

THE HITACHI Scientific Instrument NEWS

June, 1966 Vol. 9. No. 3.



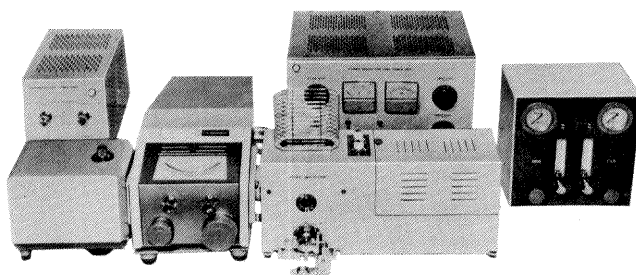
■原子吸光法の酵素学への応用

矢野圭司*

最近の酵素精製法技術の進歩とともに、単一たん白質、あるいは結晶になった酵素は年とともに急増している。このような高純度酵素たん白質の成分分析において、構成アミノ酸や、結合している糖などとともに重要な因子は金属であって、結合金属の有無、その金属元素の種類、数などを分析する機会は増加している。ことに酸化還元酵素またはこれに類する酵素においては、結合金属の種類、その数などが、電子伝達という機能の点で、酵素の作用機作を解明するためにきわめて重要なことである。Feを含む一般へムたん白質のほか、たとえばキサンチン酸化酵素では Mo 2 原子、Fe 8 原子を酵素たん白質 1 分子に含み、またアスコルビン酸酸化酵素、ラッカーゼなどは Cu を含んでおり、その Cu の原子価変動が酵素活性ときわめて密接な関係にあること⁽¹⁾⁽²⁾、Ferredoxin⁽³⁾、Adrenodoxin⁽⁴⁾などの非へムたん白質で Fe を含む生体内酸化還元に必要なたん白質も見出されている。



矢野圭司



139-0420 形原子吸光付属装置を装着した 139 形日立分光光度計

ヒドロキシン安息香酸水酸化酵素の精製標品を得た⁽⁸⁾。この標品の金属分析は、日立製作所那珂工場応用開発課のご協力を得て、HITACHI-model 139-0420 で行なったものであり、以下その結果を記述したい。なお、筆者は金属分析、とくに原子吸光法については専門外であるので、本法の詳細な説明記述は避け、応用例の一つとして紹介したい。また原子吸光法について、あるいはその応用例については、すでに本ニュースに掲載されている^(10~14)。

1950 年ピロカテカーゼの発見以来⁽⁵⁾酵素添加酵素(オキシゲナーゼ)と呼ばれる酵素が次々と発見され、次いでこれらの酵素における Fe の役割が重視されてきた。酵素の精製度の低い段階では阻害剤の作用や、Fe の添加実験などの手法でこの事実が確かめられてきたが、1963 年メタピロカテカーゼの結晶化から⁽⁶⁾結晶化に成功あるいは単一たん白質までの精製標品が数例にわたって報告され、酵素たん白質 1 分子あたり Fe 1 原子⁽⁶⁾あるいは 4~5 原子⁽⁷⁾という金属分析結果が報告されている。筆者は、細菌のベンゼン核水酸化酵素の研究を行ってきたが、最近、超遠心沈降分析、電気泳動分析においてはほとんど、単一とみなされるパラ

目次

1. 原子吸光法の酵素学への応用……………矢野圭司 …… 1
2. $YVO_4:Eu$ けい光体の Eu^{3+} の励起準位の決定
(分光けい光光度計, MPE-2 形の利用)
……………小沢隆二 嶺岸久子…………… 3
3. 日立簡易形赤外分光光度計 EPI-L 形による
粘度鈹物および鉄化合物などの測定と、その測定法
……………松平俊二 矢嶋文雄…………… 5

* 東京大学農学部農芸化学科醸酵学教室 農学博士

実験方法

パラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素は、*Pseudomonas desmolytica* の菌体よりすでに報告した方法により⁽⁸⁾精製した。この方法による最終標品の純度は第1図, a, b, に示すごとくである。この標品は0.1 M リン酸緩衝液溶液なのでリン酸の干渉を除去するため、セファデックス G-25 のカラム (1.5×15.0cm) を用い、ゲル濾過法により、0.1 M マレート緩衝液 PH 5.7 に緩衝液交換を行なった。たん白濃度 6.92mg/ml, 金属標準溶液は塩化物を用いた。使用計器は前述の 139-0420 形で、QPD₃₃ 形記録計を接続し、記録紙上の数値より計算した。アトマイザーバーナーへの通気量は、Air 7.0 ℓ/min, アセチレン 1.4 ℓ/min, 各金属はそれぞれのホローカソードランプを用い、Fe, 直流電流 35mA, スリット幅 0.2mm, 波長 2483Å; Cu, 20mA 0.2mm, 3247Å; Mo, 25mA, 0.3 mm, 3133Å; Ni, 25 mA, 0.25 mm, 2320Å; Co, 40 mA, 0.25 mm, 2407Å; Mn, 20mA, 0.25mm, 2795Å で行なった。

実験結果

第1表に示すごとく、Fe 以外の金属, Cu, Mo, Ni, Co, Mn は全く認めないか、あるいはトレース程度であり、Fe 以外の金属は考慮から除外してよい。しかし本酵素の分子量を 65,000 と設定すると(セファデックス G-100 濾過法による⁽⁹⁾)本酵素1分子あたり Fe 0.096 原子と算出される。一般に酵素たん白分子に結合している金属原子は整数であるので約1/10の比で結合しているとみられる。酵素たん白質のサブユニットの一部に Fe が結合するとしても、今のところ、それに対して容認するデータはない。むしろ、Fe の混在を検出したと考えてよい。

すでに発表した⁽⁸⁾結果では、本酵素たん白質1分子に1原子の Fe を含む結果であったが、標品中に 500~600 mμ に吸収をもつたん白質の混在を認めたので、再試験を行なった。その結果が上記のものであり、本酵素は本質的には Fe を含んでいないと見るべきである。

考 察

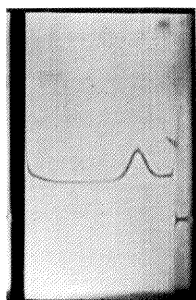
本実験の前にリン酸緩衝液溶液での定量を行なったが、リン酸による干渉の結果か、数値はより低く出ている。リン酸の干渉についての実験は行っていないが、分析精度の点から見れば、干渉以外にサンプルの粘度の影響が考えられ、より正確さを期するためには標準添加法による吸光度 0 へ外挿することが望ましい。Cu, Mo, Ni, Co, Mn についての結果はその必要がないと思われる。一般に特殊な場合を除き、精製酵素を充分量、種々の金属分析に用いることは事情が許さない場合が多く、その点、記録計を組み合わせて行なったこの実験は、一々の金属についてサンプル 0.2~0.3mℓ を使用したのみで、(安定性の悪い場合を除く) 目的を達しているのに、新しい酵素の金属分析法としては有利な点が多いと考える。記録計を使用しないで行なったこともあるが、

メーター指針の振れを瞬間的に押えることは困難で、単にサンプル使用量を低く押えるということのみでなく、記録計の使用が望ましい。使用したサンプルの金属含有量、すなわち濃度にも関係はあり、使用した計器、あるいは光源ランプによる分析感度ぎりぎりのところなので欲をいえばもう一桁の感度を望みたい。もっとも、積分計の組み合わせとか、あるいはスケール拡大(2倍は行なえるという)という方法もあるというので、ここで紹介した以上の感度や精度は期待できよう。酵素たん白質中の金属分析法として、特に数多くの金属元素についての検討を短時間に、少量の試料で行ない得るという点で、他の方法に比べ原子吸光法が便利かつ正確で、再現性も良いということはいえよう。なお、最近、*Ps. desmolytica* の他菌株より本酵素の結晶化に成功したが、結晶酵素の鉄含量を同じく原子吸光法で定量したところ、コントロール(緩衝液)との差はわずかに 0.01 PPM であった。この場合もし本酵素の一分子あたり一原子の Fe があるとする予想値は 2.0 PPM であり、結合 Fe は、0.005 原子となり、Na (緩衝液中に多い) による Light Scattering 効果を考えると無視できる結果を得ている。

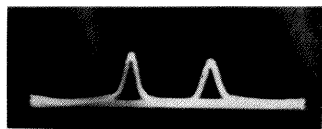
終わりに臨み、原子吸光法につき直接ご指導ならびにご協力いただいた日立製作所那珂工場、藤森慶一、内野興一両氏に心より感謝いたします。

文 献

- 1) W. N. POILLON et al.; *Biochem, Biophys, Acta* **77**, 27, 37, (1963)
- 2) T. NAKAMURA; *Biochem, Biophys, Acta*, **30**, 44, 490, 640, (1958)
- 3) K. TAGAWA and D. I. ARNON; *Nature*, **195**, 537, (1962)
- 4) T. KIMURA and K. SUZUKI; *Biochem, Biophys, Res, Comm*, **20**, 373, (1965)
- 5) O. HAYAISHI and K. HASHIMOTO; *J. Biochem*, **37**, 371, (1950)
- 6) M. NOZAKI, H. KAGAMIYAMA and O. HAYAISHI; *Biochem, Z.* **338**, 582, (1963)
- 7) H. KITA, *J. Biochem*, **58**, 116, (1965)
- 8) K. YANO, M. MORIMOTO and K. ARIMA; *Agri, Biol, Chem*, **30**, 91, (1966)
- 9) P. ANDREWS; *Biochem, J.* **91**, 222, (1964)
- 10) 大八木義彦; *HITACHI S. I. NEWS*, **6**, No. 1, 1, (1963)
- 11) 武者宗一郎ほか; *ib id*, **6**, No. 4, 1, (1963)
- 12) 武内次夫, 鈴木正巳; *ib id*, **6**, No. 5 1, (1963)
- 13) 酒井正衛; *ib id*, **8**, No. 5 1, (1965)
- 14) 早川太郎; *ib id*, **8**, No. 6, 1, (1965)



第1図a
超遠心沈降分析図
たん白濃度約0.5%
0.1Mリン酸緩衝液 PH5.8
51,200rpm に達してから
60分, 12℃
(日立UCA-1A)



第1図b 電気泳動分析図
たん白濃度約 0.7%
0.1Mリン酸緩衝液 PH 5.8
開始後 90分, 8.5℃, 4mA
(日立 HTB-2)

第1表

元 素		T %	-log T	PPM
Fe	標 準	63.1	0.200	15.0
	試 料	98.2	0.0075	0.6
Cu	標 準	88.6	0.053	2.0
	試 料	>99.9	≒0	≒0
Ni	標 準	89.9	0.046	10.0
	試 料	100.0	0	0
Mn	標 準	86.9	0.061	2.0
	試 料	100.0	0	0
Co	標 準	66.5	0.178	20.0
	試 料	>99.8	<0.001	<0.011
Mo	標 準	61.4	0.212	20.0
	試 料	>99.8	<0.001	<0.001

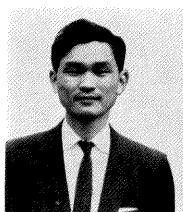
注) 試料の透過率T%は使用後緩衝液の透過率を差し引いてある

■YVO₄:Eu けい光体の Eu³⁺ の励起準位の決定

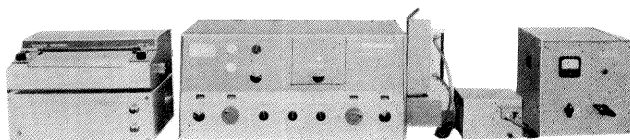
小沢隆二*・嶺岸久子**

(分光けい光光度計 MPF-2 形の利用)

希土類を付活剤として用いたけい光体は、固体レーザ物質としてあるいはカラーTV受像面に使われるけい光体として、興味をもたれるようになってきた。これら希土類付活けい光体の発光は6sおよび5d軌道によってシールドされた4fⁿ軌道内の電子遷移によって生ずるため、希土類イオンの置かれている結晶の作用を比較的受け難く、したがって吸収と発光のバンド幅は狭く線状に近い。このことから種々の結晶中にこれらのイオンを導入し、これらのイオンのエネルギー準位に対する結晶場の作用効果を評価し、不純物として導入したイオンのエネルギー準位に対する作用を明らかにする手がかりを得ようとする試みが行なわれはじめている。基底状態にあるイオンに対する結晶場の作用を調べようとするとき、ESRを用いる方法があるが、基底および励起状態までを含めて調べようとする場合、光学的方法、特にけい光現象を利用して励起および発光スペクトルから調べる方法がある。



小 沢 隆 二



MPF-2 形 日立分光蛍光光度計

にしたものである。スペクトルの測定は日立分光けい光光度計MPF-2形を使用した。

325 nm 紫外線を照射したとき、400 nm から650 nm 間に現われる発光バンドを第1図に示す。スリット幅は2 nm で測定した。分光器と光電子増倍管の組み合わせからなる測定系の分光感度補正は加えてない。500 nm 以上にある発光バンドの波長位置をnm単位で図中に示した。主発光バンドは619 nm にあって、このバンドは616 nm と610 nm の3つに分裂していた。

この619 nm 発光バンドを与える励起スペクトルの測定結果を第2図に示す。スリット幅は2 nm とした。発光はスリット幅6 nm で検出した。このスリット幅では593 nm の発光は検出光の中に混入していなかった。各励起バンドの波長位置を図中に示しておいた。325 nm にある大きなバンドは、基本結晶に原因した励起バンドであり、これより長波長側にあるいくつかのバンドはEu³⁺の直接励起バンドである。Eu³⁺の直接励起バンドは基底準位⁷F₀から⁵D₁準位以上に位置する励起準位への電子遷移であると仮定し、それぞれの励起バンドに対応する遷移をスペクトル項で図中に示した。このようにして割当てられたEu³⁺の励起準位は⁵D₀₋₄までと⁵L_{7,8}の合計7準位であり、これ以上に位置する準位は基本励起バンドの中にかくれて分離できなかった。⁵D₁と⁵D₂準位だけはそれぞれ350および400 cm⁻¹のエネルギー差をもった2つの準位に分裂していた。

G. S. Ofelt⁽¹⁾は実用的にも興味をもたれた4fⁿ配位にあるEu³⁺の励起状態のエネルギー準位を計算した。Eu³⁺の基底準位は⁷F₀であり、可視付近の吸収および発光に関与するエネルギー準位は、⁷F₀から40,000 cm⁻¹までにある準位である。この計算結果を基にして、LaCl₃⁽²⁾、Y₂O₃⁽³⁾およびその他の化合物結晶中⁽⁴⁻⁶⁾のEu³⁺のエネルギー準位と結晶場による各準位の分裂が調べられてきた。この報文はカラーTV用および高圧水銀灯用赤色成分けい光体として最近注目されたYVO₄:Eu³⁺けい光体について、常温下ではあるが励起および発光スペクトルを測定し、YVO₄結晶中におけるEu³⁺の発光に関係したエネルギー準位を求め、さらに発光に関与する主要準位間の電子遷移を明らかに

* 大日本塗料株式会社研究部 ** 日立製作所那珂工場

このようにして得た励起準位から基底準位への電子遷移を割当てると 500 nm 以上の発光バンドの全ては 5D_0 と 5D_1 準位から 7F_0 , 7F_1 および 7F_2 準位への電子遷移に帰することができた。 7F_1 準位は 340cm^{-1} のエネルギー差で2つの準位に, 7F_2 準位は 80 および 160cm^{-1} のエネルギー差をもった3つの準位にそれぞれ分裂していた。

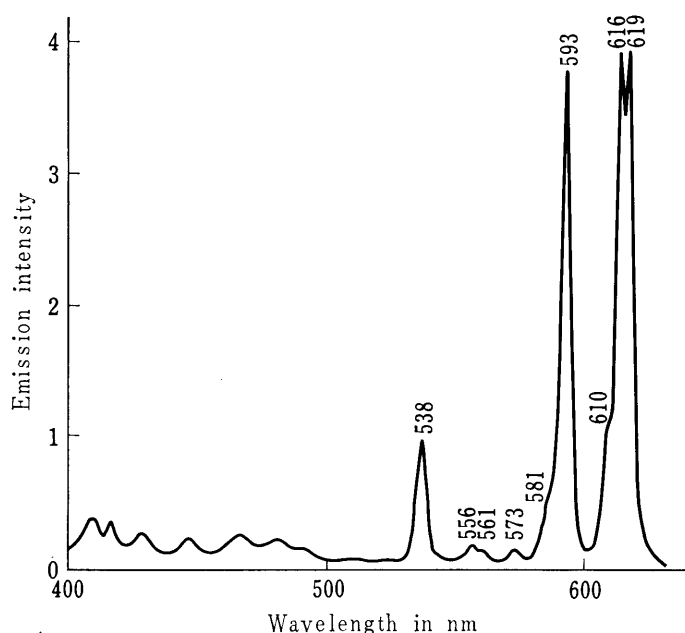
以上の結果より, 5D_2 以上の励起準位に励起された電子はなんらかの形で, たとえば格子振動や赤外域への発光のような形でそのエネルギーの一部を失って 5D_1 または 5D_0 準位まで落ちてきて, そこから発光性遷移を起こして基底準位の正孔と再結合すると考えられる。500 nm 以下にある弱い発光バンド群は, 5D_2 以上に上げられた電子が 7F_1 準位へと遷移することによって生ずるのであろうが, その遷移確率は小さく, しかも解析が複雑になる

ので略した。

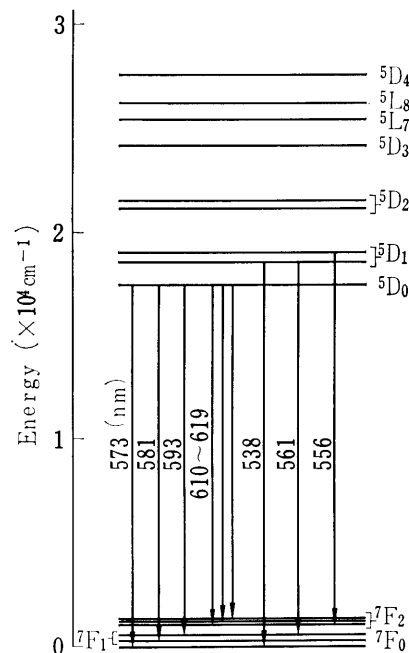
この研究によって得られた YVO_4 結晶中の Eu^{3+} のエネルギー準位図を第3図に示す。各準位の位置および結晶場による各準位の分裂程度は, Y_2O_3 および LaCl_3 結晶中のそれらと大きな差は認められなかった。

参考文献

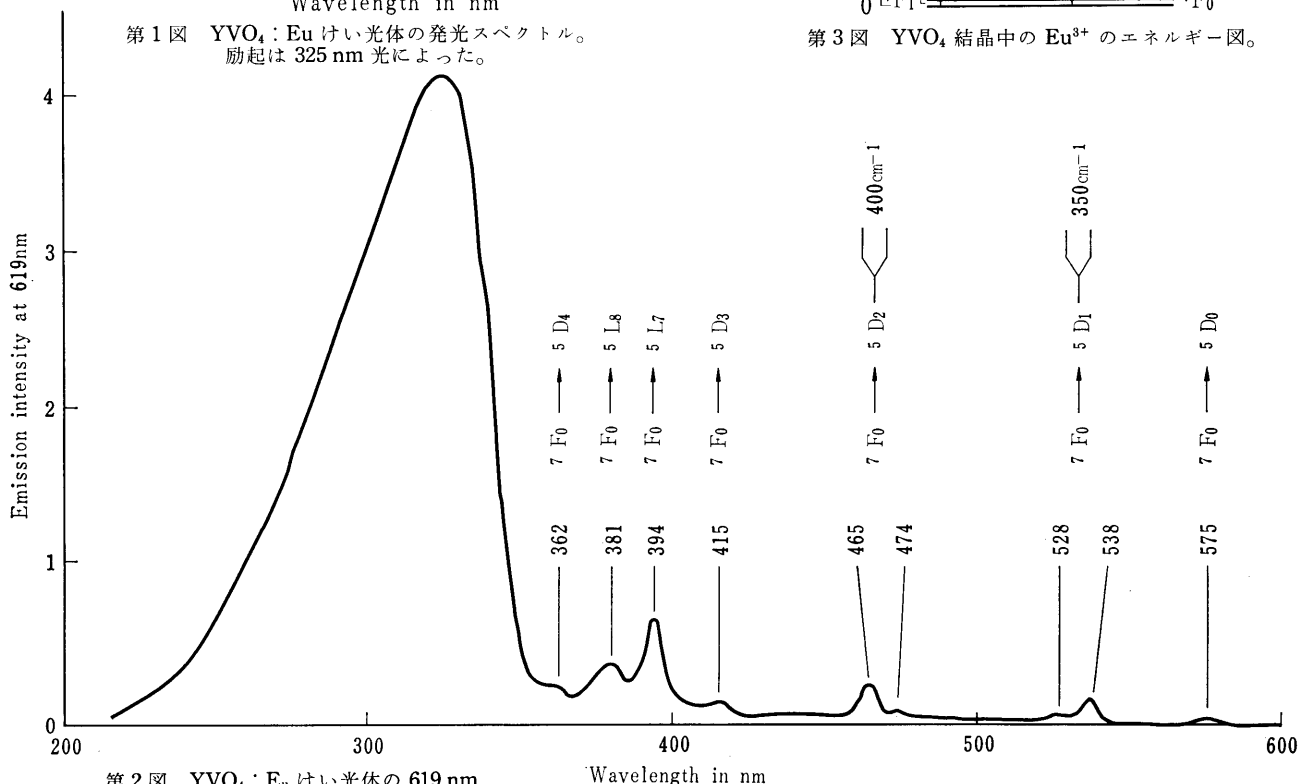
- 1) G. S. Ofelt; J. Chem Phys., **38**, 2171, 1963.
- 2) L. G. De Shazer and G. H. Dieke; *ibid.*, **38**, 2190, 1963
- 3) N. C. Chang and J. B. Gruber; *ibid.*, **41**, 3227, 1964.
- 4) E. V. Sayer and S. Freed; *ibid.*, **24**, 1213, 1956.
- 5) K. H. Hellwege, U. Johnsen, H. G. Karlle and G. Schaack; Physik, **148**, 112, 1957.
- 6) H. G. Kakle; Z, Physik, **155**, 129, 145, 157, 1959.



第1図 $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ けい光体の発光スペクトル。
励起は 325 nm 光によった。



第3図 YVO_4 結晶中の Eu^{3+} のエネルギー図。



第2図 $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ けい光体の 619 nm の発光を与える励起スペクトル

■日立簡易形赤外分光光度計 EPI-L 形による粘土鉱物および鉄化合物などの測定とその測定法

松 平 俊 次*・矢 嶋 文 雄**

日立 EPI-L 形 赤外分光光度計は、いわゆる 岩塩領域 $4,000\sim 650\text{cm}^{-1}$ ($2.5\sim 15.3\mu$) に続き $700\sim 200\text{cm}^{-1}$ ($14.3\sim 50\mu$) までの、世界最初のフィルター・グレーティング式の簡易形分光光度計である。光路長は 2m と短く、空気中の水蒸気などの影響が少ない。また、高精度の多層膜干渉フィルター、パウダー・フィルターを用い、エネルギーを効果的に利用し、しかも迷光の少ない分光器である。

自家製検知器の著しい感度向上と分光光度計製作技術の総合的な進展にともない 200cm^{-1} (50μ) までの領域はきわめて容易に測定できるようになった。EPI-L 形赤外分光光度計の外観図を第 1 図に示す。

以下に示す吸収スペクトルは、窒素置換、乾燥空気の循環など、従来行なわれていたように、煩わしい操作を全く行なうことなく、きわめて短時間 (13分) に $700\sim 200\text{cm}^{-1}$ の領域を測定した例である。操作は、EPI-S₂、EPI-G₂ など日立簡易形シリーズとほとんど変わらず、きわめて簡単である。

記載したスペクトルの測定条件は次のとおりである。

Polyethylene bagging with Nujol
Resolution ; N
Gain ; 2
Scan Speed ; 2-fast (13min.)

第 2 図は a) Kaolinite, b) Halloysite, c) Bentonite, d) Allophane, e) Silica Gel の吸収スペクトルである。

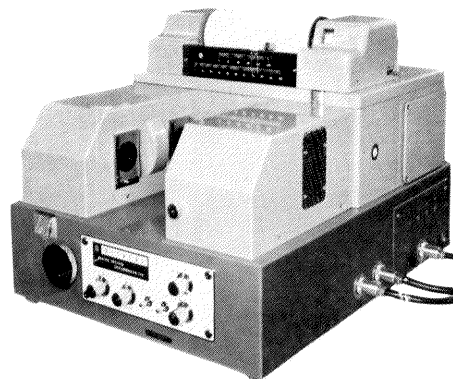
非晶質性の Allophane を除き a), b), c) に共通なバンドが 240cm^{-1} , 470cm^{-1} 付近にある。e) は 470cm^{-1} にシャープな特性吸収を示す。

Kaolinite, Halloysite は同形 (1:1 形) の粘土であるが、 432cm^{-1} の吸収は Kaolinite がきわめて特長ある吸収を示し $1,000\text{cm}^{-1}$ 付近の吸収より、明らかに差のあるバンドを見出すことができる。

346cm^{-1} の吸収は SiOAl の振動に由来する吸収と考えられ、a), b), c), d) のそれぞれに吸収を示しシリカゲルには吸収がない。 240cm^{-1} 付近の吸収は、非晶質の Allophane にないことから、結晶質の粘土鉱物に由来する吸収と考えられる。この点に関し、さらに多数の試料について、明らかにすれば Allophane と他の粘土との含有比を決定しうるキー・バンドとして用いる可能性があるものと考えられる。

上記のほか、土壌粘土についても測定した結果、いままでに報告された赤外吸収スペクトルと同じように、土壌学について有用な手掛りを与えるこの領域がきわめてルーチンに行なうことができる。

第 3 図は、加水酸化鉄、酸化鉄などの吸収スペクトルで a, a') $\alpha\text{-FeOOH}$ (Goethite), b) $\beta\text{-FeOOH}$, c, c') $\gamma\text{-FeOOH}$ (Lepidocrocite) d, d') $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Hematite) e, e') $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Ma-



第 1 図 EPI-L 形赤外分光光度計

ghemite) f) Fe_3O_4 (Magnetite) g) MnO_2 である。

ここに示したものは、結晶化度の高いものと、低いもの (第 3 図 a', c', d', e') との例であり、結晶度の相異および結晶系の相異を反映している。結晶度の高い FeOOH の α 形 268cm^{-1} の吸収が β 形で 271cm^{-1} , γ 形で 274cm^{-1} と高波数にわずかつつシフトしている。

Fe_2O_3 の α , γ 形は著しいスペクトルの差を示している。

ここに掲げた吸収スペクトルは未発表のもので、試料を提供してくださった、東京大学農学部浅見先生、東京教育大学助教授大羽先生、北海道農業試験場の金野先生のご好意に厚く謝意を表します。

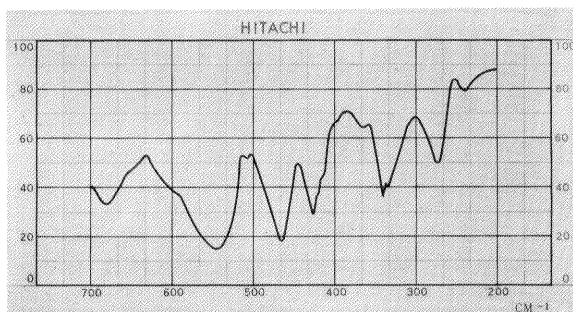
なお、粘土鉱物、鉄化合物についての 400cm^{-1} までの赤外吸収スペクトルについては「赤外線吸収スペクトル」第 9 集 P.21~50 (昭和35年) 南江堂を参照されたい。これらの詳細については別の機会に発表される予定である。

これらのスペクトル測定の際のサンプリングは、さきに Nujol ベースを作り Polyethylene の袋に入れ、通常法にならって測定した。サンプルの厚さが、低波数領域に干渉縞を生じやすい濃度を必要とする場合に、しばしば遭遇したが、固形パラフィン (m.p. 50°C) を溶融し窓となる面に、ごく薄く塗付して干渉縞の生ずるのを防止した。このほか、KBr 錠剤法によって約 35μ (280cm^{-1}), KI 錠剤法によれば 50μ (200cm^{-1}) まで測定可能である。 50μ までの窓材としては CsI があるが、一般には普及していないので Polyethylene フィルム、プレートを利用するのが、手近で重宝である。また、ホット・ローラによらずとも、歯科医用ローラで Polyethylene 中にサンプルを埋没したもので測定ができる。

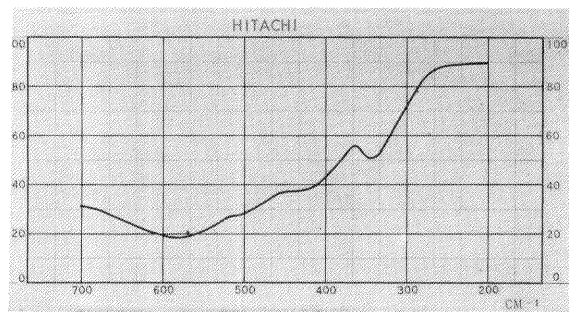
また、固体試料を微粉とし、固形パラフィンの少量を溶融して、混合均一にしたものを錠剤ホルダーに流し込み、固化後測定することもできる。これらの方法は、入手しやすいものばかりを、サンプリングに使用しているから、一度試みられれば容易に行なうことができる。

測定に当たり、いろいろご助言、ご指導をいただいた、東京大学農学部、相沢先生に深く感謝いたします。

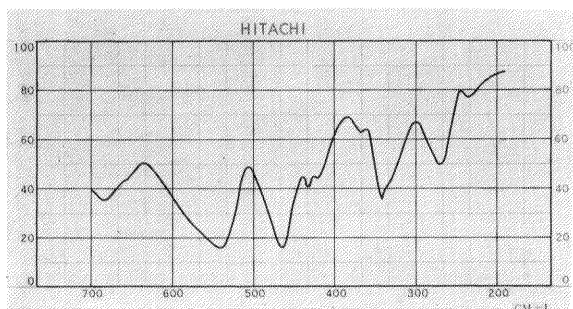
* 日立製作所 那珂工場 **日製産業株式会社 精機部



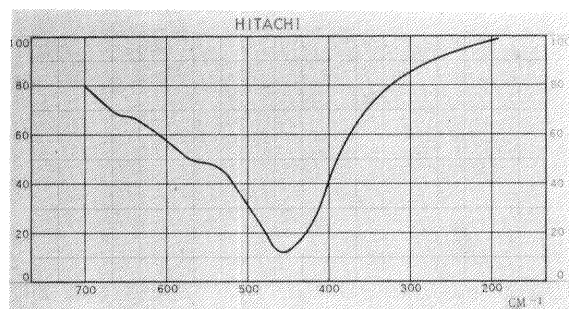
第2図-a Kaolinite の吸収スペクトル



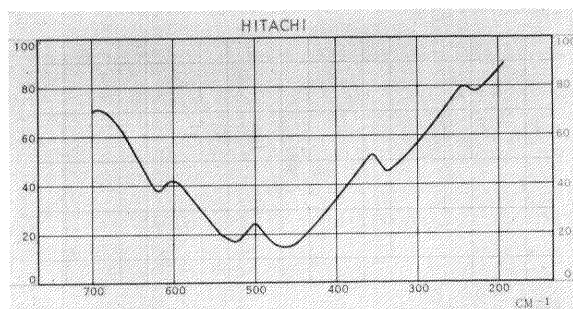
第2図-d Allophane の吸収スペクトル



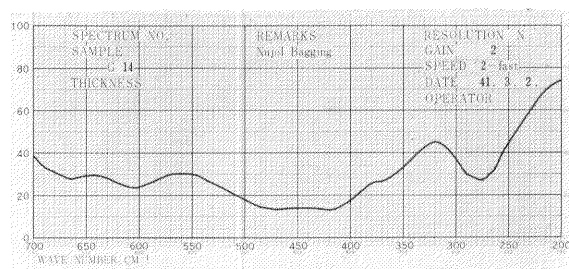
第2図-b Halloysite の吸収スペクトル



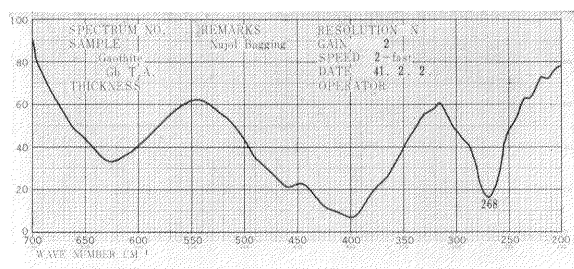
第2図-e Silica Gel の吸収スペクトル



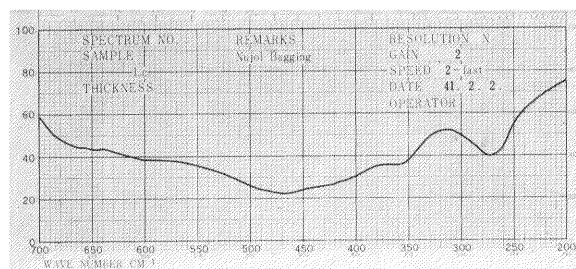
第2図-c Bentonite の吸収スペクトル



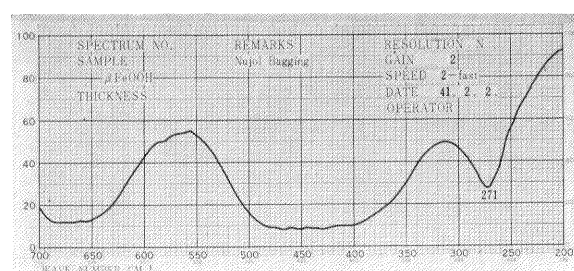
第3図-a Gaothite の吸収スペクトル



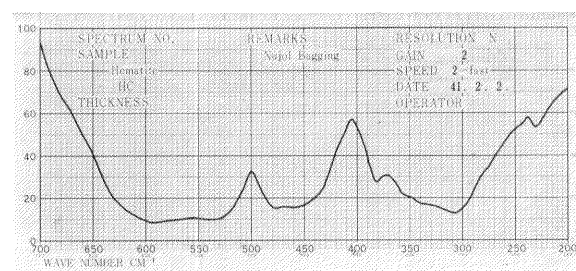
第3図-a' Gaothite の吸収スペクトル



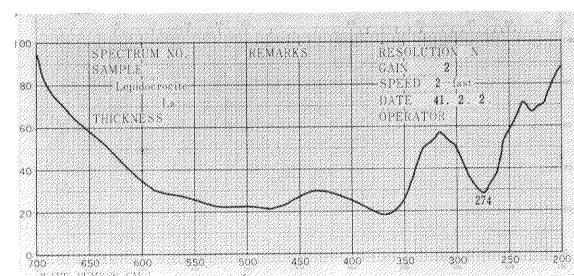
第3図-c' Lepidocrocite の吸収スペクトル



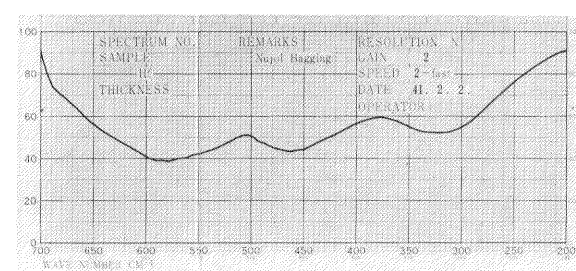
第3図-b β -FeOOH の吸収スペクトル



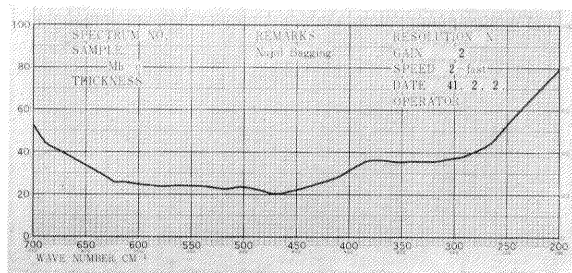
第3図-d α -Fe₂O₃ の吸収スペクトル



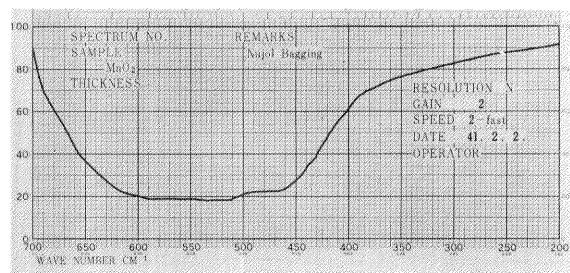
第3図-c γ -FeOOH の吸収スペクトル



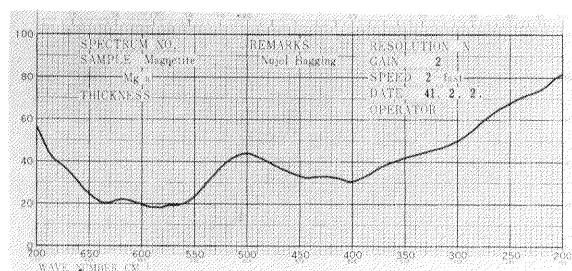
第3図-d' Hematite の吸収スペクトル



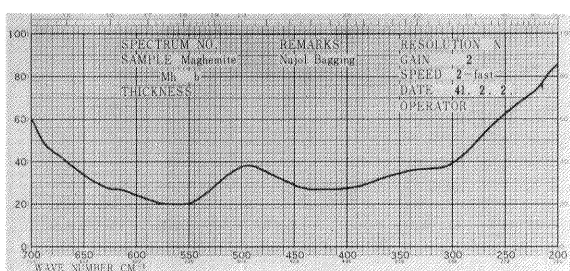
第3図-e Maghemite の吸収スペクトル



第3図-f Magnetite の吸収スペクトル



第3図-e' Maghemite の吸収スペクトル



第3図-g MnO₂ の吸収スペクトル

訂 正

本 S. I. News Vol. 9. No. 2. (April, 1966) 11 頁所載の「■日立分離用超遠心機用 RPB 17 B 形バレルロータによるマイクロゾーム酵素の精製」の記事中、執筆者、奥村 明、と、市川佳幸の写真が入れ違っております。お詫びの上謹んで訂正させていただきます。

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 9 No. 3

昭和41年5月20日印刷

昭和41年6月1日発行

非 売 品

年6回毎偶数月発行

編集人 藤 森 慶 一

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