

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16552

研究課題名(和文)皮膚バリア機能を果たす極長鎖脂肪酸含有アシルセラミド生合成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the biosynthesis mechanism of acylceramides including ultra-long-chain fatty acid as a skin barrier function

研究代表者

村井 勇太(MURAI, Yuta)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：20707038

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)：皮膚バリア異常は魚鱗癬、アトピー性皮膚炎、乾燥肌を引き起こす要因となる。特に皮膚バリアに特化したアシルセラミドは脂質全体の約8%程度にも関わらずその合成不全は重篤な皮膚疾患を引き起こす。しかし、アシルセラミドの治療薬としてのポテンシャルや一部の生合成経路は未解明のままであり、それらを化学的に解明するためには十分な量が必要となる。本研究はアシルセラミド分子のなかでも最も多く存在するC34:1あるいは最長のC36:1の超長鎖脂肪酸を含有する分子種の効率的な全合成を達成した。また -OHセラミドとリノール酸のアシル化酵素解明のために光アフィニティープローブの合成を実施した。

研究成果の概要(英文)：Acylceramides in mammalian epidermal keratinocytes, including unique ultra-long-chain (C30-C36) fatty acids, have been known as a significant component of a skin barrier. Although acylceramides are present in only about 5-8% of the total lipid in a skin barrier, its deficiency causes severe skin diseases such as atopic dermatitis, ichthyosis, dry skin and psoriasis. In acylceramides, the most abundant molecular species includes the unsaturated ultra-long-chain fatty acid (C34:1). However, the details of its physical property and the potential therapeutic use have not completely elucidated due to less report to synthesize acylceramides so far. In this study, an efficient synthesis of acylceramides including unsaturated ultra-long-chain fatty acid (C34:1 and C36:1) in big-scale.

研究分野：有機合成化学

キーワード：アシルセラミド 超長鎖脂肪酸 皮膚バリア Wittig反応 アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた陸上生物の体表面は皮膚バリアによって保護されている。バリアは感染症、炎症、アレルギーの原因となる病原やアレルゲンの侵入を防ぐ、あるいは水分の保持といった重要な役割を持つ。そのためバリア異常は皮膚角化症である魚鱗癬、アトピー性皮膚炎、乾燥肌を引き起こす要因となる。バリアの構成成分のメインは脂質であり、特に皮膚バリアに特化した脂質がアシルセラミドであり、構成割合は脂質全体の5~8%程度にも関わらずその合成不全・低下は魚鱗癬、アトピー性皮膚炎などを引き起こすことが報告されている。しかし、この皮膚バリアの生理学的、病理学的重要性にも関わらず、未だ未解明の点が多く存在している。

- ・ アシルセラミドを含めた表皮セラミド群の生合成分子機構が完全に解明されていない。
- ・ 表皮中での物理的性質(数%の存在割合で皮膚バリア・ラメラ構造を維持できる仕組み)。
- ・ 治療薬候補としてのポテンシャルを持つかどうか。
- ・ アシルセラミドは皮膚バリアを構成するもう一つの組織、タンパク質結合型セラミドの前駆体であり、その分子機構も未解明な部分が存在する。

また、ごく最近、皮膚バリア形成不全型ケラチノサイトにアシルセラミドを添加することにより、皮膚バリア形成関連遺伝子の活性化が報告された。しかし、脂質領域では、その特有の性質からタンパク、核酸、糖鎖領域に比べ、化学の貢献が遅れている。実際、アシルセラミドの主な合成手法は2例しかなく、標準サンプルの供給としては充分ではない。また、健常な個体からの単離はその微量性のため困難であり、また他の脂質群が混在する可能性も高い。これらのことから、ピュア且つ十分なアシルセラミドの供給は脂質研究領域において強く望まれており、十分な供給が可能となれば、上記の問題や皮膚病の新たな改善法確立に繋がる可能性が高い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、アシルセラミド分子のなかでも最も多く存在するC34:1あるいは最長のC36:1の超長鎖脂肪酸を含有する分子種の化学的全合成を実施、グラムスケールのサンプルを生化学的研究に応用可能にすることを目的とする。また研究当初、未解明であったアシルセラミド前駆体である -OH セラミドのリノール酸アシル化酵素解明のために光アフィニティープローブの合成についても検討を行うこととした。

具体的に

- 1) 合成困難とされている -OH 超長鎖脂肪酸(C34:1, C36:1)の安価な原料による効率的な合成法(ハロゲン-アルキンカップリングやWittig反応による)を確立する。

特に -OH 超長鎖脂肪酸は -9 位にシス型オレフィンを含有することから、位置選択的な合成ルートの確立を行う。

- 2) アシルセラミドの合成は、まずスフィンゴイド塩基と -OH 超長鎖脂肪酸によるアシル化を検討する。続いて -OH 超長鎖脂肪酸の水酸基とリノール酸とエステル化反応を行うことで、合成を達成する。
- 3) -OH セラミドのリノール酸とのエステル化に關与する酵素解明のために -OH セラミドをリガンドとした光アフィニティープローブの設計を行い、釣り上げ実験を行う。

3. 研究の方法

- 1) -OH 超長鎖脂肪酸(C34:1, C36:1)の合成について、はじめプロパギルアルコールを原料とし、水酸基の THP による保護を行う。続いてハロゲン-アルキンカップリングによって炭素鎖 25 及び 27 の鎖長延長反応を行う。特にアルキル鎖が長くなるに連れて、有機反応点が疎水部分であるアルキル鎖がアグリゲーションを起こしことで、中心部に埋もれ、反応効率が悪くなることが予測される。この点について、反応溶媒の検討やヘキサメチルリン酸トリアミドなどを使用し、アグリゲーションやオリゴマーを解離させることを検討し、効率的な反応条件を見出す。鎖延長反応によって合成された炭素鎖 25 及び 27 の内部アルキン化合物はアルキンジッパー反応により末端アルキン化合物を得る。特に -9 位のシス型オレフィン構築は炭素鎖 25 及び 27 の末端アルキン化合物と 9-プロモノニルアセテートとのハロゲン-アルキンカップリングによってアルキン構築後、リンドラ触媒による接触水添により得ることとする。最後に THP を脱保護し、TEMPO 酸化によってカルボン酸へと変換することで -OH 超長鎖脂肪酸(C34:1, C36:1)を獲得する。上記の方法が上手く進行しなかった場合の補完法として Wittig 反応による鎖長延長反応についても検討する。 -OH 超長鎖脂肪酸(C34:1, C36:1)の共通原料として 1,9-ノナンジオールより炭素鎖 9 のホスホニウム塩を合成する。このホスホニウム塩を使用し Wittig を繰り返すことで、 -OH 超長鎖脂肪酸(C34:1, C36:1)が合成可能と考えられる。Wittig 反応についてもホスホニウム塩や長鎖アルキルの有機溶媒への溶解性、反応性が問題になることが予測されるので、アルキン-ハロゲンカップリング時のように最適条件の検討を行う。
- 2) アシルセラミドの合成は 1 位および 3 位の水酸基を TBS 保護したスフィンゴイド塩基を準備し、それと合成した -OH 超長鎖脂肪酸(C34:1, C36:1)の

シル化によって、-OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) 含有セラミドを構築する。続いて -OH とリノール酸をエステル化反応することで、目標とする超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) 含有アシルセラミドの全合成を達成する。本目標はグラムスケールでの最終化合物獲得であることから、各反応収率を 70% 以上で進行させることについても考慮する。

- 3) -OH セラミドとリノール酸とのエステル化に關する酵素の解明法には光アフィニティーラベル法を検討する。リガンドには -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) 含有セラミド、光反応基にはケイ皮酸型ジアジリン、タグとして磁性ビーズを搭載した光アフィニティープローブを設計する。構築した光プローブが光反応可能であるかメタノール中で光分解を行い、ジアジリン基が分解しカルベンを効率良く発生するのかが確認する。分解が行われなかった場合はプローブを再設計し、ラベル化の検討を行う。

4. 研究成果

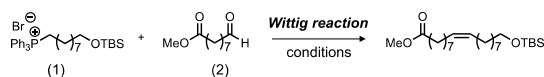
1) ハロゲン-アルキンカップリングによる -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1)

プロパギルアルコールを原料としたハロゲン-アルキンカップリングによる炭素鎖延長反応は炭素鎖が 10 以上になると予想していたアルキル鎖のアグリゲーションが起こり、反応点が中心部に埋もれ、収率が格段に落ちた。このことから、反応系にヘキサメチルリン酸トリアミドを添加することで、アグリゲーションやオリゴマーを解離させ、収率 80% 以上でカップリング反応を進行させることに成功した。しかし炭素鎖が 25 及び 27 の合成になると、収率の再現性が取れない、または反応が全く進行しないことが判明した。反応を進行させるために溶媒 (THF, CH₂Cl₂, DMF, Dioxane 等) や反応温度を上げるといった検討を行なったが、未反応や原料の分解などが確認され、これ以上の鎖長延長反応は適用できず当法による -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) の合成には至らなかった。

Wittig 反応による -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1)

はじめ安価 (500g, 19,600 円) な 1,9-ノナンジオールを原料としてホスホニウム塩 (1) とアルデヒド (2) を合成した。続く、これらの Wittig 反応であるが、一般的に用いられる THF 溶媒、NaHMDS 塩基を使用した場合、反応はほとんど反応せず、主にアルデヒドの分解が確認された。これはホスホニウム塩 (1) の有機溶媒への溶解性が低く、イリドの発生ができていないものと考えられた。そこで反応系に一度、熱を加えることでイリド

を発生させ、さらに 0 °C に戻しアルデヒドを加えることで反応を検討したが、進行は確認できなかった。そこでホスホニウム塩 (1) の有機溶媒への溶解性、及び塩基の検討を行った。その結果、溶媒には Dioxane/CH₂Cl₂ または DME/CH₂Cl₂ を混和させ、塩基に NaH を用いることで、反応を穏やか (ゆっくり) に進行させることができ、従来にはない 80% 以上の収率で Wittig 反応を進行させることに成功した (図 1 参照)。ホスホニウム塩はアセトニトリルやハロゲン溶媒のみでも溶解可能ではあったが、反応率は低いことが確認された。これはハロゲン-アルキンカップリング時のように、アニオン部分であるイリドがアグリゲーションをおこした化合物の中心部に偏り、反応がうまく進行できなかったものと推測している (今後検討の余地がある)。



| entry | base | solvent | temp. | react. |
|-------|--------|---|----------|--------------------|
| 1 | NaHMDS | THF | -78°C→rt | No reaction |
| 2 | NaHMDS | THF | heat→rt | multi spots |
| 3 | NaHMDS | dioxane | rt | No reaction |
| 4 | MeLi | THF | -78°C→rt | by-products |
| 5 | MeLi | THF | -78°C | by-products |
| 6 | NaH | toluene | 0°C→rt | Δ |
| 7 | NaH | DMF | 0°C→rt | Δ |
| 8 | NaH | CH ₃ CN | 0°C→rt | Δ |
| 9 | NaH | THF | 0°C→rt | No reproducibility |
| 10 | NaH | Dioxane | rt | 57% |
| 12 | NaH | Dioxane/CH ₂ Cl ₂ | 0°C→rt | 83% |

図 1

この条件に従って、ホスホニウム塩 (1) による Wittig 反応を繰り返すことで、-OH 超長鎖脂肪酸 (C36:1) をグラムスケールで合成することに成功した。また -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1) については安価な 16-ヘキサデカノライドより誘導されるアルデヒド体とホスホニウム塩 (1) による Wittig 反応を繰り返すことで、こちらについてもグラムスケールでの合成を達成した。

2) 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) 含有アシルセラミドの合成

まず、合成した -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) のカルボン酸をスクシンイミドによって活性エステル体へと誘導し、続いて TBS によって保護していた -水酸基をトシル酸により脱保護を行うことで -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) 活性エステル体 (3) を得た。これをスフィンゴイド塩基とアシル化することによって -OH 超長鎖脂肪酸 (C34:1, C36:1) 含有セラミド (4) を合成した。化合物 (4) はリノール酸クロリドをエステル化を経たのち、TBAF によるスフィンゴイド塩基上の TBS を脱保護することで、目的とする超長鎖脂肪酸

(C34:1, C36:1)含有アシルセラミドの初の全合成を達成した(図2)。

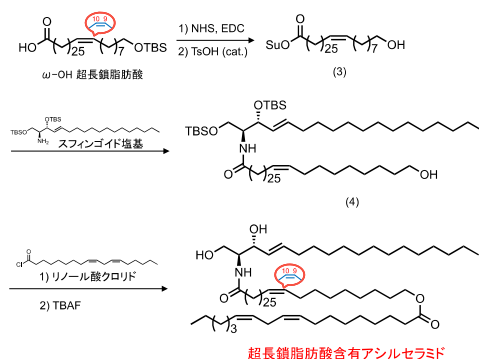


図2

3) -OH セラミドとリノール酸のエステル化に關与する酵素解明を指向した光アフィニティープローブの作成

エステル化酵素の解明については、研究実施期間中に他グループの遺伝学的手法によりホスホリパーゼの1種、PNPLA1であることが報告された(Nat. Commun. 2017)。しかし、脂質代謝酵素の光アフィニティーラベル法による解明研究は例がないため、その可能性を検討した。光アフィニティープローブは当初、親水性の磁性樹脂に固定したものを作成する予定であったが、プローブの疎水性(超長鎖脂肪酸による)や脂質の高さにより、固定化が困難であった。そこで樹脂の代わりにビオチンを標識タグとすることで、プローブを作成した(昨年度末)。しかし、本プローブも水溶性が低いため、親水性を保持したプローブの再構築の必要性が示唆された。現在は親水性を保持するためにPEGをリンカーとしたプローブ合成、また現在開発中の新型ジアジリン搭載型光アフィニティープローブの作成を行なっている最中である。本年度でプロジェクトは終了するが、これらプローブを作成後は標的のPNPLA1が釣り上がるのか否か、光アフィニティーラベル法の実用性を検討する予定である。

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 6件)

すべて査読有り

- Gowda, Siddabasave Gowda B., Nakahashi, A., Yamane, K., Nakahashi, S., Murai, Y., Ananda, Kumar C. Siddegowda, Mostafa A. S. Hammam, Monde, K. Facile Chemoselective Strategy toward Capturing Sphingoid

Bases by a Unique Glutaraldehyde-Functionalized Resin, *ACS Omega*, 2018, 3, 753.

DOI:10.1021/acsomega.7b01440

- Saito, S., Murai, Y., Usuki, S., Yoshida, M., Hammam, M.A.S., Mitsutake, S., Yuyama, K., Igarashi, Y., Monde, K. Synthesis of Nontoxic Fluorous Sphingolipids as Molecular Probes of Exogenous Metabolic Studies for Rapid Enrichment by FSPE. *Eur. J. Org. Chem.* 2017, 1045-1051.

DOI:10.1002/ejoc.201601302

- Nakahashi, A., C. Siddegowda, A. K., Hammam, M. A. S., Gowda, S. G. B., Murai, Y., Monde, K. Stereochemical study of sphingosine by vibrational circular dichroism *Org. Lett.* 2016, 18, 2327-2330.

DOI:10.1021/acs.orglett.6b00477

- Wang, M., Tachibana, S., Murai, Y., Li, L., Lau, Sharon Y. L., Cao, M., Zhu, G., Hashimoto, M., Hashidoko, Y. Indole-3-Acetic Acid Produced by Burkholderia heleaia acts as a Phenylacetic Acid antagonist to disrupt tropolone biosynthesis in Burkholderia plantarii *Scientific Reports* 2016, 6, 22596.

DOI:10.1038/srep22596

- Gowda, S. G., Usuki, S., Hammam, Mostafa A. S., Murai, Y., Igarashi, Y., Monde, K. Highly efficient preparation of sphingosine bases from glucosylceramides by chemoenzymatic method. *J. Lipid Res.* 2016, 57, 325-331.

DOI:10.1194/jlr.D065268

- Murai, Y., Yoshida, T., Wang, L., Masuda, K., Hashidoko, Y., Monde, K., Hatanaka, Y., Hashimoto, M. Efficient Synthesis of Photoreactive 2-Propoxyaniline Derivatives as Artificial Sweeteners. *Synlett* 2016, 27, 946-950.

DOI:10.1055/s-0035-1561275

[学会発表](計 12件)

- 村井勇太, 小川連, 端野翔太, 門出健次, 皮膚バリアに重要な不飽和超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成、日本化学会 第98春年会、2018年
- 小川連, 村井勇太, 門出健次, 皮膚バリア改善を指向した、-9 超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成、化学会北海道支部 2018 冬季研究発表会、2018年
- 村井勇太, 小川連, 端野翔太, 門出健次, 皮膚バリアの重要分子、不飽和超長鎖脂肪酸含有アシルセラミドの合成、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018年

- 4) 村井 勇太、Gowda B. Siddabasave、Koolath Sajeer、端野翔太、小林悠真、小川連、門出健次、スフィンゴ脂質ケミカルバイオロジーの展開、日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会、2017年
- 5) 小川連、端野翔太、村井 勇太、門出健次、皮膚バリア機能を理解するためのアシルセラミド合成、日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会、2017年
- 6) 村井 勇太、Gowda B. Siddabasave、Mahadeva Swamy M. M.、Koolath Sajeer、藤田将平、門出健次、脂質代謝酵素を標的とした新奇スフィンゴ脂質の創出、第12回スフィンゴセラピー(STC)研究会、2017年
- 7) 端野翔太、村井 勇太、門出健次、Total synthesis of skin barrier ceramide to elucidate the onset mechanism of skin diseases、化学会北海道支部 2017 冬季研究発表会、2017年
- 8) 村井 勇太、端野翔太、門出健次、皮膚バリア形成メカニズムの解明を指向した皮膚セラミドの合成、日本化学会 第97春年会、2017年
- 9) 端野翔太、村井 勇太、門出健次、難病皮膚疾患の発症メカニズム解明を目指した皮膚バリア機能セラミドの合成、化学会北海道支部 2016 夏季研究発表会、2016年
- 10) 村井 勇太、Efficient supply and synthesis of unique sphingoids contained in natural resources、12th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments、2016年
- 11) 端野翔太、村井 勇太、門出健次、皮膚バリア機能であるアシルセラミド生合成経路に関わる -OH エステル化酵素の解明研究、第64回高分子学会年次大会、2015年
- 12) 端野翔太、村井 勇太、門出健次、光アフィニティーラベル法によるアシルセラミド生合成経路解明のための極長鎖脂肪酸含有 -OH セラミドの合成、第10回 日本ケミカルバイオロジー学会、2015年

〔図書〕(計 2件)

- 1) 門出健次、村井 勇太 「化学プローブは求愛タンパク質の心をどう射留めるのか? -生命現象解明・創薬に小分子の視点から」化学同人出版 化学, 72 (10), 70-71 (2017)
- 2) 村井 勇太 「光でターゲット分子を捕まえるトリフルオロメチルフェニルジアジリン(生体機序の解明に役立つ光反応性芳香族アミノ酸の簡易的合成)」日本農芸化学会出版、化学と生物, 54,

243-245 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 勇太 (MURAI, Yuta)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：20707038