

放線菌由来 ϵ -ポリリジン及びアゾ色素誘導体の構造と分光特性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/14618

氏 名	佐々木 千鶴
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第790号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	放線菌由来 ϵ -ポリリジン及びアゾ色素誘導体の構造と分光特性
論文審査委員(主査)	国本 浩喜(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	中本 義章(自然科学研究科・教授), 上田 一正(自然科学研究科・教授), 山岸 忠明(自然科学研究科・助教授), 長谷川 浩(自然科学研究科・助教授)

Abstract

Poly (ϵ -L-Lysine) (ϵ -PL) is a microbially produced polyamino acid, composed solely of L-Lysine. Due to antibacterial activities against broad spectrum of microorganisms, this compound has been used as a preservative for various food products. In ϵ -PL, amide linkages are formed between ϵ -amino and α -carboxyl groups. There have been, however, few studies on the structure and conformation of ϵ -PL, compared to poly (α -L-Lysine) (α -PL).

In this thesis, I have investigated the physical properties, the molecular structure and conformation of ϵ -PL both in aqueous solution and in the solid state using various spectroscopic techniques. ϵ -PL was chemically modified with methyl orange (MO) and dabsyl chloride (DC), from a viewpoint of functionalization of the polymer. Structural characteristics and aggregation behaviors of azo dye modified derivatives, ϵ -MO and ϵ -PL /DC, are studied. Aggregation of dabsylated amino acids (Dabs-AA) were also examined as a comparison.

Results of my work can be summarized as follows,

1. Circular dichroism (CD) spectra indicated that ϵ -PL assumes a β -sheet conformation in aqueous solution.
2. Crystalline and amorphous components of ϵ -PL were separately observed in the solid state ^{13}C NMR, and the former takes parallel β -sheet structure similar to the γ -form of nylon-6.
3. Solid state ^{15}N NMR spectra differentiated clearly the binding modes of ϵ -PL/MO and ϵ -PL/DC and can be used as a quantitative analysis.
4. ϵ -PL/DC in DMSO solution induced a hypsochromic shift of the absorption maximum and a split CD signal upon addition of water. These observations pointed out that ϵ -PL/DC forms H-aggregates and azo chromophores interact with a chiral arrangement.
5. Dabs-AAs aggregate to form dimers with chromophores arranged in a negative chirality in aqueous solution based on uv-vis absorption and CD spectra.

【1】緒言

近年、石油由来プラスチックに替わる環境負荷低減材料として、生分解性ポリマーに関心が集まっている。ポリアミノ酸は単一のアミノ酸がアミド結合で繋がったバイオポリマーであり、天然には *Bacillus* 属の産生するポリグルタミン酸と、*Streptomyces* 属由来の ϵ -ポリリジン (ϵ -PL) が知られている。 ϵ -PL は和歌山県の土壤中の *Streptomyces albulus* の培養液より酒井平一、島昭二博士によって初めて発見された。 ϵ -PL では、必須アミノ酸 L-リジンの ϵ 位アミノ基と α 位カルボキシル基とで

ペプチド結合を形成する (Fig. 1)。側鎖のアミノ基が水溶液中でポリカチオンになり、プラス電荷を帯びることによって抗菌効果を示す。さらに、ラットを用いた経口投与試験からも高い安全性が確認されており、現在では、食品保存料としてレトルト食品などに添加されている。

α -アミノ基と α -カルボキシル基とでペプチド結合を形成している α -ポリリジン (α -PL) は、溶液の pH 条件によりランダムコイル、 α -ヘリックス、 β シート構造をとることから、ペプチドの二次構造のモデル物質として詳細に研究されている。一方、 ϵ -PL では、主鎖のメチレン基により柔軟な二次構造をとると予測されるが、溶液や固体状態の分子構造やコンフォメーションに関する報告は少ない。また、 ϵ -PL は、側鎖に反応性の α -アミノ基を有しており、化学修飾により誘導体を容易に合成でき、機能性材料の開発が期待できる。

本研究では、 ϵ -PL 溶液及び固体状態における二次構造を FT-IR、Raman、及び NMR スペクトルを用いて解析した。また、機能化の一環としてアゾ色素による化学修飾を行い、その固体の構造解析を行った。さらに、水溶液中での挙動については UV-Vis 吸収、円二色性 (CD) スペクトルを用いて検討した。

【2】 ϵ -PL の溶液中での二次構造

ϵ -PL は微生物の培養液から何段階かの精製を経て、塩酸塩 (ϵ -PL/HCl) の白色の結晶性粉末として得られる。 ϵ -PL/HCl を中和後、脱塩することで得られる遊離型 ϵ -PL と ϵ -PL/HCl の物性について Table 1 にまとめた。 ϵ -PL のガラス転移点 T_g は 88°C 、融点 T_m は 172.8°C で一次構造の類似しているナイロン 6 (T_g 56°C 、 T_m

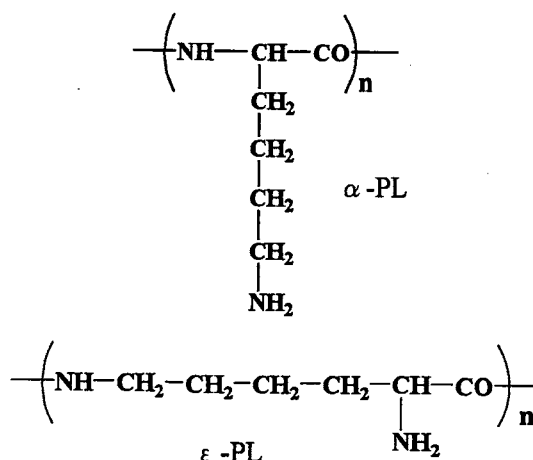


Fig. 1 ポリリジンの一次構造

Table 1 ϵ -PL 及び ϵ -PL/HCl の物性値

Properties	ϵ -PL	ϵ -PL/HCl	Nylon 6
Mn	4,090	4,200	11,000
Mw	4,700	5,330	-
Mw/Mn	1.14	1.26	-
T_m	172.8°C	256.3°C^*	221.0°C
T_g	88°C	-	56°C

* Decomposition Temperature

221°C) とほぼ対応している。また、数平均分子量および分子量分布はそれぞれ $M_n = 4,090$ 、 $M_w/M_n = 1.14$ と得られた。さらに、 ϵ -PL の HPLC イオンペアクロマトグラムより、 ϵ -PL は重合度 $n = 25 \sim 32$ に最大値をもつ、重合度分布を有することが確認された。

CD (円二色性) スペクトルはタンパク質やポリペプチドの二次構造を反映することが知られている。 ϵ -PL 溶液の CD スペクトルの pH 依存性を検討した。pH を 2.2 から 10.2 へ変化させると高 pH 側で、215~217 nm で極小値をとる負の楕円率を示し、短波長側で正の楕円率を示した (Fig. 2)。これより、酸性 pH では、プロトン化した側鎖 α -アミノ基 (α - NH_3^+) のイオン反発により静電的に広がったコンフォメーションを、また、塩基性 pH では逆平行 β シートのような構造をとることが示唆された。

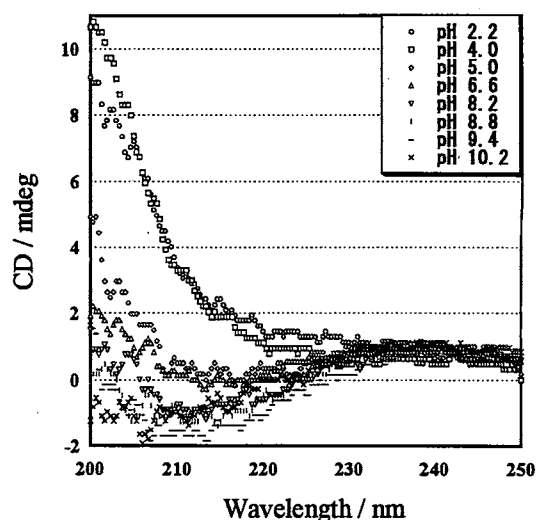


Fig. 2 ϵ -PL 溶液の CD スペクトル pH 依存性

[3] ϵ -PL の固体状態での二次構造

α -ペプチドを有するタンパク、ペプチドの二次構造は、アミドの特性振動数に反映されることが知られている。

ϵ -PL、 ϵ -PL/HCl の固体状態の FT-IR、及び Raman スペクトルの測定を行った。 ϵ -PL では、主に NH 伸縮の性質を持つ Amide A、Amide B が 3326、3081 cm^{-1} に観測されることからアミド基間の分子間水素結合の存在が示唆された。また、Amide I、Amide II はそれぞれ 1633 cm^{-1} 、1535 cm^{-1} に見られることより ϵ -PL の二次構造は β -sheet 構造であると考えられ、このことは Nylon 6 に対応していた。

Fig. 3 に ϵ -PL および ϵ -PL/HCl の固体高分解能 ^{13}C NMR スペクトルを示す。 ϵ -PL のカルボニル基 ($\text{C}=\text{O}$) のピークは、 ϵ -PL/HCl と比較して低磁場シフトし、 ϵ -PL は $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}$ で水素結合していることが裏付けられた。ま

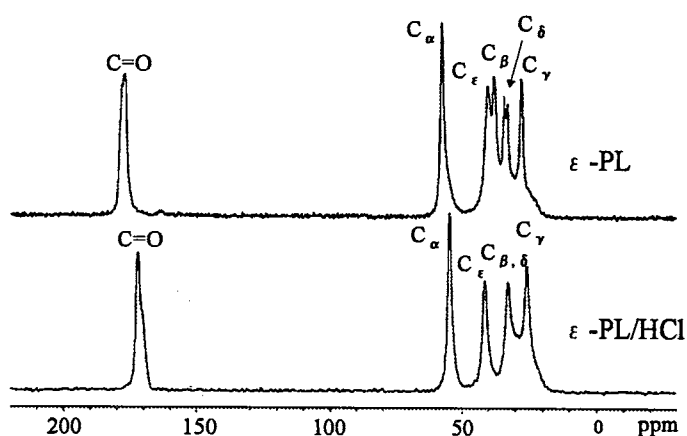


Fig. 3 ϵ -PL と ϵ -PL/HCl の固体高分解能 ^{13}C NMR スペクトル

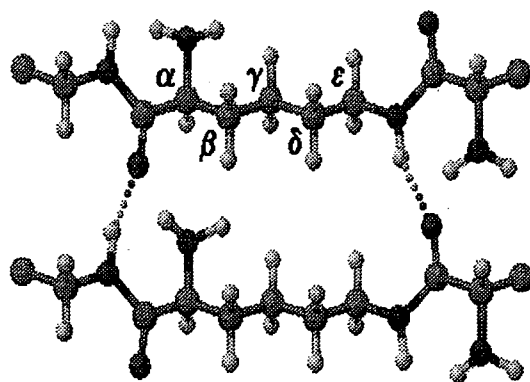


Fig. 4 ϵ -PL のコンフォメーションモデル

た、 ϵ -PL の $C\gamma$ と $C\delta$ のピークに対して、 ϵ -PL/HCl の $C\gamma$ と $C\delta$ のピークは重なって観測された。この脂肪族ピークの違いは主鎖構造に違いがあることに起因している。さらに、 ϵ -PL とナイロン 6 とを比較すると、 ϵ -PL の $C\alpha$, $C\beta$ の化学シフトには 20 ppm、8 ppm の低磁場シフトが観測された。これらのシフトは側鎖 α -アミノ基 (α -NH₂) の電子吸引性による置換基効果から説明することができる。また、ナイロン 6 には、分子間水素結合が逆平行に形成されている α -形と分子間水素結合が平行に形成されている γ -形を取る 2 つの結晶形が知られており、以上のスペクトルから ϵ -PL の固体構造は、 γ -形ナイロン 6 のような平行 β -シートコンフォメーションをとると考えられる (Fig. 4)。

さらに ¹³C NMR の緩和時間測定により、 ϵ -PL には結晶相と非晶相が存在することが明らかとなり、結晶相が 63%を占めていることが確認された。

【4】色素修飾 ϵ -PL の固体構造

ϵ -PL の機能化を目的として、 ϵ -PL の α -アミノ基をアゾ色素で化学修飾し、その分光学的特性について検討した。アゾ色素には、pH 指示薬の一つであるメチルオレンジ (MO) 及びアミノ酸分析試薬であるダブシルクロライド (DC) を用いた。MO との反応によりイオン性の複合体 ϵ -PL/MO を、DC との反応により共有結合性の誘導体 ϵ -PL/DC を合成した (Fig. 5)。それぞれの色素による α -アミノ基の修飾率は ¹H NMR スペクトルからおおよそ 70%と見積もった。

結合に関する直接的な知見を得るために、¹⁵N NMR の測定を行った。それぞれの色素修飾 ϵ -PL とその誘導体の化学シフトを Table 2 にまとめた。

ϵ -PL/MO において、 ϵ -PL の 26.6 ppm に観測された α -アミノ基由来のピークと ϵ -PL/HCl の α -アンモニウムイオン由来の 43.9 ppm のほぼ中間である 34.2 ppm にピークが観測された。このことより、 ϵ -PL と MO のイオンコンプレックス形成が示唆された。 ϵ -PL/DC では側鎖 α -スルホンアミド基 (α -NH₂SO₂) 由来ピークが 103.6 ppm に観測され、 ϵ -PL と DC が共有結合を形成していることが確認された。

さらに ϵ -PL/DC には 35.4 ppm 前後に幅広の小さなピークが観測され、この値は ϵ -PL/MO のイオンコンプレックス形成に起因する化学シフトに近い値

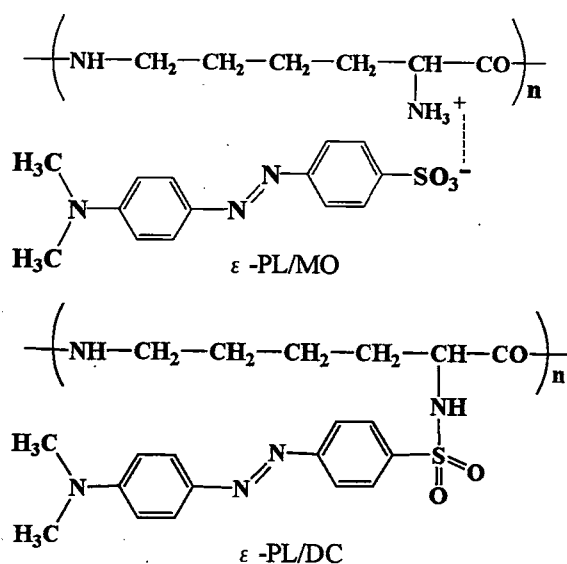


Fig. 5 色素修飾 ϵ -PL

Table 2 ϵ -PL とその誘導体の ¹⁵N NMR 化学シフト値 (ppm)

Compd.	ϵ -NHCO	α -NH ₂ SO ₂	α -NH ₃ ⁺	α -NH ₂	-N(CH ₃) ₂
ϵ -PL	116.9			26.6	
ϵ -PL/HCl	122.7		43.9		
ϵ -PL/MO	116.1		34.2		60.2
ϵ -PL/DC	120.7	103.6	35.4		62.7

であり、このことから、 ϵ -PL と DC は完全に共有結合しているのではなく、DC の一部が反応中に加水分解して MO となり、部分的に ϵ -PL/MO のイオンコンプレックスを形成して側鎖 α -アミノ基と結合していることが明らかとなった。

【5】色素修飾 ϵ -PL の水溶液中での会合挙動

ϵ -PL/DC の水溶液中での会合挙動を調べるため、UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。 ϵ -PL/DC の DMSO 溶液のスペクトルは ϵ -Boc-L-Lys/DC のスペクトルに類似しており、モノマー状態であることが示唆された。希薄濃度の ϵ -Boc-L-Lys/DC 溶液に H_2O を添加すると、最大吸収波長 (λ_{max}) は 450 nm から 480 nm へ長波長シフトするのに対し、 ϵ -PL/DC では λ_{max} は短波長シフトし、DMSO/ H_2O = 1/9 の溶媒比では 400 nm に観測された (Fig. 6)。さらに、 ϵ -PL/DC の DMSO/ H_2O 混合溶媒で CD スペクトルを測定したところ、400 nm 付近に分裂型コットン効果が観測された。

このような、 H_2O % 濃度増大による UV-Vis スペクトルの短波長

シフト及び誘起 CD はそれぞれ、Kasha らによる励起子分裂モデルおよび励起子キラリティー法を用いて考察すると、水溶液中で色素部位の疎水性相互作用によりキラリティーを持ち、H-会合体を形成していると考えられる。以上のことから、水溶液中での ϵ -PL/DC の会合モデル図を Fig. 7 のように推察した。

【6】ダブシルアミノ酸の会合挙動

ϵ -PL/DC のモデル化合物として一連のダブシル化アミノ酸 (Dabs-AA) を合成し、

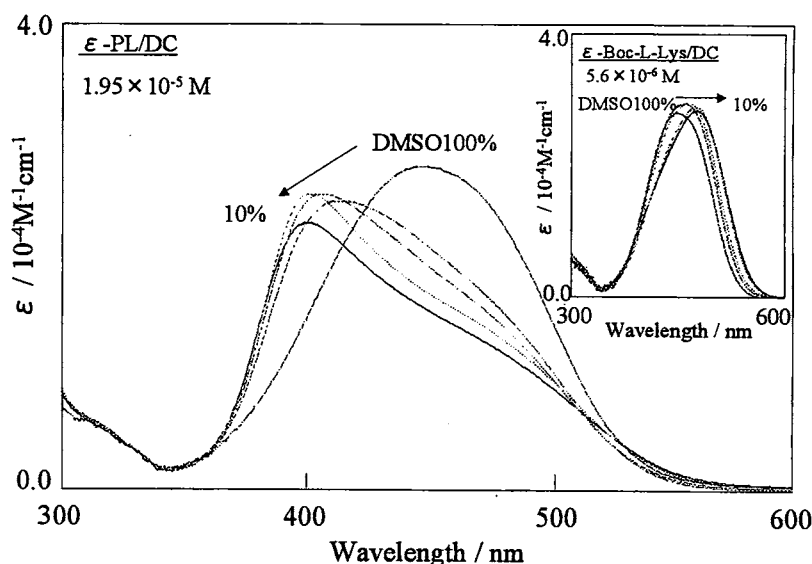


Fig. 6 UV-Vis 吸収スペクトル DMSO% 濃度依存性

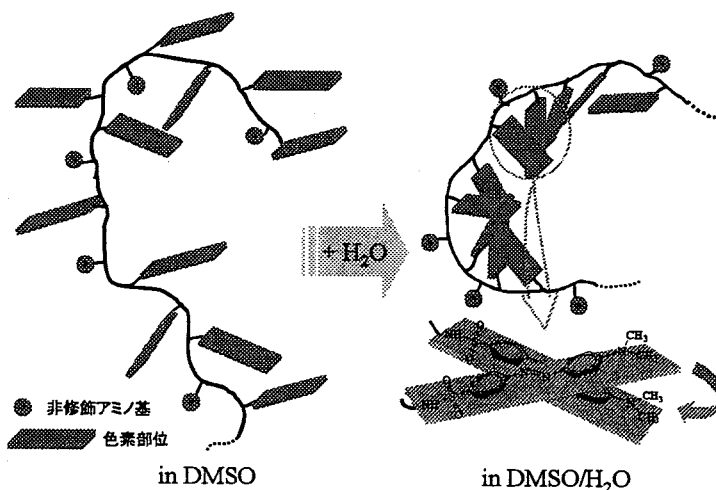


Fig. 7 ϵ -PL/DC の相互作用モデル図

UV-Vis スペクトルおよび CD スペクトルを測定し、Dabs-AA の水溶液中での会合挙動を検討した。UV-Vis スペクトルにおいて、希薄水溶液では、Dabs-AA の可視部の吸収はジメチルアミノアゾベンゼン色素特有の pH 依存性を示す。Dabs-AA の濃度上昇に伴い、Dabs-AA のモノマー由来の吸収は減少し、360-400 nm 領域にダイマーに由来するピークが観測される。ダイマーの形成は共溶媒として用いた

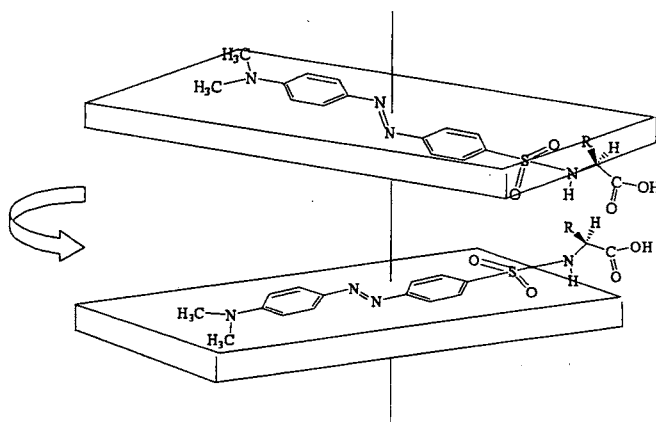


Fig. 8 Dabs-AA の会合モデル図

(Dabs-L-Phe: R = -CH₂-Ph)

DMSO 濃度、溶液温度及びアミノ酸側鎖(R) に依存する結果を得た。Dabs-L-Phe の場合、UV-Vis スペクトルでの 363 nm に観測されるダイマーの吸収帯に対応して、379 nm に負の第一コットン効果、359 nm に正の第二コットン効果をもつ強い誘起分裂型 CD スペクトルが観測された。これらの結果から水溶液中では、Dabs-L-Phe は負のキラリティーを示す配向でダイマーを形成していることが示唆された (Fig. 8)。

学位論文審査結果の要旨

提出学位論文に関して各審査委員が個別に審査を行うとともに、平成 18 年 2 月 3 日に口頭発表会と論文審査委員会を開催し、学位論文並びに資料を検討した。その結果、以下のとおり判定した。

本論文では、放線菌 *Streptomyces albulus* が産生するポリアミノ酸である ϵ -ポリリジン (ϵ -PL) の溶液および固体状態での二次構造を分光法に基づき明らかにしている。すなわち、 ϵ -PL が水溶液中で β -シート構造をとり、固体状態でナイロン 6 の γ -型結晶類似の構造をとることを FT-IR、Raman、溶液 NMR、固体高分解能 ¹³C および ¹⁵N NMR スペクトルに基づき明らかにしている。

さらに、 ϵ -PL の機能化の一環としてアゾ色素による α -アミノ基の化学修飾を行い、色素修飾ポリリジン (ϵ -PL/DC) の水溶液中での会合挙動について検討している。紫外可視吸収 (UV-Vis) および円二色性 (CD) スペクトルに基づき、 ϵ -PL/DC が水溶液中で H 型で自己会合し、会合体における色素の配置にはキラリティーが誘起されることを見出だしている。

本論文により得られた知見は、これまで研究例が少なかった側鎖型ポリアミノ酸である ϵ -PL の溶液および固体の二次構造に関して基本的な情報を与えている。また、色素修飾ポリリジンが溶液中でキラルな配置で会合するという知見は、材料設計の観点からも重要なものである。以上、本論文は十分に博士の学位論文に値すると考え、審査員一致で合格と判定した。