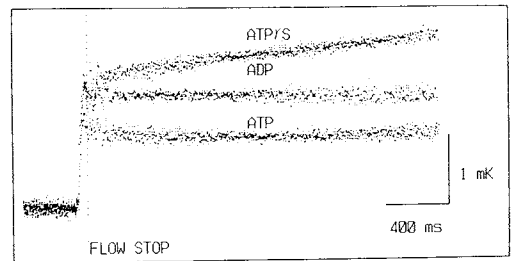


Fig. 7 Stopped-flow calorimetric records of interaction of SF-1 with ATP, ADP and ATPγS at 25°C, pH 8.0. The records were corrected for heats derived from dilution of SF-1 and mixing. Concentrations before mixing: SF-1, 0.17 mM; Nucleotides, 1.0 mM.

温度を15°Cに下げると, ATP加水分解における速い発熱の後に, 不感時間内ではあるが, 吸熱相が認められるようになる(Fig 8)。ところが, pH7.0では, 溶液の流れ停止(flow stop)後, およそ40msぐらい持続する吸熱相がみられる。ただし, 流れ停止以前に吸熱は既に始まっているので, その大きさを正確に評価することは困難である。さらに温度を下げると, pH8.0においても発熱と吸熱とが分離される。Fig. 9は, 0°Cにおける予備の結果である¹¹⁾。この場合, 吸熱反応は流れ停止後に始まるので, 熱変化の大きさが推定できる。発

熱, 吸熱の推定値は, それぞれ, 約 -50 kJ mol^{-1} , $+60 \text{ kJ mol}^{-1}$ である。また, 吸熱反応の速度定数は, およそ $20-25 \text{ s}^{-1}$ と推定される。このように, 温度や pH が低下した場合, ATP の加水分解速度は, 25 s^{-1} ($\text{pH} 8.0, 5^\circ\text{C}$) $- 55 \text{ s}^{-1}$ ($\text{pH} 7.0, 15^\circ\text{C}$) 程度まで遅くなることが知られている²⁰⁾。したがって, Fig. 7-9 で見られる吸熱相は, ATP の加水分解過程に対応し, 速い大きな発熱は, SF-1 への ATP の結合にともなう熱変化に対応すると考えられる。

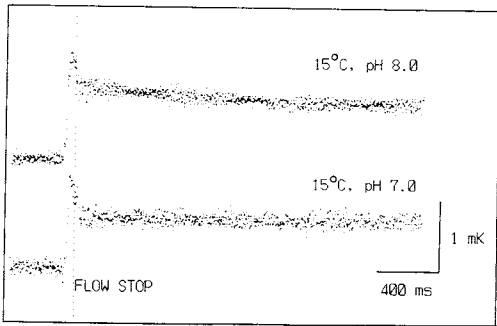


Fig. 8 Stopped-flow record of interaction of SF-1 with ATP at 15°C . See Fig. 7 for experimental conditions.

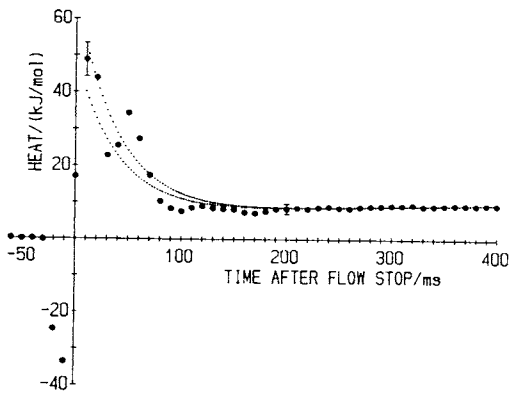


Fig. 9 Stopped-flow calorimetric record of ATP hydrolysis by myosin subfragment-1 at 0°C , pH 8.0. Results of 25 records with ATP and of 17 records with buffer were averaged separately, and the difference between the averaged results (ATP-buffer) was plotted at 10 ms intervals. The dotted lines were drawn by assuming a first-order rate constant of 25 s^{-1} for the heat absorbing phase. The magnitude of heat burst and heat absorption: upper line 53 and 46 kJ mol^{-1} ; lower line, 40 and 33 kJ mol^{-1} .

このようにしてストップフロー熱測定で評価した ATP の結合および加水分解過程の反応熱を, 原理的に異なる方法によって推定した値と比較してみると, 次のようになる。ATP 加水分解の平衡定数は, 動力学的方法で比較的正確に求めることができる。その温度依存性の van't Hoff 解析から (Fig. 10)²¹⁾, 反応熱を評価すると, $+50 \text{ kJ mol}^{-1}$ となり, 熱測定による値と良く一致する。一方, ATP γ S のミオシンへの結合熱の迅速熱量計による測定値は, 4°C で -65 kJ mol^{-1} であった²²⁾。これは, 0°C における ATP 結合のストップフロー熱測定値にきわめて近い値と見なすことができる。

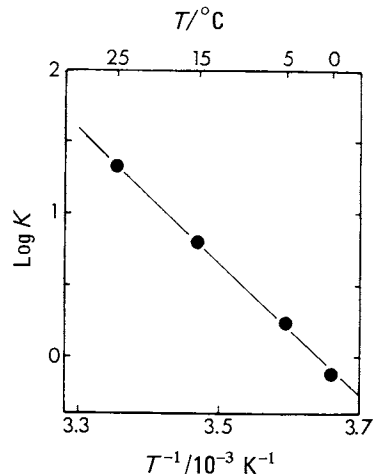


Fig. 10 Effect of temperature on the equilibrium constant for the ATP splitting step in myosin ATPase reaction.

5.3 ミオシンATPase 反応の熱力学的特徴

現時点では, ATP の熱合熱, 加水分解過程の速度および反応熱を, 広い温度範囲にわたって, 定量的に評価するまでに至っていない。しかし, これらの2つの中間過程が熱測定的に分離できて, 前者が発熱, 後者が吸熱であることが示されたことによって, ミオシンATPase 反応の熱力学的特徴がほぼ明らかにされた。

動力学的および平衡論的解析の結果に基づくと, この反応の中間過程の平衡定数, ギブズエネルギー変化 ΔG を計算することができる⁹⁾ (Table 1)。これによると, ミオシンによる ATP 加水分解中間過程には, 反応系側 (ATP の結合と加水分解) の熱力学的変化と, 生成系側 (Pi と ADP の遊離) の逆方向の変化との間に顕著な対称性のあることがわかる。このことを念頭において, * 以下の議論では, 溶質粒子と溶媒粒子との混合にのみ依存するクラティック項を補正したユニタリギブズエネルギー変化 ΔG_u ²⁵⁾ を用いている。

Table 1 Thermodynamic parameters for intermediate steps of myosin ATPase reaction.

| Reaction steps | Equilibrium constants ¹⁾ | ΔG_u ²⁾ kJ mol ⁻¹ | ΔH /(kJ mol ⁻¹) | | | | van't Hoff |
|------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | | | 23°C ³⁾ | 4°C ³⁾ | 4°C ⁴⁾ | 0°C ⁵⁾ | |
| 1 ATP binding | $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ | -76 | -43 | -31 | -65 | -50 | - |
| 2 ATP splitting | 10^6) | -6 | | | -- | +60 | +50 |
| 3 Pi dissociation | 0.1 M | +16 | -47 | -40 | -- | -83 | - |
| 4 ADP dissociation | $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ | +44 | +70 | +54 | -- | +57 | - |
| 1+2+3+4 ATP hydrolysis | $5 \times 10^5 \text{ M}$ | -22 | -20 | -17 | -- | -16 | - |

1) Conditions refer to pH 7 - 8, 20 - 25°C.

2) The unitary Gibbs energy changes at 298 K calculated from the equilibrium constants.

3) Data from ref. 23.

4) Estimated by using an ATP analogue, ATP γ S (ref. 23).

5) ΔH values for ATP binding and splitting were estimated by stopped flow calorimetry as described in the text and for ADP dissociation from ref. 24.

6) At 0°C, the value was reduced to 1.0 and hence $\Delta G_u = 0 \text{ kJ mol}^{-1}$.

ギブズエネルギー変化のパターンを見ると、2つの大きな特徴がある。その第一は、ATPのミオシンへの結合が、大きな負の ΔG_u をとめない、反応全体の駆動力となっていることである。熱測定の結果は、この変化のほとんどがエンタルピー減少に負うことを示している。

第二の特徴は、ミオシンに結合したATP加水分解は、水溶液中での加水分解とは対照的に、 ΔG_u がきわめて小さく、ATPとADP + Piとがほぼ平衡状態にある。この平衡反応はエンタルピー増加過程であるから、著しいエントロピーの増大によって、駆動されていることになる。(このエントロピー増加の大きさは、分子量10,000程度のタンパク質の熱変性にともなうエントロピー増加に匹敵する⁹⁾)。注意すべきことは、水溶液中でのATP加水分解は、主に、エンタルピー減少で駆動されていることである。理論的考察によると^{26, 27)}、水和のないガス相でのATP加水分解エネルギーの計算値は、水溶液中と比較してずっと小さいことから、水溶液中の大きな ΔG_u は、反応系(ATP + H₂O)と生成系(ADP+Pi)との水和エネルギーの差によると考えられる。このような考え方をすると、ミオシン活性サイトにおいては、ガス相に近い環境でATPの加水分解が行われていることが推測される。

中間過程全体としての対称性からのずれが、ATP加水分解の熱力学的パラメータに外ならない。特に、その ΔG_u はATPとADPのミオシンへの結合 ΔG_u の差によるものである。両者の間には、エンタルピー項には大きな相違がないことから、この差は、主にエントロピー項に由来することがわかる。

筋収縮は、ATPの化学エネルギーが力学的仕事に変換される生理的現象である。ミオシンへのATPの結合は、化学エネルギーの捕捉であり、このATPがADP +

Piに分解されると、ミオシンの高次構造が力学的に仕事を行うことのできる状態に変化するものと考えられている(エネルギーの遷移状態⁹⁾)。熱測定の結果は、エネルギー捕捉がエンタルピー的過程であり、遷移状態への変換がエントロピー過程であることを示している。筋収縮の分子機構研究の一つの進め方は、このようなミオシンATPase反応の熱力学的特徴とタンパク質高次構造変化との関連を明らかにすることであろう。

6. おわりに

これまでに開発された多くのストップフロー熱量計がほとんど実用の域に達しなかったのは、2.で述べたような諸問題に対する配慮が充分でなかったことによると考えられる。勿論、われわれの装置にも欠陥がないわけではない。特に、熱電堆の強度は満足できるとは言いがたいし、観測室の耐圧性にも問題がある。しかし、設計の基本的な考え方には大過無いと思われる。

熱測定は、比較的多量の試料が必要ではあるが、注意深く行くと、従来の方法では検出されていない(例えば、分光学的にはsilentな)新たな反応中間過程が見いだされる可能性もある。また、通常の分光学的方法では測定困難な不透明試料も取り扱えるので、生体膜系の動力学的研究にも応用できる。今後、さらに装置の強度と信頼性の改良を行えば、ストップフロー法による時間分解熱測定は、酵素反応研究における有力な解析法としての位置を占めることになると考えられる。

稿を終るにあたり、協同研究者の米谷快男博士に厚くお礼を申し上げますと共に、この研究は、江橋節郎(生理学研究所)、遠藤実(東大)、山田和廣(大分医大)の各教授をはじめとする多くの方々のご支援と、文部省科学研究費補助金「重点領域研究：バイオエナジェティ

ックス」, 日本学術振興会, 英国王立協会, 内藤科学振興財団, 三共生命科学研究振興財団からの研究費補助を受けて行われたことを記して感謝いたします。

文 献

- 1) H. Hartridge and F.J.W. Roughton, *Proc. Roy. Soc. (London)* **A104**, 376 (1923).
- 2) 広海啓太郎, “酵素反応解析の実際”, 講談社 (1978).
- 3) R.L. Berger and L.C. Stoddart, *Rev. Sci. Instrum.* **36**, 78 (1965).
- 4) T. Nakamura, *J. Biochem.* **83**, 1077 (1978).
- 5) P. Bowen, B. Balko, K. Blevins, R.L. Berger, and H.P. Hopkins, *Anal. Biochem.* **102**, 434 (1980).
- 6) A.V. Hill, “Trails and Trials in Physiology”, Edward Arnold, London (1965).
- 7) R.C. Woledge, N.A. Curtin, and E. Homsher, “Energetic Aspects of Muscle Contraction”, Academic Press, New York and London (1985).
- 8) N.A. Curtin, J.V. Howarth, and R.C. Woledge, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 207 (1985).
- 9) T. Kodama, *Physiol. Rev.* **65**, 467 (1985).
- 10) T. Kodama and K. Kometani, *Proc. Japan Acad.* **62B**, 105 (1986).
- 11) T. Kodama, “Molecular Mechanisms of Muscle Contraction” (H. Sugi and G.H. Pollack, eds), p. 671, Plenum, New York.
- 12) T. Kodama and R.C. Woledge, *Rev. Sci. Instrum.* **56**, 40 (1985).
- 13) 児玉孝雄, 米谷快男児, 生物物理 (印刷中).
- 14) N.V. Ricchuiti, and W.F.H.M. Mommaerts, *Physiologist* **8**, 259 (1965).
- 15) 米谷快男児, 山田和広, 実験生物学講座 **10**, 93 (1984).
- 16) G. Ojelund and I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* **22**, 2691 (1968).
- 17) 高橋克忠, 深田はるみ, 熱測定 **14**, 20 (1987).
- 18) M. Eftink, A.C. Anuise, and R. Biltonen, *Biochemistry*, **22**, 3884 (1983).
- 20) T. Yamada, H. Shimizu, and H. Suga, *Biochem. Biophys. Acta* **305**, 642 (1973).
- 21) S.P. Chock and E. Eisenberg, *E. J. Biol. Chem.* **254**, 3236 (1979).
- 22) T. Kodama, K. Fukui, and K. Kometani, *J. Biochem.* **99**, 1465 (1986).
- 23) T. Kodama, *J. Biol. Chem.* **256**, 2928 (1981).
- 24) T. Kodama and R.C. Woledge, *J. Biol. Chem.* **252**, 8085 (1977).
- 25) R.W. Gurney, *Ionic processes in solution*, Dover, New York, p. 90–102 (1953).
- 26) P. Geroge, R.J. Witonsky, M. Trachtman, C. Wu, W. Dorwart, L. Richman, F. Richman, F. Shurayh, and B. Lentz, *Biochim. Biophys. Acta* **223**, 1 (1970).
- 27) D.M. Haynes, G.L. Kenyon, and K. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 4331 (1978).