

「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

本研究は、ビ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、イオンチャン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質複合体の立体構造と機能発現原理を明らかにし、また、天然物の機能を超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、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、新しい化学のフロンティアを切り開き、更に機能性材料や医療応用への可能性を探る。平成13年度の最大の研究成果は、ナトリウムイオンチャンネルに結合するシガテラ中毒原因毒素、シガトキシンCTX3Cの全合成に成功したことである。今後は、この成果を踏まえて、シガテラ毒素検定用抗体の作製と神経毒ポリエーテルのチャンネル結合構造と阻害機構の研究を積極的に展開する。

2. 研究実施内容

(a) 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

C1027の芳香環化クロモフォア複合体の三次元構造は、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)を用いて精密解析できた。また、アポタンパク質の大腸菌による遺伝子発現によってアミノ酸改変超タンパク質8種を作製した。更に、優れた DDS キャリヤー超タンパク質を設計するため、Gly96 のメチレンを重水素に置換すれば、水素引き抜き速度が一次同位体効果によって遅くなり、複合体の寿命を伸ばせると期待した。実際に、大腸菌発現系によって全て Gly-d₂ の超タンパク質を合成することができた。クロモフォアと複合体を形成させる技術を確認し、短時間で寿命を測定する HPLC 解析法も確立した。予備実験では、重水素化超アポタンパク質中におけるクロモフォアの寿命は、約5.8倍も長くなった。

(b) 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と機能解析

N1999A2 の全合成と絶対配置決定を完了した。

(c) C1027複合体の ESR/MALDI-TOFMS 解析から DNA 切断機構解析プローブへ

スピントラップ剤、MNP と DMPO を用いたラジカル機構研究を開始し、従来推測の域をでなかった DNA 切断のラジカル機構の素過程を証明する新方法を開発した。

(d) クロモフォアコアモデルの ESR 測定とラジカル種の解析

ついに3位または6位に ¹³C ラベルしたモデル分子を合成することができた。その結果、観測されているラジカルは3位および6位には局在していないことが判明した。

(e) シガトキシンとピナトキシンの全合成

ナトリウムチャンネルを阻害するシガトキシンCTX3Cの全合成が、ついに完成した。同様の方略(ストラテジー)と戦術(タクティクス)を展開して、他の3種のシガトキシン類の全合成を完成する予定である。

(f) チャンネル結合構造

これまでに、チャンネルに結合するために必要な構造因子を探るため、ABC DE 環と IJKLM 環をリンカーで連結したシガトキシンモデル数種を合成した。

(g) 新しい人工ハプテンの合成と抗体調製

CTX3C型の ABCDE 環部、IJKLM 環部を持った人工ハプテン- KLH コンジュゲート抗原を合成し、マウスに免疫(生物分子工学研究所、藤井、円谷博士との共同研究)した結果、CTX3C に対してナノモル濃度で結合し、しかも他の海洋毒ポリエーテル類とは反応しない特異的モノクローナル抗体2種(10C9, 3D11:それぞれCTX3Cの左右両端部を認識する)が得られた。

(h) ファージディスプレイ法による抗シガトキシン抗体のスクリーニング

CTX3Cの ABC 環-ハプテンコンジュゲートを抗原として免疫して得た脾臓細胞のポリクローナル抗体 cDNA (>>104)を、大腸菌に導入し、ファージ抗体ライブラリーの中からハプテンと結合するファージを探索する方法と技術を開発した。

(i) 強力な抗骨そしょう活性を有するノルゾアントアミンや、ゾアントアミン、ゾアントノールの不斉合成法を開発中である。

3. 研究実施体制

(1) 化学合成グループ

- 1) 平間正博(東北大学大学院理学研究科、教授)
- 2) ・ C1027、ケダルシジン、ネオカルジノスタチン、マデュロペプチン、シガトキシン、ピナトキシンの全合成
 - ・ ビラジカルを発生するエンジン分子の設計と合成と反応の化学的研究
 - ・ NCS の合成、ハロモン、ゾアントアミン全合成

(2) ESR グループ

- 1) 秋山公男(東北大学多元物質科学研究所、助教授)
- 2) ・ エンジン化合物の熱及び光反応によって生成した 1,4-ビラジカルの ESR による電子状態解析

(3) 抗体遺伝子グループ

- 1) 水柿道直(東北大学医学部附属病院薬剤部、教授)
- 2) ・ 人工抗体によるマウス免疫と組替え抗体法によるシガトキシン抗体ライブラリー

・NCS アポタンパク質遺伝子発現系の構築

(4) タンパク構造グループ

- 1) 田中俊之(筑波大学応用生物化学系、助教授)
- 2) ・タンパク質複合体の三次元構造解析
・C1027 及び改変アポタンパク質の遺伝子工学的手法による合成

(5) チャネルグループ

- 1) 佐竹真幸(東北大学大学院農学研究科、助教授)
- 2) ・シガトキシンを使った抗体調製
・合成フラグメントや抗体ライブラリーのチャネル結合実験

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Convenient Route to Both Enantiomerically Pure Forms of trans-4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-one: Efficient Synthesis of the Neocarzinostatin Chromophore Core.
K. Toyama, S. Iguchi, H. Sakazaki, T. Oishi, and M. Hirama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 74, 997-1008 (2001)
- A Very Concise and Stereoselective Synthesis of 3-Substituted cis-Hex-3-ene-1,5-diyne and Corresponding Epoxydiyne.
G. X. Wang, S. Iguchi, and M. Hirama, J. Org. Chem., 66, 2146-2148 (2001)
- Investigation of the Total Synthesis of N1999-A2: Implication of Stereochemistry.
S. Kobayashi, R. S. Reddy, Y. Sugiura, D. Sasaki, N. Miyagaw, and M. Hirama, J. Am. Chem. Soc., 123, 2887-2888 (2001).
- Practical Entry into the HIJKLM Ring Segment of Ciguatoxin CTX3C.
T. Oishi, H. Uehara, Y. Nagumo, M. Shoji, J-Y. Le Brazidec, M. Kosaka, and M. Hirama, Chem. Commun., 381-382 (2001).
- A Direct and Efficient α -Selective Glycosylation Protocol for the Kedarcidin Sugar, L-Mycarose: AgPF6 as a Remarkable Activator of 2-Deoxythioglycosides.
M. J. Lear, F. Yoshimura, and Masahiro Hirama, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 113, 946-949 (2001).
- Solution Structures of C-1027 Apoprotein and Its Complex with the Aromatized Chromophore.
T. Tanaka, S. Fukuda-Ishisaka, M. Hirama, and T. Otani, J. Mol. Biol., 309, 267-283 (2001).
- Highly Stereocontrolled Synthesis of the ABCD Ring Fragment of Ciguatoxin CTX3C.
T. Oishi, S. Tanaka, Y. Ogasawara, K. Maeda, H. Oguri, and M. Hirama, Synlett, Special Issue, 952-954 (2001).
- Concise Synthesis of Ciguatoxin ABC-ring Fragments and Surface Plasmon Resonance Study of the Interaction of Their BSA Conjugates with Monoclonal Antibodies.
Y. Nagumo, H. Oguri, Y. Shindo, S. Sasaki, T. Oishi, M. Hirama, Y. Tomioka, M. Mizugaki,

and T. Tsumuraya

Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 2037–2040 (2001).

- Synthetic Studies toward C-1027 Chromophore: Construction of a Highly Unsaturated Macrocycle.
T. Sasaki, M. Inoue, and M. Hirama, Tetrahedron Lett., 42, 5299–5303 (2001).
- Convergent Synthesis of the ABC-ring Moiety of Zoanthenol: Intramolecular Mizoroki–Heck Reaction.
G. Hirai, H. Oguri, S. M. Moharram, K. Koyama, and M. Hirama
Tetrahedron Lett., 42, 5783–5787 (2001).
- Convergent Synthesis of EFGH Ring Fragment of Ciguatoxin CTX3C.
H. Imai, H. Uehara, M. Inoue, H. Oguri, T. Oishi, and M. Hirama, Tetrahedron Lett., 42, 6219–6222 (2001).
- Stereocontrolled Synthesis of the Northern Part of Potent Proteasome Inhibitor TMC-95A.
M. Inoue, H. Furuyama, H. Sakazaki, and M. Hirama, Org. Lett., 3, 2863–2865 (2001).
- The First Total Synthesis of N1999-A2: Absolute Stereochemistry and Stereochemical Implications into DNA Cleavage.
S. Kobayashi, S. Ashizawa, Y. Takahashi, Y. Sugiura, M. Nagaoka, M. J. Lear, and M. Hirama
J. Am. Chem. Soc., 123, 11294–11295 (2001).
- Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C.
M. Hirama, T. Oishi, H. Uehara, M. Inoue, M. Maruyama, H. Oguri, and M. Satake,
Science, 294, 1904–1907 (2001).
- Convergent Synthesis of the ABCDE Ring System of Ciguatoxin CTX3C.
M. Maruyama, M. Inoue, T. Oishi, H. Oguri, Y. Ogasawara, Y. Shindo, and M. Hirama,
Tetrahedron, Symposia in Print, 58, 1825–1851 (2001).
- Diastereoselective Additions of Ethynyl Grignard Reagent to Erythrulose Derivatives.
S. Kobayashi, P. Das, G. X. Wang, T. Mita, M. J. Lear, and M. Hirama,
Chemistry Lett., 300–301 (2002).
- Design, Production, and Characterization of Recombinant Neocarzinostatin Apoprotein in Escherichia coli.
S. Nozaki, Y. Tomioka, T. Hishinuma, M. Inoue, Y. Nagumo, L. R. Tsnrufa, K. Hayashi, T. Matsumoto, Y. Kato, S. Ishiwata, K. Itoh, T. Suzuki, M. Hirama, and M. Mizugaki, J. Biochem. 131, 729–738 (2002).

(2) 特許出願

平成 13 年度特許出願 国内 5件