

立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)

個人研究

2015年度研究成果報告書

研究代表者	所属部局・職	氏名
	理学部・教授	宮部寛志 印
研究課題	キャピラリー電気泳動を利用する分子間相互作用の速度解析法の開発	
研究期間	2015年度	
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 1,000,000円 / (採択金額) 1,000,000円	
<p>研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと)</p> <p>キャピラリー電気泳動法とモーメント解析理論を組み合わせ、化学的に非修飾かつ遊離した(非固定化)状態における分子間相互作用の平衡情報(会合平衡定数)だけではなく、速度情報(会合速度定数と解離速度定数)をも測定できる解析法を開発した。本法では、溶質とリガンドとの会合体を実験系内で停止させるクロマトグラフィックキャピラリー電気泳動法により溶出ピークを測定し、その一次絶対モーメントと二次中央モーメントを解析して速度定数を決定する。本研究では、界面活性剤ミセルをリガンドとする実験系に本解析法を適用してその有用性を実証すると共に、複数の溶質-ミセル間における各相互作用の一斉解析の可能性を確認した。</p>		

<p>キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)</p> <p>[分子間相互作用] [キャピラリー電気泳動] [モーメント解析理論]</p>
--

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)**【背景】**

分子間相互作用の解析は、化学や生物学分野等における様々な機能や現象の特徴や機構を解明する上で非常に重要な研究課題である。このため各種の解析法が開発され、その一部は溶質-リガンド間における分子間相互作用の反応速度定数(会合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d) の測定にも利用されている。しかし、これら既往の速度解析法では、分子の固定化や化学修飾(蛍光標識化等)が必要であり、分子間相互作用速度の解析結果に対するこのような分子の固定化や化学修飾の影響が懸念される。

そこで当研究室ではこれまでに、キャピラリー電気泳動(CE)法とモーメント解析理論を組み合わせ、溶質やリガンドの固定化や化学修飾が不要であり、かつ分子間相互作用の平衡情報だけではなく速度情報をも測定できる分子間相互作用解析法を開発した。すなわち、キャピラリー内に外圧を印加して溶質-リガンド会合体の動きを停止させるクロマトグラフィックキャピラリー電気泳動(CCE)法を開発した。この時、キャピラリー内における溶質分子の物質移動挙動はクロマトグラフィー系のそれと類似した状態となる。このCCE法の導入によりCE溶出ピーク形状のモーメント解析が可能になり、反応(会合・解離)速度定数を解析的に求めることが可能になった。しかし、CE装置の性能上(印加圧力の刻み)の制限からキャピラリー内に印加する外部圧力を微妙に調節することができないため、CCE条件下でCE実験を行うことは実際には難しい。そこで、外圧を段階的に変化させて実測した溶出ピーク情報を解析して目的の速度定数を決定する現実的なCE実験法およびデータ解析法を開発した。

そこで本研究では、本解析法の完成度の向上と適用範囲の拡大を図るため、ドラッグデリバリーシステムを意識した実験系として界面活性剤ミセルをリガンド(分離媒体)として使用する実験系を取り上げ、以下のような研究課題を設定した。

- (1) CCE法による溶質-界面活性剤ミセル間相互作用の速度解析
- (2) 界面活性剤ミセル-複数のアミノ酸間の各相互作用の一斉解析

【CCE法による溶質-界面活性剤ミセル間相互作用の速度解析】

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ミセルをリガンドとして利用するCE系に本解析法を適用し、SDSミセル-溶質分子間の相互作用の速度解析を行った。溶質および電気浸透流(EOF)マーカーとして、チモール(2.0 mmol dm^{-3})およびジメチルスルホキシド(DMSO)(0.33%, v/v)(いずれも電気的中性)を用いた。泳動液は、 20 mmol dm^{-3} リン酸緩衝水溶液(pH 7.1)とメタノールとの混合溶液(80/20, v/v)にSDSを $15.4 \text{ mmol dm}^{-3}$ (CMC以上の濃度)溶解して調製した。シリカ溶融キャピラリー(内径 $75 \mu\text{m}$ 、外径 $375 \mu\text{m}$ 、全長 40.2 cm 、有効長 30 cm)を使用し、 370 V cm^{-1} の電位勾配を印加して電気泳動実験を行った。また、キャピラリーに印加する外部圧力を $-0.1 \sim 0.1 \text{ psi}$ の範囲で変化させた。測定したチモールおよびDMSOの溶出ピークからCCE条件下における溶出ピークの一次、二次モーメントを求め、それらの値を解析した。

チモールおよびDMSOの一次モーメント値を逐次近似法によって解析した結果、チモール-SDSミセル会合体をキャピラリー内で停止するために印加する外部圧力は -0.082 psi であった。また、会合平衡定数は $6.35 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ であった。一方、二次モーメント

研究成果の概要 (つづき)

解析については、先ず CE 実験と同じ条件下でのキャピラリー内泳動液中における DMSO の拡散係数を DMSO ピークの二次モーメント値から求めた。次に、同条件下におけるチモールの拡散係数を上記の DMSO の拡散係数から、両者の分子サイズの差異を考慮して求めた。さらに、チモールの拡散係数に基づきチモールピークの二次モーメント値に対する拡散の寄与を求めた。二次モーメントの実測値からこの拡散の寄与を差し引いて、チモール-SDS ミセル間相互作用の寄与を求めた。その結果、チモール-SDS ミセル間相互作用の会合速度定数および解離速度定数の測定値は各々 $5.6 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および 8.7 s^{-1} であった。

以上のように、SDS ミセルをリガンドとして利用する CE 系に本解析法を適用し、チモール-SDS ミセル間相互作用の会合平衡定数、会合速度定数および解離速度定数を測定してその有用性を実証した。

【界面活性剤ミセル-複数のアミノ酸間の各相互作用の一斉解析】

二種類のアミノ酸と SDS ミセルとの間の各々の相互作用を同時に解析する一斉解析法について検討を行った。溶質として L-ドーパおよび L-チロシン、また EOF マーカーとして DMSO を用いた。試料溶液中の両アミノ酸の濃度は各々 1.5 mmol dm^{-3} であり、DMSO 濃度は上記と同様である。泳動液は、 30 mmol dm^{-3} 酢酸緩衝水溶液 (pH 5.5) に SDS を 150 mmol dm^{-3} 溶解 (CMC 以上の濃度) して調製した。シリカ溶融キャピラリー (内径 $75 \mu\text{m}$ 、外径 $375 \mu\text{m}$ 、全長 31 cm 、有効長 20.8 cm) を使用し、 323 V cm^{-1} の電位勾配を印加して電気泳動実験を行った。また、キャピラリーに印加する外部圧力を $-0.1 \sim 0.1 \text{ psi}$ の範囲で変化させた。両アミノ酸の混合溶液を注入する場合 (混合系) および L-ドーパだけを注入する場合 (単一系) について、各アミノ酸と DMSO の溶出ピークから CCE 条件下における溶出ピークの一次、二次モーメントを求め、上記と同様にしてそれらの値を解析した。

各アミノ酸および DMSO ピークの一次および二次モーメント値を解析した結果、アミノ酸-SDS ミセル会合体をキャピラリー内で停止するために印加する外部圧力は何れの場合も -0.088 psi であった。また、会合平衡定数 (K_A)、会合速度定数 (k_a) および解離速度定数 (k_d) の測定値は以下の通りであった。

$$\text{L-ドーパ-SDS ミセル (混合系): } K_A = 1.1 \times 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}, k_a = 1.3 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}, \\ k_d = 11 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{L-チロシン-SDS ミセル (混合系): } K_A = 2.2 \times 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}, k_a = 4.8 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}, \\ k_d = 22 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{L-ドーパ-SDS ミセル (単一系): } K_A = 1.2 \times 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}, k_a = 1.2 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}, \\ k_d = 10 \text{ s}^{-1}$$

上記のように、混合系の二種類のアミノ酸と SDS ミセルとの間の各々の相互作用を同時に解析することができた。また、L-ドーパ-SDS ミセル間の相互作用に関する解析結果が混合系と単一系とで良く一致しており、共存成分 (本研究では L-チロシン) の影響を受けることなく目的成分 (本研究では L-ドーパ) の相互作用挙動を解析できた。以上のように、本解析法による分子間相互作用の一斉解析の可能性が明らかになった。

※ この (様式 2) に記入の、成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書 (A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式) を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

①雑誌論文

1. Miyabe, K.; Takahashi, R.; Shimazaki, Y. “Kinetic Study of Interaction between Solute Molecule and Surfactant Micelle”, *Anal. Sci.*, 31, 2015, 1019-1025.
2. Miyabe, K.; Shimazaki, Y. “Moment Analysis of Affinity kinetics in Inclusion Complex System between Thymol and Sulfated- β -cyclodextrin by Chromatographic Capillary Electrophoresis (CCE)” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 88, 2015, 1603-1611.

④その他

1. K. Miyabe, Y. Shimazaki, “Chromatographic Capillary Electrophoresis (CCE): A Strategy for Kinetic Study of Intermolecular Interaction”, The 39th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC2015) (Fort Worth, TX USA), 2015 年 5 月 19 日
2. 宮部 寛志・島崎 裕紀, “キャピラリー電気泳動を利用する分子間相互作用の速度解析法の開発”, 第 75 回分析化学討論会 (甲府市), 2015 年 5 月 24 日
3. 宮部 寛志・島崎 裕紀, “クロマトグラフィックキャピラリー電気泳動 (CCE): 分子間相互作用の速度解析法”, 第 13 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム (仙台市), 2015 年 6 月 6 日
4. K. Miyabe, “Chromatographic Capillary Electrophoresis (CCE): A Strategy for Analyzing Equilibrium and Kinetic Characteristics of Intermolecular Interaction”, The 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2015) (Geneva, Switzerland), 2015 年 6 月 22 日
5. 宮部 寛志, “キャピラリー電気泳動を利用する分子間相互作用の速度解析法”, 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (長崎市), 2015 年 8 月 21 日
6. 宮部 寛志, “非固定化かつ非化学修飾状態における分子間相互作用の速度解析法”, イノベーションジャパン 2015 (東京都江東区), 2015 年 8 月 27 日～28 日
7. K. Miyabe, Y. Shimazaki, “Chromatographic Capillary Electrophoresis (CCE): A Strategy for Kinetic Study of Intermolecular Interaction”, The 22nd International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2015) (Helsinki, Finland), 2015 年 8 月 31 日
8. 宮部 寛志・島崎 裕紀, “キャピラリー電気泳動を利用する分子間相互作用の速度解析法の開発”, 日本分析化学会第 64 年会 (福岡市), 2015 年 9 月 9 日
9. 宮部 寛志・島崎 裕紀, “キャピラリー電気泳動法による分子間相互作用の会合・解離速度定数の測定”, 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (熊本市), 2015 年 11 月 19 日
10. 宮部 寛志・島崎 裕紀, “分子の固定化や化学修飾が不要な分子間相互作用の速度解析法の開発”, 新アミノ酸分析研究会第 5 回学術講演会 (東京都文京区), 2015 年 12 月 7 日
11. K. Miyabe, Y. Shimazaki, “Chromatographic Capillary Electrophoresis (CCE): A Method for Kinetic Study of Intermolecular Interaction”, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015) (Honolulu, HI USA), 2015 年 12 月 15 日
12. 宮部 寛志, 「電気泳動による物質の相互作用の分析方法」(国内優先特許出願) 特願 2016-007834, 2016 年 1 月 19 日