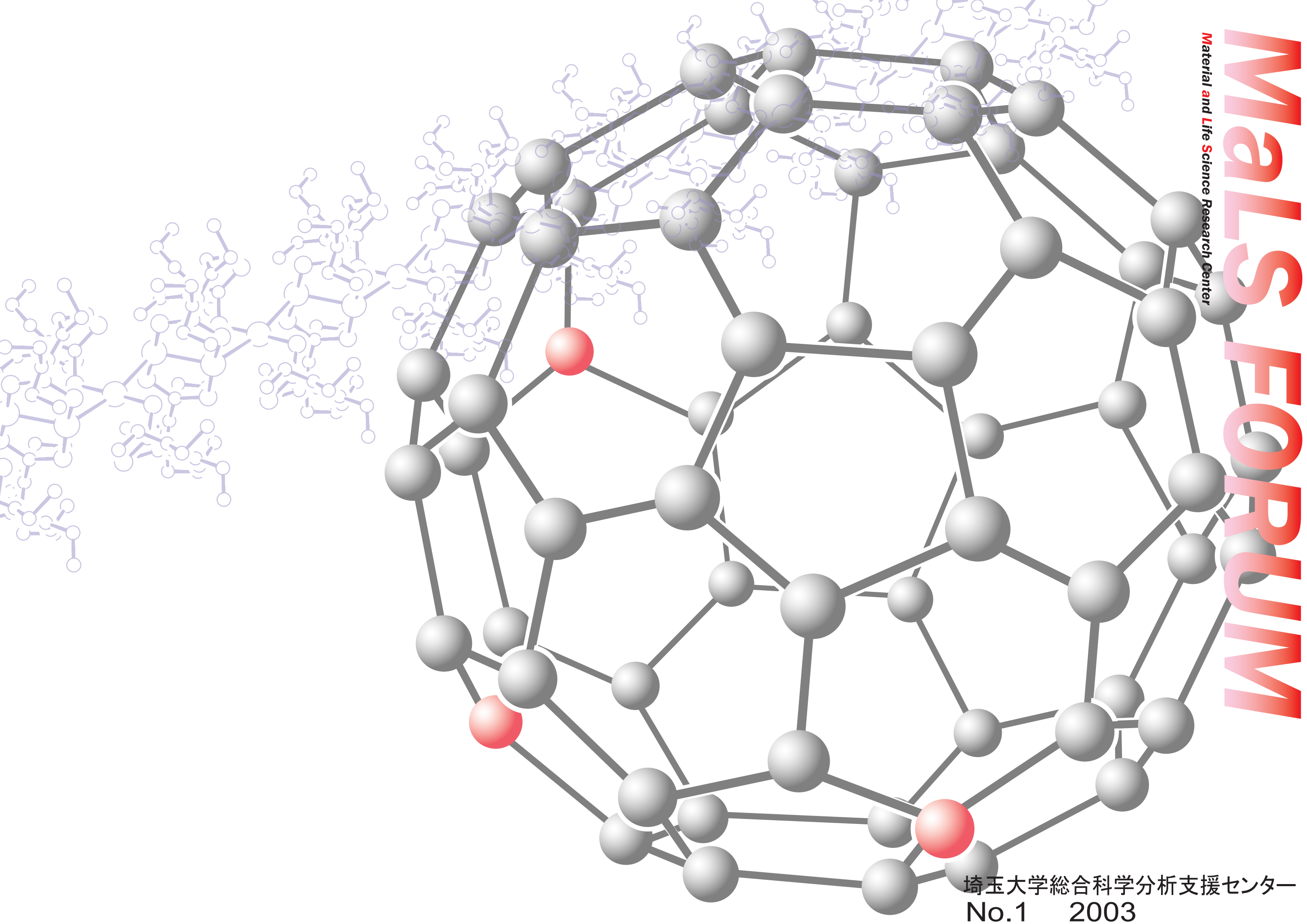


MALS FORUM

Material and Life Science Research Center



目 次

《巻 頭 言》

巻頭言	総合科学分析支援センター長 佐藤 勝	1
-----	--------------------	---

《開所式記念式典》

学長挨拶	学長 兵藤 釗	3
祝辞	文部科学省研究振興局学術機関課長 吉川 晃	4

《開所式記念講演》

環境浄化植物の構築をめざして	筑波大学遺伝子実験センター センター長 藤村達人	5
----------------	--------------------------	---

《マイレビュー》

光合成初期反応 ― 光化学系Iなど	理学部分子生物学科 檜山哲夫	10
-------------------	----------------	----

《ミニノート》

水生食虫植物ムジナモの消化・吸収と微細構造	理学部生体制御学科 金子康子	25
-----------------------	----------------	----

《Summer School》

新しい高圧力の科学	理学部物理学科 毛利信男	28
マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOFMS)の開発とその歴史について	島津製作所(株) 渡邊俊宏	34
バイオ電子顕微鏡 ―透過電子顕微鏡とその応用―	日立サイエンスシステムズ(株) 中澤英子	51

《新機種紹介》

液体クロマトグラフ質量分析装置	総合科学分析支援センター 設楽浩明	59
Bruker DRX400紹介	理学部基礎化学科 藤原隆司	62

《センターより》

平成14年度活動状況報告	64
運営委員会委員名簿	67
低温物質使用の心得	70
編集後記	71

《 巻 頭 言 》

巻 頭 言

総合科学分析支援センター長 佐藤 勝

本年4月に「総合科学分析支援センター」が設立され、7月に開所式が挙行されて順調に推移することができましたことに対して、学長はじめ関係教職員皆様方のご尽力に心より感謝申し上げます。

「総合科学分析支援センター」の設立については、一昨年の平成13年の秋に埼玉大学が当番校となって大宮ソニックシティで開催された「第5回国立大学機器・分析センター会議」の席上で、来賓で出席された文部科学省の研究振興局学術機関課の小山晴巳課長補佐が、今後の科学行政において研究支援体制の充実が如何に重要であるかについて述べられたことに端を発しています。当時分析センター長の任にあった吉岡教授が、埼玉大学においても研究支援体制の充実が急務と判断され、学長に働きかけ「総合科学分析支援センター」の設立を目指したワーキンググループが設置されました。その委員会で具体案が検討され、昨平成14年4月に平成15年度の分析センターの概算要求として、分析センターを核に既存の学内共同利用施設「アイソトープ共同利用施設」と「動物飼育室」とを統合し、生命科学の教育・研究をも支援できる「総合科学分析支援センター」の新設が申請されました。幸いにも、大学本部および文部科学省のご理解を得て、本年度めでたく「総合科学分析支援センター」が発足する運びとなりました。皆様と共に「総合科学分析支援センター」の新設を心から喜びたいと思います。

「総合科学分析支援センター」は「生命科学分析分野」と「機器分析分野」の2部門より構成され、教官5名、技官3名の体制となっています。「生命科学分析分野」は、放射性同位元素を利用する実験や遺伝子を使用する実験を中心にした教育・研究を支援することを目的にし、学内に対してはこれらの実験についての知識普及や実験技術の向上を図ると共に、学外に対しても組み換えDNA技術やバイオインフォマティクスに関する啓蒙活動も行う予定です。「機器分析分野」は、高性能な大型分析機器を集中管理して分子の構造や物質の性質・構造等の分析を行い、新物質の創生や新機能の発見など学内外における今日の科学技術の発展に寄与することを目的にしています。

このように、「総合科学分析支援センター」は自然科学関連分野の教育・研究支援体制を総合的・有機的に結びつけて、より効果的な相互連携体制を構築することによって埼玉大学の教育・研究の一層の発展を図るものです。本センターの設置により、これまで手薄であった生命科学分野の学際的・複合的な研究支援体制が可能になると共に、化学実験・物理実験・生命化学実験において大型機器等の一元管理による効率的な利用や、より綿密な教育訓練、より一層の安全性の確保などが可能になります。加えて、機器分析を統合することにより、学部・学科を越えた研究グループが密接な関係を保ちながら研究支援や共同研究を行うことが可能になることから、学際的・総合的な研究がよりスムーズに推進できることになり、今後の埼玉大学の研究ポテンシャルを高め、新たな研究の萌芽を促す効果を果たすものと考えられます。

また、地域のニーズに答えるための新たな研究の推進にもつながるものです。特に、埼玉県と埼玉大学が中心となって進められる地域結集型産学共同研究事業(通称「埼玉バイオ」)が本年1月から発足しましたので、埼玉大学がこの事業を全面的に支援して本格的な研究実験を担当していく上で、将来総合科学分析支援センターの生命科学分野の果たす役割は極めて重要になって行くものと考えられます。

「総合科学分析支援センター」の目指すものは、上で述べましたようにハイレベルで多岐にわたっています。一方で現状を省みると、多くの問題を抱える「機器分析分野」と独自の建屋を持たない「生命科学

分析分野」とが問題解決のために悪戦苦闘しております。「生命科学分析分野」が新たな事業を展開するためには独自の建屋の建設が急務であり、「機器分析分野」のスムーズな運営も今後の課題として残されています。これらの諸問題の解決には、ひとえに学内教職員のご支援・ご協力が欠かせません。「総合科学分析支援センター」を強力な学内の研究支援センターとして育て発展させていくために、今後とも分析センターのときと同様変わらぬご支援・ご協力をよろしくお願い致します。

《開所式記念式典》

学長挨拶

埼玉大学長 兵藤 釗

本日、ここに埼玉大学総合科学分析支援センターの開所記念式典を催すにあたり、一言ご挨拶を申し上げます。

埼玉大学には、ご案内のようにこれまで機器分析による研究支援施設である分析センターがあり、多方面の研究分野を支えて参りました。しかし時代の要請もあり分析センターを土台にしてこれに生命科学分野の研究を支援できる部門を加えて、埼玉大学における科学研究を総合的に支援するためのセンターの設立が望まれていたところでございます。そこで、平成 13 年度にその設立のためのワーキンググループを立ち上げまして、平成 15 年度の概算要求とすることとしておりましたところ、幸いにも認められ、埼玉大学総合科学分析支援センターの発足に至ることができました。関係各位のご協力、ご理解の賜物としてこの日をむかえられたことを心から喜びたいと思います。後ほど、センター長からこの支援センターの概要については、詳しいご説明があろうかと思いますが、簡単に述べますと、前身の分析センターは、多数の大型分析機器を備え、使用者の便宜をはかるために機器予約システムを稼働させ、効率よく分析機器を利用できる学内共同利用施設として実績をあげてきたところでございます。先ほど申しましたように、この分野に加えて、アイソトープ実験施設を含んだ生命科学分析分野が、放射性同位体に関する実験や、組換え DNA に関する実験等の生命科学の研究を支援するため新たに付け加わり、これまでにない境界領域分野の研究をも支援できる体制が整ったところでございます。

埼玉大学は、近年地域社会への貢献を一つの重要な課題として、社会に開かれた大学作りを進めておるところでございます。幸い本年度から文部科学省および、科学技術振興事業団が行いますところの地域結集型共同研究事業の一つとして埼玉バイオが採択をされたところでございます。この埼玉バイオの創立、研究拠点の構築ということを今後は課題にしておりますが、この研究プロジェクトの推進にとっても、分析支援センターが大いに役立つことと思います。新たに設立されました総合科学分析支援センターをしっかりと育てていくためには、新建屋の建設、新しい分析装置の導入、あるいは、新しい実験施設の立ち上げなど課題は山積みでございますが、新センターの発展のために今後とも関係各位のご理解とご支援をいただきたいと切に願う次第でございます。簡単でございますが、これをもってご挨拶に代えさせていただきます。

どうもありがとうございました。

＊この学長挨拶は、開所式にて述べられたものから文字にしたもので、言い回し等は編集委員会にて編集してあります。

《開所式記念式典》

祝辞

文部科学省研究振興局学術機関課長 吉川 晃

埼玉大学「総合科学分析支援センター」の開所記念式典が挙行されるに当たり、一言お祝いの言葉を申し上げます。

第二期の科学技術基本計画において、研究支援の充実や知的基盤の整備等の重要性が指摘され、これを契機として関係各方面で具体的な取り組みの検討が活発化して来ているところです。

こうした動きは、大学においては研究環境の整備のあり方を改めて問うものでありますが、これまで後回しになりがちであった研究支援の充実等を最優先に行うという方針転換は、なかなか受け入れられにくい面があることも事実であります。

そのような状況の中埼玉大学におかれては、いち早く学内のコンセンサスを得て整備計画を具体化し適時適切に対応されたことが、本センターの設置要求を実現に導いたといえるでしょう。

本センターは、広範囲の研究分野に対応していくことでこれからの埼玉大学の発展基盤を支える重要な役割を担い、また、地域結集型共同研究事業として採択された埼玉バイオプロジェクトへの参加を通じて、医療や環境といった分野で地域に貢献していくことが大いに期待されております。

終わりに、設立に至りますまでの兵藤学長をはじめ関係の皆様方の御努力に対し深く敬意を表しますとともに、本日御臨席の皆様方に本センターへの御支援・御協力をお願い申し上げまして、お祝いの言葉と致します。

平成十五年七月二十二日

環境浄化植物の構築をめざして

筑波大学遺伝子実験センター センター長 藤村 達人

抜粋

私は筑波大学遺伝子実験センターのセンター長に先秋就任しました。今回埼玉大学総合科学分析支援センターができて、そのなかに遺伝子実験施設が含まれるということで今日は筑波大学における我々の活動について少しご説明したいと思います。

私はしばらく企業におりまして、実際に消費者が使ってくれるような遺伝子組み換えイネを作っていました。したがって私自身遺伝子組み換え技術は有用な技術だと思っています。しかし遺伝子組換え作物に対する反対意見は相当に強いものがあります。その意見を、サイエンティフィックというよりも政治的に利用する人もずいぶんいらっしゃるようで、反対運動も多方面からそして多様に行われています。そういった反対運動に対して科学者は粘り強く対応しなければなりませんし、そして開発する側としても正しい認識を持ちながらやっていかなければならないと考えます。そういった意味でも我々筑波大学遺伝子実験センターそして埼玉大学の新しいセンターもこれからがんばっていく必要があります。

私は組織として農林工学系に属しており、それまでの経歴からしますと私自身の専攻分野にしては少し収まりの悪いところにおります。しかしこれが私の研究にとっては面白いことになりました。私は長いこと食べられる植物を材料にしておりましたが、農林工学という分野にはトラクターを扱っている人や土木をやっている人たちがいらっちゃって、この人たちがいろいろ話をしているうちに環境がいかに重要かということを感じるようになったわけです。そこで遺伝子・植物を中心のキーワードとし、もう一つのキーワードを環境に定めて研究を行うことにしました。環境に関しては二つ仕込みをしております。一つは悪環境に耐える植物たとえば耐塩性ですとか耐乾燥性の植物をつくるという試みです。もうひとつは汚くなった環境をきれいにするのに植物を利用してどういうことができるかを考えました。

植物を利用した環境浄化には表 1 に示したいくつかのアプローチが考えられます。このうち我々が最初に考えたのは土壌中の重金属の浄化です。実は大きく報道されてはいませんが、今土壌のカドミウムが大きな問題になっています。もともと日本の土壌は世界レベルからみるとカドミウムが多く含まれています。それに加えていろいろな鉱山の発掘の副産物として重金属が多量に含まれた土壌が廃棄されます。したがって鉱山の跡地ですとか、川の下流などに非常に高濃度のカドミウムが堆積します。このカドミウムが米に吸収されるのです。このことはすでに 20－30 年前に問題になりました。当時は政府が汚染米を買い上げて糊などの原料として処分しています。しかし残念ながらこのカドミウムを減らそうとする対策はそれ以降まったく行われておりません。そのため世界の安全基準に合わせると、今では日本の米の 20%を破棄しなければいけない事態になっています。土壌汚染が狭い範囲でかつ汚染物質が高濃度の場合は無機的にいろいろな方法が使えます。しかし汚染範囲が広い場合はそのような方法では間に合いません。そこで植物が使えないかということになるわけです。

表 1 植物を利用した環境浄化

1. 大気中の炭酸ガス吸収
光合成効率の向上によるでんぷん蓄積効率の向上
ー食料, 燃料, プラスチック原料としての活用
2. 土壌中の重金属の浄化
重金属蓄積植物を改良し高濃度に蓄積する植物を作出
(カドミウム, 鉛, ……金など)
3. 湖沼水中のリン酸の除去
リン酸の高効率吸収植物の作出
ー浄化・肥料としての利用

表 2 に示したのは重金属を濃縮するという報告がなされている植物です. 例えばカラシナは身近で漬物にもよく使われる植物ですが, 様々な重金属を吸収するという報告があります. また, ヘビノネゴザは多量の重金属を吸収することで一部の人たちにはよく知られている植物です. これらの植物の重金属吸収能力をあげることで環境浄化が行えないかと考えました. しかしそのためにはどのような遺伝子が重金属の耐性に関係するかを調べなければなりません.

表 2 金属濃縮植物

学 名	和 名	科 名	濃縮物質名
<i>Brassica juncea</i>	カラシナ	アブラナ	Cd, Pb, Cr, Cu
<i>Athyrium yokoscense</i>	ヘビノネゴザ	メシグ	Cd, Pb
<i>Heriunthus sp.</i>	ヒマワリ	キク	Pb
<i>Solidago altissima</i>	セイタカアワダチソウ	キク	Pb
<i>Ambrosia altissima</i>	フククサ	キク	Pb
<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	イネ	Pb
<i>Apocynum sp.</i>	ハシクルモン	キョウチクトウ	Pb
<i>Stragalus racemos</i>			Se
<i>Thlaspi caerulescens</i>		アブラナ	Cd, Zn
<i>Paspalum notatum</i>	スズメノヒエ	イネ	¹³⁷ Cs
<i>Arabis stricta</i>		アブラナ	⁹⁰ Sr
<i>Uncinia leptostachya</i>		カヤツリグサ	U
<i>Ipomea alpin</i>	サツマイモ属	ヒルガオ	Cu

最初は山形県の鉾山の跡地からヘビノネゴザを採集しようとしたのですが, 所有者に断られました. そこで, 身近なカラシナから遺伝子を単離することにしました. カドミウムを与えて育てたカラシナからその条件下でよく働いている遺伝子を単離し, その遺伝子をもともとカドミウムに弱い酵母に与えて, カドミウム耐性の酵母が出現するかどうかを調べました. カラシナの遺伝子を挿入された 160 万株の酵母から 55 株のカドミウム耐性酵母が回収されました. これらの酵母がカラシナなどの遺伝子を持っているかを調べたところ, 3 種類の遺伝子がみつかりました. これらはすでに知られていたファイトケラチン合成酵素, メタロチオネイン, 動原体タンパク質で, 残念ながら新規の遺伝子を見つけることはできませんでした. ファイトケラチンは非タンパク性のオリゴペプチド構造を持ち, その側鎖部分がカドミウムをキレートすることにより無毒化し, 液胞に貯蔵する働きを持つことが昔から知られていました. したがってファイトケラチン合成酵素は植

物による重金属の無毒化に関しては本命と思われる酵素です。一方、メタロチオネインは金属に結合するタンパクとして有名なものですが、カドミウムにのみ特異性をもつわけではありません。また、動原体タンパク質もカドミウムに反応して働いているとは考えにくく、単に生存条件が厳しい状況で働いている遺伝子と考えられます。これら 3 種類の遺伝子を導入した酵母に関してカドミウム投与に対する生存率を調べたところ、やはりファイトケラチン合成酵素が最も効果的に機能していることがわかりました。

そうこうしているうちに鉱山跡地に生えているヘビノネゴザを採集する許可がおりました。このヘビノネゴザは数千 ppm という濃度のカドミウムに耐え、またその鉱山跡地にはヘビノネゴザしか生えていないということで、どのような遺伝子が働いているかということに非常に興味をひかれました。さきほどのカラシナの場合と同様な遺伝子導入実験を行い、73 株のカドミウム耐性酵母を得ました。これらの酵母が持っているヘビノネゴザ遺伝子を調べた結果、やはり耐性に直接関与しているのはカラシナと同様ファイトケラチン合成酵素であることがわかりました。ヘビノネゴザのファイトケラチン合成酵素は酵母に 6 倍程度のカドミウム耐性を与えることがわかりました。ファイトケラチン合成酵素が他の金属の耐性に影響を与えるかどうかを調べたところ、ファイトケラチンの効果はカドミウムに特異的なことが判明しました。次に、筑波山に自生していたヘビノネゴザと鉱山からとってきたヘビノネゴザのカドミウム耐性を比較したところ、同じ遺伝子を持っているにもかかわらず筑波山のヘビノネゴザはカドミウム耐性がないことがわかりました。このことはヘビノネゴザそのものに耐性があるのではなく、高濃度のカドミウムにさらされていたために植物に耐性がついたと考えられます。それではこの耐性はどのようなメカニズムでもたらされたのでしょうか。カラシナやヘビノネゴザのファイトケラチン遺伝子を導入した酵母では、耐性を持っていない植物のファイトケラチン遺伝子を導入した酵母と比べて顕著な耐性の向上は観察されません。このことは耐性植物のファイトケラチン遺伝子が特殊なタイプのものではないことを示しています。おそらく遺伝子発現の調節機構、例えばファイトケラチン遺伝子の数や活性化が関係しているのではないのでしょうか。この問題については現在引き続き研究を行っています。

カドミウムを浄化する植物に望ましい条件としては、以下のものがあります。

表 3 土壤環境を浄化する植物に求められる性質

- | |
|----------------------------|
| 1. 根をよく進展し土壤中からくまなく有害物質を吸収 |
| 2. 葉茎部へ汚染物質を転流 |
| 3. 葉茎部に高濃度で無毒な形で蓄積 |
| 4. 高濃度で総量を多く蓄積 |
| 5. 水田用に湿地で生育できる植物 |

ヘビノネゴザは高い吸収力を持つのですが、シダ植物なので根の発達が悪く実用的ではありません。もうひとつ重要なことは、カドミウムは水のない条件では安定していて作物に吸収されにくく、水田のような条件でのみ吸収されやすいという性質を持っていることです。そこで水田で利用できる植物がよいことになります。最もよくこれらの条件を満たしているのは実はイネです。そこで、逆説的なようですがイネの葉の部分にカドミウムを吸収させる仕組みを考えました。イネの緑色部で高発現している遺伝子のプロモーターにヘビノネゴザのファイトケラチン合成酵素をつなぎ、イネに導入しました。このイネについては今カドミウムの耐性を試験中です。しかしさすがに茎葉とはいえイネにカドミウムを吸わせることには抵抗があります。そこで代替りの植物としてアフリカイネの利用を考えています。アフリカイネは、根が巨大で 1 m くらいの長さまで発達します。また日本では日照時間が不足するため、花が咲かないので種子が広がる心配がありません。遺伝子操作はイネと同じように行えるため、将来の有望株だと思っています。

植物体全体のカドミウム吸収力を高めることも工夫できることの一つです。それに関して考えられる条件

および我々のアプローチを次のようにまとめました。

土壌からのカドミウム溶解

EDTA(キレート剤)の散布

---劇的な効果がないだけでなく、それ自身が毒性土壌中の有機酸の濃度をあげる

---植物にクエン酸を過剰生産させる

←クエン酸合成遺伝子過剰発現 (1)

根表皮細胞のカドミウム吸収

カドミウム吸収チャネルの開放

---植物の鉄輸送系の選択性をさげる

←鉄トランスポーター遺伝子の改変 (2)

根→茎葉部への輸送

植物体内でのカドミウム無毒化

ファイトケラチン結合による細胞内での安定化

←ファイトケラチン合成酵素遺伝子の過剰発現

(1) アラビドプシス・ミロシナーゼ遺伝子のプロモーターは根で高発現する。

クエン酸合成遺伝子を下流につなぎアグロバクテリウムを利用してイネ・カラシナに導入中。積極的に土壌に分泌するためのシステムはまだ考案中。

(2) グンバイナズナと同属の欧州産雑草のうち、ガンジスという地方に育つ系統がカドミウムをよく吸収する。この植物では鉄のトランスポーターシステムに欠陥があり、選択性が弱い鉄だけでなくカドミウムまで吸収するらしい。アラビドプシス鉄トランスポーター遺伝子(IRT1)に突然変異(108番目のアミノ酸がD→Aに変化するような変異)を起こさせると、鉄とマンガンの輸送は低下するがカドミウムの吸収はおちない。

土壌中の重金属の浄化以外に我々が取り組もうとしているテーマは湖沼水中のリン酸の除去です。日本の湖の多くが富栄養化していると言われています。水を汚染している物質の中で一番汚くて臭いのが窒素で、次に問題になっているのが栄養源としての炭素です。しかし窒素や炭素はいつかは大気中に発散されます。しかしリン酸(P)はしぶとく水中に残るため、人工的に除去する必要があります。ホテイアオイという水草は皆さんよくご存知だと思いますが、水質の浄化によく使われています。しかし繁茂しすぎるため東南アジアでは逆に目の敵にされていてすぐ湖沼から除去されます。このホテイアオイを利用した水圏浄化の可能性はいろいろ研究されていますが、植物体全体のP蓄積量が低いため現時点では見込みがないものとして否定的な意見が多いようです。しかし、もし植物の改良によってPの吸収効率があがれば、水質の浄化だけではなくPを吸収した植物を肥料として資源化することも可能です。現時点でホテイアオイを焼却したときの灰が含むPの量はわずか0.7パーセントです。この状態では植物体を利用する価値はないため、水質浄化に使われたホテイアオイは水中から回収されたあと放置され、腐敗して二次汚染を招いてしまいます。しかしホテイアオイのPの蓄積量を10倍程度あげることができれば肥料として資源化することも可能です。これに対する分子生物学者のアプローチ法は、Pの蓄積物質としてフィチンを利用することです。フィチンはPを子孫に残すため植物が種の中に貯蔵する物質で、その構造の中にPを6個含みます。フィチン合成系の遺伝子を植物体で高発現させてやればホテイアオイのPの蓄積が増すと予測されるわけです。そこでいろいろな生物のイノシトールリン酸のリン酸化に関わる遺伝子との相同性を調べ、候補遺伝子をアラビドプシスから選び出しその解析を行いました。しかし候補遺伝子の中で実際に

リン酸化の活性が見られる遺伝子はそう多くはありませんでした。そこで現在はフィチン合成が活発である条件下で多量に発現している遺伝子を探索するという方法に代えて研究中です。

さて最後に植物を利用した環境浄化に実現性があるのかという話をしたいと思います。

いわゆるファイトレメディエーションに未来はあるかという話です。植物を汚染浄化に利用した場合、汚染物質を吸収・濃縮した植物の処理が問題になります。現時点では汚染植物の浄化に金がかかるため、自治体の負担が増し持続化しない可能性があり、ひいては二次汚染を生むという可能性があります。これをクリアするためには、(1)再処理に費用がかからない技術の開発、(2)取り扱いを容易にすること、(3)何らかの付加価値をつけることが必要です。(3)に関していえば、汚染植物をバイオマスとして考え、バイオガスの原料としての利用や食品としての活用が考えられますし、夢のような話ですが、鉍物資源、例えば金の濃縮に利用するという手もあります。

このように我々はいろいろな可能性を考え、分子遺伝学的なアプローチで植物を生活に役立てようと試んでいます。今のところ死屍累々でまだ実用化されるような成功は収めていませんが、我々のアプローチが間違っているとは思いません。近い将来これらの技術が社会にとって役立つことを信じて研究を進めています。

(要約： 分析支援センター助教授 石井 千津)

石井追記

12月10日の朝日新聞社会面に次のような記事が載りました。コメに含まれるカドミウムの国際的な残留基準について、厚生労働省が食品の国際規格を決めるコーデックス委員会に対し、国際基準を0.4ppm以下とするよう求めることを決議したというものです。コーデックス委員会は0.2ppm以下を提案しています。厚生省は日本人の食生活や食品のカドミウム残留量をもとに摂取量を試算し、提案値でも健康への影響がないと判断しています。このことは、すなわち我々が普通に食事をとれば国際基準値以上のカドミウムを摂取することになるということを意味していると思われます。藤村先生のお話にあるとおり、水田のカドミウム汚染が無視できないところまできているわけです。

光合成初期反応 — 光化学系 I など

Primary Reactions of Photosynthesis: a Personal View

理学部分子生物学科 檜山 哲夫

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama University

Tetsuo HIYAMA

Photosystem I of oxygenic photosynthesis is reviewed. The article describes historical as well as personal accounts on P700, P430 and chlorophyll a' besides other topics. The 1971 discovery of P430 was rather accidental in the course of a P700 investigation, which also yielded extinction coefficients of P430 and P700, together with their difference spectra. The author later conducted EPR experiments to prove that P430 is A2 (FeSx: Component X), which has, unfortunately, not been accepted well yet. The author's reconstitution experiment of P700 with PsaA/B apoprotein and chlorophyll a' in 1986 has only recently been realized when a three dimensional structure of Photosystem I complex was presented in 2001.

はじめに

「光化学系 I の初期反応」を中心に私の研究歴を振り返って独断と偏見だらけの解説をさせて頂く。光合成は植物が太陽光のエネルギーを使って水と二酸化炭素(炭酸ガス)からデンプンや砂糖のような炭水化物を作る複雑な化学反応で、葉緑体(クロロプラスト:緑葉の細胞の中にいくつもある小さい緑の袋)で行われる。明反応は光で駆動される光化学反応の一種で、多数の反応が連続し絡み合った系である。そのなかで純粋に光化学といえる素反応は初期反応とよばれ、植物のクロロプラストでは2種(光化学系 I と II)がある。この2つは密接に連携してエネルギーに富んだ分子(ATP と NADPH)を作る。

光化学系とは光化学反応が起こる場で、光化学反応中心色素とよばれる分子が光量子のエネルギーを使って化学反応を起こす系(システム)である。このシステムは反応中心色素など多くの分子種で構成されそれら低分子はタンパク質(サブユニット)に巧妙に配置され機能している。ここで起こる化学反応は酸化

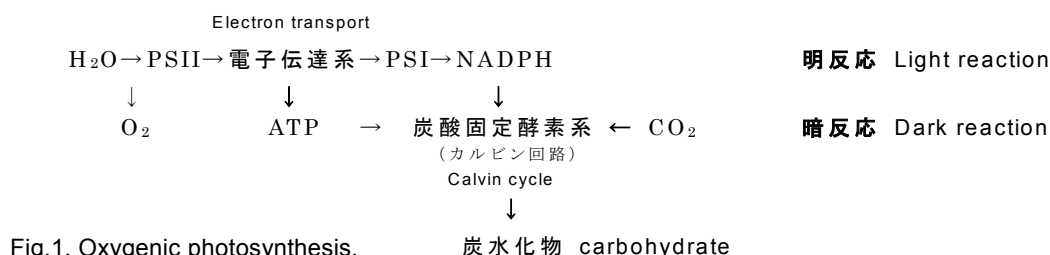


Fig.1. Oxygenic photosynthesis.

還元である。ひとつは強い還元力を生成して NADP(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸)を還元して NADPH(還元型 NADP)にする光化学系 I, もう一つは水(H₂O)から電子を引き抜き(酸化し), 副産物として酸素を発生する光化学系 II である。光化学系 II で引き抜かれた電子はいくつかの分子の酸化還元をくりかえし光化学系 I の NADP 還元に使われた電子を補う。この流れが電子伝達である。電子伝達の際のエネルギー差を利用して生体のエネルギー分子 ATP を作る(光リン酸化)。ここまでの明反応で、葉緑体の内部に一杯詰まった小さな袋の集合体(チラコイド)の膜部分に埋め込まれたタンパク質複合体

が担い手となる。暗反応はこうして明反応で出来た NADPH の還元力と ATP のエネルギーを使って単純な炭素化合物 CO₂ から複雑な炭水化物を合成する反応系のことで、葉緑体のチラコイドの外側に広がる液状部(ストロマ)にある多数の酵素がこの複雑な代謝系(カルビン回路)を触媒する。これが「酸素を発生して二酸化炭素を固定しデンプンを作る」という植物の光合成のしくみである(Fig.1)。

光化学系 I のこと

2 つの光化学系という概念は 1960 年代初めイギリスの Hill と Bendall やオランダの Duysens らが提唱した。Calvin が暗反応でノーベル化学賞をもらった頃のことである。これより前(1956)に巧妙な実験によって、光量子が最初にひきおこす反応はある種の色素(P700 と命名)の光酸化であるという光化学反応中心色素の概念を最初に提唱したのはオランダの Kok である(1)。2 つの光化学系説が提唱されたとき、Kok の色素 P700 は光化学系 I に帰属された。以後光化学系 I (Photosystem I)を PSI と省略して書くことにする。ちなみに Hill-Bendall が最初に出した模式(Z-Scheme)では Photochemical system 1 となっていた。まもなく省略した Photosystem という語が作られ、数字もいつのまにかローマ数字に変わっていった経緯を知る人は少ない。私が光合成の世界に入り込んだのは 1967 年秋だからもうこうした概念はすっかり定着していた頃だ。この当時盛んに PSI の反応中心活性をもつ複合体を葉緑体のチラコイド膜から単離調製することが試みられていた。材料は高等植物(主にホウレンソウ)の葉緑体やシアノバクテリア(ランソウ)で、膜を可溶化するため TritonX-100 のようなおだやかな非イオン系界面活性剤が使われるようになった。これらは今日ではクロロフィルなどの色素と多くの機能性低分子がタンパク質(サブユニット)に結合したもので構成される複合体であることが分かっているが、当時はもっぱら明反応(部分反応)の測定に使われていた。

私が 1969 年に移ったオハイオの研究所はこうした研究の中心のひとつであった。電子供与体としてアスコルビン酸などをプラストシアニン(銅を含む酸化還元タンパク質)または適当な人工電子伝達物質(インドフェノール類、メチレンジアミン類等)と共に与えると、鉄イオウタンパク質であるフェレドキシンおよび FNR (Ferredoxin-NADP reductase:フェレドキシン NADP 還元酵素)の存在下で、NADP を光還元する能力があることまで当時分かっていた。またメチルビオローゲン(methylviologen もともと除草剤パラコートとして開発された)がフェレドキシンの代わりに電子を受け取る人工電子受容体として働くことも当時知られていた。現在、PSI 複合体の結晶解析で立体構造が解明されつつあり、大小様々の 10 数種のタンパク質サブユニットで構成され集光用の大量のクロロフィル分子の他、P700, ビタミン K1, と 3 種鉄イオウクラスタをもつことが分かっている。詳しくは総説を読みたい(2-4)。

研究歴その I — 光化学系 I を知るまで

私は大学院を出てアメリカにポスドクとして渡るまで、光合成についてほとんど何も知らなかった。大学院では指導教官の北原覚雄先生(当時乳酸菌の世界的権威)が 1930 年代に発見されたラセマーゼ(現在では乳酸ラセマーゼ Lactate racemase)の精製というテーマで乳酸菌を培養しては破碎して抽出、硫安分画、カラムクロマトなどを来る日も来る日も繰り返す、体力だけが勝負で、学部時代勉強しないで山歩きばかりしていた私にはよく向いた仕事だった。それでも世界で初めて乳酸ラセマーゼを精製したり(5)、論文を 3 つほど書いて福井作蔵・柳田友道両先生のお世話で何とか学位を頂いた。そのうち隣の研究室で柳田先生が酸素電極を組み立てて居られたり、当時名古屋大学から早大理工学部に移って来たばかりの若き大西 劉教授の研究室では手作りの光度計など見せられ、もともと小学生の頃から好きだった電気や機械いじりの虫がうごめき始め、生化学に電子工学を取り入れた分野を勉強したくなった。当時、こうした研究者としてアメリカの Britton Chance という人が最も有名であった。この人は学部では電気工学を専攻し大学院で物理化学をやり、その後はミトコンドリアの酸化還元・リン酸化反応を独自に開発したユニ

ークな分光装置で測定し次々に成果を発表していて、ほぼこの分野では彼の独壇場であった。「蛇に怖じず」やら若気の至りやらで課程修了前年(1966)の夏に手紙を出すと何とすぐ返事をもらい、曲折はあったが翌年の秋には Philadelphia の彼の研究室に入ってしまった。研究室といっても実際は Johnson Research Foundation というペンシルバニア大学の医学部附属の研究所である。7階建ての建物の 5 階と 6 階を占めているだけで大して広くなく、そこに何と 150 人もの人がひしめいていた。

さて曲折の一つは行く直前(その年の夏)東京で開催された国際生化学会議に Chance 教授がやってきてついでに「面接」されてしまったことである。彼の宿舎だった日本橋の旅館にはもう一人の日本人の志望者が来ていて一緒に面接を受けた。この人が文法も発音もひどいものの実に良く英語をしゃべり気弱な私はかすんでしまった。結局 2 人とも採用されたのだが、私のこの英語ではと気をきかせてくれたようで、現地へ行ってみると私は日本人ばかり居る研究室へまわされた。そこは助教授と 2 人のテクニシャンだけでこじんまりしていて良いのだが、全員日本から来た方々でなにしろ朝から晩まで日本語ばかり。廊下からときどき英語が聞こえてくると「あっそうか私はアメリカにいるのだ！」なんて感じ。なかなか英語が上達しない。この助教授が光合成の権威(といってもまだ 30 代だから新進気鋭というべき)として既に当時から世界的に著名だった西村光雄先生である。もともと光合成には興味があったので良かったのだが、話はそう単純ではなかった。机とイスは西村研究室にあったがすぐ隣の John Williamson 教授の研究室に「派遣」されてしまった。

私の大学院での研究は前述のようにラセマーズだが初めは研究室の助手だった水島昭二氏の当時日本では評判だった「解糖系の定量的解析」という研究シリーズの一部をお手伝いした。これは当時世界的によく始まりかけていた代謝調節研究のはしりともいえる。水島さんはまもなくこれを止めてしまいもっと先端の生体膜研究に移行してゆくのだが、私の行った Chance の研究所の 1 部門が動物の肝臓を使って代謝調節の研究をやっていた。これを主宰している Williamson 氏はイギリス人だが小柄で研究所の当時非常に沢山居た日本人たちはチビジョンとか陰で呼んでなぜか嫌っていた。最初私はこの研究室へつれていかれ測定に使う大腸菌の酵素(何であったか全く記憶にない)の精製を手伝った。日本人たちに同情されたが、私はそれこそ初めて英語を使って研究を手伝う快い緊張感で結構楽しかった。同じ頃雇われた日系人のポストドクが化学屋で酵素は全く分からないということで実際は「指導」した。どうも Williamson 氏は日系人ということで英語のできない私に「配慮」したつもりもあったかもしれない。幸いこの人は 3 世で全く日本語は話せなかったので待望の英語の勉強には大いに役だった。私の指導が良かったせいか 1 月くらいで目的を達して多少の信用を得、西村研に戻った。

しかし、まだ直ぐには光合成に入れなかった。Chance 先生にとっては光合成は道楽で本業はミトコンドリアの電子伝達・酸化的リン酸化ということもあって最初は光合成とは直接関係ない別の仕事を与えられた。西村先生も相当迷惑だったろう。私は微生物屋(Microbiologist)ということになっていたのも、当時物理屋のポストドクが扱っていてあまりうまく行っていなかった単細胞緑藻 *Chlamydomonas* の変異株(Pale green mutant)というのを与えられ、結構苦労した。光合成をやる緑藻だが色素がおかしくなった変異株で「光に弱く」なっていて、暗いところで炭素源を与えて育てる。それでも比較的短期間になんとか菌体がとれるようになった。Chance 先生の目的はミトコンドリアをとることでふつう藻類では葉緑体が多くミトコンドリアを分けてとることは至難だが、葉緑体が少ない変異株ならやりやすいだろうとの目論見である。当時研究所では様々な生物からミトコンドリアをとっている人たちが世界中から招かれてきていた。丁度阪大からきた大西智子博士は酵母のミトコンドリアをとろうしておられたので道具がそろっていて便利であった。結局どうしても緑色の画分しかとれず、結局粗膜破片標品(要するにつぶしただけ)の状態でいろいろな測定をやってみるようになった。幸いなことに Chance 先生は忙しくて(その理由は後で述べるが)、あまりうるさく言われず西村先生の薦めで、先生の持っている 2 波長分光光度計(Chance 先生の考案になる機械でこの研究所の附属工場で作られたもの)でいろいろ測定をやってみた。西村先生はもっぱら紅

色光合成細菌を使って当時最先端のリン酸化の研究をされていたので、それに関係する試薬がいろいろあり、使ってみなさいと言われるままに、入れては起こる変化を次々に調べていった。結果が出るとはじめて勉強して、またやってみるということを繰り返しているうち、何とか PSI のまわりのサイクリック電子伝達系として話がまとまってきた(6,7)。結局この研究所にいた 2 年間で 3 回ほど学会発表もしたし、3,4 報の論文も出した。1969 年秋、西村先生は九大教授に赴任され帰国。私はまた紆余曲折を経て結局当時光合成研究のメッカの一つだったケタリング研究所(Charles F. Kettering Research Laboratory)に移った。

Kettering という人は数々の重要な発明をして自動車会社(GM)の幹部になった人だが、一面のトウモロコシに囲まれた片田舎に育ち引退後私財を投じて植物の光合成研究のための施設をつくったのがこの中西部オハイオ州の真中辺にある人口 5 千の小さな村 Yellow Springs にある研究所である。ここで私は初めて「PSI の初期反応」というテーマを与えられた。またまた紆余曲折(といっても研究室のお家騒動で私が行ったときは終わっていたのだが)のお陰でいきなり当時まだ珍しかったルビーレーザーの 20 ナノ秒パルス光で励起してマイクロ秒領域で吸光度の時間変化を測定する閃光分光法(Flash photolysis)装置をあてがわれた。当時生物試料用のこうした装置は世界中にほとんどなかった。ひとつは以前いた Chance の研究所、もう一つはベルリンの H. T. Witt のところにあったが、このオハイオの装置は全く世に知られていなかった。というのは私が行ったときようやく完成したばかりだったからだ。作った人が私の着く直前にボスとケンカして出ていってしまったので Chance 研からやって来た私が面倒を見るはめになったわけ。ボスの Bacon Ke という人は現在の中華人民共和国が成立する寸前にアメリカに逃れてきて苦学して物理化学で PhD をとった人だが、人格的に問題があったようで、私が行く直前に他にも 2 人ポストドクとスタッフなどが逃げ出していたことが来てみて初めてわかった。私もレーザー実験は Chance の所で人がやっているのをちょっと見ただけだったので一から始めた。結局、また後で述べるが、あれやこれややっているうちに半年ほどで Q スイッチルビーレーザーなるものをひとりで分解掃除組み立てまで出来るようになった。これを使った仕事をなんとかまとめて翌年春にシンポジウムで発表、論文にもしたが(8)、なにしろレーザーはお守りが大変。マイクロ秒領域の測定もしんどいので、何となくミリ秒のところばかり見るようになってしまった。幸い論文も一つ出したし、レーザー技術者(?)としてもボスの信用を得てあまりうるさく言ってくることはなかったのを幸いに、扱いやすいキセノン閃光を使って、のんびりとミリ秒領域を見ていた。

研究歴そのⅡ — 光化学系Ⅰにのめりこむ

ボスのもともとのお命令は P700 とそれに電子を供給していると考えられていたシクロム f の酸化還元の様子を生きた細胞で直接分光学的に観察して証明せよというものであった。ボスのアイデアはその当時評判高かった Bill Parson の研究のまねである。Parson は Chance 研でレーザーを使って光合成細菌でシクロム c と P700 に相当する P870 との関係をきれいに証明した(これは私が行く直前であった)。同じことを緑色植物のモデルと考えられるシアノバクテリア(当時はランソウといった)の生細胞を使ってやってみるというわけ。結局 Parson の実験のようにきれいなデータは出なかったが、とにかくまとめて書いたのが上記論文である(8)。ちなみに現在ではシクロム f が直接 P700 を還元するとは考えられていない。そんなこともあってもともと苦手な生きた細胞をやめ、つぶして膜部分だけにしたもので系を単純化した上、レーザー実験はお休みして、ミリ秒領域に移った。

さて当時の私は今考えるとそれまで 2 年間曲がりなりにも光合成の世界に居たにしては実にお粗末だった。もともと勉強嫌いで直接今やっている実験の周囲しか勉強しない怠け者だから当然であろう。P700 なんて述語もちょっと光合成を勉強していれば常識の単語のはずだが不勉強な私は一から始めなければならなかった。いざ勉強してみるとこの P700 なるもの実はそれほどよく分かっていないのではないかと思います。前述のように、オランダの Kok という物理化学者が 1956 年ごろに最初に発表したが、この天

才の一連の論文は結果と考察が主で読みにくい。方法も回転円盤を使って間欠照射をくりかえし、短時間で起こる速い変化を測定しようとする巧妙なものだ(1)。そこに記述されている結論はしかしながら 50 年後の今でもほとんど正しい。その後 1960 年代にはベルリンの Witt が登場する。この人も天才で、イギリスの Norrish-Porter が始めた閃光分光法(1967 年ノーベル賞)を光合成研究用に大幅に改良した装置を駆使して次々に独断的な論文を出している。私が始めた 1969 年はもう彼のこの種の研究の末期である。彼の論文の記述は Kok に輪をかけたすごい「簡潔」なものながら同じく結論は今日でもほとんど正しい。ただし「ほとんど」というところがミソである。私のオハイオでの仕事は Witt の追試から始まっている。マネといった方が正しい。ボスの Ke 氏は実は電気はダメで配線図も読めない。にもかかわらず研究所の電気工作室の専属技師 2 人と自分の研究室に雇った軍隊上がりのテクニシャンをうまく使って Witt の装置を再現してしまった。実際は私の前任者がほとんどやっただけで後で分かったが、豊富な研究費があったとはいえ完全に人まかせで世界に 2 つしかない装置を作らせたのは一つの才能ではある。ちなみに Chance 研の装置はレーザこそ使っているもののもっと原始的な低感度なもので測定の楽な光合成細菌にしか使えなかった。

前任者の Don Gorman 君は私とほとんど同じくらいの歳の人で学部では数学専攻だったがハーバード大学で遺伝学の PhD をとった秀才。エレクトロニクスは私と同じアマチュアだったようだが実に良くまとまった装置に出来上がっていた。レーザは 1960 年にメイマンが発明したルビーレーザであって、私が使い始めた 1969 年にはこれを作って売っているベンチャー企業が既にいくつもありそのひとつである。パルス幅を 20 ナノ秒に集中するため(Giant pulse)Q スイッチというものがついている。後にはずっと扱いやすい Pockel cell が使われるようになったが、当時のは回転ミラー式というやつで、エアタービン駆動の小さな鏡が数万 rpm でサイレンのような大騒音を発して回る。ルビーレーザは 6—7 ミリ径で 10 センチくらいの長さのピンク色のルビー棒の両端面を完全に近い平行に磨きあげたものが本体である。Giant pulse 用に片面だけハーフミラーにしてある。まわりをかこむキセノン閃光管から強力な白色閃光をたたき込まれると(pumping)いわゆる coherent な単色光(レーザ光線)がハーフミラーの面から飛び出してくるというしかけ。大事なことは回転ミラーを含めて 3 つの面が完全に平行になるよう調整することである。閃光管からは 1 回の pumping で大変なエネルギーが出るため、ルビーの温度が上がらないよう水冷式になっていた。この水はルビーと直ぐそばに位置する閃光管を直接冷やす。ルビーもコンデンサからの数千ボルトの電圧が常にかかっている閃光管も水に漬かっている恐ろしさ。循環水はイオン交換樹脂を通してイオンフリーに保つ。水は完全なる絶縁体であることを改めて認識した。毎日使っていると 1 月位で分解掃除が必要になる。その度にヘリウムネオンレーザを使って光軸の再調整をやる。うまくいくようになるのに数ヶ月かかった。面白かったが大変なので簡単なキセノンフラッシュにすら替えしたというわけ。閑話休題。

研究歴その III — P700 と P430

測定装置を Fig.2 で簡単に説明する。複雑に見えるが楕円で囲んだ部分が肝心である。試料には弱い単色光(測定光)が常時当たっている。透過した光が検出器(フォトマル)で電流に変換されその強さがモニターされる。測定光と直角の方向から強い作用光(この場合レーザやキセノンランプの閃光)が試料に照射される。閃光分光法では、非常に短い時間内に十分に強い光をあて光化学反応中心分子(色素)を励起し、その結果起こる光化学反応の時間変化を吸光度変化で測定し解析する。「非常に短い」というのは時間変化測定の時間スケールに比較してという意味だし、「十分に強い」というのは色素分子のほとんど全部を励起できる強さ(単位時間に単位断面積を通過する光量子の数)という意味である。フォトマルにはフィルターがかけられ測定光だけがあたるようにし、強い閃光の影響を全く受けないようにする。閃光の方もフィルターを通す。このフィルターの相補的(補色的)組み合わせは非常に重要である。測定は閃光をあてる少し前から開始される。全てデジタル式の積算記録装置(Computer for Averaging Transient:

CAT)でタイミングが制御され測定記録される。

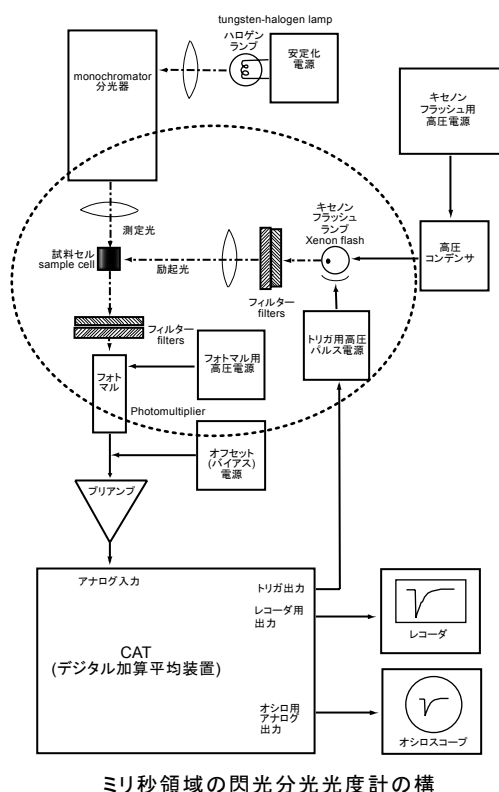


Fig.2. An instrument set-up for measuring flash-induced absorbance changes in msec range (10).

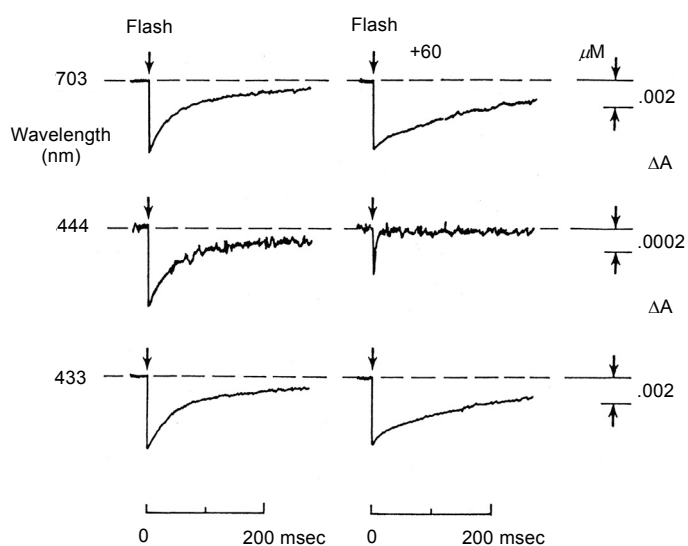


Fig.3. Flash-induced absorbance changes at 703 nm (upper), 444 nm (middle) and 433 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen. Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

Fig.3 は実際の測定例である。矢印のところで閃光が発せられる。その前のトレースが暗所での吸光度を示している。一番下の段のトレース(測定光は 433 nm, 閃光は 700 nm)を見ると、閃光があたった瞬間トレースは下に一気に下がり、吸光度が低くなったことを示す。この変化は除々にもとに戻っていく。強い短い閃光で瞬間的に吸光度が下がり、次に暗所でもとに戻ってゆく過渡現象(緩和現象)を測定しているわけである。こうした装置はその後カリフォルニアに移ってから自分で作るようになり、最後に出来た1台を埼玉大学に持ち帰った(9-11)。

もとにもどる。シアノバクテリアをつぶして膜部分だけにしたものを試料にしているいろいろやっていた。電子供与剤としてよく使われるアスコルビン酸と TMPD(*N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine)だけを入れた試料に閃光を当てて、ミリ秒領域での吸光度時間変化を見ていた。PSI の電子受容体として先に述べたメチルビオローゲン(MV)が当時知られていたわけだが不勉強な私は気づかず入れていなかった。実験結果が出てから文献を読むことが多い私が Witt の報告を読んでいて MV のことに気づいて入れてみた。そうしたら劇的な変化が起こった。再び Fig.3 の下の段をご覧ください。これは 430 nm 付近での吸光度変化である。P700 は光で可逆的に酸化される色素であって、酸化型と還元型の差スペクトルには 700 nm と 430 nm 付近にピーク(酸化型から還元型を減じた差スペクトルでは谷 — Fig.5 参照)があるということは Kok の時代から分かっていた。だから 700 nm では問題になる蛍光による干渉がない技術的に楽な 430 nm 付近を測定していたわけだ。MV を入れる前は、左のトレースのように、半減期 30 ミリ秒くらいで戻ってゆく。そこへ MV を入れたら、ずっと遅くなり半減期は 100 ミリ秒以上になった(右トレース)。これは妙である。今測定しているのは P700 のはずであるから、閃光で最初起こる吸光度の減少はその酸化(光酸化)を意味する。戻りは暗所における再還元である。この還元は予め加えてある電子供与

体(アスコルビン酸と TMPD)による化学的還元である. とすると MV のような電子受容体(弱い酸化剤)がこの戻りに影響を与えしかも遅くするというのはどういうことか? P700 の化学的還元反応は人工電子供与体が十分量ある状態の擬一次反応だと Witt は論文で書いている. そこで, このトレースを半対数方眼紙にプロットして見たら事態が分かり始めた(Fig.4).

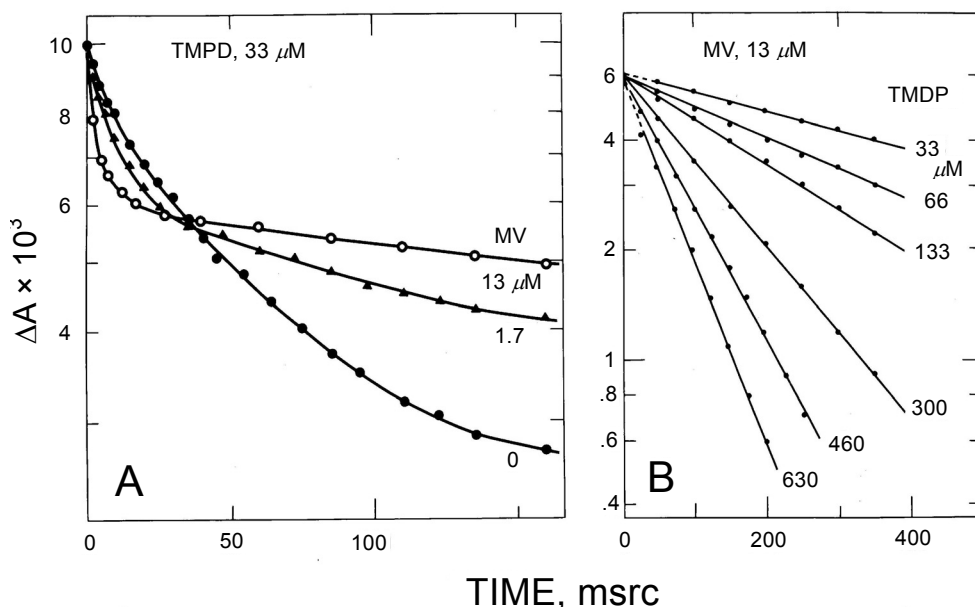


Fig.4. Flash-induced absorbance changes replotted on semi-logarithmic chart paper. Details are described in the text and the original report (12).

MV なしのコントロールは予想に反して直線にならない(左図の●). MV をたっぷり入れると直線になったが, 50 ミリ秒以下の初めの時期に非常に速い減衰を示す別のフェーズ(相)が見えてきた(左図の○). 直線になった相に着目して時間スケールを長くし還元剤 TMPD の濃度を変えて見た(右図). すると勾配が濃度に比例する典型的な擬一次反応の様相が現れた. 直線相と速い相について測定光の波長を変えて別々にプロットしたのが Fig.5 である.

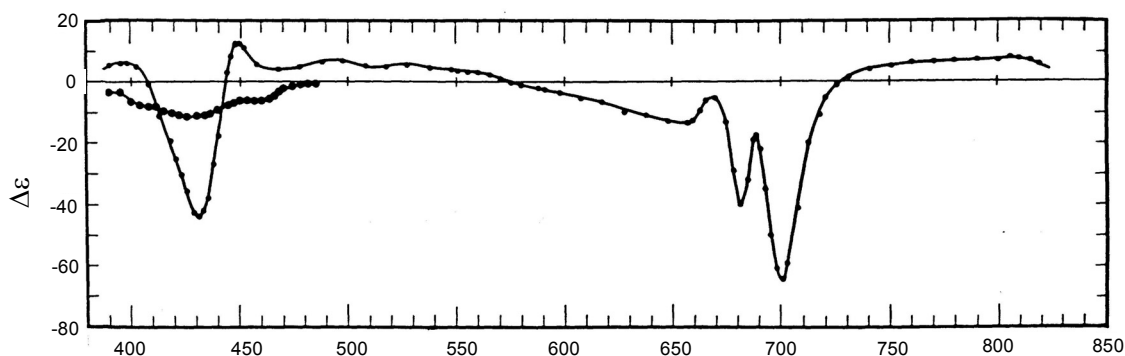


Fig.5. Flash-induced light-minus-dark difference spectra of P700 and P430. Details are in the text. 波 長 (nm)

大きい●が速い相, 小さい●が直線相である. 直線相は Kok が最初に報告しその後 Witt が測定して発表している P700 の差スペクトルとよく似ているし, 擬一次反応の様相から, 純粋の P700 の差スペクトルであると見た. Fig.5 は実は少し後に非常に慎重に測定して得た結果で, 吸光係数とともに今でも標準として引用されているものだが(14), 当時のもう少し荒っぽいものだった(13). 定性的には傾向は同じである. さて, 速い相(大きい●)は 430 nm 付近に山がある以外はかなり違うスペクトルである. 特に P700 の特長である 700 nm 付近には全く変化がない. さらに重要なことに気づいた. P700 にはいくつかの等

吸収点(Isosbestic point: 分光光学用語で差スペクトルがゼロになる波長)があることを Witt が報告している。私が改めて精密に測定したこのスペクトルでは 407 nm と 445 nm の付近であるが、そこでこの速い相は決してゼロにならなくてははっきりと吸収変化がある(Fig.5)。したがって P700 とは別のものであると考えた。この時点でこの未知のものを極小点が 430 nm 付近にあることから P430 と命名した。さらに等吸収点で測定すればこの速い相だけの減衰特性が見られるはずである。これが Fig.3 の中段左である。驚くことに MV のないとき 703 nm, 444 nm, 433 nm の減衰特性が見事に同じであった(左の各段の3つのトレース)。MV を入れると、P700 だけ見ているはずの 703 nm では減衰が遅くなるだけだが(上段右), 433 nm では速いのと遅いのと 2 相になり、大部分をしめる遅い相は 703 nm におけるのと同じ減衰特性であった(下段右)。ところが 444 nm では全部が速くなってしまった(中段右)。MV は無色であるが還元型は青色でもう一つの等吸収点である 575 nm では吸収がある。これを利用して MV の還元そのものを測定した結果が Fig.6 である。MV を少しだけ入れると 575 nm での吸収増加が 444 nm での減衰と同じ様相で観測された(右)。別の実験で MV 濃度がある程度以上になると対数プロットで直線になるし勾配は濃度に比例することも確認した。P700 と TMPD の関係と同じ(擬一次反応)であるが、TMPD が還元剤であるのに対して MV は酸化剤であるから、P700 の暗所における再還元と同時に P430 の暗所における再酸化を見ていることになる。ということは P700 が光酸化されると同時に P430 は光還元されているということになる。

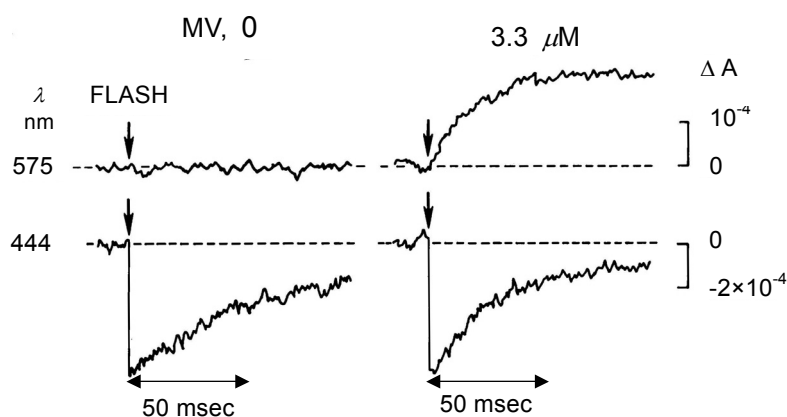


Fig.6. Flash-induced absorbance changes at 575 nm (upper) and 444 nm (lower), in the absence (left) and the presence (right) of methyl viologen. Photosystem I particles from spinach (D144) was used for the experiment.

どうもこれは当時までいろいろな物質がいろいろな人によって提唱されていたが証拠不十分で未だナゾとされていた初期電子受容体(P700 が酸化され飛び出す電子を最初に受け取る分子)そのものではないか。ちなみに MV のないときの減衰曲線は逆数プロットで直線になった。これを古典的二次反応で P430 が直接 P700 を還元している様子を表していると説明した。ここまでは一人でコツコツ考えながら実験していて、そのうちに事の重大さにだんだん興奮しつつあったのだが、数ヶ月間ボスに何も報告していなかったのも、遂に「何やってる」と聞かれてしまった。話したが信用しない。これらの現象がハウレンソウと他の数種のシアノバクテリアでもあることを確認したり、他にもいくつもじっくり実験して証拠を固めたところで、まだ理解していないボスを差し置いて 1970 年の秋ごろ研究所内で 세미나を開き数十人の前で発表した。そして翌 1971 年 2 月にはアメリカ生物物理学会で初めて公表した。その間にいくつも論文を書いた。いろいろ曲折があったが速報は 5 月に米国アカデミーの機関誌 (Proc. NAS) に出せた(12)。6 月にイタリアであった国際光合成会議で世界に発表したが、何となく皆あっけにとられていた感じだった(13)。Chance 先生だけはうれしそうに握手を求めにきてくれたが Witt 氏は私が近づいたらソップを向いて行ってしまったのは今でも覚えている。ちなみに Chance と Witt は当時誰でも知る犬猿の仲で元の弟子の仕事を楽しむ Chance 氏を Witt 氏は見ている不快だったこともあるが、後で私と同年代の Witt 研の人たちと話してわかったことだが、自分たちが見落としていたので、してやられたという悔しさが強かったらしい。

Witt vs. Chance の話はリン酸化で有名な Mitchell(1978 年ノーベル賞)だの緩和現象解析の

Norrish, Porter, Eigen(1967年ノーベル賞)だのが絡んでいて複雑である。最初に来た1967年秋私が幸いほっておかれた理由のひとつは Chance 先生は当時毎日スウェーデンからの電話を待っていてピリピリしていたからと聞いた。ずっと後で仲良くなったスウェーデンの老教授(授賞委員)の話では、それまで毎夏休暇はスウェーデンでヨット遊び(彼は大金持ちの上何とオリンピック金メダリスト)をし、かつ露骨に受賞運動していたとかで、委員会の不興を買ったらしい。1966年夏に私がもらった彼の手紙がスウェーデンから来た理由がその時初めて分かった。結局この年前記3人しかこの分野では受賞できなかった。Witt氏はMitchell説を支持する論文を発表していて、当時反Mitchell陣営の急先鋒だったChance先生がお好きなのはない。なお、50代半ばだったお二人とも今なお現役で活躍中でWitt氏などは後述のように最近PSIの結晶解析をNatureに発表している。再び閑話休題。P430とP700に関してはこの時期やった測定結果で埼玉に来てから書いたもの(16)も含めて多数の論文を発表できた(12-16)。中でもP700の吸光係数(extinction coefficient)の論文(14)は未だに引用される私のベストセラーである。

研究歴そのIV — 地下実験とEPRなど

私はこの年(1971年)の秋、この所有欲の強いKe氏のもとを去り、かねてから招ばれていたカーネギー研究所植物部門(Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology)という西海岸カリフォルニアのスタンフォード大学構内にあるやはり民間の研究所に移ってしまった。鉄鋼王カーネギーが学問の進歩などに役立てよと遺言して残した莫大な財産で運用されるこの財団は地震地学関係や動物発生学それから有名なCold Spring Harborなどいくつかの研究所を東部にもつが、これだけ西部にある。所長のC. S. French先生(知る人ぞ知るフレンチプレスの発明者)の自由にやれとの雰囲気ですらにノンビリしてしまいここに3年も居てコンピュータとエレクトロニクスばかり勉強していた。この時期にこの辺(シリコンバレー)でマイクロプロセッサが生まれたのだからいろいろ体験できて実に楽しかったが(11)、PSI関係の仕事は装置を組んだ以外ほとんど何もしていない。給料こそ大分上がっていたが相変わらずポストドクであった。そのうちFrench先生に気に入られてスタッフになれそうになったとき先生は定年(?)で所長をやめ、新しい所長は光合成屋ではなかったこともあってこの話はフイになった。スタンフォード大学はサンフランシスコの南に位置するが湾を隔てて車で1時間位東北へ行った所にカリフォルニア大学のバークレー校がある。そこには有名なCalvin(ノーベル賞ばかりで恐縮)が居たのだが、もうひとり光合成の有名人Arnon氏がいて私を招んでくれた。彼の研究室は1960年代にPSIの出口でフェレドキシンや酵素が関与するNADP還元 of 生化学的メカニズムを確立したことで有名だが、当時は「3つの光化学系説」というのに固執していた。ちなみにこの説はつい最近までときどき浮上してきていたが(17)、彼が1994年に85歳で現役のまま亡くなった後、消えた。

他に直ぐ行くところもなかったし、シリコンバレーを離れたくなかったし、Berkeleyというヒッピーの聖地にも興味があったので1974年秋に引っ越した。ここでの身分はResearch Biochemistといって大学の職員録にも載っていて、10年以上居る人はザラで単なるポストドクではない身分らしかったが決して終身雇用ではない。給料はまた大分上がった。仕事は2人の相棒と3人で2波長分光光度計でArnon説を支持するデータを出すことだった。1人でやれる実験をなぜ3人がかりでやってたのか今でも分からない。2波長分光光度計は前述のようにChance先生が開発し私が以前西村研で使っていたものである。Arnon研のはその後Amincoという会社が商品化したもの。これが私が招ばれた理由の一つと分かった。毎朝午前中一杯、午後の実験の計画のためディスカッションをやる。私の行くまではこの2人がArnon先生の指示をただ聞くだけで話は直ぐ終わっていたようだが、私はArnon先生の「3つの光化学系説」が嫌いなのですぐタテ突く。この説はP700なんか要らないという説で、吸光係数まで出している私が気に入るはずはない。当然議論は長引く。当時既に60過ぎのArnon先生はさすがに大物で30半ばの若造の話も腹を立てず辛抱強く聞いてはくれた。私の英語は以前怒りっぽいKe氏との白熱した(?)議論(debate)

でかなりうまくなっていたはずだが、ここで一段と磨きがかかった。なにしろ毎日である。午後からの実験は 5 時前には終わらせ相棒 2 人は帰宅。その後私はこの機械で自由に自分の考えた実験をやった。

Arnon 研には当時私位の歳の同じ身分のポストドクが 5, 6 人さらに助教授(やはり同じくらいの歳でデニユアはない)が数人, 皆 Arnon 先生独裁のもとに仕事をやっている。毎朝皆で仕事前にキャンパスの裏にあるコーヒー屋に抜け出す。ここで先生の悪口を中心としたおしゃべりでウサをはらす。私の英語ではとてもこのアメリカ人たちの会話に入れなかったけどリスニングの練習になった。その中でときどき出てくる語に **Underground experiment** というのがあった。どうやら核兵器の地下実験ではなくボスに無断でコッソリやる実験のことだった。私もこうして地下実験をやり, P700 に関する論文を 2 つ書いた。それを斜面になったバークレーキャンパスの上の方にある Calvin 研でのゼミでしゃべった時, 私としては不得意な数学を少し使った内容のためそこの物理化学者につつかれた以外はおおむね受けがよかったので, Arnon 先生の名前も付けて完成品の原稿を渡したのだけれど一向に見てくれない。しつこく催促して結局 1 年後によく発表できた(18,19)。

研究費は潤沢にあり, 私は職員としていろいろな設備の購入で業者との交渉やら人を雇う交渉までやっていた。Arnon 先生はついに EPR(電子スピン共鳴装置:ESR)にまで手を出し, ドイツの Bruker 社のものを一番安かったという理由で買ってしまった。機械には全く弱い先生は私がお守りをするという前提であった。ところが来て見るとまだ製品化されたばかりの試作品みたいな代物。次々に部品はすっ飛び, そのたびにサービスマンが東海岸のアメリカ支社から飛行機でやってくる。物理の PhD をもつ実に有能なアメリカ人ですっかり仲良くなりずいぶん勉強になった。液体ヘリウムが使い放題だったこともあってイギリス製の熟練を要する微妙なクライオスタットも 1 年近くで使いこなすまでになった。今度は分光計に代わって高価なこの機器で再び「3 つの光化学系説」の証明にいそしんだわけである。装置が充分使いこなせるようになった頃また夜の「地下実験」を始めた。話は戻るが 1971 年に P430 を発表したとき同じ Proc. NAS 誌の 1 号前にやはり PSI の初期受容体として「膜結合型フェレドキシン」が発表されていた(21)。液体ヘリウム温度で始めて観測できるこの信号は世間一般も私自身も P430 と同じものとして議論していたが状況証拠でしかなかった。ここへ来て私も低温 EPR を使えるようになったので可視分光法と直接に比較してもっとはっきりした結論を出そうと思ったのである。分光実験の方はカーネギー研究所で私が以前作った装置を当時の共同研究者のスタッフが未だ使っていたのでそこで一緒にやることにした。こちらは夜というわけにいかないのので, 何度か休暇をとり 100 マイルをすっ飛ばして出かけていった。バークレーとカーネギーでやっていたこの地下実験の結果を発表したのは結局埼玉大学に来てからだった(20)。結論は「P430 は Component X (A2) である」というものであった。Component X とは最初に見つかった「膜結合フェレドキシン」(Malkin-Bearden が発見, 後に Center A と命名された)とは別の鉄イオウクラスターで数年あとにカナダの研究者が発表したものである。A2 というのは又別の研究者(Sauer ら)が分光学的に観測して命名したもので, 記載されているスペクトルをプロットし直して差スペクトルを出して見ると P430 そっくりになるのだ(22)。

彼らは考察で A2 と命名し P430 とは別物として扱っているが, その理由を以下に説明する。Component X は現在 FeSx と省略される鉄イオウクラスターで大サブユニット(PsaA/PsaB)に結合しているものだが, 非常に強い還元状態(低い酸化還元電位)で初めて見えてくる EPR 信号($g = 1.76$ 付近)として発見された。Center A や少し後で見つかった Center B はもっと高い電位で還元されることから, 同じく非常に低い電位で初めて見えてくる A2 を, より初期の受容体として位置づけた。ただし Component X 発見以前にたてられた P430=Center A/B 説をそのまま受け入れてしまったため, P430=A2 (Component X) の可能性を見逃してしまった。詳細は省略するが, 私のこのとき出した「P430 は Component X (A2) である」説は当時から無視され, 最近 Ke 氏の書いた回顧録(23)でも未だ完全に無視されている。埼玉大学にきてからも O 君らががんばって実験してくれた結果これをサポートする結果が

出て論文も書いているのだが(24). ちなみに Sauer と Bearden は Calvin 研, Malkin に至っては Arnon 研に居て毎朝コーヒーショップに行く仲間だったのだが一度も PSI について討論をした覚えはない.

研究歴その V — 複合体, サブユニットそしてクロロフィル a' など

そうこうしているうち, 1978 年暮れに九大の西村先生から電話を頂き, 埼玉大学に行かないかとのこと. 埼玉大学の鈴木浩一先生からもお電話を頂いた. 滞米生活も 12 年近くなり, 両親も老いてきたことだし有り難くお受けして翌年 4 月助教授として帰国赴任. 未だ独身ながら既に 40 だった. さて埼玉大学に赴任して最初の数年は当時できたばかりの基生研(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)の客員部門助教授を兼任して頻繁に愛知県岡崎市に出張していた. 基生研では未だ何もない新しい研究室に次々と機械を購入し据え付けた. バークレーでの 2 年間の経験を買われ, 低温 EPR が購入されることになったとき, 機種選定の段階でとなりの生理研の教授とうっかりアメリカ式 debate(正論を主張すること)をやってしまい, 後でこの医学系の大ボスの大変なお怒りを買ってしまったと分かった. 結局この教授の scientific ではない根拠(何であるかここでは触れない)に基づく主張が通り, 何とあの Bruker EPR が入ってきた. クライオスタットも含めて 4 万ドル(当時約 1 千万円)払ったと Arnon 先生から聞いていたのだが, Bruker 日本支社の最初の見積は本体だけで 3 千万円というのもびっくり. 機械も外観は代わったが相変わらず初期故障の連続. ただ日本人の若いサービスの人が有能で, 1 年かけてとにかく日本ではじめてのバイオ用液体ヘリウム低温 EPR を立ち上げた(25). 2 年間の客員任期の間にかかなりの数の論文が出たがどれも人のお手伝いばかりだった.

埼玉大学では初めて持った自分の研究室でこれからはじつくりと PSI 複合体の精製に専念する決意をしていた. 私の初めての卒業研究生の一人 K 君は修士課程に残ってくれ, その後の研究室の PSI 研究の礎を作ってくれ数年後には成果が出始めた(26). 私の手製の HPLC と東ソーから頂いた高価な SW カラムを駆使してコツコツとやっていた I 君は, 修士 2 年の 1986 年秋になって分子量 8 千位のタンパク質をハウレンソウからかなり大量にとった. 2 人で電車にのって当時江東区あたりにあった ABI 東京支社に出かけ N-末端アミノ酸配列解析をお願いした. I 君の試料はキレイで量も充分な上やってくれた女性が実に有能な方だったので一発で 30 残基以上判明してしまった. 配列をよく見ればシステインが 3 つもあつたりしたのに例の不勉強がたたり重大さに気付かなかった. これが Center A/B のアポタンパク質(PsaC)であることが分かったのは, このシーケンスをその頃世界で初めて葉緑体(タバコ)DNA の全塩基配列をきめ発表されたばかりの杉浦昌弘教授(名古屋大遺伝子実験施設)に送り, 結果を知らされたその年の暮れである. ORF(未同定遺伝子)の中にこのタンパク質のアミノ酸配列にそっくりのものを見つけたとのこと. ちなみに, この杉浦グループの仕事はほぼ同時に完成したゼニゴケ葉緑体 DNA の仕事(京大の小関・大山グループ)の業績とともに, この後世界中で始まった全ゲノム研究の嚆矢で我が国が誇るべき業績である. 後で分かったが当時阪大とデンマークの研究所でそれぞれ全く独立にシーケンスが出つつあり, 翌 1987 年はこれらの論文が同時に出て久しぶりに世界の檯舞台に出た喜びを味わった(27). 1987 年という年は, 春埼玉大学キャンパスで 1000 人からの参加者のあった日本植物生理学会大会を開催するお世話をしたり, 教授に昇進, 夏には 3 ヶ月アメリカに出張して, 私的には東京に引っ越ししたり, かつての P430 の 1971 年とともに私にとって印象深い年であった. その後修士を卒業後会社にいていた S 君が出来たばかりの博士課程に戻ってきた. 遺伝子の技術を持ってきてくれて, それから理研の井上頼直さんの研究室から頂いた好熱性シアノバクテリアのいくつかの PSI サブユニットの配列決定が続いた(28-30). そのうち F 君が偶然熱ショックタンパク質(HSP: 分子シャペロン)の遺伝子をひっかけ(31), それを機会にこの世界にも入り込み, 丁度このころ来てくれた仲本準氏が現在大きく発展させつつある(32).

話は少しさかのぼる. 1984 年暮れか 1985 年初めだったか定かではないが基生研に教授で移ったば

かりの旧友村田紀夫氏に東大生研(生産技術研究所)の渡辺 正氏(当時助教授)を紹介された。彼は工学系の化学者だがクロロフィル類の HPLC による定量分析法を開発し、いろいろな植物試料を分析しているうちにそれまで人工産物とされていたクロロフィル a のエピマ(Chlorophyll a': Fig.7)がどの試料にもクロロフィル a の数百分の1だけ含まれていることに気付いた。その量比がクロロフィル a:P700 比に近いとらみ、「P700=Chlorophyll a'」仮説を立てた。私は P700 定量の権威ということで、村田氏が紹介したわけである。早速手伝った。その結果は P700:a' 比は 1:2 ということで 1985 年に発表された(33)。当時 P700 はクロロフィル a の 2 量体(ダイマー)と考えられていたから、このときの結論は「a ではなく a' のダイマーである」というものだった。翌 1986 年修士課程に入ってきた K 君が大サブユニット 2 つだけで光化学活性をもつ標品を作ってくれた。これは当時間違いなく世界初だったのだが、K 君の名人芸的一面もあり、実際発表したのは翌年卒論で入ってきた T 君がより再現性のある方法を開発してくれてからであった(35)。当時、私も特に強い界面活性剤(LDS)を使って PSI 標品を作った。これはほんの少しだけクロロフィル a が残っているほとんど無色の標品で大サブユニット(現在の PsaA と PsaB)だけで構成され活性は全くない。これに、渡辺さんがくれた Chlorophyll a' の純品を混ぜたら P700 が出来るかしらと思ったのだ。結果は予想通りで(Fig.8), 化学的酸化還元(中段), 明暗(下段)共に P700 の差スペクトル(上段)とかなり良く似ている。この実験は今振り返ると自分でほとんど全てやった最後のものになってしまったが、とにかくすぐに発表した(36)。有名な国際誌だから世界中皆読んだはずだが反響はなかった。1990 年代になって岡崎であったシンポジウムでこの話をしたら、アメリカの研究者たちは初めて聞くようなビックリした顔をしたが、その後も相変わらず総説などでもほとんど無視されて来た。その間、渡辺研究室で抽出法などが改良された結果、どうしても 1:1 になるということで(34)、私たちはヘテロダイマーの可能性を示唆した(36)。

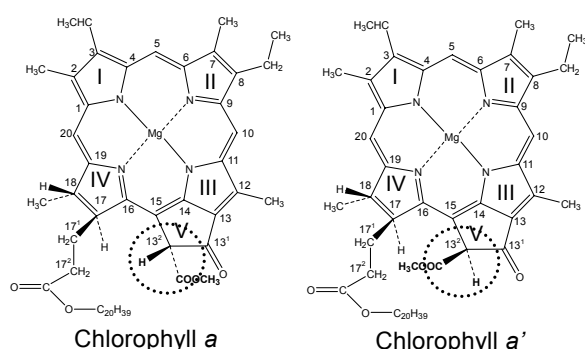


Fig.7. Structures of chlorophyll a and its epimer, chlorophyll a'. Difference is shown by the circles.

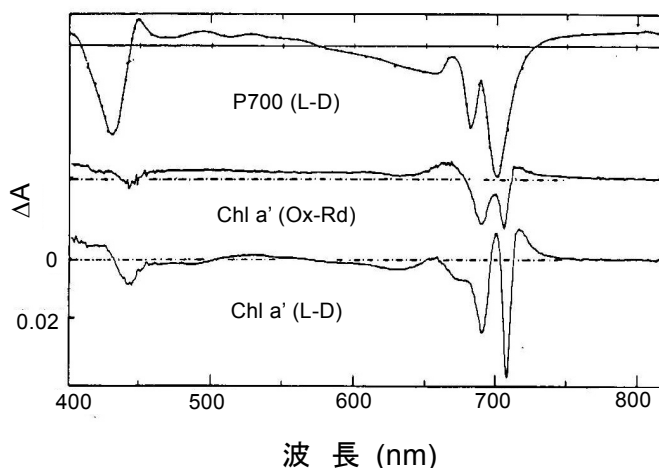


Fig.8. Light-minus-dark difference spectrum of P700 (upper), chemically induced (middle) and light induced (bottom) oxidized-minus-reduced difference spectra of reconstituted P700 (PsaA/PsaB protein complex + chlorophyll a').

話は変わって 1992 年名古屋で国際光合成会議があったとき、私が座長をやった PSI の部会の発表者の一人は何とあの Witt 先生だった。多分 80 歳近かったと思うのだが、PSI の結晶解析の 3 次元構造を発表して話題をさらった。翌日の朝日新聞に座長の私のコメントと共に載った。まだここでは P700 の三次構造ははっきりしていなかった。それから 10 年近く後に彼らは相当細部まで立ち入った構造を Nature 誌に発表した。もう 90 歳近いはずの Witt 氏がどこまで関与したのかは別として、この 2001 年の論文には、P700 の構造が Chlorophyll a と Chlorophyll a' のヘテロダイマーとして姿を現した(37)。私たちの最初の発表から 20 年近く経って Chlorophyll a' もようやく認知されたようだ。

おわりに

ここ十年近く雑用にかまけて私の研究活動は低下, それでも学生諸君ががんばってくれて, 前任の鈴木先生のヨウシュヤマゴボウまで含めた 1 報をなんとかものした(38). どうやら私にとって最後の PSI 関連の原著論文になりそうである. ここ数年大昔のサイクリック系関連の仕事に戻り, Y 君, S 君ががんばってくれた. そして今最後の卒研究生 U 君がよい結果を出してくれてしめくれるのを楽しみにしている. 最近研究室に来てくれた若い日原(園池)由香子さんも PSI 関係で DNA マイクロアレーを駆使した研究などで既に世界的だし, 仲本君もシアノバクテリアの HSP では世界でも指折りの研究者である. この間私がお手伝いした PSI 以外の仕事は結構あるが, 矢部さん(東大分生研)の Patch clamp, 関島先生・藤倉さん(埼玉県立大)のカイコ ACPIP, それにクロロフィル a' 関係で現筑波大の小林君などの仕事など退職後もお手伝いするつもりでいる. これまで私を支えてきてくれた大勢の学生さんたちや西城戸講師それに生化学科・分子生物学科をはじめ多くの先生方に深く感謝し, この独断と偏見に我田引水と自画自賛の拙文を終わらせて頂く.

参考文献

1. Kok B. On the reversible absorption change at 705 μm in photosynthetic organisms. *Biochim Biophys Acta* **22**: 399-401 (1956).
2. Hiyama T. Photosystem I: Structures and Functions. in '*Handbook of Photosynthesis*' M. Pessarakli ed., Marcel Dekker, pp 195-217 (1996);
改訂版現在印刷中(2004 年出版予定)
3. 檜山哲夫 光化学系 I を構成する蛋白質. *蛋白質 核酸 酵素* **34**: 768-772 (1989).
4. 檜山哲夫 鉄イオウクラスタの生化学. *CACS Forum* **8**: 2-8 (1988).
5. Hiyama T., Fukui S., Kitahara K. Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *J. Biochem (Tokyo)* **64**: 99-107 (1968).
6. Hiyama T., Nishimura M., Chance B. Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Two cyclic pathways of photosynthetic electron transfer in the pale green mutant. *Plant Physiol.* **46**: 163-168 (1970).
7. Hiyama T., Nishimura M., Chance B. Energy and electron transfer systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Photosynthetic and respiratory cytochrome systems of the pale green mutant. *Plant Physiol.* **44**: 527-534 (1969)
8. Hiyama T., Ke. B. Laser-induced reactions of P700 and cytochrome f in a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *Biochim Biophys Acta* **226**: 320-327 (1971).
9. 檜山哲夫 生物試料の微小吸収変化の測定, 「微小スペクトル変化の測定」(井上頼直編), 学会出版センター (1983).
10. 檜山哲夫 ミリ秒・マイクロ秒の領域, 「計算機分光学の原点」(前田浩五郎編), pp83-92, 時潮社 (1998).
11. 檜山哲夫 雑談 --- パソコン昔話など 埼玉大学総合情報処理センターニュース **7**: 16-19 (1999).
12. Hiyama T., Ke B. A new photosynthetic pigment, "P430": its possible role as the primary electron acceptor of photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 1010-3 (1971).
13. Hiyama, T., Ke, B. P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. In *Proc. II International Congress of Photosynthesis*. Ed. G. Forti, pp491-497 (1971).
14. Hiyama, T., Ke, B. Difference spectra and extinction coefficients of P 700 .

- Biochim Biophys Acta* **267**: 160-71 (1972).
15. Hiyama T., Ke B. A further study of P430: a possible primary electron acceptor of photosystem I. *Arch Biochem Biophys* **147**: 99-108 (1971).
 16. Hiyama T. Quantum yield and requirement for the photoreduction of P700. *Physiol. Veg.* **23**: 605-610 (1985).
 17. 檜山哲夫 光化学系 I 不要説—光合成明反応の見直しは必要か? 蛋白質 核酸 酵素 **41**: 2130-2131 (1996)
 18. Hiyama T., McSwain. B.D, Arnon D.I. Correlation of redox levels of component electron carriers with total electron flux in an electron-transport system. P-700 and the photoreduction of NADP⁺ in chloroplast fragments. *Biochim Biophys Acta* **460**: 65-75 (1977).
 19. Hiyama T., McSwain. B.D, Arnon D.I. Evidence for two types of P-700 in membrane fragments from a blue-green alga. *Biochim Biophys Acta* **460**: 76-84 (1977).
 20. Hiyama T., Fork D.C. Kinetic identification of component X as P430: a primary electron acceptor of Photosystem I. *Arch Biochem Biophys* **199**: 488-496 (1980).
 21. Malkin R., Bearden A.J. Primary reactions of photosynthesis: photoreduction of a bound chloroplast ferredoxin at low temperature as detected by EPR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. **68**: 16-19 (1971).
 22. Sauer K, Mathis P, Acker S, van Best J.A. Electron acceptors associated with P-700 in Triton solubilized photosystem I particles from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **503**: 120-134 (1978).
 23. Ke B. P430: A retrospective, 1971-2001. *Photosynthesis Res.* **73**: 207-214 (2002).
 24. Hiyama T., Ohinata A., Kobayashi S. Paraquat (methyl viologen): Its interaction with primary photochemical reactions. *Z. Naturforsch.* **48c**: 374-378 (1993).
 25. 檜山哲夫 電子スピン共鳴法. 実験生物学講座 4 生化学的実験法) 丸善 (1983).
 26. Hiyama T., Katoh A., Shimizu T., Inoue K., Kubo A. Preparation and properties of photosystem-I reaction center complex. in *Progress in Photosynthesis Research*, Biggins J. ed. Vol II, pp45-48, Martinus Nijhof Publishers (1987) .
 27. Hayashida N., Matsubayashi T., Shinozaki K., Sugiura M., Inoue K., Hiyama T., The gene for the 9 kd polypeptide, a possible apoprotein for the iron-sulfur centers A and B of the photosystem I complex, in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet* **12**: 247-250 (1987).
 28. Shimizu T., Hiyama T., Ikeuchi M., Koike H., Inoue Y. Nucleotide sequence of the *psaC* gene of the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3644 (1990).
 29. Shimizu T., Hiyama T., Ikeuchi M., Inoue Y. Nucleotide sequences of the *psaA* and *psaB* genes encoding the photosystem I core proteins from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Mol Biol* **18**: 785-91 (1992).
 30. Sue S., Sugiya K., Furuki M., Shimizu T., Inoue Y., Nakamoto H., Hiyama T. Nucleotide sequence of the *psaD* gene from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Photosynthesis Res.* **46**: 265-268 (1995).
 31. Furuki M., Tanaka N., Hiyama T., Nakamoto H. Cloning, characterization and functional analysis of groEL-like gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which does not form an operon with *groES*. *Biochim Biophys Acta* **1294**:

106-110 (1996).

32. Nakamoto H., Hiyama T. Heat-shock proteins and temperature stress in '*Handbook of Plant and Crop Stress*', M. Pessarakli ed., Marcel Dekker, pp 399-416 (1999).
33. Kobayashi M., Watanabe T., Nakazato M., Ikegami I., Hiyama T., Matsunaga T., Murata N. Chlorophyll a'/P-700 stoichiometries in higher plants and cyanobacteria determined by HPLC analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **936**: 81-89 (1985).
34. Watanabe T., Kobayashi M., Nakazato M., Ikegami I., Hiyama T. Chlorophyll a' in photosynthetic apparatus: Reinvestigation. in *Progress in Photosynthesis Research*, Biggins J ed. Vol I, pp303-306, Martinus Nijhof Publishers (1987).
35. Hiyama T., Yanai N., Takano Y., Ogiso H., Suzuki K., Terakado K. A Photosystem-I Reaction center complex constituted only by two subunits. in *Current Research in Photosynthesis*, Vol II, 587-590 (1990).
36. Hiyama T., Watanabe T., Kobayashi M., Nakazato M. Interaction of chlorophyll a' with the 65 kDa subunit protein of photosystem I reaction center. *FEBS Lett.* **214**: 97-100 (1987).
37. Jordan, P. Fromme, P. Witt, H. T. Klukas, O. Saenger W., Krauss, N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**: 909-917 (2001).
38. Hiyama T., Yumoto K., Satoh A., Takahashi M., Nishikido T., Nakamoto H., Suzuki K., Hiraide T. Chromatographic separation of a small subunit (PsbW/PsaY) and its assignment to Photosystem I reaction center, *Biochim Biophys Acta* **1459**: 117-124 (2000).

水生食虫植物ムジナモの消化・吸収と微細構造

Ultrastructure of *Aldrovanda vesiculosa* during digestion and absorption

理学部生体制御学科 金子 康子

Department of Regulation Biology, Faculty of Science

Yasuko KANEKO

Aldrovanda vesiculosa, an almost extinct aquatic carnivorous plant, was propagated successfully in vitro and maintained ex-vitro through its whole life cycle. Preliminary ultrastructural studies were conducted to investigate the function of gland cells on carnivorous leaves during digestion and absorption.

ムジナモ(*Aldrovanda vesiculosa* L.)は水面下に浮遊し、ミジンコなどの水生小動物を捕食する食虫植物である(図 1, 矢印:ミジンコ). かつてはアメリカ大陸を除く世界各地に点在していたが, 第二次世界大戦以降の急速な環境変化により激減し, 世界的に絶滅が危惧されている. 日本では, 1890 年に利根川流域内で牧野富太郎により発見され, 捕虫葉を輪生する植物の形がムジナ(タヌキの別名)の尾に似ていることから, ムジナモと命名された. 第 2 次世界大戦後までは, 豊富な湧水のあった埼玉県羽生市宝蔵寺沼を中心に多量に増殖していたが, その後の水環境の悪化に伴い次々と姿を消した. 現在は国指定の天然記念物として, 国内最後の自生地であった宝蔵寺沼で羽生市教育委員会とムジナモ保存会会員の尽力により維持されている. 私達の研究室では, このムジナモを次の 3 つの目的で研究に用いてきた: ①ムジナモを組織培養技術によりクローン増殖させ, 野外へもどす方策を確立すること, ②ムジナモが絶滅の危機にさらされている要因を明らかにすること, ③ムジナモを実験材料に用いて生命現象を解明すること, である. これまでに, クローン増殖したムジナモを野外へ出して生活環を回すことができるようになり(1), 現在, ムジナモの生育と水環境要因の関連を追究するための研究を続けている. また, クローン増殖により年間を通して実験材料を得ることができるようになり(図 2), ムジナモの生活環にみられるユニークな機能と微細構造とを解明するための研究にも着手した(2). 本稿では, そのうちのひとつである, ムジナモの消化・吸収機能と微細構造に関する研究について紹介したい.

ムジナモは, 二枚貝のような形をした捕虫葉で獲物をはさみ込んで捕らえ(図 1), そこで, 獲物の消化と養分の吸収を行う. 若い捕虫葉の片側を切り出し, 走査電子顕微鏡の直接観察法(3)で観察すると, 捕虫葉の内側表面に 3 種類の腺毛が観察できる(図 3). 獲物を感知し運動細胞に刺激を伝える細長い感覚毛(図 3:SH)が 2 列に並び, 消化酵素を分泌する消化腺毛(図 3, 4:D)が点在している. 葉縁部には養分を吸収すると考えられている X 型の吸収毛(図 3, 5:Ab)が並ぶ. ムジナモについて初めて学術的な記載をしたのはチャールズ・ダーウィンで, 消化腺毛は消化のみを行い, 養分は吸収毛から取り込まれると考えた(4). 1904 年にフェンナーは, 切り出した捕虫葉に肉汁を吸収させる実験を行い, ダーウィンの説とは異なり消化腺毛は消化と吸収の両方を行うとした(5). それから約 100 年後の現在でも, いまだにムジナモの消化腺毛と吸収毛の機能の解明にはいたっていない.

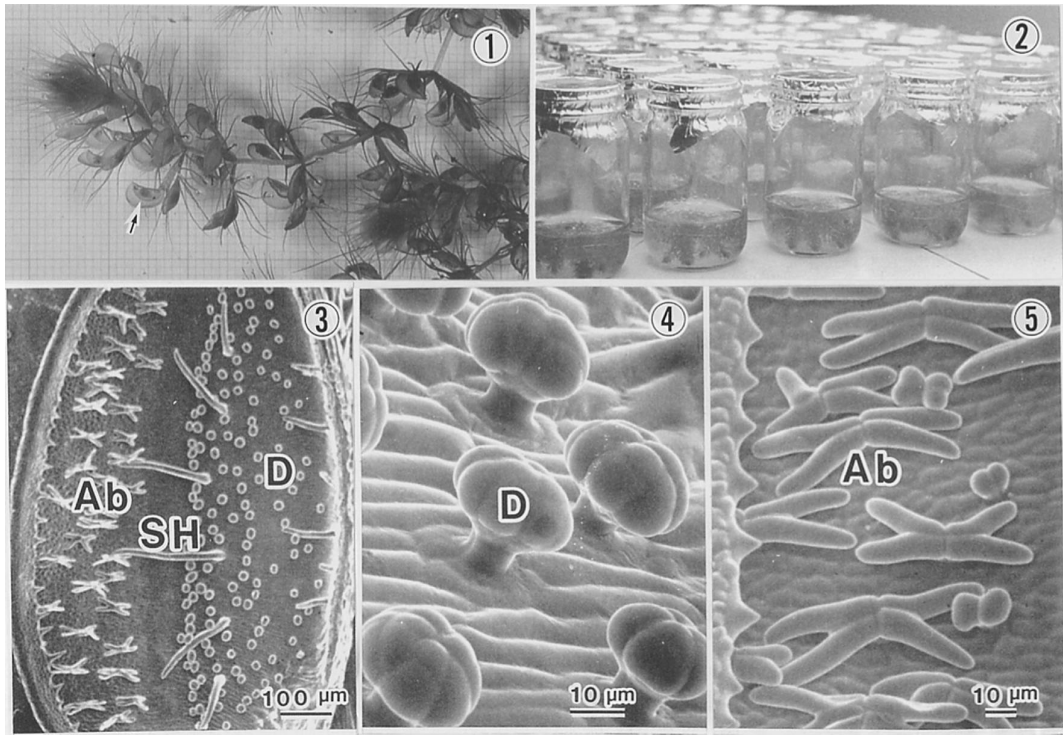


图 1-5

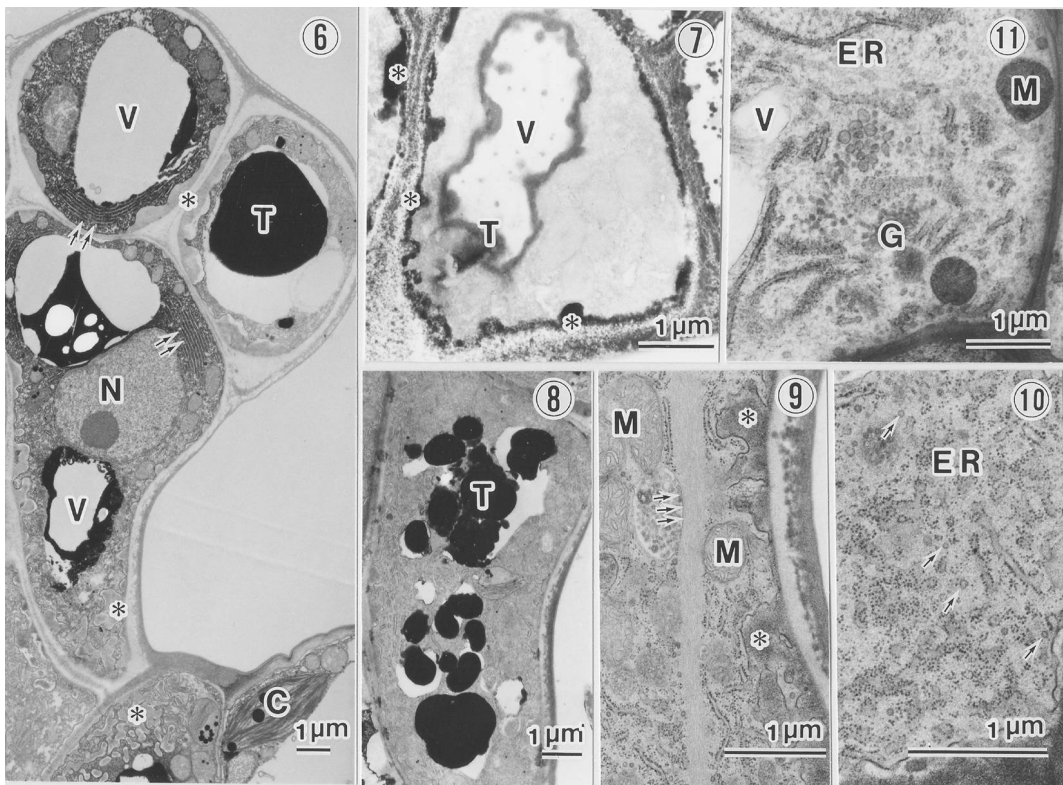


图 6-10

成熟した消化腺毛の微細構造を透過電子顕微鏡で観察すると、いくつかの特徴的な構造が存在することがわかる(図 6). 液胞(V)には電子密なタンニン(T)のかたまりがあり(タンニン液胞と呼ばれる), 細胞壁は細胞内部に向かって突出している(図 6, 8, 9:※印). この細胞壁の突出は分泌や吸収を行う植物細胞に特徴的に見られる構造であり, 図 6 の下部に見られるように, 迷路 (labyrinth) のように入り組んだ構造を取ることもあることからラビリンチン壁 (labyrinthine wall) と呼ばれる. また, 多数の層が重なった層状のER(小胞体)がしばしば見られる(図 6:2 本矢印). 消化酵素のひとつである, 酸性フォスファターゼの局在をセリウムを用いた細胞化学法で調べると, 主に消化腺毛頭部の細胞壁突出部に強い酵素活性が確認できた(図 7:※印)(6). 切片上で X 線分析を行った結果, 図 7 の細胞壁の電子密な沈殿には反応生成物の局在を示すセリウムが含まれるが, 液胞(V)中の電子密な部分(タンニン;T)ではセリウムは検出されずカルシウムが含まれていた(7). 次に, 実際にミジンコを捕食中の消化腺毛の微細構造を観察し, 捕食前と比較してみることにした(図 8, 9, 10). 捕食前は一塊であることが多かった液胞中のタンニン(図 6:T) が多数の小塊に分かれ(図 8:T), タンニンを含む液胞自体も細分化していることが多かった. タンニン液胞の変化と, そこに存在するカルシウムの作用が消化腺毛の細胞機能にどのように関わっているのか, 興味深い. また捕食中の消化腺毛の柄の細胞中には多量のアクチン繊維の束がしばしば長軸方向に配置していた(図 9:3 本矢印). この繊維の束にミトコンドリア(M)などの細胞小器官や ER 膜などが密接している様子も見られた. 活発に活動している細胞内の構造や物質輸送にこの繊維の束が関与していることも十分考えられる. さらに, 捕食前は層状に配置していることの多かった ER(図 6:2 本矢印)は, 筒状の構造をとることが多くなった(図 10:矢印). 捕食中の消化腺毛に見られたこれら特徴的な微細構造の意義については, これから一つ一つ検討していく必要がある. しかし, 消化腺毛が種々の分解酵素を分泌するだけではなく, 柄の細胞を介して, 吸収も含めた活発な物質輸送を行っている可能性は大いにある.

一方, 吸収毛はどのような微細構造を持つのであろうか. 図 11 は, 急速凍結法により瞬時に凍結固定した吸収毛細胞の微細構造である(8). ここでも多くの ER やゴルジ体(G), さまざまな小胞類が観察され, 活発な物質輸送が起こっていることが示唆される. ムジナモが獲物を消化・吸収する過程で, 消化腺毛や吸収毛がそれぞれどのような役割分担をおこなっているのか, それぞれの機能とそれを担う微細構造を明らかにするための研究は端緒についたところである.

文献および注釈

1. Y. Kaneko, K. Atsuzawa, K. Nitta, A. Takatori, and H. Matsushima, *Proc. 4th International Carnivorous Plant Conference*, 197-199 (2002).
2. Y. Kaneko, K. Atsuzawa, K. Nitta, A. Takatori, and H. Matsushima, *Proc. 4th International Carnivorous Plant Conference*, 161-163 (2002).
3. T. Saito, T. Hirosawa, S. Horiuchi, A. Murakami, and H. Matsushima, *J. Electron Microsc.*, **44**, 39-44 (1995).
4. C. Darwin, *Insectivorous Plants*, John Murray, London, (1875)
5. C. A. Fenner, *Flora*, **93**, 335-434 (1904)
6. 厚沢季美江, 修士論文(2004)
7. X 線分析では日立サイエンスシステムズの中澤英子氏, 山田満彦氏にお世話になった
8. 新田浩二, 未発表

新しい高圧力の科学

埼玉大学理学部物理学科 毛利 信男

高圧力の科学と技術 ―自然から学び、自然を超えて―

現代物理学の夜明け

人類が誕生して以来、人類を取り巻く自然環境にそれほど大きな変化があったとは思われないが、その環境の下で経験的に学び、実証し、それを継承してきた知恵、それが科学である。その科学は、特に 20 世紀において“革命”といわれる目覚ましい進展があったことは周知の通りである。

20 世紀の前夜ともいえる、1900 年 12 月 14 日、ドイツの物理学会で M. Planck が「物体による光の放出と吸収における古典論のパラドックスを解決するには、放射エネルギーはバラバラのかたまりの形でしか存在し得ないと仮定すればよい」と講演したときからその革命がはじまった。

即ち、“エネルギーは量子化されている”という現在では常識となっていることが、そのとき初めて仮定として提案されたのである。これは人類が自然現象から学び取った究極の知恵である。

量子力学と物質科学

この“量子”の概念は、それまで形而上学的存在であった原子や電子の描象を、その当時の常識的思考の範疇を超えた枠組みの中で再構築することを促し、それらの実像は粒子と波動という一見矛盾する二重の性質を兼ね備えているものとして理解されるに至った。

つまり、それらの示す現象は、単に粒子として取り扱うニュートン力学を基礎とした記述では表現できず、量子力学という微視的現象を取り扱うまったく新しい理論体系によってその本質が明らかになってきた。そのなかで、特に物質科学は格段の進展を見せた。

その理由は、物質の性質、すなわち、物性を決めているのは物質中の電子の挙動そのものであり、電子は粒子でありながら波動の性質をもつとも顕著に現す量子力学に従う典型的な粒子だからであった。

科学における高圧力の役割 ―低温の生成と量子現象―

状態方程式

$$PV = RT$$

理想気体

$$\left(P + \frac{a}{V^2} \right) \cdot (V - b) = RT \quad \text{実在気体} \quad \text{van der Waals}$$

1908 年 ヘリウムガスの液化に成功 Kamerlingh Onnes

1911 年 水銀の超伝導現象を発見

物性の多様性と相転移

“すべての物質は超高压下で相転移を起こす” P.W.Bridgman

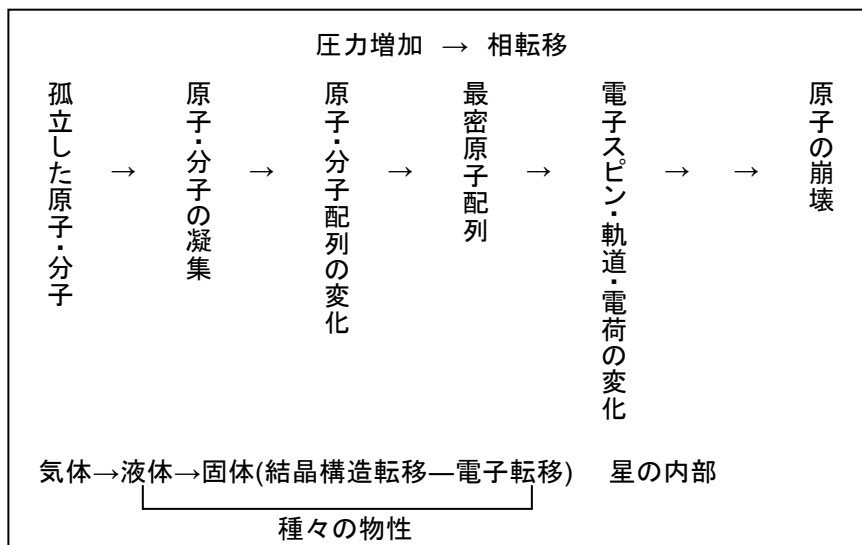
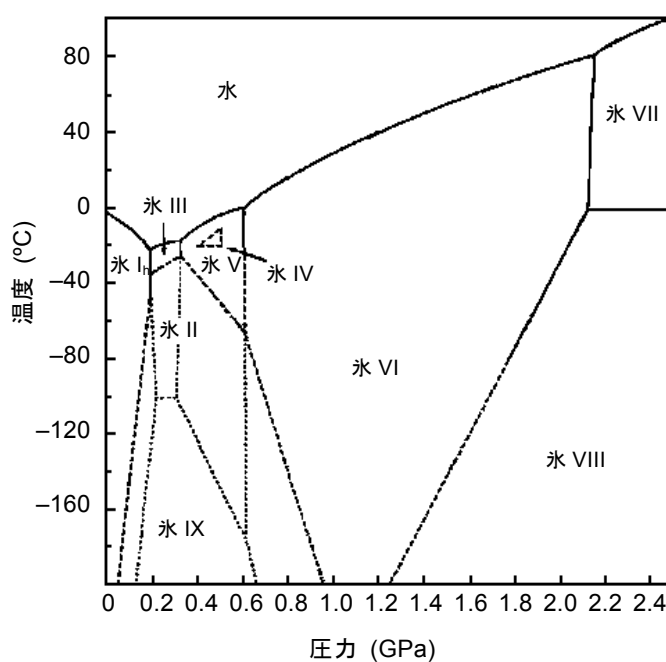


図 1 加圧による物質の状態変化

表 1 IV-B 族元素固体の加圧に伴う結晶構造の推移

	結晶型	配位数(C.N.)	充填率(P.F.)
圧 力 ↓	グラファイト型(六方晶)	3	0.171
	ダイヤモンド型(立方晶)	4	0.340
	β -Sn 型(体心正方晶)	6	0.535
	Sn-II 型(立方晶)	6.2	0.680
	Pb 型(面心立方晶)	12	0.740
	Pb-II 型(六方晶)	12	0.740

氷の相図



絶縁体-金属転移

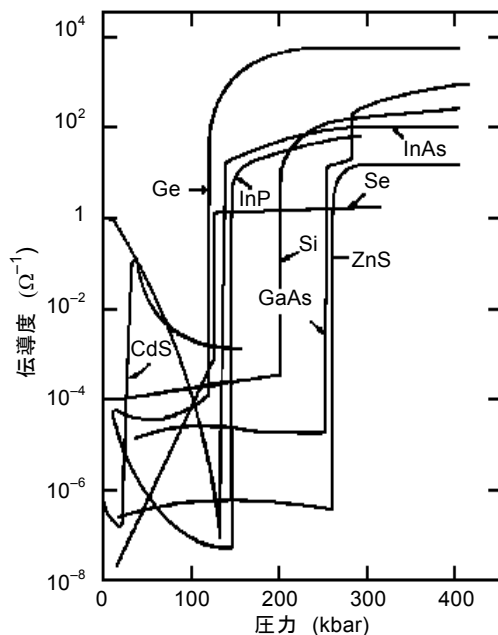


図3 種々の物質における半導体-金属転移

自然界にない未踏の領域への挑戦

1946年にノーベル物理学賞を受けた Bridgman は 1963 年の遺稿で下記のように述べている.

「It is, nevertheless, I believe, the present consensus that the most important immediate problem of technique in this field is to find methods of producing stress systems which are truly hydrostatic. The technical problems are particularly challenging in the important field of combined high pressure and low temperature, a field which has no counterpart in nature.」

分子解離と水素結合

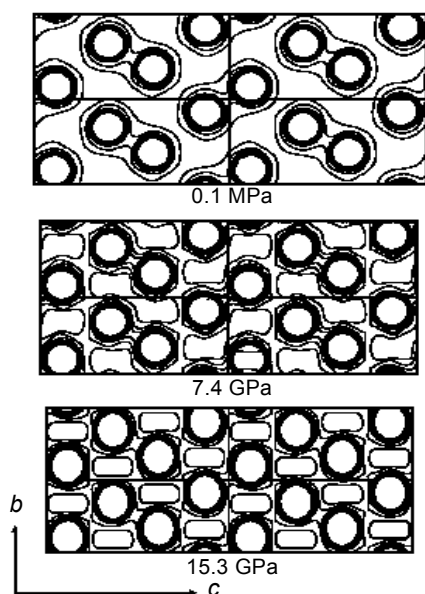


図4 0.1 MPa, 7.4 GPa, 15.3 GPa における
固体ヨウ素の bc 面内での電子分布

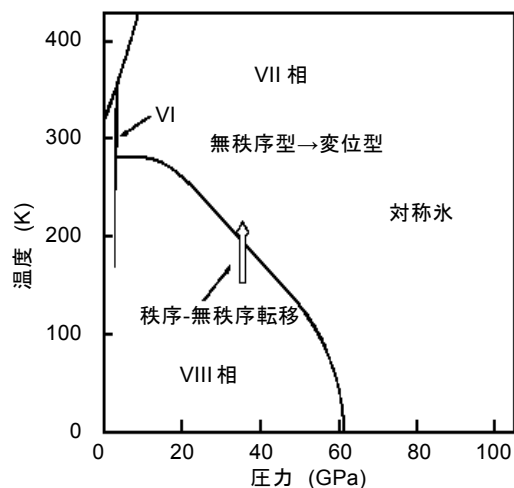


図5 氷の VII 相と VIII 相及び対称氷の概略相図
熱力学第 3 法則の問題
 $T = 0$ でエントロピーはゼロ

電子相転移

磁性

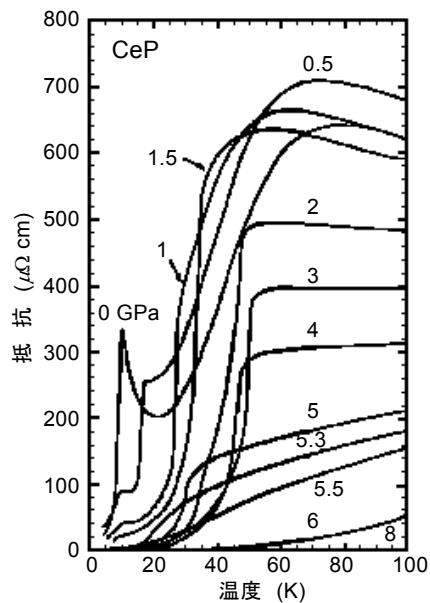


図 6 種々の圧力下における CeP の電気抵抗の温度変化

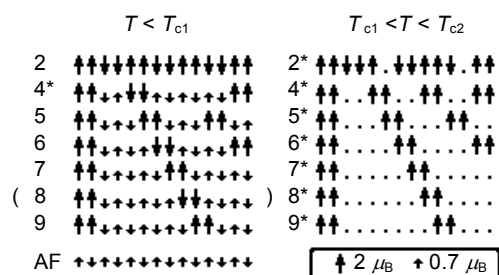
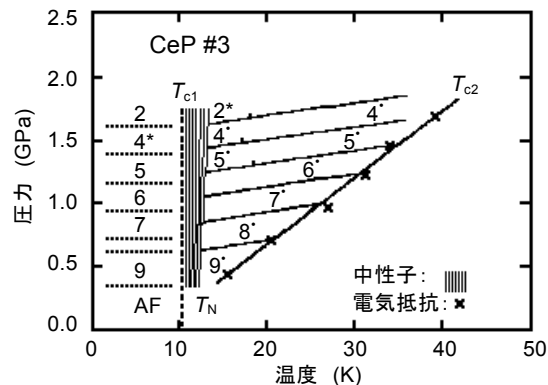


図 7 圧力と温度に依存する CeP の磁気構造

磁性-超伝導

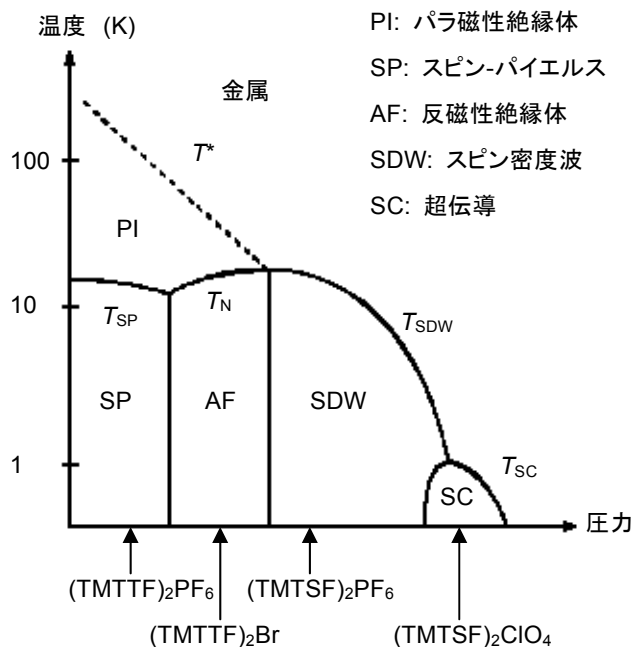


図 8 (TMTTF) $_2$ X, (TMTSF) $_2$ X 系の相図

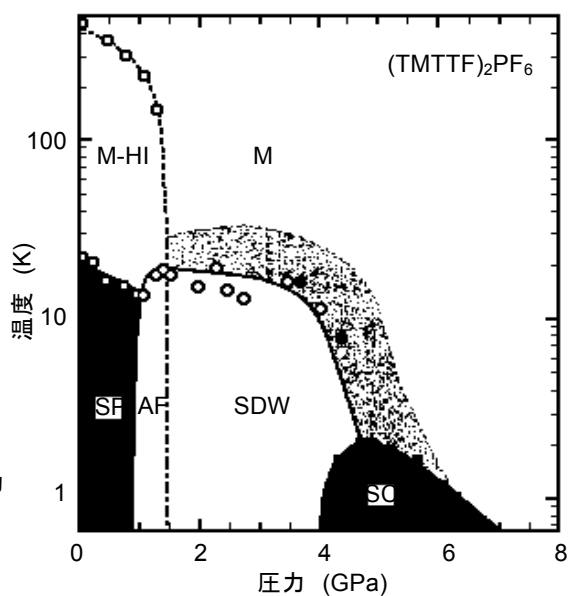


図 9 (TMTTF) $_2$ PF$_6$ の相図

M-HI: モット-ハバード絶縁体相, SP: スピンパイエルス相,
AF: 反強磁性相, M: 金属相, CDW: 電化秩序相, SC: 超伝導相

元素の超伝導

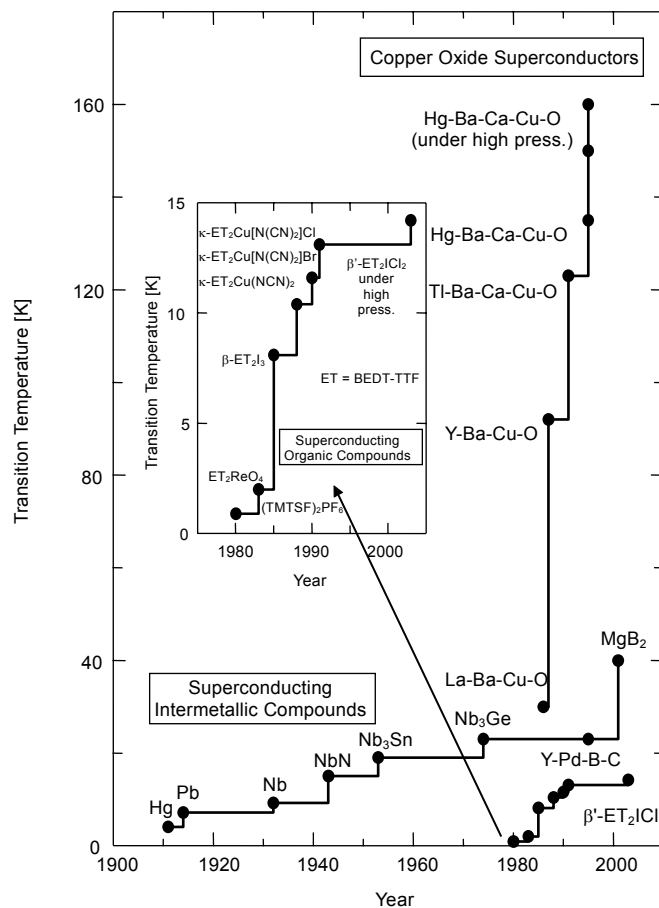
 高圧下で超伝導が発見された元素

 超伝導を示す元素

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Lr															
		La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb		
		Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No		

図 10 超伝導を示す元素

超伝導転移温度の変遷



有機超伝導体の世界記録温度を更新 = 埼玉大と東大物性研の研究グループ

超伝導研究の分野で将来の実用性が有力視されている有機物の超伝導体について、埼玉大と東大物性研究所の研究グループは 22 日、超高圧力を掛けることで、現象の現れる温度を世界記録より 1 度上げることに成功したと発表した。



(時事通信社インターネット速報 2003/01/22-15:37)

詳細は、1 月 23 日の埼玉新聞、東京新聞、日経、産経、1 月 28 日読売の各誌朝刊に掲載されました。

高圧技術の身近な応用例

動力源： 蒸気機関、油圧機器・・

圧縮成形： 密度の高い機械部品、線材、・・

物質合成：

物質の相転移を利用： 人工ダイヤモンド、立方ホウ化窒素・・

化学反応速度を利用： アンモニア、ポリエチレン、アルコール・・

物質精製：

圧力晶析法： 医薬品、高純度結晶・・

超臨界流体抽出法： 人工水晶、カフェインレスコーヒー・・

食品加工：

殺菌： ジャム、ジュース・・

酵素の不活性化： 生酒、グレープフルーツジュース、・・

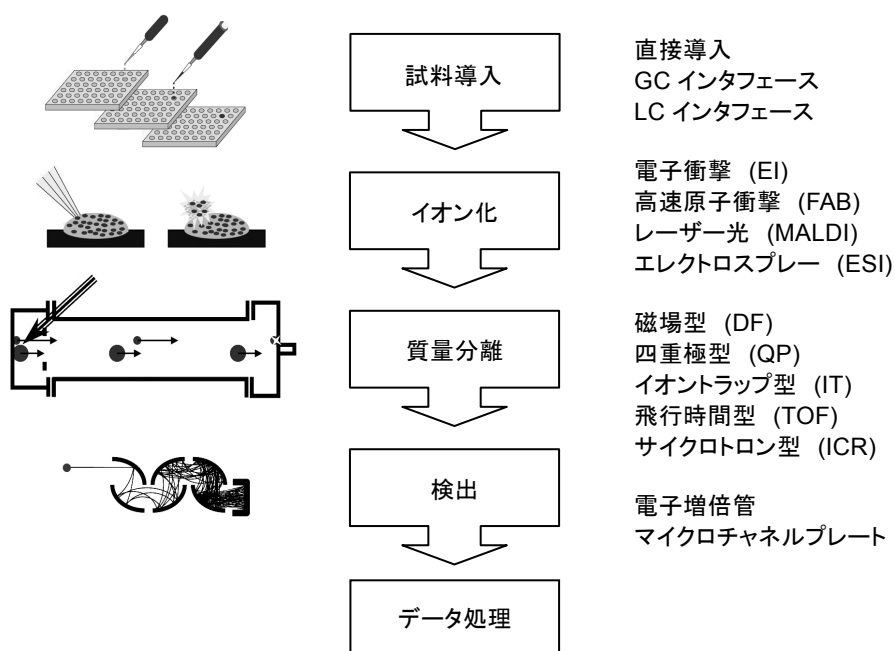
アレルギーの除去： 低アレルギー化米飯

・・

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOFMS)の開発とその歴史について

株式会社島津製作所 ライフサイエンスビジネスユニット ライフサイエンス研究所 渡邊 俊宏

質量分析計の機器構成



‘MALDI’それは 1980 年代に開発された

1980 年代の主なイオン化方法

EI, CI for GCMS Sample

FD, FAB, SIMS for Low/Middle M.W. Organic Sample

Plasma Desorption for High M.W. Organic Sample

1980 年代の主な質量分離方法

Sector (Double Focus)

Quadrupole

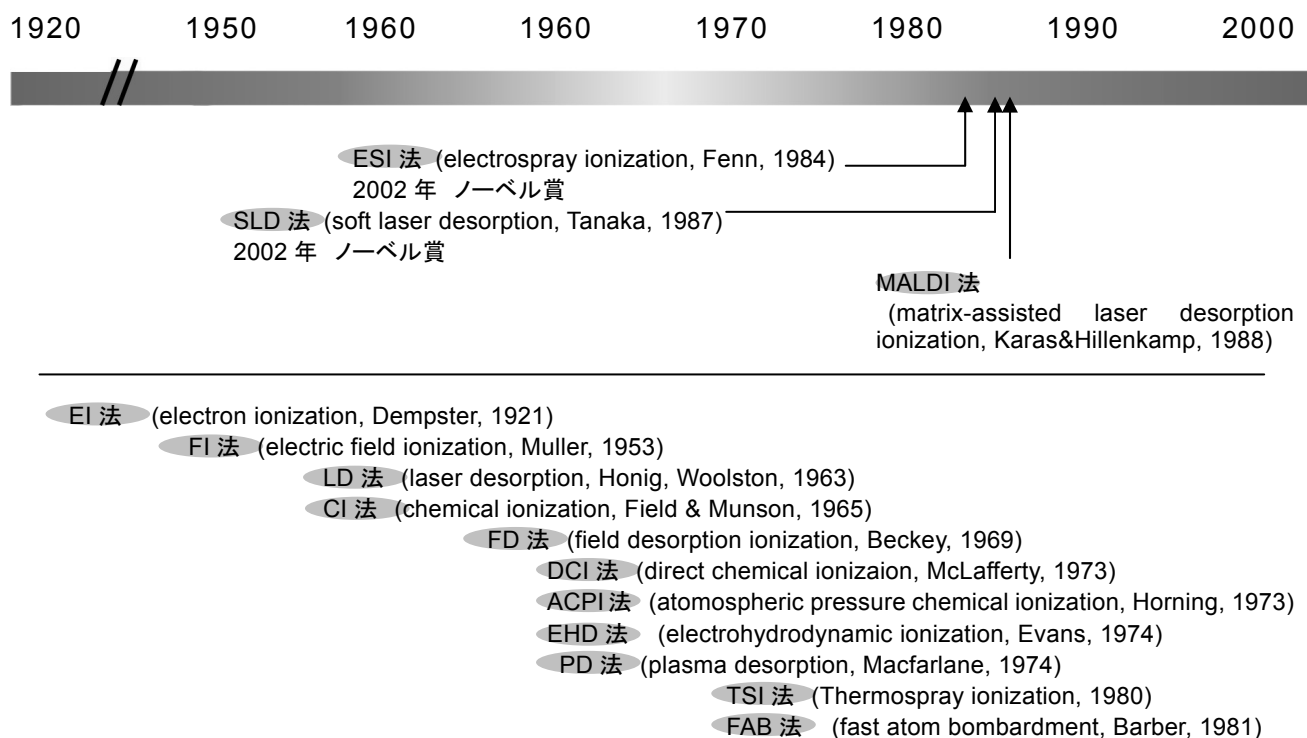
Ion Trap (QIT, FTMS)

ToF

Question: **What is ToF?**

Answer: **Toy of Fysicist**

Ph

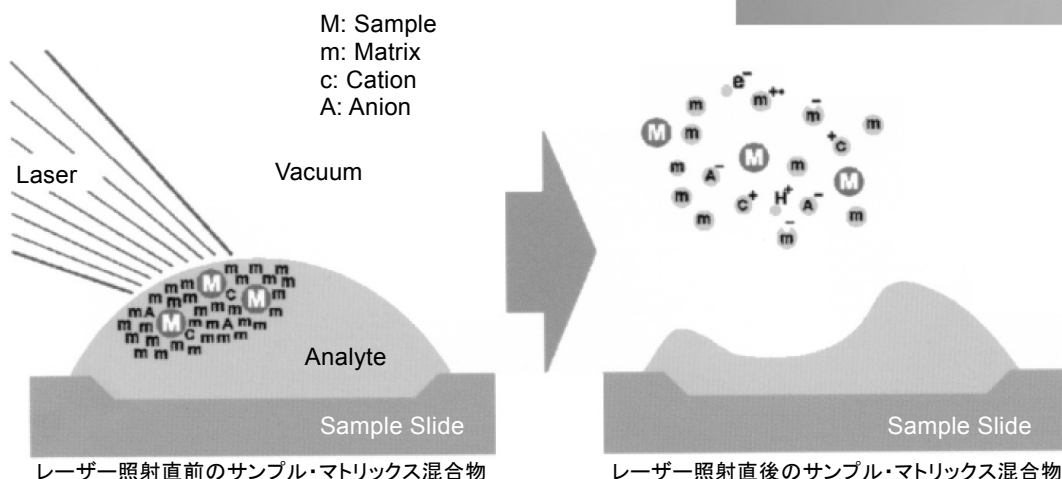
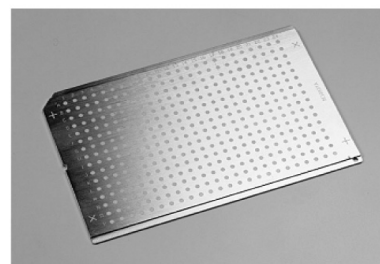


質量分析におけるイオン化法の発展

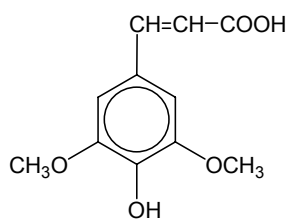
マトリックス支援レーザー脱離イオン化

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI

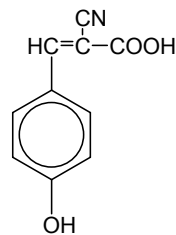
- ◎ 適用可能な化合物が多い
- ◎ イオン化室の汚れがほとんどなく保守が容易
- ◎ 主に一価のイオンが発生するため解析が容易
- × 定量性に乏しい



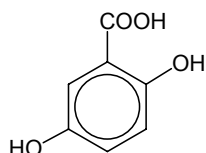
マトリックスの選択



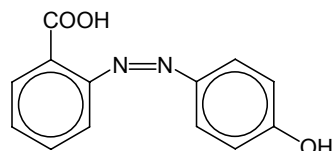
SA
sinapinic acid
タンパク・ペプチド



CHCA
 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
ペプチド混合物



DHBA
2,5-dihydroxybenzoic acid
合成高分子・低分子有機化合物・糖類



HABA
2-(4-hydroxy phenylazo) benzoic acid
合成高分子・低分子有機化合物

マトリックスの役割

◆ 目的成分のイオン化を補助する

レーザー光のエネルギーは最初にマトリックスに吸収され、その後マトリックスから目的成分に受け渡される

◆ 目的成分の光分解を抑制する

マトリックスがレーザー光を遮蔽する

◆ フラグメンテーションを抑制/昂進する

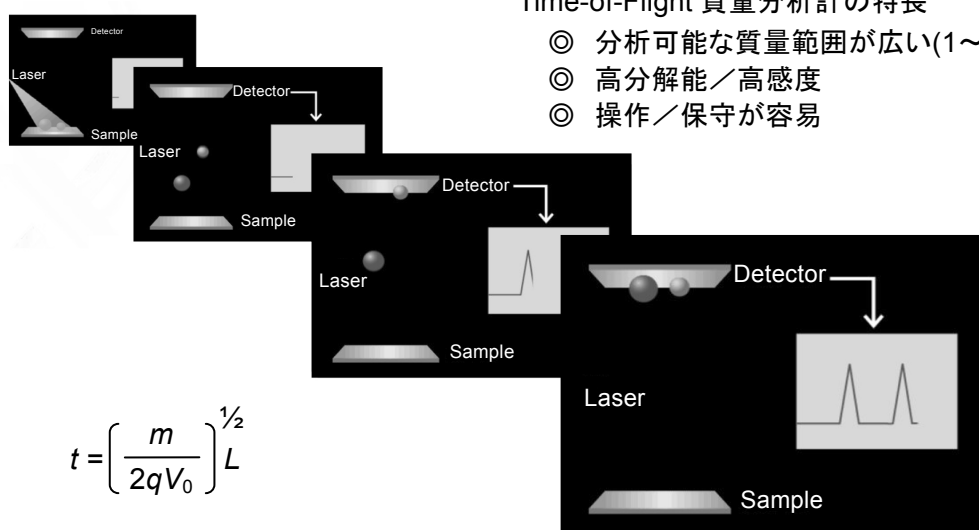
分子イオンだけを生成させる SA, DHBA etc

特定の結合を切断する CHCA(ペプチド結合), DAN(-SS-結合)

飛行時間型質量分析計

Time-of-Flight 質量分析計の特長

- ◎ 分析可能な質量範囲が広い(1~1000000)
- ◎ 高分解能/高感度
- ◎ 操作/保守が容易



$$t = \left[\frac{m}{2qV_0} \right]^{1/2} L$$

MALDI-MS 開発以前の島津

1982: 表面分析用 LD-ToFMS 研究開始 ←LAMMA-500, LIMA

結果: 失敗に終わる

1984: 生体高分子化合物分析用 LD-ToFMS 研究開始

レーザー専門家曰く: レーザー照射で固相から**高分子有機化合物**が分解されずに
イオン化できるはずがない!

当時の一般常識からしても非常識と思えた

失敗: 専門家・当時の常識を軽視してしまった



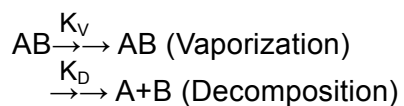
1984-85 年当時,
ラボでの田中氏(左)

左から
井戸豊(測定)
秋田智史(電気)
吉田多見男(リーダー)
吉田佳一(イオン光学)



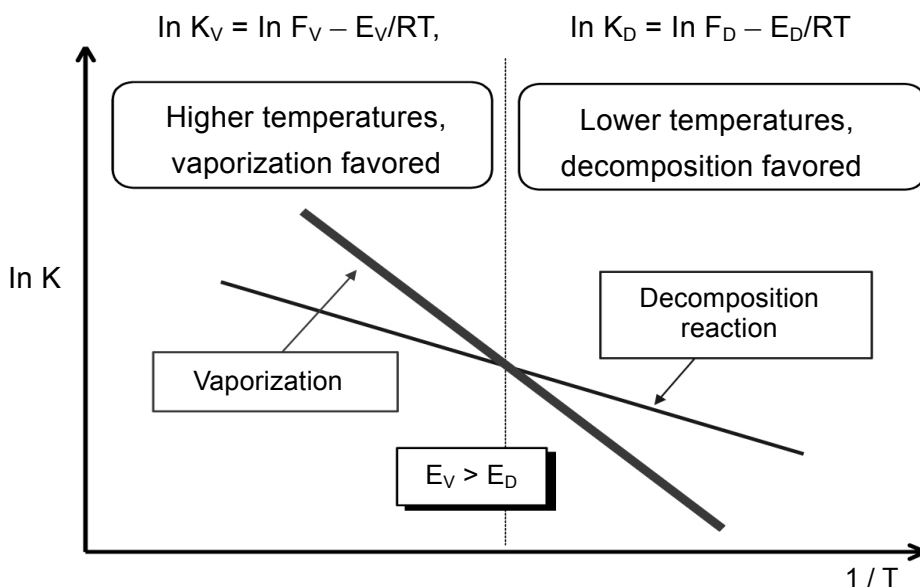
当時の開発スタッフ

Vaporization v.s. Decomposition

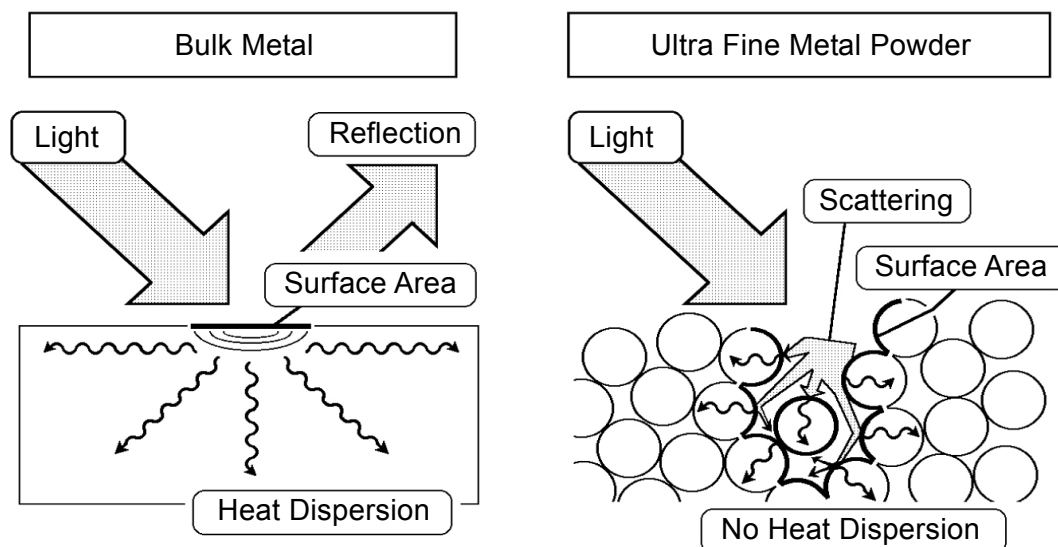


Arrhenius equation: $K = F \exp(-E/RT)$

K: Rate constant F: Frequency factor **E: Activation energy**
R: Gas constant T: Absolute temperature



超微粒金属粉末 Ultra Fine Metal Powder に注目



Differences between Bulk Metal and **UFMP**

ペプチドと **UFMP** を混合 → 今まで測定されなかった分子イオンが検出！
 しかし、**M.W.~2,000** まで 再現性が低い

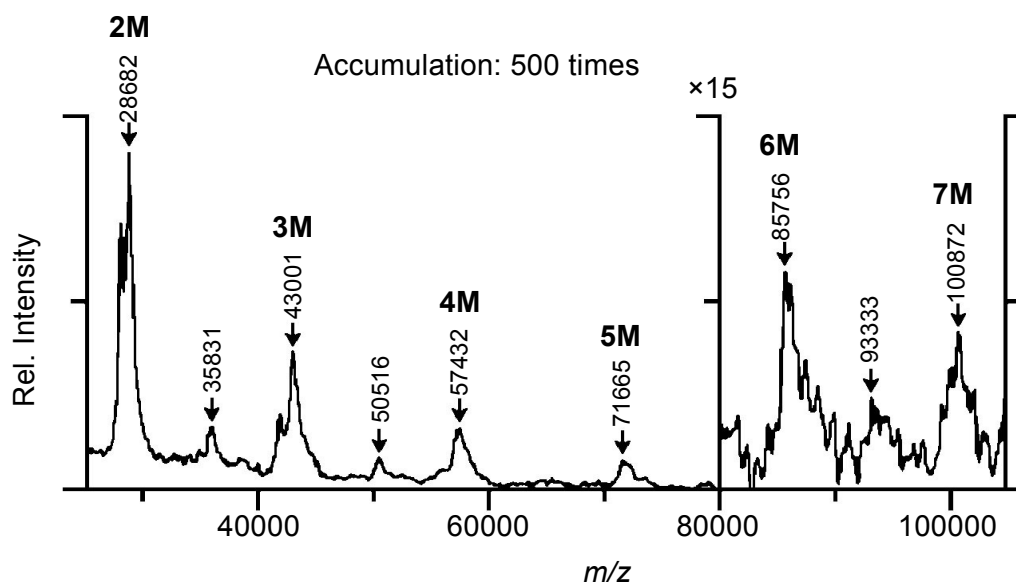
FAB-MS から Matrix の概念を導入

ペプチドとグリセリンを混合 → 分解物が測定されるのみ(しかし安定)

失敗 1: **UFMP** の溶媒として間違っググリセリンを使ってしまった

失敗 2: その溶液を「もったいない」と思って使ってしまった

結果: レーザイオン化 ToFMS による 100kDa を越えるイオン測定



1985 年～:MALDI 黎明期

1985/2: 特許 JP01731501 出願日:1985/02/28 発明者:吉田佳一

UFMP が急速加熱を促進し, 分子イオン生成に著しい寄与をしていることを指摘

現在でも, 一部の MALDI-ToF ユーザが極めて重宝している方法

1985/8: 特許 JP01769145 出願日:1985/08/21 発明者:吉田多見男,田中耕一

UFMP にグリセリンを混ぜる方法. 現在は殆ど使われていないが, これが質量数 10 万を超えるイオンをレーザイオン化で初めて測定できた方法である

社外秘のため, 下記学会までこの成果は一般には公開されなかった

1987/5: 日本質量分析連合討論会で, 初の社外発表 ただし日本語

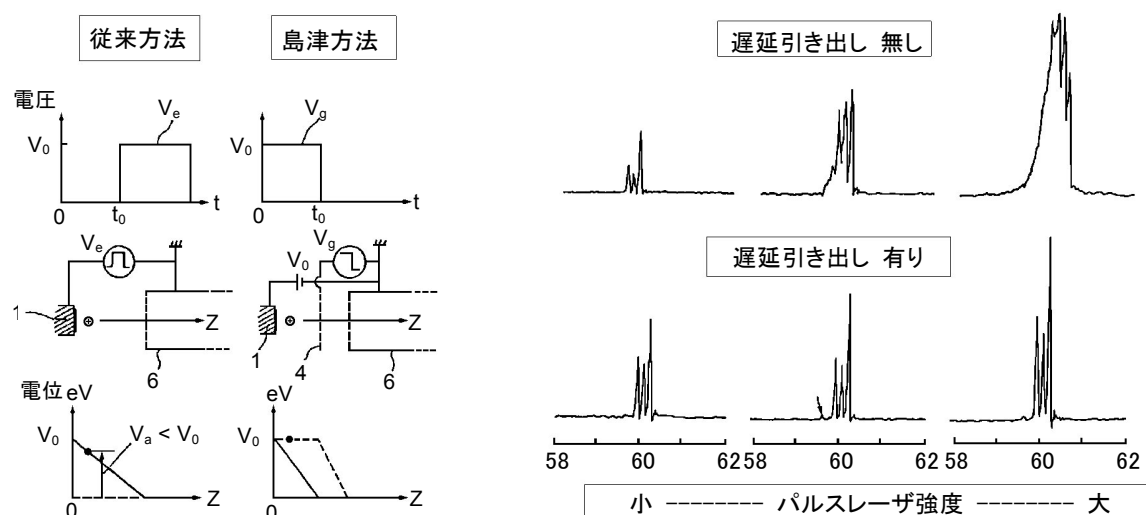
→ 予稿集のコピーが, 特に欧米に多数伝わったと聞いている

1987/9: 第 2 回日中連合質量分析討論会で発表 英文初の発表

1988: Michael Karas, Franz Hillenkamp により MALDI の研究発表
Anal. Chem., Vol. 60, p2299

1988/8: K.Tanaka,Y.Yoshida, T.Yoshida ら, Rapid Commun. Mass Spectrometry にて
英文の正式論文として発表

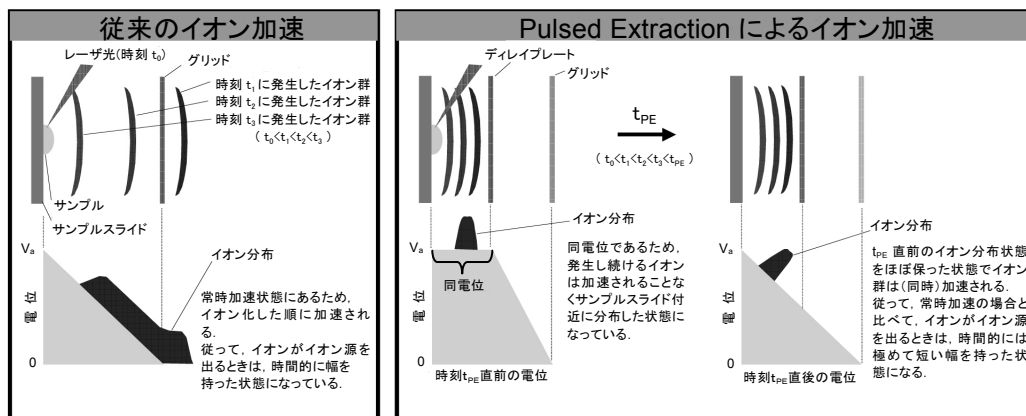
TOFMS の誤解:低分解能・低精度



1985 年 島津 → 日本特許庁への公的文書より

大失敗:「2 ～ 3 倍程度の分解能向上では意味が少ない」と放置したユーザ(市場)が何を求めているか?
を重視すべき!

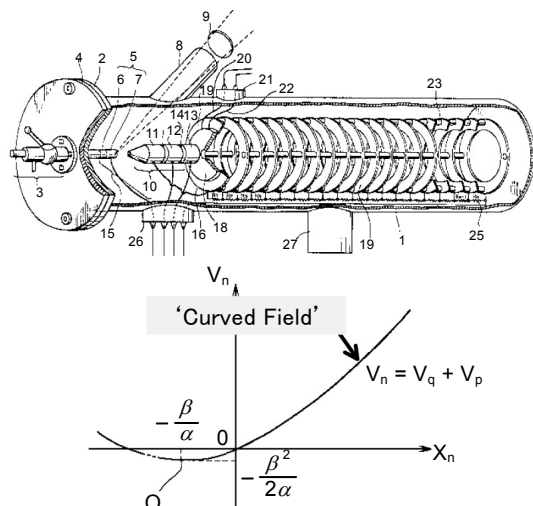
遅延引出し (Pulsed Extraction)



TOFMS の誤解: MS/MS ができない

United States Patent [19] [11] Patent Number: 4,625,112

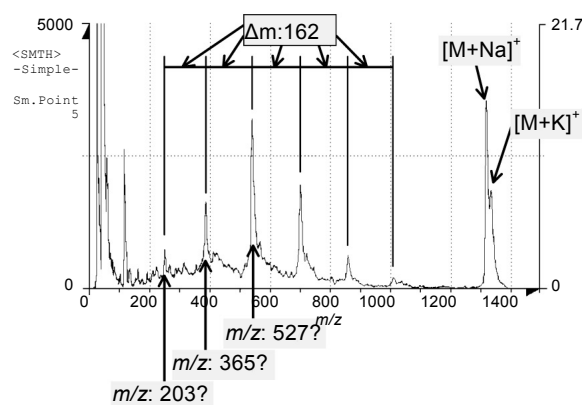
Yoshida [45] Date of Patent: Nov. 25, 1986



1986 年 島津 USA Patent より

強レーザでの gamma-Cyclodextrin 測定

<File Name> CYC-51 .SMT <Mode> AD *R25*20n <Acquired>
<Comment> Gamma-cyclodextrin M.W. 1297 u
<Acc. Time> 100 <Power> 125 <Gain> 1f*****



1988 年 島津 LAMS-50K カタログより

大失敗: イオン源以降で分解した(PSD)イオンを最初から分解していた(Fragment)イオンと誤解した

市販 MALDI-TOFMS の登場

◆MALDI イオン化法の進歩 ~ 生体高分子への挑戦

Karas(1985) ~ 難揮発性アミノ酸のイオン化に成功

Tanaka(1987) ~ リゾチーム多量体(14kDa ~ 100kDa)

Hillenkamp(1989) ~ タンパク(120kDa)

◆傾斜電界型グリッドレスリフレクタの開発 ~ 分解能の改善

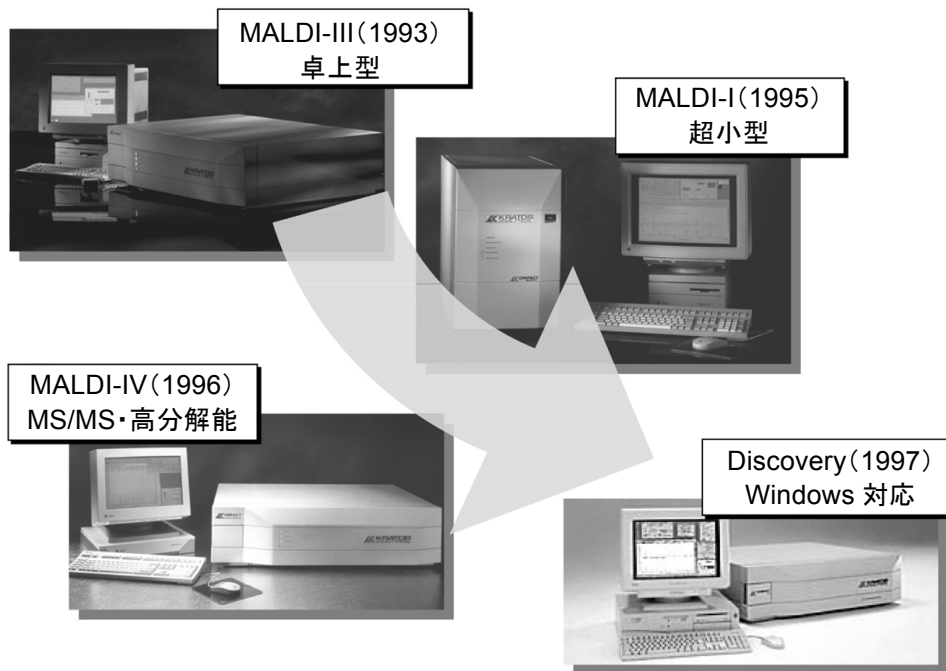
Tanaka ら(1988) ~ 反射効率を改善

◆市販 MALDI-TOFMS の登場

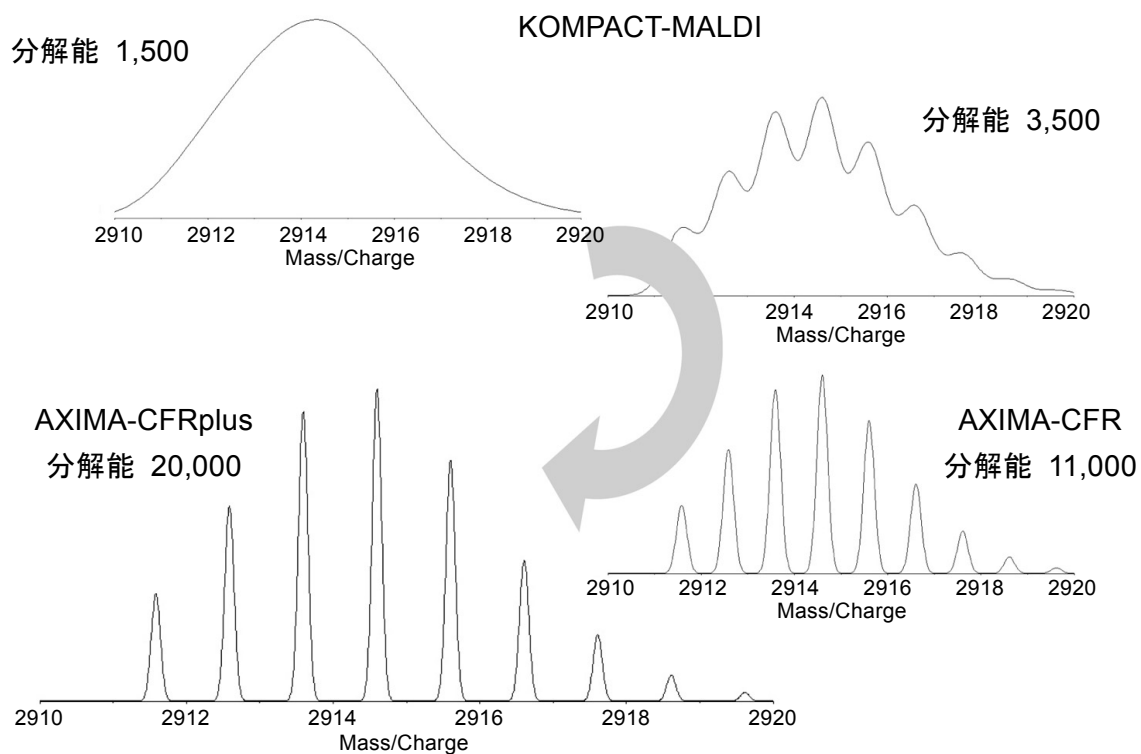
島津 LAMS-50K



さらに使いやすい MALDI-TOFMS を！



高分解能の MALDI-TOFMS を！



レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置



MALDI-TOFMS AXIMA-CFR plus

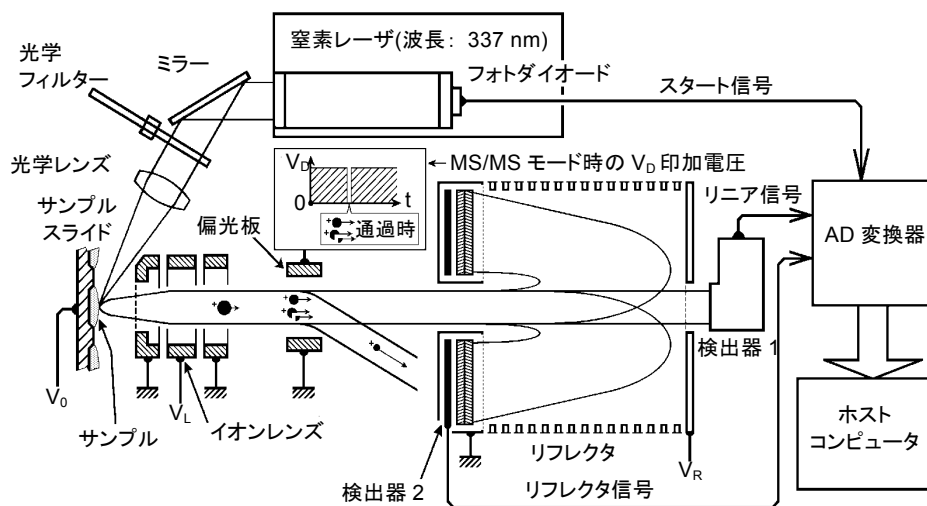
マトリックス支援レーザー脱離イオン化

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

飛行時間型

Time-of-Flight

質量分析装置



一般的な MALDI-TOFMS 装置の構成

飛行モード

◆Linear Mode

高感度

低分解能

イオン生成時のエネルギーのばらつきによる

◆Reflectron Mode

高分解能

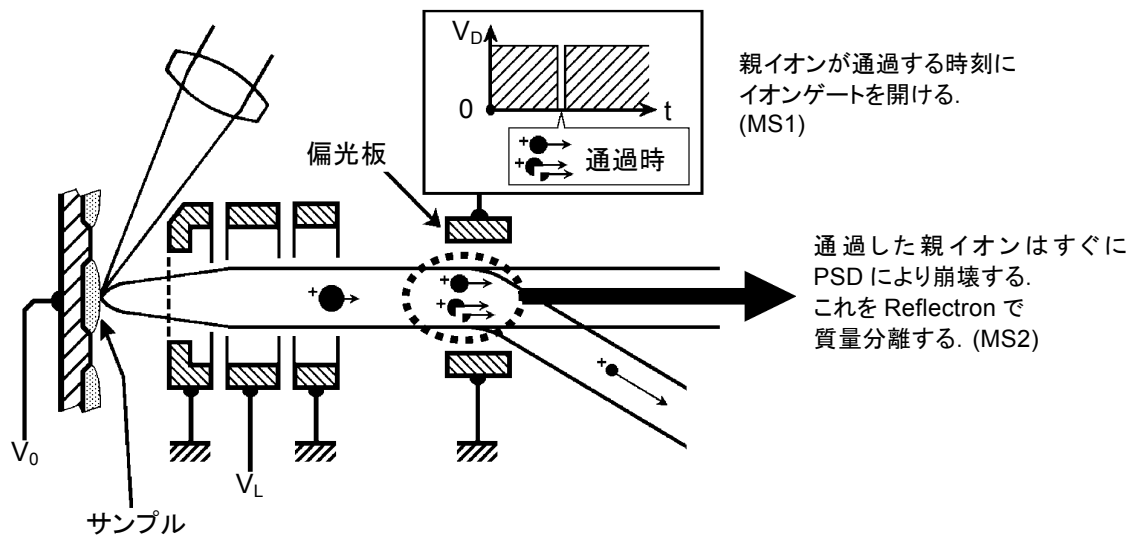
初期エネルギーのばらつきが補正される

低ノイズ

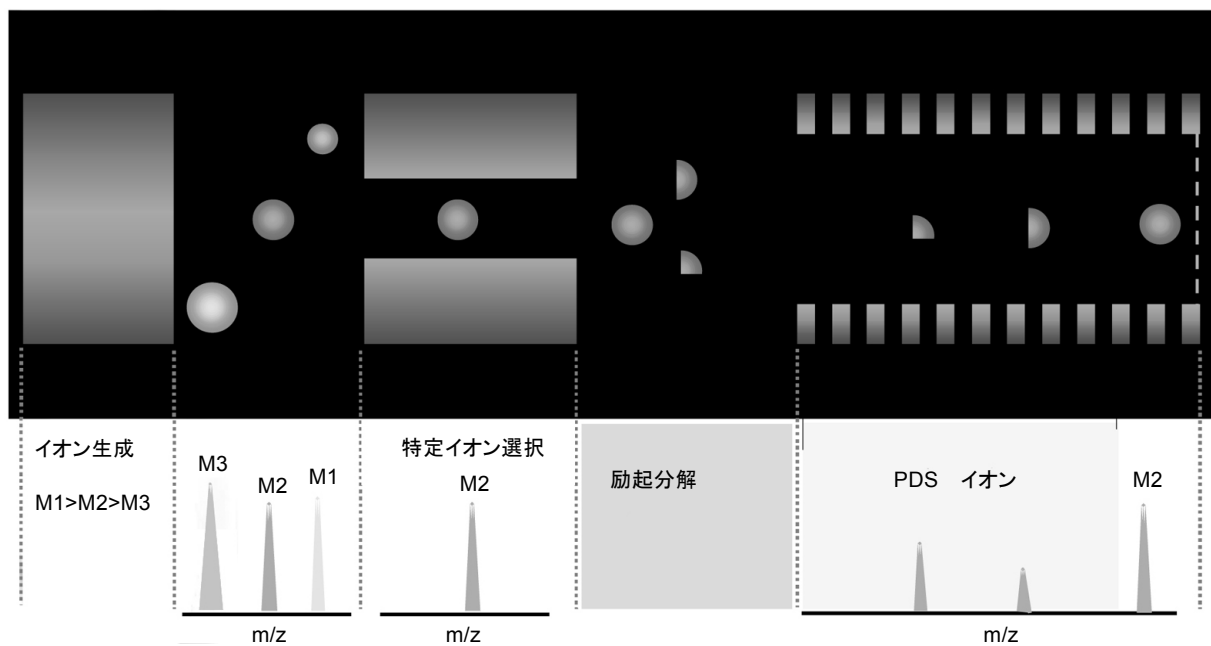
飛行中に生成した中性粒子が除去される

MS/MS 測定(PSD 測定)

PSD: Post-Source Decay



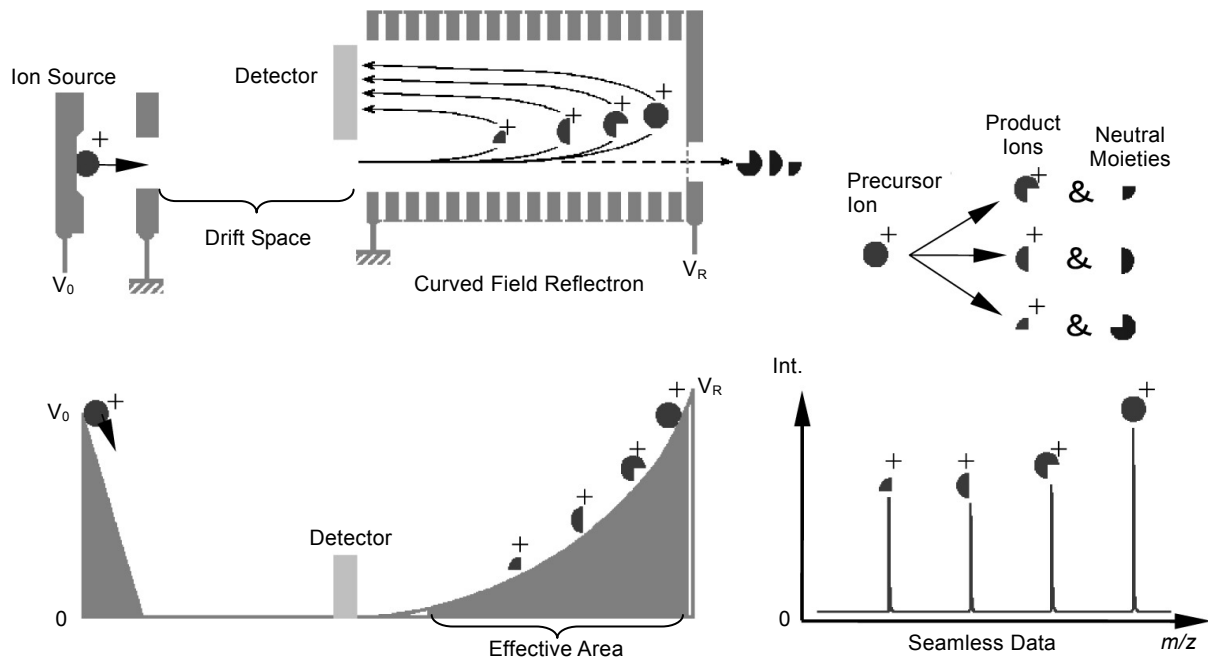
Post-Source Decay による MS/MS 測定



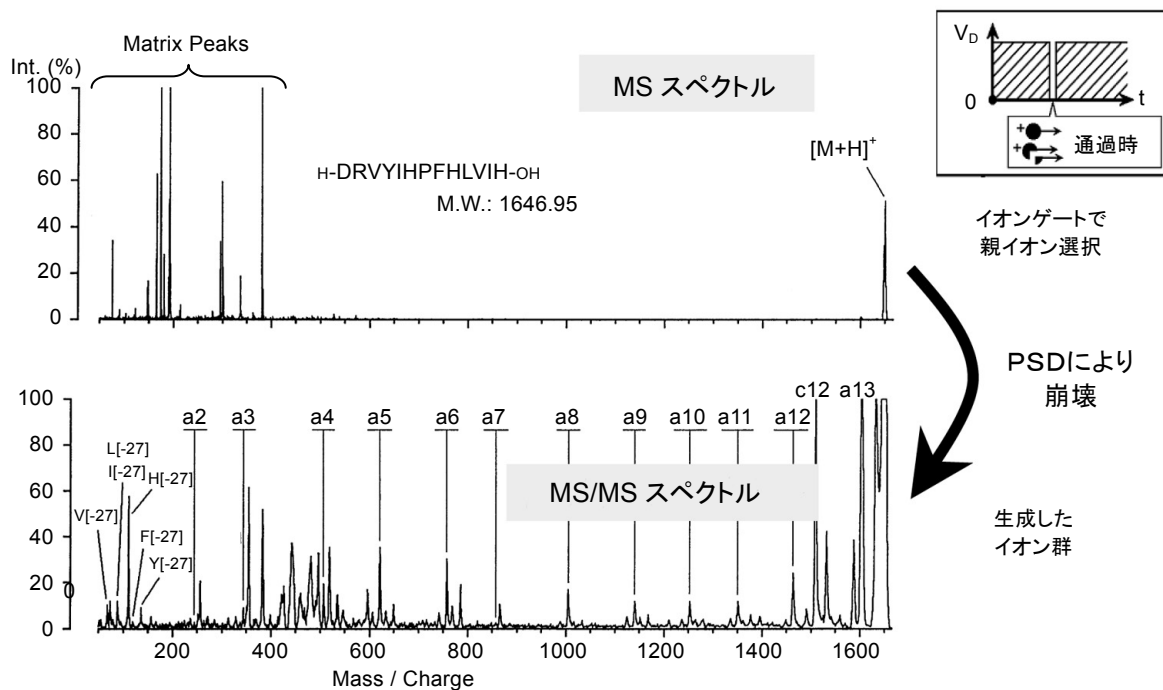
カーブドフィールドドリフレクトロン®による測定原理

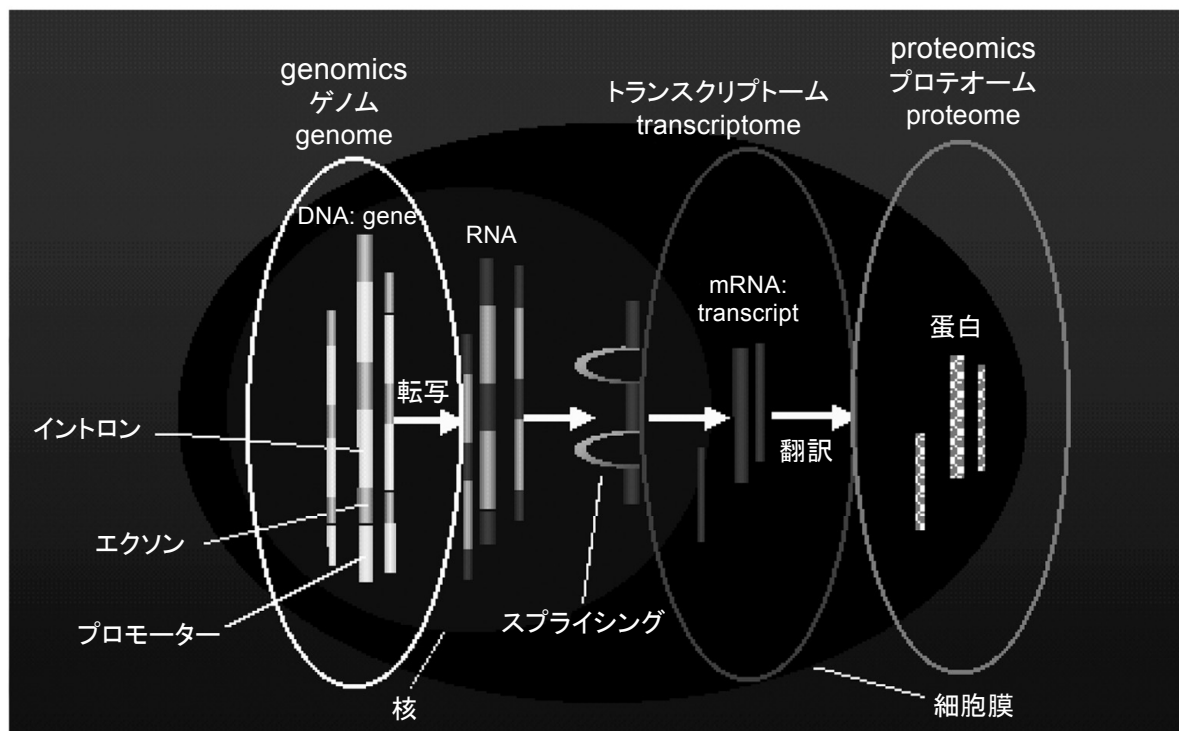
Johns Hopkins Univ., Prof. Robert Cotter により開発

- ◎ プリカーサーイオンを含め全プロダクトイオンが収束し、一度に検出可能
- ◎ 「つなぎ目のない」Seamless PSD スペクトルを得ることができる



MS/MS(sPSD)測定の実例: ペプチド





ヒトゲノム解読完了 2003/04/14

ヒトゲノム、解読完了を宣言

たんぱく質解析、課題に

ヒトゲノムの解読が終
わった。86年の提案から
17年。最終的に日英独
仏中の24機関が参加、3
500億円を超す巨費が
つき込まれた。DNAの
二重らせん構造が発表さ
れて50年。記念の年の解
読完了宣言になった。

(一面参照)

98年にデータを製薬企
業などに販売する目的で
米企業が独自に解読を始
めた。激しい競争を展開。
これが解読完了を2年前
倒した。

ただ解読データは配列
にすぎず、ゲノム解読後
(ポストゲノム)の研究
が課題だ。その一つが、
たんぱく質の構造と機能
の解析だ。遺伝子のつく
るたんぱく質が生命活動
を担い、その研究は新薬
の開発につながる。米国
立保健研究所(NIH)

や理化学研究所などのチ
ームが解析に着手した。
ヒトゲノム解読とは違
い、たんぱく質解析は特
許に直結し、膨大な利益
をうむ可能性がある。可
能な限り多くの特許を押
さえるため、各国は力
をこめて競争している。
ほかにも個人差の研究
などテーマは多い。ヒト
ゲノム解読で出された日
本だが、ポストゲノム研
究は欧米と同等以上に戦
いたいと考えた。

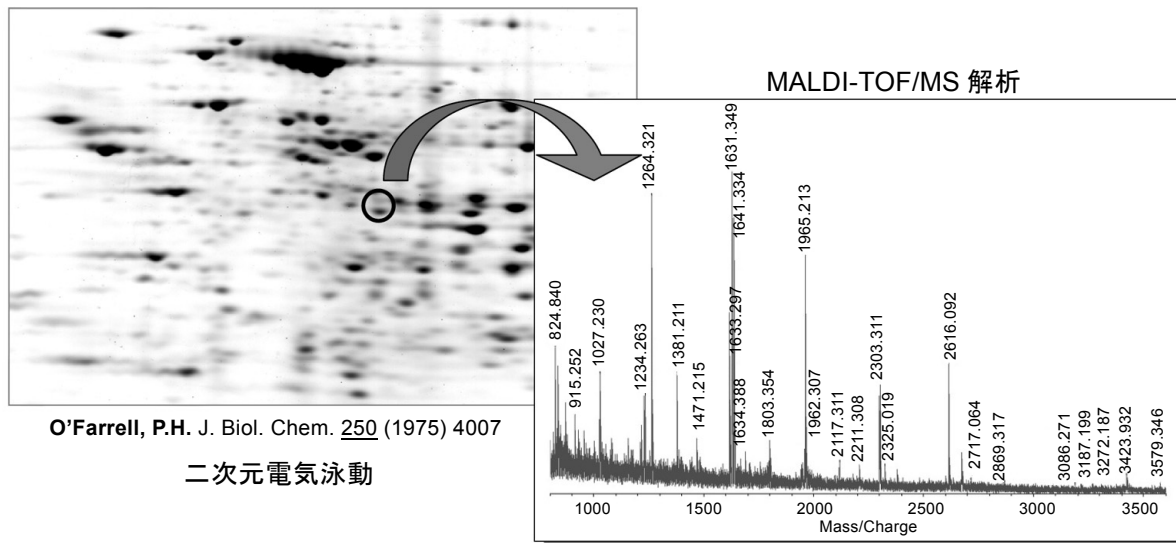
ヒトゲノム解読計画の
日本側のリーダー役、榎
佳之・理研ゲノム構造情
報研究グループプロジェ
クトディレクター(東京
大学)は「今回の成果
は文字の配列にしか過ぎ
ない。やっとスタートラ
インに立った」と話す。

生命科学研究における一大エポック

- ◆ヒトゲノム(99%)の解読完了
- ◆ヒトの遺伝子総数は 32,000 個
- ◆ゲノム解読はスタートラインに過ぎない?
- ◆今後のテーマは蛋白質の構造と機能の解析
(ポストゲノム研究)へ?

2003 年 4 月 15 日 朝日新聞

プロテオーム解析 — 異種技術の融合



Tanaka, K. et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2 (1988) 151—153
 “Protein and polymer analyses up to m/z 100000
 by laser ionization time-of flight mass spectrometry”

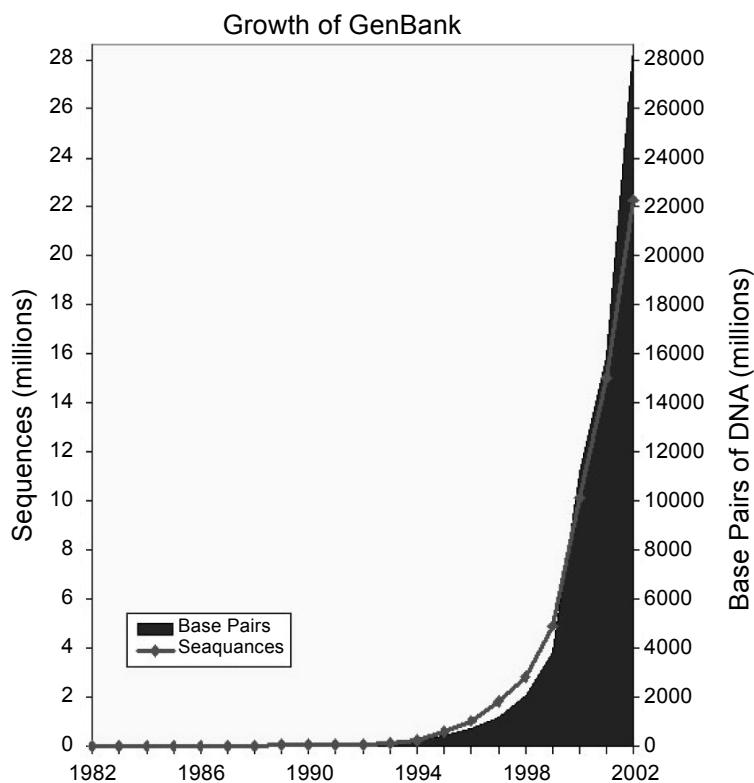
プロテオーム解析を可能にしたもの

遺伝子/タンパク質情報の蓄積(配列データベース)

バイオインフォマティクスツールの拡充

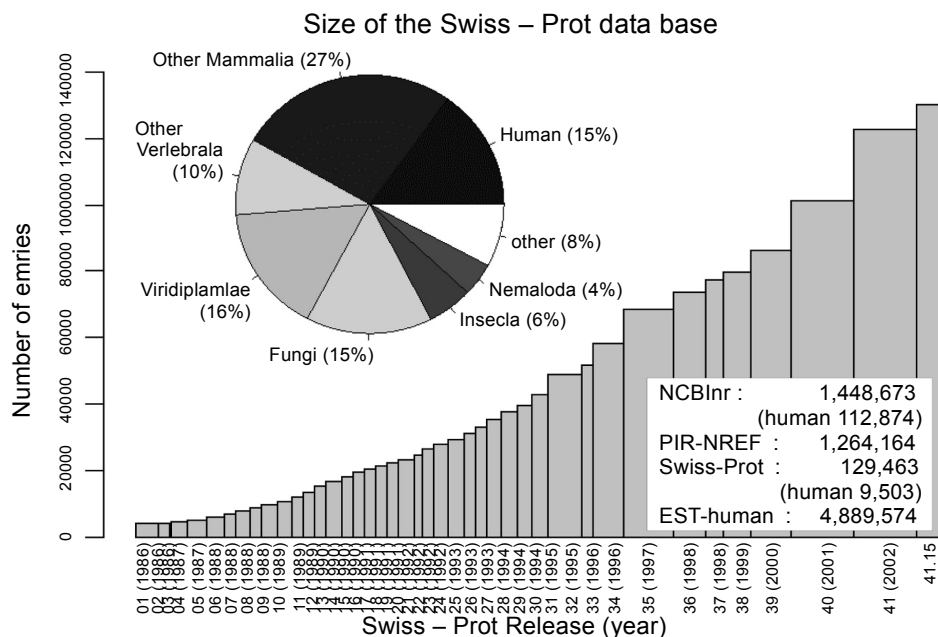
高性能な質量分析装置の開発

ゲノム情報の加速的増大 1995～

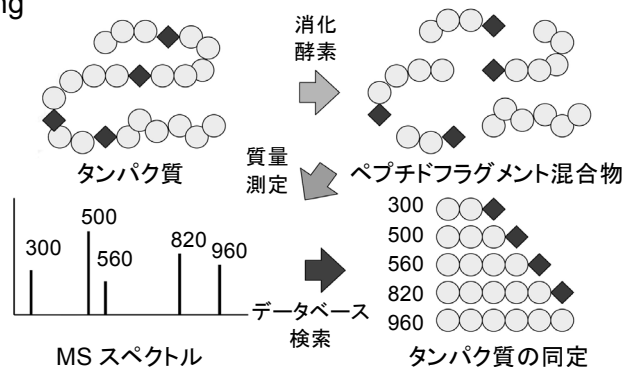


GenBank Data		
Year	Base Pairs	Sequences
1982	680,338	606
1983	2,274,029	2,427
1984	3,368,756	4,175
1985	5,204,420	5,700
1986	9,615,371	9,978
1987	15,514,776	14,584
1988	23,800,000	20,579
1989	34,762,585	28,791
1990	49,179,285	39,533
1991	71,947,426	55,627
1992	101,008,486	78,608
1993	157,152,442	143,492
1994	217,102,462	215,273
1995	384,939,485	555,694
1996	651,972,984	1,021,211
1997	1,160,300,687	1,765,847
1998	2,008,761,784	2,837,897
1999	3,841,163,011	4,864,570
2000	11,101,066,288	10,106,023
2001	15,849,921,438	14,976,310
2002	28,507,990,166	22,318,883

タンパク質データベースの推移

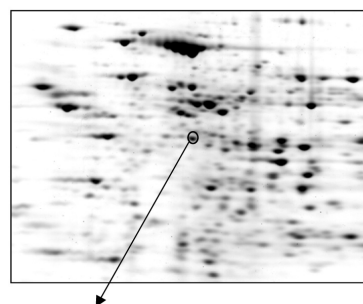


Peptide Mass Fingerprinting



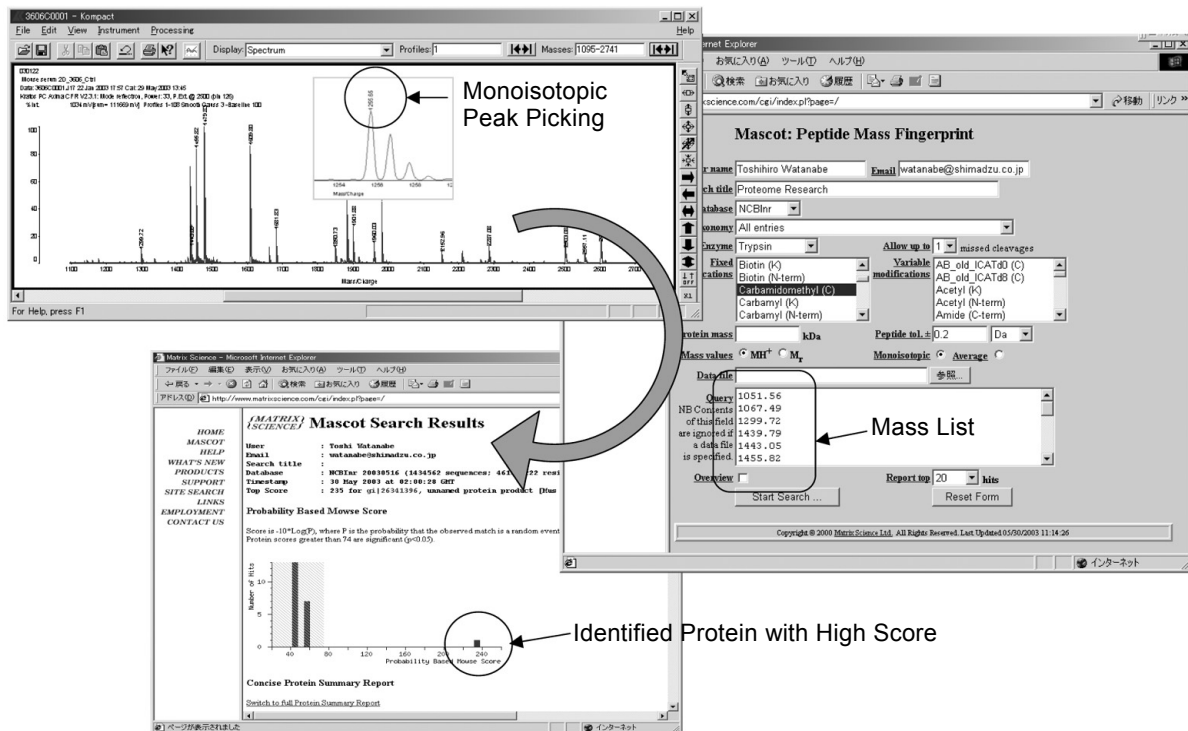
MS 測定によって得られた各ペプチドの分子量リストをデータベースからの予測値と照合

- 脱水によるゲルの収縮
1. 切り出したスポットをマイクロチューブに移す。
 2. アセトニトリル 100 μ l を加える。(10 min r.t. 時々攪拌)
 3. 溶媒を取り除く。
 4. ゲルを遠心乾燥する。
- 還元、アルキル化
5. 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える。(1 h 56°C 時々攪拌)
 6. 室温に下げる。
 7. 溶媒を取り除く。
 8. 55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 100 mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える。(45 min r.t. 時々攪拌)
- DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ の除去
9. 溶媒を取り除く。
 10. 100 mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える。(10 min r.t. 時々攪拌)
 11. 溶媒を取り除く。
 12. アセトニトリル 100 μ l を加える。
 13. 溶媒を取り除く。
 14. 10~13 を繰り返す。
 15. ゲルを遠心乾燥する。
- 消化
16. 冷却する。(4°C)
 17. 酵素溶液(50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 , 12.5 ng/ μ l トリプシン)を 100 μ l 加える。
 18. 45 min インキュベート。(4°C)
 19. 溶媒を取り除く。
 20. 50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 10 μ l を加える。
 21. 16 h インキュベートする。
- 抽出
22. 20 mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える。(20 min r.t. 時々攪拌)
 23. 溶液を回収する。
 24. 5% 酢酸, 50% アセトニトリル 100 μ l を加える。(20 min r.t. 時々攪拌)
 25. 溶液を回収する。
 26. 24~25 を繰り返す。
 27. 回収した溶液をまとめて遠心乾燥する。

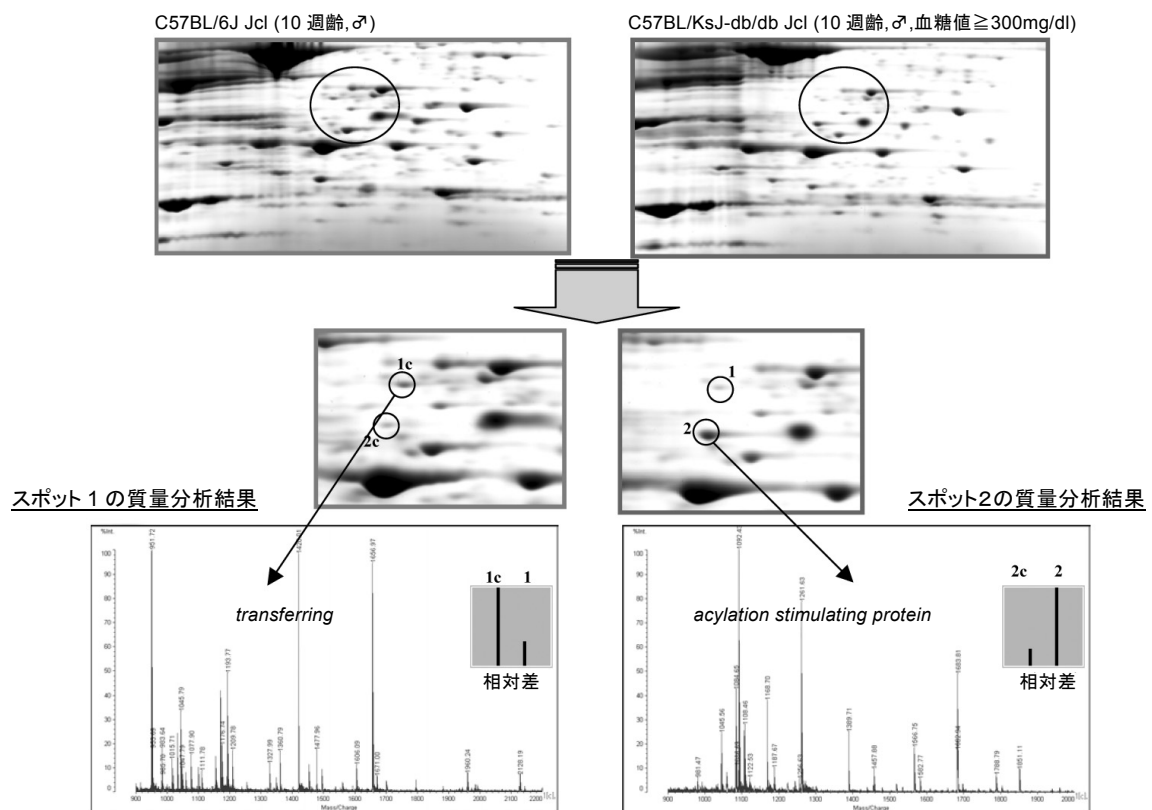


- ・電気泳動ゲルから目的スポット切出し
- ・脱色／脱水
- ・還元／アルキル化
- ・ゲル内酵素消化
- ・抽出／精製
- ・ペプチド混合物の MS 測定
- ・データベース検索(Mascot 等による)

Mascot による PMF 解析



Peptide Mass Fingerprinting 解析例



レーザーイオン化四重極イオントラップ飛行時間型質量分析装置



MALDI-QIT-TOFMS AXIMA-QIT

四重極イオントラップ

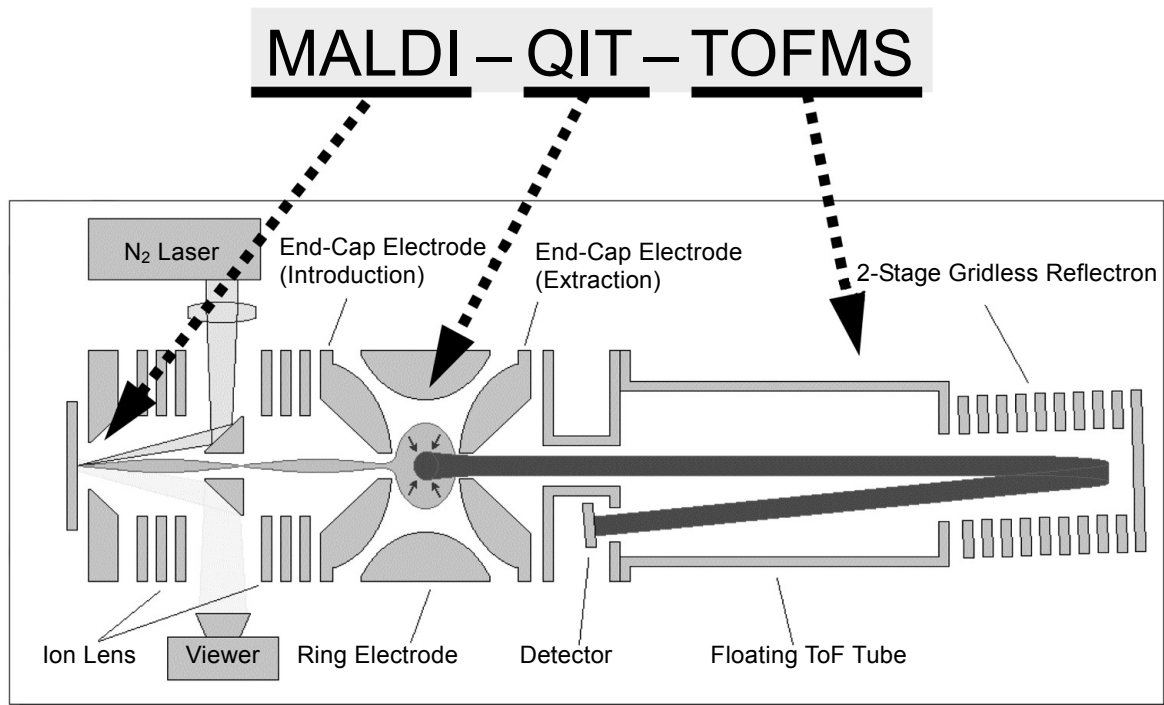
Quadrupole Ion Trap

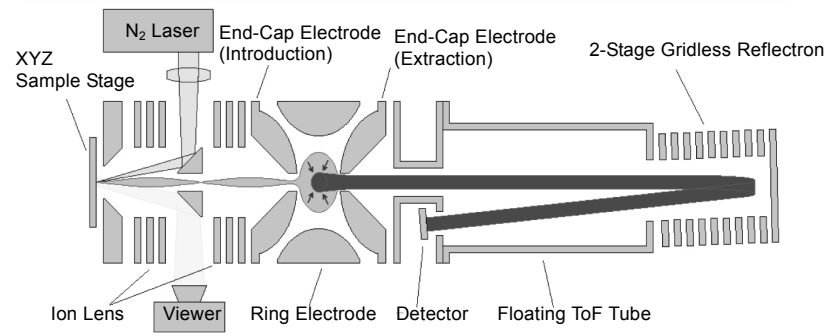
飛行時間型

Time-of-Flight

質量分析装置

MALDI-QIT-TOFMS とは??





MALDI-QIT-ToFMS developed in Shimadzu Group

Question: **What is TOF?**

Answer was **'Toy of Fysicist'**

The answer is **'Tool of Future'**

バイオ電子顕微鏡－透過電子顕微鏡とその応用－

Introduction of TEM and its application

株式会社日立サイエンスシステムズ 那珂カスタマーセンター 中澤 英子
Naka Customer Center, Hitachi Science Systems, Ltd.
Eiko NAKAZAWA

A transmission electron microscope (TEM) has the merit of being higher resolution of images than an optical microscope. The TEM has been applied to some fine morphological studies, especially to the fields of cell biology and medical science. This paper reports principle and general structure of TEM and the main features of Hitachi H-7600 TEM which one of the most useful TEM in this field for some convenient functions, such as an auto-focus function, a personal condition setting, a specimen position memory. Application of the H-7600 TEM for three-dimensional reconstruction of a protein by electron tomography is also discussed.

1. はじめに

透過電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope, 以下 TEM と略す)は 1940 年代に開発され、現在では分解能 0.1 nm(加速電圧 200 kV 以上)に達し、原子を直接観察することも可能である。ところで、TEM を用いて生物試料を観察するためには特殊な試料作製が必要であり、1960 年代に開発された樹脂包埋法や各種固定法の導入によって細胞内小器官などの生物試料の微細構造が観察されるようになった。最近では、電子線トモグラフィーを応用して、機能性タンパク分子の立体構造解析のためのツールとして注目されている。本稿では、TEM の原理と構造、さらにバイオ分野向けに開発された日立 H-7600 形 TEM の特徴と機能について、2, 3 の応用例を含めて述べる。

2. 透過電子顕微鏡の基礎

2.1 透過電子顕微鏡の構造と各部の作用

TEM の外観とその鏡体断面図を図 1 に示す。TEM の鏡体は大きく分けて、電子銃・照射系・試料室・結像系・観察室およびカメラ室の 5 つの部分から成る。それぞれの基本構造とその作用を以下に述べる。

(1) 電子銃

電子銃はフィラメント、ウェーネルト円筒、アノードなどで構成され、フィラメントは電子線を発生させる重要な部分である。フィラメントには目的と用途に応じてさまざまな種類があるが、一般には融点が高く、熱効率の良い金属のタングステンを用いたヘアピン形のものが利用されている。図 2 に電子銃の断面を模式的に示す。電子顕微鏡では、このフィラメントを加熱することで電子にエネルギーポテンシャルを与え、飛び出した熱電子を所定のエネルギーに加速することによって得られた電子線を用いる。さらにこの熱電子を加速するエネルギーの大小によって試料を透過する力が変えられる。一般に生物組織の切片試料ではさまざまな要因から 80 kV から 120 kV の加速電圧が利用される。

(2) 照射系

一般に二段のコンデンサーレンズで構成される照射系は電子銃で発生した電子線を細く絞って試料に照射するための部分である。フィラメントから放射され、ウェーネルト円筒の孔からアノードへ導かれた電子線は直径 $20\ \mu\text{m}$ から $30\ \mu\text{m}$ の束になっている。その電子線は第 1 コンデンサーレンズの作用によって、直径 $3\ \mu\text{m}$ 程度に絞られる。そして、第 2 コンデンサーレンズはこうして収束された電子線をスポット状にしたり、広げたり、試料への電子線の照射面積を適宜変更するように作用する。

電子顕微鏡のレンズは、光学顕微鏡で用いられているガラスやプラスチック製の光学レンズとは異なり、電子が真空中の電場や磁場によって屈折する性質を利用している。図 3 に一般的な TEM で用いられている電子レンズの構造を模式的に示す。励磁コイルで発生した磁力線(磁束)は軟鉄製の磁気ヨークの中を流れ、ポールピースの間隙から空間に漏洩する。このように形成された磁場の中を電子線が通過すると磁場によって屈折・収斂され、光学顕微鏡の凸レンズと同じ作用が電子線に与えられる。

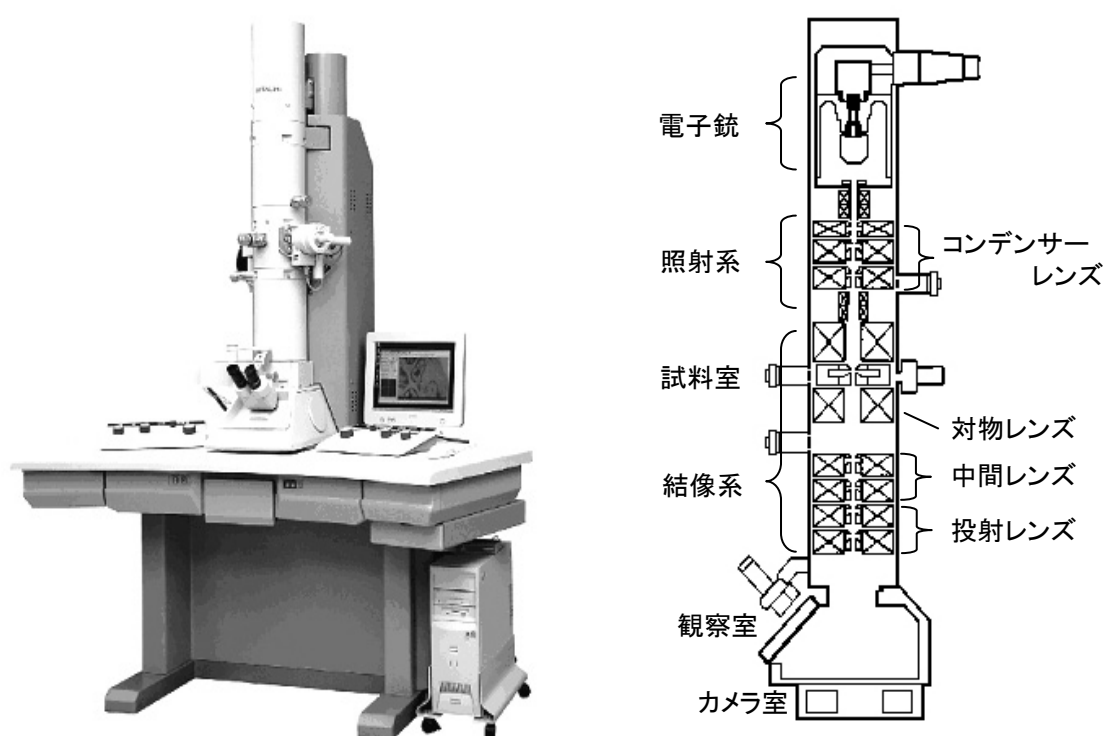


図 1 TEM の外観と鏡体断面

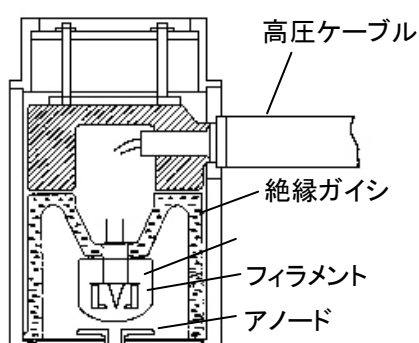


図 2 電子銃の断面

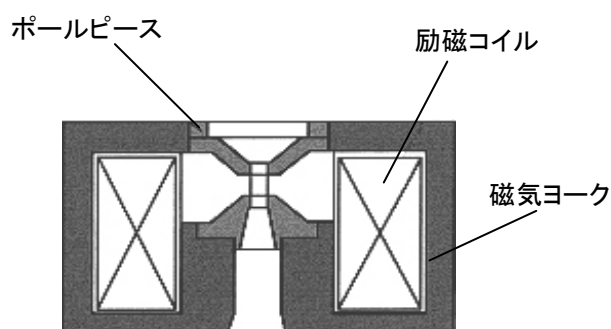


図 3 電子レンズの断面

(3) 試料室

通常 TEM で観察する試料は、支持膜を貼った直径 3 mm のメッシュ状の薄い金属片に載せられている。試料室へ装着するには専用のホルダーを用いるが、その際鏡体の真空を保持するための予備排気が必要である。また、試料室近傍には X 線検出器などさまざまな種類の信号を取り出すための検出器が装着できるようになっている。

(4) 結像系

結像系は試料透過像の焦点合わせや拡大のための対物レンズ・中間レンズ・投射レンズとで構成されている。それらのレンズの基本構造は図 3 に示したものと同様であるが、結像系レンズの中で特に重要な部分が対物レンズである。TEM では対物レンズの励磁電流を変化させることによって、透過像の焦点を微調整している。また、対物レンズの下方に設置されている中間レンズと投射レンズは、透過像の拡大率を変化させ最終像の倍率を決める。

(5) 観察室およびカメラ室

観察室には最終像を投影する蛍光板が設置されている。電子線は通常肉眼では観察できないため、蛍光剤を塗布した円板を発光させることによって観察する。カメラ室には像撮影のためのフィルムが設置されている。最近では、観察室の上部あるいはカメラ室の下部に高精細 CCD カメラを配置して、透過像のデジタル画像を取得することできるようになっている。

2.2 透過電子顕微鏡における像の焦点とコントラスト

(1) 透過像の焦点

TEM は対物レンズの励磁電流を変化させることによって像の焦点を変える。対物レンズを変化させて撮影した膜孔の透過像と基本的な光線図を図4に示す。ある励磁条件下で、試料を透過した電子線が対物レンズの焦点面に結像された状態が正焦点である。その状態から対物レンズの励磁電流を増大すると膜孔の物体側に明るいフレネル縞が現れる。このときの焦点が過焦点である。他方、正焦点の条件から励磁電流を減少させると、膜孔の空間側にフレネル縞が出現する。このときの状態が不足焦点である。通常生物組織切片のような薄膜試料の場合、最も試料のコントラストが低くなる正焦点や二重像になってしまう過焦点は撮影に適さず、やや不足焦点にずらした状態を最適な焦点量としている。

(2) 透過像のコントラスト

TEM 観察では、通常厚さ 100 nm 前後の薄膜試料が用いられるため、試料の電子散乱による散乱コントラスト、透過波と散乱波の位相変化による位相コントラスト、結晶試料のブラッグ反射による回折コントラストによって像のコントラストが与えられる。ここでは、一般的な生物切片試料の観察で利用される散乱コントラストについて述べる。

試料に電子線が照射されると、入射電子線はそのまま試料を通過する透過波と試料を構成する物質の原子核に衝突して偏向される散乱波に分かれる。散乱波には衝突の前後でエネルギーの損失を受けた非弾性散乱波とエネルギー損失の受けない弾性散乱波がある。これらの散乱波を対物レンズ内に設置された可動絞りによって遮断することによって、散乱物質である試料部分と散乱物質のない周囲の部分とに電子線強度の差が生じ、コントラストが生じる。対物レンズの可動絞り径によるコントラストの違いを生物切片で観察したものを図5に示す。孔径の小さい絞りをを用いて、より多くの散乱波を遮断することによって像のコントラストが増大する。

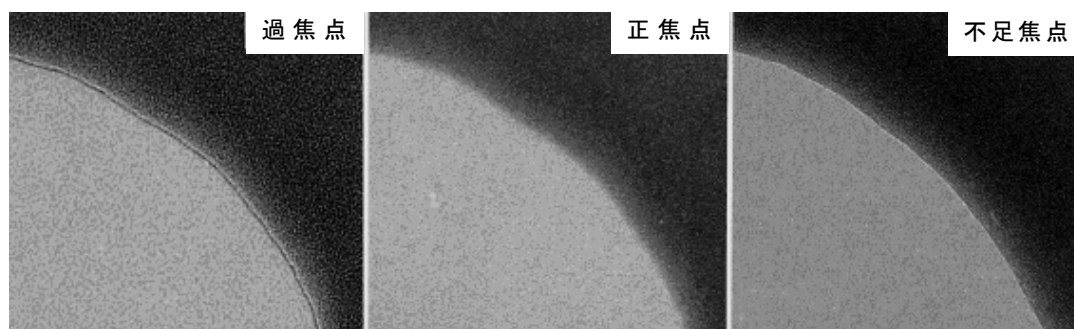
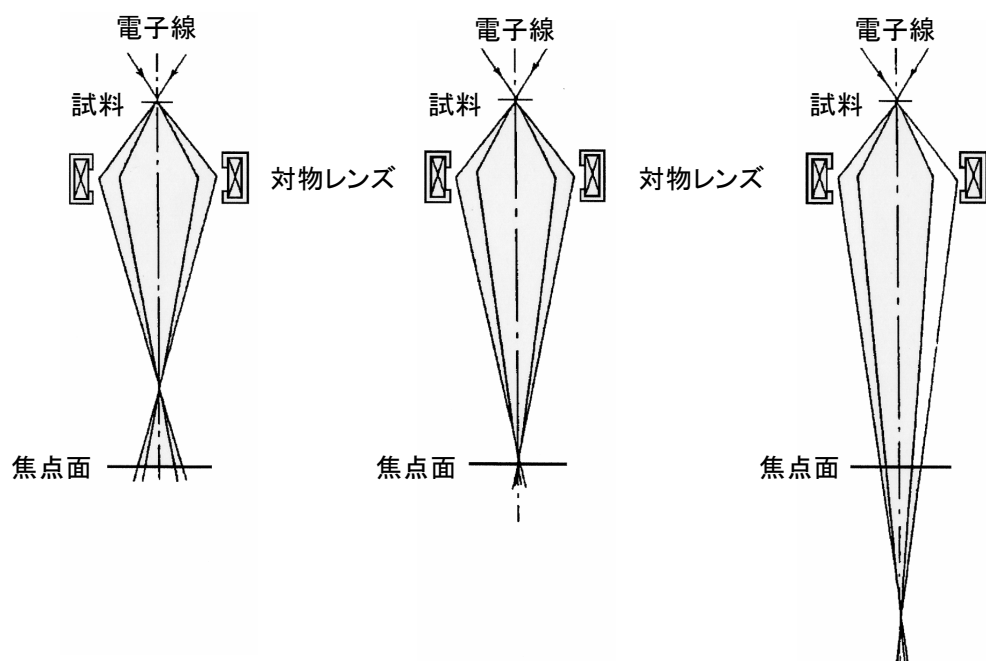
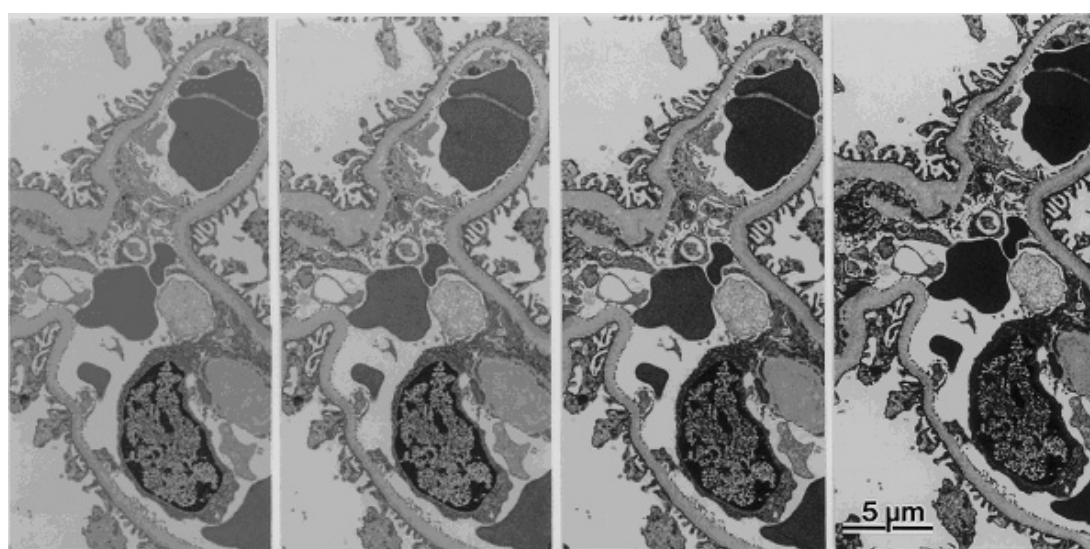


図4 TEMの焦点 (光線図(上)と膜孔の撮影例(下))



孔径 80 μm (開口角: 24 mrad) 孔径 40 μm (開口角: 12 mrad) 孔径 20 μm (開口角: 6 mrad) 孔径 10 μm (開口角: 3 mrad)

図5 対物可動絞り径と生物切片のコントラスト

3. 日立 H-7600 形透過電子顕微鏡の特徴と機能

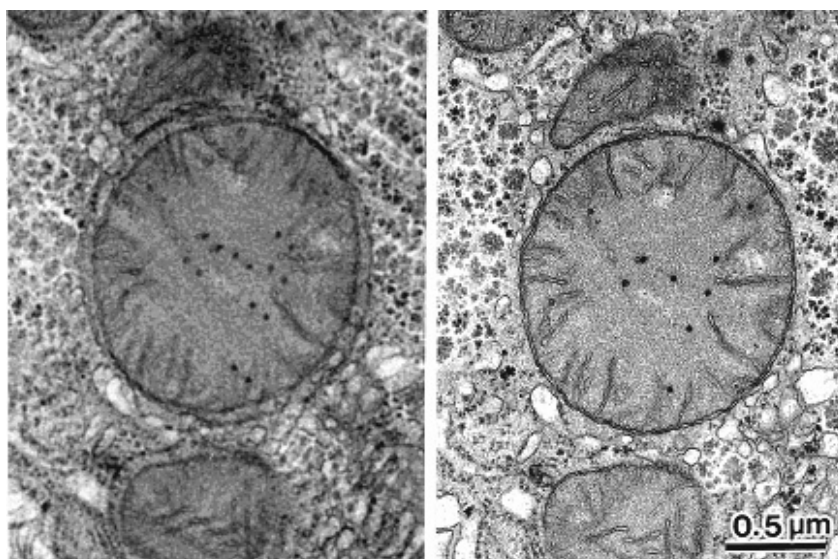
本項では最新の日立 H-7600 形 TEM の特徴と機能について述べる。この装置は最高加速電圧 120 kV の TEM で、各種レンズ系や真空系などその基幹部分を CPU 制御することによって安定した性能を発揮できるようにコントロールされている。さらに Windows PC を搭載し、さまざまな機能を装備することによって操作性の向上を図っている。また、高速画像処理用の CCD カメラを内蔵し、オートフォーカス機能をはじめ自動粒子検索や自動試料傾斜機能など各種オートマチック機能によって応用範囲の拡大を図っている。表 1 に Bio-TEM H-7600 の主な仕様を示す。

表 1 Bio-TEM H-7600 の主な仕様

分解能	0.204 nm (格子像)
加速電圧	40 ～ 120 kV
倍率	50 ～ 600,000 倍
TV システム	CCD カメラ (TV レート, 640x480 ピクセル)

3.1 オートフォーカス機能

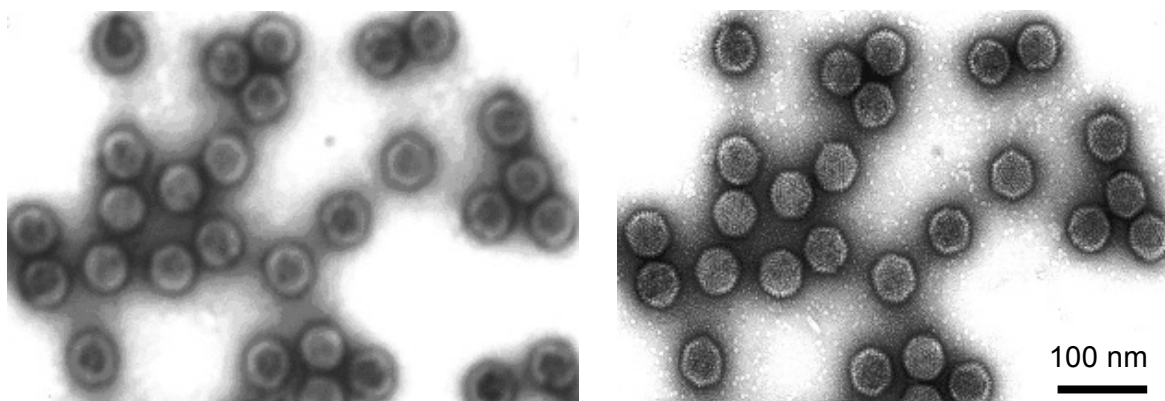
TEM の焦点は前述したように、初心者にとっては難関のひとつである。そのため、照射系の偏向コイルに一定の交流を流して、入射電子線を試料に対して周期的に傾けるイメージワブラーを用いて焦点合わせが行われる。イメージワブラーを動作すると正焦点では像は止まって見えるが、不足焦点や過焦点では像は振動する。すなわち、イメージワブラーを用いると焦点の状態を像の動きとして捉えることができる。図 6 はイメージワブラー動作時の実際の TEM 像を示したものである。H-7600 形 TEM のオートフォーカス機能は、このイメージワブラーによる像の振動を CCD カメラで捉え、その動作前後の 2 つの画像を画像処理し、その相関結果を対物レンズの励磁にフィードバックして焦点合わせを行っている。図 7 はオートフォーカス機能を用いて撮影した生物試料の観察例である。このオートフォーカス機能によって、わずか 0.9 秒で焦点合わせが可能である。



非焦点の状態

焦点の状態

図 6 焦点の違いによるイメージワブラー動作時の TEM 像



オートフォーカス動作前 (50 mm 過焦点)

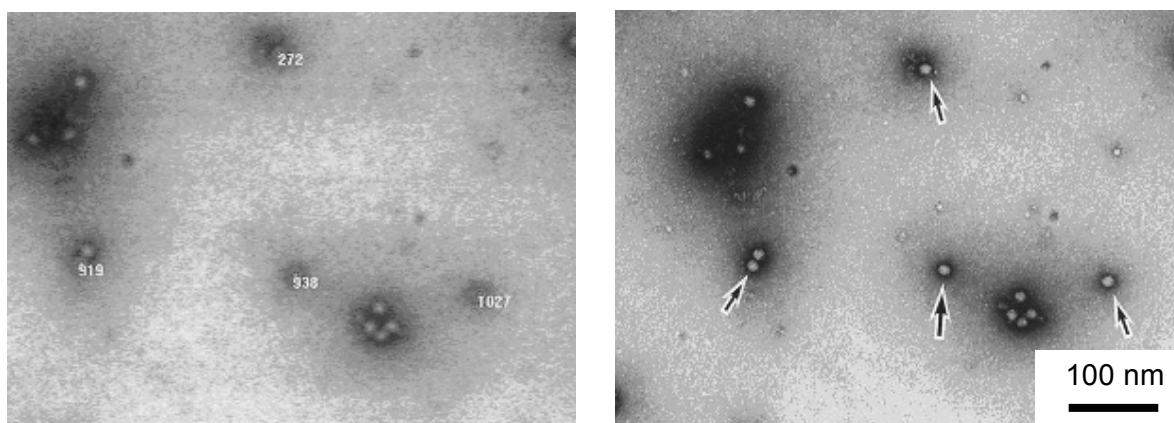
オートフォーカス動作後 (最適焦点)

図 7 オートフォーカス機能の動作例

(試料: ネガティブ染色したアデノウイルス)

3. 2 自動粒子検索機能

TEM では広範な視野の中から目的の試料を探すことにその作業の大半が費やされる. また, 視野中に大きさの類似した試料が数多く存在する場合は, 目的の試料か否か判断するまでに時間もかかる. そのような場合に効率よく試料を検出する目的で開発された機能が自動粒子検索機能である. この機能では, 目的粒子の大きさや検索範囲などの条件を設定すると, 自動的に試料ステージが移動し目的の試料を探し出す. さらに, その試料の画像やメッシュ上における位置情報などをデータベース化することが可能である. そのため, 立入り制限のあるような施設に設置された TEM においても無人で試料検索が行えるという利点がある. 図 8 は小型球形ウイルスの自動検索例である. 粒子径約 30 nm のウイルス粒子が検索されている.



CCD カメラによって検索された視野

自動検索された視野の TEM 像

図 8 自動粒子検索機能によるヒト小型球形ウイルスの検索例

(観察倍率: 25,000 倍, 加速電圧: 100 kV)

3. 3 自動試料傾斜機能

最近, TEM による電子線トモグラフィーを利用して試料の立体構造を観察しようという試みが注目されている. この手法は試料を高角度に連続的に傾斜して得られた透過像の投影像を画像処理し, その立体構造を三次元的に再構築するものである. その際, 試料傾斜に伴って発生する焦点ずれや観察試料の位置ずれなどさまざまな問題が生じる. そこで, 画像処理技術を応用して高精度に連続傾斜像を得るための機能が自動試料傾斜機能である. 図 9 は低角度白金シャドウイング法によって作製したミオシン重鎖をフィラメントに平行な軸で, 5 度ずつ ± 60 度の範囲を連続的に傾斜して撮影したものである. 高角度

に連続傾斜することによって、ミオシン重鎖のヘッド部分がダイナミックに変化しているようすが鮮明に捉えられている。

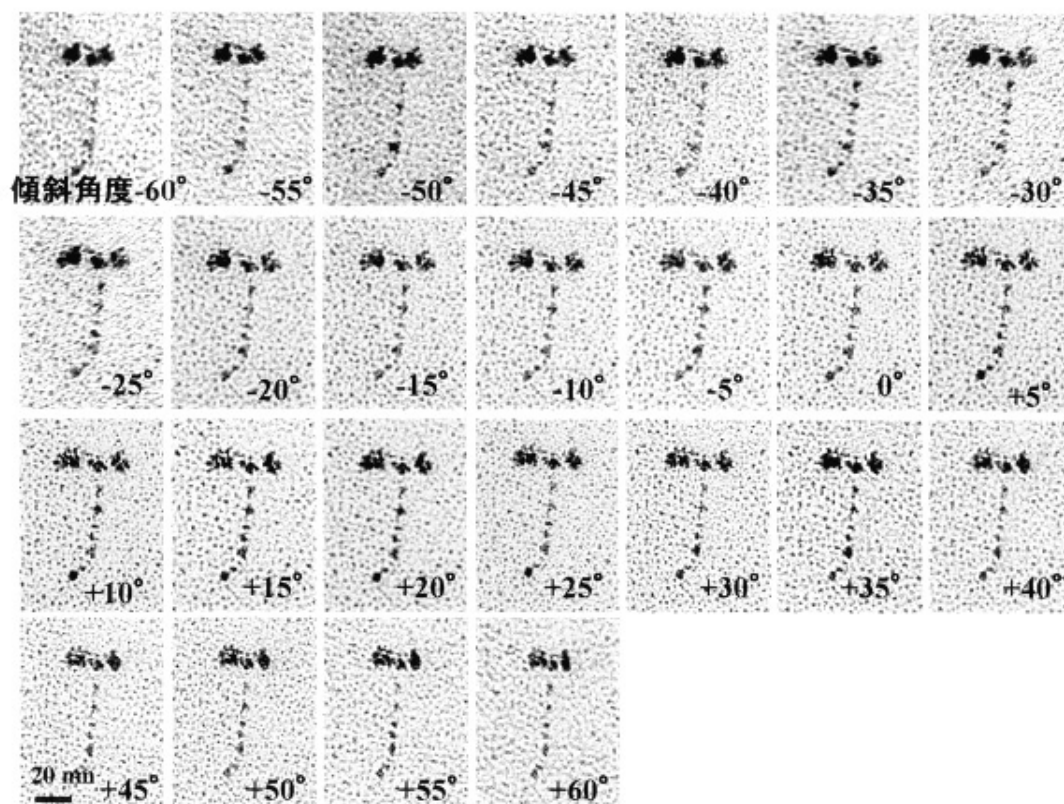


図 9 自動試料傾斜機能による低角度白金シャドウイングミオシン重鎖の連続傾斜像の観察例

(観察倍率: 40,000 倍, 加速電圧: 100 kV, 傾斜範囲: ± 60 度, 傾斜ステップ: 5 度)

3. 4 分析機能

試料に電子線が照射されると、試料を構成する元素特有のエネルギーを持った特性 X 線が発生する。そのため、TEM では試料室近傍に X 線検出器を配置して、試料の元素分析を行うことが可能である。さらに、試料面上を数 10 nm 以下に絞った電子線で走査して得られる走査透過像を併用して、その X 線スペクトルを元にある特定の元素の相対的な濃度分布をマッピングすることも可能である。図 10 はこの技術をセラミック粒子に応用したものである。X 線スペクトルに出現した特定の元素についてマッピングを行うと、元素によってその分布が局在している様子がわかる。このように TEM は試料の微細構造を高解像度で観察するだけでなく、その場分析の装置としても有用である。

4. おわりに

バイオ研究における TEM の有用性は、生物の基本単位である細胞の構造と機能との関連を分子レベルで解明するためのツールとして、さまざまな生命現象の解明に大きな貢献を果たしてきたことから明らかである。ヒト全ゲノムの解読が完了した現在、タンパク質の機能解析のための手段として NMR や X 線回折と並んで、TEM を用いた構造解析への期待が増大している。バイオ分野をはじめ多くのナノテクノロジー分野において活用されることを期待する。

本稿の執筆にあたり、試料をご提供いただいた国立感染症研究所 宇田川悦子博士、東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 佐々木博之博士に感謝いたします。

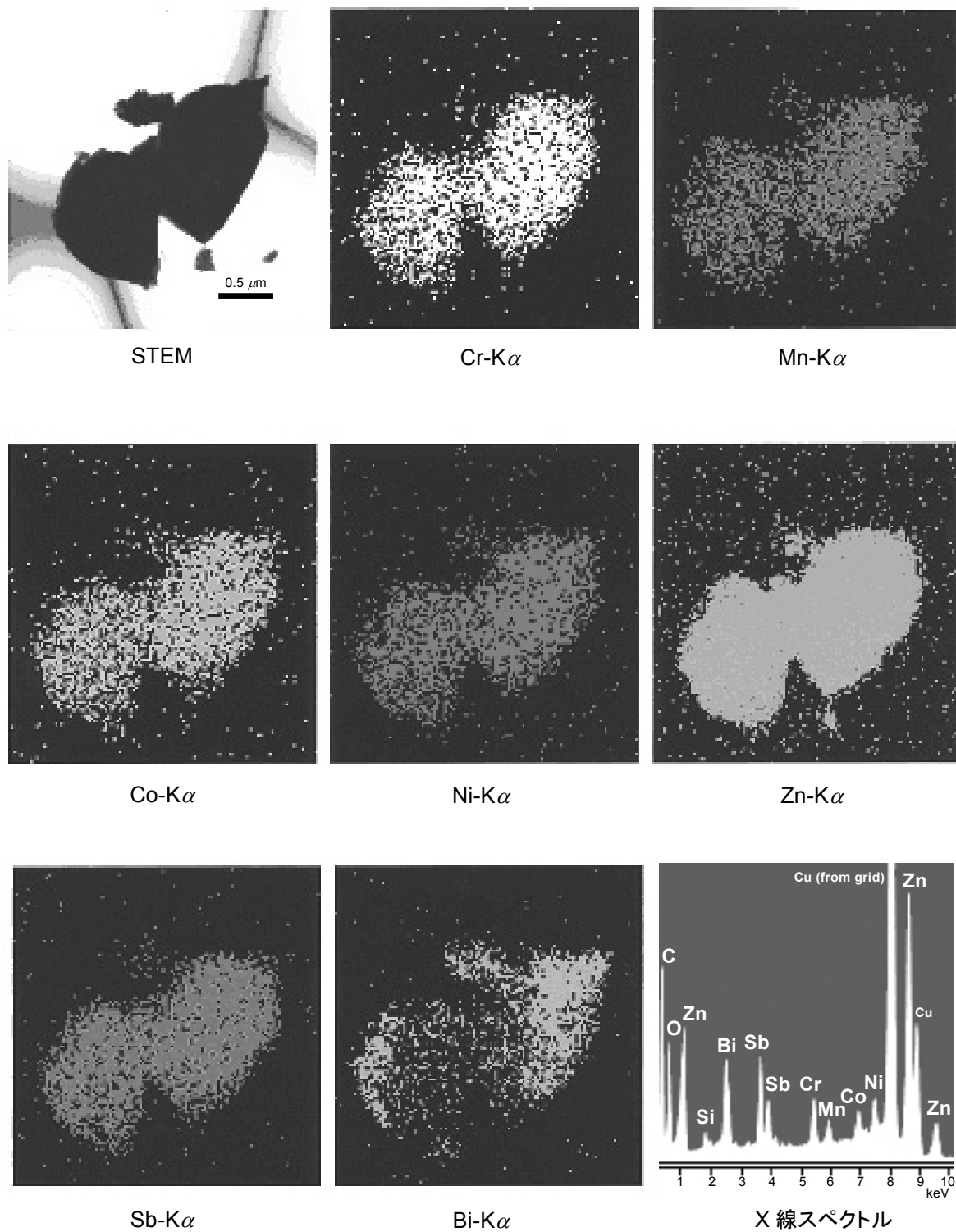


図 10 セラミック粒子の X 線分析例 (STEM(走査透過)像, 元素マッピング, X 線スペクトル)
(観察倍率: 20,000 倍, 加速電圧: 100 kV)

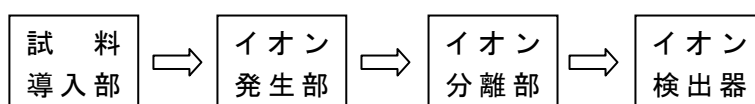
液体クロマトグラフ質量分析装置

総合科学分析支援センター 設楽 浩明

平成 12 年度に応用化学科へ導入された液体クロマトグラフ質量分析装置が本年度、分析センターが改組され新たに発足した総合科学分析支援センター(3F:質量分析室)に移管されて来ました。

1. 質量分析装置

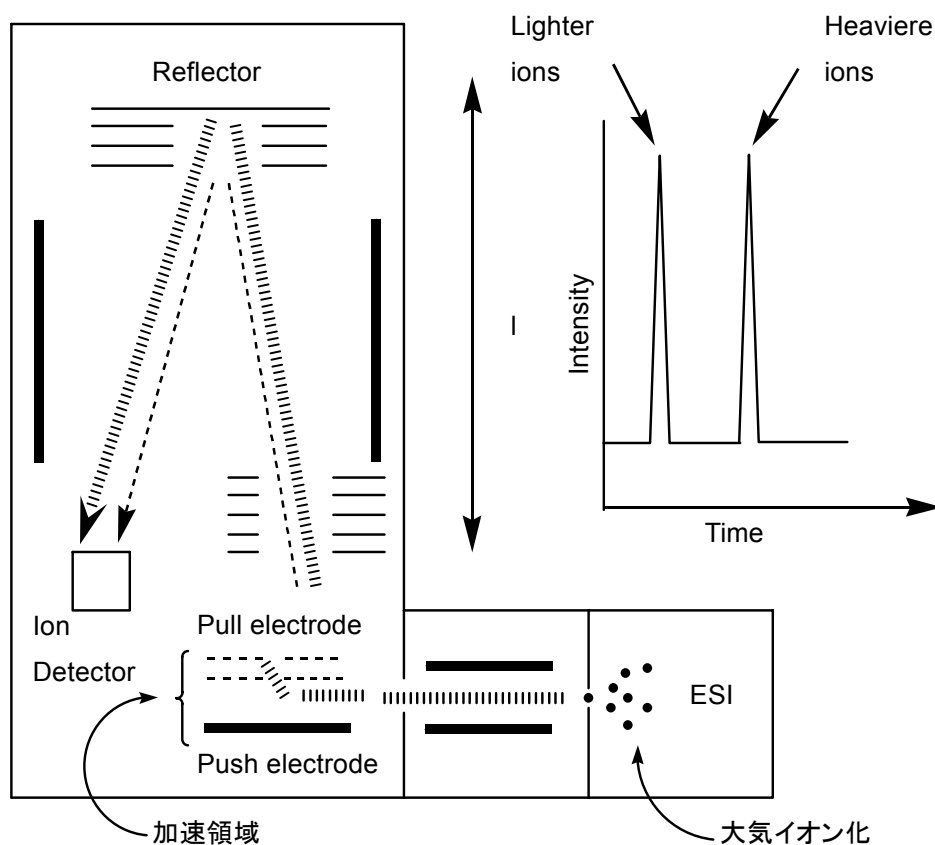
質量分析装置は M_w を計るのではなく分子イオンを、その質量と電荷の比(m/z)に従ってそれらを分離する分析手法で、 m/z を観測して分子 1 個の質量を知る装置である。その装置構成は、概ね試料導入部・イオン発生部(イオン源)・イオン分離部(アナライザー)・イオン検出器の 4 つから成っている。



装置構成概念図

2. 装置の概要

本装置は Applied Biosystems 社製の Mariner で、この装置のイオン発生部には標準でエレクトロスプレー(ESI)が取り付けられている。他に大気圧化学イオン化(APCI)も取り付けが可能である。分離部には飛行時間(time-of-flight, TOF)型アナライザーが用いられている。



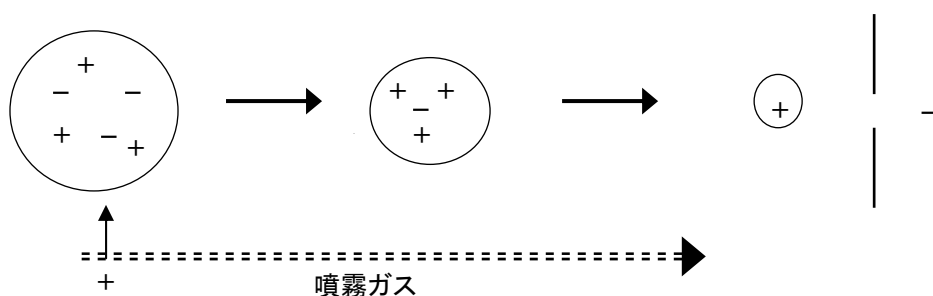
イオン光学系の概略図

また、試料導入にはインフュージョン法(シリンジポンプでシリンジ内のサンプルを連続的に導入)と LC-MS 法が使用できる。LC-MS 法では、分離精製された化合物の測定が可能である。このために高速液体クロマトグラフ(HPLC)として Agilent 社製の HP1100 が付属している。

この HPLC にはダイオード・アレイ検出器(DAD)が内蔵されており、サンプルピークの紫外吸収スペクトルも得られます。

3. エレクトロスプレーイオン化

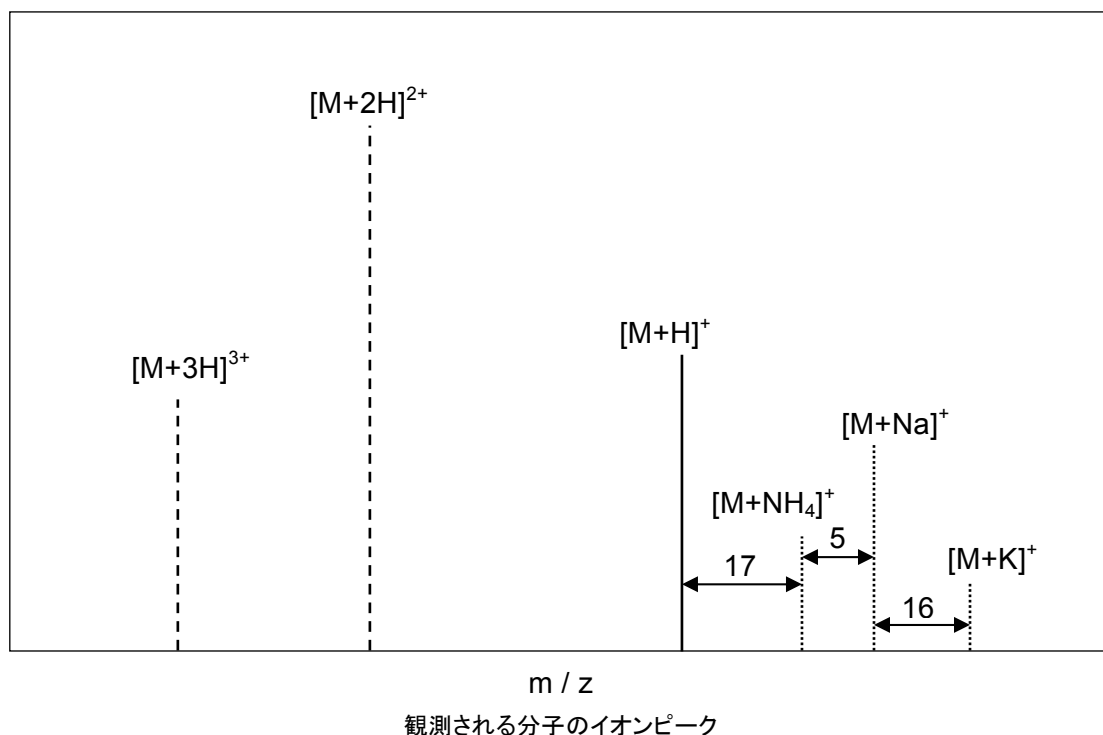
大気圧環境中で液体からイオンを発生(脱離)させる方法で、高電圧をかけたステンレス製キャピラリーより試料溶液を噴霧すると対向電極に対して生じた高電場によって、キャピラリーから出てくる試料を含んだ移動相溶媒は、高度に帯電した霧状の液滴となる。帯電した液滴は蒸発によって徐々に溶媒を失い、その大きさが小さくなり荷電試料イオンが液滴からはなれていく。溶媒から分離された試料イオンの一部はピンホールを通して高真空の分離部へと導かれる。



エレクトロスプレーの概念

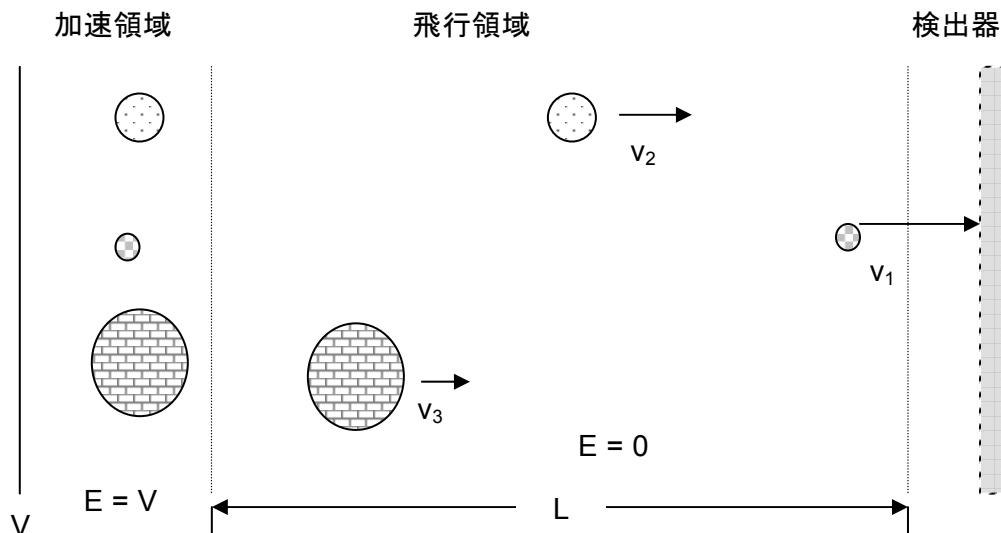
このイオン化では、アミノ基(R-NH_2)のような電荷を帯びやすい官能基を有する脂溶性から水溶性までの幅広い化合物が対象となる。試料溶媒としては、アルコール(メタノールなど)、アセトニトリル等が一般的に使用されている。

観測されるピークとして、擬分子イオン($[\text{M}+\text{H}]^+$ 等)が観測され、また多価イオンが観測されることがある。



4. 飛行時間(time-of-flight, TOF)型アナライザー

TOF では、“かたまり”状にしたイオンが加速領域から飛び出し、無電場の飛行空間を飛行して検出器まで到達する。すべてのイオンが等しく運動エネルギーを持つとすると、質量の小さいイオンは真空の飛行管内を速く、質量の大きいイオンは遅く飛行するので、決まった距離の飛行空間を通過するのに要する時間の長さによって質量分離される。



イオンを V の電場で加速すると、そのイオンは zeV (z :イオンの電荷数, e :電気素量)で表せる運動エネルギーを持つ。また、その運動エネルギーは質量(m)から見れば、 $1/2mv^2$ (v :速度)で表せる。一定の飛行距離(L)を通過するイオンの飛行時間(t)は、 L / v で表せる。従ってイオンの飛行時間を測定すれば、そのイオンの m/z を求めることができる。

本装置に搭載されている TOF の測定質量範囲は $\sim m/z$ 25000 であるが、感度等の関係から上限の m/z を 2000 $\sim$ 3000 程度に抑える設定にしています。

5. 測定操作環境

- ・ OS : Windows NT 4.0(英語版)
- ・ 制御・測定 : Mariner Control Panel
- ・ データ処理 : Data Explorer
- ・ 試料濃度 : 1 $\sim$ 5 pmol/ μ l(インフュージョン法)

測定試料として錯塩化合物・ペプチドなどが対象となるので、化学的分野から生化学分野までの利用が可能であり、本センターの機器分析分野のみならず生命科学分析分野においても今後利用が広がるものと期待される。

Bruker DRX400 紹介

理学部基礎化学科 藤原 隆司

平成 4 年にセンターに設置され、多くのユーザーに利用されてきた Bruker 社の ARX400 核磁気共鳴分光装置は、平成 14 年 12 月に超伝導マグネットはそのままに、分光計やコントロール用のコンピュータ・プローブなどを更新して新たに DRX400 として生まれ変わった。本稿はその DRX400 の特徴などについて簡単に紹介する。

測定をするためのパルスの制御や信号の取り込みなどを行う分光計は ARX にくらべて大幅にデジタル化されている。それによって発生するパルスを高速・高精度に制御することが可能になり、複雑なパルスプログラムを実行できるようになった。また従来のアナログ回路に比べてパルスの位相・周波数・強度の変調などはデジタル回路中での数値演算で行われているため、電気回路素子の誤差や温度の影響を受けない。このような最新の電気回路技術によってスペクトルの精度、感度が ARX400 や AM400 よりも向上することが期待される。

現在は標準でグラジエントプローブ(試料管外径は 5 mm)がマグネットに装着されている。このプローブによってグラジエントパルスを用いることが可能となる。一時的にサンプルのある場所の磁場を乱すことを「グラジエントをかける」といい、磁場を乱す時間や大きさを制御したパルスプログラムを用いる。このグラジエントパルスを用いることで、通常の COSY 測定では原理上積算回数は最低 4 回必要で 4 の倍数回が必要となるが、グラジエントパルスを使う COSY 測定では位相回しは不要となり、積算回数 1 回の測定が可能となるため従来法に比べて飛躍的に測定時間が短縮される。また、パルス磁場勾配スピンエコー法はこのグラジエントプローブを用いることで可能となる測定法であり、拡散係数(簡単に言えば分子の拡散していく速さ)の測定に大きな威力を発揮する。このため、従来の有機化合物などの構造決定に用いられるだけでなく、分子の溶存状態を解析するような研究にもこの分光器を用いることが可能であり、物理化学的な研究の強力なツールとして利用されることも DRX400 の新たな使命の一つであると言える。このプローブのもう一つの特徴は数十種類の核種がプローブ交換をすることなく測定することが可能なことである。共鳴周波数のチューニングもかなり自動化されており、多核種測定が非常に容易になり、多様な(NMR 測定可能な)元素を扱う研究者にとって多核種測定が非常に敷居の低くなった感がある。測定可能なすべての核種についての標準パラメータの設定はなされていないが、ユーザーが実際に測定する核種について徐々に標準パラメータ設定を行っている。また固体測定用の分光ユニットも用意されており固体用のプローブを接続すれば測定可能である。

測定・解析プログラムは X ウィンドウ上で動作する XWINNMR となり、他の機種(AC200, AM400 など)にデータ処理用として接続されている Microsoft Windows で動作する WINNMR と画面構成などが似ているため、WINNMR に慣れていればそれほど操作感覚はかわらないのではないと思われる。またソフト・OS とともに安定性が増しており、測定中ハングアップしたりすることは ARX 時代より減っている(ただバグが多少あるようで、XWINNMR が時折不安定な動作をすることがあるが)。また制御用コンピュータが SGI の O2 になり、OS が IRIX になったことでメンテナンスを行う側にとっても扱いやすくなった(ARX の OS は UNIX であったが、Bruker の特殊仕様であったのか通常の UNIX とは部分的に異なり、扱いづらいという印象があった)。

以上に紹介したように、今後この装置の特徴を生かした特殊測定の利用が増えるに伴って保存された測定データの容量が飛躍的に増加していくことが予想される。そのためデータの管理方法が問題となってくるが、データの管理・保存のためのファイルサーバを併設し、対処することを計画している（現在ファイルサーバの立ち上げ中である）。

《センターより》

平成 14 年 度 活 動 状 況 報 告

1. 分析センターガイダンスの開催

平成 14 年 4 月 16 日(火), 55 人 4 月 17 日(水), 6 人

2. 定例セミナー・施設一般公開の開催

施設一般公開・第 41 回定例セミナー

期 日: 平成 14 年 11 月 2 日(土)15:00～17:00 40 名参加

講演者: 地域共同研究センター研究支援推進員 加藤司郎氏

題 目:「微生物の醸し出すかおり 酒、漬物等の成分」

講演者: 埼玉県警察本部 科学捜査研究所 塚目孝裕氏

題 目:「鑑識科学に応用される分析化学」

第 42 回定例セミナー

期 日: 平成 15 年 1 月 14 日(火)13:00～15:00 46 名参加

講演者: (有)光信理化学製作所 渡辺昭二氏

題 目: ガラス細工とその応用による分析機器への利用法

3. 分析センター機関誌, 速報誌の発行

CACS FORUM Vol.22(H14.12)

CACS News No.107(H14.5.1) No.108(H14.6.3) No.109(H14.7.1)

 No.110(H14.7.12) No.111(H14.12.12)

4. 各種講習会の開催 (別紙 各機種講習会参照)

1) ガスクロマトグラフ質量分析装置(分析センター : 院生向け基礎・応用コース)

基礎(ダイレクト及びガスクロ), 応用コース : FAB 法, 高分解能測定法

2) その他各機器の指導者による講習会(4 年次生, 院生対象)

5. サマーセミナー(第 7 回)の実施

期 日: 8 月 26 日(月) 19 名参加

○分析センター運営委員会

第 1 回 (H14.5.9) センター改革実施委員会(仮称)について
 企画・広報委員会(仮称)について

第 2 回 (H14.10.15) 平成 13 年度決算(案)について
 平成 14 年度予算(案)について
 学長裁量経費について

第 3 回 (H15.1.14) 平成 16 年度概算要求について

第 4 回 (H15.2.18) 平成 16 年度概算要求について

第 5 回 (H15.3.26) 平成 16 年度概算要求について
 専門委員について

○第 6 回国立大学機器・分析センター会議の開催(幹事:豊橋技術科学大学分析計測センター)

期 日: 平成 14 年 11 月 15 日(金)

場 所: 豊橋商工会議所

URL:<http://www.mlsrc.saitama-u.ac.jp/>

各機種講習会

平成 15 年 3 月末日現在

機 器 名	所 属	指導者	講 習 日	受講者数
核磁気共鳴装置 AM400	基礎化学	長谷川	5/23	1
	"	杉 原	4/16・27	2
	"	藤 原	2/13,3/7	2
	応用科学	久 保	4/10	1
	機能材料	小 山	6/12,2/27	2
核磁気共鳴装置 AC200	基礎化学	佐藤(勝)	4/18	2
	"	石 井	5/1	3
	"	佐藤(大)	4/24・25	2
	"	杉 原	4/18・30,5/2	7
	"	藤 原	4/24,5/21,2/13,3/7	10
	"	斎藤(雅)	5/17	6
	"	長谷川	4/19	2
	応用化学	久 保	4/27	3
	"	太刀川	4/22	3
核磁気共鳴装置 AC300P	"	廣 瀬	4/15・17,9/18	7
	基礎化学	佐藤(勝)	4/18	2
	"	藤 原	4/24,2/13,3/7	9
	"	斎藤(雅)	5/17	6
	"	長谷川	4/19	2
	"	佐藤(大)	4/24・25	2
	"	杉 原	5/23,8/31,10/1,11/14	7
	"	石 井	5/1	3
	応用化学	久 保	4/27	3
核磁気共鳴装置 ARX400	"	太刀川	4/22	3
	"	廣 瀬	4/15,4/17,9/18	7
	"	設 楽	3/10	1
	基礎化学	永 澤	4/20	1
	"	杉 原	4/27	1
	"	藤 原	5/21	1
	"	佐藤(勝)	11/13	1
	応用化学	久 保	4/10	1
AVAMCE400	基礎化学	藤 原	1/28,2/4・13・24・25,3/7	11
	"	佐藤(勝)	2/19	1
	"	杉 原	2/17	3
	応用化学	設 楽	2/5・6	4
	機能材料	小 山	2/27	1
走査型分析電子顕微鏡 S-2400	応用化学	大 嶋	5/20・21,11/15,3/11	3
	"	徳 永	5/31,6/3,3/18・24	4
	機能材料	柿 崎	7/31,12/9,3/27・28	8
	"	後 閑	7/30	1
	電気電子	明 蓮	12/18	1
	機 械	玉 川	9/18,10/16	1
高分解能走査型分析電子顕微鏡 S-4100	応用化学	大 嶋	12/11・12	1
	"	徳 永	1/28・30	1
X 線回折装置 RAD-B	応用化学	徳 永	9/19,10/22・24	17
	"	大 嶋	4/23,5/23	3
	機能材料	柿 崎	3/11・12,7/5,3/12	20
	"	後 閑	4/18,5/20,7/17・19, 12/25・26	9

機 器 名	所 属	指導者	講 習 日	受講者数
赤外分光光度計 System2000R	基礎化学 機 械	坂本章 蔭 山	5/16,7/26 5/2	2 2
FT-IR JIR100	応用化学	大 塚	4/23,5/31	4
高出力 X 線回折装置(横型) MXP18A	機能材料	柿 崎	7/12・31,8/27	6
高出力 X 線回折装置(縦型) MXP18VA	応用化学 " 機能材料 電気電子 "	柳 瀬 徳 永 後 閑 矢 口 土 方	3/18・19 10/2・4 7/22・23 9/10 11/27	1 2 1 4 2
蛍光 X 線分析装置 PW2400	応用化学 "	徳 永 大 嶋	4/22,3/17 10/1	3 6
走査トンネル電子顕微鏡 Nano ScopeIII	日本ビーコ 機能材料 " 基礎化学 電気電子	白 井 後 閑 森 谷 明 蓮	5/14,10/26,2/12 10/15 5/22,6/5,9/11・18 11/13 12/16	3 1 3 1 1
常磁性共鳴装置 ESR(EMX)	基礎化学 "	永 澤 永澤・矢野	11/9 1/11・16	1 1
ELEXSYS580	基礎化学 "	永 澤 永澤・矢野	3/22・30 1/11・16	4 1
質量分析装置 GC/MS	分析センター 応用化学	久 保 設 楽	8/28・30 5/16・17	4 2
Aut MS	応用化学	君 島	10/29,11/7,3/17・20	2
複合表面分析装置 ESCA	電気電子 応用化学	小 林 大 嶋	7/12,9/30,11/8,12/3,1/7 9/5・6・10,12/16・17	6 4
複合形熱分析	分析センター 基礎化学	斎藤(英) ヴィレヌーヴ	4/11・18,12/2,1/17 3/6・14	6 2
JMS-700AM	基礎化学 "	斎藤(雅) 佐藤(大)	8/27,10/25,11/11 10/8・10	5 1
合 計			166	276

編集後記

例年より暖かいとはいえ、年が明けて冬本番の季節を迎えました。本来ならば2003年中のはずであった機関誌の発行が年を越えてしまったのは、ひとえに広報担当(石井)の責任です。

さて、2003年4月に総合科学分析支援センターが設立されてからもうすぐ1年になりますが、スタッフにとっては怒涛の1年でした。機器分析分野は旧分析センターを母体としており、箱としても内容としてもまとまっていましたが、生命科学分析分野は全く新しいところから始めなければなりませんでした。生命系の新任教官二人はセンターに部屋もなく、理学部の関係学科に間借りした状態で活動を開始しました。その活動の多くは、統合されたアイソトープ実験施設の維持・管理、動物飼育室の維持・管理の規則作りに費やされることとなりました。特にアイソトープ実験施設は魑魅魍魎の館といわれ、その状況の把握及び対策は生命系の職員のみならずセンタースタッフ全員に多大な努力を強いることとなりました。従って今年度のセンターとしての活動は旧分析センター時代と大差のないものになってしまいました。しかし、事務系スタッフの努力によりここにきてようやくセンターの全体像も見えて始め、また、月1度行われているスタッフ会議でも将来構想についての話し合いが始まりました。来年度からは機器分析分野と生命科学分析分野が両輪としてバランスを保って進んでいけるよう、スタッフ全員努力します。

新センターの機関誌は、20年以上発行が続いておりました旧分析センター時代の機関誌の体裁をほぼ踏襲しました。しかし、新しい組織ということで編集会議により若干の変更を加えております。《総説 レビュー》は関連分野の退官される先生方に研究の集大成をしていただくものです。《ミニノート》は研究業績を含めた形での専門分野の活動記録になっています。《Summer School》はセンターが企画したセミナーの内容紹介であり、《新機種紹介》では新しくセンターに設置された機器の紹介を行います。

創刊号には多くの方々から原稿をお寄せいただきました。執筆者の皆様にはこの場を借りて御礼申し上げます。新しい機関誌の表紙は事務補助の学生と広報担当がデザインしました。

佐藤 勝(総合科学分析支援センター センター長)

小林秀彦(工学部応用化学科 教授)

長谷川登志夫(理学部基礎化学科 助教授)

石井千津(総合科学分析支援センター 助教授)

なお、原稿の整理は事務補助の高山、細田、角田、菅谷、丸山君、印刷所との連絡や校正には久保、設楽両技官また永原さんにお世話になりました。(文責 石井千津)

MaLS FORUM

埼玉大学総合科学分析支援センター機関誌

Vol.1 2004. 1

発行者 埼玉大学 総合科学分析支援センター

さいたま市桜区下大久保255

URL: <http://www.mlsrc.saitama-u.ac.jp/>

TEL 048(858)3670 (ダイヤルイン)

FAX 048(858)3707

印刷所 寿精版印刷株式会社

行田市持田1-11-16

TEL 048(554)9001