

# エストロゲン作用物質と生体レセプターモデルとの 相互作用に関する実験的理論的研究

Experimental and Theoretical Studies on Interaction of Estrogens and Cyclodextrins as a Receptor Model

伊原靖二\* 西村愛代\* 細木淳一\* 今村主税\*\*

Yasuji Ihara, Naruyo Nishimura, Junichi Hosogi, Chikara Imamura

## Summary

The molecular inclusion of estrogens with  $\beta$ -, and dimethyl- $\beta$ -, and trimethyl- $\beta$ -cyclodextrins(CD) in aqueous solution was investigated by fluorescence measurements at different temperatures. The binding constants were calculated for each system imposing a 1:1 stoichiometry. Dimethyl- $\beta$ -CD showed the highest binding constant among the three complexes. The fitness of the guest to the cavity of CD was suggested to affect the binding constant. Based on the temperature dependence of the binding constants at different temperatures, the entropy and enthalpy changes were calculated for the complex formation and contribution of entropy to the process was discussed. Molecular modeling studies were performed by means of Monte Carlo Simulation on Molecular Mechanics in order to determine the preferred complex formation of cyclodextrins and estrogen molecules. The formation of the complex involves the phenyl group of the guest molecules which mainly interact with electrostatic interaction and hydrophobic interaction by van der Waals forces. Molecular mechanics(MM) calculations served to investigate the molecular inclusion. The more energetically stable complexes by inclusion with CD calculated based on semiempirical molecular orbital (MO) were obtained compared with CD and estrogen alone, respectively. The structural information about the preferred complex formation by inclusion from the MO calculations was also obtained and the results were compared with experimental data.

## 1. 緒言

ホルモンなど、存在は微量ながら、生命活動を行うのに重要な役割を果たすような物質は、レセプターと結合して働き作用する。どの物質がどのレセプターと結合するかは決まっておらず、例えばエストロゲンの1種であるエストラジオールは1EREレセプター(Human Estrogen Receptor)と結合してホルモン作用をもたらす。図1に1EREのA鎖の疎水性及び一部親水性アミノ酸残基からなる結合部位にフィットしたエストラジオールの分子状態を示した。

生理のある女性では卵巣でつくられるエストロゲンにはエストロン、エストラジオール、エストリオールの三種類が知られおり、これらは同じエストロゲンなのに、それぞれ少しずつちがった働きをする。エストラジオールは組織内ではエストロンに一部変化する。エストロンはエストラジオールよりエストロゲン作用が弱く、組織内で過量になるエストラジオールの働きを調節している。女性ホルモンとしての乳腺刺激の強

さはエストラジオールでは、エストリオールの千倍とされていることから、エストラジオールは乳がんに対する危険度を上げ、逆にエストリオールは乳がんを予防する可能性があることがわかってきた。

内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)は、「弱いエストロゲン」のような働きをするなど、本来ホルモンが結合すべきレセプターに化学物質が結合することによって、遺伝子が誤った指令を受けるというメカニズムである。内分泌攪乱化学物質の多くはエストロゲン(女性ホルモン)と同じ様な仕組みで作用することが知られているため、核内レセプターとの関連が注目されている。内分泌化学物質が核内レセプターに結合して生じる反応には、本来のホルモンと類似の作用がもたらされている場合と、逆に作用が阻害される場合がある<sup>1-3)</sup>。

本研究は、生体レセプターへのエストロゲン(1)の作用機能の解明のために、包接複合体形成機能を有するシクロデキストリンによるホルモンの包接作用の機構及び、その包接化に伴うエストロゲンの電子構

\* 山口県立大学大学院 健康福祉学研究科生活健康科学専攻  
\*\* 山口県立大学 生活科学部生活環境学科

造とその生物活性の発現との相関性を実験的及び理論的な両面から明らかにすることを目的とする。実験的には生体レセプターとの相互作用のモデルとして、環状化合物であるCDホストとの包接作用を試み、その結合の強さから、包接に伴う各種効果及び生体への影響を推定する。また理論化学の手法を用い、エストロゲンとの包接複合体の分子軌道法計算から得られる強い活性を示す化合物とその電子構造との関係を考察する。

シクロデキストリンは構造式(2)及びその模式図に示すようにグルコースが $\alpha$ -1,4結合した環状オリゴ糖であり、円筒状をしている。その内孔はX軸方向にCHに覆われており、強い疎水性を示す。また、分子の周辺部にはOH基(狭い口の方に1級のOH, 広い口の方に2級のOH)が配列しているため、水にかなりの親和性を持っている。疎水内孔の重合度(グルコース単位数)がそれぞれ、6, 7, 8のものは $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ と呼ばれ、重合度nが増加するに従ってその直径は広がる。この疎水性内孔の大きさに適した疎水性化合物、疎水性残基をもつ親和性化合物が存在すると、それらの疎水性部分は水溶液中でシクロデキストリンに特異的に取り込まれ、包接複合体を形成する。取り込まれるゲストは気体、液体、固体の有機物から、ヨウ素のような無機物まで多種多様である<sup>4-7)</sup>。この包接複合体の生成は、シクロデキストリンの最も特異的な性質であり、これまでも多くの研究が行われてきた<sup>8-11)</sup>。例えば、食品、医薬品、化粧品、農薬、化学工業といった分野での研究がなされており、環境分野での応用が期待される。

本研究室では以前から、CDの包接作用に着目し、生体レセプターモデルとして環境ホルモン類との相互作用の研究を行っている<sup>12)</sup>。本研究は上記1EREレセプター等のモデルとしてCDの包接機能を解析することを目的とし、 $\beta$ -CDおよびメチル化誘導体と代表的なエストロゲンであるエストラジオール及びエストリオールの相互作用について、蛍光強度の測定を用いた包接実験により実験的に検討した。さらに温度を変化させ、結合定数の温度依存性から熱力学パラメーターを算出することによりその相互作用の機構を考察した。また、エストラジオール包接複合体形成過程をコンピューターを用いた分子シミュレーションにより、CDとゲスト分子の包接作用で得られる分子複合体の安定構造を探索し、実験結果と比較検討した。

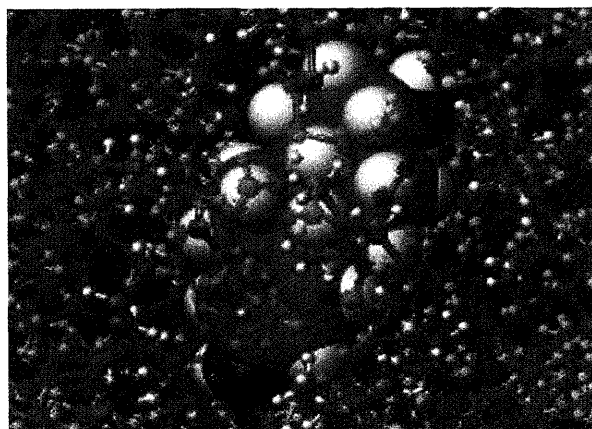
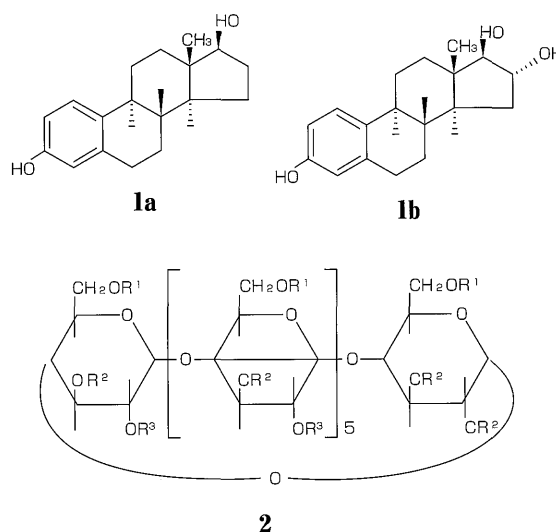


Figure 1 Human Estrogen Receptor Ligand-Binding Domain In Complex with 1,7-Estradiol (Molecule: Estrogen Receptor; Chain: A)



2a:  $R^1=R^2=R^3=H$ . ( $\beta$ -CD)

2b:  $R^1=R^3=CH_3$ ,  $R^2=H$ . (DM- $\beta$ -CD)

2c:  $R^1=R^2=R^3=CH_3$ . (TM- $\beta$ -CD)

## 2. 実験

### 2-1 試料

エストロゲン作用を有するホルモンとしてエストラジオール(1a, Estra-1,3,5(10)-triene,3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol)及びエストリオール(1b, Estra-1,3,5(10)-triene,3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol)の2種(東京化成)を用いた。生体レセプターモデルとしてのシクロデキストリン(CD, 2)は市販試薬(GR)を十分乾燥しそのまま用いた。

### 2-2 方法

包接実験は、ホスト分子として3種類のCD( $\beta$ -CD,

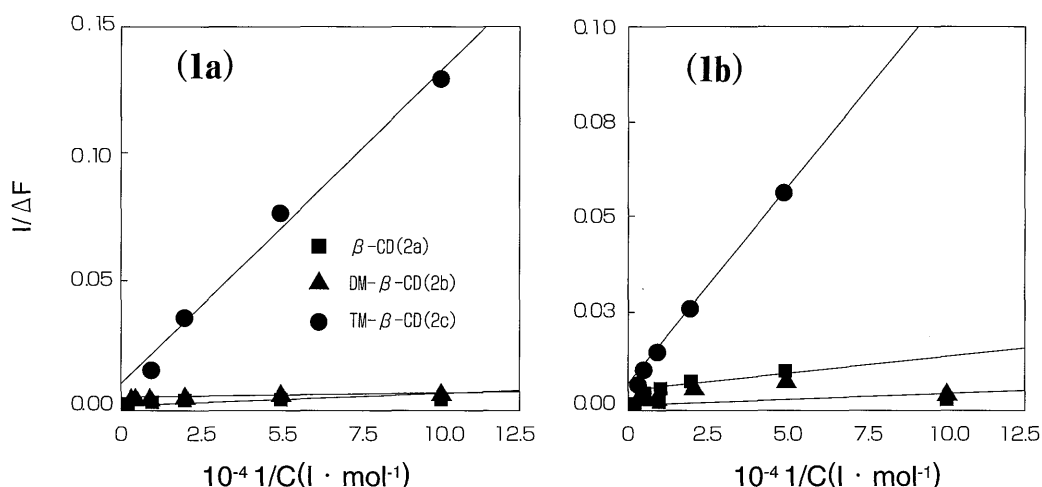


Figure 2 Reciprocal Plots of Fluorescence Changes of 1a and 1b on Complexation with CD Hosts at 25°C

$\beta$ -CD のメチル化誘導体である DM- $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD) を 0.01M リン酸緩衝液に溶解させて使用した。ゲスト分子としてエストラジオールを無水アセトニトリルに、エストリオールをエタノールに溶解させて使用した。種々の CD による環境ホルモン類の包接作用は各々の温度 (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C) において、pH7.0, 0.01M リン酸緩衝液中にてゲスト分子の濃度を固定して CD 濃度を変化して行った。包接複合体の結合定数 ( $K_b$ ) は、CD 濃度に伴うゲスト分子である基質の蛍光スペクトル変化から Gino C. Catena, Frank V. Bright<sup>13)</sup> の式を用いることにより算出した。また各温度の結合定数の変化からファントホッフプロットで温度の逆数に対してプロットすることにより、熱力学定数を算出した。また、得られた熱力学定数のエンタルピー ( $\Delta H$ ) とエントロピー変化 ( $\Delta S$ ) より、エンタルピー・エントロピー補償プロットを導いた。

## 2-3 分子モデル計算

### 2-3-1 分子力場 (MM) 計算

分子モデル計算は Compaq Alpha Workstation 上で動作する Wavefunction 社の分子設計支援プログラム Spartan に含まれる経験的分子力場計算プログラムの MMFF 力場を用いて行った。複合体形成の全エネルギー変化はそれぞれ単独で得られた最適化エネルギー変化の差として算出した<sup>14)</sup>。

### 2-3-2 半経験的分子軌道 (MO) 計算

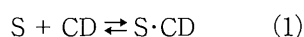
エストラジオール (1a) 及び CD との包接複合体の電子状態については、Microsoft Windows 上で

動作する半経験的分子軌道計算プログラムである MOPAC2002 (FUJITSU Version 1.0) を用いて計算を行った。計算はすべて PM5 ハミルトニアンを使用して、EF ルーチンを用いて GNORM を 0.1 に設定して最適化を行った。包接複合体の場合は、前もって上記の分子力場計算で極小化したものを計算の初期構造として用いた。原子数が多い複合体の場合は XYZ 座標パラメーターを設定し計算した<sup>15)</sup>。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 CD によるエストロゲンの包接作用

はじめに、CD に対する 2 種類のエストロゲン (1a, 1b) の pH7.0 緩衝溶液中、25°C における包接作用を検討した。すなわち、CD の濃度変化に伴うゲスト分子である各基質の極大励起波長における蛍光スペクトル変化の結果からその逆数プロットを図 2 に示す。この図において、横軸は CD 濃度の逆数  $[1/C]$  (mol/l), 縦軸は各波長における蛍光強度変化の逆数  $1/\Delta F$  を示す。これらの結果より明らかなように、いずれの場合も直線関係を示した。そこで 1:1 複合体の形成を推定して、包接複合体の結合定数 ( $K_b$ ) の値は、Gino C. Catena, Frank V. Bright<sup>13)</sup> の式を用いて算出した。



(1) 式は、エストロゲン基質とシクロデキストリンの平衡状態を表し、ここで S は基質であるゲスト分子、CD はシクロデキストリン、 $S \cdot CD$  は包接複合体を示す。

また結合定数  $K_b$  は、(2) 式で表され、(3) 式を

用いて結合定数を算出した。

$$K_b = [S \cdot CD] / [S][CD] \quad (2)$$

$$C_s / F_{sCD} = \{ (K_b k_{sCD} Q_{sCD})^{-1} (C_{CD})^2 \} + (k_{sCD} Q_{sCD})^{-1} \quad (3)$$

ここで  $C_s$  はゲスト分子の濃度,  $C_{CD}$  はシクロデキストリン濃度,  $K_b$  は結合定数,  $k$  は装置定数,  $F_{sCD}$  は包接複合体の蛍光強度, 及び  $Q_{sCD}$  は量子収量を示す。

表1に25°Cにおける各CDと誘導体との包接複合体形成の結合定数 ( $K_b$ ) を示した。まず, 包接複合体の結合定数を  $\beta$ -CD (2a), DM- $\beta$ -CD (2b), TM- $\beta$ -CD (2c) の3種から比較すると, 1a, 1b共に, 2,6-位の水酸基をメチル化したDM- $\beta$ -CDにおいて, 最も大きな結合定数が得られた。2,3,6-位の水酸基をメチル化したTM- $\beta$ -CDにおいては, 未修飾の $\beta$ -CDと比べてもかなり低い結合定数が得られた。DM- $\beta$ -CDが高い結合定数を示したのは, DM- $\beta$ -CDが3種の内でこれらエストロゲンに対し最も適切な内孔及び疎水性環境を持ち, ゲスト分子との相互作用を強め, CDホストの包接能を高め, そこへ基質がちょうどフィットしたためと考えられる。TM- $\beta$ -CDにおいては逆にそのバリエーションのため包接の妨げとなり, 未修飾の $\beta$ -CDよりも低い結合定数を示したと考えられる。また, これらの結果より, 2種のエストロゲンと最も強い結合を示すのは, DM- $\beta$ -CDであることがわかった。

次に, 構造の異なる, 1a及び1bについて比較すると, 高い結合定数を示したのは1aで, 次に1bとなった。1aが1bよりも高い結合定数を示したのは, それぞれの親水基の極性の相違によるものと考えられる。1a, 1bはそれぞれその分子構造内に極性基を2及び3つ持っており1bは分子が大きくバルキーである。これらのゲストのわずかな違いにより, 上記の結果が得られたものと思われる。

Table 1 Binding constants inclusion of estrogens(1) with CD(2) in aqueous solution at 25°C<sup>a)</sup>

		$\beta$ -CD(2a)	DM- $\beta$ -CD(2b)	TM- $\beta$ -CD(2c)
Estradiol (1a)	$K_b$	53000	212000	7700
	Rel. $K_b$	1	4	0.145
Estriol (1b)	$K_b$	31000	131000	3500
	Rel. $K_b$	1	4.23	0.113

a) At pH 7.0, 0.01 M phosphate buffer.

### 3-2 包接作用に伴う熱力学パラメーター

次に, 各CDについて, 15°Cから45°Cまで, 5°Cずつ温度を変化させ, 蛍光強度変化を測定し, 各温度における結合定数を求めた。その結合定数から, ファ

ントホッフの式を用いて結合エンタルピー ( $\Delta H$ ), 結合エントロピー ( $\Delta S$ ), 自由エネルギー ( $\Delta G$ ) を算出し, 熱力学的観点から考察した。複合体形成の $\Delta H$ と $\Delta S$ は温度を変化させその結合定数を求めることにより得られる。図3に示すように,  $\ln K_b$  対  $1/T$  のファントホッフプロットは直線関係を示し, この研究で用いた温度範囲において $\Delta H$ と $\Delta S$ は実質的の定数であることがわかる。 $\Delta H$ は, CDとエストロジェンの熱力学的観点より見た, 包接作用の状態を示し, 正の値は吸熱反応を, 負の値は発熱反応であることを示す。次に,  $\Delta S$ はCDとゲストとの適合状態を示し, 正の値は緩い結合を, 負の値は緊密な結合状態を示している。さらに,  $\Delta G$ は包接複合体における不可逆変化の過程を示し, 値が小さいほど結合は強くなる。

包接化合物の形成は一般にエンタルピー的に有利で, エントロピー的には不利な過程であり, この有利なエンタルピー変化の素過程は, (1)疎水性相互作用, (2)複合体の水和, (3)CD空洞内の不安定な水分子の放出, (4)CDの分子間のひずみエネルギーの解放であるとされている。表1の結合定数の温度変化から, ファントホッフの式を用いて $\Delta H$ ,  $\Delta S$ が得られる。これらの熱力学データを表2に示した。ここで用いた系の包接作用はすべて発熱反応であり, そのうえエントロピー増大による付加的な安定化を伴う。このエントロピー増加から, 空洞内の水の放出, のアルキル基の回りの構造化された水の解放が推定される。表2に見られる結合エントロピーの大きな負値は, 前記の空洞への緊密は適合に起因し, 自由エネルギー ( $\Delta G$ ) としてはその関係により, 緊密な適合に伴う大きな発熱により補間されるのであろう。疎水性相互作用は効果的な正のエントロピー変化 ( $S > 0$ ) とわずかな正のエンタルピー変化 ( $H > 0$ ) を伴う。しかしながら, 本実験での結果, 包接過程は正のエントロピー変化よりもむしろ正のエンタルピー変化によって補間されている。エンタルピーの安定化はゲスト分子脱水和過程のより低いエネルギー放出で説明出来る。

また図4に今回得られた全データのエンタルピーとエンタルピー変化の関係を示した。図4に示すように, これらの系中では全体の値のエントロピー・エンタルピーは補償関係であることが示された。この補償則は水溶液中での反応でしばしば見出される関係であり, 分子認識現象の弱い力の協同効果によってはじめて可能になり, 包接化合物の形成に溶媒の水が重要な働き

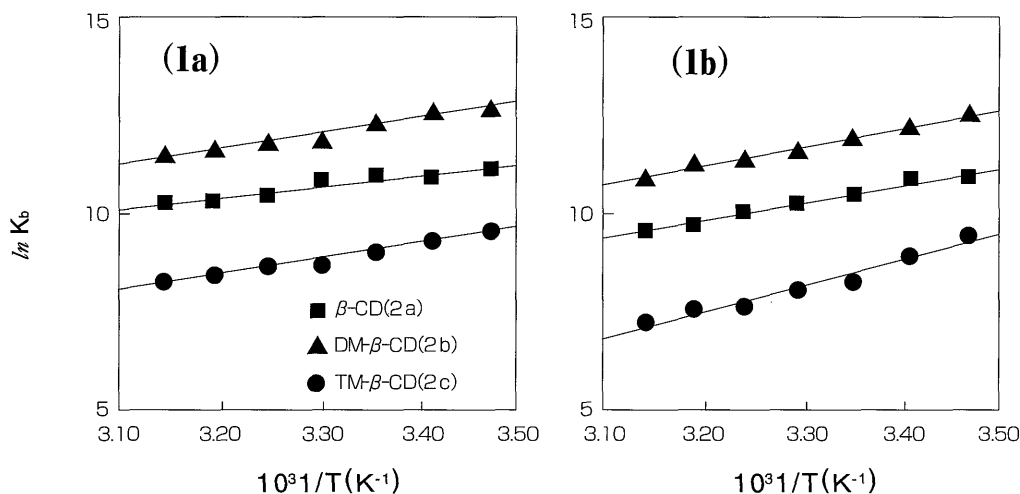


Figure 3 Van't Hoff's Plots of Binding Constants for Complex Formation

Table 2 Thermodynamic quantities for complex formation of estrogens(1) and CD(2)

		$\Delta H(\text{Kcal/mol})$	$\Delta S(\text{cal/K}\cdot\text{mol})$	$\Delta G(\text{Kcal/mol})^a$
$\beta$ -CD(2a)	Estradiol(1a)	-5.59	-2.67	-4.80
	Estriol(1b)	-8.44	-8.51	-5.90
DM- $\beta$ -CD(2b)	Estradiol(1a)	-7.53	-0.93	-7.24
	Estriol(1b)	-9.18	-7.34	-7.00
TM- $\beta$ -CD(2c)	Estradiol(1a)	-7.44	-7.03	-5.35
	Estriol(1b)	-12.70	-25.90	-4.95

a) At 298.1 K

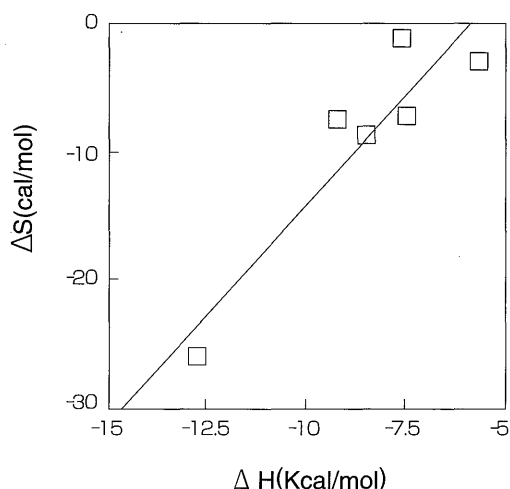


Figure 4 Entropy-enthalpy Compensation Plots for Complex Formation.

をしていることを示唆している<sup>16)</sup>。

### 3-3 分子モデル計算及び包接の様式

上記の実験結果をさらに詳細に検討するため、エストロゲンとCD誘導体のコンプレックス形成時のエネルギーを生体レセプターとしてのCDとの相互作用の理論計算によるアプローチを試みた。

シクロデキストリン (CD) は、グルコピラノース単位からなる  $\alpha$ -1,4 結合の環状オリゴ糖である。正多角形に近い断面を有する円筒状の立体構造をしている。CD の第一級水酸基側 (Primary face) は狭く、第二級水酸基 (Secondary face) は広い。これは、グルコース間の立体障害と分子間水素結合のためと考えられる。CD の周辺は、親水的で水に可溶であるがその空洞の内部は疎水的であるため疎水性化合物及び疎水性残基をもつ親水性化合物が存在すると取り込むことが知られている。また、CD の内孔の直径は  $\alpha$ -CD

= 5.7 Å,  $\beta$ -CD = 7.8 Å,  $\gamma$ -CD = 9.5 Å であり、探さが約 8 Å である。包接される分子もしくは、分子の一部はこの中に安定に収容されるものでなければならない<sup>17-20)</sup>。本研究では 1a とこれら 3 種 (2a,b,c) との相互作用を分子力場 (MMFF) 及び半経験的分子軌道計算 (MO) により検討した。

分子力場計算は Compaq Digital Alpha Workstation 上で動作する分子設計支援ソフト Spartan の MMFF 力場を用いた。CD として、 $\beta$ -CD (2a), DM- $\beta$ -CD (2b), 及び TM- $\beta$ -CD (2c) を選択し使用した。また基質として結合定数の大きい 1a を主として用いた。

まず最初に、基質 1a 及び 1b の安定構造を探索した。構造探索には上記 Spartan の MMFF 力場上で動

作するモンテカルロシミュレーションを用いた。モンテカルロ計算は、ある定められた確立規則に従って系を位相空間上でランダムに変位させる方法であり、分子のコンフォメーション構造の探索に適している。シミュレーションは Spartan の初期設定値を用いた。すなわち、各二面角の初期配座を 30 度間隔で発生させ、また糖の環状部分は小澤らが開発した方法を併用した。1a の場合 441 配座、1b の場合 469 配座からの検索の結果、得られたそれぞれ 20 個の安定構造を表 3 に示した。その内、互いの最安定構造をフェノール基の部分を中心に重ね合わせた構造を図 5 に示した。両分子ともほぼ平面構造を示したが、フェノール基の部分以外はその立体構造が微妙に異なることが分かった。

Table 3 Total energies of 1a and 1b obtained by monte carlo simulation<sup>a)</sup>

Molecule	Estradiol (1a)		Estriol (1b)	
	E(kcal/mol)	Rel. E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel. E(kcal/mol)
1	58.9631	0.0000	78.7432	0.0000
2	59.0215	0.0584	78.8024	0.0592
3	59.0660	0.1028	78.8578	0.1146
4	60.2720	1.3089	78.9187	0.1755
5	60.3680	1.4048	79.8450	1.1018
6	60.5310	1.5679	79.9171	1.1739
7	60.5948	1.6317	80.0425	1.2993
8	61.0553	2.0921	80.0760	1.3328
9	61.0768	2.1137	80.1862	1.4430
10	62.6215	3.6584	80.2134	1.4702
11	62.6898	3.7267	80.2671	1.5239
12	65.7938	6.8306	80.5598	1.8166
13	65.8781	6.9149	81.0293	2.2861
14	66.0860	7.1229	81.4450	2.7018
15	66.2020	7.2389	81.4666	2.7234
16	66.6023	7.6392	81.5416	2.7984
17	66.6225	7.6593	81.9281	3.1848
18	68.2959	9.3328	82.1147	3.3715
19	68.3996	9.4365	82.1998	3.4566
20	68.4295	9.4664	82.2162	3.4729

a) Based on MM calculation (MMFF force field).

上記の前もって単独で最適化された両分子は Spartan 上で CD と重ね合わせ、複合体を作成した。複合体形成には基質は左右対称でないので図 6 の (a) - (d) に示すように、CD の正方向及び逆方向にそれぞれの分子方向に挿入して重ね合わせた場合と、CD の上下に平行に配置した場合の 4 種類の複合体形成を考え、これらを初期値として、上記同様 MMFF 力場にてモンテカルロシミュレーションを試みた。1a の

場合約 19000-21000 の初期配座を発生させ極小化を試みた。一例として、十分に安定化させた後、その安定化されたエネルギーの低い順にまとめたのが表 4 である。この例では、最安定構造は (c) の初期構造からのシミュレーションで得られた。

さらに最終的にその各複合体の極小化を同じ MMFF 力場で行った。β-CD, DM-β-CD, 及び TM-β-CD と 1a を用いた 4 種類の各複合体の (a) - (d) の 4 通りの初期構造のシミュレーションから得られた最安定化された分子複合体を図 7 に示す。各複合体の最安定構造は (c) の初期構造から得られた。また複合体の中で各安定構造はそれぞれ異なった複合体形成を示したが、フェニル基がほぼ CD の中央に含んだ複合体形成の安定構造が得られた。

また各コンポーネント別のエネルギー変化を表 5 に示す。表中、上からそれぞれ全エネルギー、伸縮、変角、伸縮変角、平面外変角、ねじれ、静電及びファンデルワールス力の各コンポーネントを示す。この表から明らかのように、各複合体形成における安定化の全エネルギーは約 20-25kcal/mol 減少し、安定な結果が得られた。その内、β-CD 及び DM-β-CD が 25kcal/mol とほぼ同様のエネルギー差を示したが、TM-β-CD は 20kcal/mol と若干低く、これらの結果は実験で得られた結合定数と、その順序がほぼ一致し、相関することが認められた。また、各コンポーネント別のエネルギー変化から、それぞれ形態は異なるが、静電結合力及びファンデルワールス力の効果が大きく、水素結合及び疎水性結合により包接複合体が安定化されることが示唆された。

次に、MMFF にて最安定化した包接複合体について、半経験的分子軌道計算プログラムである MOPAC2002 を用いた結果を考察する。MOPAC2002 より、前章で示したように、包接複合体の生成熱、全エネルギー (Electronic energy, Core-core repulsion), 最高被占分子軌道 (HOMO) と、最低空軌道 (LUMO) を算出した。そして、この HOMO, LUMO をもとに Absolute hardness (絶対ハードネス;  $\eta$ ) 及び、Absolute electronegativity (絶対電気陰性度;  $\chi$ ) を算出した。それぞれ計算した複合体形成の結果を表 6 に示した。得られた  $\chi$  値は 1a 単独と比べ増加したが、 $\eta$  値は若干減少した。また、 $\chi$  と  $\eta$  のはつきりした相関性は本研究では認められなかった。

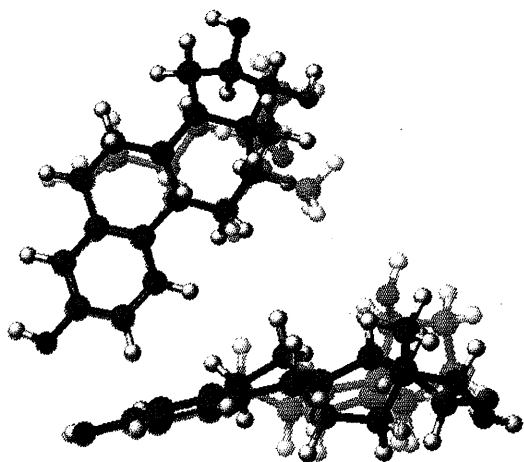


Figure 5 Molecular Docking Structures of Estradiol(1a) and Estriol(1b).

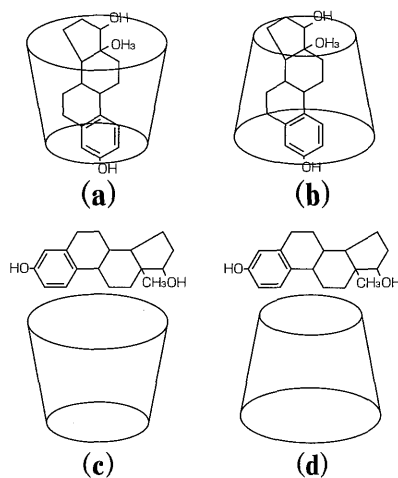


Figure 6 Sketch of the Different Topologies for the Entry of the Guest Molecule into the Cavity of CD Host.

Table 4 Total energies of CD(2)-estradiol(1a) complexes obtained by monte carlo simulation<sup>a)</sup>

$\beta$ -CD(2a)	a		b		c		d	
	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)
1	660.9819	0.0000	656.7574	0.0000	641.8160	0.0000	651.8246	0.0000
2			657.2873	0.5299	648.8009	6.9849		
3			657.3918	0.6344	649.5965	7.7805		
4			660.0633	3.3060				
5			662.5377	5.7804				
6			663.6189	6.8615				
7			665.0669	8.3096				
8			665.6252	8.8678				
9			666.0414	9.2841				
10			666.5805	9.8231				

DM- $\beta$ -CD(2b)	a		b		c		d	
	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)
1	723.7435	0.0000	718.9355	0.0000	725.4119	0.0000	729.9758	0.0000
2	726.3072	2.5638	725.5296	6.5941	727.1665	1.7546	735.1347	5.1589
3	727.1748	3.4313			730.3120	4.9001	737.0247	7.0489
4	727.7963	4.0528			731.4834	6.0715		
5	728.0537	4.3102						
6	728.0994	4.3559						
7	728.5797	4.8362						
8	728.8742	5.1307						
9	732.6303	8.8869						

TM- $\beta$ -CD(2c)	a		b		c		d	
	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	Rel.E(kcal/mol)
1	774.9873	0.0000	775.3691	0.0000	772.7731	0.0000	774.7742	0.0000
2			776.4015	1.0324			784.6303	9.8561
3			779.4047	4.0357				

a) Based on MM calculation (MMFF force field).

また表7には各包接化合物のエネルギー変化を示した。生成熱及び全エネルギー変化の値はほぼ同じ値を示した。分子力場計算 (MM) の計算と同様に、最安定化した各シクロデキストリンとエストロゲンの包

接作用に伴う生成熱及び全エネルギー変化 (Complex形成過程のエネルギー) は、包接複合体のエネルギーから CD と 1a の単独のエネルギーを足したものを引いた値であり、その差が大きくなるほど包接複合体が

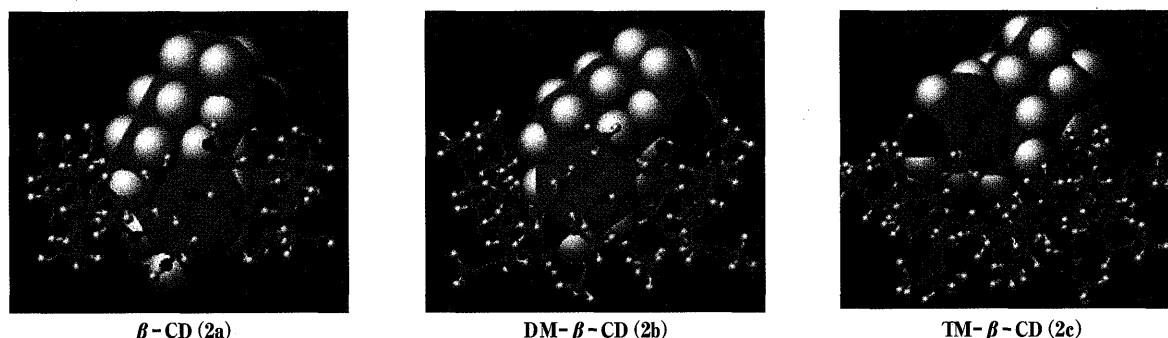


Figure 7 Computer-generated Molecular Models of Three Complexes Detected for the CD Hosts and Estrogens

Table 5 Change in the energies and their components of complex formation of estradiol with CD hosts.<sup>a,b,c)</sup>

	$\beta$ -CD	DM- $\beta$ -CD	TM- $\beta$ -CD
Totals	-24.4104	-24.2901	-20.8999
Stretching	0.2546	-0.3356	0.2880
Bending	2.4395	-0.5431	2.6763
Stretch-Bend	0.2281	0.2108	0.3402
Out-Of-Plane	0.0219	0.00231	0.0119
Tors.	1.048	5.051	-0.379
Elect.			
1-4 Interactions	-3.534	1.185	0.603
Nonbonded	-9.118	-16.681	-12.438
Vdw			
1-4 Interactions	-0.4761	0.4911	0.4713
Nonbonded	-15.2775	-13.6710	-12.4730

a) Based on MM(MMFF force field) calculation.

b) Kcal/mol.

c) Change in the energy [total energy of inclusion compound (Host-Guest)] - [(total energy of Guest) + (total energy of Host)].

Table 7 Changes in the energy for complex formation of estradiol(1a) with CD

Complexes	HEAT OF FORMATION (KCAL)	TOTAL ENERGY (EV)	ELECTRONIC ENERGY (EV)	CORE-CORE REPULSION (EV)
$\beta$ -CD(2a)	-5.4047	-0.2343	-100031.9077	100031.6733
DM- $\beta$ -CD(2b)	-5.5262	-0.2396	-112338.5333	112338.2936
TM- $\beta$ -CD(2c)	-4.9809	-0.2159	-107065.8033	107065.5874

a) Based on mopac(PM5) calculation.

b) Charge in the total energy [total energy of the inclusion compound(Host-Guest)] - [(total energy of Host) + (total energy of Guest)]

Table 6 Calculated molecular properties for hosts, guests, and their complexes<sup>a)</sup>

$\beta$ -CD(2a)-Estradiol(1a)	HEAT OF FORMATION (KCAL)	TOTAL ENERGY (EV)	ELECTRONIC ENERGY (EV)	CORE-COREC REPULSION (EV)	$\mathcal{E}_{\text{HOMO}}$ (EV)	$\mathcal{E}_{\text{LUMO}}$ (EV)
Estradiol(1a)	-120.4654	-3083.6262	-24290.4761	21206.8497	-8.599	0.573
$\beta$ -CD(2a)	-1579.0589	-15811.8343	-234243.1944	218431.3600	-10.364	-0.654
$\beta$ -CD-Estradiol	-1704.9291	-18895.6950	-358565.5781	339669.8831	-8.846	-0.556

a) Based on mopac(PM5) calculation

DM- $\beta$ -CD(2b)-Estradiol(1a)	HEAT OF FORMATION (KCAL)	TOTAL ENERGY (EV)	ELECTRONIC ENERGY (EV)	CORE-COREC REPULSION (EV)	$\mathcal{E}_{\text{HOMO}}$ (EV)	$\mathcal{E}_{\text{LUMO}}$ (EV)
Estradiol(1a)	-120.4567	-3083.6259	-24290.2801	21206.6542	-8.618	0.542
DM- $\beta$ -CD(2b)	-1479.8949	-17896.5201	-312428.0463	294531.5262	-9.958	-0.319
DM- $\beta$ -CD-Estradiol	-1605.8779	-20980.3856	-449056.8597	428076.4741	-8.749	-0.250

a) Based on mopac(PM5) calculation

TM- $\beta$ -CD(2c)-Estradiol(1a)	HEAT OF FORMATION (KCAL)	TOTAL ENERGY (EV)	ELECTRONIC ENERGY (EV)	CORE-COREC REPULSION (EV)	$\mathcal{E}_{\text{HOMO}}$ (EV)	$\mathcal{E}_{\text{LUMO}}$ (EV)
Estradiol(1a)	-116.1435	-3083.4388	-24307.3087	21223.8698	-8.598	0.594
TM- $\beta$ -CD(2c)	-1415.4214	-18938.2171	-360197.0884	341258.8713	-9.612	0.100
TM- $\beta$ -CD-Estradiol	-1536.5459	-22021.8720	-491570.2005	469548.3285	-8.402	-0.175

a) Based on mopac(PM5) calculation.



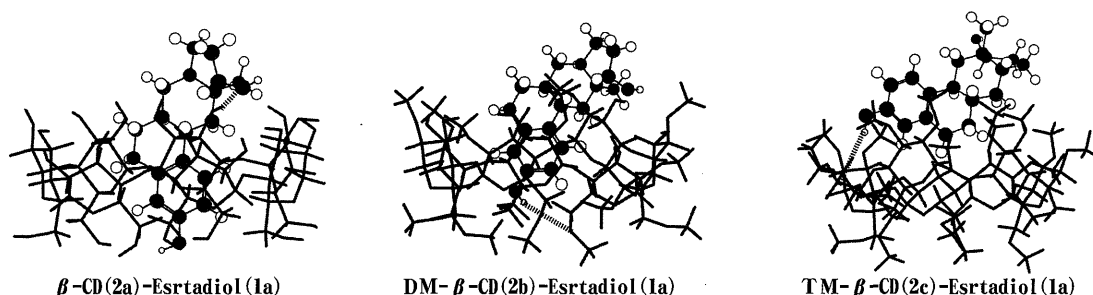


Figure 8 Optimized Molecular Structures of Complexes obtained by MO Calculation (PM5). (Broken Lines show Hydrogen Binding Interaction)

安定しているといえる。生成熱の変化を比較すると包接に伴うエネルギー変化はすべてマイナスであり、包接することにより化合物が安定化されることを示している。MM 計算の結果と同様に、DM- $\beta$ -CD、 $\beta$ -CD、TM- $\beta$ -CD の順で低い安定化エネルギーが得られ、実験結果により近い傾向が認められた。また、図 8 に MOPAC 計算で得られた、安定構造の分子図を示した。この図は MM 計算で得られた結果とほぼ同じであるが、図中の点線で示したように、ゲストとホスト間で異なった水素結合の可能性が示された。 $\beta$ -CD とはエストラジオールのアルコール水酸基の酸素と CD の 2 級水酸基との水素結合、DM- $\beta$ -CD ではフェノール水酸基の水素と CD の第一級水酸基の酸素との水素結合、さらに TM- $\beta$ -CD ではフェノール水酸基の水素と CD の環内のエーテル結合の酸素との結合である。これらの結果は表 5 の各コンポーネント別の静電エネルギーの項目の値と相関しており、各複合体は形態が異なるが、水素結合の関与が安定性に大きく寄与していることを示している。

1a 単独の HOMO は表 7 で示したように  $-8.599 \sim -8.618\text{eV}$  であるが複合体の HOMO は包接により若干に変化し、 $\beta$ -CD の場合、その値は  $-8.846\text{eV}$ 、DM- $\beta$ -CD で  $-8.749\text{eV}$ 、TM- $\beta$ -CD では  $-8.402\text{eV}$  を示し、それほど大きな変化は見られなかった。LUMO は単独ではエストロゲン骨格に、複合体では CD 骨格に分布した。

以上のように、実験的にエストロゲンは比較的大きな結合定数を有し、CD により安定な包接複合体を形成することが確認出来た。また理論的に 1a の複合体形成における安定構造を探求すると共に、得られた安定エネルギーや電子状態の変化の結果から、エストラジオールがどのように CD に結合されるかを推定し、実験から得られた結合定数との相関関係を明らかにし

た。包接に伴う生体レセプターモデルとしての CD の役割、その電子状態が変化するかを予測するとともに、CD によるレセプター結合機能効を推定することが出来た。今後、さらに包接能の高い CD、例えば CD を二個結合したダブル CD 誘導体等を用いることにより、より強力な人口レセプターの開発の可能性が期待できる。

### 3-4 結論

2 種類のエストロゲンとシクロデキストリン (CD) との相互作用に伴う結合定数の測定及び電子状態の変化を理論的に検討した結果、次のような知見が得られた。

1) 2 種類のエストロゲンに CD 濃度を変化させ加えることにより、蛍光スペクトルが変化しいずれの場合も CD 濃度の増加とともに増加し、この変化は包接化合物が形成されている結果であり、Gino C. Catena, Frank V. Bright 等の式を用い、1:1 複合体の結合定数を算出したところ、最も高い結合定数 ( $K_b$ ) が得られたのは、DM- $\beta$ -CD で、次に  $\beta$ -CD、TM- $\beta$ -CD の順であった。このように 3 種の CD 間で結合定数に差が生じたのは、DM- $\beta$ -CD が 3 種の中で最も適切な疎水性環境を提供し、そこへ基質がちょうどフィットしたためと考えられる。熱力学パラメーターの結果より、結合は発熱反応であり、結合のエンタルピーとエントロピーは補償関係にあることがわかった。

2) エストロゲンの CD による複合体形成を分子力場計算 (MM) により算出したところ、すべてにおいて、ほぼ CD は 2 級酸素側を上にしてフェノール基側のベンゼン環が内孔に包接されていることがわかった。最安定化した各シクロデキストリンとエストロゲンの包接作用に伴うエネルギー (Complex 形成過程のエネルギー) は、すべてマイナスであり、約  $20 \sim 25\text{kcal/mol}$  減少し、各コンポーネント別のエネルギーでは、ファンデルワールス力及び静電エネルギーの効果が大きく表われている。両者間の疎水性相互作用及

び水素結合の効果が高まり、包接複合体の安定性が増加することを示している。

3) 分子力場を用いたモンテカルロシミュレーションによる分子モデル計算の結果において、各複合体形成における安定化の全エネルギーは安定な結果が得られた。また、コンピューターの分子モデルから、各複合体には水素結合及び疎水性相互作用が大きく関与していることがわかった。MOPAC2002を用いた包接複合体の分子軌道計算の結果より生成熱及び全エネルギー変化を比較すると包接に伴うエネルギー変化はすべてマイナスであり、包接することにより化合物が安定化されることを示している。上記MMの結果と同様にDM- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CDの順で低い安定化エネルギーが実験結果により近い傾向が認められた。また、電子状態 (HOMO, LUMO) 及び静電ポテンシャルの変化より、包接作用に伴う電荷移動の状態を確認することが出来た。

本研究の遂行にあたり、一部の実験に協力して下さった学部卒研究生の今中香里氏に深く感謝致します。本研究は平成13年度文部科学省科学研究費 (課題番号13680125) 及び、平成15年度山口県立大学研究創作活動助成事業費により行なわれた。

#### 参考文献

- 1) 田伏岩夫・西谷孝子・木村栄一・服部憲治郎・小田嶋和徳・古賀憲司・戸田不二緒, “ホスト-ゲストの化学”, 共立出版 (1979).
- 2) 環境庁リスク対策検討会監修, “環境ホルモン 外因性内分泌攪乱物質問題に関する研究班中間報告書”, 環境新聞社 (1998).
- 3) 日本化学会編, “ダイオキシンと環境ホルモン”, 東京化学同人 (1998).
- 4) M.L.Bender and M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry" Springer-Verlag, New York (1977) .
- 5) W. Saenger, *Angew.Chem.Int.Ed. Engl.*, **19**, 344 (1980) .
- 6) L. J. Cline Love, M. L. Grayesky, and J. Novoski, *Anal.Chim.Acta*, **170**, 3 (1985) .
- 7) F. Garcia Sanchez, M. Hernandez, and A. Heredia, *Anal.Chim.Acta*, **187**, 147 (1986) .
- 8) H-J. Buschmann, D. Knittel, and E. Schollmeyer, *Melliand Textilber.*, **72**, 1012 (1991) .
- 9) E. Junquera, G. Tardaios, and E. Aicart, *Langmuir*, **9**, 1213 (1993) .
- 10) K. Harada, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **49**, 1493 (1976) .
- 11) R. L. VanEtten et al., *J.Am.Chem.Soc.*, **89**, 3242 (1967). *J.Am.Chem.Soc.*, **89**, 3253 (1967) .
- 12) 阿部浩, “シクロデキストリンホストの多次元機能の開発に関する理論的実験的研究”, 2002年度山口県立大学大学院修士論文
- 13) G. C. Catena and F. V. Bright, *Anal.Chem.*, **61**, 905-909 (1989) .
- 14) 伊原靖二, 中野昭夫, 山口県立大学生生活科学部研究報告, **27**, 11-18 (2001) .
- 15) 伊原靖二, 今村主税, 山口県立大学大学院論集, **3**, 61-70 (2002) .
- 16) 築部浩, “分子認識化学”, 三共出版, 東京 (1997) .
- 17) Y. Matsui and K. Mochida, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **51**, 673 (1978) .
- 18) R. J. Clarke, J. H. Coates, and S. F. Lincoln, *J. Chem.Soc.,Faraday Trans. I.*, **82**, 2333 (1986) .
- 19) H. Benesi and J. Hildebrand, *J. Am.Chem.Soc.*, **71**, 2703 (1949) .
- 20) D. L. Dick, T. Venkata, S. Rao, D. Sukumaran, and D. S. Lawrence, *J.Am.Chem.Soc.*, **114**, 114 (1992) .