

ルテニウム(III)金属錯体を用いたホスビチンの ボルタンメトリーのセンシング†

阿部剛*, 菅原一晴**

Voltammetric Sensing of Phosvitin Using Ruthenium (III) Complex†

Tsuyoshi Abe* and Kazuharu Sugawara**

Voltammetric sensing of phosvitin was carried out based on an interaction between ruthenium (III) and phosvitin. The electrode response of hexaammineruthenium (III) was measured using a glassy carbon electrode. When phosvitin was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing hexaammineruthenium (III), a new peak was observed due to the formation of ruthenium (III) - phosvitin complex. On the other hand, it was expected that iron strongly combines with phosphate groups of phosvitin. Although a new peak did not appear in the incubation of hexacyanoferrate (III) and phosvitin, the peak current of hexacyanoferrate (III) decreased as the concentration of phosvitin increased. The electrode responses of hexaammineruthenium (III) and hexacyanoferrate (III) were linear and ranged from 2.5×10^{-10} - 5.0×10^{-9} M and 5.0×10^{-8} - 5.0×10^{-7} M, respectively. As a result, the interaction between hexaammineruthenium (III) and phosvitin was stronger than that between hexacyanoferrate (III) and phosvitin. The decrease of the peak current with phosphoprotein such as ovalbumin and casein was observed. The change of the electrode response with phosvitin was the greatest in those proteins. Consequently, the sensing system had a high selectivity for phosvitin.

Key words : Phosvitin, Hexaammineruthenium (III), Voltammetry, Glassy carbon electrode

1 はじめに

ホスビチンは、卵黄タンパク質の一つでありリンタンパク質として知られている。その性質として分子量は35 kDaでありリン含有率が10%と高く、構成するアミノ酸の57.5%がセリン残基から成っており、セリン残基は90%程度がリン酸化されている¹⁾。その構造の一部には、ヘキソース、グルコサミン、シアル酸が6%程度も含まれ、三分岐したアンテナ形状をとる²⁾。代表的なリンタンパク質としては、牛乳中のカゼインや卵白中のオボアルブミンがある。一分子あたりのリン酸基の個数はホスビチンで110個、カゼインでは7個、オボアルブミンについては1.8~3.2個であるので、ホスビチン中に含まれるセリン残基のリン酸化率が非常に高いことがわかる³⁾。このように、セリン残基の多くはリン酸化されているため、ホスビチンは溶液中で高分子電解質のような挙動をとる⁴⁾。それゆえ、リン酸基を介してカルシウム、マグネシ

ウム、鉄イオンなどがホスビチンと錯体を形成する。特に、鉄との錯形成能が強くその貯蔵庫としての機能を持ち、1分子当たり鉄:2-3原子を含有している⁵⁾。カルシウムにおいては、ホスビチンと相互作用することで凝集するものであり⁶⁾、マグネシウムはpH 6.5前後でリン酸基と結合する⁷⁾。近年、ホスビチン-金属イオン間相互作用は生体に大きく関与することが明らかとなり、栄養摂取時におけるホスビチンの添加による金属イオンの吸収抑制効果が見出されている^{8, 9)}。また、生体防御、体調リズム調節、疾病予防など医学分野でのホスビチンの機能が注目されてきている¹⁰⁻¹²⁾。さらに、ビタミン捕捉作用や抗ウイルス作用をもっているとも言われている¹³⁾。一方、ホスビチンは抗酸化活性を有しており鉄の存在下でリン脂質の酸化を抑制する¹⁴⁾。ホスビチンとそのトリプシン加水分解物も、ヒドロキシラジカルからのDNAへのダメージ保護をすることができる¹⁵⁾。

† 原稿受理 平成28年2月26日 Received February 26, 2016

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

** 教職センター (Teaching Profession Center)

本研究では、ホスビチン生体での挙動を簡便・迅速にモニタリングするためにヘキサアンミンルテニウム(III)との相互作用に基づいたホスビチンのセンシングに関する研究を行った。その測定原理は、ホスビチンの共存により出現するルテニウム(III)に起因する新たなピークの電極応答をボルタンメトリーにより測定することでホスビチンを検出するものである。

2 実験

2.1 電気化学的測定装置

電気化学的測定には、ALS Electrochemical Analyzer 822B を用いた。作用電極にはグラッシーカーボン電極(直径, 3.0 mm, モデル No. 002012, BAS)を使用した。作用電極は、粒径 1.0-, 0.3- and 0.05- μm アルミナ (Baikowski International Corp., Charlotte, NC). 参照電極は Ag/AgCl 電極 (sat. NaCl, モデル No. 012167, BAS), 対極は白金電極であった。すべての電位は Ag/AgCl 電極に対して測定された。

2.2 試薬

ホスビチン, ヘキサアンミンルテニウム(III)塩化物, α -カゼイン, オボアルブミン, コンカナバリン A, 牛血清アルブミンは Sigma-Aldrich から購入された。ヘキサシアノ鉄酸(III)カリウムは和光純薬製である。測定における支持電解質は、リン酸二水素カリウム (0.1 M) と水酸化ナトリウム (0.1 M) から成る 0.1 M 酢酸緩衝液であった。使われた試薬は分析グレードを用いた。

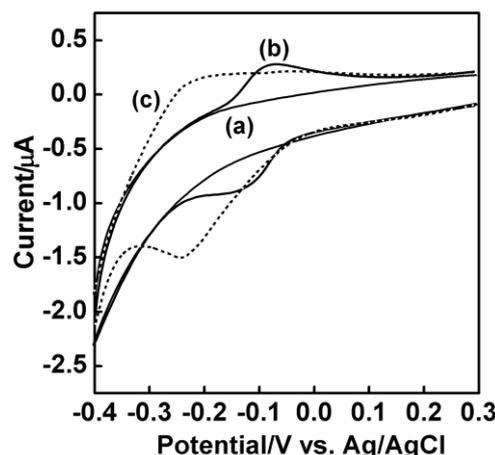
2.3 ボルタンメトリーによる測定

ヘキサアンミンルテニウム(III)の測定では電位を +0.3 から -0.4 V の範囲で変化させてサイクリックボルタモグラムを記録した(掃引速度 50 mV/s)。また、ヘキサシアノ鉄酸(III)については、+0.6 から -0.2 V の範囲でサイクリックボルタンメトリーを用い測定を行った。ホスビチンのセンシングに関しては、0.1 M 酢酸緩衝液にホスビチンを添加し、10 分間攪拌した後に酸化還元応答を測定した。

3 結果・考察

3.1 ヘキサアンミンルテニウム(III)とホスビチンとのボルタモグラム

ヘキサアンミンルテニウム(III)はリン酸基と相互作用することが報告されており¹⁶⁾, 可逆性が高くボルタンメトリーの測定をする際には優れた電気化学的マーカーとである。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.2) に 3.0×10^{-5} M ヘキサアンミンルテニウム(III)を添加した場合、-0.14 V に 3 価から 2 価の還元波、そして -0.07 V にその酸化波が認められた (Fig. 1)。一方、 5.0×10^{-8} M ホスビチンを共存させると、上記の酸化還元波のピーク電流値は減少した。それに対して、-0.25 V および -0.22 V に新たなピークが現れた。ヘキサアンミンルテニウム(III)自体の酸化還元ピークとホスビチンの添加に基づく酸化還元波は、ホスビチンの濃度を 2.0×10^{-9} M とした場合、両酸化還元波が観察されている。また、ホスビチン

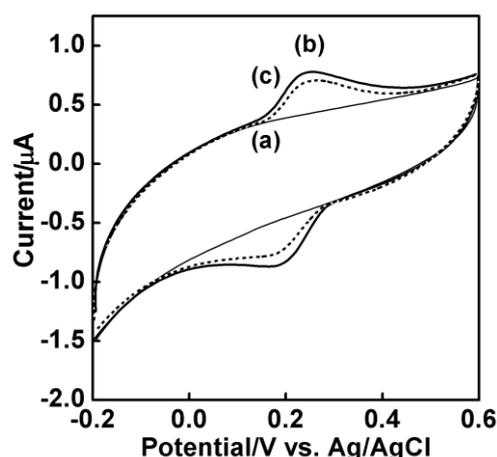


を単独で酢酸緩衝液に加えても、先のピークは現れないことも確認している。それゆえ、これらのピークの出現はホ Fig. 1 Cyclic voltammograms of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ and phosvitin using a glassy carbon electrode. (a) Blank, (b) 3.0×10^{-5} M $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, (c) (b) + 5.0×10^{-8} M Phosvitin. Measurements were carried out after potential was applied for 10 min at 0.3 V in 0.1 M acetate buffer (pH 3.2).

スピチンとヘキサアンミンルテニウム(III)とが相互作用して生成した錯体由来であると推測される。

3.2 ヘキサシアノ鉄酸(III)とホスビチンとのボルタモグラム

ホスビチンは鉄を含有するタンパク質であり鉄イオンとの結合も強いことが明らかであるため、酸化還元応答を有するヘキサシアノ鉄酸(III)を用いボルタモグラ Fig. 2 Cyclic voltammograms of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ and



phosvitin using a glassy carbon electrode. (a) Blank, (b) 3.0×10^{-5} M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, (c) (b) + 5.0×10^{-8} M Phosvitin. Measurements were carried out after potential was applied for 10 min at 0.3 V in 0.1

M acetate buffer (pH 3.2).

ムを記録した (Fig. 2). ヘキサシアノ鉄酸 (III) の濃度を 3.0×10^{-5} M とし, 0.6 V 電位を 10 分間かけ電位を掃引したところ, 鉄の還元ピークは 0.2 V に, 酸化ピークは 0.22 V にそれぞれ出現した. 5.0×10^{-8} M のホスビチンを共存させると, 酸化波および還元波共にピークの減少が見られた. それゆえ, ホスビチンはヘキサシアノ鉄酸イオンと相互作用することが示唆された. その電極応答は, 5.0×10^{-8} - 5.0×10^{-7} M で直線的に減少した. しかしながら, ヘキサシアノ鉄酸 (III) では新たなピークは確認できなかったため, ヘキサアンミンルテニウム (III) を用い, ホスビチンのセンシングを行うこととした.

3・3 pH に依存したホスビチンの構造

ヘキサアンミンルテニウム (III)-ホスビチン錯体の形成には pH の効果が関与している. Chang らは, ホスビチンの構造は, pH 3.0 から 3.6 において β -シート > β -ターンであるが, pH が増加すると β -シート < β -ターンとなることを報告している¹⁷⁾. 先の測定に用いた酢酸緩衝液において pH 4.5 として 5.5 とすると 3.0×10^{-5} M ヘキサアンミンルテニウム (III) と 5.0×10^{-8} M ホスビチンを含む pH 4.5 での新たなピークは pH 3.2 で得られた電流値の 50% 程度であった. pH 5.5 では, ルテニウム錯体に基づくピークは減少するものの, pH 3.2 で観察されたピークは認められなかった. この結果からも pH によりホスビチンの構造が変化し, 電極応答に影響することが明確となった.

3・4 ヘキサアンミンルテニウム (III) の電極応答に対するリンタンパク質および単純タンパク質の影響

ホスビチン-ルテニウム錯体との結合により新たな酸化還元応答が出現したかどうかを確認するために, リンタンパク質である 5.0×10^{-8} M α -カゼインおよびオボアルブミンと 3.0×10^{-5} M ヘキサアンミンルテニウム (III) をインキュベーションした後にボルタモグラムを記録した. それに対して, リン酸基をもたない単純タンパク質である牛血清アルブミン (BSA) とコンカナバリン A を用い同じ濃度で測定した. α -カゼインそして OVA ではルテニウム錯体の還元波電流値はタンパク質を含まない時に比較しそれぞれ 52% と 78% になった. それらの濃度を 5.0×10^{-9} M とした時には電流値の減少は認められなかった. この理由はホスビチンのリン酸化率は 57.5% であり, ルテニウム錯体との結合力は強いことに起因する. それゆえ, ホスビチンの検出感度が高いことがわかる. 一方, BSA とコンカナバリン A では, 電流

Table 1 Ratio of the peak current for $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ with and without protein.

Protein	Ratio*
α -Casein	52
Concanavalin A	100
Bovine serum albumin	100
Ovalbumin	78

$$^* \text{Ratio} = \frac{\text{Peak current of } [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} \text{ with protein}}{\text{Peak current of } [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}} \times 100$$

値の変化は認められないため, ホスビチンのリン酸基とヘキサアンミンルテニウム (III) との錯形成が関与していると考えられる.

3・5 ヘキサアンミンルテニウム (III)-ホスビチン複合体の電極応答を利用したホスビチンセンシング

新たに出現した 3.0×10^{-5} M ヘキサアンミンルテニウム (III) を 0.1 M 酢酸緩衝液に添加しルテニウム (III)-ホスビチン錯体の電極応答を使ってホスビチンの検量線を作成した.

Fig. 3 Calibration curve of phosvitin using oxidation peak of ruthenium (III)-phosvitin complex.

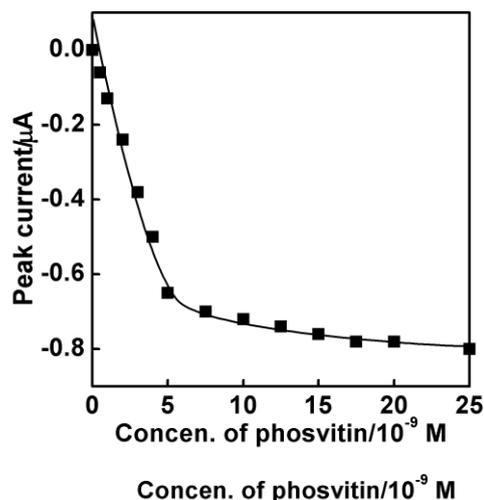


Fig. 4 Calibration curve of phosvitin using reduction peak of ruthenium (III)-phosvitin complex.

Fig. 3 に, その酸化波における電流値の変化を示した. その直線範囲は, 3.0×10^{-9} - 1.0×10^{-8} M であった. それに対して, 還元波に基づいた検量線は, 5.0×10^{-10} - 5.0×10^{-9} M となっており酸化波応答に比較し高感度であり測定範囲が広域であった (Fig. 4). ルテニウムとホスビチンの相互作用を利用したホスビチンのセンシングにはルテニウム (III) が効果的であることが明らかとなった. ホスビチンの濃度を 5.0×10^{-9} M とした $n=5$ の相対標準偏差は 6.3% であった. また, ホスビチンの標準偏差の 3 倍から見積もられた検出限界は 3.0×10^{-10} M になった.

3.6 ホスビチン-ヘキサアンミンルテニウム (III) 錯体生成に基づく電極反応

電極表面で起こる新たなピークが出現するメカニズムを Fig. 5 に示す。酢酸緩衝液にヘキサアンミンルテニウムイオンのみに加え、ホスピチンとインキュベーションするとルテニウム(III)イオンとホスピチンは錯体を形成する。その際には、ホスピチンの構造変化が起こるため疎水的性質が高まることが予想される。また、ホスピチンが有するリン酸基との錯形成によりアンモニア配位子が置換されルテニウム(III)–ホスピチン複合体が生じることで新たな酸化還元波が出現することが示唆される。このときルテニウム(III)–ホスピチン複合体は電極に吸着しルテニウム(III)に基づいた電極応答が得られている。

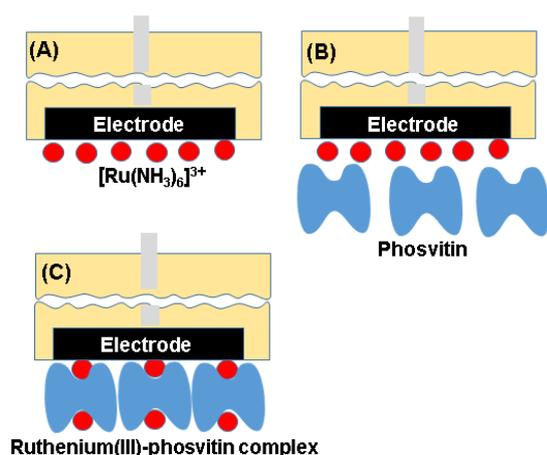


Fig. 5 Mechanism of a new peak due to binding between ruthenium(III) and phosvitin.

(A) [Ru (NH₃)₆]³⁺ alone, (B) [Ru (NH₃)₆]³⁺ + Phosvitin, (C) Formation of Ru(III)-phosvitin complex.

4 まとめ

ヘキサアンミンルテニウム(III)を用いてボルタンメトリーにより測定を行ったところ、ホスピチンとの錯体形成に基づく新たな還元波が出現することが見出された。そのピークは、ホスピチンの濃度の増加に伴って増加するため、ホスピチンセンシングに適用することができる。ホスピチンは、カゼインやオボアルブミンに比較してリン酸基の含有数が多く、ヘキサアンミンルテニウム(III)との相互作用により疎水的性質を示すようになる。このヘキサアンミンルテニウム(III)とホスピチンの錯体は電極に吸着し、錯体のルテニウム(III)が還元されることが推測される。このコンセプトはホスピチンを選択的に検出するための修飾電極の作製に応用できるものであり迅速で簡便なセンサとなる。

参考文献

- 1) B. M. Byrne, A. D. Van het Schip, J. A. M. Van de Klundert, A. C. Arnberg, M. Gruber and A. B. Geert, *Biochem.* 23, 4275 (1984).
- 2) R. L. Brockbank and H. J. Vogel, *Biochem.* 12, 5574 (1990).

- 3) 小野伴忠, 蛋白質核酸酵素, 34, 1351 (1989).
- 4) K. Grizzuti and G. E. Perlmann, *J. Biol. Chem.* 245, 2573 (1970).
- 5) G. Tarborsky, *Adv. Inorg. Biochem.* 5, 235 (1983).
- 6) C. Belhommea, E. David-Brianda, C. Guérin-Dubiardb, V. Viéc and M. Antona, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 63, 12 (2008).
- 7) K. Grizzuti and G.E. Perlmann. *Biochem.* 12, 4399 (1973).
- 8) H. J. Watzke, *Trends Food Sci. Tech.* 9, 320 (1998).
- 9) J. Ren, Q. Li, M. Offengenden and J. Wu, *J. Funct. Food*, 18, 190 (2015).
- 10) S. Hamajima, M. Maruyama, T. Hijiya, H. Hatta and Y. Abiko, *Arch. Oral. Biol.* 52, 697 (2007).
- 11) D. Young, F. Nau, M. Pasco and Y. Mine, *J. Agric. Food Chem.* 59, 9207 (2011).
- 12) K. Erdmann, B. W. Y. Cheung, H. Schröder, *J. Nutr. Biochem.* 19, 643 (2008).
- 13) Y. Mineal and J. Kovacs-Nolana, *Worlds Poult. Sci. J.* 62, 87 (2006).
- 14) S. C. K. Chiu and D. D. Kitts, *Nutraceutical beverages: Chemistry, nutrition and health effects* (2004), Oxford Press, p. 279.
- 15) S. Ishikawa, Y. Yano, K. Arihara and M. Itoh, *Biosci. Biotech. Biochem.* 68, 1324 (2004).
- 16) A. B. Steel, T. M. Herne and M. J. Tarlov, *Anal. Chem.* 70, 4670 (1998).
- 17) C. T. Chang, C. S. C. Wu and J. T. Yang, *Anal. Biochem.* 91, 13 (1978).