

酸化還元酵素チロシナーゼとペルオキシダーゼによる

環境汚染物質の除去

日大生産工 ○山田和典・柏田 歩・松田清美・平田光男

1. 緒言

汚染物質の1つとしてあげられるアルキルフェノールは、石油精製、樹脂製造、製紙など多くの工場から排出され、中には発ガン性のものである(1)。また、アルキルフェノールと同様に産業界で多く使われている化合物としてビスフェノールA(BPA)があり、エポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の製造原料として、また抗酸化剤、難燃剤、顔色剤などとして繊維、染料、製紙産業などで使われている。非イオン界面活性剤であるアルキルフェノールエトキシレートの分解生成物であるオクチルフェノールやノニルフェノール及びBPAは動物やヒトの内分泌系をかく乱する恐れがあるとして問題視されており、鳥類の卵殻薄化、魚介類の雌化、免疫機能の低下などの影響があると言われている。また、これらの化合物は、生分解性が低いため、環境中に残留して食物連鎖によって水棲動物(魚類、両生類、哺乳類)に数千から数万倍に濃縮されることも指摘されている(2, 3)。

これらの化合物は構造中にベンゼン環を有することから、酵素によって分解しにくいと言われていたが、近年様々な方法によってこれらの物質を分解または内分泌かく乱特性を失活させる研究が行われるようになってきた。我々が行ってきたこれまでの基礎研究からマッシュルームチロシナーゼや麹菌(*Aspergillus oryzae*)チロシナーゼが *p*-アルキルフェノールをキノン酸化することや西洋ワサビペルオキシダーゼが過酸化水素存在下でアルキルフェノールやBPAをラジカル化することがわかり、酵素を使った効率的な環境汚染物質の除去を構築できると考えている。その中で、マッシュルームチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズとの反応を利用した高効率な除去法を見出した(4, 5)。しかし、酵素を溶解させて用いると、処理後活性を保持した状態で単離することは困難である。また、酵素の多くは、熱、酸、アルカリ、有機溶

媒などに対して不安定であり、至適条件下で使用したとしても比較的早く失活するなどの欠点もある。そこで、酵素を固体担体に固定化することができれば、酵素の連続使用や保存などこれまでの課題となっている多くの問題を解決することができる(6, 7)。

我々は17及び18年度を通して①麹菌由来のチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールのキノン酸化と生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着(8)、②過酸化水素存在下で、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼによる *p*-アルキルフェノールとBPAのフェノキシラジカル化とラジカルカップリング反応による水不溶性ポリフェノールの形成による沈殿除去(9)、③共有結合を介したイオン交換樹脂へのマッシュルームチロシナーゼの固定化と固定化チロシナーゼの反復利用に関する研究を行ってきた。本発表では、上述した方法によりチロシナーゼとペルオキシダーゼを用いた *p*-アルキルフェノールやBPAを効率的に除去する際の至適条件の決定とその応用について報告する。

2. 実験

2. 1 麹菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

麹菌チロシナーゼは月桂冠(株)において産生、粗精製された比活性936と1170 U/mg-solidのものを使用した(10)。pH6.0のリン酸緩衝溶液を溶媒として麹菌チロシナーゼとアルキル鎖長の異なる *p-n*-アルキルフェノール(和光純薬(株)と東京化成工業(株)製)の溶液を調製した。富士紡績(株)から購入したキトサンビーズ(粒径: 70~200nm, 比表面積: 70~100m²/g)は緩衝溶液中に保存し、実験に使用した。 *p*-クレゾールを除去する際に決定した至適条件である pH6.0, 30°Cで(8)、褐色三角フラスコに入ったキトサンビーズ 0.50cm³を含む *p-n*-アルキルフェノール(0.5~0.05mM)溶液 20cm³に濃度が 150U/cm³となるように麹菌チロシナーゼ溶液を加えるこ

Removal of Environmental Pollutants by Oxidoreductases, Tyrosinase and Peroxidase

Kazunori YAMADA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA and Mitsuo HIRATA

とで、酵素反応を開始させた。実験中は、所定時間ごとに波長 300 ~ 600nm の範囲で UV-visible スペクトルを測定し、逆相カラム Inertsil ODS-2 または Inertsil C8-3 (5 μ m, 4.6mmi.d. \times 15cm) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法によって溶液中の *p-n*-アルキルフェノール濃度を求めた。移動相としてアセトニトリル水溶液を用い、アルキル鎖長によって組成を調節した。初期濃度と残留濃度の関係からキノンへの転化率を求めた。また、キトサンビーズを添加した溶液と添加していない溶液の UV-visible スペクトル測定から生成したキノンのキトサンビーズへの吸着率を求め、転化率と吸着率から除去率を決定した。

2. 2 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA の除去

Sigma Aldrich(株)製の西洋ワサビチロシナーゼ(E.C 1.11.1.7, 224U/mg-solid)を使用した。BPA とその誘導体は東京化成工業(株)から購入し、そのまま使用した。pH6.0 のリン酸緩衝溶液とエタノールからなる混合溶媒で 5.0mM の BPA 溶液を調製した。この BPA 溶液に pH6.0 の緩衝溶液を溶媒として調製した HRP 溶液、分子量 1.0×10^4 のポリエチレングリコール(10K-PEG) 溶液、過酸化水素溶液を加えて酵素反応を開始させ、所定時間ごとに濁度と残量濃度を測定した。BPA の除去における HRP 濃度、PEG 濃度と分子量、過酸化水素濃度、pH 及び温度などの至適条件を決定し、種々のビスフェノール誘導体の除去に応用した。残留濃度は Inertsil ODS-2 を用いた HPLC 法によって求め、移動相のアセトニトリル水溶液の組成は使用したビスフェノール誘導体によって調節した。

2. 3 マッシュルームチロシナーゼの固定化と *p*-クレゾールの除去

Sigma Aldrich(株)製のマッシュルームチロシナーゼ(E.C 1.14.18.1, 2590U/mg-solid)を使用した。pH7.0 の緩衝溶液中に保持したカルボキシル基型弱酸性陽イオン交換樹脂(DIAION WK-10)0.5cm³ に濃度 2000U/cm³ のマッシュルームチロシナーゼ(Sigma Aldrich(株)製, E.C 1.14.18.1, 2590U/mg-solid)溶液 2.5cm³ と濃度 0.333mmol/cm³ の水溶性カルボジイミドである(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)溶液 0.9cm³ を加え、4 $^{\circ}$ C で攪拌することでイオン交換樹脂にチロシナーゼを固定化した。

内径 5 mm のカラムにチロシナーゼを固定化した樹脂 0.5cm³ を、内径 8 mm のカラムにキト

サンビーズ 4 cm³ を充填した。チロシナーゼ固定化樹脂を充填したカラムに pH7.0、濃度 0.5mM の *p*-クレゾール溶液 20cm³ を滴下し、チロシナーゼ固定化樹脂を充填したカラムから溶出した溶液はキトサンビーズを充填したカラムに流入させ、2 本のカラムへ繰り返し流通させた。経時的に吸光度測定と HPLC を用いて *p*-クレゾールの濃度を測定した。

3. 結果と考察

3. 1 麴菌チロシナーゼによる *p*-アルキルフェノールの除去

マッシュルームチロシナーゼとキトサンビーズを用いた *p*-クレゾールの除去において至適条件(pH7.0, 45 $^{\circ}$ C)が決定され、アルキル鎖長 2 ~ 9 の *p-n*-アルキルフェノールの除去への応用を検討した結果、95%以上の除去率が得られた(4, 5)。ここでは、麴菌チロシナーゼを用いた際の *p-n*-アルキルフェノールの除去を検討した。麴菌チロシナーゼの至適条件である pH6.0, 30 $^{\circ}$ C(8)で濃度 150U/cm³ の麴菌チロシナーゼを含む 0.5mM の *p*-クレゾール溶液においてキトサンビーズ添加量を 0.0125 ~ 0.075cm³/cm³ とした際の反応時間に対するキノン形成を示す波長 400nm の吸光度の変化を図 1 に示す。キトサンビーズを加えて酵素反応を開始させると、吸光度の上昇が抑えられ、その後吸光度は反応時間とともに低下した。これは酵素反応によって *p*-クレゾールから形成したキノン化合物がキトサンビーズのアミノ基と反応して除去されたことを示す。また、添加したキトサンビーズ添加量が多いほど、吸光度の低下は顕著であり、キトサンビーズ量 0.025cm³/cm³ では反応時間 100 分で *p*-クレゾールはほぼ完全に除去された。

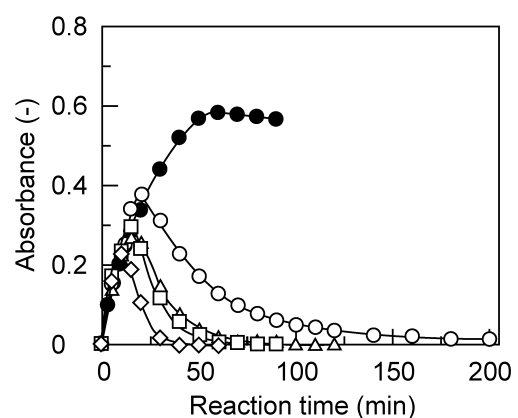


Figure 1 Enzymatic removal of *p*-cresol with *Aspergillus oryzae* tyrosinase in the absence (●) and presence of chitosan beads of 0.0125 (○), 0.025 (△), 0.050 (□), and 0.075 (◇) cm³/cm³.

Table 1 Removal of *p*-alkylphenols by the combined use of *Aspergillus oryzae* tyrosinase and chitosan beads at pH 6.0 and 30 °C.

<i>p</i> -alkylphenol	Initial conc. (mM)	Tyrosinase conc. (U/cm ³)	Chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Conversion %	Adsorption %	Removal %	Time (min)
<i>p</i> -cresol	0.50	150	0.025	100	100	100	100
4-ethylphenol	0.50	150	0.025	100	100	100	120
4- <i>n</i> -propylphenol	0.50	150	0.025	100	100	100	110
4- <i>n</i> -butylphenol	0.50	150	0.100	100	97.6	97.6	90
4- <i>n</i> -pentylphenol	0.50	150	0.100	100	97.6	97.6	120
4- <i>n</i> -hexylphenol	0.30	150	0.100	100	98.3	98.3	120
4- <i>n</i> -heptylphenol	0.10	150	0.025	100	100	100	80
4- <i>n</i> -octylphenol	0.05	150	0.025	100	100	100	120
4- <i>n</i> -nonylphenol	0.05	150	0.025	100	100	100	3
4-isopropylphenol	0.50	150	0.025	92.8	90.5	84.0	180
		200	0.025	100	100	100	120
4- <i>sec</i> -butylphenol	0.50	150	0.025	88.6	83.3	73.8	120
		200	0.025	100	82.3	82.3	180
		200	0.050	100	100	100	160
4- <i>tert</i> -butylphenol	0.50	150	0.025	92.1	54.5	50.2	180
		200	0.025	95.6	57.8	55.3	180
		200	0.050	95.2	72.6	69.1	180
		250	0.050	100	71.1	71.1	300
		250	0.100	100	90.6	90.6	480
4- <i>tert</i> -pentylphenol	0.50	150	0.025	84.9	86.2	73.2	360
		250	0.050	94.9	87.9	83.4	360
		250	0.100	96.0	95.4	92.6	360
		250	0.150	95.5	100	95.5	480

形成したキノンのキトサンとの反応はキノンの水付加反応と競争的に進行するので(11), キトサンビーズ添加量が少ないときの除去率低下の原因と考えられる. さらに pH6.0, 30°Cでアルキル鎖長 2~9 の *p-n*-アルキルフェノールの除去実験を行った結果を表 1 にまとめた. *p-n*-ブチルフェノール, *p-n*-ペンチルフェノール, *p-n*-ヘキシルフェノールでは生成したキノン化合物のキトサンビーズへの吸着が遅かったので, キトサンビーズ量を 0.100cm³/cm³に増加させて除去実験を行った結果, いずれの *p-n*-アルキルフェノールに対しても 97%以上の除去率が得られ, 高く除去できることがわかった. さらに, 分岐状 *p*-アルキルフェノールの除去においても表 1 に示すように麴菌チロシナーゼ濃度とキトサンビーズ添加量を上昇させることで 90~100%の除去率が得られた. 4-*tert*-ブチルフェノール(4TBP)は過酸化水素存在下においてマッシュルームチロシナーゼによってキノン酸化することが報告されているが, 麴菌チロシナーゼは過酸化水素なしで 4TBP と 4-*tert*-ペンチルフェノールをキノン酸化し, 本方法によってこれらを効率的に除去することができた.

3. 2 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA の除去

HRP は過酸化水素存在下において BPA をラジカル化し, 過酸化水素濃度の上昇とともに反応時間 180 分での BPA(2.5mM)の残留率は低下

し, 溶液は不溶性のオリゴマーの形成により高く白濁した. また, [BPA]/[H₂O₂]=1.0 の条件で残留率が 0%となった. これは HRP が酵素活性を示す反応機構サイクルにおいて過剰に過酸化水素が存在すると, HRP が不活性な形態をとるためと言われている(12). さらに溶液中に PEG を加えると, 酵素反応によって形成したフェノキシラジカルや自己重合生成物が PEG との間で可溶性の複合体を形成し, HRP の活性の低下を抑えることができた(13). さらに, 諸条件を変化させて BPA の残留率を検討した結果, pH6.0, 30°C, [BPA]/[H₂O₂]=1.0, [HRP]=1.0U/cm³, [10K-PEG]=0.1mg/cm³を至適条件として決定できた. この条件で種々のビスフェノール誘導体の除去実験を行った結果を表 2 にまとめた. HRP はビスフェノール S と 2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホンに対しては活性を示さなかったが, 他の 11 種類のビスフェノール誘導体を処理することができ, 残留率を 5~0%にすることができた. さらに, 酵素反応処理後, 溶液の pH を塩酸で 4.0 まで低下させると, 形成した不溶性オリゴマーの凝集が進むことで溶液を容易にろ過することができ, 無色透明な溶液が得られた.

2. 3 マッシュルームチロシナーゼの固定化と *p*-クレゾールの除去

固定化反応において pH6.0 以下ではマッシュルームチロシナーゼが EDC とともに凝集する

Table 2 Removal of BPA and its derivatives (2.5 mM) with HRP at pH 6.0 and 30 °C
[bisphenol derivative]=[H₂O₂], [10K-PEG]=0.1 mg/cm³

Bisphenol derivatives	[HRP] (U/cm ³)	% residual	Absorbance at pH 4	Color of filtrantat
bisphenol A	1.0	0	0.012	transparent
bisphenol B	5.0	0	0.006	transparent
bisphenol C	1.0	0	0	transparent
bisphenol E	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol F	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol S	20.0	no activity		
bisphenol T	1.0	0	0.001	transparent
bisphenol Z (0.5mM)	2.0	0	0.21	white
diphenolic acid	20.0	5.1	1.080	white
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	20.0	no activity		
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	1.0	0	0.001	transparent
2,4'-dihydroxybenzophenone	20.0	3.9	0.021	transparent
4,4'-dihydroxybenzophenone	20.0	5.5	0.65	white
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	0.1	0	0.004	ocher

ため、固定化量を決定できなかつたが、pH7.0～10.0の範囲では固定化反応を行うことができ、固定化時間が長いほど高い固定化量が得られた。pH7.0で72時間固定化反応させて得たクロシナーゼ固定化樹脂を用いて *p*-クレゾールの除去実験を5回行ったところ、測定回数を繰り返すことによって除去率がわずかに低下したが、85%以上の除去率が得られた。また、固定化時間を長くして調製したクロシナーゼ固定化樹脂を用いると、繰り返し利用した際の活性の低下が抑えられた。これは固定化時間を長くすることで樹脂とクロシナーゼ分子との間の結合枝数が増加し、変性しにくくなったためと考えられ、固定化によるクロシナーゼの反復利用の可能性を見出した。

4 結言

本発表では3種類の酸化還元酵素を用いて *p*-アルキルフェノールやBPAとその誘導体を効率的に除去できることを述べたが、今後は個々の酵素の特徴を活かした利用方法を見だし、他の環境汚染物質の除去への応用を検討する。また、工業的な利用(実用化)を考える上で、酵素の反復利用は重要な課題であり、現時点では固定化によって酵素の活性が十分に保持されているとは言えないので、固定化条件やキトサンビーズの合成などを検討することで、高く活性を保持した安定な固定化酵素の構築を目指すことが我々の今後の研究課題である。

5 参考文献

1) Guillette, L. J., Gunderson, M. P., *Reproduct.*,

122, 857-864 (2001).

2) 稲森悠平, 宇都宮暁子, ”非イオン界面活性剤と水環境”日本水環境学会[水環境と洗剤研究委員会]編, 技報堂出版, p.113-136 (2000).

3) Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A. G. M., Bowmer, T., *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).

4) Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).

5) Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006).

6) Bieganski, A. T., Bukowska, M. J., and Jackowska, ., *Bioelectrochem.*, **69**, 41-48 (2006).

7) Yamada, K., Iizawa, Y., Yamada, J., and Hirata, M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **102**, 4886-4896 (2006).

8) 山田和典, 井上友明, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 第 20 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, p172-173 (2006).

9) 池田尚也, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 日本化学会第 87 春季年会予稿集, 印刷中.

10) Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., and Ichishima, E., *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004).

11) Jiménez, M., and Carcía-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).

12) Wright, H., and Nicell, J. A., *Bioresource Technol.*, **70**, 69-79 (1999).

13) Duarte-Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, M. A., García-Almendarez, B. E., and Regalado, C., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 42-47 (2002).

アリールアクリル酸誘導体の光化学反応および包接化

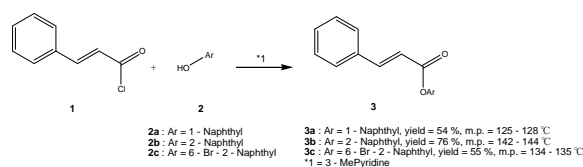
日大生産工 ○杉山 邦夫

【序】近年、光化学分野において結晶場における反応に焦点が当てられている。分子が正しく配列する結晶場での反応は、溶媒中における反応よりも高い選択性の発現が期待できるとともに、無溶媒反応としての利用価値が高い。通常の溶液反応においては、反応後の溶媒の処理、除去が必要になる。有機溶媒を使用しない水溶媒であっても溶媒に溶存する原料、触媒、生成物の除去が必要であるが、反応溶媒等を使用しない固相化学反応においてはそれらを必要としない。したがってこの種の無溶媒反応は環境への負荷が最小限になると期待される。結晶の融点以下で反応を行わなければならない固相反応において、反応に加熱が必要でない固相光化学反応は最も応用の可能性が高い。反応溶媒等を用いることなく目的化合物を合成できることから、グリーンケミストリーにかなう手法である。また、固相反応を行う場合に有利な点の一つとして、X 線構造解析手法が利用できることであり、反応の過程、反応の状態の追跡も可能となる場合がある。また、[2 + 2] 環化光二量化反応は最近接の二重結合による付加環化反応であり、溶媒を利用しない。しかしながら、結晶場における反応は結晶形態に著しく依存する特徴がある。合成的な価値が高く、様々なシクロブタン誘導体や、それらから誘導できる化合物の合成に用いられている。

ケイ皮酸類の固相光化学反応については Schmidt らにより広範な研究がなされている。彼らは、結晶中に並んでいる分子の配列が生成物の立体化学を決定するというトケミカル則を提唱した。これはケイ皮酸類に光照射すると、4.2 Å 以内の最近接分子同士の結晶構造に対応して α 型からは head - to - tail (h - t) 型の生成物が、 β 型からは head - to - head (h - h) 型の [2 + 2] 環化付加体が生成する。また、その距離が 4.7 Å 以上の場合には γ 型といわれ、[2 + 2] 環化付加反応

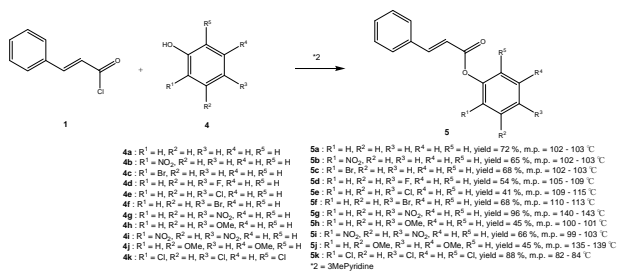
が進行しないとされている。しかしながら、ケイ皮酸誘導体のベンゼン環上の置換基効果については明確な結論が得られているとは言い難い状況であった。むしろ、置換基と反応結果には関係がないとされている場合もあり、系統的な置換基効果についてジクロロベンゼン環を有する化合物以外ほとんど研究されていなかった。固相反応において、置換基効果が認められるか否かは結晶工学的にも重要な問題である。そこで、当研究室ではケイ皮酸類の置換基効果を解明するため、ケイ皮酸のフェニル基上に種々の置換基を導入した化合物を合成し、種々の条件により結晶を作成し、その置換基効果についての解明を行っている。ケイ皮酸の環状エステルであるクマリンの光反応を行ない、二量体自身がホストとして働くことを見出した。他のエステルでもホストとして働く可能性もあることから本研究ではアリールアクリル酸エステルを合成して、主にケイ皮酸エステル誘導体について固相状態で光化学反応を行い、それぞれの置換基による反応性の違いについて単結晶 X 線構造解析等を利用して検討した。

【実験】ベンゼン溶媒中 3 - メチルピリジンに触媒として、シンナモイルクロリド (1) とナフトール (2a ~ 2c) を用いて、モル比 1 : 1 により 1 時間加熱還流を行った。反応終了後室温まで戻してメタノールにより再結晶して結晶を析出させ、ナフチル基を有したエステル誘導体 (3a ~ 3c) を得た (Scheme 1)。



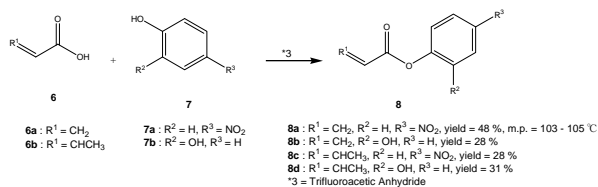
Scheme 1

同様に、ベンゼン溶媒中 3 - メチルピリジンを触媒として、シンナモイルクロリド (1) と置換フェノール (4a ~ 4k) を用いて、モル比 1 : 1 により 1 時間加熱還流を行った。反応終了後室温まで戻してメタノールにより再結晶して結晶を析出させ置換フェノールを用いたエステル誘導体 (5a ~ 5k) を得た (Scheme 2)。



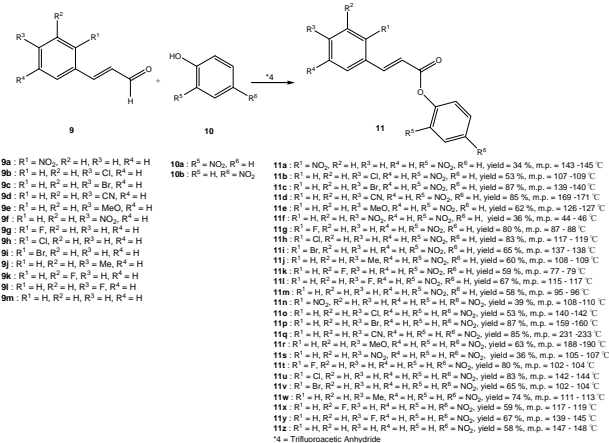
Scheme 2

また別に、トリフルオロ酢酸無水物を用いて、アクリル酸類 (6a, 6b) と 4 - ニトロフェノールまたはカテコールの置換フェノール (7a, 7b) をモル比 1 : 1 に混合し、約 24 時間室温で反応させた。反応終了後、ジクロロメタンにより再結晶して結晶を析出させアクリル酸類を用いたエステル誘導体 (8a ~ 8d) を得た (Scheme 3)。



Scheme 3

さらに、種々の置換基を有するベンズアルデヒドを出発原料として、Knoevnagel 反応を行い、対応する置換基を有するケイ皮酸 (9a ~ 9m) を得た。ついで、トリフルオロ酢酸無水物を用いて、9a ~ 9m とフェノール (10a または 10b) をモル比 1 : 1 で混合し、約 24 時間室温で反応させた。反応終了後、ジクロロメタンにより再結晶して結晶を析出させエステル誘導体 (11a ~ 11z) を得た (Scheme 4)。光反応では試料をシャーレにできる限り均等に広げ Pyrex ジャケット付き 100-W 高圧水銀光を用いて照射を行い、光反応生成物は、単結晶 X 線解析法や シクロブタン環水素の NMR パターンから立体配置を決定した。



Scheme 4

【結果・考察】結果を示し以下、シンナモイルクロリドとナフトールより得られたエステル誘導体 3a ~ 3c を固相状態で光照射し、エタノールより再結晶したところ 3b, 3c syn head to head (syn h - h) 型の光二量体を収率 55 ~ 62% で得た。3a の X 線構造解析を行ったところ最近接二重結合間距離は、5.3 Å であった。これは Schmidt 即の 4.8 Å より大きく、実際に光反応が進行しないという結果であった。しかし 3c の最近接二重結合間距離は 4.0 Å で、この値はの結晶光二量化反応が進行する 4.2 Å 以内 (Schmidt 則) であり、最近接の分子同士は syn h - h 型をとっており、生成物の型と対応している (Figure 1)。

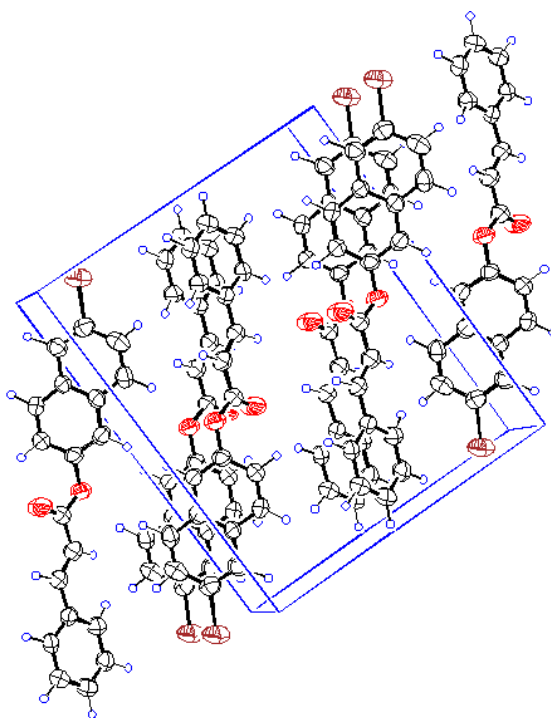


Figure 1. ORTEP Drawing of 3c

シナモイルクロリドと置換フェノールより得られたエステル誘導体 **5a** ~ **5k** を固相状態で光照射し、エタノールより再結晶して **5a**, **5b**, **5g** については光二量体が収率 3 ~ 78 % で得られた。**5b** からは syn head to tail (syn h - t) 体が 22 % で得られた。**5g** の X 線構造解析を行ったところ最近接二重結合間距離は 3.8 Å でこの値は Schmidt 則の範囲内であるため [2 + 2] 環化付加反応が進行した (Figure 2)。

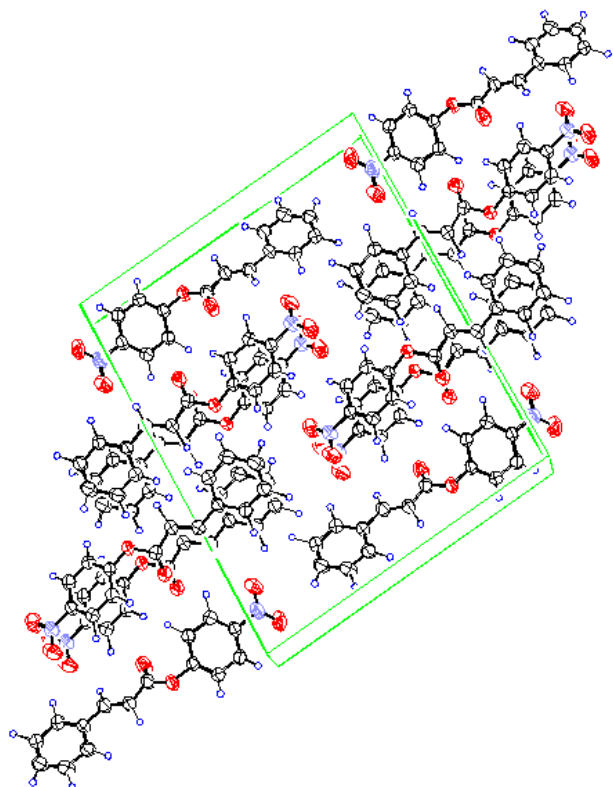


Figure 2. ORTEP Drawing of **5g**

また、生成物は syn h - h 型であり、対応してる。ここで、**5g** のような二つのベンゼン環の面同士が平行に近い場合、光反応する分子同士の立体障害が少なくシクロブタン環が容易に生成したと考えられる。一方光反応の進行しないような場合には、二つのベンゼン環同士の、ねじれの角度が 90 度に近い場合が多く、分子間に働く立体障害が大きくなり二重結合同士の接近が妨げられるため、付加反応が進行しないことが考えられる。

また、ナフタレン環を有したエステル誘導体 (**3a** ~ **3c**) でも同様に、光反応が進行する **3b**, **3c** のような構造ではねじれの角度が平行に近く分子間に働く相互作用

用が少ないことが考えられる。分子軌道計算によれば、PM3 のみならず 6-31G 計算において単独の分子の場合このねじれの角は 60 度前後の値が得られている (Figure 3)。

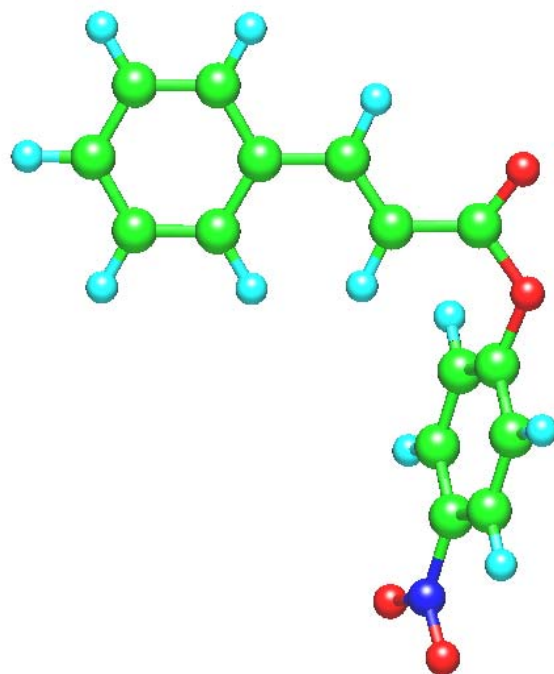


Figure 3. Calculated Structure of **5g**

アクリル酸類と置換フェノールにより得られたエステル誘導体 **8a** ~ **8d** を固相状態で光照射したところ付加反応が進行していないことが ¹H - NMR よりわかった。

オルト位、メタ位、もしくはパラ位に置換基を持ったケイ皮酸誘導体とオルト位にニトロ基を有するフェノールより得られたエステル誘導体 **11a** ~ **11z** を固相状態で光照射し、**11a**, **11c**, **11d**, **11k**, **11m** で反応が進行し、ジクロロメタンより再結晶したところ光二量体が収率 6 ~ 84 % で得られた。**11j** の X 線構造解析を行ったところ最近接二重結合間距離は、6.1 Å と大きくなっており、実際光反応は進行しなかった (Figure 4)。**11c** の X 線構造解析を行ったところ、最近接二重結合間距離は 7.5 Å であることが求められた。この値はアルケンの結晶光二量化反応が進行する極限距離 (Schmidt 則) の 4.7 Å よりも大きく、結晶中において **11c** がある程度の自由度を持ち、環化できる場合があることを示唆する結果である (Figure 5)。

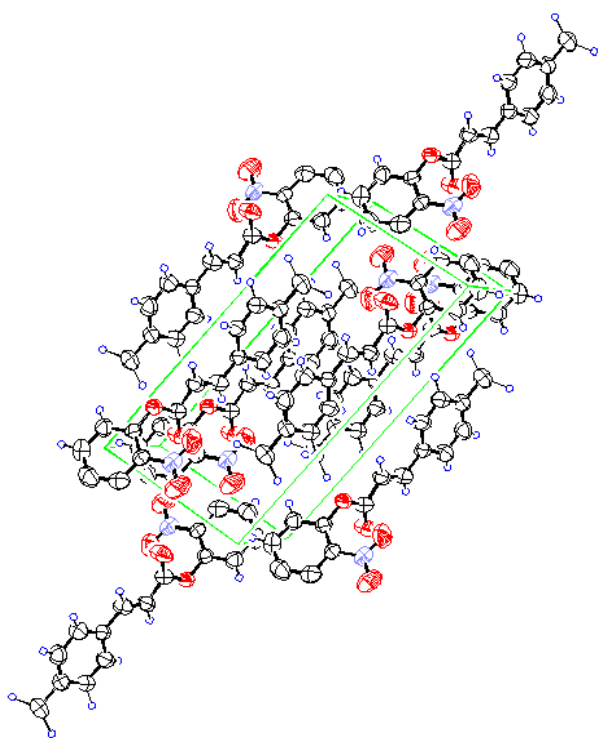


Figure 4. ORTEP Drawing of **11j**

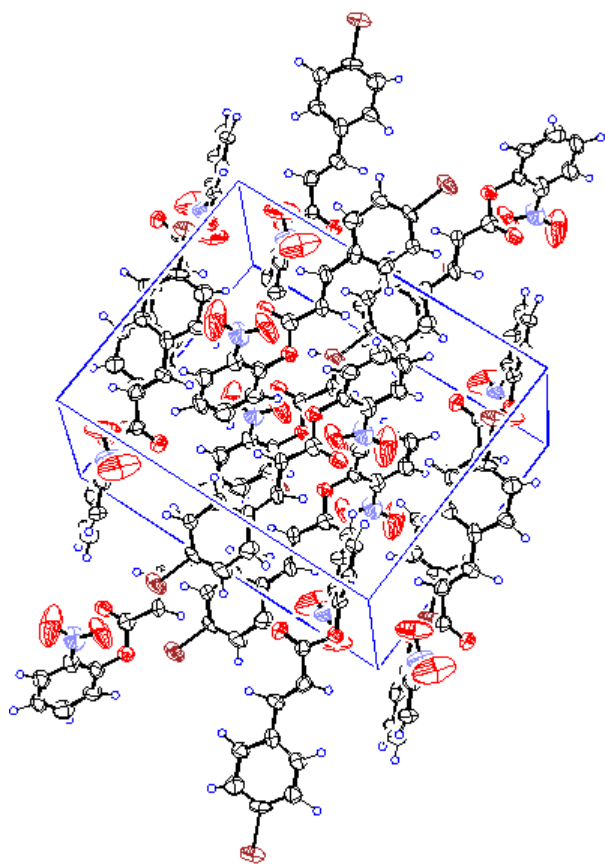


Figure 5. ORTEP Drawing of **11c**

比較のために、熔融状態で光照射を行った。これは、熱をかけることにより分子の反応自由度が増すことが期待される。**11b**では *syn h - t* 体が 7%, *ati h - h* 体が 13%, *cis* 体が 7%, **11k**では *syn h - h* 体が 13%, *ati h - h* 体が 4%, *cis* 体が 5% 得られた。分子内での *cis - trans* 異性化が起こり、熔融状態では生成物の選択性が大きく減少した。

結晶中での反応では置換基により反応が進行する場合としない場合があり、一部 *syn h - t* 型の二量体が得られたが、光二量化が進行するほとんどの場合には、*syn h - h* 型の生成物が得られた。熔融状態における反応に比べると、非常に選択的な反応結果が得られた。今後、これらのエステル類を利用してキラル反応場を構築することにより不斉選択的の反応が期待される。下に我々が得たケイ皮酸の環状エステルであるクマリン二量体にベンズピナコールが包接された結晶(クラスレート)の解析図を示す

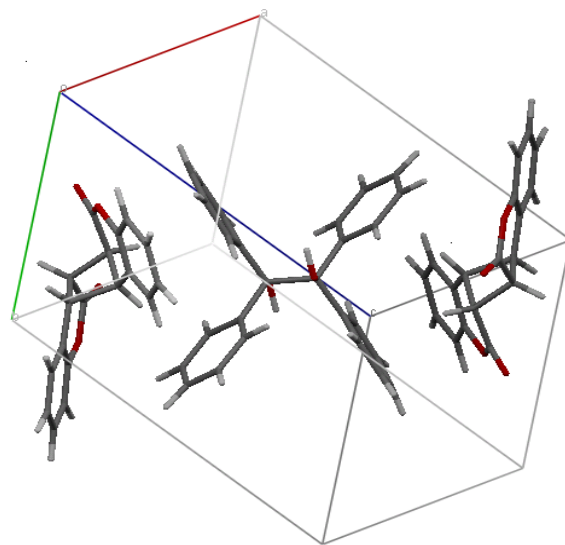


Figure 6. Crystal structure of coumarin-dimer clathrate

【参考文献】

- 1) Z. Dongbo, D. Kuiling, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 1349-1351
- 2) F. Toda, T. Tanaka, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 3255-3257. .
- 3) Nishikubo, T.; Takahashi, E.; Miyaji, T.; Iizawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, 58(11), 3399-3400.

1. 緒言

化学センサーは特定の分子に応答してシグナルを発する超分子系であり、盛んに研究が行なわれている。また、金属イオンを標的にしたセンサー構築に関しても興味を持たれている。一方、生体内では金属応答性タンパク質が種々の機能発現に重要な役割を果たしている。この機能発現においては金属イオンによるタンパク質の構造変化が駆動力となっている。いわば、金属応答性タンパク質は水系で特定の金属イオン種を選択的に認識する高精度・高感度なセンサーである。しかしながら、タンパク質を模した水溶性ポリペプチドをプローブとしたセンシングシステムの構築例はほとんどない。タンパク質による高精度・高感度な金属イオンセンシング系を人工的に構築することが可能になれば、タンパク質の構造と機能の関係について知見を得られるだけでなく、“Green Sustainable”な材料による高選択的分離分析システムの構築に大きく貢献できるものと考えられる。

これまで *de novo* 設計により、水系で安定な三本鎖 coiled coil 構造を形成するポリペプチドおよび遷移金属イオンや重金属イオンに反応して三本鎖 coiled coil 構造を形成するポリペプチドの設計が行われてきた¹⁻⁴⁾。さらに、本プロジェクトにおける 17 年度の成果として、Ni²⁺イオン極めて選択性高く応答する短鎖ポリペプチドによる coiled coil 新規アセンブル系の構築、ならびに coiled coil 構造形成時におけるポリペプチド鎖上の蛍光ドナー—アクセプター分子間による蛍光エネルギー移動(FRET)現象を利用した Ni²⁺イオンセンシングシステムの構築について報告した⁵⁻⁷⁾。

本発表では 18 年度の成果として、新たに設計したポリペプチドの構造変化を利用した希土類金属イオン選択的センシング系の構築について報告する。また、希土類金属イオン配位場付近のアミノ酸残基改変によりπ-π*励起可能な官能基を希土類金属イオン付近に固定し、希土類特有の f-f 遷移を利用した蛍光センシングについても検討したので併せて報告する。

2. 実験

2. 1 ポリペプチド合成

本研究で使用したポリペプチドはすべて Rink amide 樹脂を用いた Fmoc 固相法にて合成した。そして精製は Sephadex G-50 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよび YMC-Pack ODS-A カラム (10 mm i.d.×250 mm, 5 μm, YMC Inc., Japan)を用いた高速液体クロマトグラフィーによって行った。

2. 2 円二色性(CD)スペクトル測定

CD スペクトル測定は JASCO J-820 分光計を使用して行った。すべての測定試料は 10 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解したものを、セル長 0.2 cm で測定を行った。

2. 3 蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトル測定は HITACHI F4500 蛍光分光光度計を使用して行った。すべての測定試料は 10 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解したものを、セル長 1 cm で測定を行った。

3. 結果と考察

3. 1 ポリペプチドの設計

本研究で用いたポリペプチドのアミノ酸配列を Fig. 1 に示す。Pep1 は EE(K)KIAAI (efgabcd) の 7 アミノ酸残基の繰り返し配列によって構成されている。Pep1 において *a* および *d* 位置には Ile が配置されており、そのジッパー効果による安定な疎水性コア形成の結果、水溶液中で三本鎖 coiled coil 構造を形成するモデルである^{2,5)}。また、Pep2 は Pep1 に金属イオン結合部位としての His 残基を付与したもので、金属イオンとの配位により三本鎖 coiled coil 構造が誘起される

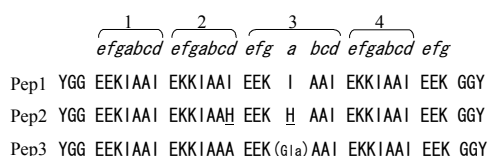


Fig. 1 Amino acid sequences of the metal ion sensing polypeptides used in this study.

Construction of Lanthanide Ion-Selective Sensing System by the Use of *de novo* Designed Polypeptides

Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

モデルである³⁾。一方, Pep3は本研究の目的に応じて設計・合成した新規モデルポリペプチドで, Pep1の第2繰り返し単位*d*位置(2*d*位)および第3繰り返し単位*a*位置(3*a*位)のIleをそれぞれAlaおよびGla(γ -carboxyglutamic acid)に置換したものである。3*a*位のGlaはこれまでの研究から希土類金属イオンに対して良好な配位子であることが報告されているため^{8,9)}, 疎水部における認識部位として選択した。また, 2*d*位のAlaは認識された希土類金属イオン収容のための空孔として利用した。Pep3は希土類金属イオン不在下では親水的なGlaの側鎖および2*d*位のAlaが形成する空孔のため, 一方, 希土類金属イオン存在下ではGlaによる認識および空孔への収容が設計どおり行われ, 安定な三本鎖coiled coil構造が誘起されるものと考えられる。

3.2 ポリペプチドの構造変化を指標とした希土類金属イオンセンシング系の設計

金属イオンに応答したポリペプチドの構造変化はCDスペクトル測定により検討した。これまでの検討から, Pep1のCDは208および222 nmに負の極大を有する典型的な α -helix構造のパターンを示し, 設計どおりの三本鎖coiled coil構造を形成することが確認された。一方, Pep2に関しては金属イオン不在下ではrandom構造によるCDパターンであったが, Ni²⁺イオン存在下においては α -helix構造特有のパターンを示した。これらの結果はPep2が設計どおりNi²⁺イオンの存在の有無によるrandom/coiled coil構造転移を起こしたことを示している。本研究で新規に設計・合成した希土類金属イオン応答性ポリペプチドPep3のCDスペクトルをFig. 2に示す。Pep3においても, 金属イオン不在下ではrandom構造であった。このことは, Pep1に対して, 2*d*位および3*a*位の改変が疎水性コアの不安定化をもたらしたことを示している。一方, 希土類金属イオンとしてEu³⁺イオン存在下におけるPep3は典型的な α -helix構造のパターンを示した。この構造変化はNi²⁺などの遷移金属イオンおよびCa²⁺イオン存在下では観測されなかったことから, 設計どおり3*a*位に配したGlaは希土類金属イオンに対して良好な配位子として機能していることが示唆された。

また, Pep3中のGlaによる希土類金属イオンへの配位挙動とcoiled coil構造形成との関係について調べるためにPep3のCDスペクトルのpH依存性を検討した。Fig. 3はEu³⁺イオン存在下でのPep3における α -helix構造形成の指標となる222 nmのCD値を種々のpHにおいてプロットしたものである。Fig. 3の結果はpHの低下

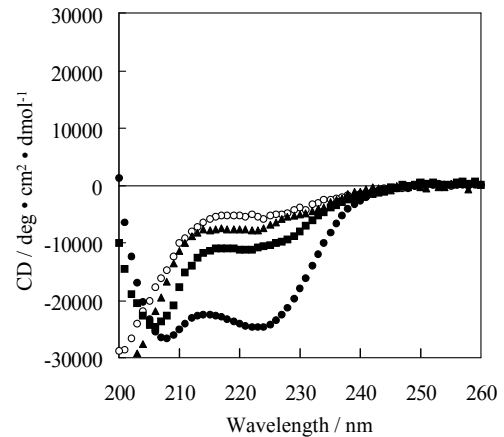


Fig. 2 CD spectra of Pep3 in the absence (○) and presence of 80 μ M of metal ions (Eu³⁺(●), Ni²⁺(▲), Ca²⁺(■)). The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.0) at 20 °C. The polypeptide concentrations were 40 μ M.

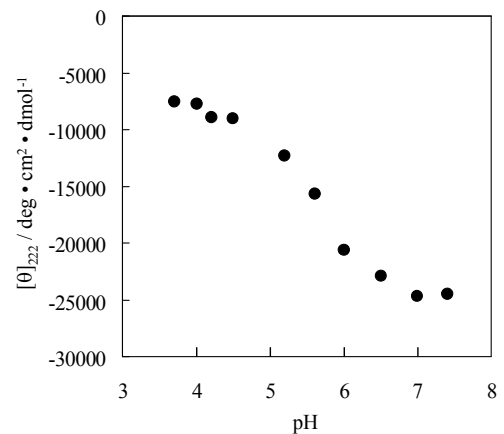


Fig. 3 pH dependence of the structure of Pep3 in the presence of Eu³⁺ ions (80 μ M) monitored by CD spectroscopy. The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl at 20 °C. The polypeptide concentrations were 40 μ M.

とともに α -helix性が低下することを示しており, カルボキシル基が解離したGlaが希土類金属イオンに対する配位子として機能していることを示唆している。

さらに, 水溶液中におけるポリペプチドの会合数を見積もるためにゲルろ過クロマトグラフィーによるPep3の分画分析を行った。その結果, Eu³⁺イオン存在下においてのみポリペプチド三量体に相当する分画(Pep1の分画を基準とした)に観測された。

以上の結果から本研究で設計・合成したPep3は希土類金属イオン(Eu³⁺イオン)を選択的に認識して安定な三本鎖coiled coil構造を形成することが示された。

3.3 希土類金属イオンの蛍光センシングに向けたポリペプチドアセンブル系の構築

本実験系を希土類金属イオンセンシングへ展開する上で、希土類金属イオンの認識過程あるいはポリペプチドの構造変化を可視化することは必要不可欠である。そこで、われわれは三本鎖 coiled coil 構造の疎水場に收容された希土類の f-f 遷移を利用した蛍光センシングに着目した。そのために二種類のポリペプチド(Pep4 および Pep5)を新規に設計・合成した(Fig. 4)。

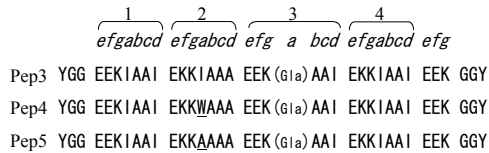


Fig. 4 Amino acid sequences of the lanthanide ion-selective polypeptides for fluorescence sensing.

Pep4 および Pep5 は Pep3 をモチーフとしたポリペプチドであり、2a 位の Ile をそれぞれ Trp および Ala に置換したものである。この置換により、希土類金属イオン存在下で Pep4 : Pep5 = 1 : 2 の三本鎖 coiled coil ヘテロ構造を形成することが過去の研究から予測される^{10,11)}。すなわち、三本鎖 coiled coil 構造形成時に 2a 位において Trp のインドール基が Ala の形成する空孔に適合することでヘテロ構造を選択的に形成するわけである。この三本鎖 coiled coil ヘテロ構造が形成されると、疎水場に收容された希土類の近傍に Trp のインドール基が位置することになる。そして Trp の π - π^* 励起 (Ex = 280 nm) により、禁制の希土類 f-f 遷移による発光を得ることができ、目的としたセンシングの可視化が実現可能となると考えられる。

はじめに希土類金属イオンに誘起されたポリペプチドの構造変化について調べるために CD スペクトル測定を行った。Fig. 5 には Pep4, Pep5, Pep4/Pep5(1:2 混合物)の CD スペクトルを示す。金属イオン不在下ではいずれの系も random 構造であった。一方、Eu³⁺イオン存在下では Pep4/Pep5(1:2 混合物)において α -helix 構造のパターンが顕著に現れた。この結果は Eu³⁺イオン存在下において、設計どおり Pep4 : Pep5 = 1 : 2 の三本鎖 coiled coil ヘテロ構造が形成されたことを示唆している。

水溶液中におけるポリペプチドの会合数を見積もるためにゲルろ過クロマトグラフィーによる分画分析を行った。その結果、Eu³⁺イオン存在下において Pep4/Pep5(1:2 混合物)はポリ

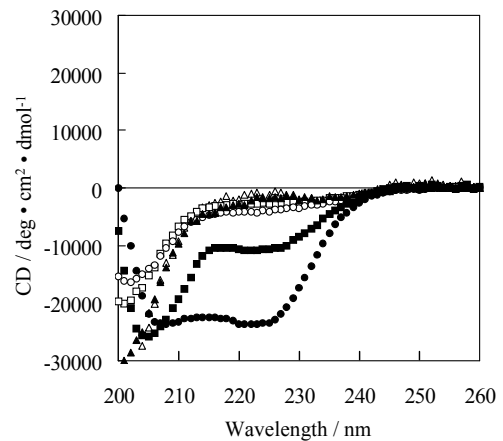


Fig. 5 CD spectra of Pep4 (squares), Pep5 (triangles) and Pep4/Pep5 (1:2 mixture) (circles) in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of Eu³⁺ ions (80 μ M). The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 20 $^{\circ}$ C. The polypeptide concentrations were 40 μ M.

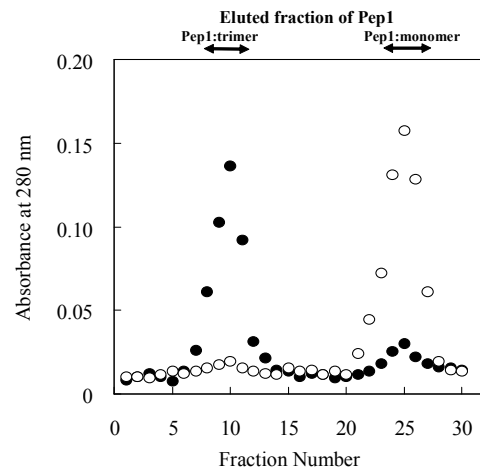


Fig. 6 Analysis of the eluted fraction of Pep4/Pep5 (1:2 mixture) in the presence (●) or absence (○) of Eu³⁺ ions using Sephadex G-50 column. The elution was performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 20 $^{\circ}$ C. The arrows indicate the eluted position of the standards, Pep1 in 10 mM Tris-HCl buffer (trimer) and Pep1 in 6 M guanidine hydrochloride solution (monomer).

ペプチド三量体に相当する分画(Pep1 の分画を基準とした)に観測された(Fig. 6)。

以上の結果から希土類金属イオンの蛍光センシングに有効と考えられる Pep4 : Pep5 = 1 : 2 の三本鎖 coiled coil ヘテロ構造が Eu³⁺イオン存在下で構築できることが示された。

3. 4 希土類金属イオンの蛍光センシング

前項で構築した Pep4/Pep5/Eu³⁺による三本鎖 coiled coil ヘテロ構造について蛍光スペクトル測定を行った。Fig. 7に Trp の π - π^* 励起(Ex = 280 nm)による Eu³⁺の f-f遷移領域の蛍光スペクトルを示す。その結果、619 nm 付近に赤色蛍光が観測された。この蛍光は Eu³⁺由来 f-f 遷移領域の発光帯特有のものであった。なお、Em = 619 nm における励起スペクトル測定の結果、280 nm 付近にピークが観測された。これらの結果は形成した三本鎖 coiled coil ヘテロ構造中の Trp から Eu³⁺イオンへのエネルギー移動が起こっていることを証明している。

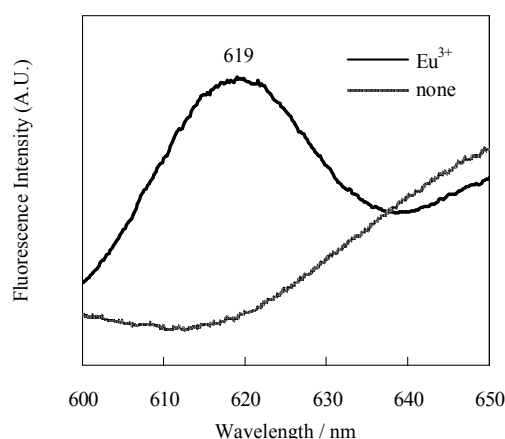


Fig. 7 Fluorescence emission spectra of Pep4/Pep5 (1:2 mixture) in the presence and absence of Eu³⁺ ions (80 μ M) with the excitation wavelength at 280 nm. The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 4 °C. The polypeptide concentrations were 40 μ M.

なお、他の希土類金属イオン(Tb³⁺および Ce³⁺)存在下においても同様の蛍光測定を行った。Table 1に示すように Tb³⁺イオン存在下では 516 nm 付近に緑色蛍光が、Ce³⁺イオン存在下では 491 nm 付近に青緑色蛍光が観測された。

Table 1 Results of Fluorescence Emission measurements of Eu³⁺, Tb³⁺, and Ce³⁺ in the Presence of Pep4/Pep5 (1:2 mixture)

	Ex / nm	Em / nm		
Eu ³⁺	280	619	→	Red
Tb ³⁺	280	516	→	Green
Ce ³⁺	280	491	→	Turquoise

以上の結果から新たに設計・合成したポリペプチドアセンブル系を用いることによって、水系における希土類金属イオンの蛍光センシ

ングの可能性が示唆された。

4 結言

本発表でわれわれは *de novo* 設計による coiled coil ポリペプチドを用いた希土類金属イオン選択的なアセンブル系構築の可能性について報告した。また、希土類金属イオンの配位場付近のアミノ酸残基改変による希土類特有の f-f 遷移を利用した蛍光センシングの可能性についても併せて報告した。センシングという観点から見れば、蛍光強度の定量性や蛍光量子収率、そして蛍光寿命についての議論が不足しており、今後の検討課題として挙げられる。また、反復利用に向け、ポリペプチドの基板や高分子への担持などについても検討する必要がある。これらの検討課題が克服されれば、EL 素子や MRI 造影剤、そしてガンの放射線療法において用いられる希土類金属を対象とした新規センシングシステムを提案できるものと考えられる。

5 参考文献

- 1) Harbury, P. B., Zhang, T., Kim P. S., Alber, T., *Science*, **262**, 1401-1407 (1993).
- 2) Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., Tanaka, T., *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055 (1998).
- 3) Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., Nakamura, H., Tanaka, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13008-13015 (1998).
- 4) Li, X., Suzuki, K., Kanaori, K., Tajima, K., Kashiwada, A., Hiroaki, H., Kohda, D., Tanaka, T., *Protein Sci.*, **9**, 1327-1333 (2000).
- 5) Kashiwada, A., Nakamura, Y., Matsuda, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005).
- 6) Kashiwada, A., Nakamura, Y., Matsuda, K., *Sens. Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005).
- 7) 柏田 歩, 松田清美, 日本大学生産工学部ハイテク・リサーチ・センター平成 17 年度研究報告書, p25-28 (2006).
- 8) Sperling, R., Furie, B. C., Blumenstein, M., Keyt, B., Furie, B., *J. Biol. Chem.*, **253**, 3898-3906 (1978).
- 9) Kohn, W. D., Kay, C. M., Sykes, B. D., Hodges, R. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1124-1132 (1998).
- 10) Kashiwada, A., Hiroaki, H., Kohda, D., Nango, M., Tanaka, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 212-215 (2000).
- 11) Kiyokawa, T., Kanaori, K., Tajima, K., Tanaka, T., *Biopolymers*, **55**, 407-414 (2000).

オンラインおよびオンカラム電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC の開発

日大生産工 澁川 雅美 日大生産工 齊藤 和憲
日大生産工(PD) ○高橋 さつき

1 まえがき

分析対象化合物に特異的な化学反応を利用する誘導体化法は、分離選択性を向上させる効果的な方法のひとつである。本研究グループは、分析対象物質に特異的な化学反応を接触的に高速で行なう化学種変換システムを複数の分離場(カラム)を持つ HPLC に導入して、多次元分離による高選択性の獲得を目的とするオンラインおよびオンカラム化学種変換 HPLC の開発を進めている。本講演では、これまでに開発を行なった多孔質グラファイトカーボン(PGC)の酸化還元機能または電気化学セルを用いたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC, および電気化学クロマトグラフィーを利用したオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムについて紹介し、実際の分離例を報告する。これらの方法は、あらかじめ化学種変換を行なった後に化学種の分離を行なう通常のプレカラム誘導体化法や、特異的な検出を目的とするポストカラム誘導体化法とは概念を全く異にするものである。また、PGC のもつ接触的酸化還元作用の発現機構について検討した結果についても、併せて報告する。

2 オンライン酸化還元化学種変換 HPLC

2.1 PGC カラムを用いたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC による Fe(II)および Fe(III)シアン化物錯体の選択的分離

オンライン酸化還元化学種変換 HPLC は 2 つの分離カラムとその中間に配置した酸化または還元を行う化学種変換ユニットから構成されている^{1,2)}。この方法は変換前後で化合物の移動速度が変化するため選択的分離が可能である。これまでに化学種変換ユニットとして PGC を用い、銅合金中の微量 Co の定量に適用してその分離選択性の高さを実証した¹⁾。この方法の適用の拡大を目的とし、シアン化物イオンを配位子とした Fe 錯体を用い、オンライン酸化還元化学種変換 HPLC における化学種変換および HPLC 分離の条件の検討を行った。

Fe^{II}(CN)₆⁴⁻と Fe^{III}(CN)₆³⁻を含む 7 種類の金属シアン化物錯体を試料とし、PGC カラムを組み込

んだフローシステムに注入し、ピーク面積を測定した。PGCカラムを除いたフローシステムにおけるピーク面積と比較したところ、Fe^{II}(CN)₆⁴⁻とFe^{III}(CN)₆³⁻のピーク面積にのみ変化が見られた。ピーク面積が変化したということは化学種が変わったことを意味する。すなわちPGCカラムを通過する際にFe^{III}(CN)₆³⁻の一部が還元されFe^{II}(CN)₆⁴⁻に、またFe^{II}(CN)₆⁴⁻の一部が酸化されFe^{III}(CN)₆³⁻に変換したと考えられる。そこでPGCカラムを還元処理して同様の測定を行ったところ、Fe^{III}(CN)₆³⁻のピーク面積がFe^{II}(CN)₆⁴⁻と等しくなった。これらのピークのスペクトルを調べた結果、Fe^{III}(CN)₆³⁻がPGCによってFe^{II}(CN)₆⁴⁻に還元されたことが確認された。

ついでPGCカラムの酸化処理を行い、これを用いた際の各金属シアン化物錯体のピーク面積の変化を調べた。Fe^{II}(CN)₆⁴⁻のピーク面積がFe^{III}(CN)₆³⁻と等しくなり、これらのピークのスペクトルからFe^{II}(CN)₆⁴⁻がPGCカラムを通過することでFe^{III}(CN)₆³⁻に酸化されたことがわかった。一方、他の金属シアン化物錯体は酸化および還元処理されたPGCカラムを通過しても変化は見られなかった。このことより、PGCカラムを酸化および還元処理することによりFe^{II}(CN)₆⁴⁻およびFe^{III}(CN)₆³⁻を選択的に酸化および還元できることを明らかにした。

そこで、PGCカラムを2本の分離カラムの中間に組み込んだオンライン酸化還元化学種変換HPLCシステムを構築し、金属シアン化物錯体の測定を行った。また各測定において、比較のために化学種変換ユニットを除いたシステムでも同様の測定を行った。酸化処理をしたPGCを組み込んだシステムで得られたクロマトグラムをFig.1に示す。化学種変換ユニットを除いたシステムでは4分に溶出したFe(CN)₆⁴⁻がオンライン化学種変換HPLCシステムでは7分に溶出した。これは前段のカラムではFe(CN)₆⁴⁻として、後段のカラムではFe(CN)₆³⁻として移動

Development of On-Line and On-Column Electrochemical Redox Derivatization HPLC

Masami SHIBUKAWA, Kazunori SAITOH and Satsuki TAKAHASHI

したためである。これにより $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ をシステムピークから分離することができた。また, Fig.3 は還元処理をした PGC カラムを化学種変換ユニットとして組み込んだシステムにより得られたクロマトグラムである。化学種変換ユニットを除いたシステムと比較すると $\text{Co}(\text{III})$ と $\text{Fe}(\text{III})$ の溶出順が逆転した。これは, 前段のカラムでは $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ として移動したが, 後段のカラムでは保持の小さい $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ として移動し $\text{Co}(\text{III})$ より早く溶出したためである。これらのことから, 酸化もしくは還元処理した PGC カラムを用いるオンライン酸化還元化学種変換 HPLC によりヘキサシアノ鉄酸イオンの溶出位置を変化させ, 選択的に分離することが可能であることを明らかにした。

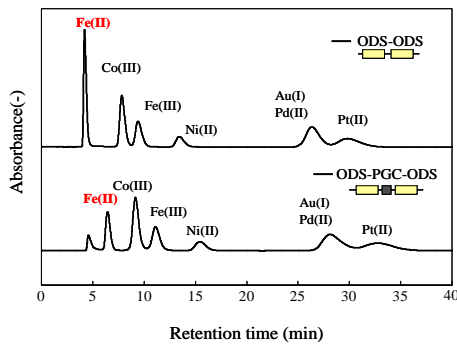


Fig.1 Chromatograms of a mixture of metal cyanide complexes obtained using the ODS-ODS system and the ODS-PGC(oxidized)-ODS system.

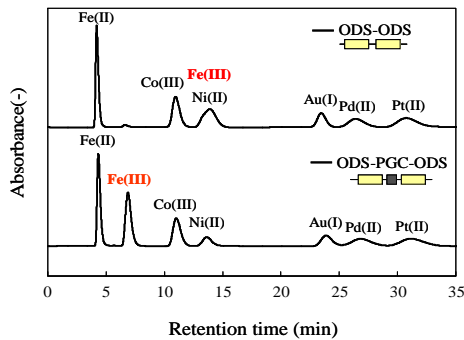


Fig.2 Chromatograms of a mixture of metal cyanide complexes obtained using the ODS-ODS system and the ODS-PGC(reduced)-ODS system.

2.2 オンライン酸化還元化学種変換HPLCによるCo-edtaの電解酸化反応の解析

PGCカラムの代わりに化学種変換ユニットとして電解セルを用いて電気化学的に酸化還元化学種変換を行うことも可能である。このオンライン電気化学的酸化還元化学種変換HPLCによりステンレス鋼中の微量コバルトの分離に成功した²⁾。一方, この研究の過程で, $\text{Co}(\text{II})$ -edta錯体を電解酸化した際に, $\text{Co}(\text{III})$ -

edta錯体の他にピークが検出されることが明らかになった。これは酸化ユニットとして PGC カラムを用いた際には見られない現象である。

分離カラムの前段に電解セルを設置したシステムにより $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体の電解酸化について検討した。Fig.3 に $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を試料として用いたときの各印加電位におけるクロマトグラムを示す。電位を 0.1V 印加すると, $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体がすべて酸化され, $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体の鋭いピークが観測された。この酸化挙動は酸化ユニットとして過酸化水素で酸化処理した PGC カラムで見られたものと同じである¹⁾。しかし, Fig.3 に示すように, $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を電解酸化すると, $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体のピークのほかに, それより僅かに速い溶出位置に小さなピーク(ピーク X)が生じている。ピーク X について得られた VIS スペクトルと $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体のスペクトルを Fig.4 に示す。ピーク X のスペクトルは可視領域では 550 nm に最大吸収を示すが, $\text{Co}(\text{III})$ -edta 錯体の最大吸収波長は 538 nm である。Doi は, 過マンガン酸イオンを用いて $\text{Co}(\text{II})$ -edta 錯体を酸化すると, 550 nm に最大吸収を持つ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ が迅速に生じ, その後閉環反応が徐々に進行して 538 nm に最大吸収を持つ $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})]$ を生成することを報告した³⁾。Fig. 4 に示すように, ピーク X の最大吸収波長は $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ のそれと一致している。これらの結果は, ピーク X が $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ であり, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ から $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})]$ への閉環反応はセル内で完全に進行しないことが明らかになった。これまでサイクリックボルタンメトリーを用いて Co -edta 錯体の酸化還元挙動に関する研究が数多くなされているが, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ の存在を明確

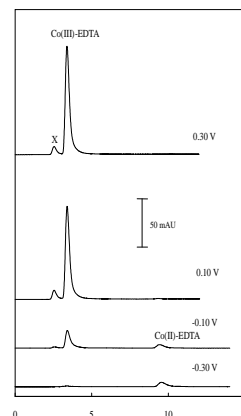


Fig. 3 Variation of chromatograms obtained for an injection of $\text{Co}(\text{II})$ -edta with potential applied to the electrolytic flow cell.

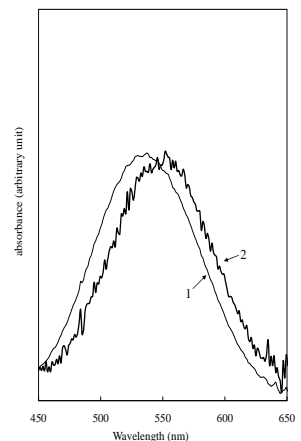


Fig. 4 VIS spectra obtained for the peak X and that for $\text{Co}(\text{III})$ -edta. 1 = $\text{Co}(\text{III})$ -edta, 2 = peak X

に示したものはない。

これらの結果はオンライン酸化還元化学種変換 HPLC が分離だけでなく電気化学反応の生成物の同定や反応機構の解析にも有効な手法となりうることを示唆している。

3 電気化学クロマトグラフィーを利用したオンカラム化学種変換 HPLC

電導性固定相を作用電極として用いてオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムの構築を試みた。本システムは変換効率が 100% でなくても、分析対象化合物を平衡混合物として分離することができる。また、印加する電位によって酸化還元平衡を制御できるという利点もある。そこで、それぞれ類似した構造を持つヒドロキノン、レゾルシノールおよびカテコール、ならびにドーパとチロシンをモデル化合物として選び、オンカラム酸化還元化学種変換 HPLC の可能性を検討した。また、カラムは Porter らによって考案された EMLC カラムを用いた。このカラムは電導性をもつ PGC を充填した特殊なカラムで、外部から固定相の電位を制御することができる^{4,5)}。

印加電位に対する各モデル化合物のピーク面積および保持係数の関係を Fig.5 に示す。チロシンを除く化合物は、それぞれ特定の電位を印加した際にピーク面積および保持係数に変化が生じた。これは、それぞれ対応する印加電位で化学種の変換が生じ、それにともない保持係数に変化したためと考えられる。チロシンについては、EMLC における印加電位では、化学種の変換が生じなかったため保持係数も変化を示さなかったと考えられる。さらに、可逆的な酸化還元反応を示す化合物として知られるヒドロキノンとカテコールについては、25-125 mV および 150-200 mV においてこれらのその酸化体である *p*-または *o*-ベンゾキノン両者の

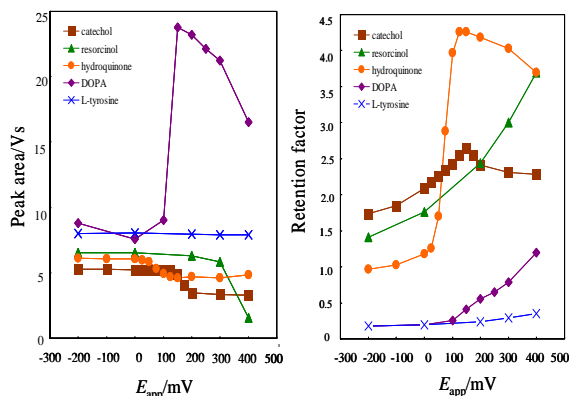


Fig.5 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

平衡混合物としてカラム内を移動していることが明らかとなった。これは、各印加電位におけるヒドロキノンとカテコールの濃度分率をピーク面積および保持係数から算出した値が互いに良く一致したことから支持される。

本システムを用いて5種化合物の混合試料の分離を行ったクロマトグラムを Fig.6 に示す。印加電位 0 mV では、ドーパとチロシン、カテコールとレゾルシノールに相互分離することができないのに対して、+300 mV の電位を印加すると、ドーパ、カテコールおよびヒドロキノンに酸化反応により化学種が変換して相互分離できることを明らかにした。

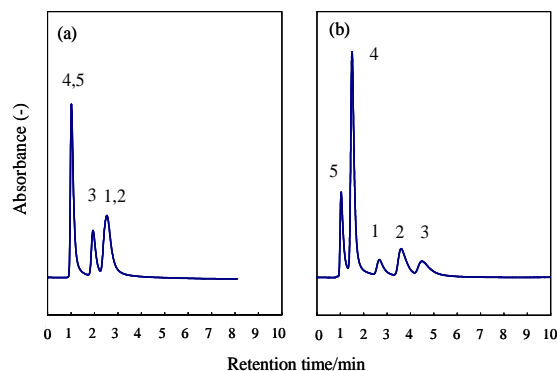


Fig.6 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by the on-column electrochemical derivatization HPLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) 300 mV

4 PGC の酸化還元反応機構

PGC の示す酸化還元作用は、その表面にごく微量存在する官能基に基因する可能性が高いと考えられているが、XPS 測定の結果からは PGC 表面には炭素以外の元素は確認されておらず、現時点ではそれらの官能基が特定されていない。また PGC は多孔質であり、かつイオン交換性を有することから、酸化剤や還元剤を吸着保持し、これらが酸化または還元反応を引き起こしている可能性も否定できない。今後、酸化還元化学種変換 HPLC の適用の拡大を図るためにも、PGC 上での酸化還元反応を系統的に評価し、その反応機構について知見を得ることが必要である。

そこで PGC 上における酸化還元反応機構解明の第一段階として、PGC カラムへの還元剤吸着の評価と、吸着量と酸化還元反応効率の関連について検討した。試料としては Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , NaNO_2 , NaNO_3 , KI , および KIO_3 の6種の塩を選択し、各陰イオンの定量は間接吸光検出イオンクロマトグラフィーを用いて行った。

PGC カラムに Na_2SO_3 溶液を注入したところ、 SO_3^{2-} のピークに加えて SO_4^{2-} のピークを検出し、

PGC カラム内での酸化反応が起こっていることを確認した。また、カラム通過前後のイオン総量を比較したところ、 IO_3^- 、 I^- 、 NO_2^- 、および SO_4^{2-} は PGC カラム前後でのイオン量の変化はほとんど見られなかったのに対し、 SO_3^{2-} と NO_3^- では、注入物質量に対して溶出物質量が減少しており、イオンの一部はカラム内に吸着している可能性が示唆された (Fig. 7)。

次に、予め Na_2SO_3 溶液を通液して、還元処理を行った PGC カラムについて SO_3^{2-} および NO_3^- の吸着量を求めた。その結果、還元処理を施さなかった PGC カラムに比べ NO_3^- の吸着量は著しく減少したが、 SO_3^{2-} は還元処理を施したカラムにも強く吸着した。この時の SO_3^{2-} は PGC カラム内で酸化され、 SO_4^{2-} として溶出していたが、 SO_3^{2-} の吸着量と SO_4^{2-} への酸化率の間に相関関係はみられなかった。また PGC カラム内での NO_3^- の酸化還元反応も観測されなかった。

以上の実験結果より、PGC カラム上での酸化還元反応は、吸着した酸化剤や還元剤が引き起こすのではなく、PGC 自体が反応に関与している可能性が高いと考えられる。また、 SO_3^{2-} と NO_3^- の PGC への吸着は互いに異なる機構であることが示唆される。

次に溶離液の pH が PGC の酸化還元反応性に与える影響について考察した。 $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ H_2O_2 溶液と、これに LiClO_4 を添加した溶液を通液した場合の PGC カラムの酸化還元性を調べたところ、 LiClO_4 を添加した溶液では Co(II)-edta に対して酸化性を示した。一方、 H_2O_2 のみの溶液で処理した PGC に Co(II) および Co(III)-edta を注入すると、どちらも Co(II)-edta に近いスペクトルを示し、PGC が還元性を示すことが分かった。

事前に酸化処理を施した PGC カラムに、溶離液として pH 3 または pH 11 に調整した 0.1 mol dm^{-3} LiClO_4 水溶液を用い、試料として Co(II) および Co(III)-edta 錯体を注入した。溶出ピークの紫外吸収スペクトルから Co の酸化状態を評価したところ、pH11 の条件では Co(II)-edta がカラム内で酸化され Co(III)-edta として溶出しており、このときの PGC カラムが酸化性であることが明らかとなった。一方 pH3 の溶離液を用いた場合には、 Co(II) および Co(III)-edta のスペクトルは pH 11 でのスペクトルと比較すると、どちらも吸光度が減少した。ここで、 Co(II) と Co(III) の間の酸化還元反応には水素イオンが関与していないことを考慮すると、今回の現象は酸化 PGC カラムが酸性の溶離液を通液することによってやや還元性に変化したことを示唆している。

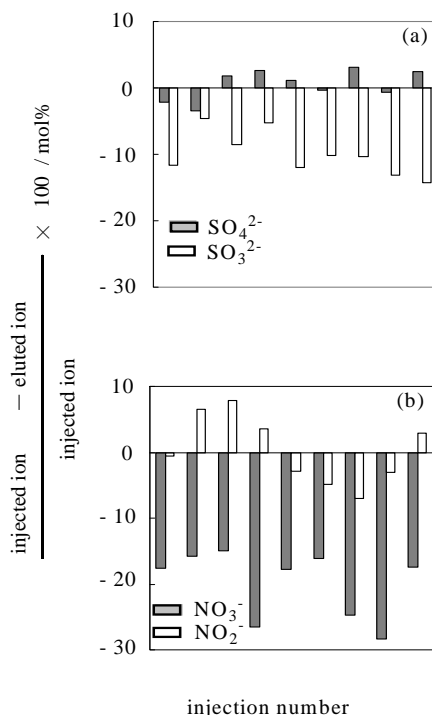


Fig. 7 Adsorption of inorganic anions on a PGC column (a) sulphonate and sulphate ions, (b) nitrite and nitrate ions. Eluent; $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ potassium hydrogen phthalate (pH 8.5)/methanol (90 / 10 (v/v)) containing 0.01% triethanolamine. Sample concentration; $0.2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

XPS 測定の結果では、PGC 表面には炭素以外の元素は確認されていない。しかし、二次元グラフアイト構造をとる炭素原子だけでは、溶離液の pH や電解質の有無によって PGC の酸化還元性が変化することを説明できない。これらの結果は、水素イオンを授受できる官能基が PGC 表面に存在し、この官能基が酸化還元反応を引き起こしていることによるのではないかと考えられる。酸化還元性を有すること、水素イオンの授受を行うこと、および PGC の生成過程を考慮し、条件を満たす官能基を持つモデル化合物としてヒドロキノノン-ベンゾキノノン系が想定される。

5 参考文献

- 1) K.Saitoh, N.Yamada, E Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J.Sep.Sci*, **2006**, 29, 49-56.
- 2) K. Saitoh, S. Naitoh, M. Endo, M. Washiya, M. Shibukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, in press.
- 3) K. Doi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, 55, 1431-1436.
- 4) R. S. Deinhammer, E. Y. Ting, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 237-246.
- 5) H. A. Jennifer, M. D. Porter, *Analyst*, **2001**, 126, 1841-1849.