

学位論文題名

ペルオキシダーゼを触媒とするルミノール化学発光反応の
分析化学的研究

学位論文内容の要旨

超微量分析の分野において機器分析が果たしている役割は大きい。一方、簡便な化学反応を利用する物質のセンシングと評価法の役割も大きくなっている。このような観点から、酵素反応の特異性と化学発光反応における高感度性に着目した分析法の開発が盛んである。

ペルオキシダーゼ（POD）は過酸化水素に対し、高い基質特異性をもつ酵素である。その酵素サイクルに第二基質として化学発光試薬であるルミノールを加えた場合には、ルミノール化学発光の触媒となる。ルミノール化学発光反応は過酸化水素を高感度に検出することから、過酸化水素を生成する酵素反応系との組み合わせにより、反応過程で生成する過酸化水素濃度の連続的な測定が可能となる。過酸化水素を生成する酵素反応系は数多く知られており、それらの酵素反応系と POD を触媒とするルミノール化学発光反応系とをカップリングさせる条件を確立することは、酵素反応を利用する化学発光分析システムを構築するうえで重要である。

このような観点から本論文では、銅（Ⅱ）含有酵素のモデル反応である銅（Ⅱ）触媒によるチオールの酸化反応において過酸化水素が生成することに着目し、その検出に POD を触媒とするルミノール化学発光反応のカップリングを検討している。その結果、遅延化学発光ならびにペルオキシダーゼの由来によって発光応答が変化する現象を見だし、これらを新たな物質センシングに応用し得ることを明らかにしている。本論文はそれらの経緯をまとめたもので、全6章から構成されている。

第1章では、酵素反応で生成する過酸化水素の検出法ならびに、過酸化水素を酸化剤とする POD 触媒によるルミノール化学発光反応に関する研究を概観している。さらに、過酸化水素を生成する酵素反応系として、銅（Ⅱ）含有酵素のモデル反応系を用い、その検出反応に由来の異なる POD を利用する理由など、本研究の背景、目的と、本論文の構成について述べている。

第2章では、まずチオールの酸化反応を独立に取り上げて詳細な検討を行い分析化学的反応を試みている。銅（Ⅱ）錯体による疎水性チオールの酸化反応において、溶媒効果が発現すること

を認め、ジメチルスルホキシド中で疎水性チオールは化学量論的に酸化され、また、ジメチルホルムアミド中では疎水性チオールは接触的に酸化されることを明らかにしている。さらにジメチルスルホキシド中で化学量論的に生成する銅（Ⅰ）錯体の吸光度を測定すると、疎水性チオールの定量が出来ることを示し、チオールの新たな吸光光度法を提案している。

第3章では、ジメチルホルムアミド中での銅（Ⅱ）触媒によるシステアミンなどの親水性チオールの接触酸化反応を詳細に検討し、銅（Ⅱ）の触媒活性が最大となる条件ならびに、銅（Ⅱ）の触媒活性に及ぼす他の遷移金属イオンの影響を明らかにしている。さらに、システアミンの酸化速度と銅（Ⅱ）濃度との関係に着目して、新規な銅（Ⅱ）の速度論的分析法を提案している。

第4章では、銅（Ⅱ）触媒によるシステアミンの酸化反応から生成する過酸化水素を検出するために、西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（HRP）を触媒とするルミノール化学発光反応を検討している。その結果、酸化反応の開始直後から過酸化水素が生成しているにも関わらず、ルミノールの発光が一定時間経過した後に突然発現する、新たな遅延化学発光現象を見いだしている。この機構を詳細に検討し、その結果、ルミノール化学発光の遅延現象は、HRPが銅（Ⅱ）と共に優先的にシステアミンの酸化触媒として作用し、システアミンの酸化反応が終了した時点でルミノール化学発光反応の触媒として作用することに起因することを明らかにしている。またこのような遅延現象は、システアミンの酸化触媒として、銅（Ⅱ）を用いた場合のみ発現し、かつ遅延時間及び遅延発光強度と銅（Ⅱ）濃度との間に良好な直線関係が存在することを述べている。さらに、遅延ルミノール化学反応はサブ ppb レベル銅（Ⅱ）の特異的な高感度分析に応用し得ることを実験的に明らかにし、この方法を実試料の分析に応用している。

第5章では、西洋わさび由来のPODのほかに、微生物および牛乳由来のPODを触媒に用いるルミノール化学発光反応を用いて、銅（Ⅱ）触媒によるシステアミンの酸化反応から生成する過酸化水素の検出を検討している。その結果、微生物由来のPODを用いると、生成する過酸化水素を反応開始直後からルミノール化学発光で検出でき、また、牛乳由来のPODを触媒に用いると、反応開始直後に微弱な発光のみが観測されることを明らかにしている。このような事実から、ルミノール化学発光の発光パターンを利用して、由来の異なるPODのキャラクタリゼーションが可能であり、これら新反応の分析化学的有用性を論じている。さらに、反応過程におけるPODのへム鉄の酸化状態やシステアミンの減少速度と過酸化水素の生成速度などの測定を基に、本反応系ではルミノールとシステアミンが競争的にPODの触媒サイクルに関与する機構を提案している。

第6章では、以上の結果を総括している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 寛 人
副 査 教 授 古 市 隆三郎
副 査 教 授 高 井 光 男
副 査 助 教 授 上 館 民 夫

近年、超微量分析の分野において、物質のセンシングや評価を簡便に行える分析法が要望されている。化学センサーはその一例である。このような見地から、化学反応を利用する分析法が再認識され、特に酵素反応の特異性と化学発光反応の高感度性に着目した分析法の開発が盛んである。

ペルオキシダーゼ (POD) は過酸化水素に高い基質特異性をもつ酵素である。その触媒反応サイクルにはさらに第二基質として、適当な水素供与体が関与し、POD を触媒とするルミノール化学発光反応では、ルミノールが第二基質として働く。ルミノール化学発光により過酸化水素を高感度に検出できるので、過酸化水素を生成する酵素反応とルミノール化学発光反応とを組み合わせると、生成する過酸化水素の測定が可能になる。したがって、両反応のカップリングに必要な諸条件を明らかにすることは、酵素反応を利用する化学発光分析システムを構築する上で重要である。

このような観点から著者は、超微量分析や物質のキャラクタリゼーションに利用し得る新反応の開発を目的として、銅(II)含有酵素のモデル反応として知られている、銅(II)によるチオールの接触酸化反応を取り上げ、この反応から生成する過酸化水素を検出するため、POD を触媒とするルミノール化学発光反応をカップリングする反応システムを検討している。その結果、POD の種類によって化学発光の時間応答性が変化する新反応を見だし、物質のセンシングに有効な新原理を提案することに成功している。本論文はそれらの経緯をまとめたものであり、6章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的について述べている。

第2章では、まずチオールの酸化反応を独立に取り上げ、ジメチルスルホキシド中で疎水性チオールが銅(II)錯体により、化学量論的に酸化され、ジメチルホルムアミド中では疎水性チオールが接触的に酸化されることを明らかにしている。この検討を基に、悪臭の主成分である疎水性チオールの新規分析法を提案している。

第3章では、ジメチルホルムアミド中における、システアミンなどの親水性チオール銅(Ⅱ)による酸化反応を詳細に検討し、銅(Ⅱ)の触媒活性に及ぼす諸因子の影響を明らかにしている。さらにシステアミンの酸化速度と銅(Ⅱ)濃度との関係に着目し、選択性に優れた銅(Ⅱ)の速度論的分析法を提案している。

第4章では、銅(Ⅱ)触媒によるシステアミンの酸化反応から生成する過酸化水素を、西洋わさび由来のペルオキシダーゼ(HRP)を触媒とするルミノール化学発光反応で検出することを試みている。まず、反応開始直後から過酸化水素が生成しているにも関わらず、システアミンの酸化触媒である銅(Ⅱ)濃度に依存して、化学発光に時間遅れが生じることを見だし、その機構を検討している。すなわち、HRPは先ず銅(Ⅱ)と共に優先的にシステアミンの酸化触媒として作用し、システアミンの酸化が終了すると、化学発光反応の触媒として作用することを明らかにしている。この遅延化学発光は酸化触媒に銅(Ⅱ)を用いた場合のみ発現し、かつ遅延時間と銅(Ⅱ)濃度との間に直線関係が存在するので、銅(Ⅱ)の特異的な高感度分析が可能であり、これを実試料の分析に応用してその有効性を確かめている。

第5章では、銅(Ⅱ)触媒によるシステアミンの酸化反応から生成する過酸化水素を、西洋わさび由来のPODのほかに、微生物及び牛乳由来のPODを触媒に用いて、ルミノール化学発光反応で検出することを検討している。その結果、微生物由来のPODを用いると、時々刻々生成する過酸化水素を化学発光で追跡できること、また牛乳由来のPODでは、反応開始直後に微弱的な発光のみが観測され、PODが分解することを見いだしている。したがって、ルミノール化学発光の時間応答パターンから、PODの触媒活性や構造安定性に関するキャラクタリゼーションが可能なることを指摘し、これら新反応の有用性を論じている。最後に、酵素による発光応答性の違いを明らかにするため、PODのヘム鉄の酸化状態や、システアミンの減少速度と過酸化水素の生成速度などを測定し、PODの構造安定性およびルミノールラジカルの生成速度の差が発光応答性に関する機構を提案している。

第6章では、以上の結果を総括している。

これを要するに、著者は新規な化学発光反応を見だし、超微量分析やヘム含有タンパク質のキャラクタリゼーションに応用し得る新原理を提案しているもので、工業分析化学の進歩に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。