

[特集]

創造する発見する  
 ~技と実験の世界~ (中)  
 新規高分子電荷移動錯体の分子設計と生物・環境化学分野への展開

生物環境化学科  
 菅野憲一、高木祐一郎、吉田勇也、  
 花田圭一郎、松村孝太郎

■はじめに

生化学検査、環境水検査など様々な検査、研究で発色剤が使われている。発色剤は酵素反応によって酸化あるいは還元されて発色したり、酸化物と反応することで発色したりする。これまでに様々な発色剤が開発され、市販されている。その様な発色剤のなかで、フェニレンジアミン誘導体は電子供与性が高く、電子移動によって異性化して発色するほか、電荷移動錯体を形成することも発色できる。電荷移動錯体は通常、近赤外領域から可視領域にかけて、電荷移動錯体由来する吸収を生じて発色にいたる。吸収

帯の最大吸収波長は、錯体が溶解している溶媒によって異なり、通常、溶媒の極性が高くなるにつれて、最大吸収波長は紫外領域へとブルーシフトする。したがって、水などの極性溶媒中では電荷移動錯体の発色は難しい場合が多い。私たちの研究室では電荷移動あるいは電子移動相互作用を通じて発色する新規高分子化合物を化学的に合成し、生化学、環境化学分析へ応用する研究を進めている。

フェニレンジアミン誘導体は酸化によって可視領域に新たな最大吸収波長を持つ。例えば、光合成研究や分子磁性体研究などにも使用されるテトラメチルフェニレンジアミン (TMPD) は酸化によって560nm, 620nmに最大吸収波長を持つ吸収帯を生じて青色に発色する。TMPDは電子1つを出した状態II (図1参照) と、さらにもう一つの電子を放出した状態IIIへと酸化される。例えば、TMPDをペルオキシダーゼ (POD) で処理すれば、市販の発色方法同様に青く発色し、そのときの560nm, 620nmの吸光度は酸化物濃度に比例するため、酵素反応を定量することができる。また、酸化物をジアホラーゼ (Dp) で還元すれば、無色に戻る。したがって、理論上、PODとDpを交互に使ってTMPDを繰り返し使用することも可能である。

市販の発色材料としての利用は、オルトフェニレンジアミン (OPD) に代表されるように生化学分野において広く使用されている。OPDはペルオキシダー

ゼ (POD) によって酸化、異性化されて発色する。PODはELISAなどの発色段階で使用される反応で、その基質の一つがOPDである。また、環境計測分野においてもジエチルフェニレンジアミン (DPP) を塩素の発色剤に用いたDPP法が公定法として取り入れられている。DPPは水中の残留塩素と反応して桃色に発色するが、このときの吸光度は塩素濃度に比例するので、塩素を定量することができる。

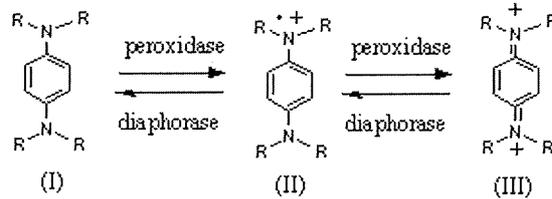


図1. TMPDの酸化還元反応

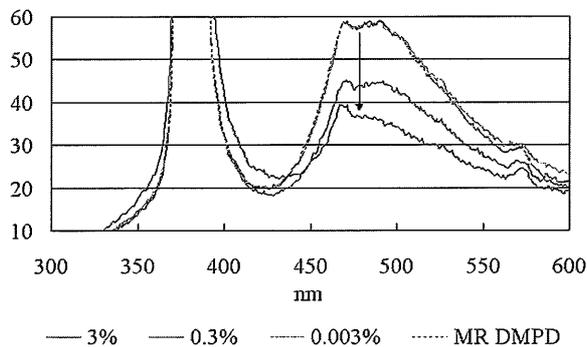


図2. DMPD樹脂の酵素酸化前後の蛍光スペクトル

■高分子発色剤

我々は、このような反応を高分子上で行なうことで様々な付加価値をえることを目的として、フェニレンジアミンを固定化した種々の高分子を合成した。特定の機能性分子を樹脂に固定化することで、反応後の後処理を簡素化することができる。また、その機能性分子を再利用しやすくしたりできる利点がある。特定の機能性分子を樹脂上に固定化する方法として頻繁に利用されるのが、酵素などを樹脂へ固定化する手法である①。酵素を樹脂上に固定化することで、酵素反応後の酵素の回収が容易になり、繰り返し酵素を使用することが可能になる。前出のフェニレンジアミンは環境汚染物質であるので、発色剤として使用後、使い捨てにせず、繰り返し使用可能な形にできれば、環境負荷が少なく、また、応用性のひろい発色

素子へと展開することができる。本研究室では固定化樹脂としてメリフィールド樹脂にフェニレンジアミン誘導体を化学修飾し、その生化学・環境化学への応用を検討した。

ジメチルフェニレンジアミン(DMPD)修飾メリフィールド樹脂(DMPD樹脂)は、100マイクロメートル程度のページュ色の粉体であるが、PODによって酸化されると、その過酸化水素濃度に応じて薄紫色に変色する。これはDMPD樹脂中のDMPDが酸化、異性化することによって可視領域に新たな吸収を生じるためである。

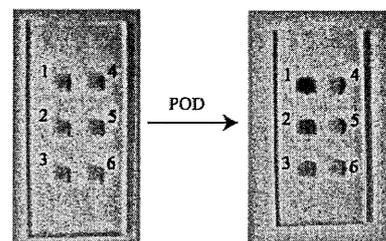
吸収波長の変化による発色・変色は微量成分の検出には不利である。そのため、微量成分の分析には蛍光色素が用いられる。そこで、DMPD樹脂の蛍光スペクトルを調べた。DMPD樹脂は380nmの励起波長で、480nmの蛍光を発することが分かった。POD酸化によって480nmの蛍光強度は過酸化水素濃度依存的に減少する(図2参照)。蛍光強度による発色が可能であるので、応用範囲はさらに広がる。その応用の一つにマイクロ分析への展開が挙げられる。

#### ■チップ上での検出

このような検出をマイクロメートルスケールで行なうことで、複数の微量検体を一度に解析できる他、検出速度を迅速に行なうことも可能になる場合がある。これは反応場が小さくなることで物質の移動が効率よく行なえたり、温度制御が効果的に行なえるなどの利点がある等のためである<sup>(2)</sup>。特に酵素反応において顕著な効果が報告されている<sup>(3)</sup>。そこで、本研究ではマイクロスケールでの研究のためにミリスケールチップ上での反応を行なった。7 cm×3 cmのPMMA板上に幅5mm、深さ200マイクロメートルの穴を掘削し、そこへDMPD樹脂を封入した。0.0003%から3%までの異なる濃度の過酸化水素とPODを滴下すると、PODの基質である過酸化水素濃度依存的に発色することができる。そこで、このチップ上での蛍光強度によるPOD活性検出を進めている。

#### ■高分子骨格の工夫

機能性分子の高分子への固定化には、酵素反応後の処理が簡易化できたり、再利用しやすいといった点以外にも様々な利点がある。それは、高分子はガラス、セラミック材料と並ぶ3大材料といわれるように、様々な形状形成できる点であ



HzO<sub>2</sub> concentration;  
1: 3%, 2: 0.3%, 3: 0.03%, 4: 0.003%,  
5: 0.0003%, 6: 0.00003%

図3. チップ上での発色

よって酵素反応が進行しにくいことが予想された。しかし、PODによる酸化およびDpによる還元が進行することが赤外吸収スペクトルよりわかった。この酸化還元による発色がより大きくなるよう主鎖構造の研究を進めている。

#### ■おわりに

フェニレンジアミン誘導体には発色剤としての利用以外にも様々な興味深い特性が知られている。ここで紹介した2種類の高分子以外にも、当研究室では様々な高分子を合成しており、機能性高分子材料としての評価を行っている。

#### ■参考文献

- (1) アミノ酸分析用バイオセンシング装置およびアミノ酸分析用バイオセンサーおよびアミノ酸分析用アミノシルトRNAセンサー、釘宮章光、大槻高史、菅野憲一、特開2006-166709
- (2) 次世代型合成デバイス：マイクロリアクター、菅野憲一、藤井政幸、宮崎真佐也、前田英明、ケミカルエンジニアリング、49巻1号、40-46、2004
- (3) Rapid enzymatic transglycosylation and oligosaccharide synthesis in a microchip, Ken-ichi Kanno, Hideaki Maeda, Showta Izumo, Masakazu Ikuno, Kazuhito Takeshita, Asuka Tashiro, Masayuki Fujii, Lab-On-a-Chip, 2, 15-18, 2002., Enhanced Enzymatic Reactions in a Microchannel Reactor, Kenichi Kanno, Hirofumi Kawazumi, Maseya Miyazaki, Hideaki Maeda and Masayuki Fujii, Australian Journal of Chemistry, 55, 687-690, 2002.