

生体高分子の超音波スペクトロスコピー

メタデータ	言語: jpn 出版者: 日本音響学会 公開日: 2016-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 崔, 博坤 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/17972

生体高分子の超音波スペクトロスコピー*

崔 博 坤**

(明治大学理工学部物理学科)

1. はじめに

最近の医用超音波診断装置の発達には目を眩らせるものがある。ところが、エレクトロニクスなど技術上の進歩は著しいのであるが、その基礎となるべき生体組織中の伝搬特性はいまだに明らかにされていない。特に、tissue characterization の立場からは音速、減衰などの伝搬特性を知ることが本質的である。

生体組織中の音波減衰の原因は細胞壁などによる散乱のほか、組織を構成するタンパク質などの生体高分子による吸収が主たるものである。そこで、生体高分子の吸収機構を明らかにすることが重要となってくる。以上は医用診断という立場からの見方であるが、もう一つ別の見方、物性の立場から見ても生体高分子は大変興味深い。単原子分子、多原子分子など比較的小さな分子の音響的振舞いはほぼ理解されているが、分子量が数万もある生体高分子では構造が複雑なためよく理解されていない。生体高分子は環境条件により異なった振舞いをする。バネのようなヘリックス状態からランダムなコイル状態に転移したり、pH によっては酸、アルカリとなり、電解質としての性質も示す、という具合である。超音波の音速、吸収という情報はこれらの性質すべてを含んでいるので、単一周波数のみの測定では我々にほとんど何も教えてくれない。それぞれの性質は固有の特性時間を持っているので音速、吸収の周波数依存性を明らかにすることによって初めて、これらを分離して理解することができる。生体高分子にはタンパク質、DNA、多糖類、脂質などがあるが、本稿では、研究が最も進んでいるタンパク質のうち、主として牛血清アルブミン水溶液と卵白、卵黄の超音波スペクトルについて、また卵白のゲル化の研究に超音波を応用した例について記述する。

2. タンパク質の超音波スペクトロスコピー

タンパク質は、20 種のアミノ酸がペプチド結合 (-CO-NH-) により結びつけられた、分子量が数千から数万の高分子である。アミノ酸の配列順序により 1 次構造が決

まり、その分子鎖が立体的にどう組み合わせられるかで 2 次以上の高次構造が決まる。血液に含まれるヘモグロビン、アルブミン等は球状のタンパク質であり、筋肉、毛髪などに含まれるコラーゲン、ケラチンは繊維状のタンパク質である。音響特性は、分子量には依存するがタンパク質の個性にはあまり依存しないようである¹⁾。最も古くから調べられているのはヘモグロビンで、Carstensen と Schwan²⁾ は水溶液の MHz 域の音速分散を測り、緩和時間の分布を示唆している。吸収測定でも緩和時間の分布が得られている^{3),4)}。分布があるということは広い周波数域にわたって吸収が変化しているということであるが、これまでの測定はせいぜい 2 桁程度の周波数域しかカバーしておらず、吸収スペクトルの全貌を明らかにするにはほど遠い。牛血清アルブミン (bovine serum albumin, 分子量 68,000, BSA と略す) もヘモグロビンと共に古くから調べられている典型的なタンパク質であるが、やはり数 MHz から数十 MHz の狭い周波数域でしか測定は行われていない^{5),6)}。最近、我々は BSA 水溶液の吸収を 4 桁以上の周波数域で測定することに成功し、吸収機構の解明に大きく一歩を踏み出した。なお、DNA 水溶液でもヘモグロビンとよく似た吸収の周波数依存性を示すことが知られており⁷⁾、吸収機構も同様なものであることが示唆される。

その他のタンパク質では、リゾチームという酵素で興味深い実験が行われている。Yamanaka ら⁸⁾ はリゾチーム水溶液に塩酸グアニジンという変性剤を加えてその吸収増加の時間変化を測定している。分子の形態が吸収に及ぼす寄与を調べるうえで示唆的である。種々のタンパク質の圧縮率は Gekko と Noguchi⁹⁾、Mitaku ら¹⁰⁾ が報告している。また、タンパク質ではないが、生体膜のモデルであるリン脂質膜で美宅¹¹⁾ が一連の研究を行っている。ジパルミトイルフォスファチジルコリンという膜は 41.5°C を臨界点として膜が秩序正しく並んだゲル相と無秩序な液晶相に分かれる。相転移点で音速は減少し、吸収は増加するという softening と critical slowing down を観測した。これは生体物質の相転移現象を超音波で明らかにした数少ない例の一つである。

* Ultrasonic spectroscopy in biomolecules.

** Pak-Kon Choi (Department of Physics, Meiji University, Kawasaki, 214)

3. 牛血清アルブミン (BSA)¹²⁾

3.1 測定法

可能な限り広い周波数域を測定するためには1種類の実験装置だけではとても足りない。我々は、5種類の装置を使って100 kHz から1.6 GHz という広帯域の吸収スペクトルを明らかにした。これだけ広いスペクトルは我々の知るかぎり世界で初めてであろう。図-1に、用いた装置と、その適用周波数域を示した。100 kHz~2 MHz はプラノ・コンケーブ共鳴法, 2~10 MHz は平面型共鳴法, 12~120 MHz はブラッグ反射法, 120 MHz ~1.6 GHz は高分解能ブラッグ反射 (HRB) 法を用いた。更に3 MHz の音速をパルスエコーオーバーラップ法で測定した。これらはすべて絶対値測定である。吸収の測定精度は約5%である。

ここでは、最も新しく開発されたプラノ・コンケーブ共鳴法¹³⁾について簡単に紹介することにする。数百kHz 域はこれまで精度よく吸収を測る方法がなかった領域で、プラノ・コンケーブ共鳴法により初めてそれが可能になった。共鳴器は円筒型で、その両端面は基本周波数2 MHz の水晶振動子と、ステンレス製の凹面反射板から成っている。中に試料が約24 cc 入る。水晶振動子で励起された連続波は多重反射の結果、キャビティの長さが $\lambda/2$ の整数倍に等しくなったときに音は強め合い、定在波となる。その振幅を検出するのにラマン・ナス光回折現象を利用する。水晶に加える信号の周波数を掃引しながら観測すれば、音波の共鳴スペクトルが得られる。共鳴ピークの間隔 $p = v/2l$ (v は音速, l はキャビティ長) から音速が求まり、半値幅から試料の吸収係数が得られる。この方法で最も大事な点は、いかにキャビティ固有の装置損失を少なくして、吸収の情報のみを取り出すかにある。特に1 MHz 以下では音波回折が著しくなるため、2枚の水晶振動子を用いる従来型共鳴法では装置損失が大きくなり吸収を測定できなかつた。凹面反射板を用いる利点は、音波回折を抑えることにあり、これによって性能を飛躍的に向上させることができた。

3.2 中性域の緩和

図-2に吸収 (αf^2) の測定結果を示す。測定濃度は51 g/l, 温度20°C, pH 7である。試料はSigma Chemical社の結晶化、乾燥したものをを用いた。図-2から、

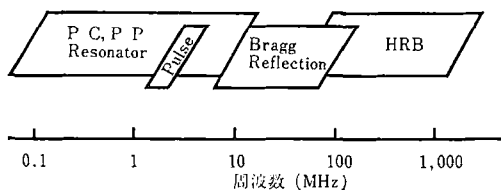


図-1 用いた実験装置とその適用周波数域

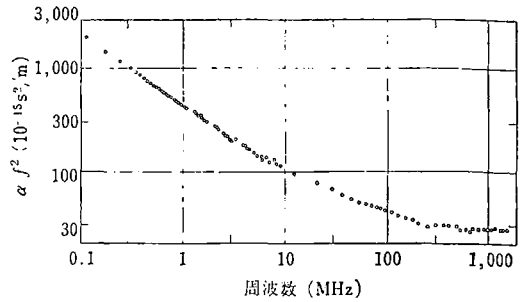


図-2 牛血清アルブミン溶液の吸収スペクトル
測定温度 20°C, 濃度 51 g/l, pH 7。

吸収は非常に広い周波数域で変化しているのが分かる。恐らく100 kHz 下でも緩和域は続くが、1 GHz ではほぼ飽和値 (αf^2) = $27 \times 10^{-15} \text{ s}^2/\text{m}$ に達している。この値は水の吸収値 24×10^{-15} に近い。緩和のみによる吸収を議論するため、この飽和値を実験値から差し引き、波長当たりの吸収 $\alpha \lambda$ に換算したのが図-3である。単一緩和の場合は釣鐘型のピークを持つはずだが、この吸収スペクトルは単一の緩和時間で解析することは不可能で、緩和時間の分布を考えなければならない。結局、次のような分布関数がよくデータと一致した。Davidson-Cole型分布という誘電緩和で有名な関数があるが、これは低周波数側にカットオフを持ち、高周波側にただただ分布を示す。ところがデータは全く反対で、低周波数側に分布を持つように見える。そこで、Davidson-Cole型分布の対数時間軸に対して鏡像の関係になるような関数を作った。複素体積弾性率 K^* に対して新しい分布関数 $g(\tau/\tau_0)$ を導入すると、

$$K^*(i\omega\tau_0) = K_0 + (K_\infty - K_0) \int_0^\infty \frac{g(\tau/\tau_0) i\omega\tau}{1 + i\omega\tau} d(\tau/\tau_0), \quad (1)$$

$$g(\tau/\tau_0) d(\tau/\tau_0) = \begin{cases} \frac{\sin 3\pi \left\{ \frac{1}{(\tau/\tau_0) - 1} \right\}^\beta}{\pi} d \ln(\tau/\tau_0) & \dots 1 < \tau/\tau_0 < \infty \\ 0 & \dots 0 < \tau/\tau_0 < 1 \end{cases}$$

となる。 ω は角周波数, τ は緩和時間, τ_0 はカットオフ緩和時間, K_0, K_∞ は体積弾性率の低周波, 高周波極

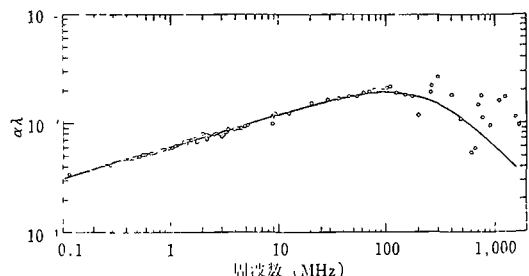


図-3 牛血清アルブミン溶液の波長当たりの吸収値
低周波域で広い緩和時間の分布を示している。実線は(2)式をフィットした計算値である。

限值、 β は分布の傾きを表すパラメータである。 $\alpha\lambda$ に直すと、

$$\alpha\lambda = \frac{\pi}{K_0} (K_\infty - K_0) (1 + \omega^2 \tau_0^2)^{-\beta/2} (\omega \tau_0)^\beta \sin \beta\theta, \tag{2}$$

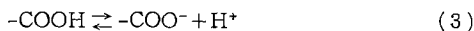
$$\theta = \arctan(1/\omega\tau_0)$$

図-3 の実線で表されるように実際にデータに合わせて得られたパラメータは $\beta = 0.29$, $\tau = 5.5 \times 10^{-10}$ s, $K_\infty - K_0 = 5.15 \times 10^6$ N/m² である。これからカットオフ周波数は 290 MHz, 音速分散量は 1.7 m/s と計算される。3 MHz と 1.6 GHz で測定した音速の差は 2 m/s であり、吸収から予想される 1.7 m/s とよく一致する。これから音速分散は無視できるくらい小さいと言える。

緩和機構について考える。幾つかの説が提案されているが、我々の実験結果をうまく説明するのは水と平衡である。タンパク質分子の外側は親水基になっていて、水分子を幾重にも束縛している。その水と量は 1 g のタンパク質当たり約 0.3 g もあることが知られている¹⁴⁾。その束縛のされ方はタンパク質から離れるほど弱く、遂には全くフリーの水分子となる。束縛の程度は吸着熱や NMR の測定から広い分布を持つことが知られており、水の滞在時間にすると $10^{-6} \sim 10^{-9}$ s の程度である。フリーの水分子の回転相関時間は 10^{-12} s であるから水分子の運動は可成り遅くなっていることが分かる。超音波が加わると、水と水の平衡が乱され緩和が起る。実験で観測された緩和時間の分布領域はほぼ $10^{-6} \sim 10^{-9}$ s に一致しており、この仮説を裏づけている。しかし、これを結論づけるためには多くのタンパク質での広帯域データが必要であり、今後の研究が待たれるところである。

3.3 酸性、アルカリ性領域の緩和

通常の生体組織中では中性であるが、生体高分子の動的挙動を調べるうえで pH は重要なパラメータである。pH を 1.5~13.2 の範囲で変化させて測定した吸収スペクトルの変化を、図-4 に 3 次元的に表した。なお、酸性側では 1 規定濃度の塩酸を、アルカリ側では同濃度の水酸化ナトリウムを加えながら pH を変化させた。吸収の pH 変化は周波数によって相当異なっている。1 GHz 付近では pH に依存しないが、10 MHz 前後では pH 3, pH 11.5 を中心として極大を持つ。100 kHz になると酸側のピークは消え、pH 低下と共にますます増大する。これらの原因について考察してみる。BSA を構成するアミノ酸残基には種々の解離基があり、pH によって幾つかの解離反応が起る。例えば次のようなものである。グルタミン酸、アスパラギン酸に含まれるカルボキシル基中で、



これは H^+ , つまりプロトンが移動するのでカルボキシル基のプロトン転移反応と呼ばれる。中性域では反応は

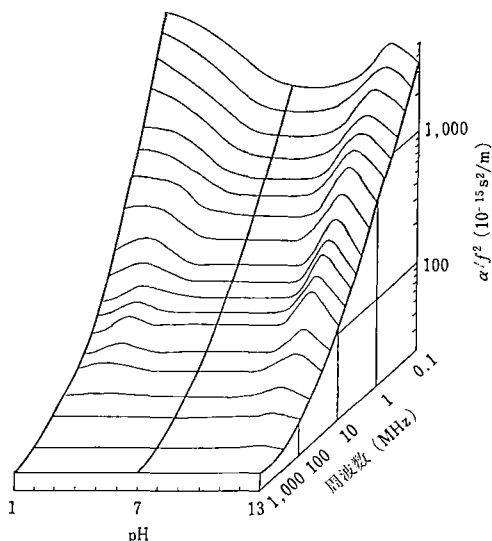


図-4 牛血清アルブミン溶液の吸収 ($\alpha\lambda^2$) スペクトルの pH 依存性

右側に偏っていてほとんど解離しているが、酸性域になって(3)式の反応がほぼ平衡するようになると反応の両側で体積差があるため、超音波緩和が起き、吸収が増大する。

図-4 では中性域の吸収分に加わる形でピークが現れているので、定量的な解析のため、中性域の吸収分を差し引いて $\alpha\lambda$ にプロットしなおしたのが図-5 である。酸性域では 2 MHz と 200 kHz 付近に二つのピークが観測されている。詳しい理論との比較から 2 MHz のピークは(3)式のプロトン転移反応によるものであることが分かった。pH を 4 以下に下げていくと、BSA 溶液の粘性率は徐々に増加することが知られている。このことは BSA 分子の立体的な形が変り (コンフォメーションの変化という) 膨張していることを意味する。200 kHz のピークは、このコンフォメーション変化と

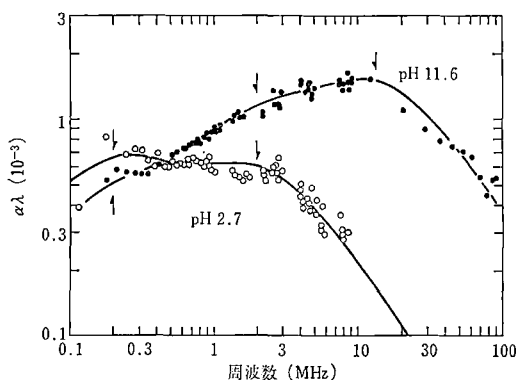
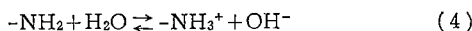


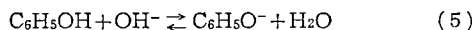
図-5 牛血清アルブミン溶液の pH 2.7, pH 11.6 での波長当たりの吸収
実線は二段、三段緩和曲線を示し、矢印はその緩和周波数を示す。

関係しているのではないかと予想される。

アルカリ性領域の場合は図-5 に示すように三つのピークが観測されている。この場合は次のようなプロトン転移反応が考えられる。リジン残基に含まれるアミノ基のプロトン転移



チロシン残基に含まれるフェノール基のプロトン転移



(4), (5) 式の反応をそれぞれ 12, 2 MHz 付近の二つのピークに当てはめるとうまく説明がつく。最も低周波の 200 kHz のピークは酸側と同様に、コンフォメーション変化による緩和と予想される。(3)~(5) 式のようなプロトン転移反応は純粋なアミノ酸溶液中ではよく調べられていて、速度定数や体積差などが分かっている。それと比較すると、タンパク質中では体積差はほぼ同じだが、反応は約 1 桁遅いことが明らかになった。

4. 卵白, 卵黄の音速と吸収スペクトル¹⁵⁾

卵白はタンパクという言葉の語源とも言われるように、我々の最も身近に存在する天然のタンパク質水溶液である。主成分はオボアルブミン 5.4%, コンアルブミン 1.2%, オボムコイド 1.1%, 水 88% である。一方、卵黄はリボタンパクと呼ばれる、脂質とタンパク質が結合したものが主成分で、水の量は 51% である。

パルスエコーオーバーラップ法を用いて 3 MHz の音速を 10~80°C の温度で測定し、更にプラノ・コンケーブ共鳴法で 200 kHz~10 MHz の吸収を測定した。なお、卵黄では光が透過しないので、凹面反射板の裏側に PZT 振動子を接触させて共鳴スペクトルを得た。試料は白色レグホーン種の鶏卵で、産卵の翌日に実験を行った。卵白の粘度は新鮮度によって変化するが、超音波吸収は 1 週間後も変化はなかった。図-6 に吸収の周波数依存性を示す。卵黄の方が卵白よりも約 4 倍吸収が大きい。測定範囲では、卵白の吸収係数 α は f の 1.25 乗、卵黄は f の 1.3 乗に比例している。明石らは¹⁶⁾、数

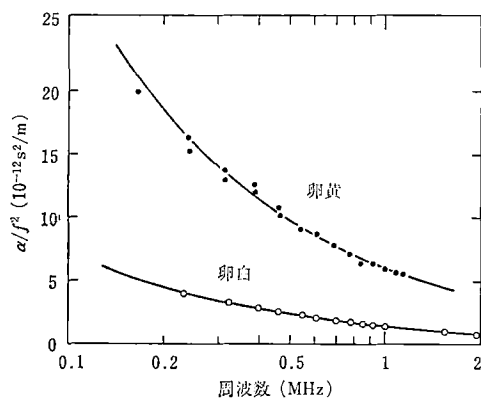


図-6 卵白, 卵黄の 20°C の吸収スペクトル

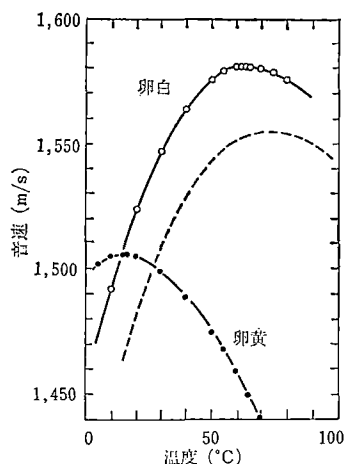


図-7 卵白, 卵黄の音速の温度依存性
破線は水の音速を表す。

百 MHz 域で卵白の吸収を測定し、400 MHz 付近で α は f の 1.8 乗に比例すると報告している。この周波数依存性の変化は図-2 の BSA の場合と酷似しており、吸収の原因も似たようなものではないかと想像される。

音速の測定結果は図-7 に示すように卵白, 卵黄でかなり異なっている。卵白の方は、破線で示された純水の温度依存性とよく似ている。ただ、極大を示す温度が 74°C から 62°C に下がっている。通常の液体では温度上昇によって分子の熱運動が激しくなるため音速は温度と共に減少するが、純水は例外である。純水中では分子間の水素結合によって大きなアイスバーグ構造ができており、その構造の圧縮率のため低温域では音速が低く、温度上昇によってその構造が壊れてくると音速が増加する。そして次第に通常の液体としての性質を示すようになるから、ある温度で音速は極大を持つことになる。卵白では、この水構造がかなり保存されているので音速は純水に近い温度依存性を示すのであろう。しかし、卵黄では、極大温度が極端に下がっていることから、水構造はわずかししか保存されていないのであろう。このように、音速は水溶液としての水の物性を全体として反映しているが、吸収は溶質の物性を反映していると言ってよい。もちろん、音速でも濃度変化を精密に測定すれば溶質の情報が得られるはずである。

5. 卵白のゲル化と超音波¹⁷⁾

ゲルは多くの分子が結合した網目の中に溶媒(水)を含んだ構造を持ち、生体中でも眼球など各所に見られる。卵白ゲルとはゆで卵のことであるが、このゲル化過程はタンパク質分子の変性という現象を伴っており、生化学的、あるいは食品化学的にも大変興味を持たれている。ゼラチン、寒天などは温度を下げるとゲル化するが、卵白は約 60°C 以上でゲル化する。実験はパルスエ

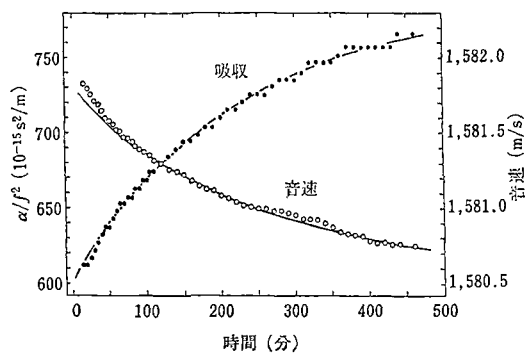


図-8 卵白ゲルの温度を70°Cから75°Cに急速に上げたときの、音速、吸収の時間依存性

コー法で 3 MHz の音速と吸収を同時に測定した。60°C から 75°C の間でステップ状に温度を上げ、温度を一定に保って時間変化を観測する (aging 実験)。図-8 は、70°C から 75°C に温度を急速に (2~3 分以内) 上昇させたときの音速、吸収の時間変化である。吸収は徐々に増加しているが、音速は減少している。卵が固くなるのに音速が減少するのは一見奇妙なことである。その時間変化は簡単な指数関数で表され、特性時間はともに 220 分であった。

卵白中のタンパク質分子は球状でコンパクトな形をしているが、ある温度以上になると変性して、形がばらばらになってくる。分子同士が結合され、網目が形成されるとゲルになる。そのゲル化過程の時間変化が正に図-8 で観測されているのである。吸収増加の原因は、網目と水との相対運動によってミクロな摩擦が生じることに帰せられる。ゲル化するとわずかにずり弾性率が増加するので、それだけ考えると音速は増加してもよいはずだが、実際には減少している。ゲル化によって水と水の構造、量が変化するので、それが音速減少の原因ではないかと考えられる。

ゲル化に関して、もう一つ興味深い現象として履歴現象がある。図-9 で★はゾル状態での吸収値を示している。60°C で aging を行うと点線のように b の▲まで上昇する。ゲルになった状態で温度を下げると b→c のようになる。再び温度を上昇させると c→b まで可逆的に変化する。62, 64, 66°C で aging を行ったが、ほとんど変化はなく 70°C でわずかに上昇する (d)。d から温度を下げ、再び上げると d↔e のように以前とは別の道をたどる。75°C で aging すると大きな変化があり (f), f↔g とまた別の道をたどる。このように最高温度がどこまで上がったかによって吸収の履歴現象が観測される。音速でも全く同じような履歴現象が得られている。これらは次のように解釈することができる。60°C, 75°C での大きな変化はそれぞれコンアルブミン、オボアルブミンの変性温度に対応している。aging によってまずコンアルブミンによる網目構造が形成されるが、一度形成

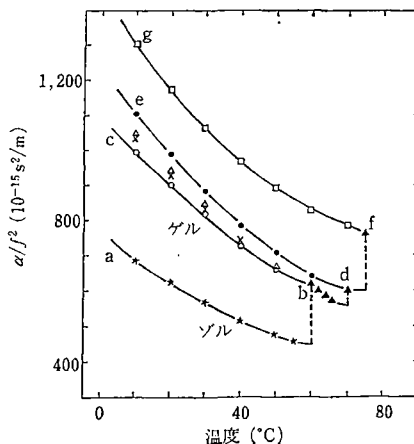


図-9 卵白ゲルの吸収の履歴現象
破線は aging 実験による吸収増加を示す。

されると主要な骨組みは温度を下げてても変化はなく、可逆的な構造のみ変化する。再び温度を上げて aging を行うと、新たな分子オボアルブミンが変性を受けて、より密な構造ができる。その骨組みは保存されて壊れることはない。従って温度を下げてても以前の b↔c, d↔e とは別の吸収値 f↔g を取ることになる。

超音波でゲル化を研究することの長所は、非破壊で、しかも単一の試料で全過程を追跡できることである。今後、この特徴を生かしてゲル化の研究に威力を発揮することが期待される。

6. おわりに

生体高分子の音波物性の研究が始まってから 30 年以上立つが、本格的な研究はまだ日が浅い。その理由は、吸収機構を解明するには広範囲の周波数, pH, 温度依存性が必要なこと、試料がわずかしか手に入らないものが多いこと、などである。今後の発展のためには新しい測定法、特に数十 kHz 帯で試料が少なくて済むもの、の開発と共に、より系統的な研究が望まれる。

本稿は、東京大学生産技術研究所において行われた高木望志郎助教授、斐鍾林博士 (現韓国大邱大学) との共同研究に基づいている。

文 献

- 1) F. W. Kremkau and R. W. Cowgill, "Biomolecular absorption of ultrasound: I. Molecular weight," J. Acoust. Soc. Am. **76**, 1330-1335 (1984).
- 2) E. L. Carstensen and H. P. Schwan, "Acoustic properties of hemoglobin solutions," J. Acoust. Soc. Am. **31**, 305-311 (1959).
- 3) W. D. O'Brien, Jr. and F. Dunn, "Ultrasonic absorption mechanisms in aqueous solutions of bovine hemoglobin," J. Phys. Chem. **76**, 528-533 (1972).
- 4) F. Schneider, F. Muller-Landau and A. Mayer, "Acoustical properties of aqueous solutions of oxygenated

- and deoxygenated hemoglobin," *Biopolymers* **8**, 537-544 (1969).
- 5) L. W. Kessler and F. Dunn, "Ultrasonic investigation of the conformational changes of bovine serum albumin in aqueous solution," *J. Phys. Chem.* **73**, 4256-4263 (1969).
- 6) J. Lang, C. Tondre and R. Zana, "Effect of urea and other organic substances on the ultrasonic absorption of protein solutions," *J. Phys. Chem.* **75**, 374-379 (1971).
- 7) W. D. O'Brien, Jr., C. L. Christman and F. Dunn, "Ultrasonic investigation of aqueous solutions of deoxyribose nucleic acid," *J. Acoust. Soc. Am.* **52**, 1251-1255 (1972).
- 8) K. Yamanaka, H. Nakajima and Y. Wada, "Kinetic study of denaturation and subsequent reduction of disulfide bonds of lysozyme by the rapid ultrasonic absorption measurement," *Biopolymers* **17**, 2159-2169 (1978).
- 9) K. Gekko and H. Noguchi, "Compressibility of globular proteins in water at 25°C," *J. Phys. Chem.* **83**, 2706-2714 (1979).
- 10) S. Mitaku, T. Kagayama and R. Kataoka, "Ultrasonic properties of proteins," *Jpn. J. Appl. Phys.* **24**, Suppl. 24-1, 43-45 (1985).
- 11) 美宅成樹, "生体液晶の異常なゆらぎ," *パリティ* **2**, 26-36 (1987).
- 12) P.-K. Choi, J.-R. Bae and K. Takagi, to be submitted to *J. Acoust. Soc. Am.*
- 13) Y. Naito, P.-K. Choi and K. Takagi, "A plano-concave resonator for ultrasonic absorption measurements," *J. Phys. E* **18**, 13-16 (1985).
- 14) I. D. Kuntz, Jr. and W. Kauzmann, "Hydration of proteins and polypeptides," *Adv. Protein Chem.* **28**, 239-345 (1974).
- 15) P.-K. Choi, J.-R. Bae and K. Takagi, "Frequency dependence of ultrasonic absorption in egg white," *J. Acoust. Soc. Am.* **80**, 1844-1845 (1986).
- 16) 明石尚之, 榑引淳一, 中鉢憲賢, "超高周波帯における卵白, 卵黄の音響特性測定," *音響論集*, 847-848 (1987.10).
- 17) P.-K. Choi, J.-R. Bae and K. Takagi, "Gelation and ultrasonic hysteresis in egg white," *Jpn. J. Appl. Phys.* **26**, Suppl. 26-1, 32-34 (1987).
-