α, β_H, β_L, γ クリスタリン溶液の誘電分散

松岡 里佳,渡辺 牧夫,上野 脩幸

高知医科大学眼科学教室

要 約

クリスタリンは水晶体可溶性蛋白質の主要構成蛋白質 ピー である.加齢変化時や白内障発症時には,水晶体中に可溶 結合 性蛋白質の減少や不溶性蛋白質の増加などの変化が生 り,3 じ,蛋白質の周囲を取り巻く蛋白結合水,自由水にも様々 する な変化を伴う.こうした水晶体の蛋白質一水系の変化を クリ 電気的に捕え,蛋白質,蛋白結合水,自由水の誘電分散を リン 非侵襲的に検出する方法を確立するため,市販の各種ク ど両 リスタリン溶液の広帯域アドミッタンスを10kHzから あっ 2GHzにわたり測定した.測定データから比誘電率,導 電率,loss factorを計算すると3段階の誘電分散が検出 キー された.3つの誘電分散とは,数 MHz 前後の低周波側に

ピークをもつ蛋白質の分散,中周波域10~100 MHzの 結合水の分散,さらに1GHz以上の自由水の分散であ り,3項 Cole-Cole式を用いてカーヴ・フィッティング することにより,各々独立した分散に分割可能であった. クリスタリン分子の分散,結合水の誘電挙動はクリスタ リン濃度に依存して変化し,また,その分子量が大きいほ ど両者の誘電強度は大きく,緩和周波数は低い結果で あった.(日眼会誌 102:495-501,1998)

キーワード:水晶体,クリスタリン,蛋白結合水,誘電分 散,緩和周波数

Dielectric Dispersions of α , β_{H} , β_{L} and γ Crystallin Solutions

Rika Matsuoka, Makio Watanabe and Hisayuki Ueno Department of Ophthalmology, Kochi Medical School

Abstract

The crystallins which constitute the major soluble proteins of the lens are known to change into insoluble proteins in aged or cataractous lenses. Such changes would affect protein-bound water and bulk water around the crystallin molecules. We measured the a.c. admittances of several kinds of crystallin solutions in the frequency range from 10 kHz to 2 GHz to define the passive electrical properties of bound water. With the experimental data, we calculated the relative permittivity, conductivity, and loss factor. The admittance of crystallin solutions had essentially three dielectric dispersions and we could divide them into three dependent dispersions by a curve-fitting analysis based on a three-term Cole-Cole equation. The lowest frequency dispersion

I 緒 言

クリスタリンは,水晶体の可溶性蛋白質の約90%を占 める主要構成蛋白質であり,水晶体の透明性や屈折に関 与している.通常,哺乳動物のクリスタリンは大きくα, β,γクリスタリンに分けられ,それぞれの分布は水晶体 around a few MHz was due to protein particles, the middle frequency of the $10 \sim 100$ MHz range to bound water, and the highest frequency of over 1 GHz to bulk water. The dielectric behavior of crystallin molecules and bound water depended on the protein concentration. With the increase in molecular weight of crystallins, the dielectric increments of both dispersions increased and the characteristic frequencies of the dispersions decreased significantly. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 495-501, 1998)

Key words: The lens, Crystallin, Protein bound water, Dielectric dispersion, Characteristic frequency

の部位により異なり,その比率は加齢により変化してい く¹⁰. また,白内障化に伴い,可溶性蛋白質の減少,不溶性 蛋白質の増加などの様々な変化が生じることが知られて いる¹⁰. これらクリスタリンの生理的・病的変化に際し, クリスタリンをとりまく周囲の蛋白結合水や自由水にも 変化が生じると考えられ¹⁰,白内障の発生機序を探る上

別刷請求先:783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮 高知医科大学眼科学教室 松岡 里佳 (平成9年10月17日受付,平成10年3月27日改訂受理)

Reprint requests to: Rika Matsuoka, M.D. Department of Ophthalmology, Kochi Medical School. Kohasu, Okocho, Nankoku-shi, Kochi-ken 783-8505, Japan

(Received October 17, 1997 and accepted in revised form March 27, 1998)

495

で,こうした水晶体の蛋白質-水系の変化を検討することは重要である.蛋白質溶液中の蛋白結合水の定量は,カ ロリメトリー,核磁気共鳴(NMR),インピーダンス測定, X線解析など²⁾⁻⁵⁾により行われているが,水晶体蛋白質 溶液に関する研究は比較的少ない.そのため,今回我々は 水晶体中の蛋白質-水系の変化を非侵襲的に検知するこ とを目的とし,各種クリスタリン溶液の広帯域アドミッ タンス測定を行った.

アドミッタンスとは、インピーダンスの逆数であり、と もに複素数で表される⁶¹.測定データから試料のもつ複素 誘電率が計算され、その実部を比誘電率、虚部を loss factor と呼ぶ. Loss factor は交流電場中での試料によるエ ネルギー損失を表す量であり、本研究では蛋白質水溶液 の誘電挙動を loss factor で表示し、蛋白質分子・結合水 ・自由水の3つに分解した上で解析に供した.

Ⅱ 方 法

1. 蛋白質溶液の調製

 α , β_{H} , β_{L} , γ クリスタリン (Sigma 社)を 20 mM Tris・ HCl 緩衝液に溶解した. α , β_{H} , β_{L} クリスタリンは pH 7.4 の 20 mM Tris・HCl 緩衝液で 5, 10, 20% (重量%)に調製 し, γ クリスタリンは溶解しにくいため, pH 8.1の同緩 衝液で 5% 溶液のみを作製した.

2. 測定セル

従来,我々は細胞懸濁液や組織の誘電挙動⁶¹⁷⁾を調べる 際,アクリル樹脂製の自作セルを用いてきた.一般に細胞 懸濁系では、比誘電率の低周波収斂値は数1,000程度,組 織では数 10 万にも及ぶため^{8⊢10)}, ラジオ波あるいはマイ クロ波領域におけるインピーダンス測定では、アクリル 樹脂自体の周波数依存性は特に問題にならなかった.し かし、今回誘電測定の対象とした蛋白質溶液の誘電強度 は、せいぜい100程度と著明に小さく、測定セル自体の持 つ周波数依存性がアーティファクトとなり,測定精度を 落とす原因となり得る.そのため,測定セルの材質自体の 周波数依存性を最小にするため、アクリル樹脂、ガラス、 フッ素樹脂(テフロン®)と3種類の材質の周波数依存性 について検討した.図1に示すように,アクリルやガラス と比較しテフロン[®]が最も周波数依存性が少なく,測定セ ルの材質として優れていた.そのため今回,蛋白質溶液用 に14山の微量測定可能なテフロン®製測定セルを自作 して試用した.基本的に平行板コンデンサー型であり,白 金電極の表面は,電極分極の影響を抑えるため白金ブ ラックでコートしている.図2にテフロン[®]製測定セルの 詳細を示す.

3. 誘電測定

測定は Hewlett Packard 社インピーダンス・アナラ イザ 4194 A および 4291 A を用いて, 10 kHz~2 GHz に わたり行った. 各周波数点における一対のキャパシタン スとコンダクタンスは, 脱イオン水, 空気, KCI 標準液の



図1 材質による周波数依存性の違い. 各材質板の1mm当たりのキャパシタンスをそれぞれ 100 kHz の値で標準化して表す.



図2 テフロン[®]製測定セルの模式図. 平行板コンデンサー型セルで,テストフィクスチャー (HP 16192 A)に固定して使用.溶液腔は 14 µl.

測定から得られたセル定数を用いて比誘電率(ε)と導電 率(κ)に変換した.高周波域における残留インダクタン スの補正は,25℃の1GHzにおける水の比誘電率の値 (78.5)を参考とし,分布定数回路に基づき行った.測定は すべて室温(25±1℃)で行った.アナライザのキャパシタ ンスの最小分解能は0.1fFであり,前述の測定セルを用 いての蛋白質水溶液測定時のキャパシタンスは,1pF前 後で,測定時の有効数字は6桁であった.

4.3項 Cole-Cole 式(式1)によるカーヴ・フィッ ティング

他の蛋白質溶液に関する過去の誘電測定に関する報告¹¹¹から,今回の測定周波数領域には3つの誘電分散が存在していると考えられる.そのため,3項 Cole-Cole 式¹²¹によるカーヴ・フィッティングを行った.

ここで, ε*は複素誘電率, j = (-1)^{1/2}, ε, は真空の絶対誘

電率(8.854×10⁻¹⁴ farad/cm), κ_1 は導電率の低周波収斂 値, ϵ_n は比誘電率の高周波収斂値, f は周波数, $\triangle \epsilon$ は比誘 電率増分, fc は緩和周波数, β は Cole-Cole パラメータで あり, 添え数字は3つの分散を意味し, 1 は蛋白質分 子, 2 は蛋白結合水, 3 は自由水の誘電分散に相当する.

5. 蛋白質分子の緩和周波数の検討

球状蛋白質の fc は Debye 式¹³⁾ (式 2)により以下のように表される.

$$\tau = \frac{1}{\omega} = \frac{1}{2\pi fc} = \frac{4\pi a^3 \eta}{kT}$$
(z², 2)

ここで,τは緩和時間,ωは角周波数,πは円周率,aは 蛋白質分子の半径,ηは水の粘性率(0.01 P),kはボルツ マン定数(1.38×10⁻²³ J/K),Tは絶対温度である.

また,蛋白質の分子量(MW)は一般に,

の関係で表される.ここで、V は蛋白質分子1 個当たりの 体積($\frac{4}{3}\pi a^3$)にアボガドロ定数(6.02×10^{27} /mol)を掛けた もの、d は蛋白質密度で1/0.75 とした.式2,3を基に、各 クリスタリンの平均分子量から蛋白質分子の分散のfc を計算し、誘電測定から得られた結果と比較した.

III 結 果

1. 脱イオン水の誘電分散

今回使用したテフロン[®]製セルの精度を調べるため,脱 イオン水を測定し,水の誘電理論曲線と比較し図3に示 す.実測データの高周波における導電率の急激な上昇は, 水の異常分散によるものであり,これは Debye 型⁷⁾の誘 電理論曲線によく一致した.

2. 20% α クリスタリン溶液の誘電分散

20% α クリスタリン溶液の比誘電率・導電率を周波数 に対してプロットすると,100 kHz~1 MHz にかけて主 分散がみられ,さらに,高周波側にブロードな周波数依存 性を認めた(図 4 a).同一データを loss factor 表示する と,100 kHz~1 MHz 付近の大きなピークの他に 10~ 200 MHz の領域にも分散がみられ,さらに高周波側に大 きな分散の一部が観察された(図 4 b).

3.3項 Cole-Cole 式によるカーヴ・フィッティング

3項Cole-Cole式(式1)によるカーヴ・フィッティン グを行うと,20% αクリスタリン溶液の誘電分散は,3つ の分散に明瞭に分割可能であった(図5).低周波域の分 散1は蛋白質の主分散,中周波域の分散2は蛋白結合水 の分散,高周波域の分散3は自由水の分散と考えられ た^{III}.カーヴ・フィッティングで得られた誘電パラメー タを表1に示す.高周波側は2GHz までと十分でないた め,自由水の緩和周波数(fc_s)は従来用いられている値



図3 脱イオン水の誘電分散.

プロットは実測値(●:比誘電率,■:導電率),—:Debye 型の水の誘電理論曲線(ε_h=4.2,κ_i=0 mS/cm, △ε_i= 74.1, fc_i=19.3 GHz, β=1.0 として).



図4 20% α クリスタリン溶液の誘電分散. a:周波数依存性の誘電分散曲線(●:比誘電率,■:導 電率),b:同一データのloss factor表示(▲).ここでは 蛋白質の主分散をみやすくするために,導電率の低周波 側のスケールを拡大して示す(図 5 a 参照).

(19.3 GHz)¹¹⁾を参考にした.Loss factor上で,特に低周 波側に実測値とフィッティング値に若干の違いを認める のは, κ₁の設定で電極分極を考慮しているとはいえ,そ の影響が残存しているためと考えられる.

同様に,20% β_H (図 6),20% β_L (図 7) クリスタリン溶 液,5% γ クリスタリン溶液 (図 8) についても 3 項 Cole-



図5 20%αクリスタリン溶液に対するカーヴ・フィッ ティング.

a:周波数依存性の誘電分散曲線(●:比誘電率,■: 導電率),b:同一データの loss factor 表示(▲).-:3 項 Cole-Cole 式による最適理論曲線(……:分散1,-·--:分散2,----:分散3に相当)を表す.

表1	Cole - Cole	パラメータ	(20 % α クリスタリン	2)
----	-------------	-------	----------------	----

	分散1	分散2	分散3
$\Delta \varepsilon$	32	21	59
fc(MHz)	0.32	22	19,300
β	0.63	0.63	0.95

 $\varepsilon_{\rm h} = 3.3 \quad \kappa_{\rm l} = 2.14 \,({\rm mS/cm})$

Cole 式によるカーヴ・フィッティングを行った.いずれ も 20% α クリスタリン溶液と同様に,3 つの分散に明瞭 に分割可能であった.カーヴ・フィッティングから得ら れた誘電パラメータを表 2~4 に示す.

4. 蛋白質濃度と比誘電率増分の関係

5~20% まで測定した α , $\beta_{\rm H}$, $\beta_{\rm L}$ クリスタリン溶液では, 蛋白質の分散である分散 1 の比誘電率増分 ($\Delta \epsilon_1$)および 結合水の分散である分散 2 の比誘電率増分 ($\Delta \epsilon_2$) は, 蛋白 質濃度とともに増加した. 一次回帰から相関係数 (r)を求 め検定すると, いずれも p<0.01 であり, 有意の正の相関 関係にあった (図 9).

5. 蛋白質分子量と誘電挙動の関係

5% α , $\beta_{\rm H}$, $\beta_{\rm L}$, γ クリスタリン溶液の $\Delta \epsilon_1$ および $\Delta \epsilon_2$ は,



図6 20%βmクリスタリン溶液に対するカーヴ・フィッ ティング.

a:周波数依存性の誘電分散曲線(●:比誘電率,■: 導電率),b:同一データの loss factor 表示(▲).実線 は3項 Cole-Cole 式による最適理論曲線(……:分散 1,一·一:分散2,----:分散3に相当)を表す.

平均分子量の順に大きく,いずれもその対数値と有意の 正の相関関係(p<0.01)にあった(図 10).分散1の緩和周 波数(fc₁)に関して,誘電測定から得られた実測値と,Debye式(式 2)から計算して得られた予測値を比較して表 5に示す.また,結合水の分散(分散2)の緩和周波数(fc₂) は,平均分子量の対数値と有意の負の相関(p<0.05)を認 めた(図 11).

IV 考 按

今回作製したテフロン[®]製セルを使用すると,材質自体 のもつ周波数依存性が問題にならないため,誘電強度の 小さい蛋白質水溶液の測定が可能であった.前述のごと く,アナライザの測定時の有効数字は6桁であり,また, 図3に示したように脱イオン水の測定では実測値と理論 値は非常に良く一致したことは,本システムでの測定精 度の高さを表す.インピーダンス測定の手法を用いての 蛋白質解析は,これまでに幾つかの蛋白質についての報 告はあるものの比較的少なく,水晶体蛋白質を対象とす るものはみあたらない.前述のごとく,水晶体蛋白質溶液 の蛋白質—水系に関する情報は,白内障の発症機構を探 る上で重要と考えられ,今回我々は,各種クリスタリン溶 液の誘電測定を行った.得られた測定データに対し,3項



図7 20%β_Lクリスタリン溶液に対するカーヴ・フィッ ティング.

a:周波数依存性の誘電分散曲線(●:比誘電率,■: 導電率),b:同一データの loss factor 表示(▲).実線 は3項 Cole-Cole 式による最適理論曲線(……:分散 1,一·-:分散2,----:分散3に相当)を表す.

Cole-Cole 式によるカーヴ・フィッティングを行い,蛋 白質,結合水,自由水の3つの分散に分割した.Cole-Cole 式は誘電分散現象を分散特性の面から整理する上で非常 に優れた式であり,我々のグループは,2項 Cole-Cole 式 を用いて,誘電分散現象を分割・解析し得ることを既に 報告¹⁵⁾しており,本報でもカーヴ・フィッティングで3 つの分散に分割して得られた誘電パラメータを基に,主 として蛋白質分子の分散,結合水の分散について考察を 加えた.これまでの他の蛋白質での報告¹¹⁾と同様に, α , $\beta_{\rm H}$, $\beta_{\rm L}$ クリスタリン溶液でも,蛋白質濃度と $\Delta\epsilon_{\rm I}$, $\Delta\epsilon_{\rm 2}$ は正 の相関関係を示した(図 9).しかし,蛋白質濃度が 0% の 時,すべてが原点を通ってはおらず, $\Delta\epsilon_{\rm 1}$, $\Delta\epsilon_{\rm 2}$ は5~20% の,あくまで限られた濃度範囲において,直線的に増加す ると思われる.

一般に,分子中の電荷分布の非対称性によって分子中 に双極子モーメント¹⁶⁾を生ずる.双極子モーメントは,電 荷と電荷間の距離の積として定義され,大きさだけでな く方向をもつベクトル量である.蛋白質の双極子モーメ ントは,その構造の複雑さから簡単には推測できず,ま た,高分子蛋白質の溶液中での双極子モーメントはさら に複雑であるが,今回3つに分割した蛋白質・結合水・ 自由水のいずれの分散においても双極子モーメントが大



図8 5% γクリスタリン溶液に対するカーヴ・フィッ ティング. a:周波数依存性の誘電分散曲線(●:比誘電率,■:

導電率),b:同一データの loss factor 表示(▲).実線 は3項 Cole-Cole 式による最適理論曲線(……:分散 1,一·一:分散2,----:分散3に相当)を表す.

表 2 Cole - Cole パラメータ(20% β_H クリスタリン)

	分散1	分散2	分散 3
$\Delta \varepsilon$	25	17.5	59.5
$f_{C}(MH_{Z})$	1.7	55	19,300
β	0.86	0.6	0.93

表 3 Cole - Cole パラメータ(20% β クリスタリン)

	分散1	分散2	分散 3
$\Delta \epsilon$	17.5	9	62.5
fc(MHz)	2.0	65	19,300
β	0.64	0.77	0.9

表4 Cole-Cole パラメータ(5% γ クリスタリン)

	分散1	分散2	分散 3
$\Delta \varepsilon$	7.2	2.6	63
$fc\left(\mathrm{MHz}\right)$	6.2	98	19,300
β	0.92	0.84	0.86

 $\varepsilon_{\rm h} = 11.8 \quad \kappa_{\rm l} = 4.65 \,({\rm mS/cm})$



図 9 α, β_n, β_L クリスタリン濃度と分散 1,2 の比誘電率 増分の関係.



図 10 クリスタリン平均分子量と分散 1,2 の比誘電率 増分の関係.

平均分子量は Sigma 社データを参考とした.



図 11 クリスタリン平均分子量と分散 2 の緩和周波数 の関係.

平均分子量は Sigma 社データを参考とした.

表5 クリスタリン平均分子量と分散1の緩和周波数(fc1)

クリスタリン	α	β H	β .	γ
分子量	500,000	150,000	46,000	20,000
予測值	0.35	1.2	3.8	8.8
$fc_1(MHz)$				
実測値	0.32	1.7	2.1	6.4
$fc_1(MHz)$				

実測値は各2例の平均値

きく関与していると考えられる.一般に蛋白質の分子量 が大きいほど,その双極子モーメントは大きいと考えら れ,今回の結果で,4種類の5%クリスタリン溶液のΔε は平均分子量の順に大きかったことと一致する(図10). また,サイズが大きい蛋白質ほど,その緩和周波数は低い と考えられ,表5のように,Debye式から計算したfc の 予測値と,誘電測定から得られた実測値は同様の傾向を 示した.その予測値と実測値には多少の差を認めるが,こ の差は,予測値の計算に際し,蛋白質分子が完全な球形で あると仮定したこと,蛋白質密度をd=1/0.75と一定値 としたことなどが原因としてあげられる.

4種類のクリスタリン溶液のΔε₂は平均分子量の順に 大きく,fc₂は20~100 MHzの間であった.蛋白結合水の 分散に関しては過去に幾つかの報告を認めるが,Grant^{IT} は結合水の緩和周波数は数 MHz から数 100 MHz とし ており,今回の結果と一致する.自由水の緩和周波数は 19.3 GHz であり,結合水は蛋白質分子に電気的に拘束さ れているため,緩和周波数は低くなる.図 11 に示したよ うに,平均分子量とfc₂は有意の負の相関関係を認めた ことから,分子量の大きなクリスタリンほど,結合水を引 きつける力が強い可能性が考えられる.また,結合水には 回転可能なものと非回転性のものがあり,蛋白質の種類 によって両者の割合が異なることが知られている¹⁸⁾.非 回転性結合水の緩和周波数は,回転性のものより低いこ とから,分子量の大きなクリスタリンでは非回転性の結 合水の割合が多い可能性も考えられる.

今回我々は,4種類のクリスタリン溶液のインピーダ ンス測定を行い,蛋白質・結合水に関する多くの情報を 得ることが可能であった.我々の用いた手法では,図5~ 8に示したように,蛋白質・結合水・自由水の3つの分 散が同一平面上で図示可能であり,全体の分散現象に対 する各分散の寄与や,蛋白質の濃度や種類が違う場合に, 各分散の大きさや緩和周波数の変化が一目でわかり,他 の手法と比べわかりやすい.また,今回試用したテフロ ン[®]製セルでは,14µlという微量で蛋白質溶液の測定・ 解析が可能な利点がある.今後は,他のクリスタリン溶液 の測定や,温度変化の影響,白内障へのアプローチなど, さらに水晶体中の蛋白質一水系について検討していきた い.

稿を終えるに当たり,御指導・御校閲を賜りましたペンシ ルベニア大学・高島士郎名誉教授に深謝いたします.なお,本 論文の要旨は第101回日本眼科学会総会(1997年)において 発表した.

文 献

- 岩田修造:2.水晶体の生理・生化学的性状.三島済 ー(編):新臨床眼科全書9A.金原出版,東京,34— 62,1990.
- Kuntz ID Jr, Kauzmann W: Hydration of proteins and polypeptides. Adv Protein Chem 28:239—345, 1974.
- Cooke R, Kuntz ID Jr: The properties of water in biological systems. Annu Rev Biophys Bioeng 3: 95-126, 1974.
- Belton PS: NMR studies of protein hydration. Prog Biophys Mol Biol 61: 61-79, 1994.
- Pethig R: Protein-water interactions determined by dielectric methods. Annu Rev Phys Chem 43: 177–205, 1992.
- 6) 入交昭彦,渡辺牧夫:生体組織・細胞の誘電解析.病 態生理 11:372-378,1992.

- Foster KR, Schwan HP: Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review. Crit Rev Biomed Eng 17:25—104, 1989.
- Watanabe M, Suzaki T, Irimajiri A: Dielectric behavior of the frog lens in the 100 Hz to 500 MHz range. Simulation with an allocated ellipsoidalshells model. Biophys J 59:139–149, 1991.
- 清家恭三,渡辺牧夫,上野脩幸:寒冷白内障に伴う ラット水晶体の誘電挙動の変化.日眼会誌 100: 262-269,1996.
- 10) Irimajiri A, Ando M, Matsuoka R, Ichinowatari T, Takeuchi S: Dielectric monitoring of rouleaux formation in human whole blood: A feasibility study. Biochim Biophys Acta 1290: 207–209, 1996.
- 11) Fukuzaki M, Miura N, Shinyashiki N, Kurita D, Shioya S, Haida M, et al: Comparison of water relaxation time in serum albumin solution using nuclear magnetic resonance and time domain reflectometry. J Phys Chem 99:431—435, 1995.
- Cole KS, Cole RH: Dispersion and absorption in dielectrics. I. Alternating current characteristics. J Chem Phys 9: 341—351, 1941.
- Takashima S: Electrical properties of biopolymers and membranes. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 91—142, 1989.
- 14) Kaatze U: On the existence of bound water in biological systems as probed by dielectric spectroscopy. Phys Med Biol 35: 1663—1681, 1990.
- 15) 渡辺牧夫,目代康子,上野脩幸,安藤元紀,入交昭彦: 表面電極による家兎角膜の誘電測定.日眼会誌 97: 569—574,1993.
- Takashima S: Electrical properties of biopolymers and membranes. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 1—10, 1989.
- Grant EH: Dielectric dispersion in bovine serum albumen. J Mol Biol 19:133—139, 1966.
- 18) Buchanan TJ, Haggis GH, Hasted JB, Robinson BG: The dielectric estimation of protein hydration. Proc Roy Soc London Ser A 213: 379—391, 1952.