



THE HITACHI

SCIENTIFIC INSTRUMENT
NEWS

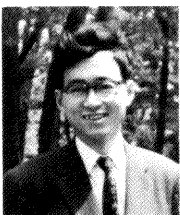
Vol. 14 No. 1

磁性体の極低温遠赤外分光

永田 一 清*

はじめに

遠赤外領域 ($25 \sim 1,000 \mu$) の分光測定は、光源のエネルギーが極めて小さいために種々の制約を受けるので、この波長域における磁性体の分光学的研究は他の波長域 (例えば、可視光、マイクロ波など) に比べてかなり遅れている。



永田 一 清

しかし、最近ライトパイプを用いて光束を絞り、それを極低温 (液体ヘリウム温度) で作動する高感度の検知器 (例えば、ボロメータ) と組合せる方法が開発されて、磁性体の分光実験に重要な、単結晶 (小さい試料) の測定、極低温測定、磁場中の分光測定などが可能になってきたために、磁性体の遠赤外分光は核磁気共鳴 (NMR)、常磁性共鳴 (ESR) などと並んで磁性研究の有力な手段と考えられるようになってきた。特に磁性体におけるスピンの交換相互作用のエネルギーは、多くの場合、この波長域に属しているため、遠赤外領域での磁気吸収の実験は当然磁性体についての有用な新しい情報をもたらすことが期待され、また実際に多くのすぐれた研究成果が報告され始めている。¹⁾

以下に、筆者が現在 FIS-21 形日立遠赤外分光光度計にライトパイプおよび Ge-ボロメータを併用して行っている極低温遠赤外分光測定について簡単に触れ、続いて反強磁性体の磁気吸収に関する研究結果を紹介する。

1 極低温遠赤外分光測定

極低温で働く高感度の検知器としては InSb などの光伝導を利用したものも使用されているが、ボロメータはゴーレイセルと同様に熱的検知器であって感度特性が平坦なので、広い波長域を 1 個の検知器でカバーしたいという要求に最も適している。ボロメータの素子は温度に対して敏感に変化する抵抗体であって、我々の場合、Ga をドープした P 形の Ge が用いられている。いずれのボロメータでも 2.1°K 以下で用いられるので、ヘリウムデューを用いなければならない。

図 1 に FIS-21 形とライトパイプ系を組合せた極低温遠赤外分光法の一例を示す。図に示されるように分光光度計から取り出された光束は、ライトパイプによって液体ヘリウムのクライオスタットに導かれ、パイプの底に取付けられた Ge ボロメータで検出される。この方法では

クライオスタットの構造は極めて簡単で、測定試料はライトパイプの途中に適当に配置することができる。しかし、ボロメータ作用を行わせるためには、パイプ内を高真空中に保って素子の余分の熱交換を防ぐことが必要であり、その結果測定試料の冷却は主としてパイプ壁との熱接触によることになるので、試料の固定には工夫を要し、また十分の注意を払わねばならない。

FIS-21 形からライトパイプで外部に光束を導き出す方法には次の 2 つが考えられる。1 つはゴーレイセルの位置から取出す場合であり、他の 1 つは図 1 に示すように出射スリットの直後から取出す方法である。ライトパイプの入射の際の f 数はゴーレイセルの位置のほうが大きい、出射スリットの直後から全光束を取出すためには 30ϕ 程度の比較的太いライトパイプを必要とし、ライトコーンで 10ϕ (クライオスタットのパイプの内径) ま

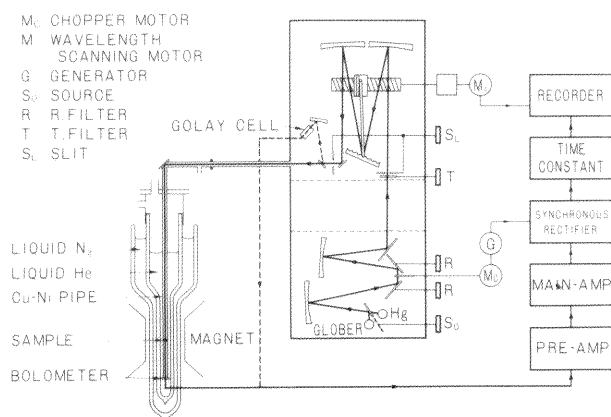


図 1 FIS-21 形日立遠赤外分光光度計とライトパイプ系

目 次

■ 磁性体の極低温遠赤外分光	永田一清	1
■ 草木染の色	柏木希介, 山田満彦	3
■ けい光光度法による生物試料中 Tryptophan の定量	平井淳子, 長谷川敬彦, 柏木力	5
■ 2 波長独立測光モードによる酵素反応機構の解析例	横田健之助	8
■ 356 形日立 2 波長自記分光光度計による光合成生物試料のスペクトルと反応の測定例	西村光雄	9

で光束を絞ったときの f 数はほぼ前者の場合と等しくなる。しかし、ライトコーンは、実際にはクライオスタットの入口近くに置くことができるので、分光光度計からクライオスタットが離れて、ライトパイプの長さが大きくなるような場合には後者のほうが有利である。

2 反強磁性体の磁気吸収

(1) K_2NiF_4 の反強磁性共鳴²⁾

交換エネルギーが直接関与する物理現象としてよく知られているものに反強磁性共鳴がある。この反強磁性共鳴の研究は従来主としてマイクロ波を用いて進められてきたが、それはネール温度の低いもの、すなわち交換エネルギーの小さな磁性体に限られていた。この反強磁性共鳴の共鳴周波数は、簡単な一軸性異方性の反強磁性体の場合、軸方向の磁場 H_0 に対して、

$$\frac{\omega}{\gamma} = \sqrt{2H_E H_A} \pm H_0 \dots \dots \dots (1)$$

$$\gamma = \frac{ge}{2mc} \dots \dots \dots (2)$$

で与えられる。³⁾ここで、 H_E 、 H_A はそれぞれ交換磁場および異方性磁場と呼ばれ、ともに磁性体の性質を決める重要な量である。多くの反強磁性体の場合、この共鳴周波数はマイクロ波よりはむしろ遠赤外領域に属する。

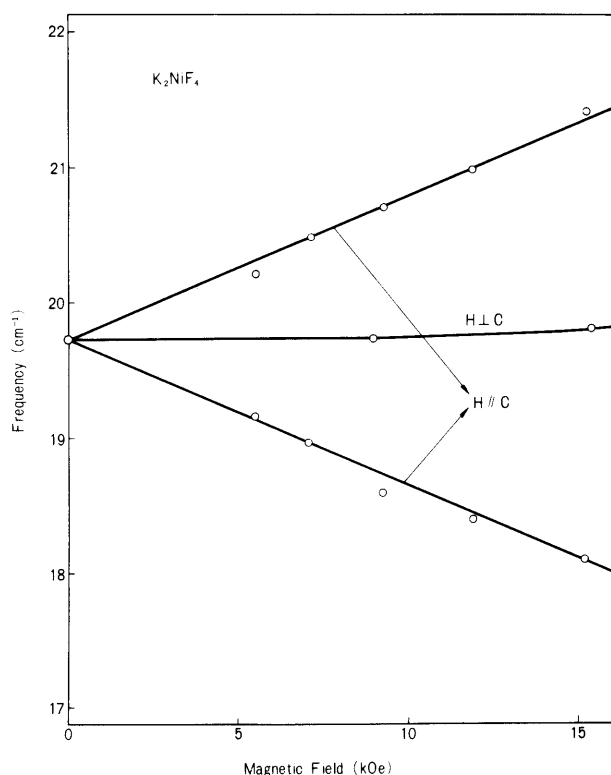


図2 K_2NiF_4 の反強磁性共鳴

図2は、最近二次元反強磁性体として注目されている、 K_2NiF_4 ($T_N=97.1^\circ K$)の単結晶について、§2で述べた方法で測定された透過スペクトルにおける反強磁性共鳴吸収のピークの位置を、磁場の大きさに対してプロットしたものである。この K_2NiF_4 の交換磁場はすでに磁化率の測定などから $H_E=3.9 \times 10^6 Oe$ と求められているので、図2の結果を(1)、(2)式を用いて解析することによって、異方性磁場ならびに g 値が、 $H_A=5670 Oe$ 、 $g_s=2.26$ と求められる。

(2) $FeCl_2$ の磁気吸収⁴⁾

図3は $FeCl_2$ ($T_N=23.5^\circ K$)単結晶の $1.5^\circ K$ における透過スペクトルを示す。これは単光束方式で測定しているので、試料を入れたときと入れないときの分光光度を別々に測って比較したものである。図には5本のピークが現れているが、これらのうちI($16.5 cm^{-1}$)とII($32.8 cm^{-1}$)の吸収ピークが磁気吸収によるものであって、結晶のC軸に平行な磁場のもとでは図4のようにそれぞれ2本にスプリットする。このIのブランチは(1)式の反強磁性共鳴に対応しているが、IIのブランチは零磁場におけるエネルギーならびに g 値(または図4における傾斜)がともに反強磁性共鳴の2倍になっており、ちょうど2個のスピンの波が同時に励起されることに対応している。⁵⁾

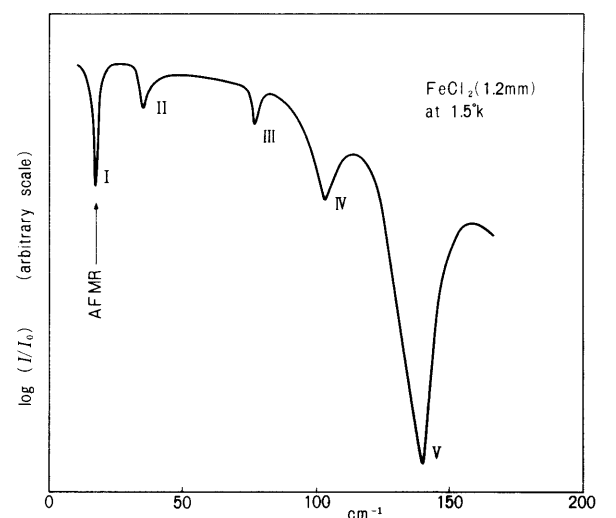


図3 $1.5^\circ K$ における $FeCl_2$ の吸収スペクトル

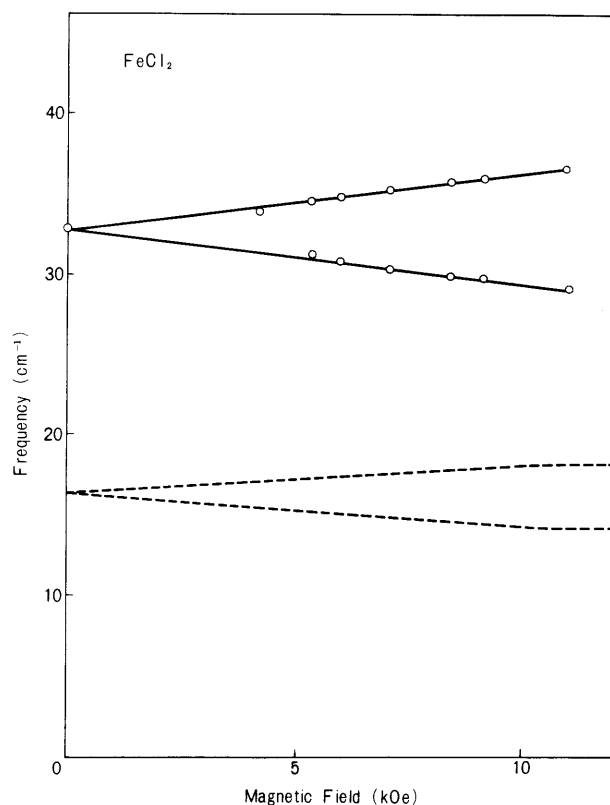


図4 $FeCl_2$ の磁気吸収の磁場変化

(3) MnCr_2O_4 の磁気吸収⁶⁾

図5は MnCr_2O_4 の粉末試料（厚さ2mmの円板状にプレスしたもの）の1.5°Kにおける透過スペクトルを示したものである。 MnCr_2O_4 は、18°K以下ではスピン配列がコーン構造と呼ばれる一種のスクリュ構造をとることが知られており、そのスピン構造に伴った交換共鳴モードのエネルギーは遠赤外領域に由来する⁷⁾。図5に見られる2本の吸収ピークはその温度に対するふるまいなどから、いずれも交換共鳴吸収と考えられる。

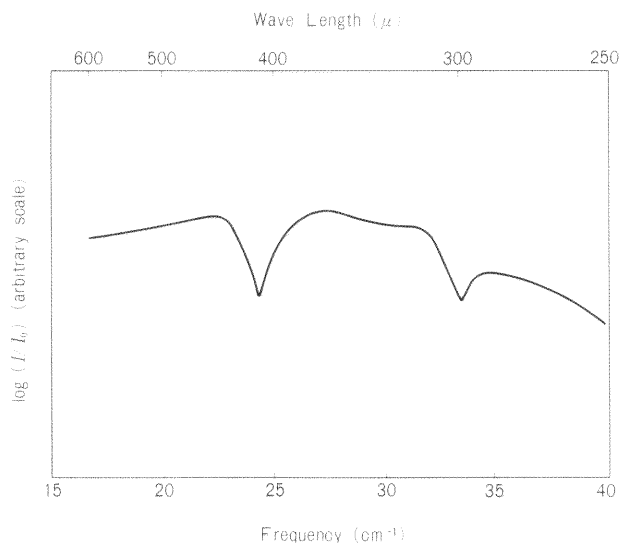


図5 1.5°Kにおける MnCr_2O_4 の吸収スペクトル

3 おわりに

最近分光測光装置が著しく普及してきており、遠赤外域における物性研究は今後ますます促進されることであろう。しかし、吸収スペクトルの測定からできるだけ多くの情報を得るためには、必ず別に何か変化し得るパラメータを加えなければならない。そのようなパラメータとして現在、エネルギー（波数）、温度、磁場の方向と強さ、偏光などが用いられているが、それだけで決して十分なわけではなく、例えば、試料に加える電場の方向と強さ、圧力の方向と強さなどを変えることによって、さらに新しい重要な情報が得られることが期待される。遠赤外域での物性研究をより一層のり多きものにするためには、そのような研究者自身のきめの細かな実験測定への努力が必要である。

参考文献

- 1) 守谷亨：日本物理学会誌 **23** (1968) 654
- 2) 永田一清，伴野雄三，梶浦正子：1970年春の分科会講演（東北学院大）
- 3) T. Nagamiya, K. Yosida, and R. Kubo: *Advances in Phys.* **4** (1955) 1
- 4) K. Nagata and Y. Tomono: *Phys. Letters* **30A** (1969) 452
- 5) Y. Tanabe, T. Moriya, and S. Sugano: *Phys. Rev. Letters* **15** (1965) 1023
- 6) K. Nagata and Y. Tomono: *J. Phys. Soc. Japan* **24** (1968) 1397
- 7) K. Siratori and K. Kohn: *J. Phys. Soc. Japan* **9** (1964) 1565

草木染の色

柏木希介* 山田満彦**

今日我々が身に着けている衣服はほとんど皆合成染料によって染められたものであるが、100年ほど前まで“自然の色”を用いて染めていたのである。その“自然の色”は主に草木の植物色素が中心であったので、我々はそれを草木染と称している。もっとも西欧などでは草木のほかコチニールなどの虫や



柏木 希介

ブルプラなどの貝の色素も用いられていたが、我国の古代からの伝統的な色は草木染である。

色については昔から豊富な文学的な表現が用いられており、我々化学者はしばしば混乱を感じる場合が多い。例えば、鶯色とは鶯の羽毛の色と相当に異なるものを指しているようである。鶯の色はうぐいす餅などの色と異なっており、もっと茶色っぽい。草木染の色の特徴は、第一にケバケバしさのない落ち着いた渋い色であることで、上村六郎先生の言をまつまでもなく我々が最も賞美するところである。

草木染の複雑な美しい色を科学的に表現しようとするにはどうしたらよいかはむずかしい問題で、完全な方法が見つからないが、現在普通に用いられているCIE法によって色の色相H、明度V、彩度Cに分けて表現するしかないかも知れない。それは染織の美しさを、無味乾燥な数字で表現することになるが、一方、実に多くのメ

リットも生み出すものでもある。

ほんの一例であるが、最も古くから使われている草木染の茜に適用してみよう。東洋茜と西洋茜は植物形態学的にも、また含有する植物色素の点からも異なるものであって、その相違は染色上にもはっきりしている。含有色素はいずれもアンスラキノン系のものであるが、西洋茜はプソイドプルプリンとアリザリンの存在によって赤色に染まり、日本茜や中国茜はそれらが存在しないために緋色つまりオレンジ系になる。今同一条件下に染色した絹布をEPR-2形日立自記分光光度計で測色した3刺激値XYZから計算したH、V、Cを示すと次のようになり、さらにこれらの染布をJISに従って、日光堅ろう性と洗濯堅ろう性を測定した結果を併記する。

表1 茜染布の色とその堅ろう性

染材	媒染	色 H V / C	日光に充分長くさらした後の色	激しい洗濯をした後の色
日本茜	カリ明ばん	1.3Y R5.8/7	2.5Y R6.2/6	4Y R6.5/5
		2.5Y R5.8/7	5Y R6.3/6.3	4Y R6.5/5
中国茜	カリ明ばん	8.2R4.7/5	9.5R5.3/5	9R5.6/5
		9.5R5.2/6	10R5.5/6.5	10R5.4/6
西洋茜	カリ明ばん	6.9R2.7/6	5R3.1/7	5R3/6
		7.5R3.2/4.5	6R3.2/8	5R3/7

* 共立女子大学 家政学部

** 日立製作所・那珂工場

前頁の表に見られるように、西洋茜だけは色相もあくまで赤であり、日光や洗濯操作にも褪色がほとんど起らない。これに対し、日本茜や中国茜はやや黄味を帯びるようになって褪色することがわかる。古代の茜染（西洋茜か同系の印度茜）が1,000年以上もの長い間、保存方法が非常に合理的なためあって、美しい色を残しているのはこのためである。

我々はこのほかにも多くの種類の草木染布について測定したが、共通の傾向として一般に草木染の色をVとCで表すと図1のようになる。

また、草木染の色が深い落ち着いた色になるのは植物色素のほかにタンニンが微妙に関係しているためで、その意味でも染色の分野でのタンニンの役割を強調したい。

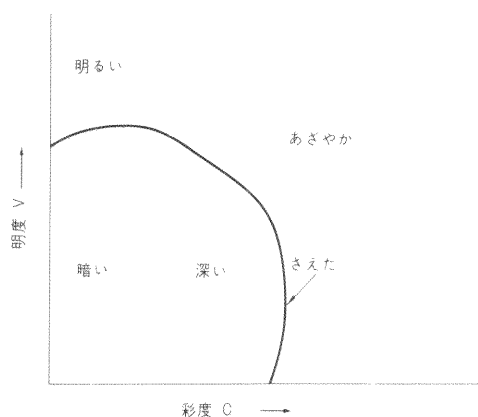


図1 草木染の色の領域

草木染の色の特徴は、その担体である繊維の絹に負うところも大きい。草木染の色の測定も、実は繊維表面の光沢がないものとして行ったものであるが、絹が独特の風合を有することは衆知のことである。絹はフィブロインという結晶性の蛋白質をセリシンという非結晶質の蛋白質が被覆してできている。フィブロインの蛋白は約65%程度であるが、これを被覆しているセリシンを去除することがいわゆる絹の精練である。昔は現代のような高温アルカリ精練のできなかったから余り精練しない絹を用いて染めていたようである。ところで絹繊維を構成するアミノ酸組成の相違から、セリシンのほうがフィブロインよりもずっと染料に染まり易いことが知られている。このため、草木染の着物は変な光沢のない落ち着いた色になるのである。このことは同時に染めむらの危険にもつながることにもなるが、良い染色は繊維の断面を見ると必ず内部まで良く染まっているのである。ここに示した写真はHSM2形日立走査電子顕微鏡で撮影した古代の染色された絹繊維である。これは飛鳥時代（6～7世紀）に中国より法隆寺に使えられた繡仏（刺繡で仏像を表現した裂地）の断片であって、法隆寺裂として名高いものである。整理の際に分断した微片の一部を山辺知行氏のご好意によって提供を受けたもので、この種の写真としては世界でも珍しいものであろう。写真から計算した直径は9μであって、今日日本や中国で使用されている絹繊維よりずっと細い。適正なカラーで示すことができれば、その美事な色に感心されるであろう。この写真に見られるように、表面のセリシンはほとんど剥離し、フィブロインの蛋白の長鎖上の配行も必ずしも明りょうでないが、顕微鏡で断面を見ても内部までよく染っており、1,300年の年月を経てなお美しい色合を見せてくれるのである。

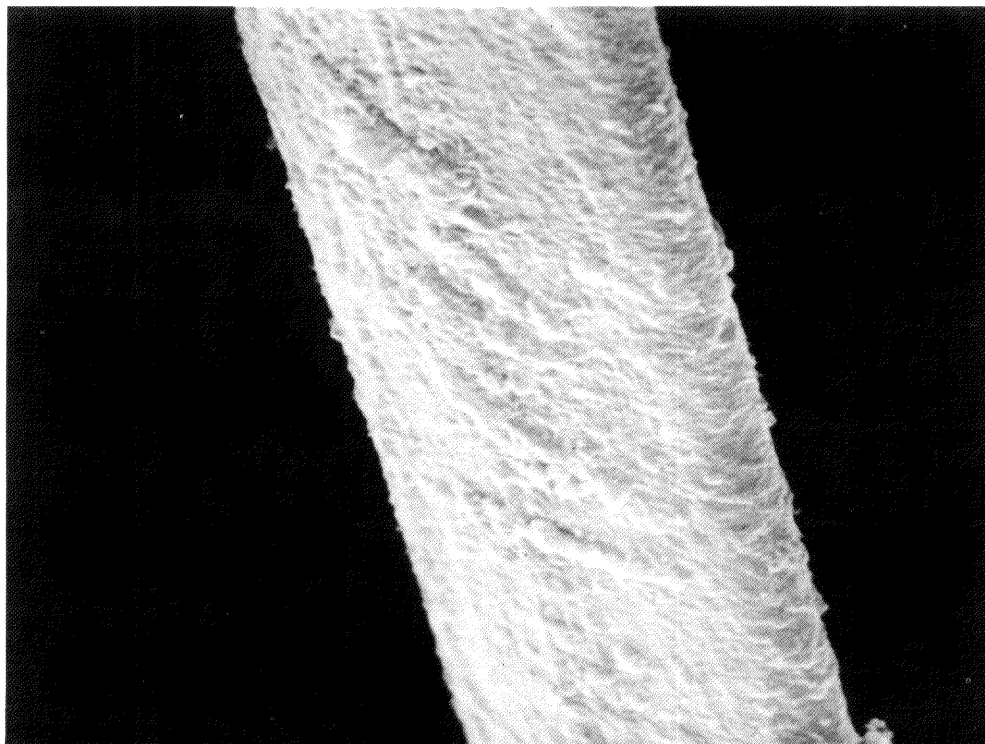


図2 古代絹糸のSEM写真 5,700倍のもの

けい光光度法による生物試料中 Tryptophan の定量

まえがき

現在, Amino 酸の個別的な特異性の高い単一な化学的な定量法は少ない。Arginin の坂口反応¹⁾²⁾³⁾⁴⁾¹¹⁾ Lysin の Nelson, 6) Kibick, 7) 迫田⁵⁾¹¹⁾ の方法, Histidine の O-phenol aldehyde⁸⁾⁹⁾¹¹⁾ phenyl alanin の nihydrin-peptide¹⁰⁾¹¹⁾ 法など, 特異性も高く, 高い感度でその amino 酸を定量する方法が報告されてきているが, 血清, 臓器 homognid など, これ等の共存物質をそのまま試料として目的の amino 酸を特異的に測定することは困難な場合が多い。

この場合, 共存 amino 酸, 還元物質などの共存干渉物を除去分離するか, または, 干渉する共存物を含まない目的の amino 酸を分割分離する step を必要とする。こうした事情がアミノ酸分析機器の開発をうながした要因のひとつと考えられる。

もうひとつの方法は, phenyl alanin の ninhydrine peptide 法¹⁰⁾である。これは Tryptamin と Formaldehyde から Fluorophore として norharman を作らせる場合と同様に, 目的とする amino 酸の化学構造と反応試薬間の構造特異性をもった Fluorophore または chromophore を作らせることであるが, それが, 共存干渉物の影響を受けないか, あるいはその除去が簡単であることが望まれている。

従来, Tryptophan の定量は, Tryptophan の indolring と強酸性下に, aldehyde またはその誘導体との間に chromophore を作らせるものが多く¹¹⁾, この場合, 臓器 homogenate 中遊離 tryptophan, 血清中遊離 tryptophan を測定するためには感度, 特異性とも充分ではなかった。

Duggan, Udenfriend¹²⁾¹³⁾ は, Tryptophan 自体のけい光を測光する方法で, 血漿中の干渉物をタングステン酸で除去し, さらにタングステン酸の消光効果を塩化バリウムで除去する方法で, 血漿中の tryptophan, tyrosin の定量を行っている。しかし, この方法は, ネズミ, トリ肝-homogenate については, 盲けい光や干渉物質の除去が充分にできないので, 血清以外の試料では困難である。

こうした点からは, 上述のように N-acyl-tryptofhan と trifluoro-acetic acid から 1-methyl-3-carboxyl-3,4, dihydro-B-carbolise を Flrorophor とする N-acyl tryptophan に特異的な定量法や¹⁴⁾ Hess, Udenfriend によって報告されている Tryptamine と formaldehyde を縮合 H₂O₂ で酸化して norhaman を Florophor として測定する方法は, norhaman を formaldehyde から作り得る相手の化学構造上から tryptamine と tryptophan 以外には可能性がないが, 生成した norharman が共存物質による干渉を受けず, また盲けい光の補正が容易に行えるならば, 測定法としての特異性は高いものと考えられる。事実 Udenfriend も tryptamine の定量の報告において, tryptophan の定量の可能性を指摘しているが酸化剤として H₂O₂ を用いた場合は, 測光感度も低くバラツキが多かった。

そこで酸化剤をいくつか変えて試みたが, 塩酸酸性,

*名古屋大学環境医学研究所

平井 淳子* 長谷川敬彦* 柏木 力*

塩化鉄溶液を用いることにより, tryptofhan の定量において, 現在のところバラツキが少なく, 感度よく測定できる結果を得たので, 血清・肝-homogenate 中の遊離 tryptophan の定量を行っている。¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾

なお, 上記とほとんど同様な方法が Denckla¹⁸⁾によっても報告されている。

1 実験結果

(1) 実験方法: L-tryptophan を 5 n mol から 25 n mol 含む水溶液 0.1 ml に, 2.5×10^{-4} M の FeCl₃ を含む 10^{-4} M-HCl を (FeCl₃-HCl 試薬) 3.5 ml に, 75% T.C.A. 0.5 ml, 更に 2% の formaldehyde 0.5 ml をクランプ付き共せん肉厚試験管に加え, 99℃ 以上を保つようにして 60 分間煮沸し, 流水中で冷却後全量が 5.5 ml になるように 10% T.C.A. で補正する。装置は 204 形日立分光けい光光度計を使用した。

(2) 鉄濃度とけい光強度: 鉄はしばしばけい光体に対する quenching 効果をもつので, 酸化剤として含まれる Fe⁺⁺ の至適濃度について検討した結果を図 1 に示す。高濃度の鉄は quenching をおこす。Norhaman 自身においても同じ傾向の quenching 効果が見られているので, tryptophan から norhaman への過程に対しての影響ではなく, norharman のけい光に対しての quenching と考えられる。

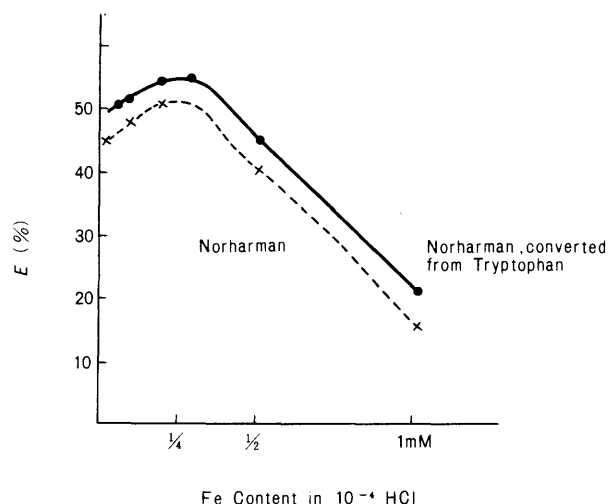


図 1 Tryptophan 反応液および Norharman における Fe の Quenching 効果

(3) Incubation の時間とけい光強度: 10 n mol を含む 1-tryptophan 0.1 ml とニワトリ肝の 0.14 M KCl homogenate (1 = 7 w/N) について実験を行った。肝 homogenate 0.1 ml を 2.5×10^{-3} M FeCl₃ を含む FeCl₃-HCl 試薬 3.6 ml を加えた後, 75% T.C.A. 0.5 ml を加えて 21,000 G で 30 分遠心後, 上澄全容をクランプ付き共せん肉厚試験管に移し, 2% formaldehyde 溶液 0.5 ml を加え 98℃ 以上に保ち, 10' 15' 30' 60' 90' 120' の各時間で incubate した後, 流水中でそれぞれ冷却し, 容量を 10% T.C.A. で 5 ml とし後, 励起波長 365 mμ けい光波長 435 mμ で測定した結果を図 2 に示す。ほぼ 60 分後には, けい光強度としては, 標準液の tryptophan においても,

homogenateにおいても,plateauに達している。tryptophanからnorharmanへの交換率については調べていない。

ただ煮沸中に反応液量が大きく減少する場合は、得られるけい光強度は低下しており、回収率、再現性が非常に悪くなる。

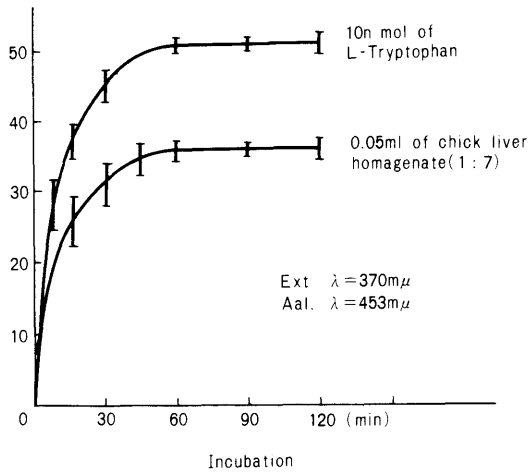


図2 10nmol Tryptophan および0.01ml ヒナ肝homogenateにおける加温時間とけい光強度

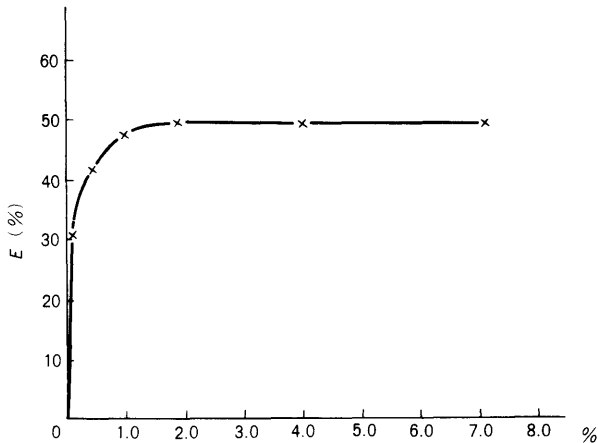


図3 Formaldehydeの量とけい光強度との関係

(4) Formaldehydeの濃度とけい光強度：Formaldehydeの濃度を変化させたときのけい光強度の変化を図3に示す。Tryptophanはformaldehydeが存在しない場合は、この励起波長とけい光波長ではけい光を呈さない。Formaldehydeの増加とともにけい光強度は増加し25nmol L-tryptophanの存在下では、1.0%のformaldehydeを加えた点からplateauになり、8.0%のformaldehyde量までの観察ではquenchingは見られない。Formaldehydeの存在量はtryptophanの存在量によっては反応のlimiting factorになり得るので、quenchingも認められない点から2.0% formaldehydeを使用することにした。

(5) Tryptophanのformamide処理によって得られたfluorophoreとnorharmanの励起ならびにけい光スペクトル

前述の方法でTryptophanをformaldehydeで処理して得られたfluorophoreとnorharmanの励起ならびにけい光スペクトルは、図4および図5のようによく一致している。また、各pH、塩酸酸性、水酸化ナトリウム、アルカリ性における励起、けい光スペクトルならびに肝-homogenateをformamide処理して得られたfluorophoreの薄層クロマトグラフのRf値もよく一致するところから、得

られたfluorophoreはnorharmanと同定としてよいものと考えられる。

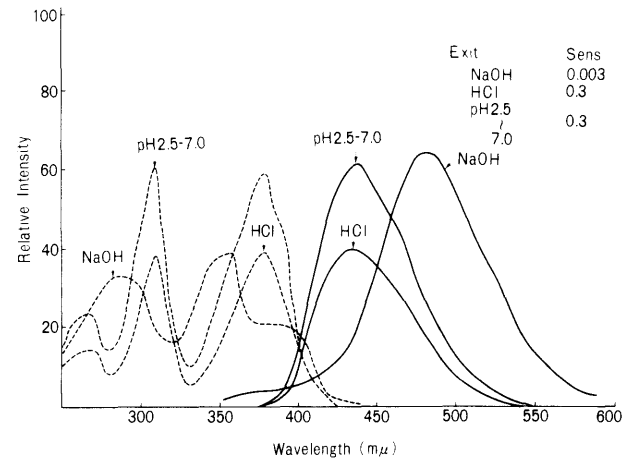


図4 Excitation and Fluorescence Spectra of Norharman

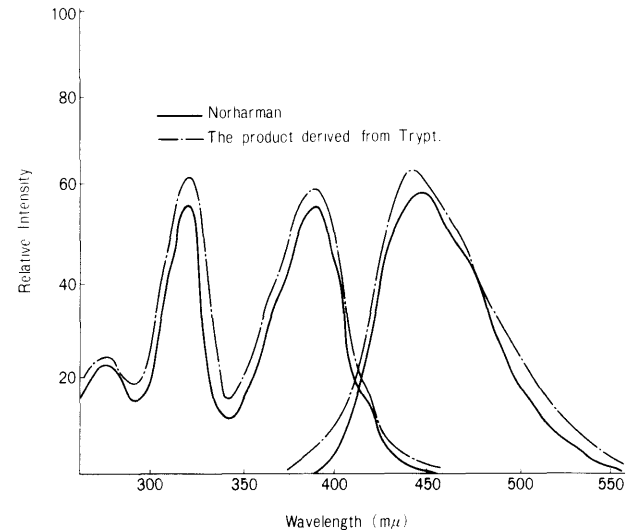


図5 Excitation and Fluorescence Spectra of Norharman, the product derived from Tryptophan

(6) Casein加水分解におけるけい光：Tryptophan以外の共存するamino酸がこの方法でけい光を出すかを検討するために、tryptophanのbioassay用のTryptophan fueのcasein酸加水分解物にtryptophanを加えた場合、formaldehydeの存在する場合しない場合についてのけい光について検討した。表1に示すようにcasein加水分解物はformaldehydeの存在の有無にかかわらず、ほぼ同じけい光を呈する。一方tryptophanを加えた試料にformaldehydeを抜いた場合は、casein酸加水分解物の示すけい光強度と同じ値を示している。したがって、formaldehydeを入れた際のけい光を測定することはtryptophanの定量に関して特異性をもつことになるし、またformaldehydeを抜いた試料は盲けい光として測定することが可能である。図6にL-tryptophan水溶液によるけい光強度の検量線とcasaminoにtryptophanをそれぞれに加えた場合の検量線を示してある。

表1 カゼイン加水分解にL-Tryptophanを添加した試料でFormaldehyde試薬を加えたときと加えないときのけい光強度

1-Tryptophan (nano mol.)	Casein hydrolysate (mg)	Form- aldehyde (ml)	Fluorescence (E %)
—	10	0.4	10.5±0.85(6)
25	—	—	51.2±0.08(6)
—	10	0.4	61.5±0.09(6)
25	—	—	1.0±0.04(6)
—	10	—	9.8±0.55(6)
25	10	—	9.8±0.85(6)

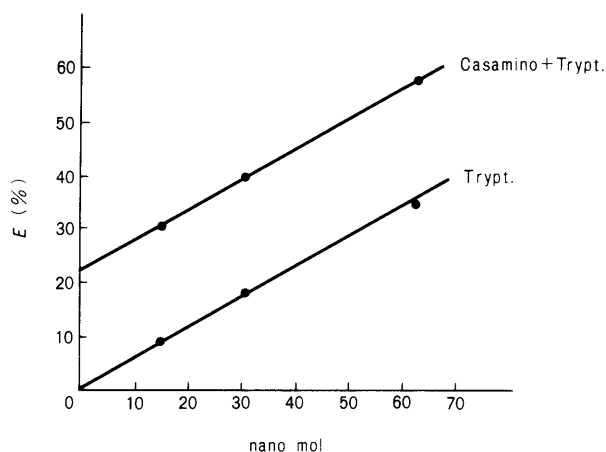


図6 Tryptophanの検量線とCasamino加水分解物に種々の濃度のTryptophanを添加した場合の検量線

2. 考 察

この方法の利点のひとつは、感度が高いという点にある。

肝組織液、血清中の遊離tryptophan量は8~15 μ g/mlの濃度といわれており、tryptophanに特異性のあるしかも分子吸光係数の高いchromophoreが見出されていない現在、測定の感度という点からは、けい光法による定量法が選ばれて来る。しかし、測定する物質のけい光スペクトルのpeakが400~500m μ の場合は、生物試料、特に組織液、尿などについては、共存する未知の物質に由来する。また、formaldehyde共存下に現れる盲けい光については、tryptophanaseで処理formaldehydeとの反応を行わせて知ることができる。対象群、L-tryptophan投与群のニワトリ肝—homogenate、ニワトリ血清においては、tryptophanaseによる処理後、formaldehydeと反応して測定の波長域に出現する盲けい光は1%以下であり、したがってformaldehydeとの反応後にnorharmanのけい光スペクトルをもたらし物質は、ほとんどtryptophanに由来するものと考えることができる点、測定の特異性は高いものと思われる。Hess, Udenfriendがこの方法をtryptamineの定量に用いたように、norharmanはtryptamineからもformaldehydeとの縮合によって生成し得る。

しかし、組織液内のtryptamineの量はtryptophanの存在量の1/100以下であるので、由来するけい光はtryptophanによるものがほとんどと考えてよい。また、5 nmol tryptophanに対して、10倍量のanthranil酸、3-hydroxyanthranil酸、5-hydroxyanthranil酸、Ky-

nurenin, Kynuren酸, Xanthuren酸の存在は、測定に影響する盲けい光としては認められなかった。また共存するamino酸については、図6に示すようにcasamino溶液を試料とした場合の標準添加法を行った結果から、この程度の共存amino酸の影響はないものと考えられる。

本法でのもうひとつの利点は、しばしばquencherとなるトリクロロ醋酸が除蛋白剤に用いることができる点および前処理としての除蛋白操作が簡易にできる点あげることができる。

本法での測定時のバラツキの原因は、ほとんどの総合反応を行わせる際の煮沸中、せんの漏れによることであつた。この点は、クランプ付き共せん試験管あるいは耐圧screw cap付き試験管を用いることによって解決することができる。

参考文献

- 1) Sakaguchi, S. : J. Biochem., 37, 231 (1950)
- 2) Szilôgyi, I. and Szabó I. : Nature, 180, 52 (1958)
- 3) 渡辺 剛 : 千葉医学会誌, 34, 86 (1958)
- 4) 石井信一 : 日 化, 81, 1586 (1960)
- 5) 迫田直一, 岡田吉美, 古都裕子 : 日 化, 76, 1146 (1955)
- 6) Nelson, J. A., Mcfarland, W. D., and Boulet, M. : Federation Proc., 5, 148 (1946)
- 7) Kibrick, A. C. : Anal. Biochem., 20, 22 (1949)
- 8) Shore, A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. Jr. : J. pharmacol. Exper. Therap, 127, 182 (1959)
- 9) Pisano, J. J., Wilson, J. D., Cohen, L., Abraham, D. and Udenfriend, S. : J. Biol Chem., 236, 499 (1961)
- 10) Tominaga N. : Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 851 (1962)
- 11) 奥山典生 : タンパク質化学, (赤堀 金子 成田編), 共立出版 S. 44
- 12) Udenfriend S. : "Fluorescence Assay in Biology and Medicine" Academic Press, New York, 1962
- 13) Duggan D. E., Udenfriend, S. : J. Biol. Chem. 223, 313 (1956)
- 14) Uphous, R. A., Grossweiner, L. I., Katz, J. : Science, 129, 641 (1959)
- 15) 長谷川敬彦, 名取靖郎, 平井淳子, 大森純子, 緒方正名, Tavev, H : 生化学, 39, 513 (1967)
- 16) 平井淳子, 長谷川敬彦, 柏木力 : 環研年報 (名古屋大学)
- 17) 平井淳子 : 分析化学討論会抄録, 大阪(1969) 243 (1968)
- 18) Denkla, W. D., Deweg, K. H. : J. Lab & clin. Med. 160 (1967)

2 波長独立測光モードによる酵素反応機構の解析例

横田健之助*

ペルオキシダーゼはNADHの分子状酸素による酸化反応を触媒するが、2波長独立測光モードを用いることにより、この反応の微細なメカニズムの解析が初めて可能となった。

図1は λ_1 を309m μ に固定し基質であるNADHの減少を測り、 λ_2 を418m μ に固定して酵素の状態変化を観測した場合の反応曲線である。この反応は結局は反応液中の酸素を消費して終るのであるが、NADHの酸化過程に特徴があり、特に反応が終りに近づく直前に著しく加速される点が通常の酵素反応と大に異なる。したがって、同時に記録した418m μ での吸収変化がどのような酵素の状態変化に対応しているのかを的確につかむことが、反応機構解析のための重要なポイントとなる。

ペルオキシダーゼには5つの異なった酸化還元状態が知られているが、図1の反応ではこのうち主に3種(F-elbic, Compound III, Compound II)が関係しているとみられる。

そこで反応の各時点までの混合比は酵素の総量が一定であるから、相異なる2つの波長で酵素の状態変化を測定し三元一次の連立方程式の解として一義的に求められる。例えば、10 μ Mの酵素を用いて λ_1 を418m μ 、 λ_2 を580m μ に選び、その吸光度を A_{418} 、 A_{580} とすると、次式が成り立つ。

$$\begin{aligned} [\text{Fe}^{3+}] + [\text{II}] + [\text{III}] &= E_t = 10\mu\text{M} \\ 0.053 [\text{Fe}^{3+}] + 0.08 [\text{II}] + 0.13 [\text{III}] &= A_{580} \\ 0.56 [\text{Fe}^{3+}] + 1.1 [\text{II}] + 1.1 [\text{III}] &= A_{418} \end{aligned}$$

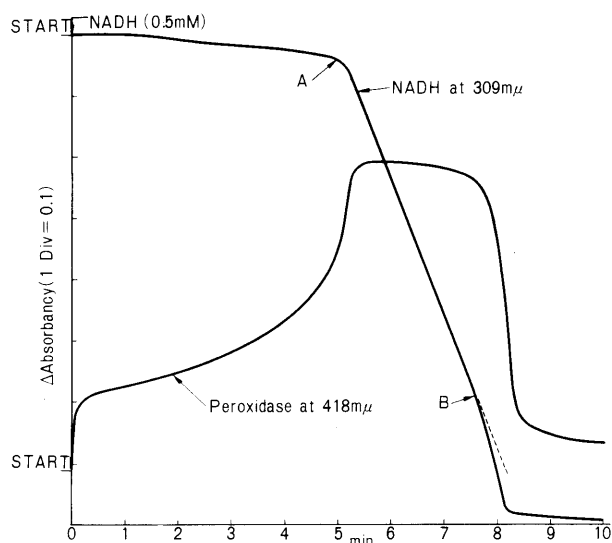


図1 ペルオキシダーゼの触媒するNADHの酸化反応

pH 5.6, 25°Cで125 μ Mの酵素を含むペルオキシダーゼ(8 μ M)の液にNADHを加えたときに見られる酵素と基質の吸収変化(A, B点で段階的加速が起っている)。

図1の反応を $\lambda_1=418\text{m}\mu$ 、 $\lambda_2=580\text{m}\mu$ として観測すると図2の結果が得られ、これから反応の各時点での酵素の状態を上式により計算することができる。しかし、実用上は図3のプロットのほうが有用である。すなわち、

XY記録計を用いてX軸に λ_1 のシグナル、Y軸に λ_2 のシグナルを入れると、その軌跡は酵素が可能な3つの状態のいずれか1つのみの状態にあるときの吸収位置を頂点とする三角形の中に収まるはずである。図2, 3を比較することにより、反応の各時点での酵素の存在比を求めることができる。図3の例では、反応終末直前で酸素が消失した頃、酵素のもう1つの状態(還元型)が現れ、そのため軌跡は三角形の外にはみだしてしまうものと考えている。

ここに述べた解析法を用いて、これまで不明とされてきたこの反応の問題点のいくつかが解明できた。

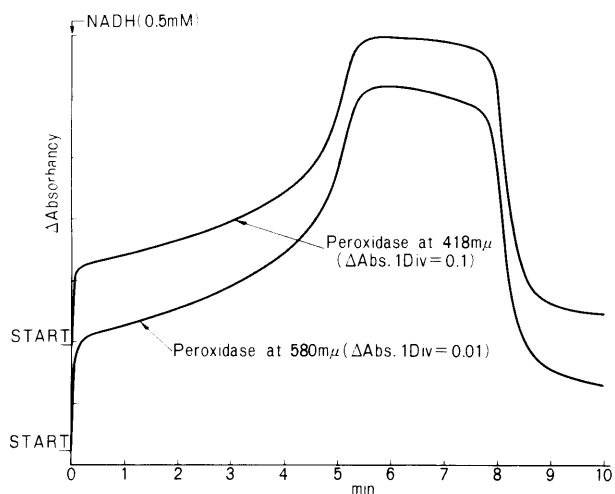


図2 図1の反応における酵素の状態の時間変化を2つの波長で観測

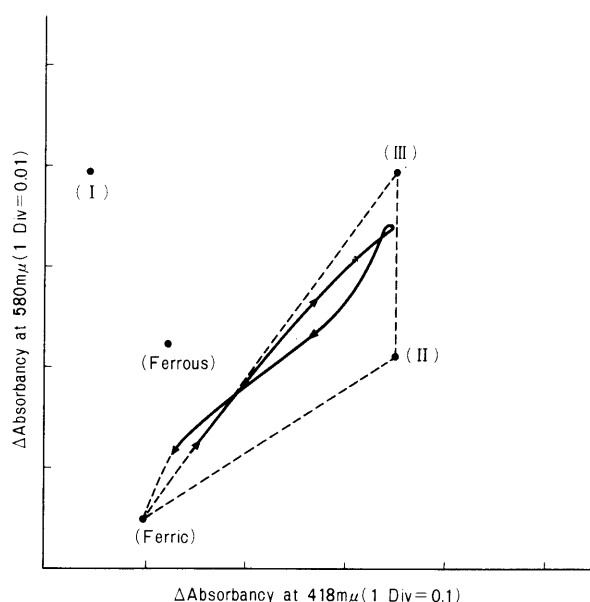


図3 図2のデータのXY記録計によるプロット

*北海道大学応用電気研究所

356形日立2波長自記分光光度計による 光合成生物試料のスペクトルと反応の測定例

西村 光雄*

まえがき

通常の分光光度計は1波長1光束または1波長2光束による測定のために設計されているが、356形日立2波長自記分光光度計では2波長または1波長の2光束による測定ができ、従来の分光光度計によってカバーできる領域のほかに、つぎのような測定法が可能であり、その使用範囲が広いことが特長である。

- (1) 1試料2波長測定によって反応による微小な吸光度変化を安定に精度よく測定することができる。
- (2) 1試料2波長または2試料2波長測定の特別な場合として2現象を独立に分光的に測定することができる。
- (3) 1試料2波長(2つの波長の差は数nm以内)測光で微分スペクトル(derivativespectrum)を測ることができる。
- (4) 高い吸光度をもつ試料、半透明試料、ほとんど不透明の試料のスペクトル、または差スペクトル(difference spectrum)を容易に測定できる。
- (5) 低温スペクトルを容易に測定できる。
- (6) 光照射による光化学反応を容易に分光的に追跡できる。

光を強く散乱し、半透明のことも多い生物試料の分光的測定についての一般的問題は柴田氏^{1) 2)}がよくまとめておられるので省略することとし、ここでは筆者が356形2波長自記分光光度計によって光合成生物のスペクトルを常温や低温で測った例や、微分スペクトル、光や酸素などによって起された反応の測定例を若干紹介することにする。

1 室温および低温での光合成生物の吸収スペクトルの測定

我々は各種の光合成生物の懸濁液について室温および低温でのスペクトルを356形2波長自記分光光度計でSplit-beam mode(1波長2光束)で測定した。試料の冷却には通常液体窒素、ドライアイス-エタノールなどを使用した。ここでしばしば問題になるのは吸光度が極度に高い試料の場合に、試料側を通過した光束は対照側のそれに比べて著しく光量が減少し、測定2光束のバランスをとるためには対照側のattenuatorを大きく絞らなければならないことである。この点は理想的な光学系では問題がないが、低温セルホルダを使ったときなどのように光を散乱させる可能性のある界面を増加させたときには、2試料に当てられる単色光の強度の比をあまり大きくする(対照側のattenuatorを極端に絞って)のはよくない。この場合には、対照サンプルの上に補助attenuatorを置き、対照側に入ってくる光束にかかるattenuatorの(本体の)絞り込みを減らすのが誤差を小さくする。吸光度が2より大きい場合など本機の性能を十分に発揮させるためには散乱光についての考慮を払わなければならない。

実際の手順として

- ①空気-空気
- ②補助attenuator-空気

③溶媒-溶媒

④試料-(溶媒+補助attenuator)

の順で測り、

④-③ + (②-①)

としてスペクトルを描いている。補助attenuatorとしては透明試料と光を散乱する試料に共通して使えるのはneutral density filterであるが、光を大きく散乱する試料の場合にはParafilm Mなどが低温でも使えて好都合である。また試料の吸光度・光散乱度が大きいときには通常のろ紙でも使える。いずれにしても試料に応じてneutral density filterの吸光度やParafilmなどの枚数を加減する。これらの補助のattenuatorの減光度は波長の関数であり、ことに赤外域や紫外域で大きく変化するので注意を要する。これと分光光度計本体についている連続attenuatorと非連続attenuatorとの組合せによる平行移動、また試料側のsignal multiplicationつまみの使用によって、かなり吸光度の大きい試料でも吸収スペクトルを測ることができる。

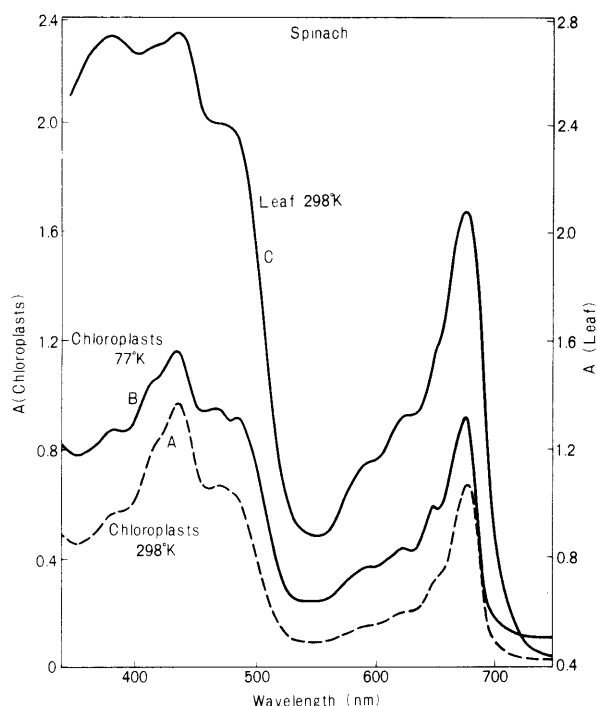


図1 ホウレンソウの葉および葉緑体の吸収スペクトル

- A: 葉緑体, クロロフィルa+b 10.7 $\mu\text{g/ml}$, 光路長10mm, 温度298°K
 B: 葉緑体, クロロフィルa+b 10.7 $\mu\text{g/ml}$, 光路長3mm, 温度77°K
 C: 葉片(1層), 温度298°K (90516-4)

例をあげると、図1にはホウレンソウの葉をそのまま室温でスペクトルをとったものおよびホウレンソウから分離した葉緑体の室温および低温(77°K)でスペクトルをとったものを示す。

また、光合成細菌 *Chromatium*, *Rhodospirillum rubrum* (野生株および青緑色変異株), *Rhodopseudomonas spheroides* の生細胞およびクロマトフォアについて室温および低温(77°K)でとった吸収スペクトルを図2～図5に示す。

これらのスペクトルに共通していえることは、低温スペクトルにおいて吸収帯の尖鋭化とスペクトル構造がよりはっきり見えることで、これはまた低温でのけい光の発光スペクトルとの比較でもいえる。この尖鋭化には、低温にしたことによる真のスペクトルの尖鋭化と、試料の氷結による光散乱による光路長の長さが増すことによる吸光度の見かけ上の増加などの因子が重なって現れている。

いくつかの藻類(藍藻の *Anacystis nidulans*, *Anabaena valianbilis*, 珪藻(*Navicula*, 小石川strain1)についても、室温における吸収スペクトルと低温(77°K)でのスペクトルとを藻細胞の色素抽出液と比較したもの例を図6～図8に示しておく。

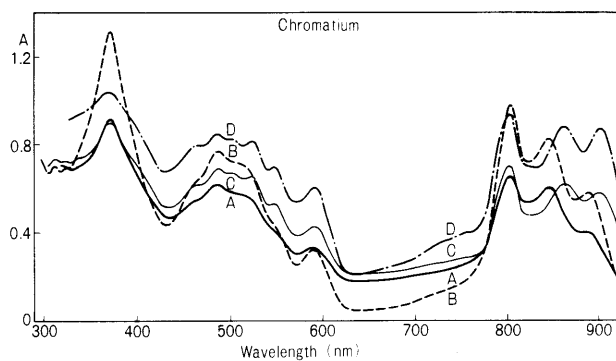


図2 光合成細菌 *Chromatium* strain Dの細胞とクロマトフォアの吸収スペクトル

- A: 細胞, バクテリオクロロフィル 3.22 μ M, 光路長10mm, 温度296°K
 B: クロマトフォア, バクテリオクロロフィル13.55 μ M, 光路長10mm, 温度296°K
 C: 細胞, バクテリオクロロフィル 4.83 μ M, 光路長 3mm, 温度 77°K
 D: クロマトフォア, バクテリオクロロフィル25.54 μ M, 光路長 3mm, 温度 77°K (90429-2.1)

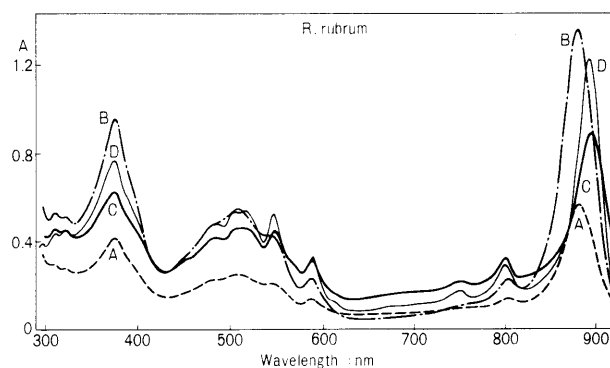


図3 光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* の細胞およびクロマトフォアの吸収スペクトル

- A: 細胞, バクテリオクロロフィル 3.86 μ M, 光路長10mm, 温度296°K
 B: クロマトフォア, バクテリオクロロフィル6.44 μ M, 光路長10mm, 温度296°K
 C: 細胞, バクテリオクロロフィル 11.59 μ M, 光路長 1mm, 温度 77°K
 D: クロマトフォア, バクテリオクロロフィル6.44 μ M, 光路長 3mm, 温度 77°K (90506-1.1)

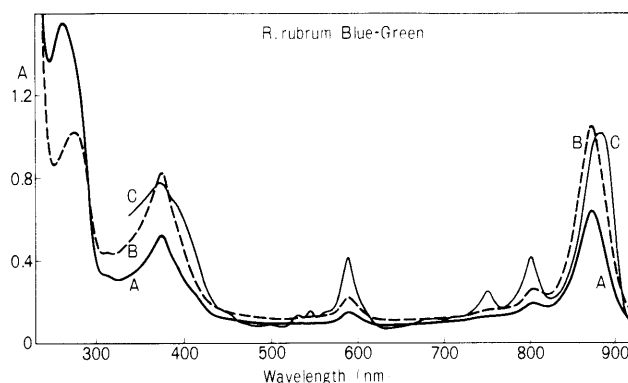


図4 光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* の青緑色変異株の細胞およびクロマトフォアの吸収スペクトル

- A: 細胞の吸収スペクトル, バクテリオクロロフィル1.18 μ M, 光路長10mm, 温度296°K
 B: クロマトフォアの吸収スペクトル, バクテリオクロロフィル4.79 μ M, 光路長10mm, 温度296°K
 C: クロマトフォアの低温スペクトル, バクテリオクロロフィル59.9 μ M, 光路長1mm, 温度77°K (90429-2.1)

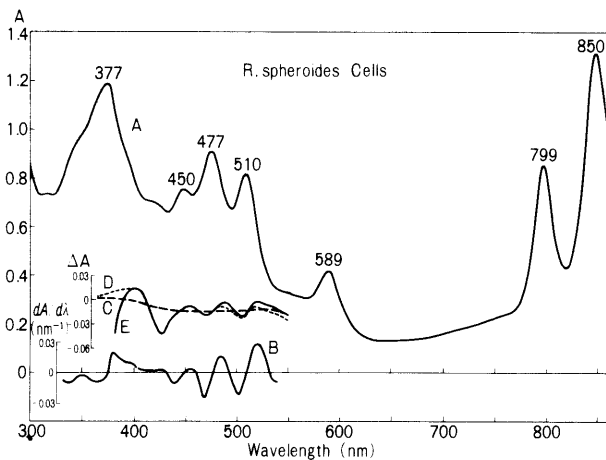


図5 光合成細菌 *Rhodospseudomonas spheroides* の細胞の吸収スペクトル、差スペクトルと微分スペクトル

- A : 細胞懸濁液の吸収スペクトル, バクテリオクロフィル $3.60 \mu\text{M}$, 光路長 10mm ,
 B : 微分スペクトル, バクテリオクロフィル $3.60 \mu\text{M}$, 光路長 10mm .
 C, D, E : 差スペクトル, バクテリオクロフィル $5.96 \mu\text{M}$, 光路長 10mm
 C : aerobic-aerobic (基線)
 D : aerobic-anaerobic
 E : aerobic-dithionite 添加
 温度 23°C , Split-beam mode (90425-2)

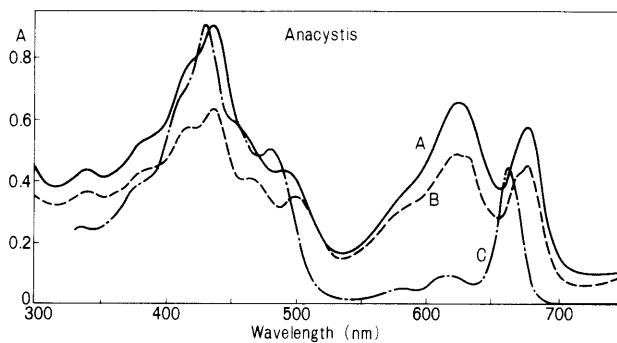


図6 藍藻 *Anacystis nidulans* の細胞と抽出液の吸収スペクトル

- A : 細胞, クロロフィル a $4.9 \mu\text{g}/\text{ml}$, 光路長 10mm , 温度 297°K
 B : 細胞, クロロフィル a $4.9 \mu\text{g}/\text{ml}$, 光路長 3mm , 温度 77°K
 C : 細胞の80%アセトン抽出液, クロロフィル a $5.38 \mu\text{g}/\text{ml}$, 光路長 10mm , 温度 297°K (90609-2.1)

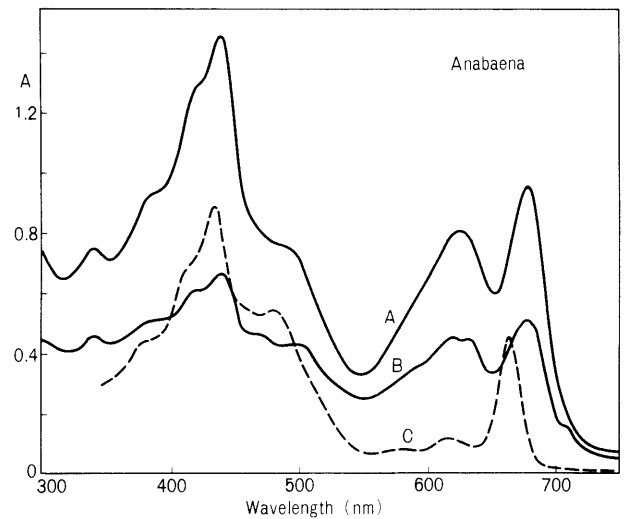


図7 藍藻 *Anabaena variabilis* の藻体と抽出液の吸収スペクトル

- A : 藻体, 光路長 0.5mm , 温度 298°K
 B : 藻体 (Aの1/5の濃度), 光路長 1mm , 温度 77°K
 C : 藻体の80%アセトン抽出液 (Aの1/30の濃度に相当), 光路長 10mm , 温度 297°K (90617-1.1)

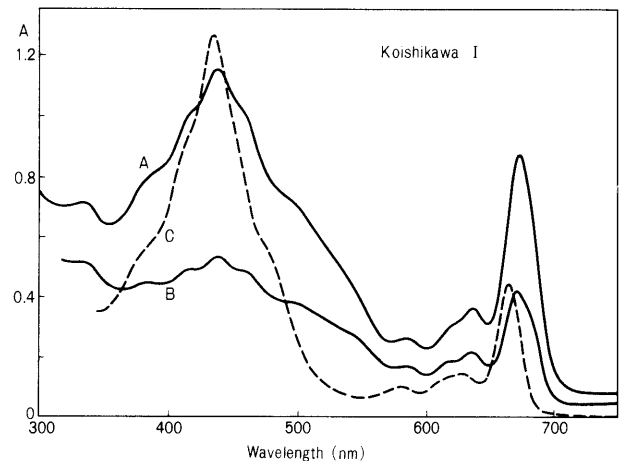


図8 珪藻 (小石川 strain 1) の細胞と抽出液の吸収スペクトル

- A : 細胞, 光路長 0.5mm , 温度 298°K
 B : 細胞 (濃度はAの1/5), 光路長 1mm , 温度 77°K
 C : 細胞の80%アセトン抽出液 (濃度はAの1/31.6に相当), 光路長 10mm , 温度 297°K (90617-1.2)

2 酸化還元などの差スペクトルの測定

生体試料の特定の成分の変化を追いかけるあるいは定性・定量を行うために、2試料を分光光度計内におき、そのうちの1試料中の特定成分を反応させ、2試料の吸収スペクトルの差をとることが行われている(差スペクトル **difference spectrum**)。図5のカーブC、D、Eはその例を示したもので、酸化、還元による光合成細菌 *Rhodopseudomonas spheroides* のヘム蛋白とカロチノイドの吸収スペクトルの変化を示している。

反応の進行によって、または、基質・阻害剤などの添加によって、生物試料の光散乱の度合が変化すること多いが、このような場合には、通常の差スペクトル(1波長、2光束、2試料)によるよりも後述の2波長法(2波長、2光束、1試料)によるほうが誤差を小さくすることができる。この例として出した図9は光合成細菌 *Rhodopseudomonas Spheroides* の緑色変異株の細胞の吸光度変化をいくつかのPhaseに分けて表わしたものである(図10も参照)。

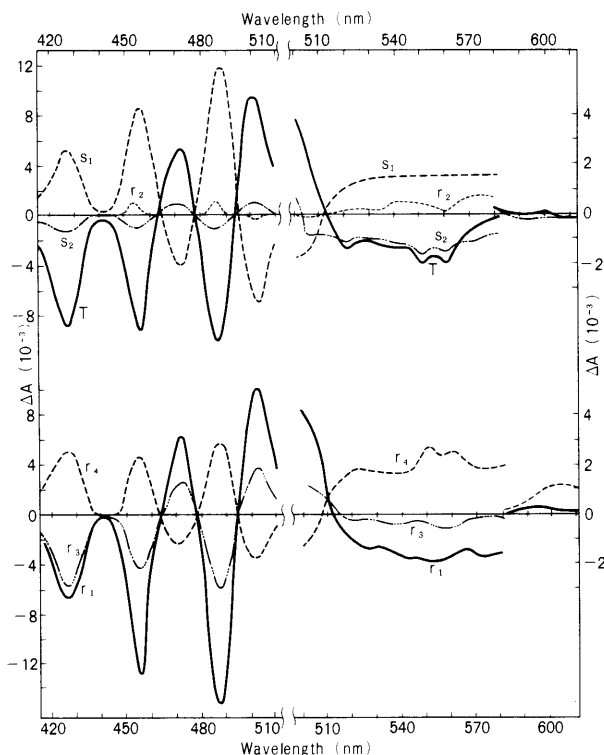


図9 光照射-暗黒の差スペクトル(光合成細菌 *Rhodopseudomonas spheroides* の緑色変異株)を反応のphaseに分けてとったもの。

細胞懸濁液7.63 μ M、バクテリオクロフィル、50mM リン酸緩衝液 pH 7.08、光路長5mm、温度26 $^{\circ}$ 、dual wavelength mode。対照波長は測定域416-580nmでは445nm、580-615nmでは570nm、励起光は720nmより長波長の近赤外光(90801-4)

3 微分スペクトル

吸光度の波長に対する第一次微分 $dA/d\lambda$ を波長に対して測定したものを微分スペクトル (derivative spectrum) と呼ぶ。この微分スペクトルをとることは、
(1) 重なりあった吸収帯の解析

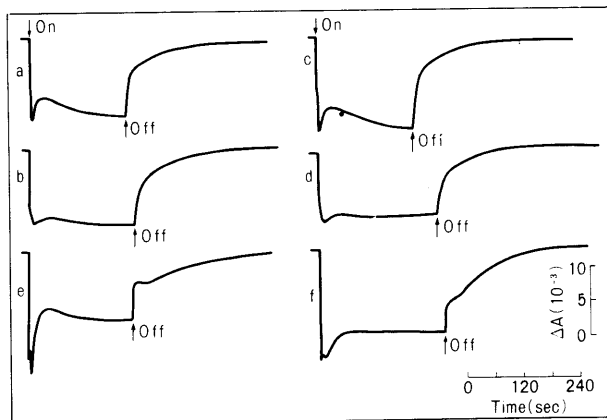


図10 光照射による光合成細菌 *Rhodopseudomonas spheroides* 緑色変異株細胞の吸光度変化。

バクテリオクロフィル12.49 μ M、50mM リン酸緩衝液 pH 7.08、光路長5mm、温度26 $^{\circ}$ C、dual wavelength mode

a, b, 425-445nm ; c, d, 428-445 nm ; e, f, 487-445 nm ; b, d, f は11.1 μ M の2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide を添加してある。光照射(720nmより長い近赤外光)の初まりと終りは図上“on”と“off”で示してある(90801-12)。

(2) 大きな吸収帯の肩の部分に弱い吸収帯が重なって現れるときの吸収帯の解析

などに有効である。筆者らは356形2波長自記分光光度計において、 $\lambda_1 - \lambda_2$ を+2, +1, 0, -1, -2nm などとおき(slit 巾0.5nm)、微分スペクトルのカーブ群をとって判定を楽にしている。このカーブ群は $\lambda_1 - \lambda_2 = 0$ nm 付近で上下対称になるはずである。幅の広い吸収帯の微分をとるには、 $\Delta\lambda$ と slit 幅はもっと大きくてもよい。図5のカーブBは光合成細菌 *Rhodopseudomonas spheroides* の生細胞の微分スペクトルをとったものである。

4 光照射による反応の測定

光合成のように光のエネルギーによって反応が進められている場合には、反応用の励起光を照らしながら分光測定を行いたいことが多い。このようなときに励起光が光の検出器(光電子増倍管)に入らないよう励起光と測定光の波長の組合せを選ぶ必要がある。そのため励起光はモノクロマトールか干渉フィルタ、色ガラスフィルタ、ゼラチンフィルタなどを通し、また試料と光電子増倍管の間には適当な保護フィルタを置かなければならない。図9~図10には光合成細菌 *Rhodopseudomonas spheroides* の緑色変異株の細胞のヘム蛋白とカロチノイドの光照射による吸光度の変化を掲げている。このカロチノイドの吸収変化は複雑な現象で、光合成系のエネルギー転換の状態に応じて変化する。図9は光照射-暗黒の差スペクトルをtime course のphaseに分けて表示したものであり、図10は測定波長のpairの代表的なものについてtime courseのボタンを示したものである。

また、光合成細菌 *Chromatium* のチトクロムcの光による酸化、光照射後の還元をオシロスコープ上で記録したものを図11に示す。このような測定のためには356形2波長自記分光光度計本体側面の4Vジャックから出力を取り出すことができる。

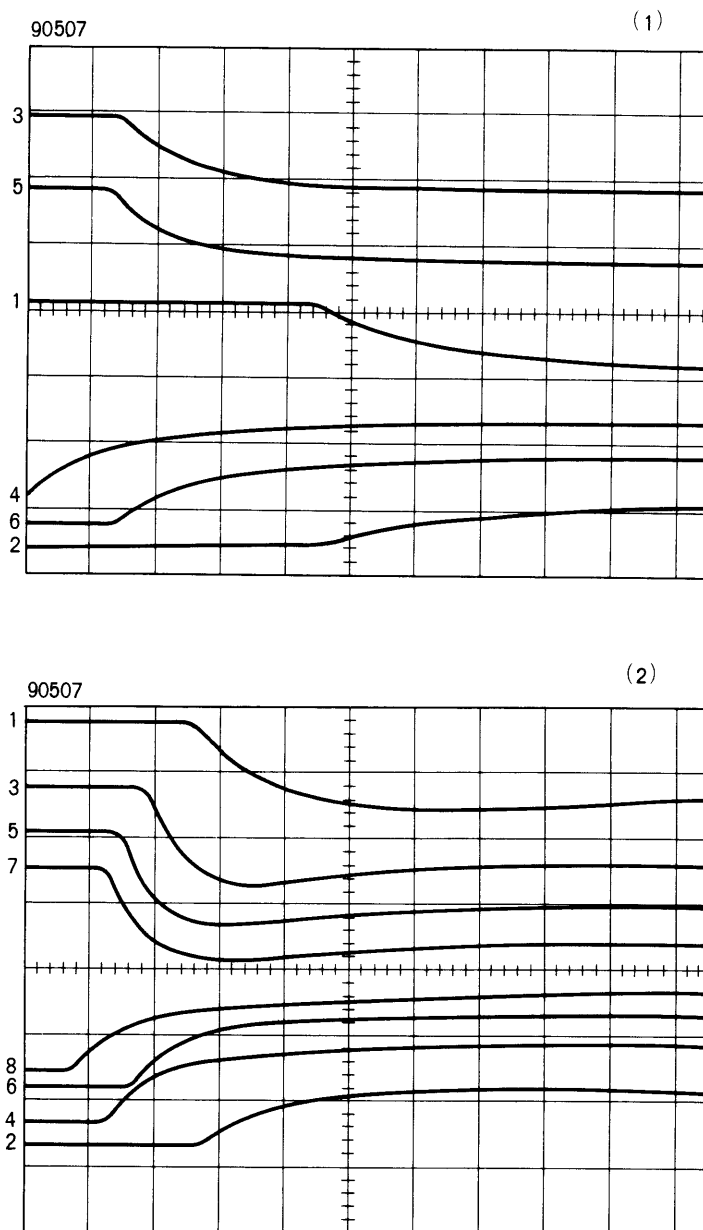


図11 光合成細菌 *Chromatium* strain D の細胞の光照射によるチトクロムCの酸化。

(1)はaerobic細胞，基質なし，縦軸8目盛が $\Delta A 0.1$ に相当。

(2)はanaerobic細胞， $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 添加，縦軸8目盛が $\Delta A 0.03$ に相当。

曲線の下向きの変化は光照射によるチトクロムcの酸化に対応し，上向きの変化は光照射終了によるチトクロムcの還元に対応する。横軸は1目盛 200msec から 1 sec まで種々変えてある。Dual wavelength mode, 445—422nm, 光路長10mm, 温度298°K, 励起光は $>720\text{nm}$ の近赤外光 (90507-2)

5 高速混合法との組合せによる測定

2種あるいはそれ以上の反応分子を別々の液中に溶かしておき，その溶液の高速混合によって反応の機構を調べる方法（高速混合法—rapid mixing methodあるいはフロー法—rapid flow method）が生体反応にも有効に使われている。これには種々の変法があるが，ここでは，2つの反応液を別個の容器に入れておき，これを混合室に導いて混合させ，定速で液を流している状態で分光的に測る“Continuous flow”の方法と，もっと長い反応時間にわたって混合後のスペクトル変化を測る“stopped flow”の方法の実例を図12に示した。これは光合成細菌 *Rhodospseudomonas spheroides* の野生株と緑色変異種

のカロチノイドとヘム蛋白の分子状酸素との反応を高速混合法で研究した例である。図のうちBはstart—stop間のtraceは定速混合状態でのカロチノイドの定常状態を示し，その他は O_2 を短時間高速混合で与えた（ O_2 パルス）後のカロチノイド（A, F），またはヘム蛋白（C, D, E）の反応を表している。

これらの実験に際して技術的援助をされた日立製作所の本川忠氏，また試料の作製と測定に協力された角田靖子，畚野礼子，世良桂子，Sandra Goldberg, Sarah Jenkins, Gerriet Loschen の諸氏に感謝いたします。

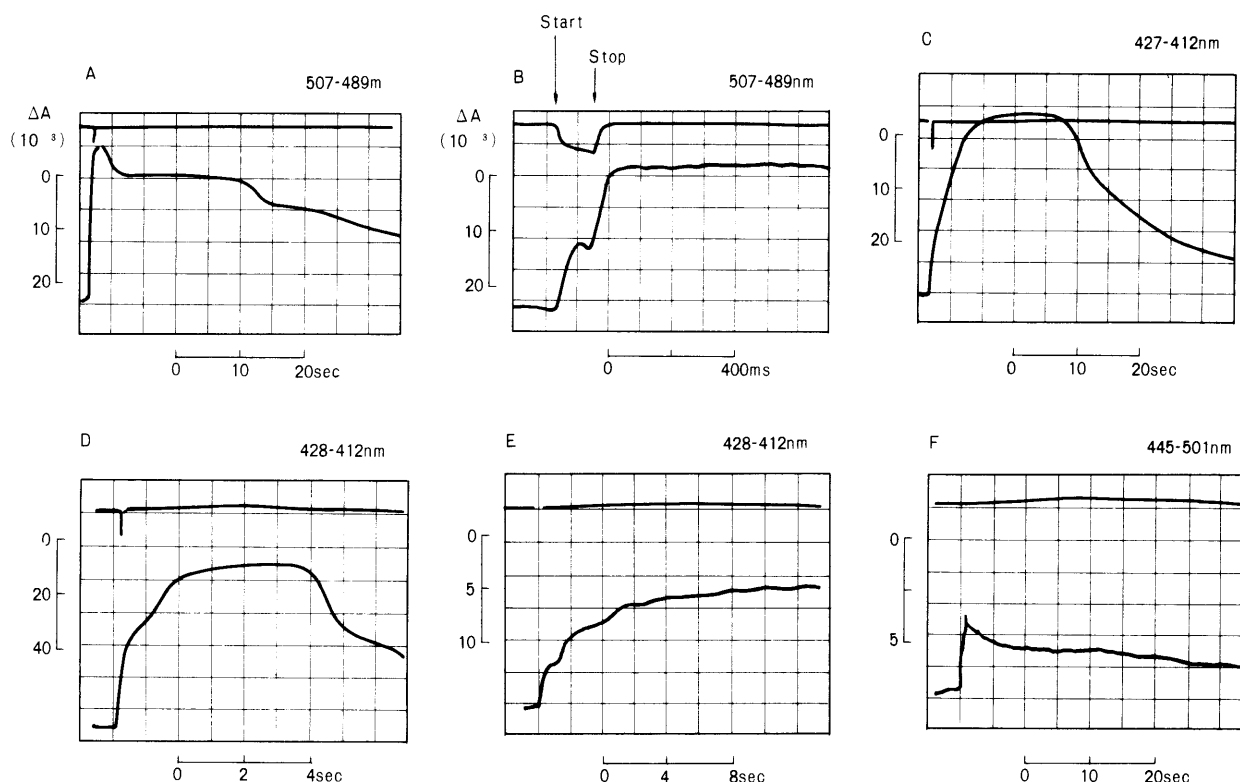


図12 高速混合法による光合成細菌 *Rhodospseudomonas* のカロチノイド、ヘム蛋白と酸素との反応の測定

A, B, C: 野生株, 光照射下で半嫌氣的に生育した細胞
 D: 野生株, 暗黒中で好氣的に生育した細胞
 E, F: 緑色変異株, 光照射下で半嫌氣的に生育した細胞
 上方トレースの下への突出は無酸素状態の細胞懸濁液と酸素を含む液との混合時を示す。またBのstartとstopの間は

定速での混合状態に対応し、その後のトレースは混合終了後の経過を示している。C, D, Eはヘム蛋白の、A, B, Fはカロチノイドの O_2 導入による変化を測っている。

Dual wavelength mode, ペンシルバニア大学 Johnson Foundation製フロー装置と356形 2波長自記分光光度計との組合せにより測定 (90731-1.15)

参考文献

- 1) Shibata, K.: J. Biochem. (Tokyo) 45:599(1958)
- 3) Shibata, K.: in Methods of Biochemical Analysis, ed. by D. Glick, vol. 7, p. 77, Interscience, New York (1959).

お詫び

本誌Vol.13. No.3. 13頁 丸野重雄氏と藤井未男氏の顔写真が入れ違っておりましたので、ここに訂正お詫び申し上げます。

尚、その他No 3, No. 4 に下記の様な誤がありましたのでお手持の本誌に訂正追加下さる様お願い申し上げます。

正誤表

Vol13, No. 3		誤	正
P13左側	実験方法 5行目	LiF	KAP
" "	" 6行目	対いた	用いた
" "	実験結果と考察4行目	C	Hydro carbon
" 右側	下から 17行目	$5_{1,000}\text{\AA} \sim 9_{1,000}\text{\AA}$	$5_{10,000}\text{\AA} \sim 9_{10,000}\text{\AA}$
" "	下から 10~11行目	約 $1_{1,000}\text{\AA}$	約 $3_{1,000}\text{\AA}$

Vol 13, No. 4		誤	正
P 2 右側	下から 5 行目	0.033, Å	0.003, Å
" "	下から 2 行目	0.0016 Å	0.016 Å

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 14 No.1

昭和46年 1 月20日印刷

昭和46年2月1日発行

非売品

編集人 石川直成

発行人 白川義雄

発行所 株式会社日立製作所

印刷所 日立印刷株式会社

Printed in Japan NH-F(H)