

ペプチド化合物の溶液内会合におよぼす

2-クロロエタノールの効果

水 野 和 子

図・本館

報告番号	乙第	3558号
------	----	-------

名古屋大学図書
和 1030414

目 次

1章 序 論	
1. 1 タンパク質と 2-chloroethanol をめぐる従来の研究の概観	---- 1
1. 2 研究の目的	----- 4
1. 3 本研究の実験的な構成と本論文の構成	----- 6
References	----- 8
2章 種々の 2-置換エタノールの水素結合性の比較	
2. 1 序 論	----- 11
2. 2 実 験	
2. 2. 1 試薬と精製, 脱水および測定試料の調製法	----- 12
2. 2. 2 赤外吸収スペクトルの測定	----- 13
2. 3 結 果 と 考 察	
2. 3. 1 アルコールと DMA との水素結合形成による $\Delta\nu_{OH}$ の測定	---- 13
2. 3. 2 アルコールと DMA との水素結合形成の平衡定数の測定	17
3章 タンパク質モデル化合物の四塩化炭素溶液中と水溶液中での自己会合	
3. 1 序 論	----- 23
3. 2 実 験	
3. 2. 1 タンパク質モデル化合物の合成	----- 25
3. 2. 2 測定試料の調製と測定の方法および装置について	-- 25
3. 3 結 果 と 考 察	
3. 3. 1 四塩化炭素溶液中のペプチド会合体の構造と 会合定数の決定	-- 26
3. 3. 2 水溶液中のペプチドの会合	----- 37
3. 3. 3 四塩化炭素溶液中と水溶液中での ペプチドの会合の違い	-- 44

4章 タンパク質モデル化合物とアルコールとの

四塩化炭素溶液中での相互作用 -- 46

4.1 カルボニル伸縮振動の波数シフトの測定による

アルコール-DMA 2:1 Complex の構造決定 -- 47

4.2 アルコールと N-methylacetamide との相互作用 ---- 52

4.3 アルコールと N-acetylglycine N',N'-dimethylamide との
相互作用 -- 54

5章 水溶液中のタンパク質モデル化合物の

自己会合におよぼす ClEtOH の効果とその原因

5.1 序論 ----- 61

5.2 実験 ----- 62

5.3 結果と考察

5.3.1 ClEtOH がペプチド化合物の会合におよぼす効果 ---- 62

5.3.2 ClEtOH が水の構造におよぼす効果 ----- 66

5.3.3 ClEtOH による水構造破壊の機構についての考察 ---- 72

5.3.4 ClEtOH とペプチドとの疎水性相互作用 ----- 73

5.3.5 ClEtOH の OH プロトンの多重度から見た

四塩化炭素溶液中での水と ClEtOH との相互作用 -- 765

6章 まとめ

6.1 実験のまとめと結論 ----- 82

6.2 本研究の結論と ClEtOH によるタンパク質変性の機構との関連 87

6.3 タンパク質の構造安定化因子についての予想 ----- 88

6.4 今後の課題 ----- 89

謝 辞

Publication

序 論

1. 1 タンパク質と 2-chloroethanol をめぐる従来の研究の概観

タンパク質は20種類のアミノ酸がペプチド結合したものであること(1930 - 1940)、タンパク質は小分子物質の凝集したものではなく、真の高分子物質であること(1940-1950)の研究成果を基礎に、さらにはタンパク質のアミノ酸配列(一次構造)の決定法の確立(1945-1960)という実験面での進展も加わって、1950年代からはタンパク質の「構造」と「機能」の間の関係を明らかにするという課題が研究者をひきつけるようになってきた。¹⁾ Anfinsen 等(1957)はリボヌクレアーゼAを尿素で変性させ、そのS-S結合をメルカプトエタノールで還元した後に、溶媒を生理条件にもどすと、S-S結合の形成をも含めたタンパク質の変性前の正しい立体構造が再び形成され、酵素活性も回復してくることを見いだした。²⁾ これは、タンパク質の一次構造と立体構造、さらにその特異的な機能とのあいだに密接な関連があることを明快に示した実験としてよく知られている。そして、この頃から現在にいたるまで、タンパク質の一次構造と高次構造、さらにはその特異的な機能がどのように関連しているかを明らかにするために多くの研究者がタンパク質と取り組んできたし、これから先も、これらの間の関連性をより詳しく調べるのがタンパク質の研究における重要な課題の一つであることに変わりはないと思われる。

ところで、タンパク質の立体構造という場合にはまずX線回折によって得られる結晶中のすべての原子の三次元的な配置をさすであろう。しかし、膜タンパク質などは別としても多くのタンパク質は血液、リンパ液などの体液や細胞液中に溶質として存在しており、いわば水溶液中でそれぞれに固有の機能を発揮すると言いうことができる。このような細胞中のタンパク質の構造や安定性、寿命などについての研究は最近になってようやく活発になりつつあると言いうことができる。しかし、in

vivo での実験の前に、in vitro での実験として、タンパク質の立体構造と機能の関係を調べようとする多くの化学者や物理学者は水溶液中のタンパク質の立体構造をCDやORD, 赤外分光法などの方法を用いて調べてきた。特にこの問題についての核磁気共鳴分光法を用いた最近の研究の発展はめざましい。

この一方で、研究者たちは水溶液中のタンパク質の構造を可能にしている構造安定化因子にも興味を持ち続け、化学的、熱力学的³⁾、あるいは統計力学的⁴⁾などを用いて、この問題と取り組んできたと言うことができる。水溶液中の球状タンパク質の構造安定化因子を「化学的に」調べる方法とは、安定化因子の構造維持への寄与を化学物質で強制的に断ち切ることによって安定化の原因を明らかにしようとするもので、一つは「変性剤」によってもたらされるタンパク質のコンフォメーション変化の機構の解明、もう一つは、変性状態から天然の状態への「巻き戻し」過程の解明という形で行われてきた。^{5,6)} 代表的な変性剤として尿素やグアニジン塩酸塩が用いられてきた一方で、アルコールやジメチルスルホキシド、ジオキサンなどの有機溶媒による変性の研究も数多くなされてきた。そして、種々の有機溶媒の中でも、ハロゲンアルコール、特に、2-chloroethanol (以後 ClEtOH) は、変性とタンパク質への preferential binding との関連性が広範囲に研究されてきた変性剤であると言うことができる。ここでタンパク質と ClEtOH をめぐる研究の歴史を簡単に述べてみたい。

ClEtOH によるタンパク質の conformation 変化を ORD, CD などの方法で調べた研究の報告は1960年頃からごく最近にいたるまで数多くある。⁷⁾ 以下に簡単にまとめてみたい。Frenke と Horn(1960) は Ovalbumin が ClEtOH 溶液中で完全なヘリックスコンフォメーションに相当する大きな比旋光度を示し、溶液の粘度が増加することを報告した。⁸⁾ Hamaguchi と Kurono (1963) は ClEtOH による Lysozyme の変性を調べ、Lysozyme 内部の疎水性領域の構造がこわれている中間体を経て、ヘリックスが非常に多い構造へと変化する過程を提出している。⁹⁾ このように、尿素やグアニジン塩酸塩にみられるような unfolding をもたらすのではなく、ヘリックスの形成をもたらす変性剤としての ClEtOH についての報告が次々と出されているうちに Timascheff と Inoue(1968) による preferential binding についての報告がなされた。すなわち、水-有機溶媒系における、タンパク質(ここでは

ラクトグロブリン)の近傍とバルクとの有機溶媒の濃度の違いを量的に示す preferential binding を測定したところ、正の preferential binding を観測した。すなわち、タンパク質の近傍に、バルクにくらべてより多くの ClEtOH が存在することになる。重要なことは、この正の preferential binding が、タンパク質のヘリックス含有量の増加と並行して起こることであった。^{10,11)} タンパク質の脂肪族側鎖と ClEtOH の疎水性部分との相互作用がこの binding に対する原因であるとされた。^{12,13)} すなわち、ClEtOH とタンパク質の疎水性部分のあいだの相互作用がタンパク質の変性に関係づけられたことになる。これから後の別の研究グループによる preferential binding の研究においても同じように、ClEtOH とタンパク質との疎水性部分どうしの相互作用がその原因として挙げられてきた。¹⁴⁻¹⁸⁾ そして、以後の ClEtOH によるタンパク質の変性についての多くが、この疎水性部分どうしの相互作用を変性の原因であるとしてきた。

1975年頃になって ClEtOH の疎水性は、タンパク質への preferential binding の原因にはできないという実験結果が出されるようになった。すなわち、Shindo 等(1974)は、後に詳しく述べるように、疎水性の異なるハロゲノアルコールのタンパク質変性能力が、疎水性の大きさによらず、しかもアルキルアルコールに比べてはるかに大きいことを報告した。¹⁹⁾ Ebina 等(1982)は ClEtOH や 2,2,2-trifluoroethanol、と 1-propanol との chymotrypsin に対する変性能力の比較から、ハロゲノアルコールによる変性ではアルコールの疎水性よりもむしろ、ハロゲン基の極性がタンパク質の水素結合や疎水結合に影響を与えているのではないかとしている。²⁰⁾ White と Wright(1984)もまた、ClEtOH の疎水性は S-S結合を切断した Lysozyme の巻き戻しにおいて何等の重要な役割を果たしていないとしている。²¹⁾

このように、タンパク質と ClEtOH をめぐる研究の歴史は 20 数年にもなるにもかかわらず、変性の原因となる因子の決定や詳しい変性機構の確立にまで至っていないのが現実であると言わなければならない。

1. 2 研究の目的

本研究の目的について述べる前に、本研究を行ってきた研究室での本研究に先立つ Bovine serum albumin (BSA) と Lysozyme の種々の有機溶媒による変性についての実験と、著者の実験と並行して始められたアルキルアルコールのこれらのタンパク質への preferential binding についての実験結果について述べなければならない。

本研究を始めたのは 1974 年であったが、これより先に Shindo 等は、ClEtOH のほかに 2-bromoethanol, 3-chloro-1-propanol, 1-chloro-2-propanol, 2,3-dichloro-1-propanol, 1,3-dichloro-2-propanol などのハロゲノアルコールによる BSA と Lysozyme の変性を ORD の測定によって調べ、その結果をアルキルアルコールの場合と比較した。¹⁹⁾ 実験の結果は次のようにまとめることができた。すなわち、

- 1) 用いたハロゲノアルコールはいずれも対応するアルキルアルコールに比べて、かなり低濃度で、しかもより強い変性能力を示す。
- 2) アルキルアルコールにおいては、すでにそれまでにも報告されてきたと同じように、疎水性の大きさと変性能力の強さとの間に関係がみられたが、ハロゲノアルコールにおいては、この関係はほとんど見いだされなかった。

この結果にもとづいて Shindo 等はハロゲノアルコールによる変性においてハロゲン部分の果たす役割を調べるために、ハロゲン以外の電子吸引性の原子である酸素、窒素を原子団中に含むアルコールとして、 R_1-O-R_2-OH ($R_1: CH_3, C_2H_5, C_3H_7, R_2: C_2H_4, C_3H_6$) で示されるアルコキシアルコール、 $(R_1)_2N-R_2-OH$ ($R_1: CH_3, C_2H_5, R_2: C_2H_4, C_3H_6$) で示されるアミノアルコール、さらには、アセトイン、ジアセトンアルコールなどのケトアルコールによる BSA と Lysozyme の変性を調べた。その結果、これらのアルコールはいずれもハロゲノアルコールのような強い変性能力を持たないことが明らかになった。

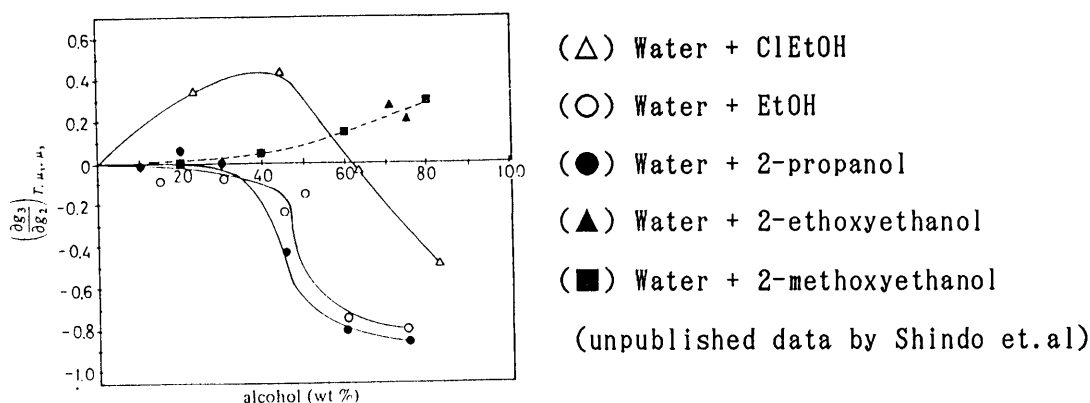


Fig.1-1 Dependence of preferential interaction parameter on solvent component for the preferential interaction of lysozyme with solvent component.(cited from ref.22)

さらに Shindo と Kimura (1984)は、屈折率の大きさが非常に接近しているためにそれまでは測定ができなかった (水-エタノール) および (水-2-プロパノール) の混合系での Lysozyme への preferential binding を密度の測定から求め、Timasheff 等の、(水-ClEtOH) の結果と比較した。²²⁾ その結果を Fig.1-1 に引用してある。これより明かなように ClEtOH と上の2種類のアシルアルコールの preferential binding 曲線は全く異なっており、ClEtOH において見られた正の preferential binding はアシルアルコールではまったく見られなかった。

以上の結果からは、ClEtOHとアシルアルコールでは変性の機構がまったく異なることが予想された。それまで、アシルアルコールによる変性ではアシル基の大きさにともなって変性能力が増加することから、アシル部分がタンパク質内部の疎水性領域を破壊するとして説明されてきた。実際、たとえば Lapanije⁶⁾ の本には ClEtOH による変性についてかなり多くのことが引用されているとすることができるが、ClEtOH はアルコールとして取り扱われることは当然としても、アシルアルコールと全く同じ仲間の化合物であり、したがってその変性の機構についても区別がされていない。Inoue と Timasheff の提出した ClEtOH の preferential binding の研究においても塩素はアシル部分の一部と見なされ、したがって変性の原因も本質的にはアシルアルコールの場合と変わらないものとされてきた。こ

の場合に一番の問題になるのは、ClEtOH の疎水性の大きさであるが、これについては De Ligny 等 (1975) がガスクロマトグラフィの方法を用いて、炭化水素であるヘキサデカンやオクタデカンへの溶解性を比較したデータがある。²³⁾ これによると、ClEtOH のこれらの溶媒への溶解性はエタノールよりは大きく、1-プロパノールよりは小さい。このような炭化水素への溶解性は疎水性と密接に関連していると考えられるから、これらのアルコールの疎水性もこの順におおきいといえることができる。しかし、ClEtOH の変性能力はエタノールはもちろん、1-プロパノールに比べてもはるかに大きい。したがって、この疎水性の大きさの比較という点からも ClEtOH の強い変性能力を疎水性部分のタンパク質との相互作用によって説明することはできない。

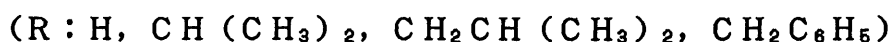
本研究は、上に述べてきたようなこれまでの疎水性部分の相互作用によっては説明できない ClEtOH の強いタンパク質変性の機構を明らかにすることを目標として始めた。そのために、ClEtOH 分子が持つ疎水性以外の特徴として、水酸基と塩素が持つ極性に注目して、これらの、アルキルアルコールには無い特徴が ClEtOH の持つ変性能力に寄与するかどうか、さらにはどのような機構をとおして寄与するかを明らかにすることを目的として開始した。そして最終的には、得られた結果を基礎にして水溶液中のタンパク質の構造安定化因子についての情報を得ることを期待した。

1. 3 本研究の実験的な構成と本論文の構成

上に述べてきた研究の目的を得るためにはまず、ClEtOH 分子の持つ特徴として、電子吸引性の原子である塩素が導入されたことによってもたらされる alcoholic hydroxyl 基 (以後 OH 基と略) の極性の大きさを見積ることが重要であると考えた。そしてこの ClEtOH の OH 基の持つ極性の大きさは具体的には水素結合性の強さとなって現れるので、N,N-dimethylacetamide との水素結合による分子間相互作用の強さを測定し、さらに先に述べたハロゲノアルコール、対応するアルキルアルコール、さらにはアルコキシアアルコール、アミノアルコールについても測定し、得

られた結果を比較した。この結果を第2章に述べる。

本研究ではタンパク質そのものを実験に用いることは結果の解析を複雑にするばかりで適当ではないと思われた。そのために、タンパク質の代わりに、タンパク質のモデル化合物として、N-acetyl-L-aminoacid-N',N'-dimethylamide,



で示される4種のペプチド化合物を用いた。そして、これらのペプチド化合物の分子間水素結合による会合がClEtOHによってどのように影響されるのか、また、どのような機構で影響されるのかを、四塩化炭素溶液と水溶液の両方において調べ、比較することを本研究における実験の主要な部分とした。そのためにはまず、これらのペプチド化合物の自己会合について調べる必要があり、第3章でこれについて述べる。

第四章では、第三章で調べたペプチド化合物の自己会合についての情報を基礎に、ペプチド化合物とClEtOHをはじめとする種々のアルコールとの四塩化炭素溶液中での相互作用について調べたことを述べる。この四塩化炭素溶液中での相互作用を調べることは、水溶液中での相互作用との比較という意味で、本研究では重要な実験であった。

第5章では水溶液中でのペプチド化合物の自己会合に対するアルコールの影響を調べ、相互作用の機構を明らかにする。そして、四塩化炭素溶液中ではClEtOHはペプチド化合物と直接に分子間で水素結合するのに対し、水溶液中においてはClEtOHと溶媒である水との相互作用がペプチド化合物の会合に影響を与えることを明らかにする。

第六章に本研究で得られた実験結果をまとめ、結論を述べる。そしてこれらがClEtOHによるタンパク質の変性とどのように関連付けることができるかについて述

べる。最後に、今後の課題を述べる。

REFERENCES

1. タンパク質 II 構造と機能編 京極好正、崎山文夫 編 1988年 東京化学同人.
2. Sela, M., White, F.H. Jr., and Anfinsen, C.B. (1957) *Science* 125, 691.
3. Pace, C.N. (1972) *CRC Crit.Rev. Biochem.*, 3, 1-43.
4. Kotelchuk, D., and Scheraga, H.A. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 1163-70. 62. 14-21.
5. Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.* 23, 122.
6. Lapanije, S. (1978) *Physico-Chemical Aspects of Protein Denaturation*, J. Wiley and Sons, New York.
7. ClEtOHによるタンパク質の変性に関する研究は以下に8-19の番号で示したもののほかに次のようなものがある。()の中は用いられたタンパク質を示す.
 - 1) Elodi, S. and Horn, P. (1961) *Comp. rend.* 250, 1646-8. (Ovalumin).
 - 2) Lokshina, L. A., Orekhovich, V. N. and Sklobovskaya, M. V. (1961) *Vysokomol. Soedin.* 3, 1474-81. (Pepsin, Pepsinogen).
 - 3) Brahm, J. and Kay, C. M. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 3499-54. (Myosin A)
 - 4) Gordon, J. and Jencks, W. P. (1963) *Biochemistry*, 2, 47-57. (Bovine serum albumin and Ovalbumin)
 - 5) Gaffield, W. Vitello, G. and Tomimatsu, Y. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 35-42. (Hen-egg conalbumin)
 - 6) Bhatnagar, G. M. and Crewther W. G. (1967) *Aust. J. Biol. Sci.*, 20,

- 827-36. (Keratin form wool)
- 7) Davies, R. C., Auld, D. S., and Vallee, B. L. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 628-33. (Carboxypeptidase A)
 - 8) Merzlov, V. P., Gurevich, V. M. (1969) *Vysokomol. Soedin., Ser. A* **11**, 2571-6. (Ovalbumin, Human globin)
 - 9) Merlov, V. P. (1971) *Bibl. Haematol (Basel)* **38**, 819-21. (Globin)
 - 10) Solli, N.J. and Herskovits, T.T. (1975) *Biopolymers*, **14**, 319-34. (Apomyoglobin)
 - 11) Byers, D. M. and Verpoorte, J.A. (1979) *Can. J. Biochem.*, **57**, 1153-8. (Human Glycophorin)
 - 12) Ebina, S., Kobayashi, T. and Nagai Y. (1979) *Experientia*, **35**, 1011-12. (Chymotrypsin)
 - 13) Toniolo, C., Claudio, B., Gian, M., Marchiori, F., Borin, G. and Filippi, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 429-39. (Clupeine)
 - 14) Ramesh, K. S., Anantanarayanan, V.S. and Rao, N. (1981) *J. Biosci.*, **3**, 167-78. (Serine hydroxymethyltransferase from monkey)
 - 15) Saito, H., Kameyama, M., Kodama, M. and Nagata, C. (1982) *J. Biochem., (Tokyo)* **92**, 233-41. (Histone H1)
 - 16) Surewicz, W. K., Moscarello, M. A., Mantsch, H. H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8598-602. (Lipophilin)
-
8. Frenkel, S. and Horn, P. (1960) *Comp. rend.*, **250**, 1646-8. (Ovalbumin)
 9. Hamaguchi, K. and Kurono, A. (1963) *J. Biochem., (Tokyo)* **54**, 497-505.
 10. Timascheff, S. N. and Inoue, H. (1968) *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1890.
 11. Timascheff, S. N. (1970) *Accts. Chem. Res.*, **3**, 62.
 12. Inoue, H. and Timascheff, S. N. (1972) *Biopolymers*, **11**, 737-43.
 13. Inoue, H. (1973) *Polymer*, **14**, 502-5.
 14. Maes, E. (1976) *Biopolymers*, **15**, 293-9.

15. Fereisen, C., Morcellet, M. and Loucheux, C. (1977) *Macromolecules*, 10, 485-8.
16. Fereisen, C., Morcelloet, M., and Loucheux, C. (1978) *Macromolecules*, 11, 620-2.
17. Morcellet, M. and Loucheux, C. (1980) *Biopolymers*, 19, 2177-90.
18. Aminabhavi, T.M., Patel, R.C. and Prasad, B.R. (1982) *Curr. Sci.*, 510, 340-4.
19. Shindo, Y., Kaido, H. and Tsurusaki, T. (1974) 25th Meeting for Protein Structures, 61-64.
20. Ebina, S., Suzuki, M., Naitoh, I., Yamauchi, K. and Nagai, Y. (1982) *Int. J. Biochem.*, (Tokyo) 92, 233-41.
21. White, F.H. Jr. and Wright, A. G. Jr. (1984) *Int. J. Pept. Protein Res.*, 23, 256-70.
22. Shindo, Y. and Kimura, K. (1984) *J. Chem. Soc., Faraday Trans I.* 89, 2199-2207.
23. De Ligny, C. L., Koole, N. J, Nelson, H. D. and Nieuwdorp, G. H. E. (1975) *J. Chromatogr.*, 114, 63.

種々の 2-置換エタノールの

水素結合性の比較

2. 1 序 論

1章で述べてきたように、ClEtOH の疎水性は ethanol (EtOH) よりは大きいが 1-propanol に比べて小さい。したがって、ClEtOH の示す 1-propanol にくらべてもはるかに強いタンパク質変性能力は、EtOH に塩素が導入されたことによってもたらされると考えなければならない。電子吸引性の塩素で置換されたことによって ClEtOH は EtOH に比べて分子がより強く分極し、その結果 EtOH ではほとんど問題にならないと思われる水素結合を形成するプロトドナーとしての能力を持つようになるであろう。そしてこのような水素結合の形成能力は ClEtOH にたいしてタンパク質との相互作用において EtOH とはまったく異なる挙動を可能にすると予想される。

このような推論にもとづいて ClEtOH によるタンパク質のヘリックス形成のおおまかな過程として、著者らが最初に予想したのは、ClEtOH の増加にともなってタンパク質のペプチドカルボニルに ClEtOH が水素結合した、いわばヘリックス状態への中間体の存在であった。そして ClEtOH がある濃度にまで達し、ペプチドカルボニルとの水素結合が最大になったのち、ClEtOH はタンパク質との水素結合を解離し始め、その結果として自由になったタンパク質のペプチド基どうしが水素結合することによってヘリックスを形成する過程を考えた。

このような仮説についての議論を進めるためには、ClEtOH をはじめとするハロゲンアルコール、対応するアルキルアルコール、さらには一章で述べたようにタンパク質の変性能力を ORD の測定から比較したアルコキシアアルコール、アミノアル

コールをも含めたアルコールのプロトンドナーとしての水素結合性を定量的に比較することがまず第一に必要であると考えた。このための実験として、共通のプロトンアクセプターとそれぞれのアルコールとの水素結合の形成によって観測されるO-H伸縮振動の波数シフトと水素結合形成の平衡定数を比較することにした。

アルコールのOH基と水素結合できるタンパク質のプロトンアクセプター基としてはまず第一にペプチドカルボニル基が予想できることから、用いるプロトンアクセプター分子としてはタンパク質のペプチドカルボニルにできるだけ似たカルボニル基を含む化合物が適当であると思われた。しかし、ペプチド化合物や第一および第二アミドのNH基はOH基と同じ波数領域に伸縮振動を持つことからOH基の伸縮バンドと重なり、正確なスペクトルの解析は期待できない。そのため本実験ではこれらの化合物を共通のプロトンアクセプターとして使うことをあきらめ、第三アミドのN-カルボニル基を含むN,N-dimethylacetamideを選んだ。

2. 2 実 験

2. 2. 1 試薬と精製、脱水および測定試料の調整法

アルキルアルコールとして、methanol, EtOH, 1-propanol, 1-butanol (いずれも和光純薬, 試薬特級)、ハロゲンアルコールとして、ClEtOH (和光、特級)、2-bromoethanol, 3-chloro-1-propanol (和光、一級)、アルコキシアルコールとして 2-methoxyethanol, 2-ethoxyethanol, 2-n-propyloxyethanol, 3-methoxy-1-propanol, アミノアルコールとして 2-dimethylaminoethanol, 2-diethylaminoethanol, 3-dimethylamino-1-propanol (いずれも和光一級) を、さらにN,N-dimethylacetamide(DMA) (和光特級)、溶媒に四塩化炭素(和光赤外スペクトル用)を用いた。

アルコールとDMAはいずれも強い吸湿性を持ち、四塩化炭素もまたかなりの濃度で水を溶解することができる。試料溶液中の水による 3600 cm^{-1} 付近の吸収はアルコールのOH基による吸収の定量的な測定を妨げるので、ていねいな脱水が本実験では不可欠であった。そのために、脱水と蒸留による試薬の精製、さらには測

定試料の調整をグリースレスコック付きの真空ライン中でおこなった。脱水剤としては、アルコールに $MgSO_4$ 、DMA に BaO 、四塩化炭素に P_2O_5 を用いた。測定用試料溶液の水分は 10^{-6} mol/l 以下であった。アルコールは四塩化炭素溶液中では非常に自己会合しやすく、ほぼ 1×10^{-2} mol/l 以上の濃度になると会合し始める。この条件下では、アルコール-アルコール間で水素結合した OH バンドがアルコール-DMA 間で水素結合したバンドと重なるために、目的とする正確な波数シフトや平衡定数は得られない。したがって、アルコールの濃度は自己会合の起きない濃度であるところの 1×10^{-2} mol/l 以下とした。また、アルコールに比べて DMA の濃度が相対的にはほぼ 2 倍以上大きくないと、アルコール：DMA が 2：1 の水素結合体が形成されはじめることが予備実験でわかったので、アルコール：DMA が 1：1 での水素結合が保証されるように DMA の濃度を十分に高くした。2：1 の水素結合形成については 4 章で述べる。

2. 2. 2 赤外吸収スペクトルの測定

赤外吸収スペクトルの測定は、日本分光社製 A-3 型を使用した。波数の補正を indene, polystyrene film の測定から行った。測定用セルには光路長が 20 mm の IR 用石英製枝つき太鼓型を使用した。測定波長範囲は $4000-2800 \text{ cm}^{-1}$ であった。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 アルコールと DMA との水素結合による $\Delta\nu_{OH}$ の測定

EtOH-DMA、ClEtOH-DMA を含む試料溶液の赤外吸収スペクトルを Fig.2-1 に示す。EtOH の 3638 cm^{-1} の吸収は、水素結合していないフリーのモノマーアルコールの O-H 伸縮振動によるものであり、ピークの波数を ν_{free} とする。ClEtOH では trans と gauche の回転異性体があり、trans 体の OH 基はフリーで 3631 cm^{-1} にショルダーとして現れている。ClEtOH の 3603 cm^{-1} における吸収は分子内水素結合している gauche 体によるもので^{1,2)}、ピークの波数を ν_{intra} とする。吸収バンドの相対的な面積の比較から、分子内水素結合している gauche 体の

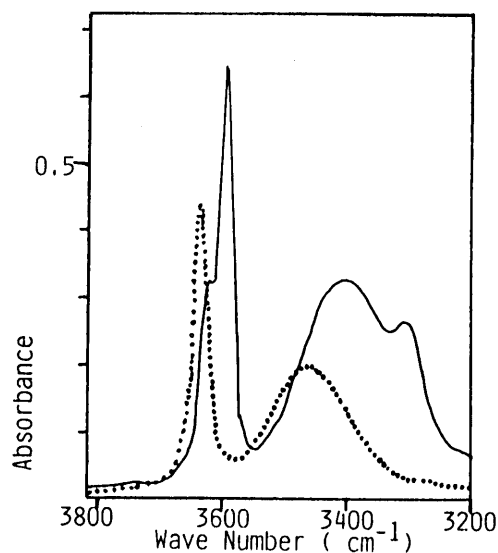
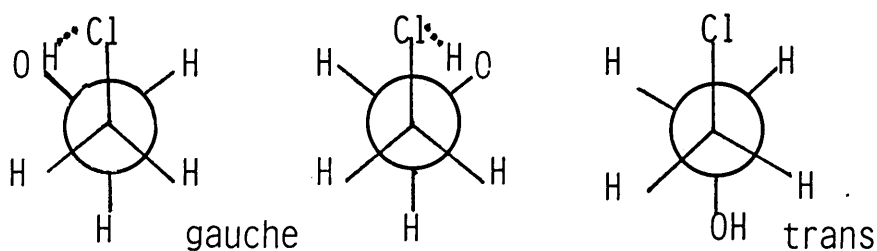


Fig.2-1 Infrared spectra of O-H bands. (—) $[\text{ClEtOH}] = 6.40 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{DMA}] = 1.67 \times 10^{-2} \text{ M}$, (···) $[\text{EtOH}] = 4.50 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{DMA}] = 2.35 \times 10^{-2} \text{ M}$.



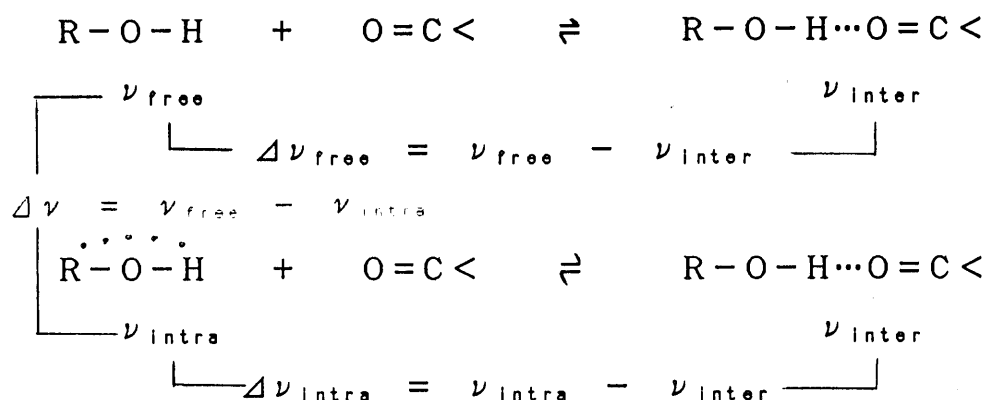
方がフリーの trans 異性体にくらべてより多く存在することがわかる。EtOH の 3450 cm^{-1} 、ClEtOH の 3400 cm^{-1} 付近のブロードバンドは DMA と分子間水素結合している OH による伸縮振動であり、ピークの波数を ν_{inter} であらわす。 3250 cm^{-1} 付近のショルダーは DMA の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動の倍音による吸収である。

測定した 15 種類のアルコールの ν_{free} , ν_{intra} , ν_{inter} , $\Delta\nu_{\text{free}} = (\nu_{\text{free}} - \nu_{\text{inter}})$, $\Delta\nu_{\text{intra}} = (\nu_{\text{intra}} - \nu_{\text{inter}})$ を Table.2-1 にまとめた。3 種のアミノアルコールでは分子内水素結合による OH バンドがブロードで非常に低波数にまでひろがって、DMA との分子間水素結合しているバンドと重なるために ν_{inter} を測定できなかった。

Table. 2-1 Spectral properties (cm^{-1}) of OH bands of alcohols and equilibrium constants ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$) in alcohol+DMA solutions in carbon tetrachloride at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ *

no.	alcohol	ν_{free}	ν_{intra}	$\Delta\nu$	ν_{inter}	$\Delta\nu_{\text{free}}$	$\Delta\nu_{\text{intra}}$	K
1	$\text{CH}_3\text{-OH}$	3646	—	—	3459	187	—	7.7 ± 0.5
2	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	3638	—	—	3461	177	—	3.6 ± 0.4
3	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3638	—	—	3465	173	—	3.2 ± 0.8
4	$\text{CH}_3\text{-C(CH}_3)_2\text{-OH}$	3612	—	—	3448	164	—	2.2 ± 0.8
5	$\text{Cl-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3631	3603	28	3407	224	196	10.9 ± 0.4
6	$\text{Br-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3632	3597	35	3410	222	187	10.2 ± 0.4
7	$\text{Cl-(CH}_2)_3\text{-OH}$	3645	—	—	3448	197	—	9.6 ± 0.4
8	$\text{Cl-CH}_2\text{-CH(CH}_3)\text{-OH}$	3634	3600	34	3419	215	181	8.6 ± 0.5
9	$\text{CH}_3\text{O-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3645	3610	35	3443	202	167	2.0 ± 0.8
10	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3644	3610	34	3442	202	168	1.9 ± 0.7
11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3638	3610	28	3455	183	155	1.2 ± 0.7
12	$\text{CH}_3\text{O-(CH}_2)_3\text{-OH}$	3648	3543	105	3460	188	83	—
13	$(\text{CH}_3)_2\text{N(CH}_2)_2\text{-OH}^c$	3642	3506	136	(3440)	(199)	(63)	—
14	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N-(CH}_2)_2\text{-OH}$	3640	3480	160	—	—	—	—
15	$(\text{CH}_3)_2\text{N-(CH}_2)_3\text{-OH}$	3646	3318	326	—	—	—	—

*



フリーのアルコールが DMA と水素結合するときのOH伸縮振動の波数のシフトである $\Delta\nu_{\text{free}}$ の大きさと置換基の電子吸引性とのあいだの関係を調べるために、電子吸引性をあらわすパラメーターとして Taft の極性置換基定数 σ_1 を用い³⁾、2-置換エタノールについて得られた $\Delta\nu_{\text{free}}$ の値を σ_1 に対してプロットしてみた。得られた結果は Fig.2-2 のようであった。すなわちこの両者のあいだにはよい直線関係が得られ、このことから、これらのアルコールはそれぞれの置換基の持つ電子吸引性に対応するプロトドナーとしての性質を持つことが明らかになった。

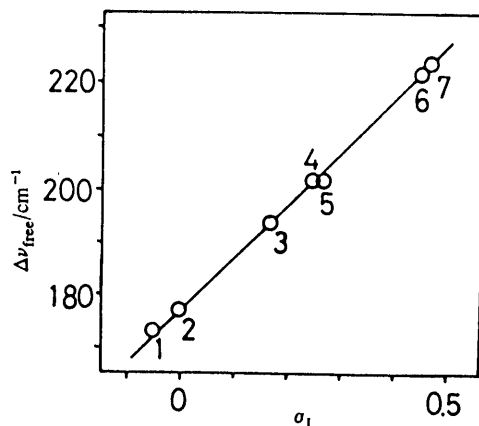
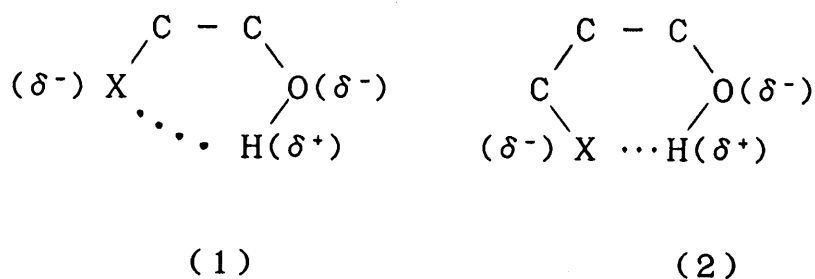


Fig.2-2 Plots of $\Delta\nu_{free}$ vs. ρ_1 for $X-CH_2CH_2OH$; X are (1)CH₃, (2)H, (3)CH₂Cl, (4)CH₃O, (5)C₂H₅O, (6)Cl, and (7)Br.

ここでアルキルアルコールを除くアルコールの分子内水素結合について述べておきたい。Table.1 に示してある分子内水素結合形成によって生じる波数のシフト、 $\Delta\nu = (\nu_{free} - \nu_{intra})$ の大きさを比較して注目されることは、アミノアルコールの $\Delta\nu$ がハロゲノアルコールやアルコキシアルコールに比べて非常に大きいことである。これは次のようにして説明することができる。すなわち、下図に示した 2-置換エタノール (1) および 3-置換プロパノール (2) において、

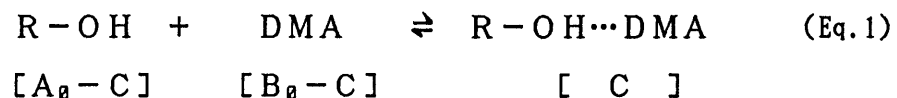


分子内水素結合の強さを支配する要素を考えると、1) Xの電子吸引性の大きさに依存するHの δ^+ の大きさ、2) XのHへの電子供与性の強さ、3) OおよびXの電気陰性度の差に依存する $O(\delta^-)-H\cdots X(\delta^+)$ で示される極性構造の安定性、4) $O-H\cdots X$ の幾何学的な直線性の増大、の4つが挙げられる。⁴⁾ 2-置換ハロゲノエタノールとアルコキシエタノールでは1、2、3、4による寄与に大きな

差が無いために、 $\Delta\nu$ の値にも大きな違いは見いだせない。しかし、アミノアルコールについては3の要素の寄与によって、すなわち、NにくらべてOの電気陰性度が大きいことから生じる $O(\delta^-)-H\cdots N(\delta^+)$ の安定な分極構造の寄与によって分子内水素結合は非常に強くなり、従って $\Delta\nu$ も飛躍的におおきくなっている。また(2)の構造を持つアルコキシプロパノール、アミノプロパノールではアルコキシエタノール、アミノエタノールに比べて分子内水素結合の強さがそれぞれ2倍から3倍の大きさになっている。これは4)の効果が大きく寄与しているためと考えることができる。

2. 3. 2 アルコールとDMAとの水素結合形成の平衡定数の測定

つぎにアルコールとDMAとの間の水素結合形成の平衡定数を求めた実験結果について述べる。



において、平衡定数 K は

$$K = [C] / \{ [A_0 - C] [B_0 - C] \} \quad \text{(Eq. 2)}$$

で表すことができる。ここで A_0 , B_0 はそれぞれ混合前のアルコール、DMAの全濃度、 C は水素結合体の濃度である。実験はアルコールの全濃度 A_0 を一定に保って、DMAを増加させながら、DMAと分子間水素結合していないモノマーのアルコールによるOHバンドの吸光度を測定した。この場合、吸光度を測定する波数にまで水素結合しているOHバンドの端の部分が広がってモノマーのバンドと重ならないことが必要条件であるが、観測されたスペクトルはいずれもこのような重なりは無かった。DMAと混合する前後の吸光度をそれぞれ D_0 , D とし、吸光係数を ε とすると、光路長は20mmなので、混合前後のアルコールモノマーの濃度 A_0

および A は,

$$A_0 = D_0 / 2 \epsilon \quad , \quad A = D / 2 \epsilon$$

となり

$$C = A_0 - A = (D_0 - D) / 2 \epsilon$$

これらを K に代入すると、

$$K = (D_0 - D) / [D \{B_0 - (D_0 - D) / 2 \epsilon\}] \quad (\text{Eq.3})$$

となる。

モノマーのOHバンドの吸光度と ϵ についてであるが、アルキルアルコールの場合は ν_{free} での吸光度を測定すればよいが、分子内水素結合をするアルコールについては次のようにして実験を進めた。すなわち、C1EtOH と 2-bromoethanol、1-chloro-2-propanol および 3種の 2-アルコキシエタノールではいずれも、分子内水素結合をしていて ν_{intra} をピークの波数に持つOHバンドにフリーのOHバンドがショルダーとなって重なって現れる。したがって ν_{intra} での吸光度を用いてモノマーの全濃度を定量することをめざして、このことが可能かどうかを調べるために ν_{intra} での吸光度をアルコールの全濃度に対してプロットし、検量線を作ってみた。結果はいずれのアルコールについてもいい直線性が得られた。このことより、測定した濃度範囲内で分子内水素結合の平衡がほとんどずれないと考えてよい。このようにして、 ν_{intra} の吸光度よりモノマーの全濃度を決定することが可能であることがわかったので、これらのアルコールについては上の式の ϵ は ν_{intra} での値である。

それぞれのアルコールについて6から7組ずつの B_0 と D から得られた K の値の平均値を Table.2-1 に示してある。

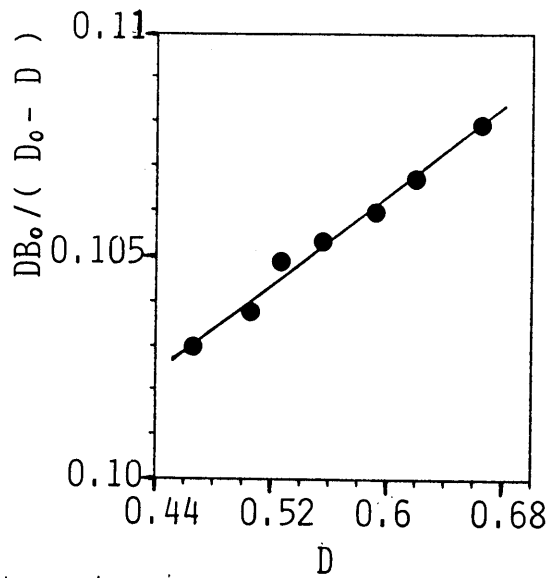


Fig.2-3 An example of the plots of (Eq.4) for the data of ClEtOH.

(Eq.3)を書きかえると、

$$DB_0 / (D_0 - D) = D / 2\varepsilon + 1/K \quad (\text{Eq.4})$$

となり、左辺を D についてプロットして得られる直線の切片から K を求めることも試みた。ClEtOH についてのプロットの例を Fig.2-3 に示す。これから得られる K の値は測定から得られた ε を用いて (Eq.3) より計算した K の値の平均値とよい一致を示した。

DMA との分子間水素結合におけるアルコールの OH のプロトンドナーとしての強さを表すパラメータとして先に求めた $\Delta \nu_{\text{r.o.}}$ は、水素結合の結合エネルギーの大きさと関係づけられる量であると言うことができる。これにたいしてここで求めた K の値は $\Delta G = -RT \ln K$ の式によって水素結合エネルギーの項と、さらに分子間水素結合を形成する際のエントロピーの減少の項をふくむ量である。エントロピーの項をアルコールの種類によらない量であると仮定した場合にはした

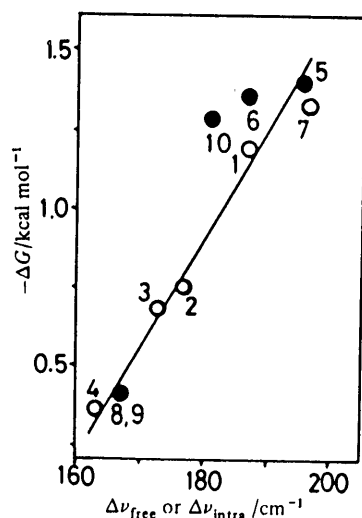


Fig.2-4 Plots of $-\Delta G=RT\ln K$ vs $\Delta\nu_{\text{free}}$ (○) or $\Delta\nu_{\text{intra}}$ (●) for the complex formation between DMA and alcohol ; (1)CH₃OH, (2)C₂H₅OH, (3)CH₃(CH₂)₂OH, (4)CH₃C(CH₃)(OH)CH₃, (5)Cl(CH₂)₂OH, (6)Br(CH₂)₂OH, (7)Cl(CH₂)₃OH, (8)CH₃O(CH₂)₂OH, (9)C₂H₅O(CH₂)₂OH, (10)ClCH₂CH(OH)CH₃.

がって、波数のシフト $\Delta\nu_{\text{free}}$ と ΔG のあいだには比例的な関係があるはずであるから、この両者をプロットしてみるとFig.2-4 が得られた。(○)で示したアルキルアルコールについては確かに直線関係が得られた。したがって得られた直線性から逆に、エントロピーがアルコールの種類によらないとした仮定は妥当であるといえることができる。しかし、その他の分子内水素結合が可能な置換アルコールについてはこの直線上にはまったくのりなかつた。そのためにこれらの置換アルコールについては $\Delta\nu_{\text{free}}$ のかわりに $\Delta\nu_{\text{intra}}$ を用いてプロットしたところ Fig.2-4 に (●) で示したような関係が得られた。すなわち、アルキルアルコールのつくる直線に近くプロットされたことから、これらの置換アルコールでは $\Delta\nu_{\text{free}}$ のかわりに $\Delta\nu_{\text{intra}}$ をプロトンドナーとしての強さのパラメータとして用いることができることが明らかになった。この理由として次の2つが考えられる。すなわち、 $\Delta\nu_{\text{intra}}$ を用いることによって、分子内水素結合エネルギーを分子間水素結合エネルギーから差し引くことになること、分子内水素結合しているモノマーの分率はいずれのアルコールにおいても 0.8 程度で⁵⁾ 大きいことである。従って、これらのアルコールでは分子内水素結合していないフリーのアルコールと

DMA との水素結合を実質的には無視することができることになる。

以上のようにして得られた結果から、アルコールの水素結合性と変性剤としての強さの関係について考えてみたい。まずアルキルアルコールについてであるが、アルキルアルコールではアルキル部分が大きくなるにつれて水素結合性は小さくなる。アルキルアルコールのタンパク質変性能力はこれとは逆に大きくなることから、したがって、アルキルアルコールにおいては変性はアルコールの水素結合性に依存しない機構で起きているということが本実験からも確かめられたことになる。つぎにハロゲンアルコール、アルコキシアルコール、アミノアルコールについてであるが、強い変性能力を持つハロゲンアルコールでは DMA との分子間水素結合性が大きい。アルコキシエタノール $R_1O-CH_2CH_2OH$ においては水素結合性はハロゲンアルコールに比べてはるかに小さく変性能力も小さい。さらに注目されるべきことは、 R_1 が大きくなるにつれて変性能力はわずかずつではあるが大きくなったのに対して、水素結合性は逆にわずかずつではあるが小さくなっていることである。これは、 R_1 部分の電子押し出し効果のために R_1 が大きくなるにつれてアルコキシ酸素の電子供与性が増し、その結果分子内水素結合がより強くなって最終的には OH 基の分子間水素結合におけるプロトドナーとしての強さが小さくなるためである。ほぼ同じことがアミノアルコールについても言える。すなわち、アミノ基のアルキル部分の大きさと変性能力のあいだには関係がみられたが、アミノアルキル部分が大きくなるにつれて、もはや DMA と分子間水素結合が起きないほどにアミノアルコールの分子内水素結合は強くなる。これらのことから、アルコキシアルコール、アミノアルコールの変性機構は $ClEtOH$ などのハロゲンアルコールとは異なっているものと考えられる。いっぽうハロゲンアルコールでは、ハロゲンを導入したことによって生じる強いプロトドナーとしての性質が変性に関係があるのではないかと予想することが可能である。すくなくとも、 $EtOH$ などのアルキルアルコールには見られない分子の分極が変性能力が大きいことに関係しているものと考えられる。

REFERENCES

1. Mizushima, S., Shimanouchi, T., Miyazawa, T., Abe, K. and Yasumi, M.
(1951) *J. Chem. Phys.*, 19, 1477.
2. Kruger, P. J. and Mettee, H. D.(1964) *Can. J. Chem.*, 42, 326-339.
3. Taft, R. W. Jr. in *Steric Effects in Organic Chemistry* ed. by M. S. Newman, Chap. 13, Wiley, New York, 1956.
4. Freedman, H. H.(1961) *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2401.
5. Toshiyasu, Y.(1973) *Nippon Kagaku Kaishi*, 429, 434.

タンパク質モデル化合物の

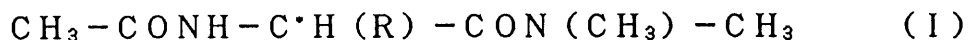
四塩化炭素溶液中と水溶液中での

自己会合

3.1 序 論

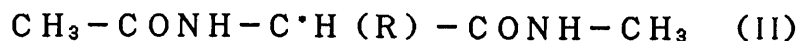
前章では ClEtOH をはじめとするハロゲンアルコールがプロトドナーとしての強い水素結合性を持つことを示してきた。本章ではタンパク質中のアミノ酸残基のモデルとなる分子として4種のペプチド化合物を合成し、四塩化炭素溶液中および水溶液中での自己会合について調べたことを述べる。この自己会合についての実験は、4章と5章で述べるこれらの化合物とアルコールとの分子間相互作用を調べるための準備として、不可欠であった。

タンパク質のモデルになる化合物として、多くの研究者によって様々の大きさのペプチド化合物が実験の目的に応じて使い分けられてきたといえることができる。タンパク質により近いという意味では、含まれるアミノ酸の種類がより多く、分子がより大きいほうがよいが、実験の容易さという観点からは逆に、より単純でより小さいことが望ましい。本研究の目的にあったタンパク質のモデル化合物としてどのようなものを選ぶかは、このような意味からかなり重要な問題であった。本研究では、モデル化合物の持つべき最低の条件として完全なアミノ酸残基を1個ふくむこととし、



で表される四種の $\text{N-Acetyl-L-aminoacid N',N'-dimethylamide}$ を選んだ。これは完全なアミノ酸残基とペプチド結合を1組づつ含んでいる。完全なペプチド結合を

2個含んでいるつぎの構造



で表される化合物は (I) に比べてタンパク質中のアミノ酸残基の分子構造により近いという点では本研究においてより望ましい構造であるが、2個のNH基の存在は実験結果の解析を複雑で困難なものにすると予想された。アミノ酸残基の種類については上記の4種を選んだ。この理由として、側鎖に水素結合性の基を含む場合は結果の解析が複雑になることと、これらの疎水性側鎖を持つアミノ酸残基は α -ヘリックスや β -構造のようなタンパク質のペプチド基のあいだに水素結合を形成する二次構造を形成しやすい残基として知られており¹⁾、したがって、ClEtOH によるタンパク質のヘリックス形成の機構をさぐる実験のためには適当であると思われるからである。アラニン残基を含む (I) については合成に成功できなかった。

本章の実験の目的は次のようである。

- 1) (I) の溶液にアルコールを加えることによって、どのような相互作用が起きるか、すなわち、(I) とアルコールとの分子間水素結合が形成されるのか、あるいは逆に、アルコールを加えると (I) の自己会合がより進むのかなどについて調べるためには、アルコールを含まないときの (I) の会合状態について調べる必要があるであり、これを行う。
- 2) 溶媒として、四塩化炭素と水を用い、溶媒の違いによる会合状態の違いを調べる。得られる結果から、水溶液中のタンパク質の立体構造の安定化に対する疎水性側鎖の寄与についての情報を得ることを期待した。

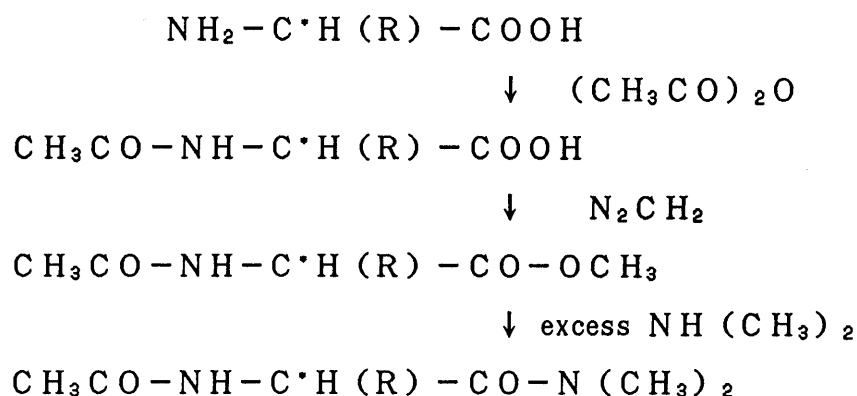
実験の結果は次の2つに分けて述べる。

- 1) 赤外分光法、 ^1H n m r 法による、四塩化炭素溶液中で形成される (I) のダイマーの構造決定とその会合定数の測定
- 2) ^1H および ^{13}C F T n m r 法による水溶液中での会合体の構造の推定

3. 2 実 験

3. 2. 1 タンパク質モデル化合物の合成

N-Acetylglycine N',N'-dimethylamide (AGDA), N-Acetyl-L-valine N',N'-dimethylamide (AVDA), N-Acetyl-L-leucine N',N'-dimethylamide (ALDA), N-Acetyl-L-phenylalanine N',N'-dimethylamide (APDA) の合成は Applewhite 等の方法に従い²⁾、次に示す順序で行った。



反応の進行をそれぞれの段階ごとに $^1\text{Hnmr}$ の測定で確認した。ALDA 以外の試料は酢酸エチルとエチルエーテル (1:10 の容量比) で数回再結晶し、ALDA は液体なので真空ライン中で 120°C 、 10^{-2} mmHg の条件で3回蒸留して精製した。TLC と GC の測定から純度を確認した。融点と比旋光度を Table.3-1 に示す。

3. 2. 2 測定試料の調製と測定の方法および装置について

1) 四塩化炭素溶液については

a) 4種のペプチドの濃度を 10^{-4} - 10^{-1} mol/l の範囲で 変化させながら NH 基の伸縮振動による赤外吸収スペクトルを $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で、日本分光製 A-3 型赤外分光光度計を用いて測定した。四塩化炭素には赤外吸収用 (和光) を用い、脱水剤として少量の五酸化リンを加えて真空ライン中でかくはんしたのちに試料用のアンプルに真空蒸留した。試料溶液中の水分は 10^{-6} mol/l 以下であった。測定用セル

は光路長 2 mm、および 10 mm の赤外用石英製の枝つきたいこ型で、試料用アンブルにガラス細工で接続したものをを用いた。

b) ALDA を除く 3 種のペプチドの濃度を 10^{-2} - 10^{-1} mol/l の範囲で変化させながら、20 - 50 °C の温度範囲で ^1H nmr を測定した。測定には日本電子社製 4H-100 型を使用し、TMS を内部基準に用いた。

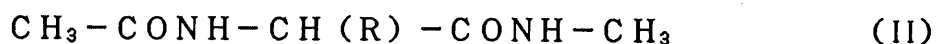
2) 水溶液については、

AGDA を除く 3 種のペプチドの (水-重水) の混合溶媒溶液中での濃度を 10^{-2} - 1 mol/l の範囲で変化させながら、日本電子社製 GX-270 型 FTnmr 測定装置を用いて ^1H および ^{13}C の nmr を測定した。重水は 99.8 atom% (Aldrich) をそのまま用いた。水はイオン交換水をパイレックスガラス製の多段式蒸留装置で蒸留して用いた。ケミカルシフトは Trimethylsilylpropanesulphonate (TMP) を内部基準として決定した。さらにプロトンのスピン-格子緩和時間 T_1 を通常の $(180^\circ - t - 90^\circ - T)_n$ インヴァージョンリカヴァリー法で測定した。核オーバーハウザー効果の測定も行った。

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 四塩化炭素溶液中のペプチド会合体の構造と会合定数の決定

5×10^{-4} mol/l 以下の濃度で 4 種のペプチドはいずれも 3500 - 3400 cm^{-1} の波数領域で鋭い吸収バンドを示す。Neel 等³⁾ は (I) で表されるこれらのペプチドの NH バンドを (II) (III) で示されるペプチドのバンドと比較した。



その結果、(I) のペプチドは溶液中で分子軸が伸びたコンフォメーションをとること、R が小さいペプチドでは観測される NH バンドは分子内で 5 員環を形成して

非常に弱く水素結合しているNH基によるものであることを結論し、これをC₅で表示した。このように分子内で水素結合をしているコンフォメーションが Fig.3-2 に示してある。AGDA で観測されるNH基はこの C₅ に帰属されてきた。これに加えてさらに Neel 等は、R基の大きい(I)では C₅ よりも高い波数にショルダーが現れ、これは分子内水素結合していないフリーの NH による伸縮振動に帰属されることを報告した。後者は L' で表示された。そして APDA で観測されるNH基は鋭いひとつの吸収のみであるがこの L' に帰属されてきた。著者等が測定したところ、ALDA ではこのように高波数側にショルダーが観測されたが、AVDA においてはより高波数の吸収 L' が主ピークで C₅ の方がショルダーとなって観測された。観測した波数を Table.3-1 に示してある。

ペの濃度が 10⁻⁴ mol/l のあいだは、これらの C₅ または L' による吸収極大の吸光度は濃度の増加とともに直線的に増加し、したがって分子間の会合は観測されなかった。この時の吸光係数を ε_m として Table.3-1 に示す。濃度をこれよりさらに高くすると、3300 cm⁻¹ 付近に吸収極大を持つブロードバンドが現れはじめ、同時に C₅ または L' の吸光度の直線性は当然のことながら失われる。したがって、低波数のブロードバンドは会合体を形成しているペプチドの NH 伸縮振動によるバンドであると帰属できる。Fig.3-1 にはこのような濃度での吸収スペクトルが示してある。会合が始まる前後のモノマーのバンドの形に、変化はまったく現れなかった。

Table.3-1 Summary of the physical and IR spectroscopic data of the four peptides.

Peptide	m.p. (°C)	[α] (in ethanol) (degree, Temp., C)	C ₅ (cm ⁻¹)	L' (cm ⁻¹)	D (cm ⁻¹)	Δν _{NH} (cm ⁻¹)	ε _m (l/molcm)	K (dm ³ mol ⁻¹)
AGDA	49		3415		3326	89	162 (163)	3.4
APDA	99	+34.1 (25 °C, 1.099)		3425	3305	120	123 (123)	11.0
AVDA	119	-2.27 (20 °C, 0.967)	3415 (shoulder)	3431	3298	117, 133	92 (91)	22.4
ALDA	30	-26.6 (25 °C, 1.055)	3421	3436 (shoulder)	3301	120, 135	79 (79)	22.1

アルコールの四塩化炭素溶液においてアルコール濃度を増加していくと、アルコールの会合体によるブロードバンドは濃度の増加にともなって低波数側へとひろがっていく。これはアルコールの会合体の構造がダイマーからオリゴマーへと大きくなっていき、これにともなう水素結合の協調 (co-operative) 効果によるものとされてきた。そして同様のことが N-methylformamide, N-methylacetamide などのアミド化合物の会合についても観測されてきた⁴⁾。しかしながら、本研究で用いた4種のペプチドは 10^{-3} - 10^{-1} mol/l の測定範囲においては会合体によるNHバンドの吸収極大の波数は一定で、したがって観測した濃度領域ではダイマーの形成のみが起きているものと考えることができた。ダイマーのNHバンドの吸収極大の波数を D で表示し、Table.3-1 に C₅, L' とともにリストする。Table.3-1 の

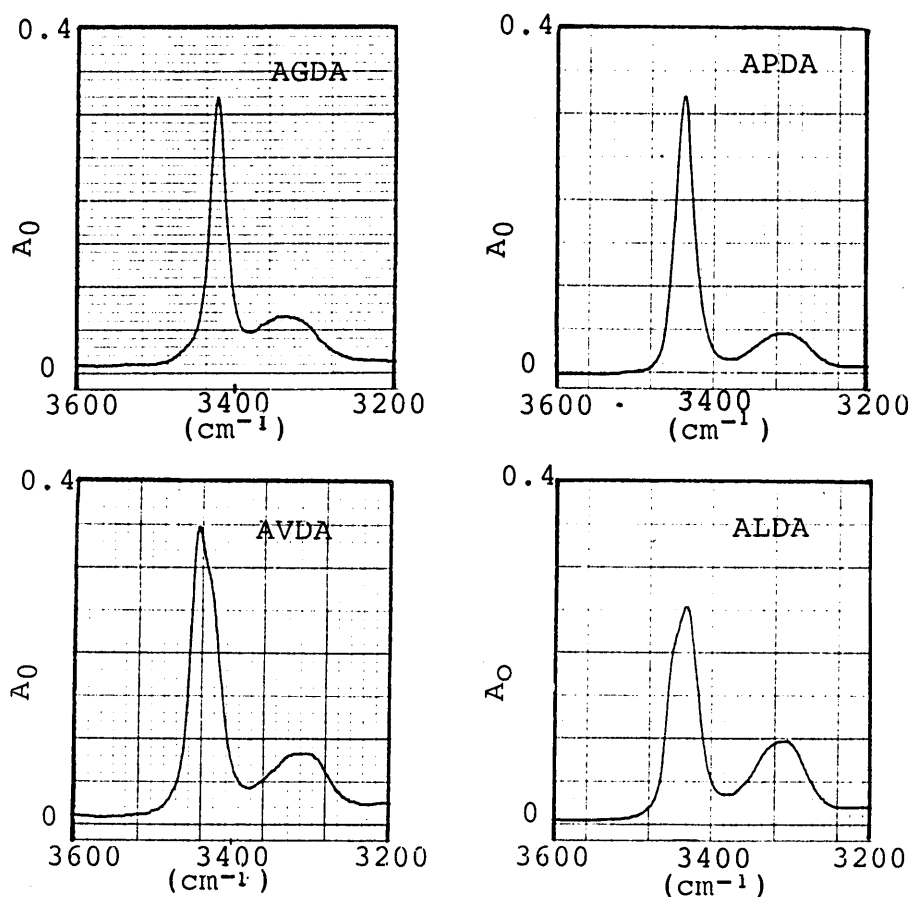


Fig.3-1 IR absorption spectra of the peptides in CCl₄ solutions measured with 10 mm cells. [AGDA] = 4.55×10^{-2} M, [APDA] = 3.02×10^{-3} M, [AVDA] = 2.30×10^{-3} M, [ALDA] = 3.40×10^{-3} M.

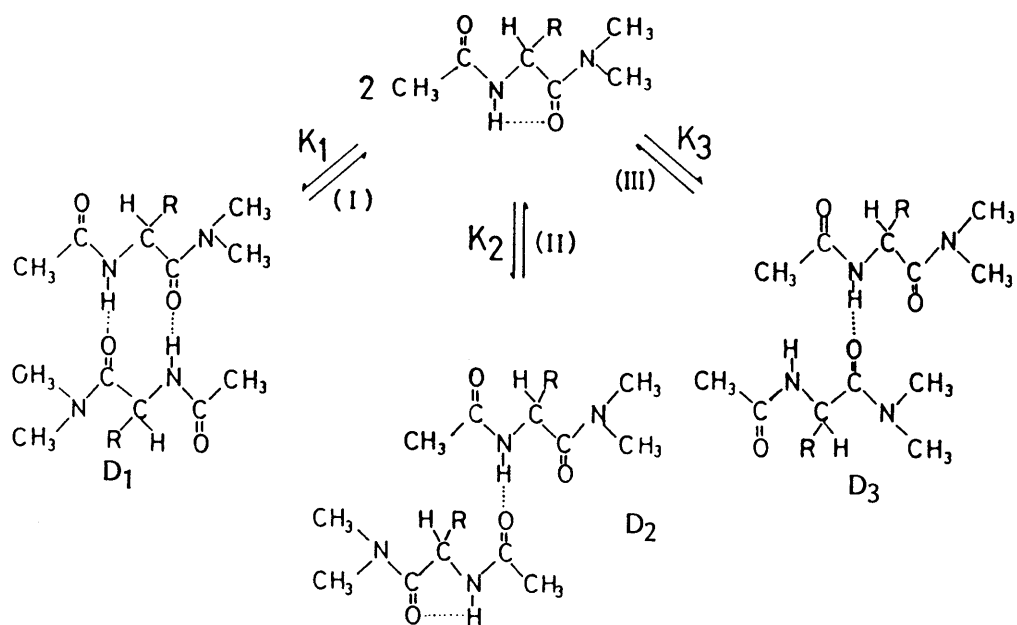


Fig.3-2 Three possible dimer species and equilibria for the self-association of the peptides in CCl_4 solutions.

$\Delta\nu_{\text{NH}} = \text{C}_5$ (または L') - D はダイマー形成にともなう波数シフトを示す。

(I) のタイプのペプチド2分子からできる会合体の構造として Fig.3-2 に示した3種が予想できる。これをそれぞれ、 D_1 、 D_2 、 D_3 としてどれが形成されているのかを以下のようにして調べた。

はじめにそれぞれのペプチドの濃度を増加させ、 $^1\text{H nmr}$ の測定から得たケミカルシフトの変化について述べる。濃度に対応するケミカルシフトの値を Fig.3-3 に示してある。まずNHプロトンであるが、いずれのペプチドにおいても濃度の増加とともに大きく低磁場シフトし、分子間水素結合が起きていることが確認できる。そしてその NH の水素結合の相手についてであるが、 CH_3CO メチルのプロトンは全く低磁場シフトをしないことから、 CH_3CO カルボニルは NH プロトンのアクセプターではないことがわかる。したがって D_2 の構造を持つダイマーは形成されていないことが明らかである。いっぽう、 $>\text{NC=O}$ カルボニルについてで

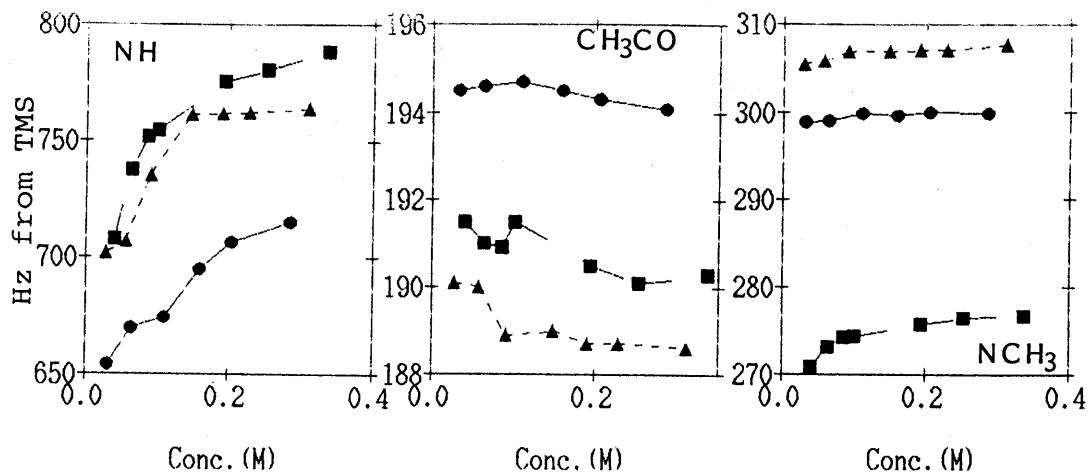


Fig.3-3 Plots of proton chemical shifts of the peptides, Hz from the internal TMS measured at 100MHz, vs. the concentration. ; (●) AGDA, (■) APDA, (▲)AVDA.

あるが、2個の N-メチルプロトン は N-C O 結合軸のまわりの回転が不完全であるために2本になってあらわれる。この2個の N-メチルプロトンの中点のケミカルシフト、NCH₃、はわずかづつではあるが濃度の増加にともなって低磁場シフトし、NHプロトンのアクセプターになっていることがわかる。また、C α HプロトンとNHプロトンとのカップリング定数は濃度の増加に対してもほとんど変化しなかったのので、ダイマーを形成しているペプチドのコンフォメーションはモノマーのコンフォメーションと変わりがないことが明らかになった。

つぎに D₁ と D₃ のどちらが形成されているかを知るために、濃度を増加させながらモノマーのNH伸縮バンドの吸光度を測定し、D₁、D₃ 形成に対応する会合平衡定数を求めてみた。D₁のサイクリックダイマーについては

$$K_1 = C_d / C_m^2 \quad (\text{eq. 1})$$

ここで C_d、C_m はそれぞれダイマー、モノマーの濃度である。溶液中のペプチド全濃度を C₀ とすると

$$C_0 = C_n + 2C_d \quad (\text{eq. 2})$$

の関係がある。ところで Fig.3-1 から明らかなようにモノマーのNHバンドの吸収極大はダイマーによるブロードバンドと重ならないので、吸光係数を ϵ_n 、セルの光路長さを l 。とおくと、

$$A_n = \epsilon_n l \cdot C_n \quad (\text{eq. 3})$$

と書くことができ、eq. 3 と eq. 2 より eq. 1は

$$K_1 = \epsilon_n l \cdot (\epsilon_n l \cdot C_0 - A_n) / 2A_n^2 \quad (\text{eq. 4})$$

となって、これを書き直すと、

$$l \cdot C_0 / A_n = 1 / \epsilon_n + (2K_1 / \epsilon_n^2) A_n / l. \quad (\text{eq. 5})$$

となる。したがって、もし D_1 が形成されているならば (eq. 5) の左辺を A_n / l 。に対してプロットしたとき直線が得られるはずである。実際のプロットを Fig.3-4 に示す。いずれのペプチドについてもよい直線関係が得られた。そして切片の読みから得られる ϵ_n の値は、希薄溶液の濃度と吸光度から得られた値とよく一致した。これを Table.3-1 の ϵ_n にかっこをして示してある。このようなよい

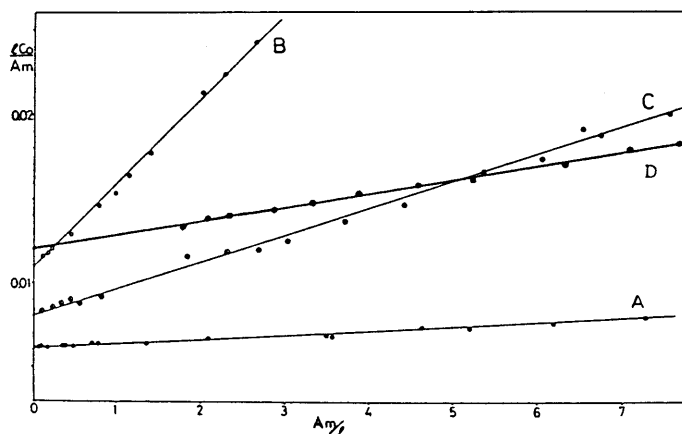


Fig.3-4 Plots of (Eq.5) for A:AGDA, B:AVDA, C:APDA, and D:ALDA.

直線性と ε_m の値のよい一致は D_1 が形成されていることを示しているものと考えることができる。Fig.3-4のプロットから得られた K_1 の値をTable.3-1に示す。

いっぽう D_3 についてであるが、Fig.3-2に示したように、 D_3 が形成されるとフリーのNH基が生じるはずである。しかしながら、AGDAの濃度を0.1 mol/lまで増加させてもフリーのNH基に対応する吸収は現れなかった。したがって D_3 は形成されていないことがわかるが、さらにAPDAについて得られた吸光度の値を利用して、 D_3 形成の平衡定数を計算し、一定の値が得られるかどうかを調べてみた。 D_3 には分子内水素結合したNHとフリーのNHが1個ずつ含まれており、またAPDAではモノマーはフリーのままなので、観測されるモノマーによる吸光度は

$$A_m = \varepsilon_m l_0 (C_m + C_d) \quad (\text{eq. 6})$$

となり、これと (eq. 2) を $K_3 = C_d / C_m^2$ (eq. 1) に代入すると、

$$K_3 = \varepsilon_m l_0 (\varepsilon_m l_0 C_0 - A_m) / (2A_m - \varepsilon_m l_0 C_0)^2 \quad (\text{eq. 7})$$

となる。 ε_m にTable.3-1の吸光度から得られた値を使ってAPDAについて得られたデータを代入した結果は、濃度の変化にともなって極端に大きな極大値を持つように変化し、一定の値は得られなかった。この結果からも D_3 が形成されていないことが確認できた。以上の考察から D_1 が形成されていることが明らかになった。

以上のようにしてダイマーとして D_1 が形成されていることが明らかになったので、つぎに0.03-0.3 mol/lの濃度範囲で温度を23, 30, 40, 50 °Cと変化させて $^1\text{Hnmr}$ を測定し、NHプロトンのケミカルシフトの変化から D_1 形成の際の ΔH と ΔS の大きさを求めてみた。観測されたケミカルシフトの変化をFig.3-5に示す。

D_1 が形成されている会合平衡反応において、観測されるNHプロトンのケミカルシフト、 ν_{obs} は

$$\nu_{\text{obs}} = (\nu_m C_m + 2\nu_d C_d) / C_0 \quad (\text{eq. 8})$$

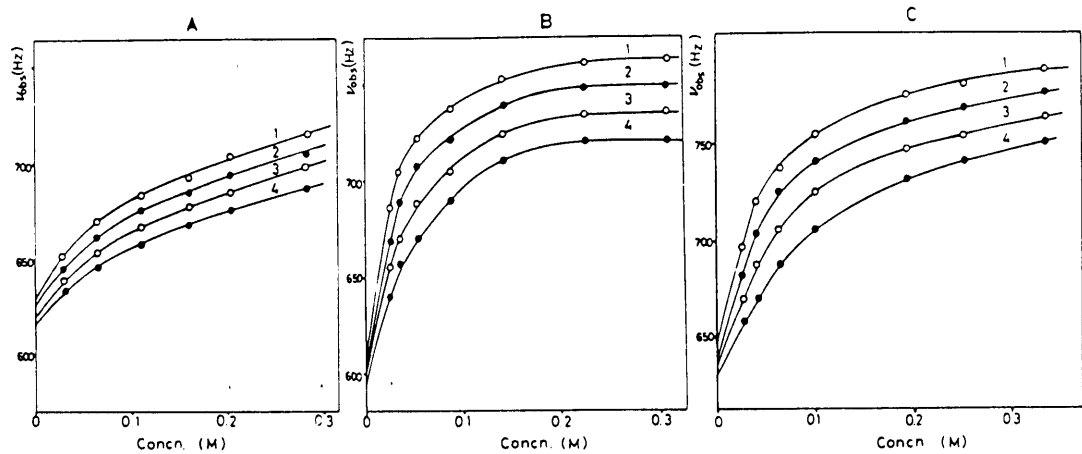


Fig.3-5 Plots of ν_{obs} vs. concentration at (1)23, (2)30, (3)40, and (4) 50 ° C. A:AGDA, B:AVDA, C:APDA

と表される。ここで ν_m , ν_d はそれぞれモノマーとダイマーのNHプロトンのケミカルシフトである。(eq. 1)、(eq. 2)と(eq. 8)から

$$\begin{aligned} \{(\nu_{obs} - \nu_m) / C_0\}^{1/2} &= \{2(\nu_d - \nu_m) K_1\}^{1/2} \\ &- \{2K_1 / (\nu_d - \nu_m)\}^{1/2} (\nu_{obs} - \nu_m) \quad (\text{eq. 9}) \end{aligned}$$

$\Delta\nu = (\nu_{obs} - \nu_m)$ とおくと (eq. 9) は

$$(\Delta\nu / C_0)^{1/2} = a - b\Delta\nu \quad (\text{eq. 10})$$

の形をしているので、左辺を $\Delta\nu$ に対してプロットすると直線が得られるはずである。 ν_m の値は Fig.3-5 において濃度を0に補外して得られる値を用いた。Fig.3-6 はプロットの結果を示している。(eq. 9)と(eq. 10)より

$$K_1 = ab/2 \quad (\text{eq. 11})$$

であるから、切片と傾きより K_1 を求め、 $\ln K_1$ を $1000/T$ に対してプロット

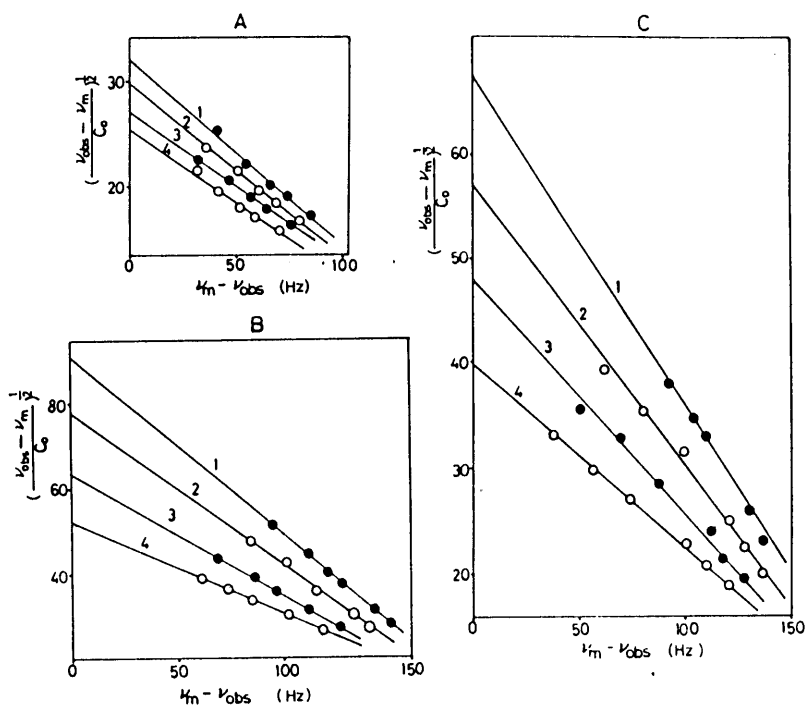


Fig.3-6 Plots of Eq.10 at (1)23, (2)30, (3)40, and (4)50 ° C. A:AGDA, B:AVDA, C:APDA.

したところ、Fig.3-7 に示す結果を得た。このプロットから得られた熱力学的な量を Table.3-2 に示す。

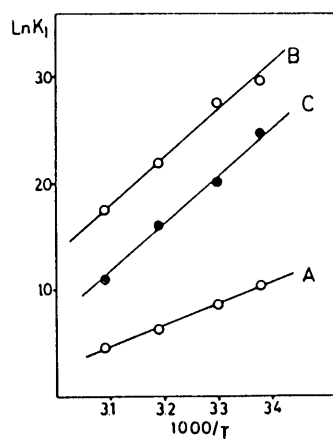


Fig.3-7 Arrhenius plots for the dimerization of the peptides. ; A:AGDA, B:AVDA, and C:APDA.

Table.3-2 Thermodynamic data and the frequency shifts of the NH band for the dimerization of the peptides.

peptide	$-\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta S_{25^\circ C}$ (cal/deg mol)	$-\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta\nu_{NH}$ (cm^{-1})
AGDA	4.2	12.1	0.58	89
AVDA	8.9	22.1	1.7	119, 133
APDA	8.7	24.6	1.4	120

つぎに、側鎖が会合にどのように寄与しているかを知るために、濃度と温度を変化させて得られるアミノ酸残基の側鎖の $^1\text{H nmr}$ シグナルの形の変化を調べてみた。AVDA の2個の $\text{C}-\text{CH}_3$ プロトンについての結果を Fig.3-8 に示した。濃度が高くなるにつれて、また温度が低くなるにつれて、2個の $\text{C}-\text{CH}_3$ プロトンは doublet から quartet へと変化する。これは $\text{C}\alpha-\text{C}\beta$ 結合のまわりの回転が濃度の増加とともに束縛されるためと考えることができる。逆に、濃度が小さく、温度が高くなるにつれて観測される quartet は $\text{C}\alpha$ の光学活性が $\text{C}\beta\text{H}$ をとおして2個の $\text{C}-\text{CH}_3$ プロトンに影響を与えているものと考えられる。APDA の側鎖の $\text{C}\beta\text{H}_2$ プロトンもまた同様に濃度、温度によって異なる多重度をあたえ、いずれの場合もダイマーの形成によって側鎖の自由な運動が束縛されることが明らかになった。サイクリックダイマー D_1 の構造においては側鎖同士は立体的に離れていることから考えて、側鎖は N -メチル部分との相互作用によって回転が束縛されるようになるものと考えられる。

以上の結果をまとめると、アミノ酸の側鎖が AGDA の H から AVDA、ALDA、APDA のように大きくなったことによって、 K_1 、 ΔH ともに非常に大きくなった。この理由として次のように考えることができる。

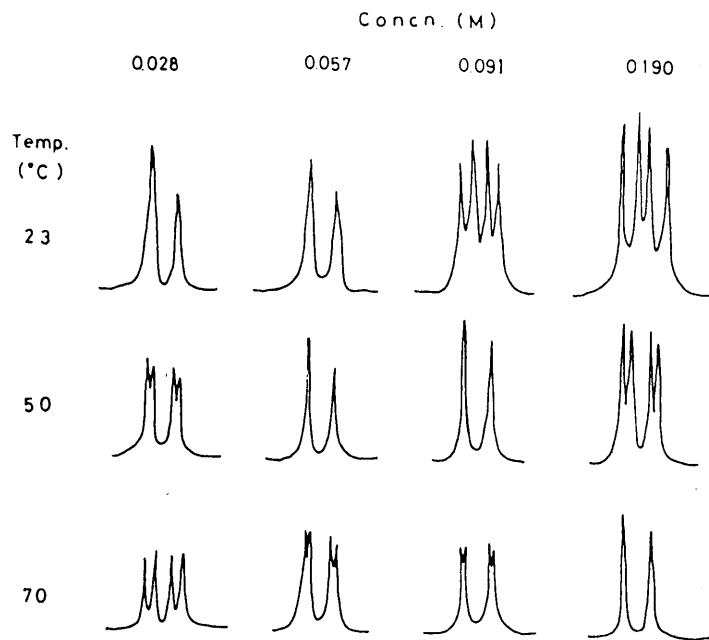


Fig.3-8 Variation in the signal of side chain methyl protons of AVDA with concentration and temperature.

まず、側鎖が立体的に大きくなったことによって分子全体の骨格がねじれ、その結果として分子内水素結合している分子の分率が小さくなり、すべての分子が分子内水素結合している AGDA にくらべると、モノマーの状態での熱的な安定性が低くなることが挙げられる。つぎにダイマーを形成している分子の NH 伸縮振動の波数、 D 、を比べてみると、側鎖の大きいペプチドではいずれも AGDA におけるよりは低波数にあり、したがってダイマーの水素結合は AGDA のダイマーにおけるよりはより強いと考えることができる。この2つのことが重なって、大きい側鎖のペプチドではダイマーがより形成されやすいことがあきらかになった。後者のより強い水素結合のダイマーが形成される原因としてアルキル基の側鎖による電子押し出し効果が $>N-C=O$ カルボニルの電子密度をより高くしていることが考えられる。

3. 3. 2 水溶液中のペプチドの会合

AVDA, ALDA, APDAはいずれも水に非常によく溶ける。これらのペプチドが水溶液中で水素結合によって会合体を形成するのか、また形成する場合にはどのような構造であるかを以下のようにして調べた。

はじめにペプチドが水素結合を形成することによって会合が起きるのかどうかについて調べた。Fig.3-9 に水-重水(4:1容量比)を溶媒としたときの ^1H のnmrの測定例を示した。いずれのスペクトルも α -プロトンが水のピークと重なるために観測されていない。NHプロトンは水のプロトンおよび重水のDとの交換でほとんど観測されないが、しかし弱く観測されるシグナルは α -プロトンとのカップリングを残した doublet として識別できる。しかもこのNH=プロトンのケミカルシフトはごくわずかではあるが濃度とともに変化する。Fig.3-10 にペプチドの濃度を変化させた時の、NHプロトンと2つのカルボニル炭素のケミカルシフトの値を濃度に対してプロットしてある。非常にわずかではあるが、NHプロトンは濃度の増加につれて高磁場にシフトした。2つのカルボニル炭素は CH_3CO カルボニル炭素のC-H ロングレンジカップリングの観測によって容易に帰属できるのであるが、これらのカルボニル炭素のケミカルシフトもまたペプチドの濃度の増加にともなって非常にわずかではあるが高磁場にシフトした。観測されたケミカルシフトの変化量は測定条件下での分解能の十倍以上であったことからこれらのデータは実験的に意味のあるものとして解析できる。

それぞれのペプチドの希薄水溶液中ではペプチド分子はモノマーとして水和しているのでペプチド結合のN-H およびC=O 基は十分に分極していると考えられる。したがって、濃度の増加につれて高磁場シフトが観測されたのはペプチド結合のまわりから水分子が離脱していったことを意味し、これは $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ の水素結合が形成されたことによるものと考えられる。すなわち3種のペプチドはいずれもわずかではあるが水溶液中で水素結合を形成することによって会合しているものと考えられる。しかも観測されるNHプロトンは α -プロトンとのカップリングを残していることから考えて、会合体の寿命はかなり長いものと予想される。しかし Fig.3-3 に示した四塩化炭素溶液中での濃度の増加にともなうNHプロトン

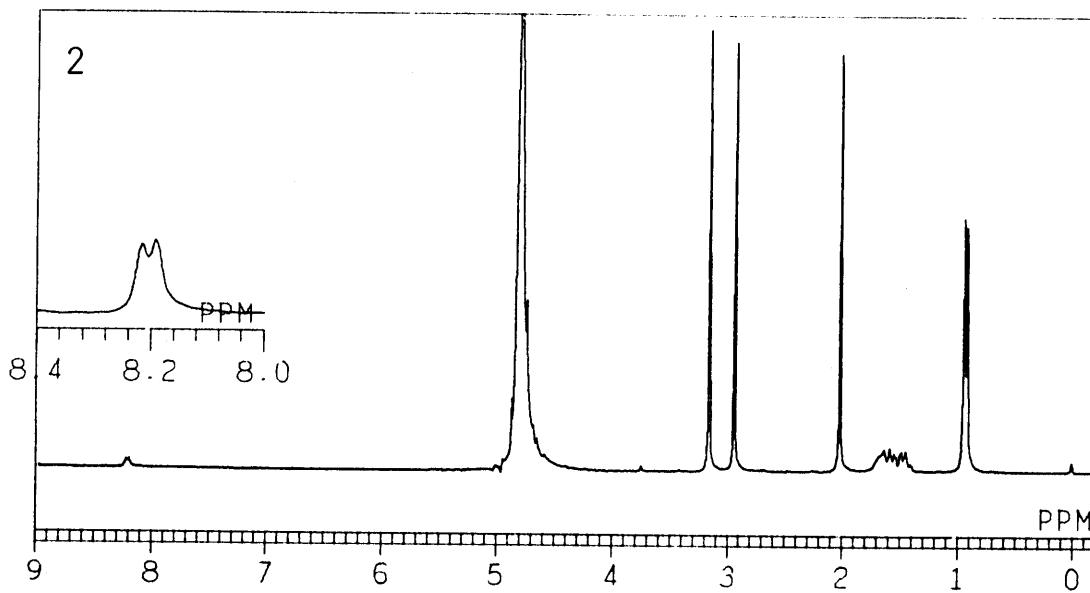
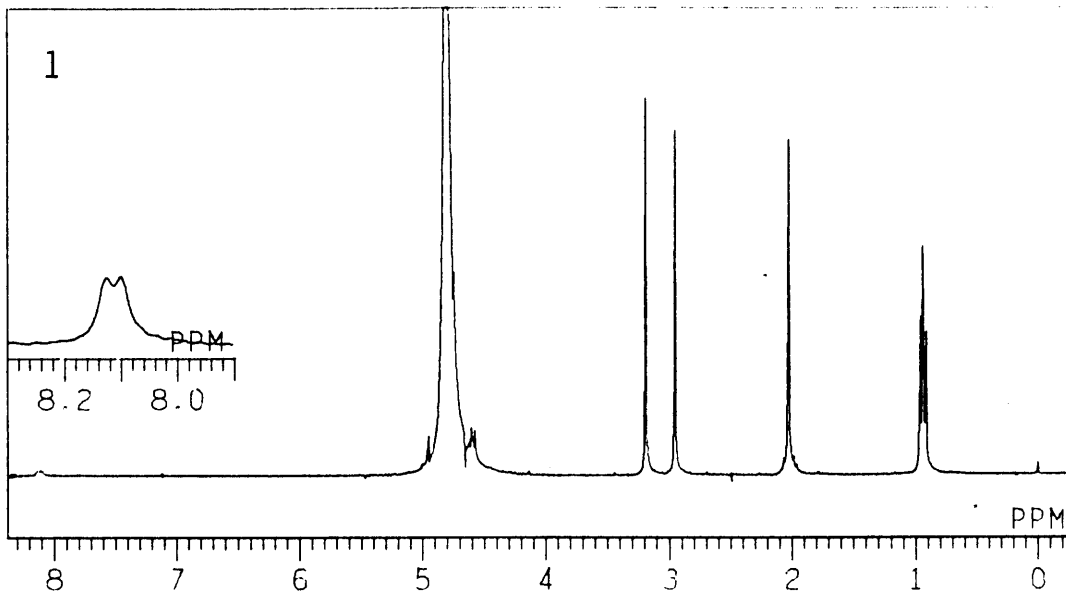


Fig.3-9(A) ¹Hnmr spectra of the peptides in H₂O-D₂O(4:1 in volume) solutions. 1)[AVDA] = 0.16 M, 2)[ALDA] = 0.29 M.

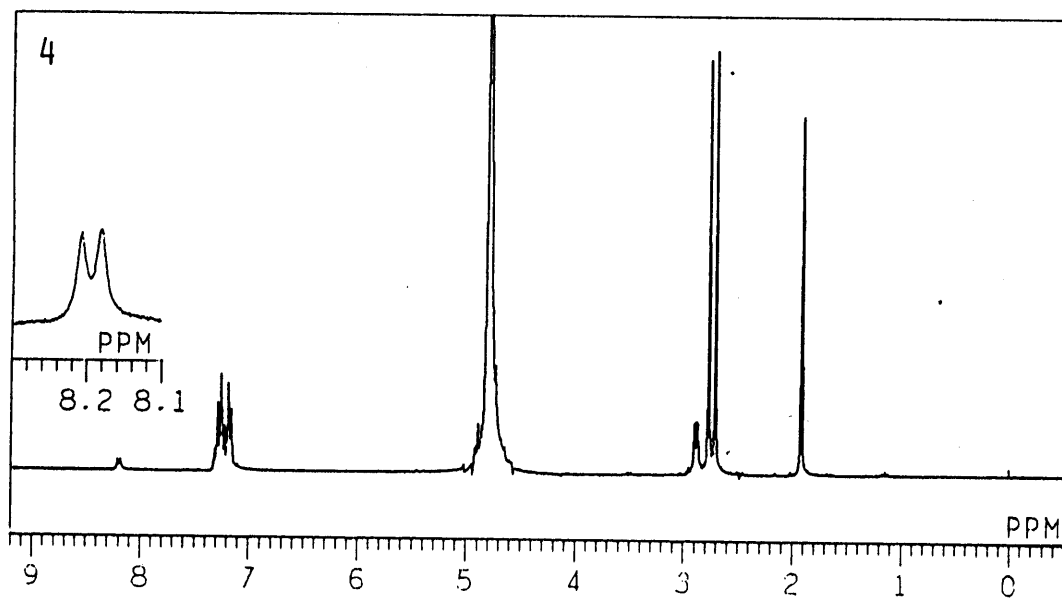
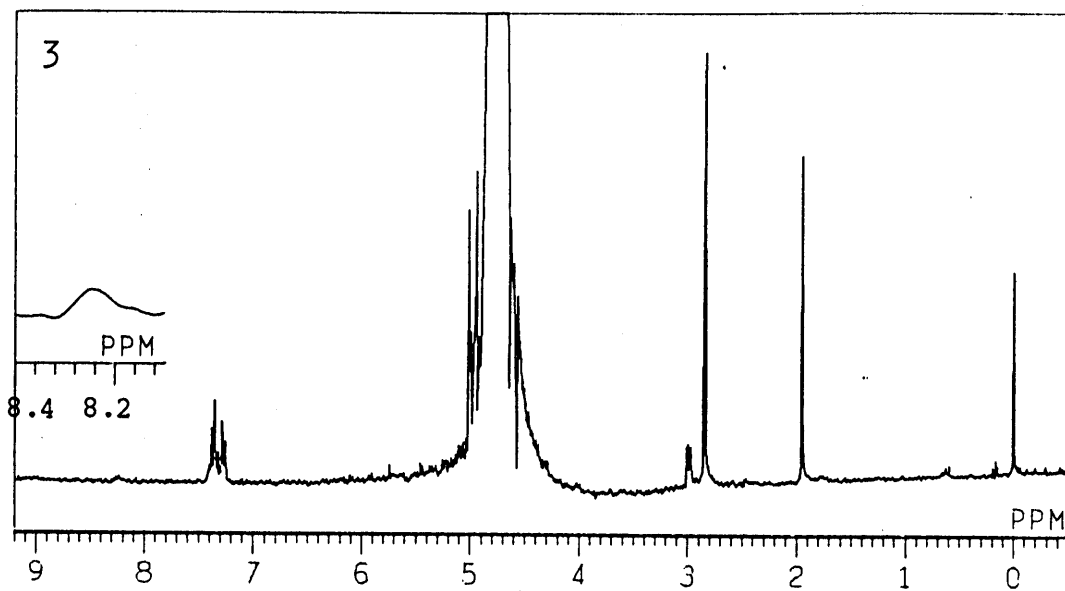


Fig.3-9(B) ^1H nmr spectra of the peptides in $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ (4:1 in volume) solutions. 3) $[\text{APDA}] = 0.01 \text{ M}$. 4) $[\text{APDA}] = 0.75 \text{ M}$.

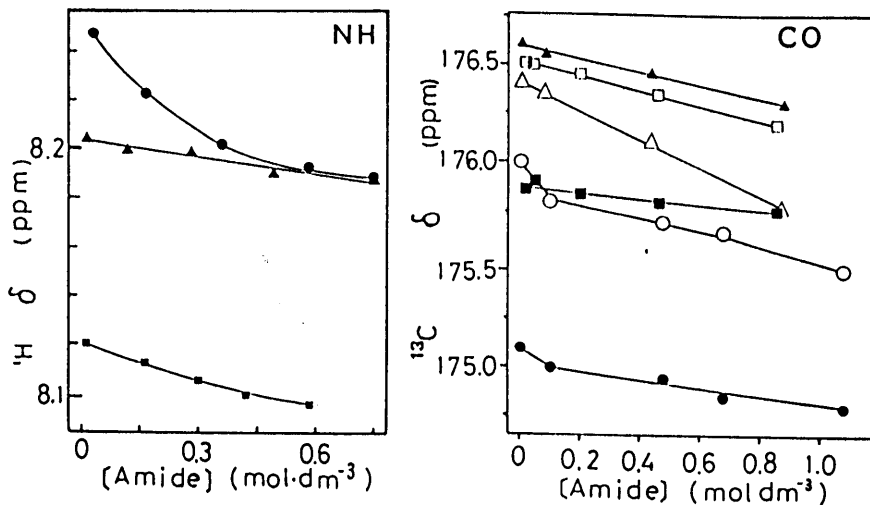


Fig.3-10 The plots of the ^1H chemical shift of NH and ^{13}C chemical shifts of the two carbonyls of each amide vs. concentration at 24 °C. : (●,○) APDA, (■,□) AVDA, (▲,△) ALDA : (○,□,△) CH_3CO , (●,■,▲) $>\text{NC}=\text{O}$.

のケミカルシフトの変化に比べると水溶液中での変化量は非常に小さい。このような水溶液中での変化量が小さい原因のひとつには、ペプチド基が分子間の水素結合を形成しても NH 基の水素結合の相手は水分子の酸素からカルボニル酸素に変わるだけで分極の大きさに決定的な違いを生じないためと考えられる。この意味では四塩化炭素溶液中でのケミカルシフトの変化量と水溶液中での変化量とを単純に比較はできないが、しかしいずれにしても水溶液中で会合体を形成しているペプチド分子の割合はモノマーのままの分子に比べて非常に小さいとすることができる。

会合体が形成されていることを示すもうひとつの実験的証拠として、Fig.3-9 に示した濃度の異なるふたつの APDA の ^1H nmr を比較してみる。N,N-dimethylformamide をはじめとして多くのジメチルアミド化合物の $>\text{N}-\text{C}(=\text{O})$ 結合の回りの回転障壁が2個の N-メチルプロトンのシグナルのケミカルシフトの差、 $\Delta\delta_{\text{NCH}_3}$ 、を測定することによって見積られてきた。ただ AVDA と ALDA ではこの値は側鎖が立体的に大きいため、会合が生じていないと予想されるような非常に小さい濃度においても大きな値を示し、濃度を増加させてもほとんど変わらない。しかし APDA では Fig.3-9(B) に示したように濃度が低いときは $\Delta\delta_{\text{NCH}_3}$ の値は

ほとんど0に近く、したがって $>N-CO$ 結合のまわりは回転が自由であることがわかる。このような自由な回転は $>N-CO$ カルボニルの十分な水和、すなわち水分子との水素結合のために $C-N$ 結合の電子が使われ、電子密度が小さくなった結果と考えることができる。Fig.3-9(B) の4で示したように濃度が増加するにつれて $\Delta\delta_{NCH_3}$ の値は0よりも大きくなり始める。しかしながら、Fig.3-10に示したように濃度の増加にともなう $>NC=O$ カルボニルの高磁場シフトはごくわずかである。したがって、濃度の増加につれて $\Delta\delta_{NCH_3}$ の値が大きくなったのは、 $>NC=O$ カルボニルと NH 基との水素結合によって $>N-CO$ 結合のまわりの電子密度が増加したためとは考えられない。濃度の増加にともなってペプチド分子間の会合が進み、立体障害のためにジメチルアミノ部分の回転がしにくくなったものと考えられる。

このように水溶液中でペプチド分子間に相互作用が起きることをさらに別の実験的方法で確認するために、濃度を増加させながらプロトンの T_1 を測定してみた。

Fig.3-11に CH_3CO , NCH_3 , および側鎖の CCH_3 プロトンの T_1 を濃度に対してプロットしてある。いずれのペプチドのどのメチルプロトンにおいても、はじめにわずかな濃度の増加で T_1 は急激に短くなる。これは NH プロトンやカルボニル炭素のケミカルシフトの変化には見られなかった変化の仕方であり、した

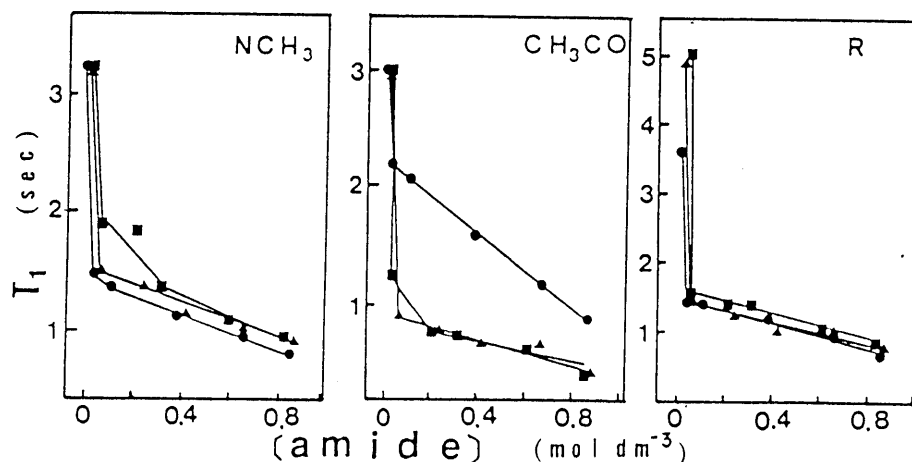


Fig.3-11 The plots of T_1 of the methyl protons of the amides vs. the concentration at 24 ± 0.1 °C. : (●) CH_3CO , (■) NCH_3 , (▲) CCH_3 of AVDA and ALDA or phenyl protons of APDA.

がって分子間の水素結合による会合ではなくて、分子間のアルキル部分どうしの相互作用によるものと考えられる。その後の濃度の増加による T_1 の減少が分子間の水素結合による会合と関係づけられるものとする。このことから、水溶液中では水素結合の形成によるよりもアルキル基による相互作用の方が分子間の相互作用に寄与していることがわかる。

つぎに、水溶液中に水素結合によって形成されている会合体の構造について考える。先に四塩化炭素溶液中ではそれぞれのペプチドはサイクリックダイマー D_1 を形成し、会合体の CH_3CO カルボニルは会合に関与していないことを明らかにしてきた。いっぽう水溶液中では Fig.3-10 に示したようにそれぞれの2つのカルボニル炭素はいずれも高磁場シフトし、しかも CH_3CO カルボニルの方が $>\text{NCO}$ カルボニルにくらべてより大きくシフトしている。このことから、水溶液中で形成される会合体の構造は四塩化炭素溶液中のものとは全く異なって、主として CH_3CO カルボニルの方が $>\text{NCO}$ カルボニルよりも NH プロトンのアクセプターとして分子間の水素結合に関与していることが明らかになった。

これをさらに別の実験的な方法で確認するために、 NH プロトンを照射しながらカルボニル炭素の核オーバーハウザー効果（以後 $^{13}\text{C}-\text{NOE}$ ）を測定してみた。ノイズデカップリングをしないで ^{13}C nmr の測定を行うことから、得られたシグナルは弱く、したがって差 NOE は積算回数を500回としても非常に雑音の多いものになった。この原因としてさらに NH プロトンが重水の重水素と部分的に交換すること、したがって、カルボニル基と水素結合している NH プロトンもまた交換されるために有効に照射が行われないうこと、会合している分率の大きさが絶対的に小さいことが挙げられる。APDAについて測定した結果を Fig.3-12 に示した。溶媒の水の OH プロトンを照射して同じ測定をおこなった結果も示してある。 NH プロトンの照射では CH_3CO カルボニルが、逆に OH プロトンの照射では $>\text{NCO}$ カルボニルの NOE の方がより大きく、互いによく反対に対応した大小関係を得た。AVDA、ALDAについても同様の結果を得た。したがって、これらの $^{13}\text{C}-\text{NOE}$ の測定結果は CH_3CO カルボニルの方が $>\text{NCO}$ カルボニルよりもより多く NH 基と水素結合し、逆に $>\text{NCO}$ カルボニルの方がより多く水和していることを示している。以上の結果から予想される水溶液中の会合体

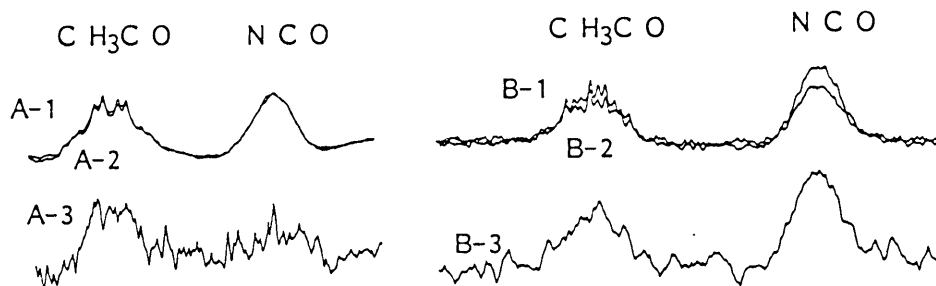
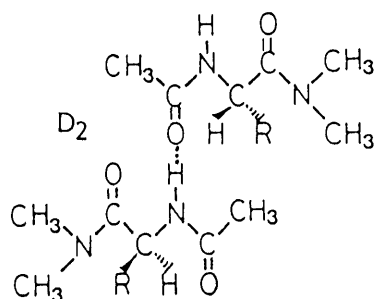


Fig.3-12 ^{13}C NOE of the two carbonyls on irradiating (A) NH and (B) OH protons at $[\text{APDA}] = 0.30 \text{ mol/l}$ at $19 \pm 0.1^\circ \text{C}$. : (1) with irradiation, (2) without irradiation, and (3) difference NOE.

の構造は Fig.3-2 に示した D_2 である。



このように、四塩化炭素溶液中で形成されるサイクリックダイマーが水溶液中では形成されていないことを CH_3CO メチルプロトンの照射によって得られる ^1H -NOE の測定によって確認した。測定の例を AVDA、APDA について Fig.3-13 に示してある。2つのN-メチルプロトンは CH_3CO プロトンの照射によるNOEを示さず、したがって立体的に近い関係にはないことがわかる。一方、ここでは省略するが、重水素化クロロホルム溶液中で同じ測定を行うと、2個の

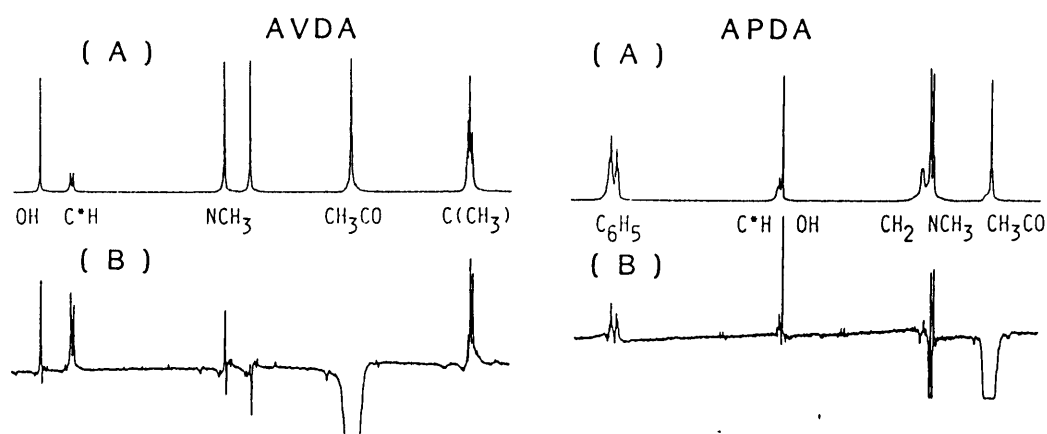


Fig.3-13 ^1H NOE of AVDA and APDA on irradiating CH_3CO protons
 at $[\text{AVDA}] = 0.12 \text{ mol/l}$ and $[\text{APDA}] = 0.45 \text{ mol/l}$ at $19 \pm 0.1^\circ \text{C}$.
 : (A) without irradiation, (B) difference NOE.

N-メチルプロトンには正の NOE が観測された。ペプチドの分子内では CH_3CO メチルプロトンと N-メチルプロトンは互いに立体的に離れていることからスピン相互作用は観測されない。したがって観測された N-メチルプロトンの NOE は D_1 を形成しているペプチド分子間の NOE によると考えられる。したがってこれが観測されない水溶液中では D_1 は形成されていないと考えられる。

3. 3. 3 四塩化炭素溶液中と水溶液中でのペプチドの会合の違い

これまで述べてきたように四塩化炭素溶液中と水溶液中での会合は会合率と会合体の構造がともに非常に異なることが明らかになった。この原因について考える。

アミド基間の水素結合形成によるペプチドの会合率が水溶液中では四塩化炭素溶液中に比べてはるかに小さいことから、溶媒の水素結合性の大きさの違いがペプチド間の水素結合のしやすさに支配的な影響を与えていることがわかる。水素結合性の強い溶媒である水はアミド基と水素結合（水和）することによってアミド基間の水素結合を阻止するためにペプチドの会合率は非常に小さくなると考えることがで

きる。つぎに会合体の構造の違いについてであるが、四塩化炭素溶液中では先に述べてきたように会合体の形成による熱的な安定化の原因はそのほとんどが水素結合の形成によると考えられる。従って、水素結合の数がより多いサイクリックダイマーが最も安定な構造として形成されているとすることができる。一方、水溶液中では会合体を安定化させているのは水素結合よりもむしろアルキル基同士の相互作用であると考えられる。会合体は水素結合の数よりもアルキル部分同士の相互作用がより多くなる構造をとると考えることができる。この章に述べてきた実験結果から、Val、Leu、Phe などの疎水性の側鎖がタンパク質の水溶液中でとる安定な構造においても同様の役割を果たしていることが予想される。

REFERENCES

1. タンパク質 -構造・機能・進化- (Principles of Protein Structure by Schulz, G.E. & Schirmer, R. H., 1979 Springer-Verlag) 6章、大井龍夫 監訳 , 1980, 化学同人
2. Applewhite, T. H. & Nieman, C. (1959) J. Am. Chem. Soc., 81, 2208.
3. Neel, J. (1972) Pure Appl. Chem., 31, 201-25.
4. Klotz, M. & Franzen, J. S. (1962) J. Am. Chem. Soc., 84, 3461-66.

タンパク質モデル化合物と

アルコールとの

四塩化炭素溶液中での

相互作用

2章でアルコールのプロトンドナーとしての水素結合性について、3章でタンパク質モデル化合物の自己会合について調べてきたので、これらの両方をふくむ系についての実験の準備が整ったことになる。本章ではまず、アルコールとタンパク質分子内の主としてペプチド基部分のためのモデル化合物としての次の3種類のアミド化合物、1) N,N-dimethylacetamide(DMA)、2) N-methylacetamide(NMA)、3) N-acetylglycine N',N'-dimethylamide(AGDA)、との四塩化炭素溶液中での相互作用について調べたことを述べる。タンパク質とアルコールの実際の系は水溶液であるが、非極性溶媒中での相互作用を調べることによって、次章で述べる水溶液中での相互作用の特徴をより明確にできることが期待されること、またタンパク質の内部は四塩化炭素溶液中とはかなり異なるにしても疎水性であると言われていることから、四塩化炭素溶液中での相互作用を調べることは意味のあることと考えることができる。

4. 1) カルボニル伸縮振動の波数シフトの測定による

アルコール-DMA 2 : 1 Complex の構造決定

4. 1. 1 序 論

2章でアルコールの水素結合におけるプロトドナーとしての大きさを比較するために、DMA と分子間水素結合する際のOH基の伸縮振動の波数シフトを測定してきたが、この時のアルコールとDMAの相対的な濃度は1 : 1 Complexの形成が保証されるようにDMAを過剰に含む系であった。1 : 1 Complex形成の見かけの平衡定数を溶液中に水素結合しないでフリーのまま残っているアルコールの濃度の測定値から計算すると、アルコールの濃度がDMAの濃度に近くなるにつれて大きくなりはじめ、1倍を越えるとさらに急激に大きくなる。これはアルコールとDMAのあいだに2 : 1 Complexが形成されはじめるため、この2 : 1 Complexに対してつぎに示す2つの構造が提出されてきた。¹⁻⁶⁾

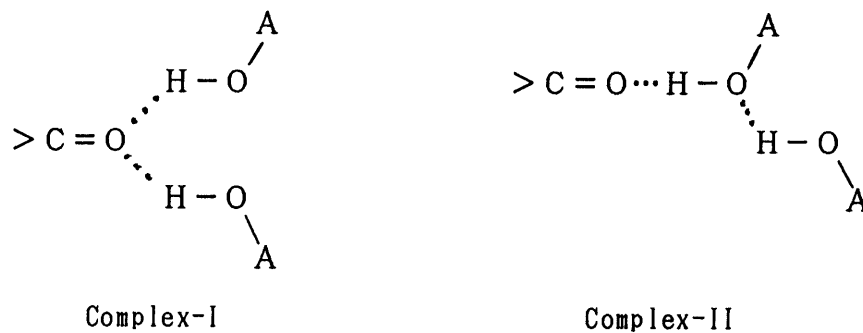


Fig.4-1 Structures of 2:1 complexes between alcohol, A-OH, and DMA.

アルコールによるタンパク質の変性を調べる場合においてもアルコールが過剰にある条件ではペプチドカルボニルとのあいだに2 : 1 Complexの形成を予想することができるので、どのような構造が形成され、またそのときのComplexの安定性あるいは水素結合の強さについて調べることは本研究において重要なことであると考えられた。これらを調べるためにはアルコールとペプチドカルボニルとの2 : 1 Complex形成の際のカルボニルの波数シフトを観測するのが望ましいが、3章でも

ク質の変性を調べる場合においてもアルコールが過剰にある条件ではペプチドカルボニルとのあいだに 2 : 1 Complex の形成を予想することができるので、どのような構造が形成されるのか、またそのときの Complex の安定性あるいは水素結合の強さについて調べることは本研究において重要なことであると考えられた。これら調べるためにはアルコールとペプチドカルボニルとの 2 : 1 Complex 形成の際のカルボニルの波数シフトを観測するのが望ましいが、3章でも述べてきたように、ペプチド化合物の自己会合すなわち NH 基との水素結合による波数のシフトとかさなるために、かわりに $>NC=O$ カルボニルを含む DMA を使って、アルコールの濃度を増加させながら DMA のカルボニル伸縮振動のスペクトルを測定した。

2 : 1 Complex の構造を決定する要因として上に述べたように、

- 1) アルコール A-OH の A 部分の立体的な大きさと、
- 2) アルコールの OH 基の酸素の水素結合におけるプロトンアクセプターとしての強さ、

の 2 つを考慮することができる。後者は Complex-II を形成するかどうかについて考える時の重要な因子である。まずはじめに、A 部分の立体的な大きさが 2 : 1 Complex の構造に及ぼす効果を調べるために、

- 1) 一級アルコールとして、ClEtOH、2,3-dichloropropane-1-ol を、
- 2) 2級アルコールとして、1-chloropropane-2-ol、1,3-dichloropropane-2-ol、1,1,1-trichloropropane-2-ol (Cl_3iPrOH) を、
- 3) 3級アルコールとして、1,1,1-trichloro-2-methylpropane-2-ol (Cl_3tBuOH) を用いた。

さらに、OH 基の酸素のプロトンアクセプターとしての大きさが異なるアルコールとして、EtOH、propane-2-ol (iso-propanol)、2-methylpropane-2-ol (tert-BuOH) の 3 種のアルキルアルコールを用いた。

実 験

DMA (和光試薬特級) は 2 章に述べたのと同じ方法で脱水、精製した。アルコール、四塩化炭素の脱水、赤外吸収スペクトル測定のための試料の調整、測定法などはすべて前章までに述べたのと同じであった。測定時の試料溶液中の水分は 10^{-6}

mol/l 以下であった。カルボニルの伸縮振動領域の測定には光路長0.5mmの岩塩窓板の液体用セルを用い、データの処理、書き出しなどをDEC社製ラボラトリーミニコンピュータ MINC-11/23 を用いて行った。⁷⁾

4.1.2 結果と考察

DMA の濃度を 0.020 mol/l に固定し、ClEtOH の濃度を増加させた時の DMA の C=O 伸縮振動のスペクトルの変化を Fig.4-2 に示した。1659.5 cm^{-1} にピークを持つ水素結合していない DMA のカルボニルは ClEtOH の増加につれて吸収が小さくなり、より低波数側にシフトした吸収が新たに現れる。ClEtOH の濃度が DMA の濃度より低いときの吸収は等吸収点 a を通ることから、この等吸収点は 1 : 1

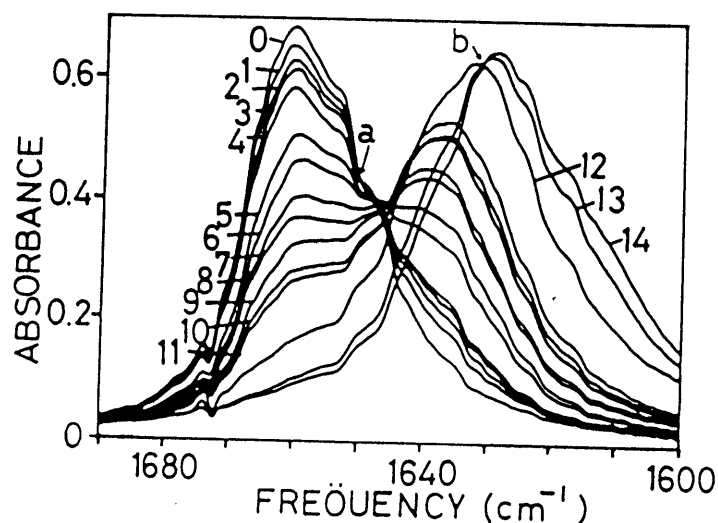


Fig.4-2 Spectral changes in the C=O band of DMA caused by increasing ClEtOH at [DMA]=0.020 mol/l ;
 [ClEtOH]/[DMA]= (0) 0, (1) 0.50, (2) 0.80, (3) 1.0, (4) 2.0, (5) 3.0, (6) 4.0, (7) 5.0, (8) 5.8, (9) 6.75, (10)8.75, (11) 10.0, (12) 25.0, (13)50.0, (14) 60.0 .
 a and b are isosbestic points.

Table.4-1 Spectrral properties of O-H bands of alcohols and frequency shifts of the C=O band of DMA.

alcohol	ν_{free}^a (cm^{-1})	ν_{inter}^b (cm^{-1})	$\Delta\nu_{OH}^c$ (cm^{-1})	$\Delta\nu_{C=O}^d$ (cm^{-1})
1 C l C H ₂ -C H ₂ -O H	3631	3407	224	31
2 C l C H ₂ -C H (C l)-C H ₂ -O H	3637	3391	246	34
3 C l C H ₂ -C H (O H)-C H ₃	3629	3411	218	29
4 C l C H ₂ -C H (O H)-C H ₂ C l	(3629) ^d	3395	234	31
5 C C l ₃ -C H (O H)-C H ₃	(3629) ^d	3356	273	28
6 C C l ₃ -C (O H) (C H ₃)-C H ₃	(3629) ^d	3393	236	24
7 C H ₃ -C H ₂ -O H	3638	3461	177	25
8 C H ₃ -C H (O H)-C H ₃	3634	3472	162	22
9 C H ₃ -C (O H) (C H ₃)-C H ₃	3629	3469	160	18

a. frequency of O-H band of free monomer, b. frequency of O-H band of alcohol-DMA 1:1 complex, c. $\nu_{free} - \nu_{inter}$ d. only the intra-molecularly hydrogen bonded O-H band was observed and the ν_{free}^c value for 1-chloro-propane-2-ol(3) is used for the calculation.

Complex 形成の平衡に対応する等吸収点と考えることができる。濃度が高くなるともはや等吸収点は無くなることから、1:1 Complex と 2:1 Complex の形成が同時に起きていることがわかる。bで示した等吸収点は、フリーの DMA がもはやなくなり1:1 Complex から2:1 Complex が形成される平衡反応のみが起きていることに対応するものと考えられる。アルコールの濃度を高くしても波数のシフトが観測されなくなった時のピークを $\nu_{C=O}^2$ とし、アルコールを加えない時のフリーの DMA のピークである 1659.5 cm^{-1} からのシフトを $\Delta\nu_{C=O}^2$ とすると、それぞれのアルコールについて Table.4-1 に示す値が観測された。

Fig.4-1 に示したように Complex-I は2分子のアルコールがカルボニルに水素結合しているので、この時の $\Delta\nu_{C=O}^2$ の大きさはアルコールの持つプロトドナーとしての水素結合性の強さに比例するはずである。このプロトドナーとしての強さをあらわすパラメータとして、先に2章で実験的に求めた $\Delta\nu_{free}$ 。すなわち、

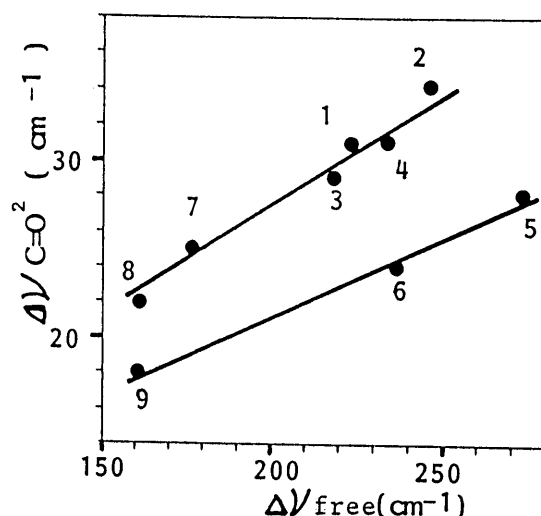
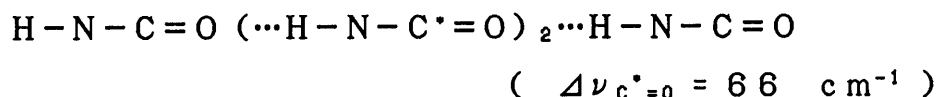


Fig.4-3 Plots of $\Delta\nu_{C=O^2}$ vs. $\Delta\nu_{free}$ for the alcohols listed in Table.4-1. The labels are identical to those in Table.4-1.

れを横軸にとり、縦軸に $\Delta\nu_{C=O^2}$ をとると Fig.4-3 に示すプロットが得られた。これを見ると、3種の2級アルコールを含む6種のアルコールについての点は1つの直線を与え、残りの3種のアルコールについての点も直線になることがわかる。Complex-I と Complex-II の構造の違いの比較から、同じ強さのプロトンドナーによってもたらされる $\Delta\nu_{C=O^2}$ の大きさは Complex-I の方がより大きいと考えることができる。したがって Fig.4-3 の2つの直線はそれぞれ上が Complex-I に、下が Complex-II に対応することを示しているように思われる。ここで ClEtOH(1) と Cl₃iPrOH(5)、Cl₃tBuOH(6) によって生じる $\Delta\nu_{C=O^2}$ について考えてみたい。ClEtOH の $\Delta\nu_{free}$ は3個の塩素をふくむ大きなA部分を持つ他の2つのアルコールに比べてより小さい。それにもかかわらず、より大きな $\Delta\nu_{C=O^2}$ を生じるのは、ClEtOH が Complex-I を、Cl₃iPrOH と Cl₃tBuOH が Complex-II を形成しているからと考えなければならない。したがって6種のアルコールは Complex-I を、3種のアルコールは Complex-II を形成することが明らかになった。この結果から注目されることは 2 : 1 Complex の構造がアルコールのA部分の立体的な大きさによって決定されることで、アルキル基による電子押し出し効果のために OH基の酸素のプロトンアクセプターとしての性質が ClEtOH よりもより強い EtOH、propane-2-olにおいても⁸⁾ Complex-I が形成されることである。

4. 2 アルコールと N-methylacetamide との相互作用

ペプチド基が鎖状に並んで連続した水素結合を形成する場合、co-operative 効果によって非常に安定な水素結合となること、そしてタンパク質の α -ヘリックスや β -構造ではこのように鎖状に連なった安定な水素結合が形成されていることがよく知られている。タンパク質と ClEtOH のあいだに水素結合を介した相互作用が生じるかどうかの可能性について知るためには、ClEtOH の持つ水素結合性がタンパク質分子内に形成されているこのように十分に安定なペプチド基間水素結合を切断するのに十分に強いかどうかを調べるのが重要になる。そこでこれを調べるために、アミド基が鎖状に水素結合することによって非常に安定な会合体を形成することが知られている N-アルキルアミドの中から N-methylacetamide(NMA) を選び、いくつかのアルコールとの相互作用を $^1\text{H nmr}$ の測定によって調べた。NMA の会合による水素結合の co-operative 効果の程度について田隅等⁹⁾ はヘリウムマトリックス法による測定からつぎに示す波数を割り当てている。



これによると、4分子の会合体ではフリーの NMA 分子が2分子で会合する際のカルボニルの波数シフトのほぼ3ばいのシフトに対応する安定な水素結合が形成されることになる。

実 験

NMA (和光特級) は calcium hydride で脱水し、2回真空蒸留して用いた。アルコールとして methanol, EtOH, 2-methoxyethanol, ClEtOH, 2-bromoethanol, 3-chloropropane-1-ol の6種のアルコールを選び、脱水、精製は前章までと同じ方法で行った。 $^1\text{H nmr}$ の測定には日本電子製 4H-100型を用い、TMSを内部基準とした。

結果と考察

NMA の濃度を 0.25 mol/l に固定して、アルコールの濃度を増加させながら NMA の NH および CH_3CO プロトンのケミカルシフトの変化を測定した結果を Fig.4-4 に示す。この濃度において NMA は 80% が会合体として存在することが NH 基の赤外吸収スペクトルの測定から計算された。会合体の NH 伸縮振動の吸収は広い波数範囲に広がり、3 量体以上の会合体が形成されていることがわかる。3 種のハロゲノアルコールの濃度を増加させて行くと NH プロトンの高磁場シフトと CH_3CO プロトンの低磁場シフトが並行して起きる。これはアミド基間の水素結合が解離した結果フリーの NH 基が増加し、一方 CH_3CO カルボニルはより強い水素結合を形成するようになることを示している。カルボニルと水素結合しているプロトンドナーとしてはアルコールの OH 基以外には考えられないから、ハロゲノ

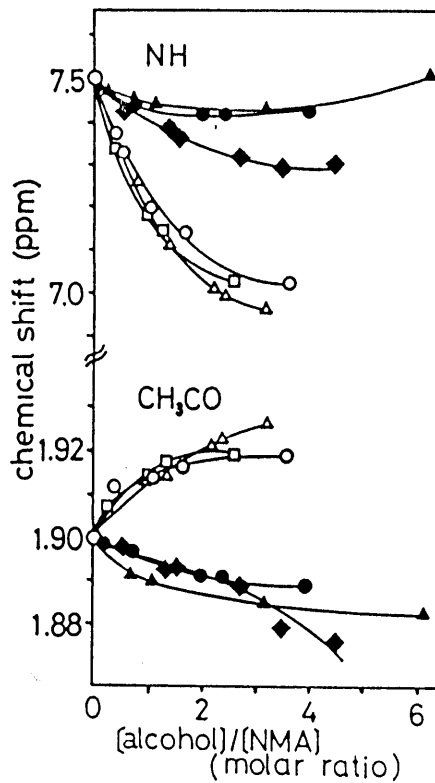


Fig.4-4 Plots of the chemical shifts of NH and CH_3CO protons of NMA vs. alcohol content.

- (O) 2-chloroethanol
- (Δ) 2-bromoethanol
- (□) 3-chloropropan-1-ol
- (●) methanol
- (▲) ethanol
- (■) 2-methoxyethanol

アルコールが存在すると NMA は自己会合するかわりにアルコールと水素結合することがわかる。一方、methanol、EtOH、2-methoxyethanol を加えた場合には NH がわずかに高磁場シフトし、 CH_3CO プロトンも高磁場シフトすることから、NMA の自己会合率がわずかに低くなるのみでアルコールとの強い相互作用はみられない。以上の結果から、NMA とハロゲノアルコールが共存する四塩化炭素溶液中ではハロゲノアルコールの水素結合性は十分に大きく、そのために NMA とアルコールとの分子間水素結合が NMA の自己会合にきつ抗して起きることが明らかになった。

4. 3 アルコールと N-acetylglycine N',N'-dimethylamide との相互作用

さいごに、N-acetylglycine N',N'-dimethylamide (AGDA) と ClEtOH、EtOH、2-methoxyethanol の3種のアルコールとの相互作用について調べた。

2章で明らかにしたように ClEtOH をはじめとするハロゲノエタノール、ハロゲノプロパノールはアルキルアルコール、アルコキシアルコールに比べて強い水素結合性を持っているが、これに加えてこれらの分子内水素結合をするハロゲノアルコールやアルコキシアルコールは分子内に水素結合のプロトンドナーであるOH基と、電気陰性度が大きくプロトンアクセプターとして作用できるハロゲン、または酸素原子の両方を持っている。したがってこれらのアルコールはプロトンアクセプターであるタンパク質のペプチドカルボニル、プロトンドナーであるペプチドNH基とのあいだに、Fig.4-5 に示したような二官能基的相互作用¹⁰⁾をする可能性を持っている。そこでこのような相互作用が実際におきるかどうかをタンパク質のモデル化合物として AGDA を使い、赤外吸収スペクトルおよび ^1H nmr の測定によって調べた。EtOH はこのような相互作用ができないアルコールとして、比較のために用いた。

実 験

AGDA とアルコールの脱水、精製、測定溶液の調製は前章までに述べてきたのと同じ方法で行った。OHおよびNH結合の伸縮振動領域の赤外吸収スペクトルの測

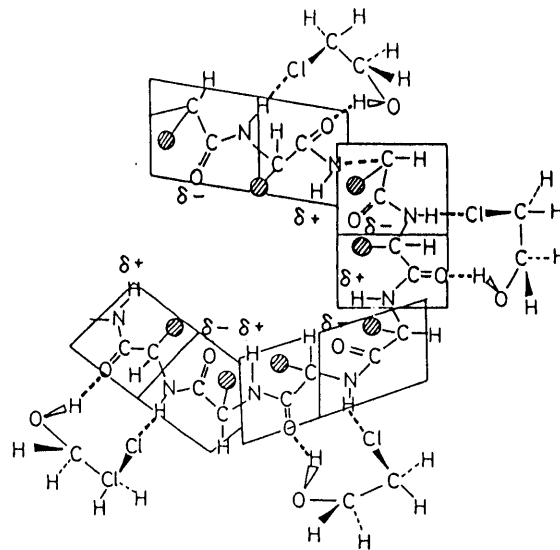


Fig.4-5 Bi-functional interaction of ClEtOH with protein.

定は2章に述べたのと同じ方法で、赤外用石英製タイコ型セルの光路長は試料の濃度に応じて20mmと2mmのものを使って行った。 $^1\text{H nmr}$ の測定には日本電子製4H-100型を用い、TMSを内部基準とした。

結果と考察

前章で述べたように 10^{-3} mol/lのオーダーの濃度ではアルコールとAGDAはともに四塩化炭素溶液中でモノマーとして溶解している。はじめにこのようなモノマー領域の濃度でAGDAとClEtOH、EtOH、2-methoxyethanol (MeOEtOH)をそれぞれ混合したときの赤外吸収スペクトルを測定した。結果をFig.4-6に示した。モノマーのClEtOHのOH基による伸縮振動の吸収が減少し、モノマーのAGDAのNH基による吸収の両端にブロードな吸収が現れている。EtOH、MeOEtOHとの混合の場合にはこのようなスペクトルの変化がまったく現れず、混合系のスペクトルは混合前のスペクトルを重ね合わせたものに一致した。

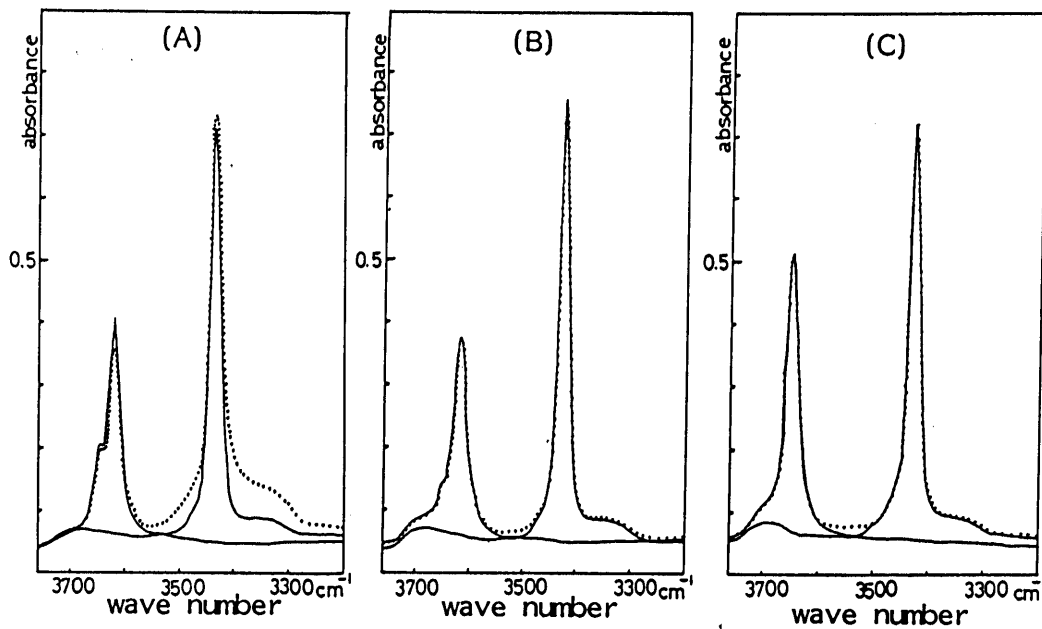


Fig.4-6 Changes in the IR spectra caused by mixing AGDA and alcohol.

: ————— before mixing, ········· after mixing.

(A) $[AGDA]=1.9 \times 10^{-3}$ M, $[ClEtOH]=4.6 \times 10^{-3}$ M ;

(B) $[AGDA]=2.0 \times 10^{-3}$ M, $[MeOEtOH]=2.2 \times 10^{-3}$ M ;

(c) $[AGDA]=1.2 \times 10^{-3}$ M, $[EtOH]=3.5 \times 10^{-3}$ M.

つぎに AGDA, アルコールともに自己会合の起る濃度である 10^{-2} mol/l のオーダーになるように両者を混合すると、それぞれの系においてスペクトルの変化が現れた。測定の結果の例を Fig.4-7 に示す。モノマーのアルコールの OH 基、AGDA の NH 基がともに減少し、分子間水素結合の結果としてあらたに低波数側にシフトしたブロードバンドとしてあらわれている。

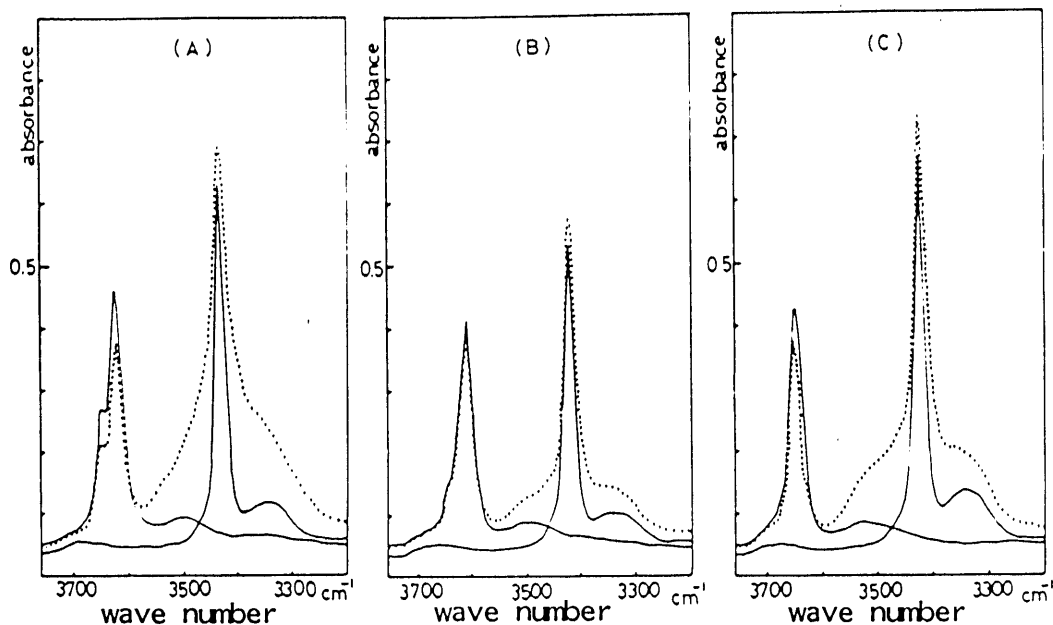


Fig.4-7 Changes in the ir spectra caused by mixing AGDA and alcohol.

; — before mixing, after mixing.

(A) $[AGDA]=1.8 \times 10^{-2}$ M, $[ClEtOH]=5.8 \times 10^{-2}$ M ;

(B) $[AGDA]=1.5 \times 10^{-2}$ M, $[MeOEtOH]=3.4 \times 10^{-2}$ M ;

(c) $[AGDA]=2.1 \times 10^{-2}$ M, $[EtOH]=3.7 \times 10^{-2}$ M.

つぎに、AGDA の濃度を 0.086 mol/l に保ち、それぞれのアルコールを増加させながら $^1\text{H nmr}$ を測定した。この時の AGDA のプロトンのケミカルシフトの変化を Fig.4-8 に示した。この濃度において自己会合している AGDA の分率は 0.28 であることが NH 基の伸縮振動の吸収から計算された。したがってこの濃度で AGDA の多くの分子が二官能基的相互作用をしやすいモノマーとして溶液中に存在していることになる。AGDA の NH プロトンは EtOH、MeOEtOH、ClEtOH のいずれのアルコールを加えても低磁場シフトし、アルコールとの水素結合を形成することを示している。そして Fig.4-7 の赤外吸収スペクトルもまた NH 伸縮振動の低波数側へのシ

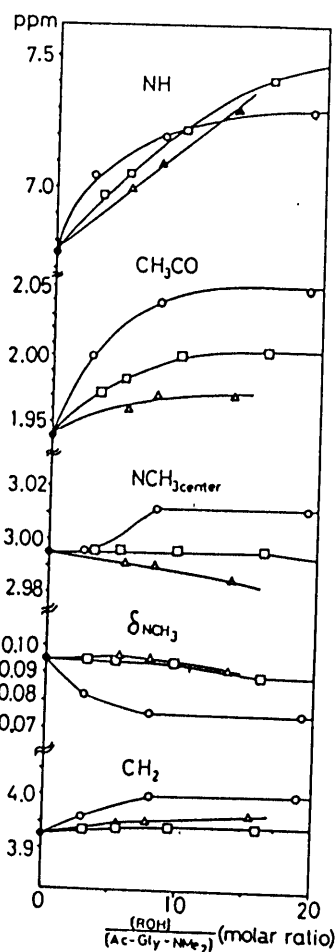


Fig.4-8 Plots of the ^1H chemical shifts of AGDA vs. alcohol content at $[\text{AGDA}] = 0.086 \text{ M}$.

- (○) ClEtOH
- (△) MeOEtOH
- (□) EtOH

フトを示し、これを裏づけている。EtOH においてNHプロトンのアクセプターとして機能できるのは OH基の酸素のみであることから、AGDA では Fig.4-9 に示した (I) が形成されていることがわかる。また、いずれのアルコールによっても CH_3CO プロトンの低磁場シフトが見られることから、(II) が形成されることも明らかである。

>NC=Oカルボニルとアルコールとの水素結合についての情報を与えることのできる2個の $\text{N}-\text{CH}_3$ プロトンのピークの中心のケミカルシフト δ_{NCH_3} とそれらの間隔の大きさ $\Delta\delta_{\text{NCH}_3}$ は、Fig.4-8 に示したように ClEtOH の増加によってのみ変化し、しかもその低磁場への変化は >NC=O カルボニルと ClEtOH が水素結合することを示している。ところで、Fig.4-8 に示した低い濃度での相互作用は、ClEtOH によってのみ起きる。先にも述べてきたように、OH基の酸素のプロト

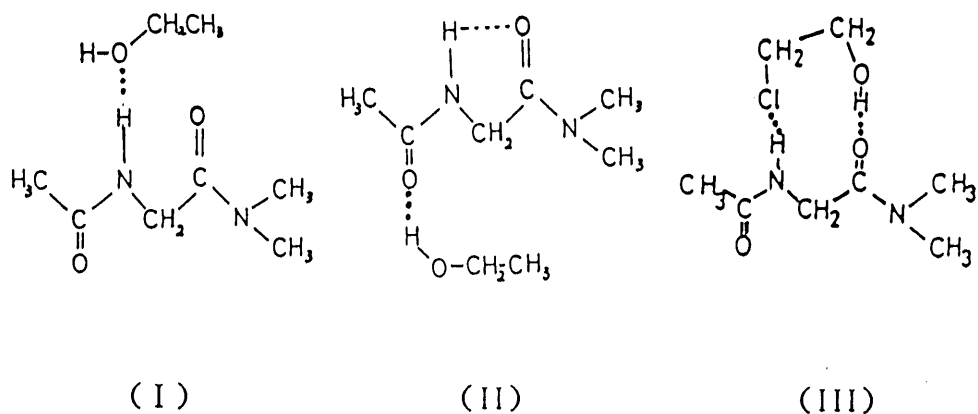


Fig.4-9 Structures of hydrogen-bonded complexes between AGDA and alcohol.

ンアクセプターとしての強さは EtOH の方が ClEtOH に比べてかなり強い。したがって、Fig.4-8 にみられる ClEtOH の増加による NH 伸縮バンドの低波数側へのシフトと、さらに Fig.4-8 にみられる ClEtOH の増加による NH プロトンの EtOH、MeOEtOH の増加によるよりも大きな低磁場シフトは、NH 基と OH 基の酸素との水素結合の結果であるとは考えられず、したがって、ClEtOH の塩素との水素結合によるものとしなければならない。ClEtOH では分子内水素結合している分子の分率が、トランス型で分子内水素結合していない分子の分率に比べてかなり大きいことをも考慮すると、Fig.4-9 の (III) で示した ClEtOH と AGDA とのあいだの二官能基的相互作用が生じているものと結論される。

REFERENCES

1. Whetsel, K. B. & Kagarise, R. E. (1962) *Spectrochim. Acta*, 18, 315.
2. Ramaswamy, K., Richai, R., & Gnanadesikan, S.G. (1967) *J. Mol. Spectrosc.*, 23, 416-24.
3. Bellamy, L. J. & Pace, R. J. (1971) *Spectrochim. Acta*, part A, 27, 705-13.
4. Symons, M. C. E. & Eaton, G. (1981) *Chem. Phys. Lett.*, 83, 292-93.
5. Symons, M. C. R., Eaton, G. Shippey, T. A., & Harvey, J. (1980) *Chem. Phys. Lett.*, 69, 344-47.
6. Symons, M. C. R. & Eaton, G. (1985) *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, 81, 1963-77.
7. 内田宗吉、 斉藤政晴、 神藤洋爾、 (1984) 福井大学工学部材研報告、 21, 31-44.
8. Kamlet, M. J. & Taft, R. W. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 377.
9. private discussion.
10. Gordon, J. A. & Jencks, P. (1963) *Biochemistry*, 2, 47-57.

水溶液中の

タンパク質モデル化合物の

自己会合におよぼす

C1EtOHの効果とその原因

5.1 序 論

前章では四塩化炭素溶液中の C1EtOH の水素結合におけるプロトドナーとしての性質は非常に強く、非常に安定な自己会合体を形成する N-methylacetamide とも水素結合して、その自己会合を抑制することを明らかにしてきた。本章では溶媒を水と重水の混合物とし、タンパク質のモデル化合物として先に3章で自己会合について調べた N-acetyl-L-valine-N',N'-dimethylamide (AVDA)、N-acetyl-L-leucine-N',N'-dimethylamide (ALDA)、および N-acetyl-L-phenylalanine-N',N'-dimethylamide (APDA) の3種のペプチドの自己会合におよぼす C1EtOH の効果を FTNMR 法を利用して調べた。その結果、四塩化炭素溶液中とは逆に C1EtOH はこれらのペプチドの自己会合を促進することが明らかになった。はじめにこの結果について述べる。つぎに、このように水溶液中ではペプチドの自己会合に対して四塩化炭素溶液中とは全く逆の効果をおよぼす原因として、水溶液中で重要なのはペプチドと C1EtOH との分子間相互作用ではなく、溶媒の水素結合性の変化であることを、本研究でこれまでに得てきた実験結果からみちびきだす。そしてこのことが水-C1EtOH の系についても成立することを明らかにするために、C1EtOH が水の構造に対してどのような効果をもたらし、さらに、ペプチドが存在するときにはこの C1EtOH の水構造への効果はどう変化するかを調べたのでその結果について述べる。

5. 2 実 験

ペプチド、アルコール、水、重水はこれまでに用いてきたのと同じ物を用いた。nmrの測定は日本電子社製GX-270型FTnmr装置を利用した。スピン-格子緩和時間(T_1)の測定、核オーバーハウザー効果(NOE)の測定も3章で述べてきたのと同じ方法で行った。

5. 3 結 果 と 考 察

5. 3. 1 ClEtOH がペプチドの会合におよぼす効果

水と重水を4:1の容積比で混合して溶媒とし、ペプチドの濃度を一定に保ちながらClEtOHの濃度を増加させて ^1H および ^{13}C のnmrを測定した。先にFig.3-9で示してきたのと同じように、 α -プロトンとのカップリングによってdoubletに分かれたNHプロトンが非常に小さいシグナルではあるが観測された。重水中に溶かしたTrimethylsilylpropanesulphonate(TMP)を外部基準として測定したNHプロトンと2個のカルボニル炭素のケミカルシフトの変化をFig.5-1に示した。その結果、NHプロトンとカルボニル炭素はClEtOHの増加にともなうていずれも高磁場にシフトした。

先に3章で述べてきたように、この両者のケミカルシフトの高磁場シフトはペプチドの分子間で $>\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}<$ の水素結合の形成によって会合が進んでいることを意味する。四塩化炭素溶液中でClEtOHの濃度を増加させた時にペプチド分子間の会合が抑制されるのとは逆に、水溶液中ではこのようにペプチド分子間の会合が促進されることをさらに実験的に確認するために、以下に述べる2つの実験を行った。

まずNHプロトンまたはOHプロトンを選択的に照射しながらカルボニル炭素のNOEを測定した。NHプロトンの照射によるNOE(^{13}C -NOE{NH}とあらわす)の大きさはペプチド基どうしの水素結合の形成の程度に、OHプロトンの照射によるNOE(^{13}C -NOE{OH}とあらわす)の大きさはペプチドカルボニルの水和の程度に対応させることができる。このようにして2個のカル

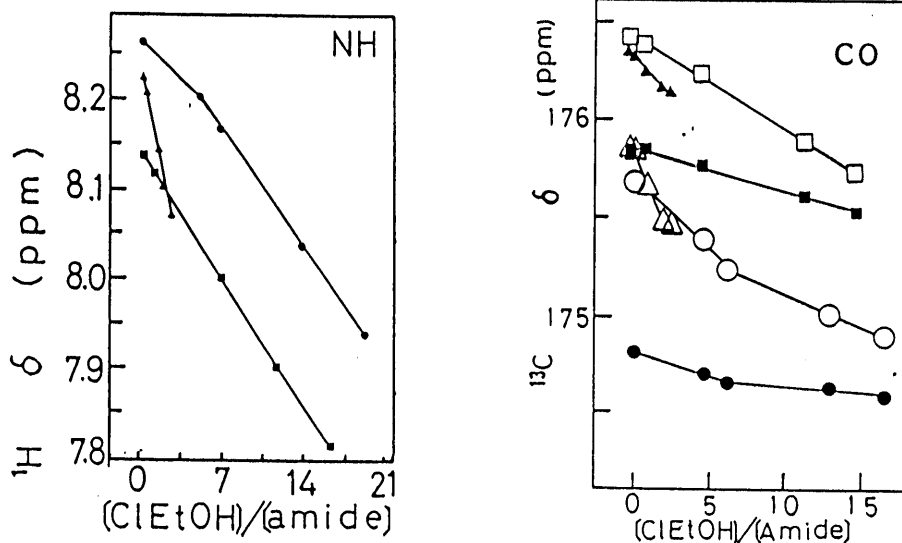


Fig.5-1 Effects of increasing ClEtOH content on ^1H and ^{13}C chemical shifts of NH and the two carbonyls of the peptides at 24°C . : (○●) [APDA]=0.37 M, (□■) [AVDA]=0.30 M, (△▲) [ALDA]=0.80 M. (○□△) CH_3CO , (●■▲) $>\text{NCO}$.

ボニル炭素のNOEを測定することはすでにペプチドの自己会合を調べるために3章で行ってきたが、非常に小さい差NOEしか観測されなかった。本実験では3章で得た結果にくらべるとはるかに大きく、定量的な取扱いが可能な程度の大きさの差NOEが観測された。測定例を Fig.5-2 に示す。この測定例に見られるように、OHプロトンの照射によっては $>\text{NC}=\text{O}$ カルボニルの、NHプロトンの照射によっては CH_3CO カルボニルのNOEがそれぞれ残りのカルボニルよりも大きく現れ、したがって自己会合の場合と同じように会合は $>\text{NH}\cdots\text{O}=\text{CN}<$ の水素結合よりもむしろ $>\text{NH}\cdots\text{O}=\text{CCH}_3$ という組合せで、逆に水和については $>\text{NC}=\text{O}$ カルボニルにおいてより生じていることがわかる。

APDAの濃度を一定に保ってClEtOHの濃度を増加させながら、NHプロトンおよびOHプロトンをそれぞれ照射し、 ^{13}C -NOE {NH} と ^{13}C -NOE {OH} を測定した。 ^{13}C -NOE {OH} の実験値の方がよりよい精度で得られるのでこ

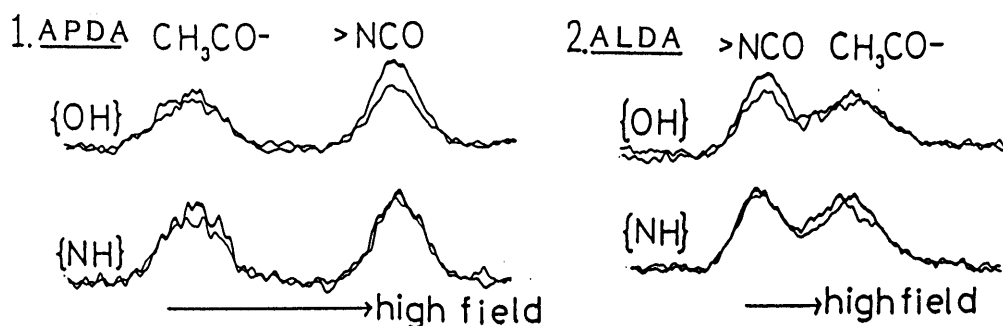


Fig.5-2 Examples of the measurements of $^{13}\text{C-NOE}\{\text{OH}\}$ and $^{13}\text{C-NOE}\{\text{NH}\}$ at $19\pm 0.1^\circ\text{C}$, where bold and thin lines represent the resonance curves measured with irradiation and without irradiation, respectively. $[\text{APDA}] = 0.65\text{ M}$, $[\text{ClEtOH}]/[\text{APDA}] = 2.5$, $[\text{ALDA}] = 0.70\text{ M}$, $[\text{ClEtOH}]/[\text{ALDA}] = 2.3$.

れを Fig.5-3 に示した。ClEtOH と APDA の濃度の比、 $[\text{ClEtOH}]/[\text{APDA}]$ の値が 1 付近では $^{13}\text{C-NOE}\{\text{OH}\}$ の値は ClEtOH を加えない時に比べてわずかに大きくなり、その後は ClEtOH の濃度の増加につれて小さくなった。このときの

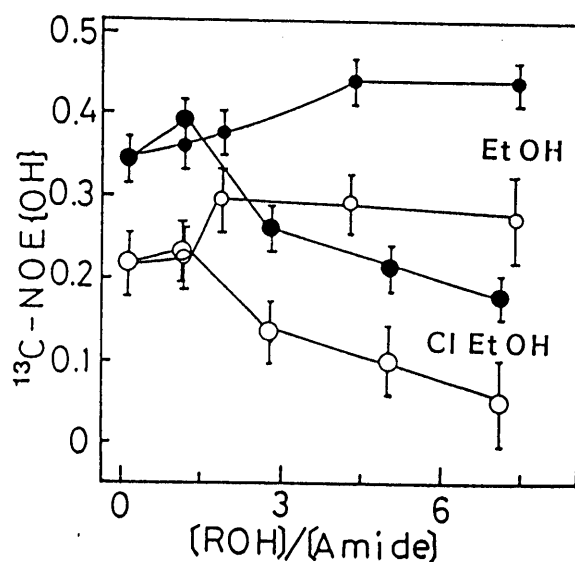


Fig.5-3 Effects of increasing the content of ClEtOH or EtOH on $^{13}\text{C-NOE}\{\text{OH}\}$ values of the two carbonyls of APDA at $[\text{APDA}] = 0.65\text{ M}$ at $15\pm 0.1^\circ\text{C}$. : (○) CH_3CO , (●) $>\text{NCO}$.

^{13}C -NOE {NH} の値は逆に大きくなった。これは ClEtOH の増加につれてカルボニルの水和の程度が減少し、逆にペプチド基間の水素結合が増加することを表しており、したがって ClEtOH がペプチドの自己会合を促進することを確認できたことになる。

つぎにもう1つの実験として、ペプチド濃度を一定にして ClEtOH を増加させながらペプチドのメチルプロトンの T_1 を測定した。結果を Fig.5-4 に示す。それぞれのペプチドの CH_3CO および NCH_3 メチルプロトン、さらに側鎖のメチルプロトン (APDA の場合はフェニルプロトン) は、濃度の比、 $[\text{ClEtOH}] / [\text{peptide}]$ の値が1付近で極大になり、その後小さくなる。3章で述べてきたように、ペプチドの会合が進むにつれて T_1 が小さくなることから、 T_1 の測定結果もまた ClEtOH がペプチドの自己会合を促進することを示している。

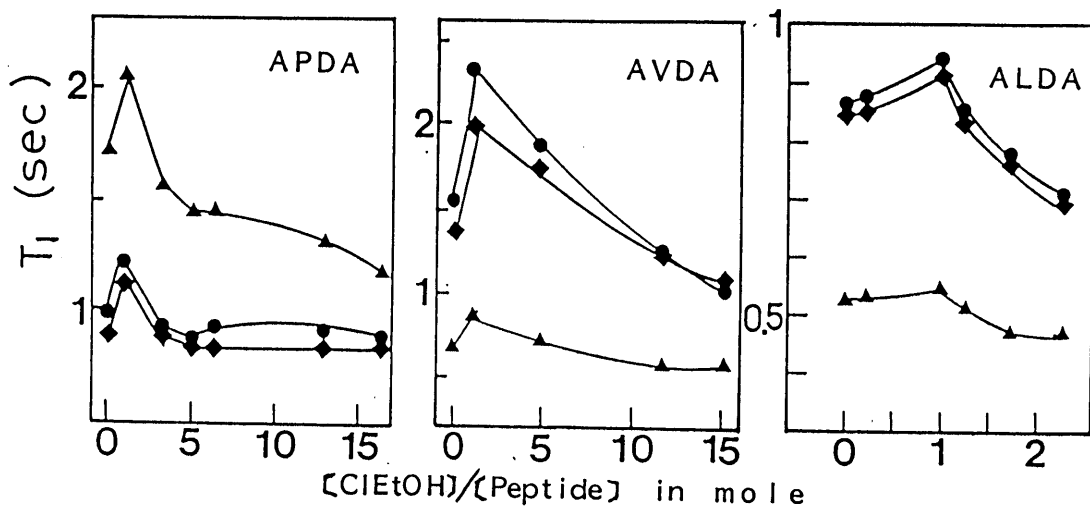


Fig.5-4 Effects of increasing ClEtOH content on the T_1 of the methyl protons of the peptides at $24 \pm 0.1^\circ \text{C}$. : (●) CH_3CO , (◆) NCH_3 , (▲) CCH_3 , $[\text{APDA}] = 0.37 \text{ M}$, $[\text{AVDA}] = 0.30 \text{ M}$, $[\text{ALDA}] = 0.80 \text{ M}$.

以上の実験結果から ClEtOH は四塩化炭素溶液中ではペプチドの自己会合を抑制し、水溶液中では逆に促進することが明らかになった。四塩化炭素溶液中における会合の抑制は、ClEtOH とペプチドの分子間水素結合の形成という、ClEtOH とペプチドのあいだの分子間相互作用によって説明することができた。そして、水溶液中においても程度の差はあるにしても同様にペプチドと ClEtOH のあいだに分子間の水素結合による相互作用が生じるものという予想をたてて実験を始めた。しかしながらこの予想はずれ、単に程度の差にはとどまらず、会合の抑制と促進という逆の効果をもたらすことが明らかになった。水溶液中での ClEtOH によるペプチドの自己会合の促進は、もはや ClEtOH とペプチドの分子間相互作用によっては説明することができないので、促進を説明できる別の機構を見出さなければならない。なお Fig.5-3 と Fig.5-4 のいずれにおいても $[\text{ClEtOH}]/[\text{peptide}]$ の大きさが1付近で極大値を持っている。これについては後に述べる。

5. 3. 2 ClEtOH が水の構造におよぼす効果

先に3章でペプチドの自己会合率が溶媒の水素結合性に大きく依存することを明らかにしてきた。水溶液中での会合率は四塩化炭素溶液中に比べて非常に小さく、これは溶媒である水がペプチド基を水和することによってペプチド基間の水素結合を抑制する結果であると説明することができた。したがって水溶液中のペプチドの会合率が ClEtOH を加えていくことによって変化するのは溶媒である水-ClEtOH 混合物の水素結合性が変化している、より詳しく言うならば、小さくなっていることによるのではないかと予想することができる。

アルコールなどの中性で極性を持つ有機化合物が水の構造¹⁾にどのような効果をもたらすかを調べるためにさまざまな方法が試みられてきた²⁾。水和熱、熱容量、熱伝導度、などの測定、誘電率、誘電緩和の測定、表面張力の測定、タンパク質の溶解度、変性温度、変性の程度の測定、あるいはミセルの溶解度、臨界ミセル濃度の測定、等のさまざまな方法に加えて、分光学的方法として、赤外吸収スペクトル法によるOH伸縮振動の基準、および倍音の吸収の測定とnmr法によるOHプロ

トンのケミカルシフトの測定が有力な方法として用いられてきた。そしてそれぞれの測定方法に応じて、個々の化合物は純水が持っている3次元構造をより増加させる「水構造形成子」(structure maker)と水構造の発達程度を阻害する「水構造破壊子」(structure breaker)に分類されてきた。³⁾

structure makerはまわりの水分子間の水素結合をより強くするので水のOHプロトンのケミカルシフトを低磁場に、structure breakerは逆にまわりの水分子間の水素結合を弱くするので高磁場にシフトさせる。アルキルアルコールの水構造に対する効果をケミカルシフトの変化から調べた報告はかなりの数になるが⁴⁻⁶⁾、ハロゲンアルコールについての報告は見あたらない。そこでまず ClEtOH-水の系で、ClEtOHの濃度を変えてOHプロトンのケミカルシフトを20°Cで測定した。測定には同心軸の2重管を用い、内管にTMPを溶解した重水を入れて外部基準とした。水とClEtOHのOHプロトンは全測定濃度領域で一本に収束した。測定結果をFig.5-5に示す。

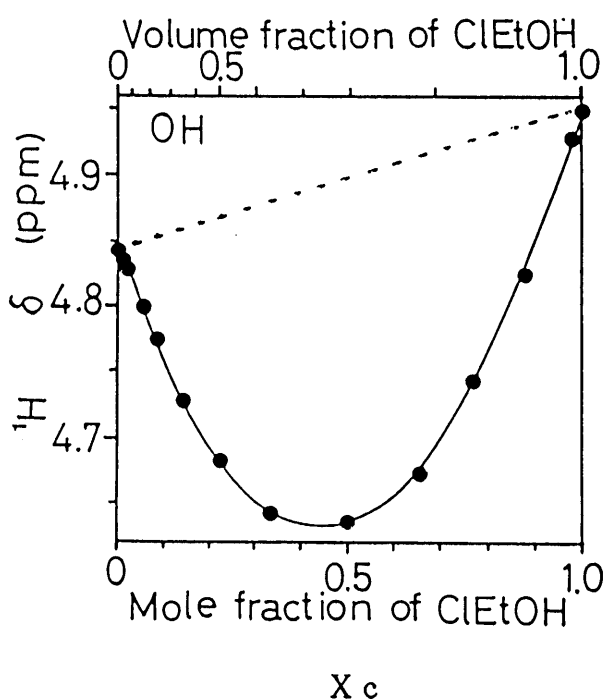


Fig.5-5 The ^1H chemical shifts of the OH in water-ClEtOH system with different molar ratios at $20 \pm 0.1^\circ \text{C}$.

Fig.5-5 の $X_o = 1$ 、すなわち ClEtOH の OHプロトンのケミカルシフトを δ_{ClEtOH} で表すと、この値は、 $X_o = 0$ のときの値、すなわち水の OHプロトンのケミカルシフト (δ_{water} で表す) よりも少し低磁場にある。しかしながら、水-ClEtOH の混合物の OHプロトンは広い混合領域にわたって、 δ_{water} よりもさらに高磁場に観測された。

ClEtOH のモル分率 X_o で観測されるケミカルシフト ${}_x\delta_{\text{obs}}$ はこの時の混合物中の ClEtOH のケミカルシフト ${}_x\delta_o$ とそのモル分率 X_o 、混合物中の水のケミカルシフト ${}_x\delta_w$ によって

$${}_x\delta_{\text{obs}} = X_o \cdot {}_x\delta_o + (1 - X_o) \cdot {}_x\delta_w \quad (\text{eq.5-1})$$

の関係で表される。Fig.5-5 の点線で示したケミカルシフトの値は水とClEtOHが混合によって分子間の相互作用を生じないと仮定したときの値で、これを ${}_x\delta'$ で表すと、

$${}_x\delta' = X_o \cdot \delta_{\text{ClEtOH}} + (1 - X_o) \cdot \delta_{\text{water}} \quad (\text{eq.5-2})$$

の関係で表される。Fig.5-5 で表した実験結果は、(eq.5-2)-(eq.5-1) がすべての X_o において正であることを示した。すなわち

$${}_x\delta' - {}_x\delta_{\text{obs}} = X_o (\delta_{\text{ClEtOH}} - {}_x\delta_o) + (1 - X_o) (\delta_{\text{water}} - {}_x\delta_w) > 0 \quad (\text{eq.5-3})$$

と書くことができる。ところで本研究の実験でペプチドの水溶液に加えた ClEtOH の濃度は、ClEtOH が溶液全体に占める体積が 40 vol% 程度を最大の濃度とした。これを水-ClEtOH の混合物中の ClEtOH のモル分率に換算するとほぼ 0.2 のあたりである。 X_o が 0 に近い、すなわち ClEtOH の濃度が小さいときこの差の値に主として寄与するのは第2項である水のケミカルシフトであるから、これが正であることより、

$${}_x\delta' - {}_x\delta_{\text{obs}} \approx (1 - X_o) (\delta_{\text{water}} - {}_x\delta_w) > 0$$

すなわち

$$\delta_{\text{water}} - x \delta_w > 0$$

したがって

$$\delta_{\text{water}} > x \delta_w \quad (\text{eq. 5-4})$$

と書くことができる。これより、ClEtOH を含まないときにくらべて水のケミカルシフトは小さい値を持っていることになる。したがって ClEtOH は水の structure breaker として作用しているといえる。X。の値が大きい、すなわち ClEtOH の濃度が高いときの高磁場シフトについては水と ClEtOH がそれぞれ OH プロトンの高磁場シフトにどのように寄与しているのかが本実験の結果からは明らかではないが、すべての濃度範囲にわたって OH 基の水素結合性が弱くなっていることは明らかである。Gierycz 等は 水と ClEtOH の混合熱を測定し、ClEtOH の広い濃度範囲にわたって混合が吸熱過程であることを報告している⁷⁾。分子間の水素結合が弱くなるのは吸熱過程であるから、Fig.5-5 の測定結果はこの報告の結果ともよく一致する。

つぎに ClEtOH が 3 種のペプチド水溶液中の水の構造にもたらす 効果を調べるために、ペプチド濃度を一定に保ち、ClEtOH の濃度を増加させた時の OH プロトンのケミカルシフトを測定した。ペプチドを溶解していない系と同様に、水と ClEtOH の OH プロトンは一つに収束した。測定の結果が Fig.5-6 に示してある。この図の変化からも明らかのように、OH プロトンはペプチドを含まない時と同様に高磁場にシフトし、水素結合性が小さくなっている。ClEtOH の濃度は最も高い場合でも ClEtOH-水の混合物のモル分率で表すと 0.2 程度であるので、観測された高磁場シフトは主として水の OH プロトンからの寄与と考えることができる。したがって、ペプチド水溶液中においても ClEtOH は水の structure breaker として作用することが明らかになった。

さらにこのようにして得られた ClEtOH がペプチドの会合とペプチド水溶液中の水構造におよぼす効果を EtOH による効果と比較するために、同じくペプチド濃度をそれぞれ一定にして EtOH の濃度を増加させ、NH プロトンと OH プロトンのケミカルシフトを測定した。EtOH と水の OH プロトンは 1 つのピークに収束して観測された。その結果を Fig.5-7 に示す。

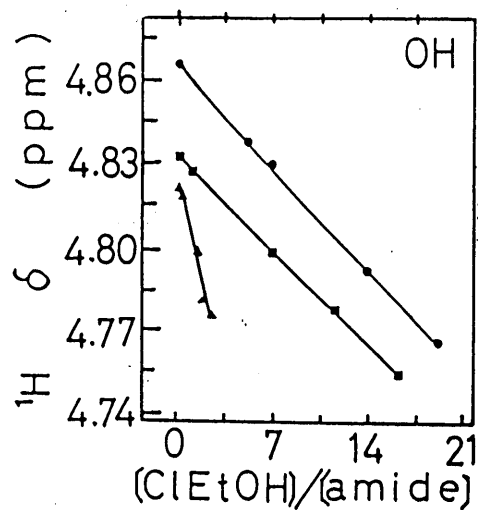


Fig.5-6 Effects of increasing ClEtOH content on the ^1H chemical shift of OH at 24 ° C, at (●)[APDA]=0.37 M (■)[AVDA]=0.30 M, and (▲)[ALDA]=0.80 M.

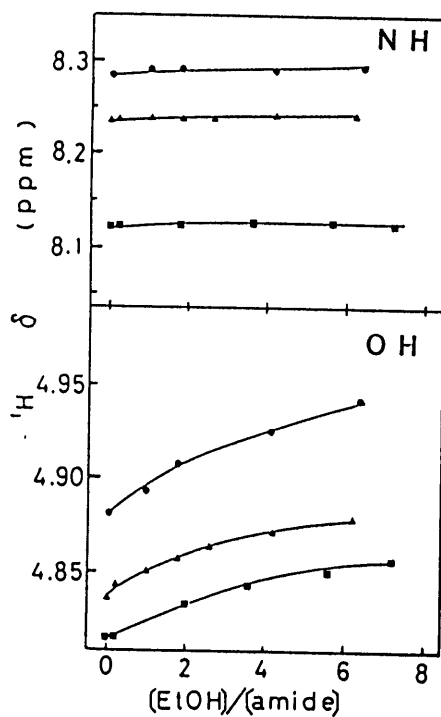


Fig.5-7 Effects of increasing EtOH on the ^1H chemical shifts of NH and OH of the peptide solutions at 22 ° C. : (●)[APDA]=0.65 M, (■)[AVDA]=0.45 M, and (▲)[ALDA]=0.70 M.

EtOH などのアルキルアルコールが低い濃度で水の構造を安定化することはよく知られてきたことである。そして、観測される水のOHプロトンの低磁場シフトはこれを実証する実験的な証拠として挙げられてきた。Coccia 等はこの原因として、水と EtOH 分子との水素結合、およびエチル基部分の疎水性水和の2つを報告している⁶⁾。Fig.5-7 に示した結果は、EtOH がペプチドの会合にほとんど影響をあたえないことと、この時、EtOH はペプチド水溶液中の水の structure maker として作用することを示している。

さらに ClEtOH の場合と同様に EtOH の濃度の増加にともなう APDA の2つのカルボニルの $^{13}\text{C}-\text{NOE}\{\text{OH}\}$ の変化を測定した結果が Fig.5-3 に示してある。2つの $^{13}\text{C}-\text{NOE}\{\text{OH}\}$ の値は EtOH を増加させていくとわずかにおおきくなり、したがって、ペプチドの会合体がわずかに解離するが、さらに EtOH を増加させるとほとんど変化が見られなくなる。

以上の ClEtOH と EtOH がペプチドの会合におよぼす効果を比較すると、効果の違いは水の構造に対する効果の違いによって生じることが明らかである。ClEtOH によってペプチドの自己会合が促進されるのは、溶媒である 水-ClEtOH の混合物の水素結合性が ClEtOH の増加にともなって弱くなるためであると結論することができる。この原因として2つの要素を考えることができる。ひとつは上に述べてきたOHプロトンの水素結合性が弱くなることであり、もうひとつは ClEtOH の増加に伴って、そのアルキル部分が混合物全体に占める体積が急激に増加することである。このアルキル部分の増加は 水-ClEtOH 混合物の疎水性を増加させ、水素結合性を低下させると考えることができる。一方、EtOH による効果は次のように考えることができる。すなわち、低い EtOH 濃度では 水-EtOH の混合物の水素結合性が強くなるためにペプチドの会合体の解離が観測される。しかしながら、EtOH の濃度が高くなるにつれて炭化水素部分のエチル基が混合物に占める体積が増加し、これによる疎水性が、強くなった水素結合性を弱くする方向に作用し、水-EtOH 混合物の水素結合性はある大きさに留まるために、ペプチドの会合にも変化が現れないものと予想することができる。

5. 3. 3 ClEtOHによる水構造破壊の機構についての考察

ClEtOH によって水の構造が破壊され、水の水素結合におけるプロトドナーとしての性質が弱くなる原因について考察してみたい。

EtOH のアルキル水素のうちの1原子だけが塩素で置換されることによって水の structure maker は破壊子に変わる原因として、はじめにOH基の酸素の水素結合におけるプロトンアクセプターとしての basicity の強さを比較してみたい。これまでも述べてきたように、EtOH の OH基の酸素の basicity はアルキル部分の電子押し出し効果が原因となって水に比べてかなり大きい。したがって EtOH の酸素は回りの水分子を分極させ、すなわち水のプロトドナーとしての性質を強くする。EtOH による水構造の形成には、アルキル基部分によるいわゆる疎水性水和による効果のほかに、このような OH基の酸素による効果も考慮されるべきであろう。このような basicity の大きさを量的に比較できるデータとして Kamlet と Taft が solvatochromic 法で得た値は、EtOH、ClEtOH、水に対してそれぞれ 0.77、0.31、0.14 である。⁸⁾ したがって、ClEtOH の場合には EtOH の場合のような OH基の酸素による水構造の形成はほとんど考えられないが、逆に破壊への寄与も無いと考えなければならない。このことから、ClEtOH による水構造の破壊は塩素原子の存在と関係があると考えなければならない。

Cl⁻, Br⁻, I⁻ などのハロゲンイオンが水の structure breaker として作用すること、そして、これらの breaker としての強さは Cl⁻ < Br⁻ < I⁻ の順に大きいことはよく知られてきた。^{1,2)} ところで、ClEtOH 分子中の塩素原子は水溶液中において、その電子吸引性の性質のゆえに、電荷を持って存在していると予想することができる。したがって、これらのハロゲンイオンによる水構造の破壊の機構についての研究は ClEtOH による破壊についての情報を与えるのではないかと期待できる。Chandarasekhar 等は⁹⁾ 希薄な Cl⁻ の水溶液について、クーロン項と Lennard-Jones 項からなる分子間相互作用にもとづいたモンテカルロシミュレーションの結果を報告している。この中で、Cl⁻ イオンのまわりの水1分子の厚さに相当する first shell とこれより外側を bulk とした場合、分子間のエネルギーは

1) first shell には6から10個の水分子が含まれ、H原子がClの方を向いたようにして配向する、2) first shell 内の水分子どうしのあいだには斥力が働く、すなわち水構造の破壊の方向に分子間力が寄与する、3) first shell 内の水分子と bulk の水分子との相互作用は first shell 内の水分子が配向しているために Cl^- がない場合にくらべて引力としての相互作用エネルギーがより小さくなる、すなわちこれも水構造破壊の方向に寄与するという結果を得ている。ClEtOH においても Cl がイオン性を帯びていると考えれば、大きさの程度は別にしても同様の効果を予想することができる。これに加えて ClEtOH の場合には塩素原子によって電子を引っ張られている CH_2CH_2 部分が水の構造にどのような影響をおよぼすのかについても考慮する必要がありそうである。この問題をもふくめて ClEtOH による水構造破壊の機構については今後の課題としたい。

5. 3. 4 ClEtOH とペプチドとの疎水性相互作用

Fig.5-3 と Fig.5-4 に見られるように、ClEtOH とペプチドのモル比が1当りの付近でペプチドの会合体の解離が起きている。しかしながら、これは先に述べてきた水-ClEtOH 混合物の水素結合性の変化によっては説明できない変化であり、これに対する原因を明らかにする必要がある。

用いた3種のペプチドはいずれも比較的大きい疎水性部分を持っている。いっぽう ClEtOH は1-プロパノールに比べれば小さいが EtOH よりは大きい疎水性を示すことが報告されている¹⁰⁾。したがってペプチドと ClEtOH は疎水基同士が水溶液中で相互作用する可能性を持っている。このような疎水性相互作用が実際に起きて、しかもこれが Fig.5-3 と Fig.5-4 に見られる ClEtOH の低い濃度でのペプチド会合体の解離に関係があるかどうかを調べるために、用いた3種のペプチドに比べて疎水性部分が十分に小さく、従って ClEtOH と疎水性相互作用をしないと考えられる N-methylacetamide (NMA) の会合に及ぼす ClEtOH の効果を調べた。

まず NMA の濃度を 3 mol/l とし、この濃度で NMA のある分率が自己会合していることを確認するために、 ^1H nmr とメチルプロトンの T_1 を測定し、希薄溶液の時に得られる値と比較した。その結果、NHプロトンのピーク幅は広く、またケミカルシフトは高磁場に移動しており、さらに T_1 も大きく減少していることから、この濃度で NMA のかなりの分率が自己会合していることを確認した。

つぎに、ClEtOH を増加させながら、NH、および OHプロトンのケミカルシフトとメチルプロトンの T_1 を測定した。結果を Fig.5-8 に示す。NHプロトンおよび OHプロトンの高磁場シフトから明らかなように、NMA は ClEtOH の増加に伴って溶媒の水素結合性の低下とともに自己会合率を高くしていく。しかしながらこの時、3種のペプチドにおいて見られた T_1 の増加は全く見られず、従って ClEtOH の増加に伴う会合体の解離は観測されなかった。この結果から、 $[\text{peptide}]/[\text{ClEtOH}]$ の値が1付近で観測されたペプチド会合体の解離は、ペプチドの疎水性部分と ClEtOH との相互作用によってペプチド分子間の相互作用が阻害され、その結果、ペプチド会合体の見かけの解離を観測したものと結論される。

Fig.5-3 と Fig.5-4 に見られるように、3種のペプチドの濃度の大きさに関係なく、いずれのペプチドにおいても ClEtOH とペプチドとのモル比が1の付近で見かけの解離が観測されたという実験結果からも、この見かけの解離がペプチドと ClEtOH との分子間相互作用にもとづくものであることを示すことができる。

ここで注目すべきことは、このようなペプチドと ClEtOH との疎水性相互作用がバルクの 水-ClEtOH 混合物の ClEtOH の組成を減少させ、その結果としてバルクの構造をエネルギー的により安定化させるということである。一方、ペプチド分子の周辺では、疎水性相互作用が起きなくても溶媒である 水-ClEtOH 混合物の水素結合性は水のみ比べて減少するのに加えて、バルクから移動してきた ClEtOH によってさらに減少し、その結果ペプチド分子間の水素結合が容易になる。この結果として、観測されたように疎水性相互作用による見かけのペプチド会合体の解離は逆に会合の促進によって変わることになる。以上のことから、逆に ClEtOH とペプチドとの疎水性相互作用が起きる原因として、水-ClEtOH の混合によるバルクのエネルギー的な不安定化を回復するために ClEtOH がバルクからペプチドの近傍へ逃散したという見方もできる。

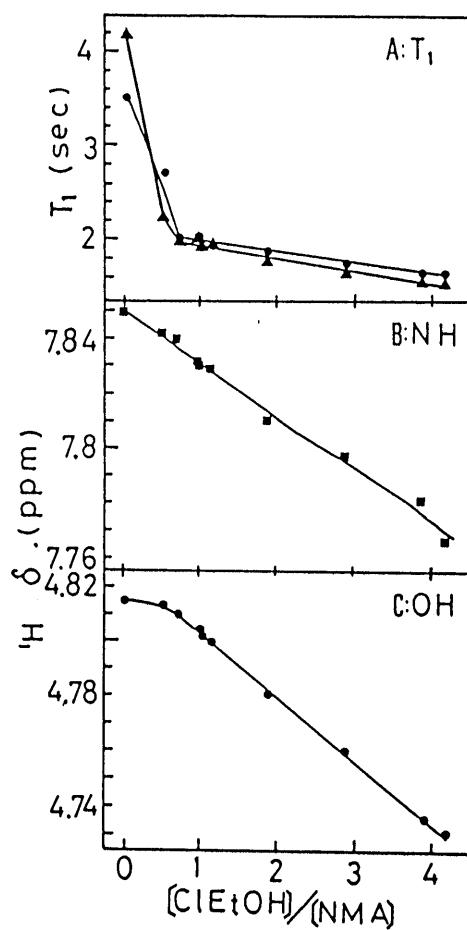


Fig.5-8 Effects of increasing ClEtOH content on the association of NMA at $[NMA]=3$ M. : A; Changes in the T_1 of the (\bullet) CH_3CO and (\blacktriangle) NCH_3 protons, B; Changes in the 1H chemical shift of NH, and C; Changes in the 1H chemical shift of OH.

5. 3. 5 ClEtOH の OH プロトンの多重度から見た

四塩化炭素溶液中での水と ClEtOH の相互作用

これまでに述べてきたように、本研究では水と ClEtOH が混合することによって、混合する前にそれぞれが持っていた水素結合性がより小さくなることが、水溶液中のペプチド化合物の会合に重大な影響をおよぼすことを明らかにしてきた。ここでは、四塩化炭素溶液中においても ClEtOH と水とは特異な相互作用をすることを示す実験結果として、ClEtOH の OH プロトンの多重度が測定試料の水分含有量に依存することについて述べる。この実験は本研究の最もはじめの頃に行ったもので、日本電子社製 4H-100 型 CWnmr 測定装置を用いて行った。

はじめに、水分含有量の異なる方法で ClEtOH の四塩化炭素溶液を調製した場合の測定結果を Table.5-1 に示してある。すなわち、蒸留した ClEtOH にあらかじめ 0.1 Wt% の水を加え、蒸留直後の四塩化炭素を溶媒として濃度の異なる溶液を調製した場合 (Method I)、ClEtOH、四塩化炭素ともに蒸留直後のものから溶液を調製した場合 (Method II)、ClEtOH、四塩化炭素の硫酸マグネシウムによる脱水、蒸留、さらに溶液の調製をすべてグリースレスコックを使った真空ライン中で行った場合 (Method III) へと試料中の水の含有量を変化させると、OH プロトンのケミカルシフトは 3 重項から 1 重項へと変化した。

Table.5-1 Multiplicity¹⁾ of OH proton of ClEtOH at 24 ° C
in CCl₄ solutions prepared by the different methods²⁾.

ClEtOH] (mol/l) monomer fraction ³⁾	0.10	0.08	0.06	0.04	0.02
Method I	T	T	T	T	T
Method II	T	T	S	S	S
Method III	S	S	S	S	S

1) T = triplet, S = singlet. 2) see the text. 3) values determined from IR spectra of OH vibration bands.

上の実験結果をさらに確認するために、Method III で調製した ClEtOH 溶液に異なる量の水を加えて OH プロトンのケミカルシフトと多重度を測定した。結果を Table.5-2 に示してある。この結果からも水を含まない試料の OH プロトンは 1 重項を示し、水を加えていくと 3 重項へと変化することが確認された。

Table.5-2 Chemical shift¹⁾ and the Multiplicity²⁾ of OH proton of ClEtOH at 21° C in CCl₄ solutions with different content of water³⁾.

[ClEtOH] (mol/l)					
0.030			0.22		
[water]	δ_{OH}	multiplicity	[water]	δ_{OH}	multiplicity
0	170.7	S	0	242.5	S
4	174.1	BS	20	249.6	BS
8	175.3	T	40	251.3	BS
			60	253.9	T

1) Hz from the internal TMS measured at 100 MHz. 2) S=singlet, BS=broad singlet, T=triplet. 3) number of μ l added to 50 ml of sample solution.

Slocum 等¹⁰⁾ は分子内水素結合している ClEtOH の回転異性体は 3 重項を示すと考え、低い濃度の時の ClEtOH の OH プロトンが四塩化炭素やシクロヘキサン溶液中で 3 重項を示す原因として、ClEtOH の濃度が低くなるにつれて、分子内水素結合している gauche 型の分率が増加するためであると考えた。彼らは ClEtOH が 66 モル%の濃度においてもなお 3 重項を観測している。しかしながら、この濃度での赤外吸収スペクトルの測定から、この濃度では分子内水素結合種の gauche 体よりは分子内水素結合していない trans 体の方がはるかに分率が高い。したがって、3 重項を分子内水素結合種によるものとするにはかなりの疑問が残るばかりか、上に示した本研究での実験結果は、3 重項が水分の存在と密接に関係していることをはっきりと示している。

まず、測定試料の調製の途中で水分の入り込む余地の無い Method III で調製した試料が3重項ではなく1重項として観測されたことについて考えてみる。このために、Table.5-3 に示したように、温度を変化させて測定してみると、温度の上昇にともなって OHプロトンは1重項から3重項へと変化した。

Table.5-3 Temperature dependence of the chemical shift¹⁾ and the multiplicity²⁾ of OH proton of ClEtOH in CCl₄ solutions prepared by the Method II and Method III.

[ClEtOH] and the method of sample preparation			[ClEtOH] and the method of sample preparation		
0.042 (mol/l) , Method III ³⁾			0.060 (mol/l), Method II ⁴⁾		
Temp.(° C)	δ_{OH}	multiplicity	Temp.(° C)	δ_{OH}	multiplicity
23	171.8	S	26	171.9	S
52	165.5	BS	50	161.8	BS
78	158.1	T	100	154.7	T

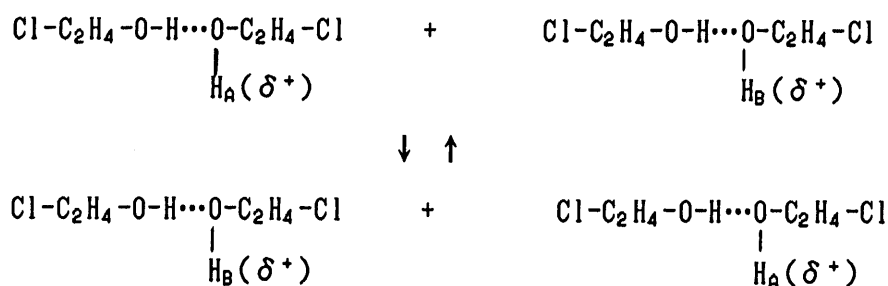
1) Hz from the internal TMS measured at 100 MHz,

2) S=singlet, BS=broad singlet, T=triplet, 3) vacuum line method,

4) volumetric preparation using freshly distilled ClEtOH and CCl₄.

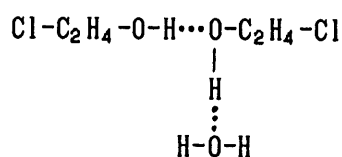
もし観測された1重項が酸性の不純物の混合によって起きるプロトン交換にもとづく場合には、温度の上昇によってプロトン交換反応はさらに加速されるはずであるからこの原因によるものではなく、アルコール分子間の会合が原因となって観測されることがわかる。四塩化炭素溶液中の ClEtOH は0.01 mol/l の当りの濃度から自己会合が始まり、IRで観測される OH伸縮振動は低波数側にシフトした広いバンドを示す。これはメタノールやエタノールのようなアルキルアルコールにも見られるスペクトルであり、ClEtOH の会合は OH基どうしの水素結合形成によって起こり、塩素は会合の水素結合形成に関与していないと考えることができる。しかし、塩素の電子吸引の効果により、会合体中の水素結合していない OH基の水素は下図に示すように十分に δ^+ 性を持つようになり、会合体どうし、あるいは会合体

とモノマーの ClEtOH 分子とのあいだで交換反応を起こしていると考えられる。



温度の上昇にともなって会合体を形成する ClEtOH の分率は少なくなり、モノマーとして溶液中に存在する分率が増加する。これにともなって ClEtOH が分子状態で本来もっていた CH_2 プロトンと OH プロトンとのスピンスピンカップリングが回復し、3重項が観測されることが出来る。実際、nmr を測定した最低の濃度、0.02M においても室温で20モル%が会合体として存在することが IR スペクトルから計算される。

このように考えていくと、Method I、すなわち水を加えた溶液において3重項が観測されたこと、あるいは Table.5-2 に示した結果から、溶液中の水分子が上に述べた ClEtOH の OH プロトンの交換を抑制するのではないかと予想される。これを実験的に示すために、まずはじめに、加えた水が四塩化炭素溶液中でどのようにして溶解しているかを明らかにしようと試みた。このために ClEtOH 溶液に水を加えて IR スペクトルを測定したところ、ClEtOH のモノマーの OH 伸縮バンドには水を加えたことによる変化が全く現れず、また四塩化炭素溶液中の水の吸収としても現れなかった。したがって、加えた水は ClEtOH の会合体に取り込まれていることがわかった。水分子をふくむ会合体の構造としてつぎのようなものを予想することが可能である。



水を加えた溶液で3重項が観測されたということから、水が ClEtOH の会合体が関与するOHプロトンの交換を、CH₂とOHプロトンのスピンスピンカップリングが観測されるのに十分な程度に減速させた結果と考えることができる。そして上の構造は交換しやすいOH基の水素が水分子の酸素と水素結合することによって交換できなくなることから、観測された実験結果を満たしている。

さらにここで注目したいことは、水-ClEtOH の2成分系の溶液の場合とは逆に、四塩化炭素溶液中では水を加えるとOHプロトンのケミカルシフトが Table.5-2 に示したように低磁場へとシフトすることである。この結果は四塩化炭素溶液中の ClEtOH のOHプロトンの水素結合性が水との相互作用によって少し強くなることを意味しており、上の構造はこの実験結果をも満たす。先に 水-ClEtOH の2成分系溶液における水構造の破壊の原因として水と塩素部分との相互作用を考え、OH基の部分との相互作用は破壊には寄与しないものと考えてきたが、上の考察はこの水構造破壊の機構を間接的に支持する。

REFERENCES

1. 中垣正幸 編 「水の構造と物性」(1974) 南江堂.
2. Collins, K.D. and Washabaugh, M.W.(1985), Q. Rev. Biophys., 4, 323.
3. Desnoyers, J.E. and Perron, G.(1972) J. Solution Chem., 1, 199.
4. Zeidler, M. D., in :Franks, F. (ed), Water, A comprehensive Treatise, vol.2, (1973), Plenum Press, P.529.
5. Harvey, J. M., Jacson, S.E. and Symons, M.C.R.(1977) Chem. Phys. Lett., 47, 440

6. Coccia, A., Indovina, P.L. and Viti, V.(1975) Chem. Phys., 7, 30.
7. Gierycz, P., Denda, M. and Nakanishi, K.(1985) Themochime. Acta, 88, 241.
8. Kamlet, M.J. & Taft, R.W.(1976) J. Am. Chem. Soc., 98, 377.
9. Chandrasekhar, J., Spellmeyer, D.C. and Jorgensen, W.L. (1984) J. Am. Chem. Soc., 106, 903-910.
10. De Ligney, C.L., Koole, N.J., Nelson, H.D. and Nieuwdorp, G.H.E. (1975) J. Chromatogr., 114, 63.
11. Slocum, D. W. and Jennings, C.A., Tetrahedron Lett., 1972, 3543.

ま と め

6. 1 実験結果のまとめと結論

目的

本研究は ClEtOH によるタンパク質変性の機構を明らかにし、EtOHによる変性の機構との違いを明確にすること、さらにはこれらのアルコールによるタンパク質の変性機構から、水溶液中のタンパク質の構造安定化因子についての情報を得ることを目標とした。

これまでに報告されてきた ClEtOH と EtOH やプロパノールによるタンパク質の変性との違いをまとめてみると次のようになる。

1. これらのアルコールはともに、尿素やグアニジン塩酸塩のようにタンパク質の unfolding をもたらしのではなく、ヘリックス含有量を増加させる、いわゆる structure-making 変性剤であるが、ClEtOH は EtOH、プロパノールにくらべて低濃度ではるかに強い変性効果をもたらす。
2. ClEtOH はタンパク質近傍においてバルクよりもより濃度が高くなる、いわゆる選択的相互作用を示すが、EtOH、2-プロパノールにおいてはこれは観測されない。

これまでに報告されてきた ClEtOH による変性の原因としては、塩素原子をも含めた疎水性のアルキル部分がタンパク質の疎水性部分と相互作用するというものであった。しかし、ClEtOH の疎水性は EtOH と 1-プロパノールの中間にあることが報告されていることから、疎水性の違いによる理由では変性についての上の 2 つの違いを全く説明できない。

本研究は、ClEtOH 分子が持つ疎水性以外の特徴として、塩素の電子吸引効果によってもたらされるアルコールOH基の極性に注目して、アルキルアルコールには無い ClEtOH のこの極性がその強いタンパク質変性能力に関係があるのではないかと、いう予想を実験的に示そうとすることから始めた。

実験の概要

実験は、ClEtOH などの種々の2-置換エタノールといくつかのペプチド化合物あるいはアミド化合物を用いて進めてきた。まずアルコールの水素結合性の定量的な比較を行った。次に、異なるL-アミノ酸残基を含むペプチド化合物を合成し、これらの四塩化炭素溶液、水-重水の溶液中での自己会合について調べた。次に、これらの性質の異なる溶媒中でのペプチド化合物、あるいはより簡単な構造を持つアミド化合物の自己会合が ClEtOH や EtOH によってどのように変化するのかを調べてこれを比較し、またその変化がどのような原因に基づくのかを明らかにしようと試みた。

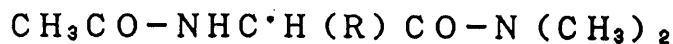
結果と考察

1. ClEtOH の水素結合性の大きさについて

四塩化炭素溶液中で、アルコールが N,N-dimethylacetamide とのあいだに 1 : 1 で水素結合するときのアルコールの OH基の伸縮振動の波数のシフトを比較したところ、ClEtOHでは 224 cm^{-1} 、EtOHでは 177 cm^{-1} 、また水素結合形成反応の平衡定数は $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ、10.9、3.6 ($\text{dm}^3\text{ mol}^{-1}$) であった。そして波数のシフトの大きさから平衡定数の値を推定する実験式を得た。平衡定数の大きさの比較からは ClEtOH の水素結合性が EtOH などのアルキルアルコールよりもかなり大きいと言えることができる。

2. ペプチド化合物の自己会合について

アミノ酸残基として Gly, L-Phe, L-Leu, L-Phe を含むペプチド化合物、



を合成し、これらが四塩化炭素溶液中で形成する会合体の構造と会合の平衡定数を、IRと¹Hnmrの方法で調べた。その結果、これらのペプチド化合物はサイクリック構造を持つダイマー(I)を形成し、それぞれのペプチドの会合定数は20℃で3,4(G), 11.0(P), 22.4(V), 22.1(L) (dm³ mol⁻¹)であった。クロロホルム溶液中においても(I)が形成されるが、水素結合の形成率はかなり小さくなる。一方、水-重水中においてのこれらのペプチド化合物の水素結合による会合をFTnmr法によって調べた結果、水素結合形成率はクロロホルム中よりもさらに小さく、しかも(II)に示すように水素結合は1組しか形成されず、水素結合しないで残っているカルボニル、あるいはNH基が多い構造のものが多く形成されることがわかった。このように、ペプチド基間の水素結合形成は溶媒の水素結合性が高いときは少なく、低いときは多く、溶媒の水素結合性を敏感に反映することを実験的に確認した。また会合体の構造については、四塩化炭素溶液中では水素結合の数が多くなるように、一方の水溶液中では疎水性部分の相互作用がより多くなるような構造をとることを明らかにした。

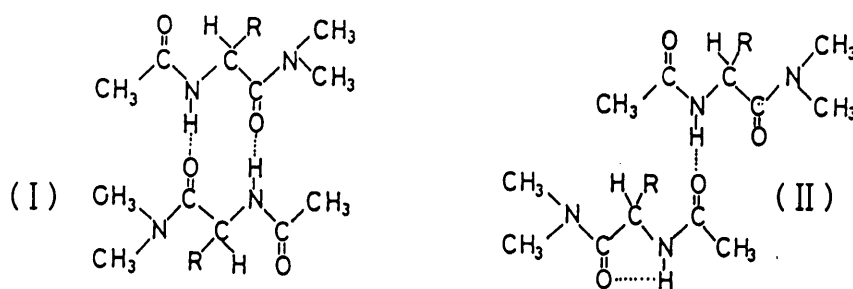


Fig.6-1 Structures of the associated complexes of the peptides.

3. 四塩化炭素溶液中での ClEtOH とペプチドあるいはアミド化合物との相互作用について

ClEtOH や EtOH などの1級アルコール、2-プロパノールなどの2級アルコール、2-メチル-2-プロパノールなどの3級アルコールと N,N-dimethylacetamide のカルボニル部分との水素結合において、アルコールの濃度をカルボニルよりも相対的

に高くしてC=O伸縮振動の波数シフトを測定した結果、1級およびA部分の小さい2級アルコールではComplex-Iで示した水素結合体が、3級およびAの大きい2級アルコールではComplex-IIが形成されることを明らかにした。ClEtOH、EtOHによるシフトはそれぞれ、31, 25 (cm⁻¹)であった。

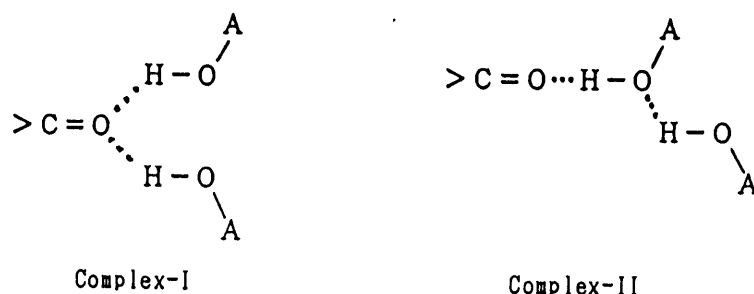


Fig.6-2 The 2:1 complexes formed from alcohol and carbonyl.

さらに、ClEtOHが形成するComplex-Iの水素結合は非常に安定であること、そのために、3分子あるいは4分子以上が鎖状に水素結合によって自己会合し、非常に安定な水素結合が形成されるN-methylacetamideの溶液においても、ClEtOHとの会合のためにアミドの自己会合が抑制されることを示した。この実験結果から、ClEtOHはタンパク質内部の安定なアミド基間の水素結合をも解離するのに十分強い水素結合性を持っていることがわかった。また、ClEtOHのOH基と塩素がそれぞれプロトドナー、アクセプターとなってペプチド化合物とのあいだに2官能基的な水素結合による相互作用を示した。

4. ClEtOHが水-重水溶液中でのペプチド化合物の会合におよぼす効果について

FTnmr法を用いた測定から、四塩化炭素溶液中において発揮されたClEtOHの強い水素結合性はここではまったく発揮されないばかりか、ペプチド化合物のペプチド基間の水素結合による自己会合を促進することを示した。したがって、水溶液中で重要なのはClEtOHとペプチド化合物との相互作用ではなく、ClEtOHと水とのあいだの相互作用であることを明らかにした。

5. ClEtOH による水構造の破壊について

水と ClEtOH の混合物の OH プロトンのケミカルシフト測定から、ClEtOH が水の構造を破壊すること、そしてこれはペプチド化合物の水溶液においても起こることを示した。このために、水と ClEtOH の混合物の水素結合性は減少し、さらに ClEtOH の疎水性部分の混合物全体に占める体積の割合も ClEtOH の増加に伴ってふえるために、混合物全体としての水素結合性は ClEtOH の増加によって減少することを指摘した。したがって2に得られた結論、ペプチド基間の水素結合形成は溶媒の水素結合性が高いときは少なく、低いときは多くなることより、ClEtOH によるペプチド基間水素結合の促進は ClEtOH を加えたことによって生じる溶媒の水素結合性の低下の結果であると結論することができた。そして ClEtOH による水構造の破壊の原因として、電子吸引性の塩素部分が弱い負電荷を帯びることと関係があると推定した。一方 EtOH はペプチド化合物の水-重水溶液中において低い濃度で ClEtOH とは逆に EtOH-水混合物の水素結合性を強くするように作用することを確認した。この時ペプチド化合物の会合がわずかに進むが、EtOH の増加にともなってアルキル部分に由来する疎水性も増加し、水-EtOH 混合物の水素結合性の大きさは変わらなくなる。これに対応して、ペプチド化合物の会合にも変化が現れなくなり、すなわち、EtOH のペプチド化合物の会合に対する効果も、溶媒の水素結合性の変化と関連づけることができた。

6. ClEtOH とペプチド化合物との疎水性相互作用について

水-重水 中で ClEtOH は疎水性部分の小さい N-methylacetamide とはそのアミド基間水素結合を促進するのみで疎水性相互作用をしないのに対して、疎水性部分がかなり大きいペプチド化合物とはペプチド化合物と ClEtOH が等モル付近で相互作用を起こすことを NOE と T_1 の測定から明らかにした。したがってこの相互作用は疎水性相互作用であると結論した。そして、1-プロパノールに比べても小さい疎水性しか持たない ClEtOH が疎水性相互作用をする原因として、バルクからペプチド近傍への ClEtOH の逃散によってバルクの 水-ClEtOH 混合物中の ClEtOH の濃度が減少するためにもたらされる系のエネルギー安定化の効果を指摘した。このときペプチド化合物近傍では ClEtOH の増加による溶媒の水素結合性の低下がさらに進み、その結果としてペプチド化合物のアミド基間水素結合の形成が促進され

ると考えることができる。

6. 2 本研究の結論と ClEtOH によるタンパク質変性の機構との関連

タンパク質のヘリックス形成はあらためて言うまでもなくタンパク質内部のペプチド基間の水素結合を意味する。 β -構造の形成もまたペプチド基間の水素結合を意味するが、ClEtOH が β -構造を増加させるかどうかについての報告は見あたらない。 α -ヘリックスを採るか β -構造かについてはアミノ酸残基の種類との関係が広い範囲で研究されていることから、ClEtOHによる変性が α -ヘリックスをもたらすか β -構造を増加させるかもまた、このアミノ酸残基の種類との関係で議論されるべきであるように思われる。重要なことは、ClEtOH が尿素のように unfolding をもたらず、すなわち、タンパク質分子内の水素結合解離をもたらすのとは逆に形成をもたらすことである。したがって本研究では、ClEtOH を加えたことによるヘリックス部分の増加をペプチド基間の水素結合形成として単純化して捕らえてみた。すなわち本研究で用いたペプチド化合物のペプチド基間の水素結合形成はタンパク質におけるヘリックスの形成に対応するものとして、以下に ClEtOH によるタンパク質の変性と本研究で得られた実験結果との関連性を述べる。

本研究で用いてきたペプチド化合物はタンパク質にくらべると余りにも小さく、単純な分子であるが、それにもかかわらずこれらは ClEtOH によるタンパク質の変性の機構についての重要な情報を与えるものと考えることができる。まず上に述べたように α -ヘリックスの形成をペプチド基間水素結合の形成とみなすと、ClEtOH の増加によってもたらされたペプチド化合物間の会合の促進の機構をそのまま当てはめることができる。すなわち、タンパク質の近傍の溶媒である水-ClEtOH 混合物の水素結合性の低下がタンパク質のペプチド基間の水素結合形成をもたらすと予想することが可能である。さらに ClEtOH のタンパク質への選択的相互作用についてであるが、結論の6に述べてきたように、この相互作用は単に疎水性相互作用というよりは、タンパク質の近傍に ClEtOH が集まることによるバルク部分のエネルギー

一安定化と深く関係していることを指摘することができる。このような

ClEtOH との混合による水-ClEtOH 混合物のエネルギー的な不安定化

↓

ClEtOH のタンパク質分子近傍への移動によって

もたらされるバルク部分の ClEtOH の減少

↓

これにともなうバルク部分のエネルギー的な安定化

を考慮しない限り、疎水性の大きさととの比較からのみでは、ClEtOH の EtOH やプロパノールとの変性剤としての強さの違いを説明することができない。逆にこのバルクの安定性について考慮することによって、EtOH、2-プロパノールでは選択的相互作用が起きないという Shindo 等の実験結果を説明することができる。すなわち、これらのアルキルアルコールでは ClEtOH とは逆に水との混合物として存在する方が安定であり、疎水性も非常に大きいということがないために、選択的相互作用は起きないものと考えることができる。

6. 3 タンパク質の構造安定化因子についての予想

Phe, Val, Leu の残基をふくむペプチド化合物の四塩化炭素溶液中と水-重水溶液中での水素結合による自己会合の会合率と会合体の構造の違いは、これらの残基が水溶液中のタンパク質の安定化に果たす役割を明確にしている。すなわち、疎水性の側鎖による相互作用である。しかしこれにも増して興味深いのは溶媒の水素結合性の違いによる会合率の大きな違いであろう。

本研究のはじめでは、ClEtOH が水溶液中においても水素結合性の溶媒として作用し、タンパク質のペプチドカルボニル基に水素結合した中間体の存在を仮定していた。しかしながらこの予想はまったくはずれてしまった。このことはまた、タンパク質の変性を変性剤との分子間相互作用によって起きるものとした前提そのものの間違いでもあったことを指摘しなければならない。本研究の結果は ClEtOH、EtOH

によるタンパク質の変性が分子間の相互作用ではなく、溶媒の熱的な安定性と深く関係し、タンパク質近傍の水素結合性の大きさの変化によってもたらされることを示している。そして、この結論を踏まえた上で、水溶液中のタンパク質の構造を安定化している因子について言及するとすれば、それぞれのタンパク質に特有の2次構造をもたらしている最も大きな因子はタンパク質のまわりの水の水素結合性の大きさであると言える。そしてこのタンパク質の近傍の水の水素結合性を決定しているものはタンパク質そのものであると言える。すなわち、側鎖の疎水性水和やイオンなど種々の原因による水の構造の変化への寄与を考慮しなければならない。

6. 4 今後の課題

これまでも述べてきたように、本研究は ClEtOH によるタンパク質の変性機構を明らかにすることを目標にして進めてきた。そしてタンパク質にくらべてはるかに小さい分子を用いた系で実験を進め、ClEtOH による水構造の破壊がタンパク質の変性に関係すること示す実験結果を得てきた。したがって、本研究で得られた結論を実証するためには、実際にタンパク質を含む系においてもまた ClEtOH がバルクの水構造を破壊していることを実験的に何らかの方法で調べる必要がある。

ClEtOH による水構造破壊の原因として本研究では、ClEtOH 分子中の塩素部分と関係があるのではないかと推論した。この原因についての問題をも含めて、種々のハロゲンアルコールについて、水の構造におよぼす効果を調べ、その原因を明らかにすることが必要であると考えられる。この問題はまた、アルキルアルコールが水の水構造におよぼす効果との比較において興味をひかれる問題であるばかりではなく、ハロゲンを含む麻酔剤、医薬あるいは農薬などの生体内での膜やタンパク質との相互作用という面でも非常に興味ある内容をふくんでいると言える。

謝

舌辛

本研究は名古屋大学理学部化学科の池田勝一教授のご指導のもとで行ったものです。懇切で丁寧なご指導をいただきました池田勝一教授に心から感謝いたします。そして池田研究室の前田悠助教授にも有益なご助言ご指導をいただきましたことを感謝いたします。

本研究の実験はすべて福井大学工学部附属繊維・機能性材料研究施設の神藤洋爾教授の研究室で行いました。研究のための恵まれた環境と自由な討論、根気強いご指導をいただきました神藤洋爾教授に心から感謝いたします。

学生時代の恩師である立花太郎お茶の水女子大学名誉教授には、終始あたたかい励ましをいただきましたことを心から感謝し、今後の精進をお誓いいたします。

本研究の実験は神藤研究室の多くの卒業研究生、修士の学生の方々といっしょに進めてきました。ご協力いただいたことを心からお礼申し上げます。

最後に、育児や家事の分担をして研究を助けてくれた母と家族に感謝します。

P u b l i c a t i o n

1. On the hydroxyl proton multiplicity in the ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 2-chloroethanol in inert solvents.
K. Mizuno, and Y. Shindo.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 1979, 475-7.
2. Association studies of N-acetyl-amino acid N,N-dimethylamides in carbon tetrachloride.
K. Mizuno, S. Nishio, and Y. Shindo.
Biopolymers, 18, 693-708(1979)
3. Studies of the interaction between alcohol and amides to identify the factors in the denaturation of globular proteins in halogenoalcohol + water mixture.
K. Mizuno, H. Kaido, K. Kimura, K. Miyamoto, N. Yoneda, T. Kawabata, T. Turusaki, N. Hashizume, and Y. Shindo.
J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 80, 879-94(1984)
4. Structures of 2:1 complexes between halogenated alcohols and N,N-dimethylacetamide of Acetone.
K. Mizuno, M. Saito, S. Uchida, and Y. Shindo.
J. Phys. Chem., 89, 2294-6(1985)
5. Fourier-transform nuclear magnetic resonance studies of the effects of 2-chloroethanol on the association of N-acetyl-L-amino acid N',N'-demethylamides in aqueous solutions.
K. Mizuno, T. Takagi, Y. Ikeda, and Y. Shindo.
J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 1989, 85, in press.

On the Hydroxy Proton Multiplicity in the ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 2-Chloroethanol in Inert Solvents

By Kazuko Mizuno and Yohji Shindo, * Textile Research Institute, Fukui University, Fukui, Japan 910

Reprinted from

JOURNAL
OF
THE CHEMICAL SOCIETY

PERKIN TRANSACTIONS II

1979

On the Hydroxy Proton Multiplicity in the ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 2-Chloroethanol in Inert Solvents

By Kazuko Mizuno and Yohji Shindo,* Textile Research Institute, Fukui University, Fukui, Japan 910

The hydroxy proton multiplicity of 2-chloroethanol has been studied in inert solvents. It has been found that only a singlet is observed in fully dehydrated sample solutions from neat to 0.02M concentration at room temperature. A trace of water present in the sample solutions causes a multiplet structure at lower alcohol concentrations. The singlet can be explained in terms of proton exchange within the associated species of the alcohol as a result of the increased acidity of the hydroxy proton due to chlorine substitution. The triplet is interpreted as the result of the reduction in proton exchange within the associated species caused by water molecules which are incorporated into the associated species of the alcohol.

THE influence of intramolecular hydrogen bonding on the multiplicity of the hydroxy proton has been investigated for 2-chloroethanols.¹ It was concluded that intramolecular hydrogen bonding is responsible for the hydroxy proton multiplicity observed at lower concentrations, while the influence of proton acidity becomes important at higher concentrations as shown by the observation of the broad singlet structure. In this paper, we present experimental results showing that the hydroxy proton multiplet of 2-chloroethanol at lower concentrations is caused by a trace amount of water remaining in the solutions.

EXPERIMENTAL

2-Chloroethanol, carbon tetrachloride, and cyclohexane were all Wako Chemicals guaranteed reagents. Tetramethylsilane (TMS) was purchased from Merck. To obtain fully dehydrated sample solutions, dehydration and purification of the alcohol, the solvents, and TMS, and the preparation of the sample solutions were all carried out carefully in a grease-free vacuum line. The alcohol and solvents, dried over MgSO_4 , and TMS were put into ampoules on the vacuum line with a small amount of MgSO_4 , and dried thoroughly by magnetic stirring overnight. The fore-run of the reagents was taken off by vacuum distillation for each preparation. To prepare sample solutions, the alcohol and solvent were condensed into an ampoule by vacuum distillation, to which an i.r. cell and a ^1H n.m.r. tube were connected. In addition, volumetric sample preparation was also carried out. Each sample solution thus prepared was submitted to both ^1H n.m.r. and i.r. measurements. TMS, condensed into the n.m.r. tube during sample preparation, was used as internal reference. In several cases, to confirm the absence of water in the solutions containing TMS, the alcohol, solvent, and TMS were condensed into the ampoule and then i.r. and n.m.r. measurements were made. The n.m.r. spectra were obtained with a JEOL model 4H-100 100Mc spectrometer. I.r. spectra were obtained with a JASCO model A-3 spectrometer with fused silica cells having 0.5, 2.0, 20, and 100 mm pathlengths. I.r. spectra in the wavenumber region 4 000—2 800 cm^{-1} were utilized to obtain information about alcohol concentrations, the degree of alcohol association, and the presence of water. Alcohol concentrations were determined by using calibration curves constructed for the alkyl part of the alcohol. The absence of water in carbon tetrachloride was confirmed from the i.r. spectra obtained with a 100 mm cell.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental results obtained for 2-chloroethanol in carbon tetrachloride can be summarized as follows.

(1) As shown in Table I, the multiplet for the hydroxy

TABLE I

Changes of the hydroxy proton multiplicity^a of 2-chloroethanol in CCl_4 with the method of sample preparation, at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Method of sample preparation	Concentration of 2-chloroethanol ^d (M)				
	0.10 (0.782)	0.08 (0.825)	0.06 (0.828)	0.04 (0.833)	0.02 (0.835)
Volumetric I ^b	t	t	t	t	t
Volumetric II ^c	t	t	s	s	s
In a vacuum line	s	s	s	s	s

^a s = Singlet. t = triplet. ^b 2-Chloroethanol containing 0.1 wt% of water and CCl_4 freshly distilled were used. The water content was determined by the Karl Fischer titration method. ^c Both alcohol and solvent were freshly distilled and used. ^d The values in parentheses are monomer fractions determined from i.r. spectra.

proton depends upon the degree of dehydration of the sample solutions. (2) At room temperature, only a singlet is observed in the sample solutions prepared on the vacuum line, the concentration range being from neat to 0.02M. For our n.m.r. measurements, 0.02M is the lowest concentration used. At this concentration the monomer fraction is found to be *ca.* 0.84 from the OH band of the monomer alcohol in the i.r. spectrum. (3) With an increase in temperature, the singlet observed at the lower concentrations changes to a broad singlet and then to a triplet in the sample solutions prepared in the vacuum line. This is also the case for the sample solutions of lower concentrations prepared volumetrically with freshly distilled reagents. The temperature at which a triplet appears becomes higher as the alcohol concentration increases and at concentrations greater than 0.1M the singlet remains unchanged even at 100 $^\circ\text{C}$. Table 2 illustrates some of these results. (4) A similar change in the multiplicity, *i.e.* from a singlet to a broad singlet and then to a triplet, was produced at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by the stepwise addition of water to the sample solutions prepared on the vacuum line (Table 3). (5) The sharp singlet of neat 2-chloroethanol changes to a broad singlet upon addition of water at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$. (6) The i.r. spectra of the samples in result (4) show an increase in the absorbance of the OH band of the self-associated

TABLE 2

Changes of the chemical shift^a (c.s.) and multiplicity^b of the hydroxy proton of 2-chloroethanol in CCl₄ with an increase in temperature

Concentration of 2-chloroethanol and method of sample preparation					
0.042 (M) (In the vacuum line)		0.060 (M) (Volumetric II) ^c		0.11 (M) (In the vacuum line)	
Temp. (°C)	C.s.	Temp. (°C)	C.s.	Temp. (°C)	C.s.
23	171.8(s)	26	171.9(s)	23	195.5(s)
52	165.5(bs)	50	161.8(bs)	53	172.9(s)
78	158.1(t)	100	154.7(t)	68	165.7(bs)
				100	168.6(bs)

^a Chemical shift values are reported as Hz downfield from internal tetramethylsilane. ^b s = Singlet, bs = broad singlet, t = triplet. ^c See Table 1.

TABLE 3

Changes of the chemical shift^a (c.s.) and the multiplicity^b of the hydroxy proton of 2-chloroethanol in CCl₄ with an increase in the amount of water added,^c at 21 ± 0.5 °C

Concentration of 2-chloroethanol (M)					
0.030		0.20		0.22	
Water (μl)	C.s.	Water (μl)	C.s.	Water (μl)	C.s.
0	170.7(s)	0	235.7(s)	0	242.5(s)
4	174.1(bs)	10	237.5(s)	20	249.6(bs)
8	175.3(t)	60	238.6(t)	40	251.3(bs)
				60	253.9(t)

^a Chemical shift values are reported as Hz downfield from internal tetramethylsilane. ^b s = Singlet, bs = broad singlet, t = triplet. ^c The amount of water is reported as the volume added to 50 ml of each sample solution.

alcohols upon addition of water to the sample solutions, though no change occurs in the OH band of the monomeric alcohol. At the concentrations below 0.008M where no alcohol association occurs, the addition of water does not affect the OH band of the alcohol, indicating that the monomeric alcohol and water are present independently in carbon tetrachloride. The above concentrations are in fact much lower than those used in the n.m.r. experiments. All these measurements show that what is formed in result (4) is not a 1:1 complex of water with the monomeric alcohol but a more stable complex of water with the self-associated species of the alcohol.

Results similar to those in (1)–(6) were also obtained for 2-chloroethanol in cyclohexane.

The absence of multiplet structures of alcohol hydroxy protons in carbon tetrachloride has been reported,² and the relationship to the impurities in carbon tetrachloride which are not easily removed has been discussed.³ However, the singlet observed in our result (2) is not due to impurities such as an acid in 2-chloroethanol, but is inherent in the alcohol itself as indicated by result (3). If the singlet observed were due to the proton exchange between the alcohol and impurities, proton exchange should be accelerated with an increase in temperature, and thus the singlet should remain unchanged. The only reasonable explanation for the triplet observed at high temperature is the

monomeric alcohol resulting from a dissociation of all self-associated species of the alcohol. This indicates that the alcohol monomer should show a triplet. Results (1)–(3) can be condensed into the experimental observation (I): the associated species of the alcohol is responsible for the singlet observed in almost fully dehydrated sample solutions at room temperature. Furthermore, our results (1) and (4)–(6) can be condensed into the experimental observation (II): a trace of water present in the sample solutions forms hydrogen bonds with the self-associated alcohol species and causes the multiplet structure for the alcohol hydroxy proton. It should be noted from these observations that there are two sources of the triplet, *i.e.* one from the alcohol monomer and the other from the alcohol solutions containing the associated species of the alcohol into which water molecules are incorporated.

The experimental observation (I) seems to be characteristic of 2-chloroethanol which has an additional proton accepting group other than the hydroxy, because the electronegative atom introduced, chlorine, not only increases the acidity of the hydroxy proton of the alcohol,⁴ but can also act as a strong proton accepting group in the formation of a hydrogen bond. Thus, the intermolecular hydrogen bond formed in the associated species of the alcohol is strong enough to induce proton exchange within the associated species. Proton exchange, here, refers to a state of hydrogen bonding where the hydroxy protons transfer between the proton accepting and donating groups. It is a well known fact for alcohol solutions that only one resonance peak is observed for the hydroxy proton because of rapid exchange between monomer and associated species. It is reasonable to assume that the rate of proton exchange within the associated species (bonding-site exchange) is faster than that of molecular exchange (monomer to *n*-mer exchange). Consequently, a singlet must be observed for the hydroxy proton as long as the life-time of the alcohol monomer is shorter than the time needed for the spin-spin coupling of the hydroxy proton with CH₂ protons. At the lowest concentration used for our n.m.r. measurements (0.02M), the monomer concentration is still low enough to satisfy the condition of observing a singlet. Thus, our model nicely explains our observation of the singlet in fully dehydrated sample solutions at room temperature.

The experimental observation (II) can be explained in terms of the ability of water to form extensive three-dimensional networks by means of almost tetrahedrally arranged hydrogen bonds.⁵ When a trace of water is introduced into the alcohol solutions, water molecules must be incorporated into the associated species of the alcohol, forming intermolecular hydrogen bonds which may be different in nature from those involved in the structure of the associated alcohols.⁶ According to Kamlet and Taft,⁷ the base strength of water as a hydrogen bond acceptor is much smaller than that of several alkyl chlorides. Therefore, when the hydroxy protons of the self-associated alcohol form hydrogen

bonds with the oxygen of water molecules, the oxygen of water is not sufficiently basic to induce the hydroxy proton of the alcohol to exchange as rapidly as in associated R-OH species in which the hydroxy proton can no longer be said to be preferentially bound to RO⁻. We believe that all those factors may, in some way, reduce the rapid hydroxy proton exchange in the associated species enough to permit the observation of the hydroxy proton coupling.

We know our explanation conflicts with the data indicating that the hydroxy peak appears as a triplet in the n.m.r. spectra of neat unsubstituted alcohols where associated species are present in high concentrations. However, we must take note of the fact that substituted alcohols such as 2-chloroethanol, which have an additional proton accepting group other than hydroxy, have many properties different from those of unsubstituted alcohols such as ethanol. Furthermore, we point out the paper by Kirsch and Coffin⁸ which reports only one hydroxy proton signal for several aliphatic alcohols in carbon tetrachloride. They have explained it as the result of rapid molecular exchange of the hydroxy proton between all the hydrogen bonded species in the solution. Slocum and Jennings have attributed the multiplet of the hydroxy proton to an intramolecular hydrogen bond in 2-chloroethanol.¹ This is, however, not likely because they have reported that the triplet structure has been

observed even at 66 mole% concentration. Judging from our i.r. measurements, the species predominant at this concentration are not *gauche*-isomers which have intramolecular hydrogen bonds, but *trans*-isomers which form self-associated species. Furthermore, the presence of water is very possible due to the method of preparation of their samples.⁹ These facts might make their conclusion doubtful. We think that more extensive studies should be done with fully dehydrated alcohols and their solutions.

[8/770 Received, 26th April, 1978]

REFERENCES

- ¹ D. W. Slocum and C. A. Jennings, *Tetrahedron Letters*, 1972, 3543.
- ² M. Saunders and J. B. Hyne, *J. Chem. Phys.*, 1958, **29**, 1319; E. D. Baker and U. Liddel, *J. Mol. Spectroscopy*, 1958, **2**, 1; S. N. Vinogradov and R. H. Ninnell, 'Hydrogen Bonding,' Van Nostrand-Reinhold, New York, 1971, p. 87.
- ³ H. Fujiwara and T. Ikenoue, *J.C.S. Faraday I*, 1976, 2375.
- ⁴ J. Cantacuzene, *Bull. Soc. chim. France*, 1962, 754.
- ⁵ D. Eisenberg and W. Kauzmann, 'The Structure and Properties of Water,' Oxford University Press, Oxford, 1969.
- ⁶ A. Coccia, P. L. Indovina, F. Pödo, and V. Viti, *Chem. Phys.*, 1957, **7**, 30.
- ⁷ M. J. Kamlet and R. W. Taft, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 377.
- ⁸ J. L. Kirsch and D. R. Coffin, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 2448.
- ⁹ E. E. Tucker and E. D. Becker, *J. Phys. Chem.*, 1973, **77**, 1783.

Association Studies of *N*-Acetyl-Amino Acid *N,N*-Dimethylamides in Carbon Tetrachloride

KAZUKO MIZUNO, SHIGENORI NISHIO, and YOHJI SHINDO,
Textile Research Institute, Fukui University, Fukui, Japan 910

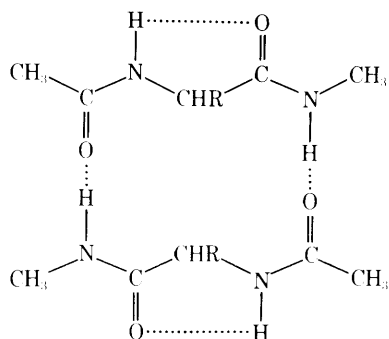
Synopsis

The self-association of *N*-acetylglycine *N,N*-dimethylamide, *N*-acetyl-L-valine *N,N*-dimethylamide, and *N*-acetyl-L-phenylalanine *N,N*-dimethylamide in carbon tetrachloride was investigated by using ir and ¹H-nmr methods. It was concluded from ir measurements that the associated species is the dimer formed as a result of the simultaneous formation of two intermolecular hydrogen bonds. This is supported by the results of ¹H-nmr measurements. Thermodynamic quantities for the association were determined from the temperature and concentration dependence of the NH proton chemical shifts of the sample solutions. Compared with the Gly derivative, L-Val and L-Phe derivatives have larger values of $-\Delta H$ for association, which shows good correlation with $\Delta\nu_{\text{NH}}$ values, the difference between the maxima of the monomer and dimer bands, obtained from ir spectra. This is due to the less stable monomer conformation and to the stronger intermolecular hydrogen bonding of the dimers in L-Val and L-Phe derivatives. The line shapes of both methyl proton resonances of L-Val residue and methylene proton resonances of L-Phe residue were found to vary with concentration and temperature of the sample solutions. These data indicate that the rotation about the C^α—C^β bond is restricted by the steric hindrance present in the associated dimers. All these experimental results can be related to the fact that L-Val and L-Phe derivatives have a warped framework because of the bulky side chains, whereas the Gly derivative has a planar framework.

INTRODUCTION

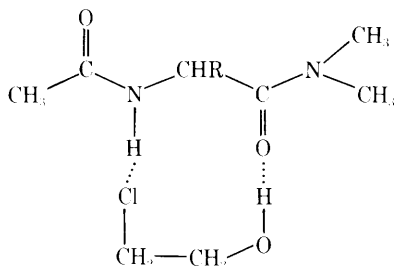
It is interesting to study the contribution of hydrophobic amino acid residues to the stabilization of the secondary structure of proteins. Since it is difficult to determine the contribution of each amino acid residue in a protein, some attempts have been made to do so in more simplified systems, such as copolymers of amino acids. It has been concluded from the studies of a series of copolymers of L-Lys and neutral amino acids that L-Val, L-Phe, and L-Ile residues stabilize the β -structure.^{1,2} In order to investigate the root of the stabilization caused by those amino acid residues, it is better to use simple compounds that can be regarded as a model of protein. Dipeptidic compounds are suitable for this purpose, and the type of compound with two —CONH— groups, as shown for CH₃—CONH—CHR—CONH—CH₃ (compound I), has been widely used in many theoretical and experimental studies.³ In studies on the self-association of compound I with L-Ala, L-Val, and L-Nva residues, it has been reported that self-associated dimers have a molecular arrangement such

as



and that the dimer formation is reduced by the steric hindrance between the bulky side chains of the L-Val and L-Phe residues.⁴

In our studies on the denaturation ability of 2-chloroethanol, we have investigated the interaction between compounds such as $\text{CH}_3\text{—CONH—CHR—CON—(CH}_3\text{)}_2$ (compound II) and various kinds of alcohols by using ir and $^1\text{H-nmr}$ spectroscopy.⁵ Compound II is more suitable in this study, because compound I has four different kinds of N—H stretching vibrational modes in its ir spectra corresponding to the different states of hydrogen bonding.⁶ This might make the analysis of data obtained too complicated. In our interaction studies the self-association constant of compound II seemed to be affected largely by the kind of amino acid residue. Furthermore, it has been concluded that the complex between compound II and 2-chloroethanol has the structure



which suggests that an associated dimer of compound II has a molecular arrangement that can be regarded as a model for antiparallel β -structure protein. In this paper we describe the molecular structure of associated species of compound II with Gly, L-Val, and L-Phe residues formed in inert solvents and examine the effect of the amino acid side chains on the stabilization of their self-associated species using ir and $^1\text{H-nmr}$ spectroscopy.

EXPERIMENTAL

Materials and Methods

N-Acetylglycine *N,N*-dimethylamide (Ac-Gly-NMe₂), *N*-acetyl-L-valine *N,N*-dimethylamide (Ac-Val-NMe₂), and *N*-acetyl-L-phenylalanine *N,N*-dimethylamide (Ac-Phe-NMe₂) were obtained from Sakai Chemicals and recrystallized three times from ethyl acetate/ethyl ether (1:10). The melting points, determined from DSC curves, were 49°C for Ac-Gly-NMe₂, 128°C for Ac-Val-NMe₂, and 98°C for Ac-Phe-NMe₂. A broad DSC curve was obtained in the case of Ac-Gly-NMe₂ because of the large hygroscopic property.

As it is essential to remove water completely from sample solutions for the association study, the sample preparation was carried out carefully in a grease-free vacuum line as follows. The exact amount of amide compound dissolved in ethyl acetate was crystallized and dehydrated by freeze-drying in the ampul A, to which an ir cell and ¹H-nmr tube were connected. Carbon tetrachloride, having been dried with P₂O₅, was put into the ampul B with a small amount of P₂O₅ and dried more thoroughly by stirring over a magnetic stirrer overnight. After being degassed by pumping out 10–15% of the initial volume, carbon tetrachloride was condensed into the ampul A. For ¹H-nmr samples, tetramethylsilane (TMS) was also condensed into sample solutions. The concentration of amide compound was determined by gravimetry. Volumes were calculated assuming zero volume change on mixing. The absence of water in the sample solution was confirmed by the absence of absorption bands of water in the ir spectra.

IR Measurements

The ir measurements were made with a Jasco A-3 spectrometer using the 5× abscissa expansion over the range of 4000–2500 cm⁻¹ at 21 ± 0.5°C. The concentration dependence of the absorption intensity of monomer N—H stretching band was investigated in the range of 10⁻⁴–10⁻¹*M*. Fused silica cells having pathlengths of 100, 20, 2.0, and 0.5 mm were used as sample and reference cells. Reference cells were filled with fully dehydrated and degassed carbon tetrachloride.

¹H-NMR Measurements

The ¹H-nmr spectra were measured with a Jeol 4H-100 100-MHz nmr spectrometer by using TMS as an internal standard. Chemical shifts were measured for NH and several other proton resonances over the concentration range of 0.03–0.3*M* at 20–50°C.

RESULTS AND DISCUSSION

IR Studies

IR Spectra of Dilute Solutions

In the concentration range lower than $5 \times 10^{-4}M$, the NH vibration of compound II exhibits an absorption band at $3400\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$. From the comparison of ir spectra of compound II with those of compound I and compounds such as $\text{CH}_3\text{--CON}(\text{CH}_3)\text{--CHR--CONH--CH}_3$, it has been concluded that compound II assumes an extended molecular conformation, and the band has been assigned to the NH of the hydrogen-bonded five-membered ring (C_5).⁶ For some of compound II, with a bulky side chain, a shoulder (L') appears on the high-frequency edge of the C_5 band and has been attributed to the free NH.⁶ In Ac-Val-NMe₂, however, the main band is L' , and the C_5 band appears as a shoulder. Furthermore, only one peak is observed in the case of Ac-Phe-NMe₂. Since the frequency of this band is nearer to that of the L' band of Ac-Val-NMe₂, we assigned it to L' . The frequencies of C_5 and L' of the three amides are shown in Table I. The values reported by Neel⁶ are shown in parentheses. The absorbance at λ_{max} , the frequency of maximum absorption, is linearly proportional to the amide concentration in the range of $10^{-4}M$. The molar absorptivities ϵ_m (Table I) were determined from the slope and were used to determine the monomer amide concentration of sample solutions. In the case of Ac-Val-NMe₂, a linear relationship was observed between the absorbance of the λ_{max} of the L' band and the total amide concentration. Thus the absorbance of the L' band can be regarded as showing the total monomer concentration quantitatively.

TABLE I
Spectral Properties of the NH Bands of Ac-Gly-NMe₂, Ac-Val-NMe₂, and Ac-Phe-NMe₂
in CCl₄ at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Compound	C_5 (cm^{-1})	L' (cm^{-1})	D (cm^{-1})	$\Delta\nu_{\text{NH}}$ (cm^{-1})	ϵ_m^c ($\text{l. mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)	ϵ_m^d ($\text{l. mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)
Ac-Gly-NMe ₂	3415 (3412) ^a		3326	89	162	163
Ac-Val-NMe ₂	3415 sh ^b (3415 sh)	3431 (3431)	3298	117 ^e , 133 ^f	92.0	91.7
Ac-Phe-NMe ₂		3425 (3424)	3305	120	123	123

^a Values in parentheses are frequencies reported by Neel (Ref. 6).

^b Absorption appears as a shoulder of the L' band.

^c Values determined from ir spectra of dilute solutions.

^d Values determined from the intercept of the plots of Eq. (5).

^e Frequency difference between the D band and the shoulder peak.

^f Frequency difference between the D band and the L' band.

Self-Association of the Amide Compounds

With increasing amide concentrations, another absorption band appears at a lower frequency region than the C₅ or L' band; it can be attributed to the N—H vibration of self-associated amide. The ir spectra of the amides at about 0.1M concentration are shown in Fig. 1. The frequencies of the self-associated NH band (D band) and $\Delta\nu_{\text{NH}}$, the difference in frequency between the maxima of C₅ or L' band and D band, are also shown in Table I. The D band of Ac-Gly-NMe₂ is at a higher frequency than are the frequencies of the other two bands. It is observed that the increase in the concentration does not shift the λ_{max} of the D band to the lower frequency and also has no influence on the shape of the D band in any of three amides. This then indicates that only the self-associated dimer is formed in the concentration range studied, because it has been reported that the associated trimer or tetramer exhibits its absorption maximum at the lower frequency than that of the dimer in the case of *N*-methylamide compounds such as *N*-methylacetamide.⁷ We consider that the weak shoulder peaks observed at about 3230 cm⁻¹ in the ir spectra of Fig. 1 are not related to a trimer or tetramer, because these shoulders are observed even at concentrations as low as 10⁻⁴M. We speculate these may be the overtone of C=O stretching vibration.

In the dimer formation of the three amides, it is necessary to take account of three kinds of dimer species, D₁, D₂, and D₃ (Fig. 2). D₁ contains two

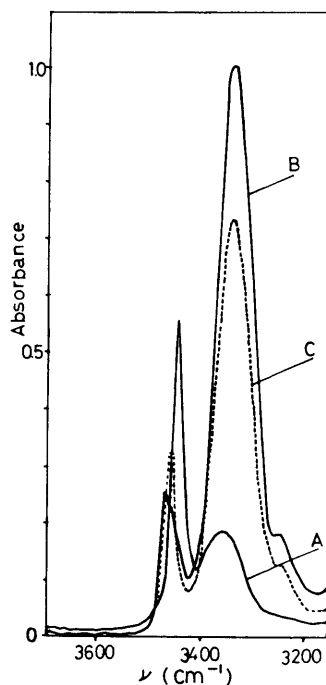


Fig. 1. The ir spectra of the three amides in CCl₄ solutions measured with 2-mm cells: A, [Ac-Gly-NMe₂] = 0.118M, B, [Ac-Val-NMe₂] = 0.124M, C, [Ac-Phe-NMe₂] = 0.125M.

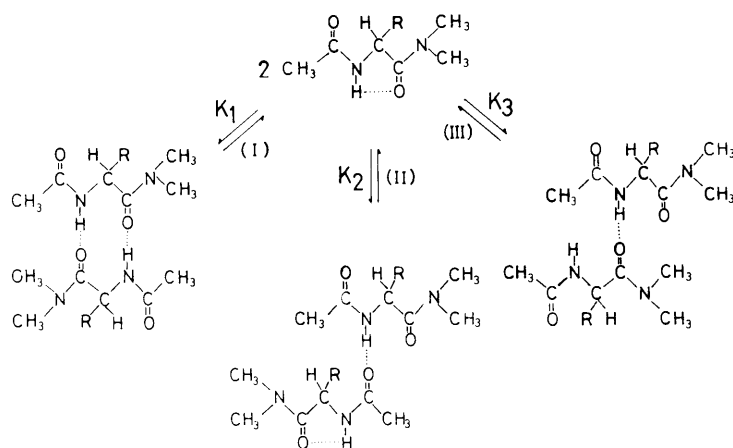


Fig. 2. Three possible equilibria and dimer species in self-association of *N*-acetyl amino acid *N,N*-dimethylamide. In the case of Ac-Phe-NMe₂ and the L' conformer of Ac-Val-NMe₂, the intramolecular hydrogen bond is not formed.

intermolecular hydrogen bondings, and D₂ and D₃ contain one intermolecular hydrogen bonding. Here it should be pointed out that all the monomers of Ac-Phe-NMe₂ take the L' conformation, and in Ac-Val-NMe₂ both the C₅ and L' conformers participate in the dimer formation. We have determined which of the dimer species is formed in the association equilibrium from the following consideration.

Association Equilibrium I. In the association equilibrium I, the equilibrium constant K_1 is given by

$$K_1 = C_d / C_m^2 \quad (1)$$

where C_m and C_d are the concentrations of monomer and dimer in the solutions. C_m and C_d are related to C_0 , the total concentration, by

$$C_0 = C_m + 2C_d \quad (2)$$

From the ir spectra of the three amide solutions, it is clear that the absorption at λ_{\max} of the monomer NH band is free from an overlap with that of the dimer NH band. Thus A_m , the absorbance at λ_{\max} of the monomer NH band, is given by

$$A_m = \epsilon_m l C_m \quad (3)$$

where ϵ_m is the molar absorptivity and l is the pathlength of the cell used. From Eqs. (1)–(3), K_1 can be obtained:

$$K_1 = \epsilon_m l (\epsilon_m l C_0 - A_m) / 2A_m^2 \quad (4)$$

This is arranged as

$$\frac{lC_0}{A_m} = \frac{1}{\epsilon_m} + \frac{2K_1 A_m}{\epsilon_m^2 l} \quad (5)$$

ϵ_m and K_1 can be evaluated from the rectilinear plotting of lC_0/A_m vs A_m/l . The rectilinear plots of the ir data for the three amides give straight lines (Fig. 3). The ϵ_m values evaluated from these plots are tabulated in Table I. These values are in fair agreement with the ϵ_m values determined previously from the ir data of dilute solutions. The K_1 values obtained from the plots are 3.30l/mol for Ac-Gly-NMe₂, 21.0l/mol for Ac-Val-NMe₂, and 12.0l/mol for Ac-Phe-NMe₂ at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Association Equilibrium II. In D₂, CH₃CO carbonyl forms an intermolecular hydrogen bond with the NH group. As described in the next section, however, the ¹H-nmr data show that CH₃CO carbonyl does not take part in the hydrogen-bond formation of the associated species in all three amides. Therefore, it is concluded that D₂ is not formed in the association equilibrium.

Association Equilibrium III. In the association equilibrium III of Ac-Gly-NMe₂, a free NH band should be contained in D₃. However, the free NH band does not appear in the ir spectra of Ac-Gly-NMe₂ solution even at $\sim 10^{-1}M$ concentrations. This indicates that D₃ is not formed in the association of Ac-Gly-NMe₂. In the association equilibrium III of Ac-Phe-NMe₂, it is reasonable to assume that the free NH of D₃ has a characteristic similar to that of the L' NH of Ac-Phe-NMe₂ monomer, and thus the molar absorptivities of those two NH bands have the same value at the same λ_{max} . Then, for association equilibrium III, A_{tot} , the total absorbance at λ_{max} of monomer NH band, is given by

$$A_{\text{tot}} = \epsilon_m l(C_m + C_d) \quad (6)$$

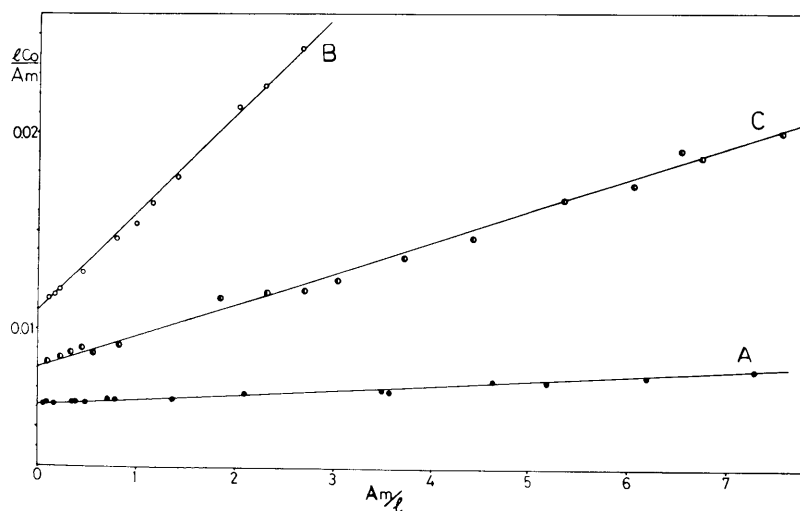


Fig. 3. Plots of lC_0/A_m vs A_m/l on the basis of ir data at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$: A, Ac-Gly-NMe₂, B, Ac-Val-NMe₂, C, Ac-Phe-NMe₂.

From the relationships $K_3 = C_d/C_m^2$, $C_0 = C_m + 2C_d$, and Eq. (6), K_3 is given by

$$K_3 = \frac{\epsilon_m l (\epsilon_m l C_0 - A_{\text{tot}})}{(2A_{\text{tot}} - \epsilon_m l C_0)^2} \quad (7)$$

For many sample solutions of Ac-Phe-NMe₂, the K_3 value was calculated by using the C_0 and A_{tot} obtained from ir spectra in the concentration range of 0.001–0.3M at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Some results of the calculation are tabulated in Table II. Table II shows that the K_3 values are far from constant. This indicates that D₃ is not formed in the association of Ac-Phe-NMe₂.

In the association equilibrium III of Ac-Val-NMe₂, the molar absorptivity of the free NH band is not equal to ϵ_m , and it is difficult to determine this value experimentally. We cannot, therefore, calculate the K_3 value of Ac-Val-NMe₂ in order to check the possibility of D₃ formation. However, we speculate that D₃ is not formed in the association of Ac-Val-NMe₂, judging from the facts that the D₂ of Ac-Val-NMe₂ is probably in almost the same energy state as D₃, and D₃ is formed neither in Ac-Gly-NMe₂ nor in Ac-Phe-NMe₂.

¹H-NMR Studies

Confirmation of the Association Mechanism

Table III shows the data of ¹H-nmr measurements at $23 \pm 0.2^\circ\text{C}$. The spin-spin coupling constants $J_{\text{CH-NH}}$ of the C^αH proton with the NH proton obtained are almost equal to those reported by Neel,⁶ and furthermore, they do not vary with the increase in concentrations. It is reconfirmed that the bulkiness of the side chain has a large influence on the $J_{\text{CH-NH}}$ value, and that Ac-Gly-NMe₂ has a planar, intramolecular, and five-membered ring,

TABLE II
Equilibrium Constants K_3 Calculated from IR Data of Ac-Phe-NMe₂ in CCl₄ at
 $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Concentration (M)	K_3 (l./mol)
2×10^{-3}	26.9
4	31.1
6	34.2
8	37.6
1×10^{-2}	32.4
2	48.8
4	96.8
6	376
8	23,200
1×10^{-1}	1630
2	36.0
3	14.4

TABLE III
Chemical Shifts for the Proton Resonances of Ac-Gly-NMe₂, Ac-Val-NMe₂, and Ac-Phe-NMe₂ in CCl₄ at 23 ± 0.2°C^a

Compound	Conc. (M)	CH ₃ CO	NH	<i>J</i> _{CH-NH}	NCH ₃ (center)	δ <i>ν</i> (NCH ₃)
Ac-Gly-NMe ₂	0.032	194.5	654.2	4.0	298.9	8.3
	0.064	194.6	669.8	4.7	299.0	9.4
	0.110	194.7	674.2	4.1	299.8	9.2
	0.159	194.5	694.9	4.5	299.6	9.6
	0.204	194.3	706.3	4.4	300.0	9.8
	0.286	194.1	715.0	4.6	299.8	11.0
Ac-Val-NMe ₂	0.028	190.1	702.0	8.5	305.5	24.7
	0.057	190.0	706.8	8.5	305.8	24.9
	0.091	188.9	735.3	8.0	306.9	25.9
	0.148	189.0	761.5	7.7	307.0	27.1
	0.190	188.7	762.1	8.0	307.1	27.3
	0.228	188.7	762.2	7.8	307.1	27.0
Ac-Phe-NMe ₂	0.311	188.6	764.0	7.9	307.7	27.1
	0.040	191.5	708.0	8.4	270.9	19.7
	0.064	191.0	737.5	8.5	273.2	16.3
	0.086	190.9	751.9	8.2	274.3	14.0
	0.101	191.5	754.8	8.1	274.4	13.9
	0.194	190.5	775.5	8.0	275.8	12.2
	0.253	190.1	780.9	8.3	276.5	10.0
	0.338	190.3	788.6	8.1	276.7	8.9

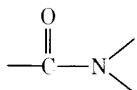
^a Chemical shifts (Hz) from internal TMS at 100 MHz.

although Ac-Val-NMe₂ and Ac-Phe-NMe₂ have warped frameworks because of the bulky side chains. Our observations indicate that the conformation of the monomer remains almost unchanged in the associated dimer of the three amides.

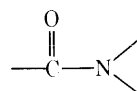
CH₃CO methyl proton chemical shifts are unchanged or shift only slightly to high field with an increase in concentration. This fact indicates that CH₃CO carbonyl does not take part in the hydrogen-bond formation of the associated species.

NCH₃ groups of *N,N*-dimethylamide compounds are in a nonequivalent magnetic environment because of a high rotational barrier about the amide C—N bond, and the nonexchanging chemical shift δ*ν*(NCH₃) between two NCH₃ groups is considered as a measure of the rotational energy barrier about the C—N bond.⁸ The δ*ν*(NCH₃) values of the three amides obtained in dilute solutions are in the following order. Ac-Gly-NMe₂ < Ac-Phe-NMe₂ < Ac-Val-NMe₂. This indicates that the bulkiness of the side chain is closely related to a steric hindrance to the rotation of the N(CH₃)₂ group and that the side chain of the Val residue with two C γ atoms causes a larger steric hindrance than that of the Phe residue. Detailed ¹H-nmr studies have been carried out on the self-association of several *N,N*-dimethylamides having no hydrogen-bonding proton such as *N,N*-dimethylacetamide in non-hydrogen-bonding solvents.⁸ It is well recognized in those systems

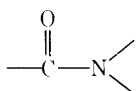
that the $\delta\nu_{(\text{NCH}_3)}$ decreases with the increase in the concentrations, although the NCH_3 doublet center does not vary with concentration.⁹ These facts are interpreted to result from the dipolar interaction between two amide molecules, which is the driving force of the self-association in non-hydrogen-bonding solvent. In protonating solvents, on the other hand, the protonation of



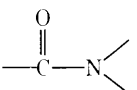
oxygen occurs, resulting in the downfield shift of the NCH_3 doublet center with a narrowing and collapse of the two NCH_3 peaks owing to the decreasing rigidity of the C---N bond.¹⁰ In the case of the three amides investigated, the NCH_3 doublet center shifts downfield more or less with the increase in concentration. Concerning the concentration dependence of the $\delta\nu_{(\text{NCH}_3)}$, considerable decrease is observed only in Ac-Phe-NMe_2 . This indicates that the protonation or hydrogen-bond formations at the



oxygen. It is, then, apparent in Ac-Phe-NMe_2 that



carbonyl takes part in the hydrogen-bond formation in the association equilibrium. The $\delta\nu_{(\text{NCH}_3)}$ of Ac-Gly-NMe_2 and Ac-Val-NMe_2 , however, increases only slightly, which should be due to the increase in the rotational barrier by the steric hindrance within the associated dimers. Together with the results indicating that the CH_3CO carbonyl does not participate in the hydrogen-bond formation of the associated species, it is reasonable to conclude that even in the case of Ac-Gly-NMe_2 and Ac-Val-NMe_2 ,



carbonyl plays an important role in the association equilibrium through the intermolecular hydrogen-bond formation with NH group. All these results support the association mechanism I concluded from the results of ir measurements.

Effects of Side Chains on Conformation and Self-Association of the Amides

For the solution of Ac-Val-NMe_2 , the line shape of the methyl protons of the side chain varies with concentration and temperature (Fig. 4). The methyl protons exhibit a quartet at the higher concentrations and a doublet at lower concentrations at 23°C . The quartet observed at 23°C changes into the doublet on increasing the temperature. This change of the methyl proton signal from a quartet to a doublet resulting from dilution or rise in temperature can be correlated to the association of Ac-Val-NMe_2 molecules as follows: the doublets observed can be assigned to the molecular conformation in which the rotation about the $\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta$ bond is free. The quartets at the higher concentrations, on the other hand, can be attributed to the molecular conformation in which the free rotation about the $\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta$ bond is reduced by the steric hindrance resulting from the formation of the dimer. The doublets observed in lower concentration solutions change to the quartets on increasing the temperature. These quartets are due to the spin systems in which the optical activity of the C^α affects the methyl protons through the C^βH proton of the side chain. It is also observed in Ac-Phe-NMe_2 that the line shape of the C^βH_2 protons of the side chain varies with concentration and temperature (Fig. 5). The AA' spin systems observed at the lower concentrations can be assigned to the molecular conformation in which the rotation about the $\text{C}^\alpha\text{H—C}^\beta\text{H}_2$ bond is free,

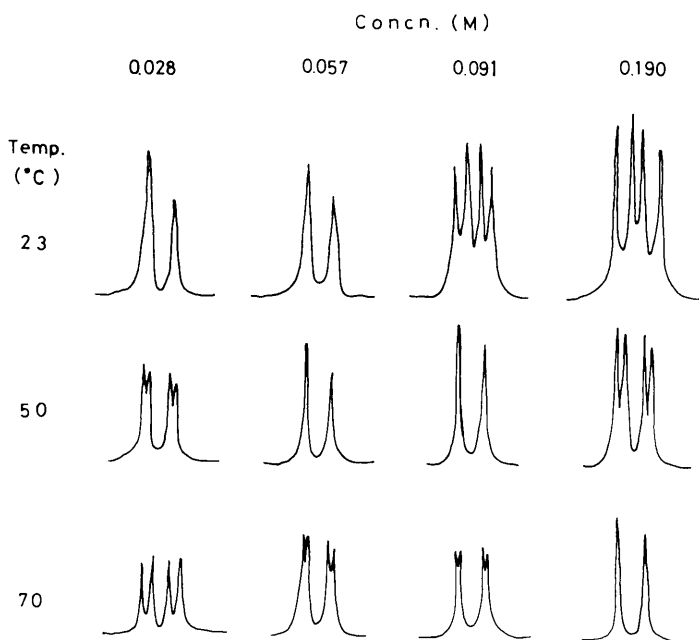


Fig. 4. Concentration and temperature dependence of the $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ methyl proton resonances of Ac-Val-NMe_2 in CCl_4 solutions.

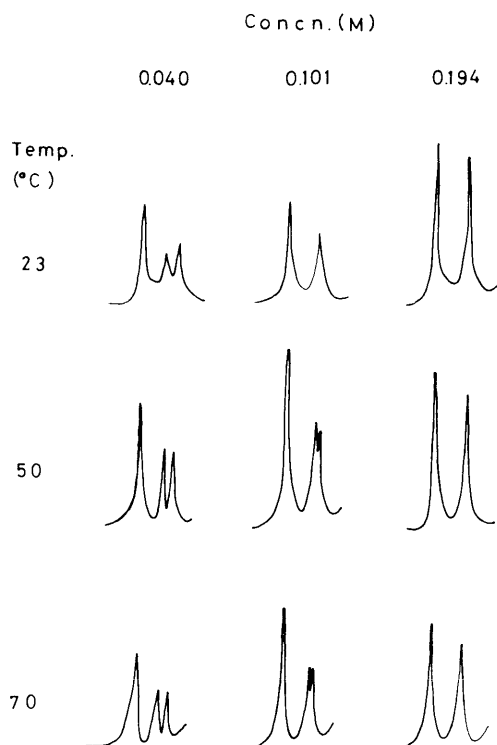
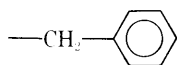


Fig. 5. Concentration and temperature dependence of CH_2 proton resonances of Ac-Phe-NMe₂ in CCl_4 solutions.

while AB spin systems at the higher concentrations can be assigned to the molecular conformation in which the rotation about the $\text{C}^\alpha\text{H}-\text{C}^\beta\text{H}_2$ bond is reduced. As mentioned previously, the $\delta\nu_{(\text{NCH}_3)}$ value of Ac-Phe-NMe₂ decreases with the increase in concentration. All these experimental results can be explained as follows: in the monomer, the rotation of the $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ group is hindered by the free rotation of the bulky side chain



in the dimer, however, the two bulky side chains occupy only a certain position that induces no steric hindrance between the side chains and simultaneously permits the free rotation of $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ groups, although the warped conformation remains unchanged, as mentioned previously.

Thermodynamic Quantities for the Self-Association

NH proton chemical shifts of the three amides were measured over the concentration range 0.03–0.3M at 23, 30, 40, and 50°C. Figure 6 shows the plots of the chemical shift observed, ν_{obs} , against the concentration of the three amides. In association equilibrium I, ν_{obs} has the following relation:

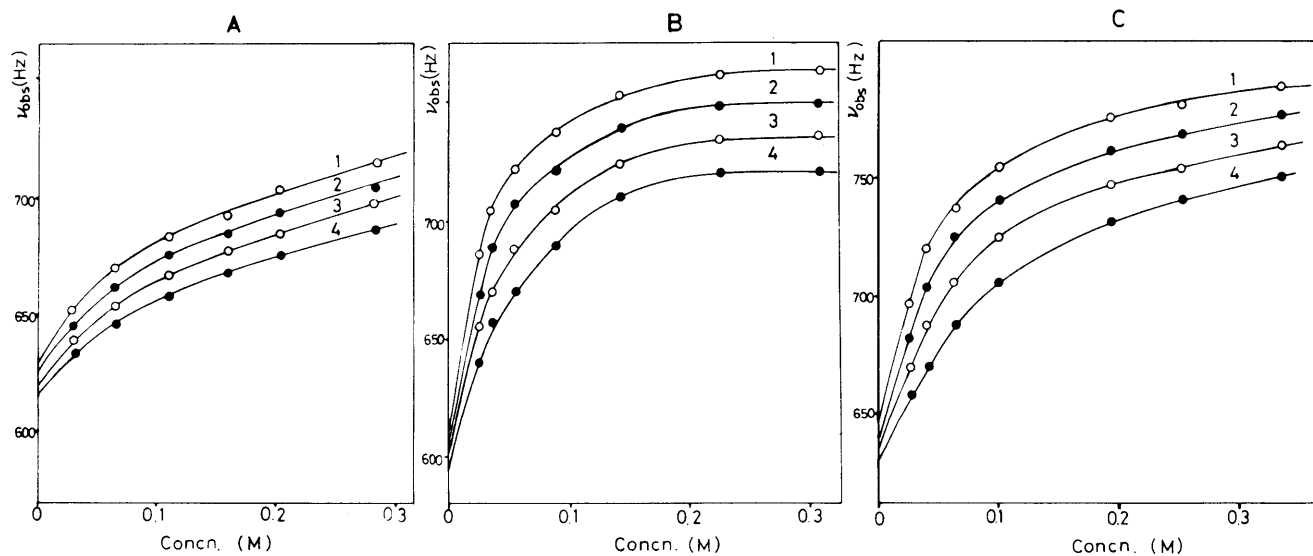


Fig. 6. Plots of ν_{obs} vs concentration for (A) Ac-Gly-NMe₂, (B) Ac-Val-NMe₂, and (C) Ac-Phe-NMe₂ at (1) 23, (2) 30, (3) 40, and (4) 50°C.

$$\nu_{\text{obs}} = (\nu_m C_m + 2\nu_d C_d)/C_0 \quad (8)$$

where ν_m and ν_d are the chemical shifts characteristic of the monomer and the dimer. From Eqs. (1), (2), and (8), we obtain

$$\left(\frac{\nu_{\text{obs}} - \nu_m}{C_0}\right)^{1/2} = [2(\nu_d - \nu_m)K_1]^{1/2} - \left(\frac{2K_1}{\nu_d - \nu_m}\right)^{1/2}(\nu_{\text{obs}} - \nu_m) \quad (9)$$

which has the form

$$\left(\frac{\Delta\nu}{C_0}\right)^{1/2} = a - b\Delta\nu \quad (10)$$

where $\Delta\nu$ is the difference between monomer chemical shift and observed chemical shift for a particular C_0 value. A plot of the left-hand side of Eq. (10) vs $\Delta\nu$ should give a straight line, with slope $-b$ and intercept a . Figure 7 shows the plots of the data at 23, 30, 40, and 50°C for the three amides. The ν_m values were evaluated from extrapolation of ν_{obs} vs C_0 plots in Fig. 6. From Eqs. (9) and (10), K_1 is given by

$$K_1 = 1/2 ab \quad (11)$$

The K_1 values were calculated from a and b determined by the least-squares method. The enthalpy change of dimer formation was calculated from the slope of the $\ln K_1$ vs $1000/T$ plots (Fig. 8), and the entropy change of the

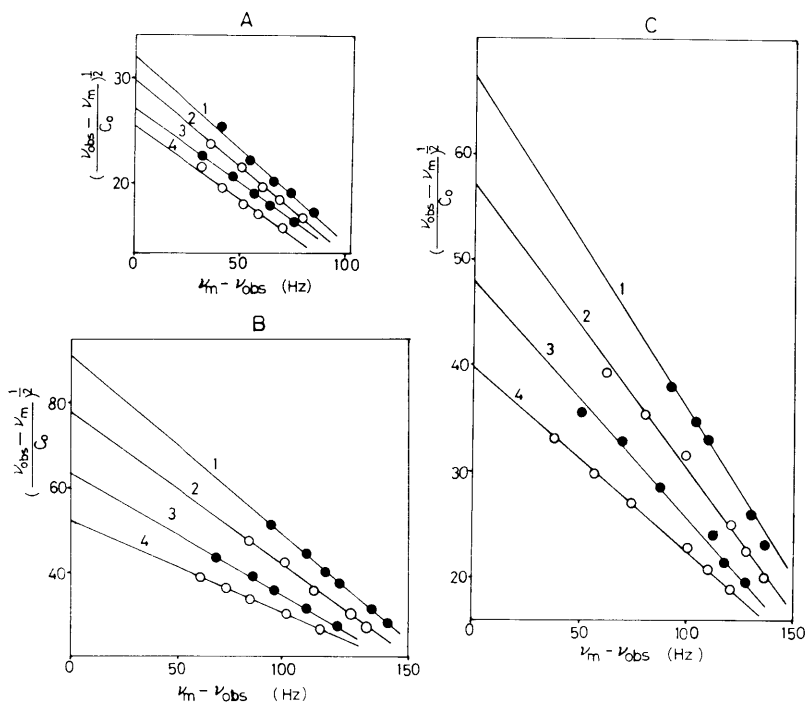


Fig. 7. Plots of $[(\nu_{\text{obs}} - \nu_m)/C_0]^{1/2}$ vs $(\nu_{\text{obs}} - \nu_m)$ for (A) Ac-Gly-NMe₂, (B) Ac-Val-NMe₂, and (C) Ac-Phe-NMe₂ at (1) 23, (2) 30, (3) 40, and (4) 50°C.

TABLE IV
Thermodynamic Data and Frequency Shifts in the Self-Association of Ac-Gly-NMe₂, Ac-Val-NMe₂, and Ac-Phe-NMe₂ in CCl₄

Compound	$-\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta S_{25^\circ\text{C}}$ (cal/deg mol)	$-\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta\nu_{\text{NH}}$ (cm ⁻¹)
Ac-Gly-NMe ₂	4.2	12.1	0.58	89
Ac-Val-NMe ₂	8.9	22.1	1.7	119, ^a 133 ^b
Ac-Phe-NMe ₂	8.7	24.6	1.4	120

^a Frequency difference between D band and C₅ shoulder peak.

^b Frequency difference between D band and L' band.

reaction was then calculated from the usual thermodynamic relations. Table IV gives the values of $-\Delta G$, $-\Delta H$, and $-\Delta S$ at 23°C for the self-association of the three amides in carbon tetrachloride solutions. The $\Delta\nu_{\text{NH}}$ values tabulated from Table I are also shown in Table IV.

The parameter $-\Delta H$, which can be considered as a measure of energy stabilization on association, is two times larger for Ac-Val-NMe₂ and Ac-Phe-NMe₂ than for Ac-Gly-NMe₂. These $-\Delta H$ values can be correlated with the bulkiness of the side chains as follows: owing to the bulky side chains, the monomers of Ac-Val-NMe₂ and Ac-Phe-NMe₂ assume the warped conformation, resulting in a less stable conformation than the Ac-Gly-NMe₂ monomer with a planar C₅ conformation. This is confirmed by the experimental fact that the λ_{max} of the Ac-Gly-NMe₂ monomer band is at a lower frequency than the bands of Ac-Val-NMe₂ and Ac-Phe-NMe₂. On the contrary, the intermolecular hydrogen bond of dimers of Ac-Val-NMe₂ and Ac-Phe-NMe₂ should be stronger than the bond of Ac-Gly-NMe₂ dimer, because the λ_{max} of Ac-Gly-NMe₂ dimer is at a higher frequency than

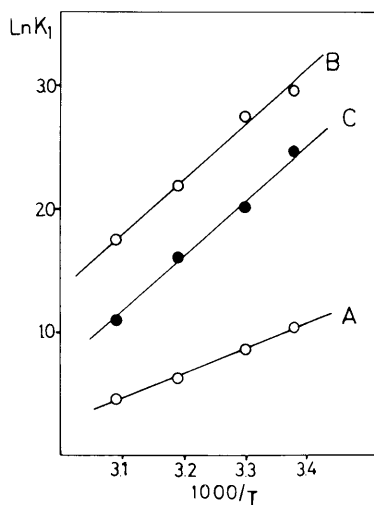


Fig. 8. Plots of $\ln K_1$ vs $1000/T$ for (A) Ac-Gly-NMe₂, (B) Ac-Val-NMe₂, and (C) Ac-Phe-NMe₂.

those of the other two dimers. The $-\Delta H$ values calculated on the basis of ^1H -nmr data thus correspond well to the values of $\Delta\nu_{\text{NH}}$ obtained from the ir studies, which can be regarded as a measure of energy stabilization on association.

Compound II, with two CH_3 groups at the N-terminal, seems unsuitable as a model compound of protein compared with compound I. However, it has been reported that the warped conformation of compound II with a bulky side chain is almost the same as that of compound I as long as the two compounds have the same amino acid residue.⁶ This is supported by our results. Furthermore, it has become clear that the monomer conformation of each compound studied remains unchanged in the dimer. Therefore, it is reasonable to use compound II as the model of protein in our association studies. From our experimental results, it is concluded that the molecular arrangement in the associated dimer of compound II can be regarded as a model of unit structure of antiparallel β -structure of protein. It is also found that Ac-Val-NMe₂ and Ac-Phe-NMe₂ can form a more stable dimer than Ac-Gly-NMe₂ and that the free rotation of the side chains in those two dimers is considerably reduced. These facts indicate the molecules in those dimers are packing together much more closely than in the Ac-Gly-NMe₂ dimer, resulting in the formation of stronger intermolecular hydrogen bonding. Our results are very interesting in connection with the report¹ that the L-Val, L-Phe, and L-Ile residues have a strong tendency to form β -structure in copolymer with L-Lys. Since the study of association of compound II can be used as one of the methods of determining the contribution of each amino acid residue to the stabilization of secondary structure of protein, it is necessary to investigate the self-association of L-Ala and L-Ile derivatives. This is now under investigation.

References

1. Arfmann, H.-A., Labitzke, R. & Wagner, K. G. (1975) *Biopolymers* **14**, 1381-1393.
2. Arfmann, H.-A., Labitzke, R. & Wagner, K. G. (1977) *Biopolymers* **16**, 1815-1826.
3. Pullman, B. & Pullman, A. (1974) *Adv. Protein Chem.* **28**, 347-526.
4. Cung, M. T., Marraud, M. & Neel, J. (1976) *Biopolymers* **16**, 1815-1826.
5. Yoneda, T., Mizuno, K. & Shindo, Y. (1976) Abstracts, 15th National Meeting of the Biophysical Society of Japan, No. 13-E-13.
6. Neel, J. (1972) *Pure Appl. Chem.* **31**, 201-225.
7. Klotz, I. M. & Franzen, J. S. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3461-3466.
8. Emsley, J. W., Feeney, J. & Sutcliffe, L. H. (1965) *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Pergamon New York, pp. 553-556.
9. Nueman, R. C., Jr., Snider, W. & Jonas, V. (1968) *J. Phys. Chem.* **72**, 2469-2474.
10. Nawrot, C. F. & Veis, A. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3903-3910.

Received May 25, 1978

Returned for Revision July 20, 1978

Accepted September 1, 1978

Studies of the Interaction between Alcohols and Amides to Identify the Factors in the Denaturation of Globular Proteins in Halogenoalcohol + Water Mixtures

BY KAZUKO MIZUNO, HIROKO KAIDO, KAZUNORI KIMURA, KENJI MIYAMOTO,
NOBUTOSHI YONEDA, TAKASHI KAWABATA, TAKAO TSURUSAKI,
NORIO HASHIZUME AND YOHJI SHINDO*

Research Institute for Material Science and Engineering,
Fukui University, Fukui 910, Japan

Received 12th July, 1983

The effect of water-miscible halogenoalcohols, alkylalcohols, alkoxyalcohols and aminoalcohols on the conformational stability of bovine serum albumin (BSA) and egg white lysozyme (Lys) has been examined by o.r.d. to find out why 2-chloroethanol binds preferentially to protein at low concentrations and acts as a strong helix-forming reagent. The results have been summarized as follows; (1) at low alcohol concentrations the order of helix-forming ability for BSA is halogenoalcohol > alkylalcohol > other substituted alcohols; (2) on Lys, for all concentrations, the halogenoalcohols are stronger helix-forming reagents than the others. In order to see if hydrogen bonding of the halogenoalcohols might be responsible for the denaturation, the molecular interaction between the above alcohols and *N*-acetylglycine-*N'*,*N'*-dimethylamide, *N*-methylacetamide and *N,N*-dimethylacetamide in solutions of carbon tetrachloride were studied by i.r. and ¹H n.m.r. spectroscopy.

Our results show that only the halogenoalcohols have a proton-donating ability strong enough to break the inter-amide hydrogen bonds and form hydrogen bonds with the amide carbonyl, and 2-halogenated ethanols may act as bifunctional hydrogen-bonding solvents. Thus it has been concluded that, in the denaturation of protein by halogenoalcohols, the formation of hydrogen bonds with the protein should be considered as a predominant factor inducing conformational changes in the protein.

The question of why globular proteins are stable in aqueous solutions is still not completely answered.¹ The problem of protein stability is closely related to that of protein denaturation, because it is necessary to destroy the native structure of the protein in order to obtain information concerning its stability. Thus, many different organic solvents have been used for studying the denaturation of globular proteins.²

Since we attempted to interpret the denaturation of protein by organic solvents using a statistical-mechanical model,³ we have been interested in the specific behaviour of 2-chloroethanol (ClEtOH). It has been demonstrated, from preferential binding studies of dioxane, ethylene glycol, 2-methoxyethanol (MeOEtOH) and ClEtOH, that ClEtOH binds preferentially to protein at low concentration, resulting in a large increase in the helix content of the protein.^{4,5}

Alcohols are suitable solvents for studying the denaturation of protein caused by organic solvents as both the hydrophobic and hydrophilic properties can be varied. Halogenated ethanol and propan-2-ol such as ClEtOH and 1-chloropropan-2-ol are interesting because they contain both a hydroxy group as a proton donor and a halogen atom as a proton acceptor. ClEtOH possesses the following characteristics that are missing in ethanol: (1) it can form an intramolecular hydrogen bond,⁶ (2)

it is a stronger proton-donating acid than ethanol⁷ and (3) it can act as a bifunctional hydrogen-bonding solvent.² Thus we wished to examine whether or not the specific behaviour of ClEtOH is related to these properties. This is because disruption of the hydrophobic interaction^{8,9} rather than the nearest-neighbour interaction is now emphasised in the denaturation of globular proteins by organic solvents, although there remain differences in opinion.¹⁰

We have therefore investigated this problem by three methods: (1) an ultrasonic absorption study of water + alcohol systems to shed light on the role of bulk solution structure in the conformational stability of globular proteins,^{11,12} (2) a study of the preferential interaction between protein and alcohol to investigate the role of the local protein-alcohol interaction in the conformational change of the protein¹¹ and (3) a study of the molecular interaction between alcohols and amides to examine the possibility of direct interaction between protein components and alcohols.

In this work, we have carried out two kinds of experiments to find the factors which play a decisive role in the denaturation of protein by ClEtOH. First, we have examined the effect of a series of water-miscible alkylalcohols and halogenoalcohols on the conformational stability of bovine serum albumin (BSA) and egg white lysozyme (Lys) using o.r.d. measurements. The same experiment was also carried out using a series of alkoxyalcohols and aminoalcohols as substituted alcohols containing an electron-withdrawing group other than halogen. Secondly, we have examined the molecular interaction between those alcohols and model protein compounds in carbon tetrachloride using i.r. and ¹H n.m.r. spectroscopy.

EXPERIMENTAL

MATERIALS

Water was prepared by distilling deionized water in an all-Pyrex still of special design. BSA (Nutritional Biochemistry) and Lys (recrystallized six times, Seikagaku Kogyo) were used without further purification. Commercially available alcohols, DMA and NMA, were all doubly distilled under reduced pressure before use. 3-Methoxypropan-1-ol and 3-ethoxypropan-1-ol were synthesized according to the method of Smith and Sprung.¹³ The method of Hartman¹⁴ was adopted to synthesize 3-diethylaminopropan-1-ol. All purities were checked by ¹H n.m.r. and g.l.c. Ac-Gly-NMe₂ and Ac-L-Val-NMe₂ were from Sakai Chemicals. CCl₄ was i.r. spectroscopic grade.

O.R.D. MEASUREMENTS

The concentrated stock solutions (*ca.* 2 g per 100 cm³) of BSA or Lys were made up in aqueous 0.02 mol dm⁻³ NaCl and 0.01 mol dm⁻³ HCl and all protein solutions used for o.r.d. measurements contained 0.002 mol dm⁻³ NaCl and 0.001 mol dm⁻³ HCl. The protein concentration was measured on a Shimadzu QR-50 spectrophotometer, using an absorptivity value of 0.66 dm³ g⁻¹ cm⁻¹ at 280 nm for BSA¹⁵ and 2.635 dm³ g⁻¹ cm⁻¹ at 281.5 nm for Lys.¹⁶ The o.r.d. measurements were carried out at 365, 405, 436, 546 and 578 nm using a modified Jasco DIP-SI spectropolarimeter at 25 ± 0.1 °C. The refractive index at each wavelength was measured with a Shimadzu Pulfrich refractometer at 25 ± 0.1 °C. Using the data for the specific rotation and refractive index thus obtained, the rotatory dispersion parameters, *a*₀ and *b*₀, of the Moffitt-Yang equation¹⁷ were calculated.

I.R. AND ¹H N.M.R. STUDIES

As it is essential to remove water completely from the sample solutions for this interaction study, the dehydration of all reagents and the preparation of stock solutions were carried out carefully in a grease-free vacuum system with the same procedure as previously reported.¹⁸ Sample solutions were prepared by mixing the stock solutions thus obtained under an atmosphere of dried nitrogen in a dry box.

I.r. spectra were obtained with a Jasco A-3 spectrometer at 21 ± 0.5 °C. Infrared silica cells of 20 mm pathlength were used to measure the spectra of the O—H vibration band over the range $4000\text{--}2800$ cm^{-1} , and the absorption intensity of the OH bands and the frequency shift were determined. On the assumption that a 1:1 hydrogen-bonded complex is formed between alcohol and DMA, the equilibrium constant, K , was calculated from the alcohol and DMA concentrations determined by weight. The initial alcohol concentration was adjusted to be between 0.002 and 0.007 mol dm^{-3} to prevent self-association, whereas the DMA concentration was varied over the range $0.01\text{--}0.1$ mol dm^{-3} . The K values were found to be independent of DMA concentration within the above concentration range. The frequency shift of the C=O band of DMA caused by the alcohols was measured over the range $1800\text{--}1600$ cm^{-1} by using NaCl cells of 0.1, 1.0 and 5.0 mm pathlengths. The DMA concentration was kept constant at 0.01 mol dm^{-3} throughout the experiment and the alcohol concentration was increased step by step from zero to *ca.* 20 times the DMA concentration.

^1H n.m.r. spectra were measured with a Jeol 4H-100 n.m.r. spectrometer at 21 ± 0.2 °C using TMS as an internal standard.

RESULTS AND DISCUSSION

O.R.D. MEASUREMENTS

The results of the o.r.d. measurements for BSA and Lys in aqueous solutions containing alkylalcohols, halogenoalcohols, alkoxyalcohols and aminoalcohols are shown in fig. 1–4, respectively, by plotting $-a_0$ and $-b_0$, the rotatory dispersion parameters of the Moffitt–Yang equation,¹⁷ against alcohol concentration.

From fig. 1–4 the effects of the alcohols on the conformation of BSA and Lys can be summarized as follows. (1) For BSA, all the alcohols investigated are found to act as helix-forming reagents, since the value of $-b_0$, a parameter of helix content, increases with increasing alcohol concentration. The value of $-b_0$ follows the order halogenoalcohols > alkylalcohols > aminoalcohols \geq alkoxyalcohol at 20 vol % alcohol concentration, and the order halogenoalcohols \approx alkylalcohols > alkoxyalcohols at 60 and 80 vol %. At 80 vol % of aminoalcohols, BSA was observed to precipitate as an aggregate from the solutions. (2) For Lys, on the other hand, the value of $-b_0$ increases with increasing alcohol concentration only in halogenoalcohol solutions, whereas it remains unchanged or decreases at 20 and 40 vol % and then increases at 60 vol % for the alkylalcohols and alkoxyalcohols. For the aminoalcohols, $-b_0$ decreases at 20 and 40 vol % and then Lys was observed to separate as an aggregate at > 60 vol %. This difference in the denaturation process between two proteins may be inherent in the characteristics of protein conformation, because BSA has a larger number of intrachain disulphide bonds which serve to limit the number and kind of conformations available to the molecule.¹⁹ (3) The values of $-a_0$ are found to change in the same fashion as the values of $-b_0$ in the alcohol+water solutions for both BSA and Lys.

The effect of alkylalcohols on proteins has been studied for several proteins^{20–23} and the effectiveness of the alcohols for protein denaturation has been reported to increase with increasing chain length or hydrocarbon content. In our experiments, as shown in fig. 1, propan-1-ol and 2-methylpropan-2-ol are, for BSA, stronger helix-forming reagents than ethanol at lower alcohol concentrations, while methanol is the least effective, in agreement with early observation.

It is generally accepted that the denaturation of proteins by alkylalcohols is caused by the dissolving out of apolar residues from the interior by the alkyl group.²⁴ This is, however, not the case for the halogenoalcohols. The halogenoethanols and halogenopropanols investigated act as much stronger helix-forming reagents than ethanol and propanol, respectively, although they are less hydrophobic because of the

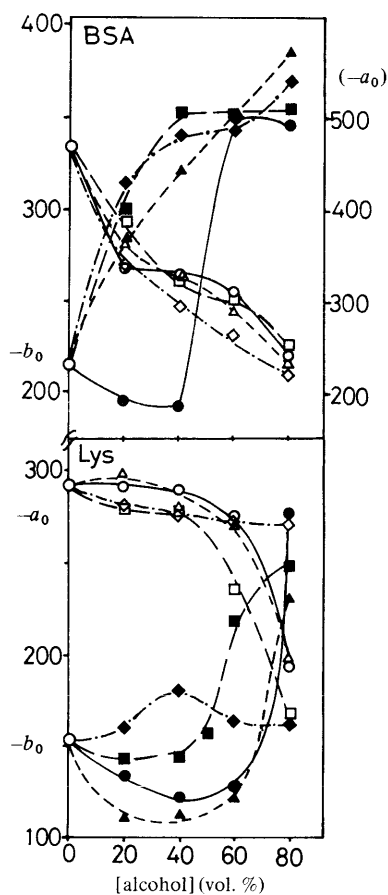


Fig. 1.

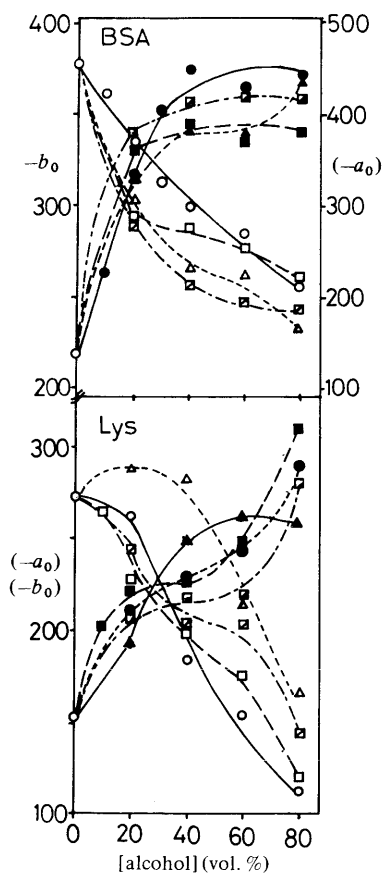


Fig. 2.

Fig. 1. Dependence of a_0 (open symbols) and b_0 (filled symbols), the conformational parameters of the Moffitt and Yang equation, for BSA and Lys on concentration of alkylalcohol in the mixed solvents with water: (○, ●) methanol, (△, ▲) ethanol, (□, ■) propan-1-ol, (◇, ◆) 2-methylpropan-2-ol.

Fig. 2. Dependence of a_0 (○△□◇) and b_0 (●▲■◆) for BSA and Lys on concentration of halogenoalcohol in the mixed solvent with water: (○, ●) 2-chloroethanol, (△, ▲) 2-bromoethanol, (□, ■) 3-chloropropan-1-ol, (◇, ◆) 1-chloropropan-2-ol.

greater electronegativity of the halogen atom. In addition to this, the four halogenoalcohols used in the o.r.d. measurements have almost equal ability for denaturation, as shown in fig. 2, although they differ in their hydrocarbon content. Therefore, the strong denaturation ability of the halogenoalcohols should be attributed to factors other than their hydrophobicity.

Frank and Egland²⁵ have emphasized that hydrophobic solutes do not cause protein denaturation by dissolving out polar residues from the interior, neither is it caused by the direct action of the solvent on protein residues, but rather the properties of the solvent system play a crucial role in the conformational stability of the protein in mixed solvents. We have carried out an ultrasonic absorption study of water + alcohol

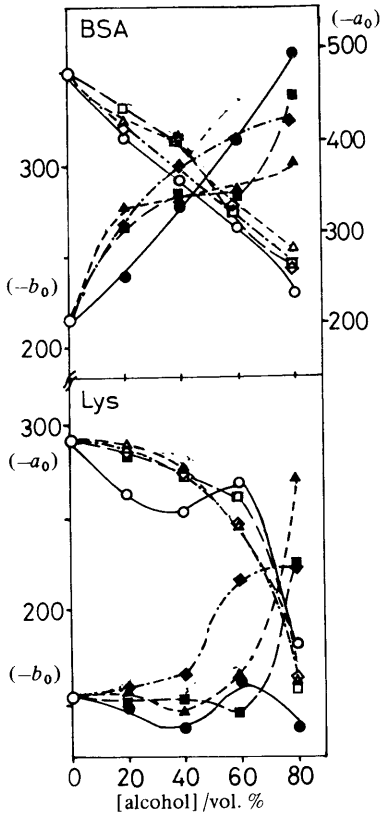


Fig. 3.

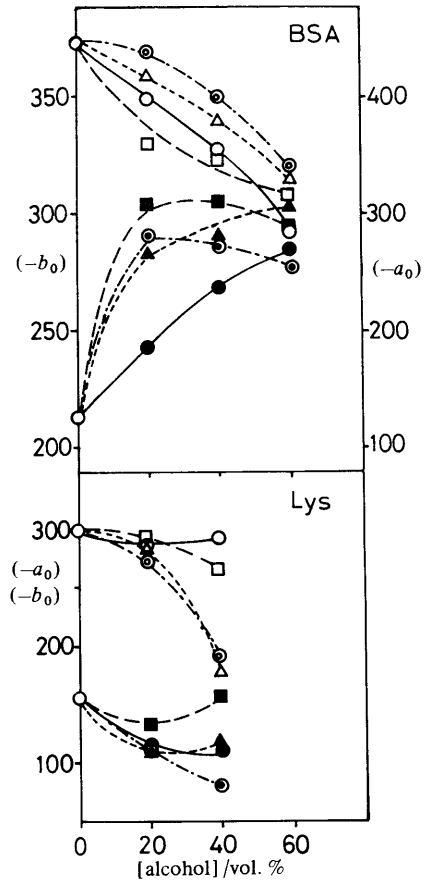


Fig. 4.

Fig. 3. Dependence of a_0 (○ △ ◇ □) and b_0 (● ▲ ◆ ■) for BSA and Lys on concentration of alkoxyalcohol in the mixed solvents with water: (○, ●) 2-methoxyethanol, (△, ▲) 2-ethoxyethanol, (◇, ◆) 2-n-propyloxyethanol, (□, ■) 3-methoxypropan-1-ol.

Fig. 4. Dependence of a_0 (○ △ □ ⊙) and b_0 (● ▲ ■ ⊚) for BSA and Lys on concentration of aminoalcohol in mixed solvent with water: (○, ●) 2-dimethylaminoethanol, (△, ▲) 2-diethylaminoethanol, (□, ■) 3-dimethylaminopropan-1-ol, (⊙, ⊚) 3-diethylaminopropan-1-ol.

systems and a preferential interaction study between protein and alcohols to investigate the role of bulk solution structure and local protein-alcohol interaction in the conformational stability of proteins in mixed solvent systems. The details have been presented previously,^{11,12} and the data obtained suggest that in water + aliphatic alcohol and water + alkoxyalcohol systems the changes in the bulk water structure on the addition of these alcohols lead to a change in the strength of the hydrophobic interaction inside the protein and thus cause conformational changes; in other words subtle solvent effects²⁵ play a crucial role. On the other hand, in the water + ClEtOH system, the main reason for the conformational change of the protein is the direct interaction between ClEtOH and the protein, and solvent effects play a minor role.

Furthermore, the results obtained in this study support the above conclusion that the properties of the solvent system are closely linked to the conformational stability

Table 1. Spectral properties (cm^{-1}) of OH bands of alcohols and equilibrium constants ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$) in alcohol + DMA solutions in carbon tetrachloride at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}^a$

no.	alcohol	ν_{free}	ν_{intra}	$\Delta\nu$	ν_{inter}	$\Delta\nu_{\text{free}}$	$\Delta\nu_{\text{intra}}$	K
1	$\text{CH}_3\text{—OH}$	3646	—	—	3459	187	—	7.7 ± 0.5
2	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—OH}$	3638	—	—	3461	177	—	3.6 ± 0.4
3	$\text{CH}_3\text{—(CH}_2)_2\text{—OH}$	3638	—	—	3465	173	—	3.2 ± 0.8
4	$\text{CH}_3\text{—C(CH}_3)_2\text{—OH}$	3612	—	—	3448	164	—	2.2 ± 0.8
5	$\text{Cl—(CH}_2)_2\text{—OH}$	3631	3603	28	3407	224	196	10.9 ± 0.4
6	$\text{Br—(CH}_2)_2\text{—OH}$	3632	3597	35	3410	222	187	10.2 ± 0.4
7	$\text{Cl—(CH}_2)_3\text{—OH}$	3645	—	—	3448	197	—	9.6 ± 0.4
8	$\text{Cl—CH}_2\text{—CH(CH}_3)_2\text{—OH}$	3634	3600	34	3419	215	181	8.6 ± 0.5
9	$\text{CH}_3\text{O—(CH}_2)_2\text{—OH}$	3645	3610	35	3443	202	167	2.0 ± 0.8
10	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—(CH}_2)_2\text{—OH}$	3644	3610	34	3442	202	168	1.9 ± 0.7
11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O—(CH}_2)_2\text{—OH}$	3638	3610	28	3455	183	155	1.2 ± 0.7
12	$\text{CH}_3\text{O—(CH}_2)_3\text{—OH}$	3648	3543	105	3460	188	83	— ^b
13	$(\text{CH}_3)_2\text{N(CH}_2)_2\text{—OH}^c$	3642	3506	136	(3440)	(199)	(63)	— ^b
14	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N—(CH}_2)_2\text{—OH}^d$	3640	3480	160	—	—	—	— ^b
15	$(\text{CH}_3)_2\text{N—(CH}_2)_3\text{—OH}^d$	3646	3318	326	—	—	—	— ^b

^a ν_{free} , ν_{intra} and ν_{inter} are the frequency at the absorption maxima of free and intra- and inter-molecularly hydrogen-bonded OH bands, respectively. $\Delta\nu (= \nu_{\text{free}} - \nu_{\text{intra}})$ is the frequency shift upon intramolecular hydrogen bonding. $\Delta\nu_{\text{free}} (= \nu_{\text{free}} - \nu_{\text{inter}})$ and $\Delta\nu_{\text{intra}} (= \nu_{\text{intra}} - \nu_{\text{inter}})$ are the frequency shift upon intermolecular hydrogen bonding by monomeric free and intramolecularly hydrogen-bonded alcohols, respectively. ^b Appreciable change was not observed in the monomeric free OH band to calculate the equilibrium constant. ^c As the intra- and inter-molecular hydrogen-bonding OH bands overlap each other, the latter band and ν_{inter} were determined by subtracting the spectrum of alcohol solution from that of alcohol + DMA solution. ^d No change was observed in the spectra on the addition of DMA.

of the protein in alkylalcohol + water, alkoxyalcohol + water and aminoalcohol + water systems, but in halogenoalcohol + water systems factors other than solvent effects, most likely nearest-neighbour interactions, are responsible for the denaturation. It is thus necessary to examine whether or not nearest-neighbour interactions between the protein and halogenoalcohols are related to the three characteristics of the halogenoalcohols mentioned in the introduction. Therefore the interaction between alcohols and amides of model proteins in carbon tetrachloride (CCl_4) solutions were studied in order to identify the factors in the denaturation of globular proteins in halogenoalcohol + water systems.

STUDIES OF THE INTERACTION BETWEEN ALCOHOLS AND AMIDES AS PROTEIN MODELS

We recognize that there remain doubts as to whether or not alcohol + amide systems in CCl_4 solutions can be treated as a model for studying the stability of real proteins in alcohol + water systems, because, for example, the self-association of *N*-methylacetamide in water has been reported to be much less than in CCl_4 .²⁶ It is, however, possible to obtain information on the hydrogen-bonding ability of the alcohols by studying the molecular interaction of alcohols with amides in CCl_4 solutions, and the values obtained can be used as a guide for aqueous systems. Thus, the results obtained are useful in a discussion of the conformational stability of proteins in alcohol + water systems.

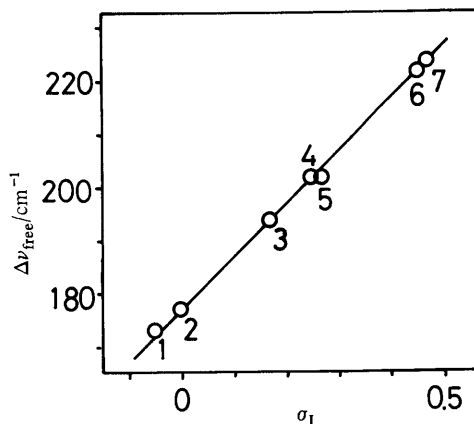


Fig. 5. Plot of $\Delta\nu_{\text{free}}$ against σ_I for $X-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; X is (1) CH₃, (2) H, (3) CClH₂, (4) CH₃O, (5) C₂H₅O, (6) Cl, (7) Br.

INTERACTION BETWEEN ALCOHOLS AND DMA

I.r. Measurements in the O—H Stretching Vibration Region: The proton-donating ability of the alcohols in hydrogen-bond formation was examined by determining $\Delta\nu_{\text{OH}}$, the frequency shift of the OH stretching vibration band, and K , the equilibrium constant for formation of a 1:1 hydrogen-bonded complex, in alcohol and *N,N*-dimethylacetamide (DMA) solutions in CCl₄ from i.r. measurements. The results obtained for fifteen alcohols are summarized in table 1, where, ν_{free} , ν_{intra} and ν_{inter} are the frequencies of the free, the intramolecularly and the intermolecularly hydrogen-bonded OH band, respectively. As shown in table 1, the alcohols, except the alkylalcohols and 3-chloropropan-1-ol (ClPrOH), are found to form intramolecular hydrogen bonds. The frequency shifts, $\Delta\nu_{\text{free}} = (\nu_{\text{free}} - \nu_{\text{inter}})$ and $\Delta\nu_{\text{intra}} = (\nu_{\text{intra}} - \nu_{\text{inter}})$, are listed in table 1. These values are a measure of the energy stabilization as the result of the molecular interaction of DMA with free and intramolecularly hydrogen-bonded alcohols. The values of $\Delta\nu = (\nu_{\text{free}} - \nu_{\text{intra}})$, the frequency shift upon intramolecular hydrogen bonding, are also shown in table 1.

In order to examine the correlation between the value of $\Delta\nu_{\text{free}}$ and the electron-withdrawing ability of the substituents, the relationship between $\Delta\nu_{\text{free}}$ and the σ_I , the parameter of the Taft equation,²⁷ was examined by plotting $\Delta\nu_{\text{free}}$ against σ_I for the 2-substituted ethanols. The plots are shown in fig. 5 and a straight line is obtained which can be expressed as $\Delta\nu_{\text{free}}/\text{cm}^{-1} = 126.4 \sigma_I + 177.0$. This indicates that the hydroxy groups of these alcohols possess a proton-donating ability corresponding to the electron-withdrawing ability of each substituent. In fig. 5, PrOH and ClPrOH are also treated as 2-substituted ethanols.

A linear relationship between $\Delta\nu_{\text{free}}$ and $\Delta G = -RT \ln K$ is also found for the alcohols which cannot form intramolecular hydrogen bonds. However, this is not the case for the alcohols which can form intramolecular hydrogen bonds. In this case, $\Delta\nu_{\text{intra}}$ is chosen rather than $\Delta\nu_{\text{free}}$ because of the energy stabilization owing to intramolecular hydrogen bonding and the predominance of that species, the fraction of the species being reported as 0.85, 0.87 and 0.77 for ClEtOH, BrEtOH and MeOEtOH, respectively, in cyclohexane,²⁸ and the value for 2-*N,N*-dimethylaminoethanol is calculated to be 0.92 in CCl₄.²⁹ In the case of 1-chloropropan-2-ol, the predominance of the species is confirmed by the strong intramolecular hydrogen-

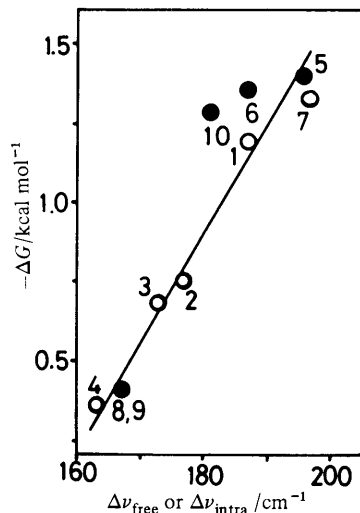


Fig. 6. Plot of $-\Delta G = RT \ln K$ against $\Delta\nu_{\text{free}}$ (○) or $\Delta\nu_{\text{intra}}$ (●) for a 1:1 complex formed between DMA and alcohols: (1) methanol, (2) ethanol, (3) propan-1-ol, (4) 2-methylpropan-2-ol, (5) 2-chloroethanol, (6) 2-bromoethanol, (7) 3-chloropropan-1-ol, (8) 2-methoxyethanol, (9)-ethoxyethanol and (10) 1-chloropropan-2-ol (see table 1).

bonding OH band in its i.r. spectra. As a result, a fairly good linear relationship is obtained, as illustrated in fig. 6, where $-\Delta G = RT \ln K$ is plotted against $\Delta\nu_{\text{free}}$ or $\Delta\nu_{\text{intra}}$. In the cases of 3-methoxypropan-1-ol and the three aminoalcohols, the value of K could not be obtained because of the absence of any appreciable change in their i.r. spectra. Fig. 6 indicates clearly that $\Delta\nu_{\text{intra}}$ should be taken as the measure of intermolecular hydrogen-bonding ability instead of $\Delta\nu_{\text{free}}$ in the halogenoethanols, alkoxyalcohols and aminoalcohols investigated. In other words, the formation of an intramolecular hydrogen bond is considered to reduce the intermolecular hydrogen-bonding ability of the alcohols.

On the basis of these results, the reason why ClEtOH and BrEtOH have a much larger value of K than the 2-alkoxyethanols and 2-aminoethanols can be interpreted in terms of the large value of $\Delta\nu_{\text{free}}$ and the small value of $\Delta\nu$, resulting in a large value of $\Delta\nu_{\text{intra}}$. The situation is, however, the opposite in alkoxyalcohols and aminoethanols. In the case of alkoxyalcohols, the small intermolecular hydrogen-bonding ability can be ascribed to the small electron-withdrawing ability of the alkoxy groups (see fig. 5). In the case of 3-methoxypropan-1-ol, in particular, the strong intramolecular hydrogen bonding through a six-membered ring reduces the net intermolecular hydrogen-bonding ability and results in a small K value.

What is significant in aminoalcohols is the very weak intermolecular hydrogen-bonding ability shown in table 1. This can be ascribed to both the weak electron-withdrawing ability of the alkylamino groups and the strong intramolecular hydrogen bonding between OH and $:\text{N} <$ groups. It has been reported that this type of hydrogen bond is very strong because of a stable polarized structure $\text{O}^{\delta-} - \text{H} \cdots \text{N}^{\delta+}$, resulting from the greater electronegativity of oxygen compared with nitrogen.³⁰ In particular, this is illustrated in the large $\Delta\nu$ value of 3-dialkylaminopropan-

l-ol. This is also due to the formation of a six-membered ring as the result of intramolecular hydrogen bonding shown by $\text{—OH}\cdots\text{N} <$.

In addition to our results, there are the data of Henson and Swenson³¹ concerning the ability of water to hydrogen bond to DMA in CCl_4 . They have reported that the value of K for the formation of a 1:1 hydrogen-bonded complex between H_2O and DMA, $>\text{CO}\cdots\text{HOH}$, is $8.66 \pm 2.45 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ at 25°C . Of course, the intermolecular hydrogen bonding of alcohols with DMA in aqueous systems is not necessarily the same as in CCl_4 solutions. However, there is no reason why it should be greatly different from that in CCl_4 solutions.

The results obtained, therefore, can be interpreted by relating the denaturation ability of the alcohols with the net intermolecular hydrogen-bonding ability taken as K values. The almost equal and large K values of the halogenoalcohols correspond well with their large and almost equal denaturation abilities, indicating that nearest-neighbour interactions play the major role in the destabilization of protein conformation. On the contrary, for the alkoxyalcohols and aminoalcohols, a direct interaction is not likely to occur judging from the very small values of K . In these systems, more subtle solvent effects²⁵ play a major role in the conformational stability of the protein.

I.r. Measurements in the C=O Stretching Vibration Region: A very useful method of studying the interaction of alcohols with proteins is to compare the strength of the hydrogen bond formed between the alcohol hydroxy and amide carbonyl groups with that formed between amide bonds. This can be carried out by measuring the frequency shift in the amide I band, $\Delta\nu_{\text{amide I}}$, because the amide carbonyl is the common proton-accepting group of the hydrogen bonds. Therefore, we tried to measure the frequency shift of the amide I band in several *N*-methylacetamide (NMA) + alcohol systems. It was, however, difficult to analyse the spectra of the amide I band because of the complex overlap of the bands caused by the self-association of NMA. Thus, DMA was chosen as the amide compound to measure the frequency shift of the CON carbonyl stretching band, $\Delta\nu_{\text{C=O}}$, as the result of interaction with alcohols.

It was found, for alcohol + DMA systems, that the spectral change in the C=O band became appreciable only when the DMA concentration was less than the alcohol concentration. Therefore, [DMA] was fixed at $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ throughout the experiment, whereas the alcohol concentration was varied from *ca.* 0.5×10^{-2} to $2 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$. The alcohols used were MeOH, EtOH, PrOH, MeOEtOH, ClEtOH, BrEtOH and ClPrOH. Fig. 7 illustrates the spectral changes in the C=O band of DMA with increasing ClEtOH concentration. As is shown in fig. 7, the peak at 1659.5 cm^{-1} , which is assigned to the non-hydrogen-bonded C=O band, $\nu_{\text{C=O}}$, decreases gradually with increasing alcohol concentration, whereas two new bands appear, $\nu_{\text{C=O}}^1$ as a shoulder to lower frequency, and $\nu_{\text{C=O}}^2$ as a band to even lower frequency. This indicates the formation of two kinds of hydrogen-bonded species between the alcohols and DMA, for which the ratio of alcohol to DMA is different. The overall tendency of the spectral change is similar for all the alcohols listed above. However, the extent of the frequency shift and the spectral change are dependent upon the kind of alcohol. The most interesting finding is that the alcohol which has the largest hydrogen-bonding ability, *i.e.* the largest value of K , induces the largest change in the C=O band of DMA.

We tried to determine the frequency shifts $\Delta\nu_{\text{C=O}}^1$, from $\nu_{\text{C=O}}$ to $\nu_{\text{C=O}}^1$, and $\Delta\nu_{\text{C=O}}^2$, from $\nu_{\text{C=O}}$ to $\nu_{\text{C=O}}^2$, for each alcohol + DMA system. However, since the $\nu_{\text{C=O}}^1$ band was observed as a shoulder in all the systems it was not possible to determine the $\Delta\nu_{\text{C=O}}^1$ values precisely. Table 2 lists $\Delta\nu_{\text{C=O}}^2$ values obtained at the concentration ratio for alcohol:DMA of 20:1.

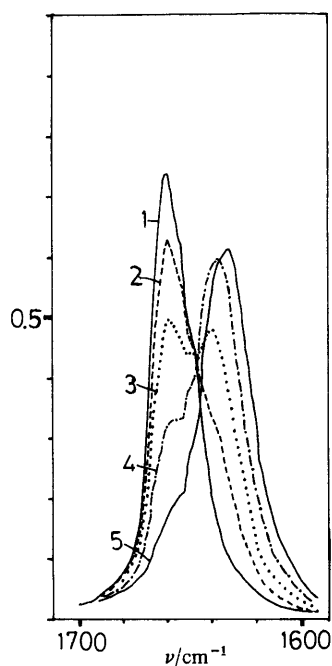


Fig. 7. Spectral changes of the C=O band of DMA with increasing alcohol in ClEtOH + DMA solutions in CCl_4 ; $[\text{DMA}] = 0.010 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{ClEtOH}]/[\text{DMA}] = (1) 0, (2) 0.86, (3) 2.8, (4) 8.3, (5) 25$.

Table 2. Frequency shifts (cm^{-1}) of the C=O stretching bands ($\Delta\nu_{\text{C=O}}$) and amide I band ($\Delta\nu_{\text{amide I}}$) in different systems^a

system	alcohol	frequency shift
DMA + alcohol	CH_3OH	$\Delta\nu_{\text{C=O}}^2$ 18
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	17
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	16
	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	16
	$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	24
	$\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	24
	$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	24
Ac-L-Val-NMe ₂	$\text{>N-C}^*\text{=O} \cdots \text{H-N-C=O}$	$\Delta\nu_{\text{C=O}}$ 11
NMA	$\text{H-N-C}^*\text{=O} \cdots \text{H-N-C=O}$	$\Delta\nu_{\text{amide I}}$ 22 ^b
	$\text{H-N-C=O} \cdots (\text{H-N-C}^*\text{=O})_n \cdots \text{H-N-C=O}$ ($n = 1, 2$)	48

^a C=O group is marked with * when the groups in different states are present in the solution.

^b Ref. (34).

The method of continuous variation³² was applied to the ClEtOH + DMA systems for the $\nu_{\text{C}=\text{O}}^2$ band and we found that the band can be assigned to a 2:1 alcohol-DMA complex. Consequently, the $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ band was attributed to a 1:1 complex.

The following three structures, (I), (II)³³ and (III), can be considered for the 2:1 complex:

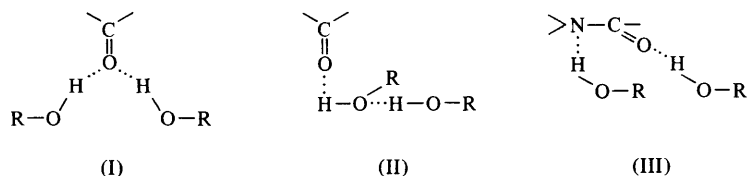
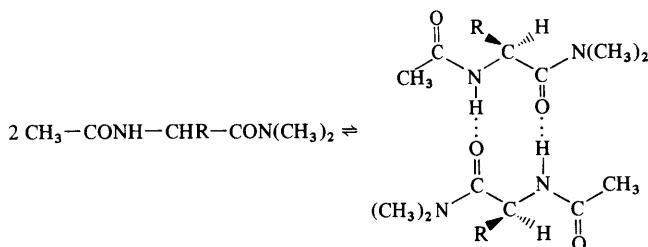


Table 2 and fig. 7, however, suggest that the formation of both 1:1 and 2:1 complexes is due to hydrogen bonding between amide carbonyl and alcohol hydroxy groups, and such large values of $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}^2$ cannot be expected for structures (II) and (III). Therefore, these experimental results imply that the $\nu_{\text{C}=\text{O}}^2$ band observed in our systems should not be assigned to structures (II) and (III) but to structure (I).

From our previous studies of model protein compounds represented as $\text{CH}_3\text{-CONH-CHR-CON}(\text{CH}_3)_2$ [$\text{R}=\text{H}, \text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$] it has become clear that these compounds dimerize by forming two interamide hydrogen bonds as shown below:



Therefore, the i.r. spectra of Ac-L-Val-NMe₂ in CCl₄ solutions were measured over a wide range of concentrations to determine $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}$ from interamide hydrogen-bond formation, $\text{CONH} \cdots \text{O}=\text{CN} <$, because this compound has the same end structure, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, as DMA and also has a large association constant for dimerization.

I.r. spectra of NMA solutions in CCl₄ were also measured to obtain the $\Delta\nu_{\text{amide I}}$ value due to interamide hydrogen-bond formation between CONH groups in order to estimate the energy stabilization in interamide hydrogen bonds as a result of the formation of linking hydrogen bonds. Table 2 summarizes the frequency shifts of the C=O stretching band in the systems investigated.

It is reasonable to assume that the $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}$ values from the formation of interamide hydrogen bonds within the protein should be larger than the value obtained in Ac-L-Val-NMe₂ solutions because of the energy stabilization from the formation of linking hydrogen bonds. In fact, as shown in table 2, the $\Delta\nu_{\text{amide I}}$ value from the formation of associated polymer is twice as large as the $\Delta\nu_{\text{amide I}}$ value from dimerization.³⁴ Therefore, in the study of the interaction of protein with alcohol, the $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}$ values, which represent the strength of the interamide hydrogen bonds, should be at least one to two times larger than the $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}$ values obtained in Ac-L-Val-NMe₂ solutions. This value should be compared with the $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}$ value obtained in alcohol + DMA solutions.

It is clear from table 2 that the $\Delta\nu_{\text{C}=\text{O}}^2$ values for MeOH, EtOH, PrOH and

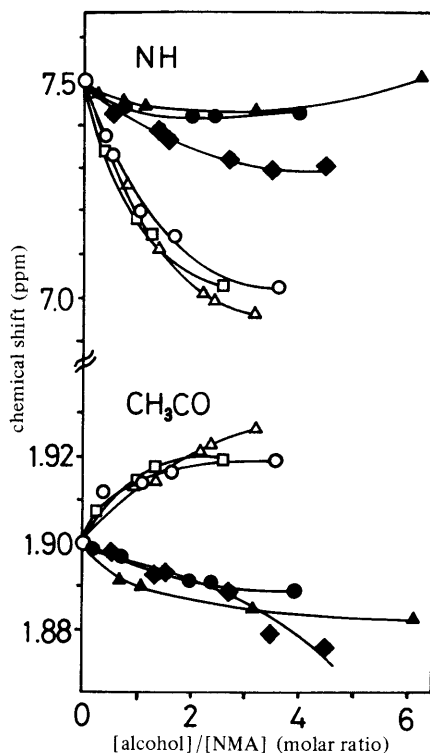


Fig. 8. Dependence of proton chemical shifts of NMA on alcohol concentration in alcohol and NMA solutions in carbon tetrachloride at $[NMA] = 0.25 \text{ mol dm}^{-3}$, at which the monomer fraction of NMA was calculated to be < 0.21 from the i.r. spectra of the NH stretching vibration band; (○) methanol, (△) ethanol, (□) 2-methoxyethanol, (●) 2-chloroethanol, (▲) 2-bromoethanol, (■) 3-chloropropan-1-ol.

MeOEtOH are within this range, whereas ClEtOH, BrEtOH and ClPrOH have values $> 22 \text{ cm}^{-1}$. Furthermore, alcohols having stronger hydrogen-bonding ability show a greater tendency for 2:1 complex formation. On the basis of these findings, it can be concluded that halogenoalcohols may form a hydrogen bond with the amide carbonyl group, the strength of the bond being greater than that of the interamide hydrogen bonds.

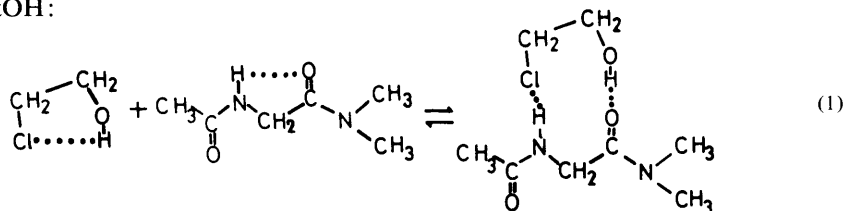
INTERACTION BETWEEN ALCOHOLS AND NMA

Changes in the ^1H n.m.r. spectra of NMA induced by the alcohols have been measured in CCl_4 solutions to confirm the above result by using an amide compound containing a COMH amide group. Fig. 8 shows plots of the chemical shifts of NH and CH_3CO protons against alcohol concentration. The alcohols used were MeOH, EtOH, MeOEtOH, ClEtOH, BrEtOH and ClPrOH. With increasing halogenoalcohol concentration, the chemical shift of the NH proton moves to higher field, whereas the CH_3CO proton shifts to lower field. These up-field and down-field shifts can be interpreted as the result of dissociation of the interamide hydrogen bonds of NMA and hydrogen-bond formation between the amide carbonyl and alcohol hydroxy groups, respectively. These results, together with those summarized in table 2, indicate

that the hydrogen-bonding ability of the halogenoalcohols is strong enough to dissociate the interamide hydrogen bond and to form an intermolecular hydrogen bond with the amide carbonyl. In case of MeOH, EtOH and MeOEtOH, both NH and CH₃CO protons shift to higher field, which indicates that neither dissociation of the interamide hydrogen bond nor formation of an intermolecular hydrogen bond occurs because of the weak hydrogen-bonding ability of the alcohols.

INTERACTION BETWEEN ALCOHOLS AND Ac-Gly-NMe₂

N-acetylglycine-*N,N'*-dimethylamide (Ac-Gly-NMe₂) can interact bifunctionally with ClEtOH:



Therefore, we have studied the interaction of Ac-Gly-NMe₂ with ClEtOH, MeOEtOH and EtOH in CCl₄ by measuring the ¹H n.m.r. spectra. Fig. 9 shows the changes in the chemical shifts of Ac-Gly-NMe₂ with increasing alcohol concentration. The down-field shift of the CH₂ proton can be related to changes in the electronic state of the vicinal NH and CO groups because of the interaction with the alcohols. The down-field shift of the acetyl methyl proton can be attributed to hydrogen-bond formation between the acetyl carbonyl and the alcohol hydroxy. The down-field shift of the acetyl proton of the three alcohols is in the order ClEtOH > EtOH > MeOEtOH, which is consistent with the order of the intermolecular hydrogen-bonding ability of these alcohols determined from the interaction between alcohols and DMA (see table 1). The down-field shift of the NH proton occurs with additional line broadening for the three systems. This indicates that the NH group of Ac-Gly-NMe₂ acts as a proton donor for the three alcohols and means that the hydroxy oxygen of EtOH acts as a proton acceptor. This suggests that the chlorine and methoxy oxygen atoms are not necessarily the only proton acceptors in ClEtOH and MeOEtOH, respectively, as shown in reaction (1). In other words, the hydroxy oxygen may also function as a proton acceptor.

The down-field shift of the NH proton by ClEtOH is larger than that produced by MeOEtOH and EtOH at lower alcohol concentrations. This cannot be explained only on the basis of hydrogen-bond formation between NH and the hydroxy oxygen because the hydrogen-bonding basicity of the hydroxy oxygen of ClEtOH is smaller than that of MeOEtOH and EtOH.³⁵ The large down-field shift must also be related to additional causes, *e.g.* hydrogen-bond formation between NH and Cl.

Hydrogen-bond formation in —CO—N< carbonyl can be confirmed from the changes in the chemical shift at the centre of the *N*-methyl doublet, δ_{NCH_3} , and the difference in the chemical shifts of the *N*-methyl doublet, $\Delta\delta_{\text{NCH}_3}$, because protonation of the —CO—N< oxygen by the protonating solvent reduces the rotational barrier about the C—N bond, resulting in collapse of the *N*-methyl doublet and a down-field shift.³⁶ Slight narrowing of the methyl doublet and the down-field shift of δ_{NCH_3} occur only for ClEtOH at lower concentrations, suggesting hydrogen-bond formation between ClEtOH and the —CO—N< carbonyl. Therefore, the fact that both narrowing of the NCH₃ doublet and excess down-field shift in NH are occurring simultaneously indicates the possibility of a bifunctional interaction between Ac-Gly-NMe₂ and ClEtOH.

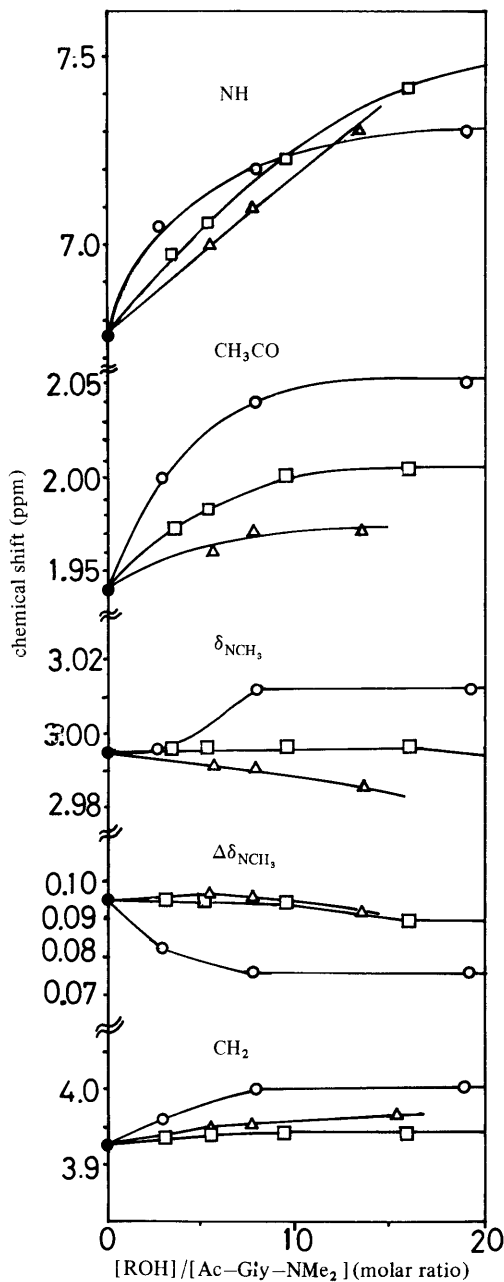


Fig. 9. Dependence of proton chemical shifts of Ac-Gly-NMe₂ on alcohol concentration in alcohol + Ac-Gly-NMe₂ solutions in carbon tetrachloride at [Ac-Gly-NMe₂] = 0.086 mol; (○) 2-chloroethanol, (△) 2-methoxyethanol, (□) ethanol. δ_{NCH_3} is the chemical shift at the centre of the NCH₃ doublet and $\Delta\delta_{\text{NCH}_3}$ is the difference in the chemical shift between the NCH₃ doublet.

In the case of MeOEtOH, however, the small concentration dependence of δ_{NCH_3} and $\Delta\delta_{\text{NCH}_3}$ indicates that a hydrogen bond is not formed between the $-\text{CO}-\text{N}<$ carbonyl group and the hydroxy group. The slight up-field shift of δ_{NCH_3} can be related to the dissociation of the intramolecular hydrogen bond of Ac-Gly-NMe₂¹⁸ caused by intermolecular hydrogen-bond formation between NH and the hydroxy oxygen of MeOEtOH. Furthermore, steric hindrance due to the methoxy group may be responsible for reducing the chance of interaction between NH and methoxy oxygen. Thus, the bifunctional interaction is unlikely to occur between Ac-Gly-NMe₂ and MeOEtOH.

CONCLUSIONS

Our results indicate that the halogenoalcohols have an intermolecular hydrogen-bonding ability which is strong enough to dissociate the interamide hydrogen bonds inside proteins and they may also interact bifunctionally with proteins, which results from the strong proton-donating ability of the hydroxy group and the participation of the halogen atom in the formation of intermolecular hydrogen bonds. Thus, the reasons why halogenoalcohols are strong denaturation solvents for proteins can be attributed to the direct interaction between the halogenoalcohols and the protein in addition to the disruption of the hydrophobic interaction inside the protein, because of the change in the bulk water structure induced by halogenoalcohols, although nearest-neighbour interactions such as hydrogen bonds and salt bridges are generally considered not to contribute substantially to the denaturation of proteins by alcohols.

This work was supported, in part, by Research Grants (A579164 and CO-538028) to F.U. from the Japanese Ministry of Education and Culture.

- ¹ T. E. Creighton, *Biopolymers*, 1983, **22**, 49.
- ² J. A. Gordon and W. P. Jencks, *Biochemistry*, 1963, **2**, 47.
- ³ Y. Shindo, *Biopolymers*, 1971, **10**, 1081.
- ⁴ S. N. Timasheff, *Acc. Chem. Res.*, 1970, **3**, 62.
- ⁵ H. Inoue and S. N. Timasheff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 1890.
- ⁶ M. Kuhn, W. Luettke and R. Mecke, *Z. Anal. Chem.*, 1959, 170.
- ⁷ J. Cantacuzene, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, 754.
- ⁸ H. Edelhoeh and J. C. Osborne Jr, *Adv. Protein Chem.*, 1976, **30**, 183.
- ⁹ A. Ben-Naim, *Hydrophobic Interaction* (Plenum Press, New York, 1980), p. 176.
- ¹⁰ A. E. Russell and D. R. Cooper, *Biochemistry*, 1969, **8**, 3980.
- ¹¹ Y. Shindo and K. Kimura, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, in press.
- ¹² Y. Shindo, M. Nanbu, Y. Harada and Y. Ishida, *Acustica*, 1981, **48**, 186.
- ¹³ L. I. Smith and J. A. Sprung, *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 1276.
- ¹⁴ W. W. Hartman, *Org. Synth. Coll.*, 1943, **11**, 183.
- ¹⁵ C. Tanford and G. L. Roberts Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 2509.
- ¹⁶ A. J. Sophianopoulos, C. K. Rhodes, D. N. Holcomb and K. E. Van Holde, *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 1107.
- ¹⁷ W. Moffitt and J. T. Yang, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1956, **42**, 596.
- ¹⁸ K. Mizuno, S. Nishio and Y. Shindo, *Biopolymers*, 1979, **18**, 693.
- ¹⁹ K. E. Van Holde and S. F. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 66.
- ²⁰ T. T. Herskovits, B. Gradedbeku and H. Jaillet, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 2586.
- ²¹ A. Kurono and H. Hamaguchi, *J. Biochem.*, 1964, **56**, 432.
- ²² E. E. Schrie, R. T. Ingwall and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 1065, **69**, 298.
- ²³ J. M. Sturtevant and G. Velicelebi, *Biochemistry*, 1981, **20**, 3091.
- ²⁴ R. M. Parodi, E. Bianchi and A. Ciferri, *J. Biol. Chem.*, 1973, **218**, 4047.
- ²⁵ F. Franks and D. Eagland, *Crit. Rev. Biochem.*, 1975, **3**, 165.
- ²⁶ I. M. Klotz and J. S. Franzen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3461.
- ²⁷ R. W. Taft Jr, *J. Phys. Chem.*, 1960, **64**, 1805.
- ²⁸ Y. Toshiyasu, *Nippon Kagaku Kaishi*, 1973, 429; 434.

- ²⁹ N. Mori, E. Nakanure and Y. Tsuzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 1967, 40.
³⁰ H. H. Freedman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 2900.
³¹ D. B. Henson and C. A. Swenson, *J. Phys. Chem.*, 1973, **77**, 2401.
³² L. I. Katzin and E. Gebert, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 5455.
³³ K. B. Whetsel and R. E. Kagarise, *Spectrochim. Acta*, 1962, **18**, 315.
³⁴ F. Fillaux and De Loze, *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.*, 1972, **69**, 36.
³⁵ M. J. Kamlet and R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 377.
³⁶ C. F. Nawrot and A. Veis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 3903.

(PAPER 3/1202)

Structures of 2:1 Complexes between Halogenated Alcohols and *N,N*-Dimethylacetamide or Acetone

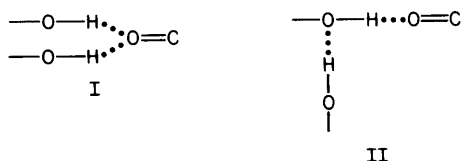
Kazuko Mizuno, Masaharu Saito, Sohkiichi Uchida, and Yohji Shindo*

Research Institute for Material Science and Engineering, Faculty of Engineering, Fukui University, Fukui 910, Japan (Received: November 5, 1984)

Spectral changes in the carbonyl vibration band of *N,N*-dimethylacetamide (DMA) caused by 2-chloroethanol (ClEtOH), 2,3-dichloropropan-1-ol (DCPrOH), and 1,1,1-trichloro-2-methylpropan-2-ol (TCMPrOH) were measured in solutions of carbon tetrachloride to determine the structure of 2:1 complexes between the alcohols and amide. It has been shown that ClEtOH and DCPrOH form a 2:1 complex (I) in which two alcohol hydroxyls attach directly to the carbonyl oxygen, whereas TCMPrOH makes a 2:1 complex (II) in which the second alcohol hydroxyl attaches to the oxygen of the first hydroxyl forming a hydrogen bond with the carbonyl group. It has been also shown that ethanol forms I with DMA. The frequency shifts upon the formation of I by these alcohols are found to correlate linearly to the proton-donating acidity of the alcohols, which is determined from the frequency shift in the OH vibration band due to the 1:1 complex formation between alcohols and DMA. From the spectral changes of the acetone carbonyl band caused by ClEtOH, it is confirmed that acetone forms I with ClEtOH.

Introduction

Since Kagarise and Whetsel suggested the following two possibilities for the structure of 2:1 complexes between phenols and acetone or cyclohexanone¹



either structure I or II has been assigned to the 2:1 complexes formed between different proton donors and acceptors; structure I is assigned to complexes of *o*-cresol-methyl acetate, -ethyl acetate, and -cyclohexanone,² phenol- or methanol-*N,N*-dimethylacetamide,³ phenol-acetophenone,³ and water-acetone,⁴ while structure II is assigned to *o*-cresol-phenyl acetate and -methyl ethyl ketone,² *p*-cresol-methyl ethyl ketone,² and methanol-acetone.⁵ In these studies, however, the molecular characteristics of these compounds as the proton donor and acceptor, which promote the formation of I or II, are not taken into account.

In our previous work,⁶ we investigated the molecular interaction between *N,N*-dimethylacetamide (DMA) and halogenated alcohols such as 2-chloroethanol (ClEtOH), 2-bromoethanol, and 3-chloropropan-1-ol and proposed the formation of I on the basis of large frequency shifts in the carbonyl vibration band. Recently we have reexamined the structure of the 2:1 complexes from the viewpoint that it might depend on the basicity of the hydroxyl oxygen of alcohols and the presence of a lone pair at the neighboring atom of a carbonyl group, such as amide nitrogen. In this paper, we report experimental results that confirm the structure of the 2:1 complexes presented in our previous paper.

Experimental Section

Materials and Sample Preparation. DMA, ClEtOH, 2,3-dichloropropan-1-ol (DCPrOH), and 1,1,1-trichloro-2-methylpropan-2-ol (TCMPrOH) were all special grades of Wako Pure Chemicals. Carbon tetrachloride was IR spectrograde of Wako.

- (1) Kagarise, R. E.; Whetsel, K. B. *Spectrochim. Acta* **1962**, *18*, 315.
- (2) Ramaswamy, K.; Richai, R.; Gnanadesikan, S. G. *J. Mol. Spectrosc.* **1967**, *23*, 416-24.
- (3) Bellamy, L. J.; Pace, R. J. *Spectrochim. Acta, Part A* **1970**, *27*, 705-13.
- (4) Symons, M. C. R.; Eaton, G. *Chem. Phys. Lett.* **1981**, *83*, 292-93.
- (5) Symons, M. C. R.; Eaton, G.; Shippey, T. A.; Harvey, J. M. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 344-47.
- (6) Mizuno, K.; Kaido, H.; Kimura, K.; Miyamoto, K.; Yoneda, N.; Kawabata, T.; Tsurusaki, T.; Hashizume, N.; Shindo, Y. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **1984**, *80*, 879-94.

TABLE I: Spectral Properties of OH Bands of Alcohols and Frequency Shifts of the CO Band of DMA^a

alcohol	ν_{free}	ν_{intra}	$\Delta\nu_{\text{OH}}$	$\Delta\nu_{\text{C=O,2}}$	$\Delta\nu_{\text{C=O,1}}$
ClEtOH	3631	3603	224	31	20
TCMPrOH		3591	236	24	21
DCPrOH	3637	3559	246	34	22
EtOH	3638		177	25	18

^a ν_{free} and ν_{intra} are the frequencies at the peaks of free and intramolecularly hydrogen-bonding OH bands of the alcohol monomer in carbon tetrachloride. $\Delta\nu_{\text{OH}}$ is the frequency shift of the OH band on the formation of a 1:1 complex with DMA. $\Delta\nu_{\text{C=O,2}}$ and $\Delta\nu_{\text{C=O,1}}$ are the frequency shifts of the CO band of DMA on the formation of 2:1 and 1:1 complexes, respectively.

The dehydration of all reagents and the preparation of stock solutions were carried out carefully in a grease-free vacuum system with the same procedure previously reported.⁷ Magnesium sulfate, barium oxide, calcium hydride, and phosphorus pentoxide were used as drying agents for alcohols, DMA, acetone, and carbon tetrachloride, respectively. From IR spectra, the water content of each reagent was confirmed to be less than 10^{-6} mol dm⁻³ before mixing. Sample solutions were prepared by mixing the stock solutions under an atmosphere of dried nitrogen.

IR Spectra Measurements. IR spectra were measured at room temperature with a Jasco A-3 infrared spectrophotometer interfaced with a MINC 11/23 minicomputer (Digital Equipment). Hardware and software for data acquisition and data processing were all developed in our laboratory.⁸ NaCl cells of 0.5-mm pathlength were used throughout the experiment.

Results and Discussion

Spectral Changes Caused by Halogenated Alcohols. (1) Proton-Donating Acidity of the Alcohols. In order to determine the structure of 2:1 complexes between the halogenated alcohols and DMA, we used TCMPrOH and DCPrOH in addition to ClEtOH. This is because TCMPrOH is a tertiary alcohol having the possibility of forming only II owing to its spacial bulkiness, and DCPrOH is a primary alcohol with a proton-donating acidity almost equal to that of TCMPrOH.

We reported previously that we can use the frequency shift of the OH vibration band of alcohols upon the formation of a 1:1 complex with DMA, $\Delta\nu_{\text{OH}}$, as a measure of proton-donating acidity of alcohols. Thus, $\Delta\nu_{\text{OH}}$ values of TCMPrOH and DCPrOH were examined in carbon tetrachloride solutions by using the same procedure.⁶ Table I summarizes the frequency of free and in-

- (7) Mizuno, K.; Nishio, S.; Shindo, Y. *Biopolymers* **1979**, *18*, 693-708.
- (8) Uchida, S.; Saito, M.; Shindo, Y. *Bull. Res. Ins. Mater. Sci. Eng., Fac. Eng., Fukui Univ.* **1983**, *21*, 31-44.

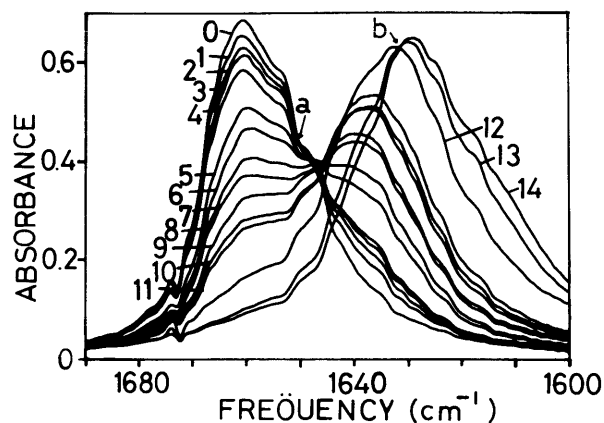


Figure 1. Spectral changes in the C=O band of DMA caused by increasing the concentration of ClEtOH; [DMA] = 0.020 mol dm⁻³, [ClEtOH]/[DMA] = (0) 0, (1) 0.5, (2) 0.8, (3) 1, (4) 2, (5) 3, (6) 4, (7) 5, (8) 5.8, (9) 6.75, (10) 8.75, (11) 10, (12) 25, (13) 50, and (14) 60. a and b are isobestic points (see text).

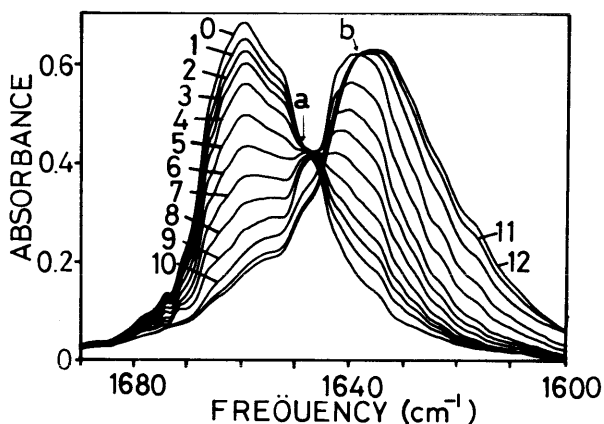


Figure 2. Spectral changes in the C=O band of DMA caused by increasing the concentration of TCMPROH; [DMA] = 0.020 mol dm⁻³, [TCMPROH]/[DMA] = (0) 0, (1) 0.3, (2) 0.6, (3) 0.9, (4) 1.2, (5) 3, (6) 5, (7) 8, (8) 11, (9) 15, (10) 30, (11) 40, and (12) 55. a and b are isobestic points (see text).

tramolecularly hydrogen bonding OH bands, ν_{free} and ν_{intra} , and the frequency shift, $\Delta\nu_{\text{OH}}$. TCMPROH has only one O-H stretching vibration band at 12-cm⁻¹ lower frequency than that of the intramolecularly hydrogen bonding O-H band of ClEtOH below concentrations of 10⁻² mol dm⁻³. As a band corresponding to the free OH vibration cannot be found at about 3600 cm⁻¹, all TCMPROH molecules in carbon tetrachloride solutions are considered to form intramolecular hydrogen bonds. From a comparison of $\Delta\nu_{\text{OH}}$ values, TCMPROH and DCPROH are verified to be stronger proton donors than ClEtOH, as is expected from the amount of chlorine atoms introduced.

(2) *Spectral Changes.* Figures 1 and 2 show the spectral changes of the C=O band of DMA caused by increasing the concentration of ClEtOH and TCMPROH, respectively. The concentration of DMA was fixed at 0.020 mol dm⁻³ throughout all experiments and the concentrations of ClEtOH and TCMPROH were increased up to 60 and 55 times that of DMA, respectively. The peak at 1659.9 cm⁻¹, which is assigned to the non-hydrogen-bonded C=O band of DMA, decreases gradually in height and at the same time new bands appear at lower frequency. A further increase in the alcohol concentrations caused a slight red shift of the peak, but an increase in the peak height was observed. Changes caused by DCPROH were substantially the same as those observed with ClEtOH except for a larger red shift than ClEtOH.

When the alcohol concentration is smaller than that of DMA, the spectra always pass through the isobestic point a, as shown both in Figures 1 and 2. In our previous paper,⁶ we concluded the formation of a 1:1 alcohol-DMA complex in this alcohol concentration range from the result that the equilibrium constant

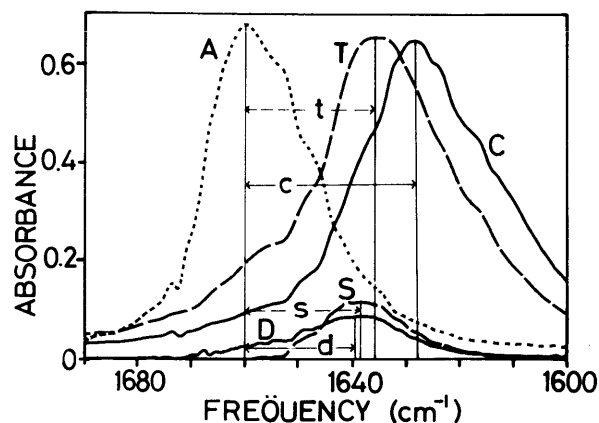


Figure 3. Spectra of the C=O bands of DMA; (A) free, (C) 2:1 complex with ClEtOH, (D) 1:1 complex with ClEtOH, (T) 2:1 complex with TCMPROH, and (S) 1:1 complex with TCMPROH. [DMA] = 0.020 mol dm⁻³ for A, C, and T, 0.003 mol dm⁻³ for D, and 0.004 mol dm⁻³ for S. c and t are $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ and d and s are $\Delta\nu_{\text{C=O},1}$.

based on a 1:1 reaction is constant, where the equilibrium constant was determined from the change in the absorption strength of the OH band of the free alcohol. Thus, we can interpret the isobestic points a as indicating an equilibrium between free DMA and 1:1 hydrogen-bonded DMA.

With an increase in alcohol concentration, the spectra pass no longer the point a. In our previous experiments,⁶ we observed the rapid decrease in the concentration of free alcohol, resulting in a significant increase in the apparent equilibrium constant for 1:1 complex formation in this alcohol concentration range. These two observations indicate that the formation of a 2:1 complex is occurring simultaneously in addition to the 1:1 reaction.

When the alcohol concentrations become fifteen times larger than the DMA concentration, another isobestic point b begins to appear. Since the bands at the lowest frequency have been assigned to 2:1 complexes on the basis of the results obtained by using the continuous variation method,⁶ this point arises from the equilibrium between 1:1 and 2:1 hydrogen-bonded DMA. The frequency shift from the band of non-hydrogen-bonded DMA to that of 2:1 complex, $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$, is summarized in Table I.

The most interesting finding is that the order of the magnitude of $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$, DCPROH > ClEtOH > TCMPROH, is different from that of the proton-donating acidity, DCPROH > TCMPROH > ClEtOH. From this result together with the fact that DCPROH and ClEtOH are primary alcohols but TCMPROH is tertiary alcohol, we think that the structure of the 2:1 complex formed by TCMPROH is different from that formed by the other two. In I, two alcohol hydroxyls attach to carbonyl oxygen, while, in II, a second hydrogen bond is formed at the hydroxyl oxygen of the alcohol which is forming a 1:1 complex with DMA. Thus, the relative value of $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ to $\Delta\nu_{\text{C=O},1}$, the frequency shift of the C=O band upon formation of a 1:1 complex, should be large for I compared with II. Therefore, it is useful to compare the ratios of $\Delta\nu_{\text{C=O},2}:\Delta\nu_{\text{C=O},1}$ for the halogenated alcohols in order to determine the structure of their 2:1 complexes. The spectra in Figures 1 and 2, however, are in practice mixtures of two or three C=O bands due to free, 1:1 hydrogen-bonded, and 2:1 hydrogen-bonded DMA molecules. Then, the problem is how do we get the spectrum of 1:1 hydrogen-bonded DMA. We have solved this by subtracting the spectrum of free DMA from that measured at a sufficiently low alcohol concentration range where only 1:1 complex formation is possible. This is because we can know easily the concentration of free DMA from the following relationship

$$K = x / \{(A_0 - x)(D_0 - x)\}$$

where A_0 and D_0 are the initial concentration of alcohol and DMA, respectively, and K is the equilibrium constant for 1:1 complex formation reported in our previous paper.⁶ We carried out the subtraction of spectra using our MINC 11/23 minicomputer. The spectrum of the 1:1 complex thus obtained is shown in Figure

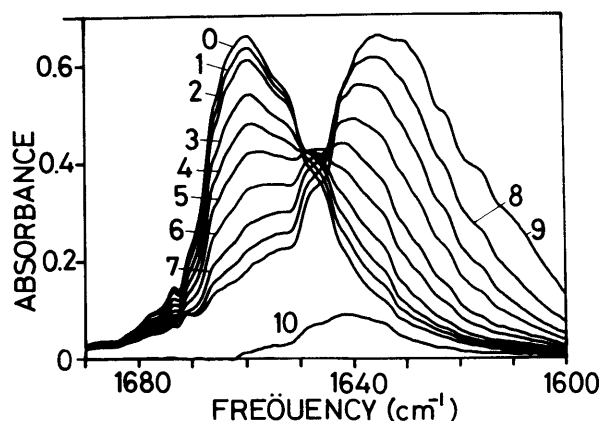


Figure 4. Spectral changes in the C=O band of DMA caused by increasing the concentration of EtOH; [DMA] = 0.020 mol dm⁻³, [EtOH]/[DMA] = (0) 0, (1) 2, (2) 4, (3) 10, (4) 15, (5) 20, (6) 30, (7) 40, (8) 80, (9) 160. (10) C=O band of the 1:1 complex between DMA and EtOH at about 0.002 mol dm⁻³.

3 together with the spectra of free DMA and 2:1 complexes. The $\Delta\nu_{\text{C=O},1}$ values obtained are listed in Table I.

A noticeable finding is that the value 1.1 obtained as the ratio $\Delta\nu_{\text{C=O},2}:\Delta\nu_{\text{C=O},1}$ for TCMPROH is much smaller than 1.5 for both ClEtOH and DCPROH. This result indicates that ClEtOH and DCPROH form I, while TCMPROH forms II. This conclusion is consistent with the prediction based on the fact that TCMPROH is sterically too bulky to form I. In order to get a further confirmation of the above conclusion we compared the ratio of $\Delta\nu_{\text{OH}}:\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ between ClEtOH and DCPROH for the following reason: As two alcohol hydroxyl groups are attached directly to the carbonyl oxygen in case of I, $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ should be closely correlated to the proton-donating acidity of alcohols. Therefore, the ratio should be independent of the kind of alcohol so long as $\Delta\nu_{\text{OH}}$ is used as a measure of the proton-donating acidity of the alcohol. We find the ratio of 7.2 for both ClEtOH and DCPROH, which confirms the formation of I by these two alcohols.

Spectral Changes Caused by Ethanol. As the halogenated alcohols investigated have larger proton-donating acidity and smaller oxygen basicity⁹ than the corresponding alkyl alcohols, these characteristics of the alcohols, especially the weak basicity of their hydroxyl oxygen, are possibly related to the formation of I. As the basicity is enhanced at the hydroxyl oxygen of a 1:1 complex as the result of the electronic polarization of the O-H bond resulting from hydrogen bonding,¹⁰ the basicity of the hydroxyl oxygen seems to be an influential factor for the formation of II. Thus, the formation of II may be favorable for the alkyl alcohols because of their strong oxygen basicity.⁹ From this point of view, we measured the spectral changes caused by ethanol (EtOH) to investigate the effect of hydroxyl oxygen basicity on the structure of the 2:1 complex.

The spectral changes caused by EtOH are shown in Figure 4 together with the spectrum of the 1:1 complex. The changes are substantially the same as those observed in Figures 1 and 2. The values of $\Delta\nu_{\text{C=O},1}$ and $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ are listed in Table I. A significant finding is that $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ is less than that caused by ClEtOH, but slightly larger than that caused by TCMPROH.

If electrons from the hydroxyl oxygen in the 1:1 complex play an important role as a proton acceptor on formation of the second hydrogen bond of II, no effective change will be induced in carbonyl double bond. This tendency should become more appreciable as the hydroxyl oxygen basicity becomes stronger, because the proton-donating acidity becomes weaker with an increase in the basicity, which results in a weaker second hydrogen bond. In this respect, $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ caused by EtOH is too large to consider it as the result of the formation of II compared with the value caused by TCMPROH. Thus, we checked the $\Delta\nu_{\text{OH}}:\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ ratio

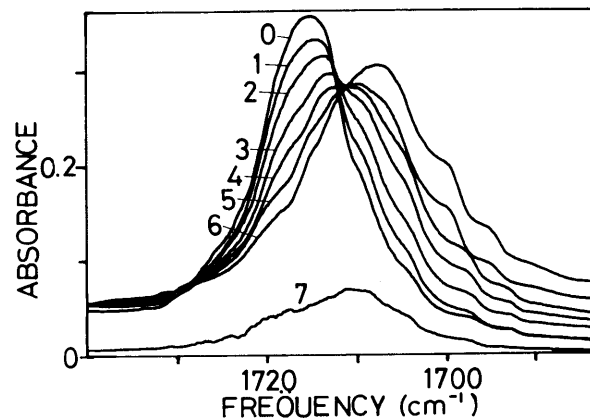


Figure 5. Spectral changes in the C=O band of acetone caused by increasing the concentration of ClEtOH; [acetone] = 0.020 mol dm⁻³, [ClEtOH]/[acetone] = (0) 0, (1) 5, (2) 10, (3) 26, (4) 37, (5) 75, (6) 130. (7) C=O band of the 1:1 complex between acetone and ClEtOH at about 0.004 mol dm⁻³.

for EtOH and obtained a value of 7.1, which is very close to the ratio for ClEtOH and DCPROH. From the above findings, we conclude that I is formed by EtOH and that the basicity of the hydroxyl oxygen has no active role in forming 2:1 complexes of primary alcohols. Since the strengths as proton donor and acceptor of the primary alcohols are not correlated to formation of I, the very bulky structure of TCMPROH should be responsible for the formation of II by TCMPROH. We think it would be interesting to examine the structure of 2:1 complexes of secondary alcohols.

Spectral Changes in the Acetone Carbonyl Band Caused by ClEtOH. In the literature so far reported, esters, ketones, and amides have been used as carbonyl compounds. Although the ester and amide groups are different from ketones in having a lone pair at the oxygen or nitrogen atom adjacent to the carbonyl group, this difference in molecular structure of the proton acceptor has not been discussed in the literature.¹⁻⁵ Thus, we have examined the spectral changes of the acetone carbonyl band caused by ClEtOH in order to examine if the lone pair of the amide nitrogen plays some role in forming I with ClEtOH.

Figure 5 shows the spectral change in the acetone carbonyl band caused by ClEtOH, together with the spectrum of the 1:1 complex with ClEtOH obtained by the same data processing described above. The spectral change is substantially the same as that observed in DMA except that the frequency shift is much smaller than that of DMA as a whole. Values of 4.0 and 7.8 cm⁻¹ are obtained as $\Delta\nu_{\text{C=O},1}$ and $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$, respectively. The ratio of $\Delta\nu_{\text{C=O},2}:\Delta\nu_{\text{C=O},1}$ from those values is 1.9. This value is larger than that obtained for the formation of I between DMA and ClEtOH or DCPROH. Therefore, we conclude that I is formed between ClEtOH and acetone and that the lone pair of the amide nitrogen does not play an important role in the formation of I for DMA with ClEtOH.

Conclusion

We conclude from the results obtained that I is formed between DMA and ClEtOH, DCPROH, and EtOH, and between acetone and ClEtOH, and that II is formed between DMA and TCMPROH. The formation of II by TCMPROH can be ascribed to the structure of TCMPROH which is too bulky to form I. The results also show that the basicity of the hydroxyl oxygen of alcohols and the lone pair of the amide nitrogen of DMA do not play any significant role in the formation of I, while the two lone pairs of carbonyl oxygen of DMA and ketone have the potentiality of forming two hydrogen bonds. Furthermore, we find that the frequency shift $\Delta\nu_{\text{C=O},2}$ of DMA upon the formation of I can be correlated with the proton-donating acidity of the alcohols measured by $\Delta\nu_{\text{OH}}$, the frequency shift of OH band of alcohol due to the formation of a 1:1 complex with DMA.

Registry No. ClEtOH, 107-07-3; DCPROH, 616-23-9; TCMPROH, 57-15-8; EtOH, 64-17-5; DMA, 127-19-5; acetone, 67-64-1.

(9) Kamlet, M. J.; Taft, R. W. *1980*, *98*, 377-89.

(10) Tse, Y.-C.; Newton, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 611-13.

Fourier-transform Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Effects of 2-Chloroethanol on the Association of *N*-Acetyl-L-amino Acid *N,N'*-Dimethylamides in Aqueous Solutions

Kazuko Mizuno, Tomoko Takagi, Yohko Ikeda and Yohji Shindo*

The Research Institute for Material Science and Engineering, Faculty of Engineering, Fukui University, Bunkyo, Fukui 910, Japan

The effects of 2-chloroethanol (ClEtOH) on the self-association of three *N*-acetyl-L-amino acid *N,N'*-dimethylamides (Val, Leu, Phe as amino acids) have been studied in water-deuterium oxide solutions by ^1H and ^{13}C F.t.n.m.r. These amides were found to self-associate through hydrogen bonding to a small extent. Hydrogen-bonding association of the amides takes place when $[\text{ClEtOH}]/[\text{amide}] > 1$. The hydroxyl proton peak of water-ClEtOH mixtures shifts to high field regardless of the presence of the amide owing to the disruption of water structure by ClEtOH. The decrease in the hydrogen-bonding capability of the solvent leads to the hydrogen-bonding association of the amide and ClEtOH induces the hydrogen-bonding association of the amides by decreasing the hydrogen-bonding capability of the solvent around the amides.

An apparent dissociation of the amide complexes was found to occur at low concentrations of ClEtOH. This is attributed to the hydrophobic interaction between ClEtOH and the alkyl part of the amides to minimize the energy loss due to the disruption of water structure, and the interaction results in a further decrease in the hydrogen-bonding capability of the solvent around the amides and leads to the start of hydrogen-bonding association of the amides.

2-Chloroethanol (ClEtOH) is well known as a strong helix-forming reagent for proteins.¹ Timascheff and Inoue reported that ClEtOH binds preferentially to proteins and simultaneously induces a large change in protein conformation due to the interaction between non-polar groups of protein and ClEtOH^{2,3} in the same way as in the helix formation induced by alkanols.^{4,5} In later studies on the preferential binding of ClEtOH to proteins and polypeptides,⁶ the same explanation has been presented.

The solubility measurements of 2-substituted ethanols into hexadecane and octadecane showed that the hydrophobic property of ClEtOH is a little larger than that of ethanol (EtOH), but less than that of propan-1-ol.⁷ We examined the denaturing abilities of several halogenoethanols and halogenopropanols, and compared them with those of the corresponding alkanols.⁸ We discovered that the halogenoalcohols have almost the same denaturing ability irrespective of their hydrophobicity and that they induce large conformational changes in proteins at much lower concentrations than the corresponding alkanols. Furthermore, we studied the preferential binding of EtOH and propan-2-ol to lysozyme and found that the preferential binding does not occur up to 60 vol % of alcohol in these alkanol-water mixtures.⁹

These results suggest that we may not be able to attribute the preferential binding of ClEtOH to protein solely to the interaction between hydrophobic groups and that the mechanism of helix formation should differ between the halogenoalcohols and the alkanols. However, there are a few works studying the difference in the mechanism of helix formation induced by the halogenoalcohols and corresponding alkanols.^{10,11}

We noticed the proton-donating acidity of ClEtOH is much larger than that of EtOH because of the electron withdrawal by the chlorine atom.⁸ Thus, in the denaturation process of protein by ClEtOH, we can assume an intermediate state before helix formation, where ClEtOH forms a hydrogen bond with the carbonyl groups of the protein. Accordingly, we have studied the interaction between the alcohols and some amide compounds, as the model molecules of amino-acid residues within protein, in carbon tetrachloride solutions and found that ClEtOH and other halogenoalcohols have proton-donating acidity strong enough to dissociate very stable inter-amide hydrogen bonds.⁸ However, these findings are not necessarily applicable to aqueous systems, although these suggest the possibility of hydrogen-bonding interaction of ClEtOH with protein.

In this work, we extend our study to the aqueous solutions of some amides, with the intention of presenting a mechanism of helix formation induced by ClEtOH. For this purpose, we investigated the effects of ClEtOH on the association of three *N*-acetyl-L-amino acid *N,N*-dimethylamides in water-deuterium oxide (D₂O) using F.t.n.m.r. We chose L-Val, L-Leu and L-Phe since these are known to have helix-forming capability.¹² The effects of EtOH were also examined for comparison. The results are discussed from the following four standpoints: (1) whether inter-amide hydrogen-bonding association of the amides occurs, (2) whether hydrogen-bonding interaction occurs between ClEtOH and the amides, (3) whether a hydrophobic interaction occurs between ClEtOH and the amides and (4) whether ClEtOH causes some significant change in water structure and the change is in some way related to the association of the amides. The last point arose because we found it necessary to consider the interaction between ClEtOH and the solvent, water, to interpret our results.

Experimental

The three *N*-acetyl-L-amino acid *N,N*-dimethylamides were the same as those used in our previous work,⁸ and are abbreviated as VMe₂, LMe₂, and PMe₂. The specific rotations were as follows: LMe₂; $[\alpha]_{577}^{25} - 26.6$ ($c = 1.055$ in ethanol), VMe₂; $[\alpha]_{577}^{25} - 2.27$ ($c = 0.967$ in ethanol), PMe₂; $[\alpha]_{577}^{25} + 34.1$ ($c = 1.099$ in ethanol). D₂O (99.8 atom % D) was purchased from Aldrich. Water was prepared by distilling deionized water. ClEtOH and *N*-methylacetamide (Wako Chemicals, guaranteed-reagent grade) were doubly distilled under highly reduced pressure before use. EtOH (Wako, Spectrograde) was used as it was.

The ¹H and ¹³C F.t.n.m.r. spectra were measured with a JEOL GX-270 spectrometer operating at 270 MHz for ¹H and 67.5 MHz for ¹³C. The ratio of D₂O to H₂O was 1:4 by volume. The chemical shifts are referred relatively to external sodium trimethylsilylpropanesulphonate dissolved in D₂O confined to a coaxial tube with the sample tube. Spin-lattice relaxation times (T_1) were obtained by the usual $(180^\circ - t - 90^\circ - T)_n$ pulse sequence. The difference nuclear Overhauser effect (NOE) of the two carbonyls arising from irradiation of NH or OH protons was measured under off-noise-decoupling by repeating alternative accumulations with and without the irradiation.

Results and Discussion

Self-association of the Amides through Hydrogen Bonds

We measured the ¹H and ¹³C n.m.r. spectra of each amide with increasing concentration to investigate whether the amides associate through inter-amide hydrogen bonds. Fig. 1 shows the ¹H chemical shifts of NH protons *vs.* concentration. The NH peaks shift to higher field slightly with increasing the concentration. The CH₃CO and NCH₃ protons also shift very slightly to higher field. In fig. 2, the chemical shifts of the two carbonyls

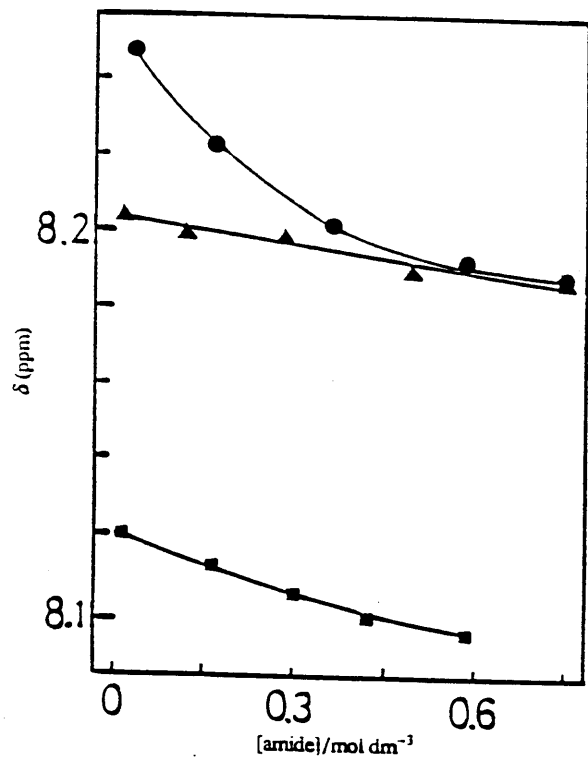


Fig. 1. The ^1H chemical shift of NH of each amide vs. the concentration at 24 ± 0.2 °C: ●, PMe_3 ; ■, VMe_3 ; ▲, LMe_3 .

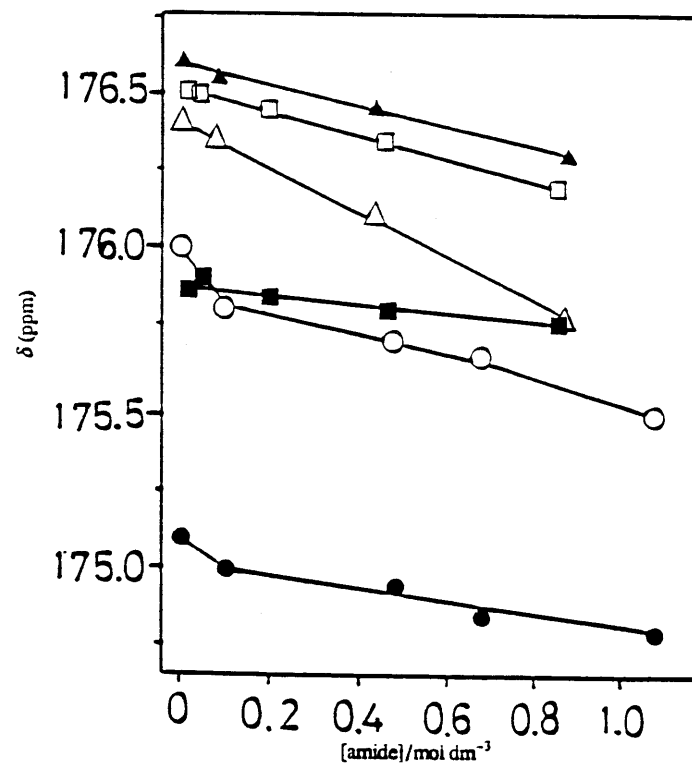


Fig. 2. The plots of the ^{13}C chemical shifts of the two carbonyls of each amide vs. the concentration at 24 ± 0.2 °C: (○, ●) PMe_3 , (□, ■) VMe_3 and (△, ▲) LMe_3 , where the open symbols are for CH_3CO and the filled symbols are for $>\text{NCO}$.

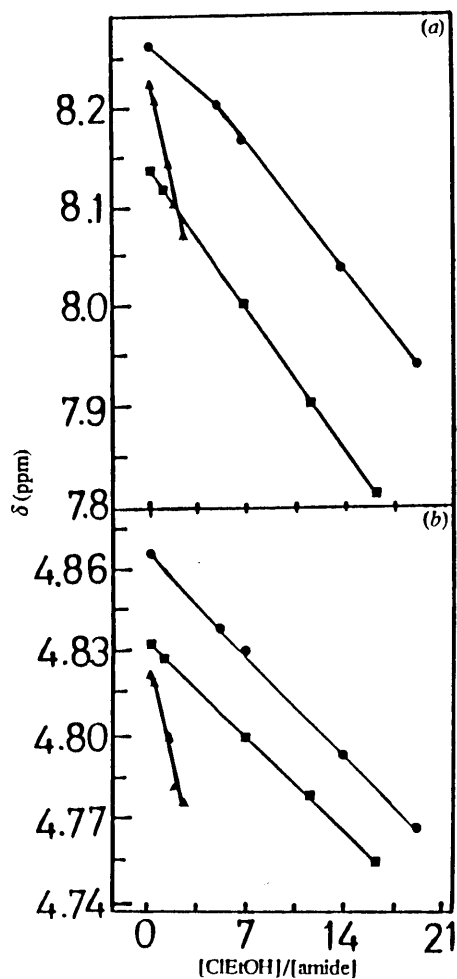


Fig. 3. Effects of increasing C1EtOH content on ^1H chemical shifts of NH (a) and OH (b) of each amide solutions at 24 ± 0.2 °C: ●, $[\text{PMe}_2] = 0.37 \text{ mol dm}^{-3}$; ■, $[\text{VMe}_2] = 0.30 \text{ mol dm}^{-3}$; ▲, $[\text{LMe}_2] = 0.80 \text{ mol dm}^{-3}$.

are plotted *vs.* concentration. The assignment of the two carbonyls can be easily made by observing the fine structure of the CH_3CO carbonyl due to the long-range C—H couplings. The extent of the high-field shift of the NH and the carbonyls is very small, but it is ten times larger than the spectral resolution under the measuring conditions. Thus, we conclude that the shifts are large enough to be analysed.

We consider that the N—H and C=O bonds of the amides are polarized to a great extent in very dilute aqueous solutions because of the large hydration of the monomer. The formation of an inter-amide hydrogen bond $>\text{NH} \cdots \text{O}=\text{C}<$ should result in a decrease in the polarization of both N—H and C=O bonds. This must be more prominent for the C=O bond, because NH is thought to be a weaker proton donor than the water hydroxyl. The upfield shift observed for both NH and carbonyl groups can be attributed to inter-amide hydrogen bonding. Thus, we conclude that hydrogen-bonding association of the amides occurs in aqueous solutions, although the extent of the association is small.

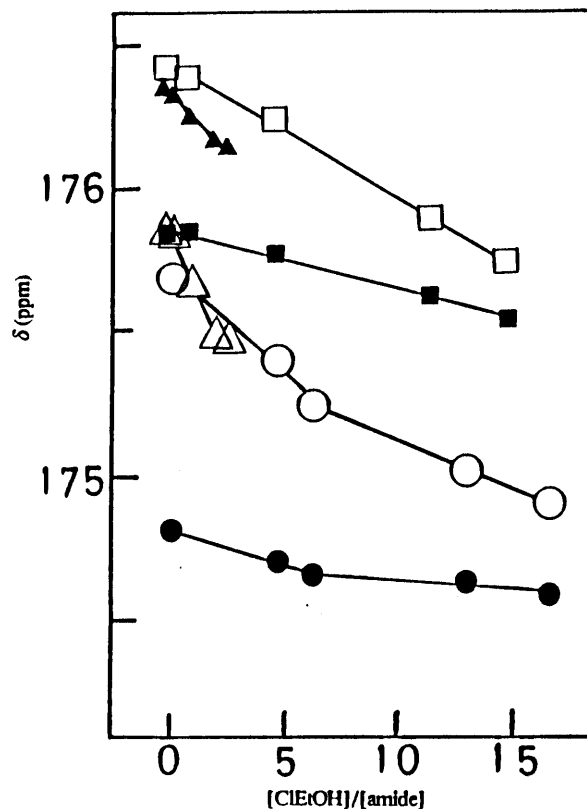


Fig. 4. Effects of increasing ClEtOH content on ^{13}C chemical shifts of the two carbonyls of each amide at 24 ± 0.2 °C: (○, ●) $[\text{PMe}_2] = 0.37 \text{ mol dm}^{-3}$, (□, ■) $[\text{VMe}_2] = 0.30 \text{ mol dm}^{-3}$, and (△, ▲) $[\text{LMe}_2] = 0.80 \text{ mol dm}^{-3}$, where the open symbols are for CH_3CO and the filled symbols are for $>\text{NCO}$.

Effects of ClEtOH on the Self-association of the Amides

We then measured the chemical shifts of the NH and the two carbonyls of each amide by increasing the content of ClEtOH under a constant amide concentration. The percentage by volume of ClEtOH was *ca.* 40% at the highest concentration. The results are shown in fig. 3 and 4. Both the NH and the carbonyls shift to high field with increasing ClEtOH, which can be interpreted as the result of inter-amide hydrogen bonding on the basis of the reasoning mentioned above. This means that ClEtOH promotes inter-amide hydrogen bonding in aqueous solutions, contrary to the dissociation of the amide complexes observed in carbon tetrachloride solutions in our previous work.⁸

In order to confirm this conclusion, we measured the ^{13}C NOE difference of the carbonyls resulting from the selective irradiation of the NH proton with increasing ClEtOH concentration under a constant amide concentration. The values obtained (abbreviated as $^{13}\text{C}\text{-NOE}\{\text{NH}\}$) can be directly correlated to the extent of inter-amide hydrogen bonding, while the values observed by irradiating the OH proton (abbreviated as $^{13}\text{C}\text{-NOE}\{\text{OH}\}$) can be correlated to the extent of hydration of the carbonyls. The $^{13}\text{C}\text{-NOE}\{\text{OH}\}$ values are larger than those of $^{13}\text{C}\text{-NOE}\{\text{NH}\}$ and so more suitable for quantitative analysis. Fig. 5 shows the changes in the $^{13}\text{C}\text{-NOE}\{\text{OH}\}$ of PMe_2 . A very

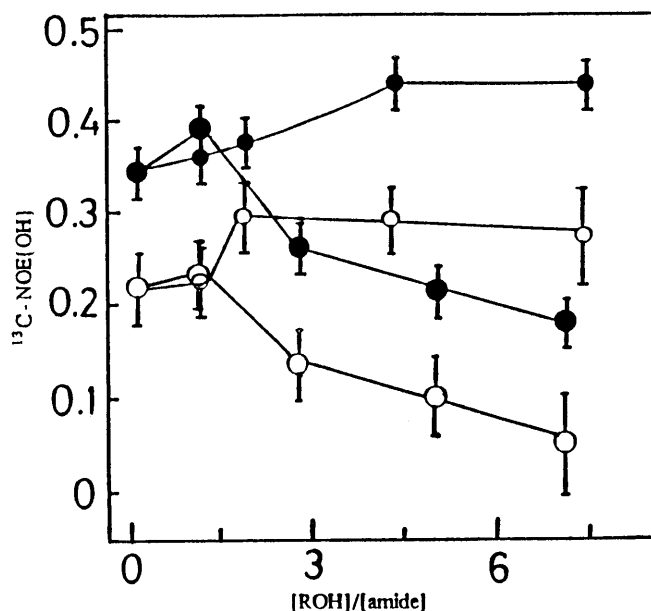


Fig. 5. Effects of increasing the content of ClEtOH or EtOH on ^{13}C -NOE{OH} values of the two carbonyls of PMe_2 at $[\text{PMe}_2] = 0.65 \text{ mol dm}^{-3}$ and $15 \pm 0.1^\circ\text{C}$; ClEtOH (○, CH_3CO ; ●, $>\text{NCO}$), and EtOH (○, CH_3CO ; ●, $>\text{NCO}$).

similar result was obtained for VMe_2 and LMe_2 . By adding a small amount of ClEtOH, the ^{13}C -NOE{OH} increases slightly in $>\text{NCO}$ and remains almost unchanged in CH_3CO , indicating that the amide complexes dissociate to a small extent and the carbonyls are hydrated or coordinated to ClEtOH hydroxyl groups. By adding more ClEtOH, the ^{13}C -NOE{OH} values began to decrease, and simultaneously the ^{13}C -NOE{NH} values began to increase, although a quantitative treatment was not possible. These results support the promotion of the inter-amide hydrogen bonding by ClEtOH.

It was necessary to confirm the initial dissociation of the amide complexes concluded from the ^{13}C -NOE{OH} measurements. Thus we carried out T_1 measurements of the methyl protons of the amides with increasing ClEtOH concentration under a constant amide concentration. As T_1 of the methyl protons is taken to be a measure of the freedom of rotation of the methyl groups, it reflects the extent of intermolecular association of the amides, *i.e.* T_1 becomes larger or smaller as the extent of the association decreases or increases. The results are shown in fig. 6. We note that T_1 increases initially and has a maximum at a concentration ratio of *ca.* 1 irrespective of the amide concentration, thus supporting the conclusion derived from the ^{13}C -NOE measurements.

Effects of ClEtOH on Water Structure

So far we have investigated whether hydrogen-bonding interaction occurs between ClEtOH and the amides in aqueous solutions. However, what we observed in this work is the hydrogen-bonding interaction between amide molecules promoted by ClEtOH. To discover the decisive factor determining the extent of inter-amide hydrogen-bonding association in various solvents, we re-examined the experimental results obtained in our previous studies. We examined the self-association of VMe_2 and PMe_2 in carbon tetrachloride solutions using n.m.r. and i.r.¹³ The NH protons shifted 50 times more than in this work and the degree of association calculated from the i.r. data was 0.21 in

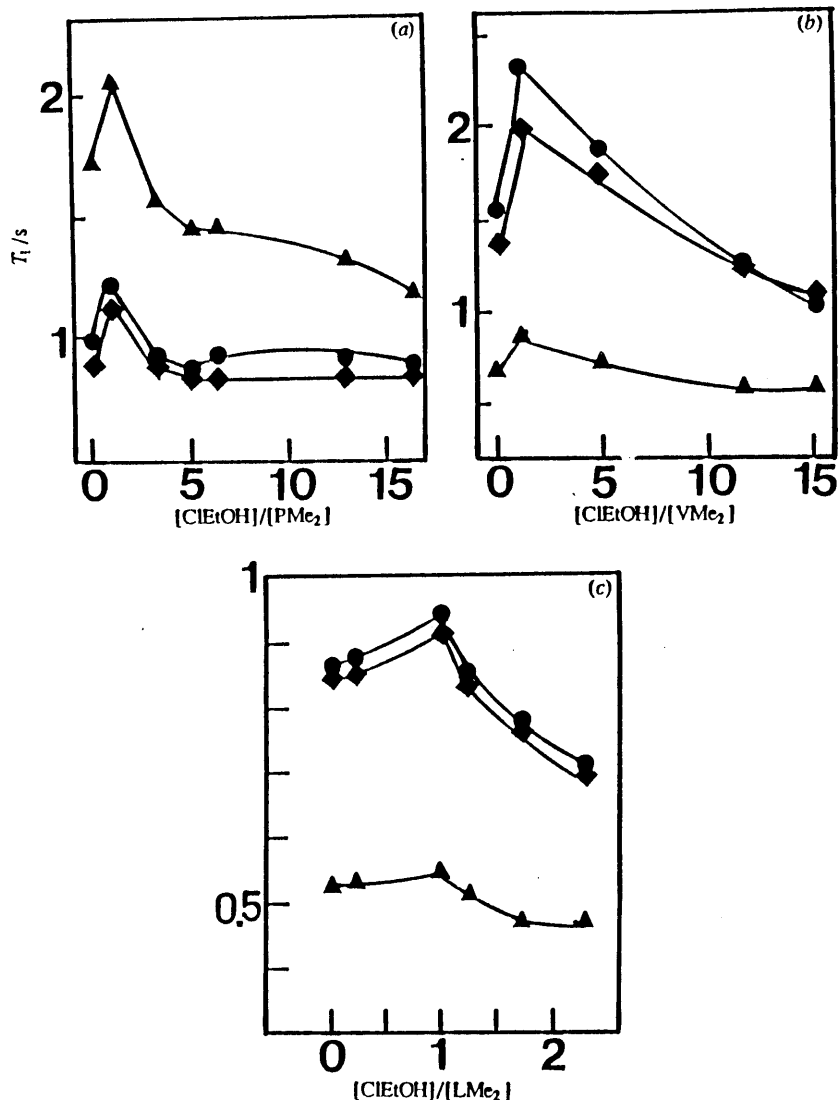


Fig. 6. Effects of increasing ClEtOH content on T_1 of the methyl protons of each amide at 24 ± 0.1 °C at (a) $[PMe_2] = 0.37$ mol dm $^{-3}$, (b) $[VMe_2] = 0.30$ mol dm $^{-3}$ and (c) $[LMe_2] = 0.80$ mol dm $^{-3}$: \bullet , CH_3CO ; \blacklozenge , NCH_3 ; \blacktriangle , phenyl protons of PMe_2 , and CCH_3 protons of VMe_2 and LMe_2 .

VMe_2 and 0.14 in PMe_2 at 0.3 mol dm $^{-3}$ and 21 °C. Although we cannot determine the degree of association in D_2O -water solutions in this work, it is reasonable to assume much smaller values than those in carbon tetrachloride solutions. Another study was performed on the association of amide compounds in alcohol-carbon tetrachloride mixtures.⁸ Dissociation of the inter-amide hydrogen bond occurs with increasing ClEtOH content in the mixed solvent, whereas the degree of inter-amide hydrogen bonding remained unchanged with increasing EtOH concentration.

From all these results, we find that the hydrogen-bonding capability of solvents is the factor determining the extent of the hydrogen-bonding association of amides. The

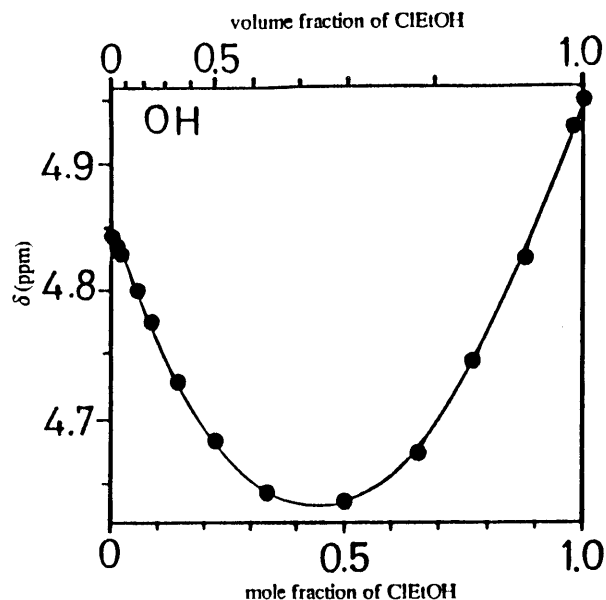


Fig. 7. The ^1H chemical shifts of the OH in the water-C1EtOH system with different molar ratios at 20 ± 0.1 °C.

degree of association increases with decreasing hydrogen-bonding capability of the solvent and *vice versa*. This is because a solvent with a strong hydrogen-bonding capability solvates amide groups strongly through hydrogen bonding and disturbs the inter-amide hydrogen bonding, whereas inter-amide hydrogen bonding predominates in solvents which have weak hydrogen-bonding capability.

We measured the chemical shift of the OH proton in water-C1EtOH mixtures at a series of different mole fractions of C1EtOH. We observed a single hydroxyl peak only, the chemical shift of which is a weighted average of the values for the alcohol and water hydroxyls. The data obtained are plotted in fig. 7. The hydroxyl of pure C1EtOH is at slightly lower field than the pure-water hydroxyl. The addition of C1EtOH to water does not shift the coalesced hydroxyl peak to lower field than the pure-water hydroxyl but does shift it to higher field over the wide range of the mole ratio of C1EtOH. Since the high-field shift occurs over the entire concentration range of C1EtOH, we consider that both the water and C1EtOH are responsible for the high-field shift of the coalesced peak. Thus, we know that the hydrogen-bonding capabilities of water and C1EtOH are decreased by mixing, therefore C1EtOH acts as water structure-breaker.¹⁴ Gierycz *et al.* measured the enthalpy of mixing of the water-C1EtOH system and observed that mixing is an endothermic process over the wide range of C1EtOH.¹⁵ As the weakening of hydrogen bonds is an endothermic process, the results of our n.m.r. data are consistent with those based on the thermodynamic data.

We measured the chemical shift of the hydroxyl peak in water-C1EtOH solutions of the amides with increasing C1EtOH concentration. The water and alcohol hydroxyls coalesce into a peak over the alcohol concentrations measured (fig. 3). The hydroxyl peak shifts to high field with increasing C1EtOH concentration, indicating that C1EtOH weakens the hydrogen-bonding capability of water as well as water in amide solutions.

It has been reported that alkanols stabilize water structure at low concentration¹¹ and that the low-field shift of the water hydroxyl is evidence of the enhancement of water structure.¹⁶⁻¹⁸ Coccia *et al.* attributed the low-field shift to hydrogen bonding between

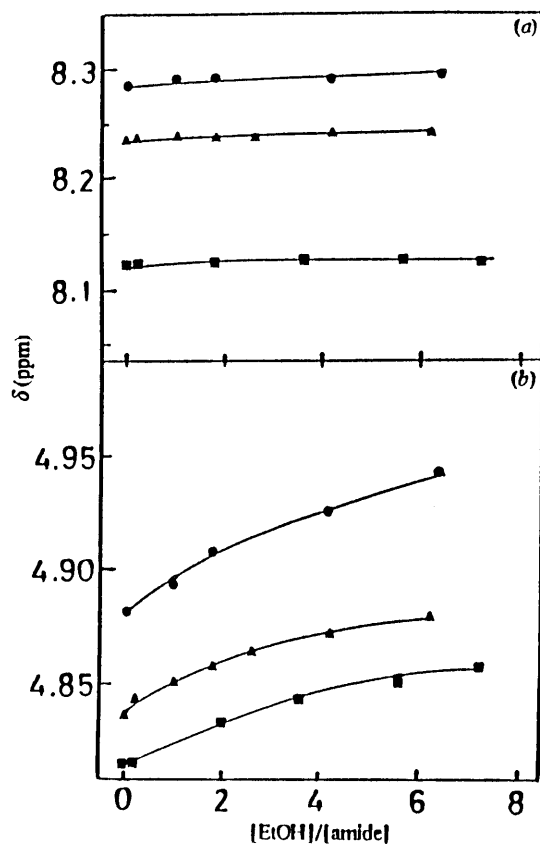


Fig. 8. Effects of increasing EtOH content on ^1H chemical shifts of NH (a) and OH (b) of each amide solution at 22 ± 0.2 °C. ●, $[\text{PMe}_3] = 0.65 \text{ mol dm}^{-3}$; ■, $[\text{VMe}_3] = 0.45 \text{ mol dm}^{-3}$; ▲, $[\text{LMe}_3] = 0.70 \text{ mol dm}^{-3}$.

water and EtOH and to the enhanced hydrogen bonding between water molecules owing to the hydrophobic hydration of ethyl groups.¹⁸ We also examined the effects of EtOH on both the association of the amides and the water structure of the amide solutions for the comparison with those of ClEtOH. We measured the chemical shifts of NH and OH protons with increasing EtOH (fig. 8). The NH peak hardly changes over the entire concentration range examined, so we know that EtOH hardly affects the association of the amides. The water and EtOH hydroxyls coalesce over the alcohol concentrations measured and shift to lower field with increasing EtOH concentration. Accordingly, we know that EtOH acts as a water structure-maker in the amide solutions.

We also measured the ^{13}C -NOE{OH} of the two carbonyls of PMe_3 with increasing EtOH concentration (fig. 5). The ^{13}C -NOE{OH} values of the two carbonyls increase slightly at low EtOH concentrations, indicating the dissociation of the amide complexes to a small extent. Further increase in EtOH concentration does not induce any changes in the ^{13}C -COE{OH} values, in agreement with the constant chemical shift of NH shown in fig. 8.

We interpret all these results as follows. The increase in ClEtOH concentration in aqueous solutions of each amide leads to a decrease in the hydrogen-bonding capability of the water-ClEtOH mixtures because of the disruption of the water structure and the

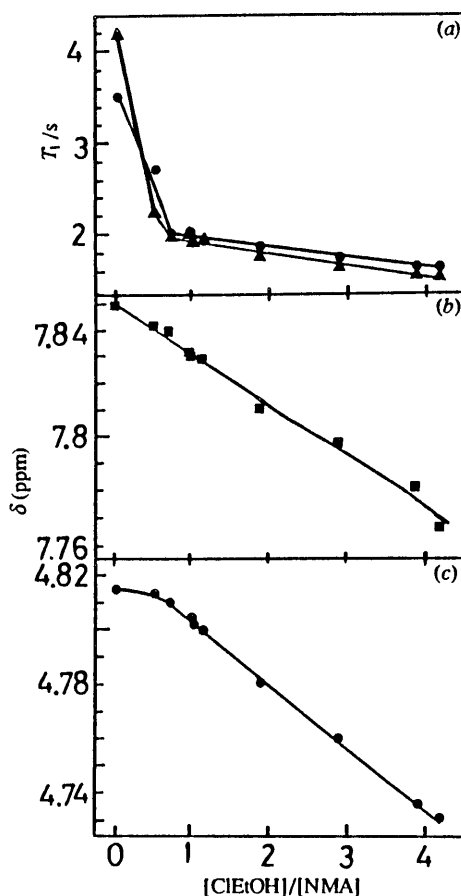


Fig. 9. Effects of increasing ClEtOH content on the association of NMA at $[NMA] = 3 \text{ mol dm}^{-3}$. (a) Changes in T_1 of the CH_3CO (\bullet) and NCH_3 (\blacktriangle) protons. (b) changes in the ^1H chemical shift of NH and (c) changes in the ^1H chemical shift of the water hydroxyl.

increase in the hydrophobic property arising from the alkyl part of ClEtOH. This results in promotion of the hydrogen-bonding association of the amides, as demonstrated experimentally above. In the water–EtOH mixtures, on the other hand, we consider two opposite factors affecting the hydrogen-bonding capability of the mixture, *viz.* enhancement of the water structure and increase in the hydrophobic property of the system. At low EtOH concentrations, water–EtOH mixtures have increased hydrogen-bonding capability because of the large contribution from the enhancement of the water structure, leading to the initial dissociation of the amide complex as shown in fig. 5. However, further addition of EtOH increases the hydrophobic property of the mixture and offsets the hydrogen-bonding capability of the mixture. Consequently, the extent of amide association remains almost unchanged (fig. 5).

A Mechanism for Disruption of Water Structure by ClEtOH

We must consider the reason why ClEtOH behaves as a water structure breaker, whereas EtOH acts as a structure-maker. So far we have focussed only on the proton-donating acidity of alcohols. However, from the fact that EtOH acts as a structure-maker, the

enhancement of water structure seems to be correlated to the proton-accepting basicity of the hydroxyl oxygen of alcohols. Kamlet and Taft defined the hydrogen-bond accepting basicity of many organic solvents based on the data obtained by using solvatochromic comparison.¹⁸ They reported that EtOH has a much greater basicity than water because of the electron-repelling capability of its ethyl group. Thus, the hydroxyl oxygen of EtOH should induce polarization of the neighbouring water molecules and result in the enhancement of the water structure. On the other hand, the basicity of ClEtOH is only slightly larger than that of water.¹⁹ Therefore, we can assume that the hydroxyl oxygen of ClEtOH hardly affects the polarization of the neighbouring water molecules. However, we should take the presence of the chlorine atom into account.

It is well known that Cl^- , Br^- and I^- ions act as a water structure-breakers and their strength as such is in the order $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$.¹⁴ The surface charge density of these ions is in the order $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. As there is a good correlation between the surface charge density and their capability as structure-breakers, we expect an ion with a lower charge density to be a stronger structure-breaker. We consider that the chlorine atom of ClEtOH carries a weak negative charge because of its electron-withdrawing property, but its surface charge density is smaller than that of Cl^- . Thus, the chlorine atom of ClEtOH should be a stronger structure-breaker than Cl^- . Accordingly, we consider that the chlorine atom is responsible for the disruption of the water structure by ClEtOH.

Hydrophobic Interaction between ClEtOH and the Amides

As shown by the ^{13}C -NOE{OH} and T_1 measurements in fig. 5 and 6, dissociation of the amide complexes occurs at a ratio of $[\text{ClEtOH}]/[\text{amide}] \approx 1$. Since we cannot explain this in terms of the change in the hydrogen-bonding capability of water-ClEtOH mixtures described above, we should find another cause for this.

The three amides used have rather large alkyl groups. On the other hand, ClEtOH is more hydrophobic than EtOH, but less hydrophobic than propan-1-ol.⁷ ClEtOH may then be able to interact hydrophobically with the amides, while it behaves as a water structure-breaker. To discover whether the initial dissociation of the amide complexes can be correlated with the hydrophobic interaction, we examined whether a similar initial dissociation occurs as in the complexes of *N*-methylacetamide (NMA), which seems to have too small an alkyl moiety to interact hydrophobically with ClEtOH. We set the concentration of NMA to 3 mol dm^{-3} and confirmed that inter-amide hydrogen-bonding association occurs to some extent. This was done by measuring the chemical shift of the NH proton and T_1 of the methyl protons and comparing them with the data of very dilute solutions of NMA. Then we measured the chemical shifts of the NH and OH protons and T_1 with increasing ClEtOH (fig. 9). The high-field shift of both NH and OH observed indicates that the inter-amide hydrogen bonding is promoted by ClEtOH for the same reason as mentioned above. However, T_1 decreases monotonically, showing that the initial dissociation of the amide complexes does not occur in NMA. From these results, we can correlate the initial dissociation of the amide complexes with the hydrophobic interaction between ClEtOH and the amides. We consider that the interference of the interaction between the amide molecules from ClEtOH should lead to the apparent dissociation of the amide complexes. The fact that the initial dissociation occurs at the same ratio (*ca.* 1) irrespective of the amide concentration also supports the idea that the dissociation is correlated to molecular interaction between the amides and ClEtOH.

Note that the interaction between the amide and ClEtOH leads to a decrease in the ClEtOH content in the bulk water-ClEtOH mixture and to the resultant energetic stabilization of the bulk mixture (fig. 7). On the other hand, the increase in ClEtOH content in the neighbourhood of the amide brings about a decrease in the hydrogen-

bonding capability of the ClEtOH–water mixtures around the amide, and consequently leads to the promotion of the inter-amide hydrogen-bonding association. Thus, we observe apparent dissociation of the amide complexes only at low concentrations of ClEtOH.

Conclusion

Our results can be summarized as follows: (1) ClEtOH promotes inter-amide hydrogen bonding in aqueous solutions, (2) ClEtOH behaves as a water structure-breaker and decreases the hydrogen-bonding capability of water, (3) the promotion of inter-amide hydrogen bonding can be attributed to a decrease in the hydrogen-bonding capability of the water–ClEtOH mixture around the amide molecules, (4) at very low ClEtOH concentrations, ClEtOH may interact hydrophobically with the large alkyl part of the amides, resulting in the apparent dissociation of the inter-amide hydrogen bond.

The relationship between the conformational change in proteins and the structure of water–organic solvent systems has been investigated using alkanols, polyols, amides and urea.^{14, 20–22} However, we have not as yet been able to draw clear conclusions concerning the relative importance of the different contributions, such as hydrogen bonding, ionic interactions and the hydrophobic interaction.²³

With the intention of presenting a mechanism of helix formation in proteins induced by ClEtOH, we have carried out our study focusing on the effects of ClEtOH on the inter-amide hydrogen bonding between the amide molecules. Compared with proteins, the three amides used in this study are very small molecularly. Our results, however, suggest that the change in the hydrogen-bonding capability of a solvent is an important factor in determining the conformational changes in proteins, and is closely related to the formation and dissociation of the inter-amide hydrogen bonds within proteins.

References

- 1 S. Lapanje, *Physicochemical Aspects of Protein Denaturation* (Wiley-Interscience, New York, 1978).
- 2 S. N. Timasheff and H. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 1890.
- 3 H. Inoue and S. N. Timasheff, *Biopolymers*, 1972, **11**, 737.
- 4 E. E. Schrier, R. T. Ingwall and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 1965, **69**, 298.
- 5 T. T. Herzkovits, B. Gadegbeku and H. Jailliet, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 2588.
- 6 M. Morcellet and C. Loucheux, *Biopolymers*, 1980, **19**, 2177.
- 7 C. L. De Ligny, N. J. Koole, H. D. Nelson and G. H. E. Nieuwdorp, *J. Chromatogr.*, 1975, **114**, 63.
- 8 K. Mizuno, H. Kaido, K. Kimura, K. Miyamoto, N. Yoneda, T. Kawabata, T. Tsurusaki, N. Hashizume and Y. Shindo, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1984, **80**, 879.
- 9 Y. Shindo and K. Kimura, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1984, **80**, 2199.
- 10 K. Hamaguchi and A. Kurono, *J. Biochem. (Tokyo)*, 1963, **54**, 497.
- 11 S. Ebina, M. Suzuki, I. Naitoh, K. Yamauchi and Y. Nagai, *Int. J. Macromol.*, 1982, **4**, 406.
- 12 P. N. Lewis, N. Go, M. Go, D. Kotelchuck and H. A. Scheraga, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 1970, **65**, 810.
- 13 K. Mizuno, S. Nishio and Y. Shindo, *Biopolymers*, 1979, **18**, 693.
- 14 K. D. Collins and M. W. Washabaugh, *Q. Rev. Biophys.*, 1985, **4**, 323.
- 15 P. Gierycz, M. Denda and K. Nakanishi, *Thermochim. Acta*, 1985, **88**, 241.
- 16 M. D. Zeidler, in *Water, A Comprehensive Treatise*, ed. F. Franks (Plenum Press, New York, 1973), vol. 2, p. 529.
- 17 J. M. Harvey, S. E. Jackson and M. C. R. Symons, *Chem. Phys. Lett.*, 1977, **47**, 440.
- 18 A. Coccia, P. L. Indovina and V. Viti, *Chem. Phys.*, 1975, **7**, 30.
- 19 M. J. Kamlet and R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 377.
- 20 F. Franks and D. Eagland, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1975, **3**, 175.
- 21 F. Franks, *NATO ASI Ser., Ser. E*, 1985, **90**, 1.
- 22 M. P. Tomb, *NATO ASI Ser., Ser. E*, 1985, **90**, 25.
- 23 J. L. Finney, in *Interactions of Water in Ionic and Nonionic Hydrates*, ed. H. Kleeberg (Springer Verlag, Berlin, 1987), p. 147.

水 野 和 子

1945 年 8 月 9 日 福井に生まれる。

1967 年 お茶の水女子大学理学部 卒業

1969 年 福井大学工学部大学院修士課程 終了

本論文は名古屋大学理学部理学博士の学位審査のために提出したものです。

1989年2月11日 発行

ペプチド化合物の溶液内会合におよぼす2-クロロエタノールの効果

著 者 水 野 和 子

発行者 水 野 和 子

発 行 な わ て 書 房

福井市中角町40-12 電話 0776-55-0011

印刷製本

カドヤ文具店
