

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750165

研究課題名（和文） 抗酸化酵素をターゲットとした光学活性なスピン剤の開発

研究課題名（英文） Development of effective spin reagent for antioxidant enzyme

研究代表者

波多野 豊平（HATANO BUNPEI）

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20333990

研究成果の概要（和文）：研究の全体構想である「抗酸化酵素と強い会合体を作る光学活性なスピン剤の開発」を確立するために、「1. 血液 - 脳関門を通過する MC-PROXYL およびその誘導体の合成方法の確立」、「2. 安定なイソインドール系のトラップ剤である TMINO の改良」、および「3. 光学活性な置換基を有する DMPO 型スピントラップ剤の合成」を行い、効率的な合成方法を開発すると共に、安定性において有用なスピン剤を見出した。

研究成果の概要（英文）：We have achieved efficient syntheses of blood-brain-barrier permeable spin probe reagents, isoindole spin trap reagent bearing trifluoromethyl group, and chiral spin probe reagent based on DMPO. These spin reagents and their adducts gave strong and stable ESR signals, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,840,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,880,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：スピン剤, 活性酸素種, MC-PROXYL, 抗酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、活性酸素種による酸化ストレスが、糖尿病、動脈硬化、脳梗塞、認知症等の様々な疾患を引き起こす原因となることが明らかとなってきており、活性酸素種の検知において ESR(電子スピン共鳴)が有用な測定手段として用いられてきている。最近では、疾患の原因となる活性酸素種の生体内での無侵襲観測(ESR-CT 法)も開発されおり、活性酸素種の検出において、ESR は欠かすことのできない測定方法である。

ESR 測定に用いられる一般的なスピン剤は、DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide)

に代表されるスピントラップ剤と TEMPO (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl) に代表されるスピンプローブ剤に大別される。トラップ剤は、短寿命のため ESR で直接観測できない活性酸素種を捕捉し、ESR で検出できるアダクトに変換することができる。一方、プローブ剤は、活性酸素種を捕捉することはできないが、その減衰率から生体内の酸化還元状態を把握することができる。

しかし、これらのスピン剤は、長期保存が難しく、二次反応により複雑なシグナルを与えるなどのいくつかの問題を抱えている。この問題に対して我々は、イソインドール骨格を有するまったく独自のトラップ剤(TMINO)

に着目し、その効率的な合成ルートの確立に成功した。

最近、ESR を用いた酵素作用の解明において、適当な光学活性部位を有するスピン剤が酵素と強い会合体を作ることが明らかとなってきた。抗酸化酵素の解析において、そのような試みは未だなされていないが、スピン剤に適当な光学活性構造を付与し、抗酸化酵素と会合体を作ること、「活性酸素種の消去能評価と同時に抗酸化酵素が作用する際の立体に関する情報も得られる」と期待できる。このことは、抗酸化酵素（スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ等）の生体内における抗酸化作用の解明や抗酸化物質（ビタミンC等）の生体内での挙動を理解するうえでも欠かすことができず、抗酸化酵素のドメインレベルでの消去能評価が可能となり、効率的な抗酸化薬剤の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、「抗酸化酵素と強い会合体を作る光学活性なスピン剤の開発」である。この目的を達成するために、本研究課題の交付期間内に、以下の3点について具体的に検討し、全体構想の根幹を確立することを目的とする。

- (1) たんぱく質の作用機構が介在する血液 - 脳関門を通過する MC-PROXYL およびその誘導体の合成方法を確立。
- (2) 安定なイソインドール系のトラップ剤である TMINO の改良。
- (3) 光学活性な置換基を有する DMPO 型スピントラップ剤の合成。

3. 研究の方法

(1) MC-PROXYL およびその誘導体の合成方法の確立

抗酸化酵素等のたんぱく質が介在する作用機構の一つに、血液 - 脳間の物質交換を制限する機構がある。本作用機構の解明を行うためにも、MC-PROXYL およびその誘導体の効率の良い合成方法の開発は重要である。そこで、Favorskii 転位を鍵反応とする MC-PROXYL およびその誘導体の効率の良い合成法を開発し、その有用性について ESR を用いて評価する。

(2) 安定なイソインドール系のトラップ剤である TMINO の改良。

TMINO は、これまでの研究から、一般に用いられている DMPO やその誘導体よりも長期安定性に富み、細胞脂質や体液との適度な親和性および活性酸素種との反応による付加物の安定性に富むことが知られている。そこで、

TMINO の置換基に大きな電子吸引効果を示す、トリフルオロメチル基を導入し、TMINO の安定性に及ぼす効果、ならびにラジカル付加物の安定性に対する効果を検証する。

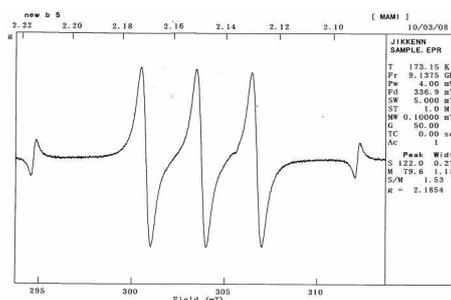
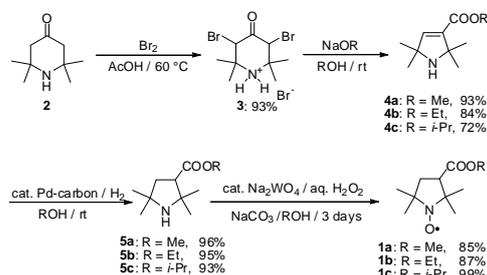
(3) 光学活性な置換基を有する DMPO 型スピントラップ剤の合成。

近年、ESR を用いた酵素作用の解明において、適当な光学活性部位を有するスピン剤が酵素と強い会合体を作ることが明らかとなってきた。しかし、汎用性のある DMPO 型スピントラップ剤において、そのような試みはなされておらず、光学活性な置換基を導入した DMPO 型スピントラップ剤の開発は、抗酸化酵素が作用する際の立体化学的な情報を得る手段として、また、抗酸化酵素と活性酸素種との相互作用を検証するツールとして重要である。そこで、光学活性な置換基を有する DMPO 型スピントラップ剤の合成し、ESR 測定を行いその有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) MC-PROXYL およびその誘導体の合成方法の確立

安価に入手可能な 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (2) を出発原料として、臭素を作用させ、ジブromo体(3)を収率 93%で得た。次に、ナトリウムメトキドを作用させ、Favorskii 転位を行い、 α -不飽和エステル(4a)を得た。次に、パラジウム-カーボンを用いて、オレフィン還元し、最後に、タングステン酸ナトリウムを触媒とした酸化反応を行い、目的生成物である MC-PROXYL (1a)をトータル収率 65%で得ることができた。

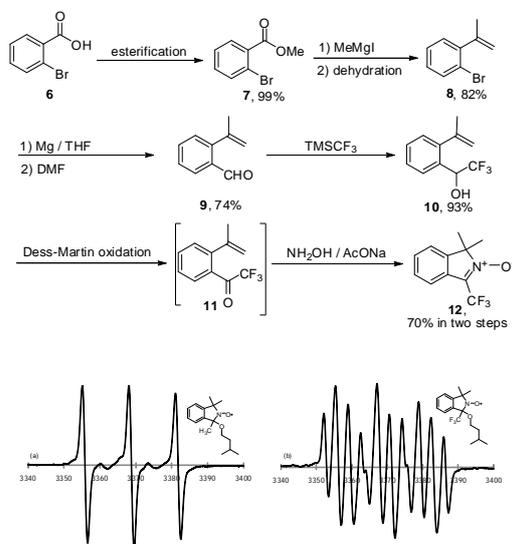


本合成ルートは、他の誘導体にも適応可能であり、同様の方法で、エチルエステル体およびイソプロピルエステル体を高収率で合成することが可能となった。

MC-PROXYL (1a)の ESR 測定においても、窒素の超微細構造がきれいに現れており、本合成ルートによって、簡便に純度の高い 1a を供給できるようになった。

(2) 安定なイソインドール系のトラップ剤である TMINO の改良。

安価に入手可能な 2-bromobenzoic acid (6) を出発原料として、エステル化を行い 99%収率でエステル(7)を得た。次に、ヨウ化メチルマグネシウムを作用させ、その後の脱水反応によりオレフィン(8)を得た。オレフィン(8)をグリニア試薬へと変換し、DMF と反応させることで、アルデヒド(9)を収率 74%で得た。次に、トリフルオロ基を導入し、アルコール(10)とした後、Dess-Martin 酸化を行い、ヒドロキシルアミンと反応させることで、目的生成物である 3-TF-TMINO(12) を 7 段階、全収率 39%で合成することができた。

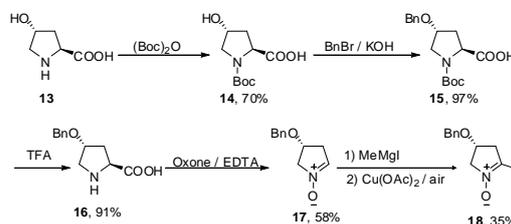


イソアミルラジカルの補足実験においても、TMINO と同様に、ラジカル付加物を与えた。また、TMINO のラジカル付加物よりも、安定であることが明らかとなった。

(3) 光学活性な置換基を有する DMPO 型スピントラップ剤の合成。

安価に入手可能な L-ヒドロキシプロリン(13)を Boc 基で保護し(70%),ヒドロキシル基をベンジル化し、化合物 15 を合成した(97%)。次に、Boc 基の脱保護を行い、化合物 16 を 91%収率で得た。脱カルボキシル化反応を伴う、N-オキシド(17)の合成において、文献記載反応等、種々の条件を検討したが、

N-オキシド(17)を合成することはできなかった。そこで、Oxone を用いて酸化反応を行うことで、N-オキシド(17)を 58%収率で得ることができた。最後に、ヨウ化メチルマグネシウムを作用させ、得られたヒドロキシルアミンを銅触媒存在下、空気酸化することで、目的化合物 DMPO 型スピントラップ剤(18)を 35%収率で合成した。



なお、ESR 測定については、研究期間内で行うことができなかった。

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 3 件)

- (1) Hatano, B.; Tachikawa, T.; Mori, T.; Nagahashi, K.; Kijima, T. "Reductive coupling of aromatic N,N-acetals using zinc and chlorotrimethylsilane", *Tetrahedron Lett.*, **52**, 3467-3469, (2011), 査読有
- (2) Hatano, B.; Miyoshi, K.; Sato, H.; Ito, T.; Ogata, T.; Kijima, T. "Synthesis and spin trapping properties of 1,1-dimethyl-3-(trifluoromethyl)-1-H-isoindole N-oxide", *Tetrahedron Lett.*, **51**, 5399-5401, (2010), 査読有
- (3) Hatano, B.; Araya, H.; Yoshimura, Y.; Sato, H.; Ito, T.; Ogata, T.; Kijima, T. "Facile synthesis of 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl and derivatives", *Heterocycles*, **81**, 349-356 (2010), 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) Tachikawa, T.; Hatano, B.; Kijima, T. "Reductive coupling reaction of aromatic aminal using zinc and chlorotrimethylsilane", Pacificchem 2010, Dec. 18th, 2010, Hawaii
- (2) Hatano, B.; Miyoshi, K.; Sato, H.; Ito, T.; Ogata, T.; Kijima, T. "Synthesis of a new isoindole based nitron: 1,1-dimethyl-3-(trifluoromethyl)-1-H-

- isoindole *N*-oxide”, Pacificchem 2010, Dec 18th, 2010, Hawaii
- (3) Hashimoto, K.; Hatano, B.; Kijima, T. “Study on the inclusion complex of 2,2 -bis(diphenylphosphinoyl)-1,1 -bi- naphthyl and derivatives”, Pacificchem 2010, Dec 16th, 2010, Hawaii
- (4) 河野羊一郎, 青柳直人, 村上聡, 波多野豊平, 泉多恵子, 木島龍朗, “アミジン環を有する触媒の合成とその反応性”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (5) 立川友晴, 波多野豊平, 森哲法, 長橋啓太, 木島龍朗, “Zn / TMSCl を用いた芳香族アミナルの還元的カップリング反応”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (6) 橋元和幸, 波多野豊平, 木島龍朗, “包接化合物を用いた BINAPO の光学分割”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (7) 渡邊真弓, 趙爽, 波多野豊平, 村上聡, 泉多恵子, 木島龍朗, “新規なベンゼン - キャップドポルフィリンの合成とその触媒活性”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (8) 山田貴司, 千葉朋実, 高野哲也, 波多野豊平, 村上聡, 大谷典正, 泉多恵子, 木島龍朗, “アミノ酸エステルの動的速度分割における酵素固定化の影響”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (9) 池田裕美子, 片岡実咲, 高橋顕久, 村上聡, 波多野豊平, 大井俊彦, 泉多恵子, 木島龍朗, “補酵素再生系を利用したアゾ還元酵素による色素の分解”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (10) 高野哲也, 大谷典正, 波多野豊平, 村上聡, 木島龍朗, “ラセミ化によるアミノ酸類の動的速度分割”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (11) 高橋泰央, 川本和希, 波多野豊平, 村上聡, 泉多恵子, 木島龍朗, “ピリジン環を有する二座配位子を用いた不斉 Heck 反応の検討”, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡
- (12) 波多野豊平, “高機能性スピントラップ剤の合成研究”, 第 1 回機能有機化学シンポジウム, 2009 年 10 月 4 日、大阪, (招待講演)
- (13) 木村悠帆, 泉多恵子, 波多野豊平, 木島龍朗, “ニトロキシラジカルを有するポルフィリン誘導体の合成”平成 21 年度化学系学協会東北大会, 2009 年 9 月 21 日, 郡山

- (14) 波多野豊平, 三角直美, 大部孝法, 木島龍朗, “ルイス酸存在下におけるアミナルのアリル化反応”, 平成 21 年度化学系学協会東北大会, 2009 年 9 月 21 日, 郡山

〔その他〕
ホームページ等
<http://hatano.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野 豊平 (HATANO BUNPEI)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：20333990

(2) 連携研究者

尾形 健明 (OGATA TATEAKI)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：50091830

(3) 連携研究者

木島 龍朗 (KIJIMA TATSURO)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：50272084

(4) 連携研究者

伊藤 智博 (ITO TOMOHIRO)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：60361276