

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 24日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710266

研究課題名（和文）精密有機合成による近赤外生物発光基質の開発

研究課題名（英文）Synthesis of new substrates for near-infrared bioluminescence imaging

研究代表者

吉田 優（YOSHIDA SUGURU）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：10583750

研究成果の概要（和文）：生体内中の望みの分子を可視化する手法の開発は未だ発展途上である。これに対して、本研究では、実用的な近赤外生物発光系の開発を目指し、セレンテラジン（CTZ）に着目し、長波長発光する ν -CTZ およびその類縁体の合成法の開発を検討した。その結果、3つの連続するクロスカップリング反応と閉環メタセシスを鍵反応とする合成法の確立に成功した。また、CF₃基を有する類縁体である $cf\beta$ - ν -CTZ の合成にも成功し、これが *Renilla* ルシフェラーゼおよびその変異体の基質になるとともに安定性が向上していることを示唆する結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：*In vivo* molecular imaging that enables non-invasive observation of molecule of interest in organisms is a valuable technique to promote life science and drug discovery. In particular, the methods using near-IR luminescence have been aggressively developed in recent years. In order to develop a near-IR bioluminescence system based on coelenterazine (CTZ)-utilizing luciferase, we have established a concise synthetic method of ν -CTZ, an analog that is known to show red-shifted light emission applicable to *in vivo* molecular imaging. The ten-step synthetic route of ν -CTZ includes three consecutive regioselective cross-coupling reactions and ring closing metathesis as key reactions, which is suitable for preparing various analogs. We also synthesized C2-CF₃-analog of ν -CTZ, $cf\beta$ - ν -CTZ, and showed that it also serves as a good substrate for *Renilla* luciferases with increased stability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生体分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー、有機化学、分子プローブ、生物発光

1. 研究開始当初の背景

近年、緑色蛍光タンパク質（GFP）に代表されるように、生体现象を可視化できるイメージング技術が医学・生物学分野の研究において重要な役割を果たすようになってきた。とくに、生体内の望みの分子をイメージングする手法（*in vivo* 分子イメージング）として生体組織を透過できる近赤外領域（波長 700 nm 以上）での蛍光や発光イメージングに利

用可能な分子プローブ開発が精力的に行われているが、未だ発展途上である。

これに対して我々は、実用的な近赤外発光系を新たに開発できれば革新的な *in vivo* イメージング法が提供できると考え、古くから研究されている代表的な生物発光基質であるセレンテラジン（CTZ、**1a**）に改めて着目した（図1）。CTZは発光基質として、オワンクラゲ由来イクオリンをはじめ、ウミシイタケ

由来 *Renilla* ルシフェラーゼ、コペポーダ由来 *Gaussia* ルシフェラーゼ、デカポーダ由来 *Oplophorus* ルシフェラーゼなど、多くの海洋生物に共通の発光基質として利用されている。従って、CTZの構造を改変することでいずれかのルシフェラーゼに適用できる近赤外発光性 CTZ 類縁体を開発できれば、イメージングしたい対象タンパク質にルシフェラーゼを融合発現させ、基質投与による近赤外発光を観測することで、生きた動物にも適用可能な *in vivo* イメージング法が提供できると期待される。

1997年に井上敏らは、数十種の CTZ アナログを用いて、イクオリン、*Renilla* ルシフェラーゼ、*Oplophorus* ルシフェラーゼに対する発光基質特性を調べている。その過程で彼らは、CTZのイミダゾピラジノンと6位ヒドロキシフェニル基とが共役二重結合を介して縮環した ν -CTZ を *Renilla* ルシフェラーゼの基質として用いた場合に、CTZを用いた際には最大発光波長が475 nm (青色発光)であったものが512 nm (緑色発光)へ40 nmほど長波長シフトすることを見いだした。しかも、この発光スペクトル分布の一部 (~5%) は近赤外領域 (>700 nm) に達しており、実際にこの発光系を用いることで、マウスでの *in vivo* イメージングも達成されている。しかし、 ν -CTZ は、1988年に岸・下村らによって合成の報告がなされているものの、この一例のみにとどまっており、その合成法の詳細は明らかにされていない。加えて、実用的な *in vivo* イメージングのためには、より長波長での発光や基質の安定性の改善が望まれており、多様な類縁体の合成に柔軟に対応できる ν -CTZ の高効率合成法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

今回我々は、近赤外生物発光を実現する新しい CTZ 類縁体の開発を念頭に、まず、 ν -CTZ の構造を改変することで実用的な近赤外発光特性を有する分子プローブの創出を目指し、 ν -CTZ 類縁体の新しい合成法の開発に取り組んだ。

さらに、本合成手法を利用し、 ν -CTZ の 2 位置換基の改変による安定性の獲得を目指した。最近我々は、CTZ の 2 位の置換基を改変した新規類縁体の合成を行い、対応する半合成イクオリン (AQ) を作製し、その発光特性を調べた。その際、2 位芳香環上の置換基の種類が基質の安定性に大きく影響することを見いだした。とくに CTZ の水酸基をトリフルオロメチル基にかえた *cf3*-CTZ (**1b**) は、安定性が大きく向上するとともに、対応する半合成 AQ に Ca^{2+} を作用させた時の発光時間が長くなることが分かった。このことから、創薬支援技術である AQ 系 GPCR アッセイに応用したところ、*cf3*-CTZ が定量性の高いア

ッセイを可能にする有用な基質であることが分かった。そこで、この結果を新しい ν -CTZ 類縁体の開発にも利用しようと考えた。

3. 研究の方法

多様な類縁体合成も視野に入れ、遷移金属触媒反応を駆使した ν -CTZ の効率的合成法の開発に着手した。すなわち、鍵となる高度に縮環した三環性骨格の構築には閉環メタセシス (RCM) 反応を適用しようと考えた。さらにその前駆体となるジビニル化合物は、ピラジン環に対して三度のクロスカップリング反応を順次、位置選択的に行うことで効率よく構築できると考えた。

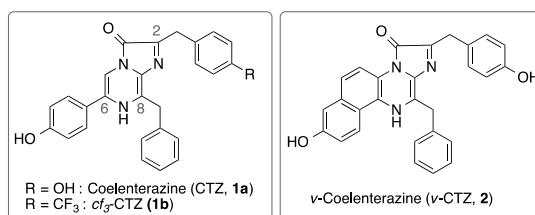
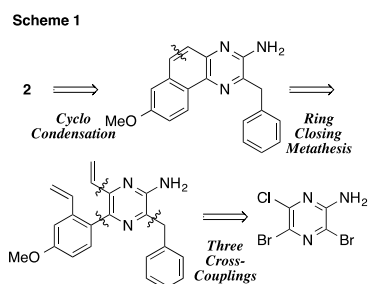
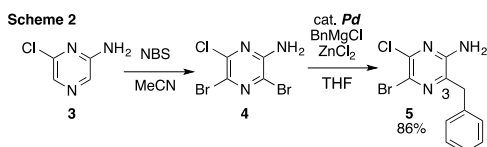


図1 セレンテラジン(CTZ)類縁体および ν -セレンテラジン (ν -CTZ)の構造



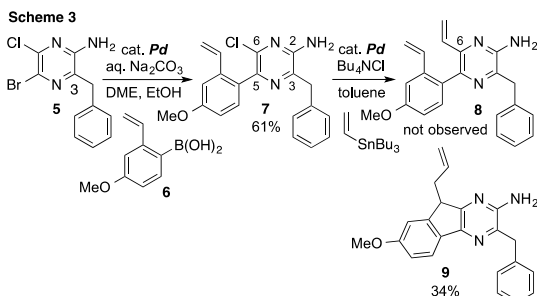
4. 研究成果

これまでの 2-amino-3,5-dibromopyrazine に対するクロスカップリング反応の報告から、Sonogashira カップリングや Stille カップリング、Negishi カップリングなどの条件において、アミノ基を保護することなく、3 位選択的に炭素-炭素結合を形成できることが明らかにされてきた。そこで、これらの知見をもとに、市販の化合物 **3** から一段階で誘導した **4** に対して、Negishi カップリングによるベンジル基の位置選択的導入を検討した。化合物 **4** はクロロ基を有しているため、反応性や選択性への影響が懸念されたものの、反応は望みの位置でのみ進行し、効率よく 3 位にベンジル基を導入できた (Scheme 2)。

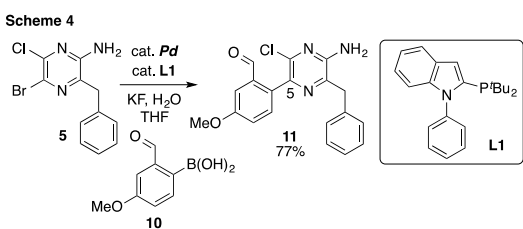


次に、得られた **5** とオルト位にビニル基を有するアリアルボロン酸 **6** との Suzuki-Miyaura カップリングを試みたところ、クロロ基を損なうことなく位置選択的に反応が

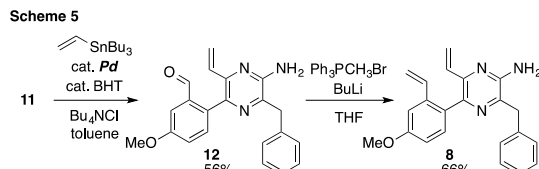
進行し、良好な収率で目的生成物 **7** を得ることができた (Scheme 3)。しかし、6 位へのビニル基導入を目的とし、ビニルスズを用いる Stille カップリングを試みたところ、目的とするジビニル化合物 **8** は全く得られず、予期に反して、環化後にビニル化が進行した生成物 **9** が得られるのみであった。このとき、まず分子内 Heck 反応が進行した後、さらにビニルスズと反応して **9** へと至ったと考えられる。



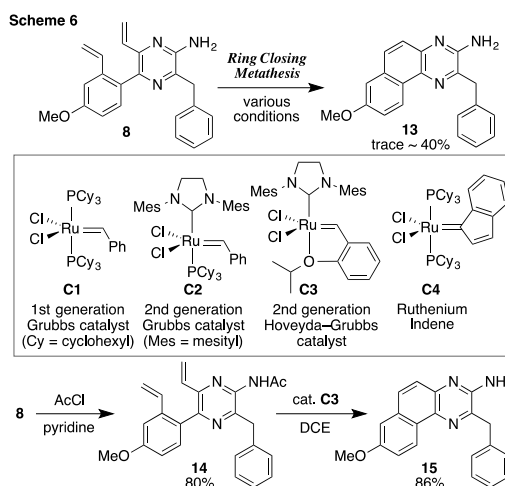
この結果を受け、反応経路の変更へと踏み切った。具体的には、まず、ビニル基に代えて、ホルミル基を有するアリールボロン酸 **10** との Suzuki-Miyaura カップリングを行うことで、分子内 Heck 反応を回避してビニル基が導入できると考えた。しかし、実際に、**5** と **10** とのカップリング反応を試みたところ、通常の条件下においても、交差カップリング反応に有効であるとされる Buchwald 配位子を用いた触媒系においても、望む生成物を得ることはできなかった。一方、オルト位にホルミル基を有するクロスカップリング反応に実績のある、インドール骨格を有するホスフィン配位子を用いた触媒系を利用したときには、交差カップリング生成物が得られることを見いだした。反応条件を最適化した結果、かさ高いインドールホスフィン配位子 **L1** を用いるとともに、水を添加して反応を行うことで、高収率で目的生成物 **11** を得ることに成功した (Scheme 4)。



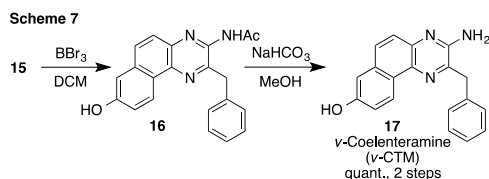
つづいて、Stille カップリングによる **11** のビニル化を試みたところ、分子内環化反応が進行することなく、ビニル化体 **12** を得ることができた (Scheme 5)。このとき、重合禁止剤として BHT (3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxyl-toluene) を触媒量添加することで収率が向上することもわかった。次に、得られた **12** を Wittig 反応条件に付すことで、閉環メタセシスの前駆体であるジビニル化合物 **8** へと変換することができた。



次に、本合成経路の鍵段階である閉環メタセシスを検討した。まず、ジクロロメタン (DCM) 中、室温で、**8** に対して第一世代 Grubbs 触媒 **C1** を作用させたところ、わずかに目的生成物が確認されるのみであった。そこで、ジクロロエタン (DCE) を溶媒として用い、加熱還流下、より高温での反応を試みたところ、中程度の収率で目的化合物 **13** を得ることができた (Scheme 6)。しかし、触媒 **C2~C4** を用いるなどのさらなる条件検討を行ったものの、触媒の失活を防ぐことはできず、これ以上の収率の改善はみられなかった。その原因が、原料あるいは生成物のアミノ基とピラジン環の窒素原子がルテニウムに配位するためと考え、アミノ基をアセチル保護した基質 **14** を合成し、閉環メタセシス反応を試みたところ、収率の大幅な向上に成功し、収率よく閉環生成物 **15** を得ることができた。

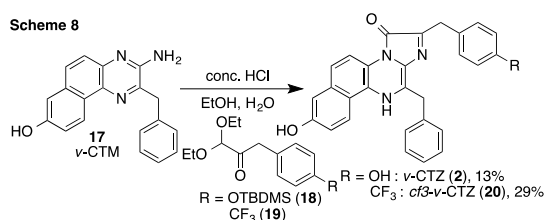


つづいて、この benzo[*f*]quinoxaline 骨格を有する **15** のメチル基及び *N*-アセチル基を脱保護することで ν -セレンテラミン (ν -CTM、**17**) へと誘導できた (Scheme 7)。具体的には、三臭化ホウ素によって脱メチル化を行い **16** に変換した後、塩基性条件下でアセチル基を除去することができた。このとき、意外なことに、このアセチル基は炭酸水素ナトリウムのような弱塩基で容易に加溶媒分解されることが分かった。

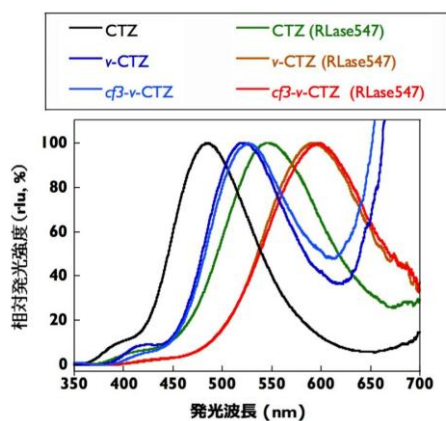


最後に、 ν -CTM (**17**) とケトアセタール **18**

との環化縮合反応を行うことで、目的とする ν -CTZ (**2**) の合成を達成できた (Scheme 8)。このとき、有機溶媒中において ν -CTZ がやや不安定な化合物であるため、最終段階が低収率であったと考えられる。そこで、ケトアセタールのパラ位を保護水酸基からトリフルオロメチル基に代えることで、安定性の向上が期待できる類縁体を合成しようと考えた。すなわち、前述した CTZ 類縁体を用いた研究の結果、CTZ の C2 位芳香環上の水酸基をトリフルオロメチル基に変換することで安定性が向上し、有用な発光基質として利用できることが示唆されている。そこで、トリフルオロメチル基に置き換えた **19** を用いて環化縮合反応を行ったところ、生成物の安定性が増したためか、収率が若干改善し、目的とする cf_3 - ν -CTZ (**20**) を得ることができた。



今回合成した ν -CTZ (**2**) は、¹H NMR スペクトルが文献値と一致した。さらに、*Renilla* ルシフェラーゼ (RLase) およびその変異体である RLase547 の基質として用いたとき、報告と同様の発光特性を示した (図 2)。さらに、 cf_3 - ν -CTZ (**20**) の発光特性を同様に調べたところ、発光活性の低下は見られるものの、 ν -CTZ と同様の発光パターンを示すことが分かり、両ルシフェラーゼの基質となることが明らかになった。



<i>Renilla</i> Luciferase			
CTZ analog	I_{\max} (%)	60 s (%)	λ_{\max} (nm)
CTZ	100	100	485.0
ν -CTZ	71.8	47.3	519.0
cf_3 - ν -CTZ	18.9	12.3	525.5
<i>Renilla</i> Luciferase 547			
CTZ analog	I_{\max} (%)	60 s (%)	λ_{\max} (nm)
CTZ	100	100	546.5
ν -CTZ	213.3	73.4	593.0
cf_3 - ν -CTZ	16.9	11.9	599.0

図 2 CTZ 類の発光特性

以上のように、今回、近赤外生物発光イメージングの実現を目指し、 ν -CTZ の高効率合成法の開発に成功した。今後、確立した合成法に基づき、*in vivo* イメージングに利用できる、実用的な発光基質の創製を目指していく予定である。

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 “Expression, purification and luminescence properties of coelenterazine-utilizing luciferases from *Renilla*, *Oplophorus* and *Gaussia*: Comparison of substrate specificity for C2-modified coelenterazines”

Satoshi Inouye, Yuiko Sahara-Miura, Jun-ichi Sato, Rie Iimori, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya

Protein Expression and Purification **2013**, *88*, 150–156, DOI: 10.1016/j.pep.2012.12.006

査読有。

② “生物発光系による *in vivo* イメージングを指向した発光基質の開発”

細谷孝充、隅田有人、吉田優、鈴木崇弘、井上敏

日本分子イメージング学会機関誌 **2013**, *6*, 3–6, 査読有。

③ “Synthesis of diverse aromatic oxophosphorus compounds by the Michaelis-Arbuzov-type reaction of arynes”

Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya

Chemistry Letters **2013**, *42*, in press, DOI: 10.1246/cl.130116, 査読有。

[学会発表] (計 8 件)

① “近赤外生物発光イメージングを目指した ν -セレンテラジンの高効率合成法の開発”

飯森理絵、隅田有人、吉田優、佐原由依子、佐藤淳一、井上敏、細谷孝充

日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会

2011年5月24日
東京工業大学 大岡山キャンパス

②“近赤外生物発光イメージングを目指した
ν-セレンテラジンの高効率合成法の開発”
細谷孝充、飯森理絵、隅田有人、吉田優、
佐原由依子、佐藤淳一、井上敏
第6回日本分子イメージング学会総会・学術
集会, 2011年5月26日, 神戸

③ “近赤外生物発光イメージングを目指した
ν-セレンテラジンの高効率合成法の開発”
隅田有人、飯森理絵、吉田優、三浦由依子、
佐藤淳一、井上敏、細谷孝充
第53回天然有機化合物討論会
2011年9月28日, 大阪国際センター

④“新しい近赤外生物発光基質の創製を目指
した ν-Coelenterazine 合成法の開発”
吉田優、隅田有人、飯森理絵、三浦由依子、
佐藤淳一、井上敏、細谷孝充
2011年11月11日, 第100回有機合成シンポ
ジウム, 早稲田大学 大隈講堂 (東京)

⑤ “Concise synthesis of ν-coelenterazine
toward near-infrared bioluminescence imaging”
吉田優、隅田有人、飯森理絵、三浦由依子、
佐藤淳一、井上敏、細谷孝充
10th International Symposium on Organic
Reactions (ISOR10), 2011年11月23日,
慶應大学 矢上キャンパス (横浜)

⑥ “高反応性化学種を利用する反応開発と生
命科学研究への展開”
吉田優, 第47回天然物談話会
2012年7月5日, 阿蘇プラザホテル

⑦ “アラインの Michaelis-Arbuzov 型反応を
利用した芳香族ホスホン酸類の新規合成法
の開発”
吉田優、細谷孝充
第38回反応と合成の進歩シンポジウム
2012年10月14日, タワーホール船堀(東京)

⑧ “Synthesis of aromatic oxophosphorus
compounds by the Michaelis-Arbuzov-type
reaction of aryne”
吉田優、細谷孝充
The Twelfth International Kyoto Conference on
New Aspect of Organic Chemistry (IKCOC-12)
2012年11月14日, 京都

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: ν-セレンテラジン化合物の製造方法
発明者: 井上 敏、佐原由依子、吉田 優、

細谷孝充
権利者: 同上
種類: 特許
番号: US 13/412,682
出願年月日: 2012年3月6日
国内外の別: 国外

名称: ν-セレンテラジン化合物の製造方法
発明者: 井上 敏、佐原由依子、吉田 優、
細谷孝充

権利者: 同上
種類: 特許
番号: GB 1204023
出願年月日: 2012年3月6日
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等
<http://chembiolab.sakura.ne.jp/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 優 (YOSHIDA Suguru)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
助教
研究者番号: 10583750

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

井上 敏 (INOUE Satoshi)
JNC 株式会社・横浜研究所・主席研究員
研究者番号: 40426622