

氏名	おおはた ともりの 大波多 友規		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	乙第 1776 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	複数の被包接部位を有するカテキンと β-cyclodextrin との包接複合体形成機構の熱力学的解明		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	安藝 初美
	(副 査) 福岡大学	教授	能田 均
	福岡大学	教授	藤岡 稔大
	福岡大学	准教授	池田 浩人

内 容 の 要 旨

茶の主要生理活性成分であるカテキン類は flavan-3-ols 骨格をもつポリフェノールの一種であり、茶葉抽出飲料の苦味や渋味の由来物質である。その高い生理活性作用を期待し、カテキン類を高濃度含有する飲料が多数市販されている。これらの飲料では、カテキン類の苦味や渋味ならびに低い水溶性を改善するため、シクロデキストリン (CD) による包接化技術が用いられている。また、CD との包接複合体形成によって、カテキン類の生理活性作用が向上する報告もなされている。CD 疎水性空洞内は一般的に疎水性ゲスト分子やゲスト分子の疎水性部位を包接し、親水性部位が包接されることは極稀である。そのため、カテキン類のようなポリフェノールと CD による包接複合体形成について多岐にわたる応用はなされているが、その包接複合体形成機構などの基礎的知見は未だ明らかにされていない。

そこで、本研究では量子化学計算（半経験的分子軌道法：PM3 法と密度汎関数法：DFT 法）および分子動力学計算によりカテキンと CD の包接モード（構造）を推定し、水溶液中における形成機構を解明した。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ 測定と等温滴定マイクロ熱量測定 (ITC) を通して計算結果を実証した。

第 1 章 計算化学を用いた分子間相互作用の予測

計算モデルには、ホスト分子として β -CD、およびゲスト分子として Fig. 1 に示す 6 種類のカテキン； (-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epigallocatechin gallate (EGCg)、(-)-epicatechin (EC)、(-)-epicatechin gallate (ECg)、(-)-gallocatechin (GC)、(-)-gallocatechin gallate (GCg) および ionized EGCg を用いた。

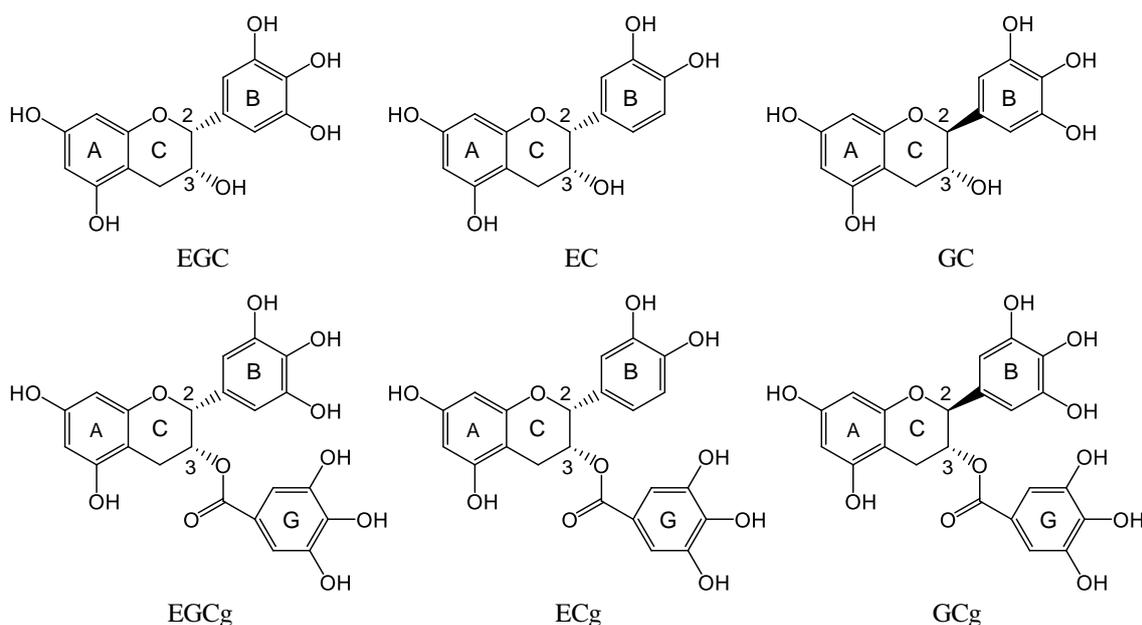


Fig. 1 カテキンの構造

各環の名称を A 環、B 環、C 環および G 環とした。

はじめに、 β -CD の二級水酸基側の空洞外からカテキンの A 環、B 環およびガロイル基を近づけた複数の複合体初期構造を作成し、それぞれについて構造最適化計算を行った。各最適化構造について、複合体形成による相互作用安定化エネルギー (ΔE) を算出した。

EGC と β -CD との包接複合体の最安定構造は、EGC の A 環が β -CD 空洞内の中央に位置した (Fig. 2 (a))。EGC と β -CD との間で形成された 5 か所の分子間水素結合は、包接複合体を安定化させるエネルギー的な安定化要因であった。EGCg と β -CD との包接複合体の最安定構造は、EGCg のガロイル基が β -CD 空洞内に包接された構造であり、EGCg と β -CD との間で 6 か所の分子間水素結合を形成した (Fig. 2 (b))。特に、ガロイル基のカルボニル基の酸素原子と β -CD の水酸基との分子間水素結合が、包接複合体を安定化させるエネルギー的な安定化要因であった。EGCg は、EGC に比べて β -CD との包接複合体形成により ΔE 値は 13.5 kJ mol^{-1} 低下したため、ガロイル基は β -CD との包接複合体形成に大きく関与し、特にガロイル基自身が β -CD 空洞内に包接された包接複合体が重要であることが判明した。

EC と β -CD との包接複合体の最安定構造は、EC の B 環が β -CD の二級水酸基付近に位置した複合体構造であり、3 か所の分子間水素結合を形成した (Fig. 2 (c))。一方、ECg と β -CD との包接複合体の最安定構造は、ECg の B 環が β -CD 空洞内の中央に位置した (Fig. 2 (d))。ECg と β -CD との間で形成された 6 か所の分子間水素結合は、包接複合体を安定化させるエネルギー的な安定化要因であった。ECg や EC は B 環がピロガロール基であるため、B 環がピロガロール基である EGCg や EGC とは異なり、B 環の水酸基の減少により、B 環自身が β -CD 空洞内の疎水性領域に包接された。

GC と β -CD との包接複合体の最安定構造は、GC の A 環が β -CD 空洞内中央に位置し、5 か所の分子間水素結合を形成した (Fig. 2 (e))。GCg と β -CD との包接複合体の最安定構造は、GCg のガロイル基が β -CD 空洞内の一級水酸基側に位置し、A 環および B 環が β -CD の二級水酸基側に位置した (Fig. 2 (f))。GCg は、C 環の 2 位または 3 位の炭素原子に結合する置換基が *S* 配置をとる場合、その置換基は C 環に対して *axial* 位にある。このため、EGCg に比べて B 環とガロイル基の立体障害が少なく、GCg のガロイル基は β -CD 空洞内により包接されやすい。また、GC は C 環に対して B 環が *axial* 位にあることで、GC の A 環が β -CD 空洞内中央に位置したとき、GC は β -CD 空洞内で強固な分子間水素結合を形成し、複合体安定化エネルギーを大幅に減少させた。

以上の結果、カテキンの β -CD 空洞内包接には、galloyl 基の有無、B 環の水酸基の数および C 環の 2 位又は 3 位の炭素に結合する置換基の立体配置が包接化の主要因であることが明らかとなった。さらに、各包接複合体安定構造を比較することで、包接複合体の安定化にはカテキンと β -CD との間に形成された複数の分子間水素結合が大きく寄与していた。

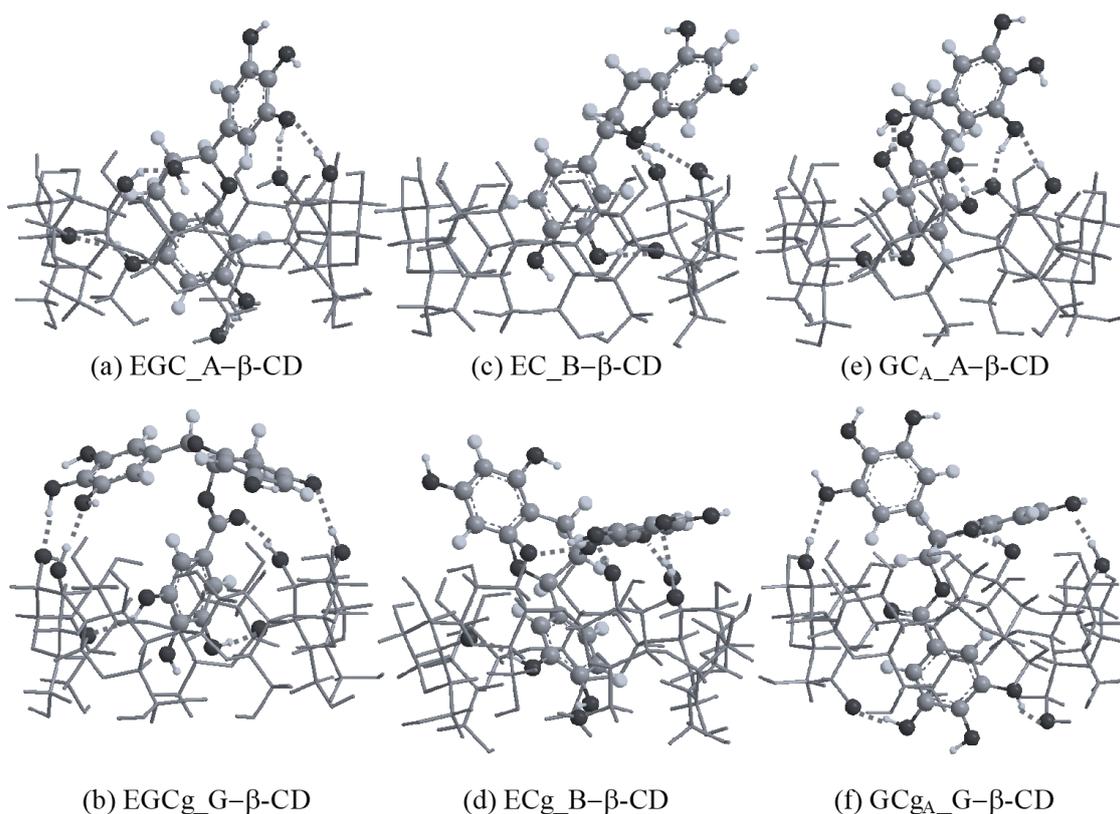


Fig. 2 6 種のカテキンと β -CD との包接複合体最安定構造

Ball and Stick model はカテキンを示し、Stick model は β -CD を示す。破線は分子間水素結合を表す。

第 2 章 核磁気共鳴スペクトル測定および等温滴定マイクロ熱量測定を用いた水溶液中包接複合体形成の確認

核磁気共鳴スペクトル測定

EGC または EGCg と β -CD を混合して $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。EGC および EGCg は、 β -CD と混合することで、 β -CD の空洞内プロトンである 3-H および 5-H の化学シフトが高磁場側へ移動し、EGC と EGCg を構成する芳香環が β -CD 空洞内に包接されたことを支持した。EGCg は $\text{p}K_{\text{a}} = 7.5$ であり、EGCg の分子型の割合がほぼ 100% である pH3.0、およびイオン型が約 91% 存在する pH8.5 で ROESY スペクトルを測定した。各クロスピークの傾向から、EGCg の A 環が β -CD の一級水酸基側付近の空洞内に深く入り込み、B 環が β -CD の二級水酸基側付近の空洞内に位置する包接複合体構造、および、EGCg のガロイル基が β -CD 空洞内に浅く包接された包接複合体構造の 2 種が得られた。一方、EGC は溶液 pH に関わらず、EGC の A 環が β -CD の一級水酸基側付近の空洞内に位置し、EGC の B 環が β -CD の二級水酸基側付近の空洞内に位置する 1 種の包接複合体のみが得られた。

等温滴定マイクロ熱量測定

6 種のカテキン (EGC、EGCg、EC、ECg、GC および GCg) について、等温滴定マイクロ熱量計を用いて β -CD との反応熱量を測定し、化学量論比、複合体形成定数、熱力学的パラメータを算出した。ガロイル基を有する EGCg、ECg および GCg は、モル比 1:1 で 2 種の包接複合体が形成された。一方、ガロイル基を有さない EGC、EC および GC はモル比 1:1 で 1 種の包接複合体が形成された。また、包接複合体の安定性にはエンタルピーが寄与していることが明らかとなった。

【総括】

本論文により、カテキンのように複数の親水性被包接部位を有するゲスト分子の場合、分子間水素結合によるエンタルピー駆動で、ゲスト分子はホスト分子の疎水性空洞内に包接されることを明らかにした。実験では明らかにすることが難しい複合体の形成機構、水溶液中の最安定構造および分子間相互作用について、PM3 法や DFT 法、分子動力学法を用いることで十分解明出来得ることを証明した。それゆえ、ゲスト分子やホスト分子を薬物やタンパク質などの任意の分子に変更することで、計算化学的手法を用いて薬物間の相互作用や薬物と生体物質との相互作用解析への応用が期待される。

審査の結果の要旨

シクロデキストリン (CD) をホスト分子とした包接化合物形成に関しては、以前より数多くの論文が発表されているが、そのほとんどが難水溶性分子や分子内疎水基の包接化である。親水性化合物については、茶葉カテキンのように苦味や渋味、低水溶性の改善のための CD 包接化は多岐に亘り実用されているにも関わらず、包接機構などの基礎的知見が未だ全く解明されていない。本論文は、親水性化合物の CD 包接機構と複合体の水溶液中最安定構造、熱力学的安定性等を計算化学によって明らかにしたものである。計算モデルには、ホスト分子に β CD およびゲスト分子に 6 種のカテキン、(-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCg), (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin gallate (ECg), (-)-gallocatechin (GC), (-)-gallocatechin gallate (GCg)、および ionized EGCg を用いている。これらのカテキンは複数の親水性被包接部位を有し、定説のエントロピー駆動によって疎水性空洞内に包接されるとは考えられない分子である。

第 1 章では、初めに各カテキン分子および β CD について配座解析、半経験的分子軌道計算法 (PM3 法) および密度汎関数法 (DFT 法) により水相中の最安定構造を決定した。包接複合体形成については、カテキンの各被包接部位に設定した基準原子と β CD 空洞内に設定した分子内平面との距離が異なる種々初期モデルから計算を開始し、複合体の最低エネルギーと包接位置を同時に算出するという新規な手法を取り入れた。最終的に水相中で構造最適化することで、各包接複合体についてエネルギー的に最安定の構造を探索した後、複合体形成による相互作用安定化エネルギーを算出した。さらに、実座標として水分子を取り込んだ分子動力学計算により、水溶液中包接複合体の挙動から複合体の安定性を視覚化した。その結果、カテキンの β CD 空洞内包接には、galloyl 基の有無、B 環の水酸基数、および C 環の 2 位または 3 位の炭素に結合する置換基の立体配置の違いが包接化に大きく影響することをつきとめた。さらに、各カテキンの最安定構造を比較することで、包接複合体の安定化にはカテキンと β CD との間に形成される複数の分子間水素結合が関係していることを証明した。

第 2 章では、塩基性条件下で galloyl 基がイオン化することを利用し、種々 pH の水溶液で NMR 測定および等温滴定量熱測定 (ITC) を行い、第 1 章の計算結果を検証した。¹H-NMR 測定で得られた β CD 空洞内プロトンのシフト変化と ROESY クロスピークによって、非イオン形 EGCg は 2 種類 (A 環と galloyl 基の包接) およびイオン形 EGCg は 1 種類 (A 環包接) の複合体、EGC はただ 1 種類 (A 環包接) の複合体が形成されるという計算結果が実証された。ITC では、反応熱量解析により複合体形成のモル比、形成定数、熱力学的パラメータを算出し、カテキンの包接複合体形成における熱力学的特性を見出した。特に、galloyl 基を有す EGCg、ECg、

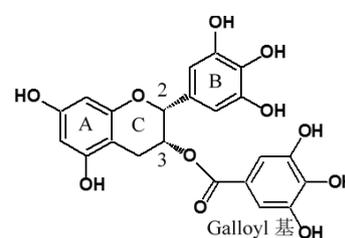


Fig. EGCg の化学構造

EGCg、ECg、

GCg はモル比 1:1 で 2 種類、一方の EGC、EC、GC はモル比 1:1 で 1 種類の包接複合体が形成されることおよび複合体の安定性にはエンタルピーが寄与していることを解明した。

第 3 章では、カテキンのような複数の親水性被包接部位を有する化合物と CD との包接複合体形成は、主として分子間水素結合によるエンタルピー駆動で進行するという理論が展開された。カテキン A 環の包接化はエネルギー的には不利であるが β CD の第一級水酸基との水素結合で空洞内に深く包接されていくこと、一方、カテキン galloyl 基の包接化はエネルギー的に最も有利で、その主要因も包接化によって形成される分子間水素結合であるという新規知見が論述された。

この研究は、実験では解決不能な複合体の形成機構、水溶液中最安定構造および分子間相互作用について、量子化学計算および分子動力学計算を用いると十分解明でき得ることを証明している。そして、それは実験系を主体とする薬学分野に計算化学を実用するさきがけとなるであろう。以上の結果、本論文は博士学位に値するものであると評価される。