

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。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。

- (1) 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、姜、闖闖、袖岡）

昨年度に引き続き、大腸菌で発現精製した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。さらに細胞にこれらタンパク質に蛍光タンパク質を融合させたものを発現させ、その機能の評価する系も構築した。今後これらの系で化合物の活性を調べる予定である。

(2) 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(斎藤、中西、井内、闔闔、袖岡;清水(東京医歯大))

IM誘導体およびNT化合物がミトコンドリアに及ぼす影響を解析することを目指し、単離ミトコンドリアおよび培養細胞を用いて解析を行った。その結果、両化合物がミトコンドリアの膜透過性を変化させることや、いくつかの生体内因子がその変化に影響を及ぼすことが明らかになった。

(3)  $\gamma$ -Linolenic acid (GLA) 誘導体の合成および活性評価(佐藤、田村、闔闔、袖岡)

本年度は昨年度に引き続き、アラキドン酸の代謝経路をもとに設計・合成したGLAの推定代謝産物の活性を調べ、いくつかの生物活性を見出した。一方でGLAを修飾した化合物も合成し、その細胞死誘導活性を調べることで、基礎的な構造活性相関を明らかにした。

(4) 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規アフィニティー精製法の開発(宮崎、早水、浅沼、江上、闔闔、袖岡)

低分子化合物の結合タンパク質および結合部位の同定を目指し、低分子化合物に導入可能な新しいタグ分子とそのアフィニティー精製法を検討した。すでにアルキンをタグ分子としてコバルト錯体が固定化されたビーズで精製する手法を確立しており、本年度はビーズより溶出させる条件を検討し、一定の知見を得ることができた。本年度は、さらに新しいタイプのタグ分子と金属錯体の組み合わせも検討した。

(5) 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規標識法の開発(山口、安藤、浅沼、中西、斎藤、山越、岡崎、闔闔、袖岡)

低分子化合物の結合タンパク質および結合部位の同定を目指し、新規標識法の開発を検討した。新しい標識官能基および標識官能基の新しい検出法、双方からのアプローチを展開した。その中で本年度は既存のタグ分子に反応性を付与することで新しい標識法を開発することに成功した。さらに既存の標識分子の新しい検出法を開発することで、化合物で修飾されたペプチド断片を効率的に検出・同定することに成功した。

(6) 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、闔闔、袖岡;Palonpon、藤田、河田(阪大))

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。これまでに、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出している。本年度はさらに様々な官能基のラマン散乱強度を比較し、ラマンで検出可能なタグ分子「ラマンタグ」を種々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

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(小嶋、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に成功した。今年度は、新たに開発した合成法を元に、9種の誘導体を合成し、そのVHR阻害活性を評価した。

(2) ハロゲン化エポキシドのユニークな反応の発見(西澤、平井、袖岡)

我々は代謝安定型GM3アナログの開発を検討してきた。その合成の課程で、ガラクトース誘導体のケトンからプロモフルオロメチレン化を検討した。目的物を得る条件を確立できたが、少し条件を変更すると目

的物ではなく $\alpha$ -ブromo酸フッ化物が生じた。本年度は、鍵中間体としてハロゲン化エポキシドが生成していると考え、本反応経路の検証と基質適用範囲の拡大に取り組んだ。

(3) シアリダーゼ耐性型ガングリオシドGM3アナログの活性評価 (加藤、西澤、大沼、平井、袖岡; 宮城(東北薬科大))

ガングリオシドGM3は細胞膜マイクロドメインの構成要素の一つであり、EGFRと相互作用して自己リン酸化シグナルを抑制するなど、細胞内シグナル伝達に深く関与していることが示唆されている。GM3は形質膜に局在するシアリダーゼNEU3によって加水分解され、異なる機能を有するラクトシルセラミドへと変換されてしまうため、GM3の機能とその発現メカニズムの解明は非常に困難な課題である。我々はマイクロドメインにおけるGM3の機能解明に向け、「加水分解されない」ガングリオシドGM3アナログを分子プローブとして考案した。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、CF<sub>2</sub>-連結型、CH<sub>2</sub>-連結型、立体化学の異なる(R)-および(S)-CHF-連結型の、計4種のシアリダーゼ耐性型GM3アナログの合成に成功している。今年度は合成したGM3アナログのシアリダーゼ阻害活性を評価した。これらGM3アナログは濃度依存的にNEU3活性を阻害したことから、GM3ミミックとして認識され、シアリダーゼ耐性型アナログとして機能することが示唆された。

(4) 代謝安定型ガングリオシドGM3を基盤とする機能性プローブの創製 (太田、加藤、平井、袖岡)

当研究室で開発した代謝安定型GM3を利用すれば、細胞膜表層でGM3と相互作用するタンパク質の解析が可能になると期待した。今年度は光親和性プローブの創製を目指し、アルキン部を脂質部に有するアナログの合成法を検討した。

(5) 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)

これまでに、特異なS<sub>N</sub>2'反応を利用した代謝安定型のCF<sub>2</sub>-連結型2糖骨格の簡便な構築法を確立している。今年度は、2糖構造の糖骨格を利用した立体選択的な官能基の導入について詳細に検討した。

(6) 新規イソベンゾフラノン誘導体のPKC $\alpha$ 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PKC $\alpha$ 阻害剤IB-15Aの、PKC $\alpha$ に対する結合部位同定に向けたプローブを開発した。今年度はそれらの阻害活性を評価し、光親和性基を有する化合物 (IB-29A) が、IB-15Aと同等の阻害活性を持つことを見出した。また表面プラズモン共鳴を用いた結合解析の結果、PKC $\alpha$ のC1aドメインとホスファチジルセリンが結合し、IB-15Aはその結合を阻害する可能性が示唆された。

(7) 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、AB環部の構築法を検討した。

(8) 高度に酸化されたステロイドライブラリーの活性評価 (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。

(9) SUMO化阻害剤スペクトマイシン類の合成研究 (Thuaud、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B1の半分の構造に相当するスペクトマイシンA1の合成を検討した。

(10) In-cell NMRに用いる常磁性プローブの合成研究 (彦根、平井、袖岡; 伊藤 (首都大学東京))

NMRを用いた蛋白質の立体構造解析において、特定のアミノ酸残基にランタノイドイオンを固定させると、PCS (pseudocontact shifts)、RDC (residual dipolar coupling) 等の立体構造情報が得られることが知られている。本年度は、DOTA骨格を持つ常磁性プローブとIn-cell NMRに利用可能な改良型プローブの合成を検討した。

#### (11) マイトトキシンの全合成研究 (齊藤(竜)、袖岡; 中田)

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鈴木-宮浦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を開発し最難関部位であるB'環の合成を行った。

#### (12) タンパク質メチル化検出法の開発 (Barjau、五月女、袖岡)

エピジェネティクス研究を推進するためには、タンパク質翻訳後修飾反応の高感度検出法の開発が重要である。特に、近年注目を集めているタンパク質のメチル化は特異性の高い抗体の作成が困難であり、抗体法に変わる検出法の開発が求められている。タンパク質メチル化において生体コファクターであるSAM (S-adenosylmethionine) が反応基質として用いられることに着目し、本年度は、分子タグを導入したSAM誘導体の合成を検討した。

### 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、薄井、河村、宮崎、江上、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、昨年度開発したアリルシランのトリフルオロメチル化反応で得た知見を基に、まずスチレン類のオキシトリフルオロメチル化反応の開発を行った。本反応で新たに構築した分子骨格は更なる分子変換により、 $\beta$ -トリフルオロメチルスチレン等の有用な中間体に誘導することができた。次に単純アルケンのカルボトリフルオロメチル化反応の開発にも成功した。この反応を用いることでトリフルオロメチル基を有する脂環式化合物、複素環化合物を効率よく得ることができる。またインドールの2位選択的トリフルオロメチル化反応に関しても、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネートを触媒として用いることで、5分以内で完結する迅速トリフルオロメチル化を達成した。一方、昨年度発見したトリフルオロメチルアリルアルコールの有機リチウム試薬による $S_N2$ 型反応に関して、その駆動力を追究するため様々な基質構造や金属試薬を検討した。

#### (2) 遷移金属触媒を用いた新規環化反応の開発 (中村、五月女、袖岡)

最近、我々は新たに開発したニッケル-ジアミン錯体触媒を用いて $\alpha$ -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用いる触媒的不斉共役付加反応の開発を報告している。本年度は、更なる展開として、 $\alpha$ -ケトエステルとニトロンを基質として用い、高度に官能基化された三連続不斉炭素を有するイソオキサゾリジン骨格を触媒的に構築する手法の開発を行った。最適化した触媒システムは、様々な置換基を有する $\alpha$ -ケトエステルに対して有効であり、いずれの基質を用いた場合にも、良好なジアステレオ選択性及びエナンチオ選択性で、対応する三連続不斉点を有するイソオキサゾリジンを得ることができた。

#### (3) 低反応性求電子剤を基質とする触媒的炭素-炭素結合形成反応の開発研究 (藏本、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。本年度は、反応性の低い求電子剤との炭素-炭素結合形成を促進するための新しい反応系として、遷移金属錯体とLewis酸を協調的に活用した触媒反応系の検討を行った。その結果、パラジウム- $\mu$ -ヒドロキソ錯体とLewis酸が共存した場合に進行するユニークな触媒的炭素-炭素結合形成反応を見出すことができた。

#### (4) 遷移金属錯体触媒を用いる酸化的不斉反応の開発 (北條、Akindele、五月女、袖岡)

触媒的不斉反応により分子の複雑性を効率的に増幅するために、酸化的不斉反応の開発にも取り組んでいる。本年度は、分子状酸素を酸化剤として用いるヒドロキシル化反応をモデル反応として、遷移金属触媒、

反応条件の徹底的なスクリーニングを行った。その結果、空気中の酸素を用いるヒドロキシル化反応が良好なエナンチオ選択性で進行することを見出した。

-----  
**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.  $\gamma$ -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) Functional analysis of IM- and NT-binding proteins (Okazaki, Kang, Dodo, Sodeoka)

By using IM- and NT-binding proteins obtained from *E. coli*, we analyzed the effects of IM and NT compounds on their function. Moreover, we established the functional assay system using fluorescent

fusion proteins in living cells and are currently planning to examine the effects of the IM and NT compounds.

2) Mechanistic studies in mitochondria (Saito, Nakanishi, Iuchi, Dodo, Sodeoka; Shimizu (Tokyo Medical and Dental University))

Both IM and NT derivatives were found to act on mitochondria directly, and we planned to investigate the effects of IM and NT derivatives on mitochondria. By using isolated mitochondria and living cells, these compounds were found to affect protein complexes formed on mitochondrial membranes and modify the permeability of the mitochondrial membrane. Moreover, some endogenous factors were found to be involved in the mitochondrial membrane permeabilization.

3) Synthesis and evaluation of GLA-related compounds (Sato, Tamura, Dodo, Sodeoka)

This year, we synthesized hypothetical GLA metabolites and examined their biological activities in cells, and some compounds were found to show several biological activities. In addition, we synthesized GLA-modified compounds and examined their cell-death-inducing activity, and basic structure-activity relationship was revealed.

4) Development of novel purification methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds (Miyazaki, Hayamizu, Asanuma, Egami, Dodo, Sodeoka)

We explored the purification methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds. We previously established the purification method for alkyne-tagged molecules by cobalt-complex-immobilized beads. This year, we tried to improve the elution efficiency from the beads. Moreover, we explored another combination of tags and metal-complex-immobilized beads.

5) Development of novel labeling tags for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds (Yamaguchi, Ando, Asanuma, Nakanishi, Saito, Yamakoshi, Okazaki, Dodo, Sodeoka)

We explored the novel labeling/detection methods for the identification of binding proteins and binding sites of bioactive compounds. As a result, we established a new labeling method by adding the reactivity to known tags. Moreover, by using a novel detection method, we efficiently detected the tags and succeeded in the identification of binding sites of bioactive compounds.

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

We planned to develop a novel Raman imaging method for the determination of cellular localization of bioactive compounds. We previously found that the alkyne group showed strong Raman scattering in the silent region, in which endogenous molecules showed no Raman peaks. This fiscal year, we systematically examined the intensities of Raman scattering of various functional groups, and several groups were found to be "Raman tags", potent functional groups which could be detected by Raman microscope.

## 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 (Kojima, 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, development of the new RE derivatives, in which the long hydrophobic alkyl chain of a VHR selective inhibitor was replaced with other hydrophobic functionalities, was successful. This year, new nine RE derivatives were synthesized by the improved synthetic methodology and evaluated as VHR inhibitors.

2) Discovery of the unique reactivity of halogenated epoxide (Nishizawa, Hirai, Sodeoka)

During the course of our synthetic studies for the sialidase-resistant ganglioside GM3 analogues, we investigated the bromofluoromethylation of ketones derived from the galactose derivative. Although we found the optimized reaction condition for synthesis of the bromofluoromethylene derivatives, a slight change of the reaction condition unexpectedly afforded the  $\alpha$ -bromoacid fluoride. Based on our hypothesis that the halogenated epoxide was a key intermediate for this transformation, we investigated the clarification of the reaction pathway and expansion of the available substrates.

3) Development of the sialidase-resistant ganglioside GM3 analogues (Kato, Nishizawa, Oonuma, Hirai, Sodeoka; Miyagi (Tohoku pharmaceutical University))

Ganglioside GM3 is thought to be a component of membrane microdomains that is involved in cell signaling. For example, GM3 suppresses cell proliferations through the interaction with EGFR and the inhibition of auto-phosphorylation. On the other hand, human sialidase NEU3 hydrolyzes terminal sialic acids of GM3 to be converted into lactosylceramide. Since the metabolism by NEU3 makes the elucidation of GM3 functions difficult, we designed “unhydrolyzable” ganglioside analogues as molecular probes. We have already established a synthetic methodology for constructing C-sialosides by Ireland-Claisen rearrangement reaction and have achieved the synthesis of GM3 analogues possessing CF<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>-, (*R*)-CHF-, and (*S*)-CHF-sialoside linkages. We evaluated the inhibitory activity of GM3 analogues for NEU3 and found that all C-linked GM3 analogues inhibited NEU3 activity in a dose dependent manner. These results suggest that GM3 analogues were recognized by NEU3 as GM3 mimics and acts as sialidase-resistant analogues.

4) Development of the functional probes based on sialidase-resistant GM3 analogue (Ota, Kato, Hirai, Sodeoka)

We planned to utilize the originally developed GM3 analogue with sialidase resistance for the clarification of the binding proteins for GM3 on the cell membrane. For this purpose, we investigated the synthesis of alkyne modified GM3 analogues to be used for photo-affinity probes.

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

We have established the methodologies to construct the CF<sub>2</sub>-linked disaccharide unit through the characteristic S<sub>N</sub>2' reaction. This year, we investigated the stereo-selective modification of the CF<sub>2</sub>-linked disaccharide unit.

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

Protein kinase C (PKC) is a family of kinases that play important roles in intracellular signal transduction. Last year, we synthesized several derivatives to identify the binding sites of the new PKC $\alpha$  inhibitor IB-15A which was originally developed in this laboratory. This year, PKC $\alpha$  inhibitory activities of these derivatives were investigated. Among them, IB-29A, which possessed the photo-reactive group, showed the comparable PKC $\alpha$  inhibitory activity to IB-15A. Binding analysis utilizing surface plasmon resonance suggested that C1a domain of PKC $\alpha$  interacted with phosphatidylserine, and that IB-15A would disturb their interaction.

7) 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 construct the AB-ring unit towards the total synthesis of physalins.

8) Evaluation of the biological activity of highly-oxygenated steroids library (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, inhibitory activities of the library compounds including synthetic intermediates and natural products for the NF- $\kappa$ B activation cascade ( $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation,  $\kappa$ B $\alpha$  degradation, NF- $\kappa$ B nuclear transition, and DNA binding of NF- $\kappa$ B proteins) were investigated.

9) 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. This year, we investigated the synthesis of spectomycin A1 which is a half structure of spectomycin B1.

10) Synthetic studies of paramagnetic probes for In-cell NMR (Hikone, Hirai, Sodeoka; Ito (Tokyo Metropolitan University))

By fixing the paramagnetic lanthanide ions to specific amino acids on protein, the detailed structural information such as PCS (pseudocontact shifts) and RDC (residual dipolar coupling) is expected to be obtained in solution NMR experiment for conformational analysis of proteins. This year, we focused on the synthesis of a paramagnetic NMR probe molecule having DOTA scaffold for standard NMR experiment and modified probes for in-cell NMR.

11) Synthetic studies of maitotoxin (T. Saito, Sodeoka; Nakata)

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 have developed a new coupling strategy for the construction of the most challenging B'-ring, based on Suzuki-Miyaura cross coupling.

12) Development of chemical strategies to analyze protein methylation

Analyzing the protein modification that occurs in the living cells is a central topic to understand the epigenetic regulation. Among them, development of a basic methodology to detect protein methylation is of particular interest because antibodies that can efficiently detect the protein methylation are not generally available. Based on the fact that methylation is governed using *S*-adenosylmethionine as a methyl source, we investigated the synthesis of SAM analogues that have a suitable tag.

### 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, Usui, Kawamura, Miyazaki, Egami, 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 first investigated the oxy-trifluoromethylation of styrene derivatives in the wake of the trifluoromethylation of allylsilanes reported last year. We also demonstrated further transformations of the products to generate useful synthetic intermediates, for example  $\beta$ -trifluoromethylstyrenes. The carbo-trifluoromethylation of simple alkenes was also achieved with high efficiency. This reaction system successfully afforded carbocycles and heterocycles bearing a trifluoromethyl group in high yields. We also achieved the rapid trifluoromethylation of indole derivatives using trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate as a catalyst. This reaction was completed within 5 min. In addition, the S<sub>N</sub>2' type reaction of trifluoromethylated allylic alcohols with an alkyl lithium reagent, which was developed last year, was examined by using various substrates and metal



reagents, in order to obtain information regarding the driving force of this reaction.

2) Transition metal-catalyzed novel cyclizations (Nakamura, Sohtome, Sodeoka)

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 the utility of this finding, we examined the catalytic asymmetric cyclization reaction of nitrones with  $\alpha$ -keto esters, enabling selective access to chiral isoxazolidines that have three contiguous stereocenters. The newly developed protocol can apply to a variety of  $\alpha$ -ketoesters in this cyclization, giving the corresponding chiral isoxazolidines containing three contiguous stereocenters with good diastereo- and enantioselectivities.

3) Development of catalytic C–C bond-forming reactions using less reactive electrophiles (Kuramoto, 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 cooperative catalytic system using both our transition metal catalyst for the selective formation of a chiral enolate and Lewis acid for activating a less reactive electrophile. In this study, we successfully developed a new C–C bond-forming reaction that is drastically accelerated by exploiting the combination of palladium  $\mu$ -hydroxo complex and a Lewis acid.

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

In order to efficiently increase the molecular complexity via bond-forming processes, we have recently studied on the development of a new methodology for the oxidative functionalization of small molecules by utilizing transition metal catalysts. This year, we focused on the catalytic hydroxylation using molecular oxygen. Extensive screening of transition metal catalysts and reaction conditions led to explore a unique hydroxylation, which is promoted under air, with good enantioselectivity.

***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

Frederic Thuaud

Joaquin Javier Barjau Vallet

小沢 正晃 Masaaki Ozawa  
北條 大樹 Daiki Hojo

***Students***

加藤 麻理依 Marie Kato  
清水 怜 Ryo Shimizu  
早水 健二 Kenji Hayamizu  
森田 昌樹 Masaki Morita  
太田 英介 Eisuke Ota  
西澤 絵里 Eri Nishizawa  
酒井 基成 Motonari Sakai  
中村 元太 Genta Nakamura  
薄井 嘉彦 Yoshihiko Usui  
小嶋 俊太郎 Shuntaro Kojima  
藏本 悠太 Yuta Kuramoto  
彦根 佑哉 Yuya Hikone

***Assistant and Part-timer***

大沼 可奈 Kana Oonuma  
斉藤 泉 Izumi Saito  
王 秀玲 Xiuling Wang

***Visiting Members***

田村 結城 Yuki Tamura  
浅沼 三和子 Miwako Asanuma  
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

河村 伸太郎 Shintaro Kawamura

中西 修一 Shuichi Nakanishi

斎藤 洋平 Yohei Saito

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

井内 勝哉 Katsuya Iuchi

上田 実 Minoru Ueda

山下 修治 Shuji Yamashita

千原 貞次 Teiji Chihara

長澤 和夫 Kazuo Nagasawa