

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651211

研究課題名(和文)官能基特異的反応に着目したスフィンゴシン類の選択的捕捉法の開発

研究課題名(英文)Development of the novel chemoselective capture method for sphingolipids

研究代表者

門出 健次(MONDE, KENJI)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・教授

研究者番号：40210207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシンを選択的に捕捉する方法論を開発するために、標品の化学合成を実施した。D-及びL-セリンを出発原料として、立体化学が明確な4種の標準サンプルを調整した。2-アミノ-1,3-ジオール構造に化学特異的に反応する部位として、グルタルアルデヒドを選択した。フェニルグルタルアルデヒド誘導体を化学合成し、樹脂に担持させた。樹脂への固定化は、IRスペクトルにより確認した。捕捉の効率を数値化するために、OPA法について検討した。血液中のスフィンゴシン1リン酸の分解物であるスフィンゴシンの検出をめざし、本方法標品を用いた実験により、血中濃度とほぼ同様な濃度での検出が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：To create new methodology of chemoselective catch toward sphingosine, large scale organic synthesis of target molecule was performed. Four standard samples having four different stereochemistries were prepared from D- and L-serine. The glutaraldehyde group was selected as functional group to react chemoselectively toward an 2-amino-1,3-diol function. The phenyl glutaraldehyde derivative was synthesized and connected with surface of the resin. The immobilization efficiency was confirmed by IR. The OPA derivatization method for detection of sphingosines reveals clearly its efficiency of the catching. To detect small amount of sphingosine in serum, downsizing of this new methodology was successfully performed utilizing the previously synthesized standard samples.

研究分野：新複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：スフィンゴシン グルタルアルデヒド 捕捉 2-アミノ-1,3-ジオール 官能基特異的

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質、核酸、糖鎖と並ぶ重要生体構成成分である脂質、このうち、スフィンゴシンは 18 個の炭素を持つ長鎖アミノジオール構造を共通構造としており、ヒト脳より最初に単離された化合物群である。スフィンゴ脂質は、すべての動植物、菌類、原核生物、ウイルスに幅広く存続しており、膜成分、リポタンパク質の主成分、肌の多重膜バリア、シグナル伝達機能物質など、生体内において、広範かつ重要な役割を果たしている。しかし、その研究は一般に生化学者を中心に進められており、そのため、スフィンゴシンの分析方法には進歩性のかけることが多い。

我々は、その立体構造研究の過程において、天然からのスフィンゴシンの分離作業が極めて煩雑であり、そのため、一般的な信頼できる大量のサンプルの入手が困難であることに遭遇した。特に、スフィンゴシンの有する特異な溶解性はその扱いを困難にしていた。また、同時に、別実験からグルタルアルデヒドがこのスフィンゴシンと極めて速やかに反応し、安定な三環性化合物を与えることを見出した。そこで、本研究では、この反応を利用して、煩雑なスフィンゴシンの分離作業を極めて簡単にし、かつ効率よく行うシステムの構築を目指すこととした。

### 2. 研究の目的

セカンドメッセンジャーとして、近年、注目を集めているスフィンゴシンをターゲット化合物として、これらを選択的に捕捉する方法論を開発することを目的としている。スフィンゴシンの共通構造である 2-アミノ-1, 3-ジオール構造に、化学特異的に反応する反応剤の設計、合成、評価を行い、官能基特異的反応を最適化する。最適化された反応を考慮した捕捉剤をビーズ等に固定化することにより、スフィンゴシンの選択的捕捉条件を検討する。具体的には、

(1) 固定化を念頭において、液相中でスフィンゴシンを効率的に捕捉する反応剤を設計、合成、評価し、捕捉剤の構造を最適化する。

(2) 捕捉剤をビーズへ固定化した後、スフィンゴシンの選択的捕捉条件の検討を行う。以上 2 点を目的としている。

### 3. 研究の方法

上記研究目的を達成するため、本研究では以下に示す手順で研究を遂行する。

#### (1) スフィンゴシンの化学合成

スフィンゴシンには 4 つの立体異性体の可能性が存在する。立体化学に留意し、化学合成により 4 種の信頼にたるサンプルを調整する。

#### (2) 官能基特異的反応剤の探索及び開発

ビーズへの固定化を念頭に、まずは液相中でスフィンゴシンを効率的に捕捉する反

応剤を設計、合成、評価し、反応剤の構造を最適化する。その後、官能基特異性発現に必要な反応条件の探索を行う。

(3) 捕捉剤のビーズへの固定化、及び実用化に向けた条件の最適化

(2) の反応剤をビーズに固定化し、スフィンゴシンの高感度分析を指向した条件の最適化。

### 4. 研究成果

セカンドメッセンジャーとして、注目を集めているスフィンゴシンを選択的に捕捉する方法論を開発するため、まず、ターゲット化合物であるスフィンゴシンの大量化学合成を実施した。スフィンゴシンは市販品として容易に入手可能であるが、微量でしか入手できないこと、また、天然体の立体化学を有したもののみしか入手できないため、化学合成によるサンプルの調製を行った。D-セリンから調製された保護体にメチルリン酸ジメチルエステルを結合させ、テトラデカナールとのエモンズ・ホーナー反応により、トランスエノン体を得ることができた。続く DIBAL 還元により、選択的に  $\alpha$  アルコール体を得、これを酸性条件で加水分解反応により非天然型の L-threo 体を合成した。更に、出発原料として、L-セリンを使用、同様な合成ルートを実施し、L-erythro, D-threo 体を調整した。

次に、スフィンゴシンの共通構造である 2-アミノ-1, 3-ジオール構造に、科学特異的に反応する反応剤の設計について検討した。「2-アミノ-1, 3-プロパンジオール」をモデル化合物として、捕捉剤の検討を行った。本化合物は、スフィンゴシンと全く同じ官能基群を有し市販品が入手可能なことから、モデルとして最適と判断された。TLC 上での条件検討を考慮して、紫外線で容易に検出可能なフェニルグルタルアルデヒドを設計、これを合成した。フェニルグルタルアルデヒドと 2-アミノ-1, 3-プロパンジオールが三環性化合物を与えることを確認した後、その生成条件に関して、pH、温度、時間等の最適条件を検討した。

補足剤の基本的骨格を有するグルタルアルデヒドが、合成スフィンゴシンと効率的に反応するかを確認した。アルデヒドとターゲット化合物は室温、中性で速やかに反応するのを確認した。また、立体異性体についても同様の反応が確認された。昨年度の実験により、高感度検出の必要性が生じた。従来の TLC 法は煩雑であり、その検出感度の低さも今後の問題となりうる。そのため、アミン類の蛍光検出試薬である既知の OPA 誘導化を実施した。HPLC、蛍光検出器との組み合わせにより、スフィンゴシンの高感度検出法を立ち上げることができた。これにより、条件検討の速度を向上させることができた。

p-ヒドロキシケイ皮酸をアンバーライト存在下、メチルエステルとした後、LiAlH<sub>4</sub>による1,2還元、DDQにより $\alpha$  $\beta$ 不飽和アルデヒドとした。フェノール性水酸基をTBDPSで保護した後、エチルビニルエーテルとDiels-Alder型反応により環状汗タール誘導体とした。その後TBAFによりシリル基を脱保護した。次に、Merrifield樹脂とエーテル型結合を介して、担持させた。最後に塩酸を用いてアセタール部分を開裂させ、dihemiacetal構造を再現させた。樹脂への固定化は、IRスペクトルにより確認した。特に、カルボニル基の吸収は樹枝上のグルタルアルデヒド部分の構造を明確に示していた。今回開発されたグルタルアルデヒド樹脂は、固定化されているため、極めて安定であり、重合することなく、約1ヶ月後も存在することがIRスペクトルから確認された。本樹脂を用いて、液相中のスフィンゴシンの補足実験を実施した。生体試料を鑑み、血清を用いることとした。血清中に一定量のスフィンゴシンを添加し、本樹脂による捕捉・脱離能の評価を行った。予備的な結果ではあるが、血清中の遊離スフィンゴシンの濃縮、検出を確認することができた。

捕捉剤の開発及び官能基特異性の評価を行った。開発した樹脂の大量合成法に沿って、捕足能を有する化合物を合成、市販樹脂との結合により、実験に必要な捕捉樹脂を確保した。捕捉の効率を数値化するために、OPA法についての検量線を作成し、補足、脱離の効率を数値化することに成功した。これにより、補足条件の検討を更に効率的に行うことができた。また、脱離条件についても詳細な検討を実施したが、脱離後のpHが、検出誘導化条件であるOPA法の塩基性条件と合致せず、良好な収率が得られないことが判明した。今後、脱離後のpHのコントロールが必要検討条件であることが判明した。

血液中にはセカンドメッセンジャーであるスフィンゴシン1リン酸(S1P)の分解物であるスフィンゴシンが存在する。まず、文献で、述べられているスフィンゴシンの濃度まで、本方法がダウンサイズ可能であるか確認した。標品のスフィンゴシンを用いた実験により、血中濃度とほぼ同様な濃度での検出が可能であることが判明した。実際の血清のサンプルでは、同様な方法での検出が不可能であったので、サンプルの濃縮を行ったところ、HPLCのRTでの確認ではあるが、血清中のスフィンゴシンの検出に成功した。

次に捕捉ビーズの応用例として、容易に入手可能でスフィンゴシン類が比較的多く含まれるタモギタケに着目し予備的な実験を実施した。

## 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4件)

- ①Asai T., Morita S. Shirata N., Taniguchi T., Monde K. Sakurai H., Ozeki T. Oshima Y., “Structural Diversity of New C13-Polyketides Produced by *Chaetomium mollipilium* Cultivated in the Presence of a NAD<sup>+</sup>-Dependent Histone Deacetylase Inhibitor”, *Org. Lett.*, 査読有, 14, 2012, 5456-5459
- ②Taniguchi T., Monde K., “The Exciton Chirality Method in Vibrational Circular Dichroism”, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 134, 2012, 3695-3698
- ③Shibata T., Miyoshi M., Uchiyama T., Endo K., Miura N., Monde K., “Enantioselective synthesis of tripodal cyclophanes and pyridinophanes by intramolecular [2+2+2]cycloaddition”, *Tetrahedron*, 査読有, 68, 2012, 2679-2686
- ④Aoyagi 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.*, 査読有, 52, 2011, 1851-1853

[学会発表] (計11件)

- ①Ananda Kumar C. S., Siddabasave Gowda B., Keiko Yamane, Saori Okamoto, Atsufumi Nakahashi, Mostafa A.S. Hammam, Tohru Taniguchi and Kenji Monde, The 11th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, “Development of an efficient capture resin for sphingolipids by using a chemoselective reaction and its applications”, 2013年8月1日~2013年8月2日、北海道大学(札幌市)
- ②アナンダクマール C. S.、岡本沙織、中橋徳文、谷口透、門出健次、第20回記念シンポジウム モレキュラー・キラリティー2013、「官能基選択的反応を用いたスフィンゴ脂質類の効率的捕捉樹脂の開発と立体化学解析への展開」、2013年5月10日~2013年5月11日、京都大学(京都府京都市)
- ③ Ananda Kumar C.S., Saori Okamoto, Atsufumi Nakahashi, Mostafa A.S. Hammam, Tohru Taniguchi and Kenji Monde, International Conference on Chiroptical Spectroscopy, “Development of an efficient capture resin for sphingolipids by using a chemoselective reaction and a stereochemical analysis method”, 2013年6月9日~2013年6月13日、Student Life center, Vanderbilt University(USA)
- ④Mostafa A. S. Hammam, Mikako Kato, Saori

Okamoto, Ananda Kumar C. S., Atsufumi Nakahashi, Tohru Taniguchi and Kenji Monde, International Conference on Chiroptical Spectroscopy, “Stereochemical Analysis of Drug-like Molecules Assisting the Investigation of Stereochemistry in Drug Discovery”, 2013年6月9日～2013年6月13日、Student Life center, Vanderbilt University(USA)

⑤ Ananda Kumar C. S., Saori Okamoto, Atsufumi Nakahashi, Tohru Taniguchi, Kenji Monde, 第4回キラルサイエンス&テクノロジーシンポジウム、“Development of an efficient capture resin for sphingolipids by using chemoselective reaction and stereochemical analysis method”, 2013年03月01日、早稲田大学西早稲田キャンパス(東京都新宿区)

⑥ 門出健次、第4回キラルサイエンス&テクノロジーシンポジウム(招待講演)、「赤外円二色性スペクトルによるキラル解析の新展開」、2013年03月01日、早稲田大学西早稲田キャンパス(東京都新宿区)

⑦ 門出健次、文部科学省戦略研究基盤形成事業「有機合成と天然物化学の手法による医薬品素材の開発」第9回研究発表会(招待講演)、「赤外円二色性スペクトルによる立体化学解析の新展開」、2012年12月22日、徳島文理大学薬学部(徳島県徳島市)

⑧ 門出健次、フルオラス科学研究会第5回シンポジウム(招待講演)、「赤外円二色性スペクトルによるフッ素系キラル化合物の迅速立体構造解析」、2012年11月29日、戦災復興記念館(宮城県仙台市)

⑨ S. Saito, M. Yoshida, A. Nakahashi, M. A. S. Hammam, T. Taniguchi, S. Mitsutake, Y. Igarashi, K. Monde, International Symposium on Fluorous Technologies 2011 (ISoFT'11), “SYNTHESIS AND METABOLIC ANALYSIS OF FLUOROUS SPHINGOLIPIDS”, 2011年12月1日、香港城市大学(香港)

⑩ Kenji Monde, Atsufumi Nakahashi, Mostafa A. S. Hammam, Saori Okamoto, Shota Saito, Tohru Taniguchi, 13th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2011), “Structural Analysis of Sphingolipids by Vibrational Circular Dichroism”, 2011年7月27日, Said Business School (イギリス)

⑪ Kenji Monde, 27th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCN27), 7th International Conference on Biodiversity (ICOB7), “VIBRATIONAL CIRCULAR DICHROISM a powerful tool for the determination of the structure and absolute configuration of chiral natural products in solution state.”, 2011年7月14日, Brisbane Convention Centre(オーストラリア)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門出 健次 (MONDE, Kenji)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40210207