

# 甘味受容体に対する光アフィニティーラベルによる ケミカルバイオロジー研究

橋本 誠

北海道大学大学院農学研究院 准教授

## 緒言

長年にわたり人類は数多くの味覚を示す物質を発見してきたが、その作用機序を完璧に明らかにした例はほとんど知られておらず、実験からもたらされた多くの実験結果を基に経験則的な観点から予想が立てられている。これらを構造-活性相関を代表するような、化学的観点であるケミカルバイオロジーの研究はこれまであまり行われてこなかった。今回の助成において、甘味化合物と知られているスクロースならびにサッカリンに関してケミカルバイオロジー的な観点から研究を行った。

## 実験方法・結果

### 1. ハロゲン化スクロース誘導体合成とその構造決定

スクラロースに代表されるハロゲン化スクロース誘導体は、複数の糖水酸基（スクロース4、1'、6'位をハロゲンに置き換えた構造）を取ることで、その甘味活性を増強することが知られている。各々ハロゲン化置換に関する甘味に対する影響は有機合成で調製したモノハロゲン化スクロース誘導体で使用されてきた。例えば6'位モノハロゲン化反応の一つとして $\text{CBr}_4$ と $\text{Ph}_3\text{P}$ による位置選択的Appel反応が知られている。この反応のスクロースへの応用は1970年代に初めて報告され、6'位選択的<sup>1)</sup>と報告されているものもあれば、6'位選択的<sup>2)</sup>と報告されているものも混在している。これら反応性の不統一性は当時の構造解析技術では旋光度に立脚した解析が主であり、混合物状態であってもそれを認識することは難しく、現在主流となっている核磁気共鳴(NMR)を利用した解析はほとんど行われずに今に至っている。これは一度学術論文に記載された化合物群はその構造が正しいものとして扱われることから、その訂正を行うには労力が必要になることが一因としてあげられる。筆者らは論文に従い単一化合物を与える反応条件において実際は複雑な位置異性体の混合物を与えることを見出し、それら異性体の網羅的な解析を行うことでこれまで混迷して

いたスクロース誘導体の構造決定を目指した。

スクロースを1.2等量 $\text{CBr}_4$ と2.4等量 $\text{Ph}_3\text{P}$ 、60°Cで1.5時間処理し、モノプロモ化物が最大になる条件で反応させた。この段階での精製は非常に困難であり、反応系全体をアセチル化に供した。ここで得られたモノハロゲン化アセチルスクロース反応系は、シリカゲルクロマトグラフィーで通常分離に使われる酢酸エチルや塩化メチレンなどの有機溶媒では分離能が極端に低く、エーテルを用いないと分離できないことが明らかとなった。分離できた化合物は6位および6'位がモノプロモ化された化合物であり、<sup>1</sup>H-NMRで $\text{CH}_2\text{Br}$ の $\text{CH}_2$ プロトンが3.5 ppm付近に6位が2つのダブルダブレット、6'位がダブルレットで観測された。これまでこの領域のシグナルはマルチレットで表されることがほとんどであり、6、6'位モノプロモ化の混合物であったことが示唆された。さらに確認のため、1'位をプロモ化した化合物を別途合成し、 $\text{CH}_2\text{Br}$ の $\text{CH}_2$ プロトンが2つのダブルレットで観測されることを明らかとした(図1)。これら生成した6、1'、6'位モノプロモアセチルスクロースを脱保護した所、<sup>1</sup>H-NMR上でほとんど差は見られず区別することが難しく、詳細な解析の重要性が明らかとなった。この反応の際同時に生成するジプロモアセチルスクロースのNMRは、モノプロモ体の特徴をそのまま反映していた。同様な傾向はモノクロロ化体でも認められ、スクロースの位置選択的ハロゲン化反応の構造決定には最新の注意が必要であることを明らかとした<sup>3)</sup>。

### 2. 光アフィニティーラベル用サッカリン誘導体の合成

人工甘味料であるサッカリンは古くから使用されてきたが、その作用機序は明らかにされていない。筆者はこの問題に光アフィニティーラベル法<sup>4)</sup>を適用することを立案した。この手法は、生理活性物質の構造中に光照射により反応性の高い活性分子種を発生する光反応性基を導入することで、標的体高分子と複合体形成後

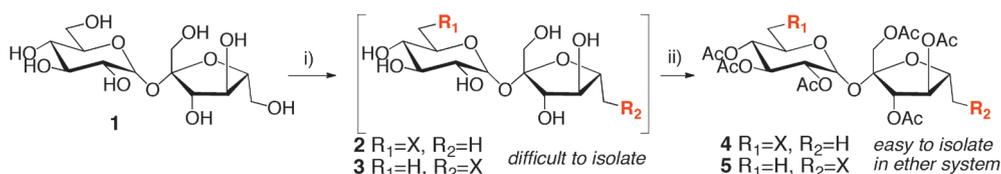


図1 スクロース位置選択的ハロゲン化

i) CX<sub>4</sub> (1.5等量、X=Br, Cl), Ph<sub>3</sub>P (2.4等量), pyridine, 60°C, 1.5 h, ii) acetic anhydride, pyridine, room temperature, 8 h, yield 5–13%.

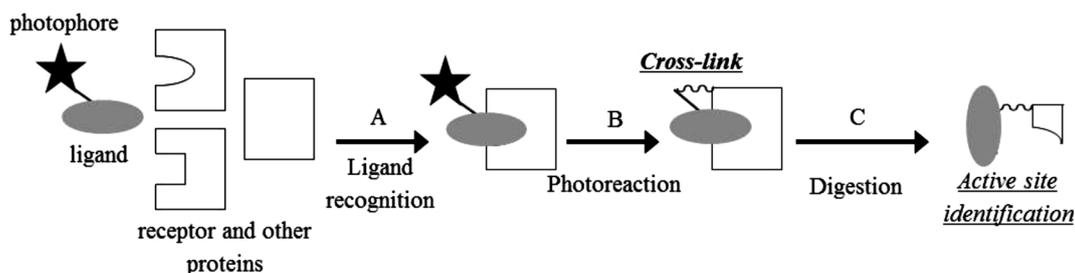


図2 光アフィニティーラベルの概念図

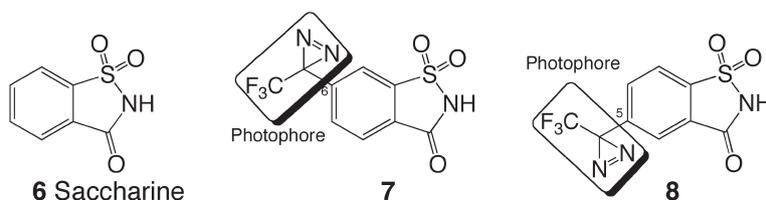


図3 サッカリン (6) とその光アフィニティーラベル用試薬 (7, 8)

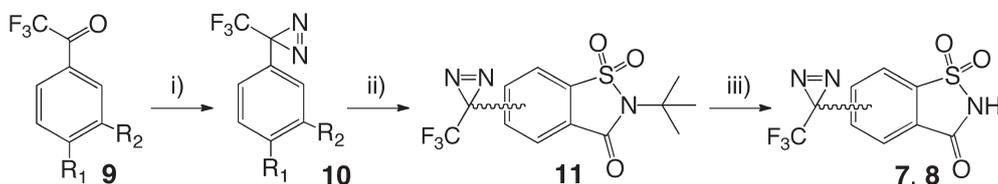


図4 サッカリン誘導体7, 8の合成

i) a) NH<sub>2</sub>OH·HCl, pyridine, 70°C, 3 h, 95–99%, b) TsCl, pyridine, reflux, 3 h, 97%, c) NH<sub>3</sub>(l), 80°C, 12 h, 98–99%, ii) a) ClSO<sub>3</sub>H, –20°C, 1 h, then rt, 4 h, b) tBuNH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 2 h, then rt, 22 h, c) H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>, CrO<sub>3</sub>, Ac<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, rt, 48 h, 28–33%, iii) CF<sub>3</sub>COOH, reflux, 24 h, 54–57%.

(図2A) 光照射することで反応活性種を発生させ (図2B)、近傍の生体高分子と共有結合を形成する。それを酵素消化等で断片化し (図2C)、生理活性物質結合部位を同定することが可能な手法である。

光反応性基としては、合成が難しいものの、光アフィニティーラベル試薬として求められる性質を一番よく満たす、トリフルオロメチルジアジリンを選択した。サッカリン6の構造より、光反応性基の導入は6位、5位とした化合物7、8をデザインした (図3)。

トリフルオロアセトフェノン誘導体(9)を最近報告した短行程合成法<sup>5)</sup>によりジアジリン(10)とし、スルフォ

ニアミド化(11)、脱保護によりジアジリン部に目的とするサッカリン誘導体(7, 8)へ変換することに成功した<sup>6)</sup> (図4)。

現在、合成した化合物7, 8の甘味活性測定を検討中である。

## 考 察

味覚は万人が感じるものであるため、古くから積極的に研究が行われてきたが、味覚物質の検討は最初に報告された論文に従った構造により展開されてきた。極性官能基である水酸基が分子内に多数ある糖鎖等の構造決定

は1970年代の分析手法では分解能等の問題から限界があったと考えられる。今回明らかとなったアセチル保護モノハロスクロース群の構造解析により、確かな構造に立脚した研究が重要であることを示唆している。また人工甘味料サッカリンの光アフィニティーラベル試薬合成を世界で初めて達成し、甘味受容体の機能解析への道を開くことに成功した。

#### 謝 辞

本研究課題を遂行するにあたり、公益財団法人三島海

雲記念財団ならびに選考に携わっていただいた諸先生方に心より深謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) B. Castro, et al.: *Carbohydr. Res.*, **36**, 412–419, 1974.
- 2) M. M. Andrade, et al.: *Eur. J. Org. Chem.*, 3655–3668, 2007.
- 3) Z. P. Tachrim, et al.: *ChemistrySelect*, **1**, 58–62, 2016.
- 4) M. Hashimoto, et al.: *Eur. J. Org. Chem.*, 2513–2523, 2008.
- 5) L. Wang, et al.: *Org. Lett.*, **17**, 616–619, 2015.
- 6) L. Wang, et al.: *Eur. J. Org. Chem.*, 3129–3134, 2015.