

解説

等温滴定カロリメトリーによる水溶液中における高重合度シクロデキストリンとヨウ素の複合体形成の熱力学的解析

北村進一, 中谷和哉

(受取日: 2001年1月25日, 受理日: 2001年2月4日)

Complex Formation of Large-ring Cyclodextrins with Iodine in Aqueous Solution as Revealed by Isothermal Titration Calorimetry

Shinichi Kitamura and Kazuya Nakatani

(Received January 25, 2001; Accepted February 4, 2001)

Complex formation of large-ring cyclodextrins (CDs) having DP21-32 with iodine in aqueous KI solution was studied by isothermal titration calorimetry (ITC). When the individual CD is shown, the term CD_n is used, where n represents the degree of polymerization. For CDs in the DP range of 21-32, the curves obtained for the titration of the CDs with iodine can be analyzed by a model assuming 1:2 complex formation with identical interacting sites. For the case of two identical interacting sites, the binding constants K_1 and K_2 ($K_1 < K_2$), defined relative to the progress of saturation, lie in the range 0.7 to $7.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and 3.0 to $62.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectively. The values of ΔH_2 and $T\Delta S_2$ lie in the range -34.9 to $-136.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ and -15.5 to $-112.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. The largest values for $-T\Delta S_2$ obtained for a CD₂₆ can, in part, be attributed to a large decrease in conformational flexibility of the CD which occurs during complex formation. Based on ITC data, conformational changes in CD₂₆ which are induced as the results of the formation of a CD-iodine inclusion complex are discussed in terms of the recently reported crystal structure of CD₂₆.

1. はじめに

重合度がそれぞれ6, 7, 8である, α -シクロデキストリン (α -CD), β -シクロデキストリン (β -CD), γ -シクロデキストリン (γ -CD) は, そのドーナツ状分子の空洞の内部に様々な物質をそれぞれ特異的に取り込んで包接化合物をつくることがよく知られている。¹⁾ これらは, この性質を応用することで, 医薬品や香料の安定化, 食品の乳化などの用途に利用されている。しかしながら, 重合度9以上のシクロデキストリンの包接機能についてはあまり研

究がなされていなかった。²⁾

1996年鷹羽らにより, 直鎖のアミロースに, 馬鈴薯由来のD-酵素 (disproportionating enzyme or 4- α -glucanotransferase, EC2.4.1.25) を作用させると, 分子内転移反応が触媒され高重合度の環状(1-4)- α -D-グルカン (高重合度のシクロデキストリン) が合成されることが見出された。³⁾ その重合度は17以上で, 大きいもので数百に及ぶ。この高重合度のシクロデキストリン (シクロアミロースと呼ばれることも多い) においても, さまざまな物質を特異的に包接する特性があると考えられる。本研究の目

的は、CDとヨウ素の包接化合物形成について、等温滴定型熱量計 (ITC; Isothermal Titration Calorimeter) を用いた熱力学的手法により解析し、高重合度のCDの水溶液中における包接機能についての基礎的な知見を得ることである。⁴⁾ 本解説では、従来知られている α -CD、 β -CD、 γ -CDも新たに発見された高重合度のシクロデキストリンも共にCDと略し、下つきの数字でその重合度を表わすこととする。実験で使用したCDは、CD₆(α -CD)、CD₇(β -CD)、CD₈(γ -CD)、CD₂₁からCD₃₂の単一重合度の試料と、高重合度のCDの混ざった重量平均重合度120のCD₁₂₀である。

2. 熱測定

ITCは反応のエンタルピー変化を測定する一方法で、反応に伴う発熱、吸熱による系の温度変化を測定する。温度変化は、ジュール熱により熱量に換算される。ITCによる一回の測定で、結合定数 K と反応のエンタルピー変化 ΔH を同時に決定することができる。断熱ジャケットの中には太鼓型の試料セルと比較セルがある。比較セルには水、試料セルにはCD溶液を充填する。ヨウ素溶液による滴定はコンピュータ制御で行われ、一定回数、一定量、一定間隔で実行される。測定中のセルは一定温度に保たれ、シリンジは400 rpmで回転し、試料セルを撈伴しながら滴定を行う。試料溶液の濃度は、30 ~ 111 μM で、試料により最適な飽和曲線が得られるように濃度を調節した。ヨウ素溶液の濃度は、 I_2 : 5.4 mM、KI: 200 mMで滴定を行った。また、ヨウ素溶液と熱容量をそろえるために、各CD試料200 mMのヨウ化カリウム水溶液に溶かして測定を行った。測定温度は20 °Cであった。滴定条件は、270秒ごとに10 μl を25回滴定するか、あるいは270秒ごとに7 μl を35回滴定するかのどちらかで、最適な飽和曲線が得られるように適宜選択を行った。試料セルにヨウ化カリウム水溶液のみを入れて、ヨウ素溶液で滴定をして、ヨウ素溶液のヨウ化カリウム水溶液に対する希釈熱の測定を行った。各試料溶液の測定データは、希釈熱のデータを差し引いた後で解析を行った。解析は、結合モデルに従って行い、専用のソフトウェア (ITC Data Analysis In OriginTM) を用いて解析を行った。

3. 結合モデル

3.1 非協同的結合モデル

このモデルでは同等でそれぞれが独立した結合サイトを n 個有するホスト分子 M に、リガンド X が n 個結合すると仮定する。解析は以下の式に基づき、非線形最小二乗法により行った。

$$Q = \frac{nM_t\Delta HV_0}{2} \cdot \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t} \right] \quad (1)$$

ここで、 Q : 反応により発生または吸収された熱量、 K : 結合定数、 n : 結合サイトの数、 V_0 : サンプルセル容量、 M_t : セル中の全ホスト分子(CD)濃度、 K_t : セル中の全リガンド分子(X_t)濃度、 ΔH : 結合のエンタルピーである。

3.2 協同的結合モデル

このモデルでは、同等である二つの結合サイトを有するホスト分子 M に、リガンド分子 X が協同的に結合すると仮定する。すなわち、二つの結合サイトは同等で、区別することはできないので、Fig.1のように飽和するまでに二つの道筋が存在する。ここで、 $K_a = K_c = K_1$ 、 $K_b = K_d = K_2$ という固有の結合定数 K_1 、 K_2 を定義する。これらの値がそれぞれの結合過程における本来の親和力を与える。 i 個のヨウ素分子が結合しているシクロデキストリンの濃度、 $[MX_i]$ は、遊離のシクロデキストリン濃度、 $[M]$ で記述することができるから、 i 個のヨウ素分子が結合している全てのシクロデキストリンのフラクション、 F_i は以下のようなになる。

$$F_0 = \frac{1}{P} \quad F_1 = \frac{K_1[X]}{P} \quad F_2 = \frac{K_1K_2[X]^2}{P} \quad (2)$$

$P = 1 + K_1[X] + K_1K_2[X]^2$: 遊離のヨウ素(I_3^-)濃度

ここで、 P は統計力学における分配関数にあたるもので、系のとり得る状態確率の総和を示している。

$$X_t = [X] + M_t(F_1 + 2F_2) \quad (3)$$

$$Q = M_tV_0\{F_1\Delta H_1 + F_2(\Delta H_1 + \Delta H_2)\} \quad (4)$$

解析では、まず K_1 、 K_2 の値を割り当てて、式(2)と式(3)から各フラクションを決定する。そして、式(4)により結合のエンタルピー ΔH_1 と ΔH_2 を決定する。この手順を繰り返して最適なパラメータを得る。

4. 測定結果と解析

Fig.2は、609 μM のCD₆溶液を270秒ごとにヨウ素溶液10 μl で25回滴定した場合の実測データである。Fig.3とFig.4はそれぞれ、49.2 μM のCD₂₆と30 μM のCD₁₂₀の溶液を、270秒ごとにヨウ素溶液7 μl で35回滴定した場合の実測データである。各図の上側の図(a)は、実際に得られた測定シグナルで、一つのピークが一回の滴定に対

等温滴定カロリメトリーによる水溶液中における
高重合度シクロデキストリンとヨウ素の複合体形成の熱力学的解析

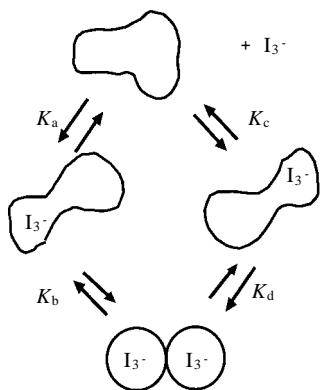


Fig.1 Model for the complex formation of CD₂₁ to CD₃₂ with I₃⁻.

応している。各CD溶液とも発熱反応が観測された。滴定が進むにつれて、各CDの結合サイトが飽和に近づいていき、発熱ピークは小さくなっていく。これらのピークの面積は熱量を意味するので、各ピークを積分し、縦軸に滴下ごとのヨウ素1モル当りに換算した熱量、横軸にセル中に存在するCDに対する総ヨウ素量のモル比をとり、プロットしたものが、各図の下側の図(b)である。点は各ピークに対応する実測値である。実線は、結合モデルにより描かれた理論曲線である。希釈熱は、 $0.1 \mu\text{J S}^{-1}$ 程度と非常に小さな発熱ピークとして観測されたが、各CDのデータから差し引くことで希釈熱の補正を行った。CD₆、CD₇、CD₈のデータを、結合モデルA(非協同的結合モデル)による解析を行い、結果をまとめたものがTable 1である。CD₈については、ヨウ素の希釈熱とほぼ同等の熱量しか検出されず、CD₈とヨウ素イオンの相互作用はほとんどないと考えられる。結合サイトの数nの値は、CD₆、CD₇ともにほぼ1となっている。CD₆とCD₇それぞれ1分子に対して、ヨウ素分子が1分子結合して包接化合物を形成していることがわかる。CD₆とCD₇とは結合定数Kの値が2桁異なり、大きな差がみられた。これにより、CD₆の方がCD₇よりもヨウ素を包接しやすいことがわかる。結合のモルエンタルピー ΔH は、CD₆はCD₇より約2倍大きいことがわかる。

Fig.3で示されるCD₂₆の滴定曲線の形状はFig.2のCD₆の場合と大きく異なる。CD₂₆では、最初の数回の滴定において、滴下が進むにつれて発熱がいったん大きくなっており、その後飽和していく。このような曲線の特徴はCD₂₁からCD₃₂までの高重合度CDすべてにおいてみられた。これらの滴定データの解析をCD₆、CD₇で用いたモデル(モデルA)で行ったところ、理論曲線を適合させることはできなかった。このことから、CD₂₁からCD₃₂では、非協同

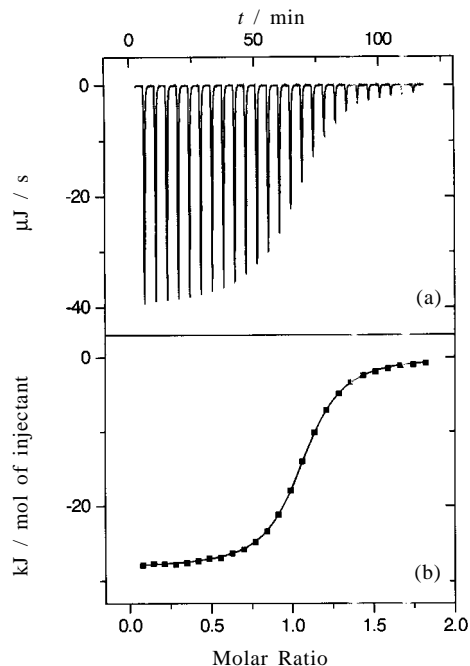


Fig.2 Experimental data for titrations of $10 \mu\text{L}$ aliquots of 4.78 mM I_2 containing 200 mM KI into a 0.609 mM aqueous solution of CD₆ containing 200 mM KI solution at 20 ± 0.25 Injections of the iodine solution were made at 4.5 min intervals. (b): data points obtained by integration of the injection peaks, and the titration curve (solid line) obtained by fitting the data points.

的な結合様式ではなく、2個の結合サイトを有し、結合サイト間に相互作用があるという協同的な結合様式(モデルB)で解析をおこなった。解析から得られるのは、Fig.1において定義している固有の結合定数 K_1 、 K_2 、および結合のモルエンタルピー ΔH_1 、 ΔH_2 である。 K_1 と K_2 の値は、 $0.7 \sim 7.3 \times 10^3$ と $3.0 \sim 62.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ の値をとり、各CDとも K_1 の値よりも K_2 の値の方が大きかった。エンタルピーについては $-34.9 \sim 136.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ の値をとり、結合定数同様、 ΔH_1 より ΔH_2 の方が大きかった。CD₂₄とCD₂₆に関しては、再現性を確認するために数回の測定を行った。

Fig.5は、CD₂₁からCD₃₂の K_1 および K_2 をグラフにしたものである。 K_1 に比べ K_2 の値の方がすべてのCDで大きい、CD₂₄では K_2 の値は特異的に大きいのがわかる。CD₂₁からCD₂₃の2分子のヨウ素との結合は、二つとも非常に弱いにもかかわらず、CD₂₄では急に二つ目のヨウ素との結合が強くなっている。CD₂₅以降は重合度の増加とともに K_2 値は増加していく傾向がみられるが、CD₂₆では K_2 値の増加はそれほど大きくはなっていない。CD₂₄での

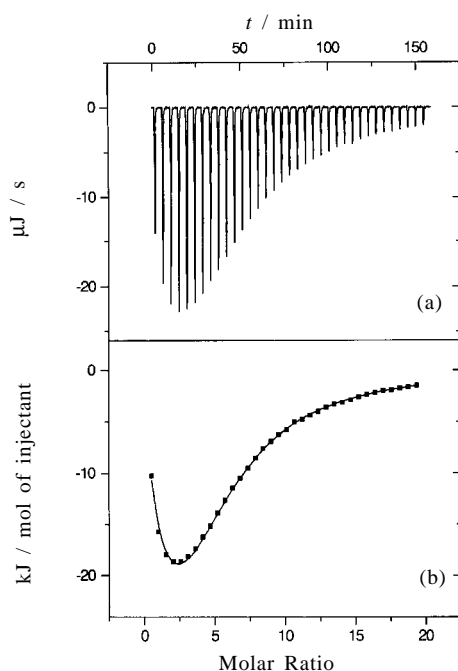


Fig.3 Experimental data for titrations 7 μL aliquots of 5.38 mM I_2 containing 200 mM KI into a 0.0492 mM aqueous solution of CD_{26} containing 200 mM KI solution at 20 $^{\circ}\text{C}$. 35 Injections of the iodine solution were made at 4.5 min intervals. (b): data points obtained by integration of the injection peaks, and the titration curve (solid line) obtained by fitting the data points.

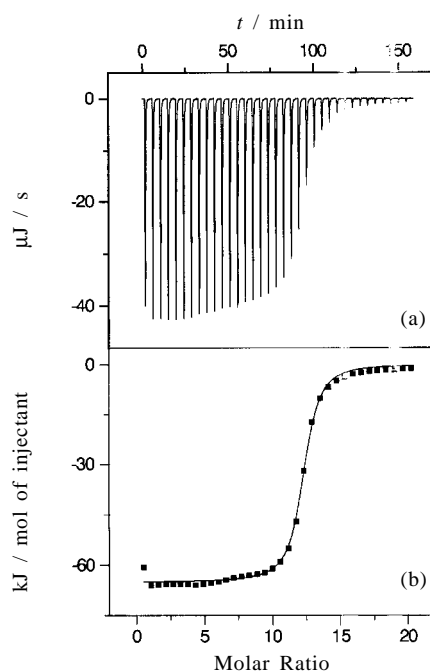


Fig.4 Experimental data for titrations 7 μL aliquots of 5.38 mM I_2 containing 200 mM KI into a 0.030 mM aqueous solution of CD_{120} containing 200 mM KI solution at 20 $^{\circ}\text{C}$. 35 Injections of the iodine solution were made at 4.5 min intervals. (b): data points obtained by integration of the injection peaks, and the titration curve (solid line) obtained by fitting the data points.

Table 1 Thermodynamic parameters obtained for CD_6 and CD_7 with iodine systems.

CD	n	K mM^{-1}	ΔH kJ mol^{-1}	ΔG kJ mol^{-1}	$T\Delta S$ kJ mol^{-1}
CD_6	1.02 ± 0.01^a	145 ± 2.00	-28.2 ± 0.04	-29.0 ± 0.03	0.80 ± 0.01
CD_7	1.04 ± 0.05	1.70 ± 0.10	-15.0 ± 1.09	-18.1 ± 0.20	3.10 ± 0.80

^a The error is the estimated uncertainty of each value.

結合定数の値は、単純に重合度に伴う増加ではなく、固有な理由によるものだと見える。

Fig.6は、次の熱力学の関係式 ($\Delta G_2 = RT \ln K_2$, $\Delta G_2 = \Delta H_2 - T\Delta S_2$) から計算したギブスのエネルギー ΔG_2 とエンタルピー項 ΔH_2 とエントロピー項 $-T\Delta S_2$ を重合度に対してプロットしたものである。図から ΔH_2 と $-T\Delta S_2$ からの ΔG_2 への寄与がちょうど打ち消しあっている結果、 ΔG_2 が小さな値になることがわかる。このような現象は、"compensation effect" と呼ばれるもので、 CD_6 や CD_7 と種々のリガンド分子の包接⁵⁾、あるいはタンパク質とリガ

ンドの結合⁶⁾など多くのリガンドとレセプターの相互作用について見出されている。

さて、複合体形成に伴うエントロピー変化量の大きな減少はなにを意味するのであろうか？ヨウ素分子の包摂に伴う自由度の減少、あるいはCDのフレキシビリティの減少が示唆される。しかし、 ΔS に影響を及ぼす要因として、水分子の存在も無視できない。水溶液中では、CDは最初から水分子を包接していると考えられる。したがってヨウ素が包接される時には、その水分子は追い出されることになる。その結果形成される水分子のクラスター形成にとも

等温滴定カロリーメーターによる水溶液中における
高重合度シクロデキストリンとヨウ素の複合体形成の熱力学的解析

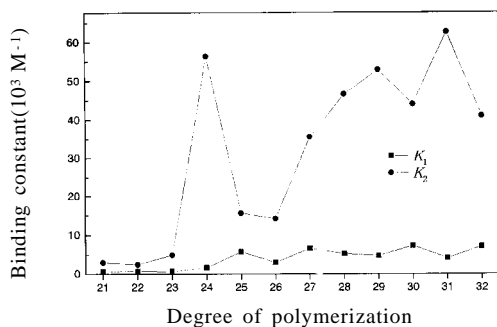


Fig.5 DP dependences of K_1 () and K_2 () at 20 for CD₂₁₋₃₂.

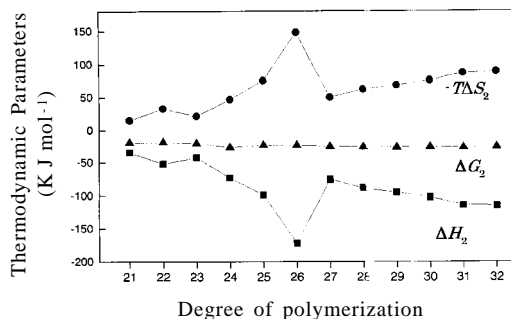


Fig.6 DP dependence of ΔG_2 (), ΔH_2 () and $-T\Delta S_2$ () at 20 for CD₂₁₋₃₂.

なう ΔS の増大を考えることができる。一方、 ΔH は、ヨウ素の包接(発熱)と水分子の追い出し(吸熱)による熱量変化の合計であり、CD₂₆の場合その差が大きいとされる。最近、CD₂₆の単結晶のX線構造解析がなされ、その原子レベルでの構造が明らかになった。Fig.7(b)にその構造を示す。⁷⁾ 6₁-helixの2巻きからできる数字の8の字様の構造であり、キャビティーを二つ持つので、丁度二つのヨウ素イオンあるいはヨウ素を包摂できることが示唆される。一方、小角X線散乱法とコンピュータモデリングで予想される構造はかなりランダムな構造(Fig7(a))である。^{2,8)} すなわち、ヨウ素を添加することにより、結晶構造のようなコンパクトな構造への変化がおこったと考えている。

今回はCD₉からCD₂₀については実験をおこなわなかったが、この間に n の値が1から2に変わる境界重合度が存在するとしたら非常に興味深い。一方、重合度33以上では、2個以上のヨウ素イオンとの相互作用が示唆され、また重合度38では特異的な挙動を示すことが明らかにされた。⁹⁾ さらに高重合度のCD₁₂₀では、いったん発熱が増加するような特徴的な滴定曲線が観察されず、単純なモデルAで解析することができた(Fig.4参照)。 $K = 1.33 \times 10^6 \text{M}^{-1}$,

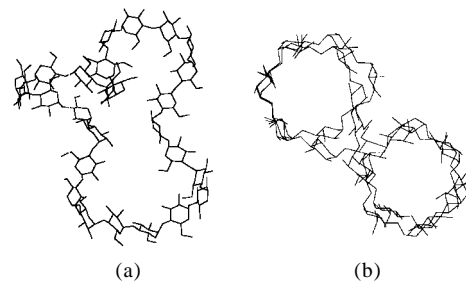


Fig.7 Solution(a)^{2,8)} and crystal(b)⁷⁾ structures of CD₂₆.

$\Delta H = -65.3 \text{ kJ mol}^{-1}$, $n = 13.5$ の値が得られたが、これらの値は、高橋らにより求められた直鎖のアミロースとヨウ素の相互作用の熱力学パラメータ¹⁰⁾とよく一致している。すなわち、CDの重合度が非常に大きくなると、環状であることの構造上の制約が少なくなり、直鎖のアミロース分子と同じような包摂挙動を取るものと考えられる。

今後は、ヨウ素以外の様々な物質との包接化合物形成についても調べていく必要があるが、他のリガンドにおいても、それぞれ特徴のある結果が得られると考えている。事実、Sodium dodecyl sulfate や sodium myristoyl sulfate などの界面活性剤と高重合度CDは複合体を形成するが、結合様式や熱力学的パラメータは異なることが見出された。本研究で得られた基礎的な知見をもとに、今後、高シクロデキストリンの包接機能の全容解明に向けた研究を進めたいと考えている。

文 献

- 1) Cyclodextrins, ed. By V. T. D'souza and K. B. Lipkowitz, *Chem. Rev.*, 98 (1998).
- 2) S. Kitamura, "Cyclic oligosaccharides and polysaccharides" in: *Cyclic polymers, 2nd edition*, J. A. Semlyen, Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Chapter 4 (2000).
- 3) T. Takaha, M. Yanase, H. Takata, S. Okada, and S. M. Smith, *J. Biol. Chem.* **271**, 2902 (1996).
- 4) S. Kitamura, K. Nakatani, T. Takaha, and S. Okada, *Macromol. Rapid Commun.* **20**, 612-615(1999).
- 5) M. V. Rekharsky and Y. Inoue, *Chem. Rev.* **98**, 1875 (1998).
- 6) D. R. Bundle and B. W. Sigurskjold, *Method in Enzymology* **247**, 288 (1994).
- 7) K. Gessler, I. Uson, T. Takaha, N. Krauss, S. M. Smith, S. Okada, G. M. Sheldrick, and W. Saenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4246 (1999).
- 8) S. Kitamura, H. Isuda, J. Shimada, T. Takada, T. Takaha, S. Okada, M. Mimura, and K. Kajiwara,

- Carbohydr. Res.* **304**, 303 (1997).
- 9) S. Kitamura, K. Nakatani, K. Imamura, and T. Takaha, Abstract of 20th International Carbohydrate symposium, A-192 (2000).
- 10) K. Takahashi and S. Ono, *J. Biochem.* **72**, 1041 (1972).

要 旨

本報は、大環状シクロデキストリン（重合度21から32のシクロデキストリンであり、 CD_{21} のようにCDの後に数字をいれ略号でしめす。）とヨウ素の包接化合物形成について熱力学的な解析を行った結果の解説である。 CD_6 、 CD_7 がヨウ素と1：1で結合するのに対して、 CD_{21} から CD_{33} では、1：2の協同的な結合モデルではじめて解析できることがわかった。すなわち、最初のヨウ素分子の比較的弱い結合の後で、次のヨウ素分子の結合が強くなることが明らかとなった。また、 CD_{24} および CD_{26} のヨウ素との包接では特異的な熱力学パラメータが得られたので、その結果の解釈を構造の観点から試みた。

北村進一 Shinichi Kitamura
京都府立大学農学部生物資源化学科,
Dept. of Biological Resource Chemistry,
Kyoto Prefectural Univ., TEL. 075-703-
5673, FAX. 075-703-5119, e-mail:
skita@kpu.ac.jp
研究テーマ：バイオカロリメトリー，多
糖工学
趣味：スキー，投げ釣り

中谷和哉 Kazuya Nakatani
三栄源エフ・エフ・アイ（株），San-Ei
Gen F. F. I., Inc., TEL. 06-6333-0521,
FAX. 06-6333-8907, e-mail: kazuu@ma9.
seikyuu.ne.jp
研究テーマ：メイラード反応香を利用し
た食品の開発
趣味：バス釣り

XIV RUSSIAN CONFERENCE ON CHEMICAL THERMODYNAMICS with International Participation

1 - 5 July 2002, in St. Petersburg

Topics

thermochemistry of organic and inorganic substances,
advanced materials
thermodynamics of liquid solutions, melts and solid
solutions
phase equilibria
thermodynamics of surface and interface phenomena
thermodynamics of polymer systems, liquid crystalline,
self-assembling and biological systems
experimental methods and equipment
standardization and systematization of thermodynamic
data
teaching of chemical thermodynamics

Dates and Deadlines:

1 July 2001 Deadline for the Registration Form
receiving
1 February 2002 Deadline for submission of the
Abstract
March 2002 Second Announcement

The address of the Organizing Committee:

RCCT2002
Div. of Physical Chemistry,
Department of Chemistry,
St. Petersburg State University
Universitetsky pr. 2,
198504 Petrodvorets, St. Petersburg, Russia
Phone: 7(812) 428 4066
FAX: 7 (812) 428 6939
E-mail: rcct2002@none1.pu.ru
<http://rcct2002.none1.pu.ru>