

多糖を利用した色素の集積とその分光分析

第1章 背景

多糖類には生体の構造を維持するもの、エネルギー貯蔵物質となるものがある。多糖類は、たくさんの単糖分子がグルコシド結合でつながったもので、酸処理又は酵素の作用で、単糖又はその誘導体に加水分解される¹⁾。ムコ多糖の一種であるヒアルロン酸 (HA) は、その単純な化学構造から長年細胞外マトリックスにおける空間充填物として比較的受動的な生物学的役割が考えられてきたが、近年 HA の生体内でのさまざまな機能が明らかとなってきた²⁾。また、保湿性を有する天然多糖類は口腔乾燥の症状を緩和させることを目的として広く利用されている³⁾。

HA は D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンからなる二糖の交互共重合体である。水溶液中での HA の高次構造は水分子を介した水素結合により形成されており、X 線回折により左巻きヘリックス構造を形成することが報告されている⁴⁻⁶⁾。さらに HA の二次構造は、温度、pH、溶媒、イオン強度、などによりコイル-ヘリックスの相転移を持つと考えられている⁷⁻⁸⁾。HA の分子量は数 10 万～数 100 万の分布を持ち、1 g の HA は約 2～6 L の水を保持することが知られている⁹⁾。高濃度の HA 水溶液は非常に高い粘性と弾性を持つ。HA をおもなりガンドとする接着分子である CD44 (Fig. 1-3) は、細胞接着、細胞運動、さらには、癌細胞の増殖能、浸潤・転移能への関与など、さまざまなシグナル伝達にかかわることが解明されてきている¹⁰⁾。CD44 受容体はがん細胞で過剰発現することが知られており、HA は CD44 受容体に対して高い親和性を有している¹⁰⁾。この HA の性質を利用し、がんの治療薬や診断薬が広く検討されている。

本研究では、水溶液中での大変興味深い高次構造と生体内での様々な機能を持つ HA を用い、HA 上で色素会合体を形成させ、温度や pH、溶媒比率、分子量、配合濃度等を変化させ、光学的性質を調べることで、色素会合体の形成制御を行うことを目的とした。

第2章では、アニオン性の多糖である HA とカチオン性シアニン色素である NK-77 (3,3'-diethyl-9-methylthiacarbocyanine: DMTC) が形成する会合体の励起子相互作用について、可視吸収スペクトル、及び、円偏光二色性 (CD) スペクトルにより調査した。アキラルな色素である NK-77 を HA と 1:2 の割合で混合したリン酸緩衝溶液中の可視吸収スペクトル、及び、CD スペクトルにより NK-77 会合体の光学的性質を調査した、さらに、温度や溶媒、HA 濃度を変化させ、HA-NK-77 会合体形成を検討した。

第3章では、HA とメチン基の長さが異なるシアニン色素 (3,3'-Diethylthiacyanine iodide : DTTHC, 3,3'-Diethylthiacarbocyanine iodide: DTC , 3,3'-Diethylthiadibocyanine iodide: DTDC) 会合体の特異的な相互作用について、HA-シアニン色素 (1:2) リン酸緩衝溶液中の可視吸収スペクトル、及び、CD スペクトルにより調査した。さらに、温度及び溶媒中のメタノール比率を変化させ、HA-シアニン色素会合体の挙動を観察した。

第4章では、シアニン色素の会合体が分子量の異なる HA から受ける影響について調査するため、吸収スペクトル、CD スペクトル、及び、蛍光スペクトルを測定した。

第5章では、基本骨格が異なるカチオン性のシアニン色素 (DTDC)、及び、ポルフィリン [$\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetrakis (1-methylpyridinium-4- γ) porphyrin *p*-toluene sulfonate: TMPyP]を用いて、HA 存在下での色素会合体の挙動について、HA 濃度や溶媒 pH を変化させ、可視吸収スペクトル、及び、CD スペクトル、蛍光スペクトルを測定し、比較した。

第6章では、2章から5章の総括を行った。

第2章 シアニン色素-ヒアルロン酸複合体形成と励起子相互作用

NK-77(DMTC)は、カチオン性のシアニン色素である。シアニン色素はもともとアキラルな物質であるが、二次構造を持つポリアミノ酸などに結合することによりキラリティーを持ったダイマーを形成することがわかっているため¹¹⁻¹²⁾、同様の効果を期待して、HA 上で形成するシアニン色素会合体の励起子相互作用について、可視吸収スペクトル、及び、CD スペクトルにより調査した。

NK-77 を HA と 1:2 の割合で混合した時の可視吸収スペクトルでは、50°Cで見られた NK-77 モノマーの吸収帯が、温度の低下により低波長シフトを示した。Kasha の励起子分裂モデルより、遷移双極子がダイマーの分子軸と垂直に近づく、高エネルギーの励起準位への遷移が許容され、その色素分子はより短波長の側のエネルギーを吸収することになり、低波長シフトすることがわかっている¹³⁾。従って、温度の低下に伴う著しい低波長シフトは、NK-77 が head-to-

head型にスタッキングしたダイマーを形成していることを示している。

CDスペクトル測定では、アキラルな色素であるNK-77をHAと1:2の割合で混合することにより、キラルダイマーの形成が観測されたことから、HA上に特別な結合部位が存在することが確認された。さらに、このキラルダイマーは、50°Cではモノマー、30°C付近では*R*-キラルダイマー、0°C付近では*S*-キラルダイマーを形成することが観測され、このNK-77のモノマーからダイマーへの転移は、HAの相転移によるものではないかと考えられる。次に、HA濃度の増加により、低温で見られた*S*-キラルダイマーの吸収帯が減少し、*R*-キラルダイマーの吸収帯が増加する現象が見られた。これらのことから、HA上の特別な結合部位において、キラリティーの異なる二種類のダイマーが形成することがわかった。HA上で形成された二種類のキラリティーの異なるダイマーは、HAを構成するD-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンとNK-77の混合では確認されなかった。また、NK-77とランダムコイル構造であるポリアクリル酸を1:2の割合で混合することにより、新たなダイマーの吸収帯は確認されたが、キラリティーは確認されなかった。すなわち、NK-77ダイマーがキラリティーを発現するためには、二次構造のような規則的な構造が必要であることを示しており、HA糖鎖が重要であることが示された。

第3章 シアニン色素-ヒアルロン酸複合体形成に対する色素の構造効果

シアニン類は写真の感光色素や情報記録用色素として使用されてきた色素であり、蛍光染料として細胞の染色にも使用されている¹⁴⁾。これまでの研究では、シアニン色素の1つであるDMTC（別名NK-77）がHA上でH-会合すること、及び、そのH-会合体は温度の低下に伴い*R*-キラル型から*S*-キラル型へスイッチすることを報告した¹⁵⁾。本章では、置換基は同じでメチン基の長さが異なるシアニン色素を用いて、シアニン色素がHA上で形成する会合体の光学特性を調査することを目的とした。対照には、ランダムコイル構造を持つポリアクリル酸ナトリウムとシアニン色素の会合体を用いた。

メチン基の長さが異なる3種類のシアニン色素（DTTHC, DTC, DTDC）の中で、DTDCが特異的にHA及びPA上でH-及びJ-会合体を形成することが確認された。CDスペクトル測定により、ヘリックス構造を持つHA存在下でのDTDCのH-及びJ-会合体はキラリティーを発現することが確認され、ランダム構造であるPA存在下では、キラリティーが確認できなかった。このことから、DTDC会合体のキラリティーはHAのヘリックス構造に由来するものである事が示唆された。またHA-DTDCのCDスペクトルでは、ブロードな吸収スペクトルに対応した正と負の分裂型のコットン効果がそれぞれ観測された。このこ

とから、HA 上で DTDC がいくつかの会合数や角度で会合体を形成することで、会合体の吸収スペクトルがブロードな吸収帯となっているのではないかと考えられている。さらに溶媒中のメタノール濃度を変化させた検討により、HA 上の DTDC モノマーから会合体への変化は、DTDC の分散状態に起因するものであることが示唆された。

第 4 章 シアニン色素－ヒアルロン酸複合体形成に対するヒアルロン酸分子量の影響

シアニン色素のポリメチン鎖中の C-C 結合の振動、ねじれ、回転（特にトランス-シス異性化）は、励起エネルギーの効率的な無放射散逸につながる。分子内移動が制限されると無放射過程が遅れるため、蛍光放射という競合過程が促進される。シアニン色素の蛍光は、溶媒粘度の増加、ミセル中や生体高分子との複合体で観察され、分光プローブや蛍光プローブとして応用されている¹⁶⁾。第 3 章では、メチン基の長さが異なる 3 種類のシアニン色素（DTTHC, DTC, DTDC）の中で、DTDC が特異的に HA 上で会合体を形成すること、及び、HA 上の DTDC のモノマーから会合体への変化は、DTDC の平衡状態に起因するものであることが示唆された¹⁷⁾。本章では、DTDC の会合体が分子量の異なる HA から受ける影響について調査するため、吸収スペクトル、CD スペクトル、及び、蛍光スペクトル（PL）を測定した。

粘度の異なる 4 種類の HA を用いた 5.0 vol%メタノール-緩衝液（pH =3.2）又は水溶液中で、HA-DTDC が粘度依存性を示し、粘度の高い HA-Q 上で DTDC の会合体形成量が最も多く、粘度の低い HA-N 上での DTDC 会合体形成量が最も低かった。HA に起因する 210 nm の CD 強度を比較すると、4 種類の HA のヘリシティは一定であると考えられるため、粘度の異なる 4 種類の HA 存在下での DTDC の会合体は、粘性の増加により会合体の形成量が増加すると推測される。pH = 3.2 の酸性条件下では、水溶液中と比較して、高い DTDC の蛍光強度が観測された。加えて、HA の分子量が小さいほど蛍光強度は高かった。つまり、670 nm 付近の蛍光の消光は、より分子量の大きい HA の場合に顕著に見られた。より分子量の大きい HA の場合に、蛍光の消光が見られたことは、粘性の増加により、会合体の形成量が増加し凝集起因消光が進んだことによると考えられる。

第 5 章 種々の色素と多糖の励起子相互作用

シアニン色素は奇数個のメチン炭素の共役鎖又は二重結合の共役系によって

結合された二つの窒素中心からなるポリメチン色素である¹⁸⁻¹⁹⁾。ポルフィリンは4つのメチン炭素を介して4つのピロールが環状に結合した平面的な大環状分子である (Fig. 5-2)²⁰⁾。それらは蛍光色素の一種であり、写真の感光色素や情報記録用色素として広く使用されている¹⁸⁻²⁰⁾。本論文の第2章及び第3章では、DMTC 及び DTTHC, DTC, DTDC など構造の異なるカチオン性シアニン色素を用い、HA 存在下でのシアニン色素会合体の挙動について報告した^{15, 17)}。第4章では、分子量の異なる4種類のHAを用いたHA-DTDCの吸収スペクトル及びPLスペクトルの比較により、DTDC会合体の形成は、混合溶液中のシアニン色素自体の分散能力に依存することがわかった。本章では、基本骨格が異なるカチオン性のシアニン色素 (DTDC) 及びポルフィリン (TMPyP) を用いて、HA 存在下での会合体の挙動を比較した。

本論文の第3章では、吸収スペクトルはH-及びJ-会合体が混在したブロードな吸収帯を示すことが確認され、溶媒中のメタノール含有率の増加に伴い会合体の形成が抑制されることが確認された¹⁷⁾。本章では、HA 濃度の増加に伴いDTDC会合体が形成され、10 unit- μ mol L⁻¹ 濃度以上で飽和に達し、HAの濃度の増加により、会合体の形成が抑制されないことが確認された。以上の結果から、HA-DTDCはHA上に静電的に相互作用したDTDCにDTDCが凝集することにより会合体を形成していると考えられる。

一方、HA-TMPyPでは、HAの添加によりTMPyPのSoret帯に ~ 3 nmの長波長シフトが見られ、PLスペクトルでは、HA濃度の増加に伴い蛍光強度の増加が確認された。このことから、TMPyPはHAと会合体ではなくモノマーとして相互作用すること、及び、TMPyPの振動運動がHAの二次構造により制限を受け、無放射過程が遅れることで蛍光強度が増大するのではないかと考えられる。また、HA濃度の増加に伴いICDスペクトルが増加し、HA濃度が30 unit- μ mol L⁻¹の時に最大値を示し、その後はHA濃度の増加に伴い減少した。PLスペクトルでも同様に、HA濃度の増加に伴い蛍光強度が増加し、HA濃度が30 unit- μ mol L⁻¹の時に675 nmの蛍光強度が最大値を示した。以上の結果より、HA濃度が0 \sim 30 unit- μ mol L⁻¹の場合は、TMPyPがHAと1箇所結合し、30 unit- μ mol L⁻¹以上では、TMPyPがHAと1箇所だけではなく、2 \sim 4箇所結合するのではないかと考えられる。一方、TMPyPの会合体はpH緩衝液中では確認されなかった。pH緩衝液中のイオンにより、HAとTMPyPの相互作用が抑制されることは、HAとTMPyPが静電的に相互作用していることを示唆している。

以上のように、比較的柔らかくて立体的にもかさばらないカチオン性のシアニン色素とアニオン性多糖類HA及び、比較的剛直で立体的にかさばるカチオン性のポルフィリンとアニオン性多糖類HAとの相互作用について対比すると、

それぞれ静電相互作用による複合体の形成は認められたものの、シアニン色素では色素の凝集と蛍光の消光が観測され、一方、ポルフィリンでは色素の孤立化と蛍光強度の緩やかな増大が見られ、2つの色素でそれぞれ異なる応答を示すことが確認された。

第6章 総括

本研究では、水溶液中での大変興味深い高次構造と生体内での様々な機能を持つHAを用い、HA上で様々な色素会合体を形成させ、温度やpH、溶媒比率、分子量、配合濃度等を変化させ、光学的性質を調べることで、色素会合体の形成制御を行うことを目的とした。

第2章では、アニオン性の多糖であるHAとカチオン性シアニン色素であるNK-77 (DMTC)が形成する会合体の励起子相互作用について、可視吸収スペクトル及びCDスペクトルにより調査した。アキラルな色素であるNK-77をHAと1:2の割合で混合したリン酸緩衝液中で、キラルダイマーの形成が観測されたことから、HA上に特別な結合部位が存在することが確認された。さらに、HA上の特別な結合部位は、温度や溶媒、HA濃度の変化により、キラリティーの異なる二種類のダイマーを形成させることがわかった。

第3章では、HAとメチン基の長さが異なるシアニン色素 (DTTHC, DTC, DTDC) 会合体の特異的な相互作用について、HA-シアニン色素リン酸緩衝液中の可視吸収スペクトル及びCDスペクトルにより調査した。メチン基の長さが異なる3種類のシアニン色素の中で、DTDCが特異的にHA上で会合体を形成すること及びHA上のDTDCのモノマーから会合体への変化は、DTDCの平衡状態に起因するものであることが示唆された。

第4章では、DTDCの会合体が分子量の異なるHAから受ける影響について、粘度の異なる4種類のHAを用いて調査した。5.0 vol%メタノール-緩衝液 (pH = 3.2) 又は水溶液中で、HA-DTDCが粘度依存性を示し、粘度の高いHA-Q存在下でDTDCの会合体形成量が最も多く、粘度の低いHA-N存在下でのDTDC会合体形成量が最も低かった。HAに起因する210 nmのCD強度から、HAのヘリシティは一定であると考えられるため、粘度の異なる4種類のHA存在下でのDTDCの会合体は、粘性の増加により会合体の形成量が増加すると推測される。pH = 3.2の酸性条件下では、HAの分子量が小さいほど蛍光強度は高かった。つまり、酸性条件下では、HAの添加によりDTDCの670 nm付近の蛍光が消光し、より分子量の大きいHAの場合に顕著に見られた。このことは、粘性の増加により、会合体の形成量が増加し凝集起因消光が進んだことによると考えられる。

第5章では、基本骨格が異なるカチオン性のシアニン色素 (DTDC) 及びポルフィリン (TMPyP) を用いて、HA 存在下での会合体の挙動を比較した。比較的柔らかくて立体的にもかさばらないカチオン性のシアニン色素とアニオン性多糖類 HA との相互作用と、比較的剛直で立体的にかさばるカチオン性のポルフィリンとアニオン性多糖類 HA との相互作用について対比すると、それぞれ静電相互作用による複合体の形成は認められたものの、シアニン色素では色素の凝集と蛍光の消光が観測され、一方、ポルフィリンでは色素の孤立化と蛍光強度の緩やかな増大が見られ、2つの色素でそれぞれ異なる応答を示すことが確認された。

本研究を通して得られた多糖を利用した色素会合体の光学的特性制御に関する知見は、バイオセンサーやがん治療のための効果的な色素選択や設計に関する指針を提言するのみならず、円偏光発光物質として3Dディスプレイ用発光素子や光暗号システムなどへの応用が期待できる。

参考文献

- 1) E. E. Corn, P. K. Stumpf 著, 田宮信雄, 八木達彦 訳, 生化学 (第5版), 東京化学同人, 東京, 1988, pp. 40-44.
- 2) M. Yanagishita, Special Issue on Hyaluronan, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2010, **22**, 124, 55-56.
- 3) H. Tobata, Oral care during disease treatment, *Bessatsu BIO Clinica*, 2018 **7**, 3, 78-84
- 4) I. Hargittai and M. Hargittai, Molecular structure of hyaluronan: an introduction, *Struct. Chem.*, 2008, **19**, 697-717.
- 5) ICM. Dea, R. Moorhouse and D. A. Rees *et al.*, Hyaluronic Acid: A Novel, Double Helical Molecule, *Science*, 1973, **179**, 560-562.
- 6) J. K. Sheehan and E. D. T. Atkins, X-ray fibre diffraction study of conformational changes in hyaluronate induced in the presence of sodium, potassium and calcium cations, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1983, **5**, 215-221
- 7) S. Arnott, A. K. Mitra and S. Raghunathan, Hyaluronic Acid Double Helix, *J. Mol. Biol.*, 1983, **169**, 861-872.
- 8) P. W. Staskus and W. C. Johnson Jr, Conformational Transition of Hyaluronic Acid in Aqueous-Organic Solvent Monitored by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism, *Biochem.*, 1988, **27**, 1522-1527.
- 9) 高橋 雅夫 監修, 機能性化粧品の開発, 2000, 226-229.
- 10) 佐谷 秀行, 永野 修, 接着分子 CD44 シグナルと癌の湿潤転移能, 蛋白質核酸 酵素, 2008, 53 (10), 1225-1230.
- 11) H. Ihara, A. Matumoto and M. Sibata *et al.*, Host-guest chemistry using alpha-helical poly (L-lysine), *Polymeric Materials Encyclopedia*, CRC Press, 1996, 3067-3074.
- 12) M. Shibata, H. Ihara and C. Hirayama, Unique property of cyanine dyes on charged poly (L-lysine), *Polymer*, 1993, **34**, 5, 1106-1108.
- 13) M. Kasha, H. R. Rawls and M. A. El-Bayoumi, The exciton model in molecular spectroscopy, *Pure Appl. Chem.*, 1965, **11**, 371-392
- 14) 倉田高明, 中澄博行 編集, 機能性色素の科学, 化学同人, 東京, 2013, 第 12 章, pp 173-188.
- 15) T. Sagawa, H. Tobata and H. Ihara, Exciton interactions in cyanine dye--hyaluronic acid (HA) complex: reversible and biphasic molecular switching of chromophores induced by random coil-to-double-helix phase transition of HA, *Chem. Commun.*, 2004, 2090-2091.
- 16) A. S. Tatikolov, Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for

- biomacromolecules, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2012, **13**, 55– 90.
- 17) H. Tobata and T. Sagawa, Specific excitonic interactions in the aggregates of hyaluronic acid and cyanine dyes with different length of methine group, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 329-333.
- 18) M. Henary, S. Paranjpe and E. A. Owens, Synthesis and application of benzothiazole containing cyanine dyes, *Heterocycl. Commun.*, 2013, **19**, 1– 11.
- 19) M. Dandapat, D. Ghosh and D. Mandal, Torsional and reorientational motion of a symmetric carbocyanine in alcohols and in aqueous micelle solutions 3,3'-Diethylthiadicarbocyanine iodide, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, **276**, 41– 49.
- 20) Y. Jiang and Z. Sun, Self-assembled porphyrin and macrocycle derivatives: From synthesis to function, *MRS Bulletin*, 2019, **44**, 167-170.