

緩衝液のイロハ

加藤太一郎

「緩衝作用」という言葉は、1900年に発表された Fernbach と Hubert の論文に初めて登場する¹⁾。彼らは アミラーゼ に関する研究を進める中で、一部中和したリン酸水溶液が「酸性度またはアルカリ性度の急激な変化を緩和」し、「リン酸塩が一種の緩衝物のような働きをする」ことを発見した²⁾。緩衝作用を示す水溶液のことを緩衝液と呼ぶが、その後緩衝作用を示す物質のさまざまな組合せが提案され現在に至っている。

タンパク質や核酸のような生体高分子、あるいは生きた細胞を取り扱う生化学実験では、緩衝液の使用が必要不可欠である。研究者にとって利用するのが当たり前すぎて、日ごろ注意を払うことはほとんどないかもしれないが、緩衝作用はさまざまな要因によって影響を受けることが分かっている。その能力を十分発揮させるためには緩衝液について正しく理解することが重要である。

緩衝液とは？

緩衝液とは、酸・塩基の添加や溶液の希釈、あるいは温度変化といった外部要因によって生じる水素イオン濃度 (pH) の変化が、純水の場合よりも小さくなるようにした溶液のことである。このように pH を一定に保とうとする働きを緩衝作用といい、その作用を示す尺度を緩衝能という。酵素による触媒反応や核酸など、生体内の化学反応や生体物質は溶液の pH によって大きく影響を受けるため、pH をコントロールすることは大変重要である。

ちなみに pH とは水素イオン濃度の常用対数に負号を付して表したものであり、

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

と定義される。水溶液中の水素イオン濃度の範囲は $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^{-14}$ M と大きいので、その濃度を表す尺度として対数値が利用される。pH 表示すると 0~14 となる。よって水素イオン濃度で 10 倍の変化が pH で 1 単位の変化に対応する。

さて、溶液中の pH を一定にするためには、プロトンを供与できる酸 (HA) とプロトンを受容できる共役塩基 (A⁻) が共存する水溶液を調製すればよい。これによ

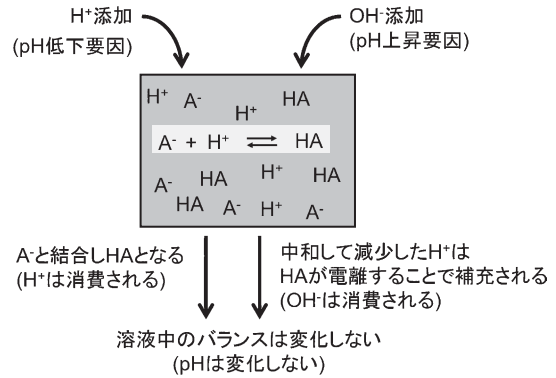
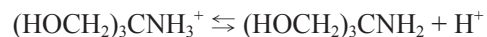


図1. 緩衝液がpHの変動を抑制する仕組み

て、プロトン濃度が減少 (pHが上昇) した時にはHAがH⁺とA⁻に解離することによって、一方、プロトン濃度が増加 (pHが低下) した時にはA⁻がH⁺と結合してHAになることによって、溶液中のプロトン濃度が一定に保たれることになる (図1)。

強酸や強塩基は水溶液中ではほぼ完全に電離するため、上記のようなプロトンの授受平衡はできず、きわめて弱い緩衝作用しか示さない。一方、弱酸や弱塩基の場合には水溶液中で完全に電離せず、プロトン化されたものとされていないものを共存させることができる。このことから、実用的に利用される緩衝液は、弱酸とその共役塩基の塩、あるいは弱塩基とその共役酸の塩を混合したものである。

たとえば、生化学実験においてもっとも利用されている緩衝剤である tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリスもしくは Tris) は水中で解離して次のような平衡状態にある。



平衡定数 K_a は、各成分の濃度を利用して次のように表される。

$$K_a = \frac{[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2][[\text{H}^+]]}{[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+]}$$

本式の両辺の対数を取って、式変形すると、

$$\text{p}K_a = -\log K_a \text{ より、}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2]}{[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+]} \quad (\text{式1})$$

が導かれる。式1からpHを1単位変化させるには、トリスとトリスイオンの比率を10倍変えなければならないことがわかる。つまり多少の酸や塩基が加えられても、緩衝液のpHはほとんど変化しない。これは滴定曲線を見てもわかる(図2)。また、もっとも強い緩衝作用は曲線上で傾斜がもっとも小さい領域として示されるが、それはトリスとトリスイオンの濃度が等しくなる場所、つまりpH = pK_aの時である。また実用的な緩衝作用を示すpH範囲は、その化合物のpK_a ± 1 (望ましくはpK_a ± 0.5) であると言われている。トリスの場合20°CにおけるpK_aは8.20なので、pH 7.2~9.2の範囲で有効な緩衝能を発揮する。このことから実験で利用したいpHにできるだけ近いpK_aを持つ緩衝剤を用いて緩衝液を調製することが肝要であるといえる。

式1は溶液中のトリスおよびトリスイオンの濃度を指定する必要があるが、共役塩基や共役酸の塩が多量に存在している場合には、共通イオン効果によって弱酸・弱塩基の解離は抑制され、ほとんど電離していないとみなすことができる。よって仕込み時の各要素の濃度Cを利用して、以下のように書き換えることができる。

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{C_{(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2}}{C_{(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+}} \quad (\text{式2})$$

この式2をヘンダーソン・ハッセルバルヒの式と呼び、溶液のpHを簡便に予測することができる便利な近似式として利用できる。

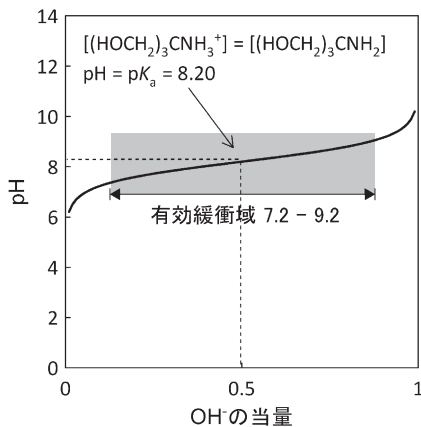


図2. トリスイオン ((HOCH₂)₃CNH₃⁺) を塩基 (OH⁻) によって滴定した時のpH変化と有効緩衝域。滴定中の傾きが最小の点(変曲点)は塩基が0.5当量添加されたときであり、この時のpHはpK_aと等しくなる

よい緩衝液の条件とは？

地球上に生息する生物の生体成分のpHは普通6.5~8.0の範囲にある。これまでに多種類の緩衝液が提案されているが、実際に生化学実験で利用される種類は限られており、それらを使い分けることで大部分の実験に対応することができる。緩衝液選択の際のもっとも重要な因子はpHであり、使用するpHにできるだけ近いpK_aの値を持つ緩衝剤を選択することが重要であることはすでに述べた。それ以外に満たすべき条件として以下の4点があげられる。

- ①分光学的手法を用いた目的成分の検出を妨害しないよう可視・紫外領域に吸収を持たないこと
- ②緩衝剤自身に変化したり、測定する反応を阻害しないこと
- ③金属イオンとの錯形成能が小さいこと
- ④水に溶けやすく、非極性溶媒には溶けにくいこと

Goodらは生化学実験に適した緩衝剤として、両性イオン構造をもつアミノエタンスルホン酸、あるいはアミノプロパンスルホン酸誘導体を提案している³⁾。これらを用いた緩衝液はグッドバッファと呼ばれ、上記の生化学実験向けの条件を満たしているだけでなく、高い化学的安定性を示し精製が容易という特性も有する理想的な緩衝液である。図3にこれらを含めた主要な緩衝液と使用可能なpH範囲を示す。

よく利用される緩衝液と調製方法

リン酸緩衝液：pK_a = 7.22 ヒドロキシアパタイトカラムを用いたクロマトグラフィーや酵素活性測定、あるいは培養細胞の洗浄や懸濁など、さまざまな用途に利用されている緩衝液である。安価であり、また生体にはもともとかなりのリン酸が含まれているため、生体内の反応を阻害しにくいことが利点である。リン酸は3段階に電離するが、リン酸二水素イオンとリン酸一水素イオ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	pK _a	緩衝液
											9.60	Glycine-NaOH
											8.20	Tris-HCl
											8.15	Tricine-HCl
											7.55	HEPES-NaOH
											7.22	NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄
											7.20	MOPS-NaOH
											6.15	MES-NaOH
											4.80	Acetate-NaOH
											2.34	Glycine-NaOH
												GTA緩衝液

図3. 代表的な緩衝液のpK_aと有効緩衝域の目安

ンの間の解離平衡の pK_a が7.22である。つまりこれらの成分がそれぞれ酸(HA)と共役塩基(A⁻)として働く。緩衝液作製時には一水素物と二水素物の混合度合いを変えるだけでpHメーターを利用しなくても正確にpHを調整できる。ただし、カルシウムイオンとの沈殿生成や、希釈によるpH変化の度合いが大きいことが欠点としてあげられる。またアシル-リン酸中間体を形成する酵素の場合にはその触媒活性を抑制してしまうこともあるので注意が必要である。

《0.1 M リン酸緩衝液の調製方法⁴⁾》

1. 71.64 gのNa₂HPO₄・12H₂Oを蒸留水・脱イオン水・超純水など(以下精製水とする)に溶解し1000 mLにメスアップすることで0.2 M Na₂HPO₄を調製する。
2. 31.21 gのNaH₂PO₄・2H₂Oを精製水に溶解し1000 mLにメスアップすることで0.2 M NaH₂PO₄を調製する。
3. 調製した0.2 M Na₂HPO₄と0.2 M NaH₂PO₄を表1にて示した割合で混合し、精製水にて100 mLにメスアップすることで、各pHの0.1 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄緩衝液を得る(有効緩衝範囲は5.8~8.0, 25°C)。

トリス緩衝液：pK_a = 8.20 TEやTAE, TBE緩衝液など、遺伝子組換え実験で多用される緩衝液の構成成分である。安価であり、生化学者にとってなじみ深い緩衝液であるが、一級アミンを持つため、タンパク質などの生体成分と反応したり、葉緑体の酸素発生系の化学反

応を阻害することがわかっている。また細胞小器官に蓄積することで哺乳類細胞に対する毒性を示す。また、温度によるpH変化が大きいため使用時は注意が必要である。これに代わる緩衝剤としてグッドバッファーにTricine緩衝液が提案されているが、高価なためかあまり普及していない。

TE緩衝液中のトリスはpHを塩基性に保つことで、核酸を脱プロトン化し、沈殿することを防ぐ役割を担っている。またSDS-PAGEを作製するときにpH 6.8にて利用することがあるが、本pHにおける緩衝能は著しく弱いため調製時に注意が必要である。ちなみになぜこのpHを利用する必要があるのかについては、以前のよもやま話に書かれているため是非確認してほしい⁵⁾。

《0.1 M トリス塩酸緩衝液の調製方法》

1. 12.11 gのトリスをおよそ800 mLの精製水に溶解する。
2. 攪拌しながら2 M塩酸を滴下し、pHメーターにて確認しながらpHを合わせる(有効緩衝範囲は7.2~9.2, 20°C)。
3. 精製水にて1000 mLにメスアップすることで、各pHの0.1 M Tris-HCl緩衝液を得る。

HEPES緩衝液：pK_a = 7.55 グッドバッファーの一つであり、高い水溶性と低い細胞透過性を実現しており、細胞毒性がほほない理想的な緩衝液とされているが、高価であることが欠点である。水溶液中では分子内のスルホン基から解離したプロトンがピペラジン基の4位窒素原子をプロトン化した両性イオンの形をとっており、これと脱プロトン化体の平衡関係で緩衝能を示す(図4)。

表1. リン酸緩衝液作製のために必要なリン酸ナトリウム一水素、二水素物の水溶液量

pH, 25°C	Na ₂ HPO ₄ [mL]	NaH ₂ PO ₄ [mL]
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

《0.1 M HEPES-NaOH緩衝液の調製方法》

1. 23.83 gのHEPESをおよそ800 mLの精製水に溶解する。
2. 攪拌しながら1 M NaOHを滴下し、pHメーターにて確認しながらpHを合わせる(有効緩衝範囲は6.6~8.6, 20°C)。
3. 精製水にて1000 mLにメスアップすることで、各pHの0.1 M HEPES-NaOH緩衝液を得る。

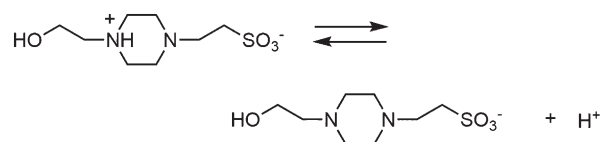


図4. HEPESの水溶液中におけるプロトン解離平衡

特殊な緩衝液

広域緩衝液 単一の緩衝剤から作製される緩衝液の有効緩衝範囲は $pK_a \pm 1$ に過ぎないが、2種類以上の緩衝剤が共存する場合には加成的にその効果が発揮される。よって pK_a が約2単位ずつの間隔を持てば、どのpHにおいても緩衝能を示す広域緩衝液を作製することができる。酵素活性のpH依存性を調べる際、緩衝剤を変更すると酵素活性が大きく変化してしまうことが多いが、広域緩衝液を利用すれば、それを回避することができる⁶⁾。さまざまな組合せが提案されているが、3,3-dimethyl-glutaric acid, Tris, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediolの等モル混合物（GTA緩衝液）がpH 3.5～10という広い範囲で緩衝作用を示す。一度利用する価値がある緩衝液ではないだろうか。

《0.1 M GTA 緩衝液の調製方法》

- 16.02 gの3,3-dimethylglutaric acid, 12.11 gのTris, および10.51 gの2-amino-2-methyl-1,3-propanediolを精製水に溶解し500 mLにメスアップする(0.6 M GTA緩衝液)。この溶液はpH 7.0～7.1を示す。
- 1 M NaOHあるいは2 M塩酸にてpHを調整し、精製水で0.3 Mに希釈する(有効緩衝範囲は3.5～10, 20°C)。本緩衝液の緩衝剤ごとの濃度は0.1 Mである。

揮発性緩衝液 LC-MS分析では移動相の蒸発を伴う検出器を利用するため、リン酸緩衝液のような不揮発性塩を利用すると、対象物の揮発性が著しく低下しイオン化が不十分となるため検出感度が低下してしまう。このような場合、アンモニウム塩や炭酸塩のような揮発性塩からなる緩衝液を使用することで問題を解決できる。たとえば、trimethylamine-acetic acid (pH 4.3～5.3, 9.3～10.3) や ammonium carbonate (pH 5.9～6.9, 8.8～9.8) がある⁷⁾。またこれらの緩衝液は凍結乾燥によっても取り除くことが可能である。高濃度の緩衝剤を含んだ状態であっても、溶液をそのまま凍結乾燥に供することが可能な便利な緩衝剤である。

緩衝液作製時の注意点

緩衝液を調製する際の注意点としては、希釈や温度変化によるpHの変動があげられる。研究室では10 × ス

トック溶液と言うような高濃度の保存用緩衝液をあらかじめ作製しておき、使用直前に希釈を行ったり、他の添加物を投入してから利用することが多いだろう。しかし緩衝剤によっては、たとえば、リン酸緩衝液のように希釈によってpHが大きく変動するものもある。よって初めて使用する緩衝液の場合には、希釈後にpHが変動していないか念のため確認することをお勧めする。

また、緩衝液は基本的に室温でpHを調整し、その後低温に冷却して利用することが一般的である。しかしトリス緩衝液は温度によってpHが変動しやすいことがわかっている。このため、pH変化に敏感な対象物をトリス緩衝液中で扱う場合には、使用する温度にてpH調整を行うなど注意が必要である。温度によってpHが変わるのはプロトン解離定数 K_a が温度によって変化するためであり、van't Hoffの式から説明が可能である⁸⁾。たとえば、トリスは0°Cと100°Cの間では緩衝液としてのpHは2.4単位も違いがあることが分かっている。その他、グッドバッファーや代表的な緩衝液についてもそれぞれ違った温度依存性を示す。各緩衝液に対するpHの温度依存性について0～100°Cの範囲で5°C間隔にて計測された論文が参考になる⁹⁾。

終わりに

生体試料を扱ううえで、緩衝液の利用は不可避である。実験系に適した緩衝剤を選択することで感度が向上したり再現性の良い分析が可能になるなど、研究の成否を決定する重要なポイントになることも多々ある。本よもやま話を読んで今一度緩衝液について考えてみてほしい。

文 献

- 1) Fernbach, A. and Hubert, L.: *Compt. Rend.*, **131**, 293 (1900).
- 2) 辻啓一訳：緩衝液の選択と応用，講談社サイエンティフィク (1981).
- 3) Good, N. E. *et al.*: *J. Biochemistry*, **5**, 467 (1966).
- 4) Dawson, R. M. C. *et al.*: *Data for biochemical research* (third edition), Oxford Science Publications (1986).
- 5) 福田青郎：生物工学, **89**, 332 (2011).
- 6) Ando, Y. *et al.*: *Nat. Photonics*, **2**, 44 (2008).
- 7) 非揮発性および揮発性のバッファー系：https://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/biodirect_mail/technical_tips/pdf/buffer.pdf (2017/06/05)
- 8) 高橋克忠：蛋白質科学会アーカイブ, **1**, e031 (2008).
- 9) Fukada, H. and Takahashi, K.: *Proteins*, **33**, 159 (1998).