

論文の内容の要旨

論文題目 グルタミン酸およびその塩の結晶成長に関する研究

氏 名 佐 野 千 明

本研究の動機及び目的

グルタミン酸Naをはじめとする各種アミノ酸の生産技術において、結晶化技術は非常に重要な位置づけにあり、従来から多くの研究開発が行われアミノ酸の分離精製技術は進歩し合理化されてきた。同時に、同じアミノ酸分子が形成する結晶でも著しく特性の異なるものが存在することがわかってきた。しかし、アミノ酸の生産技術における従来の研究、技術開発は、それぞれの結晶の様々な特性を発見し応用するにとどまり、その特性がどうして現れるのかを考察する研究は乏しく、また生産技術の開発も経験的な手法で進められ、理論的なアプローチは十分でなかった。

一方、分析化学の分野ではX線結晶構造解析学が発展し多くのアミノ酸結晶の構造が解析されたが主に学問的な興味で行われ、その構造データが工業的に積極的に活用されたことはほとんどなかった。

筆者は、アミノ酸が形成する様々な結晶の特性はアミノ酸のそれぞれの結晶構造（結晶中での分子配列、分子間結合の仕方）の違いに由来すると考えた。従って、結晶の特性と結晶構造との関係を明らかにできれば結晶構造データから結晶の特性を類推することが可能になり、技術開発の迅速化、論理化とともに

に、結晶の持つ新しい可能性の発見につながると考えられた。本研究の目的はこのようなアミノ酸生産技術開発における願いを実現することにあった。その題材を様々な性質の結晶が知られているグルタミン酸とその塩の結晶に求め研究を行った。以下、グルタミン酸 Na (GluNa) 塩およびグルタミン酸 (Glu) の各種結晶の成長に対する不純物の影響とその構造的解析を通して明らかになったことをまとめる。

1) GluNa1 水和物結晶の形状は、共存する微量の L-Ala など L- α -アミノ酸によって縦／横が小さく（太く、短く）なり、また、D-Glu、L-PCA によって縦／横比が大きく（細長く）なった。縦／横比を小さくする不純物は結晶先端面に、縦／横比を大きくする物質は結晶側面に多く検出された。このような不純物の作用と結晶構造との関係を明らかにすべく、GluNa 1 水和物結晶の X 線結晶構造解析を行い、先端面 {121} と側面 {110} において Glu 分子が吸着する半結晶位置 (kink) での水素結合状態を明らかにした。その結果、先端面 {121} には側面 {110} よりも L-Ala 等の L- α -アミノ酸が水素結合を形成できる kink が 4 倍多く存在し、側面 {110} には、D-Glu、L-PCA が強く結合する事が可能な kink が先端面 {121} よりも約 2 倍多く存在する事がわかった。このような解析により、不純物による GluNa 1 水和物結晶形状の変化が構造的に証明された。

2) GluNa には常温で析出する 1 水和物結晶 (MHF) と低温 (-0.8~-8.5°C) でのみ析出する 5 水和物結晶 (PHF) が知られている。両結晶への他アミノ酸の影響を調べるために他アミノ酸 (L-Asp, L-Thr, L-Ala, L-Leu, L-Phe, L-Lys) をそれぞれ 0.5~2.0 mol% まで段階的に混合して添加し、同じ過飽和度で結晶化を行った。その結果、MHF は強い成長阻害を受けて結晶形状が針状から粉末状に変化した。PHF の形状はほとんど変化を受けなかった。また結晶中への他アミノ酸の取り込みを有効分配係数 (K_{eff}) を用いて表したところ、PHF における各アミノ酸の K_{eff} は MHF のその 1/7~1/30 倍と小さく、PHF は MHF に対して高い不純物淘汰性を持つことが確認された。PHF の X 結晶構造解析を行い、先に解析した MHF の構造と比較した。その結果 PHF は Na イオンと水 (結晶水) の錯体構造を中心に挟んで上下に Glu 分子層が形成される特徴的な 3 層構造を持ち、MHF の 7~9 本に比較して 13~14 本と多くの Glu 分子が関与する水素結合を形成し、高い他アミノ酸識別力を持つことがわかり、両結晶における他アミノ酸

淘汰性の差が構造的にも証明された。

3) Glu 分子が等電点付近で形成する 2 種の結晶多形 (α 形、 β 形) の成長実験を行い、成長特性を把握した。その結果、 α 形は菱形の厚みのある板状の形状を取り主要面は $\{111\}$ 、 $\{001\}$ の 2 面でほぼ同等の成長速度を持つこと、 β 形は薄い板状で $\{101\}$ 、 $\{010\}$ 、 $\{001\}$ の主要な 3 面を持つが、 $\{101\}$ 面の成長速度は他 2 面に比較して 20~50 倍大きく、非常に異方的な成長速度を示すことがわかった。また、それぞれの結晶成長に対する不純物の影響を調べ、(1) L-Phe などの L- α -アミノ酸は α 形の $\{111\}$ 面、 β 形の $\{101\}$ 、 $\{010\}$ 、 $\{001\}$ の 3 面を強く阻害するが、 α 形の $\{001\}$ 面は阻害しないこと、(2) L-Gln や iso-Gln など L- α -アミノ酸構造と同時に γ 位にカルボキシル基 (または酸アミド) 構造を持つ不純物のみが α 形の $\{111\}$ 、 $\{001\}$ の 2 面を同時に阻害することを明らかにした。以上の実験結果を結晶構造から次のように考察した。

β 形の成長における異方性： β 形の結晶成長は 4 方向 (A, B, C, D) から Glu 分子が kink に吸着するが、 β 形の $\{010\}$ 、 $\{001\}$ の 2 面は、分子が単独に kink に吸着しても安定化できず、AB, CD というように分子ペアを作ってはじめて安定的に kink に吸着できるという特性を持っていた。 β 形における成長速度の異方性の原因は、一分子だけで安定的に吸着できる $\{101\}$ 面に比べて、ペア形成が律速となり $\{010\}$ 、 $\{001\}$ の 2 面の成長速度が非常に遅いためである。

不純物の作用の差： α 形の $\{001\}$ 面では全ての kink において γ -カルボキシル基が関与する水素結合が形成されており、L- α -アミノ酸構造を持つだけでは Glu 分子と同じ強さの結合は形成不可能であった。しかし、その他の面、 α 形 $\{111\}$ 面、 β 形 $\{101\}$ 、 $\{010\}$ 、 $\{001\}$ の 3 面では L- α -アミノ酸構造を持てば、Glu 分子と同等の強さで吸着可能な kink が多く存在した。この特徴は α 形の $\{001\}$ 面が、他の面より強い他アミノ酸識別力 (淘汰力) を持つことを示している。

4) Glu の 2 種の結晶多形選択的析出効果に関して、L-Phe の α 形、 γ -L-glutamyl-L-glutamic acid (γ -Glu-Glu) の β 形析出効果を実験的に確認した。また、これらの不純物の α 形、 β 形各結晶面の成長阻害効果と各結晶面への K_{eff} を調べた。L-Phe は $\{111\}$ 面が阻害を受けて大きく発達した α 形を析出させた。この効果の原因は、L-Phe は α 形 $\{111\}$ 面、 β 形 $\{101\}$ 、 $\{010\}$ 、 $\{001\}$ 3 面を強く阻害するが、 α 形の $\{001\}$ 面の成長を阻害しないため、 α 形が β 形に対して

優位性を持って成長できるためと考えられた。 γ -Glu-Glu は形状が乱れた β 形を析出させた。 γ -Glu-Glu は α 形 {111}、{001} の 2 面、 β 形 {101}、{010}、{001} の 3 面ともすべて強く阻害したため、成長阻害作用の差から γ -Glu-Glu の β 形析出効果を推定することはできなかった。しかし、 γ -Glu-Glu の β 形に対する K_{eff} は 1.0 で Glu 分子と同等の選択性で結晶中に取り込まれ、 α 形における 0.03~0.05 に対して非常に大きかったこと、また β 形結晶形状の不定形化を起こしたことから、 γ -Glu-Glu の成長阻害機構は α 形、 β 形間では異なり、 α 形では表面吸着による成長阻害を起こすが、 β 形では γ -Glu-Glu 分子が β 形結晶格子に取り込まれて混晶 (mixed crystal) を形成し、構造に歪みを生じさせて成長阻害を起こすためと考えられた。一般的には、表面吸着による結晶成長阻害では、不純物濃度が大きくなると成長が完全に止まるが、混晶形成の場合は析出 (成長) は遅いながらも継続する。従って、 γ -Glu-Glu の β 形析出作用は、 α 形 {111}、{001} の 2 面に吸着して α 形の成長を阻止するとともに、 β 形の結晶格子に取り込まれて β 形の結晶成長に阻害を与えながらも β 形を析出させることによると推定した。そこで、混晶形成機構をさらに深く解明すべく、 γ -Glu-Glu 分子における β 形析出効果に重要な構造を特定するため、 γ -L-glutamyl-L-leucine (γ -Glu-Leu) と γ -L-glutamyl-L-glutamine (γ -Glu-Gln) の多形選択析出効果を調べた。その結果、 γ -Glu-Leu は β 形析出効果を持たず、 γ -Glu-Gln は γ -Glu-Glu の約 1/3 の β 形選択析出効果を示したことから、 γ -Glu-Glu の β 形析出効果発現には、 γ 位にペプチド結合した Glu 分子の γ カルボキシル基が必須であることが明らかとなった。 γ -Glu-Gln の β 形結晶における混晶形成を γ -Glu-Gln 分子構造と β 形結晶構造を基に考察した。その結果、 γ -Glu-Glu は β 形結晶構造中の分子ペア (AB, CD) と酷似した形状を取ることがわかった。 β 形の {010}、{001} 両面の結晶成長においてはこれらの分子ペア形成が必須であり、またこの段階が成長における律速である。 γ -Glu-Glu は一分子で分子ペアに酷似した形状を取るため、疑似分子ペアとして迅速に結晶構造中に取り込まれ、 β 形の {010}、{001} 両面の結晶成長において分子ペア形成という律速段階を解消して β 形析出を促進する作用を持つと推定された。以上のように、 γ -Glu-Glu による β 形析出効果は、(1) α 形の {111}、{001} 両面の成長を阻害し、(2) 疑似分子ペアとして β 形結晶における成長の律速段階を解消しつつ結晶格子に入り込み、混晶を形成して β 形結晶を析出させるためと考えられた。