

粉末回折法によるアミノ酸およびオリゴペプチドの 環境変化に伴う構造変化の解析

Powder diffraction structure analysis of humidity and temperature dependent structure transition of amino acids and oligopeptides

清谷多美子^{1,*}, 菅原洋子²

¹昭和薬科大学, 〒194-8543 町田市東多摩川学園 3-3165

²北里大学理学部, 〒252-0373 相模原市南区北里 1-15-1

Tamiko Kiyotani^{1,*} and Yoko Sugawara²

¹Showa Pharmaceutical University, 3-3165 Higashi-Tamagawagakuen, Machida, 194-8543, Japan

²Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara, 252-0373, Japan

1 はじめに

温度や湿度条件などの環境変化に伴う医薬品（特に水和物）の結晶構造の変化は、薬効に影響を及ぼす可能性が高く、品質保持の観点から、構造変化の有無と、その特性を明らかにすることが重要である。しかし、脱水に伴う構造転移では、一般的に単結晶性が劣化するため、単結晶構造解析は難しく、粉末結晶構造解析に期待が持たれる。

タンパク質の構成単位であるアミノ酸が 2 個以上ペプチド結合により繋がってできた物質はオリゴペプチドと呼ばれるが、生理活性を持つものが多く、医薬品や甘味料、食品添加物などとして広く用いられている。我々は、アミノ酸およびオリゴペプチドの水和物結晶を対象に、粉末回折法により脱水和状態の構造決定法を確立することを目指している。その第一歩として、アミノ酸 2 個から構成されるジペプチドであるグリシル-L-チロシン（以降、Gly-Tyr）の水和物を対象とした実験を行った。

Gly-Tyr（図 1）は、水-メタノール混合溶液から二水和物が得られ、その結晶構造が報告されていたが[1]、我々は水溶液から新たに三水和物を得て、単結晶構造解析により構造決定を行った[2]。この三水和物結晶は、24℃、相対湿度 0%で一水和物に変化し、更に、相対湿度 0%下で昇温すると 50℃で無水物に転移する。Gly-Tyr 三水和物の脱水和により得られる一水和物および無水物について放射光を用いて粉末回折強度測定を行い、両結晶について粉末結晶構造解析に成功した[3]。この結果をもとに、構造転移の詳細についての解析を行った。

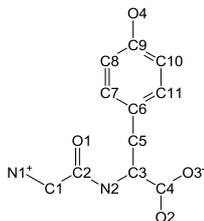


図 1 Gly-Tyr の構造式と原子の番号付け

2 実験

Gly-Tyr 一水和物は PF/BL4B2 の多連装粉末回折計を用いて、無水物については SPring-8/BL15XU（物質・材料研究機構 高輝度放射光ステーション）の高分解能粉末回折装置を用いて粉末 X 線回折強度測定を行った。また、粉末結晶構造解析プログラムとしては、DASH（Cambridge Crystallographic Data Center）および PDXL（（株）リガク）を用いた[3]。

3 解析

Gly-Tyr 一水和物および無水物のリートベルト解析結果および得られた結晶構造をそれぞれ図 2-1、図 2-2 および図 3-1、図 3-2 に示す。

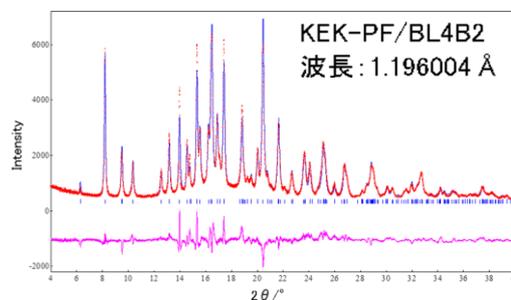


図 2-1 Gly-Tyr 一水和物の Rietveld 解析結果
青：実測強度、赤：計算強度、紫：残差

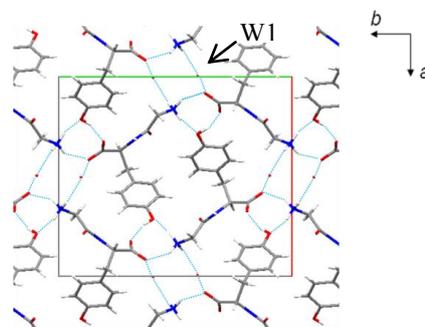


図 2-2 粉末構造解析により得られた
Gly-Tyr 一水和物の結晶構造 W1：水分子

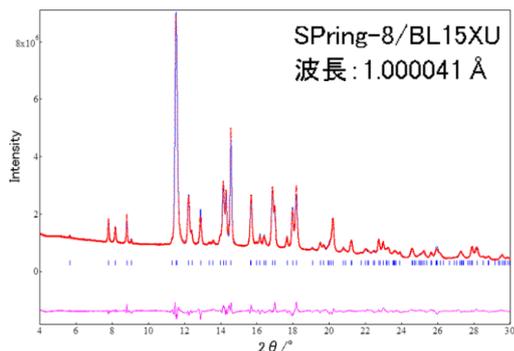


図 3-1 Gly-Tyr 無水物の Rietveld 解析結果

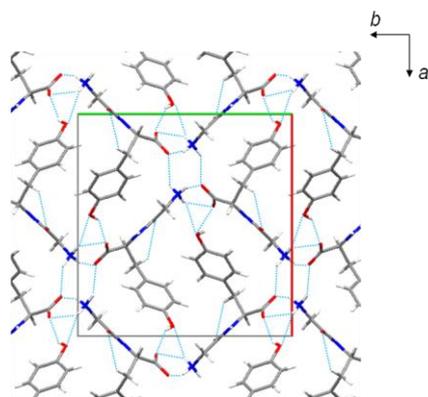


図 3-2 粉末構造解析により得られた Gly-Tyr 無水物の結晶構造

結晶学的パラメータを、単結晶構造解析により構造決定した三水和物の結晶学的パラメータと対比させて表 1 に示す。

三水和物から一水和物への変化に伴い、*a* 軸は 8%、*b* 軸は 10% 縮小したが、*c* 軸は僅かであるが伸長がみられた。一方、一水和物から無水物への変化では、空間群が $P2_12_12$ から $P2_12_12_1$ へ変化し、*b* 軸は 17% 縮小しているのに対して、*a* 軸には 2%、*c* 軸には 7% の伸長が見られた。

表 1 Gly-Tyr 水合物および無水物の結晶学的パラメータ

	三水和物	一水和物	無水物
解析方法	単結晶法	粉末法	粉末法
測定温度	298K	298K	300K
晶系	斜方晶系	斜方晶系	斜方晶系
空間群	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12_1$
<i>a</i> / Å	15.727 (2)	14.447	14.688
<i>b</i> / Å	18.598 (3)	16.787	14.012
<i>c</i> / Å	4.814 (1)	4.925	5.289

脱水転移に伴う Gly-Tyr 分子の主要なねじれ角の変化を表 2 に、結晶構造変化を図 4 に、一水和物および無水物の水素結合の距離および角度を表 3 および表 4 に示す。単結晶構造解析では、構造パラメー

タ（各原子の座標および温度因子）数の少なくとも 10 倍を超える数の回折強度データを用いて逆空間での構造決定と構造精密化を行い、高い精度でユニークに構造を決定することができる。一方、粉末構造解析では、重なり合った回折線の分離がもつ不確実性由来して、強度データの数および質が単結晶の回折強度データと比べて著しく劣るため、構造モデルの実空間におけるフィッティングという手法をとる。従って、得られた構造には、データを説明するモデルの一つでしかないという任意性を伴う。このため、得られた構造が実測データ（粉末回折図形）を十分に説明することは必要条件であるが、それとともに、構造学的に見て妥当な構造であることを確認する必要がある。以上のことを念頭に置き、単結晶構造解析により決定されている三水和物の構造と、粉末構造解析により得られた一水和物および無水物の構造の比較を行った。

三水和物、一水和物、無水物の結晶構造を比較すると、二回の相転移を通して、*b* 軸に沿った N 末端アミノ基と C 末端のカルボキシル基間の水素結合は保たれている。また、Tyr 残基のフェニル基の水酸基が、N 末端のアミノ基および C 末端のカルボキシル基を架橋する形で水素結合している構造も保持されている。

一方、*a* 軸方向の相互作用に関しては、N 末端アミノ基と C 末端のカルボキシル基間の水素結合が、三水和物では複数の水分子を介して、一水和物では 1 分子の水分子を介して形成されているが、無水物では Gly-Tyr 分子間の直接の水素結合に変化している。この変化は分子配向と密接に関係している。即ち、三水和物では Gly-Tyr 分子の主鎖はほぼ *b* 軸に平行であるが、脱水の過程で *b* 軸に対する傾きが次第に大きくなっている。水分子の離脱と分子の主鎖の配向の変化が、*a* 軸長および *b* 軸長の収縮をもたらしている。

一水和物から無水物への転移において、空間群が $P2_12_12$ より $P2_12_12_1$ へ転じているが、これは図 4-1 の *a* 軸方向からの投影図で明らかなように、分子が *c* 軸に沿って移動したことに起因している。この結果、N 末端のアミノ基は脱水転移により水分子との水素結合を失うが、上記の *a* 軸に沿った水素結合とともに、*c* 軸に沿った 2 分子の C 末端のカルボキシル基を架橋する水素結合を形成する。

一方、三水和物では *c* 軸に平行にアミド基の $>NH$ と $>C=O$ の間で水素結合鎖が形成されていたが、三水和物から無水物へ変化する過程で、*c* 軸長の伸長とともに、この水素結合は消失する。

分子のコンフォメーションに関しては（表 2）、C1—C2 結合の周りのねじれ角に約 20~30° の変化が見られるが、これは上記の主鎖間の N 末端の水素結合変化に伴い、N 末端の向きが変化していることと対応している。また、Tyr 残基のフェニル基の面

の配向が、無水物への構造転移とともに変化していることも特徴的である。

以上、本解析で得られた一水和物および無水物の構造は、Gly-Tyr 三水和物の結晶構造からの脱水に伴う構造変化として極めて合理的であり、粉末構造解析により、妥当な構造を決定することができたと判断される。

表 2 Gly-Tyr 水和物および無水物の
主要なねじれ角 (単位: °)

	三水和物 (室温)	一水和物	無水物
N1—C1—C2—N2	-160.2 (1)	169	-172.6
C1—C2—N2—C3	-179.3 (1)	161.5	178.4
C2—N2—C3—C4	-153.6 (1)	-148.6	-159.1
N2—C3—C4—O2	17.1 (2)	-0.3	3.1
N2—C3—C4—O3	-165.9 (1)	-177.3	-173.8
C2—N2—C3—C5	76.4 (1)	82.1	73.8
N2—C3—C5—C6	66.5 (1)	61.6	59.5
C3—C5—C6—C7	-83.8 (1)	-98.3	-129.2

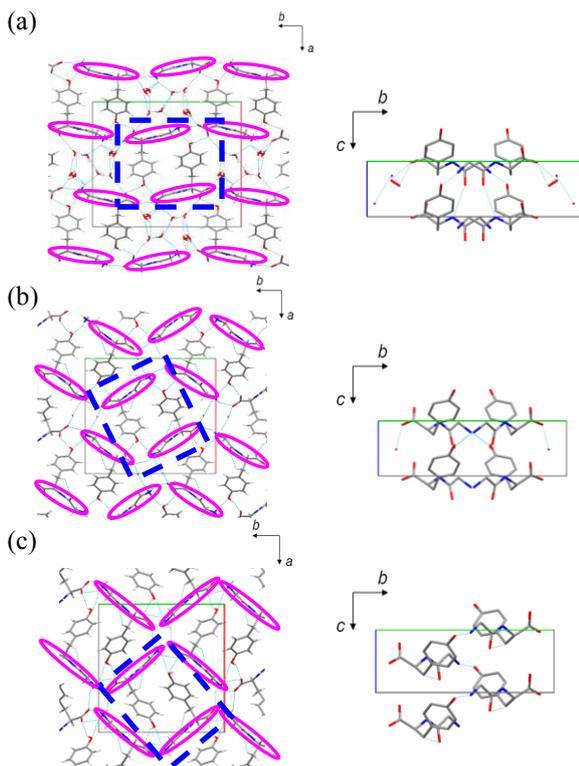


図 4 Gly-Tyr 三水和物の脱水に伴う構造変化
(a) 三水和物の結晶構造 (b) 一水和物の結晶構造
(c) 無水物の結晶構造

Gly-Tyr の主鎖部分を紫楕円で示し、青点線枠で示す分子カラム部分の a 軸方向からの投影を各図の下に示す。

表 3 Gly-Tyr 一水和物の水素結合

D—H...A	D—H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (°)
N1—H1 ... O4 ⁱ	0.91	1.88	2.75	160
N1—H2 ... O1W ⁱⁱ	0.91	2.26	3.01	139
N1—H3 ... O3 ⁱⁱⁱ	0.91	2.08	2.92	152
N2—H6 ... O1 ^{iv}	0.88	2.41	3.23	155
O4—H14 ... O2 ^v	0.84	1.71	2.51	159
C5—H9 ... O1	0.99	2.64	3.20	116
O1W... O3 ^{vi}	—	—	2.63	—
O1W... O3 ^{vii}	—	—	3.04	—
O1W... O1W ^{viii}	—	—	3.19	—

Symmetry codes: (i) $-x + 1, -y + 1, z + 1$; (ii) $x, y, z + 1$; (iii) $-x + 1/2, y - 1/2, -z + 2$; (iv) $x, y, z - 1$; (v) $x + 1/2, -y + 3/2, -z + 1$; (vi) $x - 1/2, -y + 3/2, -z + 2$, (vii) $x - 1/2, -y + 3/2, -z + 1$, (viii) $-x, -y + 1, z$.

表 4 Gly-Tyr 無水物の水素結合

D—H...A	D—H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (°)
N1—H1 ... O3 ⁱ	0.91	2.31	2.85	118
N1—H1 ... O4 ⁱⁱ	0.91	2.35	2.98	126
N1—H2 ... O3 ⁱⁱⁱ	0.92	2.22	2.82	122
N1—H3 ... O2 ⁱ	0.90	2.32	2.83	116
N2—H6 ... O1 ^{iv,a}	0.88	2.92	3.70	149
O4—H14 ... O2 ^v	0.83	2.04	2.74	141
C1—H4 ... O2 ^{vi}	0.99	2.71	3.19	110
C5—H9 ... O1	0.98	2.65	3.21	117

Symmetry codes: (i) $-x + 1, y - 1/2, -z + 1/2$; (ii) $-x + 1/2, -y, z - 1/2$; (iii) $x + 1/2, -y + 1/2, -z + 1$; (iv) $x, y, z + 1$; (v) $x - 1/2, -y + 1/2, -z + 2$; (vi) $-x + 1, y - 1/2, -z + 3/2$.

^a 水素結合としては距離が長いですが、参考として表記した。

4 まとめ

本課題では、生理活性物質として生体内で重要な機能を担い、医薬品や食品添加物として利用されているオリペプチドの水和物結晶の脱水と転移機構の解明、および脱水和物の粉末構造解析法の確立を目指し、その第一歩として、ジペプチド化合物であるグリシル-L-チロシン (Gly-Tyr) の水和物を対象に、湿度および温度に依存した構造転移の解析と水和物および脱水和物の構造解析を行った。

Gly-Tyr 三水和物の脱水転移で出現する一水和物および無水物について、放射光を用いて測定した粉末 X 線回折データを用いて構造決定を行い、三水和物から無水物に至る脱水和の過程を明らかにした。結晶水の離脱に伴い、分子の配向が変化し、水素結合網の改変が順次進行することを明らかにすることができた。

参考文献

- [1] M.Cotrait, J.-P.Bideau, *Acta Cryst.*, **B30**, 1024 (1974).
- [2] T. Kiyotani, et al., *CrSJ Annual Meeting 2011*, **2011**,

OB-II-02.

[3] T. Kiyotani, Y. Sugawara, *Photon Factory Activity Report 2011 #29 B*, 57-1 - 57-2 (2012).

成果

- 1 T. Kiyotani *et al.*, *CrSJ Annual Meeting 2011*, **2011**, OB-II-02.
- 2 T. Kiyotani *et al.*, *Acta Cryst.*, **A67**, C272-C273 (2011).
- 3 T. Kiyotani, Y. Sugawara, *CrSJ Annual Meeting 2012*, **2012**, 26-OB-02.
- 4 T. Kiyotani, Y. Sugawara, *Photon Factory Activity Report 2011 #29 B*, 57-1 - 57-2 (2012).

* kiyotani@ac.shoyaku.ac.jp