

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K18148
 研究課題名(和文) Bhc基へのオレフィン導入による新しい光化学特性を持つ光分解性保護基の開発と応用

研究課題名(英文) Development of photolabile protecting groups having a novel photochemical property by introducing olefins to Bhc group

研究代表者
 鈴木 商信 (SUZUKI, Akinobu)
 東邦大学・理学部・研究員

研究者番号：30532105
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光分解性保護基であるBhc基へオレフィンを伸展させることで、新しい光化学特性を持つ光分解性保護基を開発した。私が開発した8位にアルデヒド基を持つBhc-ケージド酢酸に Wittig試薬を反応させることで、様々なオレフィン伸展型Bhc基を新たに合成することに成功した。光化学特性を調べた結果、全ての化合物が、450 nm以上に吸収を持ち、光分解効率₄₅₀は1.5～5.6程度と低いものの、元となるBhc基ではなし得ない450 nmでの光分解を引き起こした。以上の結果から、8位にアルデヒド基を持つBhc-ケージド酢酸を元に、新規な光分解性保護基を開発する戦略が確立できたと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 ケージド化合物は、照射により薬や生理活性物質の放出を、任意の場所、任意のタイミングで制御できる化合物である。ケージド化合物に使われる光分解性保護基は、分解させるための光の波長が異なるなど、光化学特性が異なる様々な保護基が存在することが望ましい。本研究では、8位にアルデヒド基を持つBhc基に対し、簡単な化学反応でオレフィンを伸展させることで、新しい光化学特性を持つ光分解性保護基を開発した。その結果、Bhc基とは異なる450 nmの波長で分解できるような、新規の光分解性保護基を多種多様に合成することができ、本研究の方法が新規の光分解性保護基の開発に応用可能なことが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed new photolabile protecting groups having a novel photochemical property by introducing olefins to 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl (Bhc) group. Using 8-formyl Bhc-caged acetic acid, which I had developed in previous study, and Wittig reagents, I synthesized a variety of olefin-extended Bhc groups. These olefin-extended Bhc acetic acids had slightly red-shifted absorption maxima around 390 nm compared to normal Bhc acetic acid which has the maximum at 370 nm. They also showed absorption over 450 nm and photolyzed by 450 nm light which never reacted with normal Bhc-caged acetic acid, although their photolysis efficiencies, ₄₅₀, were quite low, within a range of 1.5 to 5.6. These results suggested that olefin extension of 8-formyl Bhc-caged acetic acid is a powerful method to develop new types of photolabile protecting groups with a novel photochemical property.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：バイオテクノロジー 有機化学 脳・神経 光化学 ケミカルバイオロジー ケージド化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケージド化合物とは、生理活性分子を光分解性保護基で保護し、一時的にその活性を失わせた化合物である。光照射により光分解性保護基が外れ元の生理活性物質が放出されるため、生理活性物質の活性を任意の時間、任意の場所で制御することが可能である。そのため、ケージド化合物は、特に生物学の実験において世界中で多用されている。

ケージド化合物で用いられる光分解性保護基は、主にニトロベンジル型やクマリン型に大別され、光分解で用いられる波長は概ね 350 nm ~ 405 nm の紫外光である。光による細胞、組織への障害性や光の深部への到達性を考慮した場合、光分解で用いる波長は紫外光より長波長の光が望ましい。私が所属する研究室で開発された 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl 基 (Bhc 基)は、365 nm 付近に吸収極大を持ち、なおかつ 2 光子励起による 720 nm 以上の光での光分解が可能な光分解性保護基である。2 光子での光分解は、3 次元での精密な光分解の制御が可能である反面、励起確率はレーザー強度の 2 乗に比例するため 2 光子励起に対応した強力な光源が必要となり、通常の 1 光子励起と比較して実験設備の敷居が非常に高い。そのため、長波長の光による 1 光子励起で光分解が可能な光分解性保護基が求められていた。

紫外光よりも長波長で光分解が可能な光分解性保護基に関し、本研究の研究開始時における他の研究室からの報告を概説する。DEAC450 基は、Bhc 基と同じクマリン型の保護基であり、7-diethylaminocoumarin の 3 位に ethenyl 基を導入して共役系を伸展させた光分解性保護基として、Ellis-Davies 氏らのグループから報告された¹。DEAC450 基は 450 nm の青色光での光分解が可能であり、なおかつ 900 nm の赤外光による 2 光子励起での光分解が可能だが、論文で示されている。浦野氏らのグループからは、boron-dipyrromethene (BODIPY)を母核構造に持つ新しいタイプの光分解性保護基が報告され、BODIPY-caged histamine が 500 nm の緑色光で光分解しヒスタミンが放出されることが示された²。その後、同じく BODIPY を母核とするが光分解の切断位置が異なる光分解性保護基も、Winter 氏らのグループから報告されている³。

私は、本研究の開始前、Bhc 基の 8 位に機能性分子を導入することで、Bhc 基を用いたケージド化合物に特定の細胞への集積性、水溶性、細胞膜透過性等の機能を持たせる研究を行っていた。その研究過程において、8 位にアミノメチル基を導入することを目的とした合成経路の探索の過程で、8 位にアルデヒド基を持つ Bhc 基を開発した。本研究は、この化合物を研究のアイデアの元として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、8 位にアルデヒド基を持つ Bhc 基を元に、Bhc 基にオレフィンを伸展させることで、新しい光化学特性を持つ光分解性保護基を開発することである。アルデヒド基は、Wittig 反応等で容易にオレフィンを導入することが可能であり、Bhc 基にオレフィンを導入することで共役系が伸展した形となるため、より長波長の光を吸収するようになり、長波長での光分解が可能な光分解性保護基の開発に繋がることを期待された。また、8 位にアルデヒドを持つ 7-hydroxycoumarin 蛍光色素を 1,3,3-trimethyl-2-methylideneindole と反応させた化合物は、372 nm と 528 nm の光により光異性を引き起こすことが報告されており⁴、これを類似構造である 8 位にアルデヒド基を持つ Bhc 基に応用することで、光異性と光分解を組み合わせたような新しいタイプの光分解性保護基を開発できると期待された。このように、Bhc 基にオレフィンを伸展させることで、様々な種類の新規な光分解性保護基が開発可能なことを実証することが、本研究の最終的な目的となる。

3. 研究の方法

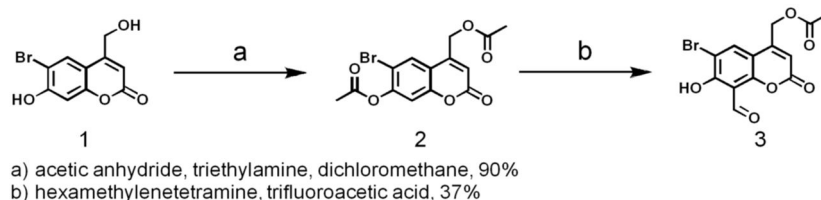
私が開発した 8 位にアルデヒド基を持つ Bhc-ケージド酢酸に対し、各種の Wittig 試薬を反応させることで、Bhc 基の 8 位にオレフィンが伸展したケージド酢酸を合成した。合成時点では光分解性を持つかどうかは不明であるが、便宜上ケージド酢酸と呼ぶこととする。続いて、これらの合成したオレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸の光化学特性を調べた。各化合物に関し 50% DMSO 含有 KMOPS 緩衝液を用いた溶液を調製し、化合物の紫外 - 可視吸収スペクトルを測定した。続いてその吸収スペクトルから照射する光の波長を決定し、光照射による光分解実験を行った。合成した化合物がケージド化合物として正しく分解した場合、光分解の反応で酢酸が放出されると共に、オレフィン伸展型 Bhc 基のアルコール体が生成する。オレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸をトリエチルアミン - メタノール中で脱アセチル化することでアルコール体を化学合成し、光分解後にアルコール体が生成されたかを比較検証した。

Wittig 試薬を用いて合成したオレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸は、全て 450 nm に吸収を持ち 500 nm には吸収を持たなかったため、結果として 450 nm の光を用いて光分解を行った。光未照射及び各時間光照射したサンプルを HPLC にて解析し、光照射時間とオレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸の残存率、及び予め測定した光強度から、光分解効率 Φ_{450} を計算した。また、化学合成したオレフィン伸展型 Bhc 基のアルコール体を HPLC にて解析し、光照射後の HPLC 結果と比較することで、光分解により酢酸が放出されているかを間接的に確認した。

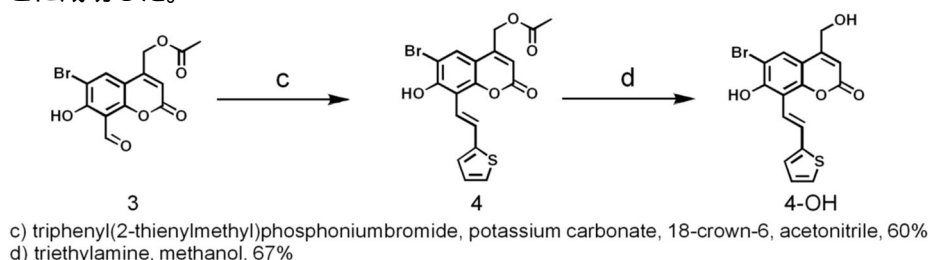
1,3,3-trimethyl-2-methylideneindole 及びその誘導体を反応させた化合物についても、上記の化合物と同様の実験を行い、合成と光化学特性の解析を行った。照射する光に関しては、合成した化合物の開環構造に由来する 550 nm 光を使用した。

4. 研究成果

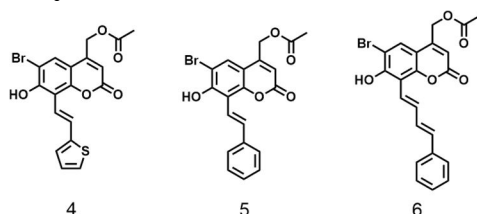
始めに、Bhc-methanol (1)を出発物質として8位にアルデヒドをもつケージド酢酸 (8-formylBhc-OAc, 3)を合成した。Bhc 基にアルデヒドを導入する過程でジアセチル (2)を経由する必要があるのだが、好都合なことに、反応後に得られる化合物が酢酸のケージド化合物として用いることができる形となっており、本研究ではこの8-formylBhc-OAc (3)をプラットフォームとして、各種のオレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸を合成した。



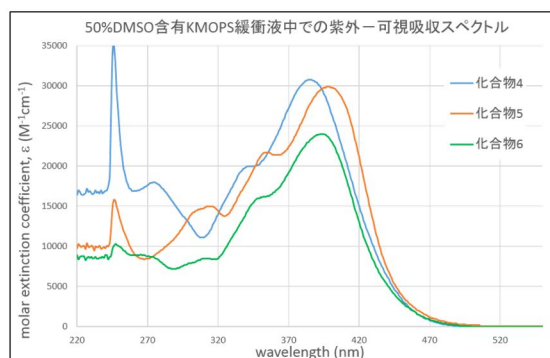
次に、8-formylBhc-OAc (3)に各種の Wittig 試薬を反応させることで、オレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸を合成した。一例を示すと、化合物 3 に、Wittig 試薬である triphenyl(2-thienylmethyl)phosphonium bromide を、炭酸カリウム及び 18-crown-6 存在下、アセトニトリル中で加熱することで、オレフィンが伸展した 8-(2-thienylethenyl)Bhc-ケージド酢酸 (4)を合成することに成功した。また、光分解後に化合物が正しく光放出されるかを確認するための化合物 (4-OH)を合成した。Wittig 試薬を用いたオレフィンの伸展反応は、上記の反応条件で、非常に様々な Wittig 試薬に適用可能であった。本研究を進める上で、Bhc 基にオレフィンを伸展させる合成経路の確立は必須であったが、8-formylBhc-OAc (3)を用いることでこれを実現し、研究の基盤を作ることに成功した。



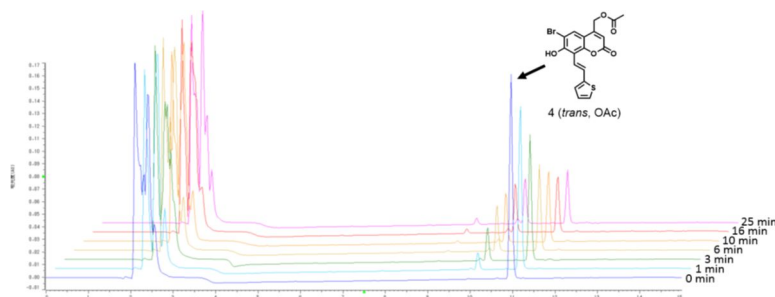
続いて、合成されたオレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸の光化学特性を調査した。各化合物に関し、50%DMSO 含有 KMOPS 緩衝液中での紫外 - 可視吸収スペクトルを測定した結果、吸収極大が 382 ~ 398 nm の範囲にあり、オレフィンが伸展していない通常の Bhc-ケージド酢酸の吸収極大である 370 nm と比較して、吸収極大が長波長シフトしていた。また、全てのオレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸は、Bhc-ケージド酢酸にはない 450 nm 以上の吸収を持つことがわかった。



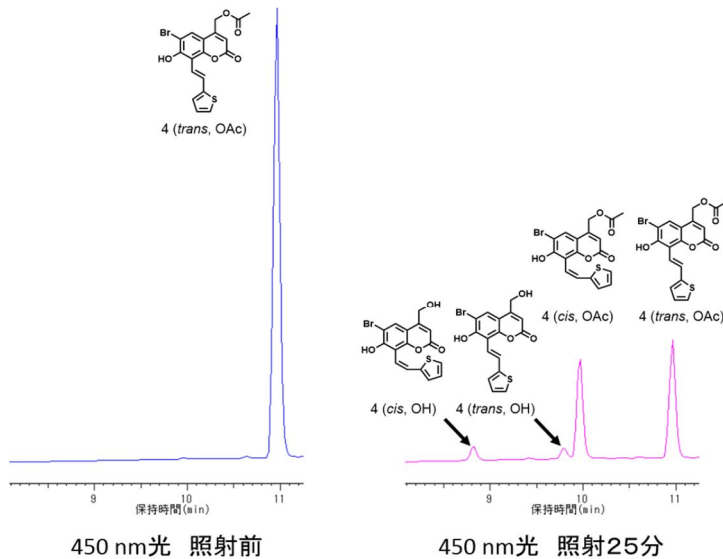
	4	5	6
λ_{\max}	393	398	385
ϵ_{\max}	24000	29900	30800
ϵ_{450}	3100	3500	4000



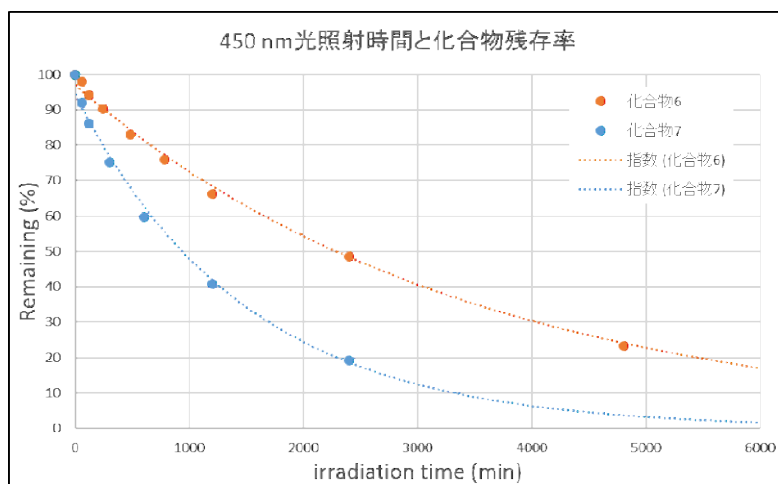
オレフィン伸展型 Bhc-ケージド酢酸が 450 nm 以上に吸収を持つことを受け、450 nm 光を使った光分解実験を行った。各化合物に対し、450 nm の光照射を行い (キセノン光源 MAX-303



化合物4への450 nm光照射時間ごとのHPLCトレース

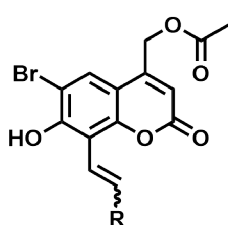


化合物4への450 nm光照射前と25分間照射時のHPLCトレース



+ バンドパスフィルター MX0450、朝日分光社製)、照射後の溶液をHPLCにて解析した。一例として化合物4への450 nm光照射実験の結果を示すが、化合物4は、光照射時間に応じて分解を引き起こし、酢酸を放出した後のアルコール体を生成していることがわかった。また、光分解反応と同時に、trans-cisの光異性化反応も引き起こしていることも判明した。

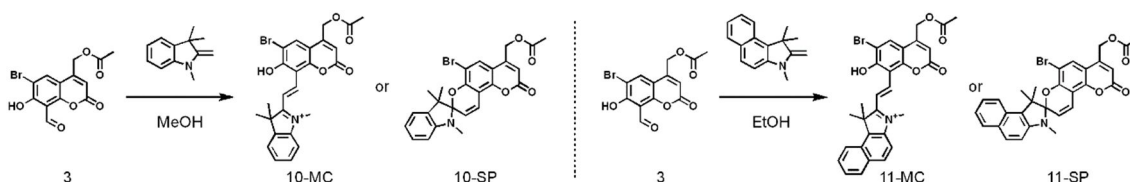
その他のオレフィン伸展型Bhc-ケージド酢酸に対しても光照射実験を行った結果、合成した全ての化合物が化合物4と同様に光分解を引き起こすことがわかった。光照射時間と化合物の残存率(trans体とcis体の合計)の関係をプロットすると、全ての化合物が指数関数的に光分解していた。その減衰率と予め測定した光強度(14.3 mW/cm²)から光分解効率($\Phi_{\epsilon 450}$)を算出したところ、その範囲は1.48~5.62となり、光分解効率 $\Phi_{\epsilon 450}$ は伸展させたオレフィンに依存することが示された。



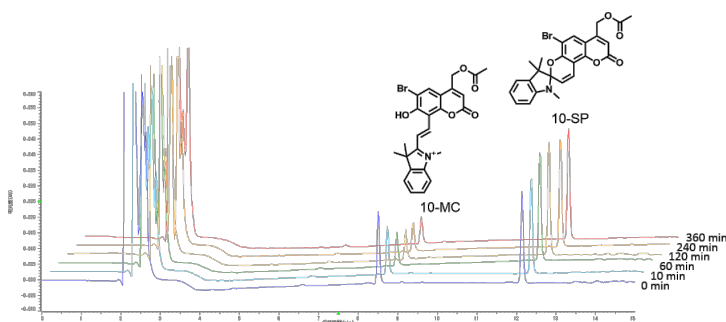
compounds	4	5	6	7	8	9
R =						
λ_{max}	393	385	398	382	392	389
$\Phi_{\epsilon 450}$	3.89	2.22	2.38	5.62	1.48	3.18

オレフィン伸展型Bhc-ケージド酢酸は、Bhc基を用いたケージド化合物にはない450 nmでの光分解を引き起こすことがわかった。一方で、Bhcケージド化合物の350 nmや365 nmでの光分解効率は100~1000以上あり、オレフィン伸展型Bhc-ケージド酢酸の光分解効率は、Bhc基と比較して非常に小さいものとなった。光分解の量子収率(化合物4:0.00126、化合物5:0.00063、化合物6:0.00059)を比較しても、Bhcケージド化合物と比較して一桁以上低かった。その原因の一つは、光異性化にあると考えられた。前述した化合物4に限らず、光異性化の反応は全てのオレフィン伸展型Bhc-ケージド酢酸で見られており、励起エネルギーがtrans-cisの光異性化反応に使われてしまうことで光分解効率が低下したものと推察された。

最後に、フォトクロミズムと光分解性保護基を組み合わせた化合物についての結果を述べる。8-formylBhc-OAc (3)と1,3,3-trimethyl-2-methylideneindoleをメタノール中で反応させること



で、化合物 **10** を開環構造 (merocyanine, MC) と閉環構造 (spiropyran, SP) の混合物として得られることが、¹H NMR の解析の結果から確認された。また、化合物 **3** と 1,1,2,3-Tetramethyl-1H-benz[e]indolium Iodide をエタノール中で加熱することで、化合物 **11** が MC 型と SP 型の混合物として得られた。



化合物 **10** を化合物 **11** 共に、MC 型に由来すると思われる 538 nm の吸収極大を確認したため、550 nm 光 (キセノン光源 MAX-303 + バンドパスフィルター MX0550) を用いて光分解実験を行った。その結果、化合物 **10** は、550 nm 光の照射時間に応じて、MC 型のピークの減少と SP 型のピークの増加が見られたが、酢酸

放出後のアルコール体を含め、新たなピークの出現は全く見られなかった。また、化合物 **11** は、光分解反応も光異性化反応も全く見られなかった (データ示さず)。これらの結果から、化合物 **10** 及び **11** は、550 nm に吸収を持つものの、光分解性は全くないことが判明し、本タイプの保護基に関しては、これ以上の研究を断念した。

以上、8 位にアルデヒド基を持つ Bhc-ケージド酢酸を元に、Wittig 試薬等を用いて様々なオレフィン伸展型の Bhc-ケージド酢酸を得ることに成功した。特に Wittig 試薬を用いてオレフィンを伸展させた Bhc-ケージド酢酸は、光分解効率は低いが、Bhc 基にはない 450 nm 光での光分解性を有していることがわかった。本研究で合成したオレフィン伸展型 Bhc 基は、全て新規の光分解性保護基である。すなわち、本研究により、Bhc 基にオレフィンを伸展させることで、新しい光化学特性を持つ光分解性保護基を開発するという目的は達成され、Bhc 基にオレフィンを伸展させるための合成法から多様な光分解性保護基を開発するまでの研究戦略が確立されたと言える。

1. Olson, J. P.; Kwon, H.-B.; Takasaki, K. T.; Chiu, C. Q.; Higley, M. J.; Sabatini, B. L.; Ellis-Davies, G. C. R., Optically Selective Two-Photon Uncaging of Glutamate at 900 nm. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (16), 5954-5957.
2. Umeda, N.; Takahashi, H.; Kamiya, M.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Urano, Y., Boron Dipyrromethene As a Fluorescent Caging Group for Single-Photon Uncaging with Long-Wavelength Visible Light. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9* (10), 2242-2246.
3. Goswami, P. P.; Syed, A.; Beck, C. L.; Albright, T. R.; Mahoney, K. M.; Unash, R.; Smith, E. A.; Winter, A. H., BODIPY-Derived Photoremovable Protecting Groups Unmasked with Green Light. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (11), 3783-3786.
4. Shiraishi, Y.; Sumiya, S.; Hirai, T., Highly sensitive cyanide anion detection with a coumarin-spiropyran conjugate as a fluorescent receptor. *Chem Commun (Camb)* **2011**, *47* (17), 4953-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Akinobu Z., Shiraishi Yukiko, Aoki Hanami, Sasaki Hirona, Watahiki Rei, Furuta Toshiaki	4. 巻 152
2. 論文標題 Design, Synthesis, and Photochemical Properties of Clickable Caged Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e60021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/60021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akinobu Z. Suzuki, Ryota Sekine, Shiori Takeda, Ryosuke Aikawa, Yukiko Shiraishi, Tomomi Hamaguchi, Hiroyuki Okuno, Hirokazu Tamamura, Toshiaki Furuta	4. 巻 55
2. 論文標題 A clickable caging group as a new platform for modular caged compounds with improved photochemical properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 451-454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8cc07981a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青木花美, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞選択的に光活性化可能なケージドDAGの設計と合成
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山愛果, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞選択的に働くリアノジン受容体阻害剤のケージド化合物の設計と合成
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木花美, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞選択的に光活性化できるリアノジンレセプターアゴニストの設計と合成
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山愛果, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 リアノジン受容体阻害剤のケージド化合物の設計と合成
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大嶋健太, 岡本榮, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞選択的に光活性化できるケージドアニソマイシンの設計と合成
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木花美, 船山瑞季, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 細胞種選択的に光活性化できるリアノジンレセプターアゴニストの設計と合成
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹田詩織, 寛和之, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞に選択的に送達されるDDS型ケージド化合物の設計と合成
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂元琴子, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 細胞種選択的にヒストンの脱アセチル化を制御する分子の開発
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横山愛果, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 リアノジン受容体阻害剤のケージド化合物の設計と合成
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木花美, 船山瑞季, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 細胞種選択性を持つケージドリアノジンレセプターアゴニストの設計と合成
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大嶋健太, 岡本栞, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 -ガラクトシダーゼ存在下で光活性化できるケージドアニソマイシンの設計と合成
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児玉一徳, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 領域特異的に修飾されたピオチン化ケージド核酸の合成
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂元琴子, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 細胞種選択的に光活性化できるケージド HDAC 阻害剤
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田詩織, 箕 和之, 鈴木商信, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞に選択的に送達される DDS 型ケージド化合物の開発
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

光で作動する抗がん剤の研究が論文誌のBack Coverに採用されました
https://www.toho-u.ac.jp/sci/biomol/course/prize/20190108_prize.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----