

講座

ライフサイエンスのための安定同位体利用技術(Ⅳ)

発光分光法による ^{15}N アミノ酸の分析†

大山卓爾‡

東京大学農学部農芸化学科

113 文京区弥生1-1-1

Key Words: emission spectrometry, nitrogen-15, amino acid, thin layer chromatography

1. はじめに

窒素はタンパク質や核酸の構成元素であり、生物に多量に必要なだけでなく、代謝上も重要な位置を占めていることから、窒素の動態の研究はライフサイエンスのあらゆる分野で重要な課題となっている。窒素の動態の研究には、アイソトープの利用が有力な手段の一つであるが、トレーサ実験に利用可能な放射性同位体 ^{15}N は、半減期が約10分と短いため限定した範囲でしか使用できず、主として安定同位体の ^{15}N が利用されている。ところで、通常 ^{15}N の分析に用いられている質量分析法では約 $30\ \mu\text{g}\sim 3\ \text{mg}^{1)}$ の試料窒素を必要とし、代謝的には重要であるが、生体内に比較的微量にしか存在しない遊離のアミノ酸などの ^{15}N 測定が困難であった。しかしながら、近年、東大の熊沢らにより発光分光分析法による ^{15}N 分析技術が確立され、手軽に多数の試料を分析することが可能になるとともに、 $0.2\ \mu\text{g-N}$ という極微量な試料の ^{15}N 濃度測定も精密に行えるようになり、動植物の窒素代謝などの研究に応用されてきている。この10年間に ^{15}N 分光分析装置は大学や農業試験場を中心に広く普及しており、本法は必ずしも新しい技術ではなくなりつつあるが、試料調製中に窒素汚染に対する注意が必要なことや、若干のガラス細工を伴うことから、これまで ^{15}N 分光法は難しいという印象が強く、とくに生体内遊離アミノ酸

の ^{15}N 分析についてはあまり普及していない。筆者は、熊沢研究室でアミノ酸などの ^{15}N 分析に携っており、本稿ではライフサイエンスの種々の分野の方々がアミノ酸の ^{15}N 分光法を手軽に利用できるように、その留意点をなるべく詳細に記述するように努めた。

2. ^{15}N 分光法の原理

^{15}N 発光分光分析法の原理ならびに測定技術一般については、多くの総説など^{1)~11)}に詳細に記載されているが、ここで簡単に要約しておく。

N_2 ガスを封入したガラス管に高周波を当てて無電極放電を起こすと、励起した N_2 の電子が低エネルギー状態に遷移するさい発光を伴う。電子のもつエネルギーのうち、 N_2 の2つの核間の振動状態で決まるエネルギー E_v は、 $^{14}\text{N}_2$ 、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}_2$ の質量数の差により異なり、これが発光のさいの波長の差として観測される。 ^{15}N 発光法では分離スペクトル計測に最適な分子スペクトルの波長は、 $^{14}\text{N}_2$ (297.7 nm)、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ (298.3 nm)、 $^{15}\text{N}_2$ (298.9 nm)である。この波長域には、 CO (297.6 nm)および H_2O (298.0, 298.7 nm)、 CO_2 、 O_2 (297.7 nm)の弱いバンドが認められるため、これらのガスによる妨害に注意を要する。

単位としては、atom %とatom % excessが用いられる。前者は、試料内の全窒素原子数のうちの ^{15}N 原子数の割合を%で表示したもので、後者は、試料のatom %から ^{15}N 濃度の自然界値(0.37 atom %)を差し引いたものである。一般に、生物に ^{15}N 標識化合物を投与するトレーサ実験はatom % excessが用いられる。

3. 試料取り扱いならびに放電管作製上の留意点

N_2 を封入した放電管の作製にはリッテンベルグ法

† Use of the Stable Isotopes in Life Science(Ⅳ) Emission Spectrometric ^{15}N Analysis of Amino Acids. Takuji OHYAMA: Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113.

‡ Present Address: The Faculty of Agriculture, Niigata University, Igarashi, Niigata-shi, Niigata Pref. 950-21.

とデューマ法があるが、ほとんどの形態の生物試料について、試料を酸化剤(CuO)とともに真空封入したのち、燃焼、ガス化する後者の方法が便利である。デューマ法では、燃焼により発生するCO₂とH₂OはN₂のスペクトルを妨害するため、吸収剤としてCaOをあらかじめ封入しておく。

¹⁵N分光法に適するN₂分圧は266.6~666.6 Pa(2~5 Torr)に限定されており、放電管内に封入する窒素量はきわめて微量である。したがって、外部からの窒素の汚染は測定に重大な誤差をもたらすので、十分、注意を払う必要がある。

直接放電管内に封入する試料や試薬、放電管用パイレックス製ガラス管、ならびにこれらを直接取り扱う器具類の汚染にはとくに気をつける。ふつう洗浄のみでは取れにくい汚染は有機物に由来する場合が多いので、放電管用ガラス管は、洗浄後560°Cの電気炉で3時間加熱前処理することにより、また、放電管内に封入する試料や試薬を扱うマイクロスペアテルやピンセットなどは直前に使用部分をガスバーナの炎で数秒間赤熱することにより除染できる。放電管に直接入れる前の操作でも微量試料を取り扱う器具類はできるだけ加熱除染する。ただし、多量の粉末試料を貯蔵する容器など微量な汚染が問題にならない場合は加熱除染する必要はないが、そのさいは十分にいいに洗浄する。

試薬類からの汚染については、できるだけ窒素の汚染が少ない試薬を選ぶことが原則であり、加熱除染が可能な場合は除染してから用いる。有機溶媒からの汚染は比較的少ないが、水については注意が必要で、蒸留水でも0.1 μg・N/1 ml程度の窒素が含まれている可能性がある¹²⁾。できれば再留水を用いるとともに、あまり多量の水で試料や試薬を希釈することは避けた方がよい。

試料調整や放電管作製時にとくに注意する必要があるのは環境からの汚染である。まず第一に問題となるのは空気中の塵や埃からの汚染であり、これを最小限におさえるように、¹⁵N分析室の床や実験台は清潔に保ち、また風の強い日は窓を閉めて作業した方がよい。試料や試薬は開放したまま長時間放置せず、アルミホイルなどで包んでおく。また、¹⁵N分析室ではアンモニアや濃硝酸など揮発性の含窒素試薬はおかないようにする。さらに分析者自身からの汚染についても、指の汚れ、唾液、フケなどはかなりの窒素を含有しており、作業中注意を要する。

試料間のクロスコンタミネーションについても十分注意する必要がある。とくに¹⁵N濃度の高い試料の後

で低い試料を扱う場合にその影響が大きい。

4. 分光法による¹⁵Nアミノ酸の測定法の概略

生体中に含まれる遊離アミノ酸の分光法による¹⁵N測定は、はじめろ紙電気泳動で試みられた。熊沢はこの方法で水稻の遊離アミノ酸、アミドへの¹⁵Nの取り込みを調べた¹³⁾が、この方法はろ紙からの窒素の汚染が避けられず、正確な値を得るには補正を要することから、米山ら¹⁴⁾によりシリカゲル薄層クロマトグラフィによる分析方法が開発された。はじめは、二次元展開した薄層板にニンヒドリンを噴霧し、発色したアミノ酸スポット部分のシリカゲルを毛细管に採取する方法であったが、のちにKanoら¹⁵⁾により、放電用ガラス管内にシリカゲルを吸引採取するように改良された。

その後、伊藤ら¹²⁾は、この方法による¹⁵N測定に対する汚染の問題について詳細に検討した結果、アミノ酸のスポットに対応する10 mgのシリカゲル中には約0.17 μgの窒素を含んでおり、試料窒素が微量のさいには大きな誤差を生じることが分かった。そこで、シリカゲルを560°Cで30分加熱し除染するとともに、各スポットに含まれるアミノ酸を50%エタノールで溶出し、シリカゲルを放電管内に封入しない方法を開発した。この方法によりシリカゲルからの汚染は回避でき、発光法の測定限界である0.2 μg-N以上の試料については正確な測定が可能となった。同時にシリカゲル封入法では、放電管作製時にシリカゲル内に吸着している空気と水を追い出すために、ヒータなしオイルバスで120°C程度に加熱する必要があった^{11),14)}が、溶出法ではこの工程を省略でき、かつ高温で分解しやすいアミドについてもより精度の高い測定が可能になった*。

筆者らは多数のアミノ酸試料を平行して能率的に分析できるように、伊藤らの方法のうち、ガラス細工の部分若干平易にした¹⁶⁾。以下、この方法について述べる。

5. 試料調製

ここでは、薄層クロマトグラフィで展開するための

* アミノ酸溶出法では200 μlのエタノール溶液を用いた場合、約70%の溶出率であり、シリカゲル封入法に比べて放電管内に導入できる窒素量が減少するという欠点もあり、現在、アミノ酸の¹⁵N分析は必ずしも溶出法に統一されているわけではない。

前処理について、植物体中の遊離アミノ酸の取り扱い例を紹介する。

抽出： ^{15}N 標識処理後凍結乾燥した植物試料粉末 1 g に約 10 ml の 80% エタノールを加えて 1 晩放置後、ろ過ないし遠沈法によりエタノール可溶部を分離する。残渣を 80% エタノールでさらに何回か洗い出し、抽出液を合わせて 25 ml に定容する。新鮮な組織についても熱ないし冷 80% エタノール中で摩砕することにより抽出が可能である。80% エタノール抽出液 10 ml をナス型フラスコに入れ、ロータリエボレータを用いて約 50°C で蒸発乾固する。5 ml の再留水を加えて溶解し、クロロフィルなど水に不溶性の物質を 12,000 g、15 分の遠沈で除去する。

脱塩：内径 10 mm、長さ 10 cm 程度のパイレックス製ガラス管の下部を細くし、イオン交換樹脂を支持するために石英綿を少量詰めておく。ガラス管は洗浄乾燥後、まとめてアルミホイルで包み、560°C で 3 時間加熱除染しておく。

イオン交換樹脂 Dowex 50X8 は新品の場合、ブフナーオートに入れて弱く吸引しつつ、それぞれ樹脂の容積の約 10 倍程度のメタノール、水、2N NaOH、水で逐次洗浄した後、1N HCl を用いて炎色反応で洗液中に Na が検出されなくなるまで洗浄する。さらに、再留水で洗液が中性になるまでよく洗った後、1 ml ずつガラス管に充填して脱塩用カラムとする*。

アミノ酸抽出液をカラムにかけた後、再留水約 10 ml を何回かに分けて注ぎ、樹脂を洗浄する。樹脂に吸着したアミノ酸、アミドを 2N アンモニア水約 10 ml を何回かに分けて注ぎ溶出する。アンモニア溶出液をナス型フラスコに入れて乾固する**。1 ml の水を加え再溶解した後、全量ないしその一部を容量 2 ml 程度のマイクロチューブに移す。チューブを真空デシケーター内に

* 使用剤樹脂はアンモニアが揮散しないように 1N HCl 中に保存し、以下の処理後再利用が可能である。樹脂をブフナーオート上で弱く吸引しつつ、樹脂のみかけの容積の約 10 倍量の 4N HCl で、ついで水で 2 回洗浄する。つぎに 10 倍容の 1N NaOH 中に懸濁し、ときどき振とうしながら、蒸気浴上で約 3 時間加熱後冷却する。ブフナーオートでろ過し、さらに何回か 1N NaOH で洗浄した後、ろ液が中性になるまで水洗後、湿潤状態で冷蔵庫に保存する。

**アンモニア水、およびアンモニア溶出液は、アンモニアの揮散により、周囲の水やガラス器具に吸着し、汚染を引き起こしやすいので、 ^{15}N 分析室外で取り扱う。

まとめて入れ、約 50°C に保温しアスピレータで濃縮する。50~100 μl の水に再度溶かし、薄層スポット用アミノ酸濃縮試料とする。

6. 薄層クロマトグラフィによるアミノ酸の分離と抽出

6.1 シリカゲル薄層プレートの準備

シリカゲル (Kiesel gel G Type 60, Merk 社) を蒸発皿に取り、560°C の電気炉で 30 分加熱し除染する。冷却後は再汚染を防ぐために密封容器に保存する。

薄層用ガラスプレートは、洗剤液 (医療器具洗浄剤 Vista, 乾商事) に一昼夜浸漬後、さらに中性洗剤を着けたスポンジで強くこすった後、水道水で十分洗浄する。このさい、水をはじく部分を残さない。蒸留水で 2 度洗浄後乾燥する。乾燥したガラス板は、指からの汚染を防ぐため一方向のみから取り扱い、とくにシリカゲルを展着する表面には触れないようにする。

薄層プレート作製装置 (矢沢科学) に 20 cm \times 20 cm のガラス板を 5 枚乗せ、その両端に 20 cm \times 5 cm のガラス板を置く。ガラス板は指の触れた向きを外側にし並べる。シリカゲル 30 g を 200 ml 三角フラスコに取り、再留水を 60 ml 加え約 30 秒間激しく振とう混合する。シリカゲル懸濁液を厚さ 0.25 mm に調節した薄層用アプリケータ内に注入し、アプリケータの両端を手で軽く押さえながら移動し、シリカゲルをガラス板に展着する。シリカゲル懸濁液が流れないように、展着直後はプレートをなるべく水平に扱い、薄層クロマト用保存箱に 30 分程度放置する。懸濁液が固化した後、約 70°C で乾燥し、続いて 110°C 30 分間加熱し、シリカゲルを活性化する。

6.2 アミノ酸濃縮液のスポットと二次元展開

先端を細くした外径 1 mm のパイレックス製毛细管を洗浄後、560°C で 3 時間加熱してアミノ酸濃縮液のスポットに用いる。かわりに、洗浄済マイクロピペット (Drumond 製) をそのまま用いてもよい。

一次元展開は、フェノール：水 (4:1) の溶媒で行い、展開終了後 70°C で 3 時間程度乾燥し、溶媒を完全に追い出す。二次元展開は、ブタノール：酢酸：水 (4:1:1) の溶媒で行い、70°C で乾燥する。乾燥したプレートに、ニンヒドリン-ブタノール溶液 (0.5%) を噴霧し、約 100°C で加熱発色する。

6.3 アミノ酸の溶出

分離したアミノ酸をシリカゲルから溶出するための

-
- ① 外径 4mm, 長さ 20cm のパイレックス管を洗剤液 (Vista) が入ったピペット洗浄器に入れ, 1 昼夜放置後よく水洗し乾燥する。
 - ② 端から 5cm の部分を細くする。
 - ③ 石英綿少量を丸めて詰める。
 - ④ ガラス棒の先端を強熱し, ピンセットでななめに引っ張る。
 - ⑤ 冷却後やすりで切断整形する。

図1 アミノ酸溶出用ガラス管の作製方法

ガラス管を準備する(図1)。パイレックスガラスは融点が高いので整形には酸素バーナを用いる。また溶出液を受けるガラス管(図2④)は, 4mm管を30cmの長さで切断し, 洗浄した後, その中央を酸素バーナで焼き切る操作により, 長さ15cmの一方のみ閉じたガラス管2本が得られる。この方法では封印部にピンホールを生じない。ガラス管はそれぞれ, 約100本を一まとめにしてアルミホイルに包み, 560°Cで3時間加熱除染する。

薄層プレート上のアミノ酸スポットの採取ならびに抽出は図2のように行う。

(1) 薄層プレート上のニンヒドリン発色部を, アスピレータで弱く吸引しながら, アミノ酸溶出用ガラス管に採取する。

(2) やすりでガラス管の首を切断する。

(3) 50%エタノールを注射器で約100 μ l ゆっくり注入する。注入時, 針先にシリカゲルが付着し, クロスコンタミネーションが起こるのを防ぐために, 試料ごとに100ml程度の50%エタノール溶液で針先を軽く洗い, さらに針先のエタノールを少量廃棄し, 針内を浄化する。針先洗浄用エタノールは数十試料ごとに更新する。

(4) 外径5mm, 長さ4cmのビニール管を装着した50ml容注射筒の空気圧でゆっくりエタノールを押し出し, アミノ酸をシリカゲルから溶出し, 一方を閉じた長さ15cmのガラス管内に溶出液を注入する。

(5) ガラス管下部に細字用ホワイトマジックで番号を記入し, 約10本ずつゴムバンドでたばね, 2lナス型フラスコに入れ60°Cで蒸発乾燥する。

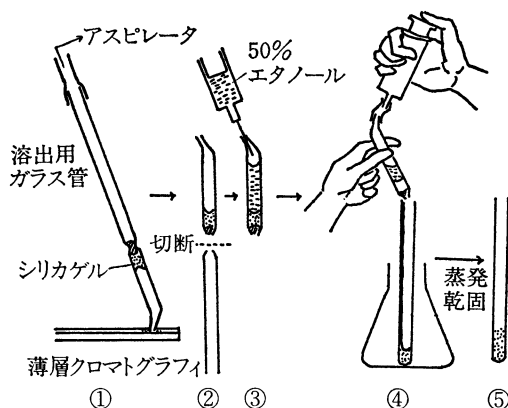


図2 アミノ酸スポットの抽出法

^{15}N 測定は同位体比を直接測定するため, アミノ酸発色部を全量採取する必要はない。窒素量が多く, 全量採取すると発光範囲を越える場合は, 中央部から一部とればよい。また, 複数のアミノ酸のスポットが若干重なった場合は, 重複部分からなるべく離れた端の部分を取り, アミノ酸同士の干渉を避ける。

7. 放電管の作製

放電管作製前に棒状CaOを準備しておく。塊状CaO(純正化学, 特級)を乳鉢と乳棒で微粉末になるまで, 十分, 摩砕する。その約1gをとり, 油圧式錠剤整形器(理研)を用い400 kg/cm^2 で数秒間加圧し, 直径約2cm, 厚さ約1mmの円形錠剤を作る。錠剤をカッターナイフの刃で切断し, 1mm幅の棒状にする。棒状CaOはるつぼに入れ, 950°Cの電気炉で2時間以上加熱し, CO_2 を十分に追い出しておく。

放電管の作製は以下の手順で行う(図3, 4参照)。

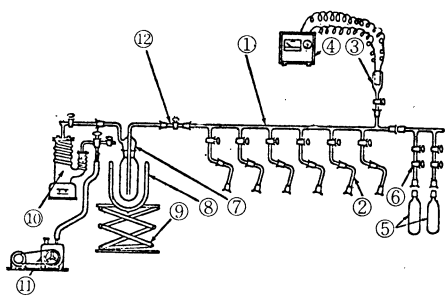
(1) 事前に560°C30分除染後冷却した粉末CuOを, 炎内で赤熱除染したミクロスパーテルに一杯ずつガラス管内に入れる。

(2) ガラス管のアミノ酸試料付着部分の上を細くする。

(3) 950°Cで2時間以上加熱している棒状CaOを, 先端の鋭利なピンセットでガラス管内に挿入する。棒状CaOはガラス管の細い部分の上に留まるようにする。CaOは冷却と同時に空中の CO_2 や水を吸収し始めるので, なるべく手早く操作を行い, 残りは使用直後に炉へ戻す。

(4) ガラス管の開放端を熱してガラスの角をとり冷却する。この操作を省くと, 真空装置の放電管装着部ビニール管に傷をつけ真空を保てなくなる。

(5) ガラス管先端部に真空グリース(アピエゾンL



- ① 分配管
- ② アダプタ
- ③ 真空度測定子
- ④ ピラニー真空計
- ⑤ 希ガスポンベ
- ⑥ 並列コック
- ⑦ H₂O, CO₂ トラップ
- ⑧ 液体窒素用魔法ビン
- ⑨ ジャッキ
- ⑩ オイル拡散ポンプ
- ⑪ 真空ポンプ
- ⑫ コック

図3 熊沢式 ¹⁵N測定放電管作製用真空装置 (大内理化製¹¹⁾より改変)

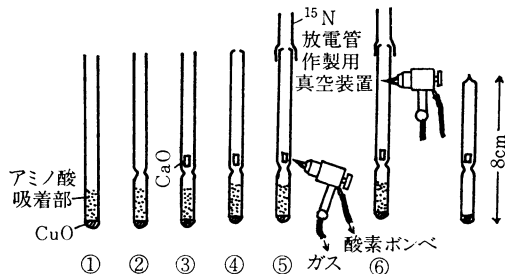


図4 ¹⁵N 放電管作製の手順

type) を少量ぬり、回転させながら放電管用真空装置に接続し、ガラス管内の空気を排気する。

弱い酸素バーナの炎を用いて、放電管中の CaO をガラスの上から熱し再度 CO₂ を追い出す。そのさい、CaO が赤色を呈し、ガラスがやや軟化するまで十分に熱し、ピラニー真空計で圧力が低下し始め、ガスの放出が完了するのを確認する。さらに続いて、試料吸着部以外のガラス管を軽く熱し、ガラス壁に吸着している水やガスを追い出す。

ピラニー真空計で 1.33×10^{-2} Pa (10^{-4} Torr) 程度まで排気した後、放電管作製部と液体窒素トラップの間のコック (図3 ⑫) を閉じ、希ガスポンベのコック操作により Xe 26.66 Pa (0.2 Torr), He 1333 Pa (10 Torr) を放電管作製部に導入する。希ガス導入時に系内に漏れがあると空中の N₂ による汚染が生ずる。分析開始前に、5分程度は 0.133 Pa (10^{-3} Torr) 以下に保たれることを確認しておく。

(6) 中程度の強さの炎を用い、試料部以外のガラス

管を軽く熱した後、ガラス管下端から約 8cm の部分を溶融し、切断封印する。

真空装置には放電管 6本を装着可能なため、放電管を能率的に作製するには、(1), (2) の操作はまとめて完了しておき、6本1組として(3)~(6)の操作を行う。放電管内を排気している間につぎの6本について、(3), (4)の操作を行うとさらに時間のむだがなくなる。

作製した放電管は数十本ずつまとめてアルミホイルで包み、560°C の電気炉で3時間程度燃焼する。燃焼直後は妨害ガスの吸収が不十分のため、バックグラウンドが高いことがあるので、冷却後1~2日放置してから ¹⁵N 濃度を測定する。

He は N₂ の励起を補助し、Xe は N₂ がガラス壁に吸着されるのを妨げるため、アミノ酸のスポットのように、微量でかつ試料の窒素量の幅がある場合には、希ガスを導入した方が成功率が高まる。ただし、希ガスポンベ内に空気が混入していると、重大な汚染を引き起こすため、使用前に汚染の検定をする必要がある。

8. アマイドのアミド基 N, アミノ基 N の分別 ¹⁵N 測定

アマイド (グルタミン (Gln), アスパラギン (Asn)) のアミド基 N とアミノ基 N の ¹⁵N 濃度を分別測定する方法が有馬¹⁷⁾により考案された。試料内の Gln, Asn を分離した後、加水分解して生成したグルタミン酸 (Glu), アスパラギン酸 (Asp) の ¹⁵N 濃度を測定し、アミノ基 N の ¹⁵N 濃度 (A) とする。事前に二次元展開して求めておいた Gln, Asn の ¹⁵N 濃度 (B) から、アミド基 N の ¹⁵N 濃度 (C) が、式 $C = 2B - A$ により計算できる。ただし、A, B, C の単位は atom % excess である。ここでは、有馬の方法を若干改変している。

アミノ酸濃縮試料全体を加水分解すると、もともと含まれていた Glu, Asp と加水分解して生成した Glu, Asp が混合してしまうため、加水分解前に試料中の Glu, Asp を除去する必要がある。そこで、一次元展開の 5×20cm のシリカゲル薄層クロマトグラフィで Gln, Asn を Glu, Asp から分離する。試料を薄層プレートの下から 2cm の部分に線状に吸着し、フェノール:水 (4:1) の溶媒で展開すると、分離したバンドが見える。事前に加熱除染しておいたシリカゲル採取管 (外径 1cm) を用いて、Gln, Asn を含むバンドの部分を吸引採取する。そのさい、Glu, Asp は原点からほとんど移動しないので、これらを区別するのは容易である。その他のアミノ酸は混入してもかまわない。

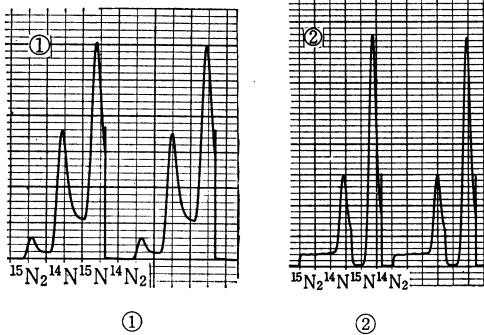
シリカゲルからのアミノ酸スポットの溶出(図2④)

と同様にして、2N HCl 2 ml を用いて Gln, Asn をシリカゲルから溶出する。溶出液は 10 ml ネジ蓋付試験管に入れ加圧滅菌器で 120°C, 30 分間加熱し加水分解する。加水分解液をエバポレーターで乾固した後、水 1 ml に再溶解した後、イオン交換樹脂を用いて脱塩濃縮する。さらに、シリカゲル薄層クロマトグラフィで二次元展開して分離した Glu, Asp の ^{15}N 濃度を測定する。

9. ^{15}N 濃度の計測

測定の概略：放電管の ^{15}N 測定開始前に ^{15}N 分析装置を 15~30 分間予備運転し、装置内部温度を一定しておく。放電管を高周波発振部の電極間に固定し、テスラーコイルで N_2 ガスを励起することにより発光を開始する。ここで、CaO, CuO 試薬は高温で CO_2 , H_2O , O_2 を発生し、バックグラウンドノイズを高めるため、発光部分からできるだけ遠ざける。

記録紙上には、図 5 ①のように $^{15}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{14}\text{N}_2$ のピークが順に繰り返し記入される。なお、 ^{15}N 濃度が低い場合は、精度を上げるため、 $^{15}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ の波長域を増幅することができる。図 5 ②は 0.08 atom % excess のチャートであり、 $^{15}\text{N}_2$ のピークは認められないが、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ は明瞭なピークを示す。実際の測定時には、5 回測定を繰り返し、うしろの 4 組が安定したグラフを示せば発光を停止し、これを用いて計測する。



- ① 27.3 atom % excess
 ② 0.08 atom % excess ($\times 32$), $^{15}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ の波長域の感度を $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ の 32 倍に増幅している。

図 5 ^{15}N 発光分光分析法によるフローチャートの見本

発光時の $^{14}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}_2$ の光の相対強度 I_{23} , I_{29} , I_{30} は分子数に比例しているとみなして測定を行う。 N_2 ガスを構成している $^{14}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}_2$ には、 ^{15}N と ^{14}N が確率的にランダムに結合しているため、 I_{29} ,

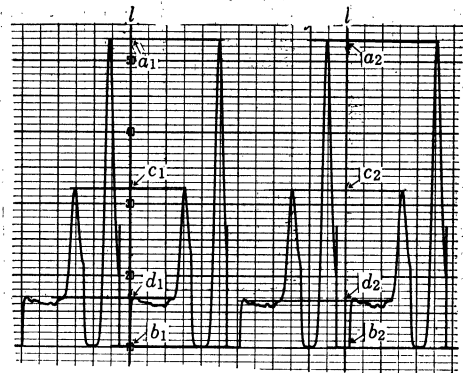
I_{29} もしくは I_{29} , I_{30} のいずれか 1 組の値が分かれば ^{15}N の存在比が計算できる。

$$^{15}\text{N}(\text{atom } \%) = \frac{100}{2 \frac{I_{29}}{I_{29}} + 1} \quad (1)$$

$$^{15}\text{N}(\text{atom } \%) = \left(1 - \frac{1}{2 \frac{I_{30}}{I_{29}} + 1}\right) \times 100 \quad (2)$$

通常、 ^{15}N 濃度が約 50 atom % ぐらいまでは式(1)を、それ以上では式(2)を用いる。

計測の手順：4 組の連続するチャートについて、2 組ずつ対にして計測する。 $^{14}\text{N}_2$ のピークについては、頂点同士と、ピーク右下のベースライン同士をそれぞれ直線で結ぶ。 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ のピークは、頂点同士と、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ピークが急激に立ち上がりを開始する変曲点同士を直線で結ぶ。図 6 の直線 l 上の ab 間、 cd 間の距離を 0.1 mm の単位まで測定し、それぞれ I_{28} , I_{29} とする。



- ① $a_1 - b_1 = 85.3 \text{ mm}$ (I_{23})
 $c_1 - d_1 = 30.6 \text{ mm}$ (I_{29})

$$^{15}\text{N}(\text{atom } \%) = \frac{100}{2 \times 32 \times \frac{85.3}{30.6} + 1} \approx 0.557$$

- ② $a_2 - b_2 = 85.2 \text{ mm}$
 $c_2 - d_2 = 30.7 \text{ mm}$

$$^{15}\text{N}(\text{atom } \%) \approx 0.560$$

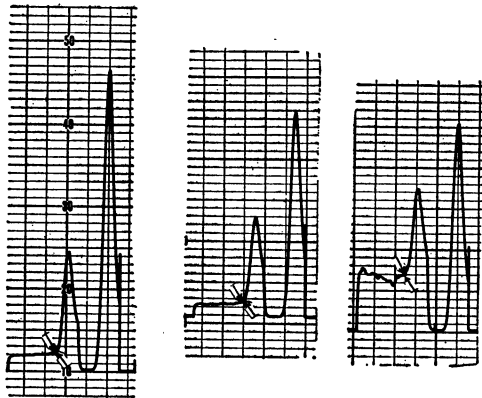
- ③ 実測値の平均 0.56 atom % を補正すると 0.49 atom % となる。したがって、試料の ^{15}N 濃度は、0.12 atom % excess となる。

図 6 ^{15}N フローチャートの計測法 ($\times 32$)

チャート 2 組ずつ対にして測定する理由は、 I_{29} と I_{29} の測定時刻のずれによる影響を補正するためである。たとえば、発光強度が徐々に低下している場合、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ 測定時点の発光強度の方が、それより遅れる $^{14}\text{N}_2$ 測定時の発光強度より明るいため、それぞれのピーク高を測定して ^{15}N 濃度を求めると、真の値より高

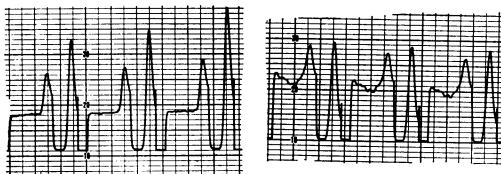
く出る。そこで、2組を対にして測定することにより、発光強度の変化を直線近似し、同一時刻における I_{29} , I_{28} を測定している。ただし、発光強度が増減したり、振動するなど不安定な場合や、その経時変化が大幅なときには変化を直線で近似できないため、正しい測定値が得られない。一般に 4mm 放電管は封入 N_2 量が少ないため、はじめ発光強度が増加した後、徐々に低下し、最終的には発光不能になる場合が多い。そこで、はじめ数秒強く光らせた後、放電管を下げた高電圧側電極との接触面積を減少すると、発光強度は弱くなるが、安定なチャートを得やすい。

$^{14}N^{15}N$ のバックグラウンドの取り方： ^{15}N 濃度が低い場合、バックグラウンドの取り方が悪いときわめて大きな誤差の原因となる¹⁰⁾。バックグラウンドノイズの低い放電管を作製することが最も大切なことである



- ① 0.08 atom % excess
- ② 0.20 atom % excess
(バックグラウンドが低い場合)
- ③ 0.20 atom % excess
(バックグラウンドが高い場合)

図7 ^{15}N フローチャート $^{14}N^{15}N$ のバックグラウンドの位置 (×32)



- ① バックグラウンドが高く、かつ発光強度が急激に増加している。
- ② バックグラウンドが高く、 CO_2 と $^{14}N_2$ のピークの変曲点が不鮮明である。

図8 発光不良な放電管のチャート例

が、そのためには、放電管作製時に CaO とガラス管壁を十分熱し、 CO_2 と水をできるかぎり除去しておくことが肝要である。バックグラウンドがやや高めに出来る放電管については、強い発光を30分程度持続すると放電中に妨害ガスが吸着されバックグラウンドを低下できる。

図7の $^{14}N^{15}N$ ピークの前に微小な肩が認められるが、これは CO_2 の発光によるものであり、 $^{14}N^{15}N$ のピークと重なっている⁹⁾。そこで、 $^{14}N^{15}N$ ピークのバックグラウンドには、 $^{14}N^{15}N$ ピークと CO_2 の肩との変曲点(矢印)をとることにより正確な測定が可能である。ただし、バックグラウンドが異常に高く、 $^{14}N^{15}N$ のピークの高さを上まわる場合には測定値が不正確になる。図8のように、バックグラウンドが高い場合や、変曲点が不明瞭な場合は、バックグラウンドを下げるか、放電管を作り直す。

補正： ^{15}N の測定値は、ピークの shadow や裾などの影響で真の値と若干ずれているため、正しい値を得るためには、おのおの ^{15}N の測定装置について標準放電管を使用して“実測値-理論値”の曲線を作り、これを用いて補正する。補正曲線を折れ線グラフに近似して計算により補正してもよい。

^{15}N 濃度が10~50%の試料については、 $^{15}N_2$ のピークが高くなるにつれて、その shadow が $^{14}N^{15}N$ のピークに重なってくる。そこで、 $^{14}N^{15}N$ 左下をバックグラウンドにとると、 ^{15}N 濃度が高くなるにつれて、

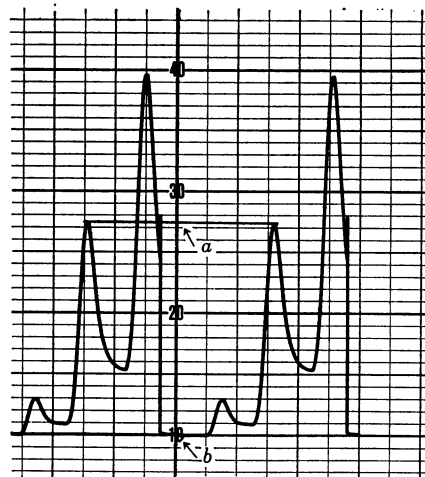


図9 10~50 atom %の試料の $^{14}N^{15}N$ ピークのバックグラウンドのとり方
 a , b 間の距離を $^{14}N^{15}N$ のピーク高とする。

相対的に測定値が真の値より低くなり、補正曲線が頭打ちを示す。筆者らは、 ^{15}N 濃度が高い場合、妨害ガスによるバックグラウンドの上昇は無視できることから、 ^{15}N 濃度10~50%の場合には、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ピークのバックグラウンドを $^{15}\text{N}_2$ ピークの前としている(図9)。この操作により直線に近い補正曲線を作ることができる。

10. 測定誤差の検討

^{15}N 分光分析法で実測したデータを用いて、同一放電管で得られる連続した2組の測定値の誤差を検討した。実測値 atom % に対する変動係数は、全濃度範囲にわたって1%以内である。ただし、図10に示されるように、実験結果の表示に用いる atom % excess を算出するさいには、試料の atom % から ^{15}N 自然存在比 (0.37 atom %) を引くため、試料の ^{15}N 濃度が 0.1 atom % excess 以下では相対誤差が急速に大きくなる。そこで、とくに定量的な実験では、0.1 atom % excess 以上の測定値が得られるように実験設計を組むことが望ましい。ただし、測定値が 1 atom % excess 以上では誤差はほとんど変化しないため、 ^{15}N 濃度のむやみに高い標識化合物を用いるのは不経済である。

とくに、 ^{15}N 濃度が低い試料をより精度高く測定するには、測定連数を多くとった方がよいが、通常のトレーサ実験においては同一試料につき2本の放電管を作り、その平均値をとれば測定精度としては十分である。ただし、放電管作製時の汚染の有無をチェックする意味でも、放電管は必ず2本作り、測定値の間に異常に差がある場合には、単純に平均せず、測定し直す

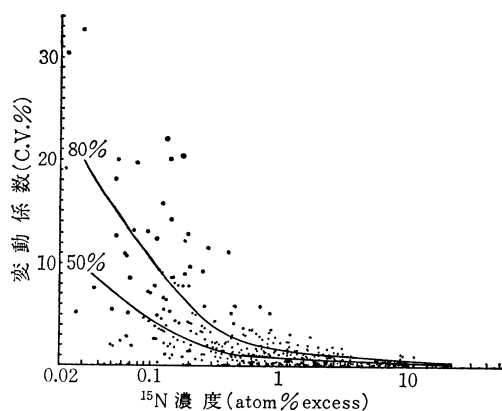


図10 ^{15}N 測定における誤差
 変動係数 (%) = 標準偏差 (σ_{n-1}) ÷ 平均値 ($\bar{\mu}$) × 100。50%の線はおおのこの ^{15}N 濃度に対して測定値の約50%が在存している範囲を示す。

か、高い方の値を採用する。

11. ^{15}N 発光分光分析法による生体アミノ酸の測定例

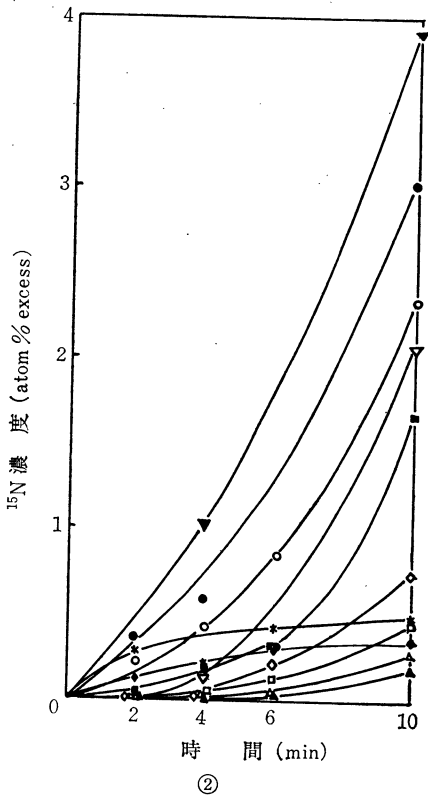
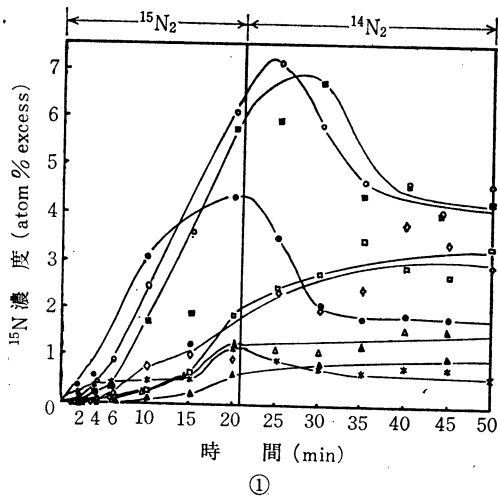
発光分光法による生体内遊離アミノ酸の ^{15}N 分析が容易に行えるようになり、すでに植物の窒素の初期代謝過程や移行などの研究に利用されてきている。熊沢¹³⁾、米山ら¹⁸⁾、¹⁹⁾、有馬ら¹⁷⁾は水稻根に吸収されたアンモニアや硝酸の代謝について検討し、また、伊藤ら^{20)~22)}はヒマワリの葉の窒素代謝と光合成の関連について報告している。筆者らは、 ^{15}N 分光法を用いて、大豆根粒で固定した空中窒素の同化ならびに体内の移動に関する研究を進めており、その結果のうち、アミノ酸 ^{15}N 分析の応用例を簡単に紹介する。

大豆など根粒を形成する豆科植物は、土壌中の窒素を吸収同化するとともに、空中の窒素を固定し利用している。宿主植物に共生した根粒菌はバクテロイドと呼ばれ、窒素固定能を発現するようになる。 N_2 は、バクテロイド内のニトロゲナーゼにより、最初にアンモニアに還元されることはよく知られているが、根粒内における固定後の代謝過程や、根粒から宿主への移行形態などについては、十分、明らかにされてはいない。そこで、筆者らは大豆の根粒に ^{15}N 標識した空気を曝露し、固定した後の窒素の挙動を追跡した。

はじめに、無窒素培地で栽培した大豆に ^{15}N 標識窒素ガス ($^{15}\text{N}_2 : \text{O}_2 : \text{He} = 1 : 2 : 7$, 70 atom % ^{15}N) を21分間曝露し、その後、根の周囲のガスを空気と置換し、 ^{15}N 供与開始50分後まで実験を続けた。処理中、植物を経時的にサンプリングし、その根粒をすばやくもぎとり、80%エタノール中で摩砕し、遊離窒素化合物を抽出して ^{15}N 濃度を測定した。結果を図11²³⁾に示す。

ニトロゲナーゼにより最初に生成するアンモニアについては、 $^{15}\text{N}_2$ 曝露開始直後に ^{15}N 濃度の急激な上昇を示すが、数分後には低いレベルで頭打ちになる。このことから、固定直後のアンモニアは N_2 固定部位近傍にのみ局在し、急速に他の化合物へ同化されていることが分かる。

アミノ酸、アミド類については、グルタミンが最も早い時点から ^{15}N 濃度の上昇を示し、また、気相を $^{15}\text{N}_2$ から $^{14}\text{N}_2$ に変換した直後から、アンモニア同様急激に ^{15}N 濃度が低下する。グルタミンのアミド基とアミノ基を分別して ^{15}N 濃度を測定すると(図11②)、 ^{15}N 処理開始直後の ^{15}N の取り込みは、グルタミンアミド基、グルタミン酸、グルタミンのアミノ基の順に始まっている。一方、グルタミン酸について見ると、 ^{15}N



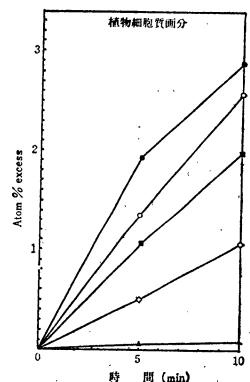
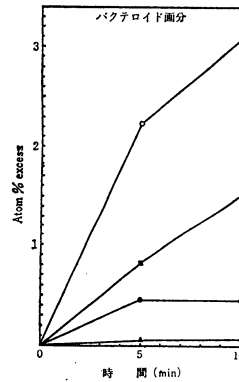
*アンモニア ●グルタミン ○グルタミン酸
 ■アラニン △アスパラギン酸 ▲アスパラギン,
 ロセリン ◇アラントイン(酸) ◆硝酸 ▼グル
 タミンアミド基 ▽グルタミンアミノ基

図11 大豆根粒に $^{15}\text{N}_2$ を曝露した後の根粒内遊離窒素化合物の標識経過

②は $^{15}\text{N}_2$ 供給開始 10 分後までの経過を拡大した。

表1 $^{15}\text{N}_2$ 曝露直後に分離した根粒バクテロイドと細胞質画分の ^{15}N 濃度と固定窒素の分布

$^{15}\text{N}_2$ 処理時間		atom % excess	窒素含有量 ($\mu\text{g-N}$)	固定窒素量 (μg)	固定窒素の分布 (%)
5分	バクテロイド	0.11	172	0.31	3
	植物細胞質	0.25	2,330	9.55	97
10分	バクテロイド	0.25	287	1.18	4
	植物細胞質	0.44	1,796	26.21	96



○グルタミン酸 ●グルタミン ■アラニン ◇アラントイン(酸) ▲アスパラギン

図12 $^{15}\text{N}_2$ 曝露後の根粒バクテロイド画分、植物細胞質画分の遊離窒素化合物の標識経過

の取り込みは数分間のラグタイムの後に始まり、その後急速に上昇し、非標識気相へ転換後もしばらく上昇傾向を維持している。これらの結果は、固定生成したアンモニアが、従来、考えられていたようにグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) ではなく、むしろ主として、グルタミン合成酵素 (GS)/グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) 系で同化されていることを示唆している。

グルタミン酸に続いてアラニンの ^{15}N 濃度が上昇しており、つぎにアラントイン(酸)が急速な ^{15}N の取り込みを示している。プリン核分解過程の中間体として知られるアラントイン(酸)が、大豆根粒内で固定窒素から活発に合成されていることは興味深い。大豆の体内窒素移動形態として重要視されているアスパラギンは、やや長いラグタイムの後に徐々に ^{15}N を取り込んでいる。

つぎに、 $^{15}\text{N}_2$ 処理後ただちに根粒をバクテロイドと植物細胞質とに分画し、両者の標識経過を調べた²⁴⁾。

両画分の ^{15}N 濃度を比較したところ(表1)、 $^{15}\text{N}_2$ 供与開始から5分後、10分後ともに、バクテロイドよりもむしろ植物細胞質の方が高い。さらに、固定窒素の分布割合をみると、5分後で97%が植物細胞質に分布

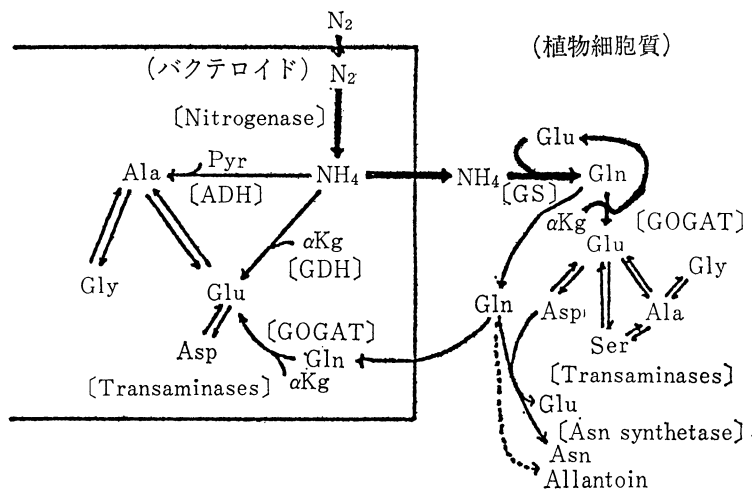


図13 大豆根粒内における固定窒素の同化に関するモデル図

しており、固定生成した窒素は大部分バクテロイドから宿主細胞質へ急速に移動していることが分かる。

つぎに、両画分の遊離窒素化合物への ¹⁵N 同化パターンを調べたところ(図12)、両者はまったく異なっており、バクテロイド内では、グルタミン酸が最も急速な ¹⁵N 濃度上昇を示しているが、細胞質ではグルタミン、グルタミン酸、アラニン、アラントイン(酸)の順である。

以上の結果、ならびに、¹⁵N と窒素同化に関与する酵素の阻害剤を組み合わせて用いた実験結果²³⁾などから、根粒内の固定窒素の初期同化過程について、筆者らは図13のようなモデルを考えている。

固定生成したアンモニアは、大部分そのまま宿主細胞質側に放出され、GS/GOGAT 系で最初に同化された後、種々のアミノ酸やアラントイン(酸)へ迅速に取り込まれて、根や茎葉部へ移行する。一方、固定生成したアンモニアの一部は、バクテロイド内では、GS/GOGAT 系ではなく、GDH やアラニン脱水素酵素で最初に同化されると考えられるのである。

文 献

1) Fiedler, R. and Proksch, G.: *Analytica Chimica Acta*, **78**, 1~62 (1975)
 2) 熊沢喜久雄: 化学と生物, **8**, 246~52 (1970)
 3) 熊沢喜久雄: *Radioisotopes*, **21**, 623~33(1972)
 4) 熊沢喜久雄, 他: 土肥誌, **45**, 378~81 (1974)
 5) 熊沢喜久雄, 他: 同上, **45**, 382~88 (1974)

6) 熊沢喜久雄: ぶんせき, **9**, 603~12 (1975)
 7) 熊沢喜久雄: *Farumashia*, **11**, 505~07 (1975)
 8) 熊沢喜久雄: *Radioisotopes*, **25**, 365~73(1976)
 9) 熊沢喜久雄: 同上, **25**, 426~36
 10) 狩野広美, 他: 土肥誌, **45**, 549~59 (1974)
 11) 有馬泰紘: 「生化学実験講座」, 6巻(日本生化学会編), pp. 297~309, 東京化学同人(1977)
 12) 伊藤治, 他: *Radioisotopes*, **25**, 448~53 (1976)
 13) 熊沢喜久雄: 第10回日本

アイソトープ会議報文集(日本原子力産業会議), 267~69 (1971)

14) 米山忠克, 熊沢喜久雄: 土肥誌, **43**, 262~63 (1972)
 15) Kano, H., et al.: *Anal. Biochem.*, **67**, 327~31 (1975)
 16) Ohyama, T. and Kumazawa, K.: "Stable Isotopes; Proc. 3rd Int. Conf.", Academic Press, pp. 327~35 (1979)
 17) 有馬泰紘, 熊沢喜久雄: 土肥誌, **46**, 355~61 (1975)
 18) Yoneyama, T. and Kumazawa, K.: *Plant Cell Physiol.*, **15**, 655~61 (1974)
 19) Yoneyama, T. and Kumazawa, K.: *ibid.*, **16**, 21~26 (1975)
 20) Ito, O. and Kumazawa, K.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **23**, 365~72 (1977)
 21) Ito, O. and Kumazawa, K.: *ibid.*, **24**, 299~303 (1978)
 22) Ito, O. and Kumazawa, K.: *ibid.*, **24**, 327~36 (1978)
 23) Ohyama, T. and Kumazawa, K.: *ibid.*, **24**, 525~33 (1978)
 24) Ohyama, T. and Kumazawa, K.: *ibid.*, **26**, 205~13 (1980)
 25) Ohyama, T. and Kumazawa, K.: *ibid.*, **26**, 109~15 (1980)