

フローマイクロカロリーメーターによる 生化学反応および溶液化学の研究

森本 敏

(平成5年3月23日受理)

Biochemical and Solution Chemical Studies by Using a Flow Microcalorimeter

Satoshi Morimoto

(Received March 23, 1993)

A highly sensitive liquid flow reaction-solution microcalorimetry system based on the heat conduction principle with multi-thermomodules, applicable to suspended solutions was developed. This calorimetry system was well suited for measurements on the biochemical and solution chemical studies. Two concrete examples; binding and reaction studies in Na^+ , K^+ -ATPase-ATP system by using suspended Jørgensen's sample, and studies on the interactions of the oxyethylene moiety of poly(oxyethylene) glycole alkylether with benzene, by means of this microcalorimetry were introduced and explained.

1. はじめに

カロリーメトリーの特徴として、熱発生が物理的・化学的変化の過程の程度に比例するために化学種等によらずに定量的な分析知見が得られること、および、媒体効果をも含めた構造と反応機構を論ずるための確な熱的変化量の決定が出来ること、が挙げられる。生体機能物質を含めた物質や溶液の状態および挙動の追求には、これらの特徴を利用した反応・溶液カロリーメトリーによる研究がしばしば行われている。

しかしながら、相対的に活性部位濃度が薄まる高分子量かつ低濃度の生体機能物質に対して、また、主要な生体機能に関与する膜タンパク質の小胞体や細胞等に対す

る測定では、検出感度的に、また、全体にわたる熱量検出に対して充分と言えるカロリーメーターに遭遇することは難しいのが現状である。さらに、小胞体や細胞の不均一分散系に現われる試剤やpH等の環境条件の不規則性が測定上の問題となろう。

この方向の測定を成就させるために、過去幾年かにわたって熱測定討論会等で、装置の開発および各種標準水溶液の希釈熱の測定¹⁾、タンパク質の水系における自己会合性の測定²⁾、シクロデキストリンのゲスト分子包接とイオノフォアのアルカリ金属イオンとの相互作用・錯形成の熱的検討³⁾等を試み発表してきた。またより端的に、膜タンパク質 Na^+ , K^+ -ATPase(Naポンプ)を用いたATPおよびその関連物質との結合熱・反応熱の研究^{4),5)}を、さらに、オキシエチレン鎖に対する有機溶媒とくにベンゼンとの相互作用を検討するために、ポリ(オキシエチレン)グリコールドデシルエーテル(POED)-溶媒系の希釈熱測定による研究⁶⁾を報告してきた。

ここでは、筆者の測定方法も固ってきた、後者の開発フローマイクロカロリーメーターを通しての測定と結果の概

東海大学開発工学部基礎教育系：〒410-03 静岡県沼津市西野317

System of Fundamental Education, School of High-Technology for Human Welfare, Tokai University, Nishino, Numazu, Shizuoka 410-03, Japan

要を報告することにする。

2. フローマイクロカロリーメーター

フロー型熱量計はバッチ型と比較して幾つもの特徴をもっている。(1)操作の単純性、(2)平衡温度までの時間の省略性、および、(3)微小測定値に影響を及ぼす蒸気相の非考慮性⁷⁾である。測定の高感度、高精度化とともに、とくに(2)の点は経時変化・変質を恐れる生物物質を対象とした場合に欠かすことが出来ない。また、フロー型熱量計の中でも等温壁型(または断熱型)に比較して伝導型の場合には、時定数が小さいことと定常状態までの時間および試料量の両者の少なさの点⁸⁾で筆者の目的により合致した型であることは明らかである。

ここで最終的に使用した反応カロリーメーターは、高感度、迅速、反応懸濁液の均一混合等に留意したフロー型式(伝導型、単子)のもので、溶液研究にもその併用が期待しうる。これは伊藤によって開発された臨床応用の微量熱量計⁹⁾の延長上のもので、より定量研究用として発展させてある。その機構上の特徴は、発生全熱量の検知を目標に直列配置した数多くのサーモモジュール(メルコア社製)の使用、その表面上へのマンガン線巻付け樹脂(ポリエチレン)製フロー管の直接接点様式による高感度測定化、高精度恒温槽等での検出部の高度な温度安定化、および、懸濁液用定速ポンプとしての振盪流入ピストンポンプ(オートサンプラー)の採用である。恒温槽はトロナック社製($\pm 0.001\text{K}$)のものを使用した。樹脂製フロー管を用いている理由は、従来の金属フロー管

(金製)では管内部の凹凸のために粒子懸濁液の流れが不調となり高精度が得られなかったためである。また、有機溶媒とくに後述するベンゼン系の場合には、ベンゼン蒸気の漏れによる熱平衡の乱れがあるためにすべてテフロン管に換えて組み直した。センサー部分を比重の大きな不活性液体(フロリナート)中に置く⁹⁾ことによって高度な熱安定性が保たれている。

装置の概念図をFig.1に、カムを付した振盪流入ピストンポンプおよびセンサー部分の例をFig.2(a)(b)にそれぞれ示した。また、検出セルのセンサー部分の一例をPhoto.1に示した。Fig.2(b)での単モジュール(約6mV/Kの起電力)の場合には熱発生面で直列接続した2個のモジュールを重ね合わせるので、単モジュール $\times 2$ 検出となる。Fig.2(b)の6モジュールの例の場合およびPhoto.1の9モジュールの例の場合には、6モジュール $\times 2$ および9モジュール $\times 2$ 検出である。本稿での測定では12 $\times 2$ 検出の24個のモジュールを用いてセンサー部として組み立てたセルを用いた。センサー部のフロー管は約7.8cm/モジュールであり、全長は約95cmとなっている。0.8~0.85mm ϕ のフロー管を用いたのでセンサー部分中での流量は0.48~0.51mlである。6ml/h近辺に流速を固定し数mlずつの流量で測定を行った。増巾および起電力検知には大倉電機製 AM-1001 型を、記録計は理化電機工業製 RY-101A 型を用いた。懸濁液でない均一溶液の場合には、時として流入ポンプにサヌキ工業社製DMX型およびカーネギーメディスン社製マイクロインジェクションポンプも使用した。

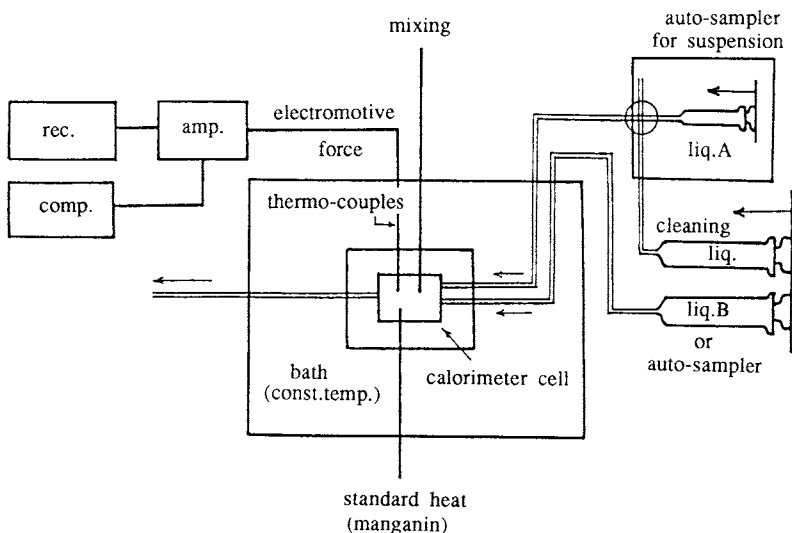


Fig.1 Conceptual figure of this flow microcalorimeter.

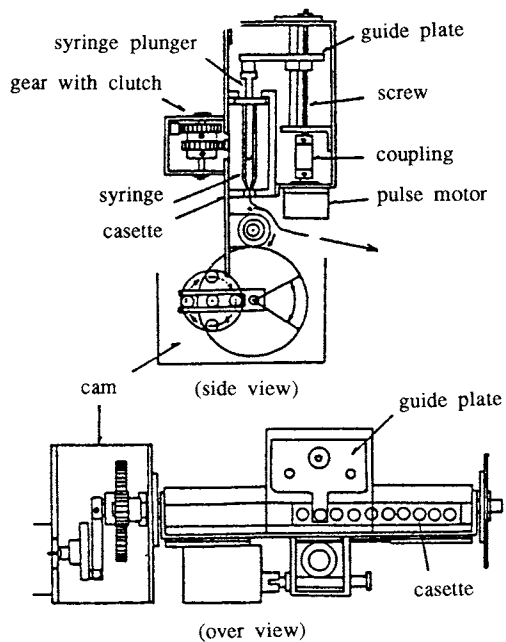


Fig.2(a) an autosampler for suspension.

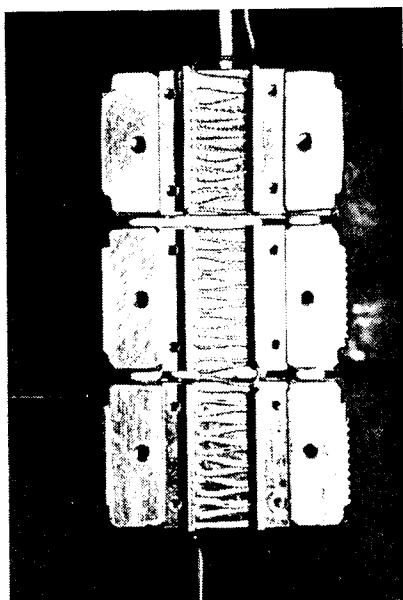


Photo.1 An example of sensor portion.

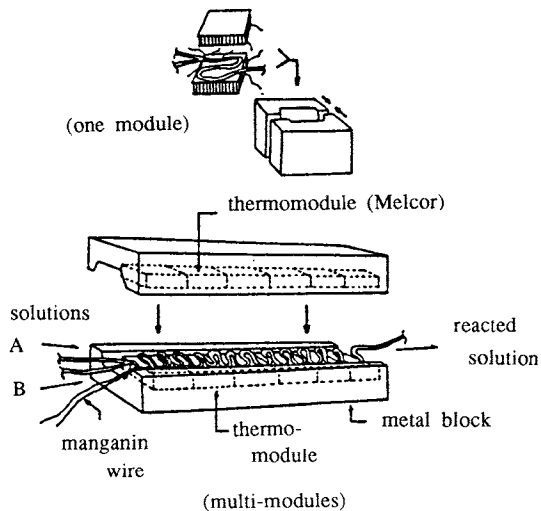


Fig.2(b) Sensor portion.

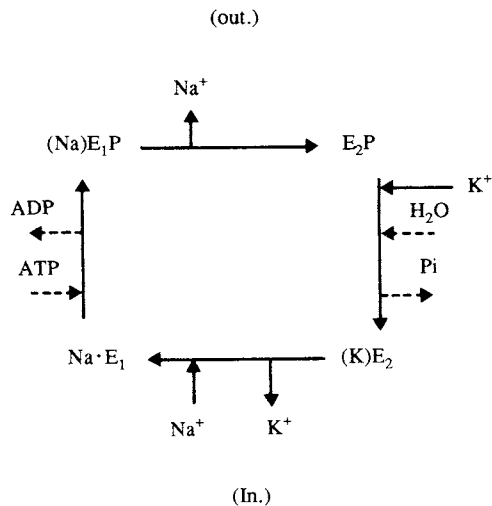


Fig.3 Outline of reaction scheme on the Na pump-ATP in Na⁺, K⁺ and Mg²⁺ aqueous media.

3. Naポンプ-ATP系の結合・反応熱^{4),5)}

3.1 反応スキーム

細胞膜におけるイオン輸送タンパク質として知られるNaポンプの反応(エネルギー変換, 能動輸送)機構は, こ

のATPaseの発見¹⁰⁾以来数多くの化学的および構造的
研究によって追求が行われている¹¹⁾⁻¹⁷⁾。その結果、輸送機
構の特徴は、輸送されるNa⁺およびK⁺によるこの酵素の
形態制御とATP分解の共役であることが基本的に明らか
にされている。Fig.4はNaポンプの輸送機構を示すもの
として現在考えられている概略のスキーム¹³⁾⁻¹⁷⁾である。
E₁およびE₂は、各Na⁺またはK⁺存在下で安定なNaポン
プ(E)のコンホメーションを示す。細胞質側(In.)の
Na⁺とATPの各結合部位にNa⁺およびATPが結合する
と、ATPは共有結合アシルリン酸を形成しNaポンプ分
子内に取り込まれた状態(occlusion)となる。この状態に
なると平衡はNaを細胞外(Out.)に遊離する傾向となり、
Na⁺を遊離し細胞外液に存在するK⁺と高親和性状態とな
る。さらにK⁺が結合すると水とリン酸エステルの反応
が顕著に増加し、正リン酸(Pi)を細胞質側に遊離し、結
合Kが酵素分子内部に取り込まれる。ここで mM オー
ダーのATPがあると、(occlusion)Kが細胞質へ放出され
酵素は再び細胞質Na⁺と結合が可能となる。生理的濃度
のATPが存在する時は細胞外へのNa⁺遊離
[(Na)E₁P→E₂P]が、またATP濃度が低い時は細胞質への
K⁺の遊離 [(K)E₂→E₁]がおのおの律速段階と見なされ
る。

近年、サブユニットの存在とその動物種による相違の
指摘、各種動物器管由来のα,βサブユニットのcDNA連
鎖からの一次構造の決定¹⁸⁾等が行われ、さらに、その高
次構造およびマクロな分子形態についての研究が進めら
れている。また最近、イオンチャネルの基本的機能部位
の特定^{19),20)}がなされる等、この分野の進展は著しい。さら
に、ATPの加水分解エネルギー^{21),22)}を輸送のエネル
ギーへ変換させるエネルギー共役反応が、MgNaE₁Pから
MgE₂Pへの変化ステップであることを示唆する研究等¹³⁾、
多くの研究がなされている。

本稿に示される筆者のカロリーメーター結果は、以下に
記すように内外層の区別がない非小胞体(極性脂質はNa
ポンプのコンホメーション変化に不可欠)に対して
のものではあるが、開発したマイクロカロリーメーターのこ
れらATPase-ATP反応系への測定の適応性を試したもの
としての意義を考えている。

3.2 測定

試料Naポンプ酵素標品はヒツジ腎からのJørgensenの
方法²³⁾により調製した高活性(600~1,000μmoles Pi/mg/
h)の分散溶解(懸濁)性のものを用いた。これは前記した
ように小胞体を形成していない微小片形態の、内外層の
区別のない生体極性脂質二分子膜中にこの酵素が埋め込
まれた状態のもの(Naポンプ-生体膜球状試料の凍結破
砕物、SDSを含む)である。タンパク質含量はLowryの方

法により酵素活性の測定は常法²⁴⁾によった。

Naポンプの活性発現には、ATP、Mg²⁺、Na⁺およびK⁺
の4つを必要とする。ここではこのATPaseのイオン要求
性を満たす²⁵⁾一つの溶媒系(150mM NaCl, 15mM KCl,
3mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, イミダゾール-塩酸緩衝液
pH7.4)を選び、希釈熱効果を補正して298.15Kでの結合
・反応熱量を評価した。測定は、可能な限り同一溶媒組
成とpHの、片方の溶液には所定濃度のNaポンプを含
み、他の溶液には所定濃度のATPあるいはイオンや基質
アナログ(何れも濃度は最終濃度の2倍)を含む二液の等
量混合(混合流速比は0.01%以内で1:1)によって行っ
た。流入速度は固定して約6ml/h、タンパク質濃度は
0.05~0.08%、ここでの熱量発生速度の実測値は5×10⁻⁸~
2×10⁻⁵J/secであった。酵素活性は実験の度に測定し、熱
量測定時150~900μmol Pi/mg/h(310K)であった。

3.3 結果と考察

Fig.4は、0.5mM EDTA水溶液、pH7.4中でのNaポンプ
に対する各種金属イオンの結合(相互作用)の熱応答例を
示したものである。参照として1μJ/secのスケールを右
下に示した。図中の1はNaポンプ懸濁液の希釈熱で、タ
ンパク質グラム当りに換算すると、-34mJ/secである。
図中の左半分のサーモグラム(Fig.5についても同様)は図
中濃度での各種金属塩溶液の希釈熱効果である。実際の
各金属イオンの結合エンタルピーは、図の右半分の希釈
熱効果の差として示される。2は150mM NaClに対して
-390、3は15mM KClに対して-120、4は3mM MgCl₂に
対して+56mJ/g Prが得られる。5は前記2,3,4の同濃度各
イオンを含む混合イオンについてで、-370mJ/gPrを示
し、結合に加成性は観られない。Naポンプの推定分子量
は12~49.6万が知られているが、ここでは分子量を13.1
万として以下に記してある。Fig.4の結果は、この
ATPaseに対する他の測定方法からの結合イオンの量の結
果等²⁶⁾との対比で考察するべきであろうが、カロリーメ
ーター値の判断から各種金属イオンおよびその混合イオン
の結合の熱的挙動が明確に追跡可能な状態であることを
示す。極めて微少な0.1μJ/sec以下の熱発生速度差の測定
が可能であることが、測定例を含めて明らかである。
Mg²⁺の吸熱効果は、Naポンプとの結合物を含んだ系全
体の安定化状態あるいは結合物の水和状態の変化の反映^{27),28)}
と考えられる。Fig.5には、Naポンプに対する
ADPの結合およびATP反応の測定熱応答例を示した。図
中Qdは補正さるべき希釈熱を、Qrは反応熱を示した。

次にADPあるいはATPに対するMg²⁺の結合、およ
び、Naポンプに対する基質アナログのADPとATP-γS
の結合についてである。Fig.6はADP-およびATP-MgCl₂
系でのMg²⁺結合熱の実測値と補正さるべき希釈熱値を

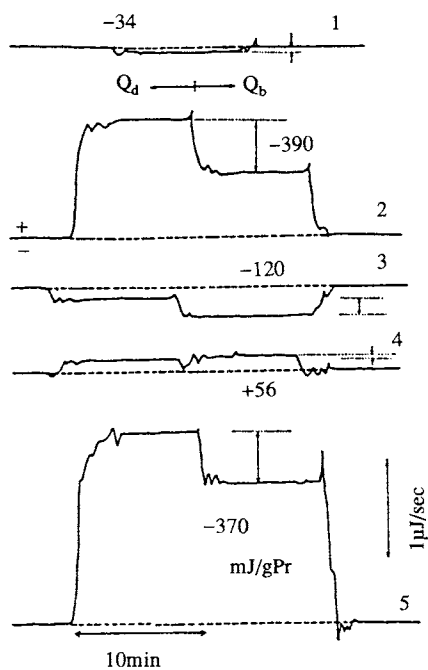


Fig.4 Examples of thermal response I; dilution of Na^+ , K^+ -ATPase(1), and interactions of that with 150mM NaCl(2), 15mM KCl(3), 3mM MgCl_2 (4) and the mixed salts(5), respectively. Q_d ; heat of dilution, Q_b ; heat of binding.

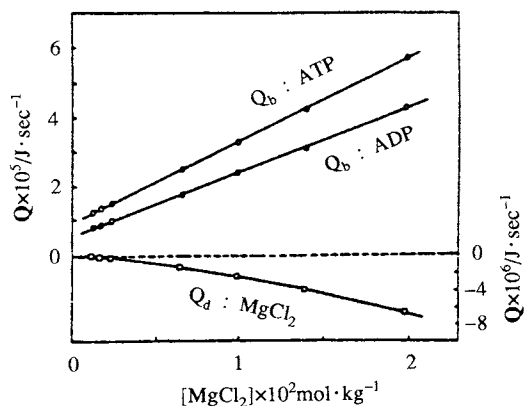


Fig.6 Observed values of the heat of binding (complex formation) and that of dilution in ADP- and ATP- MgCl_2 systems, in imidazole buffer, at pH 7.40.
ADP; $m=3.8203 \times 10^{-2}$, $Q_d=-6.77 \times 10^{-7} \text{J/sec}$ ($\Delta_d H=-10.2 \text{J/mol}$),
ATP; $m=3.3950 \times 10^{-2}$, $Q_d=+3.94 \times 10^{-6} \text{J/sec}$ ($\Delta_d H=+670 \text{J/mol}$).

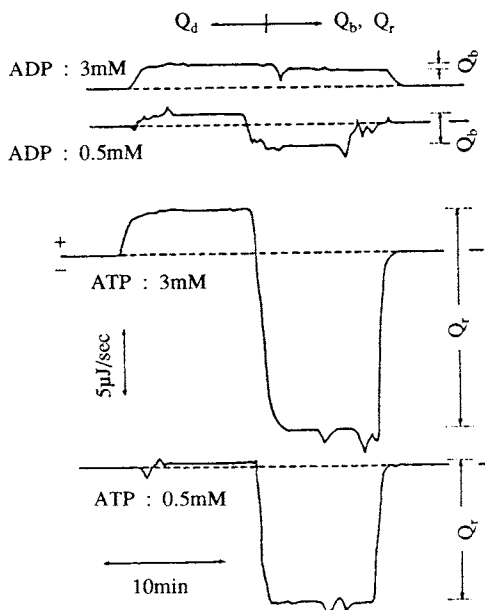


Fig.5 Examples of thermal response II; ADP binding and ATP reaction with Na^+ , K^+ -ATPase. Q_d ; heat of dilution, Q_b ; heat of binding, Q_r ; heat of reaction.

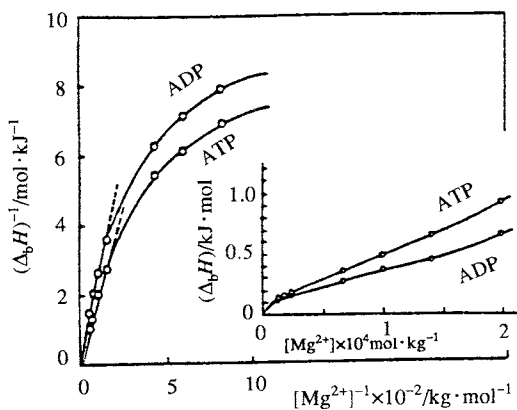


Fig.7 Molar heats of binding in ADP- and ATP- Mg^{2+} systems as a function of Mg^{2+} concentration, and double reciprocal plot of the data.

MgCl_2 濃度に対して図示した。Fig.7には、Fig.6から得られる結合のモルエンタルピーと Mg^{2+} 濃度との関係を、さらにその両逆数プロット(これは平衡定数が一つの場合には直線関係^{3),28),31)}を示した。 Mg^{2+} イオンとの結合の場合には明らかに直線関係にはない。二価金属イオン

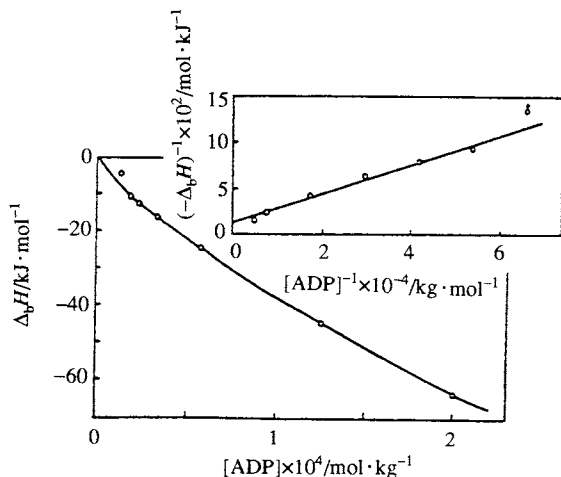


Fig.8 Molar heat of binding of Na⁺, K⁺-ATPase with ADP as a function of ADP concentration, and double reciprocal plot of the data.
Pr conc. 0.939mg/ml, S.A. 925.2μmol Pi/mg h.

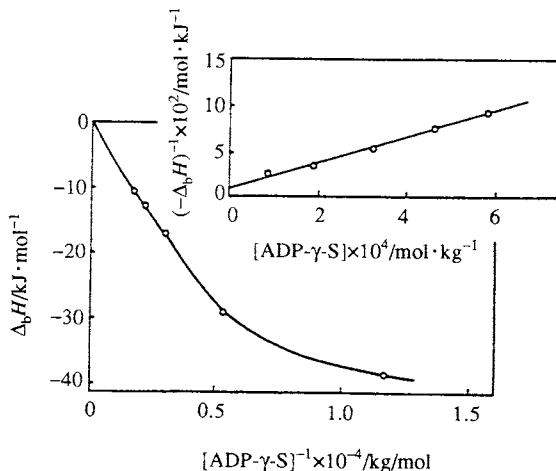


Fig.9 Molar heats of binding of Na⁺, K⁺-ATPase with ATP-γ-s as a function of ATP-γ-S concentration, and double reciprocal plot of the data.
Pr conc. and S.A.; the same as those in Fig. 7.

Table 1 Evaluated thermodynamic quantities of ligand bindings, at 298.15K.

System	$-\Delta G^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)	$-\Delta H^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)	$-\Delta S^\circ$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
ADP - Mg ²⁺	8.6	13.3	74
ATP - Mg ²⁺	8.5	18.7	91
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-ADP	23.4 ±1	78.1 ±2	187 ±5
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-ATP-γ-S	18.2 ±2	109 ±3	305 ±17

のADP, および, ATP結合の場合には二種の複合体形成過程(拡散友配とイオン浸透)²⁷⁾が知られている。ここでの結果は明らかに複数個の結合定数と認められ, 曲線の初期勾配からその中の一種の結合過程について求めた熱力学パラメーター(ΔG°, ΔH° および ΔS°)値 (Table 1)は文献値²⁷⁾と良好な一致が認められる。Naポンプに対するADPあるいはATP-γ-sの結合性に関する測定結果をFig.8,9に示す。これらの結果の両逆数関係は良好な直線関係にあり(ATP-γ-sの場合には, 大部分は基質アナログと同様に挙動するが一部は分解してリン酸化に関与することが知られているが), 結果から求めた結合の熱力学量をMg²⁺の場合と同様にTable 1に表示した。Naポンプは他のATPaseと比較してはるかに基質特異性が高いことが, 各種基質アナログの結合性から認められる³⁾。また, 球状タンパク質の各種結合系に類似したエンタル

ピー的な安定化がTable 1から観られる。結合の熱容量変化を求めれば, さらに結合周辺部分の球状タンパク質との類似性・相違性の考察を可能としよう。

イオン要求性を満たす系中での, このNaポンプに対するATPとの反応の測定結果をTable 2およびFig.10に示す。最も大きな特徴は, ATP濃度のmMオーダーとそれ以下の濃度では反応熱挙動が異なることである。これは, 親和性の異なる二つのATP結合部位の存在の示唆³²⁾⁻³⁴⁾から始まる, 高・低親和性ATP部位の存在とこの酵素の共役反応機構との関連から関心がもたれる事柄であり, ここでは熱発生の上からもこれが確認された。これはE₂からE₁(Fig.3参照)へのコンホメーション変化, あるいは, 取り込まれたK⁺の細胞質内への放出に関係するとされている。反応熱測定結果をLineweaver-Burk(LB)プロットした結果がFig.11であり, 明らかに

Table 2 Evaluated values of heat of reaction in Na⁺, K⁺-ATPase- ATP system, at 298.15K.

Medium: 150mM NaCl, 15mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.5mM EDTA in 20mM Imidazole-HCl Buffer, at pH 7.40.

[I] ATPase: Pr.conc. 0.821mg/ml, S.A. 259.0μmol Pi/mg h.

Flow rate: 1.6673×10⁻³ml/sec, Q_d(ATPase): -5.3×10⁻⁸J/sec.

No.	ATP conc.* (mol/kg)	-Q _d ×10 ⁷ (J/sec)	-Q _r ×10 ⁶ (J/sec)	-ΔH	
				(J/g Pr)	(kJ/mol ac.Pr)**
1	1.195×10 ⁻⁶	0.00	0.411	0.301	5.81×10 ²
2	1.327×10 ⁻⁵	0.23	0.530	0.388	7.49×10 ²
3	1.722×10 ⁻⁵	0.27	2.24	1.64	3.16×10 ³
4	2.512×10 ⁻⁵	0.80	3.15	2.30	4.44×10 ³
5	4.739×10 ⁻⁵	1.10	3.67	2.68	5.18×10 ³
6	2.001×10 ⁻⁴	1.34	4.94	3.61	6.97×10 ³
7	4.001×10 ⁻⁴	1.49	5.70	4.17	8.05×10 ³

[II] ATPase: Pr.conc. 0.510mg/ml, S.A. 149.0μmol Pi/mg h.

Flow rate: 1.6554×10⁻³ml/sec,

Q_d(ATPase): -5.3×10⁻⁸ J/sec.

8	5.001×10 ⁻⁴	1.92	6.89	8.12	2.72×10 ⁴
9	1.002×10 ⁻³	4.17	14.2	17.2	5.76×10 ⁴
10	2.007×10 ⁻³	21.9	19.7	25.8	8.66×10 ⁴
11	3.001×10 ⁻³	42.1	21.1	29.9	1.00×10 ⁵

* Final concentration.

** Net values of heat of reaction for enzymatic active Na⁺,K⁺-ATPase based on S.A. and M.W 131,000.

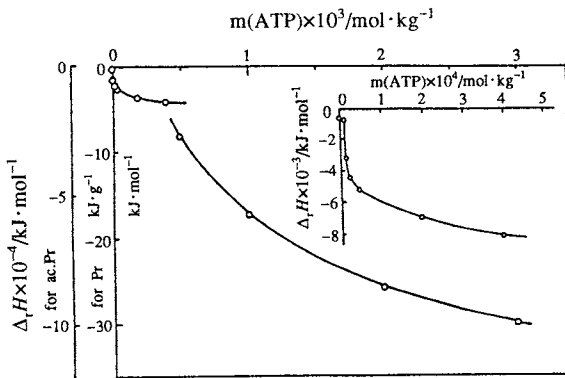


Fig.10 Evaluated values of the heat of reaction in Na⁺, K⁺-ATPase-ATP system, at 298.15K. Details of measured media and numerical values are shown in Table 2.

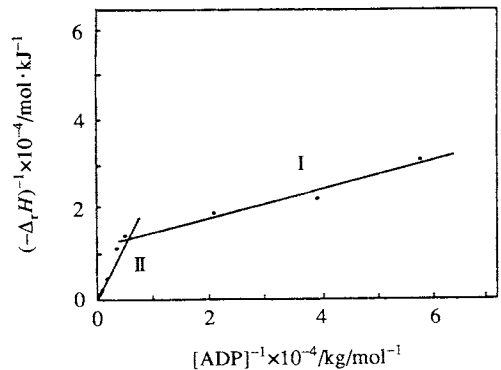


Fig.11 Substrate kinetics in Na⁺, K⁺-ATPase-ATP system: data are presented in double reciprocal Lineweaver-Burk form.

biphasic LBであることを示している。図の縦軸は、このフローカロリーメーターの特徴として、

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

反応速度(v)の代わりに熱発生速度に比例する反応のモル反応熱($\Delta_r H$)で示した。ここで、 K_m はMichaelis定数、 $[S]$ は基質濃度、 V_{max} は反応最大速度を示す。解離定数である K_m 値は、従来の文献値(直接的な反応量から求めた値; 0.5mMと1 μ M)³⁴⁾とあまり良い一致がみられず、Fig. 11からの結果はそれぞれ1mMと7 μ Mであった。さらに、この K_m 定数から、用いたNaポンプ(膜内外の区別がない)の比活性値(310Kの値を298Kのそれに換算)³⁵⁾等を使用して、ATPの分解エネルギーと実際にこのカロリーメーターで得られた発熱量との比較を行った。ATPの高エネルギーは加水分解生成リン酸イオンの静電的反発エネルギーの放出によるために、エネルギー値は溶媒組成変化を受け易い。ここでは二つのATPの分解(自由)エネルギー値(通常29~50kJ/molとして得られるが、ここではFig.12の破線1と2に対応したそれぞれ29.3および20.9kJ/mol)を用いて算出し、Fig.12の結果を得た。オーダー的な一致、傾向の一致、および、ここでは20.9kJ/mol ATPで良好な一致が観られた。これは、反応のエンタルピー ΔH^* (実線)と自由エネルギー ΔG^* (破線)のATP濃度依存性傾向は同じであること、また、ここでは $\Delta G^* = -21\text{kJ/mol}$ の値と全く一致することを示している。

この測定は定常の平衡状態での結果である。このATPaseとは異種のアミノ酸ATPase反応の前定常状態、非定常状態のストップフローによる時間分解熱測定の結果³⁶⁾からは、その熱力学的特徴として、エネルギー捕

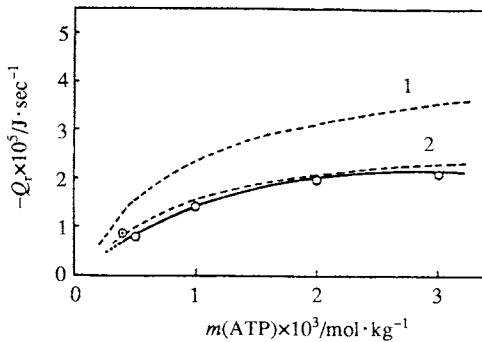


Fig.12 Reaction heats (velocity of generated heat) in Na^+, K^+ -ATPase-ATP system as a function of ATP concentration, at 298.15K; theoretical values are shown as dotted lines; 1. $\Delta G^* = 31\text{kJ/mol}$, 2. 21kJ/mol .

捉がエンタルピー過程であり、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。Naポンプの本稿の結果は、極めて高い基質特異性ととも、そのことを強く意識させている。さらに、小胞体あるいは内外の区別のある極性脂質膜中に埋め込まれたNaポンプの反応性についてこの直接カロリーメーターが行われれば、エネルギー変換性の把握にとって極めて有効なものとなる。

4. オキシエチレン鎖とベンゼンとの相互作用⁶⁾

4.1 溶媒との相互作用

オキシエチレン鎖を有する代表的な物質として、非イオン界面活性剤であるポリ(オキシエチレン)グリコールアルキルエーテル(POER; $\text{R}(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{OH}$, Rはアルキル量, n は重合度)がある。この化合物も含めて、この種の非イオン界面活性剤は炭化水素とあらゆる割合で混合する。そのうち、 σ 結合で主として二次元的に結合されているアルカン溶媒と π 電子の非局在化状態にあるベンゼン溶媒とでは溶解状態あるいは溶質分子に対する相互作用挙動が異なる。とくに筆者等から興味をもたれる事柄として、両溶媒中での溶解・相平衡挙動^{37,38)}、混合熱力学量からみられるグループ寄与の相違³⁹⁾、POERあるいは一般的にジオールモノエーテルの溶液中での分子間および分子内水素結合^{40,41)}、親水性分子部分に対する水とベンゼンの競争的相互作用⁴²⁾、熱容量による水和状態の追求⁴³⁾、POERと炭化水素との混合の過剰容積と溶液の熱膨張率⁴⁴⁾、および、混合熱^{45,47)}等が挙げられる。とくに、溶解の自由エネルギーの温度に関する二次微分に相当する熱容量⁴³⁾が溶液の挙動を知る手段として、また、自由エネルギーの圧力と温度に関する二次微分である熱膨張率^{44,45)}は溶液の構造変化に関する情報を提供する可能性があるものとして期待される。後者では、POER-ベンゼン系の特徴として、末端OH基を含めて親水基中の酸素原子に対して平等にベンゼン分子が一定の割合で相互作用し、その結果、膨張しにくい特別な構造を形成しているものと推定した⁴⁴⁾。

ここでは、この領域の研究の一環として、開発したフローカロリーメーターでのポリ(オキシエチレン)グリコールアルキルエーテルPOED($\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{OH}$, $n=2, 4, 6, 8$)の炭化水素(デカンおよびベンゼン)溶液の希釈熱を測定し、その結果を検討した。

4.2 測定

2の項に記載したように、ベンゼン溶媒の場合には熱平衡を期することが出来ず、樹脂フロー管はすべてほぼ同径のテフロン管に換えて検出セルを組み直した。測定には比較的大容積量の精密恒温槽を必要とするが、こ

ではその条件を満たす $\pm 0.01\text{K}$ の恒温水槽中で行った。流入ポンプは2の項で記したサヌキ工業製のポンプを使用した。この方法での試作セルによる検量から、数 $\mu\text{J}/\text{sec}$ 程度の熱量発生速度を検出し $150\mu\text{J}/\text{sec}$ 以上の熱量発生速度に対する検量では $\pm 0.03\%$ 以内の精度であった。希釈熱は溶質のモル分率 $x_2 = 0.01$ 以下の溶液について 293.15, 298.15 および 303.15K で測定した。測定熱量発生速度は $1.6 \times 10^{-6} \sim 7.5 \times 10^{-5} \text{J}/\text{sec}$ であった。

4.3 結果と考察

一定容積の希釈されるべき溶液の初濃度 c_a および希釈後の溶液の濃度 c_e 間の単位時間あたりの実測希釈熱をもとに、Schulzらの方法⁴⁸⁾によってビリアル係数 $B(=RTA_2)$ の熱寄与であるエンタルピー係数 B_H を求め、溶媒の部分モルエンタルピー $-\Delta\bar{H}_1$ を評価⁴⁹⁾した。平均濃度は $c_{av} = (c_a + c_e)/2$ で示される。単位は従来の結果⁴⁹⁾との関連からここでは c.g.s 単位で示した。 c_{av} と B_H 係数の関係を Fig.13 に示す。

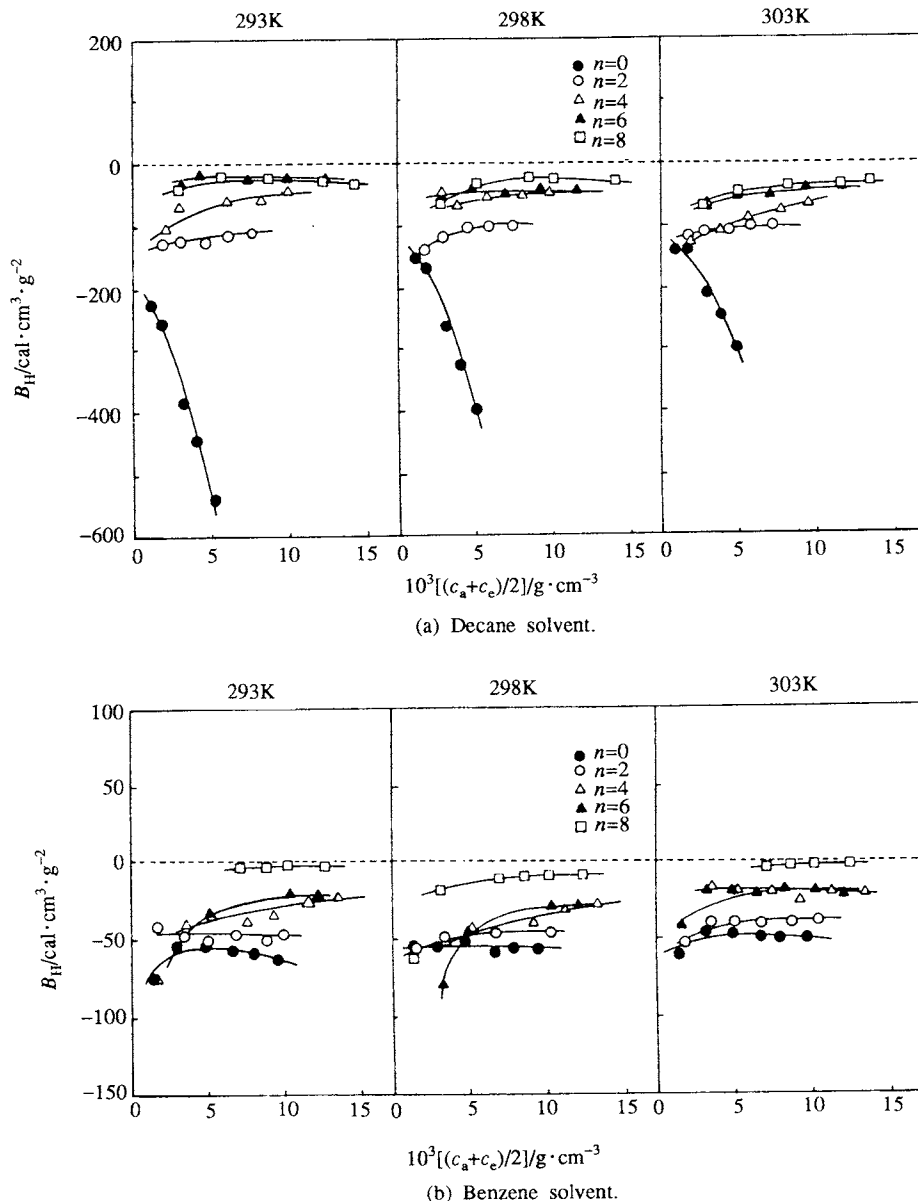


Fig.13 Concentration dependence of B_H value for $C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_nOH$ -solvent system.

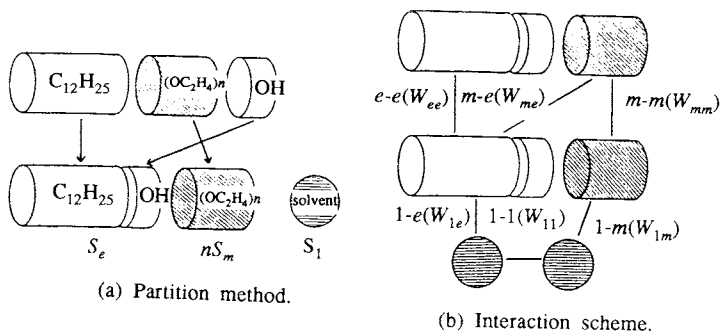


Fig.14 Pair interaction scheme in this study.

POED分子あるいはオキシエチレン鎖 $(OC_2H_4)_n$ と他の分子部分-溶媒間の相互作用を評価する目的で、 $\Delta\bar{H}_1$ 値を解析した。その検討には、零次近似、準化学的方法およびセルモデルによる対応状態を用いる方法等の種々の混合の理論的取扱いがある。われわれは対応状態をこれと同種の系での混合熱適合に用いたが⁵⁰⁾、異種分子間のセグメント間特性が幾分か異なる系のために良好な適合性を得るまでには至っていない。また、グループ寄与の適合性の検討では、今のところ最も単純と思われる零次近似による方法が効果的である³⁹⁾ことから、ここでは希釈熱に対して次のような表面分率による零次近似式の誘導化を行い、各溶質部分と溶媒との相互作用を解析した。以下の方法⁶⁾によると、ここではオキシエチレンの鎖長に応じた $\Delta\bar{H}_1$ 値が得られているために、従来の文献⁵¹⁾とは異なって溶質分子部分全部についての溶媒との相互作用エネルギー(ΔW_{ij} は ij 分子部分間の交換エネルギー)の吟味が可能となる。Fig.14に示すように、 s_1 (添字1は溶媒について2は溶質についてを示す)は溶媒分子表面積を示し、 s_2 なる溶質POED分子に対しては、表面をその中間部にあるオキシエチレン鎖部分の表面積 S_m とOH基とドデシル基と合わせた末端部分の表面積 S_e とに分割し、各部にFig.14の相互作用エネルギーを持つ各種の二体間表面接触が存在する場合を考えると、(2)~(6)式の仮定から $\Delta\bar{H}_1$ に関係した式(7),(8)が得られる。ここで、 W_{ij} は ij 分子部分間の接触エネルギー θ_i は溶液中の i 成分の表面分率を示す。

$$s_2 = ns_m + s_e \quad (2)$$

$$\theta_i = \frac{s_i n_i}{\sum s_i n_i} \quad (i=1, 2) \quad (3)$$

$$\Delta W_{1m} = W_{1m} - \frac{1}{2}W_{11} - \frac{1}{2}W_{mm} \quad (4)$$

$$\Delta W_{1e} = W_{1e} - \frac{1}{2}W_{11} - \frac{1}{2}W_{ee} \quad (5)$$

$$\Delta W_{1me} = W_{1m} + W_{1e} - W_{11} - W_{me} \quad (6)$$

$$\Delta\bar{H}_1 = \left(\frac{\partial \Delta H^M}{\partial n_1} \right)_{n_2} \quad (7)$$

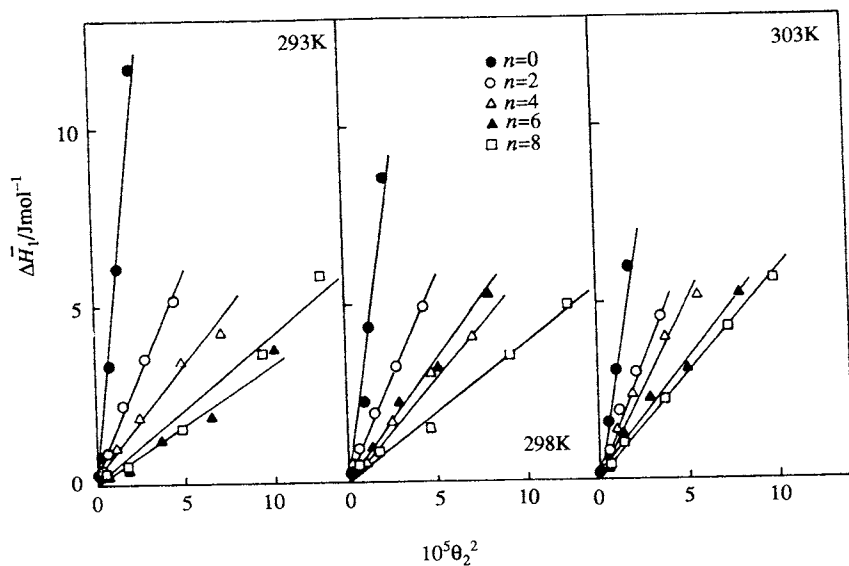
$$= \theta_2^2 \frac{s_1}{s_2} \{ s_e ns_m \Delta W_{1e} + (ns_m)^2 \Delta W_{1m} + (s_e)^2 \Delta W_{1e} \}$$

$$\left(\frac{\Delta\bar{H}_1}{\theta_2^2} \frac{s_2}{s_1} - (s_e)^2 \Delta W_{1e} \right) \frac{1}{ns_m} = s_e \Delta W_{1me} + ns_m \Delta W_{1m} \quad (8)$$

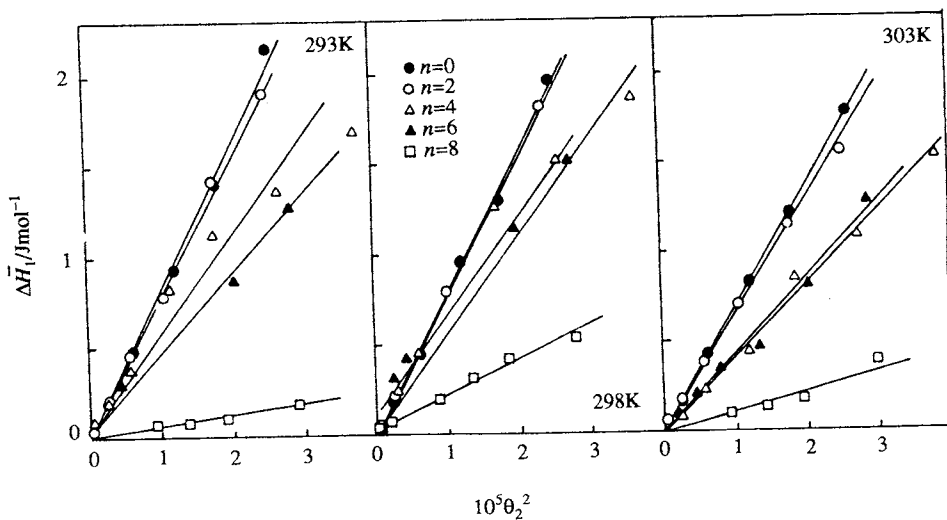
$$\lim_{n \rightarrow 0} \left[\left(\frac{\Delta\bar{H}_1}{\theta_2^2} \frac{s_2}{s_1} - (s_e)^2 \Delta W_{1e} \right) \frac{1}{ns_m} \right] = s_e \Delta W_{1me}$$

Fig.15には θ_2^2 と $\Delta\bar{H}_1$ の関係を、Fig.16には $\Delta\bar{H}_1/\theta_2^2$ とオキシエチレン鎖長 n との関係を、そして、Fig.17には ΔW_{1me} を評価するための(8)式への適合を示した。

Fig.18には、結果として得られた各分子部分二体間での交換エネルギー(ΔW_{ij})を温度に対して図示した。Fig.18の結果から次のことが言及される。デカンに対する ΔW_{1me} とベンゼンに対する ΔW_{1m} は負値を示す。デカン溶媒の ΔW_{1me} は式(6)から ΔW_{me} 値に起因したものと考えられる。すなわち、脂肪族の非極性溶媒(1)中のオキシエチレン鎖部分(m)と末端部分(多分OH基)(e)間には相対的に強いエンタルピー的相互作用がある。一方、 ΔW_{1e} および ΔW_{1m} には特に強い相互作用はない。デカン系で特に著しいのは、これらの絶対値が実験範囲内で温度の上昇とともに急激に減少することである。これは、長鎖長の溶質-溶媒間の過剰熱力学量にしばしば観られ、温度の上昇にともなう可撓性セグメントの運動の活発化とコンホメーション効果によるセグメント間接触の減少に起因^{52),53)}するものとされる。ベンゼン溶媒系では



(a) Decane solvent.



(b) Benzene solvent.

Fig.15 Partial molar enthalpy $\Delta\bar{H}_1$ as a function of the square θ_2^2 of surface fraction for $\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{OH}$ solute solution.

ΔW_{1m} 値が負を示すことから、溶媒ベンゼンとオキシエチレン鎖間の相互作用は相対的にやや強い。その強さには ΔW_{1e} および ΔW_{1me} と比較してデカン溶媒系ほどの差はない。Fig.16 の傾向は、前記した膨張率で考察⁴⁴⁾された、ベンゼンは末端OH基を含めて親水基中の酸素原子に平等に一定の割合で相互作用しているという推定を支

持するものであろう。

この希釈熱の直接測定とは別に、POEDとデカンあるいはベンゼンとの混合熱を直接測定し、その過剰エンタルピーの組成変化からポリオキシエチレン鎖とベンゼン分子との相互作用エネルギーが推定された。その結果、デカン中からベンゼン中への移行のエンタルピーは、オ

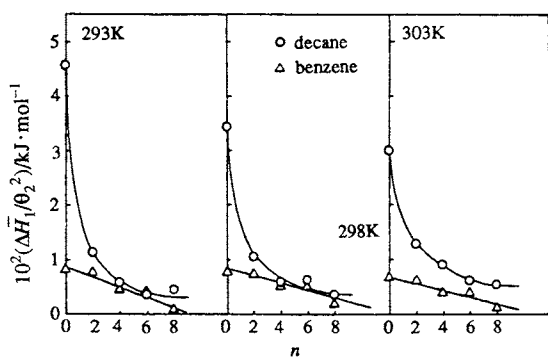


Fig.16 Relation between $\overline{\Delta H}_1/\theta_2^2$ and oxyethylene chain length n .

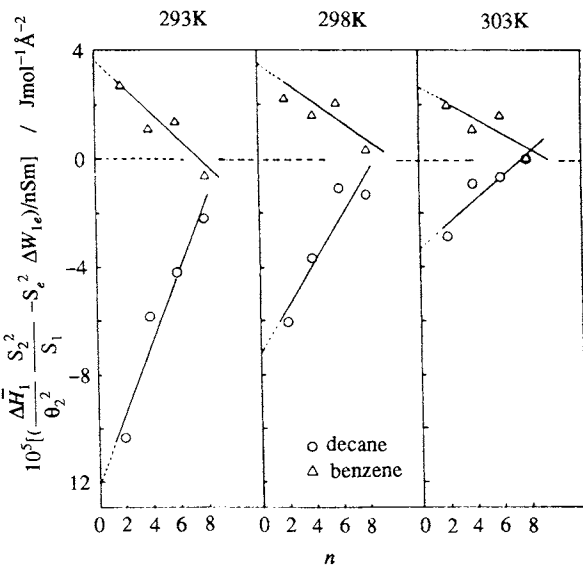
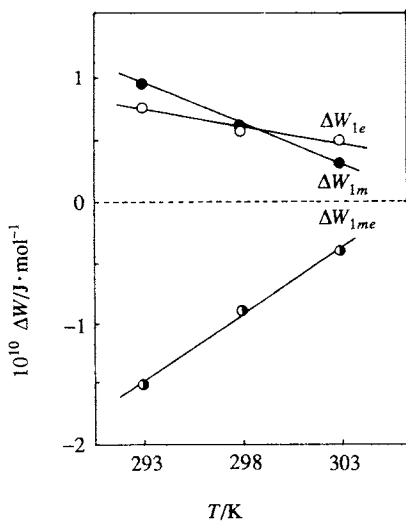
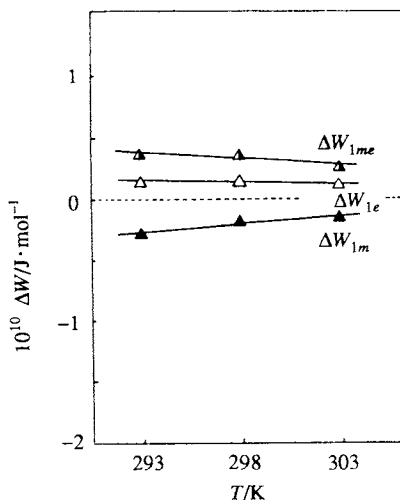


Fig.17 Plots according to equation (9).



(a) Decane solvent system.



(b) Benzene solvent system.

Fig.18 Temperature dependence of exchange energies ΔW_{ij} , suffixes are referred to the interaction scheme in Fig.14.

キシエチレン1ユニット($n=1$)あたり -2.0kJ であると評価された⁴⁵⁾⁻⁴⁷⁾。

5. まとめ

以上、測定フローマイクロカロリーメーターの概略、および、それによるNaポンプ-ATP系の結合・反応とオキ

シエチレン鎖とベンゼンとの相互作用の二つの研究の概要を紹介した。これらの測定を始めるに当たって最も留意した点は、いわゆる結合・反応等の検知のためのモニタリングとしてではなく、それらの平衡あるいは完結までの全熱量を如何に精度良く測定するかにあった。他の分野でもそのような場合があろうが、カロリーメーターに関

して、測定が確立されるまでの行程は必ずしも順調でないのが普通である。モジュール数に比例した検出感度を必ずしも期待していないことは自明のことである。ただ、長い混合液の経路を必要としたために数多くのモジュールの直列接続のセルとなってしまった。それでもセル内の温度の高度均一化が得られたのは、不活性液体の充填の恩恵にあったように思われる。さらに、熱伝導の点で劣る金属管に換えての樹脂管の使用は、順調なフロー化とともに均一化・平均化した発生熱の放出という点でも効果的であるように思われる。

JørgensenのNaポンプ試料を用い、直接的なカロリメトリーによるイオン、基質アナログおよびATPの結合・反応性の測定を試みた。とくにATPとの反応ではカロリメトリーからも明らかにbiphasicなLBプロットが示された。また、反応の ΔH° と ΔG° のATP濃度依存性傾向は同じで、 ΔH° 値は $\Delta G^\circ = -21\text{kJ/mol}$ の値と全く一致することなどを、具体的な測定値とともに結果を示した。POED溶液を用い、オキシエチレン鎖に対する有機溶媒(デカンとベンゼン)の相互作用を希釈熱とその温度依存性の測定から求めた。デカン溶媒系では、デカンとPOED分子間には特に強い相互作用はないがPOED分子中のオキシエチレン鎖と末端OH基部分との間には相対的に強いエンタルピー的相互作用が認められた。ベンゼン溶媒中では、オキシエチレン鎖とベンゼン間に相対的に強い相互作用のあること、また、その温度依存性には測定範囲内で大きな変化のないことを認めた。

文 献

- 1) 森本 敏, 伊藤正次郎, 第22回熱測定討論会講演要旨集 p.211 (1986); 第23回同 p.154 (1987).
- 2) 森本 敏, 第21回熱測定討論会講演要旨集 p.110 (1985); *Polymer Preprints Japan* **35** (9), 2826 (1986).
- 3) 森本 敏, 中石優美子, 伊藤正次郎, 第22回熱測定討論会講演要旨集 p.210 (1986); 第6回界面およびコロイド科学国際会議要旨集 p.495 (1988).
- 4) 森本 敏, 伊藤正次郎, 原 諭吉, 中尾 眞, 第24回熱測定討論会講演要旨集 p.26 (1988); *Termochimica Acta* **163**, 97 (1990).
- 5) 森本 敏, 清水 隆, 科技厅振興費研究成果報告書「生体エネルギー変換機能利用のための基礎技術」第1期, p.348 (1990).
- 6) 森本 敏, 高畑丈二, 第27回熱測定討論会講演要旨集 p.166 (1991); *The Bulletin of School of High-Technology for Human Welfare, Tokai University* **1**, 65 (1991).
- 7) P. Monk and I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* **23**, 1842 (1968).
- 8) 小川英生, 村上幸夫, 熱測定 **12**, 163 (1985).
- 9) 伊藤正次郎, 熱測定 **14**, 83 (1987).
- 10) J. C. Skou, *Biochem. Biophys. Acta* **23**, 394 (1957).
- 11) R. W. Albers, *Annu. Rev. Biochem.* **36**, 727 (1967).
- 12) R. L. Post, T. Kume, T. Tobin, B. Orcutt and A. K. Sen, *J. Gen. Physiol.* **54**, 306 (1969).
- 13) 谷口和弥, 生物物理 **21**, 11 (1981).
- 14) 福島義博, 蛋白質・核酸・酵素 **28**, 1131 (1983).
- 15) 原 諭吉, 膜 **10**, 165 (1985).
- 16) 福島義博, "バイオエナージェティクス" 中尾 眞編 p.95, 学会出版センター, 東京(1986).
- 17) 福島義博, 熊沢紀文, 膜 **13**, 73 (1988).
- 18) Y. Hara, O. Urayama, K. Kawakami, H. Nojima, H. Nagamune, T. Kojima, T. Ohta, K. Nagano and M. Nakao, *J. Biochem.* **102**, 43 (1987).
- 19) W. Stühmer, F. Conti, H. Suzuki, X. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo and S. Numa, *Nature* **329**, 597 (1989).
- 20) S. H. Heinemann, H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto and S. Numa, *Nature* **356**, 441 (1992).
- 21) T. Benzinger, C. Kitzinger, R. Hems and K. Burton, *Biochem. J.* **71**, 400 (1959).
- 22) R. C. Phillips, P. George and R. J. Rutman, *J. Biol. Chem.* **244**, 3330 (1969).
- 23) R. L. Jørgensen, in "Method in Enzymology", R. Flisher and L. Packer Eds., Academic Press, NY, pp. 277~290 (1974).
- 24) Y. Hara, T. Yamada and M. Nakao, *J. Biochem.* **99**, 531 (1986).
- 25) 原 諭吉, お茶の水医学雑誌 **23**, 25 (1955).
- 26) M. Yamaguchi and Y. Tonomura, *J. Biochem.* **83**, 977 (1978); *ibid.* **88**, 1369 (1980).
- 27) J. L. Banyasz and J. E. Stuehr, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 7226 (1973).
- 28) 森本 敏, 桜井通陽, 井上康男, 熱測定 **10**, 127 (1983).
- 29) P. R. Stoesser and S. J. Gill, *J. Phys. Chem.* **71**, 564 (1967).
- 30) M. G. Marenchic and J. M. Sturtevant, *J. Phys. Chem.* **77**, 544 (1973).
- 31) S. Morimoto, *Nucleic Acid Res. Sympo.* **10**, 67 (1979); *Chem. Lett.* **1979**, 1159; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **52**, 2250 (1979).

- 32) T. Kanazawa, M. Saito and Y. Tonomura, *J. Biochem.* **67**, 693 (1970).
- 33) I. M. Glynn and S. J. D. Karlish, *Ann. Rev. Physiol.* **37**, 13 (1975).
- 34) J. D. Robinson, *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 1006 (1976).
- 35) 原 諭吉, 私信.
- 36) 児玉孝雄, 熱測定 **15**, 2 (1988).
- 37) T. Nakagawa, K. Kuriyama and J. Inoue, *J. Colloid Interface Sci.* **15**, 168 (1960).
- 38) K. Shinoda and H. Arai, *J. Phys. Chem.* **68**, 3485 (1964).
- 39) H. V. Kehiaian, J. P. E. Grolier and G. C. Benson, *J. Chim Phys.* **75**, 1031 (1978).
- 40) F. Kimura, S. Murakami, R. Fujishiro and Y. Toshiyasu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **50**, 791 (1977).
- 41) T. Miura and M. Nakamura, *ibid.* **50**, 2528 (1977).
- 42) M. Nakamura, G. L. Bertrand and S. E. Friberg, *J. Colloid Interface Sci.* **91**, 516 (1983).
- 43) N. Nishino, S. Morimoto and M. Nakamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **57**, 2797 (1984).
- 44) 中村正男, 寺岡浩仁, 大城真由美, 森本 敏, 第38回コロイドおよび界面化学討論会講演要旨集 P.264 (1985).
- 45) 中村正男, 西野宣雄, 寺岡浩仁, 森本 敏, 第18回熱測定討論会講演要旨集 P.44 (1982); M. Nakamura, J. Takahata, S. Morimoto, *et al.*, ISP-JOCS World Congr. Abstracts 230 (1988).
- 46) 高畑文二, 城所忠彦, 森本 敏, 中村正男, 日中熱測定シンポジウム講演要旨集 p.131 (1990).
- 47) 高畑文二, 森本 敏, 第26回熱測定討論会講演要旨集 p.140 (1990).
- 48) G. V. Schulz and A. Horbach, *Z. Phys. Chem. (F)* **22**, 377 (1953).
- 49) S. Morimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **44**, 879 (1971).
- 50) 森本 敏, 中村正男, 第19回熱測定討論会講演要旨集 p.174 (1983).
- 51) V. W. Bruns, F. Mehdorn, K. Mirus and K. Ueberreiter, *Kolloid-Z.* **224**, 17 (1967).
- 52) M. Barbe and D. Patterson, *J. Phys. Chem.* **82**, 40 (1978).
- 53) S. N. Bhattacharyya and D. Patterson, *J. Solution Chem.* **9**, 247 (1980).

要 旨

生化学反応および溶液化学の研究のための、高感度、迅速、反応懸濁液の均一混合に留意したフローマイクロカロリーメーターを試作した。この装置の概要と、それを用いた、Jørgensen試料によるNaポンプのATPおよびその関連物質との結合・反応熱の研究、および、POED溶液の希釈熱とその温度依存性の測定によるオキシエチレン鎖と炭化水素溶媒との相互作用を報告した。

前者では、Naポンプに対する関連イオン、基質アナログおよびATPの結合・反応熱の具体的な測定値を示すとともに、ATPとの反応では、カロリメトリーからも明らかにbiphasicなLBプロットが示されること、および、定常の平衡状態での値として、 $\Delta H^{\circ} \approx \Delta G^{\circ} = -21 \text{ kJ/mol}$ である結果が示された。後者では、デカンとPOED分子間には特に強い相互作用はないが、分子中のオキシエチレン鎖と末端OH基部分との間には相対的に強い相互作用が認められた。ベンゼン溶媒中では、オキシエチレン鎖とベンゼン間に相対的に強いエンタルピー的相互作用のあること、また、その温度依存性には測定範囲内で大きな変化がないことを明らかにした。

国際会議のお知らせ

4th Asian Thermophysical Properties Conference

September 5-8, 1995
Tokyo, Japan

Schedule:

Abstract Submission: February 15, 1995
Notice for Acceptance: March 31, 1995
Full Paper Submission: May 31, 1995

contract:

Professor A. Nagashima
Department of Mechanical Engineering
Keio University
3-14-1, Hiyoshi, Yokohama 223, Japan
Fax: 81(Japan)-45-562-7625
Tel: 81(Japan)-45-563-1141
e-mail: nagasaka@mech.keio.ac.jp