

九州大学中央分析センター報告

— 第19号 —

REPORT
OF
THE CENTER OF ADVANCED INSTRUMENTAL ANALYSIS
KYUSHU UNIVERSITY
NUMBER 19

2001

九州大学
中央分析センター

目 次

機器分析学の進歩

1. ファインマンラチェットモデルに関する話題
.....坂口 英継 1

研究報告

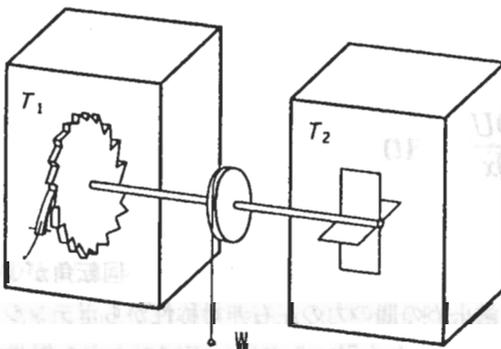
1. C-13サテライトシグナルを利用する対称化合物の立体化学決定
.....初井 敏英, 宇野 克之
.....田中 正俊, 森 章 4
2. フォトクロミックジアリールエテンを用いた磁氣的相互作用の光スイッチング
.....松田 建児, 入江 正浩 9
3. スピン系における磁場が誘起する量子現象
.....網代 芳民 14
4. トリプトファン誘導体を用いる新規高感度D-アミノ酸オキシダーゼ活性測定法
.....永安 玲子, 浜瀬 健司
.....財津 潔 25
5. アルファ・ラクトアルブミンの生きた状態および
モルテングロビュール状態からの熱転移
.....坂下 寛文, 三浦 好典 31

ファインマンラチェットモデルに関連する話題

大学院総合理工学府量子プロセス理工学専攻 坂口英継

1. ファインマンラチェットモデル

ファインマンの物理学の教科書「THE FEYNMAN LECTURES ON PHYSICS」はユニークな物理学の教科書として知られています。(文献1) ファインマン自身大変個性的な人だったようで、その一節は「ご冗談でしょう ファインマンさん!」などの本に書かれています。ファインマン物理学の教科書の一節に「爪車と歯止め」という節があります。熱力学に関してエントロピーやカルノーサイクルといった標準的な説明がなされた後に、温度差から仕事を取り出せることを示すわかりやすい例として、「爪車と歯止め」のモデルが説明されています。図はファインマン物理学からのコピーです。左の箱の温度は T_1 で箱には爪車と歯止めが入っています。右の箱の温度は T_2 で爪車の動力となる羽根がついています。それぞれの箱には気体が入っているとします。羽根には熱運動する気体分子が衝突しブラウン運動をします。羽根と爪車はつながっているので、爪車もランダムな回転力を受けると考えられます。熱運動には向きがないので爪車は時計回りにも反時計回りにも同等に回転します。しかし、爪車には歯止めがついていて反時計回りの回転が起こりにくくなっています。温度 T_1 の気体中にあるので、歯止めにもランダムな力が働き、時々歯止めがはずれます。 T_1 が T_2 よりも小さいと、平均的には時計回りの運動が起こります。図のように羽根と爪車の間に反時計回りに回転する向きにおもりがついても、温度差があると、「爪車と歯止め」の装置は平均として時計回りに回転し、おもりを持ち上げることができます。このようにして、「爪車と歯止め」の系は熱エネルギーを仕事に変換する熱機関の一種だということがわかります。「爪車と歯止め」モデルは英語ではラチェットモデルと呼ばれます。



爪車と歯止め

2. 分子モーター

近年のナノテクノロジー技術の進歩により、分子レベルで様々な操作や制御ができるようになってきています。特に生体運動に関連する分子の運動のメカニズムに関する研究がマイクロなスケールで行われています。筋肉運動は、マイクロにみると、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントの滑り運動によって起こると考えられています。蛍光物質等をこれらのタンパク分子につけることにより、運動の様子が直接観測されています。マイクロなスケールになると、熱揺らぎが重要な役割を果たすようになります。図は実験室でガラス表面にミオシンタンパクを一様に吸着させたものの上に、蛍光ラベルしたアクチンフィラメントを付着させ、その運動を観測したもののようすです。(文献2) この実験からアクチン分子の平均的な滑り速度などが測定されています。このような分子モーターの運動は熱揺らぎを受けながら一方向に運動する点でファインマンのラチェットモデルを思い起こさせるものです。分子モーターの場合、全体としてみると、ATPという化学エネルギーを仕事に変換している系ですが、一方向運動を生成するメカニズムとしてラチェットモデルが関連するのではないかという説が出されています。

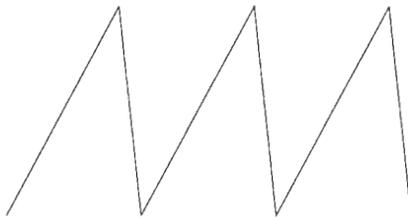


3. ランジュバンモデル

非平衡統計物理学の観点からは、ナノスケールでの熱運動や非平衡過程の例として、ラチェットモデルがさかんに研究されています(文献3)。多くのモデルは熱雑音を揺動力として持つランジュバン方程式を使っています。(文献4) 方程式の形として

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{\partial U}{\partial x} + \zeta(t)$$

のものを使います。 x は粒子の位置を表し、 U は粒子の感じるポテンシャルを表します。 ζ は揺動力を表します。ファインマンラチェットの爪車の回転角が x に対応すると考えるとよいでしょう。爪車と歯止めの間力の左右非対称性からポテンシャル関数 U も左右非対称な関数とします。 U としてよく用いるのは、下図のような鋸歯状のポテンシャルです。



ポテンシャルが左右非対称でも、揺らぎ力がガウシアンホワイトノイズだと、位置は平均として右にも左にも行きません。これはファインマンラチェットモデルで $T_1 = T_2$ に対応しています。熱平衡では特にどちらに回転するということはありません。何らかの非平衡状態にしてやらないといけません。揺動力の他に外から強制力を加える、あるいはポテンシャルの形がATPなどの作用で時間的に変化するなどの様々なモデルが考案され、揺動力の下で、一方向の運動が実現することが示されています。私の考えた一つのモデルは、元々のファインマンラチェットモデルに近いものです。回転角 x がある位置に来ると、歯止めがあり、そこでは右回転は自由にできるが、左回転はある確率でしか許されないというものです。(文献5) その確率が温度 T_2 によって決まるとすると、ファインマンの教科書とのアナロジーがそのまま成り立ち、温度差を付けると、一方向回転が起こります。また、おもりをつけても、温度差があると仕事ができ、平均回転速度が0の条件では、仕事効率が

$$\eta = \frac{T_2 - T_1}{T_2}$$

で与えられるという熱力学との整合性がよいモデルとなっています。もっとも、このモデルはあまり現実的ではないという批判もあります。

マイクロなスケールでの熱揺らぎを伴った現象の解析は今後もさらに重要になると思います。ここでは非平衡統計物理学の観点からのランジュバンモデルを使った研究を紹介しました。

参考文献

- (1) ファインマン物理学 I ~ V 岩波書店
「爪車と歯止め」の節は第II巻の21章
- (2) 分子モーターの解説
御橋廣眞著「筋肉の動きを探る」丸善
柳田敏雄「ブラウン運動を巧みに使う筋肉分子」日経サイエンス2001年10月号 p 30
- (3) ラチェットモデルの解説
R.D. アツミアン「カオスから生体分子モーターへ」日経サイエンス2001年10月号 p 20
- (4) ラチェット系のランジュバンモデルのレビュー
F. Juelicher, A. Ajdari and J. Prost, Review of Modern Physics Vol.69(1997)1269.
- (5) H. Sakaguchi, Journal of the Physical Society of Japan, Vol.67(1998)709.

C-13サテライトシグナルを利用する 対称化合物の立体化学決定

九州大学機能物質科学研究所, *大学院総合理工学府物質理工学専攻
初井 敏英, 宇野 克之, *田中 正俊, 森 章

Application of C-13 Satellite Signal to Identify the Stereochemistry of Symmetric Molecules

Toshihide Hatsui, Katsuyuki Uno, Masatoshi Tanaka,* and Akira Mori

Institute of Advanced Material Study, Kyushu University
*Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University

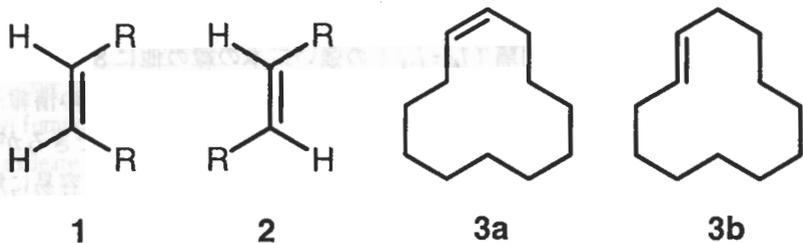
Abstract

In $^1\text{H-NMR}$ spectra of symmetric organic molecules, C-13 satellite signals give a hidden vicinal proton-proton coupling constant, an important parameter to determine stereochemistry. This method is not only effective to A_2 spin system, but also is applicable to $AA'XX'$ or $A_nA_n'X_nX_n'$ system. We applied the C-13 satellite signal analysis to assign the stereochemistry of the photodimer of 9-cyanoanthracene, and to differentiate *cis*- and *trans*-cyclododecene.

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、観測シグナルの両側に弱いシグナルが観測されることはよく知られている。C-13サテライトといわれるこのシグナルは天然に1.1%存在する炭素の同位体 (^{13}C) に起因するもので、中心シグナルから $(1/2)^1J_{\text{C-H}}$ 離れて出現し、炭素-水素結合定数 ($^1J_{\text{C-H}}$) を求めるとき以外は注目されることはほとんどない。しかし、場合によっては主スペクトルからは得られない情報が得られる。その重要なものの一つは対称分子の隣接水素間のスピン結合定数である。このようなスピン系の研究は、磁気共鳴の歴史の初期に行なわれたが¹⁾、その応用は天然存在比からくるシグナル強度の問題から一般的とはならなかった。今日、NMR装置の進歩によりシグナル感度の問題は大きく改善されたので、その利用を検討してみた。

たとえば、化学シフトの等しい2スピン系 (A_2) は一重線として観測され、その間のスピン結合は観測されない。従って、1, 2のようなオレフィンの立体化学を決めるためには、化学シフトに関する情報を既知物質のそれと比較するのがふつうである。従って、たとえば3のように化学シフトの差が僅かであれば、NMRスペクトルによる立体化学の決定は不可能になる。しかし、もしこれらのオレフィン水素間のスピン結合定数がわかれば、*E, Z*異性の帰属が容易に、かつ、より直接的になされる。C-13サテライトはこの問題を解

く方法となり、主スペクトルのみでは決定できない立体化学の決定を可能にする。



理 論

化学シフトの等しい2スピンス系 (A_2) は一重線を与えるが、これが他の核とスピンス結合し、その核の化学シフトが十分離れていれば、 $AA'X$ 系となり、 AA' 部は8本のシグナル(2組のAB型シグナル)に分裂する。この時 $J_{AX} \gg J_{AA'}, J_{A'X}$ であれば、スペクトルは一次近似で取り扱え、強度もほぼ等しくなる。通常、炭素-水素間の 1J は125-180Hzと水素-水素間の結合定数に比べて大きいのでこの条件をほぼ満足し、 ^{13}C 核スピンスをPで表示するとサテライトスペクトルは $J_{AP}, J_{A'P}, J_{AA'}$ の一次式で記述される。アイソトープ効果により $^1H(^{13}C)$ と $^1H(^{12}C)$ の化学シフトが等しくない場合、スピンス系はABPになるが、この場合にも一次近似スペクトルが得られる。Table 1にABP系($H_A-^{13}C-^{12}C-H_B$; Pは ^{13}C 核スピンスを示す)スペクトルのAB部を示した。 ^{13}C 同位体の天然存在比のNMRスペクトルでは、Line 2, 4, 5, 7は ^{13}C を含まない分子の強いシグナルに隠されるので、観測されるのはLine 1, 3, 6, 8であり、 J_{AP} と J_{AB} が求められる。サテライトの左右片方のみしか確認できない場合には、 J_{AP} はアイソトープシフトのため不正確になるが、 J_{AB} を求める目的には支障はない。

Table 1. Transition of AB part of ABP System ($J_{AP} \gg |J_{BP}|, |J_{AB}|, |\Delta\nu_{AB}|$)

Line	Energy	Relative Intensity
1	$\nu_A - (1/2)(J_{AP} + J_{AB})$	1
2	$\nu_B + (1/2)(J_{BP} - J_{AB})$	1
3	$\nu_A - (1/2)(J_{AP} + J_{AB})$	1
4	$\nu_B + (1/2)(J_{BP} + J_{AB})$	1
5	$\nu_B - (1/2)(J_{BP} + J_{AB})$	1
6	$\nu_A + (1/2)(J_{AP} - J_{AB})$	1
7	$\nu_B - (1/2)(J_{BP} - J_{AB})$	1
8	$\nu_A + (1/2)(J_{AP} + J_{AB})$	1

このようなサテライトシグナルが利用できるのは、 A_2 -一重線に限られない。 $C-^{13}C$ サテライトシグナルの利用を更に拡張するために、これらがスピンス結合していても、一次近似スペクトルが得られる条件について考察した。その結果、 A_2 -一重線に限らず、 $AA'XX'$, $A_2A'_2X_2X'_2$, $A_3A'_3X_3X'_3$ 系においても、

$$J_{XX'} = 0 \quad \text{かつ} \quad \Delta\nu_{AX} \gg \Delta |J_{AP}| \gg |J_{AX}|, |J_{AA'}|, |J_{XX'}|, |J_{AX}|$$

であるならば、一次近似C-13サテライトスペクトルが得られることがわかった。このような条件は高磁場NMRによって初めて実現される²⁾。

AA'XX'系のスペクトルは間隔 $|J_{AX}+J_{AX'}|$ の強い二本の線の他に8本の弱い線(2組のAB型シグナル)からなり、後者からは $|J_{AA}+J_{XX}|$ および $|J_{AA'}|J_{XX}|$ の情報が得られる。 $J_{XX}=0$ であればこれらは重なってAB四重線となり J_{AA} を求めることができるが、C-13サテライトシグナルは J_{AA} , J_{AX} , $J_{AX'}$ および J_{AP} で一次分裂しているの、より容易に解析できる。

一方、AA'X₂X_{2'}, AA'X₃X_{3'}系の解析はAA'XX'系に比して困難であり、サテライトシグナルにより、 J_{AA} , J_{AX} および $J_{AX'}$ が求められるメリットは大きい。

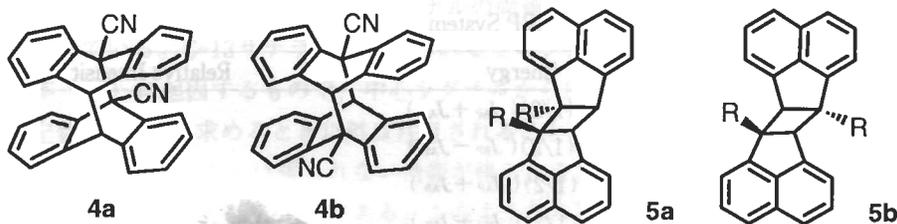
$J_{XX} \neq 0$ の場合には、これらのサテライトも複雑に分裂する。AA'XX'系における強い二本の線(間隔 $J_{AX}+J_{AX'}$)は、サテライトにおいては間隔 J_{AP} , $J_{AX}+J_{AX'}$, J_{AA} で8本に分裂するので、相対的に強い線に注目すれば J_{AA} (および J_{AP})を求めることは可能であるが、実用性は低い。

実験結果

1) A₂系

初めに、立体化学既知のオレフィンのNMRスペクトルを測定し、C-13サテライト法で求めたスピン結合定数をTable 2の1~3に記した。求められた J_{AA} (J_{vic})はトランスおよびシス-オレフィンの標準的な値の範囲³⁾にあり、これらからこの方法がオレフィンのE/Z立体化学を決定する方法として使えることがわかった。

オレフィン以外でも対称分子の立体化学は決定しがたいことが多い。たとえば、アントラセンの二量体(4)やアセナフチレン二量体(5)のシン/アンチ異性は、直接決定しにくい。このような系にC-13サテライト法を適用して、立体化学を決定することを試みた。



9-置換アントラセンは光二量化し、head-to-headおよびhead-to-tail二量体を与えることが知られている。我々はトロポンと9-シアノアントラセン(9-CA)の光反応において副生成物として二量体⁴⁾を得た。¹H-および¹³C-NMRスペクトルから、その構造は4aまたは4bと考えられたが、スピン分裂パターンからはいずれとも決められなかった。head-to-tail付加体4bは既知であるが、文献^{5,6)}にNMRデータがなかったので、メチン水素のC-13サテライトシグナルにより帰属を試みた。その結果、 δ 4.923に観測された一重線のC-13サテライト($J_{C-H}=139.0\text{Hz}$)は4aに期待されるピシナル水素による分裂がなく、4bと決定できた(Figure 1およびTable 2, No. 5)。この結論はHMBC測定による結論と一致した。

Table 2. The NMR parameters obtained from satellite signals^{a)} of symmetric olefins (RCH=CHR) and the photodimer of **9-CA**

No.	Compound	Substituent	$J(^{13}\text{C-H})$ /Hz	$J_{AA'}$ (J_{vic}) /Hz	others
1	Fumaronitrile	CN	182.1	16.7	
2	Dimethyl fumarate	CO ₂ CH ₃	169.5	15.8	
3	Diethyl maleate	CO ₂ C ₂ H ₅	167.2	11.9	
4	Cyclododecene (3)				
	Isomer A (δ 5.32)		151.0	11.0	$J_{AX} = 7.8, J_{AX'} = 1.5$ Hz
	Isomer B (δ 5.37)		149.5	15.2	$J_{AX} = 7.3, J_{AX'} \leq 1.2$ Hz
5	Photodimer (4b)	CN	139.0	ca.0	

a) All spectra were measured at 600 MHz.

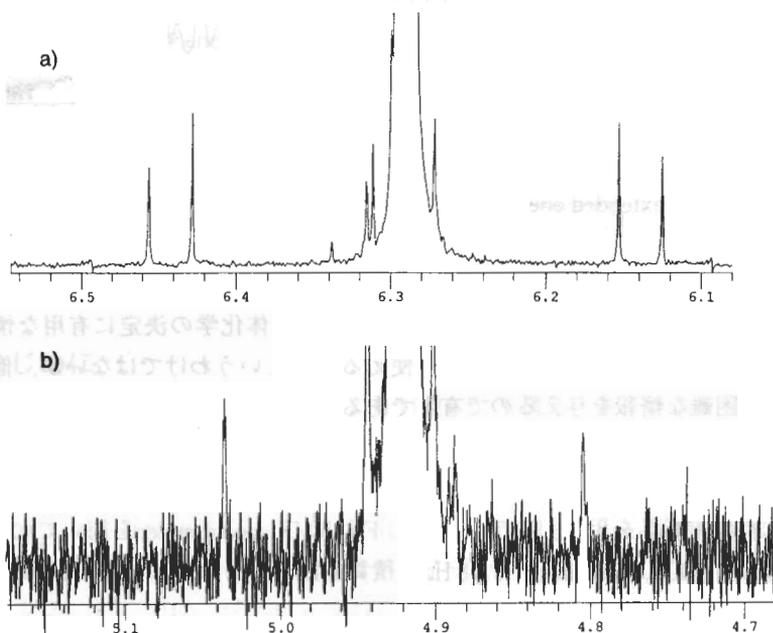


Figure 1. C-13 satellite signal of a) olefinic proton of fumaronitrile and b) methine proton of the photodimer of 9-cyanoanthracene at natural isotopic abundance.

2) A_nA_n'X_nX_n'系

次に市販シクロドデセン (3:C₁₂H₂₂; シス, トランス混合物) のNMRスペクトルを測定した。δ 5.32およびδ 5.37に観測されたオレフィン水素の積分比はこれらが7:3の混合物であることを示した。これら異性体のオレフィン水素は化学シフトも近く、形もかわらないので、NMRスペクトルでは帰属決定困難な混合物である。サテライトシグナルにより組成比70%のδ 5.32のシグナルをシス (3a), 組成比30%のδ 5.37のそれをトランス異性体 (3b)のオレフィン水素と帰属することができた (Figure 2およびTable 1, No.4)。混合物を分離することなく、積分値と組み合わせで帰属と混合比を求めることができた例である。

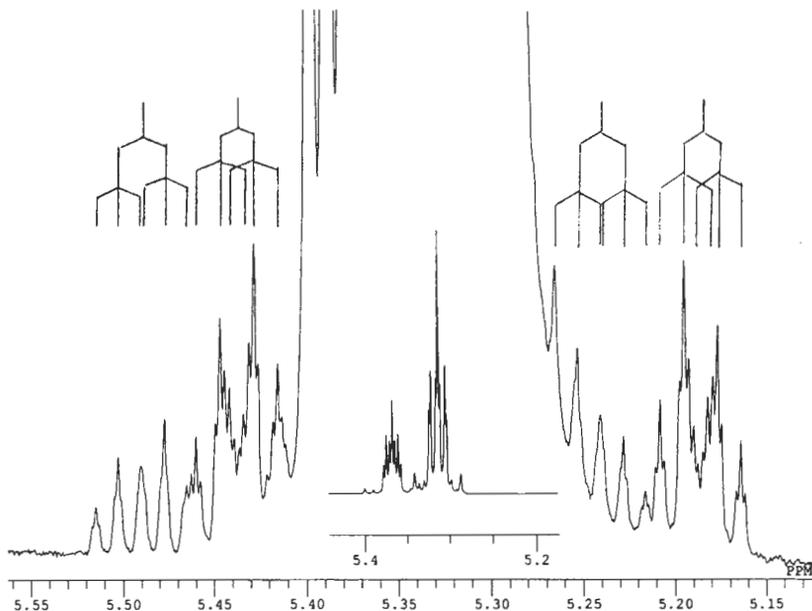


Figure 2. Spectrum of olefinic proton of cyclododecene (3) at natural isotopic abundance (center) and its extended one.

結 論

以上の例に見るように、C-13サテライトシグナルは立体化学の決定に有用な情報を与え、構造決定に役立つことが示された。常に使える方法というわけではないが、他の方法では得ることが困難な情報を与えるので有用である。

実 験

4b以外の試料は市販品を用い、JEOL LA-600 FT-NMR spectrometerを用いて600 MHzで測定した。溶媒：CDCl₃，Resolution: 0.18 Hz。積算回数は、3:128回，他は16回である。

文献および註

- 1) L. M. Jackman and S. Sternhell, "Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy," 2nd ed., Pergamon Press (1969), pp. 140-141.
- 2) 一般にAXあるいはAA'AX'近似のためには、 $\Delta\delta_{AX} \gg |J_{AX}|, |J_{AA'}|, |J_{XX'}|, |J_{AX}|$ が条件であるが、C-13サテライトを問題にする場合は、AA'AX'近似のための条件に加えて、 $\Delta\delta_{AX} \gg |J_{AP}|$ を考慮する必要がある。このため、化学シフトは十分差がある必要がある (少なくとも500Hz)。
- 3) 電気陰性度の大きなヘテロ原子や金属原子を置換基とするオレフィンを除外すると、一般に、 J_{cis} は9~12 Hz, J_{trans} は14~19 Hzである。
- 4) 初井敏英, 田中正俊, 森 章, 未発表データ。
- 5) R. Lalande and R. Calas, Bull. Soc. Chim. Fr., 1960, 144.
- 6) R. Calas, R. Lalande, and P. Mauret, Bull. Soc. Chim. Fr., 1960, 148.

フォトクロミックジアリールエテンを用いた 磁氣的相互作用の光スイッチング

Photoswitching of Magnetic Interaction Using Photochromic Diarylethenes

大学院工学研究院応用化学部門（機能）松田建児・入江正浩

Kenji Matsuda and Masahiro Irie

Abstract

Photochromic diarylethenes having benzothiophene aryl groups with nitronyl nitroxide radicals at both ends of the molecules were synthesized. Photoswitching of the magnetic interaction between two nitronyl nitroxide radicals was studied in terms of ESR spectroscopy. The exchange interaction between two radicals in the closed-ring form isomer was much stronger than that in the open-ring form isomer. Both photocyclization and photocycloreversion quantum yields of the diarylethene with nitronyl nitroxide radicals were found to increase with the increase in the π -conjugated chain length.

1. はじめに

フォトクロミック分子は、光照射により可逆に分子構造・電子構造を変えるため分子レベルのスイッチングデバイスとして用いることができる。¹⁾また有機ラジカルや遷移金属などの不対電子に由来する電子スピンを π 共役系の中に配置すると、そのスピンは互いに π 共役系を通して相互作用する。²⁾そこで我々は、相互作用を担う π 共役系にフォトクロミック分子を組み込むことによって、磁性の光スイッチングを行なうことを目的として研究をすすめている。ここでは、ジアリールエテンをスピнкаップラーとした分子磁性の光スイッチングを目的として、有機ラジカルを有するジアリールエテン誘導体の合成、物性について検討した (Fig.1)。開環体は、 π 共役系のトポロジーが相互作用がOFF状態を取る条件を満たしているのに対して、閉環体では、相互作用がON状態を取る条件を満たしている。

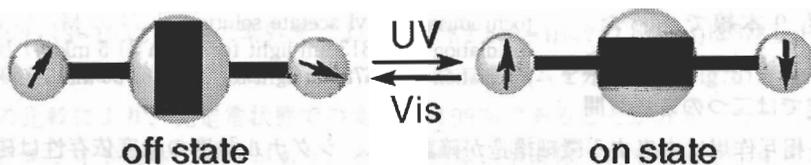
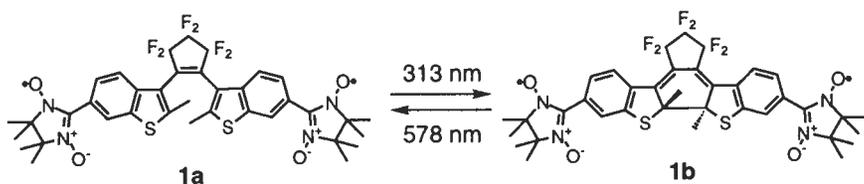


Fig. 1. Photoswitching using photochromic diarylethenes

2. 光スイッチングの検証³⁻⁵⁾

ニトロニルニトロキッドを2個、ジベンゾチエニルエテンに配したジラジカル **1a**を合成した。酢酸エチル溶液中で開環体 **1a**は紫外光により閉環体 **1b**に、**1b**は可視光により **1a**にそれぞれ変換率100%で可逆に相互変換された (Fig.2)。可視域に吸収を持つニトロニルニトロキッドが存在してもジアリールエテンの開、閉環反応は進行することが分かった。閉環反応、開環反応の量子収率はラジカル置換基の無い場合と比べてそれぞれ1/8、1/280と小さくなっていた。閉環体 **1b**ではキノイド構造との共鳴安定化があるために開環反応の量子収率が小さく抑えられたと考えられる。

1aは濃青色結晶、**1b**は黒色結晶として得られた。両異性体の構造をX線結晶構造解析により決定した。開環体 **1a**ではベンゾチエニル環とシクロペンテン環が 86.4° と直交しているのに対して閉環体 **1b**では分子は平面であった (Fig.3)。ベンゾチオフェン環とニトロニルニトロキッドの二面角はどちらの場合も 30° 程度であり、この部分での違いはなかった。



次に両異性体の磁性を、磁化率測定、ESR測定によりキャラクター化された。SQUIDによる磁化率の温度依存の測定の結果、開環体 **1a**では分子内磁氣的相互作用は $2J/k_B = -2.2\text{K}$ とほとんどなかったのに対して、閉環体 **1b**では分子内磁氣的相互作用は $2J/k_B = -11.6\text{K}$ と大きくなった (Fig.4)。室温、ベンゼン溶液中のESRスペクトルは両異性体とも9本線であった。MTHFマトリクス中での低温ESR測定では二つのスピン間

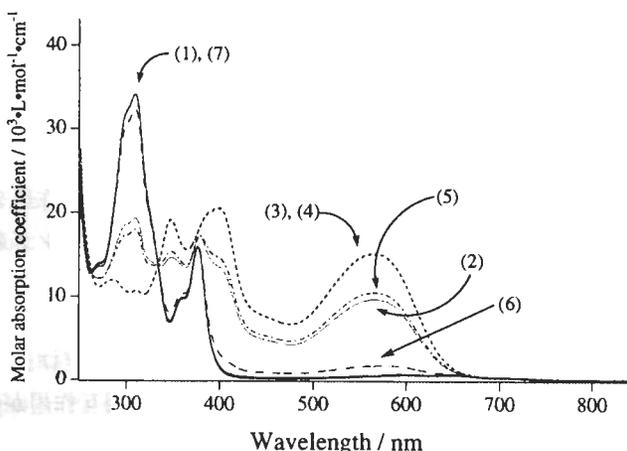


Fig. 2. Absorption spectral change of **1a** along with photochromism (ethyl acetate solution, $1.7 \times 10^{-3}\text{M}$) 1) initial 2) irradiation with 313 nm light for 1 min 3) 5 min 4) 10 min 5) irradiation with 578 nm light for 5 min 6) 30 min 7) 60 min

の双極子相互作用に由来する微細構造が確認され、シグナル強度の温度依存性は磁気測定により得られた交換相互作用の値を用いて合理的に説明された (Fig.5)。以上の実験より、分子内磁氣的相互作用の光スイッチングが実現していることが明らかとなった。

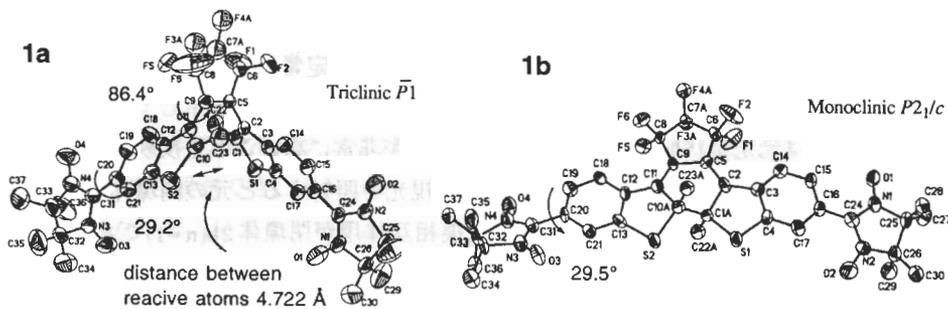


Fig. 3. ORTEP drawing of open-ring form isomer 1a and closed ring form isomer 2a

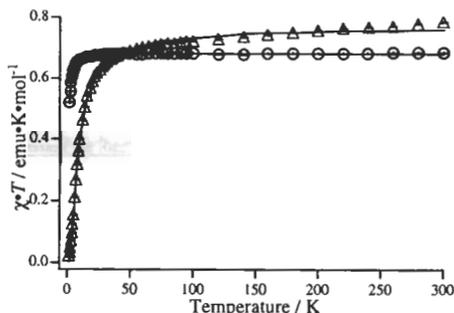


Fig. 4. χT - T plot of diradical 1a (○) and 1b (△)

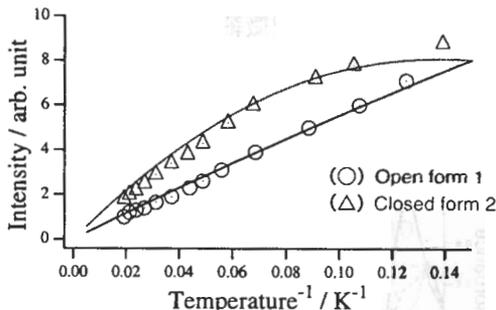
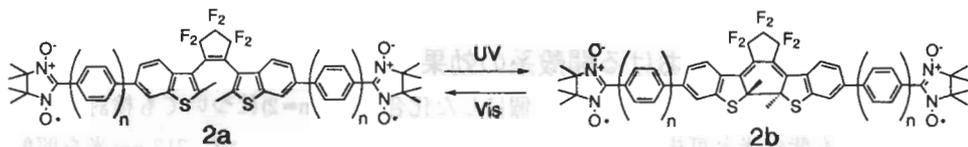


Fig. 5. Temperature dependence of ESR signal intensity of diradical 1a (○) and 1b (△)

3. ESRでの検出⁶⁾

上記の開環体1a、閉環体1bの室温、ベンゼン中のESRスペクトルは、どちらも等価な4個の窒素のハイパーファインカップリングによる9本線となった。これは、開環体1aでも超微細結合定数より十分大きな交換相互作用が働いているためだと考えられる。そこで、先ほどの1aにp-フェニレン基をスペーサーとして導入した2a (n=1,2)の分子を合成し、その挙動に付いて調べることにした。



開環体2a (n=1)は313 nmの紫外光により閉環体2b (n=1)に、2b (n=1)は578 nmの可視光で2a (n=1)にそれぞれ変換され、可逆なフォトクロミズムを示した (Fig.6)。分取した開環体との比較により、光定常状態での変換率は99%であることが分かった。この系でも閉環体にキノイド構造の寄与があり、そのため高い閉環体への変換率を示すと考えられる。

開環体2a (n=1)をベンゼン溶液としESRキャビティー中で光照射を行い、フォトクロミズムに伴うESRスペクトル変化を追跡した (Fig.7)。開環体2a (n=1)は、複雑な15本線を

示し、交換相互作用が超微細結合定数と同程度であることを支持している。366nmの紫外光を照射すると直ちに強い9本線のスペクトルが現れ、光定常状態のスペクトルは9本線であり、交換相互作用の値は超微細結合定数よりも十分大きいことを示している。開環体由来のシグナルは光定常状態では観測されず変換率が非常に高いことを反映している。光定常状態に達した試料に対して、520nm以上の可視光を照射すると元の開環体のスペクトルに戻った。開環体2a(n=1)では小さかった交換相互作用が閉環体2b(n=1)で大きくなり、その変化をESRスペクトルで検出できた。スペクトルのシミュレーションの検討により、開環体と閉環体で30倍以上の交換相互作用の変化があることが分かった。また、スペクトルの2回積分の大きさは開環体2a(n=1)と閉環体2b(n=1)で完全に一致し、スピンは生成も消滅もしていないことがわかった。p-フェニレン基のスペーサーにより、交換相互作用の強度を調節し、超微細相互作用と同程度にし、交換相互作用の光スイッチがESRで観測できるようになった。

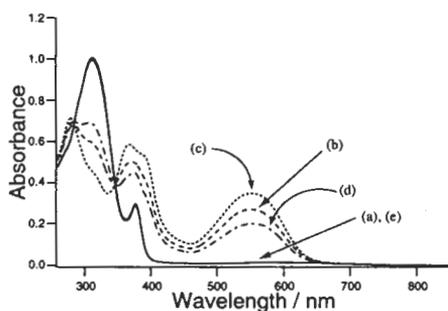


Fig. 6. Absorption spectral change of 2a along with photochromism (ethyl acetate solution, $1.3 \times 10^{-5} \text{M}$) a) initial b) irradiation with 313 nm light for 2 min c) 10 min d) irradiation with 578 nm light for 2 min e) 20 min 7) 60 min

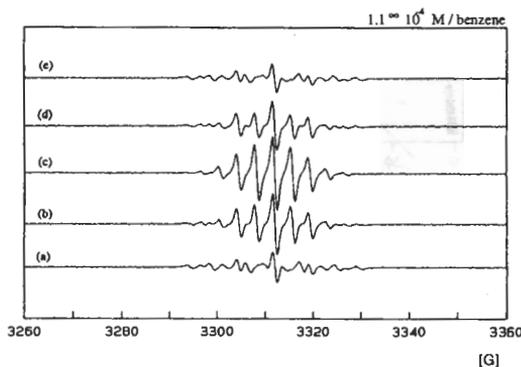


Fig. 7. ESR spectral change of 2a along with photochromism (benzene solution, $1.1 \times 10^{-4} \text{M}$) a) initial b) irradiation with 366 nm light for 1 min c) 4 min d) irradiation with >520 nm light for 20 min e) 50 min

4. フォトクロミズムにおける開殻系の効果⁷⁾

続いてp-フェニレンのスペーサーを2個にした化合物2a (n=2)についても検討を行なった。2a (n=2)も紫外光と可視光で可逆なフォトクロミズムを示したが、313 nm光を照射中の光定常状態の変換率は87%であり、キノイド構造の寄与が小さくなっていることが明らかとなった。閉環体の吸収極大波長は1bで565 nm、2b (n=1)で553 nm、2b (n=2)で548 nmと共役長が長くなると短波長化する特異な性質を示すことが明らかとなった。ラジカルを取り除いた化合物では共役長が長くなるに従って、吸収極大波長は523 nmから549 nmと長波長化し、p-フェニレンのスペーサーを2個にすると開殻系の効果は吸収極大波長の点からではなくなくなっていることが分かった。また、閉環、開環反応量子収率を調べたところ、ジアリールエテン部分とラジカル部分の距離が遠くなるに従って、閉環、開環両反

応とも量子収率が増加することが認められた。また、開環反応量子収率（60倍）は閉環反応（3倍）に比べて顕著な増加を示し、閉環体におけるキノイド構造との安定化の存在によって説明できた。

ESRスペクトルのスイッチングは

-フェニレンのスペーサーを2個にした化合物 2a (n=2)についても観測でき、シミュレーションとの比較から交換相互作用Jの値を決定することができた。その結果を下のTable 1に示す。

Table. 1. Photoswitching of exchange interaction using diarylethenes

	open-ring form isomer		closed-ring form isomer	
	ESR line shape	$ 2J / k_B K $	ESR line shape	$ 2J / k_B K $
1	9 lines	2.2	9 lines	11.6
2 (n = 1)	15 lines	$\begin{cases} 1.2 \times 10^{-3} \\ < 3 \times 10^{-4} \end{cases}$	9 lines	> 0.04
2 (n = 2)	5 lines	$< 3 \times 10^{-4}$	distorted 9 lines	0.010

文献

- 1) M. Irie, Ed. *Chem. Rev.* **2000**, issue 5, thematic issue on "Photochromism: Memories and Switches".
- 2) O. Kahn, "Molecular Magnetism," VCH, New York, 1993.
- 3) K. Matsuda and M. Irie, *Chem. Lett.* **2000**, 16.
- 4) K. Matsuda and M. Irie, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2577.
- 5) K. Matsuda and M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7195.
- 6) K. Matsuda and M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8309.
- 7) K. Matsuda and M. Irie, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3466.

スピン系における磁場が誘起する量子現象

九州大学大学院理学研究院 網代 芳民

Field-Induced Quantum Phenomena in Spin Systems

Yoshitami AJIRO

Department of Physics, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Abstracts

Quantum spin effects and spin frustration effects are the key issues for recent theoretical and experimental studies of low-dimensional magnetic systems. We synthesize a various kind of model quantum systems, such as bond alternating chain, spin ladder systems and so on and apply various complementary techniques, including advanced crystal preparation, nuclear magnetic resonance, electron spin resonance, neutron scattering, muon spin relaxation, high field magnetization as well as susceptibility and specific heat measurements, in cooperation with many other groups.

In this report, following after a brief introduction of quantum spin systems, we review our recent work, with emphasis on the field-induced quantum spin effects. High-field magnetization and electron spin resonance techniques were applied to study the field-dependent behaviors of various kind of quantum spin systems, by using a pulsed high magnetic field up to 55 T and a wide range of radiation sources up to 900 GHz at temperature down to 0.1 K.

At the last part, we propose a future target of desirable model substances which may exhibit attractive and, more importantly, unexplored possible extension in the field of novel magnetism.

1. はじめに

最近の低次元磁性体の研究分野では単一相互作用からなる構造的には単純・一様な一次元鎖や正方格子系に留まらず、交替鎖や梯子鎖などに代表されるように複数の相互作用が周期的に混在して相互作用がトポロジカルな空間構造を構成する修飾された変形磁気鎖が興味の対象になっているが、磁氣的構成単位を「原子」から「分子」にすることで物質設計の自由度が飛躍的に拡大し、多彩な物質群において特徴的なスピン系の構築が可能になる。より包括的に言うならば、電荷、スピン、軌道、格子等の関わりが新しい機能発現に重要であるとの認識から、魅力的な物質の宝庫である分子性化合物を舞台として展開される物性研究への期待は多大なものである。

本報告では、低次元磁性体研究の立場から量子効果に起因する新しい磁性に関する最近

の研究を紹介し、分子集合系を舞台にして展開される多彩な量子スピン効果の研究への期待を述べる。本実験的研究を行う際に対象となるモデル磁性体の合成は、大変重要な位置を占めている。その段階に於いて、九州大学中央分析センター工学分室(箱崎地区)に常設されているX線回折系やエネルギー分散型蛍光X線分析装置等を使用し、モデル磁性体の定性・定量分析を常時行っている。

2. 書かでものこと一何故、低次元磁性体の相転移研究か？

自然界で見られる強磁性や超伝導などの興味ある物質の性質は、電子・原子・分子などのミクロな粒子が個別にもつ性質ではなく、物質を構成する数多くのミクロな粒子が互いに協力的あるときには反発的な相互作用を及ぼしあって示す相転移という多体現象を通して現われる粒子集団の性質である。その結果、物質を構成するミクロな粒子が個別には持たない千変万化の物性が巨視的に現われる。原子の集まりである分子からはじまって、階層構造を持つ複雑なシステムにおいては、その構造の多様性を反映したさまざまな協力現象と機能が生じる。こうした観点から、自然界で発現する種々の協力現象・相転移の機構や普遍性を追及することによって、新しい機能の発現を目指すことができる。

磁氣的相互作用が近似的に一次元もしくは二次元格子内に限定された系、いわゆる低次元格子上のスピン系に着目する理由は、種々の協力現象の普遍的な理解にとって基本的かつ簡明な系であると同時に、低次元系に固有の未知の現象の発見を通じて相転移現象のより深い理解に寄与できると考えられるからである。より一般的に言えば、低次元化や極小化、ときには構造周期を破壊した無秩序化による物質状態の極限化あるいは極低温や強磁場、高圧等の外部パラメータの極限化によって、非日常的な極限条件下で発現する特徴的な存在形式や運動形式を追及することによって、日常世界では隠されている新しい現象と機能が発見できると考えられる。

3. 量子スピン系

低次元磁性体の研究によって、最近では相転移に関する量子スピン効果とスピンフラストレーション効果(相互作用の競合効果)が極めて重要な概念として認識されるに至っている。通常の磁性体では低温になって熱ゆらぎが抑えられると協力的なスピン間相互作用によって強磁性体や反強磁性体など隣り合うスピンの矢印が平行や反平行の矢印として揃っている秩序化した静的・規則的な磁気秩序が生じる。量子効果やスピンフラストレーション効果がさほど大きくなければ古典的な基底状態に補正を加えた近似的な描像が成立するが、これらの効果が大きくなると熱的ゆらぎが完全に消失する絶対零度においてもスピン秩序がなく、古典的状态と対応関係のない新しい状態が出現する。

低次元磁性体において顕著に現れる量子スピン効果はBethe以来論じられて来た古くて新しい問題である。比較的最近(1983年)Haldaneによって一次元反強磁性ハイゼンベルグ系に対して基底状態、励起状態が整数スピン、半整数スピンの場合に本質的に異なることが提唱されたことはよく知られている^[1]。半整数スピン系の基底状態では相関関数が長距離的なべき乗則に従って緩やかに減衰することから長距離秩序状態に似た準長距離的な状

態にあり、秩序と無秩序の境界に位置する臨界的な(marginal)状況にあると言える。基底状態と第一励起状態との間にエネルギーギャップは存在せず、低エネルギー励起の分散関係は古典的基底状態からのずれを表わすスピン波に似ているように見えるがその性格は本質的に異質であり「スピノン対」の励起と考えられている。整数スピン系では基底状態と第一励起状態との間に有限のエネルギーギャップ(量子スピンギャップ)が存在するのみならず、相関関数は短距離的な指数関数則に従って急速に減衰することから無秩序な状態にある。Haldaneが予想したスピンギャップを有する基底状態(Haldane相)がAffleck-Kennedy-Lieb-TasakiによってValence Bond Solid(VBS)状態と言われるスピン一重項対の敷き詰め状態として理解されることが示されて以来、量子効果によってスピンギャップを生じる系が活発に研究されている。VBS状態では $S=1$ のスピンが対称化された2個の $S=1/2$ スピンで表現され、隣り合う格子点上の $S=1/2$ スピン間で形成される一重項対(Valence Bond)で格子を敷き詰めることができる。このVBS状態の描像から、整数、半整数スピン系の基底状態の違いが直観的に理解される。整数スピン系では一重項対を組み合わせることで並進対称なVBS状態を作ることができるが、半整数スピン系では並進対称性が保てない。

スピン一重項対の敷き詰め状態の概念は、フラストレーション効果をもつ三角格子反強磁性体の基底状態モデルとしてAndersonが提案したResonating Valence Bond(RVB)モデルにさかのぼると考えられるが、このRVBモデルがその後、高温超伝導機構モデルとして再び登場した。今や、より一般的な強相関係のスピンギャップの問題が超伝導発現機構とも関連して活発に研究されている。スピンギャップそのものは異方的なスピン系や単純な反強磁性二量体で現われるが、多体量子効果による等方的なスピンギャップ状態は、量子系固有のエネルギーギャップをもつ特異な一重項基底状態(量子スピンギャップ相)であることが注目されている。この観点から、整数スピン一次元反強磁性体、スピンパイエルス系を含む交代ボンド系や梯子格子系、より一般的には相互作用が周期的に変わる一次元スピン多量体系などの空間構造を有する修飾された変形磁気鎖において予想される一重項対の種々の配置による新しい基底状態の研究が興味ある話題を提供している。

このように、一次元ハイゼンベルグ反強磁性体に代表される量子スピン系では多体効果によって量子効果が増幅され基底状態は古典的な描像とは全く異質のものになる。そこでは古典描像から予想される反強磁性的な長距離秩序は破壊されている。温度効果による長距離秩序の破壊の原因が「熱ゆらぎ」による擾乱と言われるように、熱擾乱のない絶対零度において重要となる量子効果による破壊の原因は「量子ゆらぎ」による擾乱と言われている。ある種のスピン系において絶対零度でもスピン秩序がなく、それ故、スピンの固体状態が出現しないと言うことは、液体ヘリウムが量子効果のために固体になりえないことを想起させる。液体ヘリウムは低温においてボーズ凝縮によって超流動状態に移る。量子スピン状態ははたして如何なる状態にあるのであろうか。最近の研究によれば、大きなゆらぎを持つ量子スピン系において古典的な意味での無秩序状態のなかに豊富な量子力学的な構造が発見されつつあり、それらが新しい秩序形態として注目されてきている。例えば、局所的な量子共鳴状態であるスピン一重項対を秩序の単位としてそれらが空間的にある特別な配置で敷き詰められた状態が現われる。これらの秩序単位の配置は空間的な広

がりをもつばかりではなく個々のスピンは時間的に変化する動的状態にあるが、さりとて無秩序ではなく量子的コヒーレンスを持った一つの相を形成する。これらの状態は古典スピン系に対応状態をもたない全く新しいタイプの量子基底状態であり、高温超伝導の発現機構とも関連して活発な研究がなされている。実験的には、これらの時間的、空間的に大きな揺らぎをもつ基底状態の検証と解明、さらには新しい量子凝縮相の発見をめざして、典型物質となり得るモデル磁性体を探索、合成し、比熱・磁化率等の熱力学的諸量の測定、磁気共鳴、中性子回折、 μ SR、強磁場磁化測定などによる広範な実験研究が行われている。

4. 最近の研究から

有限温度で生じる相転移は、特定の臨界温度以下で構成要素集合系に内在する相互作用が「温度ゆらぎ」による熱擾乱に打ちかかって生じる。したがって、古典系では物質内部の相互作用エネルギーの利得と熱エントロピーの損失とのせめぎ合いの結果、熱擾乱が消失する絶対零度ではゆらぎのない基底状態に凍結する。ところが量子系では不確定性原理に起因する「量子ゆらぎ」による擾乱が存在するので絶対零度において、相互作用、担体濃度、格子定数などの物質パラメータや磁場、圧力などの外部パラメータの制御によって相転移が現われる。これらは量子相転移と呼ばれているが、その臨界点近傍の低温では「量子ゆらぎ」と「熱ゆらぎ」の興味ある相互関係によるクロスオーバーが観測される。

以下では、量子スピン系に関する多彩な研究の内から、特に「スピン系における磁場が誘起する量子現象」に関して我々の研究を中心に最近の話題を列挙する。

(1) 量子スピングャップ系 $Cs_3Cr_2X_9$ ($X=Cl, Br$)の量子相転移とボーズ凝縮

$Cs_3Cr_2X_9$ ($X=Cl, Br$)は一連の $A_3M_2X_9$ 型六方晶化合物に属する反強磁性ダイマー化合物である。孤立ダイマー極限では基底状態はスピーン重項で、スピングャップを伴って励起三重項、五重項、七重項がある。パルス磁場と 3He を併用して40T、0.5Kで測定した低温強磁場磁化曲線はCl塩、Br塩で対比的な特徴ある挙動を示す。その結果は両塩のダイマー間相互作用の大きさの違いを考慮したスピングャップ系における磁場誘起量子相転移として理解することができる。

一般的に言って、量子スピングャップ系ではギャップエネルギーに対応する温度以下の十分低温では基底一重項状態が実現し磁氣的に不活性な非磁性体として振る舞う。しかし、この非磁性一重項状態は量子効果によってもたらされた量子的非磁性相であって、系を構成する原子は有限の大きさのスピンをもち磁性原子であり、かつ磁性原子間には相互作用が働いている。この意味で、本来的にスピンを持たない非磁性原子の集合体としての古典的な非磁性体とは異質であり、量子スピン効果によって系のスピンの死滅した状態に見えるに過ぎない。潜在的には高い磁気活性能力を有しているために、何らかの手段によってスピングャップを抑制して新しい磁気相を実現することができる。

基底一重項磁性体では有限のスピングャップを隔てた上部エネルギー準位に磁気励起状態がある。したがって、強磁場印加によるZeemanエネルギーの利得によって上位にある磁気準位を下げたスピングャップを破壊すれば磁性が復活するから磁気相を磁場誘起する

ことが可能である。より一般的には、離散的なエネルギー準位を持つ系において磁場中でエネルギー準位の交差が生じる場合、基底状態の逐次的な転移が期待される。

このような量子非磁性相に対する磁化過程ではどのような特徴が観測されるのであろうか。相互作用の空間構造を反映した各種の量子非磁性相が理論的に予想されているが、それらの状態はVBS描像、すなわち一重項対の敷き詰め方の違いによって理解することが出来る。交替鎖や梯子鎖などの量子スピン鎖の磁化過程において磁化が特定の値に量子化された、いわゆる磁化プラトーが出現するが、VBS状態を構成する各一重項対が磁場によって順次三重項対に移り変わることで理解される。特に、両方の対の存在比が簡単な整数比である状態では、両方の対が規則的に配列することによって励起状態との間にエネルギーギャップを生じさせ、磁化曲線にプラトーが出現する原因となる。

この特徴的な磁化過程に対応して、磁場による基底状態の変化を粒子描像を用いて模式的に示したものが図1である^[2]。ダイマー内の1/2スピン対が反平行のシングレット準粒子と平行のトリプレット準粒子を考えると、磁化過程はZeeman利得で生成されるトリプレット準粒子の存在数で表わされる。この時ダイマー間反強磁性相互作用の横成分は粒子を移動させる相互作用を与え、縦成分は粒子間斥力相互作用を与えるために生成されたトリプレット準粒子は独立ではなく粒子間に強い相関が働く。そのために、トリプレット準粒子が移動可能という意味で<液体状態>にあって磁化が増加するスロープ状態と、それに対して移動不可能という意味で<固体状態>にある磁化プラトー状態が現われる。このよ

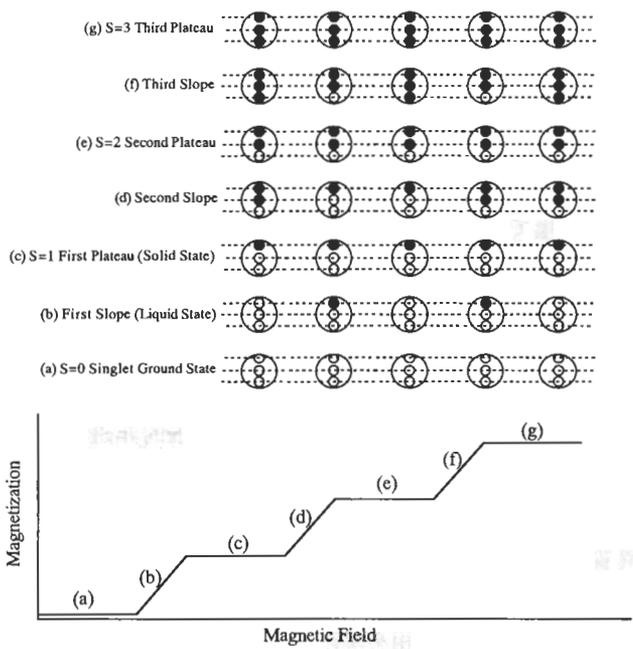


Fig.1 磁場による基底状態の変化を模式的に示した図。大きな白丸はS=3のダイマーユニットを表す。小さな丸は、1/2スピン対で、●がトリプレット状態、○がシングレット状態を表す。各(a)~(g)状態は、下部に示す磁化過程に対応。

うにして、 $\text{Cs}_2\text{Cr}_2\text{Cl}_9$ の磁化過程においてHubbardモデルによる<金属>、<絶縁体>転移と等価な量子相転移が逐次的に現われる。

$S=1$ 交替ボンド鎖や $S=1/2$ 交替ボンド競合鎖、最近では $S=1, 1, 1/2, 1/2$ 混合スピン鎖など多様な空間構造を持つ系において新しいタイプの磁化プラトーの出現が予想されており、一部実験的にも検証されている。重要なことは、これらの系では系のハミルトニアンがもつ並進周期性と一致しない周期性が現われることで、スピン対の配位形態に応じて結晶の周期性からだけでは予測のつかないプラトーが出現する。磁化プラトーが出現する(必要)条件は $n(S-m)$ =整数で与えられる。ここで n :基底状態での1周期当たりのスピン数、 S :スピン量子数、 m :サイトあたりの磁化である。量子ホール効果との類似性が議論されている。

現実のスピンギャップ系では多少とも三次元的な弱い相互作用が存在するが、零磁場では絶対零度においても自発的な磁気秩序を示さない。しかし、十分低温でギャップを破壊すると弱い相互作用による磁気秩序が現われる。粒子描像に立てばこの秩序状態はボーズ凝縮状態に対応する。

スピンギャップを制御する手段としては磁場印加が直接的であるが、圧力印加やドーピングの方法がある。圧力を加えて磁気パラメータを連続変化させてスピンギャップ相の発生過程を追及する研究や量子相の間の相転移を実現する研究、不純物原子を投入して系の量子干渉性を破壊し量子相と古典相との移行過程を究明する研究は重要である。後者の例としてスピンパイエルス系 CuGeO_3 に関する一連の研究を挙げることが出来る^[3]。一次元鎖を不純物で切断すると両側の量子的コヒーレンスが破壊されると同時に古典的な相関が強められ、弱い鎖間相互作用によって古典的な秩序が出現する。これらの研究を通じて量子効果と相転移に関する理論的予言を検証し、同時に従来のはず組みでは理解出来ない新規な現象を発見して、理論的研究にインパクトを与えることをめざす努力がなされている。

(2) Cu-benzoateにおける磁場誘起ギャップの直接観測

$S=1/2$ 反強磁性ハイゼンベルグ鎖は、量子臨界現象を示す最も単純な系として、これまで多くの研究がなされているが、磁場中挙動も非常に特異である。即ち、古典系、量子系ともにスピンギャップがないことを直接反映して磁場中で磁化が連続的に誘起されるが、古典系では磁化ベクトルが磁場方向に様にキヤントすることによって磁化が発生するのに対して、量子系では一重項基底状態に生成される磁氣的欠陥に伴って磁化が発生する。長距離秩序を持たない量子系の磁気励起が、通常の古典的な秩序化磁性体におけるスピン波とは異質の「スピノン対の励起」であることは先に述べたが、量子系では磁気欠陥の平均距離に対応して誘起磁化に比例した波数、したがって一般的には非整合波数をもつギャップのない励起モードが現われる。最近、典型的な $S=1/2$ 反強磁性ハイゼンベルグ鎖Cu-benzoateにおいて磁化率、比熱、中性子散乱実験が、極端条件下で詳細に行われ、磁場中挙動が明かにされた。その結果によると、期待される非整合波数励起モードが観測されるが、以外なことに完全にギャップが消失せず磁場によって誘起されるギャップが現われることが明かにされた。場の理論に基づいてそれらを統一的に理解する試みが行われた結

果、磁場誘起ギャップの原因はCu-benzoateにおける外部磁場に垂直な成分を持つスタガード磁場の存在であることが結論付けられ、この系が磁場中において量子sine-Gordon系の格好のモデルを実現することが指摘された。

我々は、Cu-benzoateの単結晶試料を作成、広範な温度、磁場(周波数)領域で電子スピン共鳴(ESR)実験を行い、磁場誘起ギャップと特徴的なブリーザ励起の直接観測に成功した^[4]。図2に示した $T=0.5\text{K}$ における強磁

場高周波ESR測定結果から磁場誘起エネルギーギャップの非線形的な磁場依存性が明確に示され、この励起がsine-Gordon模型の解の一つのブリーザに対応する素励起として解釈することができる事を示した。また、様々な周波数における広範な温度変化の測定から、温度の低下に伴い共鳴磁場が低磁場側にシフトし、スペクトルの線幅がブロードに変化していることが観測された。この温度依存性は、 $S=1/2$ 反強磁性ハイゼンベルグ鎖に共通な振る舞いである短距離秩序に伴う相関長の発達として解釈できた。さらに低温では、ギャップのないスピノン励起とギャップをもつブリーザ励起に起因するスペクトルが共存し、最低温度では、ブリーザ励起からのスペクトルのみが観測された。スピノン励起とブリーザ励起の共存が零温度、零磁場の量子臨界点近傍におけるクロスオーバー現象と考えられることが示された。

(3) 分子磁性体の量子現象

近年、飛躍的な物質合成技術の進展にともない、系統的な分子設計に基づいて多様かつ柔軟性に富む分子複合系磁性体が構築されるようになり、その量子物性が基礎的にも応用的にも注目されている。こうした状況において、物理と化学との十分な連携の下で本格的かつ系統的に分子磁性を研究し、精密物性実験、さらには新しい固体物性の舞台として分子磁性研究の新展開をめざす意欲的な研究が行われている。有限個の磁性金属イオンからなる分子磁性クラスターは、理論的アプローチの点からも、格好の対象であり、実験と併せて活発な研究活動が行われている分野である。

分子複合系磁性体の顕著な特徴はその階層構造にある。基本的なスピン源は金属イオンと有機分子であるがそれ等を構成要素として少数スピンからなる分子磁石が形成される。通常、**のナノサイズ系は粒子寸法が分布した複雑な磁石集合体(多分散系)であるのに対して、巨視的結晶を構成する分子磁性体は同一分子の集合体であり、それ故に同一寸法のナ**

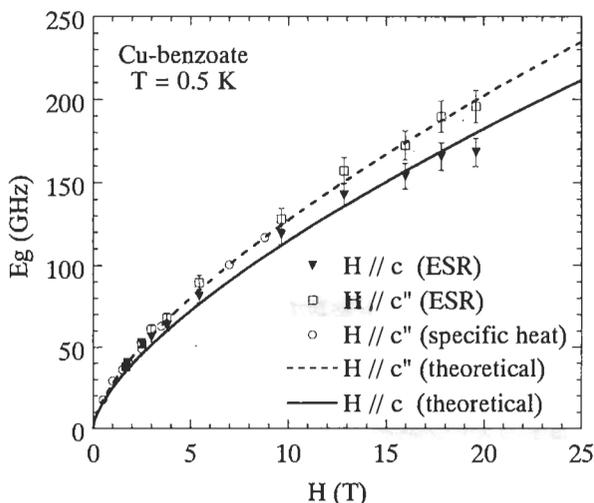


Fig.2 $T=0.5\text{K}$ における磁場誘起エネルギーギャップに磁場依存性。

ノサイズ磁石からなる分子磁石集合体(単一分散系)とみなすことが出来る。ナノサイズ粒子に代表される少数粒子系の特徴は離散的な量子エネルギー準位の存在である。系のサイズが十分に小さくなると系のエネルギー準位が離散的になり、巨視的な古典系に対応状態がない新しい量子物性が期待される。つまり、系のエネルギー準位の構造を直接反映した量子的振る舞いがみられるようになる。したがって系の量子エネルギー準位の確定が重要になると同時に量子ダイナミクスによる緩和機構すなわち量子トンネリングによる磁気緩和の解明が重要になる。

量子トンネリングに関してこれまで最も活発に研究されているのは高スピンMn₁₂分子である。この分子は4個のMn²⁺(S=3/2)から成る正四面体がリング状に結合した8個のMn³⁺(S=2)に囲まれた構造を持ち、基底状態がS=10状態にある。2Kまでの磁気緩和は熱活性型であり超常磁性体のブロッキング挙動が観測されるが、更に低温では緩和時間が温度によらず一定になることから量子トンネリング機構が示唆された。磁化過程の測定から量子トンネリングの直接的な証拠が得られる。磁化曲線が等間隔の特定磁場で階段状の変化を示すことから、離散的なエネルギー準位構造を反映して磁場誘起の共鳴トンネリングによって逐次的に特定の磁場において磁化の反転が生じていることが明かにされている。

分子磁性体に関して、磁気リングFe¹²分子磁性体と4核集積型金属錯体[Mn(hfac)₂]₂(bnn)の強磁場磁化測定によって量子エネルギー準位構造を研究した^[5]。前者は、イタリアのGatteschiグループによって合成された12個のFe³⁺(S=5/2)イオンがリング状に反強磁性的な相互作用で結合している物質である。これまで同グループによる磁化率測定から相互作用が約31.9Kと見積もられている。

我々は、0.1Kまでの低温、54Tに至るパルス強磁場中で磁化測定を行い、図3に示すように有限個数クラスタ磁性に特徴的である離散的な量子エネルギー準位の交差に由来する明確な磁化過程の逐次転移や緩和現象の異常を観測した。系のエネルギー準位構造を反映して、磁場の関数として等間隔の5段階磁化ステップが観測され、エネルギーギャップ13Kを直接的に決定することができた。さらに注目すべき点は、磁化ステップ領域において観測される磁気緩和の異常現象が量子ダイナミクスによる準安定状態の緩和機構と関連する可能性があり、量子エネルギー準位の交差に関連する物理現象を明らかにするための基礎が確立された。

後者は、岩村グループによって合成された2個の常磁性Mn²⁺(S=5/2)イオンと2個の有機フリ

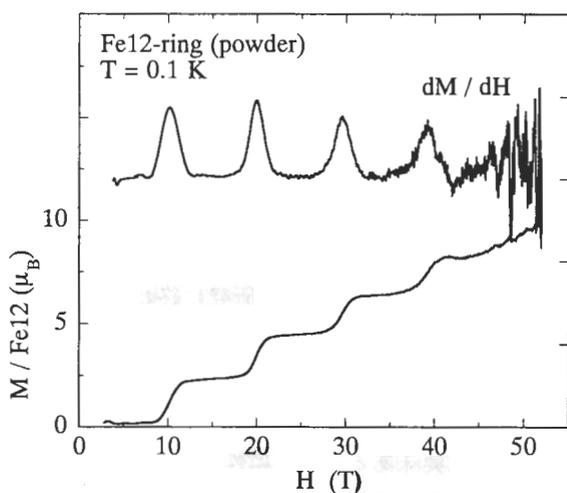


Fig.3 T=0.1Kにおける磁化過程。

ラジカル($S=1/2$)架橋配位子から成る新しい4核集積型金属錯体で、同グループの磁化率と磁化測定から磁氣的性質が明らかにされている。結晶構造は三斜晶型(空間群 $P1$)で、各分子クラスタは底辺を共有した2個の三角形から構成される菱形“butterfly”構造をしている。クラスタ内に2種類の反強磁性相互作用(Mn-ラジカル, ラジカル-ラジカル)があるためにスピンプラストレーション効果が生じ、相互作用比と磁場の大きさに依存して多様な基底状態($S_T=0$ から $S_T=6$)が可能になる。

この興味ある物質の粉末試料について、40Tに至る強磁場磁化、 ^1THz に至る高周波ESR、200mKに至る低温交流磁化率測定を行った。40Tにおける飽和磁化は $8\mu_B$ で、磁化曲線は低磁場を除くと $S_T=4$ の常磁性計算値と良く一致した。基底状態が $S_T=4$ であることが確認されると共に、40Tまで磁場を印加しても期待される $S_T=5, 6$ を持つ高スピン状態が実現しないことが判明した。より高磁場での測定が必要である。約1T以下の低磁場において異常な磁気ヒステリシスと零磁場近傍でわずかながらも明確な磁化の跳びが観測された。静的な磁化測定では観測されないこれらの異常の原因はパルス磁場測定に固有な高速磁場掃引に由来する動的なものであろう。量子トンネリング磁化現象との関連が考えられるので、極低温まで交流磁化率測定を開始して予備的な結果を得ている。XバンドESRは数多くの構造をもつ豊富なスペクトルを与えるがあまりに複雑でシミュレーションから遷移の起源を同定することが出来ない。期待されるように、強磁場・高周波ESRスペクトルは良く分離した微細構造を示した。スペクトルの温度および周波数依存性から負の結晶場異方性 $D=-0.1\text{K}$ の存在が明らかになった。この負の結晶場異方性によって生じる一軸異方性は、巨視的磁化の量子トンネリング機構と密接に関連しており、非常に重要な磁気パラメータである。

密接に関連する4核集積型金属錯体として松本グループ(熊本大学理学部)が合成した $[\text{Mn}(\text{MeOH})\text{L}(\text{OH})\text{M}(\text{bpy})]_2$ についても強磁場磁化測定を行った。一連の化合物でMを変えることによって種々の組み合わせの2種類のスピンから成る幾何学的フラストレーション系を実現することが出来る。M= Cu^2+ 化合物では、40Tまでの範囲で階段状に変化する磁化が観測された。異なる量子エネルギー準位を持つ $S_T=3$ から $S_T=4$ 状態への転移に対応しており、その臨界磁場から相互作用の大きさを議論することが出来る。

4. モデル磁性体

物性実験における試料の重要性はいまさら強調するまでもないが、とりわけ、より一般的な高次の階層的空間構造を持つスピン格子を対象になされる理論的研究が単なる数学的モデルあるいはtoyモデルの研究に終わるかどうかは、現実物質にモデル系を創出して実験的検証ができるかどうかにかかっている。逆に、従来の枠組みでは理解できない異常磁性とも言える新規な現象を示すスピン系を発見して、積極的に理論的研究にインパクトを与えることも重要である。

具体的に興味あるモデル磁性体を挙げると、

(1) 構造をもつ修飾磁気鎖

VBS状態は $S=1/2$ スピン間で形成される一重項対が構成単位であることから、スピン $1/2$

を構成要素として多様な量子非磁性相を構築することが試みられている。例えば、Haldane相を示す $S=1$ 反強磁性鎖は強磁性結合した二量体から成る反強磁性鎖や強磁性的に結合した $S=1/2$ 反強磁性二重鎖などで実現することが出来る。最も単純な構造は $S=1/2$ 交代ボンド鎖であろう。構造的な交代鎖やスピンパイエルズ転移に伴って現われる交代鎖があるが、これらの系では無限小の違ひの交代があれば、構造のない様な $S=1/2$ 磁気鎖に存在しないスピングャップが発生し、ダイマー相と言われる非磁性一重項状態が出現することは良く知られている。整数スピン交代鎖では事情が大きく異なっている。様な $S=1$ 磁気鎖自体がスピングャップを持つHaldane相であるが交代が付け加わると競合効果によって次第にスピングャップが減少し臨界交代比のとき一端消失した後、ダイマー相に転移して再び増加する。この臨界交代比の時には $S=1/2$ 一様鎖と同様の準長距離秩序状態にあると考えられる。この様にして $S=1$ 以外の整数スピン交代鎖では複数の逐次転移が予想されている。強磁性結合した3量体や4量体から構成される反強磁性鎖は $S=2/3$ や $S=2$ 系の研究のために重要であり、前者については研究が開始されている。このような観点から、スピン $1/2$ を構成要素としたより一般的な高次の階層的空間構造を持つ修飾磁気鎖の実験研究が待たれている。

(2) 混合スピン鎖

反強磁性量子スピン鎖の挙動がスピンの整数、半整数によって定性的に異なることから考えて、「整数スピンと半整数スピンの混在すれば何が起こるか」は興味ある課題である。異種スピン混合磁気鎖の場合基底状態が磁気的か、非磁性かは自明ではない。スピンの $1, 1, 1/2, 1/2$ というパターンで鎖状に並ぶと基底状態は非磁性無秩序となりスピングャップが現われることが示されている。また、 (S,s) 交代スピン鎖の特異な性質が議論されている^[6]。 (S,s) 交代スピン鎖は $S \neq s$ のとき古典的にはフェリ磁性として片付けられるが量子フェリ鎖は豊かな内容を含んでいる。すなわち、 (S,s) フェリ鎖は、スピン $(2s)$ 反強磁性鎖とスピン $(S-s)$ 強磁性鎖の融合されたものと考えることが出来るのである。スピン $(2s)$ 反強磁性鎖は常に整数スピン鎖であるからVBS状態にあり、ギャップを伴う反強磁性的な励起を与え、スピン $(S-s)$ 強磁性鎖はギャップのない強磁性的な励起を与える。 $S > 2s$ では強磁性的フェリ磁性、 $S < 2s$ では反強磁性的フェリ磁性、 $S = 2s$ では強磁性と反強磁性とが見事に均衡した融合磁性になる。

5. 結語に代えて

これまでスピンプラストレーション効果(相互作用の競合効果)については述べなかったが、量子スピン効果とスピンプラストレーション効果を相乗的に組み合わせることによって新規な低次元量子スピン系を現実物質の中に構築し、古典的秩序状態を抑制することによって量子液体的な特異なスピン状態を実現することが出来ると考えられる。

具体的な空間構造のターゲットの例としては

- 1) 単純に整数あるいは半整数スピンを構成単位とする一次元交互鎖や梯子鎖
- 2) 複核錯体などの複合スピンを構成単位とする二量体や三量体の一次元鎖
- 3) 異種スピンの組み合わせによるヘテロ構造一次元鎖

4) 次近接相互作用によるフラストレーションが働く Δ 鎖や架橋鎖

5) これらの一次元鎖が有限本数集合化した擬似二次元格子

などが挙げられる。これらあるいはこれらの多様な組み合わせによって、多彩な量子スピン効果の発見が可能になる。モデル磁性体の合成に関しては、化学における蓄積した試料合成能力が不可欠であり、物質の構造的異方性と電子波動関数の異方的な重なりを利用して磁氣的相互作用が空間的に限定・制御されたモデル物質が開発されることが期待される。

我々の研究は科学研究費の補助と多くの研究者の協力で行われている。浅野貴行、稲垣祐次(現神戸大学大学院自然科学研究科助手)をはじめとする研究室メンバーに加えて、強磁場磁化測定では東京大学物性研究所後藤恒昭教授グループ、大阪大学極限環境科学センター金道浩一郎助教授グループ、強磁場磁気共鳴実験では東北大学金属材料研究所本河光博教授、野尻浩之助教授(現・岡山大学理学部物理学教授)グループ、磁化率測定では九州大学大学院工学研究院竹田和義教授、河江達也助教授グループ、九州大学大学院理学研究院大川尚士教授グループ、九州大学大学院薬学研究院古賀登教授グループにご協力をいただいている。内外の合成化学者から各種の貴重な試料の提供と合成法の教示をいただいている。合わせて感謝申し上げます。

文献は和文の解説を中心に挙げる。

- [1] 勝又紘一, 田崎清明: 物理学会論文選集VIII (1997).
- [2] 稲垣祐次, 網代芳民: 物性研究 74 (2000) 417.
- [3] 谷本哲浩, 斎藤雅子, 福山秀敏: 固体物理 31 (1996) 783.
- [4] T. Asano, H. Nojiri, Y. Inagaki, J. P. Boucher, T. Sakon, Y. Ajiro, M. Motokawa: Phys. Rev. Lett. 84 (2000) 5880.
- [5] 網代芳民: 科研費成果報告 (2001).
- [6] 山本昌司: 固体物理 34 (1999) 36.

トリプトファン誘導体を用いる 新規高感度D-アミノ酸オキシダーゼ活性測定法

九州大学大学院薬学研究院 永安 玲子、浜瀬 健司、財津 潔

A sensitive assay of D-amino-acid oxidase activity using tryptophan analogues

Reiko Nagayasu, Kenji Hamase and Kiyoshi Zaitzu

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

A sensitive assay of D-amino-acid oxidase (DAO) activity using tryptophan analogues has been performed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. For the enzyme substrates, 5-hydroxy-D-tryptophan, 5-methoxy-DL-tryptophan, 5-methyl-DL-tryptophan, 5-fluoro-DL-tryptophan and D-tryptophan were tested. Among these D-tryptophan analogues, 5-fluoro-DL-tryptophan is found to be a suitable fluorescent substrate for the sensitive assay of DAO. The obtained signal to noise ratio is 5400 for 7.5 μ U DAO.

1. 序論

D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO, EC 1.4.3.3)は真核生物に広く分布する分子量約4万のフラビン酵素であり、哺乳類では主に腎臓、肝臓、脳に局在することが知られている^{1,3)}。DAOは生態系の主構成要素の1つであるL-アミノ酸、特に中性アミノ酸の立体異性体あるいは光学異性体であるD-アミノ酸の選択的酸化を触媒してイミノ酸を生成させる。このイミノ酸は非酵素的に加水分解されて α -ケト酸となり^{2,4)}、生体内で酵素的アミノ基付加により対応するL-アミノ酸が生成する。この様にD-アミノ酸の代謝及び栄養獲得はDAOの機能の一つであると考えられる^{1,3)}。一方、最近では基質となり得る様々な内在性D-アミノ酸の発見に伴い^{3,6-10)}、DAOが組織内におけるD-アミノ酸の含量調節に関与すると考えられているが、その詳細は未解明である。これは従来のDAO活性測定法では腎臓等強い活性を示す組織以外での活性測定が困難であることに起因しており、DAO及びD-アミノ酸の機能及び制御機構解明のために測定法の高感度化が必要とされている。しかし、従来の方法は酵素反応と共に生じる過酸化水素やアンモニア等、内在性化合物を測定対象としており^{4,11,12)}、その高感度化には限界があった。そこで本研究ではDAOの基質特異性が広いことに着目し¹⁾、非天然型D-アミノ酸を基質とすることによって、組織内に存在しない酸化体を生成させることで高感度なDAO活性測定法の開発を試みた。基質としてはインドール環を有する強蛍光性D-アミノ酸であるトリプトファン誘導体を用い、これらのスクリー

ニングを行うとともに生体試料への適用性について基礎検討を行った。

2. 実験

2.1 試薬及び装置

DAOはRoche Diagnostics製，L-トリプトファン，D-トリプトファン，5-メチル-DL-トリプトファン，FAD，CH₃CNはNacalai Tesque製，5-ヒドロキシ-L-トリプトファン，5-ヒドロキシ-D-トリプトファン，5-フルオロ-DL-トリプトファン(FTP)，5-メトキシ-DL-トリプトファン(MTP)，5-メトキシインドール-3-酢酸(MIAA)はSIGMA製，インドール-3-ピルビン酸(IPA)はALDRICH製，インドール-3-酢酸(IAA)はMERCK製を用いた。水は脱イオン水をミリQ(Ⅱ)システム(日本ミリポア製)で精製したものを用い，他の試薬は市販の特級品あるいは得られる最上級品を使用した。

HPLCシステムは日本分光製ガリバーシリーズを使用し，カラムは東ソー製ODS-120T(4.6mm i.d. x150mm，40℃)を用いた。特に記載がない限り分析用移動相はCH₃CN:TFA:H₂O=16:0.05:84(v/v)とし，流速1.0ml/minで送液した。

2.2 DAO酵素反応及びラット腎臓試料の調製

5mM D-アミノ酸又は10mM DL-アミノ酸水溶液30 μlに133mM ピロリン酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)を30 μl，0.1mM FAD水溶液20 μl，DAO水溶液(0.75mU/μl)20 μlを加えて37℃で0-120分間攪拌した。これに10%TCA水溶液100 μlを加えて反応を停止させた後，反応液を4,500gで15分間遠心分離した。得られた上清100 μlを濾過し，濾液を分析用移動相で希釈して20 μlをHPLCで分析した。検出は210nmの吸収，もしくは各生成物の蛍光により行った。

ラットはエーテル麻酔下で大動脈脱血し，直ちに腎臓を摘出秤量した。これに133mM ピロリン酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)と0.1mM FAD水溶液の混合液(9/1,v/v)2.5倍量を加え氷冷下1000回転で20回ホモジナイズした。これを4℃，13,000gで30分間遠心分離し，得られた上清20 μlを用いて上記と同様に酵素反応を行った。

3. 結果及び考察

3.1 Trp誘導体のスクリーニング

3.1.1 D-Trp及びMTPのDAO酵素反応及び生成物の同定

D-アミノ酸のDAO酸化においては，溶存酸素や過酸化水素の影響を受けて種々の生成物が考えられ，本検討における生成物の特定は酵素反応及び分析条件を最適化する上で重要である。そこで推定生成物であるIAA及びIPAが入手可能なD-トリプトファンを基質として生成物の同定を行った。Fig.1はトリプトファンのDAO酵素反応及び生成したイミノ酸の酸化過程を示している。D-トリプトファンはDAOによって脱水素され，イミノ酸が生じる。イミノ酸が非酵素的に加水分解されると，IPAが生じる。また，イミノ酸の非酵素的酸化もしくは過酸化水素存在下におけるIPAの脱炭酸によるIAAの生成やIPAのエノール変換等も考えられる。D-トリプトファンを基質としてDAO酵素反応を行いHPLCで分

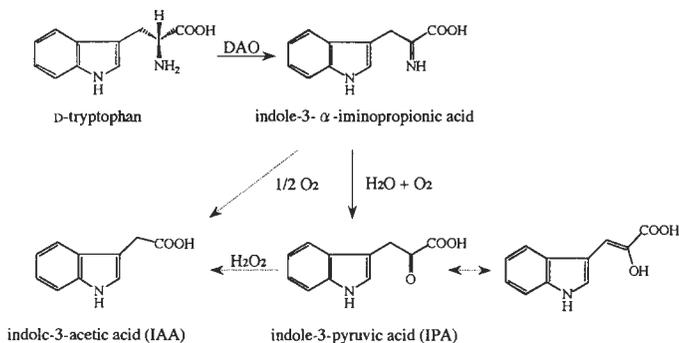


Fig.1 Oxidation of D-Trp by D-amino-acid oxidase.

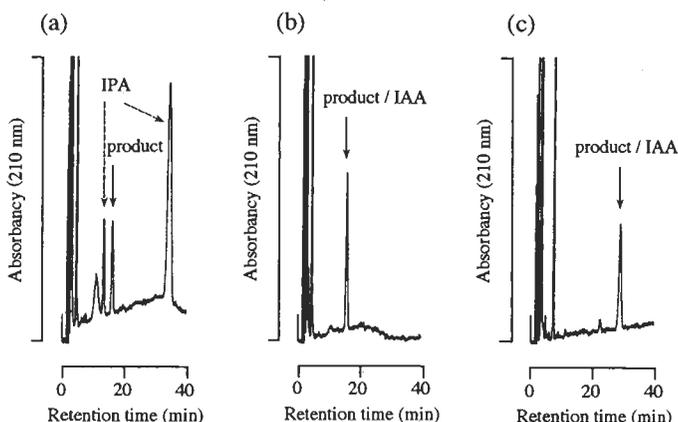


Fig.2 Co-chromatography of oxidative product of D-Trp by DAO and (a) IPA and (b, c) IAA. Mobile phase (c) ; $\text{CH}_3\text{CN} / \text{TFA} / \text{H}_2\text{O} = 12.5 / 0.05 / 87.5$ (v/v). Flow rate ; 1.0 ml / min. Other conditions are described in the text.

析したところ、クロマトグラム上で反応の進行とともに増加するピークが16分付近に認められた。このピークは基質及び酵素非存在下で認められなかったことから生成物であると考えられた。そこで推定生成物であるIPA及びIAAと生成物との共クロマトグラフィーを行った。IPAにはエノール変換等に由来すると考えられる複数のピークが存在したが、本生成物の溶出時間はいずれのピークとも一致しなかった(Fig.2(a))。一方、IAAと生成物の溶出時間は2種類の移動相において一致した(Fig.2(b),(c))。また、生成物ピークとIAAのUVスペクトルも一致しており、本条件におけるD-トリプトファンへのDAO酵素反応生成物はIAAであると考えられた。同様の検討をMTPについても行ったところ、D-トリプトファンの場合と同様に、対応する α -ケト酸が脱炭酸したMIAAの生成が認められた。

3.1.2 Trp誘導体の感度評価

3.1.1よりD-Trp及びMTPがDAOの基質となり、それぞれIAA, MIAAを生成することが示された。IAA, MIAAはともに強い蛍光を有する化合物であり、D-Trpもしくはその

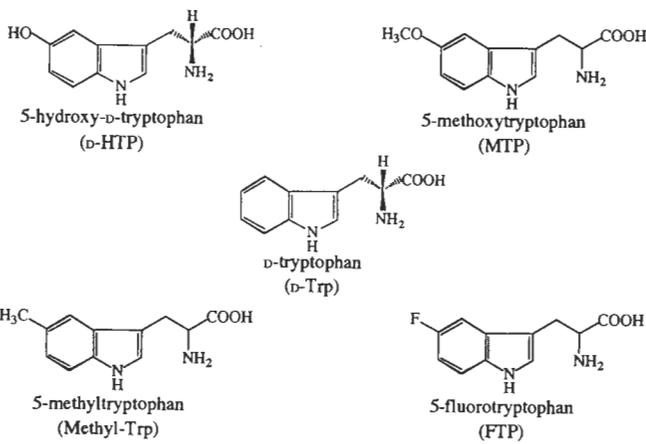


Fig.3 Structures of 5-substituted analogues of D-Trp.

インドール5位置換体を基質とすることで高感度なDAO活性測定が可能になると考えられた。そこでD-トリプトファン5位のメチル基、メトキシ基、水酸基及びフッ素に置換した化合物(Fig.3)を基質としてDAO酵素反応を行った結果、いずれも蛍光性の酵素反応生成物が認められた。これら生成物の励起及び蛍光波長、並びに検出感度をTable 1

Table 1
Separation and detection conditions of oxidative products of 5-substituted analogues of D-Trp

Substrate	Mobile phase (CH ₃ CN / TFA / H ₂ O)	Fluorescence detection		S / N
		Ex. (nm)	Em. (nm)	
D-Trp	16 / 0.05 / 84	277	355	2220
MTP	16 / 0.05 / 84	277	335	60
D-HTP	10 / 0.05 / 90	274	337	270
Methyl-Trp	20 / 0.05 / 80	274	353	47
FTP	16 / 0.05 / 84	279	364	5440

S / N : Signal to noise ratio

に示す。FTPを基質とした場合が最も高感度であり、DAO7.5 μ Uに対する反応液(20 μ l)を分析した場合における、酵素反応生成物の検出感度はS/N=5440であった。

3.2 FTPを基質とするラット腎臓におけるDAO酵素反応

3.1.2により見出されたFTPを基質とし、既にDAO活性が報告されているラット腎臓を用いて生体試料への適用性を検討した。Fig.4はラット腎臓を用いてFTPを基質としたDAO酵素反応を行った経時変化を示すクロマトグラムである。酵素反応の進行に従って増加するピークがクロマトグラム上で26分付近に認められた。このピークは標品DAOによるFTP酵素反応生成物と溶出時間が一致したことから、生成物であると考えられる。またFig.4(a)に示す様に、酵素反応を行わない試料ではラット腎臓中にFTP酵素反応生成物の分析を妨害する内在性化合物は認められず、FTPを基質として生体試料におけるDAOの高感度分析が可能になると考えられる。

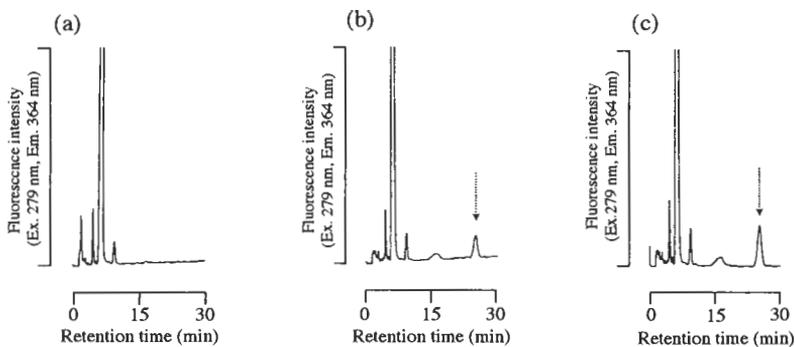


Fig. 4 Time course of oxidative reaction of FTP using a homogenate of rat kidney. (a) 0 min, (b) 30 min, (c) 60 min. Arrows indicate the oxidative product of FTP by DAO.

4. 結 語

本研究では、トリプトファン誘導体を用いる高感度DAO活性測定法について検討し、酵素反応生成物の同定と優れた基質の探索を行った。D-Trp及びMTPを用いて今回の酵素反応条件下におけるDAO酵素反応生成物を同定した結果、 α -ケト酸ではなく、これらが脱炭酸したIAA, MIAAであった。これらは強い蛍光を有しており、Trp誘導体を基質として高感度なDAO活性測定が期待できる。今回スクリーニングした5種類のTrp誘導体においてFTPが最も高感度であり、またラット腎臓を用いた基礎検討においても良好な結果が得られた。以上の結果はFTPを基質として高感度DAO活性測定法の開発が可能であることを示しており、本法の開発はDAOやD-アミノ酸の機能解明に大きく役立つと考えられる。

5. 参考文献

1. 金野 柳一, 安村 美博, *蛋白質 核酸 酵素*, **36**, 54-62 (1991).
2. A.Meister : *Biochemistry of the amino acids*, 2nd ed., (1), pp 296-300, Academic press, New York (1965).
3. K.Imai, T.Fukushima, T.Santa, H.Homma, K.Sakai and M.Kato, *Biomed. Chromotogr.*, **10**, 303-312 (1996).
4. 堀池 喜八郎, 三宅 可浩 : *生化学実験講座11(アミノ酸代謝と生体アミン上)*, pp 235-256, 東京化学同人, 東京 (1976).
5. R.Konno and Y.Yasumura, *J.Nutr.*, **114**, 1617-1621 (1984).
6. A.Hashimoto, T.Nishikawa, R.Konno, A.Niwa, Y.Yasumura, T.Oka and K.Takahashi, *Neurosci. Lett.*, **152**, 33-36 (1993).
7. A.Hashimoto and T.Oka, *Prog. Neurobiol.*, **52**, 325-353 (1997).
8. T.Inoue, K.Hamase, A.Morikawa and K.Zaitzu, *J.Chromatogr. B*, **744**, 213-219 (2000).
9. A.Morikawa, K.Hamase, T.Inoue, R.Konno, A.Niwa and K.Zaitzu, *J.Chromatogr. B*, **757**, 119-125 (2001).

10. K.Hamase, T.Inoue, A.Morikawa, R.Konno and K.Zaitso, *Anal. Biochem.*, **298**, 253-258(2001).
11. T.Watanabe, Y.Motomura and T.Suga, *Anal. Biochem.*, **86**, 310-315 (1978).
12. P.A.Biondi, L.Guidotti, A.Negri and C.Secchi, *J.Chromatogr.*, **566**, 377-382 (1991).

アルファ-ラクトアルブミンの生きた状態および モルテングロブユール状態からの熱転移

九州大学中央分析センター 坂下 寛文, 三浦 好典

Thermal Transitions from Native and Molten Globule States in alpha-lactalbumin

Hirofumi Sakashita and Yoshinori Miura,

The Center for Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University

ABSTRACT

We have investigated, by proton NMR spectroscopy and high sensitive Differential Scanning Calorimetry (DSC) of heat flux type and Alternating Current (AC) calorimetry, the conformational change from the native (N) and/or the molten globule (MG) states to a random coil (D) one in Bovine alpha-lactalbumin. In N→D transition, weakly divergent behaviour in specific heat C_p is observed indicating the increase in the fluctuation of the internal energy: so transition is almost 1st order, but weakly 2nd order like. In MG→D transition, no latent heat is observed in DSC measurement, but gradual structure destruction are confirmed by NMR measurement and C_p shows a broad anomalous peak suggesting the phase change: so this transition is weakly 2nd order like.

1. 序

微小球状蛋白質の熱変性(unfolding, denaturation)過程はprotein folding (蛋白質の折りたたみ)のいわば逆過程である(長いアミノ酸の紐が1ミリ秒から1秒の短時間にくると巻いて、生きた階層構造をとるのがprotein foldingである)¹⁾。この熱による相転移は生きた構造(N state)と完全に死んだ構造(D state)との間の相転移であるが、バルクな物質のそれに比べて、きわめてブロードな温度範囲(10から20℃)で進行し、diffusiveである。その理由は(1)蛋白質のサイズがあまりにも小さいこと(球状蛋白質の直径は30から40 Å), (2)階層構造をしている, (3)スピニンググラスの性質を持っている, ことなどによる。

一方、蛋白質は特殊な条件下で、部分的に生きた(しかし、分子機械としての機能は失活した)構造を持つmolten globule (MG)状態をとることが知られている。もともとの生きた状態(native state)の他に、半死状態(MG state)が存在することは、球状蛋白質の熱力学的な性質を複雑にするとともに豊かにする。中途半端に異常変性した蛋白質はアルツハイマー病(ベータアミロイド), パーキンソン病(ユビキチン), ヤコブ病(プリオン), 狂牛病(プリオン)の重要な病原蛋白質と考えられている(括弧内は関与する蛋白質名)。

MG状態の蛋白質は温度を上昇させると、部分的に生きていた構造が壊れ、ランダムコイル構造の状態 (D state) へ相転移することが知られている。この相転移はシトクロームcでは潜熱の出入りを伴うことから、1次相転移であるといわれている。²⁾³⁾ところが、 α -ラクトアルブミンでは潜熱が観測出来ないことから、1次相転移ではないが、驚くべきことに2次相転移でもないと考えられている。⁴⁾⁵⁾ではいったい何なのか (単なるクロスオーバーなのか) ? MG状態の蛋白質は、生きた部分はわずかであるので、N状態に比べてその有効サイズはさらに小さくなる。こういう状況からの相転移はいったい何なのか (協同現象なのか、もしそうだとすれば、N状態からD状態への普通の熱変性での協同性とどう関連があるのか) ? この相転移を特徴づける秩序変数は何か (普通の熱変性時の秩序変数との違いは何か-----この秩序変数をどう定義したらよいのかさえもわかっていない) ? 相転移の際に比熱はどういう振る舞いをするのか? (一般の熱変性の熱測定は示差走査熱量計DSCで行われる。したがって、大きな潜熱に隠れて、転移中の真の比熱は測定できない。ゆえに、隠れた部分の比熱は固体-液体相転移と同じ振る舞いをするとした仮定の元に、エンタルピーなどの算出が行われている。) この質問は、相転移に伴う内部エネルギーの臨界揺らぎは存在するのか、しないのか? と問うことと等価である。

個々の蛋白質が、生体内で分子機械として、どのような機能をはたしているかを解明することはもっとも重要な仕事である。一方、蛋白質の全体像を捕らえるには、熱力学的考察が不可欠であると考えられる。我々の研究の目的は、蛋白質のさまざまな状態変化に伴う相転移のメカニズムの普遍的性質を解明することにある。そのために、牛および人のアルファ-ラクトアルブミン蛋白質の生きた状態からの熱変性、MG状態からの熱変性をプロトンNMRと熱分析 (超高感度DSC法とAC法) で調べた。DSC法は潜熱の出入りを検知するのにすぐれていて、蛋白質の相転移の研究には欠かさず用いられているものである。今回、我々は光交流 (AC) 法を用い、直接 (すなわち、従来は潜熱が邪魔で見えなかった)、定圧比熱の測定を行ったので、そのことを中心に報告する。

2. 実験の概要

NMR測定-----プロトンNMR (日本電子(株)製JMX500)、試料は重水溶液、測定温度範囲 (30℃から90℃まで、1℃おきに測定、各温度で25分間温度を保持してから測定)。

DSC測定 (セイコー電子(株)製EXSTAR6000、試料は重水溶液、容器70 μ l銀セル、標準 (reference) 試料重水、測定温度範囲 (10℃から120℃、昇温度速度1℃/min.)。

AC測定 (真空理工(株)製ACC 1、光のチョッピング周波数1Hz、ロックインアンプ時定数10秒、試料は重水溶液、容器DSC用簡易密閉水溶液用アルミセル50 μ l、測定温度範囲10℃から110℃、昇温速度1℃/hour)。

注) 一般に、蛋白質の熱変性 (N状態からD状態、あるいはMG状態からD状態への転移) は不可逆過程であると思われる。これは、蛋白質の濃度が濃いためであり (一度変性した蛋白質粒子が会合する)、薄ければ会合を回避することが出来る。すなわち、低濃度では熱変性は可逆過程である。いわば、一度死んだ蛋白質 (D状態) でも、温度を室温に戻すと、生き返る (N状態) ののである。このことは、いったん出来上がった蛋白質の構造や機能が物理・化学的条件で決まっていることを意味している。

3. 熱変性と低温変性

図1にアルファ-ラクトアルブミン蛋白質の分子構造を示す。この蛋白質は哺乳類のミルクに含まれている2ドメインのカルシウム結合蛋白質で、アミノ酸残基数123、分子量14,200である。生きた状態では4個のアルファ-ヘリックスと1個のベータ-シートを持ち、ほぼ球状で直径は約40 Åの超微粒子である。この3次元立体構造は共有結合、ファンデルワールス力、水素結合、クーロン相互作用、疎水性相互作用の微妙なバランス(競合する相互作用)によって保持されている。したがって、フラストレイト系であり、この点に関してはスピングラスと極めて類似している。⁶⁾⁷⁾

図2に蛋白質変性過程、模式的構造、呼び名の概略図を示す。室温付近の生きた状態から、温度を上げて(熱変性、熱転移と呼ばれる)、また下げても(低温変性と呼ばれる)蛋白質の(生きた)立体構造は壊れ(構造融解)、構造なしのランダムコイル(構造)となる。高温の変性状態も、低温の変性状態もともにD状態とよばれているが、この2つの状態が熱力学的に同じものかどうかは明らかでない。熱変性の原因は温度上昇(熱振動の増大)であるが、低温変性の原動力は疎水性相互作用であると言われている。蛋白質の種類によって異なるが、熱変性は約60から80℃で起こり、低温変性は約5から-10℃で起こる(低温変性の場合、溶媒の水が凍らない状態で、蛋白質のみが変性する)。⁸⁾⁹⁾

一方、生きた蛋白質溶液をたとえば極端に低いpHに持って行くと、部分的に折りたたまれた構造が蛋白質の中心部(これを疎水性核と言う)に出現する(MG状態)。周辺部はランダムコイル(構造)で、決まった形はとっていない。温度を上げると、MG状態からD状態へ(疎水性核の崩壊の形で)熱転移が起こる。温度を下げると、MG状態からD状態へ(原理的には)低温変性が起こるはずであるが、筆者の知る限り確認の報告はない。

図3は生きた状態からの熱変性(構造融解)についての新たな描像(前駆現象)を示す(これは、牛、馬、鳥、ウサギ、マグロなどのシトクロムc、牛アルファ-ラクトアルブミン、リボヌクリアーゼS、リボヌクリアーゼA、牛ミオグロビンなどの球状蛋白質の

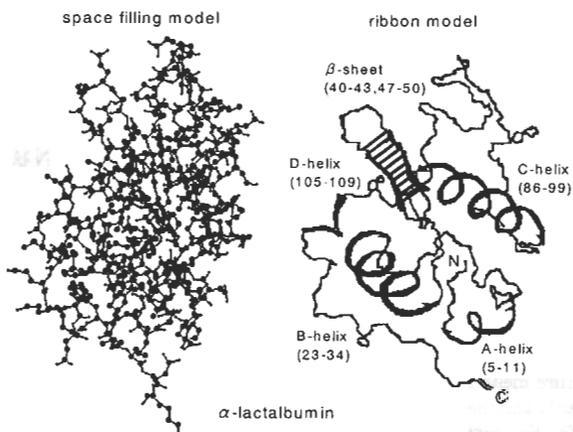


Fig.1 Alpha-lactalbumin is a two-domain calcium-binding protein with 123 amino acid residues (molecular weight 14,200) found in mammalian milk, and has four alpha-helices and one beta-sheet. Native three-dimensional structure is maintained by competing interaction. The size of this protein is about 4 nm in diameter.

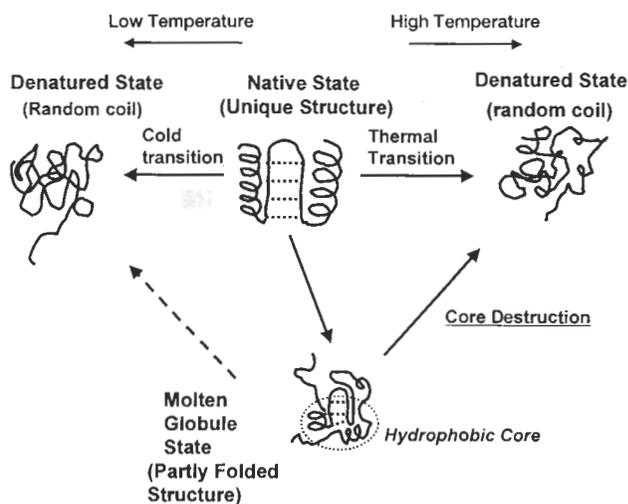


Fig.2 Schematic drawing of the native and the denatured state.

Thermal and cold transition of the native(N) conformation is the structure destruction ("structure melting") from a unique heterogeneous and hierarchical 3-dimensional conformation to a random coil one, accompanying with absorption or release of latent heat: 1st order phase transition. Molten globule (MG) conformation is a partly folded, compact and denatured one realized under some extreme aqueous condition such as at low or high pH. Thermal unfolding of the MG conformation is also the structure destruction.

Multi-Step Thermal Unfolding (thermal transition)

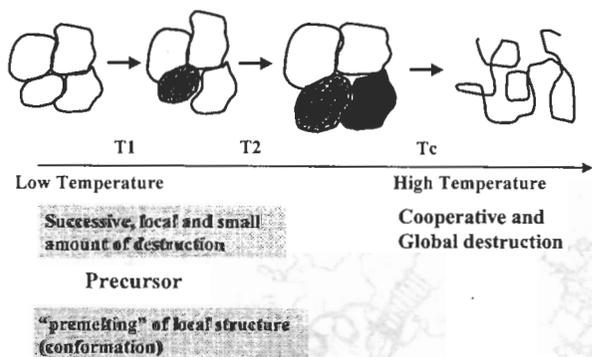


Fig.3 Summary of our previous result about the thermal transition in Bovine alpha-lactalbumin. White and shaded region show schematically slightly destructive parts of the molecular structure, and the thread designates a random coil (structureless) conformation. Upon heating, protein undergoes the successive, local and slight "structure melting" at e.g. T1 and T2 in "the native state" (Precursor), and then takes place the global "structure destruction" at Tc. So, protein consists of building blocks with distinct strength against thermal agitation. This multi-step process suggests the existence of some "triggered region" of the "protein-quake (structure collapse)", and its dynamical origin, "soft modes".

我々の研究をまとめたものである。^{10) 11) 12) 13)} 図でTcより右の紐状のものは、ランダムコイル状態を示し、左側のそれぞれが4個の塊でできた3つの絵は生きた(N)状態を示している。また、それぞれの塊は、温度上昇とともに、影をつけた部分から順次に構造が少しずつ壊れて行く様子を示している(また、それぞれの塊のサイズが徐々に大きくなっているのは、熱振動で構造が幾分ふやけている様子をあらわしている)。図でTc以下の温度範囲は、従来は生きた(N)状態として、構造的には何の違いもない(同じ構造である)として取り扱われてきた温度範囲である。そして、Tc(10から20℃の温度幅を持つ)で潜熱を伴った構造融解が、2状態(NからDへ)転移的に起こるというのが従来説である。この2状態転移の考え方は固体-液体転移の描像をそっくりそのまま蛋白質の熱変性に持ち込んだ考え方である。我々は、N状態で部分的で段階的かつ微小な構造崩壊が、温度上昇とともに、進行していることをMNRによる測定から見出した。Tcでの構造融解が全体的な、協同的な構造崩壊であるとする、Tc以下の振る舞いは(構造崩壊の)前駆現象あるいはpremeltingであるといえる。ちなみに、逆過

程すなわちD状態からN状態への相転移（構造形成あるいは生き返り）時の（ T_c 以上の温度範囲での）前駆現象については何もわかっていない（これは、希薄な濃度で実験をすれば原理的には見つけることが可能であるが、薄くすると、たとえばMNRのプロトンシグナルのS/N比が極端に悪くなるという、実験的な困難が生ずる）。さて、段階的な微小構造融解（崩壊）の存在は、蛋白質分子の中に（熱振動に対して）構造的に最も弱い部分（すなわち、構造崩壊の震央、構造融解のトリガーとなる部分）があることを示唆している。微小構造融解が、温度上昇とともに、ある領域（トリガー部分）から別の領域に、さらにまた別の領域へと伝播し、最終的に（ T_c で）潜熱を伴った大規模な構造融解にいたる……これが我々が持っている蛋白質変性の描像である。蛋白質を非線形振動子の集合体と考えれば、上の描像は、最初非常にソフトな局所モードがあり、それが段階的に周囲に伝播し、ついには振動子全体の結合がきれ、モードそのものが消滅することに相当する。

4. 牛アルファ-ラクトアルブミンのモルテングロブール（MG）状態からの熱変性

牛 α -lactalbumin のMG状態からの熱変性は、(DSC測定で) 潜熱が出ないことから、1次転移でもなく2次転移でもないと言われている。では、3次以上の高次相転移かということ、そう考えるべき実験データは何もないし、理論的根拠も不明である（少なくとも、エーレンフェストの定義によれば、自由エネルギーの3階微分に相当する物理量が、転移に際して、不連続的に変化しなければならない）。NMRで見ると相転移の存在は確認できる。図4に牛 α -lactalbumin (pH2.28, 蛋白質濃度4.2wt.%, D_2O 水溶液) プロトンNMRスペクトルの高周波領域の温度依存性を示す。ここに示されている（番号もしくははアミノ酸残基名で）シグナルは、ほとんど（MG状態特有の構造を担っている）疎水性コアのものである。温度上昇とともに、これらのシグナル強度はいったんは増大するが、60℃あたりから減少を始める。それとともに、ランダムコイル状態に対応するシグナル（この図のスケールでは非常に見にくい）が3, 7のシグナルと、6番のすぐ左, 9番のすぐ左のシグナル) が66℃あたりから出現し、だんだんと強くなる。これらのことをシグナル積分強度の温度変化として示したのが図5であ

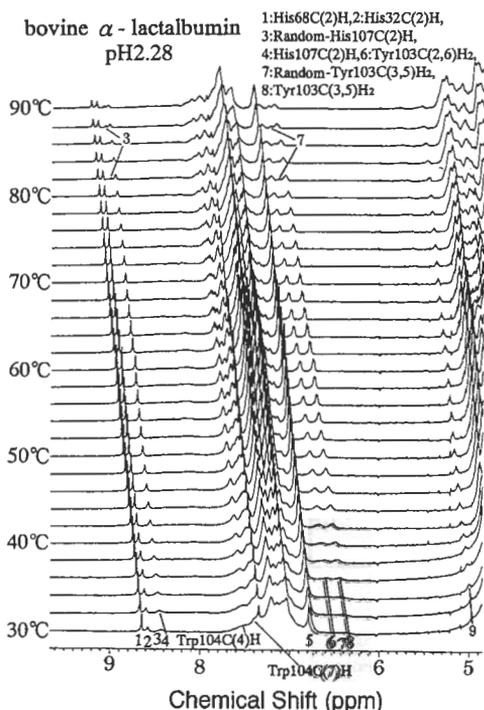


Fig. 4 The high frequency region of 500MHz proton NMR spectra in Bovine alpha-lactalbumin at pH 2.28 (4.2 wt.%) as a function of temperature.

る。初期の強度増大は motional narrowing によるが、60℃以上の温度での減少はMG特有の構造が崩壊しつつあることを示している。データは92℃までしかないが、データを外挿すると100℃以上まで、この構造融解が進行していると考えられる。すると、構造融解は温度幅40℃以上のとてつもなく広い範囲にわたっていることになる（ちなみに、生きた(N)状態からの構造融解ではこの温度幅は15℃程度、バルクな物質の固体-液体転移では転移幅1℃以下である)。この広い温度範囲において、2相共存状態にある(MG状態とD状態)。一般には、2相共存と潜熱は共に1次相転移の最たる特徴である。しかし、今度の場合は2相共存ではあるが、潜熱はないと言う奇妙な状況にある。また、前節で述べたような前駆現象や構造崩壊の震央は無いように見える。もともと熱擾乱にたいする(室温における)構造の揺らぎはMG状態の方が、N状態のそれにくらべて数百倍大きいと考えられているが、このことが“無いように見える”主たる要因かもしれない。

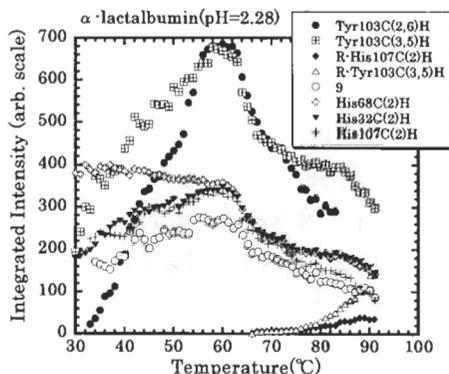


Fig.5 Integrated intensities of proton signals of Bovine alpha-lactalbumin (4.2wt.% and pH 2.28) as a function of temperature. The intensities indicative of the MG conformation (hydrophobic core) first increase, upon heating, due to the motional narrowing, and then decrease due to the structure destruction. Signals of a random coil conformation appear at 66℃, and then increase gradually. Note that both N and NG states coexist over a wide temperature range (from 66℃ to around 110℃). Clear evidence of the structure melting can be confirmed by this NMR study, because so far no sign of the transition (latent heat) has been detected by DSC measurement.

5. (転移温度) 対 (pH) 相図と多重臨界点 (?)

図6に超高感度DSC (NMRと同じ実験条件にするためにD₂O水溶液中で測定) とNMR

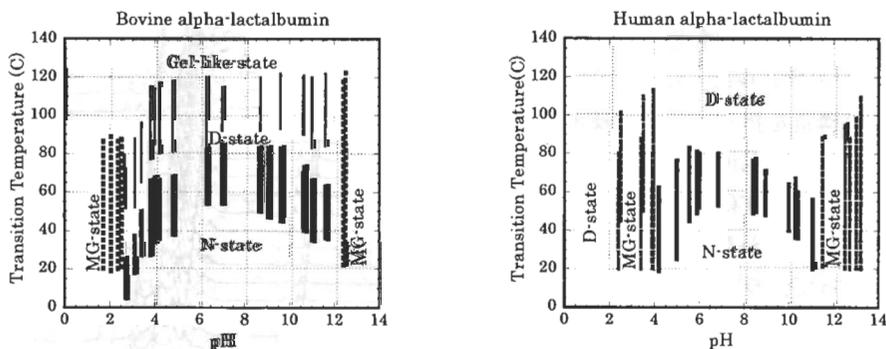


Fig.6 Transition temperature vs. pH of Bovine and Human alpha-lactalbumin determined by DSC and NMR measurements. Thick and thin solid lines designate transition region, where absorption of latent heat is observed upon heating, while dotted line indicates the temperature region where broad and progressive destruction of MG conformation proceeds. The native structure is destabilized in proportion with the distance from the neutral pH value: the transition temperatures T_c decrease and the transition widths ΔT_c broaden. Only in the Bovine alpha-lactalbumin, new transition appears at higher temperature, which reflects the heat-induced gelation-like process.

から決めた牛と人 α -lactalbumin の相図を示す。牛では新たな状態としてゲル様状態 (D 状態から Gel-like 状態への転移では吸熱ピークが観測される) が見られるが、人では見られない。牛と人ではアミノ酸残基が個所で違っており、これがゲル様状態の有無に関与していると考えられる。棒の長さは実験で決めた転移の温度幅である。横軸 pH の中間領域に安定な生きた (N) 状態があり、その周辺の極端な pH 領域に MG 状態が存在している。N から D への (熱変性) 転移温度 (従って、生きた構造の熱的安定性) は中性 pH あたりが最も高く (強く)、それからはずれるにしたがって下がってくる (弱くなる)。さらには、転移温度幅も大きくなる (相転移がより diffusive になる)。低温変性の転移温度幅は具体的に測定していないのでわからないが、熱変性の場合と似た傾向にあると思われる。

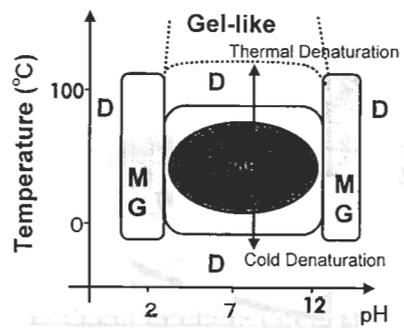


Fig. 7 Phase diagram in Bovine α -lactalbumin including information on cold transition. Note the broadened phase boundary between N and D, the narrow one between N and MG, and the several multiple (or multi-critical?) points.

図 7 に低温変性をも含めたより一般的な相図を示す。ゲル様相は蛋白質の種類によって出たり、出なかったりする。高温度側の D 状態と低温度側の D 状態、および極端な pH での D 状態は、それぞれ (熱力学的に) 同じであると言う保証はないが、(蛋白質の構造のみに着目して) 生きた状態の構造が同じよう壊れていることから、同一記号を使った。熱変性と低温変性における N 状態と D 状態の境界は広いが、N 状態と MG 状態との境界は極めて狭い。この相図から、2 つの相の境界としての 2 重点 (あるいは 2 重臨界点)、3 相の境界としての 3 重点 (あるいは 3 重臨界点) など 4 重点 (4 重臨界点) までを見出すことが出来る。もっとも、相境界がある幅 (領域) を持つことから、“点” よりも “線” あるいは “領域” と表現した方が、正確である。この相図から分かるように、蛋白質は室温あたりの狭い温度範囲で、しかも中性領域の狭い pH の範囲でしか生きられないことがわかる。また、温度のシークエンスで見ると、(中性 pH 領域で) 高温度で D 状態 (無秩序状態)、室温で N 状態 (秩序状態)、低温度で再び D 状態 (無秩序状態) といった reentrant 現象が存在する。一般に、物質の状態は温度が高ければより disorder、温度が低ければより order するのが普通であるが、蛋白質の場合はこの常識に反している。同様に、たとえば温度を 50°C に固定し、pH のシークエンス (低 pH から高 pH へ) で見ると、D → MG → N → MG → D といった reentrant 現象が横軸 pH 方向にも存在することが、見て取れる。

6. 潜熱と比熱

図 8 に牛 α -lactalbumin の熱変性およびゲル化過程を DSC 法と AC 法で測定した DSC カーブと定圧比熱 C_p を示す。DSC カーブで見られる 2 つのブロードなピークは転移に伴う潜熱 (この場合は heating run であるから吸熱) である。DSC 法では、このブロードな潜熱に隠れて、真の比熱の振る舞いはわからない。一方、AC 法では、潜熱を見ることなく、

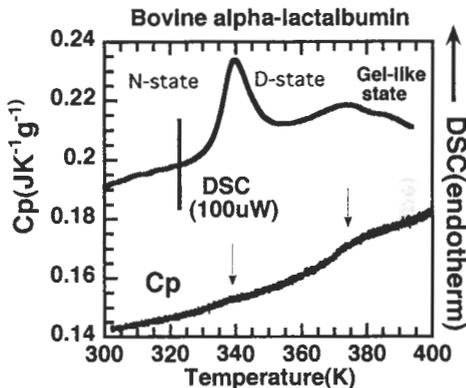


Fig. 8 Specific heat and DSC curve as a function of temperature in Bovine alpha-lactalbumin [DSC: 6wt.%, pH6.28, heating rate 60K/hour][Cp: 11.97wt.%, pH6.86, heating rate 1K/hour]. In DSC curve, two heat absorptions are observed: each corresponds to the transition from N to D state (large peak), and from D to Gel-like state (small one), respectively. In accordance with each heat absorption, specific heat show broad peaks, suggesting 2nd order transition-like behaviour. This is markedly different with the general view that Cp, as is treated in the enthalpy calculation, jumps abruptly at the transition temperature T_m and is nearly constant above and below T_m : 1st-order transition. But it is very probable that the increase in the internal energy fluctuation should occur accompanying the transition, partly because of the finite size effect and partly because of the transition itself.

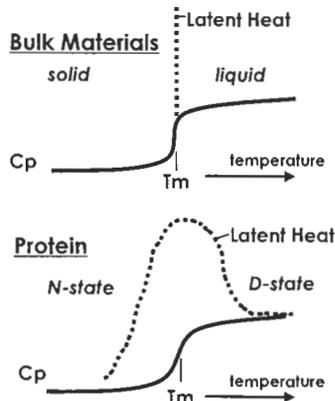


Fig. 9 Characteristic behaviour of specific heat and latent heat around solid-liquid transition for bulk materials and protein. Very sharp latent heat is observed at the melting temperature T_m in bulk materials, but in the case of protein latent heat is broad.

比熱そのものを測定することが出来る。図に示したのは試料容器の比熱を含めた生のデータであるが、矢印で示したように、ブロードな山が観測された。これは明らかに相転移に伴い内部エネルギーの揺らぎが増大することを示唆している（以下では、ゲル様状態への転移についての議論は行わず、構造融解についてのみ行う）。その意味で、2次相転移に似ていると言える。この事実は重要な意義を持っている。一般に蛋白質の熱変性は固体の融解の類似物として扱われてきた。すなわち、図9に示すように、バルクの固体が融解する場合、比熱 C_p は転移温度 T_m で不連続に増加し、 T_m でシャープな吸熱ピークが観測される。それに対して、蛋白質の構造融解は、同図下に示すように、比熱は（固体の融解と）ほぼ同様に振る舞い、非常にブロードな吸熱ピーク（潜熱）が覆い被さっているものである、と考えられている（従って、エンタルピーや潜熱の計算には、図の点線と実線と間の面積から算出されて来た）。この描像は相転移に伴う内部エネルギーの揺らぎをまったく考慮していない。

ここで、サイズ効果について考える。図10に物質のサイズを小さくして（直径数千から数十Åへ）いったら、比熱や潜熱はどうなるかをそれぞれ1次、2次相転移の場合について示した。サイズが小さくなれば転移がはやけ（かつ転移温度は低下し）、図中(c)や(e)のようになり、1次、2次の区別さえも困難になる。さらには(e)のように、比熱と潜熱の区別も難しくなる。蛋白質は超微粒子であるから、その構造融解はまさに(e)のような状況にあると考えられ、我々の実測と一致する。

図11に牛alpha-lactalbuminのMG状態からの熱変性について、DSCカーブと C_p の温度依

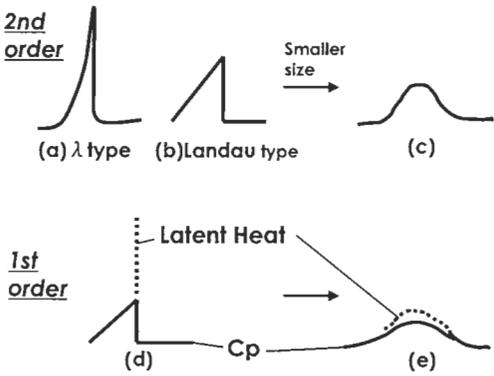


Fig. 10 Schematic variation of specific heat and latent heat with temperature for 1st and 2nd order phase transition in the bulk materials (a)(b)(d) and the fine particles (c)(e). When the system size becomes smaller below about 1 μm, the transition becomes diffusive (and also the transition temperature decrease) because of the increase in the fluctuation of the internal energy.

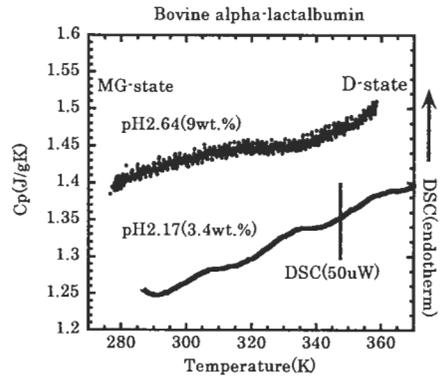


Fig. 11 Specific heat and DSC curve as a function of temperature during the thermal transition from the Molten Globule state in Bovine alpha-lactalbumin [DSC:3.4wt.%, pH2.17, heating rate 60K/hour] [Cp:9wt.%, pH2.64, heating rate 1K/hour]. In the temperature range shown, there is no evidence of latent heat absorption (the base line fluctuation is an order of experimental resolution of heat detection). On the other hand, Cp shows a broad peak, suggesting weakly divergent behaviour of the energy fluctuation. So the transition is 2nd order like, but also looks like 1st order like due to coexistence of two phases (MG and D states) as shown in Fig. 5.

存性を示す。DSCカーブの変動は熱測定限界の変動であり、吸熱ピークは観測されなかった。(この結果Privalovタイプの熱量計で測ったそれと一致している)。⁴⁾⁵⁾一方、比熱にはブロードなピークが280から340Kの間で観測された(340K以上での上昇傾向は、試料セルの密閉強度が昇温につれて、少しずつ弱まることになる。弱酸性溶液のため、どうしても完全密閉が難しい。しかし、DSCのみの測定では比熱の正確な振る舞いはわからないことが、両測定結果を比較すればよく分かる)。これをNMRの結果(図4と5参照)と比べれば、疎水性コアの構造崩壊の程度がまだ小さいと思われる温度範囲で、すでに大きな内部エネルギーの揺らぎ(したがって、構造の揺らぎ)が始まっていることが分かる。同様の振る舞いは人alpha-lactalbuminの場合にも観測された。これらのことから、alpha-lactalbuminのMG状態からの熱変性は、ほとんど潜熱なしで(検出限界以下の極めて微小な潜熱の存在は否定は出来ないが)、かつ相転移に伴う内部エネルギーの増大を確かに伴うことが、明らかとなった。その意味でこの転移は2次相転移的である。したがって、従来説のように、この転移は1次でもない2次転移でもないとの考えは誤っている。以上の結論をまとめて、図12に示す。(a)は熱変性の従来の考え方、(b)は我々の考え方である。すなわち、比熱はTmで明瞭な段差を示さ

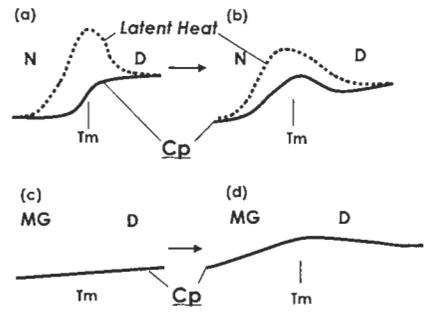


Fig. 12 Schematic summary of present study.

ず、 T_m 前後の広い温度範囲でピークをなしている。一方、MG状態からの熱変性については(c)が従来の考え方、(d)が我々の主張である。すなわち、比熱は T_m で決して（ほぼ）平坦ではなく、ブロードなピークを示す。

7. まとめと今後の展望

まとめ

- (1) Alpha-lactalbuminの相図を作成した。
- (2) 生きた状態の熱に対する安定性はpHに強く依存すること、また、MG状態が極端なpHで出現し、その熱的安定性はN状態のそれとは大きく異なる。
- (3) 多重点あるいは多重臨界点が存在する。
- (4) $N \rightarrow D$ 転移は比熱に弱い異常（内部エネルギーの揺らぎの増大）を伴うことが、初めて明らかとなった。従って、この転移は、almost 1st-order的であるが、同時に weakly 2nd-order的であると言う不思議な性格を有する。
- (5) $MG \rightarrow D$ 転移は潜熱と伴わない（2nd-order的）が、非常に広い温度範囲で2相共存が見られる（1st-order的）。また、比熱に弱い異常が見られる（2nd-order的）ことも、初めて明らかとなった。

今後の展望

- (1) 熱変性はほとんど1次的であるが、少し2次的である。また、MG状態からの熱変性はほとんど2次的であるが、2相共存（つまり、1次的）がある。このような、お互い矛盾するような特徴を、超微粒子と言うことだけで折り合いがつかぬのか？
- (2) ピングラス的性質と階層構造と（蛋白質周囲の）水の影響とから、どう比熱を算出するか？
- (3) 潜熱の元は何か？一般に、固体の融解の場合、吸収された熱は（構成原子の運動エネルギーには転化されず）原子がポテンシャルをよじ登るのに使われる。蛋白質の構造融解の場合、分子内水素結合はいったんは切れるが、直ちに水と水素結合する。すると、水素結合を切ることは潜熱の元になりえないのか？では、疎水性相互作用やクーロン相互作用はどうか？
- (4) 一般に固体の融解の場合、比熱は転移温度で段差を持ち、高温側の方が大きい。同様のことは、蛋白質の熱変性でも起こっている（今回分かった比熱弱い異常は無視する）。前者では、エントロピーの揺らぎ（の2乗平均）が大きくなるためであると説明され、後者では疎水性残基が水溶液中に露出するためであると説明されている。蛋白質の場合、エントロピーの揺らぎはどうなっているのか？
- (5) 蛋白質のような複雑な系の状態変化を記述するには、秩序変数として多数の密度 ρ の対相関関数が必要となる。蛋白質中の i 番目原子の時刻 t での位置を $r_i(t)$ とすると、相関関数は

$$g_{ij} = \langle \rho(r_i(0)) \rho(r_j(t)) \rangle,$$

ここで $\langle \dots \rangle$ は統計平均，相関関数の数は原子のペアの数になる。このままではとりつくしまがないので，この相関関数をすべてのペアについて平均し，スカラーの秩序変数 Q とする（これは，スピングラスにおけるEdward-Andersonタイプの秩序変数に似ている）。すると， Q は細かなことは無視して，おおざっぱに生きているか（ Q がある値を持つ），死んでいるか（ Q がゼロ）をあらわすことが出来る。そこで，Landau流に，自由エネルギーを Q で展開し，比熱を求めてみると，図12の(a)のようにならず，(b)のようになる。つまり，現象論的に比熱の段差のみを説明することは非常に難しい。これは，上記(4)の問題とも関わっており，今後の問題である。

(6) ミクロな状態からは難しいので，現象論的にreentrant現象やMG状態を説明できるか？このためには，疎水性効果をどう取り込むかが鍵になると考えられる。

REFERENCES

- 1) T. E. Creighton(ed.), Protein Folding, (Freeman and Company, 1992)
- 2) Y. Kuroda, S. Kidokoro and A. Wada, J.Mol.Biol.223(1992)1139-1153.
- 3) Y.Miura and H.Sakashita, 九州大学中央分析センター報告, 第18号(2000) 23-31.
- 4) D. A. Dolgikh et al., Eur.Biophys.J.13(1985)109-121.
- 5) W. Pfeil et al., FEBS Letters 198(1986)287-291.
- 6) K.H.Fisher and J.A.Hertz, Spin Glasses, (Cambridge UP,1991).
- 7) V.Dotsenko, Introduction to the Replica Theory of Disordered Statistical System, (Cambridge UP, 2001).
- 8) P. L. Privalov, Annv.Rev.Biophys.Biophys.Chem.18(1989)47-69.
- 9) P. L .Privalov et al., J.Mol.Biol.190(1986)487-498.
- 10) Y.Miura et al., 20th International Conference on Statistical Physics (1998).
- 11) H.Sakashita et al., 20th International Conference on Statistical Physics (1998).
- 12) Y.Miura et al., 21th International Conference on Statistical Physics (2001).
- 13) H.Sakashita et al., 21th Intenational Conference on Statistical Physics (2001).