

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13266

研究課題名(和文) 生体内イメージングを指向した第三周期元素架橋型セレンテラジン類の創製

研究課題名(英文) Toward development of sulfur- or phosphorus-bridged coelenterazines derivative for in vivo imaging

研究代表者

西山 義剛 (NISHIYAMA, Yoshitake)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：90755357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、実用的な近赤外生物発光系の開発を目指し、第三周期元素で架橋された新たなセレンテラジン類縁体の合成法の開発を検討した。その結果、ホスホン酸ジチオエステルに対して Grignard 反応剤を順次作用させることで、炭素-リン結合を1つずつ形成し、さまざまなホスフィンオキソド類を合成することに成功した。また、ホスフィン酸チオエステルに対してベンジル Grignard 反応剤を作用させたときには、炭素-硫黄結合が選択的に形成でき、種々のベンジルスルフィド類を合成できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた生物の中を可視化するための技術を開発するべく、セレンテラジンと呼ばれる発光基質に対して、リンや硫黄などの第三周期元素を架橋部位として導入することを計画した。本研究では、リンや硫黄を炭素に導入する新しい手法の開発に成功し、この手法を利用することで、リンや硫黄で架橋された化合物群を合成できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have studied on new synthetic methods of coelenterazine analogues bridged with a phosphorus or a sulfur in order to develop a near-infrared bioluminescence system. As the results, we found that sequential treatment of phosphonodithioic acid dithioesters with two Grignard reagents enabled the stepwise introduction of different carbon substituents on the phosphorus atom. We also found that treatment of phosphinic acid thioesters with benzyl Grignard reagents resulted in a substitution reaction at the sulfur atom to give a variety of benzyl sulfides.

研究分野：有機合成化学

キーワード：セレンテラジン 生物発光 リン 硫黄 環化反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象を理解するためには、その現象を司る生体分子の分布や挙動を知ることが非常に重要である。セレンテラジン類の生物発光は、リアルタイムで高感度にて標的の分子を検出できるイメージング技術として古くから注目されてきた。セレンテラジンはルシフェリンの一種であり、これがルシフェラーゼの触媒作用によって酸化されると、その際に発生するエネルギーが効率的に光となって放出される。生物発光では外部からの励起光を必要としないため、蛍光分析法で問題となるバックグラウンドの値を十分に小さくすることができ、検出感度を 10–1000 倍程度にまで向上させることができる。さらに、ルシフェリンは一度発光すると失活し、発光できない化合物へと変換されるため、励起光照射下において発光し続ける蛍光分析と比較して経時変化を追跡しやすくなる。

分光法として優れた性質を有する生物発光を、生体を透過することのできる長波長領域において利用しようとする研究は以前から試みられている。たとえば、下村、岸らは、セレンテラジンにビニレン鎖を導入し、共役長を伸長した ν -セレンテラジンを開発した。セレンテラジン自体は、複数の天然ルシフェラーゼの基質となるが、本化合物は、ウミシイタケ由来 *Renilla* ルシフェラーゼを選択することでルシフェリンとして認識され、最大 40 nm 程度の長波長シフトが見られる。さらに、Gambhir らは、酵素側の改変を組み合わせることによりさらなる長波長化を達成し、生きたマウスでのイメージングにも成功している。しかし、現時点でも最大発光波長は 547 nm であり、生体透過可能な領域での発光は数パーセントに限られる。このような背景のもと、効率的な生体内イメージング法を実現するべく、より長波長で発光可能なセレンテラジン類の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

1. に述べた背景のもと、私は、長波長領域で発光する新たなセレンテラジン類縁体の開発を念頭に、長波長シフトに有効なリン原子などの第 3 周期元素をセレンテラジンの構造中に組み込み、架橋型の構造を構築することを考えた。これを実現するために、複雑な環構造の構築にも利用できるように、炭素原子と第 3 周期元素とを効率良く形成する反応が必要であると考え、これを開発することを本研究の目的とした。

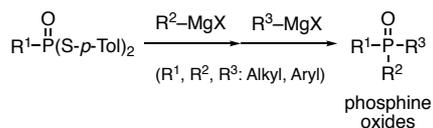
3. 研究の方法

従来の炭素-リン結合の形成は、リン原子上に良い脱離基であるクロロ基を有する求電子剤ばかりが利用されていた。この求電子剤は、求核剤に対する反応性が高い一方で、水やシリカゲルなどに不安定であるといった問題があった。これに対して、私は、中程度の脱離能を有する置換基をリン原子上に配置すれば、十分な反応性を有し、かつ取り扱いのしやすいリン求電子剤を開発できると着想した。具体的には、適度に脱離しやすいチオ基をリン原子上に配置した化合物を合成し、これに対する求核攻撃を種々検討することとした。

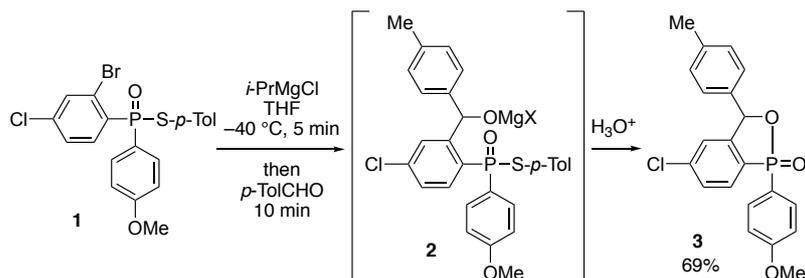
4. 研究成果

(1) ホスホン酸ジチオエステルを利用したホスフィンオキシドの合成

リン原子上の脱離基を検討した結果、*p*-トリルチオ基を有する有機リン化合物が、適度な安定性と反応性を兼ね備えたリン求電子剤として利用できることを明らかにした。とくに、リン原子上に 2 つの *p*-トリルチオ基を有するホスホン酸ジチオエステルに対して、2 種の Grignard 反応剤を順次作用させていくことで、さまざまなホスフィンオキシド類を合成できることを明らかにした (右図)。

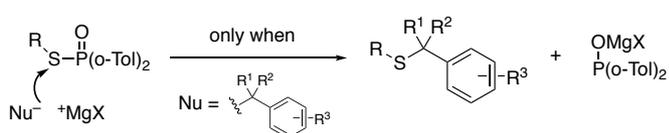


また、リン-硫黄結合が安定であることを利用し、リン架橋部位を有する化合物の合成への応用にも成功した。具体的には、オルト位にブロモ基を有するフェニル基を有するホスフィン酸チオエステル **1** に対して、イソプロピル Grignard 反応剤を作用させることで、リン-硫黄結合を保ったままハロゲン-マグネシウム交換反応を行い、これに対してアルデヒドを作用させることで生じたアルコキシド **2** においてチオ基を脱離基とする環化反応が進行し、環状ホスフィン酸エステル **3** を与えた。



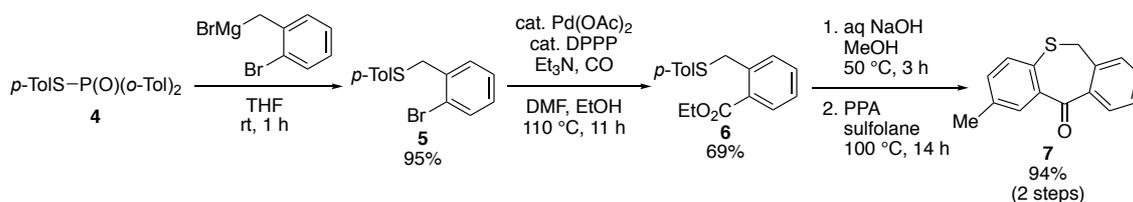
(2) ベンジルスルフィドの合成

(1) の研究を行っていくなかで、ホスフィン酸チオエステルに対してベンジル Grignard 反応剤を作用させたときのみ、硫黄原子上に求核剤由来の炭素置換基が導入された化合物が



得られることが明らかになった (上図)。本反応は、リン原子上での求核攻撃と引き続きリガンドカップリングや、ラジカル機構での反応も想定されるが、種々検証した結果、いずれの機構を支持する結果が得られなかったことから、ベンジリアニオンの直接的な硫黄原子上への求核攻撃によって進行していると考えられる。本反応は、硫黄原子上の置換基やベンジル基上の置換基を変更しても効率良く進行し、種々のベンジルスルフィド類を合成できることが明らかになった。

また、本反応を利用することで、硫黄架橋した化合物の合成にも成功した (下図)。ホスフィン酸チオエステル **4** に対して、*o*-ブロモベンジルマグネシウムブロミドを作用させたところ、ブロモ基を損なうことなくベンジルスルフィド **5** を得ることができた。その後、パラジウム触媒を利用した一酸化炭素の挿入を行うことでエステル **6** を得た後に、エステルの加水分解と分子内 Friedel-Crafts 反応を行うことで、環状スルフィド **7** を合成することができた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Suguru Yoshida, Tomoko Kuribara, Harumi Ito, Tomohiro Meguro, Yoshitake Nishiyama, Fumika Karaki, Yasutomo Hatakeyama, Yuka Koike, Isao Kii, Takamitsu Hosoya, A facile preparation of functional cycloalkynes by an azide-to-cycloalkyne switching approach, *Chemical Communications* **2019**, *55*, pp. 3556–3559. (査読あり)
DOI: 10.1039/C9CC01113G
- ② Yoshitake Nishiyama, Yoshihiro Misawa, Yuki Hazama, Kazuhiro Oya, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Synthesis of Diverse 3-Azido-5-(azidomethyl)benzene Derivatives via Formal C-H Azidation and Functional Group-Selective Transformations, *Heterocycles* **2019**, *99*, pp. 1053–1072. (査読あり)
DOI: 10.3987/COM-18-S(F)72
- ③ Suguru Yoshida, Junko Tanaka, Yoshitake Nishiyama, Yuki Hazama, Takeshi Matsushita, Takamitsu Hosoya, Further enhancement of the clickability of doubly sterically-hindered aryl azides by *para*-amino substitution, *Chemical Communications* **2018**, *54*, pp. 13499–13502. (査読あり)
DOI: 10.1039/C8CC05791E
- ④ Yoshitake Nishiyama, Shuhei Kamada, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Generation of Arynes by Selective Cleavage of a Carbon-Phosphorus Bond of *o*-(Diarylphosphinyl)aryl Triflates Using a Grignard Reagent, *Chemistry Letters* **2018**, *47*, pp. 1216–1219. (査読あり)
DOI: 10.1246/cl.180555
- ⑤ Yoshitake Nishiyama, Yuki Hazama, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Synthesis of Unsymmetrical Tertiary Phosphine Oxides via Sequential Substitution Reaction of Phosphonic Acid Dithioesters with Grignard Reagents, *Organic Letters* **2017**, *19*, pp. 3899–3902. (査読あり)
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01796

[学会発表] (計 19 件)

- ① 西山義剛、徳永直也、吉田優、細谷孝充、アライン中間体を利用した 9-ホスファチオキサントン類の効率的合成法の開発、日本薬学会第 139 年会、2019 年
- ② 西山義剛、有機リン化合物の求電子剤としての性質の探索～有用な合成化学的手法の開発を目指して～、第 92 回創薬科学セミナー、2018 年
- ③ Yoshitake Nishiyama, Shuhei Kamada, Yuki Hazama, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Selective Cleavage Reactions of Pentavalent Organophosphorus Electrophiles, The 14th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC14), 2018.
- ④ Yoshitake Nishiyama, Yuki Hazama, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Synthesis of Unsymmetrical Tertiary Phosphine Oxides via Sequential Substitution Reaction of

Phosphonic Acid Dithioesters with Grignard Reagents, 22nd International Conference on Organic Synthesis (22-ICOS), 2018.

- ⑤ 徳永直也、西山義剛、吉田優、細谷孝充、アライン中間体の反応性を利用した多彩な 9-ホスファチオキサントン類の簡便合成法の開発、第 29 回基礎有機化学討論会、2018 年
- ⑥ Yoshitake Nishiyama, Yuki Hazama, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Synthesis of Unsymmetrical Tertiary Phosphine Oxides via Sequential Substitution Reaction Using Stable Substrates with Thio Leaving Groups, International Symposium on Main Group Chemistry Directed towards Organic Synthesis (MACOS), 2018.
- ⑦ 西山義剛、リン原子に秘められた特性を引き出して活用する合成化学的手法の開拓、有機合成化学協会関東支部 平成 30 年度若手研究者のためのセミナー、2018 年
- ⑧ 西山義剛、鎌田修平、陌間由貴、吉田優、細谷孝充、有機リン化合物への Grignard 反応剤の選択的求核置換反応の開発、第 113 回有機合成シンポジウム 2018 年【春】、2018 年
- ⑨ 徳永直也、西山義剛、吉田優、細谷孝充、アライン中間体を利用する多彩な 9-ホスファチオキサントン類の効率的合成法の開発、第 75 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (千葉大シンポジウム)、2018 年
- ⑩ 西山義剛、鎌田修平、吉田優、細谷孝充、ホスフィンオキシドからのアライン発生法を利用した多置換芳香族化合物群の簡便合成法の開発、第 16 回次世代を担う有機化学シンポジウム、2018 年
- ⑪ 西山義剛、鎌田修平、吉田優、細谷孝充、炭素-リン結合の切断を利用したアライン発生法の開発と多置換芳香族化合物の合成への応用、日本薬学会第 138 年会(金沢)、2018 年
- ⑫ 西山義剛、三澤善大、陌間由貴、吉田優、細谷孝充、官能基選択的な連結反応を利用したジアジド化合物群の簡便合成法の開発、日本化学会第 98 春季年会(2018)、2018 年
- ⑬ 鎌田修平、西山義剛、吉田優、細谷孝充、ホスフィニルベンゾキノンへの 1,4-付加を利用した多置換アライン前駆体の簡便合成とその利用、日本化学会第 98 春季年会(2018)、2018 年
- ⑭ 徳永直也、西山義剛、吉田優、細谷孝充、アライン中間体を用いた 9-ホスファチオキサントン類の直接的合成法の開発、日本化学会第 98 春季年会(2018)、2018 年
- ⑮ 鎌田修平、西山義剛、吉田優、細谷孝充、炭素-リン結合の切断を経るアライン発生法の開発と多置換芳香族化合物の簡便合成への利用、第 44 回有機典型元素化学討論会、2017 年
- ⑯ 徳永直也、西山義剛、吉田優、細谷孝充、アライン中間体を利用した 9-ホスファチオキサントン類の簡便合成法の開発、第 47 回複素環化学討論会、2017 年
- ⑰ 西山義剛、陌間由貴、吉田優、細谷孝充、ホスフィン類およびスルフィド類の合成を指向したホスフィン酸チオエステルに対する求核置換反応、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017 年
- ⑱ 鎌田修平、西山義剛、吉田優、細谷孝充、多置換芳香族化合物の簡便合成を指向した炭素-リン結合の切断を経るアライン発生法の開発、第 34 回有機合成化学セミナー、2017 年
- ⑲ Yoshitake Nishiyama, Shuhei Kamada, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Generation of Arynes Triggered by Cleavage of a Carbon-Phosphorus Bond、第 2 回大津会議 合同研究発表会、2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

とくになし

6. 研究組織