

ルシフェリンアナログの網羅的合成に向けた 有機合成手法の開発

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヒガシ ショウコ 東 翔子
所属等	東邦大学 理学部 博士研究員
プロフィール	同志社大学工学部機能分子工学科出身。在学中は後周期遷移金属錯体（特にルテニウム錯体）を触媒とする有機合成法の研究に携わる。博士後期課程修了後、電気通信大学にて赤色発光ホタルルシフェリン合成開発の研究メンバーとして従事。この時タンパク質の低分子化合物認識について興味を持ち、東邦大学では、人体にとって悪い働きをするタンパク質を妨害する低分子化合物に関する研究をいくつか行っている。有機合成実験が得意。大腸菌大量培養によるタンパク質合成と精製、結晶化と構造解析を習得中。思いついたことはすぐ試そうとします。

1. 研究の概要

発光生物によるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は、バイオテクノロジーに活発に利用されている。例えば、ホタルが体内で作るタンパク質であるルシフェラーゼをコードする遺伝子を研究対象に目印として組み込み、目的の部分の発現、つまり様々な生物の遺伝子の活性やタンパク質の挙動を、ルシフェリンと反応させた際の発光によって検出する方法などである。ホタルのルシフェラーゼと反応できる小分子のルシフェリンの構造は、ホタルが自己で生成することができる天然型のホタルルシフェリン 1 種類だけであると長年考えられてきた。しかし、近年の研究でホタルルシフェリンは“ある程度”自由な構造を持つ人工のルシフェリンを使っても発光反応を起こすことがわかってきた。興味深いことに、天然のホタルの発光は黄緑色と決まっているのに対して、様々な構造を持つ人工のルシフェリンで発光反応を行うと青や赤といった様々な色・明るさの光が得られる。特に、赤色の光は生体の組織や血液による吸収減衰が少ないため動物の深部の観察を行う際には重要で、赤色発光をするルシフェリンの開発はバイオイメージング分野の発展において高い需要がある。

このような背景から、新奇な発光特性を持つ人工ルシフェリンを探索することは、バイオテクノロジー分野への大きな貢献が見込まれる。本研究では、様々な人工ルシフェリンを合成することができ、その中からより有用な人工ルシフェリンを探索するために役立つと考えられる新しい合成反応を開発することを目指した。

2. 研究の動機、目的

生化学分野で現在最も多く利用されているタイプのホタルルシフェリンと反応可能な人工ルシフェリンは、近年いくつか報告されている。例えば、Millar らはオレンジ色に強く発光する **Cycluc1** [*Nature Methods* 2014(11) 393] を、Maki らは **Akalumine®** をはじめとした赤や青色に発光するルシフェリンを多数報告した [*Curr. Top. Med. Chem.* 2016(24) 2648]。いずれの人工ルシフェリンも、天然のホタルルシフェリンが持っているチアゾリンカルボン酸部分（図 1. 右半分の構造）をもっており、この部分はルシフェラーゼでの発光反応に必須であることがわかっている。一方、残りの部分はある程度の構造改変を行なってもルシフェラーゼでの発光反応が可能であることが示されている。以上の知見に基づき、筆者は以前 Maki らの

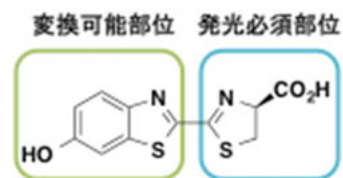


図1. 天然のホタルルシフェリンの発光必須部位と変換可能部位

研究グループにて新規人工シフェリンの合成探索に携わっていた。この時、発光の色は化合物の構造から計算等によりある程度予測できるものの、ホタルルシフェラーゼでの発光反応が起こるかどうか、またどれくらいの強さで光るかは、現時点でのデータの積み重ねからは安易には予測できないということを経験した。つまり、ホタルルシフェラーゼがどこまで人工シフェリンを基質として受け入れてくれるかは、現在のところ実際に化合物を作って反応させてみるまでわからない。このため、より数多くの人工シフェリン候補を網羅的に合成し、有能な発光特性をもつ化合物をスクリーニングする必要があると感じた。本研究はこの目的のため、発光に必須な部位であるチアゾリンカルボン酸を様々な構造をもつ分子に直接結合することができないかという発想のもと開始した。

筆者は在学中の研究テーマから、有機金属錯体をもちいるカップリング反応に親しみがあつた。この背景から、窒素と硫黄原子に挟まれたチアゾリン環の炭素がユニークな特性を持っていることを期待し、この部分を金属触媒と置き換わりやすいよう変換（図 2. 桃色部分）、その後触媒上で相手の分子と出合わせ（図 2. 緑色部分）触媒が離れると目的の生成物となる反応メカニズムを構想した。

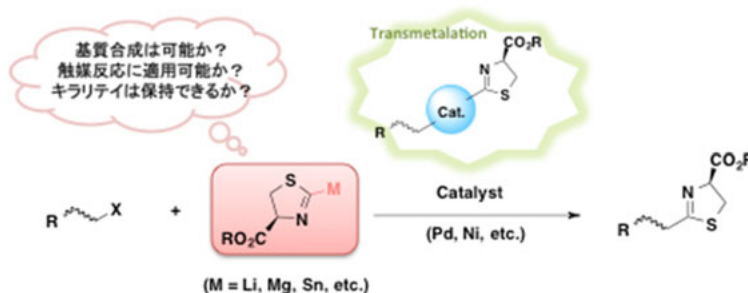


図 2. 発光必須部位を金属触媒によって様々な分子に結合する反応の構想

3. 研究の結果

(1) チアゾリンカルボン酸ブロックの基質合成

本来のホタルルシフェリンは D-システイン由来のチアゾリンカルボン酸のみで発光能力をもつが、今回は合成法の初期検討であるため、入手容易な L-システインを原料とした環状化合物を文献に基づき合成した(図 3)。いずれも良好な収率で得られ、揮発性が高い・分解が速いなどの問題も特に見られず、取り扱い易いスタート物質といえる。

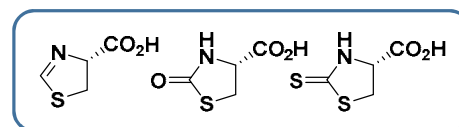


図 3. 合成したチアゾリンカルボン酸ブロック (左から基質 A, B, C)

(2) チアゾリンカルボン酸ブロックの変換反応

(1)の各基質から、目的の部位が金属触媒と置き換わり易くする変換を試みた。基質 B では酸素部分の OTf および OTs への変換を試みたが、生成物の単結晶X線構造解析から酸素部分ではなく窒素部分が NTs に変換されたことがわかった。同様に、基質 B の酸素部分、基質 C の硫黄部分の臭素化を試みたが複雑な混合生成物が得られ、目的物の同定には至っていない。この他、基質 A のリチオ化やスズ化、銅触媒を用いたベンゼン類との直接反応なども試みたが、現在のところ目的物は得られていない。

4. これからの展望

現在、リン系縮合剤を用いたカップリング反応など、興味深い既報の反応を応用し検討中です。また、今回の反応デザインでは **Cycluc1** や **Akalumine** と類似した化合物を主ターゲットとして合成容易にする方針でしたが、現在学んでいるタンパク質の構造解析と低分子の結合予測シミュレーションも応用し、未知の人工シフェリンの構造候補を探索した後、新たに反応デザインを組みなおすことも視野に入れております。

5. 社会に対するメッセージ

この度はご支援をいただきありがとうございました。高性能な分析機器等の必要を別としますと、有機合成研究は実はあまり初期費用を必要としません。というのも、有機合成化学者のほとんどは、どこでも安価に手に入る原料試薬を使い、より役に立つ化合物を組み立てようという基本的な考えを持っているからです。ただ、色々アイデアが浮かぶ過程で、もしかしたら一度しか使わないことになるかもしれない試薬、試してみたいが失敗に終わるかもしれない反応、など数多くの「出資をためらう場面」が出てきます。そのような時、普段は結局もしないことになるのですが、今回私はご支援をいただいたことで大いに背中を押していただきました。今後とも、ちょっとしたアイデアは持っているが御蔵入りにしてしまっている有機合成化学者の後輩たちへも、是非ご支援をお願いいたします。