

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310127

研究課題名（和文）赤外円二色法によるスタンダード・キロプティカル構造解析法の構築

研究課題名（英文）Construction of the standard chiroptical analysis method by vibrational circular dichroism

研究代表者

門出 健次（MONDE KENJI）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：40210207

研究成果の概要（和文）：生命維持に必須であるグリセロ脂質類は、アミノ酸と同様に1ヶの不斉炭素を有するが、その立体化学の分析は容易ではない。新規分析法の確立を目的として、まず、光学的に純粋なグリセロ脂質類を化学合成により調整し、評品の確保を行った。次に、これら評品類の赤外円二色性スペクトルの測定及び解析から、糖脂質を含むジアシルグリセロール類の立体化学に関する経験的法則を初めて発見することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Glycerolipids are essential substances for sustaining our life. Although the number of their chiral carbon is only one like most of amino acids, their stereochemistry has not been assigned with ease. In order to establish a new analytical method for determination of their absolute configurations, optically pure glycerolipids and related compounds were prepared by chemical synthesis, and subjected to the “Vibrational Circular Dichromism” measurement. The precise analysis of their spectral data resulted in a discovery of an empirical rule on the stereochemistry of diacylglycerolipids including glycolipids for the first time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：生体機能関連物質・トランス脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

円二色性 (Circular Dichroism: CD) は、タンパク質の高次構造や絶対配置の非経験的決定など高分子から低分子まで、幅広くその立体構造の研究に使用されている。CD スペクトルは、電子遷移を基本原理としているため、必然的に紫外・可視光の発色団を持つものに限られてきた。1997年に最初の赤外領域の円二色性分光器 (Vibrational CD: VCD) が開発されて以来、次々と市販装置が出現しており、ここ5年で、応用へのプラットフォームがほぼ完成された状態となった。赤外領域円二色性スペクトル (Vibrational CD: VCD) は振動領域の吸収、即ち化合物の赤外吸収の円二色性を利用したものであり、ほとんどすべての有機化合物に適用可能である。また、VCDは理論計算が容易であり、理論計算との比較により、キラル有機化合物の絶対配置を非経験的に決定できるほか、たんぱく質等の生体高分子の高次構造の決定などに応用され始めている。

研究代表者は、赤外円二色性スペクトル法 (VCD) を糖鎖に応用し、その結合様式 (α 、 β) 特異的な VCD バンドの発見、理論的裏づけ、また、その結合位置が識別可能であること等を明らかにしてきた。その成果は、国際誌に公表しており、極めて高い国際的評価を得ている。そこで本研究では、VCD法を未だ応用展開されていない糖脂質、脂質等へと発展させることとした。糖脂質、脂質は、ポストゲノム時代に糖鎖と並ぶターゲット物質群であり、生理活性物質・シグナル伝達物質として、俄かにその機能と分子機構が注目を集めている。しかし、リピドミクスに代表される MS 等の脂質分析法は、一般にキラルな構造解析法であり、そのキラリティーに着目した直接分析法は全くない。

2. 研究の目的

本研究は、あらゆる生物に存在する糖脂質、脂質に着目した。脂質類の種類は生物種によって様々であり、特に糖脂質には、動物がもつスフィンゴ糖脂質と高等植物やグラム陽性菌、藻類が産生するグリセロ糖脂質が存在する。多種類の脂質類の中から、最も単純かつ汎用で、理論的裏づけが可能であるグリセロ脂質類に注目した。グリセロ脂質は、グリセロールに脂肪酸が1、2又は3ヶ結合した化合物であり、一箇所に糖が結合したものがグリセロ糖脂質である。一般に、グリセロ部分には、1ヶ所の不斉中心が存在し、その立体化学はSとされているが、その判別方法が容易ではないため、系統的な分析は行われて

いない。本研究では、

- ① グリセロ脂質の立体化学を明確にした種々のグリセロ脂質を系統的に化学合成し、VCD法により、新たな絶対配置決定ルールを見出す。
 - ② グリセロ糖脂質についても、系統的なグリセロ糖脂質の合成・VCD測定を行うことにより、グリセロール部分の立体化学に関する一定のルールを見出す。
 - ③ 食品分析の観点から、中性脂質である市販の油 (トリアシルグリセロール) の簡易分析法へのVCD応用を試みる。
- 以上3点を目的とする。

3. 研究の方法

脂質類は天然に多量に存在しているが、一般に脂肪酸部分の長さがまちまちであり、また、その不斉中心に関する情報はほとんどない。絶対配置の確実なグリセロール誘導体をスタート物質として用い、均一な長さの脂肪酸部分を持つ糖脂質、脂質の化学合成を行う。その後、系統的なVCD測定を行い、立体化学に関する情報を整理する。また、比較的単純なモデル脂質に関して理論計算を行い、理論的な裏付けを行う。

① ジアシルグリセロール

1,2-Di-*O*-isopropylidene-*sn*-glycerol を絶対配置既知のスタート物質として用い、長さの異なる各種 (*R* and *S*) ジアシルグリセロールを合成する。ジアシルグリセロールの両鏡像体の比旋光度は、その構造の類似性から、極めて小さい値であり、實際上、 $[\alpha]_D$ による *R*, *S* の識別は不可能に近い。本VCD法は、ジアシル脂肪酸の絶対配置を確実に決定する新規の方法論であり、脂肪酸の長さを調整した化合物を合成し、適用限界を明確にする。

② 糖脂質の合成

①で合成した種々のジアシルグリセロールを糖アクセプターとし、保護糖 (グルコース、又は、ガラクトースの2種類、糖ドナー) とのグリコシル化反応を行う。グリコシル化反応については、1位の結合様式の選択性が少ない反応条件を検討し (チオ糖、AgOTf, NISによるカップリング条件等)、 α 結合と β 結合の両化合物が、一度に合成できるようにする。1位の結合様式 (α 又は β) を含め、一般的VCDルールの構築のため、8種類の化合物の合成する。ジアシルグリセロール及び糖脂質のVCD測定を行う。VCD測定の際、測定温度、溶媒等の条件の検討を綿密に行う。VCD測定条件に関しては、これまでに蓄積された条件を参考にするとともに、メーカー側とも協議し、新たな測定条件の検討に勤める。

③ トリアシルグリセロール

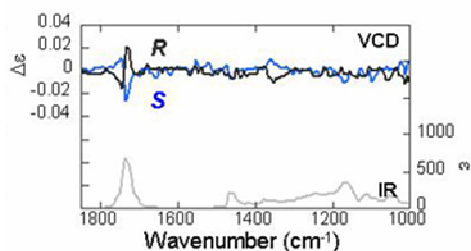
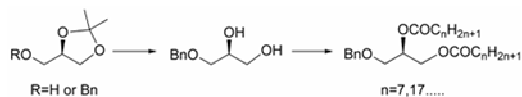
トリアシルグリセロールは、脂肪酸が3ヶ結合する脂質である。結合位置によるキラリティーの違いを考慮して、まず、最初に1位、2位に同一の脂肪酸を有するトリアシルグリセロールの合成を行う。特に、食品分析を意識して、植物油等に頻繁にみられるC18(1), C18(2) X 2, ()内数字は、二重結合の数)の脂肪酸の連結を試みる。ジアシルグリセロールの場合と同様に、

1,2-Di-*O*-isopropylidene-*sn*-glycerol を絶対配置既知のスタート物質として合成を行う。また、鏡像体の合成も同一のスキームにそって行う。両異性体合成完了後、直ちに、VCDを測定する。また、他の脂肪酸の組合せに関しても同様な方法で検討する。

4. 研究成果

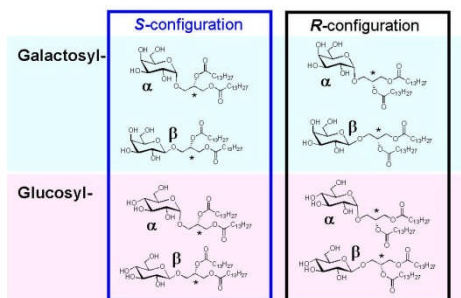
(1)

1,2-Di-*O*-isopropylidene-*sn*-glycerol を絶対配置既知のスタート物質として用い、長さの異なる各種 (*R* and *S*) ジアシルグリセロールを合成した。C14のみならず、C18脂肪酸を有するジアシルグリセロールのVCDスペクトルがカルボニル吸収領域(1700 cm⁻¹付近)に極めて特徴的なVCDシグナルを示すことが確認されている。このことにより、脂質の不斉を検出する際に、カルボニル領域が極めて有効であり、本研究の先行きが有望であることがあらためて示された。ジアシルグリセロールの両鏡像体の比旋光度は、その構造の類似性から、極めて小さい値であり、實際上、[α]_Dによる*R*, *S*の識別は不可能に近い。本VCD法は、ジアシル脂肪酸の絶対配置を確実に決定する新規の方法論となりうる可能性が高いことが、改めて示された。



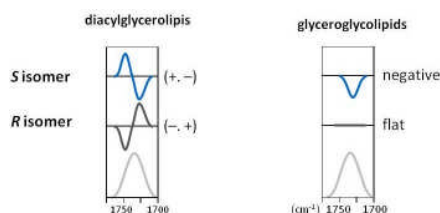
さらに糖脂質の合成をめざし、同様なスキーム従い、保護糖によるグリコシル化反応の条件を検討し、グリコシル化に成功した。*S*及び*R*-コンフィグレーションを有するグリセロール、α及びβ体、グルコース及びガラクトース誘導体、合成8種類の糖脂質の合成を完了した。グリコシル化反応の条件は、あ

えて選択性の低い条件を詳細に検討し、効率よくα体とβ体、両異性体を一度に合成できた。



(2)

合成した糖脂質およびジアシルグリセロールのVCD測定を行った。VCD測定の際、測定温度、溶媒等の条件の検討を綿密に行い、最適条件を発見した。ジアシルグリセロールにおけるVCDにおけるカルボニル領域のシグナルは、分裂型様の対称性のよい吸収であり、絶対配置判別に特徴的であることが判明した。本シグナルは、旋光度では識別不可能なジアシルグリセロールの絶対配置決定にVCDが極めて有効であり、唯一の非破壊的方法になりうることを示している。また、糖脂質においては、同様なカルボニル領域のVCDシグナルに顕著な差が観測され、一般的な経験則の確立が可能であることが判明した。

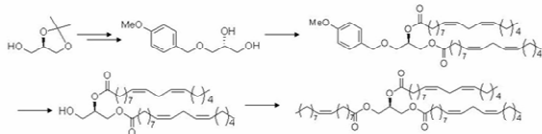


上記で得られたVCDスペクトルに関する理論計算を試みた。脂肪酸の側鎖部分が短い(C4 or C8)ジアシルグリセロールに関しての理論計算を開始した。従来行っているConflex社製のプログラムとGaussain 03の併用をメインとして、実測VCDスペクトルとの比較により、基底関数などのパラメーターの最適化を行った。

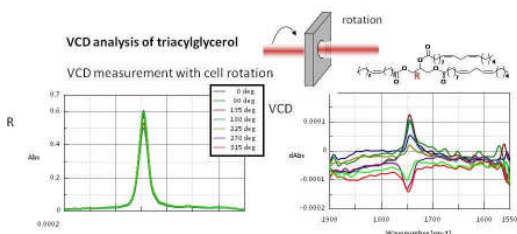
(3)

糖脂質、ジアシルグリセロールの合成ルートを参考にして、光学活性かつ均一の炭素鎖を有するトリアシルグリセロールの合成を行った。ジアシルグリセロールの場合と同様に、1,2-Di-*O*-isopropylidene-*sn*-glycerol を絶対配置が確定した出発物質として使用し、1位のフリーアルコールを保護した後、リノール酸をエステル結合で2ヶ導入、その後、アルコールを脱保護し、オレイン酸を結合させた。また、鏡像体の合成も同一のスキームにそって行った。実施した反応条件では、

ラセミ化反応は全く起こらないと考えられ、これにより、光学的に純粋なトリアシルグリセロールを得ることができた。



次に合成されたトリアシルグリセロール及びトリアシルグリセロールを主成分とする市販植物油のVCD測定を行った。重水素クロロホルムを溶媒として、カルボニルの吸収を目安に測定を行ったが、カルボニル吸収付近のVCDシグナルに再現性が見られなかった。この結果は、合成品および市販植物油で同様な傾向であった。VCDシグナルに再現性が見られないことから、他のトリアシルグリセロールの合成を見合わせ、再現性が得られない原因を究明することとした。種々VCD測定条件を検討した結果、ニートの状態で、測定セルを回転させるとカルボニルVCDシグナルの強度が劇的に変化することを発見した。このシグナル強度の変化は、セルの回転角度に依存しており、このことから、合成トリアシルグリセロールが自由な運動をしておらず、一種の液晶状態に近い状態であると結論づけた。当初予定していたトリアシルグリセロールのVCDによる単純なプロファイリングは、困難であることが判明したが、トリアシルグリセロールの液晶状態をVCDにより観察することができた。



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 13 件)

1. Nakahashi, A., Yaguchi, Y., Miura, N., Emura, M., Monde, K.
A Vibrational Circular Dichroism Approach to the Determination of the Absolute Configurations of Flavorous 5-Substituted-2(5H)-furanones
J. Nat. Prod., **74**, 707-711 (2011), 査読有
2. Aoyagi, Y., Yamazaki, A., Kato, R., Tobe, F., Fukaya, H., Nishikawa, T., Nakahashi, A., Miura, N., Monde, K., Takeya, K.
Salvileucalin C, a novel rearranged neoclerodane diterpene from *Salvia leucantha*
Tetrahedron Lett., **52**, 1851-1853 (2011), 査読有
3. Kuwahara, S., Obata, K., Fujita, T., Miura, N., Nakahashi, A., Monde, K., Harada, N.
(R)-(+)-[VCD(-)984]-4-Ethyl-4-methyloctane, a Cryptochiral Hydrocarbon with a Quaternary Chirality Center. (2) Vibrational CD Spectra of Both Enantiomers and Absolute Configurational Assignment
Eur. J. Org. Chem. 6385-6392 (2010), 査読有
4. Fujita, T., Obata, K., Kuwahara, S., Nakahashi, A., Monde, K., Decatur, J., Harada, N.
(R)-(+)-[VCD(-)984]-4-Ethyl-4-methyloctane, a Cryptochiral Hydrocarbon with a Quaternary Chirality Center. (1) Synthesis of Enantiopure Compound and Unambiguous Determination of Absolute Configuration
Eur. J. Org. Chem. 6372-6384 (2010), 査読有
5. Monde, K., Nakahashi, A., Miura, N., Yaguchi, Y., Sugimoto, D., Emura, M.
Stereochemical Study of a Novel Tautomeric Furanone, Homofuraneol
Chirality, **21**, S110-S115 (2009), 査読有
6. Chiba, K., Kurogi, K., Monde, K., Hashimoto, M., Yoshida, M., Mayama, H., Tsujii, K. Super Water- and Highly Oil-Repellent Films Made of Fluorinated Poly(alkylpyrroles)
Colloids Surf., A, **354**, 234-239 (2010), 査読有
7. Emura, M., Yaguchi, Y., Nakahashi, A., Sugimoto, D., Miura, N., Monde, K.
Stereochemical Studies of Flavorous 2-Substituted-3(2H)-furanones by Vibrational Circular Dichroism
J. Agric. Food Chem., **57**, 9909-9915. (2009), 査読有
8. Nakahashi, A., Miura, N., Monde, K., Tsukamoto, S.
Stereochemical studies of hexylitaconic acid, an inhibitor of p53-HDM2 interaction
Bioorg. Med. Chem. Lett., **19**, 3027-3030 (2009), 査読有
9. Taniguchi, T., Martin, C., Monde, K., Nakanishi, K., Berova, N., Overman, L.
Absolute Configuration of Actinophyllic Acid as Determined through Chiroptical Data
J. Nat. Prod., **72**, 430-432 (2009), 査読有
10. An, D. L., Chen, Q., Fang, J., Yan, H., Orita, A., Miura, N., Nakahashi, A., Monde, K.,

- Otera, J.
Vibrational CD Spectroscopy as a Powerful Tool for Stereochemical Study of Cyclophynes in Solution *Tetrahedron Lett.*, **50**, 1689-1692 (2009), 査読有
11. Yaguchi, Y., Nakahashi, A., Miura, N., Sugimoto, D., Monde, K., Emura, M. Stereochemical Study of Chiral Tautomeric Flavorous Furanones by Vibrational Circular Dichroism *Org. Lett.* **10**, 4883-4885 (2008), 査読有
 12. Taniguchi, T., Monde, K., Nakanishi, K., Berova, N. Chiral Sulfinates Studied by Optical Rotation, ECD and VCD: the Absolute Configuration of a Cruciferous Phytoalexin Brassicanal C *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 4399-4405 (2008), 査読有
 13. Nakagawa, H., Ohira, M., Hayashi, S., Abe, S., Saito, S., Nagahori, N., Monde, K., Shinohara, Y., Fujitani, N., Kondo, H., Akiyama, S.-I., Nakagawara, A., Nishimura, S.-I. Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system *Cancer Lett.*, **270**, 295-301 (2008), 査読有
- [学会発表] (計 36 件)
1. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii, USA 2010/12/19(Poster)
Environment-friendly synthesis of chiral fluorinated sphingolipids for metabolic analysis **S. Saito**, M. Yoshida, A. Nakahashi, M. A. Hammam, S. Mitsutake, Y. Igarashi, K. Monde
 2. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii, USA 2010/12/19(Poster)
Stereochemical study of sphingolipid derivatives by vibrational circular dichroism A. Nakahashi, **M. A. Hammam**, S. Saito, K. Monde
 3. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Makuhari Messe International Convention Complex Tokyo(Chiba), Japan, 2010/08/02(Oral)
Vibrational Circular Dichroism (VCD) Studies of Carbohydrates and Glycoconjugates **K. Monde**, A. Nakahashi, T. Taniguchi, M. Shibata, M. Fukuzawa, N. Miura
 4. 21st International Symposium on Chirality, Chirality 2010, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan 2010/07/15(Oral)
VIBRATIONAL CIRCULAR DICHROISM & ITS APPLICATION IN BIOMOLECULAR SCIENCE **Kenji Monde**, Atsufumi Nakahashi, Masataka Shibata, Tohru Taniguchi, Shota Saito, Mostafa A. S. Hammam, Nobuaki Miura
 5. 21st International Symposium on Chirality, Chirality 2010, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan 2010/07/13(Poster)
CHIROPTICAL ANALYSIS OF CARBOHYDRATES AND LIPIDS BY VIBRATIONAL CIRCULAR DICHROISM **Tohru Taniguchi**, Masataka Shibata, Masumi Fukuzawa, Atsufumi Nakahashi, Kenji Monde
 6. 21st International Symposium on Chirality, Chirality 2010, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan 2010/07/14(Poster)
ENVIRONMENT-FRIENDLY SYNTHESIS OF CHIRAL FLUOROUS SPHINGOLIPIDS FOR METABOLIC ANALYSIS **Shota Saito**, Masafumi Yoshida, Atsufumi Nakahashi, Mostafa A. S. Hammam, Tohru Taniguchi, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi, and Kenji Monde
 7. ICOPVS 2010 – The 3rd International Conference on Perspectives in Vibrational Spectroscopy February 22, 2010, Dept. of Physics, Banaras Hindu University, Varanasi, India
CHIROPTICAL ANALYSIS OF CARBOHYDRATES AND LIPIDS USING VIBRATIONAL CIRCULAR DICHROISM Kenji Monde (Invited)
 8. International Conference on Current Trends in Chemistry and Biochemistry, Bangalore University, Bangalore, India, 2009/12/18
Vibrational circular dichroism -Powerful tool for stereochemical analysis of biomolecules- Kenji Monde, Masataka Shibata, Atsufumi Nakahashi, Masumi Fukuzawa, Mai Hashimoto, Tohru Taniguchi, Nobuaki Miura
 9. CD 2009 – 12th International Conference on Circular Dichroism, ISBC – 5th Interdisciplinary Symposium on Biological Chirality, University of Brescia, Italy 2009/9/3
Chirality of Lipids Monde, K.; Shibata, M.; Nakahashi, A.;

- Fukuzawa, M.; Taniguchi, T.; Miura, N.
(Oral)
10. 21st International Symposium on Chirality,
Chirality 2009, Breckenridge, Colorado,
USA, 2009/7/13,14
Stereochemical studies of hexylitaconic acid,
an inhibitor of p53-HDM2 interaction
Nakahashi, A.; Miura, N., Monde, K.,
Tsukamoto, S. (Poster)
11. 21st International Symposium on Chirality,
Chirality 2009, Breckenridge, Colorado,
USA, 2009/7/13,14
Stereochemical Study of Chiral Tautomeric
Flavorous Furanones by Vibrational Circular
Dichroism
Nakahashi, A., Miura, N., Monde, K., Emura,
M., Yaguchi, Y., Sugimoto, D. (Poster)
12. 21st International Symposium on Chirality,
Chirality 2009, Breckenridge, Colorado,
USA, 2009/7/13
Chiroptical Analysis of Lipids & Glycolipids
by Vibrational Circular Dichroism
Monde, K.; Shibata, M.; Nakahashi, A.;
Fukuzawa, M.; Taniguchi, T.; Miura, N.;
Nishimura, S. -I. (Oral)
13. Nakahashi, A., Taniguchi, T., Fukuzawa, M.,
Nishimura, S.-I., Monde, K.
Chiroptical Analysis of Glycoconjugates by
Vibrational Circular Dichroism
International Joint Symposium of "The
6th Symposium for Future Drug Discovery
and Medical Care" and "Symposium of the
Research Center for Cooperative Projects"
March 13-14, 2009, Sapporo, Japan
14. Monde K. What can we do for Biomolecules
using Vibrational Circular Dichroism
(VCD) ? -Chiroptical Analysis of
Glycoconjugates and Related Materials-.
CRC International Symposium on
Bio-interface and Conversion, October 2008
Sapporo, JAPAN
15. Taniguchi, Tohru; Monde, Kenji; Gerhard,
Schlingmann; Nakanishi, Koji; Berova, Nina
Theoretical Calculation of Optical Activity;
Absolute Configurations of Phytoalexins and
Other Natural Products. Tennen Yuki
Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu (2008),
50th 281-284.
16. The 12th International Weurman Flavour
Research Symposium, July 1 to 4, 2008,
Interlaken, Swiss, Poster,
ABSOLUTE STEREOCHEMISTRY OF
FLAVOR RELATED
2-SUBSTITUTED-3(2H)-FURANONES,
2,5-DIMETHYL-4-HYDROXY-3(2H)-FU
RANONE AND ANALOGUES
Makoto Emura, YOSHIHIRO YAGUCHI,
Daisuke Sugimoto, Atsufumi Nakahashi,
Nobuaki Miura, Kenji Monde
17. Monde, K., Shibata, M., Fukuzawa, M.,
Nakahashi, A., Taniguchi, T., Miura, N.
Vibrational circular dichroism study on
lipids & glycolipids.
20th International symposium on chirality
(ISCD-20), July 6-9, 2008, Geneva,
Switzerland
- [図書] (計 1 件)
1. Taniguchi, T., Monde, K.
Electronic Circular Dichroism and
Vibrational Circular Dichroism of
Glycoconjugates,
Ed. Nina Berova, Prasad Polavarapu, Koji
Nakanishi, Robert Woody,
Comprehensive Chiroptical Spectroscopy,
John Wiley & Sons, in press. (2011)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
門出 健次 (MONDE KENJI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
教授
研究者番号：40210207
- (2) 研究分担者
三浦 信明 (MIURA NOBUAKI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任准教授
研究者番号：80372267
(2008 年度)
谷口 透 (TANIGUCHI TOHRU)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
助教
研究者番号：00587123
(2010 年度)
- (3) 連携研究者
三浦 信明 (MIURA NOBUAKI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任准教授
研究者番号：80372267
(2009 年度～2010 年度)