

糖水溶液中の酸素分子の拡散過程 — 蛍光相関分光による観測 —

大阪大学大学院基礎工学研究科・極限量子科学研究センター

○長澤 裕、片山 元気、伊都 将司、宮坂 博

【序】ある種の糖類は、乾燥・凍結時などにおいて、生体物質の保護剤として機能することが知られている。たとえば、体長が1ミリ以下の土壌微生物であるクマムシは乾燥により体内の水分のほとんどを失っても、その後、水分が戻ると生き返るという驚異的な耐乾燥性を示す。ただし、急激な乾燥には耐えられず、数時間に渡るゆっくりとした乾燥が必要であり、その間にクマムシは体内に2糖類の一種であるトレハロースを蓄積することが知られている。同様なトレハロースの蓄積は耐乾燥性を示すアフリカ原産のネムリユスリカの幼虫でも観測されている。また、寒冷地に住むカエルの仲間は、叩くと割れるほど身体が凍結しても温度が上昇して解凍すると生き返るが、この場合、単糖類のグルコースが蓄積される。このように極限的な悪環境の間、新陳代謝を完全に停止して耐え忍ぶ生物の能力のことをクリプトビオシス(cryptobiosis)と呼ぶ。これは液体の水が存在しないと蛋白質はその高次構造を保つことができず生物は死滅してしまうという常識に反するので、多くの科学者の注目を集め、研究も盛んに行われている。クリプトビオシスの研究は生体物質の安定な長期保存といった応用の面からも重要である。糖類の保護剤としての機能発現のメカニズムは、(1)ガラス転移してその中に生体物質を閉じ込め保護する、(2)生体物質の結合水の代替物質としてその高次構造を保護する、(3)クリプトビオシス状態から復活する際の最初のエネルギー源になる、などと説明されている。保護剤としての糖類は生体物質の変性を防止しているわけだが、ミクロなレベルで分子運動そのものを抑制していると考えられる。分子が動くことができなければ変性も起こらない。我々はこのような観点から、糖水溶液中の分子運動が溶媒の粘度にどのような影響を受けるか、分光学的手法で研究を行っている。今回は蛍光相関顕微分光法(FCS)により、糖水溶液中での酸素分子の拡散過程が観測できたと考えたので、これについて報告する。

【実験】トレハロースとグルコースは東京化成工業，スクロースとラフィノースは和光純薬工業，マルトースはキシダ化学，ローダミン 6G (R6G)はエキシトンから購入した。糖水溶液の粘度測定は、恒温槽内でオストワルド粘度計を用いることにより行った。蛍光相関顕微分光(FCS)はアルゴンイオンレーザー (LGN7812 LASOS Lasertechnik BmbH) の488nmの発振線を光源とし、倒立顕微鏡 (Olympus IX70) を用いて行った。対物レンズは油浸レンズ($\times 100$, N.A.=1.35)を用い、 $25\ \mu\text{m}$ のピンポールにより共焦点化した。顕微鏡の対物レンズで集光されたレーザー光は、その焦点で極めて光密度の高い領域を形成する。その領域の大きさは直径約400nm、高さ約 $2.0\ \mu\text{m}$ 程度である。ブラウン運動によりこの領域を数個の蛍光性分子が出入りすることに伴い、そこから発せられる蛍光強度は時間とともに揺らぐ。並進拡散が速いとその揺らぎも激しくな

り、遅ければ緩やかになる。そこで強度揺らぎの時間相関関数 $G(\tau)$ を FCS により測定すると、蛍光分子の顕微鏡焦点における平均滞在時間を求めることができる。我々は蛍光性色素 R6G を用いて、糖水溶液中の分子の並進拡散運動を観測した。

【結果と考察】図 1 にトレハロース水溶液中の R6G の $G(\tau)$ を示す。トレハロース濃度上昇とともに拡散時間が長くなるのがわかるが、同時に 0.1 ミリ秒以下の短時間領域の形が変化しているのがわかる。FCS によって観測される発光は励起一重項状態(S_1)状態からの蛍光であるが、 S_1 状態にある分子の一部は項間交差を起し、励起三重項状態(T_1)となる。一般的に一重項・三重項間の遷移は禁制なので、 S_1 状態にくらべて T_1 状態の寿命は長い。酸素分子が溶液中に存在する場合、酸素分子の基底状態は三重項状態であるため、禁制が若干解かれ、 T_1 状態の寿命が短くなる。よって、大気中で FCS を測定した場合、励起レーザー光強度が適度に弱ければ、 T_1 状態の影響をあまり受けない。しかし、糖濃度の高い水溶液では T_1 状態の影響が図 1 のように 0.1 ミリ秒以下の領域で顕著に現れる。FCS によって観測された R6G の T_1 状態の寿命 τ_{up} の粘度依存性を図 2 に示す。 τ_{up} は、純水中では 1 マイクロ秒程度であるのに対し、粘度が 20 cP を越える 50 wt %以上の糖水溶液中では 8 マイクロ秒

以上になる。これは、高濃度の糖水溶液中では、溶存酸素濃度が低下したか、その拡散速度が遅くなったため、R6G 分子と酸素分子が出会う頻度が低くなったためであると解釈できる。なお、直鎖アルコールで同様な実験を行ったところ、 T_1 状態の寿命は粘度に無関係に一定であった。酸素分子は励起されて一重項状態になると、これはいわゆる活性酸素の一種なので、生体に悪影響を及ぼす場合がある。凍結・乾燥時の糖類の生体保護剤としての特性の 1 つとして、生体物質に酸素を近づけないという作用があるのかも知れない。詳しいことは学会にて報告する。

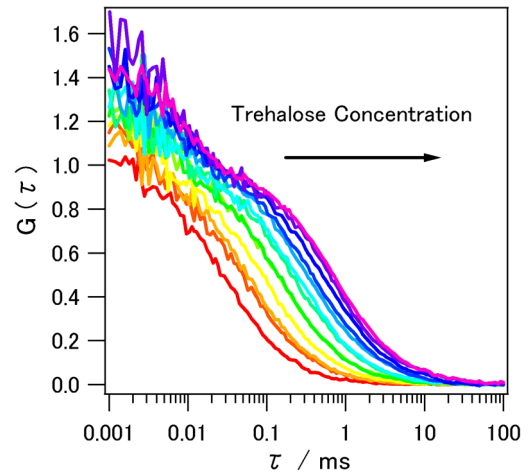


図 1. 蛍光相関分光法により求めたトレハロース水溶液中のローダミン 6G 分子の自己相関関数。トレハロース濃度上昇とともに拡散時間が長くなっているのがわかる。

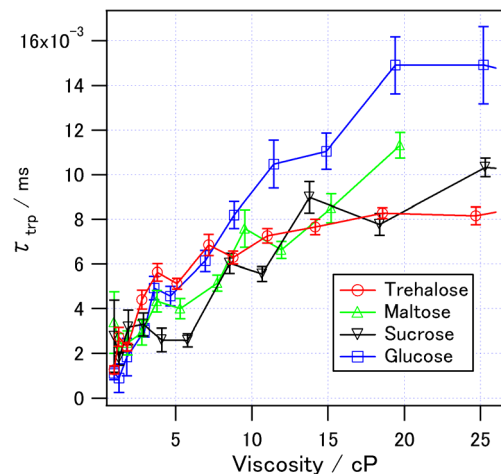


図 2. 自己相関関数から求めた糖水溶液中のローダミン 6G 分子の励起三重項状態の寿命。粘度上昇とともに寿命が長くなっているのがわかる。