

生物熱力学の分野における国際的活動(II)

生化学における平衡データの測定
および表示に関する推奨^(上)生物熱力学合同委員会 (Interunion Commission of
Biothermodynamics) 起草

廣海啓太郎*, 菅 宏**共訳

平衡に関するデータは、生化学の種々の系を記述し、理解するのに重要である。現在のところ、よく似た、あるいは同じ反応を研究するにしても、実験条件の選択やデータの表わし方は、研究者によって非常にまちまちであって、その系(研究の対象となる)に関する記述を見ただけでは、その実験を再現するに必要な知見が得られないことが多い。このため、異なる研究者の測定結果を比較検討する上に混乱と困難を生じることになる。

生化学における平衡の研究は、一般の化学の場合には遭遇することのない特別の問題を含んでいる。生化学反応の平衡を達成させるには、通常その研究しようとする反応を促進するために特異的な酵素を添加する。時には二種または三種の酵素を同時に添加することが必要な場

合もある。のみならず、酵素によっては金属イオンのような、ある種の共同因子を要求するものもある。また、反応物質あるいは生成物、またはその両方が、研究しようとする反応の途中で、プロトンや他のイオンを結合したり放出したりする場合もある。したがって実験の系を記述するには、特別の配慮が必要なのである。

生化学の系、また他の複雑な反応系に関する意味のある熱力学のデータを得ることおよび報告することに関しては、次の二つの基本的な問題がある。

1. 反応に関与する種をはっきりと定義することが必ずしも可能ではない。
2. 反応種を定義し得る場合でも、それらの熱力学的活量は決定できないことが多い。

われわれはこの報告書で、生化学的平衡のデータの有用性を高め、異なる研究者の結果をうまく関連させることができることを目的として、いくつかの推奨をしたいと思う。この推奨には、広範囲の生化学的平衡に関する普遍的な知識を得ることを容易にするための一連の標準条件に関するものも含まれている。これは、ある種の反応にとっては適当な特別の実験条件を選ぶことを妨げるものではない。しかし可能な限り、それらの反応を推奨される標準の条件下においても(同時に)研究しておくべきである。解釈における混乱を避けるために、このようなデータを表現するに際しての術語、記号、および単位についても推奨しておく。

実験から導かれる数値データおよび熱力学的データの表現に関するほかの議論については、CODATA(1)およびIUPAC(2)によって作られた指針書を参照されたい。

第一部 平衡の測定についての標準条件

真の熱力学的平衡定数は反応物質および生成物の活量を用いて定義されている。生化学的に興味ある多くの系では、すべての成分の活量を評価することは不可能であ

*京都大学農学部食品工学教室：京都市左京区北白川追分町

Keitaro Hiromi: Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyoto University

**大阪大学理学部化学教室：豊中市待兼山町 1-1

Hiroshi Suga: Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University

† IUPAC(国際純正応用化学連合), IUB(国際生化学連合)およびIUPAB(国際純正応用生物物理学連合)の承認のもとに公表する。この推奨に関する意見や今後の改訂に関する提案は、本国際委員会の委員(後記)[†]に寄せられたい。

この文書の別刷は、W. E. Cohn, Director, NRC Office of Biochemical Nomenclature, Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Box Y, Oak Ridge, Tenn., U.S.A. 37830 に請求すれば入手できる。

[†] 委員会の構成員は、国際生化学連合(IUB)代表としてH. Gutfreund(Bristol, U.K.)とP. Privalov(Poustchino, U.S.S.R.), 国際純正応用生物物理学連合(IUPAB)代表として、J. T. Edsall(Cambridge, Mass., U.S.A.)とW. P. Jenks(Waltham, Mass., U.S.A.), 国際純正応用化学連合(IUPAC)代表として、G. T. Armstrong(Washington, D.C., U.S.A.)とI. Wadsö(委員長: Lund, Sweden), ならびにR. L. Biltonen(準委員(associated member); Charlottesville, Va., U.S.A.)である。

る。したがって平衡定数をモル濃度を用いて計算しなければならないことが屢々ある。平衡モル濃度の適切な比は多くの目的には特に問題にならぬほど一定であるので、本文書においては、濃度平衡定数と名づけるものを定義し、 K_c という記号で表わすことにする。しかしこのような平衡定数 K_c 、およびこれに対応するギブズエネルギー変化、 ΔG_c° は系の組成の変化に関して真に一定ではないことは十分認識しておかねばならない^{*1}。

このような量に対する報告値には反応系の組成およびその平衡を達成せしめた方法に関する完全で正確な記述を添えておくことが不可欠である。前に発表した研究の文献を引用しておくことも、これらの方法を記述する一助となろう。

実験条件：測定は、25℃(または37℃)、イオン強度はKClで0.10 mol dm⁻³とし^{*2}、有効な最低濃度の緩衝液を用いることを推奨する。もしこれらの条件が実現しにくいならば、明確でかつ一連の実験を通じて一定に保たれるようなきまった条件を選ぶべきである。試薬は出来る限り純粋なものを用い、精製の方法、純度、および各々の試薬の入手先を明記すべきである。真の平衡条件が達成されていることは、正逆両方向より平衡状態に近づけること、および反応物質のいくつかの異なる濃度において測定を行うことによって証明すべきである。またイオン強度を変えることの効果、および特異的な塩類効果の存在についても、研究しておくことが望ましい。平衡定数を得るに用いた完全な、または代表的な実験データも報告すべきである。

温度：標準温度は、大多数の既存の化学的データとの比較を容易にするために、25℃(298.15K)を選ぶことを推奨する。できるならば、25℃と37℃の両温度における平衡定数の数値を報告するのがよい。

いくつかの温度において、平衡定数を測定することが望ましい。そうすれば、特定の反応に対する標準エンタルピーおよびエントロピー変化は平衡定数の温度依存性から計算できる。しかし、この種の実験を行う際には、反応物質や緩衝液成分の解離定数が温度とともに変化し、これに伴ってpHや解離性の成分(化学種)の濃度が変わることを考慮することが必要である。反応のエンタルピー変化の決定には、一般的に熱量測定がより正確な方法であることに注目しよう。熱量測定によって決定されたエ

ンタルピー変化は、反応に際してプロトンが取り込まれたり放出されたりすることによる、緩衝液の諸過程に関するエンタルピー変化に対して、補正を行わねばならない。

緩衝液とpH：もし限られた数の測定がなされる場合には、pH=7.0で行うべきである。そして、もしできるならば、見かけの平衡定数 K_c' が、殆んど、あるいは全くpHに依存しない領域においても、測定を行うべきである(K_c' は後の節で定義する)。もしpH=7.0における直接測定ができない場合は、このpHに換算した値を報告すべきである。このような計算に用いた手法は、ていねいに記述しておかねばならない。緩衝条件が適切で、溶液のpHは実験を通じてよく一定に保たれるように配慮しなければならない。緩衝液による特異的な効果の存否を確かめるために、緩衝液の性質やその濃度を変えることの影響を決定しておくことが望ましい。反応物質(巨大分子を含む)と相互作用することが知られている緩衝液や塩類、たとえば二価金属イオンの存在下におけるリン酸またはピロリン酸(緩衝液)のような系は避けるべきである。

イオンとの錯体形成(Complexations)：リン酸化合物とMg²⁺イオンの場合のような、イオンと反応物質との錯体形成の平衡定数は実験条件下で測定し、(実際に有効な)反応物質の濃度はこのような錯体形成に対する補正を行っておかねばならない。もしこれができないならば、別法として次の三つの方法を用いることができる。(a)酵素の活性化に必要な金属イオンを、平衡(測定しようとする)の達成には十分であるが、錯体形成による反応物質の濃度を有意に変えない程度に僅かに加えておく。(b)金属イオンの濃度が、反応物質の一つ(またはそれ以上)の種の殆んどすべてが錯体形として存在し、他の反応物質の錯体形成度は無視できる程度になるように選び、その条件下で測定を行う。すなわち平衡定数や標準ギブズエネルギー変化は、この場合錯体形成した型の反応物質を含む反応に対する値として決定されることになる。(c)生理的条件下で測定を行い、生物学的系に直接に適用できる平衡や標準ギブズエネルギー変化を得るようにする。

どの場合でも、金属イオンの濃度は明記しておくべきであり、可能な場合は、上記の三種の条件すなわち錯体形成しない反応物質、十分に錯体形成した反応物質(たとえばMg²⁺・ATP)、および生理的条件、の各々に対応する平衡定数を報告するのがよい。イオンの錯体形成の平衡定数は中々得にくいし、また時には不確かなこともあることを考慮して、用いた実験条件下において、金属イオンの濃度を変化させたときの効果を直接に測定しておくことは非常に望ましいことである。ある場合には適当

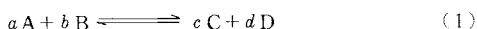
*1 標準ギブズエネルギー変化、 ΔG° はこれまで標準ギブズ自由エネルギー変化または単に自由エネルギー変化と呼ばれ、 ΔF° と書かれていたものの正式の名称である。

*2 濃度の推奨単位は、mol dm⁻³である。これは生化学の文献で通常Mで表わされているものである。

な補外法を用いたり、または反応溶液(溶媒)の成分と反応物質との錯体形成を避けるような特殊な実験条件を用いることも必要であろう。たとえば、アルカリイオンと錯体形成するポリリン酸や他のポリアニオンを含む系の測定に対しては、KClの代りに塩化テトラメチルアンモニウムを用いるなどもその一例である。

平衡のデータを報告する際の一般的注意

次の反応を考えよう。



ここで a, b, c, d はそれぞれ、成分 A, B, C, および D の化学量論係数 (stoichiometric coefficients) である。この場合、濃度平衡定数は

$$K_c = \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \quad (2)$$

で、対応する標準ギブズエネルギー変化^{*3}は

$$\Delta G_c^\circ = -RT \ln K_c \quad (3)$$

である。ここで $[A], [B]$ などはその化学反応に関与する各々の分子成分の濃度で、 R は気体定数、 T は熱力学的温度である。

“希薄な水溶液”において、水自身が反応物質となる場合は特別な問題が生じる。希薄溶液の一般原則に一致させるためには、このような場合、平衡の式における $[H_2O]$ という項の値に対して 1 を与えるべきである(第一部の最後の項参照)。

ある場合には、ある成分の表示された濃度は数種の異なる分子種を含むが(たとえば $[C]$ が $[CH_3COOH] + [CH_3COO^-]$ である場合など)、その平衡系についてそれ以上詳しい記述を行うだけの知見が足りないことがある。たとえば、緩衝液系において H^+ イオンのすべての可能な平衡への関与を評価することは不可能であろう。しかし、もし $[H^+]$ が一定に保たれるならば、 $[H^+]$ が

^{*3} (3) 式は、問題の化学平衡がすべての反応物質および生成物の活量係数が考察している濃度範囲内で濃度に無関係であるような、理想溶液と見なせるほどに希薄な溶液で成り立っている場合に相当する。実際の系ではこの条件は厳密には成立しないと予期されるが、生化学的な系における測定の実験誤差の範囲内で ΔG_c° が実質的に一定とみなされる場合が屢々見出されている。それ故、近似的な用い方であることに留意した上で、 ΔG_c° を“標準ギブズエネルギー変化”と見做すことにしよう。またその対数の引数(例えば(3)式の K_c)は無次元でなければならぬことにも注意が必要である。濃度平衡定数については、“相対濃度”、すなわち濃度を“標準濃度=1”で割った値を用いればよいことになる。この操作は原理的には重要であるが、実際上は省略することができる。しかしながら、このような値を記述する際には、標準状態の濃度単位を明記しておくことが必要である。

表に現われて来ない形で、“見かけの平衡定数” K'_c を書くことができる。このような見かけの平衡定数は pH に依存するだろうし、また pH に依存しない(2)式の K_c とは異った値をとるだろう。 K'_c は測定可能な成分の全濃度を用いて

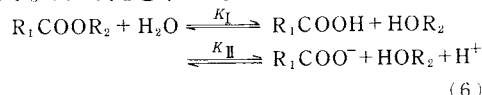
$$K'_c (\text{pH} = x, \text{ etc.}) = \frac{[C_1 + C_2 + \dots]^c [D_1 + D_2 + \dots]^d}{[A_1 + A_2 + \dots]^a [B_1 + B_2 + \dots]^b} \quad (4)$$

と書くことができ、“見かけの標準ギブズエネルギー変化”は

$$\Delta G'_c (\text{pH} = x, \text{ etc.}) = -RT \ln K'_c \quad (5)$$

と書ける。 K'_c の値はある種の制約を受けている。明確な K'_c の値を得るためには、pH 値、そしてある場合にはある種の金属イオン濃度、あるいは他のいくつかの要因をはっきりと定め、そしてそれを明記せねばならない。これらの制限因子の値は、上に述べたように表示しておかねばならないが、これらの制限因子は(4)式の右辺の成分濃度の中には明らさまには現われて来ない。生化学では通常、 K_c の添字の c は省くことができる。しかし、 K'_c や $\Delta G'_c$ に関しては(あるきまった pH などでの値であることを明示する意味において)、“見かけの”という語句は決して省かないようにすることを推奨する。

簡単な例を考えれば、この事情を明らかに示す助けとなるだろう。次の反応を考える。



I および II の過程に対する濃度平衡定数と標準ギブズエネルギー変化は次のようになる。

$$K_I = \frac{[R_1COOH][HOR_2]}{[R_1COOR_2][H_2O]} \quad (7)$$

(7) 式の水に関する因子は“希薄な水溶液”では 1 にとるのであるから、このような系の平衡の式を書くときには省略してよい。

$$\Delta G_I^\circ = -RT \ln K_I \quad (8)$$

$$K_{II} = \frac{[R_1COO^-][HOR_2][H^+]}{[R_1COOH][HOR_2]} = \frac{[R_1COO^-][H^+]}{[R_1COOH]} \quad (9)$$

$$\Delta G_{II}^\circ = -RT \ln K_{II} \quad (10)$$

全反応に対する濃度平衡定数および標準ギブズエネルギー変化は

$$K = \frac{[R_1COO^-][HOR_2][H^+]}{[R_1COOR_2]} = K_I K_{II} \quad (11)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (12)$$

となる。しかし、ある $\text{pH} = x$ における見かけの平衡定数は、 R_1COO^- と R_1COOH の濃度を一緒にし、両者を区

別することなしに、次のように書くことができる。

$$K'(\text{pH}=x) = \frac{([R_1\text{COO}^-] + [R_1\text{COOH}]) [HOR_2]}{[R_1\text{COOR}_2]} \quad (13)$$

対応する標準ギブズエネルギー変化は

$$\Delta G^\circ(\text{pH}=x) = -RT \ln K' \quad (14)$$

となる。

個々の化学平衡の詳細が知られている場合は、 K と K' との変換は一般に単刀直入に行うことができる。例えば今の場合、

$$[R_1\text{COOH}] = \frac{[R_1\text{COO}^-][H^+]}{K_H} \quad (15)$$

であるから

$$\begin{aligned} K'(\text{pH}=x) &= \frac{[R_1\text{COO}^-](1 + [H^+]/K_H)[HOR_2]}{[R_1\text{COOR}_2]} \\ &= K \left(1 + \frac{[H^+]}{K_H} \right) \cdot \frac{1}{[H^+]} \end{aligned} \quad (16)$$

となる。

よく知られているATPのADPと無機リン酸(P_i)への加水分解の標準ギブズエネルギー変化の問題は、濃度と見かけの平衡定数に関するもっと複雑な実例となる。全反応は



と書ける。こうしてある特定のpHにおける見かけの平衡定数と ΔG° の値は次式で与えられる。

$$K' = \frac{[\text{全ADP}][\text{全}P_i]}{[\text{全ATP}]} \quad (17)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[\text{全ADP}][\text{全}P_i]}{[\text{全ATP}]} \quad (18)$$

これらの見かけの定数を個々の濃度定数に換算するに必要なデータは揃っている。生物学的な環境と関連ある媒体中におけるこれらのリン酸化合物を扱うためには、それらとプロトンおよび Mg^{2+} イオンとの相互作用を考慮する必要がある。pH 7付近で、生理学的な $[\text{Mg}^{2+}]$ 値では、これら三種のリン酸化合物の各々が、1個の酸解離平衡で記述でき、また各々の酸との共役塩基は1個の Mg^{2+} イオンと結合できる。それ故、 K' および ΔG° における全濃度項は次のように分解できる。

$$[\text{全ATP}] = [\text{ATP}^{4-}] + [\text{ATP}^{3-}] + [\text{ATPMg}^{2-}] + [\text{ATPMg}^{-}] \quad (19)$$

$$[\text{全ADP}] = [\text{ADP}^{3-}] + [\text{ADP}^{2-}] + [\text{ADPMg}^{-}] + [\text{ADPMg}] \quad (20)$$

$$[\text{全}P_i] = [P_i^{2-}] + [P_i^{-}] + [P_i\text{Mg}^{+}] + [P_i\text{Mg}^{+}] \quad (21)$$

実際は $[P_i\text{Mg}^{+}]$ は常に無視できるほど小さく、また $[P_i\text{Mg}^{+}]$ も重要ではない。

ここに含まれる3つの pK_a 値(ATP, ADP, および P_i の各々について1個づつ)は知られており、またこれらの各成分と Mg^{2+} イオンとの結合定数も既知である。したがってこの反応を、反応物質と生成物の個々の種の間の関係を用いて数式化することができる。たとえば高いpH(>8)で $[\text{Mg}^{2+}] = 0$ という極限の場合には、主要な反応は、



となる。この反応はまた次のように書いてもよい。



全電荷と化学量論的な収支の均衡が保たれている限り、別の書き方も勿論可能である。ここでこのようなすべての反応の平衡定数は、 $[H^+]$ が明らかに反応を表す式に入っているかないかによらず、pHに無関係でなければならないことに注意しよう。この場合にもまた他の場合でも、このような平衡定数の式というものは、決して反応機構自体を表わすものではないのである。

反応を表示するのに(22)式を選ぶことにすれば、

$$K_{\text{ATP}^{4-}} = \frac{[\text{ADP}^{3-}][P_i^{2-}][H^+]}{[\text{ATP}^{4-}]} \quad (24)$$

となる。 $[\text{Mg}^{2+}] = 0$ という極限の場合には、 K' (17式)と $K_{\text{ATP}^{4-}}$ (24式)を関係づける式として、次式を書くことができる。

$$\begin{aligned} K'(\text{pH}=x, [\text{Mg}^{2+}] = 0) &= \frac{([\text{ADP}^{3-}] + [\text{ADP}^{2-}])([P_i^{2-}] + [P_i^{-}])}{([\text{ATP}^{4-}] + [\text{ATP}^{3-}])} \\ &= K_{\text{ATP}^{4-}} \frac{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_r}\right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_b}\right) [H^+]} \end{aligned} \quad (25)$$

ここで K_a , K_b , K_r は、それぞれ ATP^{3-} , ADP^{2-} , および P_i^{-} の酸解離定数を表わす。

(25)式のすべての定数は既知であるから、(17)式の見かけの平衡定数は、このようにしてpHに依存しない定数 $K_{\text{ATP}^{4-}}$ と明白に関係づけられる。 Mg^{2+} イオンの存在下でも、解析のし方は原理的には全く同じであるが、詳細な点ではるかに複雑な形をとる。詳しい議論はたとえばAlberty(3)によってなされている。

(17)式の効用は、ATP, ADP, および P_i の“全濃度”が、(19), (20), (21)式の中に現われて来る種々の形の種を区別することなしに、分析によって決定しうるものであるという点にある。

濃度平衡定数およびそれに対応する標準ギブズエネルギー変化は、反応そのものを完全に正確に定義した上で報告することを推奨する。これが不可能である場合には、それに相当する見かけの量を、出来ればpHや他の制限

因子変数(上例では Mg^{2+} など)の種々の範囲において測定した値を報告することもできる。いづれにしても、仮定した反応モードを明確に定義し、これを測定値に添えて記しておかねばならない。

量：平衡定数および標準ギブズエネルギー変化の値は、通常、モル濃度(物質の量を体積で割った量で、その単位はモル毎立方デシメートル)にもとづいて報告することを推奨する。ただしプロトン因子、水自身が反応物質または生成物となる水溶液系における水、および気体、または固体は例外とする。特殊の目的の場合は、重量モル濃度(molality)、モル分率(mole fraction)または分圧(partial pressure)にもとづく値をも追加することが望ましいこともある。いづれの場合も、使用した“単位”は明確に示しておくべきである。立方デシメートル(リットル)当りのミリモル(millimole)またはマイクロモル(micromole)というような単位による濃度にもとづいた平衡定

数を用いることは避けるべきである。

希薄な水溶液での反応に対しては、 H_2O に関する因子は、その相対活量の測定がない場合には、1とすることを推奨する。慣用されている 55.5 mol dm^{-3} のような実際の濃度は、液体としての水について、はっきりとした理由のある場合に限って用いるべきである。プロトンに関する因子としては 10^{-14} を用いることを推奨する。液体の水およびプロトン因子に関してどの取りきめを選んだかは、常にはっきりと、あからさまに述べておかねばならない。気体に関しては、気圧単位での分圧、または(もし分圧をキロパスカルで表現するならば)分圧と 101.325 kPa との比を用いるべきである。ギブズエネルギーはジュール毎モル(J mol^{-1})で報告すべきである。この単位が一般的に用いられるようになるまでには、結果を表わすのに、これに加えてモル当りの熱化学カロリー($1\text{ cal}_{\text{th}} = 4.184\text{ J}$)(cal mol^{-1})を用いるのもよい。