

# 平成9年度化学教室研究報告

栗原良枝\*\*\*・水口 仁\*\*・前田安昭\*\*\*・村山治太\*  
中村栄子\*・大谷裕之\*\*\*

## Annual Report of the Department of Chemistry—1997

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

平成9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、文末のカッコ内は共同実験を行なった学部学生である。

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）
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) 全リン定量におけるモリブデン青の生成機構

水中のリン化合物の定量にはモリブデン青吸光光度法が広く用いられている。モリブデン青は、リン酸イオンとモリブデン酸が1:12で結合して生じるヘテロポリ酸の還元生成物であり、発色はヘテロポリ酸中のモリブデン6価の5価への還元起因する。しかし、ヘテロポリ酸のモリブデン12のうち何個が6価から5価へ還元されているのか、還元剤の種類によってなぜ吸収曲線が異なるかなどの発色機構についてはいまだ明らかにされていない。本研究では、還元剤として塩化スズ(II)を用い、モリブデン青生成に対する還元剤の関与に着目し、その発色機構を検討した。まず、共存塩化物イオン濃度0~5%でのモリブデン青の発色に及ぼす影響を検討した。共存塩化物イオン濃度が高くなると吸光度が小さくなり、吸収曲線も異なるものが得られた。さらに、それぞれの塩化物イオン濃度で生成したモリブデン青中のスズを原子吸光光度法(フレーム法)により定量し、リンとスズのモル比を求めた。塩化物イオン濃度が0%では1:2、5%では1:0.7となり、塩化物イオン濃度が高くなるとスズが減少していくことがわかった。このことより、スズはモリブデン青の構成元素であり、共存塩化物イオン濃度の増加に伴いそのスズの量が減少し、吸収曲線が異なってくると考えられた。(小林 寛和)

\* 無機・分析化学および地球化学

\*\* 物理化学

\*\*\* 有機化学および生物化学

## (2) 全窒素定量における硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元

水中の全窒素定量は、ペルオキシ二硫酸塩による加熱分解で窒素化合物の全てを硝酸イオンとした後、その紫外部の吸収を測定する方法、Cu-Cdカラムで還元し、亜硝酸イオンにして発色定量する方法で行われている。前者の方法は臭化物イオンの妨害を受けるため、海水試料には適用できない。後者の方法は廃液中に有害なCdが含まれるという欠点がある。硝酸イオンの還元剤として、ヒドラジンや亜鉛も用いられているが、これらでは硝酸イオンの一部がアンモニウムイオンにまで還元され（過還元）、還元率が一定しない。

Cu-Cdに代わる還元剤をみつけるため、まずCu-Cdカラムを用いて、カラムの太さ、充填剤を詰める長さ、試料をカラムに流入する速度、添加する緩衝溶液のpHなどの条件を変化させ、硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元を検討した。その結果、還元剤の量が多く、還元時間が長いと、過還元が起こるということがわかった。また、添加する緩衝溶液のpHが8.5~9.5で良好に硝酸イオンが亜硝酸イオンに還元された。次に、CuをコーティングしないCdを用いた還元の見直しも行った。その結果、Cdだけでは還元にかかる時間がわかった。（中村 公紀）

## (3) ホルムアルデヒド供与体を含む排水中のシアン物の定量

シアンメトヘモグロビン法（HiCN法）では、試薬としてシアンを含む溶血液、等脹液、洗浄液を用いている。等脹液にはDMU、洗浄液にはDIUなどが含まれており、DMUとDIUはホルムアルデヒド供与体である。ホルムアルデヒドが存在すると、シアンがこれと反応してシアンヒドリンとなり、JIS法における酸性蒸留時に分解するため定量されない。本研究室ではこれまでに、試料をアルカリ性とし、水素化ホウ素ナトリウムで還元することによりホルムアルデヒドを除去する方法（前処理除去法）及びHiCN法の廃液中のシアンの定量妨害の原因がDMU、DIUであることを報告している。本研究ではHiCN法の廃液中のシアンを定量するために、DMU、DIUの共存量とその妨害の程度および除去法を検討した。シアンとDMU、DIUを含む試料中のシアンを前処理除去法を行わずにJIS法で定量したところ、シアンの回収率は0~60%だった。しかし、前処理除去法を行うと、DMU 1~5 mg、DIU 1 mgの共存では、ほぼ100%の回収率が得られた。また、DIUについては前処理除去法、蒸留を2回行うことにより90%の回収率が得られた。溶血液とDMUを含む等脹液との混合液中のシアンを定量したところ、等脹液が9.9~16.5mlの共存では、シアンの回収率はほぼ100%となり、この範囲では妨害除去できると考えられた。

（山下 孝子）

## (4) イソニコチン酸-バルピツール酸ナトリウムによるシアン化物イオンの吸光光度定量

シアン化物イオン（以下CN<sup>-</sup>）の定量はイソニコチン酸-ピラゾロン吸光光度法（以下JIS法）で行われている。これは、試料にクロラミンT溶液を加え、CN<sup>-</sup>を塩化シアンとした後、イソニコチン酸-ピラゾロン溶液を加えて青色化合物を生成させ、その吸光度を測定する方法である。しかし、この方法では、ピラゾロンの溶解にジメチルホルムアミドを使用する難点がある。一方、ピラゾロンの代わりにバルピツール酸ナトリウム（以下BurNa）を使用する方法が報告されている。この方法は、BurNaが水に溶解する、感度が高いなどの利点があるが、詳細な検討が行われていない。そこで、本研究はその報告に基づき、定量条件の詳細な検討を行った。イソニコチン酸-BurNa溶液（以下発色溶液）の濃度、pH、酢酸緩衝溶液濃度、温度、クロラミンT溶液添加量などを変化させ、発色に及ぼす影響を検討した。その結果、クロラミンT溶液（1%）0.5ml、酢酸緩衝溶液（0.1M、pH5）10ml、イソニコチン酸及びBurNaの濃度4%、1%の発色溶液10mlを試料に加えて25℃で30分間発色させることとした。この方法による検量線を作成したところ、濃度と吸光度との間に良好な直線関係が得られ、5 µgでの10回の繰り返し実験の相対標準偏差は3%であった。本法の感度はJIS法の1.1倍であった。（八木 美千子）

## (5) 非イオン界面活性剤の吸光光度定量

環境水中の非イオン界面活性剤（NS）の代表的な定量法として、テトラチオシアノコバルト（II）酸吸光光度法がある。しかし、この方法は感度が低いため、簡便で高感度な定量法の確立が望まれている。昨年度本研究室の二木は、試料中のNSをトルエンに抽出後、チオシアン酸鉄（III）錯イオンと振り混ぜて、発色定量する方法を報告した。本研究においては、この方法の発色条件の再検討及びNSと共存する陽イオン界面活性剤（CS）の妨害除去法の検討を行った。トルエン抽出試料10ml（NS100 µg）に対して、発色溶液であるチオシアン酸カリウム溶液（10M）、塩化鉄（III）溶液（1M）を5 mlずつ、pH6の酢酸緩衝溶液（0.1M）2 mlを加えることとした。また、試料100ml中のNS100 µgは、塩化ナトリウム共存での抽出操作で、完全にトルエン層に抽出されることを確認した。次に、共存するCSの妨害及びその除去法を検討した。その結果、流速1 ml/minで試料溶液50 ml（エタノール50%）を陽イオン交換樹脂カラムアンバーライトIR118に流した後、カラムをエタノール50%溶液100mlで洗浄することとした。流出液150mlを濃縮とエタノール除去のために加熱した後、先の抽出、発色操作を行った。本妨害除去法及び定量操作により、CSと共存するNSの回収実験を行った。その回収率は90%以上になり、良好な結果が得られた。（中村 早苗）

### (6) 炭酸塩鉱物の地球化学的考察

本学大学会館のコンクリート壁面に析出している二次鉱物を生成しつつある水について研究し、雨水中にはほとんど存在しない亜硝酸イオンが検出される原因を追求した。硝酸イオンが、鉄によって還元されていること、炭酸カルシウムと鉄の存在下での硝酸イオンの還元は、亜硝酸イオンがある程度生成した後その一部がアンモニウムイオンにまで還元されるが、大量の炭酸カルシウムの存在が、硝酸の還元を亜硝酸イオンの段階でとどめていることが示唆された。室内実験では自然の状態では検出されないアンモニウムイオンが検出されたが、条件をより自然の状態に近づけることで、アンモニウムイオンが生成する前で反応が止まり、亜硝酸イオンのみが生成されるという自然の状態が再現できるのではないかと思われる。

用いた試料の二次鉱物について、粉末X線回折を行った。名古屋市文化会館(A)、本学大学会館(B)の2種とも主成分は炭酸カルシウム(カルサイト型)(A:85%, B:94%)であった。二次鉱物の生成段階での生物の関与の有無を調べるために、電子顕微鏡写真の撮影と表面付着物の懸濁水のpH測定を行ったが、微生物の関与の痕跡は見られず、無機的に生成した鉱物であることが推察された。今後、人工的な環境で生成を試みるのが課題となった。(大野 悦子)

### (7) 乾性降水物の降下量の見積もり-3

昨今、環境問題の一つとして大気汚染への関心が高まっている。大気中に存在する汚染物質の一部は、水を介する形では酸性雨、酸性霧等、湿性降水物として、水を介さない形では、乾性降水物として地表に降下し、森林、土壌、河川、湖沼、建造物等に影響を及ぼす。本実験では乾性降水物に着目し、乾性降水物の昼・夜間の降下量の差の有無と季節的変動を調査、検討することを目的に試料補集と測定を行なった。試料の補集地点は教育人間科学部第二研究棟屋上で、補集容器にプラスチック製円筒容器を用いて補集した。補集は降雨の影響を避けるため晴天時もしくは曇天時にのみ行ない、雨天時には屋内へしまい込んだ。水の有無による影響を考え、容器に水を張ったものと、水を張らなかったものとを同時に補集した。補集は昼間、夜間、昼夜の区別なし、の3通りの方法で行ない、補集時間はすべて合計200時間になるようにした。補集終了後、容器を少量の水で水洗し洗浄液を濾過した。濾液が200mlになるまで繰り返し容器を洗浄し、測定試料とした。各試料のpH、電気伝導度、陽イオン濃度、陰イオン濃度を測定した。硝酸イオンの量は冬季に入り低下した。これは、生物の活動が低下したためと考えられる。その他の化学成分の季節変化は少なく、昼間と夜間の間にも大きな変化はなかった。総降下量は $0.01\text{m}\cdot\text{eq}/\text{h}\cdot\text{m}^2$ であり、平成7年鈴木値に近かった。(俣田 博)

### (8) 横浜地区における温泉の地球化学的考察

横浜市南区を中心に21ヵ所の温泉を調査した。横浜温泉は堆積作用によって地層中に閉じこめられた海水を塩類の起源としている。泉温20℃前後、褐色・透明、ナトリウムと炭酸水素イオンを主成分とし、pHが7.6~8.7を示すのが特徴であった。

着色の程度はサンプリング地点によって異なり、黒に近いものから無色に近いものまであった。色の濃さは概ねCOD値が高いほど濃くなるという関係が得られた。COD値は有機物の含有量を表しており、色の濃いものは有機物を多く含んでいると考えられる。

神奈川県温泉地学研究所が報告している過去のデータ(20~30年前)と比較した結果、温泉水に含まれる化学成分に大きな変動は見られなかった。

温泉水に含まれる化学成分から横浜の深さ100m付近の地下温度を推定した(Fournier, R. O.らの理論 1972)。結果は地下増温率から予想される温度よりも高い値になった。化石海水の影響を考え、海塩補正後、温度を算出し直したが、結果に大きな差は見られなかった。用いた地下温度推定法は地下水が岩石と溶解平衡に達していることを前提としている。横浜の温泉水はまだ岩石と溶解平衡に達していないと考えられ、推定地下温度に差異が生じたと思われる。(田中 耕太郎)

### (9) 温泉二次鉱物の実験室での生成

温泉からは、さまざまな沈殿物・二次鉱物が生成している。温泉沈殿物の1つである石灰華は箱根・湯の花沢の噴泉塔温泉でも生成している。沈殿物が沈積し塔のように成長していく様子は、88年島研究室大木によって報告された。本実験では、この現象を実験室中で再現することを試みて人工噴泉塔を作成し、噴泉塔温泉の沈殿物との比較を行った。1回目の実験は、炭酸カルシウムの飽和溶液を装置内に1週間循環させ結晶を生成させた。2回目の実験では、炭酸カルシウムの飽和溶液のかわりに炭酸水素カルシウム溶液を装置内に24時間循環させ結晶を生成させた。1回目の実験で得られた沈殿の大部分はカルサイトで、溶けきれなかった試薬の炭酸カルシウムと、新しく生成したものとの区別がつかなかった。装置のヒーター内部にできた結晶には新しく生成したアラゴナイトが15%前後含まれていた。2回目の実験で生成した析出物の結晶形はアラゴナイトを95%以上含むものであった。装置から噴出する水溶液の水温が90℃をこえていることから、二酸化炭素が逃失し炭酸カルシウムとして析出する速度が大きくなり、アラゴナイトが多量に生成されたと推定される。実際の噴泉塔は、噴出口部分はアラゴナイト、根元のほうでカルサイトの結晶が沈積していると報告されている。噴泉塔のカルサイトは結晶時の温度が低かった場合と、アラゴナイトが遷移した場合とが考えられる。(田中 良徳)

### (10) 土壌の酸性雨中和能力

土壌には酸中和能力があり、雨水などから加えられる酸を中和している。土壌が持つ緩衝能の緩衝領域は3段階構成になっている。第1の領域は約pH8、第2の領域は約pH5、第3の領域は約pH3で保たれる。土壌の酸中和能力が第3の領域まで低下したとき、植物や微生物が生育困難になるほどpHは低くなり、水素イオンと置換したアルミニウムにより植物毒性の高いアルミニウムイオン濃度も高くなり、森林が破壊されはじめる。本研究では大学構内の土壌を用いて実験室内で自然の循環を再現し、土壌が酸性雨を中和する過程について明らかにすることを目的とした。

以下のことが明らかになった。

1) 抽出液の水素イオン濃度がpH5前後であることから、用いた土壌試料の酸中和反応は、第2の緩衝領域の陽イオン交換反応である。

2) 試料1gがpH4の模擬酸性雨を100g×14回くり返し中和した時点で、抽出液中の陽イオン溶出量が1回目の半分以下になってしまった。土壌試料の酸中和能力は半分以上失われてしまっていることになる。

3) 陽イオンの構成割合の変化から、カルシウムイオンの保持量が多いほど土壌の酸中和能力は高いと考えられる。(元木 直子)

## 2. 物理化学

### (1) ペリレン誘導体の分子配列とスペクトル変化に関する研究

市販の黒色顔料である*N,N*,-ビス(2-フェニルエチル)ペリレン-3,4:9,10-ビス(ジカルボキシイミド)[略称:PB]は、真空蒸着すると鮮やかな赤色(極大吸収波長:505nm/アモルファス相)を呈するが、有機溶剤の蒸気に曝露するか100℃以上に加熱すると黒色(極大吸収波長:476 & 610nm/結晶相)に変化する。当研究室ではこの現象をAlGaInP半導体レーザー(発振波長:635nm)を用いた光ディスクへ応用することを検討している。本研究では、X線回折・可視吸収スペクトル・DSC測定を実施して、PBの基礎物性の検討と「固体溶剤」(常温では固体であり、100℃~200℃で融解するかある程度の蒸気圧を有する化合物)を用いた相転移温度の制御の検討を行った。基礎物性の検討の結果、PB蒸着膜の転移温度は100℃付近にあり、非晶質から結晶相へ24J/gの発熱を伴って移行することが分かった。また、最適な固体溶剤を選定してPBの相転移温度と固体溶剤の融点との関係を検討した結果、融点の低い固体溶剤ではPBの転移温度は下がり、高融点の固体溶剤を用いた場合ではPBの転移温度が上昇する結果となった。この実験から、固体溶剤の融点の差異により相転移温度の制御が可能ながことが明らかになった。今後は、レーザーや顕微分光装置を用いた、より実装的な実験を行う必要があると思われる。(石堂 加奈子)

(2) 3,6-ビス(*m*-シアノフェニル)ピロロ[3,4-*c*]ピロール-1,4-ジオンの電子構造について

表題化合物は赤色顔料として知られるジケトピロロピロールの誘導体で、フェニル環のメタ位にシアノ基を導入した化合物である。ピロロピロール系顔料は低分子量にも拘わらず、強い分子間相互作用のために分子構造が安定で鮮やかに発色する。分子間相互作用は更に表題化合物の物性にも大きく影響していると推測されるので、本研究では水素結合と $\pi$ - $\pi$ 相互作用という分子間相互作用の立場から表題化合物の電子構造について解明することを目的とした。溶液から固体へ移行する際に極大吸収波長は長波長側にシフトする。この原因を<sup>1</sup>H-NMRと可視スペクトルの温度変化より検討した結果、水素結合の強まりにより長波長化することがわかった。次いで、アセトン蒸気曝露による蒸着膜の可視スペクトルの変化については、X線回折や低温域での吸収スペクトルの温度変化の結果から、 $\pi$ 電子の積層方向の作用である $\pi$ - $\pi$ 相互作用の出現が電子遷移に大きく関与していることが明らかになった。さらに、直接的に分子間相互作用を確かめるため、単結晶の育成を試みた。*N,N*-ジメチルアセトアミド溶液からの再結晶法により溶媒分子を含んだ単結晶を育成し、X線構造解析を行って結晶構造を明らかにすることが出来た。温度勾配昇華法による気相からの単結晶育成は今後の課題である。(荒井 彩子)

(3) ピロロピロール顔料の結晶構造及び励起子結合効果について

ピロロピロールはジケトピロロピロール骨格を持つ赤色顔料であり、置換基の異なる複数の誘導体が存在する。ピロロピロールの溶液スペクトルはどれも同じ形状を示すが、固体状態では一変する。この現象は結晶化に伴う分子間相互作用に起因すると考えられる。本研究ではこの現象をDPPと、電子供与基を持つTB-DPP、更に強い電子供与基を有する*p*-Cl DPPの3種のピロロピロール誘導体において、結晶構造及び励起子結合効果の立場から検討した。実際の手順としては、結晶構造を精査した後、それぞれの最近接ペアに対して励起子結合効果のスペクトルシフトについて計算を行った。計算の結果得られた値と実験値とを比較すると、DPP、TB-DPP、*p*-Cl DPPの順番にエネルギーが安定化するという傾向は一致した。計算ではどの化合物においても、“head to tail”構造をとる水素結合ペアが吸収極大を約2000cm<sup>-1</sup>長波長にシフトしたのに対し、“parallel”構造の積層ペアではシフト量が大きく異なっていた。つまり固体スペクトルの変化は積層ペアの反発効果が3つの分子で大きく異なる事に原因があり、先の順序で反発効果が減少するという事がわかった。以上のように、励起子結合効果を基礎とした本計算により、ピロロピロール顔料の結晶構造とスペクトルの相関関係を理論的に解明することができた。

(田中 滋光)

#### (4) 無金属フタロシアニン単結晶の偏光反射スペクトル

無金属フタロシアニンは、各結晶型において電子構造が異なるためスペクトルに大きな差が出る。その機構を解明することを本研究の目的とした。まず、単結晶を育成し構造解析を行った。その結果、今回得られた結晶が $\beta$ 型であることが判明した。構造解析の結果及び構造最適化より得られた分子座標を基に、中心の4つの窒素原子が作る平面と4隅のベンゼン環とのなす角を調べたところ、最適構造の分子では全て等しく $0^\circ$ で $D_{2h}$ の対称性を持っているのに対し、 $\beta$ 型の分子では僅か $2^\circ$ 前後ではあるが分子は歪み、対称性も $C_1$ に降下していた。その分子座標を用いて吸収スペクトルを算出した結果、 $\beta$ 型の方がピークの分裂幅が大きく、歪みが分裂幅に直接影響していることが判った。そこで、単結晶の偏光反射スペクトルを測定したところ、やはり歪みによる影響と共に励起子結合効果による寄与も見られた。確認のために蒸着膜スペクトルの温度変化を測定した。温度の低下と共に二本のピークの分裂幅は大きくなっており、低温になったことで分子がより歪んでいることが判った。しかし、長波長側に比べて短波長側の方がシフト幅が大きくなっており、励起子結合効果の寄与が確認された。以上の実験から、 $\beta$ 型フタロシアニンでは、分子歪みの効果と励起子結合効果による寄与が重なった結果、溶液状態とは異なった吸収を与えることが判明した。(松濱 恵治)

#### (5) マグネシウムフタロシアニンの単結晶育成と構造解析

表題化合物(MgPc)には幾つかの結晶変態が存在し、それぞれ異なる吸収を示すが、その機構はまだ十分には解明されていない。そこで我々は、MgPcの電子構造を明らかにする目的から単結晶を育成し、X線構造解析並びに分子軌道計算、偏光反射スペクトルの測定を行った。単結晶育成は気相と液相から試みた。気相から育成した単結晶(結晶I)は空気中から水分を取り込むためか、測定中に多結晶化する事が判明した。一方、*N*-メチル-2-ピロリドン(結晶II)並びに2-メトキシエタノール(結晶III)溶液からも単結晶が得られた。構造解析の結果、結晶IIでは水を、結晶IIIでは溶媒を各々2分子含み、いずれもマグネシウム原子は分子内の窒素原子と、水或いは溶媒の酸素原子と6配位し八面体構造をとることが判った。また、MgPc分子は平面性が高く $D_{4h}$ の対称性が期待されるが、いずれの結晶でも分子の対称性は $C_1$ に降下し、歪んでいることが判った。そこで、歪みの効果が吸収スペクトルに及ぼす影響を調べる為に、構造最適化した分子と各結晶の一分子での分子軌道計算を行った。その結果対称性の降下が励起状態の縮退を解き、歪みの大きい結晶IIIが僅かにその分裂幅が大きいことが判った。更に各単結晶の偏光反射スペクトルを測定したところ、偏光方向により極大吸収波長に差が見られた。これは分子歪みの影響だけでは説明できず励起子結合効果の寄与が考えられる。(遠藤 彩映)



### 3. 有機化学および生物化学

#### (1) 遺伝子工学的的手法による甘味誘導タンパク質ミラクリンの作製

ミラクリンは西アフリカ原産の植物 *Richadella dulcifica* (アカテツ科) の果実に含まれる甘味誘導タンパク質である。これまで、遺伝子工学的的手法を用いて、大腸菌、酵母、タバコ等の宿主を用いてミラクリンの発現に関する研究が行われている。本研究では、タバコにおけるミラクリンの発現確認の際に使用する抗体を調製するために、抗原として用いる糖鎖の付加していないミラクリンの作製を行った。

まず、ミラクリンcDNAを鋳型にして成熟体ミラクリン遺伝子を増幅し、これをpET-3aに組み込み、ミラクリン発現用プラスミドを構築した。このプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、成熟体ミラクリンタンパク質の発現を試みた。発現は37℃、3時間で行い、不溶性画分に抗ミラクリン血清と交差反応を示すタンパク質を大量に確認した。不溶性で活性は無いが、抗原として利用するには十分であると考えられるので、分取電気泳動装置を活用してこのミラクリンタンパク質の精製を行った。その結果、抗原として十分な純度の糖鎖の付加していないミラクリンを得ることができた。また、精製したミラクリンタンパク質のN末端から10残基目までのアミノ酸配列を確認したところ天然ミラクリンと一致した。(談議所 啓輔)

#### (2) クルクリンIIの遺伝子工学的研究

クルクリンは西マレーシア原産の植物 *Curculigo latifolia* (キンバイザサ科) の果肉に含まれるタンパク質であり、それ自身が甘味をもち、酸っぱいものや水を甘く感じさせる作用を有する。本研究ではクルクリンの微小不均一性の問題はクルクリンが2種類以上のファミリー遺伝子に由来する結果であると考え、新規クルクリン遺伝子の解析、単離を試みた。クルクリゴ果実より調製されたcDNAを鋳型としてPCR法によりマイナー成分の遺伝子を増幅し、解析を行った。その結果マイナー成分クルクリンの遺伝子配列を確定することができ、これをクルクリンIIと命名した。単離したクルクリンII遺伝子をインサートとして持つプラスミドを構築した。ついで得られたクルクリンII遺伝子を用いて、大腸菌によるグルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびチオレドキシンの融合タンパクとしての発現を試みた。しかしどちらも活性のあるクルクリンIIを得る事ができなかった。そこで大量に得られる不活性の遺伝子組替えクルクリンの立体構造の再生を試みた。クルクリンII遺伝子を用いて大腸菌により発現を行い、再生を試みたが活性はみられなかった。立体構造の再生を確認するために円偏光二色性スペクトルの測定をおこなった結果、天然クルクリンと一致しなかった。このことは正確な立体構造への再生が起らなかったものと考えられる。(堀 孝一)

### (3) 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における分泌発現

クルクリンは、西マレーシア原産のキンバイザサ科の植物 *Curculigo latifolia* の果肉に含まれている甘味誘導タンパク質である。本研究では、クルクリンの遺伝子を用いて同族体であるクルクリンIおよびIIの大腸菌における分泌発現を試みた。発現したクルクリンは、ペリプラズムに分泌されるため、膜通過の際、立体構造を取り直し、活性のあるクルクリンが得られることが期待される。

まず、クルクリンIおよびクルクリンIIのcDNAをもとに、それぞれクルクリン成熟体とそれに続くC末端延長ペプチド領域の遺伝子を増幅し、これをpET26bのpelBシグナルペプチドをコードする遺伝子の下流に挿入し、クルクリン分泌発現用プラスミドを構築した。このプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、クルクリンの発現を試みた。クルクリンが可溶性として最も多く発現する誘導条件は、25℃、IPTG濃度1mMであった。また、可溶性画分のクルクリンIIは、30%飽和度硫酸で沈殿することを確認した。続いて、可溶性クルクリンIIの金属キレートカラムによる精製を行った。ここで得たクルクリンIIは微量であったが、濃縮し、N末端からアミノ酸配列を分析したところ、シグナルペプチドが切れている事を確認した。これにより、クルクリンIIがペリプラズムに分泌している事を確認した。(吉田 仁)

### (4) 甘味誘導タンパク質クルクリンの微量不均一性について

クルクリンは西マレーシア原産のキンバイザサ科の植物 *Curculigo latifolia* 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、クルクリンの精製法を改良すること、クルクリン同族体の分離・解析を行うことを目的とした。

クルクリン精製の際、従来用いられていたゲルろ過クロマトグラフィーでは、カラムに吸着して損失が大きいのでこれを省き、イオン交換クロマトグラフィーのみとし、さらに試料の添加法を改良した。これにより精製量を従来法と比べて6倍弱に増やすことができた。この試料をさらにイオン交換クロマトグラフィーを行った結果、2種類の同族体(CurA, CurB)を分離することに成功した。それぞれの同族体には活性があることを確認した。また、電気泳動自動分取装置により、さらに1種類の同族体(CurC)を分離した。これら同族体をN末端から25残基まで解析した。その結果これらの同族体の一次構造と分子量から、3種類の同族体すべてが従来報告された単量体クルクリンIを持ち、そのうちCurBは、クルクリンIのホモ二量体であることがわかった。また、CurAおよびCurCは、それぞれクルクリンIと数残基変異していると考えられるポリペプチドのヘテロ二量体であることがわかった。(花田 和希)

## (5) ホタルイカロドプシンのC末端アミノ酸配列の決定

頭足類の視物質ロドプシンは視細胞のMV膜でそのC端を細胞質中に、N端を反対側の膜外へと突き出し7回膜貫通のヘリックスを構成している。ホタルイカロドプシンの分子量約51kDaは10℃で8日間のインキュベートにより約39kDaになる。これは膜外の水溶性部分に突き出したC端を含む約12kDaの部分がリソソームの酵素によるプロテアーゼ作用を受けて失われることによる。このプロテアーゼ作用を受けたロドプシンは系の均一性が得られるため結晶化の可能性が高いと思われる。この長いC端の構造及び機能を解明する上でまた結晶化の前段階として分子量39kDaのロドプシンのC端のアミノ酸配列を決定することを目的とした。

ホタルイカ眼から遠心分離によりロドプシンを抽出し界面活性剤で可溶化した。可溶化後のロドプシンをDEAE-Sephacel, ConA-Sepharoseカラムにかけた。以上の操作により精製した39kDaのロドプシンを熱変性後AP-Iにより酵素消化してDITC-Glassとカップリングさせた。DITC-Glassを数種類の溶媒により洗浄後、TFAによる酸処理でC末端ペプチドのみを抽出した。得られたペプチドをC4カラムを用いた逆層HPLCにインジェクションして得られたピークをアミノ酸シークエンサーにかけた。しかし得られたピークからはアミノ酸配列を同定することはできなかった。(安達 宏紀)

## (6) ベータカロチンの分布について

ベータカロチンは人参などに含まれる代表的なカロチノイドで視覚物質ロドプシンのもとになる物質でもある。ベータカロチンの2重結合の開裂と肝臓の異性化酵素の作用により11-cisレチナールが生成しこれがロドプシンに変換されると考えられているが、本研究室の過去の研究により異性化酵素は存在しないのではないかという結論に達した。このことから植物体に11-cisレチナールのもとになるような11-cis型のベータカロチンが存在すると仮定しこれを分離抽出する方法を確立することを目的とした。

まず人参からベータカロチンを抽出し順相の薄層クロマトグラフィーで分離したものの吸収曲線をはかり異性体が存在することを確認した。そこでこの異性体を分離する方法を検討していった。分離法として高速液体クロマトグラフィーを使い、実際に異性化させたものをサンプルとし、カラムには順層のシリカゲルと逆層のODSの2種類を用い様々な溶媒を溶離液として試したところ、逆層では分離することができなかったが、順層で石油エーテルを用いた時5個に分離した。しかしながら完全分離とまではいかなかった。

これらのことからベータカロチンの異性体の分離には逆層より順層の方が向いており、吸着力の強いアルミナのカラムを用いたほうが異性体の分離にはより向いているのではないかとと思われる。(川島 潤)

### (7) 生体における11-cis-レチノールの分布について

ビタミンAの生理作用の中で今日分子レベルで解明されているのは視覚の場合だけである。そして、その光受容反応であるロドプシン・サイクル中においてのみ、ビタミンAのアルコール型である11-cis-レチノールの作用が解明されている。その存在は一般には眼においてのみ知られているが、本研究室の実験により生体の肝臓からの発見に始まり、スルメイカの皮膚からも発見するに至っている。そして、このことにより皮膚光覚を持つスルメイカの皮膚において、眼球同様の光受容反応が行われている可能性が考えられた。

本研究では皮膚光覚のある魚類の皮膚を中心に11-cis-レチノールの存在を調べることにより、「魚が11-cis-レチノールを用い皮膚で光受容反応を行い体色変化を行っている。」という自らが立てた仮説を証明する事を当初の目的とした。

実験の結果、魚の皮膚からはもとより鳥の皮膚からも11-cis-レチノールを発見することができた。そして、このことより「魚が11-cis-レチノールを用い皮膚で光受容反応をおこなっている。」と「11-cis-レチノールの光受容反応以外の生理作用の存在。」ということと言えることの可能性が出てきた。(広井 禎)

### (8) 脊椎動物(魚類)と軟体動物の網膜の全脂肪酸組成

ロドプシン等の膜タンパク質はリン脂質を主とする脂質二重膜にその大部分を埋めて存在している。リン脂質に用いられる脂肪酸は炭素鎖の長さ、二重結合の数とも多岐にわたっている。しかし生体膜において特定の脂質がどのような役割をしているのかはわずかしか解明されていない。本研究室では以前魚類、軟体動物、節足動物の網膜の脂肪酸組成が調べられたが、より多くのデータを集めて検討する必要がある。そこで本研究では魚類を中心に網膜の全構成脂肪酸組成を分析し、結果をさまざまな角度から検討することによって視覚反応に対する脂質の役割の研究の一助となることを目的とした。

試料は魚類19種類、軟体動物2種類を用いた。半分に切った眼を1/15 Mリン酸緩衝液に入れて軽くかきまぜ網膜の組織を回収し、Bligh-Dyer改良抽出法を用いて脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィーを用いて全脂肪酸組成を分析した。

その結果、魚類では $C_{16}$ 、 $C_{18}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{22:6}$ が、イカでは $C_{16}$ 、 $C_{20:4}$ 、 $C_{20:5}$ 、 $C_{22:6}$ の4種類が主な脂肪酸であり、不飽和脂肪酸の割合は生息域の水深が深いほど、水温が低いほど増加する傾向がみられた。また、網膜の脂肪酸組成と体内の脂肪酸組成は関係がありそうである、網膜の脂肪酸組成は餌も関係している可能性がある、 $C_{22:6}$ は視覚において何か重要な働きをしていることが考えられた。(宮本 秀和)

## (9) 4-プロモ-2,6-ビス (プロモメチル)フェノール類とナトリウムメトキシドとの反応

8,8-ジシアノ-3-[3,5-ビス (メトキシメチル) -4-ヒドロキシ] フェニルヘプタフルベン合成の一方の原料である, フェノール性水酸基をトリアルキルシリル基で保護した4-プロモ-2,6-ビス (メトキシメチル)フェノールの合成について検討した。この際, 4-プロモ-2,6-ビス (プロモメチル)フェノールトリアルキルシリルエーテルとナトリウムメトキシドとの反応を行ったところ, 容易にトリアルキルシリル保護基が脱離することが判ったので, 本研究ではその反応条件について詳細に検討した。

トリメチルシリル基を保護基とした表題反応では, メタノール中加熱還流条件下あるいは室温条件下のいずれの場合にも, 脱保護を伴うビス (メトキシメチル) 化反応が起こり, 4-プロモ-2,6-ビス (メトキシメチル)フェノールのみが得られた。また, *tert*-ブチルジメチルシリル基を保護基とした場合, 室温条件下でのみ, 脱保護生成物と共に保護基を有するメトキシメチル化体を得られた。トリアルキルシリル保護基が本反応条件下では比較的脱離しやすいことが判ったので, 4-プロモ-2,6-ビス (プロモメチル)フェノールと5等量のナトリウムメトキシドとの反応をメタノール中加熱還流条件下で行った。その結果, 収率良くビス (メトキシメチル) 化体が生成することが明らかとなった。(有山 茂芳)

## (10) 色素化[21]クラウン-6 フェノールの合成

8,8-ジシアノ-3-(4-ヒドロキシ) フェニルヘプタフルベンを発色団にもち, 塩基性有機溶媒中において金属イオン選択呈色機能が見込まれる色素化クラウンエーテル化合物のひとつとして, 表題化合物の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-21-クラウン-6の合成を行った。

まず, 4-プロモ-2,6-ジメチルフェノールのフェノール部位をメチル化した後, 2位と6位の両メチル基を同時に末端プロモ化して, ビス (プロモメチル) 化体に誘導した。次に, ビス (プロモメチル) 化体とペンタエチレングリコールとを高希釈条件下で反応させ, 4-プロモ-1-メトキシベンゾ-[21]クラウン-6を収率18%で得た。次いで, このクラウン化合物をリチオ化した後, 金属交換反応を行い亜鉛試薬を調整した。この亜鉛試薬と3-プロモ-8,8-ジシアノヘプタフルベンとをPd(0)触媒存在下でクロスカップリング反応させ, 目的化合物のメトキシ前駆体を収率39%で得た。最後に, フェノール性メチル保護基をピリジン中ヨウ化リチウム条件で除去し, 表題化合物を暗赤色結晶 (mp163~165℃) として得た。

表題化合物のTHF溶液に $5.2 \times 10^{-2}$  M KOH水溶液を添加すると, その溶液は黄橙色から青紫色に変色した。電子スペクトルを用いて検討した結果, 本呈色は表題化合物のフェノール性水酸基の脱水素化反応に伴うものであることが判った。(多田 麻子)

## (11) 2-プロモトロポンのNi(0)触媒によるホモカップリング反応

対称ビフェニル型非ベンゼン系芳香族化合物類は、その物性に関して興味深い化合物である。しかしながら、まだその合成法は確立していない。そこで本研究では、これらの化合物の一つである2,2'-ビトロポンの合成法の確立を目指して、2-プロモトロポンのNi(0)触媒によるホモカップリング反応について検討した。

反応は無水ベンゼン中、50℃でNiBr<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>を活性亜鉛で還元して発生させたNi(0)触媒に、原料の2-プロモトロポンのベンゼン溶液を滴下して行った。その結果、一部原料を回収するとともに、2,2'-ビトロボンと構造未定の副生成物が生成することが判った。Ni(0)触媒として、Ni(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>を用いると、目的とする2,2'-ビトロポンの収率は2.4% (原料回収を考慮)であった。そこで、Et<sub>4</sub>Ni共存下で発生させたNi(0)触媒を用いるホモカップリング反応について検討した。反応時間を2.5時間とすると、原料回収があるものの目的物の収率は50%に向上した。次いで、同じNi(0)触媒で反応時間を長くしたところ、原料回収は減少したものの目的化合物の収率も低下してしまった。

Ni(0)触媒での2-プロモトロポンのホモカップリング反応による2,2'-ビトロポンの合成には、Et<sub>4</sub>Ni共存下で発生するNi(0)触媒が適しており、また反応時間は2時間程度が良いことが明らかになった。(中村 文子)

## (12) 8,8-ジシアノ-3-チエニルヘプタフルベンの合成と性質

8,8-ジシアノ-3-(4'-ヒドロキシ)フェニルヘプタフルベンは、7員環部と6員環部との向合い水素同士の立体反撥により、連結部位でねじれた構造をとることが判っている。本研究では、連結部位での立体反撥によるねじれ角の低減下が期待できる8,8-ジシアノ-3-チエニルヘプタフルベン **1** を合成し、その溶液状態での物性について、8,8-ジシアノ-3-フェニルヘプタフルベン **2** と比較検討した。

化合物 **1** の合成は、市販のチオフェンをリチオ化した後、塩化亜鉛と金属交換して調整した塩化チエニル亜鉛と、3-プロモ-8,8-ジシアノヘプタフルベンをのPd(0)触媒存在下でクロスカップリング反応させて行った。その結果、化合物 **1** を収率44%で暗赤色針状晶 (mp226~227℃) として得た。また、同様の合成法により比較化合物 **2** も得た。

CHCl<sub>3</sub>中の化合物 **1** および化合物 **2** の電子スペクトルを測定し、8,8-ジシアノヘプタフルベンの場合と比較して検討した。その結果、化合物 **1** および **2** の極大吸収位置は、8,8-ジシアノヘプタフルベンに比べ約40 nmと約17 nm程それぞれ長波長シフトした。化合物 **1** と **2** の極大吸収位置の違いは、5員環導入により化合物 **1** の連結部位でのねじれ角が、化合物 **2** に比べ減少したためであると考えられる。このことは、両化合物の<sup>1</sup>H-NMRおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを比較検討した結果からも支持された。(萩江 美保)