

総 説

安定同位体利用技術

光学活性アミノ酸の安定同位体標識合成

梶原正宏

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.56, No.11
November 2007



Japan Radioisotope Association

[http : //www.jrias.or.jp/](http://www.jrias.or.jp/)

総 説



安定同位体利用技術

光学活性アミノ酸の安定同位体標識合成[†]

梶原正宏

明治薬科大学薬学部薬品化学教室
204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

Key Words : stable isotope, L-amino acid, synthesis, optical activity

1. はじめに

地球上では約 35 億年という長い壮大なドラマの過程で突然変異を幾度も繰り返し、進化の過程を戻ることなく有用な機能を獲得し、複雑で荘厳な芸術的な過程を経て生命を有する生物へ変化してきた。生命を機能面から考えると成長、代謝、複製、進化として現れてくる状態で、これらを詳細に解明することが医薬品開発へと繋がっている。有機化学は 19 世紀初頭から生きている生物に関与する化学を取り扱う学問として発展し、多くの有用医薬品を誕生させることに寄与している。

生命の化学的基本構成単位として L-アミノ酸や糖類、DNA、RNA 及び生命現象に深く関与する 2 次代謝物であるヘムやクロロフィルやビタミン B₁₂ 等の有用な生理活性化合物を取り扱ってきた。とりわけ L-アミノ酸がアミド結合して連なったポリマーであるポリペプチド、天然の巨大なポリペプチドである蛋白質は生命体の中で多種多様な機能を有していることから、21 世紀の医薬品開発上極めて重要な位置を占めている。

L-アミノ酸の安定同位体標識法は数多く開発されてきているが、主として筆者らが実施してきた安定同位体標識合成法について述べたい。

2. L-アミノ酸について

天然に存在するアミノ酸のうちグルシンを除くと α -炭素は全て不斉炭素であり、図 1 に示す L-phenylalanine (1) で考えると、アミノ酸のカルボキシル基が垂線の上に、枝鎖 R は R = ベンジル基が下方に位置するように Fischer 投影式で記載すると多数の天然アミノ酸は、 α -炭素に結合したアミノ基を左に位置するように配置するのが L-体である。わかりやすく言えば左利きである(ただし、国際的な IUPAC 命名法である絶対配置 R, S 表示法は、光学活性 ¹³C 標識アミノ酸の ¹³C 同位体標識位置により、炭素原子の優先順位が異なる場合が生じるのでここでは議論せず、後述で問題点を提言したい)。

しかし天然の糖類は Fischer 投影式において、アルドースの場合アルデヒド基を必ず垂線の上に書き、ケトースの場合はカルボニル基をなるべく上に記載し、最も下に位置する不斉炭素(下から 2 番目 5 位の炭素)に結合した水酸基を右側に位置すれば D-体となる。天然糖類としてここではグルコースを示すが、5 位の水酸基が右側に配置することにより D-体である¹⁾(図 1)。

なぜ、天然のアミノ酸や糖類はこのような立体化学をとるのか、その理由は明らかではない

[†] “Applications of Stable Isotopes in Life Sciences”.

Synthesis of L-[¹³C] Amino Acids.

Masahiro KAJIWARA : Department of Medicinal Chemistry, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1, Noshio, Kiyose-shi, Tokyo 204-8588, Japan.

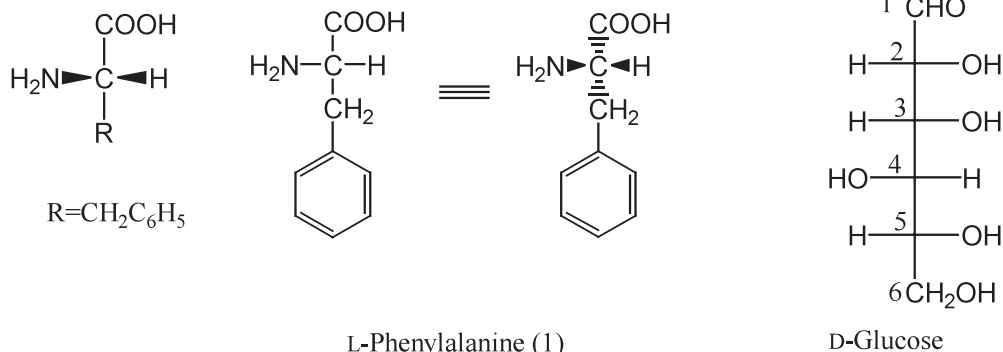


図1 L-Phenylalanine と D-Glucose の Fischer 投影式

表1 炭素原子の天然存在比

核	天然存在比	核の安定性	半減期	質量	検出スペクトル	検出不能
^{12}C	98.885%	安定	—	12.000	MS, IR	(NMR)
^{13}C	1.115%	安定	—	13.003	MS, IR, ^{13}C -NMR	
^{14}C	1.6×10^{-10}	β -崩壊	5,730年	14.003	蛍光	(MS, IR, NMR)

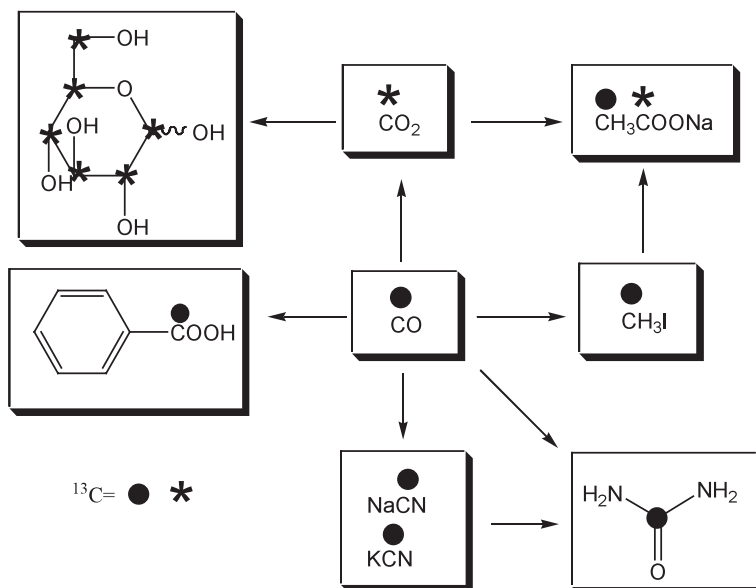
が, Fischer 投影式を概略すると一般に天然アミノ酸はL-体で左利きであり, 天然糖類はD-体で右利きである。

3. 安定同位体について²⁾

地球上に存在する元素は多くの複数の同位体の混合物であり, 特別な場合を除きその割合は一定である。ヒトの身体の主要な構成元素は酸素 65%, 炭素 15%, 水素 10%, 窒素 3% であり, 当然それらの安定同位体元素を含有している。炭素の同位体は陽子の数は 6 で同一であるが, 中性子の数が ^{12}C では 6, ^{13}C では 7 であり, 表 1 に示すように質量数や特性や検出方法等も異なる。化学反応に大きく関与する電子の質量は陽子の約 1/1840 であることから, その質量は無視できる。炭素同位体は質量数や物理的性質が異なることから, 質量分析法 (MS), 赤外分析法 (IR), ^{13}C -, ^1H -核磁気共鳴法 (NMR) で検出できるか否かで検出方法も異なってくる。

1970 年代から盛んに測定されるようになった ^{13}C -NMR において, ^{12}C はスピン量子数が 0 であることから磁石としての性質がないため検出できないが, 天然存在比が 1.1% の ^{13}C はスピン量子数が 1/2 であることから磁石の性質を持ち検出可能である。特に ^{13}C 化学シフト値が 0 ~ 200 ppm と ^1H 化学シフト値を比較すると, 約 20 倍幅広いので化合物中の個々の炭素の重なりが少ないことから, 個々の炭素を同定することが容易であり, またある特定の炭素に ^{13}C 標識して生体内有用化合物の生合成経路や医薬品の代謝経路を明確にすることができる。これらの MS, IR, 及び NMR 等の機器分析³⁾の進展と水素, 炭素, 窒素, 酸素安定同位体濃縮が米国, 日本で商業化されており, 臨床現場でも安定同位体が使用されてきている。

国内では 2000 年 11 月から胃潰瘍原因菌の感染診断薬として ^{13}C -尿素⁴⁾が IR, MS による呼気診断用に承認されている。このような現状から

図2 ^{13}C -標識原料の調製

更なる有用化合物の ^{13}C -標識合成が求められており、その応用が期待されている。

4. 安定同位体標識合成

4.1 安定同位体標識原料の調製²⁾

安定同位体標識化合物は、安定同位体の命名法や立体化学表示法が国際的に正確に規定されていないことから、しばしばアメリカ化学会のデータベース検索では的確に把握できないことも生じる。また安定同位体標識合成する際には、検出感度の問題から放射性同位体と大きく異なり天然存在比 1.115% から 99 倍しか濃縮されていないため、合成途中で放射性同位体標識合成と異なり、無標識化合物で希釈することが許されない。それゆえ、効率的な安定同位体標識合成方法としては、安価な安定同位体標識原料からできるだけ最終段階で再現性良く簡便に純度高く標識することが望ましく、また合成法は同一で目的化合物の任意の元素や選択的位置に標識できることが切望される。

例えば、天然存在比 1.115% である ^{13}C の濃縮を米国では 2 社が $^{13}\text{CO}/^{12}\text{CO}$ を、国内では 1 社が $^{13}\text{CH}_4/^{12}\text{CH}_4$ について、わずかな沸点の違

いを利用して長さ 200 m あるいは 150 m の蒸留塔を用いた低温精密蒸留法で商業的に 99% 濃縮している²⁾。

図 2 に示すように、安価な ^{13}C 標識化合物は ^{13}CO を出発原料として容易に $^{13}\text{CO}_2$ 、 $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ 、 Na^{13}CN 、 K^{13}CN 、 $(\text{H}_2\text{N})_2^{13}\text{CO}$ 、 ^{13}C 酢酸塩や、 $[1-^{13}\text{C}]$ 安息香酸及びその誘導体を合成でき、これらを ^{13}C 標識合成原料として再び利用できる。また、 $^{13}\text{CO}_2$ から光合成菌を用いて光合成を行い、炭素原子を全て ^{13}C 標識した D-[U- $^{13}\text{C}_6$]グルコースが比較的安価に得られる。D-[U- $^{13}\text{C}_6$]グルコースを唯一の炭素源として培養すれば生合成経路に従って生物変換され、2 次代謝物として例えば脂肪やクロロフィル等に ^{13}C 安定同位体標識できる。

4.2 重水素標識光学活性グリシンの合成⁵⁾

安定同位体で標識した基質の利用は、酵素反応機構や生合成経路を研究する際、極めて重要な手法である。グリシンの一方の水素原子を特異的に重水素標識したキラルグリシンの合成法は幾つかの報告例が有り、O-benzylserine を出発とする化学的方法、serine hydroxymethyl

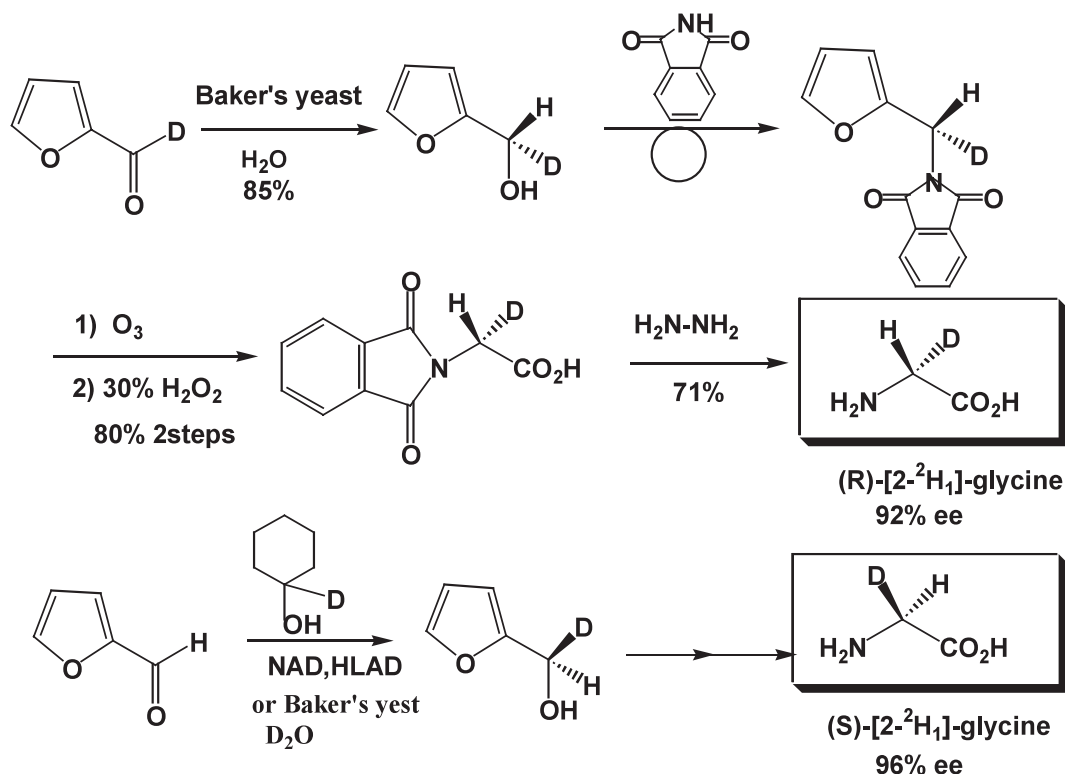


図3 (R)-[2-²H₁]グリシン及び(S)-[2-²H₁]グリシンの高選択的標識合成

transferase を用いる酵素的な方法などがある。

微生物 *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) を安価で温和な反応条件下で不斉導入に利用することは合成上有用な方法である。芳香族化合物であるフラン環は、従来使用されていたベンゼン環に比較して容易にカルボン酸へと酸化変換が可能である。

図3で示すように [2-²H₁]フルフラールをキラルグリシンの立体選択的合成のための基質として使用し、Baker's yeast で不斉還元反応に付し (S)-[2-²H₁]フルフリルアルコールを得る。本化合物は熱や酸に不安定な化合物であることから3工程を連続して行うことにより目的とする光化学活性 (R)-[2-²H₁]グリシンを光学純度 92% ee (enantiomer excess; 鏡像体過剰率), 好収率で得た。

一方、光化学活性 (S)-[2-²H₁]グリシンを簡便に生成するために、無標識フルフラールを出発原料として 1 g スケールであれば、牛肝アル

コールデヒドロゲナーゼと [1-²H₁]シクロヘキサノールを用いて酵素的還元反応より収率 72% を得ることができる。10 g スケールの場合、重水中で Baker's yeast で不斉還元反応に付した同様の工程で簡便に光学純度 96% ee で (S)-[2-²H₁]グリシンを合成した。

ここでは紙幅の都合で詳細は省くが、光学純度は Mosher 法による NMR 測定法と円偏光二色性 (CD) では (R)-グリシンは正のシグナル、(S)-グリシンは負のシグナルが得られ、CD のシグナルと絶対配置の関係を明確にでき、CD スペクトルによる絶対配置決定法を確定した⁵⁾。

4.3 代表的な光学活性アミノ酸合成^{6)~8)}

図4に示すように、一般に光学活性アミノ酸は、最も基本的な不斉炭素を持たないアミノ酸であるグリシンの水素の一方が酵素により見分けられる。天然アミノ酸では pro-S-水素 (H_S)

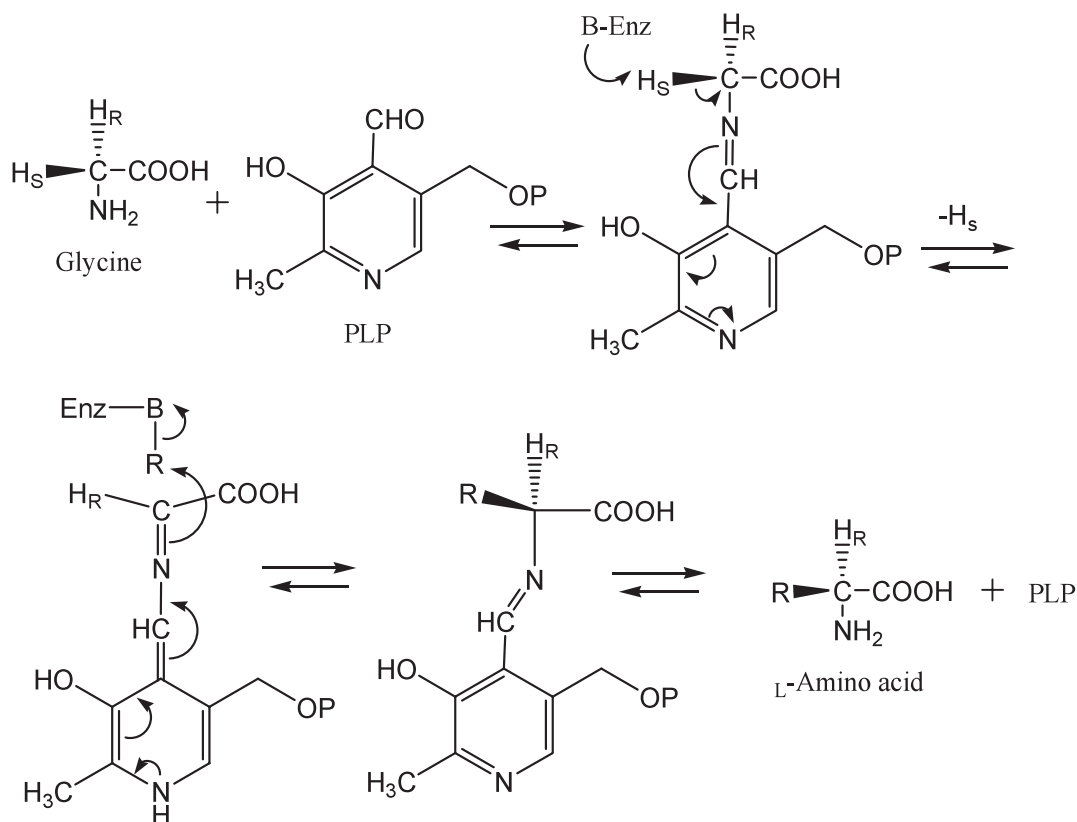


図4 光学活性アミノ酸の生成

水素を重水素に置き換えると *S* 配置の不斉炭素となり、酵素により立体選択的に補酵素であるピリドキサル (PLP) 触媒下、イミンを経由して H_s を脱離し、その後、立体選択的にアルキル化 (R で示す) されるため、天然アミノ酸は *L*-体のアミノ酸を生成すると理解している。一方、ヘムやビタミン B_{12} では、アミノ酸生成とは逆にグリシンの *pro-R*-水素がピリドキサル (PLP) 触媒下、酵素によって立体選択的に脱離して、ヘムの前駆体5-アミノレブリン酸を生成することが立体選択的標識グリシンを使用してから明らかにされている。

図5に示すように代表的な光学活性アミノ酸の合成法は、1) 化学的、酵素的光学分割法、2) エナンチオ選択的 α -プロトンの導入、3) エナンチオ選択的 α -アミノ基の導入、4) 不斉 Strecker 合成、5) 側鎖の立体選択的導入、6) α -アミノ酸からの誘導を用いる方法、など多

数の報告がある^{7),8)}。

^{13}C 標識アミノ酸の合成においては、取り扱いの制限を受けないが ^{13}C 標識合成試薬の価格が極めて高額であり、大量に造って貯蔵することが困難であるため、 ^{13}C 標識アミノ酸の在庫品はほとんどないのが現状である。また、ヨウ化メチルのように沸点が低く揮発性の高い試薬は航空機で輸入できないため、船で輸入することが求められ、輸入日数や数量等の多くの制限を受けており、経済的で簡便な合成方法や使用方法が世界的にも十分に先端の各研究者や各施設に普及していない。合成法としてはできるだけ安価な ^{13}C 試薬で平易な方法で学部生はじめ誰でも ^{13}C 標的化合物の任意の場所にできるだけ最終段階で、 ^{13}C 標識合成することが切望される。このようなことから筆者らは図6に示すように同一合成方法で多数の ^{13}C アミノ酸を簡便に合成することを企画した。

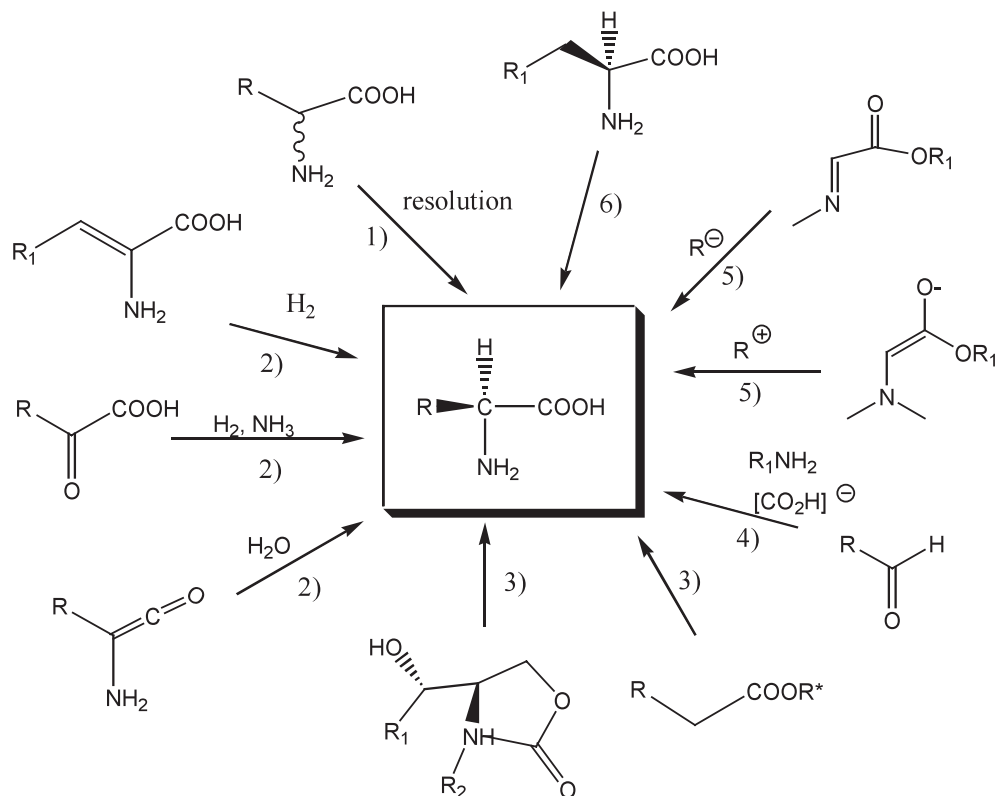
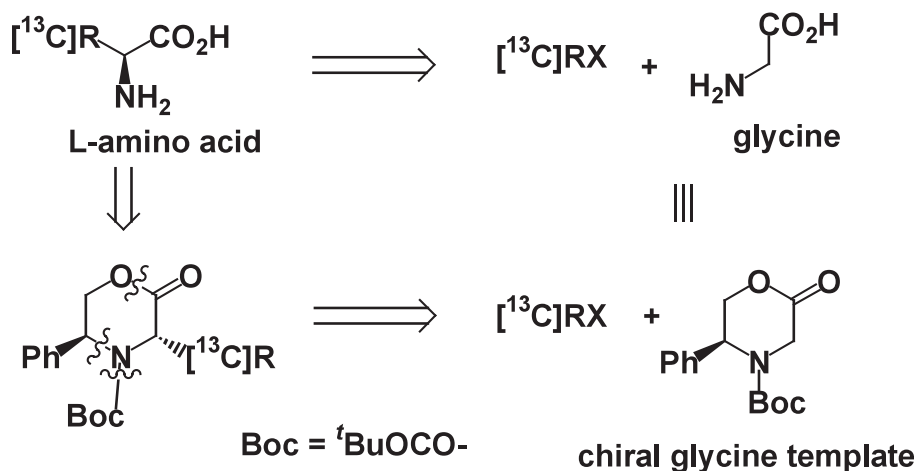
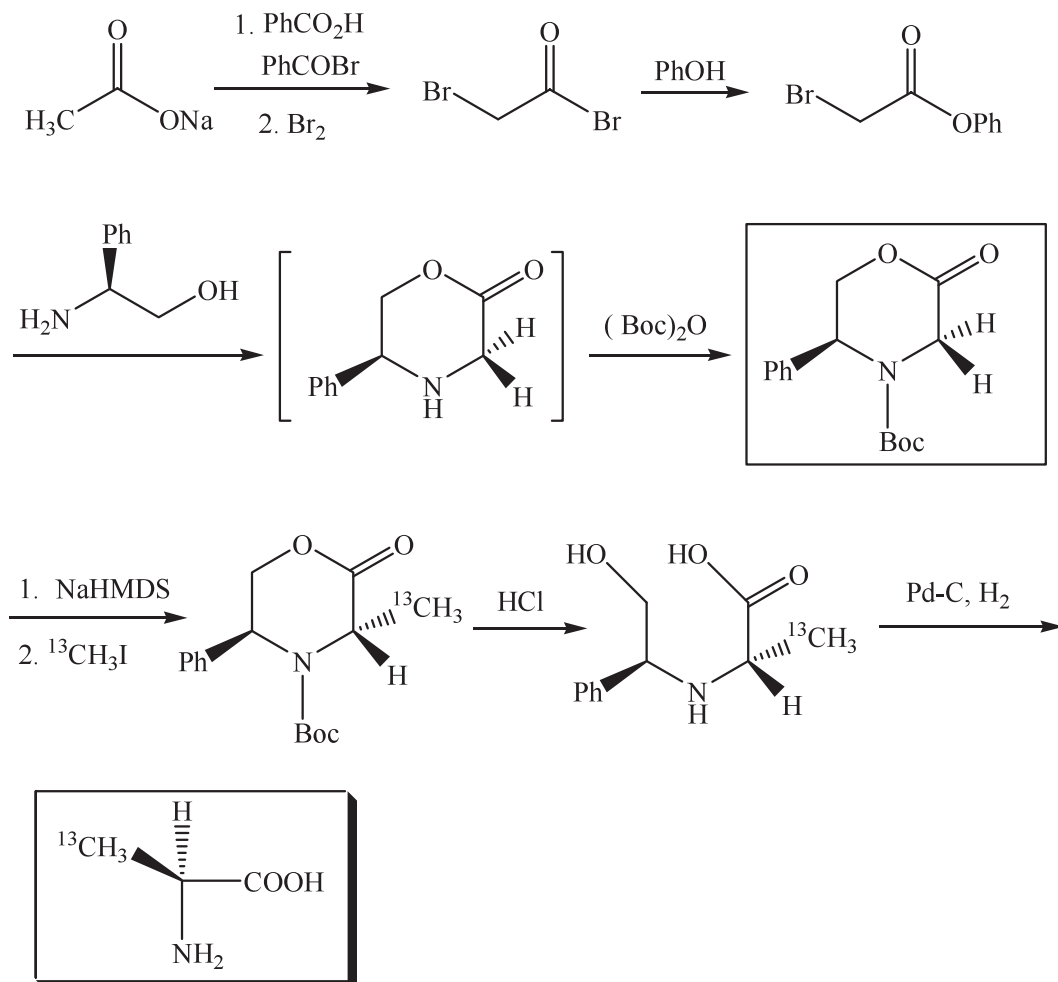


図5 代表的な光学活性アミノ酸の合成法

図6 ^{13}C -アミノ酸の逆合成4・4 L- $[3-^{13}\text{C}]$ アラニンの合成¹²⁾

筆者らは文献5において、上記の図4のアミノ酸生成及び図6で示すように天然アミノ酸の立体化学はL-体であり、この不斉炭素を如何

にコントロールして合成するかが重要なポイントである。図6の ^{13}C 標識アミノ酸の逆合成から不斉グリシン等価体アニオン、あるいはカチオンを発生させ、立体選択的に側鎖となるア

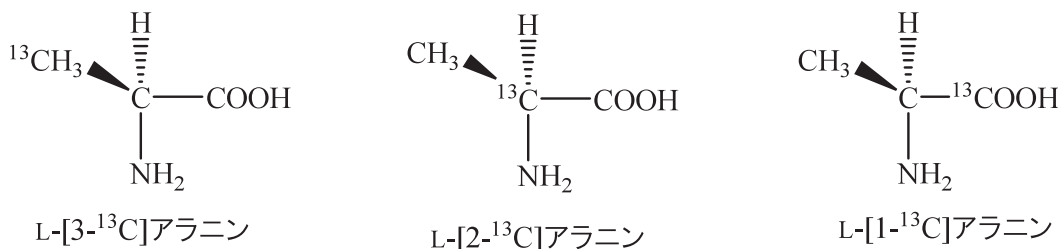
図7 鍵中間体オキサジノン合成と L-[3-¹³C]アラニンの合成

ルキル基を導入した後、不斉補助基を除去する Dellaria ら⁹⁾の環状オキサジノン誘導体の高選択的アルキル化によるアミノ酸合成法が応用範囲も広く簡便に¹³C 標識アミノ酸を生成できると考えた。

L-[3-¹³C]アラニンの合成をする際には、図7に示すようにまず鍵中間体となるオキサジノンの合成を行った。酢酸ナトリウムを安息香酸、ベンゾイルブロミドと共に加熱してアセチルブロミドへと導き、次いで臭素と反応させプロモアセチルブロミドへ変換した後、フェノールを加えてプロモ酢酸フェニルを合成した。プロモ酢酸フェニルと不斉補助基となる(*S*)-2-フェ

ニルグリシノールとをカップリングさせ、Dellaria らの環状オキサジノンを調製し、アミノ基を *t*-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基で保護して鍵中間体である未標識オキサジノンへと導いた。このオキサジノンをナトリウムビストリメチルシリルアミド (NaHMDS) によりエノール化させ、これに図2に示す比較的安価な標識原料である [¹³C]-ヨウ化メチル (99% atom ¹³C) を滴下して立体選択的に¹³C-メチル基を収率 92% で導入した後、6 モル塩酸で加水分解、続いて中圧接触還元して不斉補助基を除去し L-[3-¹³C]アラニンを合成した (図7)。

[¹³C]-ヨウ化メチルから¹³C 標識率を低下さ

図8 L- ^{13}C 標識アラニン

せずにL-[3- ^{13}C]アラニン (99%atom ^{13}C) までの総収率は84%であった。光学純度は99% eeであった。プロモアセチルブロミドからの総収率は48%であった。この方法で1位及び2位の ^{13}C アラニン合成が開発できた。

また、環状オキサジノンへのアルキル化は、嵩が小さいため立体選択性が低いと考えられるヨウ化メチルとの反応においても、高選択的なメチル化ができたことからこの合成法により、種々のアルキルハライドを用いれば他の光学活性アミノ酸の標識合成にも適用できることを見出した。

4.5 L-[^{13}C]アラニンの R, S 表示の問題点

L-[3- ^{13}C]アラニンは、ノーベル化学賞受賞したPrelogの規則に従い R, S 表示法では質量の大きい原子団が優先することから、アミノ基の窒素が優先順位が一番上位となり、通常 α -炭素に接続した炭素はカルボキシル基の炭素の方が側鎖の炭素より優先順位が高いが、L-[3- ^{13}C]アラニンの場合には、 $^{13}\text{CH}_3$ 標識メチル基中の ^{13}C の方が ^{12}C より質量数大きいことから、優先順位が高くなり、続いてカルボキシル基の炭素が3番目となり水素原子が4番目となり、優先順位の1番低い水素をみから一番遠方に置くことになり、時計と同じ右回りであることから、(R)-[3- ^{13}C]アラニンとなる。

一方、L-[2- ^{13}C]アラニン及びL-[1- ^{13}C]アラニンはこれとは逆になり(S)-[2- ^{13}C]アラニン及び(S)-[1- ^{13}C]アラニンと表示されることになり、有機化学を専門に研究している研究者であれば問題ないが、専門外の研究者は標識位置

の違いで、 R 表示とする場合や S 表示とする場合があることから、立体化学を掌握することが困難となる。

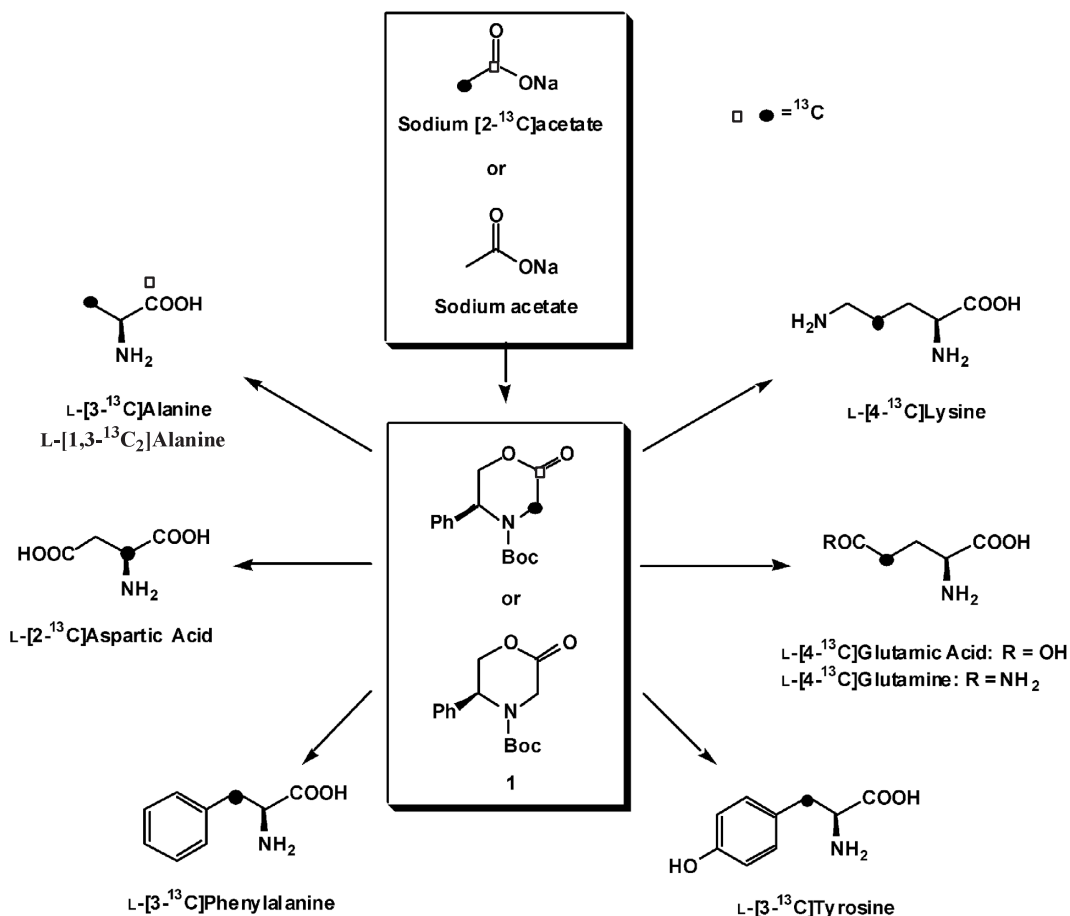
それゆえ、 ^{13}C 標識アミノ酸を従来のFischer投影式でL-体あるいはD-体で表示した方が統一することができ、立体化学表示の混乱がない。また、 ^{13}C 標識率が何atom%から優先するか等、表示法が明確に規定されていないことから、誰もが立体化学を明確に理解できる国際的な統一表示法が切望される。

4.6 L-[^{13}C]標識アミノ酸の合成^{10) - 15)}

Dellariaのオキサジノンを鍵中間体とした光学活性アミノ酸の ^{13}C 標識合成法がすでに確立されている(図6, 7)。この方法により、筆者らは図9に示すように、L-[3- ^{13}C]-, L-[1, 3- $^{13}\text{C}_2$]アラニン, L-[2- ^{13}C]アスパラギン酸, L-[3- ^{13}C]フェニルアラニン, L-[3- ^{13}C]チロシン, L-[4- ^{13}C]グルタミン酸及びグルタミン, L-[4- ^{13}C]リジン等の ^{13}C 標識体を合成している^{10) - 15)}。

この方法は、光学活性フェニルグリシノールとフェニルプロモアセテート(酢酸ナトリウムから調製)から調製されるオキサジノンを側鎖に相当するアルキルハライドで立体選択的にアルキル化した後、不斉補助基であったフェニルグリシノール部分を除去することで光学活性アミノ酸を合成する方法である。

アルキルハライドやオキサジノンを ^{13}C 標識しておくことで、アミノ酸の任意の炭素を位置選択的に ^{13}C 標識することが可能であり、更に不斉補助基となるフェニルグリシノールのエナ

図9 キラルグリシン等価体を利用した簡便なL- ^{13}C アミノ酸の合成

ンチオマーを使いわけることによってD体とL体どちらのアミノ酸も合成できるという優れた方法である。

5. おわりに

医薬品における化学的、物理的变化、あるいは生体内での代謝、蓄積、排泄などのメカニズムを解明する方法として、安定同位体(^2H , ^{13}C , ^{15}N 等)を用いる方法があり、近年 ^{13}C や ^{15}N のような安定同位体が用いられるようになってきた。これらはNMR等により、構造変化を非破壊的に容易に判別できるという利点も持っている。基礎研究分野における蛋白質あるいは核酸の構造解析等の研究では、トレーサ実験が大きな役割を担っている。

このような背景から最近、安定同位体標識アミノ酸の利用が注目されている。アミノ酸は多くの生体内生理活性物質の前駆体として重要な機能を果たしている。アミノ酸を用いたトレーサ実験により、ペプチド及び蛋白質の構造解析研究のみならず、天然物の生合成や生体内における代謝、蓄積、排泄などの動態や代謝異常疾患などの疾病についても深く解明できる。安全性の高い ^{13}C 標識光学活性アミノ酸を用いた呼吸テストが研究されており、臓器疾患の診断薬としても検討されている。すでに、筆者らはL-[$1\text{-}^{13}\text{C}$]フェニルアラニンを使用した呼吸テストを報告している。

今後、新しい科学技術や知識を活用して医療分野や生命科学分野においても、安定同位体の

利用は大きな成果を挙げていくものと期待される。

文 献

- 1) ボルハルト・ショワー, 現代有機化学 第4版, 古賀憲司, 野依良治, 村橋俊一監訳, p.1124, p.1252 (2005)
- 2) 梶原正宏, ^{13}C -呼気試験の実際, ^{13}C 医学応用研究会, pp.4-15 (2002)
- 3) E. プレシュ, T. クレーク, J. ズィブル, W. シモン著, 中西香爾, 梶原正宏, 堤 憲太郎訳, 有機化合物スペクトルデータ集, 講談社サイエンスティフィ, pp.56-256 (2006)
- 4) 谷口友志, 川田 浩, 佐藤貴一, 蘇原宏光, 木平健, 木村 健, 高取和彦, 飯田克巳, ^{13}C -尿素呼気試験, 日本消化器病学会編, *Helicobacter pylori* の最新知見, pp.181-186, 中山書店 (1995)
- 5) Yamada, H., Kurumaya, K., Eguchi, T. and Kajiwara, M., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **26**, 561-575 (1987)
- 6) Suckling, K. E. and Suckling, C. J., Biological chemistry, pp.80-85, Cambridge University Press, Cambridge (1980)
- 7) Williams, R. M., Synthesis of Optically Active α -Amino Acids, Pergamon Press, Oxford (1989)
- 8) Kurti, L. and Czako, B., 人名反応に学ぶ有機合成戦略, 富岡 清監訳, p. 446 (2006)
- 9) Dellaria Jr., J. F. and Santarsiero, B. D., *J. Org. Chem.*, **54**, 3916-3926 (1989)
- 10) Takatori, K., Nishihara, M., Nishiyama, Y. and Kajiwara, M., *Tetrahedron*, **54**, 15861-15869 (1998)
- 11) Takatori, K., Nishihara, M. and Kajiwara, M., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **42**, 701-708 (1999)
- 12) Takatori, S., Toyama, S., Narumi, S., Fujii, S. and Kajiwara, M., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **47**, 91-94 (2004)
- 13) Kajiwara, M., Takatori, K., Lee, M. and Hayashi, A., Synthesis of L-[C-13] amino acids, *5th International Conference on Isotopes*, Medimond, Brussels, 289-292 (2005)
- 14) Takatori, K., Hayashi, A. and Kajiwara, M., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **47**, 787-795 (2004)
- 15) Takatori, K., Sakamoto, T. H. and Kajiwara, M., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **49**, 445-453 (2006)