

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560443

研究課題名(和文)アジド基の特性を利用した生物発光による硫化水素検出系の開発

研究課題名(英文)Studies toward development of a novel CTZ-type hydrogen sulfide probe

## 研究代表者

細谷 孝充 (Hosoya, Takamitsu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60273124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：様々な生命現象の発現・制御に重要な役割を果たしている硫化水素の生体内局在を観察する手法が強く求められているものの、微量かつ短寿命の硫化水素を生体内で高感度に、しかも、定量的かつリアルタイムで検出することは未だに容易ではない。これに対して本研究では、生物発光基質であるセレンテラジン類の硫化水素による変換を利用した検出を目指し、アジド基を有する新規セレンテラジン類の開発のための各種検討を行った。具体的には、(1)  $\nu$ -セレンテラジン類の簡便合成法の開発、(2) 多置換ピラジン類の自在合成法の開発、(3) アジド基とヘテロ元素求核種との反応性に関する検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a new method that is capable of detecting hydrogen sulfide with a novel coelenterazine (CTZ)-type probe. To achieve this purpose, we conducted following studies regarding the synthesis of CTZ-related compounds and reactivities of azide molecules. (1) A novel synthetic method for  $\nu$ -coelenterazine ( $\nu$ -CTZ), which is a vinylene-bridged analog of native CTZ with a large red-shifted luminescence property, has been developed. The synthesis was achieved in a concise way through the use of three sequential cross-coupling reactions and ring-closing metathesis (RCM). (2) We have found that four different substituents can be introduced into pyrazine via four palladium-catalyzed regioselective cross-coupling reactions, using trihalogenated aminopyrazine as the starting material. (3) We have revisited the reduction of azides using a variety of phosphines and achieved a selective reduction of an aromatic azido group under mild conditions.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 有機合成化学 アジド ピラジン セレンテラジン

## 1. 研究開始当初の背景

硫化水素は、一般的には毒ガスとして知られているが、実は生体機能を制御する重要な分子として生体内の至るところで活躍していることが明らかにされてきた (H. Kimura, *et al.*, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1366; *etc.*). たとえば、脳における神経伝達調整、血管弛緩の誘導、酸化ストレスからの神経細胞保護、といった多岐にわたる役割を硫化水素が担っているということが近年相次いで見いだされている。しかし、硫化水素が生体内において短寿命であることから、これを生体内においてリアルタイムで検出・定量できる手法が強く求められている。こうした背景のもと、最近、硫化水素検出用蛍光プローブが開発され、硫化水素に関わる生体分子機能を徐々に解析できるようになってきた (T. Nagano, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18003; *etc.*). しかし、蛍光発光を利用した検出系では生体組織の自家蛍光のために、硫化水素の生体内局在を定量的かつリアルタイムで検出することが困難である。硫化水素を検出する分子プローブを開発できれば、一酸化窒素、一酸化炭素に次ぐ、「第3のガス性情報伝達物質」である硫化水素解析法の革新によって、気体による情報伝達を扱うガスバイオロジー分野を強く推進すると期待できる。

これまでに我々は、生物発光現象を利用した検出系に着目して様々な研究を展開してきた。生物発光検出系は蛍光検出系と比べて 10~1000 倍高い感度を有するため、微量な短寿命化学種の定量に適した手法である。そこで本研究において、生物発光を利用することで、硫化水素の優れた検出系を新たに開発しようと考え、ホタルルシフェリンと並び、古くから研究されている代表的な生物発光基質であるセレンテラジン (**1**, CTZ) に改めて着目した。CTZ は、オワンクラゲ由来の発光タンパク質イクオリンをはじめとして、多くの海洋生物に共通の発光基質として利用されている。

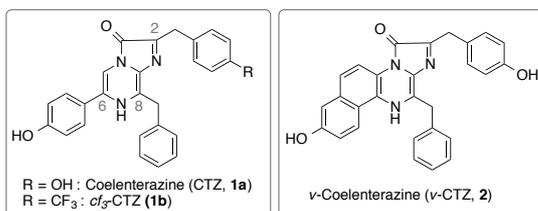


図1 セレンテラジン(CTZ)類縁体およびv-セレンテラジン(v-CTZ)の構造

本研究で我々は、適切な構造改変によって実用的な発光基質が創出できると考え、硫化水素と特異的に反応し、生物発光現象を引き起こすと期待される、アジド基を有する CTZ 類縁体の開発を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、CTZ 類の生物発光現象の活用を念頭に、硫化水素との反応部位を有する CTZ 類縁体合成を目指し、繊細な反応性部位を配置

した類縁体合成に利用できる、基盤となる手法の開発から取り組んだ。具体的には、硫化水素の高い求核能力に着目し、アジド基への求核攻撃を引き金として変換される CTZ 類縁体を設計し、これを実現するため、(1) より長波長で生物発光する v-CTZ (**2**) の簡便合成法を開発するとともに、(2) CTZ 類縁体の中心骨格であるアミノピラジンへの置換基の自在な導入法の開発に加え、(3) アジド基の変換のために、アジド基へのヘテロ求核剤の付加を経る反応に関して精査しようと考えた。これらの検討から得られた基礎的知見にもとづき、新規 CTZ 類縁体の創製による硫化水素の検出法の開発に取り組もうと考えた。

## 3. 研究の方法

## (1) v-CTZ 類の簡便合成法の開発

硫化水素の検出を念頭に、クロロ基と2つのブromo基を有するアミノピラジンから出発し、3度のクロスカップリング反応と閉環メタセシス反応を鍵反応として、長波長で生物発光する v-CTZ 類の簡便合成法を開発した。さらに、合成した v-CTZ と安定化した類縁体に関して、その生物発光特性を調べた。

## (2) 多置換ピラジンの簡便合成法の開発

硫化水素を検出できる CTZ 型プローブの開発を念頭に、まず、多置換ピラジンの簡便合成法の開発に着手した。4置換ピラジン類は、CTZ をはじめ、生物活性化化合物に広く見られる重要な含窒素環式化合物である。しかし、多置換ピラジン類の合成はいまだ容易ではなく、プローブ創製に必要な繊細な官能基を配置したピラジン合成のためには、多置換ピラジン類の簡便合成法の開発が急務であると考えた。これに対して、まず我々は、最近開発に成功した v-CTZ 類の効率的合成法を参考に、市販品より1段階で合成可能な2-アミノ-3,5-ジブromo-6-クロロピラジンをプラットフォーム分子として用いて、4種の異なる置換基を有するピラジン類の合成法の開発に取り組んだ。

## (3) 芳香族アジド基の還元法の開発

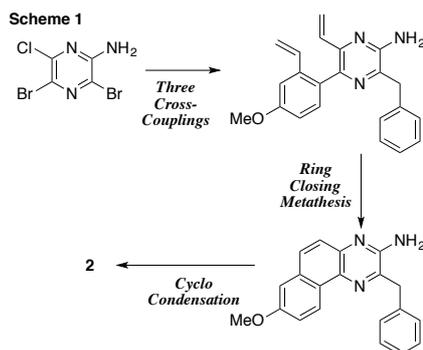
アジド基を利用した硫化水素の検出を念頭に、種々のヘテロ元素求核種と芳香族アジドとの反応を検討した。その結果、種々のチオール類は芳香族アジドとは室温では反応しない一方で、様々なホスフィン類が芳香族アジドと速やかに反応し、しかも、生じるアザイリドが水などに対して十分に安定であることがわかった。得られた知見が、アジド基を有する硫化水素プローブ開発において重要であると考え、ホスフィンの構造と生成するアザイリドの安定性に関して精査したところ、芳香族アジド基を還元するための簡便な手法の開発に成功した。

## 4. 研究成果

## (1) v-CTZ 類の簡便合成法の開発

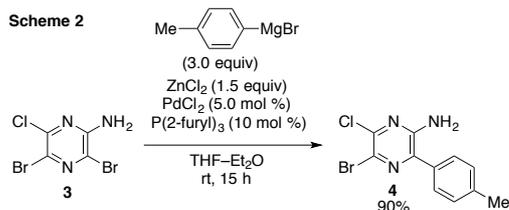
より長波長で発光するプローブの開発を目指し、共役系を伸ばした v-CTZ 類の効率的合成

法の開発に成功した (Scheme 1)。具体的には、クロロ基と2つのプロモ基を有するアミノピラジンから出発し、根岸カップリング、鈴木-宮浦カップリング、Stille カップリングという3度のクロスカップリング反応を駆使することで、鍵中間体の合成に成功した。次に、Wittig反応でメチレン化した後、閉環メタセシスで $\nu$ -CTZの主骨格を構築できた。最後に、脱保護の後、従来法であるケトアセタールとの縮合環化反応を行うことで、 $\nu$ -CTZ や安定性を向上させた類縁体の合成に成功し、これらの発光特性や安定性を明らかにすることができた。



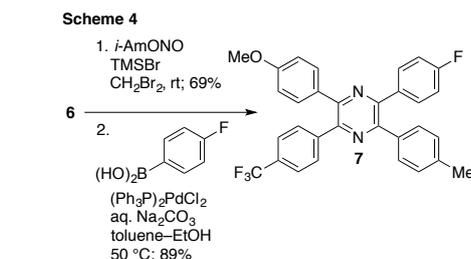
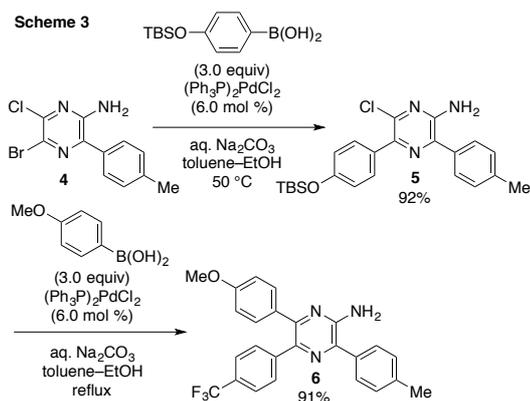
## (2) 多置換ピラジンの簡便合成法の開発

種々の検討の結果、パラジウム触媒によるクロスカップリング反応を順次行うことで、ピラジン環上に4種の異なる置換基を導入できることを明らかにした (Schemes 2-4)。具体的には、まず、根岸クロスカップリング反応の条件に付したところ、2つの臭素原子を区別することができ、アミノ基のオルト位に $p$ -トリル基を選択的に導入できた (Scheme 2)。このとき、系中で調製したジアリール亜鉛が効率よく利用できることを明らかにした。



つづいて、適切な反応条件を選択することで、アミノ基は無保護のまま、残ったプロモ基、クロロ基を鈴木-宮浦クロスカップリング反応によって順次変換できることを明らかにした (Scheme 3)。

さらに、アミノ基も変換に利用できることも分かった (Scheme 4)。具体的には、Sandmeyer反応によりプロモ基に変換した後、再び鈴木-宮浦クロスカップリング反応によってアリール基を導入することで、4種の置換基を有するピラジンの合成に成功した。本手法を利用することで、アジド基を配置した CTZ 類の合成を実現できると期待される。



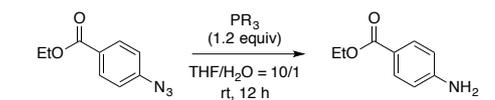
## (3) 芳香族アジド基の還元法の開発

硫化水素検出への応用を念頭に、アジドとヘテロ元素求核種との反応性に関して詳しく調べたところ、芳香族アジド基の効率的な還元法の開発に成功した。

3価のリチウム化合物を用いる Staudinger 反応は、アジド基を還元する重要な手法である。Staudinger 反応は繊細な官能基を許容し、穏和な条件で進行することから広い分野で利用されてきた。しかし、芳香族アジドからアニリンへの変換は必ずしも容易ではない。これは、中間体として生じる芳香族イリドが比較的安定なためであり、より効率的に変換できる手法が求められている。これに対して、本研究で我々は、アジド化合物のヘテロ元素求核種との反応性を検討する過程で、市販されている様々なホスフィンとの反応性を調べた結果、芳香族アジドを対応するアニリン類へと変換する簡便な手法を見いだすことに成功した。

まず、様々なホスフィン類を用いて還元反応を検討した (Table 1)。具体的には、4-アジド安息香酸エチルに対して、THF と水との混合溶媒を用いて、様々なホスフィン類を室温で作用させた。その後、内部標準を加え、 $^1\text{H NMR}$  によって解析することで、アニリンの収率を求めた。トリフェニルホスフィンを作用させた場合には、芳香族アジドは消費されたものの、対応するアニリンはほとんど得られなかった (entry 1)。これは、反応中間体であるイリドが加水分解されなかったためと考えられる。さらに、様々なホスフィンを検討した (entries 2-8)。その結果、トリフルリルホスフィンやトリブチルホスフィンを用いた場合に、高収率でアニリンが得られた (entries 3 and 6)。さらに、取り扱い容易なトリブチルホスフィンの  $\text{HBF}_4$  塩とトリエチルアミンを加えたときも、効率よくアニリンが得られた (entry 9)。

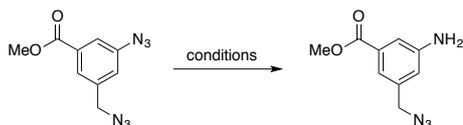
Table 1.



entry	PR <sub>3</sub>	conversion (%)	aniline (%)
1	PPh <sub>3</sub>	100	trace
2	P(C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	0	0
3		84	84
4	P(NMe) <sub>3</sub>	100	0
5	P(OMe) <sub>3</sub>	100	0
6	P( <i>n</i> -Bu) <sub>3</sub>	100	quant
7	PCy <sub>3</sub>	100	0
8	P( <i>t</i> -Bu) <sub>3</sub>	15	0
9	P( <i>n</i> -Bu) <sub>3</sub> ·HBF <sub>4</sub> Et <sub>3</sub> N (2.0 equiv)	100	94

<sup>a</sup>Yields based on <sup>1</sup>H NMR analysis by using 1,1,2,2-tetrachloroethane as an internal standard.

Table 2.



entry	conditions	yield (%)
1	P( <i>n</i> -Bu) <sub>3</sub> ·HBF <sub>4</sub> (1.0 equiv) Et <sub>3</sub> N (1.2 equiv) THF/H <sub>2</sub> O, rt	93%
2	PPh <sub>3</sub> (1.0 equiv) THF/H <sub>2</sub> O, rt then AcOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	complex mixture
3	BH <sub>3</sub> ·THF (1 equiv) THF, rt	no reaction
4	NaI (50 mol %) BF <sub>3</sub> (2.0 equiv) MeCN, rt	no reaction

本手法がアジド基の変換に関する重要な知見であるだけでなく、アニリン類の合成法としてもきわめて有用であると考え、次に、ジアジド化合物を用いて、芳香族アジドの選択的還元を試みた (Table 2)。その結果、トリブチルホスフィンを用いることで効率的に目的物を得ることができた (entry 1)。一方、トリフェニルホスフィンを用いた場合には、芳香族アジド基が選択的に変換されたものの、この条件では中間体であるイリドが加水分解されなかった。そこで、酢酸を添加したところ、複雑な混合物となってしまい、目的物はほとんど得られなかった (entry 2)。また、BH<sub>3</sub>やNaIを用いる還元反応は全く進行しなかった (entries 3 and 4)。

以上のように、本研究の途上で我々は、芳香族アジドからアニリン類を高収率で得る条件を見いだした。これにより、ジアジド化合物の芳香族アジド基を選択的に還元できることを明らかにできた。本手法は、芳香族アジドから

アニリンを簡便に合成する有用な手法となると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- (1) Takamitsu Hosoya\*, Rie Imori, Suguru Yoshida, Yuto Sumida, Yuiko Sahara-Miura, Jun-ichi Sato, and Satoshi Inouye  
“Concise Synthesis of *v*-Coelenterazines”  
Organic Letters, **17**, 3888–3891 (2015).  
DOI: 10.1021/acs.orglett.5b01872  
(査読あり)

[学会発表] (計3件)

- (1) ○目黒友啓、吉田 優、細谷孝充  
3H4-03 “穏和な芳香族アジド基選択的還元反応の開発”  
日本化学会第96春季年会  
2016年3月26日(土)  
同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市)

- (2) ○秋山 圭、西山義剛、吉田 優、細谷孝充  
1H4-30 “クロスカップリング反応により4つの置換基を自在に導入可能なピラジン合成法の開発”  
日本化学会第96春季年会  
2016年3月24日(木)  
同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市)

- (3) ○秋山 圭、西山義剛、吉田 優、細谷孝充  
P1-029 “4度のクロスカップリング反応を利用した4置換ピラジン合成法の開発”  
第5回CSJ化学フェスタ2015  
2015年10月13日(火)  
タワーホール船堀(東京都江戸川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細谷 孝充 (HOSOYA, Takamitsu)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
研究者番号：60273124