

高圧下の溶液平衡

谷口吉弘, 澤村精治, 加藤 稔

(平成 2 年 4 月 5 日受理)

Solution Equilibria at High Pressure

Yoshihiro Taniguchi, Seiji Sawamura, Minoru Katō

Pressure like temperature is a fundamental thermodynamic parameter which must be considered to understand natural phenomena. Volumetric information is derived from the pressure dependence of the Gibbs free energy in the equilibrium state. The solubilities of hydrophobic compounds and conformational equilibria of rotational isomers and proteins at high pressure are discussed from points of view of volume changes, partial molar volumes, and their isothermal compressibilities, all three important thermodynamic parameters due to pressure

1. はじめに

圧力は温度とともに自然現象を支配する基本的なパラメータである。温度一定のもとで平衡系は圧縮されると、ル・シャトリエの原理にしたがって体積の減ずる方向に移動し、平衡系への圧力効果は(1)式のように系の体積差 ΔV に関係づけられる。

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (1)$$

ここで、 K は系の平衡定数、 p , T , R , は圧力、絶対温度、および気体定数である。溶液系の場合 ΔV は、平衡系 $A \rightleftharpoons B$ の溶質成分 A , B の部分モル体積 \bar{V}_A , \bar{V}_B の差として与えられ、溶質-溶媒、溶質-溶質間の相互作用の寄与を含む。圧縮に伴う、物質系の巨視的な量である体積の変化は、微視的には分子間距離や配向の変化、さらには、分子間相互作用の組替え、分子間の分子内ポテンシャルの変化等を生じ、系のさまざまな物性の変化に反映される。従って、溶媒効果などの分子間相互作用に関する分子論的解釈を可能にし、広く水和構造を含む液物理

論モデルの検証にも重要な役割を演ずる。

物質固有の性質の一つである等温圧縮率 β_T は、圧力の応答関数として(2)式で定義される。

$$\beta_T = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T \quad (2)$$

溶液中の溶質に関しては、部分モル体積の等温圧縮率 $\bar{\beta}_T (= -1/\bar{V}(\partial\bar{V}/\partial p)_T)$ が定義できる。 $\bar{\beta}_T$ は溶液中の溶質-溶媒間相互作用を含んだ溶質分子の固さや、揺ぎの大きさを与えるだけでなく、高圧下の溶質の体積的振舞いを理解する上で重要な指針を与える。高圧下の溶液熱力学に関する内容は、前報¹⁾にゆずり、その後の新しい研究分野の展開が見られる疎水性化合物の溶解度とタンパク質や回転異性体のコンホメーション平衡系について報告する。

2. 疎水性化合物の溶解度

疎水性水和を研究する場合、溶解度の測定は一つの有力な手段になる。と言うのは疎水性化合物(炭化水素)は水に溶けにくいので、X線構造解析はじめ各種の測定に供するだけの十分高い濃度の水溶液が作れないからである。逆に溶解度が小さいので飽和溶液でも無限希釈と近似でき、標準状態での情報が直接得られるという利点がある。

これまでにベンゼン^{2), 3)}, トルエン^{2), 3)}, *o*-*m*-*p*-キシレン⁴⁾, エチルベンゼン³⁾, *n*-プロピルベンゼ

* 立命館大学理工学部化学科：京都市北区等持院北町56-1 〒603

Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, 56-1, Kitamachi, Tojiin, Kita-ku, Kyoto 603, Japan.

ン^{3),5)}の水中での高圧溶解度が測定されている。溶解度はいずれも加圧とともに増加し、100~200 MPaで極大となり、それ以上の圧力では減少する(Fig.1)。溶解にともなう体積変化は(3)式により見積ることができる。

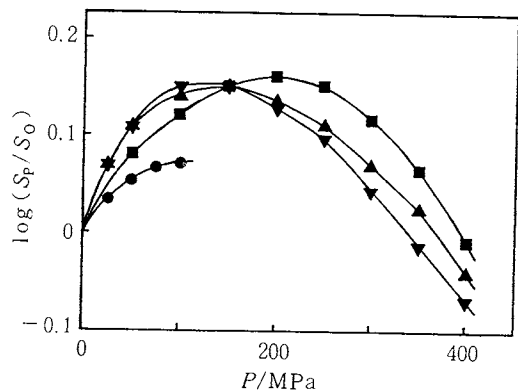


Fig.1 Pressure dependences of the logarithm of the relative solubilities of benzene and alkylbenzenes in water at 298 K:●, benzene;■, toluene;▲, ethylbenzene;▼, *n*-propylbenzene³⁾

$$\Delta V = \bar{V}^{\circ} - V^{\circ} = -RT(\partial \ln S / \partial p)_T \quad (3)$$

ここで \bar{V}° と V° は無限希釈での溶質の部分モル体積と純溶質液体のモル体積、 S は溶解度である。(3)式を用いてFig.1の曲線の傾きより体積変化を見積ると、0.1 MPaではTable1のようになる。アルキル鎖が長くなるにつれて ΔV は大きな負の値になる。メチレン基1モル当り $-1.5 (= \{(-8.5) - (-4.1)\} / 3) \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ である。この値は従来から報告されている値 $-0.5 \sim -2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ と同じ程度である⁶⁾。Fig.1の溶解度の反転は高圧下で ΔV が負から正に反転することを意味している。我々は純溶質液体の高圧密度を測定し(3)式より高圧下の部分モル体積を見積った(Fig.2)。いずれの溶質でも0.1

Table 1 Volume change for the solution in water at 298 K and 0.1 MPa³⁾

Solute	ΔV
	$\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
Benzene	-4.1
Toluene	-5.0
Ethylbenzene	-8.5
<i>n</i> -Propylbenzene	-8.5
<i>o</i> -Xylene	-4.3
<i>m</i> -Xylene	-4.4
<i>p</i> -Xylene	-5.1

MPaでは純溶質液体のモル体積の方が部分モル体積より大きい、圧縮され易いため高圧下では逆に部分モル体積の方が大きくなる。すなわち、溶解度が高圧下で反転するのは部分モル体積とモル体積の圧縮され易さの違いによることが明らかになった。

Fig.2に示すエチルベンゼンと*n*-プロピルベンゼンの50MPaまでの部分モル体積は加圧とともに増加し、負の圧縮率を示している。Table 2は0.1 MPaでの水中の部分モル体積の等温圧縮率をまとめたものである。我々の測定した炭化水素の値(No. 1-7)以外はすべて超音波速度の測定から値られる断熱圧縮率 β_s から(4)式によって見積られたものである。

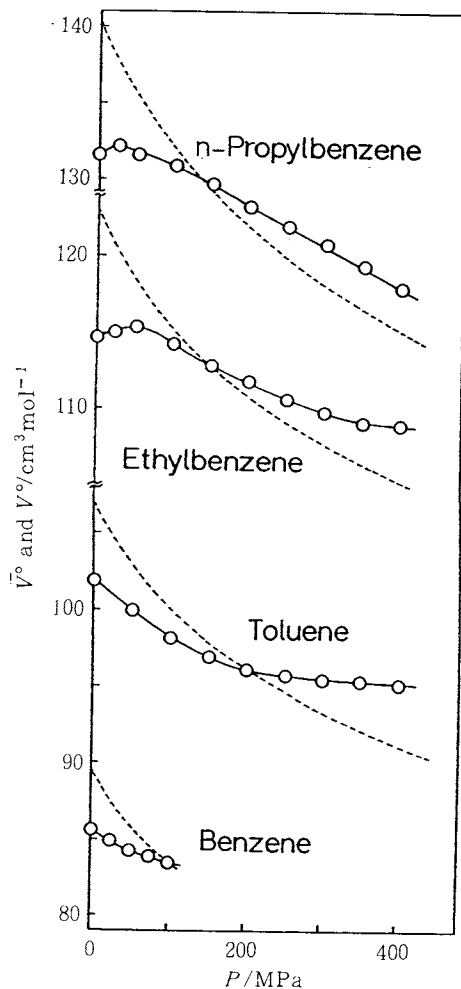


Fig.2 Pressure dependences of molar and partial molar volumes of benzene and alkylbenzenes at 298 K:○, \bar{V}° ; , V° ³⁾

Tble 2 Isothermal compressibilities of the partial molar volume in water at 298 K and 0.1 MPa.

No.	Solute	$\frac{\overline{\beta}_T^0}{10^{-4} \text{ MPa}^{-1}}$	Ref.	No.	Solute	$\frac{\overline{\beta}_T^0}{10^{-4} \text{ MPa}^{-1}}$	Ref.
Non-ionic Solute							
1	Benzene	4.1	3	24	Tetrahydrofurane	1.38	7
2	Toluene	4.0	3	25	Tetrahydropyran	1.61	7
3	Ethylbenzene	-1.6	3	26	1, 3-Dioxolane	1.59	7
4	<i>n</i> -Propylbenzene	-2.1	3	27	1, 3-Dioxane	1.71	7
5	<i>o</i> -Xylene	4.3	3	28	1, 3-Dioxepane	1.21	7
6	<i>m</i> -Xylene	4.2	3	29	1, 3, 5-Trioxane	0.86	7
7	<i>p</i> -Xylene	4.0	3	30	Dimethoxymethane	2.41	7
8	Methanol	3.37	7	31	Diethoxymethane	2.31	7
9	Ethanol	1.82	7	32	1, 2-Dimethoxyethane	1.65	7
10	<i>n</i> -Propanol	1.05	7	Ionic Solute			
11	<i>n</i> -Butanol	0.60	7	33	NaCl	-27.7	9
12	<i>n</i> -Pentanol	0.46	7			-34.7	10
13	2-Butanol	0.68	7	34	Na ₂ SO ₄	-12.4	9
14	3-Pentanol	0.65	7	35	MgCl ₂	-6.6	9
15	3-Hexanol	0.55	7	36	Me ₄ NBr	0.052	11
16	<i>c</i> -Pentanol	0.46	7	37	Et ₄ NBr	0.006	11
17	<i>c</i> -Hexanol	0.41	7	38	<i>n</i> -Pr ₄ NBr	-0.13	11
18	<i>c</i> -Heptanol	0.41	7	39	<i>n</i> -Bu ₄ NBr	-0.29	11
19	2-Methoxyethanol	1.01	8	40	Glycine	-4.57	12
20	2-Ethoxyethanol	0.58	8	41	α -Alanine	-3.32	12
21	2-Propoxyethanol	0.37	8			-3.06	13
22	2-Butoxyethanol	0.24	8	42	Valine	-2.36	13
23	Trimethylene oxide	1.98	7				

$$\overline{\beta}_T = \frac{1}{V} \left[\frac{\partial}{\partial n} \left(V\beta_s + \frac{V^2\alpha_v^2 T}{MC_p} \right) \right] \quad (4)$$

ここで α_v , C_p , V は溶液の熱膨張係数, 定圧熱容量, モル体積であり, M は容質の分子量である。イオン性溶質では負の圧縮率が多く見いだされる(No. 33-35, 38-42)。この原因としてイオンの周囲の水分子が静電相互作用によって強く引き付けられて収縮(電縮)していることが考えられる。非イオン性溶質ではエチルベンゼンと*n*-プロピルベンゼンのみが負の圧縮率を示すが, ベンゼンとトルエンは正の値である。これら一連のアルキルベンゼン(No.1-4)の圧縮率が, アルキル鎖が長くなるにつれて小さくなる点は注目に値する。類似の現象はアルキル鎖中の異なる一連のアルコール(No.8-12), 四級アンモニウム塩(No.36-39)などにも見られる。このことはアルキル鎖部は部分モル体積の圧縮率に対して負に寄与することを意味している。

疎水水和の部分モル体積には(5)式で示される寄与が考

えられる³⁾。

$$\overline{V}^0 = V_w + V_c + (V_h - V_b) \quad (5)$$

ここで, V_w は溶質分子自身の体積¹⁶⁾, V_c は水和殻内での溶質分子との隙間の体積, V_h は1モルの溶質に疎水水和している水の体積^{14),15)}, V_b はその水和水と同じモル数の純水の体積である。(5)式を圧力で微分することにより, アルキルベンゼンの水和水の圧縮率 $\beta_h = (-1/V_h)(\partial V_h/\partial p)_T$ を見積った³⁾。0.1MPaではベンゼンとトルエンの β_h は $5 \times 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$ で純水($\beta_T = 4.5 \times 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$)より10%大きく, エチルベンゼンと*n*-プロピルベンゼンでは $4 \times 10^{-4} \text{ Pa}^{-1}$ と10%小さい。水の圧縮率($1.3 \times 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$)¹⁷⁾と比べると, アルキルベンゼンの β_h ははるかに水に近い。すなわち疎水水和水のiceberg構造は, 氷よりも水に近いことを示している。加圧とともにアルキルベンゼンの β_h は純水の圧縮率に近くなり, 100MPa以上では純水と区別できなくなる。このことは疎水水和が加圧によって消えてしまうことを示

唆している³⁾。

3. 圧縮液体中の有機分子のコンホメーション

分子のコンホメーション平衡は様々な化学平衡の中でも最も基本的な平衡の1つであり、溶液物性を構造論的に語る上で、無視できない現象である。また生体高分子であるタンパク質の構造が、多くのコンホメーションの組合せからなることを思えば、この問題の広さが十分理解できるであろう。

コンホメーション平衡に対する温度効果の研究は古くから数多く行われ、多くのデータが蓄積されて来た。エンタルピー変化は溶媒や状態(相)の違いによって大きく異なる値をもち、この差異は、溶媒和の差異を反映している。Abraham¹⁸⁾は、連続体モデルに基づく静電場理論を適用しその有効性を示した。静電場理論によれば、双極子モーメント μ 、四重極子モーメント q をもつ分子が連続誘電媒体(溶媒)に浸ったときの自由エネルギー変化 ΔG_e は次式によって与えられる。

$$\Delta G_e = -\frac{\mu^2}{a^3} \left(\frac{1}{1-\alpha f} \right) \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} \right) - \frac{3q^2}{2a^5} \left(\frac{\epsilon-1}{3\epsilon+2} \right) \quad (7)$$

$$f = \frac{1}{a^3} \frac{2(\epsilon-1)}{2\epsilon+1} \quad (8)$$

ここで、 ϵ は溶媒の誘電率、 α と a はそれぞれ溶質分子の分極率と分子半径である。コンホメーション平衡に対する溶媒効果は、異性体間での自由エネルギーの差として見積られる。

コンホメーション平衡に対する圧力効果の研究は、温度効果の研究と比べて遅れて始まったが、光学特性に優れた高圧発生装置であるダイヤモンド・アンビル加圧装置が開発されるに及んで、この分野の研究も盛んに行われるようになった。高圧振動分光法については文献¹⁹⁾をあげることにとどめる。最近では、新しい試みとして、高圧NMR法²⁰⁾による研究がある。

圧力効果の研究は温度効果の研究では作り出されなかったインパクトを溶液化学の分野に与えた。今日までの研究は、対象とした分子から(a), (b)2つのグループに分けることができる。すなわち、(a)多極子モーメントをもつハロアルカン系分子に関する研究と(b)無極性分子である n -アルカン系分子に関する研究である。Table 3にその代表的研究例を示した。

(a) コンホメーション平衡に対する研究は、振動分光法にとって測定が容易であるハロアルカン分子を中心に始められた。いずれの研究においても、液体を圧縮するとより極性の大きな異性体の濃度が増大する。いいかえれば、極性の大きな異性体は極性の小さな異性体より体積が小さいことになる。Taniguchiら²¹⁾は、1, 2-ジハ

ロエタンの trans \rightleftharpoons gauche 平衡に関する詳細な研究を行い、初めて静電場理論の応用を試みその妥当性を示した。静電収縮による trans 体から gauche 体への体積変化 ΔV_e は、(7)式を圧力 p で微分することにより得られる。

$$\Delta V_e = -\frac{\mu^2}{a^3} \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} \right) \left(\frac{1}{1-\alpha f} \right) \left[\frac{3\epsilon}{(\epsilon-1)(2\epsilon+1)} \left(\frac{\partial \ln \epsilon}{\partial p} \right)_T - \left(\frac{\partial \ln a^3}{\partial p} \right)_T \right] - \frac{3q^2}{2a^5} \left(\frac{\epsilon-1}{3\epsilon+2} \right) \times \left[\frac{5\epsilon}{(\epsilon-1)(3\epsilon+2)} \left(\frac{\partial \ln \epsilon}{\partial p} \right)_T - \left(\frac{\partial \ln a^5}{\partial p} \right)_T \right] \quad (9)$$

計算より得られた ΔV_e (Table 3のカッコ内の値)は実験値とかなりの程度が一致した。他のハロアルカン分子に対する圧力効果に対しても静電場理論はよい近似を与える。しかしながら、双極子モーメントをもたないが四重極子モーメントをもつ1-ハロプロパンの場合⁵⁾、実験値と計算値は逆の符号を示した。これは後で述べるパッキング効果の影響と考えられる。

(b) アルカン分子に対する圧力効果の初期の研究は(a)の場合と異なり理論的研究が先行し実験がそれを検証するかたちをとった。コンホメーションに対する溶媒効果は古くから多くの研究者の興味を引いたが、1970年代末から理論家の興味は静電場理論では元来とり扱うことができなかった無極性分子に対する溶媒(密度)効果に移った。1978年 Prattら²³⁾は、RISM(Reference Interaction Site Model)積分を用いて、 n -ブタンの trans \rightleftharpoons gauche 平衡において密度が高くなるにしたがい gauche 体の濃度が高くなることを予言し、 $\Delta V(t \rightarrow g)$ を純液体中で $-2.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ 、四塩化炭素溶液中で $-4.7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ と見積った。この純液体中での理論値は高圧ラマン分光測定²⁴⁾により得られた値 $-1.0 \pm 0.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ と定性的に一致した。RISMでは分子間相互作用を site (通常、原子の中心) - site間の相互作用の和として考える。したがって、分子間ポテンシャルは、分子軸のオイラー角などを考えなくてもよく、site-site間の距離の関数として表現できる。これより分子間の分布関数の計算は非常に簡素化された。Prattらの計算は site-site間のポテンシャルを剛体球型と仮定しており、結論を簡単にいえば、gauche体分子はtrans体分子よりも“パッキング”されやすいということになる。

n -アルカン分子のコンホメーションは、合成高分子や生体膜のモデルとなり、応用的側面からも重要である。しかしながら、これらのコンホメーションに関する研究は実験上の困難さから、研究例も数少ない。最近、我々はダイヤモンド・アンビル加圧装置を用いた高圧赤外分光法による n -ペンタンの tt \rightarrow tg, tg \rightarrow gg 平衡に対す

Table 3 Differences of partial molar volume between conformational isomers in solutions.

Compound ^a	solvent	$\frac{T}{K}$	Method	$\frac{\Delta V}{\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}}$	Ref.
1, 2-Dichloroethane					
(t-g)	n-hexane				
	20% v/v	294	Raman	-3.5 ± 0.2 (-3.3)	21
	30% v/v	294	Raman	-3.8 ± 0.2 (-3.4)	21
1, 2-Dibromoethane					
(t-g)	2-methyl butane				
	10% v/v	294	Raman	-4.5 ± 0.5 (-1.4)	21
	acetonitrile				
	10% v/v	294	Raman	-2.0 ± 0.5 (-1.6)	21
1, 1, 2-Trichloroethane					
(t-g)	neat	318	IR	-3.8 ± 0.2	26
	CS ₂ , 10%	318	IR	-1.8 ± 0.4	26
	cyclopentane				
	90 mol %	318	NMR	$-3.8 \sim -4.0$	20
1, 1, 2, 2-Tetrachloroethane					
(t-g)	cyclopentane				
	50 mol %	318	NMR	-2.4	20
Chloroacetone					
(lp-mp)	CS ₂ , 0.05 M	298	IR	-1.6 ± 0.2	27
Chlorocyclohexane					
(ee-aa)	CS ₂ , 0.12 M	323	IR	-1.9 ± 0.1	28
trans-1, 4-Dibromocyclohexane					
(ee-aa)	CS ₂ , 0.12 M	323	IR	-3.8 ± 0.2	28
1-Chloropropane					
(t-g)	neat	293	Raman	-1.1 ± 0.2 (0.25)	22
1-Bromopropane					
(t-g)	neat	293	Raman	-1.2 ± 0.2 (0.21)	22
n-Butane					
(t-g)	neat	298	Raman	-1.0 ± 0.2	24
	neat	298	RISM	-2	23
	CCl ₄	298	RISM	-4.7	23
	neat	272.5	MC (NPT)	-0.4	29
n-Pentane					
(tt-tg)	neat	293	IR	-1.0 ± 0.2	25
(tg-gg)		293	IR	-1.1 ± 0.4	25
(tt-gg)		293	IR	-2.1 ± 0.4	25
n-Hexane					
(ttt-gtt)	neat	293	Raman	-1.1	30
(single g-double g)		293	Raman	0.0	30
n-Heptane					
(tttt-tggt)	neat	294	Raman	-1.8	31
(tttt-gttt, gggt)		294	Raman	-1.3	31

a: (t-g) represents the transformation from the trans conformer to the gauche conformer, (lp-mp) from the less polar form to the more polar form, and (ee-aa) from the equatorial form to the axial form.

る圧力効果の測定に成功した²⁵⁾。一般に振動分光法では分子内の原子の数が多くなるほど振動の帰属が困難となるが、*n*-ペンタンはそのすべての配座異性体を帰属分離できる上限の分子である。加圧にともなう異性体の増加率は $tt < tg < gg$ の順となった。すなわち、圧縮により分子はより球状でコンパクトな構造をとり易いといえる。また、体積差は $\Delta V(tt \rightarrow tg) = -1.0 \pm 0.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $\Delta V(tg \rightarrow gg) = -1.1 \pm 0.4 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ となり *n*-ブタンの $\Delta V(t \rightarrow g)$ と非常に近い値となった。

分子のコンホメーションに関してもう一つ基本的で重要な概念として分子内回転角(二面体角 θ)がある。気相中あるいは孤立系の分子のコンホメーションは、電子線回折法あるいは分子軌道法や分子力学法などの計算により決定でき、固相では X線回折法により信頼できるデータを得ることが可能である。しかしながら、液相では分子の二面体角を見積る決定的な方法がなく、この分野の研究は圧力効果に限らずその研究例はきわめて少ない。現在までに行われた二面体角に対する圧力効果の研究例を Table 4 に示した。Kato らはビフェニル³²⁾ および *p*-ターフェニル³³⁾ の“非平面振動”強度の圧力依存性から圧縮液体中での二面体角を見積った。これより 0.1 MPa でねじれ構造をとっているビフェニルと *p*-ターフェニルは溶液の加圧とともに 100 MPa 当り 2° 二面体角が減少することが明らかになった。この圧縮による二面体角の減少は 1, 2-ジハロエタン (*gauche* 体)³⁴⁾ についてもみられる。*p*-ポリフェニルの分子内回転のポテンシャルは、分子内と分子間の和からなり、二面体角が約 ±40° に極小値をもつ曲線となる。溶液の圧縮は、分子間の反発力を増大させ、加圧により分子間ポテンシャルは大きく変化する。分子間ポテンシャルは θ に対する排除体積の変化を考えれば、 $\theta = 0^\circ$ に極小値をもつ曲線となることがわかる。溶液の圧縮は分子間ポテンシャル曲線の曲率を増大させ、結果的に二面体角の減少を引き起こす。

4. タンパク質の高圧変性

タンパク質の圧力による変性の研究は、1914年、Bridgman³⁷⁾ による卵の白身が 700 MPa の加圧により凝固することに始まる。その後、鈴木ら³⁸⁾ によって多くのタンパク質について、その不可逆過程における高圧変性反応の研究がおこなわれ、300 MPa 以上の加圧は室温においてタンパク質の変性を引き起こし、300 MPa 以下の加圧では、タンパク質の熱凝固を抑制したり、いったん変性を受けたタンパク質を再生するという、タンパク質の変性に対する興味ある圧力の作用が見いだされた。分子量 3 万前後の球状タンパク質の変性が 2 状態(未変性 = 変性) 転移を示す直接的な証明は 1974年の Privalov³⁹⁾ による断熱形式差走査熱量計の開発によって現実のものとなった。このことを受けて、高圧下における可逆 2 状態転移を伴う変性の研究が主として紫外・可視・蛍光分光学的手段によって研究されて来た^{6), 40)-44)}。

いま、球状タンパク質の変性を 2 状態転移 ($N \rightleftharpoons D$: *N* は未変性, *D* は変性) と考えると、各温度・圧力下における変性タンパク質の分率 x_D は、タンパク質に特有なアミノ酸残基の特性吸収帯のモル吸光係数や蛍光スペクトルの量子収率などによって決定され、平衡に伴うギブス自由エネルギー変化 ΔG は次式で与えられる。

$$\Delta G = G_D - G_N = -RT \ln \left(\frac{x_D}{1 - x_D} \right) \quad (10)$$

2 状態転移に伴う ΔG は、温度及び圧力の関数として次式で与えられる。

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_0 + \Delta \beta \frac{(\rho - \rho_0)^2}{2} + \Delta \alpha (\rho - \rho_0)(T - T_0) \\ & - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \Delta V_0 (\rho - \rho_0) \\ & + \Delta S_0 (T - T_0) \end{aligned} \quad (11)$$

ここで添字の 0 は $\rho_0 = 0.1 \text{ MPa}$, $T_0 = 273 \text{ K}$ の標準状態における値である。Fig. 3 は、Table 5 のタンパク質の変性に伴う熱力学諸量を用いて全温度・圧力領域にわた

Table 4 Pressure effect on the dihedral angle of molecules in solutions.

Compound	$\frac{T}{K}$	Method	$\frac{d\theta/d\rho}{10^{-2} \text{ degree MPa}^{-1}}$		Ref.
1, 2-Dibromoethane (<i>gauche</i>)	294	Raman	2		34
1, 2-Dichloroethane (<i>gauche</i>)	294	Raman	2		34
Biphenyl	298	UV	3		35
	308	NMR	2		36
	293	IR	2		32
<i>p</i> -Terphenyl	293	IR	2		33

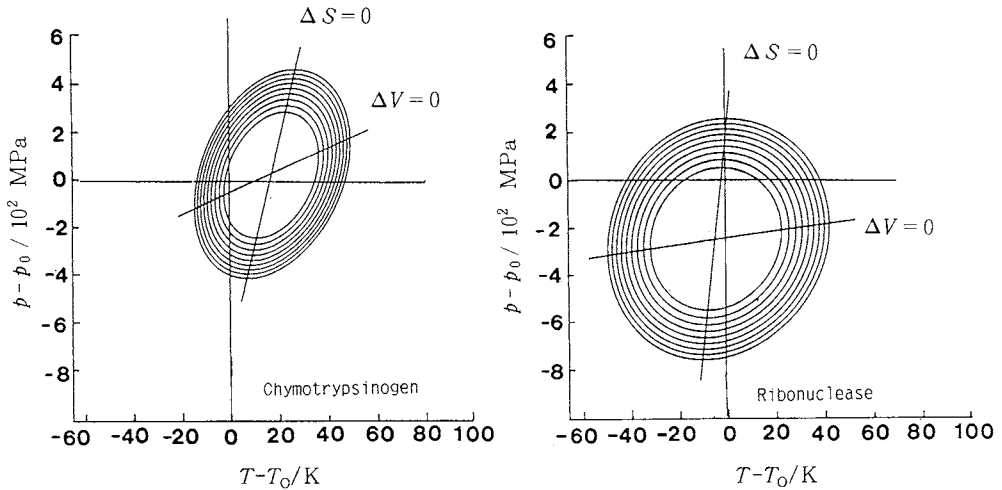


Fig.3 Contours of constant free energy difference ΔG , for chymotrypsinogen and ribonuclease A.

Table 5 Thermodynamic transition parameters for chymotrypsinogen and ribonuclease A at 273 K and 0.1 MPa⁴¹⁾

Parameter	Chymotrypsinogen	Ribonuclease A
$\Delta\beta/\text{cm}^6 \text{J}^{-1} \text{mol}^{-1}$	-0.296	-0.195
$\Delta V/\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	-14.3	-48.6
$\Delta\alpha/\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	1.32	0.252
$\Delta S_0/\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	-950	52.3
$\Delta C_p/\text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	15.9	7.11
$\Delta G_0/\text{mol}^{-1}$	10.6	10.5

る変性の自由エネルギー曲線を示したものである。負の圧力領域は現実には存在しないにもかかわらず、これらの相図はタンパク質の変性機構に及ぼす温度・圧力の特徴を理解するうえでたいへん示唆に富むものである。楕円形の内側は未変性状態 ($\Delta G > 0$) を外側は変性状態 ($\Delta G < 0$) を表している。また、 $\Delta S = 0$ の右側は $\Delta S > 0$ を、左側は $\Delta S < 0$ 、 $\Delta V = 0$ の上側は $\Delta V < 0$ 、下側は $\Delta V > 0$ を表している。温度の正軸方向は熱(高温)変性を、負軸方向は低温変性を、また、圧力の正軸方向は圧力変性を表している。リボヌクレアーゼAとキモトリプシノーゲンの変性⁴¹⁾の特徴的な相違点は、温度の正軸側にありリボヌクレアーゼAの熱変性温度 T_H は圧力の上昇とともに低温側に移行する ($\Delta S > 0$, $\Delta V < 0$) のに対してキモトリプシノーゲンでは、200 MPa までの低圧領域において T_H を高温側に移行する ($\Delta S > 0$, ΔV

> 0) が、200 MPa 以上の圧力は T_H を低温側に移行させる ($\Delta S > 0$, $\Delta V < 0$)、いわゆる、圧力の反転現象が観察される。これは、リボヌクレアーゼAでは、温度と圧力が変性に対して、常に共同的に作用するのに対して、キモトリプシノーゲンでは200 MPaまでの低圧領域の圧力は、温度に対して反作用的に働くことを意味している。キモトリプシノーゲンと同様の温度・圧力挙動 ($\Delta S > 0$, $\Delta V > 0$) を示すタンパク質としては α -キモトリプシン⁶⁾およびタカアミラーゼA⁴⁴⁾が、リボヌクレアーゼAと同様の挙動 ($\Delta S > 0$, $\Delta V < 0$) を示すものにメトミオグロブリン⁴³⁾がある。低温変性に対する圧力の作用はリボヌクレアーゼAおよびキモトリプシノーゲンともに圧力の上昇とともにその変性温度は上昇する ($\Delta S < 0$, $\Delta V < 0$)。言い替えば、この領域では温度の上昇に伴って圧力変性は抑制されることを意味している。

一般にタンパク質は圧力の作用で変性するので、変性に伴う体積変化は負となる。Table 6 には代表的な球状

Table 6 Volume changes for protein denaturation

Protein	$\Delta V/\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	T/K	Ref.
Ribonuclease A	-46	297	40
α -Chymotrypsinogen	-31.2	296	41, 42
Lysozyme	-19.7	296	42
Metmyoglobin	-97	293	43
Flavodoxins	-63	296	45
α -Chymotrypsin	-72	293	6

タンパク質の変性に伴う体積変化を示した。その大きさは、室温において $-20 \sim -100 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ 程度である。この ΔV 値は、水溶液中における未変性タンパク質および変性タンパク質の部分比容 $\bar{v}(\text{N})$ と $\bar{v}(\text{D})$ の差によって与えられ、高圧下の値 $\bar{v}_p(\text{N})$ 、 $\bar{v}_p(\text{D})$ はそれぞれの0.1MPaでの部分比容の等温圧縮率 $\bar{\beta}_T(\text{N})$ 、 $\bar{\beta}_T(\text{D})$ を用いて与えられる⁶⁾。

$$\bar{v}_p(\text{N}) = \bar{v}_0(\text{N}) [1 - \bar{\beta}_T(\text{N})p] \quad (12)$$

$$\bar{v}_p(\text{D}) = \bar{v}_0(\text{D}) [1 - \bar{\beta}_T(\text{D})p] \quad (13)$$

ここで $\bar{v}_0(\text{N})$ と $\bar{v}_0(\text{D})$ は、0.1MPaでの未変性と変性タンパク質の部分比容である。Table 7には球状タンパク質(未変性, 変性)および合成高分子の部分比容 \bar{v} とその等温圧縮率 $\bar{\beta}_T$ の値を示した。Table 7より、変性タンパク質の $\bar{\beta}_T$ は未変性タンパク質の $\bar{\beta}_T$ 値に比べて大きい。疎水性合成高分子は他の親水性およびイオン性高分子に比べて \bar{v} および $\bar{\beta}_T$ ともに大きな値を示し、変性タ

ンパク質に近い。それゆえ、(12), (13)式で与えられる未変性及び変性タンパク質の部分比容は、300MPaまでは $\bar{v}_p(\text{D}) > \bar{v}_p(\text{N})$ となり、未変性タンパク質の部分比容は変性タンパク質に比べて小さな値を示すが、300MPa以上では、 $\bar{v}_p(\text{D}) < \bar{v}_p(\text{N})$ となって反転し、結果としてタンパク質は圧力によって変性する。

未変性タンパク質の $\bar{\beta}_T$ と \bar{v} 値は、疎水性高分子と親水性高分子の中間に位置し、中でも疎水性に富みヘリックス含量の多いウシ血清アルブミン、ヘモグロビン、ミオグロビンではそれらの値は大きく、ヘリックス含量の少ないキモトリプシノーゲンは小さな値を示す。タンパク質の固さ、柔らかさの度合を与える $\bar{\beta}_T$ 値からは、タンパク質の体積の平均値のまわりの揺らぎ δV は統計熱力学により次式で与えられる⁴⁶⁾。

$$\delta V = (kT \bar{\beta}_T V)^{1/2} \quad (14)$$

ここで、 k はボルツマン定数である。 δV はタンパク質1モル当り $30 \sim 200 \text{ cm}^3$ で全体積の約0.2~0.5%である。この値はタンパク質分子の圧力変性に伴う体積変化にはほぼ対応しており、タンパク質の揺らぎの極限に変性状態が存在するものと考えられる。

5. おわりに

タンパク質は300MPa以上の圧力によって可逆的に変性し、この時の体積変化は $-20 \sim -100 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ と負の値をとる。この理由として、0.1MPaにおける変性タンパク質の \bar{v} および $\bar{\beta}_T$ は未変性タンパク質に比べていづれも大きな値を示すが、300MPa以上において、変性タンパク質の $\bar{v}_p(\text{D})$ が未変性タンパク質の $\bar{v}_p(\text{N})$ に比べて小さくなる反転現象のために、タンパク質の変性過程に伴う体積変化が負になることを明らかにした。すなわち、変性タンパク質は未変性タンパク質に比べて柔らかくそれだけ高圧下で圧縮されやすいと言える。タンパク質の高圧変性は、ペプチド共有結合による一次結合を維持しながら、静電相互作用、水素結合や疎水相互作用などの二次的な弱い相互作用で保持されている立体構造が、加圧によるこれら弱い相互作用の組替えにともなって破壊されるためと考えられる。この過程で疎水水和の役割が重要であるとの見解が、そのモデル系への温度効果に関する熱力学的諸量から明かにされたが、圧力効果の研究から得られる体積変化から導かれる結論とはかならずしも一致しないので、簡単な有機分子のコンホメーション変化に伴う体積変化の研究は、タンパク質変性の体積変化を理解する上での一つの指針を与えることになる。今後、この分野の広い範囲の研究の進展が待たれる所以でもある。

Table 7 Partial specific volumes and their isothermal compressibilities of random coil polymers and proteins in water at 273 K and 0.1 MPa⁶⁾.

Polymer	$\bar{v} / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$\bar{\beta}_T / 10^{-4} \text{ MPa}^{-1}$
<i>Hydrophilic</i>		
(Hydroxyethyl) cellulose	0.678	1.05
Poly (ethylene glycol)	0.846	1.07
Poly (vinylpyrrolidone)	0.781	1.04
<i>Hydrophilic</i>		
Dextran	0.600	0.23
Poly (vinyl alcohol)	0.750	0.65
<i>Ionic</i>		
Na-carboxymethyl cellulose (0.01 M NaOH, pH 12.0)	0.505	-0.86
Na-polymethacrylate (0.01 M NaOH, pH 12.0)	0.385	-0.48
<i>Native protein</i>		
Ribonuclease A	0.704	0.548
α -Chymotrypsinogen	0.717	0.695
Lysozyme	0.712	0.773
β -Lactoglobulin	0.751	1.18
Metmyoglobin	0.747	1.31
Ovalbumin	0.746	1.21
Bovine serum albumin	0.735	1.46
Hemoglobin	0.745	1.50
<i>Denatured protein</i>		
Ribonuclease A		0.70
α -Chymotrypsinogen		0.85

文 献

- 1) 鈴木啓三, 澤村精治, “高圧下の溶液熱力学” 熱・温度測定と熱分析 (1982) p.15.
- 2) R. S. Bradley, M. J. Dew, D. C. Munro, *High Temp.-High Pressures* **5**, 169 (1973).
- 3) S. Sawamura, K. Kitamura, Y. Taniguchi, *J. Phys. Chem.* **93**, 4931 (1989).
- 4) S. Sawamura, K. Suzuki, Y. Taniguchi, *J. Solution Chem.* **16**, 649 (1987).
- 5) A. M. Zipp, Ph. D. Dissertation, Department of Chemistry, Princeton University, 1973.
- 6) Y. Taniguchi, K. Suzuki, *J. Phys. Chem.* **87**, 5185 (1983).
- 7) S. Cabani, G. Conti, E. Matteoli, *J. Solution Chem.* **8**, 11 (1979).
- 8) S. Harada, T. Nakajima, T. Komatsu, T. Nakagawa, *J. Solution Chem.* **7**, 463 (1978).
- 9) F. J. Millero, F. Vinokurova, M. Fernandez, J. P. Hershey, *J. Solution Chem.* **16**, 269 (1987).
- 10) L. H. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **53**, 3769 (1931).
- 11) J. G. Mathieson, B. E. Conway, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **70**, 752 (1974).
- 12) A. A. Yayanos, *J. Phys. Chem.* **76**, 1783 (1972).
- 13) S. Cabani, G. Conti, E. Matteoli, M. R. Tine, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **77**, 2385 (1981).
- 14) G. Ravishanker, P. K. Mehrotra, M. Mezei, D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4102 (1984).
- 15) W. L. Jorgensen, J. Gao, C. Ravimohan, *J. Phys. Chem.* **89**, 3470 (1985).
- 16) A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **68**, 441 (1964).
- 17) A. J. Leadbetter, *Proc. R. Soc. London* **A 387**, 403 (1965).
- 18) W. J. Orville-Thomas, ed., “Internal Rotation in Molecules” Wiley (1974) Chap. 13.
- 19) 谷口吉弘, 化学の領域, **37**, 475 (1983).
- 20) Y. Yamada, T. Kazuoka, A. Sera, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7772 (1988).
- 21) Y. Taniguchi, H. Takaya, P. T. T. Wong, E. Whalley, *J. Chem. Phys.* **75**, 4815 (1981).
- 22) M. Katō, Y. Taniguchi, *J. Chem. Phys.* **93**, 0000 (1990).
- 23) L. R. Pratt, C. S. Hsu, D. Chandler, *J. Chem. Phys.* **68**, 4202 (1978).
- 24) J. Devaure, J. Lascombe, *Nouvo. J. Chim.* **3**, 579 (1979).
- 25) M. Katō, Y. Taniguchi, *J. Chem. Phys.* Submitted for publication.
- 26) S. D. Christian, J. Grudnes, P. Klaboe, *J. Chem. Phys.* **65**, 496 (1976).
- 27) Y. Taniguchi, S. Sawamura, I. Murakoshi, *J. Chem. Phys.* **83**, 2305 (1978).
- 28) S. D. Christian, J. Grundness, P. Klaboe, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 3864 (1975).
- 29) W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 4721 (1981).
- 30) P. T. T. Wong, H. Mantsch, R. G. Snyder, *J. Chem. Phys.* **79**, 2369 (1983).
- 31) P. E. Schoen, R. G. Priest, J. P. Sheridan, J. M. Schur, *J. Chem. Phys.* **71**, 317 (1979).
- 32) M. Katō, M. Higashi, Y. Taniguchi, *J. Chem. Phys.* **89**, 5417 (1988).
- 33) M. Katō, Y. Taniguchi, *J. Chem. Phys.*, **92**, 887 (1990).
- 34) H. Takaya, Y. Taniguchi, P. T. T. Wong, E. Whalley, *J. Phys. Chem.* **75**, 4823 (1981).
- 35) 松本光晴, 澤村精治, 谷口吉弘, 鈴木啓三, 第19回高圧討論会, 仙台 (1981).
- 36) H. Yamada, Y. Miyata, T. Kinugasa, *J. Magn. Reson.* **39**, 309 (1980).
- 37) P. W. Bridgman, *J. Biol. Chem.* **19**, 511 (1914).
- 38) 鈴木啓三, 生物物理, **3**, 194 (1964).
- 39) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167 (1979).
- 40) J. F. Brandts, R. J. Oliverirc, C. Westort, *Biochemistry* **9**, 1038 (1970).
- 41) S. A. Hawley, *Biochemistry* **10**, 2436 (1971).
- 42) T. M. Li, J. W. Hook, H. G. Drickamer, G. Wever, *Biochemistry* **15**, 5571 (1976).
- 43) A. Zipp, W. Kauzmann, *Biochemistry* **12**, 4217 (1973).
- 44) S. Makimoto, H. Nishida, Y. Taniguchi, *Biochim. Biophys. Acta* **996**, 233 (1989).
- 45) T. M. Li, J. W. Hook, H. G. Drickamer, G. Weber, *Biochemistry*, **15**, 3205 (1976).
- 46) A. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2740 (1976).