

小特集

第21回熱測定ワークショップ

— 生体分子、細胞、動物の状態と機能を探る —

1. 熱測定を生き物へ利用する

山村雅一, Nadia El Borai

生き物を個体として観察することと生き物を細かくしていわゆる流行の分子のレベルから分析していくことは根本的に違う。それは生きている個体は時間軸に対して常に変化するのに対して、分子は変化しない。この変化しないことが、科学にとってまことに都合がよく、科学が進歩してきた理由の一つである。しかしそれらは生きている個体を理解することにはならない。現実分子の研究からだけでは説明ができないので、環境因子を入れ説明しようとする。

分子における反応は線形領域での結果であり解釈も線形にならざるを得ない。これは今まで私たちが教育を受けている間、訓練されてきた世界であるから致し方ない。一方生き物の世界は非線形領域に属し、比例関係は成立しない。比例関係が成立しない世界を想像するのはすごく難しい。が生き物を熱測定から観察すると個性が見えしたがって非線形領域での研究ができる。

このワークショップでは動物全身の場合と細胞をつかった場合とに分けて講習を行った。

1.1 方法

全身熱量計 (Fig.1, WBC200) を用い次の要領で測定した。適当な週令マウスをWBC200へ朝10時に入れ測定を開始した。測定は通常翌日の18時まで行った。結果は測定開始日の18時から終了までの24時間とした。24時間を3つに分け、18時から2時までは夜 (N)、2時から10時までは朝 (M)、10時から18時までは昼 (D) とし濃淡で区別し図示してある。一部の結果は8時間毎の積分値を計算しジュール数を算出した (Fig.1)。

微量熱量計 (ESCO3000) は双子型で、細胞懸濁液の移動は流れを利用したFlow型である。懸濁液の流れを止めずに熱測定すると細胞濃度の濃淡のため正確な値を得ることと、また均一な細胞濃度を実験的に作り出すことは不可能であった。したがって測定しようとする細胞すべてが熱測定部位に来たときに流れを止め熱量を測定した。こうすることで測定部位に位置する容積は決まっているので、細胞濃度を調節することで測定すべき細胞数が決まり安定した値を得ることができた。

例1 正常マウスの一生

Fig.2は6匹のマウスを10週令から死ぬまでの間図に示した週令での熱測定結果である。横軸は時間、縦軸は仕事率である。この図から明らかなように、一般的には、夜多

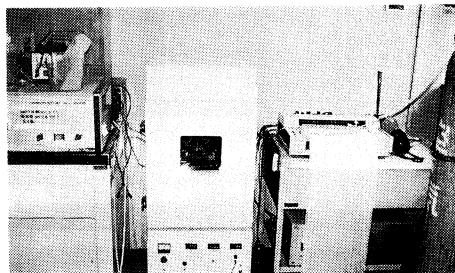
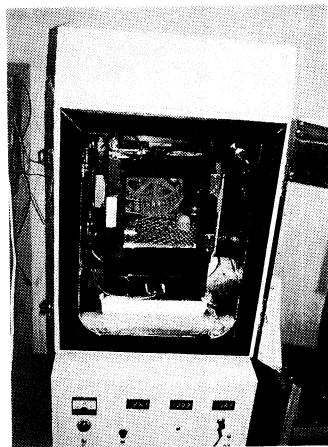


Fig.1 全身熱量計

Masaichi Yamamura and Nadia El Borai : Calorimetry in Living Cells and Animal
東海大学医学部分子生命科学：〒259-11 伊勢原市望星台
Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, boseidai, Isehara, Kanagawa 259-11, Japan

くの熱が測定され昼少ない日内リズムがどのマウスでも観察される。その上興味あることに、個体におけるリズムの特性が観察される。難しい計算をすることなくリズムがチャート上で観察される。上から3番目のマウスは96週まで生き、測定中に死亡したが、幸運にも死亡していく過程を測定できた。日内リズム乱れが70週以上から顕著に観察できている。

例2 室内照明による日中リズムの変化

室内照明が数日以上つけたままになった時に日内リズムを観察した結果はリズムの昼夜での逆転が観察される。照明を元に戻すとリズムも通常の状態となる。この観察はリ

ズムの逆転が始めに観察され、その結果照明がつけたままになっていたことに気がついた (Fig. 3)。

例3 漢方薬の効果判定への利用

マウスは健康な状態で飼育している時、麻黄蕪子細辛湯を生存期間中図中囲まれた期間餌に混ぜて摂食させた結果がFig. 4である。麻黄蕪子細辛湯は身体を暖めたり鎮痛効果をもつ漢方薬であるが、健康な場合には熱に関して特別作用する様子は観察されなかった。このような結果はいままでの思考からするとネガティブな結果として処理されるが、別な見方をすると、麻黄蕪子細辛湯は健康な時摂取し



Fig. 2 マウスの一生と日中リズム

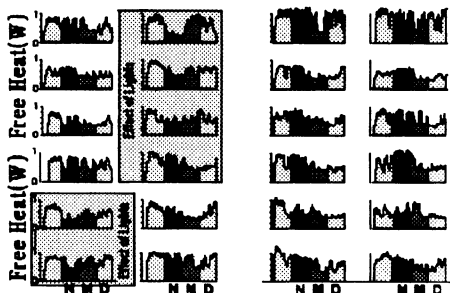


Fig. 3 照明と日中リズム

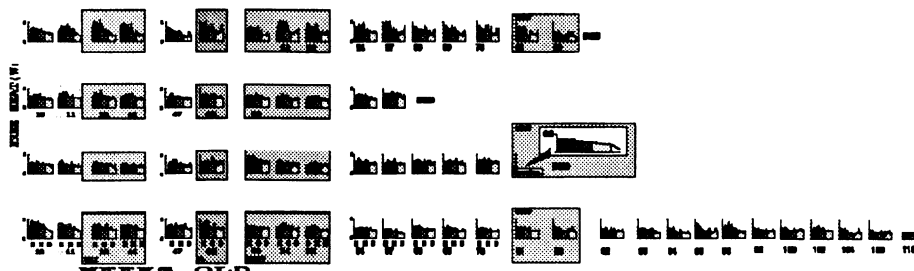


Fig. 4 漢方とマウスの一生

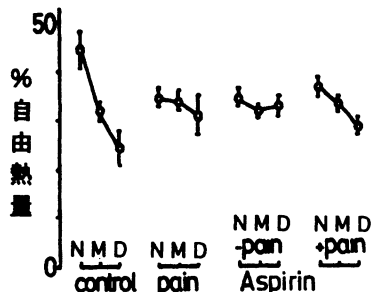


Fig. 5 鎮痛作用によるリズムの乱れ

(% 自由熱量とは24時間の積分ジュール値を100%とし各夜朝昼の占める割合のことである)

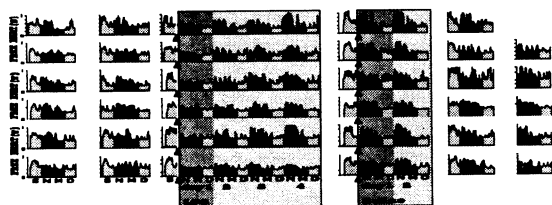


Fig. 6 LPS とリズムの乱れ

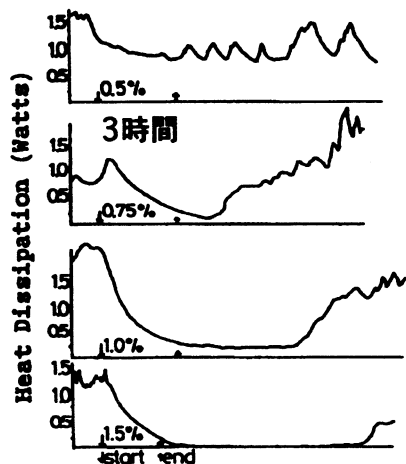


Fig. 7 全身麻酔と自由熱量変化

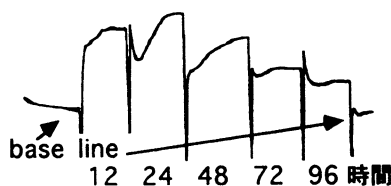


Fig. 8 細胞熱変化と培養時間

でも健康な状態を変化させないと言うポジティブな見方も可能である。

例4 鎮痛

鎮痛作用を検査するのは鎮痛効果をもつ薬物例えばアスピリンを筋肉内へ投与し、痛みを誘発する0.6%酢酸を腹くう内へ注射しそのときの行動で判断する。痛みがあると日内リズムが乱れるが、アスピリンの投与でリズムが回復することが観察される。しかし面白いことは、健康なマウスにアスピリンを投与するとリズムの乱れが観察される (Fig. 5)。

例5 発熱

菌体成分であるLipopolysaccharideを静脈内に投与すると発熱することが知られている。マウスでは顕著に検出され

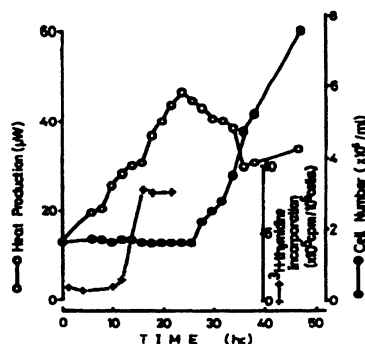


Fig. 9 細胞周期と熱量化

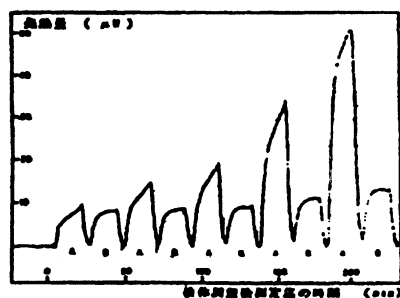


Fig. 10 細胞増加と抗生物質の効果

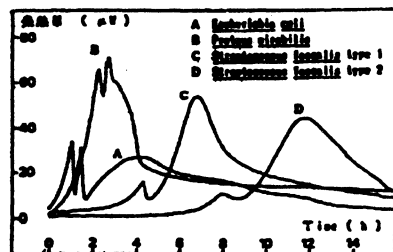


Fig. 11 細胞の増加による熱変化

ないので、一般的にはウサギを使い検査する。ここではマウスを用い、しかも使用した量は $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ と低い投与でも効果が判定できることを示した。静脈注射後day 1では平坦なリズムが観察されるにすぎない。day 2ではリズムの回復の兆しがみられ4day 4ではほとんど完全にリズムが回復していることがわかる。コントロールは同じ動物に数週間後、生理食塩水を注射した場合を示しており、リズムの乱れは観察されない (Fig. 6)。

例6 麻酔

マウスの麻酔状態を自由熱量の変化で観察するとFig. 7のようになる。麻酔濃度に反比例して熱量が少なくなる。そして自由熱量が検出されない時期を迎える。が、麻酔から覚醒すると熱量の上昇が見られる。自由熱量が検出されないのは動物が死を迎えたときと同じ状態といえる。この現象を利用し細胞を麻酔状態として保存できないかを試したのが細胞麻酔のところで示してある。

以上マウスの状態が変化する条件を設定し、全身自由熱量変化を測定した結果を示した。マウスにまったく触れることなくありのままに自然な状態を測定できた。そして測定後もマウスは生存し、リズムも戻る。リズムが乱れ始めるのは大体70週を越えたあたりで、これらが老齢にさしかかる時期であるかもしれない。死ぬ直前ではリズムはまったく観察されない。死ぬ経過を幸運にも測定できたがこれは恐らく世界でも始めてではないかと思う。

1.2 微量熱量計を用いた細胞機能

培養細胞は培養液を交換してからは細胞数が増えていくが数日立つと増加はしなくなる。そのまま放置していると細胞が死に始める。したがって培養細胞を維持するのは数日毎に培養液を換え、細胞を増殖させつつ、維持して行くのが一般的な細胞維持の方法である。この過程を熱量の変化で観察するとFig. 8となる。Fig. 8から明らかなように熱量の変化が培養日数によって異なる。この観察をさらに発展させ、細胞周期を G_0 に同調した後周期を開始させ熱量変化を測定したのがFig. 9である。細胞周期と熱量とは関係があることがわかる。

1.3 細胞の麻酔と保存への応用

1.3.1. 細菌増殖への応用

抗生物質の効果：抗生物質を加えた培地と加えない培地で細菌を増殖させ熱量増加の経過を観察したのがFig. 10である。抗生物質の添加で熱発生の増加が起こらないことがわかる。もともとあった細菌による熱量が減少しないので、抗生物質には殺菌作用がないこともわかる。

細菌の同定：細菌の種類によって熱のパターンが異なることから細菌の同定の一証拠として用いられると考えている (Fig. 11)。

その他血球成分である好中球が貪食するとき、大量の熱

が発生し、その程度は貪食した量に比例すること。細胞分化の程度は熱量変化として計測されること。等微量熱量計による利用を説明するつもりである。

微量熱量計もまた細胞を壊したりすることなく細胞の状態を20分～30分で測定できる唯一の装置であろうと思う。

2. 熱測定からわかる酵素反応の特性

城所俊一

酵素は、特定の生化学的な反応を温和な条件で進行させる触媒として、立体構造・物性・機能に関する多くの研究の対象となっている。この反応メカニズムを理解するためには、さまざまな条件で酵素活性を精密に測定し、立体構造などとの関連を考察する必要がある。

酵素反応の時間経過を連続的に精度良く測定する手法としては、分光学的手法が用いられることが多い。すなわち、吸光度スペクトルや蛍光スペクトルなど、酵素反応に伴って起こる基質の構造変化を反映するシグナルを測定・解析することにより、酵素活性を評価するという方法である。しかしながら、この手法は、適当な分光学的プローブが基質にない場合や、条件によって分光学的シグナルがバックグラウンドが高いなどの理由で測定が困難になる場合がある。

酵素反応は酵素により触媒される化学反応であり、一般に化学反応には熱に出入りを伴うものであるから、反応熱を測定することにより、酵素反応の時間経過を知ることができるはずである。これが可能になれば、基質の分光学的プローブの有無に依存しない、普遍的な酵素反応評価法が確立できるはずである。

近年の熱測定装置のマイクロ化により、少量の基質や酵素による微量な熱量の出入りを精密に測定することが可能になってきている。本講演では、例として、蛋白質分解酵素であるサーモライシンとそのアミノ酸変異体を用いて、合成基質を用いた加水分解反応と脱水縮合反応の酵素活性の特性を調べた例を報告する。特に、脱水縮合の酵素活性は、分光学的シグナルによる測定が困難であったが、熱測定による活性評価が可能であることが明らかになった。また、加水分解反応では、分光学的測定と同等の高精度かつ高感度の測定ができることが明らかになった。

Shun-ichi Kidokoro : Characterization of Enzymatic Reaction by Calorimetry

(財) 相模中央化学研究所：〒229 神奈川県相模原市西大沼4-4-1

Sagami Chemical Research Center, Nishiohnuma 4-4-1, Sagami-hara, Kanagawa 229, Japan

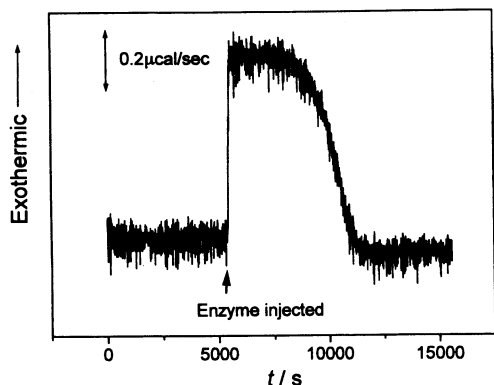
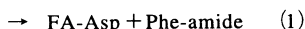
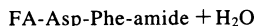


Fig.1 Hydrolysis of a synthetic substrate FADFA catalyzed by thermolysin is an exothermic reaction. The time course of the reaction heat is monitored with titration calorimetry, MCS (MicroCal) .

サーモライシンは、亜鉛イオンを活性部位に持つ金属プロテアーゼであり、疎水性のアミノ酸残基を認識して、そのアミノ基側のペプチド結合を切断するという機能を持つ。従来、この酵素に対する結合定数の高い適当なペプチド基質は存在しなかったが、吸収スペクトル変化により分光学的にも容易に活性測定が可能であり、しかも酵素に対する結合力の強い合成基質Furylacryloyl-Asp-Phe-amide (FADFA) を設計・合成した。酵素による加水分解反応により



という反応が進行する。

Fig.12はMicroCal社の熱量計MCSの滴定ユニットにより、式(1)の反応の時間経過を観測したものである。37℃ pH 6.4の条件で上記の基質を溶かしたものに、図中の矢印で示した時刻で酵素を滴下する。酵素反応の進行に伴って、この場合発熱が起こり、酵素反応のいわゆる定常状態が観測される。基質が消費され、濃度が下がるにつれて、式(1)の精製速度は遅くなり発熱も小さくなり、やがて反応終点に達して元のレベルに戻るという過程が観測できる。

反応初期のごくわずかな時間を除いては、本酵素反応はいわゆるミカエリス・メンテン型の反応で説明できる。すなわち、この反応の時間経過を解析することにより、分光学的な測定と同様に、酵素の活性パラメーターである k_{cat} と K_m とが決められる。こればかりでなく、式(1)の反応に伴うエンタルピー変化を直接評価することが可能となる。定性的にも、図の反応が発熱($\Delta H < 0$)過程であることは明確である。

熱量測定によれば、酵素反応の逆反応を測定することも可能である。すなわち、酵素反応の産物を高濃度セルに入

れておき、そこに酵素を滴下することにより、逆反応を進行させる。この方法を用いて、サーモライシンを触媒として、2種類のアミノ酸からジペプチドを合成する過程が吸熱($\Delta H > 0$)であることがわかった。これは、前述の加水分解活性の結果と一致する。

真空中では、一般にペプチド結合の形成にともないエネルギーは減少し、発熱過程($\Delta H < 0$)となるはずである。水溶液中では、逆に吸熱過程となっていることは、式(1)の右辺の物質は溶媒和のエネルギー、および解離のエネルギーの安定化が左辺の物質よりも大きいことを示唆している。すなわち、ペプチド結合の切断に伴い露出した解離性基の溶媒和およびプロトンの解離に伴うエネルギー変化は、エネルギー的に、ペプチド結合に比べて安定化されるものと理解される。

3. 熱測定からわかるDNA結合タンパク質とDNAの構造

上平初穂

3.1 はじめに

タンパク質の立体構造はアミノ酸配列によって決まり、また、固有の立体構造を保って初めて機能が発揮されることが明らかにされてきた。一方、遺伝子工学やタンパク質合成の手法が進歩して、人工的なタンパク質を創ることが可能になった。思いのままの機能を持ったタンパク質を創るには、立体構造の形成原理を知らなければならない。そのためには、タンパク質の立体構造のみでなく、立体構造を保つためのエネルギー、および立体構造と機能の関係について明らかにする必要がある、カロリーメトリーが大きな寄与をしてきた^{1), 2)}。ここでは、示差走査型熱容量測定法(DSC)^{1), 3)}によって、タンパク質や核酸の立体構造とその安定性について何がわかるかを、例を挙げて述べる。

3.2 典型的な2状態転移のタンパク質の場合^{1), 2), 4)}

タンパク質溶液を徐々に加熱すると、ある温度範囲で、協同的に天然状態から熱変性状態への転移が起こり、同時に熱容量が増加する。この変化は、天然状態(N)と熱変性状態(D)の間の平衡で表される。天然状態(N)と変性状態(D)のタンパク質の熱容量をそれぞれ $C_N(T)$ と $C_D(T)$ とすると、一般に $C_D(T)$ の値は $C_N(T)$ よりも大きい²⁾。低温側から、

Hatsuho Uedaira : Structure of a DNA Binding Protein and DNA Based on the Calorimetric Measurements
生命工学工業技術研究所：〒305 つくば市東1-1
National Institute of Bioscience and Human-Technology, 1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan

Table 1 Thermodynamic characteristics for the thermal transition of the Myb DNA-binding domain.

	T_d (°C)	ΔH^{cal} (kJ/mol)	ΔH^{vH} (kJ/mol)	ratio
Myb R123 (free)	49.8	381	127	3.0
Myb R123 (complex)	56.9	530	450	1.2

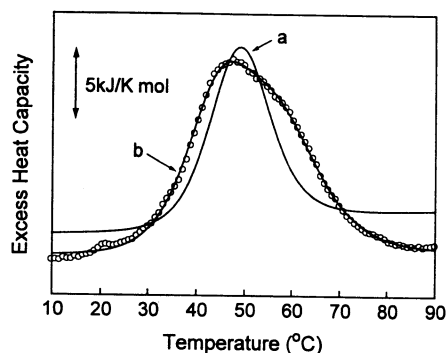


Fig. 1 Experimental (○) and calculated (solid lines a and b) heat capacity curves for the thermal transition of Myb R123. (see Text)

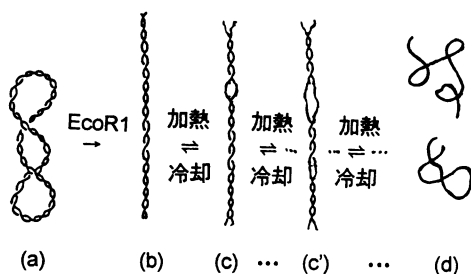


Fig. 2 The scheme of the thermal transition process for linear DNA. (a) closed circular DNA; (b) linear (native double strand) DNA; (c), (c') intermediate states of the transition; (d) denatured DNA (single strand)

$C_N(T)$ を基準にした熱容量の積分値 ($\Delta H_N(T)$) と, $C_D(T)$ を基準にした高温側の積分値が等しくなる温度が転移中点 (T_d) であり, この時の両積分値の和がカロリメトリックエンタルピー ($\Delta H_{\text{cal}}(T)$) である。一方, $\Delta H_N(T)$ から天然状態と熱変性状態のタンパク質のモル分率を温度の関数として算出し, その温度変化から通常の分光学的方法と同様にエンタルピー変化を算出することができる。この値を van't Hoff エンタルピー変化 ($\Delta H^{\text{vH}}(T)$) と呼ぶ。測定しているタン

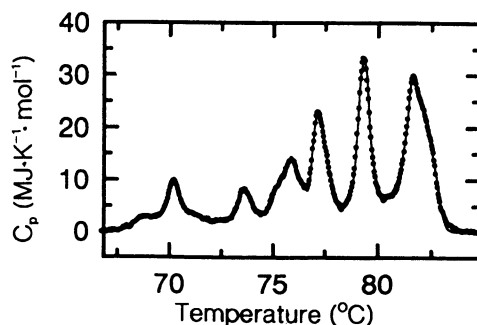


Fig. 3 The heat capacity curves for the thermal transition of plasmid pBR322 linear DNA. Dotted and solid lines denote experimental and calculated heat capacity curves, respectively.

パク質が2状態転移を示すならば, 比, $\Delta H^{\text{cal}}(T)/\Delta H^{\text{vH}}(T)$ の値は1となる。Privalovら²⁾を始め大勢の研究者によって, リボヌクレアーゼ等, 多数の2状態転移のタンパク質が研究されている。 $\Delta H_{\text{cal}}(T)$ から熱変性の自由エネルギー変化とエントロピー変化の温度依存性が得られる^{1), 2)}。これらの熱力学関数はタンパク質の低温変性や水和などの議論の基礎となる⁵⁾。

3.3 DNA結合タンパク質の3状態熱転移

カロリメトリーによって得られた2つのエンタルピーの値の比が1より大きい時は, 熱転移に中間状態が存在し, 1より小さい時は, タンパク質分子が集合体を形成していることを意味する^{1), 2), 6)}。これらの場合には, 統計熱力学の手法を用いると, 中間状態がいくつ存在するか, あるいは, 何分子が集合しているかを算出し, これらの過程の熱力学量を求めることができる⁶⁾。

以下にMybのDNA結合ドメイン⁷⁾の例について述べる。Mybはがん遺伝子により産生され, 特異DNA配列に結合する転写制御因子で, そのDNA結合ドメインには, 51～53アミノ酸残基からなる3つのユニット, R1～3が並んでいる。(分子量18kDa, 以下にMyb R123と略記) 各ユニットにはそれぞれ3本のヘリックスが含まれている。熱測定はMC-2 (Microcal) 型カロリメータ (DSC) を用いて, 昇温速度 $0.75^\circ\text{C min}^{-1}$ で行った。Fig. 1に, pH 7.5, 濃度 2.2 mg ml^{-1} で測定したMyb R123のDSC曲線を示す。図の丸印が測定値である。R123の熱容量の温度変化はなだらかで転移点は 50°C 付近にある。変性温度での $\Delta H^{\text{cal}}(T_d)$ と $\Delta H^{\text{vH}}(T_d)$ の比を求めると1より大きいので (Table 1参照), 中間状態が存在することがわかる。2状態転移を仮定した場合の計算曲線をFig. 13の実線aに, 3状態転移の場合の計算曲線を実線bに示す。明らかに3状態転移とした場合, すなわち転移の中間状態が1個存在するとした場合に

計算値と実測値がよく一致している。R1, R2, R3のそれぞれの熱転移を円2色性スペクトルによって測定した結果と比較することによって、R123の熱転移は段階的に起こり、中間状態は3つのユニットのうち、R2ユニットのみが変性した状態であると推論することができた。他方、DNAダブルヘリックスとMyb R123を等モル混合した場合の測定からは、DNAとの結合状態にあるMyb R123の熱変性の過程を調べることができる。Table 1から明らかなようにDNAとの結合によってMyb R123の変性温度が上昇し、エンタルピー変化も増大する。

3.4 プラスミドDNAの微細構造^{a)}

DNAの測定例として大腸菌のプラスミドpBR322DNA (4362塩基対)の場合について述べる。この閉環状2重らせんDNAはFig. 2 (a) のようにおしぼりのようにねじれた形の超らせん構造をとるが、酵素EcoR1で加水分解すると2本鎖が同じカ所で切断されて直鎖状の2本鎖DNA (Fig. 3 (b)) になる。以下にこの鎖状のDNAを単にDNAと呼ぶことにする。

溶液中のDNAの2重鎖ヘリックスは、高温では解離して1本鎖のDNAになる。この状態を熱変性状態という (Fig. 2 (d))。熱変性状態に至るまでの過程を観測すると、2本鎖DNAの鎖に沿って安定性の異なる領域がどの様に分布しているか、つまりDNAの微細構造がわかる。大腸菌のプラスミドpBR322 DNA溶液の熱容量 (C_p) の温度依存性をDASM-1M型のDSCで、昇温速度 $0.5^\circ\text{C min}^{-1}$ で測定した結果、Fig. 3の点線で示すように、肩のある6個のピークが $68^\circ\text{C} \sim 83^\circ\text{C}$ の温度範囲で現れた。いくつものピークがあることだけでも、DNAの熱変性が多段階でおこることが明らかである。

これらのピークについて解析し、Fig. 3の実線のように実験値をよく再現する計算値を得た。Fig. 3の各ピークは一度にほどける単位に相当するのではなくこのそれぞれのピークの中にさらに3個から6個の過程が含まれ、Fig. 2 (b) から (d) までの間に、模式的に (c), (c') で示したような中間状態が合計22も存在することが明らかになった。pBR322 DNAは4362塩基対から構成されているので、一度にほぐれる協同単位は平均して塩基対200弱の大きさである。

3.5 おわりに

以上、タンパク質とDNAの例に見るように、分子内の熱安定性が一様でない場合には、DSCによって、熱安定性の異なる部分構造が観測され、それぞれの熱力学量を求めることができる。タンパク質では熱安定性の高い部分はそのタンパク質の特異構造を保つのに重要な部分であり、また、DNAでは、熱安定性の低い部分はプロモータ等が結合する活性の高い部分と一致している。このようなデータの積み重ねによって、構造と活性との関連等が明らかにされてい

くと期待される。

文 献

- 1) 例えば、熱分析の基礎と応用第3版、日本熱測定学会編、リアライズ社 (1994)。
- 2) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **33**, 167 (1979); *idem.*, *ibid.* **35**, 1 (1982)。
- 3) P. L. Privalov, *Pure Appl. Chem.* **52**, 479 (1980)。
- 4) 上平初穂, 現代化学, 2月, 38 (1988); *ibid.*, 9月号, 34 (1993)。
- 5) 例えばSpecial Issue: Thermodynamics of Hydration, *Biophys. Chem.* **51**, pp.89-409 (1994)。
- 6) S. Kidokoro and A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987); S. Kidokoro, H. Uedaira and A. Wada, *ibid.* **27**, 271 (1988)。
- 7) A. Sarai, H. Uedaira, H. Morii, T. Yasukawa, K. Ogata, Y. Nishimura and S. Ishii, *Biochemistry* **32**, 7759 (1993)。
- 8) H. Uedaira, S. Kidokoro, S. Ohgiya, K. Ishizaki and N. Shinriki, *Thermochim. Acta* **232**, 7 (1994)。

4. 麻酔薬の細胞膜に対する作用機構 — 熱力学的研究からのアプローチ —

影本彰弘・藤原 晃*

4.1 はじめに

最近、細胞膜に注目して、細胞膜モデルとして、*Halobacterium halobium* S9から抽出した紫膜 (Purple membrane; PMと略記) を使い、PMと老化防止薬としての α -トコフェロール、Buthylated hydroxy anisole、PMと抗ガン剤 (cisplatin, adriamysine, Fluorouracil)、PMと突然変異剤 (Bromouracil)、PMと金属イオン (Mg^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} イオン)、PMと色素 (Ethidium Bromide, 9-amino-acridine, Quinacrine) 間の分子間相互作用をフロー型、滴定型微小熱量計をもちいて熱力学的観点から研究している。

本稿では、細胞膜モデルとして、*Halobacterium halobi-*

Akihiro Kagimoto and Akira Fujiwara: Mechanism of Functions of Anesthetics for the Cell Membrane — Approach from the Thermodynamic Investigation —
大阪工業大学工学部一般教育科: 〒535 大阪市旭区大宮 5-16-1

*) 本学大学院生 (応用化学専攻)

Department of General Education, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1, Omiya, Asahi-ku, Osaka 535, Japan

um S9から抽出した細胞膜（紫膜）をもちいて、細胞膜—麻酔薬間の相互作用を熱量測定の手段で研究したその結果を紹介しよう。

4.2 装置・試料

4.2.1 装置

当研究室で試作した全自動パッチ型微小熱量計（測定温度、 298.15 ± 0.005 K）、示差走査熱量計（DSC, DASM 4, 昇温速度は 1 K min^{-1} ）、その他、UV スペクトル（Hitachi 220A）、CD スペクトル（Jasco J-20）である。

なお、微小熱量計に用いた混合セルは、麻酔薬の蒸気圧が高いので麻酔薬の揮散を完全に防ぐため完全密閉型セル（セルの概略は省略）を試作した。

4.2.2 試料

この研究に使用した細胞膜試料は、高度好塩菌（*Halobacterium halobium* S9）を培養し、この菌から抽出した紫膜（Purple membrane; PMと略記）である。PM懸濁液は、脱イオン化するため、おおよそ12時間透析した。PM中の膜タンパクであるBacteriorhodopsin（bRと略記）の濃度は、568nmでのUVスペクトルのモル吸光係数 ϵ_{568} （ $=6.30 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ）から決定した。

また、PMの構成成分として、脂質（lipid）は25wt. %、膜タンパク質（Bacteriorhodopsin）は75wt. %であり、このPMから脂質成分だけを分離することは大変困難である。そこで脂質成分のモデル物質として合成脂質であるL- α -dimyristoyl phosphatidylcholine（MLV; DMPCと略記）を使用した。

麻酔薬は、市販の吸入麻酔薬であるHydrocarbon系麻酔薬Halothane（2-chloro-1,1,2-chloro-1,1,1-trifluoroethane）、およびether系麻酔薬Enflurane（2-chloro-1,1,2-trifluoroethylether）である。

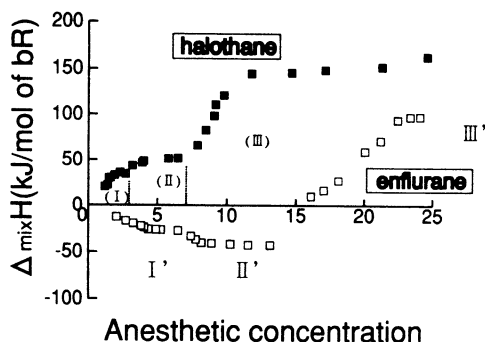


Fig.1 Plots of the heats of mixing $\Delta_{\text{mix}}H$, for purple membrane against the concentration of anesthetic (m mol). (■) Purple membrane-Halothane system, (□) Purple membrane-Enflurane system.

なお、使用した水は、比抵抗 $18.3 \text{ M}\Omega$ をもつ超純水（ $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ のフィルターをもつMilli-Q-SP-Reagent; MILLIPORE）である。

4.3 結果

4.3.1 紫膜—麻酔薬間の混合熱

PM-Halothane系、およびPM-Enflurane系の混合熱（ $\Delta_{\text{mix}}H$ ）を試作したパッチ型熱量計で測定した。Fig. 1にPM-Halothane系、PM-Enflurane系の $\Delta_{\text{mix}}H$ をそれぞれ示した。

Fig. 1に見られるように、PM-Halothane系の $\Delta_{\text{mix}}H$ は、測定濃度範囲で吸熱を示した。一方、PM-Enflurane系の $\Delta_{\text{mix}}H$ は、Enflurane濃度が 15 mol dm^{-3} 以下で発熱、 15 mol dm^{-3} 以上で吸熱を示す複雑な挙動を示した。

Fig. 1から、Halothane系は、Halothane濃度により、3つの領域（Region I, II, III）に分けられる。また、Enflurane系は、Halothane系と同様にEnflurane濃度により3つの領域（Region I', II', III'）に分けられる。

Fig. 1から、Halothane系のRegion Iの $\Delta_{\text{mix}}H_1$ は、halothane濃度の増加に伴い増加し、 $\Delta_{\text{mix}}H_1=31.9 \text{ kJ}$ に漸近する。Halothane濃度の増加により、Region IIの $\Delta_{\text{mix}}H_2$ は、 50.7 kJ で一定値、さらにRegion IIIの $\Delta_{\text{mix}}H_3$ は、 150.5 kJ となる。一方、Enflurane系のRegion I'の $\Delta_{\text{mix}}H_1'$ は、enflurane濃度の増加とともに減少し -25.9 kJ に漸近する。Enflurane濃度の増加によりRegion II'の $\Delta_{\text{mix}}H_2'$ は減少して -41.8 kJ で一定値、さらに濃度の増加に従いRegion III'の $\Delta_{\text{mix}}H_3'$ は、逆に増加し 96.3 kJ で一定値となる。以上、得られたPM-Halothane系、PM-Enflurane系のエンタルピー変化は、PM中のlipid、または膜タンパク質（bR）と麻酔薬との分子間相互作用に基づくものと考えられる。これらを確認するため、合成脂質であるL- α -dimyristoylphosphatidylcholine（DMPC）-Halothane系、およびDMPC-Enflurane系の混合熱（ $\Delta_{\text{mix}}H'$ ）を測定した（Figureは紙面の関係省略）。その結果、PM系のRegion I、およびRegion I'の $\Delta_{\text{mix}}H$ は、DMPC系のRegion I、およびRegion I'の $\Delta_{\text{mix}}H'$ と同じ傾向を示した。これらの結果から、麻酔薬は、PM（細胞膜）中の脂質部分と相互作用することを示唆している。さらに、同じ条件下でPM-Halothane

Table 1 Thermodynamic Quantities for PM-Anesthetic systems at 298K.

		k $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\Delta G^{(1)}$ kJ mol^{-1}	ΔH kJ mol^{-1}	$\Delta S^{(2)}$ $\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
Halothane	PM (Region I)	6.8×10^4	-27.6	3.51	104.2
	DMPC	7.8×10^4	-27.9	3.32	104.8
Enflurane	PM (Region I')	5.0×10^4	-26.8	-2.62	81.2
	DMPC	2.3×10^4	-30.6	-2.63	93.8
	PM (Region II')	3.2×10^4	-25.7	-42.1	-55.0

1) $\Delta G^\circ = -RT \ln K$, 2) $\Delta S^\circ = (\Delta H - \Delta G^\circ)/T$

系, PM-Enflurane 系の UV スペクトル (図は省略) を測定した。得られた UV スペクトルの結果を考慮して, PM と麻酔薬間では, それぞれの領域でつぎに示すような相互作用に伴うエンタルピー変化が考えられる。

(1) Halothane 系

Region I は, lipid と Halothane 間で complex を形成し, その complex 形成に基づくエンタルピー変化 ($\Delta H_{\text{complex}}$) は $31.9 \text{ kJ (mol bR)}^{-1}$ である。Region II は, bR trimer の order-disorder transition に基づくエンタルピー変化 (ΔH_{bR}) に対応して, その ΔH_{bR} は $18.8 \text{ kJ (mol bR)}^{-1}$ ($=\Delta_{\text{mix}}H_2 - \Delta_{\text{mix}}H_1$) である。

Region III は, PM から retinal が解離し, その解離に基づくエンタルピー変化 ($\Delta H_{\text{retinal}}$) に対応する。その $\Delta H_{\text{retinal}}$ は $99.8 \text{ kJ (mol bR)}^{-1}$ ($=\Delta_{\text{mix}}H_3 - \Delta_{\text{mix}}H_2$) である。

(2) Enflurane 系

Region I' は, lipid と Enflurane 間で complex を形成し, その形成に基づくエンタルピー変化 ($\Delta H_{\text{complex}}'$) は, $-25.9 \text{ kJ (mol bR)}^{-1}$ ($=\Delta_{\text{mix}}H_1'$) である。

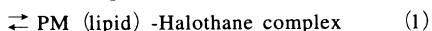
Region II' は, bR trimer と Enflurane の相互作用に基づくエンタルピー変化 ($\Delta H_{\text{bR}}'$) で, その $\Delta H_{\text{bR}}'$ は, $-15.9 \text{ kJ (mol bR)}^{-1}$ ($=\Delta_{\text{mix}}H_2' - \Delta_{\text{mix}}H_1'$) である。

Region III' は, PM から retinal が解離する際のエンタルピー変化 ($\Delta H_{\text{retinal}}'$) に対応して, その $\Delta H_{\text{retinal}}'$ は, $96.3 \text{ kJ (mol bR)}^{-1}$ ($=\Delta_{\text{mix}}H_3'$) である。

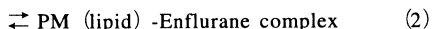
4.3.2 紫膜への麻酔効果の熱力学的解析

以上の (1), (2) の結果から, それぞれの系で次の反応式が成り立つと仮定する。

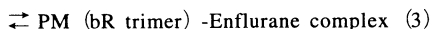
Region I : PM (lipid) + Halothane



Region I' : PM (lipid) + Enflurane



Region II' : PM (bR trimer) + Enflurane



式 (1) ~ (3) の平衡反応から次の式を使い PM-麻酔薬系の熱力学量が評価できる。

$$\Delta_{\text{mix}}H = \Delta H/2 \{1 + r/n + 1/nKP_o - [(1 + r/n + 1/nKP_o)^2 - 4r/n]^{1/2}\} \quad (4)$$

式 (4) で, ΔH は, net な PM-麻酔薬間の相互作用に基づくエンタルピー変化で混合熱 ($\Delta_{\text{mix}}H$, 測定値) と次の関係が成り立つ。

$$\Delta_{\text{mix}}H = \Delta H / P_b / P_o. \quad (5)$$

式 (4) 中の K は上記の平衡反応 (1) ~ (3) の平衡定数で次の関係がある

$$K = P_b / (P_o - P_b) (C_o - nP_b) \quad (6)$$

ここで, C_o は麻酔薬の全モル濃度, n は lipid (Region I, I' or II') に結合した麻酔薬の数, P_b は PM に相互作用

した麻酔薬のモル濃度, P_o は PM の初濃度である。

式 (4) に従い, 実験データに最もフィットする ΔH , K , n 値を computer (least squares treatment) で決定した。得られた熱力学量を Table 1 に示した。

4.3.3 細胞膜-麻酔薬間の相互作用機構の一提案

Table 1 より, Region I と I' の両系の ΔG^* は, それぞれの DMPC 系とほとんど同じ負の値を示し, Halothane, Enflurane は, PM 中の lipid と安定な complex を形成し, その complex の安定性は両系とも ΔH より ΔS により支配されている。Hydrocarbon 系吸入麻酔薬である Halothane, およびエーテル系吸入麻酔薬である Enflurane は細胞膜中の lipid と相互作用するが, しかし, 細胞膜中の lipid に対する Halothane と Enflurane とでは, その相互作用様式が異なる。

評価した熱力学量, およびスペクトルの結果から, lipid と麻酔薬間の相互作用機構は次のように考えられる。

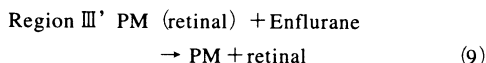
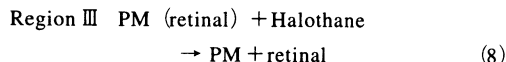
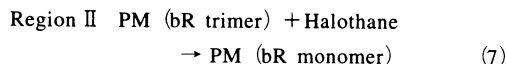
lipid は, 極性基 (head) の周りに水分子が水和し, さらに lipid の疎水基 (tail) 間で疎水結合を形成して安定に存在している。この安定に存在している lipid に, Halothane 分子が侵入すると, 2つの相互作用が考えられる; すなわち lipid の head の水和水が脱水すると同時に, Halothane 分子が lipid の head に吸着する相互作用, もう一つの相互作用は, lipid の tail 間の疎水結合が Halothane 分子により乱される。すなわち, Halothane 分子は lipid の tail 間に吸着する。一方, Enflurane 系において, 同様に 2つの相互作用が考えられる。その一つは, lipid の head に水和している水分子と Enflurane 分子中のエーテル基間で水素結合を構築する。すなわち, 水分子を介在して lipid の head と Enflurane 分子が相互作用する。もう一つの相互作用は, Halothane 系と同様に lipid の tail に Enflurane 分子が吸着して lipid の tail 間の疎水結合を乱す相互作用である。

以上, Halothane 系, および Enflurane 系の作用機構は, lipid の疎水結合を乱すと同時に, PM 中の lipid が麻酔薬で膨潤 (この事実は, 合成脂質である DMPC (液晶) -麻酔薬系の相状態の偏光顕微鏡観察から, lipid (液晶) の粒径が $26.5 \mu\text{m}$ (Enflurane 濃度; 0 mol dm^{-3}) から, 麻酔薬濃度の増加とともに $47.8 \mu\text{m}$ (Enflurane 濃度; $10.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) に大きくなる) することから推測できる。この lipid-麻酔薬系の液晶相状態の Figure は紙面の都合省略する。この lipid の膨潤により, PM 中の膜タンパクの conformation が圧迫し, 膜タンパクの conformation の変化 (UV スペクトルから推論) を誘発するようである。

一方, 平衡反応 (3) において, 膜タンパク (bR trimer) は, Enflurane と安定な bR-Enflurane complex を形成する。CD スペクトル, 混合熱の結果から, その結合機構は Enflurane の ether 基と bR 構造のループにあるアミノ酸残基 (lysine, arginine, serine, threonine, tyrosine, asparagine,

glutamine などがあるが、どのアミノ酸残基と相互作用するかは特定できない) の側鎖の N^+H_3 , N^+H_2 , OH 基と enflurane の -O- 基間での水素結合が考えられる。

さらに麻酔薬濃度が過剰に添加されると、次の反応が考えられる。



反応 (7) では、bR trimer から monomer への order-disorder 転移過程であり、反応 (8), (9) は、Excess な麻酔薬濃度による PM の変性過程である。

以上、吸入麻酔薬である Hydrocarbon 系の麻酔薬 Halothane, および ether 系の麻酔薬 Enflurane に対する細胞膜への作用機構を熱力学的に解析した。問題点は多々あるが、今後さらに研究する必要がある。この基礎的研究成果が麻酔機構解明の一つの助けになれば幸いである。

5. ワークショップに参加して

千葉かおり

今回のワークショップは、生体を試料とする熱測定、ということで、東海大学医学部の山村雅一氏、相模中央化学研究所の城所俊一氏、大阪工業大学の影山彰弘氏、生命工学工業技術研究所の上平初穂氏を演者として、12月5日に行われました。4氏の講演では、それぞれの装置の特性を生かした、基礎にも応用にも偏らない種々の興味深い実験結果が報告されました。熱測定を始めてまだ日が浅い私は、熱測定でこんなこともできるのか、とその応用範囲の広さに驚きました。また、どれも講演時間と内容の量のバランスがとれていて、じっくり聞いて勉強になる講演ばかりでした。上平氏と城所氏の講演にあったように蛋白質や核酸の構造変化や機能を熱力学的に記述するという手法は、生物物理学が専門の私にとっては馴染みの深いものでしたが、影山氏の様に薬剤が生体に及ぼす影響、特に生体膜と薬剤

の相互作用を熱測定で調べようという試みは新鮮に感じられました。山村氏はさらに、細菌やマウスを用いた熱測定が可能であり、そこから非常に興味深い結果が得られることを示しておられました。生物が元気に生きているということ、死ぬということ、発熱や痛み、鎮痛剤の効果などを、自由熱量というマウスの発熱量の日内リズムで記述することができるという報告は画期的だと思いました。

展示に関しては、演者が測定に用いた装置が同会場内に展示されたことで、講演内容の理解は多少深まったと思いますが、せっかくデモ機まで搬入することができたのですから、各社の装置の紹介を、性能面での比較を交えながらして頂く時間を10分でも別にとれると良かったと思いました。

6. おわりに

今回のワークショップは1995年12月5日に霞ヶ関ビルの東海大学交友会館を会場として開かれた。バイオ関係のワークショップは1993年5月に近畿大学で開かれて以来である。生化学および生物物理分野でのカロリーメトリーの研究は、最近数を増しており、生体物質の安定性、構造、水和、複合系での解析、酵素活性や結合機能等の測定、細胞、動物、植物分野での測定など、基礎と応用の双方に向かって適用範囲が大きく広がってきた。

今回は、1. 生きた動物と細胞の測定、2. 酵素反応の特性、3. タンパク質とDNAの構造、4. 麻酔薬の細胞膜に対する作用機構、の4つに話題を絞った。一人当たりの講演時間を長くして、講師のカロリーメトリーに関する考え方も織り込んだ話を聞いていただく意図で企画した。これらは各講師自身によって、本稿1. から4. にまとめられている。当日は約40人の参加者があり、質問も活発に行われた。参加者の中から、ちょうど熱測定を始めたところという生物物理分野の研究者お一人に感想文をお願いした。当日の雰囲気を感じとって頂ければと思う。今回のワークショップの世話人を担当して、この分野への関心が高く、今後さらに研究者層が広がることを実感した。

最後に、当日会場に展示の装置などを持ち込んで下さって、装置の概略や解析の説明等の御協力を下さいました、日製産業株式会社、日本シイベルヘグナー株式会社、電子科学株式会社、理学電機株式会社の4社の方々に感謝いたします。

(世話人 山村雅一, 上平初穂)

Kaori Chiba-Kamoshida : Report on Workshop 21
関西学院大学 : 〒662 兵庫県西宮市上ヶ原1-1-155
(財) 相模中央化学研究所 : 〒229 相模原市西大沼4-4-1
Kwansei Gakuin University, 1-1-155 Uegahara, Nishinomiya, Hyogo 662, Japan
Sagami Chemical Center, Nisiohnuma 4-4-1, Sagami-hara, Kanagawa 229, Japan