

学 位 論 文 題 名

Stereochemical analysis of conformationally flexible
bioactive molecules

(フレキシブルな構造を有する生理活性分子の新規立体解析法の構築)

学位論文内容の要旨

生理活性分子のキラリティーはその活性に極めて大きな影響を及ぼす。グルタミン酸ナトリウムの L 体がうま味、D 体が苦味を呈することは生体による不斉識別の良い例である。1960 年代には、鎮静剤“サリドマイド”の光学異性体が胎児に奇形をもたらすとの報告がなされ社会問題化した。以後の研究でサリドマイドの不斉と催奇性の因果関係は疑問視されるようになったが、本薬害が薬物キラリティーの重要性を広く認知させるきっかけになったことは確かである。事実、過去 50 年間に一方の光学異性体を選択的に合成するための不斉合成技術が飛躍的に進歩し、現在多くの医薬品が光学活性体として市場に投入されている。

上記のように生体は分子の不斉を厳密に認識するため、生命科学研究において、生理活性分子の立体化学決定は避けて通れない問題である。しかしその決定法は意外にも少なく、主に Bijvoet 法 (X 線結晶構造解析)、励起子キラリティー法 (円二色性)、Mosher 法 (NMR) 等それぞれに適用限界のある手法に限定されてきた。結果、いずれの手法を用いても立体決定が達成できない場面にしばしば遭遇する。特にフレキシブルな構造を有する分子群は、リジッドな分子と比べ結晶化が困難な傾向にあり、発色団、Mosher 試薬導入の足がかりとなる官能基が存在しない場合、立体決定は多段階の誘導化を伴った極めて複雑なものとなる。

本研究では赤外円二色性(VCD:Vibrational Circular Dichroism)に活路を求めることにした。VCD は、一般によく知られた円二色性(CD)の赤外版であり、従来の CD が電子励起遷移を基本としているのに対し、VCD は振動モードのキラリティーを観測する。従って、発色団を持たない化合物からも容易に立体化学情報を抽出できる利点がある。また、振動遷移は分子軌道法などの理論計算によって高い信頼性でシミュレーションできるため、理論計算の併用による非経験的な絶対配置決定も可能である。本論文では生物学的にも極めて重要で、フレキシブルな構造を有する①シアル酸、②ヘキシリタコン酸、③スフィンゴシンを標的に、新規立体解析法の構築を行った。本化合物群はいずれも従来法による立体決定が困難であり、簡便かつ信頼性の高い立体解析法の開発が望まれている。以下に、各立体解析法の概要を示す。

①シアル酸

シアル酸は動物の体内に広く分布する炭素 9 個の骨格からなる単糖であり、生体内において酵素やウイルスの認識部位となるなど、非常に重要な機能を発揮している。現在、シアル酸含有糖鎖を対象とした研究が盛んに行われているが、天然から得られる試料はごく微量であるため、それらの研究には合成糖鎖が大きな役割を担っている。しかし化学合成の際には、天然型として知られる α グリコシドの他に、非天然型の β グリコシドが副生するため、両者の識別が不可欠となる。一般に糖の α, β を識別する手法としては、 $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数(J 値)が用いられるが、シアル

酸はアノマー位に水素を持たないため、これを適用することができない。

実際にいくつかの α, β モデル化合物を合成し VCD 測定を行ったところ、 α, β 間において VCD スペクトル全体が顕著に異なるという結果が得られた。特に、カルボニルの C=O 伸縮振動に由来する VCD が、 α, β 間で大きく異なることを見出した。この特徴は単糖及び二糖のモデル化合物双方で観察されたことから、C=O 伸縮振動に基づく VCD のパターンが α, β 識別の指標となることが示された。

②ヘキシリタコン酸

ヘキシリタコン酸は、天然より両エナンチオマーの単離が報告されているユニークな化合物である。生理活性も興味深く、(+)体はレタスの根の成長促進効果、(-)体は p53-HDM2 相互作用の阻害活性を有する。しかしその絶対立体化学に関しては、強度の極めて弱い CD コットン効果をもとに決定した報告例が唯一あるのみで、信頼に足る絶対配置の決定が行われていない。

ヘキシリタコン酸をラセミ体として化学合成し、光学分割により両エナンチオマーを調製した。本化合物はカルボン酸に特有の会合体を形成し理論計算が繁雑になると予想されたため、始めにメチルエステル体の VCD 解析を行った。結果、計算スペクトルは、完全な一致ではないものの実測スペクトルと定性的な一致を示した。ここで著者は、不完全な一致が「コンフォメーションの多さ」に起因するものと考え、次に環化誘導体の VCD 解析を行った。環状構造にすることで分子はよりリジッドになり、配座数の大幅な減少が期待できる。予想通り、環化体の両スペクトルは完全な一致を示し、ヘキシリタコン酸の絶対配置を(*R*)-(-), (*S*)-(+と決定することに成功した。本結果は上記報告と逆の立体配置を与えるものであり、これにより本化合物の絶対配置を初めて明確にできたと同時に、ここで用いた方法論は、近年単離された類似化合物群の立体解析にも有用と考えられる。

③スフィンゴシン

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド塩基を共通骨格に、アミド結合型脂肪鎖、極性頭部基を有する脂質の総称であり、細胞膜の主要な構成成分として幅広く知られている。しかし近年は、膜の構成成分としてより生理活性分子としての注目度が高い。代表的なスフィンゴイド塩基であるスフィンゴシンのプロテインキナーゼ C 阻害活性、スフィンゴシン-1-リン酸のシグナル伝達関与等が好例であり、疾患との関連も期待されるだけに精力的な研究がなされている。本脂質群は共通骨格部位に二つの不斉中心を有するが、相対配置ならびに絶対配置決定のための簡便な手法が無いため、立体化学と生理活性の相関研究は大きく立ち遅れている。

はじめに、全スフィンゴ脂質の共通骨格であるスフィンゴシンに関して VCD による立体識別が可能か検討した。4 種の全立体異性体を合成し VCD 測定を行った結果、二重結合由来の特性吸収、及び指紋領域において極めて特徴的なスペクトルが観察された。これらは二つの不斉中心の立体化学を鋭敏に反映しており、スフィンゴシン立体識別のマーカーとして利用できることが明らかとなった。次に VCD の感度向上を指向した環化反応の検討を行った。結果、スフィンゴシンは室温、中性の穏和な条件下グルタルアルデヒドと反応し、リジッドな三環性化合物へと変換されることが明らかになった。環化体の VCD は強度が増大し、理論計算との良い一致も見られた。さらに本研究では、上記環化反応をヒントに、グルタルアルデヒド構造を固定化したレジンの開発を行った。固体 IR 解析により本レジンはスフィンゴシンを捕捉することが明らかとなり、生体内に微量にしか存在しないスフィンゴシンを濃縮、分析するためのツールとしての用途が今後期待できるものと考えている。

以上本論文は、従来法による立体決定が困難な生理活性分子群に対して新たな立体解析法を提供するものであり、今後当該分野における立体化学研究を加速するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	門 出 健 次
副 査	教 授	出 村 誠
副 査	教 授	西 村 紳一郎
副 査	特任教授	五十嵐 靖 之(先端生命科学研究院)

学位論文題名

Stereochemical analysis of conformationally flexible bioactive molecules

(フレキシブルな構造を有する生理活性分子の新規立体解析法の構築)

分子の立体構造は生理活性と密接に関連するため、生理活性分子の立体決定は生命科学研究において必須の命題である。しかし従来の分析法には制約が多く、立体決定不能なこともしばしばであった。特にフレキシブルな構造を有する分子は結晶化に難があり X 線解析の適用外となるばかりか、円二色性(CD)、NMR 法を指向した誘導化が不能な場合、立体化学決定は極めて困難なものとなっていた。本学位論文は「赤外円二色性(VCD)によるフレキシブルな分子の立体解析」に主眼を置いており、新規手法 VCD の適用可能性を詳細に検討した結果がまとめられている。

第 1 章 General Introduction では立体化学の重要性及び VCD の理論的、実験的側面が端的に論述されている。

第 2 章で著者は、シアル酸の α, β 識別という困難な課題に挑戦している。一般に糖の α, β 識別には $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数(J 値)が用いられるが、シアル酸のアノマー位には水素が無いため、これを適用することができない。著者はシアル酸の α, β モデル化合物を合成し VCD 測定を行った。結果、 C=O 伸縮振動由来の VCD により容易に α, β 識別が可能なことを明らかにした。

第 3 章ではヘキシリタコン酸と呼ばれる天然有機化合物の絶対配置決定について論述されている。本化合物は、天然より両エナンチオマーが単離されており、(+)体はレタスの根の成長促進効果、(-)体は p53-HDM2 相互作用の阻害活性というユニークな生理活性が報告されている。しかしその絶対立体化学に関しては、強度の極めて弱い CD コットン効果をもとに決定した報告(本研究により誤りであることが判明)が唯一あるのみで、信頼に足る絶対配置の決定は行われていなかった。著者はここで VCD の理論計算によるアプローチを試みている。始めに、カルボン酸の会合体形成を阻止するため、メチルエステル誘導体に関し

て実測及び理論スペクトルの比較を行った。結果、完全な一致ではないものの定性的な一致が見られた。ここで著者は、不完全な一致が「コンフォメーションの多さ(フレキシビリティ)」に起因するものと考え、環化誘導体の VCD 解析を行った。環状構造にすることで分子はよりリジッドになり、配座数の大幅な減少が期待できる。予想通り、環化体の両スペクトルは完全な一致を示し、ヘキシリタコン酸の絶対配置を(*R*)-(-), (*S*)-(+)と明確に決定することに成功した。本結果は上記 CD による誤った絶対配置の帰属を訂正するもので大変意義深い。同時に、本方法論は近年単離された類似化合物群の立体解析にも有用と考えられ、今後の構造活性相関研究に大きく貢献するものと考えられる。

第 4 章ではスフィンゴ脂質の骨格部位をなすスフィンゴシンの新規立体解析法開発に取り組んでいる。本脂質は二つの不斉中心を有するが、相対配置、絶対配置決定のための簡便な手法が無いため、立体化学と生理活性の相関研究は大きく立ち遅れていた。はじめに著者は、4 種の全立体異性体を合成し VCD 測定を行った。結果、二重結合由来の特性吸収、及び指紋領域において極めて特徴的なスペクトルが観察された。これらは二つの不斉中心の立体化学を鋭敏に反映しており、立体識別の実用的マーカーとして利用できることが明らかとなった。本手法は誘導化なしに全異性体を識別できる点で、従来法にない利点を有するものである。しかし著者は VCD 強度の弱さを指摘し、感度向上を指向した環化反応の検討も行っている。スフィンゴシンは室温、中性の穏和な条件下グルタルアルデヒドと反応し、一段階でリジッドな三環性化合物へと変換されることが明らかになった。環化体の VCD は強度が劇的に増大し、理論計算との良い一致も見られた。さらに本環化反応をヒントに、グルタルアルデヒド構造を固定化したレジンの開発を行っている。固体 IR 解析により本レジンにはスフィンゴシンを捕捉することが明らかとなり、生体内に微量にしか存在しないスフィンゴシンを濃縮、分析するためのツールとしての用途が今後期待できる。

本論文は、従来法による立体決定が困難な生理活性分子群に対して新たな立体解析法を提供するものであり、生理活性分子の立体化学研究に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格があるものと認める。