

機関番号：14601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21750071  
 研究課題名（和文） 光導波路プロトンセンサーを利用した脂質膜／水相界面での電子移動過程の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of the electron transfer at lipid membrane/water interface by a slab optical waveguide spectroscopy  
 研究代表者  
 堀田 弘樹 (HOTTA HIROKI)  
 奈良教育大学・教育学部・准教授  
 研究者番号：80397603

研究成果の概要（和文）：脂質膜／水相界面で起こる電子移動反応を光導波路分光法により観察した。ガラス薄板表面に脂質分子膜を作製し、平板型の脂質膜／水相界面を形成させる。このガラス薄板を光導波層とすることで、脂質分子膜を選択的に分光検出できる。脂質膜中に脂溶性の抗酸化剤であるクルクミンを分配させ、過酸化水素を含む水溶液を送液すると、クルクミンが脂質膜／水相界面で酸化される様子が観察された。この反応の速度定数を見積もった。

研究成果の概要（英文）：An electron transfer at lipid membrane/water interface was observed by a slab optical waveguide spectroscopy. A lipid membrane was formed on a thin glass plate, into which an excitation light was introduced. Thus, an absorption spectrum of the inside of lipid membrane was selectively observed by an evanescent wave of the guiding light. Curcumin, one of the lipophilic antioxidants, was distributed into the lipid membrane, and the oxidation, i.e. electron transfer reaction through the lipid membrane/water interface between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dissolved in water was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：化学センサー、脂質膜／水相界面、電子移動、脂質二分子膜、ベシクルフュージョン、環境応答性色素、脂溶性抗酸化剤、プロトン移動

#### 1. 研究開始当初の背景

脂質二分子膜は、生体膜として光合成や呼吸鎖の電子伝達系をはじめとする生体内エネルギー産生の場合として重要な役割を果たしている。これは分子量数百～千程度のリン脂質分子が自己集合により組織化したものであり、膜タンパクやコレステロールなどを膜内に取り込むことで、様々な機能を持つ分子集合体を形成することができる。このよう

な脂質膜の機能解明を目指した基礎研究は、生体内反応の解明のみならず、抗菌剤などの薬剤開発や、食品分野への応用など産業的にも重要な研究課題である。これまで、球状（リポソーム・ベシクル）または平面状の脂質膜（LB膜など）を介した化学反応について、プローブ分子の蛍光発光・寿命を利用した分光計測（Biochemistry, 23, 4044, 1983など）や、パッチクランプに代表される電気化学検

出 (Nature, 392, 734, 1998 など) により解析が行われてきた。また脂質膜は、分析化学的にも分離・濃縮、分子認識の場として注目され (JACS, 125, 4436, 2003 など)、今後もその必要性が増していくと考えられる。

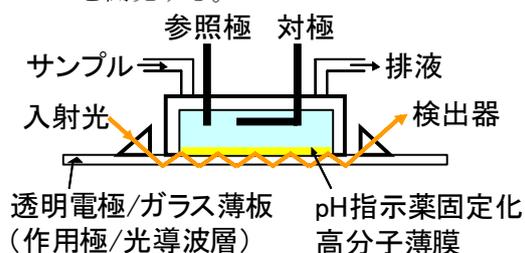
これらの反応には、疎水性場である脂質膜と水溶液の境界面 (脂質膜/水相界面) が重要な働きをしている。一般的に界面でのエネルギー移動には、電子と  $H^+$  がカップリングすることが多く (『電子と生命』, 共立出版)、通常の電気化学測定のみでは十分に解析できず、分光電気化学の手法がしばしば用いられてきたが、その方法は限られている。一方、申請者は、水と油のような互いに混じり合わない界面に注目し、そのような不均一反応場で起こる電荷移動反応 (イオン移動、電子移動) について、電気化学計測技術をバックグラウンドとして、その特異的な化学反応を追跡するための新たな分析ツールの開発に従事してきた。特に最近、分光計測法の中でも極めて界面選択性が高い光導波路分光法をベースとして、電極反応により生じる局所的 pH 変化を、in situ で追跡できる新たな測定法を開発した。この  $H^+$  感応膜は、電場の影響や  $H^+$  移動を伴わない電子移動に対して影響を受けず、 $[H^+]$  変化に対してのみ高感度に応答する。このことは蛍光プローブなどを利用した他の  $H^+$  検出法と比較して特に優れており、高く評価されている。さらに応答速度も pH 電極等と比較して高速であるという特長を持っている。

## 2. 研究の目的

本研究では、光導波路分光測定法において、導波層として  $H^+$  感応膜を修飾した ITO 電極を用い、その上に脂質二分子膜を形成させることで、水溶液相/脂質膜/ $H^+$  感応膜 (水相)/ITO ガラス (導波層) の構造を形成させ、各界面での電荷移動過程を解析できるツールを開発することを目標とした。

## 3. 研究の方法

図 1 のような測定システムを構築する。 $H^+$  感応膜を修飾した ITO 電極上に脂質二分子膜を形成させることで、脂質膜/ $H^+$  感応膜 (水相) 界面での電荷移動過程を解析できるツールを開発する。



ITO を蒸着させたガラス薄板の上に、pH 感応ポリメタクリル酸系高分子薄膜を修飾した。テフロン製のフローセルを乗せ溶液の送液が行えるようにした。フローセルにリン脂質のベシクル溶液を送液し、ベシクルフュージョン法により高分子薄膜上にリン脂質膜を形成させた。テフロン製フローセルに Ag/AgCl 参照電極と対極 (Pt 線) を固定し、ITO を作用電極とし、電位の制御が行えるようにした。光源には、Xe ランプを用い、レンズ等で集光後、プリズムを介してガラス薄板内に導入した。ガラス内を導波した光は、再びプリズムを介して、CCD 検出器で取り込みスペクトル測定を行った。この光が導波する際に、ガラス表面に染み出し光 (エバネッセント波) が生じ、 $H^+$  官能膜がその光を吸収することで、センサーとして作用する。ただし、今回の検討では、 $H^+$  官能膜上への脂質膜形成は、十分な安定性が得られなかった。そのため、水溶液相/脂質膜/ITO ガラス (導波層)、または水溶液相/脂質膜/ガラス (導波層) の二つの測定系において検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) ベシクルフュージョン法を用いた脂質膜作製と、作製した薄膜のキャラクタリゼーション

ガラス表面に多孔質なポリメタクリル酸系高分子薄膜を作製し、そこにメチルレッドを共有結合により固定化した薄膜を作製した。この  $H^+$  感応膜作製法については、既に確立している (科研費若手研究 (B) No.18750059)。 $H^+$  感応膜上に、脂質分子膜を形成させることを試みた。脂質膜形成法として既によく知られているベシクルフュージョン法を採用した。中性リン脂質である DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を用いた。超音波法により調整した DMPC ベシクル溶液を送液し、その破裂によりガラス表面に脂質膜を形成する。NaOH 水溶液の送液、緩衝液の送液により洗浄を行った。しかし、作製した脂質膜は十分な安定性が確認できず、高分子薄膜の平面性が低いと考えられた。そこで、 $H^+$  感応膜を用いず、ガラス上または ITO 上に脂質膜を形成させることにした。同様にベシクルフュージョン法により膜形成を行い、洗浄処理のあと、脂質膜に分配することで膜内でのみ蛍光を発する環境応答性色素である NBD (nitrobenzofurazan) 誘導体を用いて、蛍光顕微鏡下で脂質膜の可視化を行った結果、時間に対しても十分に安定な膜が得られていることが分かった。また、交流インピーダンス法による薄膜の厚さの測定から、均一に脂質二分子膜が形成されていた場合に想定される 10 nm 程度の厚みよりも薄い結果となり、膜が形成されておらず穴が空いている箇所

が存在していることが考えられた。これには今回測定に用いたセルの表面積が約 30 mm<sup>2</sup> と大きく均一な膜形成が困難であったためと考えられたが、以下に示すクルクミンの酸化反応の観察においては、脂質膜が形成されていない部分は、結果に影響しないため、そのまま測定を続けることにした。

### (2) 脂質膜に対する抗酸化剤の分配挙動の観察

ITO ガラス板上に形成させた脂質薄膜に対して、脂溶性抗酸化剤（還元剤）であるクルクミンのエタノール溶液を送液したところ、図 2 に示すように時間の経過と共に、クルクミンが脂質膜内に浸透したことを示す吸収スペクトルの増加が観察された。この結果はクルクミンが脂質膜内に選択的に分配していることを示している。また対象実験として脂質膜を形成させていないガラス薄板上へのクルクミン溶液送液を行った（図 3）が、青線で示すようにクルクミンの吸収スペクトルは全く観察されなかった。この結果は、クルクミンはガラス表面への吸着は起こさず、脂質膜の存在により膜内に濃縮され、吸収スペクトルが観察されたことを示している。また、この吸収スペクトルは、その後セル内をクルクミンを含まない緩衝液で洗浄しても、変化することなく、クルクミンが水相側へ再分配することが無いことを示した。

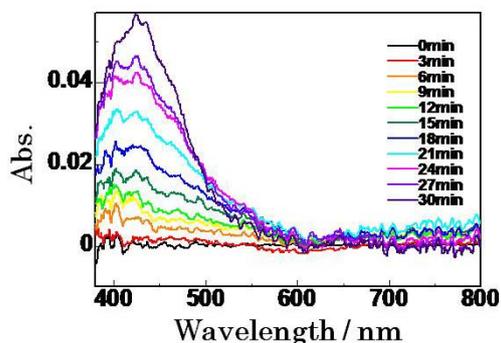


図 2. クルクミンの脂質膜内への分配

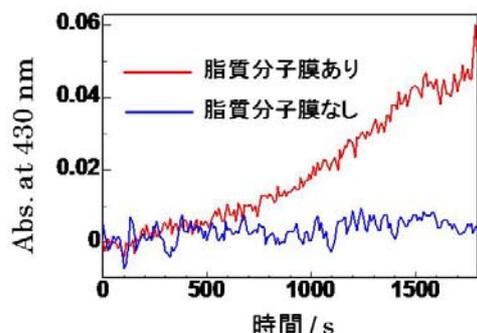


図 3. クルクミンの分配に伴う吸光度変化

### (3) 脂質膜中に分配したクルクミンの酸化還元挙動の観察

脂質膜内にクルクミンを濃縮できたため、膜内に存在するクルクミンを膜外に送液した酸化剤により酸化することを試みた。

① 第一に、フェリシアンによる酸化を検討した。クルクミンは酸化に伴い 430 nm 付近の吸収が減少することが分かっているため、図 2 に示す吸収の減少が観察されれば、脂質膜/水溶液界面で電子移動が起こっていることが示唆されるが、フェリシアン水溶液の送液による吸収スペクトルの変化は観察されなかった。脂質膜内のクルクミンは、水相中のフェリシアンにより酸化されないことが分かった。

② 続いて過酸化水素によるクルクミンの酸化を検討した。図 4 にバイアル中、均一溶液系（エタノール+水）においてクルクミンと過酸化水素の反応を観察した結果を示す。

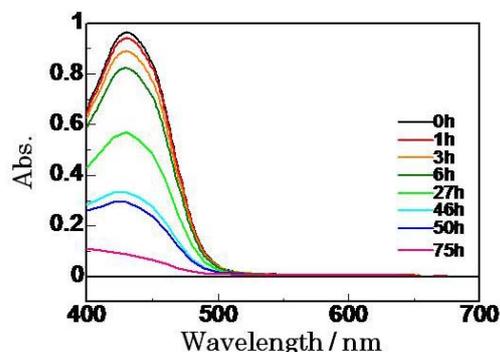


図 4. 均一溶液系での過酸化水素によるクルクミンの酸化

クルクミン溶液に対して、過酸化水素を添加するとクルクミンの酸化に伴い吸光度が減少していくことが観察された。酸化に伴う吸光度の減少は、電解実験においても確認されている。この結果から均一溶液系においてクルクミンと過酸化水素の間で電子移動が起こることが明らかとなった。ただし、時間スケールが非常に大きいことに着目して欲しい。

そこで、脂質膜/水相界面（不均一系）において、過酸化水素水溶液を送液したところ、図 5 に示すように、クルクミンの吸収スペクトルの減衰が観察され、脂質膜内に存在するクルクミンが、脂質膜/水相界面を介して過酸化水素により酸化されていることが推察された。なお、図 5 は、図 2 においてクルクミンが 30 分間、分配した時の吸収スペクトルを、吸光度 0 と直して、そこから吸光度の減少を表したものである

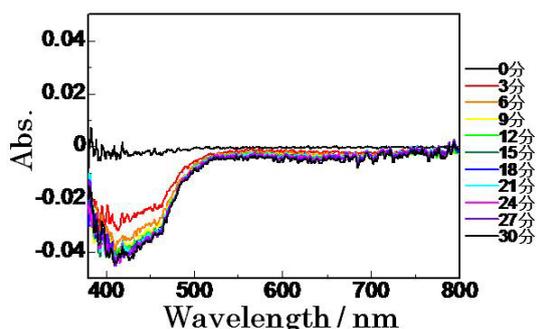


図 5. 脂質膜/水相界面 (不均一溶液系) での過酸化水素によるクルクミンの酸化

また、過酸化水素の送液により脂質膜は破壊されないことを、先に示した蛍光色素NBDを用いた蛍光顕微鏡観察により確認している。

この結果から、脂質膜/水相界面での電子移動が、今回作製した光導波路分光測定装置において観察出来ていることが分かった。

今後の課題として、反応速度の見積もりが挙げられる。現在も引き続き検討を進めている途中であるが、濃度の評価が容易でなく、慎重に解析する必要があると考えている。得られた速度定数を均一系でのクルクミンの酸化反応速度と比較し、界面における反応との違いを検討していきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hiroaki Horiuchi, Syohei Ishida, Ken-ichi Matsuzaki, Katsuhiko Tani, Takuya Hashimoto, Hiroki Hotta, Kin-ichi Tsunoda, Takuo Koraida, Tetsuo Okutsu, and Hiroshi, Hiratsuka, Suppression Mechanism of the Photodegradation of J-Aggregate Thin Films of Cyanine Dyes by Coating with Polysilanes, J. Phys. Chem. C, 査読有, 115, 2011, 6902-6909.

[学会発表] (計 5 件)

①堀田弘樹、スラブ光導波路分光法を用いたTiO<sub>2</sub>表面への色素の吸着状態解析、電気化学秋季大会 (電気化学会)、2009年9月10-11日、東京農工大学

②堀田弘樹、電極型スラブ光導波路を用いた電極表面のpHセンシング、分析化学会年会 (日本分析化学会)、2009年9月24-26日、北海道大学

③堀田弘樹、直線二色性測定用スラブ光導波

路分光装置の開発とそれを用いた固液界面への色素の吸着状態解析、ポーラログラフーおよび電気分析化学討論会 (日本ポーラログラフ学会)、2009年11月21-22日、徳島大学

④ (依頼講演) 堀田弘樹、Application of polymer coated slab optical waveguide to the electrode surface analysis, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010年12月19日、ホノルル (ハワイ)

⑤堀田弘樹、光導波路蛍光顕微鏡システムの構築とその脂質分子膜観察への応用、分析化学討論会 (日本分析化学会)、2010年5月15-16日、島根大学

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀田 弘樹 (HOTTA HIROKI)

奈良教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：80397603