

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06824

研究課題名(和文) 光励起による in situ 活性種生成を利用した新規反応及び生体分子標識法の開発

研究課題名(英文) Development of novel phototriggered reactions and their application to biomolecule labeling

研究代表者

三代 憲司 (Mishiro, Kenji)

金沢大学・新学術創成研究機構・助教

研究者番号：60776079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では申請者が独自に合成法を確立した新規骨格の生理活性物質としての利用可能性開拓、及び物性を活かした新規有機化学反応の開発、分光分析的手法による検出法の開発を行い、それらの成果を統合し、疾患の診断および治療に有用な分子プローブ開発を行うことを目的とし研究を行った。生理活性物質については申請者が独自に開発した骨格を含む目的化合物の合成を達成し、細胞、動物レベルでの動態評価を行い、当該新規骨格を用いる医薬品化学に重要な知見を得た。また、反応開発については光のON/OFFで完全に反応の進行の制御が可能な新規反応開発に成功し、学会、論文発表を行った。

研究成果の概要(英文)：In this research we have accomplished two types of project using highly strained molecules. First project was the development of novel bioactive compounds having highly strained structure. We have succeeded to synthesis the desired product and analysed its activity and biodistribution using nuclear medicine method. We have obtained some important information for the medicinal chemistry using the strained structures. Second project was the development of novel phototriggered reactions using highly strained molecules. We have succeeded to develop a phototriggered dehydration condensation whose progress is completely controllable by ON/OFF states of the light irradiation. The result was published in Org. Lett. 2017, 4912.

研究分野：化学系薬学

キーワード：光化学反応

1. 研究開始当初の背景

分子プローブは一般的に生理活性物質骨格にプローブ構造を付与することで開発される。従来法ではプローブ化に伴う本来の活性低下が問題となる場合が多く、活性低下の懸念の少ないプローブ開発法が求められている。申請者はこれまでにいった研究背景から、プローブ機能、生理活性物質機能を兼ね備えた骨格が開発可能であると考え、そのような骨格を持つ化合物の合成、物性・生理活性評価、反応開発を行う本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究では申請者が独自に合成法を確立した新規骨格の生理活性物質としての利用可能性開拓、及び物性を活かした新規有機化学反応の開発、分光分析的手法による検出法の開発を行い、それらの成果を統合し、疾患の診断および治療に有用な分子プローブ開発を行うことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

申請者が独自に合成法を確立した骨格を含む生理活性物質を合成し、化合物を放射性標識後、脂溶性等の物性、及び細胞、動物を用いた活性、動態評価を行った。

また、申請者が独自に考案した光化学反応を起こすと期待できる化合物の合成、光活性化型反応剤としての機能評価を行った。

4. 研究成果

目的の生理活性物質及びその放射性標識体の合成を達成し、物性、活性、動態評価を行い、申請者らが見出した独自の骨格についての医薬品化学に関する重要な知見を得た。また、申請者が考案した光活性化型反応の開発を達成し、学会発表及び論文報告を行った。特に大きな進展があった光活性化型脱水縮合反応の成果について以下詳細を述べる。申請者はアミノシクロプロペノン4が有用な光活性化型脱水縮合剤としてはたらくと予測し、その検討を行った。まず図1に示す方法で種々の置換基を持つアミノシクロプロペノンの合成を試みた結果、多様なアミノシクロプロペノンの合成を行うことができた。

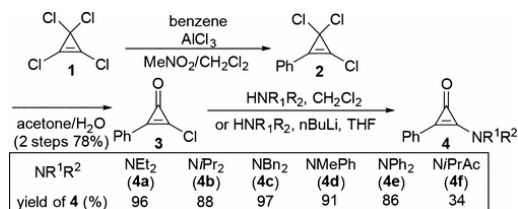


図1 種々の置換基を持つアミノシクロプロペノンの合成

合成したアミノシクロプロペノンは250-350nmに適度なUV吸収を持っており、UVB-UVA程度の紫外光で励起できることが

分かった。これらの化合物は可視光をほとんど吸収せず、通常の蛍光灯の照明下では安定に扱えることが確認できた(図2)。

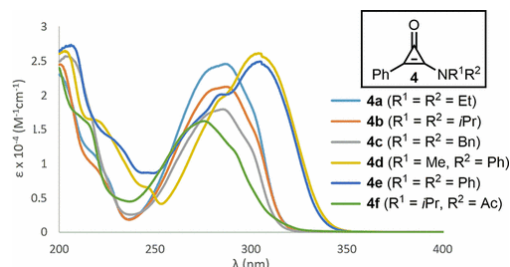
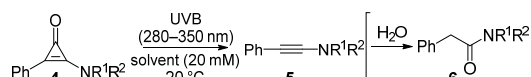


図2 種々の置換基を持つアミノシクロプロペノンのUVスペクトル

まず合成したアミノシクロプロペノンの光照射により反応活性種であるイナミンが発生できるかの確認を行った。その結果、合成したアミノシクロプロペノン4a-4f全てにおいてUVBにより活性化を受け、イナミンを生成することが分かった(表1)。

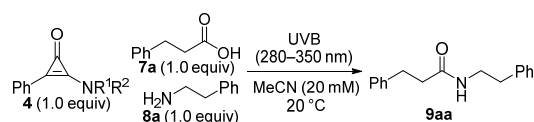


entry	NR ¹ R ²	solvent	time (h)	major product	yield (%) ^a
1	NEt ₂ (4a)	MeCN	3	-	decomp.
2		MeCN/water (1/1)	3	6a	54
3	NiPr ₂ (4b)	MeCN	2	-	decomp.
4		MeCN/water (1/1)	3	6b	65
5	NBn ₂ (4c)	MeCN	5	-	decomp.
6		MeCN/water (1/1)	5	6c	70
7	NMePh (4d)	MeCN	5	5d	85
8	NPh ₂ (4e)	MeCN	5	5e	92
9	NiPrAc (4f)	MeCN	2	5f	63

表1 アミノシクロプロペノンからのイナミン発生：^aNMR yield.

続いてアミノシクロプロペノン、カルボン酸、アミン共存下UVB照射を行い、系中で発生したイナミンを利用するカルボン酸とアミンの脱水縮合が可能か検討を行った(表2)。その結果エチル基やイソプロピル基のようなアルキル基が窒素に置換したアミノシク

ロプロペノンは比較的高収率で目的物を与え、芳香環やアシル基等電子求引性の置換基をもつものは逆に低収率、もしくは全く反応が進行しなかった。**表1**の実験から、全てのアミノシクロプロペノンからイナミンは発生しているはずであるため、この結果は発生したイナミンの反応性の違いによるものであると考えられる。



entry	NR ¹ R ²	time (h)	9aa yield (%) ^a	dark condition yield (%) ^a
1	NEt ₂ (4a)	3	57	1
2	NiPr ₂ (4b)	2	55	0
3	NBn ₂ (4c)	5	15	2
4	NMePh (4d)	5	30	0
5	NPh ₂ (4e)	5	14	0
6	NiPrAc (4f)	2	0	0

表2 アミノシクロプロペノンをを用いる光活性化型脱水縮合反応の検討：^aNMR yield.

本反応の想定メカニズムを**図3**に示す。アミノシクロプロペノン**4**の光励起による脱一酸化炭素によりイナミン**5**が発生し、カルボン酸**7**がイナミン**5**と反応し中間体**10**を生成、**10**のアミノリシスによって脱水縮合体**9**とイナミン水和体**6**が生成する。本メカニズムで反応が進行する場合、これらの複数のプロセスがうまくいくものほど高収率で最終生成物が得られる。**表2**においてアルキル置換基をもつものが高収率だったのはアミノ基の電子供与の強さが**5**から**10**、もしくは**10**から**9**が生成するプロセスの反応速度に重要であることを示唆している。

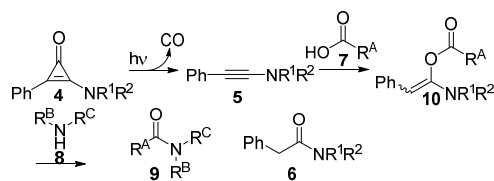


図3 想定反応メカニズム

表2、entry 1,3 にあるように、エチル基やベンジル基のような比較的立体障害の少ない置換基をもつアミノシクロプロペノンは光

の非照射下でもわずかであるが脱水縮合反応の進行が見られた。立体障害の少ないアミノシクロプロペノンでバックグラウンド反応が起こることから、**図4**に示すように、カルボン酸がアミノシクロプロペノンのアミノ基部分のイプソ位に求核攻撃を起こし、そこから **route A** もしくは **route B** のように反応が進行すると考えられる。

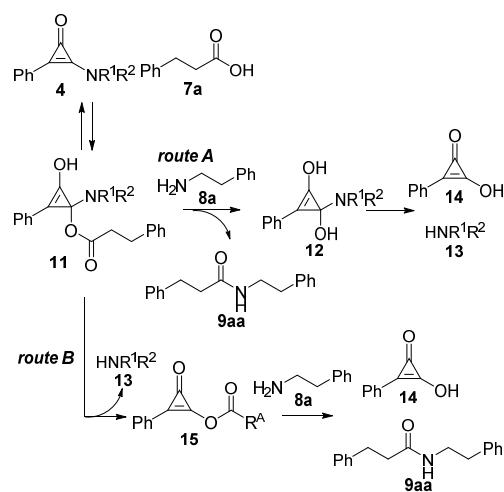
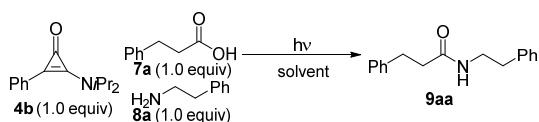


図4 バックグラウンド反応の想定メカニズム

今回の光反応開発では光の ON/OFF で制御可能な反応開発を目指すため、バックグラウンド反応が見られず収率も良好であったジソプロピルアミノ基が置換したアミノシクロプロペノン **4b** を最適構造として、さらに反応条件の最適化を行った (**表3**)。反応溶媒の検討から、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等の塩素系溶媒で最も良好な収率で脱水縮合生成物が得られることが分かった (entry 1-9)。収率が低い溶媒については、複数の副生成物が観測されたことから、反応中間体が更に光照射を受けて何らかの分解反応が進行したと考えられる。光による分解反応を抑えるため、反応濃度の向上や光の照射距離の延長により、穏やかな条件での光照射を試みた結果、いずれの場合も収率の向上が見られた (entry 10-12)。UVC で反応を試みた結果、UVB とほぼ同等の結果が得られた (entry 13)。0 °C 及び 40 °C でも 20 °C の場合とアミノシクロプロペノンの消失速度は変わらず、イナミンの発生過程は温度に依存しないことが分かった。0 °C の場合にやや収率が低下したのは、イナミン発生後の脱水縮合の速度が低下したためだと考えられる (entry 14-15)。以上の結果から **表3** entry 11 の条件を最適とし、様々なカルボン酸、アミンへの適用を行った (**図5**)。かさ高いカルボン酸やアミン、求核性の低いアニリン等も中程度以上の収率で得られ、本反応が広範な基質に適用できることが分かった。



entry	solvent	concn (mM)	temp (°C)	UV condition (lamp, distance ^a)	time (h)	yield (%) ^b
1	MeCN	20	20	UVB, 4 cm	2	55
2	MeCN/H ₂ O (1/1)	20	20	UVB, 4 cm	3	1
3	THF	20	20	UVB, 4 cm	2	39
4	1,4-dioxane	20	20	UVB, 4 cm	2	39
5	AcOEt	20	20	UVB, 4 cm	2	60
6	CH ₂ Cl ₂	20	20	UVB, 4 cm	2	80
7	CHCl ₃	20	20	UVB, 4 cm	2	80
8	1,2-dichloroethane	20	20	UVB, 4 cm	2	80
9	toluene	20	20	UVB, 4 cm	2	66
10	CH ₂ Cl ₂	40	20	UVB, 4 cm	2	85
11	CH ₂ Cl ₂	20	20	UVB, 8 cm	3	88
12	CH ₂ Cl ₂	40	20	UVB, 8 cm	5	85
13	CH ₂ Cl ₂	20	20	UVC, 4 cm	4	84
14	1,2-dichloroethane	20	40	UVB, 8 cm	3	87
15	CH ₂ Cl ₂	20	0	UVB, 8 cm	3	77

表 3 反応条件の検討: ^a Distance between the lamp and the reaction vessel. ^b NMR yield.

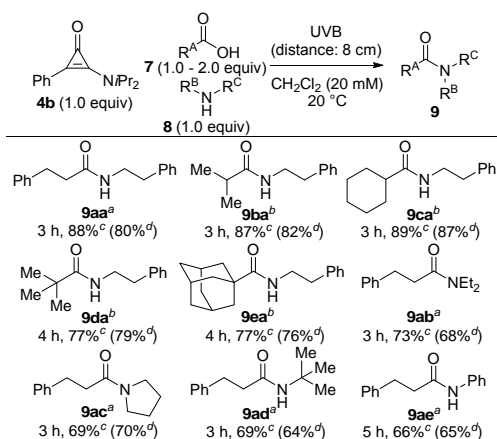


図 5 様々な基質への適用: ^a 1.0 equiv carboxylic acid was used. ^b 2.0 equiv carboxylic acid was used. ^c NMR yield. ^d Isolated yield.

続いて、反応の詳細を調べるため NMR による反応追跡を行った。反応は NMR チューブ中で行い、30 分光照射、24 時間暗所環境を繰り返し、光照射前後での反応進行を NMR で確認した (図 6)。その結果、光の照射時のみ脱水縮合が進行し、暗所環境では全く反応が進行しないことが分かった。光の照射直後の NMR 測定で、反応中間体であるイナミンやアシルオキシエナミンは全く観測されなかったことから、これらの化学種は発生後即座に反応を起こすと考えられる。以上のことより、本反応は光の ON/OFF によって反応の進行が完全に制御できることが分かった。

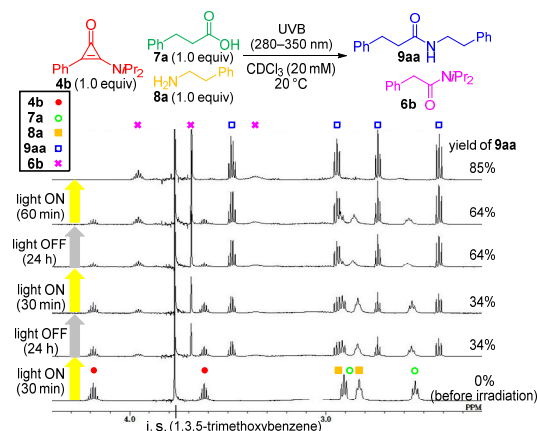


図 6 NMR による反応モニタリング

光の ON/OFF で進行の制御が可能な脱水縮合反応はこれまでに報告がなく、本反応が世界初の例である。20mM という低濃度環境でも即座に反応が完結することから、本反応は生体分子の化学修飾などにも有用だと期待できる。また、本反応で活性種として用いているイナミンは、高い反応性をもつことが知られながら非常に不安定で扱いづらいことから近年では殆ど用いられないが、本反応で用いた手法を用いれば安定なアミノシクロプロペノンの光励起により系中で簡便に高反応性のイナミンを発生できるため、イナミンを用いる未開拓な反応開発にも繋がると期待できる。これらのことについては引き続き研究を行っていく。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

K. Mishiro*, Y. Yushima, M. Kunishima.
Phototriggered Dehydration Condensation using
an Aminocyclopropanone. *Org. Lett.* 19 (18),
4912-4915 (2017)

[学会発表](計 1 件)

湯島悠貴, 三代憲司, 国嶋崇隆 "アミノシク
ロプロペノンを用いる光活性化型脱水縮合
反応の開発" 日本薬学会第 137 年会, 2017 年
3 月 24-27 日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三代 憲司 (MISHIRO, Kenji)
金沢大学・新学術創成研究機構・助教
研究者番号: 60776079