

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

主任研究員 袖岡 幹子 (薬博)
SODEOKA, Mikiko (D.Pharm.)



キーセンテンス：

1. 新規生物活性化合物を創製し、細胞内情報伝達の分子機構の解明とその制御を目指す
2. 細胞死制御分子を創製し、細胞死の分子生物学的なメカニズムに迫る
3. 複雑な構造を有する生物活性分子を効率よく合成するための方法論を新たに開発する

キーワード：

細胞内情報伝達、細胞死、生物活性分子、阻害剤、タンパク質リン酸化酵素、タンパク質脱リン酸化酵素、ガングリオシド、不斉触媒、有機金属化学、天然物全合成

研究概要

当研究室では、有機合成化学を基盤として、1)生物活性物質を効率良く合成する為の新しい反応や方法論の開発、2)新しい生物活性をもつ化合物の創製、3)合成した化合物を用いた生物化学的研究を行っている。研究対象は、遷移金属触媒を用いた不斉反応の開発から、細胞内情報伝達を制御する新しい低分子化合物の創製、ならびにそれを用いた生物化学的研究まで幅広い範囲におよぶ。特に、細胞の増殖などに関わるタンパク質リン酸化酵素や脱リン酸化酵素に着目し、その選択的阻害剤の設計・合成を行うとともに、それを用いて標的酵素の生体内での働きを明らかにすることを目指している。また、独自に開発した新しい作用機序をもつ細胞死制御分子をプローブとして用い、未知の細胞死（ネクローシス）のメカニズムの解明を行っている。さらに、糖脂質であるガングリオシドの機能解明をめざしたプローブ分子の合成も行っている。その他、ユニークな生物活性をもつ天然物の全合成にも取り組んでいる。

1. 新規細胞死制御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。本研究では、疾患と関与する細胞死を制御する化合物（細胞死制御剤）を開発し、これを用いて分子レベルでの細胞死誘導機構の解明を行う事を目指す。

これまでに当研究室では、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、そのメカニズム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誘導体の構造展開とプローブ化を行い、ミトコンドリアに存在する結合タンパク質の同定を行った。また一方でIM誘導体とは異なり、ネクローシスを誘導するNT

(NecroTrigger) 誘導体の開発にも成功した。そこで、本年度はIMおよびNT誘導体二つの化合物を駆使してネクローシスのメカニズム解明を目指した。

また、本年度より新たな研究対象として γ -linolenic acid (GLA) により誘導される癌細胞選択的な細胞死の解析を開始した。GLAは正常細胞には影響を及ぼさずに、癌細胞に選択的に細胞死を誘導することが報告されている。しかしながら、その作用機序は明らかとなっていない。そこで、我々はGLA誘導体を系統的に合成し、癌細胞に選択的に細胞死を誘導する分子を見出し、その作用機序を明らかにすることを目指す。

本研究において、細胞死制御剤の結合タンパク質を同定することは最も重要な命題である。しかしながら、既存の手法には様々な問題点があり、最も困難な命題でもある。そこで結合タンパク質の同定を効率的に行える化学的方法論の開拓も目指す。

(1) フォトアフィニティーラベリングによるIM誘導体のタンパク質結合部位の同定（紙透，浅沼，闔，袖岡）

昨年度はIM誘導体が直接結合するタンパク質を同定すべく、フォトアフィニティラベリングの検討を行い、いくつかのタンパク質と直接結合することを明らかにした。本年度は結合部位を明らかにすべく、主な結合タンパク質を大腸菌で発現させ、精製することを試みた。その結果、結合能を失うことなく精製タンパク質を得ることに成功した。今後はこのタンパク質を用いて結合部位の同定を進める予定である。

(2) NT化合物の結合タンパク質同定 (佐藤 (伸), 闌闌, 袖岡; 橋本 (東大分生研))

昨年度開発したネクローシスを選択的に誘導するNecroTrigger (NT) 誘導体に蛍光団を導入し、その細胞内局在を検討した結果ミトコンドリアに局在することが明らかとなった。また、NT誘導体はタンパク質と共有結合を形成する反応性の高い官能基を有している。この性質を利用して、単離ミトコンドリアからいくつかの結合タンパク質を同定することに成功した。

(3) 遺伝子操作によるターゲットタンパク質の検証 (藤, 佐藤 (伸), 闌闌, 袖岡)

昨年度構築したタンパク質発現量をコントロールする実験系を用い、IM誘導体およびNT誘導体の結合タンパク質がネクローシスに関与するかどうかを検証した。その結果、特定の結合タンパク質がネクローシスの誘導に大きな影響を及ぼすことを見出し、ターゲットタンパク質であることが明らかとなった。

(4) 単離ミトコンドリアを用いた実験系の構築 (井内, 闌闌, 袖岡)

IM誘導体およびNT誘導体はいずれもミトコンドリアをターゲットとしている。そこで、単離ミトコンドリアに及ぼす影響を明らかにすることで、ネクローシス誘導機構を解明することを目指した。その結果、ミトコンドリアの膜透過性亢進 (mitochondrial permeability transition, MPT) がネクローシス誘導において大きな役割を果たすことが明らかとなった。

(5) IL誘導体の構造展開 (早水, 闌闌, 深見, 袖岡)

昨年度開発したIL誘導体に関してさらなる活性向上を目指し、新たな合成ルートの開拓と構造展開を行った。その結果、IM誘導体とは異なる構造活性相関が明らかとなった。

(6) GLAによる細胞死メカニズムの解明 (田村, 佐藤 (綾), 闌闌, 袖岡)

GLAが誘導する癌細胞選択的な細胞死のモデルとなる系を検討した。その結果、癌原因遺伝子の一つであるSV40 Large T抗原が導入された細胞においてGLAが細胞死を誘導するのに対して、もとの細胞には影響を及ぼさないことが明らかとなった。今後はこの系を用いることで、GLAの作用機序解明を進める。また、GLAの代謝物を系統的に合成するルートの開拓を行った。今後は想定される代謝物の合成を行い、細胞死誘導活性を調べる予定である。

(7) 結合タンパク質同定に向けた新手法の開発 (江上, Akindede, 濱島, 闌闌, 袖岡)

結合タンパク質を精製または標識するための新たな方法論や反応の開発を検討した。その結果、リガンド分子が結合したタンパク質を精製するための新しい方法に関する初期的結果が得られ、実際にタンパク質精製を行う条件を検討している。

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) 新規コア構造を有するDSP阻害剤TE誘導体の合成と活性評価 (小山, 大沼, 土屋, 平井, 袖岡)

RK682は、強酸性の3-アシルテ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誘導体に共通するテロン酸骨格1位酸素原子を窒素原子に置き換えたTE誘導体を合成し、VHR、Cdc25A (ともにDSP類)、およびPTP1B (PTP類) に対する阻害活性を評価した。その結果、TE誘導体はRE誘導体と同等のVHR及びCdc25A阻害活性を有し、かつPTP1Bにはほとんど阻害活性を示さないことがわかった。このことから2つのカルボニルを含むエナミド構造がDSP阻害活性に重要であることが分かった。

(2) 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, 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細胞内の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ホスファターゼに対する不可逆的阻害剤RE20を開発した。また、細胞内で標的タンパク質に共有結合したRE20誘導体に対してクリックケミストリーを用いて特異的にビオチン分子を連結させ、RE20誘導体結合タンパク質を検出することにも成功している。今年度は、上記の手法に加え、アフィニティ

ービーズからのビオチン化タンパク質の溶出を効率よく行うために、温和な条件で切断可能なリンカーを用いて、RE誘導体の標的タンパク質を簡便に且つ網羅的に同定する手法を検討した。

(3) ヒトシアリダーゼNEU3の機能解析をめざしたCF₂-連結型、CHF-連結型ガングリオシドGM3の合成研究(加藤, 岡田, 内田, 平井, 袖岡; 宮城, 山口(宮城がんセ))

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はがん細胞で形質膜に異常発現し、運動性や浸潤能の亢進、細胞死の抑制によって、がんの悪性度を助長していることが近年報告されているが、その詳細な機能解明は遅れている。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、CF₂-シアロシド結合を有するガングリオシドGM4アナログの合成を達成している。今年度は、CF₂-シアロシド結合を有するシアリルガラクトース誘導体を用いたグリコシル化反応を検討し、CF₂-連結型シアリルラクトースおよびCF₂-連結型GM3の合成に世界で初めて成功した。現在、CHF-, CH₂-連結型GM3の合成も進めており、構造活性相関研究への展開を目指している。

(4) フッ素含有糖アナログ合成に向けた新反応の開発(土川, 平井, 袖岡)

フッ素含有有機化合物は、フッ素原子によりその化学的・物理的特性が大きく変化するため、ファインケミカルや医薬の分野で大きな注目を浴びている。しかし、フッ素原子の特異的な性質により、非フッ素化合物で開発されている様々な合成手法が適用できない場合が多く、その反応性をうまく利用した合成法の開発が望まれている。今年度、gem-ジフルオロメチレン基を有する誘導体に対する、様々な求核剤(C, N, O, F, S求核剤)との反応を検討し、炭素求核剤を含むいくつかの求核剤が効率よく反応する条件を見出した。

(5) プロテインキナーゼC α (PKC α) 阻害剤の開発(田村, 平井, 袖岡)

プロテインキナーゼC (PKC) は、細胞内シグナル伝達を制御する重要なリン酸化酵素である。昨年度までにPKC α C1ドメインに結合するisobenzofuranone (IB) 誘導体の開発に成功している。今年度はその中でPKC α 阻害活性を示した誘導体 (IB-6AとIB-15A) について、PKC α の酵素活性に与える影響をin vitroで既知のPKC阻害剤であるD-erythro-Sphingosine、safingol、Gö6983などと比較した。これらの化合物に比べると活性は弱いものの、(R)-IB-6A、(S)-IB-6A、IB-15AはPKC α の酵素活性を阻害した。種々誘導体を用いた解析から、IB誘導体の阻害活性にはベンゼン環上のアルキル側鎖の向きや形状が重要であることがわかった。さらにIB誘導体の阻害活性は、系内のphosphatidylserine濃度に影響を受けるという興味深い現象を見出した。

3. 生物活性化合物の効率的合成を指向した新規触媒反応の開発研究

触媒反応は、省資源・省エネルギー型の化学合成を実現するための理想的な方法である。当研究室では、合成医薬品を含む様々な生物活性化合物の効率的な合成法開発を目指し、金属錯体を駆使した新規触媒反応の開発に取り組んでいる。具体的には、ゼロエミッションを目指した原子効率の高い次世代反応として、プロトン移動型およびヒドリド移動型の触媒反応および様々な分野での用途が期待される含フッ素化合物の新規合成法に関する研究を行っている。

(1) 含フッ素化合物の新規合成法の開発(名木, 北村, 濱島, 袖岡)

含フッ素化合物は医薬品をはじめとする様々な機能性分子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。我々の研究室ではこれまでに、新規触媒的フッ素化反応の開発に取り組んできた。これまでにカチオン性ニッケル錯体やパラジウム錯体を触媒とすることで、様々な不斉フッ素化反応の開発に成功してきた。本年度は、開発した反応の一般性を更に拡大する目的でこれまでに全く検討されていなかった化合物のフッ素化を検討した。その結果、1,2-ケトエステルの不斉フッ素化を効率的に進行させる温和な触媒系を発見し、これまで合成できなかったフッ素化合物を合成する新手法を開発した。また、フッ素化の知見を基に不斉塩素化反応も開発することができた。

(2) 遷移金属触媒を用いた新規不斉骨格構築と応用(中村, Lectard, 濱島, 袖岡)

出発原料に含まれるすべての原子が生成物に含まれるプロトン移動型反応は、原子効率にすぐれているだけでなく複雑な骨格を一気に構築できるため、その開発は重要な研究課題である。我々はこれまでに、カチオン性パラジウム錯体が酸・塩基触媒として効果的に機能することを見出し、この性質を利用した種々の合成反応を開発している。今年度は、新たな触媒として銅およびニッケルを中心金属とする錯体を合成した。開発したニッケル触媒を用いることで、これまで未開発であった新規付加反応を実現した。この反応は、既存の触媒反応と異なり環境調和性の高いアルコール中でも円滑に進行する。反応の立体選択性に関してもこ

れまでの類似の反応とは異なる選択性を示す点が特徴である。さらに本反応を用い、強力なグルタミン酸受容体アゴニスト分子の不斉合成も達成した。

(3) アルコールを有効利用する触媒反応の開発 (濱島, 袖岡)

我々は、これまでにカチオン性パラジウム-ビスホスフィン錯体がエタノールからのヒドリド移動反応に有効であることを見出している。本年度は、このヒドリド移動能を基にアリルアルコールの不斉異性化反応を検討した。その結果、従来用いられてきたロジウム触媒の場合では高温、長時間を必要するのに対して、パラジウム触媒を用いた場合、室温、短時間で反応が進行することを見出した。また、収率の向上を目指してリン配位子の検討も行った。

4. 生物活性天然物の全合成と構造活性相関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評価 (安井, 清水, 袖岡; 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。昨年度、 γ -ラクトン由来のエノールトリフレートと有機亜鉛試薬から合成したジヒドロフランの酸化的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方法を見いだした。本年度はこの方法をリベロマイシンAの全合成に応用すべく、野依還元およびSmI₂を用いるラジカル環化反応を鍵反応として γ -ラクトン含有テトラヒドロピラン誘導体を合成した。現在、6,6-スピロケタールへの酸化的環化反応を検討している。

(2) フィサリンBおよびFの合成研究 (森田, 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-seco-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注目している。今年度は、位置及び立体選択的アルキル化を鍵反応としたE環部構築を検討した。また酵素を用いた速度論的分割によりDFGH環部の不斉合成中間体を高収率かつ高い光学純度で合成することに成功した。

(3) ヒストンメチル転移酵素阻害剤Chaetocinの全合成 (岩佐, 藤城, 濱島, 袖岡)

ヒストンのメチル化は遺伝子の発現に強く関与しており、選択的なヒストンメチル化酵素阻害剤は細胞の分化や発癌機構を解明するための有用なバイオプローブとして期待されている。最近、*Chaetomium minutum* 属の菌から単離された天然物である(+)-Chaetocinが、リジン特異的ヒストンメチル転移酵素を阻害する事が報告された。しかし、その単離構造決定から約40年がたっているにもかかわらず、その全合成は達成されていなかった。そこで我々は、Chaetocinの様々な誘導体を合成してその構造活性相関を明らかにすることを目標として、全合成研究に取り組んできた。昨年度の結果を基に、D-セリン、D-トリプトファンメチルエステルを出発原料として合成を進め、最終的にふたつのラジカル反応を駆使することで(+)-Chaetocinの全合成を単離・構造決定から40年を経て初めて達成することができた。また、天然物の鏡像異性体も合成することができた。合成した化合物の酵素阻害活性試験は分子リガンド探索研究チームに依頼し、合成化合物が天然物と同じ阻害活性を有する事を確認した。今後さらに構造活性相関の解明をめざし、様々な誘導体を合成する計画である。

Key Sentence :

1. Create novel bioactive compounds to control intracellular signal transductions.
2. Clarify the molecular mechanism of apoptosis and necrosis by using novel cell death control molecules.
3. Develop new and efficient methodologies for the synthesis of complex molecules having important biological activities.

Key Word :

intracellular signal transduction, cell death, bioactive molecule, inhibitor, protein kinase, protein phosphatase, ganglioside, asymmetric catalysis, organometallic chemistry, total synthesis of natural product

Outline

Our 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 encompass from transition metal-catalyzed enantioselective reactions to design and synthesis of intracellular signal transduction modulators and their application to the cell biology research. Design and synthesis of selective inhibitors of protein kinases and phosphatases, which are involved in the signal transduction of cell proliferation, aiming at clarification of the functions of their target enzymes are of particular interest. Clarification of unknown molecular mechanism of cell death (necrosis) by using our original cell death control molecules is also currently underway. We are also working on the synthesis of ganglioside analogs and several other natural products having interesting biological activities.

1. Development and Mechanistic Study of Novel Cell Death Control Molecules

Cell death is one of the most important events for multicellular organisms to live in healthy conditions and should be strictly regulated. Abnormal acceleration or suppression of cell death causes various diseases. In this study, we develop cell death control molecules, by which we try to clarify the molecular mechanism of cell death related to diseases.

We have already found that indolylmaleimide (IM) derivatives are selective inhibitors for necrotic cell death induced by oxidative stress. Moreover, we developed NecroTrigger (NT) derivatives as a novel inducer of necrosis in the previous fiscal year. 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 and NT derivatives as a biological tool, we intended to clarify the molecular mechanism of necrosis.

As a new subject of cell death study, we focused on the tumor-selective cell death induced by γ -linolenic acid (GLA). GLA was reported to kill tumor cells without affecting normal cells, but the molecular mechanism of action was not clarified. We planned to synthesize GLA derivatives systematically and to find cell death inducer for tumor cells. By using this inducer, we intend to clarify the molecular mechanisms of GLA-induced cell death.

The identification of binding proteins of cell death control molecules is the most important point in these studies, but we have various difficulties in it by using popular methods. We also planned to develop new chemical methods for the more efficient identification of the binding proteins.

(1) Identification of IM-binding site using photoaffinity labeling (Kamisuki, Asanuma, Dodo, Sodeoka)

In the previous fiscal year, we identified some proteins as a direct IM-binding protein by using photoaffinity labeling. To identify IM-binding site of these proteins, we planned labeling experiments using purified proteins. By using *E. coli*, we have succeeded in the expression and purification of IM-binding proteins without loss of the binding potential to IM derivatives.

(2) Identification of NT-binding proteins (Sato, Dodo, Sodeoka; Hashimoto (IMCB, University of Tokyo))

By using a fluorescent derivative, we studied the subcellular localization of NT derivatives, which were developed as a novel necrosis inducer. As a result, NT derivatives were found to localize in mitochondria, indicating the existence of target proteins in mitochondria. NT derivatives have a reactive group making a covalent bond with binding proteins. Taking advantage of this property, we have succeeded in the identification of NT-binding proteins.

(3) Validation study of IM and NT target proteins by using genetic technique (Teng, Sato, Dodo, Sodeoka)

To determine the real target protein which plays a critical role in the necrosis among the IM- and NT-binding proteins, the knockdown studies of IM- and NT-binding proteins were performed. As a

result, we have determined some proteins having the effects on necrosis, which were thought to be target proteins of IM and NT derivatives.

(4) Mechanistic study using isolated mitochondria (Iuchi, Dodo, Sodeoka)

Both IM and NT derivatives were found to act on mitochondria directly. Therefore, we planned to investigate the effects of IM and NT derivatives in isolated mitochondria. As a result, mitochondrial permeability transition (MPT) was found to play an important role in necrosis induction.

(5) Development of novel IL derivatives (Hayamizu, Dodo, Fukami, Sodeoka)

To improve the cell death inhibitory activity, we developed new synthetic route of IL derivatives and studied the structure-activity relationship (SAR). As a result, SAR of IL derivatives was found to be different from IM.

(6) Study of tumor-selective cell death induced by GLA (Tamura, Sato, Dodo, Sodeoka)

At first, we planned to establish a new assay system of GLA. As a result, we discovered that GLA killed cells transformed by SV40 large T antigen, one of well-known oncogenes, without affecting host cells. Cells with or without SV40 large T antigen are expected as a suitable model for tumor-selective cell death induced by GLA. Moreover, new synthetic route to obtain metabolites and derivatives of GLA was established. We plan to examine the cell death inducing activities of these molecules.

(7) Development of novel chemical method for the identification of binding proteins (Egami, Akindele, Hamashima, Dodo, Sodeoka)

We explored the chemical methods and reactions for the purification or labeling of binding proteins. As a result, we obtained preliminary results on a new method for purifying the ligand-binding proteins, and optimization of the conditions for protein purification is currently underway.

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

(1) Synthesis of TE derivatives and their inhibitory activity against dual-specificity protein phosphatases (Koyama, Oonuma, Tsuchiya, Hirai, Sodeoka)

RK682 isolated by Osada's group (Antibiotic Laboratory) is a natural product having highly acidic 3-acyltetronic acid structure and shows potent inhibitory activity against dual-specificity protein phosphatase (DSP) and protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitory activity. We succeeded in developing non-acidic RK682 enamide derivatives (RE derivatives) as a novel type of DSP inhibitor based on RK682. This year, we synthesized tetramic acid enamide (TE) derivatives, in which oxygen atom of lactone-ring in RE derivative was replaced by NH or NMe group. Inhibitory activity of the synthesized TE derivatives were evaluated for VHR, Cdc25A, and PTP1B, and we found that TE derivatives showed potent inhibitory activity for VHR and Cdc25A similar to RE derivatives, but not for PTP1B. These results suggested that enamide structure including two carbonyl groups was important for selective inhibition for DSPs.

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

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 in cells under various physiological conditions. For this purpose, we intended to develop a new method for labeling a class of phosphatases in living cells using phosphatase inhibitors, RE derivatives, originally developed by us.

We have previously succeeded to develop an irreversible Cdc25A inhibitor "RE20" and to detect the RE20 derivative-bound proteins by using click chemistry, by which a biotin tag was introduced specifically to RE20 derivative after covalent bond formation with its target proteins. This year we synthesized and tested new biotin tag with a chemically cleavable linker, expecting efficient elution of the biotinylated proteins from affinity beads.

(3) Synthesis of novel ganglioside analogues focused on human sialidase NEU3 inhibitor (Kato, Okada, Uchida, Hirai, Sodeoka; Miyagi, Yamaguchi (Miyagi Cancer Center Research Institute))

Human sialidase NEU3 hydrolyzes terminal sialic acid from ganglioside such as GM3 and GM4. Recently, it was reported that NEU3 is up-regulated in various cancer cells and promotes the cancer malignancy through facilitation of motility and infiltration and suppression of apoptosis. But the detail of the molecular mechanism remains unclear. Based on the substrate selectivity of NEU3, we designed

“unhydrolyzable” ganglioside analogues as molecular probes for NEU3. We have already established a synthetic methodology for constructing α -selective C-sialosides and have achieved the synthesis of ganglioside GM4 analogues possessing CF₂-sialoside linkage. This year we examined the β -glycosylation of CF₂-linked sialylgalactose donor with glucose acceptors and succeeded in synthesis of CF₂-linked sialyllactose analogue and CF₂-linked GM3 analogue. To investigate the structure-activity relationship of GM3 analogues, syntheses of CHF-linked and CH₂-linked GM3 analogues are also examined.

(4) Development of new methods for the synthesis of fluorinated sugar analogs (Tsuchikawa, Hirai, Sodeoka)

Fluorine-containing compounds, which have quite unique chemical and physical properties, have been paid profound attention in fine chemical and pharmaceutical fields. However, the intrinsic nature of fluorine atom does not often allow application of various synthetic methods developed for nonfluorinated prototypes. Therefore, the synthetic method taking advantage of its reactivity needs to be developed. This year, we examined novel reaction of various nucleophiles (C, N, O, F, S nucleophiles) with the compounds having a gem-difluoromethylene group, and succeeded to find appropriate substrates and reaction conditions.

(5) Development of PKC α inhibitors (Tamura, Hirai, Sodeoka)

Protein kinase C (PKC) is a family of kinases that play important roles in intracellular signal transduction. We have previously developed a novel type of PKC α inhibitors, isobenzofuranone (IB) derivatives (IB-6A and IB-15A), which bind to PKC α C1 domain. This year, we evaluated the PKC α inhibitory activity of IB-derivatives ((*R*)-IB-6A, (*S*)-IB-6A, and IB-15A) and known PKC inhibitors (D-erythro-Sphingosine, safinol, and Gö6983) in vitro. IB-derivatives inhibited PKC α enzyme, though inhibitory potency of IB-derivatives was weaker than that of these known PKC inhibitors. SAR study revealed that the direction and the shape of the hydrophobic alkyl chain on the benzene ring were important for their PKC inhibitory activity. Moreover, PKC α inhibitory activities of IB-6A and IB-15A were found to be dependent on the concentration of phosphatidylserine.

3. Development of novel catalytic reactions for the synthesis of bioactive molecules

Reflecting the growing importance of environmentally friendly chemical processes, catalytic reactions with high atom-economy have attracted much attention in modern organic chemistry. We have been working on the development of unexplored metal-catalyzed organic reactions, particularly focusing on atom-economical proton- or hydride-transfer reactions as well as novel reactions for the synthesis of organofluorine compounds as useful organic transformations for the synthesis of complex bioactive molecules.

(1) Synthetic methodologies to produce optically active fluorinated compounds (Nagi, Kitamura, Hamashima, Sodeoka)

Organofluorine compounds are important building blocks in the field of medicinal chemistry as well as material sciences, and the development of efficient fluorination reactions is highly desirable. We already developed various catalytic asymmetric fluorination reactions by using a novel Ni-based trinary catalytic system and palladium μ -hydroxo complexes. This year, we further examined the generality of the developed conditions, and we found a mild catalytic system that is applicable to enantioselective mono-fluorination reaction of 1,2-ketoesters. We believe that this allows easy access to unique fluorinated compounds that are difficult to synthesize using conventional methods. According to these successes, we also succeeded in developing a new asymmetric chlorination reaction.

(2) Transition metal-catalyzed C–C bond-forming reactions and their applications (Nakamura, Lectard, Hamashima, Sodeoka)

We previously showed that cationic palladium complexes act as an acid-base catalyst, being applicable to various asymmetric C–C bond forming reactions. In order to expand our concept, we synthesized chiral Cu and Ni complexes as a mild acid–base catalyst. The use of the Ni complex enabled the catalytic activation of unexploited compounds as a useful nucleophile, and a novel catalytic C–C bond-forming reactions with nitroalkenes were achieved. Our reaction is distinct from other reported reactions in that high catalytic performance is feasible in alcoholic solvents which basically deactivate Lewis acid complexes, and that the stereochemistry of our reaction is complementary to the related

known reactions. This novel reaction was successfully applied to the asymmetric synthesis of powerful glutamate receptor agonist.

(3) Development of the catalytic reactions using Pd-hydride intermediates (Hamashima, Sodeoka).

We already reported that Pd(II)-bisphosphine complexes can transfer a hydrogen atom from ethanol, being applicable to asymmetric conjugate reduction of enones. Based on our previous result, we attempted asymmetric isomerization of allylic alcohols. The Pd complex was found to be quite active, allowing the reaction to complete at ambient temperature within a few hours. To improve the chemical yield, we examined the effect of bisphosphine ligands. We will continue to examine other bisphosphine ligands.

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

(1) Synthesis and biological evaluation of reveromycin A derivatives (Yasui, Shimizu, Sodeoka; Kawatani, Osada (Antibiotics Laboratory))

Reveromycin A is a 6,6-spiroketal antibiotic isolated from the genus *Streptomyces* and shows strong biological activities based on the inhibition of isoleucyl-tRNA synthetase. Reveromycin A is also expected as a therapeutic agent for hypercalcemia and bone diseases. We have developed a novel method for the preparation of the succinates of tertiary alcohol by oxidative cleavage of the dihydrofuran prepared via the palladium-catalyzed coupling of the ketene acetal triflates derived from γ -lactone with zinc homoenolate. For the total synthesis of reveromycin A, we have synthesized tetrahydropyranes with γ -lactone via Noyori's asymmetric reduction and SmI₂-induced reductive cyclization of β -alkoxy acrylate.

(2) Synthetic studies of physalin B and F (Morita, Hirai, Sodeoka)

Physalin B and F are the steroidal constituents of *Physalis* plants possessing a novel 13,14-seco-16,24-cycloergostane skeleton. They show 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 were also reported as potent inhibitors for hedgehog signaling pathway. Therefore we intended to clarify the relationship between unique structural features of physalins and their biological activities. This year, we have focused on the construction of E-ring through the chemo- and stereoselective alkylation as a key reaction. Moreover, we succeeded in developing an efficient method for the preparation of a key intermediate of the synthesis of DFGH-ring system as an enantiopure form by using enzymatic optical resolution.

(3) Total synthesis of histone methyltransferase inhibitor Chaetocin (Iwasa, Fujishiro, Hamahsima, Sodeoka)

Since histone methylation plays an important role in controlling gene expression patterns, potent inhibitors of histone methyltransferases would be extremely useful for clarifying the mechanism of cellular differentiation and cancer progression. Chaetocin, which belongs to a family of mycotoxins isolated from *Chaetomium minutum*, was recently reported to be a potent inhibitor of lysine-specific histone methyltransferases. Although its isolation and structure determination was reported near 40 years ago, total synthesis of chetocin was not achieved. Therefore we planed to establish an efficient methodology for the synthesis of chaetocin and its derivatives for the structure-activity relationship study. This year, we further continued to examine the synthetic study starting from amino acids, and we have recently accomplished the total synthesis of (+)-chaetocin. Additionally, we synthesized the antipode of the natural chaetocin. The inhibitory activity of the synthetic chaetocin against the methyltransferase was tested and confirmed by Molecular Ligand Discovery Research Team. We plan to synthesize various other derivatives for SAR study.

Principal Investigator

袖岡 幹子 Mikiko Sodeoka

井内 勝哉

Katsuya Iuchi

江上 寛通

Hiromichi Egami

佐藤 綾人

Ayato Sato

深見 竹広

Takehiro Fukami

Research Staff

濱島 義隆 Yoshitaka Hamashima

Tito Akindele

平井 剛 Go Hirai

田村 理

Satoru Tamura

闔闔 孝介 Kosuke Dodo

長澤 和夫

Kazuo Nagasawa

土屋 綾子 Ayako Tsuchiya

淺沼 三和子

Miwako Asanuma

土川 博史 Hiroshi Tsuchikawa

千原 貞次

Teiji Chihara

北村 祐樹 Yuki Kitamura

Sylvain Lectard

小山 佑介 Yusuke Koyama

岩佐 江梨子 Eriko Iwasa

佐藤 伸一 Shinichi Sato

清水 猛 Takeshi Shimizu

Students

中村 綾子 Ayako Nakamura

加藤 麻理依 Marie Kato

名木 達哉 Tatsuya Nagi

安井 浩司 Koji Yasui

岡田 光晶 Mitsuaki Okada

清水 怜 Ryo Shimizu

早水 健二 Kenji Hayamizu

森田 昌樹 Masaki Morita

内田 貴子 Takako Uchida

藤城 信哉 Shinya Fujishiro

Assistant and Part-timer

大沼 可奈 Kana Onuma

斉藤 泉 Izumi Saito

Visiting Members

滕 玉鷗 Yuou Teng

田村 結城 Yuki Tamura

紙透 伸治 Shinji Kamisuki