

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790017

研究課題名(和文) ELISA法を基盤とする微量かつ有効カテキンの高感度分析法の開発

研究課題名(英文) Synthetic study of catechin probes for development of highly sensitive quantitative analysis

研究代表者

浅川 倫宏 (Asakawa, Tomohiro)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：80571257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：茶は含有成分の生理活性の多様さから注目されている。茶中の極微量成分メチル化EGCgに強力な抗アレルギー活性が、またテアフラビンTFには抗肥満活性が報告された。不安定なこれら有効成分の高含有品種の探索を目的として、簡便で迅速な定量法の開発が求められている。そこで申請者は、ELISA法による高感度な微量定量法を確立を目的とし、カテキン抗体の作成に必要な免疫原の作成に成功した。すなわち、アミノペンチル基を有するEGCg誘導体APDOEGCgを合成した。また、本合成法を基に同様の側鎖を有するTFを酸化的二量化反応により合成した。最後に、それぞれのキャリアタンパク質複合体を免疫原とし抗体の作成を行った。

研究成果の概要(英文)：The generation of antibodies specific to EGCg and rare derivatives would be useful for immunological detection of subcellular and tissue localization. Furthermore, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with color or fluorescence endpoints would be useful for quantitating trace amounts of EGCg derivatives. An efficient synthesis of 6-(5-aminopentyl)-5,7-deoxyepigallalo-EGCG (APDOEGCg) as probe precursor was accomplished by the Suzuki-Miyaura coupling, Mitsunobu reaction with our Ns (nitrobenzenesulfonyl) amide, and the construction of the dihydrobenzopyran ring. The reactive amine group of APDOEGCg was readily connect to carrier protein without the need for phenol protection. This hapten enabled the generation of EGCg antibodies. On the other hand, the synthesis of TF analogue which possess a reactive aminoalkyl side chain was accomplished by using biomimetic dimerization with Ns protective method. It would be readily converted into hapten probe.

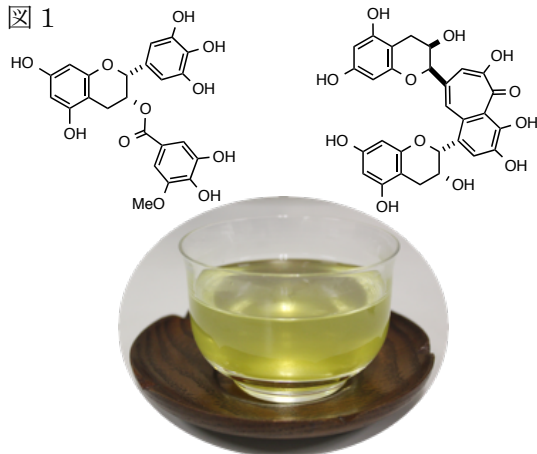
研究分野：天然物の全合成を基盤としたケミカルバイオロジー研究への展開

キーワード：カテキン フラボノイド 食品中有効成分 薬食融合 ケミカルバイオロジー テアフラビン EGCg
メチル化カテキン

1. 研究開始当初の背景

茶は含有成分の生理活性の多様さから注目されている。近年、茶中の極微量成分メチル化カテキンに強力な抗アレルギー活性が、また紅茶に含まれるテアフラビンには抗肥満活性が報告され、大きな注目を集めている。(図1) 社会問題となっている花粉症や生活習慣病の効率的な予防には高含有品種の探索が有効だが、含量は極微量な上、不安定な物質であるため含量の測定は困難である。そのため、簡便で迅速な定量法の開発が求められる。

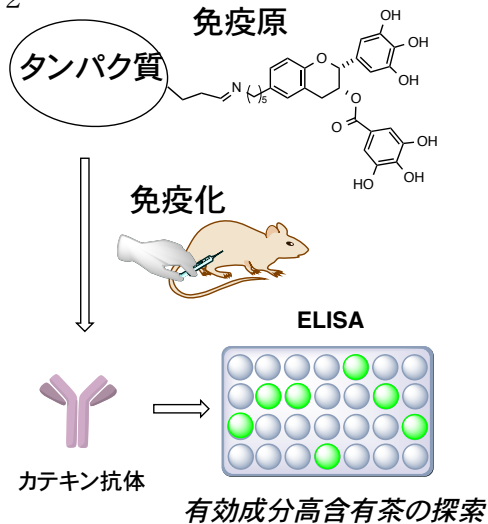
図1



2. 研究の目的

茶の微量有効活性成分を簡便で高感度に定量できれば、茶の品種改良の高効率化が期待できる。実現する手法として、抗原-抗体反応を利用した高速定量法 ELISA 法に着目した。インフルエンザの検査で使用されており、どこでも安価に利用できる。本法に適用するためには高特異的かつ高親和性の抗カテキン(ないしは微量茶成分)抗体が必要となる。そこで、免疫原とするためのタンパク質を結合可能な茶中有効成分を、有機化学的手法を用いて合成する。また、有効成分に蛍光標識やビオチン標識を施し、機能解明に用いる化学プローブ分子を創生する。

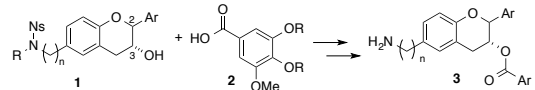
図2



3. 研究の方法

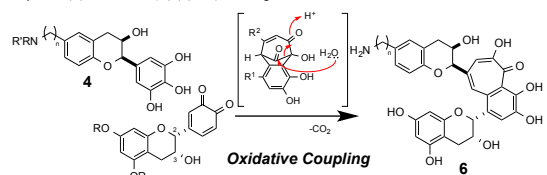
(1) カテキンプローブ前駆体の合成

独自に開発したカテキン誘導体の合成法により、アミノアルキル鎖を有するデオキシカテキン **1** の立体選択的合成を行う。まず、位置選択的にメチル化した没食子酸ユニット **2** と縮合し、メチル化カテキン類のアミノアルキル鎖導入体 **3** を合成する。



(2) テアフラビンプローブ前駆体の合成

生合成経路を模倣した酸化のカップリングによりテアフラビン類のアミノアルキル鎖導入体 **4** を合成する。



(3) 抗カテキン抗体の作成

アミノアルキル鎖を足がかりにグルタルアルデヒドを用いて、キャリアタンパク質と結合させる。それを免疫原とし、マウスに投与後、特異的に結合をするリコンビナント抗体を作成する。カテキン認識抗体は、当グループで保有する天然、及び人工メチル化カテキン類、テアフラビン類を用いて抗原認識能を評価する。

4. 研究成果

(1) これまでの知見を基にすることで、ジヒドロピラン環の2位と3位の立体化学を制御して構築した。

図3

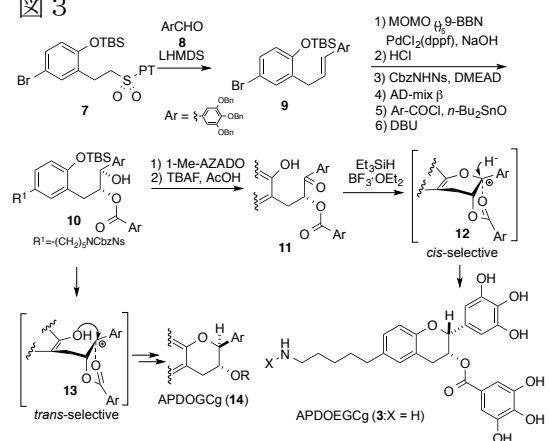
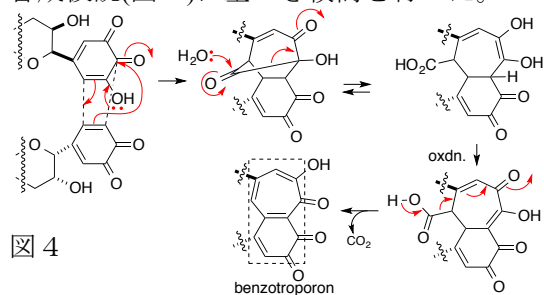


図3に示したように、まず、A-環部 **7** と B-環部 **8** を Julia-Kocienski 反応により連結しトランスオレフィン体 **9** を得た。引き続き、リンカー部分となる側鎖は **9** への鈴木-宮浦反応により導入した。さらに、側鎖末端の窒素官能基は、独自に開発した Ns アミドとの光延反応により導入した。次に、AD-mix- β により光学活性ジオールとした

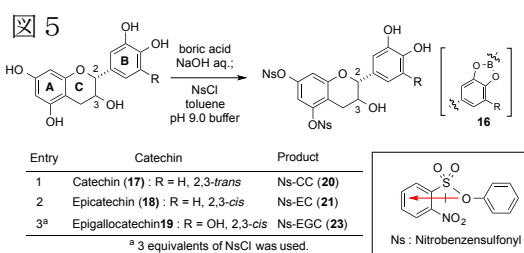
後、没食子酸を導入した。本反応では、位置選択的にエステルは得られなかったが、2位と3位の混合物のまま塩基処理すると立体障害の小さい3位の水酸基がエステル化された共通中間体 **10** へと収束した。続いて、鍵となる **10** からのピラン環の構築は、隣接基関与を利用することでシス・トランスの両異性体を選択的に構築可能となった。すなわち、**10** に酸を作用させるとキノンメチド中間体 **13** を経由した環化が進行し、トランスのジヒドロベンゾピラン **14** が得られた。一方、**10** を酸化してケトン **11** にした後、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体 ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) 存在下でトリエチルシラン (Et_3SiH) を作用させると中間体 **12** を経由して、ガロイル基の反対側からヒドリドの攻撃が進行しシス体のピランを構築した。同様の隣接基関与を利用したピラン環のシス・トランス選択的構築は、糖のC-グリコシル化反応で報告されている。さらに、窒素上 Ns 基をチオフェノール (PhSH) にて脱保護した後、ベンジル (Bn) とカルボベンジルオキシ (Cbz) 基を水素添加反応より同時に除去し、プローブ前駆体 **3** を合成した。メチル化体も同様の方法で合成できる。

(2) まずはじめに、テアフラビン類の効率的合成法の開発を行った。そこで、ベンゾトロポロン骨格の構築に際し、中塚らの合成仮説(図4)に基づき検討を行った。

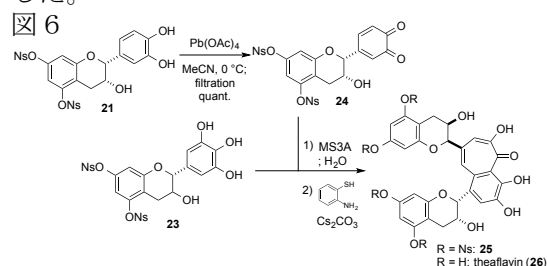


この仮説では、まずカテコール部の酸化によりオルトキノンが生成する。これに対しガロイル部の Michael 付加により三環性骨格が形成され、続く水の付加、脱炭酸を経てベンゾトロポロン化合物が生成する。

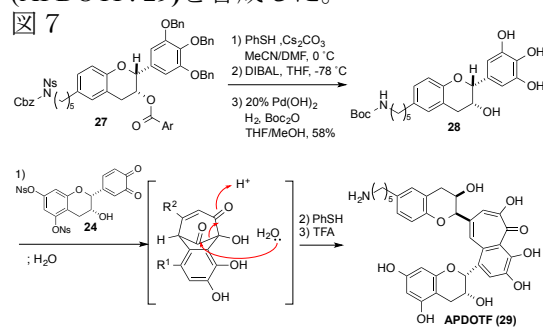
しかしながら、一般的にカテキン誘導体は酸化条件に曝すと重合化等により分解する不安定な化合物である。(+)epicatechin (**18**) の B 環上カテコール部の選択的酸化のためには、A 環選択的酸化に対する保護が鍵となる。そこで、保護基として 2-nitrobenzenesulfonyl 基 (ノシル基) を利用することとした。ノシル基は電子求引性効果により酸化耐性を付与できる。一方、カテコール構造に対してホウ酸を作用させると環状ボロン酸エステルを形成することが知られている。これらを組み合わせ B 環カテコール部を選択的に保護後、NsCl と反応させた。最後にホウ酸エステルを分解することで A 環部フェノール性水酸基を選択的に Ns 保護した。(図5)



続く **18** の酸化は B 環上で選択的に進行し、オルトキノン **24** を得た。(図6) 次いで、**24** と (-)-epigallocatechin (**19**) の A 環部の Ns 保護体 **23** を反応させることで、前述の反応経路に従いベンゾトロポロン骨格が構築され **25** が得られた。最後にアミノチオフェノールを用いた Ns 基の脱保護によりテアフラビン (**26**) の合成を達成した。



さらに、同様の方法にてアミノペンチル誘導体の合成にも成功した。(図7) すなわち、カテキンプローブ合成にて調製した **3** の保護体 **27** より、保護基の除去、エステルの分解、N-Boc 保護を経て **28** とした。続く **28** とエピカテキン-オルトキノン体 **24** との二量化反応によりベンゾトロポロン骨格が形成された。最後に、保護基の除去によりアミノペンチルデオキシテアフラビン (APDOTF: **29**) を合成した。



(3) 得られた **3** は、天然物のエピガロカテキンより、さらに強いインフルエンザ感染阻害活性を有していることが明らかとなり、A 環部の修飾によって活性が失われていないことも確認した。また、このプローブ前駆体 **3** は、フェノール性水酸基を保護することなく、様々なプローブユニットの導入が可能であった。そこで、グルタルアルデヒドをリンカーとしたキャリアタンパク質 (ヒト血清アルブミン: HSA) と結合を行い、ハプテン **30** を合成した。(図8) この **30** を抗原としてマウスに免疫することで、モノクローナル抗体の作製にも成功した。

本抗体は、カテキンの水酸基一つの有無、立体構造、メチル基の有無を高度に認識するものであった。

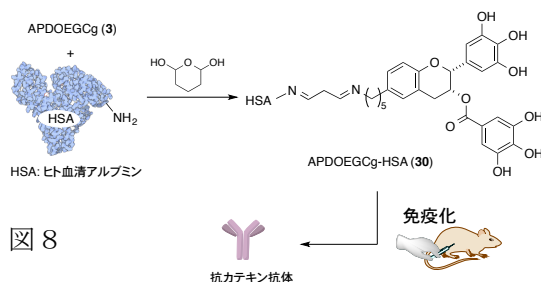
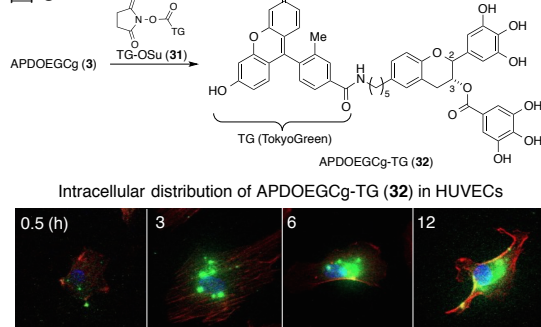


図 8

アミノペンチル基には様々な標識化合物の導入が可能であった。蛍光プローブの合成では、多くの既存の蛍光発色団の中から合成が容易な緑色蛍光色素 TokyoGreen (TG) を選択した。プローブ前駆体 **3** のアミノ基の高い反応性を利用することで、フェノール性水酸基を保護せず TG-活性エステル **31** とのアミド化反応が進行し APDOEGCg-TG (**32**) が得られた。(図 9) 本合成方法は高極性なプローブ合成に煩雑な精製操作を必要としない特徴も有する。

図 9



また、蛍光標識の他にもビオチン標識、センサーチップ上への担持も可能であった。

現在、それらを用いてカテキン誘導体の詳細な生理活性発現機構の解明を行っている。今後、茶の可能性を引き出すことで、社会問題である症状や疾病に対する予防や創薬へと発展させていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Yusuke Kawabe, Yoshiyuki Aihara, Yoshitsugu Hirose, Asuka Sakurada, Atsushi Yoshida, Makoto Inai, Tomohiro Asakawa, Yoshitaka Hamashima, Toshiyuki Kan, Synthesis of Theaflavins via Biomimetic Oxidative Coupling Reaction, *Synlett*, **2013** 479-482 (査読有). DOI: 10.1055/s-0032-1318131
- ② Tomohiro Asakawa, Yoshitaka Hamashima, Toshiyuki Kan, Chemical Synthesis of Tea Polyphenols and Related Compounds, *Curr. Pharm. Des.*, **2013**, 19, 6207 (査読有). DOI: 10.2174/1381612811319340012
- ③ Kosuke Shimizu, Tomohiro Asakawa, Norihiro Harada, Dai Fukumoto, Hideo Tsukada, Tomohiro Asai, Shizuo Yamada,

Toshiyuki Kan, and Naoto Oku, Use of Positron Emission Tomography for Real-Time Imaging of Biodistribution of Green Tea Catechin, *PLOS ONE*, **2014**, 9, e85520 (査読有). DOI: 10.1371/journal.pone.0085520

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① 河辺佑介, 吉田篤史, 稲井誠, 浅川倫宏, 濱島義隆, 菅 敏幸, テアフラビン類の合成研究, 新規素材探索研究会 第 11 回セミナー (横浜), 2012 年 6 月 8 日
- ② 河辺佑介, 吉田篤史, 稲井誠, 浅川倫宏, 濱島義隆, 菅 敏幸, テアフラビン類の合成研究, 第 58 回日本薬学会東海支部 総会・大会 (静岡), 2012 年 7 月 7 日
- ③ 稲井誠, 眞鍋多美子, 吉田篤史, 廣岡康男, 浅川倫宏, 濱島義隆, 菅 敏幸, カテキン類のプローブ分子設計, 天然物ケミカルバイオロジー: 分子標的と活性制御 第 2 回若手研究者ワークショップ (大阪), 2012 年 10 月 30 日
- ④ 河辺佑介, 吉田篤史, 稲井誠, 浅川倫宏, 濱島義隆, 菅 敏幸, テアフラビン類の合成研究, 第 9 回日本カテキン学会 (静岡), 2012 年 11 月 10 日
- ⑤ Yusuke Kawabe, Atsushi Yoshida, Makoto Inai, Tomohiro Asakawa, Yoshitaka Hamashima, Toshiyuki Kan: Synthetic Studies of Tea Polyphenols and its Probes, 第 18 回静岡健康・長寿学術フォーラム (静岡), 2013 年 11 月 1 日
- ⑥ 菅 敏幸, 浅川倫宏, 清水広介, 奥 直人, 原田典弘, 塚田秀夫, カテキンプローブの効率的合成と分子イメージングによる動態解析, 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム (広島), 2013 年 11 月 20 日
- ⑦ Yusuke Kawabe, Atsushi Yoshida, Makoto Inai, Tomohiro Asakawa, Yoshitaka Hamashima, Toshiyuki Kan, Synthetic Studies of Tea Polyphenols and its Probes., The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference (名古屋), 2014 年 9 月 4 日
- ⑧ Toshiyuki Kan, Tomohiro Asakawa, Kosuke Shimizu, Norihiro Harada, Hideo Tsukada, Makoto Inai, Masahiro Egi, Yoshitaka Hamashima, Naoto Oku, Efficient Synthesis of Catechin Probe and its Molecular Dynamics, The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference (名古屋), 2014 年 9 月 5 日
- ⑨ Toshiyuki Kan, Tomohiro Asakawa, Kosuke Shimizu, Norihiro Harada, Hideo Tsukada, Makoto Inai, Masahiro Egi, Yoshitaka Hamashima, Naoto Oku: Efficient Synthesis of Catechin Probe and its Molecular Dynamics, The 2nd International Conference on Pharma-Food (静岡), 2014 年 11 月 6 日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
浅川倫宏 (ASAKAWA, Tomohiro)
静岡県立大学大学・薬学部・助教
研究者番号: 80571257