

## 論文の内容の要旨

論文題目 アミノ酸・ペプチド結晶の固体NMRによる構造研究

氏名 海老沢計慶

一般に、アミノ酸類にはそれ自身、医薬品の主成分や原料となるものがあり、その結晶構造と固体物性の関係を理解することは、製剤学を中心に広く薬学領域において重要である。また、アミノ酸類の結晶では、水素結合様式や分子間相互作用の多様性に由来する結晶多形という現象も一般的である。固体高分解能 NMR 法とは、プロトン核 ( $^1\text{H}$ ) の磁化を炭素核 ( $^{13}\text{C}$ ) に移動する交差分極法とマジック角回転法とを用いることで、感度及び分解能の著しい向上を実現した比較的新しい手法で、現在では、X線解析と並び有機結晶の重要な構造解析手段である。これによれば、結晶内の分子運動性や熱転移における構造変化、さらには結晶形間でのダイナミクス比較などを検討し、その結果を通じて、結晶内の水素結合性や構造安定化要因を原子レベルで解析することが可能となる。

そこで、本研究では、アミノ酸類結晶の固体物性を主として固体高分解能 NMR を用いて解析する戦略に関して研究した。研究対象としては、1) 最も基本的なアミノ酸である Gly の結晶多形系、2) L-Glu アンモニウム 1 水和物結晶系、3) アスパルテーム (L-Asp-L-Phe methylester、以下 AP と略) 結晶系を取り上げた。

Gly には、 $\alpha$  晶、 $\beta$  晶、 $\gamma$  晶という 3 種の無水結晶多形があるが、ここでは、常温常湿で準安定形である  $\alpha$  晶と、最安定形である  $\gamma$  晶について検討した。まず、多形間の構造安定性の違いを考察するために、~~X線~~結晶構造を比較した結果、両形は結晶内の分子パッキングと水素結合様式が明らかに異なることが明らかとなった。

そこで、このような違いが、Gly の分子運動性に及ぼす影響を調べるために、各多形について固体 NMR による  $T_{1\rho}$  緩和解析を行った。本手法は固体系の場合、運動性が高い原子ほど核磁

気緩和が生じやすいため、緩和時間が短くなるという現象を利用して、結晶中の分子運動性を定量的に調べる一般的な方法である。

その結果、表 1 に示すように、 $\alpha$  晶の緩和時間は約 2 秒、 $\gamma$  晶では約 20 秒であることが分かり、相対的に  $\gamma$  晶の方が緩和時間が長いことが明らかとなった。一般に、結晶系の  $T_{1H}$  緩和時間は主としてプロトン核自身の運動性に依存するが、先行知見により、Gly 結晶では  $T_{1H}$  緩和の主要因がアミノ基の回転運動に帰属されることが分かっている。

従って、今回の結果は、 $\gamma$  晶の方が  $\alpha$  晶よりも結晶内でのアミノ基の回転運動が強く束縛されていること、即ち、水素結合が全体として、より強固であることを示している。さらに、比較的広い温度範囲で緩和解析を行い、束縛の程度を表す活性化エネルギー  $\Delta E$  を測定した結果、 $\gamma$  晶では  $\alpha$  晶に比べ、 $\Delta E$  が約 6 kJ/mol 大きいことが明らかとなった。重水素核 NMR による実験などからも、一般にアミノ酸結晶におけるアミノ基の回転障壁エネルギーは 20~50kJ/mol 程度であることが知られているので、今回、緩和解析によって測定された Gly 結晶の活性化エネルギーは、アミノ基の回転障壁エネルギーに相当するものと解釈できる。

表 1 Gly 結晶多形における緩和時間および活性化エネルギー  $\Delta E$  の比較

	$T_{1H}$ 緩和時間	$\Delta E$ (実験値)	$\Delta E$ (計算値 $\epsilon=1.0$ )	$\Delta E$ (計算値 $\epsilon=2.0$ )
$\gamma$ 晶	20 sec	30	52.59	40.08
$\alpha$ 晶	2 sec	24	40.77	34.94
$\Delta \Delta E$		6	11.82	5.14

エネルギーの単位は全て kJ/mol

次に、緩和解析により求めた  $\Delta \Delta E$  (実験値) を計算化学的に再現するための条件を調べた。まず、真空中の誘電率 $\epsilon=1.0$  を用いて、各多形のアミノ基回転に伴うエネルギープロファイル調べた結果、 $\gamma$  晶では  $\alpha$  晶に比べて  $\Delta E$  が約 11.8kJ 大きく、定性的には水素結合の強さの違いを説明できるものの、 $\Delta \Delta E$  は実験値の約 2 倍と高めに計算されることが分かった。Gly のように解離基由来の静電相互作用が構造安定化の主要因である結晶系では、静電項の正しい評価が重要と考えられたので、ここでは計算に用いる誘電率 $\epsilon$  を静電項を調節するための 1 種のパラメータと見なして、1.0~2.5 の範囲で変化させ同様の計算を行った。

その結果、誘電率を 1.8 に内挿したときに、つまり静電項の寄与を若干減少させたときに、 $\Delta \Delta E$  の実測値を最も良く再現できることが分かった。以上の結果、解離基を有する系、特に Gly のように分子サイズが小さいアミノ酸結晶系では、電荷が分極しやすいため、構造計算によって多形間の安定性を解析する際には、固体 NMR による活性化エネルギーの算出とそれに基づく誘電率補正が有効であることが明らかとなった。

次に、緩和解析の結果から示唆された多形間の分子ダイナミックスの違いを調べるために、 $\epsilon=1.8$  という条件で MD 計算を行い、アミノ基の回転角の時間変化を解析した。その結果、 $\alpha$  晶では  $\gamma$  晶に比べアミノ基が左右いずれの方向にもダイナミックに、かつ高頻度で回転している

ことが分かり、水素結合様式の違いに基づく分子運動性の差をシミュレートすることができた。

一般に、結晶水を含む結晶では、加熱による脱水転移が不可逆過程であるか可逆過程であるかは結晶の安定性研究において重要な側面である。そこで、次に、L-Glu アンモニウム 1 水和物結晶の不可逆的な転移過程を Glu の 2 種の多形である  $\alpha$  晶と  $\beta$  晶を参照試料として解析した。

まず、熱重量分析により、L-Glu アンモニウム 1 水和物の熱転移における組成変化を調べた結果、重量変化は 75°C と 88°C 付近で 2 段階に起こり、重量計算の結果、75°C が脱  $\text{NH}_3$  の開始点、88°C が脱水の開始点にほぼ相当することが分かった。しかし、88°C 付近に明確なプラトーがないことから、Glu $\cdot$ H<sub>2</sub>O という組成をもつ転移中間体は、安定な結晶状態ではないことが示唆された。また、熱転移に伴う粉末 X 線回折測定の結果からは、80°C における回折パターンが  $\alpha$  晶や  $\beta$  晶のものとは異なり、転移中間体に相当するものであることが推定されるとともに、本結晶が最終的には無水の  $\beta$  晶に転移することが明らかとなった。

次に、熱転移による構造変化を調べるため、固体 <sup>13</sup>C-NMR 測定を行った。その結果、転移中間体では、結晶中に少なくとも 2 種類の状態が生じることが明らかとなった。さらに、 $\alpha$  晶および  $\beta$  晶における分子配座や固体 NMR スペクトルと比較した結果、転移中間体においては、水素結合の切断に伴う分子配座の変化が主に C <sub>$\beta$</sub>  と C <sub>$\gamma$</sub>  シグナルの 2 状態に影響していること、また、転移中間体から  $\beta$  晶への脱水転移に伴って、側鎖の根元に近い内部回転角が gauche 配座から trans 配座へと大きく変化することが推定された。

一般に、アミノ酸類結晶には水和量の違いによる多形の例がいくつかあるが、AP は温度と湿度を調整することにより、4 種の結晶多形間で相互に可逆転移を示す例である。この内、IIA 晶は比較的広い温度範囲で結晶型が安定でありながら、その安定化機構の詳細が不明であった。ここでは、多形間の転移過程を種々解析することで、結晶水を含むペプチド結晶系の結晶物性や熱安定性がいかにその結晶水の存在様式と密接に関係するかを解析した。

まず、熱重量分析と粉末 X 線回折により、IIA 晶の加熱に伴う重量変化と粉末回折パターンの変化を調べた結果、通常、室温では 1/2 水である IIA 晶は、40°C~50°C で、結晶型は IIA 型のまま結晶水含量が 1/3 水である準安定状態に変化し、55°C 付近から IIB 晶への転移を開始することが明らかとなった。従って、APIIA 晶の結晶形安定性は、結晶水含量に 1/2 水~1/3 水という許容幅があることが 1 つの重要な要因であることが示唆された。なお、IIA 晶のこのようなゼオライト的な結晶物性は、結晶水が結晶表面まで続くカラムを形成しているという構造的特徴に由来するものと考えられた。

次に、この転移中間体の構造情報を得るために、固体 <sup>13</sup>C-NMR スペクトルの温度変化を調べた。その結果、転移中間体である IIA 晶 1/3 水状態では、Asp 残基のカルボキシル炭素や Phe 残基の  $\gamma$  炭素、各メチレン炭素に対応するシグナルが明瞭に 2 状態を示すことが分かった。この内、Asp 残基のカルボキシル基については、脱水による解離基の電子状態の変化がシグナル変化の要因と考えられるが、Phe 残基については、 $\gamma$  炭素が直接結晶水と相互作用する位置に

はないので、脱水が直接的な要因とは考えられない。

そこで、T1ρ緩和解析により、Phe  $\gamma$  炭素の運動性を、初期 IIA 晶と転移中間体と比較してみた結果、 $\gamma$  炭素の T1ρは、初期 IIA 晶では 208ms、転移中間体では各々、135ms と 172ms であることが分かった。即ち、IIA 晶 1/3 水状態では、Phe 残基に関して、2種類の運動性があり、その状態がほぼ同じ割合で結晶内に生じていることが示唆された。そこで、IIA 晶と転移中間体、各々について、MD 計算を行った所、Phe 残基の 2 面角  $\chi_1$  の全体の平均値は、IIA 晶の 1/2 水状態では 63.4°、転移中間体である 1/3 水状態では 63.5° とほぼ等しく、両者の AP 分子の平均構造には殆ど差がないことが分かった。一方、2 面角  $\chi_1$  の分散、即ちゆらぎの平均値は、1/2 水状態では 33.2、1/3 水状態では 33.4 と 52.5 となり、転移中間体では Phe 残基の運動性に変化が生じていること、また、少なくとも 2 種以上の状態が存在することが分かった。従って、固体 NMR により見出された転移中間体における 2 種の構造状態は、MD 計算の結果が示す分子構造の柔軟性に関する 2 状態に対応するものと推察された。

一般に、固体 NMR による REDOR 測定法を用いれば、異種核間の原子間距離が測定できる。しかしながら、従来法では 2 重標識試料を必要としたため、費用も高く、結晶転移に伴う分子配座や分子配置の変化を検討することは現実に困難であった。そこで、本研究では、1 種類の安定同位体標識試料を用いて、その安定同位体核 ( $^{15}\text{N}$ ) とその他全ての天然存在比  $^{13}\text{C}$  核との距離を同時に観測することで、結晶内の分子内および分子間距離を解析できる REDOR 法の拡張を検討した。 $^{15}\text{N}$ -Glu アンモニウム 1 水和物結晶について、窒素原子と双極子結合を示す天然存在比  $^{13}\text{C}$  核の REDOR 測定を実施した結果、単一試料を用いて分子中の全ての  $^{13}\text{C}$  核と標識  $^{15}\text{N}$  核の原子間距離を同時に測定できることが判明した。さらに RMSD の解析により、分子内距離と分子間距離の分離観測を検討した結果、表 2 に示すように、原子核の対によってはかなり良い精度で、2 種類の距離を個別に決定できることが分かった。

表 2 アミド窒素  $^{15}\text{N}$  核と各炭素核間の距離 (Å)

	REDOR		X線構造	
	$r_{\text{CN1}}$	$r_{\text{CN2}}$	分子内	分子間
$^{13}\text{C}=\text{O}$	2.545	3.725	2.492	3.687, 6.113
$^{13}\text{C} \alpha$	1.465	3.360	1.497	3.857, 4.722
$^{13}\text{C} \beta$	2.510	3.665	2.448	3.700, 4.739
$^{13}\text{C} \gamma$	3.525	3.800	3.835	4.017, 4.133
$^{13}\text{C} \delta$	3.340	3.410	4.977	3.432, 3.796