

生体構成分子の電磁波によるスペクトル解析

會 沢 勝 夫

(東京医科大学生理学第二講座)

Spectral analysis of constituent organic molecule with an electromagnetic wave. Katsuo AIZAWA (*Tokyo Medical College, Dept. of Physiology*)

はじめに

近年の電磁波分光による生体分子構造の解析手法は急速に生理機能の研究に導入され始められている。特に、生理機能を生体分子構造の動態と対応して解析する事により、機能の実体が明確に把握できる様になってきた。ここで、分子構造の動態を電磁波を手段に用いた観測法についての概要を示す。

生体分子が吸収又は放出する電磁波のエネルギー(光量子エネルギー) E は原子のエネルギー準位 E_2 と E_1 との差でまじり $E_1 - E_2 > 0$ のときは光の放出であり、 $E_1 - E_2 < 0$ のときは吸収である。光量子エネルギー E とその振動数 ν との関係は次のプランク式で示す事ができる。

$$E = h\nu = hc/\lambda \dots\dots\dots(1)$$

h は Planck 定数で、 6.6×10^{-27} erg·sec の値である。又、光の振動数 ν は光速 C を波長 λ で割った値で示す。このエネルギー E は次の式の様に変換する事ができる。

$$kT = hc\lambda^{-1} = eV = h\nu \dots\dots\dots(2)$$

kT : 熱エネルギー, $hc\lambda^{-1}$: 波数による電磁波のエネルギー, eV : 電子エネルギー, $h\nu$: 周波数による電磁波のエネルギーである。このエネルギー量は波長が短くなればなるほど(1)式より大きくなる事が理解できる。生体分子の電子エネルギー準位は吸収した光量子エネルギー(紫外・可視領域の波長で、100 kcal/mole 以上)により遷移を起こし、励起状態になる。この吸収された波長はスペクトルとして観測できる。吸収スペクトルは分子内の電子エネルギー準位内の振動と回転のエネルギー変化も含まれるので複雑な解析を必要とする。

生体を構成している主な原子は種々の原子と

結合状態にあり、大きな分子としてのネットワークを形成している¹⁾。個々の原子間で、その結合エネルギー以上の極端に強い光量子エネルギーが生体分子に供給されると結合状態は解離しネットワーク構造を維持できなくなってしまう事もある。

光量子エネルギーが小さくなると分子内の電子エネルギー準位内の振動エネルギー (~5 kcal/mole) と回転エネルギー (~0.01 kcal/mole) に変化を起こし、近赤外や赤外領域の吸収スペクトルとして観測できる。更に、波長が長くなる遠赤外やマイクロ波領域では光量子エネルギーが小さく、回転エネルギーの変化のみ起こり、吸収スペクトルとして観測できる。光量子エネルギーの高い波長の光や同等のエネルギーが生体構成分子に他から供給されると電子エネルギー遷移を起こし、接近している分子間で光化学反応を進行させる様になる。

I 紫外・可視領域の電子スペクトル

電子スペクトルは吸収スペクトルと発光スペクトルの2種類に分けることが可能である。生体分子が光の吸収により励起される電子のエネルギー状態は π 電子等に依存しており、これが吸収スペクトルとして観測できる。 π 電子は原子間の二重結合 ($C=C$, $C=O$, $N=N$, $C=S$ 等) に関与する電子で、エネルギー遷移に重要な働きをなしている。又、窒素や酸素を基本構造に持っている生体分子は非結合電子対 ($O:$) の n 電子に依存している。

単結合 ($C-H$, $N-H$ 等) を形成している電子は σ 電子である (図-1)。生理機能の解明に n 電子と π 電子, π 電子と π 電子間の相互作用は必要不可欠の情報であり、 σ 電子と π 電子間の

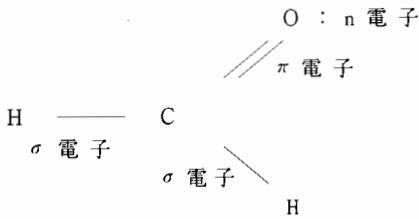


図-1. ホルムアルデヒドの価電子状態

相互作用は無視する事ができる²⁾.

生理機能を行っている場である生体分子構造は機能に特有な電子間のエネルギー遷移に伴ってスピン配列に変化が生ずると動的にコンフォメーションを変えてしまう場合も考えられる。しかし、生体を構成している多原子分子の核外電子の振動エネルギー準位（基底状態のエネルギー準位）は紫外・可視領域の波長のエネルギーを吸収して他の振動準位（励起状態のエネルギー準位）に移項を起こす時にかかる時間が非常に短かいために（ 10^{-12} sec内外）原子核の位置の変化を起こさない。一般的にエネルギー遷移による分子構造の変化は直接起きない。励起状態のエネルギー準位に到達したエネルギーは熱として放散されると同時に蛍光を出して安定な基底状態へと戻る。又、一部のエネルギーは非放射的に系間交差を起こし他の準位（励起三重項状態）に移した後、リン光を發して基底状態へと戻る^{3,4)}。

蛍光スペクトルは吸収スペクトルと鏡映の関係にあり、各分子特有の吸収ピーク波長で励起して蛍光のスペクトルを観測する事により分子の同定が可能になる。生体物質の場合に芳香族や環状構造を持った分子、脂肪族分子及びナトリウム等を含む含有しているハロゲン化合物も蛍光を出す。しかし、これらの蛍光スペクトルは周囲の環境状態によりピーク波長やその強度を大きく変化させてしまう^{5,6,7,8)}。例えば、酸性の溶液では一般的に窒素の非共有電子対はプロトンを受け取り吸収スペクトル及び蛍光スペクトルに変化をきたす⁹⁾。イオン化している化合物の蛍光スペクトルと蛍光強度が溶液の水素イ

オン濃度により変化するので、pHの蛍光指示薬として使用できる。水素イオン濃度の指示薬のみならず Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , potential sensitive probe, organelle selective, protein and receptorselective, anionic and cationic membrane, neutral membrane, 温度等の指示薬として数多く蛍光プローブが用いられている。蛍光プローブの特性をいかし注意深く用いると生理機能に対応した情報を観測する事ができる。

I-1

微小管蛋白の蛍光スペクトル

微小管蛋白の構造は電子間のエネルギー遷移に伴って動的にコンフォメーションを変え種々の生理機能を行っていると考えられる。そのエネルギーの担い手になっているのがトリプトファンやチロシン等のπ電子結合をもつアミノ

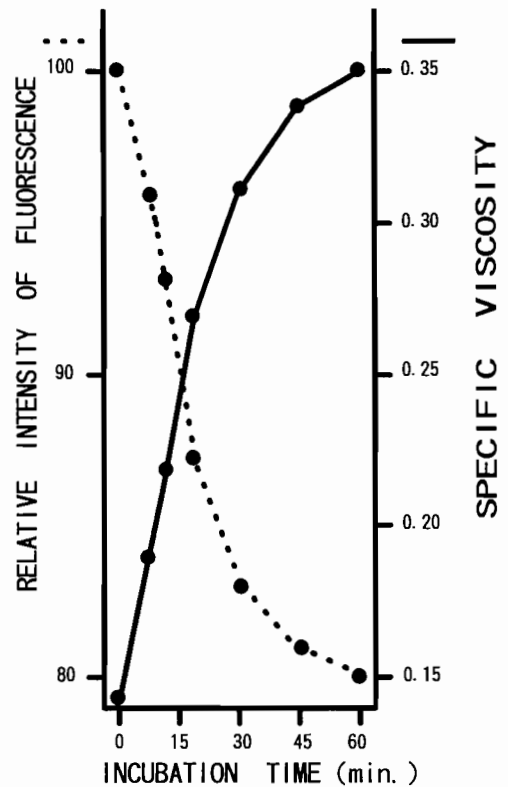


図-2. 微小管蛋白サブユニットの重合過程における粘性と蛍光強度の変化

酸である。特に、蛋白構造中に存在するこれらアミノ酸周辺の環境状態は生理機能に大きく影響を与えると考えられる。ここで、微小管蛋白のサブユニットが重合していく過程でトリプトファンの蛍光を観測してみた。

鶏卵孵化15日目の脳より微小管蛋白をサブユニット状態で取りだし、4℃に保ち実験に使用した。サブユニット溶液にGTP, KCl等を添加し36℃でインキュベートするとサブユニットは重合を開始し、微小管蛋白を形成していき、溶液の粘性は高くなる¹⁰⁾(図-2)。

サブユニット溶液の粘性を観測し微小管蛋白の重合状態を確認しながら溶液中のサブユニットに対し波長290nmで励起し350nmにピークをもつトリプトファンの蛍光スペクトルを観測した¹⁰⁾。

微小管蛋白サブユニットの粘性が最大になった時、トリプトファンの蛍光強度は約20%減少して安定化した(図-2, 図-3-A)。

サブユニット溶液のKClを50m・mol/l以下の濃度に保つとサブユニットは36℃でインキュベートを行なっても重合を起こさなかった。この微小管蛋白を形成しないサブユニットはトリプトファンの蛍光強度の減少を認めなかった(図-3-B)。

微小管蛋白サブユニットの重合に伴うトリプトファンの蛍光強度の低下現象はサブユニット状態の時に表在していたトリプトファンが蛋白構造内に組み込まれていくと考えられる。この様にトリプトファンの周囲の環境状態が微小管蛋白サブユニットの重合に対応し大切な要因となっている事が理解できる。Kイオンが微小管サブユニットのトリプトファン周辺の環境状態に与える動態については赤外領域の振動・回転スペクトルの項で述べる。

I-2

テトラピロール環の電子スペクトル

テトラピロール環(ポルフィリン系やクロリン系物質)を中心に紫外・可視領域の電子スペクトルの観測例をここに示す。

光感受性物質であるポルフィリン系の物質が

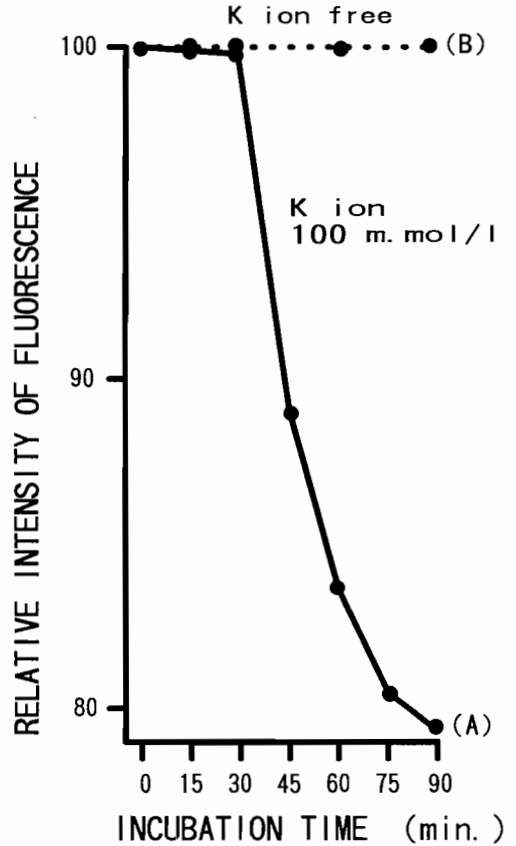


図-3. 微小管蛋白サブユニットの重合過程におけるKイオンのトリプトファン蛍光強度に対する影響

腫瘍組織に多く存在し、赤い蛍光を放出している現象が1942年に報告された¹¹⁾。以後、腫瘍に対して親和性を持つポルフィリン系物質の開発研究が進められた。1960年にヘマトポルフィリンを酢酸と硫酸で処理して調製されたヘマトポルフィリン誘導体(HpD)¹²⁾が腫瘍にたいし高い親和性を持っている事が確認され、その蛍光スペクトルを内視鏡的に観測して腫瘍の存在部位を確認出来るようになった¹³⁾。最近になってクロリン系の物質が腫瘍¹⁴⁾及び動脈硬化部位^{15,16,17,18)}に対しても高い親和性を持っている事が確認されてきた。

I-2-a

吸収スペクトル

ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)は

C₃₄H₃₈O₆N₄ の基本分子式をもち、分子量598.7を中心としたものである。HpD はリン酸緩衝塩溶液 (pH7.2) 中で近紫外部 360-410 nm の強い吸収帯 (Soret 帯) と可視部 506, 538, 565, 610 nm の弱い吸収帯 (B帯) とを有している (図-4-A)。腫瘍内に取り込まれた HpD の吸収帯は約 10 nm 長波長側に移動する。この移動は bathochromic shift と呼ばれ、生体分子の結合や置換等による構造変化が生じる時に起こる^{14,19)}。特に、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移は極性溶媒の接近や置換基との相互作用により長波長側に移動する。

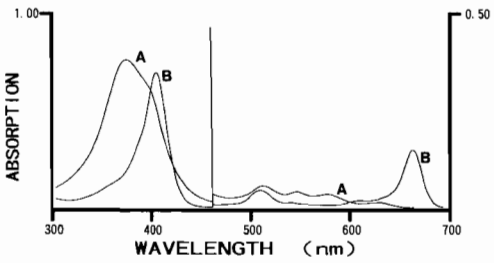


図-4. 光感受性物質の吸収スペクトル
A : ヘマトポルフィリン誘導体 HpD
B : mono-L-aspartyl chlorin e6

I-2-b

エネルギー遷移

吸収帯の波長で励起すると HpD 分子のエネルギー準位は基底状態から励起一重項へと移項する。励起一重項状態から基底状態へ戻るエネルギーは相対蛍光量子収率が0.0029 (HpD : 1 μ mol/l) であるのでわずかである²⁰⁾。この為、基底状態に直接戻らずに殆どのエネルギーは非放射的に系間交差を起こし、励起三重項状態へ移項する。励起三重項状態のエネルギーの一部は HpD に近接している酸素の励起三重項状態へと転移し、一重項酸素を産生させている^{21,22)} (図-5)。

この活性化状態の一重項酸素の存在は特有の発光(波長1265 nm)を測定する事によって確認されている²³⁾。

励起一重項から励起三重項への系間交差率

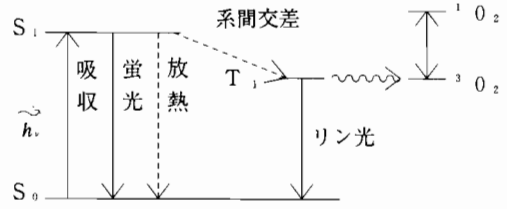


図-5. 電子のエネルギー遷移過程の速度定数
S₀: 基底状態 S₁: 励起一重項
T₁: 励起三重項

(K_{IM}) は蛍光量子収率 (Φ_{FM}) と蛍光寿命 (τ_{FM}) から求められる^{24,27)}。

輻射寿命 (τ_M) を次の式から求める。

$$\tau_M^{-1} = \tau_{FM}^{-1} \cdot \Phi_{FM} \dots\dots\dots(3)$$

非放射的に行われる系間交差率は蛍光寿命と輻射寿命から求める。

$$\tau_M^{-1} = K_{IM} + \tau_{FM}^{-1} \dots\dots\dots(4)$$

I-2-c

ポルフィリンの励起三重項への系間交差率

ヘマトポルフィリン (Hp) はテトラピロール環の周囲に存在する側鎖が全て疎水基より構成されている。

コプロポルフィリン (Cp) はテトラピロール環の周囲の側鎖の半分が親水基で構成され、ウロポルフィリン (Up) は全ての側鎖が親水基で構成されている。これらの分子の蛍光寿命 (τ_{FM}) は Hp : 75 p·sec, Cp : 149 p·sec, Up : 322 p·sec である。蛍光量子収率 (Φ_{FM}) は Hp : 0.012, Cp : 0.021, Up : 0.1096 である。ここで(4)式に Φ_{FM} と τ_{FM} を代入し、非放射的系間交差率を求める。

励起一重項(S₁)から励起三重項(T₁)への非放射系間交差率はリン酸緩衝塩溶液 (pH7.2) 中で Hp : 1.098, Cp : 0.3026, Up : 0.025 となった。この値は蛍光量子収率と対応していた。

I-2-d

蛍光量子収率の測定

HpD の蛍光量子収率を求めるために、8 \times 10⁻⁶mg/l の濃度で HpD を 10 mm のキュベットに入れ Soret 帯の 360 nm の吸光度を測定し、この測定値に分子量を598.7として分子吸

光係数56.89 (ϵ mM)を算出した。又、標準物質として Rhodamin B を用い 360 nm の分子吸光係数 5.79 (ϵ mM)を得た。分子吸光係数を求めた 360 nm 波長で励起し, HpD 及び Rhodamin B の蛍光を分光測光し, 各波長を波数変換した後に蛍光が出現している各波数の強度を積分し蛍光量とした。この時の Rhodamin B の蛍光量子収率は0.69である。これを既知の量として用いて HpD の蛍光量子収率が0.0029である事を相対的に求めた²⁰⁾。HpD を 360 nm で励起して, 励起一重項状態(S_1)になったエネルギーは0.3%が蛍光を発生して基底状態(S_0)へと戻り, 99.7%が熱として発散されるか, 非放射的に励起三重項(T_1)へと系間交差を起こしていると思われる。

I-2-e

蛍光寿命の測定

蛍光寿命の測定は次のように行った。HpD を 0.5 mg/ml の濃度に燐酸緩衝塩液 pH7.2 に溶解し, 酸素飽和状態と酸素除去状態の試料を作りアルゴン分離型シンクロナス受動併用モード同期 CW 色素レーザー(最短パルス巾 0.4 p·sec, パルス同期 12.2 n·sec, 波長 570 nm)で

励起した。励起入射光に対して90°方向の蛍光をレンズ及び, 600~700 nm 透過バンドパスフィルターを通し, ストリークカメラの蛍光面に結像してレーザーと同期し, SIT 管により蛍光測定を行った(図-6)^{25,27,28)}。

蛍光減衰曲線から算出した酸素に対する操作をしない HpD の蛍光寿命は 239 p·sec であった(図-7-A)。酸素飽和の状態での HpD 蛍光寿命は 176 p·sec (図-7-B), 酸素除去の状態では 333 p·sec となった(図-7-C)^{24,26)}。

HpD の酸素なし状態の蛍光寿命は酸素飽和状態の蛍光寿命の約半分になっている。これは HpD の励起一重項のエネルギーが励起三重項へ遷移し, 三重項を介して酸素に移動するクエンチング現象を起こしているためと思われる。

HpD の輻射寿命は蛍光寿命 239 p·sec と蛍光量子収率0.0029から(3)式より 82 n·sec となった。溶液に対して酸素処理をしていない HpD の非放射遷移率は(4)式より $4.2 \times 10^9 \text{ sec}^{-1}$ となった。

I-2-f

二分子間のエネルギー遷移

mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) はテトラ

Schematic diagram of a synchroscan streak camera

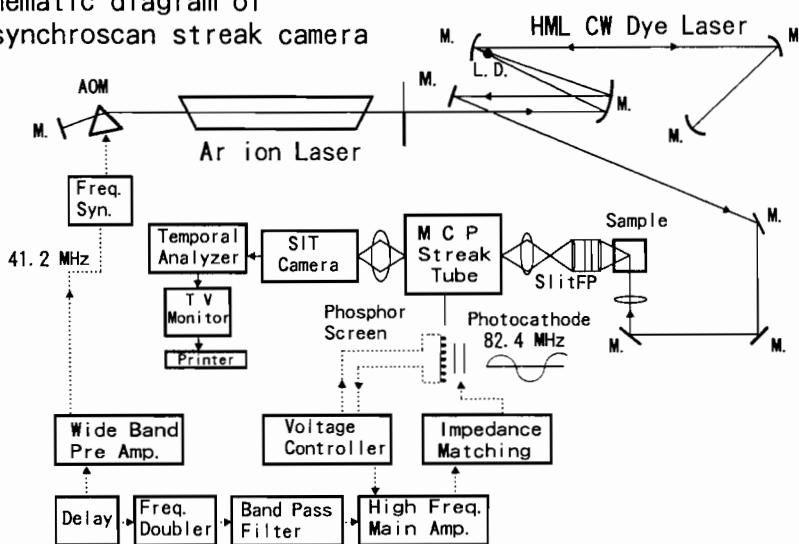


図-6. ストリークカメラを用いた蛍光寿命測定装置

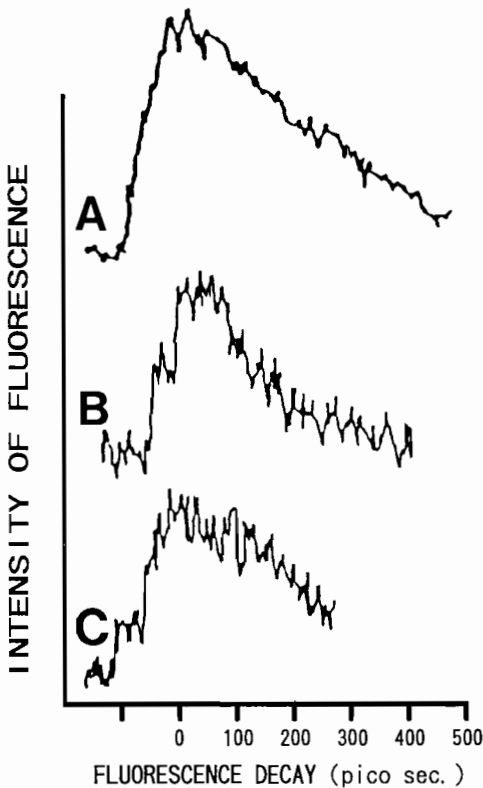


図-7. ヘマトポルフィリン誘導体の蛍光寿命曲線

- A : 酸素除去措置をしていない
- B : 酸素飽和状態
- C : 酸素除去状態

ピロールのD環にアスパラギン酸を結合した分子量871.7の腫瘍親和性の高い光感受性物質である¹⁴⁾。この腫瘍親和性の特長を調べる第一歩として血漿成分であるアルブミン [仔牛血清アルブミンフラクションV (BSA) 平均分子量68000] と NPe6 が *in vitro* の状態において、どの様に作用しているかを電子スペクトルの観測により調べた¹⁹⁾。

NPe6 のリン酸緩衝塩溶液 pH7.4 中の吸収スペクトルは紫外領域 398 nm に強いピークを持つ Soret 帯と可視領域 502, 530, 620, 654 nm にピークを持つ Q 帯とがある (図-4-B)。

Soret 帯で励起すると NPe6 はリン酸緩衝塩溶液 pH7.4 中で 662 nm にピークを持つクロリン環に依存する蛍光を発する。しかし、290

nm 励起では 662 nm にピークを持つ NPe6 の蛍光スペクトルを観測できなかった。

BSA のリン酸緩衝溶液 pH7.4 中の吸収スペクトルは 278, 288 nm に強いピークをもっている。BSA にトリプトファン吸収波長である 290 nm で励起すると、蛍光スペクトルは 350 nm にピークが観測できた。

リン酸緩衝塩溶液 pH7.4 中で BSA 濃度を一定にして NPe6/BSA のモル比を変化させ混在させると、290 nm 励起による BSA の 350 nm の蛍光ピークはモル比が上昇するに連れて短波長に移動し、同時に蛍光強度も低下していき、モル比 1 で、ピーク波長 341 nm、蛍光強度 1/5 となり、モル比 2 でピーク波長 320.8 nm に変わり、蛍光強度も 1/10 になって安定した (図-8)。

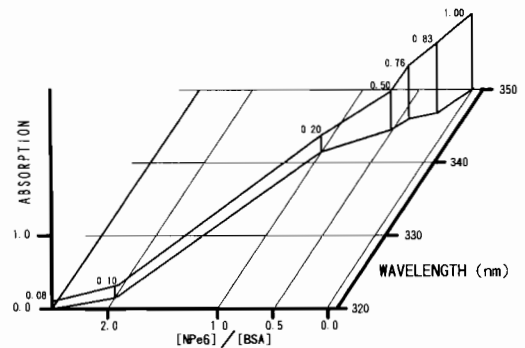


図-8. NPe6 とアルブミン混合によるトリプトファンの蛍光スペクトル変化

一方、同一条件下で NPe6/BSA のモル比を上昇させていくと、290 nm 励起による NPe6 の蛍光は 672 nm にピークをもつスペクトルが出現し、次第に強度を増しモル比 1 で最高値になった (図-9)。これらの現象は波長 290 nm 励起により BSA 分子内に存在するトリプトファンは励起状態となる。そのエネルギーは 350 nm にピークをもつトリプトファンの蛍光を発せず NPe6 分子へとエネルギー遷移を起こして 672 nm にクロリン環の蛍光を発する様になる。リン酸緩衝溶液 pH7.4 中で 662 nm にピークを持つクロリン環の蛍光は BSA と接

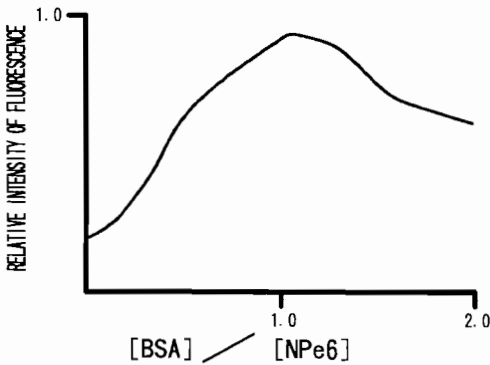


図-9. NPe6 とアルブミン混合による NPe6 の蛍光強度変化

すると 672 nm へとピーク波長を移動させていた。この様に NPe6 から BSA へのエネルギー遷移は両者が 10 Å 内外に接近していなければ起こらない。このため、BSA 分子内のトリプトファンの位置の近くに NPe6 が近接していると考えられる。

II 赤外領域の振動・回転スペクトル

赤外領域の波長になると光量子エネルギーが小さくなり、電子エネルギー準位の遷移を起こさなくなる。しかし、この波長領域では分子の電子エネルギー準位内において、振動エネルギーと回転エネルギーに変化を起こし、近赤外や赤外の領域で吸収スペクトルとして観測できる。この赤外吸収スペクトルと対応して、ラマン線を観測する事も大切である。ラマン線観測には赤外領域の電磁波のみならず紫外・可視領域の種々の電磁波を用いる事ができる。振動数 ν_0 の光(レーリー光またはレーリー線)が試料に照射されると、この光の一部は振動数が変化しないまま散乱され、レーリー光の一部となってしまふ。しかし、試料分子内にエネルギー遷移(振動数 ν_1)を起こしたレーリー光は $h(\nu_0 - \nu_1)$ のエネルギー状態で散乱される。この様にラマン線はレーリー線の振動数に対して低振動数側に ν_1 だけ移動した線(ストークス線)として観測できる。ラマン線はレーリー線から試料へとエネルギーが遷移して減少する場合と、逆に

増加する場合とがある。増加の時はレーリー線の振動数に対して高振動数側に ν_2 だけ移動した線(アンチストークス線)としてラマン線が観測できる。この様に、ラマン線は電子スペクトルと対応するのではなく、振動数に依存するスペクトルとして観測される。

II-1

赤外吸収スペクトルとラマンスペクトルの特性

空気中で赤外分光測光を行うとピークとして CO_2 と H_2O が目につく。この CO_2 を例にとり赤外吸収スペクトルとラマンスペクトルの特徴を示す。 CO_2 分子は4つの基準振動型がある。第一は炭素原子を対称軸に両サイドの酸素が対称的に伸縮振動(ν_1)を行っていて、双極子モーメントに変化をもたらさない型である。第二と第三は直線に配列している炭素原子を中心に両サイドに存在する酸素が配列軸に垂直な動きをとり、角 OCO の変化に伴う屈曲振動(ν_2)の型で、二重に縮重している。この変角運動に伴い、分子は双極子モーメントを発生する。第四は炭素原子を対称軸に両サイドの酸素が非対称的に伸縮振動(ν_3)を行っていて、双極子モーメントを持っている型である。

一般的に分子の双極子モーメントに変化の起こらない完全な対称伸縮振動は赤外吸収スペクトル活性が無く、ラマン活性を持っている。一方、双極子モーメントを持っている非対称的な伸縮振動や屈曲振動は赤外活性を持ちラマン活性が無い。

II-2

換算質量を用いた振動・回転スペクトルの計測

観測されたバンドの振動数を基準振動型に帰属する事が大切である。予め分子構造がわかっている中で、特定の数個の原子間の振動だけを考慮し、残りの原子群を無視して基準振動型に分類する事ができる。原子間の結合による振動周波数(ν)は振動している原子の質量(m_1 と m_2)と振動している結合の力定数(f)を用いて、近似的に次の式により求める事ができる。

$$\nu = \frac{1}{2\pi C} \sqrt{\frac{f}{\mu}} \dots\dots\dots(5)$$

μ は換算質量で次の式から求められる。

$$\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$$

振動周波数 ν は波数 cm^{-1} ，光速 C は $10^{10} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ ，質量 m_1 と m_2 は g ，力定数 f は $\text{dyne} \cdot \text{cm}^{-1} (\text{g} \cdot \text{sec}^{-2})$ である。

力定数は一般に結合解離 エネルギーにほぼ比例するので，数値が大きくなればなるほど結合の強さを増す事になる。力定数は一般に単結合，二重結合，三重結合でそれぞれ 5×10^5 ， 1×10^6 ， $1.5 \times 10^6 \text{ dyne} \cdot \text{cm}^{-1}$ となる。この結合状態により数値を選択して概略値として使用し(5)式から種々の赤外吸収スペクトルの位置が推測できる。

又，観測された赤外吸収スペクトルの波数から，振動している原子間の力定数も算出できる。

II-3

リン酸基の振動・回転スペクトル

生体膜の主役であるリン脂質の吸収線を計測してみる。

リン酸基 P-O 及び O-Ca の単結合の非対称伸縮振動はそれぞれ 894.6 cm^{-1} と 858.6 cm^{-1} にスペクトル線を持つと計測された。

リン酸基 P=O の二重結合の伸縮振動は 1265.1 cm^{-1} となった。

リン酸基 -O-P-O- の重結合の対称伸縮振動は 1096.5 cm^{-1} になった。

Shimanouchi 等²⁹⁾により実験的に観測された純物質 $\text{Ba}[(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PO}_2]_2$ でのリン酸基のラマ

ン線は $\text{O} \cdots \text{P} \cdots \text{O}^-$ の非対称伸縮振動が 1217 cm^{-1} に，対称伸縮振動が 1088 cm^{-1} にピークをもつ吸収スペクトルとして観測され，-O-P-O- の非対称伸縮振動が 812 cm^{-1} に，対称伸縮振動が 755 cm^{-1} に観測されている(表-1-A)。

Robert 等³⁰⁾による di-palmitoyl phosphatidylcholine の観測ではリン酸基のラマン線は $\text{O} \cdots \text{P} \cdots \text{O}^-$ の非対称伸縮振動が 1218 cm^{-1} ，対称伸縮振動が 1086 cm^{-1} に，-O-P-O- の非対称伸縮振動が 820 cm^{-1} ，対称伸縮振動が 774 cm^{-1} に現れている(表-1-B)。Koyama 等³¹⁾の観測によると L-glycero phosphoryl choline のリン酸基ラマン線は $\text{O} \cdots \text{P} \cdots \text{O}^-$ の非対称伸縮振動が anhydrous 状態で 1209 cm^{-1} ，hydrate 状態で 1220 と 1206 cm^{-1} ，水溶液で 1224 cm^{-1} に観測された。又， $\text{O} \cdots \text{P} \cdots \text{O}^-$ の対称伸縮振動が anhydrous 状態で 1089 cm^{-1} ，hydrate 状態で 1096 cm^{-1} ，水溶液で 1090 cm^{-1} である。一方，-O-P-O- の非対称伸縮振動が anhydrous 状態で 855 cm^{-1} ，hydrate 状態でなく，水溶液で 828 cm^{-1} に観測され，対称伸縮振動が anhydrous 状態で 766 cm^{-1} ，hydrate 状態で 785 cm^{-1} ，水溶液で 775 cm^{-1} に観測されている(表-1-C)。

この様に純物質で観測された各伸縮振動のスペクトル線は(6)式より算出されたスペクトル線とに多少の相違を見る。これは原子間に生じている力定数が分子の置かれている周囲の環境により多少のずれを生じているからだと思われる。

ここにリン脂質に関係する参考論文をあげて

表-1. 純物質のリン脂質ラマンスペクトル

Assignment	Ba[(C ₂ H ₅ O) ₂ PO ₂] ₂	phosphatidyl choline				
		(A) aqueous solution cm ⁻¹	di-palmitol	L-glycero		
			(B) liquid cm ⁻¹	anhydrous cm ⁻¹	hydrate cm ⁻¹	aq. sol. cm ⁻¹
$\text{O} \cdots \text{P} \cdots \text{O}^-$ anti sym. str.	1217	1218	1209	1220 1206	1224	
$\text{O} \cdots \text{P} \cdots \text{O}^-$ sym. str.	1088	1086	1089	1096	1090	
$\text{O} - \text{P} - \text{O}$ anti sym. str.	812	820	855	-	828	
$\text{O} - \text{P} - \text{O}$ sym. str.	755	774	766	785	775	

表-2. アメリカザリガニ腹部神経膜からのリン脂質ラマンスペクトル

Assignment	abdominal nerve cord membrane					
	KCl 5.4 mM NaCl 205.0 CaCl ₂ 1.0 cm ⁻¹ intensity		KCl 105.4 mM NaCl 105.0 CaCl ₂ 1.0 cm ⁻¹ intensity		KCl 105.4 mM NaCl 105.0 CaCl ₂ 40.0 cm ⁻¹ intensity	
0---P---0 ⁻ anti sym. str.	1217	11	1220	8	1205	15
	1207	18	1202	7		
0---P---0 ⁻ sym. str.	1088	6	1088	13	1088	6
0—P—0 anti sym. str.	810	8	810	3	810	4
	828	4	835	8	825	4
	785	2	785	10	785	8
0—P—0 sym. str.	740	9	770	15	740	7

おく^{32,33,34}。

アメリカザリガニの腹部神経繊維の脂質領域のリン脂質の動態について示す^{35,36}。

静止状態において、神経線維から観測されるリン酸基 O⁻...P...O⁻ のラマン線は非対称伸縮振動によるピークが 1207, 1217 cm⁻¹ に現れた。しかし、K⁺ 脱分極状態になると、リン酸基の非対称伸縮振動によるピークは弱くなった。この状態の神経線維に 40 mM CaCl₂ を細胞外液に添加すると、1205 cm⁻¹ に非対称伸縮振動のピークが再び大きく形成された。

一方、静止状態で神経繊維のリン酸基 -O-P-O- の対称伸縮振動のラマン線は 1088 cm⁻¹ に弱いピークとして観測される。K⁺ 脱分極状態になると 1088 cm⁻¹ のラマン線は増強されて、ほぼ二倍になった。この対称伸縮振動は細胞外液に 40 mM CaCl₂ を添加すると弱くなり、静止状態と同様な動きになった。リン酸基 -O-P-O- の対称伸縮振動 1088 cm⁻¹ のラマン線は Ca²⁺ に依存していると思われる。

以上の如く、リン酸基 O⁻...P...O⁻ の運動様式は静止状態における非対称伸縮が K⁺ 脱分極状態で対称伸縮に変わり、活発になる。しかし、この運動は細胞外液に多量の CaCl₂ 添加に伴い、静止状態と同様の非対称伸縮を行う様になった。

K⁺ 脱分極によるリン酸基 O⁻...P...O⁻ の運動様式の変化に伴って、リン脂質頭部領域の長軸に沿った -O-P-O- の運動は静止状態での非対

称伸縮 (810 cm⁻¹) から対称伸縮 (740 から 770 cm⁻¹ へのラマン線の移動) に変わった (表-2)。

アメリカザリガニの腹部神経繊維の脂質領域からのラマン線の解析により、リン酸基の K⁺ 脱分極による動態について情報が得られた。

II-4

動脈硬化部位の顕微フーリエ変換赤外吸収スペクトル

動脈硬化部位に集積しているコレステロールエステルを顕微フーリエ変換赤外分光法によって解析した³⁷。

この解析に、フーリエ分光法の導入は分散型の赤外分光法に比べて生体構成物質の解析に有利な点が多いため行った。

赤外領域の波長でフーリエ分光法はサイン (S) とノイズ (N) の比が分散分光法より優れている。同時に、フーリエ分光法はスリットが不要であり、立体角の大きい光学系を使用できるので面積の大きい入射光を用いる事が可能なため分散分光法よりも光利用効率が良いために顕微分光に有利である。又、フーリエ分光法はレーザー波長を基準にしたレーザー干渉計を併用しているから波数精度が高いためである。

動脈硬化部位に集積しているコレステロールエステルを観測するために、純物質コレステロール、オレイン酸、コレステロールがオレイン酸とエステル結合しているコレステロールオレイエートの赤外吸収スペクトルを測定した。

純コレステロールは 1460 cm⁻¹ に -CH₂ 挟み

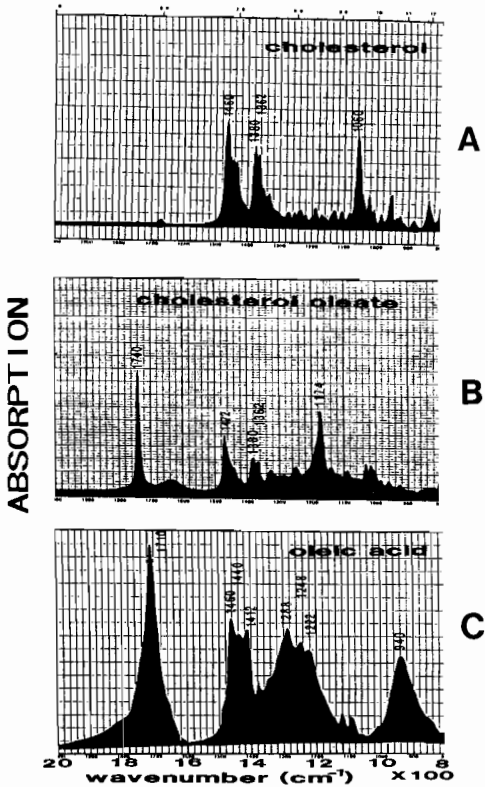


図-10. 純物質の赤外吸収スペクトル

- A : cholesterol
- B : cholesterol oleate
- C : oleic acid

込み運動, $1380, 1362 \text{ cm}^{-1}$ に $-\text{CH}_3$ の対称変角運動, 1060 cm^{-1} に $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ の対称伸縮運動の各ピークを持っている(図-10-A). 純コレステロールオレイエートに於いてエステル伸縮振動が 1740 cm^{-1} に, $-\text{CH}_2-$ 挟み込み運動が 1472 cm^{-1} に, $-\text{CH}_3$ の対称変角運動が $1380, 1362 \text{ cm}^{-1}$ に, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ の非対称伸縮振動が 1174 cm^{-1} にそれぞれピークを示している(図-10-B). 純オレイン酸は 1710 cm^{-1} にカルボン酸 $=\text{C}=\text{O}$ の挟み込み運動, $1460, 1440, 1412 \text{ cm}^{-1}$ に $-\text{CH}_2-$ の伸縮振動, $1288, 1248, 1222 \text{ cm}^{-1}$ に $-\text{CH}_2-$ の回転と捻れの運動, 及び 940 cm^{-1} に $-\text{C}-\text{C}-$ 骨格変角運動の各ピークを持っている(図-10-C). 又, 1472 cm^{-1} の $-\text{CH}_2-$ 挟み込み運動や $1380, 1362 \text{ cm}^{-1}$ の $-\text{CH}_3$ の対称変角運動吸収ピークはそれぞれ 2944 と 2760

cm^{-1} に倍波のピークを観測する事ができる(38,39).

この様な, 純物質での赤外吸収スペクトル線を参照にして, 動脈硬化部位の脂質系物質の集積状況を顕微フーリエ変換赤外吸収スペクトル(顕微 FT-IR スペクトル)を用いて解析する.

ウサギ大動脈に動脈硬化部位を形成するために, 日本白色ウサギ(日本医科学動物資材研究所 東京)を高コレステロール血症状態で30週間飼育した. この間, 10, 18と29週でウサギをネブタール麻酔下で大動脈を摘出し, 素早く -80°C に凍結した. 凍結標本をクリオスタットで $10 \mu\text{m}$ の厚さに大動脈の弓部を横断面で切断し, フッ化カルシウムのスライドガラス(応研 東京)上に断片を張付け赤外分光用の標本とした. 顕微 FT-IR スペクトルは直径 $100 \mu\text{m}$ のスポットに絞り, 動脈硬化部位から光透過により観測した. 尚, 高コレステロール飼料で飼育する前の大動脈の横断切片には動脈硬化部位は形成されていないため血管壁の最内層の $100 \mu\text{m}$ のスポットから赤外スペクトルを観測した. 高コレステロール飼料での飼育後, 10, 18, 29週の大動脈弓部の横断切片では, その時点で最大になっている動脈硬化部位を選びスペクトルを観測した.

高コレステロール飼料での飼育前の弓部の横断切片には動脈硬化部位は形成されていないため 1738 cm^{-1} でのコレステロールエステルのピークが殆ど存在していない. 高コレステロー

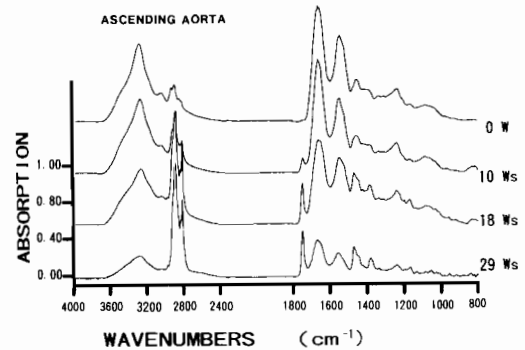


図-11. 弓部大動脈の粥状動脈硬化部位形成過程の赤外吸収スペクトル

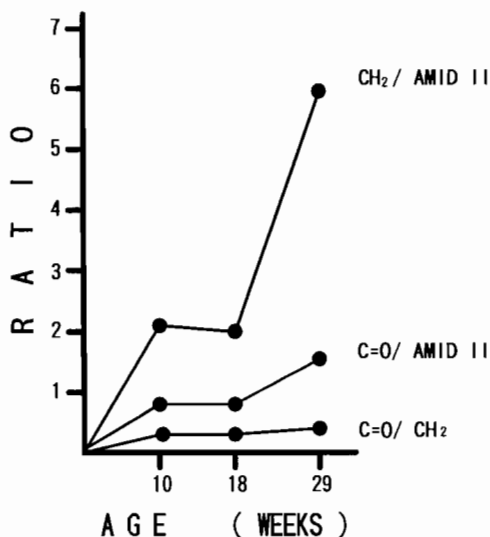


図-12. 粥状動脈硬化部位形成過程の各構成部位の比率

CH₂/AMID II : 脂肪酸/蛋白質
 C=O/AMID II : コレステロールエステル/蛋白質
 C=O/CH₂ : コレステロールエステル/脂肪酸

ル飼料で飼育していくと週を重ねるに従い動脈硬化部位も形成され順次肥大してくる。この場所でスペクトルを経時的に観測すると、コレステロールエステルのピーク 1738 cm^{-1} と $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ にかけての脂肪酸の $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ に由来するピークは共に順次増大している(図-11)。

弓部大動脈の動脈化部位での $1738\text{ (C=O)} / 2800\sim 3000\text{ (CH}_2, \text{CH}_3)$ のピーク比は経時的に変動せず0.30と一定の値を示している(図-12)。各動脈硬化部位での $1738\text{ (C=O)} / 2800\sim 3000\text{ (CH}_2, \text{CH}_3)$ 各波数のピーク比の経時的に変動しない現象はコレステロールが脂肪酸とエステル結合した形で順次集積して硬化部位を形成していくと考えられる。コレステロールや脂肪酸は単独では集積せず、細胞内に取込まれたこれら物質が細胞外に絶えず放出されていると思われる。細胞内のエステラーゼ等の機能低下に伴ってコレステロールと脂肪酸との間のエステル結合が切断されなくなると動脈硬化は形成し始められると思われる。

II-5

蛋白質の振動・回転スペクトル

スペクトル線としてシャープに観測できる脂質系物質について前の項で記載した。次に蛋白質系の振動・回転スペクトルの概略を示す。

蛋白質の生理活性はペプチドを形成しているアミド結合の構造とペプチド間を結びつけポリペプチド間の3次元構築を行っている結合による立体構造に依存している。

アミド結合により生成されたペプチドには α 螺旋(α -helix)構造と、ひだ折れ構造(β -構造, β -structure), 折れ曲がり(β -turn)及びランダムコイル(random-coil)とがある^{40,41,42}。これらの構造は赤外吸収スペクトルにおいてアミド I 領域($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$: アミド結合部位の C=O の伸縮振動)に反映している。 α -helix が 1650 cm^{-1} , β -structure が $1630, 1682\text{ cm}^{-1}$, β -turn が $1668, 1692\text{ cm}^{-1}$, random-coil が 1643 cm^{-1} にそれぞれ特徴ある吸収スペクトルを示す^{43,44,45,46,47,48,49}。アミド結合部位の N-H

の屈曲振動は $1530\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ に赤外吸収ピークを示し、アミド II 領域として観測できる。しかし、このピークはラマン線では観測できない。この様に赤外吸収スペクトルの観測により蛋白質の構造の一端を認識する事ができる。

極性アミノ酸のチロシンの OH 基はヒスチジンの NH と、セリンの OH はアスパラの C=O と水素結合により結ばれている。グルタミン酸のカルボキシル基($-\text{CH}_2\text{-COO}^-$)とアルギニンのアミン基($-\text{C-NH}_2^+$)とイオン結合で結ばれている。チロシンの振動・回転スペクトルのラマン線 $850, 830\text{ cm}^{-1}$ の強度比はフェノール基が自由状態か水素結合が弱い状態で $10 : 8$ となり、水素結合を起こした状態で $5 : 10$ となる⁵⁰。又、チロシン残基が蛋白質分子内に埋もれていると $850, 830, 640\text{ cm}^{-1}$ の各ラマン線の強度比は $0.5 : 1.0 : 0.5$ となり、表面に露出すると $1.4 : 1.0 : 0.7$ になる⁵¹。

極性のないアミノ酸であるトリプトファンインドール環はロイシンのメチル基やバリンのメチル基とファンデアワールス力によって疎水

結合を結ぶ事ができる。トリプトファン残基のインドール環によるラマン線は 1551, 1436, 1360, 1341, 1014, 761 cm^{-1} に観測される⁵²⁾。このうち、1360と1341 cm^{-1} のダブルレットピークはトリプトファンが疎水結合をしていると 1355 cm^{-1} の極小値が低くなりダブルレットピークが明確になる。一方、トリプトファンの周囲が親水状態になると 1355 cm^{-1} の極小部位は高くなり、谷を形成しなくなる⁵³⁾。又、トリプトファン残基が水と相互作用をしているとき 1361 cm^{-1} のピークは形成されない事がラクトアルブミン溶液のラマン線の観測により結論づけられた⁵⁴⁾。

紫外・可視領域の電子スペクトルの項で述べた微小管蛋白サブユニットの重合に対応したトリプトファンの動態についてラマンスペクトルにより観測する⁵⁵⁾。

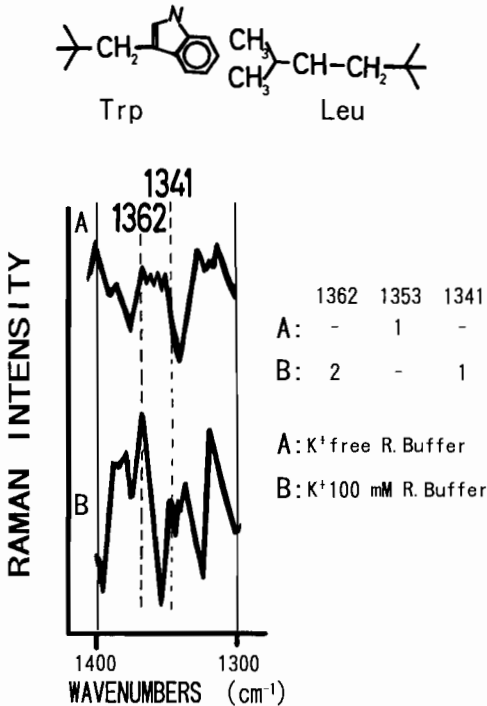


図-13-A. 微小管蛋白サブユニットのトリプトファンのラマンスペクトル

A: K⁺ free R. Buffer
B: K⁺ 100 mM R. Buffer

微小管蛋白サブユニット溶液中の KCl 濃度を 50 $\text{m}\cdot\text{mol/l}$ 以下に保って、36°C でインキュベートしても微小管蛋白へのサブユニットの重合は生じなかった。KCl 濃度が 100 $\text{m}\cdot\text{mol/l}$ 含有し、微小管蛋白形成が出来るときのサブユニットに存在しているトリプトファン特有のダブルレットピークのラマン線は 1341, 1362 cm^{-1} に明確に出現し、1355 cm^{-1} に極小値を示した。しかし、サブユニット溶液中の KCl 濃度が 50 $\text{m}\cdot\text{mol/l}$ 以下の濃度ではトリプトファンのラマン線は 1353 から 1362 cm^{-1} にかけてピークを形成し、1341 cm^{-1} にピークが観測されなかった(図-13-A)。このようなトリプトファンのラマン線の観測から微小管蛋白サブユニット溶液中の KCl 濃度が低下しているとサブユニット中に存在するトリプトファンは親水状態に置かれていると考えられる。一方、KCl 濃度が 100 $\text{m}\cdot\text{mol/l}$ 含有ししている溶液中でのトリプトファンは疎水結合を形成していると考えられる。

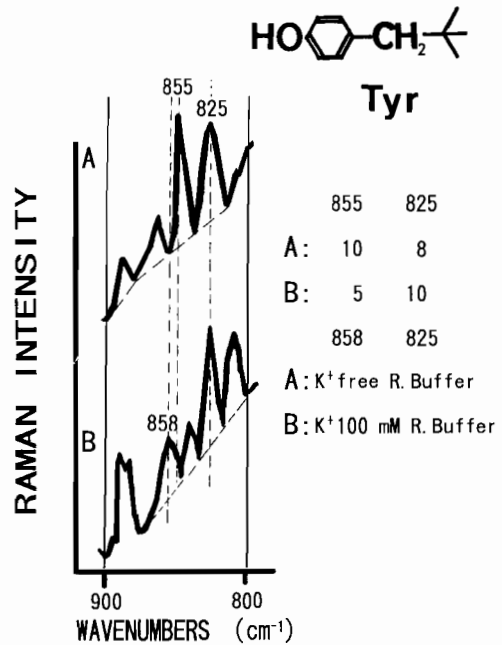


図-13-B. 微小管蛋白サブユニットのチロシンのラマンスペクトル

A: K⁺ free R. Buffer
B: K⁺ 100 mM R. Buffer

微小管蛋白サブユニットに存在するチロシンは KCl 濃度が $100 \text{ m}\cdot\text{mol/l}$ 含有している溶液中では $858, 825 \text{ cm}^{-1}$ のダブルレットピークの強度比が 5 : 10 に観測された。しかし、サブユニット溶液中の KCl 濃度が $50 \text{ m}\cdot\text{mol/l}$ 以下の濃度でチロシンのラマン線は $855, 825 \text{ cm}^{-1}$ の強度比が 10 : 8 に観測された(図-13-B)。この観測より、チロシンは KCl 濃度が $100 \text{ m}\cdot\text{mol/l}$ 含有している溶液中で強く水素結合状態を保ち、KCl 濃度が $50 \text{ m}\cdot\text{mol/l}$ 以下になるとチロシンのフェノール基が自由状態になっていると考えられる。

微小管蛋白サブユニットに存在するトリプトファンやチロシンはサブユニット溶液中の KCl 濃度が低下すると水和状態にあり、周囲の構成アミノ酸と結合状態に成らなかった。このためトリプトファンはサブユニットの表面に局在していると考えられる。

この状態の蛋白構造では GTP 等の存在している中で 36°C にてインキュベイトを行ってもサブユニットは重合して微小管蛋白を形成する事はなかった。

微小管蛋白サブユニットの重合過程に対応したトリプトファンの動態をラマンスペクトルにより観測する事によって、低濃度の KCl 存在下で微小管蛋白形成の抑制機構が説明出来ると考えられる。

終わりに

生体を構成している分子の動態と対応した生理機能の解析により、個々の機能実体が明確に把握できると考えられる。又、個々の機能の有機的な集合体として生理機能を把握する事により生命現象を総合的に理解していきたい。

個々の生体構成分子の動態を観測する手段として電磁波による観測法について概要を示した。波長の特性を活用した観測により生理機能の一面が把握できる事を期待します。

文 献

1) Loewy A. G. and Siekevitz P. (1969) Cell structure and function. (Holt, Rinehart and Winston, Inc.

- New York) Part 3, 81-172
- 2) Duncan A. B. F. and Matsen F. A. (1956) "Chemical Applications of Spectroscopy" Chapt. V. (Ed. by West W.) Interscience, New York USA.
- 3) Hercules D. M. (1966) "Fluorescence and Phosphorescence Analysis" Interscience Publishers.
- 4) Stryer L. (1968) Fluorescence spectroscopy of proteins. Science, **162**, 526-533
- 5) Gally J. A. and Edelman G. M. (1962) The effect of temperature on the fluorescence of some aromatic amino acids and protein. Biochim. Biophys. Acta, **60**, 499-509
- 6) Gally J. A. and Edelman G. M. (1964) Effects of conformation and environment on the fluorescence of proteins and polypeptides. Biopolymers, Symposia 1, 367-381
- 7) Chen R. F. and Cohen P. F. (1966) Quenching of tyrosine fluorescence in protein s by phosphate. Arch. Biochem. Biophys., **114**, 514-522
- 8) Feitelson J. (1964) On the mechanism of fluorescence quenching. Tyrosine and similar compounds, J. Phys. Chem., **68**, 391-397
- 9) Edelhoch H., Perlman R. L. and Wilchek M. (1969) Tyrosine fluorescence in proteins. Annals New York Academy of Sciences, 391-409
- 10) Aizawa K., Sakai S. and Ohata S. (1977) Tryptophanyl emission of microtubules isolated from the developing chick brain. Proc. Int. Uni. Physiol. Sci., 18,15
- 11) Auler H. and Banzer G. Z. (1942) Untersuchungen uber die rolleder porphyrin bei geschwulstkranker menschen und tieren. Z. Krebsstorssch., **53**, 65-68
- 12) Lipson R. L. and Baldes E. (1960) The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch Dermatol., **82**, 508-516
- 13) Aizawa K., Kato H., Ono J., Konaka C., Kawate N., Yoneyama K., Otawa M., Shinohara H., Saito M., Takahashi H., Nakamura H., Yamada T., Sakai H. and Hayata Y. (1984) A new diagnostic system for marignant tumors using hematoporphyrin derivative laser photoradiation and a spectroscopie. Porphyrin Localization and Treatment of Tumor. (Alan R. Liss, Inc.), 227-238
- 14) Aizawa K., Okunaka., Ohtani T., Kawabe H., Yasunaka Y., Ohata S., Ohtomo N., Nishimiya K., Konaka C., Kato H., Hayata Y. and Saito T. (1987) Localization of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues. Photochem. Photobiol., **46**, 789-793
- 15) Okunaka T., Aizawa K., Ohtani T., Kawabe H., Asahara T., Nakajima H., Yamasawa., Ibukiyama C., Ohata S., Kato H. and Hayata Y. (1987) Hematoporphyrin derivative uptake by atheroma in atherosclerotic rabbits : The spectra of fluorescence from hematoporphyrin derivative demonstrated by

- an excimer dye laser. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 769-776
- 16) Yasunaka Y., Aizawa K., Asahara T., Kato H., Hayata Y. and Ishikura I. (1991) In vivo accumulation of photosensitizers in atherosclerotic lesions and blood in atherosclerotic rabbit. *Lasers in the Life Sciences*, **4**, 53-65
 - 17) Aizawa K., Sawa H., Kuroiwa Y. and Kato H. (1993) Interaction between phosphatidyl choline and mono-L-aspartyl chlorin e6 by measurement of ¹H-NMR and Raman spectra. *Lasers in the Life Sciences*, **5**, 1-6
 - 18) Hayashi J., Kuroiwa Y., Sato H., Saito T. and Aizawa K. (1993) Transadventitial localisation of atherosclerotic plaques by fluorescence emission spectrum analysis of mono-L-aspartyl chlorin e6. *Cardiovasc. Research*, **27**, 1943-1947
 - 19) Tsuchida T., Aizawa K., Konaka C. and Kato H. (1993) Interaction of bovine serum albumin with mono-L-aspartyl chlorin e6 by spectrophotometry. *Lasers in the Life Sciences*, **5**, 155-164
 - 20) Aizawa K., Ohata S., Kato H., Hayata Y., Yamashita M., Kobayashi S., Sato T. and Minegishi S. (1983) Analysis of excited singlet state of hematoporphyrin derivative (HpD). *Hitachi Sci. Inst. News*, **26**, 2252-2255
 - 21) Khan A. U. and Kasha M. (1970) Chemiluminescence arising from simultaneous transitions in pairs of singlet oxygen molecules. *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 3293-3300
 - 22) Merkel P. B. and Kearns D. R. (1972) Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic to vibrational energy transfer. *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 7244-7253
 - 23) Parker J. G. and Stanbro W.D. (1984) Dependence of photosensitized singlet oxygen production on porphyrin structure and solvent. *Porphyrin Localization and Treatment of Tumor*. (Alan R. Liss, Inc.) 259-284
 - 24) Yamashita M., Sato T., Aizawa K. and Kato H. (1982) Picosecond fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin derivative and related porphyrins. *Picosecond Phenomena III* (eds, Eisenthal K. B., Hochstrasser R. M., Kaiser W. and Laubereau A.) 298-301
 - 25) Yamashita M., Honda T., Sato T. and Aizawa K. (1983) A compact synchroscan streak camera using a microchannel plate incorporated tube. *IEEE Trans. Instr. Measum.*, **IM-32**, 124-126
 - 26) Yamashita M., Nomura M., Kobayashi S. and Sato T., Aizawa K. (1984) Picosecond time-resolved fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative and its related porphyrins. *Ultrafast Phenomena IV* (eds, Auston D. H. and Eisenthal K.B.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 497-499
 - 27) Yamashita M., Nomura M., Kobayashi S., Sato T. and Aizawa K. (1984) Picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin derivative. *IEEE J. Quant. Electronics*, **QE-20**, 1363-1369
 - 28) Yamashita M., Tomono T., Kobayashi S., Torizuka K., Aizawa K. and Sato T. (1988) Picosecond fluorescence spectroscopy on incorporation processes of hematoporphyrin derivative into malignant tumor cells in vitro. *Photochem. Photobiol.*, **47**, 189-192
 - 29) Shimanouchi T., Toda S. and Kyogoku Y. (1964) Infrared spectra of nucleic acid and related compounds. *Adv. Chem. Phys.*, **7**, 435-498
 - 30) Robert C., Spiker J.R. and Levin I.W. (1975) Raman spectra and vibrational assignments for dipalmitoyl phosphatidylcholine and structurally related molecules. *Biochem. Biophys. Acta*, **388**, 361-373
 - 31) Koyama Y., Toda S. and Kyogoku Y. (1977) Raman spectra and conformation of the glycerophosphoryl choline headgroup. *Chem. Phys. Lipids*, **19**, 74-92
 - 32) Chapman D., Williams R. M. and Ladbrooke B.D. (1967) Physical studies of phospholipids. *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 445-475
 - 33) Lord R.C. and Yu N.T. (1970) Laser excited spectroscopy of biomolecules. *J. Mol. Biol.*, **50**, 509-524
 - 34) Wallach D. F. H., Verma S.P. and Fookson J. (1979) Application of laser Raman and infrared spectroscopy to the analysis of membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 153-208
 - 35) 會沢勝夫, 坂井朗子, 今川美登里, 齊藤弘子, 大畑進 (1983) 顕微ラマン分光法による神経膜の解析 *東京医大誌* **46**, 783-788
 - 36) Aizawa K. and Ohata S. (1984) Dynamic change of β -carotene and phospholipid in nerve cord membrane by K ion depolarization. *Proc. IX th Intern. Conf. Raman Spectroscopy*, 272-273
 - 37) Aizawa K. (1992) Analysis of the effects with a photodynamic therapy on atherosclerotic lesion using fourier-transform infrared spectra. *Reports on Topical Meeting of the Laser Society of Japan, Biological and Medical Application of Laser Spectroscopy*. No. PTM-92-31, 47-52
 - 38) Faiman R. and Larsson K. (1976) Assignment of the C-H stretching vibrational frequencies in the Raman spectra of lipids. *J. Raman Spectr.*, **4**, 387-394
 - 39) Snyder R. G., Scherer J. R. and Gaber B. P. (1980) Effects of chain packing and chain mobility on the Raman spectra of biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 47-53
 - 40) MacLennan D. H., Campbell K. P. and Reithmeier

- R. A. F. (1983) in *Calcium and Cell Function*. (ed. Cheung W. Y.) Academic Press, New York **4**, 152-174
- 41) Brandl C. J., Green N. M., Korczak B. and MacLennan D. H. (1986) Two Ca^{2+} ATPase genes: Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell*, **44**, 597-607
- 42) Csermely P., Katopis C., Wallace B. A. and Martonosi A. (1987) The $\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2$ transition of Ca^{2+} -transporting in sarcoplasmic reticulum occurs without major changes in secondary structure. *Biochem. J.*, **241**, 663-669
- 43) Susi H. (1969) in *Structure and Stability of Biological Macromolecules*. (eds, Timasheff S. and Fasman G.) Marcel Dekker, New York, 575-663
- 44) Mendelsohn R. and Mantsch H.H. (1986) in *Progress in Protein - Lipid Interactions* (eds, Watts A. and DePont J. H. H. M.) Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, **2**, 103-146
- 45) Jaworsky M., Brauner J.W. and Mendelsohn R. (1986) Fourier transform infrared spectroscopic studies of the secondary structure and thermal denaturation of CaATPase from rabbit skeletal muscle. *Spectrochimica Acta*, **42**, 191-198
- 46) Lee D. C., Haywaed J. A., Restall C. J. and Chapman D. (1985) Second derivative infrared spectroscopic studies of the secondary structures of bacteriorhodopsin and Ca^{2+} -ATPase. *Biochemistry*, **24**, 4364-4373
- 47) Krimm S. and Bandekar J. (1980) Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins. V. Normal vibrations of β -turns. *Biopolymers*, **19**, 1-29
- 48) Arrondo J. L. R. and Goni F. M. (1985) in *Spectroscopy of Biological Molecules*. (eds, Alix A. J. P., Bernard L. and Manfait M.) Wiley, New York, 184-186
- 49) Arrondo J. L. R., Mantsch H. H., Mullner N., Pikuła S. and Martonosi A. (1987) Infrared spectroscopic characterization of the structural changes connected with the $\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2$ transition in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **262**, 9037-9043
- 50) Siamwiza M. N., Lord R. C., Chen M.C., Takamatsu T., Harada I., Matsuura H. and Shimanouchi T. (1975) Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm^{-1} in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. *Biochemistry* **14**, 4870-4876
- 51) Yu N. T., Jo B. H. and O'Shea (1973) Laser Raman scattering of cobramine B, a basic protein from cobra venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 71-76
- 52) Harada I., Takamatsu T., Shimanouchi T., Miyazawa T. and Tamiya N. (1976) Raman spectra of some neurotoxins and denatured neurotoxins in relation to structures and toxicities. *J. Phys. Chem.* **80**, 1153-1156
- 53) Chen M. C., Lord R. C. and Mendelsohn R. (1973) Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. IV. Thermal denaturation of aqueous lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* **328**, 252-260
- 54) Yu N.T., (1974) Comparison of protein structure in crystals, in lyophilized state, and in solution by laser Raman scattering. III α -Lactalbumin, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 4664-4668
- 55) 會沢勝夫, 大畑 進 (1978) Laser Raman spectrumによる tubulin 中の tryptophan の動態について. *日本生理学雑誌* **40**, 209-210