

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、細胞死の分子メカニズム解明を目指す
3. 新規遷移金属錯体触媒を創製し、新しい触媒反応の開発を目指す

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、タンパク質メチル化、含フッ素化合物、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ユニークな反応の開発から、蛋白質の様々な翻訳後修飾を検出・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学的研究まで幅広い範囲におよび、様々な生命現象の解明を目指している。

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、疾患に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。さらに、細胞死制御剤の細胞内局在や結合タンパク質・結合部位を明らかにするための新たな化学的方法論を開拓し、作用機序解明へとつなげることも狙う。

(1) 新規細胞死抑制剤IM化合物の構造展開と虚血再灌流障害モデルへの適用(閻闡、寺山、中尾、袖岡)
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シス様の細胞死を抑制するユニークな低分子化合物IM化合物を見いだしている。今年度はIM化合物の構造展開を行い、水溶性および代謝安定性を向上させた誘導體IM-17の開発に成功した。さらにIM-17がラット虚血再灌流モデルで、心筋保護作用を示すことを明らかにした。

(2) 生物活性化合物の結合タンパク質・結合部位同定に向けた方法論の開発(浅沼、田中、藤原、江越、福田、閻闡、袖岡)

生物活性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、当研究室で開発された蛍光アフィニティーラベル化法であるO-NBD法において、NBD標識されたペプチドを効率的に同定する手法を検討した。その結果、ミトコンドリア膜タンパク質の同定およびその化合物結合部位の同定に成功した。

(3) IM化合物のミトコンドリア結合タンパク質の解析(福田、田中、江越、閻闡、袖岡；清水(東京医科歯科大))

これまでの研究で、IM化合物がミトコンドリアに作用していることが明らかとなっている。そこで、どのように影響しているかを調べるため、単離ミトコンドリアを用いた解析を進めた。さらに(2)で開発された手法を適用し、IM化合物の結合タンパク質の同定および解析を行った。

(4) 生物活性化合物のイメージング技術の開発(江越、閻闡、袖岡；藤田(阪大工)；上田(東北大理))
アルキンタグの持つラマン散乱をもとに、化合物の細胞内局在を調べるアルキンタグラマンイメージング法を生物活性化合物の作用機序解明へと応用することを検討した。本年度はアルキンを2つ持つジイン構造をターゲット未知の生物活性化合物へと導入し、その局在を検討した。特に植物毒素コロナチンに関してはラマンイメージングにより、これまで推定されていた核以外に作用することが明らかとなった。

(5) 新たな細胞死制御化合物の開発と作用機序解明(寺山、福田、田中、浅沼、閻闡、袖岡；田中(東京

薬科大))

酸化ストレスが関連する細胞死を制御する新規細胞死制御化合物に関して、種々構造展開を行ってターゲット分子同定のためのプローブ分子を開発した。さらに開発したプローブ分子を用いて、その結合タンパク質の同定にも成功した。

(6) γ -linolenic acidによる細胞死誘導機構の解明(大沼、藤原、中尾、鬮、袖岡)

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GLAをプローブ化し、その作用機序解明を進めることとした。今年度はGLAの活性評価系として、がん細胞と正常細胞を共培養する実験系の構築を検討した。さらに各種GLA誘導体を合成し、元のGLAを上回る細胞死誘導活性を示す誘導体を得た。

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

当研究室では、これまでになかった生物活性分子、特に細胞内でタンパク質の翻訳後修飾を制御できる化合物を、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、有用分子を提供することを目的としている。

(1) タンパク質メチル化検出法の開発(赤壁、五月女、袖岡; 島津、眞貝 (眞貝細胞記憶研究室))

タンパク質メチル化反応では、SAM (*S*-adenosylmethionine)がメチル源として用いられる。そこで、我々は分子タグを導入したSAM (*S*-adenosylmethionine)誘導体を用いるタンパク質メチル化反応の網羅的検出について検討を進めている。本年度は、確立している検出効率の更なる改善を目指した新規検出法の開発に取り組んだ。

(2) タンパク質メチル化酵素阻害剤の開発(五月女、赤壁、袖岡; 島津、眞貝 (眞貝細胞記憶研究室))

開発したタンパク質メチル化反応の検出系を基盤として、阻害剤の開発にも取り組んでいる。本方法では、未だ生物学的機能が十分にわかっていないメチル化酵素を標的とする阻害剤も探索することができる。本年度は、昨年度見出したエピジチオジケトピペラジン型阻害剤の新規標的について、タンパク質レベル、細胞レベルでの解析を行った。

(3) In-cell NMRに用いる常磁性プローブの合成研究(名取、平井、袖岡; 伊藤、三島(首都大学東京))

当研究室ではこれまでに、In-cell NMRに利用可能な改良型ランタノイド錯体の合成に成功した。今年度は、新たなヨードアセトアミド型プローブの合成に取り組んだ。

(4) RK-460誘導体の合成(三瓶、平井、袖岡; 由田、長田(環境資源センターケミカルバイオロジー研究グループ))

アブジジン酸レセプターアンタゴニストとして見出されたRK-460の構造活性相関研究を志向し、各種誘導体を合成した。

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、新規合成法の開発

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、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、プロトン移動型の不斉触媒反応及び酸素を用いた酸化的触媒反応に関する研究を行っている。また、これらの触媒反応により得られる多官能基型分子の構造展開を可能とする新規変換反応の開発にも取り組んでいる。

(1) 含フッ素化合物の新規合成法の開発(河村、Valverde-Murillo、村上、関根、Henderson、袖岡)

近年開発された医薬品や農薬の多くにフッ素を含む化合物が見られ、その中でも特にフルオロアルキル化合物が注目を集めている。当研究室では、新規な生物活性物質の探索に貢献することを目的に、フルオロアルキル化合物から成る化合物ライブラリーの構築を指向した実用的なフルオロアルキル化反応の開発研究を行っている。本年度は、アルケン類を出発原料とする含窒素複素環骨格を有するペルフルオロアルキル化反応の開発を行った。その結果、オキサゾリン、アジリジン、ピロリジン、ベンゾチアジナンジオキシドといった多様な骨格を有するフルオロアルキル化合物を効率よく合成することに成功した。

(2) 遷移金属触媒を用いる新規環化付加反応の開発(五月女、袖岡; Bartlett, Johnson (University of North Carolina))

連続不斉点の構築法の開拓を目指し、触媒的不斉[3+2]環化付加反応の開発を進めている。本年度は、ニトリルオキシドと α -ケトエステルとの[3+2]環化反応の最適化及び基質一般性の拡張に焦点を当てた。その結果、2-プロパノール中、 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ -ジアミン錯体を用いた場合、[3+2]環化付加反応が進行することを見出した。これにより、高い化学、ジアステレオ、エナンチオ選択性で二連続不斉点を有する様々なイソオキサザリン類を供給することが可能となった。

(3) 酸素を用いる酸化的触媒反応の開発 (Pünner、菅原、山口、五月女、袖岡)

本年度は、酸素を酸化剤として用い、連続四置換炭素を構築する新規環化反応を見出した。また、酸素雰囲気下、生じるラジカル種の多様な反応性に着眼し、反応条件を精査することで、異なる生成物を選択的に合成する手法の開発にも焦点を当てた。その結果、安定炭素ラジカル種とカテコール類のヘテロカップリング反応において、反応条件を適切に選択することで、位置選択性が制御できることを見出した。

(4) 連続四級炭素の新規合成法の開発 (菅原、大西、五月女、袖岡)

連続四級炭素は多くの生物活性化合物に含まれる重要な骨格である。これまでに*N*-Bocオキシインドール二量体から生じる安定炭素ラジカル活性種として用い、アゾ化合物とのヘテロカップリング反応を開発している。本年度は、安定炭素ラジカル種の適用範囲の拡張を行った。

Key Sentences :

1. Create novel bioactive compounds to control intracellular signal transductions.
2. Clarify the molecular mechanism of cell death by using novel cell death control molecules.
3. Create novel transition metal catalysts for the development of catalytic transformations.

Key Words :

intracellular signal transduction, cell death, bioactive molecule, enzyme inhibitor, protein methyltransferase, fluorine-containing molecule, 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) research using these unique molecules as biological probes. Our research interests encompass transition metal-catalyzed enantioselective reactions to the design and synthesis of intracellular signal transduction modulators and their application to cell biology research.

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 also developed new chemical methods in order to achieve more efficient identification of the binding proteins/sites and cellular localization of bioactive compounds, which contribute to mechanistic studies of cell death control molecules.

- 1) Structural development of novel cell death inhibitors, IM compounds, and their application for ischemia-reperfusion injury model (Dodo, Terayama, Nakao, Sodeoka)

We previously developed indolylmaleimide (IM) derivatives as selective inhibitors for necrotic cell death induced by oxidative stress. In this fiscal year, we performed structural development of IM derivatives and found IM-17 as an IM compound having improved water-solubility and metabolic stability. Furthermore, IM-17 showed cardioprotective activity in rat ischemia-reperfusion injury model.

- 2) Development of novel methods for the identification of binding proteins/sites of bioactive compounds (Asanuma, Tanaka, Fujiwara, Egoshi, Fukuda, Dodo, Sodeoka)

We previously established the *O*-NBD method, a turn-ON fluorescent affinity labeling method for binding proteins. To identify binding proteins/sites of bioactive compounds, we improved the efficiency

of identification of NBD-labeled peptides and succeeded in identifying the binding proteins/sites of bioactive compounds from mitochondrial membrane proteins.

3) Analysis of IM-binding proteins in mitochondria (Fukuda, Tanaka, Egoshi, Dodo, Sodeoka; Shimizu (Tokyo Medical and Dental University))

We examined the effects of IM derivatives on mitochondria. By using the novel methods developed in the previous section 2), we analyzed the IM-binding proteins in isolated mitochondria.

4) Development of a novel imaging method of bioactive compounds (Egoshi, Dodo, Sodeoka; Fujita (Osaka University); Ueda (Tohoku University))

We applied alkyne-tag Raman imaging (ATRI) for the determination of cellular localization of bioactive compounds. This year, we installed a diyne tag into bioactive compounds and analyzed their localization. Especially, a diyne-tagged coronatine, a virulence factor in plants, revealed that coronatine is localized at non-nuclear regions, suggesting the existence of novel target proteins different from the known nuclear protein.

5) Development and mechanistic study of novel cell death control molecules (Terayama, Fukuda, Tanaka, Asanuma, Dodo, Sodeoka; Tanaka (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences))

Based on the SAR study in the previous fiscal year, we designed and synthesized chemical probes from novel compounds controlling oxidative-stress-related cell death. Moreover, we successfully identified their binding proteins.

6) Mechanistic studies of tumor-selective cell death induction by γ -linolenic acid (Oonuma, Fujiwara, Nakao, Dodo, Sodeoka)

γ -Linolenic acid (GLA) has been reported to kill tumor cells without affecting normal cells, but the molecular mechanism has not yet been clarified. We planned to develop new chemical probes to clarify the molecular mechanism of GLA-induced cell death. This year, we developed a novel assay system using a coculture system of cancer and normal cells. Moreover, we synthesized GLA derivatives and found a GLA derivative showing stronger cell death induction than GLA.

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

This laboratory also focuses on the development of novel biologically-active molecules, especially regulators of post-translational modifications of proteins, that are based on natural products and biomolecules. Evaluation of their biological activities at both protein and cell levels and analysis of their binding proteins would contribute to understanding the relationship between the structure of molecules and their functions.

1) Development of chemical strategies to analyze protein methylation (Akakabe, Sohtome, Sodeoka; Shimazu, Shinkai (Cellular memory laboratory))

Focusing on *S*-adenosylmethionine (SAM), which is used as a methyl source in protein methylation reaction, we have been working on the development of a chemical methodology to detect and analyze protein methylations by utilizing SAM analogues that can transfer bioorthogonal reactive groups. This year, we have investigated a new strategy to improve the efficiency of the previously developed detection methodology.

2) Exploring protein methyltransferase inhibitors (Sohtome, Akakabe, Sodeoka; Shimazu, Shinkai (Cellular memory laboratory))

We have recently focused on application of the developed random visualization strategy using SAM analogs to evaluate the protein methylation inhibitory activity of small molecules within cell lysate. This approach provides an efficient platform to evaluate the inhibitory activity of small molecules towards a large number of poorly characterized protein methyltransferases (PMTs). This year, we evaluated the biological activities of our epidithiodiketopiperazine-type inhibitors, which were identified using chemical methylome analysis, at both protein and cell levels.

3) Synthetic studies of paramagnetic probes for in-cell NMR (Natori, Hirai, Sodeoka; Ito, Mishima (Tokyo Metropolitan University))

We developed a modified paramagnetic NMR probe molecule having a DOTA scaffold for in-cell NMR. This year, synthetic methods for new iodoacetamide-type compounds were investigated.

4) Synthesis of RK460 derivatives (Mikame, Hirai, Sodeoka; Yoshida, Osada (RIKEN-CSRS); Nagasawa (TAT))

Synthesis of derivatives of RK460, which has been identified as a new abscisic acid receptor antagonist, was performed.

3. Development of novel catalytic reactions and synthetic transformations 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. We have also focused on exploring new strategies for synthetic derivatizations of highly fictionalized products that can be obtained by our original catalytic reactions.

1) Development of novel synthetic methods for fluorinated compounds (Kawamura, Valverde-Murrilo, Murakami, Sekine, Henderson, Sodeoka)

Fluorine-containing compounds are often found in recently developed drugs and agrochemicals, and fluoroalkylated compounds have particularly attracted much attention. Our group has been developing practical fluoroalkylation reactions directed toward construction of a compound library containing fluoroalkylated compounds, which would contribute to explorations of novel bioactive compounds. In this fiscal year, efficient synthetic methods, using alkenes as the starting materials, for a diverse array of perfluoroalkyl group-containing *N*-heterocycles were developed, including oxazolines, aziridines, pyrrolidines, and benzothiazinane dioxides.

2) Transition metal-catalyzed novel cyclizations (Sohtome, Sodeoka; Bartlett, Johnson (University of North Carolina))

We have recently developed the catalytic asymmetric [3+2] cycloaddition of (*E*)-nitrones with α -ketoesters to construct contiguous stereocenters. This year, we focused on the catalytic asymmetric [3+2] cycloaddition of nitrile oxides with α -ketoesters. Our optimization study revealed that the use of Cu(OAc)₂-diamine in 2-propanol is a key to promote the desired [3+2] cycloaddition, providing a wide variety of isoxazolines having two contiguous stereocenters with high chemo-, diastereo-, and enantioselectivity.

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

This year, we have developed a new oxidative cyclization using molecular oxygen to construct two contiguous tetra-substituted carbons. We have also focused on controlling the potent multiple reaction pathways regulated by radical intermediates for the selective synthesis of two distinct compounds. These investigations revealed that the regioselectivity of the hetero-coupling reaction of tert-carbon radicals with catechols can be switched by tuning the reaction conditions.

4) Synthetic methodologies for construction of contiguous all-carbon quaternary centers (Sugawara, Ohnishi, Sohtome, Sodeoka)

Molecules containing vicinal all-carbon quaternary centers are found in many biologically active compounds. We have recently developed the hetero-coupling reaction of a stable carbon radical, which can be generated from an *N*-Boc oxindole, with azo-compounds. This year, we focused on expanding the substrate scope of the stable carbon radical.

Principal Investigator

袖岡 幹子 Mikiko Sodeoka

Vice Chief Scientist

越野 広雪 Hiroyuki Koshino

Research Staffs

闖闖 孝介 Kosuke Dodo
五月女 宜裕 Yoshihiro Sohtome
浅沼 三和子 Miwako Asanuma
Elena Valverde-Murillo
江越 脩祐 Syusuke Egoshi
菅原 真純 Masumi Sugawara
藤原 広一 Koichi Fujiwara
中尾 周平 Shuhei Nakao
境 太希 Taki Sakai

Technical Staff

寺山 直樹 Naoki Terayama
赤壁 麻依 Mai Akakabe
関根 大介 Daisuke Sekine

Students

三瓶 悠 Yu Mikame
名取 文彦 Fumihiko Natori
Cassandra Joan Henderson
大西 理華子 Rikako Ohnishi

Assistants, Part-timers, Visiting Technicians

齊藤 泉 Izumi Saito
王 秀玲 Xiuling Wang
福田 智美 Tomomi Fukuda
田中 美帆 Miho Tanaka

Cooperative members

河村 伸太郎 Shintaro Kawamura

Florian Pünner

山口 滋 Shigeru Yamaguchi
村上 遼 Ryo Murakami
大沼 可奈 Kana Oonuma

Visiting Members

藤田 克昌 Katsumasa Fujita
上田 実 Minoru Ueda
長澤 和夫 Kazuo Nagasawa
平井 剛 Go Hirai
大金 賢司 Kenji Ohgane