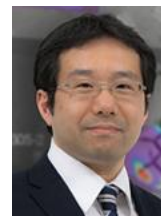


田中 生体機能合成化学研究室
Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory



准主任研究員 田中 克典 (博士(理学))
TANAKA, Katsunori (Ph.D.)

キーセンテンス：

1. 共役イミンの隠された反応性の開拓と生体分子の新奇修飾の解明
2. 生体内での「合成化学治療」の実現：血中内や特定臓器上での反応・試薬開発と生理活性物質合成
3. 分子イメージングによる糖鎖パターン認識の解明と分子ターゲティング

キーワード：

共役イミン、生体分子修飾、合成化学治療、生理活性天然物合成、分子イメージング、糖鎖認識、生体内ターゲティング

研究目的

有機合成化学の分野では、様々な効率的結合形成反応が開発されているが、これを生体内や細胞内での標識、あるいは機能性分子の複合化のために積極的に利用する試みは非常に限られている。私達は、生体内アミンに由来する共役イミン誘導体の「見過ごされてきた新奇な反応性」を、生体内アミンが関与する真の生物活性構造をヒントにして、有機合成化学的に再開拓している。また、これらの反応が生体内で実際に進行していることを証明し、その反応性が持つ「生物学的意義」を解明する。さらにこれら新奇反応を逆に利用して、生きて動物内での生理活性分子の多段階合成にチャレンジする。例えば、私達が「生体内での合成化学治療」と呼ぶ方法で、血中内や標的臓器上での反応や試薬開発を行い、ある時間枠にピンポイントで生理活性天然物を直接動物内で合成して治療の実現を目指す。このために、糖鎖分子が生体内で行っている複雑な「パターン認識機構」を分子イメージング法により初めて解析するとともに、これを生きて動物内の目的部位に対して、様々な生体分子を自由自在にターゲティングするために積極的に活用する。平成25年度では、平成24年度に続けて特に以下に示すテーマを中心に研究を進め、新奇なイミンの反応性の発見に基づく効率的な有機合成や、これまでに見過ごされてきた重要な生物活性に関する興味深い知見を得た。さらに、タンパク質や生細胞表面に対して効率的に標識基や糖鎖分子を導入する化学的手法を開発するとともに、生体内での動態や臓器選択的な集積を糖鎖によって制御することに成功した。

1. 『生体内のアミノアルコールやジアミンから得られる共役イミンの新奇反応性開拓とジアミン誘導体の不斉合成』（田中，プラディプタ）

生体内に存在するある種のアミノアルコールやジアミンから得られる共役イミンが、速やかに[4+2]や[4+4]、さらに[4+2+2]環化反応を起こすことを発見した。計算化学を用いて、この原因を詳細に調べたところ、隣接位にある水酸基やアミノ基が反応促進に大きく関わっていることを見出した。私達はこの反応を利用して、これまでに合成することが非常に困難であった光学活性ジアミン化合物をほぼワンステップで高立体選択的に、しかも試薬を混ぜ合わせるだけで簡便に合成することに成功した。このように、これまでに不安定であったためにほとんど調べられていなかった *N*-アルキル共役イミンが、実は様々な反応を起こしていることを突き止めるとともに、見出した環化反応を介することで、有機合成化学的に利用可能な反応剤として進化させることができた。

2. 『ポリアミンから得られる共役イミンの新奇反応性とその生体制御機構の解明』（田中，筒井）

上記1で述べたように、共役イミンが様々な反応を起こすことを突き止めるとともに、これらの「見過ごされていた共役イミンの反応性」が、実は生体内での酸化ストレス過程や機能発現に関与していることを見出した。すなわち、ポリアミンと、ポリアミンから酸化酵素によって生じる毒性物質アクロレインが速やかに反応し、中間に生じる共役イミンが[4+4]環化反応を起こす。通常は、生成する8員環化合物（1,5-ジアザシクロオクタン）はアクロレインの毒性を中和するが、酸化ストレス過程では[4+4]反応が過剰に進行し、8員環化合物のヒドロゲルが生じ、これが酸化ストレスをさらに亢進させる。このように、酸化ス

トレスにおける新しい機構を提唱するとともに、ポリアミンは酸化酵素によってダイナミックにその構造を変化させていることを発見した。私達が見出した新奇なポリアミンの反応性は、細胞の増殖や転写活性の制御、さらにはアミロイドの蓄積制御に携っている証拠も掴んだ。さらに現在、標識体や細胞丸ごとの NMR、あるいは様々な分子生物学的な手法を用いて、私達が発見した「共役イミン反応に基づく生体制御のしくみ」に対して分子レベルでの解析をさらに進めている。本研究は、グローバル研究クラスター・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、京都大学大学院薬学研究科、早稲田大学先進理工学部と共同で実施した。

3. 『脂質代謝物によるタンパク質翻訳後修飾に学ぶ生理活性天然物合成、および生体内の特定タンパク質上での超生理活性天然物の全ワンポット合成研究』 (田中、岩田(研修生)、坪倉(研修生))

タンパク質の構成アミノ酸中でも、アルギニンの翻訳後修飾について、その反応性が有機合成化学的に検討されたことはほとんどない。私達は、多くの報告例はないものの、アルギニン残基が脂質代謝物により翻訳後修飾を受けることに注目し、アルギニン由来イミンの新しい反応性を追求した。その結果、ほとんど例のないイミダゾール複素環のライブラリー合成に成功するとともに、この方法を利用して、Ageladine を代表とする複雑かつ真に有用な生理活性アルカロイド天然物を、簡単な原料から複数の行程を全て 1 ポットで全合成することに成功した。さらに、この全 1 ポット合成により、関連する様々な生理活性アルカロイド天然物のライブラリー型ワンポット合成を可能とし、天然物を凌駕して医薬品に利用できる超天然物類縁体の探索戦略への道を築いた。また、このように有機合成化学的に開発した全 1 ポット合成を利用して、細胞内での反応性が低い(従ってバイオオルソゴナルな)アルギニン残基の選択的な標識化や、生きている動物内の特定タンパク質上での生理活性天然物合成の基礎を築いた。さらにこの研究過程において、シアナミドとルイス酸を用いた水中での効率的なアミノ基のグアニジン化法を開発した。本研究は大阪大学大学院理学研究科、早稲田大学先進理工学部と共同で実施した。

4. 『共役イミンの 6 π -アザ電子環状反応による革新的 PET (陽電子断層撮影) イメージング、および生体分子複合法の開発』 (田中)

これまでに私達は、海産天然物による酵素阻害機構に学んだ共役イミンの速やかな 6 π -アザ電子環状反応を活用して、様々な生体分子や細胞表面のアミノ基を効率的に標識し、PET を代表とする侵襲的(動物を生きたまま)イメージングを実現してきた。さらに第二世代の方法論として、6 π -アザ電子環状反応を歪み解消のクリック反応と併用することでさらに進化させ、不安定または極少量のサンプルを含め、様々な生体分子に適応可能な金属ポジトロン放出核種/配位子標識と、汎用的な PET イメージング法を検討した。その結果、細胞や生体分子の標識と PET イメージングの効率性を飛躍的に向上させ、さまざまな疾患の診断や生物製剤の開発に大きく貢献するプロトコルを実現した。

一方、同反応を活用して、アミノ基同士を接着させる方法論を新たに開発し、細胞表面やタンパク質上に機能成分を効率良く導入することにも成功した。また、細胞表層の特定の分子に反応した際にのみに光る効率的なプローブも開発した。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、グローバル研究クラスター・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、理研袖岡有機合成化学研究室、東京医科歯科大学生体材料工学研究所、大阪大学大学院理学研究科と共同で実施した。

5. 『糖鎖導入によるタンパク質動態制御』 (田中、小椋)

上記で開発した 6 π -アザ電子環状反応を利用して、タンパク質上に様々な糖鎖構造を導入し、その動態を分子イメージングにより検討した。その結果、様々な糖鎖構造を使い分けることにより、生きている動物内での臓器や癌組織レベルでの集積や排出プロセスを制御できるだけでなく、さらに細胞レベルの集積までも制御できることが判明した。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、グローバル研究クラスター・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループと共同で実施した。

Key Sentence :

1. Exploring the Overlooked Reactivity of Conjugated Imines and Novel Modification of Biomolecules
2. Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry: Multi-step Synthesis in Live Animals

3. Molecular Imaging of Glycan Pattern Recognition: Application to Molecular Targeting

共役イミン、生体分子修飾、合成化学治療、生理活性天然物合成、分子イメージング、糖鎖認識、生体内ターゲティング

Key Word :

Conjugated imine, Modification of biomolecules, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, Synthesis of bioactive natural products, Molecular imaging, Glycan recognition, In vivo targeting

Purpose of Research :

Although many efficient bond-forming reactions have been developed in the synthetic organic chemistry field, these are rarely applied to the labeling or the conjugation methods in the live cells or the animals. We are synthetically exploring the overlooked and therefore unique reactivity of the conjugated imines, which are readily derived from the various amines in biosystems, hinted by the true bioactive structures of the biomacromolecules. We are also proving that these unique reactivity could regulate the biologically important process. Alternatively, the new reactivity of imines could be used to challenge the multi-step synthesis of the biofunctional molecules in live animals. For examples, we are investigating the method called “Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry”, which could directly generate the bioactive natural products for remedy at any time and at any regions inside the body, by executing the cascade organic transformations and/or by generating the reagents for the specific transformations in the serum or on the target organs. Toward this goal, we are analyzing the complex “pattern recognition” mechanisms by the natural glycans in vivo, based on the molecular imaging, and applying the glycan-based interaction in targeting the various molecules to the desired organs and tissues. Based on the results obtained in 2012, we realized in 2013 the efficient synthetic transformations and revealed the important biological functions that had been overlooked, based on the discovery of the new reactivity of conjugated imines. We also developed a chemical protocol, which efficiently introduces the various labels and glycans on the proteins and live cells; the method was applied to regulating the in vivo dynamics and organ-specific accumulation by the glycan structures.

1. Exploring new reactivity of conjugated imines from aminoalcohols and diamines: application to asymmetric synthesis of chiral diamines (Tanaka, Pradipta)

We have found that the conjugated imines, derived from the natural aminoalcohols and diamines could participate in the smooth [4+2]-, [4+4]-, and [4+2+2]-cycloadditions. Theoretical analysis showed that the neighboring hydroxy or amino groups of the conjugated imines significantly contribute to the acceleration of the cycloadditions. These reactions were applied to the stereoselectively synthesis of the chiral diamine derivatives, nearly in one-pot procedure simply by mixing the starting reagents. We have thus unveiled that so-far unexplored *N*-alkyl conjugated imines, due to their instability, could actually involve in the various organic transformations. Namely, we have established these imines as the promising reactants for efficient synthetic transformations through the [4+2]-, [4+4]-, and [4+2+2]-cycloaddition reactions.

2. New reactivity of conjugated imines from polyamines: Elucidation of their biological functions (Tanaka, Tsutsui)

In addition to elucidating the new reactivity of the conjugated imines, we discovered that these unexplored reactivity could regulate the biofunctions. For examples, the conjugated imines derived from the polyamines and the toxic acrolein, which itself is generated from the enzyme-catalyzed oxidation of polyamines, could participate in the [4+4]-cycloaddition reaction to generate the eight-membered 1,5-diazacyclooctane derivatives. While the diazacyclooctanes neutralized the toxic acrolein, the diazacyclooctane hydrogel, which was produced under the oxidative stress conditions, further accelerated the oxidative stress process. We thus proposed the unrecognized mechanism of oxidative stress from the new reactivity profiles of the unsaturated imines, and found that the polyamines are dynamically changing their structures by amine oxidase; such imine reactivity might regulate the cell division, transcriptional activity, and amyloid accumulation. We are continuously investigating the

regulation mechanisms caused by the reactivity of the polyamine-derived imines, based on the NMR of the labeled compounds and the various molecular biology techniques. This work was performed in collaboration with Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, and Faculty of Science and Technology, Waseda University.

3. Synthesis of bioactive natural products learning from post-translational modification of arginine by lipid metabolites: studies on in vivo one-pot natural products synthesis on target proteins (Tanaka, Iwata (student trainee), Tsubokura (student trainee))

There are very few reports for investigating the arginine reactivity as the post-translational modification of the proteins. We explored the new reactivity of the conjugated imines derived from the guanidine, based on the rather rare arginine post-translational modification by lipid metabolites. We succeeded in the first library synthesis of the 2-aminoimidazole derivatives, and the method was applied to the one-pot total synthesis of the alkaloid natural product, i.e., ageladine as the very promising anti-angiogenic MMP inhibitor (Matrixmetalloproteinase), through the multiple transformations starting from the simple materials. Such one-pot synthesis could allow us to prepare the various library of the related natural products which could lead to the promising pharmaceutical candidates, more potent than the parent compound. The one-pot synthesis could also establish the basis on (i) the selective labeling of the less-reactive arginine residue (therefore bioorthogonal) in/on the live cells or (ii) the synthesis of the bioactive natural products on the target proteins in live animals. During this research, we also developed the Lewis acid-catalyzed guanylation of amino groups by cyanamide in water. This work was performed in collaboration with Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University and Faculty of Science and Technology, Waseda University.

4. Innovative PET (Positron Emission Tomography) imaging and bioconjugation based on 6π -azaelectrocyclization (Tanaka)

We have so far established the efficient labeling of the amino groups of the biomolecules and on the live cell surface, and achieved the noninvasive imaging such as PET, by using the rapid 6π -azaelectrocyclization of the conjugated imines, that was developed through our previous investigation of the enzyme inhibitory mechanism by the marine natural products. We this year improved the labeling method by positron emitter metal/ligand complexes, that is readily applicable to variety of the biomolecules- and the whole live-cell based PET. The improved method could efficiently and generally be used for future diagnosis and/or protein-based drug discovery.

The efficient bioconjugation method was also developed using the same azaelectrocyclization. New dialdehyde probes could link the two amino groups of the biomolecules; thus the bifunctional molecules, such as peptides or the glycopeptides, were efficiently introduced on the proteins and on the live cell surfaces. The innovative labeling probes, which could only be fluorescent when reacted with the target molecules on the live cell surface, could also be developed. These works were performed in collaboration with CLST, RIKEN, Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN, Synthetic Organic Chemistry Laboratory, RIKEN, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Department of Chemistry, and Graduate School of Science, Osaka University.

5. Regulation of in vivo protein dynamics by glycan conjugation (Tanaka, Ogura)

We have introduced the various glycan structures on the proteins through 6π -azaelectrocyclization protocol developed above, and their glycan dependence on in vivo dynamics was studied by molecular imaging. Glycans could not only regulate the organ- and tumor-specific accumulation and the excretion process, but also accumulation at the cell-levels. These works were performed in collaboration with CLST, RIKEN and Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN.

Principal Investigator

田中 克典 Katsunori Tanaka

Research Staff

Ambara Rachmat Pradipta

筒井 歩 Ayumi Tsutsui

小椋 章弘 Akihiro Ogura

泰地 美沙子 Misako Taichi

Kenward Vong

Students

岩田 隆幸 Takayuki Iwata

坪倉 一輝 Kazuki Tsubokura

Elena Saigitbalalova