Metachromasy の化学物理

宮城教育大学 平野 康一
化学教室

1. はじめに

多くの色素は高分子物質に結合すると、水に溶けていたときとは違った色を現わす。この現象を Ehrlich は Metachromasy (メタクロマジ) と呼んだ¹⁾ Michaelis と Granic²⁾ は吸収スペクトルを測定してこの現象を研究した。これについては寺山の綜説に詳述してある³⁾ その後小泉と又賀は $-O\cdot SO_3^-$ をもつ高分子とローダミン $6G^+$ 等のモデル系を用いて定量的な研究を行った⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾ その結果この現象にはじめて分子レベルでの考察を加えた。それによると、この現象の原因をつぎの①、②に要約できる。①高分子電解質に結合した色素イオンの会合、②高分子電解質の解離基と色素イオンの静電相互作用。この考えで多くの実験事実が説明されるが、ここではその後の研究結果にもとづいて原因のひとつに②を加えておく。③高分子電解質(以下高分子と略す)の apolar な部位と色素イオン間の van der Waals 相互作用。①～③は、色素イオンの電子状態を変化させスペクトル変化の原因となる。実際の現象では、①～③が協同的に働いているものと考えられるが説明の便宜上ここではメタクロマジに関する研究例を①、②、③に整理して紹介する。

2. 色素の会合とメタクロマジ

①の立場でメタクロマジを研究した例として Bradley と Wolf⁸⁾ の仕事をあげておく。彼らは DNA や Poly U にアクリジンオレンジを結合させ、その binding 曲線を解析するとともに吸収スペクトルの変化を測定した。それによると、リン酸基と色素イオンの比 P/D が $\gg 1$ の範囲では色素イオンの単量体の吸収帯が red shift したとみられる α 帯が観測され、 $P/D > 1$ に変わると短波長側に二量体による β 帯が、 $P/D = 1$ に達するとより短波長側に γ 帯が現れる。そして彼らは γ 帯の起源を色素イオンの stacking に求めた。Bradley はさらに Tinoco らとともに励起子理論を応用して γ 帯について理論的な検討を行った⁹⁾ その結果、DNA のヘリ

カルな軸に垂直に分子面を向けたアクリジンオレンジがヘリックスに沿って stacking しているモデルを提出している。つづいて、Ito と I'Haya¹⁰⁾ は outside stacking したモデル(図 1, a, c)と intercalate したモデル(図 1, b)について同様の計算を行ない、 γ 帯、 $\lambda = 467\text{nm}$ の起源を説明するには intercalate したモデルの方がより適していることを見出した。

図 1¹⁰⁾ DNA の結合サイトにおけるアクリジン色素の配向モデル
(a), (c) outside stacking (b) intercalation

3. 色素の binding とメタクロマジ

DNAに結合したアクリジンオレンジの α 帯にみられる red shift, 仔牛血清アルブミン (BSA) に結合したメチルオレンジのしめす blue shift は何れも⑩, ⑪によるメタクロマチックなシフトであるとみられる。この種のシフトは高分子や色素の種類によりその方向も大きさも一様ではない。それは⑩, ⑪に起因するシフトが色素イオン個々の電子的性状や結合サイトの構造等に強く支配されることによる。Klotzら¹¹⁾はBSAとメチルオレンジを用いてメタクロマジの研究を行なった。そして観測された blue shift を色素イオンとBSAの解離基との静電相互作用によるものとして説明した。また彼らはBSAの代りにラウロイルポリエチルイミンを使って blue shift の機構をしらべている。¹²⁾ その結果、この blue shift は binding した色素イオンが apolar な環境に置かれる結果あらわれるとしている。その理由として、1) binding している色素イオンは解離基と静電相互作用するばかりでなく、色素イオンをとりまく apolar な環境より van der Waals 力を受ける、2) binding したメチルオレンジの吸収スペクトルがベンゼンなどの有機溶媒中でしめすスペクトルと似ている、3) 親水性の高分子ポリビニルピロリドンを使った実験¹³⁾ではメチルオレンジの $\lambda = 470 \text{ nm}$ が水溶液の値 $\lambda = 465 \text{ nm}$ と余り違わない、ことをあげている。Klotz らの結論は正しいものと思うが、彼らの考察の中で見落されている水素結合シフト¹⁴⁾についてふれておく。メチルオレンジが水の中から apolar な環境に移されるときには水との間の水素結合が断ち切れ、その結果 1000 cm^{-1} に及ぶ blue shift が現れる。¹⁵⁾ binding にもとづく波長シフトを問題にするときには、この種のシフト (負の水素結合シフト) のあることを忘れてはいけない。Klotz の結論に戻って、彼の問題にした blue shift の意味をもう一度考え直してみる。はじめに⑩の立場に立って、静電相互作用によるシフト (静電シフト) をとりあげる。Rabinowitch と Epstein¹⁶⁾はチオニン陽イオンの吸収スペクトルに対する Cl^- の影響をしらべ Cl^- の量が増すとチオニンの λ が red shift することを見出した。また Hogen-Esch と Smid¹⁷⁾らはフルオレン陰イオンの吸収スペクトルに対する金属イオンの影響をしらべたが、それによると Li^+ , Na^+ 等はそのイオン半径に反比例的にフルオレンの λ を blue shift させることを見出している。そして彼等はこのシフトを対イオンによる静電シフトであると説明した。これにしたがえば、陽イオンが負荷電の解離基よりう

ける静電シフトは red shift となり陰イオンが正荷電の解離基よりうける静電シフトは blue shift になるものと推測される。したがって、BSA に binding しているメチルオレンジ陰イオンに期待できる波長シフトは blue shift となろう。つぎに⑪の立場より、apolar な環境に由来するシフトについて考える。このシフトは色素イオンと環境を構成する apolar な分子間に働らく分散力に起因するもので、あとで詳しく述べるが、つねに red shift となる。したがって、BSA に binding したメチルオレンジの場合にも red shift となるべき量である。実験では、⑩と⑪によるシフトの加算値が観測されるから、色素イオンが apolar な環境に置かれたことの効果は blue shift を解消する方向で利いてくる筈である。そうであるならば、実測の blue shift, (理由の1)もふくめて), を apolar な環境に結びつけて考えることは正しくない、むしろ、メチルオレンジ陰イオンが apolar な環境に移るとき現われる負の水素結合シフトとの関連で論ずる方が自然であろう。

4. 化学物理的なアプローチ

①による場合を除いて、メタクロマジを化学物理の問題としてとりあげた例は非常に少なく、僅かに水島の研究があるくらいである。水島¹⁸⁾は、色素イオンを電荷と双極子で近似し、⑩の立場からポリビニル硫酸エステルに結合したメチレンブルーについてメタクロマチックな波長シフトを計算した。図2にしめした

図2¹⁸⁾ ポリビニル硫酸エステルに結合したメチレンブルー
 $R: -O \cdot SO_3^-$ の電荷の中心と色素分子の中心との距離
 θ : 色素の分子軸 AB と R との角

モデルにしたがって、振動ハミルトニアンを(1)であらわし、2次の振動項まで計算し、電子遷移0→1に対

$$V = -\frac{e_1 e_2}{R} + \frac{e_2 M_1}{R^2} \cos \theta \quad (1)$$

e_1 : 色素イオンの電荷量

e_2 : $-O \cdot SO_3^-$ 基の電荷量

M_1 : 色素イオンに関する双極子モーメント演算子

する波数シフトの式(2)を得た。(2)によれば、 $\delta \tilde{\nu}_{01} > 0$ となり、これが実測の blue shift に対応するものと考え

$$\delta \tilde{\nu}_{01} = \frac{2e^2 < 0 | M_1 | 1 >^2}{\hbar^2 c R^4 \nu_0} \cos^2 \theta_{01} \quad (2)$$

$\cos \theta_{01}$: $\cos \theta$ の行列要素

えた。一方 $\delta \tilde{\nu}_{01}$ がクーロン誘起力シフトであることを考えれば、 $\delta \tilde{\nu}_{01} < 0$ が期待される、しかしこれは(2)の結論とは異なる。この相違は、(2)の誘導に当り、2次の振動項をエネルギー分母最小のただひとつの項で評価したことによる。¹⁹⁾(2)よりの結論 $\delta \tilde{\nu}_{01} > 0$ が実測値に対応するように見えるのは、上の評価法よりくる誤りとこの計算で1次シフトを0と見做した結果による偶然であろう。このような問題は残るとしても、メタクロマジを電子論で扱った恐らく最初の論文として興味深い。その後 Hush と Rawlands²⁰⁾らは、 Na^+ の静電場によりナフタリン陰イオンの現わす1次シフトをモノポール近似で計算して 10^2 cm^{-1} 程度の blue shift になることをしめした。平野²¹⁾は、水島の得た2次シフトと Hush らの得た1次シフトとの関係を正しく評価することを目的に、イオン静電場による色素イオンの波長シフトを Hückel MO 振動近似のわく内で定式化した。ここでは、電荷 $Z_s e$ と色素イオンの π 電子との静電相互作用(3)を振動とみて Rein-Pollak ら²²⁾の方

$$V_{op} = -\sum_{i=1}^{2n} \frac{Z_s e^2}{|\mathbf{R}_s - \mathbf{r}_i|} \quad (3)$$

法にしたがって計算し、波数シフトの式(4)を導いた。

$$\begin{aligned} \Delta \tilde{\nu}_{\text{max}}^{\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}} = & \left\{ \sum_{\lambda} (\rho_{\lambda g} - \rho_{\lambda \text{HOMO, LUMO}}) \frac{Z_s e^2}{|\mathbf{R}_s - \mathbf{R}_{\lambda}|} \right. \\ & \left. + \frac{1}{2} \sum_{\lambda} (\pi_{\lambda}^{\text{HOMO, LUMO}} - \pi_{\lambda}^g) \frac{Z_s^2 e^4}{|\mathbf{R}_s - \mathbf{R}_{\lambda}|^2} \right\} \frac{1}{\hbar c} \quad (4) \end{aligned}$$

ここで、添字 λ はコア λ を、 g は基底状態を、HOMO, LUMO は最低励起状態を、HOMO→LUMO は電子遷移に関する量をあらわす。また ρ は電荷密度、 π は自

己分極率をあらわす。つぎに彼は、エオシン Y^{2-} について波数シフトの電荷に対する位置効果を(4)より計算した。それによれば、1次シフトは電荷の位置により blue shift にも red shift にもなること、2次シフトはつねに red shift となるがその大きさは1次>2次となること、ただし電荷の位置によっては1次=2次となり2次シフトの寄与を無視できないこと等の結論に達する。図3に波数シフト $\Delta \tilde{\nu}_{\text{max}}^{\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}}$ の電荷 $Z_s e$ に対する位置効果を示した。

図3²¹⁾ エオシン Y^{2-} にみる波数シフトとその位置効果
上) 計算に用いた座標
下) 波数シフト ($Z_s = 0.01$)
X, Y, 21, 25等は電荷の置かれた方向を上)の座標を用いてあらわしたものである。

ところで、高分子に binding している色素イオンは解離基の外辺に結着しているのではなく、高分子内部のポケットやクレバスにとり込まれていると見られている。²³⁾²⁴⁾したがって、メタクロマチックなシフトを計算するに当

っては、解離基の影響ばかりでなく高分子全体よりくる影響をも取り入れる必要がある。この考え方に沿った研究の例として Suzuki ら²⁵⁾の行った計算について述べよう。彼らは高分子全体をひとつの電荷分布と見做し、binding した色素分子などはこの電荷分布のつく一様な電場により振動をうけると考えた。そしてこの振動によるシフトを縮退系の振動論により計算した。すなわち、電場 E と色素分子の π 電子との相互作用を振動ハミルトニアン(5)であらわし、SCF-CI法で求

$$V = - \left(\sum_j e r_j \right) E \quad (5)$$

r_j : 電子 j の位置ベクトル

めた行列要素(6)より定まる振動マトリックスを対角化

$$K_{nk} = - e Q_{nk} E \quad (6)$$

Q_{nk} : 遷移モメント

することにより1次のシフトを計算することが出来る。この方法を用いて、彼等はレチナールの λ におよぼすオプシン分子の影響を検討した。その結果、 λ の実測値を再現する値として $E = 0.7 \times 10^{-2}$ a.u. を得る。この値は分子間に働らく実効電場としてまづ妥当なものであろう。ところで、高分子全体と色素分子(イオン)との相互作用として期待されるものは分散力に起因するものであるから、それを評価するには1次の項だけでは駄目で2次の項をすべて計算しなければならない。しかし、励起状態における分散エネルギーの評価は決して容易ではない。平野²⁶⁾はこの問題に溶媒効果の方法をとり入れ実用上見通しのいい結果を得た。高分子を広義の溶媒と考え、binding している色素イオンを溶質とみれば、考えている系全体を一種の溶液と近似できる。したがって、binding している色素イオンの吸収極大波長に対する高分子の影響を溶媒効果として扱うことができよう。彼はモデル物質として π 電子を有する有機イオンをとりあげ、これの λ に対する溶媒効果を McRae²⁷⁾の扱いにしたがって定式化した。それによると、有機イオン、対イオン、溶媒分子の3者間に働らく静電相互作用を振動とみて、これによる溶液全体のエネルギー変化を基底、励基両状態について求めることにより電子遷移 $i \rightarrow j$ に伴う波数シフトの表式(7)が導かれる。

$$\tilde{\nu}_{ji} = \left\{ (M_{ii}^u - M_{jj}^u) (E^{u(Q)} + E^{u(M)} + E^{u(g)}) \right\} / hc$$

$$+ \frac{1}{2} (\alpha_i^u - \alpha_j^u) \left\{ \overline{E^{u(Q)}^2} + 2 \overline{E^{u(Q)} E^{u(g)}} \right\}$$

$$+ (\overline{E^{u(g)}^2}) / hc + \frac{1}{2} \left\{ \sum_{ki} (1 - \tilde{\nu}_{ki}^0 L_{ki}) M_{ki}^u \tilde{\nu}_{ij}^u \right. \\ \left. - \sum_{lj} (1 - \tilde{\nu}_{lj}^0 L_{lj}) M_{lj}^u \tilde{\nu}_{ij}^u \right\} / hc \quad (7)$$

ここに、 $\overline{E^{u(Q)}}$ 、 $\overline{E^{u(M)}}$ は有機イオンを点電荷 Q 、双極子モーメント M^u とみたときに、これに配向する溶媒分子が有機イオンのうえにつくる電場の時間平均、 $\overline{E^{u(g)}}$ は対イオンが有機イオンのうえにつくる電場の時間平均である。それ以外の記号は McRae の論文と同じである。(7)の第1項は静電相互作用よりの、第2項は誘起力よりの、第3項は分散力よりの寄与をあらわしている。また(7)の $(\overline{E^{u(Q)} + E^{u(M)}})$ を Q の誘起する反作用電場 $F^{u(Q)}$ で評価できるとすれば、 $F^{u(Q)}$ の対称性により第1項、第2項を ≈ 0 と近似できる。またうすい溶液では $\overline{E^{u(g)}}$ も ≈ 0 と見做してよいから、 $\tilde{\nu}_{ji}^u$ として残るものは第3項だけとなる。第3項にあらわれるミクロなパラメータを溶媒分子のイオン化エネルギー I_p^u や溶媒の屈折率 n_D であらわせば、(7)の代わりに(8)が得られる。

$$\tilde{\nu}_{ji}^u = -4.26 \times 10^{-30} \left(\frac{f_{ji}^u}{a^3} \right) \frac{n_D^2 - 1}{2n_D^2 + 1} \cdot \frac{1}{I_p^u} \quad (8)$$

f_{ji}^u : 振動子強度(気相)
 a : 有機イオンの半径

(8)によれば、有機イオンが溶媒の中でしめす波数シフトはつねに red shift (気相の λ を規準とする)し、シフトの大きさは n_D に比例的となる。このことにより、波数シフトに対する分散的相互作用の寄与は red shift となることが分る。また、 $\tilde{\nu}_{ji}^u$ と分極関数 $n_D^2 - 1 / (2n_D^2 + 1) \cdot I_p^u$ との関係はエオシン Y^{2-} 、ローダミン $6G^+$ 等の色素イオンと aprotic な溶媒について充分よく成立つ。最後に、メタクロマジの問題に戻るが、(7)の $\overline{E^{u(g)}}$ を解離基の電荷に起因する量と読み替えれば(7)を利用してメタクロマチックな波数シフトを解析することが可能となる。

5. おわりに

メタクロマジの実験と化学物理的な側面について紹介した。ずいぶんと重要な仕事を見落しているかも知れないが、それは著者の微力のためにお詫びして置く。この現象はその機構が錯綜しているため、定量的な研究は困難である。しかし、問題をひとつづつほぐしてゆくならば、binding 状態にある分子の電子的性状に

ついて基礎的な知見を得ることが出来よう。おわりに、論文別刷を頂いた大阪大学基礎工学部の又賀昇教授にお礼を申し上げ度い。

文 献

- 1) P. Ehrlich, *Arch. Mikroskop. Anat. Entwickl.*, **13**, 1212 (1877).
- 2) L. Michaelis, S. Granick, *J. Amer. Chem. Soc.*, **67**, 1212 (1945).
- 3) 寺山宏, 化学の領域, **1**, 17 (1947).
- 4) 小泉正夫, 又賀昇, 日本化学雑誌, **73**, 814 (1952).
- 5) M. Koizumi, N. Mataga, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 483 (1953).
- 6) M. Koizumi, N. Mataga, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **26**, 115 (1952).
- 7) M. Koizumi, N. Mataga, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **27**, 197 (1954).
- 8) D. F. Bradley, M. K. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 944 (1959).
- 9) I. Tinoco, JR., R. W. Woody, D. F. Bradley, *J. Chem. Phys.*, **38**, 1317 (1963).
- 10) H. Ito, Y. J. I'Haya, *J. Quantum. Chem.*, **II**, 5 (1968).
- 11) I. M. Klotz, R. K. Burkhard, J. M. Urqhart, *J. Phys. Chem.*, **56**, 77 (1952).
- 12) I. M. Klotz, G. P. Royer, A. R. Sloniewsky, *Biochem.*, **8**, 4752 (1969).
- 13) I. M. Klotz, K. Shikama, *Arch. Biochem. Biophysics*, **123**, 551 (1968).
- 14) 平野康一, 日本化学会誌, 1823 (1974).
- 15) 平野康一, 妹尾孝, 未発表.
- 16) E. Rabinowich, Leo. F. Epstein, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 69 (1941).
- 17) T. H. Hogen-Esch, J. Smid, *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 307 (1966).
- 18) 水島正喬, 照明学会誌, **33**, 320 (1949).
- 19) R. Eisenshitz, F. London, *Z. Physik.*, **60**, 491 (1963).
- 20) N. S. Hush, J. R. Rawlands, *Mol. Phys.*, **6**, 201 (1963).
- 21) 平野康一, 日本化学会誌, 361 (1976).
- 22) R. Rein, M. Pollak, *J. Chem. Phys.*, **47**, 2039 (1967).
- 23) A. Wishnia, T. Pinder, *Biochem.*, **3**, 1377 (1964).
- 24) L. Stryer, *J. Mol. Biol.*, **13**, 482 (1965).
- 25) H. Suzuki, N. Takizawa, T. Komatsu, *Prog. Theor. Phys., Suppl.*, **46**, 16 (1970).
- 26) 平野康一, 日本化学会誌, 481 (1978).
- 27) E. G. McRae, *J. Phys. Chem.*, **61**, 562 (1957).

ABSTRACT

The Chemical Physics of Metachromasy

Koichi HIRANO

Department of Chemistry, Miyagi University of Education

The metachromatic shifts of dye ions were briefly reviewed. The three possible explanations for the shifts were described.

- 1) Aggregation of dye ions at binding site.
- 2) Electrostatic interactions between dye ion and ionic side chains.
- 3) Dispersive interactions between dye ion and apolar side chains.

Initially, the findings on acridine dye-DNA complexes were discussed from 1). Next, the blue shift observed in methyl orange binding to bovine serum albumin was discussed on the basis of the explanations 2) and 3). Then, it was concluded that the shift due to the disruption of hydrogen bonds plays an important role in exhibiting the blue shift.

Finally, the theoretical calculations about the spectral shift which demonstrate how the results may be applied to metachromasy were described.