

環状オクタペプチドによる芳香族アミノ酸および カテコールアミン類の分子認識

石津隆、野口俊作

Molecular Recognition of Aromatic Amino Acids and Catecholamines by Use of Cyclooctapeptides

Takashi ISHIZU and Shunsaku NOGUCHI

ABSTRACT

We have been attempting to synthesize the peptide which is possible to recognize effectively *l*-noradrenaline like a adrenoceptor. For the purpose the cyclooctapeptide having a rigid skeleton, cyclo(L-Phe-L-Pro)₄ was investigated to form the complex with some catecholamines and aromatic amino acids which are the precursors of adrenaline in the biosynthetic pathway (Chart 1). The resulted complexes of cyclo(L-Phe-L-Pro)₄ with them were formed by the force of one or two kinds of the hydrogen bond and the interaction of the pyrrolidine ring of Pro² residue with their aromatic rings. The enantioselectivity of cyclo(L-Phe-L-Pro)₄ in the complex formation was also investigated.

【はじめに】

生体は摂取した薬物を薬物受容体とよばれる蛋白質において正確に認識して取り込み、これと相互作用することで種々の生理作用の発現へと至っている。このような生体高分子の優れた分子認識能、反応触媒能、情報やエネルギー交換能などを範として、期待される機能を持つ化合物の設計、合成を目的とした、いわゆる“supramolecular chemistry”の研究が活発に行われている。その結果シクロデキストリン、クラウンエーテル、およびカリックスアレーンを用いて数多くの人工酵素や人工受容体が合成されてきた。¹⁾

その一環として著者らはアドレナリン、ノルアドレナリンをはじめとするカテコールアミン類を選択的に取り込み、さらにその*dl*を効率的に識別できる、いわば“人工アドレナ

リン受容体⁷⁾の構築をペプチドを用いて行っていくことにした。生体成分であるペプチドを素材としたこのようなモデルは、生体高分子と種々の薬物との相互作用を解明していくために今後その重要性が増してくるものと思われる。

そこで人工アドレナリン受容体の第一歩として環状オクタペプチドCyclo(L-Phe-L-Pro)₄について考察することとし、このものが基質(ゲスト化合物)であるカテコールアミン類との相互作用において前述の機能をどの程度有しているか調べることにした。またその基質(ゲスト化合物)としてはカテコールアミン類だけでなく、これらとは構造的にも類似性の高いChart 1に示した化合物、すなわちアドレナリンの生合成経路における前駆物質である芳香族アミノ酸メチルエステル塩との相互作用についても検討することにした(Chart 1)。

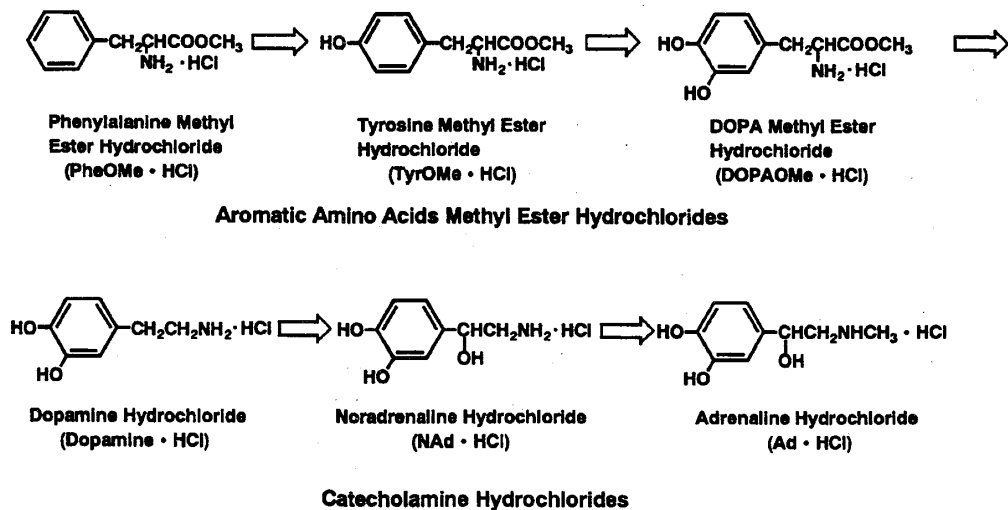


Chart 1

【これまでの人工受容体について】

これまでに Chart 1の化合物に関して合成されてきた人工受容体について紹介する。アミノ酸エステル塩については、Cramらによりクラウンエーテルに1,1'-ビナフチルユニットを二個つけた1が合成された。これはアミノ酸エステル塩を取り込む際に、不斉選択能を示すことが見いだされている。²⁾ フェニルグリシンエステル塩のラセミ体 [(R)-2および(S)-2]に光学活性な1のS,S-体を混合すると、(S,S)-1と(R)-2および(S,S)-1と(S)-2という二種の錯体が生じる。それぞれC-N結合の軸方向から眺めた様子をChart 2に示している。(S)+(S,S)の錯体はクラウンエーテル部分の酸素原子と2のNH₃⁺の間で三本の水素結合により形成しているが、錯体(R)+(S,S)の錯体はそれに加えて、エステル基による水素結合を含む四つの結合によりできている。そのため後者の方がエネルギー的に有

利で、より安定であるので前者よりも優先的に生成することにより不斉選択能を示している。

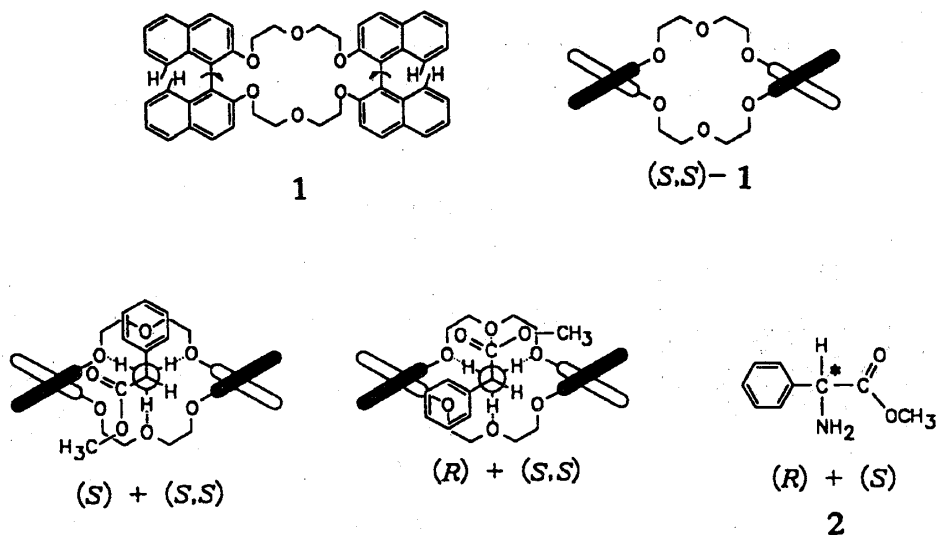


Chart 2

また生越ら³⁾はポルフィリン誘導体がChart 3aに示すように、アミノ酸を二点相互作用により認識すると報告している。それはポルフィリンの中心金属Rhとアミノ酸のNH₂の間の配位結合および、ナフトールの水酸基とアミノ酸のカルボニル基との水素結合によるものである。これらはポルフィリン骨格の剛直性とピロールのβ位に導入されたエチル基がナフトール環の回転を阻害することにより可能になっている。

Stillら⁴⁾はC₃-対称性をもつ剛直な人工受容体(Chart 3b)を合成し、N末端をBoc基またはアセチル基で、C末端をアルキルアミドで保護したアミノ酸に対する不斉認識能を検討した。NMRの化学シフトの変化から算出される結合エネルギーは、いずれのアミノ酸の場合もL体のほうがD体よりも大きく、より強く結合する。例えば、N-Boc-Val-NHMeを基質とした場合、L体の結合エネルギーは、D体に比べ2.9Kcal/mol大きい。これらアミノ酸誘導体は、bのアミド基との水素結合を通じて、C末端のN-メチル基が結合ポケット内の奥深くまではまり込んだ形で結合すると推定しており、bのリジッドで三次元的な不斉構造が選択性に寄与しているものと考えられている。

またMendozaら⁵⁾は、Chart 3cに示したように、光学活性なグアニジン化合物をベースとして、片方にβ-ナフチルエステル、もう片方にアザクラウンエーテルを有する不斉人工受容体を合成した。これは1) 高い塩基性 (PK_a=13.5) を有するグアニジン部分とカルボン酸との静電相互作用、2) ナフチル基とアミノ酸側鎖の芳香環とのπ-πスタッキング、3) クラウンエーテル部位によるアンモニウム基の補足という三点から成る不斉認識のメ

カニズムが提唱されている。

これを用いて小西ら⁶⁾は中性条件下、アミノ酸の有機溶媒中への取り込み(液-液抽出)を試み、脂肪族の側鎖を持つアミノ酸はほとんど抽出されずに、トリプファン、フェニルアラニン、などの芳香族を有するアミノ酸が選択的に抽出されることを報告している。

一方、カテコールアミン類を認識し得る人工受容体としてはChart 4に示す大環状ポリ

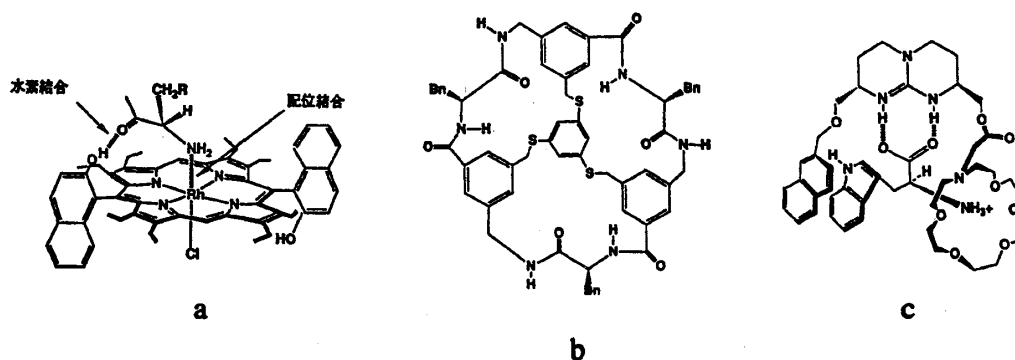


Chart 3

アニオンがある。このものはアミノ化合物の取り込み能において $-NH_3^+ > -NRH_2^+ > -NR_2H^+ > -NR_3^+$ と顕著な選択性を示し、また水溶液中でも取り込みが可能であるという利点がある。そこでこれを用いることにより、ノルアドレナリンとアドレナリン、またノルエピネフリンとエピネフリンを水中で識別することが可能になるという報告がある。⁷⁾

以上いままでに合成された人工受容体の例を見てきたが、ペプチドを用いた例はほとん

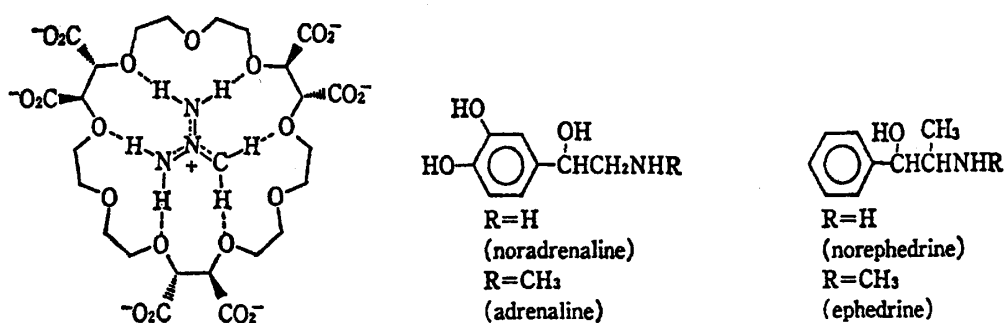


Chart 4

どない。その理由としては、ペプチドの自由度が比較的大きく、また分子内に水素結合のドナー(NH)とアクセプター(CO)が数多く存在しており、予期しない箇所にも分子内水素結合を形成して、ある機能を期待して合成してもなかなか予想通りにはいかないからである。

しかしこれらの要因をうまく制御することができれば、元来ペプチドが有しているポリアミド結合や側鎖の特色を巧みに生かした様々な生体モデルが可能になってくる。

そこで近年技術の進歩が著しい核磁気共鳴(NMR)スペクトルを駆使することで、水素結合の位置を確認しつつペプチドによる人工アドレナリン受容体の構築を行っていくこととした。

【ペプチドによる人工受容体の構築】

ペプチドを用いたほとんど唯一の人工受容体の報告として、アミノ酸エステル塩を取り込む環状ペプチドCyclo(Gly-L-Pro)_n (n=3, 4)がある (Chart 5)。⁸⁾ この錯体はアミノ酸エステル塩のアモニウム基がCyclo(Gly-L-Pro)_n (n=3,4)のカルボニル基と水素結合によって形成しているものと考えられている。⁹⁾ 著者はこのCyclo(Gly-L-Pro)_n (n=3,4)による錯体形成をたたき台として、人工受容体の構築を行っていくことにした。

通常、アミノ酸残基のペプチド結合はトランス配座しかとらないのに対し、プロリン残基を含むペプチド結合はシス配座およびトランス配座の両方をとることができる (Chart 6)。そのためプロリン残基を含むペプチドは取り得るコンホメーションの数が増し、それだけ基質分子を取り込む可能性が増してくる。そこでCyclo(Gly-L-Pro)₄のプロリン残基を残し、グリシン残基を他の残基に変えていくことにした。

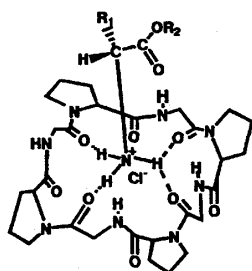
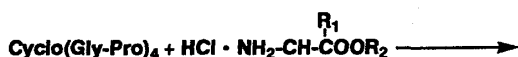


Chart 5

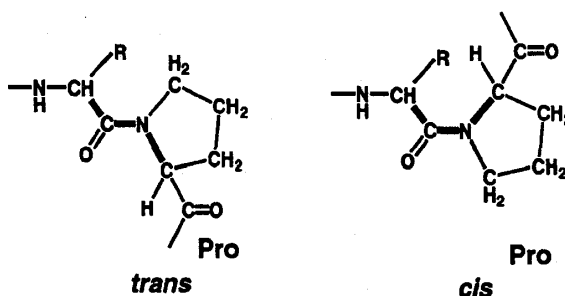


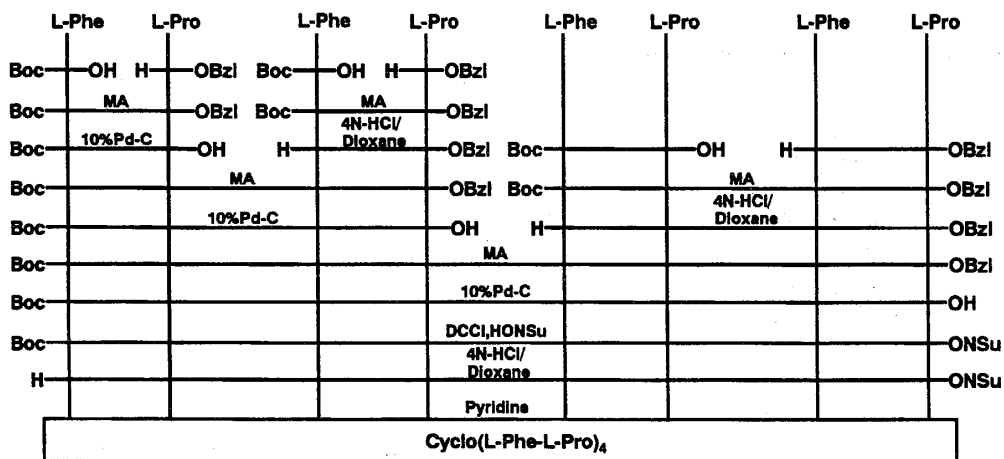
Chart 6

このような環状ペプチドについては木村らが、Cyclo(L-Lys-L-Pro)₄、Cyclo[L-Lys(Z)-L-Pro]₄、およびCyclo(L-Phe-L-Pro)₄を人工イオノホアとして合成し、アルカリ金属、アルカリ土類金属との錯体形成について以下のように報告している。¹⁰⁾ エタノール中においてCyclo(L-Lys-L-Pro)₄、Cyclo[L-Lys(Z)-L-Pro]₄の両者はK⁺、Ba²⁺、Ca²⁺と錯体を形成することができるが、Cyclo(L-Phe-L-Pro)₄はこれらの金属と錯体を形成することはできない。これは前者の骨格は柔軟で、エタノール溶液中でコンホメーション変化をおこし、カルボニル基の配列が金属を取り込みやすい配列へと変化するのに対して、後者の骨格はリジッドで変化しないためである。

著者はこれらのうちCyclo(L-Phe-L-Pro)₄ (以下CFP4と略す)に着目した。このものは4個のベンゼン環とピロリジン環がリジッドな骨格によって固定され、Chart 1の化合物がちょうど一分子入るくらいの大きさの疎水的な内孔を形成しているのではないかと考えたからである。さらにここに取り込んだ化合物に対してポリアミド結合が様々な相互作用を及ぼすようになるのではないかと想定し、人工アドレナリン受容体としての可能性を検討していくことにした。

【CFP4のコンホメーション】

CFP4についてはScheme 1に示したように、混合酸無水物 (MA)法によりペプチド鎖を伸長し、活性エステル法により環化して合成した。¹¹⁾ 尚、保護基の除去には4N-塩酸ジオキサンおよび10% Pd-Cを用いた。



CFP4のコンホメーションについては、CDCl₃、CD₃OD、およびDMSO-D₆中でC₂-対称コンホメーションをとっていることが報告されている。¹¹⁾ それぞれの残基をPhe¹、Pro¹、Phe²、およびPro²と命名するとPro²のところでシスペプチド結合をとり、そこでβ-turn (1←4分子内水素結合)をしている。またPhe¹のアミドプロトンとPro¹のカルボニル基との間で分子内水素結合を形成している。

著者はさらにCFP4のHMQCおよびHMBCをはじめとする各種2D-NMRスペクトルを用いて¹H-NMR、¹³C-NMRスペクトルの各シグナルの帰属を行った (Table 1)。

Table 1. CFP4のNMR スペクトルデータ^{a)} (ppm)

Carbon	Proton	Carbon	Proton
Pro ¹ CO	172.34	Pro ² C _α	60.49 H _α 2.99-3.03
Pro ² CO	171.24	Pro ¹ C _α	59.68 H _α 4.51-4.55
Phe ² CO	170.42	Phe ² C _α	54.87 H _α 4.60
Phe ¹ CO	168.72	Phe ¹ NH	Phe ¹ C _α 54.44 H _α 4.51-4.55
Phe ¹ C _γ	138.26		↓
Phe ² C _γ	135.66	8.96	Pro ¹ C _β 47.50 H _β 3.73-3.78, 3.80-3.84
Phe ¹ C _o	129.78	Phe ¹ , Phe ²	Phe ² C _β 38.24 H _β 3.14-3.20, 3.22-3.27
Phe ² C _o	128.96	H _o , H _m , H _p	Phe ¹ C _β 35.64 H _β 2.99-3.03, 3.14-3.20
Phe ¹ C _m	128.77		↓
Phe ² C _m	128.26	7.10-7.33	Pro ² C _β 30.71 H _β 0.86-0.94, 1.81-1.85
Phe ² C _p	127.60		Pro ¹ C _β 29.50 H _β 2.16-2.24, 2.33-2.39
Phe ¹ C _p	126.48		Pro ¹ C _γ 25.66 H _γ 2.02-2.05, 2.16-2.24
			Pro ² C _γ 21.46 H _γ 0.75-0.85, 1.38-1.42

^{a)} NMRサンプルはCFP4 (14.64mg)をCDCl₃ (1ml)に溶かしたものをを用いた。

¹³C-NMRスペクトルではシグナルの数がCFP4の炭素数の半分だけ観測され、C₂-対称コンホメーションをとっていることが確認され、八個のカルボニル炭素がカルボニル領域において四つのシグナルで観測される。これらカルボニル炭素のシグナル (168.72, 170.42, 171.24, 172.34 ppm) は主に、¹³C-¹H Correlation Spectroscopy (COSY) 2D NMR、およびCorrelation Spectroscopy via Long Range Couplings (COLOC) を用いてそれぞれ、Phe¹ CO, Phe² CO, Pro² CO, Pro¹ COであると帰属した。

またプロリン残基のC_β, C_γのシグナルが、29.51と30.70ppmおよび21.47と25.65ppmに観測されるが、これは過去のデータ¹²⁾より、29.51と25.65ppmのシグナルがトランス配座のプロリン残基 (Pro¹)のC_β, C_γの炭素であり、30.70と21.47ppmのシグナルがシス配座のプロリン残基 (Pro²)のそれらと帰属した。

次にフェニルアラニン残基のベンゼン環の位置について考察する。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの Pro^2 残基の H_α のプロトンのシグナルが Pro^1 残基の H_α のそれに比べ、1.52 ppm 高磁場にあるのをはじめとして、 Pro^2 残基の各プロトンのシグナルが Pro^1 残基のそれらに比べ、0.51 ppm から 1.30 ppm 高磁場にある。これは Phe^2 残基のベンゼン環が Pro^2 残基のピロリジン環と向き合う位置にあり、ピロリジン環の各プロトンがベンゼン環の環電流の影響を受けることにより高磁場シフトしているものと考えられる。一方 Phe^1 残基のベンゼン環は Pro 残基のピロリジン環の影響を受けない離れた位置にあることを示唆している。そこで CFP4 を模式的に示すと、当初の予想していた Chart 7a に示した構造とは異なり、Chart 7b に示した構造であることが分かった。

以上の NMR の知見より、CFP4 のコンホメーションについては、溶液中で Chart 8 に示した構造をとっていることが分かった。

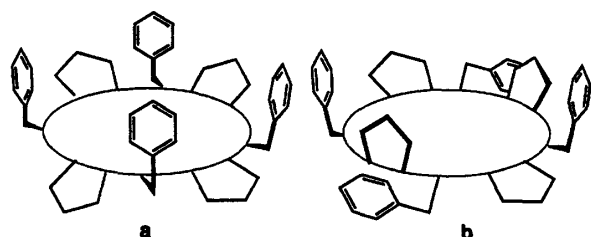


Chart 7

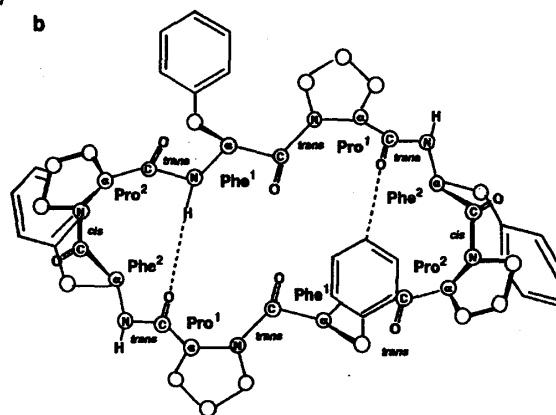


Chart 8

【CFP4の錯体形成反応の溶媒選定】

人工受容体としての機能の第一歩である基質の取り込み(錯体形成)をどのような溶媒中で行うかについて検討した。その手法としては、適当な溶媒中でCFP4およびこれと等量のラセミ体の Chart 1 の化合物を混合し、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを測定する。錯体を形成すれば、これらの化合物の炭素シグナルが分離して観察されることにより確認するという方法である。これはラセミ体はDL体の混合物であり、互いにエナンチオマーの関係にあることから、スペクトル上区別することはできないが、光学活性なアミノ酸で構成される

CFP4とD体の錯体、およびCFP4とL体の錯体というように互いにジアステレオマーの関係にある二種の錯体が形成されれば区別できるようになることによるものである。

このようにして様々な溶媒中でCFP4の錯体形成の可能性について検討したところTable 2に示す溶媒中で、Chart 1の化合物の炭素シグナルが分離して観察され、錯体の形成を

Table 2. CFP4と芳香族アミノ酸メチルエステル塩酸塩およびカテコールアミン塩酸塩との錯体形成時の溶媒

芳香族アミノ酸メチル エステル塩酸塩, カテコールアミン塩酸塩	溶媒
DL-PheOMe · HCl	CDCl ₃
DL-TyrOMe · HCl	CDCl ₃ +DMSO-D ₆ , (MeOH-D ₄) (20:3,v/v)
DL-DOPAOMe · HCl	CDCl ₃ +DMSO-D ₆ , (MeOH-D ₄) (20:3,v/v)
DL-NAd · HCl	CDCl ₃ +MeOH-D ₄ (10:3,v/v)
DL-Ad · HCl	CDCl ₃ +DMSO-D ₆ (20:3,v/v)

確認した。

例として、CFP4とDL-PheOMe · HCl とによる錯体形成を証明した¹³C-NMRスペクトルをFig. 1に示す。

Fig. 1bはCFP4(14.64 mg, 1.5×10⁻⁵ mol) とDL-PheOMe · HCl (3.236 mg, 1.5×10⁻⁵ mol)のCDCl₃(1 ml) 溶液の¹³C-NMRスペクトルであり、DL-PheOMe · HClのシグナルのうち芳香環炭素 C_r, C_p, および不斉炭素 C_α, C_βの炭素のシグナルが分離して観測された。Fig. 1aはDL-PheOMe · HCl (3.236 mg, 1.5×10⁻⁵ mol)のみによるものである。

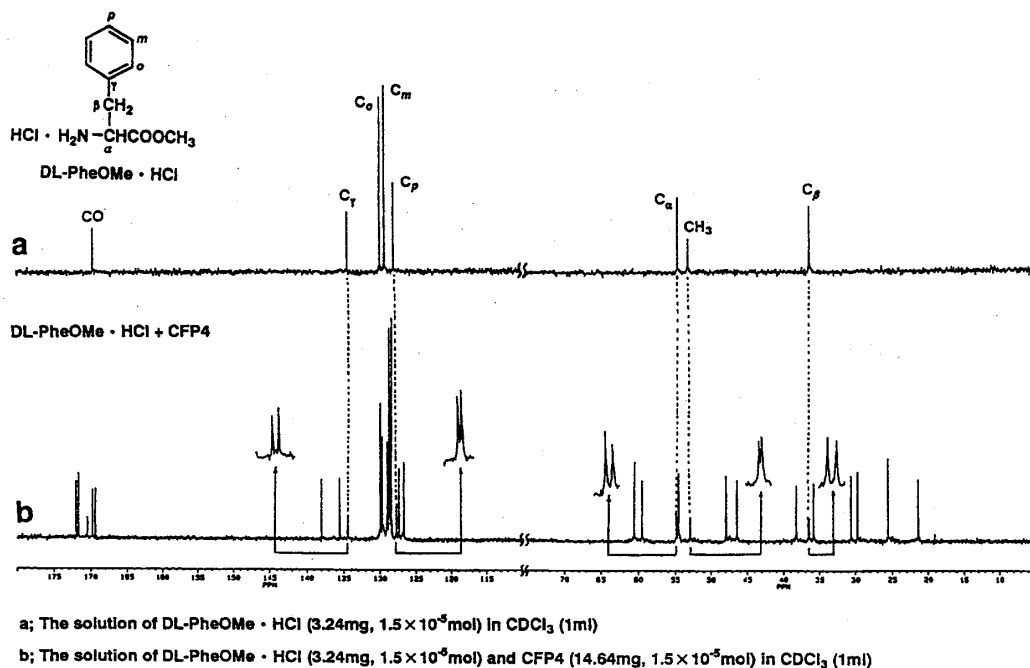
さらに、同様の操作によりCFP4とDL-Ad · HClとの錯体形成について検討したところ、CDCl₃とDMSO-D₆の20:3(V/V)の混合溶媒中でDL-Ad · HClに由来するいくつかの炭素のシグナルが分離して確認された。Ad · HClは一級アミンを有していないが、二級アミンでも錯体形成が可能であることが分かった。ただし光学活性な炭素を持たないドーパミン塩酸塩についてはこの方法による検討は行わなかった。

【CFP4と芳香族アミノ酸メチルエステル塩との錯体形成反応】

Table 2に示した溶媒中で、CFP4はChart 1に示した化合物を取り込むことが分かったので、どのような相互作用によりこれらの化合物を認識しているのかということについて検討していくことにした。

このでまずCFP4とChart 1の前半の芳香族アミノ酸メチルエステル塩〔フェニルアラニ

Fig. 1 ^{13}C NMR Spectra of DL-PheOMe \cdot HCl without and with CFP4

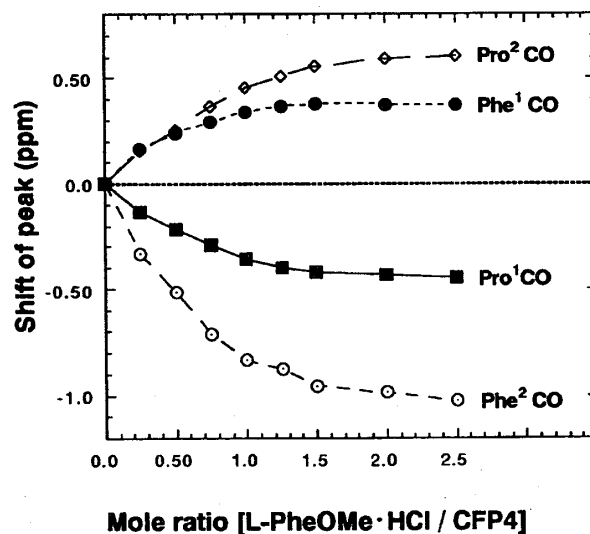


ソメチルエステル塩酸塩(PheOMe \cdot HCl)、チロシンメチルエステル塩酸塩(TyrOMe \cdot HCl)、ドーパメチルエステル塩酸塩(DOPAOMe \cdot HCl)との相互作用について検討した結果をL-PheOMe \cdot HClの場合に焦点を当てて以下に記す。

1) 反応形態

CFP4(14.64 mg, 1.5×10^{-5} mol)の CDCl_3 (500 μl)溶液に、一定モル数のL-PheOMe \cdot HClを加えていき、それぞれの ^{13}C -NMRスペクトルにおけるCFP4の四つのカルボニル炭素のシグナル(168.72, 170.42, 171.24, 172.34 ppm)のケミカルシフトのシフト値を

Fig.2



モル比(L-PheOMe · HCl / CFP4)に対してプロットした(Fig. 2)。

Fig.2の四つの曲線について、モル比法からCFP4とL-PheOMe · HClとの錯体形成反応が1:1で進行していると仮定し、の1式 (Scheme 2) を立てた。Pro² 残基のそれぞれのポイントにおけるR(=CS/CS₀)と未反応のL-PheOMe · HClのモル濃度[S]を求め、この式より結合定数 K=383.75 M⁻¹という値を得た。Rと[S]の関係をプロットした曲線と、この結果から得られる理論曲線とがよく一致していることから、この錯体形成反応が1:1で進行していることが判明した (Fig. 3)。

$$R = \frac{CS}{CS_0} = \frac{K[S]}{K[S] + 1} \quad \dots 1 \text{式}$$

K: 結合定数 (Mol⁻¹)

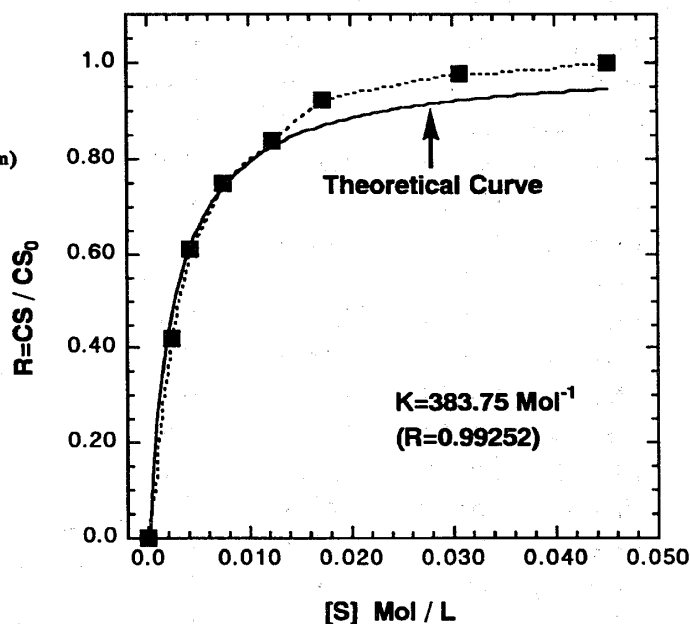
CS: ケミカルシフトのシフト値 (ppm)

CS₀: ケミカルシフトのシフト値の最大値 (ppm)

[S]: 未反応の基質 (Mol / L)

Scheme 2

Fig. 3



2) 骨格の剛直性

Table 3はCFP4および、PheOMe · HClと錯体形成時のCFP4の¹³C-NMRスペクトルデータである。それらのパターンに変化はなく、錯体形成によるコンホメーションの変化がなかったことを意味している。即ち、二つのシスペプチド結合を含むC₂-対称コンホメーションを維持したままであることが分かった。

次にNT₁値を測定した。これはペプチドの運動性を示す指標で、T₁は縦緩和時間であり、Nは結合しているプロトンの数である。この値が小さい程、運動性は小さくリジッドであることを示している。

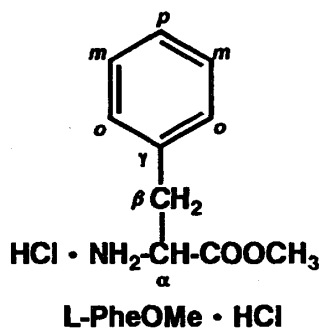
CFP4の各C_α炭素のNT₁値はTable 4に示すように、265msecから334 msec と小さい値を示しており比較的にリジッドなペプチドであることを示唆している。さらにL-PheOMe · HClと錯体形成した時のNT₁値はそれらより少し大きくなるものの以前として小さな値を示しリジッドであることを示している。この変化は後述するように分子内水素結合が錯体形成によりなくなるためであると考えている。

またPhe¹残基およびPhe²残基の炭素C_βのNT₁値がそれぞれ1752 msecと1794 msecであるのが、錯体形成によりそれぞれ760msecおよび584 msec に減少するのは、L-PheOMe・HClがCFP4のベンゼン環とピロリジン環から成る内孔に接近したことを示唆するものである。

Table 3. CFP4とL-PheOMe・HClの錯体形成時の¹³C NMR スペクトルデータ (ppm)

CFP4	a	b	b-a
Pro ¹ CO	172.34	171.98	-0.36
Pro ² CO	171.25	171.65	0.40
Phe ² CO	170.42	169.57	-0.85
Phe ¹ CO	168.72	169.12	0.40
Phe ¹ C _γ	138.26	137.99	-0.27
Phe ² C _γ	135.66	135.40	-0.26
Phe ¹ C _o	129.78	129.65	-0.13
Phe ² C _o	128.96	128.93	-0.03
Phe ¹ C _m	128.77	128.76	-0.01
Phe ² C _m	128.26	128.35	0.09
Phe ² C _p	127.60	127.32	-0.28
Phe ¹ C _p	126.48	126.63	0.15
Pro ² C _α	60.49	60.59	0.10
Pro ¹ C _α	59.68	59.53	-0.15
Phe ² C _α	54.87	54.60	-0.27
Phe ¹ C _α	54.44	54.40	-0.04
Pro ¹ C _β	47.50	47.82	0.32
Pro ² C _β	46.72	46.38	-0.34
Phe ² C _β	38.24	38.26	0.02
Phe ¹ C _β	35.64	35.81	0.17
Pro ² C _β	30.71 (c) [ⓐ]	30.62 (c)	-0.09
Pro ¹ C _β	29.50 (t) [ⓐ]	29.67 (t)	0.17
Pro ¹ C _γ	25.66 (t)	25.52 (t)	-0.14
Pro ² C _γ	21.46 (c)	21.32 (c)	-0.14

L-PheOMe ・HCl	a	b	b-a
CO	169.30	170.55	1.25
C _γ	134.05	134.34	0.29
C _o	129.62	129.67	0.05
C _m	128.95	128.50	-0.45
C _p	127.70	127.63	-0.07
C _α	54.45	54.68	0.23
CH ₃	53.00	52.82	-0.18
C _β	36.32	36.34	0.02



[ⓐ] CFP4 (14.64mg),
測定溶媒 CDCl₃ (500 μl)

[ⓑ] CFP4(14.64mg)+L-PheOMe (3.24mg),
測定溶媒 CDCl₃(1ml)

[ⓒ] cとはそれぞれ *cis*と*trans*を示す。

[ⓐ] L-PheOMe・HCl (3.24mg),
測定溶媒 CDCl₃ (500 μl)

[ⓑ] CFP4(14.64mg)+L-PheOMe (3.24mg),
測定溶媒 CDCl₃(1ml)

Table 4. NT₁ (msec)

residue of CFP4	CFP4 ^{a)}		CFP4+HCl·L-PheOMe ^{b)}	
	C α	C β	C α	C β
Phe ¹	265	1752	410	760
Phe ²	334	1794	335	584
Pro ¹	315	614	400	970
Pro ²	333	2082	376	604

a) The solution of CFP4 (39.04 mg) in CDCl₃ (650 μ l) was measured at 25 °C.

b) The solution which is added HCl·L-PheOMe (8.63 mg) to above one was measured at 25 °C.

3) 水素結合とピロリジン環による相互作用

L-PheOMe·HClのアンモニウム基がCFP4のどのカルボニル基と水素結合をつくるかについて検討した結果、Fig. 2においてPro²残基とPhe¹残基のカルボニル炭素が低磁場シフトすることからCFP4のこれらカルボニル基とL-PheOMe·HClのアンモニウム基の間で分子間水素結合を形成したことが判明した。またPro¹残基のカルボニル炭素が高磁場シフトすることからCFP4の分子内水素結合の消失が考えられる。

さらに錯体形成により¹³C-NMRスペクトルにおいてL-PheOMe·HClのカルボニル炭素が1.25ppm低磁場シフトし (Table 4)、¹H-NMRスペクトルにおいてはCFP4のPhe²残基のアミノ基が0.13ppm低磁場シフトすることからこの間にも水素結合をつくることが分かった。

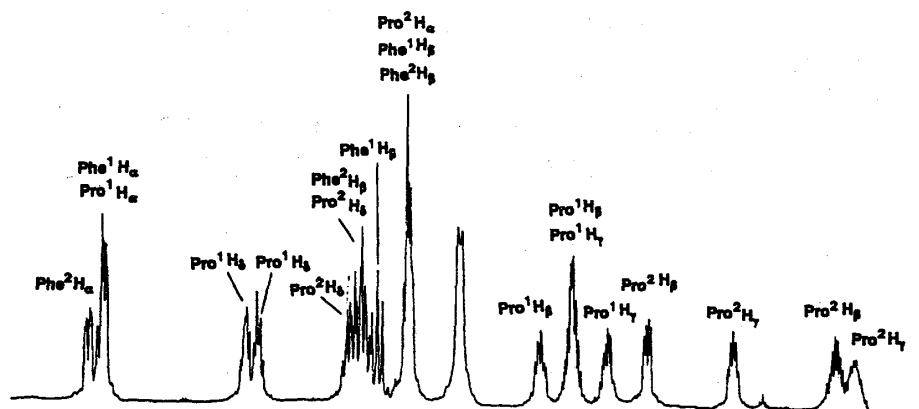
またPro²残基のH α のプロトンを除くプロトンのシグナルが0.08ppmから0.19ppm高磁場シフトしており、L-PheOMe·HClのベンゼン環の環電流の影響を受けていることが考えられる。すなわちこの錯体においてL-PheOMe·HClのベンゼン環部分は、Pro²残基のピロリジン環上にフィックスされていることが示唆される (Fig. 4)。

以上のことからChart 9に示した錯体を形成しているものと考えられる。

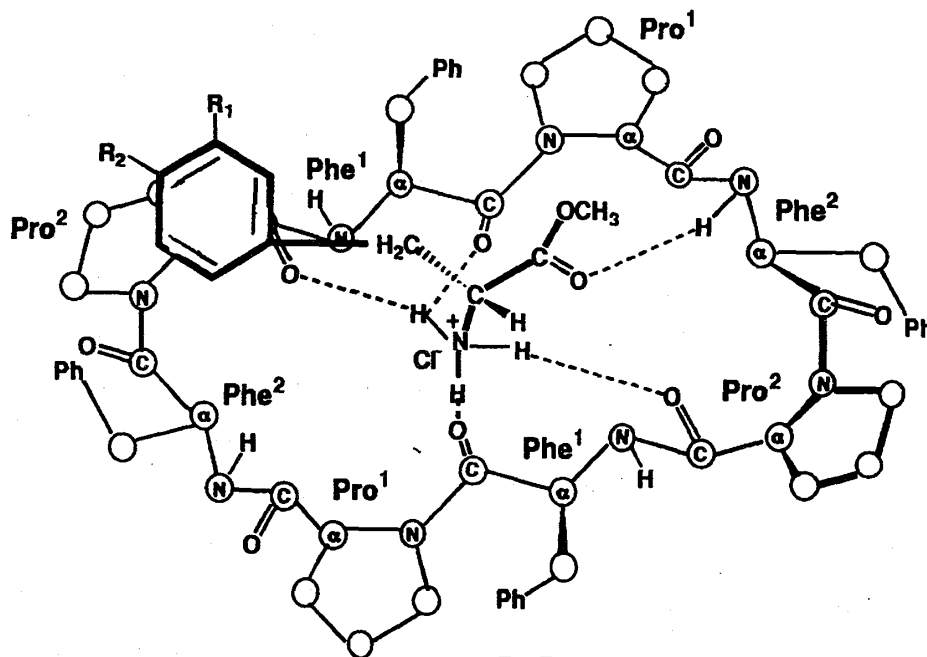
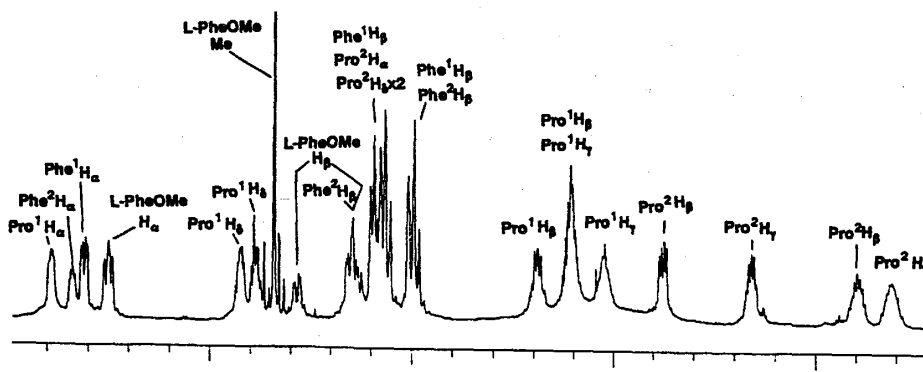
これらの知見より、CFP4はL-芳香族アミノ酸メチルエステル塩 [フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩 (L-PheOMe·HCl)、チロシンメチルエステル塩酸塩 (L-TyrOMe·HCl)、ドーパメチルエステル塩酸塩 (L-DOPAOMe·HCl)] の分子認識を、芳香環をPro²残基のピロリジン環上にフィックスすること、および二種類の水素結合により行っていることが判明した。

Fig. 4. ¹H NMR Spectra

a: the solution of CFP4 (9.76 mg) in CDCl₃ (600 μl)



b: the solution of CFP4 (9.76 mg) with HCl·L-PheOMe (2.15 mg) in CDCl₃ (600 μl)



R₁=R₂=H PheOMe · HCl
 R₁=OH, R₂=H TyrOMe · HCl
 R₁=R₂=OH DOPAOMe · HCl

Chart 9

【CFP4とカテコールアミン塩酸塩との相互作用】

CFP4と芳香族アミノ酸メチルエステル塩との相互作用から得られて知見を参考にして、CFP4がどの程度“人工アドレナリン受容体”として機能するかを検討していくために、Chart 1の後半のカテコールアミン塩酸塩[ドーパミン塩酸塩(DOPAMINE・HCl)、ノルアドレナリン塩酸塩(NAd・HCl)、アドレナリン塩酸塩(Ad・HCl)]との相互作用を調べることとした。その結果をNAd・HClの場合に焦点を当てて以下に記す。

1) 反応形態

CFP4(14.64 mg, 1.5×10^{-5} mol)の CDCl_3 溶液(500 μl)に、一定モル数の*l*-NAd・HClの CD_3OD 溶液(150 μl)を加えて、各モル比の混合溶液につき ^{13}C -NMRスペクトルを測定した。CFP4の四つのカルボニル炭素シグナルのケミカルシフト[172.60(Pro^1CO), 171.77(Pro^2CO), 171.52(Phe^2CO), 168.88(Phe^1CO) ppm]のシフト値をモル比(*l*-NAd・HCl / CFP4)に対してプロットした(Fig. 5)。

この錯体形成反応が1:1で進行しているものと仮定し、 Phe^1 残基のカルボニル炭素について $R(=\text{CS}/\text{CS}_0)$ と未反応の*l*-NAd・HClのモル濃度[S]をプロットした曲線と、得られる理論曲線とがモル比(*l*-NAd・HCl / CFP4)が1.0まではよく一致することから、この時点までは1:1で反応が進行しているものと考えられる(Fig. 6)。しかしこれ以後の反応形態に関しては不明である。

Fig. 5

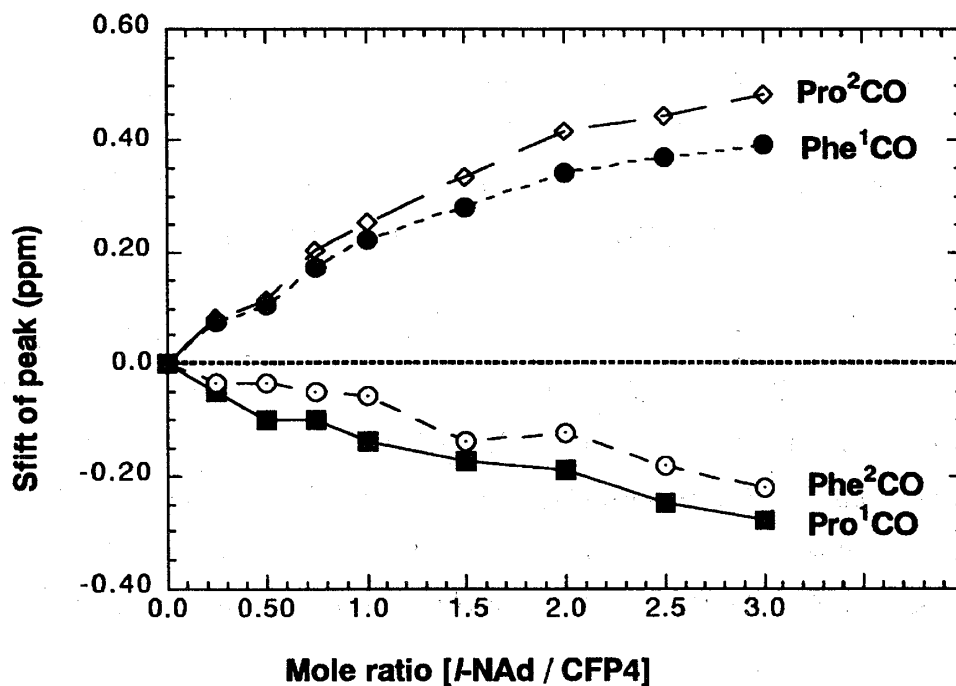
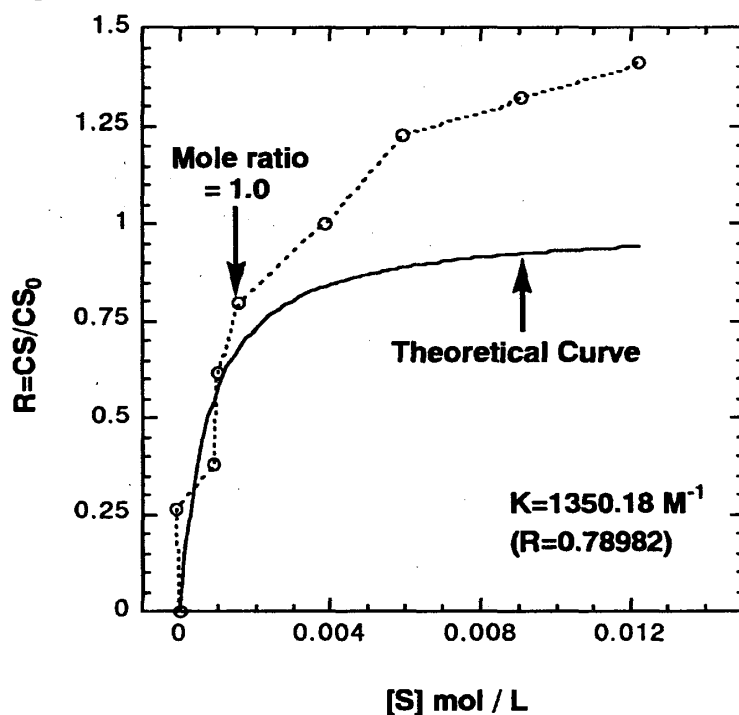


Fig. 6



2) 相互作用

CFP4と*l*-NAd・HClとの錯体形成反応においても、CFP4部分のコンホメーション変化は起こらず、二つのシスペプチド結合を含むC₂-対称コンホメーションを維持したままであることが分かった。

また水素結合については、Fig.5においてPro²およびPhe¹の二つのカルボニル炭素シグナルのケミカルシフトのシフト値が低磁場シフトすることからCFP4のこれらカルボニル基と*l*-NAd・HClのアミノ基の間で分子間水素結合を形成したことが分かった。またPro¹残基のカルボニル炭素が高磁場シフトすることからCFP4の分子内水素結合の消失が考えられる。

ROESYスペクトルにおいて、*l*-NAd・HClのH_βプロトンとCFP4のPhe¹残基のH_αおよびH_βプロトンの間に相関が観察されること、さらに*l*-NAd・HClのベンゼン環の環電流の影響により、¹H-NMRスペクトルにおいてPro²残基のピロリジン環のプロトンのシグナルが0.04ppmから0.11ppm高磁場シフトすることから、この錯体においてカテコール部分は、Pro²残基のピロリジン環上にフィックスしているものと考えられる。

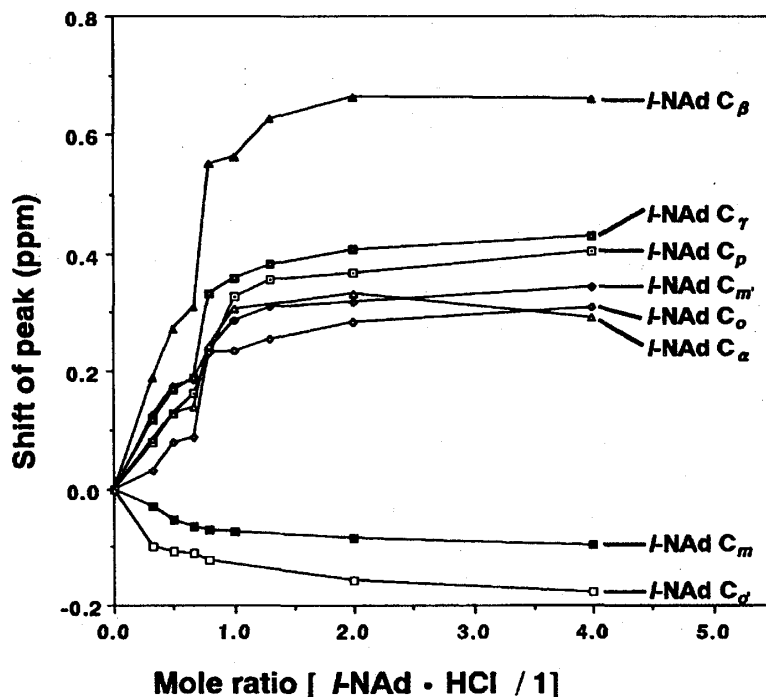
以上の知見については、DOPAMINE・HCl、*d*-NAd・HClについても同様の結果を得ている。

3) 不斉認識

一方、*l*-NAd・HCl(3.08 mg, 1.5×10⁻⁵ mol)のCD₃OD溶液(150 μl)に、一定モル数の

CFP4[モル比(CFP4 / *l*-NAd · HCl)]のCDCl₃溶液(500 μl)を加えていき、各モル比の混合溶液につき¹³C-NMRスペクトルを測定した。*l*-NAd · HClの各炭素のシグナルのケミカルシフトのシフト値をモル比(CFP4 / *l*-NAd · HCl)に対してプロットした(Fig. 7)。

Fig. 7



この結果からC_βの炭素、即ち水酸基の付け根の炭素のシフト値が他の炭素のそれらより大きく、モル比1.0のところ、0.564ppm低磁場シフトしている。これに比べ、β位に水酸基を持たないDopamine · HClについて同様の実験を行ったところ、ほとんど変化がなく、モル比1.0のところでは0.046ppm低磁場シフトしているにすぎない。一方、*d*-NAd · HClでは逆にC_βは0.091ppm高磁場シフトするのみであった。

以上のようなキラル炭素C_βの¹³C-NMRスペクトル上の異なった挙動について、現在のところ以下のように考察している。*l*-NAd · HClのカテコール部分がCFP4のPro²残基のピロリジン環上にフィックスされ、一級アミノ基が分子間水素結合を形成する際、β位の二級水酸基とPro²残基のカルボニル炭素が近い位置にあり水素結合をつくるのに対して、*d*-NAd · HClではそれをつくるには離れすぎていてつくらないためであると考えている(Chart 10)。すなわちCFP4は錯体形成の際、NAd · HClの*d*体と*l*体に対して異なった相互作用をしその不斉を認識したものと考えている。

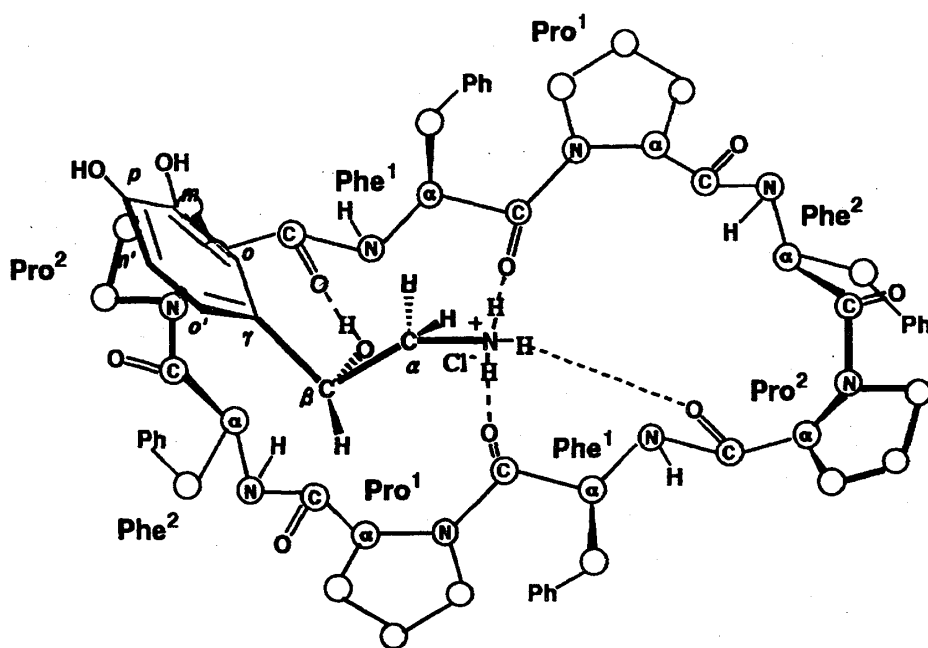


Chart 10

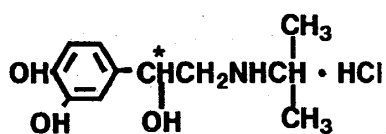
以上のようにCFP4はカテコールアミン類を取り込み、その dl を識別するという機能において、一応当初の目標を達成したものと考えられる。しかしその選択性や効率の低さについてはまだ改良の余地がある。さらにこの錯体形成反応が $CDCl_3-CD_3OD$ という有機溶媒中のものであり、生理的条件ではないことは今後検討していくべき課題であると考えている。

【ホスト-ゲスト複合体の単離】

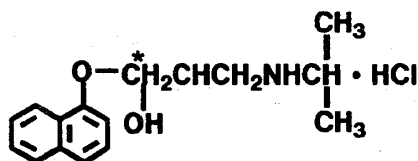
ここでCFP4とカテコールアミン類との錯体の単離を試みた。CFP4の $CHCl_3$ 溶液に l -NAd \cdot HClのDMSO溶液を加え、室温で放置することにより無色粉末として錯体[Cyclo(L-Phe-L-Pro) $_4$ \cdot l-NAd]HCl (mp 249-251 $^{\circ}C$)が沈殿した(収率 36%)。一方、CFP4と d -NAd \cdot HClの錯体の単離を試みたが得ることができなかった。これは両者のこの溶媒に対する溶解度の差によるものであると考えられ、CFP4とラセミ体のNAd \cdot HClについて同様の操作を行ったところ、錯体[Cyclo(L-Phe-L-Pro) $_4$ \cdot l-NAd]HClのみが沈殿した。さらにカテコールアミン系薬物イソプロテレノールやプロプラノロールについても環状オクタペプチドCyclo(L-Phe-L-Pro) $_2$ (L-Tyr-L-Pro) $_2$ との錯体の単離を試みた。その結果、Cyclo(L-Phe-L-Pro) $_2$ (L-Tyr-L-Pro) $_2$ と l -イソプロテレノール塩酸塩との錯体およびCyclo(L-Phe-L-Pro) $_2$ (L-Tyr-L-Pro) $_2$ と d -プロプラノロール塩酸塩との錯体を得ている(Table 5)。

Table 5

Complex of Cyclo(Phe-Pro) ₂ (Tyr-Pro) ₂ with	Yield (%)	MP (°C)
Isoproterenol · HCl	73	228-235
d-Propranolol · HCl	77	192-207



Isoproterenol Hydrochloride



Propranolol Hydrochloride

【文献】

- 1) 上野昭彦著「超分子の科学 極微の世界が未来を拓く」産業図書 (1993);
F. Vogtle著、小宮山真、八代盛夫、野口穴道、小林正美訳「超分子化学」丸善
(1995);
“超分子化学” 化学と工業、No.8, 1221 (1990);
“特集超分子” ファルマシア、No.11, 1249 (1995);
“特集超分子の世界” 現代化学、No.11, 16 (1995);
D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1009 (1988);
- 2) D. J. Cram, in *Application of Biochemical Synthesis in Organic Systems, Part II*
(J. B. Jones, C. J. Sin and D. Perlmann, Eds.), *Techniques of Chemistry, Vol.*
X, Wiley, New York, 815 (1976).
- 3) 生越久靖、化学と工業、**43**, No.8, 1231 (1990).
- 4) J.-I. Hong, S. K. Namgoog, A. Bernardi, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**,
5111 (1991).
- 5) A. Gala' n, D. Andreu, A. M. Echavarren, P. Prados, J. de Mendoza, *J. Am.*
Chem. Soc., **114**, 1511 (1992).
- 6) 小西克明、化学と工業、**46**, No.1, 80 (1993).
- 7) J.-P. Behr, J.-M. Girondeau, R. C. Hayward, J.-M. Lehn, J.-P. Sauvage,
Helvetica Chimica Acta, **63**, 2096 (1980).
- 8) C. M. Deber, and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7566 (1974).
- 9) V. Madison, C. M. Deber, and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4788
(1977).
- 10) S. Kimura, and Y. Imanishi, *Biopolymers*, **22**, 2383 (1983).
- 11) S. Kimura, and Y. Imanishi, *Biopolymers*, **22**, 2191 (1983).
- 12) K. Wüthrich, A. Tun-Kyi, and R. Schwyzer, *FEBS Lett.*, **25**, 104 (1972); C.
M. Deber, V. Madison, and E. R. Blout, *Acc. Chem. Res.*, **9**, 106 (1976).