

藻類バイオマスを原料とする、海水中の2価重金属イオン簡易検出センサーの開発

佐賀 佳央

近畿大学理工学部

概要 海水中に含まれる重金属イオンの検出は地球上の大部分を占める海洋環境の保全を考えるうえでの重要な課題であると考えられる。このような観点から、海水などを対象とした重金属イオンのセンシングに関する研究が行われてきた。しかし、従来の重金属イオンセンサー作製には高価・希少な元素の使用や多大なエネルギー投入などの課題を抱えているケースが見受けられる場合がある。そこで本研究では、使い道のない未利用バイオマスである藻類に含まれるクロロフィルを用いた、2価重金属イオン検出のための環境低負荷型材料を開発することを目的とした。

海洋や湖などには藻類が大量に生育しているが、それらの多くは利用されておらず、ときには人類にとって有害となっている場合がある。しかし、これらの藻類がエネルギー獲得の手段としての光合成に用いているクロロフィル類を大量に生合成しており、これらのクロロフィル色素はテトラピロール環中心への金属配位によって分光特性を大きく変化させる。そこで、未利用バイオマスと位置づけられる藻類バイオマスから抽出した天然クロロフィル類を改変し、銅(II)イオンをセンシングする色素材料として利活用することを目指した研究を推進した。すなわち、藻類バイオマスから抽出した天然クロロフィル色素の誘導體化によって得られた色素への銅(II)イオンの選択的配位によって分光測定によるスペクトル変化や視覚で感知できる色調変化によるセンシングに関する基礎研究を行った。

1. 研究目的

地球表面の大部分を占める海洋の水質の調査および保全は環境科学や生態学の重要研究課題のひとつであると考えられる。そのような観点から、本研究では海水などに含まれる遷移金属イオンに着目し、簡便かつ低コストでこれらのセンシングを行うことが可能な色素材料を開発することを目的とした。通常、海水中には微量の遷移金属イオンが含まれているが、これらの濃度上昇は生態系に大きな影響を及ぼすと考えられる。生命活動においても微量の遷移金属イオンが必要であるが、過剰に存在すると有害な影響を及ぼす。そのため、海洋や河川、湖などの水に含まれる遷移金属イオンが多くなると、まずそのような環境に生育する生物に蓄積するとともに影響が生じ、最終的には人間の健康被害にもつながる恐れがある。そこで、このような環境の水に含まれる遷移金属イオン(重金属イオン)のモニタリングは重要である。とくに、なるべく低コストで環境低負荷型の検出方法の探索やセンシング材料の

開発は、これからこのような課題に取り組むうえで考慮すべきポイントのひとつとなると考えられる。

海洋には多くの藻類が生育しており、海洋の二酸化炭素吸収や地球規模での物質循環の基礎となる光合成で重要な役割を果たしている。しかし、このような藻類バイオマスはこれまで積極的に利用されることはあまりなく廃棄される場合が多かった。したがって、未利用バイオマスと位置づけられる藻類バイオマスを利用した機能性材料は環境低負荷型の材料開発として有意義であると考えられる。海洋の物質循環プロセスで重要である藻類の光合成で主要な役割を担っているのがクロロフィル色素分子であり、藻類バイオマスに大量に含まれている。藻類などの酸素発生光合成生物に含まれるクロロフィル色素であるクロロフィルの分子構造を図1に示す。クロロフィル分子は環状テトラピロール骨格の中心にマグネシウムが配位しており、高い可視光応答特性を有している。クロロフィルは一般的にテトラピロール環中心への金属配位によって色調や分

光特性を大きく変化させる。このような性質は、2価重金属イオンのセンシングに適している可能性が考えられる。また、クロロフィル分子はテトラピロール環周辺置換基の改変により吸収波長やモル吸光係数、金属配位能などの制御ができ、また天然クロロフィルに存在するフィチルエステルを改変することで担体へ固定化するためのリンカー導入が可能である。

そこで本研究では、藻類バイオマスから抽出した天然クロロフィルを構造改変し、海水中の2価重金属イオンのセンシングのための機能性色素を開発することを目的とした。そのために、クロロフィル誘導体を調製し金属配位による分光特性の変化を解析するとともに、金属イオンの選択性や塩化ナトリウムなどの共存物質の影響を解析した。また、調製したクロロフィル誘導体を担体に固定化し、視覚での金属イオン検出が可能な定性センサーのプロトタイプを作成した。

2. 研究方法

2.1 テトラピロール環中心に金属配位が可能なフリーベースクロロフィル誘導体の調製

シアノバクテリア(ラン藻)から、有機溶媒を用いて天然

クロロフィル *a* を抽出した^{2,3)}。天然クロロフィル *a* の抽出から目的化合物としたフリーベースクロロフィル誘導体(メチルピロフェオフォルバイド *a*)を合成するスキームを図 2 に示す。抽出したクロロフィル *a* を含む抽出溶液を希塩酸で処理することによって、クロロフィル *a* のテトラピロール環中心に配位しているマグネシウムを脱離させフェオフィチン *a* を得た。得られたフェオフィチン *a* を少量の硫酸を含むメタ

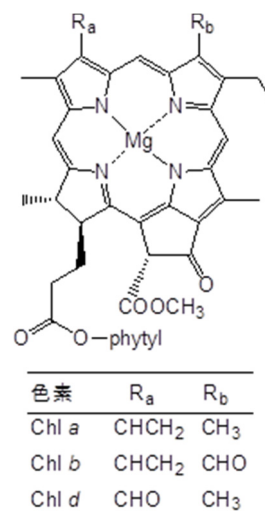


図 1. 海洋に存在する藻類に含まれる天然クロロフィル (Chl) の分子構造

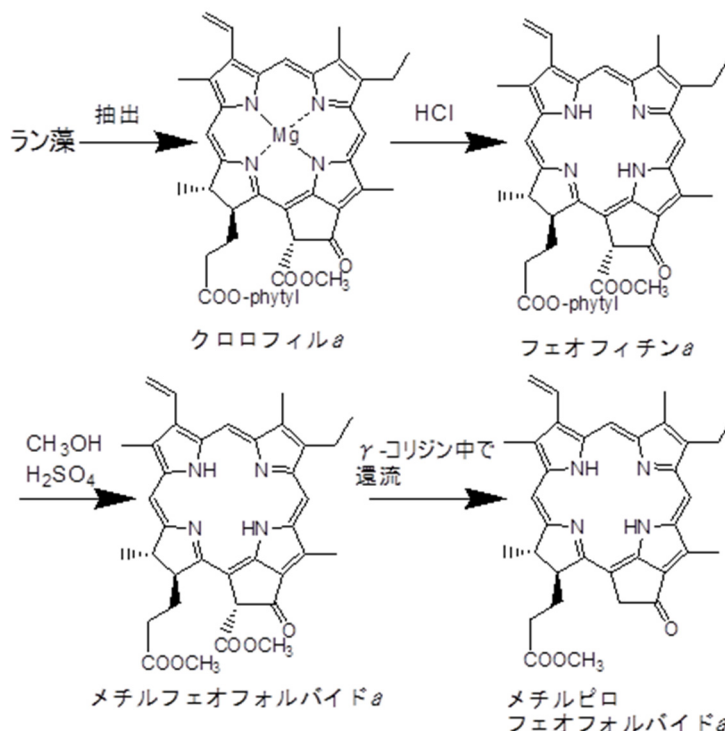


図 2. 天然クロロフィル *a* からのメチルピロフェオフォルバイド *a* の合成スキーム

ノール中で攪拌することによって天然型のクロロフィル類の多くに存在するフィチルエステルをメチルエステルに変換した。その後、 γ -コリジン中で過熱還流することで目的化合物であるメチルピロフェオフォルバイド *a* を得た。メチルピロフェオフォルバイド *a* はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、 ^1H NMR、質量分析、紫外可視分光法、逆相高速液体クロマトグラフィーによって同定、構造確認を行った。

2.2 銅配位クロロフィル誘導体の調製と分光分析

調製したメチルピロフェオフォルバイド *a* のテトラピロール環中心に銅イオンを配位させた誘導体を合成し、銅イオンの配位前後での色調や分光特性の変化を解析した。メチルピロフェオフォルバイド *a* のジクロロメタン溶液に酢酸銅(II)を飽和させたメタノール溶液を混合し、暗所で攪拌した⁴⁾。その後、4%炭酸水素ナトリウム水溶液を加えたのちに、ジクロロメタンで生成物を抽出した。ジクロロメタンを減圧留去したのちに再結晶を行い、目的化合物である銅メチルピロフェオフォルバイド *a* を得た。この化合物は質量分析、紫外可視分光法、逆相高速液体クロマトグラフィーによって同定を行った。

合成したメチルピロフェオフォルバイド *a* と銅メチルピロフェオフォルバイド *a* をジクロロメタンに溶解させ、両者の吸収スペクトルと蛍光発光スペクトルを比較した。

2.3 フリーベースクロロフィル誘導体への金属配位挙動の解析

合成したメチルピロフェオフォルバイド *a* を各種の金属イオンの酢酸塩を0.33 mM 含むアセトン/水(2/1)の混合溶媒中で、25°Cでインキュベーションし、可視吸収スペクトルの経時変化を追跡した。また、センシングの際に影響を及ぼす可能性がある塩化ナトリウムや対アニオンの影響を調べるため、これらを共存させた状態での金属配位過程を可視吸収分光法で追跡し比較した。金属イオンの対アニオンとして、酢酸イオンのほかに塩化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオンの場合で検討を行った。

2.4 フリーベースクロロフィル誘導体の担体固定化と銅イオン配位による色調変化の解析

クロロフィル誘導体を用いた簡易的な定性センサーのプロトタイプ構築を目指して、メチルピロフェオフォルバイド *a* を担体に固定化し、銅イオンを含む水溶液に浸漬したときの挙動を調べた。メチルピロフェオフォルバイド *a* の

ジクロロメタン溶液をシリカゲル TLC プレートにコーティングし簡易的に吸着固定化した。その後、酢酸銅の水溶液にその TLC プレートを浸漬させ、色調変化を観察した。

3. 結果と考察

3.1 メチルピロフェオフォルバイド *a* と銅メチルピロフェオフォルバイド *a* の調製、および環中心への銅配位による分光特性の変化

未利用バイオマスのモデルとして海洋に多く存在するシアノバクテリアから抽出した天然クロロフィル *a* を原料としてメチルピロフェオフォルバイド *a* (フリーベース化合物) と銅メチルピロフェオフォルバイド *a* (銅が配位した化合物) を合成することに成功した。これらの化合物の可視吸収スペクトルを図3に示す。メチルピロフェオフォルバイド *a* は414 nmにSoret帯の吸収極大を、667 nmにQy帯の吸収極大を有する。それに対して、銅メチルピロフェオフォルバイド *a* は425 nmにSoret帯の吸収極大を、653 nmにQy帯の吸収極大を有しており、テトラピロール環中心への銅(II)イオンの配位によってSoret帯は11 nmのレッドシフト、Qy帯は14 nmのブルーシフトすることがわかった。

また、これらの化合物を420 nmで励起したときの蛍光発光スペクトルを図4に示す。メチルピロフェオフォルバイド *a* は671 nmに強い蛍光発光を示すのに対して、銅メチルピロフェオフォルバイド *a* ではその蛍光強度が著しく減少することがわかった。このように、テトラピロール環中心

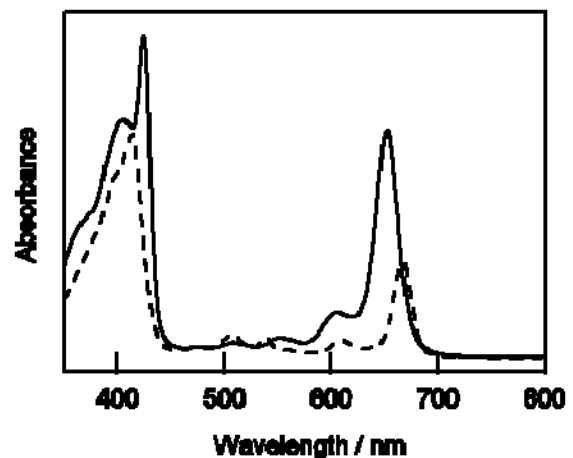


図3. メチルピロフェオフォルバイド *a* (点線) と銅メチルピロフェオフォルバイド *a* (実線) の可視吸収スペクトル

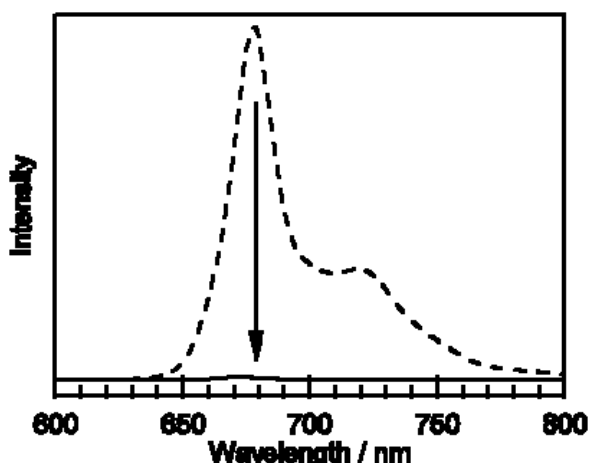


図4. メチルピロフェオフォルバインド *a* (点線) と銅メチルピロフェオフォルバインド *a* (実線) の蛍光発光スペクトル。励起波長: 420 nm

への銅(II)イオンの配位によってメチルピロフェオフォルバインド *a* は分光特性を大きく変化させることが明らかとなり、銅(II)イオンのセンシング材料として有用である可能性が示された。

3. 2 フリーベースクロロフィル誘導体への金属配位挙動の解析

合成したメチルピロフェオフォルバインド *a* のテトラピロール環への各種の金属イオンの挿入反応を可視吸収分光法で解析した。同条件でインキュベートしたときの 7 種類の 2 価金属イオンを用いたときの可視吸収スペクトル変化を図 5 に示す。

メチルピロフェオフォルバインド *a* の可視吸収スペクトルは銅イオンの存在下で速やかに変化して Soret 帯のレッドシフトと Qy 帯のブルーシフトが観測された。このスペクトル変化は、上述のメチルピロフェオフォルバインド *a* のテトラピロール環に銅イオンが配位したときの変化とよく対応している。それに対して、他の 6 種類の 2 価金属イオンでは同条件のインキュベーションにおいてそのようなスペクトル変化は誘起されず吸収帯の位置は変化しなかった。これらのことから、銅イオンがこのような条件においてメチルピロフェオフォルバインド *a* に選択的に配位し、大きなスペクトル変化を誘起することが明らかとなった。したがって、フリーベースのクロロフィル誘導体が銅イオンを選択的にセンシ

ングする色素材料として適用可能であることが示された。

海水中には、塩化ナトリウムをはじめとした多くの共存物質が混在しているため、実際に海水中での銅イオンのセンシングを考えるうえでは共存する物質の影響を明らかにすることが必要と考えられる。とくに、海水中でもっとも高い濃度を示す塩化ナトリウムの影響は、海水を対象とした研究では重要であると考えられる。そこで、塩化ナトリウムが共存したときのメチルピロフェオフォルバインド *a* への銅イオンの配位挙動を速度論的に調べた。その結果を図 6 に示す。塩化ナトリウムが共存していても、メチルピロフェオフォルバインド *a* への銅イオンの配位速度はそれほど大きくは変化しなかった。このことから、メチルピロフェオフォルバインド *a* による銅イオンのセンシングにおいて共存する塩化ナトリウムの影響はあまりないことが示唆された。

あわせて、銅イオンの対アニオンがメチルピロフェオフォルバインド *a* への銅イオンの配位挙動に与える影響を調べたところ、酢酸イオンに比べて塩化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオンの場合では配位速度が遅くなることが示された。したがって、迅速な銅イオンのセンシングを考えるうえでは酢酸イオンを共存させる方法論が有用である可能性が示唆された。

3. 3 フリーベースクロロフィル誘導体の担体固定化と銅イオン配位による色調変化の解析

実用的なセンサーとして用いるためには、センシングのための色素材料を担体に固定化することが有用であるとされる。そこで、フリーベースクロロフィル誘導体を予備的に担体に固定化する手段として、シリカゲル TLC プレートに吸着させ、銅イオンを含む溶液への浸漬による応答を観測した。

メチルピロフェオフォルバインド *a* のジクロロメタン溶液をシリカゲル TLC プレートに付着させたのちに溶媒を蒸発させ吸着固定化を行った。そのシリカゲル TLC プレートを酢酸銅水溶液に浸漬させたところ、浸漬させた部分だけエメラルドグリーンのような色に変化した。この色が銅配位メチルピロフェオフォルバインド *a* の色と一致することは、上記で合成した化合物との比較で判断した。したがって、担体に吸着固定化していてもメチルピロフェオフォルバインド *a* のテトラピロール環中心に銅イオンが挿入される反応が起こり、視覚的に検出できる定性センサーが構築できることが示唆された。

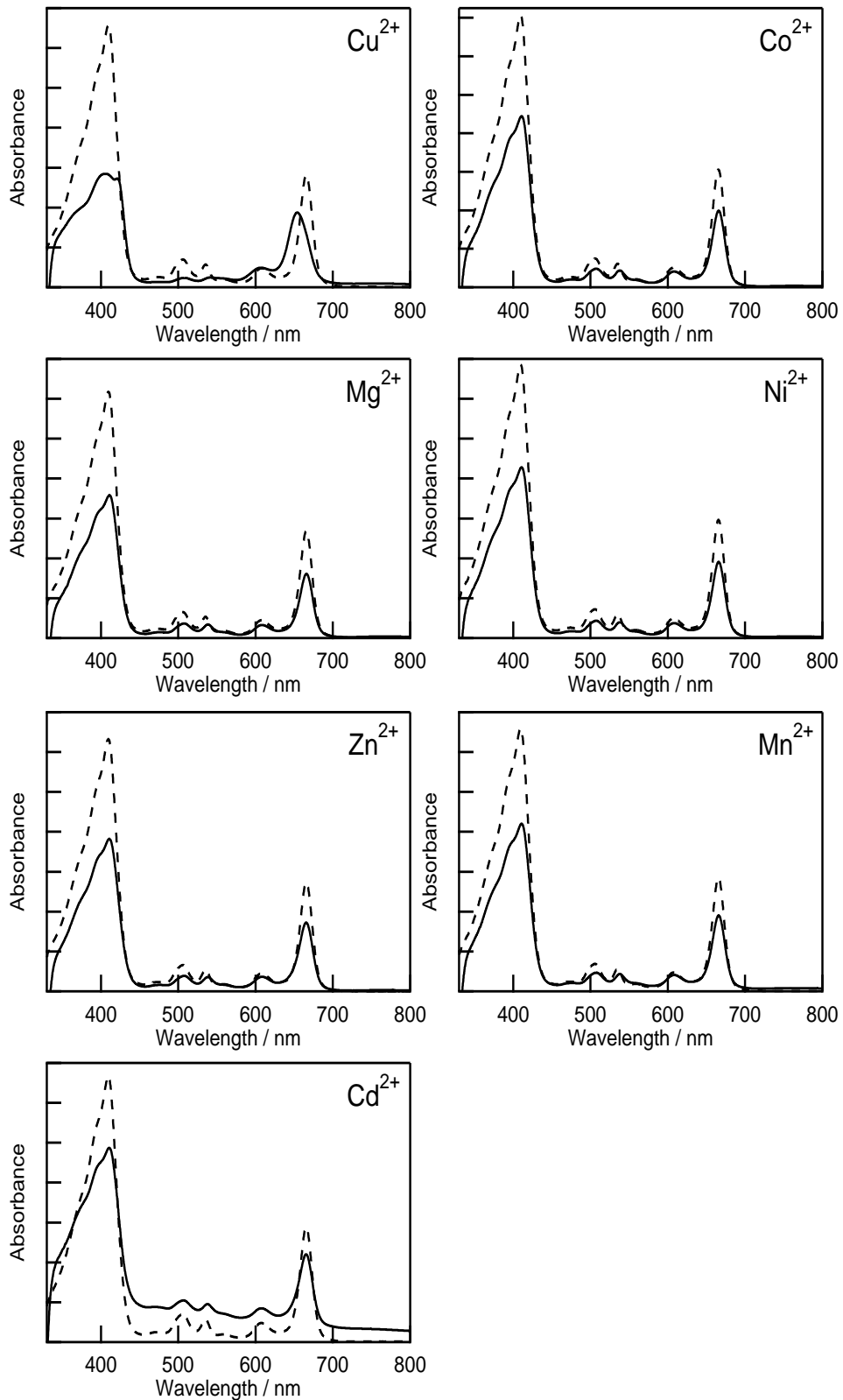


図5. 各種の金属イオンの酢酸塩を0.33 mM 含むアセトン/水(2/1)の混合溶媒中で、25°Cでインキュベーションしたときのメチルピロフェオフォルバイド *a* と可視吸収スペクトル。実線:120 分後、点線:インキュベーション前

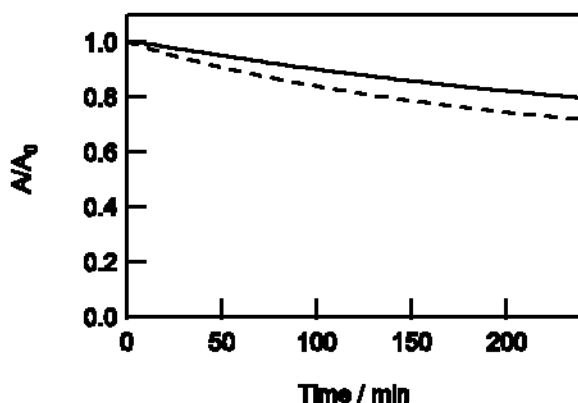


図 6. 塩化ナトリウムが存在するとき(実線)と存在しないとき(点線)のメチルピロフェオフォルバイド *a* への銅配位の経時変化。666 nm の吸光度でモニタリングし、メチルピロフェオフォルバイド *a* 減少の経時変化で測定した。

4. 結論

本研究では、藻類バイオマスの一種であるシアノバクテリアから抽出した天然クロロフィル *a* を原料とし、テトラピロール環中心に金属が配位していないフリーベース誘導体・メチルピロフェオフォルバイド *a* を調製した。この誘導体は短時間で銅イオンをテトラピロール環中心に配位させ分光特性を大きく変化することが示され、他の2価金属イオンに対して明らかな選択性がみられた。また、メチルピロフェオフォルバイド *a* のテトラピロール環への銅イオンの配位は海水中に多く含まれる塩化ナトリウムにあまり影響を受けないことが示された。このような性質を利用したセンサーのプロトタイプとしてシリカゲル TLC プレートにメチルピロフェオフォルバイド *a* を固定化し銅イオンを含む溶

液に浸漬させたところ、明確な色調の変化が認められた。したがって、現在利用されていない藻類バイオマスに大量に含まれる色素を原料とした銅イオンセンサーの開発が期待される。

5. 今後の課題

藻類に含まれる多様な天然クロロフィル類を原料とし、また有機合成的にテトラピロール環の周辺置換基を改変することで、銅イオンを検出するフリーベース誘導体の銅イオン配位能や分光特性の制御を行い銅イオン検出のパフォーマンスを向上させることが、第一の今後の課題と考える。第二の課題として、フリーベースクロロフィル誘導体の担体への固定化が挙げられる。このような課題に取り組んで銅イオン検出を最適化することで、環境低負荷型、低コストで簡便な重金属イオンのセンシングへの展開が期待できると考える。

参考文献

- 1) J. P. Riley, G. Skirrow, *Chemical Oceanography*, 2nd Ed., Vol. 1, Academic Press, New York (1975).
- 2) H. Tamiaki, M. Amakawa, Y. Shimono, R. Tanikaga, A. R. Holzwarth, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.* **63**, 92-99 (1996).
- 3) N. Takahashi, H. Tamiaki, Y. Saga, *Tetrahedron*, **69**, 3638-3645 (2013).
- 4) K. Sadaoka, Y. Saga, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **25**, 639-641 (2015).

Developments of Facile Sensors of Divalent Heavy Metal Ions in Sea Water Using Algae Biomasses

Yoshitaka Saga

Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Kinki University

Summary

Detection of heavy metals in sea water is one of the important themes in environmental sciences, and developments of sensing materials for detection of heavy metals by low-cost and green processes will be useful to study such a theme. From the points of view, we focus on chlorophylls in algae biomasses, which are largely present in sea water but have not been utilized yet. Chlorophylls are natural photosynthetic pigments and have intense absorption bands in the visible wavelength region. In addition, the positions of absorption bands and the efficiency of photon absorption of chlorophyll molecules can be regulated by modification of their molecular structures. Generally, chlorophyll molecules have central magnesium in the tetrapyrrole macrocycle, and the central metal is responsible for spectral properties of chlorophylls. Therefore, chlorophylls in algae will be one promising materials for functional pigments to detect heavy metals in sea water. In this study, we synthesized methyl pyropheophorbide *a* from natural chlorophyll *a*, which was extracted from a cyanobacterium, and investigated coordination behaviors of divalent metals to methyl pyropheophorbide *a*. As a result, copper ion was selectively inserted into the center of the tetrapyrrole macrocycles of methyl pyropheophorbide *a*, resulting in large spectral changes. Methyl pyropheophorbide *a* was successfully immobilized on the silica-gel plates; its color was clearly changed by incubation in an aqueous solution containing copper ion. These results suggest that chlorophyll derivatives from algae will be useful for developments of facile copper ion sensors in sea water.