

走査型マイクロカロリメトリーによる 蛋白質構造のエネルギー論

上平 初穂*

(昭和63年5月9日受理)

Energetics of Protein Structure by Scanning Microcalorimetry

Hatsuho Uedaira

Scanning microcalorimetry has a remarkable advantage in the study of protein structure, because it gives all information on the thermodynamic states of proteins as enthalpy function. Owing to the development of scanning microcalorimetry, heat capacity functions for thermal transition of small compact globular proteins, multidomain proteins and multi-subunit proteins have been precisely studied. These data have revealed general principles for the thermodynamic properties of ordered structure of small globular proteins and for organizing into large protein molecules. In this paper, recent investigations on the following subjects are reviewed; (1) the experimental studies on small proteins such as neurotoxins, (2) theoretical elucidation of the heat capacity difference between native and denatured states, (3) calorimetric data analysis for multi-domain or multi-subunit proteins, and (4) effects of nonspecific interactions between proteins and additives on the protein structure.

1. はじめに

蛋白質は生体中で反応の触媒をはじめとする種々の機能を担っている。その機能を発揮するためには各分子に固有の立体構造が保たれていなければならない。現在までに多数の蛋白質の立体構造がX線解析によって明らかにされている。溶液中の立体構造の解析には、この他に変性剤の添加や加熱によって立体構造が変化したり壊れたりする過程を観測する方法が有力である。測定手段として、NMR、円二色性スペクトル等の分光学的方法が盛んに用いられて来た。他方では1960年代後半から熱量計とその解析法が急速に進歩した事によって、蛋白質の熱容量変化を高い精度で測定しその結果を解析することが可能になった^{1),2)}。熱測定では分光学的方法と異なり、個々の側鎖に対する情報を得る事はできないが、熱転移に伴う熱力学量、すなわち、蛋白質構造を保つ力のエ

ネルギー量を直接実測できるという特徴がある。Privatlovは自ら設計開発した微小熱量計によって数多くの蛋白質の高次構造の熱力学的研究を発表している³⁾⁻⁵⁾。なお、生体高分子の熱測定に関しては日本語で書かれた多数の総説⁶⁾⁻¹³⁾、ノート¹⁴⁾、解説¹⁵⁾⁻¹⁹⁾がある。

蛋白質の熱転移は協同現象であってその転移ユニットには下限があるため、小さな蛋白質の転移挙動が興味を持たれている。また、リボヌクレアーゼのような典型的な球状蛋白質のデータの蓄積^{3),20)}によって球状蛋白質の立体構造転移の一般的特性が帰納され、その原理を明らかにしようとする研究が進められるようになった。このような問題の一つが熱転移の際の熱容量変化、 $\Delta_{ND} C_p$ 、に関するものである。一方、解析法の進展と共にサブユニットやドメイン構造のある複雑な蛋白質の熱転移の研究も盛に行われている^{4),20)}。これらのデータが蓄積されればそれに伴ってサブユニット、ドメイン構造を特性づけるエネルギー学の理論が進展するであろう。更に、蛋白質に対して弱い非特異的な相互作用をする物質を加えたときに蛋白質の転移や水和がどのような影響を受けるかについても明らかにされつつある。本稿では、これらの話題を中心に、蛋白質構造の熱力学の最近の動きにつ

繊維高分子材料研究所：茨城県つくば市東1-1-4

〒305

Research Institute for Polymers and Textiles,
Tsukuba, Ibaraki Pref. 305, Japan

Table 1 Transition ranges for a two-state transition with various values of the transition enthalpy. ($T_d = 50^\circ\text{C}$)²¹⁾

Transition enthalpy kJ mol^{-1}	Molecular weight*) D	Temperature/ $^\circ\text{C}$ at $\alpha = 0.1$ **)	Temperature/ $^\circ\text{C}$ at $\alpha = 0.9$
80	3400	29	75
170	6700	39	62
250	10000	43	58

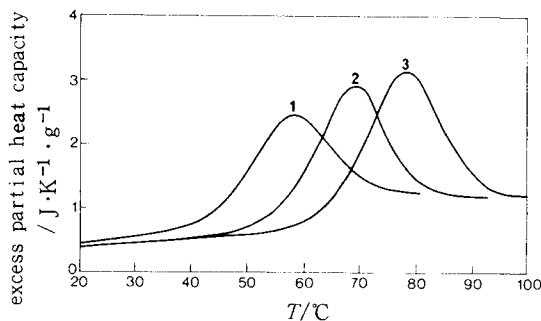
*) The average transition enthalpy is assumed to be $25 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ ³⁾.**) α : fraction of protein molecules in a denatured states.

いて述べる。

2. 分子量の小さい蛋白質の転移

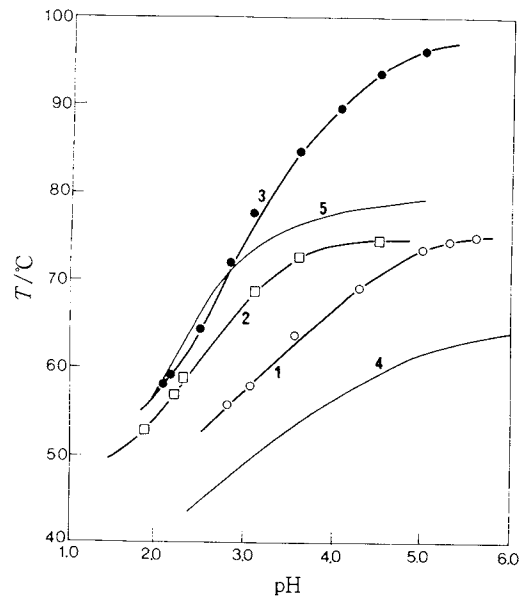
生体高分子の熱による転移は、分子の立体構造保持に関与している弱い相互作用が協同的に切れる現象である。これらの弱い相互作用の変化によるエンタルピーは、通常のコンパクトな球状蛋白質の場合平均して $25 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ (50°C 附近) であるから、分子量が数千以上でないと協同性を示さない²¹⁾。例えば Table 1 からわかるように転移の midpoint (T_d) が 50°C の場合、分子量 3400 (アミノ酸約 30 ケ) の蛋白質の転移では転移の分率が 0.1 ~ 0.9 の温度範囲は約 30°C から 75°C にわたっていて、ブロードにおこる。従って分子量が小さいペプチドの場合は集合体を形成している時に、初めて熱測定が可能となる。

低分子量の球状蛋白質 (ペプチド) には、毒素、ホルモンなどの一群がある。コブラ毒 (cobra venom *Naja naja oxiana* 由来) から取った 3 種の神経毒、すなわち神経毒 I (分子量 8020, S-S 結合 5), 神経毒 II (分子量 6888, S-S 結合 4), サイトトキシン I (分子量 6810, S-S 結合 4), の pH 3.1 における過剰部分熱容量は Fig. 1 の

Fig. 1 Excess heat capacity curves of toxins at pH 3.10.²²⁾

1, Neurotoxin I ; 2, cytotoxin I ; 3, neurotoxin II

ようになる²²⁾。pH 2 ~ 5.5 の範囲ではこれら 3 種の蛋白質の熱転移の可逆性は 90% 以上である事が確かめられている。熱転移温度 (T_d) の pH 依存性を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 pH dependence of transition temperature.^{3), 22)}

1, neurotoxin I ; 2, cytotoxin I ; 3, neurotoxin II ; 4, ribonuclease A ; 5, lysozyme

Fig. 2 の曲線 4 および 5 は比較のために示したリボヌクレアーゼ A³⁾ およびリゾチーム³⁾ の熱転移曲線である。神経毒 II (曲線 3) の T_d は 3 つの毒素の中で最も高く、特に pH 5.0 では図中の他に蛋白質より約 20°C も高い。立体構造保持にはジスルフィド結合が一般に重要な役割を果たすが、この図の転移温度とは相関が見られない。これら神経毒の熱転移のエンタルピー, $\Delta_{ND} H(T)$, を T_d に対して図示すると Fig. 3 のように直線になる。神経毒

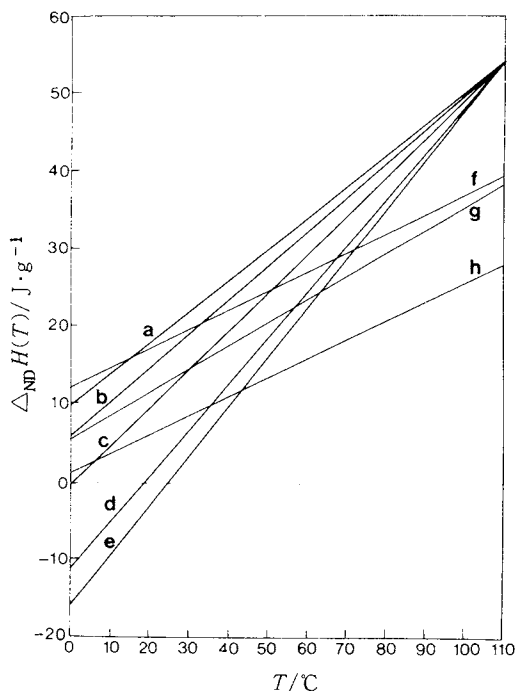


Fig. 3 Temperature dependence of enthalpies of denaturation $\Delta_{ND}H(T)$ for proteins.^{3),22)} a, ribonuclease A ; b, lysozyme; c, α -chymotrypsin; d, cytochrome C; e, metmyoglobin; f, cytotoxin I and neurotoxin II ; g, neurotoxin I ; h, [Nle²¹]-CRF (CRF: corticotropin-releasing factor)²⁷⁾

IIとサイトトキシンIの $\Delta_{ND}H(T)$ は一致し(直線f), 神経毒Iの $\Delta_{ND}H(T)$ は小さい(直線g)。3者の $\Delta_{ND}H(T)$ の温度依存性は非常に小さく、 $\Delta_{ND}H(T)$ の110℃への外挿値はFig.3に示すように通常の分子量11000以上の球状蛋白質の外挿値($54 \pm 0.6 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$)の約70%, $41 \pm 0.4 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ である。これらの毒素の熱変性状態は、4.1 M グアニジン塩酸塩溶液中と同じく完全変性状態であることが確かめられているので²²⁾, この小さな $\Delta_{ND}H(T)$ の値は不完全変性によるものではない。また、水溶液中で単量体として存在することが明らかにされている²²⁾。エラプトキシンb(分子量6860, S-S結合4)のX線解析結果²³⁾を参考にして天然状態の無極性基の対の数(N_{np}/M)を求めると、 $5.0 \times 10^{-3} \text{ g}^{-1}$ となる。この値を $\Delta_{ND}H(T)$ の温度微分、 $\Delta_{ND}C_p$, に対してプロットするとFig.4ようになる。図の点1は、神経毒IIの立体構造が近似的にエラプトキシンbに等しいと仮定²²⁾した値である。神経毒を含めて N_{np}/M の値は $\Delta_{ND}C_p$ に對

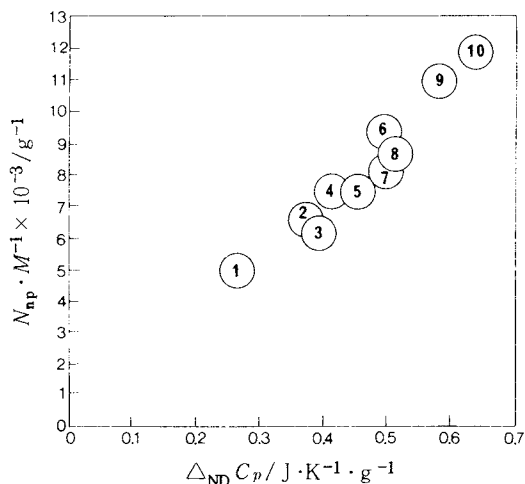


Fig. 4 Plots of concentration of nonpolar contacts in proteins N_{np} against the observed denaturational specific heat capacity change $\Delta_{ND}C_p$.^{3), 22)} 1, erabutoxin b ; 2, ribonuclease A ; 3, parbarbumin; 4, lysozyme; 5, pancreatic trypsin inhibitor; 6, α -chymotrypsin; 7, β -trypsin; 8, papain; 9, cytochrome C; 10, mioglobin

してはほぼ直線となる。一方、水素結合の相対数(N_H/M)の値は分子量11000以上の球状蛋白質では平均 $6.2 \times 10^{-3} \text{ g}^{-1}$ であり、ばらつきは $\pm 5\%$ 内である³⁾。膵臓トリプシンインヒビター²⁴⁾, エラプトキシンb²²⁾およびインシュリンの単量体形²⁵⁾では N_H/M は、この平均値より小さく、それぞれ 4.3×10^{-3} , 4.4×10^{-3} , $4.3 \times 10^{-3} \text{ g}^{-1}$ である。上記の3種の神経毒の $\Delta_{ND}H(110^\circ\text{C})$ の値が小さく、また、それらの値がほぼ等しいのはこれら低分子量の蛋白質の N_H/M の値がこのように小さいためであると考えられている²²⁾。

副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)は視床下部から分泌され、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の脳下垂体から血中への放出を促進する作用がある。CRFはこのように一連の調節機構の中で重要な役割を果たすホルモンであり、41残基のアミノ酸から成る分子量4650のペプチドである。このペプチドの21位のMetをNleに置換した誘導体([Nle²¹]-CRF)は天然のCRFよりも安定でかつ同等の活性がある事が示されている²⁶⁾。[Nle²¹]-CRFはpH 7.5のリン酸緩衝溶液中で分光測定によっても熱測定によっても協同的な転移を示す²⁷⁾。測定された熱容量曲線を単量体あたりで表わすとFig.5aのようになる。 T_d , $\Delta_{ND}C_p$ および $\Delta_{ND}H(T_d)$ がこの測定値と同じであるとして二状態転移を仮定して計算した熱容量曲線は、

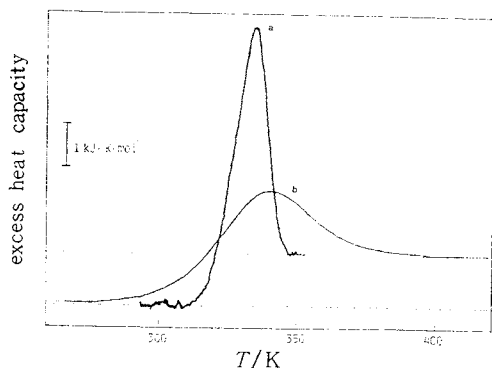


Fig. 5 Excess heat capacity curves of [Nle²¹]-CRF27).

a, observed curve at pH 7.5; b, calculated curve assuming a two-state transition of monomer with the same T_d and denaturation enthalpy as curve a.

Fig. 5 b のように 0℃ から 100℃ 以上の温度にわたる非常にブロードな形となる。これに対して実測の曲線 a が非常にシャープなのは、[Nle²¹]-CRF が天然状態でも熱変性状態でも 6 量体を形成しているためである事が、後述の城所ら¹²⁾の解析法によって明らかになった。[Nle²¹]-CRF の $\Delta_{ND}H(T)$ の温度依存性は Fig. 3 の h のようになる。

更に小さいペプチドとしては、リボヌクレアーゼの N 端フラグメントである C-ペプチドラクトン (アミノ酸残基 1~13) のコンフォメーション変化が CD と NMR によって測定されている²⁸⁾。222 nm における CD スペクトルから、4℃ 以下ではこのペプチドはヘリックスを形成し、その程度は pH 5.04 で最大値をとり、強く pH に依存する。ヘリックス構造は 4~30℃ で転移を示し、30℃ 以上では CD の変化が見られない。この転移でヘリックスが壊れる際の van't Hoff エンタルピー変化は 66.9 kJ·mol⁻¹ である。この値は 45.1 J·g⁻¹ に担当し、Privalov³⁾ によって熱測定から求められた多くの球状蛋白質の熱転移エンタルピー変化に比較してはるかに大きい (Fig. 3 参照)。種々の仮定のもとに計算されたものではあるが、この結果は短いペプチドが、低温でヘリックスを取り得る事、ヘリックスの安定性に対する側鎖間の相互作用の影響 (pH 5.04 では Gly⁹ が負に、His²¹ が正に荷電している)、特に電気的相互作用が蛋白質の折りたたみ過程で重要な役割を果し得る事を示唆している。

3. $\Delta_{ND}C_p$ に影響を及ぼす因子

高精度の走査型マイクロカロリーメータによる熱力学データから明らかになった球状蛋白質の特性の一つは、熱変性状態では天然状態よりも比熱容量が大きく、その増分、

$\Delta_{ND}C_p$ は温度に依存せず、蛋白質分子固有の値を持つ事である³⁾。従って $\Delta_{ND}H(T)$ は次式のように温度の一次関数で表わされる (Fig. 3 参照)。

$$\Delta_{ND}H(T) = \Delta_{ND}H(T_d) + (T - T_d)\Delta_{ND}C_p \quad (1)$$

ここで $\Delta_{ND}H(T_d)$ は測定された熱変性温度、 T_d 、でのエンタルピー変化である。ギブス自由エネルギーは次式から計算される。

$$\frac{d}{dT}(\Delta_{ND}G(T)/T) = -\Delta_{ND}H(T)/T^2 \quad (2)$$

Privalov ら²⁹⁾ によって測定されたメトミオグロビンの pH 3.83 における熱容量曲線には Fig. 6 c に見られる

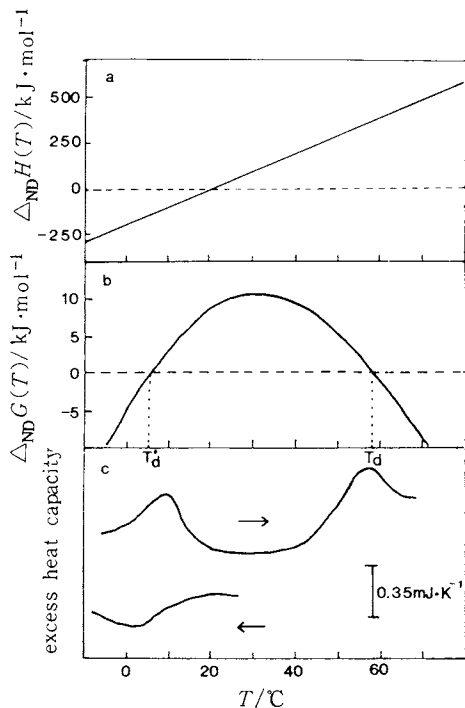


Fig. 6 Thermodynamic functions for thermal transition of metmyoglobin.²⁹⁾

a, $\Delta_{ND}H(T)$
b, $\Delta_{ND}G(T)$ at pH 3.83
c, excess heat capacity at pH 3.83

ように 2 つのピークがある。高温側のピークが多くの蛋白質で観測される熱転移に相当する。高温側の熱転移のピークから (1), (2) 式によって $\Delta_{ND}H(T)$ および $\Delta_{ND}G(T)$ を計算した結果が Fig. 6a および b である。 $\Delta_{ND}G(T)$ は極大値を持ち、高温領域 ($T > T_d$) および低温領域 ($T < T_d$) で $\Delta_{ND}G(T) < 0$ となる。222 nm および 275 nm における分子楕円率、NMR スペクトル、粘度の測定によっても $T_d < T < T_d$ においてメトミオグロビンが秩序性の高

い天然状態をとり、 T_d 以上と T_d' 以下の温度ではヘリックス含量が減少し、側鎖の自由度および分子の広がりが増している事が確かめられている。またFig. 6cから明らかなように、高温側の熱転移のデータから予測された低温変性が実際に観測され、転移温度もFig. 6bの T_d' に一致している。この事は $\Delta_{ND}H(T)$ の計算において、(1)式が成立すること、すなわち $\Delta_{ND}C_p$ が温度によらない定数であるとして、(1)式によって測定温度の高温および低温側に $\Delta_{ND}H(T)$ を外挿出来ることを証明している。

アポミオグロビンはメトミオグロビンのアポ蛋白質であるが、この蛋白質でもFig. 7に示すように低温変性が

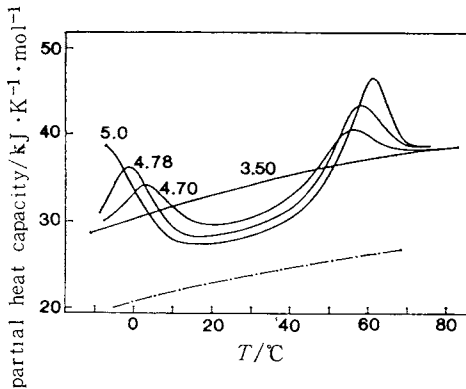


Fig. 7 Partial heat capacity curves of apomyoglobin at various pH.³⁰⁾

Dotted line denote the partial heat capacity of metmyoglobin at pH 3.5.

観測されている³⁰⁾。この場合も高温変性は二状態間の転移で記述され、メトミオグロビンに比較して $\Delta_{ND}H(T)$ および $\Delta_{ND}C_p$ が小さい事が見出されている。メトミオグロビンの天然状態の部分分子熱容量はFig. 7の一点破線であって、アポミオグロビンよりも小さい。30°Cで両蛋白質とも最も安定であるが、この温度でのアポミオグロビンとメトミオグロビンの $\Delta_{ND}H$ の値は各々12および49 kJ · mol⁻¹でありこの差37 kJ · mol⁻¹がメトミオグロビンの天然状態の安定化に対するヘムの寄与と見なされ、アポミオグロビンでは天然状態の疎水性核がメトミオグロビンより小さく、疎水性側鎖がより多く表面に露出していると考えられている³⁰⁾。

$\Delta_{ND}H(T)$ が(1)式で表わされ、その温度係数 $\Delta_{ND}C_p$ が各々の蛋白質に固有の値である事が多数の実験データから帰納された事から、 $\Delta_{ND}C_p$ と蛋白質構造の関係についての研究が行れるようになった。 $\Delta_{ND}C_p$ と蛋白質の立体構造との関係を最初に示したのはPrivalov³⁾である。

彼はX線解析において立体構造が明らかにされた蛋白質について無極性側鎖の対の数を計算し³¹⁾(Table 2の N_{np})、これと $\Delta_{ND}C_p$ との間に直線関係がある事を見出した(Fig. 4 参照)。Table 2の数値は、平均アミノ酸残基量を115としたアミノ酸残基モルあたりの量である。8種の蛋白質のアミノ酸残基あたりの水素総合数 N_H は 0.73 ± 0.06 であるのに対し無極性基のアミノ酸残基あたりの接触数、 N_{np} は 1.00 ± 0.47 と差が大きい。更に、Table 2の数値から、8種の蛋白質について、 $\Delta_{ND}C_p$ と N_{np} の間の相関係数が0.96であるのに対し $\Delta_{ND}C_p$ と N_H のそれは0.39と低い。これらからPrivalovは N_H の $\Delta_{ND}C_p$ に対する影響は小さいと考えている³⁾、³¹⁾。

城所と和田³²⁾は $\Delta_{ND}C_p$ がTable 2に見られるようにかなり大きな正の値を取る原因を明らかにするために、種々のアミノ酸の水への溶解度から、溶解に伴うアミノ酸側鎖(λ)の標準ギブス自由エネルギー($\Delta G_i^s(T)$)を求めた。また、炭化水素(液体)の水への溶解に伴う熱力学関数のデータに基づき、溶解のエンタルピー変化、 $\Delta H_i^s(T)$ が温度の一次関数で近似できるとし(その温度係数を ΔC_i^s とする)、更に溶解エントロピー、 $\Delta S_i^s(T)$ とこの熱容量の比、 $\Delta S_i^s(T)/\Delta C_i^s$ 、か物質によらないというモデルによって、各アミノ酸の溶解度の温度依存性のデータから ΔC_i^s を算出した。一方、球状蛋白質の立体構造のX線解析のデータから、蛋白質の構成原子の溶媒への露出表面積の変性の際の変化量、 β 、を算出した。変性に伴って水に露出したアミノ酸側鎖による熱容量変化、 ΔC_p^{hyd} は、 β と ΔC_i^s の積を次式のように蛋白質構成アミノ酸残基について合計して求める。

$$\Delta C_p^{hyd} = \sum_i \beta \Delta C_i^s \quad (3)$$

このようにして算出した25°Cにおける8種の蛋白質についての ΔC_p^{hyd} は $\Delta_{ND}C_p$ と非常に良く一致した。すなわち、熱測定によって得られた $\Delta_{ND}C_p$ は、極性基および無極性基を含めたすべてのアミノ酸側鎖の水和によって良く説明される。

また、大井と大畠³³⁾は、水溶液中の蛋白質の安定性を記述する熱力学的性質を二つの要素に分けた。天然状態から変性状態への転移の熱力学量は次式で表わされる。

$$\Delta_{ND}G(T) = \Delta_{ND}G^e(T) + \Delta_{ND}G^{hyd}(T) \quad (4)$$

$$\Delta_{ND}H(T) = \Delta_{ND}H^e(T) + \Delta_{ND}H^{hyd}(T) \quad (5)$$

$$\Delta_{ND}S(T) = \Delta_{ND}S^e(T) + \Delta_{ND}S^{hyd}(T) \quad (6)$$

ここで肩つきCで示される項は天然構造における分子内相互作用とペプチド鎖の秩序性による項であり、肩つきhydで示される項は蛋白質分子のまわりの水化した水分子による項である。また、 $\Delta_{ND}H^e(T)$ および $\Delta_{ND}S^e(T)$ の符号は正で、 $\Delta_{ND}H^{hyd}(T)$ および $\Delta_{ND}S^{hyd}(T)$ の符号は負である。水和に基づく熱力学量を計算するために、

Table 2 Thermodynamic parameters for proteins with medium molecular weight³¹⁾.

Proteins	M. W.	N_H	N_{np}	$\Delta_{ND}C_p$	$\Delta_{ND}H$ (at 110°C)	$\Delta_{ND}S$
Ribonuclease A	13600	0.69	0.76	43.5	6.06	17.8
Paralbumin	11500	0.71	0.71	46.0	6.12	16.8
Lysozyme, egg	14300	0.71	0.86	48.1	6.24	17.6
Fragment K4 Plasminogen	97000	—	—	51.7	6.32	18.0
β -Trypsin	23800	0.79	0.91	57.7	6.23	17.9
α -Chymotrypsin	25200	0.79	1.08	57.7	6.17	18.0
Papain	23400	0.68	1.00	60.1	6.01	17.0
Staphylococcus nuclease	16800	—	—	61.3	6.05	17.5
Karboanhydrase	29000	—	—	63.3	6.17	17.6
Cytochrome C	12400	0.64	1.26	67.3	6.37	17.8
Pepsinogen	40000	—	—	73.3	6.47	18.7
Mioglobin	17900	0.85	1.37	74.5	6.37	17.9
Mean		0.73	1.00		6.21	17.7

N_H : number of hydrogen bonds per aminoacid residue, N_{np} : number of nonpolar pairs per aminoacid residues, $\Delta_{ND}C_p$: $\text{k J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot (\text{aminoacid mol})^{-1}$, $\Delta_{ND}H$: $\text{kJ} \cdot (\text{aminoacid mol})^{-1}$, $\Delta_{ND}S$: $\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot (\text{aminoacid mol})^{-1}$, 115 for molecular weight of mean aminoacid residue.

大井ら³⁴⁾は蛋白質の構成原子を7種の原子団に分けた。これらの原子団の水和の自由エネルギーおよびエンタルピーを低分子化合物の実測値から計算した。一方、結晶構造がわかっている12種の蛋白質について露出表面積(S_A)を計算した。上記原子団と水との相互作用は S_A に比例し、また相互作用の加成性が成立すると仮定して $\Delta_{ND}G^{hyd}(T)$ および $\Delta_{ND}H^{hyd}(T)$ を計算した。 $\Delta_{ND}H(T)$ の環境パラメータ(温度, pH等)依存性は水和項のみに起因すると仮定して計算した $\Delta_{ND}C_p$ は実験値と良く一致している。このように $\Delta_{ND}C_p$ は天然状態で蛋白質内部に埋れていたアミノ酸残基が露出する際の水和の変化によって定量的に説明される。

この考え方は低温変性にも適用されている。Fig. 6から明らかなように、 T_d における熱転移では $\Delta_{ND}H(T_d) > 0$, $\Delta_{ND}S(T_d) > 0$ であるが、 T_d' における転移即ち低温変性では $\Delta_{ND}H(T_d') < 0$, $\Delta_{ND}S(T_d') < 0$ である。Privalov³¹⁾は温度の低下と共に水におよぼす無極性基の秩序化作用が強められる、つまり充分低温では(4)~(6)式の第2項の寄与が第1項を陵駕するためであると考えている。また、大井と大畠は³³⁾ pH 3.83のミオグロビンの実測値($T_d = 57.5^\circ\text{C}$, $\Delta_{ND}H(T_d) = 222 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta_{ND}C_p = 10.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)に対して上述の計算法を適用して低温変性がおこる温度を16°Cと計算した。この値は実際の低温変性温度よりも約10°C高温側にずれてはいるが、低分子化合物の水和に基づいたモデルが蛋白質の転移に適

用できる事を示している。

高温側の特性を見ると、Fig. 3からわかるように二状態転移を示す多くのコンパクトな球状蛋白質の $\Delta_{ND}H(T)$ は同一の値(約 $54 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$)に収斂する。この結果を説明するためにPrivalovはGillら^{35), 36)}の求めた15~35°Cにおける無極性化合物の水に対する溶解のエンタルピーの値を利用している。Gillらは無極性化合物の溶解エンタルピーが温度と共に直線的に増加し、また、溶解に伴う熱容量の増分($\Delta_{np}C_p$)が溶質分子と直接に接している水分子の数に比例する事を見出した。 $\Delta_{np}C_p$ の値が高温でも変わらないと仮定すると、測定されているすべての無極性分子の水への溶解のエントロピーは112°C付近で0になる³¹⁾。例として、ベンゼン、エチルベンゼンおよびヘキサンの水への溶解エンタルピー($\Delta_{ND}H(T)$)、エントロピー($\Delta_{np}S(T)$)および自由エネルギー変化($\Delta_{np}G(T)$)を各々温度に対して図示したものがFig. 8a, b, cである³¹⁾。篠田らが1968年³⁷⁾と77年³⁸⁾にベンゼンとエチルベンゼンの溶解エンタルピーの値を160°Cに外挿して求めた値をFig. 8aに×印で示してある。これらの値は熱測定によって得られた $\Delta_{np}H(T)$ を直線的に外挿した値と一致する。また、篠田によれば無極性化合物の溶解エンタルピーは約160°Cで温度依存性を示さなくなり、ほぼ一定値になる。この考えに従って点線のように外挿すれば、熱測定値と溶解度法による値の一致は更に良くなる(Fig. 8a 参照)。種々の無極性化合物の $\Delta_{np}S(T)$

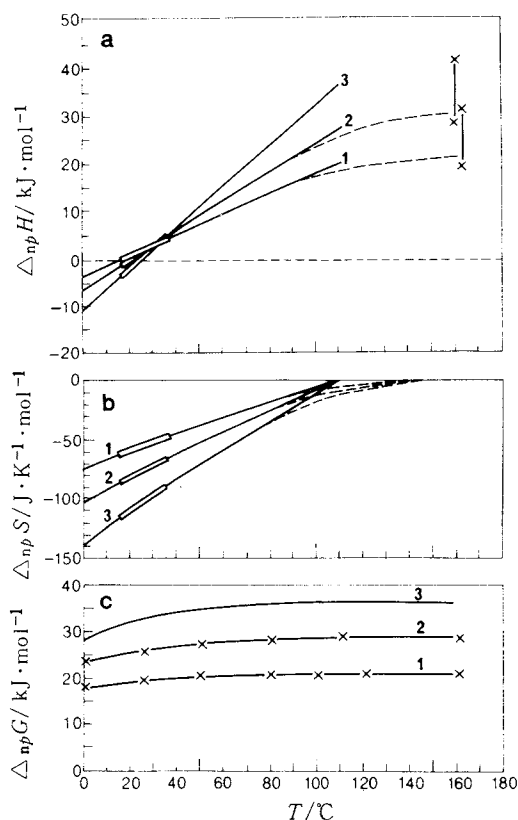


Fig. 8 Temperature dependence of enthalpy ($\Delta_{np}H$), entropy ($\Delta_{np}S$) and Gibbs free energy ($\Delta_{np}G$) of benzene (1), ethylbenzene (2) and hexane (3).³¹⁾ Open bars denote calorimetric experimental data, thin lines are the linear extrapolated values to 110°C. Dotted lines show the extrapolated lines to the values obtained by the measurement of solubility of the same compounds in water.

が収斂する温度はFig. 8bからわかるように約110°Cであり、この温度は $\Delta_{ND}H(T)$ の収斂する温度と一致する。このことから、110°Cでは天然構造が壊れる時に水に露出する無極性基のまわりの水分子の秩序化によるエンタルピーの寄与がなくなると考えることができる³¹⁾。

Baldwin³⁹⁾はこの110°Cにおけるエンタルピーに寄与するのは側鎖間のvan der Waals力であると考えており、一方、PrivalovとKhechbushvili⁴⁰⁾は主として水素結合であるとし、又Privalov⁴⁾は構造安定性に対するvan der Waals作用の寄与は水素結合と同じオーダーであるとの考えも示している。

蛋白質の $\Delta_{ND}C_p$ の値は熱測定によって始めて得られた

ものであり、この熱測定結果が、 $\Delta_{ND}C_p$ と蛋白質の立体構造を関連づける上述の研究を進展させたのである。しかし110°Cでの議論の基となる数値に関しては狭い温度範囲のデータの外挿値が用いられているので、より確かな値を得るために広い温度範囲にわたって $\Delta_{ND}C_p$ および $\Delta_{np}C_p$ を実測する必要がある。

4. ドメインあるいはサブユニット構造を持つ蛋白質

これまででは、天然状態も熱変性状態も単分子状態であって、この二つの状態の間で転移を示す蛋白質について主として述べてきた。しかしこのような簡単なモデルでは記述できない蛋白質が今までに多数見出されている⁴⁾。このような系に対しては、熱容量曲線を解析することによって会合体や中間状態の有無を知ることかでき、又それらの状態の熱力学関数と分率を温度の関数として得ることができる。以下に、複雑な蛋白質の熱容量曲線の解析法とその結果を簡単に述べる。

熱容量曲線の最大値の温度又は熱転移の中心(T_d)における過剰熱容量の値から計算したvan't Hoff エンタルピー($\Delta_{ND}H^{VH}$)と熱測定によって実測された $\Delta_{ND}H$ の比較に基づいた解析法をSturtevant²¹⁾および高橋と深田^{6), 15), 17)}が提案している。この方法によって、例えば、Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI)⁴¹⁾およびStaphylococcal nuclease⁴²⁾が天然状態で2量体、または一部2量体である事が明らかにされた。この方法は脂質の熱転移⁴³⁾にも適用されている。これらの解析法については高橋と深田による一連の総説^{6), 15), 17), 19)}を参照していただきたい。

統計熱力学に基づいて熱測定データから分配関数を計算して解析する方法はFreireとBiltonen^{44), 45)}によって提案された。Filimonov⁴⁶⁾、Privalov⁴⁷⁾はこの方法を改良した。前節で述べたように熱転移に伴って熱容量が増加する事($\Delta_{ND}C_p > 0$)が蛋白質の特徴の一つである。Privalovら^{46), 47)}は解析に際して $\Delta_{ND}C_p$ の効果を取り除いてから計算を行っている。城所と和田⁴⁸⁾は $\Delta_{ND}C_p$ の値も考慮して解析法を拡張し、更に城所、上平、和田⁴⁹⁾は中間状態を含む自己会合系に適用できる解析法を提案した。これらの解析法については、上平、和田¹¹⁾、城所¹²⁾、城所、和田¹³⁾の総説に述べられている。

腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒素(分子量18650)のpH 7.0における熱容量曲線のピーク温度は、濃度が0.21から0.57mg·ml⁻¹に増加すると約0.5°C上昇した⁵⁰⁾。この系について城所らの解析法を用いて、天然状態は2量体、中間状態(I状態)と熱変性状態は単量体というモデルを得た。 $\Delta_{ND}C_p$ と $\Delta_{NI}C_p$ は温度に依存しないと

いう条件で最小二乗法^{12), 49)}によって求めたこれらの状態間のエンタルピー変化, エントロピー変化は 320 K において各々 $\Delta_{\text{NI}}H = 231 \pm 25$, $\Delta_{\text{ND}}H = 938 \pm 10$ kJ $\cdot$ mol⁻¹, $\Delta_{\text{NI}}S = 704 \pm 78$, $\Delta_{\text{ND}}S = 2870 \pm 32$ J $\cdot$ K⁻¹, mol⁻¹ また, $\Delta_{\text{ND}}C_p = 8.4 \pm 1.2$ kJ $\cdot$ K⁻¹, mol⁻¹ であった⁴⁹⁾。100°C に外挿した $\Delta_{\text{ND}}H(T)$ の値は 39.4 J $\cdot$ g⁻¹ であり, Fig. 3 と比較すると, 通常のコンパクトな蛋白質³⁾ の約 2/3 である。この毒素がコンパクトでない原因の一つは 2 量体を形成しているためと考えられる。

ペプシノーゲンの熱転移を種々の pH で測定し, この方法⁴⁸⁾で解析した結果, 中間状態が二つ存在することが明らかになっている¹²⁾。これまで測定された球状蛋白質では pH などの条件を変えて求めた $\Delta_{\text{ND}}H(T)$ を T_d に対して図示すると, Fig. 3 のように 1 本の直線で表わすことができた。しかしペプシノーゲンの場合は熱転移過程で存在する 4 つの状態の間のエンタルピー変化は pH に依存する⁵¹⁾。

中間状態と天然状態の間のエンタルピー変化の温度依存性から, 天然状態で内部にあった側鎖が中間状態でどの程度溶媒に露出するか, つまり中間状態のペプチド鎖のゆるみ加減がわかる。Novokhatny, Kudinov および Privalov⁵²⁾ はヒトプラスミノノーゲンの熱転移を測定し, Privalov と Filimonov の方法^{46), 47)}で解析を行っている。分子量 83 KD の Lys-プラスミノノーゲンの分子構造を Fig. 9 に模式的に示すが, この蛋白質は pH 3.4 で 280 ~ 360 K にわたる複雑な熱変性曲線を示す。解析の結果, 全部で 7 つの転移が存在し, このうち低温側から 4 つの転移が N 端側のドメイン (Fig. 9 の 1 ~ 4) に対応する。図の 3 と 4 の間で切ったフラグメントを K1-3, 1 と 2

の間に切ったフラグメントおよび 4 の両側で切ったフラグメントを各々 K1 および K4 とする。解析結果から, K1-3 の熱変性は 3 つの転移から成ることが明らかになり, この 3 つの転移と K1, K4 の転移のエンタルピー変化の温度依存性は Fig. 9 のようになる。比較のために, リボヌクレアーゼ A の $\Delta_{\text{ND}}H(T)$ を直線 a で示した。K1-3 フラグメントの最も低温側の転移 (○印) のエンタルピー変化の Fig. 9 の直線上に K1 フラグメントの実測値 (●印) がのっている, この転移は K1 フラグメント部分に対応すると推論されている⁵²⁾。この○印を除き, Fig. 9 の各直線の傾斜はリボヌクレアーゼとほぼ等しい。これらの結果は, K1-3 の各転移は 1 ~ 3 のドメインが互いにほぼ独立に 2 状態間転移をしている事, また, 2 ~ 4 のフラグメント (またはドメイン) の天然状態がコンパクトな構造を持っている事を示している⁵²⁾。

更に Privalov⁵³⁾ は, オボムコイドなどのいくつかの蛋白質について熱力学的に得たドメインの境界のペプチド鎖上の位置がそのポリペプチド鎖をコードしている DNA のイントロンの位置に対応すること (1 つのドメイン内に存在するイントロンもある) を明らかにしており, 複雑な蛋白質が進化の過程で作り出される機構についても考察している。

5. 非特異的相互作用の影響

5.1 中性塩の影響

蛋白質の立体構造保持に關与する相互作用のうち, 荷電基間のクーロン力による相互作用は, 塩の添加によって影響を受ける。たとえば種々の NaCl 濃度における Soybean および *Vicia faba* 由来の 11 S グロブリンの pH 7.6 での熱容量曲線は Fig. 10 のようになる⁵⁴⁾。この 2 種の蛋白質は同じようなアミノ酸組成とサブユニット構造を持つオリゴマー蛋白質であり, 測定した条件では夫々平均分子量 26.0 および 27.3 KD の 12 ケのプロトマーからなる。Fig. 10 から明らかのように, $\Delta_{\text{ND}}C_p$ は塩濃度に依存しない。 T_d と $\Delta_{\text{ND}}H(T_d)$ は加えた塩濃度の増加と共に始めは非線性に増加し, 塩濃度が高くなるとほぼ直線的に増加する (Fig. 11 参照)。緩衝溶液に濃度 C_s の塩を加えた場合を加えない場合の 11 S グロブリンのプロトマーの転移の自由エネルギーの差を過剰自由エネルギー ($\Delta_{\text{ND}}G^e$) と定義する。 $\Delta_{\text{ND}}G^e$ は 11 S グロブリンの安定性に対する塩の影響の尺度である。Fig. 11 の $\Delta_{\text{ND}}H(T_d)$ を T_d に対して図示すると直線となるので, この関係と (2) 式を用いて $\Delta_{\text{ND}}G^e$ を算出する。 $\Delta_{\text{ND}}G^e$ は静電的寄与 ($\Delta_{\text{ND}}G_{\text{el}}^e$) とリオトロピック効果 ($\Delta_{\text{ND}}G_s^e$) の寄与の和である。静電的寄与は Debye-Hückel の近似式によって計算できる。天然状態の静電, 自由エネルギーに比較して変

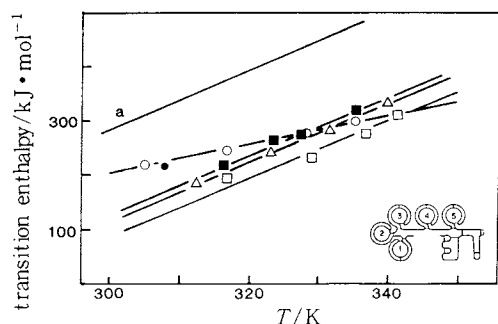


Fig. 9 Temperature dependence of transition enthalpies of fragment K4 (—■—), K1 (—●—), the first (—○—), second (—△—), and third (—□—) transition of fragment K1-3 and of ribonuclease A (line a)^{3), 52)}

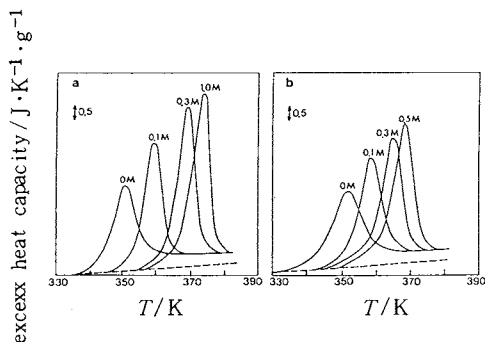


Fig. 10 Excess heat capacity curves of 11S globulin from *Vicia faba* (a) and *Glycine max* (b) at various concentrations of NaCl.⁵⁴⁾ Temperature dependence of heat capacity for native states are shown by dotted lines.

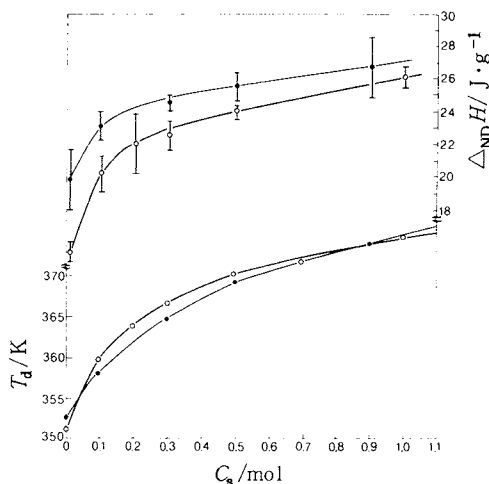


Fig. 11 Dependence of $\Delta_{ND}H$ and T_d on the concentration of NaCl.⁵⁴⁾ —●—, 11S globulin from *Glycine max*; —○—, from *Vicia faba*. Bars in the figure correspond to the error.

性状態の静電自由エネルギーが無視できると仮定すると、次式が成立する。

$$\frac{\Delta_{ND}G_{el}^0}{RT} = B_{el} \{Y_N(\chi) - Y_N(\chi_0)\} \quad (7)$$

ここで B_{el} は電気的相互作用のパラメータ、 χ_0 、 χ および $Y_N(\chi_0)$ 、 $Y_N(\chi)$ はそれぞれ緩衝溶液中および塩添加溶液中の Debye-Hückel パラメータおよび天然状態の蛋白質の静電的相互作用の遮蔽関数である。遮蔽関数は

χ 、集合数および分子半径から計算する。またリオトロピック効果の寄与は次式によって計算する。

$$\Delta_{ND}G_s^0/RT = \Delta_{ND}B_s C_s \quad (8)$$

ここで $\Delta_{ND}B_s$ は天然状態および変性状態の第二ビリアル係数の差である。NaCl、KCl および $(NH_4)_2SO_4$ 添加塩系での結果を Table 3 に示す。表の B_{el} の値は天然の 11S グロブリンのプロトマーあたりの実効電荷として 4 ~ 6 価に対応する。また B_{el} つまり蛋白質の電荷は NaCl よりも $(NH_4)_2SO_4$ の存在下で大きい。 $\Delta_{ND}B_s$ の値は、 $(NH_4)_2SO_4 \gg NaCl = KCl$ であり、この傾向は一般的なりオトロピック効果の順序と一致している⁵⁴⁾。

単量体の蛋白質については Matthew および Gurd⁵⁵⁾ の研究がある。彼らによれば全ての荷電サイトについて静電、自由エネルギー項の和を取り、その変化量から、蛋白質の安定性に対する静電的寄与 (ΔG_{el}) が計算できる。荷電した基が溶媒に最大限接しており、互いに静電的相互作用を持たない状態すなわち完全変性状態を基準状態とする。与えられた pH における i および j サイトの実効電荷を Z_i 、 Z_j とし、荷電している全ての基数を n とすると静電自由エネルギーは次式で与えられる⁵⁵⁾。

$$\Delta G_{el} = \sum_{i,j} \sum_{\lambda \epsilon j} W_{ij} (1 - \overline{SA_{ij}}) Z_i Z_j \quad (9)$$

ここで $\overline{SA_{ij}}$ は平均露出表面積である。

イオン強度 0.01 および 0.15 におけるリボヌクレアーゼ S の天然状態の安定性に対する静電的相互作用の寄与についての Matthew らの計算値を Fig. 12 に示す。酸性領域を除き、自由エネルギーの値は負であり、静電的寄与が本質的に安定化作用である事がわかる。図に見られるように、pH 5 ~ 7 で最大値 $23.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ となる。I = 0.15 の場合の計算値 (曲線 2) と実測値 (点線) は pH 4 ~ 7 で良く一致している。酸側での不一致は、計算の際は Cl^- イオンの結合を考慮しなかったためである。リボヌクレアーゼには Cl^- イオンの結合サイトが 5 ケあり、各 pH での Cl^- イオンの結合数 (最大 3) を考慮に入れると計算値は曲線 3 となる。測定値との差は曲線 2 の場合の 30% にまで減少する。pH 6.5 ではイオン強度を 0.01 から 0.5 に上げると、 T_d は 62℃ から 63℃ に上昇する。これは Cl^- の特異的結合による安定化作用が、高いイオン強度でのクーロン力の遮断効果による T_d を下げる作用を陵駕したためである⁵⁵⁾。比較のために、Fig. 12 にリボヌクレアーゼ A の 25℃ の $\Delta_{ND}G$ を示す (曲線 4)。

Matthew と Gurd⁵⁵⁾ は更にヘモグロビンに対するイオン強度の影響から、蛋白質の集合に対する静電的安定化作用を議論している。各々の蛋白質では個々の荷電サイトによるオーバーラップした long-range のクーロン場

Table 3 Experimental values of B_{el} and $\Delta_{ND}B_s$ and calculated values of $\Delta_{ND}B_s$ for 11S globulin⁵⁴⁾.

Added salts	T/K	$B_{el} \times 10^6 / \text{cm}$	$\Delta_{ND}B_s / (\text{l} \cdot \text{mol}^{-1})$	
			Experimental	Calcd.
NaCl	293	2.9	9.0	
	352	1.2	8.2	8.3
KCl	352	1.2	8.2	8.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	352	2.3	10.6	11.0

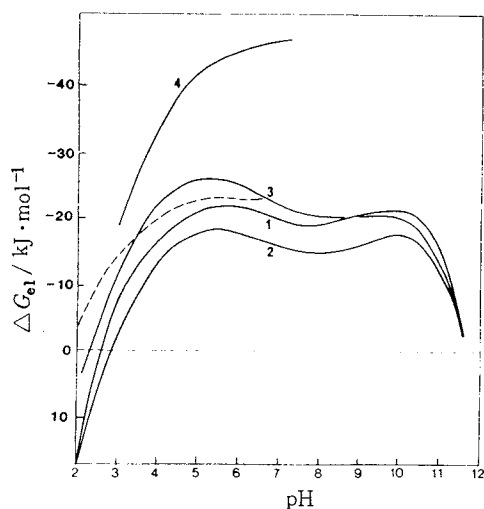


Fig. 12 Total electrostatic free energy of interaction between charged sites, ΔG_{e1} , for ribonuclease S⁵⁵⁾. Curve 1 corresponds to ionic strength 0.01 in the absence of specific ion uptake. Curves 2 and 3 are calculated at 0.15 ionic strength in the absence and presence of specific anion uptake, respectively. Curve 4 represents an experimental values of $\Delta_{ND}G$ of ribonuclease A at 25°C³⁾ calculated from the calorimetry data. The dashed line represents an experimental determination of the electrostatic component of protein stability for ribonuclease A ($I = 0.16$, 25°C)⁵⁶⁾.

によって、全体として安定化したり不安定化したりする。固々の荷電サイトの寄与と全体の安定化作用は、pH、イオン強度、荷電成分の結合、溶媒への露出の変化等に応じてこの電場の組が変動することによって影響を受ける。

5.2 非電解質の影響

pH 2.0 においてメタノール、エタノールおよびプロパ

ノールの存在下でのリゾチームの熱転移が Velecelevi と Sturtevant⁵⁷⁾ によって測定されている。アルコール濃度 (C_s) と共に転移温度は非直線的に減少し、エンタルピーは始めは増加し最大値を経て減少に転じる。最大値を与える濃度は鎖長の長いアルコール程低い。 $\Delta_{ND}G(T)$ の C_s による変化も C_s と共に一旦増加した後、減少する。この傾向は温度が低い程顕著である。アルコール添加系の特徴は $\Delta_{ND}C_p$ が C_s と共にほぼ直線的に減少する点にある。その傾斜 $d\Delta_{ND}C_p/dC_s$ は、メタノール、エタノール、プロパノールの場合に各々、 -0.060 , -0.11 , $-0.13 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} (\text{mol protein})^{-1} \cdot (\text{mol alcohol})^{-1}$ と鎖長の長い程負になる。pH 変化や尿素添加の場合には転移温度が下れば $\Delta_{ND}H$ も減少し $\Delta_{ND}H(T)$ は Fig. 3 のように蛋白質毎に 1 本の直線になるがアルコール添加の場合の $\Delta_{ND}H$ はこれとは異なり、メタノールでは 45°C、エタノールでは 44°C、プロパノールでは 37°C で最大値をとる。リゾチームの変性の $\Delta_{ND}C$ の値がアルコール濃度と共に減少するのは、アルコール溶液中では蛋白質の疎水性側鎖の露出による水構造の秩序化の程度が水溶液中より少ないためと考えられる⁵⁷⁾。この $\Delta_{ND}C_p$ の変化が他の蛋白質にも共通である事を明らかにする必要がある。

Danilenko ら⁵⁸⁾ は、pH 7.6 で 11S グロブリンに対するエタノールの影響を測定した。この系では T_d および $\Delta_{ND}H(T_d)$ はエタノール濃度と共に直線的に減少する。また $\Delta_{ND}C_p$ はエタノール濃度 1.5 ~ 2 M の範囲で最大値を取り、温度と共に直線的に増加する。エタノール 1.53 M での測定値から計算した $\Delta_{ND}H(T)$ は 0 ~ 100°C の間で常に正で、約 50°C で共に極小値をとる。一方 $\Delta_{ND}G(T)$ は 0°C で +70, 100°C で -70 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ の値を取り、温度と共に減少し、50°C に変曲点がある。また、0°C に外挿した値のエタノール濃度依存性をみると、エタノール 1.53 M で、 $\Delta_{ND}H$ と $\Delta_{ND}S$ は極大値を $\Delta_{ND}C_p$ は極小値をとる。これから、Danilenko ら⁵⁸⁾ は低温では低濃度のエタノールは 11S グロブリンを安定化するが、高濃度では不安定化すると結論し、その原因として、アルコールは水のクラスレート構造を壊し、変性状態での疎水性水和

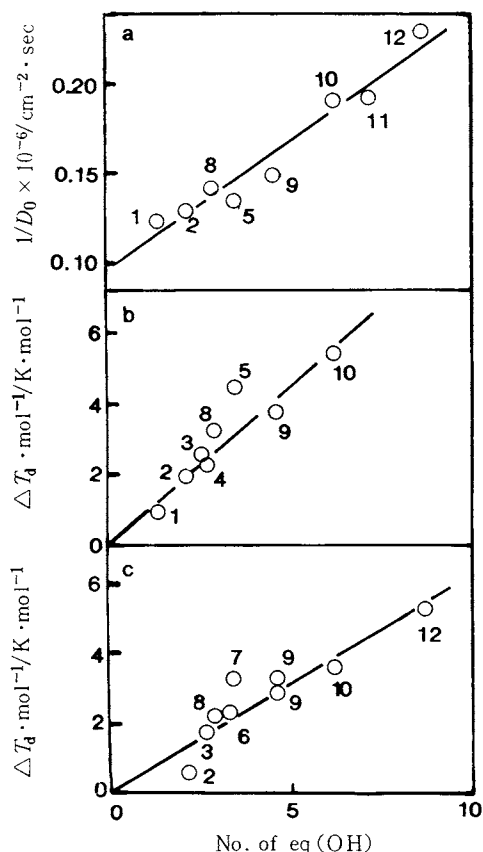


Fig. 13 The relation between the mean number of e-OH groups in a sugar molecule and the value of $1/D_0$ (a), the increase in the denaturation temperature (ΔT_d) of lysozyme (b) and of ovalbumin (c).^{70),71)} 1, deoxyribose; 2, ribose; 3, arabinose; 4, lyxose; 5, xylose; 6, mannose; 7, galactose; 8, fructose; 9, glucose; 10, sucrose; 11, maltose; 12, raffinose

を弱める一方で、変性した蛋白質に結合して変性状態を安定化すると考えている。

多価アルコールや糖類が蛋白質の立体構造を安定に保持する作用がある事は古くから知られている⁶³⁾。熱および変性剤の添加等に対して蛋白質を安定化する作用^{59)~65)}、低温、凍結による蛋白質変性の保護作用⁶⁶⁾等について総説が書かれている。月向らは^{61),62),65)}糖や多価アルコールによる変性防止作用を、これらの物質による蛋白質の選択的水和効果によって説明している。

上平らは^{59),63)}、やや異った観点から糖の作用を議論している。 β -D-グルコースのコンホメーションは、水の三次元網目構造によく適合する。一般に、糖分子中

の equatorial 水酸基 (e-OH基) の数が多いほど水構造を安定化する作用が大きいことが見出されている^{67),68)}。また、糖の水和に係る種々の性質は、e-OH基の数と極めて良い相関がある^{69)~71)}。蛋白質の立体構造の安定性はまわりの水構造の変化によって大きな影響を受ける^{32)~34),59),63)}。糖による蛋白質の立体構造の安定化は、水構造の変化によると考えられ^{59),63)}、実際に蛋白質の熱変性温度の変化は e-OH基の数と、良い相関性がある。Fig. 13 はその 1 例である^{70),71)}。Fig. 13a は種々の糖の水溶液中の無限希釈度における拡散係数の逆数 (併進の摩擦係数に比例する量) を、また b と c はリゾチームおよびオвалブミンの熱変性温度の 1 モル濃度の糖による上昇分を糖分子の e-OH基の数に対してプロットしたものである。三者とも e-OH基の数と共に直線的に増加している。

6. おわりに

前節までに、小さな蛋白質の熱転移、天然状態と熱変性状態の蛋白質の熱容量差と蛋白質の立体構造安定性の物理的考察、複雑な蛋白質の熱測定の解析法とその結果、非特異的相互作用の影響について述べた。蛋白質の熱転移挙動に対する特異的相互作用の影響、すなわち、固有の結合サイトに強く結合するリガンドの影響の研究も、熱測定が有力な手段となる分野である。これらについては、Hinze^{72),73)}、Gill と Richery⁷⁴⁾、Schellman⁷⁵⁾、深田⁷⁶⁾による秀れた総説があるので参照していただきたい。

また、生体高分子に限らず、液体ヘリウム温度附近での分子の振動スペクトルを知る唯一の方法は熱容量測定である。生体高分子の極低温挙動についての研究は、Mrevlishvili によってまとめられている^{77),28)}。0~10 K 附近の極低温でのポリペプチド等の熱容量は温度の 3 乗に比例すること^{77),78)}、水和していない天然コラーゲンの熱容量は 10~50 K では温度の 2 乗に比例し、又、50~150 K では温度の一次関数である事が見出されている^{79),80)}。更に、水和した変性コラーゲンと天然コラーゲンの熱容量の差から立体構造の秩序化に基づく熱容量についての情報が得られるが、この差は温度と共に複雑に変化し、0~240 K では正であるが、240 K 以上では負となる⁷⁹⁾。脱水状態での変性コラーゲンと天然コラーゲンの熱容量差は、水和状態とは全く異っている⁷⁹⁾。0℃前後の熱容量に関しては、たとえば、-30~110℃で、種々の量の水和水を含むリボスクレアーゼの熱容量の測定から、相図が求められている⁸¹⁾。

今後、測定対象の広がり、測定条件の多様化によって、

蛋白質分子の立体構造を保つエネルギーの本質が一層明らかにされ、機能との関連が解明されていくと期待している。

最後に、本総説の討論について北海道大学上平恒教授に感謝いたします。

文 献

- 1) P.L. Privalov, *FEBS Lett.* **40S**, S140 (1973).
- 2) P.L. Privalov, *Pure & Appl. Chem.* **52**, 479 (1980).
- 3) P.L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979).
- 4) P.L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **35**, 1 (1982).
- 5) P.L. Privalov, *Biofizika* **30**, 722 (1985).
- 6) 高橋克忠, 熱測定 **1**, 61 (1974).
- 7) 滝沢俊治, 熱・温度測定と熱分析 **1975**, 41 (1975).
- 8) 滝沢俊治, 熱・温度測定と熱分析 **1978**, 45 (1978).
- 9) 森本 敏, 熱測定の進歩 **1**, 69 (1983).
- 10) 深田はるみ, 熱測定の進歩 **2**, 67 (1984).
- 11) 上田初穂, 城所俊一, 和田昭允, 生物物理 **27**, 601 (1978).
- 12) 城所俊一, 熱測定 **14**, 143 (1987).
- 13) 城所俊一, 和田昭允, 蛋白質核酸酵素 **33**, 348 (1988).
- 14) 馬場義博, 影本彰弘, 熱測定 **3**, 28 (1976).
- 15) 深田はるみ, 高橋克忠, 熱測定 **4**, 117 (1977).
- 16) 高橋克忠, 深田はるみ, 熱測定 **4**, 165 (1977).
- 17) 高橋克忠, 深田はるみ, 熱測定 **14**, 20 (1987).
- 18) 上平初穂, 現代化学 **203**, 38 (1988).
- 19) 高橋克忠, 蛋白質核酸酵素 **33**, 337 (1988).
- 20) W. Pfeil in *Thermodynamic data for Biochemistry and Biotechnology*, ed. H.-J. Hinz, Springer-Verlag (1986).
- 21) J.M. Sturtevant, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463 (1987).
- 22) N.N. Khechinashvili, V.I. Tsetlin, *Mol. Biol.* **18**, 786 (1984).
- 23) M.R. Kimvall, A. Sato, J.S. Bischoff, L. Sosen, B.W. Low, *Biochem., Biophys. Res. Commun.* **88**, 950 (1979).
- 24) J. Deisenhefer, W. Steigeman, *Acta Crystallogr.* **B31**, 238 (1975).
- 25) D.C. Hodgkin, *Proc. Roy. Soc. A* **338**, 251 (1974).
- 26) S. Ohashi, M. Shiraki, M. Okada and E. Muneoka, *Peptide Chem.* **1982**, 143 (1983).
- 27) 上平初穂, 城所俊一, 大箸信一, 国分友邦, 第23回熱測定討論会 (1987) 講演要旨, p. 20.
- 28) A. Bierzynski, P.S. Kim, R.L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2470 (1982).
- 29) P.L. Privalov, Yu. V. Griko and S. Yu. Venyaminov, *J. Mol. Biol.* **190**, 487 (1986).
- 30) Yu. V. Griko, P.L. Privalov, S. Yu. Venyaminov, V.P. Kutysenko, *Biofizika* **33**, 18 (1988).
- 31) P.L. Privalov, *Biofizika* **32**, 742 (1987).
- 32) 城所俊一, 和田昭允, 生物物理第25回年会 (1987) 講演要旨, p. 232.
- 33) T. Ooi, M. Oobatake, *J. Biochemistry* **103**, 114 (1988).
- 34) T. Ooi, M. Oobatake, G. Nemethy, H.A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3086 (1987).
- 35) S.J. Gill, N.F. Nichols, I. Wadso, *J. Chem. Thermodyn.* **8**, 445 (1976).
- 36) S.F. De, S.J. Gill, *J. Solution Chem.* **14**, 827 (1985).
- 37) K. Sinoda, M. Fujihira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**, 2612 (1968).
- 38) K. Sinoda, *J. Phys. Chem.* **81**, 1300 (1977).
- 39) R.L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8069 (1986).
- 40) P.L. Privalov, N.N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **86**, 665 (1974).
- 41) K. Takahashi, J.M. Sturtevant, *Biochemistry* **21**, 6185 (1981).
- 42) R.O. Calderon, N.J. Stolowich, J.A. Gerlt, J.M. Sturtevant, *Biochemistry* **24**, 6044 (1985).
- 43) C.H. Spink, K. Muller, J.M. Sturtevant, *Biochemistry* **21**, 6598 (1982).
- 44) E. Freire and R.L. Biltonen, *Biopolymers* **17**, 463 (1978).
- 45) E. Freire and R.L. Biltonen, *Biopolymers* **17**, 481 (1978).
- 46) V.V. Filimonov, S.A. Potekhin, S.V. Matveev, P.L. Privalov, *Mol. Biol.* **16**, 551 (1982).
- 47) P.L. Privalov and S.A. Potekhin, *Methods Enzymology* **131**, 4 (1987).
- 48) S. Kidokoro, A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987).
- 49) S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, *Biopolymers* **27**, 271 (1988).
- 50) 上平初穂, 本田武司, 武田美文, 三輪谷俊夫, 上平恒, 逢坂昭, 第19回熱測定討論会 (1983) 講演要旨, p. 90.
- 51) S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, 投稿準備中.
- 52) V.V. Novokhatny, S.A. Kudinov, P.L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **179**, 215 (1984).
- 53) P.L. Privalov, *Biofizika* **30**, 722 (1985).
- 54) A.N. Danilenko, J.M. Bikbov, V. Ya. Grinberg, T.V. Burova, V.B. Tolstoguzov, *Mol. Biol.* **20**, 128 (1986).

- 55) J.B. Matthew and F.R.N. Gurd, *Methods Enzymology* **130**, 437 (1986).
- 56) J. Hermans and H.A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3283 (1961).
- 57) G. Velicelevi and J.M. Sturtevant, *Biochemistry* **18**, 1180 (1979).
- 58) A.N. Danilenko, T.M. Bikbov, V. Ya. Grinberg, T.V. Burova, N.I. Raevskii, S. Kh. Dotdaev, Yu. A. Borisov, V.B. Tolstgusov, *Mol. Biol.* **20**, 1604 (1986).
- 59) H. Uedaira, H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**, 2451 (1980).
- 60) K. Gekko, T. Morikawa, *J. Biochem.* **90**, 51 (1981).
- 61) K. Gekko, *J. Biochem.* **91**, 1197 (1982).
- 62) K. Gekko, S. Koga, *J. Biochem.* **94**, 199 (1983).
- 63) 上平初穂, 繊維と工業 **37**, p. 436 (1981).
- 64) 荒川 力, S.N. Timasheff, 生化学 **54**, 1255 (1982).
- 65) 月向邦彦, 蛋白質核酸酵素 **30**, 1115 (1985).
- 66) 花房尚史, 蛋白質核酸酵素 **22**, 301 (1977).
- 67) F. Franks, in "Polysaccharides in Food", ed. J.M.V. Blanshard and J.R. Mitchell, Butterworths Pub., London (1979).
- 68) 上平 恒, 化学総説 No. **11**, 191 (1976).
- 70) H. Uedaira, H. Uedaira, *J. Solution Chem.* **14**, 27 (1985).
- 71) 上平初穂, 上平 恒, 織高研研究報告 **145**, 1 (1985).
- 72) H.-J. Hinz, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 285 (1983).
- 73) H.-J. Hinz, *Methods Enzymol.* **130**, 59 (1986).
- 74) S.J. Gill, B. Richery, G. Bishop, J. Wyman, *Biophys. Chem.* **21**, 1 (1985).
- 75) J.A. Schellmann, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 115 (1987).
- 76) 深田はるみ, 蛋白質核酸酵素 **33**, 328 (1988).
- 77) G. Mrevlishvili, *Usp. Fiz. Nauk* **128**, 273 (1979).
- 78) G.M. Mrevlishvili, "Low Temperature Calorimetry of Biological Polymers", Metznuereba (1984) Tbilisi.
- 79) G.M. Mrevlishvili, *Biopolymers* **15**, 1991 (1976).
- 80) G.M. Mrevlishvili, *Biofizika* **22**, 180 (1977), *ibid.* **26**, 233 (1981).
- 81) G.M. Mrevlishvili, V.I. Lobyshev, G. Sha. Dzapadze, V.M. Soxadze, D.A. Tatishvili, L.V. Orberashvili, Yu. G. Sherimanov, *Biofizika* **25**, 44 (1980).

熱測定関係国際会議ニュース

August 8 – 12, 1988, Bartlesville, Oklahoma, U.S.A.

第43回米国カロリメトリー会議
(詳細は Vol. 15, No. 2, p. 69 参照)

September 9 – 12, 1988, Innsbruck-Schoröcken, Austria

6th ISMAB Conference

International Symposia on Microcalorimetric Applications in Biology
(詳細は Vol. 15, No. 1, p. 56 参照)

September 24 – 30, 1988, Chicago, U.S.A.

7th International Symposium on Thermodynamics of Nuclear Materials (STNM-7)
(詳細は Vol. 15, No. 1, p. 56 参照)

August 25 – 28, 1989, China

IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics
(詳細は Vol. 14, No. 4, p. 142 参照)

March or October, 1989, Lille, France

Journées de Calorimétrie et d'Analyse Thermique
(詳細は Vol. 14, No. 4, p. 142 参照)

August 27 – 31, 1990, Como, Italy

11th International IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics (IUPAC)
(詳細は Vol. 14, No. 4, p. 142 参照)