

種々の色素との複合体形成に及ぼすPolylysineの形態の影響

日大生産工 ○高橋 大輔 ・ 和泉 剛

1 緒論

高分子 - 低分子間複合体に関する研究は、学問的興味から古くから行われており、DNAやタンパク質へのプローブ色素分子の導入など低分子を利用し生体高分子の構造や機能を明確にしようという研究が行われてきた。近年では、集合化により高度な機能を発現するタンパク質などの生体分子を模倣した新たな材料系の構築へ向けた生体高分子 - 低分子間複合体に関する研究が盛んに行われている。そのような生体高分子を利用した新たな材料系の構築に当たっては、複合体形成機構の理解が必要不可欠である。

この種の複合体形成機構の解明に有効な手段として、アキラルな物質がキラルな物質との相互作用により、あたかもキラルな物質であるかのように振舞う現象すなわち誘起円二色性 (ICD) がある。この現象を生体高分子 - 低分子間複合体に適用し、複合体形成機構を理解しようという試みは、StryerらによるAcridine Orange - Polyglutamic Acidの系をはじめ多くの報告があり、現在では、有機化学分野における化合物の絶対構造の決定などにも利用されている。

ポリペプチドの一つであるポリ-L-リシン (PLL) はタンパク質の二次構造を構成する α -helixや β -sheet構造を取ることで知られており、特にアミロイド様繊維を形成することが報告されている。我々はこれまでPLLと種々のシアニン色素やアゾ色素との複合体の形成機構とその分光特性について評価を行ってきた。

そこで、本研究ではアゾ色素の一つでアミロイド線維の検出薬として知られているコンゴレッド (CR) とPLLの複合体形成機構とその特性評価を種々のアゾ系色素と併せて円二色性や吸収スペクトル測定等から検討していく。PLL/CR間の複合体形成機構を明らかにすることは、アミロイド線維の形成を要因とするプリオン病 (BSE) ・クロイツヤコブ病やアルツハイマー病などの病気の解明につながることを期待される。

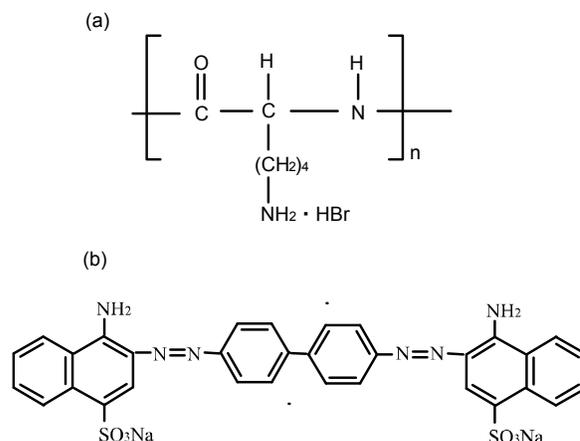


Figure 1 Chemical structure of (a) Poly L-lysine hydrobromide (PLL) and (b) Congo Red (CR)

2 実験

2.1. 試料

高分子試料としては、SIGMA社製、小角散乱平均分子量 (LALLS) 94,600、小角散乱平均重合度453のPLL (Fig.1 (a)) を使用した。PLL溶液の濃度はポリビニル硫酸カリウム標準溶液を用いた濁度滴定より 2.5mmol/dm^3 と決定した。

低分子色素としては、和光純薬工業製のCongo Red (CR; Fig.1 (b))、関東化学製のMethyl Orange (MO) およびEthyl Orange (EO) 東京化成製のAlizarin Yellow R (AYr)、Alizarin Yellow GG (AYg) を精製せずに、そのまま使用した。

2.2. 実験

所定のpH、濃度 $3.16 \times 10^{-4}\text{mol/dm}^3$ に調製したPLL水溶液を用いてCDスペクトルのpH (pH1.0~13.0) および温度 (20~50°C) 依存性について検討した。測定には、日本分光(株)製の円偏光二色性 (CD) 分散計を使用した。

複合体溶液は、予め $4.0 \times 10^{-5}\text{mol/dm}^3$ に調製したPLL溶液と種々の濃度に調整した色素溶液を同体積混合し調整した。UV-VIS分光光度計 (ベックマン(株)製) およびCD分散計を用いて種々のPLL/アゾ色素間複合体の形成機構とその分光特性について評価した。

3 結果および考察

<PLLの形態のpH依存性と安定性>

Fig.2に20°CにおけるPLL水溶液のCDスペクトルのpH依存性を示す。Fig.2よりpH10を境にrandom coil構造に起因する198nmのピークのCD値が正負の反転と、208nmおよび222nmにピークの出現による α -helix構造への変化が観察された。また、PLLではrandom coilおよび α -helix構造の他に50°C以上において β -sheet構造を取ることが報告されていることからPLL水溶液の二次構造の温度依存性について検討した。Fig.3にpH11.0における種々の温度におけるPLL水溶液のCDスペクトルを示す。Fig.3より明らかなように20~40°CにおいてはCD値の強度の現象は見られるもののピーク位置に大きな変化は見られなかった。しかしながら、50°Cにおいては216nmに β -sheet構造に起因するピークを示し、15分後以降安定していることがわかった。また、このPLL水溶液を20°Cまで降温させ変化を観察したが β -sheet構造に変化は見られず安定であった。このような挙動は変性タンパク質の温度に対する挙動と同様であった。また、 β -sheet構造はPLLが α -helix構造をとるpH (pH10.0以上)よりも高いpH10.8から観察された。PLLはpH10.0および10.8ではそれぞれ77.2%と34.9%解離していることから、PLLの形態変化にPLL主鎖の分子内水素結合のみならずPLL側鎖の ϵ -NH₃⁺の解離状態が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

<PLLの形態とCRとの複合体形成>

Fig.4に種々の形態のPLLとCR系水溶液の吸収スペクトルを示す。ここで、 α -helixおよび β -sheet構造のPLL水溶液はPLLの解離状態を一定とするためpH11.0を選択し、また50°Cで1時間放置し β -sheet構造を有するPLL水溶液を調整した。

PLL混合前には、CRのmonomerの吸収に由来するピークが498nmに観察された。PLL存在下においてはrandom coil、 α -helixおよび β -sheet構造に対してPLL/CR複合体に帰属される吸収がそれぞれ453nm、449nmおよび541nmに観察された（ここで、453nmおよび449nmの吸収帯は非常に小さいため、CRの吸収帯に隠されてしまうため、差スペクトルから確認した）。これらのことはCRが β -sheet構造のPLLと特異的な相互作用をしておりPLLがアミロイド様線維の状態を取っていることを示唆している。

本講演ではCDスペクトルなど種々の手法を用いてPLL/CR複合体の複合体形成機構や種々のアゾ色素 (MO, EO, AYr, AYg) とPLLの系に関する結果について報告する。

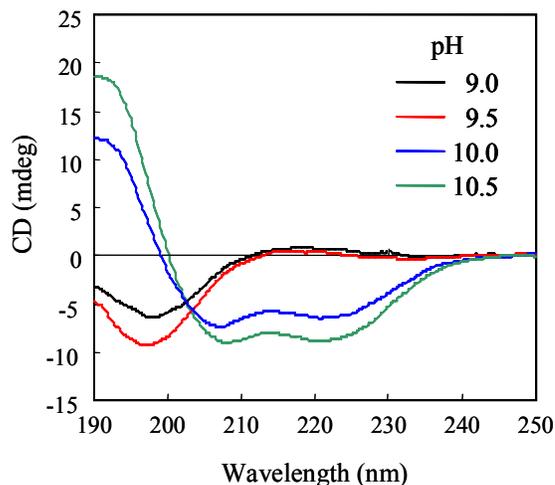


Figure 2 CD spectra of PLL aqueous solution with various pH levels (pH9.0 – 10.5) at 20°C
PLL concentration (mol/dm³): 3.16×10⁻⁴

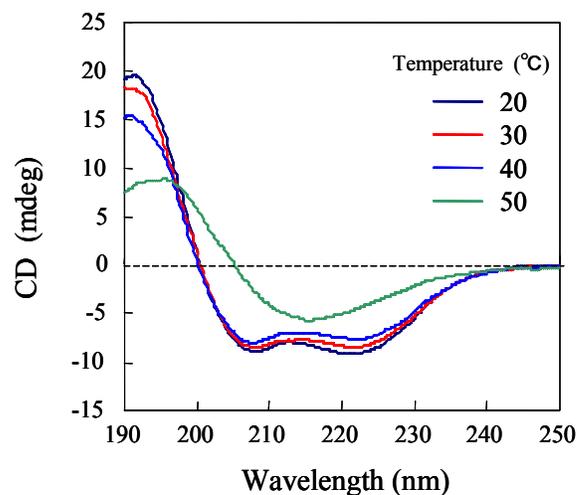


Figure 3 CD spectra of PLL aqueous solution with different temperature (20-50°C) at pH 11.0
PLL concentration (mol/dm³): 3.16×10⁻⁴

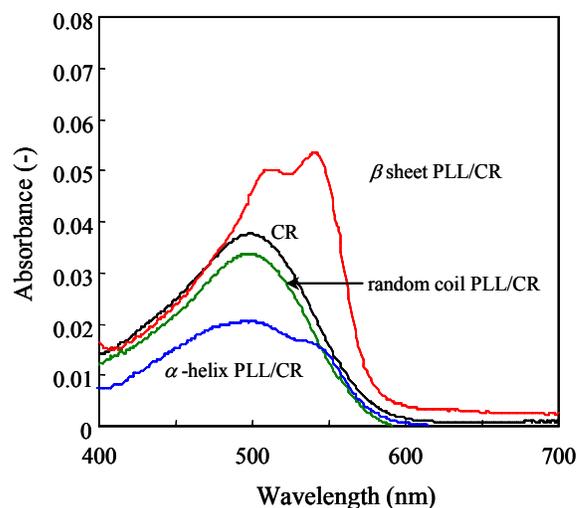


Figure 4 Absorption spectra of PLL/CR complex solution with different types conformation at 25°C
CR concentration (mol/dm³): 1.0×10⁻⁶