

Title	低温分光測定法の生体試料への応用
Author(s)	飯塚, 哲太郎; 萩原, 文二
Citation	大阪大学低温センターだより. 2 p.3-p.7
Issue Date	1973-04
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/12368
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

低温分光測定法の生体試料への応用

基礎工学部 飯塚 哲太郎

医学部 萩原文 二

生体中の色素(例えば、ヘモグロビン、ミオグロビン、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、各種のチトクローム類などのヘム酵素やヘムたんぱく質)は、広く生化学者により、分光学的に研究されて来た。ケーリンとハートレーは、1949年に、ヘムたんぱく質の吸収スペクトルが、液体窒素温度で尖鋭化する事を報告した。この現象は、現在ケーリン・ハートレー効果と呼ばれている。その後、混濁試料を測定する方法が試みられ、Shibataのオパールグラス法やChanceのスプリットビーム法などがよく知られている。

我々は、1968年に、Chanceのスプリットビーム法を改良し、二重デューワー方式を採用する事により、 $4.2^{\circ}\text{K} \sim 300^{\circ}\text{K}$ で安定に生体試料凍結溶液の吸収スペクトルを測定するシステムを完成した。その後これを応用していくつか仕事を行なって来たので、ここに、装置と例を示し、その将来性について論じたい。

図1は、全体のブロックダイアグラムである。生体試料のホモゼネートやそのバッファー溶液は、凍結すると粒子や水の微結晶による散乱のため不透明になる。このような試料に光を通すために、安価なしかも強力な光源として、ヨウ素ランプ(岩崎電機: Quartz Halogen

Lamp 12V 50W)を定格を少しオーバーして用い好結果を得ている。光源からの光は、プリズムと回折格子から成るダブルモノクロメーター

で分光される。この単色光を60 $\frac{1}{s}$ で回転振動するバイブレーションミラーによりスキャンさせて、試料溶液側(キュベットのS)と比較溶液側(R)を通過させる。この光は、キュベットの直後に置か

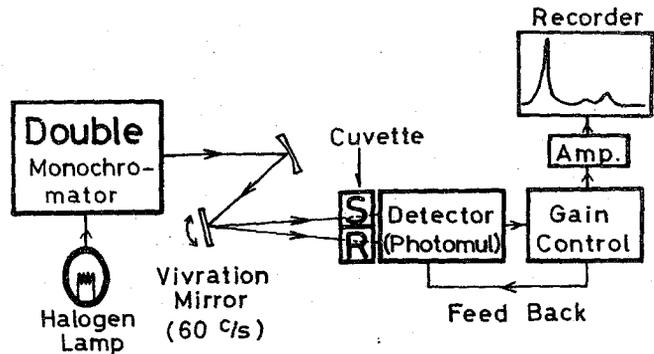


図1. スプリットビーム型自記分光光度計のブロックダイアグラム(B.Hagihara and T. Iizuka, J.Biochem., 69 355 (1971)より

れたエンドオン型光電子増倍管 (EMI 9558 QB) で検出され、比較溶液 R を通過した光の量をたえず一定に保つようにゲインコントロールを行なう。出力を増巾し、試料溶液 S の吸光度 A はログアンプを通してレコーダーに記録させている。(ランベルトの法則は $A = \log \frac{I_0}{I}$ となっている。 I_0 , I はそれぞれ入射光、透過光の強度)

図 2. ツインキュベットと二重デュワー

①金属の箱, ②外デュワー, ③液体窒素,
④内デュワー, ⑤液体ヘリウム, ⑥銅の筒,
⑦窓, ⑧銅の筒⑥の窓, ⑨ツインキュベット,
⑩ネジ, ⑪ベークライトの棒 (10 mm φ),
⑫金属パイプ, ⑬金属のキャップ, ⑭ゴムチューブ,
⑮ゴムパッキング, ⑯液体ヘリウム導入用パイプ (トランスファーチューブに合わせる。), ⑰ゴムチューブ, ⑱スクリュウコック, ⑲ハーメチックシール, ⑳熱電対, カーボン抵抗, 内部ヒーターのリード, ㉑真空コック, ㉒ゴム板 (クッション), ㉓内デュワー固定用のベークライト板, ㉔, ㉕パッキング用蝶ネジ ㉖ネジ, ㉗外部ヒーター, ㉘内部ヒーター

(B. Hagihara and T. Iizuka, J. Biochem. 67, 355 (1971) より)

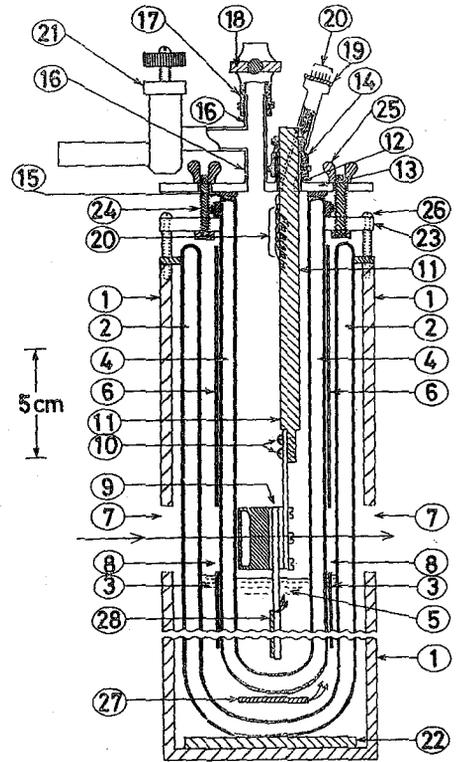


図 2 は、液体 He 用二重デュワーにセットされたツインキュベットを示す。内・外デュワー④, ②は、ライトパスの位置だけ帯状にメッキを抜いてあり、金属箱①におさめられている。ツインキュベット⑨は、3 mm 厚のアルミ板の一端にヨの字型の切り込みを入れ両面をアクリル板でおさえ、試料側と比較溶液側を構成している。試料側にはカーボン抵抗と金コバルト-銅の熱電対が挿入してありそれぞれ、4.2 ~ 50°K と 50 ~ 300°K の温度範囲をカバーする。上部には、ヘリウム回収用部品がついている。又内デュワーの外側には、銅の筒がまいてあり、ライトパスより下の液体窒素につかっている。光電子増倍管は金属箱①の直後におかれる。以後は図 1 で説明した通りである。

〔余談〕 図 2 に示したような複雑な He 回収装置がついていると、試料のとりはずしが大変である。又阪大の場合週三回のヘリウムデーでは、測定は、順調に行っても、週三回が限度であろう。これで計算すると、一年に 40 週として、120 回測定可能となる。所で筆者の一人が、ペンシルバニア大医学部に、このデュワーを持参し、He 温度での測定を行なった時は、回収装置は不要で、試料のとりかえ

が楽な事と、ベッセルから自分で勝手に液体ヘリウムを使用できた（これは夜中でも実験できる事を示唆している）ので、一日四回の測定が付き、一週五日制でも一カ月半に優に150回近くの測定を行なった。さらに脅威を感じたのは、生体試料の4.2°Kでの測定（ESR, 吸収スペクトルなど）を、医学部で、大変簡単にやっているという点である。

〔例1〕表紙に示したのは、肝臓のミクロゾームより抽出した、チトクロームb₅の吸収スペクトルを各温度で測定したものである。室温では、555nmのピーク（いわゆるα-バンド）はブロードではっきりしないが、4.2°Kでは、はっきりしたダブルピークになっており、又530nm前後のいわゆるβ-バンドは、4.2°Kになると、最低5つのピークに割れる。このような微細構造の記述は、生体内の臓器に存在するチトクローム類の分析（定量や同定）を行なうために重要である。薬物投与したりガンにかかった動物の臓器などで、生理機能に重要な役割を果たしている呼吸酵素（チトクロームなど）の定量を行なう事は、医学、薬学方面への応用例として将来性が期待されている。

所で我々の最近の研究（B.Hagihara, R.Oshino and T.Iizuka, J.Biochem投稿中）から、各種チトクロームは、液体窒素温度ではピークの分離及びピーク位置のブルーシフトが不十分であるのに対し、20°K以下では十分である事がわかった。それゆえ、生体試料のチトクローム分析には、液体水素（20°K）で十分であると考えられる。（この場合、二重デューワーは不要で、少し真空度のよい液体窒素用デューワーを用いることが可能である。）

ここで低温スペクトル法のもう一つの重要な利点を述べておきたい。図2⑨のツインキュベットの厚さは、3mmであるがグリセリンなどの溶媒を用いる事により氷の微結晶を上手に作ってやると、結晶の粒界での多重反射により、実際に光が走る厚さは30倍にもなる事がわかっている。すなわち濃度のうすい試料でも、30倍も増幅されることになるので、微量の生体試料測定には大変有利である。

〔例2〕図3に示したのは、メトヘモグロビン誘導体の

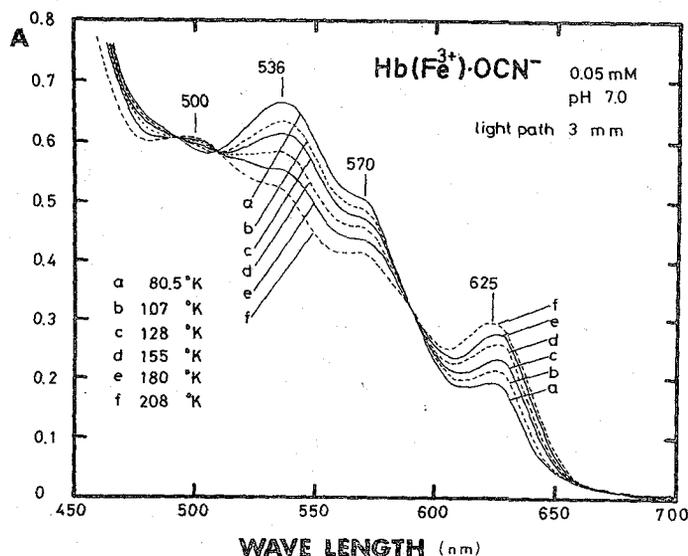


図3. メトヘモグロビン誘導体の吸収スペクトル

(T.Iizuka and M.Kotani, Biochim. Biophys. Acta, 194(1969) 351より)

(cyanate complex)の吸収スペクトルの温度変化である。80.5°Kでは536 nmにピーク、570 nmに肩をもつLow Spin型スペクトルが、温度上昇に伴って、500, 625 nmにピークをもつHigh Spin型スペクトルに変化して行く。この変化の過程で、三つの等吸収点(isosbestic point)が観測されることは、二つの型のスペクトル(High Spin型とLow Spin型)のみが関与しており、他の第三のスペクトルは存在しない事を示唆している。又この温度範囲では、EPRシグナルの温度変化も、よく観測できないので、吸収スペクトルに頼るのが有利であった。もちろん常磁性磁化率の温度変化は、図3に非常によく対応していた。

図3のように、きれいな等吸収点が観測できるという事は、我々のシステムが、(物理的な解析に必要な)温度変化の測定に適している事を示す。普通の分光器でテストした結果、温度変化における、等吸収点はうまく観測できなかった。

[例3] 図4には、液体ヘリウム温度で光分解された、コバルトミオグロビン酸素解離型が、温度上昇に伴って再び酸素化型にもどるプロセスを示した。(f)のように413.5 nmにピークを持つ吸収スペクトル(酸素化型)は4.2°Kで、光を吸って、396 nmにピークをもつ酸素解離型(a)に移行する。又(a)は温度上昇とともに50°K近くで殆ど完全にもとの酸素化型(f)にもどった。このことは、ポルフィリンの π 電子系が吸った光エネルギーで、コバルトとO₂分子の結合が切れ、温度を上昇させ熱エネルギーを与えると再結合するというピクチャーを与えた。

図4の場合も403 nmに等吸収点が観測されるので、この光分解-熱再結合の現象でも二つの型(酸素化型と酸素解離型)のみを考えればよい。幸いCo²⁺はd⁷配置なので、

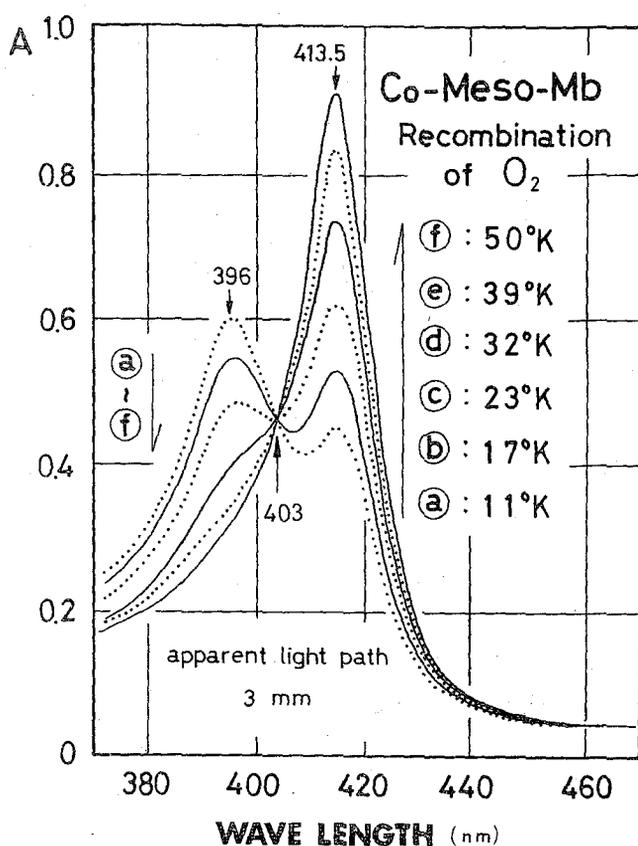


図4. コバルトミオグロビン酸素化型の
光解離-熱再結合現象(T. Iizuka,
H. Yamamoto and T. Yonetani,
submitted to J. Biol. Chem.)

両型のEPRシグナルも観測でき、我々の推論の正しさを証明した。

上記三例以外に、最近Orii(理学部)は、生体試料の凍結状態においても反応が進み得る可能性を、低温分光法により証明した。この分野は、医学的な手術や食品工業にも低温技術が導入されつつある現在及び将来、重要な基礎的研究となるであろう。

以上低温分光学の基礎から応用まで、非常に簡単に紹介させていただきましたが、御質問・御忠告などありましたら、是非御連絡下さい。

[文献]

1. D. Keilin and E. F. Hartree, Nature, 164, 254(1949).
2. B. Chance, "Haematin Enzymes" ed. by J. E. Falk et al., Pergamon Press, London and New York, p454(1961).
3. T. Yonetani, D. F. Wilson and B. Seamonds, J. Biol. Chem. 241, 5347(1966).
4. T. Yoshizawa and G. Wald, Nature, 212, 483(1966).
5. K. Kawai, Analytical Biochem., 25, 264(1968).
6. T. Iizuka and M. Kotani, Biochim. Biophys. Acta, 194, 351(1969).
7. B. Hagihara and T. Iizuka, J. Biochem., 69, 355(1971).
8. Y. Orii and T. Iizuka, Biochem. Biophys. Res. Com., 48, 885(1972).