

ノ ー ト

キレート剤を包埋したリポソームを用いる
金属イオンの増幅定量

片岡正光**, 滝浪雅夫, 阿部浩久, 梅澤喜夫®*

(1990年6月22日受理)

1 緒 言

生体のイオンチャンネルはホルモンや神経系などに存在し、生体を維持していくうえで極めて重要な役割を演じている。生体膜におけるこれらのチャンネルのユニークな点は、基質の選択的な認識とそれに続く情報の増幅がチャンネルスイッチングにより達成されていることである。著者らはこのようなコンセプトを利用したセンサーの開発を手掛け、リポソーム上で起こる抗原/抗体/補体反応を利用したイムノセンサーを開発¹⁾²⁾した。又、ニュートラルキャリアーや大環状ポリアミン、シクロデキストリンポリアミンを包埋した LB (Langmuir-Blodgett) 累積膜を感応膜としたイオンチャンネル型センサー³⁾⁴⁾も報告した。

今回、脂溶性の高いバソフェナントロリンをはじめとするキレート剤を脂質二分子膜中に包埋したリポソームが、外側の膜表面で金属イオンとキレート剤とが選択的に錯体を形成することにより、膜の陰イオン透過性が急激に増大することを見いだした。このことを利用して増幅を伴う金属イオンの定量法の試みを行った。

2 実 験

2.1 試 薬

リポソーム調製用試薬として、日本精化製ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) と Sigma 製コレステロール (Chol) を、キレート剤として同仁化学研究所製 4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン (BPhen), 2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-ジエチルアミノフェノール (5-Br-PADAP), 3-(2-ピリジル)-5,6-ジフ

ェニル-1,2,4-トリアジン (PDT) 及び 4,4'-ジオクタデシル-2,2'-ジピリジル (DODP) をそのまま用いた。又試料溶液の pH の調整には、半井化学薬品製 N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) を用いた。金属イオン溶液は和光純薬工業製の特級塩化銅、塩化コバルト及び塩化ニッケルを用いて調製した。その他の試薬はすべて和光純薬工業製の特級試薬を用いた。試料溶液は Milli-Q 水 (比抵抗 17.5 MΩ 以上) を用いて調製した。

2.2 装 置

リポソームの調製には東京理化工器製ロータリーエバポレーター N 型, Scientific Industries 製ボルテックスミキサー及びトミー精工冷却遠心分離装置 RS-18 IVS を用いた。電位差の測定は東亜電波工業製ポテンシオメーター HM-18E に理化電機記録計 R-01 を接続して行った。又電極としては、フッ化物イオン選択性電極としてナショナル IE-510102 を、参照電極としては電気化学計器製ダブルジャンクション型銀-塩化銀電極 4083-1 型を、薄層ポテンシオメトリーによる測定では参照電極として 80×50×2 mm の表面を塩化銀で被覆した銀板を用いた。

2.3 実験操作

2.3.1 リポソームの調製 本実験で用いたリポソームは、ナシ型フラスコに 25 mM DPPC, 50 mM Chol 及び 10 mM BPhen のクロロホルム溶液をそれぞれ 200, 100, 50 μl 加え、内水層溶液を 0.5 M フッ化ナトリウム溶液として常法²⁾⁵⁾により調製した。

2.3.2 測定 リポソームから外部水層に輸送されたフッ化物イオン量はフッ化物イオン選択性電極を用い、少量のリポソームで一連の実験を行うため試料量 30 μl の薄層ポテンシオメトリー⁶⁾で測定した。ただ

* 北海道大学理学部化学科:060 北海道札幌市北区北10条西8丁目

** 現在 小樽商科大学商学部:047 北海道小樽市緑3-5-21

し、pHの影響の実験においては、通常の測定法(試料量 2.5 ml)を適用した。前者では、遠心分離したリポソームを 0.5 M NaCl 溶液 1 ml にボルテックスミキサーで懸濁し、その一定量を分取して測定溶液に加えた時間を 0 分とし、10 分後に 30 μ l 分取して銀-塩化銀参照電極板上に置き、フッ化物イオン選択性電極で挟み込むようにして 1 分後の電位を読みとった。この後懸濁液に金属イオンを 10^{-6} ~ 10^{-3} M になるように添加し、溶液をかき混ぜ、10 分ごとに 30 μ l を分取して銀-塩化銀参照電極板上に置き、1 分後の電位を測定した。なお薄層ポテンシメトリーでは、試料溶液-参照電極間の電位を常に一定とするよう試料溶液中の塩化物イオン濃度が 0.5 M となるように注意した。後者では、溶液をかき混ぜながら金属イオン溶液を加えてリポソーム内胞からのフッ化物イオンの輸送をモニターした。

3 結果と考察

3.1 pH の影響

キレート剤として BPhen を用い、リポソームからのマーカーイオンの輸送の pH 依存性について検討した。外部溶液は 0.5 M 塩化ナトリウムを含む pH 3~7 の 0.1 M HEPES 緩衝液とした。Fig. 1 に示すように、マーカーイオンのリポソームからの漏れは pH が高くなるに従って増加するが、金属イオンとして Cu^{2+} を

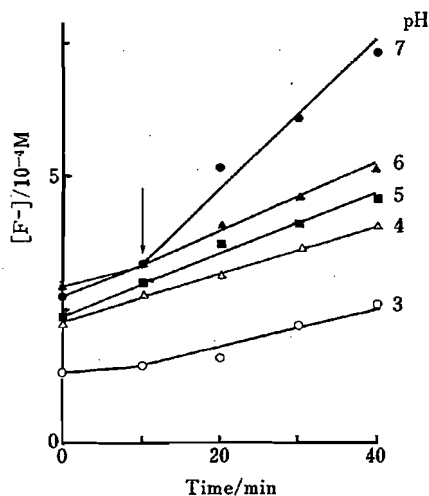


Fig. 1 Effect of pH on fluoride release from the liposome

Chelating agent: 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline; Metal ion: 10^{-3} M Cu^{2+} . pH values of the sample solutions were adjusted with 0.01 M HEPES buffer. An arrow shows the injection of a metal ion solution.

10^{-3} M になるように添加した後の輸送の増加は pH 7 で最大であった。これは pH の上昇に伴って、キレート剤の Cu^{2+} イオンに対する錯形成能が増大するためと考えられる。しかし溶液の pH が 7 より大きくなると Cu^{2+} イオンが水酸化物を作り沈殿する⁷⁾。又他のキレート剤を用いた場合についても同様の結果が得られたので、以後の実験は pH 7.0 で行うこととした。

3.2 検量線の作成と増幅度の測定

マーカーであるフッ化物イオンのリポソーム内水層か

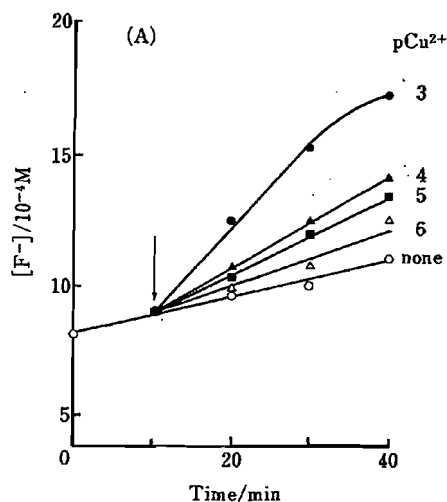


Fig. 2(A) Effect of Cu^{2+} ion concentration on the fluoride release from the liposome

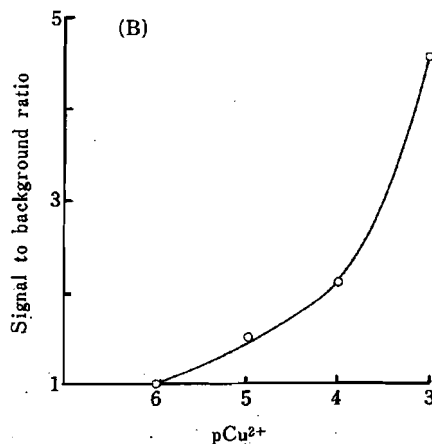


Fig. 2(B) Calibration curve for Cu^{2+} ion

Chelating agent: 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. pH values of the sample solutions were adjusted to 7.0 with 0.01 M HEPES buffer. An arrow shows the injection of a metal ion solution.

ら外部溶液への輸送の被分析金属イオン濃度に対する依存性を薄層ポテンシメトリーによって測定した結果を Fig. 2(A) に示す。被分析金属イオンが外部水層に添加されるとリポソーム上で錯形成反応が起き、脂質二分子膜での金属キレート化合物の生成により膜の構造が乱れ、内水層に封入されているフッ化ナトリウムの透過性が増大する。又フッ化物イオンは、リポソーム膜内の銅錯体陽イオンがキャリアとなって外部水層の塩化物イオンと交換され輸送されることも考えられるが、むしろ前者のほうの可能性が大きいと思われる。金属イオン濃度 0 でのマーカーの輸送量を測定し、これをバックグラウンド (G) とし、金属イオン添加後の輸送量をそれぞれの金属イオン濃度で求め、これを信号 (S) として S/G を縦軸に、金属イオン濃度の対数を横軸として検量線を作成した [Fig. 2(B)]。その結果 Cu^{2+} イオン濃度が 10^{-6} M では S/G の値はほとんど 1 であり応答はないが 10^{-5} ~ 10^{-3} M の範囲でその濃度の増加に伴って上昇した。リポソーム調製から定量までの再現性について検討したが、 Cu^{2+} イオン濃度 2×10^{-2} M でのフッ化物イオンの輸送量は $(1.82 \pm 1.29) \times 10^{-5}$ M/min ($n=3$, 95% 信頼限界) であった。信頼限界が比較的大きいのは、リポソーム調製の収率を一定に保つことが困難であることが大きな原因であると考えられる。リポソームから外部試料溶液中に輸送されたフッ化物イオンの数 (から試験値を差し引いた数)/外部溶液中の金属イオンの数を増幅度と定義したときの、各キレート系の増幅度と共に検出下限、選択性を Table 1 に示す。本センサーの最大増幅度は、5-Br-PADAP を用いたとき 25.8 であった。

3.3 選択性

キレート剤である 5-Br-PADAP と錯体を形成する Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} を試料金属イオンとして用い、

マーカーのリポソーム内水層からの輸送量を測定した結果を Fig. 3 に示す。HEPES 緩衝溶液 pH 7 の条件では、 Cu^{2+} イオンの応答が一番強く、以下 Co^{2+} , Ni^{2+} の順であった。被分析金属イオン間の選択性は、外部試料溶液中の金属イオン濃度がそれぞれ 10^{-3} M になるように添加したとき、10 分間に輸送されたフッ化物イオンの数の比から計算した。結果を Table 1 にまとめて示す。選択性と各キレート剤の金属イオンに対する安定度定数との相関は Irving-Williams 規制によれば、同

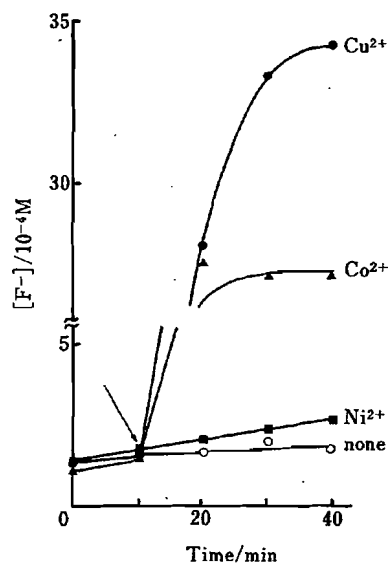


Fig. 3 Selectivity for F^- ion release upon interaction of the membrane receptor (chelating agent) with different metal ions (see text)

Chelating agent: 5-Br-PADAP; Metal ion concentration: 10^{-3} M. pH values of the sample solutions were adjusted to 7.0 with 0.01 M HEPES buffer. An arrow shows the injection of a metal ion solution.

Table 1 Summaries for detection limit, selectivity and amplification factor of the present method

Chelating agent	Metal ion ^{a)}	Detection limit/M	Selectivity ^{b)}			Amp. factor ^{c)}
			Cu^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	
Bphen	Cu^{2+}	10^{-5}	1	0.26	0.13	7.7
5-Br-PADAP	Cu^{2+}	10^{-5}	1	0.96	0.01	25.8
PDT	Cu^{2+}	—	1	0.06	0	—
DODP	Cu^{2+}	—	1	0	0	—

a) concentration of metal ion: 10^{-3} M; b) selectivity: the ratio of the number of F^- ions released from the liposome membrane by adding different metal ions; c) amplification factor: the number of F^- ion released from the liposome membrane/the number of Cu^{2+} ion in the outer sample solution (10^{-3} M, 30 μl volume)

じ配位状態の場合、 Cu^{2+} 錯体が最も安定で $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ の順となるが、得られた選択係数の序列は Cu^{2+} はよいとして Ni^{2+} と Co^{2+} が逆転している。この理由は速度論的因子、膜界面での配位数の違いなどが考えられる。

文 献

- 1) Y. Umezawa, S. Sofue, Y. Takamoto: *Talanta*, **31**, 375 (1984).
- 2) H. Abe, M. Kataoka, T. Yasuda, Y. Umezawa: *Anal. Sci.*, **2**, 523 (1986).
- 3) M. Sugawara, K. Kojima, H. Sazawa, Y. Umezawa: *Anal. Chem.*, **59**, 2842 (1987).
- 4) S. Nagase, M. Kataoka, R. Komatsu, R. Nagawawa, K. Odashima, Y. Umezawa: *Anal. Chem.*, **62**, 1252 (1990).
- 5) 保田立二, 内藤祐子, 多田隈卓史: “免疫実験操作法”, IX, 2989 (1980).
- 6) 梅澤喜夫, 藤原鎮男: 日化, **1980**, 1437.
- 7) A. Ringbom: “*Complexation in Analytical Chemistry*”, Table A.5 (1963), (Interscience Publishers, New York, London).



Amplified determination of metal ions with liposomes incorporating hydrophobic chelating agents. Masamitsu KATAOKA[†], Masao TAKINAMI, Hirohisa ABE and Yoshio UMEZAWA (Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Kita 10, Nishi 8, Kita-ku,

Sapporo-shi, Hokkaido 060; [†]Present address: Otaru University of Commerce, Midori 3-5-21, Otaru-shi, Hokkaido 047)

Potentiometric determination of metal ions with liposomes incorporating hydrophobic chelating agents is presented. Thin layer potentiometry was used to monitor fluoride ion release from the multilamellar liposome. Several kinds of chelating agents such as 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline (BPhen), 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol(5-Br-PADAP), 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine (PDT) and 4,4'-dioctadecyl-2,2'-dipyridyl(DODP) were incorporated into the lipid bilayer of liposome membranes as selective metal ion receptors for Cu^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} . Chelating agents acted as carriers which enabled fluoride ions transport through the bilayer membrane by forming ion-pairs with positively charged metal ion complexes. Released fluoride (F^-) ions from the liposomes were monitored by a F^- ion selective electrode. The maximum amplification factor of the present assay, defined as the ratio of the number of F^- ions released from the liposome membrane to that of metal ions in the outer sample solution (30 μl volume), was found to be 25.8 by using 5-Br-PADAP as a receptor and Cu^{2+} as an analyte ion.

(Received June 22, 1990)

Keyword phrases

potentiometric sensor, determination of metal ions, liposomes incorporating hydrophobic chelates, amplification.