

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19185

研究課題名(和文) アルカプトン尿症の尿黒変化反応の解析と迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the reaction process of the pigmentation in alkaptonuria, and development of rapid diagnosis of alkaptonuria

研究代表者

倉持 幸司 (Kuramochi, Kouji)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授

研究者番号：90408708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルカプトン尿症の特徴の一つであるホモゲンチジン酸の酸化重合反応をフラスコ内で再現することに着手した。様々な条件下でホモゲンチジン酸及びその類縁体の重合反応を検討した結果、ホモゲンチジン酸の酸化体であるベンゾキノン酢酸の反応性が高く、本分子が黒変化の原因物質である可能性が示唆された。さらに、重合阻害剤の探索が可能なスクリーニング系の確立を行い、アスコルビン酸がホモゲンチジン酸及びベンゾキノン酢酸の重合を阻害するという分子レベルでの証拠を得ることができた。これらの知見は、アルカプトン尿症の病理メカニズムの解明において重要な手がかりとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルカプトン尿症は常染色体劣勢遺伝の代謝疾患で、尿中に多量のホモゲンチジン酸が排出される。また体内に蓄積したホモゲンチジン酸の酸化重合により生成する色素が原因で重篤な関節炎を引き起こすことが知られている。本疾患の予防法・治療法は未だ確立されておらず、従来の診断法も課題が多い。本研究でホモゲンチジン酸の重合阻害剤の探索が可能なスクリーニング系を確立することに成功した。今後、このスクリーニング系は、アルカプトン尿症の治療薬候補の探索に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have studied the oxidative dimerization reaction of homogentisic acid, which is one of the characteristics of alkaptonuria. We examined the dimerization reaction of homogentisic acid and its analogs under various conditions and revealed that the dimerization will proceed via highly reactive benzoquinone acetic acid, an oxidant of homogentisic acid. Furthermore, we established a screening system for identifying compounds, which inhibits the dimerization reaction. These findings can be important clues in the elucidation of the pathological mechanism of alkaptonuria.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アルカプトン尿症 ホモゲンチジン酸 ベンゾキノン酢酸 アスコルビン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

アルカプトン尿症は常染色体劣性遺伝の代謝性疾患であり、尿中にホモゲンチジン酸が大量に排泄されることが特徴である [1]。症状は幼少期では尿が黒変する以外は特にはないが、加齢に伴い耳介や眼球結膜などに色素沈着が起こり、さらに腰や膝、肩、股関節などに生じる関節炎に伴う深刻な疼痛によって、日常生活に支障をきたすようになる [2]。尿の黒変化や色素沈着は、ホモゲンチジン酸の酸化重合に由来することが推測されているが、詳細な原因や生成機構は未解明である。アルカプトン尿症は希少疾患であるために、予防・治療・診断に関する基礎研究が遅れている。この疾患は 1902 年に発見されたが、それから 100 年以上経過した現在でも効果的な治療法や予防法は確立されていない。また、アルカプトン尿症の一般的な診断法は、尿の黒色化に基づく目視による方法であるが、判定が困難な場合や、判定までに長時間が必要であるといった問題点があった。

## 2. 研究の目的

本研究では希少疾患「アルカプトン尿症」の治療・予防・診断法の開発に挑戦する。アルカプトン尿症は先天代謝異常症のひとつで、ホモゲンチジン酸が大量に尿に排泄されることが特徴である。その発生頻度は 25 万から 100 万人に 1 人と極めてまれであり [2]、それが原因となり、研究に必要な基本的な研究基盤の開発が遅れている。しかも、患者数が少なく開発費の回収が見込めないために、企業での診断・治療法の開発も進んでいない。本研究で、臨床症状である尿の黒変化の反応機構や黒色素の構造を明らかにし、本疾患の予防・治療法確立への足がかりをつかむ。また、黒変化反応を阻害する物質を探索し、発症を抑制する薬剤候補物質を選抜する。さらに、ホモゲンチジン酸の酸化二量化反応を開発し、その反応をアルカプトン尿症の迅速診断に応用する

## 3. 研究の方法

ビタミン K<sub>3</sub> やホモゲンチジン酸などを基質に用いて、酸化二量化反応を検討した。ホモゲンチジン酸を基質に用いた反応では、アルカプトン尿症の特徴的な黒変化をフラスコ内で再現する検討を行った。また、黒変化を阻害する薬剤を探索するためのスクリーニング系を構築する研究に取り組んだ。

### 3. 1. ビタミン K<sub>3</sub> の二量化反応

ビタミン K<sub>3</sub> を基質として二量化反応を検討した。イオン性液体を溶媒に利用した際に、色調の劇的な変化を伴う二量化反応を見出すことができた。特に電解質として用いられているイオン性液体 (ionic liquid) の一つである臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBAB) を溶媒に用いることで一般的な有機溶媒では進行しない新規二量化反応を発見し、ビタミン K<sub>3</sub> から一段階で 1-methylKuQuinone [3] の合成に成功した [4]。反応条件の検討を行った結果、本二量化反応には好気性条件、TBAB 及び温度の要素が重要であることが明らかとなった。また、本反応にこれまで報告が無いメチル基転位が関与していたため、反応機構の解明に着手した。反応中間体の特定と <sup>13</sup>C 標識体の合成・NMR 解析により、本反応が酸臭化物を経由して進行することを明確にした。

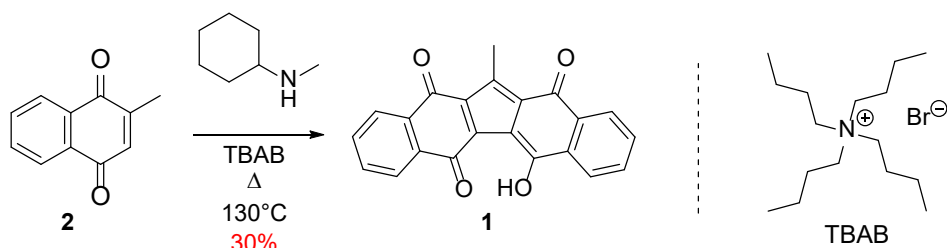
### 3. 2. ホモゲンチジン酸や酸化物の重合反応の検討

ホモゲンチジン酸を生理食塩水に溶解させ、溶液の黒変化を観察した。温度、pH、酸化剤などの反応条件を検討し、黒変化が最も速く進行する条件を検討した。様々な条件下でホモゲンチジン酸及びその類縁体の重合反応を検討した結果、ホモゲンチジン酸の酸化体であるベンズキノン酢酸の反応性が高いこと、ホモゲンチジン酸の重合には塩基性条件、好気性条件、温度が関与していることが示された。また、重合阻害剤の探索が可能なスクリーニング系の確立を行い、多量のアスコルビン酸がホモゲンチジン酸の重合を抑制することを明らかにした。

## 4. 研究成果

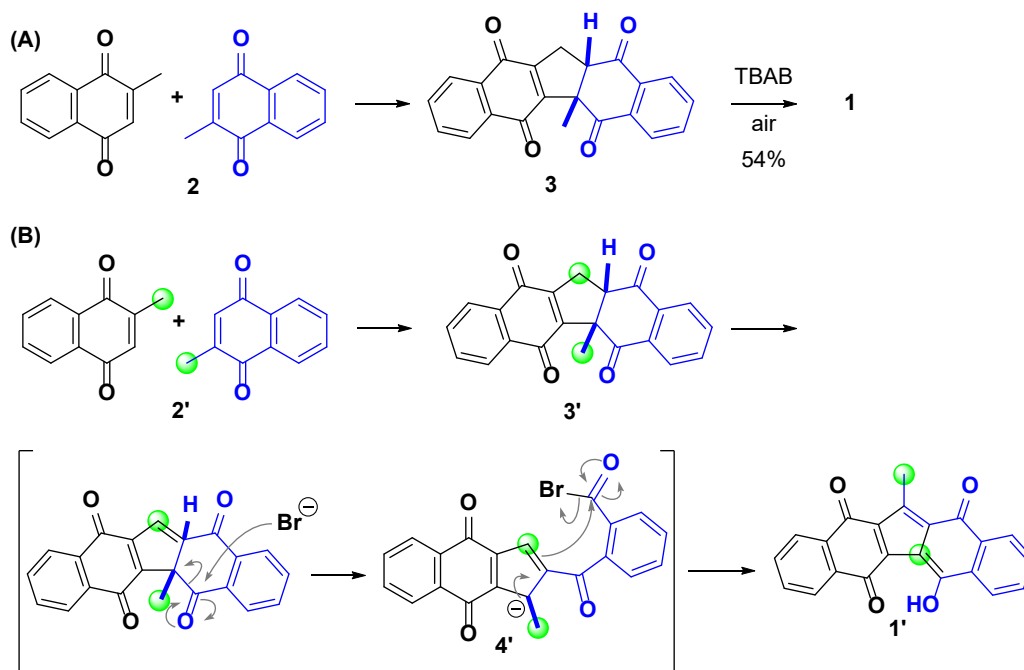
### 4. 1. ビタミン K<sub>3</sub> の二量化反応

ビタミン K<sub>3</sub> (2-メチル-1,4-ナフトキノン; **2**) を臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBAB) 中で 130 °C で反応を行ったところ、1-methylKuQuinone (**1**) を 30% の収率で得られることを見出した。本二量化反応には好気性条件、TBAB 及び温度の要素が重要であることが明らかとなり、既存の合成法と比較して、**1** の収率を約 5 倍向上させることに成功した (Scheme 1)。



Scheme 1. ビタミン K<sub>3</sub> の新規二量化反応の開発

1-MethylKuQuinone は中央にシクロペンタジエニル環を有する五員環ジキノイド化合物である。この五員環ジキノイドの骨格形成に、これまで報告が無いメチル基の転位が関与している可能性が示唆された。よって、反応中間体の特定と 2-(メチル-<sup>13</sup>C)-1,4-ナフトキノン (2') を用いた <sup>13</sup>C 標識実験を行い、反応機構の解明に着手した (Scheme 2)。化合物 2 から合成した二量体 3 を TBAB 中、好気性条件下で反応させることで 1 を 54% の収率で得た (Scheme 2A)。したがって、化合物 3 が本二量化反応の中間体であることが示唆された。さらに、3 から 2 への機構を明らかにするために 2-(メチル-<sup>13</sup>C)-1,4-ナフトキノン (2') から <sup>13</sup>C 標識 1-methylKuQuinone (1') を合成し、NMR による解析を行った。その結果、本反応は系中の酸臭化物 4' を経由して進行することが強く示唆された。



Scheme 2. 反応機構解明 (A) 反応中間体の特定 (B) <sup>13</sup>C 標識実験

#### 4. 2. ホモゲンチジン酸や酸化物の重合反応の検討

アルカプトン尿症の特徴であるホモゲンチジン酸の酸化重合反応を再現するため、Figure 1 に示した基質 (ホモゲンチジン酸 5、ベンゾキノン酢酸 6、ベンゾキノン酢酸メチル 7) を用いて重合反応試験を行った。これら 3 つの基質を pH の異なる緩衝液中 (pH 4.2~10.5) で反応させ、反応の進行を色調の変化と吸光度で追跡した (Figure 2)。その結果、① 時間経過共に反応が進行し、溶液の色調が無色→赤→黒へと変化すること、② いずれの基質も塩基性条件下で重合が起こりやすいこと、③ ホモゲンチジン酸 5 よりもその酸化体である 6 の反応性が高いこと、④ 3 つの基質では 7 の反応性が一番高いことが明らかとなった。

また、重合阻害剤の探索が可能なるスクリーニング系を確立した。基質 5 及び 6 においてアスコルビン酸を用いた重合阻害試験を行った (Figure 3)。その結果、多量のアスコルビン

酸が **5** 及び **6** の重合を抑制することを明らかにした。また、ベンズキノン酢酸 **6** とアスコルビン酸の反応を  $^1\text{H NMR}$  で追跡した結果、アスコルビン酸は酸化物へと変化することがわかった。すなわち、アスコルビン酸は還元剤として作用し、基質の重合を抑制している可能性が示唆された。以上より、弱アルカリ性条件下において **5** が **6** よりも安定であったことから、**6** が黒変化の原因物質である可能性が示唆された。

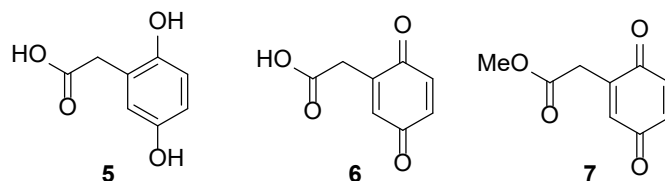


Figure 1. 反応性を評価した基質

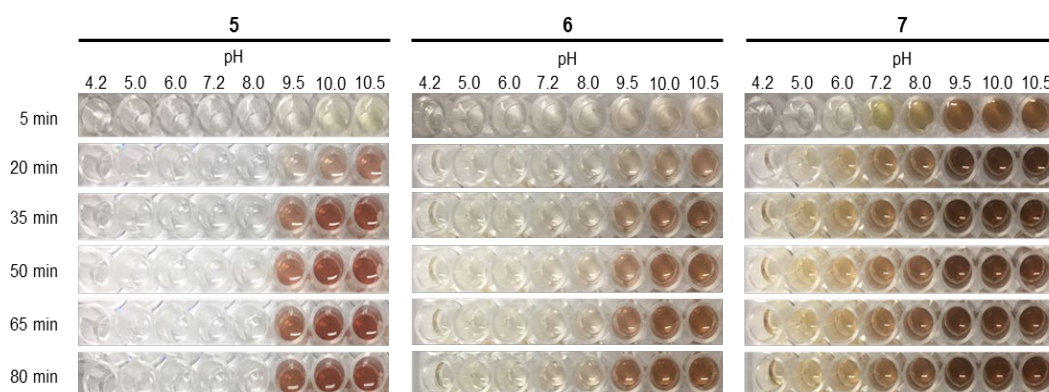


Figure 2. ホモゲンチジン酸とその類縁体の重合反応試験

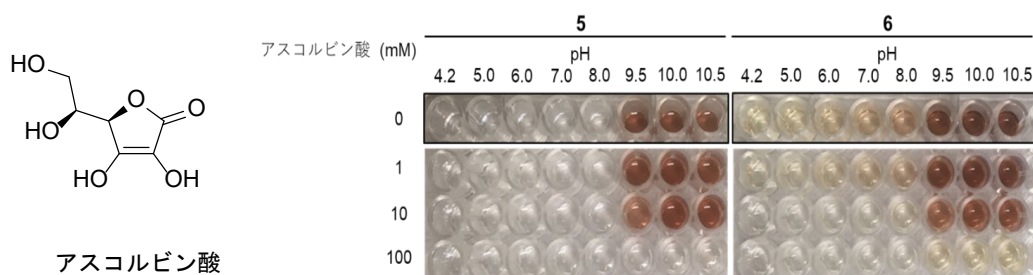
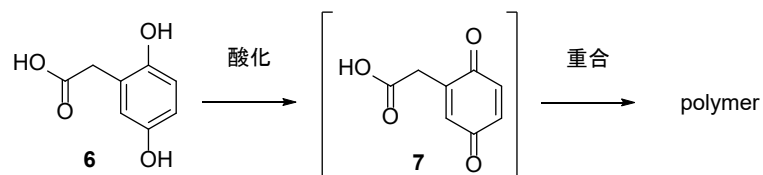


Figure 3. アスコルビン酸を用いた重合阻害試験

ヒトの体内環境は中性に近い弱アルカリ性、尿は弱酸性であるとされている。今回の結果から、**6** は酸性 ~ 弱アルカリ性付近で、比較的安定して存在することが示唆された。一方で、**7** は酸性 ~ 弱アルカリ性付近においても重合反応が進行したことから、本疾患で現れる症状において、**7** の影響が強いと考えられる。また、塩基性における **6** の重合試験において、反応開始直後に反応液が黄色に変化したことから **7** が生成していることが考えられる。よって、**7** の生成が、重合反応の律速要因の一つであると考えている。以上の結果から、考察した **6** の二段階の重合様式を **Scheme 3** に示した。



**Scheme 3.** ホモゲンチジン酸の推定重合様式

以上の知見は、アルカプトン尿症の病理メカニズムの解明において重要な手がかりとなると考える。今回確立した系を利用して、今後はさらなる抑制剤の探索を行いつつ、ホモゲンチジン酸の二量化反応によるアルカプトン尿症の簡便かつ迅速な診断法の確立を目指す。

## 5. 参考文献

- [1] アルカプトン尿症 概要、小児慢性特定疾病情報センター。
- [2] 毛利真理子、田中正美、影山裕子、宿谷賢一、大久保滋夫、藤城緑、下澤達雄、矢富裕、医学検査、**2015**, *64*, 324-329.
- [3] Coletti, A.; Lentini, S.; Conte, V.; Floris, B.; Bortolini, O.; Sforza, F.; Grepioni, F.; Galloni, P. Unexpected One-Pot Synthesis of Highly Conjugated Pentacyclic Diquinoid Compounds. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6873–6879.
- [4] Mai Onuki, Motohiro Ota, Shoya Otokozawa, Shogo Kamo, Shusuke Tomoshige, Kazunori Tsubaki, Kouji Kuramochi. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 130899.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamo Shogo, Saito Tatsuo, Kusakabe Yasuha, Tomoshige Shusuke, Uchiyama Masanobu, Tsubaki Kazunori, Kuramochi Kouji	4. 巻 84
2. 論文標題 Synthetic and Biological Studies of Juglorubin and Related Naphthoquinones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13957 ~ 13966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1021/acs.joc.9b02119	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onuki Mai, Ota Motohiro, Otokozaawa Shoya, Kamo Shogo, Tomoshige Shusuke, Tsubaki Kazunori, Kuramochi Kouji	4. 巻 76
2. 論文標題 Dimerizations of 2-bromo-3-methyl-1,4-naphthoquinone and 2-methyl-1,4-naphthoquinone in tetra-n-butylammonium bromide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 130899 ~ 130899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.tet.2019.130899	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大貫真依, 太田元博, 男澤翔矢, 加茂翔伍, 友重秀介, 椿一典, 倉持幸司
2. 発表標題 イオン性液体中での 1,4- ナフトキノンの特異な二量化反応
3. 学会等名 第37回 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉持幸司
2. 発表標題 有機合成から生命科学へのアプローチ
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大貫真依, 太田元博, 加茂翔伍, 友重秀介, 椿一典, 倉持幸司
2. 発表標題 イオン性液体中でのキノン二量化反応による有用化合物の効率的合成
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部 2018 年度支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kouji Kuramochi
2. 発表標題 Bioinspired Syntheses of Natural Naphthoquinone Dimers
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry Langkawi (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考