

研究テーマ：電解発光を利用する新規センサの開発と電解発光種の探索	
研究代表者（職氏名）：教授・江頭 直義	所属：生命環境学部環境科学科
共同研究者（職氏名）：教授・猪谷 富雄、准教授・三苫 好治	

1. 目的： 最近、「食の安全」が声高に叫ばれ、安全で安心できる食品を効率よく作る植物工場が注目されている。その生産管理において植物のストレスを簡便な装置で測定し、評価できれば経験による管理工程を軽減できるので意義あることであり、社会的ニーズは高いと考えられる。植物に高塩あるいは低温ストレスをある種の化学物質、例えば、糖、プロリン、グリシンベタインなどが細胞に蓄積することが知られているが、特にイネではプロリン蓄積に関する報告が多い。本研究では、数種類のイネについて塩ストレスを与え、蓄積されるプロリン含有量と電解発光（ECL）強度との関係を調べ、プロリン含有量がストレスの簡便な指標として活用できるかを明らかにすることを目的とする。ここでは簡便で小型化が可能なECLに基づくプロリン検出器の試作を行い、ストレスの評価に使用できるか検討する。さらに、ECL分析では従来トリスビピリジンルテニウム錯体が利用されているが、その応用分野を広げるためには発光波長の異なる新規な錯体が必要である。そのため幾つかの新規ルテニウム錯体を合成し、それらの特性を調べたので報告する。

2. ECL測定装置の試作：① 方法： ECL測定装置のプロトタイプはあるが、送液の機構がプランジャーポンプあるいはペリスタポンプを採用しているので装置容積が大きく、コスト高である。そこでポンプ部をシリンジに置き換えることによりコスト低減と小型化を図った。さらに、検出部位を発光電極面に接近させ、光補足効率を向上させることにより植物内のプロリン量が測定できる感度 $10^{-6}M$ オーダのプロリン濃度検出を目指した。

検出部位はアクリル板を基盤に白金電極を埋め込み装置全体を自作した。移動相はリン酸緩衝液 (pH7.4) を使用し、ECLのための印加電圧は $1.3 V vs. Ag/AgCl$ とした。② 結果： 本装置はポンプレスの機構であるにも拘わらず、再現性の良いデータが得られ、イネの塩ストレスの測定に十分使用できることが分かった。今後、装置の改良を進めることにより実用化可能な装置に仕上げる必要がある。

3. 塩ストレスによるイネ中のプロリン測定：①方法：イネの試料としてコシヒカリ（大）、IR28の非耐塩性2品種について実験を行った。栽培した試料に塩ストレス (0.25 M) を与え、無処理試料もコントロールとして同時に数日毎に葉を採取した。葉の処理法は簡便性を重視して文献の手法を大幅に見直し、以下の操作によりプロリン抽出法を確立した。採取した葉 (0.10 g) にリン酸緩衝液 (0.1M, pH=7.4) を加えメノウ乳鉢で5分間粉碎し、ろ過 (シリンジフィルター： $5 \mu m + 0.45 \mu m$) した溶液を測定試料とした。この試料をHPLC(カラム：ODS、移動相:50mM酢酸緩衝液(pH=3.5) + アセトニトリル 25% → 74%)及びECL装置で測定した。HPLC測定ではDabsyl化して測定した。保持時間はプロリンのDabsyl化誘導体を合成 (NMR及びIRで同定) し、これを使用して確認した。②結果：コシヒカリについては塩処理8日目からプロリン含量 (HPLC) が増加し、同様に、ECLも増加している。IR28は塩処理5日からプロリン含量の増加し、8日目で最大になり減少している。コシヒカリの含量より大きい。ECLも同様に増加しているが、ピークの位置がずれていることがわかる。両試料ともコントロールは全く変化していない。これらの結果は、ECLはプロリン含量の傾向をよく反映しており、塩ストレスの良い指標となると結論される。さらに、イネの品種を拡大して適用範囲を確定していく必要がある。

4. 新規ルテニウム錯体の合成： 合成したルテニウム錯体のECL発光極大波長は652nmであり、従来の錯体より長波長に32nmシフトしていた。この錯体は、DNAのインターカレータ部位として特定遺伝子配列の検出に利用する予定である。

5. まとめ： 電解発光法はストレスの簡易評価法として有用であるので、さらに多品種のイネについて測定し、確認するとともに様々なストレスについても調査する必要がある。装置についてはさらなる軽量化を進めたい。

6. 平成18年度の成果発表： 論文 5報 (英文)、学会発表 6