

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410146

研究課題名(和文) 新規な溶液内化学反応速度解析法としての拡張型キャピラリー電気泳動反応器の開発

研究課題名(英文) Development of extended capillary electrophoretic reactor as novel methodology for kinetic analysis of chemical reactions in solution

研究代表者

高橋 透 (TAKAKAHSI, Toru)

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授

研究者番号：30361166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：種々の分野における“錯体システム”の有用なキネティクス(反応速度論)解析法に対する喫緊のニーズに応えるべく、キャピラリー電気泳動分離プロセスを“錯体システム”の「反応容器」として用いるというコンセプトに基づき“拡張型”キャピラリー電気泳動反応器(CER)の開発を行った。金属錯体の生成反応速度解析の新たな手法として、zone-passing mode CER(ZP-CER)を開発し、さらにその適用範囲を非金属錯体の生成反応系、および色素の加水分解反応系へと拡張した。さらに、温度可変型ZP-CERを開発し、これを用いて非金属錯体の生成反応における活性化パラメータを取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：There are urgent and strong demands for the development of useful kinetic analysis method in a variety of research fields. The aim of this research program is the construction of “extended” capillary electrophoretic reactor (CER), which is based on the basic concept using capillary electrophoretic separation process as “reactor” for the reaction of complexes. Zone-passing mode CER (ZP-CER) was developed as a novel methodology for the kinetic analysis of the formation reaction of a metal complex. The scope of the application of ZP-CER was extended to the kinetic analysis of the formation reaction of a nonmetal complex, and hydrolysis of a dye. A temperature variable type ZP-CER was also developed, and was successfully applied to the acquisition of the activation parameters of the formation reaction of a nonmetal complex.

研究分野：分析化学

キーワード：反応速度解析法 キャピラリー電気泳動 生成反応速度定数 活性化パラメーター 金属錯体

## 1. 研究開始当初の背景

化学反応における反応速度は、分子構造のみならず、温度、圧力、濃度などすべての反応条件の影響を受けるため、種々の実験条件下での反応速度を調べれば反応の詳細を知ることができる。それ故、物質の変化を研究する学問領域である“化学”における反応速度定数の定量的な評価、即ち反応速度論的解析の重要性は周知のところである。

金属錯体、生体分子複合体等を含む広い意味での“錯体”の速度論的解析が極めて重要な研究課題として近年注目されている。これら“錯体”は、共有結合ではなくそれに比べて比較的弱い結合（分子間相互作用）によって結びつけられた複合体であり、容易に解離する。例えば、生体内での物質間相互作用＝生命活動は、このような解離活性な“錯体”を形成する、時間的にも空間的にも一時的な相互作用である場合が少なくない。従って、非平衡系における生体分子複合体の挙動の解析、すなわち速度論的解析こそが、その相互作用の生物学的な意味を理解するための鍵であると言っても過言ではない。また、各種プローブ等の機能性分子として働く金属錯体はその機能を発現し得るか否かはその速度論的安定性によるところが極めて大きい。このように“錯体”の速度論的解析の重要性は周知されており、これを簡便かつ正確に行うための新しい方法論の開発は喫緊のニーズとなっている。これは、“錯体”の速度論的解析のための多くの機器が各社から次々と発売されている状況を見れば明白である。

生体物質間相互作用は、*in vitro*における、結果としての結合の平衡状態で議論されることが多いが、実際の細胞内における生命活動はそれとは異なり時間的にも空間的にも一時的な非平衡の物質間相互作用である場合がほとんどである。このような背景から、生体分子間相互作用の生物学的な意味を理解する上で速度論的な考察の重要性が広く認識されている。また、近年、特に創薬、タンパク質工学など応用分野において、生体分子からなる“錯体”の速度論的パラメーター（反応速度定数）の獲得は、新しい機能分子の設計を行う上で極めて重要であることが認識されており、その研究が近年に至り急速に加速しつつある。

一方、金属錯体の生成および解離反応にお

ける速度パラメータは錯体化学の基礎データとしての重要性のみならず、種々の画像イメージング試薬など、機能性分子としての金属錯体の機能発現の可否を決定する極めて重要な物性である。さらに、天然配位子—金属錯体—タンパク質間の配位子交換反応、金属タンパク質間の配位子ならびに金属イオン交換反応は、生物の必須微量元素獲得のメカニズムの解明、および、プリオン病をはじめとする金属イオン—タンパク質間相互作用が原因とされている疾病の病態解明、治療法の確立に欠かせない情報であると認識されるようになってきている。

このように、現在、種々の分野において“錯体システム”のキネティクス解析に強い関心が寄せられている。これは、特に最近、「Biacore」をはじめとして、多くの機器メーカーから“錯体システム”のキネティクス解析のための装置が数多く発表されている事実からもうかがい知ることができよう。

しかしながら、これら“錯体システム”のキネティクス解析を行うことは、そもそも技術的に困難であり、既存の解析法のほとんどが平衡状態での測定を原理とすることから、煩雑な操作を繰り返す必要があることに加え、その測定精度も決して高いものではなかった。これに対し、申請者らは、キャピラリー電気泳動(CE)分離プロセスを“錯体”の「反応容器」として用いるという研究代表者ら独自の発想に基づく解離反応に特化した“錯体”のキネティクス解析法、キャピラリー電気泳動反応器 (CER) (図1)、を開発し、簡便、かつ正確な“錯体”の解離反応速度定数( $k_d$ )の直

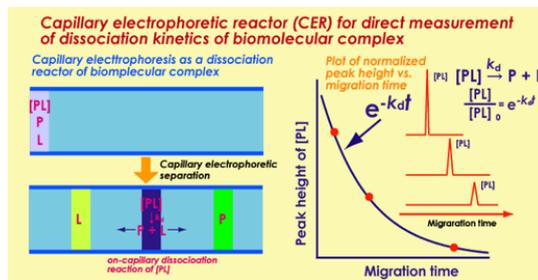


図1 CERの概念図

接測定を実現している。

以上のような背景に基づき、申請者は、次項に述べる本研究計画の構想を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

種々の分野における“錯体システム”の有  
用なキネティクス解析法に対する喫緊のニ  
ーズに応えるべく、本研究では、CE 分離  
プロセスを“錯体”の「反応容器」として用いる  
というコンセプトに基づき“錯体”の解離反  
応速度解析に特化して開発したキャピラリ  
ー電気泳動反応器 (CER)の概念を、“錯体シ  
ステム”に拡張し、以下に挙げる「拡張型 CER」  
の創出を目指す。

1. “錯体”の生成反応速度解析のための拡張型 CER としての zone passing mode CER
2. “錯体”の置換反応速度解析のための拡張型 CER としての配位子置換モード CER
3. “錯体”の活性化パラメータ測定のための拡張型 CER としての温度可変型 CER

1, 2 は、キャピラリー内で“錯体”の生成  
反応、置換反応を行わせ、その反応挙動をリアルタイムでモニタリングすることによってこれらの反応の速度論的解析を実現するものである。3は1, 2を迅速反応系に拡張しようとするものであり、“錯体”の迅速解離反応速度解析法として既に開発したマイクロチップキャピラリー電気泳動反応器 ( $\mu$ CER)をベースに開発を進める。1~3については、申請者ら自らによる先行研究の成果として、これらのベースとなる数種の拡張型 CER を既に開発した経緯があり、これらのノウハウを注入して開発を進める。

### 3. 研究の方法

本研究計画は、開発した“錯体”の解離反応に特化したキネティクス解析法であるキャピラリー電気泳動反応器(CER)の概念を、生成、解離、置換反応および迅速反応系など“錯体システム”のすべての反応系に拡張し、“錯体”の生成反応速度解析および、置換反応速度解析のための拡張型 CER の創出に加え、“錯体”の迅速な生成・置換反応速度解析のための拡張型 CER の創出、およびこれら拡張型 CER の適用範囲の拡大のための誘導体化法の創出を行うものである。これを実現するために、申請者ら自らによる先行研究の成果として開発した、キャピラリー内での配位子交換反応を利用して錯体の数時間程度の長いタイムスケールで進行する解離反応プロセスの解離反応速度解析法である配位子交

換モード CER, および数秒程度のタイムスケールで進行する解離反応プロセスの解離反応速度解析法であるマイクロチップ電気泳動反応器のノウハウを注入して開発を進める。

### 4. 研究成果

Fe(II)-1,10-フェナントロリン (phen) 錯体をモデル化合物として、本研究において提案する“錯体”の生成反応速度解析のための拡張型 CER「zone-passing mode (ZP-) CER」(図2)のコンセプトを確立する事を試みた。配位子である phen を含む泳動緩衝溶液で満たしたキャピラリーにFe(II) 溶液のプラグを注入し、電圧を印可して電気泳動を行った。Fe(II) のプラグを注入した後、さらに落差法により泳動緩衝溶液を注入した。このときの泳動緩衝溶液の注入時間を変えることによって、Fe(II) 溶液プラグのスタート位置を種々に変化させ、泳動時間を制御した複数の電気泳動図を得た(図3)。またこのとき、phenを含まない泳動

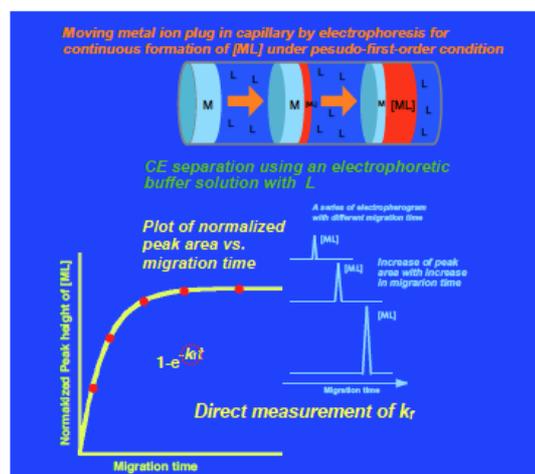


図2 Basic concept of ZP-CER.

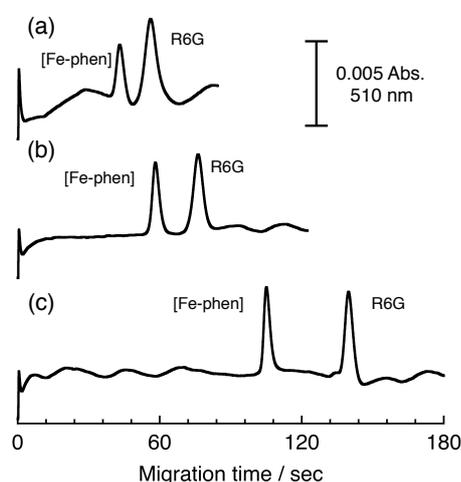


図3 A series of electropherograms of Fe(II) samples with different migration time varying the start position in the capillary obtained by ZP-CER.

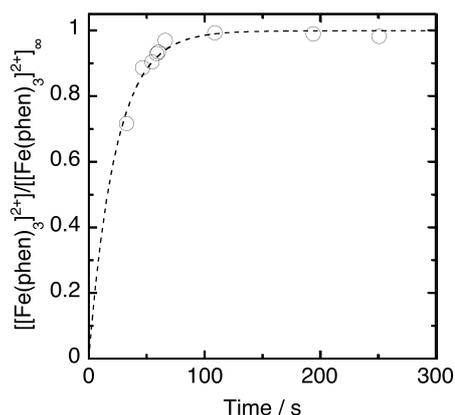


図4 Normalized reaction profile of  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  obtained by ZP-CER. The line in the plot is the calibration curve by the equation.

緩衝溶液をFe(II) のプラグの前後に注入した。それぞれの電気泳動図を解析し、泳動時間の増加に伴うFe(II)-phen錯体ピークの相対ピーク面積の変化から、Fe(II)-phen錯体の生成率の時間プロファイルを得た(図4)。これを、擬一次反応として解析し、その生成速度反応速度定数を算出することに成功した。

一方、フルボ酸—Fe(III) 錯体—EDTA間の配位子交換反応をモデル反応系として、ZP-CER の“錯体”の置換反応速度解析への拡張を試み、フルボ酸—Fe(III) 錯体—EDTAの配位子置換反応速度定数を算出することに成功した。

フタレイン系色素の一つであるテトラプロ

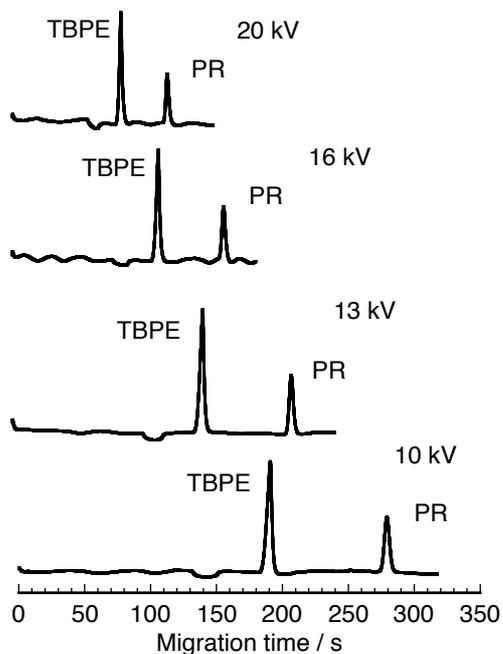


図5 A series of electropherograms of TBPE with various migration time at pH 11.84. Sample:  $[\text{TBPE}] = 4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{PR}] = 6.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Electrophoretic buffer: 0.01 M phosphate (pH = 11.84). Capillary:  $L = 60 \text{ cm}$ ,  $r = 13.5 \text{ cm}$ .

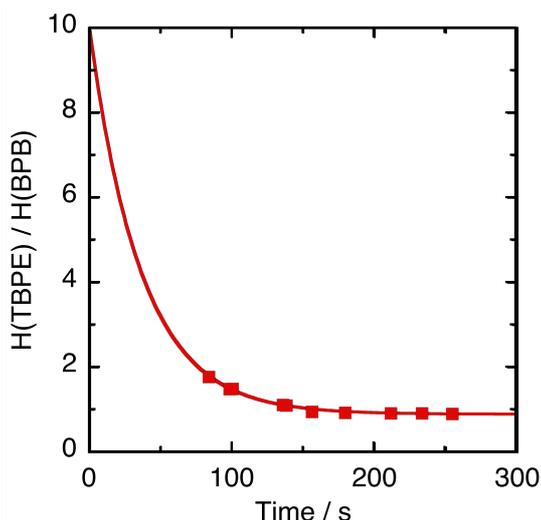


図6 Normalized reaction profile of the dissociation of TBPE obtained by ZP-CER. The line in the plot is the calibration curve by the equation.

モフェノールフタレインエチルエステル(TBPE)をモデル化合物として、本研究において提案する“錯体”の生成反応速度解析のためのzone-passing mode (ZP-CER)を、そのコンセプトはそのままに、一般的な化合物の反応のキネティクス解析へ拡張することを試みた。酸性泳動緩衝溶液で満たしたキャピラリーにTBPE溶液のプラグを注入し、電圧を印可して電気泳動を行った。TBPEのプラグを注入した後、さらに泳動緩衝溶液を注入した。このときの泳動緩衝溶液の注入時間を変えることによって、TBPE溶液プラグのスタート位置を種々に変化させ、泳動時間を制御した複数の電気泳動図を得た(図5)。またこのとき、中性泳動緩衝溶液をTBPEのプラグの前後に注入した。それぞれの電気泳動図を解析し、泳動時間の増加に伴うTBPEピークの相対ピーク面積の変化から、キャピラリー内で進行したTBPEの酸加水分解反応の残存率の時間プロファイルを得た(図6)。これを、擬一次反応として解析し、その酸加水分解反応速度定数を算出することに成功した。

一方、ZP-CERを非金属錯体である1-(2,4-ジヒドロキシ-1-フェニルアゾ)-8-ヒドロキシナフタレン-3,6-ジスルホン酸(H-レスゾルシノール) - ホウ酸錯体生成反応系へ応用することを試み、その生成反応速度定数を算出することに成功した。これを受け、ホウ酸-Hres錯体の生成反応系をモデル反応系として、“錯体”の活性化パラメータ測定のための拡張型CERとしての温度可変型ZP-CERの創出に取り組んだ。活性化パラメータの測定には、精密な $k_f$ の測定が必須になる。これを達

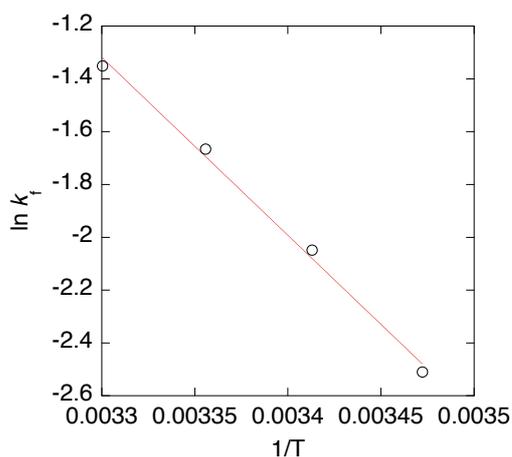


図7 Arrhenius plot for the formation reaction of B-Hres complex obtained by ZP-CER.

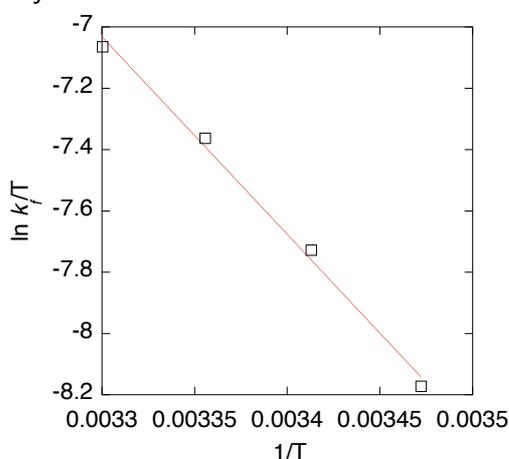


図8 Eyring plot for the formation reaction of B-Hres complex obtained by ZP-CER.

表1 Activation parameters of the formation reaction of B-Hres complex obtained by ZP-CER.

Ea / kJmol <sup>-1</sup>	56.0
ΔG <sup>‡</sup> / kJmol <sup>-1</sup>	77.2
ΔH <sup>‡</sup> / kJmol <sup>-1</sup>	53.6
ΔS <sup>‡</sup> / Jmol <sup>-1</sup>	-79.2

成するための手段として、印可電圧を変化させずに泳動時間を制御する方法をとった。通常、ホウ酸泳動緩衝溶液で満たしたキャピラリーに Hres 溶液のプラグを注入し、電圧を印可して電気泳動を行うが、ここでは Hres のプラグを注入した後、さらに泳動緩衝溶液を注入した。このときの泳動緩衝溶液の注入時間を変えることによって、キャピラリー内の Hres 溶液プラグのスタート位置を種々

に変化させ、電気泳動時の印可電圧を変えること無く泳動時間を制御することが出来た。また、ホウ酸を含まない泳動緩衝溶液を Hres 溶液プラグの前後に注入し、プラグ同士の接触により電気泳動開始前に錯形成反応が進行することを防止した。各々の電気泳動図を解析し、泳動時間の増加に伴うホウ酸-Hres 錯体ピークの相対ピーク面積の変化から、キャピラリー内で進行した錯形成反応による錯体生成量の時間プロファイルを得た。これを、擬一次反応として解析し、その  $k_f$  を算出した。ZP-CER による  $k_f$  の測定温度を 15-25°C の間で変化させて、各測定温度における  $k_f$  を測定した。これを基にアレニウスプロット (図7) およびアイリングプロット (図8) を作製し、活性化エネルギー ( $E_a$ )、活性化自由エネルギー ( $\Delta G^\ddagger$ )、活性化エンタルピー ( $\Delta H^\ddagger$ ) および活性化エントロピー ( $\Delta S^\ddagger$ ) を得ることが出来た (表1)。すなわち、温度可変型 ZP-CER の開発に成功した。

#### 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 3 件)

- ① T. Sakurai, H. Hoshino, T. Takahashi, Separation of single-base sequential isomers of single-stranded DNA by capillary electrophoresis and its application in the discrimination of single-base DNA mutations, Journal of Separation Science, in press. DOI: 10.1002/jssc.201700443 査読有
- ② Yosuke Sato, Hitoshi Hoshino, Nobuhiko Iki, High kinetic stability of ZnII coordinated by the tris(histidine) unit of carbonic anhydrase towards solvolytic dissociation studied by affinity capillary electrophoresis, J. Inorg. Biochem., 161, 122-127 (2016). 査読有
- ③ Nobuhiko Iki, Eszter Boros, Mami Nakamura, Ryo Baba, and Peter Caravan, Gd<sub>3</sub>TCAS<sub>2</sub>: An Aquated

Gd<sup>3+</sup>-Thiacalix[4]arene Sandwich Cluster with Extremely Slow Ligand Substitution Kinetics, Inorg. Chem., 55, 4000-4005 (2016).査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 伊藤 洋平, 壹岐 伸彦, 高橋 透, Zone-passing モードキャピラリー電気泳動反応器によるホウ酸-H-レソルシノール錯体の錯形成反応速度解析における生成反応プロファイル解析法の検討, 第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2016年11月, 徳島大学常三島キャンパス
- ② 壹岐 伸彦, CE の解き明かす溶液内分子複合体の熱力学的・速度論的描像, 第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2016年11月, 徳島大学常三島キャンパス
- ③ 伊藤 洋平, 壹岐 伸彦, 高橋 透, “zone-passing モードキャピラリー電気泳動反応器によるホウ酸-H-レソルシノール錯体の生成反応速度解析”, 日本分析化学会第64年会, 2015年9月, 九州大学伊都キャンパス.
- ④ 伊藤 洋平, 壹岐 伸彦, 高橋 透, zone-passing モードキャピラリー電気泳動反応器による非金属イオン錯体の錯形成反応速度解析, 第35回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2015年11月, 岡山大学津島キャンパス
- ⑤ 高橋 透, 細野 晃弘, 富谷 頼行, 壹岐 伸彦, キャピラリー電気泳動反応器による金属錯体系の総合的定量解析, 第34回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2014年12月, 京都大学桂キャンパス
- ⑥ Toru Takahashi, Akihiro Hosono, Toshio Takayanagi, Nobuhiko Iki, Kinetic Analysis of Acidic and Basic Hydrolysis of Tetrabromophenolphthalein Ethyl Ester by Zone-passing Mode Capillary Electrophoretic Reactor, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2014), 2014年12月, 京都大学桂キャンパス

[図書] (計 1 件)

基礎から学ぶ機器分析化学 (井村, 樋上編), 高橋 透 (分担執筆), 化学同人, (2016) [産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 透 (TAKAHASHI, Toru)

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授  
研究者番号: 30361166

### (2) 研究分担者

壹岐 伸彦 (IKI, Nobuhiko)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授  
研究者番号: 50282108

### (3) 研究分担者

星野 仁 (HOSHINO, Hitoshi)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授  
研究者番号: 20124620