

報 文

エクトインの重水素化による安定同位元素標識化合物の調製

堤内 要, 佐々木雅史, 三浦章寛, 早川優希, 金政 真

中部大学応用生物学部

要 旨

パラジウム炭素-重水-水素反応系を用いたエクトイン (EC) の H-D 交換反応を行った. 反応温度を検討したところ, 160℃で反応が速やかに進行し, 目的とする重水素標識 EC (EC- d_n) が調製された. LC-MS や NMR を用いて特性解析を行ったところ, 2 位のメチル基や 4 位のメチン基が主に重水素化されていると判明し, 本反応系が EC の重水素標識に利用できることが明らかとなった.

キーワード: エクトイン, H-D 交換反応, 安定同位元素標識化合物.

1. 緒言

生物はさまざまな環境ストレスから細胞を保護するために, ストレスの種類に応じた防御機構を有している. エクトイン (EC) は塩水湖や塩分を含んだ砂漠などの過酷な環境に生息する微生物などがストレスを感じた際に誘導産生される環状アミノ酸である. とくにハロゲン塩類親和性バクテリアの中に多く存在することが確認されており, この生物が極めて厳しい条件下 (温度変化や乾燥条件下) でも生息できる理由のひとつとして EC が大きく関与していることが明らかになっている (Cánovas, 1999; Roberts, 2006; 仲山, 2012).

浸透圧調節物質あるいは適合溶質として知られる EC の主な働きとして, 細胞内水分量の保持, タンパク質や核酸等の安定化, 細胞膜や生体膜の浸透圧調節による保護, ヒートショックプロテイン (Hsp) の生成促進, ランゲルハンス細胞の保護など全部で 5 つほどの作用が確認されている. そのなかでも細胞内水分量の保持は EC の最も特徴的な作用機構であり, この作用によってコラーゲンなど体内の重要なタンパク質が熱や乾燥などのストレスから保護される (Addor, 2019).

ヒトの皮膚は自己防衛を行う際に Hsp というタンパク質をつくる働きがある. この Hsp は自己回復タンパ

ク質や熱ストレスタンパク質などと呼ばれ, 人の体の中でも 10 種類のタイプが確認されており, そのタイプごとに違った役割があると考えられている. Hsp はコラーゲンなどのタンパク質やアミノ酸をその状態と状況に合わせオーダーメイドでメンテナンスする介添え役とされており, ダメージを負ったタンパク質に対して Hsp はタンパク質の折り畳みによる修復, 防御, 分解・処理, 輸送・運搬, 修復のミスの修正, コラーゲンの生成を促進するなどといった効果を発揮する. 簡単な例を挙げると, 私たちの皮膚は常に太陽からの紫外線ダメージによる炎症の発生やメラニンの増加などが起こっており, Hsp はそれらのダメージから皮膚を守っている. EC は人間の皮膚において重要な役割をする Hsp を生成促進する作用があり, 現在では一部の化粧品にも添加されている (Buommino, 2005).

また, 私たちの皮膚の表皮内にはランゲルハンス細胞 (免疫細胞) が存在している. ランゲルハンス細胞は皮膚の免疫を司る細胞で皮膚内部の状況を脳へ伝達したり, 樹状突起の先端にあるレセプターで外部からの異物 (細菌やウイルス・カビ・放射線・紫外線・温熱や寒冷など) の侵入を認識して皮膚の均衡を保つセンサーの役目を担っている. ランゲルハンス細胞が正常に機能していれば皮膚の生体恒常性機

能が保たれるが, こちらも太陽からの紫外線ダメージや化粧品などの合成石油系界面活性剤の過剰使用によりランゲルハンス細胞の免疫機能の低下がおり, 異物が皮膚を刺激することで結果として乾燥肌や敏感肌, シミやシワ, ニキビなどの吹き出物ができやすくなる. EC は自らの優れた保水機能で皮膚の潤いを長時間保つことで, ランゲルハンス細胞を乾燥や紫外線などの外的ダメージから守る作用がある. このように, EC は皮膚細胞の老化防止プロセスを補強する機能を備えた画期的な成分として我々人間にとって有益な存在であり, また毒性や刺激性やアレルギー報告もないため安全性の高い成分であると考えられる (Graf, 2008).

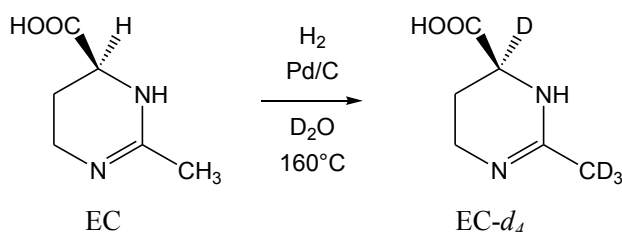
このような知見から, 我々も EC に関する研究を開始することとした. 様々な生物試料において EC がどれだけ存在しているかを把握するには, LC-MS/MS が有用な分析法であると期待されるが, EC の高い親水性ゆえに試料に含まれる様々な無機成分や親水性有機化合物との分離が困難なため, 定量分析の精度が著しく低下することが懸念される.

一方, 質量分析法を用いた定量分析における分析精度の向上には内部標準法を用いることが効果的であることが広く知られている. この方法で用いる内部標準物質には分析対象にできるだけ近い諸物性を有することが求められ, 分析対象物質の水素や炭素が重水素 (D) や ^{13}C などの安定同位元素で部分的に置換された化合物が最も使いやすいと考えられている (Desiderio, 1998). しかし, これまで, そのような EC の安定同位元素標識化合物は報告されていない.

このような場合, 一般的には化学的な合成が試みられる. 当該化合物を全合成する途中の段階で安定同位元素を含む試薬を反応させて調製するため, 多段階の反応になることが多く, 高価なものとなったり, 入手できないことが多い. ところが, このような問題を解決する画期的な方法を岐阜薬科大学の佐治木らが開発した (佐治木, 2013). この方法は分析対象物質の軽水素を重水素に直接変換するシンプルな方法であり, かつ, 高価な試薬や触媒を必要としないた

め比較的安価に合成を行うことができる. そのため我々はこの方法を用いて EC の安定同位元素標識化合物の合成を行った.

佐治木らの反応は白金族系触媒を重水中, 水素雰囲気下で用いるものであり, 通常あまり反応しないと思われる炭素-水素結合が開裂し, 炭素-重水素結合が生成する. 特に本研究ではアルキル基の H-D 交換も可能なパラジウム触媒を用いて, 本反応が EC にも適用できるかを検討し, 生成物がどのような分子構造を有するかを調べることにした (図式1).



Scheme 1

2. 材料と方法

2.1. 試薬

EC と 3-(トリメチルシリル)プロパンスルホン酸ナトリウム(DSS)は Sigma-Aldrich 社製のものを使用した. 5%パラジウム炭素 (Pd/C), 重水 (D_2O), ギ酸, 塩酸, 塩化ナトリウムは和光純薬工業株式会社, メタノール (HPLC 用), アセトニトリル (HPLC 用), 蒸留水 (HPLC 用), アンモニア水は関東化学株式会社より購入した.

2.2. Pd/C 触媒を用いた EC の H-D 交換反応

スリ付試験管に EC 10 mg (7.0 mmol), 5%Pd/C 4.0 mg, D_2O 2.0 mL を量り採り, スターラーバーを1つ入れた. その後, 水素で満たしたバルーン付き三方コックで栓をしてから試験管内を水素雰囲気下とした. 油浴を用いて 160°C に加熱しながら 20 時間磁気攪拌した後, 室温に戻してからメタノールを約 10 mL 追加し, 超音波を約 30 秒間照射した. セライトを用いた吸引濾過で反応混合物中の触媒を取り除き, 減圧濃縮および真空乾燥により重水素化 EC (EC-d_n) を得た.

2.3. LC-MS を用いた EC- d_n の定性分析

得られた EC- d_n を蒸留水 5.0 mL に溶解し、フィルターろ過 (Agilent Captiva Econo Filter, PTFE, 0.2 μm) を行った。ろ液 50 μL を LC-MS の移動相溶媒 [0.1 % ギ酸水溶液 (FAaq) + 0.1% ギ酸アセトニトリル (FAACN) 溶液 (FAaq : FAACN = 1 : 9)] 950 μL で希釈し、測定用試料溶液とした。LC-MS は表1に示した測定条件により行った。

Table 1. LC-MS condition for qualitative analysis of EC- d_n

EC- d_n	
LC system	Agilent 1100 series (Agilent)
Column	Unizon UK-Amino ($\phi 2.0 \times 150$ mm)
Mobile phase	A : 0.1 % FAaq; B : 0.1 % FAACN
Flow rate	200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Gradient program	B : 95 % (0 min) $\rightarrow$ 70 % (15 – 20 min) $\rightarrow$ 95 % (21 – 35 min)
Column temperature	40°C
Injection volume	5.0 μL
Detection	UV (202 nm)
MS system	Esquire 3000 plus (Bruker)
Ionization	ESI
Polarity	Positive
Scan range	m/z 50 – 1000
Nebulizer	N ₂ ; 30 psi
Dry gas	N ₂ ; 8.0 L/min; 365°C
Ion change control	On; target : 20,000

なお、EC- d_n の重水素化率の計算は重水素が 4 つ置換した EC (EC- d_4) を基準として考え、以下の計算式1によって算出した。また、生成物の平均分子量 (MW_{products}) に関しては、LC-MS 分析における生成物の MS スペクトルのピーク強度から式 2 により算出した。

$$D (\%) = 100 \times \frac{MW_{\text{Products}} - MW_{\text{EC}}}{MW_{\text{EC-}d_4} - MW_{\text{EC}}} \quad \cdots \text{Eq. 1}$$

$$MW_{\text{Products}} = \frac{\sum_i M_i I_i}{\sum_i I_i} \quad \cdots \text{Eq. 2}$$

M: EC- d_n のプロトン付加体の m/z の値 – 1.008

I: EC- d_n のプロトン付加体のピーク強度

i: EC- d_n のプロトン付加体ピークの m/z の値

2.4. EC- d_n の核磁気共鳴(NMR)スペクトル測定

EC- d_n 30 mg を 1.0 % DSS 入り D₂O 0.70 mL に溶解させて ϕ 5 mm の NMR 試料管に入れた。その後、ECS-400 型フーリエ変換核磁気共鳴装置 (JOEL) を用いて室温で ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルを測定した。

3. 結果と考察

3.1. Pd/C 触媒を用いた EC の H-D 交換反応

LC-MS/MS 測定を用いたエクトイン(EC)の定量分析をより高い精度で行うため、EC の H-D 交換反応を用いた重水素化エクトイン(EC- d_n)の調製を試みた。はじめに H-D 交換反応に及ぼす反応温度の影響を調べる実験を行った。反応条件および結果を表2に示した。これらの実験では、まず EC を 10 mg 用いて反応温度を 40°C から 200°C まで段階的に変えて 20 時間反応を行い、生成物の重水素化率(D)を評価した(実験番号 MS04)。その結果、反応温度 100°C 以下では、H-D 交換反応がそれほど進まなかったのに対し、160°C 以上では重水素化率が 100% 以上と高い生成物を与えた。なお、本研究では 2 位のメチル基と 4 位のメチン基の軽水素が重水素に置換した化合物を重水素化率計算の基準にしているため、100% を超えた生成物に関しては、比較的 H-D 交換反応が進行しにくい 5 位や 6 位のメチレン基での重水素化が進行したものと考えられる。MS04 実験の結果から、反応温度 100 - 160°C の間に H-D 交換反応が活発に進行し始める温度があると考え、次にこの温度領域を詳しく調べることにした(実験番号 MS05)。ちなみに、MS05 の実験では EC, 5% Pd/C, D₂O をそれぞれ

Table 2. H-D exchange reaction of EC with Pd/C - D₂O - H₂ system

Expt. No.	EC, mg (μmol)	5% Pd/C, mg	D ₂ O, mL	Temp., °C	Time, h	Yield, %	D ^a , %
MS04-01	10 (70)	4.0	2.0	40	20	-	-
MS04-02	10 (70)	4.0	2.0	60	20	-	-
MS04-03	10 (70)	4.0	2.0	80	20	-	6.0
MS04-06	10 (70)	4.0	2.0	100	20	94	17
MS04-05	10 (70)	4.0	2.0	160	20	98	116
MS04-07	10 (70)	4.0	2.0	200	20	97	104
MS05-01	35 (25)	14	7.0	100	20	88	23
MS05-02	35 (25)	14	7.0	110	20	76	39
MS05-03	35 (25)	14	7.0	120	20	68	58
MS05-04	35 (25)	14	7.0	130	20	78	67
MS05-05	35 (25)	14	7.0	140	20	95	76
MS05-06	35 (25)	14	7.0	150	20	94	84
MS05-07	35 (25)	14	7.0	160	20	96	89

^a Efficiency of deuteration. EC-*d*₄ was used as a target compound.

MS04 実験の時の 3.5 倍に増量して実験を行った。反応温度を 100°C から 10°C ずつ高くして 160°C まで変化させたところ、反応温度の上昇に伴い、重水素化率の上昇がはじめは 16% あり、その後徐々に緩慢となっていた。結果として、MS05 の実験では反応温度 160°C が最も H-D 交換反応を活発に進めており、MS04 の実験では反応温度を 200°C と高くしたところ重水素化率が低下したことから、今後の重水素化反応は 160°C で行うこととした。なお、反応温度が同じ 160°C でも MS04 と MS05 の実験で重水素化率に大きな違いが認められるのは、実験規模が 3.5 倍となったにも関わらず、同じ試験管を用いて反応を行ったため、反応液と水素ガスが接触する面積が変わらなかったことによる、見かけの反応速度の低下によるものと思われる。対策としては、反応時間の延長や反応容器の大型化が適当であろう。

3.2. LC-MS を用いた EC-*d*₄ の定性分析

EC と重水素化率が最も高くなった MS04-05 の生成物の LC-MS クロマトグラムを図 1 に示した。測定条件は表 1 の通りで、測定用試料溶液におけ

る試料濃度は 0.10 mg/mL であった。

これらの LC-MS 測定においては、全イオンクロマトグラム (TIC) では EC 溶出時間に相当するピークが認められなかった。一方、UV クロマトグラムにおいてエクトインの溶出が確認できた (図 1 矢印)。そこで EC 溶出時間 (6.1-7.4 min) におけるマスペクトルを抽

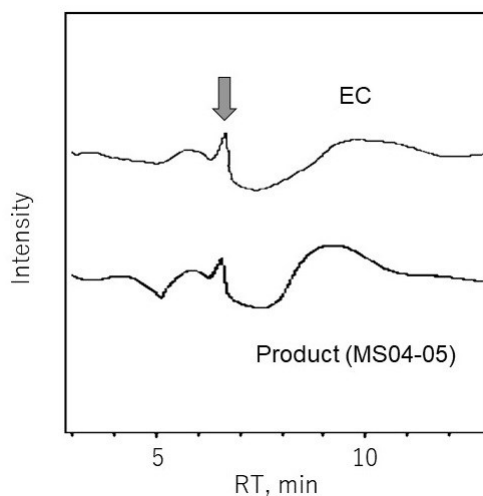


Fig. 1. UV chromatograms of EC and product (MS04-05) in LC-MS (sample conc., 0.10 mg/mL; The arrow shows RT of EC).

出し, MS04 実験における反応温度 40℃, 60℃, 80℃, 100℃, 160℃, 200℃の生成物について図2に示した. スペクトルを比較してわかるように, 反応温度 40 および 60℃ではほとんど反応が進んでおらず, 80, 100℃でようやく少し反応が進行した. ところが, 160℃になると一気に反応が進行し, それまで最も高い強度で確認されていた m/z 143 のピーク, すなわち未反応の EC のピークが認められなくなった. 一方, 反応温度が 200℃とさらに高くなると, 高い m/z のピークが小さくなり, 低い m/z のピークが増え始めた. これらは, 昇温に伴う副反応の併発を示唆するものと考えている.

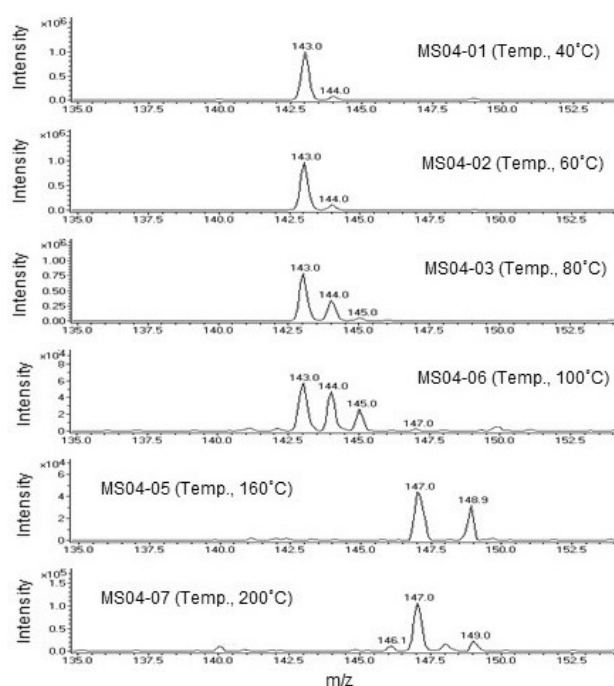


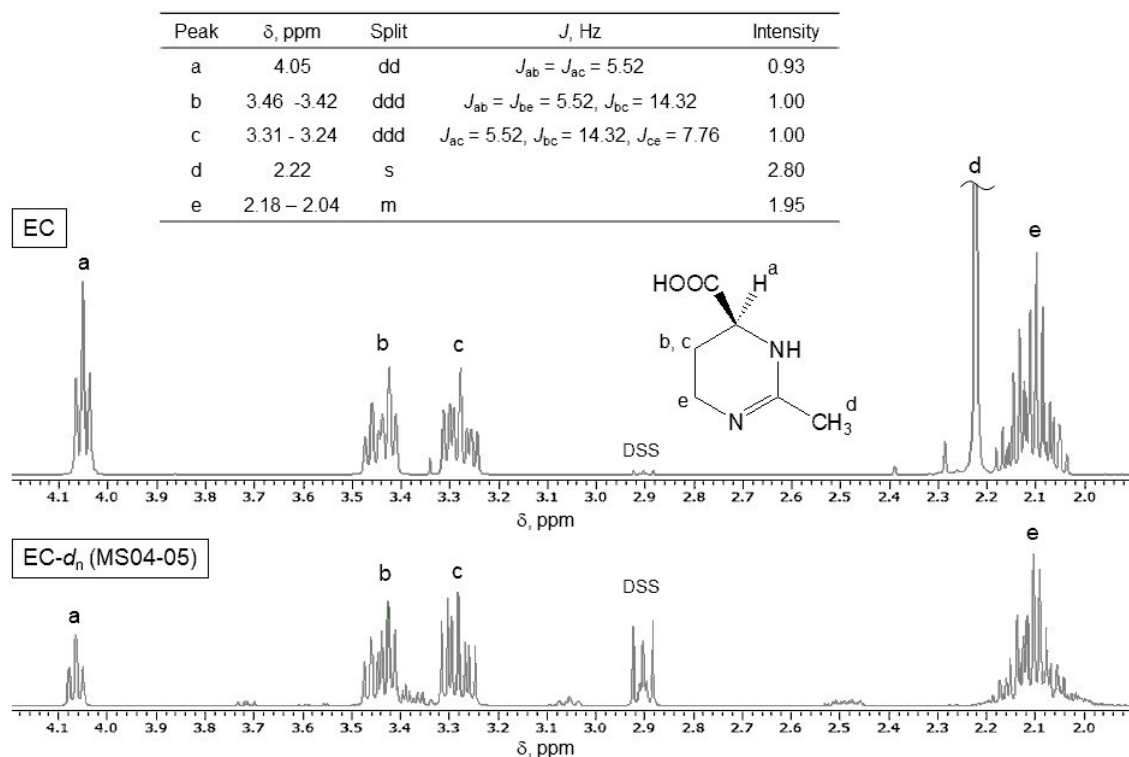
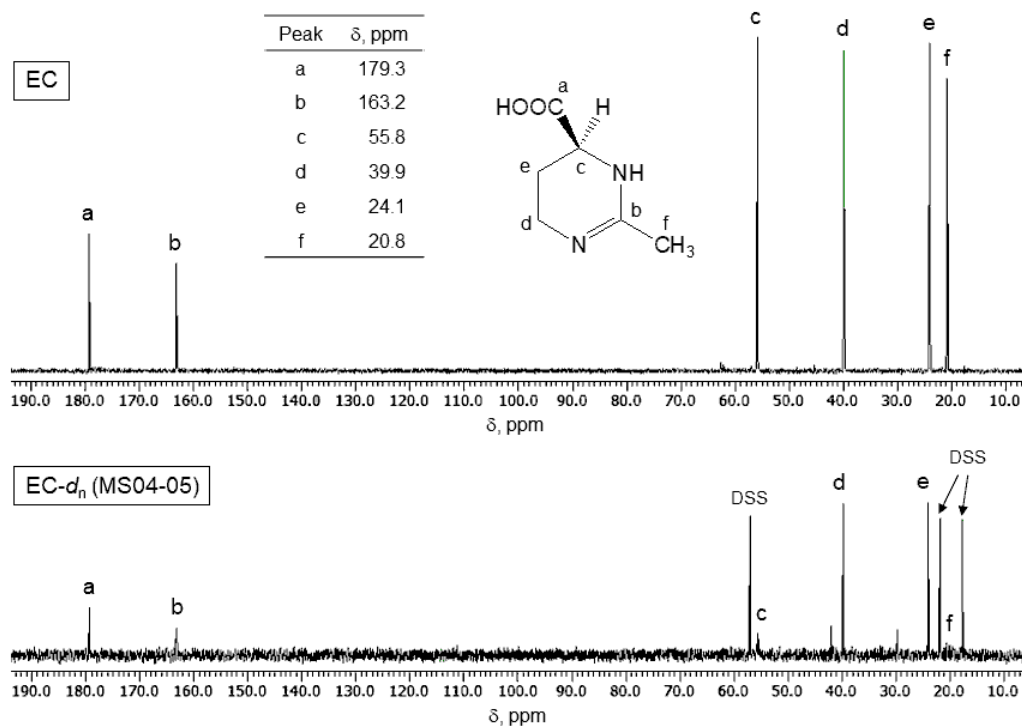
Fig. 2. MS spectra of EC- d_n in LC-MS measurements of products in MS04 experiments (RT, 6.1-7.4 min).

3.3. EC- d_n の NMR スペクトル測定

EC と MS04-05 の EC- d_n (重水素化率, 116%) の ^1H および ^{13}C -NMR スペクトルをそれぞれ図 3, 図 4 に示す. 図 3 の ^1H -NMR スペクトルでは, 重水素化された EC- d_n (重水素化率, 116%) では 2 位のメチル基のピーク (ピーク d) が完全に消失しており, この部位の軽水素が最も反応しやすいことを示している. 次に, ピーク面積が減少しているのは 4 位のメチン基のプロ

トン (ピーク a) であった. それゆえ, 本研究における重水素化率計算はこの 2 か所の軽水素が重水素に置換した化合物 ($\text{C}_6\text{H}_6\text{D}_4\text{N}_2\text{O}_2$) を基準に算出している. ただ, これ以外の軽水素も H-D 交換することが, 図 3 の EC- d_n のスペクトルにおけるピーク e からわかる. EC のスペクトルにおけるピーク b, c とピーク e との面積比が変化していることがそれを反映している. これらの知見から, EC における H-D 交換反応の起こりやすさは, 2 位メチル基 > 4 位メチン基 > 6 位メチレン基 > 5 位メチレン基ということが判明した.

これらの傾向は図 4 の ^{13}C -NMR スペクトルでも確認できる. ^{13}C -NMR 測定では ^{13}C -H などのスピン結合をデカップリングしているため, それぞれの炭素は単一の鋭いピークとして認められるが ^{13}C -D のスピン結合はデカップリングしていない. 重水素のスピン数は 1 なので重水素が 1 つ結合するとその炭素のピークは 1:1:1 の強度比で分裂する (Silverstein, 1981). また, 軽水素が重水素に 1 つ置換すると炭素のピークは約 0.2 ppm 高磁場シフトすることから, 本研究のように軽水素が徐々に重水素置換してゆくと結合していた炭素のピークは単一の鋭いピークから小さな多重線へと変化してゆく. 図 4 をみると, EC の 2 位のメチル基 (ピーク f) は 5 位や 6 位のメチレン基のピーク (ピーク e, d) とほぼ同じ強度で認められるが, EC- d_n のスペクトルでは極めて低い強度の多重線となっている. 4 位のメチン基 (ピーク c) に関しても明確な強度の低下が認められ, 重水素化の進行を知ることができた. 以上の結果から, EC の重水素標識化合物の調製に Pd/C - D_2O - H_2 反応系による H-D 交換反応が利用可能であり, 反応温度 160℃で行えば 2 位のメチル基や 4 位のメチン基が重水素化されることを明らかにすることができた. これらの重水素化 EC はこれまでに報告例がなく, 新規な化合物と考えられる. 今後はこれらの手法により EC- d_n を調製し, それらを内部標準に用いて, これまで困難とされてきた生物圏における EC の産生や体内動態調査などの研究を行う予定である.

Fig. 3. ^1H -NMR spectra of EC and EC- d_n (MS04-05) (soln., D_2O ; temp., 25°C ; ref., DSS; 400MHz).Fig. 4. ^{13}C -NMR spectra of EC and EC- d_n (MS04-05) (soln., D_2O ; temp., 25°C ; ref., DSS; 100MHz).

引用文献

Addor, F. A. S. 2019. Topical effects of SCA (*Cryptomphalus aspersa* secretion) associated with regenerative and antioxidant ingredients on aged skin: evaluation by confocal and clinical microscopy, Clin. Cosmet. Investig. Dermatol., 12: 133-140.

Buommino, E., Schiraldi, C., Baroni, A., Paoletti, I., Lamberti, M., Rosa, M. D., and Tufano, M. A. 2005. Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B9 in human keratinocytes modulating the proinflammatory response, Cell Stress Chaperones, 10: 197-203.

Cánovas, D., Borges, N., Vargas, C., Ventosa, A., Nieto, J. J., and Santos H. 1999. Role of *N*-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine, 65: 3774-3779.

Desiderio, D. M., Zhu, X. 1998. Quantitative analysis of methionine enkephalin and β -endorphin in the pituitary by liquid secondary ion mass spectrometry and tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 794: 85-96.

Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., Driller, H. 2008. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant, Clin. Dermatol., 26: 326-333.

Roberts, M. F. 2006. Characterization of organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, Meth. Microbiol., 35: 615-647.

Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H.-P., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D., and Kunte, H. J. 2011. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581, Environ. Microbiol., 13:

1973-1994.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. "Spectrometric identification of organic compounds", 4th ed., Wiley, New York (1981).

佐治木弘尚. 2013. 不均一系白金族触媒的 C-H 活性化に基づく重水素標識化法の開発, 薬学雑誌, 133: 1177-1193.

Title : Preparation of stable isotope labeled compounds by deuteration of ectoine.

Author(s) : Kaname Tsutsumiuchi, Masahumi Sasaki, Akihiro Miura, Yuki Hayakawa, Shin Kanamasa

Address(es) : College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

Keywords : ectoine, H-D exchange reaction, stable isotope labeled compounds