

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16341

研究課題名(和文) 生体内多成分の同時検出を目的とする生物発光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of bioluminescent probes for multi detection of biological components

研究代表者

高木 晃 (Takagi, Akira)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00758980

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)：本研究はホタルの発光現象の元となる生物発光基質ルシフェリンを遷移金属触媒を用いた化学変換を利用することで、生体内成分を同時に検出可能な官能基を導入した、生体透過性の高い近赤外領域での発光が可能な基質として創製する研究である。
本研究により近赤外生物発光基質の創製に必要な各種ユニットを、アルキンを用いて連結する手法を見出し、アルキンへの置換基導入についても達成した。本研究で合成した基質を用いてルシフェリンユニットを構築することで、生体内多成分を同時に検出可能なプローブとなることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はホタル発光基質の創製を目指し、ベンゾチアゾール環を含んだ基質の化学変換を行った。ベンゾチアゾール環は様々な反応に影響を与えられ、種々の検討を行い、遷移金属を用いたカップリング反応や置換基の導入反応について良好な収率で目的の分子を得ることに成功した。今後多様な置換基導入を達成することで複数の生体成分を同時に検出することが可能な生物発光基質の創製が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is development of near infrared bioluminescent substrate for the luciferase reaction. We achieved Sonogashira coupling of 2-iodobenzothiazole derivative with propargyl alcohol. We also found that trans selective hydrosilylation of propargyl alcohol underwent efficiently even the substrate has benzothiazole moiety. We tried to transform from allyl alcohol to vinyl thiazoline via formation of acrylonitrile by using cinnamyl alcohol as a model compound.

We

研究分野：バイオイメージング

キーワード：ルシフェリン 生物発光 遷移金属触媒 近赤外光

1. 研究開始当初の背景

生体内微量成分は細胞のシグナル伝達に関わる重要な分子群である。近年これらの成分を検出することを目的として様々なバイオイメージングプローブが開発されてきた。中でも二つ以上の成分を同時に検出することのできるプローブは、複数の成分が単独または互いに作用している挙動を調べることが可能なため、より複雑な生体機構の解明に繋がると期待されている。

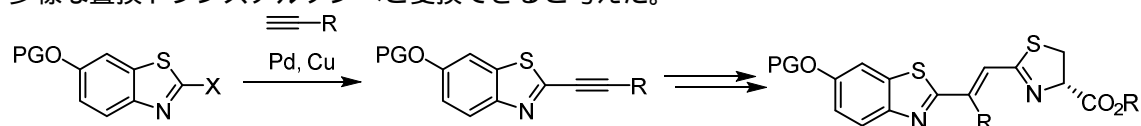
そのような背景の中、生体成分を複数同時に検出可能な蛍光プローブの開発がされてきた。適切な保護を行った蛍光団を組み合わせることで、目的の成分と選択的に反応し、片方もしくは両方の蛍光団の蛍光が回復し、それぞれの蛍光を測定することにより、目的の成分を検出可能としている。一方で生物発光は、バイオイメージングで汎用される蛍光法の欠点である背景蛍光に由来する signal/noise 比の低下は生じず、非常に高い発光強度を持つため、創薬開発等における動物実験の画像診断技術として重要な役割を担っている。生物発光系として現在汎用されるホタルルシフェラーゼを用いた検出方法は、ルシフェリンを発光基質として、酵素反応により励起状態のオキシルシフェリンアニオンへと酸化的に変換され、基底状態に戻るときに発光を示す。その際の最大発光波長はおよそ 560 nm である。上述のように生物発光を用いた検出法は蛍光法とは別の利点を持つが、蛍光プローブと同様の手法で生物発光プローブを用いて複数の成分を検出しようとした場合にはいくつかの問題点がある。生物発光は酵素反応を利用しているために、基質の形を大きく変えると酵素との親和性が低下する点、また化学発光を利用した検出法であるため、蛍光法のように励起光を変えようとする任意の発光波長を測定することができない点があり、これまでに複数の成分を検出可能な生物発光プローブは報告されていなかった。すなわち生物発光を用いて複数の成分を検出するためには、ルシフェラーゼ基質のサイズを大きく変えることなく、複数の波長の光を放出する化合物の創製が必要となる。

2. 研究の目的

本研究は、二つの成分を検出可能な生物発光プローブの創製を目的とする。具体的には、目的のプローブを用いて成分 A のみを検出した際には活性化体 1 となり Color 1 を、B のみを検出した際には活性化体 2 となり Color 2 を、両方を同時に検出した際には活性化体 3 となり Color 3 を放出することが可能となる機構を作り、三色の発光を識別することで、それぞれの成分について単独または同時に検出を可能とする。

3. 研究の方法

本研究では、アルキンへの置換基導入を鍵反応として長波長化されたルシフェリンアナログの合成を行う。ベンゾチアゾール含有アルキンはハロゲン化ベンゾチアゾールを基質とした菌頭カップリングにより合成することとし、アルキンへの置換基導入としては申請者が博士研究員時代に所属していた研究室で行っていたトランス選択的なヒドロメタル化を利用することで多様な置換トランスアルケンへと変換できると考えた。



PG = Protecting Group

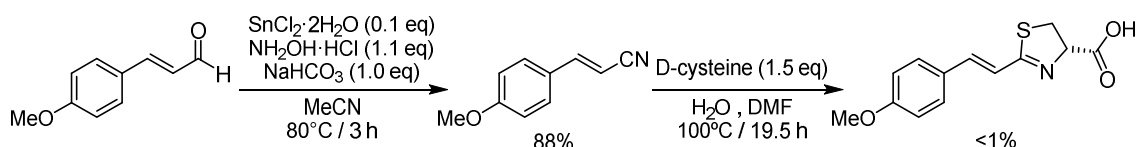
Scheme 1

4. 研究成果

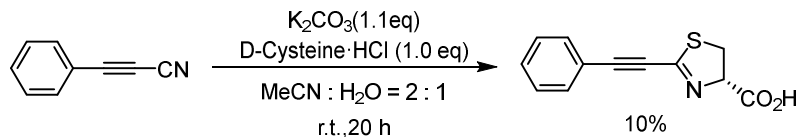
本研究では、申請計画に基づき以下の三つの結果を得た。

・モデル基質におけるチアゾリン環構築

目的の長波長化ルシフェリンアナログを創製するためには、ルシフェラーゼが基質を認識するためのチアゾリン環を構築する必要がある。モデル基質を用いてチアゾリン環の構築を試みた。ベンズアルデヒドに対して D-システインを反応させた場合には効率的にチアゾリン環を構築することが確認できたが、同様の条件をシナムアルデヒドに対して行ったところ、目的のチアゾリン環化合物を得ることはできなかった。そこでシナムアルデヒドから共役チアゾリン化合物を得るための条件を調べたところ、DMF 中で加熱することで微量ながら目的の共役チアゾリン化合物を得ることができた (Scheme 2)。また、アルキニルニトリルについても D-システインとの反応を試み、目的の環化体を得た (Scheme 3)。



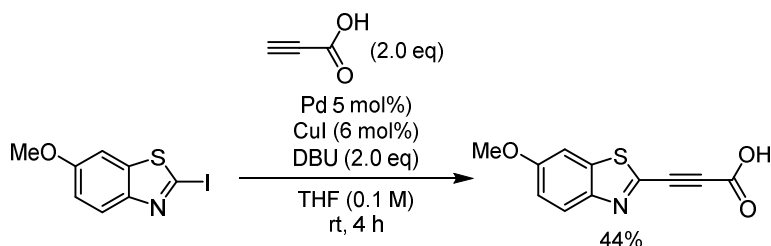
Scheme 2



Scheme 3

・プロピオール酸との菌頭カップリング

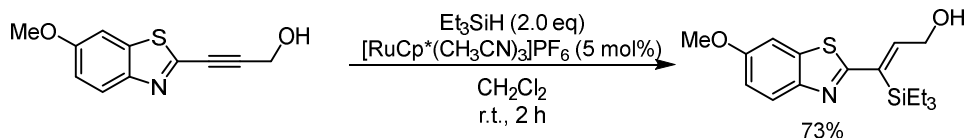
プロピオール酸との直接的な菌頭カップリングが可能であればルシフェリンアナログの短工程合成が可能であると期待される。まず、2-ヨードベンゾチアゾールから4工程かけて標準品となるカルボン酸を合成した。つづいて2-ヨードベンゾチアゾールから直接的にプロピオール酸との菌頭カップリングを検討した。種々の条件を検討した結果、プロピオール酸を過剰量用いた条件にて中程度の収率ではあるがカルボン酸誘導体を得ることができた。



Scheme 4

・プロパルギルアルコールを用いたトランス選択的ヒドロシリル化

プロパルギルアルコールを用いたヒドロシリル化を試みた。2-ヨードベンゾチアゾールとプロパルギルアルコールとの菌頭カップリングは良好な収率で進行した。得られたプロパルギルアルコールに対してルテニウム触媒を用いたトランス選択的ヒドロシリル化を行うと、 γ 位にケイ素が導入されたE体アリルアルコールを得ることができた(Scheme 5)。



Scheme 5

以上の結果より、目的の置換基を有する長波長化ルシフェリンアナログの創製における検討課題をそれぞれ達成することができた。今後はこれらの結果を組み合わせることで目的とする多成分同時検出生物発光プローブとしての役割を果たす分子の創製が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashima Ippei, Inoue Yohei, Matsumoto Nobuyuki, Takagi Akira, Okuda Kensuke	4. 巻 56
2. 論文標題 A fluorogenic probe using a catalytic reaction for the detection of trace intracellular zinc	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13327 ~ 13330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc05315e	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 Takagi Akira, Usuguchi Kazuki, Takashima Ippei, Okuda Kensuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Total Synthesis of Antiausterity Agent (\pm)-Uvaridacol L by Regioselective Axial Diacylation of a myo-Inositol Orthoester	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c00079	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 Tsujino Hirofumi, Uno Tadayuki, Yamashita Taku, Katsuda Masafumi, Takada Kazuki, Saiki Takeshi, Maeda Shotaro, Takagi Akira, Masuda Shigeaki, Kawano Yasuhiko, Meguro Kanji, Akai Shuji	4. 巻 29
2. 論文標題 Correlation of indoleamine-2,3-dioxygenase 1 inhibitory activity of 4,6-disubstituted indazole derivatives and their heme binding affinity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126607 ~ 126607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.08.011	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 Ikawa Takashi, Sun JingKai, Takagi Akira, Akai Shuji	4. 巻 85
2. 論文標題 One-Pot Generation of Functionalized Benzyne from Readily Available 2-Hydroxyphenylboronic Acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 3383 ~ 3392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b03169	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 臼口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 (±)-uvaridacol L の合成研究
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木 晃
2. 発表標題 がん微小環境を標的とした 生物活性化合物の創製研究
3. 学会等名 第6回関西薬学シンポジウム：化学系の若い力（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木 晃、田坂 今日子、津田 智英美、高嶋 一平、奥田 健介
2. 発表標題 がんの栄養飢餓耐性解除に着目したグルコース誘導体の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼口和希、高木 晃、高嶋一平、奥田健介
2. 発表標題 位置選択的ジベンゾイル化による (±)-uvaridacol Lの効率的合成
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井川貴詞, 川端将暉, 高木 晃, 赤井周司
2. 発表標題 縮合複素環化合物合成を指向する2-シリルピリダインとアジドとの(3+2)付加環化反応
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Ikawa, Masaki Kawabata, Akira Takagi, Shuji Akai
2. 発表標題 Regioselective Synthesis of Fused Heterocycles Using 2-Silyl-3,4-pyridyne
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 Akira Takagi, Kentaro, Oh-hashii, and Kensuke Okuda
2. 発表標題 Development of Drugs for Modulating Endoplasmic Reticulum Stress Response
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 高木 晃, 大橋 憲太郎, 平田 洋子, 奥田 健介
2. 発表標題 小胞体ストレス応答を制御する化合物群の創製研究
3. 学会等名 第25回癌治療増感研究会 in 飛騨高山
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白口和希, 高木 晃, 奥田健介
2. 発表標題 小胞体ストレス応答を標的とする創薬化学研究
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木 晃, 奥田健介
2. 発表標題 ストレス適応応答阻害を指向した低栄養選択的細胞毒性化合物の探索
3. 学会等名 第22回癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白口和希, 高木 晃, 奥田健介
2. 発表標題 Uvaria dac.由来天然物の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------