生物試料の低温吸収スペクトルの測定

大阪大学理学部 河 合 清 三※
放射生物学研究室

1. はじめに

吸収スペクトルの測定は、普通、室温で行なわれるが、試料を液体空気(約90°K)または液体窒素(77°K)の温度に保って測定すると、吸収バンドが細かく分かれたり、室温では見られない新しいバンドが出現することが少なくない。有機化合物の低温吸収スペクトルは、普通、エーテル・イソペンタン・アルコールの混合溶媒や3-メチルペンタン・イソペンタンなどの水を含まない混合溶媒に溶かし、低温でガラス状の固型物にして測定されるが、生物試料の多くのものは、水溶液にして測定しなければならないので、氷の結晶による吸収増強(幅)作用や、入射光の試料表面からの散乱など、やっかいな問題が付随してくる。

自記分光光度計を用いて、生物試料の低温吸収スペクトルを測定する方法は、いろいろ工夫されているが、装置の構造、規模、操作方法などに多くの問題が残されており、また低温装置には適当な市販品はまだ見あたらない。Applied Physic 社から Cary 14および15型自記分光光度計用の液体ヘリウムも使用できる低温アタッチメントが出されているが、非常に高価(\$3,500)で、しかも差スペクトルは測定できない。われわれの研究室では、市販の自記分光光度計用として、取り扱いの比較的簡便な、しかも高性能の低温アタッチメントを開発し、チトクロームについて従来の結果とはかなり違った結果を得ている。装置は手作りすることも可能なので、広く利用してもらうため、装置の構造と操作方法を中心に紹介することにした。

よく知られているように、チトクロームの吸収バンドは、低温では著しく増大し、微細構造が出現するとともに、吸収ピークが2~3mμ 短波長側に移動する。したがって、低温スペクトル法は、(1) 生細胞、ミ

トコンドリア、ミクロゾームなどに含まれている吸収バンドの近接したチトクローム成分の同定および定量に偉力を発揮する。また一般的には(2) 精製標品中の不純成分の検出、(3) 常温では不安定な反応中間体の検出による反応機構の解析などに非常に有用な方法である。低温スペクトル法では、普通、1—2mmの厚さのセルを使用するので、1回の測定に必要な試料の量(0.3—0.8ml) が少なくすむことも、この方法の見のがすことのできない利点である。

2. 低温アタッチメント

図1の外観図は、Cary 14型用のもので、(1) 塩化ビニール製のデュワーホルダー(2) デュワー(内径30mm、外径50mm)、(3) セルおよびセルホルダーの3部分よりなっている。図1のAおよびBは、それぞれ対照側用および試料側用のデュワーホルダーである。Cary 14型の対照側のセル室では、室温用のセルホルダーの台架が底部で固定されており、しかも光路が外壁に接近しているため、デュワーホルダーもAのように、側面を削った特殊な型のものにした。光学用デュワーには、銀メッキをしないものがよく使われ、外壁に生じる露や霜を除くために、乾燥空気や窒素ガ

図1. Cary 14型自記分光光度計用低温アタッチメント

Absorption Spectrophotometry of Biological Materials at Low Temperature;

※ Kiyozo KAWAI: Laboratory of Radiobiology, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka

スを吹きつけるなどの方法がとられるが、デュワーの真空部分を厚くし (15mm)、また真空度をよくし、スリット入りの銀メッキをすることによって、このような煩わしきから、全く解放された。光路の関係から、対照側のデュワーには、スリットが中心よりやや右に傾いているものを使用した。⁸⁾なお、物理化学の分野でよく行なわれているように、試料を真空容器に入れ、液体窒素を注入しながら、真空ポンプで排気するというような方法もあるが、装置がかさばるだけでなく操作が煩雑で、少数試料の定性的な実験は別として、試料の多い場合や測定の定量的結果を求めるには不適当である。

図1のCは、吸収用セルとセルホルダーの構造を示す。セルの本体には真ちゅう材を使用、長い舌のようになった部分を液体窒素中につけることによって、試料を 77°K 近くに維持する。対照側のセルは、点線の部分から下端を切り取った。セルの窓は、透明なアクリル板を使用しているが、この関係で、350m μ 以下の短波長の吸収を測定することはできない。セルの厚さは、1~3mmの金属製のコの字型のスペーサーを取り替えることによって、自由に変更することができる。セルホルダーの柄の部分についている円型のふたは、上下移動が可能で、セルの位置を調節することができる。ふたの前方のガスエスケープは、沸とうする窒素ガスを逃がすことと、セルのセンター合わせの両者を兼ねている。図2は、この低温アタッチメントを、Cary 14型に装着したときの写真で、実際の操作のさいには、セル室の上部に 29.6×15.8×17.0*cmのふたをかぶせる。以上で装置の構造の説明を終るが、このデュワーホルダーの1部を改造するだけで、島津MPS-50型自記分光光度計、Cary15型自記分光光度計などに使用することが可能である。図3の写真は島津 MPS-50型用のデュワーホルダーを示す。差スペクトルを必要としないときは、対照側に低温装置を使わなくてもよく、適当なオパールガラスか、適当な減光器を装着するだけで、十分目的を達することができる。Cary 11, 14, 15型や島津 MPS-50型のように、試料と対照のセル室を分離した自記分光光度計では、デュワーを2個必要とし一見取り扱いがやっかいのように思われるが、試料と対照側の氷の結晶状態をそろえることや、散乱不透過光の検出器側への入射防止などに有利な点が多い。

3. 低温吸収スペクトルの測定法

試料を吸収セルに入れ、あらかじめ別のデュワー中

図2. Cary 14型自記分光光度計への低温アタッチメントの装着。

図3. 島津 MPS-50型自記分光光度計用のデュワーホルダー。A. 検出器側より (セルホルダーを挿入)、B. 入射光側より見る。

で凍結冷却し、氷の結晶の生成状態と温度が一定になったのち、測定用のデュワーに移す。氷の微結晶を生成させるために、50%グリセリン溶液がよく使用されるが、この場合試料を液体窒素中で冷やすだけでは、ひびのはいた半透明の氷が生成し、氷の微結晶はできない。このようなものを、いったんデュワーより取り出し、弱いヒーターで少し温めると約 -50°C 付近で氷の結晶の相変化が起こり、微結晶が生成して、試料があたかもオパールガラスのように変化する。これが、いわゆる不透明化 devitrification の現象である。ミトコンドリアやマイクロゾームのグリセリン懸濁液では、これら粒子が結晶核となって、氷の微結晶は比較的容易に生成するが、精製標品の場合均一な微結晶を得るにはかなりの習熟が必要である。試料中の氷の微結晶の成熟度がよいかどうか、吸収の増幅度に大きく影響してくる。なおセル表面に霜ができた場合、吸光度に影響するので適当な方法で霜を完全に除去しなければならない。

Estabrook⁹⁾ は Chance¹⁾ らの考案した Split-beam spectrophotometer 用の低温装置を作り、チトクロームの吸収スペクトルを液体窒素の温度で測定しているが、1mm のセルと50%グリセリンを含んだ媒質を用いた場合、チトクローム c の α および β バンドの吸光度は、室温における値の5ないし6倍に増加するけれども、 γ バンドのそれは室温とあまり変らないと述べている。しかし、その吸収スペクトルは、明らかにかなり変形している。図4は、前述の新しい装置を用いて、ウシ心筋チトクローム c の吸収スペクトルを測定した1例で、 α バンドの吸光度は室温の約22倍に、 γ バンドのそれは室温の約13倍に増加していることがわかる*。チトクローム c 0.5–5 μM の濃度域で、1mm のセルを用いて測定した場合、 α バンドの吸光度は室温のものの約26倍に増幅され、 γ バンドのそれは約16倍に増幅されることがわかった。すなわち、1mm のセルを使用した場合、試料の濃度が低くければ、低温の不透明な試料についても Beer の法則が近似的に成立する。2mm 以上のセルでは、チトクローム c の濃度が 1 μM 以下でないと、吸光度と試料濃度との間に比例関係は見られない。

試料の濃度を一定にし (1 μM 以下)、セルの厚さを

図4. ウシ心筋チトクローム c (還元型) の吸収スペクトル。A. 室温における吸収スペクトル B. 液体窒素の温度における吸収スペクトル (見かけの絶対スペクトル、対照には不透明化した媒質を使用)。[Cyt. c] = 10.6 μM , 媒質 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4) (50%グリセリンを含む) の 1mm セルを使用。Cary 14型を使用。

変えて低温スペクトルを測定すると、セルの厚さの増加とともに試料の吸光度が指数的に増加し、いわゆる Lambert の法則は成立しないことがわかる。セルの厚さと吸光度の増幅との関係は、1 μM のチトクローム c を試料とした場合 1mm セルについては、 α バンドは室温のものの26倍、2mm セルでは40倍、3mm セルでは70倍というように、驚くほど大きな値が得られる (図5)。しかし、これらは50%のグリセリンを含む媒質を用い、均一な氷の微結晶を生じさせた場合だけで、荒い氷の結晶しかできないリン酸緩衝液だけを使用した場合、2mm セルでは、 α バンドの吸光度は5倍程度にしか増幅されない。タンパク質も濃度が増せば、グリセリンと類似的作用を表わすので、低温スペクトルについて定量的結果を出すには、媒質と試料中の水和性成分について十分検討しておかねばならない。図6は低温差スペクトルの1例で、ラット肝臓ミトコンドリア中の各種チトクローム成分の、コハク

* 各吸収バンドの吸光度は次式により計算。

α バンド: $A_{i\alpha}$ または $A_{i\gamma} = A_{\alpha \text{ max}} - A_{\alpha \text{ trough}}$,
 γ バンド: $A_{i\alpha}$ または $A_{i\gamma} = A_{\gamma \text{ max}} - A_{\gamma \text{ trough}}$ (約455nm)。また各吸収バンドの低温による吸光度の増幅度 β は次式により算出。 $\beta = A_{i \text{ 77}^{\circ}\text{K}} / A_{i \text{ 298}^{\circ}\text{K}}$ 。

図5. 酵母チトクロームc (還元型) の吸収スペクトル。
セルの厚さと低温による増幅との関係を示す。
A: 2mmセル, 1μM Cyt. c (室温), B: 1mmセル,
10μM Cyt. c (室温), C, D, E 1μM Cyt. c セルはそ
れぞれ1, 2, 3mm (77°K)。上部のグラフはαおよび
γバンドの吸光度とセルの厚さとの関係を示す。Cyt. c
1μM, A: αバンド, B: γバンド。Cary 14型による。

図6. ラット肝臓ミトコンドリアの差スペクトル。
state 5—state 2, 0.1フルスケールのスライドワイ
ヤーを使用, 媒質 0.3M マニトール・ショ糖混液。

酸を基質にした場合の還元状態を示す。

以上, 測定試料の取り扱い方法について詳しく述べてきたが, 低温吸収スペクトルの測定においては, 自記分光光度計の諸特性, とくにモノクロメーターの分光特性, 検出器の感度の検討が必要である。また, 実際の操作に当たっては, 波長送りの速度, 有効波長幅, ノイズレベルに十分留意すべきである。低温において, オパールグラス状の試料を透過してくる光量は, 入射光量のせいぜい2—5%以下であるので, 低温スペクトルの測定には, 検出器のゲインを上げねばならない。しかし, それはまた, ノイズレベルの上昇に通じる。シャープな吸収ピークの近接しているところでは, 波長送りの速度はできるだけ低速で行なわなければならない。波長送りが速すぎると, 細かい吸収ピークをとばしてしまう恐れがある。筆者は Cary 14型を用い, 光電子増倍管の感度 (dynode tap) を2~3, 波長送り速度を2.5 Å/sec, 有効波長幅を約0.5 mμに維持し, レコーダーゲインを適当に調節し, 吸光度1.0のフルスケールでは, ノイズレベルを $A \pm 0.002$ 以下, 吸光度0.1フルスケールでは, ノイズレベルを $A \pm 0.0007$ 以下に保って測定を行なっている。

4. 吸収スペクトルに対する低温効果

チトクロームの吸収スペクトルに対する低温の効果は, 分子に直接作用する過程と, 間接に作用する過程の2つが考えられる。吸収の微細構造の出現は前者によるもので, 試料の低温固化化によって試料分子と溶媒分子との相互作用が小さくなり, いわゆる振動構造が現われるものと考えられる。また, 吸収の著しい増幅作用は, 後者によるもので, 試料分子の周囲に生成する氷の微細結晶の光学的作用と考えてよい。氷の微細結晶による吸収の増幅作用は Keilin と Hartree¹⁰⁾によって, はじめて見いだされた現象であるが, 柴田^{11, 12)}らによって指摘されているように, その作用要因として, 氷の微細結晶の多重反射作用だけではなく, 氷の結晶のオパールグラス作用も考えねばならないだろう。実際の吸光度の増幅は, セルの厚さ以外に波長, 媒質の屈折率, 氷の結晶の粒度, 試料の粒度などの複雑な関数のようである。前述のように, Estabrook¹³⁾らは増幅度の低い, かなり変型したチトクロームcの低温スペクトルを測定しているが, これはおそらく, 装置の不完全さ, たとえば散乱不透過光の検出器への入射,あるいは氷の微細結晶の成熟度が不十分な状態でスペクトルを測定したためと思われる。電気回路による増幅は, つねにノイズの増幅を伴うものであるが, 氷の微

結晶による吸光度の増幅は、ノイズの増幅を伴わない実現可能な「理想的」増幅作用であって、その増幅度が約20倍から数10倍という大きい値が得られることに注目しなければならない。低温スペクトル法は、はじめに述べたようなチトクロームの同定定量や反応中間の検出だけではなく、一般的な微量分析法としても有望である。

最後に、低温吸収スペクトルの実験について、いろいろ援助していただいた大阪大学蛋白質研究所浅野朗氏、チトクロームの精製標品を提供していただいた理学部奥貫研究室瀬屑一郎氏、和田敬一郎氏に感謝の意を表す。また島津MPS-50型用の低温装置の試作に協力していただいた島津製作所科学器械工場真壁英樹氏ならびに栗田昂氏に深く感謝する。

文 献

- 1) R. W. Estabrook: Haematin Enzymes, p. 436, Pergamon Press, Oxford (1961)
- 2) W. B. Elliott, W. Tanski: Anal. Chem., **34**, 1672 (1962)
- 3) G. F. Doebbler, W. B. Elliott: Biochim. Biophys. Acta, **94**, 317 (1965)
- 4) J. E. Wilson, L. P. Hager: Biochim. Biophys. Acta, **102**, 317 (1965)
- 5) K. Kawai: J. Biochim., 投稿中
- 6) 河合清三: 生化学会近畿支部会 (1967年5月)
- 7) K. Kawai: in preparation.
- 8) 神田慶也: 実験化学講座11, 電子スペクトル p. 99, 丸善, (1965)
- 9) C. C. Yang, V. Legallais: Rev. Sci. Instrum., **25**, 801 (1954)
- 10) D. Keilin, E. F. Hartree: Nature, **164**, 254 (1949)
- 11) K. Shibata: Methods of Biochemical Analysis **7**, p. 77, Interscience Publ., New York (1959)†
- 12) 黒住玉子, 稲田祐二, 柴田和雄: 生体物理化学, **5**, 29, 南江堂 (1960)

■訂正表■ Vol 6, No. 6〔沈降平衡法……………田 代 裕〕33頁～40頁

頁	誤	正
35, 左↓25	には蒸着による	には蒸発による
36, 右↓11	もし斜に横切るようであればX軸をもとの50mmにもどしてから載物台を廻転し……………	もし斜に横切るようであれば載物台を廻転し……………

昭和43年度

◇大阪大学蛋白質研究所共同研究員募集◇

募集要項

資 格	大学, 研究機関 (民間を除く) の研究者
研究期間	3 か月乃至 6 か月
旅 費	交通費および滞在費支給
申込〆切	昭和43年2月15日 (木)
宿 舎	本研究所の宿舍かまたは下宿をあっ旋します
申込方法	所定の申込書に推薦状をそえて所属機関長より申し込を行なう
そ の 他	研究課題その他の詳細は 大阪大学蛋白質研究所 大阪市北区常安町36 大阪(443)8421～8 にお問い合わせ下さい。