

新規蛍光プローブによる環境試料および生体試料中の 重金属イオンの超高感度電気泳動法の開発

Ultrasesitive Detection of Heavy Metal Ions in Environmental and Biological Samples by
Capillary and Gel Electrophoresis Using Novel Fluorescence Probes

齋藤 伸吾

Shingo SAITO

現在の分析技術をもってしても、多量の妨害物質を含む試料中の微量物質の検出や化学物質のスペシエーション(化学種同定)などは困難な課題となっている。本研究では、水溶液中の重金属イオンをターゲットとして、超高感度・迅速・簡便・少試料量・省エネルギー・ロバストな電気泳動-蛍光検出法を構築した。これを達成するために、重金属イオンの錯体化による蛍光ラベル化可能な配位子群(蛍光プローブ)を開発し、その金属錯体を高度分離する電気泳動分離場も併せて開発した。これによって、環境水、生体試料、使用済み核燃料中の重金属イオンの超高感度検出法および生体試料中のタンパク結合型重金属イオンのスペシエーション法の開発に成功した。

Ultratrace detection and speciation of trace heavy metal ions in small-volume samples containing a lot of interfering substances with low energy cost, rapidity and robustness is very difficult. In this study, a series of capillary and gel electrophoresis-fluorescence detection methods was developed using novel fluorescent metal probes, which fluorescently labeled target metal ions via complexing. The metal-probe complexes were successfully separated from the free probe and interfering ions, to be detected in ppt levels. Using these probes, determination methods for heavy metal ions in environmental, biological and nuclear spent fuel samples, and a speciation method for protein-bound copper ions in human serum were established.

はじめに

水溶液試料中の重金属イオンの計測法は、機器分析法などによってほぼ確立されているとあって良い。しかし、様々な共存物を含む高マトリクス試料中の微量金属イオンの測定には、未だ様々な課題が存在する。例えば、放射性廃棄物中の重金属イオンの分析では、機器測定の前に煩雑な化学分離操作により、マトリクスとの分離を必要とする場合が多い。また、被ばくを避けるために微小試料量中の超微量検出が望まれているが、これらを達成している方法は現存しない。さらに、生体試料に関しては、生命活動に深く関わっている微量金属イオンの化学形態を分析する手法は確立されていない。この様に、従来の分析法では対処できない試料が未だ数多く存在する。

一方、本研究では電気泳動法に着目した。電気泳動法とは、分離場(キャピラリー内の自由溶液中やゲル中)に導入した微小な溶液試料($n \sim \mu\text{L}$ レベル)に外部から高電場を印加し、分子を電氣的に泳動(移動)させ、その泳動速度の違いにより、物質同士を分離する手法である(**Figure 1**)。50~100 μm の溶融シリカ細管中で電気泳動を行うキャピラリー電気泳動法(CE)やゲル中で泳動を行うポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)は、少試料量かつ非常に高い分離能を有することが知られている。ここで紹介する一連の研究では、これら電気泳動法によって金属イオンを分離し、かつ高感度に測定する技術の開発を試みた。特に、高感度な蛍光検出法を適用することで、超高感度・省エネルギー・少試料・ロバストな重金属イオンの分析法を開発することを着想した。しか

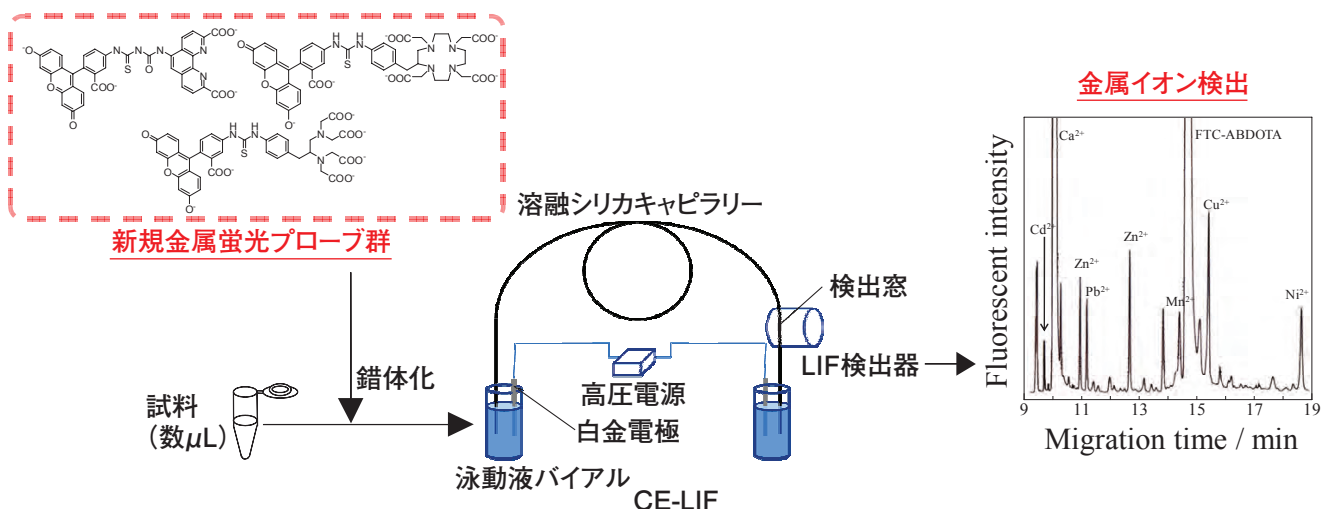


Figure 1 本研究におけるキャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光検出法(CE-LIF)の概念図
右泳動図：蛍光プローブL8(Figure 2)を用いた河川水中の重金属イオンの分析例

し、本研究以前に、電気泳動-蛍光検出法で重金属イオンの超高感度な分離検出に成功した例はない。これは、以下に示す問題のためである。

1. 多くの重金属イオンは発蛍光性を有していない。そこで、発光させるために蛍光団を有する有機配位子(蛍光プローブ)と錯体を形成させることが望ましいが、重金属イオンの多くは常磁性消光や重原子効果を有するため、蛍光プローブ由来の発光を消光してしまい、蛍光検出の適用が不可能である。
2. 重金属イオンを錯体化することはいわゆる金属イオンの蛍光ラベル化とも言えるが、金属イオンと配位子の結合は配位結合によるものであり、通常の有機物の蛍光ラベル化で用いられる共有結合に比べて結合が弱い。従って、ラベル化錯体が電気泳動中に解離(分解)してしまう場合が多い。よって、目的の金属錯体が解離不活性になる(解離速度が遅く、泳動時間内に分解しない)ように有機配位子の配位構造を工夫しなければならない。
3. 高感度化のためにプローブの蛍光団(π 電子系)を大きくすると金属イオン間の分離が困難となる。なぜなら、電気泳動では電荷とサイズの比の差異が分離原理となるが、バルキーで大きさと電荷がほぼ等しい金属-プローブ錯体同士では、その差がほとんど無くなってしまいうからである。従って、蛍光プローブ錯体群を一斉分析するためには、分離様式を工夫する必要がある(分離場の設計)。

本稿では、著者の開発してきた電気泳動法用の金属蛍光プローブ分子とそれらを基盤とした超微量金属イオンの分離検出法を紹介する^[1]。特に使用済み核燃料、環境試料、生体試料などの高マトリクス試料中の重金属イオンのCE-レーザー励起蛍光検出法(LIF)による検出と、生体中金属イオンのスペシエーション(生体中金属イオンがどのタンパク質に結合しているか)を可能とするPAGEについて概観する。

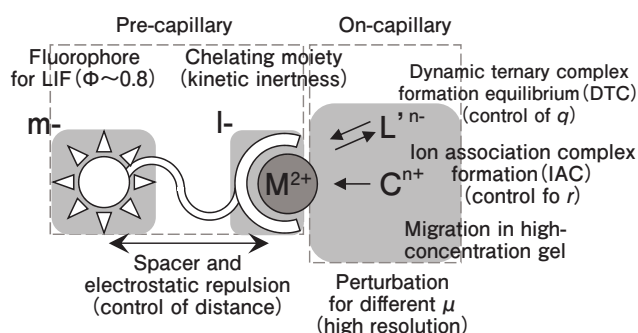
蛍光プローブの分子設計

電気泳動法に適合した金属蛍光プローブ分子の設計の概念図および実際に設計し合成した蛍光プローブL1~L8をFigure 2に示す。前述したように、重金属イオンの蛍光プローブ錯体を高効率に発光させることができれば、超高感度検出が可能となる。そこで、量子収率 ϕ の高い蛍光団を選択する必要がある。ここでは $\phi \sim 0.8$ であることが知られるフルオレセイン骨格を選択した。錯形成に伴う常磁性消光に関しては、作用機序は分子内エネルギー移動あるいは電荷移動機構であるとされるが、これらは共に距離に大きく依存することが分かっている。また、重原子効果は重原子とのスピン-軌道相互作用によって系間交差の遷移確率が上がることに起因しており、やはりプローブ錯体内での蛍光団と重金属との距離が問題となる。そこで、蛍光団と錯形成部位の間にスペーサを導入すると共に、両部位を負電荷に帯電させることで静電反発を生じさせ、両部位が溶液中で十分に離れるように分子設計した。実際に蛍光団と錯形成部位の距離を調

整したプローブの重金属錯体群の発光挙動を調査した結果、10~12 Å以上離れば、消光効果を抑制できることを発見しており、これを満たすプローブを設計した^[1-3]。また、錯形成部位に関しては、様々な化学構造(非環状あるいは大環状型の4~8座)のポリアミノカルボン酸(PAC)配位骨格を選択した。PACは様々な金属イオンと解離不活性な錯体を形成することが知られており、解離活性な(分解しやすい)錯体を形成しやすいことが知られるランタノイド(Ln)やアクチノイド(An)イオンでさえも蛍光プローブによるラベル化が期待できる^[4]。

CE-LIFによる高マトリクス試料中の重金属イオンの測定

Figure 2に示す蛍光プローブをCE-LIFに導入した。しか



し、前述したように電荷と分子サイズがほぼ等しい金属-プローブ錯体群を分離するのは困難であった。そこで、泳動場に第二の錯平衡を導入することを考えた。すなわち、解離不活性な母錯体(目的金属-プローブ錯体)に、第二の配位子を添加することにより動的錯平衡を付与し、母錯体の有効電荷を制御する方法である(動的三元錯体平衡分離(DTC)モード)(Figure 2)。これは金属イオンの第一配位圏に、蛍光ラベル化機能と分離機能の両方を与えるユニークな分離法といえる。これまで三元錯体平衡を利用した分離手法の報告は少ないため、DTCモードは従来にない分離選択性が期待できる。さらに様々な分離試薬を用いることができることも利点である。例えば、L2を母錯体として用い、水酸化物イオンを三元錯体形成試薬として用いると、第一遷移金属イオンの一斉分離が可能であり、河川水やヒト血清といった実試料中のMn²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺の超高感度検出(10⁻¹¹ Mレベル、絶対感度zmol)が可能であった^[5]。また、一般的に解離活性な錯体を形成しやすく、かつ蛍光ラベル化が困難であったLnイオン群に対しても本法は有効である。Lnイオンは一般に8~10座配位を取ることが知られているが、ここでは配位不飽和な6座配位子のL2およびL3を用いることで意図的に残余配位座を作り出した。Ln³⁺-L1および-L2錯体はイミノ二酢酸、クエン酸、炭酸および水酸化物イオンがDTC分離に有効であった^[6-8]。さらに、用

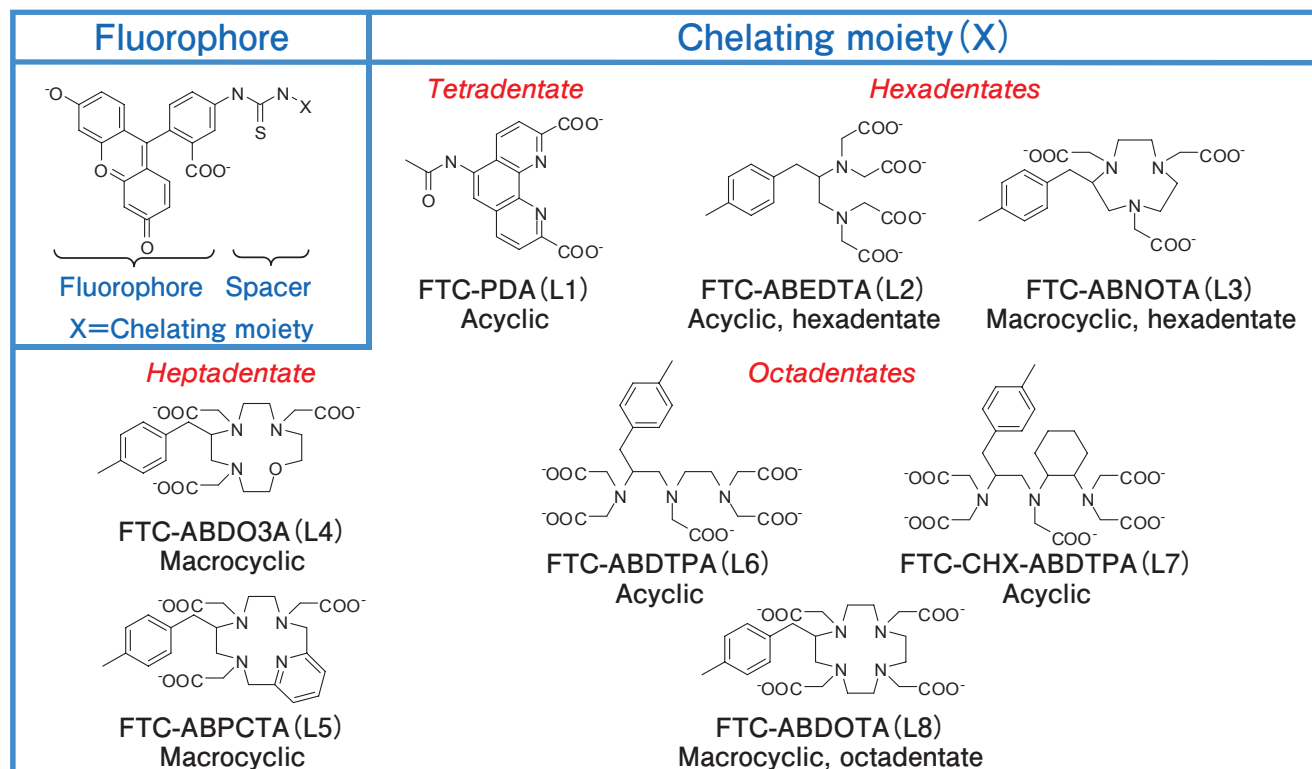


Figure 2 電気泳動法に適した金属蛍光プローブの設計(上図)と実際に合成したプローブ群(下図)

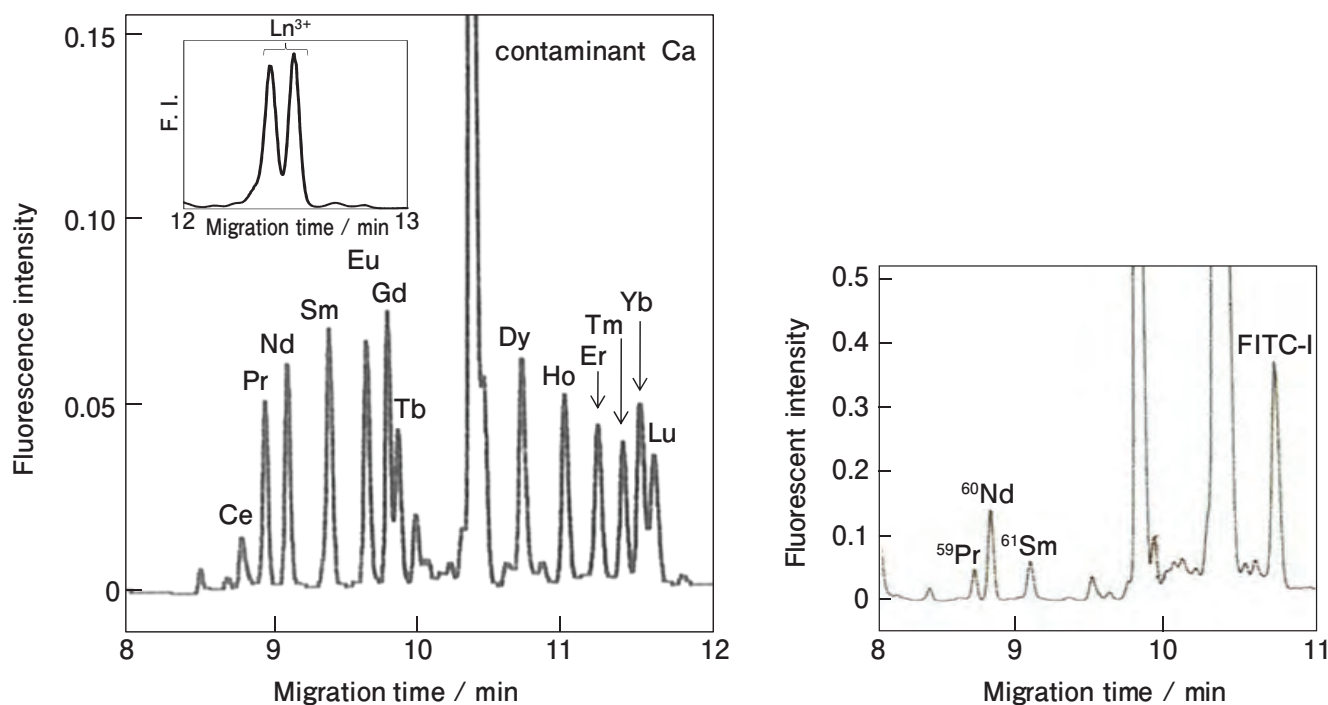


Figure 3 Ln-L3錯体のCE-LIF

左)水酸化イオンを三元錯体形成試薬とした時の泳動図

挿入図:三元錯体形成試薬を添加しない時の泳動図

右)使用済み核燃料模擬試料の泳動図

いる三元錯体形成試薬の種類により金属イオンの検出順が変化し、分離選択性を制御できることも分かった。例として Ln^{3+} -L3錯体の泳動図を示す(Figure 3)。一般的なCE-LIFでは一本のピークである Ln^{3+} がDTCモードでは高分離が達成されている^[9]。ここでは Nd^{3+} に対して分離の最適化を行っている。使用済み核燃料試料中のNdイオンの測定は、試料中Nd濃度から燃焼率を見積もるために重要であることが知られる。従来法では高レベルの線量を有する溶解試料を大量に使うため、被ばくリスクが高い。本法では、10 μL 程度の試料さえあれば、高速に計測でき、さらに遠隔操作も可能なため、非常に安全な方法として期待できる。実際に本法を使用済み核燃料に適用した場合、10分程度でNdの測定が可能であることを確かめている(Figure 3)。

もう一つのCE-LIFによる金属蛍光プローブ錯体の新規分離様式は、分子形状の差異を利用したものである。L6およびL8を用いた時、泳動場にポリブレンなどのカチオン性ポリマーを添加すると、カチオン性ポリマー-プローブ錯体のイオン会合複合体が生成する。その複合体の立体構造が金属イオンによってそれぞれ大きく異なることが円二色性スペクトル測定から明らかとなった。そして、この立体構造の差異が電気移動度の違いとなり、金属間的高分離が達成できることが分かった。この分離モード

をイオン会合複合体(IAC)分離モードと名付けた^[10]。これは、カチオン性ポリマーがプローブ錯体の形状を認識し、その分子形状の差異を増幅する分離機構であり、従来のイオン会合平衡の違いを用いる分離様式とは大きく異なる。この方法によって、多くの金属イオン(Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+})の 10^{-11} Mレベルでの一斉分離検出が可能であり、約570,000倍の Ca^{2+} や約34,000,000倍の Na^{+} の共存する血清や河川試料中の重金属の測定も可能であり、実用法として十分使用に耐えうることが分かった(Figure 1右, 泳動図)。

超微量アクチノイドイオン検出への展開

さらに近年では、CE-LIFで検出できる金属蛍光プローブの種類をAnイオン群へと拡張している。現在、放射性廃棄物を処分するためには、各廃棄体に含まれている放射性核種の種類および量を確定することが定められている。中でも長寿命放射性核種のAn(Th, U, Np, Pu, Am, Cm)の分析は重要である。これら元素の簡便・安全・高速、かつ遠隔操作が可能な方法が求められている。従来法では、試料マトリクスとの十分な分離が必要であり、前処理が非常に煩雑である。さらに、放射線被ばくを避けるためには、微小試料量中の超微量検出が必須になる。これまで、AnイオンのうちAm, NpおよびUに対して

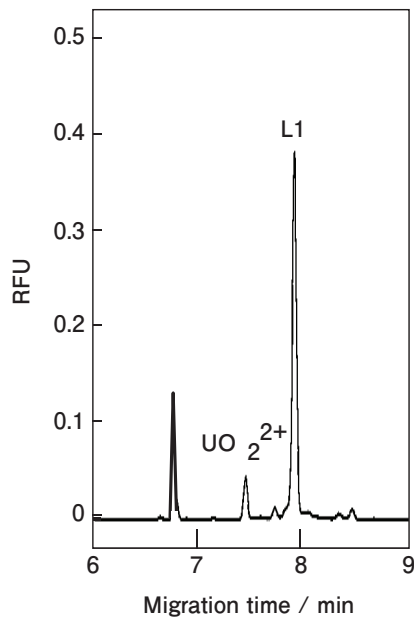


Figure 4 UO_2^{2+} -L1錯体の典型的泳動図

分離検出できる蛍光プローブの調査を進め、Amに対してはL2~L8が、Npに対してはL2およびL3を用いれば高感度検出可能であることが分かった^[11]。さらに、U(UO_2^{2+} として存在)に対してはL1だけが検出可能であり、かつ種々の金属イオンが共存していても UO_2^{2+} だけを検出することができる特異的な検出系であることが分かった(検出限界： 3.5×10^{-10} M, 絶対感度1.8 amol)(Figure 4)^[12, 13]。これは、 UO_2^{2+} が直線状の分子であるのに対し、L1の配位構造が UO_2^{2+} の酸素原子と立体反発を起こさない平面構造であり、かつU原子の周りを取り囲む4座配位構造を取るため、 UO_2^{2+} に対してだけ安定な錯体を形成するためと考えている。さらに、分子軌道計算からU=Oの π 電子とL1の π 電子が非局在化することで安定化する電子軌道が存在していることもわかった。このように種々のAnイオンに対して適した蛍光プローブの配位構造が明らかとなってきている。

PAGEによるヒト血清中の銅イオンのスペシエーション

ここまでは、CE-LIFを用いる金属イオンの蛍光プローブを見てきたが、PAGEを用いても金属イオンの分離-蛍光検出が可能である^[14]。タンパク質や核酸などの生体高分子の高効率な分離法として知られるPAGEであるが、一般に使用されていない高濃度ゲル(30~60%)を用いると金属-L8錯体が高分離できることが分かった(Figure

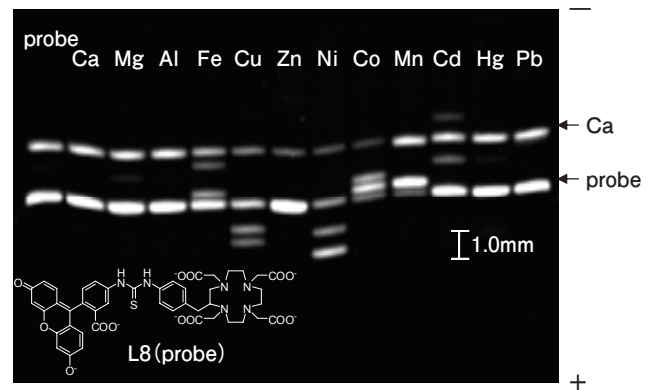


Figure 5 金属検出PAGEの典型的泳動図

5)。この分離原理は、現在のところ明らかではないが、ゲルナノ細孔中の特殊な水相(凍結結合水や不凍水)が分離に大きく関与することが示差走査熱量測定から分かっている。この金属検出PAGEの検出限界は Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} に対し 10^{-10} Mレベル(絶対感度fmolレベル)であった。また、高感度だけでなく、濃縮ゲルとの併用によってオンラインで $\sim 100 \mu\text{L}$ の試料を40倍濃縮可能である。すなわち、この手法は数十 μL 程度の試料の濃縮-分離検出法として有効に機能する。この金属検出PAGEを、通常のタンパク質のPAGEと接続することによって、「どのタンパク質にどの金属イオンがどの程度結合しているか」を測定することが可能である。Figure 6にヒト血清の典型的なタンパク質-銅イオンの電気泳動マップを示す。図中の上にある泳動図は、ゲル中から汚染金属イオンを排除したブルーネイティブ(BN)-PAGE(MICS-BN-PAGE)による分子量に基づくタンパク質の分離を示す(一次元目PAGE)。一次元目のゲル分画を切り出し、ゲル切片中の金属イオンを酸溶出した後、プローブL8で錯体化して金属検出PAGEによる定量を行った(Figure 6中の下泳動図、二次元目PAGE)。これにより、少体積の溶出液中の金属イオンを再濃縮しながら高感度検出可能である。

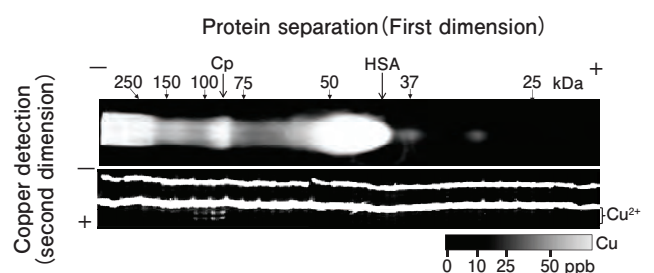


Figure 6 ヒト血清のタンパク質-銅イオン電気泳動マップ

従来のヒト血清中のCu²⁺の分布はセルロプラスミン(Cp) 65~70%, アルブミン(HSA)3~18%, その他のタンパク質が0~9%であるというのが定説である。しかし、これまでHSA結合型Cu(HSA-Cu)を定量的に回収できた報告例は無い。一方、本研究のMICS-BN-PAGE/金属検出PAGEを用いた場合、HSA結合型Cuを定量的に回収できた。すなわち、本法で計測するヒト血清中のCu分布がより正確であることを意味する。本法で得られた分布はCp-Cuが99%であり、HSA-Cuは0.1%程度であり、これまで報告されてきた分布と大きく異なる。この理由は、従来法ではCuに関する感度が足りていなかったこと、分離場の汚染Cuイオンの影響を大きく受けていたことなどが考えられ、これらの問題点を解決した本法で初めて正確なCuイオンの分布が明らかとなった。

おわりに

以上のように、電気泳動法に適合した金属蛍光プローブの開発により、従来、計測が困難あるいは危険、煩雑であった試料に対し、超高感度、簡便、迅速、省エネルギー、安全な分析法を提案することができた。さらに、正確な生体中金属イオンの分布情報も獲得可能な方法を開発した。今後は、使用済み核燃料や福島原子力発電所の事故処理で生じた高放射線量な廃棄体や汚染水中のアクチノイド(An)イオンの安全(少試料)・迅速・高感度なCE-LIFの開発を行うこと、および、水環境の重金属イオンの生体に与える影響を調査することを目的とし、微生物中のタンパク質結合型金属イオンのスペシエーションが可能なPAGEの開発を行っていく予定である。

参考文献

- [1] 齋藤伸吾, 分析化学, **60**, 773(2011)
- [2] S. Saito, J. Shimidzu, S. Hoshi, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, *J. Chromatogr. A*, **1140** 230(2007).
- [3] S. Saito, N. Danzaka, S. Hoshi, *J. Chromatogr. A*, **1104**, 140(2006)
- [4] S. Saito, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Inorg. Chem.*, **40**, 3819(2001)
- [5] S. Saito, R. Suzuki, N. Danzaka, A. Hikichi, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, *Electrophoresis*, **28**, 2448(2007)
- [6] S. Saito, S. Takeuchi, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, *Analyst*, **132**, 237(2007)
- [7] S. Saito, N. Danzaka, S. Hoshi, *Electrophoresis*, **27**, 3093(2006)
- [8] S. Saito, H. Hoshino, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1644(2004)
- [9] S. Saito, Y. Sato, T. Haraga, Y. Nakano, S. Asai, Y. Kameo, K. Takahashi, M. Shibukawa, *J. Chromatogr. A*, **1232**, 152(2012)
- [10] S. Saito, Y. Nakano, A. Hikichi, R. Suzuki, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Aoyama, M. Shibukawa, *Analyst*, **136**, 2697(2011)
- [11] T. Haraga, Y. Nakano, M. Shibukawa, Y. Kameo, K. Takahashi, S. Saito, *Proceedings of the ASME 14th International Conference on Environmental Remediation and Radioactive Waste Management(ICEM2011)*, 1(2012).
- [12] 原賀智子, 齋藤伸吾, 佐藤義行, 特願2012-34711号(2012.2.21)
- [13] T. Haraga, S. Saito, Y. Sato, US patent 13/748953(2013.1.24).
- [14] S. Saito, M. Kawashima, H. Ohshima, K. Enomoto, M. Sato, H. Yoshimura, K. Yoshimoto, M. Maeda, M. Shibukawa, *Analyst*, in press.



齋藤 伸吾

Shingo SAITO

埼玉大学大学院 理工学研究科
准教授
博士(工学)