

生化学における熱測定研究法*

II タンパク質の熱力学関数

高橋克忠**, 深田はるみ**

生体物質を対象とする熱測定のひとつとして、生体高分子とりわけタンパク質の変性に際してのエンタルピー変化測定があることをすでに述べてきた。タンパク質は、それがおかれた環境が変化することにより、生物的機能を維持するために必要な一定の空間構造が破壊され、本来の生物活性を失う。そのような過程を一般に変性と呼んでいるが、この変性を起こさせる環境因子としては、水素イオン濃度(pH)、イオン強度、有機溶媒による溶媒効果、あるいは温度などがある。適当な変性条件を設けて、熱測定により直接、未変性状態および変性状態にあるタンパク質のエンタルピー差を求めるのがこの方法であり、大きくわけて、温度一定の条件で、酸、アルカリもしくは変性剤を用いた変性反応の反応熱を測定する方法(Isothermal calorimetry, (I)2.1.3および2.2.3)と、温度を走査する過程で熱的に誘起される変性の過剰熱容量を測定し、それを積分して変性のエンタルピーを導く方法(Scanning calorimetry, (I)3.2.1)がある。けれどもこのようにして得られたものは、あくまで与えられた条件(環境因子)のもとでの未変性状態および変性状態の間のエンタルピー差だけであって、タンパク質のもつ熱力学的安定性を論ずるにはきわめて不十分なものであった。1976年 Privalov らは、上に述べた二種の熱測定の方法とタンパク質の電位差測定を組み合わせ、実験測定手段を基盤にして、タンパク質がどのような条件で、どの程度安定化されているのか、その熱力学的性質を统一的に理解するための手続きを整理して示した^{1~3)}。この稿では、彼等が体系化したタンパク質の熱力学関数を導く方法論を、実際の系での計算結果と併わせ紹介する。

1. 原 理

まず、タンパク質の熱力学関数を導くための原理¹⁾を述べる。タンパク質のエンタルピー微小変化をタンパク質の状態を規定する各環境因子(温度, pH, 変性剤濃度など)にもとづく項にわけて考えると、次のように書くことができる。

$$dH = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{\text{pH}, C} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \text{pH}}\right)_{T, C} d\text{pH} + \left(\frac{\partial H}{\partial C}\right)_{T, \text{pH}} dC \quad (2.1)$$

ここで、 T , pH , C はそれぞれ温度、水素イオン濃度、および変性剤濃度を表わす。これ以外の因子も考えることは可能であるが、ここでは簡単のため、温度と pH の項についてのみ取り扱うことにする。

まず標準状態として $\text{pH}^\circ = 7.0$, $T^\circ = 25^\circ\text{C}$ およびイオン強度 $I^\circ = 0.1$ を設定する。

未変性状態(N)の標準エンタルピーは次のように書くことができる。

$$\begin{aligned} H^{\circ, N}(T, \text{pH}) &= \int_{T^\circ}^T \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{\text{pH}} dT + \int_{\text{pH}^\circ}^{\text{pH}} \left(\frac{\partial H}{\partial \text{pH}}\right)_T d\text{pH} \\ &= \int_{T^\circ}^T [C_p]_{\text{pH}}^N dT + (H_{\text{pH}^\circ}^N - H_{\text{pH}^\circ}^N)_{T^\circ} \\ &= \int_{T^\circ}^T [C_p]_{\text{pH}}^N dT + H^{\circ, N}(\text{pH}) \quad (2.2) \end{aligned}$$

右辺第一項は温度依存項であり、ある一定の pH における未変性タンパク質の部分熱容量を測定することにより、実験的に決定できる(I 3.2.1)。さらに第二項は pH 依存項で、 $\text{pH} 7.0$, 25°C を標準として、酸ないしアルカリで所定の pH にジャンプさせたときのエンタルピー変化である。これはいうまでもなく、isothermal calorimetryにより実験的に決定することができる(I 2.1.3 および 2.2.3)。

これと同様に、標準エントロピー項に関しては次のようになる。

$$\begin{aligned} S^{\circ, N}(T, \text{pH}) &= \int_{T^\circ}^T \left(\frac{\partial S}{\partial T}\right)_{\text{pH}} dT + \int_{\text{pH}^\circ}^{\text{pH}} \left(\frac{\partial S}{\partial \text{pH}}\right)_T d\text{pH} \\ &= \int_{T^\circ}^T \frac{[C_p]_{\text{pH}}^N}{T} dT + S^{\circ, N}(\text{pH}) \quad (2.3) \end{aligned}$$

* 生化学における熱測定研究法 I(上)熱測定 4(2)67-75(1977)

生化学における熱測定研究法 I(下)熱測定 4(3)117-125(1977)

** 大阪府立大学農学部生物物理化学研究室:堺市百舌鳥梅町 4 丁目

Katsutada Takahashi and Harumi Fukada: Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, 591 Japan

ここで右辺の温度依存項は(2.2)式と同様、scanning calorimetryにより得ることができる。ところが、第二項のpH依存項 $S^{\circ,N}(\text{pH})$ は実験的に直ちに求めるわけにはいかない。けれども標準エンタルピー $-H^{\circ,N}(\text{pH})$ と標準ギブズ関数 $G^{\circ,N}(\text{pH})$ が25℃という標準温度で与えられていれば、熱力学の基本式

$$S^{\circ,N}(\text{pH}) = \frac{H^{\circ,N}(\text{pH}) - G^{\circ,N}(\text{pH})}{298.15} \quad (2.4)$$

を用いて求めることができる。

$H^{\circ,N}(\text{pH})$ は先に述べた isothermal calorimetry で導かれるものである。また $G^{\circ,N}(\text{pH})$ はプロトンの解離平衡に関する項であり、タンパク質溶液の電位差滴定を通じて実験的に決定できる。

したがって、(2.2)式、(2.3)式をもとに、最終的に未変性タンパク質のギブズエネルギー関数は

$$G^{\circ,N}(T, \text{pH}) = H^{\circ,N}(T, \text{pH}) - TS^{\circ,N}(T, \text{pH}) \quad (2.5)$$

で与えられることになる。

これに対応する変性状態(D)の熱力学関数は、変性のエンタルピー変化 $(\Delta H_d)_{T_d}$ を導入して、次のように書くことができる。

$$H^D(T, \text{pH}) = \int_{T_0}^{T_d} (C_p)_{\text{pH}}^N dT + (\Delta H_d)_{T_d} + \int_{T_d}^T (C_p)_{\text{pH}}^D dT + H^{\circ,N}(\text{pH}) \quad (2.6)$$

$$= (\Delta H_d)_{T_d} - \int_{T_d}^T (\Delta C_p)_d dT + H^{\circ,N}(T, \text{pH}) \quad (2.6)'$$

$$S^D(T, \text{pH}) = \frac{(\Delta H_d)_{T_d}}{T_d} - \int_{T_d}^T (\Delta C_p)_d d \ln T + S^{\circ,N}(T, \text{pH}) \quad (2.7)$$

$$G^D(T, \text{pH}) = H^D(T, \text{pH}) - TS^D(T, \text{pH}) \quad (2.8)$$

ここで、 $\Delta(C_p)_d$ は変性に伴う熱容量変化である。また T_d は変性温度を表わし、この変性温度における変性のギブズエネルギー変化は零である($\Delta G_d)_{T_d} = 0$)。したがって変性のエントロピー変化は $(\Delta S_d)_{T_d} = (\Delta H_d)_{T_d} / T_d$ と書けばよいことになる。

このようにして変性前後の熱力学関数は isothermal calorimetry, scanning calorimetry および電位差滴定という三種の実験手段を通して全て導くことができる。次に各項の実験的な決定方法を簡単に述べる。

2. 温度に依存する項の決定

(2.6)式のうち右辺第三項までが温度に依存する項である。このうち第二項の変性に伴うエンタルピー変化 $(\Delta H_d)_{T_d}$ は、熱容量差測定による過剰熱容量の実測値より得られることはすでに述べた(I 3.2.1)。この熱容量

差測定はさらに変性の前後における熱容量を温度の関数として与える(図 1.11, 図 1.12 および 図 2.1 を参照)。すなわち、(2.6)式の右辺第一項および第三項も実験的に与えられるのである。

Privalov らのグループは典型的な数種の球状タンパク質の精密な熱容量差測定を行い、次のような重要な実験事実を得ている。1)未変性状態(N)および変性状態(D)の熱容量、 $(C_p)_{\text{pH}}^N$ 、 $(C_p)_{\text{pH}}^D$ は変性に伴う熱容量変化

$$\Delta(C_p)_d = (C_p)_{\text{pH}}^D - (C_p)_{\text{pH}}^N \quad (2.9)$$

だけずれるだけで、いずれも温度とともにゆるやかに直線的に増加し、しかも pH に無関係である、2)変性に伴う熱容量変化 $\Delta(C_p)_d$ は実験誤差範囲内で pH にも変性温度 T_d にも依存せず一定である(図 2.1 を参照)。

これらの事実は実験値を用いて熱力学関数を計算する場合、非常に助けになる。具体的なデータを示すと、Privalov らはリゾチームについて、次の数値を用いて計算している。

a) 25℃における未変性リゾチームの部分熱容量は pH に無関係に $(C_p)_{25^\circ\text{C}}^N = 4.578 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ である。

b) 未変性リゾチームの部分熱容量の温度係数は pH に無関係に $d(C_p)^N/dT = 0.0286 \text{ kcal}^{-1} \text{ K}^{-1}$ である。この関係から $(C_p)^N$ を温度の関数として書けば

$$(C_p)^N = 3.863 + 0.0286 t \quad (2.10)$$

となる。ここで t はセルシウス温度で、3.863は0℃における未変性リゾチームの熱容量である。

c) 変性に伴う熱容量変化は pH および変性温度に無関係に、 $\Delta(C_p)_d = 1.57 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ である。

d) 変性のエンタルピー変化は変性温度 T_d (セルシウス)の関数であり、次のように書くことができる。

$$(\Delta H_d)_{T_d} = 17.10 + 1.5737 T_d \quad (2.11)$$

以上のような実験データをもとに、リゾチームにおける(2.2)式~(2.8)式の温度依存項が計算された。

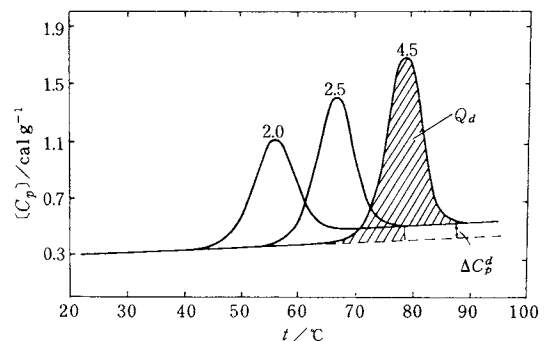


図 2.1 リゾチーム溶液の各種 pH における部分熱容量の温度依存性

3. pHに依存する項の決定

3.1 $H^{\circ,N}(\text{pH})$ の決定

(2.6)式の右辺のうち、pHに依存する第四項 $H^{\circ,N}(\text{pH})$ の求め方について述べる。

$H^{\circ,N}(\text{pH})$ は標準状態($T^{\circ}=25\text{C}$, $\text{pH}^{\circ}=7.0$)にあるタンパク質溶液を任意のpHに変化させたときのエンタルピー変化であり、これが isothermal calorimetry により実測できることはすでに述べた(1.2.1.3)。ここではリゾチーム溶液の場合の例をとりあげて説明する。

図2.2 aは $\text{pH} < 7.0$ におけるリゾチームのエンタルピーレベルを $\text{pH} 7.0$ を基準にして($H_{\text{pH} 7.0}^{\circ,N} = 0$)表示したもので、 $\text{pH} 7.0$ にあるリゾチーム溶液($I^{\circ}=0.1$, $T^{\circ}=25\text{C}$)に酸を加えてpHを変化させたときの反応熱として求められる(測定に際しては、最初のリゾチーム溶液のpHは必ずしも7.0でなくてもよい)。これはリゾチーム分子を構成するアミノ酸中の解離基の解離エンタルピーの積算値に相当する。温度がより高い条件でpHを変化させると、解離基の解離状態の変化とともに、タンパク質の変性も同時に起こり、その場合には変性に伴うエンタルピー変化も測定にかかってくる。図2.2 bは50Cおよび59CにおけるエンタルピーレベルのpH依存性で、いわゆる isothermal calorimetry による酸変性熱の測定にあたる。この場合には、 $\text{pH} 4.8$ が基準になっており、点線で示した25Cのデータ(図2.2 aの単位を圧縮して描いたもので、符号が逆であることに注意)との比較から明

らかなように、 $\text{pH} 4$ 以下のところでタンパク質の変性による大きな吸熱変化が観測されている。本論からはずれるが、このような方法で精密に変性のエンタルピーを評価することは一般に行われており、リゾチームの場合にも、この方法で得た値を5節で述べる計算値の妥当性をチェックするためのひとつの材料として用いている。

3.2 $G^{\circ,N}(\text{pH})$ の決定

(2.7)式に含まれる $S^{\circ,N}(T_{\text{pH}})$ は(2.4)式により、前節の $H^{\circ,N}(\text{pH})$ とともに $G^{\circ,N}(\text{pH})$ と組み合わせで求められることを先に述べた。ここではプロトンの解離平衡による項 $G^{\circ,N}(\text{pH})$ を電位差滴定により直接決定する手続きを説明する。

タンパク質のようにプロトンの解離平衡が多段階含まれる系では、ギブズエネルギー関数を次のように書くことができる。

$$\begin{aligned} G(\alpha) &= \text{const} + \int_{\alpha_0}^{\alpha} \mu(\alpha) d\alpha \\ &= G(\alpha_0) - 2.303 RT \int_{\alpha_0}^{\alpha} \text{pH}(\alpha) d\alpha \quad (2.12) \end{aligned}$$

ここで、 α は解離度(degree of ionization)である。

電位差滴定の方法はタンパク質の溶液に酸もしくはアルカリを滴下し、そのときのpH変化と酸(アルカリ)の滴下量を解析して、任意のpHにおいたとき、系が吸収もしくは放出したプロトンの数 ν を求める。典型的な電位差滴定曲線の例を図2.3に示してある。

実験的にはこのように解離度 α でなく、プロトン数 ν

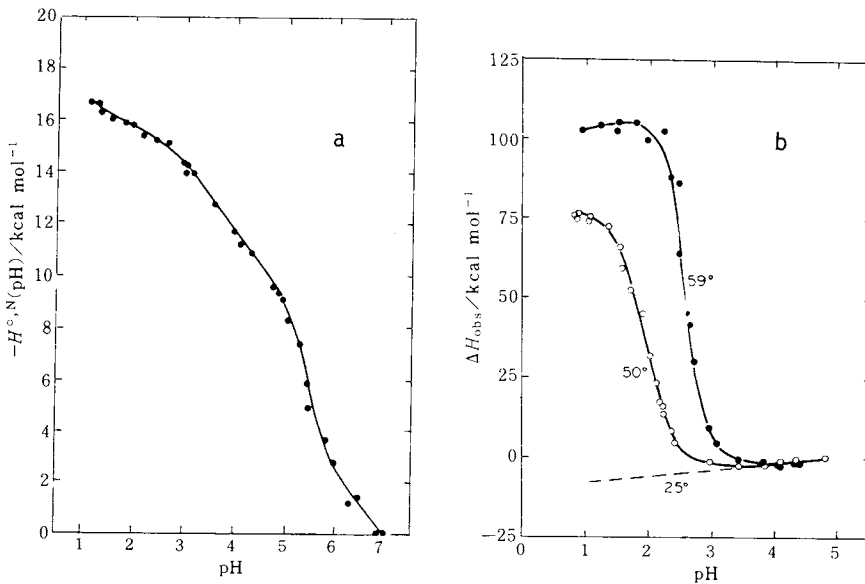


図2.2 リゾチームの酸によるエンタルピー滴定曲線
a) 25C, b) 50Cおよび59C

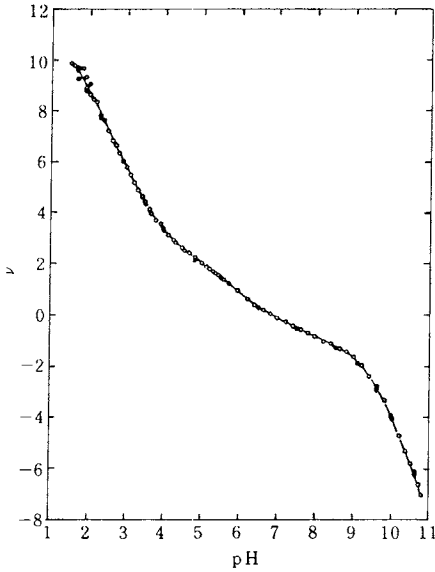


図 2.3 リゾチームの電位差滴定曲線

が求められることになるので(2.12)式の α の代わりに ν を用いて書き直した式

$$G^{\circ,N}(\nu) = -2.303RT \int_{\nu_0}^{\nu} \text{pH}(\nu) d\nu \quad (2.13)$$

を用いる。ここで、標準状態(25°C, pH 7.0)では $\nu_0 = 0$ であるから、積分定数値は $G^{\circ,N}(\nu_0) = 0$ となる。

$G^{\circ,N}(\nu)$ の $G^{\circ,N}(\text{pH})$ への読み代えは滴定曲線(図2.3)から容易に行うことができる。

4. 変性剤を含む場合

変性剤を用いた変性の系で、変性の熱力学量を評価する場合には、タンパク質と変性剤の相互作用にもとづくものを正しく補正しなければならない。塩酸グアニジンを変性剤とするリゾチーム変性を例に、isothermal calorimetry により変性のエンタルピーを導く方法²⁾を述べる。

一般にこの方法では、変性剤濃度を種々変えたときの反応熱を測り、一種の熱滴定曲線を描く。図2.4は各種pH、温度で得られたリゾチームの塩酸グアニジンによる変性の系の熱滴定曲線である。いずれの条件においても、曲線は三つの部分—二つの直線部分とそれにはさまれたシグモイド曲線部分—から成っている。1~4 mol dm⁻³の間の急激な吸熱反応はタンパク質の構造転移(変性)であり、変性が協同的に進行することがわかる。その前後では、タンパク質はそれぞれ未変性および変性状態にあり、変性剤濃度の増加にしたがって直線的に発熱量が増大している。この発熱現象は、塩酸グアニジン分子

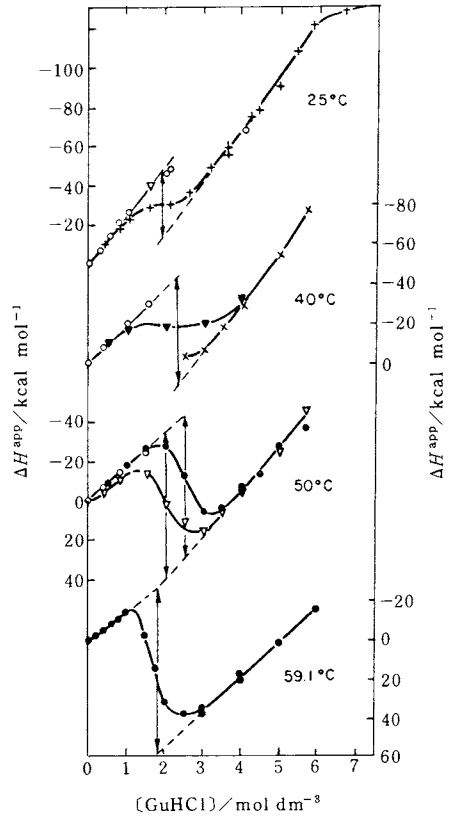


図 2.4 塩酸グアニジンによるリゾチームの変性

+ : pH 1.3, × : pH 2.1, ▼ : pH 2.5, ▽ : pH 3.0, ○ : pH 3.5, ● : pH 4.5,

がタンパク質に結合することにもとづく。これら直線部分を転移中点へ外挿することにより、みかけの変性のエンタルピー変化 ΔH_d^{app} が求められる(図中矢印で示す)。この値には、真の変性エンタルピー ΔH_d のほかに、構造変化によって新たに溶媒と接触ようになった部分への変性剤分子の結合による熱量 ΔH_{pref} も含まれている。すなわち、

$$\Delta H_d^{app} = \Delta H_d + \Delta H_{pref} \quad (2.14)$$

真の変性エンタルピーは、グラフ的には、変性状態部分の直線(曲線)を変性剤濃度=0へ外挿した値で与えられる。しかし、この方法では大きな誤差を生じる場合が多いため、次のような計算式で ΔH_{pref} を算出して補正が施される。

未変性、変性各タンパク質への変性剤の選択的結合のエンタルピー変化は、図2.4におけるそれぞれに対応した直線部分の勾配で与えられる。それらを $(\partial \Delta H / \partial C)_T^N$ 、 $(\partial H / \partial C)_T^D$ とおき、転移中点の変性剤濃度を $C_{0.5}$ とすると ΔH_{pref} は次式のようにになる。

$$\begin{aligned} \Delta H_{\text{pref}} &= \left(\frac{\partial H}{\partial C}\right)_T^D C_{0b} - \left(\frac{\partial H}{\partial C}\right)_T^N C_{0s} \\ &= \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial C}\right)_T^N \frac{C_{0b} \Delta n}{a_D - \Delta n} \end{aligned} \quad (2.15)$$

ここで、 a_D は変性状態におけるタンパク質1モル当りの変性剤結合サイト数、 Δn は変性-未変性状態間の結合サイト数の差を表わす。また、結合サイトはすべて等価で、同じ結合熱であると仮定している。

リゾチームの例では、図2.4に示した各種条件下における結果から、 $\Delta n = 21.5$ 、 $a_D = 67$ を用いて ΔH_{pref} を求め、 ΔH_d が得られた($T = 25 \sim 59.1^\circ\text{C}$ で $\Delta H_d = 54 \sim 106 \text{ kcal mol}^{-1}$)。さらに、 ΔH_d の温度依存性(1.2.2.4)から、変性に伴う熱容量変化が $\Delta(C_p)_d = 1.5 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と評価された。

変性剤を用いた変性の熱力学量はscanning calorimetryにより求めることもできる³⁾。それについては省略するが、各種塩酸グアニジン濃度での転移温度における変性のエンタルピー変化 ΔH_d およびその温度依存性から導かれた変性に伴う熱容量変化 $\Delta(C_p)_d$ が、上記の isothermal calorimetry により得られたものとよく一致することが示されている。

なお、一般に熱的に誘起されるタンパク質の変性は、塩酸グアニジンのような強力な変性剤による変性とは異なり、完全なランダム状態への構造変化をしていないと言われてきたが、リゾチームにおいては、上述の ΔH_d 、 $\Delta(C_p)_d$ の値が、変性剤を含まない場合の熱変性の ΔH_d 、 $\Delta(C_p)_d$ (2のcおよびd参照)とほぼ等しくなることから、両変性状態には熱力学的に区別できるほどの差がないとの結論がなされている。

5. リゾチームの熱力学的性質

これまで isothermal calorimetry, scanning calorimetry および電位差滴定の三種の方法により、実験的に得られたデータをもとに、任意の条件における熱力学関数が導かれることを述べてきたが、次に実際の系として、Privalovらにより計算されたリゾチームの熱力学的性質³⁾を紹介する。

簡単のために変数としてpHおよび温度だけを採用し、変性剤やそのほかの環境因子は除外してある。未変性状態(N)および変性状態(D)の熱力学関数を(2.2)式~(2.8)式により計算した結果が図2.5~図2.8である。pHおよび温度を横軸にとり、熱力学量を三次元的に図示したもので、これらの熱力学マップからリゾチームの熱力学的性質を容易に理解することができる。ここではpH 1.5~7.0、温度0~100℃の範囲で、標準状態として $T^\circ = 25^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}^\circ = 7.0$ における熱力学レベルをそれぞれ

$H^{\circ,N} = 0$ 、 $S^{\circ,N} = 0$ 、 $G^{\circ,N} = 0$ として示されている。

図2.5はエンタルピー、図2.6はエントロピーで、未変性状態(N)、変性状態(D)のものを重ねて描いてある。両図ともマップの上面が変性状態(D)である。ここで特徴的な点は、エンタルピーおよびエントロピーがともに大きな温度依存性を示すのに対し、pH依存性が余り顕著でないということである。変性のエンタルピー

$$\Delta H_d(T, \text{pH}) = H^D(T, \text{pH}) - H^N(T, \text{pH}) \quad (2.16)$$

はpHには無関係でほぼ温度とともに直線的に変化する。

H° 、 S° をもとに得られたギブズエネルギー関数は、図2.7($G^{\circ,N}$)、図2.8($G^{\circ,D}$)に示すように、当然のことながらエンタルピー、エントロピーとは異った断面をもっている。たとえば、一定のpHにおける温度依存性をみると、20~25℃に極大値のある放物線状になる。ここで $G^{\circ,N}$ と $G^{\circ,D}$ を比較してみると、いずれも断面としては非常によく似た性質をもっているが、D状態の方がギブズエネルギーの最大値が大きく、またpHおよび温度

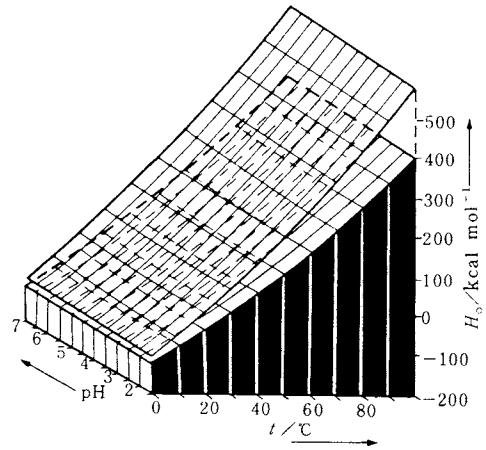


図2.5 未変性および変性リゾチームのエンタルピー

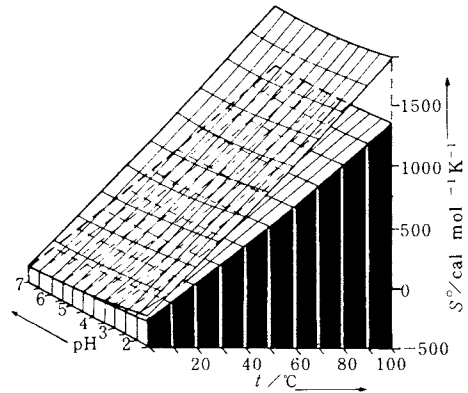


図2.6 未変性および変性リゾチームのエントロピー

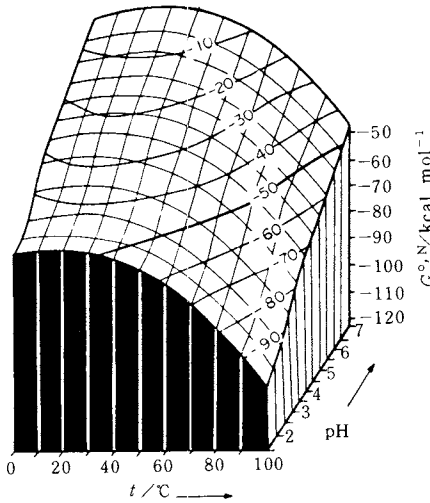


図 2.7 未変性リゾチームのギブズエネルギー

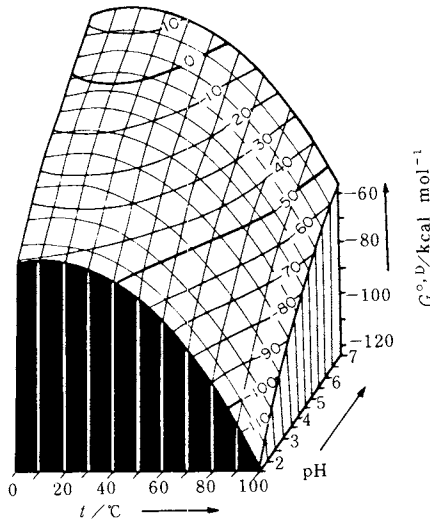


図 2.8 変性リゾチームのギブズエネルギー

に対する依存性が大きい(放物線の角度が急)ことがわかる。これを両者の差として、変性に伴うギブズエネルギー変化 $\Delta G_d(T, \text{pH})$ で表示すると、図 2.9 のようになる。 $\Delta G_d = 0$ のレベルを境にして、それより上の部分が N 状態が熱力学的に優位に存在する条件である。図から明らかのように pH 1.5 という低い pH でも 50℃ まで変性せず安定に存在するが、これがリゾチームの熱力学的特性をよくあらわしている。表示された範囲でもっとも安定なのは pH 4.5~7.0、 $T = 0^\circ\text{C}$ で、変性のギブズエネルギー変化は $\Delta G_d = 16 \text{ kcal mol}^{-1}$ になる。

25℃、pH 7.0 における ΔG_d は $14.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ となるが、この値は塩酸グアニジンによる変性で求められてい

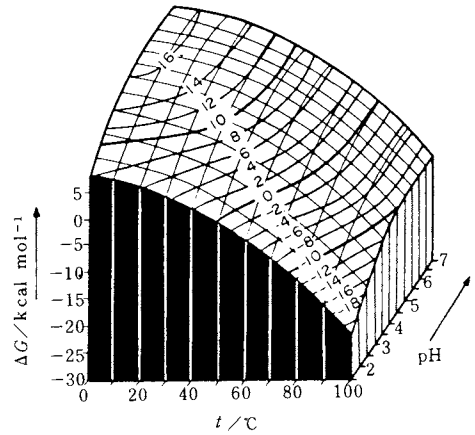


図 2.9 リゾチームの変性のギブズエネルギー変化

る結果 $\Delta G_d = 14.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ とよく一致している。このことから、Privalov らは 4 節で述べたと同様、変性剤による変性も、熱的に誘起された変性も、熱力学的に区別しうるほどの大きな差はない状態にあるものと推論している。

Privalov らはこのほか、チトクローム C、ミオグロビン、リボヌクレアーゼ、キモトリプシンなどについて、このギブズエネルギー関数の計算を行っている⁴⁾。

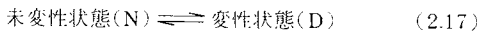
6. この方法論のもつ意義

タンパク質の変性エンタルピーの評価は、これまでも isothermal calorimetry あるいは scanning calorimetry により、個別に行われてきた。けれども、対象が酸あるいは変性剤による変性にしろ、熱的に誘起される変性にしろ、タンパク質分子の局所的な状態変化ではなく、分子全体にわたる大きな変化であり、得られたデータ(変性のエンタルピー変化 ΔH_d)を分子内のミクロな状態に帰属させることがほとんど不可能なため、設定された条件での未変性状態-変性状態間のエンタルピー差のみを提示するにとどまっていた。さらに、分子論的に正体不明ともいえる無秩序な状態を作りだして、それとエンタルピーレベルを比較することがどれ程の意味をもつか、その実験方法自体の有意さを疑問とする立場の批判さえもあった。

このように、熱測定が熱力学量を導くための直接測定手段として位置づけられながら、その機能を十分に果たしていない状況の中で、熱力学関数を導く方法論が体系化された意義は大変大きい。またこの方法は単に理論的に整理したというのではなく、最新の熱測定技術によって得られた実験結果をもとに、実際の系での熱力学量を計算によって求めていることにも注目しなければならない。

前節で示したリゾチームについての計算結果は、これまで経験的に知られているこのタンパク質のもつ特徴をよくあらわしている。さらに計算の手続きの妥当性をチェックするため、いくつかの方法が採られている。たとえば、図 2.9 に示すギブズエネルギー変化は、上に述べた方法とは別個に、変性平衡の pH 依存性を調べることにより導くことができ、そうして得たものが(2.2)式～(2.8)式による計算結果とよく一致することが示されている。また、ある状態から別の状態に到達するのに二つの異った経路を考え、それぞれの経路に沿って求められた熱力学量が、経路の如何を問わず同一であることも示された。

いまひとつ特筆すべきことは、実際の計算にあたって、仮定が何一つ設けられていない点である。タンパク質変性の熱力学量を間接的に評価する場合、



という非常に単純化した二状態間の転移が一般に解析の基本となっているが、このような中間的な状態を考えない二状態転移の仮定は、熱力学量を導く上で危険を伴うことがしばしば指摘されているものである⁹⁾。また変性のギブズエネルギー変化を導く目的で、電位差滴定の結果に Linderstrøm-Lang の式を用いる場合があるが、同式がタンパク質のような複雑な構造のものに適用するには、余りにも単純化されすぎているという批判があ

る。

このような中で Privalov らにより示された方法は、実験的に得られる実測値のみにもとづくものであり、結果に対する信頼性が高いだけでなく、二状態転移など、従来の方法において設定された仮定をチェックする手段にもなる。

さらに、熱力学マップが任意の条件で連続的に得られることから、変性過程の中間的な状態を定量的に把握し、それがきっかけとなってタンパク質分子の微視的な状態変化の模様をより詳細に理解する方向へ研究が展開することにつながるであろう。

タンパク質の変性に興味をもつ方々には是非とも理解しておいて頂きたい方法論である(つづく)。

文 献

- 1) W. Pfeil, P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 23 (1976)
- 2) W. Pfeil, P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 33 (1976)
- 3) W. Pfeil, P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 41 (1976)
- 4) P. L. Privalov, *Pure Appl. Chem.* **47**, 293 (1976)
- 5) 高橋克忠, 蛋白質核酸酵素, **20**, 1169 (1975)

本稿に含まれる図は全て文献 1) および 4) から転載したものである。また熱量の単位は原著通り cal 表示のまま、Joule 単位に換算せず、記載した。