

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550187

研究課題名(和文) 生体内で不変的な ESR 活性を保つスピラベル剤の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of stable spin-label reagent for in vivo analysis

研究代表者

波多野 豊平 (Hatano, Bunpei)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20333990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内で不変的な ESR 活性を保つスピラベル剤として、ニトロキシラジカル周辺が立体的にかさ高く、中心のニトロキシラジカルが守られたイソインドール骨格をもつスピラベル剤の開発を行った。開発したスピラベル剤のビタミン C を用いた還元耐性試験を行ったところ、開発したスピラベル剤は、従来のスピラベル剤よりも優れた還元耐性を示した。また、クリック反応を用いた農薬にスピラベル部位を導入する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We developed new spin-label reagents based of isoindole framework bearing bulky alkyl groups near nitroxyl radical. The spin labels showed strong resistance against the reduction with L-sodium ascorbate. We also developed the synthesis method of agricultural chemicals bearing spin-labels using click reaction.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：スピラベル剤 農薬ミュータント ESR

1. 研究開始当初の背景

電子スピン共鳴 (ESR : Electron Spin Resonance) は不対電子 (ラジカル) を検出する分光法の一つであり、不対電子を持った金属、もしくは、有機ラジカルの検出に用いられている。最近では、Lバンド ESR法の発展によって、生体内のイメージング法 (ESR-CT法) が開発されており、この手法は、「生物中のラジカルを、生物が生きたままイメージングできる」点において、生物および医学の分野から注目されている分析手法である。ESR計測においては、スピン剤が用いられる。スピン剤は、トラップ剤、プローブ剤、ラベル剤に大別され、例えば、ラベル剤は生体膜脂質などの生体機能を有する分子に導入され、その分子の生体内での周辺環境や運動状態の解析に用いられている (図1)。

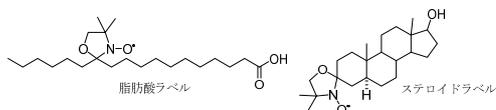


図 1

さらに、生体内をターゲットとした ESR 計測は、放射性同位体や蛍光を用いた他の計測法と比較して都合がよい。それは、「(1) 計測装置が簡易であり、野外での観測に適している。(2) 空間イメージングによる立体画像化に適している。(3) スピン部位が小さく、被ラベル分子の性質や機能を損なわずに導入できる。(4) 計測試薬の合成コストが安価である。」からである。ESR 計測は優れた生体計測法の一つであるが、その最大の問題点は、「ビタミン C によるニトロキシラジカルの還元」である。図2のように、スピン剤が、生体内に存在するビタミン C (L-(+)-ascorbic acid) によって ESR 不活性となるために、長期間の経時変化の測定は難しい。

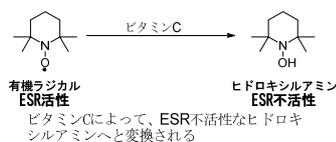


図 2

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) リンカー部位を有し、ビタミン C で失活しないスピンラベル剤の開発と (2) クリック反応を用いたスピンラベル部位の農薬への導入方法の確立である (図3)。



図 3

生体内に存在するビタミン C などの還元剤によって還元されにくいスピンラベル剤を開発することは、生体内の抗酸化酵素や活性

酸素種の役割を解明する上で重要である。また、スピンラベル剤の農薬への導入方法を確立し、作物への農薬の浸透移行過程ならびに代謝過程を解明することは、人や動物に対して害のない農薬を開発する上で、大変重要なことである。

3. 研究の方法

(1) リンカー部位を有し、ビタミン C で失活しないスピンラベル剤の開発。

これまで、TMPO (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl) およびその誘導体が、スピンラベル剤として用いられてきた。しかし、生体内に多く存在するビタミン C に対する還元耐性は長くても数時間程度であると報告されており、生体内の計測に用いるためには、さらなる還元耐性の向上が求められている。そこで本研究では、ビタミン C に対して耐還元性が良好である五員環骨格に着目し、中でも PROXYL 型をさらに発展させた、イソインドール骨格を基本骨格としたスピンラベル剤の開発を行う。特に、後の農薬への導入を考慮し、足がかりとなる置換基を有したイソインドールニトロキシラジカルを合成し、ニトロキシラジカル周辺にかさ高い置換基を導入することでその耐還元性の向上を目指す (図4)。

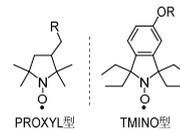


図 4

(2) クリック反応を用いたスピンラベル部位の農薬への導入方法の確立。

殺虫剤や殺菌剤を中心とする農薬は、多種多様な構造を有しており、それらにスピンラベル剤を導入する簡便な導入方法の開発は、非常に重要である。そこで、本研究ではクリック反応に着目し、スピンラベル部位の導入を試みる。クリック反応とは、銅触媒存在下、末端アセチレンとアジド化合物から 1,2,3-トリアゾール環を形成する反応であり、副反応が非常に起きにくい反応である。クリック反応を利用したスピンラベル部位の導入を代表的な殺虫剤および殺菌剤に対して行いその ESR 評価をおこなう。

4. 研究成果

(1) リンカー部位を有し、ビタミン C で失活しないスピンラベル剤の開発。

- スピンラベル剤の合成ルートの開発 -

まず、図5の合成スキームにより、イソインドール骨格を持つスピンラベル剤を合成した。安価に入手できる *m*-アニス酸 (2) をプロモ化して臭化物 3 を合成し、次にメタノール中、硫酸触媒存在下、エステル 4 を合成した。次に、エステル 4 をエチルマグネシウムプロミドと反応させ、アルコール 5a を得た。この反応の際に副生成物として 2 級アルコー

ル **6a** が得られたため、TEMPO で酸化し、エチルマグネシウムブロミドと反応させてアルコール **5a** に導いた。本副生成物の、酸化、エチル基の導入により、全体としてアルコール **5a** を収率 90% で得ることができた。次に、アルコール **5a** を脱水し、オレフィン **8a** に変換した後、低温で *n*-ブチルリチウムを作用させ、DMF を反応させることでアルデヒド **9a** を高収率で得た。次に、塩基性条件下で、塩化ヒドロキシルアンモニウムで処理し、オキシム **10a** とし、オキシム **10a** を還元してヒドロキシルアミン **11a** に導いた。ヒドロキシルアミン **11a** の Reverse-cope 環化により、イソインドール誘導体 **12a** を合成し、酸化反応とエチル基の導入を繰り返すことで、ヒドロキシルアミン **16a** を得た。最後に、NaWO₄ 触媒存在下、過酸化水素を作用させて、スピラベル剤 **1a** を合成した。同様に、テトラメチル体 **1b** も合成した。

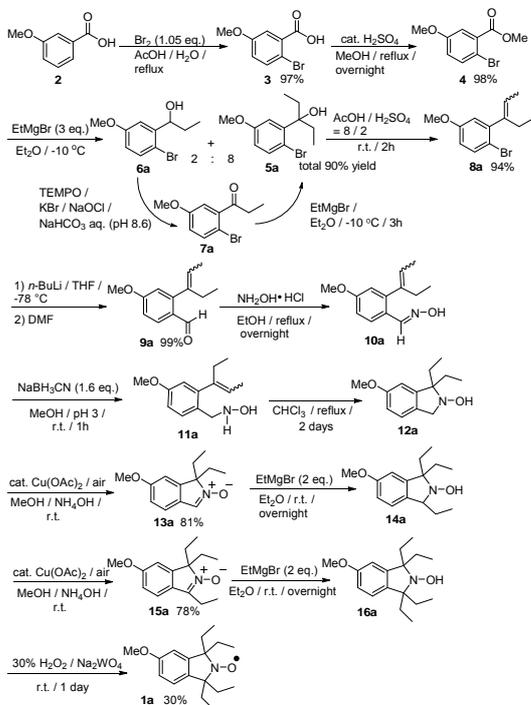


図 5

- スピラベル剤の ESR 評価 -

合成したスピラベル剤 (**1a** (TEIO 型) および **1b** (TMIO 型)) に対して ESR 測定を行った。両スピラベル剤 (**1a** および **1b**) とともに吸収線の数、*g* 値および超微細結合定数 (*a_N*) においてニトロキシラジカルに特徴的なスペクトルを示した (図 6)。

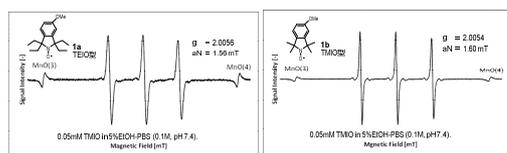


図 6

次に、合成したスピラベル剤を用いて、ビタミン C による還元耐性の比較を行った。比

較対象として、一般に広く用いられている PROXYL 型のスピラベル剤を用いた (図 7)。

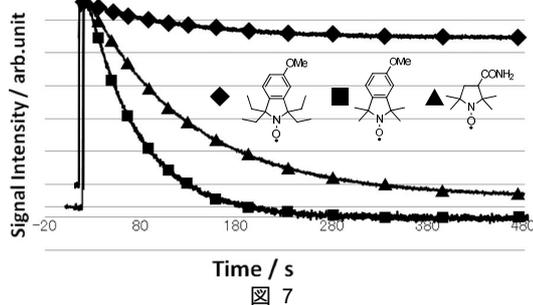


図 7

スピラベル剤 **1a** (TEIO 型) および **1b** (TMIO 型)、比較対象として PROXYL 型のスピラベル剤に対して 1000 倍濃度のビタミン C (L-(+)-ascorbic acid) を加え測定を行った。TMIO 型ならび PROXYL 型は、測定開始から急激なラジカルの減少が見られた。一方、TEIO 型は、ゆるやかにラジカル濃度が減少した。図 7 より還元反応における初期段階の反応速度定数 *k* を求めたところ、**1a** (TEIO 型) の場合、 $9.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、**1b** (TMIO 型) の場合、 $22.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、比較対象として用いた PROXYL 型は、 $13.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった。

反応速度定数において、大きな差が見られなかったため、ビタミン C 存在下におけるニトロキシラジカルの残存率の評価を行った。結果を図 8 に示す。スピラベル剤 **1a** (TEIO 型) および **1b** (TMIO 型)、比較対象として PROXYL 型のスピラベル剤に対して、ビタミン C 存在下、ニトロキシラジカルの初期濃度に対する残存率の変化を 1, 4, 8, 15, 29 日後に測定した。1 日後に、スピラベル剤 **1a** (TEIO 型) では、51% の残存率を示した。一方、エチル基をメチル基に変換した **1b** (TMIO 型) では、ビタミン C に対する還元耐性を示さず、ニトロキシラジカルの残存率は 0% であった。また、比較対象物である PROXYL 型では、8% まで減じた。スピラベル剤 **1a** (TEIO 型) は、4 日、8 日、15 日後においても高い残存率を示し、15 日後においては、26% の残存率を示した。一方、PROXYL 型では 4 日後から 5~10% 程度の残存率であり、スピラベル剤 **1a** (TEIO 型) は、優れた耐還元性を示すことが明らかとなった。

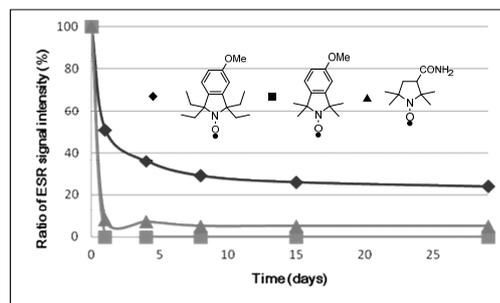


図 8

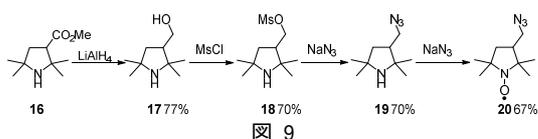
このように、スピラベル剤 **1a** (TEIO 型) は、

図7のような数時間程度の初期減少速度においては、他のスピラベル剤との明確な違いが見られなかったものの、ラジカル残存率においては、優れた特性を示した。今後、実際の生体内 ESR 計測を行い、スピラベル剤 1a (TE10 型)の有用性を明らかにしていきたい。

(2) クリック反応を用いたスピラベル部位の農薬への導入方法の確立

- スピラベル部位の合成 -

まず、農薬とのクリック反応を行うスピラベル部位の合成を行った。合成スキームを図9に示す。



エステル 16 を、LiAlH₄ を用い還元し、アルコール 17 を 77%収率で得た。次に、アルコール 17 に対して MsCl を作用させ、メシル体 18 としたのちに、NaN₃ と反応させ、アジド基 19 へと導いた。最後に、Na₂WO₄ を触媒として、ラジカル化反応を行い、ニトロキシラジカル 20 を 67%収率で得た。

- スピラベル部位を持った殺虫剤アセタミプリド誘導体の合成 -

次に、スピラベル部位を持った殺虫剤アセタミプリド誘導体の合成を行った (図 10)。

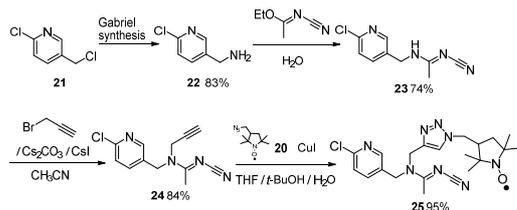


図 10

Gabriel 合成を用いて、2-クロロ-5-クロロメチルピリジン(21)にアミン部位を導入し、続いてシアノイミド部位を導入することで、アセタミプリド前駆体 23 に変換した。次に、炭酸セシウムを用いてプロバルギル基を導入することで、アセタミプリド誘導体 24 を合成した。最後に、ニトロキシラジカル 20 とのクリック反応を行い、スピラベル部位を持ったアセタミプリド誘導体 25 を高収率で合成した。本クリック反応は、他の農薬に対しても有効であり、殺虫剤であるイミダクロプリド誘導体 27 および殺菌剤であるフルジオキシニル誘導体 28 の合成にも応用することができる (図 11)。

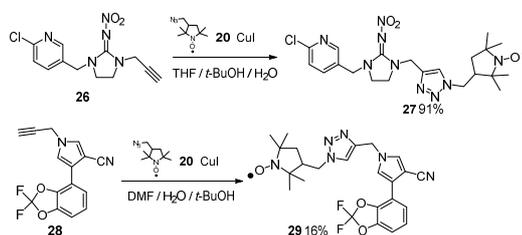


図 11

- スピラベル部位を持った農薬誘導体の ESR 測定 -

合成した農薬誘導体の ESR 測定を行い、吸収線の数、g 値および超微細結合定数 a_N を求めた。以下に測定結果を示す (図 12)。

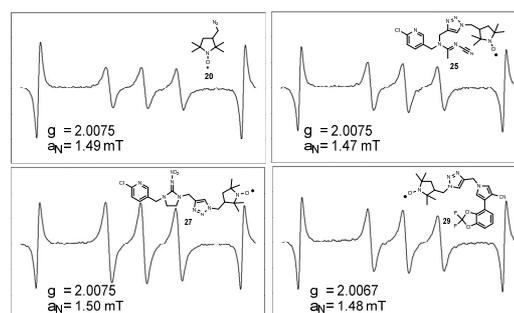


図 12

合成した農薬誘導体の ESR 測定において、吸収線の数、g 値および超微細結合定数 a_N は、スピラベル部位そのものの値と大きく変化することはなかった。このことは、スピラベル部位の構造変化が少ないことを意味しており、農薬に導入した際に、スピラベル剤のラジカル環境が維持されることが明らかになった。今後、作物内での農薬の浸透移行過程などを明らかにしていきたい。

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 4 件)

1. X. Sun, T. Obu, T. Kijima, S. Murakami, S. Matsuba, M. Kusakari, B. Hatano*, "Allylation of *N,N*-acetal derivatives using allyl tin reagent in the presence of aluminum chloride", *Heterocycles*, **2013**, *87*, 2395 - 2402.
2. B. Hatano*, K. Hashimoto, H. Katagiri, T. Kijima, S. Murakami, S. Matsuba, M. Kusakari, "Enantioresolution of 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl oxide using inclusion complex with chiral 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl", *J. Org. Chem.*, **2011**, *77*, 3595 - 3597.
3. R. Zhu, S. Murakami, B. Hatano, T. Kijima*, "Novel synthesis of poly(nitro -methystyrene) by fuming nitric acid", *ITE-IBA Lett. Batt. New Tech. Med.*, **2011**, *5*, 24 - 27.

4. B. Hatano*, T. Tachikawa, T. Mori, K. Nagahashi, T. Kijima, "Reductive coupling of aromatic *N,N*-acetals using zinc and chlorotrimethylsilane", *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 3467 - 3469.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. M. Kusakari, H. Nakagawa, Y. Ohta, H. Katagiri, T. Kijima, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Optical resolution of *rac*-2-methoxy-2-(1-naphthyl)propionic acid using (R)-1-phenylethylamine", *4th UK / Japan Conference in Catalytic Asymmetric Synthesis*, Apr. 19 - 20, (2013), Sendai.
2. A. Watanabe, T. Kijima, M. Kusakari, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Synthesis of spin-labeled agricultural chemical analog", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
3. Y. Saito, T. Kijima, M. Kusakari, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Synthesis of TEIO derivative and ESR study", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
4. R. Mashiko, Y. Nakazawa, M. Kusakari, B. Hatano, S. Murakami, T. Kijima*, "Enzyme-catalyzed resolution of -cyanohydrin derivatives", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
5. X. Wang, M. Kusakari, B. Hatano, S. Murakami, T. Kijima*, "Synthesis and properties of the alkyl ferrocenes with cation binding ability", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
6. P. Y. Samori, Y. Yoshida, Y. Adachi, M. Kusakari, S. Murakami, B. Hatano, N. Ohya, T. Kijima*, "Simulation Analysis of Chiral Recognition for Farnesyl Diphosphate Synthase from *Bacillus stearothermophilus*", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
7. M. Suzuki, T. Ooi, M. Kusakari, B. Hatano, S. Murakami, T. Kijima*, "Functions as nitroreductase activity by azoreductase from *Geobacillus stearothermophilus*", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
8. Y. Yoshida, M. Kusakari, B. Hatano, S. Murakami, T. Kijima*, "Enzyme-catalyzed resolution of optically active cyclohexylidene derivatives", *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sept. 28 - 30, (2013), Sendai.
9. 波多野豊平*, "水素結合を利用した包接化合物の形成とその応用", 平成 24 年度 化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 16 日, 秋田, (招待講演).

〔その他〕

ホームページ等

<http://hatano.yz.yamagata-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野 豊平 (HATANO, BUNPEI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：20333990

(2) 連携研究者

尾形 健明 (OGATA, TATEAKI)

山形大学・大学院理工学研究科・名誉教授
研究者番号：50091830

木島 龍朗 (KIJIMA, TATSURO)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：50272084

伊藤 智博 (ITO, TOMOHIRO)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：60361276