

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15952

研究課題名(和文)迅速定量解析を指向した蛍光分子形成型クリック反応の開発

研究課題名(英文)A fluorogenic click reaction for rapid quantitative analysis

研究代表者

高山 亜紀(Kohyama, Aki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：40778586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2つの分子を特異的に連結させ、連結後に光るような反応は、生命現象の解明や医薬品創出のための技術として重要である。本課題では、我々が過去に報告した2分子連結反応をそのような光る反応へと発展させるべく、反応の設計と検討を行なった。検討の結果、光る分子に変換されるために必要な“芳香族化反応”が予想に反して進行しないことが分かった。しかし、本検討を通して、元々の連結反応自体の効率向上が達成でき、さらには新規性の高い連結反応を発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、所望の反応ではないものの、新しい2成分連結反応が見出された。このような温和な条件下での連結反応は、将来、生命現象の解明や医薬品創出のための道具として発展していくことが期待される。したがって、本研究成果は学術的にも医薬学への波及効果的にも意義深いものと位置付けられる。

研究成果の概要(英文)：A ligation reaction forming a fluorophore is one of important tools for biological study and drug development. In this work, we aimed to develop such a reaction by refining a ligation reaction reported by our group. Then, we designed the reaction and substrates and carried out the plan. As a result, our experiments proved that a desired aromatization, a crucial step to form fluorophore, did not proceed. However, we could improve yield of the original ligation reaction and find a novel ligation reaction unexpectedly.

研究分野：生物有機化学

キーワード：オルトキノジメタン アジド ホスフィン Staudinger 2分子連結

1. 研究開始当初の背景

(1) 高反応性ジエン発生を契機とした2分子連結反応

当研究室では、独自に開発した温和な条件下での高反応性ジエン“オルトキノジメタン”発生法を利用した2分子連結反応を報告している (*Chem. Commun.* **2019**, *55*, 6205)。この反応は、ベンゾシクロブテン (BCB) とスチリルホスフィンの2分子が3連続反応 (Staudinger 反応, 四員環開裂, 分子内 Diels-Alder 反応) を起こすことで連結する。in situ にて一時的に発生する高反応性の OQM を足場として、室温・含水条件下という温和な条件で結合形成が起きる点を特徴としている。

(2) クリック反応の適用例, 研究に着手した動機

現在までに開発された様々なクリック反応は、生体分子や高分子の蛍光標識化や PEG 化, 薬物抗体複合体合成などに適用されてきた。

- ・ 蛍光標識化: 基質に蛍光分子を使用するため, 蛍光を目印として反応生成物の解析が可能である。しかし, 基質由来の蛍光がバックグラウンドとして生成物の解析を妨げる場合もある。

- ・ PEG 化や薬物抗体複合体合成: 基質に蛍光分子を使用せず, 薬剤や PEG 分子などの小分子を使用する。反応相手が複雑なタンパクなどの場合, 目印とする分子がなくしばしば解析が困難になる。

これらの背景から, 簡便に定量解析できるようなクリック反応が必要とされている。

2. 研究の目的

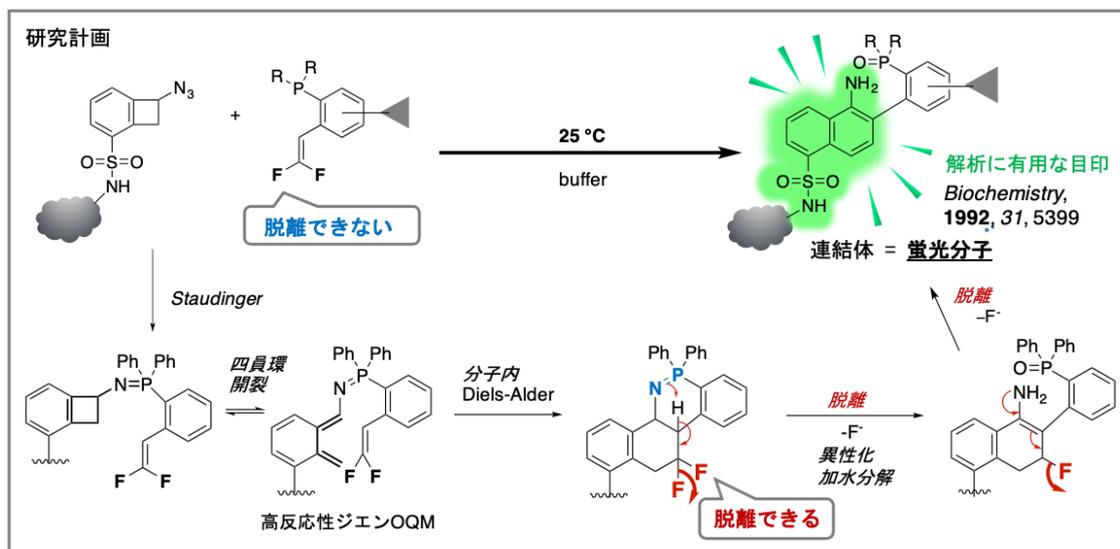
過去に申請者が開発した2分子連結反応を, 分子生物学実験などの夾雑系で定量・追跡容易なクリック反応へと発展させることを研究目的とした。

3. 研究の方法

定量解析可能なクリック反応を開発すべく, 分子連結と蛍光団形成が同時に起きる反応を設計した (下図)。

具体的には, 基質であるスチリルホスフィンのアルケン部分にフッ素原子を導入した。導入したフッ素原子が分子内 Diels-Alder 反応後に2度の脱離反応を起こせば, 連結体を蛍光性の芳香族化合物へと導くことができるものと期待した。

そこで, まずは計画した芳香族化の過程が進行するか調査を行うべく, F 置換型スチリルホスフィン **a, b** (次頁図) を合成し, 2分子連結反応を検討した。



4. 研究成果

(1) F 置換型スチリルホスフィン **a, b** を用いた連結反応-芳香族化の検討

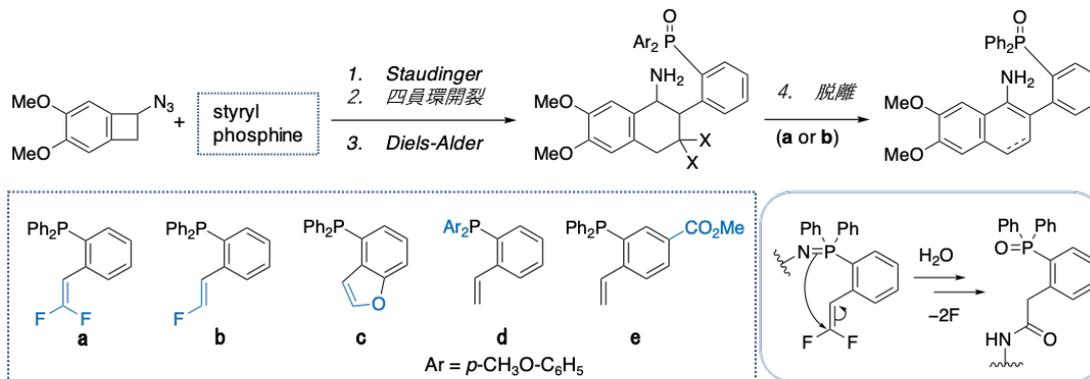
F 置換型スチリルホスフィン **a** は, Hu らの手法 (*OL*. **2010**, *12*, 1444) により 1 工程で市販の対応するアルデヒドから調製することができた。合成した **a** とアジド BCB との 2 分子連結反応を検討した結果, 所望の反応は進行せずイミノホスホラン形成後に副反応としてアミド化反応が進行することが分かった。ジフルオロアルケンの末端炭素は, 通常のアルケンに比べて非常に求電子性が高いため, 求核性のイミノホスホランと接近することで, 分子内アミド化反応が四員環開裂に優先して進行したものと考察している。なお, 本反応は, その後の検討により一般性の高

い新規分子内アミド化反応であることが見出された。

さらに、ジフルオロアルケンの求電子性を抑えたモノ置換型スチリルホスフィン **b** を用いて検討を行った。しかし、Diels-Alder 反応後の F の脱離反応は進行しないことが分かった。さらに、F 原子が導入されたことで Diels-Alder 反応の進行が抑制された。F 原子は比較的小さいものの、以前までと同様に末端アルケンの修飾でネガティブな効果が観測されたことから、これ以上の末端アルケン修飾は所望の反応を妨げると考え、当初計画していた芳香族化の反応設計から大きく方針を変更した。すなわち、置換基効果を基本方針としてアジド BCB とスチリルホスフィンとの 2 分子連結反応の含水条件下での収率向上を目的として種々検討を進める方針に変更した。

(2) スチリルホスフィンの置換基効果の検討

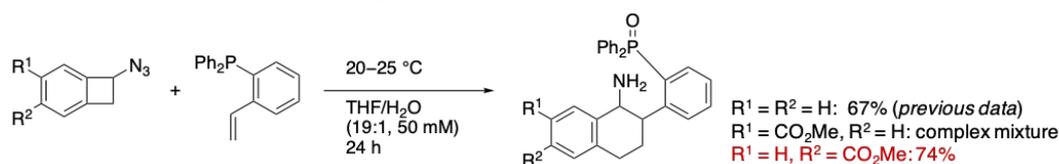
アルケンの向きを固定することで、Diels-Alder 反応が促進されることを期待し、ベンゾフラン型ホスフィン **c** を用いて検討を行ったが、Diels-Alder 反応は全く進行せず四員環開裂後の副生成物が得られるのみであった。さらに、電子供与基導入による Staudinger 反応と四員環開裂促進効果を期待し **d** を用いたが、Diels-Alder 反応の効率が悪いために所望の連結体は低収率にとどまった。そこで、ジエノフィルの LUMO のエネルギーを低下させるべくスチレン環上に電子求引基を導入した **e** を用いた。しかし、反応系が複雑化し所望の連結体の収率は大幅に低下した。



Styryl phosphine	期待される効果	Staudinger	四員環開裂	Diels-Alder	note
a	Diels-Alder後のFの脱離による芳香族化を期待 (図1)	○	X	X	副反応が優先
b		○	○	△	Fの脱離が進行しない
c	アルケンの固定によるDiels-Alder反応促進	○	○	X	
d	イミノホスホラン形成加速 四員環開裂の促進	○	○	△	
e	電子求引基によるDiels-Alder反応促進	○	○	△	

(2) アジド BCB の置換基効果の検討

アジド BCB の芳香環上置換基の効果を検討したところ、適切な位置に電子求引基(エステル)を導入した時、含水条件下での収率が向上することが分かった。エステル基を導入することで系中で発生するオルトキノジメタンの HOMO のエネルギーを低下させ、水との副反応を抑制することができたものと考察している。



今回、過去に開発した 2 分子連結反応の改良に取り組んだ。その結果、連結体を蛍光団にすることはできなかった。しかし、初期段階で研究方針を変更することで、2つの成果が得られた。1つ目として、アジド BCB の置換基効果を利用することで、含水条件下での連結反応の収率を向上させることができた。2つ目として、研究の途上で発見された新規 2 分子連結反応が一般性のある分子内アミド化反応を発見することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高野 晃成, 高山 亜紀, 是澤 恵莉, 松谷 裕二
2. 発表標題 高反応性ジエンを経由する含水下での2分子連結反応の改良
3. 学会等名 第47回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinari Takano, Eri Koresawa, Kiyoshi Tsuge, Aki Kohyama, Yuji Matsuya
2. 発表標題 Development of ligation reaction triggered by in situ generation of highly reactive dienes
3. 学会等名 PACIFICHEM 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aki Kohyama
2. 発表標題 Synthesis of Guggulsterone Analogues and Their Biological Activities
3. 学会等名 6th Toyama-Basel Joint Symposium 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------