

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 γ -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、倉林、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。その結果、酸化ストレスがその機能に影響することを見出した。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、その細胞内での機能を評価する系も構築し、化合物がこれに与える影響を検出することに成功した。

(2) IM誘導体のミトコンドリアへの作用解析 (斎藤 (洋)、中西、高木、闔闔、袖岡; 清水 (東京医歯大))

ネクロシス誘導時にIM誘導体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、IM誘導体がネクロシス誘導時のミトコンドリア膜透過性亢進や蛋白質漏出を抑制することが明らかになった。

(3) γ -Linolenic acid (GLA) 誘導体の合成および活性評価 (佐藤、田村、大金、闔闔、袖岡; 橋本 (東大分生研; 榎島 (日大医))

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、dinor-prostaglandin類が核内受容体スーパーファミリーの一つであるperoxisome proliferator-activated receptor (PPARs) のアゴニスト活性を持つことを見出した。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。本年度はすでに開発した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に関して、より詳細な条件検討を行い、複雑なペプチド混合物から非常に低濃度のアルキンを有するジペプチドを濃縮・精製することに成功した。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、大金、中西、斎藤、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。新しい標識官能基の開発および標識官能基の新しい検出法の開発、双方からのアプローチを展開した。本年度はnitrobenzoxadiazole (NBD) が酸素原子でつながったユニットO-NBDを用いた新規標識手法の開発を行った。従来無蛍光であるO-NBDはアミノ基と反応することで蛍光を持つN-NBDへと変換される。この反応を利用し、生物活性化合物にO-NBDユニットを導入し、結合タンパク質中の化合物結合部位近傍のリジン残基を蛍光標識することに成功した。さらにいくつかの標識官能基に対して新しい検出法の開発に成功し、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。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、ニトリル、重水素などを見出している。本年度はこのうちニトリルの持つラマンピークに着目し、ミトコンドリアの脱共役剤として使われる化合物FCCPの細胞内局在を調べた。その結果、プロトン化を受けた状態と脱プロトン化された状態、2つの状態のFCCPを区別してイメージング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

タンパク質の翻訳後修飾は、細胞内情報伝達を制御する重要な生体内化学反応である。当研究室では、既存の化合物にはなかった新たな機能を有し、細胞内で翻訳後修飾を制御する分子を、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、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、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9種を合成した。今年度は、新たに3種の誘導体を合成し、そのVHR阻害活性を評価した。

(2) 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と機能性プローブへの展開(太田、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。我々はマイクロドメインにおけるGM3の機能解明に向け、シアリダーゼ耐性型ガングリオシドGM3アナログを創製した。今年度は、昨年に引き続き、各種アッセイ系を構築しアナログの生物活性評価に取り組んだ。また、脂質部にアルキンを持つアナログの合成に成功した。

(3) 糖骨格に由来する特異な S_N2' 反応を利用した CF_2 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_N2' 反応を利用した代謝安定型の CF_2 -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と、 S_N2' 反応に利用可能な脱離基について詳細に検討した。

(4) HMPTとCFBr₃から調製できるリンイリドの反応(角本、森田、平井、袖岡)

昨年度、GM3誘導体の合成研究の過程で、我々は、HMPTとCFBr₃から調製できるリンイリドにユニークな反応性を見出していた。今年度は、このリンイリドの基礎的特徴を理解するために、各種カルボニル化合物とのWittig反応を検討した。

(5) 新規イソベンゾフラノン誘導体のPKC α 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。昨年度我々は、光親和性基を有するPKC α 阻害剤IB-29Aをプローブとして開発した。今年度は、これを用いてIB誘導体の結合位置決定の予備検討を開始した。

(6) フィサリン類の全合成研究(森田、小嶋、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- κ 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。今年度も引き続き、AB環部の構築法を検討した。

(7) 高度に酸化されたステロイドライブラリーの活性評価(小沢、森田、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、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。今年度は、観賞用ホオズキ(*Physalis alkekengi* var. *franchetii*)からフィサリンBを単離し、誘導体化してライブラリーを拡張した。

(8) SUMO化阻害剤スペクトマイシン類の合成研究(野村、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。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、今年度は単量体構造に相当するスペクトマイシンA1の合成に必要な合成手法の確立に成功した。

(9) 新規糖脂質グルクロノシルジアシルグリセロール(GlcADG)の全合成(蔵本、太田、平井、袖岡)

環境資源科学研究センターの統合メタボロミクス研究グループでのリポドミクス解析によって、リン欠乏状態で生育したシロイヌナズナではリン脂質が減少し、代わりに新規なグルクロン酸を含む糖脂質(GlcADG)が増加することが見出された。更なるリポドミクス解析を容易にするため、今年度はGlcADGおよびその異性体の化学合成に着手した。

(10) In-cell NMRに用いる常磁性プローブの合成研究(彦根、金場、平井、袖岡; 伊藤、三島(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。今年度我々は、In-cell NMRに利用可能な改良型プローブの合成を達成した。

(11) マイトトキシンの全合成研究(斉藤(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。今年度は、B'環を含む5環性化合物の合

成に成功した。

(12) タンパク質メチル化検出法の開発 (Barjau、五月女、袖岡)

タンパク質のメチル化反応を解析するための新しい化学ツールを開発するために、分子タグを導入したSAM (S-adenosylmethionine) 誘導体の合成を行っている。本年度は、合成したSAM誘導体の化学的安定性を指標に構造活性相関研究を行い、その分解経路を解析した。この知見に基づき、より安定性の向上したSAM誘導体の構造展開を行い、酵素反応において基質として機能するSAM誘導体を見出すことができた。

(13) ヒストンメチル化酵素阻害剤の開発 (Barjau、高木、五月女、闔闔、袖岡)

Chaetocinは、エピゲノム制御を司るリジン特異的ヒストンメチル化酵素を阻害する天然アルカロイドである。確立した全合成ルートを基盤に本化合物の構造活性相関研究を行い、ヒストンメチル化酵素G9aを阻害するために重要となる基本構造を見出している。本年度は、更なる誘導体の合成を行い、合成したETP化合物のG9a阻害活性と細胞毒性を評価した。

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、河村、薄井、宮崎、東條、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着目されている。しかしながら、優れた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、これまでの知見を活かし、窒素および炭素求核剤を用いた複素環化合物や脂環式化合物の骨格構築を伴うトリフルオロメチル化反応の開発に成功した。

(2) 遷移金属触媒を用いる新規環化反応の開発 (中村、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。本研究の新たな展開として、 α -ケトエステルから生成するキラルエノラート種を基軸とする新規炭素-炭素結合形成反応の開発を行っている。本年度は、 α -ケトエステル及びニトロンとの触媒的不斉[3+2]環化付加型反応において、更なるエナンチオ選択性の向上を目指し反応条件の最適化を検討した。その結果、新規三成分触媒系を開発し、反応基質の適用範囲を大幅に拡張することに成功した。

(3) 遷移金属錯体触媒を用いる酸化的不斉反応の開発 (北條、澤村、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、本年度は昨年度に引き続き、分子状酸素を酸化剤として用いるヒドロキシル化反応について検討を行った。

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. γ -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, Kurabayashi, Dodo, Sodeoka)

By using IM- and NT-binding proteins obtained from *E. coli*, we analyzed their function. As a result, oxidative stress was found to affect their function. Moreover, we established the functional assay system using fluorescent fusion proteins expressed in living cells and succeeded in the detection of the effects of several compounds.

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

IM derivatives were found to act on mitochondria directly, and we planned to investigate the effects of IM derivatives on mitochondria. By using isolated mitochondria and living cells, IM derivatives were found to inhibit the permeabilization of mitochondrial membrane and protein release from mitochondria.

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

We synthesized hypothetical GLA metabolites and examined their biological activities in cells. As a result, dinor-prostaglandins were found to show the agonistic activities against peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), which belong to the nuclear receptor superfamily. In addition, we synthesized GLA-modified compounds and examined their cell-death-inducing activity.

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. This year, we tried to improve the purification method for alkyne-tagged

molecules by cobalt-complex-immobilized beads, which were previously reported. As a result, we succeeded in the purification of alkyne-tagged dipeptide from peptide mixture at low concentration. 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, Ohgane, 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. This year, we established a new labeling method by using O-linked nitrobenzoxadiazole (NBD), *O*-NBD unit. *O*-NBD unit is nonfluorescent, but through the reaction with amine, it becomes fluorescent *N*-NBD. By using this reaction, we introduced *O*-NBD unit into bioactive compounds and succeeded in the fluorescent labeling of lysine residues of binding proteins. Moreover, by using a novel detection method, we efficiently detected the several chemical 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 the several functional groups, such as alkyne, nitrile, and deuterium, showed strong Raman scattering in the silent region, in which endogenous molecules showed negligible Raman peaks. This year, we investigated the cellular localization of FCCP, a well-known mitochondrial uncoupler, by using Raman peaks from nitrile groups. As a result, we succeeded in dual imaging of protonated FCCP and deprotonated one respectively.

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

Post-translational modifications of proteins are well recognized as the important chemical reactions in cells for regulating intracellular signal transduction. In this study, we are focusing on the development of novel types of organic molecules regulating the intracellular post-translational modifications of protein, based on natural products and bio-molecules. Evaluation of their biological activities at both protein and cell levels and analyzing their binding proteins would contribute to 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, 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, we synthesized nine RE derivatives, in which the long hydrophobic alkyl chain of RE12 (a VHR selective inhibitor) was replaced with other hydrophobic functionalities. This year, new three RE derivatives were synthesized and evaluated as VHR inhibitors.

- 2) Biological evaluation of sialidase-resistant ganglioside GM3 analogues and development of the functional probes (Ota, Oonuma, Koshino, Hirai, Sodeoka; Miyagi (Tohoku pharmaceutical University))

Ganglioside GM3 is thought to be a component of membrane microdomains that is involved in cell signaling. Last year, we have developed “unhydrolyzable” ganglioside analogues as molecular probes for the analysis of microdomain at molecular level. This year, several assay conditions were established, and biological functions of these analogues were investigated.. Moreover, synthesis of the probe molecules with alkyne moiety incorporated into fatty acid chain was completed.

- 3) Synthesis of the CF₂-linked disaccharide unit utilizing the unique S_N2' reaction (Sakai, Hirai, Sodeoka)

We have established the methodologies for construction of the CF₂-linked disaccharide unit through the characteristic S_N2' reaction. This year, we investigated the stereo-selective modification of the CF₂-linked disaccharide unit and the effect of leaving groups for S_N2' coupling reaction.

- 4) Investigation of the chemical reactivity of phosphorus ylide generated from HMPT and CFBr₃ (Kakumoto, Hirai, Sodeoka)

Last year, during the synthetic studies of GM3 analogues, we have discovered the unique reactivity of phosphorus ylide generated from HMPT and CFBr₃. This year, we investigated Wittig reaction of this

ylide with several carbonyl compounds in order to understand the basic chemical reactivity of the ylide.

5) Studies on the molecular mechanism of PKC α 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 have synthesized IB-29A, which possessed the photo-reactive group. This year, preliminary investigations toward the determination of the binding site of the IB derivatives were started.

6) Synthetic studies of physalins (Morita, Kojima, 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- 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 examined methodologies to construct the AB-ring unit towards the total synthesis of physalins.

7) Evaluation of the biological activity of highly-oxygenated steroids library (Ozawa, Morita, 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 *Physalis* plants. This year, further expansion of the physalin library was investigated by chemical modification of the natural product physalin B.

8) Synthetic studies of a novel SUMOylation inhibitor, spectomycin B1 (Nomura, Thuaud, 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 established the synthetic methodologies toward spectomycin A1, which is a half structure of spectomycin B1.

9) Total synthesis of the novel glycolipid, glucuronosyldiacylglycerol (GlcADG) (Kuramoto, Ota, Hirai, Sodeoka)

Recent lipidomic analysis by the Metabolomics Research Group (CSRS) revealed that the amount of several phospholipids was decreased, and, instead, GlcADG was accumulated in *Arabidopsis*, when the plants were cultivated under phosphorus depletion conditions. To facilitate further lipidomic analysis, we established the synthetic strategy toward GlcADG and its stereo-isomers.

10) Synthetic studies of paramagnetic probes for In-cell NMR (Hikone, Kanaba, Hirai, Sodeoka; Ito, Mishima (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 completed the synthesis of a modified paramagnetic NMR probe molecule having DOTA scaffold 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 synthesized a penta-cyclic molecule including B'-ring.

12) Development of chemical strategies to analyze protein methylation (Barjau, Sohtome, Sodeoka)

In order to explore the chemical methodology to detect and analyze protein methylation, we have studied on synthesis of *S*-adenosylmethionine (SAM) analogues that can transfer bioorthogonal reactive groups using protein methyl transferase. This year, we examined structure and activity relationships studies to examine the stability of the developed SAM analogues, enabling to identify their decomposition pathway. Further structural development of the SAM analogues led us to explore the SAM analogues with sufficient stability to apply enzymatic transfer reaction.

13) Exploring histone methyltransferase inhibitors (Barjau, Takagi, Sohtome, Dodo, Sodeoka)

Chaetocin is a natural alkaloid reported to inhibit histone methyltransferase (HMT), which is an enzyme that plays an important role in epigenetic regulation in living cells. Based on the total synthesis

of this molecule we previously established, we also successfully identified the core structure that plays a key role in HMT inhibitory activity. This year, we synthesized several ETP derivatives and evaluated their G9a inhibition activity and cytotoxicity.

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, Kawamura, Usui, Miyazaki, Tojo, 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 efficient methodology has been rather limited. This year, based on the previous results, we could successfully accomplish new trifluoromethylation reactions with simultaneous formation of heterocycles and carbocycles.

2) Transition metal-catalyzed novel cyclizations (Nakamura, 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 have recently focused on the development of strategy for the selective formation of transition metal enolates from α -ketoesters, facilitating the catalytic asymmetric carbon-carbon bond-forming reactions. This year, we examined the optimization of catalytic asymmetric formal [3+2] cycloadditions of α -keto esters with nitrones, leading to find a new catalytic triad. By exploiting the catalytic system, we have successfully expanded substrate scopes.

3) Synthetic methodologies for oxidative functionalization of small molecules using transition metal catalysts (Hojo, Sawamura, 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 continued the examination of hydroxylation using molecular oxygen as an oxidant.

Principal Investigator

袖岡 幹子 Mikiko Sodeoka

Vice Chief Scientist

越野 広雪 Hiroyuki Koshino

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

清水 怜 Ryo Shimizu
早水 健二 Kenji Hayamizu
森田 昌樹 Masaki Morita
太田 英介 Eisuke Ota
酒井 基成 Motonari Sakai
野村 勇作 Yusaku Nomura
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
角本 大樹 Daiki Kakumoto
澤村 美紀 Miki Sawamura
東條 敏史 Toshifumi Tojo

Assistant and Part-timer

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

Senior Visiting Scientist

岡本 晃充 Akimitsu Okamoto

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
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
大金 賢司 Kenji Ohgane
中田 忠 Tadashi Nakata
藤田 克昌 Katsumasa Fujita
土屋 綾子 Ayako Tsuchiya
井内 勝哉 Katsuya Iuchi
上田 実 Minoru Ueda
千原 貞次 Teiji Chihara
長澤 和夫 Kazuo Nagasawa
金場 哲平 Teppei Kanaba

Visiting Technician

高木 宏晃 Hiroaki Takagi
倉林 克枝 Katsue Kurabayashi