

平成21年5月26日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19550014

研究課題名(和文) 固体円二色性および固体NMR測定によるキラルな固体試料の立体構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of analytical method for elucidation of stereo structure of chiral solid sample by measurements of solid circular dichroism and solid NMR

研究代表者

前田 史郎 (SHIRO MAEDA)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70209378

研究成果の概要：本研究の目的は、固体円二色性(CD)測定と固体高分解能核磁気共鳴(NMR)測定を組み合わせ、同位体ラベルしないキラルな固体試料の立体構造解析の方法を確立することである。固体CD測定の目的は、固体状態における多結晶粉末あるいはフィルム状のポリアミノ酸の高次構造の決定である。これらの試料を用いて α -ヘリックス、 β -シート、あるいはランダムコイルなのかを決定することができれば非常に有効な分子構造解析手段となる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	600,000	2,600,000
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：分子構造

1. 研究開始当初の背景

(1)キラルな試料の立体構造解析方法として、円二色性(CD)測定が用いられているが、ほとんどの場合液体あるいは溶液試料に限られている。1969年にKemp[1]が光弾性偏光変調素子(PEM)を開発して以来、PEMはポッケルスセルに取って代わってCD分光計やエリプソメトリーなどの偏光変調分光機器の最も重要な構成要素となっている。これらの偏光変調分光機器には系統的な誤差やニセの信号(artifact)が存在する。これは、試料の巨視的異方性、PEMの残留

複屈折や検出器の偏光特性などの装置の非理想性に起因する。Norden[2]やShindoら[3]によってCDスペクトルに存在するニセの信号の理論的および実験的な解析が行われた。ミューラー行列解析法を用いた理論的な解析の結果、巨視的異方性を持つ試料のCD信号には、直線複屈折(LB)や直線二色性(LD)に起因するニセの信号が現れることが明らかとなった。研究代表者は、平成2年度および平成3・4年度の科学研究費補助金等の交付を受けて、残留複屈折の小さなPEMおよびその駆動装置の開発とア

ドミッタンス測定を利用した性能評価の方法を開発する [4] とともに、巨視的異方性を持つ試料において、ニセの信号を除去して真のCD信号を測定する方法の開発に取り組んできた [5]。一方、Kurodaらは固体CD測定専用装置を開発している [6]。研究代表者は、平成15・16年度の科学研究補助金基盤研究(C)の交付を受け、日本電波工業から入手した高品質水晶振動子を用いた高性能PEMの製作と固体CD測定への応用として、DNAの固体表面への吸着過程の研究 [7] や固体CD測定による微生物産生分解性高分子ポリ(ε-リジン)(ε-PL)の構造評価の研究 [8] を行っている。

(2) 固体試料の分子構造解析法として、最も広く用いられているのはX線結晶構造解析である。しかし、単結晶を得ることが難しい試料や無定形材料の場合、幅の広いハローが得られるだけであり、詳細な立体構造解析は困難である。このような多結晶粉末試料や無定形試料の固体構造を解明する唯一といって良い方法は固体高分解能NMRである。研究代表者は、現在固体CD測定ならびにその応用にも取り組んでいるが、平行して固体高分解能NMRを用いた固体試料の分子構造解析にも取り組んでいる。主な研究成果としては、(1) ポリビニルアルコールにおけるメチン炭素吸収線の立体規則性分裂を初めて見出し、その原因が分子内水素結合であることを明らかにした [9]。(2) ポリアセチレンの異性化の機構を明らかにするとともにドーピングしたポリアセチレンの導電機構の研究を行った [10]。その後も、引き続き固体高分解能NMRを用いた分子構造解析の研究を続けてきている。最近では、(1) キラルな生理活性物質のX線分子構造解析を行っている研究者との共同研究で固体高分解能NMRによる分子構造解析を分担する [11] ほか、(2) ポリ(ε-リジン)およびその誘導体の分子構造解析などを行っている [12]

[1] J. Kemp, *J. Opt. Soc. Am.* 59(1969)950. [2] B. Nordén, *J. Phys. Chem.* 81(1977)151; A. Davidsson and B. Nordén, *Spectrochim. Acta* 32(1978)717; A. Davidsson, B. Nordén and S. Seth, *Chem. Phys. Lett.* 70 (1980) 313. [3] Y. Shindo and M. Nakagawa, *Rev. Sci. Instrum.* 56 (1985) 32; Y. Shindo, M. Nakagawa and Y. Ohmi, *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 860. Y. Shindo, M. Nishio, S. Maeda, *Biopolymers*, 30, 405-413 (1990). [4] S. Maeda, K. Nakae, and Y. Shindo, *Enantiomer*, 7, 175-183 (2002); S. Maeda, K. Nakae, and Y. Shindo, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42, 4546-4551(2003). [5] Y. Shindo, R. Kuroda, S. Maeda, and T. Fukazawa, *Proc. 7th Int. Conference on Circular Dichroism*, 44 (1999); Y.

Shindo, K. Kani, J. Horinaka, R. Kuroda and T. Harada, *J. Plastic Film Sheeting*, 164-182 (2001) [6] R. Kuroda, T. Harada, and Y. Shindo, *Rev. Sci. Instrum.*, 3802-3810 (2001) [7] J. Horinaka, H. Nakura, and S. Maeda, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61, 349-357 (2004) [8] 前田史郎, 第40回固体NMR・材料研究会/第5回強磁場固体NMRフォーラム合同研究会要旨集, 57-60 (2006) [9] T. Terao, S. Maeda, and A. Saika, *Macromolecules*, 16, 1535-1538, (1983) [10] T. Terao, S. Maeda, T. Yamabe, K. Akagi, and H. Shirakawa, *Solid State Commun.*, 49, 829-832, (1984); T. Terao, S. Maeda, T. Yamabe, K. Akagi, and H. Shirakawa, *Chem. Phys. Lett.*, 103, 347-351, (1984) [11] S. Kitoh, H. Senda, K.-K. Kunimoto, S. Maeda, A. Kuwae, and K. Hanai, *Crys. Res. Tech.*, 39, 375-381 (2003), K. Hanai, A. Kuwae, Y. Sugawa, K. Kunimoto, S. Maeda, *J. Mol. Struct.*, 101-106 (2007). [12] S. Maeda, K. Kunimoto, C. Sasaki, A. Kuwae, and K. Hanai, *J. Mol. Struct.*, 655, 49-155 (2003), S. Maeda, T. Mori, C. Sasaki, K.-K. Kunimoto, A. Kuwae, K. Hanai, *Polym. Bull.*, 223-231 (2005)

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、固体CD測定と固体高分解能NMR測定を組み合わせ、同位体ラベルしないキラルな固体試料の立体構造解析の方法を確立することである。固体CD測定の目的は、固体状態における多結晶粉末あるいはフィルム状のポリアミノ酸の高次構造の決定である。これらの試料を用いてα-ヘリックス、β-シート、あるいはランダムコイルなのかを決定することができれば非常に有効な分子構造解析手段となる。

(2) CD測定は高次構造の決定にはなくてはならない重要な手段であるが、詳細な分子構造解析は困難である。一方、多結晶粉末試料や無定形試料の固体構造を解明する唯一の手段といって良い強力な機器分析手法が固体高分解能NMRである。しかし、粉末試料の固体NMRは線幅が広く高次構造の解析には向いていない。そこで、固体CDと固体NMRを併用することによって、同位体ラベルしないキラルな固体試料の立体構造解析を行なうことができるかどうかを明らかにしたい。

(3) 固体NMR測定の手法は日々目覚ましい進歩を遂げている。¹³Cならびに¹⁵Nで選択的に同位体ラベルした試料を用いて原子間距離を精密に求める様々な手法が開発されており、種々の多核種3次元、4次元NMR法を駆使して極めて詳細な分子構造解析が可能になっている。また、固体NMRにおいても930 MHzの超高磁場NMR装置が稼動してい

る。しかしながら、これらの高度なテクニックを駆使できる多チャンネル固体NMR分光計は非常に高価であり誰でもが利用できる訳ではない。また、選択的な同位体ラベルした試料が入手できないことの方が多い。最新鋭の高価なNMR装置と複雑なパルスシーケンスを駆使し、遺伝子工学など最新の手法を用いて同位体ラベルした試料を用いて詳細な分子構造解析を明らかにする研究は非常に重要であり、科学技術の進歩に大きな貢献をすることは間違いない。しかし、一般に普及している標準的な ^1H と ^{13}C など他核種の2チャンネル構成の固体NMR装置と同位体ラベルしていない天然存在比の試料を用いてキララな固体試料の立体構造を明らかにする方法を提案することは、地味ではあるが研究の裾野を広げる意味で重要である。

3. 研究の方法

(1) CD測定は高次構造の決定にはなくてはならない重要な手段であるが、詳細な分子構造解析は困難である。したがって、固体高分解能NMRとの併用が不可欠となる。そこで、すでに詳細な高次構造解析がなされているポリ(α -アミノ酸)をモデル試料として、固体CD測定を行い、X線結晶構造解析等ですでに知られている高次構造を予測できるかどうか調べる。数多くの測定データを基にしてCDスペクトルの形から高次構造を推定する経験則が良く知られているので、種々のポリ(α -アミノ酸)の固体CDスペクトルが、この経験則に合っているかどうか検証する。

固体CDスペクトルを測定する際には、直線複屈折(LB)や直線二色性(LD)といった巨視的異方性に起因するニセに信号(artifact)を考慮しなければならない。ポリ(ϵ -リジン)キャストフィルムのCDスペクトルを通常の液体試料と同じ方法で測定すると、光軸に対して垂直にフィルムを回転したときにスペクトルが変化した。これは、巨視的異方性LB・LDに起因するニセの信号が現れていることを意味している。そこで、本研究室で開発した、ニセの信号を除去して真の固体CDスペクトルを測定できる方法[2]を適用して測定したのが図2に示すスペクトルである。ポリ(α -アミノ酸)の固体CDスペクトルを測定するときにも、最初にLB・LDを測定して巨視的異方性があれば、このような方法を適用しなければいけない。

[1] 固体高分解能NMRおよび固体CDによる生分解性高分子ポリ(ϵ -リジン)の分子構造解析, 前田史郎, 第40回固体NMR・材料研究会/第5回強磁場固体NMRフォーラム合同研究会要旨集, 57-60 (2006) (招待講演)

[2] Y. Shindo, K. Kani, J. Horinaka, R. Kuroda

and T. Harada, *J. Plastic Film Sheeting*, 164-182 (2001)

(2) ポリ(α -アミノ酸)の固体CDスペクトルから、溶液CD測定から得られている経験則に基づいて高次構造を推定できたとしても、ポリ(ϵ -リジン)は主鎖にメチレン炭素を4つ含んでおりフレキシブルな構造をとる可能性がある。そこで、分子構造が良く研究されているポリ(γ -グルタミン酸)をモデル試料に用いて、ポリ(α -アミノ酸)で得られた経験則が合っているかどうか検証する。これらの基礎的な研究に則って、ポリ(ϵ -リジン)の固体状態における高次構造を決定する。

(3) 微生物が産生する高分子としては主に3種類が知られており、納豆菌が産生するポリ(γ -グルタミン酸)(PGA)については、多数の研究がなされている。PGAはポリ(ϵ -リジン)に比べて主鎖のメチレン炭素が2つ少なく、側鎖がアミノ基ではなくカルボキシル基であるという違いがあるが、CDスペクトルから高次構造を予測できるかどうかのモデル化合物としては他にはない。そこで、PGAについて、固体CDならびに固体NMR測定を行って、スペクトルと高次構造の関連性について調べる。

以上のような、基礎的な検証を行なったうえで、ポリ(ϵ -リジン)の高次構造についてより詳細な実験を行なう。ポリ(ϵ -リジン)は半結晶性高分子であり、固体高分解能NMRを用いたスピン-格子緩和時間 T_1 測定から、結晶相、非晶相の2成分からなり結晶化度が63%であることが分かっている。各相における高次構造の違いがあるかどうかを調べることは、ポリ(ϵ -リジン)誘導体あるいは高分子ブレンドを作成して、有用な機能性材料を開発する際に非常に役立つことが期待される。

4. 研究成果

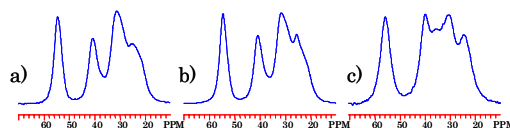


図1. a), b), c)は、それぞれpH 3、5、9の水溶液から作成したポリ(ϵ -リジン)キャストフィルムの固体 ^{13}C NMRスペクトルの脂肪族炭素部分である。

塩基性および酸性pHの水溶液からキャスト法で作成し凍結乾燥したポリ(ϵ -リジン)キャストフィルムの ^{13}C 固体高分解能NMRスペクトルを図1に示す。それぞれフリー

および塩酸塩型ポリ(ε-リジン)粉末の非晶領域のスペクトルと一致することを見いだした。

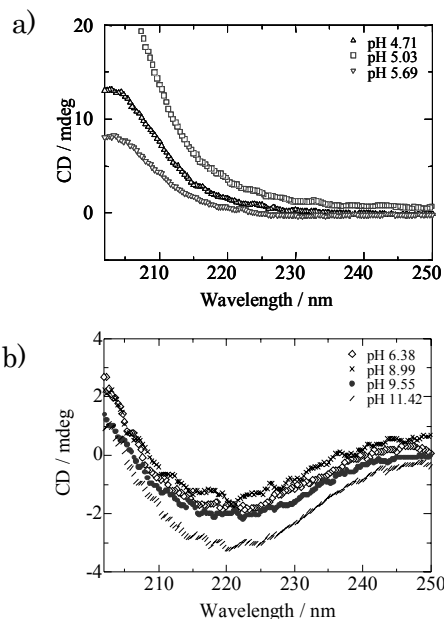


図2 a)酸性水溶液, b)塩基性水溶液からキャストしたポリ(ε-リジン)フィルムの固体CDスペクトル

図2にこれらの試料の固体CDスペクトルを示す。スペクトルはpHに依存しており、固体NMRを用いたポリ(ε-リジン)粉末試料の分子構造解析から明らかになったフリーおよび塩酸塩型ポリ(ε-リジン)の主鎖のコンフォメーションと矛盾しないことを見いだした。

図3に、種々のpHのポリ(γ-グルタミン酸)(PGA)水溶液からキャストしたPGAフィルムの¹³C固体NMRスペクトルを示す。試料には、D:L比が7:3である平均分子量200,000~500,000のPGAおよびPGA/Naをそのまま使用した。pH3.3よりも高いpHでは図3(a)とほぼ同様なスペクトルが得られた。また、PGAおよびPGA/Na粉末のスペクトルは、それぞれ図3(c)および図3(a)とほぼ同じであった。

pH1.5およびpH2.3の水溶液からキャストしたPGAフィルムのIRスペクトルには、アミドIおよびアミドIIの吸収線以外に、1735 cm⁻¹付近に明確な吸収線が現れるが、pH3.3の水溶液からキャストしたフィルムでは、この吸収線がほぼ無くなっている。この1735 cm⁻¹の吸収線は分子間で水素結合したCOOH二量体のC=O伸縮振動に帰属できる。PGA粉末あるいは図3(b)および(c)のカルボニル炭素吸収線は3つの吸収線で線形解析することができる。

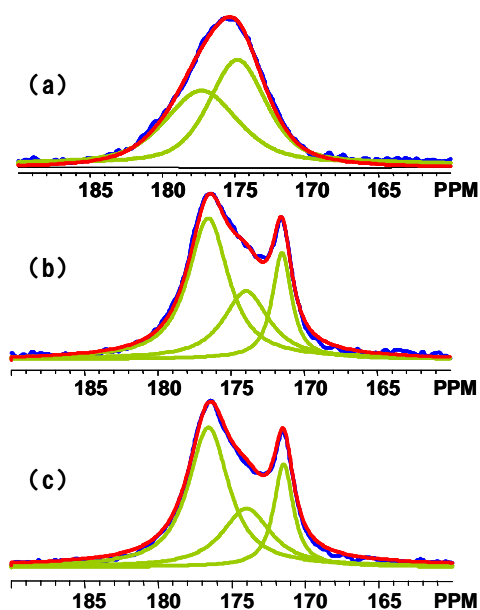


図3. 様々なpHのPGA/Na水溶液からキャストしたPGAフィルムの¹³C NMRスペクトルのカルボニル炭素吸収線の線形解析 (a) pH3.3, (b) pH2.3, および (c) pH1.5

一方、PGA/Na粉末および図3(a)の吸収線は2つの吸収線で線形解析できた。最も高磁場側の吸収線はpH約3以上では現れず、pHが低いほど吸収線面積が大きかった。

IRおよび溶液NMRの測定結果を考慮して、最も低磁場側の吸収線を主鎖アミド結合NHCOのC=Oに、高磁場側の2つの吸収線を側鎖COOHまたはCOO⁻に帰属した。PGA/Naの場合、高磁場側の吸収線はCOO⁻である。一方、PGAの側鎖COOH基のpKaは約2.3であり、これより低いpHでは高磁場側の吸収線が2本現れることから、COOHと帰属した。2本のうち一方は分子間あるいは分子内で水素結合を形成しているCOOHと考えられるが、詳細については検討中である。

PGAについてもポリ(ε-リジン)同様な固体CD測定を行う予定であった。しかし、吸収スペクトルの極大波長が紫外領域にあり、本研究で使用したCD分光計では測定できないため固体CD測定はできなかった。今後、真空紫外領域での測定が可能なCD分光計を用いて固体CD測定を行う予定である。

ポリ(ε-リジン)およびそのポリマーブレンドの固体NMRを測定することによって詳細な分子構造解析を行い、分子間相互作用等について知見を得ることができた。これらの結果については省略するが、それぞれの発表要旨に記載してある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 21 件)

- ①前田史郎, 清水裕太, ポリ(γ -グルタミン酸)およびそのポリマーブレンドの固体NMR, 第47回NMR討論会, 2008.11.14, 筑波大学
- ②前田史郎, 加藤久美子, 国本浩喜, 微生物産生高分子ポリ(ϵ -L-リジン)およびそのポリマーブレンドの固体NMR, 同上
- ③前田史郎, 国本浩喜, 微生物産生高分子ポリ(ϵ -L-リジン) / ポリビニルアルコールブレンドフィルムの構造解析, 第57回高分子討論会, 2008.09.26, 大阪市大
- ④S. Maeda, Y. Fujiwara, K. Kato, K. Kunimoto, Solid-state NMR structural study of microbial poly(ϵ -L-lysine) and its polymer blends, *235th Am. Chem. Soc., National Meeting, Symposium, "NMR Spectroscopy of Polymers"*, 2008.04.09, New Orleans (USA) (Invited Speaker)
- ⑤S. Maeda, O. Kinoshita, Y. Fujiwara, K. Sakurai, C. Sasaki, K. Kunimoto, Characterization of Microbial Poly(ϵ -L-lysine)/Poly(L-lactic acid) Blend Films by Solid-State NMR, *2nd Asia-Pacific NMR Symposium*, 2007.10.13, Hsinchu (Taiwan)
- ⑥S. Maeda, Y. Fujiwara, C. Sasaki, K. Kunimoto, Characterization of Microbial Poly(ϵ -L-lysine)/Poly(acrylic acid) Complex by Solid-State NMR, *ibid.*
- ⑦前田史郎, 藤原康博, 加藤久美子, 佐々木千鶴, 国本浩喜, 微生物産生分解性高分子ポリ(ϵ -リジン)の高分子複合体の固体NMR, 第56回高分子討論会, 2007.09.19, 名古屋工大
- ⑧前田史郎, 加藤久美子, 佐々木千鶴, 国本浩喜, 固体高分解能NMRによる微生物産生高分子ポリ(ϵ -L-リジン) / の分子構造解析, 第46回NMR討論会, 2007.09.11, 札幌市
- ⑨S. Maeda, Y. Fujiwara, C. Sasaki, K. Kunimoto, Structural Analysis of Microbial Poly(ϵ -lysine)/Poly(acrylic acid) blend by using solid-state NMR, *4th Int. Symp. Adv. Mater.*, 2007.07.14, Niigata (Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 史郎 (SHIRO MAEDA)
福井大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：70209378

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし