

研 究 報 告 書

「タンパク質の新規電気化学定量法の開発」

研究期間：平成18年10月～平成23年3月（平成20年 ライフイベントで中断）

研究者：吉田 裕美

1. 研究のねらい

検量線を用いずに物質量を決定する、すなわち絶対定量法は、あらゆる化学物質の分析法の根幹となっている。その基本となる測定法が、重量測定である。SI単位系に基づいて物質量を求める場合、純物質の重量からモル数を決定する。しかし、タンパク質やペプチドなどの微量生体試料では、高純度で重量測定が可能な量の標準試料を得ることができないため、物質量を決定することができない。

重量測定を必要としない簡便で高感度な絶対定量法としては、電量測定、すなわちクーロメトリーがある。クーロメトリーは、Faraday の法則に基づいて物質の酸化還元によって生じる電流から直接、物質量を決定する方法である。同法は、検量線の不要な絶対定量法として広く用いられているが、測定対象が酸化還元するものに限られていた。そこで、本研究では、物質の酸化還元の代わりに、イオン性物質の水相および有機相間の電解抽出を利用して絶対定量を行うことを試みた。外部電源によって水相 | 有機相界面に電位差を印加し、それによって生じるイオン性物質の界面移動を電流として測定するもので、従来のクーロメトリーのように物質が酸化還元する必要がない。したがって、難酸化還元性のイオン性物質の絶対定量に有効であると考えた。

2. 研究成果

測定原理を図 1 に示す。タンパク質やペプチドなどの生体試料は、分子内に大なり小なり電荷を有する。そこで、電荷を有するイオン性物質を、試料水溶液から有機相に移動させ、そのときの電荷移動量を測定することによって生体試料の定量を行う。具体的には、試料を含む水溶液を有機相と接触させ、外部電源と各相に挿入した二つの電極を用いて水相 | 有機相界面に電位差 E を印加する。界面電位差がイオン性物質の水相 | 有機相界面移動エネルギー（疎水性・親水性の指標）に相当したときに、イオン性物質は界面移動するので、その電荷の移動量を移動電流 I として測定し、積分によって得られたクーロン数 Q からイオン性物質のモル数 n を見積もる。

絶対定量で不可欠な点は、試料水溶液中のイオン性物質が短時間に全て界面移動することである。イオン性物質の界面移動は界面近傍の拡散層で生じるため、短時間で全てのイオン性物質を界面移動させるためには、各相の厚みを拡散層に近い厚みまで薄層しなければならない。そこで、水相と有機相を薄層にした薄層電解セルの開発を行った。薄層電解セルでは、各相に挿入

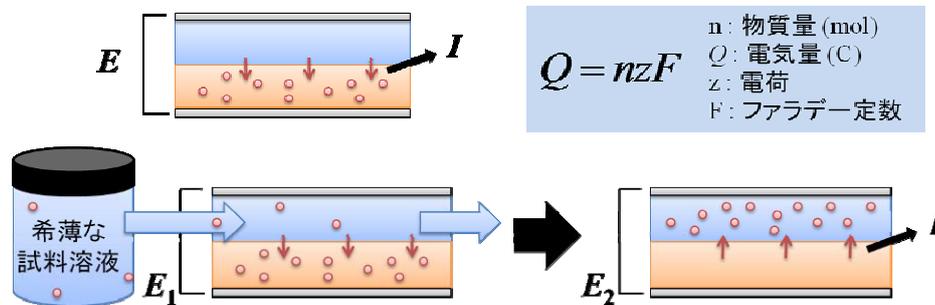


図 1 測定原理

する電極として、正確な界面電位差を印加でき、且つ電極反応物質が水相と有機相を汚染しないような電極を用いる必要がある。本研究では、(1)各相に挿入する電極の開発、(2)薄層電解セルの作製、(3)薄層電解セルによるイオン性物質の絶対定量を行った。

(1)電極の開発

水相と有機相を薄層化する場合、各相に挿入する電極は次の条件を満たす必要がある。一つは、電極反応生成物が水相や有機相を汚染しないことである。電極反応生成物の多くはイオン性化学種であるが、これらは界面移動の測定の際、水相 | 有機相界面を移動し、測定を妨害する。これを避けるためには、電極反応生成物が各相に溶解しないことが望ましい。もう一つは、電極系が単純で参照電極 RE および対極 CE としての機能を満たすことである。通常の液液界面電解セルでは、電位を規制するための RE と電流を流すための CE の計 2 本を水相と有機相にそれぞれ挿入した 4 電極式電解セルが用いられる。それに対し、一つの電極が RE および CE として機能するならば、水相と有機相を 2 本の電極ではさんだ単純な電解セルを構築できる。これが実現すると、電解セルの小型化のみならず、マイクロ流路への展開も期待できる。これらの条件を満たす電極として、水相では銀 | 塩化銀電極が広く用いられているが、有機相の場合、これらの機能を有する電極は報告されていなかった。そこで、有機相用の電極として、導電性高分子で被覆したガラス電極を開発し、その電極機能の評価を行った。

図 2 は導電性高分子被覆電極の電極反応を模式的に示したものである。導電性高分子は、それ自体が酸化還元すると同時に、電気的中性を保つように高分子内へイオンをドーピングする。そこで、有機相中の支持電解質アニオンを導電性高分子内にドーピングした電極を作製した。導電性高分子は、有機相に不溶であるため、電極反応が生じた場合、有機相に対して支持電解質がドーピング・脱ドーピングされる。この時、電極電位は式(1)で表わされる。



P: 導電性高分子 A: 支持電解質アニオン

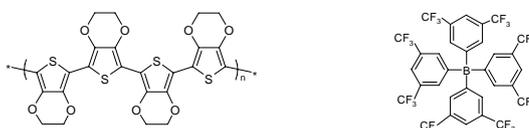


図 2 導電性高分子被覆電極

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{P^+A^-(Poly)}}{a_{P(Poly)}} - \frac{RT}{F} \ln a_{A^-(Org)} \quad (1)$$

ここで、右辺第1項は、導電性高分子の標準酸化還元電位、第二項は、導電性高分子の酸化体 $a_{P^+A^-(Poly)}$ と還元体 $a_{P(Poly)}$ の比、第三項は、有機相中の支持電解質アニオンの活量 $a_{A^-(Org)}$ を示している。図 3 は、作製した電極電位の安定性を示したものである。電極電位の安定性を確保するために導電性高分子の酸化体と還元体の比を 1:1 に調整した。得られた結果は、長時間電極電位が安定であることを示した。一方、支持電解質の濃度を変化させて電極電位を測定したものが図 4 である。式(1)のとおり、支持電解質に対してネルンスト応答した。低濃度から高濃度まで測定したのち、有機溶媒で洗浄し再び測定したのもも示しているが、電極電位の再現性も良好であった。導電性高分子被覆電極において、このような良好な電位安定性と電極電位の再現性が得られたのは、世界初である。

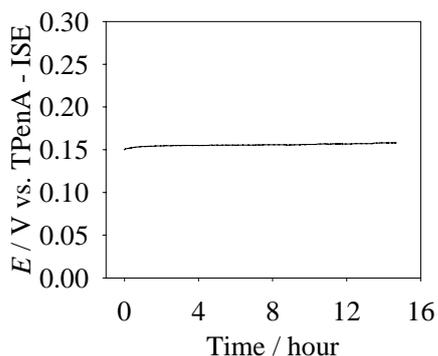


図3 電極電位安定性

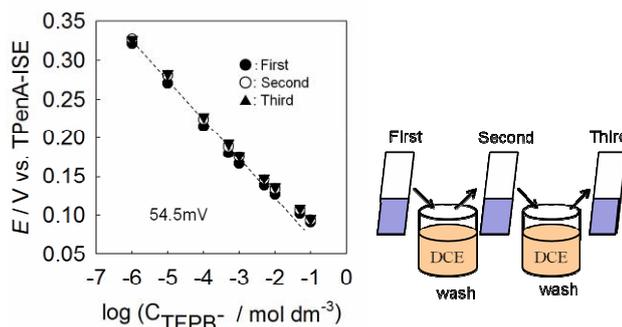


図4 電極電位の応答性・再現性

(2) 液液界面薄層電解セルの作製

図5に示すように水相と有機相を薄層にした薄層電解セルを作製した。有機相はdichloroethane DCEである。水相の電極として銀 | 塩化銀電極、有機相の電極として導電性高分子被覆電極を用いた。同セルは2電極式であり、それぞれの相に挿入した電極はREおよびCEとして機能する。導電性高分子被覆電極と銀 | 塩化銀電極の間に、薄層の水相と有機相を形成した。薄層の水相は、PTFE製のスペーサーによって厚さ50 μm に調整した。一方、薄層の有機相は、厚さ50 μm のPTFE多孔質膜に有機相を含浸させることによって形成した。

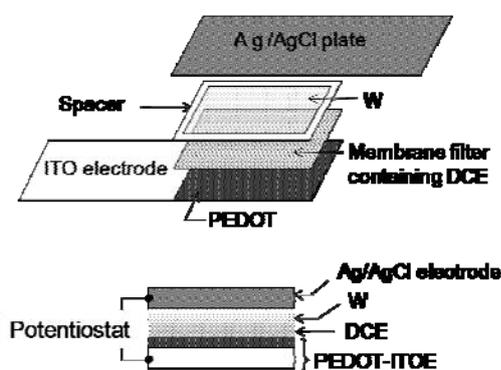


図5 薄層電解セル

図6は、目的イオンとしてtetraethylammonium ion TEA^+ を水相に添加したのち測定された界面電位-イオン移動電流曲線(イオン移動ボルタモグラム)を示している。界面電位を正電位側に掃引すると、 TEA^+ の水相から有機相への移動を示す正電流ピークが、界面電位を逆に負電位側に掃引すると、有機相へ移動した TEA^+ が水相へと逆抽出される負電流ピークが観察された。界面電位差を変化させる速度(掃引速度)を50 mV/s から5 mV/s まで変化させると、正電流ピークと負

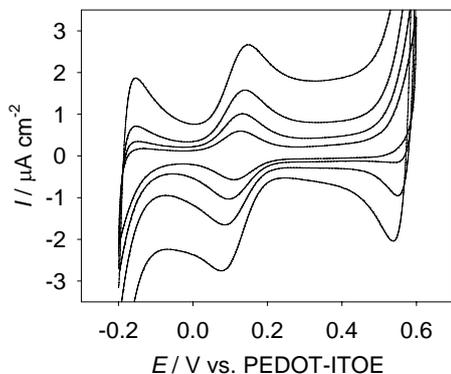


図6 掃引速度依存性 (5, 10, 20, 50 mV s^{-1})

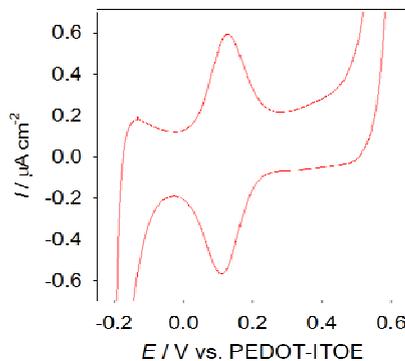


図7 5 mV s^{-1} で測定したボルタモグラム

電流ピークのピーク間電位差が 65 mV から 10 mV まで減少した。これは、50 mV/s のように掃引速度が速いときの拡散層は薄く、TEA⁺ の界面移動は TEA⁺ のバルクからの拡散によって律速されているが、掃引速度が低下するにつれて拡散層は次第に厚くなり、水相の厚さと同じになったことを示している。この時、水相中に存在する TEA⁺ のほとんどが有機相へ界面移動する。したがって、5 mV/s で測定したボルタモグラムは、ピーク間電位差が小さく、ゼロ電流軸に対して対称なベル型になる。

図 7 は、5 mV/s のボルタモグラムを拡大したものである。電流ピークの面積からクーロン数を解析した結果、正電流ピークでは 91 pmol、負電流ピークでは 95 pmol の TEA⁺ が界面移動していた。水相に含まれる TEA⁺ の物質量を水相の体積と濃度から計算すると 110 pmol であるので、TEA⁺ の界面移動の電解効率、水相から有機相への移動では 83 %、有機相から水相への移動では 86 % であった。つまり、0 V ~ 0.25 V まで電位を掃引している間(約 50 秒)に、水相に存在する TEA⁺ の約 80 % が有機相に電解抽出され、再び有機相から水相に逆抽出されることが分かった。これは、薄層液液界面電解セルを用いれば、水相中の目的イオンの全量を有機相に濃縮した後、再び水相に逆抽出することにより、イオン移動電流のクーロン数に基づく、高感度な絶対定量が可能であることを示唆している。

3. 今後の展開

本研究では、安定な電位を示す導電性高分子被覆電極を作成し、水相と有機相を薄層にした電解セルを開発することによって、ペプチドの絶対定量法を実現した。これらの成果をふまえて、様々な構造を有するペプチドについて適用し、その適用範囲を確定したい。また、開発した方法は、ペプチドの一分子あたりの電荷を基準として定量するものであるが、ペプチドがリン酸化したり、イオンと会合する場合、一分子あたりの電荷数が変化すると考えられる。逆にこれを利用すれば、ペプチドの状態を簡便に評価できると考えられる。これらの研究に対しても、同法の応用を検討する。一方、開発した電解セルは、バッチ式のセルであるが、フローセルへの改良が必須である。これによって、連続分析、超微量分析、他の分析法との複合化が可能となるだけでなく、新たな電気化学的分離法に発展できると考えている。

4. 自己評価

本研究課題では、電気化学的な手法を利用して、タンパク質の絶対定量を実現することを最終目標としてきた。研究期間中では、このための電極の開発、薄層電解セルの製作を行い、絶対定量が実現可能であることを確認した。また、短いペプチドとはいえ、タンパク質の絶対定量を行うことができたことから、当初の目標には到達したと考えている。ただし、生物系の分野の研究者に汎用的に使用してもらうには、様々なタンパク質への実用、測定精度の向上、電解セルの耐久性の確認など、実際の使用に対する課題が多く残されている。これらに対して、さらに研究・改良を重ね、簡便且つ汎用的に使用される測定法へと確立していきたい。

5. 研究総括の見解

超微量タンパク質を電気化学的方法により絶対定量をする方法の開発を目的とした独創的な研究である。絶対定量法は一般には用いられる機会が少ないが、計測分析の基本であり、とくにタンパク質のように絶対定量が困難な物質に対して本計測法の開発は意義がある。

測定原理は水相 | 有機相間をイオン性物質(タンパク質)を電氣的に定量的移動させ、移動する電氣量を測定する方法で、原理は単純であるが初めての装置であり各構成要素の開発が重要であった。本研究者は研究開始1年半後にライフイベントにより1年間の研究中断をしたので、装置開発に時間がかかったが、四級アンモニウムイオンをモデル化合物に選び測定原理の確認には成功している。ペンタペプチドを用いた絶対定量についても予備実験な

がら成功しており、本研究の方法がタンパク質の絶対定量法として利用できる可能性が示されたことは高く評価できる。現段階では試料量としては 100 pmol 必要であるが、さらに微量化も可能である。定量精度を上げるためには装置の構成要素の更なる改善が必要であり、今後の進展に期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Y.Yoshida, S. Yamaguchi, K. Maeda, Conducting Polymer-coated Electrode as a Reference/Counter Electrode in an Organic Phase and Its Application to a Two-electrode Type Thin-layer Cell for Voltammetry at the Liquid | Liquid Interface, *Anal. Sci.*, **26**, pp.137-139 (2010)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件 (出願中: 非公開)

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

(国際)

- ・ Y. YOSHIDA, S. YAMAGUCHI, and K. MAEDA, Conducting a polymer-coated electrode as a reference/counter electrode in an organic phase and its application to a two-electrode type thin-layer cell for voltammetry at the liquid | liquid interface, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 2010
- ・ Y. YOSHIDA, Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)-ITO-Electrode as a Reference-Counter Electrode of Organic Phase in Voltammetry for the Ion Transfer at the Liquid/Liquid Interface, 42nd Heyrovský Discussion, Jun. 2009

(国内)

- ・ 中村祥太郎、吉田裕美、山口聡士、森田恭朗、前田耕治、水相と有機相を薄層にした 2 電極式液系界面電解セルの開発と絶対定量への応用、日本分析化学会第 59 年会、2010 年 9 月
- ・ 吉田裕美、山口聡士、中村祥太郎、前田耕治、導電性高分子被覆電極の参照電極および対極としての機能および薄層液系界面電解セルへの応用、第 71 回分析化学討論会、2010 年 9 月
- ・ 山口聡士、吉田裕美、中村祥太郎、前田耕治、水相と有機相を薄層にした液液界面電気化学セルの開発、日本分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月
- ・ 吉田裕美、山口聡士、前田耕治、導電性高分子被覆電極の作製と薄層有機相 | 水相界面イオン移動ボルタンメトリーへの応用、山口聡士、吉田裕美、前田耕治、2009 年 5 月
- ・ 吉田裕美、山口聡士、前田耕治、有機相中の参照電極および対極として適用可能な導電性高分子被覆電極の作成—薄層有機相 | 水相界面イオン移動ボルタンメトリーへの応用—、電気化学会第 76 回大会、2009 年 3 月

(招待講演)

- ・ 吉田裕美、山口聡士、中村祥太郎、前田耕治、有機相中で参照電極および対極として機能する導電性高分子被覆電極、第 56 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2010 年 11 月

受賞

- ・ Analytical Sciences Hot Article Award (2010 年 2 月)