

THE HITACHI

Scientific Instrument

NEWS

February, 1965 Vol .8. No. 1.

 Hitachi, Ltd.

目 次

1. ミトコンドリアの高分子構造とエネルギー転換機能
.....小田 琢三・田原 敦子・西 義美..... 1
2. 日立微小部X線分析装置用スキャンニング装置
.....原 行 一・渡部 忠雄・戸村 光一・奥村 正秀..... 4
3. ペーパークロマト展開物質の反射スペクトル
.....嶺 岸 久子・保田 和雄・後藤 幹保..... 5
4. 炎光付属装置による各元素の検出限界.....保田 和雄・須藤 健吾..... 7

ミトコンドリアの高分子構造とエネルギー転換機能

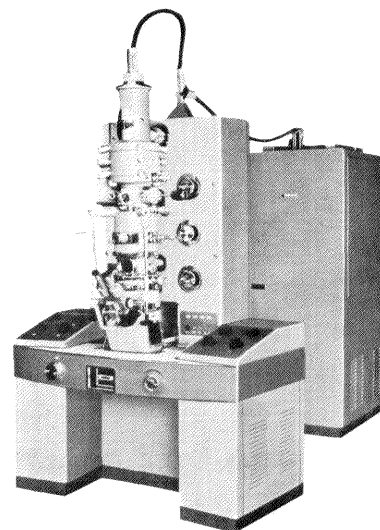
小田 琢三*・田原 敦子*・西 義美**

生物がどのようにして生きてゆくエネルギーを獲得するかということは、生物学に課せられた最も重要な中心課題の一つである。すべての生物は生命のエネルギー獲得の手段として多種多様な構造装置を含んでいる。ミトコンドリアと呼ばれる細胞内小器官は酵母のような下等な植物から人間のような高等な動物に至るまですべての好気的生物の細胞に共通に備わったエネルギー産生（転換）装置である。それらの生物の生命現象に必要なエネルギーの大部分はミトコンドリアにおける呼吸機能の遂行によって産生される。すなわち細胞質内で代謝された糖の分解産物ピルビン酸をはじめ、アミノ酸や脂肪酸などの代謝産物は、ミトコンドリアにおいてその膜に構成されたクエン酸回路その他の酸化酵素群と電子伝達系との共同的触媒作用によって水と炭酸ガスに分解さ

*岡山大学医学部病理学教室 **日立製作所那珂工場

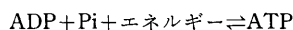


小田 琢三
(岡山大学 医学部)



HU-11A 形
日立電子顕微鏡

れ、その酸化過程で遊離するエネルギーが化学的エネルギーに転換される。すなわちアデノシン二リン酸 (ADP) と無機リンからアデノシン三リン酸 (ATP) が合成される (酸化的リン酸化)。この高エネルギーリン酸化合物 ATP の化学的エネルギーがあらゆる生命現象の原動力となるのである。



すなわち ATP が逆に ADP と無機リンに分解されるときに遊離するエネルギーが、たとえば筋肉の収縮のような機械的エネルギー、神経の刺激伝達のような電気的エネルギー、分泌や吸収のような浸透圧的エネルギー、物質の合成のような化学的エネルギーなどに転換されて諸々の複雑な生命現象が営まれるのである。

現代生物学の中心課題は生物がどのようにしてそのエネルギーを産生し、どのようにして巨大分子を複製するかということにあり、その共通の焦点は細胞の微細構造と生化学的機能を分子やミセルのレベルで結びつけることによって、生命現象の基本的な物理化学的原理を認識することである。ミトコンドリアがどのような分子によって構成され、どのような化学的機構でエネルギー産生の機能を果たすかを究明することは、生物学の基本的命題である生命の神秘を解くための一つの重要な礎石となるであろう。このような研究のために高分解能電子顕微鏡による分子あるいはその複合体の直接的観察が不可欠の条件である。

筆者らはミトコンドリアの最も基本的な機能である生命のエネルギー産生 (転換) を行なう最小の構造単位が何であるか、それがどのような分子によって構成されミトコンドリアの薄膜構造を形作っているか、そしてエネルギー転換の化学反応がその構造といかに関連して果されるかを究明するために、高分解能電子顕微鏡によるミトコンドリアの高分子構造の観察と基本単位粒子の生化学的分離同定に努めてきた。

ミトコンドリアは普通長さおよそ $1 \sim 3 \mu$ 、幅 $0.3 \sim 1.0$ ミクロンほどの桿状あるいは楕円形の細胞質内顆粒で、その電子顕微鏡的微細構造に関しては、すでに十数年も前 (Palade や Sjöstrand) から、四酸化オスミウム固定、超薄切片標本の観察で、外限界膜と内膜およびそのおいたたみによって生ずる櫛状の皺壁 (クリステ) をもつ薄膜構造、すなわち一枚の比較的電子透過性の膜 (幅約 $60 \sim 80 \text{Å}$) をはさんだ 2 枚の比較的電子不透過性の膜 (それぞれ幅約 $50 \sim 60 \text{Å}$) よりなる二重膜構造 (全体の幅約 $160 \sim 200 \text{Å}$) がミトコンドリア膜の基本構造であると唱えられてきた。最近過マンガン酸カリで固定したミトコンドリアでは二重膜の各々がさらに薄い二重膜構造 (単位膜, Robertson) よりなるともいわれる。しかしこのような固定超薄切片標本の観察のみではそれがど

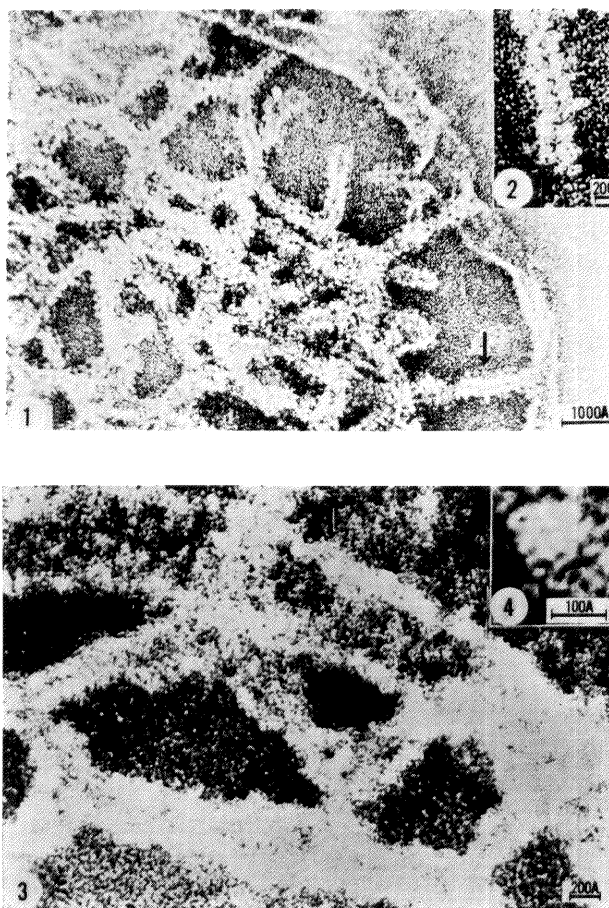
のような機能を営む分子によって構成されているかを知ることはできなかった。

筆者らは純粹に分離したミトコンドリアの中に含まれるエネルギー転換系の主要成分である電子伝達系の固定成分の分析から、電子伝達系単位 1 当りの粒子量を求め (Green and Oda, 1961)、それから粒子の大きさを推定し、Fernandez-Moran の協力によって、リンタングステン酸によるミトコンドリアのネガティブ染色標本の電子顕微鏡的検索の結果、ミトコンドリアの内膜に規則正しく配列した巨大分子複合体 (基本粒子, Elementary Particle) (直径 $80 \sim 100 \text{Å}$) が見出された (Fernandez-Moran, Oda, et al. 1964; 小田, 1963)。さらにミトコンドリアをコール酸とデオキシコール酸で溶かし、硫酸アンモニウムで塩析分画することによって活性な電子伝達系の最小単位を分離することに成功した (Oda, Blair and Green, 1961)。分離された基本粒子は電子顕微鏡で直径約 150 オングストローム、種々な物理化学的分析の結果、分子量およそ 140 万で、その固定成分としてコハク酸脱水素酵素 1 分子、NADH 脱水素酵素 1 分子、チトクローム a6 分子 b3 分子、C+C_i 1 分子などを含む。さらにその後の電子顕微鏡的検索によってミトコンドリアの内膜の基本粒子は頭部 ($80 \sim 100 \text{Å}$, 最初見出された粒子)、柄部 ($30 \times 50 \text{Å}$)、基底部 ($45 \times 100 \text{Å}$) より成ることが明かにされた。(Fernandez-Moran, Oda, et al.) しかしこのようなミトコンドリア膜から突出した基本粒子の頭部は固定標本の超薄切片では観察されないで、両者の相関性が問題となった。

筆者らはミトコンドリアの種々な機能状態における基本粒子の分子構造を検索した結果、基質 (コハク酸) の添加によって旺盛に呼吸中のミトコンドリアをリンタングステン酸でネガティブ染色し、瞬間的に飛沫した標本においては基本粒子は内膜クリステの二重膜内に完全構成形直径およそ $140 \sim 150 \text{Å}$ の球状ない (多面体) の巨大分子複合体粒子として存在しうることを見出した (図 I-4) (Oda and Nishi, 1963)。それは四酸化オスミウム固定超薄切片のオスミウム親和性膜の部に一致し、高分解能写真の拡大図ではその巨大分子複合体粒子の内部に単一酵素ないし酵素複合体レベルの大きさに相当する Subunit (直径およそ $25 \sim 40 \text{Å}$) 構造を認めることができる。この内膜内に見出した完全構成形の基本粒子は分離した電子伝達連鎖の基本単位と同様な大きさで構造が認められ、さらに諸種の物理化学的分析データの結果を総合して、それこそ真の電子伝達系の基本単位であると考えられるであろう。しかしその確実な同定は、尚将来の研究に残されている。

付図 1~4。ウサギの心筋から分離したミトコンドリアのリンタングステン酸によるネガティブ染色，飛沫標本。ミトコンドリア浮遊液にコハク酸を添加し2%リンタングステン酸，pH 7.0と混合して，なお旺盛に呼吸していることを確認後直ちに瞬間的に飛沫乾燥したもの。図1, 2, 3はミトコンドリアの内膜クリステの二重膜に配列した基本粒子を示す。基本粒子の大部分は内膜内に完全に構成されており，あるものはその一部の構成要素が膜から半ば突出しあるいは膜に付着しているように見える。膜内に構成されている基本粒子は膜から突出している粒子（頭部，すなわ

ち基本粒子の一部の分節より大きく，より微密に見える。図2は図1の矢印の部の拡大図で個々の基本粒子がよりはっきりと見える。膜内に構成された基本粒子は直径およそ120~170Åである。図4は図3の矢印で示した1つの基本粒子の拡大図である。この基本粒子の大きさは直径約150Åで，その内部に直径25~40Åの多数のSubunit粒子が認められる（図1，×92,000；図2，×196,000；図3，×266,000；図4，×910,000）（日立 HU-11A 形で撮影 Oda & Nishi 1963）。

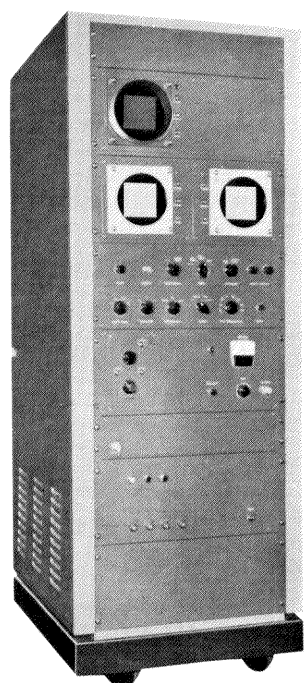


文 献

1. Fernandez-Moran, H., Oda, Blair, P. V., and Green, D. E.: J. Cell Biol., 1964, in Press.
2. Green, D. E. and Oda, T.: J. Biochem., **49**, 742, 1961.
3. Green, D. F., Tzagoloff, A., and Oda, T.: Science, **140**, 382, 1963.
4. Green, D. F., Blair, P. V., and Oda, T.: Proc. Ist. Internat. Symp. Cell. Chem. Ohtsu, Japan., 1963, in Press.
5. 小田琢三：細胞化学シンポジウム，**14**, 11, 1963.
6. 小田琢三：電子顕微鏡講習会講義集第16分冊，電子顕微鏡学会関西支部発行，1963.
7. Oda, T. and Nishi, Y.: J. Electron Microscopy, **12**, (4), 1963, in Press.
8. Oda, T., Blair, P. V., and Green, D. E.: In "Proc. of the 5th. Internat. Congr of Biochem., Moscow, 1961," Vol 9, 9, Plenary Lecture by D. E. Green, Pergamon Press, 1963. 小田琢三訳：核酸・酵素・蛋白質，**9**, 174, 1962.

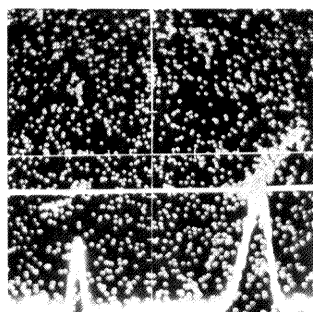
日立微小部線分析装置用スキャンニング装置

原 行一*・渡部忠雄*・戸村光一**・奥村正秀**

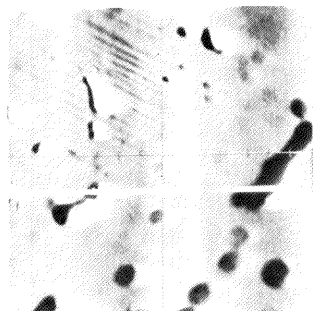


第1図 微小部X線分析装置用スキャンニング装置外観

微小部X線分析装置において、Point Analysis（定性分析、定量分析）およびLine Analysisによって、物質の構成元素・含有比・一次元分布の情報を得ることは、基本的な事柄である。よく研磨された被検体表面を光学顕微鏡で観察する場合に得られるものは、経験的なもの以外は面の凹凸によるコントラストであって、構成元素の2次元（厳密には3次元）的分布については想像の域をでない。



第2図 真鍮内の鉛の偏析を示すX線像（太く白い直線は線分析箇所を示す、またその線上の計数率も表示でき、二重露出によって撮影）



第3図 鉛の偏析をもつ真鍮の吸収電子線像（鉛の部分黒くなっている。また太く白い直線は線分析箇所を示す）

いま、電子線束を装置本体に組み込まれた電子線偏向電極によって試料面上を2次元に走査させ、試料面から励起されるX線を、あらかじめ定められた角度の分光結晶を通して、検出器に単色X線を入れ増幅、波高選別の後、ブラウン管に輝度変調をかけ、X線信号を管上に明暗として表示すれば、被検体中の特定元素の2次元分布が知られる。

厳密に言えば、被検体に入射した電子の深さは入射電子のエネルギーおよび元素の密度によって異なるが、数 μ の深さに侵入するから光学顕微鏡にて得られなかった。ごく表面直下の元素分布まで知ることができる。

また、被検体に吸収される電子の数は原子番号によって異なり、加えて試料の凹凸によっても幾分の吸収量が異なる。つまり被検体に入射する電子数と被検体から出る2次電子数の差である試料吸収電子流 I_{ab} は原子番号 Z が大きいときは小さく、 Z が小さいときは大きい。また、被検体の凹部に入射した電子は、形状によっては籠の中の鳥のごとく、外部へ逸出できず、結局 I_{ab} となる。逆に凸部で反射条件のよい部分は、入射電子数が小さくなる。

原子番号の差および表面状態が、2次元の拡がりの場所、場所によって異なる場合には、 I_{ab} が異なるからこの検出した電子流を増幅し、輝度変調回路を通して、ブラウン管上に表示することが可能となる。

以上のように光学顕微鏡で得られなかった被検体表面の特定元素の2次元分布状態を知ると同時に、元素の軽、重および凹凸の状態をも観測が可能となる。

第1図はX線像および試料吸収電子像を観察するYS-2形スキャンニング装置の外観である。

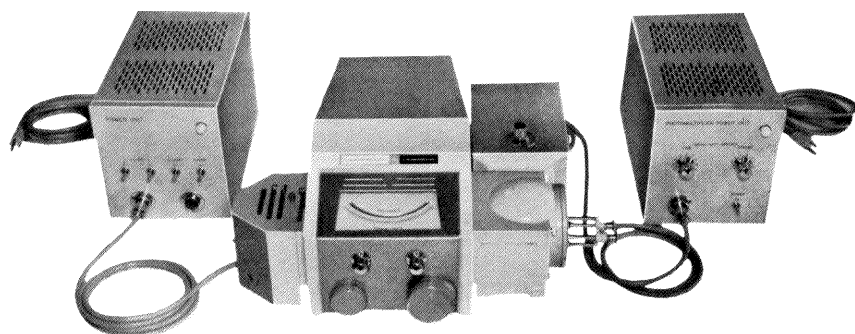
第2図は真鍮に鉛が偏析している場合のX線像を示し、第3図はその吸収電子像を示す。

X線像観察には、X線分光器台数が増した場合、ブラウン管数を分光器と同数準備することによって、異元素の同時表示が可能となる。

*日立製作所那珂工場 **日立製作所中央研究所

ペーパークロマト展開物質の反射スペクトル

嶺岸久子*・保田和雄*・後藤幹保**



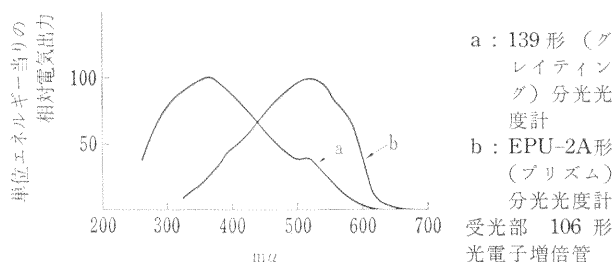
139-0640 形 反射付属装置を組み合わせた 139 形 日立分光光電光度計

ペーパークロマト展開物質の定性には、従来スポットを溶出して、その吸収スペクトルを透過法によって測定している。しかし、近年とくに微量分析がさかんになってきたので、試料が微量のため溶出不可能である場合が少なくない。したがってクロマトグラムから物質を溶出しなくても、そのままの状態吸収スペクトルが測定できることが望ましい。このため、Korte⁽¹⁾ はペーパークロマトグラムの反射スペクトルから生化学代謝物質の定性をこころみた。

展開物質が微細な結晶を作っている場合、試料濃度が高い場合には吸収スペクトルと反射スペクトルとが一致しない。試料濃度が低く、単分子膜のような形になって展開されている場合には実験的に両スペクトルが一致する⁽²⁾。

クロマト展開物質の反射光は、全く吸収されないで試料および濾紙によって反射されてくる光、吸収されて反射してこない光、および試料によって吸収されて濾紙によって反射されてくる光の積分されたものである。したがって試料が高濃度になると、後二者の強度よりも前者の強度の方が大きくなり、正しい吸収スペクトルを与えない。濃度が低い場合には前者による影響が大きくないので近似的に反射スペクトルと吸収スペクトルが一致することが考えられる。

著者らは 139 分光光度計と反射付属装置を用いてペーパークロマトグラムの反射スペクトルを求め、それと溶液の吸収スペクトルとを比較した。



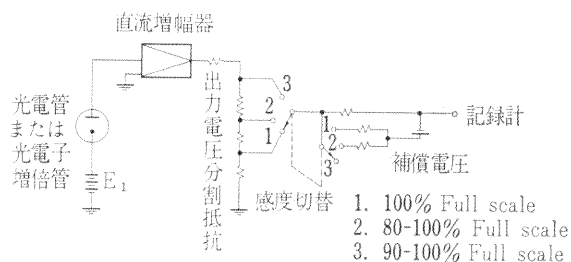
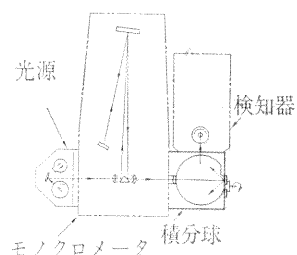
第 1 図 分光光電光度計の分光特性 (NBS 標準ランプで補正)

装 置

反射スペクトルの測定には 139 形分光光電光度計と反射付属装置 (0640) を用いた。139 の分光特性は第 1 図に示すようにプリズム分散型のモノクロメータにくらべて紫外域の分光感度が高い。これは紫外域のペーパークロマトグラム反射スペクトルを測定するのに必要な条件である。なお濾紙に吸着した試料はランダムな方向に存在しているので、反射の測定の際に一定方向のみで測定するよりも、積分球を用いて反射光の積分値を求める方がより正しい測定値を与える。

第 2 図に測定装置の光学系を示す。この方法では試料に直接照射される紫外線強度が小さくなるので、試料の光化学反応などをおさえることができる。しかし試料が蛍光性のものであると蛍光が反射光に重なるため正しい反射スペクトルが得られない。その場合は蛍光反射付属装置 (0680) を用いて測定することが望ましい。反射スペクトルの測定においては、濾紙の反射が試料の反射スペクトルに重なってくるのをふせぐために、標準側に試料の吸着していない濾紙を用いた。低濃度の試料の測定の場合には第 3 図に示す回路を用いて 5～10 倍のスケール拡大を行なった。

第 2 図 反射スペクトル測定
の光学系



第 3 図 スケール拡大回路系統図

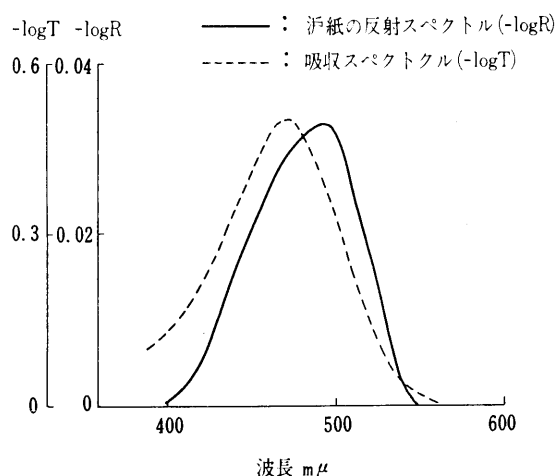
*日立製作所那珂工場 **学習院大学理学部化学科助教授

測定結果

いくつかの試料について、沱紙展開物の反射スペクトル ($-\log R$) と溶液の吸収スペクトルを比較した結果を次に示す。

第4図にイソドロブテリン (ショウジョウバエの目の色素) の低濃度の反射スペクトルを10倍に拡大して測定した結果と酸性溶液の吸収スペクトルを示す。沱紙に吸着した状態と酸性溶液の状態とでは電子状態が異なるので吸収の主波長は相違するが、この点を除けばスペクトルの形そのものはよい一致を示している。

第5図にスケール拡大を行なわないで測定したナフトキノンの吸収スペクトルを示す。反射スペクトルと溶液の吸収スペクトルは、一方が固体であり、他方が溶液の状態であることを考えればよく一致している。



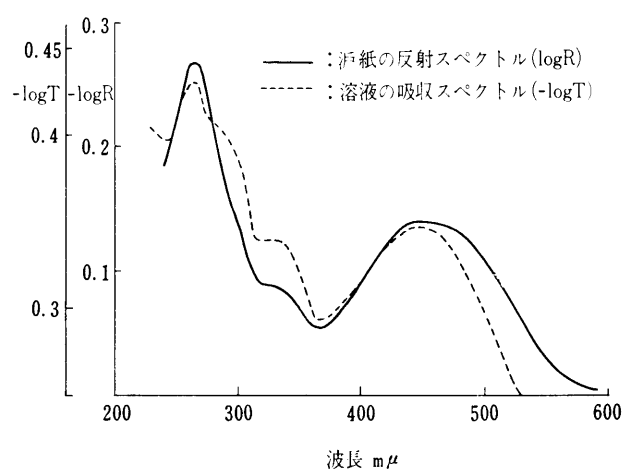
第4図 スケール拡大して測定した
イソドロブテリンの吸収スペクトル

第6図にコプロポルフィリン (鳥型結核菌) の反射スペクトルと溶液の吸収スペクトルを示す。両者の極大波長は比較的よく一致しているが、反射スペクトルの方が吸収スペクトルよりもバンド巾が広い。

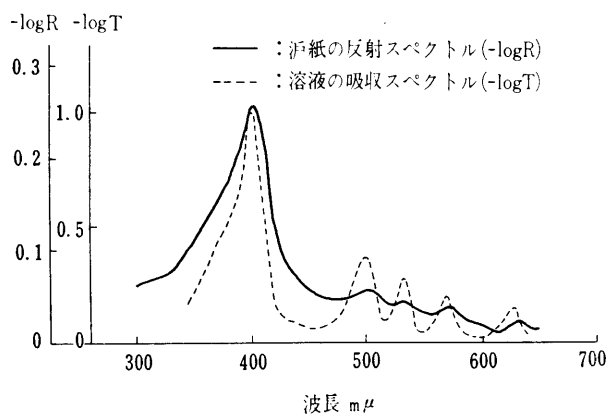
第7図のリボフラビンの場合も同じようなことがいえる。

参考文献

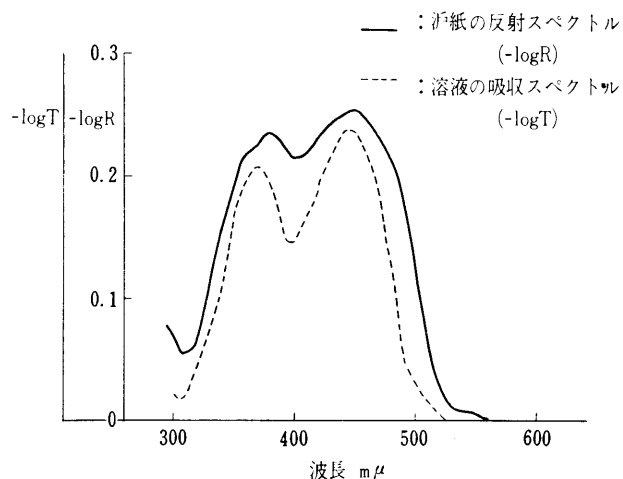
- (1) F. Korte & H. Weitkamp: *Angew. Chem.*, **70**, 434 (1958)
- (2) 保田和雄, 嶺岸久子, 小川 努: *日立評論* **46**, (第4号), 145 (1964)



第5図 2-アミノ-1:4-ナフトキノンの反射スペクトル



第6図 コプロポルフィリンⅢ-メチルエステル
(鳥形結核菌) の反射スペクトル



第7図 リボフラビンの反射スペクトル

炎光付属装置による各元素の検出限界

保田 和雄*・須藤 健吾**

炎光分析法は、主にアルカリ金属、アルカリ土金属の定性定量分析に用いられるが、他の金属元素の分析も可能である。

炎光分析に用いられるガスは、水素、アセチレン、プロパン、都市ガスなどであるが、従来これらには夫々専用のアトマイザーバーナーが使用されてきた。

日立パーキンエルマー 139 型分光光電光度計の炎光付属装置に標準装備されているバーナーは、一つのバーナーで水素、アセチレン、プロパンのいずれの燃料ガスでも炎光分析ができるという特長をもっている。

このバーナーによる酸素-水素、酸素-アセチレン、酸素-プロパンのバックグラウンドを第1図、第2図、第3図に示す。

この図からもわかるように、バックグラウンドは、酸素-水素、酸素-プロパン、酸素-アセチレンの順に高くなっている。

第4図 A, B は、酸素-プロパンによる検出限界測定の一例である。

表1に、酸素-水素、酸素-アセチレン、酸素-プロパンを用い $S/N=1$ とした時の各金属元素の検出限界の測定例を示す。

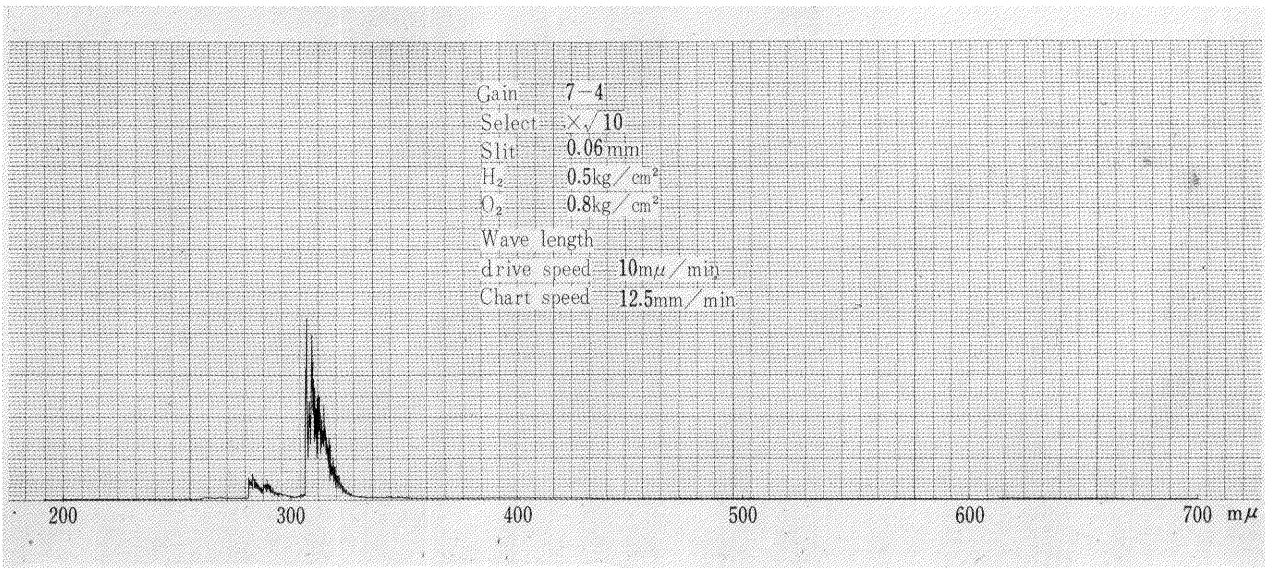
そして表1に酸素-水素、酸素-アセチレン、酸素-プロパンを用い $S/N=1$ としたときの各金属元素の検出限界の一例を示す。なお、この値は装置の誤差によるバラツキについては考慮していない。

第一表 各金属元素の検出限界 単位 p. p. m.

元素	波長 m μ	ガ ス 種 類					
		H ₂ -O ₂		C ₂ H ₂ -O ₂		C ₃ H ₈ -O ₂	
		Photo-tube*	Photo-mul**	Photo-tube*	Photo-mul**	Photo-tube*	Photo-mul**
Ag	338	3	0.21	2.5	1.05	0.63	0.052
B	521	22.5	2.04	16.6	2.2	3.33	0.34
	548	36.6	2.2	13.3	3.2	4.16	0.63
Ba	515	22.5	1.17	—	12.5	4.9	5.43
Ca	423	0.13	0.02	0.1	0.025	0.17	0.0071
	554	0.16	0.007	0.118	0.08	0.15	0.0068
	622	0.5	1.1	0.23	1.0	0.47	0.38
Cd	326	42.8	7.2	93.7	20.0	71.3	18.9
Co	353	4.7	1.05	6.6	1.5	3.2	0.86
Cu	325	0.73	0.37	3.62	0.165	0.614	0.293
K	405	—	—	—	—	—	—
	768	0.016	0.93	0.033	7.05	0.046	0.33
Mg	285	—	—	—	—	—	—
	371	3.32	0.67	12	3.5	1.07	0.55
	383	4.01	1.16	13.2	4.2	0.57	0.54
Mn	403	0.63	0.054	0.87	0.72	0.158	0.049
Mo	540	12.7	1.7	8.3	2.98	1.88	0.55
Na	589	0.0025	0.0007	0.002	0.00068	0.0034	0.00056
Ni	352	6.95	0.52	6.6	2.04	0.70	0.59
Pb	406	—	3.8	—	21.42	30.0	2.16
Ti	518	—	—	—	—	3.13	1.29
V	528	41.6	2.6	16	—	7.53	1.076

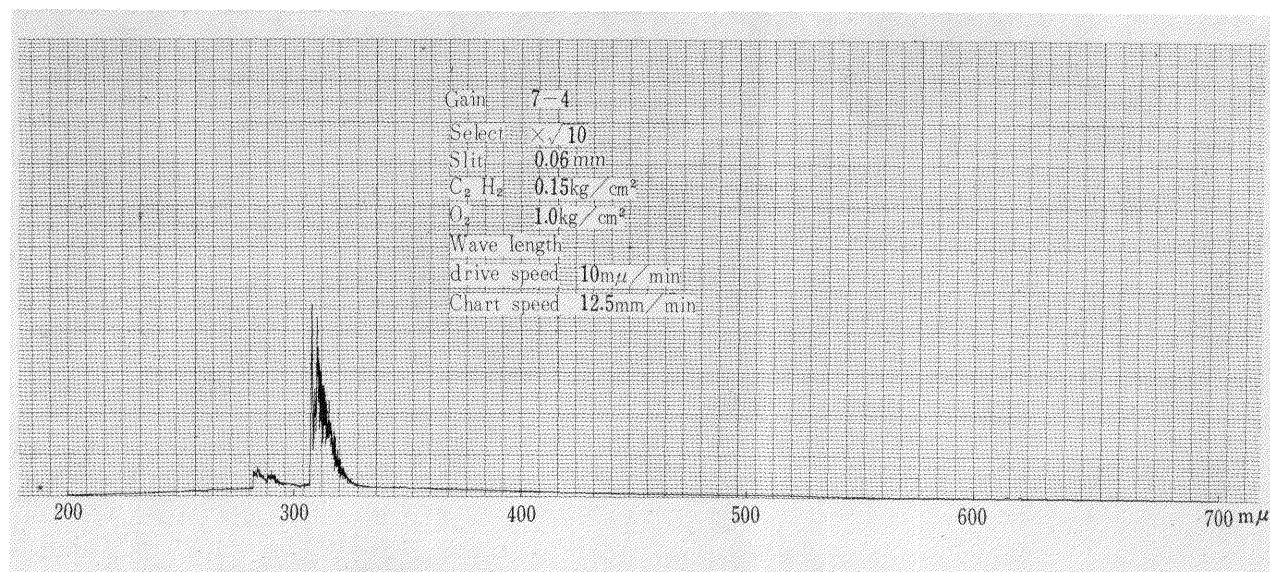
* 光電管受光部
** 光電子増倍管受光部
注 上表の検出限界は装置のバラツキを考慮していない

第1図 酸素-水素・フレイムのバックグラウンド

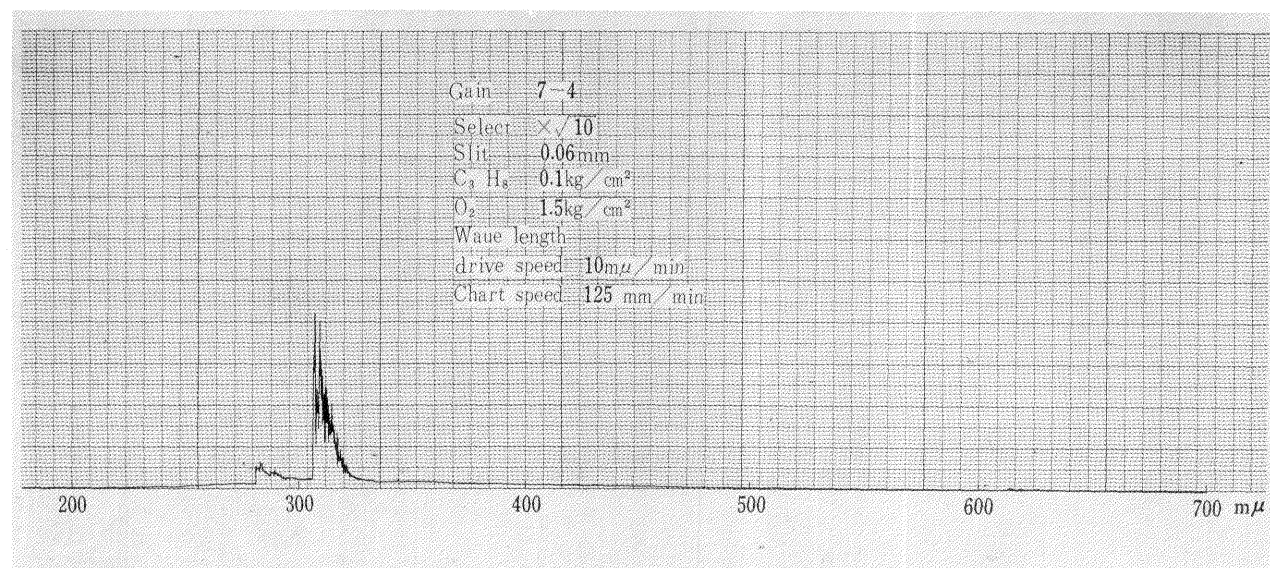


*日立製作所那珂工場 **日立パーキンエルマー（株）

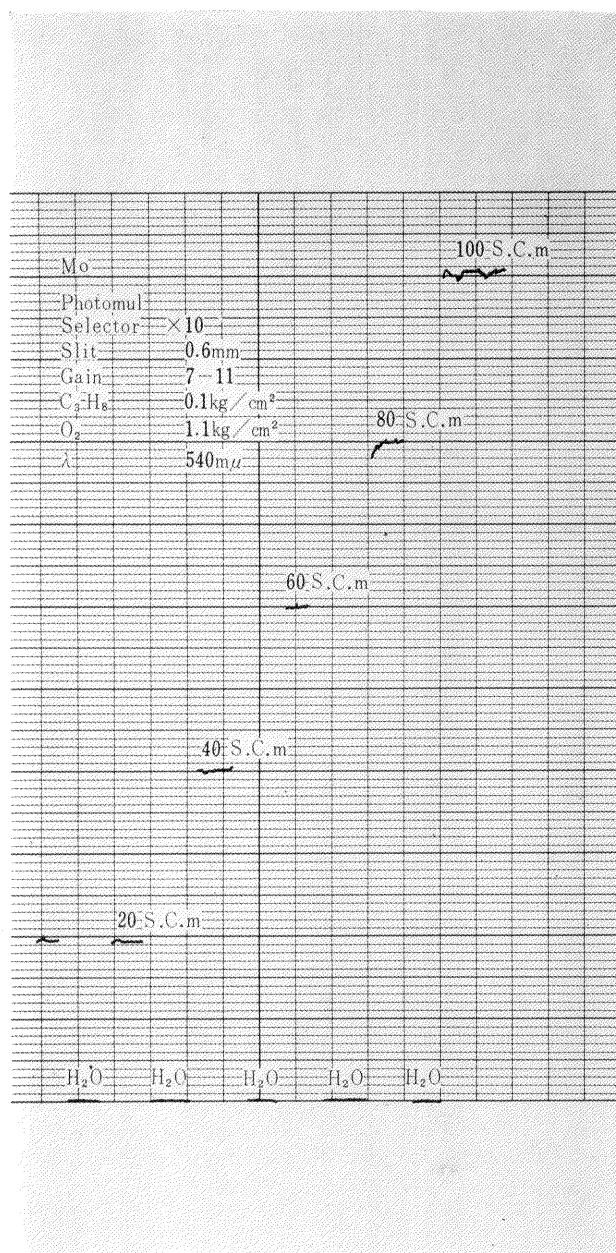
第2図 酸素—アセチレンフレイムのバックグラウンド



第3図 酸素—プロパンフレイムのバックグラウンド

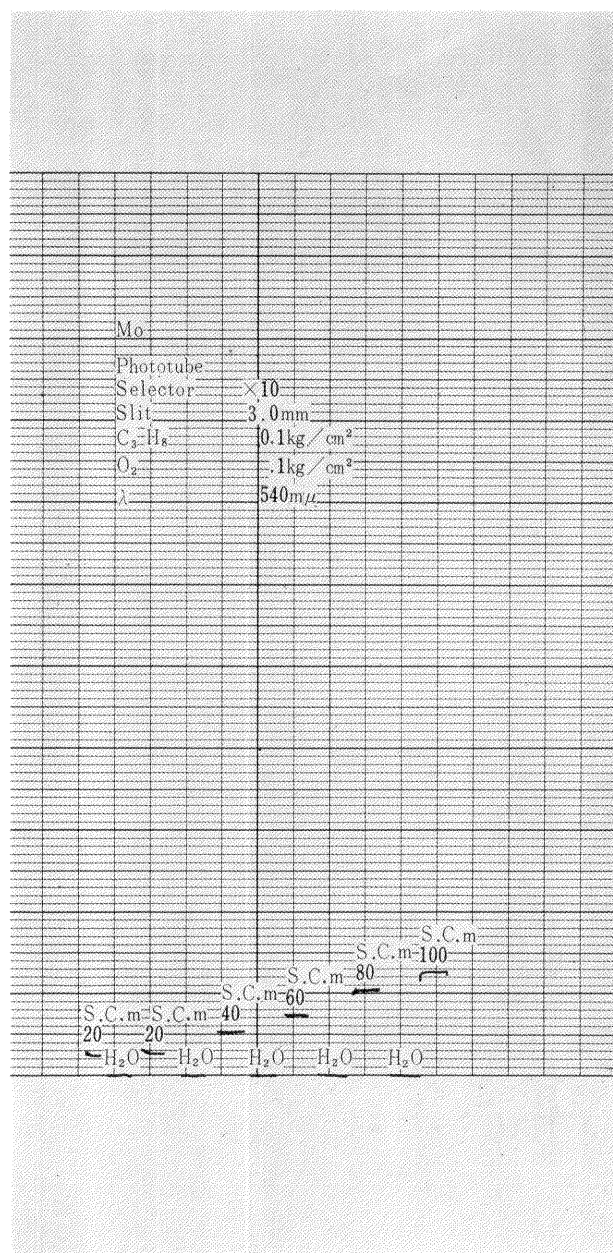


第4図A 検出限界測定記録例



ガス 酸素—プロパン
受光部 光電子増倍管受光部
試料 (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ 4 H₂O 水溶液

第4図B 検出限界測定記録例



ガス 酸素—プロパン
受光部 光電管受光部
試料 (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ 4 H₂O 水溶液

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 8 No. 1

昭和40年 1 月 20 日印刷

昭和40年 2 月 1 日発行

非 売 品

年 6 回毎偶数月発行

編集人 麓 吉 治

発行人 白 川 義 雄

発行所 株式会社 日立製作所

印刷所 株式会社 日立印刷所