

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860074

研究課題名(和文)茶ガレート型カテキン類を用いた不斉認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the chiral recognition mechanism using tea gallate-type catechins

研究代表者

堤 広之(TSUTSUMI, Hiroyuki)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：00461301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：右手と左手の関係にある化合物(エナンチオマー)は、物理的性質が同じであるため見分けることや分離することが難しい。これまでお茶の主要成分である(-)-エピガロカテキン-3-0-ガレート(EGCg)が、カフェインをはじめ多くの物質を捕捉することを明らかにしてきたが、本課題ではエナンチオマーを見分け、さらに分離するツールに応用できるのではないかと考え研究を行った。カフェインと同程度の大きさの化合物ジケトピペラジンCyclo(Pro-Gly)、また狭心症や不整脈の治療薬として用いられる遮断薬プロプラノロールについて検討したところ、EGCgがこれらのエナンチオマーを見分けることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Enantiomer, which is relationship between the right hand and the left hand, is known to be difficult to discern and separate them because physical properties are the same. In our previous study, it have been revealed that the tea major compound (-)-epigallocatechin-3-0-gallate (EGCg) captures many substances including caffeine. These results led to the idea that EGCg may be available as a new optical resolving agent for natural products and medicines. Chiral recognition of EGCg is investigated using diketopiperazine cyclo(L-Pro-Gly), cyclo(D-Pro-Gly) and sympathetic α -receptor blocker (R)-propranolol, (S)-propranolol, and we reveal that EGCg can discern these enantiomers.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：不斉認識 エピガロカテキン-3-0-ガレート(EGCg) X線結晶構造解析 NMR ジケトピペラジン プロプラノロール

1. 研究開始当初の背景

お茶は世界中で広く飲料や嗜好品として親しまれ、また近年では健康ブームにより、その需要が高まっている。このようなお茶において、クリーミングダウン現象（温かいお茶が冷えると沈殿ができる現象）は、お茶本来の風味や外観を損なうものとして大きな問題となっている。これまでに沈殿成分の大部分は(-)-エピガロカテキン-3-*O*-ガレート (EGCg) や(-)-エピカテキン-3-*O*-ガレート (ECg) などの茶ガレート型カテキン類とカフェインであることが報告されているが、その詳細な立体化学構造やメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究代表者らは、この現象を解明するために EGCg、ECg 水溶液にカフェイン水溶液を加えることにより生じる沈殿をそれぞれ結晶化し、得られた結晶の X 線結晶構造解析を行うことにより、EGCg と ECg は 3 つの芳香環 (A 環、B 環、B' 環) によって形成される疎水性空間に 1 分子のカフェインを捕捉して錯体を形成することを明らかにしている (Fig. 1)。すなわちクリーミングダウン現象は、ガレート型カテキン類とカフェインがこのような錯体を形成するため疎水性が高くなり、結果として水溶液中から沈殿が生じているのだと考えている。

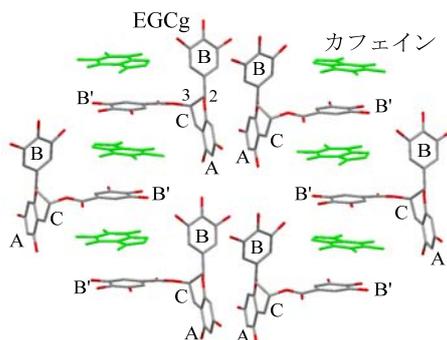


Fig. 1 EGCg・カフェイン錯体

2. 研究の目的

このようなクリーミングダウン現象はお茶の風味や外観を損なうなどマイナス要因でしかなかったが、茶ガレート型カテキン類が 3 つの芳香環 (A 環、B 環、B' 環) によ

て形成する疎水性空間は、カフェイン以外にも様々な有機化合物を認識して捕捉でき、さらに茶ガレート型カテキン類は C 環の 2 位、3 位に不斉炭素を有しているため、不斉認識の場としての利用が期待できる。そこで新たな不斉認識のツール及び光学分割法の開発を目的として本研究課題を遂行した。

3. 研究の方法

茶ガレート型カテキン類である EGCg は、カフェインを疎水性空間に取り込み錯体を形成することが分かっている。そこで EGCg がもつ不斉認識能を検討するために、まずカフェインと同程度の分子サイズの光学活性物質であるジケトピペラジン Cyclo(Pro-Gly) に注目し (Fig. 2)、以下に示す方法で検討を行った。さらに、医薬品に対して応用できるか調べるために、通常ラセミ体で用いる交感神経 β 受容体遮断薬のプロプラノロールを用いて同様に検討を行った。

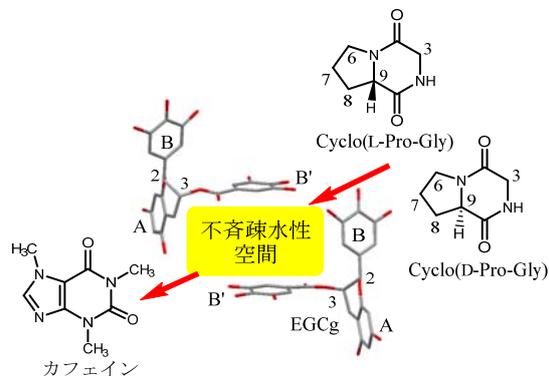


Fig. 2 不斉疎水性空間の利用

茶ガレート型カテキン類・光学活性物質錯体の立体化学構造と分子間相互作用の解析法

茶ガレート型カテキン類の不斉認識能は、光学活性物質の構造の特徴に加え、茶ガレート型カテキン類と光学活性物質が形成する錯体の立体化学構造とそこに働く分子間相互作用が重要になると考えられる。そこで以下 2 つの手法を用いて、これらを調べ、分子レベルで不斉認識のメカニズムを検討していく。

(1) X線結晶構造解析による立体化学構造と分子間相互作用の解析

茶ガレート型カテキン類と光学活性物質の水溶液から得られた沈殿の結晶化を試み、得られた結晶のX線結晶構造解析を行うことにより、その錯体の立体化学構造と両者の間に働いている分子間相互作用を解析する。また、結晶調製ができない場合は、(2)の方法を用いて解析を継続する。

(2) NMRによる溶液構造と分子間相互作用の解析

水中における茶ガレート型カテキン類・光学活性物質錯体の溶液構造と分子間相互作用については、各種NMRの手法(^1H NMR、NOE [^1H NMR 1D different nuclear Overhauser effect (NOE)、nuclear Overhauser and exchange spectroscopy (NOESY)])を用いて解析を行う。

4. 研究成果

まず、カフェインと同程度の分子サイズの光学活性物質であるジクトピペラジン Cyclo(Pro-Gly)に注目し、検討を行った。等モルのEGCgとCyclo(L-Pro-Gly)を90°Cで水に溶かし、10°Cで1日放置すると無色ブロック状結晶が得られた。Cyclo(D-Pro-Gly)についても同様の操作を行うと無色ブロック状結晶が得られた。これらのX線結晶構造解析を行ったところ、2:2 EGCg・Cyclo(L-Pro-Gly)錯体と2:2 EGCg・Cyclo(D-Pro-Gly)錯体であり(Fig. 3)、EGCg・カフェイン錯体と同様に、EGCgの3つの芳香環(A、B、B'環)から形成される疎水性空間にそれぞれを取

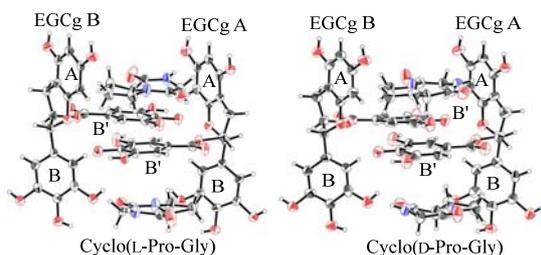


Fig. 3 EGCg・Cyclo(Pro-Gly)錯体

り込むことにより錯体を形成していた。Cyclo(L-Pro-Gly)とCyclo(D-Pro-Gly)の重水溶液にそれぞれ等モル量のEGCgの重水溶液を加え ^1H NMRスペクトルを測定したところ、EGCg存在下ですべてのプロトンシグナルはブロード化していた。その際、プロリン残基の不斉炭素に結合している H_9 メチンプロトンシグナルはCyclo(L-Pro-Gly)とCyclo(D-Pro-Gly)いずれも単独時に比べて化学シフトが0.2 ppm以上高磁場シフトしていた。さらに、プロリン残基の $\text{H}_{7\alpha}$ および $\text{H}_{7\beta}$ 、 $\text{H}_{8\alpha}$ プロトンシグナルはいずれも高磁場シフトしているが、その値はCyclo(L-Pro-Gly)よりCyclo(D-Pro-Gly)の方が大きく変化していた(Fig. 4)。

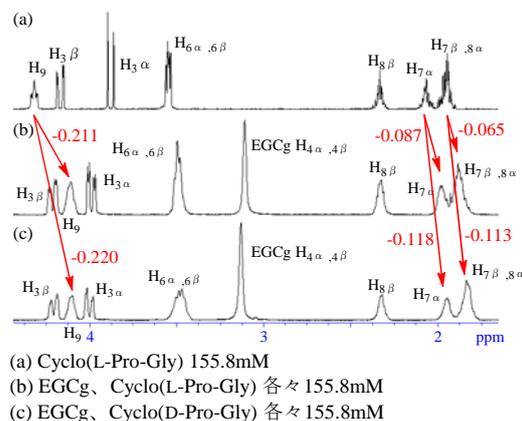


Fig. 4 ^1H NMRによる錯体形成の確認

また、Fig. 3よりEGCgが形成する疎水性空間に取り込まれたCyclo(L-Pro-Gly)とCyclo(D-Pro-Gly)は、どちらもプロリン残基の不斉炭素に結合している H_9 がEGCgのB'環の真下に存在している。このことから ^1H NMRスペクトルにおける H_9 メチンプロトンシグナルの高磁場シフト変化は、B'環の環電流の影響を強く受けているためであると考えられた。さらに、プロリン残基の $\text{H}_{7\alpha}$ および $\text{H}_{7\beta}$ 、 $\text{H}_{8\alpha}$ プロトンシグナルは、Cyclo(L-Pro-Gly)よりもCyclo(D-Pro-Gly)の方が大きく高磁場シフトしていたが、これはEGCgのB環による環電流の大きさの違いによるものであると考えられた。これらプロトンシグナルの化学シフト値の相違によりEGCgは

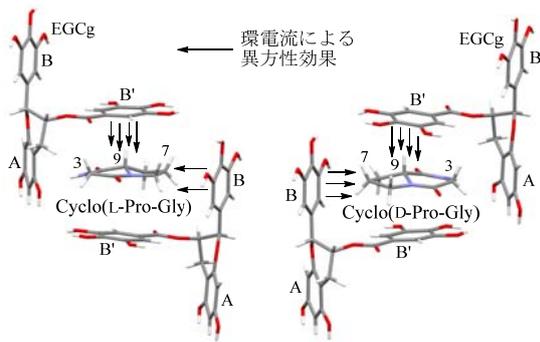


Fig. 5 EGCgを用いたCyclo(Pro-Gly)の不斉認識

Cyclo(L-Pro-Gly)とCyclo(D-Pro-Gly)の不斉を認識したと考えている (Fig. 5)。

次に、高血圧の治療に用いられる医薬品で、通常ラセミ体として使用されている交感神経 β 受容体遮断薬であるプロプラノロールに注目し、EGCgによる不斉識別について検討を行った。ラセミ体のプロプラノロールと等モル量のEGCgの重水溶液を ^1H NMRスペクトルを測定した結果、プロプラノロール単独時には1つのダブルレットとして観測される H_2 プロトンシグナルが2つのダブルレットに分離して観測された (Fig. 6)。これはEGCgのA、B、B'環により形成される不斉疎水性空間に(R)-プロプラノロールと(S)-プロプラノロールが取り込まれ、それぞれ錯体を形成したためであり、これによりEGCgはプロプラノロールの不斉を識別したと考えている。

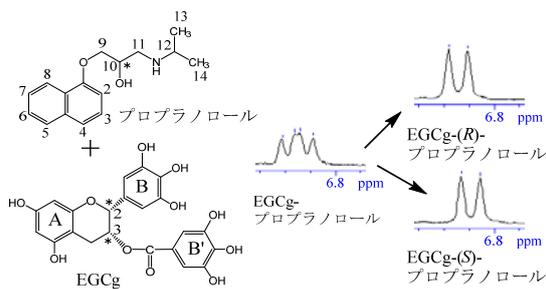


Fig. 6 EGCg添加におけるプロプラノロール H_2 プロトンシグナルの分裂

その不斉識別の機構を明らかにするために、 ^1H NMRスペクトルを用いてEGCgと(R)-プロプラノロール、EGCgと(S)-プロプラノロールの化学量論的考察を行ったところ、水溶液中においてどちらも1:1で錯体を形成していることが明らかになった。また、エント

ロピー値 ΔS に注目すると、(R)-プロプラノロールと(S)-プロプラノロールはそれぞれ $-21.7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と $-6.7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であることより、(R)-プロプラノロールの方が(S)-プロプラノロールよりEGCgとリジットな錯体を形成していることが分かった。

次にEGCg存在下、(R)-プロプラノロールと(S)-プロプラノロールの立体化学構造を検討するために ^1H NMRにおけるNOE測定を行った。その結果、(R)-プロプラノロールでは10位の水酸基の酸素原子とナフタレン環の H_2 が近い位置にあり、(S)-プロプラノロールでは H_{10} とナフタレン環の H_2 が近い位置に存在していることが分かった (Fig. 7)。このような立体化学構造の違いにより ^1H NMRスペクトルにおいて(R)-プロプラノロールの H_2 は分離して低磁場にそのシグナルが出現したと考えられる。

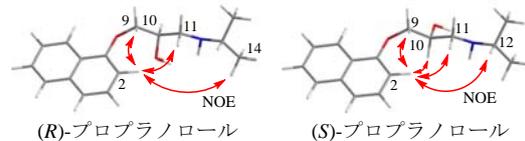


Fig. 7 EGCg存在下におけるプロプラノロールの立体化学構造

さらに(R)-プロプラノロールと(S)-プロプラノロールの重水溶液に一定量のEGCgを添加していったところ、(R)-プロプラノロールと(S)-プロプラノロールはともにナフタレン環の水素原子 ($\text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7, \text{H}_8$) と H_9 のプロトンシグナルが高磁場シフトした。これは錯体形成によりこれらの水素原子がEGCgのB'環からの環電流による遮蔽効果を受けるためであると考えられる。

これらの知見から、水溶液中においてEGCgとプロプラノロールは1:1錯体を形成し、プロプラノロールのナフタレン環がEGCgのB'環の間に挟みこまれていることが分かった。さらに、EGCg・(R)-プロプラノロール錯体では H_2 と10位水酸基との間で微弱な相互作用を形成したのに対して、EGCg・(S)-プロプラノロール錯体ではしないことが分かつ

た。これにより両者のH₂シグナルの化学シフト値に差が生じ、結果としてEGCgはプロプラノロールの不斉を識別したと考えている。

本研究課題ではジケトピペラジン Cyclo(Pro-Gly)と交感神経β受容体遮断薬プロプラノロールを用いてEGCgの不斉認識とその機構の解明を行った。これらの結果により、EGCgが様々な光学活性物質に対する新たな不斉認識のツールや光学分割法に応用できる可能性を示すことができたと考えている。

5. 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2件)

- ① Takashi Ishizu, Hiroyuki Tsutsumi, Emi Yokoyama, Haruka Tanabe, Aoi Yokoyama Chiral Recognition of Diketo piperazines Cyclo(Pro-Gly) and Propranolol Using (-)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate *Chem. Pharm. Bull.*, **64**(2), 142-149 (2016) (査読有)

- ② Takashi Ishizu, Hiroyuki Tsutsumi, Aoi Yokoyama Chiral Recognition of Diketopiperazines Cyclo(Pro-Gly) using (-)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate *Tetrahedron Lett.*, **56**(9), 111-1114 (2015) (査読有)

[学会発表] (計13件)

- ① 藤岡 侑祐、川本 晴香、富士野 覚、横田 留奈、竹本 壮士、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類を用いたプロリン残基を含むジケトピペラジン類の不斉認識、日本薬学会第136年会、2016年3

月28日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

- ② 富士野 覚、川本 晴香、藤岡 侑祐、横田 留奈、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類を用いた種々のヘテロ環化合物の水中からの分子捕捉、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

- ③ Hiroyuki Tsutsumi, Emi Yokoyama, Takashi Ishizu, Chiral recognition of sympathetic β-blocking agent propranolol using (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月16日、Honolulu (USA)

- ④ 堤 広之、横山 葵、横山 えみ、石津 隆、茶ガレート型カテキン類とジケトピペラジン cyclo(Pro-Gly) 及びプロプラノロールの錯体形成における熱力学的考察、第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2015年10月31日、高知市文化プラザ かるぼーと(高知県・高知市)

- ⑤ 川本 晴香、藤岡 侑祐、富士野 覚、横田 留奈、田岡 侑祐、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類を用いたジケトピペラジン cyclo(Pro-Phe) の不斉認識、第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2015年10月31日、高知市文化プラザ かるぼーと(高知県・高知市)

- ⑥ 田邊 晴香、横山 えみ、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類とキサントニン骨格を有する医薬品の錯体形成、第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病

院薬剤師会中国四国支部学術大会、2015年10月31日、高知市文化プラザ かるぼーと（高知県・高知市）

- ⑦ 堤 広之、横山 葵、田邊 晴香、横山 えみ、石津 隆、茶ガレート型カテキン類 (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate を用いた不斉認識、第57回天然有機化合物討論会、2015年9月9日、神奈川県民ホール（神奈川県・横浜市）
- ⑧ 堤 広之、横山 葵、石津 隆、茶ガレートカテキン類をもちいたジケトピペラジン類の不斉認識、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、デザイン・クリエイティブセンター神戸（兵庫県・神戸市）
- ⑨ 横山 えみ、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類をもちいたプロプラノロールの不斉識別、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、デザイン・クリエイティブセンター神戸（兵庫県・神戸市）
- ⑩ 堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類・カフェイン錯体の結晶構造と溶液構造、第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2014年11月9日、広島国際会議場（広島県・広島市）
- ⑪ 横山 葵、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類を用いたジケトピペラジン Cyclo(Pro-Gly) の不斉識別、第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2014年11月9日、広島国際会議場（広島県・広島市）
- ⑫ 竹本 壮志、堤 広之、石津 隆、茶ガレート型カテキン類との錯体形成時におけるジケトピペラジン Cyclo(Pro-Ala)

のコンホメーション変化、第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2014年11月9日、広島国際会議場（広島県・広島市）

- ⑬ Hiroyuki Tsutsumi, Yoshifumi Kinoshita, Hironori Mukaida, Takashi Sato, Takashi Ishizu, Study on Mechanism of Creaming Down by (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate and Caffeine, 27th International Conference on Polyphenols, 8th Tannin Conference, 2014年9月5日、Nagoya (Japan)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/ishizu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 広之 (TSUTSUMI, Hiroyuki)
福山大学・薬学部・講師
研究者番号：00461301