

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655136

研究課題名(和文) 生体超分子系の機能制御を目指した人工超分子系の創出

研究課題名(英文) Development of supramolecular systems for the regulation of bio-supramolecular functions

研究代表者

袁 德其 (Yuan, De-Qi)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70304962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：cucurbit[7]urilの効率的合成法および分離精製法を確立したうえ、cucurbit[7]urilとアセチルコリンを含む多種多様のゲスト分子との包接挙動について検討を行った。アセチルコリンに対してcucurbit[7]urilはアセチルコリンレセプターに匹敵する結合親和性を有することを明らかにした。また、cucurbit[7]urilは、主に疎水性相互作用によりコリンなどのオニウムイオンを空洞に取り込み安定な包接錯体を形成すること、類似した形状の中性分子に対してはより高いエネルギー障壁を直面することを解明した。

研究成果の概要(英文)：An convenient method has been established for the synthesis and purification of cucurbit[7]uril. The binding behavior of cucurbit[7]uril and a large variety of guest compounds including acetylcholine and their analogs has been investigated. Cucurbit[7]uril binds acetylcholine with very strong affinity that competing natural acetylcholine receptors. It was clarified that cucurbit[7]uril binds the onium ions deep in its cavity to form very stable inclusion complexes. Cucurbit[7]uril also forms stable inclusion complexes with neutral guests of the similar shape and size to that of onium ions but confronts much higher energy barriers.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：超分子化学 人工レセプター 分子認識 cucurbit[n]uril

## 1. 研究開始当初の背景

生体の中では、抗原-抗体やリガンド-受容体など数多くの超分子系が生命活動を営んでいる。それらの仕組みを解明する、またはそれらの機能を模倣し超越できる人工レセプターを創出することは、生命科学の大きな目標の1つである。中でも、神経伝達に重要な役割を担っているアセチルコリン(Ach)の人工レセプターの創製は特に注目を集めている。Ach 受容体は Tyr 残基から構成されたポケットにカチオン-相互作用により Ach を結合しているため、カリックスアレーンを土台とした人工的 Ach レセプターの開発は数多く報告され、中には Ach に対する親和性が  $K_a = ca 10^5 M^{-1}$  に達しているものもある (J. Rebek, *et. al. Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3150)。これとは対照的に、疎水性相互作用を主に利用するシクロデキストリンなどのホスト分子は、Ach のようなオニウムイオンに対して親和性をほとんど示さない。筆者らは、7つのグリコウリル単位から構成された樽型の cucurbit[7]uril (Q[7]) が Ach に対して Ach 受容体に匹敵する結合親和能を持ち、疎水性相互作用によって Ach を空洞に取り込むことを発見した。これは、疎水性相互作用によって4級アンモニウムを強く結合する初めての例であり、それまでにカチオンがクーロン力によってウレア基の酸素原子から構成した Q[n]の入口に結合されるという常識を打ち破った(第26回シクロデキストリンシンポジウム、2009年9月、宇都宮)。しかし、純粋な Q[7]は入手困難であり、その化学的修飾は Q[n]に基づく人工レセプターの創出に避けて通れない厚い壁でした。

## 2. 研究の目的

Q[7]および官能化 Q[n]の効率的合成法を確立するとともに、Q[7]による新規の分子認識能を発見し、Q[7]の超分子形成を制御する要因について究明する。また、生体超分子系を凌駕する人工的超分子系を創出し、人工的超分子系による生体超分子系の機能制御に向けた超分子化学的基盤を築く。

## 3. 研究成果

**Q[n]誘導体の合成:** Q[7]の逆相クロマトグラフ分離精製法を初めて確立し、純粋な Q[7]を効率的に入手することを可能にした。また、メチルグリコウリルおよびグリコウリルを 1:6:14 のモル比で反応させ、モノメチル Q[6]を初のモノ置換 Q[n]誘導体として14%の収率で合成し、2次元 NMR スペクトル解析により構造を決定した。

Q[7]とアミノ酸、ジペプチド、Ach 類縁体、カルボン酸、アミドなど多量のゲスト分子と

の結合定数は、アクリジンオレンジを指示薬とした競合的蛍光滴定により求めた。主な結果は Table 1 にまとめる。

**-アミノ酸の分子認識:** 8種類の -アミノ酸について調査した結果、Gly の結合は最も弱く、His、Try、Lis、Met、Leu の順に結合定数が少しずつ増加したが、いずれも弱い結合しか示さなかった。一方では、Tyr および Phe ははるかに強い結合を示した。NMR 測定の結果に基づき、Gly、Try および Lis では、 $H_3N^+$ 基が Q[7] の入口に結合し、親水性置換基は空洞の外に位置していると推測される。一方では、Leu、Tyr および Phe は  $H_3N^+$ 基を通じて Q[7] の入口に結合しながら、疎水性の置換基を空洞内に配置させている。

**-アミノ酸の分子認識:** カルボン酸基が Q[7]空洞に包接されることは報告されておらず、-アミノ酸の検討においてもそれを証するデータは得られなかった。ところが、

-アミノ酸について検討を行ったところ、極性のカルボン酸基が Q[7]空洞に包接されるという驚くべき結果を得た。Table 1 に示すように、-アミノ酸の結合能が、 $CH_2$ 数の増加に伴い有意に向上し、7-アミノヘプタン酸で最大値に達する。これは、カルボン酸基が Q[7]の空洞内に包接されていることを強く示唆する結果である。直接的証拠は NMR 測定から得られた。-アラニンは錯体を形成すると、-H および -H にそれぞれ-0.77 ppm および-0.48 ppm の大きな高磁場シフトを示した。これは -アラニンの二つの  $CH_2$  が Q[7]の空洞に位置し、- $CH_2$ よりも - $CH_2$ が空洞の中心に近いことを表している。また、各々の  $CH_2$  のケミカルシフト変化から、ゲスト分子の長さの増加に伴い、COOH が空洞の中心に向かって伸びていき、そして、中心を通り越して出口へ向かうイメージを容易に作ることができる。さらに、包接に関わる自由エネルギー変化 ( $G^0$ ) と  $CH_2$ 数 (2~6) との間が良い直線関係が得られた。

**ジペプチドの分子認識:** 3組のジペプチドについて調査した結果、芳香環を N 末端にもつジペプチドは、逆の配列を取ったジペプチドより 500 倍以上強く認識されることが分かった。この高い選択性は、Q[7]の疎水性空洞および極性の入口の共同的働きによるものと推測される。空洞に結合しながらも入口と静電気相互作用または水素結合形成できるゲストがより強く認識される。

**アセチルコリン類縁体の分子認識:** 神経伝達物質として重要な役割を演じているアセチルコリン (Ach) は、Ach レセプターの Trp や Tyr 残基から成る結合部位にカチオン-相互作用により結合すると考えられている。シクロデキストリンなど主に疎水性相互作用を利用するホスト分子は Ach に対して殆んど結合能を示さないため、現在まで報告されている人工 Ach レセプターの多

**Table 1. Association constants for the 1:1 complexes of Q[7] with some bio-inspired guests**

Guest	$K_a$ /mM	Guest	$K_a$ /mM	Guest	$K_a$ /mM
<b><math>\alpha</math>-amino acids</b>		<b><math>\omega</math>-NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH</b>		<b>onium ions and related species</b>	
L-Ph-alanine	44	$n = 2$	0.76	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH · Cl <sup>-</sup>	1200
L-tyrosine	11	3	2.6	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OAc · Cl <sup>-</sup>	310
L-tryptophan	0.47	4	15	Me <sub>4</sub> N <sup>+</sup> OH <sup>-</sup>	600
D-leucine	1.8	5	145	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> Ph · I <sup>-</sup>	4900
L-methionine	1.1	6	347	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	7.8
L-histidine	0.26	8	1560	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> CH(OAc)CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1.9
L-lysine	1.0	tulobuterol	2670	Bu <sub>3</sub> N <sup>+</sup> · I <sup>-</sup>	0.59
glycine	0.12	<b>H(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H</b>		Me <sub>3</sub> CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	830
<b><math>\omega</math>-NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H</b>		$n = 1$	0.11	Me <sub>3</sub> P <sup>+</sup> Ph · I <sup>-</sup>	1030
$n = 2$	0.6	2	0.42	Me <sub>3</sub> S <sup>+</sup> O · Br <sup>-</sup>	18
3	9.4	3	1.3	Me <sub>3</sub> S <sup>+</sup> · Br <sup>-</sup>	136
4	13	4	2.8	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub> · Br <sup>-</sup>	880
5	130	5	3.0	Me <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub> · Br <sup>-</sup>	290
6	230	6	7.7	neostgmime bromide	63
7	200	8	28	cetyl pyridinium chloride	80
<b>dipeptides</b>		10	67	vercuronium Bromide	82
Gly-Phe	0.9	<i>t</i> -BuCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	1040	succinylcholine cholride	1560
Phe -Gly	815	<b>aromatic guests</b>		<b>steroids and sugars and <i>o</i>-carborane</b>	
Gly-Trp	0.28	phenol	24	cholesterol	142
Trp-Gly	138	<i>p</i> -chlorophenol	5.2	chenodeoxycholic acid	213
Gly-Tyr	0.57	<i>p</i> -cresol	6.1	lithocholic acid	79
Tyr-Gly	524	<i>p</i> -ethyl phenol	3.9	ursodeoxycholic acid	53
<b><i>N</i>-acyl-homoserine lactone</b>		<i>p</i> - <i>i</i> -Pr-phenol	7.3	glucose	52
<i>N</i> -pentanoyl	1.6	<i>p</i> - <i>t</i> -Bu-PhOH	146	galactose	43
<i>N</i> -hexanoyl	2.9	<i>p</i> - <i>t</i> -Bu-PhNH <sub>2</sub>	1460	fructose	182
<i>N</i> -heptanoyl	29	<i>p</i> - <i>t</i> -Bu-PhCO <sub>2</sub> H	214	mannose	455
<i>N</i> -octanoyl	125	Me <sub>3</sub> SiPh	119	<i>o</i> -carborane	145

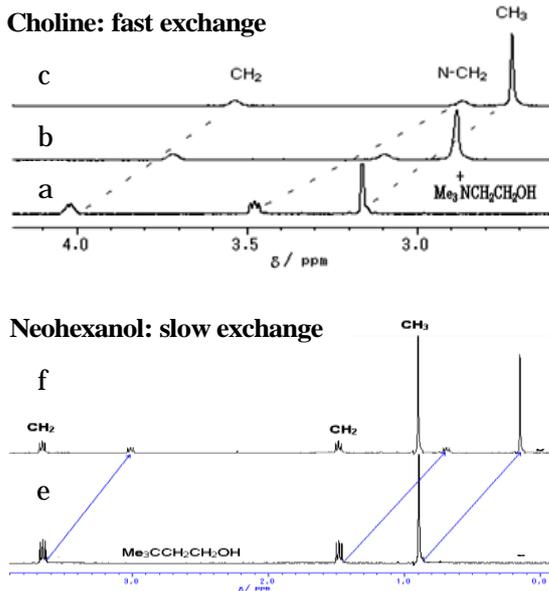
**Table 2. Isothermal calorimetric titration data for the complexation of Q[7]**

Guest	$K_a / 10^6 M^{-1}$	$\Delta H$ (kcal · M <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal · M <sup>-1</sup> · K <sup>-1</sup> )	$n$
choline	4.26 ± 0.23	-7.8 ± 0.0081	4.16 ± 0.018	0.99 ± 0.001
acetyl choline	1.93 ± 0.11	-8.7 ± 0.027	-0.55 ± 0.027	0.99 ± 0.002
neohexanol	3.68 ± 0.23	-13.1 ± 0.037	-13.9 ± 0.037	1.02 ± 0.001

くはカリクスアレーンに基づくものであり、Ach のセンシングを目的としている。本研究において、Ach およびその類縁体に対する Q[7] の結合能について調査したところ、Q[7] は Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup> を強く認識することが分かった。驚いたことに、十分に競合できる疎水部位が存在しない限り、Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup> は負の電荷を帯びる空洞入口ではなく、空洞の奥に結合

する。類似構造を持つコリンおよびネオヘキサノールは荷電状態が異なるが、ほとんど同じ強度で Q[7] に結合し類似した錯体構造を形成する。これは、コリンが主に疎水性相互作用により包接錯体を形成していることを強く示唆する。また、このことは、ICT 滴定による熱力学的検討結果 (Table 2) によって支持されている。

面白いことに、コリンとネオヘキサノールはほぼ同じ結合能を示したが、錯体の動的特性が明らかに異なる (Fig. 1)。コリンは Q[7] の空洞を貫通しやすく、速やかに Q[7] の空洞を出入りすることができるが、中性のネオヘキサノールは Q[7] 空洞の入口を通過し難く、NMR スペクトル上では空洞内外のネオヘキサノール分子が明白に区別されている。



**Fig. 1**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of choline in the absence (a), and presence of 0.66 (b), 1 eq Q[7] (c), and neohexanol in the absence (e) and presence of 0.5 eq Q[7] (f)

その他のゲスト：胆汁酸や細菌の情報伝達物質である *N*-アシルホモセリンラクトン類縁体など多種の生体関連物質に対する Q[7] の分子認識挙動について検討を行い、結合能を評価した。Q[7] はこれらのゲスト分子に強い親和能を示すことが明らかとなった。Q[7] が *N*-アシルホモセリンラクトン誘導体に対して  $1.25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  に及ぶ強い結合能を示したことは特に興味深い。これは、細菌の増殖に影響を与えず、耐性を起こさない新型抗菌剤の開発に寄与すると期待される。

各種のゲスト分子に対する親和能および錯体の構造などに関する情報を総合的に解析し、Q[7] の超分子形成を制御する重要なファクターについて検討を行い、重要な知見を得た。

Q[n] の官能化：Kim らによって報告された Q[n] のパーヒドロキシ化法を参考に Q[n] のヒドロキシ化を精力的に検討したが、目的物を得られず、当初計画した Q[n] の二量体の創出を実行することができなかった。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. M. A. Mostafa, K. Koga, M. Fukudome, H. Sasaki, D.-Q. Yuan, Synthesis and Binding Behaviors of Monomethyl Cucurbit[6]uril, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 646 ~ 4649.

[学会発表](計 7 件)

1. 堺洋子, 小塩和人, 楊成, 福留誠, 袁德其, AHL 類クオルモン人工レセプターの合成と分子認識機能、第 61 回日本薬学会近畿支部大会, 2011 年 11 月, 神戸.
2. D.-Q. Yuan, K. Koga, M. Fukudome, Syntheses of Cyclomannins from Cyclodextrins, The 16th International Cyclodextrin Symposium, 2012 年 5 月, Tianjin, China. (招待講演)
3. M. Fukudome, K. Fujita, D.-Q. Yuan, Site-specific Cleavage of Modified Cyclodextrins to Linear Oligosaccharides, The 16th International Cyclodextrin Symposium, 2012 年 05 月, Tianjin, China. (招待講演)
4. 福留誠, 内藤潤, 藤田佳平衡, 袁德其, シクロデキストリン二級水酸基側ヘテロ二官能化を経由する修飾マルトヘプタオースの合成と構造, 第 29 回シクロデキストリンシンポジウム, 2012 年 9 月, 東京.
5. 瀧本竜哉, 山内章嗣, 杉田康, 橘亮介, 袁德其, 佐々木秀明, アシルホモセリンラクトンをターゲットとする人工レセプターの合成を目指した cucurbit[6]uril の水溶化, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 03 月, 横浜.
6. 福留誠, 内藤潤, 袁德其, 藤田佳平衡 重塩酸中におけるシクロデキストリン誘導体閉環反応の NMR 解析, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 03 月, 横浜.
7. 田中詩織, 堺陽子, 古賀和隆, 福留誠, 袁德其, AHL 人工レセプターの創製を目指したシクロデキストリン誘導体の合成と分子認識, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 03 月, 横浜.

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

袁 德其 (YUAN, De-Qi)

神戸学院大学薬学部・教授

研究者番号：7 0 3 0 4 9 6 2