

微量アミノ酸及び糖類の立体化学を高感度に検出可能な試薬の開発に成功

—創薬シーズとなりうる希少天然物の検出にも応用—

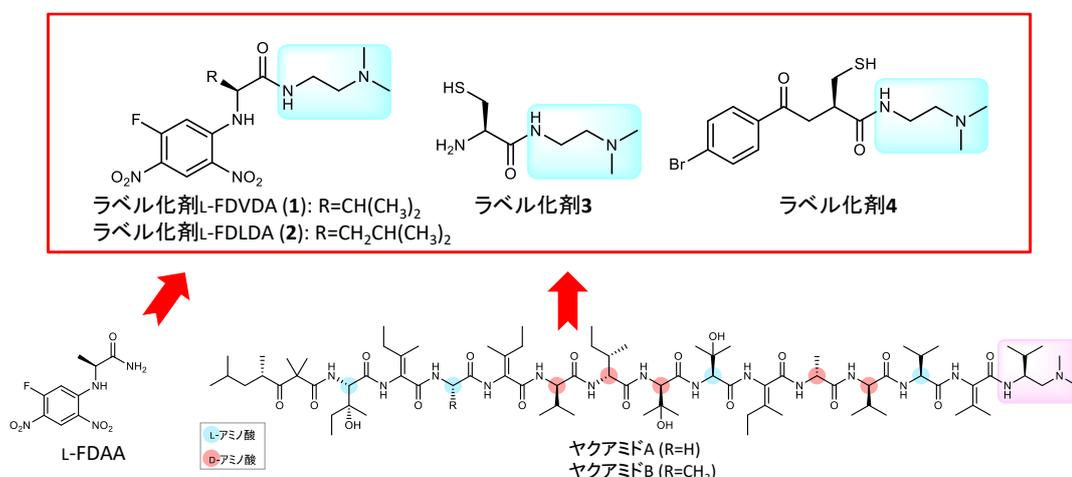
概要

京都大学大学院薬学研究科 掛谷秀昭 教授、同学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット 倉永健史 特任講師、同薬学研究科 箕手万由里 修士課程学生、潘承謙 同博士後期課程学生、小川はるか 同修士課程学生（研究当時）、同薬学部 森本涼太 学部学生らの研究グループは、液体クロマトグラフィー—質量分析計（LC-MS）システムを利用して、極めて微量のアミノ酸及び糖類の立体化学を高感度に検出可能な試薬の開発に成功しました。さらに、同原理を応用して、自然界に存在し創薬シーズとなりうる極めて微量な天然物（希少天然物）の検出にも成功しました。すでに、当該試薬の市販化が決定しており、今後、本研究成果は世界中で広く利用され、アミノ酸、糖類、希少天然物などに関連する医薬、農薬、食糧分野などの発展に寄与することが期待されます。

小分子化合物と抗体の中間的性質を有するペプチド系化合物は、双方の利点を併せ持ち、また欠点を克服しうる創薬シーズとして重要です。これらペプチド系化合物の構造決定には、その構成アミノ酸の立体化学の決定は必須です。現在は、ペプチド系化合物を酸加水分解後、分解産物のアミノ酸を L-FDAA などの光学分割ラベル化剤により誘導体化（ラベル化）を行い、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）や LC-MS システムを用いてラベル化アミノ酸標品の保持時間と比較して決定する方法（Marfey 法）が汎用されています。しかし、極めて微量にしか存在しない希少ペプチド系天然物などの構成アミノ酸の立体化学を決定する際の加水分解条件によっては、不可避な異性化に基づく誤った構造決定が多数報告されており、より高感度なアミノ酸ラベル化剤が希求されていました。

本研究グループは、ヤクアミド類（カイメン *Ceratopsion* 属が生産）の構成アミノ酸の立体化学決定時の知見に基づいて、分子内に末端 3 級アミンを有する複数の光学分割ラベル化剤を設計・創製した後、LC-MS システムを利用して各種アミノ酸の立体化学決定に関する検討を行いました。その結果、従来法に比較して検出感度において非常に優れた新規光学分割ラベル化剤として L-FDVDA (1) 及び L-FDLDA (2) の開発に成功し、簡便な合成経路及び精製方法も確立しました。さらに、同原理を用いて糖類や希少天然物を高感度に検出可能なラベル化剤 (3 及び 4) の開発にも成功しました。

本研究成果は、2020 年 8 月 31 日（日本時間：9 月 1 日）にアメリカ化学会が発刊する「*ACS Chemical Biology*」のオンライン版に掲載されました。



1. 背景

小分子化合物と抗体の中間的性質を有するペプチド系化合物は、双方の利点を併せ持ち、また欠点を克服しうる創薬シーズとして重要です。例えば、免疫抑制剤シクロスポリン A (糸状菌 *Tolypocladium* 属が生産) や抗生物質ダプトマイシン (放線菌 *Streptomyces* 属が生産) は、L-アミノ酸のみならず、D-アミノ酸を含む特殊ペプチドを多く含んでいます。これらペプチド系化合物の構造決定には、その構成アミノ酸の立体化学の決定は必須です。現在は、ペプチド系化合物を酸加水分解後、分解産物のアミノ酸を L-FDAA などの光学分割ラベル化剤により誘導体化(ラベル化)を行い、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)や LC-MS システムを用いてラベル化アミノ酸標品の保持時間と比較して決定する方法 (Marfey 法¹) が汎用されています。しかし、極めて微量にしか存在しない希少ペプチド系天然物などの構成アミノ酸の立体化学を決定する際の加水分解条件によっては、不可避な異性化に基づく誤った構造決定が多数報告されており、より高感度なアミノ酸ラベル化剤が希求されていました。

2. 研究手法・成果

本研究グループは、ヤクアミド類 (カイメン *Ceratopsion* 属が生産) の構成アミノ酸の立体化学決定時の知見²に基づいて、分子内に末端 3 級アミンを有する複数の光学分割ラベル化剤を設計・創製した後、LC-MS システムを利用して各種アミノ酸の立体化学決定に関する検討を行いました。その結果、従来法に比較して検出感度において非常に優れた新規光学分割ラベル化剤として L-FDVDA (**1**)及び L-FDLDA (**2**)の開発に成功し、簡便な合成経路及び精製方法も確立しました (図 1)。ラベル化剤 **1** 及び **2** は、検討した全てのアミノ酸 (タンパク質構成アミノ酸のうち光学分割の必要のない Gly を除く 19 種類のアミノ酸: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Thr, Ser, His, Lys, Trp, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Met, Tyr, Pro, Cys) の光学分割に有用であることを証明しました。また、同原理を用いて糖類 (D-グルコースなど) や α,β -不飽和カルボニルなど親電子性官能基を有する希少天然物 (パルテノリドなど) の検出に有用なラベル化剤 **3** 及び **4** の開発に成功しました (図 2)。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で開発されたラベル化剤を用いることで、各種アミノ酸の超微量分析が可能となります。本研究成果は、天然物化学におけるペプチド系化合物の構成アミノ酸の立体化学の決定のみならず、生体中や食品中のアミノ酸の超微量分析など、医療や食糧など様々な研究分野への応用が期待されます。また、本研究グループは、幅広い天然資源 (微生物代謝産物、生薬・薬用植物、機能性食品、海産動物など) を探索源として、多因子疾患 (がんや感染症など) の予防・治療薬につながる新しい天然有機化合物 (天然物) を開発するための天然物ケミカルバイオロジーを展開しており³、本研究成果は有用な新規希少天然物の発見に寄与することが期待されます。

<参考文献・ウェブサイト>

1. Marfey, P. **1984**, *49*, 591-596.
2. Kuranaga, T. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9443-9451.
3. 研究室ウェブサイト URL: <https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/sc-molsci/>

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、文部科学省 (MEXT)、日本学術振興会 (JSPS)、日本医療研究開発機構 (AMED)、東京生化学研究会等 の支援のもとに行なわれました。

<研究者のコメント>

この度、極めて微量のアミノ酸や糖類の立体化学を高感度に検出可能な試薬の開発に成功し、同原理を用いて、親電子性官能基を有する天然物を高感度に検出可能な試薬の開発にも成功しました。すでに当該試薬の市販化が決定しており、今後、本研究成果が世界中で広く利用され、関連する医薬、農薬、食糧分野などの発展に寄与することを期待しています。

<用語解説>

創薬シーズ：医薬品や農薬等のリード（タネ）となる化合物。

ペプチド系化合物：2 個以上のアミノ酸がアミド結合を介して縮合した化合物。

立体化学：化合物の 3 次元的な構造。グリシン以外の α -アミノ酸では、 α 炭素へのアミノ基やカルボキシル基などの結合様式が 2 通り可能で、L 型（天然型）、D 型（非天然型）の光学異性体として区別可能である。

L-FDAA：1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide

光学分割：ラセミ体をそれぞれの鏡像異性体（エナンチオマー）に分離すること。

誘導体化（ラベル化）：ある化合物に化学修飾（酸化、還元、縮合など）を行うこと。

異性化：ある分子が原子の組成は同じで、配列が変化して別の分子に変化すること。これらの関連する分子を異性体とよぶ。

3 級アミン：アンモニアの水素を 3 つの水素以外の置換基に置き換えた化合物。

L-FDVDA：1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-valine-*N,N*-dimethylethylenediamine-amide

L-FDLDA：1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucine-*N,N*-dimethylethylenediamine-amide

親電子性官能基： α,β -不飽和カルボニルなどのような電子を受け取る性質を有する官能基のこと。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Highly Sensitive Labeling Reagents for Scarce Natural Products（希少天然物等を検出するための高感度ラベル化剤の開発）

著者：Takefumi Kuranaga, Mayuri Minote, Ryota Morimoto, Chengqian Pan, Haruka Ogawa, Hideaki Kakeya

掲載誌：ACS Chem. Biol. Doi: 10.1021/acscchembio.0c00517

< 参考図表 >

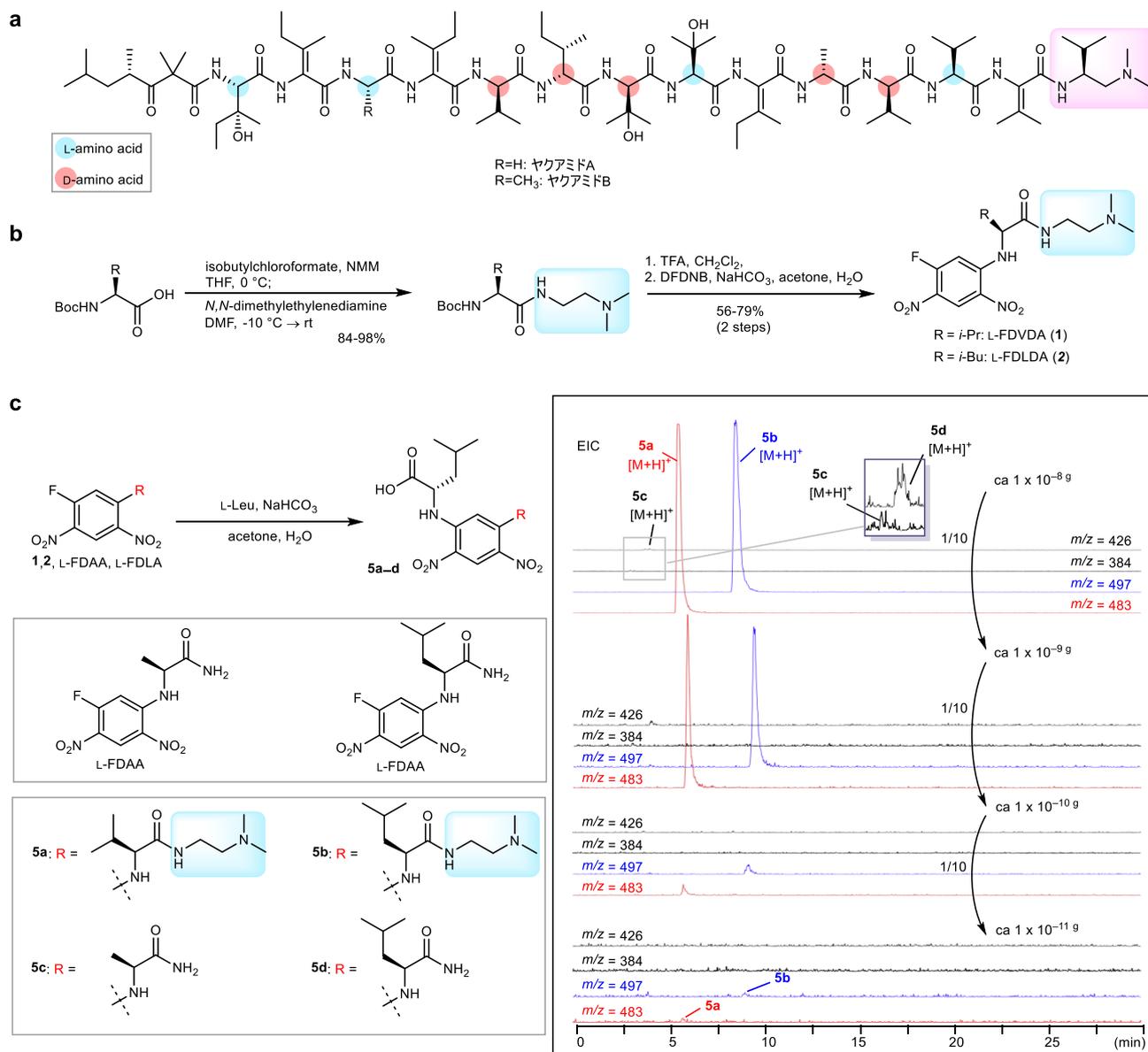


図 1. a. ヤクアミドの化学構造. b. 新規ラベル化剤 1 及び 2 の合成経路. c. 各種ラベル化剤 (1, 2, L-FDAA, L-FDLA) による L-Leu のラベル化及び LC-MS によるラベル化生成物 (5a-5d) の検出感度の比較

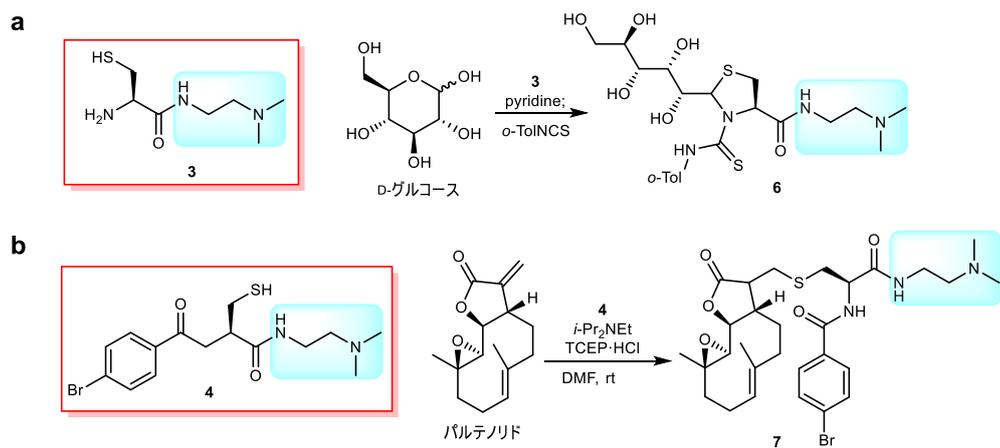


図 2. a. 新規ラベル化剤 **3** による D-グルコースのラベル化. ラベル化生成物 **6** は LC-MS により高感度に検出された。 b. 新規ラベル化剤 **4** によるパルテノリドのラベル化. ラベル化生成物 **7** は LC-MS により高感度に検出された。