総説

希少糖結晶の熱容量と相転移挙動

山村泰久¹, 深田和宏²¹筑波大学数理物質系²香川大学農学部応用生物科学科

Heat capacities of four ketohexoses, fructose, sorbose, psicose, and tagatose, were measured by adiabatic calorimetry in the temperature range from ca. 10 to 330 K. For sorbose, thermal anomalies were detected: 199.5 K (main phase transition of order-disorder type), around 210 K (minor ones), and ca. 120 K (glass transition). Although no heat anomaly was observed for the other three ketohexoses, their standard thermodynamic functions were estimated from the measured molar heat capacities. A spectral analysis using Kieffer's model was applied to the heat capacities to rationalize the relation among them in terms of intra- and intermolecular hydrogen bonds in crystal.

monosaccharide / rare sugar / adiabatic calorimetry / heat capacity / phase transition / hydrogen bond

1. はじめに

糖は生物の主要なエネルギー源や構造材料として、更に種々の生体分子間や細胞間の認識において重要な役割を果たしている。糖の基本単位は単糖であるが、生体内に見られる単糖の種類は比較的少数に限られ、炭素数6のヘキソースではグルコース (Glc), マンノース (Man), ガラクトース (Gal), フルクトース (Fru) の4種以外は圧倒的に少ない。これは糖の起源に関する研究から次のように説明されている (図1)¹⁾。ホルムアルデヒドは塩基性条件でグリコールアルデヒドやジヒドロシキアセトンを経て炭素数6のケトースを生成する (ホルモース反応)。これが原始地球上での糖生成機構と目されている。炭素数6のケトースには4種あるが、このうち3, 4位がトレオ型の Fru とソルボース (Sor) が熱力学的に安定で優先的に生成し、次に非酵素的な異性化 (Lobry de Bruyn-van Ekenstein 転移) でアルドースが生成する。その際、Sor の異性化で生ずるアルドースに比べ Fru から生成する Glc と Man が安定なため、これら三つの単糖が主に利用されることとなり、更に生命の発生後、糖鎖認識の目的で Gal が生合成されたと考えられている。

生体内での存在量の少ない単糖およびそれらの誘導体は希少糖 (rare sugar) と総称され、鏡像体を区別しなければケトヘキソースで3種、アルドヘキソースで5種の希少糖が存在する。希少糖はこれまで入手困難

なこともあり殆ど研究されてこなかったが、近年、網羅的に希少糖を生産する手法 (‘‘イズモリング’’と名付けられた) の確立により、実験試料としての供給が可能となった²⁾。その後、希少ケトヘキソースに様々な生理機能のあることが次々と見出され³⁾⁻⁵⁾、それらの基本的物性についても明らかにされてきている^{6), 7)}。

糖の起源において単糖種間の熱力学的安定性の相違が重要であるように、希少糖類の生理機能の発現機構の理解には熱力学的な基礎物性を明確にしておく必要がある。そこで本稿では、従来まで知られていなかった希少ケトヘキソースについて、熱力学物性 (結晶の熱容量) を明らかにした最近の研究を解説する。

図1 炭素数6の単糖のFisher投影式と原始地球における単糖の予測生成機構 (Sor, Psi, Tagの3種は希少糖)。

Heat Capacity and Phase Transition of Rare Sugar Crystals

Yasuhisa YAMAMURA¹ and Kazuhiro FUKADA²¹Department of Chemistry, Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba²Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University

2. 熱力学関数と断熱法による熱容量測定

物質の安定性や反応性などを研究する上で、エンタルピー、エントロピー、ギブズエネルギーといった熱力学関数が重要な役割を果たしている。一般にこれらの熱力学関数は、極低温から断熱法により測定された熱容量から求められ、基本的な物質についての熱力学関数データが整備されてきた。例えば、化学便覧⁸⁾にはタンパク質を構成する主要アミノ酸の低温熱容量が掲載されている。一方、糖に関しては二糖のスクロースしか掲載されていない。我々が研究を開始する以前に報告されていた単糖の熱容量は限られ、極低温から室温付近まで測定された例は D-Glc (α -ピラノース型) しかなく⁹⁾、他は L-Sor と D-Glc の液体窒素温度以上での報告のみであった¹⁰⁾。この状況では、全単糖間の変換経路がイズモリングで示されているにもかかわらず²⁾、熱力学的観点からの単糖の系統的な評価を行うことはできない。

ここで、多くの読者に馴染みがないと思われる断熱法による熱量測定について触れておく。断熱法は、真空断熱条件下で試料容器に既知のジュール熱 (ΔE) を加え、その前後の熱平衡温度 (T_i , T_f) を測定することにより、熱容量 ($C = \Delta E / (T_f - T_i)$) を求める手法である。ジュール熱の印加毎に試料を含む試料容器が熱平衡に達してから温度測定するため、熱平衡状態における試料の熱容量の絶対測定をしていることになる。この点が断熱法の特徴であり、温度を走査して測定する示差走査熱量計 (DSC) と決定的に異なるところでもある。断熱法では精度・確度の高い熱容量の絶対値が得られるため、異なる物質間におけるわずかな熱容量差を比較することができる。

3. D-ソルボースの熱容量と相挙動

我々はヘキソースの熱力学関数の整備を目指し、4種の D-ケトヘキソース (Fru, Psi, Tag, Sor) を対象に、断熱法による熱容量測定を行った^{11), 12)}。ケトヘキトースは室温では結晶であり、結晶中の分子はいずれも環状構造 (ピラノース型) を取る (図 2)。

各々の結晶の熱容量 (C_p) の温度依存性を図 3 に示す。Sor には 199.5 K に鋭い熱異常が存在する。その高温側 260 K 付近にも微小な二つの熱異常がある。これら三つの熱異常から得られる転移エントロピーの総和から、秩序-無秩序型の相転移であることが示唆された。実際、199.5 K の鋭い熱異常の低温側と高温側における結晶構造解析により、Sor 分子の 1 位の炭素

図 2

4 種の D-ケトヘキソース結晶の分子構造。

図 3

4 種の D-ケトヘキソース結晶の熱容量 (Fru 以外は縦軸方向に平行移動して表示)。挿入図は Sor の熱異常。

原子とそれに結合している酸素原子の配向に関する秩序-無秩序型相転移であることが確かめられた。Sor には更に 120 K にも小さな段差を伴う熱異常が見られた。これは、酸素原子の無秩序配向が冷却速度に依存して一部凍結するガラス転移によるものであった。したがって、120 K 以下の Sor は非平衡状態であり、平衡熱力学としての熱力学関数は定義できない (それ故 120 K 以上の熱力学関数しか得られない)。本稿では更なる詳細は述べないが Sor 結晶の相挙動に関心を持たれた方は文献 12 を参照して頂きたい。

4. ケトヘキソースの熱容量のスペクトル解析

図 3 を見ると Fru, Psi, Tag には測定温度範囲内に C_p の熱異常は認められず、室温付近での熱容量を比較すると $C_p(\text{Fru}) > C_p(\text{Tag}) > C_p(\text{Psi})$ となり、Fru と Psi で約 4% 異なっていた。図 4 には C_p の温度依存性を比較しやすくするため、 C_p を絶対温度 T で除した数値の温度依存性を示した。Fru と Tag の C_p 温度依存性はよく似ており、両者の差は温度低下とともに小さくなっていくが逆転はしない。この挙動は、各々の孤立分子の量子化学計算より得られる分子内振動から見積もった熱容量 C_{isolated} の温度依存性と一致する。この

図 4

(a) Fru (黒), Psi (赤), Tag (青) の熱容量の実測値 C_p と C_{isolated} および各モード (C_{E1} , C_{E2} , C_{R1} , C_{R2}) の寄与. (b) Fru, Psi, Tag の有効フォノン状態密度分布と結晶中の Psi の分子内水素結合 (挿入図中の破線).

C_{isolated} は、気相中における分子間相互作用の影響がない孤立分子の熱容量に対応する。一方 Psi の C_p は Fru や Tag と様子が異なっており、250 K での C_p は三者中で最も小さい (C_{isolated} は最も大きい) が、100 K より低温では Tag より大きく C_p の逆転が生じている。このような温度変化挙動の違いの原因を明らかにするには、 C_p そのものの解析が必要である。

熱容量には測定試料のすべてのエネルギーに関する情報が含まれている。多くの分子結晶の場合、分子内および分子間ポテンシャルの情報と考えるとよい。これらが分子内振動をも含めた格子振動 (フォノン) として熱容量に寄与している。したがって、熱容量の実測値からフォノンの情報を抽出できれば、分光法のようなスペクトル解析も可能となる。振動のエネルギーに対するフォノンの状態密度分布 $g(\omega)$ は、振動モードに由来する熱容量への寄与 (C_{vib}) と次の関係がある。

$$C_{\text{vib}} = 3rN_A k_B \int_0^\infty \frac{(\hbar\omega/k_B T)^2 \exp(\hbar\omega/k_B T)}{[\exp(\hbar\omega/k_B T) - 1]^2} g(\omega) d\omega$$

ここで N_A はアボガドロ数、 r は化学式中の原子数 ($3rN_A$ で 1 mol 当たりの自由度の数)、 k_B はボルツマン定数、 $\hbar$ は Dirac 定数、 ω は振動数である。理論上この関係式を使えば、熱容量からフォノンの状態密度が得られることになる。現実には、熱容量から $g(\omega)$ を直接求めるのは難しく、結晶全体の低エネルギーモードまで考慮したデバイ関数や、調和振動の集合体を記述するアインシュタイン関数の熱容量のモデル関数の組み合わせを用いて $g(\omega)$ を再現することが多い。しかし、これらの関数だけでは実際の結晶で現れる連続したフォノンの状態密度分布を表現することは難しく、

筆者らはこの点を改善した Kieffer モデル^{13),14)} を用いた解析を行っている。このモデルは、エネルギーに対して $g(\omega)$ が一定の箱形の状態密度分布 (図 4b) を考え、それとデバイ関数とアインシュタイン関数を組み合わせ、より現実に近いフォノンの状態密度分布を表現することを可能にする。今回の解析では 3 種の結晶の C_p の比較をしやすいように、デバイモード (D)、格子振動に由来するアインシュタインモード (E)、箱形のモード (R) の数と自由度の数を揃え、室温以下の熱容量への寄与が小さい分子内の共有結合に由来する 2500 cm^{-1} より高い振動モードには、孤立分子の量子化学計算から得られる振動数にアインシュタイン関数を充てた。また、熱膨張の影響をリンデマンの関係式 ($C_p - C_v = AC_p^2 T$, A は定数) より推定した。そして実測した熱容量へのフィッティングによって、各モードの特性温度 (θ) と自由度、および A を最適化した。

こうして得られたフォノンの状態密度分布が図 4b である。いずれの結晶の振動モードも、低エネルギー側 (左) と高エネルギー側 (右) の二つに分かれるが、高エネルギー側は共有結合に由来する分子内振動モードであり、250 K 以下での熱容量への寄与は少ない。250 K 以下の熱容量に寄与する低エネルギー側の各モードの熱容量 (C_{E1} , C_{E2} , C_{R1} , C_{R2}) は図 4a に示されている。図 4a を見ると 100 K 以下の低温域では低エネルギーの E1 および E2 モードが支配的なことがわかる。このうち E1 モードの寄与はいずれの結晶でも同程度だが、E2 モードには差があり、その大きさは $C_{E2}(\text{Psi}) > C_{E2}(\text{Fru}) > C_{E2}(\text{Tag})$ の順であった。これが低温域で Psi の C_p が他より大きくなる原因であるといえる。E2 モードの特性温度 θ_{E2} は 84.8 K (Psi), 99.1 K (Fru), 110 K (Tag) であり、それぞれの分子の孤立状態における最低分子内振動モードよりも低く、E2 モードは分子全体の回転運動に由来する秤動振動モードに帰属することができる。低温域で Psi の C_{E2} が他より大きくなるのは、 θ_{E2} が他よりも低く、この秤動振動モードの振動数が低い (ソフト) ことが原因である。結晶中における分子全体の秤動振動モードは、分子量が同一の場合、周りを取り囲む分子との間に働く分子間相互作用に強く依存する。ピラノース型のケトヘキソース分子は 5 個の水酸基を持つため、結晶中では周りを取り囲む分子との間に分子間水素結合を形成する。Fru と Tag ではすべての水酸基が周りの分子と分子間水素結合を形成している。一方、Psi では水酸基の一つが分子内水素結合を形成する (図 4b)。この分子内水素結合により、Psi の分子間相互作用は他の二つよりも弱く、秤動振動モードがより“ソフト”であるため

に、 C_{E2} の寄与が低温で大きくなると考えられる。また、TagはFruに比べ C_{E2} が小さい。これはFru¹⁵⁾よりTag¹⁶⁾の方が結晶の密度が大きいためにTagの秤動振動モードが抑制され、相対的に θ_{E2} が高いことによる。

150 K以上では、 $C_p(\text{Fru}) > C_p(\text{Tag}) > C_p(\text{Psi})$ の順である。一方、孤立分子の熱容量 C_{isolated} はPsiが最大となっており、ここにも結晶の影響が現れている。この温度範囲では低エネルギーの分子内振動モードに由来する C_{R1} と C_{R2} の寄与が支配的であり、この二つの寄与の和($C_{R1} + C_{R2}$)は C_p と同じ順序となっている。 $(C_{R1} + C_{R2})$ は孤立分子の C_{isolated} よりもかなり小さい。これは、結晶中ではR1およびR2モードに属する分子内の振動モードの分布が孤立分子よりも高エネルギー側に広がる(振動数が高くなる(ハード化))ために生じる。結晶中では分子が密に充填され、周りの分子との水素結合を含めた分子間相互作用が働く環境に置かれることを考えれば、この振動モードの分布の変化はもっともといえよう。FruとTagの($C_{R1} + C_{R2}$)の大きさについては、結晶の密度がTagの方が大きく、分子内モードのハード化が強く現れるため、Tagの方が熱容量が小さくなる。したがって、Psiの熱容量が最も小さくなるのは、結晶中のPsi分子に見られる分子内水素結合が環構造を安定化させ、その結果として対応する分子内振動モードがハード化しているためである。

このように、熱異常がなくても、熱容量を詳細に解析するとその物質に関する情報を抽出することができる。

5. おわりに

4種のケトヘキソース結晶の熱容量について述べてきた。熱容量にはエネルギーに関する情報がすべて含まれるため、たとえ熱異常がなくても、様々な情報が抽出できることを理解頂ければ幸いである。もちろんこの手法は糖だけではなくアミノ酸やタンパク質の結晶にも適用できる。特にアミノ酸は多様な官能基を持つため、結晶の熱容量をスペクトル解析することは十分意義深いと考えられる。

単糖のうち4種のケトヘキソースの結晶については、熱力学関数を得ることができた。残りのアルドースについては現在Glcの熱力学関数のみが入手できる状態であり、今後他のアルドース結晶の熱容量測定を進めていく予定である。将来的には、熱容量測定から得られる熱力学関数に加え、燃焼熱や溶解熱のデータベースが整備されれば、イズモリングに示された全単糖の変換機構に対応した熱力学的見地からの包括的な理解が可能になると期待できる。

謝 辞

本稿の内容は齋藤一弥氏(筑波大学)をはじめとする原著論文の共著者の皆さんとの共同研究に基づいている。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) Hirabayashi, J. (1996) *Quart. Rev. Biol.* **71**, 365-380. DOI: 10.1086/419443.
- 2) Izumori, K. (2006) *J. Biotech.* **124**, 717-722. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.04.016.
- 3) Shintani, T. *et al.* (2017) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **493**, 1528-1533. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.147.
- 4) Nagata, Y. *et al.* (2018) *J. Sci. Food Agric.* **98**, 2020-2026. DOI: 10.1002/jsfa.8687.
- 5) Mochizuki, S. *et al.* (2020) *Commun. Biol.* **3**, 423. DOI: 10.1038/s42003-020-01133-7.
- 6) Fukada, K. *et al.* (2010) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83**, 1193-1197. DOI: 10.1246/bcsj.20100148.
- 7) Yoshihara, A. *et al.* (2016) *Chem. Lett.* **45**, 113-115. DOI: 10.1246/cl.150953.
- 8) 化学便覧基礎編改訂6版(2021)日本化学会編, 丸善.
- 9) Boerio-Goates, J. (1991) *J. Chem. Thermodyn.* **23**, 403-409. DOI: 10.1016/S0021-9614(05)80128-4.
- 10) Jack, G. W., Stegeman, G. (1941) *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 2121-2123. DOI: 10.1021/ja01853a027.
- 11) Yamamura, Y. *et al.* (2017) *J. Chem. Thermodynamics* **131**, 420-430. DOI: 10.1016/j.jct.2018.11.014.
- 12) Iwagaki, S. *et al.* (2020) *Crystals* **10**, 361. DOI: 10.3390/cryst10050361.
- 13) Kieffer, S. W. (1979) *Rev. Geophys.* **17**, 35-59. DOI: 10.1029/RG017i001p00035.
- 14) Yamamura, Y. *et al.* (2002) *Phys. Rev. B* **66**, 014301. DOI: 10.1103/PhysRevB.66.014301.
- 15) Kanters, J. A. *et al.* (1977) *Acta Cryst. B* **33**, 665-672. DOI: 10.1107/S0567740877004439.
- 16) Punzo, F. *et al.* (2009) *Acta Cryst. E* **65**, o1393-o1394. DOI: 10.1107/S1600536809017656.

山村泰久

山村泰久(やまむら やすひさ)

筑波大学数理解物系准教授

1997年東京理科大学理学研究科博士課程修了, 1998年北陸先端科学技術大学院大学助手, 2004年筑波大学助手, 2005年同大学講師を経て, 2009年より現職。

研究内容: ソフトマターの物理化学

連絡先: 〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1

E-mail: yasu@chem.tsukuba.ac.jp

URL: <http://www.chem.tsukuba.ac.jp/kazuya/index.html>

深田和宏

深田和宏(ふかだ かずひろ)

香川大学農学部応用生物科学科教授

1989年名古屋大学理学研究科博士後期課程修了, 1989年東京理科大学理学部助手, 2001年香川大学農学部助教授を経て, 2005年より現職。

研究内容: コロイド分散系および糖類の物理化学

連絡先: 〒761-079 香川県木田郡三木町池戸 2393

E-mail: fukada.kazuhiro@kagawa-u.ac.jp

URL: <https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/fukada/index.html>