

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

大波多 友規

福岡大学薬学部薬品物理化学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Thermodynamic elucidation for the formation mechanism of inclusion complex between catechin with multiple inclusion sites and β -cyclodextrin

Tomonori Ohata

Physical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Numerous polyphenols are contained in tea leaves, the most important of which are flavan-3-ols and their gal-
lates, referred to as 'catechins'. These two types of catechins have different physical properties due to the presence
or absence of a galloyl group. Cyclodextrins (CDs) generally form some inclusion complexes with hydrophobic
molecules. However, polyphenol catechins have been included by CDs and the bitterness and the astringency were
reduced. In this study, the formation mechanism of inclusion complex between (-)-epigallocatechin gallate (EGCg),
that is main component of tea leaves, and β -cyclodextrin (β -CD) was studied by molecular modeling calculation
(MMC), $^1\text{H-NMR}$ and isothermal titration microcalorimetry (ITC). MMC studies clarified that two rings of EGCg
(A-ring and G-ring) could include in the cavity of β -CD in water. The A-ring of EGCg being deeply inserted into
the cavity of β -CD since the steric hindrance of B-ring or G-ring was small. The G-ring of EGCg was included in
 β -CD cavity to form an energetically the most stable complex by six intermolecular hydrogen bonds. $^1\text{H-NMR}$
spectroscopy and ITC measurements supported these results. These results suggested that when determining the
structures of inclusion complexes in an aqueous solution, MMC might be indispensable to discuss the inclusion
mechanism between cyclodextrin and guest molecules such as catechins with some insertable sites.

keywords : catechins, cyclodextrins, inclusion complex, molecular modeling calculation, hydrogen bonding inter-
action

【緒言/目的】

近年、コンピュータの演算速度の高速化や磁気ディスク容量の拡大に伴い、量子化学計算を始めとする
計算化学的手法は、薬物間の相互作用解析や創薬のための *in silico* スクリーニングに応用されている
[1,2]。分子間に働く相互作用には静電的相互作用、双極子間相互作用、水素結合による相互作用、疎水
性相互作用等がある。水素結合による相互作用エネルギーは $10 \sim 40 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、他の相互作用に比
べて非常に大きい [3]。多くの薬物分子は構造中に水酸基、アミノ基やカルボキシ基等の官能基を有する。
そのため、水溶液中では薬物同士あるいは薬物と他の物質との相互作用、特に先述した官能基を介した
分子間水素結合の形成により、薬効減弱の可能性が考えられる。例えば、統合失調症治療薬である

risperidone (RISP) 内用液は、茶葉抽出飲料で希釈すると RISP 含量が低下する[4]。この含量低下は、RISP と茶葉抽出飲料に含まれるカテキン類、特に (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) とモル比 1:1 の不溶性複合体を形成することに起因し、RISP のピペリジン環窒素と EGCg のガロイル基にある水酸基との間で形成される分子間水素結合が重要であると報告されている [5]。カテキン類は flavan-3-ols を基本骨格とするポリフェノールの一種であり、水溶性向上や苦味軽減を目的として cyclodextrins (CDs) による包接化が行われている。CDs の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めて稀である。そのため、カテキン類のようなポリフェノールと CDs 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。

本研究では、複数の被包接部位を有するゲスト分子と β -cyclodextrin (β -CD) との包接複合体形成機構を明らかにするため、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) によって、ゲスト分子と β -CD の包接モード (構造) を決定した。包接複合体形成による相互作用安定化エネルギーおよび分子間に形成された水素結合を基に、包接複合体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 (ITC) 測定によって計算結果を実証した。

【実験方法】

1. 計算化学を用いた分子間相互作用の予測

β -CD 空洞内に包接されるゲスト分子として、3か所の被包接部位 (A 環, B 環および G 環) を有する EGCg を用いた (Fig.1)。はじめに、ChemBio3D[®] を用いて EGCg および β -CD の初期構造を作成し、CONFLEX ver.6.12a による配座解析を行った [6, 7]。次いで、創出された配座異性体のうち立体エネルギーが最小である配座から $+12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ の範囲内にある配座について、PM3 法による気相中での構造最適化 (GAMESS Ver.12) を行い、さらに DFT 法による水相中での構造最適化 (Gaussian 09 rev E.01) を行った [8, 9]。それぞれの配座の全エネルギー (E_{total}) を比較し、最終的に、 E_{total} が最小の構造を最安定構造とした。これらの最安定構造は、包接複合体作成のための初期構造として使用した。

β -CD 二級水酸基側の内径は一級水酸基側に比べて大きく、約 900 pm であり、種々のゲスト分子を二級水酸基側から空洞内に包接することができる。1,3-ベンゼンジオール (A 環) の酸素原子間距離はおよそ 480 pm であるため、EGCg の A 環, B 環または G 環は β -CD 空洞内に包接される可能性が考えられる。Fig.2 に示すように、各芳香環が β -CD の二級水酸基側から空洞内に包接する場合 (EGCg_A- β CD, EGCg_B- β CD または EGCg_G- β CD) を検討した。ゲスト分子の各環に設けた基準炭素原子と、 β -CD 空洞内に設定した平面との距離を r (pm) とし r 値を 400 pm から -100 pm まで 100 pm ずつ変化させた 6 種の初期入力構造を作成した。作成した構造は、DFT 法による水相中での構造最適化を行った。最適化構造の全エネルギー (E_{complex}), EGCg および β -CD の最安定構造における全エネルギー (E_{EGCg} および $E_{\beta\text{-CD}}$) から、次式を用いて相互作用安定化エネルギー (ΔE) を算出した。

2. $^1\text{H-NMR}$ 測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルは JNM-ECZ600R (日本電子) を用いて 600 MHz で測定した。二重管の外管に試料溶液、内管に D₂O 溶液を入れ、presaturation 法を用いて ROESY スペクトルを測定した。pH3.0 HCl 溶液または pH8.5 NaHCO₃ 溶液を用い、EGCg と β -CD を混合した溶液を試料溶液とした。

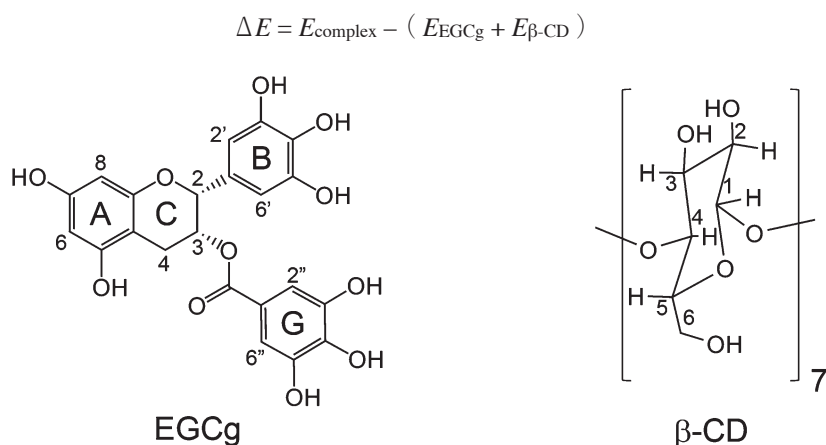


Fig.1 Chemical structures of EGCg and β-CD

The numbers of these structures represent the hydrogen atom attached to the ring according to IUPAC. Symbols in the phenyl group of EGCg represent the names of the rings.

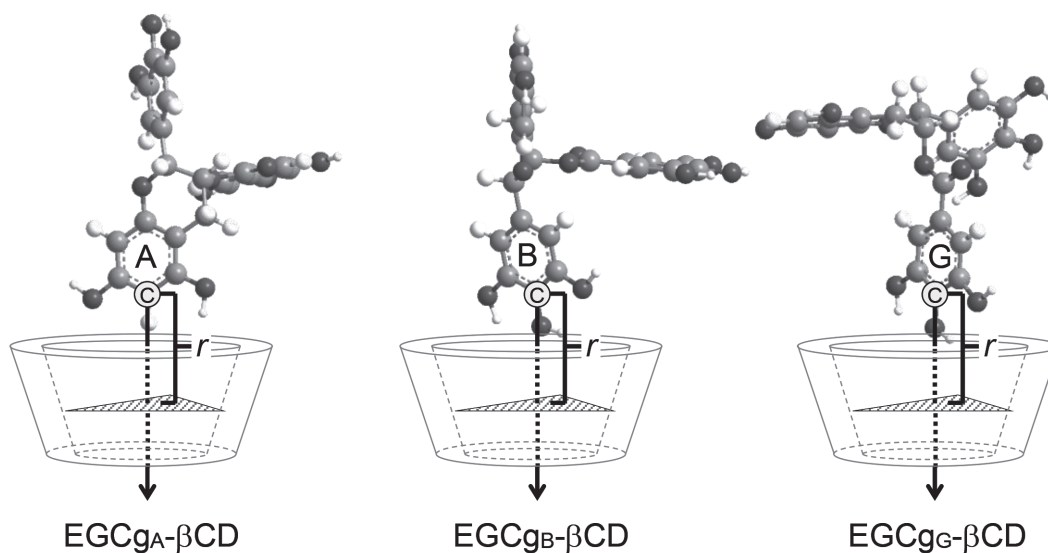


Fig.2 Initial structures of inclusion complex between EGCg and β-CD for MMC

3. 等温滴定マイクロ熱量測定

反応熱量の測定は、Thermal Activity Monitor 2277型 (Thermometric 社製, Sweden) を用いて、298.15Kで行った。pH4.5からpH8.5に調製したリン酸緩衝液を用い、0.5 mMのEGCg溶液を初濃度10 mMのβ-CD溶液で滴定した。熱量滴定曲線から複合体形成定数 (K)、化学量論比 (n) および熱力学的パラメータ (自由エネルギー変化: ΔG , エンタルピー変化: ΔH およびエントロピー変化: ΔS) を算出した。

【結果・考察】

1. 計算化学を用いた分子間相互作用の予測

EGCgの配座解析では、165個の配座異性体が創出された。これらの配座は、ジヒドロピラン環であるC環の立体構造が異なる Conformer A および Conformer E に大別された (Fig.3)。最小の立体エネルギー値を有する配座から +12.6 kJ mol⁻¹ の範囲内には Conformer A のみが11 個含まれ、存在比率の総和は全体

の96.9 %を占めた (Table 1)。化学的に有意な配座は全てこの範囲内に含まれていることが示唆された。これらの配座についてDFT 法による水相中での構造最適化を行い、最小の E_{total} 値を有する配座を最安定構造とした。EGCgの最安定構造はA環, C環およびB環がほぼ同一平面上に位置し, G環はA環に対して垂直に位置した (Fig.4)。 β -CDの水相中における最安定構造はEGCgと同様の方法で算出した (Fig.4)。

EGCgと β -CDの水相中における包接複合体の最安定構造を求めるため, EGCgの各環の基準原子が β -CDの二級水酸基側の縁よりやや上位に位置する $r = 400$ pmから, β -CD空洞内に位置する $r = -100$ pmまで変化させた6種の初期入力構造を作成し, 構造最適化を行った。ただし, EGCg_A- β CDの $r = -100$ pmの初期入力構造は, EGCgの2" 位炭素原子と β -CDの3位酸素原子が接近しすぎたため, 構造最適化を行うことはできなかった。

Fig.5 は, EGCg_A- β CD 5種, EGCg_B- β CD およびEGCg_G- β CD各6種の最適化構造について, r 値を横軸に, 対応する ΔE 値を縦軸に示した。全ての最適化構造の ΔE 値を比較したとき, EGCg_A- β CDおよびEGCg_G- β CDの ΔE 値はEGCg_B- β CDよりも小さい傾向であった。そのため, 水相中において, EGCgはB環に比べてA環やG環が β -CDの空洞内に包接されやすいことが考えられた。 ΔE 値の最小値はEGCgのG環が β -CD空洞内中央に位置した複合体構造であった (Fig.6)。この複合体構造は6か所の分子間水素結合を形成し, 複合体は大きく安定化されることが明らかとなった。EGCg_A- β CDでは, A環が β -CD空洞内に最も深く包接された複合体構造が得られた (Fig.6)。EGCgのA環はC環と結合しているため, B環お

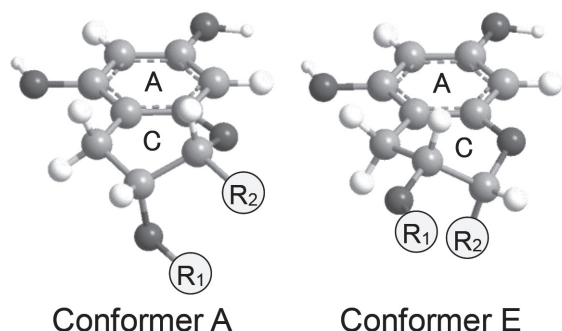


Fig.3 Puckering structures of EGCg R₁ represent galloyl group, R₂ represent pyrogallol group.

Table.1 Conformational search results of EGCg

Energy range / kJ mol ⁻¹	Sum of conformers		Population of conformers / %
	A	E	
0 ~ 4.2	1	0	74.6
4.2 ~ 8.4	3	0	14.8
8.4 ~ 12.6	7	0	7.5
12.6 ~ 16.7	7	3	2.4
16.7 ~ 20.9	6	9	0.6
20.9 ~ 25.1	10	7	0.1
25.1 <	74	38	0.0

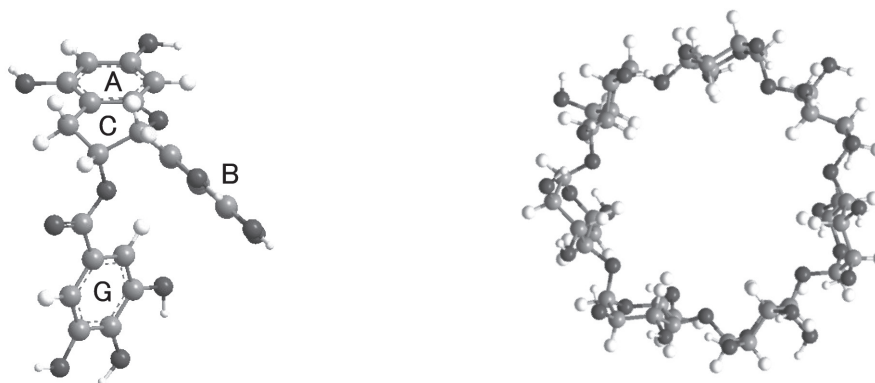


Fig.4 Most stable conformers of EGCg (left) and β -CD (right) in water

よびG環と立体的に離れている。そのため、A環は深く、さらにはC環も β -CD空洞内に包接されたと考えられる。一方、B環が包接された複合体は、Fig.8に示す最安定構造に比べ ΔE 値は $+23 \text{ kJ mol}^{-1}$ 以上大きいことが判明したため、EGCgのB環は β -CD空洞内にほとんど包接されないことが示された。

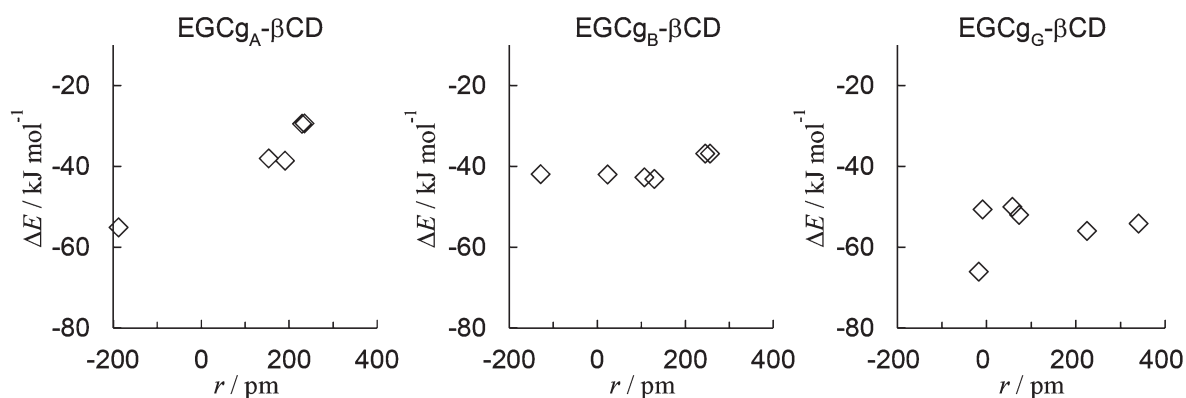


Fig.5 The optimized stable energy in water during complexation between EGCg and β -CD

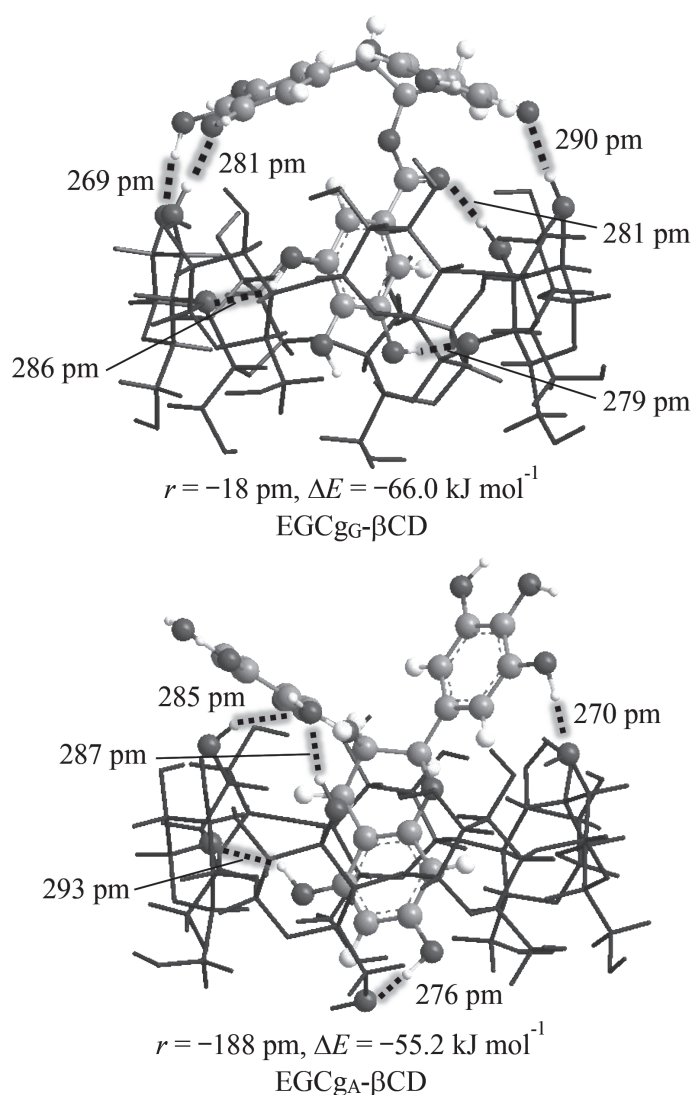


Fig.6 Most stable structures of inclusion complex between EGCg and β -CD in water

2. 核磁気共鳴スペクトル測定

EGCg は $pK_a = 7.5$ であり、水溶液中では分子形およびイオン形が存在する (Fig.7)。EGCg 分子形分率がほぼ 100% である pH3.0、およびイオン形が約 91% 存在する pH8.5 溶液中で ROESY スペクトルを測定した。EGCg の H-6 および H-8 は重水置換されやすいため、pH3.0 HCl 溶液および pH8.5 NaHCO_3 溶液を使用し、presaturation 法を用いた [10]。

EGCg と β -CD を混合した場合、pH3.0 溶液中では β -CD の 3-H と EGCg の H-6 (H-8)、H-2' (H-6')、および H-2'' (H-6'')、 β -CD の 5-H と EGCg の H-6 (H-8) とのクロスピークが観測された。pH8.5 溶液中では、 β -CD の 3-H と EGCg の 2' (H-6')、 β -CD の 5-H と EGCg の H-6 (H-8) との 2 種類のクロスピークが観測された。溶液 pH に関わらず β -CD の 5-H と EGCg の A 環 H-6 (H-8) とのクロスピークおよび β -CD の 3-H と EGCg の B 環 H-2' (H-6') とのクロスピークが観察された。これらの結果により、分子形およびイオン形に関わらず EGCg の A 環が β -CD 空洞内に包接された包接複合体 (Fig.9 左) が示唆された。さらに、 β -CD の 3-H と EGCg のガロイル基の H-2'' (H-6'') とのクロスピークが酸性溶液でのみ観察された。すなわち、分子形の EGCg では、ガロイル基が 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 (Fig.9 右) が形成されていることを示唆している。

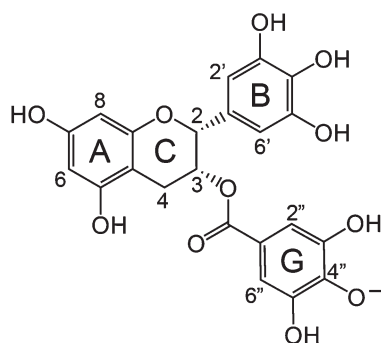


Fig.7 Ionic form of EGCg

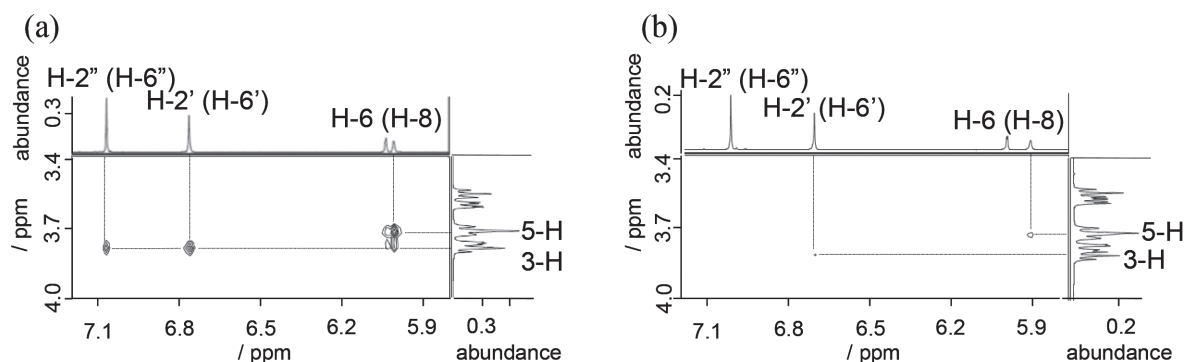


Fig.8 ROESY spectra of EGCg and β -CD mixtures in pH3.0 HCl solution (a) and pH8.5 NaHCO_3 solution (b) at 308 K

In ROESY spectra, the symbols shown on the X and Y axes represent the protons of EGCg and β -CD molecules, respectively.

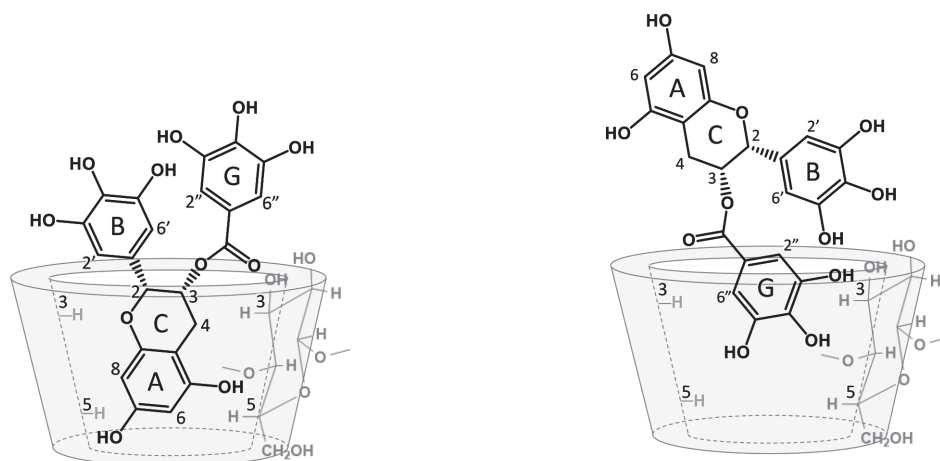


Fig.9 Two expected types of inclusion complexes for EGCg-βCD.

3. 等温滴定マイクロ熱量測定

EGCgおよびβ-CDをpH4.5～8.5のリン酸緩衝液に溶解し反応熱量を測定することで、包接複合体形成に対する溶液pHの影響を検討した。熱量滴定曲線は、溶液中で2種の包接複合体が同時に形成することを仮定して解析した。



ただし、 K 値の大きい順 ($K_1 > K_2$) に第1複合体および第2複合体とし、第1複合体はモル比1:1 ($n_1 = 1.0$) で形成すると仮定した (Table 2)。

EGCgとβ-CDの第1複合体形成について、 K_1 値および ΔH_1 値はpHに関係なくほぼ一定となった。各パラメータの平均値は、 $K_1 = 7430 \pm 168 \text{ M}^{-1}$ 、 $\Delta H_1 = -47.2 \pm 4.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ および $\Delta S_1 = -84.6 \pm 14.8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であった。 ΔH_1 値および ΔS_1 値が負に大きいため、第1複合体形成は主として水素結合が関与していると考えられる。一方、 n_2 値、 K_2 値および $-\Delta H_2$ 値はpHの上昇に伴い減少し、特にpH8.0およびpH8.5においては、これらの減少は顕著であった。すなわち、塩基性溶液中では、第2複合体はほとんど形成されないと考えられる。

EGCgはG環4'位の水酸基がイオン化され、その割合はHenderson-Hasselbalch式によれば、pH4.5で0.10%、pH7.5で50%、pH8.5で91%とpH上昇に伴い増加する。第1複合体形成における種々熱力学的パラメータにpH依存性がなかったことは、イオン化に関係しないA環またはB環がβ-CD空洞内に包接されたことが推定される。一方、第2複合体はpHの上昇に伴い、 n_2 値は1.0から0.5に、 K_2 値は 3250 M^{-1} から 180 M^{-1} に減少した。β-CDの空洞内は疎水性であり、ゲスト分子はイオン形よりも分子形の方がβ-CDの疎水性空洞内に包接されやすい [11]。それゆえ、第2複合体はガロイル基がβ-CD空洞内に包接された包接複合体であり、pHの上昇に伴いβ-CDとの1:1の複合体が形成されにくくなったと考えられる。¹H-NMR測定結果で得られた包接複合体構造を考慮すると、第1複合体はpH変化に依存しないA環がβ-CD空洞内に包接された包接複合体であり、第2複合体はEGCgのガロイル基がβ-CD空洞内に包接された包接複合体であると考えられる。

Table.2 Best-fit values of stoichiometries, association constants and thermodynamic parameters for complexation between EGCg and β -CD at 298.15 K and 101.32 kPa

pH	n_1	K_1	$-\Delta G_1$	$-\Delta H_1$	ΔS_1	n_2	K_2	$-\Delta G_2$	$-\Delta H_2$	ΔS_2
4.5	1.0	5040	21.1	44.3	-77.8	1.0	3250	20.0	59.8	-134
5.3	1.0	6470	21.7	48.4	-89.5	0.9	1640	18.3	42.3	-80.6
6.0	1.0	7120	22.0	45.1	-77.7	0.8	1220	17.6	39.5	-73.4
6.5	1.0	5020	21.1	42.3	-71.2	0.7	599	15.8	28.1	-41.2
7.0	1.0	9450	22.7	44.2	-72.1	0.6	292	14.1	24.1	-33.8
7.5	1.0	8210	22.3	43.7	-71.5	0.5	180	12.9	19.1	-20.7
8.0	0.8	3360	20.1	32.8	-42.5	0.3	43	9.3	5.8	11.8
8.5	0.8	2520	19.4	49.2	-100	0.3	50	9.7	7.7	6.5

【総括】

カテキン類のように複数の親水性被包接部位を有するゲスト分子について、分子間水素結合によるエンタルピー駆動でCDsの疎水性空洞内に包接されることが明らかとなった。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、計算化学的手法を用いることで十分解明出来得ることが証明された。今後、人工知能をはじめとするコンピュータ技術が発展することによって、計算化学的手法は、体内における薬物動態や薬物と生体物質との相互作用に関する詳細な解析を可能とすることが期待される。

【参考文献】

1. Inaba S., Fukada H., Oda M., *J. Therm. Anal. Calorim.*, **131**, 335-341 (2018).
2. Yamanishi Y., *Yakuzaigaku*, **78**, 77-81 (2018).
3. Linus P., "The nature of the chemical bond" ed. by Cornell University Press, New York, pp. 407-456.
4. Hatsumi A., Yasuhiro O., Takayoshi K., *J. Therm. Anal. Cal.*, **32**, 190-198 (2006).
5. Ikeda H., Moriwaki H., Matsubara T., Yukawa M., Iwase Y., Yukawa E., Aki H., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 145-153 (2012).
6. Goto H., Osawa E., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8950-8951 (1989).
7. Goto H., Osawa E., *J. Chem. Soc.*, **2**, 187-198 (1993).
8. Murata S., "The Fifth Series of Experimental Chemistry" ed. by The Chemical Society of Japan, Tokyo, pp. 54-65.
9. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, "Gaussian 09", Revision D.01; Gaussian, Inc., USA) Gaussian, Inc., Wallingford CT (2013).
10. Ishizu T., Kintsu K., Yamamoto H., *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8992-8997 (1999).
11. Uekama K., *YAKUGAKU ZASSHI*, **101**, 857-873 (1981).