

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550076

研究課題名(和文) 油水界面を用いるタンパク質の電気化学的分離・検出システムの構築

研究課題名(英文) Development of the Electrochemical Separation/Detection System for Proteins Using the Oil/Water Interface

研究代表者

大塚 利行 (OSAKAI TOSHIYUKI)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30183023

研究成果の概要(和文)：ある種のアニオン性界面活性剤を含む油相とタンパク質を含む水相(pH ≈ 3.4)との間の界面において、界面活性剤との錯形成によってタンパク質の界面吸着が促進される。この反応は、油水界面の電位差に依存し、また界面を流れる電流は界面活性剤が過剰であればタンパク質濃度に比例するので、タンパク質の定性および定量分析が可能になる。この測定原理に基づき、タンパク質のフロー分離・検出系を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：At the interface between an oil phase containing certain anionic surfactants and an aqueous phase (pH ≈ 3.4) containing proteins, the adsorption of the proteins is facilitated by complexation with the surfactants. This reaction is dependent on the potential difference of the oil/water interface, and the electric current flowing through the interface is proportional to the protein concentration in the presence of excess surfactant, suggesting the possibility of qualitative and quantitative analyses of proteins. Based on such measurement principles, we could develop a flow separation/detection system for proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：タンパク質、液液界面、フローセル、電気化学測定、尿中タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の分離・検出は、バイオテクノロジーの発展を支える重要な技術要素の一つである。これまで、タンパク質の分離法としては、液体クロマトグラフィーが広く用いられてきたが、タンパク質がカラムに吸着してしまうなどの問題があった。一方、タンパク質の検出法としては、ビウレット反応やローリー法などの色素染色法が主に用いられてきたが、試料溶液の色や濁度による妨害を受

けやすいという問題があった。このため、より信頼性が高く、迅速・簡便なタンパク質の検出法として電気化学センサーが注目され、多くの研究が行われたが、従来の電気化学センサーは抗原抗体反応や酵素反応を利用して間接的にタンパク質を定量するものであり、直接、タンパク質を電極で検出するものは報告されていなかった。

2. 研究の目的

研究の申請に先立ち、研究代表者の大塚らは、油水界面を用いてタンパク質を電気化学的に分離・検出できる原理を見出した [M. Shinshi, T. Sugihara, and T. Osakai, *Langmuir*, **22**, 5937-5944 (2006)]. この手法では、水中で多価カチオンとして存在するタンパク質を油水界面でアニオン性界面活性剤と錯形成させ、この際にタンパク質が界面で吸(脱)着反応を行う電流を測定する。このため、多種多様なタンパク質の検出が可能であり、また、検出電位がタンパク質によって異なるため、選択的なタンパク質の分離も可能と思われる。本研究では、まず、本手法のたんぱく質に対する“選択性”に焦点を当て、基礎的な反応メカニズムを解明することを第一の目的とした。さらに、近年開発された多孔質テフロン (PTFE) 管を用いる油水界面型フロー電解セルを応用して、複数のたんぱく質を分離・検出できるフロー系の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 当研究グループによって確立した油水界面イオン移動のボルタンメトリー装置を用いて、数種のアニオン性界面活性剤を油 (1,2-ジクロロエタン; DCE) 相に含んだ場合の各種たんぱく質の界面吸脱着反応をサイクリックボルタンメトリー法により詳細に調べた。タンパク質には、ミオグロビン、 α -ラクトアルブミン、リゾチーム、リボヌクレアーゼ A, シトクローム c, プロタミン, アルブミンなどを用いた。

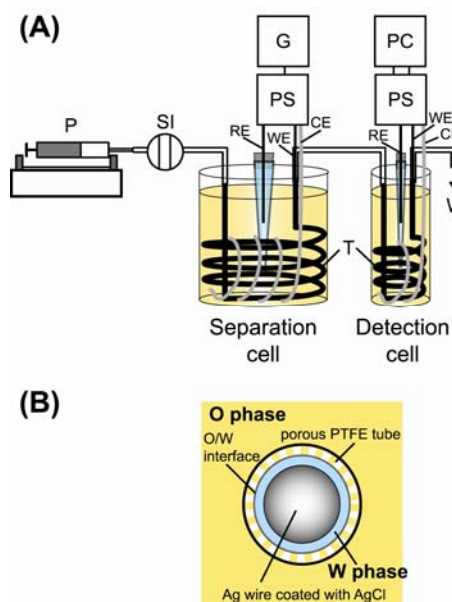


図 1 (A) 油水界面型フローセル系と (B) 銀線を挿入した多孔質 PTFE 管の断面図。

(2) 上述の油水界面型フロー電解セルを二連で結合し、一段目に長め (50 cm) のセルを用いてタンパク質の分離を行い、二段目に短め (20 cm) のセルを用いてタンパク質を検出するフロー系を作製した [図 1(A) 参照]。

分離および検出セルは、それぞれ溶液抵抗補償回路を内蔵したポテンシostat (PS) を用いて電位制御を行い、電位設定などは分離セルでは関数発生器 (G), 検出セルではパソコン (PC) を用いた。なお、各フローセルの多孔質 PTFE 管は、表面に塩化銀を電着させた銀線を挿入し、油相中に浸して、内部に水相溶液を流した。油水界面は PTFE 管の内側の面に作成される [図 1(B) 参照]。予備的検討として、このような二連のフローセル系を用いて低分子イオン (アセチルコリンおよびコリン) を分離定量できることを確かめている [雑誌論文②]。

4. 研究成果

(1) 静止油水界面を用いるイオン移動ボルタンメトリーにより、アニオン性界面活性剤としてエアロゾル-OT (AOT), dinonylnaphthalene sulphonate (DNNS), bis(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7-dodecafluoroheptyl) sulfosuccinate (BDFHS) を油相側に加えた場合、これらの界面活性剤との錯形成にともなう各種タンパク質の界面吸(脱)着による明瞭なボルタンメトリー波を観察することができた (図 2)。

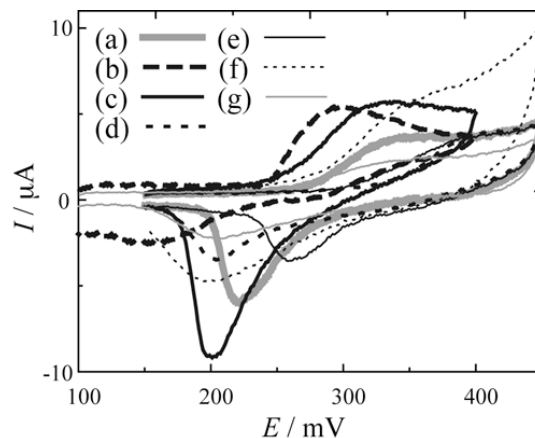


図 2 各種タンパク質の DCE/水界面でのサイクリックボルタモグラム。DCE 相は 1.0 mM DNNS を含む。pH = 3.2. 掃引速度 100 mV/s. (a) 0.1 mM Cyt c, (b) 0.1 mM プロタミン, (c) 0.1 mM ミオグロビン, (d) 0.1 mM リゾチーム, (e) 0.1 mM リボヌクレアーゼ, (f) 0.05 mM アルブミン, (g) 0.1 mM α -ラクトアルブミン。

この波 (ここでは“タンパク波”と呼ぶ) の界面吸着による電流は、界面活性剤が十分高濃度に存在するときには、タンパク質の濃度に比例し、定量分析が可能であることを示

した。また、タンパク波が現れる電位 (foot potential; E_{foot}) は、タンパク質や界面活性剤の種類に依存し、原理的に定性分析が可能であることが分かった。さらに、異なるタンパク質と界面活性剤で測定された E_{foot} の値に対して多変量解析を行ったところ、本法のタンパク質選択性は、タンパク質分子の荷電性 (charged), 極性 (polar), および非極性 (nonpolar) の表面積に依存することが明らかになった (図 3)。

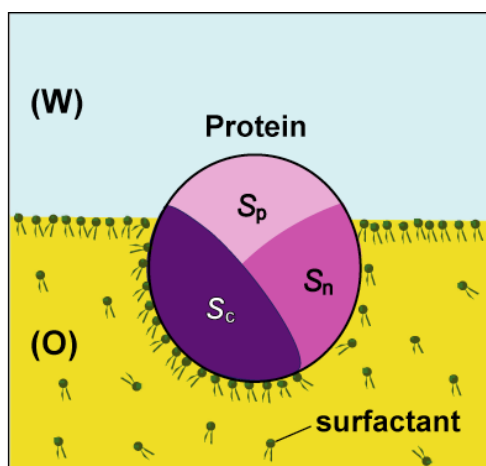


図 3 タンパク質のアニオン性界面活性剤による油水界面吸着のモデル。 S_c : 荷電表面, S_p : 極性表面, S_n : 非極性表面。

(2) (1) のボルタンメトリーによる基礎的検討結果を踏まえ、上述のフロー系を用いて二種類のタンパク質を分離・検出するシステムの構築を試みた。

分離対象のタンパク質としては、 E_{foot} の値が約 60 mV 異なるミオグロビンとリゾチムを選んだ。これら二種のタンパク質を含む試料溶液をサンプルインジェクター (SI) よりフロー系に導入して測定した結果を図 4 に示す。

試料溶液を注入後約 3 min に、試料溶液中のリゾチム濃度に依存する電流ピークが得られた。ただし、リゾチムが含まれない試料においてもミオグロビンによる若干の電流応答が観察された。このように、分離セルの印加電圧をミオグロビンが優先的に界面吸着するように 250 mV に設定すると、二つのタンパク質をある程度分離できることが分かった。次に、図 4 の $t = 6$ min の時点で、分離セル内の界面に吸着トラップされていたミオグロビンが界面から脱離し、図のように検出セルにミオグロビンによる電流ピークを与えた。得られた二つの電流ピークの面積 (電気量) を用いて、二つのタンパ

ク質の濃度を計算で求めたところ、10% の実験誤差でタンパク質を同時定量できることが示された。

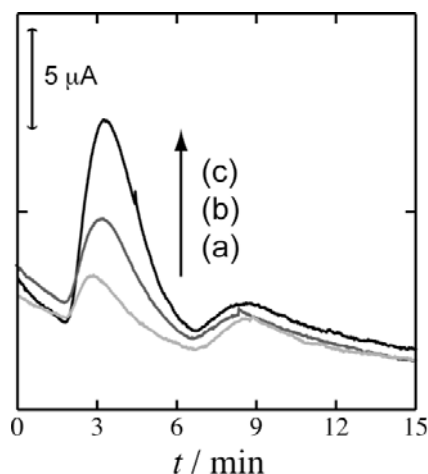


図 4 油水界面型フローセル系を用いて測定した検出セルの電流応答。試料溶液 (pH 3.4) には 20 μM のミオグロビンおよび (a) 0, (b) 20, (c) 50 μM のリゾチムを含む。 $t = 6$ min の時点で分離セルの印加電圧を 250 mV から 100 mV に切換え。検出セルの電圧は 300 mV。流速 6.0 mL/h。

以上の (1) と (2) の主な研究成果をまとめて、雑誌論文③として報告した。

(3) 上記の研究成果の実際的応用のモデル実験として、人工尿中のタンパク質の分析を試みた。人尿中のタンパク質は主としてアルブミンであることから、単独のフローセルを用いて測定を行ったところ、人工尿中に含まれる低分子イオン (クレアチニンなど) がアルブミンと同様の大きな電流応答を示すことが分かった。そこで、透析膜を用いて試料溶液中の低分子イオンを予め除去したところ、タンパク質のみによると思われる電流応答を得ることができた。標準添加法により人工尿中のアルブミン濃度を求めたところ、他の含有タンパク質の影響のため表示値より一桁高い値 (3.0 μM) となったが、尿タンパク陽性の患者のアルブミン濃度は十分高いので、臨床的応用の可能性は大きいと思われる。

(4) 本研究と密接に関連する研究として、生体膜において重要な役割りを担っている膜結合型酵素 (フルクトースデヒドロゲナーゼ) および酸化還元タンパク質 (Cyt c) の油水界面での電子移動の研究を実施し、その成果を学会発表 (⑩~⑬) している。

以上述べたように、本研究計画における当初の研究目的は概ね達成され、新たな応用的

ならびに基礎的研究の進展に繋がる成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件. 本研究に直接関係するもののみ)

- ① T. Osakai and A. Shinohara, Electrochemical Aspects of the Reverse Micelle Extraction of Proteins, *Anal. Sci.*, Vol. 24, No. 7, pp. 901-906 (2008), 査読有.
- ② E. Gohara and T. Osakai, Flow-Injection On-line Electrochemical Separation/Determination of Ions Using a Two-Step Oil/Water-Type Flow Cell System, *Anal. Sci.*, Vol. 26, No. 3, pp. 375-378 (2010), 査読有.
- ③ T. Osakai, Y. Yuguchi, E. Gohara, and H. Katano, Direct Label-free Electrochemical Detection of Proteins Using the Polarized Oil/Water Interface, *Langmuir*, Vol. 26, No. 13, pp. 11530-11537 (2010), 査読有.

〔学会発表〕(計13件)

- ① 湯口友紀子, アニオン性界面活性剤を用いるタンパク質の電気化学的検出法の検討, 第69回分析化学討論会, 2008年5月15日, 名古屋国際会議場.
- ② 郷原絵美, 油水界面型全電解フローセルを用いるアセチルコリンおよびコリンの同時定量, 日本分析化学会第57年会, 2008年9月10日, 福岡大学.
- ③ 湯口友紀子, アニオン性界面活性剤存在下の油水界面におけるタンパク質のボルタンメトリーとラベルフリー検出への応用, 第54回ポーログラフィーおよび電気分析化学討論会, 2008年11月22日, 熊本大学.
- ④ 郷原絵美, 油水界面型全電解フローセルを用いるイオンの分離定量法の開発, 第54回ポーログラフィーおよび電気分析化学討論会, 2008年11月23日, 熊本大学.
- ⑤ 大塚利行, 油水界面を用いるタンパク質のラベルフリー電気化学検出の試み, 電気化学会第76回大会, 2009年3月29日, 京都大学.
- ⑥ 郷原絵美, 油水界面型フローセルを用いたタンパク質の分離定量法の開発, 第70回分析化学討論会, 2009年5月16日, 和歌山大学.
- ⑦ T. Osakai, Label-free Electrochemical Detection of Proteins Using the Oil/Water Interface, the 42nd Heyrovsky Discussion "Liquid-liquid Electrochemistry - from Fundamentals to

Applications", June 17, 2009, Trest, Czech.

- ⑧ 郷原絵美, 油水界面型フローセルを用いる血清中リチウムイオンの定量法の開発, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月25日, 北海道大学.
- ⑨ 郷原絵美, 油水界面型フローセルを用いるイオンの分離定量法の開発, 第55回ポーログラフィーおよび電気分析化学討論会, 2009年11月22日, 徳島大学.
- ⑩ 佐々木優子, 油水界面に吸着したフルクトースデヒドロゲナーゼによる電子移動反応, 第71回分析化学討論会, 2010年5月15日, 島根大学.
- ⑪ 今井蓉子, 油水界面でのシトクローム c の電子移動反応のメカニズム, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15日, 東北大学.
- ⑫ 佐々木優子, 油水界面に吸着したフルクトースデヒドロゲナーゼによる電子移動反応, 第56回ポーログラフィーおよび電気分析化学討論会, 2010年11月6日, 秋田大学.
- ⑬ Y. Sasaki, Electron Transfer Mediated by Membrane-bound D-Fructose Dehydrogenase Adsorbed at an Oil/Water interface, 2010 環太平洋国際化学会議, 2010年12月16日, ホノルル (USA).

〔その他〕

研究室のホームページ (<http://www2.kobe-u.ac.jp/~osakai/>) に研究概要, 学会発表, 論文のリストを随時掲載している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 利行 (OSAKAI TOSHIYUKI)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 30183023

(2) 研究協力者

片野 肇 (KATANO HAJIME)
福井県立大学・生物資源学部・教授

杉原崇康 (SUGIHARA TAKAYASU)
住友電気工業(株)・解析技術研究センター