

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、酵素阻害剤、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創製も行っている。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（闍闍、袖岡）

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。また、昨年度にはこのIM誘導体で抑制可能なネクローシス様の細胞死を誘導する化合物としてNT (NecroTrigger) 化合物の開発にも成功している。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誘導体およびNT化合物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。これまでにIM誘導体およびNT化合物の構造展開とプローブ化を行い、これら化合物がミトコンドリアに直接作用することを明らかにし、ミトコンドリアに存在する結合タンパク質の同定に成功している。本年度はこれら結合タンパク質の機能解析を進めると共に、IM誘導体およびNT化合物の結合部位同定を目指した。

また、昨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、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、細胞死制御剤の細胞内局在や結合タンパク質を明らかにすることは作用機序の解明において重要な命題である。しかしながら既存のタグ分子には様々な問題点があり、最も困難な課題でもある。そこで細胞内局在や結合タンパク質を効率的に調べるための化学的方法論の開拓も目指す。

(1) IM誘導体の結合部位同定（紙透、山口、浅沼；梶尾、木川（NMRパイプライン高度化研究チーム））

昨年度IM誘導体の結合タンパク質に関して、大腸菌で発現精製することに成功した。そこで本年度はIM誘導体が結合する部位を同定するため、精製タンパク質に対してフォトアフィニティーラベリングを行って、

修飾されたアミノ酸残基を質量分析により同定することを試みた。また同時にタンパク質とIM誘導体の相互作用のNMRを用いた解析も開始した。その結果、結合部位として可能性の高いドメインを絞りこむことに成功した。

(2) IM誘導体およびIL誘導体の構造展開 (早水、山口、藤、大倉)

IM誘導体およびIL誘導体に関して新たな合成ルートの開拓と構造展開を行った。これまでに検討されていなかったインドール環部位の置換や新たな環構造の導入を検討した。その結果、より活性の高い誘導体を得ることに成功した。

(3) NT化合物の結合部位同定 (佐藤 (伸)、紙透、浅沼; 橋本 (東大分生研))

昨年度同定したNecroTrigger (NT) 化合物の結合タンパク質に関して、大腸菌での発現・精製を試みた。その結果、NT化合物との結合能を失うことなく精製タンパク質を得ることができた。さらに各種プロテアーゼを用いた限定分解やアミノ酸変異体を作製することで、NT化合物が結合すると考えられるアミノ酸残基を特定することに成功した。

(4) IM誘導体およびNT化合物のミトコンドリアへの作用解析 (井内、佐藤 (伸)、紙透)

IM誘導体およびNT化合物はミトコンドリアに局在して作用することから、ミトコンドリアに何らかの影響を与えていることが考えられた。そこで、単離ミトコンドリアを用いてIM誘導体およびNT化合物の作用を解析した。その結果、ミトコンドリア膜上で形成されるタンパク複合体の会合状態に影響を及ぼしていることが明らかになった。

(5) γ -linolenic acid (GLA) 誘導体の合成および活性評価 (佐藤 (綾)、田村)

昨年度GLAが誘導する癌細胞選択的な細胞死のモデル系を構築することができたので、本年度はGLA誘導体を合成し、構造活性相関を調べることを計画した。アラキドン酸の代謝経路をもとにGLAの代謝産物を推定し、系統的に合成することに成功した。今後得られた化合物の細胞死誘導活性を調べる予定である。

(6) 生物活性化合物の結合タンパク質および結合部位同定に向けた新手法の開発 (江上、紙透、浅沼、Akindede、山越、濱島)

低分子化合物の結合タンパク質および結合部位を精製または標識することを目指し、新たな方法論の開発を検討した。その結果、アルキンを含む低分子化合物を精製する手法を確立した。さらにタンパク質、修飾ペプチドの精製に応用することを検討している。

(7) 生物活性化合物の新規イメージング技術の開発 (山越; 岡田、安藤、Palonpon、藤田、河田 (阪大工))

特定の化学構造を持つラマン散乱をもとに、化合物の細胞内局在を調べるイメージング技術の開発を計画した。ラマン顕微鏡を用いて様々な化合物のもつラマン散乱を調べ、サイレント領域 (細胞内の生体成分がラマン散乱を示さない領域) に強いラマン散乱を持つ官能基を探索した。その結果、細胞内で検出可能な強いラマン散乱を示す官能基を見出すことに成功した。

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 (平井、袖岡)

タンパク質リン酸化は、細胞内情報伝達を制御する最も重要な翻訳後修飾の1つとして知られている。細胞内には、数多くのタンパク質リン酸化制御因子が存在し、主にタンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) と脱リン酸化酵素 (プロテインホスファターゼ) が中心的役割を担っている。これまで多くの生物学的研究がなされてきたものの、リン酸化ネットワーク特有の複雑性のため、タンパク質リン酸化制御因子の詳細な機能解明には至っていない。本研究では、既存の阻害剤などにはなかった新たな機能を有し、細胞内タンパク質リン酸化を制御する“脂質系有機分子”を、天然物や生体分子を元に新たに“創製”することを基盤として研究を展開している。これら有機分子のタンパク質レベル、細胞レベルでの活性、結合タンパク質解析を同時に進め、リン酸化関連タンパク質の機能解明に貢献するだけでなく、有機分子の構造と機能との相関関係明らかにしていくことを目的としている。

(1) DSP阻害剤RE誘導体の活性向上を目指した構造展開 (内田、Thuaud、大沼、土屋)

昨年までに天然物RK-682を基盤として、中性構造を有し細胞膜透過性も改善した新規両特異性プロテインホスファターゼ (DSP) 選択的阻害剤RE誘導体を開発し、多くの誘導体を合成してきた。RE12は合成した誘導体の中でも、DSPの一種VHRを選択的に阻害し、NIH3T3細胞でERK、JNKの脱リン酸化を抑制することも見いだしている。今年度はRE12のさらなる阻害活性向上と物性改善を目的として、種々検討した。細胞レベルでの活性向上には、RE12が有する長鎖アルキル基を別の疎水性置換基に置き換える必要があった。そこで、ベンゼン環を含むアルキル基を有するRE誘導体を種々合成し、RE12に匹敵するVHR阻害剤を見出

すことに成功した。

(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、西澤)

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。当研究室では、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Cdc25ホスファターゼと共有結合を形成する不可逆的阻害剤RE20を見いだしている。今年度はこのアルキン誘導体RE64をプローブとして用いて、細胞内でのホスファターゼ標識実験を検討した。

(3) 質量分析法によるCdc25A触媒サブユニットとその阻害剤RE誘導体との結合部位の同定 (浅沼、土屋)

Cdc25A に対する不可逆的阻害剤 RE20 は、活性中心のシステイン残基と共有結合を形成していると考えられている。しかし、その明確な証拠を得るまでには至っていない。そこで今年度は、結合部位同定用プローブ分子 RE142 を開発した。RE142-Cdc25A 触媒サブユニット (Cdc25Acat) 複合体の酵素消化物をアビジンビーズと混合し RE142 結合ペプチドを捕捉させた後、リンカー部分の化学的切断によって標的ペプチドを溶出した。MS 解析により溶出画分に cleaved RE142 (cRE142) 結合ペプチドが含まれることを確認した。さらに LC-MS/MS 解析により、cRE142 は Cdc25Acat の活性中心近傍の Cys384 に結合していることが強く示唆された。

(4) 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、CH₂-連結型ガングリオシドGM3の合成研究 (加藤、岡田、西澤; 宮城、山口 (宮城がんセ))

ガングリオシドGM3は、EGFRと相互作用しリン酸化シグナルを抑制することで、細胞増殖を負に制御していることが知られている。形質膜に局在するヒトシアリダーゼNEU3は、GM3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報告されている。しかし、ガングリオシド代謝とNEU3の機能との相関関係は明らかになっていない。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アナログおよびGM3アナログの合成を達成している。今年度合成したGM3アナログの活性試験を種々検討した。その結果、GM3のセラミド部の脂質長がNEU3阻害活性と阻害形式に影響を与えていることが示唆された。そこで脂質長の異なるセラミドを持つGM3アナログを合成し、NEU3とGM3との相関関係をより詳細に検討することにした。昨年度までに確立したGM3合成法の改善も検討しつつ、CF₂-連結型、およびCH₂-連結型GM3の合成を進めている。また、CHF-連結型GM3の合成に必要なCHF-連結型シアリルガラクトース誘導体の両異性体の合成も検討した。

(5) 糖骨格に由来する特異なS_N2'反応を利用したCF₂連結型2糖ユニットの合成 (土川)

昨年度までに、様々な求核剤 (C, N, O, F, S求核剤) のgem-ジフルオロメチレン基を有する糖誘導体に対するS_N2'反応が効率よく進行することを見いだしている。本年は、ガラクトール誘導体を求核剤とするS_N2'反応も進行することを見出し、代謝安定型のCF₂-連結型2糖骨格を簡便に合成できることを見出した。

(6) 新規イソベンゾフラノン誘導体のPKCα阻害機構の解析 (田村、酒井)

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、PKCαのC1ドメインに結合してPKC活性化を阻害するジアシルグリセロールアナログ、イソベンゾフラノン (IB) 誘導体 (IB-6A、IB-15A) の開発に成功している。今年度は構造活性相関研究や結合部位の同定を指向し、最も強いPKC阻害活性を持つIB-15Aをテンプレートとして、誘導体の合成とその活性評価を検討した。PKCと相互作用することが予想されるアセトアミド部分の置換基を種々検討した結果、置換基が大きいほどIB誘導体の阻害活性が減弱することがわかった。さらに結合部位の同定に有用なクロロアセチル体 (IB-21A) が、PKCαの酵素活性を阻害することを見出した。

(7) フィサリン類の全合成研究 (森田、金)

フィサリン類はホオズキから単離された複雑な13,14-seco-16,24-cycloergostane骨格を有する酸化度の高いステロイド成分である。抗腫瘍活性及びNF-κBカスケードの阻害活性を初めとする種々の興味深い生物活性を有しており、我々はフィサリン類の特徴的な構造と生物活性の関連を解明すべく合成研究に着手している。今年度は、ワンポットEGH環構築反応を確立し、新たにE環ラクトンを有するかご型のDEFGH環部の合成に成功した。

3. ヒストンメチル化酵素阻害剤Chaetocinの全合成と構造活性相関研究（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化酵素を阻害する事が報告された。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み、昨年度までにアミノ酸誘導体を出発原料とする全合成ルートを確立した。本年度はその合成法を基に様々な誘導体の合成を行い、構造活性相関を明らかにするとともにそれらの細胞死誘導能に関しても検討を行った。

(1) Chaetocin誘導体の構造展開（岩佐、藤城；樋口、伊藤、吉田（分子リガンド探索研究チーム））

chaetocinのヒストンメチル化酵素阻害メカニズムを明らかにする為に、全合成ルートをもとに、非天然型のent-chaetocinおよび硫黄官能基欠損型chaetocin類縁体に加え、chaetocinの有する二量体構造およびエピジチアジケトピペラジン構造に着目した誘導体合成を進めた。分子リガンド探索研究チームとの共同研究により酵素阻害活性試験を行い、chaetocinの硫黄官能基の重要性について明らかにした。

(2) Chaetocin誘導体の細胞死誘導能（膝、井内、閻闔）

合成によって得られたChaetocinならびにその誘導体のヒト白血病細胞 HL60 に対する細胞死誘導能を調べた。その結果、天然型ではなく非天然型のent-chaetocinの方が、低い濃度でカスパーゼ 8 に依存したアポトーシスを誘導するという極めて興味深い現象を見いだした。これら細胞死誘導のメカニズムの解明は、ヒストンメチル化酵素阻害活性と細胞毒性を分離した化合物の設計合成に役立つものと考えられる。

4. 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（濱島、袖岡）

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（清水、Lectard、江上）

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。我々の研究室では新規触媒的フッ素化反応の開発に取り組んでおり、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1,2-ケトエステルのフッ素化反応の有用性を示すべく、そのフッ素化化合物の誘導化を検討している。また、フッ素化反応の知見を基に不斉塩素化反応も開発することができた。

一方、有機分子骨格にフッ素を導入する手法として、近年トリフルオロメチル化反応が注目されている。しかしその方法論は限られており、より一般性の高い反応の開発が望まれている。本年度は生物活性物質中にしばしば含まれるインドール骨格に着目し、そのトリフルオロメチル化反応を検討した。その結果、銅塩を触媒とすることでインドール誘導体の直截的トリフルオロメチル化反応が位置選択的に進行する事を見出した。

(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、Pünner）

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炭素-炭素結合生成反応を開発してきた。本概念をさらに拡張するため、新たな触媒として銅およびニッケルを中心金属とするキラルジアミン錯体を合成し、それまでほとんど求核剤として用いられていなかった1,2-ケトエステルのニトロオレフィンへの触媒的共役付加反応を開発する事に成功した。本反応は、アルコール溶媒中で極めて高い立体選択性で進行する。さらにこの新規不斉触媒反応を鍵反応として用い、強力なグルタミン酸受容体アゴニストMFPAの不斉合成も達成した。さらに、今年度は、本触媒的共役付加反応終了後、ワンポットで異なる求電子剤と反応させるタンデム反応の検討も行った結果、高立体選択的なMichael-Michael-Henry反応を実現する事ができた。

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, enzyme 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 these unique molecules as biological probes. 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 (Dodo, Sodeoka)

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.

We are also focusing 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 a tumor-selective cell death inducer. By using this inducer, we intend to clarify the molecular mechanisms of GLA-induced cell death.

To clarify binding proteins and cellular localization 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 (Kamisuki, Yamaguchi, Asanuma; Tochio, Kigawa (NMR Pipeline Methodology Research Team))

In the previous fiscal year, we succeeded in the expression and purification of IM-binding proteins by using *E. coli*. To identify IM-binding site of these proteins, we planned photoaffinity-labeling experiments using purified proteins and mass spectrometric analysis. Moreover, we started NMR analysis of purified proteins. As a result, we identified a domain containing a possible IM-binding site.

- 2) Development of novel IM and IL derivatives (Hayamizu, Yamaguchi, Teng, Ohkura)

To improve the cell death inhibitory activity, we developed new synthetic route of IM and IL derivatives and studied the structure-activity relationship of these compounds. As a result, we obtained

more potent derivatives.

3) Identification of NT-binding site (Sato, Kamisuki, Asanuma; Hashimoto (IMCB, University of Tokyo))

To identify the binding site of NT compounds, we carried out the expression and purification of NT-binding proteins by using *E. coli*. After the confirmation of NT-binding activity of purified proteins, we tried to identify the NT-binding site by limited proteolysis and mass spectrometric analysis. As a result, we identified a single amino acid residue which was thought to react with NT compounds.

4) Mechanistic study using isolated mitochondria (Iuchi, Sato, Kamisuki)

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, these compounds were found to affect protein complexes formed in mitochondrial membranes.

5) Synthesis and evaluation of GLA-related compounds (Sato, Tamura)

In the previous fiscal year, we established a new assay system for GLA. This year, we planned to conduct structure-activity relationship study of GLA derivatives. Based on the metabolites of arachidonic acid, we designed hypothetical GLA metabolites and synthesized them. We plan to examine the cell death inducing activities of these molecules.

6) Development of novel chemical method for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds (Egami, Kamisuki, Asanuma, Akindele, Yamakoshi, Hamashima)

We explored the chemical methods for the purification or labeling of binding proteins of small molecules. As a result, we established a new method for the purification of alkyne-containing molecules. We plan to apply this method for the purification of protein and peptide modified by the alkyne-containing small molecule.

7) Development of novel imaging method for determination of cellular localization of bioactive compounds (Yamakoshi; Okada, Ando, Palonpon, Fujita, Kawata (Osaka University))

We planned to develop a novel Raman imaging method for determination of cellular localization of bioactive compounds. By using a Raman microscope, we explored the functional groups having Raman scattering in silent region, in which endogenous molecules showed no Raman peaks. As a result, we successfully detected some functional groups in live cells.

2. Synthesis of small molecule modulators of enzymes controlling intracellular signal transduction (Hirai, Sodeoka)

Protein phosphorylations are well recognized as one of the most important post-translational modification for regulating the intracellular signal transduction. Many kinds of molecules are involved in protein phosphorylations, and protein kinases and protein phosphatases act as central key enzymes for tuning the phosphorylation signals. Although many efforts by means of molecular biology and biochemistry have been made for analyzing the function of protein phosphorylation, a lot of room for further research into the clarification of the precise roles of the molecules regulating the protein phosphorylation still remains due to the complicated network systems in protein phosphorylations. In this study, we are focusing on the development of novel types of lipid-like molecules having unique functions based on natural products and bio-molecules. Moreover, biological activities of all new compounds at both protein and cell levels are tested. Analysis of their binding proteins is also conducted. In these ways, we aim for not only contributing to clarification of the function of the proteins involved in protein phosphorylations, but also understanding the relationship between the structure of molecules and their functions.

1) Structural evolution of dual-specificity protein phosphatase inhibitors, RE derivatives, for improvement of their inhibitory activity (Uchida, Thuaud, Oonuma, Tsuchiya)

We have developed novel type of cell-permeable dual-specificity protein phosphatase inhibitors, RE derivatives, which have a neutral core structure. Various derivatives have been prepared, and among them, RE12 was found to be a selective inhibitor for VHR and to inhibit dephosphorylation of ERK and JNK in cells. This year, further improvement of inhibitory activity and physical property of RE12 were investigated. For the better performance at cellular level, the long hydrophobic alkyl chain of RE12 should be displaced by other hydrophobic functionalities. Some of the synthesized compounds having an alkyl group substituted by benzene rings were found to show the inhibitory activity for VHR

comparable to RE12.

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

Protein phosphatases are involved in many important biological events, but the molecular mechanisms of their substrate recognition and control of their activity have not been fully clarified. 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". This year, the labeling experiment of dual-specificity protein phosphatases in cells was examined by using RE64, the alkyne derivative of RE20.

- 3) Identification of binding sites of RE derivative on Cdc25A catalytic domain by mass spectrometry (Asanuma, Tsuchiya)

RE20, irreversible inhibitor for Cdc25A, was thought to form covalent bond with cysteine residue on catalytic domain of Cdc25A. But we have not confirmed the evidence of it yet. To identify the binding site of RE20, this time we succeeded in development of an irreversible Cdc25A inhibitor RE142, which composed of RE20 derivative, a chemically cleavable linker, and biotin tag. The complex of RE142 with catalytic domain of Cdc25A (Cdc25Acat) was digested by proteases, and among the complex mixture of enzymatic digests, RE142-bound peptides were specifically trapped on avidin beads. By treatment of beads with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, the peptides on avidin beads were eluted. MS analysis of eluted peptide indicated that targeted RE142-bound (cRE142) peptide existed in the eluent. Further LC-MS/MS analysis strongly suggested that cRE142 bound to Cys384, which is close to Cys430 of the active site of Cdc25Acat.

- 4) Synthesis of novel ganglioside analogues focused on human sialidase NEU3 inhibitor (Kato, Okada, Nishizawa; Miyagi, Yamaguchi (Miyagi Cancer Center Research Institute))

Ganglioside GM3 is thought to be involved in suppression of cell proliferations through the interaction with EGFR and inhibition of phosphorylation signals. On the other hand, human sialidase NEU3 hydrolyzes terminal sialic acids from ganglioside such as GM3. Recently, it was reported that NEU3 is up-regulated in plasma membrane of various cancers and promotes the cancer malignancy through facilitation of motility and invasion of tumor cells and suppression of apoptosis. But the precise molecular mechanism remains unclear. Focusing on the substrate selectivity of NEU3, we designed "unhydrolyzable" ganglioside analogues as molecular probes for the clarification of the relationship between metabolism of GM3 by NEU3 and function of NEU3. We have already established a synthetic methodology for constructing α -selective C-sialosides and have achieved the synthesis of ganglioside GM4 and GM3 analogues possessing CF_2 -sialoside linkage. This year, biological activity of CF_2 -linked GM3 was first evaluated. As a result, it was suggested that the length of ceramide chains of GM3 influenced the inhibitory activity and/or inhibition mode for NEU3. Therefore we next aimed to synthesize the several CF_2 -linked GM3 analogues with different length of ceramide chains for further investigation of the inhibitory activity against NEU3. Simultaneously, optimization of synthetic methodology for GM3 analogue was also investigated. Moreover, we also examined the stereoselective synthesis of both diastereomers of CHF-linked sialylgalactose analogues, which would be the precursors for CHF-linked GM3 analogues.

- 5) Synthesis of CF_2 -linked disaccharide unit utilizing the unique $\text{S}_{\text{N}}2'$ reaction arising from sugar structure (Tsuchikawa)

We have already found that $\text{S}_{\text{N}}2'$ type reaction of various nucleophiles (C, N, O, F, S nucleophiles) with the compounds having a gem-difluoromethylene group on sugar derivatives. This year, galactal derivatives were found to be also applicable as a nucleophile for this $\text{S}_{\text{N}}2'$ reaction, indicating that this unique reaction would be useful for the construction of CF_2 -linked disaccharide analogues, which is expected to act as a stable analogue under biological conditions.

- 6) Studies on molecular mechanism of PKC α inhibition by novel isobenzofuranone derivatives (Tamura, Sakai)

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, diacylglycerol analogue

“isobenzofuranone (IB) derivatives” (IB-6A and IB-15A), which bind to PKC α C1 domain. This year, toward an SAR study and identification of binding site, we developed a series of IB-derivatives based on IB-15A which has the most potent PKC α inhibitory activity. Evaluation of inhibitory activity of newly synthesized compounds revealed that larger substituent of α -position of amide group weakened their PKC α inhibitory activity. Fortunately, IB-21A having α -chloroacetyl group was found to retain the PKC α inhibitory activity, so it was expected that IB-21A would be useful for identification of its binding site.

7) Synthetic studies of physalins (Morita, Kim)

Physalins are the highly-oxygenated steroidal constituents of *Physalis* plants possessing a novel 13,14-seco-16,24-cycloergostane skeleton. As they show antitumor activity and inhibitory activities on NF- κ B cascade, we launched a synthetic study of physalins to elucidate the relationship between their unique structural features and biological activities. This year, we have achieved the synthesis of a cage-shaped DEFGH-ring moiety of physalins utilizing the key reaction which constructs EGH-ring in one pot.

3. Total synthesis of histone methyltransferase inhibitor Chaetocin and its structure- activity relationship studies (Hamashima, Sodeoka)

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. Because histone methylation plays important roles in controlling gene expression patterns, the structure-activity relationship study of chaetocin is expected to be helpful in developing biological tools for epigenetic research. We achieved the first total synthesis of chaetocin in early 2010. This year, its derivatives were synthesized based on the synthetic method and investigated SAR for inhibition of the histone methyltransferase and for cell death-inducing activities.

1) Synthesis of Chaetocin derivatives (Iwasa, Fujishiro; Higuchi, Ito, Yoshida (Molecular Ligand Discovery Team))

Based on the synthetic method we developed, *ent*-chaetocin and several other analogues were synthesized. To know the role of the unique dimeric structure and epidithiadiketopiperazine structure on the inhibition of histone methyltransferases, S-deficient analogs and monomeric analogs were synthesized. Their inhibitory activities were tested and indicated the importance of the sulfur functional group.

2) Cell death inhibition by Chaetocin (Teng, Iuchi, Dodo)

Cell death-inducing activity of chaetocin and its analogues was also tested using human leukemia HL60 cells. Consequently, we found *ent*-chaetocin was more potent for apoptosis induction than naturally occurring chaetocin. This result may be a promising clue for the separation between inhibitory activity of histone methyltransferase and cell death-inducing activity. Interestingly, the observed apoptosis was found to be caspase-8-dependent.

4. Development of novel catalytic reactions for the synthesis of bioactive molecules (Hamashima, Sodeoka)

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-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 (Shimizu, Lectard, Egami)

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 examined the derivatization of fluorinated compounds derived from 1,2-ketoester to show the utility of our fluorination reactions. Based on the fluorination reaction, we also developed an asymmetric chlorination reaction.

On the other hand, trifluoromethylation recently attracted the attention as useful method for introducing fluorine atom to organic molecule. Development of new trifluoromethylation reaction having higher generality is required, because the methodology has been limited. This year, we examined the trifluoromethylation of indole derivatives, which are often found in bioactive compounds, and succeeded in developing a direct regioselective trifluoromethylation of indole derivatives catalyzed by copper acetate.

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

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 1,2-ketoesters as a useful nucleophile, and a novel catalytic conjugate addition to nitroalkenes was achieved in alcoholic solvent with excellent enantio- and diastereo-selectivity. This novel reaction was successfully applied to the asymmetric synthesis of glutamate receptor agonist MFPA. Furthermore, one-pot tandem reaction with second electrophiles was also examined, and highly stereoselective Michael–Michael–Henry reaction reaction have been realized.

Principal Investigator

袖岡 幹子 Mikiko Sodeoka

紙透 伸治

Shinji Kamisuki

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

岩佐 江梨子

Eriko Iwasa

闔闔 孝介 Kosuke Dodo

山越 博幸

Hiroyuki Yamakoshi

土屋 綾子 Ayako Tsuchiya

山口 卓男

Takao Yamaguchi

Sylvain Lectard

浅沼 三和子

Miwako Asanuma

土川 博史 Hiroshi Tsuchikawa

長澤 和夫

Kazuo Nagasawa

王 軒 Xuan Wang

千原 貞次

Teiji Chihara

Students

中村 綾子 Ayako Nakamura

佐藤 伸一 Shinichi Sato

加藤 麻理依 Marie Kato

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

大倉 彰太 Shota Ohkura

西澤 絵里 Eri Nishizawa

酒井 基成 Motonari Sakai

Frederic Thuaud

Florian Punner

金 智恵 Ji Hye Kim

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