

■受領No.1375

## COPD 簡易診断を目指した弾性線維エラスチン架橋ペプチドの抗原・抗体作製

代表研究者

臼杵 豊展

上智大学理工学部物質生命理工学科 准教授



## 1. 研究目的

COPD (chronic obstructive pulmonary disease; 慢性閉塞性肺疾患) は、喫煙を代表とする有毒な粒子やガスの吸入、または加齢などによる肺胞の不可逆的な破壊にともない発症する。WHO (世界保健機関) によると COPD は現在、世界第 3 位の死因である。臨床現場では、スパイロメトリー法や画像解析などの総合的評価により診断を下しているが、時間やコストが甚大であり、しかもその根治薬は未開発である。今後、世界規模での COPD 患者の増加と医療費の増大が危惧されており、簡便な診断薬の確立が切望されている。また最近では、COPD 患者もしくはその予備軍患者の新型コロナウイルスによる発症率・死亡率が高いという報告もなされている。

肺胞や皮膚、血管などの伸縮を主につかさどる弾性線維エラスチンは、786 アミノ酸からなるトロポエラスチンが架橋重合した多量体型ファイバー構造をもつ。その架橋に寄与するアミノ酸として、desmosine (図 1) および isodesmosine が知られている。COPD 患者の血液や尿を加水分解処理し LC-MS/MS 分析すると、desmosine が健常者よりも多く観測されるため、desmosine は COPD のバイオマーカーである。すなわち、COPD の進行にともないエラスチンの崩壊が進み、結果として生体内へ代謝される desmosine 量が増加する。しかし、臨床試料の加水分解処理に続く LC-MS/MS 測定は、コスト・時間・設備などの観点から簡便な診

断法としての実用化は困難である。しかも、弾性線維エラスチンはその不溶性および不結晶化性のため、X線や NMR などによる構造解析が進んでいない。

そこで本研究では、次のような目的を掲げる。弾性線維エラスチンの生化学的知見に立った架橋構造の研究から、desmosine はエラスチン内のアラニン (Ala) 豊富な部位に存在していることが示唆されていることをふまえ、本研究では Ala を含む環状ペプチドが結合した化合物 1 (図 1) を設計する。そして、当研究室で独自に開発したパラジウム触媒による連続的なクロスカップリング反応と脱水縮合反応を基盤とした有機合成化学によって、その挑戦的な合成を推進する。得られた 1 とキャリアタンパク質である BSA との複合体 (コンジュゲート) を作製し、これを抗原としてマウスなどの実験動物へ免疫したのち、ポリクローナル抗体を作製する。このようにして、COPD 患者の尿や血液だけで簡便に疾患を判断できる診断薬の開発研究に必要な研究を推進する。

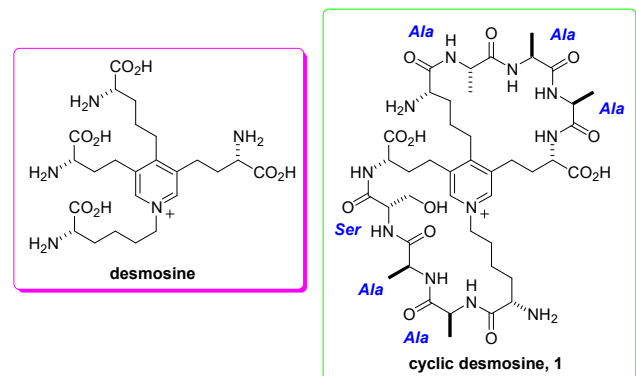


図 1 Desmosine と環状 desmosine ペプチド 1

## 2. 研究内容

ピリジニウムアミノ酸desmosineは、トロポエラスチンのリシン残基が酵素リシルオキシターゼによりアルデヒドへ酸化されアリシンとなることを発端とし、続く多段階の脱水縮合反応によるピリジン環を形成し生合成される。報告されているトロポエラスチンのアミノ酸配列情報から、ピリジン環を含むアラニンリッチな環状ペプチド構造1が推定されている。本研究では有機合成化学を駆使して、この環状ペプチドの合成を目指すことにした。

目的の1の合成の鍵反応として、ピリジン環とアミノ酸との間の炭素-炭素結合の構築には、パラジウム触媒を用いた位置および化学選択的なクロスカップリングを採用し、ペプチド結合については、分子間または分子内縮合反応を用いて構築することにした (図2)。トリハロピリジン2を出発物質として、別途調製した3つのAlaをもつアルキン3とPd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (10 mol%)、P(2-furyl)<sub>3</sub> (40

mol%)、CuI (40 mol%) を利用した4位選択的な菌頭クロスカップリングによって4の合成に成功した。次に、得られた4のピリジン環の3および5位に対して、別途調製したヨードアミノ酸5から誘導した有機亜鉛試薬とのPd-PEPPSI (20 mol%)を用いた根岸クロスカップリングによって、トリカップリング体とした後、選択的なCbz保護基の除去により6を得た。そして強力な縮合剤であるCOMU/Oxyrnaを用いた分子内縮合によって、一環状ペプチド7の合成に成功した。

次に、この7と別途合成したトリペプチドSer-Ala-Alaのカルボン酸8を、COMU/Oxyrnaの条件下、分子間縮合した後、分子内N-アルキル化によるピリジニウム塩の構築をおこない、9とした。最後に、すべての保護基の除去を経て、目的の二環状ペプチド1の合成を完了した。現在、得られた化合物を用いたキャリアタンパク質複合体の調製を行っており、抗原・抗体作製を推進中である。

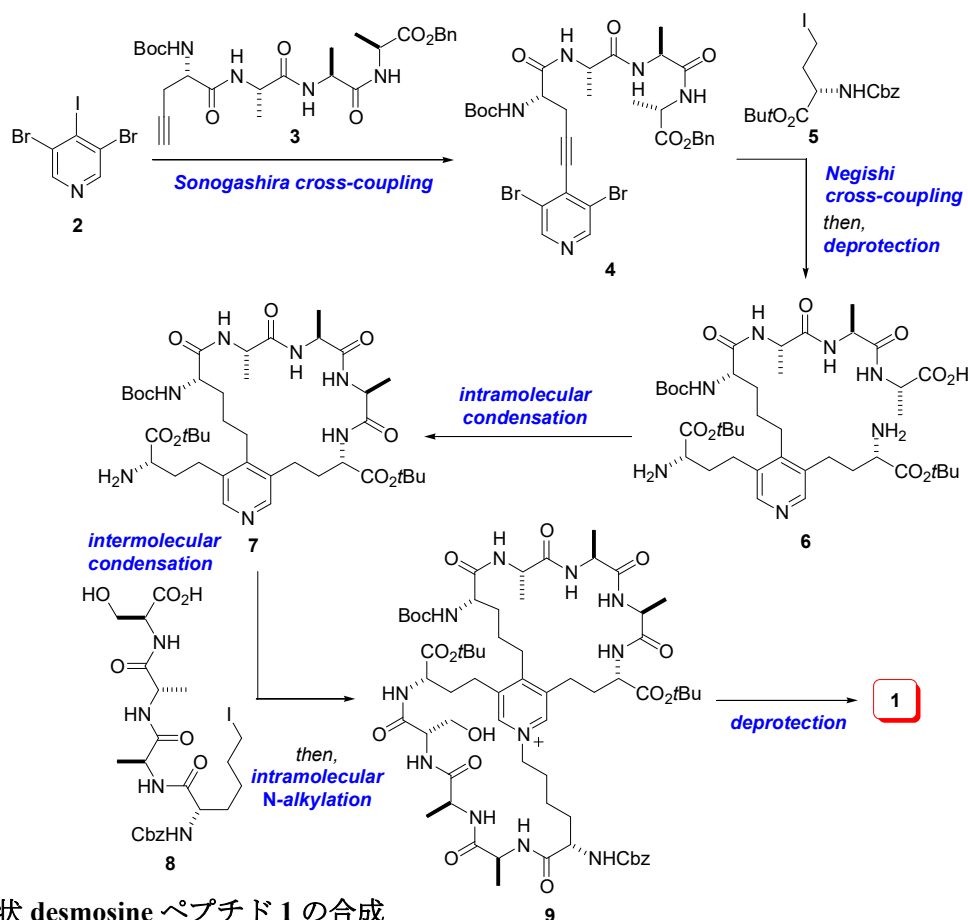


図2 環状 desmosine ペプチド 1 の合成

### 3. 発表 (研究成果の発表)

国内外の学会誌、学会講演会等における発表を 5 件程度記載。

記載内容：氏名、題目、誌名、巻、号、頁 (年次)、学会名 (場所、年次)

Daria A. Baut, Nao Tanaka, Reiko Yokoo, Toyonobu Usuki

“Preparation of Isodesmosine-KLH Conjugate for ELISA System”

*Chirality*, 32, 431-436 (2020)

石田優理子、東海林大、木村高岳、白杵豊展

「環状desmosine型ペプチドの合成研究」

日本化学会第100春季年会、2020年3月22日、東京理科大学

宮城聖矢、横尾玲子、谷川貴寛、白杵豊展

「desmosine-BSA複合体抗原の合成」

日本化学会第100春季年会、2020年3月22日、東京理科大学