

## Red-edge効果を用いたトレハロースガラス中の分子運動の解析

立命館大学 生命科学部

○太田 周志・豊 淳史・平田 雄大・松本 誠史・長澤 裕

### Analysis of molecular motion in trehalose glass using red-edge effect

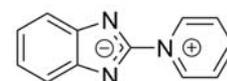
○OTA, Chikashi; TOYO, Atsushi; HIRATA, Yudai; MATSUMOTO, Akifumi;  
NAGASAWA, Yutaka

*College of Life Science, Ritsumeikan University, Japan*

**【Abstract】** Trehalose glass is considered to play an important role for organisms that can survive harsh environmental conditions such as dehydration and freezing by preserving the molecular structure of biological materials. To understand the mechanism of trehalose as a protectant, it is highly important to understand the microenvironment of trehalose glass. In this study, by using a solvatochromic dye, 2-(1-pyridinio)benzimidazolate (SBPa), as a molecular probe, polarity and inhomogeneity of several saccharide glasses were monitored by the solvatochromic shift of the visible absorption spectrum and by the red-edge effect in two-dimensional fluorescence excitation spectrum.

**【序】**クマムシやネムリユスリカ等の生物は、極度の乾燥により生命活動が完全に停止しても、復水すると再生するという現象「cryptobiosis」(隠された生命)を示し、二糖類のトレハロースはその耐乾燥性の根幹を支える重要な分子のひとつであると考えられている。そのメカニズムは、水の代替物質として生体物質に作用すると同時に、ガラス転移によって凝固し、長期間に渡って生体分子の構造を保ち、その活性を維持するということである。このようなトレハロースの優れた生体保護機能を理解するには、粘度や誘電率、ガラス転移点等のバルク物性を観測するだけでは不十分であり、トレハロースガラス中のマイクロ環境の分子論的な詳細を理解する必要がある。Fig. 1に示すベタイン色素 2-(1-pyridinio)benzimidazolate (SBPa)は、基底状態では大きな電気双極子モーメントを有するが、励起状態ではこれが減少するため、可視部の吸収スペクトルの極大が溶媒極性に依存してシフトするソルバトクロミズムを示す。

今回、この特性に着目し、トレハロースを含むいくつかの糖ガラス中に SBPa をドープし、そのマイクロ極性環境を評価した。加えて、SBPa が蛍光色素である特徴を活かし、アモルファス中で観測される蛍光の励起波長依存性「red-edge 効果」について検討した。溶液系では、励起状態におけるエネルギー緩和は高速で起こるので、蛍光スペクトルに励起波長依存性は現れない。しかし、ガラスやポリマー等のアモルファス中では、周辺分子の運動が抑制されるため、吸収の長波長端(0-0 遷移付近)で、蛍光スペクトルの励起波長依存性が見られ、red-edge 効果と呼ばれている。二次元蛍光励起スペクトル測定により red-edge 効果を観測すると、糖ガラス中における分子運動の凍結度合いを示す指標が得られることを我々は提案して



**Fig. 1.** Molecular structure of 2-(1-pyridinio)benzimidazolate (SBPa)

おり[1]、今回は SBPa を用いて、red-edge 効果を検討した。

【実験】SBPa は文献報告の方法で合成し [2]、生成物をエタノール-水混合溶媒で再結晶して SBPa の黄色針状結晶を得た。D(+)-トレハロース (2水和物, >99.0%,)、D-(+)-グルコース (>98.0%)、D-(+)-マルトース (>99.0%)、D-(+)-スクロース (>99.0%) の水溶液を作成し、親水性スライドガラス上に滴下し、室温乾燥後、真空デシケータ中にて乾燥し、糖ガラスを作成した。作成した糖ガラスはどれも均一に着色した透明の状態であり、SBPa の会合や相分離の兆候は認められなかった。

【結果と考察】 Fig. 2a に水溶液、メタノール溶液、各糖水溶液中の SBPa の吸収スペクトルを示す。各糖水溶液の吸収の極大値波長は、マルトース<スクロース<グルコース<水<トレハロース<メタノールの順となり、短波長側ほど水溶液の極性の大きいことを示唆している。マルトース、スクロース水溶液は特に大きな極性を示し、これは理論計算による双極子モーメントの計算結果とも一致する (マルトース : 5.2 D、スクロース : 2.5 D、グルコース : 1.4 D、トレハロース : 1.5 D、水 : 1.85 D、メタノール : 1.71 D)[3]。 Fig. 2b には水溶液、メタノール溶液、各糖ガラス中の SBPa の吸収スペクトルを示す。溶液とは異なり、マルトース、スクロース、グルコースの極大値には大きさ差異はないものの、トレハロースガラスの極大値は他と比較して長波長側に位置した。ガラス中の含水量の影響も考慮する必要があるが、トレハロースガラスは他の糖ガラスと比較して低極性であることが示唆された。 Fig. 3a-d に各種糖ガラス中の SBPa の二次元蛍光励起スペクトルを示す。蛍光スペクトルの極大を図中に白線で示してあり、水溶液中の極大(643 nm)よりも短波長側にあることから、水溶液に比べてガラス中の分子運動が凍結していることがわかる。さらに、励起波長に依存してシフトする red-edge 効果によって、糖ガラスの不均一性も確認できた。発表では、各糖ガラスの二次元蛍光励起スペクトルを解析し、分子運動の凍結度を比較する。

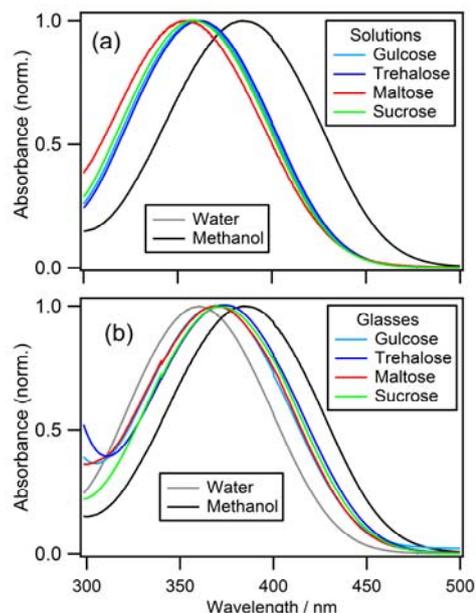


Fig. 2. Absorption spectra of SBPa (a) in solutions and (b) in glasses.

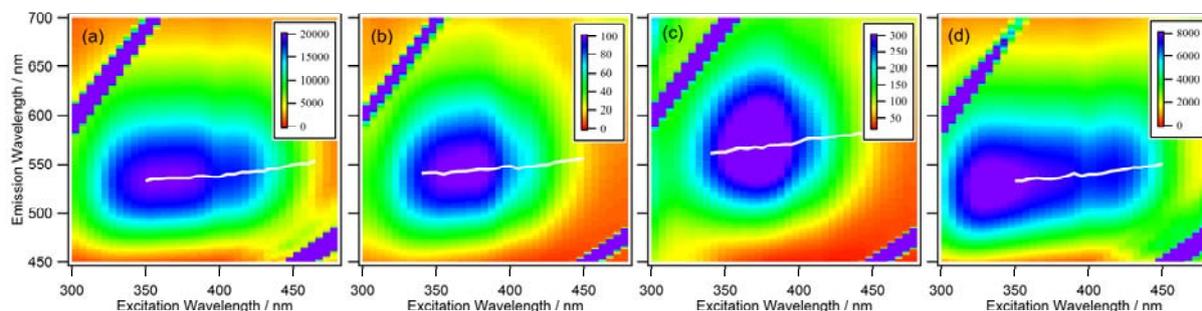


Fig. 3. Two-dimensional fluorescence excitation spectra of SBPa in glasses of (a) trehalose, (b) maltose, (c) sucrose and (d) glucose at room temperature.

[1] 長澤裕, 片山元気, 浅川奈緒美, 宮坂博, 低温生物工学会誌, **2011**, 57, 121-124.

[2] E. Alcalde, I. Dinares, J. Elguero, J-P, Fayet et al, J Org Chem, **1987**, 52, 5009-5015.

[3] S. Giuffrida, G. Cottone, L. Cordone, Biophys J, **2006**, 91 968-980