卵殻膜含有のデスモシンの LC-MS/MS 定量分析

上智大学理工学部物質生命理工学科・准教授　臼杵　豊展

■　緒　言

卵殻膜は、火傷や創傷などの治癒効果や、保湿効果などの魅力的な薬理活性をもつことが知られており、それらの作用物質としてタンパク質やペプチドの探索研究が進んでいる[1]。最近では、高血糖の予防効果のある卵殻膜含有ペプチドが報告されている[2]が、それ以外にもデスモシン(desmosine, **1**, Figure 1)と呼ばれる弾性線維エラスチンの架橋アミノ酸分子[3]の存在も以前から提唱されている。エラスチンは動物の靭帯や血管、皮膚などの細胞外マトリックスに豊富に含有し、魚類にも含まれている不溶性のタンパク質である[4]。Desmosine には、その構造異性体である isodesmosine(**2**, Figure 1)や、neodesmosine (**3**, Figure 1)[5]が同族体として知られている。1980 年代に発表された論文[6]では、卵殻膜中の desmosine を紫外分光(UV)法や呈色法などの限られた古典的な測定技術で検出しているため、信憑性に乏しく、しかも desmosine の定量分析はこれまでなされてこなかった。

当研究室では、ピリジン環に 4 つのアミノ酸が結合した異常アミノ酸である desmosine の世界初かつ唯一の化学合成[7]と、それに基づく高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析(LC-MS/MS)による定量分析法の確立[8]を推進している。すなわち、有機合成によって調製した同位体標識 desmosine を内部標準物質とすることにより、たとえ微量成分であっても厳密な定量分析が可能となる。本手法は、化学合成のみによって得られる同位体化合物を基にした分析法であり、LC-MS/MS 測定と組み合わせることで実現可能な実験である。なお、本研究における同位体標識 desmosine として、[$^{13}C_3$, $^{15}N_1$]-desmosine **4**(Figure 2)を設定する。

本研究では、同位体希釈 LC-MS/MS 法を用いることで、これまで曖昧にされてきた卵殻膜中に含まれる desmosine 類の存在の有無とその定量分析を行うことを目的とする。これにより、不可食部分として処理されてきた卵殻膜の新たな機能性素材としての可能性を探る。

■方　法

1．有機合成化学による同位体標識デスモシン [$^{13}C_3$,$^{15}N_1$]-desmosine **4** の合成

当研究室で確立された合成戦略[9]を基盤とし、生合成模倣反応を重要な鍵段階として採用することにする。まず、安価な出発原料アミノ酸より、同位体標識および保護基を付与したアルデヒドとアミンをそれぞれ合成する。これらに対して、希土類元素の一つであるプラセオジムで構成されるプラセオジムトリフラートを触媒として合成したアルデヒドとアミンを反応させると、ピリジン骨格を一挙に構築できる。その後、アミノ酸の保護基を除去し、目的の [$^{13}C_3$,$^{15}N_1$]-desmosine **4** の合成を完了する。なおこの化合物は、天然の desmosine **1** および isodesmosine **2** よりも *m/z* 4 だけ大きい質量をもつ。

2．卵殻膜成分の酸加水分解処理

購入可能な粉末の卵殻膜を原料として、6 規定の塩酸で 100℃の条件下、24 時間撹拌することで、タンパク質やペプチドの加水分解処理を行う[8]。その際、あらかじめ既知の量の [$^{13}C_3$,$^{15}N_1$]-desmosine **4** を撹拌前に添加する。その後、溶液をセルロースカラムに供してろ過することで、不純物を除去する。得られた溶液の窒素ガスによる溶媒の除去を経て、卵殻膜の乾燥物を得る。

3．同位体希釈 LC-MS/MS による desmosine の定量分析

上記で得られた乾燥物を溶液に溶かし、LC-MS/MS による分析を行う。まず LC の部分で他の夾雑物と目的の desmosine 類を分離する。次に、電子スプレーイオン化(ESI)で最初に検出した desmosine **1** および isodesmosine **2** の分子量 *m/z* 526 付近のイオンを選択し、続くアルゴンガス照射による特異的なフラグメンテーションを起こすことで、分解物の検出イオン濃度を求める。この際、濃度既知の [$^{13}C_3$,$^{15}N_1$]-desmosine **4** を基準物質とすることで、desmosine **1** および isodesmosine **2** それぞれの量を算出することができる。このように、卵殻膜中の desmosine 類の定量分析を遂行し、機能性評価へつなげる。

■ 結 果

1．同位体標識デスモシン ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-desmosine **4** の合成

目的の ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-desmosine **4** の合成に向け、まずはアルデヒド **12** の調製を Scheme 1 に示す。まず、購入可能なグルタミン酸保護体 **5** を出発原料とし、カルボキシ基のメチルエステル化を行い化合物 **6** としたのち、水素添加反応によるベンジル基の除去によってカルボン酸 **7** を得た。そして、**7** のカルボキシル基の *t*Bu 保護を行い、中間体 **8** とした。これを bisBoc 化により化合物 **9** としたのち、DIBAL 還元によりアルデヒド **10** を得た。生じたアルデヒドに対して、^{13}C 標識した Wittig 試薬を用いることによって、増炭したアルケン **11** を合成した。その後、9-BBN と酸化によりアルコール 12 としたのち、DMP 酸化によって鍵反応基質アルデヒド **13** を調製した[9]。

一方、Scheme 2 ではアミン **17** の合成を示す。上記で得られた中間体 **8** に対して、$NaBH_4$ 還元によってアルコール **14** としたのち、Appel 反応によりブロモ化合物 **15** を合成した。次に、$KC^{15}N$ を試薬として用いることで、同位体を含むニトリル化合物 **16** を得た。最後に、加圧条件下での水素添加反応によって、鍵反応基質である 1 級アミン **17** を合成した[9]。

それぞれ調製した、アルデヒド **13** および 1 級アミン **17** を用いて Chichibabin ピリジニウム合成を行うことで、四置換ピリジニウム **18** を構築した（Scheme 3）。この際、当研究室で確立された反応および溶媒条件（H_2O/CH_2Cl_2=1/6）[10]を適用することで、選択的に **18** を得ることに成功した。最後に酸性条件下で保護基を除去し、世界初の ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-desmosine **4** の合成を達成した。なお、**4** は HPLC による精製および減圧乾燥を行ったのちに、内部標準物質として用いた。

2．卵殻膜成分の酸加水分解処理

購入可能な粉末の卵殻膜 500 mg を出発原料として、6 規定の塩酸中で 100℃の条件下、24 時間撹拌することで、タンパク質やペプチドの加水分解処理を行った[8]。その際、あらかじめ濃度既知の ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-desmosine **4** を撹拌前に添加することによって、実験誤差をなくした。その後、撹拌後に得られた溶液をセルロースカラムに供してろ過することで、不純物を除去した。溶出した溶液を窒素ガスによって除去し、卵殻膜の乾燥物を得た。

3．同位体希釈 LC-MS/MS による desmosine の定量分析

上記で得られた乾燥物を溶液に溶かし、LC-MS/MS による分析を行った。まず LC の部分で他の夾雑物と目的の desmosine 類を分離することが可能である。次に、ESI によって、検出されるイオンのうち、desmosine **1** および isodesmosine **2** の分子量 *m/z* 526 付近に相当するイオンだけを選択的に四重極中で分離を行う。つづいて、そのイオンに対してアルゴンガスの照射による特異的なフラグメンテーションを起こすことによって、desmosine **1** および isodesmosine **2** 特有の分解物のイオンを検出した。この際、濃度既知の ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-desmosine **4** のピークを基準とすることで、**1** および **2** それぞれの量を算出することが可能であった。

これまでのところ、Figure 3 のように主として 3 つのピークが検出されており、これらは保持時間の早い順に、neodesmosine **3**、isodesmosine **2**、desmosine **1** であることが判明した。最終的な定量分析は現在推進中であるが、卵殻膜中の desmosine **1**、isodesmosine **2**、neodesmosine **3** を LC-MS/MS によって世界で初めて観測することに成功した。

■ 考 察

これまでの研究において、生合成模倣反応である Chichibabin ピリジニウム合成による ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-isodesmosine の合成には成功していた[9]。最近になって、desmosine 型化合物の選択的な合成に成功した[10]ため、本研究で遂行したところ、首尾よく目的の ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-desmosine 4 の合成を達成した。また、卵殻膜の酸加水分解処理については、臨床の血液試料の処理法[8]を参考に行ったところ、とくに困難な点はなく遂行できた。そして、卵殻膜の加水分解処理を施した試料に対して、同位体希釈 LC-MS/MS 法を適用することによって、目的の desmosine **1**、isodesmosine **2** だけでなく、以前より報告されていた neodesmosine **3** を観測することにも成功した。これらの結果は、卵殻膜含有のアミノ酸・ペプチドの研究に画期的な成果といえる。

■ 要 約

本研究では、卵殻膜中に含まれるとされる desmosine **1**、isodesmosine **2** に着目し、当研究室独自の同位体希釈 LC-MS/MS による分析を試みた。有機合成化学を駆使することで同位体標識体 ［$^{13}C_3$,$^{15}N_1$］-

desmosine **4** の合成に成功し、これを内部標準物質とした LC-MS/MS 分析を展開した。すると、desmosine **1**、isodesmosine **2** だけでなく、以前より報告されていた neodesmosine **3** の観測にも成功した。このように本研究の遂行によって、これまで長い間不明瞭であった卵殻膜中の desmosine 類の存在が、同位体希釈 LC-MS/MS 法によって世界で初めて明らかとなるという重要な成果を得た。

■ 文 献

1) S. Makkar, R. Liyanage, L. Kannan, B. Packialakshmi, JO. Lay Jr, NC. Rath. 2015. Chicken Egg Shell Membrane Associated Proteins and Peptides. *J. Agric. Food Chem.* 63：9888-9898.
2) 芦田均．2017．抗糖尿病効果をもつ卵殻膜に含有する新規活性ペプチドの単離とその作用機序解明．平成 29 年度旗影会特別助成報告書
3) L. Debelle, AM. Tamburro. 1999. Elastin：molecular description and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31：261-272.
4) J. Thomas, DF. Elsden, SM. Partridge. 1963. Degradation Products from Elastin：Partial Structure of Two Major Degradation Products from the Cross-linkages in Elastin. *Nature.* 200：651-652.
5) Y. Nagai. 1983. ウシ項靭帯エラスチンに含まれる新ピリジニウム誘導体. *Conn. Tissue.* 14：112.
6) RM. Leach Jr, RB. Rucker, GP. Van Dyke. 1981. Egg shell membrane protein：a nonelastin desmosine/isodesmosine-containing protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 207：353-359.
7) R. Suzuki, H. Yanuma, T. Hayashi, H. Yamada, T. Usuki. 2015. Syntheses of Natural and Deuterated Desmosines via Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Tetrahedron* 71：1851-1862.
8) S. Ma, G. M. Turino, T. Hayashi, H. Yanuma, T. Usuki, Y. Y. Lin. 2013. Stable Deuterium Internal Standard for the Isotope-Dilution LC-MS/MS Analysis of Elastin Degradation. *Anal. Biochem.* 440：158-165.
9) T. Tanigawa, A. Komatsu, T. Usuki. 2015. [$^{13}C_3$, $^{15}N_1$] -Labeled Isodesmosine：a Potential Internal Standard for LC-MS/MS Analysis of Demosines in Elastin Degradation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25：2046-2049.
10) N. Tanaka, M. Kurita, Y. Murakami, T. Usuki. 2018. Chichibabin and IsoChichibabin Pyridinium Syntheses of Isodesmosine, Desmosine, and their Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* 21：6002-6009.

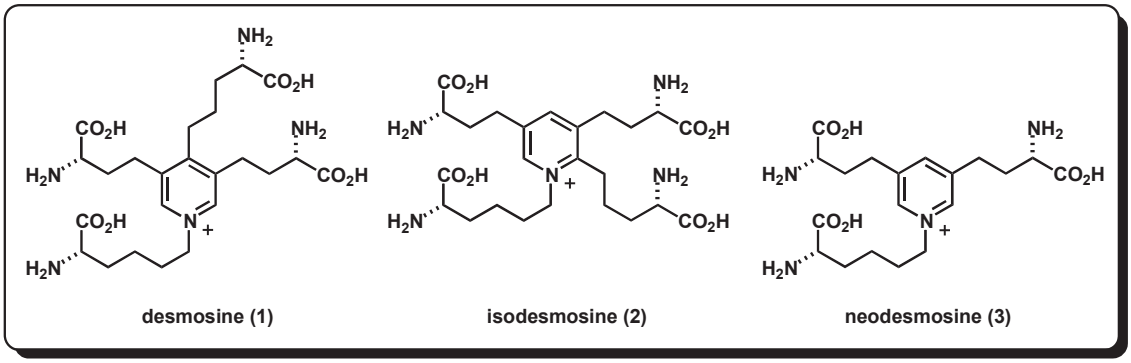


Figure 1. Chemical structures of desmosine (1), isodesmosine (2), and neodesmosine (3).

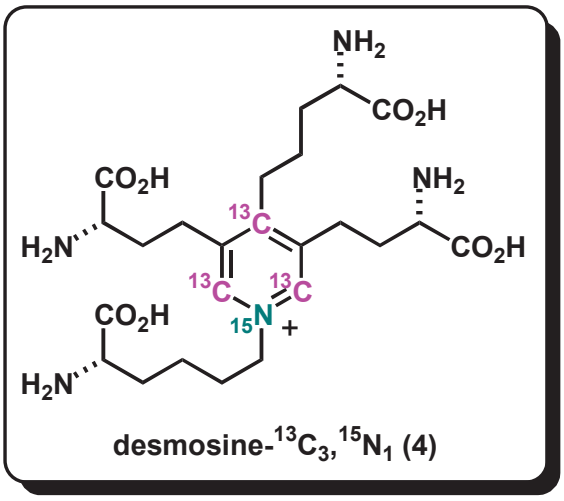


Figure 2. Chemical structures of desmosine-$^{13}C_3$, $^{15}N_1$ (4).

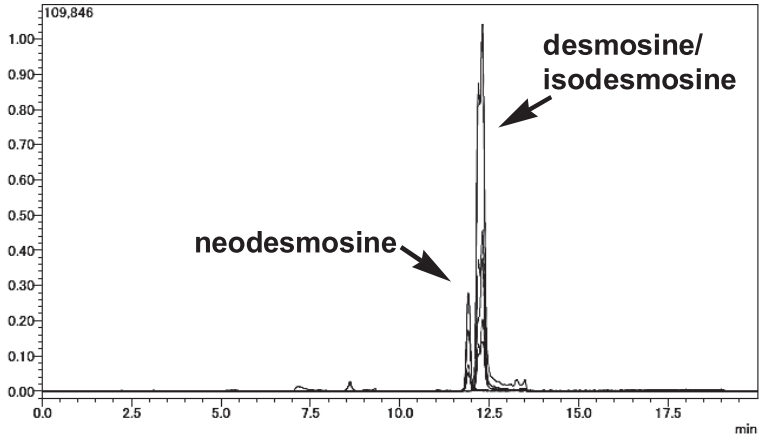
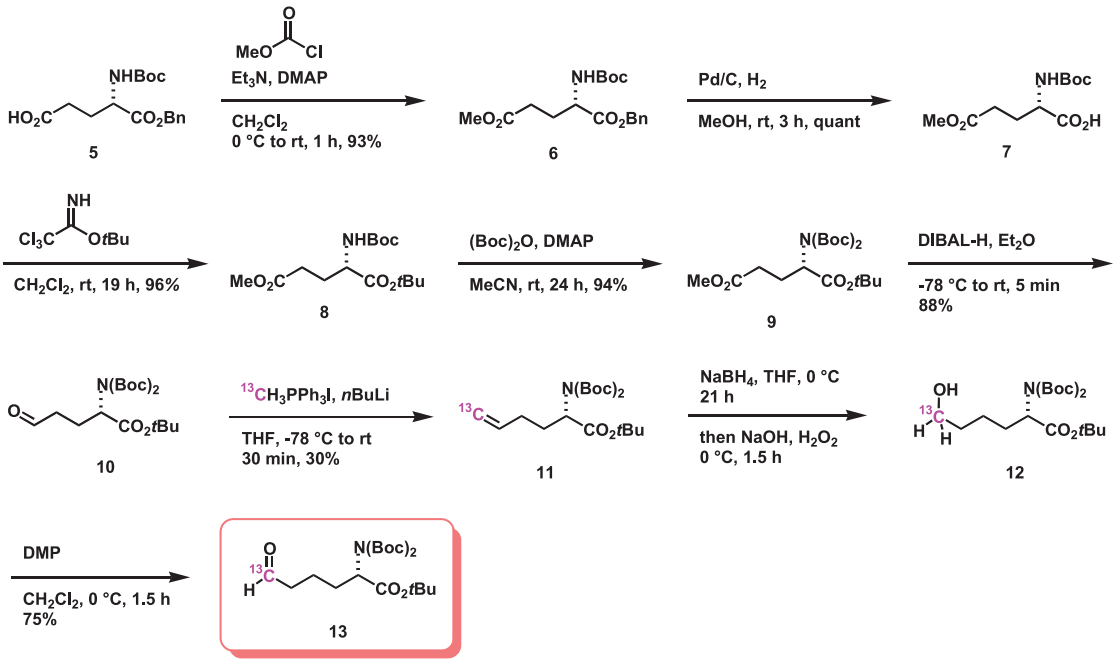
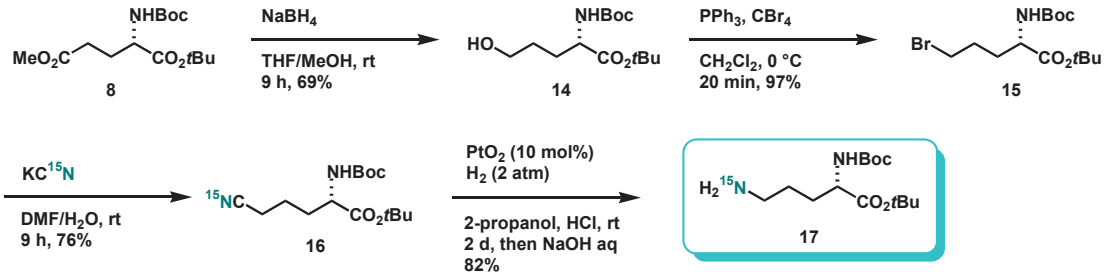


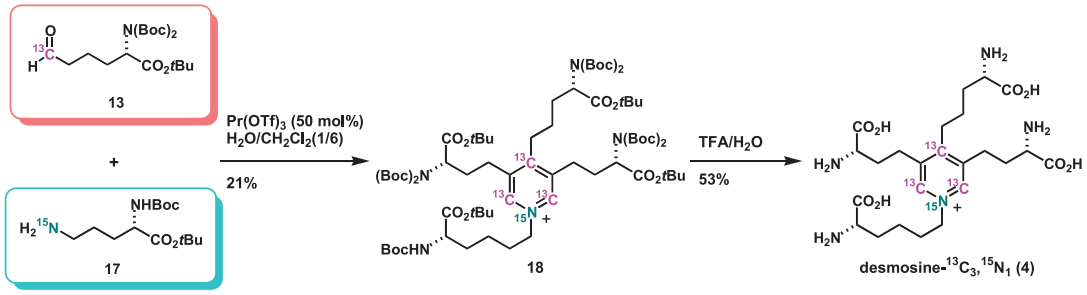
Figure 3. LC-MS/MS chromatogram.



Scheme 1. Synthesis of 13.



Scheme 2. Synthesis of 17.



Scheme 3. Synthesis of 4.