

氏 名	山 田 弘
授 与 学 位	博 士 ( 工 学 )
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 5 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 応用化学専攻
学 位 論 文 題 目	脂質二分子膜および酸化還元性膜酵素の電気化学的研究
指 導 教 官	東北大学教授 内田 勇
論 文 審 査 委 員	東北大学教授 内田 勇      東北大学教授 板谷 謹悟 東北大学教授 野澤 庸則

## 論 文 内 容 要 旨

### 第 1 章 序 論

細胞は、生体膜といわれる脂質二分子膜と数多くの膜タンパクからなる膜で隔絶されており、選択性透過膜として、エネルギー変換の場として、情報交換の場として、機能している。このような複雑な生体膜の機能を解明するには、人工脂質二分子膜モデル系での理解は必要不可欠である。

本論文は、生体膜モデルを念頭においた脂質二分子膜が関与する諸現象である膜を介した物質透過、電子移動、イオン移動に関して、また、生体内電子伝達に関わるフラビン酵素のひとつであるジアフォラーゼの電気化学的反応性に関して、従来にない新しい電気化学的手法を展開し、新しい切口で検討を行うことを目的としている。また、酸化還元酵素の工学的利用という面から、固定化酵素の活性評価を電気化学的手法を駆使して行った。

### 第 2 章 実験および実験装置

本章では脂質二分子膜の形成法、およびマイクロ電極の作製法ならびに電気化学セル、測定機器と構成について述べている。

平面脂質二分子膜はおもに刷毛塗り法で形成させた。即ち、脂質のデカン溶液をテフロンシートにあけた小孔に水中にて塗布し、平面脂質二分子膜を形成させた。二分子膜化は干渉縞の消失および膜の電気容量測定により確認した。

### 第 3 章 脂質二分子膜を介する物質透過過程の検討

脂質二分子膜を介した物質透過現象の解析にマイクロ電極を膜に近接させる手法を開発し、膜透

過係数 ( $P_m$ ) の測定を行った。膜透過速度の速い系であっても膜近傍に存在する拡散層内部にマイクロ電極を挿入することにより拡散層の影響を受けずに測定が可能である。

フェロセニルメタノール (FMA) およびフェロセンカルボン酸 (FCA) の  $P_m$  の測定を行い、表 1 に結果を示す。脂質二分子膜の物質透過は一般に Overton's rule と呼ばれる経験則に従うことが知られる。即ち、膜透過係数 ( $P_m$ ) はヘキサデカンなどの有機溶媒/水間の分配係数 ( $K_{hex}$ ) と比例関係にある。FMA, FCA の  $P_m$  とヘキサデカン/水間の分配係数から Overton's rule に基づき予想される膜透過係数 ( $P_{m,pred}$ ) も合わせて表 1 に示す。FCA の実測した  $P_m$  は予想値とほぼ一致しているが、FMA の実測値は予想値よりも 3 桁以上も小さいことがわかった。

FMA のように脂溶性の高い物質の膜透過は Overton's rule では説明できないことが明らかとなり、脂溶性の高い物質の膜透過に関して再考の必要があると考えられる。

表 1 フェロセニルメタノール (FMA) とフェロセンカルボン酸 (FCA) の膜透過係数 ( $P_m$ ) .

	$\log(P_m/\text{cm s}^{-1})$	$K_{hex}$	$\log(P_{m,pred}/\text{cm s}^{-1})$
FMA	$-2.3 \pm 0.2$	2.8	1.6
FCA	$-0.2 \pm 0.3$	1.0	1

#### 第 4 章 脂質二分子膜を介する電子移動過程の検討

AC インピーダンス法を脂質二分子膜の系に適用し、テトラシアノキノジメタン (TCNQ) を含む脂質二分子膜を介する電子移動反応を定量的に解析した。レドックス種として  $\text{Co(phen)}_3^{2+/3+}$ ,  $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$  およびキノ/ヒドロキノを用い、見かけの膜抵抗のレドックス体の濃度依存性を検討することにより、膜表面でのレドックス種と膜間の電子移動パラメータと膜内電子移動過程の分離に成功した。表 2 および 3 に膜内電子移動抵抗および膜表面での電子移行速度定数を示す。TCNQ を存在させることにより膜内電子移動抵抗は著しく減少した。また電子移行速度定数 ( $k_s$ ) はレドックス種により大きく異なった。 $\text{Co(phen)}_3^{2+/3+}$  および  $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$  の白金電極上での  $K_s$  値はほぼ同じであるが、脂質二分子膜上でのそれは  $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$  のほうが  $\text{Co(phen)}_3^{2+/3+}$  より 4 桁以上も小さい値が得られた。本研究で用いた脂質はリン脂質であり膜表面は負電荷が過剰に存在すると考えられる。表 3 の結果から膜表面の負電荷とレドックス種の電荷との静電的相互作用が電子移動速度に大きく影響していることが示唆された。

さらにカルシウムイオン共存下ならびにイオン強度を変化させたときの電子移行速度の検討を行った。カルシウムイオンは膜表面に吸着し、膜表面の見かけの電荷が変化することが知られている。カルシウムイオン共存下、およびイオン強度を高くしたとき  $\text{Co(phen)}_3^{2+/3+}$  の電子移行速度が遅くなることが確認した。以上のことから膜表面とレドックス種との静電的相互作用が電子移行速度に大きく影響していることが明らかとなった。

表 2 イオン移動抵抗 ( $R_f$ )、膜内電子移動抵抗 ( $R_e$ ) および膜容量 ( $C_m$ ) .

	$R_f/k\Omega \text{ cm}^2$	$R_e/k\Omega \text{ cm}^2$	$C_m/\mu\text{F cm}^{-2}$
TCNQあり	~1000	17	0.5
TCNQなし	~1000	>1000	0.5

表 3 脂質二分子膜表面 ( $k_{s,BLM}$ ) および白金表面 ( $k_{s,Pt}$ ) における電子移行速度定数.

	$10^4 k_{s,BLM}/\text{cm s}^{-1}$	$10^4 k_{s,Pt}/\text{cm s}^{-1}$
$\text{Co(phen)}_3^{2+/3+}$	$2.0 \pm 0.5$	480
$\text{H}_2\text{Q/Q}$	0.001	
$\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$	<0.0002	520

## 第5章 脂質二分子膜を介するイオン移動過程の検討

抗生物質の一種であるアラメシチンが形成するイオンチャンネルを介したイオン移動過程に関して膜電流測定ならびにマイクロ電極測定により検討を行った。イオンチャンネル形成のキネティクスに関して膜電流測定により考察し、マイクロ電極を膜に近接させることにより、全膜電流測定では困難であった単独のイオン種の透過性の評価を行っている。

イオンチャンネル形成のキネティクスに関してはアラメシチン分子が膜電位を印加することにより膜を横切り移動すること、イオンチャンネルは5から6個のアラメシチン分子で形成されていることが明らかとなった。

膜電位を印加したときチャンネルを介して移動するヨードイオンの酸化電流を脂質二分子膜に近接させたマイクロ電極によって測定した。

図1に膜電位パルスを印加したときの膜電流およびマイクロ電極での酸化電流の経時変化を示す。

膜電流より全イオンのフラックスおよびマイクロ電極での電流応答よりヨードイオンのフラックスを求めることができる。ヨードイオンのフラックスは全イオンのフラックスの4%であることがわかった。ヨードイオン濃度は全イオン濃度の10%であるので電解質として存在しているカリウムイオンおよび塩素イオンに比べるとヨードイオンはアラメシチンイオンチャンネルを通過しにくいことが明らかとなった。

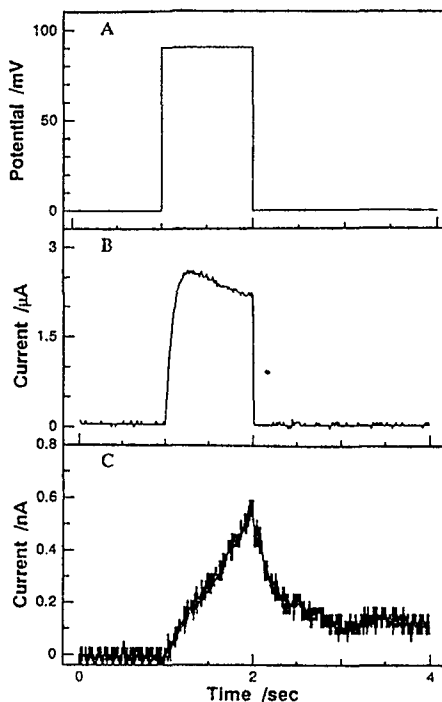


図1 印加した膜電位(A)、膜電流(B)およびマイクロ電極における電流応答(C)

## 第6章 酸化還元性膜酵素のキネティクス

生体内電子伝達に関わるフラビン系酸化還元酵素の一つであるジアフォラーゼとメディエーターとの電子移動反応をストップフロー法により検討を行った。さらに得られた結果をもとに、メディエーター/酵素/NADH反応系のボルタンメトリーにおける挙動をデジタルシミュレーション法を用いて解析している。

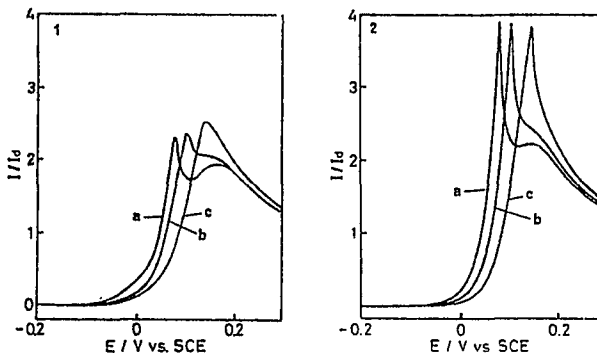


図2 ジアフォラーゼおよびNADH共存下における $\text{Co(phen)}_3^{2+}$ のボルタモグラム、(1)実験結果、(2)計算結果  
a:5 ;b:20 ;c:50 mV/s.

ジアフォラーゼは1電子供与体メディエーターにより2電子酸化される。

$E_{red} + Mox \rightarrow E' + M_{red}$  (1)  $E_{red}$ ,  $E'$ ,  $E_{ox}$ :酵素の還元型, セミキノ型, 還元型

$E' + Mox \rightarrow E_{ox} + M_{red}$  (2)  $Mox$ ,  $M_{red}$ :メディエーターの酸化型, 還元型

ストップフロー法により検討結果からは、還元型ジアフォラーゼが1電供与体メディエーターにより2電子酸化される際、(1)の反応が律速で(2)の反応は非常に速いことが明らかとなった。また、 $Fe(CN)_6^{3-}$ および $Co(phen)_3^{3+}$ とジアフォラーゼとの反応速度定数を決定した。ここで得られた結果をもとにメディエーター/酵素/NADH反応系のボルタンメトリーにおける挙動をデジタルシミュレーション法を用いて解析を行った。図2にNADHおよびジアフォラーゼ共存下におけるボルタモグラムを示す。1)が実験結果であり、2)が計算結果である。ある条件下ではボルタモグラムはふたつのピークが観測され、このような挙動はデジタルシミュレーションによって再現されている。各電位におけるメディエーターおよびNADHの濃度分布を計算することにより、ふたつのピークが観測されることは次のように説明される。最初の電流の立ち上がりはNADHの触媒酸化によるものであるが、反応が進行するうちに電極近傍のNADHが枯渇してくるため電流は減少しピークが観測される。ふたつの電流ピークはメディエーターの拡散に起因するピークである。このような均一化学反応に伴う複雑な電極反応を解析する場合、デジタルシミュレーション法は有効である。

## 第7章 固定化した酸化還元膜酵素の活性化評価

固定化したジアフォラーゼの活性評価をふたつの電気化学的手法で行った。電極上にグルタルアルデヒドで架橋固定したジアフォラーゼのメディエーターによる触媒酸化電流を解析することにより、電極上の活性な酵素濃度の決定を行い、固定した酵素の約1割が活性であることが明らかとなった。またガラスおよび脂質二分子膜表面に酵素を単分子固定した系では、酵素膜にマイクロ電極を近接させて速度論的検討を行い、メディエーターにフェロセニルメタノールおよび $Co(phen)_3^{2+}$ を用いたとき、ミカエリス定数ならびに分子活性を決定することができた。ミカエリス定数は固定しない酵素のそれと同じ値であるが、分子活性は固定しない酵素より1桁程度小さい値となることが明らかとなった。

## 第8章 総括

本論文は生体膜モデルとしての人工脂質二分子膜および酸化還元性膜酵素に関して電気化学的観点から従来にない新しい測定手法を開発し検討を行ったものである。生体膜の機能発現には電荷の移動を伴うことが多いため、本論文で開発した電気化学的測定手法による研究の展開は、生体膜現象に関していっそうの理解をもたらすと期待される。

## 審査結果の要旨

本論文は、生体膜モデルとしての人工脂質二分子膜が関与する諸現象、即ち膜を介した物質移動、電子移物、イオン移動、および酸化還元性膜酵素であるジアフォラーゼの活性評価に関して、電気化学的観点から従来にない新しい測定手法を開発し検討を行ったもので全編8章からなる。

第1章は序論であり、本研究の目的と背景について述べている。

第2章では脂質二分子膜の形成、マイクロ電極の作製など実験方法について述べている。

第3章では、脂質二分子膜を介した物質透過現象の解析にマイクロ電極を膜に近接させる手法を開発し、その手法により膜透過速度が非常に速い系でも測定が可能であることを示し、フェロセン誘導体の膜透過係数の決定を行っている。脂溶性の高いフェロセン類の膜透過は、従来より知られている膜透過の経験則では説明できないことが明らかになり、有用な知見を与えている。

第4章では、ACインピーダンス法を脂質二分子膜の系に適用し、テトラシアノキノジメタン(TCNQ)を含む脂質二分子膜を介する電子移動反応を定量的に解析し、膜表面での電子移動パラメータと膜内電子移動との分離に成功した。また膜表面とレドックス種との静電的相互作用が、電子移動速度に大きく影響することを明らかにし、膜界面の電子移動過程の解析に新たな手法を提案している。

第5章ではアラメシチン分子が形成するイオンチャンネル形成のキネティクスを膜電流測定により考察し、さらにマイクロ電極を膜に近接させることにより、全膜電流測定では困難であった単独のイオン種の透過性の評価に成功し、ヨードイオンの透過性の評価を行っている。

第6章では生体内電子伝達に関わるフラビン系酸化還元酵素の一つであるジアフォラーゼと、メディエーターとの電子移動反応をストップフロー法により検討を行っている。さらに得られた結果をもとに、メディエーター/酵素/NADH反応系のボルタンメトリーにおける挙動をデジタルシミュレーション法を用いて解析している。

第7章では電極上に架橋固定したジアフォラーゼのメディエーターによる触媒酸化電流を解析することにより、電極上に固定された活性な酵素濃度の決定を行っている。

第8章は総括である。

以上要するに本論文は、脂質二分子膜および酸化還元性膜酵素に関して、電気化学的観点から新しい測定手法の開発を行い、それらを駆使して脂質二分子膜を介した電子、イオンを含めた物質移動現象、および酸化還元性膜酵素と電極間の電子移動の解明を行ったもので、応用化学および生物電気化学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文を博士(工学)の学位論文として合格と認める。