

チオフェンー置換鉄ポルフィリンを用いた活性酸素センサーの構築

東條敏史^a, 下野涼輔^a, 近藤剛史^a, 湯浅真^a

Construction of active oxygen sensor using thiophene monosubstituted iron porphyrin

Toshifumi Tojo^{a*}, Ryosuke Shimono^a, Takeshi Kondo^a, Makoto Yuasa^a

^a Department of Pure and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science (2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba, 278-8510, JAPAN)

Abstract

Active oxygen species, which are excessively generated in the body, cause diseases such as cancer and inflammation. Since the measurement of the concentration of active oxygen species *in vivo* is important from the viewpoint of diagnosis of various diseases and evaluation of pharmacological action of therapeutic agents, establishment of a rapid quantitative measurement method *in vivo* is eagerly desired. Previously, we have reported the construction of active oxygen sensor using thiophene tetrasubstituted iron porphyrin. It has been suggested that thiophene tetrasubstituted porphyrins polymerize randomly to build a three-dimensional structure, on the other hand, conductive polymers show high conductivity in a linear structure. As the results of the detectability and quantitative evaluation of active oxygen species, it was revealed that the thiophene monosubstituted porphyrin sensor showed higher current responsiveness than the thiophene tetrasubstituted porphyrin.

Keywords : Porphyrin, Active oxygen sensor, Modified electrode

Received May 11, 2022; accepted May 30, 2022

^a Department of Pure and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba, 278-8510, JAPAN

^a 東京理科大学理工学部先端化学科 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)

*Correspondence author: Toshifumi Tojo, Email: tojo-t@rs.tus.ac.jp

1. 緒言

活性酸素種は、生体内でエネルギー代謝の副産物として生成され、免疫機能や殺菌作用を持つ物質として生体維持に不可欠な因子であると考えられている。生成した活性酸素種は生体内の抗酸化酵素 (スーパーオキシドディスムターゼ等) や抗酸化物質 (ビタミン等) により迅速に消去される。生体内では、活性酸素種生成系と消去系バランスが保たれることで恒常性が維持されている。しかし、紫外線や過度な飲酒、喫煙など外的要因によりその生成系と消去系のバランスが崩れると酸化ストレス状態となることが明らかになっている。酸化ストレス状態では強いラジカル毒性が生じ、がんや炎症、生活習慣病など多くの疾患の要因となることが示唆されている¹⁻³⁾。そのため、生体内における活性酸素種の濃度測定は、各種疾患の診断や治療薬の薬理作用評価などの観点から重要であるといえる。特に、活性酸素種において生体内で最も多く発生し、他の活性酸素種の前駆体となるスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の *in vivo* での迅速な定量測定法の確立が切望されている。

従来の $O_2^{\cdot-}$ 検出法である吸光光度法や、化学発光法、ESR 法などは *in vivo* 及び *in situ* での測定が困難である⁴⁾。また、シトクロム c やスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) などの酵素を固定化した電極を用いた電気化学的測定法も存在するが、酵素を用いるため高価であり、安全性、再現性の面においても多くの問題点があることが懸念されている⁵⁾。

近年、 $O_2^{\cdot-}$ を *in vivo* および *in situ* でリアルタイムに定量測定でき、長期間安定な $O_2^{\cdot-}$ センサー作製における電極触媒の材料としてポルフィリンが注目されている⁶⁻⁹⁾。ポルフィリンはピロールが4つ組み合わさった環状構造をしており、ヘム鉄やクロロフィルなどの生命維持に需要である色素の基本骨格をなしている。加えて、ポルフィリンは 18π 電子系という大きな π 共役系を有しており、中央の窒素対に金属原子を配位することができるため金属錯体を形成することができる。この錯体形成により金属ポ

ルフィリンは酸化還元特性を発現することができ、 $O_2^{\cdot-}$ センサーへの応用がなされている (Fig. 1)。

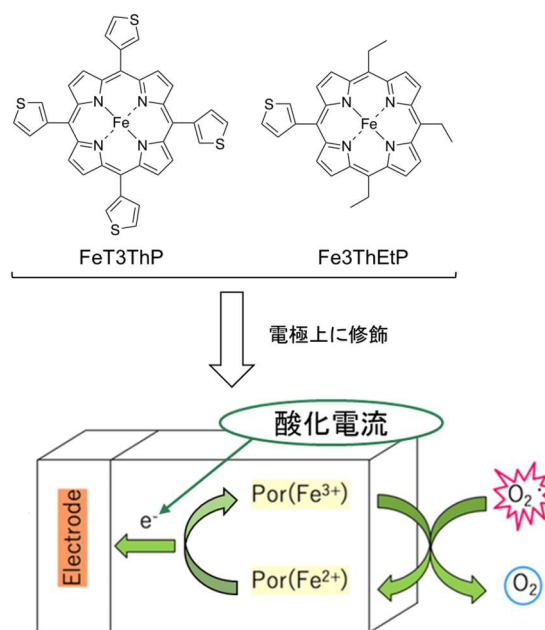


Fig 1. Schematic view of active oxygen sensor using porphyrin derivatives

当研究室では、4つの meso 位に重合性置換基である 3-チエニル基を置換したチオフェン四置換鉄ポルフィリン (FeT3ThP) を用いて高い安定性と導電性を示す $O_2^{\cdot-}$ センサーの作製に成功している^{10,11)}。電極上に製膜する際に電解重合を用いており、FeT3ThP においてはランダムに重合し立体的な構造を構築している一方で、導電性高分子は直線状の構造において高い導電性を示すことが示唆されている¹²⁾。ポルフィリンに修飾する重合性置換基が1つであれば、電解重合の際にチオフェン鎖が直線状となりさらなる $O_2^{\cdot-}$ センサーの電流応答の向上が期待できる。また、重合性官能基が一置換型であるポルフィリンにおいて $O_2^{\cdot-}$ センサーの構築が可能となれば、重合性置換基を他の官能基に変換する事により新たな機能を付与することができる。 $O_2^{\cdot-}$ センサーにおいて、他の活性酸素種が混在する生体内で $O_2^{\cdot-}$ 選択的に電流応答することが求められている。ポルフィリン環における酸化還元反応の反応場近傍を嵩高い官能基で空間的に制御

すれば、高い $O_2^{\cdot-}$ 選択性を示す可能性があり、重合性官能基が一置換型であるポルフィリンを基盤とした高い電流応答性および選択性を有する $O_2^{\cdot-}$ センサーの構築につながる可能性が期待できる。

以上を踏まえ、本研究ではチオフェン一置換鉄ポルフィリン (Fe3ThTEtP) を用いた $O_2^{\cdot-}$ センサーを作製し、FeT3ThP を用いたセンサーとの電流応答性における性能比較をおこなった。

2. 実験

Fe3ThTEtP の前駆体である 5,10,15-20-(チオフェン-3-イル)ポルフィリン (H₂3ThTEtP) は、3-チオフェンカルボキシアルデヒドとプロピオンアルデヒドの mol 比を 1:3 にしてピロール存在下、プロピオン酸中で反応させることにより合成した。得られた H₂3ThTEtP に対し、DMF 中で臭化鉄と反応させ目的化合物である Fe3ThTEtP に変換した。Fe3ThTEtP に 1-メチルイミダゾールを軸配位子として導入して鉄 6 配位錯体にした後に、サイクリックボルタムメトリー (CV) による電解重合によりガラス状カーボン電極表面に Fe3ThTEtP の重合膜を修飾した。

作製した Fe3ThTEtP 修飾型 $O_2^{\cdot-}$ センサーの $O_2^{\cdot-}$ 検出能評価および定量評価に用いた測定装置の概略図を Fig.2 に示す。 $O_2^{\cdot-}$ の検出能評価は、キサンチン (XAN)/キサンチンオキシターゼ (XOD) を用いた $O_2^{\cdot-}$ 発生系 ($O_2^{\cdot-}$ 濃度: 1.00 μ M) と XAN に $O_2^{\cdot-}$ 消去系酵素である SOD を混合した $O_2^{\cdot-}$ 消去系を、クロノアンペロメトリー (CA) の評価によりおこなった。定量評価は、XAN/XOD 系における XOD の注入量を変えることで $O_2^{\cdot-}$ の濃度を変化させ ($O_2^{\cdot-}$ 濃度: 0.05-2.00 μ M), CA により測定をおこなった。

3. 結果

Fe3ThTEtP 修飾型 $O_2^{\cdot-}$ センサーの $O_2^{\cdot-}$ 検出能評価の結果を Fig. 3 に示す。XAN+XOD の系に

おいて XOD 添加後、直ちに電流増加が確認さ

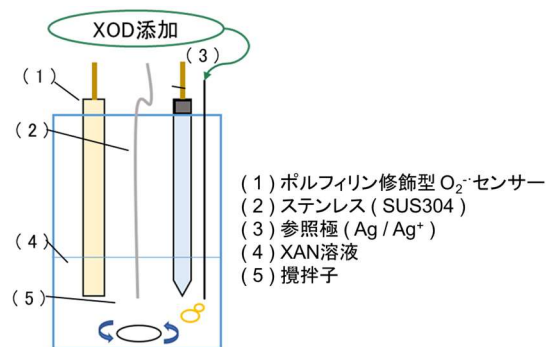


Fig 2. Schematic view of evaluation of $O_2^{\cdot-}$

れた一方で、XAN+SOD+XOD の系では電流応答が認められなかった。以上より、XAN+XOD の系において確認された電流応答が、XAN と XOD の反応において発生する尿酸および $O_2^{\cdot-}$ の自己不均化反応で発生する過酸化水素に起因する電流応答ではなく、 $O_2^{\cdot-}$ 由来の電流応答であることが示唆された。

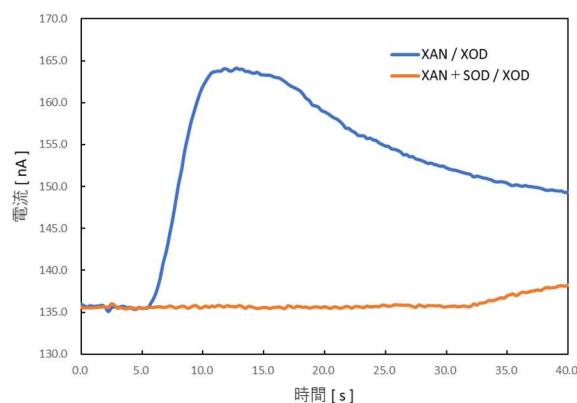
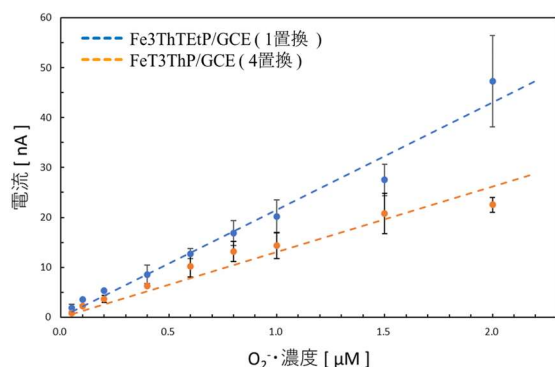


Fig 3. Evaluation of $O_2^{\cdot-}$ detectability

Fe3ThTEtP 修飾型 $O_2^{\cdot-}$ センサーの $O_2^{\cdot-}$ 定量評価の結果を Fig.4 に示す。検討した $O_2^{\cdot-}$ の濃度 0.05-2.00 μ M において、チオフェン四置換体である FeT3ThP 修飾型 $O_2^{\cdot-}$ センサーは $O_2^{\cdot-}$ の濃度が高くなるにつれて電流値の上昇量が低くなる傾向を示した一方で、チオフェン一置換体である Fe3ThTEtP 修飾型 $O_2^{\cdot-}$ センサーでは高い線形性を示す結果となった。また、検討した全ての $O_2^{\cdot-}$ 濃度において Fe3ThTEtP 修飾型

$O_2^{\cdot-}$ センサーの方が高い電流値を示した。各センサーの $O_2^{\cdot-}$ 定量評価において Fe3ThTEtP 修飾型 $O_2^{\cdot-}$ センサーが優位性を示した要因として重合膜の構造の違いが考えられる。導電性に関して着目すると、重合性官能基が1つである Fe3ThTEtP においては電解重合の結果得られる膜が直線状の構造になり高い導電性を示した可能性が示唆された。一方で、電極反応速度に着目すると、重合性置換基の数に違いはあるがどちらも同じポルフィリン環であるため、分子単体において FeT3ThP と Fe3ThTEtP との間で反応速度に違いはないと考えられる。一方で、電解重合後において FeT3ThP では複雑に絡み合う立体的な膜構造を取るため、他のポルフィリン環がポルフィリンと $O_2^{\cdot-}$ 間の酸化還元反応の立体障害となり得る可能性が考えられる。Fe3ThTEtP においては膜構造が直線状であるため立体障害が生じず、電極反応速度が向上した可能性が示唆された。

以上より、重合膜の構造の違いによる導電性および電極反応速度の変化が電流応答性の向上に寄与する可能性が示唆された。



4. 結論

Quantitative evaluation of $O_2^{\cdot-}$ sensor
 $O_2^{\cdot-}$ センサーに重合させるポルフィリンの重合性官能基に着目し $O_2^{\cdot-}$ 由来の電流応答性を評価した結果、チオフェン四置換体よりもチオフェン一置換体の方が高い高感度で $O_2^{\cdot-}$ を定量的に検出できることが明らかになった。今後の展開として、ポルフィリンに修飾する重合性官能基の数を検討することで、更なる高機能で

実用的な $O_2^{\cdot-}$ センサーへの発展が期待できる。

参考文献

- 1) J. M. McCord, I. Fridovich. *J. biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049-6055.
- 2) D. P. Riley. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2573-2587.
- 3) 川上浩良. *オレオサイエンス*. **2001**, *1*, 157-165.
- 4) L. Campenella, G. Favero, M. Tomassetti, *Sens. Actuators B Chem.* **1997**, *44*, 559-565.
- 5) K. V. Gobi, F. Mizutani, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *484*, 172-181.
- 6) J. Zagal, R. K. Sen, E. Yeager. *J. Electroanal. Chem.* **1977**, *83*, 207-213.
- 7) T. Kuwana, M. Fujihira, K. Sunakawa, T. Osa, *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *88*, 299-303.
- 8) K. Shigehara, F. C. Anson. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2776-2783.
- 9) P. Vasudevan, S. N. Mann, S. Tyagi. *Transition. Met. Chem.* **1990**, *15*, 81-90.
- 10) M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Yamaguchi, M. Ishikawa, K. Eguchi, T. Kobayashi, Y. Toyoda, S. Tsutsui, *Polym. Adv. Technol.* **2005**, *16*, 616-621.
- 11) 湯浅真. *オレオサイエンス*. **2012**, *12*, 617-625.
- 12) S. Kivelson. *Phys. Rev. Lett.* **1981**, *46*, 1344-1348.