

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02765

研究課題名（和文）生体膜反応を模擬した電荷膜透過反応の空間的共役の原理解明のための電気化学計測

研究課題名（英文）Electrochemical measurement for the elucidation of principle of spatial coupling of charge transport reactions mimicking biological membrane reactions

研究代表者

前田 耕治（Maeda, Kohji）

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：00229303

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,100,000円

研究成果の概要（和文）：空間的に分離した部位でのイオン透過と電子透過の共役反応について、反応を律速する界面以外への添加物が共役速度を支配する特異的現象、共役初期過程でのミリ秒オーダーでの電気的中性の破れの可能性、共役部位間の接近や薄膜利用による共役速度の促進、イオン透過と電子透過を仲立ちする第3のイオン透過部位の特異的役割について、新規知見を得た。複数の電位振動反応間の伝播と同期については、蛍光性イオンの利用と界面画像の解析から、界面伝播の実体を明らかにした。3つ以上の振動系間の伝播については、一つの自発系パルスから他の振動系に受動性パルスとして伝播するパターンと、自発系パルスが順々に伝播するパターンをみいだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアにおけるプロトン共役説の原理や共役の特異性をモデル化したことにより、ミトコンドリア病などエネルギー変換機能の不調や、外部からの薬物注入によるエネルギー変換機能の麻痺などの原因の追究に寄与することができる。また、複数の振動系の同期と伝播のモデルは、心臓や膵臓の正常と異常の差異の原因を示した。すなわち、電気的伝播と物質的伝播の両方が存在することやペースメーカーの有無に依存することに留意することを示唆する。後者については、多数の刺激細胞の中にペースメーカーが存在する場合は安定な同期状態をもたらす、逆に、ペースメーカーが存在しないと、同期パターンが多岐にわたり不整脈のパターンをもたらす。

研究成果の概要（英文）：Regarding coupling reactions between ion and electron transport at spatially separated sites, the following results were demonstrated; the unique phenomenon that additives other than at the rate-determining interface dominate the coupling rate, the possibility of breaking the electrical neutrality in the order of milliseconds during the initial coupling process, the enhancement of the coupling rate by proximity between coupling sites, and the unique role of a third ion transport site that mediates the coupling rate.

Regarding propagation and synchronization between multiple potential oscillation systems, the chemical species propagating on the interface were investigated through the use of fluorescent ions. As for the propagation between three or more oscillation systems, we found a pattern in which one autonomic pulse propagates to other oscillation systems as a passive pulse and another pattern in which autonomic pulses propagate sequentially.

研究分野：電気分析化学

キーワード：エネルギー変換 電荷移動共役 ボルタンメトリー 電位振動 同期 界面伝播 ペースメーカー

1. 研究開始当初の背景

Mitchell の化学浸透圧説によれば、電子伝達系で作られた膜内外のプロトンの濃度差 (pH 勾配) を利用して、プロトン透過をとまう ATP 合成反応が進行するといわれている。その素過程で働く、酸化還元タンパクによるプロトン汲み出し機構や ATP 合成酵素における分子モーター機構が近年明らかになってきたように、個々の膜タンパクの構造・機能の研究は飛躍的に進んでいる。化学浸透圧説は生体エネルギー生産でのセントラルドグマといわれるように、個々のタンパクや器官だけではシステムは機能せず、複数の機能性分子の協同・連携・共役により初めてエネルギーが生産される。

この際、pH 勾配を介した共役といっても、ATP 合成酵素の内外にプロトン濃度差が生じるまでには一定の時間を要するので、プロトン濃度勾配形成(電子移動)とプロトン放出(ATP 合成)は同時には生じない。いずれか片方が生じれば、各相の電気的中性が破れることになるので、それらを仲介する別の共役機構が必要である。例えば、プロトンが ATP 合成酵素を通して膜内に流入するためには、電気的中性の原則にしたがって、プロトンの正電荷を補償する別の電荷移動が必要である。そうであるならば、電気的中性に基づく共役反応が ATP 合成を制御することになる。しかし、生化学分野では、この電気化学的共役の観点は重要視されていない。

生体膜での共役機構を解明するためには、互いに共役する電荷移動は同一膜上でありながら空間的に分離した部位で生じることを認識しなければならない。したがって、電荷移動の空間的共役の距離依存性あるいは非同時性を測定、評価する必要があり、そのためには、電気化学的なアプローチが欠かせないが、そのような研究は皆無であった。

膜共役の基本的な考えを踏まえれば、電気的中性が破れて一方の電荷移動だけが先行して進むような、見かけ上、セントラルドグマに逆らっているような現象も電気化学的な研究対象になりうる。マクロな電池反応と違って、細胞の微小空間レベルでは、電気的中性にもとづいた複数の反応の同時性が必ずしも成立せず、微小な時差が存在する可能性がある。この時差が閾値となって生物学的異常が生み出され、ミトコンドリア病に代表される電子伝達系と ATP 合成の不整合による疾病と深く関係していると考えられる。

2. 研究の目的

生命を司る細胞内でのエネルギー変換あるいは神経、心臓、感覚細胞などの電気信号の伝達は、生体膜あるいは細胞間における複数の電荷移動反応の複合現象である。最近の生命科学の進歩により、個々の電荷移動反応に関わる膜タンパクや酵素の構造や機能は詳細に解明されてきた。しかし、各々のタンパクだけでは全体のエネルギー変換システムは稼働しない。とくに膜反応の場合は、膜内外の電気的中性を維持するために、個々の電荷移動反応の間の協同、連携、共役が必須である。

本研究では、液膜、脂質二分子膜のような人工膜を用いて、膜を介した電荷移動反応の共役機構を電気化学的理論と方法に基づいて解明し、時間・空間の影響を考慮した共役の原理・原則を確立することを目指す。第 1 の対象が生体膜でのエネルギー変換を想定したイオン透過と電子

透過の共役反応であり、第 2 の対象が人工液膜における複数部位での電位振動反応の共役である。

1) 第 1 の研究対象であるイオン透過と電子透過の共役反応については、空間的に分離した部位でのイオン透過と電子透過の共役反応の精密計測を通じて、「共役の基本的測定法の確立」と「共役の基本的原理の確立(秒オーダーでの共役)」を第 1 段階の目標とした。次に、共役初期過程での電気的中性の成立の調査(ミリ秒オーダーでの共役)を第 2 目標とした。ドメイン間での電気容量成分等の違いから生じる両ドメイン間でのファラデー電流成分の時間差を解析する。すなわち、電子移動とイオン移動の時間差による電気的中性の破れの可能性を実証し、有機液膜から薄膜に拡張して空間依存性の詳細を検討することとした。空間依存性の最終段階としては、生体膜系に近づけるため、脂質 2 分子膜の厚みにまで薄層化する。

また、研究期間中に着想した新たな展開として、高等植物のミトコンドリアでの時間的・空間的分離を想定した共役系の構築のため、イオン透過と電子透過を仲立ちする第 3 の電荷透過反応を設けたモデル系の構築を目指した。第 3 の液膜系がミトコンドリアにおける電子透過とプロトン透過を制御する役割について詳細に検討する。

2) 第 2 の研究対象である複数の電位振動反応間の伝播速度と伝播経路の精密計測については、2 つあるいはそれ以上の電位振動系が同期する条件とその機構について明らかにする。(1) 電気パルスの界面伝播とバルク伝播という 2 種類の伝播過程を区別する測定法を開発し、これまでに推論している界面伝播の優越性の確証を得る。界面伝播については、蛍光性界面活性剤のレーザーによる追跡と電気化学の同時測定の方法を確立する。界面活性剤の界面動画を撮影し、電位変化との関係を実証し、イオン対の界面伝播に基づく振動機構の一端を証明したうえで、親水性の対イオンの方を蛍光化することで、イオン対移動の完全な証明を目指す。(2) 従来の 2 つの振動系間の共役を超えて、3 つあるいは 4 つの振動系の間での特異的伝播・共役関係の発見を目指す。(3) 研究期間内に見出した、振動の同期の位相が 180 度ずれる「反転同期」が起きる新しい現象について、位相のずれをもたらす空間依存性について詳細に検討する。

3. 研究の方法

1. 空間的に分離した部位でのイオン透過と電子透過の共役反応の精密計測

(1) 膜共役の基本的測定法の確立

空間的に独立した部位での共役関係を調べるために、水相 | 有機相 | 水相の液膜系にイオン透過と電子透過がそれぞれ生じるドメインを作成し、自発的に生じる共役反応を各ドメインでの膜電流と膜電位をモニターしながら観測する。また、各膜系でのイオン移動ボルタモグラム(電流 - 電位曲線)を記録したうえで、共役電流・共役電位の実測値と比較する。

(2) 共役の基本的原理の確立(秒オーダーでの共役)

電気的中性の成立が保証される定常状態に近い時間レンジでの測定より、同一電流・同一膜電位での自発的共役条件を特定し、両ドメインでのイオン移動ボルタモグラムから共役速度の予測が可能であることを示す。

(3) 共役初期過程での電気的中性の成立の調査(ミリ秒オーダーでの共役)

ドメイン間での電気容量成分等の違いから生じる両ドメイン間でのファラデー電流成分の時間差を解析する。すなわち、電子移動とイオン移動の時間差による電気的中性の破れの可能性を実証する。この際、高速応答ポテンシオスタットと時間分解能の小さいデータロガーを使用する。

(4) 共役初期過程での共役速度の距離依存性の測定

ドメイン間の距離を μm オーダーから mm オーダーまで変えて、ミリ秒オーダーの初期過程と秒

オーダーの定常状態との違いを観察する。また、その際、塩濃度すなわち溶液内電気伝導度を変えることにより、バルク伝導過程と界面電荷移動過程を区別して考察する。

2. 複数の電位振動反応間の伝播速度と伝播経路の精密計測

2つあるいはそれ以上の電位振動系が同期する条件とその機構について明らかにする。(1) 電気パルスの界面伝播とバルク伝播という2種類の伝播過程を区別する測定法を開発し、これまでに推論している同期をもたらす界面伝播の優越性について実証する。(2) 電気信号の時間分解測定と界面のイメージング測定を組み合わせた測定法を構築して、電気パルスが界面を伝播する様子を可視化する。そのために、振動をもたらすイオン対の蛍光化を実施し、蛍光性カチオンとしてローダミン6Gを、蛍光性アニオンとしてエオシンYを用いる。(3) 3つあるいは4つの液膜振動系間の界面伝播と共役の成否を観察するため、界面に浮かべた活性炭の動きを撮影し、各振動系の電位変化との同時測定を行う。

4. 研究成果

1. 空間的に分離した部位でのイオン透過と電子透過の共役反応の精密計測

(1) 膜共役の基本的測定法および共役の基本原理の確立(秒オーダーでの共役)

イオン透過部位と電子透過部位の共役において実測された電流と膜電位が膜ポルタモグラムから予測されるものと一致することを確認した。それぞれの部位に存在する、合計4つの界面のうち、いずれかが膜共役速度を律速するが、律速界面とは無関係な界面でのイオン透過反応が共役速度に影響する例を見出した。これは生体膜での外部からの薬物注入によるエネルギー変換機能の麻痺などのモデルになると考えられる。

(2) 共役初期過程での電気的中性の成立の調査(ミリ秒オーダーでの共役)

共役初期過程での電気的中性の成立の調査(ミリ秒オーダーでの共役)について、ドメイン間での電気容量成分等の違いから生じる両ドメイン間でのファラデー電流成分の時間差の現れを観測し、電子移動とイオン移動の時間差による電気的中性の破れの可能性を実証した。

(3) 共役初期過程での共役速度の距離依存性の測定

共役部位間の距離依存性については、cmオーダーの距離では生じない共役が μm オーダーで生じるという現象を見出し、電子透過部位で組みだされたプロトンが他方のイオン透過部位(ATPase)で消費される反応に近いモデルを構築した。また、液膜の薄膜化に着手し、薄膜化により共役速度の増幅という新たな知見を得て、脂質二分子膜への展開に期待を持たせる結果となった。

(4) 非同時的共役モデルの構築

新たな展開として、高等植物のミトコンドリアでの時間的・空間的分離を想定した非同時的共役系の構築のため、イオン透過と電子透過を仲立ちする第3のイオン透過部位を設けたモデル系の構築に成功した。第3の部位のイオンの濃度勾配によって最適の共役速度が得られることを示した。

2. 複数の電位振動反応間の伝播速度と伝播経路の精密計測

(1) 界面伝播とバルク伝播の区別

ローダミン6G(R6G^+)を従来の界面活性カチオンの代わりに用いることで、一つの共役パルスの中に、100 cm/sの高速伝播(バルク伝播)のあとに、10 cm/sの低速伝播(界面伝播)が生じることを見出し、二つの伝播過程が存在することを実証した。

(2) 蛍光性イオンの使用による界面伝播の可視化

従来用いていた塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTACl)の CTA^+ を R6G^+ に変えて、界面

に2本のレーザーを照射することで、 $R6G^+$ が界面を移動することを動画としてとらえた。また、その移動時間が電位パルスの伝播時間と一致することを確認した。

しかし、振動の同期をもたらす物質は塩化物イオンのアニオンの方であるという従来の仮説を直接証明したことにはならないため、次に、CTACIの Cl^- をエオシンY(EOY^-)に変えて界面での蛍光を観察したところ、同様に EOY^- の移動時間が電位パルスの伝播時間と一致することを確認した。以上より、親水性アニオンが同期をもたらす界面伝播物質であることを実証した。

(3) 3つ以上の振動系における伝播と同期の関係

すべての振動系の固有振動数が等しく等価な場合と、そうでない場合に分けて評価した。

前者の場合、振動系が3つ以上のとき、同じ配置でも大きく分けて2つの異なる様式の伝播が生じることを見出した。一方の様式(パターンA)では、一つの自発系パルスから他のすべての振動系に受動性パルスとして伝わり、もう一方(パターンB)では、自発系パルスが順々に伝播しながら、受動性パルスに変化する。この2つの伝播様式はほぼ同じ確率で現れることがわかった。

さらに、4つの振動系の場合にも、上記の2つのパターンが観察されたが、自発性パルスが2つ以上あるパターンBの場合、界面に浮かべた活性炭の動きより、界面伝播が2回起こることを確認した。

固有振動数の大きな振動系が存在する場合は、そこから他の振動系に伝播するパターンAのみになる。これは、多数の刺激細胞の中にペースメーカーが存在する状態を表しており、その場合は安定な同期状態をもたらすことを意味する。逆に、ペースメーカーが存在しないと、同期パターンが多岐にわたり、すなわち不整脈的模式パターンをもたらすことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 鈴木真由子、植田巧、廣瀬健人、吉田裕美、前田耕治	4. 巻 70
2. 論文標題 電気化学発光を用いるO/Wエマルション分散状態のin situ測定	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 541-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.70.541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiho Tatsumi, Terumasa Omatsu, Kohji Maeda, Maral P.S. Mousavi, George M. Whitesides, Yumi Yoshida	4. 巻 408
2. 論文標題 An all-solid-state thin-layer laminated cell for calibration-free coulometric determination of K ⁺	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.electacta.2022.139946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Terumasa Omatsu, Kisho Hori, Naoto Ishida, Kohji Maeda, Yumi Yoshida	4. 巻 1863
2. 論文標題 Distribution of ion pairs into a bilayer lipid membrane and its effect on the ionic permeability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2021.183724	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omatsu Terumasa, Hori Kisho, Naka Yasuhiro, Shimazaki Megumi, Sakai Kazushige, Murakami Koji, Maeda Kohji, Fukuyama Mao, Yoshida Yumi	4. 巻 145
2. 論文標題 Dynamic behavior analysis of ion transport through a bilayer lipid membrane by an electrochemical method combined with fluorometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3839 ~ 3845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0AN00222D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田裕美、日下部瑛美、高見恵生、前田耕治	4. 巻 69
2. 論文標題 分光電気化学測定法による導電性高分子インクの式量電位の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 723-730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.69.723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Mayuko Suzuki, Takumi Ueda, Takehito Hirose, Kohji Maeda
2. 発表標題 In Situ Observation of the Dispersed State of O/W Emulsions Based on Electrochemiluminescence
3. 学会等名 72th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木真由子, 植田巧, 廣瀬健人, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 電気化学発光を用いるO/Wエマルション分散状態の in situ 測定
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木佐和, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 無機ヒ素の価数別定量のための銀電極を用いたストリップングボルタンメトリー
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東拓, 筒井美結, 道川佳世子, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 界面伝播の可視化による液膜電位振動の同期機構の解明
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayuko Suzuki, Takehito Hirose, Yumi Yoshida, Kohji Maeda
2. 発表標題 In Situ Observation of the Dispersed State of O/W Emulsions Based on Electrochemiluminescence
3. 学会等名 72nd Annual Meeting of the International Electrochemical Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木佐和, 大西彩由佳, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 難溶性銀塩析出のストリップングポルタンメトリーを用いたヒ素 価・ 価の定量
3. 学会等名 第66回ポーラログラフィおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤綾香, 加藤奈桜, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 化学浸透説のモデルとなる液膜系非同時共役反応の構築
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田大成, 鈴木真由子, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 電気化学発光を用いたエマルション三元相図内の粒子径マッピング
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 筒井美結, 伊東 拓, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 3つ以上の膜電位振動系の空間配置に特異的な同期機構
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 筒井美結, 伊東拓, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 複数の液膜電位振動系間の同期機構の変容 - 2体系から4体系まで -
3. 学会等名 第68回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東 拓, 道川 佳世子, 筒井 美結, 吉田 裕美, ○前田 耕治
2. 発表標題 液膜電位振動における界面伝播の可視化と同期機構
3. 学会等名 第 82 回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊東 拓, 筒井美結, 道川佳世子, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 蛍光性界面活性イオンを用いた液膜電位振動の同期と伝播の可視化
3. 学会等名 第67回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井美結, 伊東 拓, 道川佳世子, 吉田裕美, 前田耕治
2. 発表標題 複数の膜電位振動系の同期と伝播に及ぼす空間配置の影響
3. 学会等名 第67回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井 美結・伊東 拓・道川 佳世子・吉田 裕美・前田耕治
2. 発表標題 同一平面上に存在する複数の膜電位振動系の伝播と同期の様式
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------