

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

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、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、いまだその分子機構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。現在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ている。

細胞死研究の一環として、天然物やその誘導体により誘導される細胞死のメカニズム解明も行っている。*Chaetomium minutum*属の菌から単離された天然物chaetocinに関しては、その誘導体に天然物以上のアポトーシス誘導活性を見出し、その作用機序解明を目指した研究を行っている。また、天然由来の不飽和脂肪酸 $\gamma$ -linolenic acid (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が、その作用機序は明らかとなっていない。そこで、我々は系統的に合成したGLA誘導体から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している。

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。

研究年報

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

大腸菌で発現精製したIM誘導体の結合タンパク質に関して、IM誘導体が結合する部位を同定することを目指した。IM誘導体に各種反応性官能基を導入し、結合タンパク質と共有結合を形成させた後、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。本年度は反応性官能基に関して検討を行い、いくつかの修飾残基を同定することができた。また、タンパク質とIM誘導体の相互作用をNMRで解析するためのプローブ分子もいくつか合成し、その解析を進めている。

(2) NT化合物の結合解析 (安藤、浅沼、岡崎、閼闔、袖岡)

NT化合物の結合タンパク質に関して、二次元電気泳動を用いて網羅的に検出する系を確立した。これを用いて複数のNT化合物でその結合タンパク質群を比較することで、ネクロシス誘導に重要なタンパク質を絞り込むことに成功した。さらに、これらタンパク質のNT化合物の結合部位に関して、質量分析装置での同定を検討した。

(3) IM誘導体およびNT化合物結合タンパク質の機能解析 (岡崎、安藤、井内、閼闔、袖岡)

これまでに大腸菌での発現精製に成功したIM誘導体およびNT化合物の結合タンパク質に関して、その機能解析を行った。その結果、大腸菌で発現したタンパク質が正常に機能していることが確認できた。本機能に対する化合物の影響を今後調べる予定である。

(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、閼闔、袖岡；清水 (東京医歯大))

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、両化合物がミトコンドリアの膜上のタンパク質複合体に影響し、膜の透過性を変化させることが明らかになった。

(5) Chaetocin誘導体の細胞死誘導機構の解明 (藤、井内、岩佐、藤城、濱島、閼闔、袖岡)

昨年度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事を明らかにした。本年度はそのメカニズム解明を目指し、chaetocinが作用すると報告されている細胞内因子に対する*ent*-chaetocinの影響を調べた。その結果、細胞内活性酸素種が*ent*-chaetocin処理により低下するという興味深い現象を見いだした。

(6)  $\gamma$ -Linolenic acid (GLA) 誘導体の合成および活性評価 (佐藤 (綾)、田村、閼闔、袖岡；橋本 (東大分生研)、榎島 (日大医))

昨年度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。そこで、本年度は得られた化合物の細胞での活性を調べ、いくつかの誘導体で細胞死誘導活性を確認した。さらに、核内受容体スーパーファミリーの一つであるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) を活性化する化合物も見出した。

(7) 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 (浅沼、山口、安藤、宮崎、早水、江上、閼闔、袖岡)

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目指した。その結果、アルキンを含む低分子化合物をコバルト錯体が固定化されたビーズを用いて精製する手法を確立した。さらに、本手法を修飾ペプチドの精製法へと展開すべく、モデルペプチドの合成を行った。今後これを用いて条件の最適化を目指す予定である。また、修飾ペプチドの高感度での検出を目指して新しいHPLCシステムを検討し、その構築に成功した。

(8) 生物活性化合物の新規イメージング技術の開発 (山越、安藤、閼闔、袖岡；岡田、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目指した。ラマン顕微鏡を用いて、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としてアルキンを見いだした。さらに、このアルキンを有するDNAの構成因子のミミックであるEdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) が核に取り込まれる様子をラマン顕微鏡で観察することに成功した。

## 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

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、平井、袖岡）

当研究室では天然物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誘導体を開発した。昨年度はVHR選択的阻害剤であるRE12のさらなる阻害活性向上と物性改善を目的として、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た誘導体の開発を検討した。今年度も引き続き詳細な構造活性相関を検討し、側鎖構造によってVHR阻害活性が大きく変化することがわかった。またRE12のClogP値を約2下げ、RE12とほぼ同程度の阻害活性を有する新規RE誘導体を見出すことに成功した。一方CDC25Bの阻害剤RE44については、LBプロットによる阻害形式の解析、界面活性剤存在下での阻害活性を詳細に検討した。

(2) (S)-CHF-連結型シアリルガラクトース誘導体の合成（西澤、加藤、平井、袖岡）

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のシアリ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完全には明らかにされていない。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リ酸C-グリコシド結合構築法を開発し、CF<sub>2</sub>-シアロシド結合、CH<sub>2</sub>-シアロシド結合、さらに(R)-CHFシアロシド結合の構築に成功している。残る(S)-CHF-連結型シアロシド構築には、(Z)-モノフルオロメチレン基を有するガラクトース誘導体の合成が必要であった。そこで、今年度は鍵反応であるブロモフルオロメチレン化反応を種々検討し、高収率、高選択性で望むガラクトース誘導体を合成する手法を確立した。またこの際、シリル系保護基の違いにより、立体選択性が大きく異なるという興味深い知見や、簡便かつ迅速に反応が進行する新規ブロモフルオロメチレン化条件も見出した。

(3) CHF-連結型、CH<sub>2</sub>-連結型ガングリオシドGM3の合成研究（加藤、西澤、大沼、平井、袖岡；宮城（東北薬科大））

昨年度までに当研究室では、CF<sub>2</sub>-連結型ガングリオシドGM3の合成とNEU3阻害活性評価を完了している。今年度は、CH<sub>2</sub>-連結型、およびCHF-連結型GM3アナログの両ジアステレオマーの合成に世界で初めて成功した。合成したGM3アナログの生物活性評価は現在検討中であるが、予備的データより、これらGM3アナログが顕著なEGFR自己リン酸化阻害活性を示すことを見出した。

(4) 糖骨格に由来する特異なS<sub>N</sub>2'反応を利用したCF<sub>2</sub>連結型2糖ユニットの合成（酒井、平井、袖岡）

昨年度までに、特異なS<sub>N</sub>2'反応を利用して代謝安定型のCF<sub>2</sub>-連結型2糖骨格を簡便に合成できる手法を確立している。今年度は、2糖構造の変換について詳細な検討を開始した。

(5) 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、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。昨年度は、当研究室で開発した新規PKCα阻害剤IB-15Aのアセトアミド部分の構造活性相関を検討し、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を見出している。今年度は、さらに構造活性相関研究を進め、モノメトキシアセトアミド体（IB-26A）やジメトキシアセトアミド体（IB-27A）といった、α位に酸素原子を有する誘導体がPKCα阻害活性を示すことを見出した。またIB-15AのPKCαに対する結合部位を同定するため、求電子性のホルミル基を導入したオキソアセトアミド体（IB-24A）やフォトアフィニティーラベリングが可能と考えられるジアゾアセトアミド体（IB-28A）の合成を達成した。現在、これらの阻害活性について検討している。

(6) フィサリン類の全合成研究（森田、平井、袖岡）

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- $\kappa$ B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、全合成に向けて、DEFGH環部ユニットとC環部ユニットの連結法を検討した。

(7) 高度に酸化されたステロイドライブラリーの構築 (小沢、大沼、平井、袖岡)

フィサリン類の標的タンパク質と生物活性発現機構の解明を目的に、全合成研究から提供される化合物だけでなく、世界中に豊富に存在しているホオズキからのフィサリン類縁体のライブラリー構築を目指した。今年度中に観賞用ホオズキ (*Physalis alkekengi* var. *franchetii*) からフィサリン骨格を有する化合物を、また食用ホオズキ (*Physalis peruviana*) からウィザノリド骨格を有する化合物を単離した。これら天然物と合成中間体のNF- $\kappa$ Bカスケード活性化に対する阻害活性について検討した。

(8) SUMO化阻害剤スペクトマイシン類の合成研究 (Thuaud、Cruchter、平井、袖岡)

スペクトマイシン類は、1994年にRinehartらによってバクテリアの1種から単離された天然物である。最近、伊藤、吉田 (吉田化学遺伝学研究室) らによって、2量体構造を有するスペクトマイシン B1がタンパク質SUMO化を阻害することが見出された。我々は、スペクトマイシン類の合成供給と構造活性相関研究を志向し、全合成研究に着手した。今年度は、スペクトマイシン類のコア部分に存在する2つの立体中心をジアステレオ選択的なピナコールカップリングを利用して構築することを主に検討した。

(9) マイトトキシンの全合成研究 (齊藤竜、袖岡)

1993年に単離されたマイトトキシンは、生体高分子を除く天然物では最大の分子量を持ち、最強の毒性を有していることから注目を集めている。マイトトキシンは疎水性部位と親水性部位に大きく分けることができ、各部位の毒性発現への関与は大きく異なることが予想される。本年度は疎水性部位の合成において最難関部位であるB'環の合成を目指し、クロスカップリング反応を基盤とした新規エーテル環連結法の開発を検討した。

### 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、江上、Lectard、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。その有機分子骨格にフッ素を導入する1つの手法として、近年トリフルオロメチル化反応が着目されている。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、昨年度開発したインドール類のトリフルオロメチル化反応で得た知見を基に、アリルシランのトリフルオロメチル化反応を検討した。その結果、銅触媒を用いることで効率的に所望の反応が進行することを見出した。興味深いことに、基質の構造に依存して生成する化合物がスイッチングすることを発見し、さらにはそれぞれの生成物の特異な反応性を見出すことに成功した。

また、 $\alpha$ -ケトエステルの触媒的不斉モノフッ素化反応により得られる $\beta$ -フルオロ- $\alpha$ -ケトエステルの誘導体化についても検討を行った。その結果、触媒的不斉モノフッ素化反応終了後に、ワンポットで適切な還元剤と反応させる事により、*anti* 体、*syn* 体の $\beta$ -フルオロ- $\alpha$ -ヒドロキシエステルを選択的に作り分けられる事を見出した。更にこれらの化合物は、異性を伴うことなく、 $\beta$ -フルオロ- $\alpha$ -アミノエステルに変換することもできた。

(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、五月女、袖岡)

$\alpha$ -ケトエステルは、エステルによりケトン部位が活性化された基質であることから、これまで多くの場合、求電子剤として触媒的不斉反応に用いられてきた。一方、我々は、新たに開発したニッケル錯体触媒を用いて $\alpha$ -ケトエステルから選択的にエノラートを発生させることで、 $\alpha$ -ケトエステルを求核剤として触媒的不斉反応に適用できることを報告している。そこで本年度は、ニッケル錯体触媒を用いる $\alpha$ -ケトエステル類の触媒的不斉共役付加反応の拡張研究として新たな求電子剤の適用の検討を行い、本触媒システムは連続する不斉点を有する数種の新規不斉骨格構築するために有用であることが示された。

(3) 遷移金属触媒を用いる触媒的不斉酸化反応の開発 (Akindele、五月女、袖岡)

我々はこれまでに、酸・塩基触媒として機能する遷移金属錯体を開発し、種々の触媒的不斉反応の開発を行ってきた。本触媒の更なる新しい反応性を開拓するために、遷移金属錯体を用いる酸化的不斉反応の開発に取り組んだ。本年度は、遷移金属触媒を用いる酸素分子の活性化について検討を行った。

(4) 新規二核錯体の設計と合成 (江上、袖岡)

様々な有機分子を酸化的に変換する酵素には、鉄や銅といった地球上に大量に存在する普遍金属をその活性中心に有するものが多く存在する。しかしながら人工的にこれらの反応を実現することはまだまだ困難である。そこで我々は **この問題を解決するため**、本年度は種々の錯体設計、合成を行った。

-----

### Key Sentences :

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 Words :

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 research areas 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 the design and synthesis of intracellular signal transduction modulators and their application to 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 for the clarification of the functions of their target enzymes are of particular interest. Clarification of the 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 analogues and several other natural products having interesting biological activities.

#### 1. Development and Mechanistic Studies 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 aim to 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. However the molecular basis of necrosis remains to be elucidated. Therefore, using IM derivatives and NT derivatives as biological tools, we intended to clarify the molecular mechanism of necrosis.

We are also focusing on cell death induced by natural products and their derivatives. In the previous fiscal year, analogues of chaetocin, which belongs to a family of mycotoxins isolated from *Chaetomium minutum*, were found to have stronger apoptosis-inducing activity than natural chaetocin. We planned to clarify the mechanism of apoptosis induced by chaetocin analogues.  $\gamma$ -Linolenic acid (GLA) has been reported to kill tumor cells without affecting normal cells, but the molecular mechanism of action has not yet been 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.

Clarification of the binding proteins and cellular localization of cell death control molecules is of key significance in these studies. However, there are various difficulties encountered in their clarification using traditional methods. We are also planning to develop new chemical methods in order to achieve more efficient identification of the binding proteins.

1) Identification of the IM-binding site (Yamaguchi, Asanuma, Okazaki, Dodo, Sodeoka; Tochio, Kigawa (NMR Pipeline Methodology Research Team))

By using IM-binding proteins obtained from *E. coli*, we planned to identify the IM-binding site. We designed and synthesized novel IM derivatives having various reactive functional groups. After their reaction with IM-binding proteins, we tried to identify the modified amino acids by mass spectrometric analysis. As a result, we succeeded in the identification of some modified residues. On the other hand, we tried NMR analysis of the purified proteins complexed with IM derivatives.

2) Analysis of NT-binding sites and proteins (Ando, Asanuma, Okazaki, Sodeoka)

By using 2D electrophoresis, we succeeded in the global analysis of NT-binding proteins. Comparative analysis of some NT compounds revealed the candidate protein mediating necrosis induced by NT compounds. Moreover, to identify the binding site of NT compounds, we carried out the mass spectrometric analysis of NT-modified proteins.

3) Functional analysis of IM- and NT-binding proteins (Okazaki, Ando, Iuchi, Dodo, Sodeoka)

By using IM- and NT-binding proteins obtained from *E. coli*, we analyzed their reported function. As a result, we were able to confirm that these proteins were functioning normally and are currently planning to examine the effects of the IM and NT compounds on them.

4) Mechanistic studies using isolated mitochondria (Iuchi, Dodo, Sodeoka; Shimizu (Tokyo Medical and Dental University))

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 on mitochondrial membranes and modify the permeability of the mitochondrial membrane.

5) Cell death inhibition by chaetocin analogues (Teng, Iuchi, Dodo, Sodeoka)

In the previous fiscal year, we found that *ent*-chaetocin, an enantiomer of chaetocin, was more potent for apoptosis induction than naturally occurring chaetocin. To clarify the molecular mechanism of apoptosis induced by *ent*-chaetocin, we examined its effects on various cellular factors. As a result, *ent*-chaetocin was found to reduce cellular ROS.

6) Synthesis and evaluation of GLA-related compounds (Sato, Tamura, Dodo, Sodeoka; Hashimoto (IMCB, University of Tokyo); Makishima (Nihon University of Medicine))

In the previous fiscal year, we succeeded in the synthesis of hypothetical GLA metabolites designed from the metabolites of arachidonic acid. This year, we examined the activities of these compounds in cells, and some compounds were found to have the cell-death-inducing activity. Moreover, we obtained some compounds having agonistic activities against peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).

7) Development of novel chemical methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds (Asanuma, Yamaguchi, Ando, Miyazaki, Hayamizu, Egami, Dodo, Sodeoka)

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 by cobalt-complex-immobilized beads. We are currently synthesizing a model peptide in order to apply this method for the purification of labeled peptides. Future work will involve use of this peptide to conduct optimization studies. Moreover, to detect the modified peptides, we succeeded in establishing a new HPLC system.

8) Development of a novel imaging method for the determination of cellular localization of bioactive compounds (Yamakoshi, Ando, Dodo, Sodeoka; Okada, Palonpon, Fujita, Kawata (Osaka University))

We planned to develop a novel Raman imaging method for the determination of cellular localization of bioactive compounds. By using a Raman microscope, the alkyne group was found to have strong Raman scattering in the silent region, in which endogenous molecules showed no Raman peaks.



Moreover, EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), a mimic of a DNA component having an alkyne group, was successfully detected in live cells.

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

Protein phosphorylations are well recognized as one of the most important post-translational modification for regulating intracellular signal transduction. Many kinds of molecules are involved in protein phosphorylations, and protein kinases and protein phosphatases act as key central enzymes for tuning the phosphorylation signals. Numerous efforts have been made by means of molecular biology and biochemistry for analyzing the function of protein phosphorylation. However, due to the complexity of the network systems in protein phosphorylations, there still remains space for further research towards the clarification of the precise roles of molecules regulating protein phosphorylation. 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 the clarification of the function of the proteins involved in protein phosphorylations, but for 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, Hirai, Sodeoka)

We have developed novel types of cell-permeable dual-specificity protein phosphatase inhibitors, RE derivatives, which have a neutral core structure. Last year, in order to improve the inhibitory activity of RE12 at the cell level as well as its physical property, replacement of the long hydrophobic alkyl chain of RE12 with other hydrophobic functionalities was investigated. Continuous investigation on the structure-activity relationship of this side chain revealed that the change of the side chain structure affected the inhibitory activity for VHR and resulted in the new derivatives showing similar inhibitory potency with RE12 but having the ClogP lowered by a value of two relative to RE12. For the CDC25B inhibitor RE44, analyzing the inhibition pattern by LB plotting and inhibition potency in the presence of detergents was investigated.

2) Synthesis of the (S)-CHF-linked sialylgalactose derivative (Nishizawa, Kato, Hirai, Sodeoka)

Ganglioside GM3 is thought to be involved in the suppression of cell proliferations through the interaction with EGFR and inhibition of auto-phosphorylation. On the other hand, human sialidase NEU3 hydrolyzes terminal sialic acids in gangliosides such as GM3. It was reported that NEU3 is up-regulated in the plasma membrane of various cancers, and promotes the cancer malignancy through enhancements of motility, invasion of tumor cells as well as suppression of apoptosis. But the precise molecular mechanism is not fully understood. Focusing on the substrate selectivity of NEU3, we designed "unhydrolyzable" ganglioside analogues as molecular probes for the clarification of the relationship between the metabolism of GM3 by NEU3 and the function of NEU3. We have already established a synthetic methodology for constructing  $\alpha$ -selective C-sialosides and have achieved the synthesis of sialylgalactose analogues possessing CF<sub>2</sub>-sialoside, CH<sub>2</sub>-sialoside, and (*R*)-CHF-sialoside linkages. To synthesize the remaining (*S*)-CHF-sialoside linkage, galactose derivatives having the (*Z*)-fluoromethylene unit should be prepared stereoselectively. This year, we examined the key bromofluoromethylation reaction for the galactose derivatives and found that this methodology afforded the desired compound in high yield and stereoselectivity. During the course of this examination, we also found the characteristic effect of the neighboring silyl protective group on the stereoselectivity in bromofluoromethylation. We also found a new simple method for the bromofluoromethylation reaction of aldehydes.

3) Synthesis of novel ganglioside analogues focused on the clarification of human sialidase NEU3 function (Kato, Nishizawa, Oonuma, Hirai, Sodeoka; Miyagi (Tohoku pharmaceutical University))

We have already completed the synthesis and the evaluation on the inhibitory activity for NEU3 of GM3 analogues possessing the CF<sub>2</sub>-sialoside linkage. This year, we succeeded in the first synthesis of the CH<sub>2</sub>-linked and the two diastereomers of CHF-linked GM3 analogues. The preliminary results on the effect of synthesized GM3 analogues suggested that these GM3 analogues showed remarkable inhibitory effect for the EGF-receptor tyrosine auto-phosphorylations.

- 4) Synthesis of the CF<sub>2</sub>-linked disaccharide unit utilizing the unique S<sub>N</sub>2' reaction arising from the sugar structure (Sakai, Hirai, Sodeoka)

We have established methodologies to construct the CF<sub>2</sub>-linked disaccharide unit through the S<sub>N</sub>2' reaction. This year, we started to examine the transformation of the CF<sub>2</sub>-linked disaccharide unit.

- 5) Studies on the molecular mechanism of PKC $\alpha$  inhibition by novel isobenzofuranone derivatives (Sakai, Tamura, Hirai, Sodeoka)

Protein kinase C (PKC) is a family of kinases that play important roles in intracellular signal transduction. Last year, structure-activity relationship studies of the amide functionality in the new PKC $\alpha$  inhibitor IB-15A, which was originally developed in this laboratory, revealed that a larger substituent on the  $\alpha$ -position of the amide group weakened their PKC $\alpha$  inhibitory activity. This year, we continued the structure-activity relationship studies and found unexpectedly that monomethoxy-acetamide (IB-26A) and dimethoxy-acetamide (IB-27A) shows weak inhibitory activity for PKC $\alpha$ . To analyze the binding site of IB-15A towards PKC $\alpha$ , synthesis of electrophilic formyl derivative (IB-24A) and the diazo-acetamide derivative (IB-28A), which are expected to be used for the photo-affinity labeling method, was achieved. Currently the inhibitory activity of these compounds is under investigation.

- 6) Synthetic studies of physalins (Morita, Hirai, Sodeoka)

Physalins are highly-oxygenated steroidal constituents of the *Physalis* plants possessing a novel 13,14-seco-16,24-cycloergostane skeleton. As they show antitumor and inhibitory activities on the NF- $\kappa$ B cascade, we launched a synthetic study of physalins to elucidate the relationship between their unique structural features and biological activities. This year, we examined methodologies to create the connection between the DEFGH-ring unit and the C-ring unit towards the total synthesis of physalins.

- 7) Library construction of highly-oxygenated steroids from *physalis* plants (Ozawa, Oonuma, Hirai, Sodeoka)

To further pursue research regarding the identification of the target protein and the molecular mechanism of physalins, we constructed a library of physalin derivatives from the world-famous *Physalis* plants. This year, phytochemical investigations of ornamental Hozuki (*Physalis alkekengi* var. *franchetii*) and edible Hozuki (*Physalis peruviana*) resulted in the isolation of physalins and withanolides, respectively. Inhibitory activities of library compounds including synthetic intermediates from the synthetic studies of physalins, towards NF- $\kappa$ B activation were investigated.

- 8) Synthetic studies of a novel SUMOylation inhibitor, spectomycin B1 (Thuaud, Cruchter, Hirai, Sodeoka)

Spectomycins (A1, A2 and the dimeric structure B1) are natural products isolated from bacteria in 1994 by Rinehart and collaborators. Recently, Yoshida and co-workers (chemical genetics laboratory) showed that spectomycin B1 exhibits inhibitory activity for protein SUMOylation. To obtain the spectomycin derivatives and investigate the structure-activity relationships, we started research towards the total synthesis of spectomycins. We planned to synthesize the core structure of spectomycins with a diastereoselective pinacolic coupling.

- 9) Synthetic studies of maitotoxin (T. Saito, Sodeoka)

Maitotoxin, isolated in 1993, is the most toxic and largest natural product known so far, apart from biopolymers, such as proteins or polysaccharides. Furthermore, the amphiphilic nature of maitotoxin, which contains two uneven polar domains are each expected to contribute differently to the onset of toxicity. This year, we investigated a new coupling strategy for the construction of the most challenging B' ring, based on the cross coupling reaction.

### 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-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, Egami, Lectard, Sodeoka)



Organofluorine compounds are important building blocks in the field of medicinal chemistry as well as material sciences. Therefore, the development of new methodologies for the construction of fluorinated compounds is highly desirable. Trifluoromethylation has recently attracted attention as a useful method for introducing fluorine atoms into the organic framework. Development of new trifluoromethylation reactions having higher applicability is required, because the methodology has been rather limited. This year, we examined the trifluoromethylation of allylsilane derivatives and succeeded in developing the desired reaction catalyzed by copper salt. Interestingly enough, product switching was observed, and the product outcome was dependent on structure of the substrate. In addition, we succeeded in finding novel and unique reactions using these trifluoromethylated products.

The catalytic enantioselective mono-fluorinations of  $\alpha$ -ketoesters have also been achieved. The obtained  $\beta$ -fluoro- $\alpha$ -keto esters can be converted to the corresponding  $\beta$ -fluoro- $\alpha$ -hydroxy esters in an either *anti* or *syn*-selective manner. Furthermore, both *anti* and *syn*- $\beta$ -fluoro- $\alpha$ -hydroxy esters have also been successfully transformed to the corresponding  $\beta$ -fluoro- $\alpha$ -amino esters without loss of their diastereoselectivity.

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

$\alpha$ -Ketoesters have often been utilized as an electrophile owing to their high reactivity of the ketone moiety. In sharp contrast, we have recently developed an efficient strategy for the selective formation of transition metal enolates from  $\alpha$ -ketoesters, facilitating the catalytic asymmetric conjugate addition of  $\alpha$ -ketoesters to nitroalkenes. In order to extend this strategy, we searched other electrophiles for the development of a new variant of conjugate addition of  $\alpha$ -ketoesters, leading to find several classes of C–C bond-forming reactions that enable access to structurally complex molecules having multiple contiguous stereocenters.

3) Synthetic methodologies for oxidative functionalization of small molecules using transition metal catalysts (Akindele, Sohtome, Sodeoka)

We have developed a variety of catalytic asymmetric reactions by exploiting transition metal complexes that can act as an acid-base catalyst. To further expand this concept, we focused on the development of a new methodology for the oxidative functionalization of small molecules by utilizing transition metal catalysts. This year, we examined the feasibility to activate molecular oxygen by utilizing transition metal catalysts developed in our group.

4) Design and synthesis of new dinuclear complexes (Egami, Sodeoka)

Many enzymes which have the ability to introduce oxidative transformations of organic compounds contain ubiquitous metals, such as iron and copper in its active center. However, many difficulties are encountered when an artificial catalyst is used in the place of enzymes. To overcome this situation, we designed and synthesized some new complexes this year.

***Principal Investigator***

袖岡 幹子 Mikiko Sodeoka

***Research Staff***

平井 剛 Go Hirai  
闔闔 孝介 Kosuke Dodo  
五月女 宜裕 Yoshihiro Sohtome  
斉藤 竜男 Tatsuo Saito

Sylvain Lectard

Frederic Thuaud

小沢 正晃 Masaaki Ozawa

***Students***

加藤 麻理依 Marie Kato  
氷室 真史 Masafumi Himuro  
成子 朗人 Akito Naruko  
清水 怜 Ryo Shimizu  
早水 健二 Kenji Hayamizu  
森田 昌樹 Masaki Morita  
内田 貴子 Takako Uchida  
江越 脩祐 Syusuke Egoshi  
藤城 信哉 Shinya Fujishiro  
務台 陽輔 Yosuke Mutai  
西澤 絵里 Eri Nishizawa  
酒井 基成 Motonari Sakai

Thomas Cruchter

中村 元太 Genta Nakamura

***Assistant and Part-timer***

大沼 可奈 Kana Oonuma  
斉藤 泉 Izumi Saito

***Visiting Members***

田村 結城 Yuki Tamura  
井内 勝哉 Katsuya Iuchi  
江上 寛通 Hiromichi Egami

佐藤 綾人 Ayato Sato

Tito Akindele

山越 博幸 Hiroyuki Yamakoshi

山口 卓男 Takao Yamaguchi

安藤 潤 Jun Ando

岡崎 正晃 Masateru Okazaki

宮崎 亜矢子 Ayako Miyazaki

日比野 泰男 Yasuo Hibino

姜 文一 Moon-Il Kang

浅沼 三和子 Miwako Asanuma

中田 忠 Tadashi Nakata

藤田 克昌 Katsumasa Fujita

濱島 義隆 Yoshitaka Hamashima

土屋 綾子 Ayako Tsuchiya

滕 玉鷗 Yuou Teng

上田 実 Minoru Ueda

山下 修治 Shuji Yamashita

千原 貞次 Teiji Chihara

長澤 和夫 Kazuo Nagasawa