

物理化学概論

熱力学的観点からの生体分子の相互作用

九州工業大学 竹中繁織

熱力学の法則

熱力学第0法則：

- ・系 A と B, B と C がそれぞれ熱平衡ならば、A と C も熱平衡にある。

熱力学第1法則(エネルギー保存則)：

系(閉鎖系)の内部エネルギー U の変化 dU は、外界から系に入った熱 δQ と外界から系に対して行われた仕事 δW の和に等しい。

熱力学第2法則：

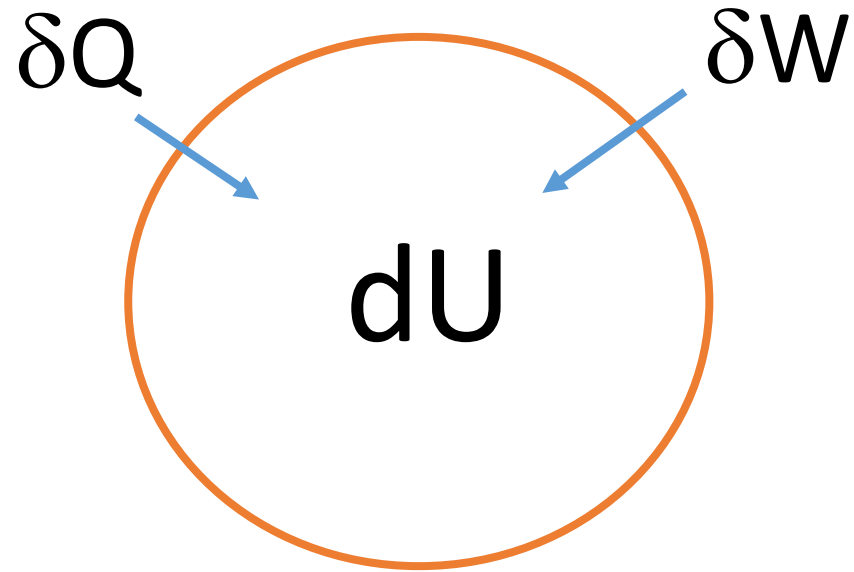
- ・永久機関は実現不可能である(オストヴァルトの原理)。
- ・断熱系で不可逆変化が起こるとき、エントロピーは必ず増加する。可逆的な変化ではエントロピーの増加はゼロとなる(エントロピー増大の原理・クラウジウスの不等式)。

熱力学第3法則：

- ・絶対零度でエントロピーはゼロになる(ネルンスト・プランクの仮説)。

熱力学第1法則 (エネルギー保存則) ;

$$dU = \delta Q + \delta W$$

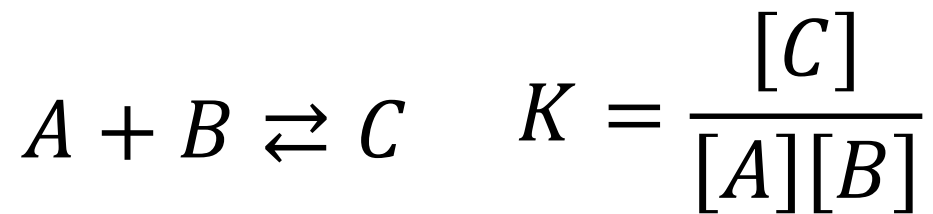


熱力学第2法則 ;

$$dS = dQ/T$$

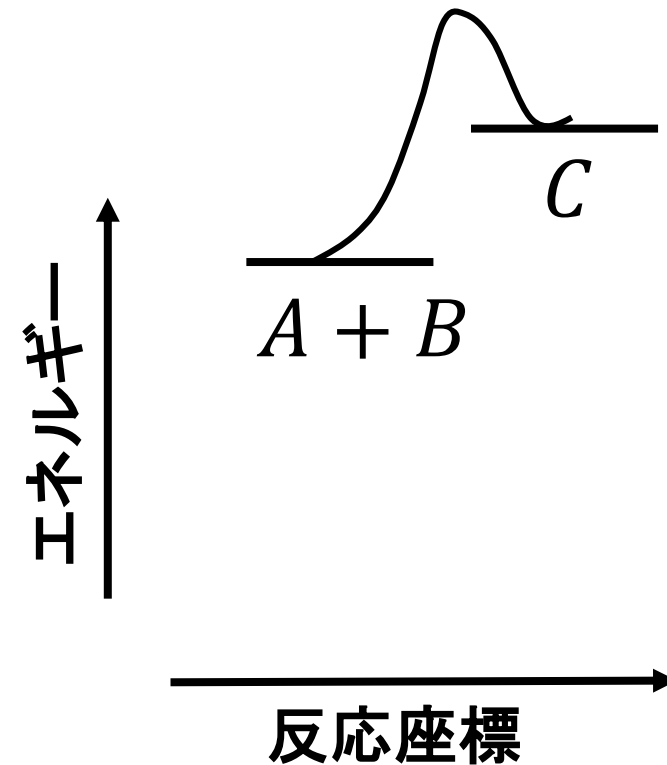
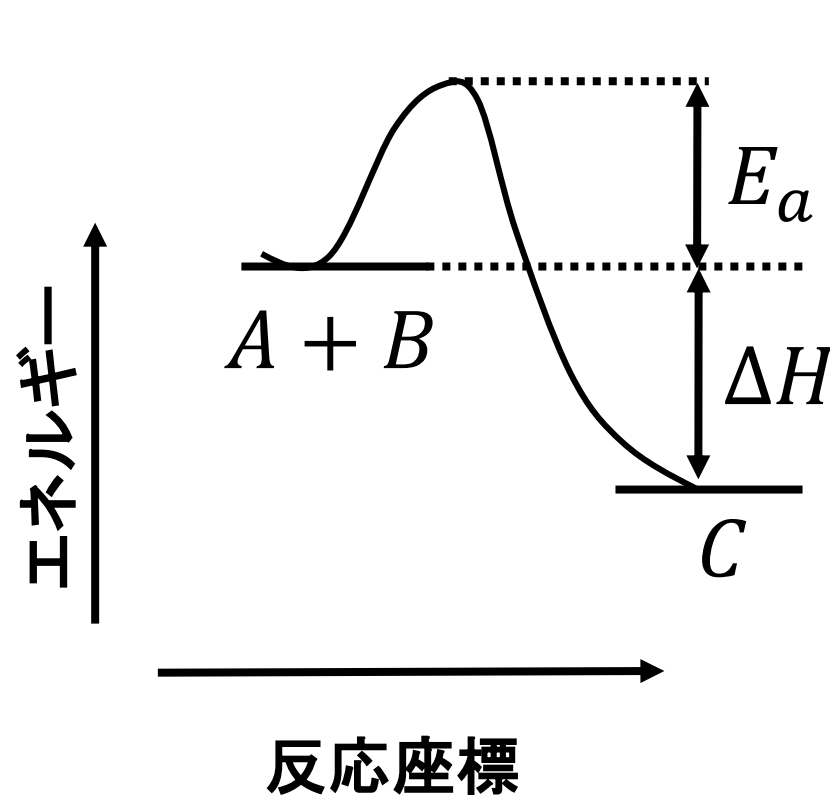
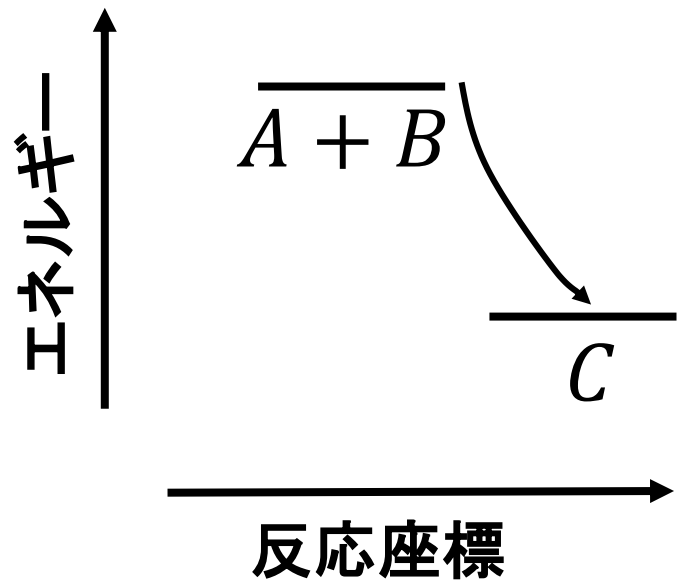
$$S = k \log w \quad (k: \text{ボルツマン定数})$$

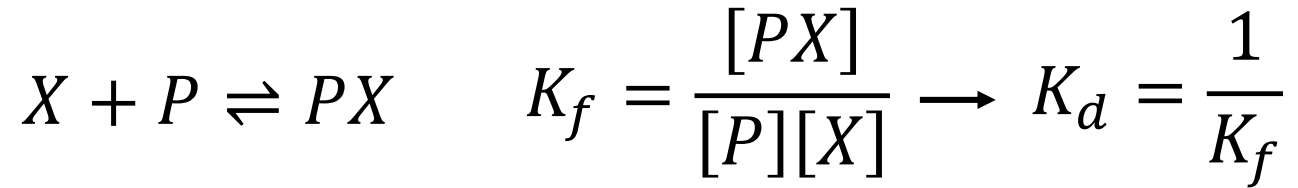
化学平衡



$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = -RT \ln K$$





$$\Delta G_f^{\circ} = -RT \ln K_f$$

$$= -5.708 \log K_f \text{ KJmol}^{-1} (25^{\circ}\text{C})$$

$$\log K_f = -\log K_d = pK_d$$

pK_d が1だけ異なると ΔG の違いは -5.7 KJmol^{-1}

溶液中での粒子の平均運動エネルギー $-\frac{3}{2}k_B T \approx 3.7 \text{ KJ (or } 0.89 \text{ kcal)} (25^{\circ}\text{C})$

$$K_f = 10 (\Delta G^{\circ} = -5.7 \text{ KJmol}^{-1} \text{ or } -1.36 \text{ Kcalmol}^{-1})$$

結合エネルギーは、分子の熱運動エネルギーをわずかに上回るだけ。→弱く結合

$$K_f = 10^4 (\Delta G^{\circ} = -22.8 \text{ KJmol}^{-1})$$

→38%が結合体

$$K_f = 10^7 (\Delta G^{\circ} = -40 \text{ KJmol}^{-1} \text{ or } -22.8 \text{ Kcalmol}^{-1})$$

→97%が結合体

NaClが水に溶ける際の熱力学

	$\Delta H/KJmol^{-1}$	$\Delta S/KJmol^{-1}$
$NaCl(s) \rightarrow Na^+(g) + Cl^-(g)$	+786.3	+0.227
$Na^+(g) + Cl^-(g) \rightarrow Na^+(aq) + Cl^-(aq)$	-782.0	-0.184
Total	+4.3	+0.043

溶解熱 $\Delta H = +786.3 - 782.0 = +4.3 KJmol^{-1}$ わずかに吸熱

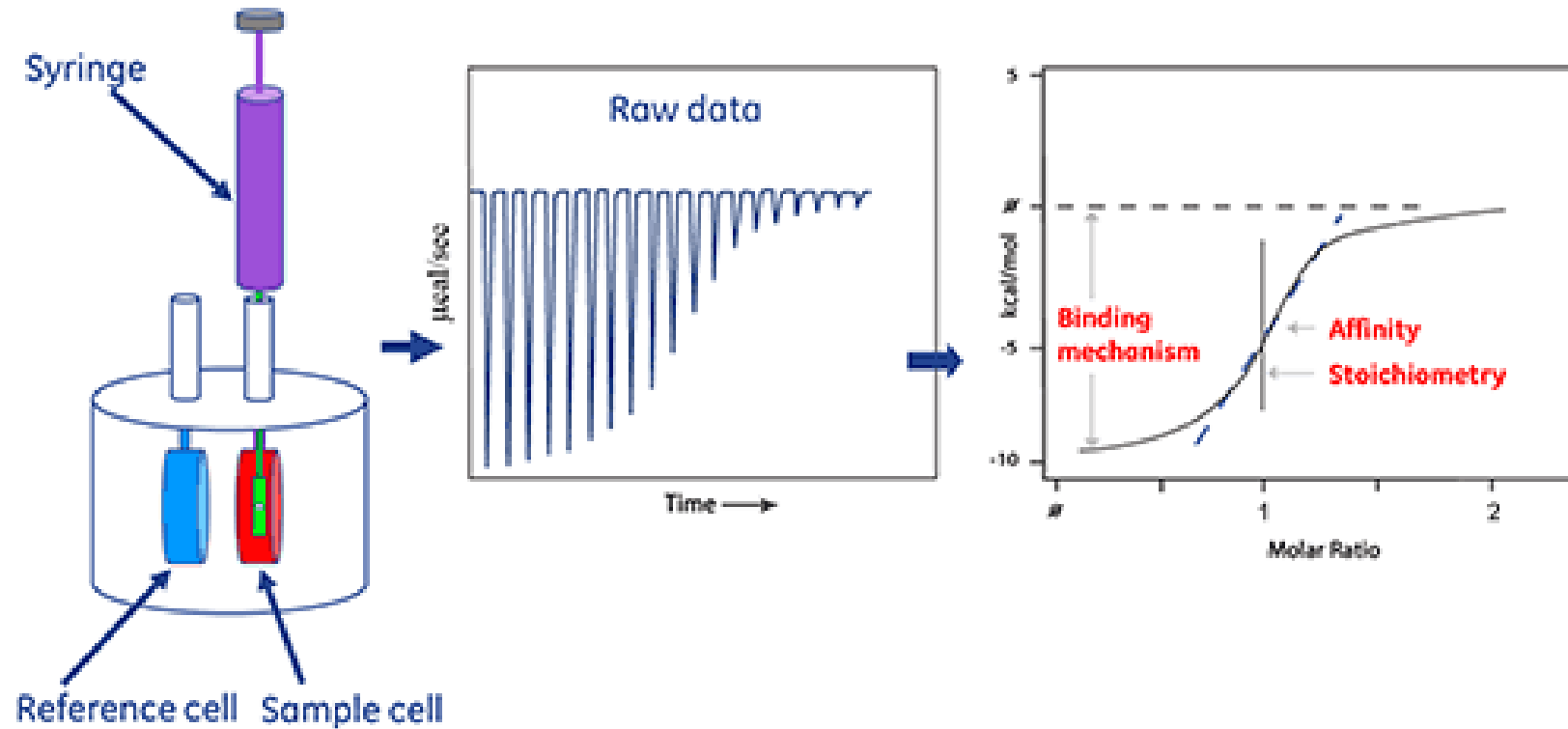
エントロピー変化 $\Delta S = +0.227 - 0.184 = +0.043 KJmol^{-1}$ エントロピー増大

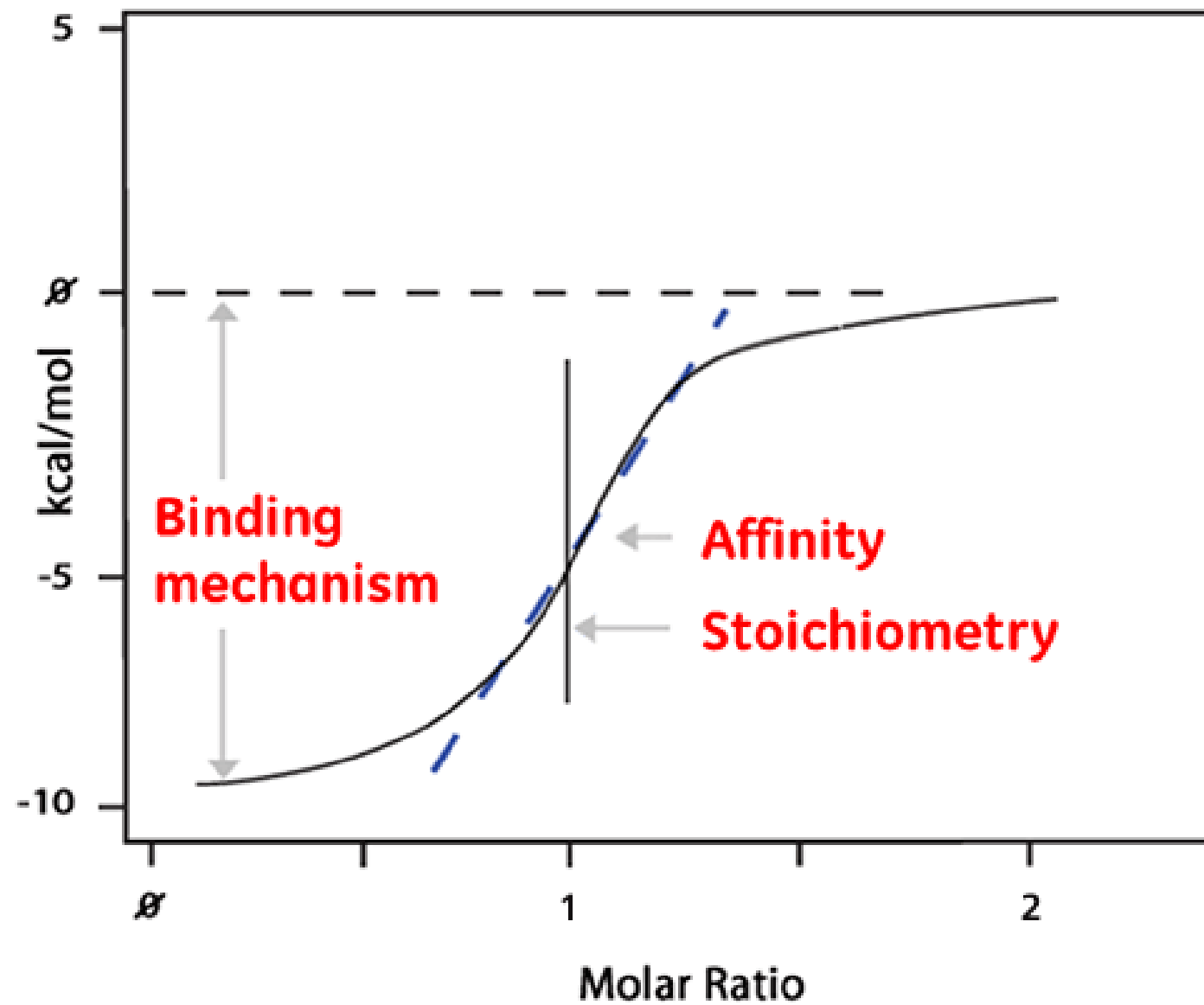
室温25°C (298 K)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = (+4.3) - (0.043 \times 295) = -8.5 KJmol^{-1}$$

$\Delta G < 0$ NaClが水に溶解するのはエントロピーの増大の効果

等温滴定型カロリメトリー (ITC)





3. 等温滴定型熱量測定

3-1. 測定原理

等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) は結合成分を標的分子に滴下した際に起こる化学反応もしくは結合反応を観測する熱力学的方法です。物質同士が結合するときには熱の発生もしくは吸収が起こるため、この熱量を測定することにより相互作用の結合定数(k_{ass})、反応の結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH)、およびエントロピー変化(ΔS)を精度良く得ることができます。他の手法と異なり、試料への化学修飾や物理的固定化等を必要とせず、自然状態に近い環境下で測定できます。また、1回の実験で分子間相互作用の完全な熱力学的プロファイルを把握できることも特長の一つといえます。

ITCの装置内部にはサンプルセルとリファレンスセルが備わっており、任意の一定温度に保たれたサンプルセル中の標的分子溶液に対して、滴定シリンジ中のリガンド溶液を数マイクロリットルずつ逐次滴定します。リガンドがサンプルセル内へ滴定されて両物質が相互作用すると、結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こります。リガンド滴定の進行に沿ってサンプルセル中の標的分子の結合サイトが飽和され、熱シグナルは減少して最終的にリガンドの希釈熱のみが観測されるようになります。Fig. 4にその模式図を示しました。

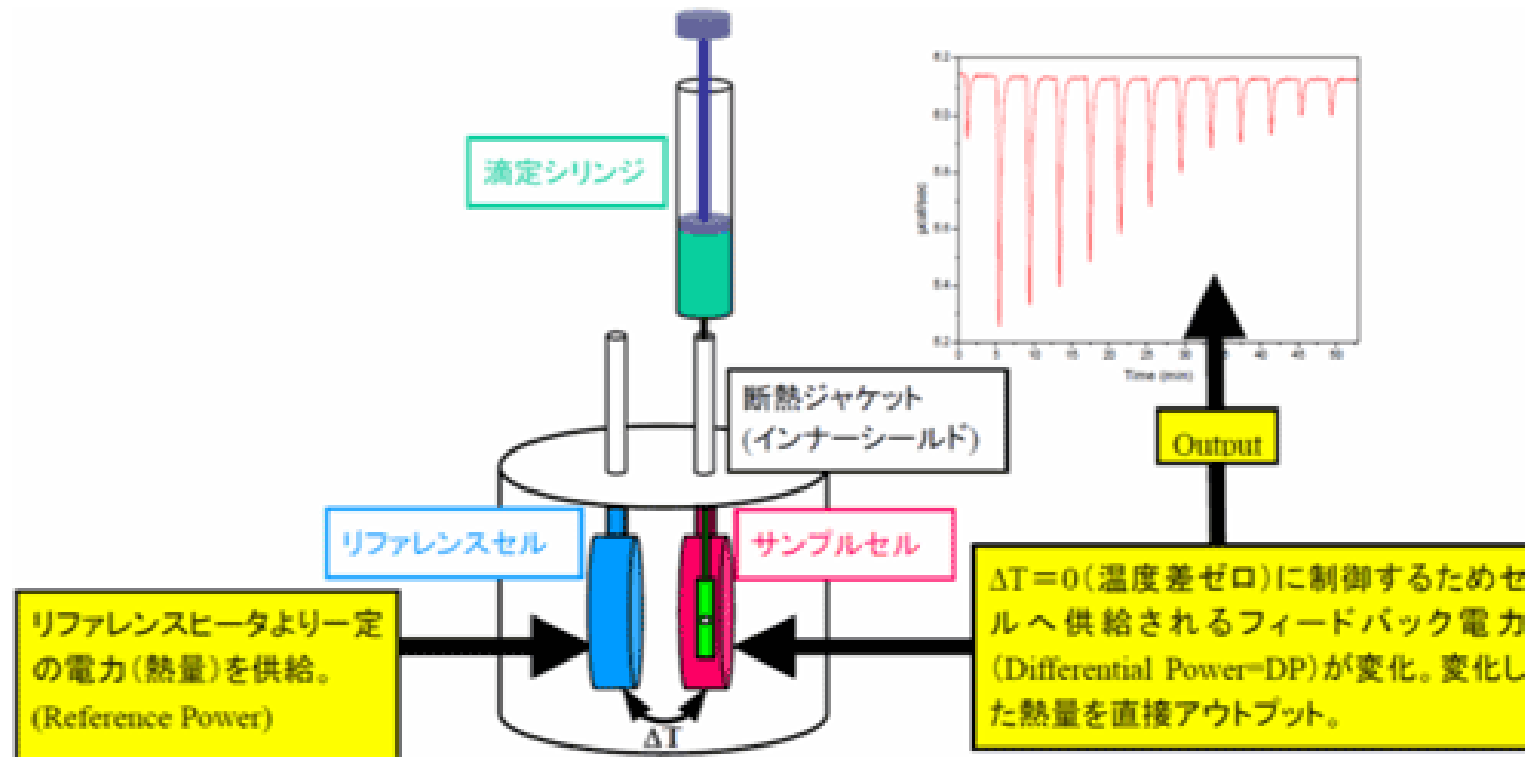
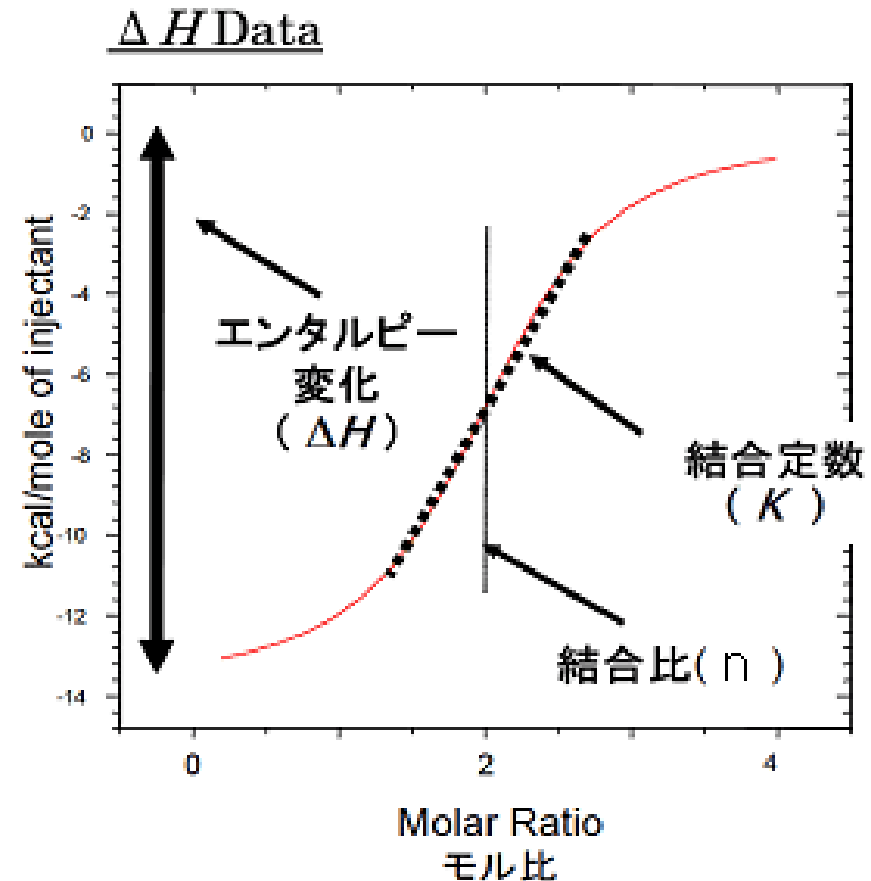
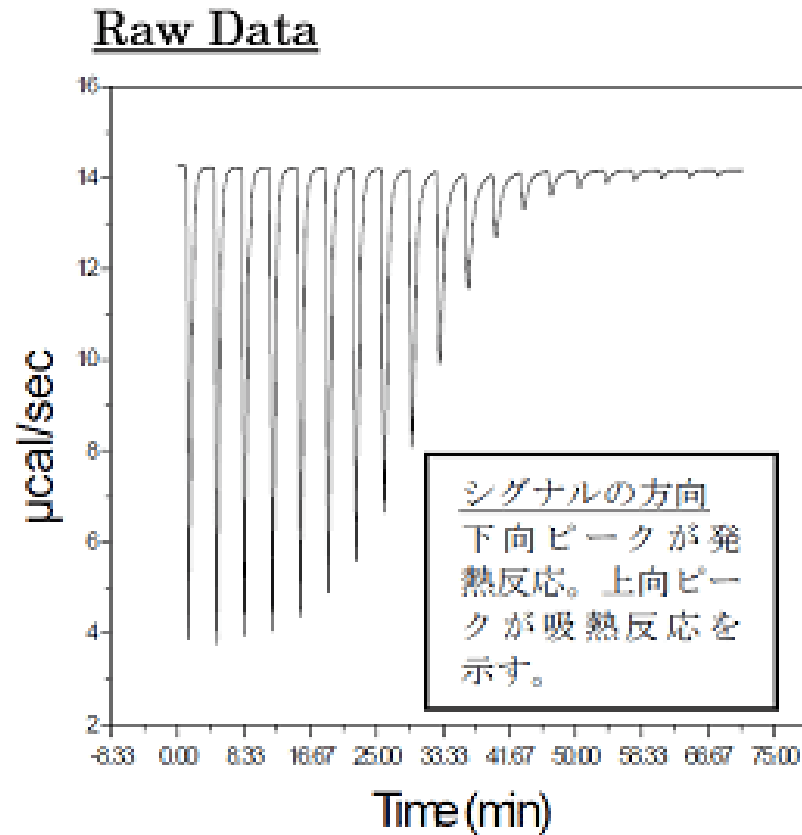


Fig. 5に典型的なITCデータと等温滴定曲線を示します。左図はリガンド溶液をサンプルセル中の標的分子溶液へ合計18回にわたって滴下したときのデータを示しており、各滴定ピークの面積はその滴定によって発生した熱量に等しくなります。また、各滴定の発生熱量をセル中におけるリガンドと標的分子のモル比に対してプロットすることにより右図のような相互作用の結合等温線が得られます。この例の場合、カーブフィッティングにはOne-Set-of-Sitesモデルを使用し、得られたベストフィットカーブを赤線で示してあります。各フィッティングパラメータから、結合定数、結合比、エンタルピー変化を求めることができます。



滴定のデータから結合定数Kを以下のように求めることができます。化学量論的に1：1の反応に対して、 $M+X=MX$ の結合平衡は次式で記述されます。

$$K = \frac{[MX]}{[X][M]} \quad (f16)$$

$$X_{tot} = [X]+[MX] \quad (f17)$$

$$M_{tot} = [MX]+[M] = [MX]+\frac{[MX]}{K[X]} \quad (f18)$$

ここでKは結合定数です。
MX濃度の変化は、熱変化として次式と関連付けられます。

$$dQ = d[MX]\Delta H^{\circ}V_0 \quad (f19)$$

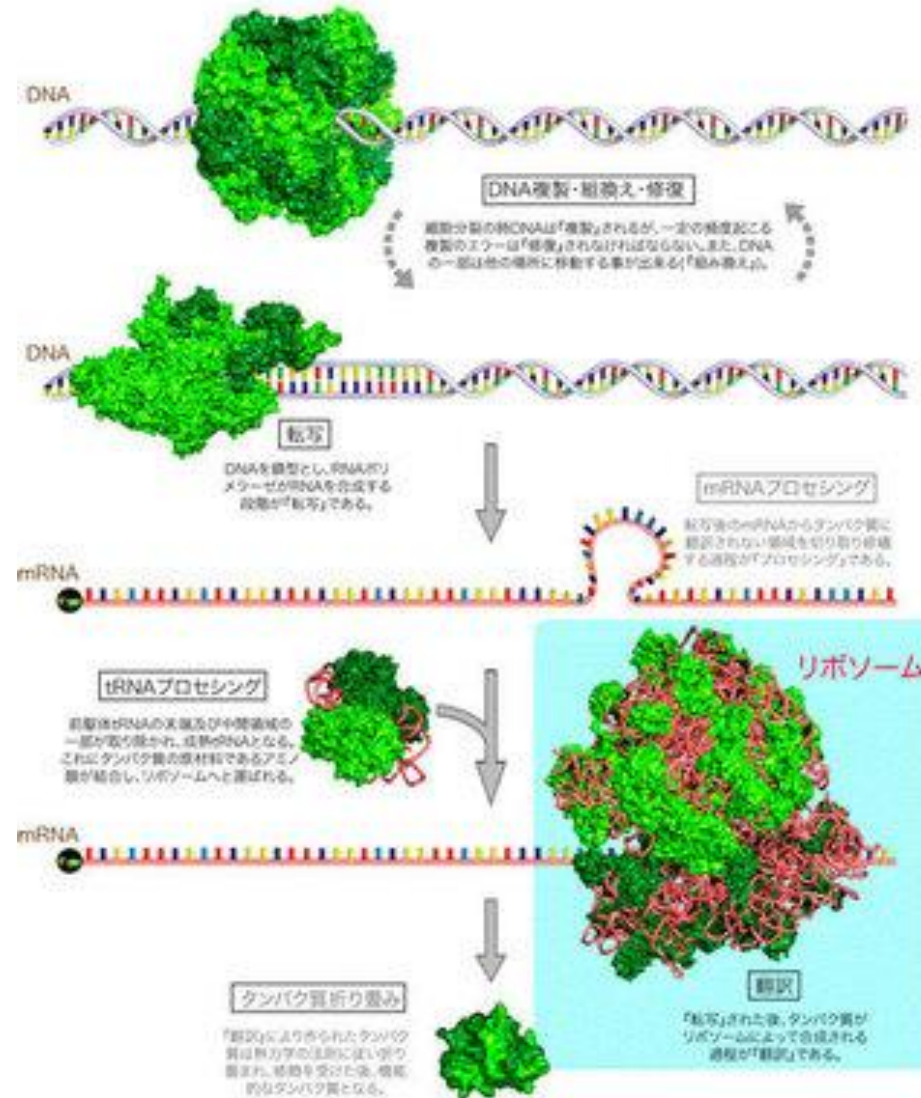
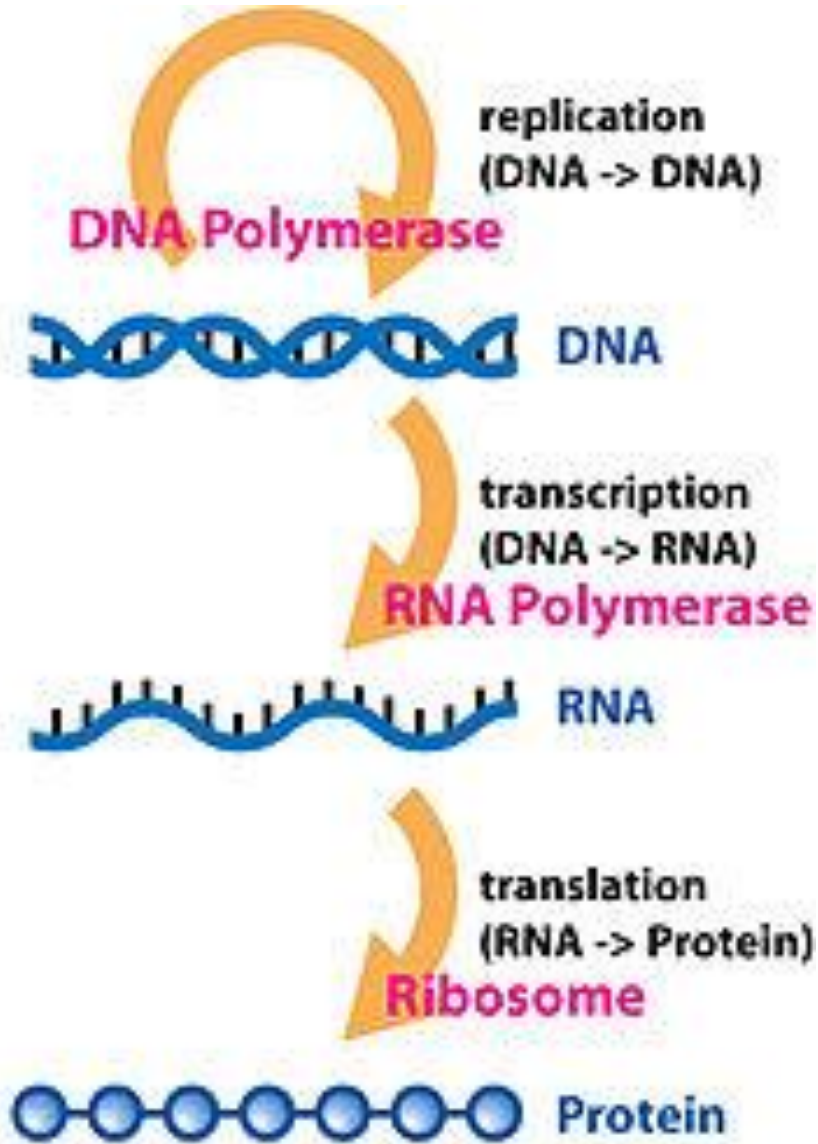
ここで ΔH° は結合のモルエンタルピー、 V_0 はセル容積、Qは吸収または発生した熱量です。
(f16)、(f17)、(f18)、(f19)式より次式が導かれます。

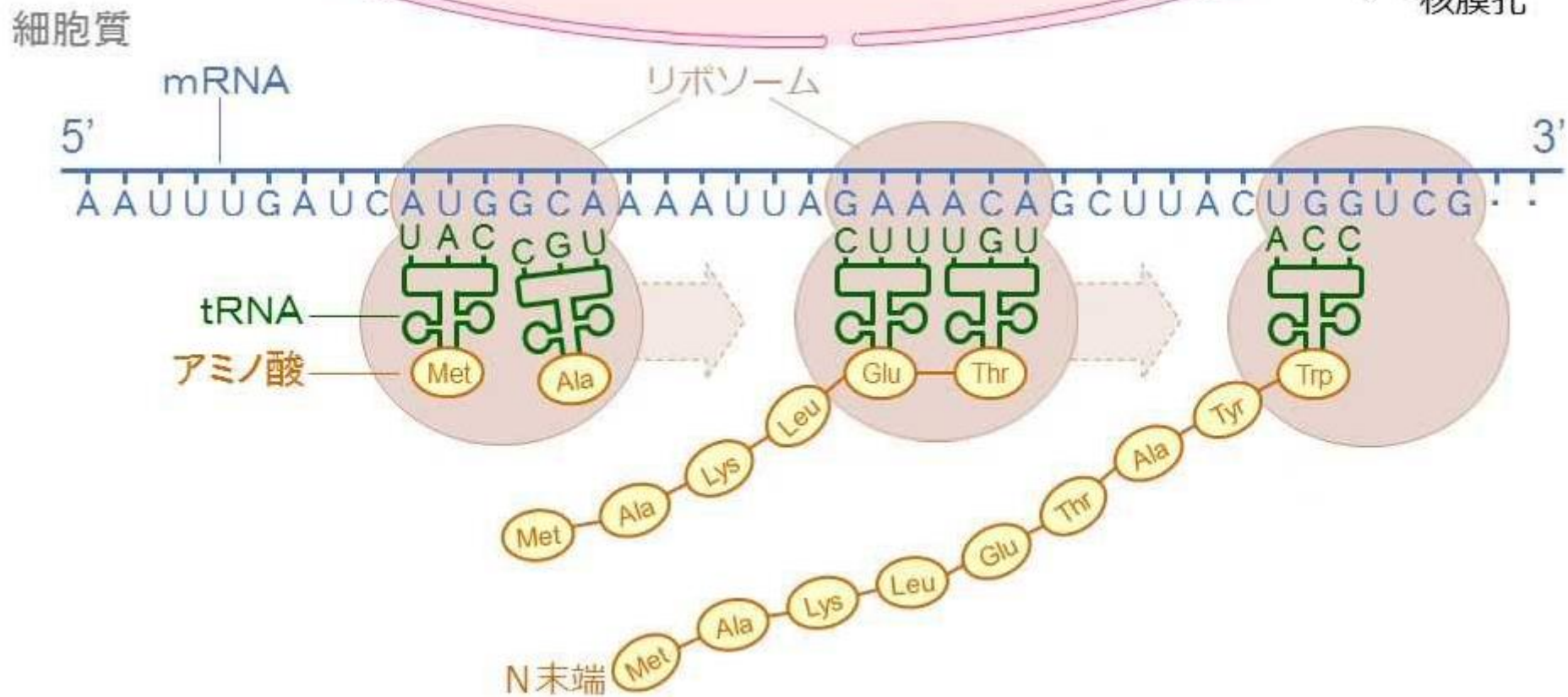
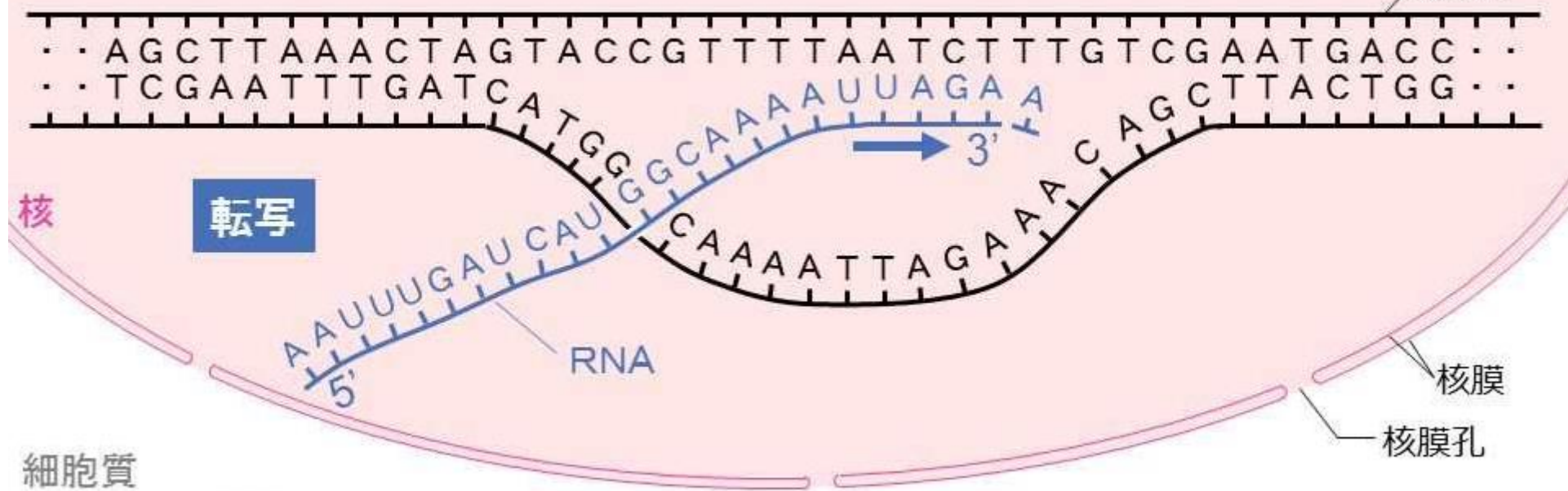
$$\frac{1}{V_0(dQ/dX_{tot})} = \Delta H^{\circ} \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - (1+r)/2 - X_r/2}{(X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \right) \quad (f20)$$

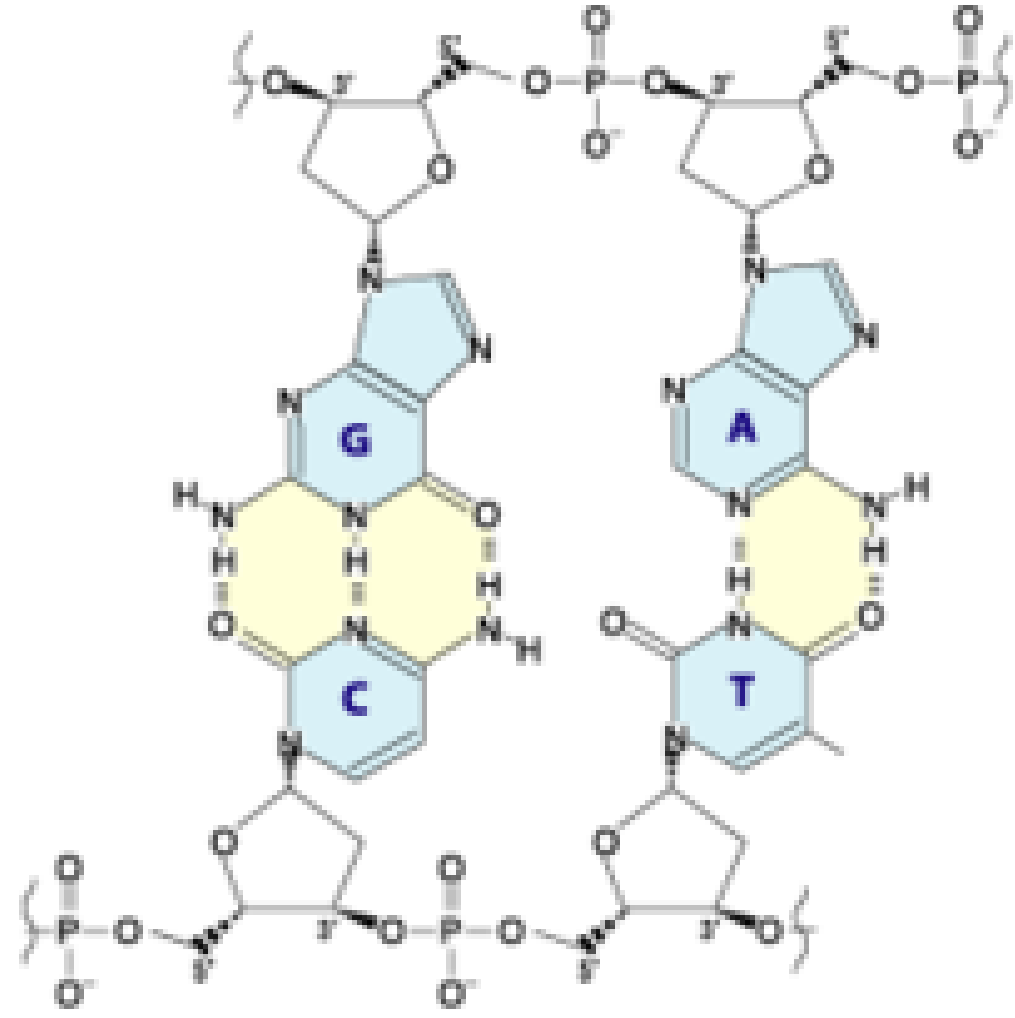
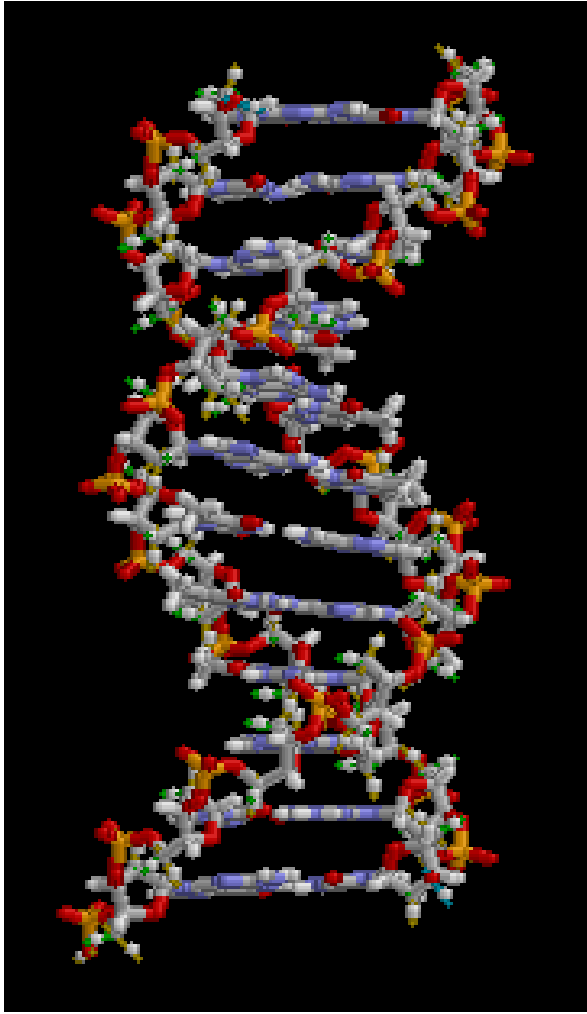
ここで、 $r=1/(K M_{tot})$ 、 $X_r=X_{tot}/M_{tot}$ です。
滴定型熱量測定装置で測定される実験的パラメータは示差熱 dQ/dX_{tot} (実際には $\Delta Q/X_{tot}$) です。 ΔH° は滴定曲線下の総面積から得られます。上記のようにして、測定値として ΔH° とKが求められるので、(f21)式よりギブスエネルギー ΔG° とエントロピー ΔS° が算出されることとなります。

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} = RT\ln K \quad (f21)$$

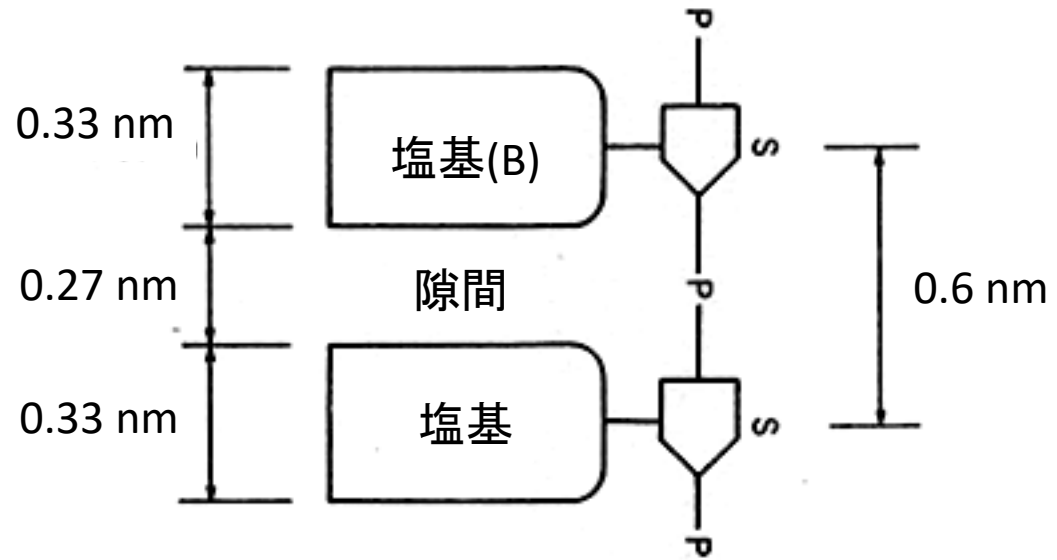
セントラルドグマ(central dogma)

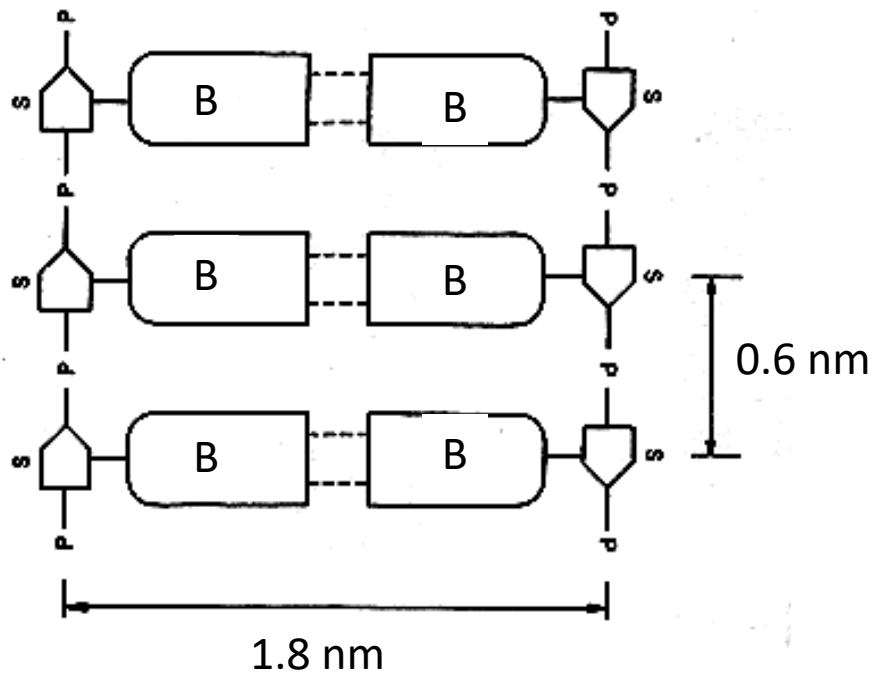




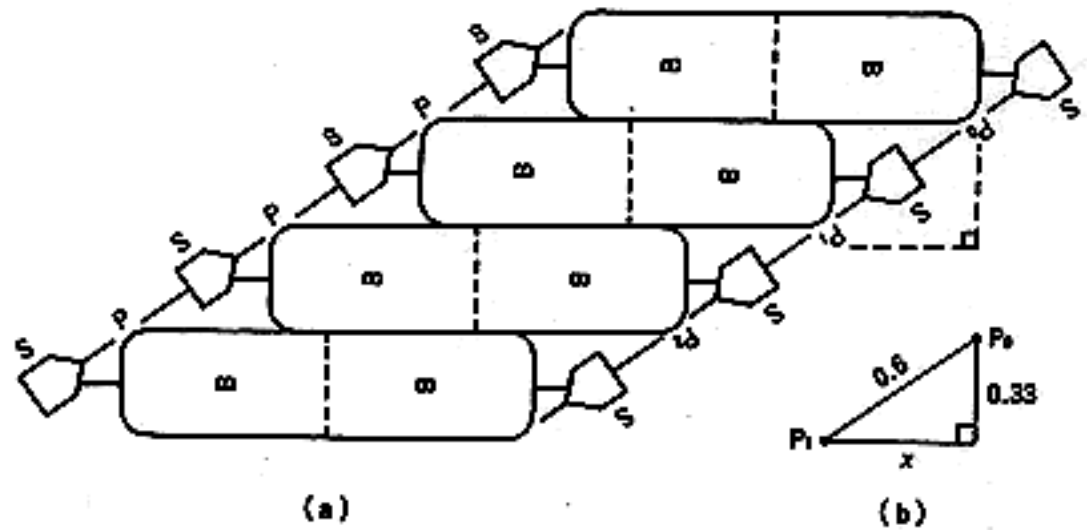


2つのヌクレオチドの大きさ

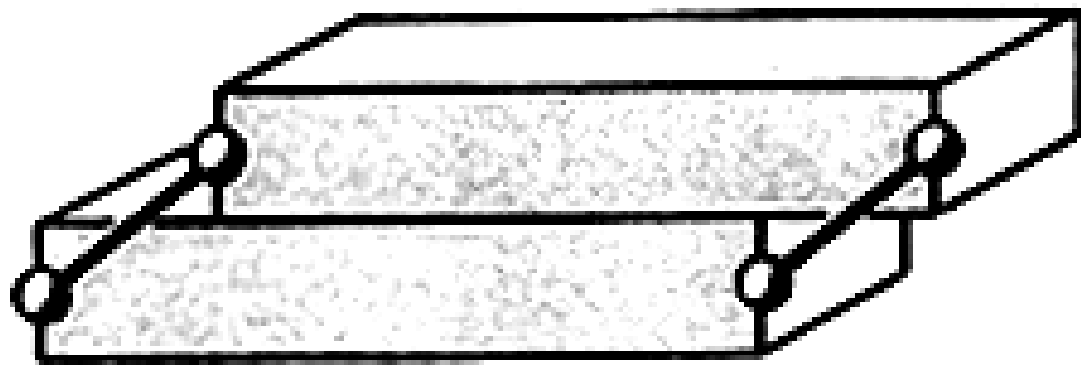




塩基が会合してできたDNAのはしご



(a)塩基対間の隙間をなくした傾いたはしご、
(b)aのはしごから直角三角形を抜き出す。

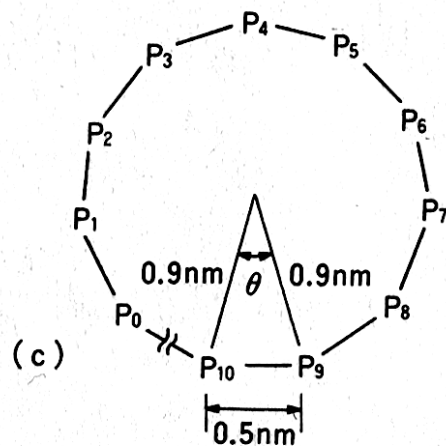
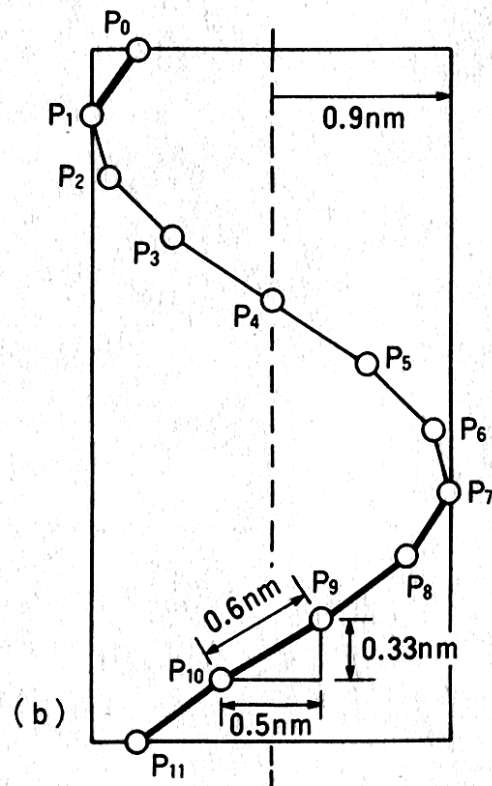
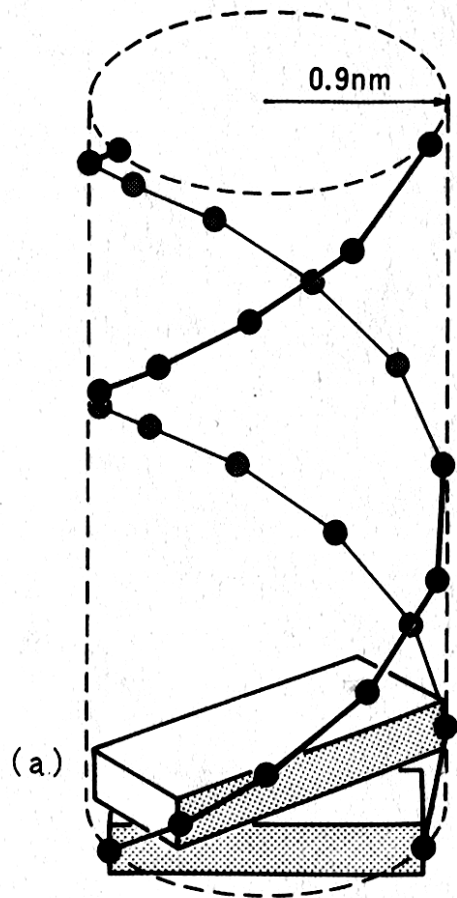


(a)



(b)

(a) 傾いたはしごと同じ塩基対の積み重ね、
(b) ねじれらせんの型に塩基対を積み重ねたもの。



円筒まわりに糖とリン酸の鎖がらせん状に巻き付いたところ。

- (a) 黒い点または灰色の点は糖を、点と点をつなぐ線はリン酸を示す。
 (b) 白い点はリン酸を、線は糖を示す。
 (c) 円筒を上から見下ろしたところ。

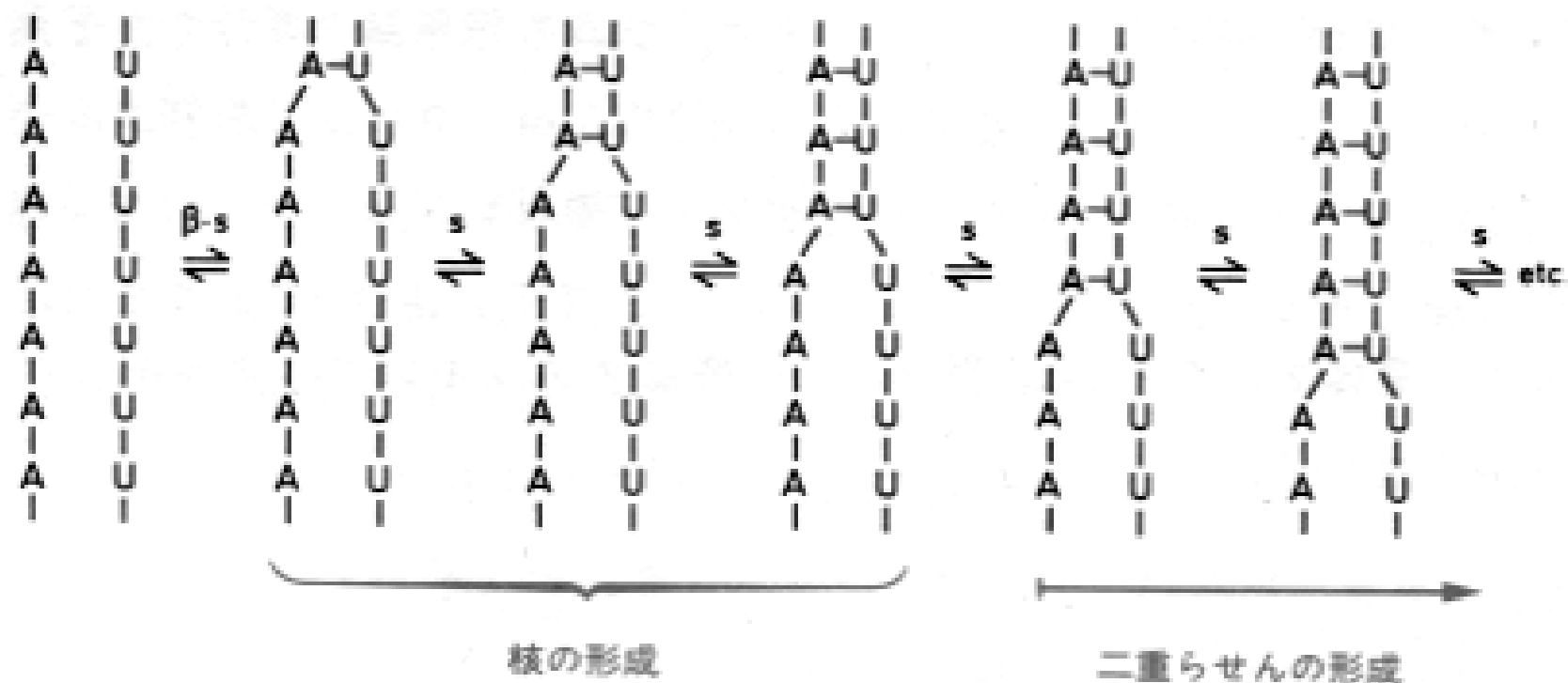
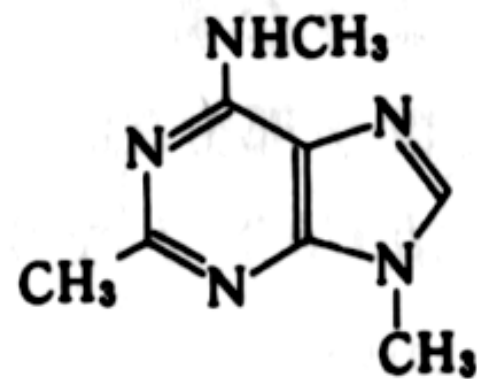
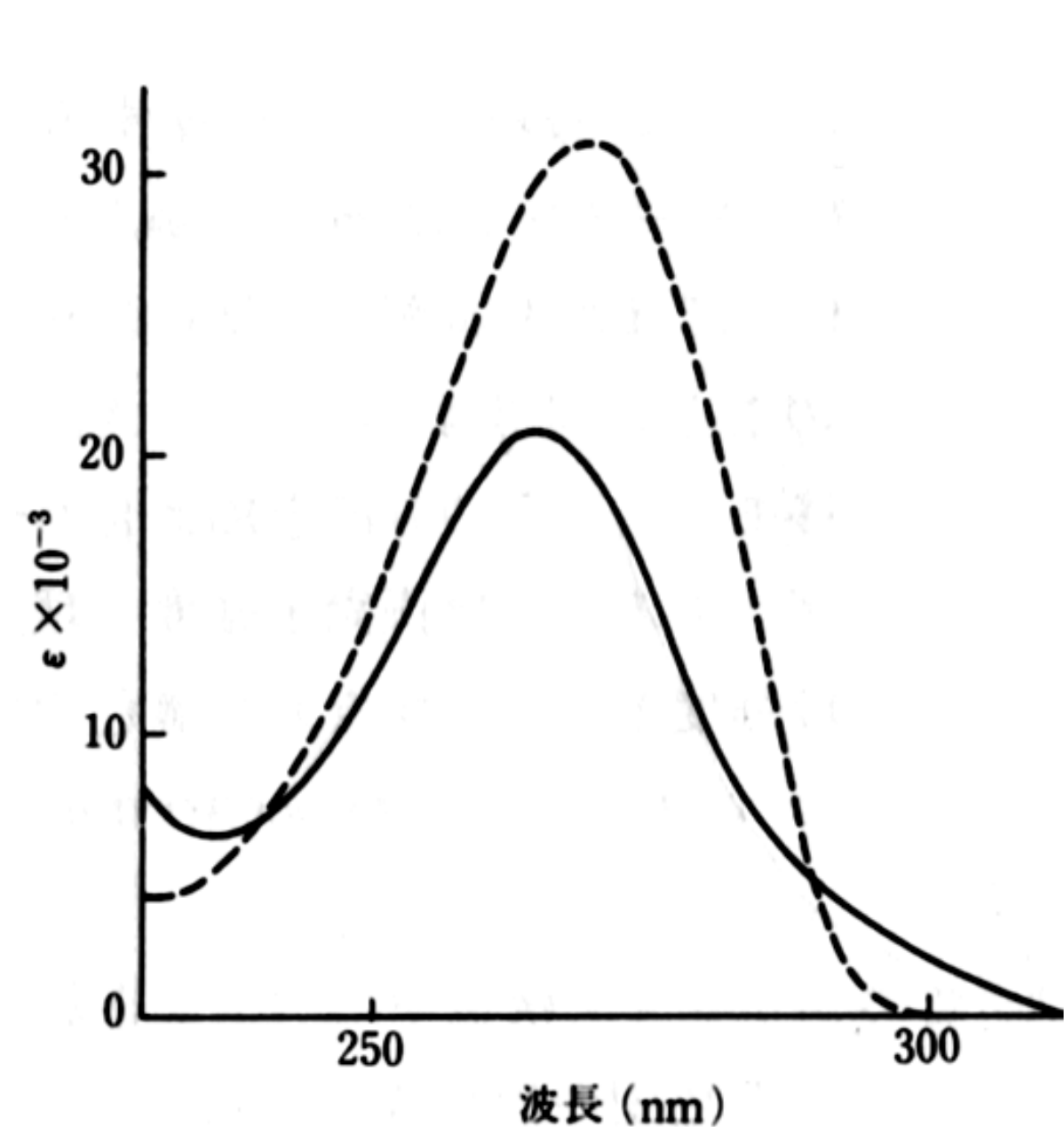
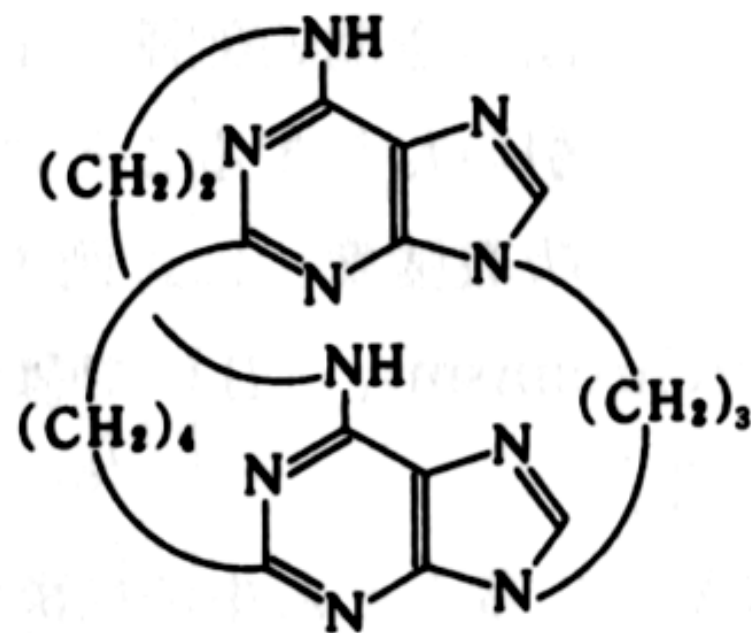


図6.11 oligo(A)・oligo(U)の場合の、二重らせん形成の図解。この系では、らせん成長パラメータ s は0℃で約10であり、融解温度で1である。核形成パラメータ β は 10^{-3} l/mole で、安定化定数 $K = \beta \cdot s$ で表される最初の塩基対形成を不安定にするが、それ以上の塩基のスタッキングには影響せず、スタッキングは協同的に $K = s$ で形成され、線形 Ising 模型にしたがう。塩基のスタッキングに対するインデスマックモデル (図6.9) では各段階は互いに独立しているのに対し、Ising 模型で記述される協同的過程では、塩基対の形成とスタッキングはごく最初の塩基-塩基会合の場合以外は、隣の塩基対の影響をうける。[544]より。



68a



68

図 3.46 **68** の淡色効果 (実線). 破線は **68a** (**68** の 2 倍量). エタノール中

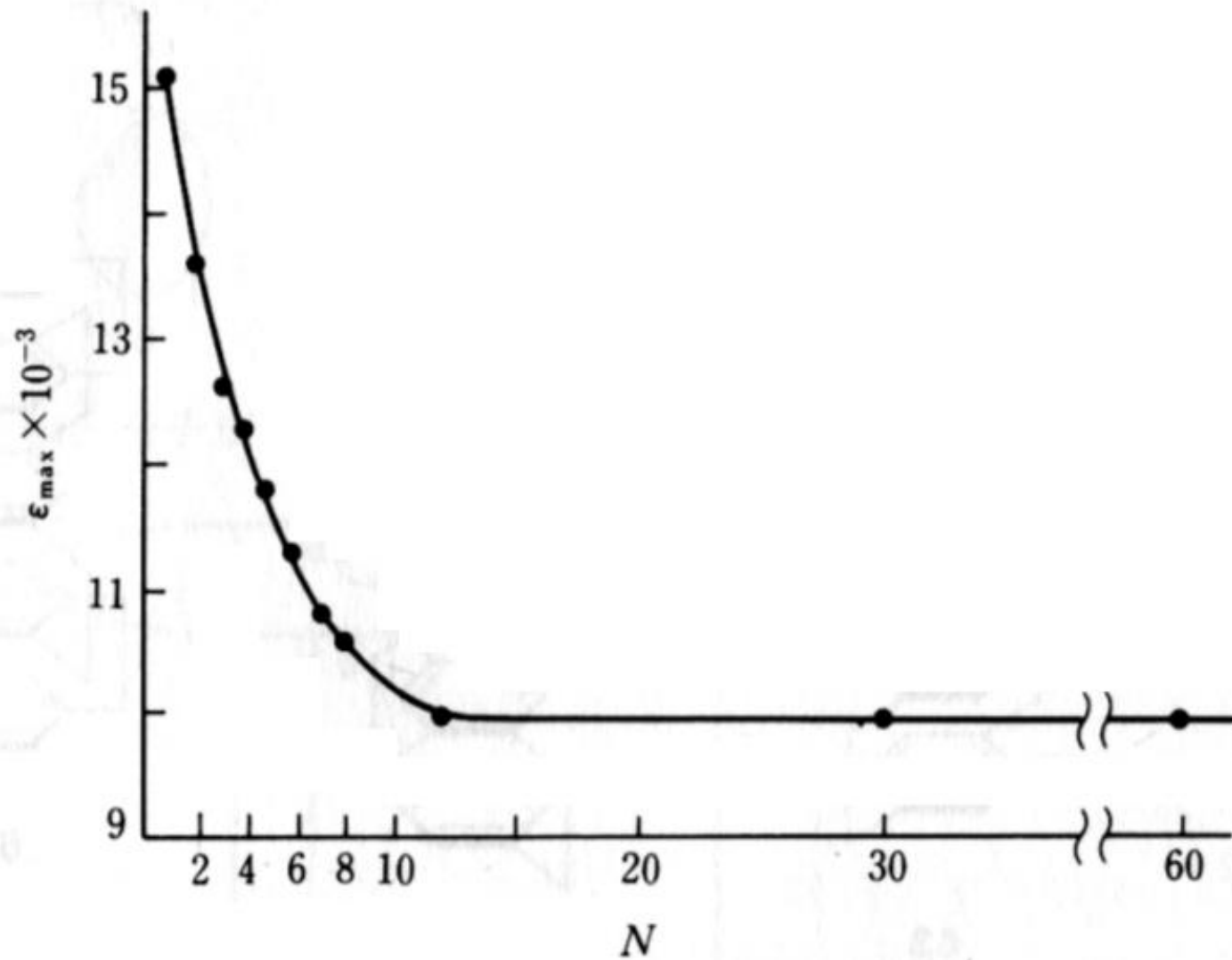
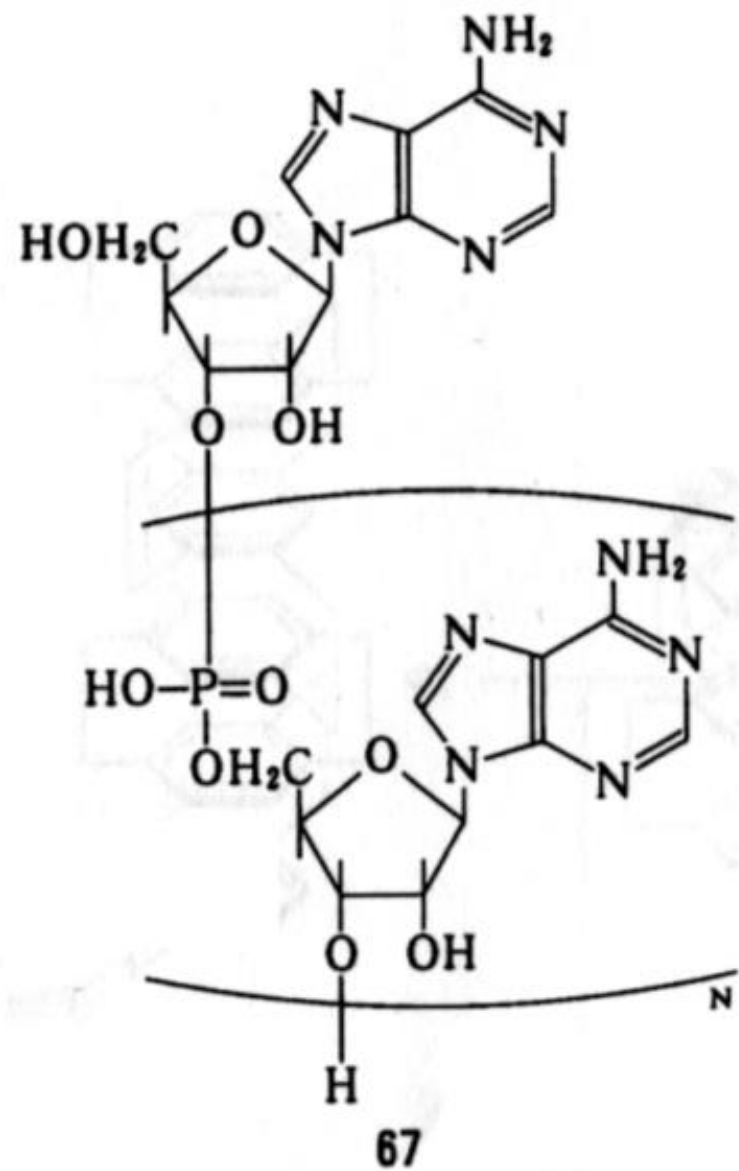
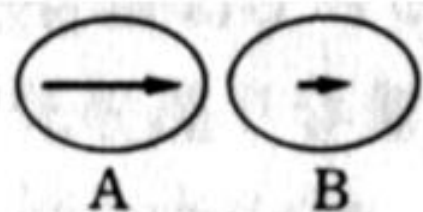


図 3.45 ポリアデニル酸 **67** における重合度 N と淡色効果との関係

(I)



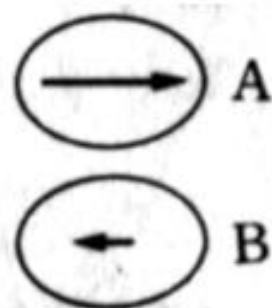
$$\begin{array}{cc} \varphi_a^0 \rightarrow \varphi_a' & \varphi_b^0 \rightarrow \varphi_b' \\ \langle a | \vec{r} | a' \rangle & d \langle b | \vec{r} | b' \rangle \\ \xrightarrow{+ \quad -} & \xrightarrow{+ \quad -} \end{array}$$

遷移モーメントの総和



濃色効果

(II)



$$\begin{array}{c} \xrightarrow{\langle a | \vec{r} | a' \rangle} \\ \xleftarrow{d \langle b | \vec{r} | b' \rangle} \end{array}$$



淡色効果

図 3.44 発色団の空間配置と濃色 (I), 淡色 (II) 効果

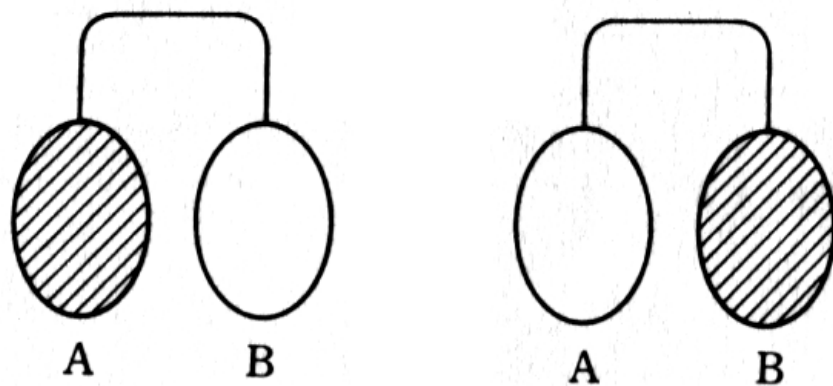


図 3.41 分子集合体の励起状態の概念図

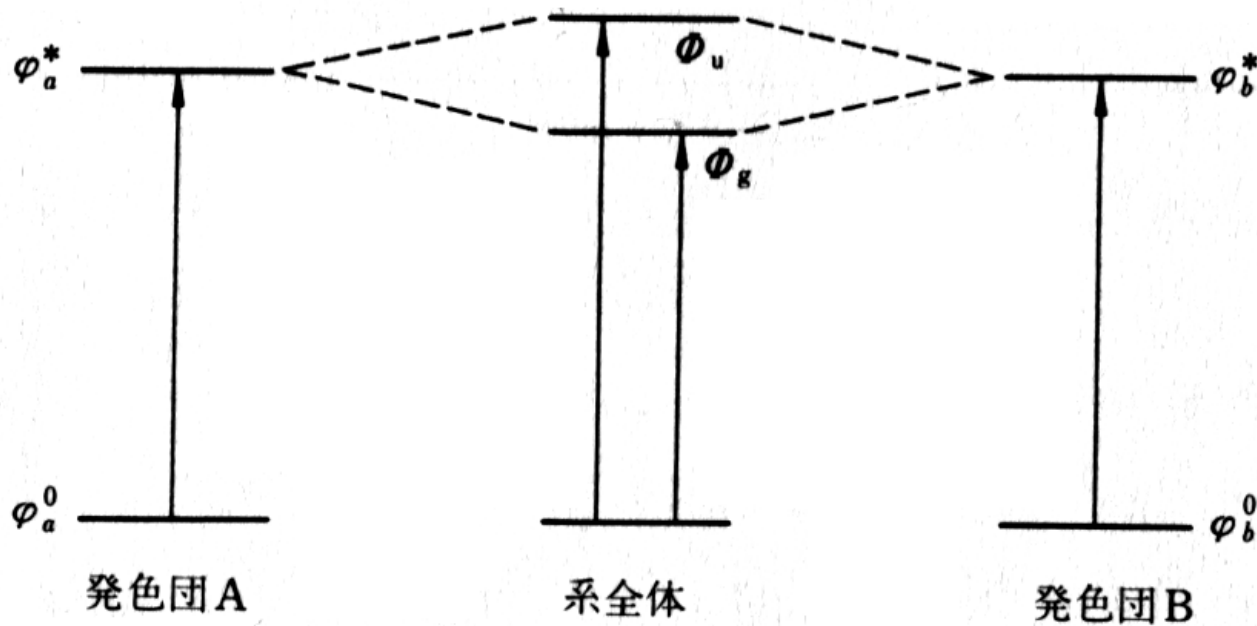
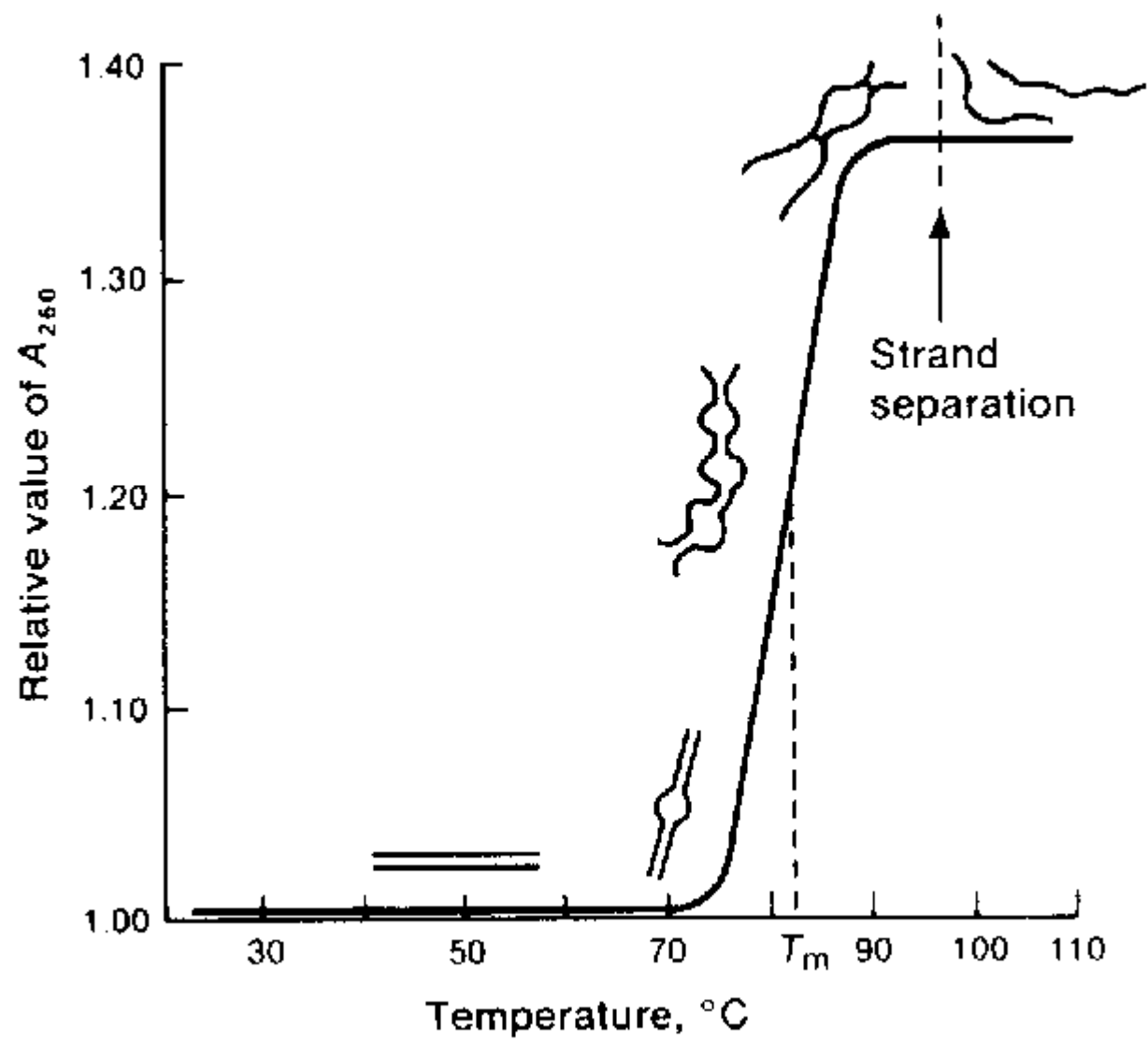


図 3.42 Davydov 分裂の概念図



T_mとは？

DNAは通常、二本鎖らせん構造を取っています。

センス鎖、アンチセンス鎖の相補的塩基(アデニンとチミン、シトシンとグアニン)は水素結合によって対をなしています。

二本鎖DNAの溶液を加熱すると、この水素結合が切断され一本鎖となります。

この現象を核酸の融解(Melting)と呼び、DNA分子の50%が変性して一本鎖となる温度が融解温度、すなわちT_m(Melting Temperature、融解温度)です。

T_mでは、二本鎖と一本鎖の存在する割合が等しくなります

核酸の場合、T_mとなる温度は配列や溶媒をはじめとする周囲の環境によって変わります。

一般的にT_mの数値(T_m値)は、以下のように変化します。

塩濃度が高いとT_m値は上がる

核酸の濃度が高いとT_m値は下がる

配列のGC含量が高いとT_m値は上がる(アデニン/チミン間の水素結合は2本、シトシン/グアニン間の水素結合は3本)

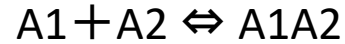
変性剤(ホルムアミド、DMSOなど)存在下ではT_m値は下がる

Tm値と各熱力学パラメーターの関係

核酸の熱安定性については、Tm値の他、エンタルピー変化(ΔH)、エントロピー変化(ΔS)、自由エネルギー変化(ΔG)で評価されます。熱力学において自由エネルギー変化(ΔG)は、温度T(絶対温度)を用い、以下のように定義されています。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

核酸溶液中では、2つの異なる一本鎖(A1, A2)と二本鎖(A1A2)の間には平衡関係が成立しており、A1、A2の濃度は等しいと仮定します。



二本鎖の状態と一本鎖の状態の2つの状態のみで系が構成されており、温度の上昇に伴ってこの2つの状態の自由エネルギー差が変化し、1種類の平衡定数のみが存在することになります。

二本鎖の状態と二本鎖の状態の間の自由エネルギー変化(ΔG)は以下の式によって表すことができます。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \dots (1)$$

(R: 気体定数、ln: 自然対数, K: 平衡定数)

平衡定数は、系の平衡状態を物質の存在比で表したものですので、二本鎖の状態が核酸分子全体に占める比率を[N]、一本鎖の状態が占める比率を[D]とすると、平衡定数Kは以下のように表すことができます。

$$K = [D]/[N] \dots (2)$$

ここで、二本鎖のモル分率を α 、核酸の総濃度をCtとすると平衡定数Kは以下のように表すことができます。

$$K = [D]/[N] = 2\alpha / ((1-\alpha)^2 \times Ct) \dots (3)$$

Tm値では二本鎖と一本鎖の占める割合が等しくなり、この温度では二本鎖のモル分率 α は1/2になりますので、(3)式を(1)式に代入し、 $\alpha=1/2$ を適用すると以下の式を得ることができます。

$$1/T_m = (R/\Delta H) \ln(Ct/4) + \Delta S/\Delta H$$

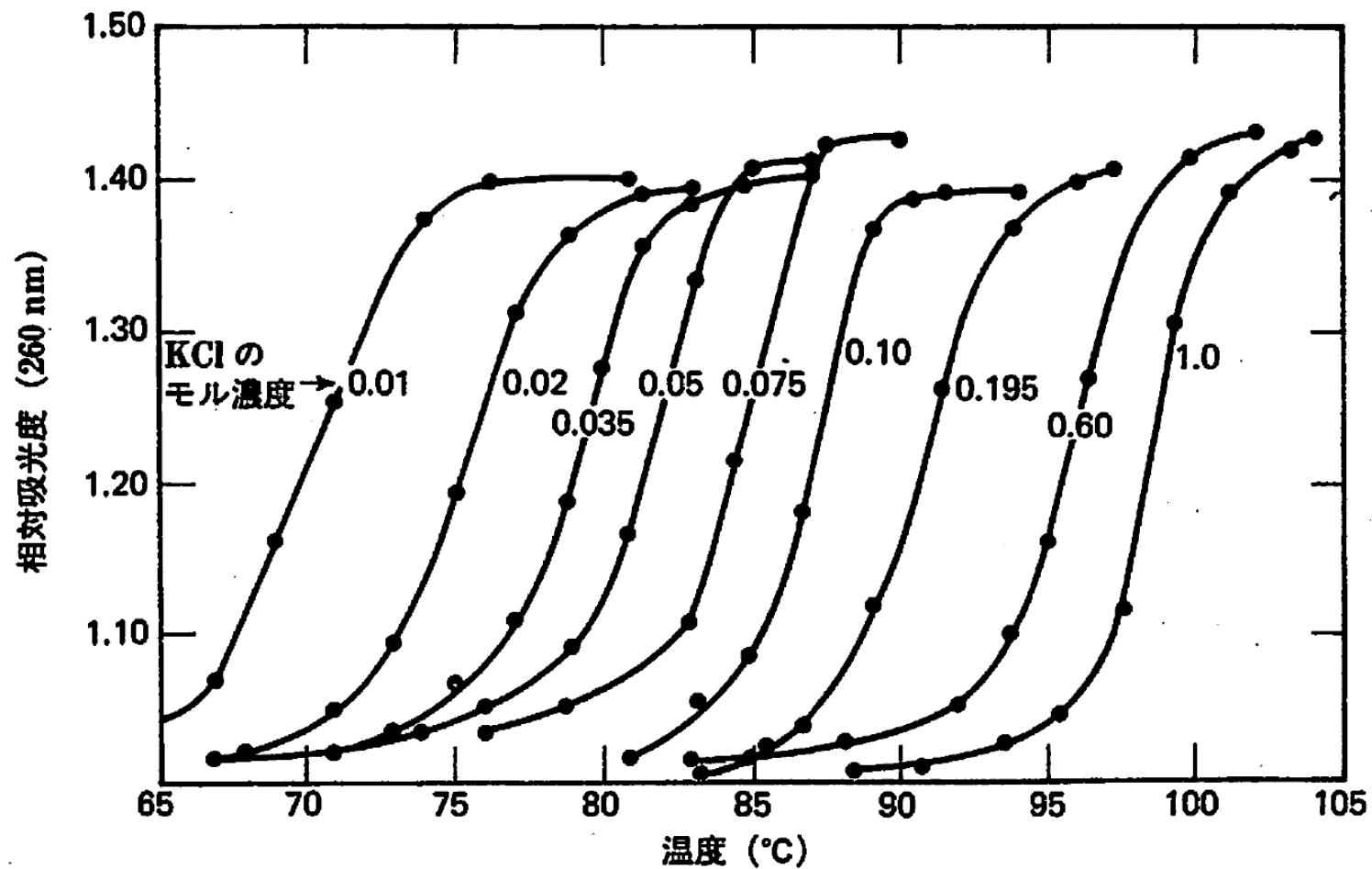


図 6.16 *D. pneumonia* (R-36A) DNA の熱変性のイオン強度依存性. クエン酸緩衝液 pH 7.0 で KCl 濃度を
変化させてある. [549]より.

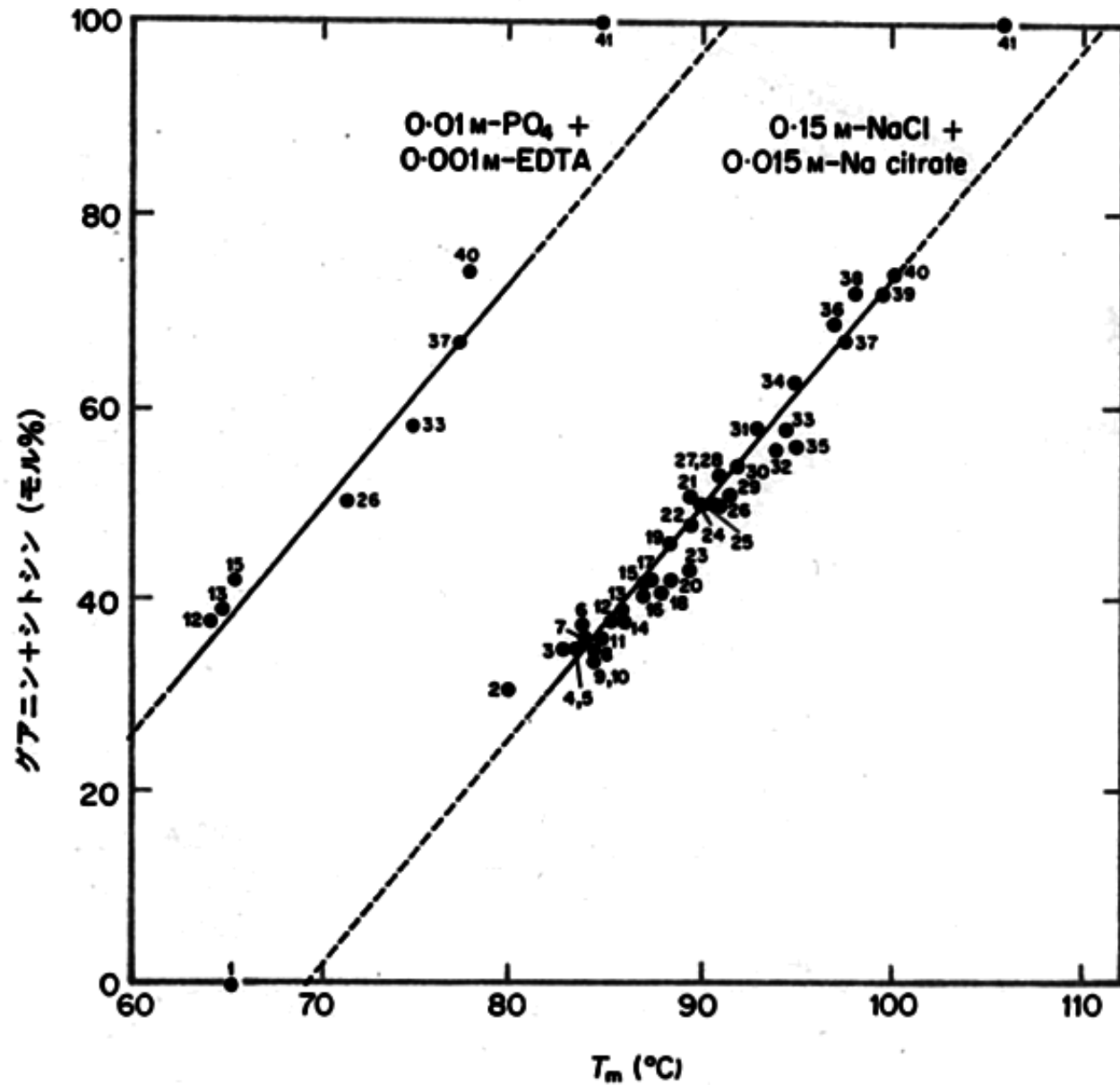


図 6.17 いろいろな種から得た DNA のグアニン+シトシン (G+C) 含量に対する融解温度 T_m の依存性。DNA は 0.15 M NaCl + 0.015 M Na-クエン酸 pH 7.0 に溶けている。点 1 は poly(dA-dT)、点 41 は poly(dG-dC) であり、解析的に $T_m = 69.3 + 0.41 (\% \text{GC})$ で示される最小 2 乗法の線からはずれている。[549] より。

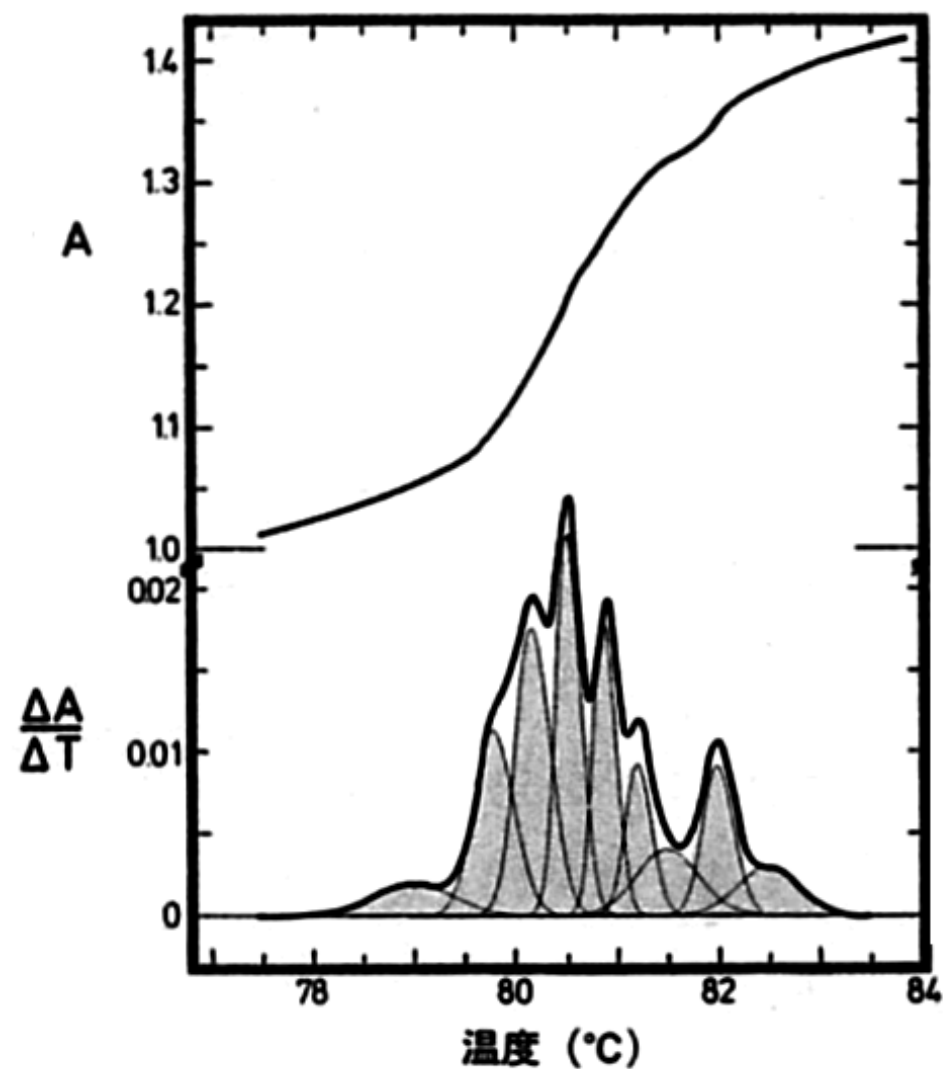


図6.19 DNAの融解曲線(上)とその一次微分 dA/dT (下). 微分曲線は, 温度, 強度, 幅で特徴づけられる9つのピークに分けられている. A は260 nmのUV吸収を示し, dA/dT すなわち $\Delta A/\Delta T$ は, 温度差 T に関する1次微分である. ピークの曲線は計算により得られている. 具体的なデータについては [557] を見よ.

表 6.9 塩基配列から予測された DNA 二重らせんの安定性 ([555] より)

(A) B-DNA 構造での塩基対ジククレオチド中の隣接スタッキングの安定性行列^a

		3'			
5'	A	T	G	C	
T	36.73	54.50	54.71	86.44	
A	54.50	57.02	58.42	97.73	
C	54.71	58.42	72.55	85.97	
G	86.44	97.73	85.97	136.12	

^a 数字は 19.5 mM Na⁺中での T_m 値を℃で示してある。

(B) 一定の配列をもった合成 DNA ポリマーに対する安定性行列による T_m 値の予測

ポリヌクレオチド	T_m (°C)		
	実験値 ^a	計算値 ^b	差 ^c
Poly(dA-dT)·poly(dA-dT)	45.0	46.9	-1.9
Poly(dA-dA-dT)·poly(dA-dT-dT)	49.2	49.4	-0.2
Poly(dA)·poly(dT)	53.0	54.5	-1.5
Poly(dG-dA-dA)·poly(dT-dT-dC)	64.5	66.5	-2.0
Poly(dG-dT-dA)·poly(dT-dA-dC)	66.8	64.3	2.5
Poly(dA-dA-dC)·poly(dG-dT-dT)	70.2	69.0	1.2
Poly(dG-dA)·poly(dT-dC)	71.3	72.4	-1.1
Poly(dG-dA-dT)·poly(dA-dT-dC)	72.0	66.1	5.9
Poly(dG-dG-dA)·poly(dT-dC-dC)	76.3	76.9	-0.6
Poly(dG-dT)·poly(dA-dC)	77.4	76.2	1.2
Poly(dG)·poly(dC)	87.8	86.0	1.8
Poly(dG-dC)·poly(dG-dC)	99.2	104.3	-5.1

^a 種々のイオン強度での融解温度の実験を 19.5 mM Na⁺ に外挿した。

^b 各ポリマー中の隣接頻度と表 6.9 (A) の値から計算した。

^c T_m (実験値) - T_m (計算値)。

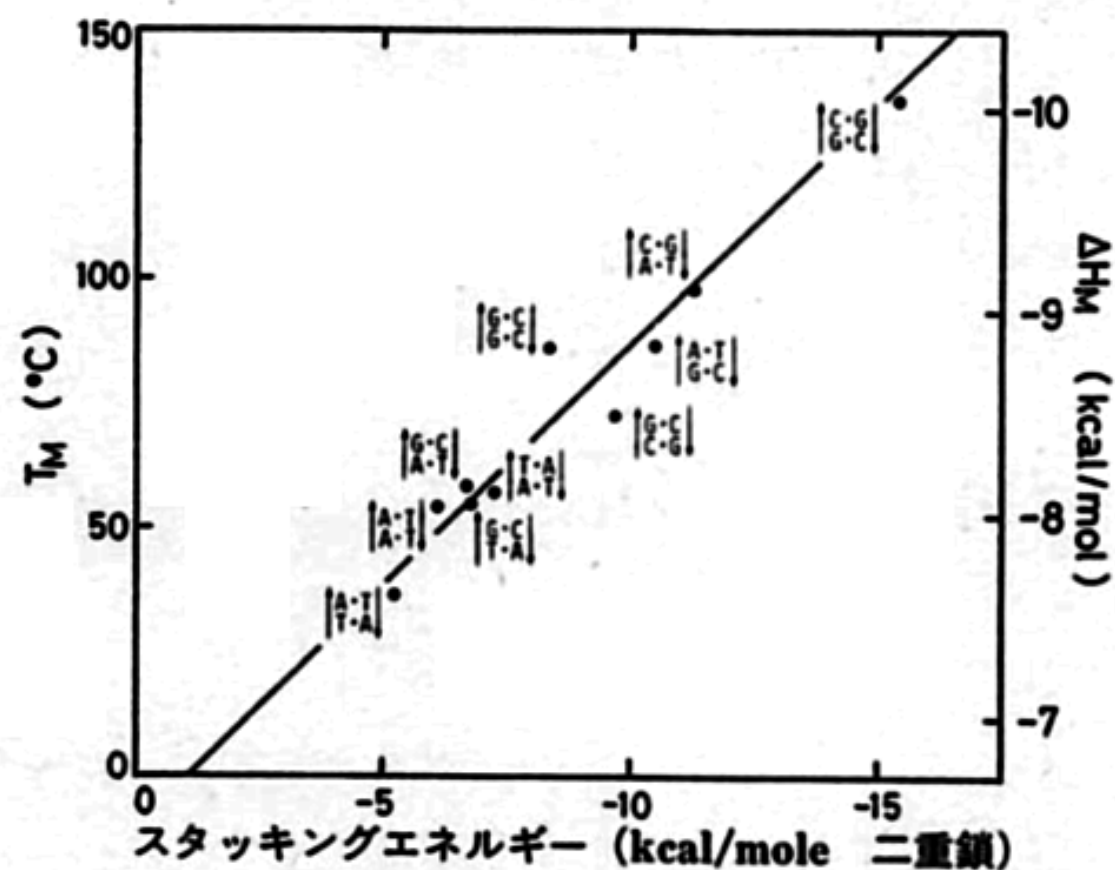
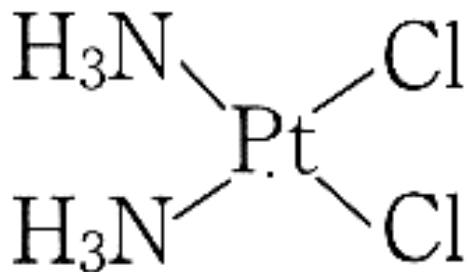


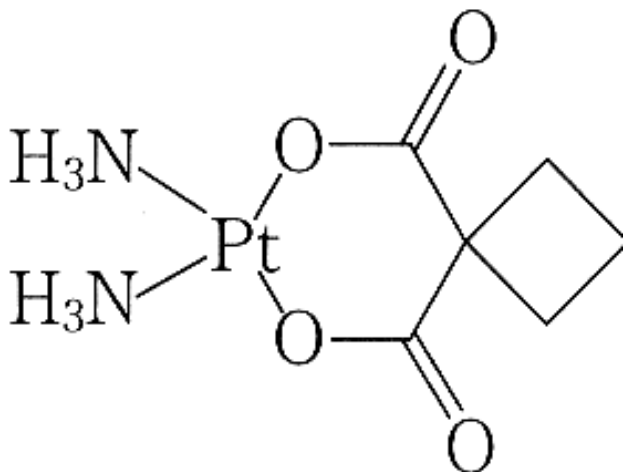
図 6.20 実験から得られた融解温度, T_m (表 6.9) と B-DNA の幾何学での塩基対ジヌレオチドの理論計算で求められたスタッキングエネルギー (表 6.8) の間の相関図. 同じ問題についての 2 つの異なる研究は, 相関係数 0.97 と満足できる結果を与えた. このプロットに使われているジヌクレオチド二量体のスタッキングエネルギーは表 6.8 のデータと若干異なる [536] の結果が使われている. [555] より.

抗がん薬

シスプラチン

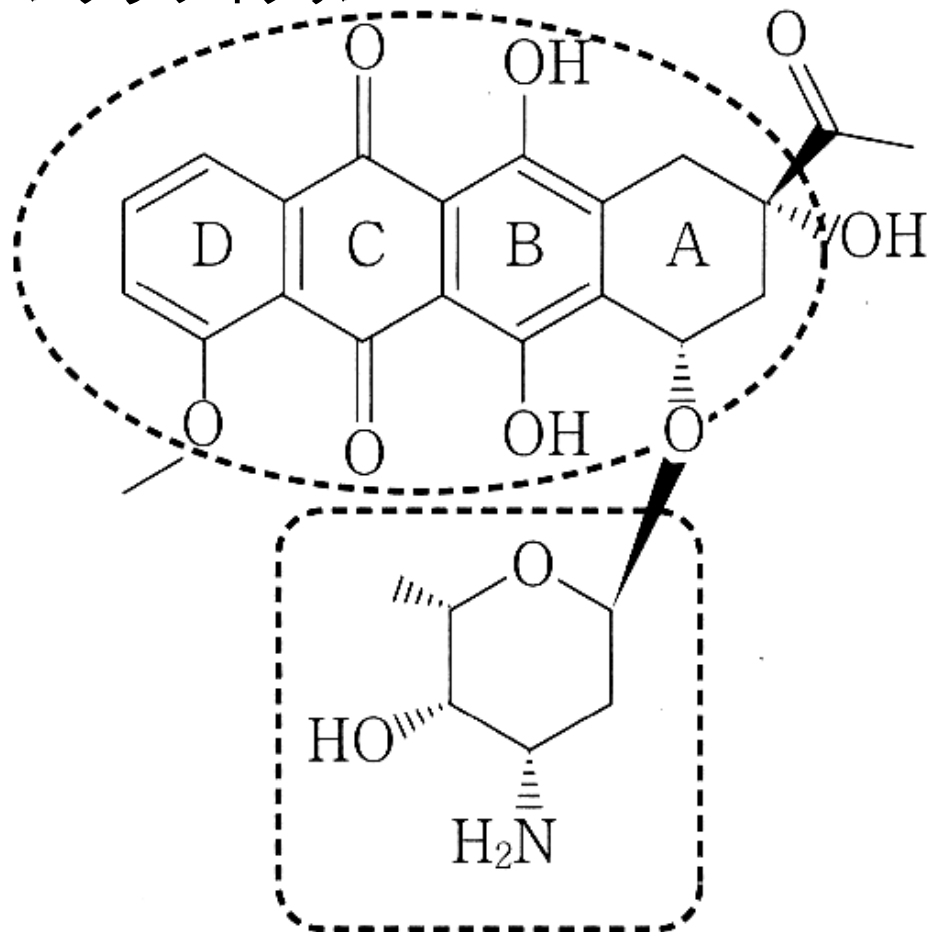


カルボプラチン



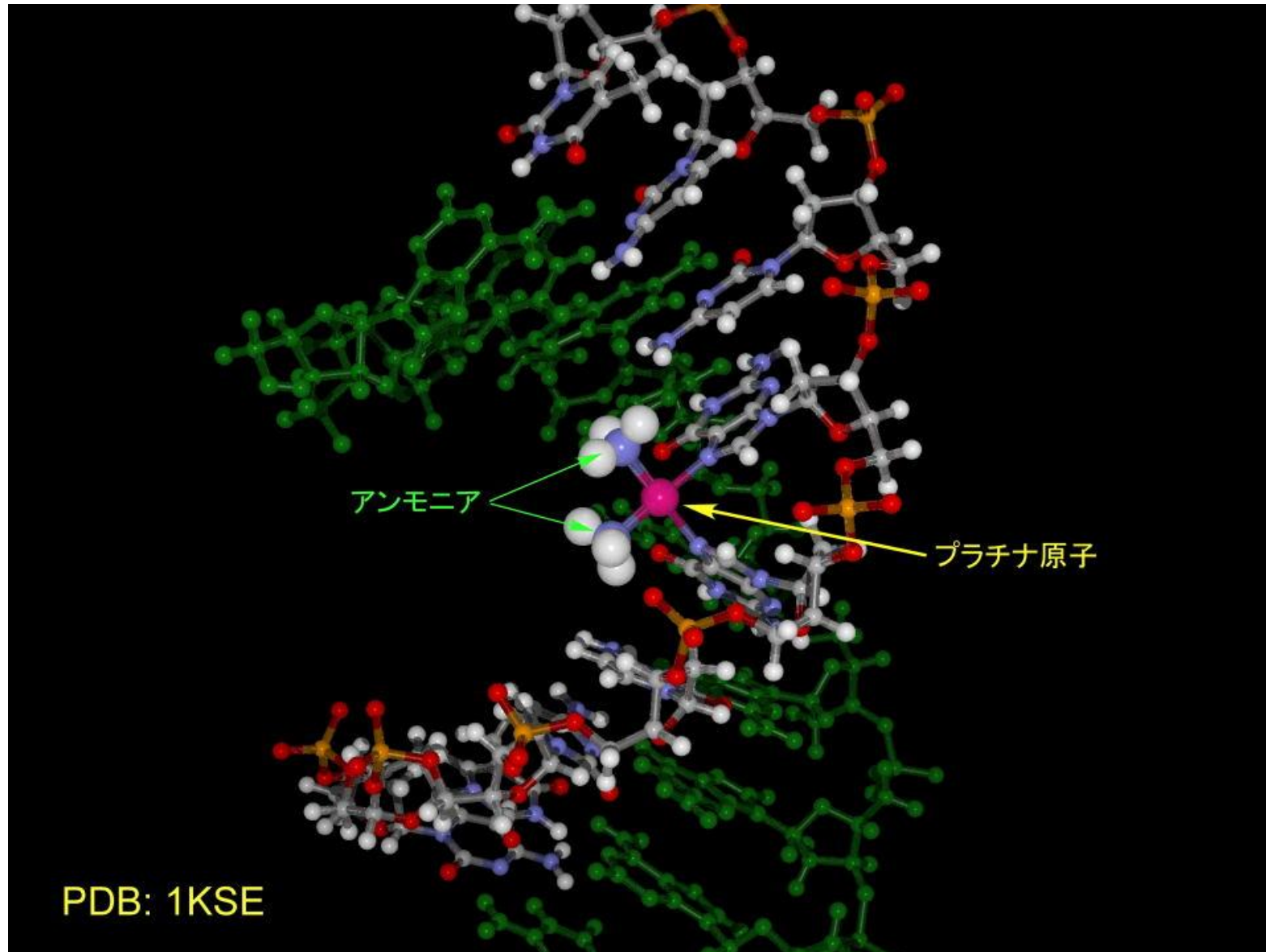
ダウノルビシン

アンタラサイクリン



ダウニサミン

DNAに結合したシスプラチン



DNAに結合したダウノルビシン

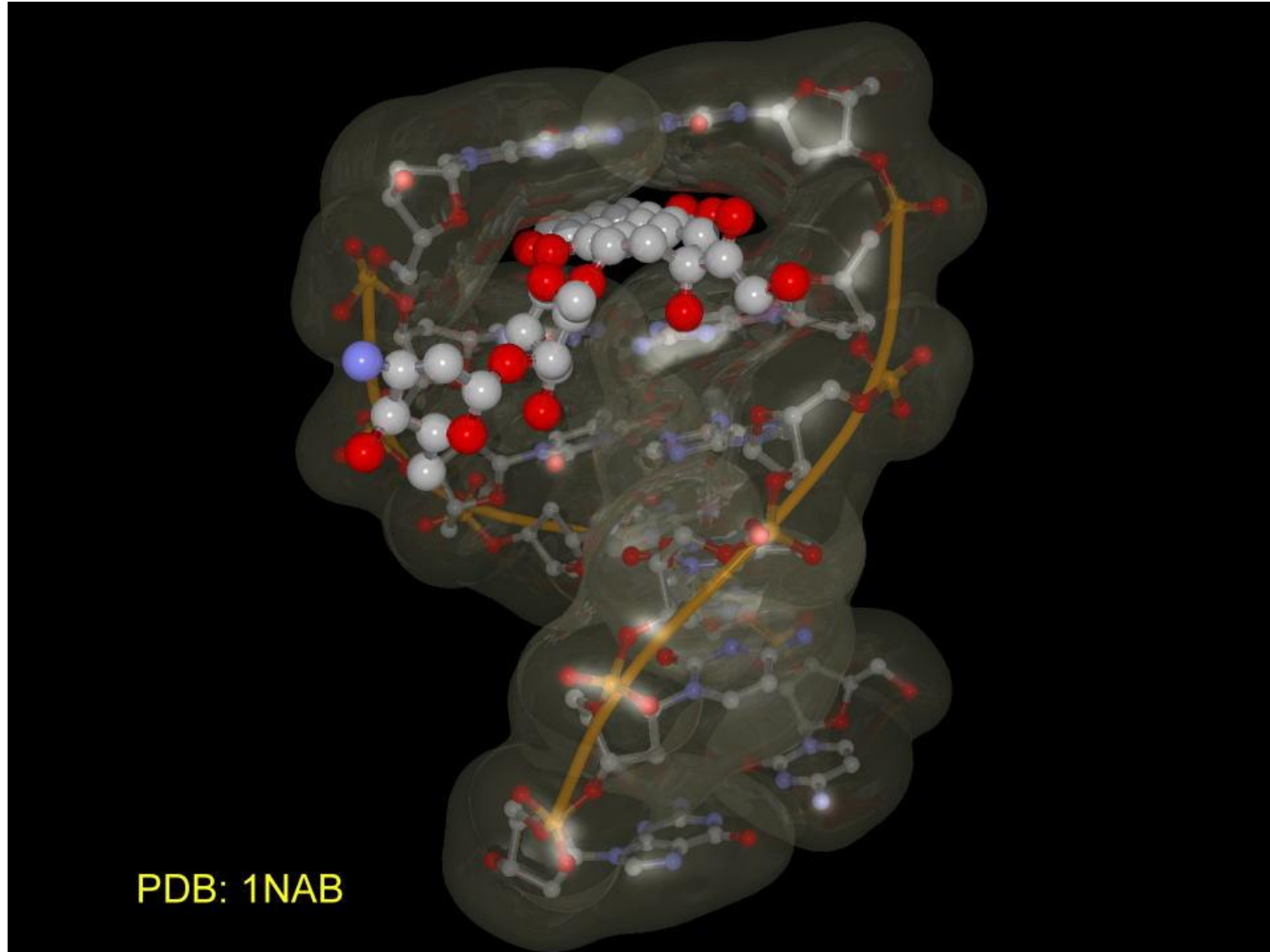
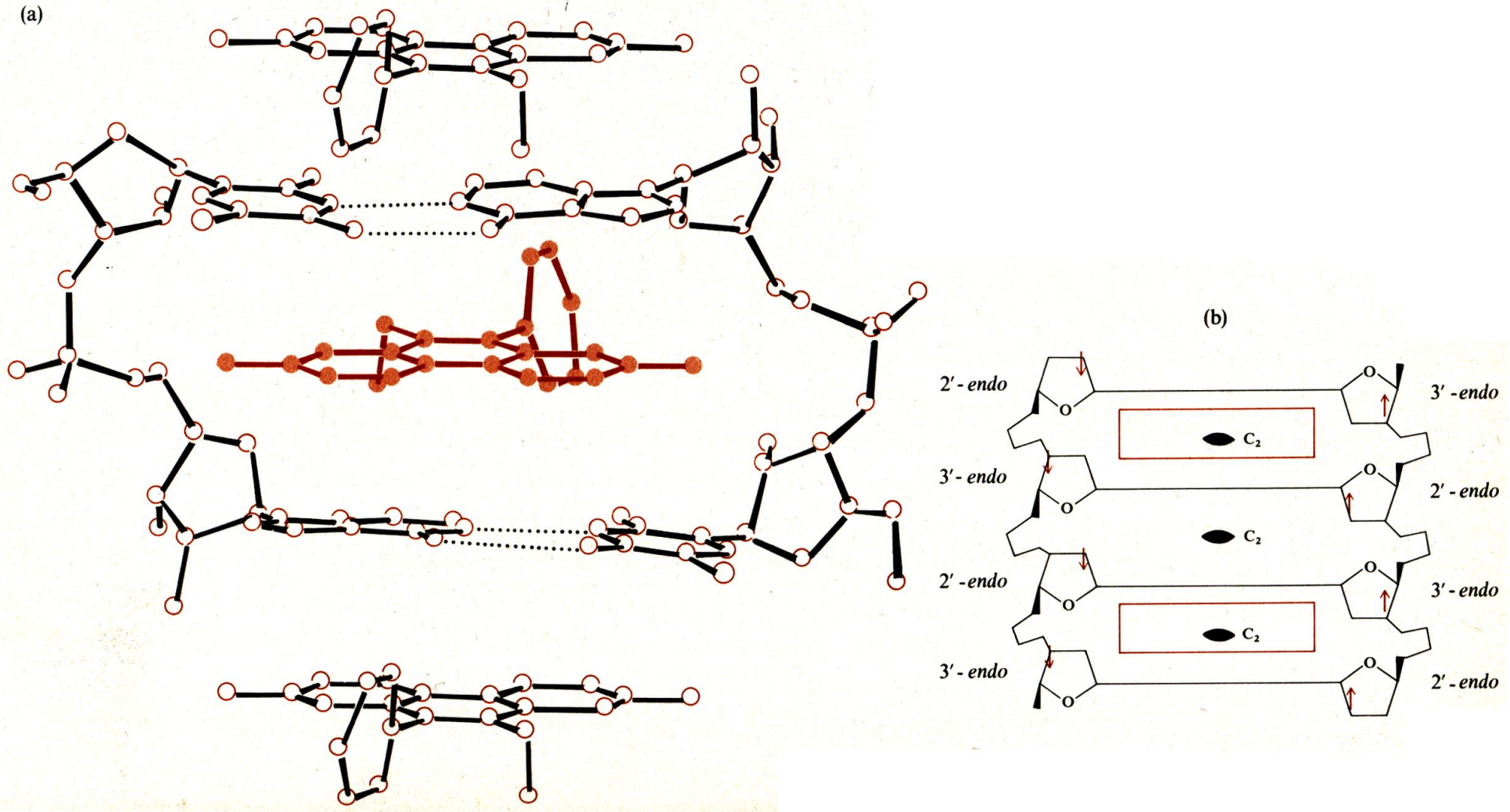
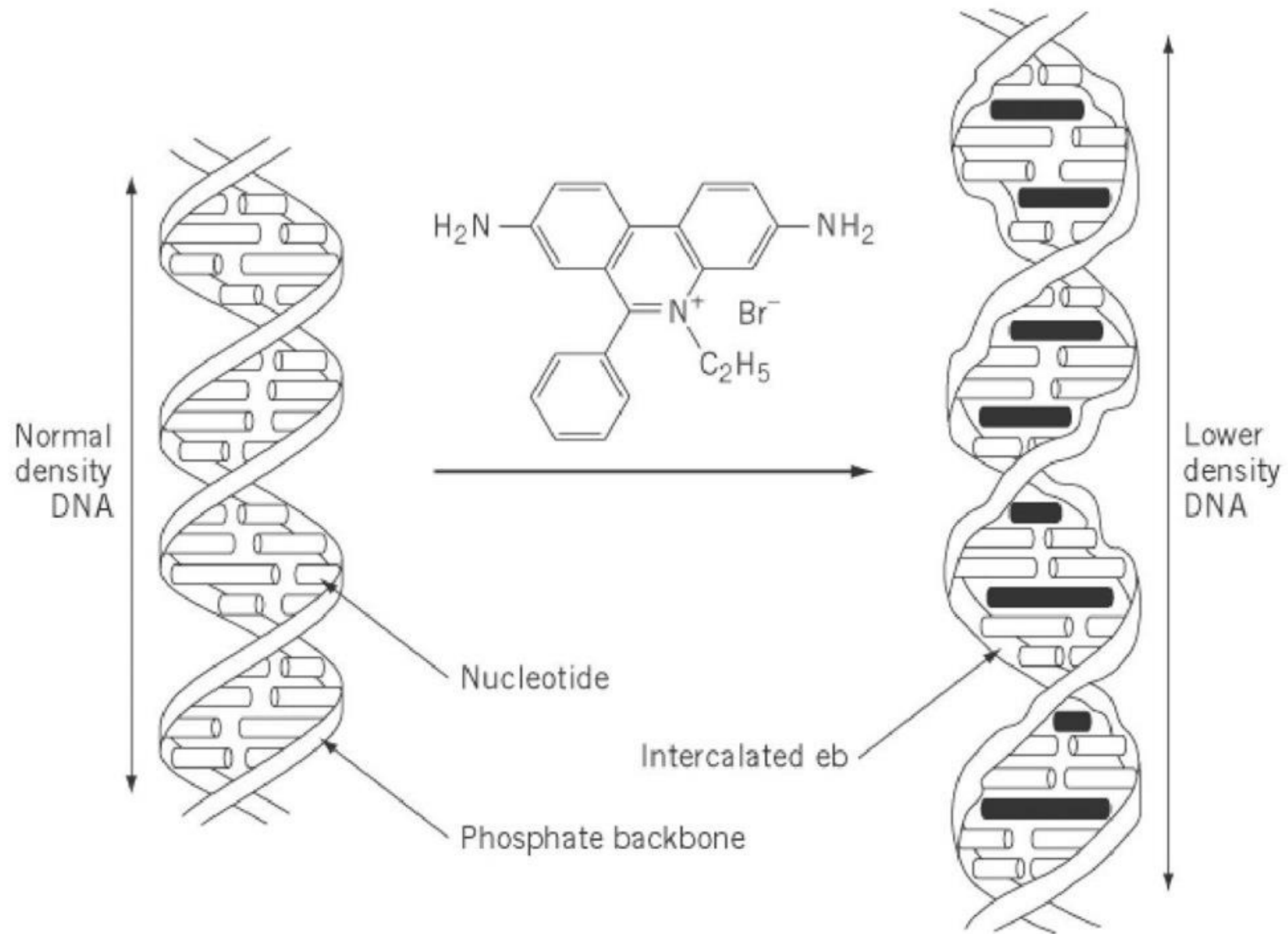


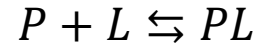
Figure 23-30

Model for binding of ethidium bromide to DNA. (a) X-ray structure of a 1:1 complex of ethidium and iodoUpA. Ethidiums are intercalated (colored) between the base pairs of the dinucleotide phosphate duplex, and also are stacked at the ends. [After C. C. Tsai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:628 (1975).] (b) Schematic representation of the structure in part a extrapolated to an excluded-site saturated DNA duplex. Note that alternating sugar pucker destroys the dyad axis of the DNA but leave a C_2 axis between each set of base pairs, as shown. The pattern of puckering also leads to a regular alternation of two classes of potential binding sites. (c) Two views of a more realistic model for the ethidium-DNA complex, showing a kink and a displacement of the helix axis (the vertical bars indicate the local helix axis). [From H. M. Sobell et al., *J. Mol. Biol.* 114:333 (1977).]





スカッチャード(Scatchard)プロット



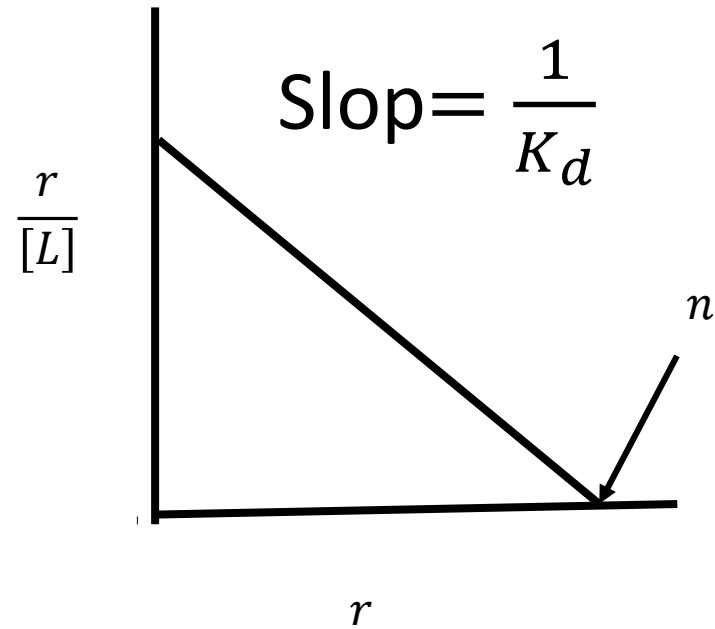
$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

$$[P]_0 = [P] + [PL] \quad \text{より}$$

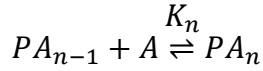
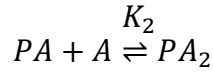
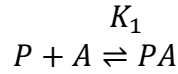
$$K_d = \frac{([LP]_0 - [P][L])}{[PL]}$$

$$r = \frac{[PL]}{[P]_0} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

$$\frac{r}{[L]} = K_d(1 - r) \quad \rightarrow \quad \frac{r}{[L]} = K_d(n - r)$$



Scatchardの拡張



$$\sum_{i=1}^3 a_i = a_1 + a_2 + a_3$$

$$\prod_{i=1}^3 a_i = a_1 \times a_2 \times a_3$$

$$K_1 = \frac{[PA]}{[P][A]} \implies [PA] = K_1[P][A]$$

$$K_2 = \frac{[PA_2]}{[PA][A]} = \frac{[PA_2]}{K_1[P][A]^2} \implies [PA_2] = K_1 K_2 [P][A]^2$$

$$K_n = \frac{[PA_n]}{[PA_{n-1}][A]} = \frac{[PA_n]}{K_1 K_2 \dots K_{n-1} [P][A]^n}$$

Pの全モル数を $[P]_t$, 結合したAのモル数を $[A]_B$ とすると

$$\begin{aligned} [P]_t &= [P] + [PA] + [PA_2] + \dots + [PA_n] \\ &= [P] \left(1 + \sum_{j=1}^i K_j [A]^j \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [A]_B &= [PA] + 2[PA_2] + \dots + n[PA_n] \\ &= [P] \left(1 + \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^i K_j i [A]^i \right) \end{aligned}$$

平均結合数 (飽和度) $\tilde{v} = \frac{[A]_B}{[P]_t}$

n個の結合サイトが等価であるとする

PA型についてとり得る異なった結合構造の数n個

PA₂型についてとり得る異なった結合構造の数 $\frac{n(n-1)}{2}$ 個

PA_i型についてとり得る異なった結合構造の数 $\frac{n!}{i!(n-i)!}$ 個

すべて結合定数をkとすると

$$\frac{[PA]}{[P][A]} = K_1 = k$$

$$\frac{[PA_2]}{[P][A]^2} = K_1 K_2 = \frac{n(n-1)k^2}{2!} \quad K_2 = \frac{(n-1)k}{2}$$

$$K_i = \frac{(n-i+1)k}{i}$$

$$\text{従って } \tilde{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i \left\{ \prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i [A]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i [A]^i}$$

$$\prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) = \frac{n!}{(n-i)! i!} \text{ より}$$

$$\tilde{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i k^i \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i}$$

2項定理

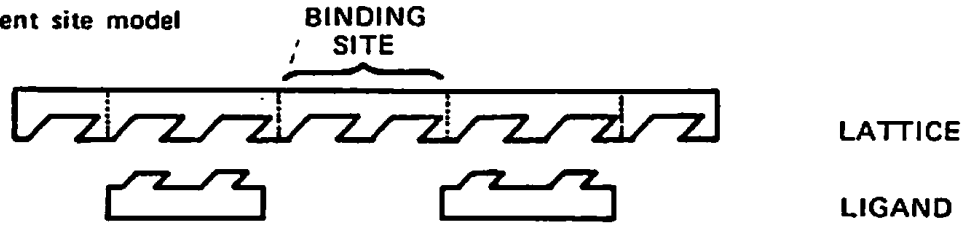
$$(1 + k[A])^n = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i$$

$$n(1 + k[A])^{n-1} = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^{i-1}$$

2項定理より

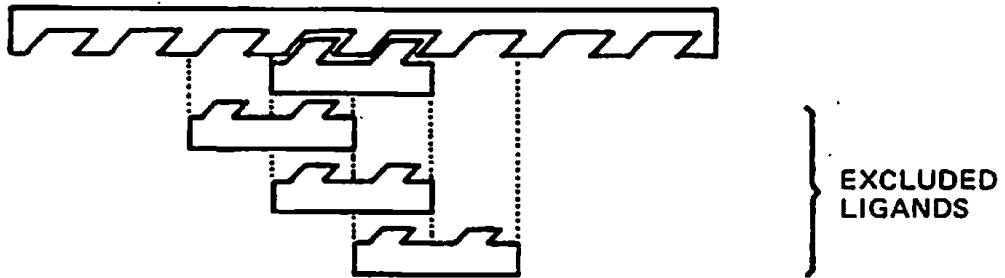
$$\tilde{v} = \frac{nk[A]}{1 + k[A]} \implies \frac{\tilde{v}}{[A]} = k(n - \tilde{v})$$

I. Independent site model

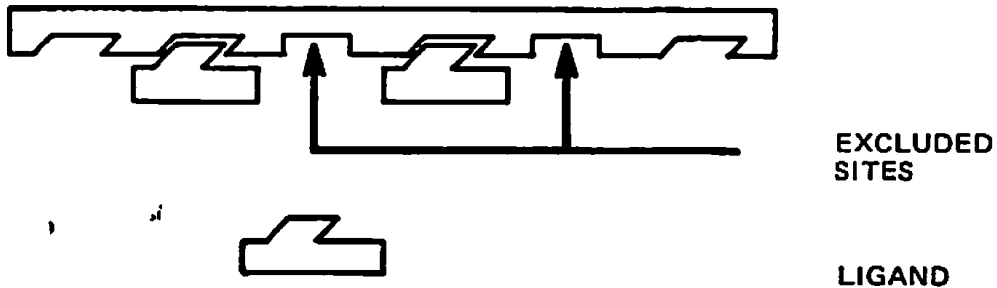


II. Excluded site model: overlapping binding sites

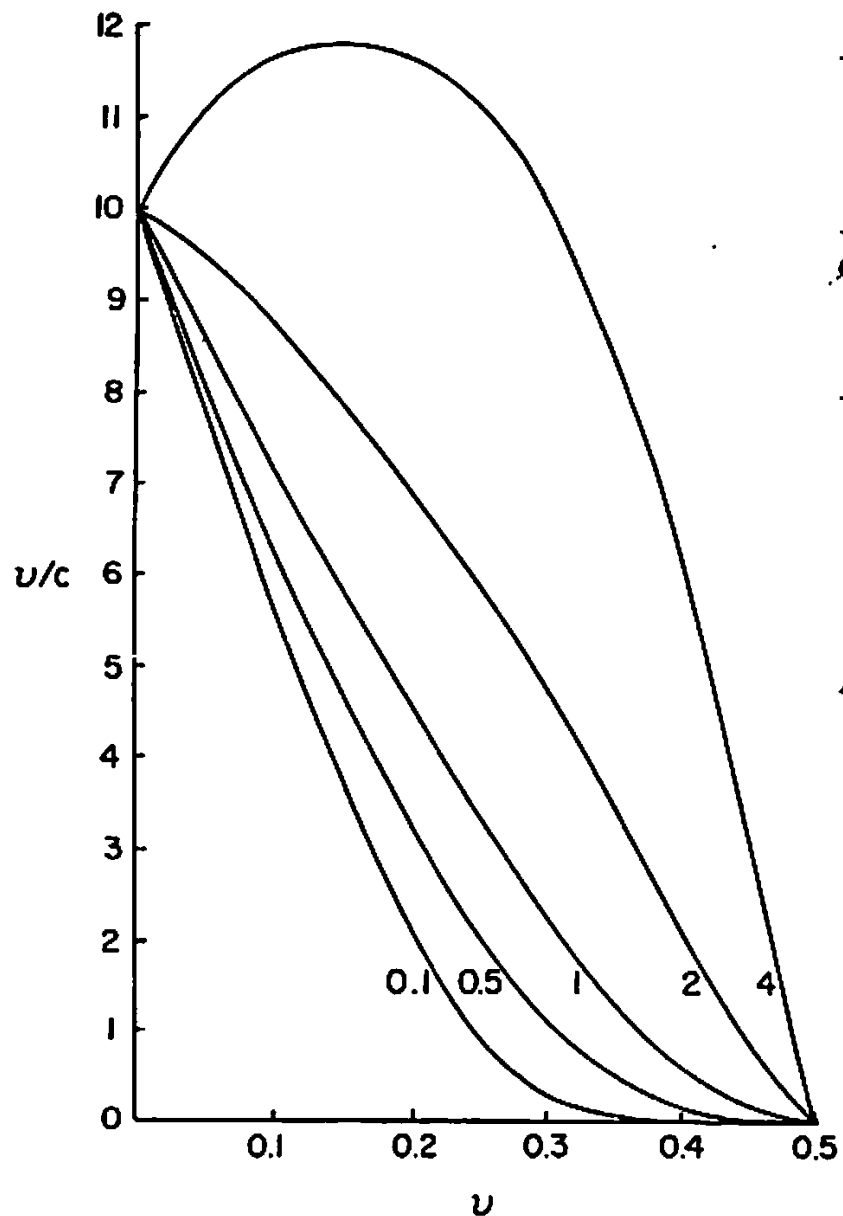
(a) Direct exclusion: large ligands



(b) Indirect exclusion: binding at one site induces a conformational change at an adjacent site.



Possible ligand interactions with a linear lattice such as DNA. Exclusion models involving binding site elimination through direct blockage of lattice binding sites by large ligands (IIa) and through indirect blockage caused by a conformational change induced in the lattice (double helix) by the ligand interaction (IIb) are shown. Classical independent site behavior is shown in I.



協同性がない場合

$$\frac{v}{c} = K(1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1}$$

協同性がある場合

$$\frac{v}{c} = K(1 - nv) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)v + R}{2(1 - nv)} \right)^2$$

$$R = [(1 - (n+1)v)^2 + 4\omega v(1 - nv)]^{1/2}$$

Idealized Scatchard plots as predicted by Eq. (6) for different ω values. The ω value for each curve is indicated at the bottom of the figure. When $\omega = 1$, which indicates no ligand cooperativity, Eq. (6) reduces to Eq. (5). For the illustration, a K value of 10 is used for all curves. Changing K values over a fairly wide range do not dramatically affect the curve shapes.

課題レポート

たんぱく質において熱に伴う吸光度変化の理由とそれによって何が分かるかについて考察せよ。