

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05707

研究課題名(和文) 結合形成・切断が自在なバイオコンジュゲーションメソッドの創出

研究課題名(英文) Development of on-demand bioconjugation/deconjugation methods

研究代表者

渡邊 賢司 (Watanabe, Kenji)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：90631937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：安定な共有結合を光照射により迅速に形成・切断するインドリジンの光反応の開発した。インドリジンと光増感剤に、エネルギーの低い長波長光を短時間照射することで、カルボン酸またはアルコール化合物が放出されることが分かった。本反応をアミン存在下で行うと、インドリジンとアミンとの分子間でアミド結合が形成されることが分かった。反応機構の検討の結果、光増感剤への光照射によって生じる一重項酸素が本反応の活性種であることが分かった。本反応は、組織透過性を示す長波長光の照射によって、水中、室温で進行することから、生命科学研究や創薬への応用が今後期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エネルギーの低い長波長光で安定な共有結合を活性化することは従来容易ではない。本研究ではインドリジンに適切な置換基を導入することで光反応性を高め、迅速な共有結合の形成と切断を可能とした。光照射により共有結合の形成と切断を起こす光反応素子は生命科学研究に役立つと考えられる。現在、本素子の生命科学研究に向けた応用を進めている。例えば、患部に光照射することで薬物を放出し、薬効を発揮する医薬品候補化合物を開発するなど、本研究の社会実装に向けた研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have developed photoreactions of indolizines that rapidly form and cleave stable covalent bonds upon photoirradiation. Short-time irradiation of indolizines with low-energy long-wavelength light in the presence of a photosensitizer led to the release of carboxylic acid or alcohol compounds. When this reaction was carried out in the presence of an amine, an amide bond was formed between indolizines and amines. Study on the photoreaction mechanism revealed that singlet oxygen species, produced by photoirradiation of the photosensitizer, were the active species. Since this photoreaction proceeds in water at room temperature upon photoirradiation of tissue-permeable long-wavelength light, it is expected to find applications in life science and drug discovery in the future.

研究分野：有機化学

キーワード：インドリジン 光反応 カルボン酸 アルコール アミン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子や合成分子を結びつけるバイオコンジュゲーション(生体共役反応)は、生物活性化合物や抗体-薬物複合体の合成などに用いられる重要な反応である¹⁾。光照射によって誘起される共有結合形成反応は、反応の時空間と進行度を簡便に制御できる利点がある。このため、近年では光などの外部刺激に応じて共有結合の形成や切断を行う反応や素子に注目が集まっている。これまでに光開始プロセスを含む共有結合形成反応がいくつか開発されてきた²⁾。また、光照射によって共有結合を切断し、機能性分子を放出する化合物はケージド化合物と呼ばれ、時空間制御が必要な医薬品の送達や生物研究に用いられてきた³⁾。従来の共有結合形成反応やケージド化合物の分解では、高エネルギーの短波長光(<500 nm)の照射が用いられる。これらの短波長光は、基質の望ましくない光分解や細胞毒性を誘発しやすい問題があった。このため、長波長光の照射でも効率的に進行する光反応の開発が国内外で進められてきた⁴⁾。しかし、エネルギーの低い長波長光によって安定な共有結合を選択的に活性化することは難しい。光反応の効率および光非照射条件での安定性に優れた新たな手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

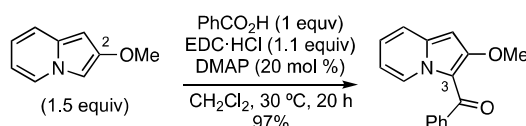
本研究の目的は、長波長光の照射によって効率的に共有結合の形成および切断を行う光反応を開発することである。具体的には、芳香族複素環化合物の一種である3-アシルインドリジンの光酸化を用いた共有結合形成・切断反応の開発を行なった。そして、本反応の応用としてペプチドなどの生体分子からの機能性分子の放出と連結を検討し、反応の有用性について検証した。

3. 研究の方法

ペプチド合成で一般的に使用される縮合試薬とカルボン酸と用いた、簡便な3-アシルインドリジンの合成法を示す。つぎに、得られた3-アシルインドリジンを用いて、赤色光の照射によるアンケーシングおよびアミンとの共有結合形成反応の一般的な実験手順を示す。

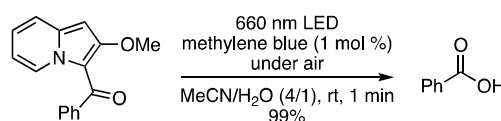
(1) 3-アシルインドリジンの典型的な合成手順⁵⁾

安息香酸(48.8 mg, 0.400 mmol, 1 equiv)、2-メトキシインドリジン(88.3 mg, 0.600 mmol, 1.5 equiv)および4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP, 9.8 mg, 80 μmol, 20 mol%)のジクロロメタン溶液(2.0 mL)に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC·HCl, 84.3 mg, 0.440 mmol, 1.1 equiv)を加えた。反応溶液をアルゴン雰囲気下、30 °Cで4 h かけ混ぜた。反応終了後、反応溶液に飽和食塩水(15 mL)を加え、酢酸エチル(15 mL)で3回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル, 5/95-95/5)により精製し、生成物の(2-メトキシ-3-インドリジニル)フェニルメタノンを97.1 mg(0.386 mmol, 96.7%)を得た。



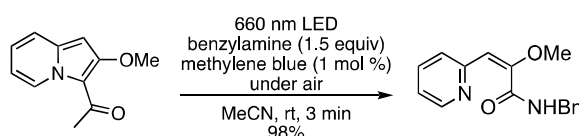
(2) インドリジンを用いたアンケーシングの典型的な実験手順⁶⁾

4 mL のガラスバイアルに(2-メトキシ-3-インドリジニル)フェニルメタノンのアセトニトリル溶液(2.5 mM, 400 μL, 1 equiv)、水(100 μL)、メチレンブルー水溶液(1.25 mM, 8.0 μL, 1.0 mol%)および回転子を加えた。この溶液を室温、空気下でマグネチックスターラーにより攪拌しながら、1 分間光照射した。光反応は、Kessil H160 Tuna Flora LED ランプ(40W, red channel)を光源に使い、HepatoChem 社製 PhotoRedOx Box 中で行なった。光照射後、反応溶液に1-ナフトールのアセトニトリル溶液(4.0 mM, 250 μL, 1 equiv)を加え、溶液の一部を HPLC 分析(カラム:化学物質評価研究機構製 L-column3 C18, 4.6 × 100 μm, 展開溶媒:アセトニトリル/40 mM リン酸水溶液, 5/95-95/5, 0-30 min, 流速:0.5 mL/min)にかけた。生成物の安息香酸のピーク面積を内部標準の1-ナフトールのピーク面積に対して校正し、比較することで、安息香酸の収率を99%と決定した。



(3) インドリジンとアミンとの共有結合形成の典型的な実験手順⁷⁾

100 mL ナス型フラスコに1-(2-メトキシ-3-インドリジニル)エタノン(37.8 mg, 0.200 mmol, 1 equiv)、ベンジルアミン(32.1 mg, 0.300 mmol, 1.5 equiv)、メチレンブルーのアセトニトリル溶液(1 mL, 2.0 mM, 2.0 μmol, 1.0 mol%)および回転子を加えた。この溶液を空気下、室温でマグネチックスターラーにより攪



拌しながら、3 分間光照射を行った。光反応は、Kessil H160 Tuna Flora LED ランプ (40 W, red channel) を光源に用い、光源からナス型フラスコの距離は 1 cm とした。光照射後、反応溶液を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム/メタノール, 100/0-95/5) により精製し、生成物の (*E*)-*N*-ベンジル-2-メトキシ-3-(2-ピリジニル)アセチルアミドを 52.7 mg (0.196 mmol, 98.3%) 得た。

4. 研究成果

(1) インドリジンをも核とする新規ケージド化合物の開発^{5,6)}

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は、適切な光増感剤 (PS) に長波長光を照射することで容易に生成することができる。 $^1\text{O}_2$ の反応性は共有結合を切断するのに十分高く、オレフィンなどの炭素-炭素二重結合を酸化的に開裂する。これまで、オレフィンの酸化開裂を用いたアンケーシングが報告されている。Youらは、光増感剤を連結したアミノアクリレート的光酸化を用いた芳香属アルコールの放出を報告した (図 1A)⁸⁾。Schnermannらは、シアニン色素のオレフィン部位の光酸化を利用した芳香族アルコールの放出を報告した (図 1B)⁹⁾。しかし、これらの方法ではオレフィンの光酸化に長時間の光照射が必要であり、放出される化合物が芳香属アルコールに限られるなど課題があった。

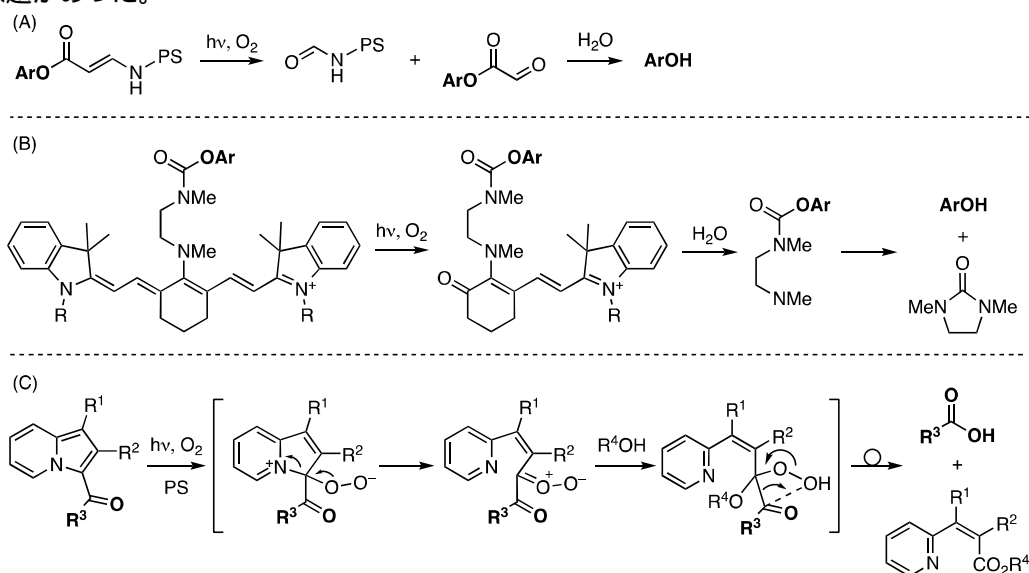


図 1. 一重項酸素を用いた光酸化反応

これらの課題を解決するために、我々は芳香属複素環化合物の一種であるインドリジンの光反応に着目した。Xuらは、光増感剤 (PS) を用いてインドリジン光酸化するとピリジニルアクリレートが生成することを報告した (図 1C)¹⁰⁾。本反応では、副生成物としてカルボン酸が生じると考えられるが、その生成は実際に確認されていない。また、本光反応では高エネルギーのキセノンランプ (500 W) を 20 時間以上照射する条件が用いられ、光反応性の改善が必要であった。

我々は、2 位にメトキシ基を導入した 3-アシル-2-メトキシインドリジンを用いると、C2-C3 二重結合に直接結合した窒素原子と 2-アルコキシ基の電子供与性によって、インドリジンの光反応性が向上することを見出した (図 2A)。実際に種々の光増感剤で光反応を検討した結果、660 nm の赤色光照射条件ではメチレンブルーが最適の光増感剤であることが分かった。3-アシル-2-メトキシインドリジンに対して 1 mol% のメチレンブルーの添加により、30 秒の赤色光照射でほぼ定量的に生成物のフェノールが得られることが分かった (図 2A)。本反応は、1% O_2 の低酸素条件で進行するが、酸素を含まないアルゴン雰囲気下では進行しないことが分

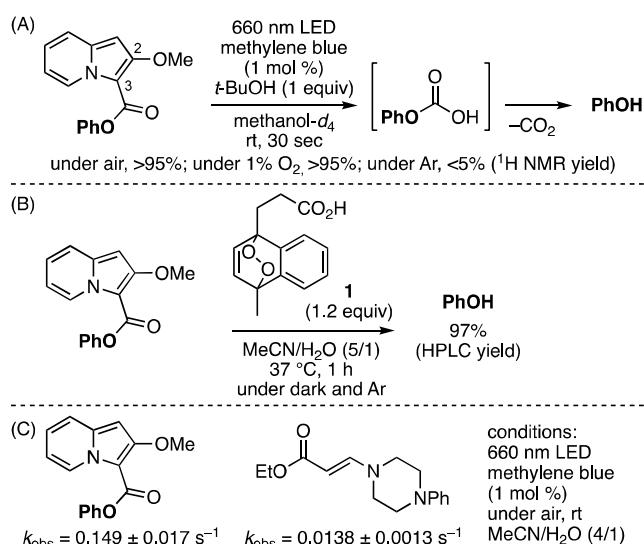


図 2. インドリジンの光酸化反応

かった。このことから、本反応に酸素分子が関与することが分かった(図2A)。一重項酸素を放出する化合物1を3-アシル-2-メトキシインドリジンに添加し、暗闇下で反応したところ、生成物のフェノールがほぼ定量的に得られることが分かった(図2B)。このことから、光増感剤への光照射によって生じる一重項酸素が本反応の活性種であることが分かった。

次に、光反応の速度定数を $0.149 \pm 0.017 \text{ s}^{-1}$ と決定した(図2C)。これは、同じ光照射条件におけるアミノアクリートの酸化開裂と比べて約10倍早い(図2C)。従来のアンケーシングに利用される素子と比べ、3-アシル-2-メトキシインドリジンが優れた光反応性を示すことが分かった。

本反応の基質適用範囲についての検討を行った結果、多様な官能基を持つ生物活性カルボン酸およびアルコール化合物の放出に幅広く適用できることが分かった。最後に、本光反応の応用として生体分子からの機能性分子の放出を検討した。クマリン色素をケージドしたインドリジンを3分子担持したインスリンから、クマリン色素のほぼ定量的な放出を確認した(図3)。また、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)によって、アクリル酸誘導体を持つペプチドの生成を確認した(図3)この結果は、ペプチドなどの生体分子からの機能性分子のアンケーシングにインドリジンの光反応が利用できることを示している。

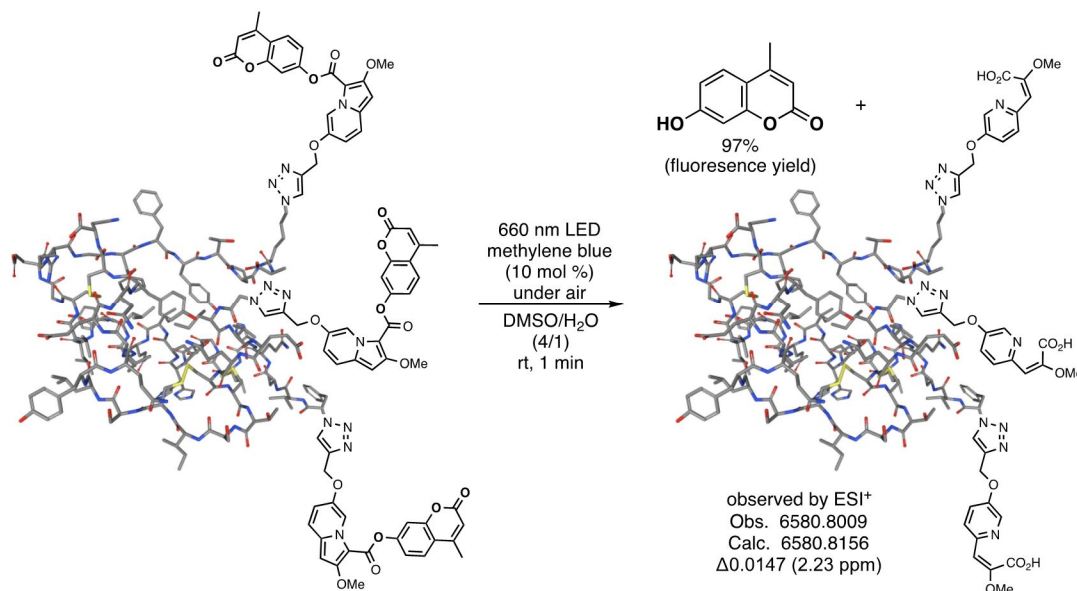


図3. インスリン-インドリジン複合体からの蛍光色素の放出

(2) インドリジンの光反応を用いたアミンとの共有結合形成反応の開発⁷⁾

本研究では、赤色光照射によって誘起されるインドリジンの共有結合形成反応を検討した。我々はインドリジンの光反応機構の検討を行う中で、溶媒の水分子が反応に関与することを明らかにした。実際に、 ^{18}O 原子でラベル化された水分子($[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$)を溶媒に用いると、ほぼ定量的にアクリル酸誘導体への ^{18}O 原子の取り込みが起こることが分かった(図4)。

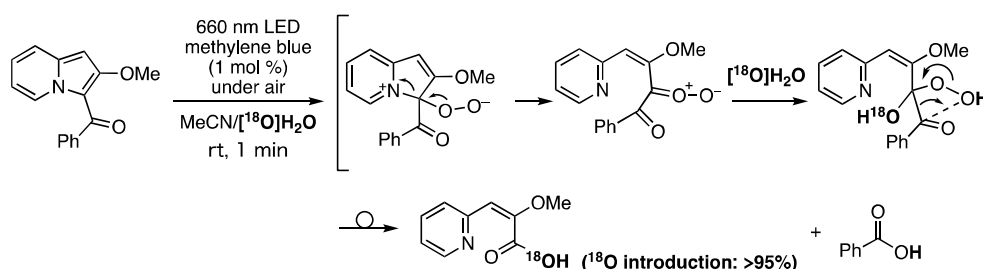


図4. ^{18}O ラベル化実験

そこで、水分子よりも求核性の高いアミンを用いると、インドリジンとアミンとで共有結合による分子連結が行えるのではないかと考えた。実際に、種々のアミン化合物を用いて光反応を検討した結果、高い官能基許容性で様々な機能性アミンの連結が行えることが分かった。

本反応は赤色光の照射を行うため、短波長光で容易に分解されるクマリニルメチルエステル基やジアジニル基が共存する基質においても目的のアミド化反応が高収率で進行することが分かった(図5)。図5Bでは、赤色光照射によるアミド化に続き、365nmの紫外光照射によるジアジニル基の脱窒素と溶媒のメタノールの付加を連続的に行うことで、光反応生成物が高収率で得られることを示している。

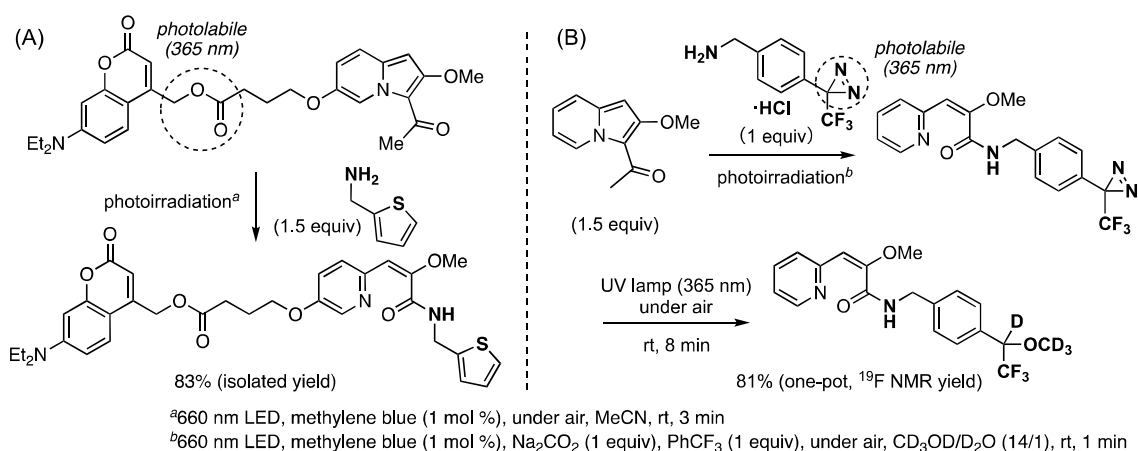
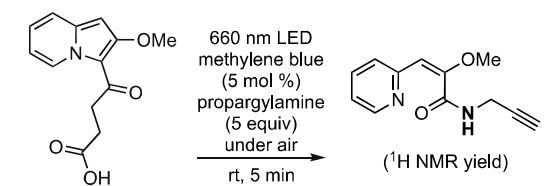


図 5. 波長選択的な光反応

最後に本光反応が有機溶媒を含まない水溶液中においても進行するか検討した。水溶性の 3-アシルインドリジンとプロパルギルアミンを用いた水中反応では、アミンと光増感剤の増量と反応時間の延長が必要であったが、目的のアミドを定量的に得ることができた(表 1, entry 1)。これは、水中では一重項酸素の寿命がアセトニトリル中 (~80 μs) と比べて短いため (~3 μs)、光反応性が低下したためだと考えられる。また、ほぼ中性の緩衝水溶液 (pH 7.4) では収率が低下することが分かった (entry 2)。これは、アミンのプロトン化 (pK_b = 9) により求核性が低下したためだと考えられる。実際に緩衝水溶液の pH を 8.5 に変更すると、目的物が高収率で得られことが分かった (entry 3)。これらの結果は、水溶液の pH 調整が必要ではあるが、水にしか溶けない化合物の分子連結に本光反応が利用できることを示している。

表 1. 水中での光反応の検討



entry	solvent	yield (%)
1	water	>95
2	sodium phosphate buffer (pH 7.4)	35
3	sodium phosphate buffer (pH 8.5)	93

以上のように、本研究ではインドリジンの光反応を用いた共有結合形成・切断反応の開発を行った。本反応を用いることで、長波長光照射による迅速な機能性分子の放出や機能性アミンとの連結が可能となった。本光反応の生命科学研究への応用を現在進めている。

< 引用文献 >

- Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174–2195.
 Fairbanks, B. D.; Macdougall, L. J.; Mavila, S.; Sinha, J.; Kirkpatrick, B. E.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6915–6990.
 Klán, P.; Solomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
 Weinstain, R.; Slanina, T.; Kand, D.; Klán, P. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272.
 Watanabe, K.; Terao, N.; Niwa, T.; Hosoya, T. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 11822–11834.
 Watanabe, K.; Terao, N.; Kii, I.; Nakagawa, R.; Niwa, T.; Hosoya, T. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5434–5438.
 Watanabe, K.; Kuratsu, A.; Hashizume, D.; Niwa, T.; Hosoya, T. *Commun. Chem.* **2022**, *5*, 91.
 Bio, M.; Nkepan, G.; You, Y. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6517–6519.
 Nani, R. R.; Gorka, A. P.; Nagaya, T.; Kobayashi, H.; Schnermann, M. *J. Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 13635–13638.
 Li, Y.; Hu, H.-Y.; Ye, J.-P.; Fun, H.-K.; Hu, H.-W.; Xu, J.-H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2332–2339.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kenji Watanabe, Nodoka Terao, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya	4. 巻 86
2. 論文標題 Direct 3-acylation of indolizines by carboxylic acids for the practical synthesis of reed light-releasable caged carboxylic acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11822-11834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.1c01244	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 -

1. 著者名 Kenji Watanabe, Nodoka Terao, Isao Kii, Reiko Nakagawa, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya	4. 巻 22
2. 論文標題 Indolizines enabling rapid uncaging of alcohols and carboxylic acids by red light-induced photooxidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5434-5438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.0c01799	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 -

1. 著者名 渡辺 賢司	4. 巻 77
2. 論文標題 芳香族ニトロ化合物の生体分子との共有結合形成反応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 有機合成化学協会誌	6. 最初と最後の頁 841-842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5059/yukigoseikyokaisi.77.841	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Nodoka Terao, Isao Kii, Reiko Nakagawa, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Indolizines enabling rapid uncaging of alcohols and carboxylic acids by red light-induced photooxidation
3. 学会等名 ACS Spring 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Asuka Kuratsu, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Rapid photouncaging-induced amide formation by red light irradiation to indolizines
3. 学会等名 International Medicinal Chemistry Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Nodoka Terao, Takashi Niwa, Isao Kii, Reiko Nakagawa, Yousuke Kanayama, Riyo Zouchi, Yuka Nakatani, Yasuyoshi Watanabe, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Rapid uncaging of alcohols and carboxylic acids by red light-induced photooxidation of indolizines
3. 学会等名 The 2020 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 賢司、倉津 飛鳥、丹羽 節、細谷 孝充
2. 発表標題 インドリジンへの赤色光照射によるアミンとの共有結合形成反応の開発
3. 学会等名 第54回酸化反応討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Watanabe
2. 発表標題 Development of covalent bond formation/cleavage reactions for functionalization of biomolecules
3. 学会等名 広島大学研究拠点・光ドラッグデリバリー講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Nodoka Terao, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Photocaging-induced amide formation by red light irradiation to indolizines
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 賢司
2. 発表標題 インドリジンへの赤色光照射を用いた化合物放出と連結
3. 学会等名 第18回六甲有機合成化学勉強会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Nodoka Terao, Isao Kii, Reiko Nakagawa, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Designer indolizines enabling rapid uncaging of alcohols and carboxylic acids by red light-induced photooxidation
3. 学会等名 第18回次世代を担う有機化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊賢司、寺尾和花、喜井勲、中川れい子、丹羽節、細谷孝充
2. 発表標題 赤色光を用いたインドリジンの光酸化反応によるアルコールおよびカルボン酸の高速放出
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊賢司、寺尾和花、喜井勲、中川れい子、丹羽節、細谷孝充
2. 発表標題 赤色光を用いたインドリジンの光酸化反応によるアルコールおよびカルボン酸の高速放出
3. 学会等名 第53回酸化反応討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊賢司、寺尾和花、喜井勲、中川れい子、丹羽節、細谷孝充
2. 発表標題 赤色光によるアンケーシングが可能な3-アシルインドリジンの簡便合成
3. 学会等名 反応と合成の進歩2020特別企画シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊賢司、寺尾和花、喜井勲、中川れい子、丹羽節、細谷孝充
2. 発表標題 3-アシル-2-アルコキシインドリジンの合成および光反応
3. 学会等名 Pioneering Project: Chemical Probe (生命現象探索分子) 第三回合同セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊賢司、寺尾和花、丹羽節、細谷孝充
2. 発表標題 生物活性カルボン酸の赤色光誘導放出のための水溶性3-アシル-2-アルコキシインドリジンの合成
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Development of On-Demand Bioconjugation/Deconjugation Platforms
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺賢司、寺尾和花、丹羽節、細谷孝充
2. 発表標題 インドリジンを主骨格とする光ケージド化合物の開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 化合物を放出する方法	発明者 渡辺賢司、丹羽節、 細谷孝充	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/008120	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 化合物を放出する方法	発明者 渡辺賢司、丹羽節、 細谷孝充	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-037259	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------