

アミノ酸全 20 種核酸塩基全 5 種の広域吸収スペクトル完結計画

神戸大学 中川 和道*

Absorption spectra of biomolecules over wide energy range are very important to study their radiation effects in terms of the optical approximation proposed by Platzman. Using synchrotron radiation we accumulated absorption spectra of amino acids and bases of nuclear acids. Now we will be able to complete the measurement for all 20 amino acids and all 5 bases of nuclear acids within one year. Here we report mainly about basic techniques to obtain precise data.

Keywords: biomolecules, absorption spectra, synchrotron radiation

1 はじめに

生命体や生体分子に対する放射線の化学作用を調べようとする、その構成要素であるアミノ酸、核酸塩基など生体分子の広域吸収スペクトルから出発するのが通常のアプローチであろう。ところが、アミノ酸の吸収スペクトルの主要部分は真空紫外域（波長 200 nm 以下の領域）にあり、第 1 励起状態への遷移ですら真空紫外域にあるものが多い。このため、アミノ酸の吸収スペクトルがほとんど報告されない時期が続いた。我々神戸大グループはこの状況に一石を投じて鋭意測定をつづけ、アミノ酸全 20 種核酸塩基全 5 種の広域光吸収スペクトル測定の完結が射程に入ってきた。

ここではこれまでの成果を概観し今後の課題を展望したいのだが、計画はまだ完結していない。そこで本稿では、研究の遂行にあたってどのような技術的問題

をどのように突破してきたかを重点に書いてみたい。若い人たちが自分の研究においてこれからいろいろな困難に直面するであろうが、それらを突破する際に何らかの参考になるであろうと思うからである。

放射線は粒子放射線と電磁波放射線とに大別される。電磁波のエネルギーが低い場合には物質への化学作用は「光化学」の学問領域で扱われるが、X 線、ガンマ線など電磁波のエネルギーが十分高い場合には「放射線化学」の領域となることはよく知られている。

光と放射線の間接のエネルギー領域の光子は大気で激しく減衰するため「軟 X 線領域」と呼ばれ、光化学と放射線化学との懸け橋である¹⁾。軟 X 線のエネルギー範囲は分野によって異なり厳密な定義はできないが、一般的には光子エネルギーが 100 eV から 2 keV 程度を指す。これ以上の光子エネルギーでも空気中で減衰はある程度起き、筆者の実測では、8 keV の「硬」X 線の空気 30 cm に対する透過率は約 70% であったものの、排気しないと実験ができない軟 X 線や真空紫外の実験は大きな困難が伴う。

さて軟 X 線領域が興味をもたれている理由は、生体分子の主な構成原子の K 吸収端がこのエネルギー領域に存在する（炭素約 280 eV、窒素約 405 eV、酸素約 530 eV）ことである。このことは、それぞれの原子の K 吸収端近傍にはそれぞれの原子の 1s 電子状態を始状態とし、終状態をイオン化状態や分子軌道励起状態とする光学遷移に対応する吸収帯が存在することを意味する。カイラルなアミノ酸や、核酸中の糖の分子軌道にはカイラリティーを有する成分があるのだから、吸収端近傍の光学応答には必然的に円偏光応答が現れる。我々は K 吸収端近傍での円二色性をアミノ酸の窒素および酸素について世界で初めて観測することに成功した^{1,2)}。この結果はさらに円偏光軟 X 線による化学作用に円偏光依存性が観測されるかどうかという問題すなわち「偏極放射線化学」の検証を我々に問いかけており³⁾、今後の課題として興味深い、その議論は別の機会に譲る。

Toward the completion of measurement of absorption spectra of 20 amino acids and 5 bases of nuclear acids over wide energy range

Kazumichi NAKAGAWA* (Kobe University),
〒657-8501 神戸市灘区鶴甲 3-11
TEL:078-803-7750, FAX: 078-803-7761,
E-mail: nakagawa@kobe-u.ac.jp

粒子放射線のうち、電子と物質の相互作用は最も馴染み深い。電子線照射による化学作用を調べる際によく用いられるのが高速電子線であるからだ。それだけにとどまらない。高エネルギー光子で物質を励起した結果、光電効果、コンプトン散乱、電子対生成によってひとたび高速電子が生じれば、それ以降の物質との相互作用の主役はもはや光子ではなく高速電子である。この高速電子と物質の相互作用を考える際、有用な手掛かりを与えるのが Platzman による光学近似⁴⁾である。丑田・河内⁵⁾の要約によれば、光子エネルギー E の光子に対するその物質の吸収スペクトル $\sigma(E)$ から求められる振動子強度分布 df/dE (f -分布) を用いると、エネルギー T の荷電粒子によるその物質の励起断面積は

$$\int_0^T \frac{df}{dE} \frac{dE}{E}$$

に比例する。すなわち、光子も荷電粒子も励起の確率は f -分布に依存するので、物質の情報としては f -分布だけを調べればそれで十分である。ここで重要なことは、吸収スペクトル $\sigma(E)$ すなわち f -分布の測定は荷電粒子のエネルギー T に相当する光子エネルギーまで行う必要がある。 $T = 2 \text{ MeV}$ の荷電粒子の放射線作用を知るには光子エネルギー $E = 2 \text{ MeV}$ までの広域吸収スペクトルが必要である。また、振動子強度分布の総和則から、 df/dE の積分は遷移に参与した電子の総数に等しい。この総和則は、簗野らが行ったように、吸収スペクトル $\sigma(E)$ の絶対値が正しいかどうかを検証するのに重要な手掛かりとなる。以下の 2.2.3 でこの検証を行った実例を報告する。

我々はこの広域吸収スペクトルの測定を、シンクロトロン放射を用いて行うことにした。例えば岡崎の分子科学研究所 UVSOR のビームライン 7B では $2 < E < 30 \text{ eV}$ 、ビームライン 5B では $40 < E < 260 \text{ eV}$ の測定が可能であり、シンクロトロン放射はこのうえもなく重要な実験ツールである。

2 実験技術の開発

2.1 蒸着法の開発

生体アミノ酸および核酸塩基は、高純度のものが安価に入手できる。生体アミノ酸とはタンパク質を構成するアミノ酸であり地球上の生命体はそのすべてがアミノ酸の光学異性体 L-体と D-体のうち L-体のみを用いている（グリシンだけは異性体がない）。このため、販売されているアミノ酸試薬はグリシンを除いて L-体試薬しかないかというところではない。生化学では

D-体も用いられるので、D 体アミノ酸や D-L ペプチドですら入手可能であり、生体分子の物性研究にはこの状況が強みとなっている。

我々は宇宙から飛来した隕石中にアミノ酸が検出されたことに興味を抱いて宇宙における化学進化の研究をしている⁶⁾ので、アミノ酸の主に固体状態の電子スペクトルを調べてきた。それには質のよい蒸着膜の作製技術（ナノテク技術）の確立が必須であった。

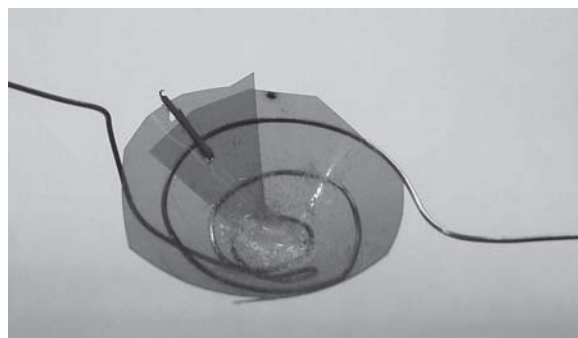


Figure 1. Conically-shaped polyimide (Kapton) sheet and heater in the vacuum sublimation system for preparing amino acid films.

我々がアミノ酸の蒸着膜作製技術の開発を始めた 1994 年頃は、アミノ酸は蒸着の際、激しく熱分解してしまうので蒸着は不可能と信じる研究者がほとんどであった。その頃、ある生化学者と雑談をしていて彼の「培地を 130°C 滅菌してもアミノ酸は壊れないからこそ培養が可能である」との発言を聞いてアイデアがひらめいた。ならば、温度を上げすぎないよう工夫すれば蒸着膜は熱分解や熱重合を回避できるのではないか？ 1996 年頃に、修士課程の持田武志氏が半年以上もかかって、カプトンで最大径 25 mm、高さ 10 mm 程度のコーン型のるつぼを作りこれにニクロム線を巻きつけ、 130°C くらいで動作させる蒸着システムを開発した（カプトンコーン方式, Figure 1）。このシステムなら、電源を切れば直ちに温度が下がるので過熱分解は起こらない。実際にこの方法で作った蒸着膜を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で調べたところ、熱分解を免れ得ることが分かった。蒸着速度を水晶振動子膜厚計で 0.1 nm/s 程度に調整し、アミノ酸の膜を一層ごとに積層していき、目的の膜厚の膜を作成することができるようになった。蒸着基板には合成石英 (SiO_2 , 透過率短波長側のカットオフ波長 160 nm), フッ化マグネシウム (MgF_2 , カットオフ波長 115 nm), フッ化リチウム (LiF , カットオフ波長 105 nm), コロジオン

(低硝化度ニトロセルロース、カットオフ波長なし)、軟 X 線測定用には SiN メンブレン、SiC メンブレンなどを用いた。Figure 2 にコロジオン薄膜に蒸着したアミノ酸の様子を示す。直径 12 mm の開口部上半分がコロジオン薄膜、下半分がその上にアミノ酸蒸着膜を 1000 nm 蒸着したものである。コロジオン薄膜（膜厚約 30 nm）は、コロジオンの 10% イソアミルアルコール溶液を水面上に展開し、サイズ 80 mesh/inch 程度のメッシュですくい上げて作製した。石英基板上のアラニン蒸着膜を田中真人氏に原子間力顕微鏡観察してもらったところ、この蒸着膜は直径数 nm の微結晶の集合体であった。蒸着速度をうまく設定すると、マクロに見た場合、線二色性をよい精度で排除できることが分かった。このため真空紫外および軟 X 線領域で円二色性を詳細に調べる格好の研究材料となり、2005 年には SPring-8 のアンジュレーターで世界初のアミノ酸軟 X 線円二色性を検出することに成功した²⁾。

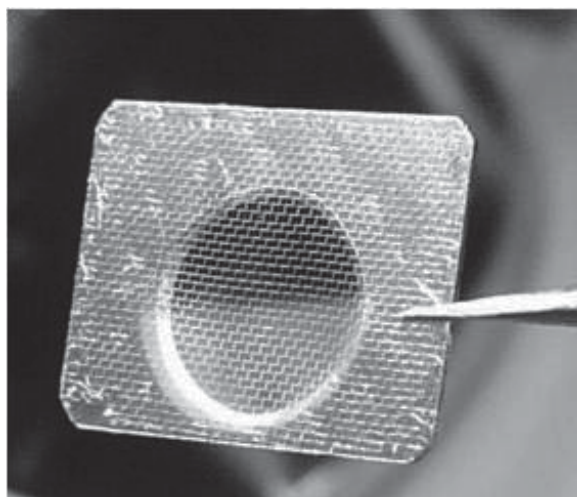


Figure 2. Amino acid thin film sublimated onto a collodion film supported by a mesh metal grid.

蒸着システムはその後、何段階にもわたって改良された。持田によるカプトンコーン方式 (Figure 1) では一度に 1 枚の蒸着膜しか作れなかった。そこで 1999 年、田中真人氏・小結俊行氏らはニクロム線をジグザグに折り曲げて 100 mm × 50 mm くらいの「座布団型ヒーター」をつくらせてほぼ同サイズのカプトンを乗せ、アミノ酸の粉末を盛大に撒いて一度に 3, 4 枚の蒸着膜を作成できるシステムを作り、膜づくりの省力化は大きく前進した。その後、一度に 10 枚程度の蒸着

膜を高い精度で同じ厚さで一気にする必要が生じた。宇宙ステーションで多数のアラニン膜に真空紫外線を照射する計画が持ち上がったためである。2010 年、田邊真依子氏は蒸着基板を 12 枚並べてセット出来る回転式の円盤を「座布団ヒーター」の上で 10 回転/分程度の速度で回転させ、膜厚のばらつきを ±2% に抑えることに成功した。くるくる回転する基板の列に順次蒸着が行われていく様子は半導体製造工場でシリコンウェハーが回転しているナノテクの現場そっくりで、アミノ酸の膜づくりもナノテクに近づいたのだと感慨深かった。

蒸着法の画期的な進展によって蒸着膜づくりは大いに進んだ。だが 2009 年頃から実は深刻な問題に突き当たっていた。新しいアミノ酸へと測定対象を拡大していく過程で、蒸着後に大気に長くさらすとじわじわと壊れてしまう現象に出会ったのである。この困難を克服するため、三本晶氏はロードロックシステムを開発して真空から一度大気中に取り出す時間を短くして測定に挑んだ。だがその後、大気にさらすと直ちに壊れてしまうものが現れ、測定完結計画は暗礁に乗り上げた。もはや真空蒸着した膜を大気にさらすことなく真空中で測定点に移動する「その場蒸着」を行うしかない。このシステムは 2011 年に谷川能章氏によって開発され「*in situ* 蒸着」と命名された (Figure 3)。図に示すように 70 mm 径のコンフラットフランジ電流導入端子にタングステンの円形ヒーターを組み込み、カプトン箔を折り曲げてヒーターからの脱落とアミノ酸

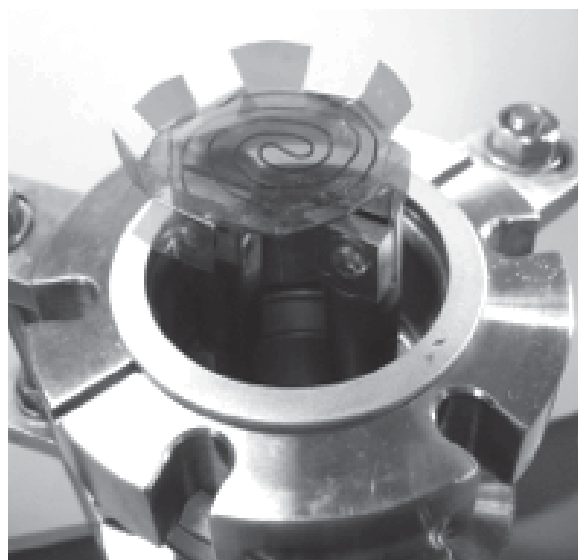


Figure 3. Novel *in situ* sublimation system.

試料のこぼれを防ぐ構造に進化させたのは石山公啓氏である。この方法の問題点は、測定槽に直結した小さなスペース内で蒸着を行うため水晶振動子を内蔵することができない点である。膜厚のコントロールに失敗したら蒸着部を再び大気にさらして振り出しに戻って掃除せねばならない危さが予測された。ところがやってみたら運が向いてきた。上部から覗きこみながら、まず極薄く膜をつけ、それを測定して厚さを検討し、少しずつ厚さを足していった所定の厚さを達成するやり方が谷川によって確立されたのである。Figure 4 に示すようにアラニンの吸収断面積の大きさは 16.5 eV で最大値約 117 Mb, 250 eV では 0.624 Mb と 186 倍も異なるため、S/N のよい吸収スペクトルを測定するには 100 倍にわたって膜厚を制御する必要がある。谷川の「*in situ* 蒸着」以前には 4 段階程度に厚さを変えた膜を神戸大学で作製し、大気中に取り出して別の真空容器に封入して岡崎まで運搬し測定実験をしてきた。1 種類のアミノ酸について 4 種類の厚さの膜を準備し、合計 6 種類のアミノ酸を測定するには 24 枚もの蒸着膜を準備せねばならず、蒸着作業の合計時間は 48 時間にも及び、マシンタイムの前に院生たちはくたくたに疲れてしまう状況であった。ところが「*in situ* 蒸着」では、現地で様子を見ながら、しかも真空中で可能になり、毎日 2 から 4 種類ものアミノ酸の測定が可能となったのである。

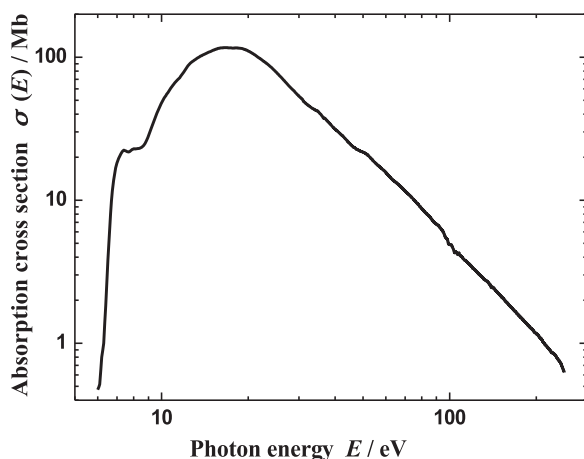


Figure 4. Absorption spectrum of alanine sublimated film in the UV, vacuum UV and soft x-ray regions.

2.2 吸収スペクトル測定と絶対値校正

上記の光学近似において必要な吸収スペクトルは相対値ではなく絶対値で測定されることが不可欠である。ここでいう絶対値とは数学でいう絶対値ではなく吸収断面積 $\sigma(E)$ が実際の値で測定されることを意味する。UVSOR での測定では $\sigma(E)$ の相対値である光学密度あるいは吸光度 $ABS(E) = \log(I_0(E)/I(E))$ が測定できる。その例を Figure 4 に示すが、図の縦軸はすでに絶対値として Mb 単位で値づけされている。その値づけをどのように行うかを次に説明する。

2.2.1 溶液の吸収スペクトルが測定できる場合

濃度 C (mol/L) が既知の溶液を調製して光路長 L (cm) の測定セルに入れ、市販の分光光度計で吸光度 $ABS(E)$ を入射光子エネルギー E の関数として測定する。この溶液中に溶けたアミノ酸分子が独立に光子エネルギー E の光を吸収しているとしてその吸収断面積を $\sigma(E)$ とあらしアミノ酸蒸着膜中でも同じ $\sigma(E)$ をもつと仮定する。 $\sigma(E)$ を求めるには、ランベルトベールの式において上記の溶液濃度 C (mol/L) を分子数密度 n (cm^{-3}) に $n = CN_A/10^3$ と変換し $\sigma(E) = \ln 10 \times \frac{ABS(E)}{nL}$ とすればよい。

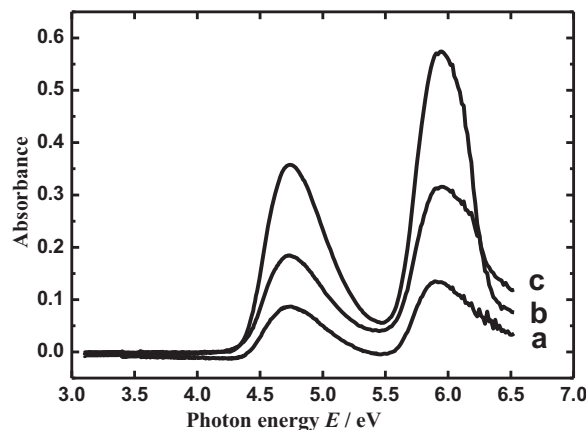


Figure 5. UV spectra of adenine ethanol solutions; concentration, 3.8×10^{-5} M; path length, 0.3 cm (a), 0.5 cm (b), 1 cm (c).

核酸塩基の一つであるアデニンにこの方法を適用した例を Figure 5 に示す。アデニンのエタノール溶液 (濃度 $C = 3.8 \times 10^{-5}$ M) を光路長 $L = 1$ cm の石英光学セルに入れ、紫外可視分光光度計で吸収スペクトルを測定した。図には $L = 0.3$ cm, 0.5 cm の結果も合わせ

て示す。図の分光光度計の測定限界が 6 eV 付近にあるので 6 eV 付近のピークはみかけのピークである可能性がある。そこで 4.74 eV の吸光度ピーク値 0.358 を吸収断面積に換算し、 $\sigma(4.74 \text{ eV}) = 36.0 \text{ Mb}$ を得た。Figure 6 は、UVSOR で測定したアデニン蒸着膜の吸光度スペクトルの 4.54 eV ピークがエタノール溶液の 4.74 eV ピークでありその吸収断面積はエタノール中のアデニン分子の吸収断面積と等しいと仮定して吸光度を吸収断面積に換算したものである。

Figure 6 から、4.74 eV ピークの大きさを基準にそれよりも約 4 倍大きい 16.5 eV 付近のピークの大きさを値づける「危うさ」が見てとれよう。Figure 4 のアラニンの例では 16.5 eV 付近の吸収は 7.6 eV 付近のそれよりも約 5.3 倍大きく、値づける困難さがうかがえる。

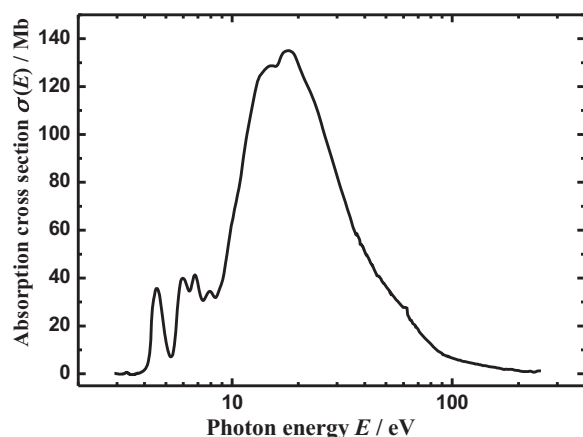


Figure 6. Absorption spectrum of adenine sublimated film in the UV, vacuum UV and soft x-ray regions.

2.2.2 蒸着膜の分子数をクロマトグラフィーで定量できる場合

アミノ酸の定量分析には HPLC がよく用いられる。ところが Figure 2 に示すコロジオン基板上の蒸着膜を水で回収するのだが、回収の際破れたコロジオンの断片が HPLC システムを詰まらせないようにフィルターでろ過する方法を検討した。我々の膜は薄いので得られた溶液の濃度を分析可能な値にするには回収に用いる水を 50 μL に制限する必要があったため、50 μL の少量ではフィルターの使用は難しい。結局コロジオン膜上の蒸着膜の回収はあきらめた。合成石英（カットオフ波長 160 nm）やフッ化マグネシウム（カットオ

フ波長 115 nm）上に蒸着した膜の吸光度スペクトル $ABS(E)$ を測り、その膜の面積 S (cm^2) を水で回収して膜中の分子数 N_F を HPLC の検量線から求めた。膜厚 L と膜の分子数密度 n を用いると $N_F = nSL$ となるので上記 (1) の方法と同様にランベルトベールの式 $I(E) = I_0(E) \exp^{-\sigma(E)nL}$ における nL の値が決まるので、 $ABS(E)$ を $\sigma(E)$ に換算することができる。Figure 4 のアラニンのスペクトルはこうして絶対値を得た。

2.2.3 総和則を用いて吸収断面積を校正する

吸収スペクトルのエネルギー積分値が有限であることは量子論の基礎を考えると自明である。1 個の電子が無限に多くの光子を吸収できるはずがない。光子エネルギー $E = (E_n - E_0)$ の光が量子力学系に吸収され量子状態 0 から n に光学遷移が起きる様子を f_{0n} 個の古典論振動子が励起されるという考え方と対応させた量は振動子強度 f_{0n} と呼ばれ、

$$f_{0n} = \frac{2m_e(E_n - E_0)}{3\hbar^2} \left| \langle \Psi_n | \sum_s r_s | \Psi_0 \rangle \right|^2$$

と書かれる⁷⁾。今、連続スペクトルを考えて単位励起エネルギーあたりの振動子強度の密度分布を df/dE (これを f -分布と呼ぶ、単位は $(\text{eV})^{-1}$) とあらわすと、吸収断面積 $\sigma(E)$ (単位 cm^2) との関係は、

$$\sigma(E) = 4\pi^2 \alpha a_0^2 E_R \frac{df}{dE} = 0.01098 \frac{df}{dE}$$

となる⁷⁾。ここで、 α は微細構造定数で $\alpha = e^2/(2\epsilon_0\hbar c) = 1/137.04$ 、 a_0 はボーア半径、 E_R はリドベールエネルギーである。さらに重要なのは、 f -分布を用いて様々な総和則が導かれてきたことである。0 次の総和則 $S(0)$ すなわち f -分布の遷移エネルギーに関する積分は

$$\int \left(\frac{df}{dE} \right) dE = N$$

となって、遷移に関与した電子数に等しく、Thomas-Kuhn-Reiche の総和則 (TRK 総和則) として知られている⁸⁾。

東京工業大学の簗野嘉彦先生たちが井口道生先生と共同してメタンやアルコールなどの気体分子にこの総和則を用いて研究を進めておられた⁹⁾ のに触発され、我々も Figure 4 や Figure 6 の縦軸の校正に TRK 総和則を用いることにした。

Figure 7 にグリシン、アラニン、フェニルアラニン、メチオニンの広域吸収スペクトルを示す¹⁰⁾。図に示した測定結果に TRK 総和則をあてはめる際、Figure 7

の測定範囲が $4 < E < 250$ eV であるから、積分範囲をこのエネルギー範囲とした。その結果、[(Figure 7 の df/dE の積分値)/(遷移に關与する電子数)] は、グリシン [27.3/30]、アラニン [31.0/36]、フェニルアラニン [63.2/64]、メチオニン [60.1/62]、他の実験のデータではアデニン [44.1/50]、シトシン [43.2/42] と、12% 以内の誤差となり、TRK 総和則によるクロスチェックが有用であることがわかった。

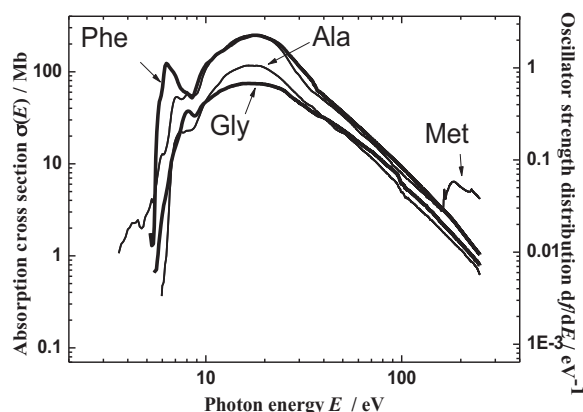


Figure 7. Absorption spectra of glycine (Gly), alanine (Ala), phenylalanine (Phe), and methionine (Met) sublimated films in the UV, vacuum UV and soft x-ray regions.

3 今後の課題

現在、アミノ酸全 20 種のうち 15 種、核酸塩基全 5 種のうち 3 種のスペクトル測定を一応終えたところである。これからの課題は、(1) 全てのスペクトルを一枚のグラフに描いたとき互いにつじつまが合うかどうか、たとえば 17 eV 付近のピークの高さが分子量の順番になっているかどうか、50 eV 付近などに測定間違いに起因するスペクトルの交差などがないかどうかなどを検討すること、(2) 量子化学計算と突き合わせてそれぞれの特徴と一般性を検討することである。

長い道のりの行きつく先がようやく見えようとしている。

〈謝 辞〉

この研究のほとんどは分子科学研究所 UVSOR での共同研究(課題番号 23-817, 23-819, 23-824, 24-515, 24-532, 24-548, 25-517, 25-530)によってなされまし

た。歴代の UVSOR スタッフの方々に篤くお礼を申し上げます。また、膨大なスペクトルは中川研究室歴代の大学院生諸君の奮闘によって測定されました。本文中に名前が出ていない人も含め、合計 60 人近い院生たち学生たちに篤くお礼申し上げます。

〈参 考 文 献〉

- 1) K. Nakagawa, Z. Jin, I. Shimoyama, Y. Miyake, M. Ueno, Y. Kishigami, H. Horiuchi, M. Tanaka, F. Kaneko, H. Nishimagi, H. Kobayashi and M. Kotani, *Radiat. Phys. Chem.*, 77 (2008) 1156.
- 2) M. Tanaka, K. Nakagawa, A. Agui, K. Fujii, A. Yokoya, *Phys. Scr.*, T115 (2005) 873.
- 3) K. Nakagawa, Y. Izumi, M. Tanaka, M. Tanabe, *Photon Factory Activity Report*, 2010 #28 Part B (2011), p. 1.
- 4) R. L. Platzman, *Vortex*, 23 (1962) 372. 解説は例えば、志田忠正「放射線化学の基礎」、新実験化学講座 基礎技術 6 核・放射線 [II], 547-580 (1975).
- 5) 丑田公規, 河内宜之「9-1 放射線と物質の相互作用」、日本放射線化学会編「放射線化学のすすめ」、学会出版センター, 2006 年, pp. 217-224.
- 6) 中川和道「宇宙での化学進化における放射線・紫外線の役割」、*Viva Origino*, 37 (2009) 24.
- 7) 井口道生, *日本物理学会誌*, 22 (1967) 196.
- 8) J. Berkowitz, *Atomic and Molecular Photoabsorption*, Academic Press, 2002.
- 9) Y. Hatano, M. Inokuti, *Photoabsorption, photoionization and photodissociation cross section*, in: IAEA-TECDOC-799, *Atomic and Molecular Data for Radiotherapy and Radiation Research*, 1995, pp. 331-370.
- 10) M. Kamohara, Y. Izumi, M. Tanaka, K. Okamoto, M. Tanaka, F. Kaneko, Y. Kodama, T. Koketsu, K. Nakagawa, *Rad. Phys. Chem.*, 77 (2008) 1153.

〈著 者 略 歴〉

中川 和道：1978 年 名古屋大学工学研究科博士課程(後期)修了。1978 年 分子科学研究所リサーチフェロー。1980 年 東京大学基礎科学科助手。1989 年 神戸大学教育学部助教授。1995 年 同教授。1996 年 神戸大学自然科学研究科教授。2007 年 神戸大学人間発達環境学研究科教授(現職)。専門：放射光物性、生体分子分光、環境物理学。趣味など：登山、音楽。