

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：32621
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22710224
 研究課題名（和文） COPDバイオマーカー診断法の確立を目指したdesmosine類の創製
 研究課題名（英文） Preparation of desmosines for diagnosis of COPD by the biomarker

 研究代表者
 臼杵 豊展（USUKI TOYONOBU）
 上智大学・理工学部・助教
 研究者番号：50514535

研究成果の概要（和文）：COPD（慢性閉塞性肺疾患）は、世界第4位の死亡原因となっている肺の生活習慣病である。本研究では、バイオマーカーによるCOPDの迅速かつ正確な定量分析を目的として、エラスチン架橋アミノ酸分子desmosine類の有機合成化学的手法による全合成研究を展開した。パラジウム触媒によるクロスカップリングを鍵反応としたところ、desmosineやisodesmosineなどの全合成に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, total synthesis of desmosine and isodesmosine, known as COPD biomarkers and elastin crosslinkers, was achieved via palladium-catalyzed cross-coupling reactions as key steps.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：COPD、エラスチン、バイオマーカー、クロスカップリング

1. 研究開始当初の背景

(1) COPD（慢性閉塞性肺疾患）は、別名タバコ病とも呼ばれる、肺気腫や慢性気管支炎などの病気の総称である。世界保健機関（WHO）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4位を占めており、2020年までに第3位に浮上すると警告している。COPDの主な症状は、肺の炎症による咳や痰、呼吸困難等が挙げられる。そもそも病態が複雑で未知の部分が多く、根本的治療薬すら存在しないのが現状である。

(2) 医療現場では現在、COPDはスパイロメトリー法やCT、X-ray撮影などの総合的な評価により診断を下しているが、時間やコストが甚大である。しかも患者は、重篤な症状を呈して初めて受診することが多い。今世紀、発展途上国を中心とした喫煙者の増加や産業発展による大気汚染により、世界規模でのCOPD患者の急増が危惧されているため、迅速かつ簡便な検査法の確立が至上命題となっている。

(3) 肺胞の伸縮を司る弾性繊維タンパク質エラスチンの架橋アミノ酸として、**desmosine** およびその異性体 **isodesmosine** が知られている。COPD 患者の痰・血液・尿を加水分解処理し、LC-MS 分析すると、**desmosine** および **isodesmosine** が観測される。健常者と COPD 患者におけるそれらの存在量が異なることが示唆されていることから、COPD のバイオマーカーとして有望視されている。

(4) しかしこれまでのところ、**desmosine** および **isodesmosine** の迅速な LC-MS 分析のための標準物質が未開発であるため、臨床由来の試料について詳細かつ厳密な定量分析が実現できていない。さらに、COPD による変性が予想される弾性繊維タンパク質エラスチンの真の三次元構造が未解明のままである。その上、有機合成化学による **desmosine** 類の全合成も、現在まで達成されていない。このように、現代の重要疾患の一つである COPD に関連する基礎研究は立ち遅れている状況にある。

2. 研究の目的

(1) 本研究の第一の目的として、アミノ酸とピリジン環の間の炭素-炭素結合を、パラジウム触媒によるクロスカップリングを鍵反応として、エラスチン架橋アミノ酸分子 **desmosine** および **isodesmosine** の最初の全合成を達成する。

(2) 第二の目的として、COPD 患者由来の試料中の **desmosine** 類を LC-MS による厳密な定量分析を目論み、同位体標識した **desmosine** の合成を行う。具体的には、化合物に重水素や ^{13}C を導入することにする。

(3) これまでの研究から予想されるアミノ酸 (アラニンリッチ) を有する環状ペプチド型 **desmosine** を創製し、エラスチンや実際の生体試料から観測されるスペクトルとの比較によるエラスチンの部分構造の推定を、第三の目的とする。

3. 研究の方法

(1) パラジウム触媒によるピリジン環とアミノ酸との炭素-炭素結合構築法の確立：標的分子である **desmosine** 類は、ピリジン環に炭素鎖の異なる 3 種類のアミノ酸が 4 つ結合した構造を有している。そこで初めに、ピリジン環とアミノ酸との間の炭素-炭素結合の構築をパラジウム触媒により検討する

ことにする。モデル基質として、**monohalopyridine** と保護基を付与したアミノ酸を用いる。このときに採用する反応として、根岸カップリングと鈴木-宮浦カップリングを計画する。また、生体由来の **desmosine** 類は天然型の L-アミノ酸と推定し、本合成に用いるアミノ酸は L 体を出発物質とする。そして、配位子や時間、温度などのカップリング反応の最適化条件の検討を行う。

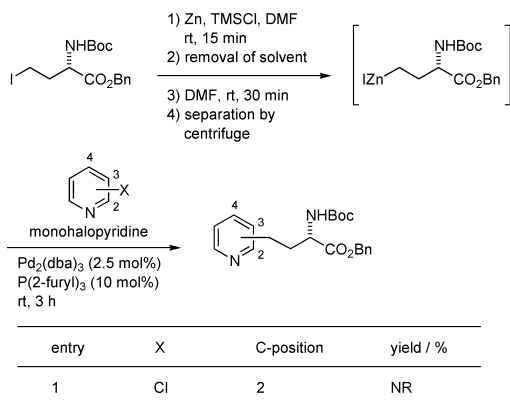
(2) **Desmosine** および **isodesmosine** の全合成達成：ピリジニウム塩の構築は最終段階で行うこととし、残りの 3 つの L-アミノ酸を段階的なカップリングにより導入することを計画する。合成の出発物質として、**monohydroxypyridine** を用いることにする。**Desmosine** の合成では、**4-hydroxypyridine** を位置選択的にトリハロゲン化し、これと最適化した条件下、炭素鎖 3 および 4 のアミノ酸をとのカップリングを検討する。このようにして得られた 3 置換ピリジンに対して、炭素鎖 5 のアミノ酸の導入を試みる。最後にアミノ酸のカルボン酸とアミンに付与した保護基を除去し、HPLC によって単離・精製することで、**desmosine** および **isodesmosine** の世界初の全合成を達成する。

(3) 定量分析に向けた重水素化 **desmosine** の合成：以上のように確立した合成法を適用して、重水素化した **desmosine** の合成に取り掛かる。予め水素 6 つを重水素置換した炭素鎖 5 のアミノ酸を調製し、3 置換ピリジンと結合させることで、重水素化 **desmosine** の合成を達成する。得られた試料を海外共同研究先のコロンビア大学医学部へ送り、LC-MS による定量分析に供する。この試料は、マススペクトル上で質量が 6 (m/z) シフトするため、イオンクロマトグラム上での定量が可能となる。このようにして、患者由来試料の含有 **desmosine** および **isodesmosine** の定量分析が可能となり、COPD バイオマーカー診断法の開発に大きく貢献できることとなる。

(4) 環状ペプチド型 **desmosine** 誘導体の創製とエラスチンの部分構造推定：肺胞の伸縮を司る弾性繊維エラスチンは、アミノ酸が複雑に架橋したペプチドの集合体であるが、ピリジン環周辺の構造は不明である。解読されたエラスチンの遺伝子配列から想定されている環状ペプチドを、先に確立した合成技術を駆使することにより創製し、NMR や X 線、計算化学による構造解析を行う。そして得られた環状化合物と、エラスチンまたは臨床由来の試料の LC-MS の保持時間やマススペクトルなどを比較検討することで、クロマトグラフ上で一致するピークがあれば、エラスチンの部分構造であることが強く示唆される。

4. 研究成果

(1) 改良型根岸クロスカップリングの開発：ピリジン環とアミノ酸の炭素-炭素結合構築反応として、遷移金属パラジウムを触媒とした根岸クロスカップリングを検討した。モノハロピリジンと、別途合成したキラルなヨードアミノ酸について反応させ、配位子、触媒、反応時間等の検討を行った。特に本反応では、有機亜鉛試薬を調製する際、過剰の亜鉛がカップリング反応を阻害すると考え、エッペンドルフチューブによる遠心分離を行い、余分な亜鉛を除去する新たな手法を開発した。すると、ジメチルフォルムアルデヒド中、配位子としてトリフルルオスフィンを用いた時、4-iodopyridine を基質とした場合、最高90%の収率でカップリング体を得ることができた。このように、炭素-炭素結合構築反応の条件最適化に成功した。

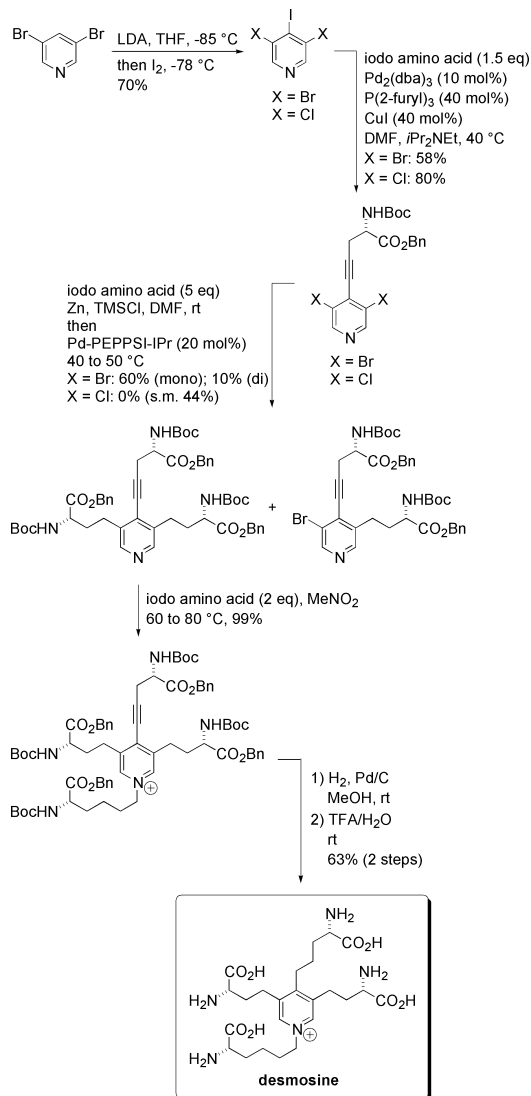


^a The reaction time was 15h.

(2) 菌頭クロスカップリングを基軸とした desmosine の全合成：トリハロピリジンとアセチレンを付与したアミノ酸との段階的な菌頭クロスカップリングを鍵反応として desmosine の合成研究を検討した。カップリング反応は90%程度の良好な収率で進行し、結果的に13段階・総収率11%で目的の desmosine の世界初の全合成を達成することができた。

(3) 菌頭-根岸クロスカップリングを基軸とした desmosine の全合成：菌頭ルートでは、13段階もかかったため、より効率的なルー

トの開拓を試みた。種々検討の結果、パラジウム触媒によるクロスカップリング反応を菌頭-根岸の順番で遂行することにより、6段階・総収率15%と短段階かつ高収率で desmosine の第二世代全合成を達成するという重要な成果が得られた。



(4) 重水素化 desmosine の合成：確立した上記の合成ルートを用いることによって、重水素によるアルキンの還元反応を用いて分子内に確実に同位体標識した desmosine の創製に成功した。これにより、desmosine の厳密な定量法を実現する研究へ展開することができた。

(5) クロスカップリングを基軸とした isodesmosine の全合成：desmosine の異性体である 1,2,3,5-四置換ピリジンである isodesmosine についても、段階的なクロスカップリングによる合成を検討した。その結果、根岸-菌頭-根岸の順番でカップリング反

応を行うことにより、位置選択的にアミノ酸を導入することができ、最終的に isodesmosine の全合成に成功した。

(6) Desmopyridine の全合成：エラスチン架橋アミノ酸分子の一つとして、3,4,5-三置換ピリジンである desmopyridine が知られている。この化合物も、上記の菌頭-根岸クロスカップリング反応を駆使することによって、6段階・総収率10%で初めて全合成することができた。

(7) Neodesmosine の全合成：さらに別のエラスチン架橋アミノ酸分子の一つとして、1,3,5-三置換ピリジンである neodesmosine が知られている。この化合物の場合は、3,5-ジハロピリジンとアミノ酸との根岸クロスカップリングを用いることで、4段階・総収率33%で最初の全合成を達成した。

(8) 環状ペプチド型 desmosine の合成研究：エラスチンの構造解析に向け、ピリジン環を含むアラニンリッチな環状ペプチド型 desmosine の合成研究も開始した。鍵反応として、菌頭-根岸クロスカップリングを採用したところ、これまで1つの環状ペプチドを合成することができている。今後さらに検討を続け、アラニンリッチな2つの環状ペプチドを完成させたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

① 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

② Yuko Murakami, Hiroto Yanuma, Toyonobu Usuki, "Total Synthesis of the Elastin Crosslinker (+)-Desmopyridine", *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1557-1563 (査読有)
DOI: 10.1016/j.tetasy.2012.10.009

③ Hiroto Yanuma, Toyonobu Usuki, "Total Synthesis of the COPD Biomarker Desmosine via Sonogashira and Negishi Cross-Coupling Reactions", *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 5920-5922 (査読有)
DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.08.084

④ Toyonobu Usuki, Haruka Yamada,

Takahiro Hayashi, Hiroto Yanuma, Yohei Koseki, Noriyuki Suzuki, Yoshiro Masuyama, Yong Y. Lin, "Total Synthesis of COPD Biomarker Desmosine that Crosslinks Elastin", *Chemical Communications* **2012**, *48*, 3233-3235 (査読有)

DOI: 10.1039/C2CC17958J

⑤ Yohei Koseki, Haruka Yamada, Toyonobu Usuki, "Efficient Synthesis of Benzyl

2-(S)-[(*tert*-Butoxycarbonyl)aminol]- ω -Iodoalkanoates", *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 580-586 (査読有)

DOI: 10.1016/j.tetasy.2011.03.002

[学会発表] (計47件)

① 臼杵豊展、矢沼裕人、林貴広、村上祐子、「改良型根岸カップリングによる COPD バイオマーカー desmosine 類の創製」、日本化学会第93春季年会、2012年3月24日、立命館大学

② 臼杵豊展、矢沼裕人、山田はるか、林貴広、「エラスチン架橋アミノ酸 desmosine 類の全合成」、第42回複素環化学討論会、2012年10月12日、京都

③ 臼杵豊展、「COPD (慢性閉塞性肺疾患) バイオマーカーの開発を志した天然物合成」、有機合成化学協会関東支部ミニシンポジウム、2012年6月30日、早稲田大学

④ 矢沼裕人、林貴広、小関洋平、山田はるか、Yong Y. Lin、臼杵豊展、「COPD バイオマーカー desmosine の全合成」、日本化学会第1回 CSJ 化学フェスタ、2011年11月14日、早稲田大学

⑤ Toyonobu Usuki, Haruka Yamada, Yohei Koseki, Hiroto Yanuma, Takahiro Hayashi, Yuko Murakami, Yong Y. Lin, "Synthetic Study of Crosslinking Amino Acids of Elastin Utilizing Palladium-Catalyzed Cross-Coupling", 14th Asian Chemical Congress 2011, September 6 2011, Bangkok (タイ王国)

[図書] (計1件)

① Tohru Taniguchi, Toyonobu Usuki, John Wiley & Sons Ltd, "Circular Dichroism Spectroscopy" in *Supramolecular*

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 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: 特願 2011-052211

出願年月日: 23 年 3 月 9 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: 特願 2013-018473

出願年月日: 25 年 2 月 1 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

① 研究室ホームページ :
<http://www.mls.sophia.ac.jp/~usuki/>

② 研究成果 (Usuki, T., et al *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10560) がイギリス王立化学会のウェブサイトの特集記事が掲載された :
<http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2011/August/25081101.asp>

また、イギリス王立化学会誌 *Chemistry World* にも特集が掲載された : *Chemistry World*, **2011**, October, page 5

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・助教

研究者番号 : 50514535