

# 高度な分子認識を目指した 新規な二量化シクロデキストリン誘導体の合成とその性質

山村 初雄

Preparation of a Novel Cyclodextrin Dimer and its molecular recognition behavior

Hatsuo YAMAMURA

A novel cyclodextrin dimer whose cyclodextrin moieties were linked with a bis(picolinyl)cystine moiety was prepared. The pyridine moiety can be intramolecularly included by a cyclodextrin cavity and it may competitively suppress a guest coming into a cyclodextrin cavity. Upon an addition of a copper ion the included pyridine group may bind the copper ion for the two cyclodextrin moieties in the molecule to include a guest intermolecularly and cooperatively. Coupling of Boc-protected cystine with amino-modified cyclodextrins, followed by deprotection of the Boc groups and bispicolinylation, gave the desired compound. The dimer showed less affinity to an organic guest molecule than that of a native cyclodextrin monomer. An intramolecular inclusion of the pyridine moiety into a cyclodextrin cavity was demonstrated by NOE observation between the pyridine peaks and cyclodextrin inner cavity protons. Upon an addition of a copper ion significant increase of guest affinity was observed as we expect. As a result intramolecular and intermolecular inclusion behavior of the cyclodextrin dimer was controlled.

## 1. はじめに

シクロデキストリンは、グルコースが環状に連なったオリゴ糖であり、澱粉を原料として発酵により製造される。最もよく見られるものは、構成するグルコースの数が6個、7個および8個のもので、それぞれを $\alpha$ 、 $\beta$ 、および $\gamma$ -シクロデキストリンと呼ぶ。この分子は環状構造ゆえに分子内空洞を有し、その内径は約0.7ナノメートル、深さは0.8ナノメートルである。そしてその内壁はグルコース残基の3位と5位のメチン(C-H)部と、グルコース残基の間に形成されたグリコシド結合の酸素原子から覆われており、比較的疎水性である。ゆえに、水溶液中で有機化合物のアルキル基やベンゼン環を中に取り込む性質を現す。この現象を包接といい、取り込まれる化合物をゲスト分子と呼び、取り込むシクロデキストリンをホスト分子とみなす。

この包接によって取り込まれたゲスト分子は、シクロデキストリンが存在しない状態とは異なった性質を示す。これによって溶解性、安定性、吸収性といったゲスト分子の性質を改良することが可能である。ゆえに、その包接現象はひろく研究されてきた<sup>1)</sup>。

しかし、シクロデキストリン自身による包接能力は、天然の酵素や抗体などの系に比べれば、十分に効果的でなく、また特異的でない。そこでシクロデキストリンの包接能力を改良する研究がなされてきた。その方策の一つが、さらなる結合サイトとしてもう一つのシクロデキストリン部分を分子内に追加することである。この分子はシクロデキストリンダイマーと呼ばれ、この研究領域においてはこれまでに然るべき構造を備えたダイマー分子であれば抗体が抗原を結合するのに匹敵するほど強力にゲスト分子を結合できることが実証されている。<sup>2)~4)</sup>

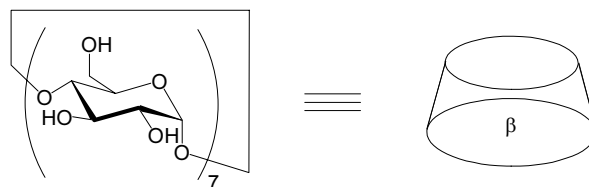


図1. シクロデキストリンの構造<sup>1)</sup>

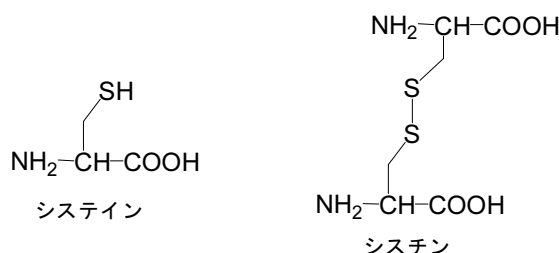


図2. システインとシスチン

そこで次の研究段階として、二つのシクロデキストリンを分子内に備えることによって発現した強いゲスト包接能力を制御因子（信号）によってコントロールすることが極めて重要であると考えられる。この観点から、Liuらは、オリゴエチレンオキシド部位で二つのシクロデキストリンを連結したダイマーがそのオリゴエチレンオキシド部位が金属を配位することで分子の柔軟性を変化させることでゲスト分子に対する親和性を変化させることを報告した<sup>5)</sup>。一方、Breslow<sup>6)</sup> 7)およびReinoudt<sup>8)</sup>はゲスト包接を光制御できる新規なシクロデキストリンダイマーを報告した。

本研究では、シクロデキストリンダイマーを構成する重要な部品としてアミノ酸の一種であるシスチン(Cys)に着目した。シスチンは、形式的にはこれもアミノ酸であるシステインがジスルフィド結合形成により二量化した分子である。したがって、シスチンは二組のカルボキシ基とアミノ基を有し、ゲスト結合部位と制御分子結合部位を分子内に構築するために最適な最小構造の一つであると言える。そこで、シスチンのカルボキシ基にシクロデキストリン分子を導入し、アミノ基にピコリニル(2-ピロジンカルボキシ、PyCO)基を導入したダイマー**1**を分子設計した。これまでのシクロデキストリン誘導体研究<sup>9)</sup>に基づいて推定すると、疎水性の大きいピコリニル基は**1**のカルボキシ基に結合しているシクロデキストリン部位によって分子内で自己包接されると考えられる。この状態では、外部より加えたゲスト分子に対する**1**の親和性は、未修飾のシクロデキストリンのそれよりも小さくなると推定できる。一方、分子内に存在するビス(ピコリニルアミド(PyCONH))基は銅などの2価金属イオンを配位して安定な1:1錯体を形成することが知られている<sup>10)</sup>。したがって、ダイマー**1**へ銅イオンを添加すると、それを配位するために自己包接されていたピコリニル基はシクロデキストリン空洞の外へと出ることになり、空になったシクロデキストリン空洞は新たなゲスト分子を結合できるようになる。以上の機構により、シクロデキストリンダイマーによるゲスト結合と分子認識および分子内包接と分子間包接の精密なコントロールが可能になると期待した。

## 1. 実験

### 2.1 一般項

$\beta$ -シクロデキストリンは日本食品化工(株)より供与されたものを使用した。その他の化学物質は市販品を用いた。薄層クロマトグラフィー(TLC)は市販のシリカゲルプレート(メルク社製)を用いた。スポットの検出にはUVライト及び/あるいは0.1%1,3-ナフタレンジオール-エタノール:水:硫酸(5:4:1(V/V/V))溶液あるいは10%ニヒドリン-アセトン溶液を使用した。低圧逆相カラムクロマトグラフィーには、市販のODSカラム(メルク社製)を用いた。高速液体クロマトグラフィー分析には、J'sphere ODS-M80およびDiol-60(YMC社製)を用いた。

### 2.2 Boc保護されたシスチンで連結されたシクロデキストリンダイマー中間体**2**

*N,N'*-ビス(Boc)-L-Cys **3** (199 mg, 4.51x10<sup>-4</sup> mol)と $\beta$ -シクロデキストリンの一つのヒドロキシ基がアミノ基に置換された誘導体<sup>9)</sup> **4** (1.20 g, 1.06x10<sup>-3</sup> mol)を乾燥ジメチルホルムアミド(6 mL)に溶解した。これを、*N,N*-ジイソプロピルアミンで中和した後に、氷冷下、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ピロリジン)ホスホニウムヘキサフルオホスフェート(PyBop)(549 mg, 1.05x10<sup>-3</sup> mol)を添加した。反応混合物を室温にて2日間攪拌した後に、溶媒を減圧留した。その残渣を水(500 mL)に溶解し、これを低圧逆相クロマトグラフィーに供した。水(700 mL)による溶出の後に、グラジエント溶出(水(1500 mL)から25%メタノール水溶液(1500 mLまで))によって目的化合物**2**を得た(892 mg, 73.8%)

TLCにおける $R_f$ 値[1-プロパノール/酢酸エチル/水/28%アンモニア水溶液(3/3/2/1)(v/v/v/v)]; 保持時間 $t_R$ [カラム, J'sphere ODS-M80; グラジエント, 0-30%アセトニトリル水溶液(30分)]; 流速, 0.2 mL/分] 11.2分・[カラム, Diol60; 溶出液, 水; 流速, 1.0 mL/分] 9.9分;  $\delta$  H (400 MHz, D<sub>2</sub>O), 1.43 (18 H, s, CH<sub>3</sub>), 4.60-4.95 [14H, シクロデキストリンC(1)H], 7.39 (2H, brs, ウレタン NH), 7.60 (2H, brs, アミド NH);  $m/z$  (LSIMS) 2670.6 (M<sup>+</sup>); Found C 40.95, H 6.28, N 1.90, S 2.54, Calcd. for C<sub>100</sub>H<sub>166</sub>O<sub>74</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub>·13H<sub>2</sub>O C41.32, H 6.18, N 1.90, S 2.54.

### 2.3 ダイマー**2**の脱保護とそれに引き続くピコリニル化によるダイマー**1**の合成

Boc保護されたダイマー中間体**2**(257 mg, 9.62x10<sup>-5</sup> mol)を、氷冷下で1時間、トリフルオロ酢酸(2.0 mL)で処理した。トリフルオロ酢酸を減圧流去下の地に、残渣を乾燥ジメチルホルムアミド(2.0 mL)に溶解して*N,N*-ジイソプロピルアミンを添加して過剰のトリフルオロ酢

酸を中和した。これにピコリン酸(30mg,  $2.43 \times 10^{-4}$  mol)と PyBop (120 mg,  $2.30 \times 10^{-4}$  mol)を加えて、氷冷下で *N,N*-ジイソプロピルアミンを添加して pH を 8.5 に調整した。混合物を 1 時間攪拌した後、アセトン-エーテル (1/1 v/v) (50 mL) に添加した。生じた沈殿を遠心分離 (3000 rpm, 10 分) で回収し、それを水 (100 mL) に溶解した。その溶液を低圧逆相クロマトグラフィーに供した。水 (300 mL) による溶出の後に、グラジエント溶出 (水 (300 mL) から 40%メタノール水溶液 (300 mL まで) によって目的化合物 **1** を得た (180 mg, 69.9%)。

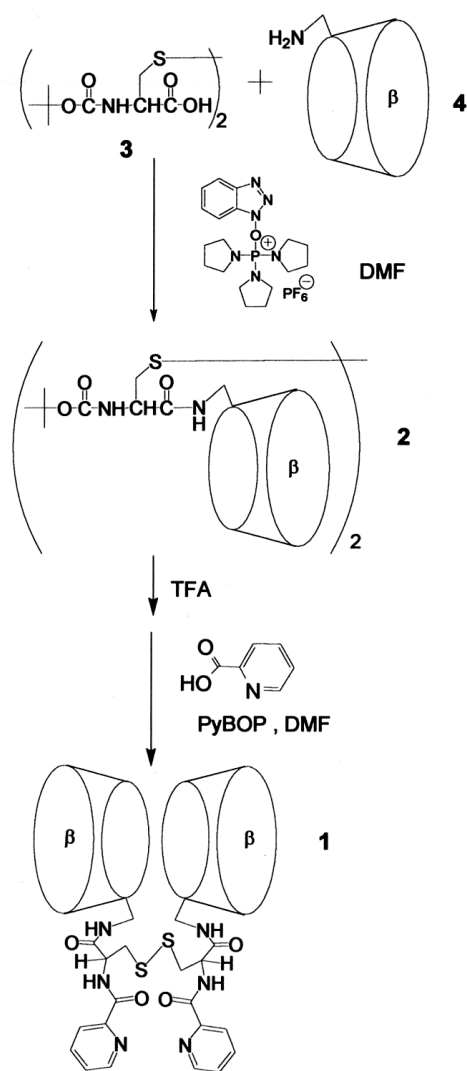
TLC における *R<sub>f</sub>* 値 0.36 [1-プロパノール/酢酸エチル/水/28% アンモニア水溶液 (1/1/1/1) (v/v/v/v)]; 保持時間  $t_R$  [カラム, J' sphere ODS-M80; グラジエント, 0-30% アセトニトリル水溶液 (30 分); 流速, 0.2 mL/分] 24.0 分・[カラム, Diol60; 溶出液, 水; 流速, 1.0 mL/分] 13.0 mL/分;  $\cdot\cdot\cdot$  H (200 MHz, [ $^2\text{H}_6$ ]Me<sub>2</sub>SO), 4.70-4.90 [14H, シクロデキストリン C(1)H], 7.52-7.66 [2H, ピリジン C(5)H], 7.88 (2H, brd, ウレタン NH), 7.93-8.03 [4H, ピリジン C(3)H および C(4)H], 8.61 [2H, brd, ピリジン C(6)H], 8.91 (2H, brd, アミド NH); *m/z* (FABMS) 2681.6 (M+H<sup>+</sup>); Found C 42.99, H 6.35, N 3.02, S 2.78, Calcd. for C<sub>102</sub>H<sub>156</sub>O<sub>72</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub>·9H<sub>2</sub>O C43.07, H 6.17, N 2.95, S 2.25。

## 2.4 高分解能核磁気共鳴スペクトル測定と結合定数決定のための紫外可視吸収スペクトル測定

高分解能核磁気共鳴スペクトル測定は 200MHz、400MHz および 600MHz 高分解能核磁気共鳴装置を用いて測定した。各プロトンシグナルの帰属は COSY スペクトル (Correlation Spectroscopy)、HOHAHA スペクトル (Homonuclear Hartmann-Hahn Spectrum) を測定することによって行った。核オーバーハウザー効果の観察には ROESY スペクトル (Rotating Frame Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy) を測定した。結合定数決定のための紫外可視吸収スペクトル測定は紫外可視分光光度計 (U2450, 島津製作所) を用いた。

## 3. 結果と考察

ピコリニル基を導入したシクロデキストリンダイマー **1** を得るために、シスチンは以下のように化学修飾された (スキーム 1)。Boc 保護されたシスチン **3** を、まず  $\beta$  シクロデキストリンの一つのヒドロキシ基がアミノ基に置換された誘導体 **4** と縮合させた。この化合物 **4** は、シクロデキストリンの一つのヒドロキシ基をトルエンスルホン酸エステルにしたものを原料に、そのスルホンオキシ基をアジド基に置換し、さらに還元して得たものである。最初に、ペプチド合成などにおける縮合反応では最も汎用される縮合剤であるジシクロヘキシルカ



スキーム 1

ルボジイミドと *N*-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いた。この反応では、反応混合物の薄層クロマトグラフィーによる分析によりまず *R<sub>f</sub>* 値 0.36 を示す生成物が現れ、引き続いて *R<sub>f</sub>* 値 0.07 を示す中間体 **2** が生じることが観察された。この反応を完結させるためには、過剰の縮合剤 (シスチン **3** に対して 8.7 倍) の使用と 4 日間の反応時間が必要であった。得られた反応混合物を低圧逆相カラムとゲルろ過カラムを使用したクロマトグラフィーによって精製した結果、アミド **2** が 29.6% の収率で得られた。この低い収率はシクロデキストリン分子に存在するヒドロキシ基とシスチン **3** のカルボキシ基との反応により生じたエステルなどの副生成物のためである。

そこでこの副生成物が生じることを避けるためにジシクロヘキシルカルボジイミドと *N*-ヒドロキシベンゾ

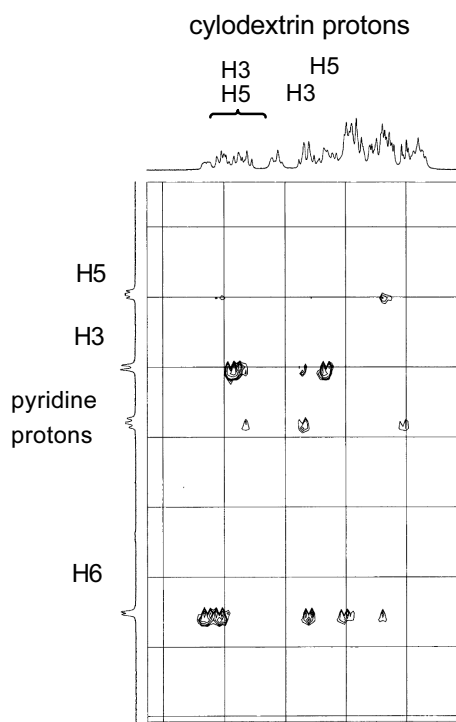


図3. ダイマー1の  
ROESスペクトル

トリアゾール系に替わる縮合剤として、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ピロリジノ)ホスホニウムヘキサフルオホスフェート(PyBop)を用いることとした<sup>12)</sup>。この試薬は反応性が高く、しばしば立体的に嵩高い側鎖を持つアミノ酸の縮合剤として用いられる。ビス(Boc)シスチン**3**と当モルのPyBopを使用した反応は、ジシクロヘキシルカルボジイミド-ヒドロキシベンゾトリアゾール系よりも早く進行して2時間で反応は終了し、しかも副生成物はほとんど生じなかった。そして中間体**2**は逆相クロマトグラフィーにより容易に精製でき、結果として収率73.8%で得られた。

精製された中間体**2**の二つのBoc基を脱保護するためにまずトリフルオロ酢酸で処理した。その後、生じた二つのアミノ基をピコリニル化するために塩化ピコリニルと反応させた。反応混合物を薄層クロマトグラフィーによって分析したところ、3種類以上の生成物の存在が確認された。これをゲルろ過クロマトグラフィーによって精製したところ目的物であるダイマー**1**は得られたが、その収率は低いものであった(37.8%)。このことは、この反応においてシクロデキストリン上のアミノ基だけでなくヒドロキシ基もまた当該酸塩化物と反応してエステル結合を形成したことを示している。そこで酸塩化物を使用するアミド化に替わるものとして、脱保護した化合物**2**とピコリン酸をPyBopを用いて縮合させる反応を採用した。この反応は、選択的に目的とするビス(ピコ

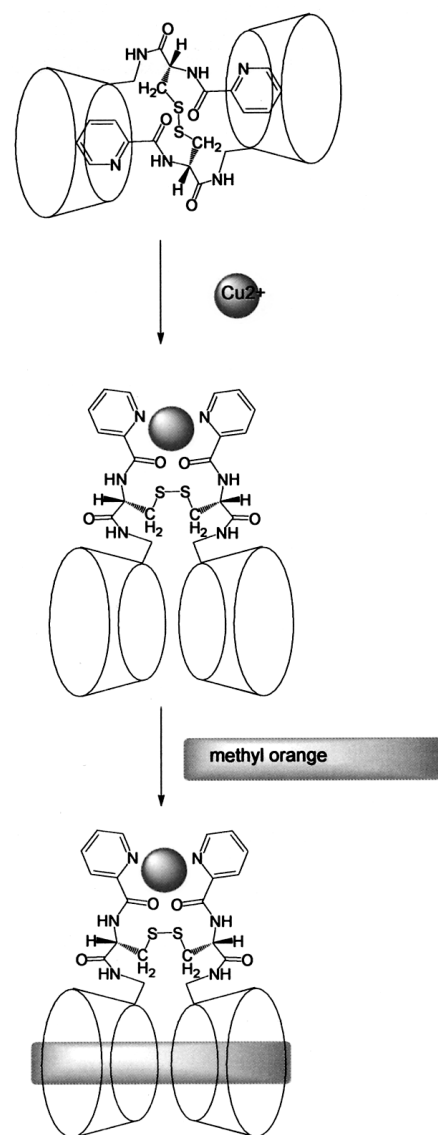


図4. ダイマー1の自己包接、  
その解除とゲスト分子包接

リニルアミド(PyCONH))基を備えたシクロデキストリンダイマー**1**を収率69.9%で与えた。これらすべての化合物の構造は<sup>1</sup>H-NMR、質量分析、そして元素分析によって決定した。

ダイマー**1**のROESYスペクトル上には、ピリジンプロトンとシクロデキストリンのH3およびH5の間にNOE交差ピークが観測された(図3)。このことはピリジンプロトンがシクロデキストリン分子内空洞を覆うH3およびH5の近傍に存在することを意味する。すなわち、分子設計したようにダイマー**1**のシクロデキストリン空洞がそのピリジン部分によって占められた分子内包接錯体を形成していることを示している。

そこでダイマー **1** のゲスト結合能力を評価するために紫外可視吸収スペクトル滴定を用いて結合定数測定を行った。その結果、ダイマー **1** のメチルオレンジに対する結合定数は  $500\text{M}^{-1}$  であると判った。これは未修飾の  $\beta$  シクロデキストリンのそれ ( $2790\text{M}^{-1}$ ) の約 6 分の 1 である。ここで観察された未修飾のシクロデキストリンよりも低いゲスト分子親和性は、外から加えたゲスト分子の包接を競合的に阻害するダイマー **1** の自己包接状態を強く支持するものである (図 4)。一方、ダイマー **1** に銅イオンを添加すると飛躍的にメチルオレンジに対する親和性は増加した。その結合定数は  $7420\text{M}^{-1}$  であり、これは自己包接状態のその 15 倍に匹敵する。これは自己包接されていたピリジル基が銅イオンと結合するためにシクロデキストリン空洞の外に出て、その結果、分子内の二つのシクロデキストリンが協同的かつ分子間でゲスト分子を包接したことを示している。以上のように、シクロデキストリンダイマーによるゲスト結合親和性と分子認識を、外部から加えた制御因子 (銅イオン) によって分子内包接と分子間包接の変換を誘導することでコントロールすることに成功した。

**謝辞** 本報告に示した研究実験は名古屋工業大学にて川井正雄教授の御協力のもとに行われたものである。研究実験に使用した  $\beta$ -シクロデキストリンは日本食品化工 (株) より御提供いただいたものである。ここに記して心より感謝する。

## 引用文献

- 1) J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn, ed. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Elsevier Science Ltd., Oxford (1996), vol. 3.
- 2) K. Fujita, S. Ejima, T. Imoto *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1977, 1277.
- 3) R. Breslow, S. Chung *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1990, 9659.
- 4) R. Breslow, S. Halfon, B. Zhang *Tetrahedron* **51**, 1995, 377.
- 5) Y. Liu, C.-C. You, B. Li *Chem. Eur. J.* **7**, 2001, 1281.
- 6) A. Ruebner, Z. Yang, D. Leung, R. Breslow *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1999, 14692.
- 7) S. D. P. Baugh, A. Yang, D. K. Leung, D. M. Wilson, R. Breslow *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2001, 12488.
- 8) A. Mulder, A. Jukovic, F. W. B. van Leeuwen, H. Kooijman, A. L. Spek, J. Huskens, D. N. Reinhoudt *Chem. Eur. J.* **10**, 2004, 1114.
- 9) For example, J. S. Lock, B. L. May, P. Clements, S. F. Lincoln, C. J. Easton *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2004, 1381.
- 10) H. Siegel, R. B. Martin *Chem. Rev.*, **82**, 1982, 385.
- 11) K. Hamasaki, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuki, T. Osa *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1993, 5035.
- 12) J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro *Tetrahedron Lett.* **31**, 1990, 205.