

平成7年度化学教室研究報告

栗原 良枝・水口 仁・前田 安昭・西川 恵子
村山 治太・中村 栄子・大谷 裕之

Annual Report of the Department of Chemistry-1995

Yoshie KURIHARA, Jin MIZUGUCHI, Yasuaki MAEDA, Keiko NISHIKAWA,
Haruta MURAYAMA, Eiko NAKAMURA, and Hiroyuki OTANI

平成7年度の化学教室の研究成果を報告する。本報告は以下のように分類してある。なお、文末のカッコ内は学部学生である。

1. 無機・分析化学および地球化学 (中村, 村山)
2. 物理化学 (水口, 西川)
3. 有機化学および生物化学 (栗原, 前田, 大谷)

1. 無機・分析化学および地球化学

(1) 環境水中の陰イオン界面活性剤の簡易分析法

工場排水試験法 (JIS K0102) で定められている陰イオン界面活性剤 (以下AS) の定量法の一つに、メチレンブルー (以下MB) 法がある。そこでは、ASをMBとのイオンペアとしてクロロホルムに溶媒抽出し、吸光定量している。一方、クロロホルムの有害性が最近問題となっており、これを用いない定量法が要求されている。昨年矢嶋らにより、ASを含む溶液にMBを加えて激しくかき混ぜると、ASとMBとのイオンペアが集合体を形成し、メンブランフィルターに捕集されることが見いだされた。本研究では、この原理を利用したASの簡易定量法の確立を目的とした。ASとして、ドデシル硫酸ナトリウムを用い、イオンペア集合体の生成条件、フィルター捕集後の定量法などを検討した。AS ($2 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6} \text{M}$) を含む試料20mlに、MB ($2 \times 10^{-4} \text{M}$) 1mlを加え、シェーカーで3分間振り混ぜると、ASとMBとのイオンペア集合体が良好に生成し、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターに捕集された。フィルターに捕集されたイオンペアをエタノール5mlに溶かし、その吸光度を測定すると、これはAS量に比例し、ASが従来のMB法の約二倍の感度で簡便に定量できることがわかった。また、いろいろなASを用い、この方法による検量線を作成したところ、モル濃度と吸光度との間に傾きの等しい良好な直線関係が得られた。(沖村 晴晶)

(2) 陰イオン界面活性剤共存下での陽イオン界面活性剤の高感度吸光光度定量

水中の陽イオン界面活性剤（以下CS）の定量法の一つに、これを陰イオン性色素（以下色素）とのイオン会合体として有機溶媒に抽出後、吸光定量する方法がある。試料中に陰イオン界面活性剤（以下AS）が共存する場合、CSはASとのイオン会合体となり、色素とのイオン会合が妨害され、定量不能となる。本研究室では、CSをASとのイオン会合体としてあらかじめ、1, 2-ジクロロエタンに抽出することによって過剰に共存するASから分離した後、テトラプロモフェノールフタレインエチルエステルカリウム塩の高濃度色素溶液で発色させる方法を、すでに見い出している。しかし、この検討では、CSとしてゼフィラミンを用いており、他のCSの定量が可能か明らかでなかった。本研究では、この方法の、種々のCS定量への適用及び定量条件の再検討を行った。CSの種類によっては、1, 2-ジクロロエタンへの抽出が悪いものがあったが、抽出時に試料100 ml当りASとしてドデシル硫酸ナトリウム0.4mgを加えることにより、一回の抽出操作でCSを完全に1, 2-ジクロロエタン層に抽出させることができた。今回定めた方法で種々のCSの検量線を作成したところ、モル濃度と吸光度との間に良好な直線関係のある同一の検量線が得られた。また、これを環境水中のCSの定量に適用したところ、共存物の影響を受けることなく良好な結果が得られた。（大久保 満恵）

(3) 水中の全シアン定量における前処理条件

水中の全シアン化合物は、試料をリン酸酸性下で加熱蒸留し、すべてのシアン化合物をシアン化水素として留出させた後、これを4-ピリジンカンボン酸-ピラズロン吸光光度法で定量することになっている（JIS K 0102, 以下JIS法）。この時、金属シアン錯体の分解を促すためにEDTAが添加される。ところが、試料によっては、加熱蒸留時に試料中に含まれる物質とEDTAとが反応してシアン化水素が生成することが報告されている。そこで本研究ではEDTA添加の効果を再検討することを目的とした。

試料として、シアン化カリウム、フェリシアン化カリウム、フェロシアン化カリウム、ニトロプルシッドナトリウム、ヘキサシアノコバルト酸カリウム、テトラシアノ金酸カリウムを含む溶液を用い、JIS法での試料量、リン酸の添加量、留出液量を変えて蒸留し、EDTA添加の有無とシアン化水素の留出状況との関係を検討した。その結果、いずれの場合もEDTA添加の効果は見られなかった。また、試料量はJIS法の1/5の約50ml、EDTAは無添加、留出液量はJIS法と同じ約70mlとした加熱条件では、JIS法でほとんど回収できなかったニトロプルシッドナトリウム、ヘキサシアノコバルト酸カリウム、テトラシアノ金酸カリウムの回収率がそれぞれ約85%、約65%、約40%に向上した。（石井 進）

(4) イオンクロマトグラフィーによる海水中の陰イオン定量のための分離カラムの検討

イオンクロマトグラフィーは、高感度で操作も簡単なため、微量陰イオンの定量に広く用いられる。しかし、海水のように特定の陰イオンを多量に含む試料には適用できない。

本研究では、交換容量の異なる様々な分離カラムを用い、塩化ナトリウム溶離液の濃度及び流速を変えて定量対象とする陰イオンの分離状態を検討し、海水試料に適するクロマト条件を見い出すことを目的とした。

交換容量の低い分離カラム4種、高い分離カラム1種及びその中間の塩化セチルトリメチルアンモニウムを吸着させたODS-80Tsカラムについて検討したところ、ODS-80Tsカラムが海水試料に適することがわかった。このカラムを用い、溶離液として0.1Mの塩化ナトリウム溶液、流速毎分1.2mlの条件で紫外部に吸収を持つ海水中の陰イオンを定量したところ、各イオンが塩化物イオンの影響なく良好に分離定量できることがわかった。

本法を実際の海水及び河川水中の亜硝酸イオン、硝酸イオン、臭化物イオン及び全窒素の定量に適用した。得られた定量値はJIS法での定量値とほぼ一致し、本法が実際の海中試料中の陰イオン定量に有効であることがわかった。(小林 史維)

(5) 乾性降下物の降下量の見積り

地球環境問題の1つとして、大気汚染に関心が持たれている。大気中に排出された汚染物質の一部は雨に取り込まれ、酸性雨となって地表に降り注いでいる。雨の降らないときにも乾性降下物として地表に影響を与えているが、酸性雨ほど研究されてはいない。

本研究は乾性降下物の降下量を見積ることを目的とした。スチロール樹脂製円筒容器を捕集器として用い、降雨の影響を避けるため晴天及び曇天の日だけを選び試料を捕集した。水の有無による乾性降下物の捕捉効率の差を見るために、容器をそのまま置いた場合と、容器に蒸留水を張った場合との2通りの捕集方法を同時に行った。化学分析の結果から降下量を見積り、捕集方法による違いや、乾性降下物のイオン組成について考察した。

- 1) 乾性降下物の全降下量は水を張った場合 $0.6 \text{ m-ed/m}^2 \cdot \text{日}$ 、水を張らなかった場合 $0.2 \text{ m-ed/m}^2 \cdot \text{日}$ であった。この違いは水が、1度捕捉された降下物の飛散を防いでいるだけでなく、大気中のエアロゾル状物質を吸収したためと考えた。
- 2) 水を張った容器では、 NH_4^+ と SO_4^{2-} の合計が捕集された乾性降下物中の約40%を占め、水を張らなかった容器では、 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Na}^+ \cdot \text{Cl}^-$ の合計で60%を占めた。
- 3) 容器設置場所——第二研究棟屋上(地上25m)・シラカバ林の地面・シラカシ林の地面・芝草地——による違いは顕著ではなかった。(鈴木 美都)

(6) 旧足尾銅山周辺における渡良瀬川水系の重金属含有量

渡良瀬川は皇海山に源を発し、足尾地区から両毛地区を流れて利根川に注いでいる。日本で最初の公害問題を派生した足尾銅山は1973年に閉山したが、明治時代からの鉱滓やズリ（無価値の鉱石）の堆積場はそのまま残存し、現在も輸入鉱石による精錬は行われている。渡良瀬川の現状を把握し、含有されている重金属元素（Cd・Cu・Fe・Mn・Pb・Zn）の起源を推定するために、旧足尾銅山周辺の渡良瀬川水系を11区画に分割し、3～5回採水した。同時に川底や堆積場の砂など15試料を採取し、河川水と酸性雨を想定した溶出実験を行った。

- 1) 足尾線「原向」駅付近（調査地最下流—庚申川合流点の100m下）で測定対象とした重金属元素の全てが検出された。カドミウムは環境基準値（10ppb）を越えていた。
- 2) 集水域に堆積場のある河川では重金属濃度が高かった。堆積場の砂などを用いた溶出実験では、蒸留水でも重金属は溶出し、酸性雨を想定した溶出実験では溶出量が増加することが明らかになった。
- 3) 精錬所の煙害によって森林が枯死し、表土が流失した、岩石むき出しの集水域を持つ支流河川は流水量の変動が大きく、晴天の続いた流水量の少ない時期に重金属含有量が多かった。増水時には土砂の運搬量も増大し、河川水による重金属運搬量がさらに増大する。（星野 智昭）

(7) 帷子川の重金属汚染の原因と水棲生物への影響

産業革命以降環境汚染が世界的な問題となっている。日本での重金属による汚染に限定しても、銅鉱山・銅精錬工場からの排水による足尾鉍毒事件、東京・牛込柳町の自動車排気ガスによる鉛汚染、カドミウムによる富山県・神通川流域のイタイイタイ病、水銀による熊本・鹿児島県の水俣病など、動植物に生死にかかわる影響を与えるだけでなく、人間の生存そのものを脅かしている。そこで身近な川として帷子川を選び、河川水中の重金属（Cd・Cu・Fe・Mn・Zn）濃度を測定し、汚染の原因と水棲生物に対する影響を調べた。帷子川の集水域を8区画に分割し、全集水域で3回サンプリングした他、経日変化を調べるために星川で4時間毎に19回、4日間にまたがってサンプリングした。

- 1) 銅は測定限界（10ppb）以下、カドミウムは1回だけ2.3ppb（環境基準値は10ppb）という測定値が得られたが、他はすべて測定限界（2ppb）以下であった。亜鉛は平均値4.1ppb（最大値5.9ppb・最小値2.6ppb）であった。カドミウムと亜鉛は流域土壌からの溶出は考えられず、人為的汚染であると結論した。
- 2) 鉄・マンガンはそれぞれ0.13～0.42ppm・0.03～0.31ppm含まれていたが、いずれも地下水に起因するものと考えた。

現在の帷子川の人為的重金属汚染はそれほど深刻ではないと結論した。（米倉 典正）

2. 物理化学

(1) 光散乱法による超臨界状態の観測

本研究室では、昨年度超臨界状態を直接肉眼で観測するための超臨界用サンプリング装置を製作した。超臨界流体では、密度ゆらぎが非常に大きいためレイリー散乱が強く起こり、白色光を照射すると波長の短いものは散乱され、その補色である黄色や赤色が観測される。そしてレイリー散乱の様子は、試料の密度揺らぎに大きく依存している。

本研究では、この光散乱を利用して、超臨界状態を定量的に観測する装置を製作した。光源にヘリウム・ネオンレーザー、検出器にフォト・ダイオードを使用した。フォト・ダイオードは入射光量に比例して電流が流れるが、本研究での実験条件においても、透過光量と電流は、比例関係にあることを確認し、光源および検出器を上記装置に組み込んだ。

この観測法により、無極性分子である二酸化炭素と、極性分子であるトリフルオロメタンの超臨界状態を調べた。その結果、相図において、気液曲線の延長線に近い経路をたどる試料は、密度ゆらぎが大きいことが明らかになった。そして、双方の密度ゆらぎの度合いを気液曲線の延長線上に近い試料と比較すると、同様であることが明らかになった。それにより、超臨界流体の物性は、分子の極性によらず、臨界点という状態が大きく関与していることが示唆された。(佐藤 安男)

(2) 広角X線回折法による超臨界状態の二酸化炭素の構造解析

超臨界流体とは臨界温度・臨界圧力を超えた状態の流体である。工業的には全く新しいタイプの溶媒で、抽出、分離、反応溶媒として用いられている。しかし、分子レベルでの構造研究は十分に行われていない。そこで、二酸化炭素を用いて超臨界流体の分子レベルの構造の密度依存性を広角X線回折法により解析した。

測定は、気液曲線を超臨界領域に延長した線を挟んで等温的に行った。また、試料によって回折されるX線の検出装置として二次元検出器イメージング・プレートを使用した。この得られたデータを一次元化などの補正・変換を行い、全散乱強度、構造関数及び動径分布関数を求めた。

解析結果より次のことが考えられる。気液曲線の延長線より密度が高い状態では、クラスターが大きく成長しており、液体のパッキングに近いと考えられる。一方、気液曲線の延長線より密度が低い状態では、気体に近い構造で、クラスターは存在するが、その大きさはまちまちで、いろいろな構造は入り混じったものであると考えられる。また、超臨界流体の気液曲線の延長線は一次の相転移線である気液曲線とは異なり、液体に近い構造から気体に近い構造への変化は緩やかである。(古高 誠也)

3. 有機化学および生物化学

(1) 甘味誘導タンパク質ミラクリンの大腸菌における生産系の確立

ミラクリンは西アフリカ原産の植物 *Richadella dulcifica* (アカテツ科) の実の果肉に含まれる甘味誘導タンパク質である。本研究では、ミラクリンの甘味誘導活性部位を解明するために、ミラクリンの大腸菌における生産系を確立することを目的とした。

まず、ミラクリン cDNA を鋳型として、PCR法により、ミラクリン前駆体とミラクリン成熟体の塩基配列をコードする遺伝子を増幅した。これを T-ベクターにクローニングした後インサートを切り出し、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の系のベクターである PGEX-4T-1 と結合させ発現用プラスミドを構築した。これを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、GST-ミラクリン融合タンパク質の発現を試みた。その結果、菌体破碎液の上清に抗ミラクリン血清と交差反応を示す新規タンパク質の発現を確認した。また、GST-ミラクリン前駆体融合タンパク質と GST-ミラクリン成熟体融合タンパク質の発現量に違いは見られなかった。

次に、発現した GST-ミラクリン融合タンパク質をグルタチオンセファロース 4B カラムで精製した。その後スロンビン酵素消化による GST-ミラクリンと分離を試みた。その結果、GST-ミラクリン成熟体融合タンパク質の分離に成功し、ミラクリン成熟体を得ることができた。(遠藤史子)

(2) 甘味配糖体と甘味抑制配糖体との構造と活性に関する理論的考察

マレーシア産の植物 *Staurogyne merguensis Kuntze* (キツネノマゴ科) の葉には、それ自身に甘味があり、さらに水を甘くする成分 (ストロジン) が存在する。一方、インド原産の植物 *Gymnema sylvestre* (ガガイモ科) の葉には、甘味を抑制する成分 (ギムネマ酸) が存在する。ストロジンとギムネマ酸とは、同じオレアナン骨格をもつ配糖体である。両者は、構造が似ているにも関わらず、前者は甘味および甘味誘導活性があり、後者は甘味抑制作用がある。本研究では、ギムネマ酸 I の立体構造を決定し、ギムネマ酸 I とストロジン 1 の立体構造を比較して両者の構造と活性について考察することを目的とした。

G. sylvestre の乾燥葉をエタノール抽出し、各種カラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC により分離・精製し、ギムネマ酸 I を得た。次に、ギムネマ酸 I の立体構造を実験と計算の 2 つの面から検討した。まず、ギムネマ酸 I について ROESY スペクトルの解析を行った。これにより得られた距離情報と分子軌道法を用いて計算された最適構造とを比較検討し、ギムネマ酸 I の立体構造を決定した。さらに、ギムネマ酸 I とストロジン 1 の立体構造を比較した。その結果、両者のアグリコンに対するグルクロン酸の向きは同じであることがわかった。よって、ギムネマ酸 I とストロジン 1 の立体構造上の大きな違いは D 環、E 環側にあり、これにより異なる活性を示すと推定された。(藏川恵)

(3) 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における生産系の確立

クルクリンはマレーシア原産の植物*Curculigo latifolia* (キンバイザサ科) の実の果肉に存在する甘味誘導タンパク質である。本研究では、クルクリンの構造活性相関を検討するため、クルクリンの大腸菌における発現系の確立を目的とした。

まず、クルクリンcDNAを鋳型として、PCR法によりクルクリン遺伝子を増幅した。これをpGEX-4T-1のもつグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子の下流に組み込み、発現プラスミドを構築した。これを用いて大腸菌BL21株を形質転換し、GST-クルクリンとの融合タンパク質の発現を試みた。その結果、菌体破碎液の沈澱に抗クルクリン血清と交差反応を示すタンパク質の発現を確認した。次に、可溶性のタンパク質を得るために、pMAL-P2のもつマルトース結合タンパク質遺伝子の下流にクルクリン遺伝子を組み込み、発現プラスミドを構築した。これを用いて大腸菌BL21株を形質転換し、マルトース結合タンパク質とクルクリンの融合タンパク質の発現を試みた。その結果、菌体破碎液の上清に、抗クルクリン血清と交差反応を示す分子量約6万のタンパク質の発現を確認した。(山中納美恵)

(4) 鯉の肝臓における11-cisレチノールの抽出及び脂質の分析

目の網膜においてall-transレチノールを11-cisレチノールに変化させる異性化酵素が存在すると考えられている。ウシやイカの肝臓においても、11-cisレチノールが微量に確認されているため、その異性化酵素が、肝臓にも存在するのではないかと予測し、その有無を判断することを実験の目的とした。サンプルには鯉を使用し、同時に脂肪酸分析も行った。

まず、アセトン抽出により11-cisレチノールを除いたエサを作成し、そのエサを鯉に与え一定期間ごとにその肝臓からレチノールを抽出しall-transレチノール、11-cisレチノールの相対量を比較した。その結果11-cisレチノールのall-transレチノールに対する相対量が徐々に減少してきていることにより肝臓には、その異性化酵素は存在しないのではないかと推測された。

脂肪酸分析に関しては中性脂質、リン脂質の脂肪酸を分析した。リン脂質のそれはエサの脂肪酸組成とは異なる組成を示した。しかし、中性脂質はエサとほぼ同様な脂肪酸の構成比を示した。このことから、中性脂質に属する11-cisレチノールはエサに微量に含まれるものが発見されたものであることが示唆された。(川田今日祐)

(5) 牛ロドプシンの再生に対する脂質の影響

視物質ロドプシンは主にリン脂質からなる膜の中に存在する。膜中ではPHによらず再生反応を行い、いくつかの活性剤中ではPH=5.9で再生反応を行うことが分かっている。本研究では、ロドプシンを網膜から抽出し数種類のリン脂質のミセル中で再生させることにより、ロドプシンの再生にリン脂質がどのような影響を及ぼすのかを考察する事を目的とした。

ロドプシンを遠心分離により分けとり、石油エーテル処理をしてリン脂質を除き、塩析をして精製した。リン脂質は市販のものを5種、本研究室でイカより精製したものを4種用いた。ロドプシンと各リン脂質を3時間混合し、光を90秒間照射して退色させ、エタノールに溶解した11-cisレチナールを加えて60分間再生させ、再び光を90秒間照射して退色させた。

その結果、炭素鎖が短く不飽和度が低いリン脂質と、炭素鎖が長く不飽和度が高いリン脂質のミセル中で再生反応が行われた。

一方、網膜中には、炭素鎖が短く不飽和度が低いリン脂質は存在しない。それは、炭素鎖が長く不飽和度の高いリン脂質からなる膜は、ロドプシンを安定に保つことができ、かつ11-cisレチナールを導入させやすいからであると考えられる。(布施和美)

(6) アキアカネ複眼中における視物質の抽出、精製

視物質ロドプシンの抽出、精製はウシやイカなどでは行われてきたが、昆虫類に関してあまり報告されていない。本研究では日本で手に入りやすいアキアカネをサンプルとしてロドプシンの精製を試みた。サンプルは昨年8月、長野県蓼科高原にて約4000匹採取し、実験に用いた。

視物質が含まれている複眼中の感桿を精製する段階でショ糖濃度勾配による遠心分離、その後の蒸留水による洗浄操作を徹底的に行うことにより、オモクロームを含む不純物をかなり取り除くことができた。

精製した感桿より2%の界面活性剤溶液にて抽出し、陰イオン交換クロマトグラフィーにてロドプシンを精製することを試みた。しかし、溶離液の種類、PH、塩濃度に関して条件検討を行ったが、ロドプシンの溶離を確認することはできなかった。

そこで抽出液中のロドプシンを含む光活性物質の存在を再確認するため、抽出液に光を5分間当てたものと当てていないものの吸収曲線を比較した。その結果ロドプシンの存在は確認されたが、その量はごく微量であった。そのため陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製は、出来なかったのではなく、確認することが出来なかつただけの可能性が高い。(吉谷川誠司)

(7) 金属イオン選択呈色を示す新しい色素化クラウンエーテルの合成と性質

取り込む金属イオンの種類によって色調が変化する色素化クラウンエーテルとして5-8', 8'-ジシアノヘプタフルベン-3'-イル-2-ヒドロキシ-1, 3-キシリル-18-クラウン-5(1)を合成し, その金属イオン選択呈色について検討した。

化合物1は3-プロモ-8, 8'-ジシアノヘプタフルベンと5-プロモ-2-メトキシ-1, 3-キシリル-18-クラウン-5から調整した亜鉛試薬とのパラジウム0価触媒存在下でのクロスカップリング反応と, ヨウ化リチウム-ピリジン系での脱メチル化反応とを用いて良好な収率で合成し, 赤色針状晶 (mp 149°C) として得た。

次に化合物1の金属イオン選択呈色について可視スペクトルを用いて検討した。その結果, 化合物1はテトラヒドロフラン (THF) 中塩基存在下でアルカリ金属イオンに対し選択的に呈色し, 著しいスペクトル変化を示した。特にTHF中ピリジン存在下では, アルカリ金属イオンのイオン半径の違いにより化合物1の最長波長部の極大吸収位置が変化し, Li^+ で18 nm (赤色), Na^+ で155 nm (赤紫色), K^+ で210 nm (青色), Rb^+ で210 nm (緑色), 及び Cs^+ で4 nm (黄色) 赤色移動した (カッコ内は溶液の色を示す)。このことから, 化合物1はアルカリ金属イオンに対し特異的に金属イオン選択呈色を示す色素化クラウンエーテルであることがわかった。(湯村 要)