

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810095

研究課題名(和文) 生体内酸化現象解析を指向した活性酸素検出ジヒドロピリミジン蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of dihydropyrimidine fluorescent probe to detect reactive oxygen species for analysis of in vivo oxidation

研究代表者

西村 良夫 (NISHIMURA, Yoshio)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60431516

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)：活性酸素を選択的かつ高感度に検出する新しい方法を開発して生体内の酸化状態を効率的に調べ、病態分子解析を深化させることは現代社会の重要な研究テーマである。本研究は、ジヒドロピリミジン誘導体が活性酸素によって酸化的芳香族化を受けて強い蛍光性のピリミジン誘導体を生成するという方法論により、新しいジヒドロピリミジン蛍光プローブを開発するものである。

新規4,6-無置換ジヒドロピリミジン誘導体のうち、2-アミノジヒドロピリミジン-5-エステル、5-アシル-2-フェニルジヒドロピリミジンおよび5-アシル-2-アミノジヒドロピリミジンの合成法を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：Development of a new method to detect reactive oxygen species (ROS) in high selectivity and sensitivity for analysis of in vivo oxidation state is a significant research theme. For this purpose, we set up our goal to establish a novel and practical dihydropyrimidine fluorescent probe that is oxidized by ROS to give strongly fluorescent pyrimidine.

In this project, we developed novel methods to synthesize hitherto unavailable 4,6-unsubstituted 2-aminodihydropyrimidines 5-carboxylic acid ethyl esters, 4,6-unsubstituted 5-acyl-2-phenyldihydropyrimidines and 4,6-unsubstituted 5-acyl-2-aminodihydropyrimidines, which expanded dihydropyrimidine-based chemistry.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ジヒドロピリミジン ピリミジン 蛍光プローブ 活性酸素 酸化

1. 研究開始当初の背景

活性酸素 (以降、ROS と表記する) は、呼吸 (ミトコンドリアでの酸素利用によるエネルギー生成過程) を主な発生源として生体内に酸化損傷を与えるが、過剰に産生されるとガン、心筋梗塞、アルツハイマー病などの重大な疾病の引き金となる。代表的 4 種のほか、関連化学種としてさまざまなものが知られている (Figure 1)。呼吸により体内へ取り込まれた酸素の 1-3% が ROS になるとされ、外的要因としてはストレス、紫外線、アルコール、排気ガスも挙げられ、これらは現代社会特有の環境に由来するため、ROS にさらされることは不可避である。従って、ROS を選択的・高感度に検出する新しい方法を構築して生体内の酸化状態を効率的に調べ、その結果として病態分子解析を深化させることは現代社会の重要な研究テーマである。

代表的な ROS			
$O_2^{\cdot -}$	1O_2	H_2O_2	$^{\cdot}OH$
$^{\cdot}OOH$	$ROOH$	ROO^{\cdot}	RO^{\cdot}
$HOCl$	NO^{\cdot}	NO_2	ONO_2

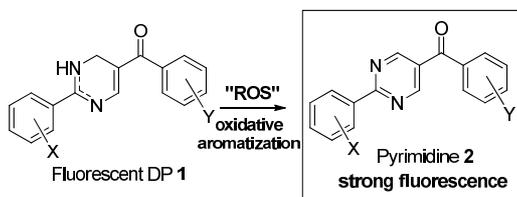
Figure 1

ROS 検出蛍光プローブの開発研究は近年進んでおり、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素などの特異的検出が可能となっている。しかし、実際に生体内で利用できる実用的な蛍光プローブとなると多くの機能が求められ、化学種選択性だけでなく、高感度 (nM 濃度以下)、長波長領域での励起・発光、合成の容易さ、細胞膜透過性、少ない細胞障害性 (安全性) などが挙げられ、多岐に渡る。蛍光プローブと蛍光顕微鏡を用いる生体解析は生きた細胞を観察する効果的手段だが、万能な蛍光プローブは少ない。

2. 研究の目的

ジヒドロピリミジン (以降、DP と表記する) 誘導体に関する研究は最近まであまり行われてこなかったが、近年になって合成法や機能性分子としての利用に関する研究が進展し、中でも有糸分裂に関わるタンパク質を阻害する初めての化合物が見出され、抗ガン剤としての有用性から注目された。申請者は最近の研究によって新しい DP 骨格構築法を見出しており、特に置換基の少ないシンプルな誘導体の合成を中心に進めてきた。例えば、従来困難であった 4,6-無置換 2,5-二置換ジヒドロピリミジンなどの誘導体の合成に成功した。あわせて、一連の化合物群の生物活性、機能性分子としての活用に興味を持って研究を進めてきた。ところで、研究途上で得た DP 誘導体の一つである 2-アリール-5-アリロイルジヒドロピリミジン誘導体の

蛍光スペクトルから、蛍光性を有することが示唆された。これまで蛍光性の DP 誘導体に関する研究は報告されておらず、新しい知見であった。DP 誘導体は酸化剤あるいは空気中で酸化され、対応するピリミジン誘導体へ変換されることが知られている。そこで、DP 誘導体を利用する新しい活性酸素検出蛍光プローブを開発したいと考えた。すなわち、活性酸素によって DP 誘導体 1 が脱水素化 (酸化芳香族化) を受けて発光波長、色調や蛍光強度の異なる蛍光性ピリミジン誘導体 2 へと変換され発光することを基本原理として、新しい ROS 検出蛍光プローブを開発できないかと考えた (Scheme 1)。DP 誘導体の酸化剤に対する高い反応性 (不安定性) を ROS 検出に活かそうというものである。



Scheme 1

3. 研究の方法

新規なジヒドロピリミジンの合成法の開発を中心に行い、誘導体合成が進む中で並行して蛍光性評価を行う。電子的・立体的効果について系統立てて各種誘導体を合成し、順次ピリミジン誘導体へ酸化して、両化合物の蛍光性を精査する。芳香族共役系と互変異性構造が重要な可能性が示されているので、2 位芳香族、5 位アリロイル基、互変異性体を部分構造に組み込んだ化合物を出発点とし、周辺誘導体を対象にする (Figure 2)。計画通りに進まない場合は、既知のフルオレセインやカチオン性ホスフィン部を含む誘導体で打開策を検討する。順調に進展した場合、細胞内での DP 誘導体の蛍光プローブとしての機能評価を行う。

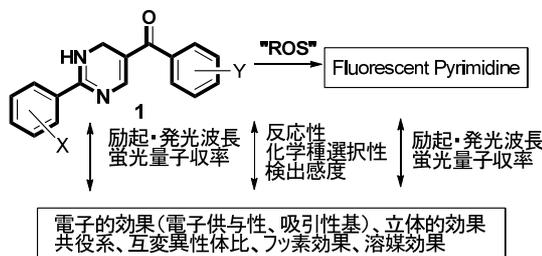
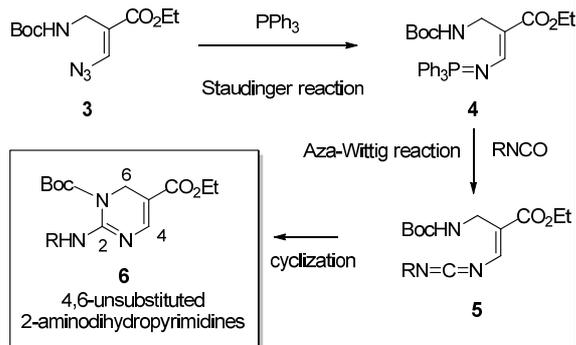


Figure 2

4. 研究成果

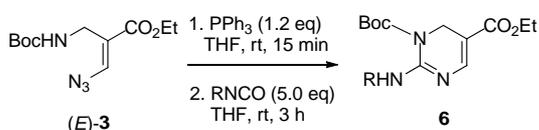
(1) 連続的 Staudinger / Aza-Wittig 合成 / 環化反応による 4,6-無置換 2-アミノジヒドロピリミジン-5-エステル合成
ジヒドロピリミジン誘導体の合成には Biginelli 反応をはじめとする閉環反応が主な合成法として利用されてきたが、置換基の少ない誘導体の合成は一般に困難であった。今回、新しいジヒドロピリミジン骨格構

築方法として、Scheme 2 のように () アルケニルアジド **3** の Staudinger 反応、() イミノホスホラン **4** とイソシアナートの Aza-Wittig 反応、() カルボジイミド **5** の分子内閉環反応を連続して行う新しい合成法を開発し、これまで例がない 4,6-無置換-2-アミノジヒドロピリミジン **6** を得ることに成功した。



Scheme 2

結果の詳細は以下の通りである。プロモピルビン酸エチルより合成したアルケニルアジド (*E*)-**3** に、THF 中トリフェニルホスフィンと反応させた後にフェニルイソシアナートと反応させると、2-アミノジヒドロピリミジン **6a** が収率 78% で得られた (Table 1, Entry 1)。パラ位にクロロ基などの電子吸引性基を有する芳香族イソシアナートは高い反応性を示し、メトキシ基の場合は比較的収率が低下したが、いずれも好収率で **6** が得られた (Entries 2-5)。立体障害のある 2-トリルイソシアナートや 1-ナフチルイソシアナートでも反応は進行し、**6e**, **6f** が得られた (Entries 6,7)。アルケニルアジド **3** の立体化学は重要であり、(*Z*)-**3** を基質に用いた場合 **6a** は得られなかった (Entry 8)。反応中間体のカルボジイミド (*Z*)-**5** (Scheme 1) が環化を起こさないと考えられ、原料のアルケニルアジドの立体化学は重要であることがわかった。



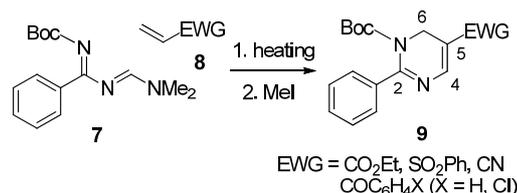
Entry	R	6	Yield (%)
1	Ph	6a	78
2	4-ClC ₆ H ₄	6b	85
3	4-EtO ₂ CC ₆ H ₄	6c	92
4	4-CF ₃ C ₆ H ₄	6d	95
5	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	6e	65
6 ^a	2-CH ₃ C ₆ H ₄	6f	47
7	1-naphthyl	6g	54
8 ^b	Ph	6a	0

a) Reaction time with RNCO was 12 h.
b) (*Z*)-**3** was used as a starting material.

Table 1

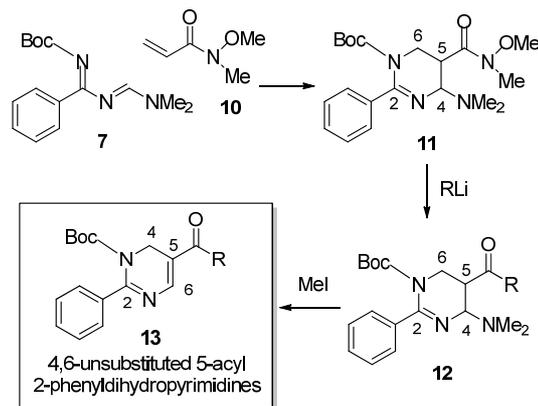
(2) Weinreb アミド基を利用する 4,6-無置換 5-アシル-2-フェニルジヒドロピリミジンの合成

先に、1,3-ジアザ-1,3-ブタジエン誘導体 **7** と電子吸引性基を有するアルケン **8** との環化反応と続く脱離反応により、4,6-無置換-2-フェニルジヒドロピリミジン誘導体 **9** の合成法を開発した (Scheme 3)。



Scheme 3

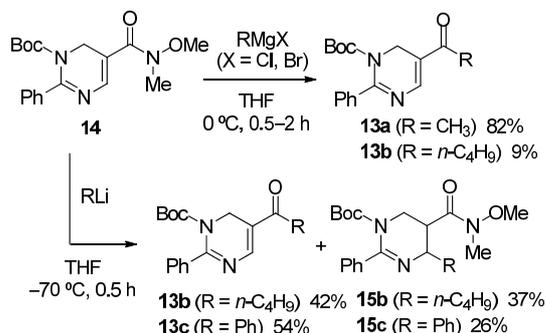
この反応においてビニルケトン誘導体を用いた場合、4,6-無置換 5-アシル-2-フェニルジヒドロピリミジンを与える。しかし、アリールビニルケトンは入手容易でないため調製する必要があり、またメチルビニルケトンは反応に適用できなかった。そこで今回、Scheme 4 に示すように () 1,3-ジアザジエン **7** と Weinreb アミド基を有するアルケン **10** との環化反応、() テトラヒドロピリミジン **11** に対する有機リチウム試薬による 5 位 Weinreb アミド基のアシル基への置換反応による **12** の合成、() **12** のジメチルアミノ基の脱離によるジヒドロピリミジンへの変換、により 4,6-無置換 5-アシル-2-フェニルジヒドロピリミジン **13** を合成した。これにより、テトラヒドロピリミジン **11** を合成共通中間体として、**13** を収率的に合成することができた。



Scheme 4

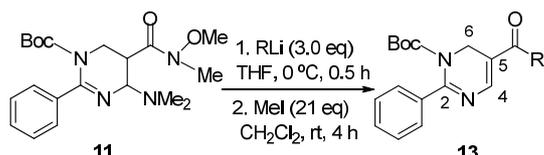
結果の詳細は以下の通りである。当初は、Weinreb アミド基を有するテトラヒドロピリミジン **11** をジヒドロピリミジン **14** に変換し、有機リチウム試薬またはグリニャール試薬によって 5 位 Weinreb アミド基のアシル基への変換反応を検討した (Scheme 5)。メチルグリニャール試薬を用いると収率よく反応したが、ブチルまたはフェニルグリニャール試薬では低収率であった。ブチルリチ

ウムやフェニルリチウムを用いると 5-アシルジヒドロピリミジン **13** は得られたが、1,4-付加体 **15** が副生が問題となった。



Scheme 5

1,4-付加を回避するために基質をテトラヒドロピリミジン **11** に変えて検討した。ブチルリチウムを反応させると定量的に 5-ペンタノイルテトラヒドロピリミジンが得られた。シリカゲルカラム中で安定でないため、粗生成物のままヨードメタンを作用させてジヒドロピリミジン体 **13b** に変換し、収率 85% で得た (Table 2, Entry 1)。なお、メチルグリニヤール試薬と **11** はほとんど反応せず、原料が回収された。基質の適用範囲を調べたところ、アルキニルリチウム、各種の芳香族リチウム試薬を用いて 4,6-無置換 5-アシル-2-フェニルジヒドロピリミジン **13** を収率よく合成することができた。

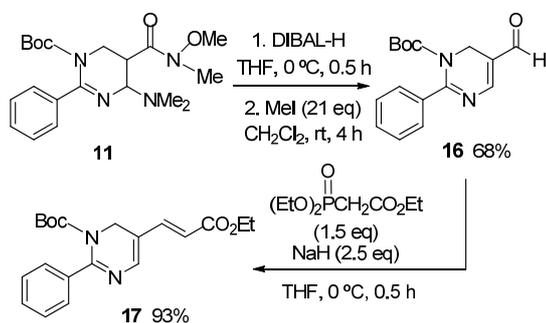


Entry	R	13	Yield (%)
1 ^a	<i>n</i> -Bu	13b	85
2	Ph	13c	89
3	PhC≡C—	13d	86
4	4-MeOC ₆ H ₄	13e	79
5	4-MeC ₆ H ₄	13f	80
6	4-CF ₃ C ₆ H ₄	13g	76
7	2-naphthyl	13h	76
8 ^b	2-thienyl	13i	65

a) Reaction time with *n*-BuLi was 2 h.

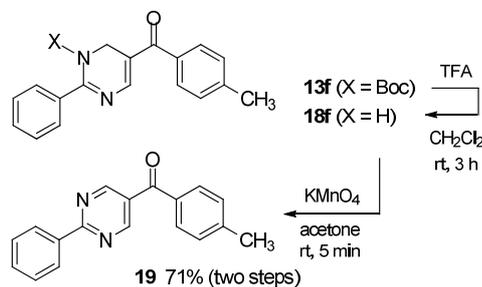
Table 2

アシル基以外への変換反応として、水素化ジイソブチルアルミニウム (DIBAL-H) を用いて 5-ホルミルジヒドロピリミジン **16** に導けた (Scheme 6)。さらに、オーナーエモンズ (Horner-Emmons) 反応によってホルミル基を共役エステル **17** に変換することもできた。この手法を用いれば、適切な Horner-Emmons 試薬を反応させることで **13** における 5 位の共役系を 2 炭素伸長することができるため、それにより蛍光特性を変化させられるであろう。



Scheme 6

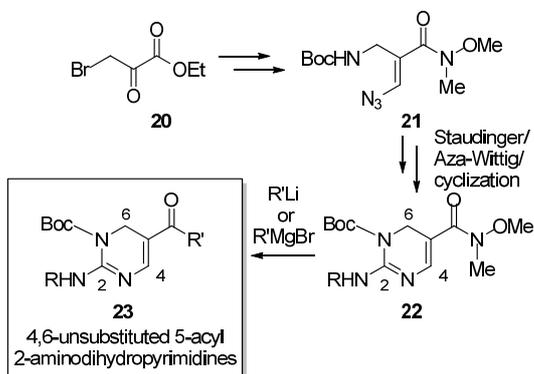
窒素原子上の保護基 (Boc 基) はトリフルオロ酢酸 (TFA) を反応させることによって容易に除去でき、水素がいずれかの窒素上にある互変異性体の平衡混合物が得られる。これは過マンガン酸カリウムによってピリミジン **19** にすみやかに酸化することができた (Scheme 7)。単純な構造であるが、**19** はこれまでに知られておらず、Table 2 より同様の反応によって導かれるピリミジン誘導体はいずれも新規な化合物群である。



Scheme 7

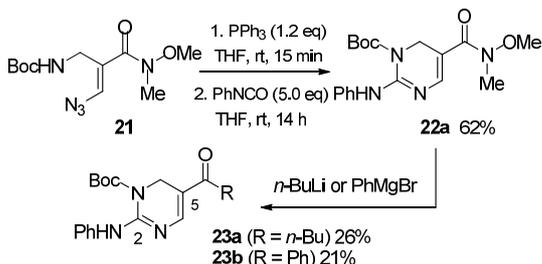
(3)連続的 Staudinger / Aza-Wittig 合成 / 環化反応および Weinreb アミド基を利用する 4,6-無置換 5-アシル-2-アミノジヒドロピリミジンの合成

(1)の研究では 5 位がエチルエステルのみであったが、(2)の研究結果から Weinreb アミド基をアルケニルアジドにあらかじめ導入することにより、5 位のさらなる官能基変換が可能になる。すなわち、() Weinreb アミド基への変換工程を含む、プロモピルビン酸エチル **20** からアルケニルアジド **21** の合成、() アルケニルアジド **21** とトリフェニルホスフィンの Staudinger 反応 / イソシアナートとの Aza-Wittig 反応 / 分子内閉環反応によるジヒドロピリミジン **22** の合成、() 有機リチウム試薬またはグリニヤール試薬による 5 位 Weinreb アミド基のアシル基への置換反応、という方法論である。これによって、これまで合成例がない 4,6-無置換-5-アシル-2-アミノジヒドロピリミジン **23** を収束的に合成することに成功した (Scheme 8)。



Scheme 8

プロモピルビン酸エチル **20** より 7 工程で合成したアルケニルアジド (*E*)-**21** に、THF 中トリフェニルホスフィンを反応させた後にフェニルイソシアナートを反応させると、2-アミノジヒドロピリミジン **22a** が収率 62% で得られた (Scheme 9)。ブチルリチウムやフェニルグリニャール試薬を反応させ、4,6-無置換-5-アシル-2-アミノジヒドロピリミジン **23** を合成することができた。反応は低収率であったが、窒素保護基の導入または金属塩の添加などの検討によって収率を向上させることが今後の課題である。



Scheme 9

各種誘導体の蛍光特性と活性酸素に対する反応性について、今後検討する。

5. 発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Synthesis of 4,6-Unsubstituted 2-Aminodihydropyrimidine-5-Carboxylates via Sequential Staudinger/Aza-Wittig/Cyclization Reactions. Y. Nishimura, H. Cho, *Synlett* **2015**, *26*, 233-237. (査読あり)

Convergent Synthesis of 4,6-Unsubstituted 5-Acyl-2-Phenyldihydropyrimidines by Substitution Reactions of Weinreb Amide Group of Tetrahydropyrimidines. Y. Nishimura, H. Cho, *Tetrahedron Lett.* submitted. (投稿中)

〔学会発表〕(計6件)

西村良夫、雲地早紀、久常由加里、岡水涼、森川瞳、西博行、生中雅也「リパーゼによる desymmetrization を利用した *N*-Cbz (*S*)- α -メチルセリンの実用的合成プロセスの開発」、日本プロセス化学会 2014 サマーシンポジウム、東京、7/31-8/1 (2014)

西村良夫、長秀連「連続的 Aza-Wittig / 環化反応による 4,6-無置換ジヒドロピリミジンの合成」、第 44 回複素環化学討論会、札幌、9/10-9/12 (2014)

西村良夫「新しい糖尿病合併症治療薬ラニレストットの合成研究」(招待講演)、第 132 回日本薬学会中国四国支部例会、広島、1/10 (2015)

西村良夫、長秀連「連続的 Staudinger / Aza-Wittig / 環化反応による 4,6-無置換 2-アミノジヒドロピリミジン-5-エステル合成」日本薬学会第 135 年会、神戸、3/25-3/28 (2015)

西村良夫、長秀連「Weinreb アミド基を利用する 4,6-無置換 5-アシルジヒドロピリミジンの合成」第 45 回複素環化学討論会、東京、11/19-11/21 (2015)

西村良夫、長秀連「Weinreb アミド基を利用する 4,6-無置換 2-アリール-5-アシルジヒドロピリミジン誘導体の収束的合成」日本薬学会第 136 年会、横浜、3/26-3/29 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 良夫 (Nishimura, Yoshio)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60431516