講 義

水溶性高分子と小分子との相互作用 (その2)

——種々の水溶性高分子の結合力——

高 岸 徹

1. はじめに

種々の水溶性高分子と小分子との相互作用について述べ、いかなる力が両者の結合に寄与しているかという点に焦点をしばって記してみたい。

2. 水溶性生体高分子と小分子の相互作用

水溶性生体高分子と小分子の相互作用に関しては、生化学的重要性からきわめて多くの研究がなされている。詳細は Klotz の文献^{1,2)}を参照されたい。

生体高分子のアニオンに対する結合親和力は、第1表のように示される。血清アルブミンの結合力が一番強く、順次結合力は減少する³⁾。

Klotz¹⁾ は、第1表に示された生体高分子の 10⁵ g 当

第1表 タンパク質の結合性

Serum albumin
β -Lactoglobulin
Hemocyanine
Egg albumin, casein
Insulin, ribonuclease, pepsin, trypsin, γ -globulin

第2表 タンパク質のアミノ酸組成と結合指数

Protein	$\Sigma(-\text{COO}^-)$	$\Sigma(-\text{OH})$	$\Sigma(\equiv\text{NH}^+)$	$\frac{\Sigma(\equiv\text{NH}^+)}{ \Sigma(\text{OH}) - \Sigma(\text{COO}^-) }$
Bovine albumin	133	128	145	29
β -Lactoglobulin	141	118	105	4.6
Egg albumin	98	134	90	2.5
Casein	99	146	100	2.1
Insulin	63	150	72	0.83
Ribonuclease	48	233	128	0.69
Bovine γ -globulin	67	216	99	0.66
Pepsin	109	248	18	0.13

Macromolecule-Small Molecule Interations (II)

TÖRU TAKAGISHI

大阪府立大学工学部応用化学教室 助手・工博

りの $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $\equiv\text{NH}^+$ 残基の数を求め、それから $\Sigma(\equiv\text{NH}^+)/|\Sigma(\text{OH}) - \Sigma(\text{COO}^-)|$ なるパラメータの値を計算した(第2表)。そして、このパラメータの順序と、これらの高分子のアニオンに対する親和力の順序がよく一致することを見出した。

$\Sigma(\equiv\text{NH}^+)/|\Sigma(\text{OH}) - \Sigma(\text{COO}^-)|$ の意味について説明しよう。生体高分子とアニオンとの相互作用には、生体高分子中のカチオン残基、主として $\equiv\text{NH}^+$ 残基との静電

第1図 タンパク質中の極性基の水素結合とその解離エネルギー

力が考えられる。しかるに、 COO^- 残基はアニオンに対して斥力として働く。

タンパク質分子中の $-\text{COO}^-$, OH , $\equiv\text{NH}^+$ 残基間の水素結合の解離エネルギーは第1図のようになっており、 $-\text{COO}^- \sim \text{OH}$ の水素結合が他の水素結合よりも安定であることがわかる。したがって、 $-\text{COO}^-$ と OH の水素結合がまず優先し、両者のうちどちらかが水素結合で消費つくされてしまうと、残った方の残基 ($-\text{COO}^- > \text{OH}$ の場合は $-\text{COO}^-$, $-\text{COO}^- < \text{OH}$ の場合は OH) が $\equiv\text{NH}^+$ と水素結合して $\equiv\text{NH}^+$ を消費する。 $|\Sigma(\text{OH}) - \Sigma(\text{COO}^-)|$ の値が

小さい程 $\equiv\text{NH}^+$ と水素結合する割合は小となり、その結果 $\equiv\text{NH}^+$ のカチオン量の減少は少ない。タンパク質中のカチオン量が多い程、アニオンに対して大きい親和力を示すのは当然であろう。したがって、 $\Sigma(\equiv\text{NH}^+)/\Sigma(\text{OH}-\Sigma(\text{COO}^-))$ の値とアニオン結合性の間には相関関係がみられる。しかし、この場合、両者の静電的結合力のみを考慮したのであり、両者の結合には、それ以外の結合力も働くことは十分考えられるから、他の結合力が入った場合には、現象はもっと複雑になるだろう。しかし、アニオン性の小分子に対してはよい一致がある。Klotz はこのパラメータ $\Sigma(\equiv\text{NH}^+)/\Sigma(\text{OH}-\Sigma(\text{COO}^-))$ を結合指数 (binding index) とよんだ¹⁾。あるタンパク質のアミノ酸残基数から結合指数がわかると、そのタンパク質のアニオンに対する結合力をある程度予測することができる。

2.1 血清アルブミン

血清アルブミンに関する研究はきわめて多い^{1,2)}。

血清アルブミンの小分子に対する結合力は非常に大きい。種々の低分子に対する最大結合座席数を第3表¹⁾に示す。また、血清アルブミンのアニオンとの結合における熱力学関数を第4表¹⁾に示す。第4表から明らかにように、結合にともなう自由エネルギー変化は負、エンタルピー変化はわずかに吸熱から発熱にわたっており、エントロピー変化はすべて正の大きな値をもつ。結合の自由エネルギー変化におよぼすエントロピー項の寄与はエンタルピー項の寄与よりも大きい。すなわち、結合の安定化はもっぱらエントロピー項の寄与によるものである。エンタルピー項の発熱は、前に述べたように、タンパク質分子のもつ正電荷とアニオンとの静電力によるも

第3表 低分子化合物に対する血清アルブミンの最大結合座席数

Ion	n	Ion	n
Chloride	10	m-Nitrophenolate	24
Dodecyl sulfate	14	p-Nitrophenolate	25
Phenyl butyrate	24	Methyl orange	22
o-Nitrophenolate	6	Cupric	16

第4表 血清アルブミンとアニオンとの結合における熱力学関数

Ion	t	ΔF° (cal./mole)	ΔH° (cal./mole)	ΔS° (cal./mole/deg.)
Chloride	25°	-2,220	400	8.7
Octyl sulfate	25°	-5,010	0	16.7
Decyl sulfate	25°	-6,030	-2,000	13.3
Dodecyl sulfate	25°	-7,220	0	24.0
Methyl orange	25°	-6,410	-2,100	14.5
Azosulfathiazole	25°	-7,150	-2,000	17.1

第2図 ウシ血清アルブミンに結合したメチルオレンジの吸収スペクトル (pH 6.9, 25°C)

のであろう。ウシ血清アルブミンは、ヨウ化 *p*-アゾベンゼントリメチルアンモニウムのようなカチオンとはほとんど結合しない³⁾。

Klotz, Shikama⁴⁾ は、ウシ血清アルブミンに結合したメチルオレンジの吸収スペクトルを調べた(第2図)。その結果、メチルオレンジ結合量が増大するにつれて、染料の最大吸収波長は短波長にシフトする (465 mμ → 420~430 mμ)。一方、エタノールやベンゼン中でのメチルオレンジの最大吸収波長は 420 mμ 付近にある。したがって、メチルオレンジは血清アルブミンの非極性雰囲気中に結合していることがわかる。

ウシ血清アルブミンでは約 40% の残基が非極性である⁵⁾。また、血清アルブミンの $[\eta]$ は約 4 であり、このポリマーはコンパクトでまっただったコンホメーションをもっている(第3図)。したがって、血清アルブミンの結合における非極性部分のしめる役割は非常に大きい。

以上のことから、第4表で得られた結合にともなう正の大きなエントロピー変化は、低分子が血清アルブミンの疎水性部分と結合する際の疎水性結合によるものと考えられる。

Burkhard ら⁶⁾ は、ウシ血清アルブミンとブチルオレンジおよび *p*-アゾベンゼンスルホン酸との結合におよぼす温度の影響について調べた。その結果、ブチルオレンジでは吸熱反応、*p*-アゾベンゼンスルホン酸では発熱反応になる。彼らは、このブチルオレンジの異状性をブ

第3図 血清アルブミン (左) とポリビニルピロリドン (右) のコンホメーションと固有粘度

第5表 各種水溶性高分子と染料の結合定数 ($K_1 \cdot 10^3$)

ポリマー	エチルバイ オレレット $=\overset{+}{N}(C_2H_5)_2$	染料 (I) $-NH_2$ $=\overset{+}{N}(CH_3)_3$	ロゾール酸 $-OH$	メチルレッド $-COO^-$	メチル オレンジ $-SO_3^-$	メタベンゾ パープリン 4 B
PEO $[-C_2H_4O-]_n$	—	吸着	0.415	—	0.275	16.7
PEI $[-C_2H_4NH-]_n$	—	—	—	0.98	0.49	沈殿
PVA $\left[-CH_2-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-\right]_n$	—	—	—	—	0.125	11.1
PVP	—	17.25	0.435	2.215	2.56	6,940
PAA $\left[-CH_2-\underset{\substack{ \\ COO^-}}{CH}-\right]_n$	—	吸着	—	—	—	—
ゴムスル ホン酸 $\left[-CH_2-\underset{\substack{ \\ CH_3 \\ \\ SO_3^-}}{C=CH}-CH_2-\right]_n$	(~40) 吸着	8.34	8.4	—	—	—

チルオレンジの会合に帰している。

しかしながら、ブチルオレンジでは、ブチル基とポリマーの疎水性部分との疎水性結合を考えると、吸熱のエンタルピー変化を矛盾なく説明することができる。すなわち、スルホン酸アニオンとポリマーとのイオン性結合による発熱量よりも、ブチル基の疎水性結合による吸熱量の方が大きく、全体として吸熱反応になったものと考えられる。

最近、古賀、黒木らはウシ血清アルブミンと光学活性化合物との不整選択的相互作用について研究し、D-体色素が L-体色素よりも多く結合することを認めた^{7,8,9)}。

3. 水溶性合成高分子と小分子の相互作用

Scholtan¹²⁾は種々の水溶性合成高分子と染料の相互作用を調べ、第5表に示すような結合定数を得た。ここでは、種々の水溶性合成高分子と小分子の結合について述べよう。

3.1 ポリビニルピロリドン

ポリビニルピロリドンは代用血漿として用いられ生化学的、薬理学的に重要な水溶性高分子である。

また、染料に対する親和力が大きく、染色工業においては抜染剤としてよく用いられる。

このような関係から、結合に関しては血清アルブミンとともに多くの研究がなされている^{4,10-20)}。

Scholtan¹²⁾は、ポリビニルピロリドンとメチルオレンジの結合性におよぼすポリビニルピロリドンの分子量の影響について調べ、ポリマーの分子量が增大するにつれてポリマーへの染料の結合は増大することを明らかにした(第6表)。ただし、ポリマーの分子量が大きくなるに従って、分子量の増大に比し結合性の増加は小となる。

また、ポリビニルピロリドンとメチルオレンジとの結合における熱力学関数を求め、第7表のような結果を得ている。ポリマーの分子量の増大による染料結合性の増大は、両者間相互作用のエネルギーおよびエントロピーがともに増大するためであるが、エントロピーの寄与がエネルギーの寄与より大であることがわかる。

Klotz, Shikama⁴⁾は、ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドンおよびポリリジンのメチルオレンジに対

第6表 メチルオレンジの結合性におよぼすポリビニルピロリドン分子量の影響
(0.001 mol リン酸緩衝液, pH 7.0, 0.03% 4級塩添加)

PVP	数平均重合度	$K_1 \cdot 10^3$
ビニルピロリドン	1	0.33
Kollidon*	12	1.76
"	16	2.12
"	20	2.51
"	26	2.46
"	90	2.56
"	100	3.09

* Kollidon はポリビニルピロリドンの商品名

第7表 ポリビニルピロリドンとメチルオレンジの結合における熱力学関数におよぼすポリビニルピロリドンの分子量の影響

	PVP の分子量	
	6,180 (Kollidon 16)	32,000 (Kollidon 90)
ΔF° (kcal/mol)	-4.221	-6.698
ΔH° (kcal/mol)	-0.904	-1.905
ΔS° (cal/mol/deg.)	+11.2	+16

する結合定数を透析平衡法により求め、それから結合にともなう熱力学関数を算出した。結合曲線を第4図に、熱力学関数の値を第8表に示す。

第4図 ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドンおよびポリリジンとメチルオレンジの結合曲線 (pH 5.6, 25°C)

第8表 ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドンおよびポリリジンとメチルオレンジの結合定数および熱力学関数 (アセテート緩衝液, pH 5.6, 25°C)

Macromolecule	$k_1 \times 10^{-4}$		ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (cal/mol/deg)
	0°	25°		
Bovine serum albumin	9.4	5.4	-3.6	10
Polyvinylpyrrolidone	3.2	2.2	-2.3	12
Poly-L-lysine	0.9	0.8	-0.8	15

第9表 ポリビニルピロリドンと1 mol の共存溶質の結合における熱力学関数 (水溶液, 303°K)

Cosolute	ΔF (kcal/mole)	ΔH (kcal/mole)	ΔS_u (e. u.)
Benzene, 318°K	-1.1	2.4	18
Nitrobenzene	2.6	0	17
Phenol	-1.6	0.5	15
Benzoic acid	-2.05	-1.0	12
Resorcinol	-1.95	-3.8	2
Phloroglucinol	-2.75	-4.0	4
2-Naphthol	-2.85	-1.7	12
Sodium benzoate	-2.1	-4.5	0
Sodium 2-naphthoate	-2.15	-4.4	1
Sodium biphenyl-4-carboxylate	-2.6	-3.6	5
Sodium 3-phenanthroate	-2.4	-4.7	4
Nitrobenzene (in methanol, 288°K)	-4.2	-9.6	-12
2-Naphthol (in methanol, 288°K)	-3.9	-6.1	-1

第5図 ポリビニルピロリドンに結合したメチルオレンジの吸収スペクトル (pH 6.9, 25°C)

ポリビニルピロリドンのメチルオレンジに対する親和力は、ウシ血清アルブミンのそれよりは小さい。しかし、第5表の結果からみると、合成高分子の中では非常に大きな結合力を示すことがわかる。

第8表から明らかなように、結合にはエントロピー項と、エンタルピー項の両方が寄与しているが、前者の方が後者よりも大きい。

Molyneux, Frank¹⁸⁾ は簡単な芳香族化合物とポリビニルピロリドンの相互作用を透析平衡法で調べ、結合定数および熱力学関数を求めた。その結果を第9表に示す。この表から明らかなように、結合にともなうエントロピー変化はすべて正であり、エンタルピー変化は正の値から負の値まで変化している。

ポリビニルピロリドンに結合したメチルオレンジの吸収スペクトルを第5図に示す。ポリビニルピロリドンではメチルオレンジ結合量が増大しても、最大吸収波長は変化せず 465 mμ のままである。したがって、染料はこのポリマーの比較的親水性部分に結合していることが考えられる。しかし、ポリビニルピロリドンの [η] は 22

であり(第3図)、このポリマーは伸びたコンホメーションをとっているため、染料がポリマーの疎水性部分に結合しても吸収スペクトルのシフトはみられないのかも知れない。

以上のように、ポリビニルピロリドンと低分子化合物の結合には、エンタルピー項およびエントロピー項の二つが寄与していることは明らかである。

エンタルピー項すなわちエネルギー項としては、a) P型水素結合、b) π型水素結合、c) 静電力の三つが考えられる。

Scholtan¹²⁾ は、染料とポリビニルピロリドンとの結合は染料 (プロトン供与体) ~ ポリビニルピロリドン (プロ

第 10 表 ポリビニルピロリドンと染料の結合定数 (pH 7, 25°C) (Scholtan¹²⁾)

染料	$K_1 \cdot 10^3$
$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$	2.6
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2 \text{Cl}^-$	0

第 6 図 ポリビニルピロリドンと染料の結合力

トン受容体) 間に P 型水素結合を生ずるためだとしている。

しかし, Scholtan のいう P 型水素結合では説明できない現象があり, 吉田²¹⁾は染料とポリビニルピロリドンとの結合には π 型水素結合および静電力が働いているとしている。実際, エネルギー項に関しては π 型水素結合および静電力の寄与を考えると, Scholtan の得た実験結果および Molyneux らの結果を矛盾なく説明できるようなのである。静電力の寄与は第 10 表に示す二つの染料の結合定数を比較しても明らかだろう。

エントロピー項としては, ポリマーと低分子間の疎水性結合が考えられる。そして, 第 7~9 表から明らかなように, 疎水性結合の寄与は非常に大きい。

Eirich ら¹⁷⁾もポリビニルピロリドンとアミノ酸類, カルボン酸類の相互作用を主として粘度法で測定し, ほかに溶解度, 透析, 分光光度法などで補って二価の酸やその塩, オキシン酸, 芳香族酸, 芳香環その他の環構造をもつアミノ酸とポリビニルピロリドン間にはかなりの相互作用があること, この相互作用の機構は塩析と似ていることから疎水性結合を考えている。

ポリビニルピロリドンと活性剤の結合には特異な現象がみられる。最近, Fishman, Eirich²⁰⁾ は, ポリビニルピロリドンとアニオン活性剤の一つであるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) との相互作用を, 透析平衡法で調べた。ドデシル硫酸ナトリウム水溶液にポリビニルピロリドンを添加すると, 会合高分子電解質が生ずる。ポリマ

第 7 図 ポリビニルピロリドンとドデシル硫酸ナトリウムの結合曲線

ー濃度を一定にして活性剤濃度を変化させると, 挙動は三つの領域にわかれる(第 7 図)。活性剤とポリマーの比 (S/P) が非常に小さいときには, 結合がおこらないか, おこってもわずかである(第 7 図中には示されていない)。中間領域では, 遊離活性剤濃度とともにポリマーは直線状に活性剤イオンを結合させる。そして, cluster

第 8 図 タンパク質 (P) と rigid ligand の結合 (a) およびタンパク質と flexible ligand の結合 (b)

または submicelle が形成される。S/P が大きいところでは、これらの submicelle は純活性剤の cmc よりも小さい cmc のところで通常の混合ミセルに変化する。この混合ミセルは一定の活性剤イオン濃度と平衡になっている。したがって、ポリビニルピロリドンは活性剤ミセルに対して核形成剤として働く。

Némethy ら²²⁾は、活性剤のような長鎖アルキル基をもつ低分子とポリマー（タンパク質）の結合において、長鎖アルキル基の flexibility (configuration) を考慮に入れて、統計的取り扱いをしている（第8図）。

ポリビニルピロリドン～メチルオレンジ結合における尿素添加の影響について調べられている（第9図）⁴⁾。尿素を 6 mol 添加すると、ポリマーのメチルオレンジに対する結合量はいちじるしく減少する。この現象は血清アルブミンにおいてみられたのと同様である²³⁾。尿素がタンパク質および合成高分子に対して同じような効果を示すことや、尿素の効果はその添加量が非常に多くならないとあらわれないことから、Klotz は尿素の作用はそれを添加したためにおこる溶媒の組成変化に帰している (alloplastic factor)²⁴⁾。

3.2 ポリメタクリル酸

ポリメタクリル酸の水溶液では、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミドおよびポリメタクリルアミドなどの水溶液に比べて、2, 3 の特異な現象が以前から観察されていた^{25, 26)}。

第9図 ポリビニルピロリドン～メチルオレンジ結合における尿素添加の影響 (pH 7, 25°C)

第11表 脂肪族炭化水素類の純水中およびポリメタクリル酸水溶液中での溶解度とその分配係数 (25°C)

Hydrocarbon	Solubility of hydrocarbon, mmoles of hydrocarbon per liter of H ₂ O	Solubility of hydrocarbon, mmoles of hydrocarbon per liter of unneutralized 0.4 N	
		PMA solution ($\bar{M}_v=1.4 \times 10^4$)	K (eq./liter ⁻¹)
Cyclopropane	11.1	11.24	0.03
Propane	1.50	1.83	0.54
n-Butane	1.09	1.37	0.64
n-Pentane	1.03	2.27	3.16
n-Hexane	0.96	3.77	7.31

第12表 芳香族多環状炭化水素類の純水中およびメタクリル酸水溶液中での溶解度とその分配係数

Hydrocarbon	Solubility in H ₂ O (mole/l.) at 25°	Solubility (mole/l.) in PMA solution at 25° ($\alpha=0$, $C=0.1$ N, $\bar{M}_v=58 \times 10^4$)	K (l./equiv) at 25° PMA ($\alpha=0$)
Phenanthrene	9.0×10^{-6}	2.70×10^{-4}	3.0×10^2
Anthracene	4.47×10^{-7}	0.31×10^{-4}	7.0×10^2
Pyrene	7.7×10^{-6}	2.08×10^{-4}	2.7×10^3
1,2-Benzpyrene	2.9×10^{-8}	0.67×10^{-4}	2.3×10^4
3,4-Benzpyrene	1.6×10^{-8}	1.25×10^{-4}	7.8×10^4

この特異性は、ポリメタクリル酸水溶液では、側鎖メチル基間に疎水性結合が存在するためであるといわれている²⁷⁻³¹⁾。

Liquori ら²⁸⁾は、高分子電解質であるポリメタクリル酸の粘度、電位差滴定、遠視外吸収スペクトル、染料結合能などを測定して、このポリマーは中和度の限界領域で、水溶液中で形態転移をおこすことを実験的にたしかめた。低い中和度では球状コイルのコンホメーションをとり、中和度が大きくなるにつれてカルボン酸基が解離して、ポリマー内の静電的反発力が増大し、その結果ポリマーは unfolding してくることを明らかにした。そして、低い中和度で球状コイルになるのは、側鎖メチル基間の疎水性結合のためだとしている。

また彼らは、脂肪族炭化水素類（第11表）³⁰⁾および芳香族多環状炭化水素類（第12表）³¹⁾の純水およびポリメタクリル酸水溶液中での溶解度を調べ、両溶液中での炭化水素類の分配を求めた。そして、ポリメタクリル酸水溶液中での炭化水素類の溶解度は、小さい中和度では純水中でのそれよりも大きいこと、また中和度の増大とともにポリメタクリル酸の溶解力は減少することを明らかにした（第10図）。これは小さい中和度では、球状コイルの疎水性部分へ炭化水素類が溶解するためであると考えられる。

アクリル酸は炭化水素類の溶解度に影響をおよぼさ

第 10 図 ビレン (○) および 3,4-ピッツピレン (●) の分配係数 K と中和度 α の関係

ず、純水中の溶解度とアクリル酸水溶液中の溶解度は同じである。これは、アクリル酸は水溶液中では疎水性結合が存在せず、伸びたコンホメーションをとっているためである。

高岸ら³²⁾は、ポリメタクリル酸と分散染料モデル物質 (アゾベンゼン, p-アミノアゾベンゼン, p-オキシアゾベンゼン) との相互作用を透析平衡法で調べ、結合にともなう熱力学関数を求めた。その結果を第 13 表に示す。この表から明らかなように、自由エネルギー変化は負、エンタルピー変化は負で発熱、エントロピー変化は正の値をとる。とくに結合には正のエントロピー変化の寄与が大きい。これは分散染料がポリメタクリル酸の球状コイル内部の疎水性部分に結合する際の疎水性結合のためであると考えられる。

これらの分散染料は、ポリメタクリル酸と相互作用をもつが、ポリアクリル酸およびポリアクリルアミドとは全く結合しない。ポリメタクリルアミドとはわずかに結合する。

ポリメタクリル酸～分散染料の結合におよぼす尿素の

第 11 図 ポリメタクリル酸～*p*-オキシアゾベンゼン結合における尿素添加の影響

○: 尿素なし
●: 0.5 mol 尿素
⊙: 1.0 mol 尿素

影響を調べると、尿素をわずか 1 mol 添加しただけで結合量はいちじるしく減少する (第 11 図)。これは、尿素が水の構造の規則性を減少させ (iceberg の破壊)、ポリマーの folding に寄与する疎水性結合を減少させること、およびポリマー～染料間の疎水性結合を減少させるためであると考えられる。尿素水溶液中ではポリメタクリル酸の粘度が、純水中でのそれよりもいちじるしく増大することからも明らかである。

3.3 ポリエチレンイミン

Klotz, Sloniewsky³⁾ は、ポリエチレンイミン (PEI-6*) にラウロイル基を導入すると、ジメチルアミノアゾベンゼンに対する結合力はいちじるしく増大することを明らかにした。ポリエチレンイミンそれ自身は、ジメチルアミノアゾベンゼンと全く結合しない。この実験では、PEI-6 の分子量が小さいために、透析平衡法では測定できなので溶解度法により測定した。その結果を第 14 表に示す。Lauroyl-PEI-6 はウシ血清アルブミンよりも

大きな親和性をジメチルアミノアゾベンゼンに対して示すことがわかる。

Klotz, Royer, Sloniewsky³³⁾ は、さらに分子量の大きいポリエチレンイミン (PEI-600**) を用いて、透析平衡法によりメチルオレンジに対する結合を調べた。すなわち、ポリエチレンイミンの第 1 級アミンにアシル基、たとえばラウロイル基、ヘキサノイル基、ブチル基、イソブチル基、カルボベンゾキシチロシン、カルボベンゾキシトリプトファンなどの基を導入した。これらのポリマーのメチルオレンジに対する結合曲線を第 12 図に示す。

第 13 表 ポリメタクリル酸と分散染料モデル物質の結合における熱力学関数

Compound	Temp. (°C)	ΔF (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS_u (e. u.)
<chem>c1ccc(cc1)-N=N-c2ccccc2</chem>	5 15 25	—5,780	—560	+25.7
<chem>c1ccc(cc1)-N=N-c2ccc(O)cc2</chem>	5 15 25	—5,690	—1,670	+21.9
<chem>c1ccc(cc1)-N=N-c2ccc(N)cc2</chem>	5 15 25	—5,410	—1,630	+21.1

* 分子量約 600

** 分子量約 60,000

第 14 表 ジメチルアミノアゾベンゼンのアシル化ポリエチレンジアミンおよびウシ血清アルブミンに対する結合量 (20°C)

Macromolecule	Concentration (%)	pH	Buffer Salt	Moles Bound Dye 10 ⁶ g Macromolecule
Lauroylpolyethyleneimine-10 ^a	1.0	9.1	Na ₂ HPO ₄	1.1
"	0.5	9.1	Na ₂ HPO ₄	1.0
"	0.1	9.1	Na ₂ HPO ₄	0.9
"	0.5	9.0	(Cl ⁻) ^c	0.8
"	0.1	8.8	(Cl ⁻)	0.7
"	0.07	8.8	(Cl ⁻)	0.6
"	1.0	7.3	HEPES ^d	0.58
"	0.5	7.3	HEPES	0.48
"	0.2	7.3	HEPES	0.33
Bovine serum albumin	1.0	7.3	HEPES	0.21
"	0.5	7.3	HEPES	0.22
"	0.2	7.3	HEPES	0.23
Lauroylpolyethyleneimine-10 ^a	1.0	7.3	(Cl ⁻)	0.61
"	0.5	7.3	(Cl ⁻)	0.48
"	0.2	7.3	(Cl ⁻)	0.43
Lauroylpolyethyleneimine-20 ^b	1.0	7.3	(Cl ⁻)	1.6
"	0.5	7.3	(Cl ⁻)	1.5
"	0.1	7.3	(Cl ⁻)	1.4
Bovine serum albumin	1.0	7.3	(Na ⁺) ^e	0.22
"	0.5	7.3	(Na ⁺)	0.24
"	0.2	7.3	(Na ⁺)	0.28

a) 10% ラウロイル基

b) 20% ラウロイル基

c) 緩衝液なし, pH は HCl または NaOH で調整

d) N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-ethansulfonate

第 12 図 アシル化 PEI-600 とメチルオレンジの結合曲線 (pH 7, 25°C)

- 1: Lauroyl-PEI-600 (8.4% アシル化)
- 2: Hexanoyl-PEI-600 (11.5% アシル化)
- 3: Butyryl-PEI-600 (10% アシル化) (○)
- 4: iso-Butyryl-PEI-600 (10% アシル化) (□)
- 5: ウシ血清アルブミン (BSA)

第 13 図 アシル化 PEI-600 とメチルオレンジの結合曲線 (pH 7, 25°C)

- 1: Carbobenzoxytyrosine-PEI-600 (10% アシル化)
- 2: Carbobenzoxytryptophan-PEI-600 (8% アシル化)
- 3: Carbobenzoxytryptophan-PEI-600 (2% アシル化)
- 4: ウシ血清アルブミン (BSA)

メチルオレンジに対する結合力の強さは, Lauroyl-PEI-600 > Hexanoyl-PEI-600 > *n*-Butyryl-PEI-600 ~ *iso*-Butyryl-PEI-600 > PEI-600 の順となる。遊離メチルオレンジ濃度が 10⁻⁶ mol のところでは, 10⁶ g の Lauroyl-PEI-600 は 100 mol 以上のメチルオレンジと結合する。Hexanoyl-PEI-600 に対しては約 10 mol, Butyryl-PEI-600 に対しては約 1 mol, ウシ血清アルブミンに対しては 1 mol 以下である。

第 13 図にアミノ酸誘導体のメチルオレンジに対する結合曲線を示す。結合力は Carbobenzoxytyrosine-PEI-600 > Carbobenzoxytryptophan-PEI-600 > BSA (ウシ血清アルブミン) の順となる。第 12, 13 図を比較しても明らかなように, Lauroyl-PEI-600 の結合能力は異常に大きい。

Lauroyl-PEI-600 に結合したメチルオレンジの吸収スペクトルを第 14 図に示す。この吸収スペクトルは透析平衡時の透析膜内と外の差スペクトルより得られたものである。メチルオレンジ水溶液の最大吸収波長は 465 mμ である。一方, Lauroyl-PEI-600 に結合

したメチルオレンジは、その結合量が低い時には約 420 m μ に最大吸収波長をもつが、結合量が増大するにつれて 375 m μ 付近に新しい鋭いピークがあらわれる。この

第 14 図 Lauroyl-PEI-600 に結合したメチルオレンジの吸収スペクトル (pH 7)

結合メチルオレンジ量

1 : 9.1 mol	4 : 174 mol
2 : 28.3 mol	5 : 233 mol
3 : 82.4 mol	6 : 287 mol

第 15 表 架橋の方法

* 分子量約 1,800

ような青色移動から、結合メチルオレンジは Lauroyl-PEI-600 の非極性部分の雰囲気中にあることがわかる。また第 12 図における結合曲線の鋭い立ちあがり、第 14 図における 375 m μ 付近の新しいピークは cooperative binding のためである。

Takagishi, Klotz²⁴⁾ は、ポリエチレンジアミン (PEI-18*) にペンダントグループ (アシル基) をつけ、さらにつぎの方法でポリマー中に SH 基を導入し、その後、第 15 表に示す方法で架橋して、メチルオレンジに対す

る結合力を調べた。ここで、(I) ではメチルオレンジなし、(II) ではメチルオレンジ存在下で架橋した。(I) と (II) の唯一の異なる点は架橋時のメチルオレンジの存在か否かであり、すべての実験を通して他の条件、方法はすべて同じである。架橋後、ポリマー溶液を 1 mol 塩化ナトリウム溶液中で透析し、その後水中で透析して

第 15 図 ポリマー (I) および (II) とメチルオレンジの結合曲線 (Lauroyl-PEI-18, pH 7, 25°C)

- (I) メチルオレンジなしで架橋
 (II a) : メチルオレンジ存在下 (2.75×10^{-6} mol) で架橋
 (II b) : メチルオレンジ存在下 (5.5×10^{-6} mol) で架橋

第 16 図 分子内および分子間架橋とポケットの模式図

塩をとりのぞいた。ポリマー (II) 中に含まれたメチルオレンジはこの透析により完全に除去することができ、透析後、ポリマーを凍結乾燥により得た。それから、得られた 2 種類のポリマーに対するメチルオレンジの結合を透析平衡法により求めた。

Lauroyl-PEI-18 について、2 種類のポリマー (I) と (II) に対するメチルオレンジの結合曲線を第 15 図に示す。ポリマー (I) と (II) のメチルオレンジに対する結合力には明らかに差があらわれ、ポリマー (II) は (I) よりも強い結合力を示すことがわかる。

また、ポリマー (I) と (II) の結合力の差は、架橋時の初期メチルオレンジ濃度の増加とともに増大すること、ポリマー中の S-S 含量の増加とともに増大すること、長鎖アシル基をポリマー中に導入すると増大すること、および架橋後のポリマー (I) と (II) の分子量には差がないことなどから、メチルオレンジ存在下で架橋した場合には、ポリマー (II) 中にメチルオレンジが S-S 結合により mold され、それが透析によりとりのぞかれるためにポリマー (II) にはメチルオレンジの大きさに合ったポケットが形成され (第 16 図)、このため、ポリマー (II) は (I) よりも大きな結合力を示すものと考えられる。

3.4 ポリリジン

第 4 図に示すように、ポリリジンのメチルオレンジに対する結合力は非常に小さい。これはポリリジンが伸びたコンホメーションをとるためであろう。そこで、ポリリジンの小分子に対する結合力を高める方法として、rigid でコンパクトなコンホメーションをとるように、このポリマーを修飾することが考えられる。Klotz, Harris⁸⁵⁾は、ポリエチレンイミンと同じような反応によりポリリジン中に SH 基を導入し、無機電解質の存在下で種々の条件でポリマーを架橋した。種々の架橋ポリリジンを第 16 表に示す。この表において、ポリマー A は 2.5 mol のグリシンを含む 0.01 mol Tris-cacodylate

第 16 表 各種ポリマーとメチルオレンジの結合定数 (アセテート緩衝液, pH 5.6, 25°C)

Macromolecule	% Lys Residues Cross-Linked	$k_1 \times 10^{-5}$
Polylysine		0.08
S-S preparation A	10.5	0.2
B	10.5	0.2
C	10.5	0.37
D	13.7	0.46
E	13.7	0.4
F	13.7	1.45
Bovine serum albumin		0.54
Polyvinylpyrrolidone		0.22

第 17 図 ポリリジンおよび架橋ポリリジンとメチルオレンジの結合曲線 (pH 5.6, 25°C)

緩衝液 (pH 7.0) 中で、B は 2 mol の塩化ナトリウムを含む 0.01 mol Tris-cacodylate 緩衝液 (pH 8.0) 中で、C, D は 1.5 mol の硫酸ナトリウムを含む 0.01 mol Tris-cacodylate 緩衝液 (pH 8.0) 中で、E は 0.75 mol の硫酸ナトリウムを含む 0.01 mol Tris-cacodylate 緩衝液 (pH 8.0) 中で、F は 1.5 mol の硫酸ナトリウムを含む 0.01 mol Tri-cacodylate 緩衝液 (pH 9.0) 中で、いずれも空気により酸化し架橋した。結合曲線を第 17 図に示す。これから明らかなように、ポリマー F が大きな結合定数を示すことがわかる。

ポリマー D の $[\eta]$ は 10、架橋しないものとポリリジンの $[\eta]$ は 230 であること、また架橋は分子内架橋のみがおこっていることから、架橋によりポリマーがコンパクトなコンホメーションをとり、その結果、メチルオレンジに対して大きな親和力を示すものと考えられる。

3.5 ポリエチレンオキシド

Scholtan¹²⁾は、ポリエチレンオキシドとメタベンゾパーブリン 4B の結合性におよぼす、ポリエチレンオキシドの分子量の影響について調べ、第 17 表に示すような

第 17 表 メタベンゾパーブリン 4B の結合性におよぼすポリエチレンオキシドの分子量の影響

PEO の分子量	$K_1 \cdot 10^3$
500	4.2
800	6.8
4,500	16.7

第 18 図 ポリエチレンオキシドと染料の結合力

結果を得た。

吉田²¹⁾は、ポリエチレンオキシドと染料の相互作用には、 π 型水素結合の可能性を示唆している(第 18 図)。

3.6 その他の水溶性合成高分子

ポリビニルピリジン, ポリイソプロピルアクリルアミド, ポリビニルイミダゾール, ポリビニルメチルオキサゾリジノン, ポリ(ビニルメチルオキサゾリジノン-ビニルイミダゾール)共重合体, ポリ(ビニルピロリドン-ビニルイミダゾール)共重合体, ポリ(ビニルピロリドン-ビニルアルコール)共重合体, ポリ(ビニルピロリドン-無水マレイン酸)共重合体, ポリ(ビニルメチルオキサゾリジノン-無水マレイン酸)共重合体, ポリ(2-ジメチルアミノエチルメタクリレート-メタクリル酸)共重合体の小分子に対する結合性が調べられている⁹⁾。しかしながら, これらのどのポリマーも血清アルブミンに比べると小分子に対する結合力は小さい。

文 献

- 1) I. M. Klotz; *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 14, 97 (1950)
- 2) I. M. Klotz; *The Proteins*, Vol. IB, H. Neurath and K. Bailey, Ed., Academic Press, New York, N. Y., (1953)
- 3) I. M. Klotz, E. W. Gelewitz and J. M. Urquhart; *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 209 (1952)
- 4) I. M. Klotz and K. Shikama; *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 551 (1968)
- 5) I. M. Klotz and A. R. Sloniewsky; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 421 (1968)
- 6) R. K. Burkhard, B. E. Burgert and J. S. Levitt; *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2977 (1953)

- 7) J. Koga, N. Morita and N. Kuroki; *Kolloid Z.*, 226, 153 (1968)
- 8) 古賀, 森田, 黒木; 日化, 90, 411 (1969)
- 9) 古賀, 黒木; 表面, 8, 533 (1971)
- 10) H. Bennhold and R. Schubert; *Z. Ges. Exptl. Med.*, 113, 722 (1943)
- 11) C. Wunderly; *Arztl. Forsch.*, 4, I, 29 (1950)
- 12) W. Scholtan; *Makromol. Chem.*, 11, 131 (1953)
- 13) S. Saito; *Kolloid Z.*, 154, 19 (1957)
- 14) H. P. Frank, S. Barkin and F. R. Eirich; *J. Phys. Chem.*, 61, 1375 (1957)
- 15) S. Saito; *Kolloid Z.*, 158, 120 (1958)
- 16) I. M. Klotz and V. H. Stryker; *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 5169 (1960)
- 17) J. Eliassaf, F. Erikson and F. R. Eirich; *J. Polymer Sci.*, 57, 193 (1960)
- 18) P. Molyneux and H. P. Frank; *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 3169 (1961)
- 19) P. Molyneux and H. P. Frank; *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 3175 (1961)
- 20) M. L. Fishman and F. R. Eirich; *J. Phys. Chem.*, 75, 3135 (1971)
- 21) 吉田; 染色工業, 8, 675 (1960)
- 22) N. Laiken and G. Némethy; *J. Phys. Chem.*, 74, 4421 (1970)
- 23) I. M. Klotz, H. Triwush and F. M. Walker; *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2935 (1948)
- 24) I. M. Klotz; *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 92 (1966)
- 25) A. Silverberg, J. Eliassaf and A. Katchalsky; *J. Polymer Sci.*, 23, 259 (1957)
- 26) J. Eliassaf and A. Silverber; *Polymer*, 3, 555 (1962)
- 27) T. M. Birshtein et al; *Vysokomol. Soed.*, 7, 372 (1965)
- 28) J. Eliassaf; *Polymer Letters*, 3, 767 (1965)
- 29) A. M. Liquiri, G. Barone, V. Crescenzi, F. Quadrifoglio and V. Vitagliano; *J. Macromol. Chem.*, 1, 291 (1966)
- 30) G. Barone, V. Crescenzi, B. Pispisa and F. Quadrifoglio; *J. Macromol. Chem.*, 1, 761 (1966)
- 31) G. Barone, V. Crescenzi, A. M. Liquori and F. Quadrifoglio; *J. Phys. Chem.*, 71, 2341 (1967)
- 32) 高岸, 栗野, 片山, 小西, 黒木; 織学誌, 25, 325 (1969)
- 33) I. M. Klotz, G. P. Royer and A. R. Sloniewsky; *Biochemistry*, 8, 4752 (1969)
- 34) T. Takagishi and I. M. Klotz; *Biopolymers* 11, 483 (1972)
- 35) I. M. Klotz and J. U. Harris; *Biochemistry*, 10, 923 (1971)

(昭和 47 年 2 月 2 日受理)