

高分子固体構造解明のための新しい固体 NMR 評価システムの開発

Development of New Solid State NMR for Polymer Structure Analysis

- 研究代表者 東京農工大学工学部教授 朝倉 哲郎
Prof., Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei,
Tokyo
- 研究分担者 米国フロリダ州立大学教授 T. A. Cross
Prof., Florida State University, FL, U.S.A.
- 東京農工大学機器分析センター講師 出村 誠
Assoc. Prof., Instrumentation Analysis Center, Tokyo University of Agriculture and
Technology, Koganei, Tokyo

Atomic-level solid state NMR analysis for determination of polymer structure in the solid state has been developed. Two kinds of structural analysis "angle constraint" and "distance constraint" are a key for the purpose and therefore, each analytical method is developed independently. The "angle constraint" is obtained as follows. Atomic resolution structural details are obtained from solid state NMR data in the form of bond orientations, which yield the relative positions of specific atoms within the molecule. In this study, the ϕ and φ torsion angles of five amino acid types (glycine, alanine, serine, tyrosine and valine) in isotopically labeled *Bombyx mori* silk fibroin fiber have been determined by solid state NMR studies. The isotope labeling was performed by oral administration or cultivation of the silkglands from the silkworm in amino acid medium and the block samples of uniaxially aligned fibers are prepared for the angle-dependent solid state NMR. Especially, the ϕ , φ determination for serine, tyrosine and valine residues is performed for the first time from this study. On the other hand, "distance constraint" is obtained as follows. The ϕ , φ angle of Ala residue of the sequence model peptides for *B. mori* silk fibroin is determined using REDOR solid state NMR. Two kinds of model compounds were synthesized by a liquid phase method, Boc-AlaGlySer(Bzl)[^{13}C]GlyAla [^{15}N] Gly-OBzl, and Boc-AlaGlySer(Bzl)Gly [^{15}N]Ala[^{13}C]Gly-OBzl. The ^{15}N - ^{13}C dipolar coupling constants of the two samples were 39.5 and 27.2 Hz, respectively from the NMR. The ^{15}N - ^{13}C distances were calculated as $4.33 \pm 0.05 \text{ \AA}$ and $4.82 \pm 0.05 \text{ \AA}$ from these values. Finally, the (ϕ , φ) angles for the central Ala residue of these model compounds were determined with these distance constraints. The merit of this analytical approach is that the form of the sample is powder without single crystal or oriented fiber.

研究目的

現在、高分子固体材料の構造解析で最も有力な手法のひとつは、X線回折法と言われている。規則正しく分子が整列している結晶構造は、X線回折法の最も得意とする解析対象となる。しかしながら、分子鎖がより乱れた非結晶構造まで拡張した完全な構造解析はX線回折法のみでは行えない。現在実用化、あるいは研究されている高分子固体材料の

ほとんどは、結晶構造よりも非結晶構造の方が多く、後者の構造がむしろ機能と直接関連すると考えた方が妥当である。従って、よりよい機能性材料を創製していくためには、非晶部分を中心に材料全体の構造をカバーできる新しい構造評価システムの開発が不可欠となる。一方、我々はこれまで、核磁気共鳴 (NMR) 法によって種々の溶液および固

体高分子試料を測定し、基礎的なデータを検討してきた。その結果、結晶、非結晶構造を含む全固体高分子材料の構造解析を行うためには、固体NMR測定から得られる実験データを新しい観点から精密に解析すれば、非晶構造についてもX線回折法では得られなかった原子座標レベルの構造情報が引き出

せることを理論的に予測してきた。そこで、本研究では、固体NMR理論を用い、機能性高分子材料を分子設計する上で重要な基礎データとなる原子座標レベルの構造情報を得るための今までにない新しい構造評価システムを開発することを目的とした。

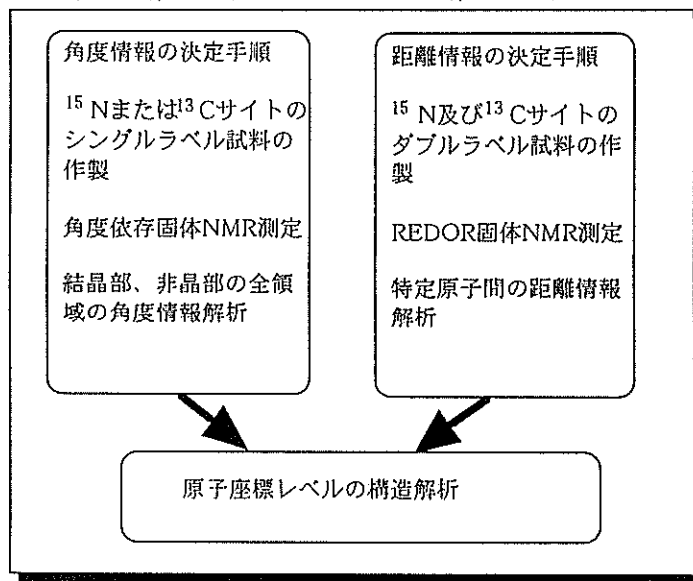
研究経過

本研究は、研究代表者が全般をとりまとめ、米国フロリダ州立大学のCross教授および東京農工大学機器分析センターの出村講師とともに共同研究を進めた。具体的な研究計画では、試料を*Bombyx mori* 絹フィブロインとし、その固体構造の解明を目的とした。固体NMRによる構造解析の段階で二つの柱を設けた。一つは特定原子の原子間の角度を配向軸を基準として定量的に決定することである。そのために、まず試料の絹フィブロインの特定アミノ酸残基の ^{15}N または ^{13}C 原子を安定同位体でシングルラベルする方法を確立した。カイコへの安定同位体アミノ酸

の投与、または絹糸腺の同アミノ酸存在下での培養である。さらに、その一軸配向試料を作製し、結晶あるいは非結晶構造の角度情報を求めるため、角度依存固体NMR測定、引き続き解析を行った。

もう一つは、特定原子間 (^{15}N および ^{13}C) の距離を定量的に決定することである。このため決定したい原子間のダブルラベル化試料を合成し、結晶性試料の粉末状態でREDOR固体NMR測定を行った。続いて、原子間距離を組み合わせて構造決定を行った。以下にそのフローチャートを示す。

高分子固体構造解明のための新しい固体NMR評価システム



なお、これらの手法を他の高分子の構造解析にも適用した。

研究成果

①角度依存固体 NMR 測定と主鎖内部回転角(ϕ, φ)の決定

一例として、グリシン残基のカルボニル部位がラベルされた[1- ^{13}C]Gly 絹フィブロイン繊維の配向ブロック試料について、配向軸

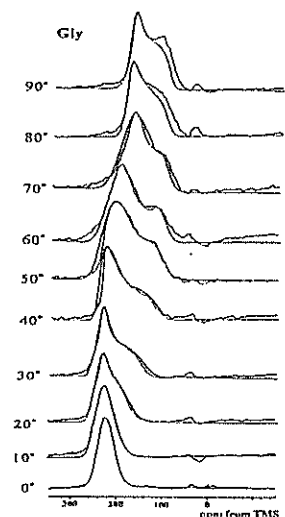


Fig. 1 [1- ^{13}C]Gly 絹フィブロイン繊維配向ブロック試料の ^{13}C 固体 NMR スペクトル (角度は配向軸と磁場方向のなす角度を表す)

と磁場方向を変化させて得られた ^{13}C 固体 NMR スペクトルを示した。著しい角度依存性が観測され、これらのスペクトルシミュレーションから、C-N 結合と配向軸の角度とその分布が精度よく決定された。同様に、Ala, Ser, Tyr, Val サイト (これらのアミノ酸残基を合わせると絹の 92% を占める。また、Tyr, Val は、非晶部中に存在する) について、角度依存スペクトルを測定し、最終的に主鎖内部回転角(ϕ, φ)を決定した。特に、Ser, Tyr, Val サイトの角度は、本研究によって初めて決定がなされた。

固体 NMR 法で決定された絹フィブロインアミノ酸残基の主鎖内部回転角

Residue	ϕ /deg.	φ /deg.
Gly	-138	139
Ala	-141	136
Ser	-140	136
Tyr	-151	134
Val	-145	135

② REDOR 固体 NMR 測定と原子間距離精密測定

絹フィブロインのシーケンスモデル化合物の二つのサイトを同位体ラベルし、その REDOR スペクトルから、サイト間距離を精度よく決定すること、さらに、原子間距離情報を組み合わせて、アラニン残基の(ϕ, φ)を決定することを具体的に目標とした。Boc-Ala-Gly-Ser(Bzl)-[1- ^{13}C]Gly-Ala-[^{15}N]Gly-OBzl (A) および、Boc-Ala-Gly-Ser(Bzl)-Gly-[^{15}N] Ala-[2- ^{13}C]Gly-OBzl (B) のダブルラベル試料を液相法で合成し、粉末状態で REDOR 固体 NMR 測定を行った。試料 A. について ^{13}C - ^{15}N の距離を求めると 4.33 ± 0.05 Å、試料 B の場合は 4.82 ± 0.05 Å と得られた。これらの原子間距離の制限を用いて、Fig.2 で示したように、各々中央の Ala 残基の(ϕ, φ)値 (黒所) を決定できた。なお、幅は、実験誤差を示している。

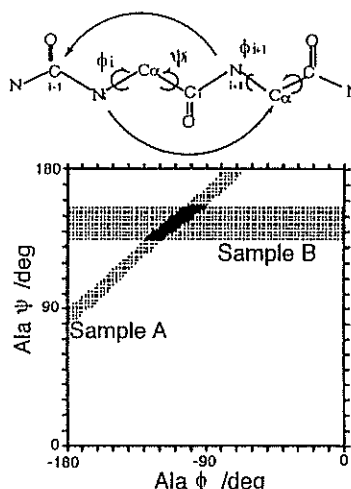


Fig.2 REDOR 固体 NMR 法で得られた ^{15}N - ^{13}C 原子間距離データをもとに計算した Ala 残基の ϕ - ψ マップ

今後の課題と発展

(1) 角度依存固体 NMR 法について

角度依存固体 NMR 法は NMR 化学シフトの異方性を分子の配向構造と直接関係づけられるために、極めて有用な構造解析手法である。さらに、分子配向構造と直接関係づけられる NMR パラメーターは化学シフト異方性のみならず、双極子相互作用、四極子相互作用なども用いることが可能である。今後は、化学シフト異方性、双極子相互作用、四極子相互作用を組み合わせた解析を行うことによって、より精度を上げた解析が可能となるはずである。さらに、固体 2 次元 NMR パルスシークエンスを使うことも、これらのデータ処理（測定から解析まで）の効率をあげるために有効となろう。

(2) REDOR 固体 NMR 法について

REDOR 固体 NMR 法は、異核種間の双極子相互作用を約 5Å 以内の距離として測定可能な方法である。しかもその精度はナノメートル単位である。分子間の双極子相互作用の寄与のなどの補正が必要であるが、 ^{15}N - ^{13}C

間、 ^{15}N - ^{31}P 間などスピン $I=1/2$ の核間の距離を測定できる。今後は、 $I=1/2$ 以外の核、たとえば ^2H 核と他の核種、あるいは、同核種間 (^{15}N - ^{15}N 、 ^{13}C - ^{13}C) の距離などが測定できれば、高分子固体構造の解明にはより有用な方法として利用できると思われる。

また、もう一方では、距離決定サイトの安定同位体ダブルラベル試料の調製が本方法でのポイントとなる。したがって、ペプチド系では固相法による合成機の利用が迅速な試料調製にはかせない方法といえる。

高分子の固体構造は、結晶、非晶を含む全体の把握が物性予測の面からも重要である。今後、生体高分子、合成高分子などを含む材料の分子設計ために、固体 NMR により得られる各種 NMR 構造パラメータが直接利用されるような評価法への発展性を本研究は示唆しているものと期待する。

本研究を遂行するにあたり、日産科学振興財団の助成に深く感謝申し上げます。

発表論文リスト

1. High-Resolution Solid State ^{13}C NMR Spectroscopy of Syndiotactic Poly-propylene, *Polymer J.*, 28, 24-29, 1996.
2. Structural analysis of uniaxially oriented ^{13}C -labelled poly (ethylene tere-phthalate) films studied with solid-state ^{13}C nmr spectroscopy, *Polymer*, 37, 1965-1973, 1996.
3. ^2H Labeling of Silk and ^2H NMR Analysis of Oriented Silk Fiber. *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 38, 605-608, 1995.
4. Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin Studied by REDOR NMR Spectroscopy, *Polymer Journal*, 26, 1405-1408, 1994.
5. Determination of the Structure of [1- ^{13}C] Glycine- [^{15}N] Alanine Double Labeled *Bombyx mori* Silk Fibroin Fibers Using Solid State ^{15}N NMR, *CHEMISTRY LETTERS*, 2249-2252, 1994.
6. Structural Analysis of *Bombyx mori* Silk Fibroin Using REDOR NMR Spectroscopy, *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 37, 703-706, 1994.
7. The Contour Plots of the Conformation-Dependent ^{13}C NMR Chemical Shifts of Proteins, *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 37, 707-708, 1994.
8. Isotope Labeling of Low Molecular Weight Protein A and Its Structural Analysis by ^{13}C NMR, *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 37, 709-712, 1994.
9. The Origin of The Amide Proton Chemical Shifts of Proteins, *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 37, 713-714, 1994.
10. A Study on the Hydration of *Bombyx mori* Silk Fibroin by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *SEN-I GAKKAISHI*, 50, 498-504, 1994.
11. The Crystalline and Non-Crystalline Structure of Oriented Poly (ethylene terephthalate) Films Studied with Solid State ^{13}C NMR, *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 38, 447-410, 1995)