

inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



論文目録

報告 番号	乙 薬 第 22 号	氏 名	吉 川 祐 子
学位論文題目	荷電性薬物と生体膜およびDNAとの相互作用 —物理化学的手法を用いたモデル的研究—		
<p>公刊論文</p> <p>(1) Y. Yoshikawa and H. Terada, "Thermodynamic analysis of ion-pair partition of methyl orange anion with alkali metal cation in an octanol-water system" <i>Chem. Pharm. Bull.</i>, 36, 8, 2759-2765 (1988).</p> <p>(2) Y. Yoshikawa and H. Terada, "Ion-pair partition mechanism of methyl orange with aminoalkanols and alkylamines" <i>Chem. Pharm. Bull.</i>, 42, 12, 2407-2411 (1994).</p> <p>(3) Y. Yoshikawa and K. Yoshikawa, "Diaminoalkanes with an odd number of carbon atoms induce compaction of a single double-stranded DNA chain" <i>FEBS Lett.</i>, 361, 277-281 (1995).</p> <p>(4) Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa and T. Kanbe, "Daunomycin induces elongation for a compacted single DNA molecule" <i>Nucleic Acids Symp. Ser.</i>, 34, 173-174 (1995).</p> <p>(5) Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa and T. Kanbe, "Daunomycin unfolds compactly packed DNA" <i>Biophys. Chem.</i>, in press.</p> <p>公刊参考論文</p> <p>(1) H. Terada, K. Kitagawa, Y. Yoshikawa and F. Kametani, "Partition of ion-pair partition of 2,4-dinitrophenol, an uncoupler of oxidative phosphorylation" <i>Chem. Pharm. Bull.</i>, 29, 1, 7-14 (1981).</p> <p>総説</p> <p>(1) 寺田弘、吉川祐子、【膜酵素II、第12章 膜酵素の機能と薬物】(廣川書店) (1990).</p> <p>(2) 恵美宣彦、吉川祐子、【日本臨床、化学物質を用いた遺伝子導入法】54巻7号 (日本臨床社) (1996).</p>			

論文内容要旨

報告番号	乙 葉 第 22 号	氏名	吉川 祐子
学位論文題目	荷電性薬物と生体膜およびDNAとの相互作用 —物理化学的手法を用いたモデル的研究—		
<p>内容要旨</p> <p>薬物が生体系に作用して機能を発現させる場合、その作用形態として、特定の受容体を介した基質特異的な作用と、静電的相互作用や疎水性相互作用に基づく非特異的(non-site-specific)な作用が考えられるが、多くの場合、前者の受容体を想定した相互作用に焦点が置かれている。しかし、麻酔剤やミトコンドリアの脱共役剤、または生体ポリアミンのように生体膜やDNAに非特異的に作用して特異的な薬理活性をもたらす薬物も存在する。この様に、特定の受容体をもたない薬物、特に荷電性薬物で、一見静電的相互作用のみに立脚した作用を示すような化学種がなぜ特異的な薬理作用を示すのかまだ未解決な点も多い。本論文ではこの様な荷電性薬物に注目して、生体高分子系(生体膜とDNA)への作用をモデル系を用いて調べた。</p> <p>生体膜は主としてリン脂質二重層から成り、非特異的な薬物の膜透過は、膜脂質に由来する疎水部分に薬物がどの程度溶解し易いか、つまり薬物の疎水的な性質に依存している。しかし、生体に作用する多くの薬物が解離基を有し、しかも生理的条件下で解離型(イオン)で存在するにもかかわらず、膜への移行性は主としてその非解離型(中性型)の疎水性(水油二相間における分配係数)から間接的に評価され、解離型の分配機構については不明な点が多い。本研究では、イオンの疎水領域への移行は、主として対イオンと複合体を形成して達成されると考え、水-オクタノール二相分配系を生体モデル膜として用いて、Methyl Orange(MO)を指標として種々のカチオンとの"イオン対分配機構"を詳細に検討した。最初にアルカリ金属イオン(Na^+, K^+, Cs^+)を用いてイオンの大きさの疎水性相互作用に与える影響を調べたところ、MOとのイオン対形成時に生じる脱水和の程度はCs^+が最も大きく、かつオクタノール相へも移行しやすいことが明らかとなった。次に一価のアミノ化合物である</p>			

アミノアルコールとアルキルアミンを用いてアルキル鎖や親水基を導入したときの膜への移行性を比較したところ、アルキル鎖の長い程オクタノール相へ移行しやすく、さらにメチレン基1個当りの疎水領域移行に対する寄与はOH基を有するアミノアルコールの方が少ないことも明らかになった。さらにイオン対の疎水領域移行に伴い、対イオン間の静電引力が増大し分子の運動の自由度が減少することも示した。

一方、遺伝情報を伝える本体であるDNAへの薬物の作用は、これまで主として一次塩基配列やその情報に基づいて産生されるタンパク質の変化に主眼が置かれ、DNAの高次構造への影響についてはあまり重点が置かれてこなかった。しかし、DNAは生体中でコンパクトに折り畳まれた状態で存在し、その凝縮構造が遺伝子の発現を考える上でも重要であると考えられる。本研究ではDNAの高次構造制御に焦点を当て、荷電性薬物とDNAとの非特異的な相互作用がDNAの高次構造へどのような変化をもたらすのかを、DNA単分子の蛍光顕微鏡による動的な直接観察と電子顕微鏡による微細構造観察から検討した。最初に二価のジアミノアルカンのアルキル鎖長の違いとDNA単分子凝縮能との関連を調べた。これまで低分子カチオンのDNA凝縮剤としては三価以上のものしか凝縮を引き起こさないと考えられてきたが、今回初めて二価のカチオンでもDNAの単分子凝縮を引き起こすことが明らかとなり、しかも炭素数がC3とC5のジアミンはC2, C4, C6のものよりDNAに対する凝縮能が高いことも明らかとなった。次に抗癌剤でありかつDNAのインターカレーターでもあるダウノマイシンのDNA凝縮高次構造への影響を調べ、ダウノマイシンが凝縮したDNA分子を引き延ばす作用があることを明らかにした。従来報告では、既に凝縮したDNAに対してはダウノマイシンのようなインターカレーターは、その高次構造に影響を与えないとされていたが、今回蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡による経時的観察から、凝縮DNA分子が引き延ばされている様子が認められた。本方法は、他のDNAに作用する薬物のDNA高次構造への影響を調べる手段としても有用であると考える。

様式9

論文審査の結果の要旨

報告番号	乙 葉 第 22 号	氏 名	吉川祐子
審査委員	主 査	寺 田 弘 (印)	
	副 査	嶋 林 三 郎 (印)	
	副 査	淡 谷 雅 之 (印)	

学位論文題目

荷電性薬物と生体膜およびDNAとの相互作用
—物理化学的手法を用いたモデル的研究—

審査結果の要旨

薬物とその薬効を発現するためには、基本的に生体高分子系と相互作用を行う必要がある。本論文は、荷電性の薬物のこのような相互作用の機構を明らかにするために、カチオン性のアルキルアミン類を荷電性薬物のモデルとして選び、水相から疎水相(オクタノール相)への移行機構および核酸との相互作用様式を研究した。

まず、カチオン性薬物の疎水相への移行は共存するアニオンとのイオン対形成が主たるものであることを明らかにした。この場合、種々の鎖長のアルキルアミンとのイオン対形成定数、イオン対分配係数を種々の温度で決定し、熱力学的な考察を行った。その結果、イオン対の疎水相への移行にはイオン対の脱水和のしやすさが重要であること、また、その際にはイオン対間の静電的相互作用が強化されるために移行するイオン対の自由度が減少することを明らかにした。

また、遺伝子に対する作用の研究に際しては、単分子のDNAの高次構造に対する2価のカチオン性アルキルアミンであるジアミノアルカンの影響を蛍光顕微鏡によるDNAの動的な構造変化と電子顕微鏡による微細構造の変化とを調べた。その結果、ジアミノアルカンはDNAの単分子凝縮を誘起するが、炭素鎖が奇数のジアミノアルカンの方が偶数のものよりも強力な凝集作用を有することを明らかにした。また、カチオン性の抗がん剤のDNAに対する作用に関する研究も行った。

本研究は、薬物の活性発現機構の基礎的研究として大きな意義を有するものであり、博士(薬学)の学位論文として妥当であると判定する。

關於... (Faint title text)

第一、... (Faint paragraph of text)

第二、... (Faint paragraph of text)

第三、... (Faint paragraph of text)

第四、... (Faint paragraph of text)

第五、... (Faint paragraph of text)

第六、... (Faint paragraph of text)

1

荷電性薬物と生体膜およびDNAとの相互作用

—物理化学的手法を用いたモデル的研究—

1996年

吉川 祐子

荷電性薬物と生体膜およびDNAとの相互作用

—物理化学的手法を用いたモデル的研究—

1996年

吉川 祐子

目次

第1章 序論	1
第2章 生体モデル膜（水-オクタノール二相分配系）における アルカリ金属とMethyl Orangeとのイオン対分配	5
2-1 緒言	5
2-2 実験の部	6
2-3 イオン対分配モデル	8
2-4 結果	13
2-5 考察	19
第3章 生体モデル膜（水-オクタノール二相分配系）における アミノアルカノールおよびアルキルアミンとMethyl orange とのイオン対分配	21
3-1 緒言	21
3-2 実験の部	21
3-3 結果	23
3-4 考察	31
第4章 ジアミノアルカンによる長鎖DNAの単分子凝縮作用	34
4-1 緒言	34
4-2 実験の部	36
4-3 結果	38
4-4 考察	46

第5章	ダウノマイシンによる長鎖DNA単分子凝縮体の高次構造への影響 ---	52
5-1	緒言 -----	52
5-2	実験の部 -----	54
5-3	結果と考察 -----	56
第6章	総括および今後の課題 -----	66
謝辞	-----	70
引用文献	-----	71
参考文献	-----	76

略語一覧

CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DAPI	4',6 - diamidino - 2 - phenylindole
DM	daunomycin
DNA	deoxyribonucleic acid
HMG-1	high mobility group 1
HVJ	hemagglutinating virus of Japan = Sendai virus
2-ME	2 - mercaptoethanol
MO	methyl orange
Spd	spermidine

第1章 序論

薬物の作用機序を分子レベルから解明することは、薬学研究において根幹的な課題である。従来、生理活性発現の研究は、受容体を想定し、鍵と鍵穴的に基質特異性をより高め、作用を誘起するといった方法が主流であった。一方で、特定の受容体をもたない非特異的 (non-site-specific) な薬物は、異種電荷は引き合い、同種電荷は反発するといった一見単純なメカニズムで作用していると考えられ、疎水性相互作用においても特異的な薬理活性をもたらすようなfactorは少ないと考えられていた。この様に考えると非特異的な薬物は、特定の薬理作用を示さないという構図が出来上がってしまう。しかし、現実には、麻酔剤やミトコンドリアの脱共役剤のように非特異的に生体膜に作用して特異的な薬理活性を示す薬物¹⁾や、DNAの転写活性を強めると考えられている比較的簡単な構造を有する生体ポリアミン等が存在する²⁾。この様に、特定の受容器をもたない薬物、特に荷電性薬物で一見静電的相互作用のみに立脚した作用を示すような化学種がなぜ特異的な薬理作用を示すのか、まだ未解決な点が多く、今後に残された研究課題となっている。本研究では、非特異的かつ簡単な構造を有する荷電性薬物に着目して、これらの薬物の生体高分子系 (生体膜とDNA) への作用について物理化学的なアプローチを試みた。

生体膜は、表面にリン脂質やタンパク質が高密度に荷電して親水的な場を提供し、内部には隣接して疎水的な場が存在するという複雑な系である。非特異的な薬物の膜透過は、膜脂質に由来する疎水領域へ薬物がどの程度移行し易いか、つまり薬物の疎水性が重要な因子となる。この様な非特異的相互作用を知るための研究は、一

連の誘導体を用いて、化合物の物理化学的な性質の違いから生じる生体側の応答の変化をみることによって作用機構を明らかにしていく方法が有用である。第2章および第3章は、より簡単な生体膜モデルとして水-油二相分配系を用いて、荷電性薬物の膜疎水領域への移行性（分配係数）を上記に述べた考えに立脚して系列化し考察した。第2章では、アルキル金属イオンを用いて、イオンの大きさの疎水性相互作用に与える影響を調べ、第3章では、アミノ化合物を用いて、アルキル鎖長や親水基を導入したときの膜への移行性の違いを比較した。従来、荷電性薬物の疎水性については、非解離型の分配係数から間接的に評価されてきたが³⁾、本研究では、荷電薬物が膜へ移行する場合は、対イオン（counter ion）と複合体を形成して“イオン対複合体”として移行すると考え、直接イオン対複合体の分配係数を求めて考察した。

一方、遺伝情報を伝える本体であるDNAへの薬物の作用は、これまで、主として一次塩基配列やその情報から間接的に産生されるタンパク質の変化に主眼がおかれて研究が行なわれ、DNAの高次構造への影響についてはあまり重点が置かれてこなかった。これに対して、同じように生体高分子であるタンパク質に対する薬物の作用については、高次構造の変化→機能への影響という図式で明確に高次構造と機能の関係が問題とされてきた。これは、DNAの場合、高次構造自身の果たす役割よりも一次塩基配列から得られる遺伝情報に生理機能の本質があると考えられてきたためである。この理由としては、DNAはたった4種類の塩基からなる生体ポリアニオンであり、対イオンとなるカチオンとの相互作用も静電的相互作用を主とする比較的非特異的なものであるため、DNAの高次構造自身の機能と関連するような特異性

が存在するとは考えられにくかったことが挙げられる。しかし、DNAは、生体中でコンパクトに折り畳まれた状態で存在している。たとえば、バクテリアでは、非ヒストンタンパク質、ポリアミン、RNAの作用によって凝縮し、ウイルスでは、内部タンパク質やポリアミンの作用で凝縮していることが報告されている⁴⁾。真核細胞中でも、ヒストンやそれ以外のタンパク質の作用によって染色体中に折り畳まれている⁵⁾。このことから、遺伝子の発現を考える上でこの折り畳まれ方、つまり高次構造が重要な役割を果たしていると考えられる。また、DNAは、*in vitro*で種々の凝縮剤の作用により凝縮し秩序性の高い構造をとることが知られている⁶⁾。これらの構造は、*in vivo*で観測されるDNAの凝縮体に似ていることから、生体におけるDNAの折り畳み構造のシンプルモデルとして注目されている。本研究ではDNAの高次構造制御に焦点を当て、荷電性薬物とDNAの非特異的相互作用がDNAの高次構造に対してどのような変化をもたらすのかを、主として蛍光顕微鏡によるDNAの単分子観測から調べた。第4章と第5章は、長鎖DNAの単分子凝縮転移に対する荷電薬物の影響を、溶液中の個々のDNAのブラウン運動を直接観察することによって考察した。即ち第4章では、2価のアミンのアルキル鎖長の違いとDNA単分子凝縮能との関係を調べた。これまで低分子カチオンについては、3価以上のものしか凝縮を引き起こさないと考えられてきたが⁷⁾、今回初めて2価のイオンでも単分子凝縮を引き起こすことが明らかになった。第5章では、抗癌剤でありかつDNAのインターカレーターであるダウノマイシンのDNA凝縮構造への影響を、電子顕微鏡による微細構造の観察も含めて考察した。本研究で用いた蛍光顕微鏡による方法は、個々のDNAの凝縮状態とコイル状態を直接観察して見分けることができ、光散乱法のようなアンサン

ブル平均で間接的に評価する方法とは異なり、DNA単分子の高次構造変化を調べる方法として有用である。

以上の結果を第6章で総括し、今後これらの成果を融合して発展していくテーマとして考えている"合成化学物質担体による遺伝子導入メカニズムの解明"についても言及した。

第2章 生体モデル膜（水-オクタノール二相分配系）におけるアルカリ金属と Methyl Orangeとのイオン対分配

2-1 緒言

薬物の膜透過は膜脂質への溶解が主たる機構である。膜に対する薬物の親和性は薬物の疎水的な性質に支配されており、通常互いに混じり合わない水と油二相間における薬物の活量比である分配係数を指標としている。しかし生体に作用する多くの薬物が解離基を有しているにもかかわらず、膜への移行性は主としてその非解離型（中性型）の分配係数から間接的に評価され、解離型（イオン）の分配機構については不明な点が多い。イオンの疎水領域への移行は、主として対イオン（counter ion）と複合体を形成して達成されることが考えられるため、イオン対形成過程とイオン対移行過程からなる"イオン対分配機構"の解明が生理活性な荷電性薬物の膜透過を理解する上で重要である。

本章では、このような荷電性薬物の分配機構をモデル膜として水-オクタノール二相分配系を用いて詳細に検討した。オクタノールは、生体膜の疎水的性質をよく反映していると考えられており⁸⁾、この系における分配係数によって薬物の疎水性が評価され、活性との相関が議論される場合が多い。また本章で用いたアルカリ金属イオンは生体の緩衝液成分として存在し、酸性薬物が膜へ移行する場合の対イオンとなり得る。酸性薬物モデルとしては、広pH領域で解離型（アニオン）として存在し、しかも可視領域に吸収スペクトルを有する色素であるMethyl Orange (Fig.2-1)を用いた⁹⁾。

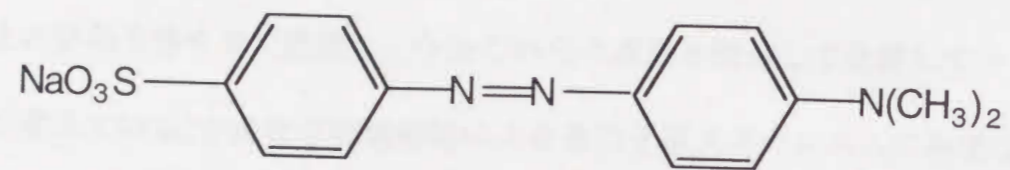


Fig. 2-1 Structure of Methyl Orange.

2-2 実験の部

Methyl Orange (MO) は、メルク社から購入した。n-オクタノールは、ナカライテスク株式会社（京都）から購入した。他の試薬は、市販の特級品を用いた。

試料の調製

オクタノール相および水相は、予め相手の相で飽和させた。水相に $5 \times 10^{-5} \text{M}$ のMOとMOに比べて高濃度の Na^+ , K^+ あるいは Cs^+ 塩を加えた。アルカリ金属イオンの濃度は、MOの濃度より十分に高く（ 10^3 倍以上）、分配前後で水相におけるカチオン濃度が基本的に一定に保たれるようにした。水相は、 Na^+ および Cs^+ とMOとのイオン対分配実験については 0.01M の NaOH で $\text{pH}12$ に調整し、 K^+ については 0.0085M の KOH で調整した。

分配係数の測定

種々の濃度のアルカリ金属イオンを含むMO溶液と水で飽和させたオクタノール溶

液を一定量とり、共栓付試験官に入れて一定温度に保たれた水浴中で約6時間緩やかに振とう後、同じ温度で約12時間静置した。分配後の水相のMO濃度をUV分光測定装置（model UV-180 島津製作所）にて 464nm の吸収波長で測定した。オクタノール相中のMOの濃度（ C_o ）は、水相中のMOの初期濃度（ C_i ）と分配平衡後の水相中のMOの濃度（ C_w ）から（1）式に基づいて求めた。

$$C_o = (C_i - C_w)(V_w/V_o) \quad (1)$$

（1）式において、 V は水相（w）およびオクタノール相（o）の体積を示す。

2-3 イオン対分配モデル

Fig.2-2にイオン対分配モデルを示した。ここでMHおよびM⁻は、それぞれMOの非解離型と解離型を示し、M⁻とアルカリ金属イオンX⁺とのイオン対複合体はMXで示した。アルカリ金属イオンは、X⁺Y⁻という形（YはCl⁻）で加えられているが本実験条件下ではX⁺Y⁻の分配係数は非常に小さく無視できると考えられる。Mがオクタノール相へ移行する場合、M⁻はX⁺とイオン対複合体を形成し（イオン対形成過程）、イオン対として移行する（イオン対移行過程）。

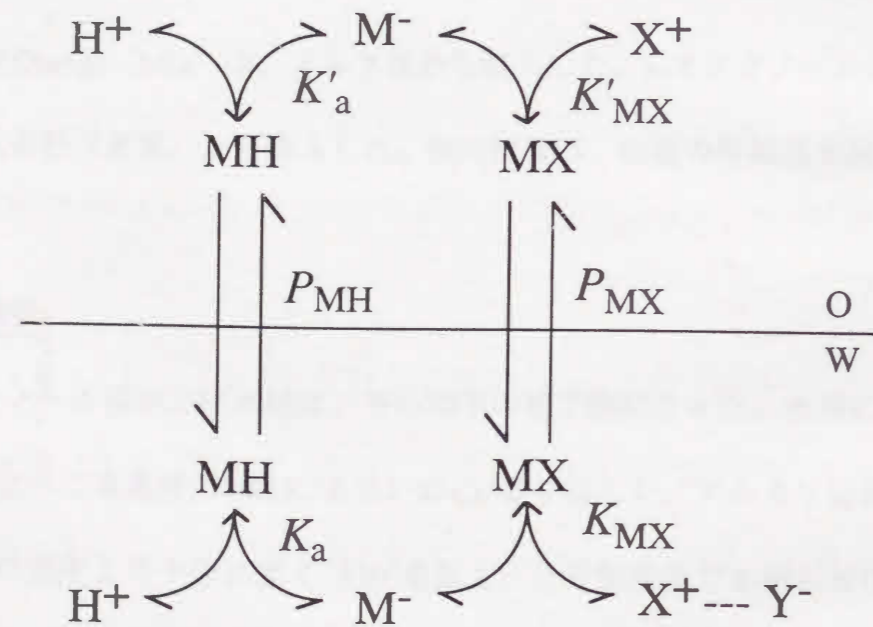


Fig. 2-2 Possible Mode of Partition of MO between Aqueous (w) and Octanol (o) Phases.

MHとMXの真の分配係数PをそれぞれP_{MH}およびP_{MX}とすると、P_{MH}とP_{MX}は(2)式と

$$P_{MH} = [MH]_o / [MH]_w \quad (2)$$

$$P_{MX} = [MX]_o / [MX]_w \quad (3)$$

MHの水相およびオクタノール相における解離定数をそれぞれK_a、K'_aとし、M⁻とX⁺の水相およびオクタノール相におけるイオン対会合定数をそれぞれK_{MX}およびK'_{MX}とするとそれぞれの定数は式(4)から(7)で表される。

$$K_a = [M^-]_w [H^+]_w / [MH]_w \quad (4)$$

$$K'_a = [M^-]_o [H^+]_o / [MH]_o \quad (5)$$

$$K_{MX} = [MX]_w / [M^-]_w [X^+]_w \quad (6)$$

$$K'_{MX} = [MX]_o / [M^-]_o [X^+]_o \quad (7)$$

以上の定義から実測される見かけの分配係数P'は、(8)、(9)式で表される。

$$P' = C_o / C_w = \frac{[MH]_o + [M^-]_o + [MX]_o}{[MH]_w + [M^-]_w + [MX]_w} \quad (8)$$

$$= \frac{P_{MH}[H^+]_w + P_{MH}K'_a[H^+]_w/[H^+]_o + P_{MX}K_{MX}K_a[X^+]_w}{[H^+]_w + K_a + K_aK_{MX}[X^+]_w} \quad (9)$$

$[X^+]_w = 0$ のとき、(9) 式は (10) 式として表される。

$$P' = \frac{P_{MH}[H^+]_w + P_{MH}K_a[H^+]_w/[H^+]_o}{[H^+]_w + K_a} = P'_o \quad (10)$$

(10) 式を (9) 式にあてはめると (11) 式になる。

$$P' = \frac{P'_o(K_a + [H^+]_w) + P_{MX}K_{MX}K_a[X^+]_w}{[H^+]_w + K_a + K_aK_{MX}[X^+]_w} \quad (11)$$

pH \gg pKa のとき、(11) 式は (12) 式で示される。

$$P' = \frac{P'_o + P_{MX}K_{MX}[X^+]_w}{1 + K_{MX}[X^+]_w} \quad (12)$$

(12) 式で、 $[X^+]_w$ に対して P' をプロットすると Y 切片は P'_o に相当する。また P'_o は、

pH \gg pKa の条件を考慮すると (13) 式として表される。

$$P'_o = P_{MH}K_{MH}[H^+]_w + P_{M^-} \quad (13)$$

(13) 式において、 P_{M^-} は MO の解離型単独のみの分配係数 ($= [M^-]_o/[M^-]_w$)、また $K_{MH} = 1/K_a$ である。イオン対会合定数 K_{MX} とイオン対分配係数 P_{MX} は (14) 式に基づい

て $1/P'$ に対して $(P' - P'_o)/(P' \cdot [X^+]_w)$ をプロットすると、Y 切片と傾きから決定することができる。

$$\frac{P' - P'_o}{P'} \cdot \frac{1}{[X^+]_w} = P_{MX}K_{MX} \frac{1}{P'} - K_{MX} \quad (14)$$

イオン対抽出定数 E_{MX} ($= [MX]_o/[M^-]_w[X^+]_w$) は (15) 式によって表される。

$$E_{MX} = [MX]_o/[M^-]_w[X^+]_w = P_{MX}K_{MX} \quad (15)$$

Cs⁺ の実験では水相の pH を NaOH で調整したため、2 種類のアルカリ金属イオン X⁺ ($= Cs^+$) と Z⁺ ($= Na^+$) が存在し、見かけの分配係数 P' は (16) 式で表される。

$$P' = \frac{(P'_o + P_{MX}K_{MX}[X^+]_w) + P_{MZ}K_{MZ}[Z^+]_w}{(1 + K_{MX}[X^+]_w) + K_{MZ}[Z^+]_w} \quad (16)$$

$(1 + K_{MX}[X^+]_w)$ を R、 $(P'_o + P_{MX}K_{MX}[X^+]_w)$ を S として記号で置き換え簡素化すると

(16) 式は (17) 式のように表される。

$$\frac{P' - (S/R)}{P'} \cdot \frac{1}{[Z^+]_w} = \frac{P_{MZ}K_{MZ}}{R} \frac{1}{P'} - \frac{K_{MZ}}{R} \quad (17)$$

(17) 式に基づいて、 $1/P'$ に対して $(P' - (S/R))/P' [Z^+]_w$ をプロットすると直線の関係が得られ、傾きとY切片の値からイオン対分配係数 P_{MZ} とイオン対会合定数 K_{MZ} を求めることができる。

従来、一般的なイオンの有機相への移行の程度は主として(15)式で示されるイオン対抽出定数 E_{MX} により評価されてきた¹⁰⁾。 E_{MX} はイオン対形成過程とイオン対移行過程の総合的な指標となるが、 E_{MX} 単独ではそれぞれの過程を支配する因子を別々に評価することは難しい。本モデルを用いることにより、実験で測定した見かけの分配係数 P' から、イオン対形成過程とイオン対移行過程それぞれの指標となるイオン対分配係数 P_{MZ} とイオン対会合定数 K_{MZ} を求めることができ、イオン対分配機構のより詳細な検討が可能である。

2-4 結果

本章では、種々のアルカリ金属イオン濃度に対するMethyl Orangeの見かけの分配係数 P' の変化を調べた。Fig.2-3は、 Na^+ について濃度を変えたときの P' の変化を示したものである。水相中の Na^+ の濃度の増加に伴い、 P' の値も増大している。また、温度の上昇につれて P' が減少している。この図のY切片は(12)式の P'_0 に相当し、10℃、15℃および25℃における値はそれぞれ0.08、0.06、0.05であった。これらの値を

(14)式に代入して $1/P'$ に対して $(P' - P'_0)/(P' \cdot [Na^+]_w)$ をプロットするとFig.2-4に示されるような直線関係が得られ、傾きとY切片の値からイオン対分配係数 P_{MNa} とイオン対会合定数 K_{MNa} を決定した。 K^+ についても Na^+ と同様に(14)式に基づいて P_{MK} と K_{MK} を決定した。

Cs^+ については、水相のpHはNaOHで調整したため、(17)式に基づいて P_{MK} と K_{MK} を決定した。Fig.2-5は25℃における Cs^+ の(17)式に基づくプロットを示したものである。

Fig.2-6は、25℃における見かけの分配係数 P' の値を種々のアルカリ金属イオンについて比較したものである。 P' の値は、 $Na^+ < K^+ < Cs^+$ となりイオン半径が大きい程 P' の値も大きくなっている。

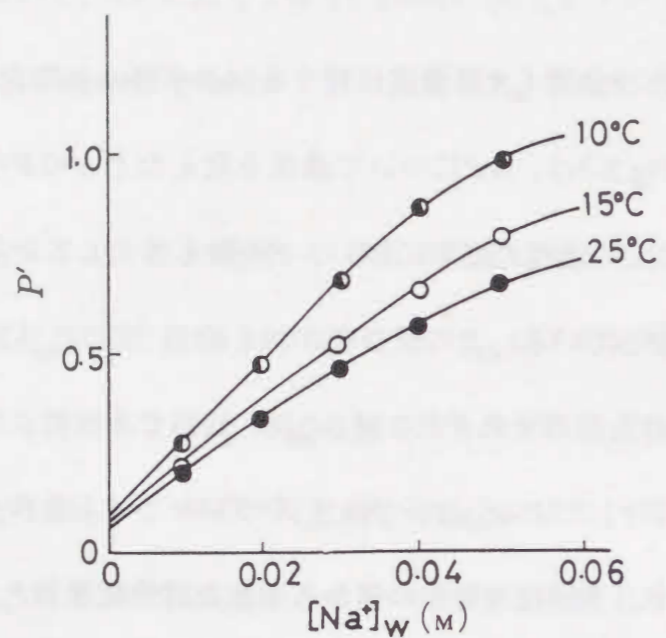


Fig. 2-3 Apparent Partition Coefficient P' of MO in the Presence of Na^+ at Various Temperatures.

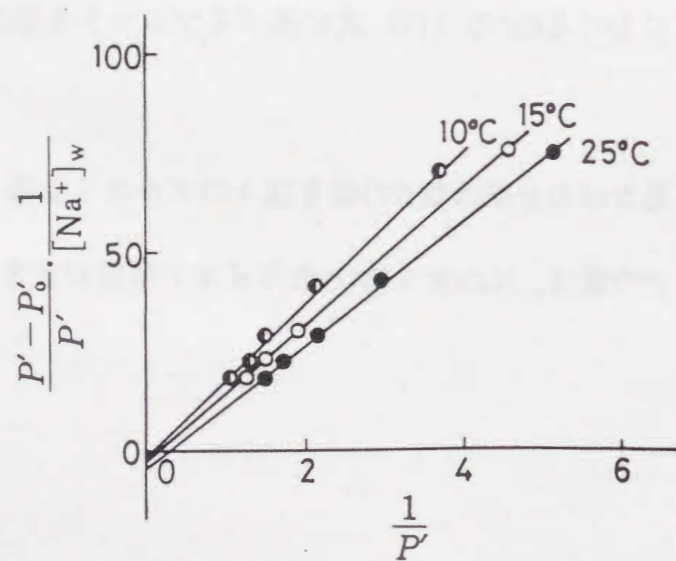


Fig. 2-4 Linear Relation between $(P' - P'_0) / P' [Na^+]_w$ and $1/P'$ in the Ion-Pair Partition of MO Anion with Na^+ .

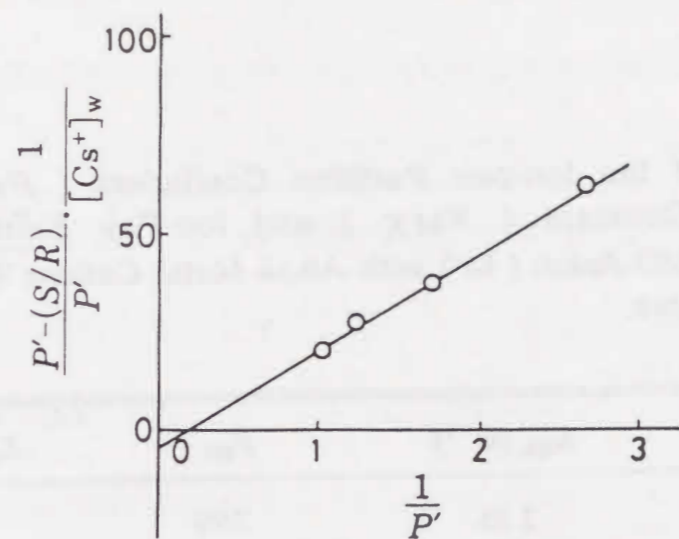


Fig. 2-5 Relationship between $(P' - (S/R)) / P' [Cs^+]_w$ and $1/P'$ in the Ion-Pair Partition of MO Anion with Cs^+ at 25°C.

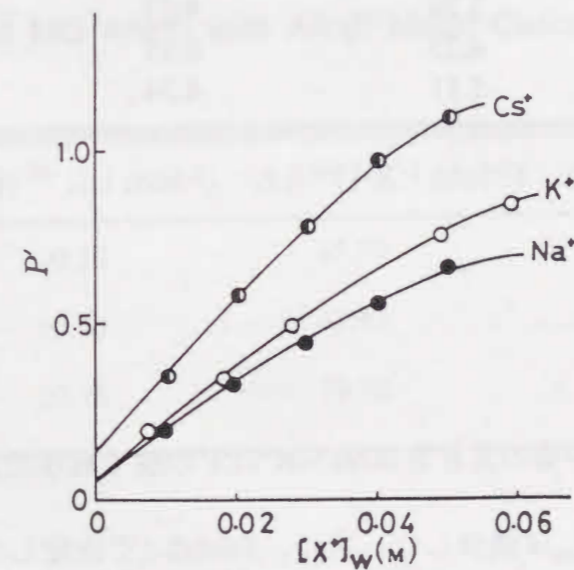


Fig. 2-6 Dependence of Apparent Partition Coefficient P' of MO on Alkali Metal Cations X^+ at 25°C.

Table2-1にこのようにして求めた種々の温度における K_{MX} 、 P_{MX} さらにイオン対抽出定数 E_{MX} の値をまとめてある。

Table 2-1 Values of the Ion-pair Partition Coefficient (P_{MX}), Ion-Pair Formation Constant (K_{MX}) and Ion-Pair Extraction Constant (E_{MX}) of MO Anion (M^-) with Alkali Metal Cations (X^+) at Various Temperatures.

X^+	Temp. (°C)	K_{MX} (M^{-1})	P_{MX}	E_{MX} (M^{-1})
Na ⁺	10	2.55	7.99	20.37
	15	2.64	6.47	17.09
	25	3.16	4.81	15.20
K ⁺	10	2.48	9.44	23.42
	25	3.09	5.35	16.54
	35	3.53	4.05	14.31
Cs ⁺	10	2.86	13.46	38.50
	15	3.24	9.59	31.07
	25	4.23	6.05	25.60
	30	5.11	4.34	22.18

Table2-1において、 P_{MX} と E_{MX} の値の大きさは $Na^+ < K^+ < Cs^+$ の順であった。また温度の上昇に伴い、 K_{MX} 値は増大し P_{MX} は減少した。次に、Table2-1で決定した K_{MX} 、 P_{MX} および E_{MX} 値について、(18)、(19)、(20)式に基づいて熱力学的パラメーターを求めた。

Table2-2、2-3、2-4に25°Cにおける結果を示す。

$$\Delta G^\ominus = - RT \ln K \quad (18)$$

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial (1/T)} \right)_P = - \frac{\Delta H^\ominus}{R} \quad (19)$$

$$\left(\frac{\partial (-RT \ln K)}{\partial T} \right)_P = - \Delta S^\ominus \quad (20)$$

Table 2-2 Thermodynamic Parameters of the Ion-Pair Formation Constant (K_{MX}) of MO Anion with Alkali Metal Cation at 25°C.

X^+	ΔH^\ominus (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ominus (J·K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^\ominus (kJ mol ⁻¹)
Na ⁺	10.20	43.79	-2.85
K ⁺	10.15	43.42	-2.79
Cs ⁺	20.18	79.70	-3.57

Table 2-3 Thermodynamic Parameters of the Ion-Pair Formation Constant (P_{MX}) of MO Anion with Alkali Metal Cation at 25°C.

X^+	ΔH^\ominus (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ominus (J·K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^\ominus (kJ mol ⁻¹)
Na ⁺	-23.51	-65.84	-3.89
K ⁺	-24.50	-68.29	-4.15
Cs ⁺	-38.71	-114.93	-4.46

Table 2-4 Thermodynamic Parameters of the Ion-Pair Formation Constant (E_{MX}) of MO Anion with Alkali Metal Cation at 25°C.

X^+	ΔH^\ominus (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ominus (J·K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^\ominus (kJ mol ⁻¹)
Na ⁺	-12.91	-20.70	-6.74
K ⁺	-14.35	-24.83	-6.95
Cs ⁺	-18.53	-36.44	-7.67

Table2-2の K_{MX} について、 ΔG^\ominus の値は全て負の値を示し、 ΔH^\ominus と ΔS^\ominus の値は正の値を示した。 P_{MX} (Table2-3) については全ての熱力学的パラメーターの値は負になり、しかもCs⁺の場合に最も大きな負の値が得られた。

2-5 考察

イオン対分配機構は2つの過程から成る。最初の過程は、水相における Methyl Orange アニオン (M^-) とアルカリ金属イオン (X^+) のイオン対複合体形成過程で、形成の程度はイオン対会合定数 K_{MX} を指標として評価される。第2の過程は、イオン対複合体のオクタノール相への移行過程で、移行の程度はイオン対分配係数 P_{MX} を指標とする。 E_{MX} は2-2項で示したように上記2つの過程を統合した指標である。

最初にイオン対形成過程について考察する。Evansらは、水を含めたプロトン性溶媒においては2種類のイオン対複合体が存在すると指摘している¹¹⁾。Fig.2-7に2種類のイオン対モデル (A) 接触イオン対 (contact ion-pair) と (B) 溶媒介入イオン対 (solvent separated ion-pair) を示した。

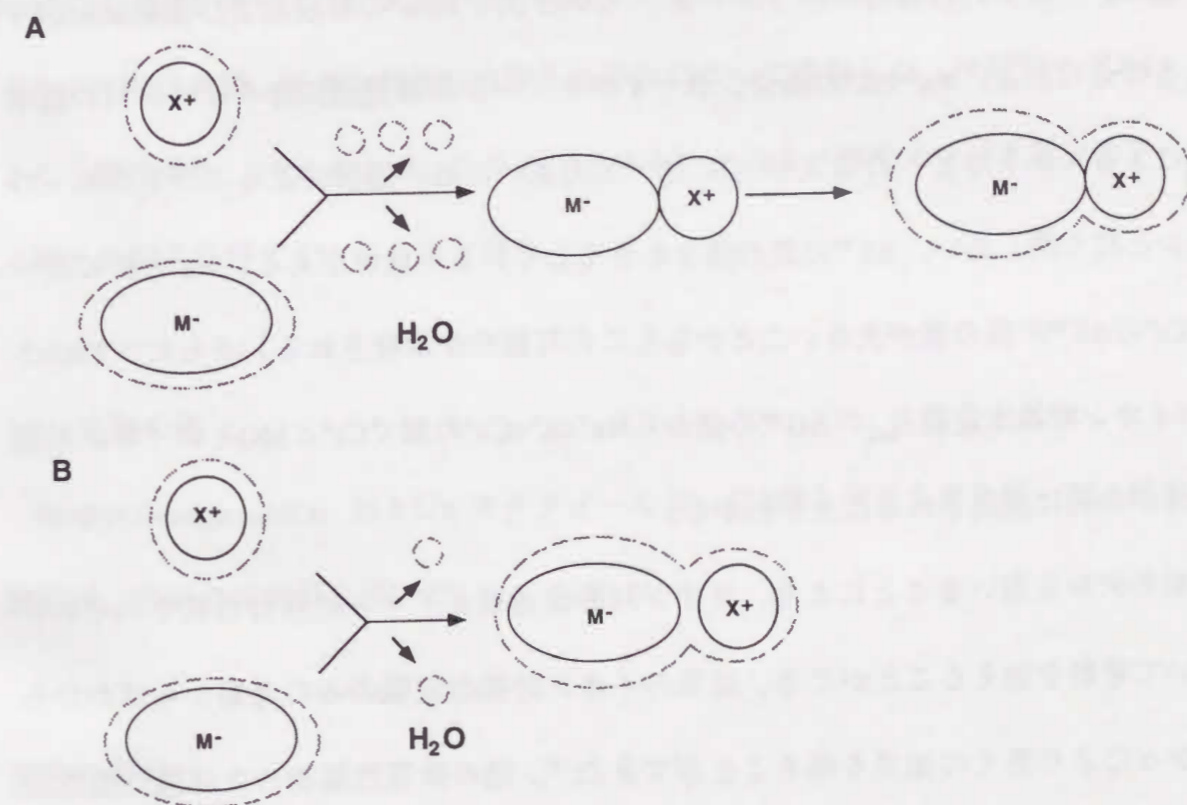


Fig. 2-7 Two Models of the Ion-Pair Formation Process; Contact Ion-Pair (A) and Solvent Separated Ion-Pair (B) Complexes. Dotted lines round M^+ and X^+ , and small dotted circles indicate hydrated shell and librated water molecules, respectively. X^+ , alkali metal cation; M^- , methyl orange anion.

接触イオン対は、イオン対の形成にともない大きな脱水和が起こる。一方、溶媒介入イオン対は、イオンの水分子を引き付ける作用が強く、イオン対形成時に部分的脱水和は生じるが、ある程度水和した状態でイオン対を形成する。Table 2-2の K_{MX} において、 ΔS^\ominus の値は全てのアルカリ金属イオンについて正の値を示した。水和のエントロピーは負の値を示すため¹²⁾、 ΔS^\ominus の正の値はイオン対が形成されるとき“脱水和”によると考えられる。また脱水和にはエンタルピーの増大も伴う。脱水和の程度が大きいほど、 ΔH^\ominus および ΔS^\ominus の正の値も大きくなるため、脱水和の程度は Cs^+ が最も大きく、接触イオン対を作りやすいと考えられる。

イオン対複合体のオクタノール相への移行においてはTable 2-3の負の ΔH^\ominus と ΔG^\ominus の値から、移行過程は発熱反応でエンタルピー支配であることがわかる。 ΔS^\ominus の負の値は、イオン対の移行に伴うオクタノール相での“hole”の形成および溶解に起因すると考えられる。 Na^+ や K^+ の場合、水-オクタノール界面通過に伴うイオン対の脱水和によるエントロピーの増大が Cs^+ に比べて大きいため、溶解によるエントロピーの減少と打ち消しあい、 ΔS^\ominus の負の値を小さくしている可能性がある。 Na^+ と K^+ に比べて Cs^+ の ΔS^\ominus の負の値が大きいことからこの可能性が示唆される。さらに、Table 2-4のイオン対抽出定数 E_{MX} の ΔG^\ominus の値から $Na^+ < K^+ < Cs^+$ の順で Cs^+ とMOとのイオン対複合体が有利に抽出されることがわかる。

本モデルを用いることにより、イオン対形成過程とイオン対移行過程それぞれについて考察を加えることができ、従来のイオン対抽出定数のみの考察からはわからなかったより多くの知見を得ることができた¹³⁾。他の荷電性薬物の生体膜への作用を考える上でも本研究モデルが有用であると考えられる。

第3章 生体モデル膜（水-オクタノール二相分配系）におけるアミノアルコールおよびアルキルアミンとMethyl Orangeとのイオン対分配

3-1 緒言

これまでに、ペプチド類やポリアミンをはじめ、アミノ基を有する多くの生理活性物質が見いだされている。これらの薬物の多くは、生理的条件下でイオンとして存在し、生体膜へは主として対イオンとなるアニオンとイオン対を形成して移行すると考えられる。本章では、アミノ化合物の“膜への移行”モデルとして、対イオンとなるアニオンとしてMethyl Orangeを用いて、イオン対分配機構を調べた。具体的には、アミノ化合物としてアルキルアミン $NH_3^+(CH_2)_{n-1}CH_3$ とアミノアルコール $NH_3^+(CH_2)_nOH$ を用いて、イオン対分配における炭素鎖長や親水基（OH基）の影響を、イオン対形成過程、イオン対移行過程それぞれについて考察した。本研究モデルは、また、酸性薬物（Methyl Orangeをモデルとする）とアミノ酸やタンパク質中のアミノ基との相互作用モデルにもなり得る。

3-2 実験の部

Methyl Orange (MO) およびn-オクタノールは、第2章と同じものを用いた。他の試薬は、市販の特級品を用いた。

試料の調製

オクタノール相および水相は、予め相手の相で飽和させた。水相に $5 \times 10^{-5}M$ のMO

とMOに比べて高濃度のアルキルアミン $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_{n-1}\text{CH}_3$ またはアミノアルコール $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ を加えた。アミンの濃度は、MOの濃度より十分に高く、分配前後で水相におけるカチオン濃度が基本的に一定に保たれるようにした。水相は、アルキルアミン $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_{n-1}\text{CH}_3$ (pKa約10.5) とMOとのイオン対分配実験については0.1Mのリン酸ナトリウムまたはカリウム緩衝液でpH6.8に調整し、アミノアルコール $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ (pKa約9.5) については0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液でpH6.45に調整した。

分配係数の測定

種々の濃度のアミノ化合物を含むMO溶液と水で飽和させたオクタノール溶液を一定量とり、共栓付試験管に入れて一定温度に保たれた水浴中で約6時間緩やかに振とう後、同じ温度で約12時間静置した。分配後の水相のMO濃度をUV分光測定装置 (model UV-180 島津製作所) にて464nmの吸収波長で測定した。オクタノール相中のMOの濃度 (C_o) は、水相中のMOの初期濃度 (C_i) と分配平衡後の水相中のMOの濃度 (C_w) から第2章の (1) 式に基づいて求めた。

3-3 結果

Fig.3-1にイオン対分配モデルを示した。Methyl Orangeアニオンに対して対イオンとなりうるカチオンは、緩衝液成分である Na^+ 、 K^+ (X^+) とアミノカチオン (Z^+) の2種類存在するため、第2章の (17) 式に基づいてイオン対会合定数 K_{MZ} 、イオン対分配係数 P_{MZ} およびイオン対抽出定数 E_{MZ} を決定した。

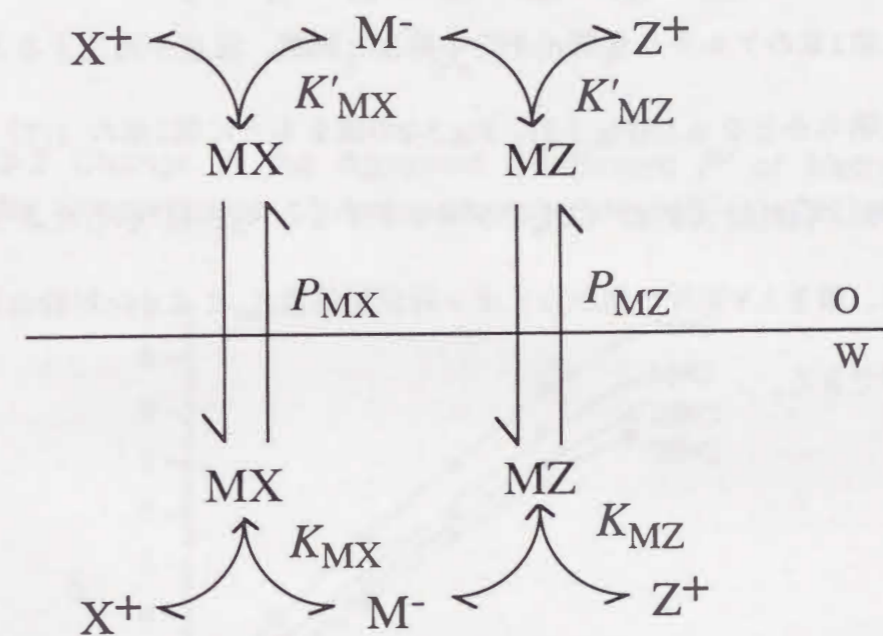


Fig. 3-1 Possible Model of Partition of Methyl Orange Anion M^- with Counter Cations X^+ and Z^+ between Aqueous (w) and Octanol (o) Phases.

本章では、炭素数の異なるアミノアルコール $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ ($n=2,3,5$) とアルキルアミン $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_{n-1}\text{CH}_3$ ($n=3,4,5$) の濃度を変えたときのMethy Orangeの見かけの分配係数 P' の変化を測定した。Fig.3-2は、一例として25°Cにおけるアミノアルコールの濃度 $[Z^*]_w$ を変えたときの見かけの分配係数 P' の変化を示したものである。アミノアルコール濃度の増加に伴い P' 値は増加し、また n の値が大きいほど P' 値も大きな値を示した。アルキルアミンについても同様な結果が得られたが、同じ炭素数のもので比べた場合 P' 値はアルキルアミンの方がアミノアルコールより大きかった。また第2章のアルカリ金属イオンの場合と同様、温度が増加すると P' 値は減少することも明らかとなった(Fig.3-3)。Fig.3-2の値をもとに第2章の(17)式に基づいて、 $1/P'$ に対して $(P' - (S/R))/P' [Z^*]_w$ をプロットするとFig.3-4に示したような直線の関係が得られ、傾きとY切片の値からイオン対分配係数 P_{Mz} とイオン対会合定数 K_{Mz} を求めることができる。

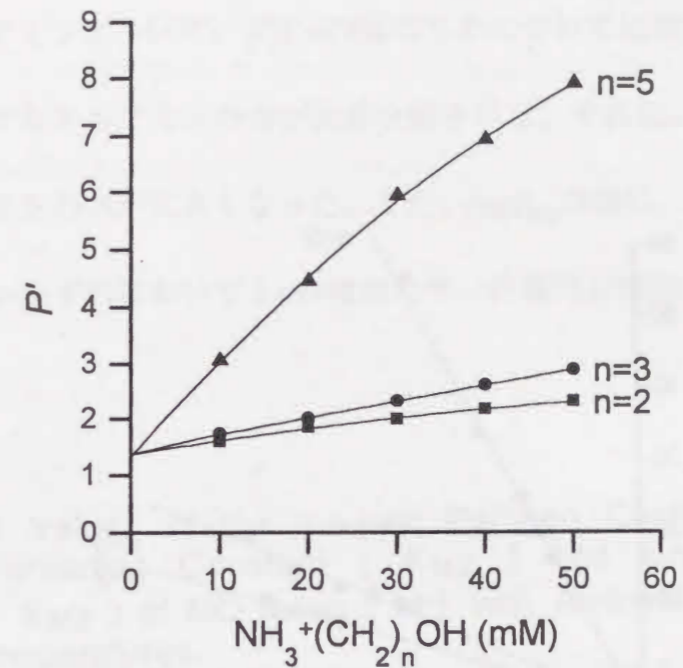


Fig. 3-2 Change in the Apparent Coefficient P' of Methyl Orange with the Concentration of Aminoalkanol $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ at 25°C.

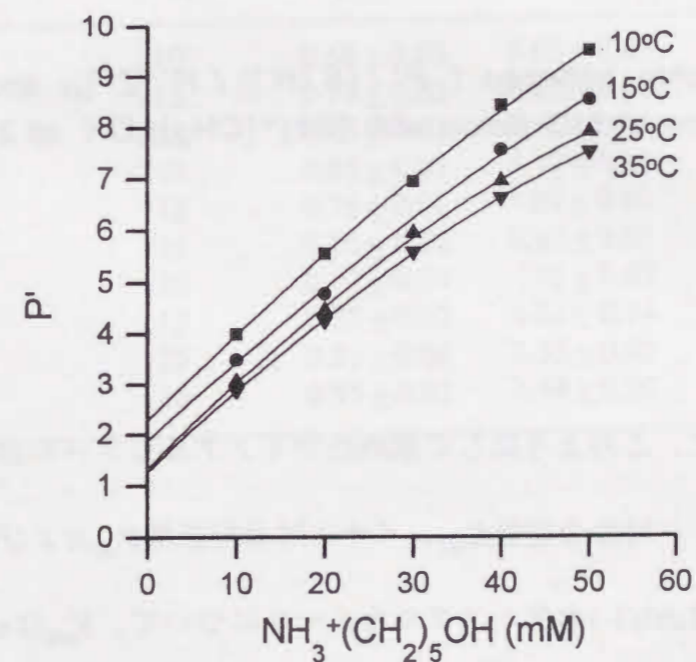


Fig. 3-3 Apparent Coefficient P' of Methyl Orange with the Presence of $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ at Various Temperatures.

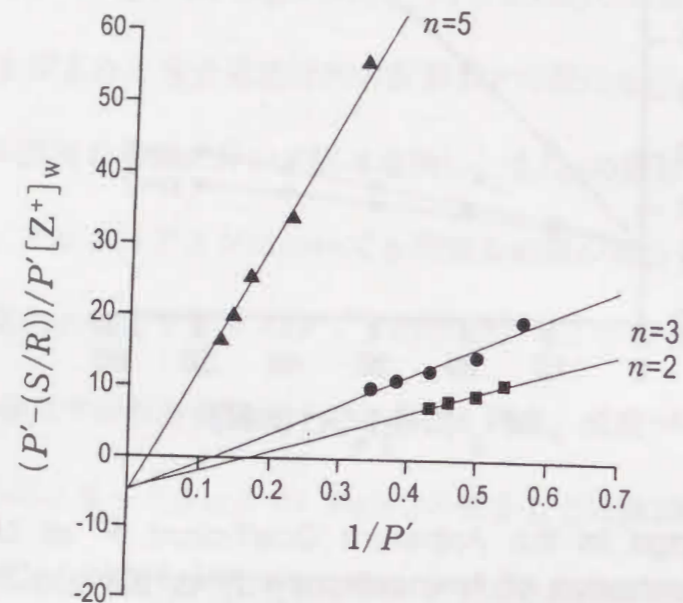


Fig. 3-4 Relationship between $(P' - (S/R)) / P' [Z^+]_w$ and $1/P'$ in the Ion-Pair Partition of MO Anion with $NH_3^+(CH_2)_nOH$ at $25^\circ C$.

Table3-1および3-2に、このようにして求めたアミノアルカノールおよびアルキルアミンについてのイオン対会合定数 K_{MZ} 、イオン対分配係数 P_{MZ} およびイオン対抽出定数 E_{MZ} をまとめた。Table3-1のアミノアルカノールについて、 K_{MZ} は n の値に関係なくほぼ同じ値を示したが温度の上昇に伴って値は大きくなった。一方、 P_{MZ} は n の値が大きくなると増加したが、 K_M の場合とは逆に、温度の上昇に伴って値は小さくなった。同様の傾向は、アルキルアミンでも見られた (Table3-2)。アミノアルカノール

とアルキルアミンについて、同じ n の値のものについて比較すると、 K_{MZ} 、 P_{MZ} いずれにおいてもアルキルアミンの方が大きな値を示し、それ故、イオン対抽出定数 E_{MZ} もアルキルアミンの方が大きくなった。また、 $\log P_{MZ}$ の値は、アミノアルカノール、アルキルアミンいずれにおいても n の増加に伴い直線的に増加した (Fig.3-5)。

Table 3-1 Values of the Ion-pair Partition Coefficient (P_{MZ}), Ion-Pair Formation Constant (K_{MZ}) and Ion-Pair Extraction Constant (E_{MZ}) of MO Anion (M^-) with Aminoalkanols (X^+) at Various Temperatures.

n	Temperature ($^\circ C$)	$\log K_{MZ}$ (M^{-1})	$\log P_{MZ}$	$\log E_{MZ}$ (M^{-1})
2	10	0.68 ± 0.03	0.95 ± 0.03	1.63 ± 0.01
	15	0.73 ± 0.02	0.85 ± 0.02	1.58 ± 0.01
	25	0.85 ± 0.03	0.60 ± 0.10	1.45 ± 0.06
3	10	0.68 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.87 ± 0.01
	15	0.76 ± 0.01	1.07 ± 0.01	1.83 ± 0.01
	25	0.85 ± 0.02	0.93 ± 0.01	1.78 ± 0.02
5	10	0.71 ± 0.04	1.70 ± 0.02	2.41 ± 0.05
	15	0.73 ± 0.02	1.61 ± 0.04	2.34 ± 0.02
	25	0.85 ± 0.06	1.55 ± 0.05	2.40 ± 0.01
	35	0.95 ± 0.02	1.44 ± 0.01	2.39 ± 0.01

Table 3-2 Values of the Ion-pair Partition Coefficient (P_{MZ}), Ion-Pair Formation Constant (K_{MZ}) and Ion-Pair Extraction Constant (E_{MZ}) of MO Anion (M^-) with Alkylamines (X^+) at Various Temperatures.

n	Temperature (°C)	$\log K_{MZ}$ (M^{-1})	$\log P_{MZ}$	$\log E_{MZ}$ (M^{-1})
3	10	0.90 ± 0.02	1.58 ± 0.05	2.48 ± 0.07
4	10	0.93 ± 0.01	2.08 ± 0.01	3.02 ± 0.01
	15	1.03 ± 0.03	1.97 ± 0.06	2.99 ± 0.03
5	25	1.13 ± 0.03	1.83 ± 0.02	2.96 ± 0.02
	10	1.05 ± 0.01	2.57 ± 0.01	3.62 ± 0.01
	15	1.09 ± 0.04	2.49 ± 0.04	3.58 ± 0.01
	25	1.17 ± 0.03	2.34 ± 0.06	3.51 ± 0.03

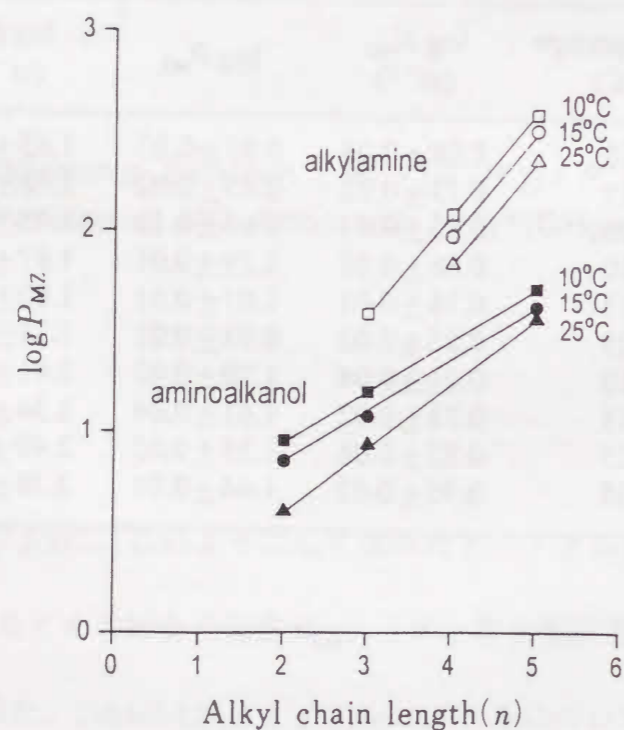


Fig. 3-5 Relationship between $\log P_{MZ}$ and Alkyl Chain Length of Aminoalkanols or Alkylamines.

アミノアルカノールおよびアルキルアミンについて、10°Cにおける $\log P_{MZ}$ と n の関係を示すと (21) 式と (22) 式のようになる。

$$\log P_{MZ}(\text{aminoalkanols}) = 0.24n + 0.51 \quad (21)$$

$$\log P_{MZ}(\text{alkylamines}) = 0.50n + 0.07 \quad (22)$$

上式の傾きの値から、炭素鎖長 n に対する P_{MZ} の増加の程度は、アルキルアミンの方が大きかった。

Table3-1とTable3-2の K_{MZ} , P_{MZ} および E_{MZ} の値から、第2章の(18) (19) (20)式に基づいて25°Cにおける熱力学的パラメーター ΔG^\ominus 、 ΔH^\ominus および ΔS^\ominus を求めると、Table3-3、Table3-4、Table3-5のようになる。 K_{MZ} についてはアミノアルカノールおよびアルキルアミンいずれにおいても ΔG^\ominus の値は負の値を示したが、 ΔH^\ominus および ΔS^\ominus は正の値を示した。一方、 P_{MZ} の全ての熱力学的パラメーターは正の値を示し、 P_{MZ} および E_{MZ} の ΔS^\ominus の値は、 n の増加に伴い増大した。

Table 3-3 Thermodynamic Parameters of the Ion-Pair Formation Constant (K_{MZ}) of MO Anion with Aminoalkanols and Alkylamines at 25°C.

Z^+	n	ΔG^\ominus ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS^\ominus ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH^\ominus ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{OH}$	2	-4.8 ± 0.1	77.2 ± 9.7	18.2 ± 2.9
	3	-4.8 ± 0.1	75.6 ± 2.7	17.7 ± 0.8
	5	-4.8 ± 0.1	72.8 ± 9.7	16.9 ± 2.9
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_{n-1}\text{CH}_3$	4	-6.5 ± 0.2	92.7 ± 14.9	21.1 ± 4.3
	5	-6.7 ± 0.2	67.7 ± 15.0	13.5 ± 4.3

Table 3-4 Thermodynamic Parameters of the Ion-Pair Partition Constant (P_{MZ}) of MO Anion with Aminoalkanols and Alkylamines at 25°C.

Z^+	n	ΔG^\ominus (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^\ominus (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔH^\ominus (kJ·mol ⁻¹)
NH ₃ ⁺ (CH ₂) _n OH	2	-3.4±0.1	-125.1±14.0	-40.7±4.1
	3	-5.3±0.1	-73.8± 6.7	-27.3±2.0
	5	-8.8±0.1	-26.2± 3.1	-16.6±1.0
NH ₃ ⁺ (CH ₂) _{n-1} CH ₃	4	-10.5±0.1	-55.2±8.3	-26.9±2.4
	5	-13.3±0.3	-37.8±7.1	-24.4±7.1

Table 3-5 Thermodynamic Parameters of the Ion-Pair Extraction Constant (E_{MZ}) of MO Anion with Aminoalkanols and Alkylamines at 25°C.

Z^+	n	ΔG^\ominus (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^\ominus (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔH^\ominus (kJ·mol ⁻¹)
NH ₃ ⁺ (CH ₂) _n OH	2	-8.3±0.2	-40.1±14.2	-20.2±4.0
	3	-10.1±0.1	2.1± 8.9	-9.5±2.6
	5	-13.7±0.1	42.0± 3.2	-1.2±1.0
NH ₃ ⁺ (CH ₂) _{n-1} CH ₃	4	-17.2±0.2	37.4± 6.6	-5.9±1.9
	5	-20.2±0.1	34.9±15.0	-9.7±4.3

3-4 考察

Table3-1に示したイオン対分配モデルから、イオン対分配機構は、(a) K_{MZ} を指標とするイオン対形成過程と (b) P_{MZ} を指標とするイオン対移行過程に分けられる。本章では第2章にならって、それぞれの過程について考察した。

(a) イオン対形成過程

Table3-1とTable3-2からアミノアルコールとアルキルアミンいずれにおいても炭素鎖長の違いにかかわらず K_{MZ} 値はほぼ同じ値であった。このことからMethyl Orangeアニオンとイオン対を形成するカチオン(アミノ基)の部分と同じであればイオン対形成の程度には、疎水性の寄与が少ないと考えられる。また、 K_{MZ} の ΔS^\ominus は全て正の値を示し(Table3-3)、これはイオン対形成時の脱水和によると考えられる。

(b) イオン対移行過程

アルキルアミンの P_{MZ} および E_{MZ} は、 K_{MZ} と異なりアミノアルコールの場合より大きな値を示した。また、(21)式と(22)式から10℃におけるメチレン基1個あたりの $\log P_{MZ}$ の増加の割合は、アミノアルコールでは0.24、アルキルアミンでは0.5であった。この差はアミノアルコールの親水基(OH基)の寄与による。アルキルアミンの場合、他の温度においても0.5で、しかも非解離型のアルキルアミン単独の $\log P$ も1メチレン基増加する毎に0.5増加すると報告されている¹⁴⁾。他のアルキル化合物の場合においてもメチレン基1個あたりの $\log P$ の増加の割合は0.5¹⁴⁾であることから、加成性が成立して $\log P$ 値が予測できるが、アルキルアミンの場合も非解離型のみならず解離型においても加成性が成立すると考えられる。

Table3-4から、 P_{MZ} の ΔG^\ominus 、 ΔH^\ominus および ΔS^\ominus は全て負の値を示すことからイオン

対分配はエンタルピー項の寄与が大きいと考えられる。これは水とオクタノールの誘電率の違いから説明できる。異種電荷の一価のイオン同士の静電的引力 $F(r)$ は(23)式で示される。

$$F(r) = \frac{e^2}{4\pi\epsilon r^2} \quad (23)$$

ここで ϵ 、 e 、 r は、それぞれ溶媒の誘電率、単位電荷、イオン間距離を示す。上式の関係から $F(r)$ と誘電率は反比例の関係にあることが分かる。水、オクタノールの誘電率はそれぞれ80.4と10.3 (20℃) であるため、水相よりもオクタノール相における $F(r)$ 値の方が大きい。つまりイオン対はオクタノール相中に存在する方が安定である (=イオン間相互作用が強くなる) ためオクタノール相側に移行しやすくなる。換言すると、 P_{MZ} の ΔH^\ominus は、負の値をとることになる。また P_{MZ} の ΔS^\ominus が負となることは、イオン対のオクタノール相への移行に伴いイオン間の静電的引力が強くなって分子の運動の自由度が減少するためであると考えられる。

以上の考察から、Fig.3-6に例としてMethyl Orangeとアミノアルコールおよびアルキルアミンとのイオン対分配機構を模式的に示した。Methyl Orangeアニオンとアミノカチオンとのイオン対形成時に脱水和が起こり、イオン対のオクタノール相への移行に伴いイオン間の静電的引力が増大し、運動の自由度が減少する。第2章では、イオン半径の違いがイオン対形成過程、イオン対移行過程それぞれに与える影響を調べたが、本章では、疎水性の違いと親水基の影響を定量的に考察することができた¹⁵⁾。

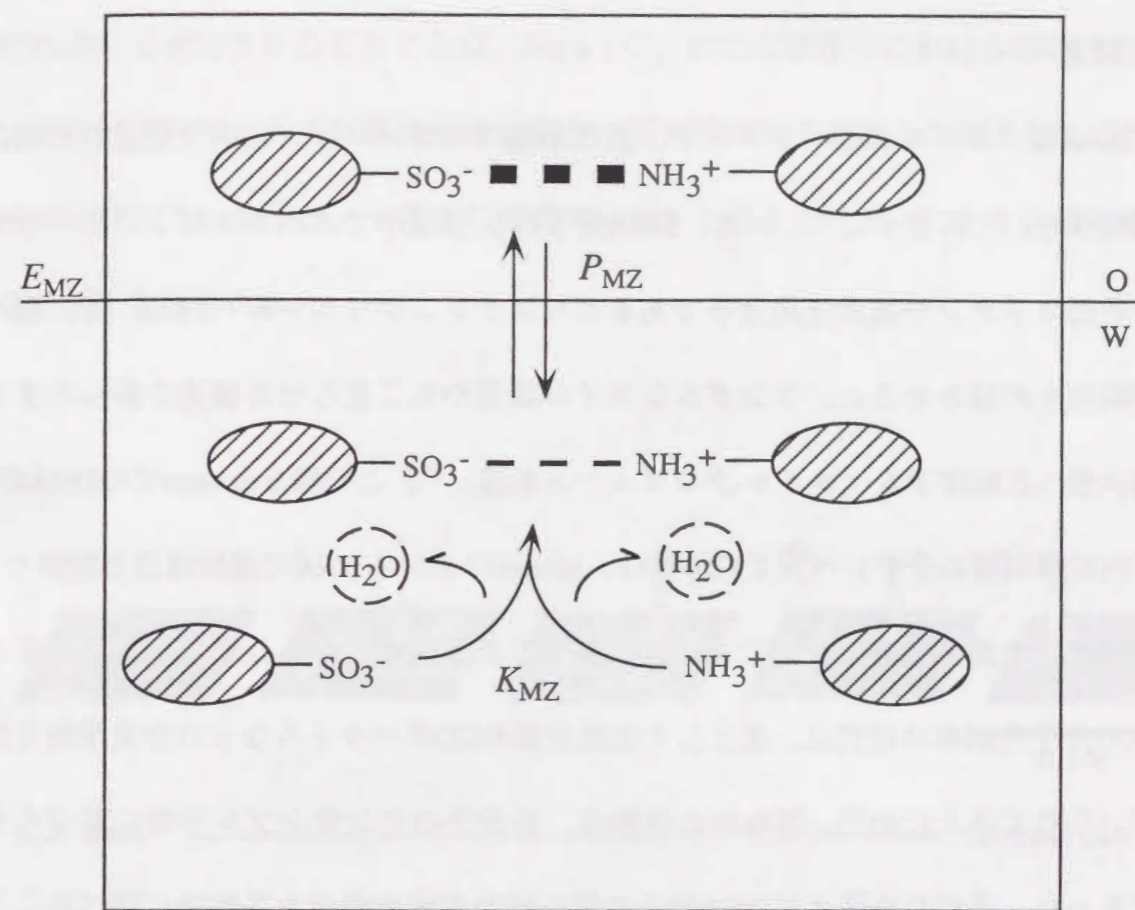


Fig. 3-6 Schematic Model of Ion-Pair Partition Process of Methyl Orange with Aminoalkanols and Alkylamines.

SO_3^- represents methyl orange anion and NH_3^+ represents aminoalkanol and alkylamine cations. The bold discontinuous line in the ion-pair complex in the octanol phase indicates stronger ionic attraction than in the aqueous phase.

4-1 緒言

DNAは、ウイルスやバクテリア、真核細胞中でコンパクトに折り畳まれた構造(凝縮状態)で存在する¹⁶⁾。一方、DNA分子は、溶液中でスペルミジンのような低分子多価カチオンや親水性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)等、種々の凝縮剤を作用させると、ランダムなコイル状態から二重らせん構造を保ったまま凝縮状態へと転移する(コイル-グロビュール転移)¹⁷⁾。この様なin vitroでのDNAの分子内転移機構の分子レベルでの解明は、in vivoにおけるDNAの凝縮構造と複製や転写機構との関係を考える上でも非常に重要であると考えられる。しかしこれまでDNAの分子内転移の研究は、主として光散乱法やCDスペクトルなどの分光学的方法が用いられてきたため¹⁸⁾、得られる情報は、多分子のアンサンブル平均に基づくものであった。そのため個々のDNA分子の動的特性や構造変化を系統的に調べるのが困難であった。また、DNA分子像を得るには通常電子顕微鏡が用いられてきたが、静的な微細構造に関する情報を得るには適しているが、溶液中の動的挙動を観察するには不適である。

本研究では、これらの問題点を解決する方法として、蛍光顕微鏡による直接観察法を用いた。約10年前、柳田らは、DNA分子が蛍光顕微鏡により可視化できることを見いだした¹⁹⁾。二重らせんを形成しているDNAは、その横断面の直径は約2nm(20Å)しかないが、細胞内のDNAは、長さ方向では数μm~数mmと充分可視化できる大きさであることが分かる。そこでDNA分子を蛍光染色して励起光を照射して

分子を発光させると分子像が可視化できる。蛍光顕微鏡法によれば、個々のDNAの溶液中のコンフォメーションを直接観測することができ、しかも単分子上で起こる変化の過程を追跡することもできる。Fig.4-1に、PEG水溶液中におけるDNA 1分子のコイル-グロビュール転移の経時変化を、蛍光顕微鏡で観測した例を示した²⁰⁾。コイル状態のDNA分子が、一端から紐をスルスルと巻き上げていくように縮んでいく様子が示されている。

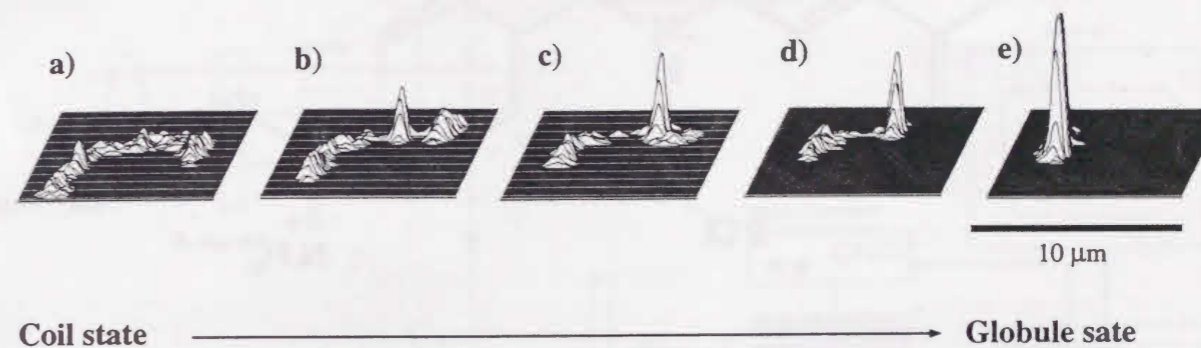


Fig. 4-1 Time Process of Coil-Globule Transition on a Single Duplex T4DNA Molecule.

Time interval between the successive frames is ca. 2sec.

本章では、蛍光顕微鏡法により、長鎖DNA(T4ファージDNA、166kbp、全長57μm)の単分子観察を行ない、これまで明らかになっていなかった二価カチオンであるジアミノアルカン $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n=1\sim 6$)のDNA凝縮作用を調べた。

4-2 実験の部

T4ファージDNAは、株式会社ニッポンジーンから購入した。蛍光色素4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、Fig.4-2)と抗酸化剤2-mercaptoethanol (2-ME)は、和光純薬株式会社から購入した。他の試薬は、市販の特級品を用いた。

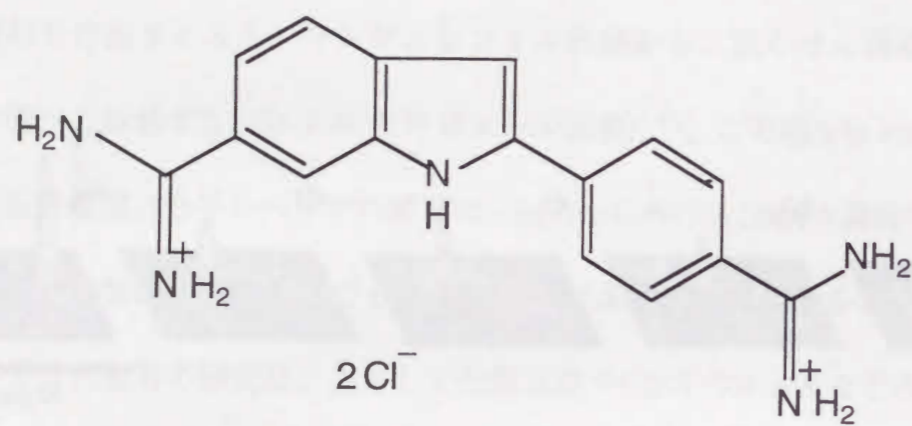


Fig. 4-2 Structure of DAPI.

試料の調製

試料のDNAは、NaCl (40mM), DAPI (0.6 μM), 2-ME (4%)を含むpH5.3および7.2のTris-HCl緩衝溶液(45mM)に溶解し、ジアミンを添加して蛍光顕微鏡下で20°Cにおける溶液中のDNA分子の動的形態を直接観察した。DNAの濃度は、ヌクレオチド単位で0.6 μM である。また、DNAとDAPIのモル濃度比は1:1で、この濃度比ではDNAの長さに影響を与えないことが確かめられている²¹⁾。

蛍光顕微鏡による測定

Fig.4-3に蛍光顕微鏡測定装置を示した。蛍光顕微鏡はCarl Zeiss社のAxiovert135Vを用いた。観察像は高感度SITカメラC2400 (浜松ホトニクス社)により撮影し、ビデオ録画した。DNAの長軸長と流体力学的半径の測定にはArgus50を用いた。DAPIの最大励起波長は365nm、最大発光波長は450nmである。

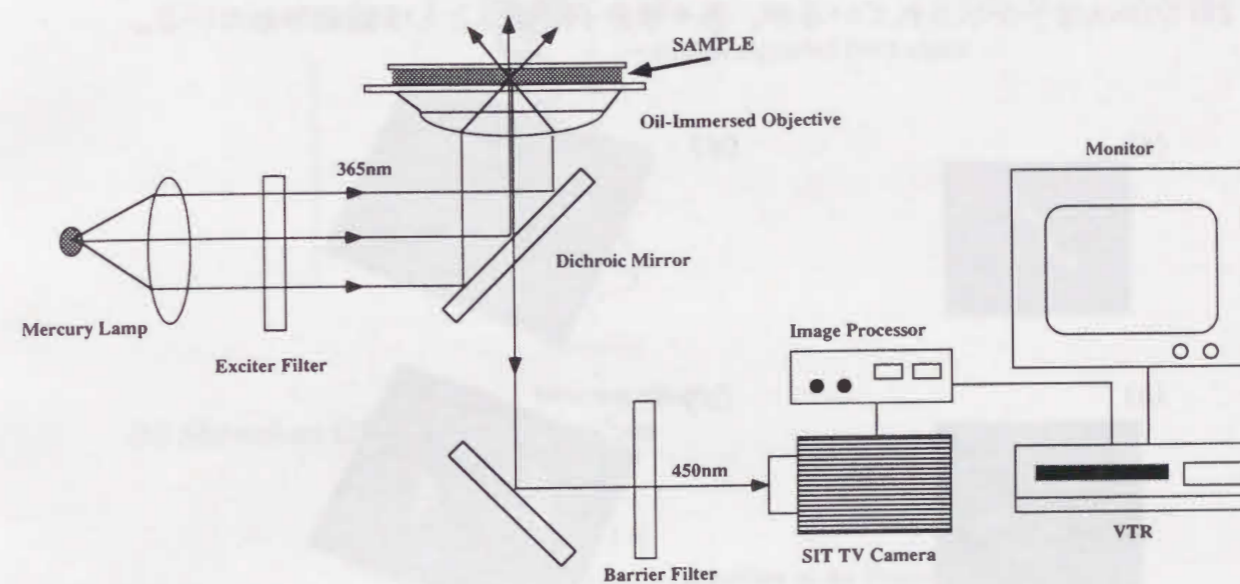


Fig. 4-3 Schematic Diagram of the Experimental Apparatus.

4-3 結果

Fig.4-4にジアミンが存在するときと存在しないときのDNAの蛍光像と蛍光強度を示した。この図の(a)は、ジアミンが存在しない場合で、DNA1分子がコイル状に広がっているのを示している。また(b)の20mMのジアミノエタン (n=2) 存在下では、DNA2分子の像を示しているが、各々のDNA分子は、僅かに縮む傾向はあるが(a)と同様にコイル状態である。一方、(c)の20mMのジアミノプロパン (n=3) 存在下では、2個のDNA分子が示されているが、各々単分子凝縮体として観測されている。

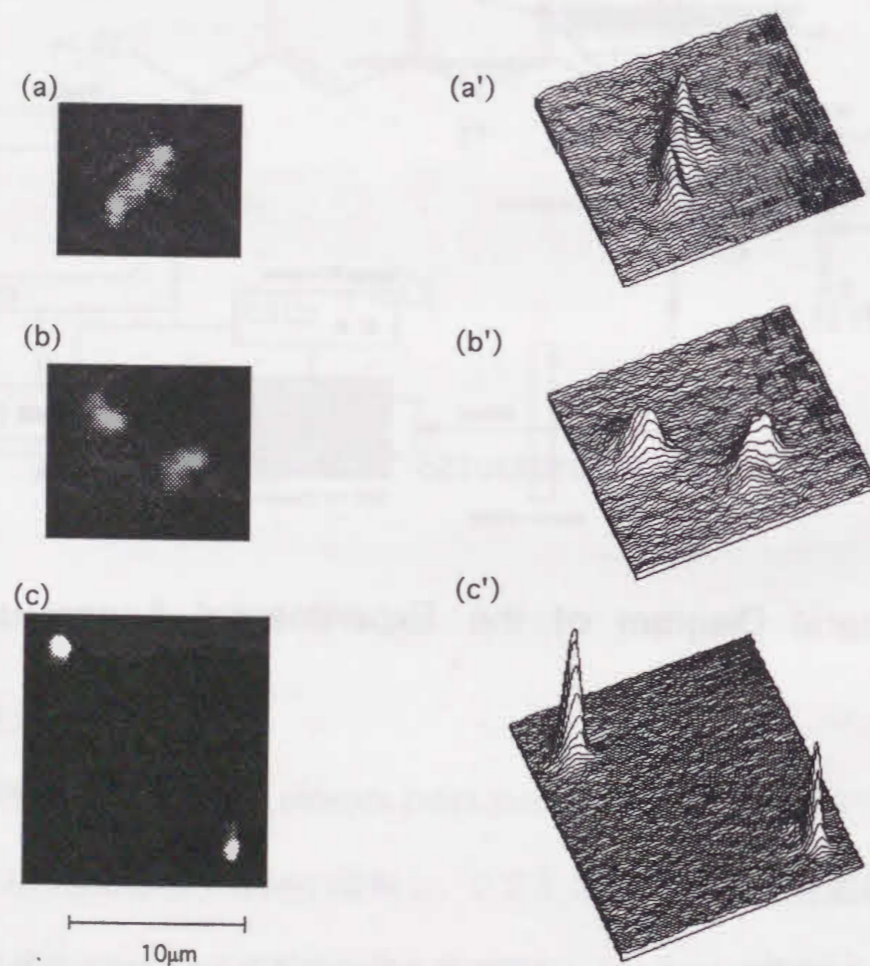


Fig. 4-4 Fluorescent Images (left side) of Individual T4 DNA and the Corresponding Light Intensity Distributions (right side).

(a) and (a'), in 45mM Tris-HCl buffer solution with 40mM NaCl at pH7.2; (b) and (b'), with the addition of 20mM diaminoethane to the buffer solution; (c) and (c'), with the addition of 20mM diaminopropane to the buffer solution.

蛍光色素DAPIによるにじみの影響を考慮してFig.4-4の蛍光像とマイクロなDNA鎖の形態との関係を模式的に示すとFig.4-5のようになる。

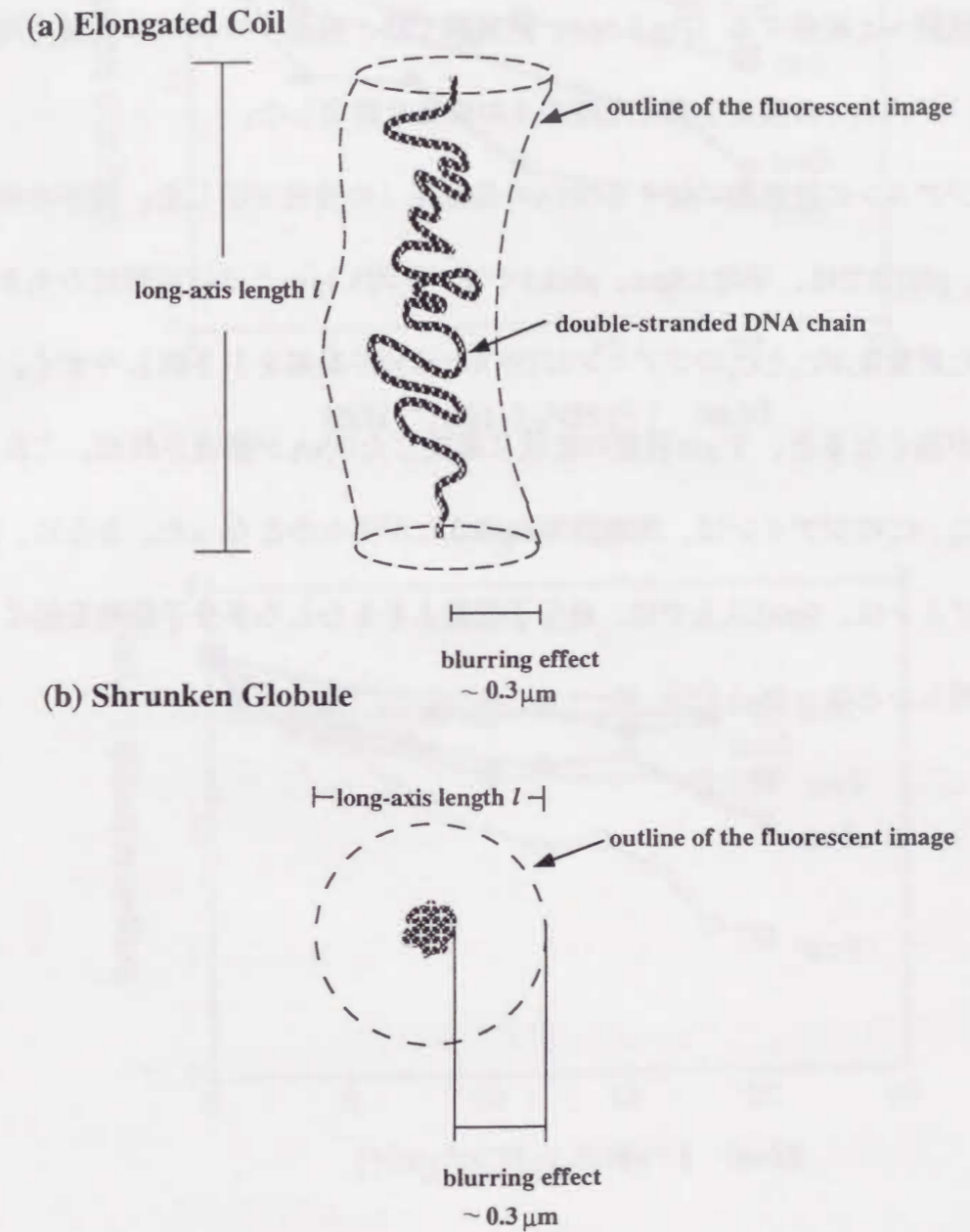


Fig. 4-5 Schematic Illustration of the Fluorescent Image of Double-Stranded T4DNA Molecules.

二重らせんのDNAは、蛍光顕微鏡下では、蛍光色素DAPIの発光等に起因する滲みの影響が $0.3\mu\text{m}$ 程度あるため²²⁾、点線で示したような像として1本のコイル状に見える (Fig.4-5(a))。これに凝縮剤を加えると二重らせんを保持しながら凝縮 (グロビュール) 状態へと転移する (Fig.4-5(b))。実験では、溶液中のDNAの長軸方向の長さを l とし、ジアミンの濃度を変えた時の l の変化を測定した。

Fig.4-6にジアミンの炭素数に対するDNAの長軸長 l の変化を示した。緩衝溶液中での長軸長は、pH7.2では、平均 $3.5\mu\text{m}$ 、pH5.3では、平均 $3.3\mu\text{m}$ とほぼ同程度の大きさを示した。また炭素数が C_3 と C_5 のジアミンはDNAの単分子凝縮を引き起しやすく、ジアミンの濃度が高くなると、 $1\mu\text{m}$ 程度の粒状に凝縮したDNAが観測された。これに対して、 C_2 、 C_4 、 C_6 のジアミンは、凝縮作用に劣るとが明らかとなった。さらに、炭素数が C_4 のジアミンは、 5mM 以上では、単分子凝縮よりもむしろ多分子凝縮を起こしやすいことも明らかとなった。

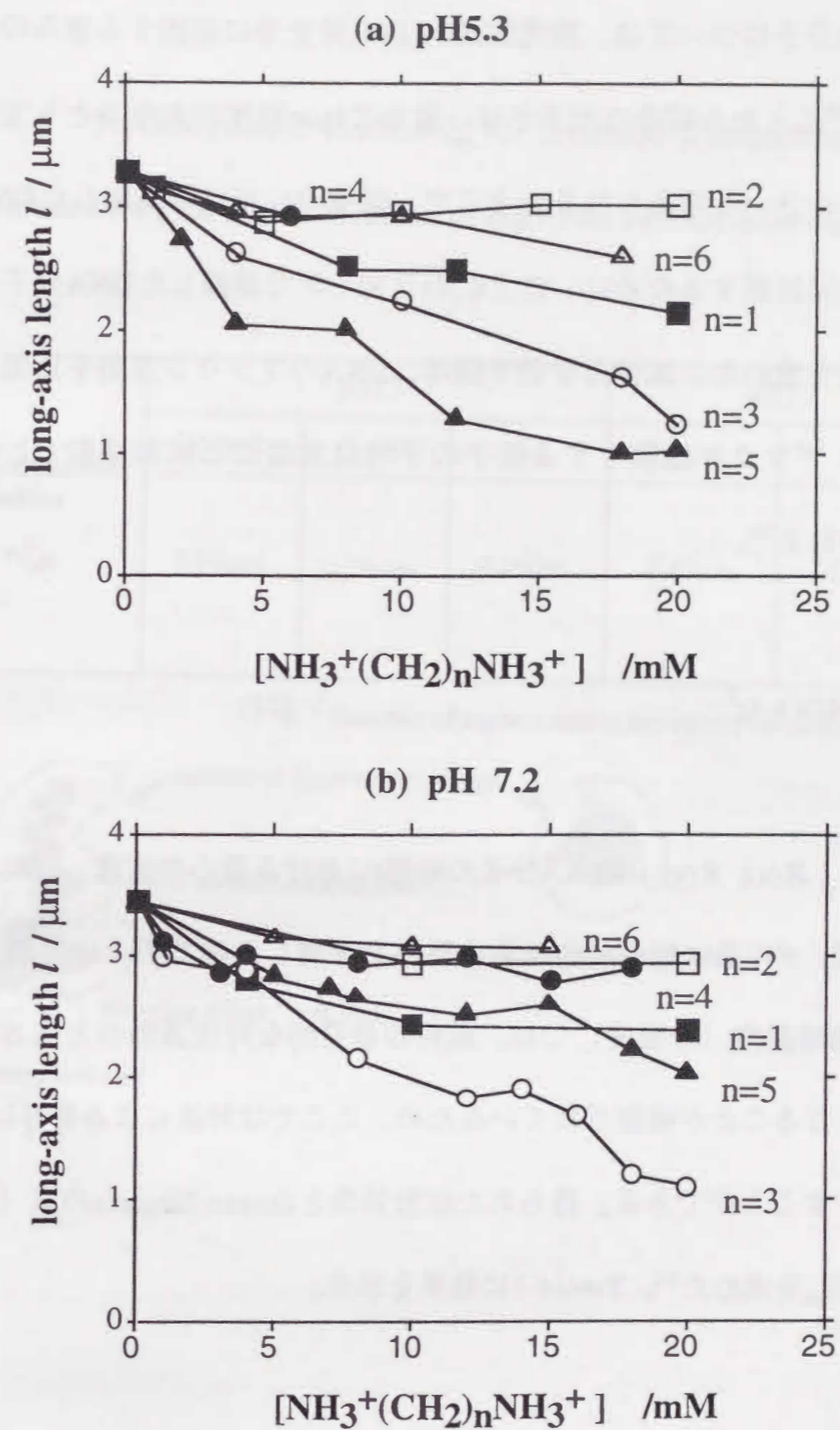


Fig. 4-6 Change of Long-Axis Length of T4DNA with the Concentration of Diamines.

凝縮したDNA分子については、蛍光色素DAPIの発光等に起因する滲みの影響が、 $0.3\mu\text{m}$ 程度ある²⁰⁾ことから実際の大きさは、蛍光で $1\mu\text{m}$ 程度の大きさとして観測されるよりもかなり小さいと考えられる。そこで、溶液中における凝縮したDNA分子の大きさを定量的に評価するために、 C_3 と C_5 のジアミンで凝縮したDNA分子について流体力学的半径を求めた。流体力学的半径は、DNAのブラウン運動を計測することにより求めた。ブラウン運動をする粒子の平均自乗偏位と拡散係数 D との関係は(24)式で示される²³⁾。

$$\langle(R(t)-R(0))^2\rangle = 4Dt + At^2 \quad (24)$$

ここで、 $R(t) = (R(x), R(y))$ はDNA分子の時間 t における重心の位置、 $\langle(R(t)-R(0))^2\rangle$ は平均自乗偏位、 t^2 の項は観測時の対流の寄与を考慮した項である。実際、各々のDNA分子の観測時間内(分程度)では、試料の自発的な対流運動の方向および速度は、ほぼ一定となることが確認されているため、ここでは対流による寄与は t^2 に比例しているとみなすことができる。得られた拡散係数とStokes-Einsteinの式(25)から流体力学的半径 ξ_H を求めた²⁴⁾。Table4-1に結果を示す。

$$\xi_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s D} \quad (25)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 η_s は溶媒の粘度である。

Table 4-1 Hydrodynamic Radius ξ_H for Diamine Compacted T4DNA.

ξ_H was estimated from the Brownian motion of individual T4DNA molecules.

Hydrodynamic Radius $*\xi_H$	pH5.3			pH7.2	
	Control	n=3	n=5	Control	n=3
	0.60 μm	0.18 μm	0.19 μm	0.63 μm	0.16 μm

n : Number of carbon atoms between two amino groups

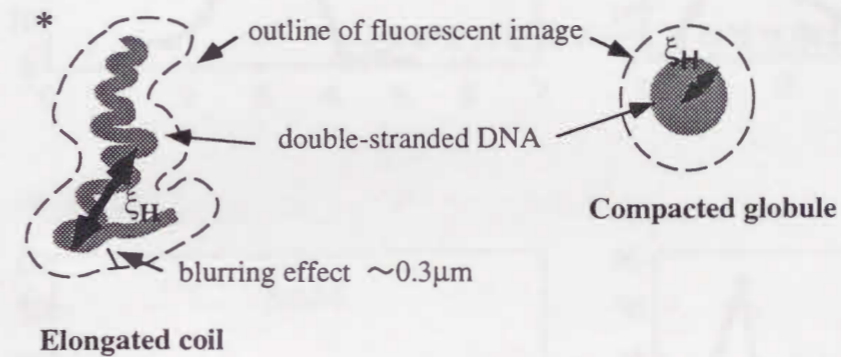


Table4-1において、炭素数が C_3 と C_5 のジアミンで凝縮したDNA分子の流体力学的半径は、約 $0.2\mu\text{m}$ である。一方、Fig.4-6に示したように、直接蛍光像からは凝縮DNA分子の大きさは $0.8\sim 1.0\mu\text{m}$ 程度として観測されるが、にじみの影響 $0.3\mu\text{m}$ (Fig.4-5)を考慮してその分を差し引いて計算すると $(0.8\mu\text{m} - (0.3 \times 2)\mu\text{m} = 0.2\mu\text{m})$ となり、拡散係数から求めた流体力学的半径の値とよく一致する。

次に、ジアミノプロパン ($n=3$) について、各濃度ごとの長軸長 l の分布を調べた (Fig.4-7)。ジアミンの濃度が高くなるにつれて、DNAのコイルの長さが徐々に縮み、 8mM の濃度では、コイルと凝縮体 (グロビュール) が共存していることが明らかとなった。その後さらにコイル状態のDNAの長さが縮み、グロビュールの比率が高くなって、 20mM では殆どグロビュール状態になった。

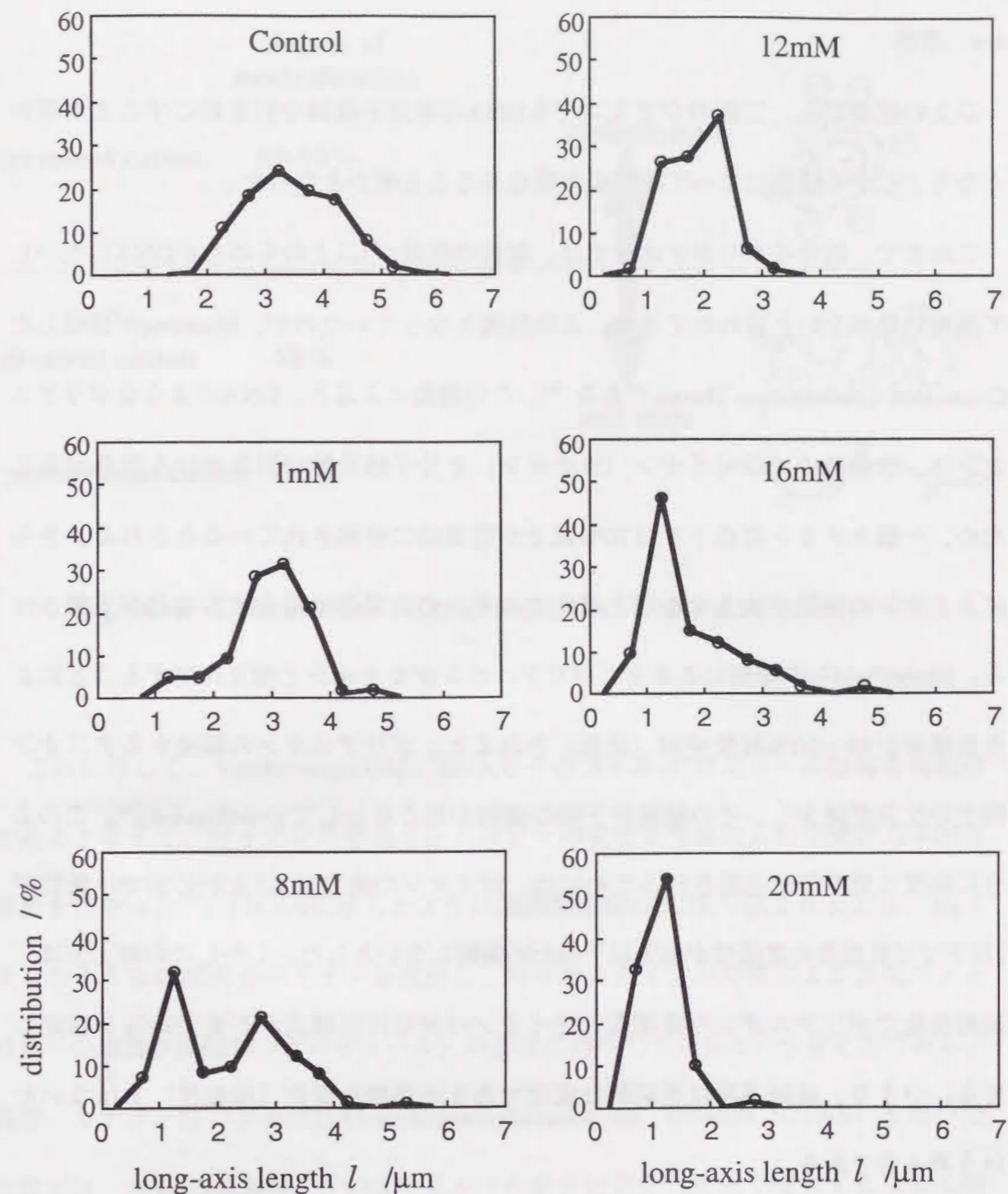


Fig. 4-7 Distribution of the Long-Axis Length of T4DNA at Various Diaminopropane Concentrations (pH7.2).

4-4 考察

以上の結果から、二価のジアミンでもDNAの単分子凝縮を引き起こすことが明らかとなり、しかも構造によって凝縮能が異なることも明らかとなった。

これまで、低分子ポリカチオンでは、電荷の価数が3以上のものしかDNAにたいして凝縮効果がないと言われてきた。この根拠となっていたのが、Manningが提唱した Counterion Condensation Theory である²⁵⁾。この理論によると、DNAのようなポリアニオンは、水溶液中では対イオン（カチオン）を分子鎖近傍に引きつける効果があるため、一価カチオン存在下では70%以上が電気的に中和されているとされる。さらにカチオンの価数が大きくなるとポリアニオンの負電荷は減少することが予想される。Bloomfieldらの推測によると、ポリアニオンがカチオンと相互作用することにより負電荷が89~90%程度中和（遮蔽）されると、ポリアニオンの隣接するアニオン同士の反発が減少し、その結果分子鎖の凝縮が起こるとしている(Fig.4-8)²⁶⁾。このように高度に負電荷が遮蔽されるためには、対イオンの価数は3以上が必要で、価数が2以下では負電荷の遮蔽度が88%以下のため凝縮しないとされた。しかしこの考え方は、凝縮前後でポリアニオンの負電荷と対イオンの相互作用様式が不変であると仮定している。つまり、凝縮過程は連続的な変化であり不連続な変化（相転移）ではないという考え方である。

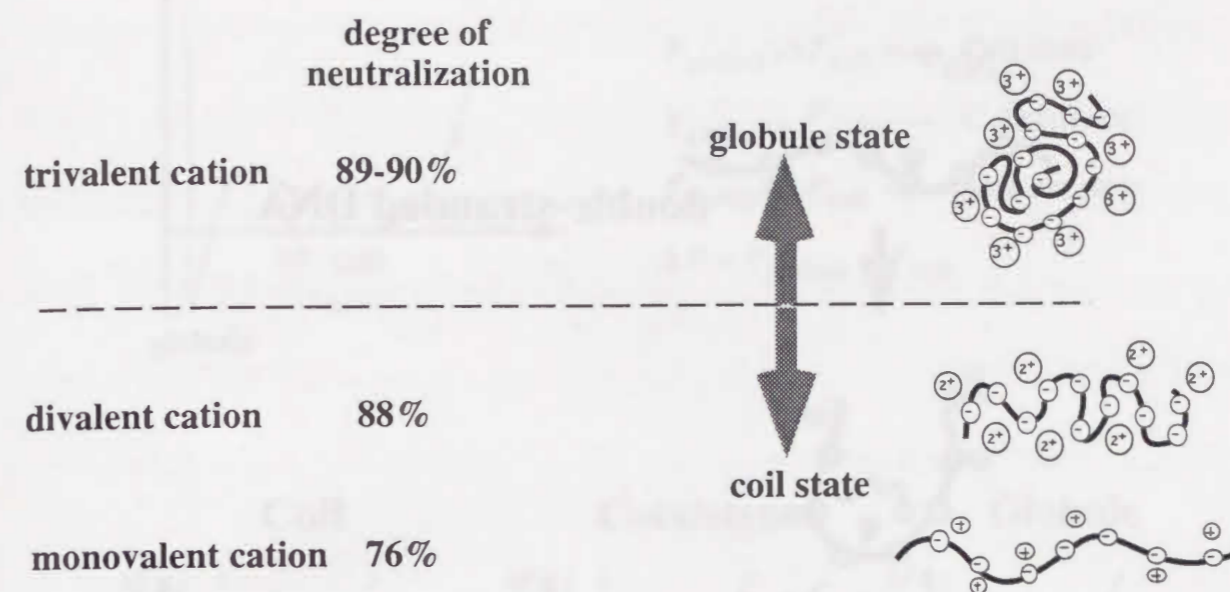


Fig. 4-8 Counterion Condensation Theory.

これに対して、Vasilevskayaらは、DNA分子のコイル-グロビュール転移を相転移であると考えて、対イオンの並進エントロピーの変化を考慮に入れて統計力学的な解析を行なった²⁷⁾。Fig.4-9に示したように凝縮剤がDNAに取り込まれるとき、Naイオンのような溶媒成分のイオンを放出し、対イオンのイオン交換による並進エントロピーの増加が凝縮体（グロビュール）の形成に寄与しているという考え方である。実際、カチオン性の界面活性剤cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を用いた実験では、DNAの凝縮時にCTABの見かけの結合定数が二桁近く増大することも明らかになっている²⁸⁾。

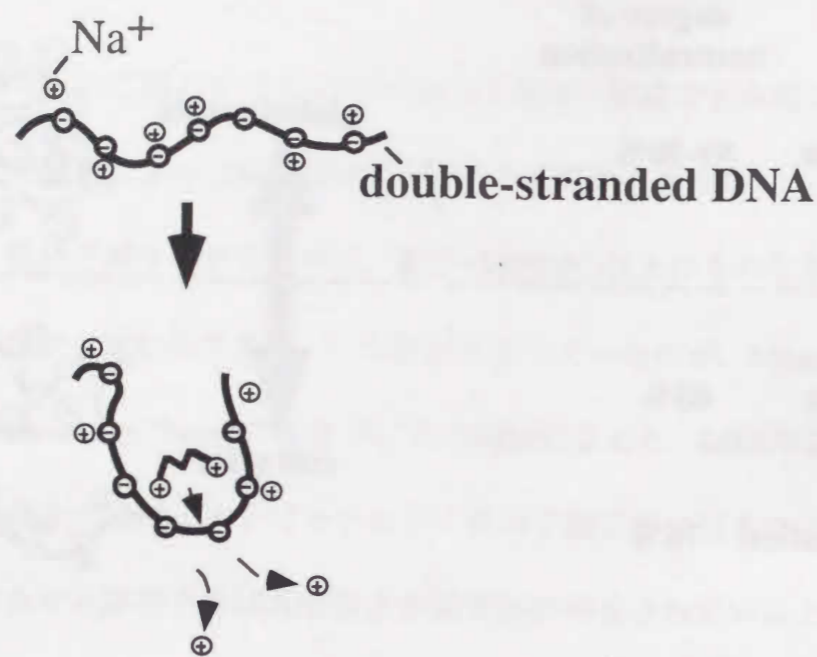


Fig. 4-9 Ion-Exchange Reaction

Fig.4-10は、吉川、高橋らがこの理論に基づいてシミュレーションを行い、イオンの価数による凝縮の仕方の違いを示したものである²⁹⁾。横軸に分子の広がり α 、縦軸に自由エネルギー変化 ΔF をとって、自由エネルギー曲線で模式的に示した。 α はガウス鎖（理想鎖）を基準とした分子鎖の広がりを出すパラメーターであり、 $\alpha > 1$ または $\alpha \approx 1$ であれば分子鎖はコイル状態、 $\alpha \ll 1$ であればグロビュール状態であることを表している。 ΔF の2つの極小値は、それぞれコイル状態とグロビュール状態を示している。この図から、二価でもグロビュールになり、しかもコイルとグロビュールが共存する状態が存在することが予想できる。三価や四価との違いは、二価の場合、コイルの長さも徐々に短くなっていく点である。そのため、見かけ上、徐々に短くなっていくように見える。三価や四価は、コイルとグロビュールが共存する濃度領域が狭く、一次相転移が明確に認められる。

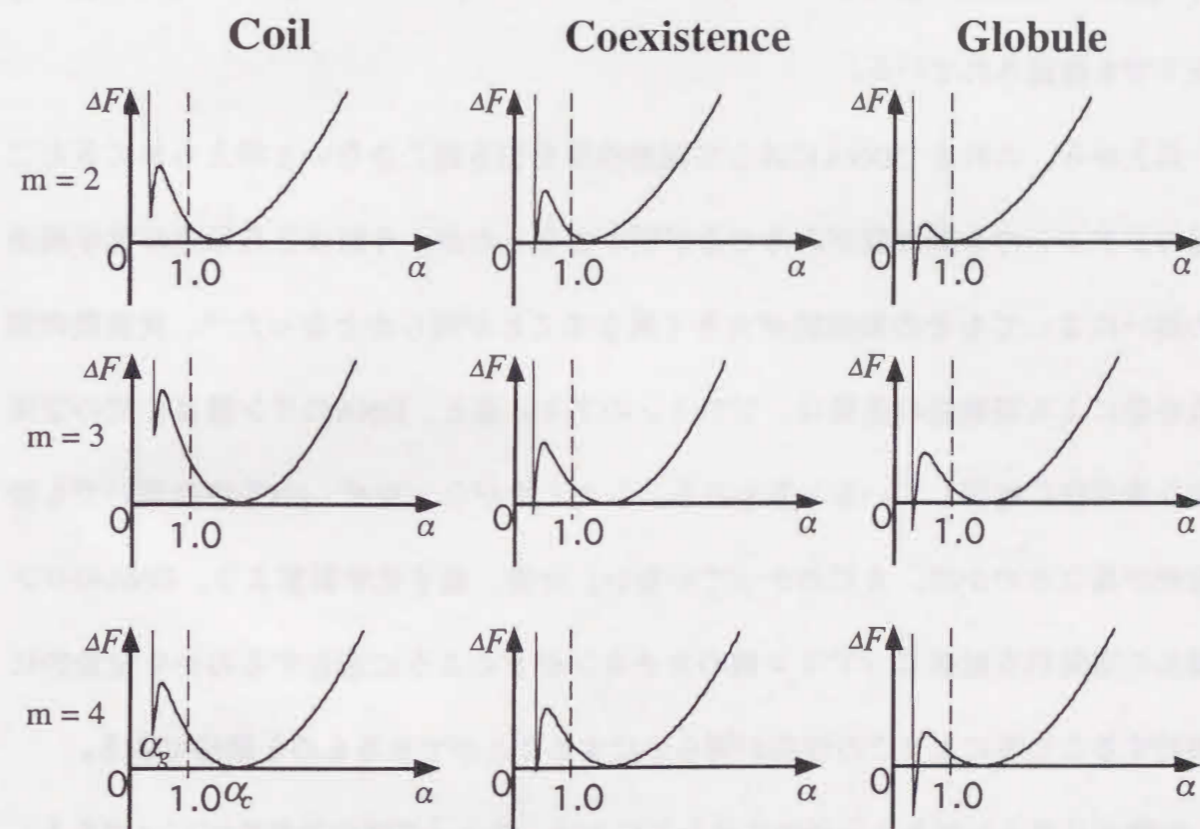
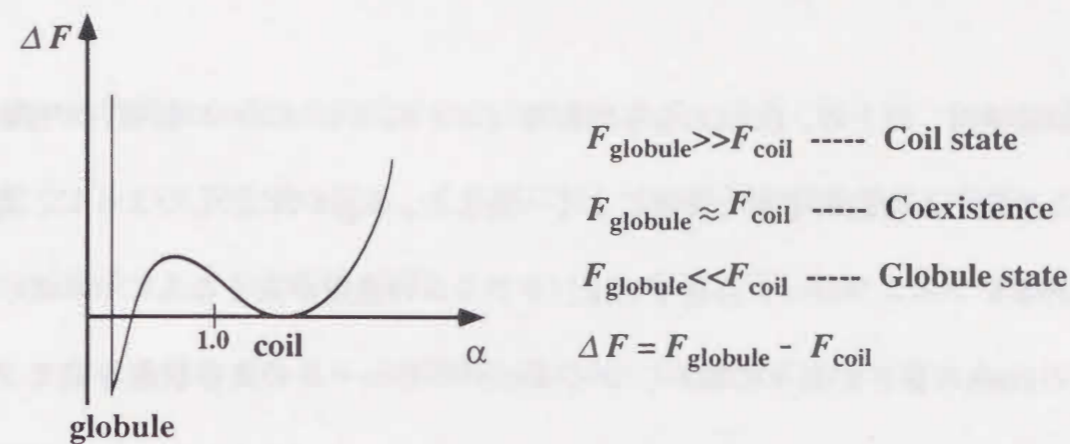


Fig. 4-10 Free Energy Profile of Coil-Globule Transition. m represents the valency of cations.

本実験結果は、以上の、DNAの分子内転移（コイル-グロビュール転移）が相転移であると想定した理論的考察と非常によく一致した。Fig.4-7に示したように、凝縮作用のあるジアミノプロパン存在下では、ジアミンの濃度が高くなるにつれて、コイル状のDNAの長さが徐々に縮み、コイルとグロビュールの共存状態を経てグロビュール状態になった。DNAの単分子凝縮過程におけるコイルとグロビュールの共存状態は、凝縮剤であるポリエチレングリコール³⁰⁾、ポリアルギニン³¹⁾、CTAB²²⁾存在下でも確認されている。

以上から、これまでDNAに対して凝縮作用を引き起こさないと考えられてきた二価のジアミンでも凝縮能があることが明らかとなったが、今回はさらにその化学構造の違いによってもその凝縮能が大きく異なることが明らかとなった³²⁾。炭素数の偶数奇数による凝縮能の差異は、ジアミンのアミノ基と、DNAのリン酸基の間の空間的な適合性に起因していると思われる。しかしながら、なぜ、pH条件の違いでも凝縮能が異なるのかは、まだわかっていない。今後、量子化学計算より、DNAのリン酸基の空間的な配置にジアミン側のカチオンがどのように適合するのかを定量的に解析すること等によりこの理由が明らかにすることができるものと期待できる。

生体ポリアミンである三価のスペルミジンは、アミノ基間の炭素数が3と4である。また四価のスペルミンは、炭素数が3、4、3である。Shuwalskeyらは、スペルミンによるDNAの多分子凝縮作用を調べ、スペルミンの中央の炭素鎖（炭素数=4）がDNA分子間の結合の橋渡しをしていると報告している³³⁾。本実験でも炭素数がC₄のジアミノブタンは、他のジアミンに比べてDNAの多分子凝縮を引き起こしやすいことが示された。ポリアミンは、生体においてDNAをはじめとする生体高分子に作用

して種々の特異的な活性を発現することが知られている³⁴⁾。例えば、DNAの構造の安定化やタンパク質合成の促進、生体膜に対しては物質の膜透過性の促進、さらに細胞増殖因子としての作用等が報告されている。本章で示したようなin vitroでの研究は、生体におけるポリアミンの役割を考える上でも重要であると考えられる。

5-1 緒言

ダウノマイシンは、アントラサイクリン系の抗癌作用を有する抗生物質である (Fig.5-1)。その作用機序は、二重鎖DNAにインターカレートしてDNAの複製や転写活性を阻害すると考えられている³⁵⁾。DNAとダウノマイシンの結合様式については、これまでにX線結晶解析等多くの研究報告があり、アントラサイクリンのB,C,D環がDNAの塩基対にインターカレートし、A環のシクロヘキセンからダウノサミンの部分がDNAの小溝 (minor groove) にそって配向していると考えられている (Fig. 5-2)³⁶⁾。

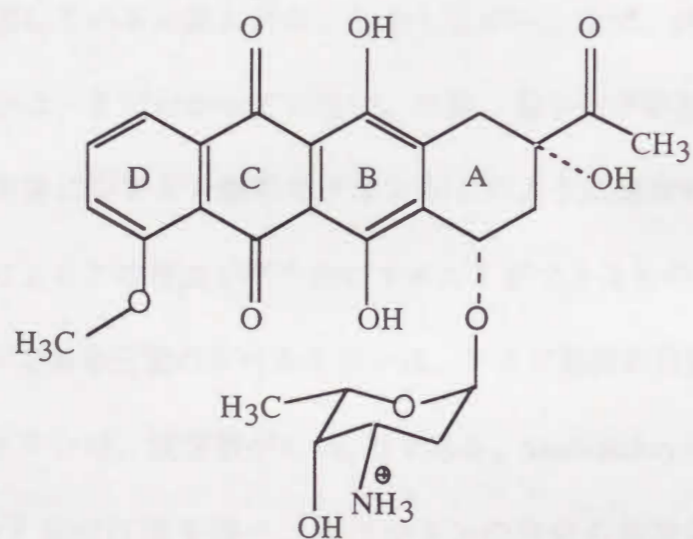


Fig. 5-1 Structure of Daunomycin.

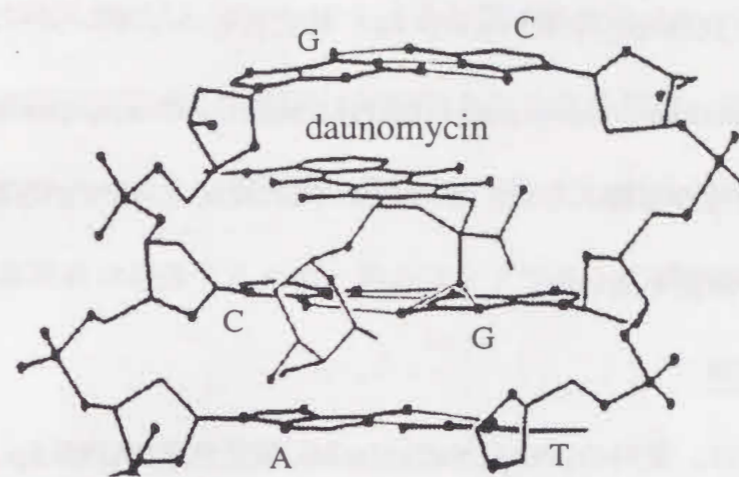


Fig. 5-2 Diagram of Daunomycin Intercalating into DNA Base-Pairs.

しかし多くの研究は、数塩基対からなるDNAのオリゴマーや部分的なDNAフラグメントとダウノマイシンとの相互作用を調べたもので、DNA、特に長鎖DNAの高次構造に対する影響はほとんど明らかになっていない。DNAは生体中でコンパクトに凝縮した状態で存在しており、ダウノマイシンがDNAの凝縮構造にどのような影響を及ぼすのかを知ることは、ダウノマイシンの薬理活性を考える上でも非常に重要である。

本研究では、ダウノマイシンのDNAの凝縮構造に与える影響を、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて *in vitro* におけるDNAの単分子観察により調べた。DNAの凝縮剤としては、生体ポリアミンであるスベルミジンを用いた。スベルミジンは、DNAの凝縮構造を安定化させ³⁷⁾、転写活性を強める²⁾と考えられている。

5-2 実験の部

T4ファージDNA (166kbp、全長 $57\mu\text{m}$) は、株式会社ニッポンジーンから購入した。蛍光色素4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)と抗酸化剤2-mercaptoethanol (2-ME) は、和光純薬株式会社から購入した。ダウノマイシンは、シグマから購入した。他の試薬は、市販の特級品を用いた。

蛍光顕微鏡による観測

蛍光顕微鏡実験では、試料のDNAはNaCl(60mM), 蛍光色素DAPI($0.6\mu\text{M}$), さらに抗酸化剤の2-ME(4%)を含むpH7.2のTris-HCl緩衝溶液(10mM)に溶解した。DNAの濃度は、ヌクレオチド単位で $0.3\mu\text{M}$ で、蛍光色素DAPIとの濃度比は1:1にした。これにスペルミジンを加えDNAを凝縮させた。このように調製したDNA溶液にダウノマイシンを加えて、蛍光顕微鏡下で溶液中のDNA分子の動的形態を直接観測した。蛍光測定は、第4章と同じ方法で行なった。

電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡実験では、蛍光色素と2-MEを除いて同じ条件で試料溶液を作成し、以下の手順により観察した。

1. コロジオン膜を張った銅グリッドにカーボン蒸着して支持膜を作成。
2. 1で作成した支持膜の表面をグロー放電により親水化処理する。
3. 1%酢酸ウラン溶液と試料溶液をそれぞれ $20\mu\text{l}$ 程度とり、パラフィルム上に別々に滴下。
4. 2で作成したグリッドを膜を下にして試料溶液側に浮かべ、3分程度待った後、グリッドをすくい上げてろ紙で軽く排水する。

5. 滴下した酢酸ウラン溶液上に4のグリッドを浮かべて10秒以内にグリッドをひきあげて軽く風乾し、グリッドを透過型電子顕微鏡にセットして観察する。

以上の1~5の手順で作成した試料上に照射された電子線は、試料の周辺にふりかけられた酢酸ウランのような重元素の存在する部分では散乱されて透過せず、軽元素から成る生体試料は透過するため、負のコントラストで観察される(ネガティブ染色法)。

5-3 結果と考察

蛍光顕微鏡下でのダウノマイシンのDNA単分子凝縮体への影響の直接観察

Fig.5-3は、単分子DNAの蛍光像と蛍光強度を示したものである。スペルミジンが存在しないときは、個々のDNA分子はFig.5-3のaに示したようにコイル状態で存在するが、300 μ Mのスペルミジン存在下では、二重らせん構造を保ったままbに示されるような1 μ m程度の大きさのDNAの単分子凝縮体に転移する。この状態で、ダウノマイシンをスライドガラス上で加えて拡散させ、経時的に観察すると、c,d,eに示したように凝縮体がほどけた像がみられるようになる。これまで、ダウノマイシンは、既に凝縮したDNAに対してはその高次構造に対して影響を与えないと考えられていたが³⁸⁾、このように凝縮したDNAに対しても影響を与えることが明らかとなった。

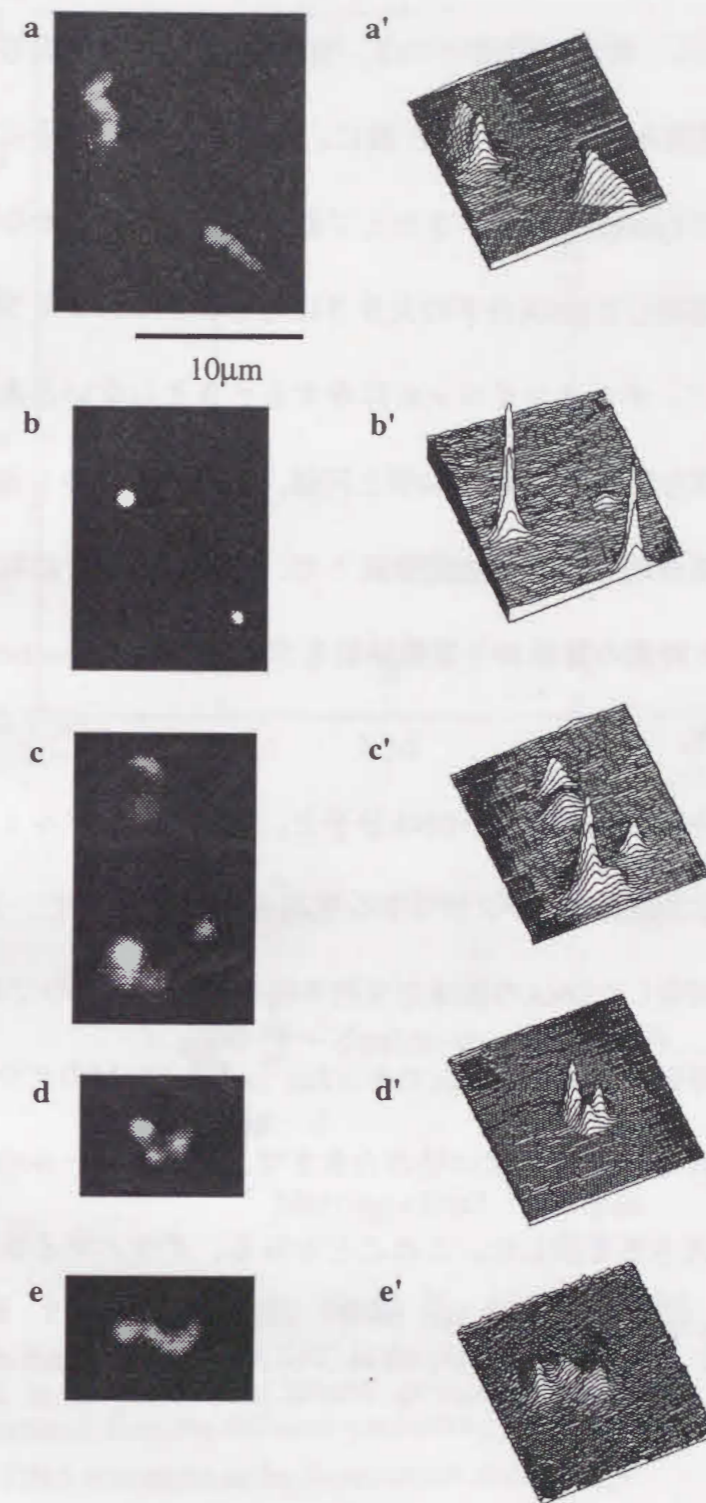


Fig. 5-3 Fluorescence Microscopic Images of Individual T4DNA Molecules Moving Freely in the Solution and Corresponding Pictures of Light Intensity.

(a) and (a'), coiled DNA molecules in the buffer solution containing 10 mM Tris-HCl and 60 mM NaCl at pH 7.2; (b) and (b'), 300 μ M spermidine-compacted DNA molecules; (c-e) and (c'-e'), elongated DNA molecules 40 min after the addition of daunomycin (final concentration, 20 μ M) to the compacted DNA.

二重らせんのDNAは、蛍光顕微鏡下では、蛍光色素DAPIの発光等に起因する滲みの影響が、 $0.3\mu\text{m}$ 程度ある。そのため、特に、凝縮したDNA分子については、実際の大きさは、蛍光で $1\mu\text{m}$ 程度の大きさとして観測されるよりもかなり小さいと考えられる。そこで、凝縮したDNA分子の大きさに対するダウノマイシンの影響を定量的に評価するために、ダウノマイシンが存在するときとしないときの流体力学的半径を比較した。流体力学的半径は、第4章と同様、DNAのブラウン運動を計測することにより求めた。具体的には、蛍光顕微鏡下で、ある時間内での粒子の移動した距離を測定し、距離と時間の関係から拡散係数を求め、Stokes-Einsteinの式から流体力学的半径を求めた²⁴⁾。

Fig.5-4は、緩衝溶液中のコイル状態のDNA分子と、 $300\mu\text{M}$ のスペルミジンで凝縮させたDNA分子、さらに $24\mu\text{M}$ のダウノマイシンを凝縮DNAに加えて、少なくとも2時間以上経過した後測定したDNAの流体力学的半径を比較したものである。

DNA凝縮体の流体力学的半径は $0.063\mu\text{m}$ であった。一方、 $24\mu\text{M}$ のダウノマイシンを加えた場合は、 $0.62\mu\text{m}$ になり、ほぼ10倍の大きさで、コントロールのコイル状態のDNAとほぼ同程度の大きさを示した。このことから、ダウノマイシンがDNA凝縮体を引き延ばすことが明らかとなった。

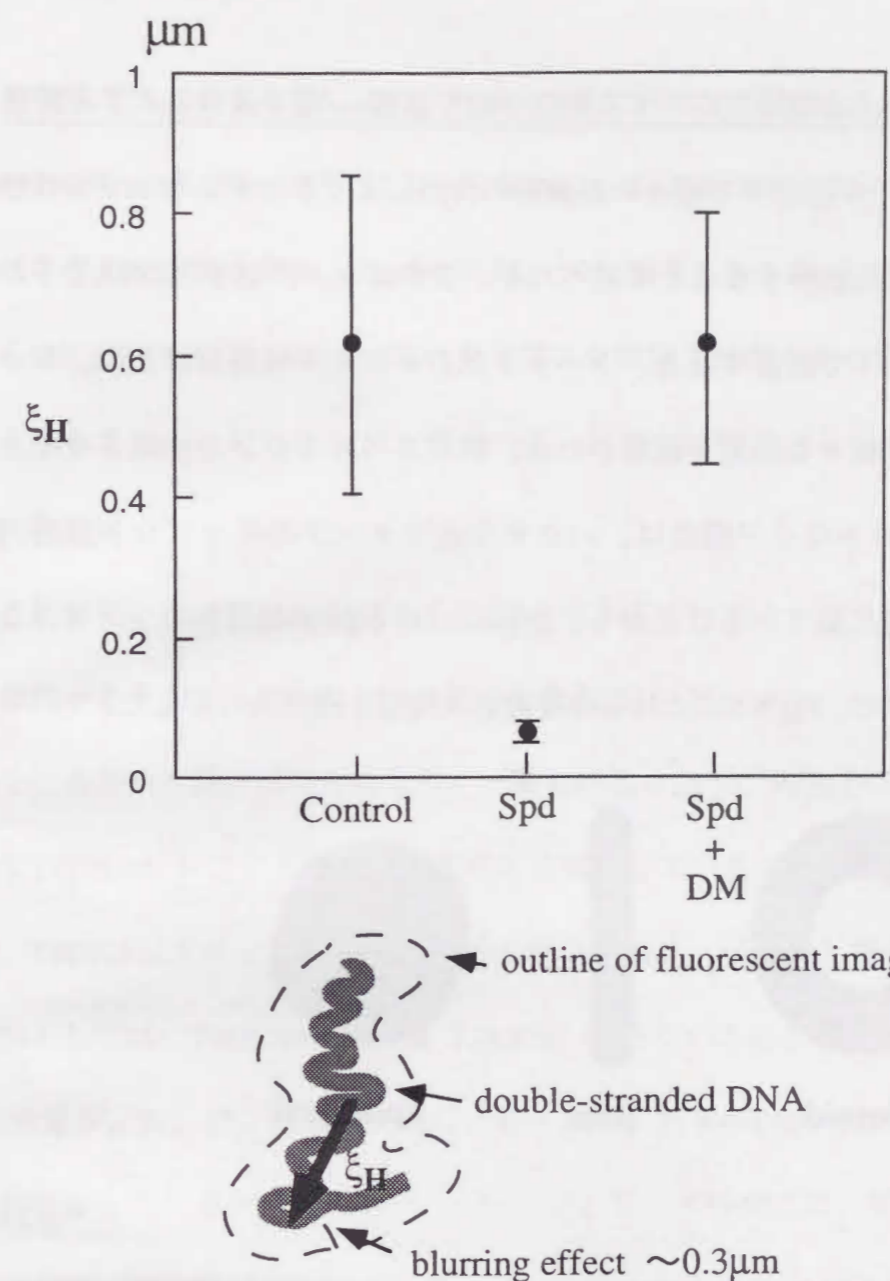


Fig. 5-4 Hydrodynamic Radii ξ_H of T4DNAs.

Control, in the buffer solution; Spd, in the presence of $300\mu\text{M}$ spermidine; Spd + DM, in the presence of $300\mu\text{M}$ spermidine and $24\mu\text{M}$ daunomycin. ξ_H was obtained from the diffusion constant for the Brownian motion of individual DNA molecules under fluorescence microscopy.

第4章で、DNA分子が溶液中で種々の凝縮剤の作用によりランダムなコイル状態からグロビュール状態に移転することを述べたが、グロビュール状態のDNA分子の高次構造を電子顕微鏡下で観察すると、ドーナツ状のトロイド構造をはじめ、ロッド状、不定形球状等、様々な形態が観察される。特にスペルミジン作用させたときに観察されるDNAのトロイド構造は、バクテリオファージのキャプシド頭部内のDNAの折り畳み構造に似ていることから、生体におけるDNA凝縮体のシンプルなモデルとして注目された。Fig.5-5にこれらの凝縮高次構造を模式的に示した。

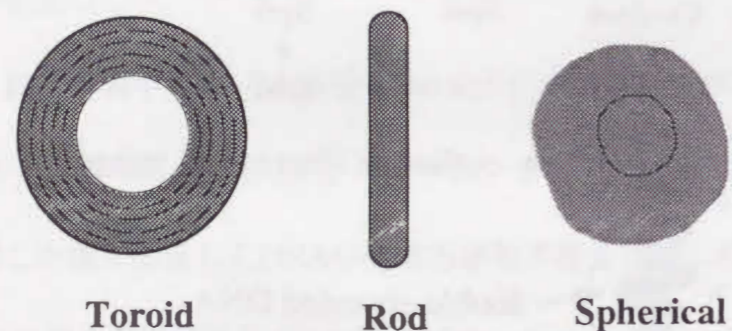


Fig. 5-5 Schematic Illustration of Compacted Globular DNAs.

本実験では、まず最初にスペルミジン作用させ、T4DNAを凝縮させた。コイル状のT4DNAはスペルミジンによって凝縮し、Fig.5-6に示したようなドーナツ状のトロイド構造が観察される。Fig.5-6のaは、300 μ Mのスペルミジン作用させたとき、さらにFig.5-6のb,cは、600 μ Mスペルミジン作用させたときのT4DNAのトロイド構造を示している。スペルミジン濃度が高いほどより密に詰まったトロイド構造が認められた。

これまで、数十キロ塩基対以下のDNA分子についてはトロイド構造に関する多くの報告があるが³⁹⁾、本研究で用いたような長鎖DNA (166キロ塩基対) がトロイド構造をとるといふ報告はほとんどない。著者が知る限り、1975年にLaemmliがポリリジンでT4DNAがトロイド構造をとることを報告しているのみである⁴⁰⁾。さらにこれまで、T4DNAはトロイド構造等規則的な構造を形成しにくいと考えられてきた。その理由としては、T4DNAのGC含量 (34.5%) が少ないためとされている。Reichらは、GC含量が、31、42、71%のDNAについて調べ、31%のDNAでは規則的な構造が検出されなかったと報告している⁴¹⁾。これに対して、本研究では、明らかにT4DNAがスペルミジンの作用により凝縮してトロイド構造をとることが認められ、しかもトロイドの大きさは、50~120nm程度で、数十キロ塩基対以下のDNA分子で報告されているトロイドの大きさと同程度であることも明らかとなった。しかし、トロイド構造がどのような過程を経て形成されるかはまだ明らかになっていない。今後、単分子観察法を活用し、DNAの"凝縮過程"や"巻き戻し過程"を詳細に調べることによりその機構がより明確になるものと期待される。

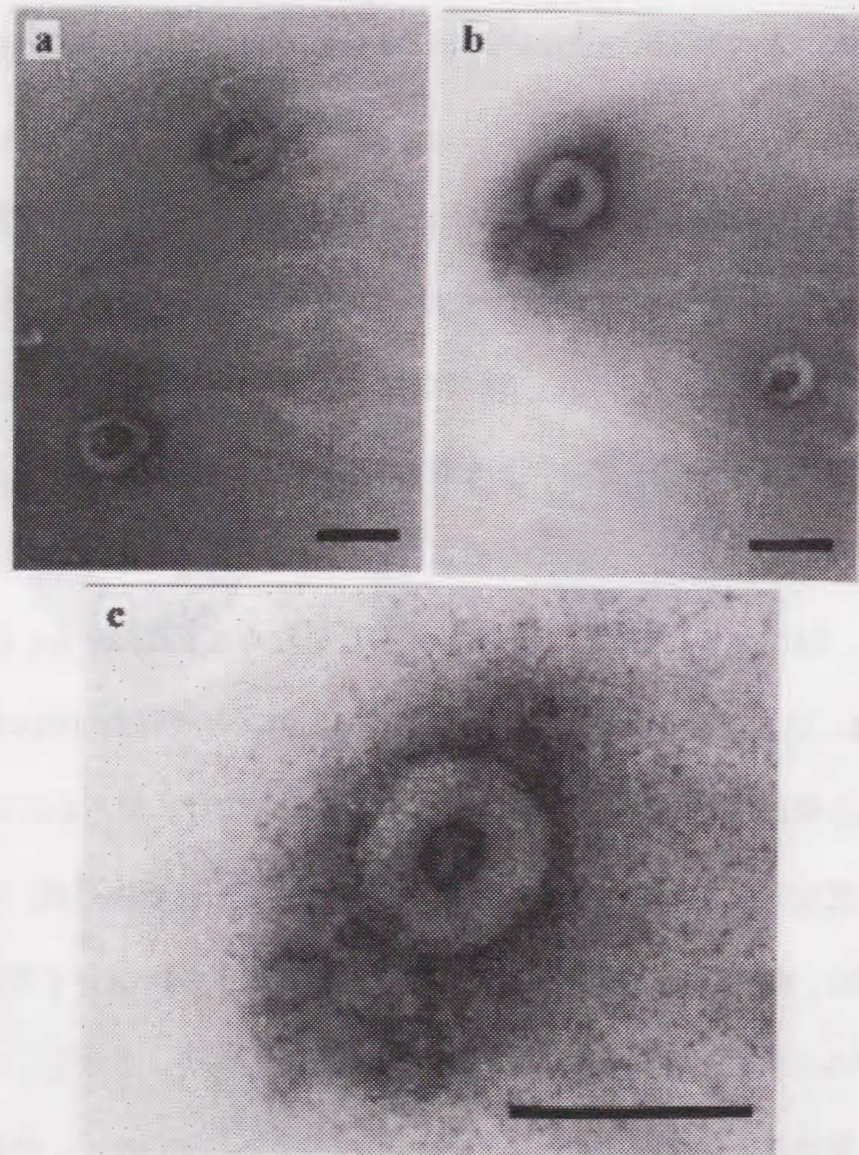


Fig. 5-6 Electron Micrographs of Spermidine-Compacted T4DNA. All DNA preparations were contrasted with 1% uranyl acetate. DNA-spermidine complexes with 0.3 μ M DNA in nucleotide unit and (a) 300 μ M spermidine, and (b and c) 600 μ M spermidine. (c) is the magnification of (b). Scale bar = 100 nm.

次に、この様にしてできたDNA凝縮体に対して、ダウノマイシンを作用させたときの結果を示す。Fig.5-7のa,bは、600 μ MのスぺルミジンによるDNA凝縮体に40 μ Mのダウノマイシンを作用させて10秒以内に観察した電顕像であるが、凝縮したDNAのトロイド構造の一部がダウノマイシンの作用により、ほどけた様子を見られる。300 μ Mのスぺルミジンによる凝縮体に対しても同様の変化が認められたが、この様にさらに強固に巻いたトロイド構造に対しても引き延ばす作用があることが明らかとなった。Fig.5-7のcは、さらに6時間経過後の電顕像である。広範囲な凝縮構造の変化が認められた。これらの結果は、蛍光顕微鏡で観察された結果とよく一致している。本研究では、スぺルミジンの希釈による凝縮構造の引き延ばしへの影響を避けるため、全ての実験を通じて、ダウノマイシンの添加前と後でスぺルミジンの濃度を同じにしてある。また、微細構造の観察から、ダウノマイシンによって引き延ばされたDNA繊維の束の厚みは、Fig.5-7のa,b,cいずれにおいても10nm程度で、2重鎖DNAの中が2~3nmであることから、面積比からその断面には、11本から25本程度の2本鎖DNAセグメントがより集まっていると考えられる。このことから、ダウノマイシンによるDNA凝縮構造の引き延ばしは、凝縮状態からコイル状態への単なる転移過程での巻き戻しではなく、ある程度DNAのセグメント間の引力を保ったままの状態、引き延ばされていると考えられる。このセグメント間の引力は、スぺルミジンによる架橋効果も考えられる。

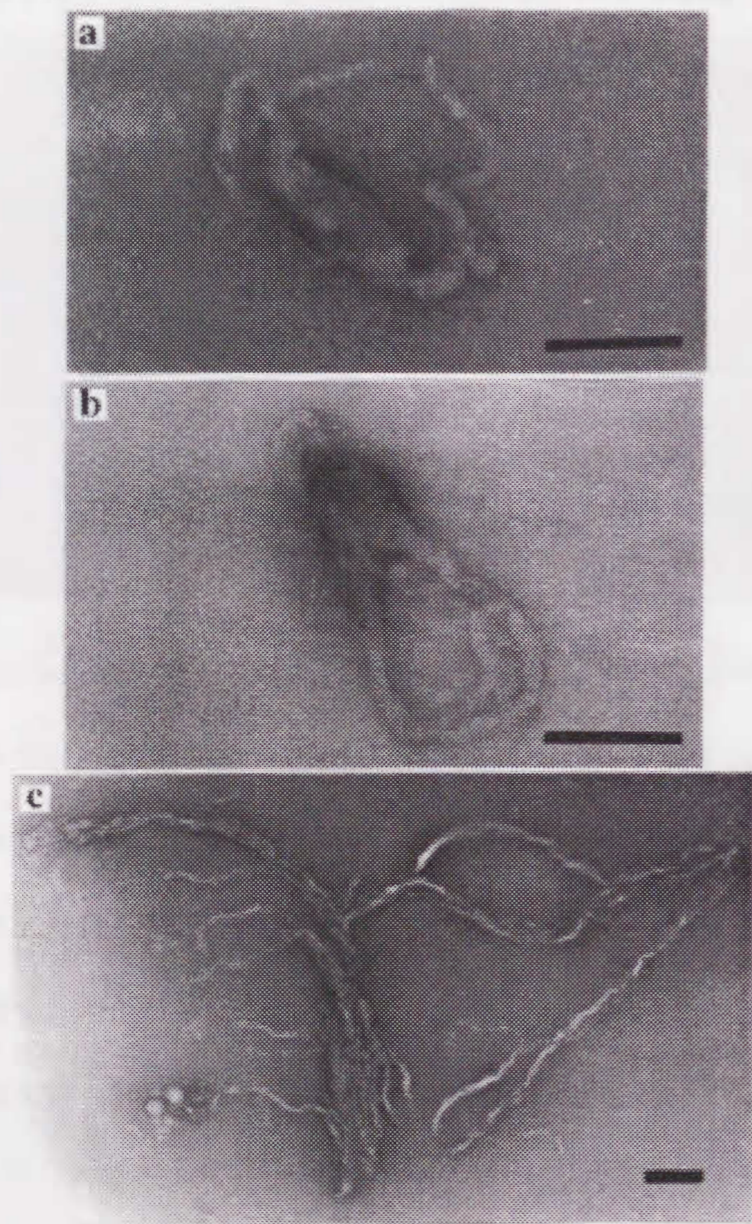


Fig. 5-7 Effect of Daunomycin on Spermidine-Compacted T4DNA. Daunomycin was added to 600 μM spermidine-compacted DNA. The pictures were observed 10 minutes (a and b), and 6 hours (c) after the addition of 40 μM daunomycin. Scale bar = 100 nm.

以前の報告では、ダウノマイシンは、コイル状態のDNAにインターカレートし、塩基対間を大きく引き延ばして、引き続き凝縮転移を阻害する作用があるとされてきた³⁸⁾。しかし、既に凝縮したDNAは、その構造の中にインターカレーターを受け入れられないため、影響はないと考えられてきた。これに反して、本研究では、ダウノマイシンは、明らかに凝縮DNAの高次構造に対して影響を与えることが分かった⁴²⁾。

これまでにDNAに対して作用することが明らかになっている他の薬物についても、この様に高次構造に対して影響を与えている可能性が十分考えられる。本方法は、それらの薬物のDNAの高次構造への影響を調べる方法としても有効であり、さらには、DNAの高次構造と遺伝子の発現との関係を解明する上でも有用な知見を得ることができると考えられる。

第6章 総括および今後の課題

本研究は、荷電性薬物と生体（生体膜とDNA）との相互作用に焦点を当て、荷電性薬物が生体に作用して生理機能を発現する機構をモデル系を導入して考察したものである。以下に個々の実験から得られた知見を要約する。

1. 荷電性薬物と生体モデル膜との相互作用

(1) 荷電性薬物が生体疎水領域に移行する場合、主として対イオンとイオン対複合体を形成して移行する。

(2) イオン対形成時に脱水和（正のエンタルピー）が起こるが、イオン半径が小さい程水を引き付ける作用が強いため、脱水和の程度は小さくなり、溶媒介入イオン対を形成しやすい。

(3) イオン対を形成するアニオンとカチオンの部分が同じであれば、イオン対の形成の程度には、疎水基の寄与は少ない。

(4) アルキルアミンの場合、解離型、非解離型いずれもメチレン基1個あたりの $\log P$ の増加の割合($\Delta \log P$)は0.5で、加成性が成立する。一方、アミノアルカノールの場合、10℃では、 $\Delta \log P$ は0.24で、親水基（OH基）の導入によりメチレン基1個あたりの疎水性への寄与が約1/2になることが明らかとなった。

(5) イオン対の疎水領域への移行に伴い、対イオン間の静電的引力は増大し、分子の運動の自由度が減少する。

2. 荷電性薬物とDNAとの相互作用

(1) これまで、低分子ポリカチオンでは、電荷の価数が3以上のものしかDNAにたいして凝縮作用がないと考えられてきたが、蛍光顕微鏡による直接観察により二価のジアミンでも長鎖DNAに対して単分子凝縮を引き起こすことが明らかとなった。

(2) 二価のジアミンの凝縮作用は、そのアミノ基間の炭素鎖長の違いにより差異があり、炭素鎖長が2、4、6のものは、3と5のものに比べて凝縮能に劣ることも明らかとなった。

(3) DNAのモノインターカレーターでありかつ抗癌作用を有するダウノマイシンは、凝縮したDNAを引き延ばす作用があることが明らかとなった。これまで既に凝縮したDNAに対しては、その高次構造に影響を与えないと考えられてきたが、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡による観察から、スベルミジンにより凝縮したトロイド構造のDNA分子を、十数本程度のDNAセグメントの束として引き延ばしていることが認められた。

以上、2つの生体モデル系を用いて、荷電性薬物と生体との相互作用に関して新しい方法論の開発も含めて一定の成果を得ることができた。今後これらの成果を融合して展開していくテーマとして”遺伝子導入”を考えている。

近年急速に、先天的な遺伝子疾患をはじめ種々の悪性腫瘍やAIDSの治療方法として、遺伝子治療が注目されてきている。遺伝子治療は、外部から正常な遺伝子を細胞に送り込み治療を行なう方法で、根治療法として大きな期待が寄せられている。その基礎となる遺伝子導入法の研究としては、レトロウイルスやアデノウイルス等ウイルスベクターを用いる生物的方法、エレクトロポレーションや遺伝子銃によ

る物理的方法、さらにリポソームに代表される合成化合物担体を用いる化学的方法がある。この中で、ウイルスの"感染力"を利用する生物的方法が最も広く用いられているが、合成化学物質を担体として用いる化学的方法も近年急速に研究が進んでいる。

化学的方法の特徴としては、(1) 化学修飾をしやすい (=誘導体を作りやすい)、(2) 操作が容易、(3) ウイルスベクターを用いる場合に危惧される病原性を考えなくてよい、という長所がある反面、導入のバラツキが大きく、細胞内でリソソームによる分解を受けやすいという問題点もある。また、導入遺伝子のほとんどは宿主細胞の染色体DNAに組込まれず、発現は一過性であるため適用が限られる。しかし、導入した遺伝情報が染色体とは独立して存在するということは、遺伝子の発現を制御するプロモーターの本来の機能を損なわないという利点でもあり、挿入変異の危険性も減る。

本研究者は、これまでに開発された導入試薬の特徴を比較検討しながら、新しい導入試薬の開発を模索している。遺伝子(DNA)を細胞内へ導入する場合、そのキャリアとなる物質に要求される要素は、(a)DNAとの親和性(b)膜融合性(c)核内での安定化と転写の促進等が考えられる。(a)については、"DNAの凝縮"に注目している。これまでに導入試薬として用いられてきた化合物には、DNAに対して凝縮作用のあるものが多いことに気がつく。ポリリジンは、DNA分子を凝縮させることが電子顕微鏡により確かめられており、DEAEデキストランについても本研究者はすでに凝縮作用があることを蛍光顕微鏡等で確認している。リポソームを用いる場合も、抗原性を抑えるためにサイズが小さいことが望まれる。その意味でもDNAを凝縮させる

ことの意義は大きい。最近この凝縮の重要性が少しずつ注目されるようになってきている。(b)との関連では、膜への融合性を高めるために、DNA凝縮剤に疎水基を付与した遺伝子導入試薬が開発されている。リポスペルミン(トランスフェクタム)は、DNA凝縮作用のあるスペルミンにアシル基が結合した構造をしており、培養細胞に対して高い導入効率を示す。(c)に関して注目されているものに、核内タンパク質であるHMG-1(High Mobility Group 1)がある。HMG-1は、DNAを核内で安定化させ、さらには転写を促進すると報告されている。しかもDNAにHMG-1を作用させ電子顕微鏡で観察するとDNAの凝縮体が観測されることから、DNAの折り畳み構造つまり高次構造制御にも関与していると考えられる。実際には、DNAとHMG-1複合体をリポソームに取り込ませ、これをHVJ(Sendai virus)と反応させて作成したHVJ-リポソームを用いた遺伝子導入法が試みられている。

この様に考えてくると、遺伝子導入を考える場合、DNAを凝縮させること(凝縮構造制御)と膜への融合性を高めること(疎水性相互作用)が非常に重要な役割を果たしていることが分かる。つまり、これらの非特異的(non-site-specific)な生体高分子への作用が、"細胞内への外来遺伝子導入"という特異的な機能を導いているのである。本研究論文でテーマとした"荷電性薬物と生体との相互作用"の研究成果を踏まえて、今後遺伝子の細胞内への導入・発現メカニズム解明へにむけてさらに研究を発展させていきたいと考えている。

謝辞

本研究を進める上で、多くの方々から有益なご指導や貴重なご意見を賜りました。まず最初に、終始一貫してご指導、ご鞭撻を賜りました徳島大学薬学部 寺田弘教授に心より感謝致します。また本論文をまとめるにあたり、査読していただき多くの有益なご意見を賜りました徳島大学薬学部 渋谷雅之 教授と嶋林三郎 教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、DNAの電子顕微鏡観察の的確なご指導とご討論をしていただきました名古屋大学医学部 神戸俊夫 講師、遺伝子導入の基礎研究の機会を与えていただき有益なご意見とご指導を賜りました名古屋大学医学部第一内科 恵美宣彦 博士に深く感謝の意を表します。さらにDNAの蛍光顕微鏡測定法を伝授していただき研究上の討論もしていただきました豊橋技術科学大学工学部 松沢有希子 助手と名古屋大学大学院人間情報学研究科 物質情報論講座のDNAグループの皆様へ深謝致します。

また本研究に対し深いご理解とご激励をいただき、生体膜機能研究の場を与えてくださいました名古屋大学医学部 曾我部正博 教授に深く感謝の意を表します。

最後に、研究活動が続ける上で最大の理解者でありかつ共同研究者でもある夫吉川研一と、全面的に協力、応援してくれた家族に心より感謝致します。

引用文献

第1章序論

1. 藤井達三、寺田弘、野村靖幸 著、「薬物作用と生体膜 3章」南江堂、東京(1987) p89.
2. I. Baeza, M. Ibanez, C. Wong, P. Chavez, P. Gariglio and J. Oro, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **21**, 225 (1992).
3. a) J. A. Rogers and A. Wong, *Int. J. Pharmaceut.*, **6**, 339 (1980); b) I. Kojima and S. S. Davis, *ibid.*, **20**, 247 (1984).
4. a) B. N. Ames and D. T. Dubin, *J. Biol. Chem.* **253**, 769 (1960); b) W. C. Earnshaw and S. R. Casjens, *Cell*, **21**, 319 (1980); c) C. W. Tabor and H. Tabor, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 749 (1984).
5. J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes, R. S. Brown, B. Rushton, and A. Klug, *Nature*, **269**, 29 (1977).
6. a) L. C. Gosule and J. A. Schellman, *Nature*, **259**, 333 (1976); b) J. Widom and R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.*, **144**, 431 (1980); c) P. G. Arscott, A.-Z. Li and V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **30**, 619 (1990); d) V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **31**, 1471 (1991).
7. L. C. Gosule and J. A. Schellman, *J. Mol. Biol.* **121**, 311 (1978).

第2章および第3章

8. a) C. Hansch and T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1616 (1964); b) E. J. Lien, C. Hansh and S. M. Anderson, *J. Med. Chem.*, **11**, 430 (1968); c) H. Machleidt, S. and P. Seeman, *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 178 (1972); d) T. Fujita, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 285 (1983).
9. a) I. M. Klotz and J. Ayers, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4078 (1957); b) 中垣正幸、寺田弘、*薬学雑誌*, **86**, 1196 (1966).
10. S. M. J. Harris, T. Higuchi and J. H. Rytting, *J. Phys. Chem.*, **77**, 2694 (1973).
11. a) S. M. A. Matesich, J. A. Nadas and D. F. Evans, *J. Phys. Chem.*, **74**, 4568 (1970); b) 田中元治、松浦二郎、富永敏弘、山本学、山本勇麓、*イオンと溶媒 (化学総説)*, **11**, 151 (1976).
12. A. S. Davydov, "*Biology and Quantum Mechanics*" Pergamon Press, Inc., London (1982) p31.
13. a) H. Terada, K. Kitagawa, Y. Yoshikawa and F. Kametani, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 7 (1981); b) Y. Yshikawa and H. Terada, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2759 (1988).
14. a) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971); b) N. Kurihara, M. Uchida, T. Fujuta, M. Nakajima, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2**, 383 (1973).
15. Y. Yshikawa and H. Terada, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2407 (1988).

第4章および第5章

16. a) D. Furlong, H. Swift and B. Roizman, *J. Virol.*, **10**, 1071 (1972); b) K. E. Richards, R. C. Williams and R. Calendar, *J. Mol. Biol.*, **78**, 255 (1973); c) W. C. Earnshaw, J. King, S. Harnson and F. Eiserling, *Cell*, **14**, 559 (1978).
17. G. A. Yu and A. R. Khokhlov, *Sov. Sci. Rev. Sect. A*, **8**, 147 (1987).
18. a) J. Widom and R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **144**, 431 (1980). b) D. Keller and C. Bustamante, *J. Chem. Phys.* **84**, 2972 (1986).
19. M. Yanagida, Y. Hiraoka and I. Katsura, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 177 (1983).
20. K. Yoshikawa and Y. Matsuzawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **18**, 929 (1996).
21. Y. Matsuzawa and K. Yoshikawa, *Nucleosides and Nucleotides*, **13**, 1415 (1994).
22. S. M. Melnikov, V. G. Sergeev and K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2401 (1995).
23. M. Matsumoto, T. Sakaguchi, H. Kimura, M. Doi, K. Minagawa, Y. Matsuzawa and K. Yoshikawa, *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.*, **30**, 779 (1992).
24. a) M. Doi and S. F. Edwards, "*The Theory of Polymer Dynamics*" Clarendon, Oxford (1986); b) Y. Oono and M. J. Kohmoto, *J. Chem. Phys.*, **78**, 520 (1983).

25. G. C. Manning, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179 (1978).
26. R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, *Biochemistry*, **18**, 2192 (1979).
27. V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov, Y. Matsuzawa and K. Yoshikawa, *J. Chem. Phys.*, **102**, 6595 (1995).
28. S. M. Melnikov, V. G. Sergeev and K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9951 (1995).
29. K. Yoshikawa and M. Takahashi, unpublished data.
30. K. Minagawa, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, A. R. Khokhlov and M. Doi, *Biopolymers*, **34**, 555 (1994).
31. K. Minagawa, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, M. Matsumoto and M. Doi, *FEBS Lett.*, **295**, 65 (1991).
32. Y. Yoshikawa and K. Yoshikawa, *FEBS Lett.*, **361**, 277 (1995).
33. M. Suwalskey, W. Traub, U. Shmueli and J. A. Subirana, *J. Mol. Biol.*, **42**, 363 (1969).
34. C. W. Tabor and H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749 (1984).
35. a) F. Zunino, R. Gambetta, A. Di Marco and A. Zaccara, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 489 (1972); b) A. Di Marco, M. A. Casazza, R. Gambetta, R. Supino and F. Zunino, *Cancer Res.*, **36**, 1962 (1976).
36. a) G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. van der Marel, J. H. van Boom and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7204 (1980); b) D. P. Remeta, C. P. Mudd, R. L. Berger and K. Breslauer,

Biochemistry, **32**, 5064 (1993).

37. I. Flink and D. E. Pettijhon, *Nature*, **253**, 62 (1975).
38. a) Z. Reich, R. Ghirlando, T. Arad, S. Weinberger and A. Minsky, *J. Biol. Chem.*, **265**, 16004 (1990); b) C. Bustamante, B. Samori and E. Builes, *Biochemistry*, **30**, 5661 (1991).
39. a) D. K. Cattoraji, L. C. Gosule and J. A. Shellmann, *J. Mol. Biol.*, **121**, 327 (1978); b) J. Widom and R. L. Baldwin, *Biopolymers*, **22**, 1595 (1983); c) P. G. Arscott, C. Ma, J. R. Wenner and V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **36**, 345 (1995).
40. U. K. Laemmli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4288 (1975).
41. Z. Reich, R. Ghirlando and A. Minsky, *Biochemistry*, **30**, 7828 (1991).
42. a) Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa and T. Kanbe, *Nucleic Acid Symp. Ser.*, **34**, 173 (1995); b) Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa and T. Kanbe, *Biophys. Chem.*, in press.

参考文献

第2章および第3章

「薬物の構造活性相関」(構造活性相関懇談会編)、化学の域増刊136号、南江堂、(1982).

「水の構造と物性」(中垣正幸編)、化学の領域増刊106号、南江堂、(1974).

第4章および第5章

「核酸構造 上、下」(W. Saenger著、西村善文訳)、シュプリンガー・フェアラーク東京、(1987).

"Molecular Biology of The Cell" 2nd edition, B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, Garland Publishing, Inc., New York (1989).

「遺伝子の構造と発現」(J. D. Hawkins著、田宮信雄、田宮徹訳)東京化学同人、(1995).

第6章総括および今後の課題

「特集 遺伝子治療の最前線」、現代化学11月号、東京化学同人(1994).

「遺伝子治療」、蛋白質核酸酵素12月号増刊、共立出版、(1995).

「総説 化学物質を用いた遺伝子導入法」(恵美宣彦、吉川祐子)、日本臨床54巻7号、日本臨床社、(1996).

