

ポリ-L-グルタミン酸の局所構造の解析 Study of Local conformation of poly(L-glutamic acid)

清水繁, 室賀嘉夫, 栗田公夫
Shigeru Shimizu, Yoshio Muroga and Kimio Kurita

College of Science and Technology, Nihon University, Tokyo 101-8308, Japan.
e-mail: shimizu@chem.cst.nihon-u.ac.jp

はじめに

ポリ-L-グルタミン酸(PLGA)は側鎖に解離基を有するポリペプチドで, 水溶液中では pH の変化に伴い構造転移, すなわち helix-coil 転移を起こすことがよく知られており, 実験・理論の多くの研究例がある[1][2]. しかしながら, 局所構造に対する添加塩の種類やその濃度がどのように影響を与えるかについては有効な実験的手法がなかったため不明な点も多い. 最近, 我々は X 線小角散乱法が添加塩水溶液中の PLGA の局所構造に関する知見を得るために有効な手法であることを明らかにした[3].

本研究では, 解離度の高いランダムコイル領域にある PLGA の一価および二価の添加塩水溶液の X 線小角散乱測定を行い, PLGA の局所構造に対する添加塩種の影響についての検討を行った.

実験

試料の PLGA は, SIGMA-Aldrich 社製のポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩 ($M_n=1.78 \times 10^4, 5.48 \times 10^4$) をイオン交換により一旦酸型にしたものを実験条件の解離度にあうよう約 0.8 に部分中和した. 試料溶液は, いずれの添加塩系でも高分子濃度を 0.01 g/ml となるように調製した. 溶媒は, 一価の添加塩系として 0.2M NaCl, NaF を, 二価の添加塩系として 0.02M $CaCl_2, MgCl_2, BaCl_2$ を用いた. また, helix 状態の比較試料として N-methylacetamide(NMA)を用いた.

X 線小角散乱測定には高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設 BL-10C 設置の酵素筋肉回折計を用いた. 測定は, 室温 (25°C) にて試料溶液, 溶媒共に 20 分間の測定を行い, 各試料に対し透過率補正を行った. なお, NMA 溶液に関しては 60°C での測定を行った.

結果および考察

Fig.1 に添加塩 0.2M NaCl, NaF の電位差滴定曲線を示す. NaCl の場合には PLGA が pH の増加に伴い helix \rightarrow helix/coil \rightarrow coil への変化が明瞭であるが, 一方 NaF の場合では helix から coil 状態への変化が明瞭に観測できない. 二価添

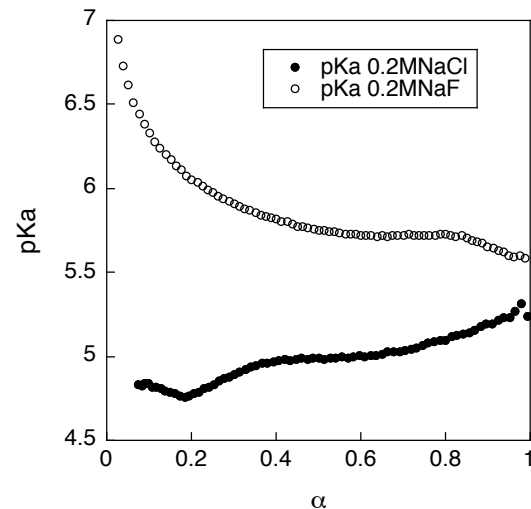


Fig.1 Potentiometric titration curves for PLGA in 0.2M NaCl and 0.2M NaF aqueous solution.

加塩では NaCl と同様に pH の増加に伴う形態変化が明瞭に見られるため, この異常性は NaF の場合のみであることが判明した. このことは, CD および NMR 測定から 0.2M NaF 中では, 解離度にかかわらず coil 状態であることから確認された[3].

Fig.2 に一価添加塩系の Kratky plot を示す. 併せて, helix 状態の比較として NMA 系も示した. いずれの添加塩系も, helix 状態の NMA 系にくらべ, 高角側の立ち上がりが緩やかであり, 溶液中で random coil 状態であることが示唆される. 図中, 0.2M NaCl 系の実線は, Sharp-Bloomfield[4][5]の wormlike chain の散乱関数である. なお, フィッティングを行うに当たり, contour length を 1990 Å とした. これより, 持続長は添加塩種によらず約 6 Å と求められた. この値は, Holtzer ら[6]の unperturbed effective bond-length 8 Å とほぼ一致している. 一方, NaF 系では, $q < 0.005 \text{ \AA}^{-1}$ の領域では分子内相互作用が無視できないか, 高分子 segment 密度が random coil よりも高いことが示唆された. そのため, 図中には

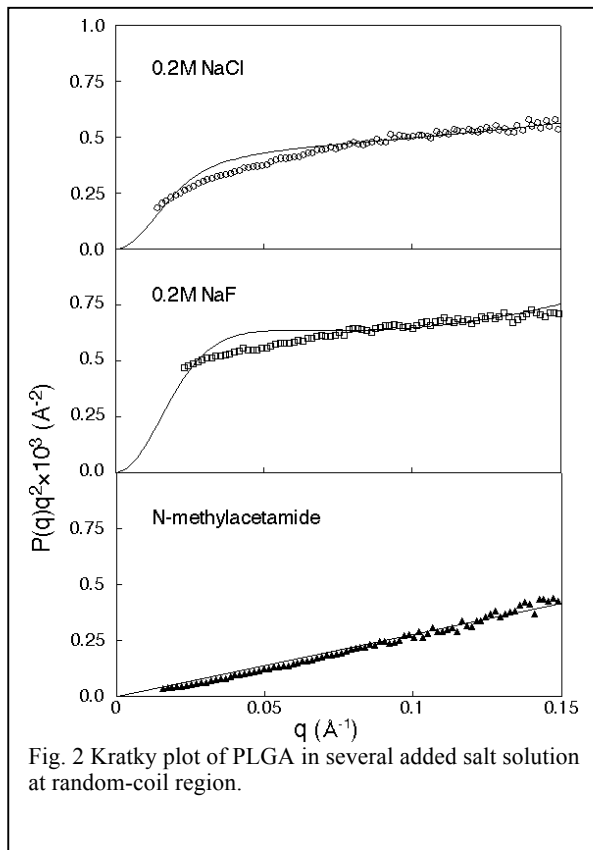


Fig. 2 Kratky plot of PLGA in several added salt solution at random-coil region.

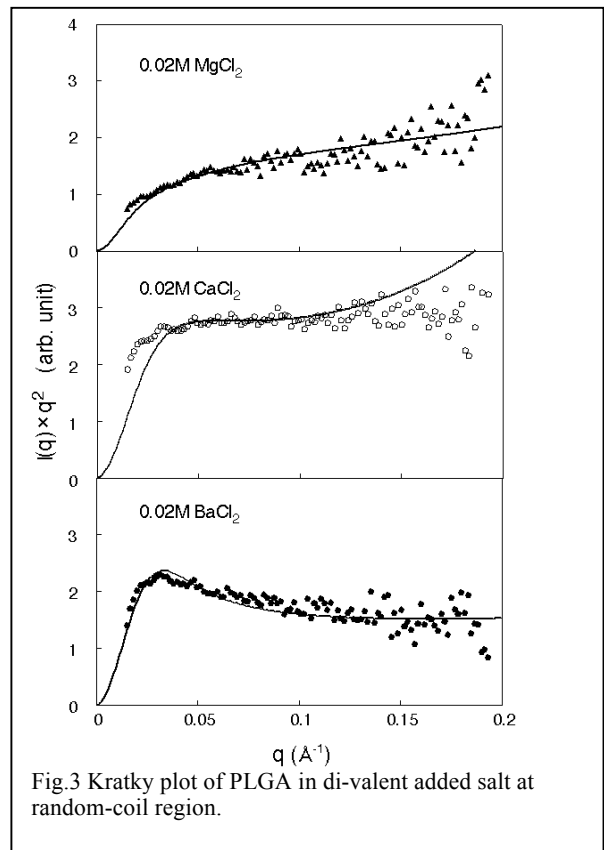


Fig.3 Kratky plot of PLGA in di-valent added salt at random-coil region.

dendrimer の散乱関数[7]でのフィッティングを実線で示した. 比較的よい一致をすることから, NaF 存在下では孤立した random coil と異なる形態をとると考えられる.

Fig.3 に, 二価の添加塩系の Kratky plot を示す. 0.02M $MgCl_2$ 系では, 持続長約 8 \AA の wormlike chain の散乱関数に比較的良く一致するが, 小角領域に 0.02M $CaCl_2$ にはわずかな, 0.02M $BaCl_2$ 系には明らかな bump が見られる. これは, 溶液中で PLGA と二価の添加塩が錯体様の構造を形成しているものと考えられる. NaF の場合と同様に dendrimer の散乱関数でフィッティングした結果を実線で示した. $BaCl_2$ 系の場合は, 実測角度領域で良く一致した. このことは, カルボキシイオンと対イオンの間での結合力の大小に負うところが大きいと言える. 二価のイオンの結合力の増大は分子内および分子間のカルボキシイオンを引き寄せ PLGA 鎖の収縮を引き起こすと考えられる. 実際, PLGA 鎖のコンパクト化の順序は, 第一イオン化エネルギーの大小関係 $Ba^{++} < Ca^{++} < Mg^{++}$ に対応していることから妥当であると考えられる. したが

って, Mg^{++} は錯体形成が弱いため, あたかも一価イオンと同様な振る舞いをするが, 錯体形成力が増すにつれ徐々にゲルの様な高分子セグメント密度の高い構造を形成してゆくものと考えられる.

以上の実験結果から, 一価の添加塩系では, NaF 系の場合, F が PLGA の溶液中での形態に大きな影響を与えることが判明した. また, 二価の添加塩系では, イオンの錯体形成力が大きくなることで, 溶液中で PLGA 鎖がより収縮した形態となることが判明した.

References (参考文献)

- [1] P.A. Doty et al.: *J. Polym. Sci.* **23**, 851-861(1957).
- [2] M. Nagasawa et al.: *J. Am. Chem. Soc. Appl.* **86**, 538-543 (1964).
- [3] S. Shimizu et al.: *J. Appl. Cryst.* **40**, s553-s557 (2007).
- [4] P. Sharp et al.: *Biopolymers* **6**, 1201-1211(1968).
- [5] C. W. Schmid et al.: *Biopolymers* **10**, 883-893(1971).
- [6] R. B. Hawkins et al.: *Macromolecules* **5**, 294-301(1972).
- [7] B. Hammouda: *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **30**, 1387-1390(1992).