

機関番号：12608  
 研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20350017  
 研究課題名 (和文) レドックス制御機構の化学的解明を指向した生体反応活性種の合成モデル研究  
 研究課題名 (英文) Synthetic model study of reactive species involved in biological reactions for chemical elucidation of redox regulatory mechanism  
 研究代表者  
 後藤 敬 (GOTO KEI)  
 東京工業大学・大学院理工学研究科・教授  
 研究者番号：70262144

研究成果の概要 (和文)：生体反応中間体の中には、人工系では極度に不安定であるために研究が困難な化学種が多くある。特に、システイン残基が関与するレドックス制御機構については、不安定な反応中間体を含むものが多く知られている。本研究では、独自に開発したナノサイズのキャビティ型分子を活用することで、従来合成困難であったシステイン由来の生体反応中間体を安定化し、提唱されてきた反応機構の化学的検証について検討した。

研究成果の概要 (英文)：Cysteine residues located in clefts within the proteins are sterically restrained from forming inter- or intramolecular bridging bonds. The reactive intermediates generated by their reactions with reactive oxygen and nitrogen species play a crucial role in redox regulation. However, many of these intermediates are notoriously unstable in artificial systems, and model studies on these species have been difficult due to their instability. In this study, novel nano-sized molecular cavities with bowl-shaped frameworks were developed for modeling such sterically isolated environment and applied for the stabilization of highly reactive chemical species involved in redox regulations. Some of the mechanisms proposed for biological transformations were demonstrated experimentally by utilizing these model systems.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,400,000  | 2,520,000 | 10,920,000 |
| 2009年度 | 3,100,000  | 930,000   | 4,030,000  |
| 2010年度 | 3,100,000  | 930,000   | 4,030,000  |
| 総計     | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：有機元素化学

#### 1. 研究開始当初の背景

レドックス制御をはじめとする細胞の様々な機能において、システイン残基と活性酸素種および活性窒素種との反応が重要な役割を果たしていることは広く知られている。しかし、これらの反応で想定されている中間体は、人工系では極度に不安定であるものが多く、中には化学種の存在自体が確認されていないものもある。たとえば、細胞に放

射線照射を行った際に生成するシステイン由来のラジカルは20時間以上の寿命を持ち、細胞のガン化に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、このラジカル種は人工系では最長でもミリ秒オーダーの寿命しかなく、生体内での反応を検証することは極めて困難であった。また、近年注目を集めている活性窒素種ニトロキシル(HNO)がシステインと反応して生成すると考えられて

いる化学種は、実験的にはこれまで観測すらなされていない。これらの生体反応中間体に関しては、入手できる化学的情報がごく限られているため、現在の多くの研究が間接証拠に頼らざるを得ない状況にある。生化学の分野で仮説として提案されてきた様々な想定反応機構を実験的に検証し、より化学的根拠に基づいた機構を確立するためには、反応中間体を生体内と同様に安定化できる人工モデル系の構築が必要とされている。

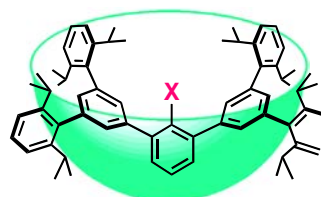
## 2. 研究の目的

本研究では、従来合成困難であった生体反応中間体を安定化するために、酵素の活性部位の構造的特性を採り入れた、ナノサイズのキャビティ型分子を開発する。そして、合成した化合物を用いて、これまで紙上の仮説にとどまっていた想定メカニズムを化学的に検証することを目的とする。特に、生体のレドックス制御において中心的役割を果たしているシステイン残基と活性酸素種や活性窒素種との相互作用メカニズムを、分子レベルで解明する。標的化学種として、システインと活性酸素種との反応により生成し、細胞のがん化との関連に関心が持たれているスルフィニルラジカル ( $\text{RSO}\cdot$ )、活性窒素  $\text{HNO}$  の作用により生成すると提起されていながら未だ化学種の存在自体が確認されていない *N*-ヒドロキシスルフェンアミド ( $\text{RSNHOH}$ )、システインの酸化修飾における重要な中間体ヨウ化スルフェニル ( $\text{RSI}$ ) などについて検討する。

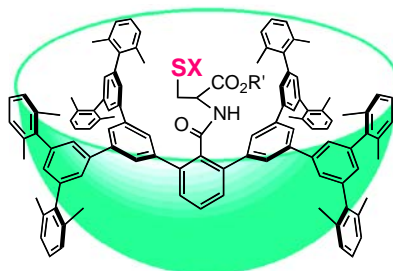
## 3. 研究の方法

酵素の活性部位など生体内のマイクロ環境をモデル化する研究は多く行われてきたが、高反応性中間体が失活することなく存在できるような孤立した反応空間を人工系で再現することは極めて困難であった。たとえば、既知のチオールと活性酸素種・活性窒素種との反応を行うと、中間体がさらに二分子間で反応したジスルフィドなどが容易に生成してしまう。本研究では、研究代表者が独自に開発したキャビティ型分子 **1** を活用することで、高反応性中間体の二分子間反応による失活を分子の周縁部の立体反発により抑制し、速度論的安定化を図る。キャビティ型分子の場合、従来の立体保護基とは異なり官能基の周辺には広い反応空間が存在するため、他分子に対する反応性は保持され、様々な基質分子との反応を検討できる。また、代表者がこれまで行ってきた研究では、標的化学種本来の性質を調べるために、**1** のように化学種に電子的摂動を与えにくい置換基を用いてきた。次のステップとして、より生体に近い部分構造をもつモデル系の構築を目指す。具体的には、サイズを拡大したキャビティ内に、

システインユニットそのものを導入したモデル化合物 **2** を開発し、システイン由来活性化化学種を発生させ、その性質を明らかにする。



**1** (BpqX)



**2** ( $\text{BmsCONHCH}(\text{CO}_2\text{R}')\text{CH}_2\text{SH}$ )

## 4. 研究成果

### (1) 安定なスルフィニルラジカルの合成と反応性の解明

スルフィニルラジカル ( $\text{RSO}\cdot$ ) などシステイン残基と活性酸素種との反応で生じるラジカル種は、生体内のレドックス制御において重要な役割を果たしている。最近では、細胞への放射線照射によって生成する長寿命スルフィニルラジカルが、細胞のがん化を引き起こすことを示唆する結果が報告されている。しかし、人工系ではスルフィニルラジカルは非常に不安定であり、速やかに二量化を起こすため、最長でもミリ秒オーダーの寿命の化合物しか報告されていなかった。今回、**1** に示したキャビティ型置換基 (Bpq 基) を用いることで、極めて高い安定性をもつスルフィニルラジカルの合成に成功するとともに、いくつかの特徴的な反応性を明らかにした。

Bpq 基をもつスルフェン酸 **3** に対し、ベンゼン中過剰量の酸化鉛 (IV) を作用させ、不溶分をろ別後、溶媒を留去した。*o*-ジクロロベンゼンを溶媒として ESR を測定したところ、 $g = 2.0100$  にスルフィニルラジカル **4** に由来するシグナルが観測された。**4** の発生率は 88% と見積もられた。この ESR シグナルは、170 °C においても観測することができ (図 1)、**4** が極めて高い熱安定性を有することがわかった。また、ESR シグナルから求めたラジカル量から、**4** の減衰曲線を求めたところ、**4** は 2 次反応速度式に従って減衰することがわかり、その解析から活性化パラメータを算出した。スルフィニルラジカルは放射線照射により細胞内に生成することが最近示唆されて

おり、これと細胞のガン化との関連に興味を持たれている。放射線照射の 20 時間後に抗酸化剤であるビタミンCを添加すると細胞のガン化が抑制されるが、ヒドロキシルラジカルのスカベンジャーとして知られるジメチルスルホキシドを同様に添加した場合は、ガン化は抑制されないことが報告されている。スルフィニルラジカル 4 のベンゼン溶液にジメチルスルホキシドを加え、室温で ESR シグナル強度を追跡したところ著しい変化は見られなかった。一方、抗酸化剤の部分骨格を有するカテコールを 4 に加えたところ、ESR シグナルの減衰が観測され、効率的よくラジカルが消去されることが明らかとなった。

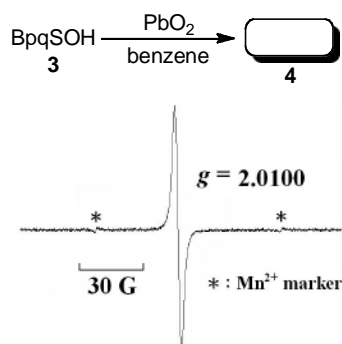
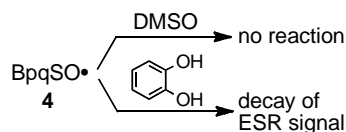


Figure 1. ESR spectrum of 4 in deaerated *o*-dichlorobenzene at 170 °C.

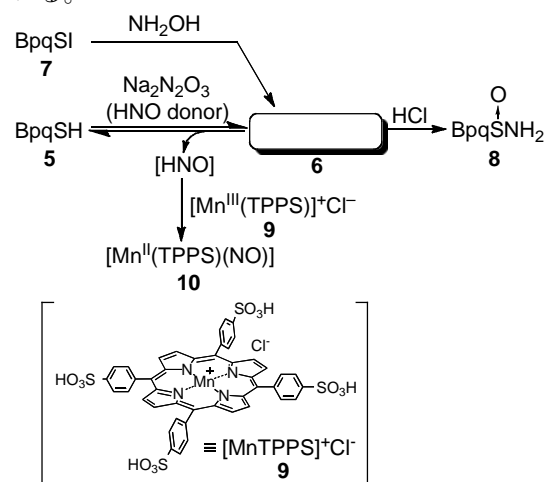


## (2) システインとニトロキシル (HNO) との反応のモデル研究

近年、一酸化窒素 (NO) の類縁化合物であるニトロキシル (HNO) が、一酸化窒素と関連するが異なる生理作用を示す活性窒素種として急速に関心を集めている。特に虚血再灌流障害や酵素機能阻害などの作用について多くの研究がなされている。生体内における HNO の代表的な反応は、システイン残基のチオールとの反応であると考えられている。この反応は、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミド (RSNHOH) を初期生成物として与えると提唱されており、この仮説に基づいて HNO の生理作用が解釈されている。しかし、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミドは実験的には単離例はおろか観測例すら報告されておらず、化学種の存在自体が確認されていなかった。また、生体内においても、生成した *N*-ヒドロキシルスルフェンアミドがどのような反応を起こすかについては不明な点が多い。今回、キャビティ型置換基 (Bpq 基) を用いることにより、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミドの合成・単離に初めて成功した。また、この *N*-ヒドロキシルスルフェンアミドを用い、その構造および反

応性について検討した。

Bpq 基を有するチオール 5 の THF-水混合溶液に炭酸水素ナトリウムを少量加え弱塩基性にした後、ニトロキシル供与体である Angeli's salt ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) を作用させたところ、80%の変換率で *N*-ヒドロキシルスルフェンアミド 6 が生成した。また、別途合成として、ヨウ化スルフェニル 7 にヒドロキシルアミンを作用させたところ、6 が定量的に生成し、安定な結晶として単離することに成功した。生体内では、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミドは酸触媒存在下でスルフィンアミドへ転位した後に加水分解され、スルフィン酸を与えることが提唱されている。6 に触媒量の希塩酸を作用させたところ、対応するスルフィンアミド 8 が定量的に得られた。一方、中性および塩基性条件下において 6 に水を作用させたところ、ゆっくりと分解が進行し、チオール 5 が得られた。この結果は、チオールと HNO との反応が可逆的であり、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミドが HNO 供与体として機能していることを示唆している。そこで、これを検証するために、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミド 6 から生成した HNO を Mn(III) ポルフィリン錯体 9 で捕捉する実験を行った。錯体 9 は、Angeli's salt との反応により還元的ニトロキシル化を受け、ニトロキシル錯体 10 に変換されることが知られている。塩基性条件下で錯体 9 に 6 を作用させ、紫外可視吸収スペクトルで反応を追跡したところ、錯体 9 からニトロキシル錯体 10 への等吸収点をもった変化が観測された。この結果は、*N*-ヒドロキシルスルフェンアミドが HNO 供与体として挙動することを示しており、生体内でこの化学種が HNO の貯蔵および輸送に関与している可能性を示唆している。

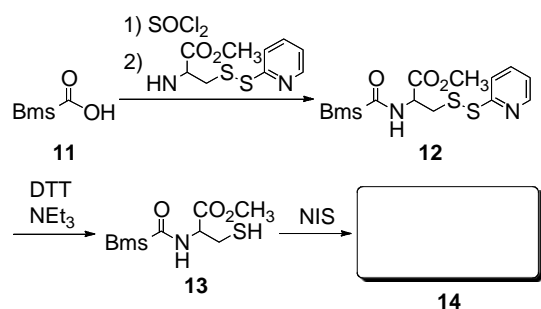


## (3) システインユニットをキャビティ内に導入したモデル系の開発と応用

前項までに述べたように、キャビティ型置換基である Bpq 基を活用することで、生体反応に関連した種々の高反応性含硫黄化合物

を合成し、その基本的性質について明らかにしてきた。一方、より生体内に近いモデル系を構築する上で、システインチオール由来の高反応性化学種を合成することは重要である。しかし、これらの化学種はその不安定性から自在に合成することは困難であった。今回、システインモデル化合物の構築を目指し、2に示したように Bpq 基からさらにキャビティサイズを拡大した新規なデンドリマー型置換基 Bms 基を開発し、そのキャビティ内にシステインを導入した種々の誘導体を合成した。さらに、システイン由来のヨウ化スルフェニル(RSI)の合成について検討した。

Bms 骨格の構築は、Hart らの方法を研究代表者らが改良した手法を用いて行い、カルボン酸 **11** を合成した。キャビティ内へのシステインユニットの導入は、カルボン酸 **11** とシステイン誘導体を縮合させアミドとすることで行った。システインチオールの保護基について種々検討したところ、2-ピリジルチオ基が有効であることがわかった。すなわち、2-ピリジルチオ保護体 **12** に対し、ジチオスレート(DTT)を作用させることによりチオール **13** を収率よく得ることができた。次に、ヨウ化スルフェニルの合成について検討した。ヨウ化スルフェニルは、システインの様々な酸化修飾の中間体として注目されている高反応性化学種であるが、通常二分子間過程により容易に不均化を起こす。合成したキャビティ型システインチオール **13** に対し、*N*-ヨードコハク酸イミドを作用させたところ、対応するシステインヨウ化スルフェニル **14** が定量的に生成し、溶液中では比較的高い安定性を有することがわかった。これは、システインヨウ化スルフェニルの初めての観測例であり、立体保護基から遠く離れた部位に存在する活性官能基がこのような高い安定性を示したことから、キャビティ型反応場による周縁立体保護効果の有効性が実証された。



#### (4) まとめ

以上のように、独自に開発したナノサイズ分子キャビティを活用することにより、従来は合成困難であった、あるいは化学種の存在すら実証されていなかった生体反応活性種を安定化することに成功した。その反応性を

実験的に解明することにより、生化学の分野で提唱されていた活性種の反応性を化学的に検証するだけでなく、従来想定されていなかった新たな反応性を見出すことができた。今回得られた知見を基にして生体内での現象を捉え直すことにより、生体反応機構をより化学的証拠に基づいた形で解明していくことが可能になると考えている。

#### 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13件)

- ① Sase, S.; Aoki, Y.; Abe, N.; Goto, K. "Syntheses of Biologically-relevant Reactive Sulfur Species by Utilizing a Primary Alkyl Steric Protection Group" *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* 印刷中, 査読有.
- ② Mieda, E.; Sasamori, T.; Sase, S.; Goto, K.; Tokitoh, N. "Formation of a Unique Fluorosilene-KF Complex Bearing Bulky Substituents" *Chem. Lett.* 40, 196-197 2011. 査読有.
- ③ 後藤 敬, "分子キャビティを活用した含ヨウ素高反応性中間体の安定化" *SIS Letters*, 12, 2-11, 2011, 査読無.
- ④ Goto, K.; Sonoda, D.; Shimada, K.; Sase, S.; Kawashima, T. "Modeling of the 5'-Deiodination of Thyroxine by Iodothyronine Deiodinase: Chemical Corroboration of a Selenenyl Iodide Intermediate" *Angew. Chem., Int. Ed.* 49, 545-547, 2010, 査読有.
- ⑤ Suwa, K.; Otsuki, J.; Goto, K. "Photo- and Thermal Isomerization of Shuttlecock- and Bowl-Equipped Phenylazopyridines" *J. Phys. Chem. A* 114, 884-890, 2010, 査読有.
- ⑥ Domoto, Y.; Fukushima, A.; Kasuga, Y.; Sase, S.; Goto, K.; Kawashima, T. "Catalyst-free Syntheses of [2]Rotaxanes Utilizing a Pentacoordinated Hydrosilane as an End-capping Agent" *Org. Lett.* 12, 2586-2589, 2010, 査読有.
- ⑦ Goto, K.; Fukushima, A.; Kawashima, T. "5, 6, 7, 12-Tetrahydro-6-(1-methylethyl)-12-phenyldibenz[c, f][1, 5]azasilocine" *Acta Crystallogr., Sect. E*, 66, o20, 2010, 査読有.
- ⑧ Domoto, Y.; Saruhashi, K.; Fukushima, A.; Sase, S.; Goto, K.; Kawashima, T. "Synthesis and Properties of Pentacoordinated Phenoxysilane and Carboxysilanes with Intramolecular Nitrogen-Silicon Coordination" *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*

185, 1221-1229 2010, 査読有.

⑨Sase, S.; Aoki, Y.; Abe, N.; Goto, K. "Stable Sulfenyl Iodide Bearing a Primary Alkyl Steric Protection Group with a Cavity-shaped Framework" *Chem. Lett.* 38, 1188-1189, 2009, 査読有.

⑩Goto, K.; Takahashi, Y.; Kawashima, T. "Synthesis and Structural Characterization of a Mixed Aggregate Containing a Lithium Thiolate and a Lithium Amide" *J. Sulfur Chem.* 30, 365-369, 2009, 査読有.

⑪ Suwa, K.; Otsuki, J.; Goto, K. "Syntheses of Shuttlecock- and Bowl-Equipped Phenylazopyridines and Photomodulation of Their Coordination Ability to Zn-porphyrin" *Tetrahedron Lett.* 50, 2106-2108, 2009, 査読有.

⑫後藤 敬, "新規な立体保護基の開発と生体反応活性種安定化への応用" *フラインケミカル*, 38, 27-36, 2009, 査読無.

⑬Goto, K. "Chemistry of Calixfurans" *Top. Heterocycl. Chem.* 17, 97-121, 2008, 査読有.

[学会発表] (計 19 件)

①阿部憲明, 佐瀬祥平, 後藤 敬, Bowl 型脂肪族および芳香族置換基を活用した *S*-ニトロソチオールの反応性の解明, 日本化学会第 91 回春季年会, 2011 年 3 月 29 日, 横浜.

②中村正輝, 佐瀬祥平, 後藤 敬, 分子キャビティを活用した *p*-チオベンゾキノンの合成研究, 日本化学会第 91 回春季年会, 2011 年 3 月 29 日, 横浜.

③石原充裕, 吉川修平, 佐瀬祥平, 後藤 敬, Bowl 型立体保護基を活用した *N*-ヒドロキンスルフェンアミドの反応性の解明, 日本化学会第 91 回春季年会, 2011 年 3 月 28 日, 横浜.

④K. Goto, Modeling of Reactive Species Derived from Cysteine and Selenocysteine Residues, TITech/UniGE Symposium 2010, 2010 年 11 月 26 日, Geneva, Switzerland.

⑤阿部憲明, 佐瀬祥平, 後藤 敬, Bowl 型分子キャビティを活用した *S*-ニトロソチオールの熱分解機構の解明, 第 37 回有機典型元素化学討論会, 2010 年 11 月 26 日, 室蘭.

⑥石原充裕, 吉川修平, 佐瀬祥平, 後藤 敬, Bowl 型立体保護基を有する *N*-ヒドロキンスルフェンアミドと求核剤との反応, 第 37 回有機典型元素化学討論会, 2010 年 11 月 26 日, 室蘭.

⑦K. Goto, Y. Aoki, N. Abe, S. Sase, Syntheses of Biologically-relevant Reactive Sulfur Species by Utilizing a Primary Alkyl Steric Protection Group, 24th International Symposium on the

Organic Chemistry of Sulfur, 2010 年 7 月 29 日, Florence, Italy.

⑧後藤 敬, 活性化学種の反応制御を指向したナノサイズ分子キャビティの開発, 有機合成化学協会関東支部有機合成化学ミニシンポジウム, 2010 年 7 月 3 日, 東京.

⑨三崎朋子, 佐瀬祥平, 後藤 敬, デンドリマー型分子キャビティを活用したシステインモデル化合物の合成, 日本化学会第 90 回春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 東大阪.

⑩中村正輝, 佐瀬祥平, 後藤 敬, キャビティ型分子骨格を活用したベンゾキノンスル黄類縁体の合成研究, 日本化学会第 90 回春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 東大阪.

⑪三崎朋子, 佐瀬祥平, 後藤 敬, キャビティ型分子骨格を有するシステイン誘導体の合成, 第 36 回有機典型元素化学討論会, 2009 年 12 月 11 日, 鳥取.

⑫K. Goto, D. Sonoda, S. Sase, T. Kawashima, Model Study on the Reaction Mechanism of Iodothyronine Deiodinase by Utilizing a Bowl-shaped Molecular Cavity, The 14th Japan-Korea Seminar on Organic Chemistry, 2009 年 10 月 26 日, 熱海.

⑬K. Goto, Y. Aoki, N. Abe, S. Sase, Modeling of Reactive Sulfur Species Derived from Cysteine Residues Using a Primary Alkyl Steric Protection Group, The 9th International Conference on Heteroatom Chemistry, 2009 年 7 月 4 日, Oviedo, Spain.

⑭後藤 敬, 青木洋平, 吉川修平, 三崎朋子, 阿部憲明, 佐瀬祥平, Bowl 型分子キャビティを活用した *S*-ニトロソチオールおよび関連化合物の反応性の解明, 第 5 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2009 年 5 月 30 日, 宇都宮.

⑮三崎朋子, 佐瀬祥平, 後藤 敬, 芳香族 C-H 活性化を利用したナノサイズ分子キャビティの合成, 日本化学会第 89 回春季年会, 2009 年 3 月 29 日, 船橋.

⑯後藤 敬, ナノサイズ分子キャビティを活用した生体反応活性種のモデル研究, 山口大学大学院医学系研究科産学連携セミナー, 2009 年 1 月 29 日, 山口.

⑰吉川修平, 佐瀬祥平, 後藤 敬, Bowl 型置換基を有するスルフェンアミド誘導体の合成と反応, 第 35 回有機典型元素化学討論会, 2008 年 12 月 11 日, 八王子.

⑱後藤 敬, 吉川修平, 青木洋平, 佐瀬祥平, 新規なキャビティ型骨格を有するチオニトラートの構造と反応性, 第 19 回基礎有機化学討論会, 2008 年 10 月 5 日, 大阪.

⑲K. Goto, D. Sonoda, T. Kawashima, Model Study on the Reaction Mechanism for a Thyroid Hormone-Activating Enzyme by Utilizing a Bowl-shaped Molecular Cavity,

19th IUPAC Conference on Physical Organic  
Chemistry, 2008年7月14日, Santiago de  
Compostela, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 敬 (GOTO KEI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：70262144