

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550095

研究課題名(和文)油水界面は生体膜のモデル系になり得るか？ 電子移動反応場としての類似性と相違点

研究課題名(英文)Can the oil/water interface be a model system of biomembrane? -Similarities and Differences as the reaction field of electron transfer-

研究代表者

大塚 利行(Osakai, Toshiyuki)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30183023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：「油水界面は生体膜のモデル系になり得るか？」という命題に答えを出すため、生体膜により近いと考えられる自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer; SAM)および油水界面での電子移動を比較検討することによって、油水界面と生体膜の類似性と相違点を明らかにすることを目的とした。

サイクリックボルタンメトリーなどの電気化学測定法を用いて、SAM膜/水溶液界面のガルバニ電位差が油水界面と同様に電子移動に重要な役割を担うことが明らかになった。しかし、SAM膜/水溶液界面では油水界面と異なり、生体膜類似のシトクロームcの電子移動を観察することができた。

研究成果の概要(英文)：To know if the oil/water (O/W) interface can be a model system of biomembrane, electron transfer reactions occurring at a self-assembled monolayer (SAM) modified electrode (which seems to be more analogous to biomembrane systems) have been compared with those occurring at the O/W interface. Using electrochemical techniques such as cyclic voltammetry, it has been found that the Galvani potential difference across the SAM/solution interface should play an important role in the electron transfer occurring therein, in a similar manner as the electron transfer at the O/W interface. However, we can observe a biomimetic electron transfer for cytochrome c at the SAM/solution interface, though no such electron transfer occurs at the O/W interface.

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：液液界面 自己組織化単分子膜 生体膜モデル 電子移動 ボルタンメトリー シトクロームc ユビキノン ビタミンK1

1. 研究開始当初の背景

従来、油水界面を生体膜のモデル系として用いた電気化学的研究が盛んに行われてきた。しかし、研究代表者らの研究により、生体膜上で起こる電子移動反応が必ずしも油水界面では起こらないことが示された。

2. 研究の目的

本研究では、生体膜により近いと考えられるSAMと油水界面での電子移動を比較検討することによって、油水界面と生体膜の類似性および相違点を明らかにすることを目的とした。これによって、生体膜での呼吸鎖電子伝達系のメカニズムの正しい理解に結びつけ、さらに、油水界面を用いる新しいバイオセンサーの原理を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)油水界面でのシトクローム c (Cyt c) と 1,1-ジメチルフェロセン (DiMFC) との間の電子移動反応の研究には、サイクリックボルタンメトリー (CV) 法およびポテンシャルステップクロノアンペロメトリー法を用いた。また、この界面電子移動の標準 (形式) 電位の測定には、先に開発した導電体分離油水 (ECSOW) 系を用いた。

(2)SAM 修飾金電極は、Takehara ら (J. Electroanal. Chem., 308 (1991) 345) の方法によって作製し、SAM 中にユビキノ 10 (UQ) またはビタミン K1 (VK1) をドーブした。この電極を用いて CV 測定、および必要に応じてクロノポテンシオメトリー (CP) 測定を行った。さらに、電解質溶液中に Cyt c のような酸化還元物質を含む場合についても CV 測定を行った。

4. 研究成果

(1) 先の Lillie ら (J. Phys. Chem. B, 106 (2002) 12101) の報告と同様に、水相に加えた Cyt c と 1,2-dichloroethane (DCE) 相に加えた DiMFC との間の電子移動による明瞭なボルタンメトリー波を観察した。様々な濃度条件や電位掃引速度において観察されたボルタモグラム (一例を図 1 に示す) を、デジタルシミュレーション法を用いて詳細に検討したところ、観察された電子移動反応は、図 2 のような反応機構 (いわゆる “イオン移動メカニズム”) によることが示された。この反応機構では、まず、DCE 中の DiMFC が一部水相側に分配し、これが水相バルクから拡散によって供給された Cyt c (酸化体) と水相中で電子移動を行う。これによって生じる DiMFC の酸化体 (DiMFC⁺) が界面電位差に応じて水相から DCE 相へ移動し、電流が流れる。このように、Cyt c と DiMFC との電子移動は油水界面の水相側の反応層中、つまり homogeneous な環境下で起こる。この結論は、実際の呼吸鎖電子伝達系における Cyt c の電子移動機構の理解において示唆に富むもの

と思われる。

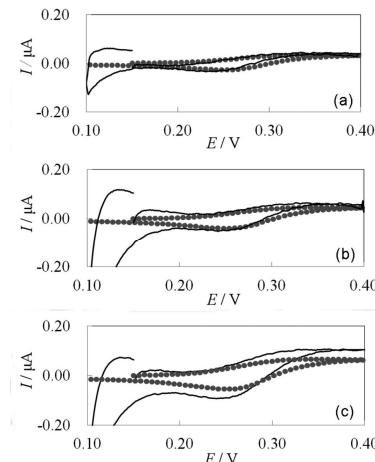


図 1 0.02 M DiMFC を含む DCE 相と (a) 0.2, (b) 0.4, (c) 0.8 mM Cyt c を含む W 相との界面のサイクリックボルタモグラム (50 mV/s). 図中の点はデジタルシミュレーションによる理論曲線を示す。

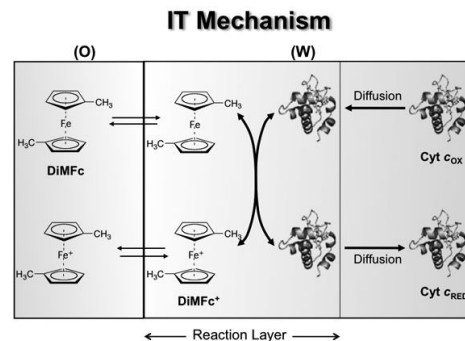


図 2 イオン移動メカニズム。

(2) 炭素数 18 と 12 の octadecylmercaptane (OM) および dodecylmercaptane (DM) を用いて作成した SAM 中に、UQ や VK1 を組み込んだところ、CV 測定によって準可逆的なボルタンメトリー波が観察された。図 3 に一例として OM の SAM 中に UQ を組み込んだ場合のボルタモグラムを示す。図に見られるように、支持塩 (塩化物塩) の陽イオンを K⁺, TMA⁺, TEA⁺, TPrA⁺, TBA⁺, TPnA⁺ のように変えたとき、UQ の還元に対応する負のピーク電位が正側へシフトすることを見出した。このピーク電位の正電位シフトは、上記の陽イオンの油水界面での標準イオン移動電位が負に大きいほど、すなわち陽イオンが疎水性になるほど大きくなることが分かった。このことは、SAM / 溶液界面には、油水界面のように一定のガルバニ電位差がかかっていることを示唆している。このことを確かめるために、さらに、支持電解質の陽イオンが異なる条件下において CP 測定を行い、得られた電位-時間曲線を理論的に解析した。その結果、確かに SAM / 溶液界面には支持電解質イオンの分配によって支配されるガルバニ電位差が印加さ

れていることが分かった。このように SAM / 溶液界面は油水界面のように振る舞い、生体膜と同様に界面でのイオン移動に影響を与えることが確認された。なお、SAM を作成する試薬を OM から DM に変えると、還元ピークの電位シフトはあまり顕著ではなくなり、SAM / 溶液界面の効果は相対的に小さくなった。

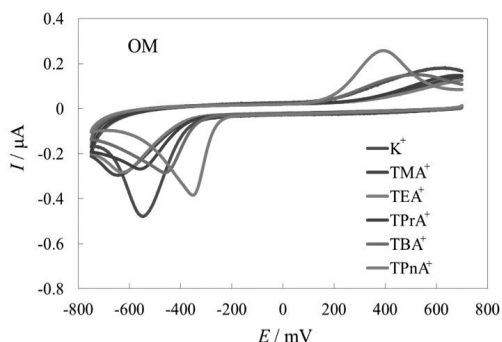


図3 OMを用いて作成したSAM修飾金電極に組み込んだUQのサイクリックボルタモグラム (100 mV/s).

(3) OMを用いて作成したSAM修飾金電極を用い、SAM中のUQやVK1と溶液中に添加した酸化還元物質(Cyt cなど)との電子移動反応についてCV測定を行った。

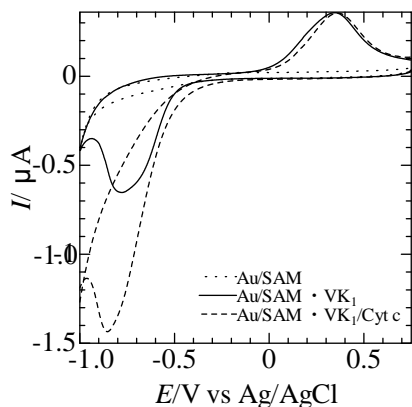


図4 OMを用いて作成したSAM修飾金電極に組み込んだVK1のサイクリックボルタモグラム (100 mV/s). 詳しくは本文を参照。

図4に一例としてVK1とCyt cの電子移動のサイクリックボルタモグラムを示す。Cyt cはVK1を組み込まないSAM修飾電極上では酸化還元波を示さなかったが、VK1を組み込んだ場合、 -0.8 V 付近のVK1の還元ピークを著しく増大させた(図中の破線)。このことは、SAM中のVK1がCyt cと金電極との間の電子メディエータとして機能したことを示している。興味深いことに、 $+0.35\text{ V}$ 付近の再酸化のピーク電流値は、Cyt cがある場合(破線)とない場合(実線)で変化がなかった。

このようにSAM中のVK1のメディエータとしての作用は不可逆的であることが分かった。この知見は、呼吸鎖電子伝達系などにおける電子の“一方向的な”移動反応を理解する上で重要な示唆を与えるものと思われる。

以上述べたように、SAM / 溶液界面では生体膜におけるイオン移動や電子移動に類似した反応を観察することができた。しかし、VK1とCyt cの電子移動のような反応は、油水界面では観察されなかった。これは、油水界面では油相のバルクが大きいいため、UQやVK1のような疎水性の酸化還元物質が油相中で安定化しすぎて、界面での電子移動を起こしにくくなったものと推察される。一方、SAM / 溶液界面では、SAMの厚みが分子レベルであるため、SAM中の酸化還元物質が界面で電子移動を行える程度に十分界面に近づいて存在できる。このため、SAMと同様に疎水層の厚さが薄い生体膜に類似した反応がSAMにおいて観察されたものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) Y. Imai, T. Sugihara, T. Osakai, Electron Transfer Mechanism of Cytochrome c at the Oil/Water Interface as a Biomembrane Model, J. Phys. Chem. B, 116 (2012) 585-592, 査読有.
DOI: 10.1021/jp2092658

〔学会発表〕(計8件)

- (1) 上木美里, 塩田皓輝, 大塚利行, 生体膜モデルとしての自己組織化単分子膜修飾電極の電気化学的研究, 第74回分析化学討論会, 2014年5月24日・25日, 日本大学工学部, 福島県郡山市.
- (2) 塩田皓輝, 上木美里, 大塚利行, ユビキノン10を組み込んだ自己組織化単分子膜修飾電極の電気化学的挙動, 第74回分析化学討論会, 2014年5月24日・25日, 日本大学工学部, 福島県郡山市.
- (3) 塩田皓輝, 上木美里, 大塚利行, ユビキノン10やビタミンK1を組み込んだ自己組織化単分子膜修飾電極の挙動, 第59回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 2013年11月28日~12月1日, 石垣市民会館.
- (4) 上木美里, 塩田皓輝, 大塚利行, 生体膜モデルとしての自己組織化単分子膜修飾電極の電気化学的研究, 日本分析化学会第62年会, 2013年9月10日~12日, 近畿大学東大阪キャンパス.
- (5) 塩田皓輝, 今井蓉子, 大塚利行, 自己組織化単分子膜修飾電極でのユビキノン10の電子移動のメカニズム, 第73回分析化学討論会, 2013年5月18日・19日, 北海道大学函館キャンパス.

- (6) 今井蓉子, 杉原崇康, 大塚利行, 導電体分離油水 (ECSOW) 系を用いるシトクローム c の油水界面電子移動メカニズムの研究, 第 57 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 2011 年 12 月 1 日 ~ 3 日, 沖縄県男女共同参画センター, 那覇市.
- (7) Y. Imai, Y. Sasaki, T. Sugihara, T. Osakai, Electron Transfer of Redox Proteins at the Biomimetic Oil/Water Interface, Shikata Discussion 2011, Awaji Yumebutai, Japan, May 27-29, 2011.
- (8) T. Osakai, Y. Imai, Mechanistic Study of the Electron Transfer of Cytochrome c at the Oil/Water Interface, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), Kyoto, Japan, May 22-26, 2011.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~osakai/>

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