

バイオ分析化学特論(3)

Scatchard解析

竹中繁織

九州工業大学 物質工学研究系 応用化学部門

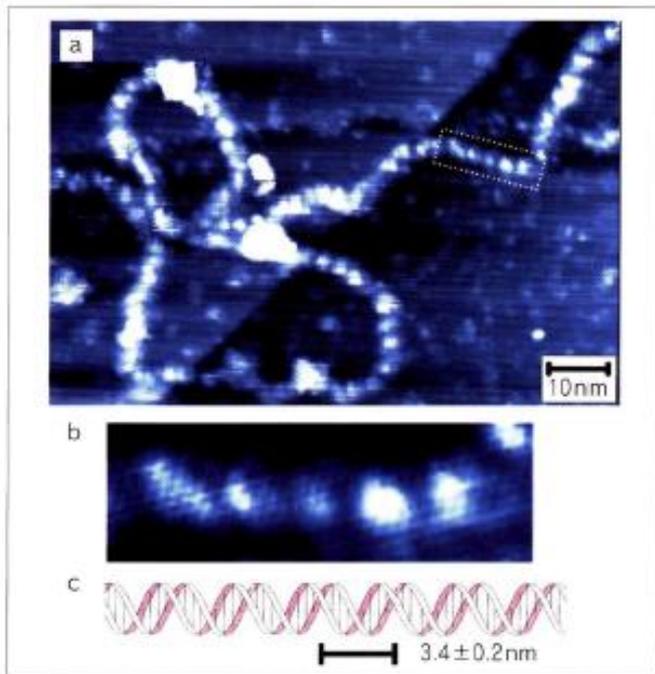
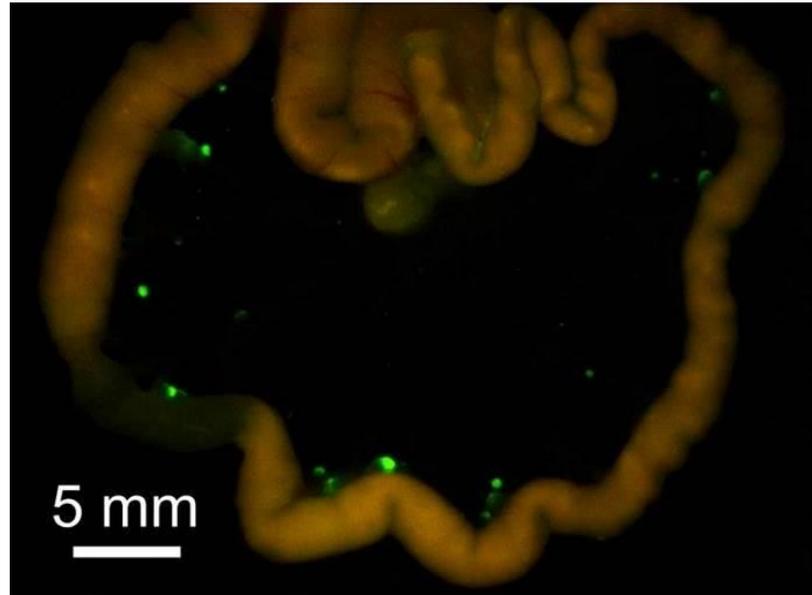


図5 プラスミドDNAの二重らせんのSTM像
 (a)Cu(111)清浄表面に蒸着された環状プラスミドDNA(約3,000塩基対)の拡大STM像。DNA鎖に沿ってストライプ状の内部構造が見られる。(b)aの白い点線で囲まれた長方形の領域の拡大像。(c)Watson-Crick DNAの模式図。bとcは互いに等スケールに合わせてある。観察されたSTM像での周期は2.6~3.6 nmであり、Watson-Crick DNAでの3.4 nmとほぼ一致する。

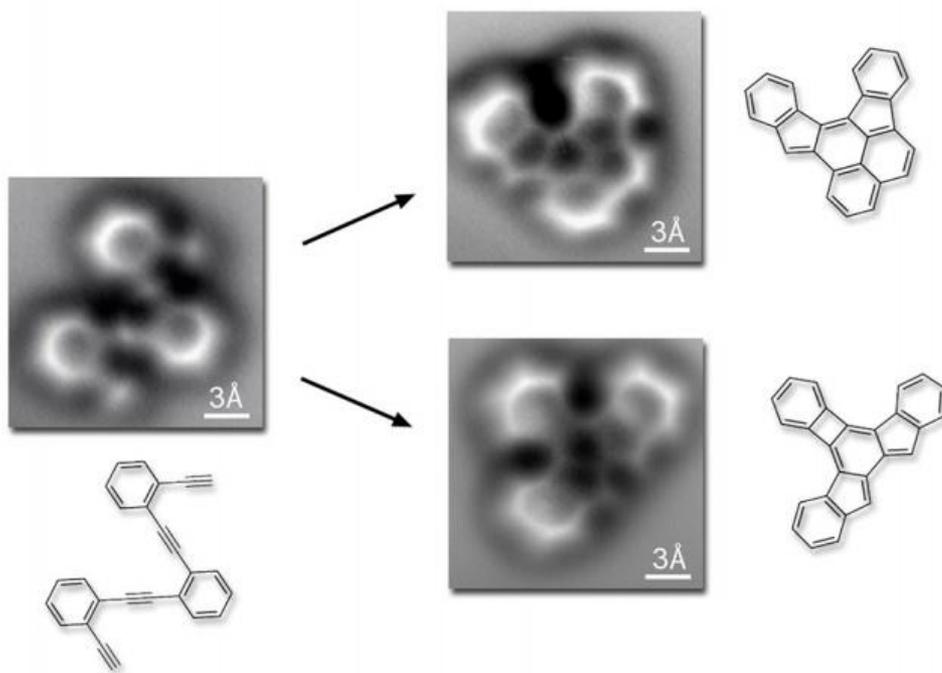
手術中にがんだけを光らせるスプレー、東大が開



モデルマウスの腸間膜上にある微小がんが緑色に光っている

東京大学大学院 医学系研究科・薬学系研究科 浦野泰照教授

First-ever high-resolution images of a molecule as it breaks and reforms chemical bonds



Direct Imaging of Covalent Bond Structure in Single-Molecule Chemical Reactions

Dimas G. de Oteyza,^{1,2*} Patrick Gorman,^{2*} Yen-Chia Chen,^{1,4*} Sebastian Wickenburg,¹ Alexander Riss,¹ Duncan J. Mowbray,^{1,5} Grisha Etkin,¹ Zahra Pedramrazi,¹ Hsin-Zon Tsai,¹ Angel Rubio,^{1,6,7} Michael F. Crommie,^{1,4} Felix R. Fischer^{1,†}

¹Department of Physics, University of California, Berkeley, CA 94720, USA, ²Centro de Física de Materiales CSIC/UPV/EHU-Materials Physics Center, Paseo Manuel de Lardizabal 5, E-20018 San Sebastián, Spain, ³Department of Chemistry, University of California, Berkeley, CA 94720, USA, ⁴Materials Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA, ⁵Donostia International Physics Center, Paseo Manuel de Lardizabal 4, E-20018 San Sebastián, Spain, ⁶Nano-Bio Spectroscopy Group and ETSF Scientific Development Center, Dpto. de Física de Materiales, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Avenida de Tolosa 12, E-20018 San Sebastián, Spain.

*These authors contributed equally to this work.
†Corresponding author. E-mail: crommie@berkeley.edu, ffischer@berkeley.edu

Observing the intricate chemical transformation of an individual molecule as it undergoes a complex reaction is a longstanding challenge in molecular imaging. Advances in scanning probe microscopy now provide the tools to visualize not only the frontier orbitals of chemical reaction partners and products, but their internal covalent bond configurations as well. Here we demonstrate the use of noncontact atomic force microscopy to investigate reaction-induced changes in the detailed internal bond structure of individual oligo(phenylene-1,2-ethynylene)s on Ag(100) as they undergo a series of cyclization processes. Our images reveal the complex surface reaction mechanisms underlying thermally induced cyclization cascades of endiynes. Additional evidence for the proposed reaction pathways is obtained using ab initio density functional theory.

Understanding the microscopic rearrangements of matter that occur during chemical reactions is of great importance for catalytic mechanisms and might lead to dramatic optimization of industrially relevant processes (1, 2). Traditional chemical structure characterization methods, however, are typically limited to ensemble techniques where different molecular structures, if present, are convolved in each measurement (3). This limitation complicates the determination of final chemical products, and often renders such identification impossible for products present only in small amounts. Single-molecule characterization techniques, such as scanning tunneling microscopy (STM) (4, 5), potentially provide a means for surpassing these limitations. Structural identification using STM, however, is limited by the microscopic contrast arising from the electronic local density of states (LDOS), which is not always easily related to chemical structure. Another important sub-nanometer-resolved technique is TLM. Here, however, the high-energy electron beam is often too destructive for organic molecule imaging. Recent advances in tunneling-tip-based non-contact atomic force microscopy (nc-AFM) provide a method capable of non-destructive sub-nanometer spatial resolution (6, 10). Single-molecule images obtained with this technique are reminiscent of wire-frame chemical structures and even allow differences in chemical bond-order to be identified (10). Here we show that, by using nc-AFM, it is possible to resolve intramolecular structural changes and bond rearrangements associated with complex surface-supported cyclization cascades, thereby revealing the microscopic processes involved in chemical reaction pathways.

Intramolecular structural characterization was performed on the products of a thermally-induced endiynyl cyclization of 1,2-bis(2-

ethynyl)phenylacetylene (1). Endiynes exhibit a variety of radical cyclization processes known to compete with traditional Bergman cyclizations (11, 12), thus often rendering numerous products with complex structures that are difficult to characterize using ensemble techniques (13). In order to directly image these products with sub-nanometer spatial resolution, we thermally activated the cyclization reaction on an atomically clean metallic surface under ultra-high vacuum (UHV). We probed both the reactant and final products at the single molecule level using STM and nc-AFM. Our images revealed how the thermally induced complex bond-rearrangement of 1 resulted in a variety of unexpected products, from which we have obtained a detailed mechanistic picture of the cyclization processes. The mechanism are corroborated by ab initio density functional theory (DFT) calculations, revealing the profound potential of nc-AFM for providing new insight into chemical reactions and catalysis.

We synthesized 1,2-bis(2-ethynyl)phenylacetylene (1) through reactive Sonogashira cross-coupling reactions [scheme S1 (14)]. We deposited 1 from a Kratoshe oil onto a Ag(100) surface held at room temperature under UHV. Molecular-decorated samples were transferred to a cryogenic imaging stage (T < 7K) before and after undergoing a thermal annealing step. Cryogenic imaging was performed both in a home-built T = 7 K scanning tunneling microscope and in a qPlus-equipped (15, 16) commercial Omicron LE-SIM/AFM at T = 5 K. nc-AFM images were recorded by measuring the frequency shift of the qPlus resonator while scanning over the sample surface in constant height mode. For nc-AFM measurements the apex of the tip was first functionalized with a single CO molecule (6). To assess the reaction pathway energetics we performed ab initio DFT calculations within the local density approximation (17) using the Grid-based Projector Augmented-Wavefunction method code GPAW (18, 19). Figure 1A shows a representative STM image of 1 on Ag(100) before undergoing thermal annealing. The adsorbed molecules each exhibited three maxima in their LDOS at positions suggestive of the phenyl rings in 1 (Fig. 1A). Annealing the molecule-decorated Ag surface up to 80°C left the structure of the molecules unchanged. Annealing the sample at T > 90°C, however, induced a chemical transformation of 1 into distinctively different molecular products (some molecular description was observed). Figure 1B shows an STM image of the surface after annealing at 145°C for 1 min. Two of the reaction products can be seen in this image, labeled as 2 and 3. The structure of the products is unambiguously distinguishable from one another and from the starting material 1, as shown in the close-up STM images of the most common products 2, 3, and 4 in Fig. 2, 1B to D. The observed product ratios are 2:3:4 = (51 ± 7)%:(28 ± 5)%:(17 ± 3)% with the remaining products comprised of other minority monomers as well as final oligomers [Fig. S2 (19)].

Detailed sub-nanometer-resolved structure and bond conformation of the molecular reactant 1 and products (2 to 4) were obtained by per-

WHAT IS LIFE?

*The Physical Aspect of the
Living Cell*

BY

ERWIN SCHRÖDINGER

SENIOR PROFESSOR AT THE DUBLIN INSTITUTE FOR
ADVANCED STUDIES

*Based on Lectures delivered under the auspices of
the Institute at Trinity College, Dublin,
in February 1948*



4339

CAMBRIDGE
AT THE UNIVERSITY PRESS
1948

生命とは何か

物理的にみた生細胞

シュレーディンガー 著

岡 小天・鎮目恭夫 訳



量子力学を創造し、原子物理学の基礎をつくった著者が追究した生命の本質——分子生物学の生みの親となった20世紀の名著。生物の現象ごとに遺伝のしくみと染色体行動における物質の構造と法則を物理学と化学で説明し、生物におけるその意義を究明する。負のエントロピー論など今も熱い議論の渦中にある科学者の本懐を示す古典。



青 946-1
岩波文庫

シュレーディンガーの猫と観測問題

ボルの論文が出て約10年後、量子状態の確率的重ね合わせの概念が一般的に受け入れられるようになった。シュレーディンガーは自分の方程式が間違っ使われていることに思い悩み、確率概念の不条理さをすべて一度に証明できると信じて「思考実験」を行った。

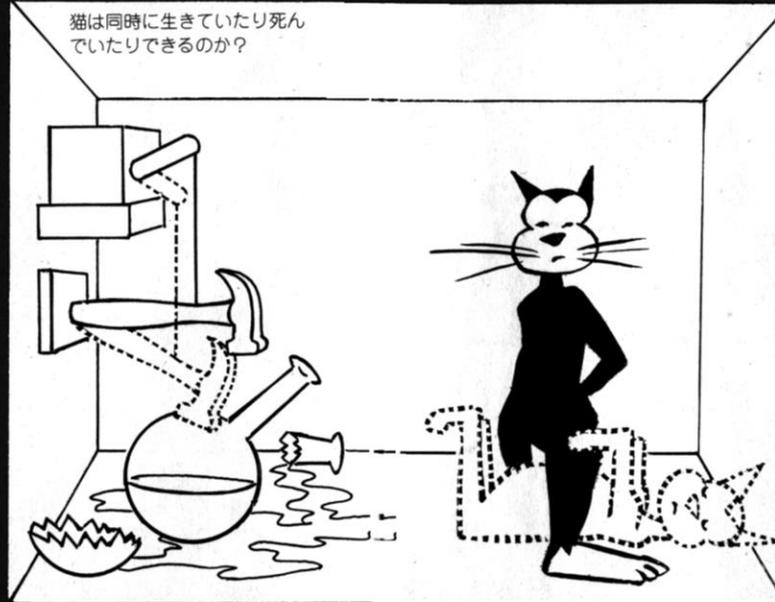
シュレーディンガーは、生きた猫を放射線源とガイガー計数管、金づち、そして揮発性の毒薬が密封されたフラスコといっしょに箱の中に入れる奇妙な実験を考えついた。放射性元素の崩壊が起こると、計数管は金づちを振り下ろす装置を動かし、フラスコを割ってしまう。すると毒性の蒸気が猫を殺してしまう。

放射線源が、量子論によって毎時50%の確率で崩壊し、粒子を放出するでしょう。すると1時間後には、猫が生きている状態と死んでいる状態がどちらも同じ確率となる。



154

J.P.マックホイ文 オスカー・サラティ絵、治部眞里訳、「マンガ量子論入門」、講談社



(ボルの解釈による) 量子論は、実験開始から正確に1時間後、この箱の中には完全に生きているのでもない死んでいるのでもない、2つの波動関数の重ね合わせとして、生きた状態と死んだ状態が混じり合った猫がいることを予測している。

見よ、まったく滑稽ではないか!

波動関数の確率解釈を受け入れることはできない!



シュレーディンガーは、うまくポイントをついたと考えた。しかし60年後の今日でさえ、シュレーディンガーのパラドックスは、量子確率と量子状態の重ね合わせという概念を教える目的で利用されている。

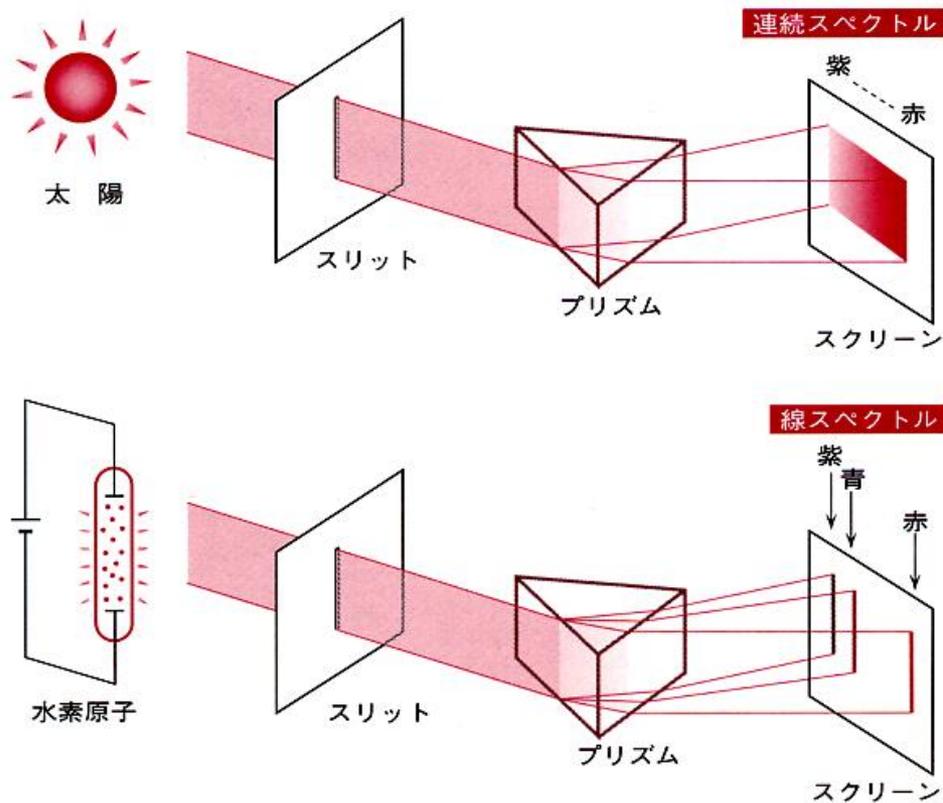
箱のふたを持ち上げ、量子論の予測が正しいかどうか見極めたとき、袋小路から抜け出られる。

観測という行為が2つの波動関数の重ね合わせを壊してひとつの波動関数へと収縮させ、猫を完全に死んだ状態が生きた状態にする。



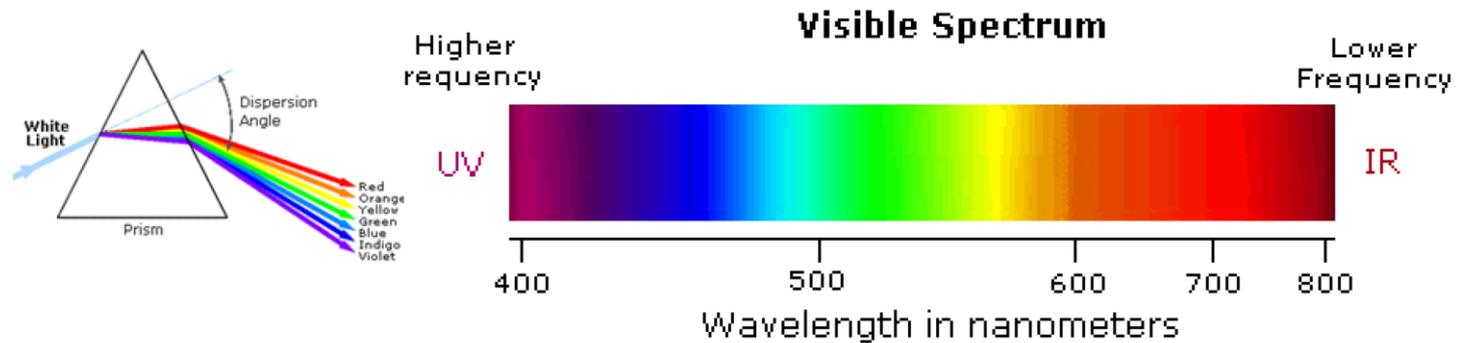
155

太陽光と水素原子の発光スペクトル

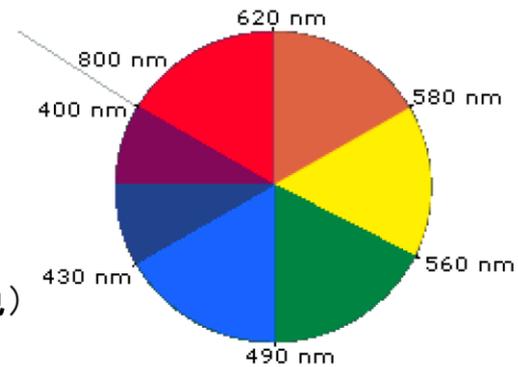


中田宗隆著,「量子化学II 分光学理解のための20章」, 東京化学同人.

可視光・色・補色(complementary colors)

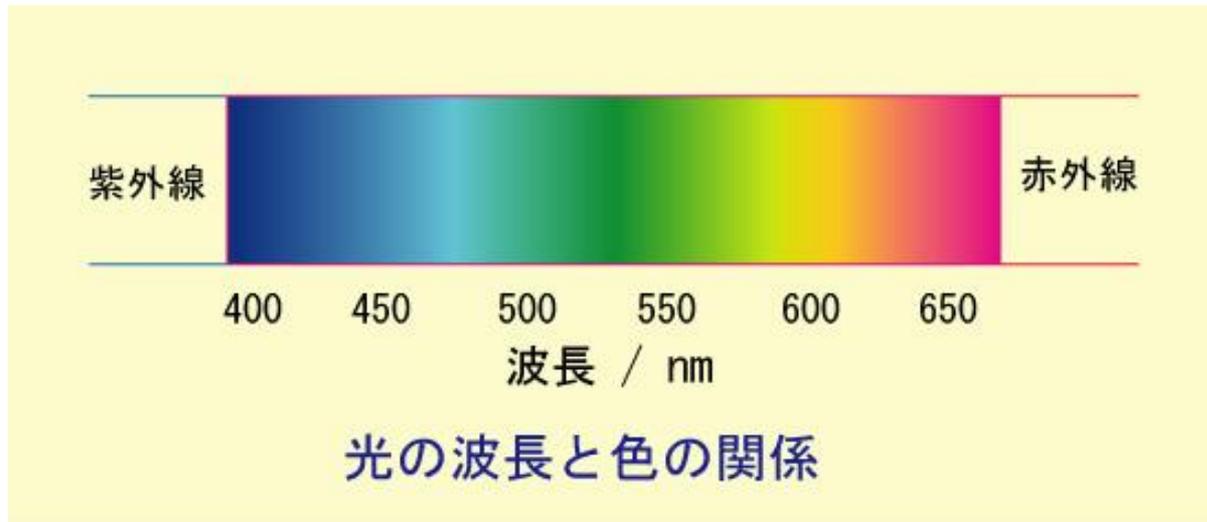


- **Violet:** 400 - 420 nm
- **Indigo:** 420 - 440 nm
- **Blue:** 440 - 490 nm
- **Green:** 490 - 570 nm
- **Yellow:** 570 - 585 nm
- **Orange:** 585 - 620 nm
- **Red:** 620 - 780 nm



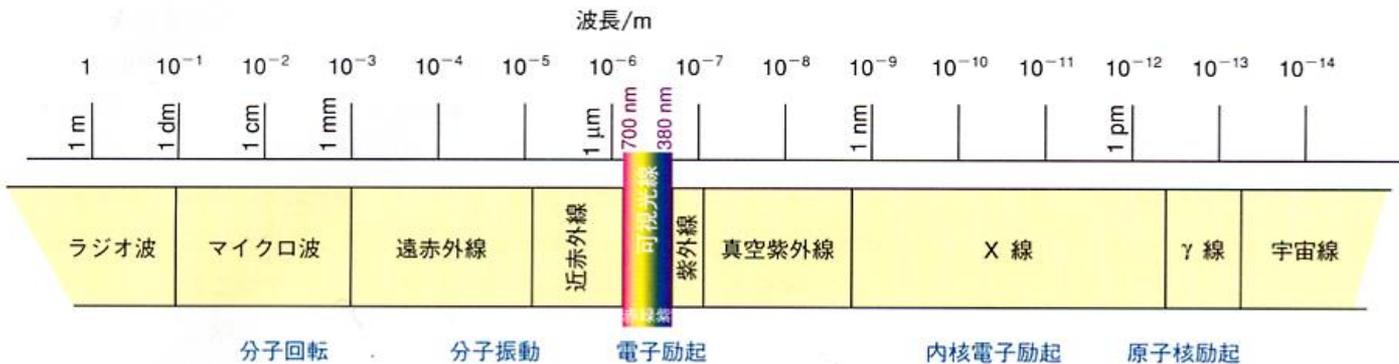
吸収バンドの
反対側の色(補色)
が見える。
例: 葉っぱ=緑は赤色光の吸収

光の波長と色の関係

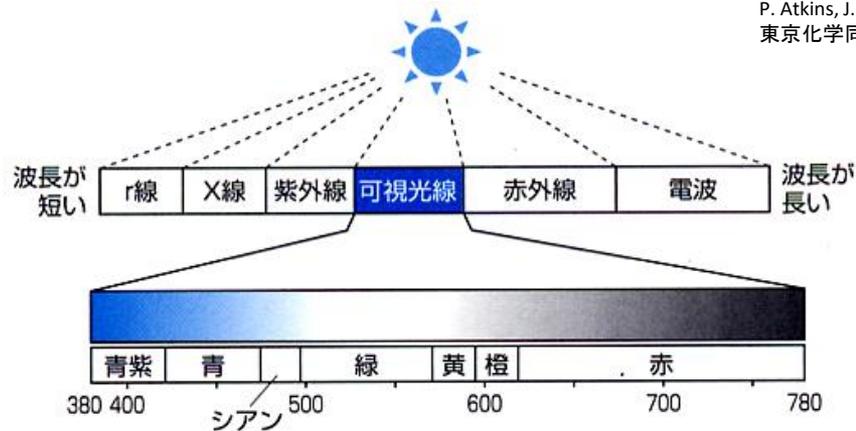


400 nm くらいの波長の光は紫色をしています。550 nm くらいの波長の光は緑色です。650 nm くらいの光は赤色をしています。およそ400 nm くらいから650 nm くらいまでの光は人間の目で見ることができるので、**可視光**と呼ばれます。可視光よりも短い波長の光(およそ400 nm よりも短い波長の光)は人間の目には見えません。このような短い波長の光は紫色の光の範囲外にあるために、**紫外線**と呼ばれます。紫外線は波長が短いためにエネルギーが大きく、人間の肌の日焼けの原因となります。一方、可視光よりも長い波長の光(およそ650 nm よりも長い波長の光)も人間の目には見えません。このような長い波長の光は赤色の光の範囲外にあるために、**赤外線**と呼ばれます。赤外線は熱線とも呼ばれるように、この領域の波長の光を受けると暖かさを感じます。

電磁スペクトルとスペクトル領域の分類

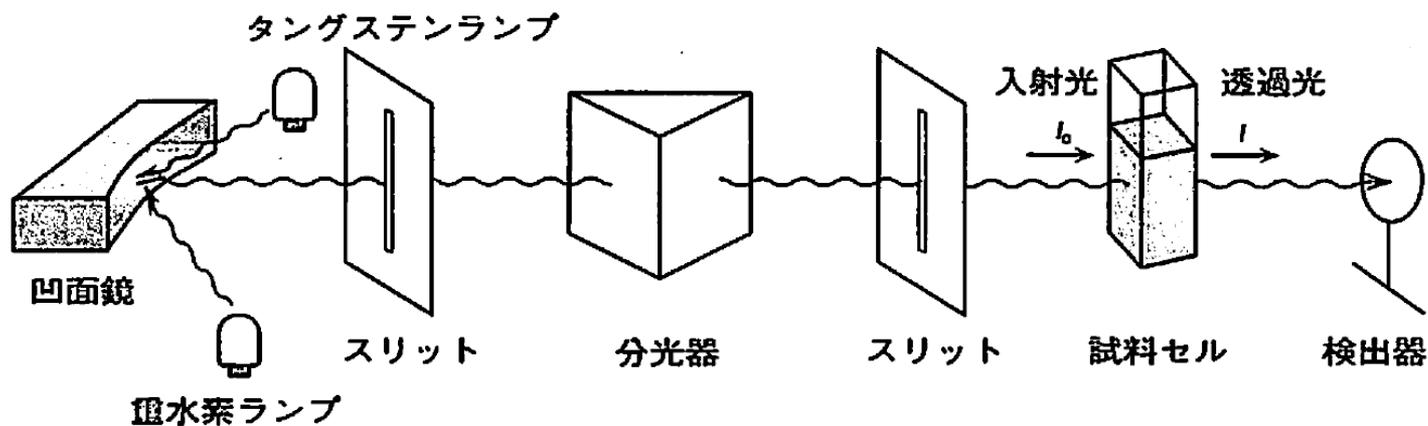


P. Atkins, J. de Paula著, 千原秀昭, 中村亘男訳, 「物理化学(上)第8版, 東京化学同人.



加藤薫監修, 光る生き物, 技術評論社.

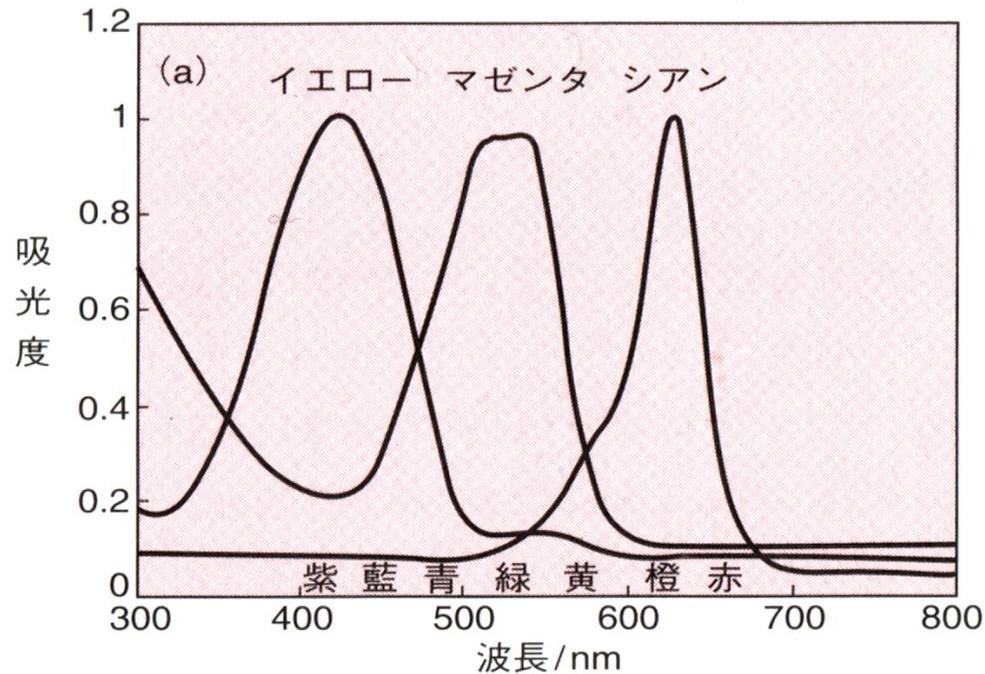
紫外・可視吸収分光光度計の原理



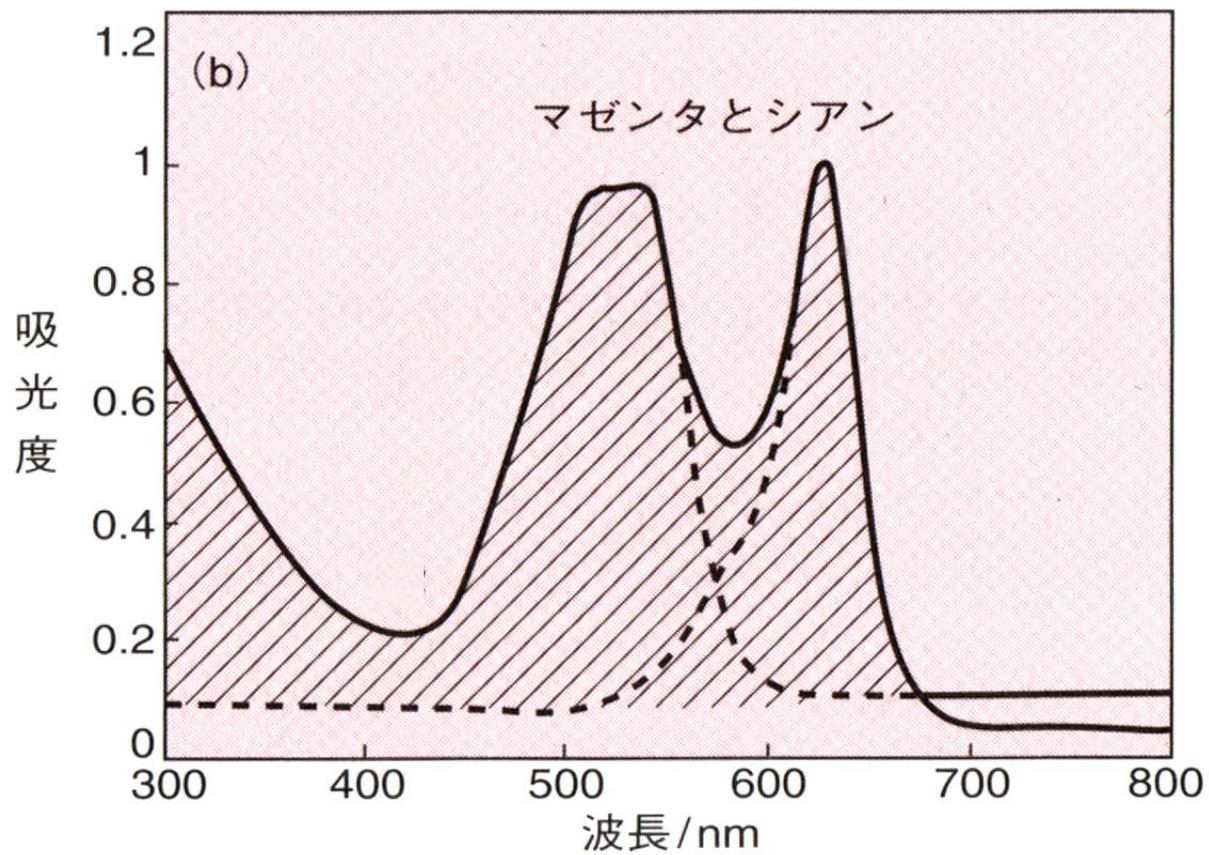
$$\text{透過率 (\%)} = \frac{I}{I_0} \times 100$$

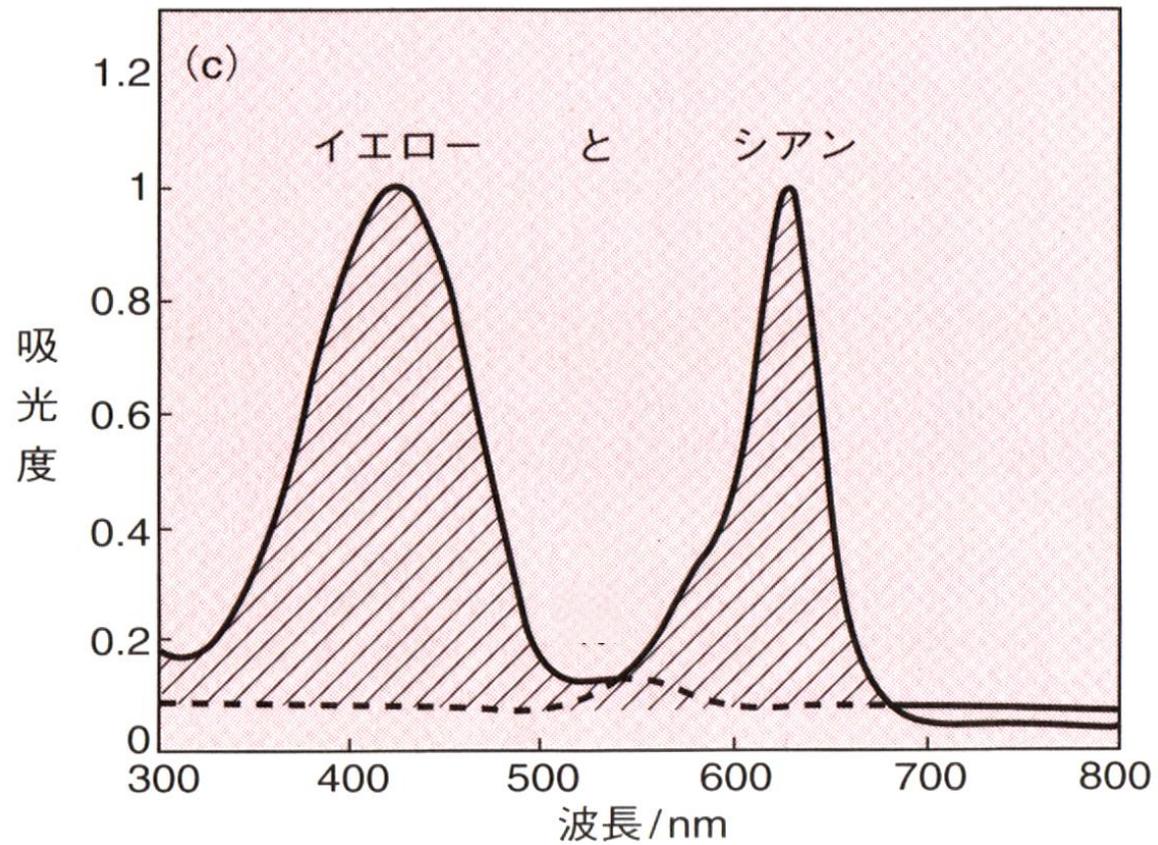
$$\text{吸光度} = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

インクの吸収スペクトル

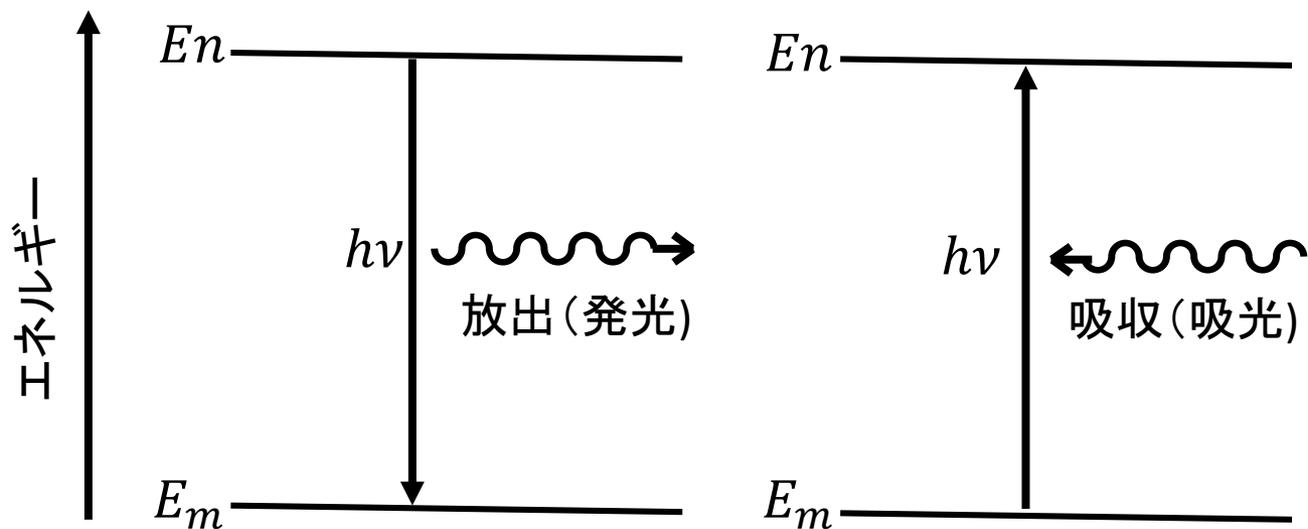


- マゼンダ: 約460-570 nmの光を吸収(黄色、緑、青が吸収)、赤、橙と藍、紫が反射(紫がかった赤)
- イエロー: 約350-480 nmの光を吸収(青、藍、紫を吸収)、緑、黄、橙、赤が反射(黄)
- シアン: 560-670 nmの光を吸収(赤、橙、黄)、緑、青、藍、紫が反射(青)





光の放出と吸収



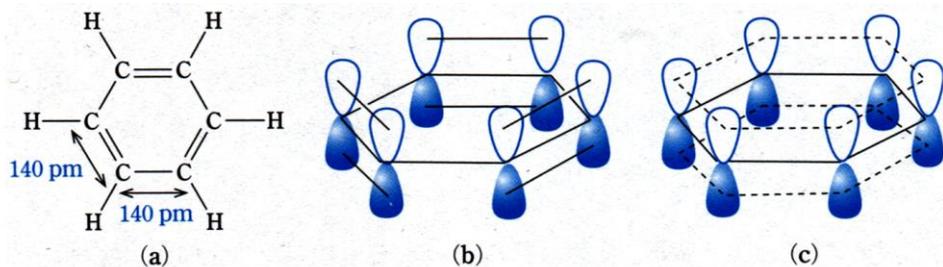
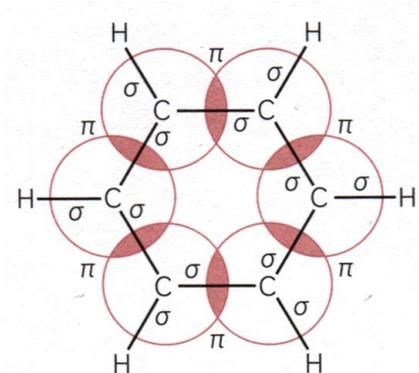
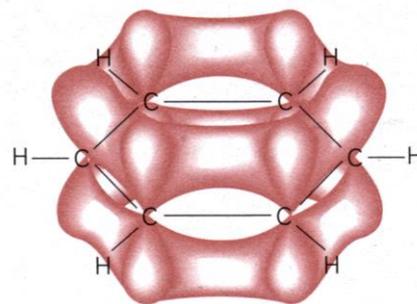


図 4.21 ベンゼンの構造 (a) および平行に配列された 2p 軌道の局在した相互作用 (b) と非局在化した相互作用 (c)



ベンゼンの骨格



π 結合の様子

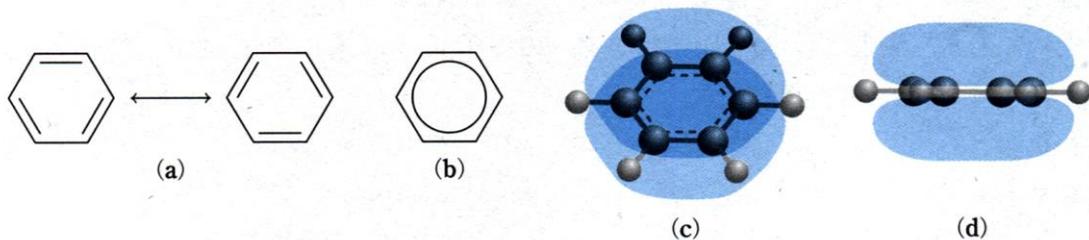


図 4.22 ベンゼンの 2 つの極限構造式の共鳴 (a) とそのもう 1 つの表現 (b) およびベンゼンの π 電子雲 (c), (d)

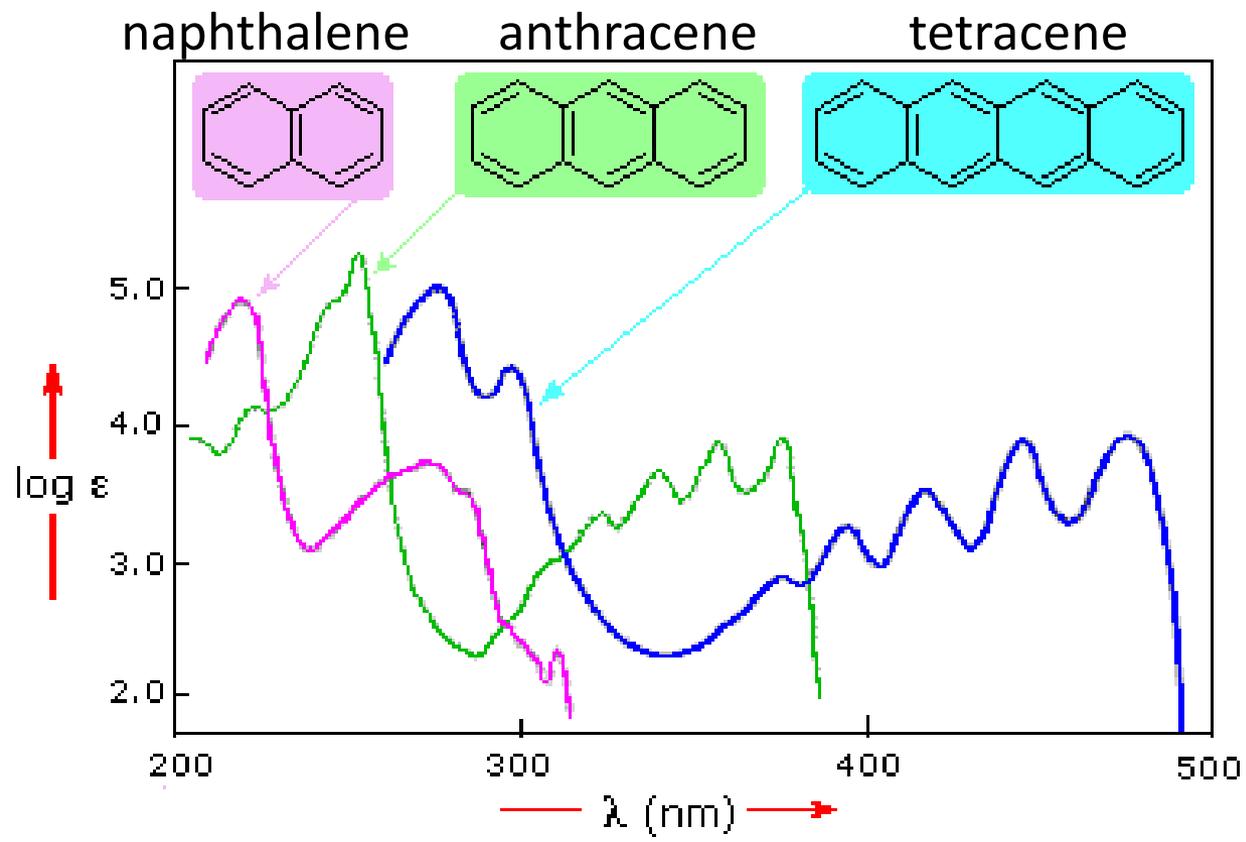
$$R_{C-C} = 1.54 \text{ \AA}$$

$$R_{\text{Benzene } C-C} = 1.39 \text{ \AA}$$

$$R_{C=C} = 1.33 \text{ \AA}$$

$$\frac{1.54 + 1.33}{2} = 1.44 \text{ \AA}$$

浅野努, 上野正勝, 大賀恭, 「第2版 Freshman 化学」学術図書出版社 (2014).
中村潤児, 神原貴樹, 「理工系の基礎化学」, 化学同人 (2012).



一次元の箱の中の粒子

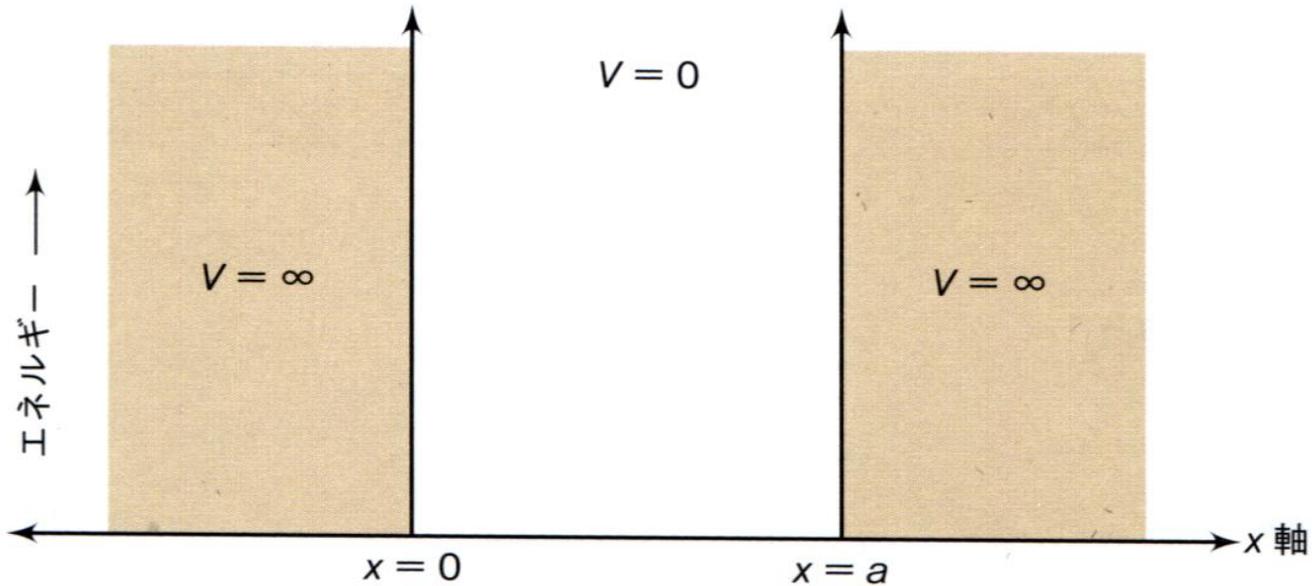


図 10.5 箱のなかの粒子は、量子力学で取り扱われる最も単純で理想的な系である。この箱は $x = 0$ から $x = a$ までのある長さの領域からできており、そこではポテンシャルエネルギーがゼロである。この領域の外側 ($x < 0$ または $x > a$) ではポテンシャルエネルギーが無限大なので、箱のなかのどのような粒子も、その外側には存在しない。

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} \psi(x) = E\psi(x) \quad \text{の固有関数を } \psi(x) = A\sin kx + B\cos kx \quad \text{とする。}$$

箱の外では $\psi(x) = 0$ である。波動関数は連続でなければならないので、 $\psi(0) = \psi(a) = 0$ である。

これを境界条件という。 $\psi(0) = 0$ よりただちに $B = 0$ である。また、 $\psi(a) = 0$ より

$$\therefore A\sin ka = 0 \quad \text{になり} \quad \therefore ka = n\pi \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

$$\text{従って、固有関数は } \psi_n(x) = A\sin\left(\frac{n\pi x}{a}\right) \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

$$\text{になる。これを規格化するためには } \int_0^a \psi_n^2(x) dx = A^2 \int_0^a \sin^2\left(\frac{n\pi x}{a}\right) dx = 1$$

$$\therefore A^2 a = 1 \quad \therefore \psi_n(x) = \sqrt{\frac{2}{a}} \sin\left(\frac{n\pi x}{a}\right) \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

でなければならない。

$$\text{これを } -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} \psi(x) = E\psi(x) \quad \text{に代入して微分を実行すると } E_n = \frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{n\pi}{a}\right)^2 = \frac{n^2 \hbar^2}{8ma^2} \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad \text{がえられる。}$$

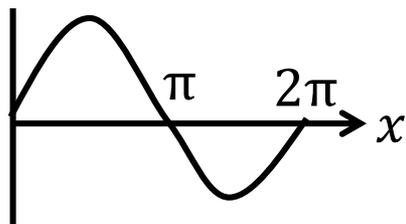
$$\sin^2 x = \frac{1 - \cos 2x}{2} \quad (\text{2倍角の公式から出てきますね})$$

$$\int \sin^2 x dx = \int \frac{1 - \cos 2x}{2} dx = \int \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos 2x \right) dx = \frac{1}{2}x - \frac{1}{4} \sin 2x + C$$

よって $A^2 \int_0^a \sin^2 \left(\frac{n\pi x}{a} \right) dx = 1$ は、

$$A^2 \left[\frac{1}{2}x - \frac{n\pi}{4a} \sin \frac{2n\pi x}{a} \right]_0^a = 1 \quad A^2 \frac{1}{2}a = 1 \quad \text{ゆえに} \quad A = \sqrt{\frac{2}{a}}$$

$$y = \sin x$$



なので $\sin 2n\pi = 0$ ですよね。

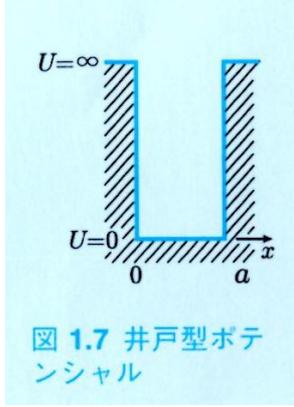


図 1.7 井戸型ポテンシャル

シュレディンガー方程式

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} \psi(x) = E\psi(x)$$

エネルギー

$$E_n = \frac{n^2 \hbar^2}{8ma^2} \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

波動関数

$$\psi(x) = \sqrt{\frac{2}{a}} \sin \frac{n\pi x}{a} \quad n = 1, 2, 3, \dots$$

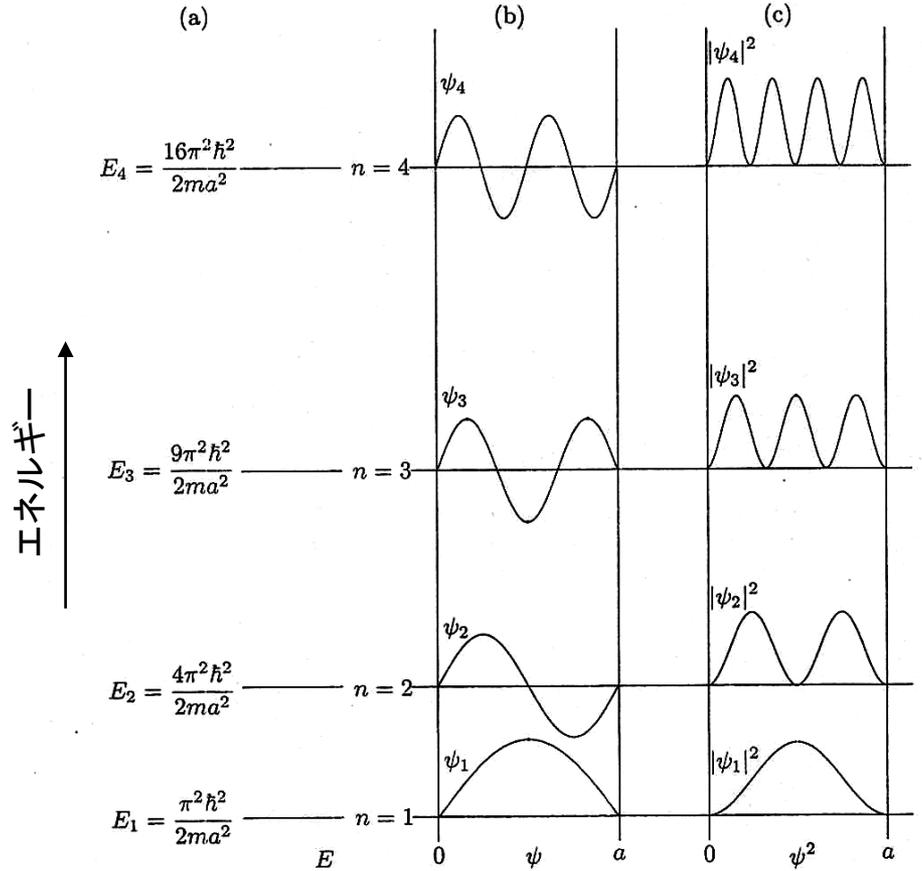


図 3.2 (a) 1次元の無限に深い井戸型ポテンシャルに拘束された粒子のエネルギー準位図, (b) 対応する波動関数 ψ_n と (c) 確率密度 $|\psi_n|^2$: (b) と (c) はエネルギー準位と同じ高さに描いた。

視覚の化学

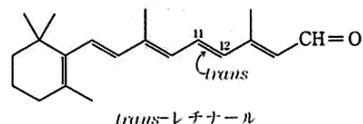


ニンジンにはβ-カロチンを含んでいる

有機化合物の色彩は一般に二重結合が長く共役している系と関連している。よい例がβ-カロチン(β-carotene)である。これはニンジンや他の多くの植物中にみられる黄橙色の色素である。この炭化水素C₄₀H₅₆には11個の共役した炭素-炭素二重結合がある。これはC₂₀の不飽和アルコールであるビタミンA(vitamin A; レチノールともいわれる)の生物学的前駆体であり、ビタミンAは視

覚に関与する重要物質の11-*cis*-レチナール(retinal)に誘導される。図3.7に示すように、ビタミンAを11-*cis*-レチナールに変換するにはアルコール残基(-CH₂OH)をアルデヒド(-CH=O)に酸化するだけでなく、C₁₁-C₁₂位の二重結合が*trans*→*cis*異性化をする必要がある。

*cis-trans*異性化は視覚においてきわめて重要な役割を演じている。目の網膜にある桿状体細胞にはロドプシン(rhodopsin)とよばれる光に敏感な赤色の色素が含まれている。この色素は活性部位で11-*cis*-レチナールと錯体を形成したタンパク質のオプシン(opsin)である。適当なエネルギーをもった可視光がロドプシンに吸収されると、錯体を形成した*cis*-レチナールは*trans*体へ異性化する。この過程は驚異的に速く、ピコ秒(10⁻¹²秒)以内に起こる。構造式からも明らかのように、*cis*体と*trans*体の形状はだいぶ異なっている。

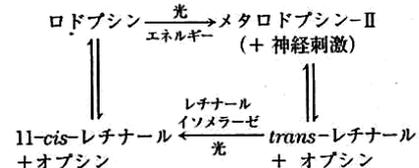


オプシンと*trans*-レチナールとの錯体(メタロドプシン-IIとよばれる)は*cis*-レチナールとの錯体より不安定で、オプシンと

trans-レチナールに解離する。この構造上の変化が桿状体神経細胞に反応を引き起こし、それが脳に伝えられて視覚として認識される。

以上が視覚現象のすべてであれば、桿状体細胞に存在するすべての11-*cis*-レチナールはただちに消費されてしまうであろうから、われわれはほんの瞬間しか物を見ることができないはずである。しかし、幸運なことに、光の照射下で*trans*-レチナールを11-*cis*-異性体へもどすレチナールイソメラーゼとよばれる酵素が存在するので、このサイクルを繰り返すことができる。細胞および細胞膜に存在するカルシウムイオンは、光が当たった後に視覚システムが回復する速度を制御してい

る。同時にカルシウムイオンは細胞がどのような波長の光にも対応するように働いている。以上をまとめると、視覚のサイクルはつぎのように示すことができる。



この表し方はかなり単純化されているが、実際にはロドプシンと完全に解離した*trans*-レチナールとオプシンの間にはさらに数種類の間体が存在している。

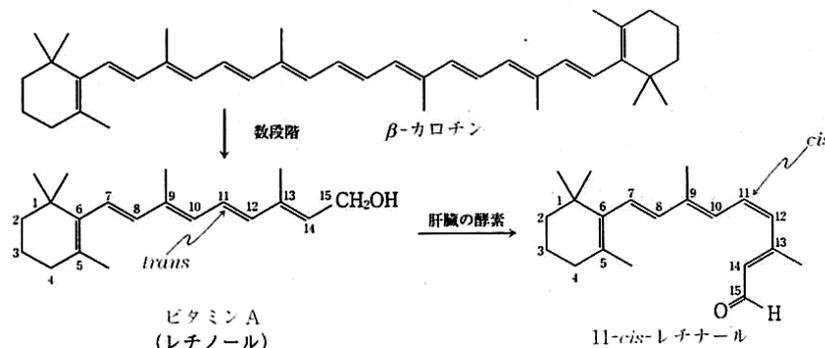
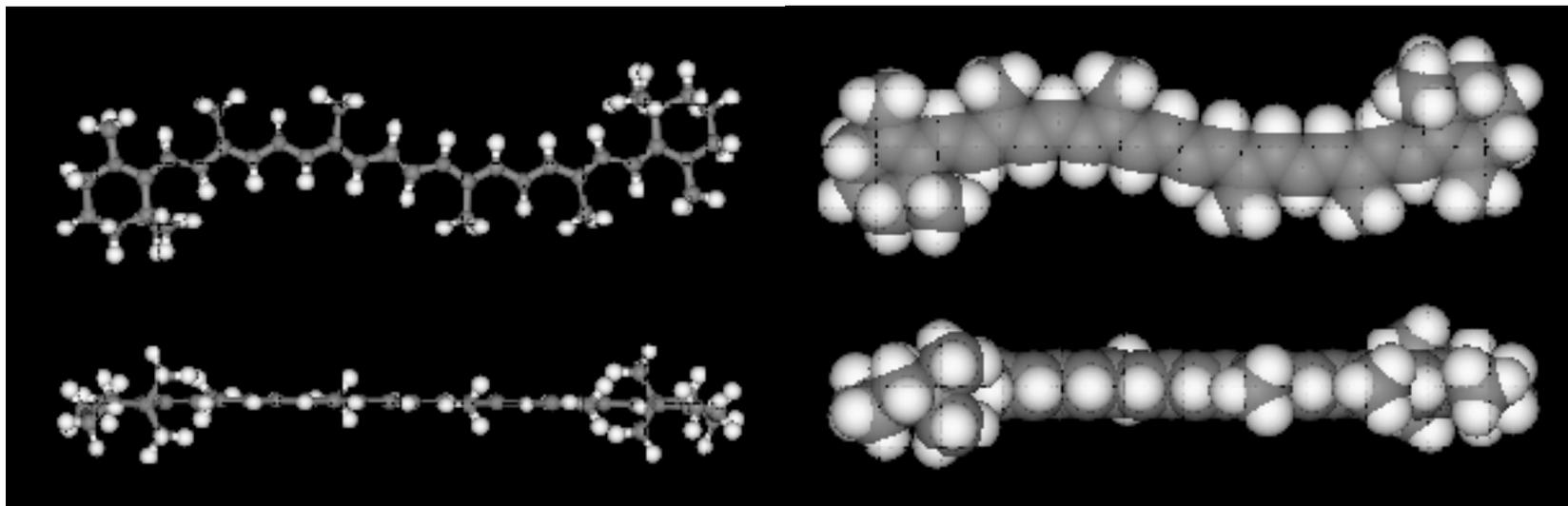
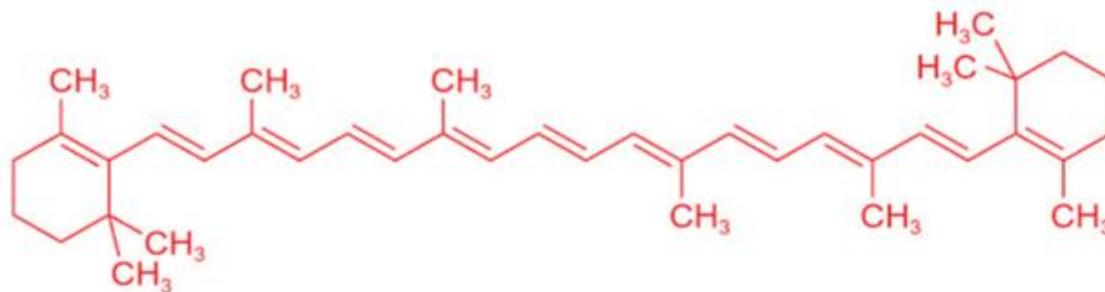


図3.7 肝臓において、β-カロチンは最初ビタミンAに、続いて11-*cis*-レチナールに変換される

β-カロテン



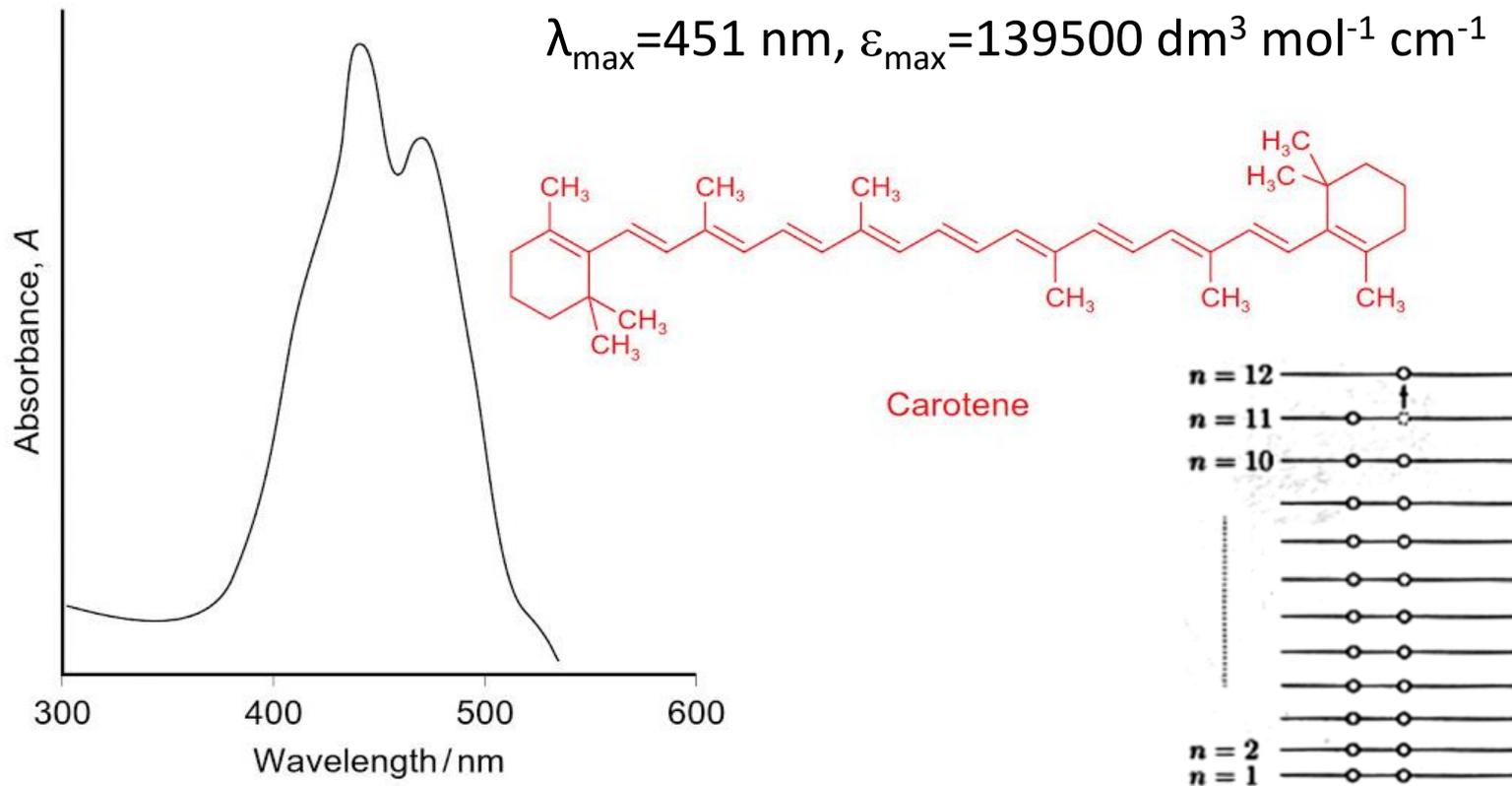


Figure 10.37 Carotene has 11 conjugated C=C bonds and absorbs strongly in the blue-green region of the visible spectrum. Its strong red-orange colour is responsible, in part, for the colour of vegetables such as carrots and tomatoes.

問 β-カロテンは多くの野菜に見られる高次の共役ポリエンである。これが酸化されると哺乳類の視覚の化学で重要な役割を果たす色素が合成される。親物質であるβ-カロテンは、波長 $\lambda=480\text{ nm}$ に最大の光吸収を示す。この遷移が一次元箱の中の電子の量子数 $n=11$ から $n=12$ への遷移に対応するとすればこの分子の”箱”の幅はおよそいくらか。

$$c = 2.9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1} \quad h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ Js} \quad m_e = 9.109 \times 10^{-31} \text{ Kg}$$

$$E = \frac{hc}{\lambda} = \frac{(6.626 \times 10^{-34} \text{ Js})(2.9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})}{4.8 \times 10^{-7} \text{ m}}$$

$$\Delta E = E_{12} - E_{11} = \frac{12^2 h^2}{8m_e a^2} - \frac{11^2 h^2}{8m_e a^2} = (12^2 - 11^2) \frac{h^2}{8m_e a^2} = 23 \frac{h^2}{8m_e a^2}$$

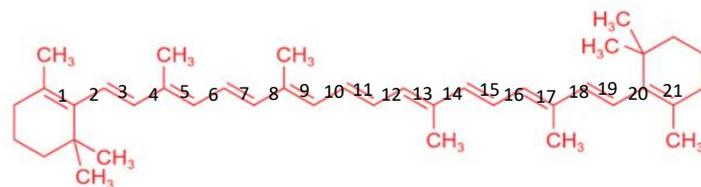
$$(\because E_n = \frac{n^2 h^2}{8m_e a^2})$$

$$\frac{(6.626 \times 10^{-34} \text{ Js})(2.9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})}{4.8 \times 10^{-7} \text{ m}} = 23 \frac{(6.626 \times 10^{-34} \text{ Js})^2}{8m_e a^2}$$

$$a^2 = \frac{(23)(6.626 \times 10^{-34} \text{ Js})(4.8 \times 10^{-7} \text{ m})}{8 \times (9.109 \times 10^{-31} \text{ Kg})(2.9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})} = 3.35 \times 10^{-9} (\text{Js}^2 \text{ Kg} = \text{m}^2)$$

$$a = 1.83 \times 10^{-9} \text{ m} = 18.3 \text{ \AA}$$

$$(\because J = \text{Kg m}^2 \text{ s}^{-2})$$



$$21 \times 0.14 \times \cos 30^\circ = 21 \times 0.14 \times 0.12 = 3.5 \text{ \AA}$$

実験値 約 29 \AA

Langmuirの吸着等温式

前提条件として

- ①吸着媒体表面に有限の数の結合サイトsがあるとす。
- ②結合サイトsにリガンドLが吸着したものをsLとする。
- ③会合平衡定数をKとすると、吸着平衡ではそれぞれのモル濃度について以下の平衡式が成立する。

$$K = [SL] / [S][L]$$

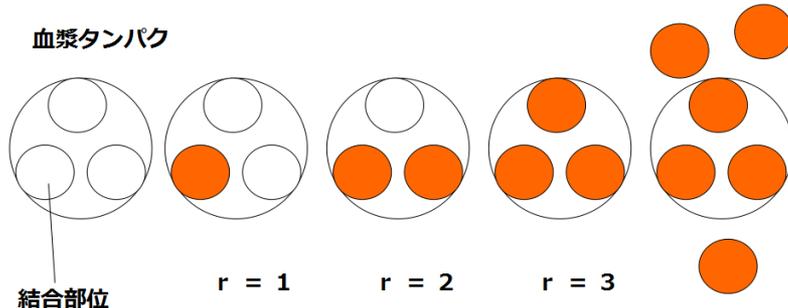
吸着媒体上のサイト数をn、吸着媒体ごとの吸着量をγとすると、 $\gamma / n = [SL] / [S] + [SL] = K[S][L] / [S] + K[S][L] = K[L] / 1 + K[L]$

ここで[L]を遊離リガンド濃度[Df]と表し、γについて整理すると、 $r = nK[Df] / 1 + K[Df]$

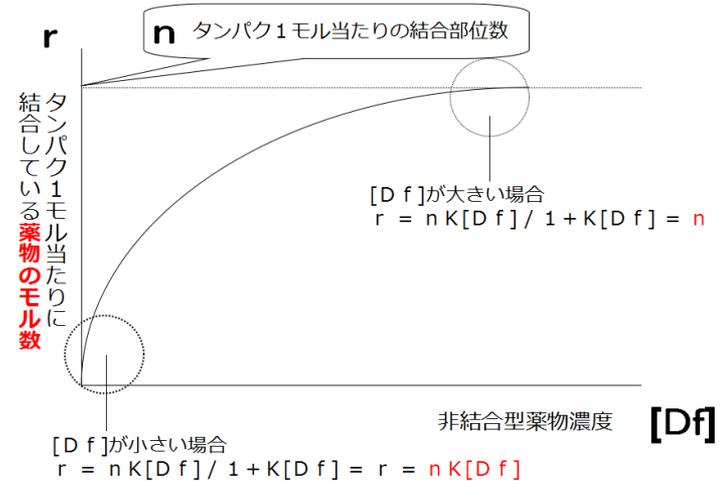
r: タンパク 1 mol 当たり結合している薬物の mol 数 ($0 \leq r \leq n$), n: タンパク 1 mol 当たりの結合部位数, K: 結合定数
[Df]: 非結合型薬物濃度

このような式が得られ、これがLangmuirの吸着等温式に相当します。

次は図を見ながら理解していきましょう。n=3の場合(結合部位数が3カ所)



この図で確認しておいてほしいことは、rの最大値はnであるということです。薬物濃度がいくら多くなったとしても、結合部位数以上に薬物は結合できないという、当たり前のことを理解しておけば大丈夫です。



この図からも、薬物濃度を上げていくことで、 $r=n$ になることがわかります。

次にScatchard式、両辺逆数式について見ていきましょう。Langmuir式より、Scatchard式、両辺逆数式を求めることができます。これらの式は、結合定数やタンパク質1分子当たりの薬物結合部位数を求める時に用います。

スカッチャード(Scatchard)プロット

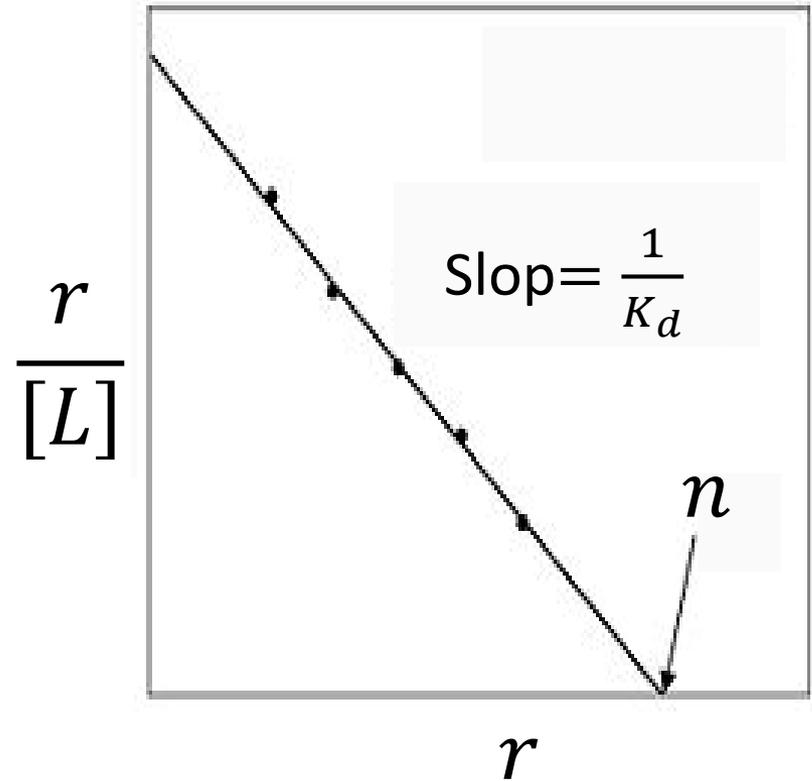


$$[P]_0 = [P] + [PL] \text{ より}$$

$$K_d = \frac{([LP]_0 - [P][L])}{[PL]}$$

飽和度(saturation fraction)

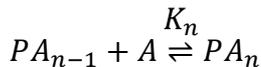
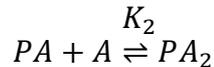
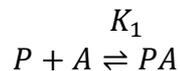
$$r = \frac{[PL]}{[P]_0} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$



$$\frac{r}{[L]} = \frac{1}{K_d} (1 - r)$$

$$\frac{r}{[L]} = \frac{1}{K_d} (n - r)$$

Scatchardの拡張



$$\sum_{i=1}^3 a_i = a_1 + a_2 + a_3$$

$$\prod_{i=1}^3 a_i = a_1 \times a_2 \times a_3$$

$$K_1 = \frac{[PA]}{[P][A]} \Rightarrow [PA] = K_1[P][A]$$

$$K_2 = \frac{[PA_2]}{[PA][A]} = \frac{[PA_2]}{K_1[P][A]^2} \Rightarrow [PA_2] = K_1 K_2 [P][A]^2$$

$$K_n = \frac{[PA_n]}{[PA_{n-1}][A]} = \frac{[PA_n]}{K_1 K_2 \dots K_{n-1} [P][A]^n}$$

Pの全モル数を $[P]_t$, 結合したAのモル数を $[A]_B$ とすると

$$\begin{aligned} [P]_t &= [P] + [PA] + [PA_2] + \dots + [PA_n] \\ &= [P] \left(1 + \sum_{j=1}^i K_j [A]^j \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [A]_B &= [PA] + 2[PA_2] + \dots + n[PA_n] \\ &= [P] \left(1 + \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^i K_j i [A]^i \right) \end{aligned}$$

平均結合数 (飽和度) $\tilde{v} = \frac{[A]_B}{[P]_t}$

n個の結合サイトが等価であるとする

PA型についてとり得る異なった結合構造の数 n個

PA₂型についてとり得る異なった結合構造の数 $\frac{n(n-1)}{2}$ 個

PA_i型についてとり得る異なった結合構造の数 $\frac{n!}{i!(n-i)!}$ 個

すべて結合定数をkとすると

$$\frac{[PA]}{[P][A]} = K_1 = k$$

$$\frac{[PA_2]}{[P][A]^2} = K_1 K_2 = \frac{n(n-1)k^2}{2!} \quad K_2 = \frac{(n-1)k}{2}$$

$$K_i = \frac{(n-i+1)k}{i}$$

$$\text{従って } \tilde{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i \left\{ \prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i [A]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) \right\} k^i [A]^i}$$

$$\prod_{j=1}^i \left(\frac{n-j+1}{j} \right) = \frac{n!}{(n-i)! i!} \text{ より}$$

$$\tilde{v} = \frac{\sum_{i=1}^n i k^i \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i}$$

2項定理

$$(1 + k[A])^n = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^i$$

$$n(1 + k[A])^{n-1} = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)! i!} (k[A])^{i-1}$$

2項定理より

$$\tilde{v} = \frac{nk[A]}{1 + k[A]} \Rightarrow \frac{\tilde{v}}{[A]} = k(n - \tilde{v})$$

DNA上の塩基対一つを一つの格子とし、その格子のn個がリガンド(ここではインターカレータ分子)が結合することにより覆われるとする。今DNAがN個の格子よりなっていると考え、平衡式は、結合定数を K とすると、



質量作用の法則より、

$$\frac{[\text{結合リガンド}]}{[\text{リガンド}]} = K \cdot [\text{リガンドの結合部位}] \quad (1)$$

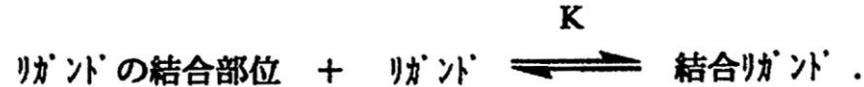
格子あたりのモル濃度で両辺を割ると、

$$[L] \frac{[\text{格子あたりの結合リガンドの平均数}]}{[L]} = K \cdot [\text{格子あたりのリガンドの結合部位の平均数}] \quad (2)$$

ここでLは、リガンド濃度である。 ν をリガンドの結合数、 B を(格子あたりの結合リガンドの平均数)とすると $\nu = B/N$ となるので(2)式の左辺は、 $\nu N/L$ である。

ここでは、(1)式を導く。

DNA上の塩基対一つを一つの格子とし、この格子のn個がリガンド（ここではインターカレーター分子）が結合することにより被われるとする。今DNAがN個の格子よりなっていると考える。平衡式は、結合定数をKとすると、



質量作用の法則より、

$$\frac{[\text{結合リガンド}]}{[\text{リガンド}]} = K \cdot [\text{リガンドの結合部位}].$$

格子あたりのモル濃度で両辺を割ると、

$$\frac{\{\text{格子あたりの結合リガンドの平均数}\}}{L} = K \cdot \{\text{格子あたりのリガンドの結合部位の平均数}\} \quad (6)$$

ここでLは、リガンドの濃度である。vをリガンドの結合数、Bを{格子あたりの結合リガンドの平均数}とすると $v=B/N$ となるので(6)式の左辺は、 vN/L である。

$$B = vN \quad v = B \cdot N$$

格子に結合したB個のリガンドに対して(B+1)個の間隔があり、その間隔あたりリガンドの結合部位が平均s個存在すると考えると右辺の{格子あたりのリガンドの結合部位の平均数}は、(B+1)・sとなる。

隣り合った結合格子の間隔がg個の時のリガンドの結合部位の数は、(g-n+1)であるので(図7参照)。

格子に結合したB個のリガンドに対して(B+1)個の間隔があり、その間隔あたりリガンドの結合部位が平均s個存在すると考えると右辺の[格子あたりのリガンドの結合数の平均]は(B+1)・sとなる。隣り合った結合格子の間隔がg個の時のリガンドの結合部位の数は、(g-n+1)であるので、



図1. 結合格子の間隔がg個の時のリガンドの結合部位の数は(g-n+1)である。ここでは、g=5, n=3の場合を示している。

格子に結合した二つのリガンドの間隔がg個である確率を P_g とすると、

$$s = \sum_{g=n}^N (g - n + 1) \cdot P_g \quad (3)$$

となる。格子あたりリガンドが結合している確率をb、リガンドが結合していない確率をfとすると(図2参照)

$$P_g = (b_n f)(f f)^{s-1}(f b_1) \quad (4)$$

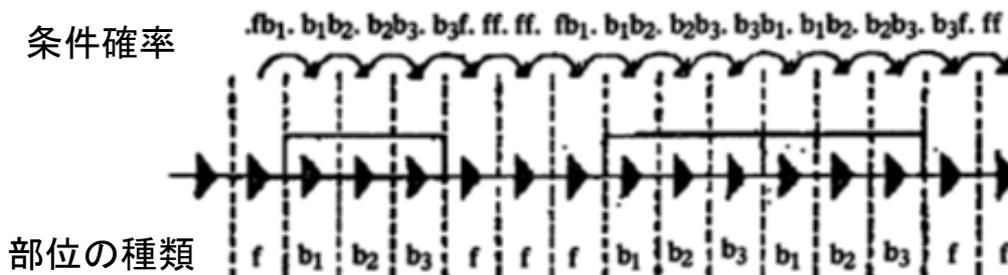


図2. それぞれの格子に可能な(n+1)個の条件確率。ここではn=3である。

ここで、結合していない格子のすぐ隣は、結合しているか結合していないかの二通りしかないので、

$$(ff) + (fb_1) = 1 \quad (5)$$

である。また結合したリガンドの右末端は、結合していないか結合しているかの二通りしかないので

$$(b_n f) + (b_n b_1) = 1 \quad (6)$$

となる。リガンドは格子n個を覆うので

$$(b_{n-1} b_n) = 1 \quad (7)$$

である。ところでB個が結合したDNAは、 $(B \cdot n)$ 個の格子が覆われている。被われた割合は $v=B/N$ より、 $nv=Bn/N$ である。従って、被われていない割合は $(1-nv)$ (でたために選んだ格子がリガンドによって被われていない割合に等しい)である。また、二番目の格子がリガンドによって被われていない割合は $(1-nv)$ であるので、

$$(1 - nv)(ff) + (b_n f) = (1 - nv) \quad (8)$$

となる。ここでは非協同過程での結合を考えているので

$$(ff) = (b_n f) \quad (9)$$

$$(fb_1) = (b_n b_1) \quad (10)$$

となる。(8), (9)式より

$$(ff) = (b_n f) = \frac{1 - nv}{1 - (n - 1)v} \quad (11)$$

また、(5), (11)式より

$$(fb_1) = \frac{v}{1 - (n-1)v} \quad (12)$$

(9), (11), (12)式より

$$P_g = (ff)^g (fb_1) = \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^g \left(\frac{v}{1 - (n-1)v} \right) \quad (13)$$

となる。従って(3)式は、(14)式となる。

$$s = \sum_{g=n}^N (g - n + 1) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^g \left(\frac{v}{1 - (n-1)v} \right) \quad (14)$$

$N \rightarrow \infty$ とすると(14)式は(15)式となる(補足参照)。

$$s = \left(\frac{1 - nv}{v} \right) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1} \quad (15)$$

$N \rightarrow \infty$ では $B \doteq B+1$ なので(1)式の右辺は、

$$K \cdot N \cdot (1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1} \quad (16)$$

となる。結局(1)より

$$\frac{v}{L} = K \cdot (1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1} \quad (17)$$

が導かれる。

<補足>(14)式が $N \rightarrow \infty$ で(15)式となる理由

$$\frac{1-n}{1-(n-1)v} = s$$

とおいて、 s' を考える。 $s = s' \frac{v}{1-(n-1)v}$

$$s' = \sum_{g=n}^N (g-n+1) \cdot a^g = 1 \cdot a^n + 2 \cdot a^{n+1} + 3 \cdot a^{n+2} + \dots$$

となる。従って、 $\frac{(1-a)}{a^n} \cdot s' = 1 + a + a^2 + \dots = \frac{a^{N+1} - 1}{a - 1}$

すなわち $s' = \frac{a^n}{(1-a)^2} (1 - a^{N+1})$

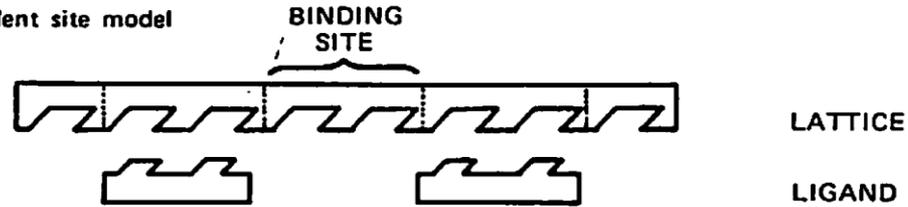
ところで $v > 0$ から、 $1 > a = \frac{1-nv}{1-(n-a)v}$ であるから、 $N \rightarrow \infty$ とすると $a^{N+1} \rightarrow 0$ となるので

$$s' = \frac{a^n}{(1-a)^2} = \frac{\{1-(n-1)v\}^2}{v^2} \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^n$$

である。従って s は、

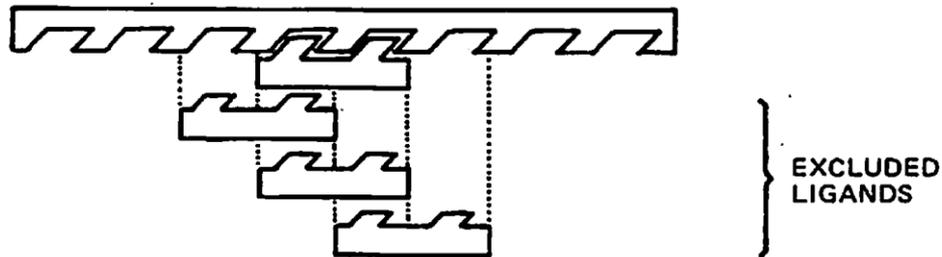
$$s = \frac{\{1-(n-1)v\}^2}{v^2} \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^n \frac{v}{1-(n-1)v} = \left(\frac{1-nv}{v} \right) \left(\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^{n-1}$$

I. Independent site model

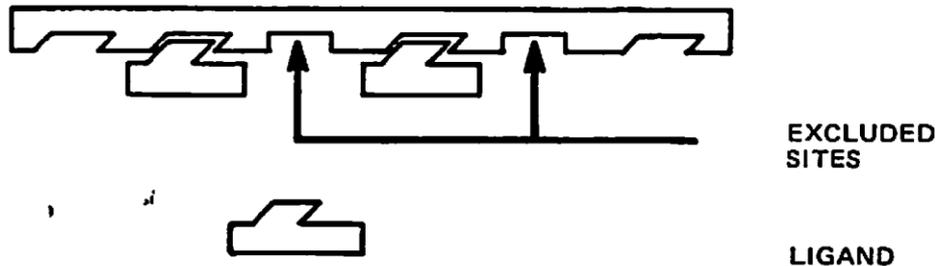


II. Excluded site model: overlapping binding sites

(a) Direct exclusion: large ligands



(b) Indirect exclusion: binding at one site induces a conformational change at an adjacent site.



Possible ligand interactions with a linear lattice such as DNA. Exclusion models involving binding site elimination through direct blockage of lattice binding sites by large ligands (IIa) and through indirect blockage caused by a conformational change induced in the lattice (double helix) by the ligand interaction (IIb) are shown. Classical independent site behavior is shown in I.

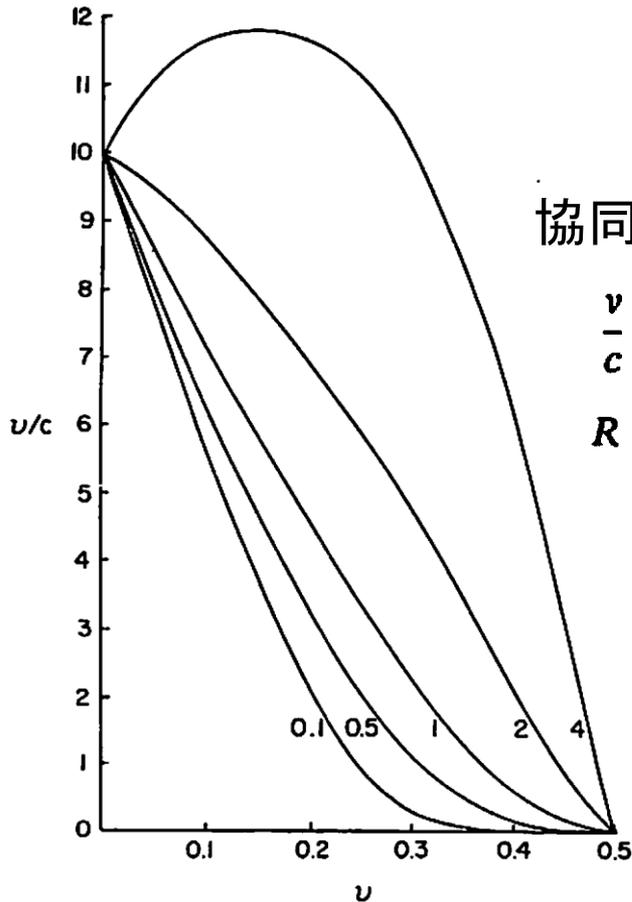
協同性がない場合

$$\frac{v}{c} = K(1 - nv) \left(\frac{1 - nv}{1 - (n-1)v} \right)^{n-1}$$

協同性がある場合

$$\frac{v}{c} = K(1 - nv) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nv) + v - R}{2(\omega - 1)(1 - nv)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)v + R}{2(1 - nv)} \right)^2$$

$$R = [(1 - (n+1)v)^2 + 4\omega v(1 - nv)]^{1/2}$$



Idealized Scatchard plots as predicted by Eq. (6) for different ω values. The ω value for each curve is indicated at the bottom of the figure. When $\omega = 1$, which indicates no ligand cooperativity, Eq. (6) reduces to Eq. (5). For the illustration, a K value of 10 is used for all curves. Changing K values over a fairly wide range do not dramatically affect the curve shapes.