

【論文】

オリゴペプチドの NMR 測定

野辺雅彦*, 神尾克彦**, 添嶋康廣**, 米光直志**

NMR measurement of oligopeptide

Masahiko NOBE*, Katsuhiko KAMIO**, Yasuhiro SOEJIMA**

and Tadashi YONEMITSU**

The oligopeptide was synthesized with the peptide bond of Gly in each amino acid (Leu,Phe). By the place where Gly combined, the effect which the hydrogen on α carbon of the amino acid receives was examined. The result showed that the chemical shift value changed most, when it made with the amino group of amino acid peptid bond. Carboxyl group (electron-withdrawing substituent) of amino acid draws resistant the electron near, when there is no concerning the combination. Therefore, the chemical shift value of the hydrogen on α carbon of amino acid greatly changed.

Keywords: NMR, Chemical shift, Oligopeptide, Leu,Phe,Gly

1. はじめに

近年, オリゴペプチドは, 有用なものとして食品, 医薬品等に利用されてきている¹⁾。10 個以下のアミノ酸によるペプチド結合からなるものをオリゴペプチドと総称している。身近なオリゴペプチドには, アスパラギン酸とフェニルアラニンの結合よってできたアスパルテム (商品名) がある。これは, 低カロリー人工甘味料として, 飲料水, 食品に広く利用されている¹⁾。最近では, オリゴペプチドを癌ペプチドワクチンとして癌治療に利用する試みがなされている²⁾。臨床試験段階ではあるが, 効果が見られており, 癌再発防止薬としても期待されている。しかし, オリゴペプチドのアミノ酸間の電子の影響についての研究は少ない。今回, 我々は, 各ロイシン (Leu), フェニルアラニン (Phe) を含んだ種々のオリゴペプチドを合成し, ¹H-NMR 測定を行った。そして, Leu,Phe の α 炭素に結合する水素に注目し, 結合するアミノ酸による電子の影響について化学シフトの変化から検討を行なった。

2. 実験

2.1 試料合成

合成に使用したアミノ酸は, グリシン (Gly), ロイシン (Leu), フェニルアラニン (Phe) を用いた。これらのアミノ酸は, すべて (株) ペプチド研究所の試薬を使用した。合成は, 液相法によった^{3,4)}。例えば Gly-L-Leu-Gly の合成では, Z-Gly-OH と H-Leu-Gly-OBzl · TEF に EDC · HCl を反応させ, ついで還元により Gly-L-Leu-Gly を得た。同様の方法により各オリゴペプチドの合成を行い, NMR 測定により構造確認を行なった。

2.2 試料調製

合成した各オリゴペプチドを重水に溶解して NMR 管に移し, 基準物質 3-トリメチルシランプロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3-d₄ を添加して NMR 測定試料とした。

2.3 ¹H-NMR 測定

400MHz ¹H-NMR 測定装置 (日本電子製) を使用して, 測定温度 25°C, 積算回数 20 回 (¹H) で測定した。

3. 結果と考察

アミノ酸は, 1つの炭素にアミノ基とカルキシル基および R 基 (側鎖, side chain) を持つ。アミノ酸のアミノ

*工業化学科卒業生

**物質生命化学科

基は、カルボキシル基のα位の炭素原子に結合している。
 今回、α炭素に結合する水素(※: αH)に着目した。
 合成に使用するアミノ酸は、非極性側鎖を持つLeu, Phe,
 Glyを選んだ (Fig2)。

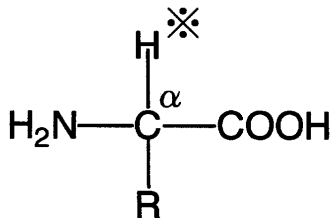


Fig.1 Structure of α-amino acid

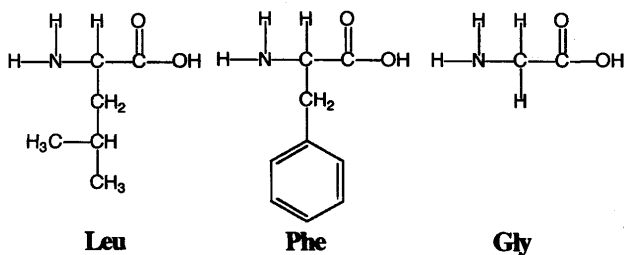


Fig.2 Structure of each amino acid

次に、Leu を中心にして、Leu のアミノ基と Gly のカルボキシル基をペプチド結合した場合と逆に Leu のカルボキシル基と Gly のアミノ基でペプチド結合させた場合のオリゴペプチドを合成した (Fig3)。さらに、Phe を中心にして、Phe のアミノ基と Gly のカルボキシル基をペプチド結合した場合と逆に Phe のカルボキシル基と Gly のアミノ基でペプチド結合させた場合のオリゴペプチドを合成した (Fig4)。Leu,Phe 単体のα炭素についている水素(αH) 化学シフト値と Gly の結合する場所が違うオリゴペプチドのαH 化学シフト値に違いが見られるかを 1H-NMR 測定から求めた。Fig5 に Leu, Gly-Leu の 1H-NMR スペクトルを示した。Leu 単体のαH 化学シフト値は、3.73ppm になった。Gly-Leu オリゴペプチドのαH 化学シフト値は、4.21ppm になった。Leu 単体に比べ、オリゴペプチドのほうが低磁場シフトしていることが分かった。低磁場シフトしたのは、Leu に結合する Gly の電子吸引性カルボニル基によって、αH 原子の電子密度が小さくなり、磁気しゃへいが弱められたためと考えられる。反対に、電子密度が高くなると外部磁場の強さより弱くなるため、

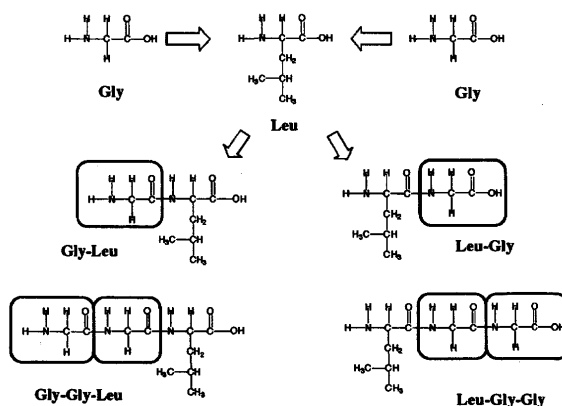


Fig.3 Structure of synthetic oligopeptide

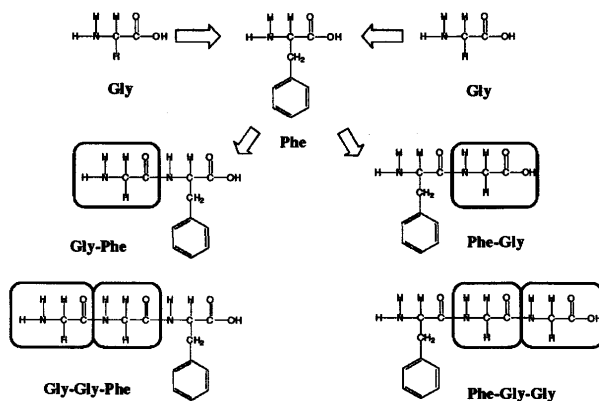


Fig.4 Structure of synthetic oligopeptide

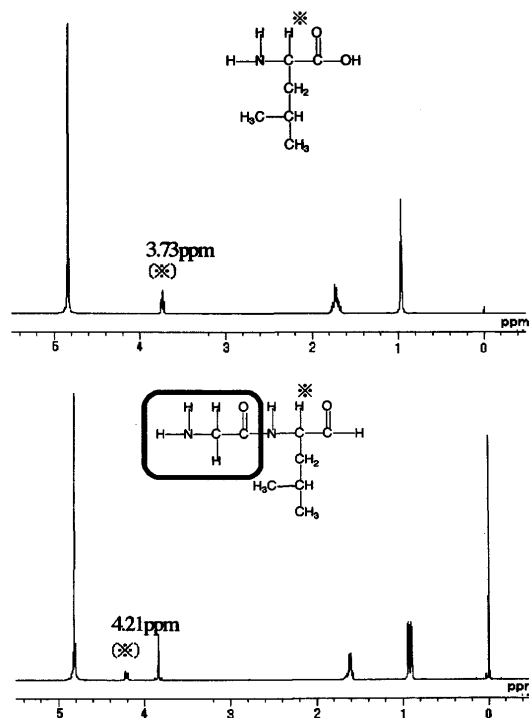


Fig.5 Leu,Gly-Leu NMR spectra

共鳴周波数は小さくなり、高磁場シフトする。その他のオリゴペプチドも測定した。Leu 中心のオリゴペプチドの αH 化学シフト値を Table 1 に示した。その結果からオリゴペプチドと化学シフト値の関係を Fig.6 のグラフにした。

Leu 単体の αH 化学シフト値を Leu のカルボキシル基と Gly のアミノ基とのペプチド結合した場合を比較してみると No.1:3.73ppm, No.2:4.03ppm, No.3:3.99ppm となった。

Leu 単体からの化学シフト値の差をとると, 0.3ppm, 0.26ppm となり Gly が1つのほうが2つより αH への影響が強かった。次に, Leu のアミノ基と Gly のカルボキシル基とのペプチド結合した場合を比較してみると No.4:4.21ppm, No.5:4.23ppm となった。Leu 単体からの化学シフト値の差をとると, 0.48ppm, 0.5ppm となり Gly が2つのほうが1つより αH への影響が強かった。化学シフトはその核のごく近くの磁場環境を反映している。

磁場環境は電子的环境でもある。一般に, 相対的に電子密度の高い原子の核は, より高磁場に現れ, 相対的に電子密度の低い原子は, それより低磁場に現れる。電子密度の偏りは, 結合の両端の原子の相対的な電気陰性度の大小に対応している。また, 原子核が実際に感じる磁場の強さが, そのまわりをまわる電子が発生する電場(磁場)などの影響で, 外部磁場より弱められる現象を磁気しゃへいといい, 化学シフトを生ずる主な原因となっている。磁気しゃへいが強いと, 原子核が実際に感じる磁場は与えられている外部磁場の強さより弱くなるため, 共鳴周波数は小さくなり, 結果的に高磁場シフトする。

磁気しゃへいが弱い場合は, この逆になる。Fig.7 には, カルボニル基, カルボキシル基による電子の偏りを示した。Fig.7 から αH の電子密度が最も低くなっているのは, GlyGlyLeu であることが分かった。そのため, αH 原子核の磁気しゃへいが弱くなり, 原子核が実際に感じる磁場は与えられている外部磁場の強さより強くなるため, 共鳴周波数は大きくなり, 結果的に低磁場シフトしたと考えられる。Leu に Gly とペプチド結合させる場合, Leu のカルボキシル基とペプチド結合させると αH への影響は弱く, 逆にアミノ基とペプチド結合させると影響が強いことが分かった。Phe についても同様に, 検討してみた。

Table2 には結果を示した。その結果から, オリゴペプチドと化学シフト値の関係を Fig.8 に示した。 αH への影響について, オリゴペプチドの化学シフト値から Phe 単体の化学シフト値の差をとった。その化学シフト値の差は,

Table1 Result of chemical shift value and oligopeptide

No.	Oligopeptide	Chemical shift value /ppm
1	Leu	3.73
2	Leu-Gly	4.03
3	Leu-Gly-Gly	3.99
4	Gly-Leu	4.21
5	Gly-Gly-Leu	4.23

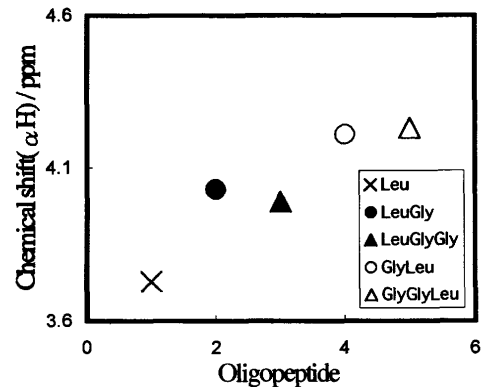


Fig.6 Relationship between chemical shift (αH) and oligopeptide

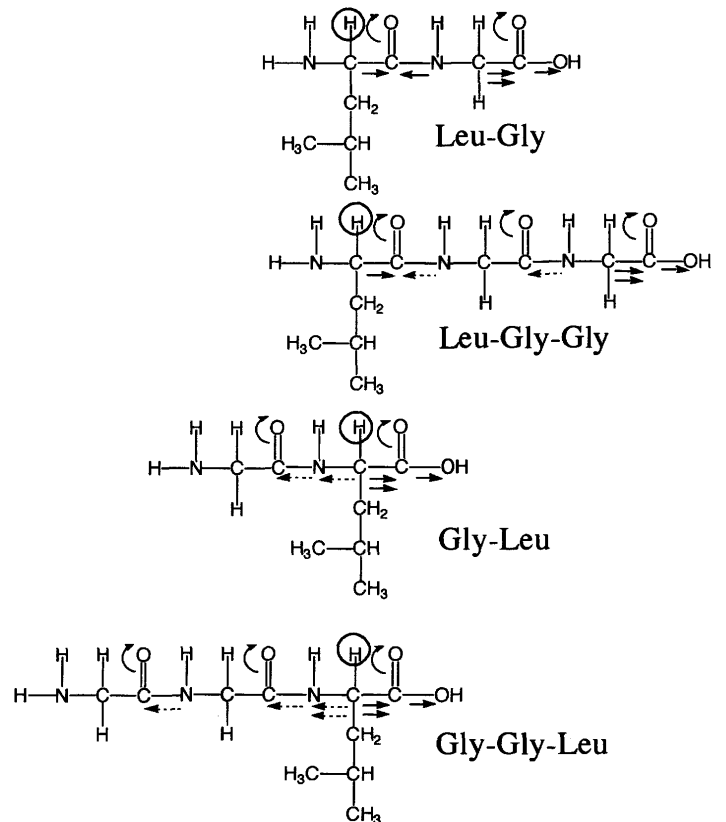


Fig.7 Electronic polarization by carbonyl group and carboxyl group

No.6:0.27ppm, No.7:0.32, No.8:0.52ppm, No.9:0.49ppm となった。Leu, Phe と Gly の結合位置と化学シフト値の結果を Table3 に示した。Table3 から Leu, Phe とともに Gly の結合する場所によって α H に対する影響に違いがあることが分かった。その結果を Fig9 に示した。Gly の結合する数には、大きな差は見られなかった。このことから、 α H への影響の強さは、アミノ酸のアミノ基とペプチド結合をした場合が強くなることが分かった。すなわち、カルボキシル基がペプチド結合に関与しなければ、 α H 核の電子を吸引してしまうため、電子密度は低下する。そのため、 α H 核は、磁気しゃへいが弱くなり、化学シフト値は、低磁場にシフトしたと考えられる。

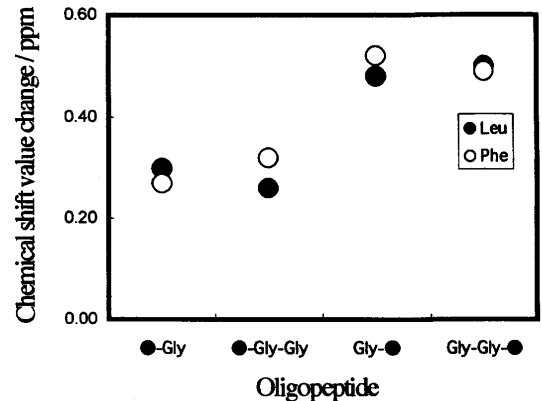


Fig.9 Relationship between chemical shift change and oligopeptide

Table2 Result of chemical shift value and oligopeptide

No.	Oligopeptide	Chemical shift value / ppm
5	Phe	3.99
6	Phe-Gly	4.26
7	Phe-Gly-Gly	4.31
8	Gly-Phe	4.51
9	Gly-Gly-Phe	4.48

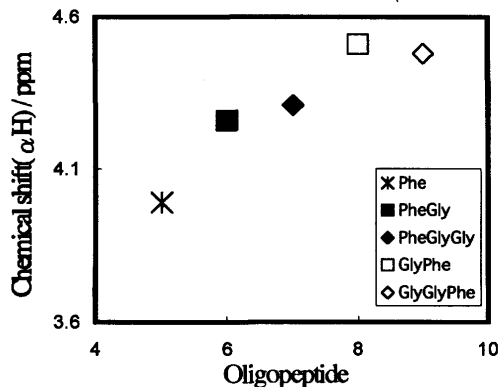


Fig.8 Relationship between chemical shift (α H) and oligopeptide

Table3 Chemical shift value change by the combination place

	● : Leu ppm	● : Phe ppm
●-Gly	0.30	0.27
●-Gly-Gly	0.26	0.32
Gly-●	0.48	0.52
Gly-Gly-●	0.50	0.49

4.まとめ

種々のオリゴペプチドを合成した。Gly の結合する場所によって、アミノ酸の α 炭素につく水素の受ける影響について検討した。その結果、アミノ酸のアミノ基とペプチド結合した時が、最も化学シフト値が変化した。これは、アミノ酸のカルボキシル基（電子吸引基）が結合に関与しないため、 α H 核の電子を強く引き寄せた結果と考えられる。Gly の結合数による影響は、小さいことが分かった。

参考文献

- 1) Mannie Elizabeth, Prep Foods, 176, 75 (2007)
- 2) Matuo Keisuke, Biochem Biophys Res Commun, 362, 4, 1069 (2007)
- 3) Pillai VNR, J. Org. Chem., 45, 26, 5364 (1980)
- 4) Koppke KD, Int. J. Peptide Protein Res., 21, 3, 269 (1983)
- 5) Y. Soejima, Chem. Pharm. Bull., 42, 2618 (1994)

今回の NMR スペクトルは、すべて本学総合機器センターの日本電子製 λ -400 型 NMR スペクトル測定装置によって得られたものである。