

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18550123

研究課題名 (和文) 新規機能性分子を自己集積化した生体内 NO センサー用電極の構築

研究課題名 (英文) Construction of a sensing electrode for bioavailable NO modified with self-assembled novel functional molecule

研究代表者

小澤智宏 (OZAWA TOMOHIRO)

名古屋工業大学 大学院工学研究科 准教授

研究者番号 70270999

研究成果の概要：

生命維持に関与する生体内一酸化窒素 (NO) を検出するために、NO と選択性の高い化合物の設計し、高感度が期待できる電気化学的手法を用いた系の構築を試みた。一般的に NO のみならずヘテロ原子を有する分子あるいはイオンは金属イオンと相互作用するが、金属イオンに相互作用できる配位子の電子供与性を大きくすることで、反応性の高い NO のみに選択性を示す分子の構築に成功した。またこの化合物を用いて電極化を試みた。電極化の方法は 2 種類選択した。第一に、本研究で得られた高選択性を示す化合物には金などと非常に強い相互作用可能な硫黄原子を有していることから、金-硫黄結合を利用した電極の構築を行った。しかしながら、本分子には 3 つの硫黄原子が含まれていたためその配向性の制御が非常に困難であり、再現性のある結果が得られなかった。そこで NO に対し電気化学的応答性質を有するカーボンナノチューブに本機能性錯体を静電的相互作用を利用して表面修飾したものを電極として用いた。本来のカーボンナノチューブが検知可能な感度に対し、有意な電流応答が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	480,000	4,280,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学

キーワード：生体内一酸化窒素 (NO) ・ トリルヒドラターゼ ・ センサー電極 ・ 高選択性 ・ 金属 (コバルト) 錯体

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は従来から光化学スモッグの原因分子の一つとして知られてきたが、近年、生体内で 3 つの非常に重要な働きをしていることが分かってきた。第一に免疫作用

であり、がん細胞や細菌など外部からの異物の侵入に対してマクロファージが比較的高濃度 ($\sim 100 \mu\text{M}$) の NO を攻撃剤として用いている。これは iNOS と呼ばれる NO 合成酵素によって生成され、必要な場合に誘導されて

発現する酵素である。第二に eNOS により生成する NO は、血管の弛緩作用があり血圧の調整に用いられている。生成した NO は酵素グアニル酸シクラーゼに作用し、血管を拡張する。そのためメタボリック症候群をはじめとした血管付着物が多い環境下あるいは活性酸素が発生しやすい環境下では、NO 合成酵素やグアニル酸シクラーゼの活性が低下し、血管の弛緩作用が衰えるすなわち動脈硬化を促進することになる。また3つめのカテゴリーには nNOS から産出される NO があり、これは細胞間の情報伝達物質として働く。そのためこれらの異常とアルツハイマー病などの神経伝達関連疾病との関連が取りざたされている。eNOS や nNOS は恒常的に発現している酵素であり、iNOS とは大きく異なっている。iNOS が急性の疾患により大量の発現が生じた場合には、急激な血圧降下に伴うショック状態に陥ることになり、生命に危険が生じることがある。

このように NO 合成酵素あるいはその関連酵素の働きに異常があると、成人病に代表されるさまざまな疾病の原因となることから、生体内における NO の濃度を正確に定量することが望まれている。

こうした背景に基づいて、NO の検出方法が検討されてきた。とくに NO との反応において蛍光の発光や消光を利用した検出方法や電気化学的な検出方法は、その感度と利用の簡便さから特に検討がなされてきている。とくに電気化学的な検出方法はその用途の拡張性から多くの研究がなされてきた。NO は電気化学的にはその酸化電流を検出することにより定量が試みられてきたが、NO の酸化物の酸化還元電位も非常に近接しているため誤差を生む原因になる。こうしたことからイオン交換膜をはじめとする様々な高分子化合物を被覆することで選択性の確保をしてきた。しかしながらこうした方法は電極の均質性や感度の低下といった面にデメリットを生じる。こうしたことを解決するために機能性化合物の被覆を行った修飾電極を用いて検出の試みもなされてきた。こうした機能性化合物を用いた場合にも十分な選択性を確保することが困難であった。

2. 研究の目的

上記のような背景に基づいて、本研究では NO に対して高選択性を示す機能性化合物の構築とその電極化を試みることにした。従来用いられてきた修飾化合物は、酸化還元反応を触媒できるポルフィリンやサレンといった金属含有金属錯体を用いられてきた。金属-ポルフィリンや金属-サレンは、NO と高い反応性を示す半面、NO が水や酸素と共存する（生体内環境）と容易に生成する NO₂とも反応するため、その検出には非修飾型電

極同様イオン交換膜の被覆を必要としてきた。本研究では、NO への高選択性を実現するために、以下の配位子設計を行った。

○配位子には4座配位子を用い、NO と相互作用できる空配位座を提供可能な六配位構造をとりやすいコバルト (III) イオンを用いることにした。

○NO は非常に反応性が高い分子であり（ラジカル）、多少反応性が低い金属イオンとも反応することが可能であると考えられることから、金属イオンの正味の正電荷を小さくする（ルイス酸性度を低下させる）配位子を設計した。

二番目の項目を実現させるために、配位子には金属イオン1つに対し4-を提供可能な配位子を設計した。具体的な配位子の構造は図1に示す。

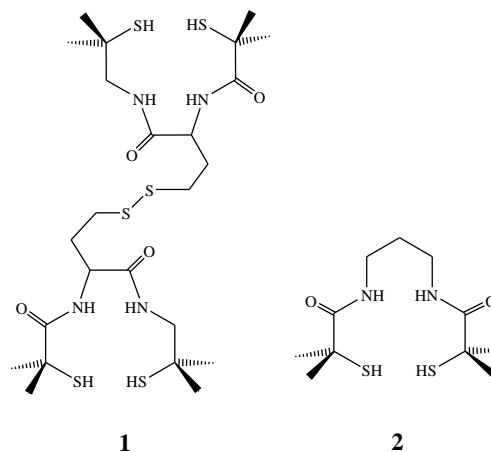


図1 配位子

この配位子を用いた金属錯体（コバルト錯体）の構築を行い、その NO に対する反応性と選択性を検討した。さらにこの金属錯体を用いて電極化を図った。

3. 研究の方法

まず上記設計指針に従い配位子の合成およびコバルト(III)錯体の構築を行う。これらの生成は元素分析、NMR、紫外可視吸収、赤外吸収スペクトルをはじめとする各種分光法により確認した。これらの金属錯体の物性および NO をはじめとする小分子との反応性は各種分光学的手法をもちいて検討した。

電極への修飾では、配位原子としてジチオール (S-S) 結合を有するものについては、金電極を用いた。ここでは Au-S 結合を利用した修飾分子の金電極表面への自己集積化が期待できる。さらにジチオール結合を有しない金属錯体については、電極として従来 NO の検出能を有するカーボンナノチューブの表面をアミノ化することで、電極表面に正

電荷を有するナノチューブに改質し用いた。金属錯体は負電荷を有しているため、ナノチューブ表面と静電相互作用が可能であることが期待できる。電極の評価はサイクリックボルタンメトリーあるいは抵抗値測定により行った。

4. 研究成果

まず配位子の合成と金属錯体の構築について記述する。配位子は反応性の高いSを有するため、保護基を選択することで数段階を経て合成した。配位子は2つのアミドN⁻と2つのチオレートS⁻(計4-)を提供可能であるが、アミドの塩基性が比較的に強いいためDMF中で教塩基の水素化ナトリウムを用いて脱プロトンすることで、錯形成を試みた。まず嫌気条件下で脱プロトンした配位子に対し、量論量の塩化コバルト(II)を混合したところ、色変化を示したことから錯形成が確認できた。この錯体に空気を混入することでコバルト(II)からコバルト(III)へと酸化を行い、目的化合物を合成した。本錯体の合成は元素分析により確認した。本錯体は各種分光学的手法から、平面4配位錯体であり、小分子と反応可能な空間を十分に確保できていることが分かった。

本錯体のNOとの反応性は、錯体を十分に脱気したメタノールもしくはアセトニトリルに溶解し、嫌気条件を保ったままNOガスを吹き込む方法で行った。NOガスを導入するとすぐに色変化(緑から薄いオレンジ)が見られた。その色変化の様子とそれに伴う吸収スペクトル変化を図4に示す。チオールを配位原子として含む平面型コバルト(III)錯体に特徴的な吸収(600nm付近)が消失し、380nm付近の吸収体が増加した。このことはNOがコバルト(III)中心に相互作用していることを示唆している。(図2参照) 溶媒を除

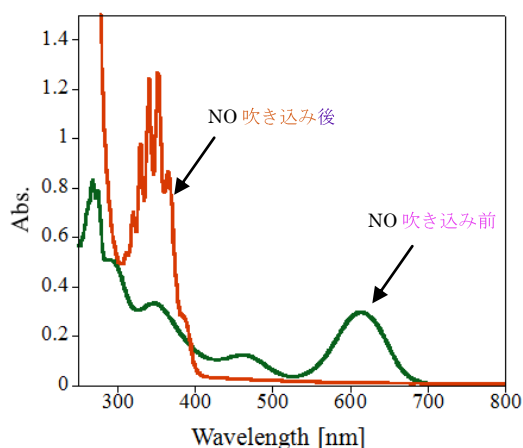


図2 コバルト錯体(1)におけるNO吹き込み前後の紫外・可視吸収スペクトル (MeOH)

去してもオレンジ色が保持されていたので、固体のIRスペクトルの測定を行った。NOを吹き込む前には見られなかった配位したNOの伸縮振動に帰属できる1650 cm⁻¹のピークが新たに出現したことから、NOが金属イオンに配位した化合物であることを確認した。

次いでNOに対する選択性を検討した。アルゴン下でコバルト(III)錯体をメタノールに溶解し、NaCl (Cl⁻)、H₂O、NaNO₂ (NO₂⁻)を錯体に対し量論比で1000倍以上を添加するあるいはCOガスを飽和状態にすることで、その分光学的性質から配位状況を判断した。一例としてコバルト錯体(1)についてNO₂⁻を添加した場合の紫外可視吸収スペクトルを図3に示した。紫外領域(400nm以下)ではNO₂⁻イオン由来吸収が大きく出現する

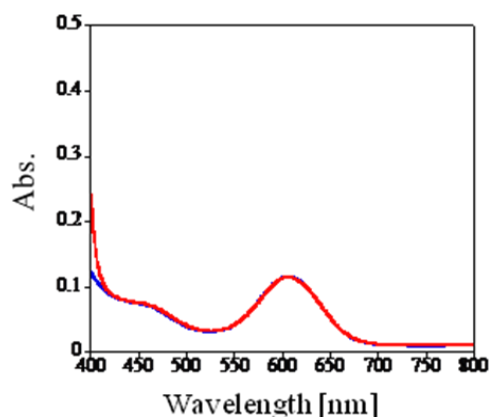


図3 コバルト錯体(1)に1000倍等量のNaNO₂添加前後の紫外・可視吸収スペクトル (MeOH:H₂O=2:8)

一方で平面型コバルト(III)錯体に特徴的な可視領域の吸収帯(~600nm)には変化が全く見られず、溶液の色も緑色のままであった。これはCl⁻、H₂O、COにおいてもみられたことから、NOに対する選択性は非常に高いものであることが分かった。コバルト(III)錯体(2)についてもほぼ同じ現象が観測されたが、NOとの反応において時間の経過に伴い(NO濃度の減少に伴い)NOが錯体から解離することが吸収スペクトルから判断できた。再度NO濃度を大きくすることにより、NO付加体が生成したことから、時間経過に伴う可逆的なNOとの反応性が観測できた。NOとの反応に伴う電気化学的応答性への影響を検討するため、サイクリックボルタンメトリー法により評価した。NOの導入前後において明瞭な酸化還元挙動の変化が生じ、還元電位のシフト量が約300mVであった。この電位差はNO検出において十分信頼性のあるデータを提供可能であると考えられる。

このように高選択性を示すコバルト(III)錯体(1)および(2)を用いて電極デバイス化を試

みた。錯体(1)は分子内にS-S結合を有していることから、これを利用して金電極表面への自己集積化を試みた。アセトニトリルに錯体(1)を溶解し、室温において10分間浸漬したものを電極とした。その酸化還元応答の例を図4に示す。このように電極表面においても

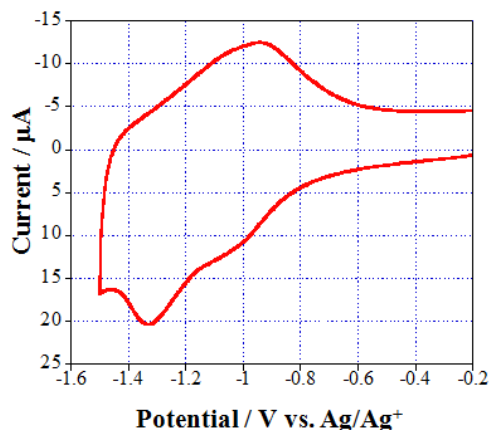


図4 金電極表面に修飾したコバルト(III)錯体(1)サイクリックボルタモグラム(MeCN)

電気化学的応答を得る事ができた。しかしながらこのような応答性は、電極作成のたびに異なっており、再現性のよい結果は得られていない。これは、S-S結合以外に金電極と作用可能な配位S原子も相互作用に関与しているためであると考えられる。さらに詳細な電極修飾条件を検討する必要があるが、均質な修飾金電極を作成するためには、配位原子に硫黄を含まない化合物の設計が必要であると考えられる。

またコバルト(III)錯体(2)においては、表面に正電荷を誘導したカーボンナノチューブ(CNT)を用いて、静電相互作用により表面への修飾を行った。その際の吸着量は0.27mg/CNT1mg程度であった。この修飾カーボンナノチューブの抵抗変化を利用して、NOの検出を試みた。ブランクとなる未修飾カーボンナノチューブの結果に対し、優位な差が生じていることがわかった。(図5参照)

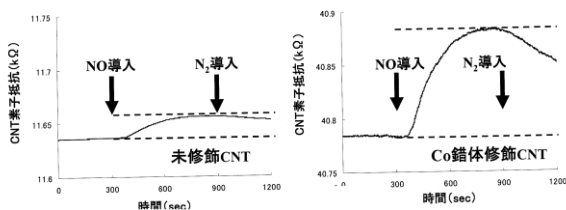


図5 コバルト錯体(2)を修飾したカーボンナノチューブのNO応答性

以上のことから、本機能性分子は非常にNO選択性が高い分子であること、またこれを利用したセンサー用電極の作成においては、電極の種類をうまく選択することで、NOの検出

が可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件) 全て査読有り

- Effect of an asymmetrically arranged equatorial chelate ring in an active site of Nitrile Hydratase.
T. Yano, Y. Wasada-Tsutsui, Y. Kajita, T. Shibayama, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda
Chem. Lett., **2008**, 37(1), 66-67.
- Structural and functional model systems for analysis of the active center of nitrile hydratase.
T. Yano, T. Ozawa, and H. Masuda
Chem. Lett., **2008**, 37(7), 672-677.
- Self-assembled monolayer electrode of a diiron complex with a phenoxo-based dinucleating ligand: observation of molecular oxygen adsorption/desorption in aqueous media.
T. Inomata, K. Shinozaki, Y. Hayashi, H. Ariei, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda
Chem. Commun., **2008**, 392-394.
- Syntheses, Characterization, and Reactivities of (μ - η^2 : η^2 -Disulfido)dicopper(II) Complexes with N-Alkylated *cis*, *cis*-1, 3, 5-triaminocyclohexane Derivatives.
Y. Kajita, J. Matsumoto, I. Takahashi, S. Hirota, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda
- Enantioselectivity in Electron-Transfer Reactions between Cytochrome c and (S)/(R)-Ruthenium Complexes. Non-Polar Interaction in a Molecular Recognition Process.
T. Kato, I. Takahashi, H. Kumita, T. Ozawa, Y. Funahashi, K. Jitsukawa, H. Masuda
Bull. Chem. Soc. Jpn., **2007**, 80(8), 1577-1579
- Fixation of CO₂ by Hydroxyzink(II) Complex with Pyridylamine Type Ligand.
S. Yamaguchi, T. Takahashi, A. Wada, Y. Funahashi, T. Ozawa, K. Jitsukawa, H. Masuda
Chem. Lett., **2007**, 36(7), 542-543.
- Co(III) Complexes with N₂(SO)₂-type Equatorial Planar Ligands Similar to the Active Center of Nitrile Hydratase: Role of Sulfenate Group in the Enzymatic Reaction
T. Yano, Y. Wasada-Tsutsui, H. Ariei, S. Yamaguchi, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda,
Inorg. Chem., **2007**, 46(24), 10345-10353.
- An N₂S₃-type Co(III) complex adsorbed into

- mesopores of FSM as a high-performance device
T. Yano, T. Ikeda, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda
Adv. Mater. Res., **2006**, 11-12, 347-350.
9. Synthesis and Luminescent Behavior of π -Extended [Ru(bpy)₃]²⁺ Derivatives through Triple Hydrogen Bonds as an Organic-Inorganic Hybridized Material.
T. Ozawa, Y. Kishi, K. Miyamoto, Y. Wasada-Tsutui, Y. Funahashi, K. Jitsukawa, H. Masuda
Adv. Mater. Res., **2006**, 11-12, 277-280.
10. Co^{III} Complexes with Square-Planar N₂S₂- and N₂(SO₂)₂-Type Ligands as An Active Site Structural Model for Nitrile Hydratase - Biological Implications of an Amidate Coordination
T. Yano, H. Ariei, S. Yamaguchi, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda
Eur. J. Inorg. Chem., **2006**, 18, 3753-3761.
11. Electrochemical Evaluation of Structural Difference in Azurins-1 and -2 from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 in Aqueous Solution Using Self-assembled Monolayers of Optical Active Co^{III} Complex.
I. Takahashi, T. Inomata, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda
Chem. Lett., **2006**, 35(12), 1404-1405
12. Electron Transfer Reaction of Cytochrome c Using the Mixed Monolayer Au Electrode Composed of Co^{III} Complex and Hydroxyl Terminated Alkanethiols
I. Takahashi, T. Inomata, D. Tsujimoto, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda
Trans. Mater. Res. Soc. Jpn., **2006**, 32(2), 583-586

[学会発表] (計 21 件)

2008 年度

(第 35 回生体分子科学討論会) 兵庫県立先端科学技術センター 6 月 25 日

1. ニトリルヒドラーゼのスルフェン酸の働きと反応機構に関する提言：含流アミド型 Co(III)モデル錯体を用いた検討
小澤智宏・矢野卓真・柴山知範・増田秀樹

(第 58 回錯体化学討論会) 金沢大 9 月 21 日

2. 生体内 NO センサーを目指した含アミド型 Co 錯体の NO 配位挙動
諏訪部達也・矢野卓真・猪股智彦・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹
3. NiSOD を指向した Ni(III)錯体への外部配位子の配位挙動
中根大輔・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

(EUROBIC 9) ポーランド 9 月 5 日

4. Reactivity for Isocyanide and Nitrile by Using Cobalt(III) Complexes Directed to An Active Site Model of Nitrile Hydratase
Tomonori Shibayama, Takuma Yano, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Hideki Masuda

(PRIME2008 Meeting) ハワイ 10 月 15 日

5. Preparation of Co(III) complexes with a high selectivity for NO sensing
Tomohiro Ozawa, Takuma Yano, Tomohiko Inomata, Hideki Masuda

(IUMRS-ICS 2008) 名古屋国際会議場 12 月 11 日

6. Selective NO sensing materials similar to the active site of nitrile hydratase
Tomohiro Ozawa, Takuma Yano, Tomohiko Inomata, Hideki Takagi, Hideki Masuda

2007 年度

(第 57 回錯体化学討論会) 名古屋工業大

7. N₂S₃型 Co(III) 錯体における基質の配位挙動：ニトリルヒドラーゼ反応機構への提言 9 月 27 日
矢野卓真・柴山知範・和佐田裕子・池田友宏・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹
8. 酸化型 NiSOD 活性中心の軸配位挙動に関するモデル的検討 9 月 26 日
中根大輔・藤井達也・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

(第 88 回 日本化学会春季年会) 立教大

9. ニトリル水和酵素活性中心に対する錯体化学的アプローチ 3 月 30 日
矢野卓真・池田友宏・柴山知範・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

10. ニトリルヒドラーゼ活性中心構造を指向した N₂S₂型 Co(III)錯体を用いたニトリル水和反応 3 月 30 日

柴山知範・矢野卓真・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

(ICBIC) オーストリア 7 月 18 日

11. Coordination behavior of monodentate ligands for N₂S₃-type Co(III) complex as an active site model for nitrile hydratase and its hydration activity
Takuma Yano, Yoshinori Sugiura, Tomonori Shibayama, Tomohiro Ikeda, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Hideki Masuda

(ICMAT 2007) シンガポール 6 月 4 日

12. An N₂S₂-type Co(III) Complex for a High selective NO Sensing.

T. Ozawa, T. Yano, Y. Funahashi, H. Masuda

2006 年度

(第 56 回錯体化学討論会) 広島大 9 月 16 日

13. ニトリルヒドラーゼ活性中心にみられる非対称平面の役割

矢野卓真・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

(バイオ関連化学合同シンポジウム：第 21 回生体関連化学部会) 京都大 9 月 28 日

14. ニトリルヒドラーゼ活性中心を規範とした Co(III)錯体のナノ細孔への固定化と配位挙動の検討

矢野卓真・池田友宏・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

(第 6 回日本 NO 学術集会) 東京砂防会館 5 月 25 日

15. NO 選択性を有する機能性錯体の合成とその応用

(Preparation and application of functional complex molecules with a selectivity for nitric oxide)

矢野卓真、船橋靖博、小澤智宏、増田秀樹

(第 16 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム) 東京大 6 月 1 日

16. Role of post-translational oxidized thioles in Nitrile hydratase: Investigation of the basis of solvent effects of N₂S₃-type Co(III) complexes.

(ニトリルヒドラーゼにおける翻訳後酸化修飾された配位硫黄原子の役割：N₂S₃ 型コバルト (III) 錯体を用いた溶媒効果に基づく研究)

Tomohiro Ozawa, Tomohiro Ikeda, Takuma Yano, Yasuhiro Funahashi, Hideki Masuda.

(第 87 回 日本化学会春季年会)

17. 高選択的 NO 捕捉化合物の構築：ニトリルヒドラーゼ活性中心モデル錯体の NO との反応性

矢野卓真・船橋靖博・小澤智宏・増田秀樹

(EUROBIC8) Portugal Aveiro 7 月 5 日

18. Role of the Oxidized Thiols in Nitrile Hydratase: Investigation on the Basis of Solvent Effects of an N₂S₃-type Co(III) complex

Tomohiro Ozawa, Tomohiro Ikeda, Takuma Yano, Yasuhiro Funahashi, Hideki Masuda

19. Characterization of N₂S₃-type Co(III) complexes similar to nitrile hydratase active site and their insertion into hydrophobic meso-porous materials.

Takuma Yano, Tomohiro Ikeda, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Hideki Masuda

(Interantional Workshop on Advanced Ceramics) 名古屋 名古屋貿易産業センター 11 月 30 日

20. Consideration on function of the specifically oxidized thiols in nitrile hydratase using an N₂S₃-type Co(III) model complex.

Tomohiro Ozawa, Tomohiro Ikeda, Takuma Yano, Yasuhiro Funahashi, Hideki Masuda

21. Preparation of N₂S₃-type Co(III) complexes similar to nitrile hydratase active site and their insertions into mesopores of FSM.

Takuma Yano, Tomohiro Ikeda, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Hideki Masuda

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：化学物質センシング素子、学物質センシング装置、表面修飾カーボンナノ構造体製造方法、及び、化学物質センシング素子の製造方法

発明者：増田秀樹、小澤智宏、矢野卓真、川田倫久、工藤淳、原圭太、山中幹宏、音無恵美子

権利者：名古屋工業大学・シャープ(株)

種類：物質特許

番号：特願 2008-204652

出願年月日：8 月 7 日

国内外別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 智宏 (Ozawa Tomohiro)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：70270999

(2) 研究分担者

増田 秀樹 (Masuda Hideki)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：50209441

船橋 靖博 (Funahashi Yasuhiro)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：00321604

(3) 連携研究者