(1998年4月20日受付・1998年7月8日受理)

ジクロロ酢酸処理したトリプトファン含有 コポリペプチド膜のpH応答性

名古屋工業大学工学部材料工学科 杉本英樹・中西英二
水野慎吾・日比貞雄

pH Response of Copolypeptide Hydrogel containing Tryptophan Treated with Dichloroacetic Acid

Hideki Sugimoto, Eiji Nakanishi, Shingo Mizuno, and Sadao Hibi

Department of Materials Science & Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho,
Showa-ku, Nagoya, 466-8555 Japan

Abstract : Coloration phenomenon of L-tryptophan (Trp) derivative treated with dichloroacetic acid (DCA) was observed under varying pH, i.e., between purple (below pH 2.5) and yellow (above pH 4.0). To elucidate the coloration mechanism of Trp treated with DCA, the colored compound was fractionated and investigated spectroscopically. Trp formed yellow compound consist of tricyclic structure by treatment with DCA. The color change with the variation of pH is due to the dissociation of nitrogen atom in the tricycle. Colored copolypeptide hydrogel was also prepared by immersion of copoly (*N*-hydroxyethyl L-glutamine-co-Trp) membrane, which was obtained by aminolysis of copoly (γ -benzyl L-glutamate-co-Trp) in the presence of crosslinking agent, in DCA. Color change was also observed for the hydrogel. The pH dependence of the degree of swelling (Q_w) was investigated. The Q_w changed in the pH region of color change and reflected the results of Trp treated with DCA.

(Received 20 April, 1998 ; Accepted 8 July, 1998)

1. 緒 言

ポリ(*N*-ヒドロキシアシル-L-グルタミン)から成るポリペプチドゲルは、生体組織と同様にペプチド結合からなる骨格鎖を持ち、柔軟で物質透過性に富み、生体組織との親和性が高く、抗原抗体反応の不活性化[1]、分解吸収性[2-6]、分解生成物の非毒性[7]などから生体材料への応用が期待され、数多くの研究がなされている[8-12]。我々は、側鎖の疎水性を変化させることでコンホメーションを制御し、ゲルの吸水性、透過性、分解性および力学特性を自由に調節できることを報告してきた[13-15]。ここでは、天然に存在するアミノ酸の中で最も疎水性が大きくインドール核を有しているL-トリプトファン(Trp)を導入したポリペプチドゲルについて報告する。

Trpのインドール核は π 電子過剰系で、電子密度が高く、酸性条件下で容易に酸化され様々な構造に変化することが知られている。また、Trpは酸性条件下においてインドール環の α 位とアルデヒド類のカルボニルとが縮合し、色素を形成することが知られている[16,17]。これらの生成物は、構造も明らかにされており、鮮やかな着色を示すため、Trpを含むペプチドの定性や定量に広く用いられている。

しかしながら、アルデヒドとの反応以外で呈色物質の構造が解明されているものは少なく、ましてや色変化についての報告は全く見当たらない。

我々は、このTrpの呈色に着目して、Trp誘導体をトリフルオロ酢酸(TFA)および硝酸で処理すると呈色し、pHにより可逆的に色変化することを見出した。また、上記

の強酸で処理したときのTrp誘導体の呈色機構を明らかにし、さらに、Trp含有コポリペプチドゲルを用いて、色と吸水率などの物性が同時に変化するpH応答性材料を調製した[18-20].

本研究では、新たにTrp誘導体をジクロロ酢酸(DCA)で処理したときの呈色機構について種々の分光学的な方法により調査を行い、さらに、*N*-ヒドロキシエチル-L-グルタミンとTrpから成るランダムコポリペプチドゲルを調製し、DCA処理したときの色変化と吸水率のpH応答性について検討した.

2. 実験

2.1 試料の調製

2.1.1 酸処理Trp誘導体の調製

本研究では、アミノ基、カルボキシル基の両末端が保護されており、ペプチド鎖内の環境に近いと思われる、*N*-アセチルTrpエチルエステル(ATE)をDCAに溶解させ、従来の方法により酸処理を行った[18, 19]. この酸溶液にジエチルエーテルと*n*-ヘキサンを加えて生成物を析出させ、ジエチルエーテルで洗浄した後、遠心分離により回収し、DCA処理したATE(ATE-D)を得た. 処理時間は、DCA中における可視光スペクトルの時間変化から、紫色を示す580nm付近の吸収が最大となる三日間で行った. また、紫外線を照射せずに酸処理を行った場合、紫外線を照射して処理した場合と同程度の吸光度を示すのに一週間以上必要であることから、ここで照射する紫外線は反応を促進する効果があると思われる.

このATE-Dをカラムクロマトグラフィーにより精製し、分取した溶液を減圧濃縮して固体試料を得た. 充填剤にはオクタデシル基結合型シリカゲル(ODS) (ナカライCosmosil, C18-OPN, C18-PREP, 75meshおよび富士シリシアChromatex, DM1020T, 100mesh)を、展開溶媒にはメタノール/水=1/1(v/v)の混合溶媒を用いた. また、精製後の確認は、液体クロマトグラフィー(東ソーCCP, UV-8000, 流速1ml/min, 検出波長254nm)により行った.

2.1.2 酸処理Trp含有コポリペプチドゲルの調製

母試料となるランダムコポリ(γ -ベンジル-L-グルタマート-*co*-Trp)(GT)は、以下の方法により得た. まず、出発モノマーである γ -ベンジル-L-グルタマート(γ -BLG)とTrpを従来のホスゲン化法により、アミノ酸無水物(NCA)とし、 γ -BLG-NCAおよびL-Trp-NCAのそれぞれを得た. これらのNCAを塩化メチレン/1,4-ジオキサン(1/1v/v%)重合溶媒中に90/10mol%の割合で仕込み、トリエチルアミン(NCAに対して1/50N)を開始剤とし、室温で三日間重合を行った. 母試料は、メタノールで洗浄、粗分別を行い、高分子量(粘度平均分子量376000)のGTを

得た(収率97%). $^1\text{H-NMR}$ 測定および元素分析の結果から、コポリマーの組成はほぼ仕込み通りであることが確認された.

次に、クロロホルムからキャスト製膜したGTを、Scheme 1に示すように、架橋剤オクタメチレンジアミン(OMDA)を10mol%共存させた2-アミノ-1-エタノール(EA)に浸

Scheme 1

漬して側鎖置換反応を行い、ランダムコポリ(*N*-ヒドロキシエチル-L-グルタミン-*co*-Trp)(EGT)を得た[21]. 反応は、温度58°C、反応時間72時間にて行った. 反応の終了はIRスペクトルのエステル結合に起因する1740 cm^{-1} 付近の吸収の消失により確認した. このEGT膜をATEと同様な条件においてDCA処理することで、紫色に呈色したランダムコポリペプチドゲル膜(EGT-D)を得た. EGT-D膜は残留DCAを除去するためメタノールで充分に洗浄した後、72時間真空乾燥した.

2.2 測定

ATE-DおよびEGT-Dの色変化のpH応答性を調査するため、UV/VISスペクトル測定(日本分光工業株式会社 分光

光度計V-520型)を行った。測定は、1% (v/v) メタノール水溶液に濃度 5×10^{-3} mol/lで溶解させ、波長200~1100nm、光路長1 cmの角型石英セルにて測定を行った。また、膜については、膜厚10 μ m程度の試料を石英セルの透過面に張り付けて行った。測定時におけるpHの調整は、濃度変化を最小限に抑えるために5NHClと5NNaOHを用いて行った。

精製したATE-Dの構造を検討するため、IRスペクトル測定(日本電子製 フーリエ変換赤外分光光度計JIR-100型)および ^1H -NMRスペクトル測定(バリアン社製 XL-200型)を行った。IRスペクトル測定については、積算回数32回、KBr錠剤法にて行った。 ^1H -NMRスペクトル測定については、試料を CD_3OD (濃度1~3w/v%)に溶解させ、積算回数4~254回にて行った。基準物質にはテトラメチルシランを用いた。また、JEOL社製、フーリエ変換核磁気共鳴装置JNM-GX400型を用いて ^1H - ^1H シフト相関2次元NMR(COZY)測定を行った。

EGT-D膜のpHによる吸水性の変化を調査するために吸水率(Q_w)測定を行った。吸水率は、予め測定した乾燥重量(W_d)と、各pHの緩衝液に浸漬し膨潤平衡に達した後の湿潤重量(W_w)を用いて、次式により算出した。

$$Q_w(\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100$$

3. 結果と考察

3.1 ATE-Dの呈色変化

Trp誘導体であるATEをTFAで処理するとpH4.0からpH5.5の領域で赤色から黄色[19]に、硝酸で処理するとpH10.5からpH12.5の領域で黄色から赤色[20]に色変化するのに対して、DCAで処理したATE(ATE-D)は、pH4.0以上において、紫色を示す400nm付近の波長を吸収するために、その補色である黄色に呈色し、pH4.0からpH2.5の間で黄緑から赤色を示す550-650nm付近の波長の吸収が増大するために紫色に呈色する。このことから、ATE-Dの色変化は、赤色から黄色に変化する他の酸処理とは異なりpH2.5からpH4.0の間で紫色から黄色に色変化することが確認された。また、DCA処理前後における蛍光スペクトル測定において、ATEは350nm付近に蛍光極大を示すのに対し、ATE-Dは365nm付近とATEとは異なった波長に蛍光極大を示すことから、ATE-DはATEとは異なった構造に変化していると考えられる。

3.2 精製したATE-Dの呈色変化

Fig.1に精製前後におけるATE-Dの液体クロマトグラフィー(HPLC)の結果を示す。精製前のATE-Dには大きく分けて5つのピークがあり、未反応のATEを含む混合物であることがわかる。また、HPLCのピーク面積比から

(a) ATE-D unpurified

(c) ATE-D68

(b) ATE-D58

Fig. 1 HPLC curves of *N*-acetyl *L*-tryptophan ethylester treated with dichloroacetic acid (ATE-D) before and after purification, (a) ATE-D unpurified, (b) ATE-D 58, and (c) ATE-D 68, elutriant: MeOH/Water = 1/1 (v/v), flow rate: 1 ml/min, detection wavelength: 254nm.

5.8minにピークを示す化合物が約22%、6.8minにピークを示す化合物が約14%であることが明らかになった。そこで、ODSゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによる精製を行った結果、5.8minと6.8minにピークを示す物質(ATE-D58, ATE-D68)を単離することができた。その他の物質は、ピークの位置が近いことや含まれている量が微量であるため、完全に分離することができなかったが、pHを変化させても色変化しないことから、目的の呈色物質ではないと考えられる。ATE-D58は、pH4.0以上では黄色、pH1.5以下ではオレンジ色に呈色するのに対し、ATE-D68はpH4.0以上で400nm付近の波長を吸収するために、黄色に呈色し、pH4.0からpH2.5の間で560-630nm付近の

波長の吸収が増大するため、紫色に呈色することが確認され、未精製のATE-Dと同様のpH領域で色変化が起きていることが明らかとなった。このことから、全体としての色変化は、ATE-D68によると考えられる。

3.3 ATE-D68の構造

Fig.2にATE-D68およびATEのIRスペクトルを示す。ATEのスペクトルには、 1743cm^{-1} に脂肪族エステル $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に起因する吸収が見られるが、ATE-D68では 1730cm^{-1} と低波数側にシフトしていることから、エステル部分の環境が変化していると思われる。また、アミド結合の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に起因する吸収が残存しているにもかかわらず、 $\text{N}-\text{H}$ 変角振動が消失していることから、二級アミドが三級アミドに変化していると考えられる。これまでの調査から、Trp誘導体をTFAや硝酸で処理すると、同様なIRスペクトルの変化が起き、三環構造を形成することから[19,20]、ATEはDCA処理により、Fig.3に示すような構造に変化していると考えられる。

Fig. 2 IR spectra of *N*-acetyl L-tryptophan ethylester (ATE) and *N*-acetyl L-tryptophan ethylester treated with dichloroacetic acid after purification (ATE-D 68).

次に、 CD_3OD 中におけるATE-D68の ^1H -NMRスペクトルをFig.4に示す。ATE-D68のスペクトルには、1.8か

Fig. 3 Cyclization of *N*-acetyl L-tryptophan ethylester by treatment with dichloroacetic acid.

ら2.1ppm付近にアセチルのメチル基と思われるピークが3本あり、大きく分けて3つの物質が混在しているように思われる。しかしながら、先に示したようにATE-D68のHPLC曲線はシングルピークであり、HPLCの分離能を上げるなど測定条件を変えて測定を行ったが、結果はシングルピークであった。このことから、一次構造は同じで、他の要因により異なったケミカルシフト(c.s.)を示すと考え、アセチルのメチル基が高磁場のc.s.を示す化合物から、便宜的に化合物A、B、Cとし、図中のように帰属した。

化合物Cは、出発物質であるATEとよく似たピークの分裂様式を示し、c.s.も非常に近い位置にピークを示した。ATEとの大きな相違点は、化合物Cはe)、f) 2つ分のプロトンがそれぞれカルテットに、異なったc.s.で現れていることである。これは、 H_A と H_B の立体環境が異なり、さらに固定化された環境に存在していると考えられる。また、プロトンの交換速度の遅いDMSO- d_6 中での ^1H -NMRスペクトルにおいても、アミドのNHプロトンに起因するピークが観測されないことから、三環構造への変化を支持している。

一方、化合物AおよびBは、スペクトルの強度がほぼ同

Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of *N*-acetyl L-tryptophan ethylester treated with dichloroacetic acid after purification (ATE-D 68) in CD_3OD .

て、c.s.やピークの分裂が複雑で、 ^1H -NMRのみによる帰属・同定が困難なため、 ^1H - ^1H シフト相関2次元NMRスペクトル(COZY)測定により、プロトン同士の相関関係を調査した。COZYからエステルメチル基、a)とメチレン基、b)は相関があるが、1つのメチル基のピークに対し、メチレン基のピークが2ヶ所に存在していることが確認された。これは、エステル基のメチル-メチレン間の回転が自由であるのに対し、O-CH₂間の回転が束縛を受け、メチレン基の2つのプロトンの環境が異なるためと考えられる。また、Cと同様に、骨格メチン基のH_xプロトン、c)に対し、インドール環に隣接したメチレン基のプロトンが2つの相関関係を持ち、それぞれ環境の異なるプロトンH_A、H_Bが存在している。さらに、AとBはエステルのメチル基、a)がかなり高磁場(0.7ppm付近)に現れていることから、メチル基は近傍にある芳香環の環電流により、強く遮蔽されているため、高磁場シフトしていると考えられる。また、化合物AとBのアセチルのメチル基、d)も、一般的なc.s.(~2.1ppm)より高磁場に現れている。これはAとBのアセチル基のカルボニル基がインドール環のNHプロトンと水素結合するためと考えられ、これにより、カルボニル炭素の電子密度が大きくなり、隣

接したプロトンが高磁場シフトしたと思われる。以上より、A、BおよびCは一次構造は同じで、コンホメーションの違いによって差異が生じていると考えられる。推定したATE-D68の3つのコンホメーションA、B、CをFig.5に示す。コンホメーションCでは、エステル基は外側を向いているため、メチル基a)、とメチレン基、b)のc.s.は通常の有機化合物と同等であり、また、水素結合しないためエステル基は自由に回転できると考えられる。また、コンホメーションA、Bでは、アセチル基の酸素とインドール環のNHの水素が水素結合するため、アセチル基のカルボニルがインドール環と同一平面になるように固定され、エステル基がインドール環の上部に位置すると、アセチル基のメチルが立体障害になるため、容易に外側を向くことができず、その結果、インドール環の環電流によりメチルは強く遮蔽され、高磁場に大きくシフトすると考えられる。またAとBの違いは、アミノ酸骨格のメチン基のH_xプロトン、c)とメチレン基のH_Aプロトン、e)とのわずかなコンホメーションの違いであると考えられる。

3.4 ATE-D68の呈色機構

ATE-D68は、pH2.5からpH4.0の領域で紫色から黄色に色変化する。TFAおよび硝酸で処理したATEは、イン

Fig. 5 Possible conformations of *N*-acetyl L-tryptophan ethylester treated with dichloroacetic acid after purification (ATE-D 68).

ドール環の窒素原子の解離によって色変化する[19,20]ことから, ATE-D68も解離により呈色変化することが考えられる。そこで, クリスタルバイオレット(CV)を用いた非水滴定を行い, 解離基の有無を調査した結果, CVの変色に要する過塩素酸の滴下量が, ブランク滴定から求めた滴下量とは異なり, 約32%が解離していることが確認された。これにより, ATE-D68の色変化は, 酸性領域におけるプロトン化によることが明らかになり, 推測されるATE-D68の呈色変化機構をFig. 6に示す。一般にベンゼン誘導体は, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NR}_2$ などの置換基を導入すると, UV/VISスペクトルの吸収波長が20~85nm程度深色移動する[22]。ATE-D68についても同程度シフトすると考えると, インドール環の $\alpha(2)$ 位に $-\text{NRCOCH}_3$ が置換されるために, Trpの特性吸収である278nm, 292nmの吸収が深色移動し, 320nmを中心とするブロードな波長を吸収するため, 薄い黄色に呈色すると考えられる。

Fig. 6 Dissociation form of *N*-acetyl L-tryptophan ethylester treated with dichloroacetic acid after purification (ATE-D 68).

一方, pH4.0以下において, インドール環のN原子は, その不対電子が芳香環形成に動員されるためプロトン化せず, Fig. 6のように, アセチル基のカルボニルにプロトン化が起これ, $\text{N}=\text{C}$ に変化するため, インドール環の平面上で電子状態が変化し呈色変化すると考えられる。また, この機構では, 水素結合していない化合物Cは, アセチル基とインドール環が同一平面上に並ばず, 窒素原子の不対電子がアセチル基のカルボニルに流れ込まないために, プロトン化せず色変化しないと思われ, 水素結合によりインドール環とアセチル基が同一平面上に位置する化合物AとBのみプロトン化し, 色変化すると考えられる。

以上のように, ATEはDCA処理により三環構造を形成し, pH4.0以下で正に解離するため呈色変化することが明らかとなった。

3.5 EGT-D膜のpH応答性

DCA処理したTrp含有ハイドロゲル膜, EGT-D膜は, 0.1N塩酸中では紫色に, 0.1N水酸化ナトリウム水溶液中では黄色に呈色することが確認された。Fig. 7にEGT-D膜の可視光スペクトルのpH依存性を示す。pH4.0以上では400nm付近の波長を吸収するため黄色に, pH2.5からpH1.5の間で550nm付近の波長の吸収が増大するため紫色に呈色する。このEGT-D膜の色変化が起きるpH領域は, ATE-D68の色変化が起きるpH領域に比べて若干低pH側にシフトしているが, DCA処理によりハイドロゲル膜中のTrp残基がATE-D68と同様な構造に変化していると考えられる。これらのことから, EGT-D膜の色変化は, ATE-D

Fig. 7 pH dependence of VIS spectra of random copoly (*N*-hydroxyethyl L-glutamine-co-L-tryptophan) membrane treated with dichloroacetic acid (EGT-D).

での色変化を反映していることが明らかとなった。

次に、EGT-D膜のpHに対する膜吸水率の変化をFig. 8に示す。膜の色変化するpH2.5からpH1.5付近にかけて、膜吸水率は増加した。ポリペプチドは、外部刺激により二次構造が変化することから、このpH領域における二次構造について、無架橋のEGT-Dを用いたCD測定により調査した結果、無架橋EGT-Dは、完全なランダム構造であ

Fig. 8 pH dependence of the degree of swelling (Q_w) of random copoly (*N*-hydroxyethyl L-glutamine-co-L-tryptophan) membrane treated with dichloroacetic acid (EGT-D).

り、pHによる二次構造変化はないことが確認された。これらから、膜内においても、ATEをDCA処理したときと同様の構造変化が起きており、Trp残基がプロトン化し、解離することによって吸水率が増加すると考えられる。しかしながら、他の酸処理膜と吸水率を比較すると、TFA処理膜では最大900%[19]、硝酸処理膜では480%[20]吸水するのに対して、DCA処理膜では200%と大きな違いがある。この理由について、Trp残基を含まないポリ(*N*-ヒドロキシエチル-L-グルタミン)膜のDCA処理前後におけるIR測定から検討したところ、DCA処理後のIRスペクトルには、 817cm^{-1} および 1747cm^{-1} にC-Cl伸縮振動とエステル基のC=O伸縮振動に起因するピークが現れ、膜重量が増加することが確認された。すなわち、DCA処理することで、グルタミン残基側鎖の水酸基とDCAとがエステル結合し、この結果、吸水率が低下することが明らかとなった。また、この吸水率の低下により、EGT-D膜の色変化の起きるpH領域が低pH側にシフトすると考えられる。

以上のように、*N*-ヒドロキシエチル-L-グルタミンとTrpから成るランダムコポリペプチドをDCA処理することにより、Trp誘導体での結果を反映して、色変化を伴いながら吸水率の変化する新しいpH応答性材料を調製することが可能となった。

文 献

1. P. H. Maurer, *J. Immunol.*, **88**, 330 (1962).
2. T. Hayashi, K. Takeshima, Y. Tabata, and A. Nakajima, *Polym. J.*, **17**, 1148 (1985).
3. Y. Iizuka, K. Wakamatsu, M. Oya, T. Hayashi, and T. Yamamoto, *Kobunshi Ronbunshu*, **48**, 239 (1991).
4. T. Hayashi, Y. Iizuka, M. Oya, and M. Iwatsuki, *Polym. J.*, **25**, 481 (1993).
5. T. Hayashi, Y. Iizuka, M. Oya, and M. Iwatsuki, *Biomaterials*, **14**, 497 (1993).
6. T. Hayashi, E. Nakanishhi, Y. Iizuka, M. Oya, and M. Iwatsuki, *Eur. Polym. J.*, **31**, 453 (1995).
7. "Polyamino acids, Polypeptides and Proteins", M. A. Stahman, Ed., Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin (1962).
8. J. M. Anderson, K. L. Spilizewski, and A. Hiltner, in "Biocompatibility of Tissue Analogs", D. F. Williams, Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1985 p.68.
9. S. D. Bruck, *Biomater. Med. Artif. Organs*, **1**, 79 (1973).
10. B. D. Ratner and A. S. Hoffman, "Hydrogels for Medical and Related Applications", J. D. Andrade,

- Ed., ACS Symp. No. 31, ACS, Washington DC, 1976 Chapter 1.
11. V. Skarda, F. Rypacek, and M. Ilavsky, *J. Bioactive and Compatible Polymers*, **8**, 24 (1993).
 12. D. L. Elbert and J. A. Hubbell, *Polymers Annual Review of Materials Science*, **26**, 365 (1991).
 13. E. Nakanishi, E. Sugiyama, S. Hibi, M. Maeda, and T. Hayashi, *Polym. J.*, **23**, 983 (1991).
 14. E. Nakanishi, K. Hamada, E. Sugiyama, S. Hibi, and T. Hayashi, *Polym. J.*, **23**, 1053 (1991).
 15. E. Nakanishi, Y. Shimizu, K. Ogura, S. Hibi, and T. Hayashi, *Polym. J.*, **23**, 1061 (1991).
 16. J. J. Sharp, A. B. Robinson, and M. D. Kammen, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6097 (1973).
 17. H. Ogawa, T. Sasaki, H. Irie, and H. Tajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3144 (1978).
 18. H. Sugimoto, E. Nakanishi, N. Kondo, and S. Hibi, *Kobunshi Ronbunshu*, **55**, 1 (1998).
 19. H. Sugimoto, E. Nakanishi, and S. Hibi, *Polymer*, in press.
 20. H. Sugimoto, E. Nakanishi, K. Susaki, and S. Hibi, *Polym. J.*, in press.
 21. T. Sugie and P. A. Hiltner, *J. Macromol. Sci-Phys.*, **B17**, 769 (1980).
 22. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morrill in "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 荒木峻, 益子洋一郎, 山本修 訳, 東京化学同人, 東京都, (1992), p 280.