

COFFEE BREAK

生体膜内・外の pH と NMR

坂田 亮・鳥光 慶一

慶応義塾大学理工学部 計測工学科
〒223 横浜市港北区日吉3丁目14-1

(1984年1月17日 受理)

Internal and External pH Measurement across the Biological Membranes with NMR Method

Makoto SAKATA and Keiichi TORIMITSU
Faculty of Science and Technology, Keio University
14-1, Hiyoshi 3 chome, Kohoku-ku,
Yokohama 223

(Received January 17, 1984)

薄膜の一つである生体膜の内・外における pH を知ることは、非常に魅力ある課題である。生物細胞の表面は、厚さ 10 nm ほどの薄膜でおおわれている。このような薄膜を生物系では細胞薄膜とは呼ばず、「細胞膜」と呼ぶ。ところで、「生体膜」と言った場合には、通常上記の「細胞膜」ばかりでなく、「細胞内膜」すなわち、ミトコンドリア膜、小胞体膜、ゴルジ体膜、核膜などの膜系の総称である。各々の膜の機能は極めて多様であるので、ここでは外界と細胞とを隔てている「細胞膜」の内・外における pH (水素イオン濃度) について特に注目して述べてみよう。

細胞膜は、単に細胞を外界から隔てているだけでなく、各種分子の出入を制御している。つまり、どの分子の出入を許し、どの分子の出入を拒否するかを選択する機能を持っているということである。その機能により細胞膜は細胞の必要とするものを取り込み、また細胞内で不必要となったものを排出する。

人工膜の場合、膜の内・外の物質は、拡散によって等しい濃度になるまで (正確には、電気化学ポテンシャルが等しくなるまで) 移動して熱力学的な平衡状態に達する。しかし、細胞膜は、ATP (アデノシン三リン酸) という物質をエネルギー源として、絶えずこの拡散に抗して、すなわち、電気化学ポテンシャルの勾配に逆らって物質を輸送する。また細胞膜は、代謝で生成、消費された物質を絶えず輸送して、膜内・外の物質の濃度差が一定になるような定常状態を作り出す。このような生体膜の持つ物質 (イオン) 選択性は、特定物質の精製や海水の淡水化などに应用可能で、将来この技術が確立されれば

工業的に非常に有益であり、このことにつき現在研究が盛んに進められている。

ところで、生体膜に限らず、生体を研究していく上で最も問題となるのは、測定系の与える影響である。影響を全く与えない測定ということは困難であるが、影響はできるだけ少ない方がよい。そのような方法の一つとして NMR (Nuclear Magnetic Resonance, 核磁気共鳴) 法があり、それは次に示すような方法である。

いま、原子核を磁場中におくと、原子核のもつ磁気モーメントの大きさに応じて、原子核のエネルギー準位に Zeeman 分裂がおこる。このような状態で、その分裂した準位差に等しい電磁波のエネルギーを外部より加えると、この電磁波のエネルギーが原子核に共鳴吸収される。この吸収されたエネルギー量や磁場の大きさなどにより、この原子核を含む物質のある種の物性値を測定しうる。この NMR 法は試料を前処理なしに非接触で非破壊的に測定できるので生体の物性を調べるのに非常に優れた方法である。NMR 法によれば、生体への影響はほとんどないといえるが、唯一つ問題になるのは、比較的強い磁場 (23,500 Gauss 程度) を必要とするので、それが生体に及ぼす影響である。現在までのところ、この程度の磁場は生体に余り障害を与えないとされている。

NMR の生体への応用は、FT-NMR (フーリエ変換 NMR) が普及し始めた 1970 年代初頭に始まる。1971 年、R. Damadian は、ガン組織中の水に属するプロトンの T_1 (縦緩和時間) が正常組織中のものよりも大きいことを発見した。そして翌年、この発見から、X線や超音波診断と同じ様なイメージング法による、NMR を用いたガンの臨床診断を提唱した。これが今日有名となり、NMR-CT (Computer Tomography) の基礎となった。そして、1973 年、R. B. Moon と J. H. Richards は、赤血球を試料として無機リン原子核 ^{31}P を対象とした ^{31}P NMR を測定し、その中に含まれる ATP, NAD, ホスホクレアチン、糖リン酸エステル、無機リン酸などを観測し、それらの化学シフトから細胞内 pH を測定しうることを示した。これらは、生体内代謝産物を非破壊的に測定しうることを示したもので、NMR 法が生体膜の機能面の測定に応用されうることを示唆した画期的な研究であった。

ここで化学シフトとは、原子核のまわりの環境、すなわち電子状態のちがいに、核の感じる磁場の大きさが変わるために共鳴周波数が変化するという現象で、この化学シフトを調べることにより、原子核のまわりの電子状態、すなわち原子核の環境を推定することが可能である。この化学シフトの性質を利用した例が、無機リン

をプローブとした ^{31}P NMR による細胞内 pH 測定である。無機リンはどの細胞にも含まれており、その解離状態は pH によって異なることから、その化学シフトも pH によって変化する。したがって、あらかじめ pH と化学シフトとの関係を調べておけば、pH 測定のために、試料に何ら特別な処理をすることなく、化学シフトの値から間接的に pH を求めることが可能となるわけである。

この方法を用いて、前述の細胞膜を介した細胞内・外の pH を我々は同時に測定してみた。その結果細胞膜の外側の pH を変化させても、生理的範囲を逸脱しない環境の下では、細胞膜の内側の pH はほとんど変化せず一定であった。この現象は、電気化学ポテンシャルの勾配に従った H^+ の輸送（受動輸送）のみでは説明できなくなった。検討の結果、細胞膜が前述のような電気化学ポテンシャル勾配に逆らった H^+ の輸送（能動輸送）を行っているものと判断された。また、このような測定においては、細胞内・外の pH 測定のみならず、生体におけるエネルギー源である ATP や糖リン酸などの濃度測定も同時に可能であるので、細胞の代謝状態すなわち、いま細胞が生理的どのような状態にあるかということが推測できる。

以上のように、NMR を用いることにより測定対象にダメージを与えることなく、今まで測定することが不可能であった生体膜を通しての物質輸送の経時変化を調べることが可能となり、NMR は生体膜研究の有力な手法の一つとなったのである。しかし、NMR 法には全然問題がないというわけではなく、たとえば感度があまりよくないという欠点がある。FT-NMR の出現や技術の向上により、感度は飛躍的に増大したが、よりよいデータを得るには、もっと感度を上げる必要がある。そのため

には、磁場を強くするか、被検出元素濃度を上げるかのいずれかである。しかし、生体をそのまま扱おうとすると試料濃度を上げることが困難な場合が多いので、そのときは磁場を強くする以外に方法はない。現在、プロトン共鳴周波数で 400 MHz, 500 MHz (これを磁場に換算するとおよそ 94,000 Gauss, 117,500 Gauss) といった超伝導磁石を用いた装置もあるが、高価で、これを備えているところはまだ少なく、そう簡単な問題ではない。しかし、現在主流の FT-NMR がまだ無く、CW (Continuous Wave) 法が全盛であった 10 数年前、「生体膜内・外の pH と NMR」といった題で研究ができるようになるうとは、誰も考えてもみなかったであろう。それほど NMR 装置の発達は著しく、1946 年に発明されてからわずか 30 数年で、以前では考えられなかったようなプロトン以外の他核 (たとえば ^{31}P や ^{13}C など) についても、FT 法を用いることにより、比較的短時間に必要な情報を得ることができるようになってきた。このことを考えると、近い将来、より感度の高い新しい応用が開発され、NMR の使用範囲が拡張されるものと期待される。

最後に、生体膜における研究は、まだ始まったばかりで、試料調製法や測定法など問題が多いのが実状である。また、生体膜に関しても、現在まで生命現象の基本である生体エネルギーの形成に、この膜が主役を演じているということはわかっているが、まだ未知な事柄を多く含んでいる。今後どのように生体膜に関する知見が増していくのかわからないが、生体膜は非常に興味ある研究対象であり、将来は生体膜その物の研究のほかに、生体膜と同様な機能を持つ人工的薄膜の作成も試みてみたい。

第 40 回会属表面アカデミック研究会討論会

—表面のキャラクタリゼーション—

定量分析法

主催 (社)金属表面技術協会 協賛 日本表面科学会他
日 時: 1984 年 6 月 15 日(金) 13:30~17:00
会 場: 日本化学会講堂 Tel. 03-292-6161
東京都千代田区神田駿河台 1-5

講演: 司会 (東京大学生産技術研究所)本間禎一

1. 定量電子分光法とその応用

(早稲田大学理工学部)市ノ川竹男

2. 装置, 計測, 信号処理についての諸問題

(電子技術総合研究所)小野 雅敏

3. パネル討論会

パネラー: (早稲田大学理工学部)大坂 敏明,
(筑波大学物質工学系)小間 篤,
(東京都立大学工学部)馬場 宣良,

(新日本製鉄(株))前田 重義, (日本電子(株))最上明矩

参加費: 入場無料。当日講演概要(有料)配布。

問い合わせ先: (社)金属表面技術協会 Tel. 03-252-3286

(〒101 東京都千代田区神田岩本町 2 共同ビル)