

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32621

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750388

研究課題名(和文) エラスチン架橋分子の創製・構造解析とCOPD診断法の開発

研究課題名(英文) Preparation and Structure of Elastin Crosslinkers and Development of COPD Diagnosis

研究代表者

臼杵 豊展 (USUKI, Toyonobu)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号：50514535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エラスチンは、肺胞や皮膚、血管、靭帯などに存在する弾性繊維の主要タンパク質であり、分子内に架橋構造を有している。その架橋アミノ酸desmosineおよびisodesmosineは、世界第4位の死亡原因となであるCOPD(慢性閉塞性肺疾患)のバイオマーカーである。
本研究では、1)有機合成化学を基盤としたdesmosine類の効率的な化学合成、2)重水素および¹³C標識したdesmosine類の調製、および3)環状ペプチド型desmosineの合成、のそれぞれに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, synthesis of elastin crosslinkers and COPD biomarkers desmosine and isodesmosine was achieved via a lanthanide-promoted Chichibabin pyridine synthesis as a key step. Isotopically labeled desmosines were also prepared for the use of an internal standard in LC-MS analysis of desmosines. In addition, preparation of cyclic desmosine was succeeded.

研究分野：天然物化学

キーワード：バイオマーカー エラスチン desmosine COPD

1. 研究開始当初の背景

(1) エラスチンは、肺胞や皮膚、血管、靭帯などに存在する弾性線維の主要タンパク質であり、786 アミノ酸残基から成るトロポエラスチン単量体同士が複雑に架橋することで、多量体を形成したファイバー構造をもつ。その架橋に寄与するアミノ酸として、desmosine および isodesmosine が知られている。このエラスチンは不溶性タンパク質であるため、その詳細な三次元構造の解析が困難となっていた。

(2) 弾性線維の変性を伴う代表的な疾患として、COPD (慢性閉塞性肺疾患) が挙げられる。本疾患は肺気腫や慢性気管支炎などの病気の総称であり、WHO (世界保健機関) によると、現在全世界で2億人以上の患者がおり、死亡原因の第3位を占めている。しかし、そもそも病態が複雑で、かつ根本的治療薬すら存在しないのが現状である。COPD患者の痰・血清・尿を加水分解処理し LC-MS 分析すると、desmosine および isodesmosine が健常者よりも多く観測される。したがって、これらのアミノ酸は、COPD のバイオマーカーとして有望視されている。

(3) これまでに研究代表者は、ピリジン環とアミノ酸の炭素-炭素結合の構築の際にパラジウム触媒によるクロスカップリングを鍵反応とすることで、desmosine の最初の全合成を達成した。その際、菌頭カップリングルートでは13段階・総収率11%、菌頭-根岸カップリングルートでは6段階・総収率15%であり、収率や段階数に課題を残していた。また、desmosine による COPD バイオマーカーの厳密な定量分析法の確立には至っていない。

2. 研究の目的

(1) Desmosine 類の全合成研究において、クロスカップリングルートよりも効率的かつ斬新な生合成を模倣した、新規合成ルートを確認する。その際、ランタノイドをルイス酸として用いた Chichibabin ピリジン合成を鍵反応とする。

(2) COPD のバイオマーカーである desmosine を用いた診断法の確立を目指し、同位体標識 desmosine を合成し、これを標準物質とした同位体希釈 LC-MS 厳密定量法を開発する。

(3) 不溶性エラスチンのペプチド間架橋部位における三次元ネットワーク構造の解明を目指し、環状 desmosine ペプチドの合成研究を推進する。

(4) 推定したエラスチン架橋構造に基づき、COPD の診断薬開発を狙った抗原・抗体の調製を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 生合成を模倣したエラスチン架橋アミノ酸 desmosine 類の新規全合成法の開発: 4当量のアルデヒドと1当量のアミンを出発原料として、1,2,3,5 または 1,3,4,5 - 四置換ピリジン環を一挙に構築できる Chichibabin ピリジン合成反応の検討を行う。この際、ランタノイドトリフラートをルイス酸触媒として水中で反応を行う。状況に応じて、マイクロ波合成装置を用いる。

(2) 同位体標識 desmosine の調製と LC-MS による厳密定量法の確立: 確立した新規全合成法を適用することで、重水素標識および ^{13}C 標識した desmosine または isodesmosine の化学合成を行う。そして、これを用いて、desmosine 類の LC-MS 測定における厳密な定量分析法を確立する。

(3) 環状ペプチド型 desmosine 誘導体の調製: 以前に確立したクロスカップリングを基盤とした desmosine 類の全合成法に基づき、推定されているアラニンを中心とするアミノ酸を有し、ピリジン環を含む環状架橋構造をもつペプチド誘導体の合成を推進する。

(4) エラスチンの部分構造の推定と抗体調製: 合成した環状ペプチド型 desmosine 誘導体を、エラスチンの酵素分解物や臨床試料と LC-MS 上で分析・比較し、部分構造の推定を行う。首尾よく構造の同定ができた場合、その抗原 (キャリアタンパク質複合体) を調製し、マウスに免疫後、モノクローナル抗体を得る。

4. 研究成果

(1) 購入可能なリシン保護体およびグルタミン酸保護体からそれぞれ誘導できるアミンとアルデヒドを原料として、水溶媒中で 50 mol% の $\text{Pr}(\text{OTf})_3$ 存在下、Chichibabin ピリジン合成を検討したところ、isodesmosine および desmosine の全合成を達成できた。出発物質からの最高収率として、isodesmosine の場合は4段階 35%、desmosine の場合は4段階 8%となり、これまでよりも短段階での合成が可能となった。

(2) 希土類元素であるランタノイドをルイス酸触媒として用いた Chichibabin ピリジン合成による desmosine 類の全合成ルートを適用することにより、同位体標識した isodesmosine の合成を志した。 ^{13}C 標識した

アルデヒドと、 ^{15}N 標識したアミンをそれぞれ調製することにより、Chichibabin ピリジン合成を検討した。その結果、収率 20%でピリジン環を一挙に構築し、目的の ^{13}C および ^{15}N 標識した isodesmosine の合成に成功した。さらには、クロスカップリングで得られた基質のアルキンの還元反応において、重水素を用いることによって、desmosine に重水素を導入した化合物も合成できた。これらの同位体標識体を標準物質とすることで、COPD 患者の臨床試料の desmosine の定量分析が可能となった。

(3) これまでに desmosine の最初の全合成において確立した、菌頭および根岸クロスカップリングを基盤とした合成ルートに則り、推定されているアラニンを中心とするアミノ酸を有し、ピリジン環を含む環状ペプチド型 desmosine 誘導体の合成に成功した。本化合物は、環状ペプチドにピリジン環が結合した稀な構造をもつ。特に、分子内縮合反応において、縮合剤 COMU を用いることで再現性よく反応が進行することを確認した。また、合成した環状 desmosine の MS/MS 測定を行ったところ、アラニン 1 つが脱離したマスペクトルを得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

Yohei Koseki, Takanori Sugimura, Keita Ogawa, Rina Suzuki, Haruka Yamada, Noriyuki Suzuki, Yoshiro Masuyama, Yong Y. Lin, Toyonobu Usuki "Total Synthesis of Isodesmosine via Stepwise, Regioselective Negishi and Sonogashira Cross-Coupling Reactions" *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *18*, 4024-4032. (査読有)
DOI:10.1002/ejoc.201500449

Takahiro Tanigawa, Akira Komatsu, Toyonobu Usuki "[$^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_1$]-Labeled Isodesmosine: a Potential Internal Standard for LC-MS/MS Analysis of Desmosines in Elastin Degradation" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*, 2046-2049. (査読有)
DOI:10.1016/j.bmcl.2015.03.084

Rina Suzuki, Hiroto Yanuma, Takahiro Hayashi, Haruka Yamada, Toyonobu Usuki "Syntheses of Natural and Deuterated Desmosines via Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions" *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1851-1862. (査読有)

DOI:10.1016/j.tet.2015.01.064

Haruka Yamada, Takahiro Hayashi, Toyonobu Usuki "Total Synthesis of the COPD Biomarker Desmosine via Stepwise Sonogashira Cross-Coupling Reactions" *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2015**, *88*, 673-683. (査読有)

DOI:10.1246/bcsj.20140394

Yuko Murakami, Rina Suzuki, Hiroto Yanuma, Jiantao He, Shuren Ma, Gerard M. Turino, Yong Y. Lin, Toyonobu Usuki "Synthesis and LC-MS/MS Analysis of Desmosine- CH_2 , a Potential Internal Standard for the Degraded Elastin Biomarker Desmosine" *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12*, 9887-9894. (査読有)
DOI:10.1039/C4OB01438C

Takanori Sugimura, Akira Komatsu, Yohei Koseki, Toyonobu Usuki "Pr(OTf) $_3$ -promoted Chichibabin Pyridine Synthesis of Isodesmosine in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ " *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 6343-6346. (査読有)
DOI:10.1016/j.tetlet.2014.09.097

Toyonobu Usuki, Takanori Sugimura, Akira Komatsu, Yohei Koseki "Biomimetic Chichibabin Pyridine Synthesis of the COPD Biomarkers and Elastin Crosslinkers Isodesmosine and Desmosine" *Organic Letters* **2014**, *16*, 1672-1675. (査読有)
DOI:10.1021/ol500333t

Toyonobu Usuki, Hiroto Yanuma, Takahiro Hayashi, Haruka Yamada, Noriyuki Suzuki, Yoshiro Masuyama "Improved Negishi Cross-Coupling Reactions of an Organozinc Reagent Derived from L-Aspartic Acid with Monohalopyridines" *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2014**, *51*, 269-273. (査読有)
DOI:10.1002/jhet.1807

Shuren Ma, Gerard M. Turino, Takahiro Hayashi, Hiroto Yanuma, Toyonobu Usuki, Yong Y. Lin "Stable Deuterium Internal Standard for the Isotope-dilution LC-MS/MS Analysis of Elastin Degradation" *Analytical Biochemistry* **2013**, *440*, 158-165. (査読有)
DOI:10.1016/j.ab.2013.05.014

Hiroto Yanuma, Toyonobu Usuki
“Synthesis of Neodesmosine, a
Crosslinking Pyridinium Amino Acid of
Elastin, via a Negishi Cross-Coupling”
Heterocycles **2013**, *87*, 55-63. (査読有)
DOI:10.3987/COM-12-12600

〔学会発表〕(計48件)

東海林大、小川圭太、林貴広、臼杵豊展
「弾性線維エラスチンの構造解明を目指
した環状 desmosine の創製」日本化学会
第96春季年会、2016年3月26日、同
志社大学(京都府京田辺市)

小川圭太、林貴広、臼杵豊展「エラスチ
ンの三次元架橋構造解明に向けた環状
desmosine ペプチドの合成研究」日本化
学会第5回CSJ化学フェスタ、2015年
10月13日、タワーホール船堀(東京都
江戸川区)

臼杵豊展、鈴木里奈、林貴広、矢沼裕人、
山田はるか、馬樹人、トリート・エム・
ゲラルド、林栄源「重水素標識 desmosine
合成に基づく COPD バイオマーカーの
同位体希釈 LC-MS/MS 定量分析」日本ケ
ミカルバイオロジー学会 第10回年会、
2015年6月11日、東北大学百周年記念
会館(宮城県仙台市)

小松瑛、杉村尚則、谷川貴寛、小関洋平、
臼杵豊展「COPD バイオマーカー
isodesmosine の Chichibabin ピリジン合
成」日本化学会第95春季年会、2015年
3月27日、日本大学(千葉県船橋市)

小松瑛、杉村尚則、谷川貴寛、小関洋平、
臼杵豊展「COPD バイオマーカー
isodesmosine の全合成」日本化学会第4
回CSJ化学フェスタ、2014年10月15
日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
【優秀ポスター発表賞】

臼杵豊展、Yong Y. Lin、Gerard M.
Turino「COPD バイオマーカー診断法の
確立：エラスチン架橋分子 desmosine の
アイソトープ希釈 LC-MS/MS 法による
定量分析」第54回日本呼吸器学会学術講
演会、2014年4月27日、大阪国際会議
場(大阪府大阪市)

Akira Komatsu, Takanori Sugimura,
Yohei Koseki, Toyonobu Usuki,
“Biomimetic Synthesis of the COPD
Biomarker Desmosines”, 14th
Tetrahedron Symposium - Asian
Edition, October 21-22 2013, Seoul
(Republic of Korea) 【Won the Elsevier
Best Poster Prize】

臼杵豊展「同位体標識とイオン液体によ
る超天然物化学研究」第2回慶應有機化
学若手シンポジウム、2014年5月10日、
慶應義塾大学(神奈川県横浜市)【招待
講演】

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

名称：カフェオイルキナ酸類抽出方法及びカ
フェオイルキナ酸類製造方法
発明者：臼杵豊展、藤田正博、音田慎吾
権利者：学校法人 上智学院
種類：特許
番号：特願2014-092037、特開2015-209401
出願年月日：平成26年4月25日
国内外の別：国内

名称：化合物、これを用いた定量分析用標準
物質およびデスモシン類の定量方法
発明者：臼杵豊展
権利者：学校法人 上智学院
種類：特許
番号：特願2014-055337、特開2015-178957
出願年月日：平成26年3月18日
国内外の別：国内

名称：デスモシン、イソデスモシン、および
その誘導体の製造方法
発明者：臼杵豊展
権利者：学校法人 上智学院
種類：特許
番号：PCT/JP2014/051482、
2015-0376127-A1
出願年月日：平成26年1月24日
国内外の別：国外

名称：Analyzing elastic injury markers
発明者：Yong Y. Lin, Shuren Ma, Gerard M.
Turino, Toyonobu Usuki
権利者：Columbia University
種類：特許
番号：US 2013-61817669、WO
2014-US36070、WO 2014179408
出願年月日：平成25年4月30日
国内外の別：国外

取得状況(計1件)

名称：シキミ酸取得方法及びシキミ酸製造方
法
発明者：臼杵豊展、藤田正博、保田菜々絵
権利者：学校法人 上智学院
種類：特許
番号：5737751
取得年月日：平成27年5月1日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.mls.sophia.ac.jp/~usuki/>

新聞報道

拓く研究人-107-『たばこ病関連物質など
探索』:2016年1月27日 日刊工業新聞

『上智大、アルツハイマー病有効成分-
イモ葉から抽出量6倍』:2016年1月12
日 日刊工業新聞

『上智大、イオン液体でイチョウ葉から
効率抽出』:2015年10月9日 日経産業
新聞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼杵 豊展 (USUKI, Toyonobu)
上智大学・理工学部・准教授
研究者番号: 50514535