

袖岡有機合成化学研究室 Synthetic Organic Chemistry Laboratory

主任研究員 袖岡 幹子
SODEOKA, Mikiko

当研究室では、有機合成化学を基盤として、生物活性物質の合成に有用な合成反応の開発と、新しいユニークな生物活性を有する分子の設計・合成、さらにその分子を用いて様々な生物現象の解明を行うことを目指している。現在は、遷移金属触媒を用いた新規不斉合成反応の開発とその応用、細胞内情報伝達を司るタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）や脱リン酸化酵素（プロテインホスファターゼ）に対する阻害剤設計、細胞死を抑制する低分子化合物の合成とその作用機序の解明、生理活性天然物の全合成およびその誘導体合成、ヒトシアリダーゼに対する阻害剤の創製等の研究を展開している。

1. 新規触媒的不斉合成反応の開発

(1) パラジウム錯体の酸・塩基触媒としての特性を利用した触媒的不斉合成 (Seidel*1、梅林*2、濱島、袖岡)

当研究室では、キラルホスフィン配位子を有する様々なパラジウム錯体 ($[Pd(II)(\text{ligand})(H_2O)_2](X)_2$ や $[Pd(II)(\text{ligand})(\square-OH)]_2(X)_2$ (ligand = Binap-type, X = OTf or BF_4^-) が酸・塩基触媒として作用することを見出しており、これまでに活性メチレンおよびメチレン化合物の系内直接活性化を利用した種々の炭素-炭素結合形成反応を開発している。今年度は、酸性条件で生成するキラルエノラートの特性を活かし、酸性条件で活性化されるアセタールを求電子剤として用いた反応を検討した。その結果、アルデヒドとは反応しないジカルボニル化合物がアセタールと円滑に反応することを見出し、これまでに類のない不斉アルドール型反応の開発を行った。また、これまでに開発した *N,O*-アセタールとの Mannich 型反応のメカニズム解析を進め、その知見を基に系内で酸化的にイミニウムイオンを発生させる新規 Mannich 型反応を考案した。エナンチオ選択性や基質一般性に改善の余地があるものの、イミンに比べ合成が容易なアミンを出発原料とする酸化的不斉 Mannich 型反応の開発に成功した。更に、この反応を鍵として生物活性化合物の基本骨格を効率的に合成できることを示した。

(2) エタノールを還元剤とする共役還元反応の開発研究 (門口、濱島、袖岡)

これまでに我々の研究室では、カチオン性パラジウム-BINAP 錯体とエタノールからパラジウムヒドリド種が生成することを見出しており、これを用いた不飽和カルボニル化合物の触媒的不斉共役還元反応を開発している。本年度は、より反応性の高い触媒の開発を目指し、パラジウム錯体の配位子の電子密度に注目した配位子の検討を行った。その結果、パラジウムトリアルキルホスフィン錯体が不飽和ケトンおよび不飽和エステルに対して高い活性を示すことが分かった。この触媒を用いる場合、モレキュラーシーブスを添加剤として加えることが必須であった。これは、触媒前駆体であるパラジウム- \square -ヒドロキノ錯体の生成が促進されたためと考えている。本反応は安全性の高いエタノールを還元剤および溶媒として用いることができ、環境調和性に優れている。更に、本触媒はアリルアルコールの異性化反応も促進することが分かった。現在、本異性化反応の最適化を検討中である。

(3) 触媒的不斉フッ素化反応の開発研究 (鈴木、濱島、袖岡)

フッ素化された有機化合物は医薬品の構成要素として重要であり、効率的な合成法の開発が注目を集めている。我々の研究室では、効率的な不斉フッ素化反応の開発に取り組んでいる。昨年、ニッケル錯体を触媒とする 3 成分反応系を用いてアリール酢酸誘導体の α 位モノフッ素化に初めて成功したが、本年度は基質の一般性の拡大を目指し、より反応性の低い基質にも適用できる触媒系の探索を行った。更に、反応機構解析に関する研究を行い、塩化ニッケル触媒が系内でカチオン錯体になり反応が進行することを明らかにした。また、Pd 錯体が 1,3-ジカルボニル化合物のフッ素化にも有効であることを既に見出しているが、新たに酸性度の高いケトンを用いることで、ニッケル触媒系では現在のところ合成できないフッ素化合物が合成できることを見出した。現在、このフッ素化法の最適化と医薬品合成への応用を検討中である。

2. 細胞内情報伝達酵素の活性を制御する低分子化合物の創製

(1) プロテインホスファターゼ阻害剤 RE 誘導体の合成と活性評価 (小山*2、平井、袖岡)

RK682 は、強酸性の 3-アシルテトロン酸骨格を有する天然物であり、両特異性プロテインホスファターゼ (DSP)、チロシンホスファターゼ (PTP) の顕著な阻害活性を示すことが知られている。我々は RK682 を基盤として、中性分子で DSP に対する阻害活性を有する RK682 エナミド誘導体 (RE 誘導体) をすでに開発している。今年度は RE 誘導体の効率的合成法を開発し、これまでに比べ大量合成可能なルートを確立した。さらに各種誘導体を合成し、DSP の一種である Cdc25A に対する阻害活性と HL60 細胞に対する増殖抑制効果を検討した。その結果、Cdc25A の活性および HL60 細胞増殖の両方を阻害する化合物をいくつか見出すことが出来た。

(2) ホスファターゼ阻害剤 RE 誘導体をプローブとしたホスファターゼ網羅的解析法の開発 (土屋*1、平井、袖岡)

プロテインホスファターゼは多くの重要な生理機能を担っているが、分子レベルでの活性制御機構や基質の認識機構についての解明は十分になされていない。本研究室では、様々な生理的条件下におけるホスファターゼ活性をモニタリングすることを目指し、独自に開発したホスファターゼ阻害剤である RE 誘導体をプローブとしてホスファターゼ群を網羅的に標識する新たな手法の開発を検討している。

これまでに Cdc25A に対して顕著な阻害活性を有し、且つ Cdc25A と共有結合を形成する不可逆的阻害剤 RE20 を見出している。本年度は蛍光団を RE20 に導入した誘導体を各種合成し、本ラベル体を用いた細胞内標的タンパク質ラベリングを詳細に検討した。その結果 RE 誘導体は、生きた細胞内で様々なタンパク質と共有結合を形成できることを確認した。また、蛍光団の導入位置によって、ラベル化されるタンパク質の種類や量に変化することを見出し、RE 誘導体の置換基を変えることで異なったタンパク質群を解析できることが示唆された。一方蛍光ラベル体の細胞内局在を検討したところ、核周辺の細胞質に存在することが確認できたものの、本結果は蛍光団の影響を少なからず受けていることも同時に判明した。現在、標的タ

シパク質の同定を進めている。

(3) PP2B選択的阻害剤の開発 (清水 (忠) *1, 袖岡)

PP2B はセリン・スレオニン型タンパク質脱リン酸化酵素であり、免疫抑制剤 FK-506 等により脱リン酸化活性が阻害されることが知られている。これら阻害剤はイムノフィリンと呼ばれるタンパク質と複合体を形成して PP2B の酵素活性を阻害する。イムノフィリンはプロリンの異性化を行うシストランソイソメラーゼ活性を有し、カルシウムチャネルの調整など生体内での重要な働きを担っている。そのため、免疫抑制剤が PP2B を阻害する際にイムノフィリンの働きも阻害してしまうことが、副作用の一因となりうる。そこで、イムノフィリンを介さずに単独で PP2B を選択的に阻害する低分子化合物の創製を目的として研究を行っている。これまでに光学活性な 1,5 位二置換カンタリジン誘導体 NCA-01 が酵素アッセイレベルで PP2B 阻害活性を有することを明らかとしていた。しかし、NCA-01 は細胞レベルでの活性が不十分であったため、今年度は細胞レベルでの誘導体の開発を行った結果、細胞レベルで IL-2 の産制抑制を示す新規誘導体 NCA-01-DME の開発に成功した。

(4) ヒトシアリダーゼ (Neu3) の機能解析をめざした新規ガングリオシドアナログの創製 (渡邊*2, 加藤*2, 平井, 袖岡; 宮城, 山口 (宮城がんセ))

形質膜に局在するヒトシアリダーゼ Neu3 は、GM3、GM4 等のガングリオシドのシアル酸を選択的に加水分解するユニークなシアリダーゼである。Neu3 はガンや糖尿病等と関連していることが報告されているが、その分子機構はほとんどが未解明のままである。我々は Neu3 の基質特異性に着目し、「加水分解されない」ガングリオシドアナログを分子プローブとして設計した。これまでに、Ireland-Claisen 転位を利用した新規シアル酸 C-グリコシド結合構築法を開発し、CF₃-シアルコシド結合を有するガングリオシド GM4 アナログの合成に成功している。合成した GM4 アナログのシアリダーゼ阻害活性およびヒトリンパ球増殖抑制活性を評価した結果、ガングリオシドを基質とするヒトシアリダーゼ Neu2, Neu3, Neu4 に対して本アナログが阻害活性を示すこと、また天然型の GM4 と同等のヒトリンパ球増殖抑制活性を示すことを見出した。本結果は、合成した GM4 アナログがガングリオシドミミックとして働いていることを強く示唆している。

3. 新規細胞死抑制剤の開発と作用機序解明研究

細胞死 (アポトーシスやネクローシス) は、分化や増殖と並んで最も重要な生体内イベントの一つであり、厳密に制御されると同時にその異常は様々な疾患の原因となる。当研究室では、カスパーゼを介して実行されるアポトーシスは抑制せず、酸化ストレスによって誘導されるネクローシス様の細胞死を抑制するユニークな低分子化合物 IM (Indolylmaleimide) 誘導体を見いだしている。ネクローシスは、神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病) や虚血性疾患 (脳梗塞、心筋梗塞) をはじめとして様々な疾患への関与が示唆されているものの、いまだその詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では IM 誘導体の作用機序解明を通じて、その制御機構を分子レベルで解明することを目的としている。昨年度は IM 誘導体のプローブ化を行ない、得られたプローブを用いて作用機序の解明を開始した。本年度は昨年度に引き続き作用機序の解明を進めた。

(1) IM誘導体の作用部位の同定 (閻闔*3, 清水 (忠) *1, 森, 袖岡)

蛍光ラベル化された IM 誘導体を合成し、ヒト白血病細胞 HL-60 において細胞内局在を検討した。その結果、IM 誘導体がミトコンドリアに局在することが明らかとなった。そこで、ミトコンドリアで IM 誘導体がどのような作用を及ぼしているのかを調べるべく、ミトコンドリア機能の指標として膜電位および細胞内 ATP 量を調べた。その結果、IM 誘導体は酸化的ストレスにより誘導されるミトコンドリアの機能を維持することで、ネクローシスを抑制していることが明らかとなった。

(2) アフィニティーゲルを用いたターゲット蛋白質の同定 (閻闔*3, 森, 藤*4, 清水 (忠), 袖岡)

昨年度は、様々な IM 誘導体を固定化したアフィニティーゲルを作製し、これらに結合する蛋白質を単離ミトコンドリアから精製することで、ターゲット蛋白質の候補を見出すことに成功した。そこで、本年度はこれら蛋白質のうちどれが真のターゲット分子かを同定すべく、それぞれの蛋白質をノックダウンまたは過剰発現させる条件を検討し、いくつかの蛋白質に関してノックダウンや過剰発現させることに成功した。

(3) 新規誘導体の開発 (清水 (忠) *1, 閻闔*3, 袖岡)

より高い活性を有する誘導体を得るべく、IM 誘導体の母核構造を変換することを試みた。その結果、IM 誘導体を上回る新規誘導体を得ることに成功した。

(4) 新たな細胞株を用いた実験系の構築 (森, 藤*4, 閻闔*3, 袖岡)

今まで細胞死抑制活性の評価に使ってきた培養細胞 HL-60 は扱いの容易さはあるものの、作用機序解明を行うには遺伝子導入が困難であるなど問題点があった。そこで、HL-60 以外にも培養細胞で作用機序に使える細胞株の探索を行った。その結果、いくつかの細胞株が作用機序研究に有用であることを見出した。

4. ATP結合性タンパク質の新規網羅的解析法の開発 (清水 (護) *3, 袖岡)

本研究では蛋白質群の中から ATP 結合性蛋白質群を標的として、網羅的に解析する技術を確認することを目的としている。そのための手段として、多用途に利用できるアミノリンカーを有し、三リン酸部位に加水分解を受けない修飾を施した ATP ミミックを用いることを計画した。

本年度はリボース環 2'位水酸基に、多用途に利用できるアミノリンカーを有し、三リン酸部位に加水分解を受けない修飾を施した ATP ミミックの合成を行なった。またアミノリンカーの有無の影響を調べるため、リンカーを有しない ATP ミミックも合成し、得られた化合物に対して、各種キナーゼに対する阻害活性について調べた。

さらに、本研究において核酸塩基部位への保護基の導入を種々検討していた際に、既存の試薬と比較して、極めて優れた試薬の開発に成功した。基本骨格に 3-nitro-1,2,4-triazole (NT) を有する試薬 (NT 試薬) は、高い結晶性を有し、潮解性を示さず、化学的に安定で長期間保存でき、迅速且つ定量的にカラムクロマトグラフィーによる精製を必要とせず carbamate を合成することができる。また、これまで化合物の不安定さから使用直前に調整する必要があった 2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl (Teoc) 基の導入試薬なども NT 試薬とすることで安定な結晶にすることが可能である。

5. 生理活性天然物の全合成と構造活性相関研究に向けた誘導体合成

(1) リベロマイシンAおよびその誘導体の合成および活性 (安井*2, 清水 (猛), 袖岡; 白井, 川谷, 長田 (長田抗生物質研究室))

リベロマイシン A は isoleucyl-tRNA 合成酵素阻害活性に基づく強いタンパク質合成阻害活性を有する 6,6'-スピロケタール

である。また、成熟破骨細胞にアポトーシスを誘導し骨組織吸収活性を阻止することから、新しい骨粗鬆症の治療薬としても期待されている。我々は既にその全合成に成功し、その三級アルコールのサクシネートの構築に超高压法を用いたが、超高压法では反応スケールや反応装置の維持に問題があった。そこで新しい構築法を考案した。すなわち、3-butyn-1-ol より 11 行程で得られるラクトン由来のエノールトリフレーと有機亜鉛試薬から合成したジヒドロピランの酸化開裂反応を行なうことにより、三級アルコールのサクシネートを構築するという新しい方法を見いだした。さらに、その三級アルコールのサクシネートとアルキンの反応を経由して 6,6-スピロケタールへの変換も行なった。

(2) ヒメイク酸の合成とユビキチン活性化酵素 (E1) 阻害活性 (松重^{*2}, 清水 (猛), 袖岡)

細胞内のタンパク質分解系としてユビキチン-プロテアソームシステムが重要な役割を果たしている。ヒメイク酸はユビキチン活性化酵素 (E1) に対する阻害物質として海洋真菌から単離された 2 位に ω -カルボキシル長鎖アルケニル基および 5 位にカルボキシル基を有するイミド基が置換した 4-ピロン化合物である。本年度は 2 位への ω -カルボキシル長鎖アルケニル基の導入および 5 位へのカルボキシル基を有するイミド基の導入法を見いだした。

(3) 抗肥満剤および新規リード化合物の開発に関する研究 (鈴木^{*5}, 金子^{*5}, 平沼^{*5}, 清水 (猛))

5-カンペステノン (Campest-5-en-3-one) の脂質代謝制御転写因子ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α) に対するアゴニスト活性について三次元定量的構造活性相関解析により評価した。はじめに、立体構造が既知のヒト PPAR α のリガンド結合ドメイン (LBD) に対する Campest-5-en-3-one と合成 PPAR α アゴニスト GW409544 (GlaxoSmithKline) の結合様式を Glide プログラムにより求めた。ついで、それぞれ得られた PPAR α -LBD-アゴニスト複合体モデルに対するタンパク-リガンド相互作用を Glide score、F score および自由エネルギーにより比較した。その結果、Campest-5-en-3-one は GW409544 と類似の配向で PPAR α -LBD のリガンドポケットに結合するが、そのタンパク-リガンド相互作用は GW409544 より弱いことが示唆された。

(4) フィサリンBおよびFの合成研究 (大窪^{*2}, 平井, 袖岡)

フィサリンBおよびFはホオズキから単離された複雑な 13,14-sec-16,24-cycloergostane 骨格を有するステロイド成分である。抗腫瘍活性及びNF- κ Bカスケードの阻害活性を有しており、炎症性疾患などの治療薬として期待されている。また、ごく最近ヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害剤としても報告されており、我々はフィサリン類のもつ特徴的な構造と生物活性との関連性に着目している。今年度は、フィサリンB, Fに特徴的なDEFGH環部の合成を検討した。Diels-Alder反応、CeCl₃を用いるアセチリドの付加反応などを利用し、もっとも官能基化されたE環部のすべての立体中心を制御して、EF環部を合成することに成功した。現在、DGH環部の構築を検討している。

(5) ヒストンメチル化酵素阻害剤の合成研究 (岩佐^{*2}, 濱島, 袖岡)。

Chaetocin は、*chaetomium minutum* から単離されたマイコトキシンのひとつであり、リジンに特異的なヒストンメチル転移酵素を阻害することが知られている。ヒストンのメチル化は遺伝子の発現に大きく関与しており、ヒストンメチル転移酵素の阻害剤は、細胞の分化や発癌機構の解明に有用なバイオプローブとして期待されている。そこで我々は、Chaetocin の化学合成法を確立し、様々な誘導体を用いて、その構造活性相関を明らかにすることを目指している。本年度は、生合成経路に近いと考えられるアミノ酸を出発原料とする合成を計画し、検討を開始した。L-セリン、L-トリプトファンメチルエステルから誘導した 2,5-ジケトピペラジンの閉環反応を行ったところ、立体選択性の改善が必要であるものの、目的とする四環性化合物を得ることに成功した。現在、Chaetocin の基本骨格を構築すべく、得られた閉環体の二量化反応を検討中である。

*1 訪問研究員, *2 研修生, *3 基礎科学特別研究員, *4 派遣職員, *5 テクノフローラ

The laboratory focuses on the following researches based on synthetic organic chemistry: 1) development of new reactions and methodologies for the efficient synthesis of bioactive molecules, 2) design and synthesis of molecules having unique biological activity, 3) biological researches using the unique molecule as a biological probe. Our research interests cover from transition metal-catalyzed enantioselective reactions to design and synthesis of intracellular signal transduction modulators and their application to the cell biology research. Selective inhibitors of protein kinases and phosphatases, which are involved in the signal transduction of cell proliferation and death, are of particular interest

1. Development of catalytic asymmetric reactions

(1) Catalytic enantioselective synthesis of chiral nitrogen-containing molecules via palladium enolates

We previously showed that palladium complexes of the type [Pd(II)(Ligand)(H₂O)₂](X)₂ and [Pd(II)(Ligand)(μ -OH)]₂(X)₂ (Ligand = Binap-type, X = TfO⁻ or BF₄⁻) act as an acid-base catalyst, being applicable to various asymmetric C-C bond forming reactions of dicarbonyl compounds. Considering the unique property of Pd enolates generated under acidic conditions, we examined reactions with acetals, which are considered to be hard to react under basic conditions. It was found that dicarbonyl compounds underwent catalytic asymmetric aldol-type reaction with acetals, which is unprecedented in the literature. Also, we carried out the mechanistic studies on our recently reported Mannich-type reaction with *N,O*-acetals of dihydroisoquinolines. Based on these results, we devised a novel oxidative Mannich-type reaction, where reactive iminium ion intermediates were generated using a chemical oxidant. Notably, this reaction can be carried out starting from the corresponding amines, and the imines, which is normally tedious to prepare, is no longer necessary. Additionally, this reaction was successfully applied to the synthesis of a core structure of many bioactive compounds.

(2) Development of the catalytic asymmetric conjugate reduction with EtOH as a hydride source.

Last year, we reported a novel catalytic asymmetric conjugate reduction of enones using a Pd-H species as the key intermediate based on the observation that Pd(II)-BINAP complex can transfer a hydrogen atom from ethanol. The main drawback of this reaction is the narrow scope of the substrate, and α,β -unsaturated esters were not available. To address this issue, we examined various phosphine ligands, focusing on the electron density of the phosphorous atom. A Pd(II) complex having an electron-rich trialkylphosphine displayed higher reactivity, and the reaction of unsaturated esters proceeded smoothly. In these reactions, the addition of molecular sieves facilitated the reaction, which might be important for the in situ generation of the Pd- μ -OH complex. Importantly, since safe and clean EtOH can be used as a solvent and a hydride source, this reaction is environmentally advantageous. We also found that this new Pd complex was able to

promote asymmetric isomerization of allylic alcohols. Further investigation on this isomerization reaction is under way.

(3) Development of efficient asymmetric fluorination reactions

Organofluorine compounds are important building blocks in the field of medicinal chemistry, and development of efficient fluorination reactions is highly desirable. Last year, we reported the first example of asymmetric mono-fluorination of aryl acetic acid derivatives using a novel Ni-based trinary catalytic system. This year, we further examined various conditions to improve the scope of the reaction. We also carried out mechanistic studies on this Ni-catalyzed reaction. As for the Pd-catalyzed reactions, the scope of the substrates has been limited to only 1,3-dicarbonyl compounds. But we recently found that ester-activated ketones also underwent the mono-fluorination reaction. This reaction can produce optically active mono-fluorinated compounds that are not accessible using the Ni-catalyzed reaction. Further study on this reaction and its application to the synthesis of the drug candidates is under investigation in our laboratory.

2. Synthesis of small molecule modulators of enzymes controlling intracellular signal transduction

(1) Synthesis of RE derivatives and their inhibitory activity against protein phosphatase and HL60 proliferation

RK682 isolated by Osada's group is a natural product having highly acidic 3-acyltetronic acid structure and shows potent dual-specificity protein phosphatase (DSP) and protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitory activity. We succeeded to develop non-acidic RK682 enamide derivatives (RE derivatives) as a novel type of DSP inhibitor based on RK682. This year, we established the synthetic methodology for large scale-preparation of RE derivatives. Moreover, various RE derivatives were synthesized, and their inhibitory activity against Cdc25A, which is one of the most famous DSP, and HL60 proliferation were evaluated. We found that some compounds showed remarkable inhibition for both Cdc25A and HL60 proliferation.

(2) Development of a new methodology for the comprehensive analysis of protein phosphatases using RE derivatives as a biological probe

Although protein phosphatases are involved in many important biological events, their molecular mechanism of action has been less well studied. Our final goal is to establish a system for profiling phosphatase activities under various physiological conditions. For this purpose, we intended to develop a new method for labeling a class of phosphatases in full details using phosphatase inhibitors, RE derivatives, originally developed by us.

We have succeeded to develop a RE derivative RE20, which showed potent Cdc25A inhibitory activity and was able to bind covalently to Cdc25A. This year fluorescent labeled RE20 derivatives were synthesized, and covalent bond formation of these derivatives with target proteins in cells were confirmed. Moreover, we found that the position of fluorescent tag of the RE derivatives affected the pattern of the binding proteins. This fact suggested that group of RE-bound proteins could be altered by changing the substituents of RE derivatives. Next, subcellular localization of the fluorescent labeled RE derivatives was examined and we found labeled derivatives localized in cytosol around the outside of nuclei. Identification of RE-binding proteins is now in progress.

(3) Development of PP2B-selective inhibitors

Protein serine/threonine phosphatase 2B (calcineurin) plays important roles in intracellular signal transductions. The immunosuppressant drugs FK506 and cyclosporine A have been known to block activation of the transcription factors, such as NF-AT, in T-lymphocytes. These drugs bind to immunophilin (cyclophilin and FKBP) and form a complex that binds to PP2B and inhibits its phosphatase activity. Remarkably, these immunosuppressants cannot directly inhibit PP2B; the formation of immunophilin complex is essential. Thus, it is of interest to find a direct and selective inhibitor of PP2B that does not involve the immunophilins as a biological tool for studies of PP2B and also as a candidate therapeutic agent. Recently, we found optically active 1,5-di-substituted cantharidin derivatives NCA-01 as an isozyme-selective inhibitor of PP2B, but its inhibitory activity was not sufficient in cell assay. This year, to address this issue, we developed cell-permeable derivatives NCA-01-DME, which showed inhibitory activity against PHA-induced IL-2 production.

(4) Synthesis of novel ganglioside analogues focused on human sialidase (Neu3) inhibitor

Human sialidase Neu3 localized in plasma membrane hydrolyzes terminal sialic acids from ganglioside such as GM3 and GM4. Although Neu3 has been implicated to be involved in the progression of cancers and diabetes, the molecular mechanism remains unclear. Based on the substrate selectivity of Neu3, we designed "unhydrolyzable" ganglioside analogues for molecular probes of Neu3. We have already established the synthetic methodology for construction α -selective C-sialoside and achieved synthesis of ganglioside GM4 analogues possessing CF₂-sialoside linkage. This year inhibitory activity of GM4 analogue for human sialidase Neu1, Neu2, Neu3, and Neu4 were evaluated, and GM4 analogue was found to show inhibitory activities against sialidase Neu2, Neu3 and Neu4, which can hydrolyze terminal sialic acids from ganglioside. This compound also showed inhibitory activity for proliferation of human lymphocyte as same as a native GM4. These results suggested that CF₂-linked GM4 analogue would be a mimic for ganglioside GM4.

3. Development and Mechanistic Study of Novel Cell Death Inhibitors

Cell death signaling is currently one of the hottest topics in biological research. We have already found that indolylmaleimide derivatives (IM derivatives) are selective inhibitors for necrotic cell death induced by oxidative stress. Necrosis was found to play an important role in pathological cell death, for example, in neurodegenerative disorders and ischemia-reperfusion injury. But the molecular basis of necrosis remains to be elucidated. Therefore, using IM derivatives as a biological tool, we intended to clarify the signaling pathway of necrosis. IM derivative are also expected to be a lead compound for therapeutic agents.

(1) Cellular site of action of IM derivatives

To identify the target site of IM derivatives, we synthesized a fluorescent IM derivative and examined the subcellular localization by confocal microscopy. As a result, IM derivatives were found to localize in mitochondria. To examine the effect of IM derivatives on mitochondria, we monitored the mitochondrial membrane potential and cellular ATP level as a marker

of mitochondrial function. IM derivatives were found to inhibit necrosis by maintaining the mitochondrial function.

(2) Identification of target protein of IM derivatives by using affinity gel

To identify the target protein of IM derivatives, we synthesized various kinds of IM-derivative-immobilized affinity gel. Using the affinity gel, IM-binding proteins were purified from isolated mitochondria and some candidates for the target protein were identified. To determine the target protein of IM derivatives from IM-binding proteins, the knockdown and overexpression of IM-binding proteins were performed.

(3) Development of new derivatives

To improve the cell death inhibitory activity, we tried to modify the core structure of IM derivatives. As a result, we obtained some derivatives having more potent activities than IM derivatives.

(4) Establishment of experiment using new cell lines.

HL-60 cells, which are used for the cell death inhibition assay, have some problems for the mechanistic study, such as the difficulty in gene transfection. Therefore, we explored other cell lines applicable to the mechanistic study. As a result, some cell lines were found to be useful for the mechanistic studies.

4. Development of a new methodology for the global analysis of ATP-binding proteins

Reflecting the importance of ATP binding proteins in living cells, it is of great interest to develop an efficient system for the global analysis of ATP-binding proteins. For this purpose, we planned to use non-hydrolyzable ATP mimics bearing versatile amino-linker for the analysis of ATP-binding proteins.

This year, we synthesized non-hydrolyzable ATP mimic bearing versatile amino-linker at the 2'-*O* position of ribose ring. To investigate the effect of amino-linker, we also synthesized same ATP mimic without amino-linker. Then, we have examined inhibitory activity toward various kinases using these synthesized ATP mimics.

During this study, we have also succeeded in developing a novel reagents for the preparation of carbamates, carbonates, and thiocarbonates. Newly developed NT reagents, which contain 3-nitro-1,2,4-triazole (NT) as a basic skeleton, have the following advantages: (1) They are highly stable and can be stored for long periods without decomposition; (2) Since they are nonhygroscopic crystalline materials, they are easy to handle and weigh accurately even on a milligram scale; (3) The reactions can be carried out even in an open flask; (4) The co-product NT can be recycled; (5) Generally, carbamate formation proceeds quickly (within 5 min) under neutral conditions; (6) in most cases, highly pure carbamates were obtained without tedious column chromatographic purification.

5. Total synthesis of biologically active natural products and their derivatives for structure-activity relationship studies

(1) Synthesis and biological evaluation of reveromycin A derivatives

Reveromycin A is a 6,6-spiroketal antibiotic isolated from the genus *Streptomyces* and shows strong biological activities that makes it potentially useful as an antitumor drug based on inhibition of isoleucyl-tRNA synthetase. Reveromycin A is also expected as a therapeutic agent for hypercalcemia and bone disease. We have developed a novel method for the preparation of the succinates of tertiary alcohols for the synthesis of reveromycin A. 3-Butyn-1-ol was converted into a lactone in eleven steps. Oxidative cleavage of the dihydropyrans prepared via the palladium-catalyzed coupling of the ketene acetal triflates and zinc homoenolate with OsO₄ - Pb(OAc)₄ gave the succinates of tertiary alcohols. Then, the succinates were converted into the 6,6-spiroketal via the coupling with an alkyne.

(2) Synthetic studies of himeic acid A, a new ubiquitin-activating enzyme inhibitor

Himeic acid A is a new ubiquitin-activating enzyme (E1) inhibitor isolated from a culture of marine-derived fungus, *Aspergillus sp.* Himeic acid A is a 4-pyrone which substitutes α,ω -carboxyl alkenyl group at the C2 position and ω -carboxyl imide group at the C5 position. We have synthesized the 5-carboxylated 4-pyrone from the 4-hydroxy-2-pyrone via the formylation at the C3 position. The C5 carboxyl group was converted into the imide group and the C2 methyl group was modified for the synthesis of himeic acid A.

(3) Research on the development of anti-obesity drugs and new lead compounds

The agonist activity of 5-campestenone (campest-5-en-3-one) for the peroxisomal proliferator-activated receptor α (PPAR α) that is a transcriptional regulator of lipid was evaluated using a 3D quantitative structure-activity relationship analysis. First, the docking poses of campest-5-en-3-one and synthetic agonist GW409544 (GlaxoSmithKline) on the ligand binding domain (LBD) of human PPAR α whose 3D structure is already-known were obtained by the Glide program. Subsequently, protein-ligand interactions on each complex model of the PPAR α -LBD-agonist were compared based on the Glide score, F score and free energy, respectively. Results suggest that campest-5-en-3-one shifts in the ligand pocket of PPAR α as a similar distribution as GW409544 though its interaction is weaker than that of GW409544.

(4) Synthetic studies of physalin B and F

Physalin B and F are the steroidal constituents of *Physalis* plants possessing a novel 13,14-seco-16,24-cycloergostane skeleton. They possess antitumor activity and inhibitory activities on NF- κ B cascade, which make them potentially useful as a therapeutic drug for inflammatory diseases. Recently, physalin B and F was also isolated as potent inhibitors for hedgehog signaling pathway, therefore we aim clarifying the relationship between unique structural features of physalins and their biological activities. This year, we envisioned that establishment of synthetic methodology for construction of a unique right fragment DEFGH-ring moiety of physalins, and we achieved the stereo-controlled synthesis of EF-ring moiety in which all stereocenters of most functionalized E-ring in physalins was regulated by such as Diels-Alder reaction and addition of CeCl₃-lithium acetylide. Construction of DGH-ring moiety is now under investigated.

(5) Synthetic study of chaetocin

Chaetocin, which belongs to a family of mycotoxins isolated from *Chaetomium minutum*, is the first inhibitor of a lysine-specific histone methyltransferase. Since histone methylation plays an important role in gene expression, development of effective inhibitors of histone methyltransferases would be extremely useful for clarifying the mechanism of action of cellular differentiation and cancer progression. Our goal is the establishment of an efficient methodology for the

synthesis of chaetocin and its derivatives to clarify the structure-activity relationship and the discovery of a strong inhibitor. This year, according to the retro-synthetic analysis, we synthesized a 2,5-diketopiperazine starting from *L*-serine and *L*-tryptophan. A ring closing reaction of the 2,5-diketopiperazine gave the desired tetracyclic compound in good yield, although the stereoselectivity should be improved. The dimerization of the obtained compound to synthesize the core structure of chaetocin is under intensive investigation.

Staff

Head

Dr. Mikiko SODEOKA

Members

Dr. Takeshi SHIMIZU
Dr. Yoshitaka HAMASHIMA
Dr. Go HIRAI
Ms. Kumiko HARATA
Dr. Kosuke DODO*¹
Dr. Mamoru SHIMIZU*¹
Dr. Yasunori MORI*²
Dr. Shoko SUZUKI*²
Dr. Daiki MONGUCHI*²
Dr. Thomas SEIDEL*³
Dr. Tadashi SHIMIZU*³
Dr. Ayako TSUCHIYA*³

*¹ Special Postdoctoral Researcher *² Contract Researcher *³ Visiting Scientist

in collaboration with

Dr. Hiroyuki OSADA (Antibiotics Laboratory)
Dr. Takeo USUI (Antibiotics Laboratory)
Dr. Makoto KAWATANI (Antibiotics Laboratory)
Dr. Taeko MIYAGI (Miyagi Cencer Center Research Institute)
Dr. Kazunori YAMAGUCHI (Miyagi Cencer Center Research Institute)

Visiting Members

Dr. Yuou TENG (WDB)
Dr. Toshiro SUENAGA (Sankyo Kasei Kogyo)
Dr. Kazuo NAGASAWA (Tokyo Univ. Agri. Teck.)
Dr. Sayoko HIRANUMA (Technoflora Co.)
Mr. Yasunobu KANEKO (Technoflora Co.)
Dr. Kunio SUZUKI (Technoflora Co.)

Trainees

Mr. Toru WATANABE (Fac. Eng., Tohoku Univ.)
Mr. Megumi OHKUBO (Fac. Eng., Tohoku Univ.)
Ms. Eriko IWASA (Fac. Sci&Eng., Saitama Univ.)
Ms. Natsuko UMEBAYASHI (Fac. Sci&Eng., Saitama Univ.)
Mr. Yusuke KOYAMA (Fac. Sci&Eng., Saitama Univ.)
Mr. Kohei MATSUSHIGE (Fac. Eng., Tokyo Denki Univ.)
Mr. Koji YASUI (Fac. Eng., Tokyo Univ. Agri. Teck.)
Ms. Marie KATO (Fac. Sci., Tokyo Univ. Sci.)