

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790131

研究課題名(和文)量子ドット標識による高感度蛍光プローブの簡便合成法の開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive fluorescent probes based on Quantum dot labeling

研究代表者

松本 健司 (MATSUMOTO, KENJI)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：20531817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ボンクレキン酸(BKA)の蛍光プローブ化を目的に構造活性相関研究を展開し、BKAの3つのカルボン酸がアポトーシス阻害活性を発現する上で重要であることを明らかにした。さらにBKAの構造を単純化したトリカルボン酸誘導体や配座固定型トリカルボン酸がアポトーシス阻害活性を示すことを見出した。これら新規誘導体はBKAより短工程で合成でき精製も容易なことから、入手容易なBKAの代替化合物としてだけでなく、蛍光基などを有する高機能性アポトーシス阻害剤や分子プローブを開発する上での有効なリード化合物として期待できる。さらに、抗腫瘍活性天然物xanthatinの効率的全合成を達成した。

研究成果の概要(英文)：Based on our developed total synthesis of BKA, we conducted the structure-activity relationship study, which revealed three carboxylic acid groups of BKA plays an important role in staurosporin-induced apoptosis inhibitory activity of HeLa cells. Next, we designed and synthesized simpler derivatives and the conformation-restricted derivatives and then found that these derivatives showed potent apoptosis inhibitory activity. Consequently, we successfully achieved the design and synthesis in more easily available potent novel apoptosis inhibitors, which would be useful for highly sensitive fluorescent probes. The efficient asymmetric synthesis of xanthatin based on the highly stereoselective conjugate allylation of the  $\alpha$ -butenolide was also achieved.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：蛍光プローブ 構造活性相関 ボンクレキン酸 キサンタチン

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージングは、医学・生命科学分野で最も汎用されているイメージング法であり、蛍光タンパク質やタグ融合タンパク質を用いた蛍光標識法の開発により様々な生命現象の解明に大きく貢献している。その中でも、抗体や低分子リガンドなどの生体作用分子を蛍光標識した蛍光プローブを用いる手法は、遺伝子操作が不要で操作が簡便な非常に優れた方法であり、マウスなど個体レベルの解析、疾病の解明や新薬開発に必要な不可欠である。そのため、抗体-抗原反応やリガンド-受容体相互作用に基づく特異性の高い蛍光プローブの開発が活発に行われているが、生体作用分子の本来の生物活性を損なわずに蛍光標識することは容易ではなく、簡便で汎用性の高い蛍光標識法の開発が現在求められている。このような背景のもと、申請者らは、糖脂質の集合構造(脂質ラフト)や糖修飾高分子のように糖鎖が集積すると強い相互作用を生じる多価効果に着目し、蛍光性ナノ粒子表面にリガンドを集積することで受容体親和性を保持または増強したりリガンド集積型高感度蛍光プローブの創製が可能になると考えた。この考えに基づき各種蛍光性ナノ粒子を用いた蛍光標識法の開発に取り組み、量子ドットを活用した蛍光プローブの簡便合成法の開発に成功した(産業財産権2)。量子ドットは、直径数 nm サイズの蛍光性ナノ粒子で、高輝度、高い光退色耐性、粒子サイズによる蛍光波長の制御が可能など優れた光学特性を有する。しかし量子ドットによる蛍光標識は抗体やペプチド等を用いる例が多く、低分子リガンドの標識法としては未だ十分確立されていない。申請者は、近年開発された無触媒クリック反応(Bertozzi, C.R. *Angew.* **2009**, 6974)を活用した新規量子ドット標識法の開発に成功した。本法は、抗体はもちろん低分子リガンドを母体化合物とする蛍光プローブの合成が可能であること、そして培養細胞など生細胞の解析に適応可能であることを見いだしている。そこで本研究では、申請者がこれまで独自に取り組んできた蛍光標識法の確立を目的に、高感度で特異性の高い蛍光プローブの開発を試みる。

### 2. 研究の目的

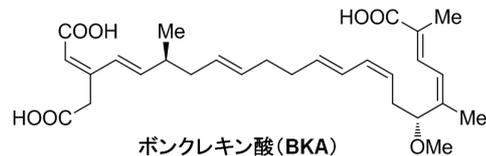
蛍光標識化した生体作用分子(蛍光プローブ)を用いた蛍光イメージング研究は、創薬研究や生命科学の発展に大きく貢献しているが、高感度で特異性の高い蛍光プローブの創製は容易ではない。本研究では、申請者が独自に開発した量子ドット標識法を活用して高感度蛍光プローブの合成を行い、その有用性および実用性を1つ1つ検証することにより本法の確立を目指す。そこで、低分子性リガンドやペプチド性リガンドをはじめ生物活性天然有機化合物等の蛍光標識化研究

を行い、本法の有用性を確かめる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミトコンドリア膜タンパク質 ANT 特異的な蛍光プローブの開発

ボンクレキン酸は、ミトコンドリア膜に存在するアデニンヌクレオチド輸送担体(ANT)の強力な阻害剤であり、近年、アポトーシス誘導阻害活性を有することが明らかにされ、アポトーシス研究における必須の分子ツールとして位置づけられている。しかし、ボンクレキン酸によるアポトーシス制御の分子レベルでの解明研究は端緒についたばかりであり、ANT 阻害作用とアポトーシス誘導阻害活性の間の詳細な分子機構の解明が待ち望まれている。申請者の所属研究室では、ボンクレキン酸の大量供給可能な実用的全合成の開発を達成している(7L 2004, 8863.; 7L 2009, 4164.)。まず、全合成を基盤に構造活性相関研究を展開し、蛍光基の導入部位を明らかにする。またボンクレキン酸は非常に複雑な構造を有する化合物であり、全合成に全40工程を要するため、合成容易で強力なアポトーシス阻害活性を示す新規誘導体を開発し、蛍光プローブの合成へと展開する。



#### (2) Xanthatin の効率的な全合成と蛍光プローブ合成

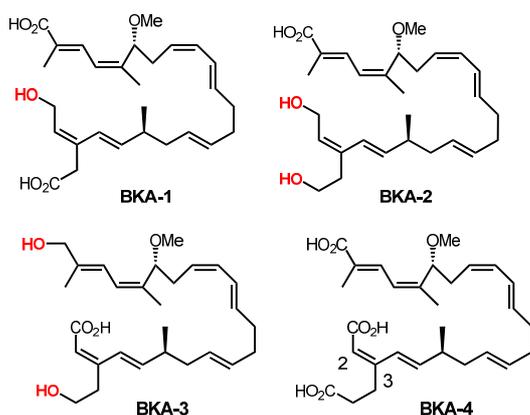
Xanthatin は、キク科植物のオナモミ(*Xanthium pennsylvanicum*)から単離・構造決定されたセスキテルペノイドであり、アレロパシー(植物他感作用)活性、抗炎症作用や抗 MRSA 活性などの生物活性を示す。最近、我々と荒牧らは xanthatin がヒト乳がん細胞に対し強力な抗腫瘍活性を示すことを見出した(*Chem. Res. Toxicol.* **2011**, 855.)。この作用機構はガン抑制遺伝子 GADD45 を特異的に活性化する非常にユニークな機構であることが明らかにされており、xanthatin は新規乳がん治療薬のリード化合物として期待されている。そこで、xanthatin の大量合成法の確立および構造活性相関研究、そして蛍光プローブの開発を行う。本研究を通して、xanthatin の未知標的タンパクや未解明現象の解明へと展開する。

### 4. 研究成果

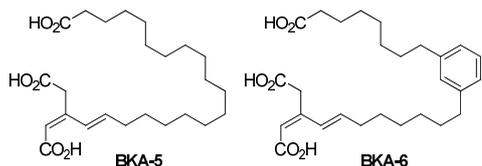
#### (1) ミトコンドリア膜タンパク質 ANT 特異的な蛍光プローブの開発

我々が以前に開発したボンクレキン酸の合成法を活用し、BKA のカルボン酸部位を水酸基に置換した BKA 誘導体 BKA-1, 2, 3 を合成した。また、ボンクレキン酸の C2-C3 の二

重結合は容易に異性化し、アポトーシス阻害活性が失活する知見を得ていたため、異性化の抑制を目的に、1 炭素伸長した BKA 誘導体 BKA-4 を合成した。上記合成した各種誘導体を、HeLa 細胞を用いたアポトーシス阻害試験により活性評価を行ったが、これら誘導体はアポトーシス阻害活性を示さず、細胞毒性を有することが分かった。この知見から、アポトーシス阻害活性を示す上で、3 つのカルボン酸が必須であると共に、標的タンパク質がその三次元的な位置関係を厳密に認識している事が示唆され、いずれのカルボン酸も蛍光基導入部位として適切ではないことが分かった。

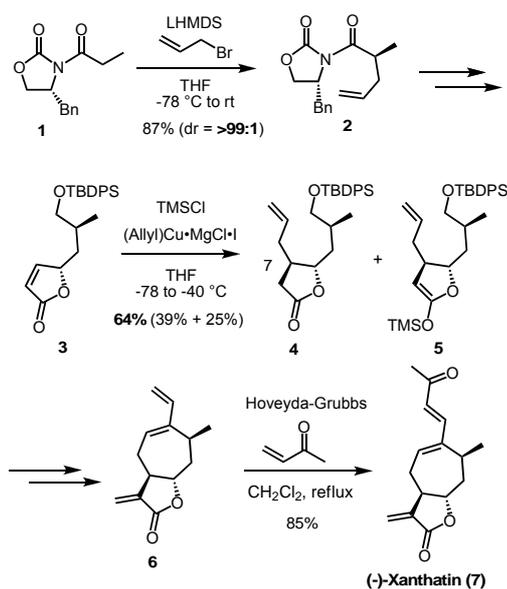


上述のように、3 つのカルボン酸がアポトーシス阻害活性発現に必須であることを明らかにしたので、蛍光プローブ開発を目指して、BKA の二重結合および側鎖全てを除去し分子構造を単純化したトリカルボン酸誘導体 BKA-5 を分子設計し、合成した。細胞試験の結果、ボンクレキン酸と同様なアポトーシス阻害活性を示すことが分かった。さらに、炭素鎖長の異なるトリカルボン酸誘導体を系統的に合成したところ、ボンクレキン酸と同じ炭素鎖長を有する誘導体 BKA-5 が最も強い阻害活性を示すことを見出した。そこで、BKA の立体配座の部分固定化による阻害活性の向上を目指し、また機能性置換基導入の足場としてベンゼン環を組み込んだ BKA 誘導体 BKA-6 を設計合成した。スタウロスポリン (STS) 誘導アポトーシス抑制評価の結果、BKA と同様の阻害活性を示した。配座固定型トリカルボン酸は、合成容易なアポトーシス阻害剤としてだけでなく、蛍光基などを有する高機能性アポトーシス阻害剤や分子プローブを開発する上での有効なリード化合物として期待できる。



## (2) Xanthatin の効率的全合成と蛍光プローブ合成

オキサゾリジノン 1 を用いた Evans 不斉アルキル化反応により、アリル化体 2 を高ジアステレオ選択性かつ高収率で合成し、LAH 還元、TBDPS 基保護、Morken らの不斉ジヒドロキシル化、TEMPO 酸化、そして安藤-Emmons オレフィン化により、プテノリド 3 を合成した。次に、本合成の鍵反応である共役アリル化反応による 7 位不斉中心の立体選択的構築を検討した。プテノリド等の  $\alpha,\beta$ -不飽和ラクトンに対する共役アリル化反応は、数例が報告されているに過ぎなかったため、様々なアリル金属種を用いてプテノリド 3 に対する共役アリル化反応を精査した。その結果、Lipshutz らのアリル銅試薬を用いる条件において反応が進行し、所望の立体配置を有する共役アリル付加体 4 及び 5 が高立体選択的に得られた。種々の官能基変換および閉環エニンメタセシスによりエキソメチレンラクトン 6 へと変換し、最後に第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒を用いたメチルビニルケトンとのクロスメタセシスにより、(-)-xanthatin (7) の全合成を達成した。本研究により、アリル銅試薬を用いた共役アリル化反応により 7 位不斉中心を高立体選択的に構築できることを見出し、xanthatin (7) のトランス縮環骨格の直接的構築に成功した。本法は、全 14 工程と従来法 (全 29 工程) を遙かに凌駕する効率性及び実用性を兼ね備えた合成法である。本合成法により、xanthatin の構造活性相関研究や蛍光プローブの開発研究への展開、そして xanthatin の作用機序解明研究の進展が大きく期待できる。



## 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 7件)

(1) Shindo, M.; Matsumoto, K. Synthesis of Xanthanolides including New Acylations and their Synthetic Applications. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2013**, *71*, 1152-1162. (査読有)

(2) Takeda, S.; Nishimura, H.; Koyachi, K.; Matsumoto, K.; Yoshida, K.; Okamoto, Y.; Amamoto, T.; Shindo, M.; Aramaki, H. (-)-Xanthatin induces the prolonged expression of c-Fos through an N-acetyl-L-cysteine (NAC)-sensitive mechanism in human breast cancer MDA-MB-231 cells, *The Journal of Toxicological Sciences* **2013**, *38*, 547-557. (査読有)

(3) Matsumoto, K.; Koyachi, K.; Shindo, M. Asymmetric Total Synthesis of Xanthatin and 11,13-Dihydroxanthatin using a Stereocontrolled Conjugate Allylation to  $\gamma$ -Butenolide. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1043-1049. (査読有)

(4) Yamada, Y.; Makamura, K.; Furukawa, R.; Kawamura, T.; Moriwaki, T.; Matsumoto, K.; Okuda, K.; Shindo, M.; Harashima, H. Mitochondrial delivery of bongkreikic acid using a MITO-Porter prevents the induction of apoptosis in human HeLa cells *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 1008-1015. (査読有)

(5) Okuda, K.; Hasui, K.; Abe, M.; Matsumoto, K.; Shindo, M. Molecular Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Potent Apoptosis Inhibitors Inspired from Bongkreikic Acid. *Chem. Res Toxicol.* **2012**, *25*, 2253-2260. (査読有)

(6) Matsumoto, K.; Shindo, M. Palladium-Catalyzed Fluoride-Free Cross Coupling of Intramolecularly Activated Alkenylsilanes and Alkenylgermanes: Synthesis of Tamoxifen as a Synthetic Application. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2012**, *354*, 642-650. (DOI: adsc.201100627) (査読有)

[学会発表](計 32件)

(1) 水品直之、松本健司、新藤充；アレンを用いた多置換共役ジエンの新規構築法の開

発；日本薬学会第134年会（熊本市，2014年3月28日-30日）

(2) 堂籠健斗，石井孝典，松本健司，新藤充；不均一系触媒を用いた芳香族アミン類の酸化の二量化反応；日本薬学会第134年会（熊本市，2014年3月28日-30日）

(3) 池永大、西川慶祐、酒井健太郎、松本健司、新藤充；Stemona アルカロイド類の全合成；日本薬学会第134年会（熊本市，2014年3月28日-30日）

(4) 石井孝典，堂籠健斗，寺井康了，松本健司，行平大地，三浦大典，藤村由紀，割石博之，新藤充；アミノ酸の微量検出に有効な負イオンモード用 MALDI-MS マトリックスの開発；日本薬学会第134年会（熊本市，2014年3月28日-30日）

(5) 松本健司、新藤充；アポトーシス制御分子の合成と活性評価；第1回アライアンス若手研究交流会（東北大学片平キャンパス、仙台市、2013年11月25日-26日）

(6) 松本健司、佐々木剛、横地敬太、新藤充；gem-ジアニオンの創製と新規連続反応の開発；第39回反応と合成の進歩シンポジウム（九州大学、福岡市、2013年11月5日-6日）

(7) 松本健司；有機合成化学の貢献：膜タンパク質阻害剤～アポトーシスの制御へ；第34回日本薬学会九州支部コロキウム（第一薬科大学、福岡市、2013年10月12日、招待講演）

(8) 松本健司、陶山正樹、森脇拓也、蓮井啓佑、福永幸裕、奥田勝博、安部真人、狩野有宏、新藤充；ボンクレキン酸を起点とするアポトーシス阻害剤の設計と活性評価；第55回天然有機化合物討論会（同志社大学、京都市、2013年9月18日-21日）

(9) 水品直之、松本健司、新藤充；アレンを用いた Ireland-Claisen 転位反応による多置換共役ジエン構築法の開発；第48回化学関連支部合同九州大会（北九州国際会議場、北九州市、2013年7月6日）

(10) 松本健司、新藤充；Efficient Asymmetric Syntheses of trans-Fused Xanthanolides；The 23rd French-Japanese Symposium (Nagasaki, 2013.5.12-15)

(11) 松本健司、佐々木剛、新藤充；高機能性 gem-ジアニオンによるワンポット連続反応の開発；日本薬学会第133年会（横浜市，2013年3月28日-30日）

(12) 和宇慶久史、松本健司、新藤充；対称

ジチオマロン酸エステルの非対称化反応の反応機構；日本薬学会第 133 年会（横浜市，2013 年 3 月 28 日-30 日）

(13) 陶山正樹、福永幸裕、奥田勝博、松本健司、新藤充；アポトーシス阻害活性を示す配座固定型トリカルボン酸の開発；日本薬学会第 133 年会（横浜市，2013 年 3 月 28 日-30 日）

(14) 和宇慶久史、松本健司、新藤充；Monoaminolysis of Symmetric Dithiomalonates；Kyushu Univ-NUS Joint Seminar 2013（シンガポール，2013 年 1 月 30 日-31 日）

(15) 西川慶祐、池永大、崔香花、八道健太郎、松本健司、新藤充；イノラートを用いた stemona アルカロイド類の合成研究；第 54 回天然有機化合物討論会（東京農業大学、東京都、2012 年 9 月 20 日）

(16) 松本健司、小谷内邦吉、新藤充；xanthatin 類の効率的合成；第 10 回次世代を担う有機化学シンポジウム（大阪大学銀杏会館、大阪市、2012 年 5 月 11 日）

(17) 松本健司；Xanthanolide 類の効率的合成；有機合成薬学シンポジウム（徳島大学、徳島市、2012 年 3 月 9 日、招待講演）

〔図書〕(計 1 件)

(1) Shindo, M., Matsumoto, K.  
Stereoselective Synthesis of  
Tetrasubstituted Alkenes via  
Torquoselectivity-Controlled Olefination  
of Carbonyl Compounds with Ynolates. *Top. Curr. Chem.* **2012**, 327, 1-32. (査読有)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

(1) 名称：MALDI 質量分析用マトリックス  
発明者：新藤充、割石博之、三浦大典、藤村由紀、松本健司

権利者：国立大学法人九州大学

番号：特願 2013-137028

出願年月日：2013 年 6 月 28 日

国内外の別：国内

(2) 名称：蛍光プローブ

発明者：松本健司、疋田正喜、成宮周

出願人：国立大学法人京都大学、アステラス製薬株式会社

番号：特開 2013-32291

出願年月日：2013 年 2 月 14 日

国内外の別：PCT 出願

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/dv01/dmstj.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 健司 (MATSUMOTO KENJI)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：20531817