

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06180

研究課題名(和文) 生体内分子イメージングに有用なケイ素架橋型セレンテラジン類の創製

研究課題名(英文) Toward development of a silicon-bridged coelenterazine derivative for in vivo imaging

研究代表者

西山 義剛 (Nishiyama, Yoshitake)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：90755357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、実用的な近赤外生物発光系の開発を目指し、新たなセレンテラジン類縁体の合成法の開発を検討した。その結果、パラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応を連続的に利用することで、ピラジン環上に4つの異なるアリール基を順次導入する手法を開発することに成功した。また、オルト位に水酸基を有するフェニル基をピラジン環に導入できることを見だし、この水酸基をトリフルロキシ基に変換することで、縮環構造の構築の足がかりにできることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have studied on new synthetic methods of coelenterazine analogues with the aim of development of a near-infrared bioluminescence system. As the results, we found that four substituents could be introduced into easily accessible 2-amino-3,5-dibromo-6-chloropyrazine via successive palladium-catalyzed cross-coupling reactions. Moreover, a phenyl group equipped with a free hydroxy group at the ortho position was also applicable for the cross-coupling reaction. The hydroxy group could be transformed into a triflyloxy group, which was found to be useful for construction of a cyclic system containing the pyrazine ring.

研究分野：有機合成化学

キーワード：セレンテラジン ピラジン クロスカップリング反応 環化反応

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象を理解するためには、その現象を司る生体分子の分布や挙動を知ることが非常に重要である。セレンテラジン類の生物発光は、リアルタイムで高感度にて標的の分子を検出できるイメージング技術として古くから注目されてきた。セレンテラジンはルシフェリンの一種であり、これがルシフェラーゼの触媒作用によって酸化されると、その際に発生するエネルギーが効率的に光となって放出される。生物発光では外部からの励起光を必要としないため、蛍光分析法で問題となるバックグラウンドの値を十分に小さくすることができ、検出感度を 10-1000 倍程度にまで向上させることができる。さらに、ルシフェリンは一度発光すると失活し、発光できない化合物へと変換されるため、励起光照射下において発光し続ける蛍光分析と比較して経時変化を追跡しやすくなる。

分光法として優れた性質を有する生物発光を、生体を透過することのできる長波長領域において利用しようとする研究は以前から試みられている。たとえば、下村、岸らは、セレンテラジンにビニレン鎖を導入し、共役長を伸長した  $\nu$ -セレンテラジンを開発した。セレンテラジン自体は、複数の天然ルシフェラーゼの基質となるが、本化合物は、ウミシイタケ由来 *Renilla* ルシフェラーゼを選択することでルシフェリンとして認識され、最大 40 nm 程度の長波長シフトが見られる。さらに、Gambhir らは、酵素側の改変を組み合わせることによりさらなる長波長化を達成し、生きたマウスでのイメージングにも成功している。しかし、現時点でも最大発光波長は 547 nm であり、生体透過可能な領域での発光は数パーセントに限られる。このような背景のもと、効率的な生体内イメージング法を実現すべく、より長波長で発光可能なセレンテラジン類の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

これに対して我々は、長波長領域で発光する新たなセレンテラジン類縁体の開発を念頭に、長波長シフトに有効なケイ素原子をセレンテラジンの構造中に組み込み、架橋型の構造を構築することを考えた。これを実現するために、(1) セレンテラジンの中心骨格であるピラジン環上に異なる置換基を順次導入する手法を開発するとともに、(2) 後に縮環構造を構築可能な官能基を有する置換基をピラジン環上に導入し、それを足がかりに縮環構造の構築を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

## (1) ピラジン環への置換基の順次導入

さまざまなセレンテラジン類縁体の合成を行うためには、多彩な置換基をピラジン環上に自在に導入可能な手法の開発が必要である。多置換ピラジン類は、セレンテラジンを初めとした天然有機化合物に広く見られ

る化合物群であり、有用な含窒素複素環化合物である。しかし、ピラジン環の有する高い対称性のために、無置換ピラジンに含まれる 4 つの炭素原子はすべて等価であり、区別することは困難である。そこで、我々は、最近開発に成功した  $\nu$ -セレンテラジン類の効率的合成法を参考にし、容易に入手可能な原料をプラットフォーム分子とした 4 置換ピラジン類の合成法の開発を行うこととした。

## (2) ピラジン環を含む縮環構造の構築

セレンテラジン骨格へのヘテロ原子の導入や架橋構造の導入は、その生物発光の長波長化をもたらすと考えられる。ヘテロ原子や架橋構造を導入するためには、ピラジン環上の置換基に配置した官能基を用いてさらなる変換を行う必要がある。そこで、ハロゲン基のように後に変換可能な官能基を配置したアリアル基をピラジン環上に導入する検討を行うこととした。さらに、導入できた官能基を利用して、縮環構造の構築を目指すこととした。

## 4. 研究成果

## (1) ピラジン環への置換基の順次導入

まず、2-アミノ-3,5-ジブromo-6-クロロピラジン (**1**) を出発原料とし、2 つのプロモ基を選択的にカップリングすることを検討した。導入する置換基を *p*-トリル基とし、詳細な検討を行った (Table 1)。初めに、鈴木-宮浦クロスカップリング反応を試みたが、2 つのプロモ基の選択性は低い結果となった。次に、根岸クロスカップリング反応を用いたところ、原料は多く残存するものの、単一の生成物を与えた。さらに、Grignard 反応剤と塩化亜鉛(II)との当量比を 2:1 とし、配位子としてトリ(2-フリル)ホスフィンを選択することで、原料の残存や位置異性体の生成を伴うことなく、高収率にて目的物 **2** を得ることができた。

Table 1

entry	<i>p</i> -TolMgBr (equiv)	ZnCl <sub>2</sub> (equiv)	catalyst	conv. (%)	2 : 2'
1	2.0	2.2	(Ph <sub>3</sub> P) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub>	51	100:0
2	4.4	2.2	(Ph <sub>3</sub> P) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub>	100	26:74
3	2.4	1.2	(Ph <sub>3</sub> P) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub>	80	93:7
4	3.0	1.5	(Ph <sub>3</sub> P) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub>	100	91:9
5	3.0	1.5	PdCl <sub>2</sub> , Ph <sub>3</sub> P	100	86:14
6	3.0	1.5	PdCl <sub>2</sub> , XPhos	57	49:51
7	3.0	1.5	PdCl <sub>2</sub> , (C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> P	77	100:0
8	3.0	1.5	PdCl <sub>2</sub> , (2-furyl) <sub>3</sub> P	100	100:0

残存したプロモ基、クロロ基は、温度を制御することで区別することができ、反応温度だけを変更して鈴木-宮浦クロスカップリング反応を行うことで置換基を 1 つずつ導入できた (Scheme 1)。具体的には、**2** に対して

50 °Cにて鈴木-宮浦クロスカップリング反応を試みると、ボロン酸を過剰量用いているにも関わらず、ブロモ基のみが反応して **3** が高収率で得られた。さらに、残存したクロロ基も反応温度を高くすることで鈴木-宮浦クロスカップリング反応に利用でき、3つのアリール基を有するアミノピラジン **4** を合成することができた。これと同様な合成手法により、3つのさまざまなアリール基を有するセレンテラミン類縁体を合成できた (Figure 1)。

Scheme 1

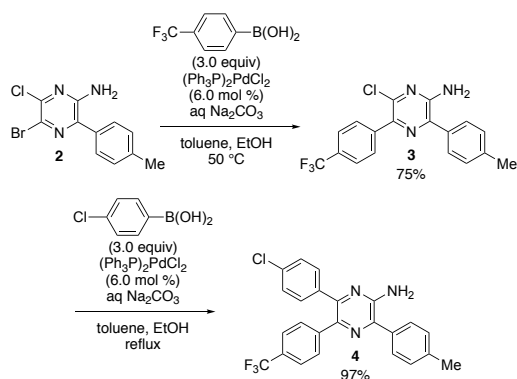
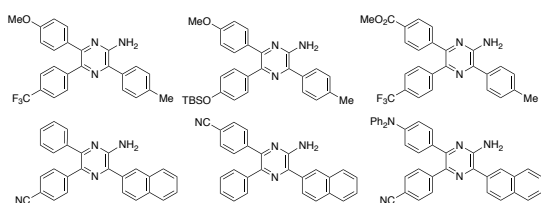


Figure 1



得られたセレンテラミン類縁体のさらなる変換を検討するべく、アミノ基の変換を試みることにした。アミノ基をアリール基へと変換できれば、通常では合成の難しい、4つの異なるアリール基を有するテトラアリールピラジン類を合成できると考えた。まず、アミノ基をジアゾニウム塩に変換して、直接的に鈴木-宮浦クロスカップリング反応を行おうとしたが、目的物は得られなかった。そこで、一度ジアゾニウム塩からハロゲノ基へと変換し、その後クロスカップリング反応を行うことにした。種々検討した結果、亜硝酸イソアミルとプロモトリメチルシランとの組み合わせを用いたときに効率よく Sandmeyer 反応が進行し、ブロモピラジン **6** が得られることを見いだした (Scheme 2)。さらに、このブロモ基を足がかりとして4つめのアリール基を導入でき、4つの異なるアリール基を有するテトラアリールピラジン **7** を合成することに成功した。ここで確立した方法では、多彩なアリール基を選択的にピラジン環上に導入することができ、さまざまなテトラアリールピラジン類の合成に適用可能であった (Figure 2)。

Scheme 2

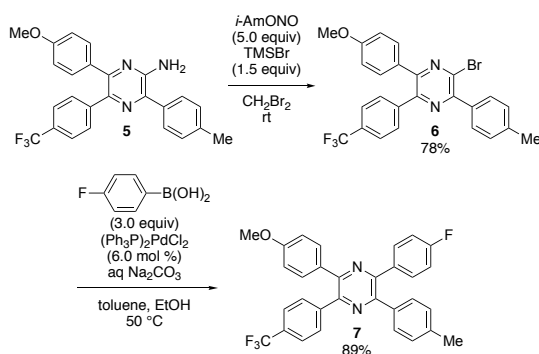
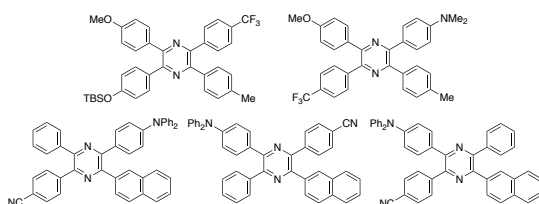


Figure 2

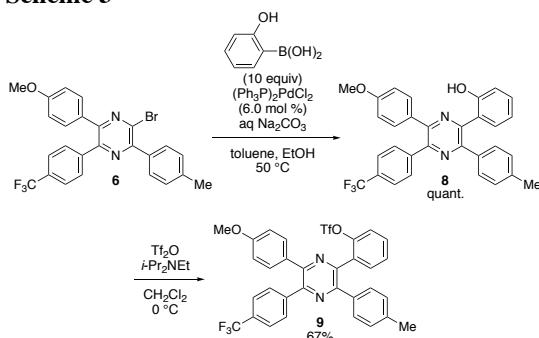


## (2) ピラジン環を含む縮環構造の構築

セレンテラジンへの架橋構造の導入を念頭に、オルト位にハロゲノ基を有するアリール基をピラジン環に導入する検討を行った。一般的に、ピラジン環上のハロゲノ基はベンゼン環上のハロゲノ基よりも反応性が高いため、区別可能であると考えた。ところが、*o*-ブロモフェニルボロン酸とブロモピラジンを用いた鈴木-宮浦クロスカップリング反応では、目的物は得られないことがわかった。この結果から、ピラジン環上のハロゲン原子を利用した変換によって縮環構造を構築することは困難であることが明らかとなり、長波長発光するセレンテラジン類の創製のためには、ピラジン環上での環化反応の開発が急務であると考えた。

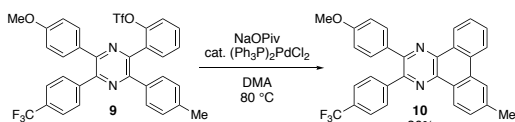
これに対して、今回我々は、擬ハロゲン原子を配置した置換基をピラジン環上に配置し、これを置換基同士の連結反応に利用できれば、 $\pi$ 拡張により発光波長が長波長化した縮環型ピラジン類を開発できると考えた。種々検討を行ったところ、オルト位に水酸基を有するフェニルボロン酸とブロモピラジン **6** とのクロスカップリング反応は円滑に進行し、無保護の水酸基を損なうことなく定量的に目的物 **8** を与えることがわかった (Scheme 3)。さらに、水酸基をトリフルル化することによって、擬ハロゲノ基であるトリフルルオキシ基へと変換できた。

### Scheme 3



構築したトリフルルオキシ基は、ピラジン環を含む縮環構造を構築するのに有用であった。先に合成した **9** に対して、ピバル酸ナトリウム存在下パラジウム触媒を作用させると、ピラジン環上の隣り合う2つのアリール基間に結合が生じ、縮環型ピラジン化合物 **10** を得ることに成功した (Scheme 4)。

### Scheme 4



以上のように、セレンテラジンの中心骨格であるピラジン環上に異なる置換基を順次導入する手法を開発することに成功し、さらにピラジン環上の置換基に擬ハロゲノ基を配置することで縮環構造の構築を行えることも明らかにできた。縮環構造の構築をヘテロ原子との結合形成反応に応用することで、ヘテロ原子架橋型セレンテラジン類縁体の合成を行えると期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ① Takamoto Morita, Yoshitake Nishiyama, Suguru Yoshida, and Takamitsu Hosoya  
"Facile Synthesis of Multisubstituted Benzo[*b*]furans via 2,3-Disubstituted 6,7-Furanobenzynes Generated from ortho-Iodoaryl Triflate-type Precursors"  
Chemistry Letters, **46**, 112–115 (2017).  
DOI: 10.1246/cl.160951  
(査読あり)

〔学会発表〕 (計9件)

- ① ○西山義剛、陌間由貴、吉田 優、細谷孝充  
"ホスフィン酸チオエステルに対する求核剤依存的置換反応によるホスフィン類およびスルフィド類の選択的合成"  
日本薬学会 第137年会  
2017年3月25日  
東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)
- ② ○西山義剛、陌間由貴、吉田 優、細谷孝

充

"ホスフィン酸チオエステルをアンビデント求電子剤として用いるホスフィン類およびスルフィド類の合成"

日本化学会第97春季年会

2017年3月16日

慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市)

③ ○秋山 圭、西山義剛、吉田 優、細谷孝充  
"連続的なカップリング反応を利用した多置換ピラジン類の網羅的合成法の開発"

日本化学会第97春季年会

2017年3月16日

慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市)

④ ○西山義剛、陌間由貴、吉田 優、細谷孝充

"リン-硫黄結合の開裂を鍵とするホスフィン類およびスルフィド類の簡便合成法の開発"

第43回有機典型元素化学討論会

2016年12月9日

仙台市民会館 (宮城県仙台市)

⑤ ○秋山 圭、西山義剛、吉田 優、細谷孝充  
"パラジウム触媒を利用した逐次カップリング反応による多置換ピラジン類合成法の開発"

第72回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム)

2016年11月26日

新潟薬科大学新津駅東キャンパス (新潟県新潟市)

⑥ ○秋山 圭、西山義剛、吉田 優、細谷孝充  
"高選択的クロスカップリング反応を利用した多置換ピラジン類の網羅的合成法の開発"

第46回複素環化学討論会

2016年9月26日

金沢歌劇座 (石川県金沢市)

⑦ ○西山義剛、陌間由貴、吉田 優、細谷孝充

"多彩な有機リン化合物群の合成を指向したホスホン酸チオエステルの逐次置換反応の開発"

第109回有機合成シンポジウム

2016年6月8日

東京工業大学大岡山キャンパス (東京都目黒区)

⑧ ○西山義剛、陌間由貴、吉田 優、細谷孝充

"チオ基を脱離基としたリン原子上での逐次置換反応の開発"

日本化学会第96春季年会 2016

2016年3月24日

同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市)

⑨ ○西山義剛、陌間由貴、吉田 優、細谷孝充

"ホスホン酸チオエステルの逐次置換反応による有機リン化合物群の合成法の開発"

第 70 回記念有機合成化学協会関東支部シンポジウム

2015 年 11 月 21 日

長岡高専（新潟県長岡市）

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西山 義剛 (NISHIYAMA, Yoshitake)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
助教

研究者番号：90755357