



Title	酸化還元滴定
Author(s)	永島, 賢治
Citation	低温科学, 67, 545-550 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39190
Type	bulletin (article)
Note	4章 分光測定 4
File Information	67-075.pdf



[Instructions for use](#)

4. 酸化還元滴定

永島 賢治¹⁾

電子伝達反応の向きと速度は、供与体と受容体それぞれの電子親和性の違い、すなわち酸化還元中点電位 (E_m) の差に大きく依存する。この酸化還元中点電位を実験により求める方法として酸化還元滴定がある。本章では化学的方法による酸化還元滴定を中心に紹介する。

Redox titration for electron transfer proteins

Kenji V. P. Nagashima

Redox midpoint potential is an important factor as a determinant of the direction and the rate of electron transfer. Here, methods of titration to determine the redox midpoint potentials of electron transfer proteins are described.

4.1 はじめに

細胞内での電子伝達反応機構を調べるにあたって、電子供与体と受容体の電子の「渡し易さ」「受け取り易さ」を知ることは極めて重要なことである。この電子の授受の起こり易さを表す尺度として酸化還元電位がある。単位はボルト (V) で、定義としては標準水素電極における $H^+ + e^- \rightleftharpoons 1/2 H_2$ の反応に伴う電極電位を 0 V とした時、対象となる電子の受け渡し反応 (酸化還元反応) が示す電極電位のことで、これを標準酸化還元電位 (E_0) と呼ぶ。酸化還元反応は周囲の pH の影響を強く受けるが、実際の生体反応を考える上では pH 7 の時の E_0 を考えることがほとんどであり、この時の標準酸化還元電位は E_0' または $E_{m,7}$ あるいはさらに省略して E_m などと表現される。ちなみに pH 7 の条件下では上述の水素の酸化還元反応は -0.42 V となる。

大まかな理解としてはある電子伝達成分が pH 7 の緩衝液中で半量が酸化型、半量が還元型となっているときの電極電位 (E_h) がその成分の酸化還元能を表していると考えて差し支えない。光合成研究の論文ではこの値を酸化還元中点電位 (redox midpoint potential) と表記し、記号では E_m を使うことが多い。一般には単に酸化還元電位とだけ表記することもある。

酸化還元滴定は E_m を実験により求める手法であり、Dutton によって確立された化学的方法が広く用いられてきた¹⁾。これは目的とするサンプルを含む緩衝液に酸

化剤・還元剤を加えながら酸化還元状態を少しずつ変えていく方法で、電極を使って酸化還元電位を測定しながら分光測定を行い、サンプルの状態をモニターして E_m を求める。本章では主にこの化学的方法による酸化還元滴定の実際について解説する。また、近年では電極で直接的に酸化還元状態を制御する方法 (電気化学的方法) も用いられるようになってきているので、この事にも簡単に触れたい。

4.2 電極

酸化還元電位の測定に用いる電極は ORP 電極と銘打って市販されているもので、これは基準電極と作用電極をひとつにまとめた複合電極である。定義に従えば基準電極は水素電極とするのが自然であるが、ほとんどの製品では基準電極 (比較電極) として銀-塩化銀 (Ag/AgCl) 電極を使用している。作用電極は白金である。

ORP 電極は pH メーターに接続して使用する。たいいてい pH メーターは電極電位をそのまま mV 表示するモードを備えているのでそれを利用する。注意すべきことはこのとき表示される電位は使っている基準電極に対する電位差であることで、この値を水素電極に対する電位差に換算してやる必要がある。基準電極が銀-塩化銀電極であって、かつ電極内部液として飽和 KCl を使用し室温 (25°C) で測定する場合、水素電極に対して +197 mV の差が生じる。水銀-塩化水銀を使ったカロメル電極 (甘コウ電極) を基準電極とした場合、この差は +241 mV となる。

1) 首都大学東京 大学院 理工学研究科 生命科学専攻 細胞エネルギー研究室

4.3 測定容器

図1に執筆者らが酸化還元滴定に使用している測定容器を示す。1 cm 角のガラスキューベット上部に湾曲した液溜め部を持ち、そこに内径 18 mm の開口部がキューベットの直上に、内径 15 mm の開口部がやや角度を付けかつキューベット直上に向けて二つ備えられている。15 mm の開口部の片方にはゴム栓を介して電極を取り付け、もう片方の口にはガス置換用のニードルをやはりゴム栓を介して装着している。この口は試薬を加えるときにも使用する。直上の開口部には攪拌用のモーターを取り付けてある。モーターは乾電池で作動する模型用のもので、直径 9 mm ほどの穴を空けたゴム栓を貼り付けて容器に装着している。モーター軸は切ったスパチュラ等（直径 2 mm）で延長し、ゴム栓の穴を通じて溶液部まで伸びている。その先端は平たく、さらにヒネリを加えることで攪拌効率を上げているが、作動時に電極を叩かないよう微調整が必要である。攪拌が強すぎると溶液が泡だつて測定に悪影響を与えるので、モーターと電池の間に 10 オーム程度の可変抵抗を入れ、回転数を調節できるようにしておくが良い。電極は試料溶液に対しやや斜めに浸かることになるので液絡部が水面上に出ないように深さや向きに注意しなければならない。酸化還元滴定では試料

溶液の酸化還元平衡を安定に保つため容器内の酸素を除去する必要がある。これはニードルを通して窒素ガスやアルゴンガスを常に通気することで達成する。容器内が完全に密閉されている場合はガスを排出するためのニードルをもう一本追加する必要があるが、図1の装置の場合ではモーター部分の隙間から抜けるのでその必要はない。ガス置換で気を付けたいのは、これらのガスがたいてい乾燥していることで、長時間の測定では試料溶液が濃縮される可能性が有る。そのため執筆者らは図にあるようなトラップを設け、窒素ガス等を蒸留水に通気してから測定容器へ導入している。このトラップは気泡の出方を見ることでガス流量モニターとしても利用できる。

ここで紹介した測定容器は酸化還元滴定法の草分けである Dutton らが使用したものに基づいた一例である。市販はされていないのでガラス器機業者に特注することになる。重要なのは(1)試料溶液を嫌気条件下に保つことが出来る(2)試料溶液を随意に攪拌できる(3)使用する分光測定機器への装着に支障が無い、の3つの条件を満たすことである。

4.4 溶液組成

測定するサンプルは精製した電子伝達タンパクまたは

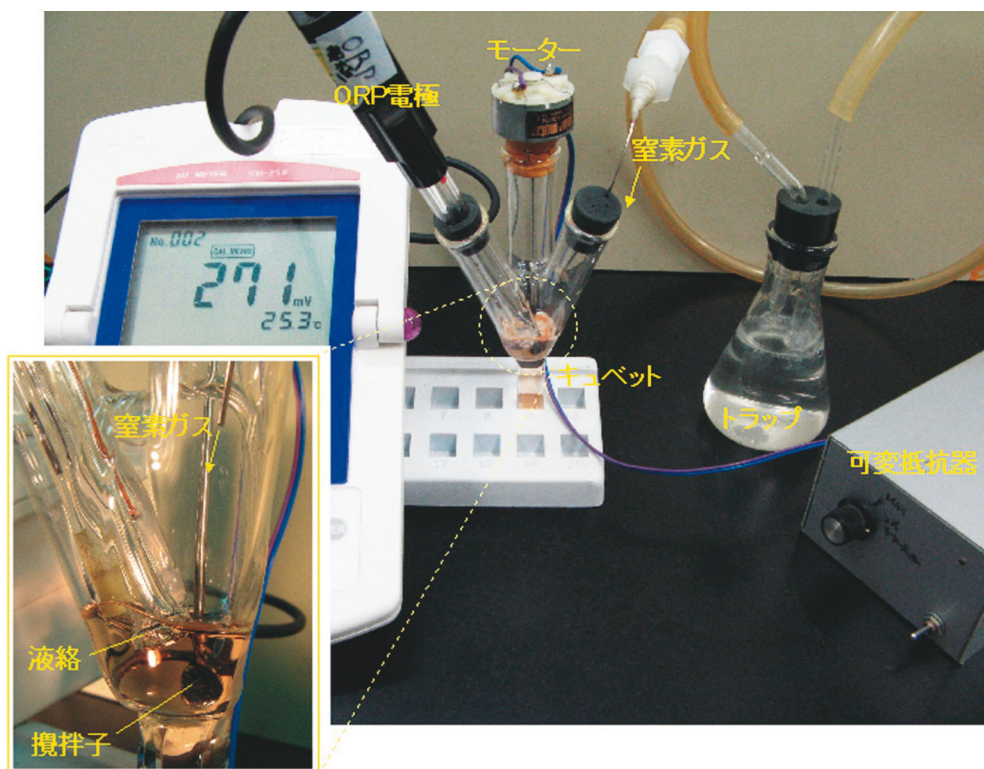


図1：酸化還元滴定における測定用キューベットのセットアップ例

クロマトフォア等の膜標品となるが、これらの物質と電極の間に速やかにかつ安定した酸化還元平衡を成立させるために電子のやり取りを仲介する低分子化合物を加えておく必要がある。これら電子伝達を仲介する化合物をメディエーターと呼び、主なものを表1にまとめた。各メディエーターはそれ自身が酸化還元反応を行う物質であり特有の E_m を持っている。一つのメディエーターが平衡の安定化に寄与する E_h の範囲は限られており、おおよその目安としてその E_m の前後 100 mV 程度だと考えるとよい。従って酸化還元滴定を行う際には、自分の測ろうとする E_h レンジをいくつかのメディエーターを組み合わせるカバーするように考えなければならない。また、メディエーターの中には特有の波長に吸収帯を持ち、それが酸化還元状態に応じて変化する場合があるので、分光学的に滴定を行う場合はメディエーターの吸収変化が測りたい物質の吸収帯と重ならないように考慮する必要がある。執筆者が光合成細菌のクロマトフォアを使ってチトクロムの酸化還元滴定を行う場合を例にとると、DAD 20 μ M, Fe-EDTA 50 μ M, PMS 5 μ M, Pyocyanin 5 μ M, Hydroxy-1, 4-napthoquinone 10 μ M, Vitamin K3 20 μ M の組み合わせで、おおよそ -200 mV から 450 mV の範囲で測定を行っている。

酸化還元反応は先にも述べたとおり pH の影響を大きく受ける。後の章で説明するネルンストの式に従えば、溶液の pH が 1 ユニット上昇すると E_m は -60 mV 変化することになる。従って測定溶液は十分な緩衝能を備えていなければならない。基本的には pH 7 で測定する事が多い。執筆者がよく利用するのは 50 mM リン酸バッ

ファーもしくは 10 mM MOPS バッファーである。また、場合によっては違う pH で測定することが効果的なことがある。対象となる物質の E_m が低すぎたり高すぎたりして測定が困難なときは pH 1 ユニットあたり 60 mV 変化することを逆に利用して、測定しやすいレンジに持ってくる事が出来る。ただし覚えておきたいのは測定対象物質が溶液に露出しているかペプチド等に囲まれて溶液から隔離されているかで pH による影響が変わってくる事である。もちろん隔離されていれば pH 変化をほとんど受けないことになる。逆にこのことを上手く利用すると pH7 での E_m が近接した 2 成分をバッファーの pH を変えることで見分けられるかもしれない。

溶液の酸化還元電位を変えるための酸化剤としてはフェリシアナイド(フェリシアン化カリウム)、還元剤としてはジチオナイト(ヒドロサルファイトナトリウム)がよく使われる。還元剤としては他にもジチオスレイトールや、100 mV 程度以上の範囲を測定する場合にはアスコルビン酸なども使われる。滴定を行う際にはこれらの酸化還元剤を電極電位をモニターしながら適量ずつ加えていくことになるが、1, 10, 100 mM 程度に濃度を分けて溶液を作っておくと使い勝手がよい。ジチオナイト溶液は空気との接触による自動酸化が速いので、測定の度に作り直す。ジチオナイトの場合は小試験管に粉末を少量(10 mg 程度)入れ、洗瓶で蒸留水を静かに注いでやれば溶液上方に向かって薄くなる濃度勾配が出来るので、適当な層から溶液を吸い取りながら使うと便利である。

表1：酸化還元滴定でよく使われるメディエーター

メディエーター名 (カッコ内は通称または略称)	E_m
Ferrocene carboxylic acid	+530 mV
Potassium ferricyanide	+430 mV
1, 1'-Dimethylferrocene	+340 mV
N, N, N', N'-Tetramethylphenylene diamine (TMPD)	+260 mV
2, 3, 5, 6-Tetramethylphenylene diamine (diaminoduroil or DAD)	+260 mV
2, 6-Dichlorophenol indophenol (DPIP)	+217 mV
1, 2-Napthoquinone	+145 mV
Trimethylhydroquinone	+100 mV
Fe-EDTA	+96 mV
N-Methylphenazonium methosulfate (PMS)	+80 mV
N-Ethylphenazonium ethosulfate (PES)	+55 mV
2-Methyl-1, 4-napthoquinone (Vitamin K ₃ or Menadione)	0 mV
N-Methyl-1-Hydroxyphenazonium methosulfate (Pyocanine)	-34 mV
2-Hydroxy-1, 4-napthoquinone	-145 mV
Anthraquinone-2-sulfonic acid	-225 mV
Benzyl viologen dichloride	-350 mV
Methyl viologen dichloride hydrate	-440 mV

4.5 測定

1. 測定容器にまずバッファーのみ (10 ml 位) を入れ、電極、攪拌子、ガス置換用ニードルをセットする。窒素ガスまたはアルゴンガスを通気しながら 20 分程度バッファーを攪拌し、嫌気状態を確立する。
2. サンプルとメディエーターを入れる。サンプルは濃度の高いものを少量入れるようにし、メディエーターも終濃度の 1000 倍程度に調整したものをストックとして使うようにする。なおメディエーターの中には水に溶けにくいものも多く、その場合ストック液はエタノールで作る。
3. 酸化剤または還元剤を加え、容器内の酸化還元電位を高低いずれかに振っておく。
4. 測定容器を分光光度計にセットし測定を開始する。滴定中も常にガスを通気しておくが、液面が揺れるほど過度に吹き付けないこと。攪拌も続けるが、スペクトル測定時には一時的に止める。
5. 酸化剤または還元剤を極少量加えて酸化還元電位を変える。10 μ l 容量のガラスシリンジで加えるのが望ましいが、キャピラリーチップを装着した小容量のピペットマンでも可。いずれにせよ測定容器に差し込む前にキムワイブ等で外側に付着した余分な溶液をふき取っておくこと。
6. 目安として 10 mV ほど電位が変化し、容器内の酸化還元平衡が安定したところで分光測定する。この「安定した」という判断をいつ下すかが難しいところで、例えば 1 分間待っても電位の変動が ± 1 mV 以内であるなど具体的な判断基準を作っておくと良い。
7. 手順 5 と 6 を繰り返す、目的とする範囲まで測定を続ける。

酸化還元滴定は根気のいる作業である。酸化剤・還元剤を加える時、どれだけの量を加えれば望むだけの電位変化が起こるか予想するのは困難で、メーターの表示を見ながら慎重に作業しなければならない。ある E_h レンジではシリンジの針先が溶液に触れただけで電位が大きく変わったり、またあるレンジでは大きく変化してもすぐに元の電位まで戻ってきたりする。こうした経験に基づいて、使用するメディエーターの組み合わせや濃度が決まってくる。単純にその種類を増やしたり濃度を高くすれば良いというものでもない。信頼性のあるデータを得るにはある程度「慣れ」が必要である。初めて酸化還元滴定に挑む場合、いきなり大事なサンプルを使うのではなく、まずは入手し易く性質のよく分かっている馬心臓チトクロム *c* 等を使って練習すると良い。加えるメ

ディエーターの種類と濃度は過去の文献を参照し、その条件下の各 Eh レンジで酸化還元平衡がどんな挙動を示すか体得しておくことが重要である。

酸化還元滴定は、ある程度慣れていても時間の掛かる作業である (フェリシアナイド/ジチオナイトを使った広い E_h レンジの測定だと約半日から全日)。その間、サンプルが変性していないか、アグリゲーションを起こしていないか、時々測定容器を取り出してチェックする必要がある。また、面倒であっても酸化→還元 (reductive titration) と還元→酸化 (oxidative titration) の両方向とも滴定すべきで、論文の投稿の際などでもしばしばこの事が求められる。両者の一致性が低い場合、電極とサンプルの間で充分な酸化還元平衡が得られぬうちに測定していることが疑われる。

4.6 データ処理

測定作業の次に、得られたデータをグラフ上にプロットし E_m を求める。横軸は水素電極を基準とした電極電位 (E_h)、縦軸に吸光度変化量をとるのが一般的である。図 2 に例として紅色光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* から単離・精製したチトクロム c_{2m} を用いた滴定結果を示す。ここでは α 帯のすそ野 (540 nm および 570 nm) を結んだ線をベースラインとし、551 nm のピークまでの吸光度差を縦軸にプロットしている。図 2 から読みとれるようにグラフはシグモイド曲線を描く。この曲線の上端 (還元型) と下端 (酸化型) の漸近線のちょうど中間に線を引き、曲線と交わる点が E_m 値ということになるが、普通はコンピューターを使ってネルンストの式と呼ばれる理論式に当てはめ、線形回帰させようとして求める。

$$\text{ネルンストの式: } E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]} \quad (1)$$

ここで R は気体定数、 T は絶対温度、 n は反応にあずかる電子数 (チトクロム c_2 の場合は 1)、 F はファラデー定数である。[ox]/[red] は酸化型と還元型のモル比を示しており、 E は電極電位、 E_0 は標準酸化還元電位つまり今求めようとする E_m にあたる。この式を図 2 のデータに合わせて横軸 (x) を E_h (mV)、縦軸 (y) を差吸光度とし、さらに各定数 (温度は 25°C とする) も代入して表現すると

$$y = \frac{a}{1 + \exp(0.039(x - E_m))} + b \quad (2)$$

と表すことが出来る。ここで a はシグモイド曲線の上端と下端の差、つまり吸光度の変化量を、 b はシグモイド曲

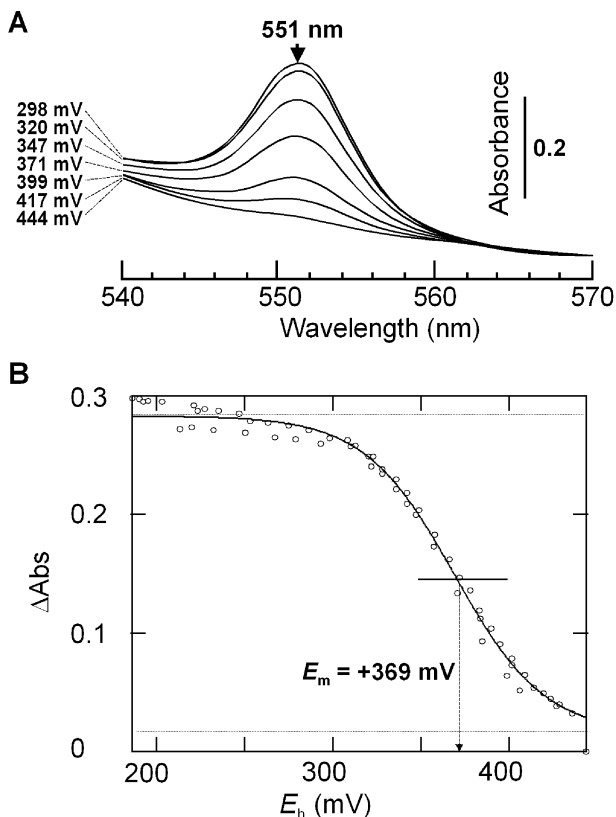


図2：紅色光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* から精製した膜結合型モノヘムチトクロム c_2 の酸化還元滴定
 A. E_h を変えていった時の α 吸収帯のスペクトル変化。B. α 吸収帯の吸収変化量を E_h に対してプロットした結果。Kimura らの報告⁵⁾ から一部改変して転載。

線下端が示す吸光度（ベースライン）を示す。執筆者らは自作のプログラムによって線形回帰を行っているが、市販のデータ解析ソフトウェア（Origin Lab社 Origin など）を利用しても同様の計算が出来るものと思われる。

図2で示したチトクロム c_2 は電子の授受を行う成分としてヘムを一つだけ含む単純な例であるが、電子伝達タンパクの多くは複数の電子伝達成分を持つ。 n 個の成分を含み、かつそれらの E_m が同じである場合、(2)式の指数部分にある 0.039 に n を乗じる。例えば電子伝達成分を一つ持つタンパクのホモダイマーであれば $0.039 \times 2 = 0.078$ を適用することとなり、描く曲線の傾き部分は急になる。複数の電子伝達成分それぞれの E_m に違いがある場合は (2) 式を加算することになる。この場合 n 個の成分があるとすると

$$y = \frac{a(1)}{1 + \exp(0.039(x - E_m(1)))} + \frac{a(2)}{1 + \exp(0.039(x - E_m(2)))} + \dots + \frac{a(n)}{1 + \exp(0.039(x - E_m(n)))} + b \quad (3)$$

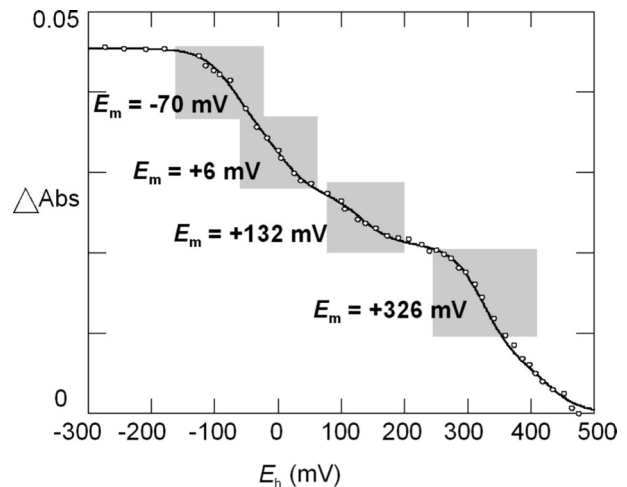


図3：紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* の反応中心結合型4ヘムのチトクロム c の酸化還元滴定
 測定サンプルはバクテリオクロフィル濃度が $40 \mu\text{m}$ となるように調製した光合成膜標品（クロマトフォア）である。Nagashima らの報告⁶⁾ から一部改変して転載。

で表される。図3にこのような例として4つの c 型ヘムを含む紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* 反応中心結合型チトクロムサブユニットの滴定データを示す。ここでは $n=5$ として計算を行っているが、そのうち最も E_m の高い成分 (400 mV 付近) はスペシャルペアによるものである。

本章で例示したのは与えられた酸化還元平衡状態における電子伝達成分の吸収スペクトルを記録していくいわゆる dark titration であるが、閃光照射に伴う吸収変化を測定して滴定を行う場合もある。吸収スペクトルが測りにくい反応中心のキノン・アクセプターを、電子供与体となるスペシャルペアや結合チトクロムの光酸化量によって滴定する場合などがそれにあたる。また、滴定を目的とせずとも特定の酸化還元平衡状態での電子伝達反応を測定するメリットは大きい。こうした閃光照射/時間分解分光測定を行う際に気を付けたいのは、メディエーターによってはサンプルへの電子伝達が非常に速く、閃光照射後の酸化・還元速度を測りたい時などメディエーターによる反応が無視できなくなることである。このことは特に PMS や DAD などを使った場合に顕著で、紅色細菌の膜を使った閃光照射実験では測定する E_h にもよるが数10ミリ秒のオーダーで反応中心結合チトクロムへの電子伝達が見られる。一方で電子の授受が遅いメディエーターの場合、測定間隔に注意を払う必要がある。測定データを積算する際などは特に、平衡が元に戻るまで充分な間隔を取ることが大切である。

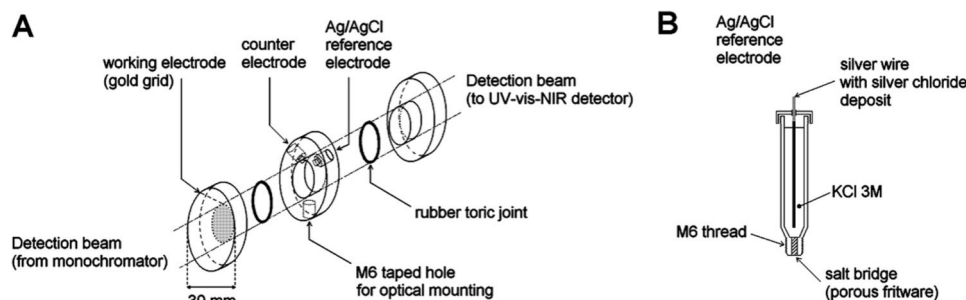


図4：電気化学的方法による酸化還元滴定で用いられる測定セルの例
フランス IBPC-CNRS の Alric 博士から執筆者への提供資料より，許可を得て転載。

4.7 電気化学的酸化還元滴定

実際の測定を行う上での酸化還元電位は，基準電極と作用電極の間に生じる電位差によって表されるということはすでに述べた。このことを逆にとらえれば，電極間の電位を制御することができれば測定溶液中の酸化還元状態を任意に調節できることになる。ポテンショスタットというのがそのための装置であり，電極間の電位を任意の値に調節し，その時の電極間に流れる電流値を測るように作られている。つまり電位を変化させていったときに，溶液中の電子伝達物質が電極との間で電子のやり取りをすれば電流値が変化するので，それをモニターすることで E_m を推定することが出来る。ここでは詳しい説明はしないが，その原理や特性について加藤らの解説が分かりやすいので参照されたい²⁾。

酸化還元剤を用いる化学的な方法に比べ電気化学的方法が優れているのは測定レンジの広さである。化学的方法でよく酸化剤として使われるフェリシアナイドは 450 mV，あるいはせいぜい 500 mV 程度までしか電位を上げることが出来ないが，電気化学的方法ではそのような限界は無く，これは反応中心のスペシャルペアのように E_m が高い色素団の測定に極めて有利である。電位の制御も化学的方法のような手技的な“熟練”は必要無いので，その点も有利である。

電気化学的な酸化還元滴定で最も単純なやり方はポテンショスタットのみを使う方法で，モノヘムのチトクロ

ム等はこれで充分測定できる。しかし酸化還元物質が2つ以上となるとそれぞれを見分けることが出来ず，近年はポテンショスタットに光学系を組み合わせた測定が行われるようになってきた^{3,4)}。図4にそのような測定で使われる特殊なセルの一例を示す。このセルは光を通す材質で出来ており，作用電極は極めて薄い金メッシュである。サンプルはその表面に 0.1 mm ほどの厚みを持って配置され，電極との間の平衡が素早く均一に成立するよう考慮されている。測定光は作用電極を通過して検出されることとなる。

参考文献

- 1) P. L. Dutton, *Methods Enzymol.* **54** (1978) P.411.
- 2) 加藤裕樹，仲村亮正，渡辺正，*光合成研究* **17** (2007) p. 63.
- 3) F. Baymann, D. A. Moss & W. Mäntele, *Anal. Biochem.* **199** (1991) P.269.
- 4) S. Bernad & W. Mäntele, *Anal. Biochem.* **351** (2006) P. 214.
- 5) Y. Kimura, J. Alric, A. Vermeglio, S. Masuda, Y. Hagiwara, K. Matsuura, K. Shimada & K. V. P. Nagashima, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) P.6463.
- 6) K. V. P. Nagashima, J. Alric, K. Matsuura, K. Shimada, & A. Vermeglio, *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives*, eds. A. van der Est & D. Bruce, Montreal, Allen Press, 2005, p.325.