

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651257

研究課題名(和文) 活性酸素種の生体内イメージングを指向した新規セレンテラジン類縁体の創製

研究課題名(英文) Development of new coelenterazine analogue for in vivo imaging of reactive oxygen species

研究代表者

細谷 孝充 (Hosoya, Takamitsu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60273124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種は、生体内のいたるところで細胞内および細胞間情報伝達物質として利用されているだけでなく、炎症や癌などの疾患の発現に関わっている。本研究では、活性酸素種を高感度、定量的かつリアルタイムで検出する方法の開発を目指し、ある種の活性酸素種と親和性の高いホウ素を含む化合物の新規合成法を開発するとともに、多くの海洋生物が利用しているセレンテラジン生物発光系に使用できる新しい発光基質を開発した。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species are not only used as an intra- and intercellular messenger, but also involved in the onset of diseases such as inflammation or cancer. In this study, we aimed to develop an efficient method that can quantitatively detect reactive oxygen species in real time with high sensitivity. Since boron shows high affinity toward a certain type of reactive oxygen species, we developed a new synthetic method of organoboron-containing compounds. We also synthesized a new coelenterazine analogue which served as an efficient substrate for a coelenterazine-type bioluminescence system.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

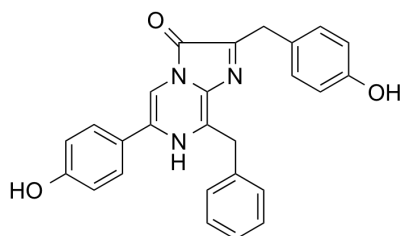
キーワード：分子イメージング 活性酸素種 生物発光 ホウ素化合物

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素やスーパーオキシドアニオンラジカルといった半減期が数秒の短寿命活性種である活性酸素種は、生体内のいたるところで細胞内および細胞間情報伝達物質として利用されるとともに、炎症や癌などの疾患の発現に関わる事が知られており、多岐に渡る生命現象の発現・制御において重要な役割を担っている。この活性酸素種の様々な生体分子機能を解明するためには活性酸素種の観測手法が必要不可欠であり、こうした背景のもと、これら活性酸素種を検出する目的でいくつかの蛍光プローブが開発され、活性酸素種が関わる生体分子機能解析に用いられてきた。しかし、蛍光発光を利用した検出系では、生体組織の自家発光が大きな問題となるため、その生体内局在を定量的かつリアルタイムで検出する方法の開発が今なお世界中で活発に行われている。これに対して我々は、蛍光検出系と比べて10~100倍高い感度を有する生物発光検出系を、微量な短寿命活性種の定量に利用できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと、我々は、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 *Gussia* 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セレンテラジン (**1**, CTZ) に着目した (図1)。



セレンテラジン (**1**, CTZ)

図1. セレンテラジン (CTZ) の構造

本研究では、CTZの構造を適切に改変することで、活性酸素種と特異的に反応して生物発光を引き起こす、あるいは発光波長が変化するCTZ類縁体の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 含ホウ素化合物の新規合成法の開発

生物発光を利用して活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオンラジカルを検出するためには、スーパーオキシドアニオンラジカルと反応して水酸基へと変換されるホウ素官能基を含むCTZ類縁体が有用であると考えられる。そこで含ホウ素複素環化合物の取扱いの習熟に加え、CTZのような含窒素芳香環化合物への置換基導入法への展

開を念頭に、複雑な置換形式の含ホウ素芳香族化合物の新規合成手法の開発を検討した。

### (2) 新規CTZ類縁体の開発

活性酸素種と反応し、検出を可能とするためのCTZ類縁体の設計指針を得るため、新規CTZ類縁体を合成し、各種ルシフェラーゼに対する発光能を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 含ホウ素化合物の新規合成法の開発

今回、環状ボロン酸ハーフエステルの一つである6-hydroxy-6H-dibenz[*c,e*][1,2]oxaborin (以下、ジベンゾオキサボリン) 類に着目した。ジベンゾオキサボリンは、ホウ素-酸素結合を同一環状に有する六員環ボロン酸エステル構造を含む三環性の有機ホウ素化合物であり、*o*-フェニレンオリゴマーのモノマーとして用いられるなど、様々な分野においてその反応性や物性の利用が期待されている。しかし、既存の合成法では適用できる基質に制限があり、種々の官能基を有する類縁体の合成が困難であることから、多様な置換基を持つジベンゾオキサボリン類の効率的な合成法の開発が望まれている。

そこで我々は、一方に酸素、もう一方にホウ素を有するユニットを、鈴木-宮浦クロスカップリングにより連結させることで、多様な置換基を持つジベンゾオキサボリン類を効率よく合成できるのではないかと考えた。

このとき、ホウ素源**3**のホウ酸基を1,8-ジアミノナフタレン (**dan**) で保護することで、ホウ素選択的に鈴木-宮浦クロスカップリング反応が進行するように設計した。種々検討の結果、円滑に反応が進行する条件を見出すことができた。なおその際、クロスカップリング体**4**は特別な脱保護操作を行うことなく系中でジベンゾオキサボリン**5**へと変換され、高い収率で望みの生成物を与えることを見いだした。通常 **Bdan** 基の脱保護には比較的強い酸性条件が必要であるがその操作を行うことなくジベンゾオキサボリン**5**が得られたことから、ホウ素-酸素の親和性が高いことに加えて、**5**の三環性構造の安定性が示唆された。さらにカップリング基質である酸素源**2**は、2工程でトリフルルオキシ基を有するホウ素源**3** ( $X = OTf$ ) へと容易に変換できるため、本手法は多様な類縁体の合成に適しており、実際、本手法を用いて様々な置換基やヘテロ芳香環を有するジベンゾオキサボリン類を効率よく合成することができた (図2)。

本合成法の開発過程で得られた知見は、今後、活性酸素種と反応し得るホウ素官能基を含むCTZ類縁体の合成に役立つと期待される。

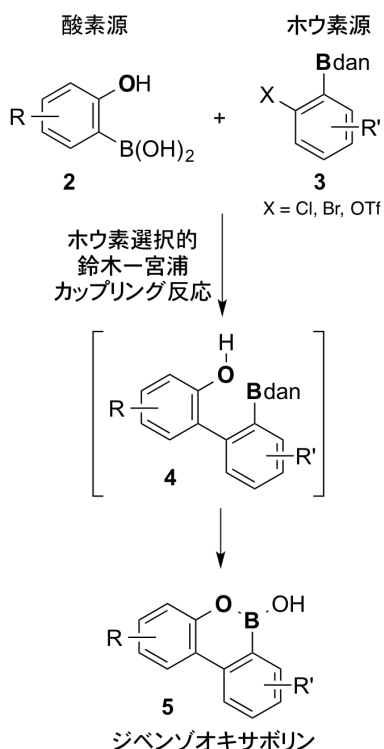


図2. ジベンゾオキサボリン類の高効率的合成法

## (2) 新規 CTZ 類縁体の開発

これまでに我々の研究グループでは、CTZ がいくつかのルシフェラーゼの基質（ルシフェリン）となることを利用し、新しい CTZ 類縁体の合成を基盤として新たな生物発光系を開発することを目指してきた。CTZ を基質とするルシフェラーゼの一つである *Oplophorus* ルシフェラーゼは、分子量が 19 kDa と 35 kDa の異なる 2 種類のタンパク質から構成されており、19 kDa のタンパク質（19kOLase）がルシフェラーゼの触媒作用を司る部位であることが分かっている。最近、この 19kOLase の 16 アミノ酸残基を改変した変異ルシフェラーゼ（nanoLuc）が 19kOLase よりも優れた発光特性を示すことが他のグループにより報告された。さらに、nanoLuc は CTZ の C2 位にフラン環を有する furimazine と名付けられた類縁体と併せて用いた場合にレポーターアッセイに有用であるとされているが、基質となる CTZ 類縁体の適用範囲に関する詳細は明らかにされていない。

これに対して我々は、コドン最適化法により nanoLuc と同じアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした 19kOLase 変異体である「nanoKAZ」を独自に開発し、これを用いて CTZ 類縁体に関する基質特異性を精査した。その結果、大腸菌細胞において発現させて精製した nanoKAZ あるいは、*Gaussia* ルシフェラーゼ由来の分泌シグナル配列を融合して CHO-K1 細胞において発現させた nanoKAZ のいずれに対しても、bis-セレンテラジン（bis-CTZ）と我々が新たに合成した 6h-f-セ

レンテラジン（6h-f-CTZ）が furimazine よりも優れた発光特性を示す基質であることを見いだした（図3）。

また、nanoKAZ の改変した 16 カ所のアミノ酸残基のうち、発光活性に最も影響の大きかった 3 つのアミノ酸残基を特定した。さらに、その 3 カ所の改変体である「eKAZ」を作製し、基質特異性を検討した。

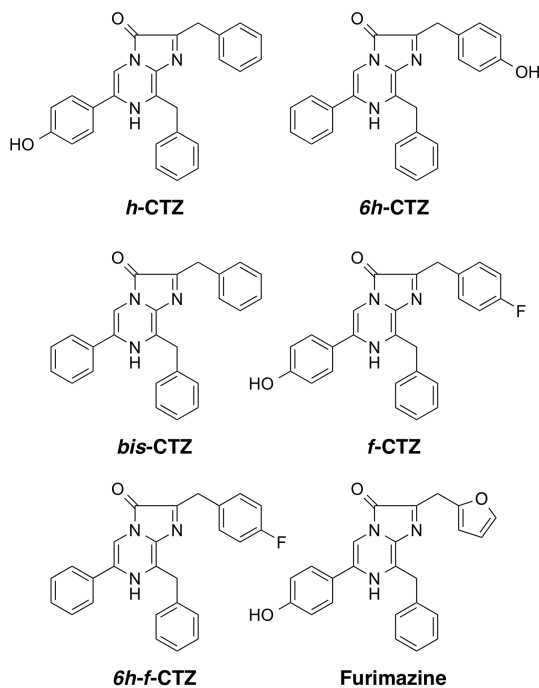


図3. CTZ 類縁体の構造

これらの結果は今後、活性酸素種検出用の CTZ 類縁体の設計と、適切な組み合わせのルシフェラーゼを選択する上で極めて重要な知見であると考えている。

## 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5件）

(1) S. Inouye, J.-i. Sato, Y. Sahara-Miura, S. Yoshida, and T. Hosoya, “Luminescence enhancement of the catalytic 19 kDa protein (KAZ) of *Oplophorus* luciferase by three amino acid substitutions.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445, 157-162 (2014).

（査読あり）. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.133

(2) S. Inouye, J.-i. Sato, Y. Sahara-Miura, S. Yoshida, H. Kurakata, and T. Hosoya, “C6-Deoxy coelenterazine analogues as an efficient substrate for glow luminescence reaction of nanoKAZ: the mutated catalytic 19 kDa component of *Oplophorus* luciferase.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437, 23-28 (2013). (査読あり).

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.026

(3) S. Yoshida, T. Hosoya, "Synthesis of diverse aromatic oxophosphorus compounds by the Michaelis-Arbuzov-type reaction of arynes.", *Chemistry Letters*, 42, 583-585 (2013). (査読あり) DOI: 10.1246/cl.130116

(4) 細谷孝充, 隅田有人, 吉田優, 鈴木崇弘, 井上敏, "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.", *日本分子イメージング学会機関誌*, 6, 3-6 (2013). (査読あり)

(5) S. Inouye, Y. Sahara-Miura, J.-i. Sato, R. Imori, S. Yoshida, and T. Hosoya, "Expression, purification and luminescence properties of coelenterazine-utilizing luciferases from Renilla, Oplophorus and Gaussia: Comparison of substrate specificity for C2-modified coelenterazines.", *Protein Expression and Purification*, 88, 150-156 (2013). (査読あり) . DOI: 10.1016/j.pep.2012.12.006

〔学会発表〕(計8件)

(1) 隅田有人, 原田龍, 加藤ともえ, 細谷孝充, "銅触媒を用いたジベンゾオキサボリンの脱ホウ素環化反応によるジベンゾフラン合成.", *日本化学会第94春季年会(2014)*, 2014年3月28日, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋)

(2) 原田龍, 隅田有人, 細谷孝充, "ホウ素の特性を利用したジベンゾオキサボリン類の簡便合成法の開発と defcogilvocarcun M の高効率合成への応用.", *日本化学会第94春季年会(2014)*, 2014年3月28日, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋)

(3) 原田龍, 隅田有人, 細谷孝充, "Dibenzoxaborin 類の簡便合成法の開発と defucogilvocarcun M 合成への応用.", 第66回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(東工大シンポジウム), 2013年11月30日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京)

(4) 隅田有人, 原田龍, 加藤ともえ, 細谷孝充, "ホウ素の特性を利用したベンザイン発生法とジベンゾオキサボリンの合成法の開発と応用.", 第39回反応と合成の進歩シンポジウム, 2013年11月6日, 九州大学病院キャンパス(福岡)

(5) 隅田有人, 原田龍, 加藤ともえ, 細谷孝充, "銅触媒を用いたジベンゾオキサボリンの酸化的環化反応によるジベンゾフランの合成.", 第60回有機金属化学討論会, 2013年9月14日, 学習院大学目白キャンパス(東京)

(6) 隅田有人, 原田龍, 細谷孝充, "An Efficient Synthetic Method of Dibenzoxaborins and Application to the Concise Synthesis of Defucogilvocarcin M.", *The First Asian Conference for "MONODUKURI" Strategy by Synthetic Organic Chemistry (ACMS)*, 2013年7月18日, 糸満市(沖縄)

(7) 隅田有人, 細谷孝充, "ホウ素を利用した新規ベンザイン発生法の開発.", *日本化学会第93春季年会(2013)*, 2013年3月23日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)

(8) 吉田優, 細谷孝充, "ベンザインの Michaelis-Arbuzov 型反応を用いた芳香族ホスホン酸類の新しい合成法の開発.", *日本化学会第93春季年会(2013)*, 2013年3月23日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細谷 孝充 (HOSOYA, Takamitsu)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
研究者番号: 60273124

### (2) 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  
東京工業大学・バイオフィロンティアセンター・特任教授  
研究者番号: 40426622