

分子クラウディング環境を模倣した 有機溶媒中の反応機構の解明

宮 川 晃 尚*

Investigation of Reaction Mechanism in Organic Solvents Mimicked by Molecular Crowding Environment

Akihisa MIYAGAWA*

Molecular crowding is a characteristic feature of the biological cell environment. In this setting, the equilibrium constant and reaction rate constant differ from those observed in dilute solutions. Molecular crowding studies have predominantly focused on aqueous solutions, primarily due to their relevance in biochemical research. However, considering molecular crowding effects, such as volume exclusion and osmotic pressure, it is possible to create a molecular crowding environment in organic solvents as well. In the present study, we investigated the molecular crowding effect on the complexation of oxine and a porphyrin derivative in methanol and ethanol solvents.

1. 背景

生体細胞中には核酸や糖、タンパク質などが高密度に存在しており、これを分子クラウディング(MC)と呼ぶ。このMC環境下では、分子反応の平衡定数や速度定数といった熱力学的パラメータが希薄溶液中と異なることが知られており、生化学の分野で注目を集めている。しかし、生化学分野では生体分子を中心とした研究に注力しており、例えば錯形成反応などの小分子の反応などについては未開拓領域であった。申請者はMC環境中で、オキシシン配位子と金属イオンの錯形成定数が増加することを見出し、その増加挙動を反応分子と水の活量係数を用いて説明できることを示した¹⁻²⁾。また、それ以外にも水溶液中でMC環境を模倣し、オキシシンの酸解離定数やポルフィリン誘導体のJ会合体形成におけるMC効果について明らかにした³⁻⁴⁾。これらの研究で明らかになった事実は、MC環境の模倣試薬(MC剤)が反応分子の占有体積を減少するため、反応分子の実効濃度(活量係数)が増加するという、いわゆる排除体積効果が重要ということであった。MC環境は生化学分野で検討されてきたという背景もあり、水溶液中の研究しか行われていないが、排除体積効果の原理に基づく有機溶媒中でもこのMC環境を形成し、反応性を変化できると考えられる。そこで本研究では、MC環境を有機溶媒中で形成し、MCによる有機溶媒中の反応性(平衡定数、速度定数)を物理化学的側面から明らかにすることを目的とした。①オキシシンと金属の錯形成定数、②ポルフィリン誘導体と金属の反応速度定数に着目し、MC効果について検討した。

2. 実験

①オキシシンと金属の錯形成定数

錯形成定数は吸収滴定法によって定量した。50 μM の金属イオンを含むメタノール溶液に、25 mM のオキシシン溶液を 3 μL ずつ滴下し、攪拌しながら、吸収分光光度計で吸光度を測定した。吸収滴定のプロットは Bebesi-Hildebrand 式に基づき解析し、1:1 錯形成定数、1:2 錯形成定数を算出した。金属イオンには Zn, Co, Cd を用いた。MC 環境の形成にはポリエチレングリコール 200(PEG200)を用い、0-50vol%における錯形成定数を定量した。

②ポルフィリン誘導体と金属の反応速度定数

ポルフィリン誘導体には TMPyP と呼ばれる分子、金属イオンには Zn を用いた。6 μM の TMPyP 溶液に 1 μM の Zn を滴下し、吸光度を測定した。TMPyP は Zn と錯形成することで、吸収波長が長波長にシフトする。したがって、長波長側の吸光度の経時変化を測定することで、反応速度定数を算出した。有機溶媒にはメタノール、エタノールを用い、MC 剤には PEG200 を用いた。PEG200 濃度が 0-50vol%の範囲における反応速度定数を定量し、MC 効果について評価した。

3. 結果と考察

①オキシシンと金属の錯形成定数

図1にPEG濃度(C_{PEG})に対する全錯形成定数(β)を示す。明らかに C_{PEG} の増加に伴い、全錯形成定数が増加していることがわかる。例えば、Znの場合、 $C_{\text{PEG}}=50\text{vol}\%$ で全錯形成定数が約100倍増加した。メタノールとPEGの極性パラメータは同程度であるため、極性による効果は小さいと考えられる。また、1:1および1:2錯形成定数についても同様の結果が得られており、これはMC効果によるものであると考えられる。

得られた挙動について、MC効果における、排除体積効果と浸透圧効果を考慮した熱力学式¹⁻²⁾で解析を行った。その結果、錯形成定数の増加挙動をこのモデルでよく説明できることを示した。1:1錯形成は浸透圧による脱溶媒和、1:2錯形成は排除体積効果によって反応促進しており、結果として全錯形成定数が増加したということを明らかにした。以上のことから、有機溶媒中においても、MC効果により、錯形成を促進できるということを実証した。

②ポルフィリン誘導体と金属の反応速度定数

図2に C_{PEG} と反応速度定数の関係を示す。 C_{PEG} が $50\text{vol}\%$ のとき、反応速度定数は約1000倍増加した。上述のように、メタノールの極性はPEG200と同程度であるため、極性の効果は小さい。また、エタノールにおいても同様の結果が得られており、MC効果がメタノールだけでなく、エタノールにも働くことを明らかにした。

速度定数についても、排除体積効果と浸透圧効果を考慮した熱力学式¹⁻²⁾を用いて、MC効果について検討した。しかし、ポルフィリン誘導体と金属の錯形成の反応速度の解析においては、排除体積効果が働かないということを示し、浸透圧の効果のみを評価した。結果として、反応速度定数の増加挙動をよく説明することができ、本系においてもMC効果が働き、錯形成が促進していることを明らかにした。また、メタノールとエタノールでは、反応性が異なり、メタノールの方がMC効果を受けやすいことがわかった。これは、金属錯体形成反応の過程でメタノール分子が脱溶媒和しやすいということに起因すると考えられる。以上のことから、メタノールだけでなく、エタノールにおいてもMC効果によって錯形成反応速度が向上することを明らかとした。

4. まとめ

本研究では、有機溶媒中におけるMC効果を実証するために、二つの検討を行った。オキシシンと金属イオンの錯形成反応では、メタノール溶媒中におけるZn, Co, Cdの錯形成定数に着目した。いずれの金属イオンも錯形成定数が増加し、メタノール中での錯形成が促進した。MC効果の解析により、排除体積効果と浸透圧効果により錯形成定数が増加することを明らかにした。TMPyPと金属イオンの錯形成反応では、またメタノールとエタノールの溶媒中におけるZnの反応速度定数を評価した。どちらの有機溶媒でも反応速度定数は増加し、浸透圧の効果によるものであることを明らかにした。これらの結果は、これまで水溶媒中でしか検討されてこなかったMC環境の概念を大きく覆すものである。また、このMC効果は錯形成反応の反応性を向上し、他の反応系においても同様の効果を期待できる。したがって、有機溶媒中MCという本研究が新たな反応場として注目を集めることを期待している。

REFERENCES

- 1) A. Miyagawa, H. Komatsu, S. Nagatomo and K. Nakatani, *J. Phys. Chem. B*, **125** (2021) 9853-9859.
- 2) A. Miyagawa, H. Komatsu, S. Nagatomo and K. Nakatani, *J. Mol. Liq.*, **372** (2023) 121181.
- 3) A. Miyagawa, H. Komatsu, S. Nagatomo and K. Nakatani, *J. Mol. Liq.*, **360** (2022) 119526.
- 4) A. Miyagawa, H. Komatsu, S. Nagatomo and K. Nakatani, *Anal. Sci.*, **38** (2022) 1505-1512.

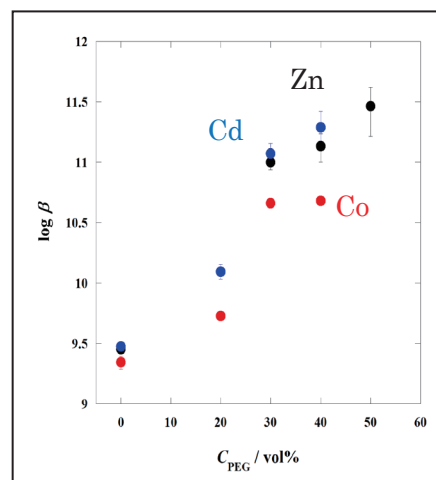


図1 PEG200濃度に対する全錯形成定数.

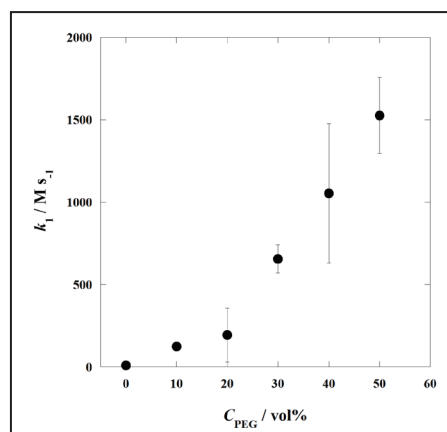


図2 PEG200濃度に対する反応速度定数.