

平成 5 年度化学教室研究報告

並木 博・栗原 良枝・永瀬 茂・前田 安昭
西川 恵子・村山 治太・中村 栄子・大谷 裕之

Annual Report of the Department of Chemistry-1993

Hiroshi NAMIKI, Yoshie KURIHARA, Shigeru NAGASE, Yasuaki MAEDA,
Keiko NISHIKAWA, Haruta MURAYAMA, Eiko NAKAMURA, and Hiroyuki OTANI

平成 5 年度の化学教室の研究成果を報告する。本報告は以下のように分類してある。なお、文末のカッコ内は学部学生である。

1. 無機・分析化学および地球化学
2. 物理化学
3. 有機化学および生物化学

1. 無機・分析化学および地球化学

(1) 水中の全シアン定量におけるシアン化水素の異常生成—IV

水中の全シアン化合物の定量において、シアン化合物を全く含まない試料からシアン化水素が検出される場合があることが知られている。本研究室では、このシアン化水素の異常生成についての検討を行っており、これまでに、加熱蒸留時に生成する窒素酸化物と、試薬として添加した EDTA との反応が原因であると推定している。

本研究では、異常生成の代表例であるペルオキシ二硫酸塩とヒドロキシルアミンを含む試料での生成機構およびその防御法を検討した。又、窒素酸化物の標準ガスを用いて EDTA と反応させた場合の生成についても検討を行った。

その結果、ペルオキシ二硫酸塩とヒドロキシルアミンを含む試料からシアン化水素が生成する場合は、窒素酸化物と EDTA との反応による場合とは生成機構が異なることを見出した。すなわち、この場合の生成には、ペルオキシ二硫酸塩による EDTA の酸化生成物が大きく関与することを推定した。従って、その防御にはペルオキシ二硫酸塩をあらかじめ還元するのが効果的と考えられた。種々の還元剤を検討した結果、塩化スズ (II) が有効であることがわかった。一方、窒素酸化物のうち亜酸化窒素、一酸化窒素、二酸化窒素は生成に関与しないことを標準ガスを用いた検討により明らかにした。(酒井 将)

(2) 陽イオン界面活性剤の高感度吸光光度法

水中の陽イオン界面活性剤 (以下 CS) は、これを陰イオン性色素 (以下色素) とのイオン会合体として有機溶媒に抽出した後、その有機層の吸光度を測定する方法で定量されている。しかし、陰イオン界面活性剤 (以下 AS) が共存すると CS は AS とのイオン会合体となり、色素とのイオン会合が妨害されて定量不能となる。本研究では、CS を AS とのイオン会合体としてあらかじめ、1, 2-ジクロロエタンに抽出することによって過剰に共存する AS から分離した後、テトラブロモフェノールフタレインエチルエステルカリウム塩 (以下 TBPE) の高濃度色素溶液で振り混ぜて発色、定量することを検討した。TBPE は CS との結合力が強い色素であり、又、過剰の AS が有機層中に存在しないことから、TBPE と AS との置換反応が容易になり、CS-TBPE イオン会合体の生成が進んだ。CS-AS イオン会合体を抽出した有機層に、pH 9.5 のアンモニア緩衝溶液 5 ml と TBPE 溶液 (10^{-3} M) 2 ml を加えた後、振り混ぜると、有機層が十分に発色した。ただし、この時、TBPE の一部が有機層に抽出されるため、有機層を塩化ナトリウム溶液で洗浄した。この方法を環境水中の CS の定量に適用したところ、共存物の影響をうけることなく CS を定量できた。又、CS としてゼフィラミン 0.02 mg を用いた場合の 10 回の繰り返し実験での相対標準偏差は約 1.93% であった。(井上 聡子)

(3) イオンクロマトグラフ法による高塩濃度試料中の陰イオンの定量

イオンクロマトグラフ法は、高感度で操作も簡単であることから水中の微量陰イオンの定量に広く用いられている。しかし、特定のイオンを多量に含む試料にはこれを適用することができない。例えば、多量の塩化物イオンが共存する海水試料の場合、クロマトグラムは大きく歪み、亜硝酸イオンや他の陰イオンを定量することはできない。

そこで本研究では、このような試料にイオンクロマトグラフ法を適用することを目的とし、これまで無機イオンの分析には用いられていなかった交換容量の大きいイオン交換樹脂カラムと高濃度の溶離液を使用することを検討した。

分離カラムに交換容量の大きい TSKgel SAX (3.7 meq/g) を、溶離液に塩化ナトリウム溶液 (0.5 M) を用い、流速 1.2 ml/min、紫外吸光検出 210 nm の条件で、多量の塩化物イオンが共存する試料のクロマトグラムをとったところ、各イオンの分離が良好なクロマトグラムが得られ、紫外部に吸収をもつ陰イオンを定量することができた。

本法を実際の海水および河川水中の亜硝酸イオン、臭化物イオン、硝酸イオンの定量に適用し、JIS 法と比較したところ、両者の定量値はほぼ一致し、本法が実際の試料での定量に有効であると考えられた。(井上 順子)

(4) 紫外線吸光光度法による海水中の全窒素定量における臭化物イオンの除去

窒素化合物は環境水の富栄養化と深く関連しており、その定量が極めて重要である。これは、水中で硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンおよび有機窒素化合物の形態で存在し、水質規制では、これら全量の定量が要求されている。そこでは、全ての窒素化合物をペルオキシ二硫酸カリウムによる120℃の加熱分解で硝酸イオンに変えた後、紫外線吸光光度法、又は銅-カドミウムカラム還元吸光光度法により定量することになっている。このうち硝酸イオンによる紫外部の吸収を測定する紫外線吸光光度法は、操作が簡便で最も広く用いられているが、海水に適用できない欠点を持っている。すなわち、海水に一定量(67 mg Br/l)含まれる臭化物イオンが紫外部に吸収をもち、妨害をする。さらにその一部は、加熱分解時に酸化されて臭素酸イオンとなるため、その補正も不能である。

本研究では、紫外線吸光光度法を海水に適用するため、臭化物イオンおよび臭素酸イオンの除去法を検討した。ペルオキシ二硫酸カリウムによる分解後の試料に、硫酸および亜硫酸ナトリウム溶液を加え、臭素酸イオンを還元して臭化物イオンにした後、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、臭化物イオンを酸化して臭素とする。これを固相吸着カラム Sep-Pak Plus PS-1 (日本ミリポア工業)に通して臭素および過剰の次亜塩素酸を吸着除去する。この溶液中の硝酸イオンの紫外吸収を220 nmで測定する。海水中の全窒素定量に本法を適用したところ、良好な結果が得られた。(花上 和己)

(5) 硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元定量における還元方法の検討

水中の全窒素の定量は、ペルオキシ二硫酸塩による加熱前処理で全ての窒素化合物を硝酸イオンとした後、その紫外部の吸収を測定する方法、又はこれを銅-カドミウムカラムで還元し、亜硝酸イオンとして吸光光度定量する方法で行われている。後者の方法では、硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元がポイントであり、還元剤として銅-カドミウムの他にヒドラジン、亜鉛などを用いる方法もあるが、これらでは亜硝酸イオンへの還元率が一定しない。これは硝酸イオンがアンモニアにまで還元されることが原因であると考えられている(以下、これを過還元という)。

本研究では、過還元を起こさずに硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元するための基本的な条件を検討した。

検討の結果、その系の酸化還元電位を硝酸イオンが亜硝酸イオンに還元される時の電位と硝酸イオンがアンモニアに過還元される時の電位の間になるように、金属の種類、溶液のpH、錯化剤の種類、濃度を調節すれば良いことが推定された。これまでの検討では、黄銅を用い、EDTA共存下で溶液のpHを10に調節すれば、適切な酸化還元系が得られ、硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元が良好に進むと考えられた。(渡慶次 真弓)

(6) 早川水系の物質運搬量

箱根地区における河川の流下に伴う物質移動の研究は、本研究室では1968年(昭和43年度)に橋爪史明により卒業論文“On the chemical composition of natural waters in Hakone district”として初めて行われた。25年経った今年、再び同じ着眼点から早川水系の物質運搬量を見積り、25年前と比較した。

- 1) 早川を通じて相模灘に搬出される1日(24時間)当りの物質量は25年前とほぼ同じ値が得られた。酸化されやすい物質を含む温泉水が流れている採水地点No.4の、堰堤(落差30m)の上と下とで溶存酸素を測定し、堰堤によるエアレーション効果を測定した。付近の河原では S^{2-} が酸化されて生じた単体の硫黄や、 Fe^{2+} が酸化されて生じた $Fe(OH)_3$ の沈澱が観察された。
- 2) 溶存している金属イオンの、試料運搬過程での濃度変化を追究するために、試料採取直後に二分し、片方はNo.5Bの濾紙で濾過した後、硝酸を添加して持ち帰った。大涌沢や須沢の試料では、硝酸を添加しなかった場合には小さな値を示した。
- 3) 早川本流で、ナトリウム・塩化物イオン・ COD_{Mn} の値は流下に伴って増大した。この現象は人間活動の影響を反映しているものと考えている。
- 4) 蛇骨川は早川本流と比べてナトリウムと塩化物イオンの濃度が高い(約5倍)。供給源は温泉の流入である。(古平 暁子)

(7) 黄砂の化学組成について

タクラマカン砂漠やゴビ砂漠、黄土高原の黄砂は強い季節風に吹き上げられ、偏西風に乗って移動し、遠く北太平洋まで飛来して様々な現象を引き起こす。日本でも黄砂は馴染み深く「春の風物詩」とまで言われている。また「赤雪」や「黄雨」などと呼ばれる現象が日本でも見られることがあるが、これらは飛来した黄砂粒子が雲に取り込まれ雪や雨とともに落下したものである。このように広く地球規模で様々な影響を及ぼす黄砂について研究するために、チベット高原北部の山の上(海拔2850m)で採取された砂(タクラマカン砂漠—平均標高1000m—起源と考えられる風成堆積物)を化学分析し考察を試みた。

粉末X線解析を行った結果、チベット高原で採取された試料には炭酸カルシウムがカルサイトとして存在していた。化学分析の結果は日本地質調査所作成の標準試料である火山岩JB-2とは全く異なった。試料の化学組成は琵琶湖の堆積物JLK-1とやや似ていたが、カルシウムの含有量が多かった。JLK-1は水成堆積物であるために、カルシウムが溶脱していると考えた。チベット高原で採取された試料の化学組成は日本で採取された黄砂の組成と類似していたがカルシウムの量が多かった(ゴビ砂漠や黄土高原で採取された黄砂でも同じ結果が報告されている)。黄砂の輸送過程においてカルシウムの減少が起こっていると考えられる。黄砂飛来時に降水のpHが高くなるという報告と合わせて考えるとカルシウムの含有量の減少は酸性雨の被害の軽減に寄与していると思われる。(浜田 陽一郎)

(8) 降水中の窒素化合物の存在割合

今日の地球環境には、産業活動などの影響により様々な問題が生じている。たとえば化石燃料などを燃焼させエネルギーとして活用する際、大量の汚染物質が大気中へ放出され、その一部は酸性雨となって地上へ降り注いでいる。酸性雨は生態系に大きな影響を与えている。酸性雨による生態系への影響を論議をする場合、大気汚染物質の濃度だけでなく、降下している絶対量を考慮する必要がある。

本研究では横浜に降った雨を試料にして、pH・電気伝導率および溶存している8種類の化学成分 ($\text{Na} \cdot \text{K} \cdot \text{Mg} \cdot \text{Ca} \cdot \text{NH}_4^+ \cdot \text{Cl}^- \cdot \text{NO}_3^- \cdot \text{SO}_4^{2-}$) を測定し、降雨量で重み付けして降下量を見積った。特に窒素化合物に注目し、窒素化合物の存在割合、降下量に影響を与える因子および NH_4^+ と各陰イオンの相関関係について考察した。

測定した9成分の中での当量濃度に基づいた NH_4^+ の降水中の存在割合は、冬にくらべ夏のほうが大きかった。 NO_3^- の存在割合には季節変化が認められなかった。 NO_3^- の単位時間あたりの降下量は、特に降雨初期において、単位時間あたり降水量が多いほど増加する傾向がみられた。風向によっても NO_3^- 降下量は変化し、南よりの強い風に伴って降った雨の場合、 NO_3^- 降下量は著しく減少した。冬季(12月～2月)に降った雨についての NH_4^+ と各陰イオンの相関係数は、 $\text{Cl}^- : 0.45$, $\text{NO}_3^- : 0.80$, $\text{SO}_4^{2-} : 0.77$ であった ($n=67$)。 NH_4^+ の濃度は Cl^- 濃度とは直接関係なく、 $\text{NO}_3^- \cdot \text{SO}_4^{2-}$ 濃度とよい相関が認められた。(藤原 誠)

2. 物理化学

(1) 結晶構造の三次元的視覚化

結晶構造を解析する上でその構造を視覚的に捉えることは非常に大切なことである。しかし、複雑な構造をもつ物質では一般的に行われている二次元的表示では全体的なイメージをつかみにくい。そこで、本研究においては結晶の三次元的表示をはかることにより、イメージを具体的に表現することを目的とした。

取り扱った結晶は最密充填、ダイヤモンド構造、結晶二酸化炭素の3つである。最密充填については六方最密充填および立方最密充填はもとより、特に立方最密充填と面心立方構造が同じものであることをイメージさせる模型の製作に重点をおいた。そこで全体を8つのパーツに分けるなどの工夫を凝らし、視覚的のみならず感覚的にもその構造をより理解できるようにした。ダイヤモンド構造については、それぞれの炭素原子が正四面体型に囲まれている様子や椅子型の六角形をつくるのが捉えやすいように工夫した。二次元的な図では理解しにくいことがこの模型により具体的にイメージすることができた。結晶二酸化炭素の構造は、それぞれの CO_2 分子が XY 平面および X 軸にたいして複雑な角度をもつ。その模型の製作にあたっては、炭素原子を表す発泡スチロール球に決まった角度をもつ穴をあけ、その穴に通すアクリル棒を回すことにより XY 平面との角度をもたせるように工夫した。これにより、特有の分子配列構造をイメージする事ができた。(嵯山 浩人)

(2) X線回折法による液体ジメチルスルホキシドの構造解析

液体は結晶のように無限に続く規則的な構造をとっているわけではないが、液体においてもその形状を反映した近距離にわたる構造が存在する。このような分子同士のパッキングや配向を考えた液体の構造に興味をもち、ジメチルスルホキシド (DMSO) を試料とし X線構造解析を行った。DMSO の分子構造および結晶構造はすでに明らかにされているが、その液体の構造はほとんど明らかにされていない。また DMSO は水と完全に混ざりあう物質であるので、DMSO 水溶液は理想的な混合状態を持つものとして興味深い。そこで DMSO モル分率 0.28, 0.5 の水溶液の解析も行った。

実験から得られるサンプルからの強度データにいろいろな補正を加えて、構造に関する情報を与える動径分布関数を得た。そこから次のようなことがわかった。①任意の DMSO 分子を中心にとり、そこからまわりを見ると液体 DMSO の構造領域は 10 数 Å であり、水と混ざることによってこの構造領域の範囲はせまくなる。②水が rich である DMSO モル分率 0.28 では、DMSO 分子間の硫黄原子の距離は液体 DMSO や DMSO モル分率 0.5 水溶液に比べて短くなっており、バルクな場合と異なる DMSO-DMSO のパッキングをしている。今後は、分子間のパッキングまで考えた液体の構造解析、並びに DMSO 水溶液の混合状態の解析が課題となる。(吉野 かすみ)

(3) 高圧液体二酸化炭素の広角 X線回折法による構造解析

本研究では、高圧の液体二酸化炭素 (温度 4.2°C 圧力 6.82 MPa) の X線回折実験を行い、その結果をもとにモデルをたて、シミュレーションを行った。そして実験値をよく再現する構造モデルを得ることができた。

液体の構造とは、任意に選んだ中心分子の回りにその分子間の相互作用を反映した構造領域が存在するが、規則的に固定されているのではなく、中心分子から離れるにつれて揺らぎが大きくなり、ある程度以上はなれると一様な密度で連続的に分布しているとみなせる、というものである。具体的に、液体二酸化炭素の構造を表現するために、次の五つのパラメータを用いた。①中心分子の回りで構造をつくっている分子の数 N 、②最近接分子間距離 A 、③揺らぎの程度を表す Prins のパラメータ D 、④構造領域の半径 R_c 、⑤構造領域と連続領域のつなぎ目をなめらかにするための減衰因子 l_c 。また、液体の分子の配列は結晶構造を参考にした。

理論の式に各パラメータの値を代入し、モデルの $s_i(s)$ (原子間の構造を反映した量) を求め実験値の $s_i(s)$ と比較した結果、 $N:55$ 個 $A:4.384(\pm 0.0119)$ Å $D:0.180(\pm 0.0103)$ Å $R_c:9.214(\pm 0.0246)$ Å $l_c:1.800(\pm 0.1338)$ Å の時、最も高い整合性を示し、液体二酸化炭素の場合その部分構造において、結晶の構造をよく残していることがわかった。(飯田 華枝)

(4) C₆₀ のディフューズパターンの解析

昨年本研究室の竹内が、C₆₀ 結晶のX線回折パターンの測定を行った。室温のC₆₀ 結晶は面心立方格子構造をとり、柔粘性結晶相であることが分かっている。柔粘性結晶とは、分子の位置は決まっているが、分子が大きな振動回転をしている、もしくは向きの乱れている結晶である。液体と通常の結晶相の中間状態といえる。C₆₀ 柔粘性結晶を冷却すると相転移を起こし、通常の結晶相となる。これは単純立方格子構造である。

室温のC₆₀ 結晶は柔粘性結晶相をとることは分かったが、柔粘性結晶相のC₆₀ 分子の方向の乱れの詳細、すなわち分子の振動回転が等方的であるか異方的であるかは確認されなかった。等方的な振動回転とはあらゆる向きへの回転、異方的な振動回転とは方向の制限された振動回転をいう。

X線回折実験における柔粘性結晶相のパターンから結晶相のパターンを差し引きすると、分子の向きの乱れからくるディフューズパターンのみが残る。その実験値と、振動回転が等方的であると仮定して計算的にシュミレーションしたディフューズパターンを比較した。これらの散乱強度の位相が一致したため、柔粘性結晶相のC₆₀ 分子の振動回転は等方的であると結論した。

しかし強度の一致はまだ完全でなく、実験値の一次元化、結晶の熱膨張の考慮等今後の課題である。(緒方 雅浩)

3. 有機化学および生物化学

(1) 甘味配糖体ストロジンの構造

ストロジンはマレーシア産の植物 *Staurogyne merguensis* Kuntze (キツネノマゴ科) の葉の中に含まれる甘味配糖体である。

本研究ではNMR スペクトル解析により、酸加水分解生成物(アグリコン部)の構造および糖の結合様式を決定し、ストロジンの全構造を決定することを目的とした。

酸加水分解生成物において、その構造は1個の三置換二重結合、3個の二級水酸基、2個の一級水酸基、6個の四級炭素、3個のメチン基、8個のメチレン基、6個のメチル基から構成されていることがわかった。さらに糖の結合位置はアグリコンの3位および21位であることがわかった。

今回および前年度の結果を総合して、ストロジンの構造は、3位、21位、22位、23位および29位に水酸基、12位に二重結合をもつオレアナン骨格をもつトリテルペン配糖体であることを決定した。糖については、アグリコンの21位にトリアセチルラムノースが α 結合していることを決定した。なお、3位に結合している糖については検討中である。(日裏 亜希)

(2) ストロジンの活性と機能

ストロジンはマレーシア産のキツネノマゴ科の植物 *Staurogyne merguensis Kuntze* の葉の中に含まれる甘味配糖体である。本研究ではストロジンの甘味活性および甘味誘導活性を定量的に測定すること、またストロジンの甘味活性と構造相関について考察することを目的とした。2 mM ストロジン溶液 0.5 ml を口に含み、その時の甘さをショ糖溶液の濃度に換算した。1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM ストロジン溶液についても同様の操作を行ったところ、1 mM ストロジン溶液で甘味度が最大値 (0.4 M ショ糖溶液に相当) に達した。ストロジンが舌に吸着するのに必要な時間を調べたところ 2 分間であった。またストロジンの水を甘くする甘味誘導活性は水の温度が低くなるほど増し、さらに活性の持続時間は約 20 分間であった。これらの結果をもとに、ストロジンの水を甘くする甘味誘導活性について次のような方法で測定した。4 mM ストロジン溶液 0.5 ml を口に含み 2 分間舌に吸着させた後吐き出し、1°C の水により誘導される甘味をショ糖溶液の濃度に換算した。2 mM, 1 mM, 0.5 mM ストロジン溶液についても同様の操作を行った。その結果、2 mM ストロジン溶液で甘味度が最大値 (0.175 M ショ糖の甘さに相当) に達した。さらに、ストロジンの酸加水分解生成物、アルカリ加水分解生成物、酵素消化生成物およびストロジン同族体の甘味活性について調べた結果、ラムノースに付いているアセチル基が関与していることが推定された。(山口 敦子)

(3) 耐熱性甘味タンパク質マビンリンIIのNMRスペクトルによる構造解析

マビンリンは、中国雲南省地方に自生するつる性の低木 *Capparis masaikai* (バビンロウ) の種子の中に含まれている耐熱性甘味タンパク質である。本研究室では、1990 年よりマビンリンに関する研究を行っている。それによるとマビンリンは数種と同族体 (I-1, I-2, II, III, IV) が存在すること、これらのうちマビンリンIIは、80°C で 48 時間加熱しても甘味を失わないことがわかっている。マビンリンIIの耐熱性と構造相関を明らかにするためには、マビンリンIIの立体構造の解析が必要である。そこで、本研究では二次元 NMR スペクトルによりマビンリンIIの高次構造を解明することを目的とした。

精製マビンリンIIを 5 mM (28.0 mg/0.45 ml) となるよう H₂O (H₂O : D₂O = 95 : 5) あるいは D₂O に溶解した後、0.1 N HCl で pH を 5 付近に調製し、BRUKER 社製 AMX500, AMX600 分光器で測定し、HOHAHA, COSY, NOESY スペクトルを得た。得られたスペクトルを解析した結果、 α -ヘリックスの領域を A 鎖の L15 から Q19 と B 鎖の C10 から R15, V17 から R19, C21 から Q31, A51 から R53, および N63 から A66 と決定した。また、疎水性のコアに含まれている領域を B 鎖の L14, R15, V25 から Q31, および A51 から R53 と決定した。(郷原 幸彦)

(4) 耐熱性甘味タンパク質マビンリン同族体の一次構造の決定

マビンリンは、中国雲南省地方原産の植物 *Capparis masaikai* (フウチョウソウ科) の種子に含まれる耐熱性甘味タンパク質である。マビンリンには5種類の同族体が存在し、そのうちI-1, II, IIIの構造と甘味活性およびその熱安定性はすでに明らかにされている。

本研究ではマビンリンIVの甘味活性とその熱安定性を調べ、さらに一次構造を決定することを目的とした。ヒト官能テスト法によりマビンリンIVの甘味活性を調べたところ、重量比にしてショ糖の約10倍の甘味度を持ち、さらに、80°Cで1時間加熱後も失活しなかった。次に、マビンリンIVを還元ピリジルエチル化し、逆相高速液体クロマトグラフィーによりA鎖、B鎖に分画した。A鎖を酸加水分解した後、トリプシン、 α -キモトリプシンを用いて断片化し、エドマン分解法により全アミノ酸配列を決定した。さらに、ヒドラジン分解を行って、C末端アミノ酸を確認した。また、B鎖をピログルタミルアミノペプチダーゼにより酵素消化した後、リシルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼを用いて断片化し、エドマン分解法により全アミノ酸配列を決定した。さらに、カルボキシペプチダーゼW法によりC末端を確認した。その結果、マビンリンIVはアミノ酸残基数が28残基のA鎖と72残基のB鎖の2本のポリペプチド鎖からなることが明らかになった。

以上の結果、マビンリンIVの一次構造が決定され、マビンリンIVは他の同族体と同等な甘味を持ち、また熱に対して安定であることが明らかになった。(藤澤 佳代子)

(5) 甘味タンパク質クルクリンおよびマビンリンIIの結晶化の検討

クルクリンは酸っぱいものや水を甘くする作用を有する甘味タンパク質であり、マビンリンIIは耐熱性甘味タンパク質である。クルクリンとマビンリンIIの高次構造をX線結晶構造解析により解明するために、本研究では、X線結晶構造解析に必要なクルクリンとマビンリンIIの単結晶を得ることを目的とした。結晶化にはハンギングドロップ蒸気拡散平衡化法を用い、沈殿剤や添加剤の種類および濃度、ならびに緩衝液のpHについて条件をかえて種々検討した。

クルクリンでは、沈殿剤：13% 2-メチル-2, 4-ペンタンジオール、緩衝液：0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH 4.2)、添加剤：0.1 M 塩化カルシウムの条件で、長さ約200 μm の柱状晶が生成した。また、沈殿剤：クエン酸三ナトリウム (30%飽和度)、緩衝液：0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸 (pH 5.0) の条件においても、長さ約100 μm の柱状晶が得られた。さらに、これらの結晶を種に結晶の成長を試みたが、現在までのところ顕著な結晶の成長は認められていない。さらに、マビンリンIIでは、沈殿剤：硫安 (30%飽和度)、緩衝液：0.1 M リン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム (pH 6.0) の条件で、長さ約25 μm の立方晶が生成した。

クルクリンおよびマビンリンIIいずれの場合にも単結晶の生成に成功したものの、その大きさはX線結晶構造解析を行うには不十分なものであった。(野田 昌孝)

(6) N, N-ジメチルアミノフェニルトロポン類の合成と性質

代表的な7員環非ベンゼン系芳香族化合物であるトロポン,あるいはその2位置換体を電子吸引基とするジメチルアニリン誘導体を3種類合成し,その性質について検討した。実際に合成した化合物は,5(4'-N, N-ジメチルアミノフェニル)-2-ヒドロキシトロポン(1),5(4'-N, N-ジメチルアミノフェニル)-2-メトキシトロポン(2),および2(4'-N, N-ジメチルアミノフェニル)-トロポン(3)である。これらは溶媒の極性変化に依存したスペクトル変化が期待できる化合物である。

目的化合物1~3は,4-ブロモ-N, N-ジメチルアニリンから調製したアリール亜鉛試薬と対応するプロモトロポン体とのPd(0)触媒存在下での交差カップリング反応を鍵ステップとして合成した。各種スペクトルを用いて非極性溶媒中と極性溶媒中での,化合物1~3の性質の違いについて比較検討した。その結果,化合物1および3では非極性溶媒(例えばシクロヘキサン)中で既にジメチルアミノ基から7員環部への分子内電荷移動が大きいことが明らかとなった。ところが,化合物2では非極性溶媒中でその分子内電荷移動は比較的小さいが,極性溶媒(例えばメタノール)中では電荷移動が大きくなることが明らかとなった。よって,化合物2は溶媒の極性変化に応じて著しいスペクトル変化を示すとともに,溶媒の極性によって溶液の色調が変化しシクロヘキサン中で淡黄色を示す溶液が,メタノール中では橙色として観測された。(尾崎 歩)

(7) 牛ロドプシンの再生に対する脂質の影響

視物質ロドプシンは,タンパク質オプシンと11シスレチナールの結合したタンパク質である。牛ロドプシンは,光によって容易に11シスレチナールがオールトランスレチナールになり,オプシンとオールトランスレチナールに分解する。また逆に,オプシンに11シスレチナールを加えると,自然なロドプシンが再生する。この牛ロドプシンは,脂質に取り囲まれている。本研究では,視細胞内での脂質の役割を調べる手段として,ロドプシンの再生時に,組成のわかっている脂質を入れ換えることにより,再生にどのような影響をあたえるかを調べることにした。したがってまず,ロドプシンについている脂質を取り除く必要があるので,それを陰イオン交換クロマトグラフィーで行った。まずロドプシン膜を精製し,それを抽出した。その抽出液をクロマトにかけた。10mM トリスバッファー(SM1200 0.2%)で脂質を洗いながすと,ロドプシンの流出が見られた。そこで,界面活性剤をSM1200 からコール酸ナトリウムに変えて,10mM トリスバッファーで脂質を洗い流した。結果はロドプシンの流出は見られず,300ml流して,脂質はリンの定量的結果70.4%とれていた。脂質の取り除きは不十分だったが,ロドプシンの流出がないので,このバッファーを多く流せば,脂質が取り除けることがわかった。この方法で脂質を取り除き,再生の実験が行われることを期待する。(浜浦 直樹)

(8) イカ桿体外節中のリン脂質の脂肪酸組成について

桿体外節などの生体膜は、脂質二分子膜という構造から成り立っており、リン脂質はその中に 8～9 割程度含まれている。そこで、本研究では、膜の状態を明かにするためにリン脂質のホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルコリン (PS) の分析を行った。スルメイカの桿体外節を遠心分離により精製した後、リン脂質を抽出した溶液をサンプルとした。

まず、順相高速液体クロマトグラフィーによって、各リン脂質に分離させ、次に逆相高速液体クロマトグラフィーによって、各分子種に分離させた。そして、各リン脂質、各分子種の流出液をメチルエステル化したものをガスクロマトグラフィーによって、各リン脂質とその分子種について、構成脂肪酸分析を行った。

それらの結果の面積値と補正值とから重量パーセントを求めたものを、逆相高速液体クロマトグラフィーにおける溶出順序とを考えあわせて、それぞれの分子種を決定した。

今後は、各分子種における 1 位と 2 位の脂肪酸の決定や、各分子種の量的関係が明かにされることを期待する。(熊谷 典子)

(9) アキアカネ複眼中における視物質の精製

視物質ロドプシンは、ビタミン A のアルデヒド型である 11 シスレチナールとタンパク質オプシンがシッフ塩基結合した構造をとっている。ロドプシンは色素タンパクであり、暗順応させた状態で 500nm 付近に極大吸収をもつ。

本研究では無脊椎動物の中でも未だ精製方法の確立されていない昆虫を題材とし、その中でも複眼も大きく、比較的入手しやすい不均し亜目アキアカネをサンプルとして、ロドプシンの精製を試みた。昨年はあまり精製してない段階で陰イオン交換クロマトグラフィーでロドプシンを分けようとしたが、ほとんどロドプシンはとれず、再現性も困難であった。そこで今年はミキサーを使い、精製回数を増やし、マイクロピライの比重の差を利用して、出来るところまできれいにしようと試みた。

精製後、4% コール酸ナトリウムで抽出した後吸光度を測定し、560nm の光を照射し、さらに吸光度を測定した。結果は 530nm 付近の吸光度が下がり、450nm 付近が上がった。つまり、530nm 付近に極大吸収をもつ感光物質ロドプシンを確認することが出来た。

今後は、アキアカネ採取後、生きたまま暗順応させロドプシンの量を増やしたり、トンボのロドプシンに合わせて微妙に比重を変えたりして、さらにきれいなロドプシンを精製することを期待する。(田中 光男)

(10) イカロドプシンの再生に対する脂質の影響

視物質ロドプシンの再生に対し、組成が分かっている脂質を入れ換えることによって、ロドプシンに対する脂質の影響を調べることにした。そのため陰イオン交換クロマトグラフィーを使い、ロドプシンとレチノクロームを分けることにした。pH 7.8と7.2の240nm トリスバッファーを30 mlずつ流し、クロマトを行った。吸光度は490nmを測定すると4つのピークが得られた。1つめの連続スペクトルより500nm付近にピークをもつものが得られたことにより、これはレチノクロームであると思われた。2つめピークの連続スペクトルをとると、485nm付近にピークが見られた。これをアルカリにすると485nm付近が下がり、380nm付近が上がった。2つめのピークはpH依存性があることと、連続スペクトルが485nm付近にピークをもつことからメタロドプシンであると思われる。3つめの連続スペクトルをとると、490nm辺りにピークが見られた。これをアルカリにすると450nm以降はほとんど変化が見られず、450nm以前が少し上がった。3つめはpH依存性がないことと連続スペクトルから判断するとロドプシンであると考えられる。吸光度は低いですが、レチノクロームとメタロドプシンとロドプシンは分けられた感じである。今後吸光度の高いものを取り再生に対する脂質の影響を調べることを期待する。(谷口 健一)