

「単一分子・原子レベルの反応制御」
平成9年度採択研究代表者

平間 正博

(東北大学大学院理学研究科 教授)

「超天然物の反応制御と分子設計」

1. 研究実施の概要

天然物の研究は、しばしば新しい化学のフロンティアを切り開く。本研究は、ピラジカルを発生して DNA を切断するエンジン系低分子とそれを安定化して運ぶ蛋白質複合型抗癌抗生物質や、イオンチャネル蛋白質に結合して猛烈な神経毒性を発揮するポリエーテル系天然物の蛋白複合体の立体構造と機能発現原理を明らかにし、また、天然物の機能を越える分子を化学合成する新しい方法論の開拓を目的とする。即ち、

- (1) 1,4-ピラジカル活性種を安定化する蛋白質複合系の原理とデザイン、
- (2) 神経毒ポリエーテルのイオンチャネル阻害の原理と修復、
- (3) 人工ハプテンによるシガトキシン特異的抗体の創出、
- (4) 微量海産生理活性分子、骨そしょう薬ノルゾアンタミン、抗癌剤ハロモン等の不斉合成法と作用機構に関する基礎および応用研究、

を進めている。これらの研究を通じて、自然を原子レベルと同時に分子集合体で理解する超天然物化学を創始し、機能性材料や医療応用への可能性を探る。

12年度の具体的目標は、C1027、ケダルシジン、マチュロペプチン、ネオカルジノスタチンのクロモフォア、N1999A2、およびシガトキシン、ピナトキシンの全合成達成。13C ラベルしたエンジンの合成と ESR 測定。組み替え抗体法によるシガトキシン抗体ライブラリーと、C1027アポタンパク質の大腸菌遺伝子発現系の構築を進める。タンパク質複合体の三次元構造解析と、神経毒ポリエーテルのチャネル結合研究も積極的に行う。その他、抗骨そしょう活性の強力なノルゾアンタミンや、強力な抗腫瘍活性を有するハロモンの大量不斉合成法を開発する。低分子・生体高分子間相互作用の解析にプラズモン共鳴装置を活用する、等である。

本研究は、東北大学大学院理学研究科の平間・大石・野田・大栗・井上による「化学合成グループ」をコア研究室として、東北大学反応化学研究所の秋山による「ESR グループ」、東北大学医学部の水柿・富岡による「抗体遺伝子グループ」、筑波大学応用生物化学系の田中による「タンパク構造グループ」、東北大学農学部の佐竹による「チャネルグループ」の協力を得て、有機的に研究を進めている。

2. 研究実施内容

2.1 クロモプロテイン抗腫瘍性抗生物質複合体の三次元構造解析と遺伝子発現

昨年度、C1027の芳香環化クロモフォア複合体の三次元構造解析を、2D-NMRを用いて完了したが、更に、¹³C および ¹⁵N ラベルしたアポタンパク質を調製し、3D-NMR(500,600,800MHz)を用いて精密解析中である。また、遺伝子工学的手法によってC1027アポタンパク質を大腸菌で発現させることに成功し、特定のアミノ酸残基を改変できるようになった。また、Gly-d2 をこの大腸菌発現培養系に加えて、全ての Gly を80%以上重水素化することができたが、更に生産効率と Gly への重水素化選択性を上げるために、無細胞系でGC-rich ベクターを用いたアポタンパク質発現を検討中である。

2.2 クロモプロテイン抗腫瘍性抗生物質クロモフォアの全合成研究

ネオカルジノスタチン、C1027、ケダルシジン、N1999A2、マヂュロペプチンを始めとするエンジン系クロモフォアの全合成方法論を検討中であるが、昨年度は大いに進展した。特に、N1999A2 の全合成を達成した。更に、C1027クロモフォアの、マクロライド環構築法を開発することにも成功した。

2.3 C1027複合体の ESR 測定とラジカル種の解析

C1027複合体(ホロタンパク質)粉末の FT-ESR ニューテーション法によって判明した前年度までの成果をまとめると以下のようになる。クロモプロテイン系抗腫瘍性抗生物質C1027の不安定9員環エンジンクロモフォアが、アポタンパク質中(タンパク複合体中)で安定に存在できて、しかも複合体が常磁性になる原因と仕組みは、複数の化学反応のダイナミックな集積に基づいていた。しかも、予想外ではあったが極めて合理的な原理によって統括されていることを明らかにした。即ち、閉殻9員環エンジンクロモフォアは、p-ベンザインピラジカル閉殻構造と平衡になって存在する。しかも、アポタンパク質の水素を引き抜きにくい三次元(配座)構造をとっていて、速度論的に安定化されている。しかし、ゆっくりとピラジカル近傍の Gly96 水素を引き抜いてフェニルラジカルを生成し、アポタンパク質側グリシニルラジカルとのラジカル対が三重項種として ESR で観測される。後者のアルキル炭素ラジカルは、酸素との反応性が高いので捕捉されてパーオキシラジカルとなる。これら三種のラジカル種は、平衡によって微量ながら連続的に供給されるので、ESR で定常的に常磁性種として観測される。これは、微生物が生産する抗生物質エンジンが DNA のみならず、タンパク質をも切断できることを初めて証明したものであり、タンパク質切断試薬としての可能性や、抗生物質の自己劣化を防止する方法を示唆し、DNA 切断の素過程を追跡する新しいプローブとしての応用も期待される。

また、昨年度に新たに微生物醗酵させて生産させた新鮮なC1027ホロタンパク

質が、従来用いていた古い試料とは異なった ESR スペクトルを示すことを発見した。明らかに経時変化を示している。この新しいシグナルは、p-ベンザインピラジカルに由来する可能性もあり、詳細に解析中である。

2.4 クロモフォアおよびクロモフォアコアモデルの ESR 測定

ビシクロ[7.3.0]エポキシエンジイン合成モデルについて観測しているスペクトルが、p-ベンザインピラジカルである可能性がある。この可能性を最終的に証明するために、簡便合成法の確立と、3、6 位に ^{13}C ラベルしたモデル合成を検討中である。

2.5 シガトキシンとピナトキシンの全合成

分子間アルキル化と分子内オレフィンメタセシス法を組み合わせた新規効率的連結法を開発し、シガトキシン CTX3C の完全な ABCDE 環部とHIJKLM 環部の収束的な合成に成功した。更に、それら 2 大セグメントを連結するための方法論を確立し、シガトキシン CTX3C トリベンジルエーテルの全合成に成功した。そして、CTX3C がマウスに対して極めて強い神経毒性を示すのに対して、このベンジルエーテルは殆ど毒性を示さないことを明らかにした。これは、水酸基を保護したシガトキシンは、殆ど無毒であることを初めて証明したものであり、ナトリウムチャンネルへの作用に関連して、極めて重要な知見である。

一方、デメチルピナトキシンについてオレフィン閉環メタセシスによる全骨格構築が可能であることを明らかにして、ピナトキシン全合成の最終段階に到達した。

2.6 シガトキシンのチャンネル結合構造

シガトキシンのチャンネル結合と毒性発現に必要な構造要因の中で分子長の重要性を評価する目的で、左右両端の ABC および KLM 環部をポリエチレングリコールや剛直なメタ-ジエチニルベンゼンリンカーで繋いで分子長を30~35オングストロームにしたモデル分子を複数合成した。ナトリウムチャンネルへの結合が一部観測され始めたので、詳細な検討を進めている。

2.7 新しい人工ハプテンの合成と抗シガトキシン用モノクローナル抗体の遺伝子配列

ABC環-ハプテンから作製した3種の抗体中で、6F12抗体が、天然型2S配置を認識し、シガトキシン1Bに対する交差活性が最も高かった。その遺伝子配列が解析できたので、大腸菌の遺伝子発現による大量発現系を検討中である。モノクローナル抗体組み替え抗体法によるファージミッドライブラリーの構築も検討中である。更に、CTX1B や CTX3C の ABC, ABCD, IJKLM 環部ハプテン類(4種)の合成に成功したので、それらの KLH コンジュゲートをマウスに免疫し、新しい抗 CTX3Cモノクローナル抗体として有望な抗体を複数作製することに成功した。

また、プラズモン共鳴装置(BIACORE)を用いて、ハプテンやシガトキシンとモノクローナル抗体間の相互作用解析や、結合定数を簡便に求める実験系を開発した。

2 . 8 特色ある生理活性天然物の全合成研究

強力な抗骨そしょう活性を有するノルゾアンタミンの全合成を検討し、ゾアンテノール合成上の全ての問題を個別に解決する方法を確立した。

3 . 研究成果の発表

H. Oguri, S. Tanaka, T. Oishi, and M. Hirama, A Very Short Route to the Functionalized A-ring Moiety of Ciguatoxin. *Tetrahedron Lett.*, 41, 975-978 (2000)

M. Hirama, K. Akiyama, T. Tanaka, T. Noda, K. Iida, I. Sato, R. Hanaishi, S. Fukuda-Ishisaka, M. Ishiguro, T. Otani, and J. E. Leet, Paramagnetic Eneidyne Antitumor Antibiotic C-1027 : Spin Identification and Characterization of Radical Species. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 720-721(2000)

T. Sotokawa, T. Noda, Sun Pi, and M. Hirama, A Three-Step Synthesis of Halomon. *Angew. Chem. Internat. Ed. Engl.*, 39, 3430-3433(2000)

S. M. Moharram, G. Hirai, K. Koyama, H. Oguri, and M. Hirama, Enantio-Face Control by Molecular Sieves in the Asymmetric Diels-Alder Reaction. *Tetrahedron Lett.*, 41, 6669-6673(2000)

M. Maruyama, K. Maeda, T. Oishi, H. Oguri, and M. Hirama, Convergent Strategy for Synthesizing Polycyclic Ether Marine Toxins: Synthesis of the ABCDE Ring Fragment of Ciguatoxin CTX3C. *Heterocycles*, 54, 93-99(2001)

S. Khan, N. Kato, and M. Hirama, Stereoselective Synthesis of Functionalized (*Z*)-Keto-enyne and its Epoxide. *Synlett*, 1494-1496(2000)

H. Imai, T. Oishi, T. Kikuchi, and M. Hirama, Concise Synthesis of 3-O-(2-O- α -D-Glycopyranosyl- 6-O-acyl- α -D-glucopyranosyl)1,2-di-O- acyl-sn-Glycerols. *Tetrahedron*, 56, 8451-8459 (2000)

K. Ando, T. Oishi, M. Hirama, H. Ohno, and T. Ibuka, Z-Selective Horner-Wadsworth-Emmons Reaction of Ethyl (Diarylphosphono)acetates Using Sodium Iodide and DBU. *J. Org. Chem.*, 65, 4745-4749(2000)

S. Toujima, K. Kuwano, Y. Zhang, N. Fujimoto, M. Hirama, T. Oishi, S. Fukuda, Y. Nagumo, H. Imai, T. Kikuchi, S. Arai, Binding of Glycoglycerolipid Derived from Membranes of *Acholeplasma Laidlawii* PG8 and Synthetic Analogues to Lymphoid Cells. *Microbiology*, 146, 2317-2323(2000)

K. Toyama, S. Iguchi, H. Sakazaki, T. Oishi, and M. Hirama, Convenient Route to

Both Enantiomerically Pure Forms of trans-4, 5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-one: Efficient Synthesis of the Neocarzinostatin Chromophore Core. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press.

G. X. Wang, S. Iguchi, and M. Hirama, A Very Concise and Stereoselective Synthesis of 3-Substituted cis-Hex-3-ene-1, 5-diyne and Corresponding Epoxydiyne. *J. Org. Chem.*, 66, 2146-2148 (2001)

S. Kobayashi, R. S. Reddy, Y. Sugiura, D. Sasaki, N. Miyagawa, and M. Hirama, Investigation of the Total Synthesis of N1999-A2: Implication of Stereochemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 2887-2888 (2001)

T. Oishi, H. Uehara, Y. Nagumo, M. Shoji, J.-Y. Le Brazidec, M. Kosaka, and M. Hirama, Practical Entry into the HIJKLM Ring Segment of Ciguatoxin CTX3C. *Chem. Commun.*, 381-382 (2001)

M. J. Lear, F. Yoshimura, and Masahiro Hirama, A Direct and Efficient Selective Glycosylation Protocol for the Kedarcidin Sugar, LMyrcarose: AgPF6 as a Remarkable Activator of 2-Deoxythioglycosides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 113, 946-949 (2001)

T. Tanaka, S. Fukuda-Ishisaka, M. Hirama, and T. Otani, Solution Structures of C-1027 Apoprotein and Its Complex with the Aromatized Chromophore. *J. Mol. Biol.*, 309, 267-283 (2001)

T. Oishi, S. Tanaka, Y. Ogasawara, K. Maeda, H. Oguri, and M. Hirama, Highly Stereocontrolled Synthesis of the ABCD Ring Fragment of Ciguatoxin CTX3C. *Synlett*, in press.

Y. Nagumo, H. Oguri, Y. Shindo, S. Sasaki, T. Oishi, M. Hirama, Y. Tomioka, M. Mizugaki, and T. Tsumuraya, Concise Synthesis of Ciguatoxin ABC-Ring Fragments and Surface Plasmon Resonance Study of the Interaction of Their BSA Conjugates with Monoclonal Antibodies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press.

T. Sasaki, M. Inoue, and M. Hirama, Synthetic Studies toward C-1027 Chromophore: Construction of a Highly Unsaturated Macrocyclic. *Tetrahedron Lett.*, in press.

Y. Kobori, K. Akiyama, and S. Tero-Kubota, Theoretical analysis of singlet-triplet energy splitting generated by charge-transfer interaction in electron donor-acceptor radical pair systems. *J. Chem. Phys.*, 113, 465-468 (2000)

T. Ikoma, S. Okada, H. Nakanishi, K. Akiyama, and S. Tero-Kubota, ESEEM

Study on a stable paramagnetic center in polydiacetylene having a p-conjugated ladder structure. *Solid State Comm.*, 117, 285-289 (2001)

Y. Nagano, T. Ikoma, K. Akiyama, and S. Tero-Kubota, Electronic Structures and Dynamics of α,ω -Diphenylpolyynes in the Excited Triplet States. *J. Chem. Phys.*, 2001, 114, 1775-1784 (2001)

A. Morohashi, M. Satake, H. Nagai, Y. Oshima, T. Yasumoto, The absolute configuration of gambieric acids A-D, potent antifungal polyethers isolated from the marine dinoflagellate. *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron*, 56, 8995-9001 (2000)

A. Morohashi, M. Satake, Y. Oshima, T. Yasumoto, Absolute configuration at C45 in 45-hydroxyessotoxin, a marine polyether toxin isolated from shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1761-1763 (2000)