

蛍光プローブによるメチル化シクロデキストリン の包接形態の検討

高橋 圭子* 小泉 豊** 服部 憲治郎*

Inclusion Behavior of Methylated Cyclodextrins with Fluorescent Probes.

Keiko TAKAHASHI, Yutaka KOIZUMI and Kenjiro HATTORI

The fluorescence spectra of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) and 7-toluidino-2-naphthalene sulfonic acid (TNS) were observed with or without various cyclodextrins. From the change of fluorescence intensity, the association constants between cyclodextrins and fluorescent probes (K) and the fluorescence intensity constants (i_0) for each cyclodextrin complex were calculated. The value of i_0 depended on the probe's local microenvironment. These parameters assist in explication of the complex formation. And the effect of methylation of cyclodextrin for inclusion behavior is also indicated.

1. 緒 言

グルコースが6-8個 α -1, 4結合で環状に連なったシクロデキストリン(CD)は中央の疎水性空洞にその大きさに適した分子をゲストとして包接する。多くの場合包接化合物のCDとゲスト分子の比は1:1であり、その他2:1, 1:2等が報告されている¹⁾。この包接化合物は酵素反応にみられるミカエリスメンテンコンプレックスになぞらえられ会合定数(K)により包接能力が議論されてきた。ところが、蛍光スペクトル、ESR、NMRを用いた包接現象の基礎的な検討が重ねられ、1:1コンプレックスでさえもその実態は見かけほど単純ではなく、種々のコンプレックスの集合体であるということが報告され²⁾³⁾⁴⁾、会合定数の比較のみでCD包接を論ずるのは不十分であることが

解ってきた。即ち、会合定数以外にCD空洞中のゲスト分子の位置、運動性の議論なくしてはCDの包接現象の特質を評価することができず、ひいては高度の分子認識能を有する系の構築も不可能となる。一方、生化学分野で疎水性蛍光プローブとして用いられる8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS)と7-toluidino-2-naphthalene sulfonic acid (TNS) (図1)はCDの良好なゲスト分子となる。CD濃度を変化させて蛍光スペクトルを測定すると会合定数 K の他にゲスト分子が存在しているCD空間の疎水性を示すパラメー

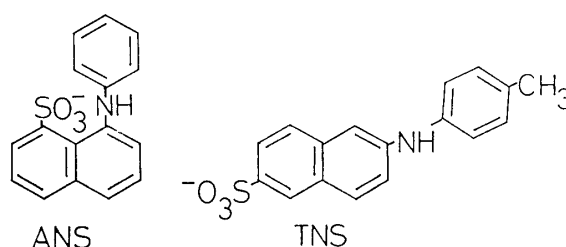


Fig. 1 Structure of Fluorescent Probes.

* 工業化学科

** 卒業生 (平成2年工学研究科終了)

平成2年9月12日受理

ター (蛍光強度定数: i_0) も算出することができる⁵⁾. そこで本研究では種々のメチル化シクロデキストリン存在下, ANS, TNS の蛍光スペクトルを測定した. その結果, それぞれの会合定数 K および蛍光強度定数 i_0 を算出でき包接形態の特質を推定することができたので報告する.

2. 実 験

試薬 α, β, γ -CD は日本食品化工 (株) のものをメタノール, 水からそれぞれ再結晶して使用した. heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -CD (DMCD) および heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- β -CD (TMCD) はいずれも日本食品化工製のものをメタノールあるいは *n*-ヘキサンで再結晶して用いた. 再結晶 TMCD は *n*-ヘキサンをかなりの割合で包接しているので蒸留水で還流し, *n*-ヘキサンを除去した. β -CD の水酸基にランダムにメチルエーテル基が導入されたメチル化 CD (MCD) は次のように合成した. 10 g の β -CD を濃アルカリ溶液に溶かし, 40 ml のジクロロエタンを加える. これを氷冷下 3°C に保ちながら CD に対し 50 当量のジメチル硫酸を滴下し, 12 時間反応させた. その後, 濃アンモニア水を加え過剰のジメチル硫酸を処理した. ついでクロロホルムで数回抽出を行い, 抽出液を希塩酸溶液および水で洗い, ほう硝乾燥後乾固して生成物約 9 g を得た. これは TLC によると平均メチル化度 7 から 14 までの分布を持っていた. そこで ODS シリカゲルを賦した逆相系 HPLC で分取し, 平均メチル化度 12 のもの (MCD₁) と 14 のもの (MCD₂) に分けた. 蛍光プローブである ANS, TNS は Sigma 社製, Aldrich 社製のものをそれぞれ使用し, 溶媒はすべて和光純薬工業ドータイトルミナゾールを用いた.

測定 蛍光スペクトルは日立 F-4000 型分光光度計を用い 25.0±0.2°C にて 350 nm を励起波長として測定した.

3. 結果と考察

3.1 ANS, TNS の蛍光スペクトルと溶媒の誘電率に対する変化

まず蛍光プローブの種々の誘電率における蛍光スペクトルを測定した. (図 2, 3) 溶媒の誘電率は水とアセトニトリルの混合比を変えて調製した. 表 1 にアセトニトリルの重量% と比誘電率を示した. 純水中では ANS は 500 nm に極大値を持つスペクトルを示す. 溶媒の比誘電率が減少するにつれて, 蛍光強度は増大し, また極大波長も短波長へシフトした. アセトニトリル 100% の溶媒においては 470 nm に極大を持つスペクトルを示した. TNS も程度こそ異なるが傾向を示し, アセトニトリル 100% の溶媒中では 440 nm 付近に極

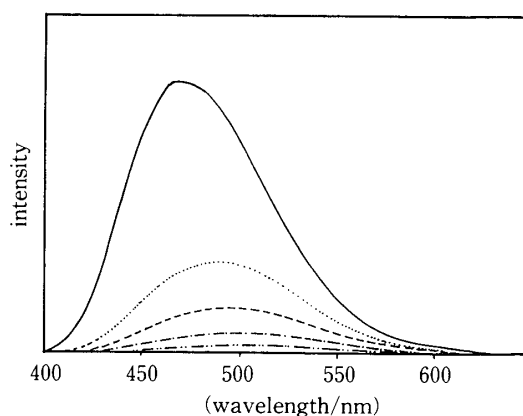


Fig. 2 Fluorescence spectra of ANS in various solvents.

[ANS] = $9.96 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, concentration of acetonitrile;

(—) : 100, (.....) : 90, (---) : 80, (-.-) : 60, (-.-.-) : 0% w/w.

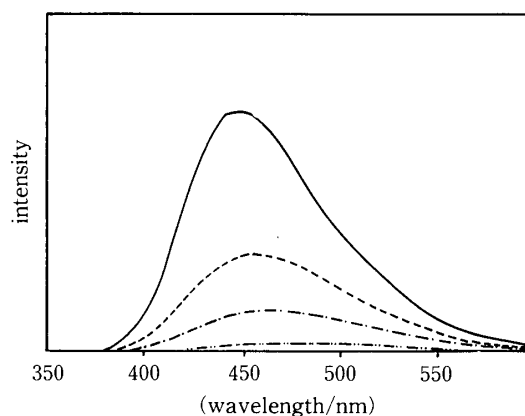


Fig. 3 Fluorescence spectra of TNS in various solvents.

[TNS] = $9.92 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, concentration of acetonitrile;

(—) : 100, (---) : 30, (-.-) : 60, (-.-.-) : 0% w/w.

大値をもつ強い蛍光スペクトルを示した。図4に各溶媒中の蛍光強度の極大値を示した。誘電率の増加に伴い蛍光強度が減少しているのがわかる。尚、この減少は真の蛍光強度の減少であり、著しい蛍光強度増加による自己消光ではない。

3.2 シクロデキストリンの添加効果

ANS 溶液に $0.5\text{--}7.5 \times 10^{-3}$ の範囲で β -CD を添加した場合の蛍光スペクトルの変化を図5に示す。 β -CD の濃度の増加に伴い蛍光強度極大値は増加し、波長は短波長側にシフトしている。これは先の比誘電率が減少した際の挙動に酷似している。CD 添加による変化は ANS 分子が CD 空腔に包接されることに起因していると考えられる。この変化を定量的に評価するために、ANS が CD と 1:1 でコンプレックスを形成し、蛍光の変化にはこのコンプレックス形成 ANS により生じていると仮定して CD 濃度と蛍光強度変化を Beneshi-Hildebrand 式 (eq. 1) に従い処理した。

Table 1. Dielectric constants of solvent

CH ₃ CN	0	20	40	60	80	90	100
(%w/v)							
ϵ	78.54	70.7	60.3	51.0	42.9	39.4	36.0

temp.: 25°C

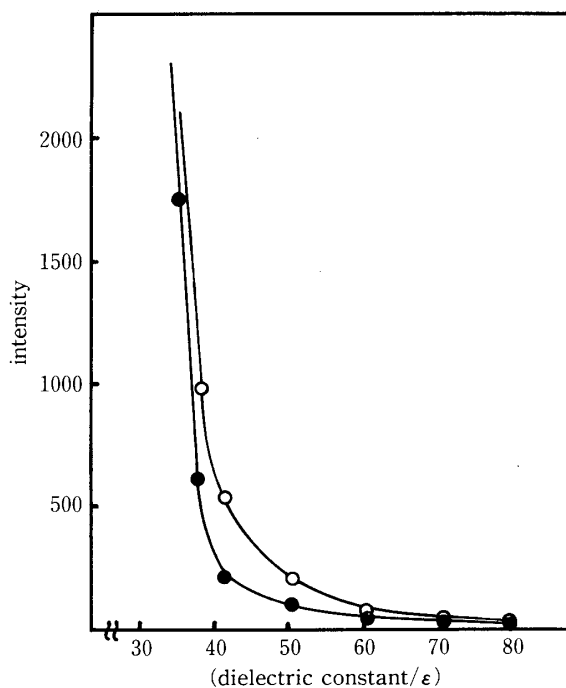


Fig. 4 Dependence of fluorescence intensity on dielectric constant at 25.0°C.

$$\frac{[G]_0}{\Delta y} = \frac{1}{[CD]_0 \cdot K i_0} + \frac{1}{i_0} \quad (\text{eq. 1})$$

いずれの CD 添加の場合も直線性がよく 1:1 の包接体を作っていることが明らかとなった。この切片と傾きより会合定数 K の他に ANS が全てコンプレックスを形成している場合の蛍光強度定数 i_0 が求まるさらに i_0 値を図4の比誘電率と ANS の蛍光強度のグラフにあてはまると各コンプレックスにおける ANS のマイクロ環境の平均的な誘電率が求まる。これらの値を表2に示した。この i_0 の値が大きい程コンプレックスの中の ANS の平均的なマイクロ環境が疎水的である。TNS の場合は、いずれの CD を添加しても蛍光強度の増加と極大波長の短波長シフトがみられた

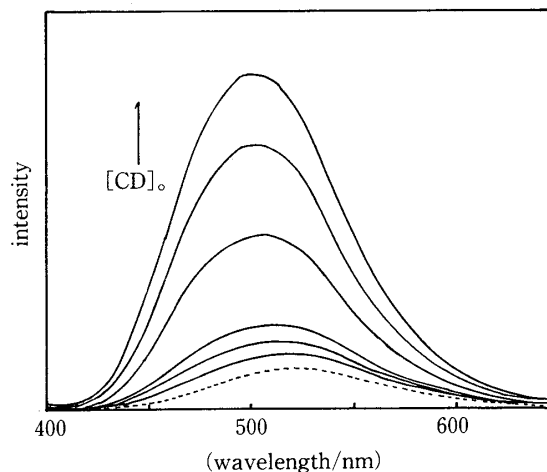


Fig. 5 Dependence of fluorescence spectra on β -CD concentration, $[ANS] = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[\beta\text{-CD}] = 0.0 \sim 7.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Table 2. Association constants and fluorescence intensity constants

Guest	Host	$K (\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3)$	$i_0 \times 10^{-4}$	ϵ
ANS	TMCD	63 ± 1	9.2	52
	DMCD	51 ± 2	20.9	43
	MCD ₁	555 ± 45	32.0	41
	MCD ₂	717 ± 74	32.3	40
	NH ₂ -CD	110 ± 7	4.3	60
	α -CD	27 ± 14	1.9	66
	β -CD	86 ± 8	5.2	58
γ -CD	246 ± 27	3.9	61	
TNS	TMCD	2120 ± 190	49.4	44
	α -CD	30 ± 8	7.6	61
	γ -CD	109 ± 9	20.5	52

のはANSと同様であったがTMCD, α -CD, γ -CD以外はep. 1に従って処理しても直線性が見られなかった。F. V. Bright⁶⁾らによると2,6-ANSは β -CDと1:1, 1:2のコンプレックスをつくることが報告されており、分子形の類似しているTNSも同様に2:1コンプレックスが存在していると考えることができる。

3.3 種々のCDの会合定数と包接形態

図6に各種CDとANS, TNSの会合定数とコンプレックス形成時の蛍光強度定数の相関図を示した。メチルエーテル化していないCDに関して、ANSの会合定数の大きさは α -CD < β -CD < γ -CDとなった。疎水性空洞の大きさは α -CD < β -CD < γ -CDであり、空洞が大きい程コンプレッ

クス形成の割合が大きくなっている事がわかる。しかし、 i_0 をみると α -CD < γ -CD < β -CDとなっており、 β -CDに包接されているANSが最も疎水的な環境にあることがわかる。即ち、 β -CDとANSは比較的tightにコンプレックスを形成していると考えられる。TNSは例が少ないがANSに比べ会合定数は大きくないのに i_0 が大きくなっている。これはTNS分子がANS分子に比べ細長く、CD空洞に深く入りやすい為と考えられる。

CDを構成するグルコース上に規則的にメチルエーテル基を導入したDMCDとTMCDでは β -CDに比べて会合定数はそれほど変化していない。但し、ANSの環境の疎水性パラメーターである i_0 は大きくなっている。CDの包接は空洞とゲスト分子間の疎水性相互作用が大きな駆動力となっていると言われており、メチルエーテル化によってCDの疎水性が高まると包接能が上昇するように予測されたが、どれだけの割合の分子を包接するか(K値)という点に関してはそれほど効果的ではなかった。これはCDの包接には疎水性相互作用の他に空洞の大きさ、形が大きく関与していることを示すものであると思われる。TMCDがK値、 i_0 値、いずれに対してもそれほど効果的ではなかったのは、メチルエーテル化によって空洞が β -CDより細長くなったためにゲスト分子の一部しか空洞に包接されなくなってしまった結果と思われる。一方、ランダムに修飾されたMCD₁およびMCD₂は、 i_0 ともに非常に大きな値を示した。これはCD空洞が比較的フレキシブルでANSの包接に適応したためと思われる。

4. 結 論

コンプレックスあたりの蛍光強度定数をパラメーターとして加えると、包接化合物中のゲスト分子とCDとの相対的位置関係のある程度予測することができ、CDのゲスト分子認識——CD空洞がゲスト分子の形をいかに区別してコンプレックスを作るか——の探査の一助となることが解った。しかし、 i_0 は分子の平均的な疎水環境を示すのみで分子の局所的環境を示すパラメーターではな

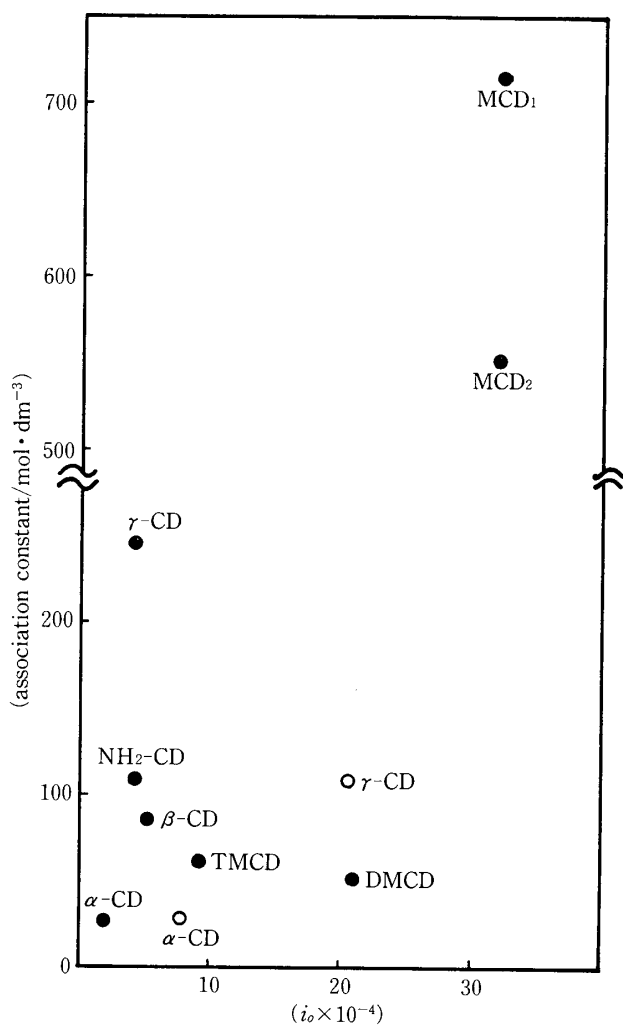


Fig. 6 Association constants and fluorescence intensity constants between fluorescent probe and CD.
(●) : ANS, (○) : TNS.

い。これには時間分解の手法や寿命測定などの情報, 蛍光分析以外では ESR, 高分解能 NMR などの情報が必要であろう。これまで CD の分子認識能の評価は主に会合定数が用いられてきたがこれだけではコンプレックスの結合形態の変化が反映されるとは限らず, 他のパラメーターも同時に評価していくことが必須であろう。

参考文献

- 1) J. L. Atwood, J. E. Davis, D. D. MacNicol, Eds; *Inclusion Compounds*, Academic Press: London

- (1984)
- 2) Y. Kotake and E. G. Janzen, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 5138 (1989) .
- 3) Y. Kotake and E. G. Janzen, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 3699 (1988) .
- 4) F. V. Bright, G. C. Catena and J. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) .
- 5) H. Kondo, H. Nakatani and K. Hiromi, *J. Biochem.*, 79, 393 (1976) .
- 6) G. C. Catena and F. V. Bright. *Anal. Chem.*, 61, 905 (1989) .