

ポリ- β -p-クロロベンジル-L-アスパラギン酸の ω 型の構造

武 田 泰 宏

Summary

The Structure of ω -form of Poly- β -p-chlorobenzyl-L-aspartate

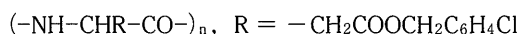
TAKEDA Yasuhiro

The structure of the right-handed ω -helical form of synthetic polypeptide PCIBLA in fibrous state has been studied again, and found to be in the monoclinic system. A suitable molecular model, especially of its sidechain conformation has been worked out computationally to be consistent with X-ray diffraction data and polarized IR absorption data once obtained.

Equatorial structure factor for the superposed up- and down-chain model of the pseudo 4_1 helix has been calculated by using a newly developed BASIC soft, that is in good agreement with the observed scattering amplitudes. These results indicate that the sidechain conformation is fairly regular despite disordered assemblies of molecules, its plane of chlorophenyl group being inclined to stack on in a molecule and interacting with that of neighbor molecules. The reason of the cell deformation from tetragonal packing by para-chloro substitution is explained on the basis of steric conditions to accommodate chlorine atom.

1. 緒 言

合成ポリペプチドであるポリ- β -ベンジル-L-アスパラギン酸 (PBLA) は例外的に左巻きラセン構造をとるが、その p 位塩素置換体であるポリ- β -p-クロロベンジル-L-アスパラギン酸 (PCIBLA) は次の化学式で表され通常の右巻きラセン構造をとる。この配向繊維の熱処理によって生ずる ω 型構造は α 型が少し変形したもので左巻きより不安定とされる右巻き 4_1 ラセンからなるので、この集合系は当初、常識的に正方晶系であると考えられた¹⁻³⁾。



しかし、X 線回折写真の反射の指数付けに無理があり分子モデルのパッキングに重大な障害が生ずるなどの難点があったので、他の型の格子を考える必要があった。最近、X 線データを再検討した結果、この準結晶の単位格子は単斜晶系であることが分かった。そこで、晶系に関する訂正を行うと共に赤外二色性と単位格子に適合した分子モデル、特に側鎖構造モデルを計算機により作成し、その構造因子を計算したので以下にその概要を報告する。

2. 実験と方法

試料の PCIBLA (d.p.150) は大日本製薬(株)・研究所の橋本昌久氏が合成し提供されたものである²⁾。この X 線繊維写真の反射面間隔の測定は既報の原版を約 4 倍に引伸ばしたプリントについて行った。その強度測定は He ガスを流しながら多重フィルムに撮った回折写真について単結晶用標準スケールを用いて目測により行ってあったが、 α 型と同様に次式に従い L_p 補正を行い散乱振幅 $|F_o|$ とした³⁻⁴⁾。

$$|F_o| = K\sqrt{(L_p^{-1}) I_o/M} \doteq K'(1/d)\sqrt{I_o/M}$$

IR 用の配向薄膜は塩化銀板上で試料のクロロホルム溶液から作成し同様に熱処理を行った。この試料の偏角赤外スペクトルは赤外線分光光度計 JASCO IR-S により測定したものをを用いた。各吸収帯の二色比 R は今回は平行、直角吸収帯の各ピーク値を吸光度に換算して求め次式に従いその遷移モーメントの方向角 θ (ラセン軸とのなす角) を算出した⁵⁾。

$$R(\parallel/\perp) = (2\cos^2\theta + g)/(\sin^2\theta + g), \quad g = 2(1-f)/3f$$

ここで g は配向因子、 f は配向部分の割合を表す。この式は不完全一軸配向部分と完全ランダム部分からなる場合についても成り立つことが示される¹⁵⁾。

分子モデルの作成は当初、 $1A=2.5\text{cm}$ のワイヤモデルを用いて行ったが、その後は全て計算機を用いて行った。即ち、主鎖構造はラセン定数と 3 つの内部回転角を関係づける宮沢の式⁶⁾を解きこれを直交座標に変換した。側鎖構造に関しては、組み立てたワイヤモデルの内部回転角近傍において 5 つの単結合の周りの回転角 (主鎖側から順に $\chi_1-\chi_5$) を変数として 5°

(又は 2.5°) ずつ回転させ側鎖原子団に基づく5つの特性吸収帯の遷移モーメントの方向角(主鎖側から $\theta_1-\theta_5$)を計算し、赤外二色比から得られる観測値とよく一致するモデルを探した。その際、(i) α 型と同じ標準結合長と結合角 (ii) α 型からの小変化により得られるトランス形とゴーシュ形の組み合わせ (iii)適正なファンデルワールス (VDW) 半径、特に塩素原子間の短距接触のない分子構造とパッキングを原則とした。

分子のパッキングに関しては隣接分子の方向性を考慮した投影図とこれを正方形に切り抜いた紙モデルの組み合わせを用いて検討した。 $C\beta$ 原子がx軸上にあるup鎖の位置を分子回転角 0° 位とし、down鎖の座標はこのup鎖についてx軸の周りの2回回転対称と並進の操作により得た。 Cl 原子のVDW半径は 1.7\AA とした。 CH_2 基のVDW半径は 2.0\AA とされているが、C-H結合の方向性によっては約 $1.2-1.4\text{\AA}$ の距離も可能であるとした⁷⁾。

平均分子フーリエ変換と構造因子の計算は新たに開発したBASICソフトFT3 (FT2の拡張版)とSF55fを使って行った。後者は任意のラセン対称性高分子の回転角依存性の構造因子を計算するソフトである。計算機は日立パーソナルコンピューターMB16001を使用した⁸⁾。

3. 結 果

既報の如く回折写真には $l=0$ の反射の他、 5.20\AA の強い $l=1$ 上の反射、 $l=4$ の弱々の子午線反射を含めて第4層線まで観測され、分子は基本的に1回転-4残基の右巻きラセンであることが示された。その後、 $l=0$ と $l=1$ のブラック反射は $a=16.3\text{\AA}$, $b=13.6\text{\AA}$, $c=5.20\text{\AA}$, $\gamma=100^\circ$ の単斜晶系の単位格子に基づいて指数付けされることが分かった。これより主鎖は 4_1 ラセンであっても分子の外側に位置する側鎖は1非対称単位-2残基分の 2_1 ラセンをなし、格子定数のより短いb軸方向の分子のパッキングにおいてはa軸方向に比べ強い相互作用の存在が示唆される。この赤道線反射の面間隔とミラー指数をTable 1に示す。 $l=2$ と $l=3$ の連続的な弱い層線状反射は分子の集合状態の乱れ、特にz-シフトや回転の乱れの存在を示している。 19.5\AA のやや散漫な反射はa軸、b軸共に2倍長の大格子の(110)反射に相当し局所的には最小格子よりも大きい格子の存在を示唆するが、便宜上、分離して扱った。この場合、準結晶(paracrystal)であるが、空間群は $P2_1$ となる。密度は 1.40g/cm^3 で ω -PBLAのそれよりも重い。

偏向IRの主な吸収帯の帰属、二色比、遷移モーメントの方向をTable 2に示す。配向因子 $g=0.41$ は α 型のアミドII ($\theta=90^\circ$)のR値より求めたが⁹⁾、 ω 型にも共通であるとした。主鎖及び側鎖吸収帯の θ 値は傾向として ω -PBLAとよく似ている。この中でフェニルC-H面外変角は約 50cm^{-1} 、高波数側にシフトし2本に分裂しているが、塩素の置換の影響が現れている。この θ_5 値より芳香環面は1周期上下のものと約 3.4\AA の間隔で積み重なっているといえる。エステル基吸収帯の遷移モーメントの原子団内における方向は ω -PBLAの場合と同じとした。この結果から多くの吸収帯は二色性を示し、 α 型とは逆転しているものもあるので、側鎖構造はランダムではなく秩序性があるといえる¹⁰⁾。

解として得られた ω -ラセン主鎖の内部回転角は $\phi=-52.01^\circ$, $\omega=184.0^\circ$, $\phi=-66.79^\circ$ で

Table 1. Observed spacing of equatorial reflections, its corrected scattering amplitude, and structure factor of the ω -form PCIBLA

h k l	d_o	$ F_o $	$ F_c $
(l=0)			
— — —	19.5 (w^*)	39.1	—
1 0 0	16.1 (s)	122.2	123.0
0 1 0	13.4 (m)	98.8	49.1
-1 1 0	11.2 (m)	92.2	26.0
1 1 0	9.56 (vw)	42.1	9.0
2 0 0	8.04 (w)	89.6	51.0
-2 1 0	7.46 (w)	72.4	84.6
0 2 0	6.66 (w)	71.5	76.4
2 1 0	—	—	115.7
1 2 0	5.79 (vw)	53.8	31.2
3 0 0	5.36 (m)	164.5	158.7
2 2 0	4.73 (w)	131.8	124.1
-3 2 0 }	4.51 (vs)	270.1	157.0 }
-1 3 0 }			94.7 }
0 3 0	4.36 (w)	82.6	26.5
1 3 0	4.09 (w^*)	124.5	108.1
3 2 0	3.88 (vw)	65.6	81.8
-3 3 0	3.72 (vw)	83.8	117.3
0 4 0 }	3.26 (m)	213.8	143.4 }
4 2 0 }			88.8 }
-3 4 0	3.04 (w)	118.4	89.7

w^* : weak and diffuse. Structure factor is shown only of equatorial reflections due to disorder of z-shift in fiber.

Table 2. Dichroic properties in main infra-red absorption bands of ω -form of PCIBLA $^{*)}$

assignment	cm^{-1}	R	θ°
amide A	3,298	2.83	31(33)
ester C=O str	1,733	1.08	53(51)
amide I	1,670	1.55	45(43)
amide II	1,535	0.26	90(90)
phenyl C-C str	1,486	0.60	66(64)
$C\beta H_2$ sci	1,403	1.68	43(41)
amide III	1,296	0.76	61(60)
ester C-O-C	1,163	0.39	76(75)
antisym. str			
phenyl C-H	801	1.31	49(48)
op. bend			

$^{*)}$ Values in parentheses are those measured on another specimen by using Perkin-Elmer 621 infra-red spectrometer.

ペプチド基は非平面であるが、 $C'=O$ 基と 4 残基先の N-H 基との間に水素結合（水素結合長 2.77Å, 同結合角 25.0° ）が形成されうる。この右巻き ω -らせん主鎖には側鎖 $C\beta$ と 1 回転下の $C'=O$ 基との立体的障害がありこれが不安定要因とされているが、 $C\beta H_2$ の一方の H と O との距離は約 1.8-1.9Å でありこの C-H 結合の方向性を考慮すると大きな障害とはならないと思われる¹¹⁾。

側鎖構造としては Table 2 の遷移モーメントの観測値に適合し、構造化化学的に無理の少ない

Table 3. Internal rotational angles χ and angles θ of transition moments to the helix axis in the model of sidechain conformations of the ω -helix.*)

sidechain	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	χ_5
l-chain	152.5	170.0	-107.5	107.5	-92.5(-10.0)
s-chain	155.0	162.5	-100.0	105.0	-95.0(-15.0)
sidechain	θ_1	θ_2	θ_3	θ_4	θ_5
l-chain	28.8	49.5	87.2	63.8	47.9(47.3)
s-chain	26.9	48.0	84.1	62.7	47.2(47.0)

*) χ, θ in degree. Values in parentheses correspond to B-position of aromatic ring inverted from A-position. When $\chi_1=0$, C γ is in the eclipsed position relative to N.

モデルをいくつか選びだした。その上で格子定数の短いb軸方向の分子のパッキング上の障害を緩和させ、かつ格子定数の長いa軸方向のパッキングを良くするために半径の長いl側鎖とこれを少し変形させた半径の短いs側鎖を組み合わせ調整したが、この2残基分を1非対称単位とした。この代表的な側鎖モデル (l鎖の塩素ラセン半径 $r_{Cl}=7.94\text{\AA}$, s鎖の $r_{Cl}=7.41\text{\AA}$) における χ と θ の値を Table 3 に示す。ここで芳香環面の A と B の位置は互いに反転した関係にある。但し、ここでは C α -C β 結合軸の周りの内部回転角 (振れ角) χ_1 については、C β -C γ 結合が C α -N 結合に対してシス位にある場合を 0° とし、その他については IUPAC-IUB の定義に従うものとする¹⁴⁾。

これは α 型モデルから主としてそのエステル結合軸の周りの回転によりトランス形からゴーシュ形へ変化させて得られた。この ω 型モデルにおいてエステル C=O 結合はやや上向きであるが、これが下向きのモデルの場合は C-O-C 逆対称伸縮が平行二色性になりこれを直角二色性にするためにはフェニル基を下方から上方へ大きくはね上げる必要があるので妥当ではないと考えた。左巻きの ω -PBLA の場合 χ_1 と χ_2 はほぼゴーシュ形であるのに対して、上記の右巻き ω -型モデルの場合これらは共にトランス形であるが、全体的に見ると両者の構造はよく似ている。

分子のパッキングに関しては、b軸方向の隣接 up-down 鎖の場合、両分子の回転角が共に 10° において l鎖塩素が短距接触 (atomic short contact) を起こすが、回転角が 0° 又は 20° においては側鎖間相互作用の様相が全く同等で塩素原子間距離が適切な位置関係になることが見いだされた。この塩素原子間の水平距離は単位格子の形と大きさにより決まり側鎖モデルによらず約 2.4\AA 離れているので適正な接触距離をとるためには一方の分子を z-方向にシフトさせ縦方向に約 2.4\AA だけ離す必要がある。s側鎖間の原子対 O δ -C ϵ 及び C ϵ -C δ についても同様に z-シフトの距離を調節する必要がある。

このように b軸方向のパッキングは立体的な制約が強いが、a軸方向はルースで up 鎖と down 鎖のどちらの配置でも塩素の収容上の問題は起こらず分子の z-シフトの自由度も多いといえる。

Table 3 に示した 2 対称 ω -ラセンモデルの平均分子フーリエ変換は弱々の子午線反射を含めて全体的な層線強度分布を傾向として良く説明するが、赤道線上ブラック反射については一

致が悪かった。その理由として ω 型分子は円筒対称としては近似できず格子形成による異方性の効果が現れていることが考えられる。そこで最小格子中に up 鎖と down 鎖の重ね合わせ(統計的配置)を置いた場合の構造因子を計算したが、 0° 位より 20° 位の方が $|F_o|$ と比較的良好く一致した (Table 1)。原子座標として水素を除く全原子を取り入れ、芳香環は l(A)-s(B)の組み合わせとし、温度因子は7.0とした。観測されない反射で $|F_c|$ が60以下のものは表より除いた。ここで up 鎖又は down 鎖単独の場合、 (-320) 反射と (-130) 反射の $|F_c|$ は回転角依存性が大きい、4.5Åの強い反射はこれらの重なりとして説明しうる。回転角 20° 位における up 鎖の投影図を Fig. 1 に示す。この構造モデルにおける主な側鎖間の最近接原子間距離も算出したが、詳細は省略する。

以上の結果、この右巻き ω -型はいくつかの乱れの自由度があるが、側鎖構造はかなり規則的であり、主鎖構造の不安定化要因を補償するクロロフェニル基の分子内スタッキングだけでなく分子間においても強い相互作用を必要とする構造であり固体状態に特有の構造であるといえる。

4. 考 察

PBLA の p 位塩素置換体の ω 型が正方晶系ではなく単斜晶系になる理由は b 軸方向の分子のパッキング上の障害となる塩素原子間の接近を避け適切な接触距離を保った塩素の收容のために必要な変形と考えられる。仮に ω -ラセン分子がほぼ同じ寸法の正方晶系になるとした場合

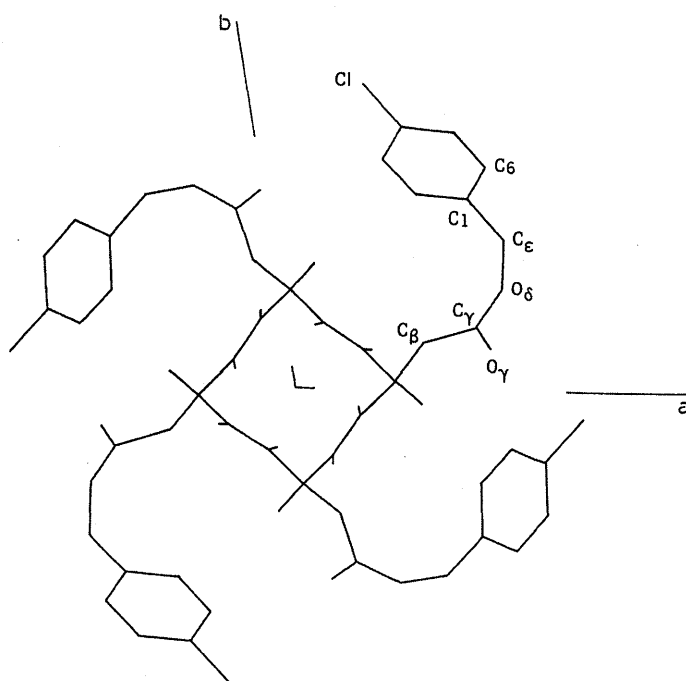


Figure 1. Skeletal structure model of the ω -helical molecule of PCIBLA in the monoclinic cell projected along the helix axis.

には、隣接 up 鎖-down 鎖の塩素の水平位置はほぼ重なり著しい障害が起きるのでこの晶系になることは不可能と考えられる。

b 軸方向の up 鎖-down 鎖間の Cl と芳香環の C₃ 又は C₅ との距離は約 3.1 Å-3.2 Å ではほぼ適正な距離であるが¹²⁾、恐らく電気陰性度の強い Cl の負の部分電荷と隣接芳香環側の正の部分電荷との間に強い静電相互作用の存在を示唆する立体的な位置関係にあると思われる。

Cl (1, U) と O₇ (s, D) 間の距離 (約 2.6 Å) も塩素のラセン半径の多少の違いによらずほぼ単位格子の大きさと π -シフトにより決まっているが、同様の相互作用が示唆される。

尚、右巻き ω 型と左巻き ω 型における側鎖構造の主な相違は χ_1 が各々、トランス形かゴーシュ形かであるが、結晶母液中のミオグロビンとリゾチームの分子模型におけるアスパラギン酸残基とアスパラギン残基側鎖の C α -C β 結合軸の周りの立体配座はトランス形とゴーシュ形の両方が混在しており、周辺環境により変りうるものと考えられる¹³⁾。

一般的に準結晶性高分子の構造は集合状態の乱れを伴う不完全性が本質でありその回折写真には形式的にデータ処理しにくい部分があるので、やや理想化された分子モデルや構造モデルにより定性的に説明し理解するやり方をしている。この性格上、R-因子は余り問題にされていないが、参考までに書くと分子モデルの作成に用いた側鎖吸収帯の遷移モーメントの R-因子は 11-12%、赤道線反射の R-因子は重なり反射の扱い方により異なるが、23-28% の値になり ω -PBLA の場合の 29% とほぼ同じ値となっている。

上述の側鎖構造上の難点は結合角と内部回転角の微小変化により半径を少し長くした l-側鎖と更に短くした s-側鎖のモデルの組み合わせにより多少、改善することは可能である。しかし、配置状態に乱れのある up 鎖と down 鎖のパッキングを良くするために微妙に異なる複数の組の側鎖コンフォメーションが存在する可能性もありうると思われる。

この報告の前半の X 線回折と赤外線吸収の測定は著者が東京大学・薬学系大学院博士課程に在学中に行ったものであるが、後半の解析と計算は神戸女学院大学 (1992-2001) において個人研究費の援助を受けて断続的に行った。また、X 線写真のマイクロデンシトメトリーに関しては三菱化学・生命科学研究所の黒田和史氏のお世話になったことを併せて付記します。

文 献

- 1) Bradbury, E.M., Brown, L., Downie, A.R., Elliott, A., Fraser, R.D.B. & Hanby, W.E. (1962) J. Mol. Biol., 5, 230-247.
- 2) Hashimoto, M. & Aritomi, J. (1966) Bull. Chem. Soc. Japan, 39, 2707-2720.
- 3) Takeda, Y., Iitaka, Y. & Tsuboi, M. (1970) J. Mol. Biol., 51, 101-113.
- 4) Kasper, J.S. & Lonsdale, K. (1972) "International Tables for X-ray Crystallography", Vol. 2, p. 265-266, Kynoch Press, Birmingham.
- 5) Fraser, R.D.B. (1953) J. Chem. Phys., 21, 1511-1515.
- 6) Miyazawa, T. (1961) J. Polymer Sci., 55, 215-229.
- 7) Barrow, G.M. (1981) "Physical Chemistry for the Life Sciences", 2nd ed., p. 431-434, McGraw-Hill, New York.
- 8) Takeda, Y. (1996) Kobe College Studies, Vol. 43, No. 1, 63-72.

- 9) Miyazawa, T. & Blout, E.R. (1961) J. Am. Chem. Soc., 83, 712-719.
- 10) Mitsui, Y., Iitaka, Y. & Tsuboi, M. (1967) J. Mol. Biol., 24, 15-28.
- 11) Takeda, Y. (1975) Biopolymers, 14, 891-893.
- 12) Hassel, O. & Stromme, K.O. (1959) Acta Chemica Scandinavica, 13, 1781-1786.
- 13) Phillips, D.C. (1966) Scientific American, Vol. 215, No. 5, p. 78-90.
- 14) IUPAC-IUB commission (1970) J. Mol. Biol., 52, 1-17.
- 15) Takeda, Y. (2001) "unpublished note"

(原稿受理 2002年4月11日)