

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) パラジウムエノラートを經由する含窒素化合物の触媒的不斉合成 (Dubs^{*1}, 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 ($[\text{Pd}(\text{II})(\text{ligand})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{X})_2$ や $[\text{Pd}(\text{II})(\text{ligand})(\mu\text{-OH})_2(\text{X})_2$ (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に対する種々の炭素-炭素結合形成反応 (Michael反応やMannich反応) を開発している。今年度は、この知見をもとにこれまでに不斉触媒反応の研究では用いることが困難であったアセタールとの反応を検討した。種々のアセタールを利用可能であることを明らかにし、マロン酸エステルと*N,O*-アセタールとのMannich型反応によって生物活性化合物として重要なイソキノリン誘導体の効率的な不斉合成法の開発に成功した。また、分光学的手法を用いることによってこの反応のメカニズムを明らかにした。現在、中間体であるパラジウムエノラートのX線結晶構造解析を検討中である。

(2) エタノールを還元剤とする共役還元反応の開発研究 (土屋 (康)^{*1}, Beemelmanns^{*2}, 濱島, 袖岡)

共役還元反応は合成上重要な反応であり、これまでに様々な反応が開発されてきた。しかしながら、毒性が高い、または爆発性のある試薬の利用などが問題であり、より安全性の高い反応の開発は重要な課題である。我々は最近カチオン性パラジウム-dppb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、本年度はこれを用いた不飽和カルボニル化合物の共役還元反応を開発した。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。また、当研究室で開発した光学活性パラジウム μ -ヒドロキソ錯体を触媒として用いると、不斉共役還元を高エナンチオ選択的に行うことができた。更に、本反応の応用として抗凝血薬であるワルファリンの効率的な触媒的不斉合成も達成した。

(3) ニッケル触媒を用いる三成分触媒系と触媒的不斉フッ素化反応の開発研究 (鈴木^{*2}, 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、触媒的不斉フッ素化反応の開発に取り組んでいる。これまでは酸性度の高い化合物のフッ素化が検討されてきたが、反応性の低いエステル類縁体を用いる触媒反応は皆無であった。今回、我々はニッケル錯体を触媒とする3成分反応系がエステル類縁体の α 位モノフッ素化に有効であることを見出し、高い不斉収率でフッ素化体を得ることに成功した。現在、基質一般性の拡大を目指し検討を行っている。

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) PKC-C1 ドメインへのリガンドの結合能評価を目的とした低分子蛍光プローブの作成 (小山^{*2}, 平井, 袖岡)

プロテインキナーゼC (PKC) は、リン脂質、カルシウム依存性のタンパク質リン酸化酵素である。PKCは、リガンド結合性のC1 ドメインを2つ有しており (C1a, C1bドメイン)、ここには生理的リガンドである1,2-diacylglycerol (DAG) や発ガンプロモータであるphorbol esterなどが結合する。リガンドが結合すると、PKCはリン脂質-リガンドとの3者複合体を形成し、活性化コンホマーへと構造変化することが示唆されている。PKCの機能解析のためには、C1 ドメインに結合する人工的リガンドが必須であり、当研究室ではisobenzofuranone (IB) を基本骨格とした新規リガンドを創製している。リガンドのPKCへの結合能評価法としては、phorbol esterのトリチウムラベル体 $^3\text{H}[\text{PDBu}]$ をトレーサーとした競合的結合阻害実験法がよく用いられていたが、近年になってPKC α ではphorbol esterがC1bドメインに優先的に結合することが報告され、従来法ではC1bドメインの結合能評価しかできていないことが示唆された。

これまでに我々は、isobenzofuranone 誘導体の7位にイノシトール誘導体を連結した化合物 (IB-inositol 誘導体) が、C1bドメインへ結合能は低いものの、顕著なPKC α 活性化能を有していることを見出している。このことは、C1aドメインに優先的に結合していることを示唆しており、IB-inositol 誘導体に蛍光団を導入した化合物は、C1aドメインのトレーサー分子となると考えた。本年度は、IB-inositol 誘導体のリン脂質と相互作用する部位に疎水性の蛍光団であるBIDIPY誘導体を連結した分子の合成を検討した。蛍光団を炭素鎖のみで連結できる分子間オレフィンメタセシス反応を利用し、蛍光プローブの合成に成功した。

(2) ホスファターゼ阻害剤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 (綾)^{*1}, 尾谷^{*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目指している。本年度はプローブとして用いる化合物の選択とプローブとしての活性評価を行った。

天然物RK-682を基盤として、両特異性プロテインホスファターゼ(DSP)と共有結合を形成するようにデザインした誘導体への変換を行った。その結果、RK-682のエナミド誘導体であるRE20がDSPの一つであるCdc25Aのホスファターゼ活性を阻害し、さらに活性中心に存在するシステイン残基と共有結合することを見いだした。また、RE20はチロシンホスファタ

一ゼである PTP1B およびセリン/スレオニンホスファターゼである PP2A にはまったく阻害活性を示さなかった。これらのことから RE20 は DSP に対する特異性の高い阻害剤であると考えられたため、蛍光ラベル化した RE20 を合成し、ホスファターゼのプロープとして機能するかを検討した。ヒト急性前骨髄性白血病細胞である HL-60 細胞に RE20 を添加し細胞内における RE20 標的分子の網羅的な標識を試みたところ、いくつかの蛍光ラベル化タンパク質を検出することに成功した。

(3) PP2B 選択的阻害剤の開発 (清水 (忠)^{*1}, 松倉, 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-トランス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。昨年度見出した 1,5 位二置換カンタリジン誘導体 NCA-31 は、酵素選択性は高いものの阻害活性は不十分であった。今年度はこの問題点を克服すべく、酵素阻害剤とタンパク質の結合モデルをもとに更なる誘導体合成を行った。

(4) ヒトシアリダーゼ (Neu3) の阻害剤を目指した新規ガングリオシドアナログの創製 (渡邊^{*2}, 平井, 袖岡)

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。Neu3 阻害剤を開発することで Neu3 の機能解明のみならず、治療薬としての応用も期待できる。そこで我々は Neu3 の基質特異性に着目し、阻害剤として「加水分解されない」ガングリオシドアナログを設計した。本年度は、昨年度開発したシアル酸 C-グリコシド結合構築法を鍵行程として、グリコシド結合を炭素で連結したシアリルガラクトースアナログの合成を達成した。また、セラミドを導入したガングリオシド GM4 アナログの合成に成功した。

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 誘導体のプロープ化を目指し、種々条件検討を行った。本年度は引き続きプロープ化の検討を行うと同時に、得られたプロープを用いて作用機序解明を目指した。

(1) 蛍光誘導体の細胞内局在検討 (闔闔^{*3}, 清水 (忠)^{*1}, 森, 大沼^{*4}, 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。今年度は、共焦点顕微鏡を用いることでさらに詳細な細胞内局在を調べることに成功した。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。

(2) アフィニティーゲルを用いた結合蛋白質の同定 (闔闔^{*3}, 清水 (忠)^{*1}, 袖岡)

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。

(3) 新規誘導体の開発 (清水 (忠)^{*1}, 闔闔^{*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, 闔闔^{*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、ラット褐色細胞腫 PC12 細胞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。

目的化合物が強塩基性及び酸性条件下、化学的に不安定であると考えられるので、中性条件下除去可能な保護基の組み合わせで合成する必要がある。そこで穏やかな条件下、水素添加反応で除去可能な保護基を用いることにした。また、アミノリンカー部位としてクリックケミストリーへの応用も可能なアジド基を有するヌクレオシド誘導体をイノシンより 10 工程で合成した。得られたヌクレオシド誘導体に対し、次亜リン酸より新たな手法で合成した三リン酸誘導体をホスホニウム型の縮合剤を用い弱塩基性条件下反応させることにより、高収率で保護された ATP ミミックを合成した。さらに脱保護条件についても検討し、高収率で目的とする ATP ミミックを合成することに成功した。

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 およびスピロファンジン A 誘導体の合成および活性 (清水 (猛), 村越^{*2}, 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-スピロアセタールである。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。本年度は合成したリベロマイシン A 誘導体およびスピロファンジン A 誘導体の isoleucyl-tRNA 阻害活性および破骨細胞に対する細胞死誘導活性を検定し、リベロマイシン A の 2,3-ジヒドロ体や 4-ヒドロキシ誘導体に強い活性を見いだした。また、リベロマイシン A は構造的特徴として三級ヒドロキシ基のヘミサクシニル基を有しているが、根岸カップリングの応用により容易に得られるジヒドロピランの酸化開裂法という超高压法を用いない応用性の高い新しい構築法を

見いだした。

(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 (清水 (猛), 松重^{*2}, 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キル基および 5 位にサクシニル化されたアミド基が置換した 4-ピロン化合物である。本年度はその基本骨格 3 位にカルボキシル基を有する 6-メチル-4-ピロンの合成法を見だし、且つそれらの官能基化を行なった。

(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 (清水 (猛), 鈴木^{*3}, 金子^{*5}, 平沼^{*5}, 今野^{*5})

カンペステロール誘導体 5-カンペステノンの高脂血症改善作用のメカニズムについて検討した。SD ラットを 0.2% 5-カンペステノン食で 14 日間飼育し、単離肝臓還流法を用いて脂質出納を解析した。その結果、5-カンペステノン群の肝臓におけるケトン体生成は著しく増加し、一方、トリグリセライド (TG)、コレステロールおよびリン脂質の分泌はいずれも有意に減少した。とくに TG 分泌の減少は著しく、この減少は還流液中の TG 画分への外因性および内因性脂肪酸の取り込み減少によるものであった。このように、5-カンペステノンの高脂血症改善作用は脂肪酸の酸化系への代謝を促進し、一方脂肪酸のエステル化系への代謝、とくに TG の合成・分泌を抑制することで発揮されることが示唆された。

(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-*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ことから、これらの全合成研究に着手した。今回、フィサリン類のユニークな右部分フラグメントに着目し、その合成法の確立を目指した。その結果、Diels-Alder 反応を鍵として重要中間体の合成に成功した。

*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 共同研究員

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 $[\text{Pd}(\text{II})(\text{Ligand})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{X})_2$ and $[\text{Pd}(\text{II})(\text{Ligand})(\mu\text{-OH})_2](\text{X})_2$ (Ligand = Binap-type, X = OTf or BF₄⁻) act as an acid-base catalyst, being applicable to various asymmetric C-C bond forming reactions of dicarbonyl compounds. Based on our previous results, we have succeeded in developing highly enantioselective coupling reactions of malonates with acetals, which has rarely been used in asymmetric catalysis. Notably, the reaction was successfully applied to the highly enantioselective synthesis of chiral tetrahydroisoquinolines. We also carried out spectroscopic studies to clarify the reaction mechanism. Structural studies of the intermediate enolate-complexes by single crystal X-ray analyses are being investigated.

(2) Development of the catalytic conjugate reduction with ethanol as a hydride source

Since the conjugate reduction of α,β -unsaturated compounds is extremely useful in synthetic organic chemistry, various methods have been developed. However, the use of toxic or explosive reducing agents is still the task to be solved. On the basis of our recent finding that Pd(II)-dppb complex and EtOH react to give a Pd-H species, we developed an efficient catalytic conjugate reduction of α,β -unsaturated ketones. Importantly, since safe and clean EtOH can be used as a solvent and a hydride source, this reaction is environmentally advantageous. We also developed an asymmetric version of this conjugate reduction using chiral Pd- μ -hydroxo complex. To confirm the synthetic utility of the reaction, a highly enantioselective synthesis of warfarin, a clinically important anticoagulant, was successfully demonstrated.

(3) Development of the catalytic asymmetric fluorination reaction using a novel Ni ternary system

Organofluorine compounds are important building blocks in the field of medicinal chemistry, and development of efficient fluorination reactions is highly desirable. In contrast to reactions of active methine compounds, there had been no example of α -monofluorination reactions of less reactive ester equivalents. This year, we found a novel Ni-based ternary system is highly effective for the catalytic asymmetric α -monofluorination reaction of carboxylic acid derivatives. This reaction proceeds smoothly to give the desired product in good yield with high enantioselectivity. Further studies to expand the scope of the reaction are in progress in our laboratory.

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

(1) Development of fluorescent-labeled chemical probes for analyzing the ligand binding of protein kinase C (PKC) C1 domains

Protein kinase C (PKCs) are the phospholipids- and calcium ion-dependent serine/threonine protein kinases. PKCs have two similar C1 domains, C1a and C1b, and the physiological ligand 1,2-diacylglycerol (DAG) and a natural product phorbol ester, known as a powerful tumor promoter, are known to bind to these C1 domains. Formation of the lipid-ligand-PKC ternary complex, caused by the ligand binding to C1 domains, is believed to be a key for the activation of this enzyme. To clarify the precise activation mechanism of PKCs, we have developed a novel type of C1 domain ligands, isobenzofuranone derivatives (IB derivatives). Competitive inhibition of [³H]PDBu (³H-labeled phorbol ester) binding to PKC is a useful method for evaluating the binding affinity of C1 domain ligands. However, recent studies showed that phorbol ester preferentially binds to PKC α C1b domain, and the assay using [³H]PDBu seemed to provide only the binding affinity to C1b domain.

We have already discovered that IB derivatives having *myo*-inositol derivatives (IB-*inositol* derivatives) at C7 of IB skeleton showed the remarkable activation ability of PKC α , whereas they have only weak binding affinity toward PKC α C1b domain. This fact suggests that

IB-inositol derivatives could preferentially bind to C1a domain of PKC α . To develop a new method for evaluating the binding affinity of the ligand molecules to C1a domain, we envisioned the development of fluorescent-labeled chemical probes based on the IB-inositol derivatives. This year, we have been working on the design and synthesis of the IB derivatives with fluorescent tag in inositol moiety of IB-inositol derivatives, expecting that such tag would interact with phospholipids. An IB derivative and hydrophobic fluorescent tag, BODIPY, was successfully connected by cross-metathesis reaction.

(2) Development of a new methodology for the comprehensive analysis of protein phosphatases using low-molecular inhibitors 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 originally developed by us. This year, many candidates of the probes were prepared, and their activity to several known phosphatases was evaluated.

We synthesized new compounds which were designed to make a covalent bond with dual-specificity protein phosphatases (DSPs) based on RK-682, a natural product isolated from *Streptomyces* sp. Among them, the enamide derivative RE20 was found to inhibit Cdc25, which is one of the members of DSPs, through a covalent bond with cysteine residue located at the active site of the enzyme. Furthermore, RE20 did not show any inhibitory activity to both tyrosine phosphatase PTP1B and serine/threonine phosphatase PP2A. These results indicated that RE20 is a DSP-specific inhibitor. Therefore, we synthesized a fluorescence-labeled RE20 derivative and carried out the comprehensive labeling of target proteins of RE20 in living cells. Gratifyingly, we found that a number of proteins were labeled in human leukemia HL-60 cells treated with the fluorescence-labeled RE20.

(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. Last year, we found 1,5-di-substituted cantharidin derivatives NCA-31 as an isozyme-selective inhibitor of PP2B, but its inhibitory activity was not sufficient. In this year, to address this issue, we designed and synthesized more sophisticated derivatives on the basis of docking models of the compounds with the active site of PP2B.

(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. Neu3 inhibitor is expected to be useful for not only the clarification of Neu3 function but also the treatment for diseases. Based on the substrate selectivity of Neu3, we designed "unhydrolyzable" ganglioside analogues. In this year, we achieved the synthesis of the several compounds designed as sialylgalactose analogues, in which sugars are linked with one carbon unit in place of the naturally occurring glycosyl bond. In addition, the synthesis of glycoconjugate with C20-ceramides was also achieved.

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) Subcellular localization of a fluorescent IM derivative

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 was found to localize in mitochondria.

(2) Identification of IM-binding protein 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.

(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 new cell systems.

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, rat pheochromocytoma PC12 cells 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.

Since the ATP mimics are considered to be unstable under basic or acidic conditions, the synthesis needs to be carried out using adequate combination of protecting groups which can be cleaved under the neutral conditions. We chose protecting groups removable by hydrogenolysis. In only 10 steps starting from inosine, we synthesized desired nucleoside derivatives bearing azide group in the amino-linker part, which is potentially applicable to the click chemistry. The resulting nucleoside derivatives were coupled with triphosphate analogs, which were prepared from hypophosphorous acid by our original method, affording protected ATP mimics. Finally, using the deprotection conditions established in our group, we successfully completed the synthesis of the designed ATP mimic in excellent yield.

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

(1) Synthesis and biological evaluation of reveromycin A and spirofungin A derivatives

Reveromycin A is a 6,6-spiroacetal 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. The 2,3-dihydroreveromycin A and 4-hydroxyreveromycin A were synthesized and found to strongly inhibit both the isoleucyl-tRNA synthetase activity and the cell death inducing activity to mature osteoclasts. The succinates of the tertiary alcohols were conveniently constructed by oxidative cleavage of the dihydropyran obtained via the Negishi coupling using zinc homoenolate.

(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 2,5-disubstituted 4-pyrone derivative which includes a 3-substituted dienone attached to a linear fatty acid and *N*-succinyl amide group. We have synthesized the 2,5-disubstituted 4-pyrone from the 4-hydroxy-2-pyrone and the 4-pyrone functional groups were modified.

(3) Research on the development of an anti-obesity and a new lead chemical for medicine

The mode of action of the hypolipidemic effect of 5-campestenone, a derivative of campesterol, was investigated. Sprague-Dawley rats were fed on the 0.2% 5-campestenone-added feed for 14 days. Lipid balance in the liver was examined using a liver perfusion system. Dietary 5-campestenone markedly elevated hepatic ketone body production, while cumulative secretion of triglyceride (TG) cholesterol, and phospholipid were all significantly lowered; the extent of the reduction was more prominent in the secretion of TG than other lipid components. In addition, the reduction of TG secretion was accompanied by the reduced incorporation of both exogenous and endogenous fatty acids into this lipid molecule. These results suggest that dietary 5-campestenone exerts its hypolipidemic effect through an enhanced metabolism of fatty acid to oxidation and the reduced synthesis and secretion of esterified lipids, especially TG, in rat liver.

(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. This year, we aimed at the establishment of synthetic methodology for construction of a unique right fragment of physalins, and we achieved the synthesis of a key intermediate via Diels-Alder reaction.

Staff

Head

Dr. Mikiko SODEOKA

Members

Dr. Takeshi SHIMIZU

Ms. Hiroko MATSUKURA

Dr. Go HIRAI

Dr. Yoshitaka HAMASHIMA

Ms. Kumiko HARATA

Dr. Kosuke DODO*¹

Dr. Mamoru SHIMIZU*¹

Dr. Yuko OTANI*²

Dr. Yasunori MORI*²

Dr. Yasunori TSUCHIYA*²

Dr. Thomas SEIDEL*²

Dr. Tadashi SHIMIZU*³

Dr. Ayako TSUCHIYA*³

Dr. Christian DUBS*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)

Visiting Members

Ms. Fumie OHNUMA (Science Service)
Dr. Toshiro SUENAGA (Sankyo Kasei Kogyo)
Dr. Kazuo NAGASAWA (Tokyo Univ. Agri. Tech.)
Dr. Sayoko HIRANUMA (Technoflora Co.)
Mr. Yasunobu KANEKO (Technoflora Co.)
Dr. Rie KONNO (Technoflora Co.)
Dr. Kunio SUZUKI (Technoflora Co.)

Trainees

Mr. Toshiaki SUZUKI (Fac. Eng., Tohoku Univ.)
Mr. Toru WATANABE (Fac. Eng., Tohoku Univ.)
Mr. Megumi OHKUBO (Fac. Eng., Tohoku Univ.)
Mr. Katsunori MURAKOSHI (Fac. Eng., Tokyo Denki Univ.)
Ms. Natsuko UMEBAYASHI (Fac. Eng., Tohoku Univ.)
Ms. Christine BEEMELMANN (Fac. Chem., RWTH, Aachen Univ. Tech.)
Mr. Yusuke KOYAMA (Fac. Eng., Tokyo Univ. Sci.)
Mr. Kohei MATSUSHIGE (Fac. Eng., Tokyo Denki Univ.)