

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14749

研究課題名（和文）生体内光分子操作技術を指向した新規光環化反応の開発

研究課題名（英文）Development of photo-induced cyclization reaction toward modulation of molecular function under physiological conditions

研究代表者

岡村 秀紀 (Okamura, Hidenori)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：60832293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：特定の化学反応を任意の場所とタイミングで引き起こす手法は、生命現象の解明や副作用の少ない薬物療法への応用が期待される。このような方法論の一つとして、光化学反応の利用があげられるが、生体応用可能な光反応は現状限られている。そこで本研究では、*o*-ニトロベンジル基の特異な光反応性に着目し、薬物分子に含まれる含窒素芳香環を与える新規分子内光環化反応の開発に成功した。本光反応の詳細な反応機構の解明を達成したほか、細胞レベルにおける光反応の進行を確認することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、汎用的な光感受性基である*o*-ニトロベンジル基の新たな光反応性を明らかにした点において、学術的意義は大きい。さらに、本研究で開発した新規光環化反応は、従来法では困難であった薬物分子の光制御を可能とし得ることから、ケミカルバイオロジー研究や創薬研究の加速につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed an intramolecular cyclization reaction by utilizing the unique photo-reactivity of the *o*-nitrobenzyl moiety. This photo-reaction enables the construction of nitrogen-containing aromatic rings, which are often found in drug molecules, by photo-irradiation in an aqueous solvent. Notably, the photo-reaction proceeds inside living cells; thus, we envision that the reaction would be powerful tool for chemical biology research and drug discovery research.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光反応 光薬理学 ケミカルバイオロジー 光化学 含窒素芳香環

### 1. 研究開始当初の背景

光で誘起される化学反応は、化合物の効率的な合成法だけでなく、分子機能を高度に時空間制御する技術として注目を集めている。特に、光化学反応を用いた薬理活性の制御は、標的部位を狙い撃ちする高精度かつ副作用の少ない薬物療法への応用が期待される。このような光薬物療法に応用可能な手法として、分子間相互作用を物理的に妨げる光切断性保護基を結合した薬物分子を用いて、照射で薬理活性を OFF-ON 制御する光ケージド法が活発に研究されてきた(図 1a)。例えば、ニトロベンジル基を付与した薬物分子は、照射によって本来の分子機能を任意の場所とタイミングで回復できるため、標的とする細胞や組織に選択的な薬理活性の発現や、シグナル伝達経路の解明に幅広く応用されている。このように光ケージド法は優れた手法ではあるものの、1) 薬理活性を完全に消失させるために薬物分子の適切な位置を保護する必要があること、2) 薬物分子が光保護基を導入するための置換基を持つ必要があることから、適用可能な薬物分子の種類に本質的な制限がある。このような背景のもと、本研究では、より幅広い種類の薬物分子を光薬物療法に適用可能とする、新たな光化学的手法の開発を目指すことにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、より幅広い種類の薬理活性化合物の光制御を可能とする、含窒素芳香環を構築可能な新たな光化学反応の開発を目的とした(図 1b)。含窒素芳香環は、多くの生物活性物質に含まれており、薬理活性に直結する分子構造である。このような環構造を光刺激で構築できれば、活性の OFF-ON の高精度な光制御が可能になると考えた。また、本光環化反応を用いることで、従来困難であった化合物の活性制御が可能となり、光制御可能な基質を拡張できると期待した。

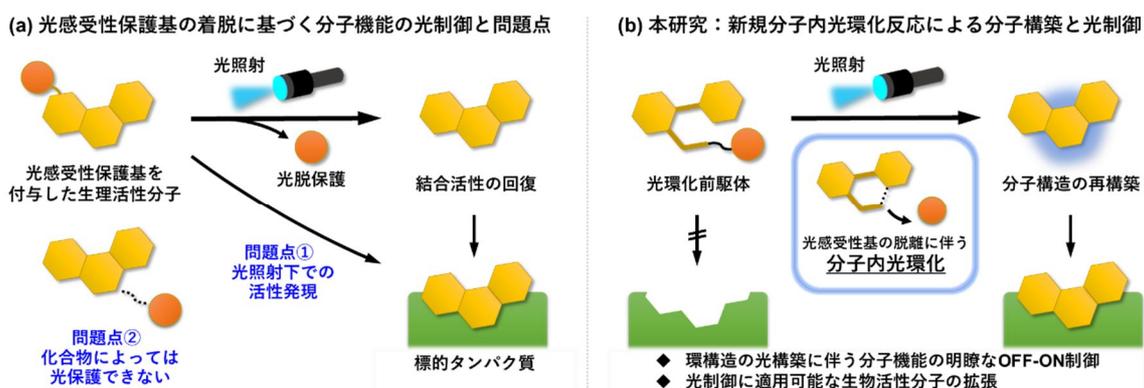


図 1 (a)光感受性保護基の着脱に基づく光分子操作技術, (b)分子内光環化反応による分子機能の光制御

### 3. 研究の方法

薬理活性分子の生体内構築に応用できる光化学反応として、光感受性オキシムを基軸とした含窒素芳香族化合物の光環化反応を開発することを考えた。我々は、光切断性保護基として知られる *o*-ニトロベンジル基を付与したオキシムに対して光を照射すると、一般的に予想される C-O 結合の切断ではなく、想定外の N-O 切断が起こることを見出している。この N-O 切断反応において、イミニルラジカルが中間体として生成していることを予想した。イミニルラジカルは、薬物分子に多く見られる含窒素芳香環の構築に利用される、重要な中間体である。そこで、この *o*-ニトロベンジロキシムエーテルが示す特異な光反応性を利用することで、含窒素芳香環を細胞内構築できる光誘起型の環化反応を開発できると考えた。具体的には、*o*-ニトロベンジル基をもつピアリールオキシムエーテルが照射によってフェナントリジン化合物を与えるか検証することで、設計概念の実証を目指すことにした(図 2)。

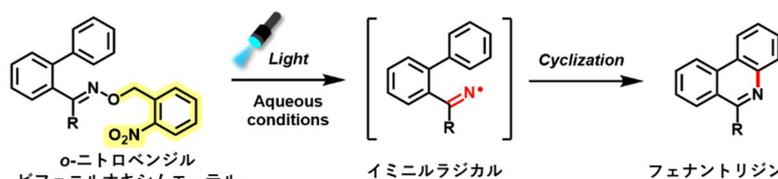


図 2 *o*-ニトロベンジル基の特異な光反応性に基づく分子内環化反応の設計

## 4. 研究成果

### (1) 分子内光環化反応の検証

まず、目的とする分子内光環化反応が進行するかを検証するために、*o*-ニトロベンジル(NB)基を付与したビフェニルオキシムを環化前駆体として合成し、光反応を検証した(図3)。NB基を付与した化合物の DMSO 溶液に 405 nm の LED 光を照射し、HPLC で経時変化を追跡した。その結果、環化前駆体の消失と同時に、二種類の化合物の生成が観察された。それぞれ単離し、構造を決定したところ、6-メチルフェナントリジンと、C-O 切断によって得られるオキシムであることを確認した。また、別途作成した検量線をもとに収率を算出したところ、メチルフェナントリジンが 32%、オキシムが 62%と算出された。このように光照射によって環化反応が進行し、フェナントリジン環を構築できることを見出した。

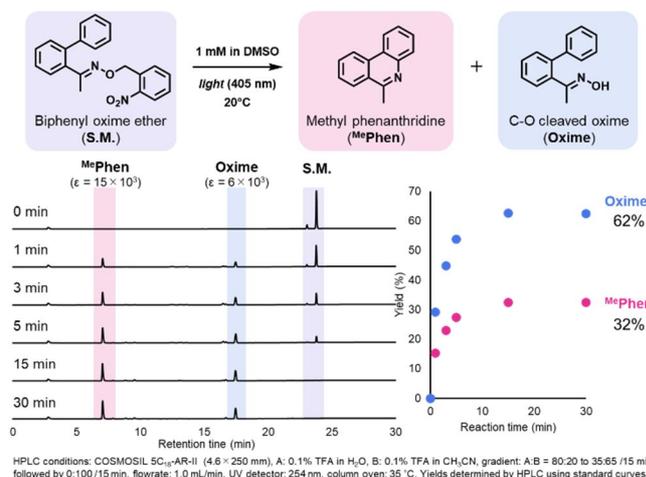


図3 分子内環化反応の初期検討

次に、収率の向上を期待して、NB 以外のニトロベンジル誘導体(NV, MeNV, MeNP)を用いて反応を検証した(図4)。その結果、これら電子供与基をもつニトロベンジル誘導体を用いると、フェナントリジンの収率を向上出来ることを見出した。いずれの場合においても、副生成物のオキシムの生成が減少しており、ベンゼン環上の置換基が環化反応の進行に有利に寄与していることが示唆された。また、ベンジル位にメチル基がある場合、反応速度の上昇が認められた。一方で、パラ位にニトロ基をもつ誘導体(*p*NB)では、環化反応は全く観察されず、*o*-ニトロベンジル構造が本反応の進行に重要であることを確認した。

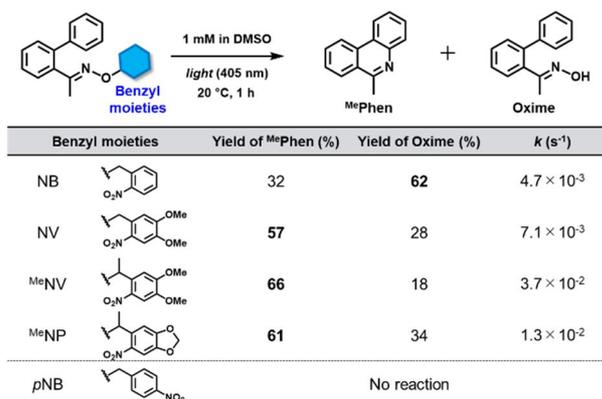


図4 *o*-ニトロベンジル基の検討

続いて、比較的高い収率で環化反応が進行した NV 基を持つ誘導体を用いて、溶媒検討を行った(図5)。生体応用の観点から、含水溶媒中で反応を試みたところ、反応の進行を確認できた。続いて、水の代わりに pH 7.0 のリン酸緩衝液を用いて反応を行ったところ、興味深いことに、収率の大幅な向上認められた。pH が異なる緩衝液を用いた場合にも同様にして、目的のフェナントリジンが良好な収率で生成した。これらの条件では、競合するオキシムがほとんど生成しないことから、C-O 切断反応の抑制が収率向上の直接的な理由と考えられた。さらに、副生成物を解析したところ、ニトロソ安息香酸が生成していることを見出した。

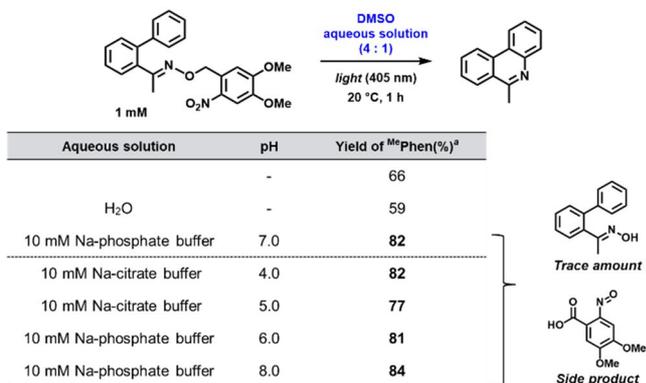


図5 溶媒効果の検証

## (2) 分子内光環化反応の基質適用範囲の検証

*o*-ニトロベンジルオキシムの特異な光反応性を用いた分子内環化反応が進行することを確認できたので、ビアリール上の置換基を変えた種々の環化前駆体を合成し、本反応の基質適用範囲を調査した(図6)。まず、芳香環上の置換基効果を検証した。DMSO-バッファー溶液中にて、NV基を付与した種々の置換ビフェニルオキシムに対して光を照射したところ、対応するフェナントリジン誘導体が良好な収率(73~89%)で得られた。また、ピリジン・ピリミジン・トリアゾールなどのヘテロ環を持つ基質を用いても、環化反応の進行(63~66%)が確認された。次に、オキシム炭素上の置換基効果を検証した。その結果、メチル基をトリフルオロメチル基で置換した場合には収率が低下した(19%)ものの、おおむね良好な収率(44~96%)で環化反応が進行することを確認した。

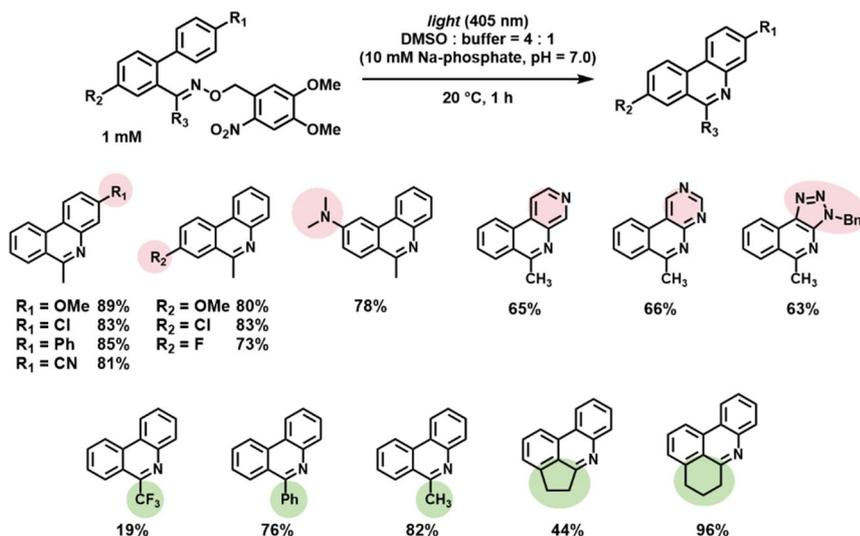


図6 光誘起型分子内環化反応の基質適用範囲の検証

## (3) 反応機構の解明

前述の実験結果を踏まえ、本光反応には、イミニルラジカルが関与すること、また、フェナントリジン環およびニトロソ安息香酸を生成するための酸化過程があることを予想した。そこで、反応機構の解明を目的として種々の実験を行った。まず、イミニルラジカルの生成を検証した。ラジカルトラップ剤である DMPO の共存下にて光反応を行い、生成物を ESI-MS により解析した。その結果、イミニルラジカル-DMPO 付加体の酸化体が観測され、本反応の中間体がイミニルラジカルであることが確認された。次に、酸化過程を検証した。酸化剤としては溶存酸素の関与が考えられ、その場合、系中には過酸化水素が発生すると予想した。そこで、過酸化水素を蛍光検出できる試薬を用いて、反応を解析した。その結果、光照射後に過酸化水素の発生を示す蛍光強度の増加がみられ、環化後の酸化過程には溶存酸素が関与していることが示唆された。

これらの結果から想定される反応機構を図7に示す。まず、*o*-ニトロベンジル基の光励起によってベンジル位にラジカルが生じ、均等開裂を経て、イミニルラジカルとニトロベンズアルデヒドラジカルが生じる。イミニルラジカルは、環化および酸化を経て、フェナントリジンを与える。一方、ニトロベンズアルデヒドラジカルも同様に酸化を受けたのち、光異性化を経てニトロソ安息香酸に変換されると考えられる。

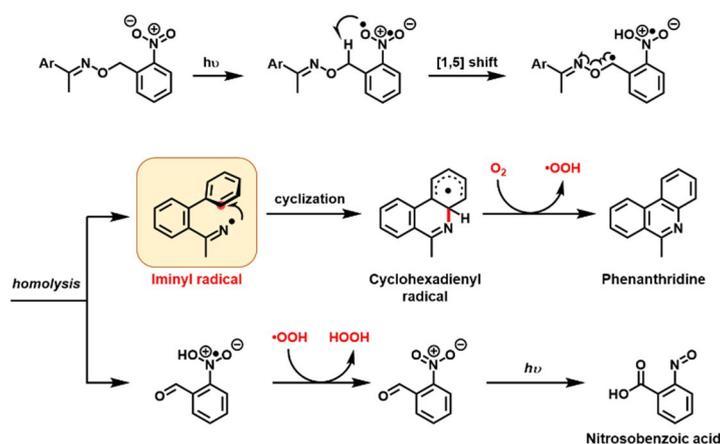


図7 光誘起型分子内環化反応の予想反応機構

#### (4) 胞内における光環化反応の検証

最後に、本光化学反応が細胞内で進行するかを検証した(図8)。細胞内反応には、環化後に蛍光を発するジメチルアミン置換体を用いた。この環化体を HeLa 細胞に添加し、蛍光顕微鏡で観察すると、細胞内に蛍光シグナルが観察される。一方、環化前駆体は蛍光性を示さないため、細胞に添加しても蛍光シグナルは観察されない。これに対して、環化前駆体を細胞に添加後、光を照射した場合には、環化体を添加した場合と同様、蛍光シグナルが観察された。このことから、新たに開発した光誘起型分子内環化反応は、細胞内でも進行することが示唆された<sup>1,2)</sup>。

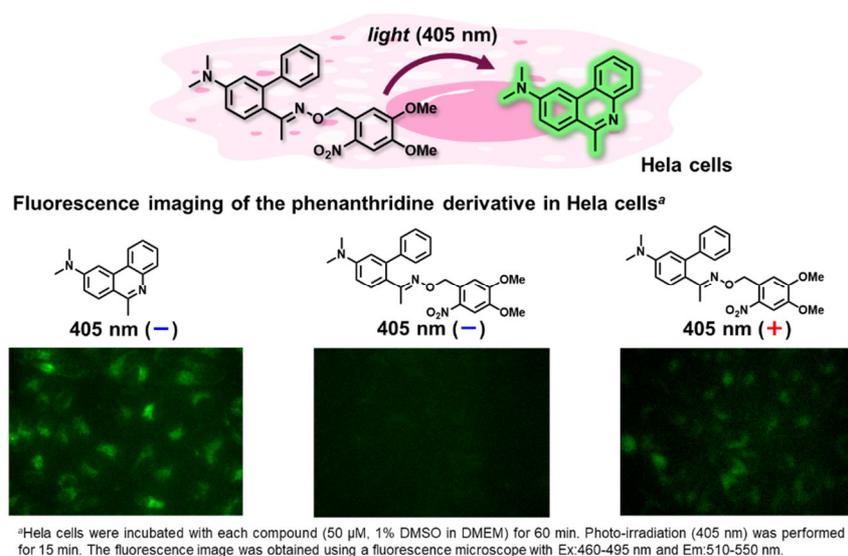


図8 HeLa細胞を用いた光誘起型分子内環化反応の細胞内検証

以上、本研究では、*o*-ニトロベンジルオキシムエーテルの特異な光反応性を利用することで、含窒素芳香環の一種であるフェナントリジン環を与える新たな光反応の開発に成功した。窒素を含む環状構造は、天然化合物及び医薬品に多く存在する基本骨格であり、標的結合活性に重要な役割を果たしている。このような基本骨格を光照射のみで構築できる本反応は、従来法では制御できなかった生体関連分子や医薬品の光機能制御を可能とするため、ケミカルバイオロジー研究や創薬研究を大きく加速すると期待される。

#### <引用文献>

- 1) Hidenori Okamura\*, Momoka Iida, Yui Kaneyama, Fumi Nagatsugi\*, “*o*-Nitrobenzyl oxime ethers enable photo-induced cyclization reaction to provide phenanthridines under aqueous conditions”, *ChemRxiv*, **2022**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2022-gjn1v.
- 2) Hidenori Okamura\*, Momoka Iida, Yui Kaneyama, Fumi Nagatsugi\*, “*o*-Nitrobenzyl Oxime Ethers Enable Photoinduced Cyclization Reaction to Provide Phenanthridines under Aqueous Conditions”, *Org. Lett.*, **2023**, 25, 466–470.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okamura Hidenori, Iida Momoka, Kaneyama Yui, Nagatsugi Fumi	4. 巻 -
2. 論文標題 o-Nitrobenzyl oxime ethers enable photo-induced cyclization reaction to provide phenanthridines under aqueous conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26434/chemrxiv-2022-gjn1v	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Hidenori, Iida Momoka, Kaneyama Yui, Nagatsugi Fumi	4. 巻 25
2. 論文標題 o-Nitrobenzyl Oxime Ethers Enable Photoinduced Cyclization Reaction to Provide Phenanthridines under Aqueous Conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 466 ~ 470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.2c04015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Hidenori, Trinh Giang Hoang, Dong Zhuoxin, Fan Wenjue, Nagatsugi Fumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Synthesis of 6-Alkynylated Purine-Containing DNA via On-Column Sonogashira Coupling and Investigation of Their Base-Pairing Properties	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1766 ~ 1766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules28041766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Hidenori, Trinh Giang Hoang, Dong Zhuoxin, Masaki Yoshiaki, Seio Kohji, Nagatsugi Fumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Selective and stable base pairing by alkynylated nucleosides featuring a spatially-separated recognition interface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 3042-3055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岡村秀紀, 飯田百香, 金山唯, 永次史
2. 発表標題 含窒素芳香環を細胞内構築できる光誘起型環化反応の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidenori Okamura
2. 発表標題 Expanding the toolbox of non-natural nucleosides for functionalization of oligonucleotides
3. 学会等名 FIBER International Summit for Nucleic Acids 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡村秀紀, 飯田百香, 金山唯, 永次史
2. 発表標題 光感受性オキシムの特異な反応性に着目した新規光環化反応の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidenori Okamura, Rina Ito, Kenta Sato, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Development of a chemically-convertible nucleoside system toward enzymatic amplification of the minor-groove modified DNA
3. 学会等名 ISNAC 2022: The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry; The 6th Annual Meeting of Japanese Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wenjue Fan, Hidenori Okamura, Zhuoxin Dong, Giang Hoang Trinh, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Design and synthesis of alkynylated C-pyridone nucleosides for selective unnatural base pairing
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川森 有沙, 岡村 秀紀, 飯田 百香, 金山 唯, 永次 史
2. 発表標題 光誘起型環化反応を用いたトポイソメラーゼ阻害剤の光構築
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金山 唯, 岡村 秀紀, 飯田 百香, 川森 有紗, 永次 史
2. 発表標題 光誘起型N-O開裂に基づく含窒素芳香環構築反応の開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村 秀紀, 飯田 百香, 金山 唯, 川森 有沙, 永次 史
2. 発表標題 含窒素芳香環の細胞内構築を可能にする光誘起型環化反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田百香, 岡村秀紀, 金山唯, 永次史
2. 発表標題 Development of a photo-cyclization reaction producing phenanthridines in aqueous media
3. 学会等名 令和3年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡村 秀紀, 飯田 百香, 金山 唯, 永次 史
2. 発表標題 光感受性オキシム構造を用いた生体適合性の光誘起型環化反応の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidenori Okamura, Zhuoxin Dong, Giang Hoang Trinh, Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Unnatural base pairs with spatially isolated hydrogen-bonding units in the DNA major groove
3. 学会等名 ISNAC2021, The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, The 5th Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学 プレスリリース  <a href="https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2023/01/press20230120-01-reaction.html">https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2023/01/press20230120-01-reaction.html</a></p>
--

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
---------	---------