

分子認識能を有する新規包接化合物の開発と液/液二相系反応 および抽出・分離プロセスへの応用

清水 正一 (応用分子化学科)

1. 当初の課題の意義、目的およびその概要

現在、化学工業においては、地球環境の保全という観点から揮発性有機溶媒の使用量削減が急務となっている。通常、有機合成は有機溶媒中で行われるが、これを他の安全性の高い溶媒中で行うことができれば、揮発性有機溶媒使用量の大幅な削減が可能となる。したがって、水、フルオラス溶媒、超臨界流体、イオン性液体などが新しい反応溶媒として注目され、大きな貢献が期待されている。したがって、前プロジェクトでは水を反応溶媒とする有機合成反応の開発を行ってきた。さらに、本プロジェクトでは、もう一つのグリーン溶媒であるフルオラス溶媒を用いた新規プロセス、例えばフルオラス相/有機相二相系での廃棄物を出さない反応およびこの二相系を活用した抽出・分離プロセスの開発を目指した。

フルオラス溶媒は、Horváthら¹がフルオラス配位子からなるロジウム錯体触媒と組み合わせてオレフィンのヒドロホルミル化に用いて以来、その有効性が広く認められ、フルオラスな基質や反応剤をも含めてフルオラスケミストリーとして爆発的に広がってきた。これらの研究で取り扱われているフルオラス化合物を利用法から分類すると、溶媒としての利用に加え、ほぼ次の4つに限られている。(1)フルオラス触媒^{2,3,4}、(2)フルオラス反応剤⁵、(3)フルオラス・タグ^{6,7}、(4)フェイズスクリーン⁸である。最近、これらに加えて、フルオラス界面活性剤が開発され、超臨界二酸化炭素中での反応を促進する添加剤となることがKobayashiら⁹によって報告された。しかし、フルオラスケミストリーで用いることができるツールはまだ限定されたものにとどまり、フルオラスケミストリーの潜在性はまだまだ十分には解明されていない。

そこで本研究テーマでは、フルオラスケミストリーに超分子ホストという新しいツールを提供することにより、その潜在性を引き出すため、

フルオラス溶媒中で機能する新規包接化合物をデザインし、合成を行った。さらに、得られたフルオラスカリックスアレーンが分子カプセルを形成して、フルオラス溶媒に溶けることを見出した。この超分子ホストは、従来のフルオラス溶媒を用いた液/液二相系では実現が不可能であった反応への応用が可能で、加えて、新しい抽出・分離プロセス (Figure 1) の開発にも貢献できると考えられるので、本研究テーマではその基礎と応用について研究を行った。また、前プロジェクトから継続して行っている水を溶媒とする有機合成反応の開発においても、スルホン酸型レゾルシンアレーンを触媒としたアルコールの脱水的アミノ化を実現した。

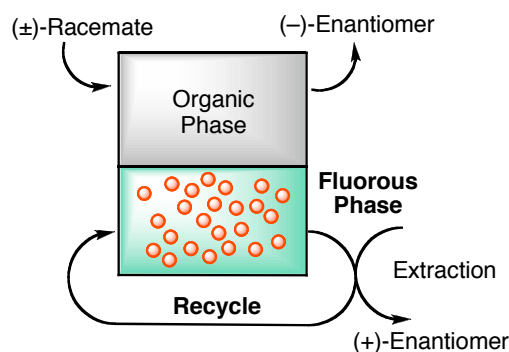


Figure 1. Application of supramolecular capsule to extraction/separation process.

2. 研究成果

フルオラスケミストリーに超分子ホストという新しいツールを提供することにより、その潜在性を引き出すため、フルオラス溶媒に溶け、分子認識能を有する新規包接化合物を開発した。また、これを環境調和型のフルオラス相/有機相二相系反応および抽出・分離プロセスへ応用する試みを幾つか行ったので、次にその概要を示す。

2.1 平成17年度

フルオラス溶媒中で機能する新規包接化合物を開発するために、まず、パーフルオロアルキル基を有するレゾルシンアレーン **1a-c**、**2a-c**、**3a-c**

Development of Novel Host Compound for Molecular Recognition and
Their Application to Liquid-Liquid Biphasic Reactions,
Extraction and Separation Processes

Shoichi SHIMIZU

(Figure 2) をデザインし、相当するフルオラスアルデヒドとレゾルシノールとの酸触媒環化縮合反応により合成した (Scheme 1)。

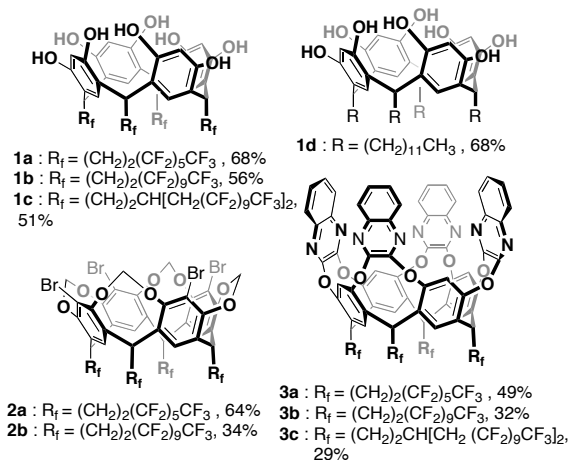
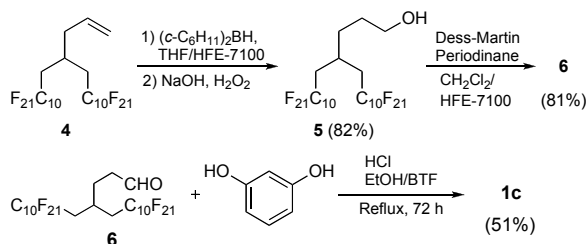


Figure 2. Structures of resorcinarenes and their derivatives.



Scheme 1. Synthesis of "Teflon footed" resorcinarene **1c**.

合成されたフルオラレゾルシニアレーンの内、**1c** だけがフルオラス溶媒の HFE-7100 (メチルパーフルオロブチルエーテル) および FC-72 (パーフルオロヘキサン) に溶解、フッ素含有量が 60wt% 以上の化合物がフルオラス溶媒に溶解するとの経験則にほぼ従っていた。

次に、**1c** が期待された性質を示したので、このフルオラス溶媒/有機溶媒間の分配を測定した。**1a** は、フルオラス溶媒 FC-72 とメタノールの組合せでは FC-72 に分配せず ~0% であり、酢酸エチルでは僅かに 1.1% で、ほとんど FC-72 に分配しなかった。一方、**1c** は、メタノールとの組合せでは FC-72 への分配は 99.7%、酢酸エチルでは 99.2%、アセトニトリルでは 99.0% であり、ほぼ選択的に FC-72 に分配した。

さらに、この **1c** は HFE-7100 などのフルオラス溶媒中で 8 分子の水と共に 6 量体分子カプセル (**1c**)₆ · (H₂O)₈ (以後、(**1c**)₆ と略記) を形成していることも明らかにした (Figure 3)。

HFE-7100/ベンゼン混合溶媒系で **1c** のスペクトルを測定した結果、ベンゼンが混合していない HFE-7100 中では、**1c** の分子カプセルに包接されたと考えられる HFE-7100 分子のメチ

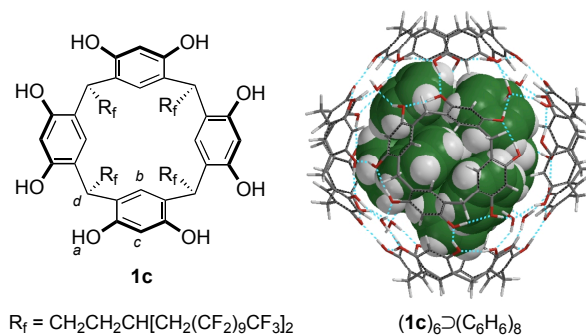


Figure 3. Structure of "Teflon footed" resorcinarene **1c** and model of the hexameric assembly (**1c**)₆ encapsulating eight benzene molecules. Peripheral highly-fluorinated alkyl groups (R_f) are removed for viewing clarity.

ル基のシグナルが 1 ppm 付近に現れ、このシグナルは、溶媒中のベンゼンが増加するにつれて消失し、代わりに包接されたベンゼンの芳香族水素のシグナルが 5.5–5.9 ppm に現れた (Figure 4)。このシグナルの強度比から、HFE-7100/ベンゼン = 5/2 の混合溶媒において、**1c** の 6 分子からなる分子カプセル 1 個に 8 分子のベンゼンが包接されていることが分かった (Figure 3)。これは **1d** で得られている結果¹⁰ と完全に一致しており、フルオラレゾルシニアレーンもフルオラス溶媒中で分子カプセルを形成することが確認された。さらに、ベンゼンの割合が少ない 5/2 の混合溶媒中でも選択的にベンゼンが包接されていることを示しており、これは疎フルオラス性効果^{11–13} によるものであることを明らかにした。すなわち、フルオラス溶媒中での包接においては、一般的な水素結合や CH/π 相互作用に加え、疎フルオラス性効果が働き、より高い分子包接能および分子認識能が得られることが分かった。実際、カプセル(**1c**)₆ と 3,3-ジメチル-1-ブタノール **7** および *tert*-ブチルベン

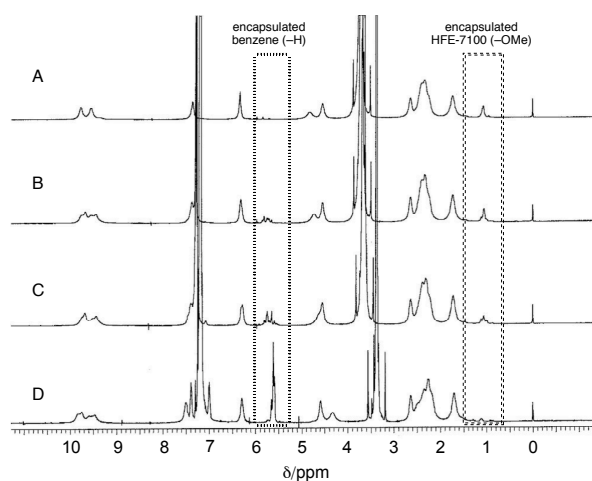


Figure 4. ¹H NMR spectra (400 MHz, 300 °K) of A) **1c** (50 mM) in HFE-7100. B) same as (A) after the addition of 2.2 equiv of benzene (**1c**, 50 mM); HFE-7100/benzene = 100/1 (v/v). C) same as (A) after the addition of 11 equiv of benzene (**1c**, 48 mM); 20/1 (v/v). D) same as (A) after the addition of 90 equiv of benzene (**1c**, 35 mM); 5/2 (v/v).

ゼン **8** との会合定数は、これまでに知られている (**1d**)₆ のそれぞれ 330 倍、50 倍であることが明らかとなった (**Table 1**)。すなわち、このカプセルでは、ゲスト分子との相互作用の違いにより会合定数が大きく異なり、分子認識能が確認された。また、フルオラス溶媒中での **7** の会合定数は **8** の 330 倍であるのに対し、フロロホルム中では 5 倍であった。これはフルオラス溶媒中では分子認識能が向上したことを示しており、本研究テーマである分子認識能を有する新規包接化合物の開発に成功したことが分かる。

Table 1. Association constants K_a for the complexation of 3,3-dimethyl-1-butanol **7** and *tert*-butylbenzene **8** by (**1c**)₆ and (**1d**)₆ at 300 K.

Capsule	Solvent	K_a (M ⁻¹)	
		7	8
(1c) ₆	HFE-7100	1.8×10^4	54
(1d) ₆	CHCl ₃	55	1.1

これとは独立に、分子認識能を有する新規包接化合物の開発のための基礎研究として、既に合成された分子不斉型カリックスアレーンの不斉認識能や不斉触媒能を評価した¹⁴。

2.2 平成 18 年度

平成 18 年度は、前年度開発したフルオラスレゾルシンアレーンの分子カプセル(**1c**)₆ を反応場とする Diels-Alder 反応を試みた。Diels-Alder 反応は、水やフルオラス溶媒中で反応が加速することが知られているので、フルオラス溶媒中で形成された分子カプセル(**1c**)₆ を反応場として用い、**Figure 1** に模式的に示した反応プロセスの実現を目指した。まず、パーフルオロヘキサン (FC-72) と *p*-キシレンを用いた二相系反応で *p*-ベンゾキノンと 1,3-シクロヘキサジエンの反応を行った。反応温度 35°C、20 時間のフルオラス二相系反応条件下では、フルオラスレゾルシンアレーン **1c** が 10 mol% 存在しても目的生成物の収率は 57% で、**1c** を用いない場合の 43% と比較して大きな加速効果は認められなかった。ところが、反応温度 50°C の場合、反応の加速が認められ、**1c** の効果は反応温度に強く依存することが分かった。*p*-キシレンと FC-72 の溶媒の組合せでは、35°C および 50°C で二相を形成して相溶性を示さないことから、この加速効果は分子カプセル(**1c**)₆ の水素結合が 50°C では弱まり、生成物と反応物の交換が容易になることを示している。次に、室温では二相を形成するが 50°C では均一相となる FC-72/ヘキサンの溶媒の組合せ、さらには反応物の *p*-ベンゾキノンも適度に溶解する HFE-7100 を反応溶媒として、同じ Diels-Alder 反応を行った。結果を **Table 2**

に一括して示した。なお、フルオラス (FC-72/ヘキサン) 均一系反応条件下では、反応の初期には *p*-ベンゾキノンは殆どが溶解せずに系中に懸濁した状態で存在した。

Table 2. Diels-Alder reaction in the presence of catalyst **1c** in fluoruous solvent.^a

Entry	Host (mol%)	Time (h)	Solvent ^b	Yield (%) ^c
1	none	12	FC-72/hexane	2
2	1c (10)	12	FC-72/hexane	62
3 ^d	none	12	FC-72/hexane	9
4 ^d	1c (10)	12	FC-72/hexane	80
5 ^e	none	12	FC-72/hexane	21
6 ^e	1c (10)	12	FC-72/hexane	85
7	none	14	HFE-7100	16
8	1c (10)	14	HFE-7100	77
9 ^d	1c (10)	14	HFE-7100	75

Reaction conditions: benzoquinone (0.25 mmol), cyclohexadiene (0.25 mmol), host **1c** (0.025 mmol in the case of 10 mol%), 800 rpm, 50°C. ^bFC-72, HFE-7100 (1.0 mL), hexane (0.5 mL). ^cIsolated yield. ^dAddition of ethanol (**1c** : EtOH = 1 : 5). ^eBenzoquinone : cyclohexadiene = 1 : 2.

フルオラスレゾルシンアレーン **1c** を用いない場合には生成物の収率が 2% (Entry 1) であったのに対し、**1c** を用いた場合には 62% (Entry 2) に向上した。これは 31 倍の収率で、非常に大きな反応の加速が認められた。すなわち、**Table 2** の結果から、水素結合のネットワークで形成された分子カプセル(**1c**)₆ において、その内部孤立空間が反応を促進する反応場となることが確かめられた。

次に、フルオラスレゾルシンアレーン **1c** のリサイクル実験を行い、結果を **Table 3** に示した。

Table 3. Recovery and reuse of calix[4]resorcinarene **1c** in Diels-Alder reaction in FC-72/hexane in the presence of ethanol.

Entry	1c (10 mol%)	Time	Solvent	Yield (%) ^p
1	1st use	12	FC-72/hexane	80
2	2nd use	12	FC-72/hexane	82
3	3rd use	12	FC-72/hexane	80
4	4th use	12	FC-72/hexane	81
5	5th use	12	FC-72/hexane	78

Reaction conditions: benzoquinone (0.25 mmol), cyclohexadiene (0.25 mmol), host **1c** (0.025 mmol in the case of 10 mol%), 800 rpm, 50°C. ^pIsolated yield.

1c を 5 回繰り返し使用しても反応の加速効果は低下せず、ほぼ初回の生成物収率と実質的に同等の収率 78% (Entry 5) が得られた。これは、分子カプセル(**1c**)₆ の分配係数がフルオラス相に対して非常に大きく、抽出有機溶媒にはほぼ抽出されないことを示している。したがって、本反応系の基本コンセプトは、環境調和型反応プロセスの構築において大きな貢献ができるものと期待される。

2.2 平成 19 年度

平成 19 年度は、フルオラス溶媒中に形成された

分子カプセル(**1c**)₆に不斉分子を包接・固定化することにより、その内部空孔を不斉化し、さらにはその不斉空孔を反応場あるいは抽出・分割剤としての不斉認識場とするための基礎的研究を行った。

まず、カプセル内部に不斉源として包接・固定化するための分子の構造を決定するため、分子力学計算ソフトを用い、水素結合性分子の最適構造を検討した。その結果、第一級アルコールが適していることが明らかになった。そこで、内部空孔の不斉源として第一級アルコールを中心に詳しく検討し、中心性キラリティーをもつ1-フェニル-1,3-プロパンジオール **9** や軸性キラリティーを持つ 2,2'-ジ(ヒドロキシエチル)-1,1'-ビナフチル **10** が水素結合を壊すことなく、その第一級水酸基を水分子と置換できることが分かった。さらに、不斉源 **10** を包接・固定化したカプセル(**1c**)₆⊃**10** が不斉認識能を示すかどうかをシミュレーションで検討した。例えば、2,2'-ジメトキシ-1,1'-ビナフチル **11** をゲスト分子とした場合の *S* 体、*R* 体のエネルギー差が 6.17 kcal/mol と大きく、さらには不斉源 **10** と合わせた空孔占有体積が 52%で、Rebek Jr. ら¹⁵ が求めた最適値 55%に近いことがわかった。

このようにカプセル(**1c**)₆⊃**10** は、不斉認識能を示すことが期待できたので、キラルアルコール **10** を合成した。その¹H NMR スペクトルには、 δ 3.72, 2.58-2.66 ppm の付近にビナフチル基の 2,2' 位に結合したヒドロキシエチル基に帰属するシグナルが現れ、IR スペクトルには、3290 cm⁻¹ 付近にアルコールの水酸基に帰属するピークが現れたことから、目的化合物の **10** が得られたことが確かめられた。現在は、このキラルアルコール **10** を用いて、フルオラス溶媒中でカプセル(**1c**)₆⊃**10** を形成させるための条件検討を行っている段階である。今後、カプセル(**1c**)₆⊃**10** を不斉反応場および不斉認識場として応用するための実験を試みる計画である。

さらに、これとは独立に、水を溶媒とする有機合成反応の開発においても、スルホン酸型レソルシンアレーンを触媒としたアルコールの脱水的アミノ化を実現した¹⁶。

3. 問題点および今後の展望

本研究で新規に開発したフルオラス溶媒中で自己組織化する超分子ホスト(**1c**)₆は、分子認識能を持っていることが確かめられ、また(**1c**)₆はDiels-Alder反応の反応場としても応用できることが明らかになった。しかし、抽出・分離

プロセスへの応用実験はこれからである。今後は、(**1c**)₆をDiels-Alder反応以外の反応へ応用し、その汎用性と特徴を明らかにする、また、抽出・分離に関してはその可能性を探る計画である。実用化に向けては、(**1c**)₆⊃**10**を用いてより付加価値の高い不斉反応場や不斉認識場として応用し、このプロセスの有用性を示す必要がある。一方で、より合成が簡単な超分子ホストの開発も必要となると考えられる。

4. 社会および学協会等への貢献度

本研究テーマから得られた主な成果は、*Angewandte Chemie International Edition* 誌に Very Important Paper として掲載され¹⁷、フルオラスケミストリーに超分子ホストの概念を導入した最初の例として国際的に高い評価を受けた。今後さらに有用な不斉有機合成反応や光学分割へとその応用範囲を広げることができれば、環境調和型プロセスの構築とその実用化に大きく貢献できると考えられる。

5. 参考文献

- 1) Horváth, I. T.; Rábai, J. *Science* **1994**, *266*, 72-75.
- 2) Xiang, J.; Toyoshima, S.; Orita, A.; Otera, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3670-3672.
- 3) Wende, M.; Meier, R.; Gladysz, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11490-11491.
- 4) Ishihara, K.; Kondo, S.; Yamamoto, H. *Synlett.* **2001**, 1371-1374.
- 5) Curran, D. P.; Hadida, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2531-2532.
- 6) Studer, A.; Hadida, S.; Ferritto, R.; Kim, S.-Y.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *Science*, **1997**, *275*, 823-826.
- 7) Miura, T.; Hirose, Y.; Ohmae, M.; Inazu, T. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3947-3950.
- 8) Nakamura, H.; Usui, T.; Kuroda, H.; Ryu, I.; Matsubara, H.; Yasuda, S.; Curran, D. P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1167-1169.
- 9) Komoto, I.; Kobayashi, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 680-688.
- 10) Shivanyuk, A.; Rebek, J., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3432-3433.
- 11) Myers, K. E.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12025-12026.
- 12) Leeder, S. M.; Gagué, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9048-9054.
- 13) Martin, O. M.; Yu, L.; Mecozzi, S. *Chem. Commun.* **2005**, 4964-4966.
- 14) Shirakawa, S.; Moriyama, A.; Shimizu, S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3117-3119.
- 15) Mecozzi, A. S.; Rebek, Jr., J. *J. Chem.-Eur. J.* **1998**, *4*, 1016-1022.
- 16) Shirakawa, S.; Shimizu, S. *Synlett* (preparation).
- 17) Shimizu, S.; Kiuchi T.; Pan, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6442-6445; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6562-6565.

オンライン化学種変換分離分析法の開発と分離選択性および効率の検討

埼玉大院理工 ○渋谷 雅美
日大生産工 齊藤 和憲

1. 当初の課題の意義, 目的およびその概要

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、優れた分離分析技術として広く認識され、研究・産業・医療の各分野で利用されている。しかし、近年、分析対象化合物は増加の一途をたどっており、多成分混合物中の極微量成分の分離ならびに正確な定量は必ずしも容易ではない。特に環境試料中の微量汚染物質や生体試料中の生理活性物質の分離定量は困難であることが多く、常に新しい分離選択性をもつ HPLC システムの開発が望まれている。この要求に応えるため、特異的な保持特性を有する固定相の開発や新規分離場の導入などの分離分析手法の開発が精力的になされている。

本研究グループは、平成 12~16 年度ハイテクリサーチセンター整備事業において「機能有機物質を用いる高選択的分離分析システムの開発とその環境汚染物質分析への応用」をテーマとして研究を行い、酸化還元反応による化学種変換を利用した新しい HPLC 法を開発した。この方法は、酸化還元反応による化学種変換を HPLC 分離場に導入したもので、2つのシステムを創案している。一つは、分離と化学種変換を同時に行なうオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムであり、他の一つは化学種変換と分離を切り離れたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムである。前者は、多孔質グラファイトカーボン(PGC)が固定相担体としてだけでなく酸化還元触媒としても機能すること、およびこれを酸化剤または還元剤で処理することによってその酸化還元電位を変化させることを見出したことに基づいて考案した¹⁾。一方、後者は分離場内の特定の位置で化学種を酸化還元反応によって変換し、変換前後の化学種の移動する距離を制御することにより選択的な分離を行うものである。このシステムは、化学種変換ユニットとして PGC を充填したカラム、またはグラファイトを作用電極とした電解セルを用いて構成した。

本研究では、これらの研究成果に基づいて、新たに電気化学的作用場を HPLC 分離場に導入した電気化学クロマトグラフィー(EMLC)を用いる化学種変換分離分析システムを構築したほか、開

発したそれぞれのオンライン化学種変換 HPLC 法の有用性を実試料に適用して分離選択性ならびに分離効率の面から評価した^{2,3)}。また、本研究で分離場あるいは反応場を構成するカラム充填剤として用いた化学結合型逆相系シリカゲルおよび多孔質グラファイトの表面構造について検討した^{4,5)}。

2. 研究成果

a. 平成 19 年度における研究成果

Porter らは、液体クロマトグラフィーの分離場であるカラムに電気化学的作用場を導入し、固定相と試料成分の静電的相互作用に基づいてイオン性化合物の保持を制御する EMLC を報告した^{6,7)}。EMLC は、電気化学と分離化学を融合したユニークな分析法であり、イオン交換容量可変のイオン交換クロマトグラフィーと考えることができるが、この方法では従来のイオン交換クロマトグラフィーと同様の分離選択性しか得られない。そこで本研究では、EMLC を用いて分析対象化合物の酸化還元反応を PGC 固定相で接触的に高速で引き起こし、印加電位を制御することにより酸化還元反応を二次的平衡⁸⁾として利用できないかと考え、電気化学的酸化還元化学変換 HPLC を構築し⁹⁾、その生体関連物質の選択的分離への応用を試みた。

【実験】

EMLC カラムは BTR Carbon(Biotech Research, 3.5 μm)を実験室で充填して作製した。溶離液は、pH6 に調整した 0.1 M リン酸緩衝溶液 20 % (v/v) アセトニトリル-水混合溶媒を用い、超音波脱気後、窒素ガスでバブリングしながら 0.4 ml/min で分離カラムへ通液した。EMLC カラムへの印加電位は、北斗電工製 HA-151 ポテンショスタットを用いて制御した。試料化合物には、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、L-3,4-ジヒドロキシベンジルアミン(ドーパ)、L-チロシンのほかカテコールアミン代謝物として L-アドレナリン、ドーパミン、L-ノルアドレナリンを用い、それぞれ溶離液に溶解して試料溶液を調製した。試料注入体積は、20 μl とした。検出には、SI-1/2002 UV-VIS 検出器および SI-2/3017 PDA 検出器を用

Development of Separation methods with On-Line Derivatization and Evaluation of Their Separation Selectivity and Efficiency

Masami SHIBUKAWA and Kazunori SAITOH

いた。

【結果と考察】

印加電位に対するカテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、ドーパ、L-チロシンのピーク面積(検出波長 220 nm)および保持係数の依存性を Fig. 1 に示す。L-チロシンを除く化合物は、それぞれの化合物の酸化還元電位にほぼ対応する印加電位で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が変換し、それにもなって保持係数が変化したものと考えられる。このことは、Fig. 2 に示す溶出前後の吸収スペクトルの変化からも確認できる。それぞれの試料化合物の酸化体の同定は、標準物質のスペクトルあるいは文献データと比較することにより行った。L-チロシンは測定した電位範囲内では化学種の変換が生じないため、ピーク面積に変化は見られない。保持係数はわずかに印加電位依存性を示しているが、これは固定相の表面電位の変化によって溶質の保持特性が変化したためと考えられる。

さらに、ヒドロキノンは $E_{app} = 25 - 125$ mV においてヒドロキノンとその酸化体である *p*-ベンゾキノンとの平衡混合物として、またカテコールは、 $E_{app} = 150 - 200$ mV においてカテコールとその酸化体である *o*-ベンゾキノンとの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。酸化還元平衡がカラム内のどの位置でも迅速に成立していると仮定できるならば、二次的平衡として機能しているはずであり、その保持係数は(1)式で与えられる。

$$k = \alpha_{Ox} k_{Ox} + \alpha_{Red} k_{Red} \quad (1)$$

ここで、 k_{Ox} と k_{Red} および α_{Ox} と α_{Red} はそれぞれ酸化体と還元体の保持係数と化学量論的分率を示している。しかし、もしカラム内の特定の位置で酸化されていたり、電位が不均一でカラムの上部と下部とで酸化還元平衡が異なっていたりするようであれば、 α 値はカラム内で異なる値をとることになり、その場合このようにして求められる α 値は、カラム内で存在していた化合物の平均化学量論的分率に対応する。一方、カラムから溶出した溶質ピークの面積 A は(2)式で与えられる。

$$A = \alpha_{Ox}^E A_{Ox} + \alpha_{Red}^E A_{Red} \quad (2)$$

ここで、 A_{Ox} と A_{Red} および α_{Ox}^E と α_{Red}^E はそれぞれ酸化体と還元体のピーク面積と溶出バンド内でのそれぞれの分率を示す。したがって、保持係数から求めた α 値とピーク面積から求めた α^E 値が等しければ、分析対象化合物はカラム内を常に一定の化学量論比を保った平衡混合物として溶出していることを示すことになる。各種印加電位におけるヒドロキノンと *p*-ベンゾキノン、カテコールと *o*-ベンゾキノンの分率をピーク面積および保持係数から算出した結果を Table 1 に示す。両者はそれぞれ互いに良く一致していることがわ

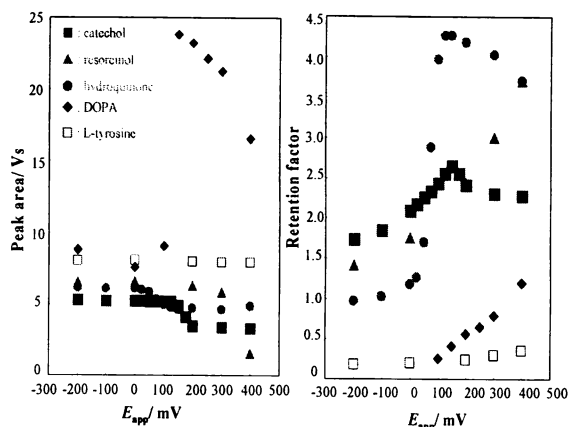


Fig.1 Dependence of peak area and retention factor of catechol, resorcinol, hydroquinone, DOPA and L-tyrosine on applied potential.

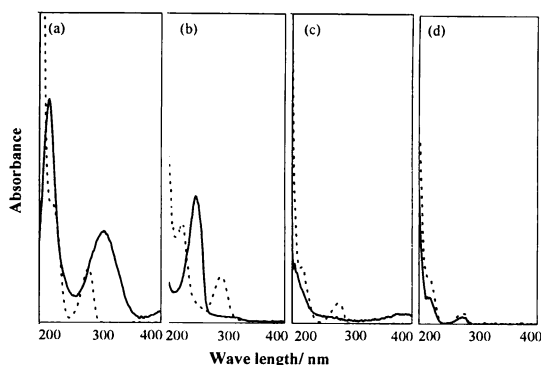


Fig.2 UV spectra obtained for DOPA(a), hydroquinone(b) and catechol(c) at 0 mV(dashed line) and +400 mV(solid line) and resorcinol(d) at +300(dashed line) and +400(solid line).

Table 1 Stoichiometric fractions of hydroquinone and catechol calculated from retention factors and peak areas.

Applied potential, mV	hydroquinone		catechol	
	α_{Red}	$\alpha_{Red, E}$	α_{Red}	$\alpha_{Red, E}$
25	0.99	0.93		
50	0.79	0.83		
75	0.37	0.46		
100	0.10	0.19		
125	0.02	0.02		
150			0.91	0.83
175			0.44	0.41
200			0.13	0.08

かる。このことから、ヒドロキノンとカテコールはカラム内をそれぞれの還元体と酸化体の平衡混合物として移動しており、印加電位をコントロールすることにより酸化還元反応を二次的平衡として制御できることが明らかとなった。また、このことは同時に EMLC カラムに電位が均一に印加されていることを示している。

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. 3 に示す。印

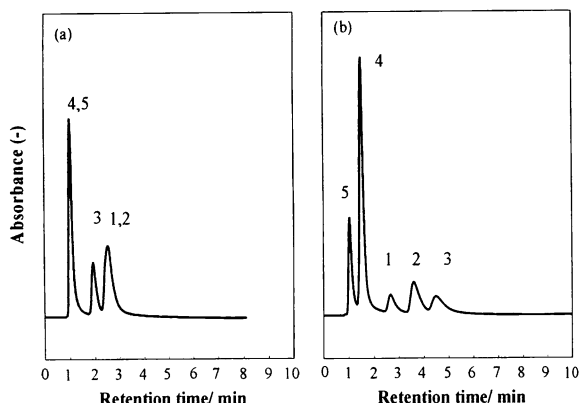


Fig.3 Separation of catechol(1), resorcinol(2), hydroquinone(3), DOPA(4) and L-tyrosine(5) by EMLC. Applied potential; (a) 0 mV, (b) +300 mV

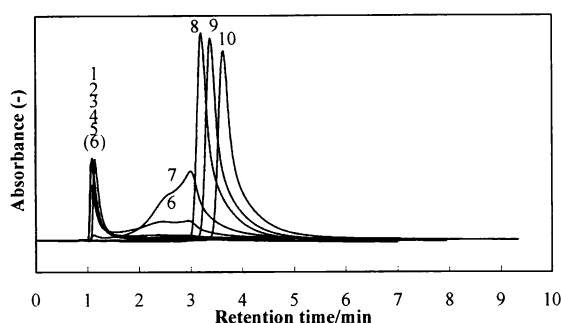


Fig.4 Dependence of chromatographic profile of L-adrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +200(8), +300(9), +400(10).

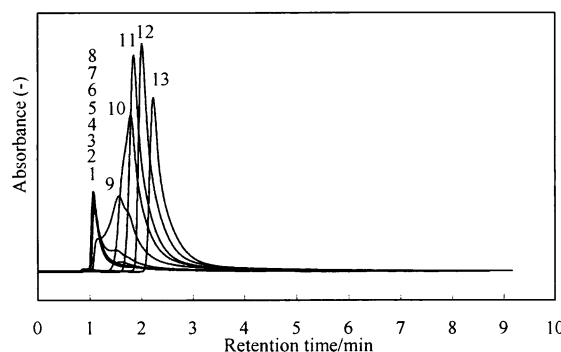


Fig.5 Dependence of chromatographic profile of L-noradrenaline on applied potential (mV); -200(1), -100(2), 0(3), +25(4), +50(5), +75(6), +100(7), +125(8), +150(9), +175(10), +200(11), +300(12), +400(13), +400(10).

加電位 0 mV のときには、ドーパと L-チロシン、カテコールとレゾルシノールにほとんど保持の差がないため相互に分離することは困難であったが、+300 mV の電位を印加すると、ドーパ、ヒドロキノン、カテコールの酸化反応を利用して 5 つの化合物をすべて分離できることが明らかとなった。

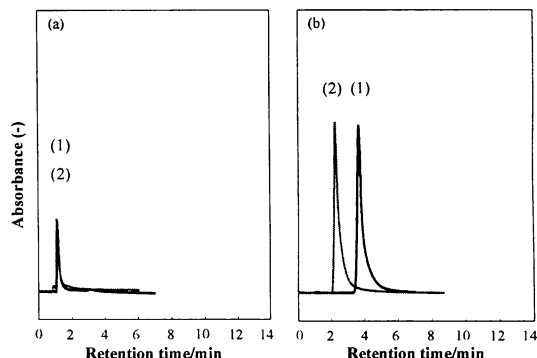


Fig.6 Chromatogram of L-adrenaline (1) and L-noradrenaline (2) obtained by EMLC. Applied potential; (a) -200 mV, (b) +400 mV

ついで L-アドレナリン、ドーパミン、L-ノルアドレナリンについて印加電位と保持時間およびピーク面積の関係を検討した。L-アドレナリン、L-ノルアドレナリンについて得られた結果をそれぞれ Fig.4 と Fig.5 に示す。全ての化合物は、それぞれの化合物の酸化還元電位に対応する電位で保持時間とピーク面積に変化が生じた。これは、酸化還元反応により化学種の変換が生じたためであり、このことは溶出前後の吸収スペクトルの変化からも確認された。しかし、カラム内を酸化体と還元体の平衡混合物として移動しているというよりは、むしろ完全に化学種が変換されて溶出していることを示す結果が得られた。これは、カテコールアミンの酸化還元反応を二次的の化学平衡として制御できていないことを示している。しかし、Fig.6 に示すように印加電位を制御することにより L-アドレナリンと L-ノルアドレナリンをカラム内で酸化し、相互分離できることが示され、本法が電気化学活性な生体関連物質の分離に有用であることが確認された¹⁰⁾。

b. 継続 3 年間に総括した研究成果

本研究では、平成 12~16 年度における研究により創案したオンカラムおよびオンライン酸化還元化学種変換 HPLC 法の有用性を実試料への適用によって評価したほか、EMLC を新しい電気化学的オンカラム化学種変換 HPLC として用いる方法の開発と基礎検討を行った。その結果、化学種変換ユニットとして PGC を充填したミニカラム、またはグラファイトを作用電極とした電解セルを用いたオンライン化学種変換システムにより、鉄鋼中や銅合金の微量コバルトを選択的に分離できることを明らかにした^{2,3)}。また、環境試料中の酸化数の異なる鉄イオンの定量¹¹⁾および食塩中に添加されている微量フェロシアン化物イオンの定量¹²⁾に適用できることを示した。さらに米国ユタ大学 M. D. Porter 教授との共同研究により開発したオンカラム電気化学的酸化還元化学種変換 HPLC は電気化学的に酸化還元反応を二次的の化学平衡として制御し、精密な分離を

達成できることを明らかにした。

以上の成果はいずれも新しい発想に基づいて達成された過去に例のないものである。本研究の目的は新しい分離選択性を有する分離分析法の創出とその評価であり、ほぼ達成することができたと考えている。

3. 問題点および今後の展望

酸化還元化学種変換 HPLC は、酸化還元性物質に対して選択性を有する新しい分離分析法である。したがって、その代謝過程で酸化還元反応を示す多くの生体関連物質の分析への適用は、本法の有用性を示す上でも、またその分析の重要性を考えてみても極めて大きな意義があると考えられる。しかし、上述したように、生体関連物質の酸化還元反応機構は複雑で明らかにされていない部分が多い。むしろ、酸化還元反応機構を明らかにする目的で、この方法を利用することができるものと期待され、さらにその結果に基づいて分離の最適化を図る必要があると考えられる。

また、金属化学種の酸化還元機構の解析や環境試料中の酸化状態別分析すなわちスペシエーションへの適用も期待される本法の応用分野である。金属元素はその酸化状態によって毒性が大きく異なるので、環境中の金属分析においては酸化状態別に定量することが要求されるが、酸化還元化学種変換 HPLC は、原理的にこの要求に応える能力を持つ方法である。今後は各種の環境試料、特に表層水および土壌を対象として研究を進める予定である。また、酸化還元化学種変換 HPLC による金属化学種の酸化還元機構の解析に関しては、特に超微量成分を対象としたときにその威力を発揮すると期待され、数 10-100 個の原子が対象になる超アクチノイド元素の研究を日本原子力研究開発機構先端基礎研究センターと共同で計画している。

酸化還元化学種変換 HPLC を汎用性の高いものにする上での大きな課題の一つは、化学種変換反応の高速化である。これを達成するためには、高温下での酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築することが求められる。平行して進めている超高温水クロマトグラフィーの研究で得られた成果¹³⁻¹⁵⁾を融合することによって、さらに高効率・高速の分析システムに発展させることを目論んでいる。

4. 社会および学協会等への貢献度

近年、キャピラリーゾーン電気泳動に代表される各種の分離法は急速な発展を遂げ、分離効率は著しく向上したが、多数のまた大量の共存成分から目的の成分のみを取り出すには、その成分に特異的な選択性を持つ分離システムを必要とする。これは、複雑な組成を持つ試料を対象とするときや、目的成分が微量であり、かつ類似する成分が

大量に共存する場合に特に重要である。特に、生体中で重要な働きをする化合物の多くは酸化還元反応性を有しており、酸化還元化学種変換 HPLC が実用化されれば、これらの化合物の選択的分離定量を容易にする新しい道が開かれると期待される。さらにまた、酸化状態によって毒性が異なる金属化学種のスペシエーションにも有力な方法となりうるものであり、学術のみならず社会的にも大きな貢献が期待できる。酸化還元化学種変換 HPLC 技術に関しては、すでに「高速液体クロマトグラフィーシステム」として特許を出願中である。

5. 参考文献

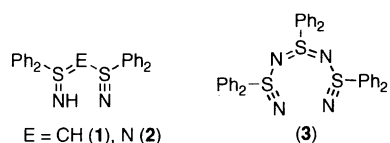
- 1) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.*, **75**, 2775 (2003).
- 2) K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, **29**, 49 (2006).
- 3) K. Saitoh, S. Naitoh, M. Endo, M. Washiya, M. Shibukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 951 (2007).
- 4) 渋川雅美, *分析化学*, **55**, 149 (2006).
- 5) M. Shibukawa, Y. Takazawa, K. Saitoh, *Anal. Chem.*, **79**, 6279 (2007).
- 6) J. A. Harnisch, M. D. Porter, *Analyst*, **126**, 1841 (2001).
- 7) L. M. Ponton, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **76**, 5823 (2004).
- 8) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.*, **59**, 102 (1987).
- 9) K. Saitoh, K. Koichi, F. Yabiku, Y. Noda, M. D. Porter, M. Shibukawa, *J. Chromatogr. A*, submitted.
- 10) 小市孔大, 齊藤和憲, 日秋俊彦, M. D. Porter, 渋川雅美, *日本分析化学会第 56 年会講演要旨集*, p. 252 (2007).
- 11) 安田卓也, 屋比久史子, 齊藤和憲, 中島秀, 渋川雅美, *第 67 回分析化学討論会講演要旨集*, p. 12 (2006).
- 12) 添田直希, 屋比久史子, 齊藤和憲, 渋川雅美, *第 67 回分析化学討論会講演要旨集*, p. 200 (2006).
- 13) T. Yarita, R. Nakajima, M. Shibukawa, *Anal. Sci.*, **19**, 269 (2003).
- 14) 中島良司, 鎗田孝, 渋川雅美, *分析化学*, **52**, 305 (2003).
- 15) T. Yarita, R. Nakajima, K. Shimada, S. Kinugasa, M. Shibukawa, *Anal. Sci.*, **21**, 1001 (2005).

高選択的分離を指向した機能性材料の創製 —新規スルファンニトリル配位子の合成と錯形成について—

日大生産工 ○藤井 孝宜・平田 光男

1 当初の課題の意義, 目的およびその概要

近年, 金属配位子はポリエチレンなどの高分子合成や半導体, 非線形光学素子, 超電導体などの新素材の作製, さらには有価金属の抽出や生体中の分子認識など幅広い分野で活用されていることから, 新規な電子構造や配位形態を有する配位子の登場は, そのまま新機能の発現につながることを十分に意味している。本研究では, 新しい配位子の設計および合成を行い, これを有価金属の高選択的分離が可能な誘導化試剤として利用することを目的としている。新規配位子としては, 我々がすでに合成・単離に成功した硫黄-窒素三重 (S≡N) 結合を有する化合物 (λ^6 -スルファンニトリル) を鍵化合物とする。具体的には, 1) 末端に S≡N 結合と S=NH 結合を備え持つ新規スルファンニトリル配位子 **1**, **2** と両端に S≡N 結合を有する配位子 **3** の設計と合成, 2) 得られた配位子を用いた各種金属錯体合成とキャラクタリゼーション, 3) 各種金属イオンの分離能の評価を行う。本研究課題では, 有機官能基として非常に珍しい S≡N 結合を配位部位とすることから, 他に例をみない独創的な化学が展開でき, 有機化学, 錯体化学, 分析化学を鍵とした機能性有機材料の開発と高選択的分離分析システムへの展開に多いに貢献することが期待できる。



2 研究成果

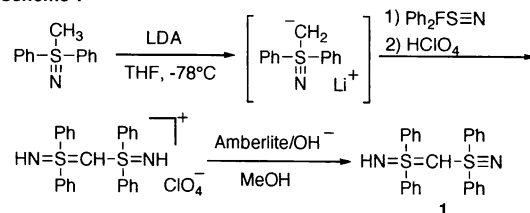
2.1 新規スルファンニトリル二座配位子の設計と合成

硫黄-窒素三重結合を配位部位に活用した新規スルファンニトリル配位子は, 現在, 配位化学の分野で数多く用いられている β -ジケトン, α -エナミノケトン, および-ジケチミン二座配位

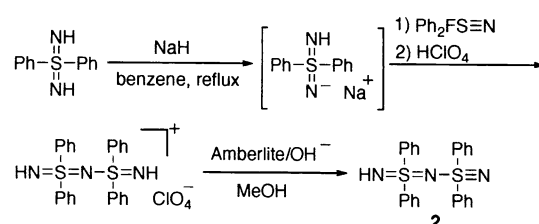
子をモチーフとして, 化合物 **1**, **2** を設計した。また, 両端にチアジル基 (S≡N) をもち, 配位金属のサイズ効果を考慮した化合物 **3** を設計した。

化合物 **1-3** の合成は, フッ素原子と容易に置換が可能であるジフェニルフルオロ- λ^6 -スルファンニトリル ($\text{Ph}_2\text{FS}\equiv\text{N}$) を鍵化合物として行った。すなわち, 化合物 **2** は, メチル(ジフェニル)- λ^6 -スルファンニトリルの α -炭素の反応性を利用し, また, 化合物 **3** は, ジフェニルスルフィミノアニオンと $\text{Ph}_2\text{FS}\equiv\text{N}$ とを反応させることにより合成を行った (Scheme 1, 2)。さらに, 化合物 **3** は, 化合物 **2** と $\text{Ph}_2\text{FS}\equiv\text{N}$ とをアセトニトリル中, 40 °C で反応させることにより, 57%の収率で得ることができたが, 興味深いことに, ジフェニルスルフィミドと過剰量 (5当量) の $\text{Ph}_2\text{FS}\equiv\text{N}$ とを反応させることで, 1ポットで化合物 **3** を得ることに成功した (Scheme 3)。

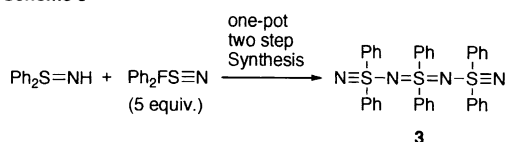
Scheme 1



Scheme 2



Scheme 3



Design and Synthesis of Novel Functional Materials
Directed toward High Selective Separation
— Synthesis and Complexation of Novel Sulfanenitrile Ligands —

Takayoshi FUJII and Mitsuo HIRATA

反応をメタノール中、室温で行ったところ、それぞれ対応する $[MCl_2 \cdot 3]$ 錯体が青色 ($M = Co, Ni$) および、黄色 ($M = Cu$) の固体としてほぼ定量的に得られた。また、配位子 **3** が複数配位した錯体を得るため、 MCl_2 と 5 当量の化合物 **3** とを反応させた結果、それぞれ対応する $[M_3]Cl_2$ が青色 ($M = Co, Ni$) および、緑色 ($M = Cu$) の固体でほぼ定量的に得られた (Scheme 6)。各金属錯体の分子構造は、単結晶 X 線構造解析より明らかにし、 $[MCl_2 \cdot 3]$ 錯体の金属を中心とした構造は、四面体構造であり (Figure 2 as a representative), $[MCl_2 \cdot 3]$ 錯体においては、Co(II) 錯体が四面体 (Figure 3), Ni(II) および Cu(II) 錯体が平面四角形を示した (Figure 4 as a representative)。

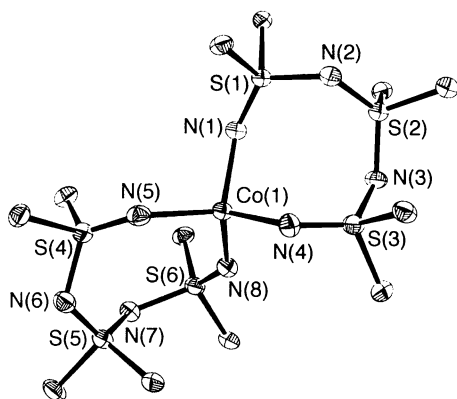


Figure 3. ORTEP drawing of $[Co_3]Cl_2$ [50% probability thermal ellipsoids; H, C atoms (apart from the C α atoms of the phenyl rings), and two chloride anions have been omitted for clarity].

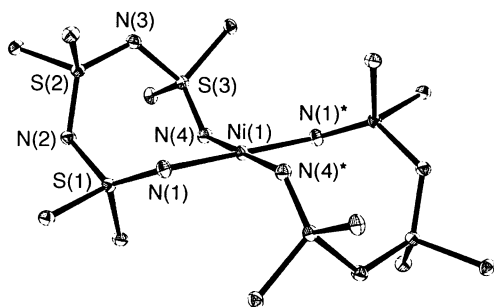


Figure 4. ORTEP drawing of $[Ni_3]Cl_2$ [50% probability thermal ellipsoids; H, C atoms (apart from the C α atoms of the phenyl rings), and two chloride anions have been omitted for clarity].

得られた各種錯体の電気化学的性質について調査したところ、テトラヒドロフランやジクロロメタン中でそれぞれ特徴ある酸化還元挙動を示したが、得られた錯体の水に対する溶解性が低いことから、水中での酸化還元電位を求むることが出来なかった。

2.3 PEG- Na_2SO_4 水性二相系における新規スルファンニトリル配位子による遷移金属イオンの抽出挙動

スルファンニトリル配位子 **1-3** を抽出剤として、ポリエチレングリコール-硫酸ナトリウム (PEG- Na_2SO_4) 水性二相系における各種金属イオンの溶媒抽出実験を Figure 5 に示した方法で行った。また、配位子 **1-3** を用いた各種金属イオンの抽出率に対する pH の影響を調べた結果を Figure 6-8 に示した。

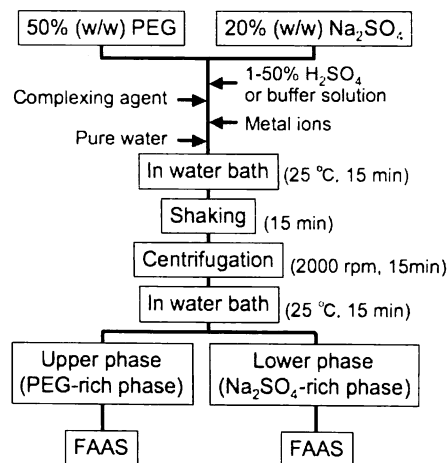


Figure 5. Experimental procedure for aqueous two-phase extraction of metal ions

配位子 **1** を抽出剤に用いた場合、pH が 7-10 の領域において、Co(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) イオンをほぼ定量的に抽出できることが分かった (Figure 6)。また、これら金属イオンの定量的な抽出は、pH が狭い範囲 (pH = 1 またはそれ以下) で達成されることも分かった。Fe(III) イオンは、pH 1-4 の範囲では抽出することができず、pH 4 以上においては、Fe(III)-配位子 **1** 錯体と考えられる黄色沈殿が確認できた。Mn(II), Ni(II) の抽出率は pH 9-10 付近において、それぞれ 10-20% 程度であった。また、pH が 10 以上の領域においては、どの金属イオンも抽出することができなかった。この理由としては、形成した錯体が不安定であること (Ni(II)-配位子 **1** 錯体は不安定である (2. 2)), 水酸化物として沈殿してしまうこと、二相系界面への吸着などが考えられる。次に、配位子 **2** を抽出剤に用いた場合、配位子 **1** よりも低い pH 領域で、Co(II), Cu(II), Zn(II) イオンが、ほぼ定量的に抽出できることが分かった (Figure 7)。また、配位子 **1** の場合とは異なり、Mn(II) イオンに関しても pH 9 付近でほぼ定量的に抽出されることが分かった。これは、配位子 **2** の共役酸の pKa

($pK_a = 7.86$)と配位子 1 の共役酸($pK_a = 10.89$)との差が起因していると考えられる。Fe(III), Ni(II)イオンに関しては、配位子 1 と同様に低い抽出率となった。配位子 3 の抽出挙動は、配位子 1, 2 と大きく異なり、より酸性側での抽出が確認され、酸性側から Fe(III), Cu(II), Zn(II), Co(II), Mn(II)の順で定量的に抽出された。

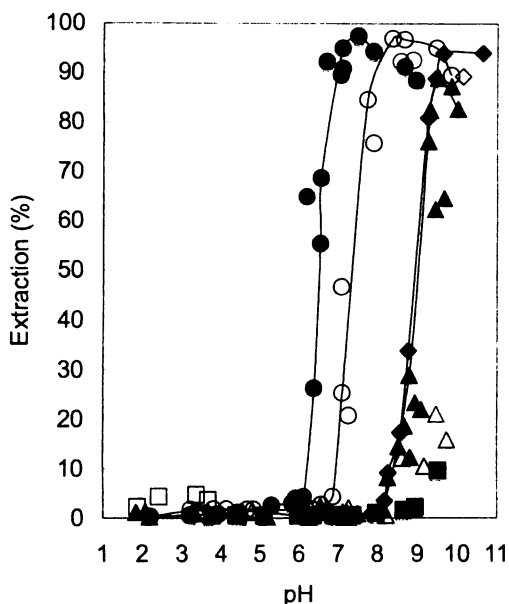


Figure 6. Effect of pH on the extraction of metal ions with 1 in the PEG- Na_2SO_4 aqueous two-phase system. M = Mn(II) (■), Fe(III) (□), Co(II) (▲), Ni(II) (△), Cu(II) (●), Zn(II) (○), Cd(II) (◆).

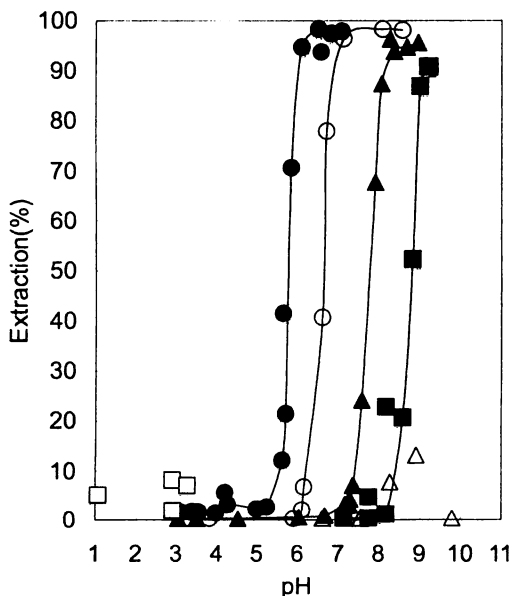


Figure 7. Effect of pH on the extraction of metal ions with 2 in the PEG- Na_2SO_4 aqueous two-phase system. M = Mn(II) (■), Fe(III) (□), Co(II) (▲), Ni(II) (△), Cu(II) (●), Zn(II) (○).

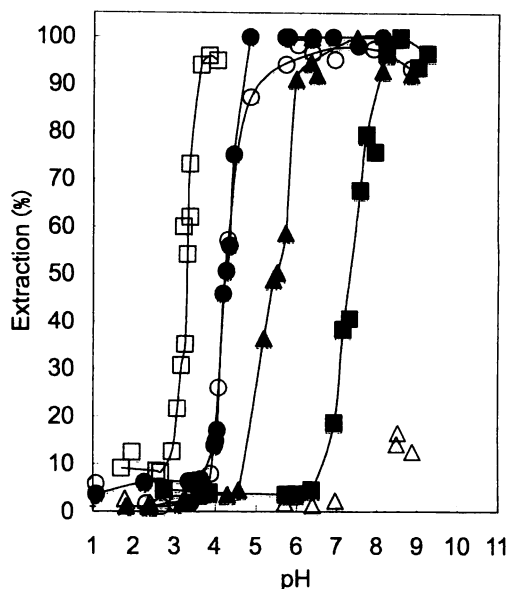


Figure 8. Effect of pH on the extraction of metal ions with 3 in the PEG- Na_2SO_4 aqueous two-phase system. M = Mn(II) (■), Fe(III) (□), Co(II) (▲), Ni(II) (△), Cu(II) (●), Zn(II) (○).

3 問題点および今後の展望

得られた各種錯体の電気化学的性質について調査したところ、それぞれ特徴ある酸化還元挙動を示したが、水に対する溶解性が低いため、当初計画していた水中での酸化還元化学種変換システムに活用することができなかったが、各種配位子および、錯体の溶解性を考慮し、PEG- Na_2SO_4 水性二相系における金属イオンの抽出剤として展開した。また、スルファンニトリル配位子を高分子膜等に導入する計画については、配位子の保護-脱保護の反応で行うが、脱保護の際、分解反応が伴ってしまい配位子の高分子膜への導入には至っていない。現在も導入反応について検討中である。

3 社会および学協会への貢献度

本研究課題では、有機官能基として非常に珍しい $\text{S}=\text{N}$ 結合を配位部位とする新規配位子の設計と合成に成功し、さらに、これらを用いた各種金属錯体の形成や水性二相系における有効なキレート抽出剤として機能することを明らかにした。これらの研究成果は、今後、錯体化学、分析化学、有機化学などの多方面の分野に多いに貢献することが期待でき、社会に対する波及効果は非常に大きいと確信する。その一つとして、両端に硫黄-窒素三重結合を有する配位子 ($\text{Ph}_2\text{S}(\text{=N}(\text{Ph}_2)\text{S}=\text{N})_2$ (3)) の合成に成功した研究成果に関しては、無機化学の分野で評価の高い学術雑誌 (Inorganic Chemistry) に掲載された。

新規クラスレートの構築による選択的固相合成

日大生産工 ○杉山邦夫

1 当初の課題の意義, 目的およびその概要
本研究課題「新規クラスレートの構築による選択的固相合成」では, 新規クラスランドを開発し, これをホストとして, クラスレートを構築し, 光化学反応を主体とした有機合成反応および分離に活用することを目的とした。

クラスレートは包接体の一種として定義され, 溶液中でシクロデキストリンなどが分子内空孔中にゲストを収容する包接体とは異なり分子集合体の隙間にゲストを取り込んだ結晶状の包接体である。クラスレートで用いるホストは, 複雑な構造を必要とせず, 再利用可能であり, さらにクラスレートの光反応は有機溶媒を使用しない固相反応でもあり, グリーン・サステイナブルな化学の観点から優れている。クラスレートを形成しやすいホストの条件として『ゲストを取り囲むフェニル基と, 水素結合形成のための水酸基を持つ剛直な構造の分子はホストとして最も良く機能する』という経験則から, ケイ皮酸の光二量体であるトルキシシン酸誘導体のホスト分子としての可能性に着目した。即ち, これら化合物群は結晶性, 溶解性が良く, 水素結合が可能なカルボキシル基, 嵩高い芳香環, 剛直な四員環構造を有することからホスト分子として機能することが期待された。ケイ皮酸誘導体の二量体は主に水素結合するカルボキシル基を分子内に2個有するトルキシシン酸またはトルキシシン酸型四員環構造をとり, X線構造解析により, 前者は結晶中で直線的な水素結合鎖を形成して分子が配列するのに対し, 後者は空間の多いジグザグ型の水素結合鎖が形成される場合が多いことが明らかになり, このため後者は

より包接化が進行しやすいと期待された。そこでクラスランドとして種々のトルキシシン酸誘導体を固相光化学反応により合成した。トルキシシン酸またはトルキシシン酸誘導体を選択的に与えるケイ皮酸の固相光反応の置換基効果については明らかとなっているが, ケイ皮酸のフェノールエステル類については置換基効果が異なり, 多くの場合に, 新規トルキシシン酸誘導体を与えることを明らかにした。またケイ皮酸の環状エステルと考えられるクマリンの光二量体ではベンズピナコール等と効果的に新規クラスレートをつくることが判明した。さらにトルキシシン酸のカルボキシル基の官能基変換により種々の新規キラルクラスランドの合成にも成功した。ゲスト分子として 5,6 員環状エノン化合物を用いた場合にはそのほとんどがクラスレートを形成し, 光付加反応の選択性が著しく向上した。またシッフ塩基を原料とする光反応によりキラルなジアミン型のクラスレートの合成にも成功した。これら多くの結晶構造が単結晶 X線構造解析の手法により明らかになった。以上, 所期の目標はほぼ達成されたので, 今後これらのクラスランドおよびクラスレートによる様々な応用が期待される。

2 研究成果 (当初の目的にどれだけ達したか, 新たに得られた知見)

a. 平成 19 年度における研究成果

ケイ皮酸エステル的一种としてクマリンおよび 6-メチルクマリンのアセトン溶液に 450-W 高圧水銀ランプによりベンゾフェノン増感反応を行なったところ, 可能性のある多くの異性体の

Selective Solid-State Syntheses by Construction of Novel Clathrates

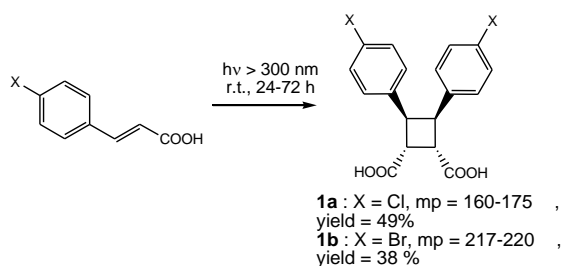
Kunio SUGIYAMA

中から選択的に *anti* head to head (*h-h*)型の二量体をうることができた。前者のクマリン二量体はベンズピナコールクラスレートを作ることが単結晶 X線結晶構造解析から明らかになった。そこでケイ皮酸、マロン酸、酒石酸等のヒドロキシル基を有する化合物を包接実験を行なった。

さらにこのクマリン二量体のジオキサン溶液に (*s*)-フェニルエチルアミンを作用させてジアステレオマーの分割を行ない生成したジアミドについてもマロン酸、酒石酸等の包接能の検討を行なった。

また、ケイ皮酸フェニルについては、これまでの結果から光反応が進行するのは、フェニル側の置換基が電子吸引性のときに結晶での光反応が進行する傾向がみとめられた。そこでさらに種類を増やして実験を行なったところ、期待されたように電子吸引性のシアノ基やクロルの場合に結晶での光反応が進行した。反応が進行したのは $\text{XC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCOOC}_6\text{H}_4\text{Y}$ において、 $\text{X}=\text{H}, \text{Y}=4\text{-CN}$; $\text{X}=4\text{-CN}, \text{Y}=4\text{-CN}$ の場合でいずれも *h-h* 型の二量体を与えた。 $\text{X}=\text{H}, \text{Y}=2\text{-Cl}$; $\text{X}=\text{H}, \text{Y}=2\text{-NO}_2$ の場合には *head to tail* (*h-t*) 型の生成物が得られた。原料結晶と生成物の間に相関が認められた。

b. 継続 3 年間を総括した研究成果 置換ケイ皮酸を固相で光照射し置換トルキシニン酸

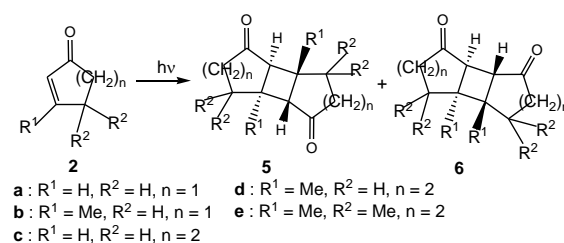


Scheme 1

1a 及び **1b** を得た(Scheme 1)。

トルキシニン酸 (**1a**) とゲスト (**2**) とをエーテル-ヘキサン (1 : 1, v/v) から再結晶させることで、トルキシニン酸 : 環状エノン = 1 : 1 となるクラスレート (**3a** ~

3e) が得られた。トルキシニン酸 (**1b**) を用いたクラスレート (**4a** ~ **4e**) はエーテル溶液から再結晶から調製することができ、トルキシニン酸がクラスレートホスト



Scheme 2

分子として有効であることが明らかとなった。イソホ

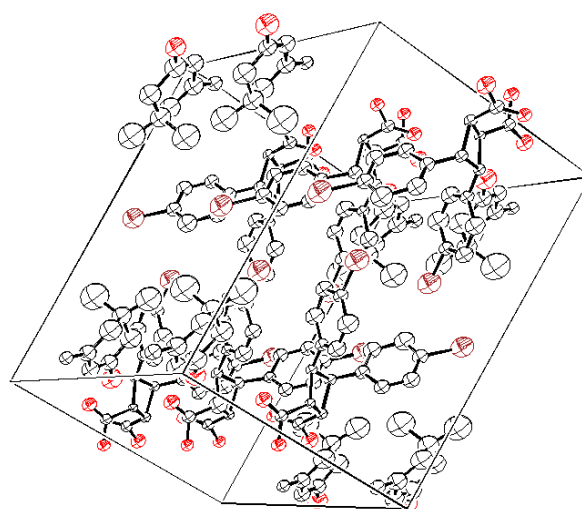
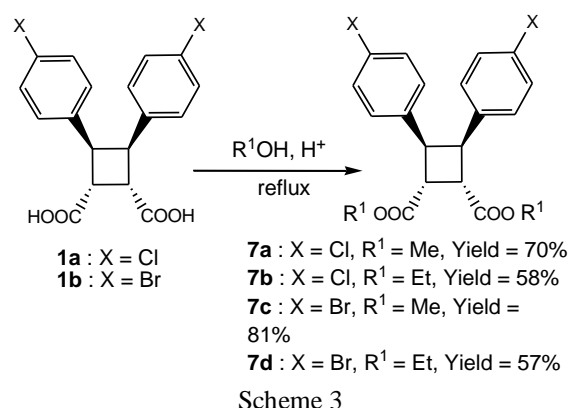


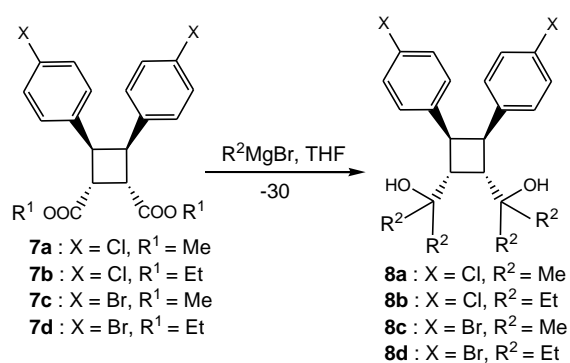
Figure 1. ORTEP Drawing of **4e**

ロンをゲストとするクラスレートの X線解析 (Figure 1) から、ゲストはホストの間隙に取り込まれていることが明らかとなった。一方、イソホロン以外のエノンをゲストとするクラスレートは IR からゲストがホストのカルボキシル基と水素結合によって包接されている事が示唆された、その内の幾つかは X線より支持された。**2d** のヘキサン溶液中の光二量化は、*anti* *h-t* (**5**) : *anti* *h-h* (**6**) = 27 : 73 となることが報告されているが **1a** - **2d** のクラスレート (**3d**) は、光照射により *anti* *h-t* 型二量体のみを与えた、**1a** をホストとする **2d** の光二量化に対し立体選択性が確認された。一方、**2a** をゲストとするクラスレート (**3a**) は光不活性であった。クラスレート **3d** は、**2d** が *anti* *h-t* 型となる立体配置が確認され、分子間の最短距離は 6.8 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、クラスレート中

において **2d** がある程度の自由度を持ち、環化できることを示唆する結果である。一方、クラスレート **3a** では、**2a** の分子間最短距離は 7.8 Å であった。トルキシニン酸誘導体は環状エノン類と包接体を形成しやすく一部光二量反応も選択的に進行し特定のゲストに対しては有効である事が明らかとなった。しかし、光化学的に不活性なクラスレートも多く、エノンがカルボキシル基の水素結合により包接されている例も多くあり、エノンの励起状態の観点からより温和な水素結合もしくは疎水的な包接体を形成できるホスト分子設計が求められた。そこで、トルキシニン酸誘



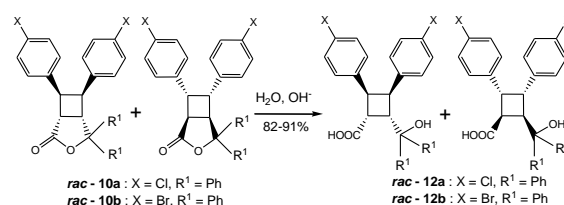
導体のカルボキシル基をアルコールへ官能基変換させた新規ホスト分子の合成について検討し



た。まず、光反応の際に結晶中のゲストの運動の自由度を上げる目的でトルキシニン酸誘導体のカルボキシル基をジアルキル化したアルコールを設計した。一方で不斉環化反応に対応させるため二つのカルボキシル基を異なる二種類の官能基へ変換しキラルなホストとすることを検討した。まず、エステル化後グリニャール反応により得た **8a** ~ **8d** を環状エノン類およびマレイン酸などと再結晶したがク

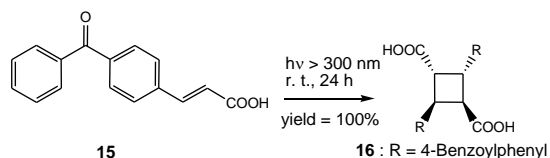
ラスレートは得られなかった(Scheme 3, 4)。そこで、導入するアルキル基を更に嵩高い基とすることで結晶格子に隙間が得られることを期待し、フェニル基を導入したところ立体障害により二種類の非対称な生成物 *rac* - **9** および *rac* - **10** が得られた。*rac* - **9** は自身に水酸基を持っており、また、ベンゾイル基を有していることから増感剤としての機能も併せ持っておりキラル増感ホストとして期待ができる。しかしながら、*rac* - **9** は溶解性が低く適度な結晶を作成する事が困難である。そこで

rac - **10** をホストの構造へ誘導し光学分割を検討した。そのため、*rac* - **10** をより効率よく合成する方法として **1a**, **1b** を無水物化し、-78 °C 下で対応するグリニャール試薬 3 等量を滴下し 15 分間攪拌後室温に戻し反応を終了することで選択的に *rac* - **10** のみを得ることに成功した。また、この方法を用いる事でフェニル基のほかメチル基も導入する事が可能となった。ラクトン型化合物 *rac* - **10** を THF - メタノール - KOH aq 系の加熱還流による加水分解で *rac* - **12** を収率 82 ~ 91 % で得た(Scheme 5)。



rac - **12b** の X 線構造解析を行ったところ空間群は P2₁/C となっており対称心を持った結晶であった。*rac* - **12** は何れもカルボキシル基と水酸基を持ち、さらに嵩高いアルキル基を有していることからエノン類に対して **1a**, **1b** 以上に包接能が高いことが予測できる。そこで包接能の有無を検討するために *rac* - **12b** と環状エノン類 **2a**, **2c**, **2e** とをジエチルエーテルで再結晶したところ何れも定量的にホスト : ゲストの mol 比は 1 : 1 のクラスレートを形成していることがわかった。さらに **1a**, **1b** の場合にクラスレートを形成しなかったイソアミルメチルケトン(**13**)は *rac* - **12b** とジエチルエーテルで再結晶により定量的にホスト : ゲストの mol 比 1 : 1 のクラスレートを形成し

た。このことは **rac** - **12** が環状エノン類以外にもクラスレートを形成する能力を持っていることを示唆する結果である。更に、トルキシシ酸のフェニル基をベンゾイル基に置換して増感作用の機能を持ったホストの合成を試みた。**15** の固相光反応では選択的に *syn* head to tail 型生成物 **16** がほぼ定量的に



Scheme 6

得られた。**16** は増感作用の機能を持ったホストとして期待できる。また他のケイ皮酸エステル類からのトルキシシ酸類合成についても検討を行い、酸残基とフェノール残基との間のねじれの程度が結晶形成に相当の影響を及ぼすことが明らかになった。また、新規ホスト **rac** - **12** は鎖状のエノンを取り込むことが可能であり、官能基変換による包接能の向上が達成された。

- (1) トルキシシ酸誘導体はカルボキシル基に由来して、分子間力が強力な新規クラスランドとして働くことが証明され、他の種々のゲストに対しても広くクラスレートの生成が期待できる。
- (2) ケイ皮酸の環状エステルであるクマリンの光反応による二量体自身がホストとして働くことを見出したが、OH基を有しないクラスランドとして珍しいタイプのものであり今後の展開が期待される。
- (3) 以上のような結晶でのトポケミカル反応についての Schmidt 則では最近接の二重結合距離が 4.7 Å 以上の場合付加が起こらないとしているが、本研究の X線解析の結果ではこれを超えて反応する例が複数あり、これは示唆に富んだ結果である。
- (4) 置換ケイ皮酸の固相光化学反応においてトルキシシ酸を与える場合が多いが、ケイ皮酸のフェノールエステル類については置換基効果が異なり、ほとんどの場合に、新規クラスランド

として働くトルキシシ酸誘導体を与えることが明らかになり、この種の化合物の合成に重要な知見がえられた。

3 問題点および今後の展望

クラスレートは通常の分子内に取り込む包接と較べて、結晶をつくるホスト分子の間隙間にゲストを取り込むため、多様なゲストを取り込むことが可能になる点で優れている。しかしその反面、結晶という制約があるため結晶化の成否が重要で、本研究においてもクラスレートにならない場合があった。一般的に、有機化合物の結晶化のプロセスは解明が難しい問題であり、このことについて今後の学問の進展が待たれる。

4 社会および学協会等への貢献度

a) 学協会等掲載論文

- 1) T. Tsuno, K. Kondo and K. Sugiyama, "Cycloaddition Reaction of Schiff Bases with Ketenes Generated by Pyrolysis of 2-Aryl-substituted 1,5,7-Trioxaspiro[2,5]octane-4,8-diones", *Journal of Organometallic Chemistry*, Vol.43, 2006, 21-28

b) 学協会等口頭発表

- 1) 杉山邦夫, ケイ皮酸エステル類の固相光化学反応, 第 54 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム, 2007, C23
- 2) 杉山邦夫, 杉山淳史, 梅垣直央, 谷口勇氣, アリールアクリル酸類の光化学, 日本化学会第 87 春季年会, 2007, 3PB-264
- 3) 谷口勇氣, 津野孝, 杉山邦夫, アクリル酸誘導体の固相光化学反応, 光化学討論会 2006, 2006, 2P078
- 4) 田中政人, 津野孝, 杉山邦夫, トルキシシ酸誘導体によるクラスレートの光化学反応, 光化学討論会 2005, 2005, 3P054

グラフト化高分子のヒドロゲル化と酵素の固定化

日大生産工 ○松田 清美・柏田 歩
山田 和典・平田 光男

1 当初の課題の意義, 目的およびその概要

生体組織の機能を代替する人工臓器の開発は1950年代より本格的に始まり, 失われた生体の機能を代替する数々の人工臓器が開発されているが, 現在使用されている人工臓器の素材は, 工業用汎用性材料を医療用に加工したものに過ぎず, 機械的特性は優れているものの, 生体にとっては異物となる。そのため, 生体に優しくかつ安全性の高い人工臓器の開発が強く望まれている。近年, 膜自体が置かれた環境変化を敏感に感知して膜の透過特性を変化させる, すなわちセンサー機能とバルブ機能を有する開発が行われるようになってきている。

本研究では, 人工血管などの医用材料に多く用いられているポリテトラフルオロエチレン(PTFE)を用いる。水溶性高分子(中性または電解質)をグラフトしたPTFEは高強度・高含水性である。PTFEを延伸して得られる多孔質膜(ePTFEフィルム)を高分子基質とし, 酸素プラズマ前処理により表面を活性化し, モノマー水溶液中で光グラフト重合を行うことにより, アクリル酸(AAc)をフィルムの片側表面に導入している。ポリアクリル酸グラフト化ePTFEフィルム(ePTFE-g-PAAc膜)を酵素固定化基盤として活用する。酵素は, 常温, 常圧での穏和な条件下で優れた触媒活性を示し, 反応を高効率に触媒し, さらに基質, 立体, 反応などの作用特異性が高いのが特徴である。しかし, 熱や強酸, 強塩基, 有機溶媒などに不安定であり, 酵素反応を行うのに適した環境においても比較的早く失活してしまうという欠点がある。さらに, 反応溶液中から酵素を変性させずに回収し, これを再利用することは技術的に困難であり, 一反応ごとに酵素を捨てることになるので非常に不経済な使用方法である。この酵素が特異的な触媒活性を保持し, 連続的に酵素反応を行うことができ, 再利用できる状態に

あるものが固定化酵素である。その中でフィルム状のものを酵素固定化基盤として活用し, 酵素が有する基質特異性, 穏和な条件下での反応性といった特徴を生体外において高効率で反復して行うことを目指した。グラフト鎖から酵素の遊離・脱着を抑えるために共有結合法を適用するが, これはグラフト鎖の高い易動性で固定化時の酵素の変性を低減できるという固定化基質としての優れた特徴を利用しようとしたものである。

初年度(平成17年度)はサステイナブルな機能性酵素固定化複合膜の調製を行う。酵素グルコースオキシダーゼ(GOD)のグルコース応答性を利用してインスリンを透過させることができる。しかし, グルコースとGODの反応を促進させるため, 酵素カタラーゼを選択した。カタラーゼはグルコン酸とともに生成する H_2O_2 を消費することにより, グルコースと固定化GODとの反応を促進できることが確認された。GODとグルコースの反応では人体に有害である過酸化水素(H_2O_2)を分解するため, これを無毒化することは意義があるものと考えられる。さらに本研究では, このカタラーゼが使い捨てにせず, 再利用することを目的として, GODと同様にグラフト化PTFE膜への固定化と新しくゲル膜への包括固定化を行うことを検討した。透過膜としてゲル膜を用いることでゲルの網目の調節により酵素を固定化できること, 共有結合で固定化した酵素に比べ高い活性を維持できることの利点を活かした複合膜の調製を検討する。

また, 基礎研究としてPTFE板を用いてグラフト鎖の形態を検討した。

2年度(平成18年度)は, グルコース応答膜としてGODのみならずカタラーゼをも固定化して用いる。また, 装置に改良を加えインスリンの補給をできるようにし, 膜の複合化とともにDDSの構築を目指した。

Hydrogelation of Grafted Polymer and Enzyme Immobilization onto Grafted Chains

Kiyomi MATSUDA, Ayumi KASHIWADA, Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

3年度（平成19年度）は、固定化する GOD とカタラーゼを同一のグラフト膜に固定化して用いることの有効性を確立する。さらに、高分子表面をヒドロゲル化してインスリンの透過をグルコース濃度の上昇に伴い効率的に制御できるようにするため、グラフト鎖の長さの調節を試みた。

2 研究成果（当初の目的にどれだけ達したか、新たに得られた知見）

糖尿病対策として、血糖値（グルコース濃度）の上昇を検知してその治療薬であるインスリンを提供でき、血糖値が正常に戻ればその提供を中止できるシステムの構築を目指した。

2.1 ePTFE 膜の PAAc グラフト量

ヒドロゲル化に用いられるグラフト鎖の量を増加させる工夫として、光重合を 2 回行ったところ、ePTFE 膜の PAAc グラフト量は、Fig. 1 に示すように、1 回目で約 50 mg/mg、2 回目には 150 mg/mg とほぼ 3 倍となり、確実にグラフト量の増加がみられた^{1,2)}。この結果、二重グラフト鎖は OFF 状態でのインスリンの透過を抑制することができた。

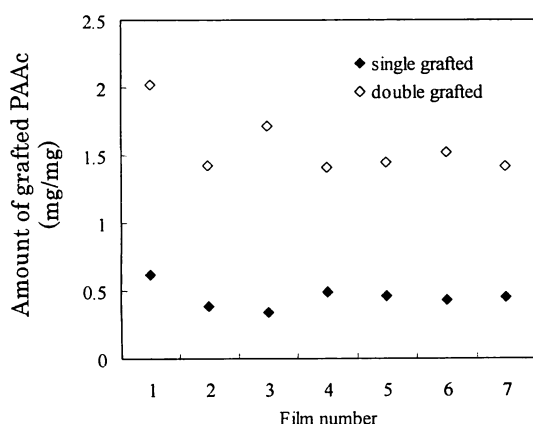


Fig. 1 Amount of grafted PAAc onto ePTFE film

2.2 カタラーゼ固定化ePTFE膜の酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜の酵素活性の保持は確認されていたが、基質グルコースの消費量が小さいため、カタラーゼの添加による促進作用を利用していた。添加した場合、使い捨てとなるため、GOD同様にカタラーゼについても膜への固定化を行い、ePTFE-g-PAAc-i-Catalase膜の酵素活性は、Fig. 2に示すように確認された¹⁾。

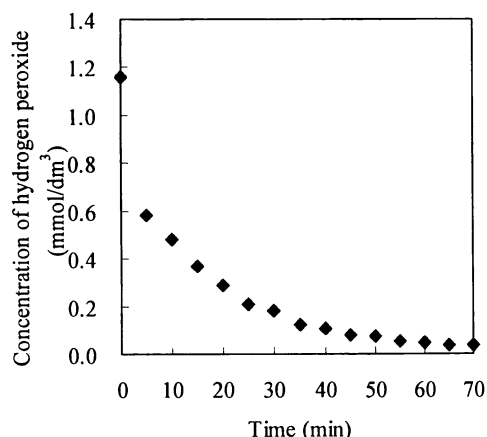


Fig. 2 Enzyme activity of immobilized Catalase on PAAc-g-ePTFE film

2.3 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜 および ePTFE-g-PAAc-i-Catalase膜を用いたインスリンの透過制御

GOD およびカタラーゼをそれぞれ固定化したフィルム 2 枚を用いたインスリンの透過結果を Fig. 3 に示す。グラフト膜を pH 7.80 緩衝溶液中で膨潤状態に保つとインスリンの透過は抑えられた。150 分後にグルコースを添加するとインスリンの透過が始まり 180～210 分後には放出量が急激に増加した。

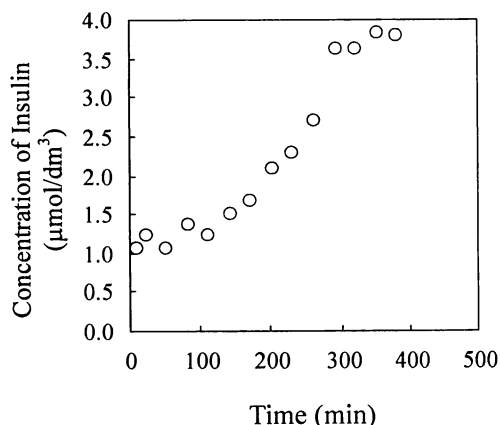


Fig. 3 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and ePTFE-g-PAAc-i-Catalase film

このことは、グルコースと GOD の酵素反応によるグルコン酸の生成のため PAAc グラフト鎖が次第に収縮するのでインスリンの透過が始まったと考えられ、次のカタラーゼ固定化膜のカタラーゼが H₂O₂ を消費した結果、

GODの酵素反応が促進され、さらにグラフト鎖が収縮して孔が開き、インスリン透過量を増加させることができたと考えられる。

2.4 ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびカタラーゼ包括PAAcゲル膜およびPEIゲル膜を用いたインスリンの透過

カタラーゼを膜に固定化する場合と、ゲル膜に包括することも検討した。ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびカタラーゼ包括PAAcゲル膜およびPEIゲル膜を用いたインスリンの透過制御を検討した。PAAcゲル膜は、低温レドックス重合によりカタラーゼを同時に包括固定した。PEIゲル膜はBPEIを架橋剤にエチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDGE)を用いてゲル化させ、カタラーゼを同時に包括させた。ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜と2種のゲル膜を組み合わせた透過膜によるインスリンの透過の経時変化をFig. 4に示す。

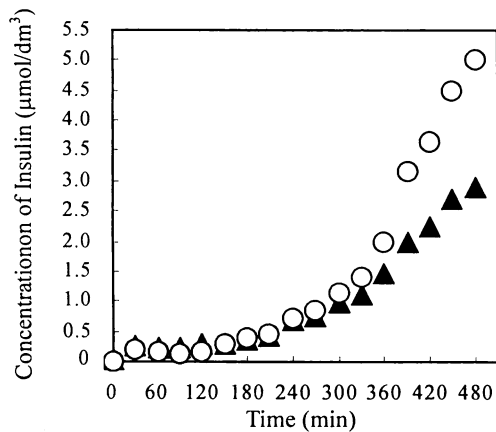


Fig. 4 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and Catalase trapped in gels (▲; PAAc gel and ○; BPEI gel) and ePTFE-g-PAAc film

実験開始から150分までは、膨潤状態のグラフト鎖が膜の孔を塞いでいるため透過が抑えられていた。150分後にグルコースを添加すると両者ともインスリンを透過させた。300分後以降に透過量が増大したのは、ゲルにトラップされたカタラーゼがグルコースの酸化を促進し、pHのさらなる低下をもたらしたものと考えられる。ゲルの種類による透過量の差異は、酵素反応による膜周辺のpHの低下により、PAAcゲルはカルボキシル基の解離が抑制され、陰イオン同士の静電反発が減少し収縮するため、インスリンが透過し難く、BPEIゲル

ではイミノ基のプロトン化による陽イオン同士の静電反発によりPEI鎖が広がり膜が膨潤するため、透過しやすいためと考えられる。グルコース添加後、インスリンの透過が始まるまでに時間を要したのは、ゲルを挟み込んだ透過側のePTFE-g-PAAc膜のPAAcグラフト鎖の収縮に時間がかかったためと考えられる。ゲルに包括された酵素の活性は、共有結合で固定化した場合に比べ、格段に良好であった。現在までの段階ではゲル化の際のEGDGE量が多いと酵素の活性が低下することが確認されているので、最適な包括条件の検討が必要である^{1,2)}。

2.5 ePTFE-g-PAAc-i-GOD&カタラーゼ膜を用いたインスリンの透過

一重および二重アクリル酸グラフト化膜へGODおよびカタラーゼ同時固定化膜を用いて行ったインスリンの透過実験の結果をFig. 5に示す。実験開始から120分までインスリンの透過は抑制されている。120分後にグルコースを添加することにより、徐々にインスリンの透過が始まった。これは、添加されたグルコースがGODの基質であるため、酵素反応が起こり、グルコン酸が生成したために膜の周辺のpHが低下した結果、膜の孔を塞いでいたアクリルグラフト鎖が収縮をし、孔が開いたものと解釈される。また、一重グラフト膜より二重グラフト膜の方がインスリン透過量が大きくなった。この原因としてはグラフト量の大きい膜の方が酵素の固定化量が多い結果ではないかと考えられる³⁾。

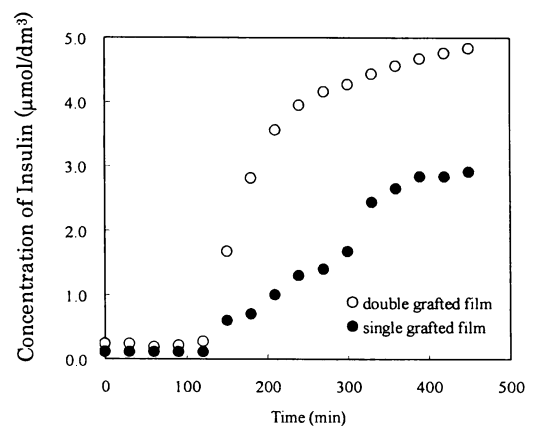


Fig. 5 Changes in the Insulin Permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD & Catalase film

一方、表面に導入したグラフト鎖の形態変化を検討する基礎的な研究を平滑な PTFE 板の表面解析により実施した。グラフト鎖の導入の際の溶媒組成、モノマー濃度および反応温度の影響を ESCA および接触角により評価した。PTFE 表面のヒドロゲル化はグラフト量の増加に伴い PTFE 表面に機能性ヒドロゲルの付与を増進することが示された^{4,5,6,7)}。

3 問題点および今後の展望

ヒドロゲル化ePTFE膜の調製は、酸素プラズマ処理後、増感剤ベンゾフェノン塗布し、アクリル酸溶液中で光重合を行っている。ヒドロゲル化ePTFE膜がOFF状態でモデル薬物であるインスリンを透過させてしまうことに対して、表面に多くの高分子鎖を導入させるために増感剤ベンゾフェノンを塗布するところから、光重合を再び行った。その結果、OFF状態でもインスリンの漏れ出しは防ぐことができるようになった。二重グラフト膜への酵素の固定化は、インスリンの透過量の増加をもたらした。しかし、酵素を共有結合で固定化すると活性の低下が著しいため、他の方法としてゲルへの酵素の包括固定化を試みた。使用したゲルは、生体適合性が要求されることと、GODとの反応による酸性状態への変化によってもカタラーゼが酵素活性を発揮することが必要である。そのため、酸性下で膨潤状態を示す、BPEIをEGDGEで架橋して使用したところ初期の目的は達成できた。しかし、ゲル膜は強度が不足しているため、繰り返し使用するには強度の付与が不可欠である。

酵素固定化量の決定に、吸光度、TOC 等を試みているが、吸光度を用いる場合には、縮合剤が酵素と同様の紫外領域に吸収があることと、固定化されて減少する酵素溶液の濃度低下を検出しようとするが、変化が小さく信頼性が低い。酵素活性測定から固定化量を推定しなければならない。TOC 値からの決定にもまだ問題が多いことが分かった。

透過膜として実用化へ向けての展開を図るために、固定化酵素膜の基質として ePTFE 膜を用いることが有望と考えられる。従って、酵素の固定化は共有結合を用いることになる。そこで共有結合で固定化した酵素にいかにより高い活性を維持できるようにするか、その調

製方法の開発を図る必要があると考えられる。繰返し使用可能な固定化酵素膜として活性の保持がなければ実用化の道は開けないものとする。

4 社会および学協会への貢献度

糖尿病、高脂血症、尿毒症などに親水性ポリマーを表面グラフト鎖として導入し、ヒドロゲル化した高分子膜を利用する前回の課題の中から糖尿病に特化した。その研究成果は、日本化学会、高分子学会および Photopolymer Conference で発表するとともに *J. Photopolymer Science and Technology* 誌等に掲載している。糖尿病は生活習慣病として社会的に対策を囑望されており、その一端を担うことには十分な意義があると考えられる。

【参考文献】

- 1) Kiyomi Matsuda, Yasuhiro Kawahara, Shunsuke Shimada, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada, and Mitsuo Hirata, *J. Photopolymer Science and Technology*, **19**, 225-230 (2006)
- 2) 松田清美, 柏田 歩, 山田和典, 平田光男, 日本大学生産工学部第 38 回学術講演会オーガナイズドセッション, 講演概要, 9 (2005)
- 3) Kiyomi Matsuda, Yasuhiro Takahashi, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada, and Mitsuo Hirata, *J. Photopolymer Science and Technology*, **20**, 201 (2007)
- 4) Kiyomi Matsuda, Hirotaka Yamamoto, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada, and Mitsuo Hirata, *J. Photopolymer Science and Technology*, **18**, 257-262 (2005)
- 5) 山本裕貴, 柏田 歩, 松田清美, *Polymer Preprints, Japan*, **54**, 4212 (2005)
- 6) 高橋靖宏, 松田清美, 柏田 歩, 山田和典, 平田光男, *Polymer Preprints, Japan*, **56**, 1769 (2007)
- 7) 安藤 輝, 高橋靖宏, 柏田 歩, 松田清美, 山田和典, 平田光男, *Polymer Preprints, Japan*, **56**, 4425 (2007)

酵素固定化技術の開発と環境浄化システムへの応用

日大生産工 ○山田和典・柏田 歩・松田清美・平田光男

1. 当初の課題の意義, 目的およびその概要

フェノール化合物は環境汚染物質の1つであり, 石油精製, 樹脂製造, 製紙などの工場からの排出が考えられる(1). さらに, 近年ポリカーボネートやエポキシ樹脂の合成原料であるビスフェノール A (BPA)の加熱処理による加工製品材料からの溶出や埋め立てごみ廃棄場から浸出に関する報告もある(2). これらの化合物は環境中で分解されにくいいため, 食物連鎖によって魚類, 両生類, 哺乳類などの水棲動物中で高く濃縮されることも指摘されている (2, 3).

これらのフェノール化合物の分解や除去法として活性炭やゼオライトへの吸着, 膜分離, 電気分解などの化学的処理法や微細藻類やバクテリアを使った生物学的処理法が報告されているが, 副生成物の生成や未反応成分の残存, 設備の大型化や低効率といった問題がある. 我々はこれらの化合物を分解する, または反応性の高い別の化学種に変換できる酵素に着目した(4-6).

本プロジェクトでは, ①マッシュルームと麹菌由来のチロシナーゼによる *p*-アルキルフェノール(7-9)及び BPA とその誘導体(10)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を利用した除去(8), ②過酸化水素(H₂O₂)存在下で, 西洋ワサビペルオキシダーゼによる BPA のラジカル化とカップリング反応による不溶性オリゴマーの形成を利用した沈殿除去とビスフェノール誘導体の除去(11,12), ③イオン交換樹脂に固定化した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除去(13,14)に関する研究を行ったので, その成果を総括する.

2. 研究成果

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

月桂冠(株)から提供された麹菌によって産生されチロシナーゼを用い(15), その比活性は 936 と 1170 U/mg-solid であった.

pH6.0 で *p*-アルキルフェノール溶液に麹菌チ

ロシナーゼ溶液とキトサンビーズ(富士紡績(株), 粒径: 70~200 μ m)を加えて反応を開始させた. まず, *p*-クレゾールを対象物質として麹菌チロシナーゼの至適条件を pH6.0, 30°C と決定した. 至適温度はマッシュルームチロシナーゼの 45°C に比べて低かった. このような至適条件の違いは, 由来の異なる同種の酵素を用いる際にしばしば見られ, 酵素のアミノ酸配列, 解離基密度などが異なるためと考えられる.

p-*n*-アルキルフェノール溶液に麹菌チロシナーゼ(150U/cm³)を加えると, キノン化合物の形成と同時にキトサンビーズ中のアミノ基にキノン化合物が結合して高く除去された(4, 5). キトサンビーズ量 0.025cm³/cm³では反応時間 100 分で *p*-クレゾールを完全に除去することができ, 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, 高く除去できた.

さらに, 分岐状 *p*-アルキルフェノールの除去を検討した結果, キノン酸化とキノン吸着が *p*-*n*-アルキルフェノールに比べて遅かったので, 麹菌チロシナーゼ濃度とキトサンビーズ添加量を増加させることで, 90~100%の除去率を得ることができた. 4-*tert*-ブチルフェノール(4TBP)と 4-*tert*-ペンチルフェノール(4TPenP)はマッシュルームチロシナーゼを使ってキノン酸化するには H₂O₂が必要であったが(11), 麹菌チロシナーゼでは H₂O₂を加えることなくこれらのアルキルフェノールを効率的に除去できたことは本方法における研究成果である.

2. 2 マッシュルームチロシナーゼによるビスフェノールAの除去

Sigma 社製のマッシュルームチロシナーゼ(EC 1.14.18.1, 比活性: 2590U/mg)を用いて BPA をキノン酸化する際の至適条件とキトサンビーズへのキノン吸着による除去を検討した.

BPA のキノン酸化は H₂O₂を加えると効率よく進行し, H₂O₂濃度 0.3~0.4mM で最大となった. チロシナーゼには 3つの形体があり, その

Development of Enzyme Immobilization and its application to Environmental Purification Systems

Kazunori YAMADA, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA and Mitsuo HIRATA

多くは mettyrosinase (Emet 体)として存在する.

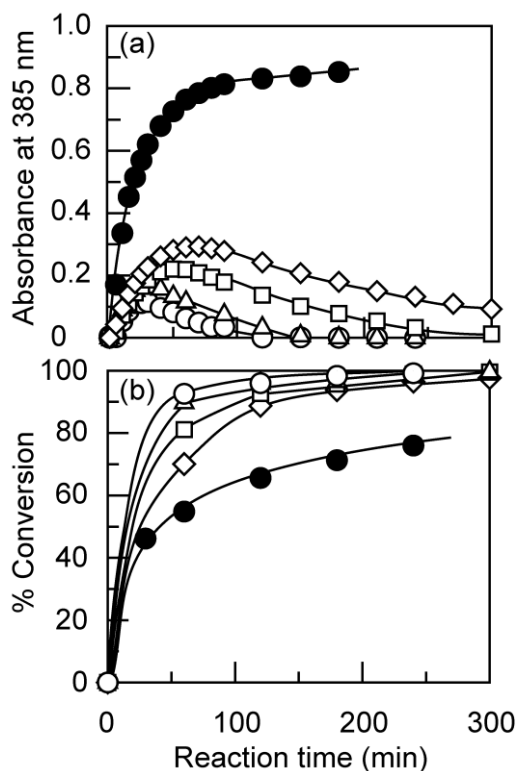


Figure 1 Removal of BPA (0.3 mM) by combined use of mushroom tyrosinase (200 U/cm³) and chitosan beads (●: without, ◇: 0.025, □: 0.050, △: 0.100, ○: 0.150 (cm³/cm³)) in the presence of H₂O₂ (0.3 mM) at pH 6.0 and 40°C.

しかし, H₂O₂ の存在下では Emet 体が oxytyrosinase 体に転化し, キノン酸化を加速すると考えられている. さらに, pH と温度依存性を検討した結果, pH6.0~7.0, 40°C を至適条件と決定できた. キトサンビーズ量を変化させた際の吸光度の変化(酵素濃度: 200U/cm³)を見ると(図 1), キトサンビーズの添加によって吸光度の上昇が抑えられ, キトサンビーズ量 0.050 cm³/cm³ では 300 分で形成したキノン化合物をほぼ除去できた. さらにキトサンビーズ量を増加させるとより短時間で除去できるようになった(10).

2. 3 ペルオキシダーゼによるBPAおよびその誘導体の除去

Sigma (株)から購入した西洋ワサビペルオキシダーゼ (E.C 1.11.1.7, 224U/mg-solid)を使用し, 0.3mM の BPA 溶液を対象として BPA を除去する際の至適条件の決定と種々のビスフェノール誘導体の除去を検討した.

pH6.0 の BPA 溶液(0.4mM)に西洋ワサビペル

オキシダーゼ, 分子量 1.0×10^4 のポリエチレングリコール(10K-PEG), H₂O₂ を加えることによって酵素反応を開始させた. 西洋ワサビペルオキシダーゼはチロシナーゼが活性を示さない α -アルキルフェノールに対して活性を示すことが本研究で明らかとなっており(8), BPA を H₂O₂ 存在下でラジカル化し, 水不溶性オリゴマーが形成することがわかった. 残留率は H₂O₂ 濃度の上昇とともに低下し, [BPA]/[H₂O₂]=1.0 (BPA 濃度: 0.3mM)において BPA が完全に処理された. ペルオキシダーゼの触媒作用は H₂O₂ 存在下で進行し, 低濃度では BPA の他に形成した 2 または 4 量体をラジカル化する際にも H₂O₂ が消費されるため不足し, 逆に H₂O₂ が過剰に存在すると, ペルオキシダーゼの一部が不活性な形体となるため, 活性が低下するとされている(16). また, PEG を加えると, 酵素反応によって形成したラジカルによる酵素の失活や不溶性オリゴマーへの包括が抑えられるため, 酵素の活性が保持され, BPA の処理時間を短縮することができた(17). また, 0.3mM の BPA に対して pH6.0, 30°C, [BPA]/[H₂O₂]=1.0, [HRP]=0.1U/cm³, [10K-PEG]=0.1mg/cm³ を至適条件と決定できた.

さらにビスフェノール誘導体を対象に除去実験を行った結果(表 1), 10U/cm³まで濃度を上昇させても転化率が約 30~50%程度に留まったビスフェノール S と 2,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホンを除いて他のビスフェノール誘導体は酵素濃度を上昇させる必要があるものもあったが, ほぼ完全に処理することができた. また, 酵素反応後の溶液の pH を塩酸で 4.0 まで低下させることで形成した不溶性オリゴマーが凝集しやすくなり, ろ過によって透明な溶液を得ることができた.

2. 4 固定化チロシナーゼの反復利用と p -アルキルフェノールの除去への応用

酵素の触媒機能を反復して利用するため, ここではマッシュルームチロシナーゼの固定化担体としてアクリル酸系弱酸性イオン交換樹脂 DAIAION, WK10 (三菱化学(株), 粒径: 300~1180 μ m, イオン交換容量: 2.5 mmol/cm³)を選び, 共有結合を介した固定化を行った.

濃度 2000U/cm³ のチロシナーゼ溶液にイオン交換樹脂 0.5cm³ を加えた後, 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を溶解させた pH7.0 の緩衝溶液を滴下し, 4°C で所定時間攪拌することで, 固定化反応を行った. 内径 5.0mm, 長さ 12cm のカラム 2 本にチロシ

ナーゼ固定化イオン交換樹脂 0.5cm³ と市販のキトサンビーズを所定量充填した。

45°C で 0.5mM の *p*-クレゾール溶液 20cm³

Table 1 Removal of BPA and its derivatives by horseradish peroxidase in the presence of 10K-PEG (0.10 mg/cm³) at pH 6.0 and 30 °C.

Bisphenol derivatives	[HRP] (U/cm ³)	Reaction time (min)	Residual %	Color of precipitates
bisphenol A	0.1	120	0	white
bisphenol B	0.03	90	0	yellowish white
bisphenol C (0.05mM)	0.01	60	0	orange
bisphenol E	0.1	120	0.5	ocher
bisphenol F	0.5	120	2.6	gray
bisphenol S	10	120	48.7	brown
bisphenol T	0.1	120	0.2	yellowish white
bisphenol Z (0.01mM)	0.05	60	0	white
diphenolic acid	0.5	60	0.3	white
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	0.001	60	0	pink
2,4'-dihydroxydiphenylmethane	0.1	120	0.5	ocher
2,4'-dihydroxydiphenylsulfone	10	120	28.7	brown
4,4'-dihydroxybenzophenone	0.5	90	0.3	white
2,4'-dihydroxybenzophenone	1.5	120	0.2	yellowish white

(pH7.0)をチロシナーゼ固定化樹脂を充填したカラムに流入し、その溶出液をキトサンビーズを充填したカラムに流入させた。溶出液は2本のカラムを通して繰り返し循環させた。

異なる固定化時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂 0.5cm³ と市販のキトサンビーズ 4.0 cm³ を充填したカラムに *p*-クレゾール溶液を3回循環させると(1回の除去実験)、固定化時間72時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂では *p*-クレゾールをほぼ除去できた。この際、*p*-クレゾール溶液は2本のカラムを約30分で通過し、1回の除去実験に90分の時間を要した。また、5回の除去実験を繰り返した際の除去率は95%以上となり、共有結合を介した固定化によりチロシナーゼの酵素活性を反復利用できることがわかった(13)。しかし、短い固定化時間で調製したチロシナーゼ固定化樹脂では固定化チロシナーゼの熱変性や生成したキノン化合物によるアロステリック効果によって活性が徐々に低下した(14)。

キトサンビーズが生成したキノン化合物を吸着し、固定化チロシナーゼの活性の低下を抑えるには、4.0cm³のキトサンビーズが必要であったが、溶液がカラムを通過する時間が長いと、固定化チロシナーゼの活性を低下させるので、粒径の大きい架橋キトサンビーズを作成した。キトサン 500(和光純薬(株))を2.0wt%に溶解した酢酸水溶液(濃度:1wt%)10cm³を1wt%のトリポリリン酸ナトリウム(TPP)溶液中に滴下する

ことで得たキトサンビーズをエピクロロヒドリン 15mmolを含む1MのNaOH水溶液に移し、75°Cで24時間加熱することで架橋キトサンビ

ーズ(粒径:2.0~2.8mm)を調製した。架橋キトサンビーズを内径8.0mmのカラムに充填し、上記と同様の手順で除去実験を行った。5.0cm³の架橋キトサンビーズを充填すると95%以上の除去率が得られ、処理時間を約70分に短縮できた。さらに、除去率の温度とpH依存性を検討した結果、固定化していないチロシナーゼの至適pHである7.0では50°Cまでの温度範囲で反復利用が可能であることがわかった。また、pH依存性を評価した結果、図1に示すように固定化していないチロシナーゼの至適pHより高いpH8.0や9.0で繰り返し利用できるように

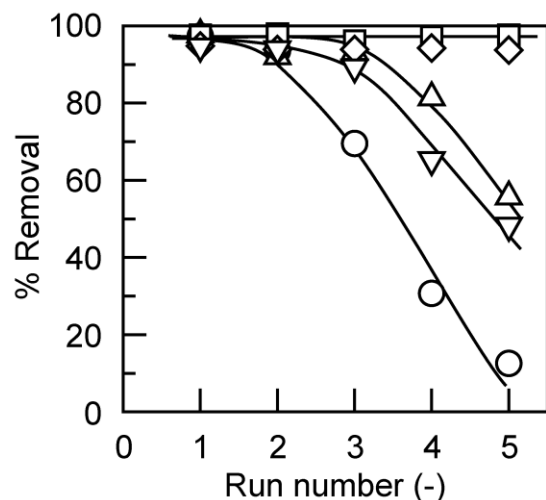


Figure 2 Reusability of mushroom tyrosinase immobilized on an anion-exchange resin, DAIAION WK 10, for removal of *p*-cresol at pH 5.0 (○), 6.0 (△), 7.0 (□), 10.0 (◇), and 11.0 (▽) at 45°C. Average immobilized amount =2.81 mg/cm³. Amount of packed chemically crosslinked chitosan beads=5.0 cm³.

なり、固定化によって酵素の pH と熱安定性が向上したことがわかった。

3. 問題点および今後の展望

酵素の触媒機能を利用した環境汚染物質の除去と水質浄化を目的とした一連の研究を行ってきた中で、マッシュルームと麹菌由来のチロシナーゼや西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼの基質選択性と至適条件を評価した。これらの酵素を使ってアルキルフェノール、ビスフェノール A 及びその誘導体などを除去することができたので、固定化と酵素の反復利用に関する点では、マッシュルームチロシナーゼのイオン交換樹脂への固定化を行った。そして、至適固定化条件の決定と固定化酵素の反復利用性を評価できた。今後は種々の直鎖状および分岐状アルキルフェノールの除去へ展開させ、固定化チロシナーゼの安定性と再利用性をさらに向上させるとともに他の酵素の固定化に関する研究を展開する予定である。この点では、イオン交換樹脂よりも親水化処理した PE 板またはフィルムへの固定化の方が経済的かつ合理的な処理技術であるといえ、今後の研究方向の1つといえるだろう。つまり、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、これらの酵素の高分子担体への共有結合を介した固定化と固定化条件を検討することで、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できる。

4 社会および学協会等への貢献度

4 種類の異なる酸化還元酵素(由来の異なるチロシナーゼ 2 種類とペルオキシダーゼ 2 種類)を用いてアルキルフェノール、BPA 及びその誘導体を対象として水溶液中からこれらの化合物を高く除去するための至適条件を決定し、水質汚染物質の環境中への排出防止や水質浄化を目的とした現在の環境問題を解決すべき簡易的な除去方法を確立できた。さらに、固定化による酵素の反復利用に関する基礎的知見を得ることができ、その研究成果は日本化学会、高分子学会、日本農芸化学会、日本キチン・キトサン学会などの国内学会やアメリカ化学会で発表するとともに、その研究成果を *Biotechnology. Progress, Journal of Applied Polymer Science, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 高分子論文集などの国内外の学術雑誌に掲載した。また、西洋ワサビペルオキシダーゼによるビスフェノール A 及びその誘導体の除去に関する一連の研究成果は社会的関

心となっている環境汚染物質を含む汚水の処理の生化学的処理の一方法を見だし、1 件の特許を出願するに至った。

5 参考文献

- 1) Guillet, 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, p113-136 (2000).
- 3) Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A. G. M., Bowmer, T., *Aqua. Toxicol.*, **43**, 77-92 (1998).
- 4) Sun, W. Q., Payne, G. F., *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 79-86 (1996).
- 5) Ikehata, K., Buchanan, I. D., Smith, D. W., *J. Environ. Eng. Sci.*, **2**, 463-472 (2003).
- 6) Ghiourelis, M., Nicell, J. A., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**, 98-106 (2000).
- 7) Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biotechnol. Prog.*, **21**, 823-829 (2005).
- 8) Yamada, K., Inoue, T., Akiba, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2467-2475 (2006).
- 9) Yamada, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., Nakamura, Y., Hata, Y., Higashida, K., in *Polym. Prep., in 232th ACS Meeting*, **47**(2), 140-141 (2006).
- 10) 杉山立樹, 武蔵絵里子, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 山田和典, 高分子論文集, in press.
- 11) Yamada, K., Ikeda, N., Takano, Y., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Prep. of Expand. Abst. of Environ. Chem., in 234th ACS Meeting*, **48**(2), 94-98 (2006).
- 12) Yamada, K., Shibuya, T., Noda, M., Uchiyama, N., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2503-2510 (2007).
- 13) 山田和典, 市村葉子, 西健次郎, 柏田 歩, 松田清美, 平田光男, 第 21 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, p114-115 (2007).
- 14) 佐藤えりか, 田村鮎美, 川越潤一, 市村葉子, 西健次郎, 山田和典, 高分子論文集, in press.
- 15) Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., Ichishima, E., *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004).
- 16) Jiménez, M., and Carcía-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1297**, 33-39 (1996).
- 17) Duarte-Vázquez, M. A., Ortega-Tovar, M. A., García-Almendarez, B. E., Regalado, C., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 42-47 (2002).

ポリペプチド超分子系の構築とセンシング材料への展開

日大生産工 ○柏田 歩 ・ 松田 清美

1. 当初の課題の意義、目的およびその概要

ポリペプチドによる二次構造や超二次構造のデザインは盛んに行われ、得られた形成理論や安定化などの成果は天然タンパク質に応用されている。そのなかで、coiled coil 構造は単純な構造に反して、天然のタンパク質の重要な機能を有しているため広く研究が進められている。coiled coil 構造が関与する種々の生体内反応のうち、膜融合反応はその代表例といえる。膜融合反応は生体内における神経伝達物質などの物質輸送やウイルス感染といった情報伝達において重要な役割を果たしており、融合タンパク質の刺激応答型(pH や金属イオンなどの存在による)コンホメーション変化をきっかけとした標的膜に対する認識を引き金に進行する。すなわち、モノマー状態である不活性型から coiled coil 構造である活性型へのポリペプチドの構造変化が生体機能を制御している。このような生体内における刺激応答型 coiled coil を基本にして、金属イオンなどの外部刺激に応答したポリペプチドのアセンブル系が可能となれば生体内におけるタンパク質の自己組織化機構のモデルとして解釈できるであろう。また、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と言える。しかしながら、刺激(金属イオン)応答性タンパク質を模して、水溶性ポリペプチドをプローブとしたセンシング系の構築例はほとんどない。このような人工ポリペプチドによるセンシング系の構築は天然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。

そこで、本プロジェクトでは、*de novo* 設計によるポリペプチドを用いた高精度・高感度な金属イオンセンシング系の構築を目的として、はじめに coiled coil ポリペプチドによる相補的認識および金属イオン選択的認識を目指した超分子系の構築に関して検討を行った。そして、この知見をもとに coiled coil ポリペプチドを用いた遷移金属イオンの蛍光センシング系ならびに希土類金属イオンの f-f 遷移発光に基づくセンシング系の構築に関する検討を行った。

2. 研究成果(当初の目的にどれだけ達したか、新たに得られた知見)

(1) coiled coil ポリペプチド超分子系の構築

① 相補的 coiled coil アセンブル系の構築

近年、ペプチド繊維やペプチドゲルなどの設計を目的とした合成ポリペプチドによる高次アセンブル系の構築が盛んに行われている。本研究ではバイオマテリアルという観点からだけでなく、機能性分子(ここではセンシング材)担持基材のビルディングブロック構築のために、二量化イソロイシンジッパー(IZ)ポリペプチドを用い、coiled coil 超分子を単分散的に二量化した。すなわち、N-末端に Cys を有する IZ ポリペプチドならびにペプチド鎖中央部に Cys を有する IZ ポリペプチド同士それぞれ、マレイミド基を有

Construction of Polypeptide Supramolecular Assembled Systems
and Application to Sensing Materials

Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA

設計どおりの coiled coil hetero block 構築に成功した。²⁾

本研究成果は、二つのドメイン間で機能の on, off 制御ができる新規人工タンパク質の創製のみならず、ポリペプチドのコンホメーション変化を利用した金属イオンセンシング系に大きく寄与できるものと考えられる。

(2) coiled coil hetero block を用いた遷移金属イオンセンシング系の開発

金属イオンセンシングにおいては特定の金属イオン種を選択的に検出するための定量的計測が必要とされる。そのためにはセンシング挙動の可視化が重要となる。そこで、本研究では上記の coiled coil hetero block 形成における、ポリペプチドのコンホメーション変化の可視化を目的として Fig. 2 の Pep3 および Pep4 それぞれに蛍光ドナー(Cy3B), アクセプター(Cy5Q)を導入した Pep5 および Pep6 の合成を行った。そして、Pep 5 および Pep 6 に導入した蛍光ドナー-アクセプター間の FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)現象を用いることによる金属イオンに対するポリペプチドの構造変化の可視化について検討を行った(Fig. 3)。すなわち、蛍光ドナーである Cy3B を励起することによるアクセプター-Cy5B の蛍光発光を観察することで FRET 効率を見積もる。その結果、Ni²⁺イオン存在下において高効率な FRET 挙動が観測された。これは coiled coil hetero block が形成した際に Pep5 および Pep6 それぞれに配した Cy3B-Cy5Q 間距離が Förster 半径内に近づいたことに起因すると考えられた。^{3,4)}

本研究成果は、ポリペプチドのコンホメーション変化を利用した金属イオンセンシング系を蛍光センシングに移行することにより可視化できたことを示している。さらにセンシングにおける定量性や金属イオン選択性をより厳密に制御できるモデル構築が行うことができれば、ポリペプチドを有効な金属イオンセンシング材として供出できるものと考えられる。

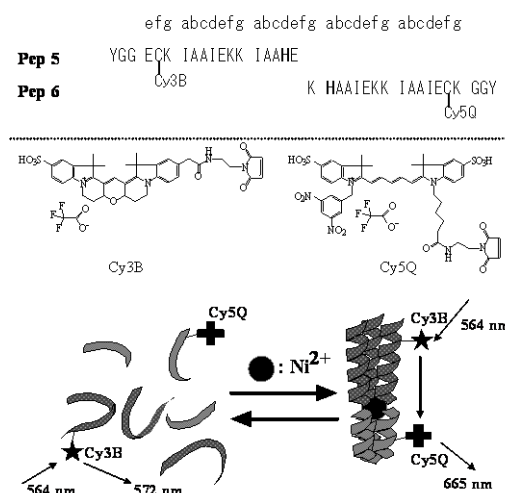


Fig. 3 Schematic illustration of Ni²⁺ ion induced coiled coil FRET system.

(3) Coiled Coil ポリペプチドを用いた希土類金属イオンセンシング系の構築

(2)では、Ni²⁺イオンなどの遷移金属イオンに応答した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 FRET 現象を利用した遷移金属センシング系の構築について記したが、本研究では希少性が高く、かつ EL 素子や造影剤などの用途において重要な役割を果たしている希土類金属イオンの coiled coil ポリペプチドによる選択的センシングについて検討した。本研究で用いた coiled coil ポリペプチドは希土類金属イオン結合部位としてγ-カルボキシルグルタミン酸(Gla)残基を有しており、希土類金属イオンとの配位により coiled coil 構造が誘起されるモデルである。また、希土類金属イオン結合部位近傍に Trp 残基を配し、π-π*励起による希土類特有の f-f 遷移を利用した発光センシングを目指したモデル設計を行った。

希土類金属イオン存在下におけるポリペプチドの構造変化は CD スペクトル測定から判断した。その結果、Eu³⁺などの希土類金属イオンに選択的応答を示す新規ポリペプチドアSEMBル系の構築に成功した。また、Trp のπ-π*励起による Eu³⁺の f-f 遷移領域の発光が観測された。これらの結果は形成 coiled coil 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おり、希土類金属イオンの蛍光センシングの可能性が示された。⁵⁾

本研究成果は、coiled coil 構造が形成する疎水コアに希土類金属イオンを配位させ、f-f 遷移由来の発光をもとにセンシングを実践できたことから希少な金属イオンに対する高感度センシングに有効であると考えられる。

3. 問題点および今後の展開

本研究課題を通して、*de novo* 設計による coiled coil ポリペプチドのセンシング材への利用可能性について示した。遷移金属に応答する coiled coil hetero block に関しては、学術的には新奇なモデルである。しかしながら、実用性に関しては対象となる遷移金属イオンの選択性が必ずしも高いとは言えず、配位場付近のアミノ酸残基改変によるモデル変更が今後の課題となる。また、水系での金属イオン回収まで考慮すると、2(1)①で提案した担体との複合化なども課題となる。また、より希少性の高い希土類金属検出を目的とした f-f 遷移利用センシングの可能性についても、18 年度以降検討したが、希土類金属イオンの発光がブロードであるため、蛍光強度の定量性や蛍光量子収率などが問題となる。検討課題として希土類金属イオンの配位場のさらなる改良をコンセプトにした新規ポリペプチド設計が挙げられ、現在進行中である。これらの検討課題が克服されれば、EL 素子や MRI 造影剤、そしてガン放射線療法において有効な希土類金属イオンを対象とした新規センシング系が確立できるものと考えられる。

4. 社会および学協会等への貢献度

本研究では種々の「金属イオンの存在により構造変化をおこすポリペプチド会合体設計」に成功した。特にペプチド工学分野における興味対象としてだけでなく、「金属イオンセンシング材としてのポリペプチド設計」と置き換えるこ

とで金属応答性の可視化の手法についても開発することができた。これらの成果は種々の目的に応じた、新規金属イオンセンシング系へ展開できるものと考えられる。本研究課題の成果は国内外学会で発表が行われ、中でも希土類金属イオンの蛍光センシングに関する発表は第 42 回ペプチド討論会ポスター賞を受賞した。さらに研究成果は国内外英文雑誌にも掲載された。特に 2(1)①における成果は日本化学会欧文誌 BCSJ 賞として表彰されるとともに、日本化学会の刊行物「化学と工業 2007 年 8 月号」にその旨掲載された。

5. 参考文献

- 1) A. Kashiwada, A. Sakakibara, Y. Nakamura, K. Matsuda: Monodispersed Dimerization of Isoleucine Zipper Coiled Coil Trimer, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 1296-1301 (2007).
- 2) A. Kashiwada, Y. Nakamura, K. Matsuda: Metal Ion-induced Hetero-Block α -Helical Coiled Coil, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005).
- 3) A. Kashiwada, Y. Nakamura, K. Matsuda: Fluorescence Resonance Energy Transfer by α -Helical Coiled Coil Polypeptides in Response to Metal Ions, *Sens. and Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005).
- 4) A. Kashiwada, K. Ishida, Y. Nakamura, K. Matsuda: Development of the Novel Metal Ion Sensing System by the Use of *de novo* Designed Polypeptides, *Pept. Sci. 2005 : T. Wakamiya (Ed.)*, 429-432 (2006).
- 5) A. Kashiwada, K. Ishida, Y. Nakamura, K. Matsuda: Lanthanide Ion-Induced Folding of *de novo* Designed Coiled Coil Polypeptides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, in press (2007).

環境中の金属イオンの分離濃縮および高感度モニタリング法の開発

日大生産工 ○南澤 宏明

① 当初の課題の意義、目的およびその概要

当該研究プロジェクト「グリーン・サステイナブルな先端有機材料の高機能化と高選択的分離分析システムへの展開」における研究役割分担「高選択的吸着材料による重金属イオンの分離分析」に携わり、「環境中の金属イオンの分離濃縮および高感度モニタリング法の開発」の研究課題で平成17-19年の3カ年、研究に取り組んできた。

20世紀のめざましい科学の発展は我々人類の生活を快適にしてきたが、無計画であったために、地球環境の汚染や破壊、資源の枯渇が深刻な問題になっている。我々の地球環境を修復するためにはこれらの環境汚染の元凶となる有害物質の分離除去およびそれらの正確な存在量の把握、まだまだ利用されていない未利用資源の有効利用や資源の再利用が重要なカギとなる。本研究課題はこれらの問題解決を目指すものであり、社会的に見ても非常に意義のあるものである。環境中の重金属類の分離濃縮には吸着、イオン交換、凝集、膜分離、起泡分離、微生物処理などの多くの物理的、化学的、生物的手法が用いられており、化学的処理における代表的な分離濃縮材として、イオン交換樹脂、キレート樹脂、シリカゲル、活性炭、凝集剤、種々の膜、マイクロバブルなどが挙げられる。天然に存在する無機系未利用資源としては天然ゼオライトや粘土などが、生物系未利用資源としては

キチンやキトサン、植物残渣などが挙げられ、これらはこれからの有効利用が期待される重要な未利用資源である。本研究ではこれらをそのままにし、これらに種々の化学処理を施して新たな分離濃縮材を調製して重金属イオンの分離濃縮について検討を行った。

一方、高感度モニタリング法の開発については、機器による測定の前の子備濃縮操作を中心に検討を行った。重金属類を分析する方法として、原子吸光分析や誘導プラズマ発光分析などがある。いずれも高感度な分析方法であるが、装置の検出限界以下の極低濃度で人体や植物に影響をあたえるような有害物質も少なくない。このような有害物質を定量する際は装置による測定の前に種々の予備濃縮操作を併用することで高感度な分析が可能になる。また、IT工業などでは高純度の製品が求められ、極微量な不純物の混入も製品に重大な影響を与えるため、高感度で高精度な成分分析が不可欠であり、機器による測定の前に行う予備濃縮操作が重要な意味を持つ。

本研究では、このような背景のもと、「環境中の金属イオンの分離濃縮および高感度モニタリング法の開発」について検討を行った。前述のように、本研究は環境修復および環境理解のために、また、精度の高い製品が望まれるIT工業などの発展にも寄与するものを考えられる。

Study on separation and determination of heavy metal ion
in environmental sample

○ Hiroaki MINAMISAWA

② 研究成果

a. 平成19年度における研究成果

a-1. マイクロカプセルを用いる金属イオンの分離濃縮に関する研究

検討を行い、得られた方法でいくつかの実試料の目的金属イオンの定量を行った。人の毛髪が人体に入り込んだ有害金属を排泄する役割を担っていることはあまり知られていない。毛髪の構成成分は主にケラチンというタンパク質であり、ケラチンにはシスチン、メチオニン、システインという含硫アミノ酸が多く含まれている。これはこれらのアミノ酸が有害金属の濃縮能を有していることを示唆しているが、アミノ酸の多くは両性イオンとして水に溶解するためにそのままの状態では有害金属の固相吸着体として使用できない。一方、アルギン酸ナトリウム溶液は塩化カルシウム溶液に滴下すると膜を形成して球状ゲルを生成する。そこで、アミノ酸とアルギン酸からなる新たな機能を持った有害金属の吸着体の調製およびそれらを用いた重金属の吸着能について基礎的検討を行った。そこで、シスチン、メチオニン、システインを1%含むアミノ酸含有アルギン酸ビーズをそれぞれ作成し、いくつかの金属 (Co, Mn, Ca, Fe, Mg, Ni) を用いて吸着能を比較したところ、いずれの元素においてもシステインビーズの吸着が良好であり、特に最も良好にFe(III)を吸着することがわかったので、より優れたシステインビーズを調製するために、アルギン酸濃度、システイン濃度、塩化カルシウム濃度、塩化カルシウム溶液への浸漬時間、ビーズの粒子径、乾燥の効果等の様々な調製条件について検討を行った。システインは水溶性であるため吸着操作中にビーズから溶出する可能性がある。そこで、アルギン酸溶液と塩化カルシウム水溶液の両方にシステインを添加してシステインができるだけビーズ内に保持されるよう調製を行い、16%システイン含有アルギン酸ビ

ーズが最適であった。粒子径の影響についてはマイクロピペット用チップおよび毛細管を用いて粒径の異なるビーズを作成して検討を行った。その結果、粒子径を小さくすることで吸着表面積が増加し良好な吸着が得られると考えていたが、実際は逆に吸着量が減少したので、実験では粒子径1.3 mmのビーズを用いることにした。今回使用したシステインは容易に酸化されて金属と錯生成能を有さないシスチンに変化することが知られている。そこで、Fe(III)の吸着率が向上しない理由がシステインの酸化によるものではないかと考え、システインの酸化防止剤(還元剤)であるメルカプト酢酸を含んだシステインビーズを作成して吸着実験を行ったが良好な結果は得られなかった。以上のような検討結果より、本研究では粒子径1.3mmの2%アルギン酸-16%システインビーズをFe(III)の吸着体とした。50 ppbのFe(III)溶液について吸着実験を行ったところ、吸着率は吸着時間30分で57.4%、6時間で77.8%となり、吸着率は向上したが100%の吸着には至らなかった。本研究で調製した吸着体はアミノ酸およびワカメの成分であるアルギン酸を用いて作成しており、有機溶媒などを用いない環境にやさしい吸着体ということで、その利用が期待されるが、実用にはシステイン溶出の改善が課題である。

b. 継続3年間を総括した研究成果

環境調和型未利用資源を用いた重金属類の除去に関する研究では、代表的なバイオマスであるキチンを用いたMnの吸着および無機系化合物であるハイドロタルサイトをを用いたPbなどの重金属類の吸着について検討を行い、一定の評価を得ることが出来た。また、高感度モニタリング法の開発では、キトサン溶液を用いた界面濃縮による微量Cuの黒鉛炉原子吸光分析および新規な吸着剤として注目を集めているキレート繊維を用いた微量Sb, CeのICP-AESについて

検討を行い、得られた方法でいくつかの実試料中の目的金属イオンの定量を行った。

b-1 重金属類の分離濃縮

ハイドロタルサイト(HT)は陽イオンと陰イオンの両イオン交換能を有する層状構造の無機系吸着剤である。陽イオンはホスト層の陽イオンと交換され、陰イオンは層間に取り込まれて陰イオン交換される。また、他の無機イオン交換体に比べて交換容量が大きいのが特徴である。そこで、有害イオンである CrO_4^{2-} 、 Cr(III) および Pb(II) の吸着について種々の検討を行った。各イオンはpHの上昇と共にHTへの吸着量が上昇し、pH2以上で Cr(III) および Pb(II) はほぼ100%、 CrO_4^{2-} は60%ほど吸着された。pH1以下ではHTが酸に可溶であるためにHTの一部溶け出して吸着体として作用しなかった。 CrO_4^{2-} の低い吸着率の原因としては Cr(III) のような陽イオンはホスト層での交換に対して、陰イオン交換能はホスト層とホスト層との間の層内で行われるため、サイズの大きい CrO_4^{2-} は層内に入りにくく、このような傾向を示したものと考えられる。HTの有害物質の除去剤としての可能性について吸着等温線を作成して最大吸着量を求めたところ、いずれのイオンも最大吸着量はHT50mgに対し、30~50 μg 程度であった。また、これらのイオンを吸着したHTは少量の酸に溶解できるので、HTはこれらのイオンの予備濃縮剤としても有効であると考えられる。

キチンを用いる方法ではキチンが酸性領域で陰イオン吸着体として作用する性質を利用して水中の全Mnを MnO_4^- としてキチンに分離濃縮後、直接メタル炉に注入する環境水中の微量Mnの原子吸光分析法について基礎的諸条件の検討を行った。試料水に酸化処理を施し、水中の全Mnを安定化した MnO_4^- とすることでpH3.0~5.0の範囲でほぼ100%キチンに吸着濃縮することができた。 MnO_4^- の吸着したキチンを少量の水(5.0 cm^3)に分散させ、その一部(10 μl)をメタ

ル炉に注入する方法で検量線を作成したところ、 $\text{Mn}1.0\mu\text{g}/100\text{cm}^3$ 以下で原点を通る直線関係が得られた。 $\text{Mn}0.2\mu\text{g}$ および $0.5\mu\text{g}$ を含む試料溶液についての本法での繰り返し精度(n=5)はそれぞれ4.7%、3.9%であった。 Mn の定量時において Cu(II) 、 Co(II) などの多くの金属イオンは Mn の10倍程度の共存で、 K(I) 、 Ca(II) などは200倍程度の共存でも影響を与えなかった。一般的な水道水などの水試料にはこれらの金属イオンはそれほど多く存在していないため、本法は金属イオンなどの共存イオンの影響を受けることなく、環境水中の全Mnの定量に応用できるものと考えられる。

b-2 高感度モニタリング法の開発

キトサンを含む水溶液と少量の有機相を振り混ぜると二相間界面に疎水性膜状物質が生成し、そこに水中の微量 Cu(II) が分離濃縮される。この現象を黒鉛炉原子吸光分析における予備濃縮操作とする環境試料中の微量 Cu(II) の高感度モニタリング法について検討を行った。微量 Cu(II) を含む水試料に0.2%キトサン溶液5.0 cm^3 を加えpHを8.5に調整後、ニトロベンゼン3.0 cm^3 を加えて振り混ぜて水相と有機相の二相間界面に生成する疎水性の膜状物質に Cu(II) を水相から分離濃縮させる。この Cu(II) を含む膜状物質を10M- CH_3COOH 2.0 cm^3 で溶解後、その一定量(20 μl)を黒鉛炉に注入し、原子吸光分析により定量を行ったところ、検量線は0.006~0.3 $\mu\text{gCu(II)}/100\text{cm}^3$ の範囲で原点を通る直線関係($r=0.992$)を示し、検出限界(3 σ)は $\text{Cu(II)}0.002\mu\text{g}/100\text{cm}^3$ (0.02ppb)であった。この方法をいくつかの水試料中の微量 Cu(II) の定量に応用し、良好な結果を得ることができた。

一方、キレート繊維はセルロースにキレート基などを化学修飾させて金属を捕捉できるようにした素材であり、安価で吸着性に優れる新規な吸着剤として注目されている。今回、工業的にも利用されているSbお

よびCeを分析対象金属として検討した。SbおよびCeのキレート繊維への吸着に及ぼす水相のpHの影響を検討した結果、SbはpH 3.0~7.0、CeはpH 3.6~7.0の範囲でほぼ100%の吸着を示した。キレート繊維に分離濃縮されたCeは硝酸、Sbは硝酸と酒石酸の混合溶液に良好な溶離性を示した。ICP-AESを用いる実際の測定における定量範囲を調べるため試料溶液を1000 cm³、溶離液を10 cm³として実験を行い、溶離後の検量線を作成し定量性の確認を行った(濃縮率100倍)。その結果、溶離操作後に得られた検量線は濃縮前の濃度でSb: 0.50~1.50 ppb, Ce: 0.25~1.00 ppbの範囲で直線関係を示し、直線の相関係数はいずれも $r=0.9999$ と良好な結果を示した。本法を水道水中の定量に応用した。その結果、濃縮前の水道水1000 cm³中にSbが1.98 μg, Ceが0.293 μg含まれていることがわかった。本法での検出下限はそれぞれSb: 11.9 ppb, Ce: 5.0 ppbだった。これらの検討結果よりキレート繊維を予備濃縮操作に用いることでICP-AESの検出下限以下に存在するような極微量な金属を定量可能な範囲まで濃縮し、定量することが可能になった。本法は環境水試料中の極微量SbおよびCeの固相抽出-ICP-AESとして有効である。

③ 問題点および今後の展望

天然ゼオライトや粘土などの無機系未利用資源およびキチンや植物廃棄物などの生物系未利用資源の有する重金属類の吸着能に注目し、化学修飾などを加えて新規な重金属吸着体を製造することは資源の乏しい我が国などにとって非常に有効である。このような未利用資源は我が国をはじめ世界中に多く保有されているため、この未利用資源の有効利用法の開発は発展途上国などにとって非常に重要であり、これらの国へのさらなる展開が期待できる。また、有害物質の除去の点からも本研究は環境浄化お

よび環境修復に寄与するものであり、さらには、選択的な重金属類の分離濃縮が可能になれば、再利用への展開が期待される。

しかしながら、良いことばかりではなく、重金属類を分離濃縮した固相の処理が大きな問題となっている。現在はセメントやガラスなどに固化して処理するのが一般的であるが、環境の変化により、それらから有害物質が溶出しないとも限らない。今後は「捕らえたものは逃さずに留める。」の姿勢で取り組む必要がある。

一方、未利用資源には多種多様な共存物があり、機器分析における予備濃縮操作に未利用資源を使用するには精度の点で問題があるため、未利用資源を高感度モニタリング法へ適応するのは困難であった。しかしながら、現在の高感度モニタリング法では高価な装置や試薬を使う場合が多く、今後はハイドロタルサイトなどの比較的安価な化合物を使った方法の開発を行う。

④ 社会および学協会等への貢献度

前述したように未利用資源の有効利用という点で、また、環境浄化(環境修復)という点で、本研究課題は環境中の有害物質である重金属類の分離濃縮(除去)を目的としているため、社会への貢献度が高いものと考えられる。最近の学協会誌にも環境修復、未利用資源や廃棄物の有効利用に関する論文が数多く掲載されている。また、それらに関した新しい学会の設立や論文誌が発刊されていることから、社会の関心の高さが伺われる。

また、分析化学の立場から言えば、精度と感度の優れた高選択的モニタリング法の開発は環境理解、精密工業の分野で必要不可欠であり、この点からも本研究課題の遂行は社会および学協会へ十分寄与するものである。