

トレハロースのラマン散乱

2001 年 1 月

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 物質科学専攻

吉田智子

論文要旨

水は私たち人間にとって最も身近な存在であり、なくてはならない物質である。しかし、意外にもその構造や性質については未だ未知な部分が多い。私たちの住む地球上ではその7割が海でおおわれていると言われている。また私たち人間の体の実に70%は水であり、この数字を見ても、私たちの生命活動を行う上で水の存在が不可欠であることが伺える。

ところが、最近この水の機能の一部を代行して、生物の生態機能を維持する働きがあると考えられている糖の存在が注目を浴びている。それがトレハロースである。トレハロースは酵母や茸類、海藻類、海老類などに多く含まれていて、自然界に広く分布している。このトレハロースについては食品業界、薬品業界などで盛んに研究が行われていて、蛋白質や細胞膜といった生体膜を乾燥や凍結などの物理的ストレスから守る働きが注目されている。

これまでの研究では、トレハロース水溶液のラマン散乱実験が行われ、C-C変角振動モードの領域にある 840 cm^{-1} と 920 cm^{-1} の2つのモードは、トレハロース水溶液のものが他の糖水溶液に比べ、強度が著しく強くなっているという結果を得ている。重水溶液との比較からも、 840 cm^{-1} と 920 cm^{-1} の二つのモードはトレハロースに特徴的な水和特性を反映していると考えられるが、この水溶液のラマンスペクトルだけからでは、トレハロースにだけ特有な水和特性を十分に明らかにすることができなかった。

本研究では、飽和水溶液から水を蒸発させ、トレハロースの単結晶・多結晶を作成した。トレハロース単結晶・多結晶をラマンスペクトルで測定し、水溶液との差違を検討しようとしたが、水溶液を再結晶させただけでは、ラマンスペクトルが尖鋭化するのみで、特に目立った差違は発見されなかった。

しかし、 D_2O 溶媒で作った結晶を得ることで、トレハロース水溶液で問題になった2つのピークのうち、 908 cm^{-1} のピークに、特異な現象が認められた。 D_2O 結晶で、 908 cm^{-1} のピークが著しく弱くなってしまっている。また、 H_2O 結晶で2本あるピーク (518 cm^{-1} と 540 cm^{-1}) が D_2O 結晶で1本になっている。

糖の振動は、結合が複雑なので、重水素化前後の振動モードの変化について、具

体的に対応づけることは難しいが、一つの可能性として以下のことが考えられる。

908 cm^{-1} の振動数のモードは、基準振動解析の計算結果によると、グリコシド結合の変角振動を含むので、重水素化によって強くなった水素結合が、トレハロースの flexibility を失わせ、振動モードが減ってしまっているように思える。

この事は、 H_2O 結晶でピラノース環骨格振動領域に属する 2 本のピーク (518 cm^{-1} と 540 cm^{-1}) が D_2O 結晶で 1 本になっていることにも矛盾しない。

これらの結果が、トレハロースの水和特性に直接関与しているかどうかを具体的にいうことはできないが、2 つのピラノース環の振動が、水と深く関わっていることは推測できる。

トレハロースの単結晶を作成する際、マルトース、グルコースの単結晶も得ようと試みたが、単結晶は得られなかった。また、トレハロース D_2O 結晶と同様の方法で他の糖の D_2O 結晶 (多結晶) を作成したが、測定したラマンスペクトルから、まったく重水素置換されないことが分かった。この点から見ると、トレハロースは結晶性が高く、flexible な性質をもつことが推測できる。

これらの研究で、トレハロースの特異な水和特性を具体的に解明することはできなかったが、トレハロースと水の関わり合いについて、トレハロースの flexibility、特に重水素化によるピラノース環の変角振動の変化が、トレハロースの水和特性を解明する 1 つの手がかりになると考えている。

Abstract

Water is one of the most familiar materials to our lives. Unfortunately however, the structure and the basic physico-chemical properties have not yet been fully revealed. In human beings water occupies in 70 percents of the whole body. Thus water is indispensable to our lives.

Recently trehalose has been recognized to be an interesting material as a water substitute. Trehalose is distributed widely in nature, for example in yeasts, seaweeds, Crustacea, and so on. It has been recognized that this disaccharide protects proteins and cell membranes against physical stresses, such as waterless and frozen environment. So trehalose has been studied vigorously in variety of scientific fields, especially foods science and medical science.

In the previous work the dynamical structure of trehalose and related saccharides in aqueous solutions were investigated by Raman spectroscopy. It has been found that the Raman spectral intensities of two vibration modes in the C-C stretching region (840 cm^{-1} and 920 cm^{-1}) are much stronger than those of other saccharides. Comparing a H_2O solution with a D_2O solution of trehalose, these two modes reflect the peculiar hydration of trehalose. But it was impossible to explain this peculiarity of trehalose clearly from only aqueous solutions.

In the present work, we have prepared single crystals of trehalose and tried to find some differences between single crystals and aqueous solutions by Raman spectroscopic study. We intend to find some vibrational modes of trehalose itself because a single crystal has much less water molecules around trehalose than aqueous solutions. However, the result was not expected one. The spectral profiles of single crystals are merely sharper than those of aqueous solutions. We cannot find any characteristic differences between them.

Next we have prepared a deuterated single crystal of trehalose (a D-crystal of trehalose) and tried to find some differences between a D-crystal and a H-crystal of trehalose. Comparing Raman spectra of the D-crystal with the H-crystal, we

have found that the 908 cm^{-1} mode of D-crystal discussed in aqueous solutions is drastically weakened than that of the H-crystal and that two vibration modes 518 cm^{-1} and 540 cm^{-1} in the H-crystal merge into one mode in the D-crystal.

According to the result of normal mode calculations the mode of 908 cm^{-1} is assigned to the bending deformation of the C-O-C glycosidic angle and the modes 518 cm^{-1} and 540 cm^{-1} are assigned to the normal vibration in the skeletal deformation region of pyranose rings.

The origin of these spectral change may be the complex vibrational interactions due to the complexity of trehalose structure. But one possibility is that the hydrogen bond between trehalose molecules and hydrated water much strengthened in deuteration and prevent the bending-like vibration of two pyranose rings and glycosidic bond. This suppresses the modulation of the polarizability under normal vibrations resulting the intensity decrease of the 908 cm^{-1} mode. At the same time the hardening of the hydrogen bond between trehalose molecules and hydrated water decrease the flexibility of the vibration pattern between the pyranose rings. This reflects that the two modes 518 cm^{-1} and 540 cm^{-1} in the H-crystal merge into one mode in the D-crystal.

Although we cannot conclude definitely that the present result is directly related to the peculiar hydration of trehalose, we can suppose that the bending vibrations of the two pyranose rings certainly participate in the hydration dynamics in trehalose.

We tried to prepare single crystals of maltose and glucose, but these saccharides are difficult to crystallize and did not succeed to get single crystals. We also tried to prepare D-crystals of maltose and glucose by the same way as trehalose's, but these crystals were never deuterated. We can prepare a single crystal only the trehalose. From this fact we think that trehalose is more flexible in local structure than other saccharides and easily crystallize.

We haven't clarified the peculiar hydration of trehalose definitely, but the flex-

ibility of trehalose and the vibrations of the pyranose rings can be a key to solve the mechanism of the peculiar hydraton effect of trehalose .

目 次

1	序論	1
2	ラマン分光法	2
2.1	ラマン散乱の概要	2
2.2	ラマン散乱の原理と理論	4
3	トレハロースについて	7
3.1	単糖の構造	7
3.1.1	D-系列と L-系列	7
3.1.2	ピラノース環とその立体配座	8
3.1.3	α 構造と β 構造	11
3.2	二糖	12
3.2.1	還元性二糖	12
3.2.2	非還元性二糖	14
3.3	トレハロース水溶液のラマン分光	15
3.4	トレハロース結晶の構造	18
3.5	トレハロース結晶の基準振動解析	19
4	実験の概要	21
4.1	試料	21
4.1.1	実験に用いた試料	21
4.1.2	単結晶の作成方法	21
4.2	実験装置	22
4.3	測定条件	23
5	実験結果	25

5.1	水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル	25
5.2	H_2O 結晶と D_2O 結晶の比較	27
5.2.1	低振動数領域 ($0\sim 300\text{ cm}^{-1}$)	27
5.2.2	高振動数領域 ($300\sim 1500\text{cm}^{-1}$)	29
5.2.3	高振動数領域 ($2000\sim 3800\text{cm}^{-1}$)	34
6	実験結果の考察	35
6.1	重水素化による振動数シフト	36
6.2	低振動数領域 ($0\sim 300\text{cm}^{-1}$)	38
6.3	高振動数領域 ($300\sim 1500\text{cm}^{-1}$)	39
7	まとめ	41

図 目 次

2.1	ラマン散乱の様子 1	3
2.2	ラマン散乱の様子 2	3
3.1	グルコースの鎖状構造における光学異性体	7
3.2	グルコースの鎖状構造と環状構造	8
3.3	いす型立体配座異性体（コンホマー）	9
3.4	アキシアル置換基とエカトリアル置換基	10
3.5	D-グルコースの α 構造と β 構造	11
3.6	マルトースの構造式	12
3.7	ラクトースの構造式	13
3.8	スクロースの構造式	14
3.9	トレハロースの構造式	14
3.10	トレハロースと他糖の水溶液の対称化ラマンスペクトル（低振動 数側）	16
3.11	トレハロースと他糖の水溶液のラマンスペクトル（高振動数側） .	17
3.12	トレハロース水溶液と重水溶液のラマンスペクトル（高振動数側）	17
3.13	トレハロース二水和物結晶の構造	18
4.1	単結晶の測定の様子（マクロ）	24
4.2	単結晶の測定の様子（顕微）	24
5.1	トレハロース水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル	25
5.2	トレハロース水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル	26
5.3	トレハロース水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル	26
5.4	単結晶のラマンスペクトル ($0\sim 300\text{ cm}^{-1}$)	28
5.5	単結晶のラマンスペクトル ($250\sim 750\text{ cm}^{-1}$)	30
5.6	単結晶のラマンスペクトル ($650\sim 1150\text{ cm}^{-1}$)	31
5.7	単結晶のラマンスペクトル ($1050\sim 1550\text{ cm}^{-1}$)	32
5.8	単結晶のラマンスペクトル ($2000\sim 3800\text{ cm}^{-1}$)	33

5.9	トレハロース多結晶のラマンスペクトル ($200\sim 3800\text{cm}^{-1}$)	34
6.1	重水素化したトレハロース D_2O 結晶の構造式	35
6.2	H_2O 単結晶と D_2O 単結晶のピーク振動数の比較	36
6.3	トレハロースの重水素化による振動数シフトの様子	37
6.4	考えられるトレハロース D_2O 結晶の構造	38
6.5	トレハロース D_2O 結晶の振動の様子	40

表 目 次

3.13	トレハロースの基準振動計算に用いられた結晶構造のデータ	19
3.13	振動数領域による主なトレハロースの振動の分類	20

1 序論

水は私たち人間にとって最も身近な存在であり、なくてはならない物質である。しかし、意外にもその構造や性質については未だ未知な部分が多い。私たちの住む地球上ではその7割が海でおおわれていると言われている。また私たち人間の体の実に70%は水であり、この数字を見ても、私たちの生命活動を行う上で水の存在が不可欠であることが伺える。

ところが、最近この水の機能の一部を代行して、生物の生態機能を維持する働きがあると考えられている糖の存在が注目を浴びている。それがトレハロースである。トレハロースは酵母や茸類、海藻類、海老類などに多く含まれていて、自然界に広く分布している。このトレハロースについては食品業界、薬品業界などで盛んに研究が行われていて、蛋白質や細胞膜といった生体膜を乾燥や凍結などの物理的ストレスから守る働きが注目されている。

このようなトレハロースの生体保護効果については、今までに次の二つのメカニズムが提案されているが、いずれも決定的な証拠をつかめないでいる。

1. トレハロースが直接、水の代わりにタンパク質分子に水素結合して水のようにふるまう。(水置換説)
2. トレハロースがガラス状になり、そのガラス構造によって、タンパク質を「カプセルに包む(encapsulating)」ようにして分子構造を歪まないようにする。(ガラス状態仮説)

トレハロースの分光学的性質については、これまでに水溶液のラマン散乱についての研究がなされ、その特徴がわかってきた[8]。しかし、この水溶液のラマンスペクトルだけからでは、トレハロースにだけ特有な水和特性を十分に明らかにすることができなかった。

本研究では、飽和水溶液から水を蒸発させ、トレハロース単結晶を作成した。単結晶のラマンスペクトルを測定することにより、水をほとんど蒸発させたことによる影響、水溶液では見えにくかったトレハロース自身の振動モードなどを調べることにより、トレハロースの水和特性の特徴を側面から明らかにしようと試みた。

2 ラマン分光法

2.1 ラマン散乱の概要

単一の振動数 ν_i をもつレーザー光を物質に照射し、入射方向と異なる方向に散乱されてくる微弱な光を分光器を通して観測すると、振動数スペクトルが得られる。

このスペクトルには、入射光と同じ振動数の他に、入射光と異なる振動数を与える散乱光が現れる。入射光と同じ振動数 ν_i を与える光散乱をレイリー散乱、 $\nu_i \pm \nu_R$ を与え得る光散乱をラマン散乱という。

また、ラマン散乱のうち、 $\nu_i - \nu_R$ の振動数をもつ成分をストークス散乱、 $\nu_i + \nu_R$ の振動数をもつ成分をアンチストークス散乱と呼び、入射光と散乱光の振動数差 $\pm \nu_R$ をラマンシフトという。(図 2.1) ラマンシフトは物質に固有で、物質の種々の運動状態（例えば分子全体の並進運動、分子内の原子の振動など）に対応するエネルギー準位に関係づけられる量である。

量子の言葉で言うと、入射フォトンと物質内の素励起の弾性衝突による散乱がレイリー散乱で、非弾性衝突による散乱がラマン散乱である。

ストークス散乱では $h\nu_R$ のエネルギーが衝突の際に物質に与えられ、アンチストークス散乱では $h\nu_R$ のエネルギーが衝突の際に物質から奪われる。(図 2.2)

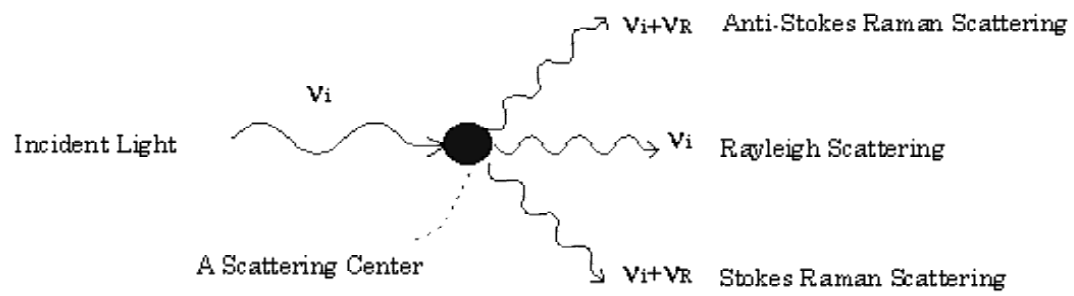


図 2.1: ラマン散乱の様子 1

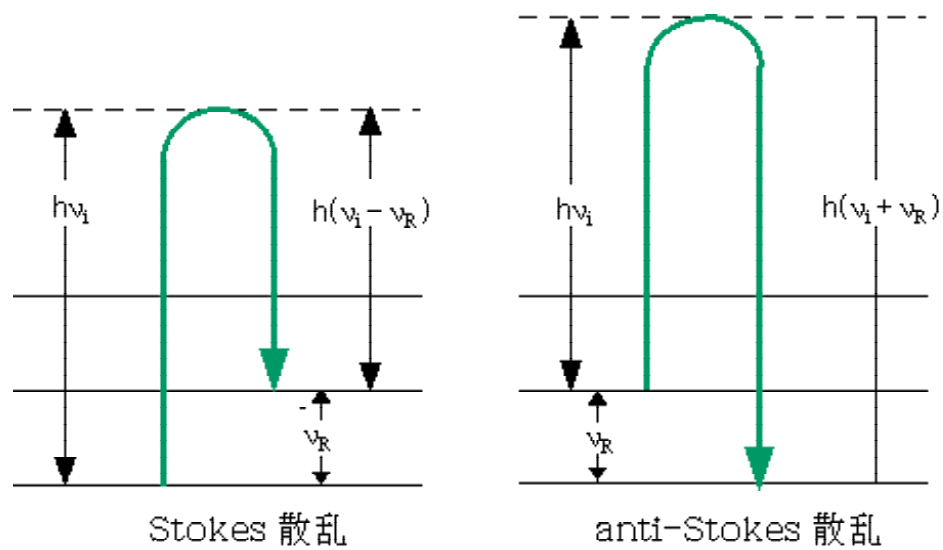


図 2.2: ラマン散乱の様子 2

2.2 ラマン散乱の原理と理論

ラマン散乱について厳密に論じるためには、量子論に基づく導出をしなくてはならないが、ここでは古典論によって簡単に記述することにする。ラマン散乱は先に述べたように原子や分子の固有振動による変調によって生じるが、その変調は分子の分極率の変化によって生じる。

電場の強さが $E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ である振動数 ν_0 の入射光を分子にあてると、分子中の電子が影響を受け、分極 P が誘起される。

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (1)$$

一般に分極には電子分極、イオン分極、配向分極があるが、入射光が可視光である場合には電子内の電子の移動により電子分極が起こる。従って、ここで使われている分極率 α は電子分極率を表す。また、3次元空間で分極率 α を扱うと、テンソルによって以下のように表せる。

$$\begin{pmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{yx} & \alpha_{zx} \\ \alpha_{xy} & \alpha_{yy} & \alpha_{zy} \\ \alpha_{xz} & \alpha_{yz} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} \quad (2)$$

ここでは簡単のため1次元で説明する。分子が振動数 ν_i で振動していると、電場によって分子内の電子雲の運動は ν_i の周期で変調を受けると考えられる。そして、分子に固定した座標系で基準座標 Q を考え、その微小変位 $\Delta Q = l \cos 2\pi\nu_i t$ で分極率 α_0 を展開し1次の項までとると、以下のようになる。

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) \Delta Q = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) l \cos 2\pi\nu_i t \quad (3)$$

式(3)を式(1)に代入すると、

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} l E_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) \{ \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_i) t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_i) t \} \quad (4)$$

のように分極が表せる。従って、式(4)の第一項からは入射光と同じ振動数 ν_0 の散乱光（レーリー散乱）が放出され、第二項、第三項からは $\nu_0 \pm \nu_i$ ($\nu_i > 0$) の散乱

光が放出されていることが分かる。これがラマン散乱光に対応し、 $\nu_0 + \nu_i$ 、 $\nu_0 - \nu_i$ の散乱光がそれぞれアンチストークス光、ストークス光である。また、入射光と散乱光の振動数差 $\pm \nu_i$ がラマン振動数（ラマンシフト）となる。式(4)から分かる通り、

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right) \neq 0 \quad (5)$$

でないとラマン散乱は観測されない。つまり、分極率が変化するような分子振動のみがラマン散乱スペクトルに現れる。このような分子振動モードをラマン散乱という。

以上がラマン散乱の原理を古典論で説明したものであるが、そこで述べられた物質固有のラマン振動数は、量子論では物質中の種々の運動状態に相当するエネルギー準位によって表される。物質と入射光が衝突する際に、物質の運動状態は入射光のエネルギー $h\nu_0$ によって始状態から終状態に遷移され、その時衝突によってエネルギーが $h\nu_i$ だけやりとりされる。このエネルギー分 $h\nu_i$ がちょうどラマン振動数に相当するものである。そして、この場合 $h\nu_i$ は分子振動や結晶の光学フォノンの励起エネルギーである。

では、実際に分光器で測定された物理量をどのように表しているのかについて説明する。先程述べたように入射光と物質のエネルギーのやりとりにより、散乱光には電場の変動成分が含まれる。電場変動は分子の振動、回転、熱揺らぎなどの分極率や誘電率の揺らぎ（電子雲のランダムな揺らぎ）が原因となる。このような散乱光の電場変動をフーリエ変換すると、単位振動数当たりどれだけ強度成分があるか表すことができる。これが散乱光の強度スペクトルで、次のように書ける。

$$I(\omega) \Delta\omega = \sum_{\omega_n} \langle |b_n|^2 \rangle \quad (6)$$

$I(\omega)$: スペクトル強度 $\Delta\omega$: 観測の振動数幅

b_n : フーリエ展開後の各電場成分の振幅

ここで、Wiener-Khinchin の定理を適用すると、スペクトル強度は分極率の相関関数を用いて以下のように表せる。

$$I(\omega_1, \omega_2, K) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega t} \langle \alpha_{21}(K, t) \alpha_{21}(K, 0) \rangle \quad (7)$$

ω_1 : 入射光の振動数 ω_1 : 散乱光の振動数

$\omega = \omega_1 - \omega_2$

K : 入射光と散乱光の波数ベクトルの変化 ($K_1 - K_2$)

基準振動が微小振動であることを仮定して、平衡位置の周りで展開すると、式 (7) は振動モードの相関関数に書き直される。すると揺動散逸定理を用いることができ、最終的にラマン散乱のスペクトル強度は以下のような系の動的感受率 $\chi(\omega)$ の虚数部とボーズ因子の積で表すことができる。

$$I(\nu) = A(\nu_0 - \nu)^4 (n(\nu) + 1) \chi''(\nu) \quad (8)$$

$\nu_0 (= f_0/c)$: 入射光の振動数 $\nu (= f/c)$: ラマン振動数

但し振動数の単位は cm^{-1} を使っている

A : 定数 $(n(\omega) + 1)$: ボーズ因子

$(\nu_0 - \nu)^4$: 散乱電磁波の散乱効率

式 (8) よりラマンスペクトル $I(\nu)$ から系の動的感受率の虚数部 $\chi''(\nu)$ を求めることができる。ラマン分光の低振動数領域では系の動的感受率の虚数部 $\chi''(\nu)$ に変換すると、各モードの形が見易くなる。従って、本研究で得られた低振動数ラマンスペクトルはこの系の動的感受率の虚数部 $\chi''(\nu)$ で示されている。

3 トレハロースについて

以下でトレハロースとそれを構成するグルコピラノース環、トレハロースの異性体の糖などを簡単に記述する [2]。

3.1 単糖の構造

単糖は一般に $C_nH_{2n}O_n$ であらわされ、 $n = 3 \sim 10$ のものが知られている。単糖のうちアルデヒド基 (-CHO) をもつものをアルドース (aldose)、ケトン基 (-CO) をもつものをケトース (ketose) という。アルドースの中で自然界に最も多く存在するものはグルコースである。

3.1.1 D-系列と L-系列

カルボニル基から最も遠い不斉炭素原子（4つの結合手にすべて異なる原子、分子が結合している炭素原子）に結合している水酸基が右側にあるものを D-系列、左側にあるものを L-系列という。

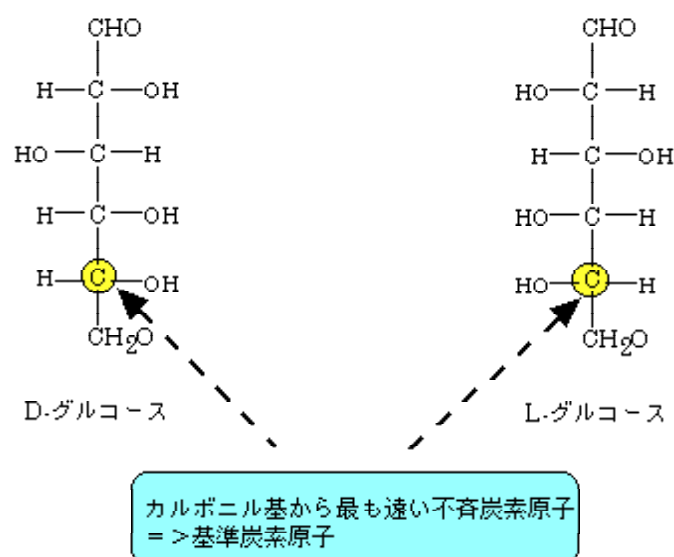


図 3.1: グルコースの鎖状構造における光学異性体

3.1.2 ピラノース環とその立体配座

ピラノース環というのは、単糖の環状異性体の一つである。アルドースの場合、C1 のカルボニル炭素が C5 の水酸基との間に分子内ヘミアセタールを形成して、6 員環構造をとったものがピラノース環である。ヘミアセタールとは形式的にアルデヒド水和物の一個の水酸基がアルキル基とエーテル結合した構造の化合物をさす。同一分子内にアルデヒドと水酸基を持つような化合物では安定な環状になるためにヘミアセタールを形成する。(図 3.2)

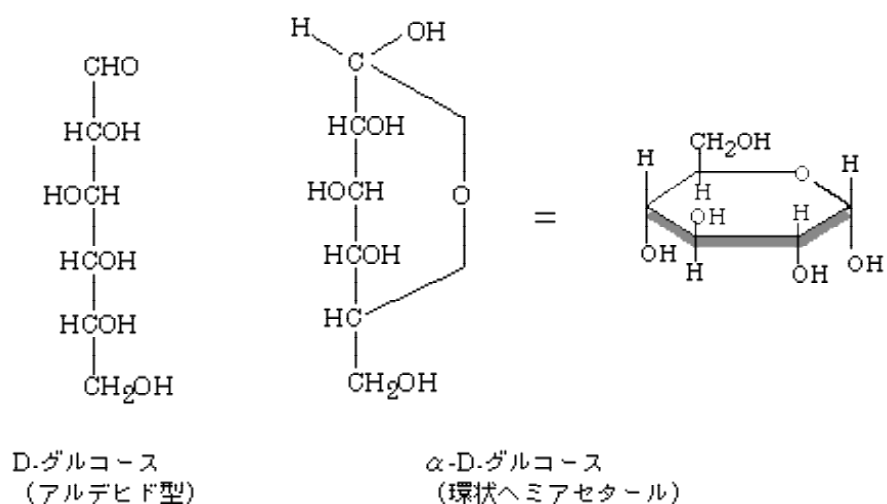


図 3.2: グルコースの鎖状構造と環状構造

ピラノース環はいす型配座、舟形配座をとり得るが、いす型の方がエネルギー的により安定であると考えられている。いす型立体配座異性体（コンホーマー、conformer）として、以下の2つが考えられる。（図 3.3）このコンホーマーでは環内の4つの原子（図 3.3 で 0、2、3、5）が同一平面上にあり、残りの2つの原子（1、4）がこの平面上の上にあるか下にあるかによって、それぞれ C_1 (または 4C_1)、 $1C$ (または 1C_4) とあらわす。また、前者を normal 形、後者を alternative 形と呼ぶこともある。

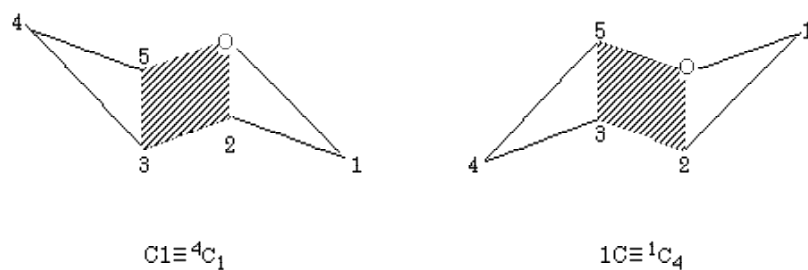


図 3.3: いす型立体配座異性体（コンホーマー）

立体配座において、置換基の結合が軸と平行なものを軸結合（アキシアル結合、axial）、放射状に外側に向かっているものを赤道結合（エカトリアル結合、equatorial）と呼ぶ(図 3.4)。C1 と 1C は互いに変換するが、より安定なものが優位に存在する。C1 でのアキシアル結合は 1C ではエカトリアル結合となる。一般にピラノース環ではいす型でエカトリアルにある置換基が多い方がより安定であると考えられている。

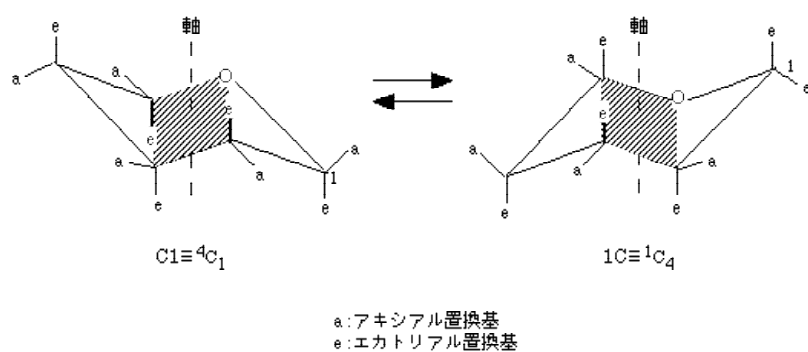


図 3.4: アキシアル置換基とエカトリアル置換基

3.1.3 α 構造と β 構造

環状構造を作るときにできるアノマー性炭素原子（アルドースでは C1、ケトースでは C2）に結合する OH 基が D-系列、L-系列を決定する基準炭素原子に結合する OH 基と同じ側にあるものを α 構造、逆側にあるものを β 構造という。

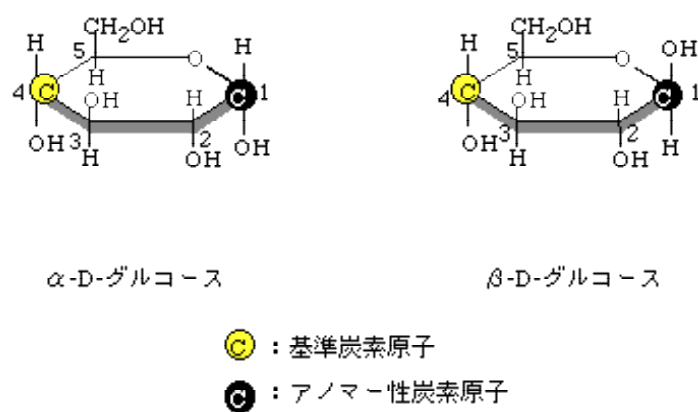


図 3.5: D-グルコースの α 構造と β 構造

3.2 二糖

二糖はオリゴ糖の一種で、加水分解により2分子の単糖を生成するものをいう。オリゴ糖は比較的少数の単糖が結合した糖で、加水分解で得られる単糖の数によって二糖、三糖、四糖、五糖などに分類され、通常十糖までをいう。

二糖の構成単位としてはヘキソース、ペントース、アミノ糖、ウロン糖などがあるが、最も一般的なものはヘキソース2分子から1分子の水がとれたジヘキソース $C_{12}H_{22}O_{11}$ である。

二糖は通常、還元性二糖と非還元性二糖に分けられる。以下に代表的な天然産二糖について簡単に記述する。

3.2.1 還元性二糖

一方の糖のヘミアセタール性水酸基と第二の糖のアルコール性水酸基の間で脱水縮合した二糖。第二の糖のヘミアセタール性水酸基が遊離しているため、フェーリング溶液などのアルカリ性重金属塩を還元する。

マルトース（麦芽糖） マルトースは α 型のピラノース環が α -1,4結合してできた二糖であり、1水和物の構造で安定した状態になっている。デンプンに麦芽またはアミラーゼを作用させると得られる。二つの α -グルコースが α -1,4結合している。（図3.6）

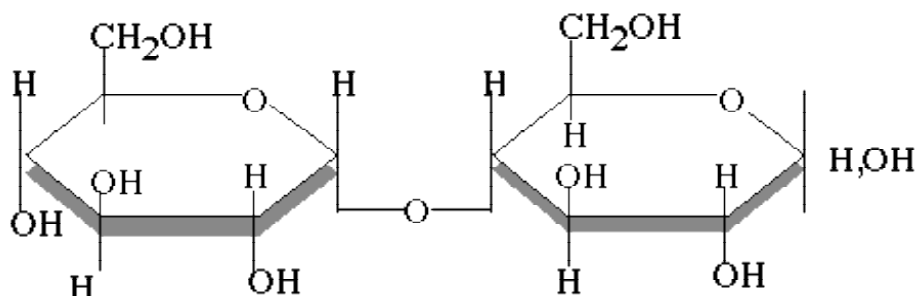


図 3.6: マルトースの構造式

ラクトース（乳糖）ラクトースは哺乳動物の乳汁に約5%含まれる還元性二糖で、 β -ガラクトースと（ α 又は β ）グルコースが β -1,4 結合している。（図 3.7）

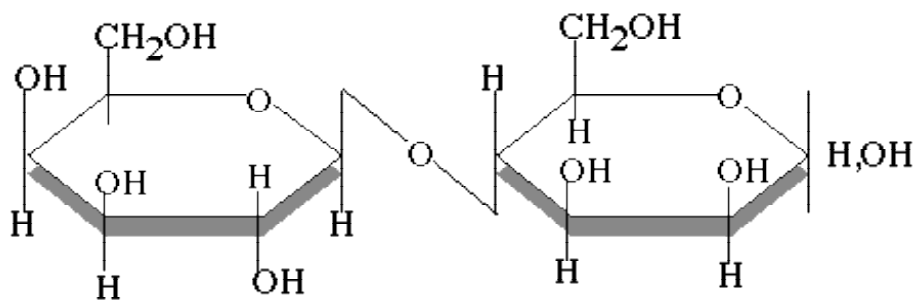


図 3.7: ラクトースの構造式

3.2.2 非還元性二糖

2つの糖のヘミアセタール性水酸基の間で脱水縮合した二糖。すなわち2つのアノメリック炭素の間でグリコシド結合しているものなので、フェーリング溶液を還元しない。

スクロース（ショ糖） スクロースは、ほとんどすべての植物の種子、果実、花、根などに広く存在する。工業的にはサトウキビとテンサイから得られる。 β -フルクトースと α -グルコースが β -2,1結合している。

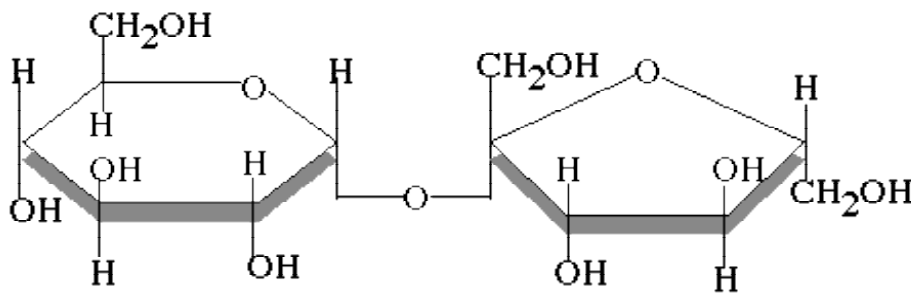


図 3.8: スクロースの構造式

トレハロース トレハロースはカビや酵母などに広く分布し、また昆虫の体液中には多量に存在して主要なエネルギー源となっている。生体保護作用の他に、炭水化物、脂質の変質を抑制する効果などがある。パン酵母をすりつぶして含水エタノールで加熱抽出すると、無色柱状のトレハロースの結晶（2水和物）が得られる。二つの α -グルコースが α -1,1結合している。（図 3.9）

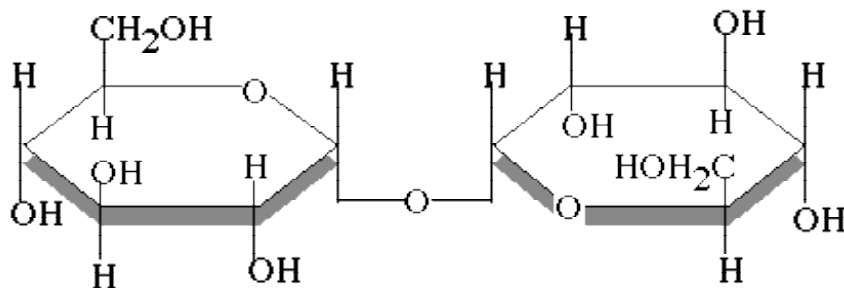


図 3.9: トレハロースの構造式

3.3 トレハロース水溶液のラマン分光

宮原らは、トレハロースと構造の類似した糖水溶液のラマンスペクトルとトレハロースのスペクトルを比較し、トレハロースが他の糖より安定な水和圏を形成しているという考えに肯定的な結果を得ている [8]。

低振動数領域では、 $\sim 200\text{cm}^{-1}$ 付近で、単糖には現れず、二糖にだけ現れる対称化スペクトルのモードが存在している (図 3.10)。このモードは溶媒を重水に変えても全く変化しないことと、振動数領域からいって、ピラノース環同士の変角振動であると考えられる。マルトースとトレハロースでは振動数が異なることから、ピラノース環同士の結合様式を反映している可能性があり得る。

高振動数領域では、C – C 変角振動モードの領域にある 840cm^{-1} と 920cm^{-1} の 2 つのモードは、トレハロース水溶液のものが他の糖水溶液に比べ、強度が著しく強くなっている (図 3.11)。この 2 つのモードは、トレハロース重水溶液においては振動数が低下している (図 3.12)。このことから、 844cm^{-1} と 920cm^{-1} の 2 つのモードはトレハロースに特徴的な水和特性を反映していると思われる。

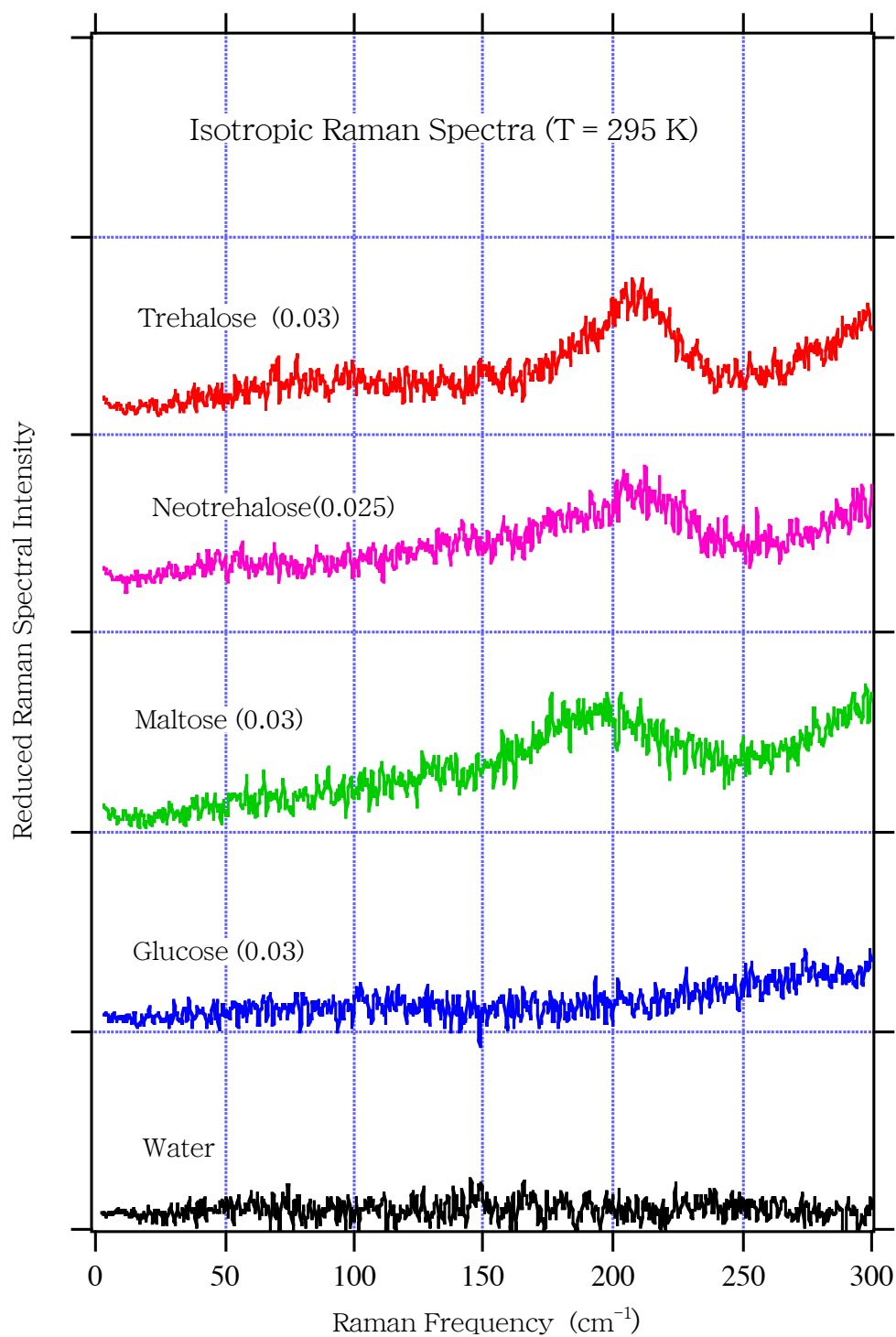


図 3.10: トレハロースと他糖の水溶液の対称化ラマンスペクトル（低振動数側）

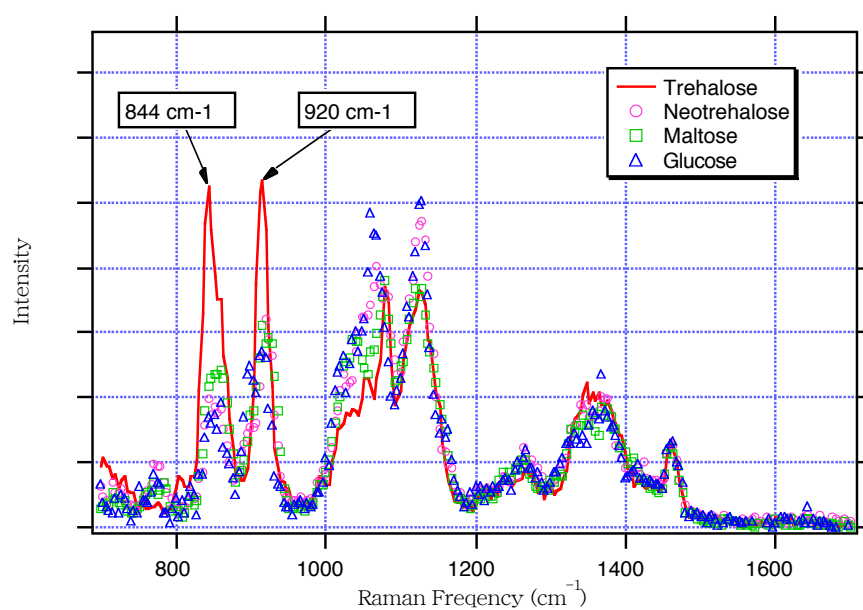


図 3.11: トレハロースと他糖の水溶液のラマンスペクトル（高振動数側）

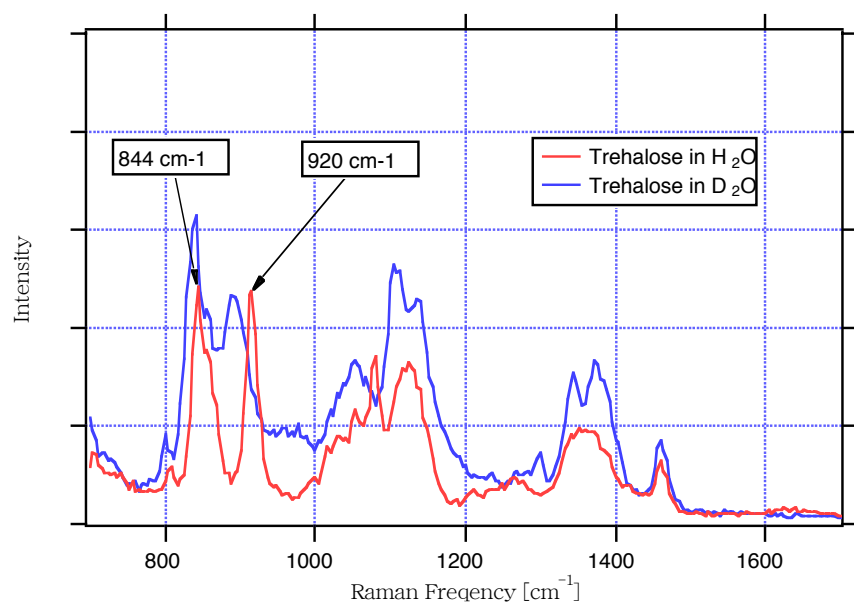


図 3.12: トレハロース水溶液と重水溶液のラマンスペクトル（高振動数側）

3.4 トレハロース結晶の構造

トレハロースの結晶は、2水和物結晶状態で安定な構造をとり、1ユニットあたり4分子、空間群 $P2_12_12_1$ の斜方晶の構造をとることがわかっている。

Taga らはX線解析を用いて、二水和物結晶が図3.13 のような結晶構造をとることを示した。[3]

トレハロース分子と結晶水は、 $O(6) - H_{w1}$ 、 $O(4)H - O_{w2}$ 、 $O(2') - H_{w2}$ 、 $O(2')H - O_{w1}$ の部分で水素結合している。

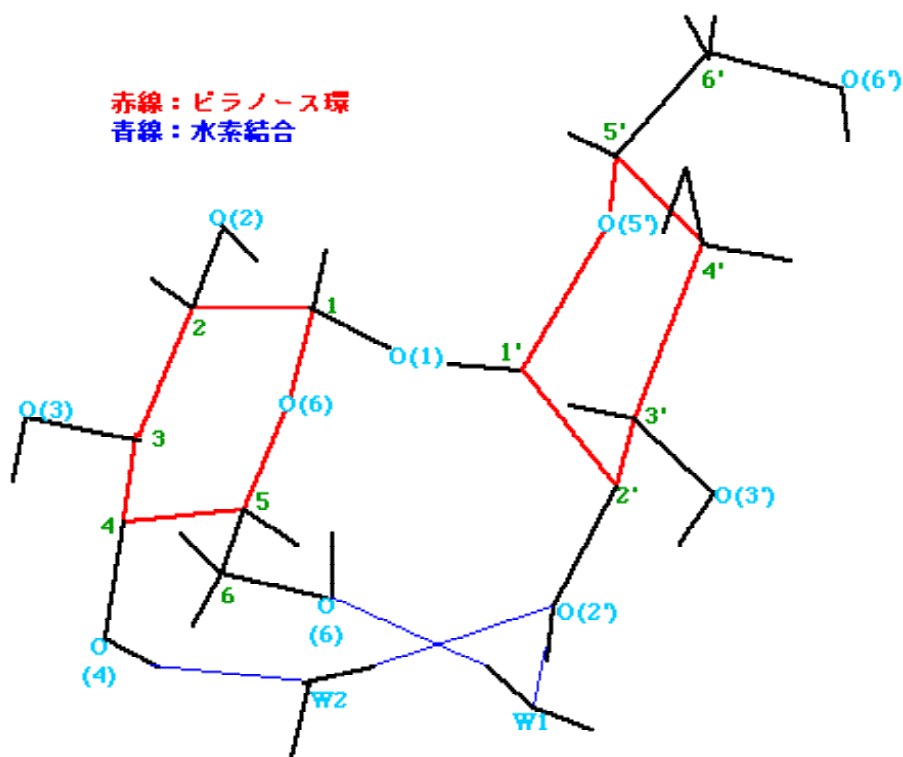


図 3.13: トレハロース二水和物結晶の構造

3.5 トレハロース結晶の基準振動解析

第 3.4 節で示されたトレハロース二水和物結晶の構造解析を基に、Dauchez らは、G F 法を用いたトレハロース二水和物結晶の基準振動計算を行った。[5, 7] 計算では 4 分子を 1 unit とした cell をモデルにして計算されている。モデル力場は、分子内について mUBSFF(modified Urey Bradley Simanouchi Force Field) を使った。結晶構造についての計算条件のデータを表 3.13 に示す。

a、b、c は cell の長さを表しており、 α 、 β 、 γ は角度を表している。

<i>N: number of atoms</i>	51
<i>3N-6</i>	147
<i>Space group</i>	$P2_12_12_1$
<i>Molecules per cell</i>	4
<i>Number of cells</i>	125
<i>a=(Å)</i>	12.230
<i>b=(Å)</i>	17.890
<i>c=(Å)</i>	7.596
<i>$\alpha=()$</i>	90.00
<i>$\beta=()$</i>	90.00
<i>$\gamma=()$</i>	90.00
<i>intramolecular H bonds</i>	4
<i>intermolecular H bonds</i>	8

表 3.13: トレハロースの基準振動計算に用いられた結晶構造のデータ

基準振動計算の結果、トレハロース二水和物結晶の振動モードがより具体的に求められた。振動領域と振動の形態を表 3.13 に示す。糖の振動は、原子間の振動がいくつか結合して現れる。

$\sim 100cm^{-1}$	C-C、C-O の周りの internal rotation と格子振動の coupling C(1)-O(1)、C(1')-O(1) torsion
$100\sim 200cm^{-1}$ 分子内水素結合モード	C-C、C-O の周りの internal rotation C-C-C、C-C-O angle bending
$200\sim 600cm^{-1}$	C-C-O、C-O-C、O-C-O skeletal deformation C-O rotation
$600\sim 800cm^{-1}$	水素結合 network の angle deformation 環外 C-O torsion
$800\sim 950cm^{-1}$	OH 基の rocking deformation C(1)-O(1) stretching elongation C(1)-O(1)-C(1') bending deformation
$950\sim 1200cm^{-1}$	C-C、C-O valence deformation C-C-H、H-C-O bending deformation C-C、C-O stretching elongation
$1200\sim 1500cm^{-1}$	H-C-H、C-O-H、H-C-O、C-C-H bending deformation OH 基の wagging と twisting
$2850\sim 3000cm^{-1}$	C-H stretching
$3200\sim 3700cm^{-1}$	O-H stretching

表 3.13: 振動数領域による主なトレハロースの振動の分類

4 実験の概要

4.1 試料

4.1.1 実験に用いた試料

本研究で扱った試料は（表 4.1.1）に示した、トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、グルコースの 4 種類の糖の水溶液である。グルコース以外の糖は林原生物科学研究所から提供していただいたものを使用し、グルコースは関東科学株式会社から購入したものを使用した。

溶媒として使用した蒸留水は、水道水を純粋製造装置（YAMATO オールスチール **WG-25**）でイオン交換し、蒸留したものをさらに卓上純粋製造装置（*mili-Q.Jr.*）で蒸留したものを用いた。重水は、Aldrich 社から購入したものを使用した。

Name	Formula	Molecular Weight	Molar ration range	Purity
Treharose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$	378.33	0 – 0.04	99.1
Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360.32	0 – 0.03	99.0
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.16	0 – 0.052	98.0

4.1.2 単結晶の作成方法

単結晶は powder 状の糖を飽和状態になるまで蒸留水または重水に溶解させ、温度の安定した場所で 1～2 カ月静置して再結晶させる。完全に水分がなくなったら、ひびなどが入っていない透明な部分を削りだし、直方体に形を整える。この方法ではトレハロースの H_2O 単結晶、 D_2O 単結晶のみ得られた。他の糖については透明な結晶にならなかったため、得られた結晶を乳鉢で細かくし、powder（多結晶）として用いた。

4.2 実験装置

使用したラマン散乱の実験装置は、試料を励起するための光源、試料からの散乱光を集光するための試料部光学系、散乱光をスペクトルに分解するための分光器、スペクトルを測定するための光検出器、データ処理系などの部分により構成されている。

低振動数領域 ($-50 \sim 200 \text{cm}^{-1}$) 光源には Ar^+ レーザーの青色の 488nm の発振線を用いた。分光器はダブルモノクロメーター (U1000) を用いた (迷光除去率: 20cm^{-1} で 10^{-14})。光検出器には光電子増倍管を用いた光子計数法で計測し、スペクトルを得た。

高振動数領域 ($200 \sim 3800 \text{cm}^{-1}$) 光源には Ar^+ レーザーの青色の 488nm の発振線を用いた。分光器はトリプルモノクロメーター (T64000) を用いた (迷光除去率: 20cm^{-1} で 10^{-14})。光検出器にはマルチチャンネル型の CCD(charge coupled device) 検出器を用いた。CCD 検出器は液体窒素程度の低温にして、熱雑音を減らし、検出効率を良くしてスペクトルを測定した。この装置では顕微ラマン散乱の測定も行った。

powder は顕微のみ、単結晶は顕微とマクロでそれぞれ測定した。

4.3 測定条件

単結晶の3辺の長さをそれぞれ長い方から a、b、c として、各方向からラマン散乱を測定した。マクロでの測定の様子を図 4.1 に、顕微での測定の様子を図 4.2 に示した。

低振動数領域 ($-50\sim 200\text{cm}^{-1}$)

- laser power : 200 mW
- 測定間隔 : 0.2cm^{-1}
- 積算時間 : 2 秒
- 積算回数 : 1 回
- macro

高振動数領域 ($200\sim 3800\text{cm}^{-1}$)

- laser power : 200 mW
- 積算回数 : 2 回
- 積算時間 : 16 秒
- grating : 1800
- triple
- macro or micro

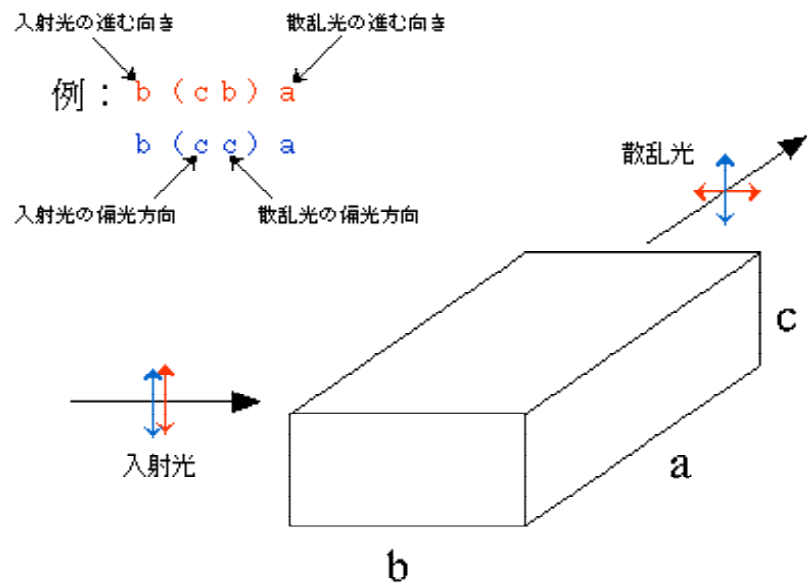


図 4.1: 単結晶の測定の様子（マクロ）

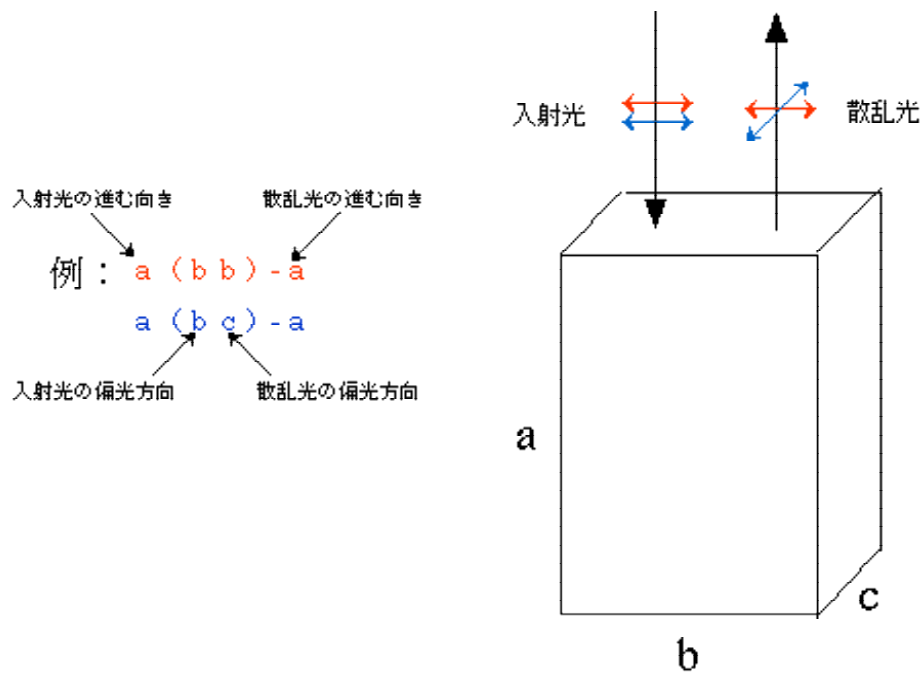


図 4.2: 単結晶の測定の様子（顕微）

5 実験結果

5.1 水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル

トレハロース水溶液と H_2O 単結晶、 H_2O 多結晶 (powder 状) のラマンスペクトルを図 5.1、5.2、5.3 に示す。二水和物結晶のラマンスペクトルは、水溶液のスペクトルを尖鋭化することはできたが、それ以外の違いは見られなかった。

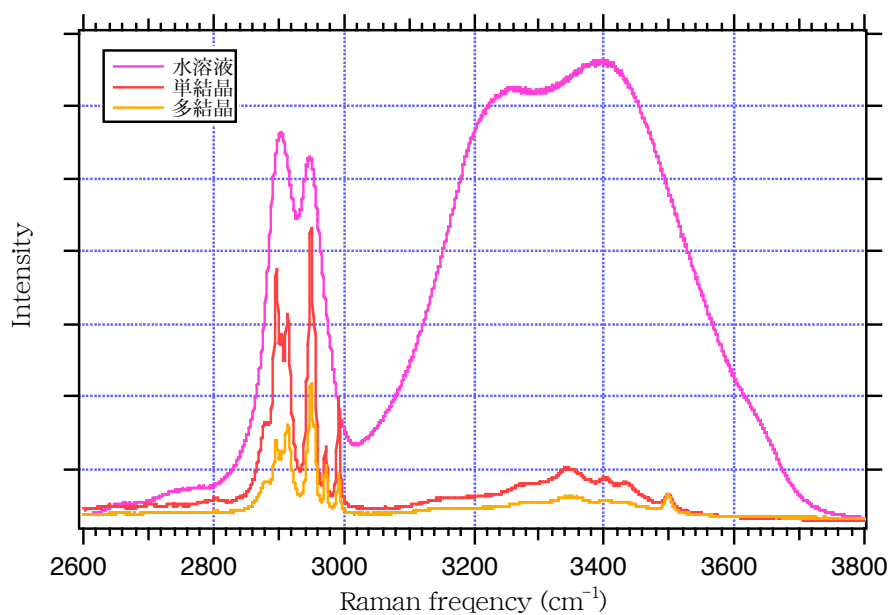


図 5.1: トレハロース水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル

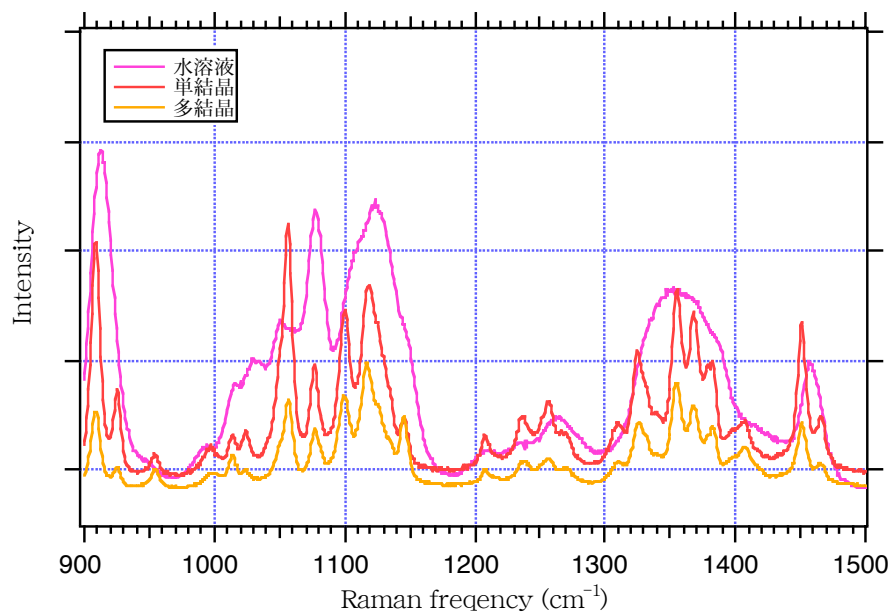


図 5.2: トレハロース水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル

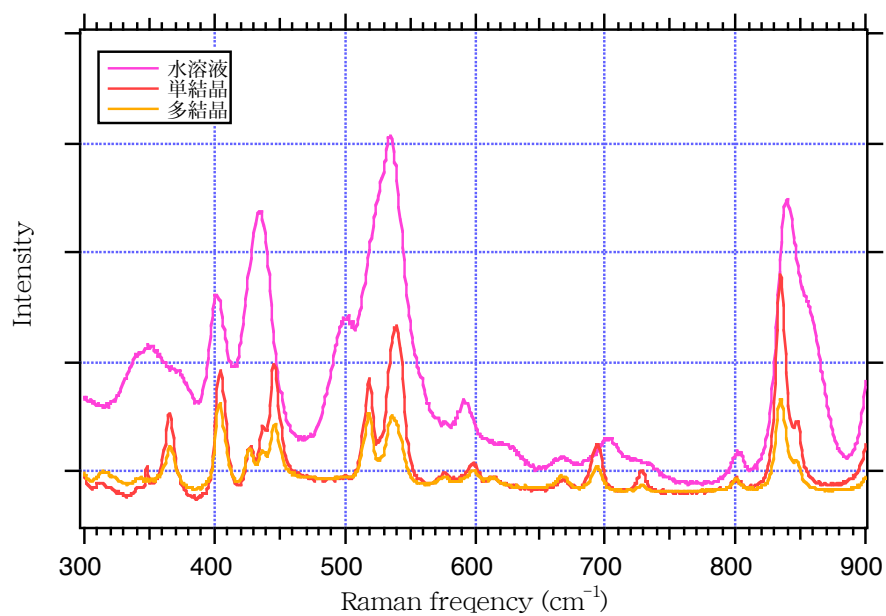


図 5.3: トレハロース水溶液と単結晶、多結晶のラマンスペクトル

5.2 H_2O 結晶と D_2O 結晶の比較

5.2.1 低振動数領域 ($0\sim 300\text{ cm}^{-1}$)

単結晶は測定する方向によりピーク強度が異なるため、スペクトルのピークの強度・ピーク群の形状は比較できないが、ピーク振動数については比較することができる。各方向から測定したスペクトルのうち、 H_2O 単結晶と D_2O 単結晶のラマンスペクトルを3つずつ図 5.4 に示す。

$0\sim 200\text{cm}^{-1}$ ピーク振動数のパターンは H_2O 単結晶、 D_2O 単結晶でほとんど変化していない。

$200\sim 300\text{cm}^{-1}$ H_2O 単結晶に比べ、 D_2O 単結晶のピーク振動数のパターンは僅かではあるが低振動数側へシフトしている。

この結果は、多結晶や単結晶をどの方向から測定しても同様の結果を得た。

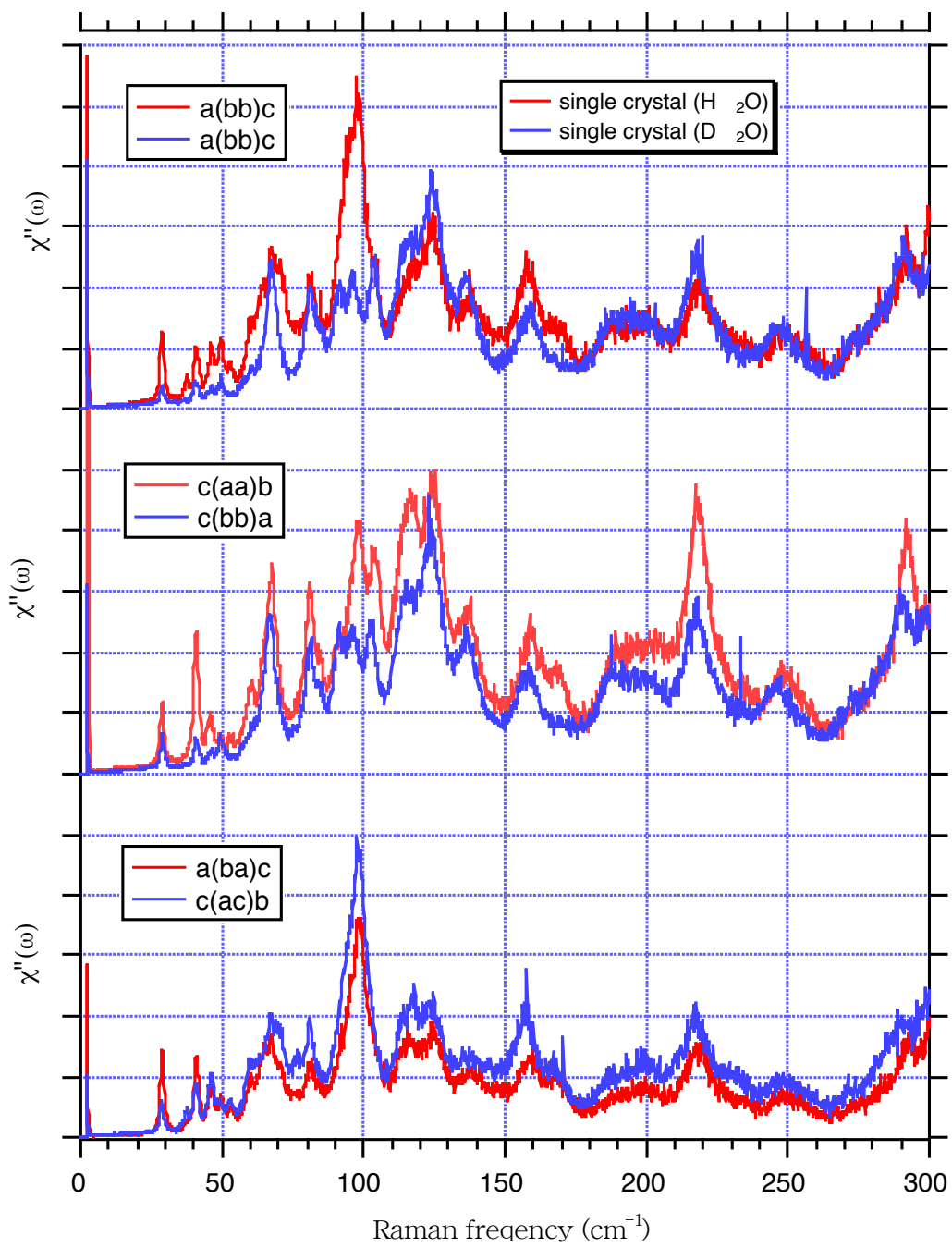


図 5.4: 単結晶のラマンスペクトル (0~300 cm^{-1})

5.2.2 高振動数領域 (300~1500cm⁻¹)

以下の結果は、多結晶や単結晶をどの方向から測定しても同様の結果を得た。

300~850cm⁻¹ スペクトルのピークのパターンは D_2O 結晶は低振動数側に僅かにシフトしている。しかし、この領域中の H_2O 結晶 518、540cm⁻¹ の2本のピークが、 D_2O 結晶では1本になっているように見える。(図 5.5)

また、水溶液で問題になった2本のピークのうち、844cm⁻¹ に対応するピーク (H_2O 単結晶では 835cm⁻¹) は、 D_2O 結晶では他のピークと同様に、低振動数側にシフトしている。(図 5.6)

850~1350cm⁻¹ H_2O 結晶と D_2O 結晶のピークがきちんと対応しておらず、光振動数側へシフトしているようにも見える。特に、 H_2O 結晶で 1077cm⁻¹ のピークは、 D_2O 結晶には現れない。(図 5.6、5.7)

また、水溶液で問題になった 920cm⁻¹ に対応するピーク (H_2O 単結晶では 908cm⁻¹) については、 D_2O 結晶では著しく強度が低くなっている。(図 5.6)

1350~1500cm⁻¹ スペクトルのピークのパターンは D_2O 結晶は低振動数側にシフトしている。(図 5.8)

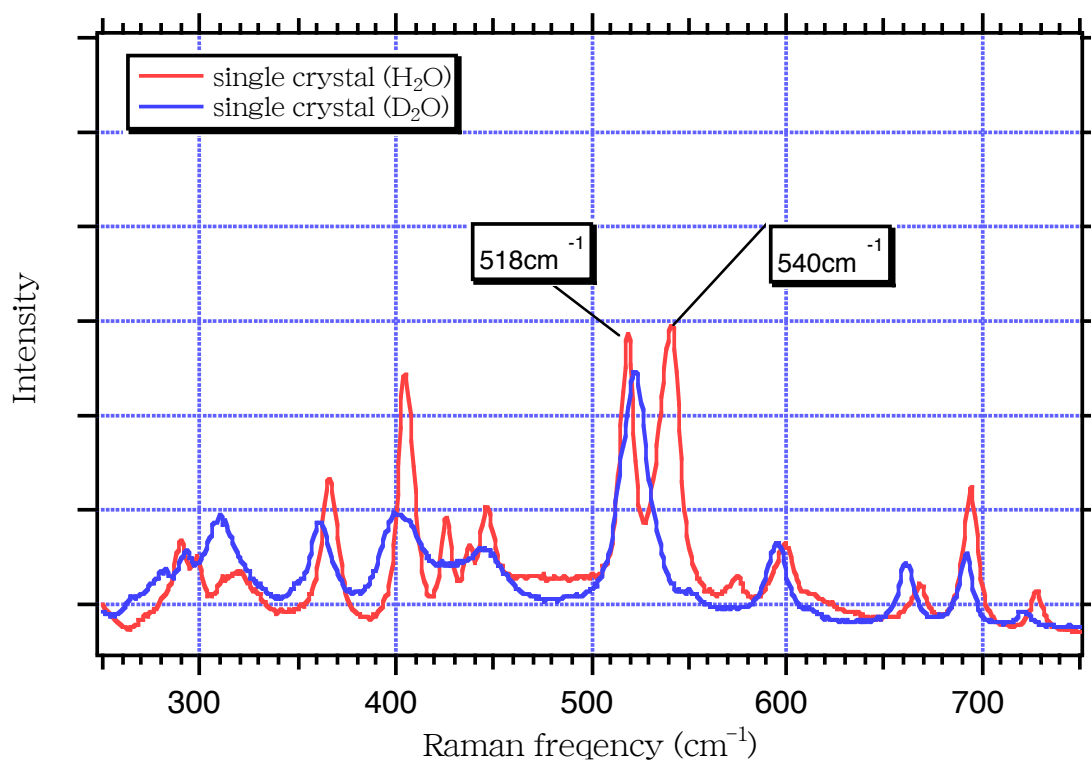


図 5.5: 単結晶のラマンスペクトル ($250\sim 750\text{cm}^{-1}$)

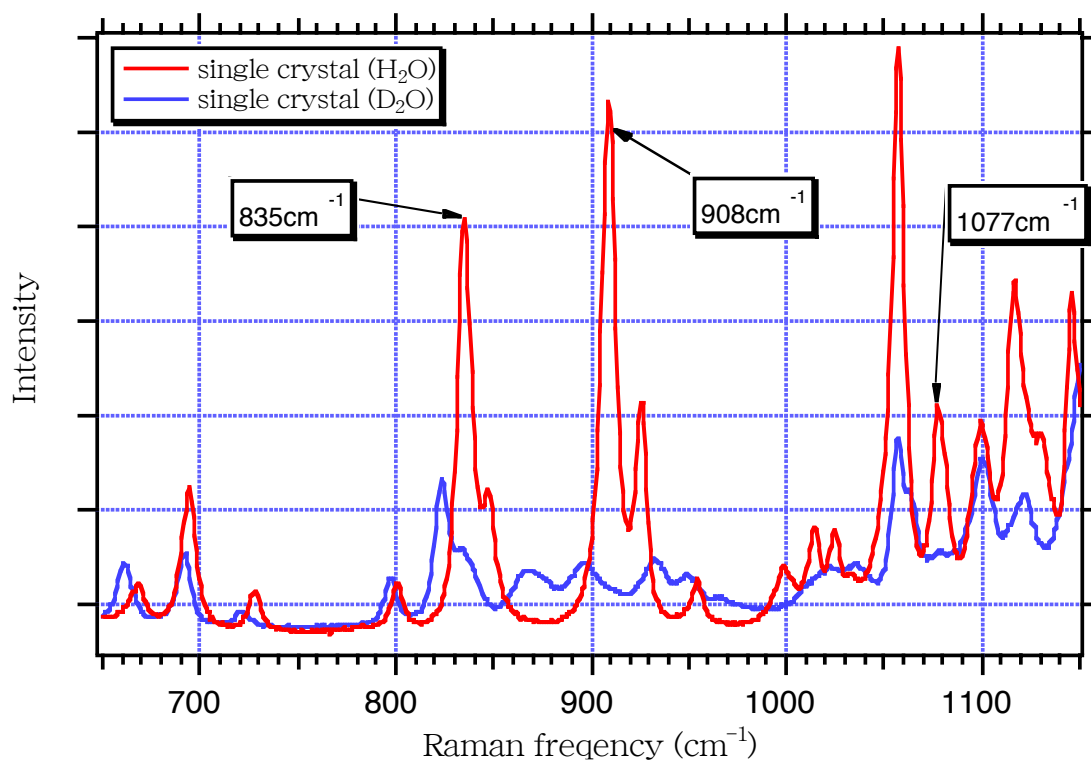


図 5.6: 単結晶のラマンスペクトル ($650\sim1150\text{cm}^{-1}$)

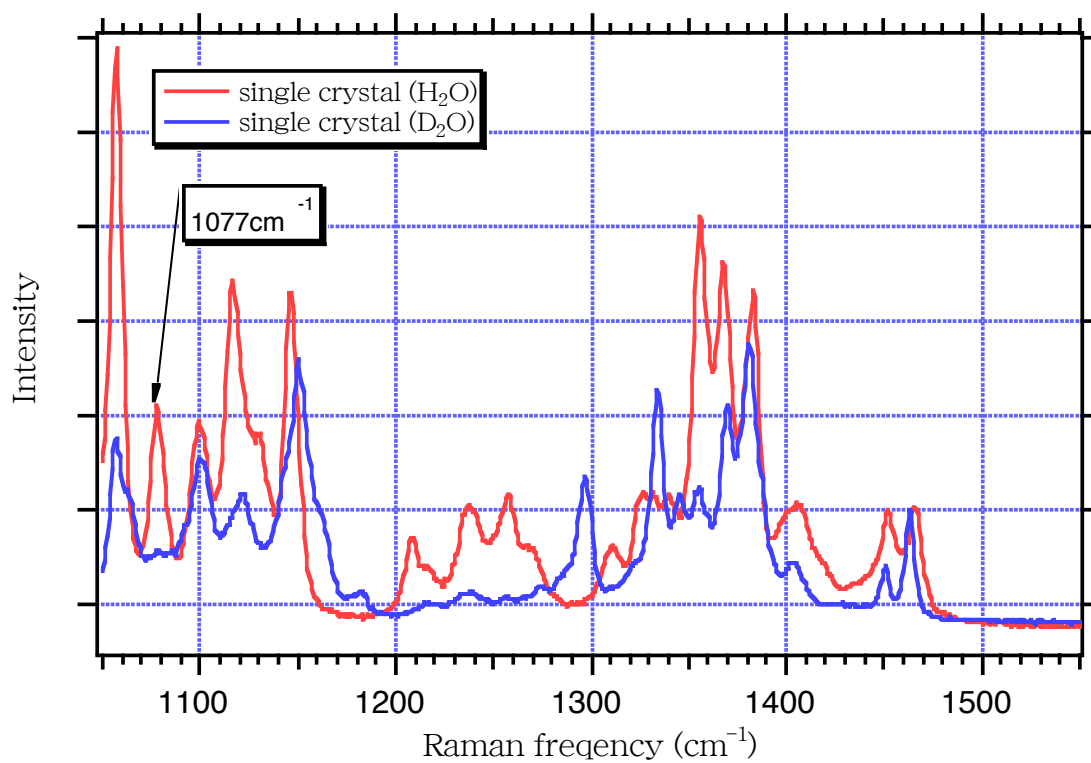


図 5.7: 単結晶のラマンスペクトル ($1050\sim 1550\text{cm}^{-1}$)

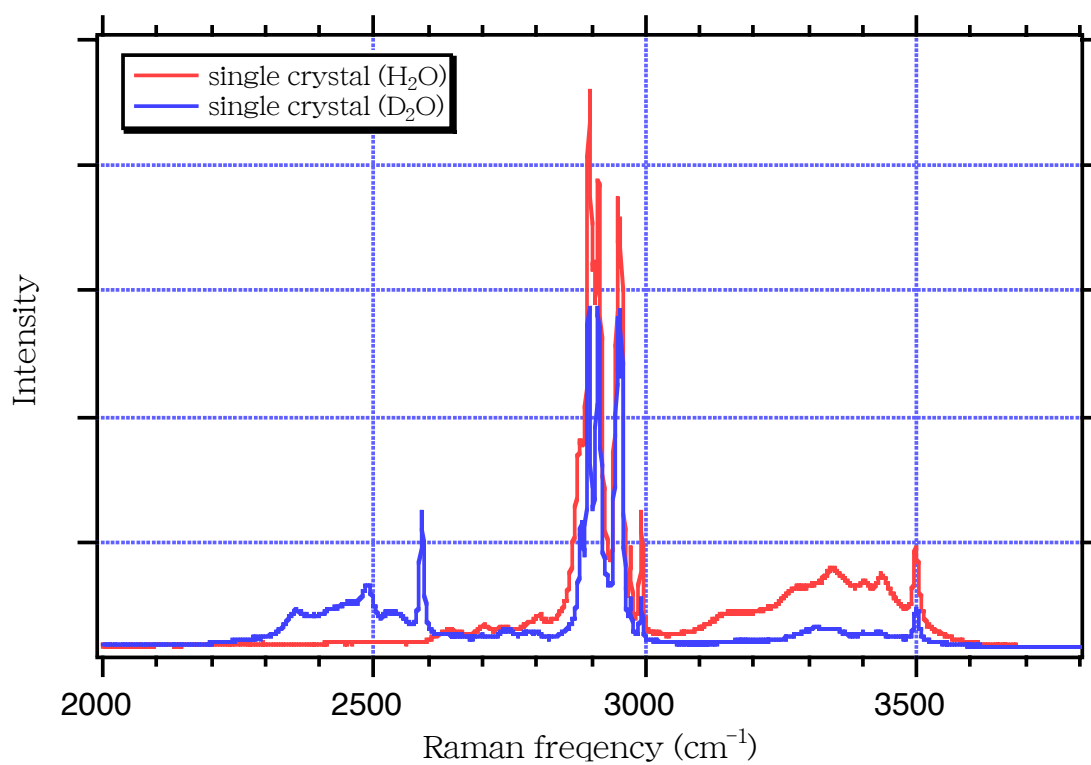


図 5.8: 単結晶のラマンスペクトル ($2000\sim3800\text{cm}^{-1}$)

5.2.3 高振動数領域 (2000~3800cm⁻¹)

多結晶 (powder 状) のトレハロース H_2O 結晶と D_2O 結晶のラマンスペクトルを図 5.9 に示す。 H_2O 結晶で 3100~3700cm⁻¹ の領域にあるピーク群が、 D_2O 結晶では大部分が 2200~2650cm⁻¹ の領域にシフトしている。

しかし、2850~3000cm⁻¹ の領域にあるピーク群は H_2O 結晶と D_2O 結晶で、全く変わりがなかった。

D_2O 結晶の 2200~2650cm⁻¹ の領域のピーク群と 3100cm~3700cm⁻¹ の領域のピーク群の強度積分の比は、およそ 7 : 3 である。

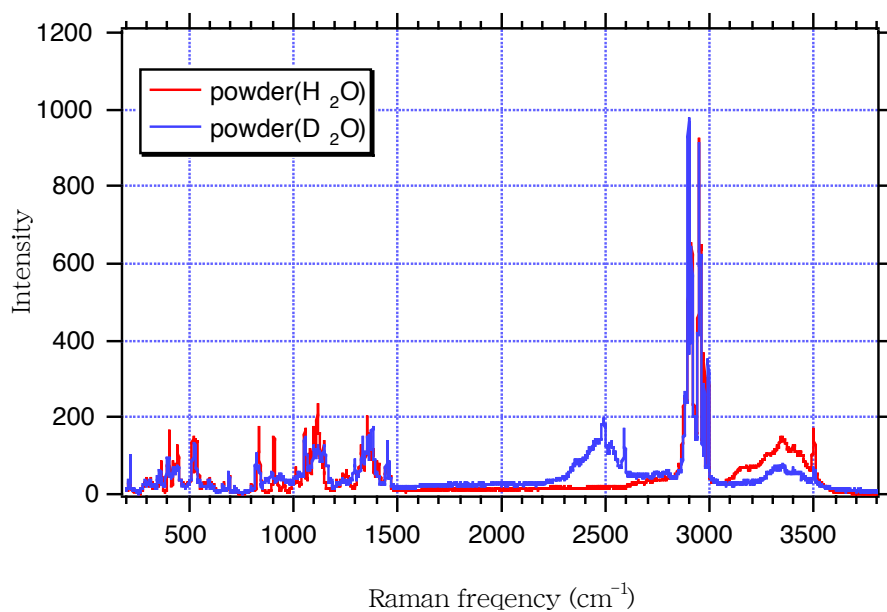


図 5.9: トレハロース多結晶のラマンスペクトル (200~3800cm⁻¹)

6 実験結果の考察

第 5.2.3 節について、 $2850\sim3000\text{cm}^{-1}$ の領域は、C-H stretching モードの領域であり、 $3200\sim3700\text{cm}^{-1}$ の領域は、O-H stretching モードの領域である。結晶のもとになるトレハロース水溶液の溶媒を H_2O から D_2O に変えたことによって、O-H stretching モードの大部分が低振動数側にシフトして、C-H stretching モードが変化しないことから、 D_2O 単結晶では、O に結合した H と水和水の H は置換して、C に結合した H は置換していないと考えることができる (図 6.1)。シフトしたピーク群とシフトしていないピーク群の積分強度の比から、およそ 7 割の O-H が O-D に置換されたと考えられる。

以下はこのことを前提にして議論する。

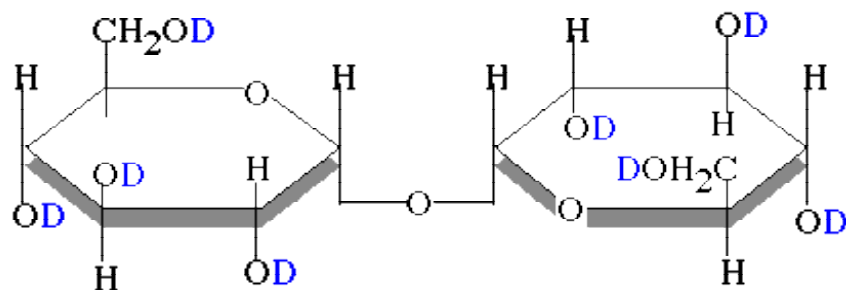


図 6.1: 重水素化したトレハロース D_2O 結晶の構造式

6.1 重水素化による振動数シフト

トレハロース H_2O 結晶と D_2O 結晶のピーク群を、水溶液のスペクトルを参考に対応させてみたところ、図 6.2 のようになった。多結晶 (powder) は多結晶同士で、単結晶はスペクトルの形状が似ているもの同士で比較させた。全体の傾向として、 $0 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ では振動数は一致しており、 $850 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ あたりの領域では H_2O 結晶の方が振動数が高く、 $1100 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ あたりの領域では D_2O 結晶の方が振動数が高くなって見える。

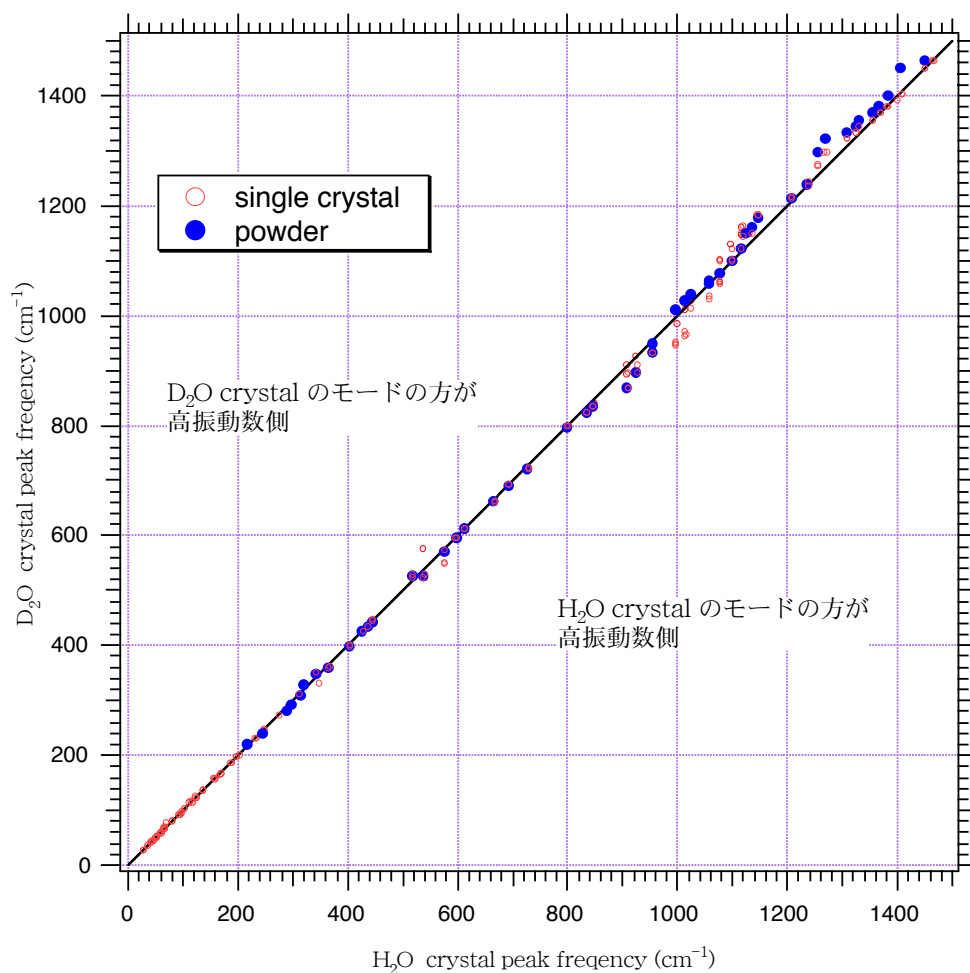


図 6.2: H_2O 単結晶と D_2O 単結晶のピーク振動数の比較

1000~1400 cm^{-1} の領域の振動は、C の周りの変角振動と C-O-H 変角振動が coupling している。重水素化に伴って、C-O-D 変角振動は振動数が下がるので、一見同じように 1000~1400 cm^{-1} 領域に観測されている振動でも、その中身（振動形）は変化している [9]。

重水素化によって、C-O-D 変角振動が低振動数側、800~1000 cm^{-1} の領域に下がり、他の振動と coupling し、それと同時に、1000~1400 cm^{-1} にあったモードの coupling がなくなる、ということも考え得る。すると、見方によっては高波数シフトが起こったようにも見える（図 6.3）。

また、908 cm^{-1} のモードのピーク強度が D_2O 結晶で著しく弱くなった点については、908 cm^{-1} の振動が、重水素化によって低振動数側へシフトしてきた C-O-D 変角振動と couple して強度が分散してしまった可能性も考えられる。

糖の振動はカップリングが複雑なので、どの振動が重水素化後のどの振動へ対応するかは判然とはしないが、800~1000 cm^{-1} と、1100~1400 cm^{-1} で振動数シフトの傾向が現れたのは、それぞれの領域に、C-O-D 変角振動と C-O-H 変角振動が属する為であることが考えられるが、確定的なことは言えない。

このことを、はっきり解明させるためには、今回得られた D_2O 結晶の構造解析を行い、それに基づいた基準振動解析の計算を行って、計算値と実験結果と比較することが必要である。

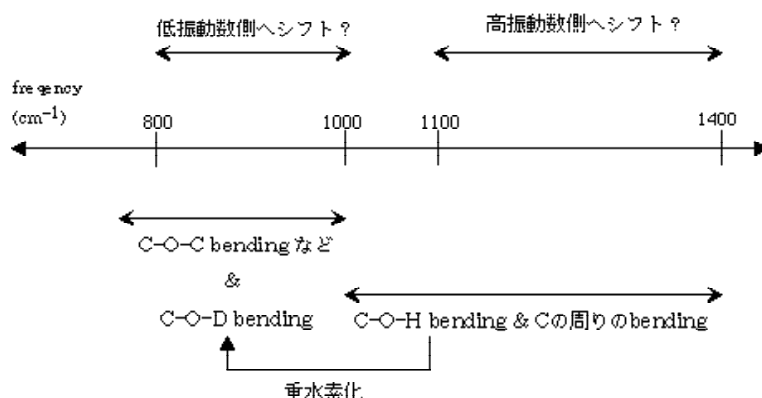


図 6.3: トレハロースの重水素化による振動数シフトの様子

6.2 低振動数領域 ($0\sim 300\text{cm}^{-1}$)

第 5.2.1 より、結晶の重水素化前後のラマンスペクトルを比較した結果、低振動数領域では重水素化による振動モードのパターンの大きな変化はみられなかった。この領域は、分子間振動領域であるから、分子間振動領域のパターンが大きく変化しないと考えられる。よって、トレハロース結晶の構造が重水素化によってあまり変わらないと考えることができる (図 6.4)。

$150\sim 300\text{cm}^{-1}$ 付近の僅かな振動数シフトについては、この領域では分子内水素結合モードの影響を受けているため、重水素化によって分子内水素結合が何らかの変化をしたためと考えている。

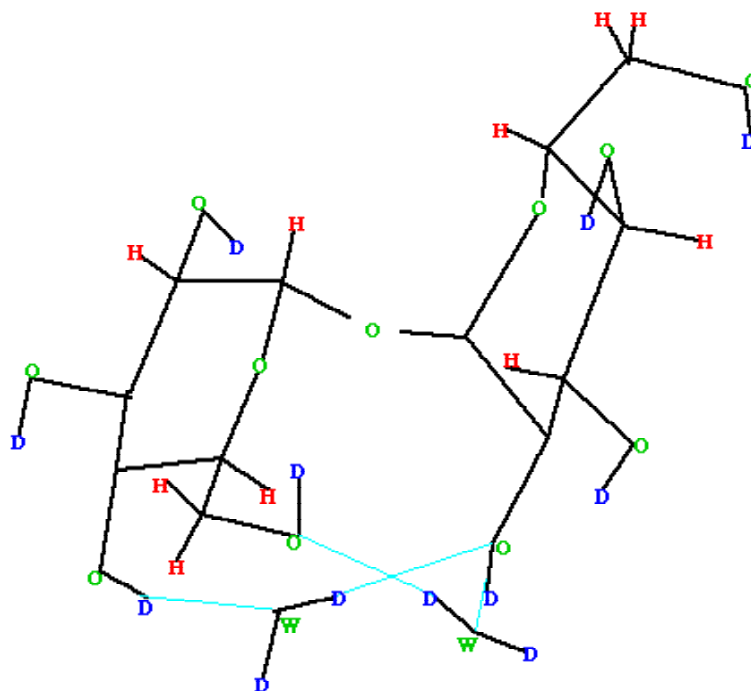


図 6.4: 考えられるトレハロース D_2O 結晶の構造

6.3 高振動数領域 (300~1500cm⁻¹)

まず、水溶液で問題になった 844cm⁻¹ (H_2O 結晶では 835cm⁻¹) について、この振動数のモードは、 $C_{(5)}H_2OH$ の部分の変位のモードであり、この H が D に置換されたことにより ($C_{(5)}H_2OD$ になる)、この部分の原子が重くなるので、振動モードが低振動数側にシフトしていると考えるのは妥当である。しかし、この振動モードがトレハロースで特に強いということと、トレハロースの水和特性との関連性は、まだ具体的に言うことはできない。

同じく水溶液で問題になった 920cm⁻¹ (H_2O 結晶では 908cm⁻¹) の振動数を持つモードが、 D_2O 結晶では著しく強度が弱くなる点については、現在、次のように考えている。

908cm⁻¹ の振動モードは基準振動計算の結果から CO 伸縮振動と、グリコシド結合 ($C_1 - O - C'_1$) の変角振動であると帰属されている [6]。トレハロースの D_2O 結晶の構造は X 線解析の結果と低振動数ラマンスペクトルの結果より、図 6.4 と考えられるから、水和水が D_2O に置換されたことにより、分子内の水素結合が強くなり、ピラノース環から水素結合にかけてのライン (図 6.5 の赤いライン) 全体の振動が鈍くなっていると考え。そう考えると、グリコシド結合の変角振動である 908cm⁻¹ の振動モードの振幅が小さくなるので、 D_2O 結晶ではピーク強度が著しく弱くなっているのではないだろうかと考えられる。

そう考えると、計算結果からピラノース環の骨格振動モードと帰属されている H_2O 結晶の 518cm⁻¹、540cm⁻¹ の 2 本ピークが、 D_2O 結晶では 522cm⁻¹ 1 つだけに減っていることも、ピラノース環の取り得る変角振動のパターンが 2 種類あったのが、上述の理由から、重水素化後では 1 種類しか取れなくなるために起こると説明することもできる。トレハロースは他の二糖に比べて、グリコシド結合した 2 つのピラノース環の距離が狭い [6]。この違いが、トレハロースに特有な水和特性を示しているのではないかと考えているが、まだ具体的な根拠はない。

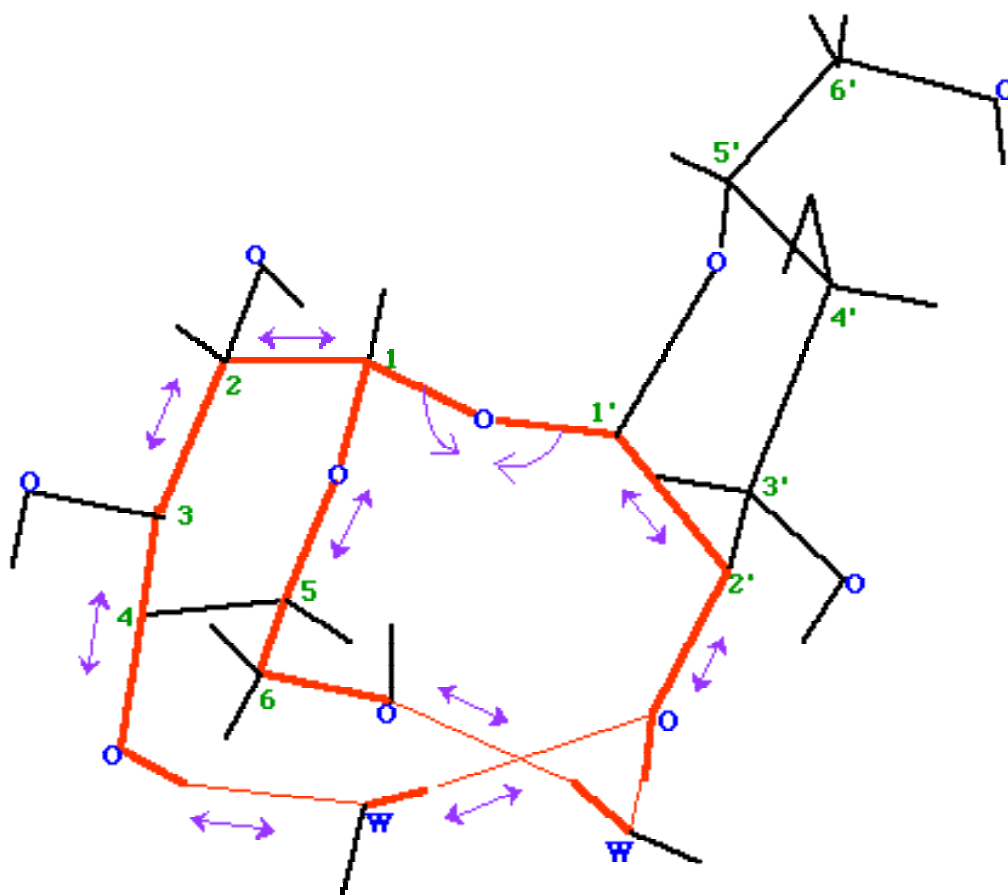


図 6.5: トレハロース D_2O 結晶の振動の様子

7 まとめ

トレハロースの単結晶、多結晶をラマンスペクトルで測定し、水溶液との違いを検討しようと試みたが、水溶液を再結晶させただけでは、ラマンスペクトルが尖鋭化するのみで、特に目立った違いは発見されなかった。

しかし、 D_2O 溶媒で作った結晶を得ることで、トレハロース水溶液で問題になった2つのピークのうち、 908cm^{-1} のピークに、特異な現象が認められた。 D_2O 結晶で、 908cm^{-1} のピークが著しく弱くなってしまっている。

D_2O 溶媒で作った結晶は、O-H 振動領域のモードの大部分が、約 $1/\sqrt{2}$ 倍の振動数領域にシフトしていることから、O-D に置換されていると考えられる。

908cm^{-1} の振動数のモードは、グリコシド結合の変角振動を含むので、重水素化によって強くなった水素結合が、トレハロースの flexibility を失わせ、振動モードが著しく弱くなってしまっているように思える。

同様の現象から、ピラノース環骨格振動領域に属する2本のピーク (518cm^{-1} と 540cm^{-1}) が D_2O 結晶で1本になっていることを説明することもできる。

このことが、トレハロースの水和特性に関与しているかどうか、具体的にいうことはできないが、2つのピラノース環の振動が、水と深く関わっていることは推測できる。

トレハロースの単結晶を作成する際、マルトース、グルコースの単結晶も得ようと試みたが、単結晶は得られなかった。また、トレハロース D_2O 結晶と同様の方法で他糖の D_2O 結晶を作成したが、測定したラマンスペクトルから、まったく重水素置換されないことが分かった。この点から見ると、トレハロースは結晶性が高く、flexible な構造をもつことが推測できる。

また、別の議論では、 908cm^{-1} の振動モード強度が落ちる点については、重水素化によって C-O-H が C-O-D になり、別の振動と couple することにより、強度が分散するという可能性も否定できない。

これらの研究で、トレハロースの特異な水和特性を具体的に解明することはできなかったが、トレハロースと水の関わり合いについて、トレハロースの flexibility、

特に重水素化によるピラノース環の変角振動の変化が、トレハロースの水和特性を解明する 1 つの手がかりになると考えている。

参考文献

- [1] 濱口宏夫、平川暁子編：ラマン分光法（日本分光学会測定法シリーズ 17）、学会出版センター 1988
- [2] 阿武喜美子・瀬野信子：糖科学の基礎 講談社
- [3] T.Tagu, M.Senma, and K.Osaki, *Acta Cryst.*, B28,3258-3263 (1972)
- [4] 中川一朗：振動分光学（日本分光学会測定法シリーズ 16）、学会出版センター
- [5] M.Dauchez, P.Derreumaux, and G.Vergoten, *J.Comp.Chem.*, Vol.14, No.3, 263-277 (1992)
- [6] M.Dauchez, P.Derreumaux, P. Lagant, and G.Vergoten, *J.Comp.Chem.*, Vol.16, No.2, 188-199 (1993)
- [7] M.Dauchez, P.Derreumaux, P. Lagant, and G.Vergoten, *Spectrochimica Acta*, Vol.50A, No.1, 87-104 (1994)
- [8] 宮原ちひろ 修士論文 お茶の水女子大
- [9] Y.Sugawara private communication

謝辞

この研究はお茶の水女子大学大学院人間文化研究科物質科学専攻在学中に行われたものです。本研究を進めるにあたり、終始親切に御助言、御指導して下さったお茶の水女子大学人間文化研究科教授である富永靖徳教授に心から感謝致します。

また、お茶の水女子大学理学部物理科助手である梅原敏宏さん、富永研究室の天羽優子さん、氏家知子さん他、研究室の方々には研究に関するだけでなく、多方面にわたる御支援、御協力をいただき、2年間楽しく研究させて頂きましたことを深く感謝致します。

試料として用いたトレハロース、マルトースは（株）林原生物化学研究所の御好意により提供されたものです。ここに厚く感謝の意を表します。