

平成 26 年 12 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350015

研究課題名(和文)斬新なナノサイズ有機反応場の設計に基づく生体反応過程の化学的解明

研究課題名(英文)Elucidation of the chemical processes of biological reactions based on the design of novel nano-sized reaction environments

研究代表者

後藤 敬(Goto, Kei)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70262144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：酵素の活性部位の構造的特性を採り入れた新規なナノサイズの反応場として、 dendリマー骨格に基づく巨大分子キャビティを開発した。内部の官能基を保護するキャビティ型反応場を活用することで、従来合成困難であったレドックス制御や信号伝達に関わる生体反応活性中間体を手に取れる形に安定化し、その構造および反応性を解明した。特に、システイン残基およびセレノシステイン残基と酸化剤や活性窒素種との相互作用について検討し、これまで仮説にとどまっていた生体反応の想定機構を化学的に検証した。

研究成果の概要(英文)：Novel nano-sized molecular cavities with a dendrimer-type framework were developed for modeling reaction environments in the active site of enzymes that enable the stabilization highly reactive intermediates. By utilizing the novel model compounds, several highly reactive species otherwise very unstable in artificial systems were successfully synthesized and their reactivities were elucidated. These results contribute to the experimental demonstration of the hypothetically proposed chemical processes involved in the redox regulation and signaling.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：有機化学 酵素モデル 活性中間体 レドックス制御 ナノサイズ分子

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の様々な機能において、システイン残基およびセレノシステイン残基と活性酸素種および活性窒素種との反応は重要な役割を果たしている。しかし、これらの反応で想定されている中間体は、人工系では極度に不安定であるものが多く、入手できる化学的情報がごく限られている。そのため、現在の多くの研究が間接証拠に頼らざるを得ない状況にある。たとえば、ニトログリセリンをはじめとする硝酸エステルは、顕著な血管拡張作用を有するために狭心症などの特効薬として古くから用いられているが、その作用機序、特にどのようにして硝酸エステルから一酸化窒素 (NO) あるいは NO ドナーが生成するかについては、いくつか仮説が立てられているものの未だ証明されていない。これは、中間体と考えられているチオニトラート ( $\text{RSNO}_2$ ) の不安定性が大きな原因となっている。また、レドックス制御において重要な役割を果たしているメチオニンスルホキシドレダクターゼの触媒作用については、セレン酸 ( $\text{RSeOH}$ ) を中間体として経由する機構が提案されているが、中間体の不安定性のために化学的証拠を得ることが困難であり、仮説に留まっている。このように、生化学の分野で仮説として提案されてきた様々な想定反応機構を実験的に検証し、より化学的根拠に基づいた機構を確立するためには、反応中間体を生体内と同様に安定化できる人工モデル系の構築が必要とされていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず酵素の活性部位の構造的特性を採り入れた新規なナノサイズの反応場として、 dendritic 骨格に基づく巨大分子キャビティを開発した。そして、内部の官能基を保護するキャビティ型反応場を活用することで、従来合成困難であった生体反応活性中間体を手にとれる形に安定化し、その構造および反応性を直接的に解明することを目的とした。それにより、これまで紙上の反応式に過ぎなかった生体反応の想定機構を、化学的に検証した。特に、システイン残基およびセレノシステイン残基と酸化剤や活性窒素種との相互作用の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

システインやセレノシステインのモデルとして、既知のチオールやセレノールを用いて活性酸素種、活性窒素種との反応を行うと、中間体がさらに二分子間で反応したジスルフィドなどが容易に生成してしまう。そこで、このような二分子間失活過程を効果的に抑制できる反応場として、剛直なフェニレン dendritic 骨格に基づいたナノサイズ分子キャビティを構築する。その内部空間を活用して、チオールおよびセレノールと酸化剤、活性窒素種等との反応で生成する高反応性中間体を安定に合成し、その構造および物性を明ら

かにする。得られた化合物を用いることにより、生化学の分野で仮説として提案されてきた反応機構を幅広い実験手段により直接的に検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 拡大型 dendritic 骨格を活用した新規なシステインモデル化合物の開発

研究代表者が以前に開発した dendritic 骨格と比較して、より高い立体保護効果をもつ拡大型 dendritic 骨格を開発した。このモデル化合物では、末端芳香環上にイソプロピル基を導入することで、周縁立体保護効果を高めている。この分子キャビティの内部空間を活用することで、従来は極めて困難であったシステイン由来高反応性化学種の安定化に成功した。拡大型 dendritic 骨格の構築は、Hart らの方法を改良した手法を用いて行い、中心部にカルボキシ基をもつ分子キャビティを合成した。キャビティ内へのシステインユニットの導入は、カルボン酸とシステインユニットを縮合させアミドとすることで行った。システインチオールの保護基について種々検討したところ、2-ピリジルチオ基が有効であることを見出し、キャビティ中心部にシステインチオールをもつ誘導体 (図1, X=H) を高収率で合成した。これを用いてシステインヨウ化スルフェニル (RSI) の合成について検討した。ヨウ化スルフェニルは、システインの様々な酸化修飾の中間体として注目されている高反応性化学種であるが、通常二分子間過程により容易に不均化を起こす。研究代表者が以前に行った研究においても、溶液中で比較的安定なシステインヨウ化スルフェニルは得られたものの、単離には至っていなかった。今回合成したシステインチオール誘導体に対し、*N*-ヨードコハク酸イミドを作用させると、対応するシステインヨウ化スルフェニルが定量的に生成し、安定な結晶として単離することに成功した。これは、システインヨウ化スルフェニルの初めての単離例であり、立体保護基から遠く離れた部位に存在する活性官能基が高い安定性を示したことから、キャビティ型反応場による周縁立体保護効果の有効性が実証された。

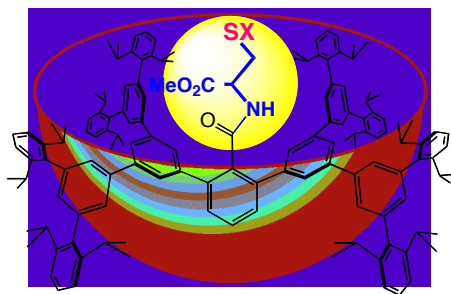


図1 キャビティ型骨格をもつ新規なシステインチオールモデル化合物

#### (2) メチオニンスルホキシドレダクターゼ作用機序についてのモデル研究

メチオニンスルホキシドレダクターゼ (Msr) は、レドックス制御において中心的役割を果たす酵素の一つであり、細胞を酸化損傷や感染から守る機能を担っている。セレン含有 Msr の作用機序として、活性中心のセレノシステインがメチオニンスルホキシドをメチオニンへ還元し、自身はセレネン酸となる機構が提唱されている。しかし、この素反応過程については実験的に示された例が全くなく、推測の域を出ていなかった。これは、通常の条件では、生成するセレネン酸が不安定であることが大きな原因となっている。そこで、セレネン酸の安定化が可能と期待されるボウル型分子キャビティを活用することで、想定反応機構を化学的に検証した。まず、ボウル型骨格をもつセレノールとジメチルスルホキシドとの反応をモデル反応として検討したところ、酸および水存在下において、対応するセレネン酸が良好な収率で生成することを見出した。これは、セレノールがスルホキシドを還元し、セレネン酸とスルフィドを与えることを実験的に示した初めての例である。次に、メチオニンスルホキシド誘導体を基質とした反応について検討したところ、ジメチルスルホキシドとの反応に比べて速度は遅いものの、セレネン酸とともに、対応するメチオニン誘導体が生成することが明らかになった。さらに、これらの反応の反応機構について、溶媒効果の解析、速度論解析などにより検討を加えた。

### (3) 硝酸エステルの血管拡張作用機序におけるシステインの関与についてのモデル研究

ニトログリセリンをはじめとする硝酸エステルは、顕著な血管拡張作用を有するために狭心症などの特効薬として古くから用いられている。しかし、その作用機序、特にどのようにして硝酸エステルから一酸化窒素 (NO) あるいは NO ドナーが生成するかについては、いくつか仮説が立てられているが未だ明らかになっていない。今回、システインユニットをボウル型キャビティの内部に固定したモデル化合物 (図 1) を活用することで、システインと硝酸エステルとの反応によるシステインチオニトラート (CysSNO<sub>2</sub>) 生成過程を実証するとともに、この中間体から他のシステインへニトロソ転移が進行することを明らかにした。これらの結果から、硝酸エステルの代謝過程として提唱されいながら仮説の域に留まっていた反応過程の実証に成功した。また、ニトロキシル (HNO) とシステインチオールとの反応中間体である N-ヒドロキシスルフェンアミド (RSNHOH) の反応性について検討し、N-ヒドロキシスルフェンアミドがスルフェニルニトレン (RSN) 前駆体として機能することを初めて見出した。

## 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 9 件)

- ① Sase, S.; Kakimoto, R.; Goto, K. "Synthesis of a Stable Selenoaldehyde (RCH=Se) by Self-Catalyzed Thermal Dehydration of a Primary-Alkyl-Substituted Selenenic Acid (RCH<sub>2</sub>SeOH)" *Angew. Chem., Int. Ed.*, 印刷中. 査読有.
- ② Sase, S.; Hashimoto, M.; Goto, K. "Oxygen-Atom-Transfer Reactions of a Pd(II) Peroxocarbonate Complex" *Chem. Lett.*, 印刷中. 査読有.
- ③ Sase, S.; Ikehara, Y.; Goto, K. "Chloro-( $\eta^6$ -p-cymene)-{3-[3,5-bis(2,6-dimethylphenyl)-1,2-phenylene]-1-(2,6,2"6"-tetramethyl-1,1"3',1"-terphenyl-5'-yl)imidazol-2-ylidene}-ruthenium(II) benzene disolvate" *Acta Crystallogr., Sect. E*, 70, m394, 2014. 査読有.
- ④ Domoto, Y.; Sase, S.; Goto, K. "Efficient End-Capping Synthesis of Neutral Donor-Acceptor [2]Rotaxanes under Additive-Free and Mild Conditions" *Chem. - Eur. J.*, 20, 15998-16005, 2014. 査読有.
- ⑤ Goto, K.; Yoshikawa, S.; Ideue, T.; Sase, S. "Transnitrosation from a stable thionitrate to an amine with concomitant formation of a sulfenic acid" *J. Sulf. Chem.* 34, 705-710, 2013. 査読有.
- ⑥ Kobayashi, Y.; Ohkubo, K.; Nomura, T.; Kubo, M.; Fujieda, N.; Sugimoto, H.; Fukuzumi, S.; Goto, K.; Ogura, T.; Itoh, S., Copper(I)-Dioxygen Reactivity in a Sterically Demanding Tripodal Tetradentate tren Ligand: Formation and Reactivity of a Mononuclear Copper(II) End-On Superoxo Complex. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 4574-4578. 査読有.
- ⑦ Sase, S.; Ebisawa, N.; Goto, K. "Iodide-Promoted Deselenylation of  $\beta$ -Chloro- and  $\beta$ -Oxyselenides to Form Alkenes and Selenenyl Iodides" *Chem. Lett.* 41, 766-768, 2012. 査読有.
- ⑧ Sase, S.; Aoki, Y.; Abe, N.; Goto, K. "Syntheses of Biologically-relevant Reactive Sulfur Species by Utilizing a Primary Alkyl Steric Protection Group" *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* 186, 1255-1258, 2011. 査読有.
- ⑨ 後藤 敬, "分子のボウルを使って生体反応活性種をモデル化する" *化学と教育*, 59, 604-605, 2011, 査読有.

[学会発表] (計 40 件)

- ① 柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 "Bowl 型骨格を有する一級アルキル置換セレネン酸から安定なセレノアルデヒドへの変換" 日本化

学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 28 日.

②石原充裕, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl 型立体保護基を有する *N*-ヒドロキシセレンンアミドとチオールとの反応” 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 28 日.

③佐野 司, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティに内包されたシステインチオールと硝酸エステルの反応” 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 28 日.

④井手上拓, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “活性窒素種による *S*-ニトロソチオールの酸化反応に関する機構的研究” 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 28 日.

⑤高橋絵里歌, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “ヨウ化セレンニルを用いたアルケンのアミノセレン化反応の開発” 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014 年 3 月 27 日.

⑥Kei Goto, “Organoelement Chemistry in Mechanistic Studies on Biological Reactions”, US/Japan Joint Symposium on Advanced Organo-Main Group Chemistry, 名古屋, 2014 年 3 月 29 日.

⑦後藤 敬 “キャビティ型分子骨格を活用した生体反応活性種のモデル研究” 第 2 回生物元素戦略研究会, 浜松, 2014 年 3 月 1 日.

⑧高橋絵里歌, 海老澤和明, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “キャビティ型置換基を活用したヨウ化セレンニルのアルケン活性化機構に関する研究” 第 40 回有機典型元素化学討論会, 東大阪, 2013 年 12 月 6 日.

⑨石原充裕, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl 型立体保護基を活用した初めての *N*-ヒドロキシセレンンアミドの合成” 第 40 回有機典型元素化学討論会, 東大阪, 2013 年 12 月 6 日.

⑩佐野 司, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “*S*-ニトロシステインからチオールへのニトロソ転移の反応機構の解明” 第 40 回有機典型元素化学討論会, 東大阪, 2013 年 12 月 6 日.

⑪井手上拓, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl 型立体保護基を活用した  $\text{NO}^+$  による *S*-ニトロソチオールの活性化機構の解明” 第 40 回有機典型元素化学討論会, 東大阪, 2013 年 12 月 6 日.

⑫柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl 型分子キャビティを活用したセレン含有メチオニンスルホキシド還元酵素の反応機構に関するモデル研究” 第 40 回有機典型元素化学討論会, 東大阪, 2013 年 12 月 6 日.

⑬Kei Goto, “Synthesis and Application of Cysteine Model Compounds Based on Nano-sized Molecular Cavities”, The 16th Japan-Korea Seminar on Organic Chemistry, 仙台, 2013 年 9 月 27 日.

⑭井手上拓, 佐瀬祥平, 後藤 敬, Manik Ghosh, 永瀬 茂 “*S*-ニトロソシステイン誘導体の熱分解機構に関する速度論的研究” 第 24 回基礎有機化学討論会, 東京,

2013 年 9 月 5 日.

⑮柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “一級アルキル置換セレン酸の合成と安定なセレンアルデヒドへの変換” 第 24 回基礎有機化学討論会, 東京, 2013 年 9 月 6 日.

⑯Kei Goto, “Modeling of Highly Reactive Intermediates in the Reaction of Cysteine Thiols and Reactive Nitrogen Species”, 6th Heron Island Conference on Reactive Intermediates and Unusual Molecules, Heron Island, Great Barrier Reef, Queensland, Australia, 2013 年 7 月 11 日.

⑰後藤 敬, 柿本 涼, 佐瀬祥平 “ナノサイズキャビティ型骨格を有するセレンシステインモデル化合物の合成と応用” 第 10 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 和歌山, 2013 年 5 月 25 日.

⑱井手上拓, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “*S*-ニトロソシステイン誘導体の熱分解反応機構の解明” 日本化学会第 93 回春季年会, 草津, 2013 年 3 月 25 日.

⑲柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “一級アルキル置換セレン酸の脱水反応による安定なセレンアルデヒドの合成” 日本化学会第 93 回春季年会, 草津, 2013 年 3 月 25 日.

⑳井手上拓, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “*S*-ニトロソチオールの二分子間分解過程に関する機構的研究” 第 39 回有機典型元素化学討論会, 盛岡, 2012 年 12 月 7 日.

㉑柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl 型骨格をもつセレン化合物を活用したメチオニンスルホキシド還元酵素のモデル研究” 第 39 回有機典型元素化学討論会, 盛岡, 2012 年 12 月 7 日.

㉒佐野 司, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティに内包された高反応性システイン誘導体の合成” 第 39 回有機典型元素化学討論会, 盛岡, 2012 年 12 月 6 日.

㉓ Kei Goto, “Application of Cavity-shaped Molecules to Modeling of Biologically-relevant Reactive Sulfur Species”, The 15th International Symposium “Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, Poland, 2012 年 11 月 16 日.

㉔ Kei Goto, “Modeling of Chalcogen-containing Reactive Intermediates of Biological Reactions by Utilizing Molecular Cavities”, XII International Symposium on Selected Problems of Chemistry of Acyclic and Cyclic Heteroorganic Compounds, Częstochowa, Poland, 2012 年 11 月 15 日.

㉕佐瀬祥平, 佐野 司, 後藤 敬 “デンドリマー型ナノサイズ分子キャビティを活用したシステインチオニトラーのモデル研究” 第 23 回基礎有機化学討論会, 京都, 2012 年 9 月 21 日.

②⑥後藤 敬, 佐野 司, 三崎朋子, 佐瀬祥平 “内部にシステインユニットを有するナノサイズ分子キャビティの開発と応用” 第9回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 札幌, 2012年5月27日.

②⑦Taku Ideue, Shohei Sase, and Kei Goto, “Investigation on Disulfide Formation from S-Nitrosothiols by Taking Advantage of a Bowl-shaped Substituent”, The 10th International Conference on Heteroatom Chemistry, 宇治, 2012年5月22日.

②⑧Tsukasa Sano, Shohei Sase, and Kei Goto, “Synthesis and Reactivity of a Cysteine Thionitrate Derivative by Taking Advantage of a Bowl-shaped Molecular Cavity”, The 10th International Conference on Heteroatom Chemistry, 宇治, 2012年5月22日.

②⑨Ryo Kakimoto, Shohei Sase, and Kei Goto, “Modeling of the Key Reduction Step of Selenocysteine-containing Methionine Sulfoxide Reductase”, The 10th International Conference on Heteroatom Chemistry, 宇治, 2012年5月22日.

③⑩ Kei Goto, “Elucidation of the Reactivity of Biologically-relevant Reactive Sulfur Species by Utilizing Molecular Cavities”, The 10th International Conference on Heteroatom Chemistry, 宇治, 2012年5月25日.

③⑪井手上拓, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl型分子キャビティを活用した S-ニトロソチオール の二分子間分解反応の解明” 日本化学会第92回春季年会, 横浜, 2012年3月25日.

③⑫柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl型分子キャビティを活用したセレンールによるスルホキシド還元過程の解明” 日本化学会第92回春季年会, 横浜, 2012年3月25日.

③⑬海老澤和明, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “ヨウ化セレンニルの生成を鍵とした新規合成反応の開発” 日本化学会第92回春季年会, 横浜, 2012年3月25日.

③⑭石原充裕, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “HNO 供与体としての N-ヒドロキシスルフェンアミドの反応性” 日本化学会第92回春季年会, 横浜, 2012年3月25日.

③⑮佐野 司, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “デンドリマー型分子キャビティを活用した S-ニトロソおよび S-ニトロシステイン誘導体の合成と反応” 日本化学会第92回春季年会, 横浜, 2012年3月27日.

③⑯ Kei Goto, “Modeling of Reactive Species Derived from Cysteine and Selenocysteine Residues by Utilizing a Phenylene-based Molecular Cavity”, 1st International Symposium on Creation of

Functional Materials, つくば, 2011年12月17日.

③⑰後藤 敬 “分子キャビティを活用した含高周期典型元素活性種の反応性制御” 第38回有機典型元素化学討論会, 金沢, 2011年12月8日.

③⑱石原充裕, 吉川修平, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “Bowl型分子キャビティを活用した N-ヒドロキシスルフェンアミドの反応性に関するモデル研究” 第38回有機典型元素化学討論会, 金沢, 2011年12月9日.

③⑲ Kei Goto, Noriaki Abe, Michihiro Ishihara, and Shohei Sase, “Modeling of Biologically-relevant Reactive Sulfur Species by Utilizing Molecular Cavities”, The 15th Japan-Korea Seminar on Organic Chemistry, Gyeongju, Korea, 2011年10月2日.

④⑰佐野 司, 三崎朋子, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “デンドリマー型分子キャビティを活用した安定なシステインヨウ化スルフェニルの合成” 第5回バイオ関連化学シンポジウム, つくば, 2011年9月13日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 敬 (GOTO KEI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号: 70262144