

シクロデキストリンの包接能を利用した 17 β -エストラジオール活性の抑制

九州大学工学部 学生会員 ○鳥屋尾啓太

九州大学工学研究院 正会員 大石京子

1. はじめに

近年、多くの河川水や底質中に内分泌攪乱化学物質が存在していることが報告されている。内分泌攪乱化学物質の中には女性ホルモンに類似した作用をして本来のホルモン作用を攪乱するものもあり、PCBやDDTに代表される人工化学物質の他に天然の女性ホルモンなども含まれる。天然女性ホルモンであ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3種が存在するが、17 β -エストラジオール(E2)は特に高いエストロゲン活性を持ち、人工化学物質の約 10^5 倍の内分泌攪乱作用を持つため、E2の環境に及ぼす影響の重大性が指摘されている。一方、シクロデキストリン(CD)はグルコースが環状に連なったもので、内部の空孔の大きさによって種々の疎水性物質を包接できる超分子のひとつである。グルコースが6、7、8個環状に連なったものをそれぞれ α 、 β 、 γ -CDといい、空孔の大きさによってそれぞれ包接する物質も異なる。

本研究では、このように分子認識能を有するCDを用いて、E2の包接に適したCDの種類について検討し、包接によるE2のエストロゲン活性の抑制の可能性について考察を加えた。

2. 実験方法

CDによるE2の包接能について、溶解度、分光スペクトル、 ^1H NMRスペクトルで検討した。E2の濃度測定にはELISA法を用いた。

2.1 CDの包接によるE2の溶解度の変化

E2に各種CD(α 、 β 、 γ 、HP- β)を加え、可溶化の状態を濁度(O.D.660)で検討した。反応液の最終濃度はE2を 5×10^{-4} mole/l、CDを 5×10^{-4} mole/l及び 10^{-3} mole/l、メタノール濃度は5%とした。

2.2 分光スペクトルの測定

E2と各種CD(α 、 β 、 γ)の混合液をE2とCDのモル比1:0、1:1、1:4、1:20、1:40、1:80で作成し、それぞれの溶液について20で1、2、3時間後のUVスペクトル、蛍光スペクトルを測定した。UVスペクトルの測定によって得られた等吸収点を励起波長(265nm)として蛍光スペクトルを測定した。また、修飾CD(HP- β 、メチル- β)についても1:40で試料を作成しUV及び蛍光スペクトルを測定した。

2.3 ^1H NMRスペクトルの測定

β -CD及びE2+ β -CD溶液を作成し、 ^1H NMRスペクトルを測定した(400MHz、20、積算回数128回)。 β -CDを 4×10^{-3} mole/l、E2を 5×10^{-4} mole/l、メタノール濃度1%で測定した。

2.4 ELISA法によるE2濃度の測定

E2、 β -CD及びE2+ β -CD溶液を作成し、20で1時間インキュベーションした後、E2-ELISAキットでE2濃度を測定した。濃度はE2を 10^{-9} mole/l、 β -CDを 2×10^{-7} mole/l、メタノール濃度は0.2%である。

3. 結果及び考察

3.1 CDによるE2の可溶化

図1にCDとE2のモル比が2:1の場合の結果を示す。E2はほとんど水に溶けずメタノールに溶ける。しかし、図1に示すようにE2の溶解度は α γ β ・HP- β の順で増加しており、E2に対するCDの濃度比が高いほどこの傾向は顕著になった。これはE2がCDの疎水的内孔に包接されて溶解度が増加したものと考えられる。 α -CDを添加しても溶解度に変化がなく、包接されないことを示している。HP- β -CD内孔の大きさは β -CDと同じで水への溶解度が β -CDの100倍高いものである。従って、包接に置換基の影響はないと考えられる。

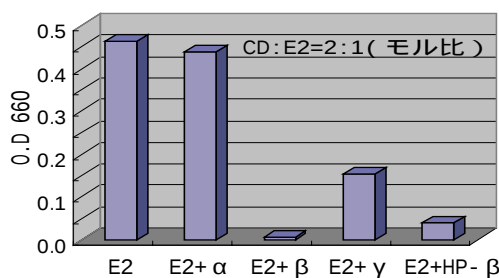


図1 α 、 β 、 γ 、HP- β -CDによるE2の可溶化
CD: 10^{-3} mole/l E2: 5×10^{-4} mole/l メタノール濃度5%

3.2 CD共存下における分光スペクトルの変化

E2と各種CDの混合液(モル比 E2:CD = 1:40、反応時間1時間)のUVスペクトルを図2に、蛍光スペクトルを図3に示す。 α -CDを加えたものについてはほとんど変化が見られなかった。しかし、 β -CD、 γ -CDを加えたものについては吸光度および蛍光度が大幅に増加した。これは包接の際に見られる現象で、特に β -CDを加えた場合には変化が大きかった。このことから、 β -CDがE2を包接するには一番適していると考えられる。また、HP-

β -CD とメチル- β -CD についても β -CD の場合と同じようなスペクトルが得られた(図4、図5参照)。吸光度、蛍光度の変化は α γ β ・HP- β の順で増加しており、これは3.1と同様な結果を示している。

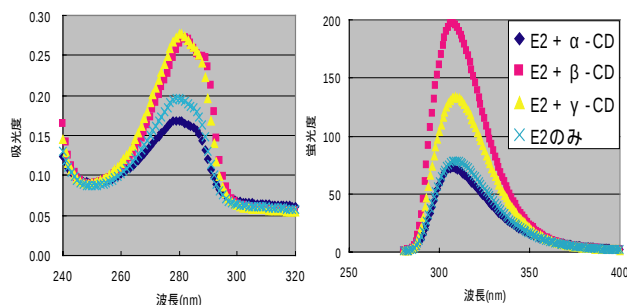


図2 α , β , γ -CD 存在下でのE2のUVスペクトル(20、メタノール11%)

図3 α , β , γ -CD 存在下でのE2の蛍光スペクトル(20、メタノール11%)

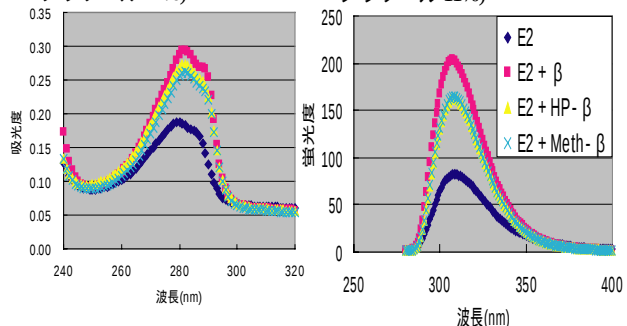


図4 β , HP- β , メチル- β -CD 存在下でのE2のUVスペクトル(20、メタノール11%)

図5 β , HP- β , メチル- β -CD 存在下でのE2の蛍光スペクトル(20、メタノール11%)

3.3 β -CD共存下における ^1H NMRスペクトルの変化

濁度の測定、分光スペクトルより、 β -CDがE2の包接に適していると考えられたので、 β -CDの ^1H NMRスペクトルの变化から包接について検討した。図6に β -CDの水素基の配向性、図7にE2の構造式、図8(a)に β -CD、図8(b)に β -CD+E2の ^1H NMRスペクトルを示す。E2を加えた場合、H-2、H-3でスペクトルに小さな変化が見られた。このことから、E2はH-2及びH-3と相互作用があると考えられる。 β -CDによるE2の包接に関しては、図6の開口の広いほうからE2が一部入り込み、H-2付近にまで存在している可能性が高い。図7のどの部位が β -CDとの包接に関与しているかは不明である。また図8(a)に β -CDのH-5を検出できなかったため、H-5の関与についても不明である。

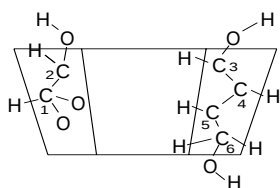


図6 β -CDの水素基の配向性

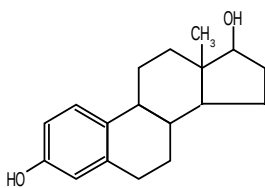


図7 E2の構造式

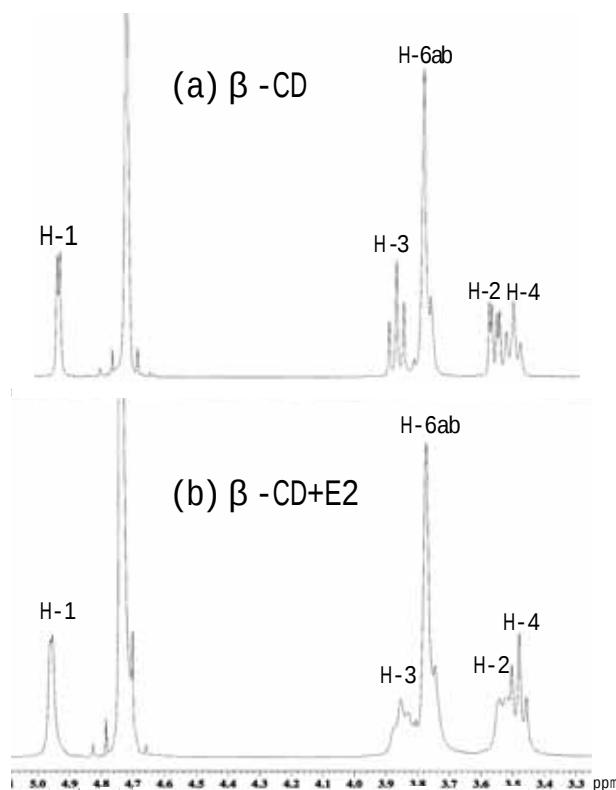


図8 20、400MHzでの各溶液の ^1H NMRスペクトル
 β -CD: 4×10^{-3} mole/l E2: 5×10^{-4} mole/l メタノール1%

3.4 β -CD存在下でのE2のELISA測定

以上の結果からE2は β -CDによって包接されている可能性が一番高い。E2- β -CD包接物がELISA法で反応するかどうかについて検討した。表1にELISA法により定量した各試料のE2濃度を示す。なお、この結果はELISA測定を6回行って得られたデータを平均したものである。表1より、E2のみの場合に比べて β -CDを加えるとわずかながらE2濃度が上昇した。 β -CDはELISA法では反応しなかったため、これはメタノール濃度が0.2%と非常に低いために溶解していなかったE2が、 β -CDに包接されたことによって溶解した可能性が高い。従って、E2包接部位はELISAの抗原決定基ではないと考えられる。

表1 ELISA法により定量したE2、 β -CD、E2+ β -CD溶液のE2濃度の平均値

	E2($\mu\text{g/l}$)
E2のみ	0.38
β -CDのみ	0.01
E2+ β -CD	0.51

4. おわりに

本研究により、 β -CDでE2が包接されているということがほぼ明らかとなった。しかし、エストロゲン活性に関わっている部分を包接しているかどうかは不明であるため、今後はその解析が必要である。また、エストロゲン活性に関係ない部分を包接している場合にはE2- β -CD包接物の分離方法についても検討する必要がある。