

ポリアミノ酸分子構造の研究

教授 増田 幸夫

1. 序 論

天然タンパク質分子の構造はきわめて複雑であるが、その基本構造として、 α -Helix、(らせん構造)、 β 型(ジグザグ構造)、Random Coil(不規則コイル状)の3種が知られている。これらの分子構造については今までに多くの研究がなされているが、この3種の区別、相互交換などはなお重要な研究課題である。天然タンパク質の模型物質として、合成ポリアミノ酸は、その構造が上記3種のどれかをとるので、きわめて有用な物質として注目されている。ここでは、著者が今までに行なった研究の中で、特にポリアミノ酸の各種分子構造の解明を試みたいくらかの例をのべることにする。ポリアミノ酸とは、アミノ酸を化学的反應によって重合させて、天然タンパク質と同じく分子内にペプチド結合(-CHR-CO-NH-)_nを含む高分子化合物としたものである。本研究に用いられたポリアミノ酸はほとんどすべて N-カルボキシアミノ酸無水物法によって合成されたもので、無水物と重合開始剤の比を調節することによって各種重合度のものを作ることが出来る。アミノ酸としては、グルタミン酸およびアスパラギン酸のエステルを主にあつかい、その他、アラニンなども用いた。詳細な歴史的背景、合成の詳細、装置の説明、結果の考察については、すでに発表した各論文にのべてあるので、この報告においては、著者等によって得られた結論を簡略に提示することとしたい。IR, ORD, UV, NMR の測定曲線もこの際は全く省略させていただき、表であらわした結果のみを示すことにしたので、おわかりになりにくい点もあろうかとおそれるが、興味のある方は、原著を参照していただければ幸いである。

2. アミドV赤外吸収帯による構造の識別¹⁾

天然タンパク質および合成ポリアミノ酸の研究に、赤外線吸収スペクトルが古くから用いられているが、ここでは、種々の重合度をもった各種ポリアミノ酸について、その赤外吸収低波数領域に着目し、分子構造の変化に鋭敏に対応する特性吸収帯の性格を調べた。

いわゆるアミド特性吸収帯として、アミドIからVIIまでの7種の重要な吸収帯が、Nメチルアセトアミドのような低分子物質について研究され、そのうちアミドIおよびII吸収帯については、タンパク質やポリアミノ酸の構造の研究にも利用されている。しかしアミドI(C=O結合の伸縮振動)、アミドII(N-H面内変角とC-N伸縮との混合した振動)では、その波数は分子構造の変化によって、たとえば α -Helixのアミドは 1650 cm^{-1} 、 β 型では 1630 cm^{-1} と、差が小さいので、あまり区別が明確に出来ない。又アミドI, IIを用いては、 α -HelixとRandom Coilの識別が出来ない。それに対して低波数領域のアミドIII~VII吸収帯の波数と分子構造の相関関係については今までにほとんど研究がなく、これらは局在化しない分子振動に対応するから、より鋭敏に分子構造によって変化すると期待された。

まず高重合度ポリグルタミン酸メチルについて、そのクロロホルム溶液より臭化カリ板

上に作った固体薄膜の赤外線吸収スペクトル ($4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 岩塩および臭化カリウム領域) の測定結果より, $700\sim 600\text{ cm}^{-1}$ の低波数領域に α -Helix 構造に特有な 620 cm^{-1} の強い吸収帯が見出された。配向試料についての赤外二色性, および重水素化トリフルオロ酢酸 (CF_3COOD) による N-重水素化試料についての測定によって, この吸収は, N-H 面外変角振動によるアミドV 吸収帯と帰属された。このアミドV 吸収帯は低重合度ポリグルタミン酸メチル (β 型構造) では 700 cm^{-1} と全く変化して現われ, 重合度20程度で α -helix の形成が起っているときには $620, 700\text{ cm}^{-1}$ の両者がともに存在し, その強度の比較で α, β 両構造の存在比も推察される。またこの吸収帯は, ポリグルタミン酸ベンジルでも, α -Helix 615 cm^{-1} , β 型 700 cm^{-1} (N 重水素化試料より推定) と同様に 100 cm^{-1} 近い波数差をもって存在することがみとめられた。

さらに各種ポリグルタミン酸エステル類, ポリグルタミン酸ナトリウム (Random Coil 構造), ポリアラニン, ポリゼリン, ポリ β アラニン, ポリアスパラギン酸ベンジルおよびメチルと, 数多くのポリアミノ酸についても, アミドV 吸収帯が見出され, Random Coil もふくめて構造の変化によって波数の差が著しく, きわめて識別に便利であることが明らかとなった。表 1 に, アミド I, II とあわせてアミドV 吸収帯の波数値を, まとめ

表 1 ポリアミノ酸の赤外吸収スペクトルにおけるアミド特性吸収帯

(波数 cm^{-1})

ポリアミノ酸	構造	アミド I	アミド II	アミド V
ポリLグルタミン酸 γ メチル	α	1658	1550	620
〃	β	1629	1531	700
ポリLグルタミン酸 γ エチル	α	1658	1550	620
ポリLグルタミン酸 γ イソアミル	α	1656	1550	615
ポリLグルタミン酸 γ ベンジル	α	1653	1550	615
〃	β	1629	1524	(690)
ポリLグルタミン酸ナトリウム	random	1658	1577	650
〃	β	1621	1565	700
ポリLアラニン	α	1658	1548	610
〃	β	1631	1543	695
ポリDLアラニン	α	1658	1543	620
〃	random	1658	1536	650
ポリLセリン	random	1661	1534	647
ポリ β アラニン	β	1642	1550	695
ポリLアスパラギン酸 β ベンジル	α	1664	1553	615
〃	β	1637	1543	(690)
ポリLアスパラギン酸 β メチル	α	1664	1553	615
〃	β	1639	1541	695
〃	random	1667	1536	643

てかかげた。この吸収帯の研究は, 将来, 天然タンパク質の分子構造の解明にも, より多くの知見をあたえるものと思われ, 今後の発展が期待される。

3. 赤外吸収と旋光分散による Helix 含量の決定²⁾

タンパク質分子は多くの場合 Helix (らせん) 構造をとっているが, Helix はさらに複雑な高次の構造の中に含まれている。タンパク質分子中の Helix 含量を決定することは,

分子構造解明への一つの手がかりとなる。ポリアミノ酸では、 α -Helix を作るものがあるが、例えば、L-グルタミン酸エステルの重合体は右巻きの α -Helix を、D-グルタミン酸エステルの重合体は左巻き α -Helix を形成することがわかっている。そこでL-アミノ酸とD-アミノ酸とが、種々の割合に含まれるような重合体を合成した場合には、純L-重合体および純D-重合体とは異なった α -Helix 含量をもったものができると思われる。あらかじめL:Dの分量比のわかった重合体試料について、種々の物理的方法で Helix 含量を調べて比較すれば、その含量決定法の有用性も確立され、タンパク質分子構造の決定にも大いに利用されると期待して、次の研究を行なった。

用いた試料は高重合度ポリグルタミン酸 γ -メチルエステルのDL共重合体11種であって、純L重合体からL:D=1:1までのものである。 α -Helix 含量の決定法としては、赤外線吸収スペクトルと旋光分散の両法を用いた。前述のように、ポリアミノ酸の赤外線吸収スペクトルの低波数領域にはN-H面外変角振動に基づくアミドV吸収帯があって、 α -Helix 構造のときはほぼ620~610 cm^{-1} に強く現われる。しかもこの吸収帯は純L-重合体にD-残基が入るにつれてしだいに強度が減少してゆくことが観察される。DL-共重合体では、純L-重合体に比べて Helix 形成がより困難であり、したがって Helix 含量も減じていると思われる。それゆえこのアミドV吸収帯の強度は Helix 含量に比例すると考えられる。アミドV吸収帯の吸収強度を決める基準としては、2950 cm^{-1} にある側鎖のCH伸縮振動による吸収帯を用いた。臭化カリブリズム領域測定のために作製した比較的厚い固体薄膜をワクに固定し、同一部分をフッ化リチウムブリズムによって3 μ 付近を精密に測定した。赤外スペクトルの α -Helix 特性吸収帯では、Helix の右巻き、左巻きの区別はつかず、今、純L-重合体(右巻き Helix のみより成る)の含量を1として、各々の Helix 含量を x_H^r (右巻き)、 x_H^l (左巻き)と表わせば、アミドV吸収帯による決定法では、 $x_H^r+x_H^l$ が算出できることになる。結果は表2に示した。

表2 赤外吸収と旋光分散による右巻き、左巻きの Helix 含量

L/D+L%	$x_H^r+x_H^l$	$x_H^r-x_H^l$	x_H^r	x_H^l
100	1	1	1	0
95	0.95	0.93	0.94	0.01
90	0.89	0.82	0.86	0.03
85	0.88	0.79	0.84	0.05
80	0.92	0.75	0.84	0.08
75	0.88	0.68	0.78	0.10
70	0.79	0.58	0.69	0.10
65	0.77	0.51	0.64	0.12
60	0.66	0.38	0.52	0.14
55	0.73	0.18	0.46	0.27
50	0.78	-0.01	0.39	0.39

次に旋光度の測定は、溶媒としてクロロホルムを用い、700~320 $m\mu$ の領域で分散曲線を求めた。Helix 分子についての Moffitt 式:

$$[m']_i = \frac{[\alpha]R}{100} \cdot \frac{3}{n^2+2} = a_0 \frac{\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0 \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

$[m']_i$: 有効残基旋光度

[α]: 比旋光度
 R : 残基分子量
 n : 溶媒の屈折率
 λ_0 : 212 $m\mu$

上式に値を入れ、 b_0 値を算出した。 b_0 は Helix に固有の定数であり、これを用いて Helix 含量が決定出来る。純L-重合体の b_0 を 1 とし、各試料の b_0 との比を求めれば、これは $x_H^r - x_H^l$ すなわち Helix 含量の右巻きと左巻きの差をあらわすことになる。

表 2 でわかるように、右巻きおよび左巻きの Helix の含量和は L-重合体に D 残基が入ってゆく場合、あまり急激な減少を示さず、L と D が 1:1 のものでも、約 80% の Helix が存在することがあきらかとなった。L 残基は L 残基どうし重合し右巻き Helix を、D 残基は D 残基どうしで重合して左巻き Helix をつくりやすいことが想像される。旋光分散の結果より求めた Helix の含量差は、L 重合体に D 残基が入るにつれて減少し、L:D が 1:1 のとき全く打消しあって 0 となっている。

固体薄膜と溶液の場合で、Helix 含量を同一と仮定したとき、表 2 のように x_H^r , x_H^l がそれぞれ算出できる。L:D=1:1 のとき、両 Helix はともに約 40% ずつ存在することになる。このポリグルタミン酸メチルの場合には、D 残基が少しでも入ると、 $x_H^r - x_H^l$ はすぐ減少するので、他のポリアミノ酸例えばポリロイシン、ポリグルタミン酸ベンジルでみとめられているような、D 残基の“巻き込み”は起こりにくく、すぐに左巻き Helix が生成するようであり、この意味では、ポリアラニンの場合に似ている。このように右巻き、左巻き Helix の含量を定量的に求めたのは、これがはじめてであり、将来利用され得る方法と思われる。

4. 遠紫外吸収と旋光分散による Helix 形成の確認³⁾

ポリペプチドやタンパク質の溶液における遠紫外吸収スペクトルが、分子構造の相違によって変化することは知られている。190 $m\mu$ 付近の吸収極大はペプチド結合発色団によっており、その吸収強度は、Helix 構造のときが、同じ物質の Random Coil 構造のときより著しく少ないことがみとめられた。Helix 構造では、190 $m\mu$ 吸収帯がわずかに短波長側へ移動し、205 $m\mu$ 付近に肩のような新しい吸収帯があらわれる。

ここでは、アスパラギン酸メチル、グルタミン酸メチルの合成ポリペプチドについて、遠紫外吸収を測定し、分子中の残基数の増加によって α -Helix が形成される境界点をくわしくしらべた。同じ試料の旋光分散によって、前述の b_0 値の変化も追究した。表 3 に得られた結果を示す。

試料は Prof. Goodman 研究室の人達によって、永年にわたって合成されたものであり、アミノ酸を複雑な誘導体に変え、段階的に 1 残基ずつ結合して作られた価値ある化合物である。ただし n が High とあるものだけは N カルボキシアミノ酸無水物法で合成された高重合体である。遠紫外部まで透明であり、しかもポリアミノ酸をよく溶解する良溶媒として、2,2,2 トリフルオロエタノール (CF_3CH_2OH) がはじめて使用され、好結果が得られた。吸収強度は残基あたりの分子吸光係数 (ϵ_r) で示すことにしたので、低重合体より高重合体への比較が可能になった。L アスパラギン酸エステルの高重合体は、L グルタミン酸エステルの場合と違って生成 Helix は左巻きであり、Helix 安定性も少いとい

表 3 遠紫外吸収による残基あたり分子吸光係数 (ϵ_r) と旋光分散による b_0 値

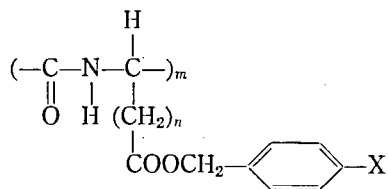
アミノ酸 残基数 n	L アスパラギン酸 γ -メチル・ペプチド		L グルタミン酸 γ -メチル・ペプチド	
	190 m μ における $\epsilon_r \times 10^{-3}$	b_0	189 m μ における $\epsilon_r \times 10^{-3}$	b_0
2	8.0	- 40		+185
3	7.5	- 80	7.7	+ 72
4	7.2	-100		+ 50
5	7.0	-130	8.1	0
6				0
7			8.3	- 42
8	6.8	- 90		
9			7.4	-210
11	6.4		5.8	-277
13			4.4	-337
14	5.0	- 30		
High	3.2	+860	3.9	-816

(溶媒: トリフルオロエタノール)

われている。左巻き Helix は b_0 値がプラスとなる。今までに知られた ϵ 値は、例えばポリLグルタミン酸のとき、Random Coil の 190 m μ の値 7,100, Helix の値 4,200 である。表 3 に示すように、アスパラギン酸メチル系列では、 $n=14$ ではじめて Helix が形成されはじめるのに対し、グルタミン酸メチル系列では、 $n=9$ で Helix の形成がみとめられる。このように両者の Helix 形成能、Helix 安定性の研究に遠紫外吸収と旋光分散法の併用が有効であることが明確にされた。遠紫外吸収による Helix 含量の決定も可能性があることと思われる。

5. 芳香族ニトロ基による Helix 逆転の効果⁴⁾

ポリLアスパラギン酸 β -ベンジル (PBLA) の側鎖に、芳香核のパラの位置にニトロ基を導入すると、クロロホルム中のポリペプチドの Helix の巻き方が逆転することが、最近発見された。



すなわち上式で $n=1$, $X=\text{H}$ のものはLアミノ酸のとき左巻き α -Helix を作るのに対し、 $X=\text{NO}_2$ の残基が入った共重合体になると、ニトロ基残基が増加するにつれて、らせん構造は変化し、ニトロ基 20% 程度以上では右巻きらせんになってくることがわかった。現在 Prof. Goodman の研究室では n を 0,1,2 と変え、 X を NO_2 以外に CN , OH , OCH_3 と変化して、この特殊効果 ("Nitroaromatic Effect") の詳細な研究を続行中である。ここでは、著者が実際測定に参加した Lアスパラギン酸 p-ニトロベンジル・メチル共重合体についての結果だけを説明することにする。表 4 の上部には、今のべたニトロベンジ

表 4 ニトロベンジル共重合体の比旋光度と旋光分散定数

	NBLA%	$[\alpha]_{546}^{25}$	b_0	λ_c
Copoly NBLA・BLA*	0	-102.9	+ 760	40
	11	-141.9	+ 580	167
	23	-102.7	+ 270	184
	36	-117.7	- 570	260
	44	-125.9	-1100	286
	66	-139.8	-1300	284
Copoly NBLA・MLA**	0	-217.0	+ 610	142
	10	-169.5	+ 510	158
	20	-133.8	+ 100	190
	25	-107.8	- 660	262
	48	- 75.2	- 890	283

(溶媒 * クロロホルム ** トリフルオロエタノール)

ル・ベンジル共重合体 (Copoly NBLA・BLA) についての旋光分散測定結果があげてある。純Lアスパラギン酸ベンジルの左巻き helix を示す +760 の b_0 値は、分子中に p-ニトロベンジル基が導入されるのに従って、急激に減少し、23~36% ニトロ基のところで符号が逆転し、ニトロ基含量と b_0 をそれぞれ横軸、縦軸にとって plot した曲線が直線状を示さないことから、らせんの巻き方の反転が推測されるのである。

この特性の原因として、はじめニトロベンジルおよびベンジル基中の芳香核相互作用が考えられたが、表 3 下部に示すように、ニトロベンジル・メチル共重合体 (Copoly NBLA・MLA) を新たに合成して、旋光分散を測定したところ、ベンジルの場合と同様の結果が得られたことから、ニトロベンジル基のみの相互作用が関係していることが明らかとなった。すなわち純Lアスパラギン酸メチルは左巻きらせんで b_0 が +610 であるが、p-ニトロベンジル基が導入されるにつれて、やはり 20~25% ニトロ基の点で符号が逆転し、らせんの巻き方が反転する。この Helix の巻き方の方向については、 b_0 測定とあわせて、180 m μ 付近までの遠紫外旋光分散の測定も行ない、いわゆる Cotton 効果の正負の相違によっても、確認されている。

今のところ、この Helix 反転の機構について、確定的な理論は完成していないが、側鎖中の芳香核相互作用 (電子雲の重畳) による二次的らせん構造 (Side Chain Super Helix) が、主鎖のらせんの巻き方を変えるというような考え方も出されている。このような特殊な Helix の研究は、タンパク質中の複雑な Helix 構造の解明に、新しい方向をあたえるものとして、注目されている。さらに遠紫外部の旋光分散の測定が進められれば、もっとはっきりした説明が出されるであろう。

6. 核磁気共鳴吸収による Helix-Coil 変換の検出⁵⁾

タンパク質および合成ポリアミノ酸分子がとり得る分子構造のうちで、 α -Helix と Random Coil 構造は、色々な条件の下で相互に変換することが知られている。溶媒の相違、温度の変化などがその条件である。この Helix-Coil 変換の研究には今まで主として旋光度の測定が用いられて来た。ここに著者がはじめて試みた新しい方法についてのべる。すなわち核磁気共鳴吸収スペクトルの測定である。ポリペプチドの核磁気共鳴についての文

表 5 トリフルオロ酢酸・トリフルオロエタノール溶媒組成と Random Coil 含量

トリフルオロ酢酸 含量 %	NH/CH ₃ 面積比	Random Coil 含量 %	b ₀ (10%溶液)
100	0.30	100	—
70	0.30	100	—
68	0.24	80	—
66	0.11	37	0
64	0.09	29	0
62	0	0	-350
60	0	0	-460

献はわづかで、それが α -Helix 構造のとき、ほとんど吸収の山があらわれないといわれていた。著者は試料としてポリ L-グルタミン酸エチルの高重合度のものを用い、Helix 形成溶媒としてトリフルオロエタノール、および Random Coil 溶媒としてトリフルオロ酢酸をとりあげ、両者の混合組成と核磁気共鳴吸収の山の面積（各種状態の水素原子の数量と対応する）との相関関係についてしらべた。（温度 25°C、濃度 15%）特に N-H の水素の吸収の山がある混合組成のところで消滅するのに着目し、この山と、変化の著しくない側鎖エチル基中のメチルの水素の吸収の山との面積比の減少をしらべた。表 5 に測定結果を示してある。トリフルオロ酢酸 70% の組成の溶媒中では、完全に分子は Random Coil であるが、さらにトリフルオロエタノールが入ると、N-H の吸収の山は減少し、62% で消滅する。トリフルオロ酢酸によってこわされていた α -Helix は、62~64% の範囲で、再生する（N-H が分子内の C=O と水素結合を生ずる）わけである。このように核磁気共鳴によって認められた Helix-Coil 変換点は、今までに知られている旋光度測定による研究の結果とよく一致する。表 5 には、旋光分散による b₀ 値も示してある。

温度による Helix-Coil 変換の研究にも、この核磁気共鳴の方法は試みられたが、測定 の困難さにより、良好な結果は得られていない。ただ、75°C という高温での測定においてトリフルオロ酢酸 70% の溶媒中でも、 α -Helix が相当量存在していることがわかった。これは文献にある傾向と一致する。

分子内 N-H 吸収の山が、トリフルオロエタノールの増加とともに消滅すると同時に、水素結合した N-H の吸収の山が、どこかにあらわれる筈であるが、まだ観察されてはいない。この核磁気共鳴によるポリアミノ酸の分子構造の研究は、今後の発展が大いに期待される方法と考えられる。将来、良い溶媒の発見、強力な装置の開拓と相まって、有力な手段となると思われる。

7. 結 語

以上の研究は、もともと著者が学習院大学理学部化学教室在職当時に開始され、その後大阪大学蛋白質研究所の物理構造部門および物性部門において、ついで北米 New York の Polytechnic Institute of Brooklyn の Department of Chemistry において続行されたものであり、現在本学理工学部化学教室において継続中である。著者は、阪大の宮沢辰雄教授、Brooklyn Poly. の Prof. M. Goodman の協力を得て、終始研究を遂行して今日に至った。

ポリアミノ酸の分子構造に関しては、今日なお不明の点が多く、天然タンパク質の構造

解明に応用されるためには、さらに新しい方法と知見の探究が必要である。元来、高分子化学は研究分野が広汎で、近代的な装置の利用、密接な情報の交換、多人数の研究員の絶ゆまぬ努力が要求される。しかも、国際的なポリアミノ酸シンポジウムが 1966 年には日本で開かれようといわれている今日、今後このポリアミノ酸分子構造の研究領域への世人の関心が増し、研究態勢の一層の充実によって、輝かしい研究成果が続出することを祈ってやまない。ポリアミノ酸の実際的应用も、現在では夢ではなくなって、人造タンパクの名も近い将来人々の口に上ることであろう。

原 著

- 1) T. Miyazawa, Y. Masuda and K. Fukushima: *J. Polymer Sci.*, **62**, S62-64 (1962).; 増田幸夫: *高分子化学*, **20**, 161-176, 206-209 (1963).; Y. Masuda, T. Miyazawa and M. Goodman: to be published.
- 2) 増田幸夫: *高分子化学*, **20**, 210-214 (1963).
- 3) M. Goodman, I. Listowsky, Y. Masuda and F. Boardman: *Biopolymers*, **1**, 33-42 (1963).
- 4) M. Goodman et al.: *Biopolymers*, **1**, 371-400 (1963).; M. Goodman, Y. Masuda and M. Falxa: *Biopolymers*, in press.
- 5) M. Goodman and Y. Masuda: *Biopolymers*, **2**, 107-112 (1964).

Summary

Molecular Conformational Studies on Polyamino Acids

Yukio Masuda

As the model of natural protein, molecular conformation of various polyamino acids were studied using many physical methods. Amide V bands (N-H out of plane bending mode) of infrared absorption spectra were found very useful to determine specific conformations. Combining infrared absorption spectra and optical rotatory dispersion, the right and left handed helical content of poly γ -methyl-DL-glutamate were determined. Helical assignments via far ultraviolet absorption spectra and optical activity were investigated. "The nitroaromatic effect" which means that the introduction of a nitro group in the para position of the aromatic ring in the side chain of poly β -benzyl-aspartate causes a reversal in the helical sense has been studied more fully using other poly amino acids. The detection of polypeptide helix-coil transitions has been studied first by high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results so far obtained were found consistent with the previous measurements by other methods.