

博士学位論文審査要旨

2019年2月14日

論文題目： 含フッ素ベンズアルデヒド類を用いたアミノ酸と生体アミンのキラル分析および一斉分析手法の開発

学位申請者： 濱口 尚斗

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 太田 哲男

副査： 生命医科学研究科 准教授 大江 洋平

副査： 理工学研究科 教授 水谷 義

要 旨：

アミン類やアミノ酸の簡便な分析は工業的に有用である。さらに、生体内で重要な役割を果たしている生理活性化合物も多いため、医療や健康診断でも将来性があり、手軽かつ短時間分析や混合物の分析が求められている。そこで、本論文では、フッ素原子を含む新しい分子プローブを開発し、 ^{19}F -NMRによるアミン類やアミノ酸の分析手法の開発に取り組んでいる。

第一章では、アミノ酸エステルとフッ素プローブ、キラル誘導化剤として入手容易な(S)-BINOLを適切な条件下で反応させることにより目的化合物のイミノボロン酸エステルが得られ、その混合物を ^{19}F -NMRにより分析することで13種のアミノ酸誘導体の光学純度の決定が可能となることを見出した。これは新たなキラル分析手法の確立であり、本手法により3種のアミノ酸誘導体の混合物における各々の光学純度を一度に決定することを可能とした。

第二章では、フッ素を含むベンズアルデヒド誘導体をプローブ分子として用い、アミン類を反応させた後、混合物を ^{19}F -NMRにより分析することで、6種の生体アミンを一度に定性的に分析することを可能とした。また、混合物の生体アミンの定量分析も可能であることを示した。

第三章では、第二章で用いた手法をアミノ酸分析にも適用できることを明らかにしている。さらに、その分析法を、食品や飲料中に含まれるアミノ酸などの定性分析に用い、飲料中のタウリンの定性分析や食品中のGABAの定性分析を可能とした。

第四章では、異なる電子状態のフッ素基を複数もつプローブ分子をアミン類と反応させ、その ^{19}F -NMRスペクトルを二次元的に解析するアミン類の分析を試みている。フッ素置換基とトリフルオロメチル基を同時に持つプローブ分子をデザイン・合成し、そのプローブ分子とアミン類を反応させ、生成物を ^{19}F -NMRにより分析した。二種類のフッ素原子の化学シフト値を二次元プロットすると、アミン類の分析のみならず、大まかな構造上の特徴を含むアミンの分類分析の可能性を示した。これにより、第二章、第三章の手法では分析が困難であった構造の類似したアルキルアミン類などの分析が可能であることを示した。

以上のように、本研究では、新しい含フッ素ベンズアルデヒド類を用いることで ^{19}F -NMR による生体アミンおよびアミノ酸のキラル分析および一斉分析手法が確立された。本研究成果は、工業的のみならず新たな分析手法の開拓として学術的にも価値あるものと認められる。よって、本論文は、博士（工学）（同志社大学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2019年2月14日

論文題目： 含フッ素ベンズアルデヒド類を用いたアミノ酸と生体アミンのキラル分析および一斉分析手法の開発

学位申請者： 瀧口 尚斗

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 太田 哲男

副査： 生命医科学研究科 准教授 大江 洋平

副査： 理工学研究科 教授 水谷 義

要 旨：

本論文提出者は、2010年4月生命医科学部入学の後、2014年4月本学大学院生命医科学研究科博士課程（前期課程）に進学、さらに2016年4月より博士課程（後期課程）に在学している。各年度において優れた研究成果を挙げ、英語の語学試験に合格し十分な能力を有すると認定されている。また、「生物情報学深論」「プロジェクト特別演習B」の2科目4単位を修得しており、これまでの特殊研究を履修している。

論文の主たる内容は、*Chirality* に公表（2019年1月、Volume 31、頁34-40）している。さらに、国際会議に加えて多くの国内学会にも積極的に参加し、高い評価を得ている。

2019年1月12日午後5時より約1時間20分にわたり提出論文に関する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され、種々の質疑討論がなされたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。

さらに講演会終了後、審査委員により論文内容ならびにこれらに関連する諸問題について口頭試問を実施した結果、本論文提出者は研究者として十分な学力を有することが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目：含フッ素ベンズアルデヒド類を用いたアミノ酸と生体アミンのキラル分析および一斉分析手法の開発

氏名：瀧口 尚斗

要旨：

アミノ酸は、自然界に豊かに存在し、タンパク質の構成原料であるだけでなく、各種の情報伝達を担うなどさまざまな生理機能をもつ。同様に、生体アミン類は、生体内に広く存在し、細胞増殖や、神経伝達物質であるとともに、ときに生体に害をなすことが知られている。そのためこれらの物質は、化学はもとより医学、薬学、食品衛生学等の幅広い分野において、現在においても重要な研究対象であり、あらゆる側面からの興味は尽きない。先人らの努力により、新たな蛍光、化学発光等の高感度検出法や新たな分離技術の開発や質量分析等の網羅的分子検出法の発展とともに、アミノ酸および生体アミンの生理機能が明らかにされてきたが、さらなる生命機能の解明に向けて、アミノ酸および生体アミンさらにはそれらの代謝産物も含む網羅的な分析手法の開発が望まれる。一方で、有機合成化学の分野では、L-アミノ酸をビルディングブロックとした光学異性体の合成や、生体内で異なった生理活性を示す可能性をもった光学活性化合物の合成など医薬品等のファインケミカルの開発にとっては欠かすことはできない。また、そのような開発の過程において、最終生成物や中間体の光学純度の決定は非常に重要である。

従来のアミノ酸およびアミノ酸誘導体の構造決定法として、酵素の特異性を利用した酵素法、キラルな試薬を用いてジアステレオマーに誘導させるキラル誘導体化法、さらには、光学異性体を認識できる固定相を用いた方法が挙げられる。また、アミノ酸および生体アミンの一斉分析法としては、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC, RP: Reversed Phase)による分離と電気化学検出法 (ECD: Electrochemical Detector)を組み合わせた HPLC-ECD 分析や、蛍光プレラベル化 HPLC 分析法が広く利用されている。

一方で、近年 $^{19}\text{F-NMR}$ を用いた生体関連分子の一斉分析法に関しても盛んに研究されている。 $^{19}\text{F-NMR}$ は幅広いシフト領域を有しており非常に分離能が良いのが特徴で、同位体の影響もなく ^1H と同等の感度を有している。また生体内は ^1H を含む有機分子で溢れているが、 ^{19}F をもつ有機分子は基本的に存在していない。このような利点は、生体試料の分析を行う上で非常に好ましい。

そこで、本論文には、生命機能の解明だけでなく、新たな創薬合成の一助となるような $^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸および生体アミンのキラルおよび一斉分析手法の開発に取り組んだ結果を記した。

本論文は、序論に続く全四章から構成されている。第一章では、含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸類を用いたキラルアミンおよびアミノ酸誘導体の $^{19}\text{F-NMR}$ によるキラル分析手法の検討と一斉分析への応用について述べた³¹⁾。第二章および第三章では、含フッ素ベンズアルデヒド類を用いた生体アミンおよびアミノ酸の $^{19}\text{F-NMR}$ による一斉定量分析の検討について述べた。最終の第四章では、二つのフッ素リポート基をもつ *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide を分子プローブとして用いる、アミン類の $^{19}\text{F-NMR}$ による二次元的な一斉分析について報告する。

第一章 $^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸誘導体のキラル分析

生体内にはアミノ酸をはじめ、糖や生体アミンなど不斉炭素原子を有するキラルな化合物が数多く存在している。こういったキラル化合物は立体選択性を除く化学反応性や旋光性を除く物理的物性は等しいが、生体内での作用が大きく異なる場合がある。このことから、キラル化合物の容易な光学純

度の決定は、創薬合成や現代の有機合成分野さらには医学において非常に重要である。一方で、近年、新たな生体試料の分析法として¹⁹F-NMRを利用した分析手法が盛んに研究されているが、複数のキラルなアミン類やアミノ酸誘導体の光学純度を混合物中から¹⁹F-NMRにより一斉に決定した例はこれまでに報告されていない。

本章では、*o*-ホルミルボロン酸、キラルジオールおよびキラル第一級アミンを用いた三成分の自己集成的なNMR分析による光学純度の決定法 (James-Bull 法) を¹⁹F-NMR分析に適用し、未開拓な分野であった James-Bull 法に基づく¹⁹F-NMRによるアミノ酸誘導体の光学純度の決定手法の開発および、一斉分析への適用について報告する。

本手法は、キラル誘導化剤として安価で入手容易な(S)-BINOL、フッ素誘導体化剤として5-fluoro-2-formylphenyl boronic acidを用い、triethylamine および4A シーズ存在下、CDCl₃中で室温、10分で対象化合物と攪拌することで、対象化合物のイミノボロン酸エステル化が進行し、その混合物を¹⁹F-NMRにより分析することで13種のアミノ酸誘導体の光学純度の決定が可能となり新たなキラル分析手法を確立した。また、本手法により初めて混合物中から¹⁹F-NMRにより3種のアミノ酸誘導体の光学純度を一度に決定することを可能とした。

第二章 ¹⁹F-NMRによる第一級アミン類の一斉分析

動植物・微生物を問わず、広く生体内に存在するアミン類を生体アミンという。生体アミンはその構造から、カテコール骨格をもつカテコールアミン、インドール骨格をもつインドールアミン、モノフェノール骨格をもつモノフェノールアミン、またアミノ基を二つ以上もつポリアミンに分類される。生体アミンの多くは、神経伝達物質として、あるいは体液中に分泌されて神経ホルモンとして様々な生理機能の調整にかかわっている。また、ヒトに限らず、生体内で産生される生体アミンは魚類や食品の腐敗の指標として扱われるだけでなく、アレルゲンとして人体に害をなすこともあるため、それらの定量的な分析はとくに食品を扱う場合には重要である。一方で、生理活性化合物の¹⁹F-NMRによる分析手法では、分離を必要とせず、簡便な前処理での一斉分析が可能となる。しかしながら、報告されている生理活性化合物の¹⁹F-NMRによる一斉分析手法のほとんどは金属錯体を用いた手法である。

本章では、そのような高価な遷移金属錯体を用いない有機反応的なアプローチとして生体アミン類のアミノ基をイミノ基に変換するとともに、フッ素を導入することで化学シフト値の変化を利用して¹⁹F-NMRによる一斉定性分析手法および一斉定性分析への適用について報告する。

本手法は、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehydeをプローブ分子として用い、triethylamine および内部標準である4-bromofluorobenzene存在下、対象アミン類をCD₃OD中、室温で1.5時間反応させた後、この混合物を¹⁹F-NMRにより分析する。本手法を用いることで、6種の生体アミンを一度に定性的に判別することを可能とした。また、測定対象の生体アミンの検量線を予め作成しておくことにより、混合物中から対象の生体アミンの定量分析も可能であることを明らかにした。

第三章 ¹⁹F-NMRによるアミノ酸の一斉分析

生体アミンの多くはアミノ酸を前駆物質とする代謝過程を経て生体内で産生される。したがって、生体アミンの生理機能の解明には生体アミンそのものだけではなく、その前駆物質であるアミノ酸も含めた一斉分析が求められる。また、尿中や血液中の特定のアミノ酸の定量分析は、アミノ酸代謝異常疾患などの早期治療に導くことが可能で、医学の分野でもアミノ酸の定量分析は非常に重要となる。

本章では、第二章で報告した手法のアミノ酸への適用について報告する。さらにその分析法を食品や飲料中に含まれるアミノ酸などの定性分析に関しても検討したので、その結果も合わせて報告する。

本手法は、前章と同様に、プローブ分子である4-fluoro-2-hydroxybenzaldehydeをtriethylamine および内部標準である4-bromofluorobenzeneと4種のアミノ酸をCD₃OD/NaHCO₃·Na₂CO₃緩衝液 (pH 10.0)混合溶液中、室温で1.5時間攪拌すると対応するイミン類が効率よく生成し、CsClを加えた後、¹⁹F-NMRにより分析することで4種のアミノ酸を一度に定性することを可能とした。また、本手法は飲料や食

品中の他の成分に影響することなくイミン類が生成され、本手法を用いることで、taurine 含有飲料中の taurine の定性分析や GABA 含有食品中の GABA の定性分析を可能とした。

第四章 第一級アミン類の二次元的な一斉分析

^{19}F -NMR による一斉分析手法において用いられるフッ素誘導体試薬の多くはフッ素基に対称性を有している。これは、シグナルが煩雑にならないように同じ化学シフト値を与え、かつ感度を向上させるためである。一方で、 ^{19}F -NMR による分析において二種の異なる化学シフト領域を用いたフッ素誘導体化試薬を用いる例はほとんどない。また、第二章、第三章で報告した手法では概ね良好な分離を見せるため、本手法がアミン類の一斉分析に十分に使用でき得ることを示せた。その一方で、直鎖状の脂肪族アミン類である *n*-butylamine と *n*-hexylamine のように構造が非常によく似ており、側鎖のわずかな鎖長の差しかないようなアミン類の識別は十分ではない。この NMR 分析で用いるプローブ分子が一種類ではなく二種類の含フッ素基を分子中に有し、各々のフッ素原子がアミンの構造的な特徴を別々に伝えることができれば、より詳細な構造情報が得られ、わずかな違いも捉えられると考えた。さらに、 ^{19}F -NMR による一斉分析手法でこのように二次元的な解析アプローチを用いる例は報告されていない。

本章では、異なるフッ素基をもつプローブ分子の ^{19}F -NMR スペクトルの二次元的な解析によってアミン類の判別を行う独自の解析戦略に基づいた新奇含フッ素ベンズアルデヒドの合成とその利用について報告する。

まず、二つの含フッ素基をもつプローブ分子として *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide をデザイン・合成した。続いて、そのプローブ分子とアミン類を CD_3OD 中、室温で 6 時間反応させ、対応するイミン類へと変換し、これらを ^{19}F -NMR により分析した。得られた ^{19}F -NMR シフトの二次元プロットを展開すると、アミン類の大まかな構造上の特徴のみならず鎖長や分岐・芳香族基の有無などを含む非常に詳細なアミンの構造的情報が抽出できることがわかり、これにより、第二章、第三章で報告した手法では分析が困難であった 4 種のアルキルアミン類の分類が可能であった。

総括

本研究では、様々な機能をもつ含フッ素ベンズアルデヒド類を用いることで ^{19}F -NMR による生体アミンおよびアミノ酸のキラル分析および一斉分析手法が確立された。本研究成果は、生体アミンおよびアミノ酸を中心とした幅広い研究分野の更なる発展に繋がるものであると確信している。