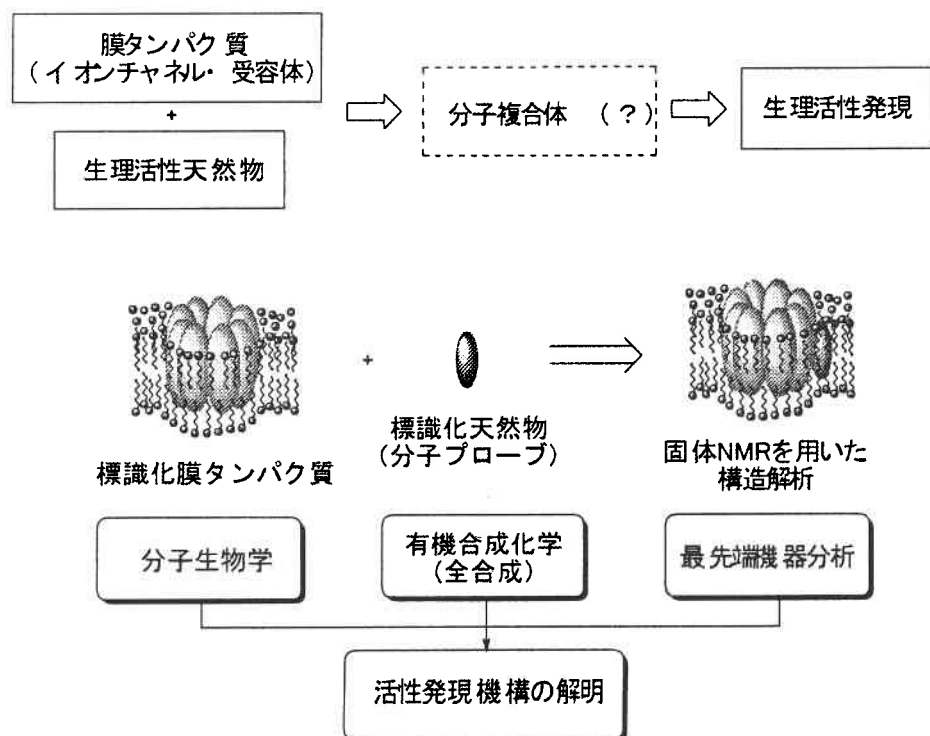


# 機能解明を指向した標識化天然物(分子プローブ)の合成研究

大阪大学大学院理学研究科 大石 徹

## 1. はじめに

近年、分子生物学の発展により、細胞の情報伝達に関わる受容体やイオンチャネルが次々と発見されてきた。これらは生理学的に重要な働きを担う膜タンパク質であり、詳細な構造（立体構造）や機能を分子レベルで明らかにすることは基礎科学として重要であるばかりでなく、医学・薬学の発展においても多大に貢献できると期待される。しかし、X線結晶構造解析や溶液NMRなどの構造決定法が膜タンパク質に対しては一般に適用困難であることから、構造解析や作用機構の解明は水溶性タンパク質と比較して立ち遅れている現状にある（水およびイオンチャネルの構造解明および機能解析等の偉大な業績に対し、Agre教授、MacKinnon教授に2003年のノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい）。重要な生理機能を担う受容体やイオンチャネルの構造と機能を分子レベルで解明するためには、これらのタンパク質に対して高い親和性をもって特異的に結合し、その機能を制御する生体機能分子（阻害剤、活性化剤など）の存在が必要不可欠である。これまで微生物の二次代謝産物などから特異的阻害剤（抗生物質など）が数多く発見され、細胞生物学研究用ツールとして用いられており、特にこの分野において日本の天然物化学者は歴史的にも多大な貢献をしてきた（フグ毒として有名なテトロドトキシンが、ナトリウムチャネルの研究において重要な役割を果たした事は言を俟たない）。阻害剤-膜タンパク質複合体の構造解析や作用解析は、ポストゲノムサイエンスの中心的課題として今後益々重要になると考えられるが、これまで膨大な生物化学的研究が行われているにもかかわらず、かなりの事が未解明のまま残されている現状にある。

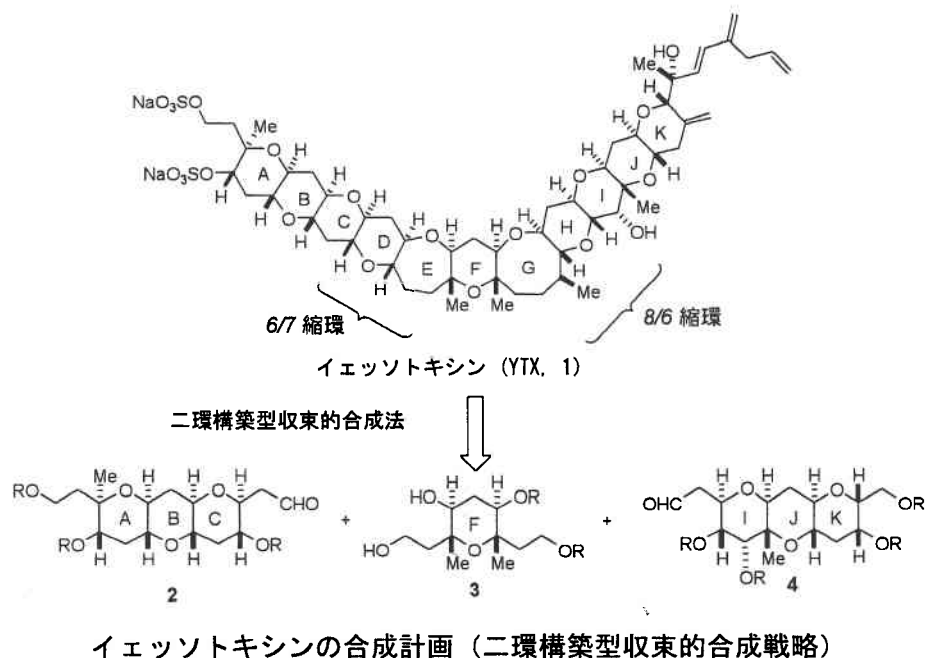


標識化天然物（分子プローブ）-膜タンパク複合体の固体NMRを用いた構造解析

ところで、高磁場固体 NMR 装置は測定法も含め近年著しく発展してきており、膜タンパク質の構造解析への応用が盛んになりつつある。核間距離測定法として双極子-双極子相互作用を観測し異種核間距離測定する REDOR 法<sup>1)</sup> (Rotational Echo Double Resonance)や、同種核間距離測定法である RR 法<sup>2)</sup> (Rotational Resonance)などが知られている。固体 NMR を用いる上で、測定に適した核種(炭素-13, 窒素-15 など)の天然同位体存在率の低さが問題となる。膜タンパク質の同位体標識化は、遺伝子工学的手法などにより解決できる可能性が高いが、阻害剤である天然有機化合物の特定の位置に炭素-13, 窒素-15, あるいは天然には無いフッ素などで標識された生体機能分子プローブの調製には、有機合成化学的手法を用いた人工合成が最も現実的調達手段であると考えられる。私達は、同位体標識化天然物の実践的合成法を開発するとともに、合成した分子プローブと膜タンパク質複合体の構造を固体 NMR 測定によって解析し、分子レベルでの作用機構を明らかにすることを目的として研究を行っている。以下に最近の研究結果について紹介したい。

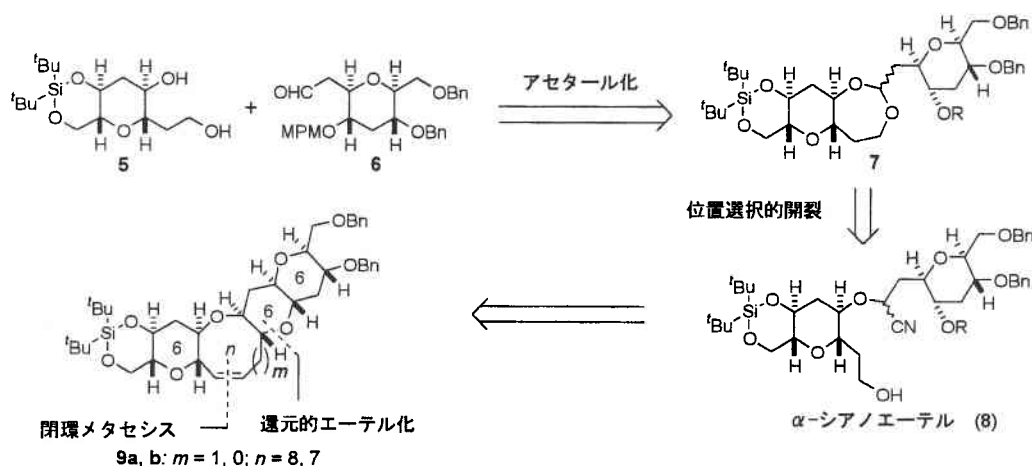
## 2. イェットキシンの全合成研究-標識化分子プローブの創製を目指して

イェットキシン (YTX, 1) は、ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の中腸線から下痢性貝中毒原因物質の一つとして単離された梯子状ポリエーテル化合物である<sup>3)</sup>。真の生産者は渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* であるが、食物連鎖を経て二枚貝に蓄積される。YTX は強力な神経毒性(マウス腹腔内投与による急性致死毒性: LD<sub>50</sub> 286 μg/kg)を示すが<sup>4)</sup>、最近の研究によると、実際は下痢毒性が無いことや(共存するオカダ酸やペクテノトキシンが下痢毒性を示す)、ヒト細胞に対して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇<sup>5)</sup>やアポトーシスを誘導<sup>6)</sup>するなど興味深い結果が得られている。しかしながら、作用標的分子や活性発現機構に関してはまったく不明であり、YTX のユニークな生理活性発現機構を解明するためには有用な分子プローブ(光親和性標識体など)を調製する必要がある。そこで私達は、まず YTX の効率的な全合成法を確立することにした。



YTX は環状エーテルがトランス縮環した分子量が 1,000 を超える梯子状ポリエーテル化合物であり、分子末端の硫酸基やオレフィン側鎖が特徴的な合成化学的にも興味深い研究対象であるため、既に他の研究グループにより部分合成が報告されている<sup>7)</sup>。分子中央部にある 1,3-ジアキシャルメチル基の導入 (F

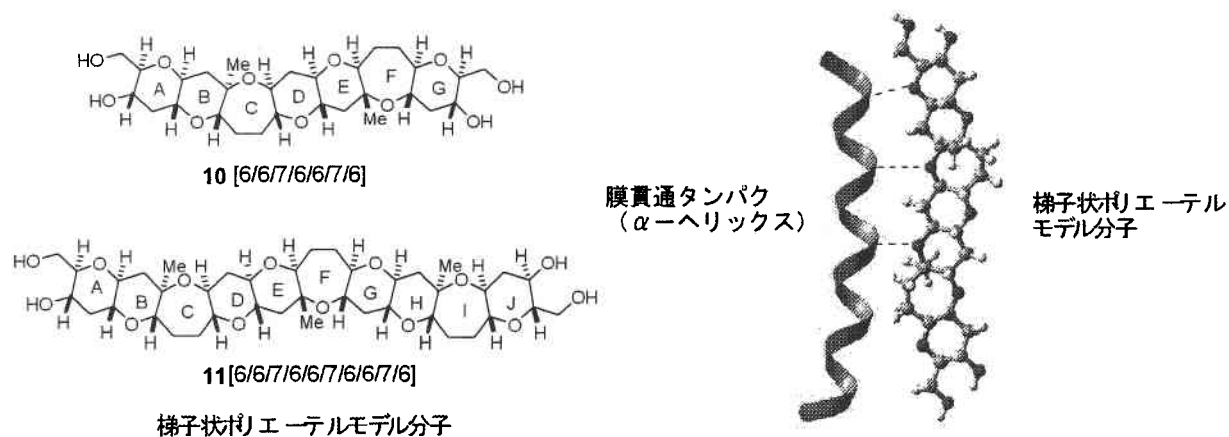
環部), 二つの中員環(七,八員環)エーテルの効率的な構築法の開発 (E, G環部), およびG環部メチル基の立体選択的導入が合成上の大きな問題点である。YTXの様に複雑で分子長の長い(~2.5 nm)天然物の全合成を効率的に行うためには収束的合成法の開発が必要不可欠である。そこで, DE環およびGH環に相当する6/7環および8/6環システムの二環構築型収束的合成法<sup>8)</sup>の開発を計画した。ところで, 同位体標識体を調製する際の問題点として, 標識化試薬が高価でかつ種類が非常に限られていることが挙げられる。<sup>13</sup>C-シアン化カリウム(K<sup>13</sup>CN)は比較的安価な標識化試薬であり, シアン化物イオンの求核性を利用した<sup>13</sup>C-の導入が容易で, かつ生成したニトリルは様々な求電子剤と反応することから合成上利用価値の高いものである。そこで, <sup>13</sup>C-標識化を念頭に置いた $\alpha$ -シアノエーテルを経由する収束的ポリエーテル合成法を考案し, CDEF環部及びFGHI環に相当する四環性モデル化合物(9aおよび9b)の合成を検討した。2-デオキシ-D-リボースから合成したジオール(5)とアルデヒド(6)を連結して七員環アセタール(7)へと誘導し, アセタールの位置選択的開裂を経由して鍵中間体である $\alpha$ -シアノエーテル(8)へと変換した。ニトリルのアルデヒドへの還元, アリル化( $m=1$ )によりジエンへと誘導し, Grubbs触媒を用いた閉環メタセシス反応<sup>9)</sup>により八員環を, 還元的エーテル化により六員環を構築し, 6/8/6/6四環性化合物(9a)の収束的合成法の開発に成功した。同様に, ビニル基の導入( $m=0$ ), 7員環の構築を経て6/7/6/6四環性化合物(9b)を得た<sup>10)</sup>。現在, この方法論を用いたYTXのCDEFGHI環部の立体選択的合成を検討中である。



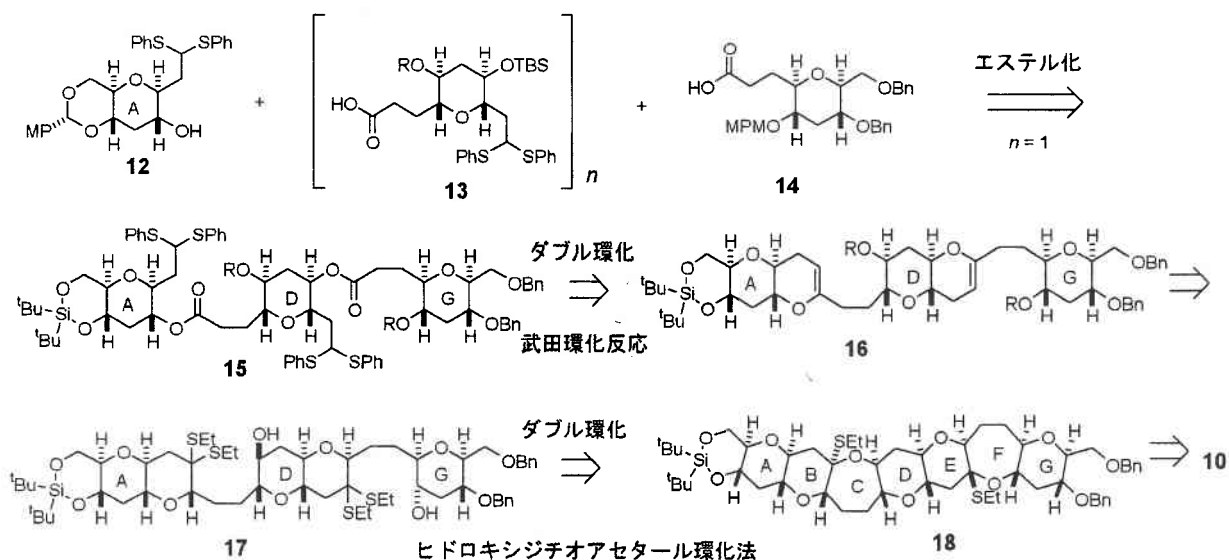
3. 梯子状ポリエーテルモデル分子の合成—膜タンパク質の分子認識機構解明を目指して

イェソトキシン以外にも海洋生物から梯子状ポリエーテル構造を有する一連の天然物が単離・構造決定されており, その特異な構造と生理活性が注目を集めている。代表的なものとして赤潮毒のプレベトキシンや, 魚介類による食中毒の原因物質であるシガトキシンが挙げられるが, いずれも電位依存性ナトリウムチャンネルに作用し強力な毒性を発現することが知られている。他の梯子状ポリエーテルについてもイオンチャンネルなどの膜タンパク質に結合することでその毒性を発現すると考えられているが, 海洋生物から微量しか得られず, 詳細なメカニズムについては未解明のままである。これらの化合物は, トランスに縮環したエーテル環が梯子状に連なっているという共通の特徴を有しているものの, 連結している環の数(分子長), エーテル環の大きさ(5~9員環)や連結順序が異なっており, 構造と毒性が密接に関係していると考えられ, 特に, 分子長の長いものほど毒性が強い傾向にある。ポリエーテルの酸素原子が水素結合のアクセプターとして働き, 膜貫通型 $\alpha$ -ヘリックス部分と多点-分子間水素結合により安定化すると予想されるが, どのようなアミノ酸配列を選択的に認識するのか興味を持たれる。私達は, 梯子状ポリエーテルと膜タンパク質と分子認識機構の基本原理を解明する目的で, 天然には存在

しないものの梯子状ポリエーテルの特徴を備えたモデル化合物を設計・合成してそれらの物理化学的性質や生理活性を調べることにした。そこでまず角間メチルを持ち主に 6/7/6 環システムの繰り返し構造からなる七環性モデル化合物(10)および十環性モデル化合物(11)の合成を計画した。

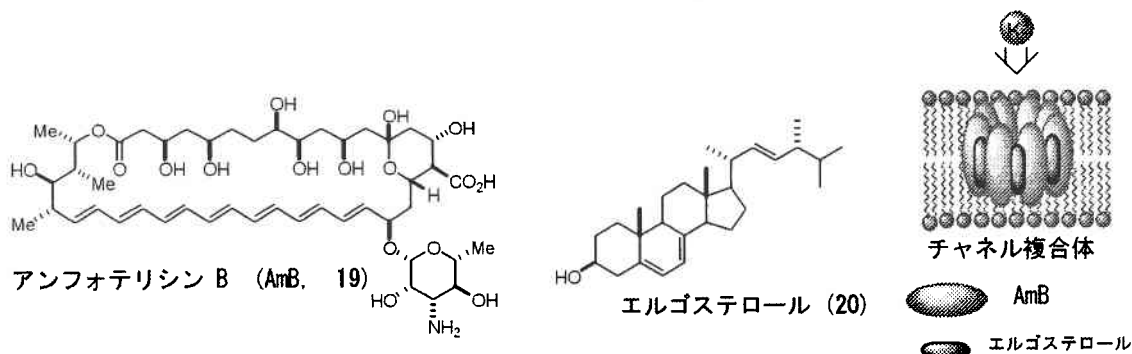


分子長の長いポリエーテル天然物を合成する上で収束的合成法は非常に効率的であるが、より単純なモデル化合物の合成を行う場合でも総工程数は数十段階を要してしまう。そこで、繰り返し構造を同時に構築できれば工程数を大幅に短縮できると考え、二環構築型収束的合成法を複数箇所と同時に適用する多重環化法を考案した。すなわち、ビルディングブロックとしてアルコール(12)、カルボン酸(13)および(14)を合成し、それぞれをエステル化により連結した( $n = 1$ )。合成したジエステル(15)に対して武田環化反応<sup>11)</sup>を行ったところ、期待通りダブル環化が進行した(16)。当初この反応はチオアセタール部分の還元体が副生するなど再現性に乏しかったが、武田試薬(低原子価チタン)の調製時に塩化鉛(II)を添加すると、再現性良く短時間で調製できる事を見出した。その後、ヒドロキシジチオアセタール(17)の環化反応<sup>12)</sup>により七員環部を同時に構築し(18)、最後に角間メチル基を同時に導入し、ビルディングブロックから僅か 15 段階で 6/6/7/6/6/7/6 七環性化合物(10)を合成できた。現在、十環性化合物(11)の合成、および合成ペプチドとの会合実験を検討中である。

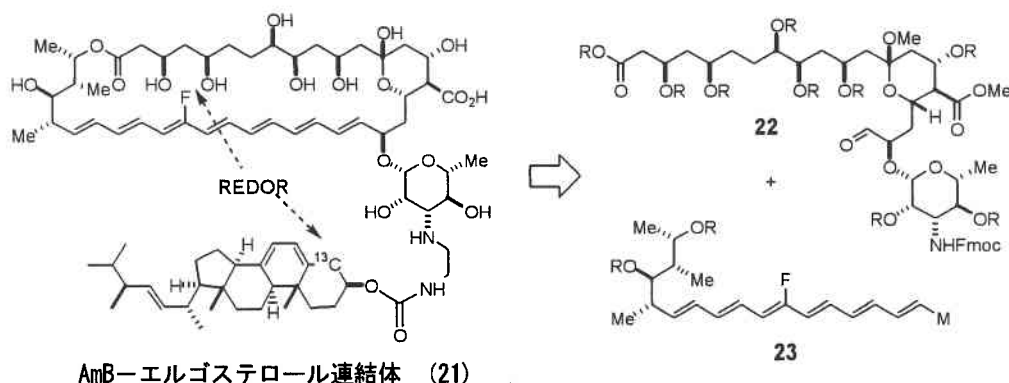


#### 4. 標識化アンフォテリシンBの合成研究—チャネル複合体の構造解明を目指して

膜タンパク質以外にも細胞膜中に分子会合体を形成し顕著な生物活性を示す興味深い天然物が存在する。アンフォテリシンB (AmB, **19**)は、放線菌 *Streptomyces nodusus* によって生産される強力な抗真菌物質であり<sup>13)</sup>, 発見から40年以上経った現在でも感染症治療薬として広く用いられている。AmBは、リン脂質二重膜にイオン透過性のチャネル複合体を形成することで抗菌活性を発現し、さらに、真菌の膜含有ステロールであるエルゴステロール(**20**)に対する高い親和性によって選択毒性を発揮すると考えられている。しかし、この複合体の構造やステロールとの分子認識の詳細については未だ解明されていない。



私達は、複合体の構造を固体NMR測定により明らかにするため、チャネル構造の安定化を狙った様々なAmB-AmB,あるいはAmB-エルゴステロール連結体を調製し、これらの分子が天然物と同等以上の活性を保持していることを既に見出している<sup>14)</sup>。REDOR法<sup>1)</sup>により分子間の距離を測定する際の観測核として、共鳴周波数が高く長距離測定に適したフッ素に着目し、一方を<sup>19</sup>F-で他方を<sup>13</sup>C-で置換した連結分子(**21**など)を合成することにした。AmBの全合成は、1987年にNicolaouらによって達成されているのみであり<sup>15)</sup>, 現在でも合成が容易ではない複雑な化合物である。そこで、入手可能な天然物からの誘導(**22**)と化学合成(**23**)を組合せた標識体合成を検討している。



#### 5. おわりに

重要な生理機能をもつ受容体などの構造と機能を分子レベルで解明する上で、有機合成化学の果たす役割は大きく、特異な生物活性を有する天然物あるいは分子プローブをより効率良く合成する方法論の開発はこれから益々重要になるであろう。天然物全合成の戦略, 方法論にさらに磨きをかけ、標識体合成を含め真に実用的な合成法を開発できれば、分子生物学的手法および最先端の機器分析法を組合せることで新たなライフサイエンスへの展開が期待できる。

## 謝辞

本研究は、大阪大学大学院理学研究科の村田道雄教授、松森信明博士との共同研究であり、日夜実験に励んでいる学生諸氏に深く感謝します。

## 文献

- 1) Raleigh, D. P.; Levitt, M. H.; Griffin, R. G. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *146*, 71.
- 2) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57.
- 3) (a) Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5869; (b) Satake, M.; Terasawa, K.; Kadowaki, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5955; (c) Takahashi, H.; Kusumi, T.; Kan, Y.; Satake, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7087.
- 4) Terao, K.; Ito, E.; Oarada, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Toxicol.* **1990**, *28*, 1095.
- 5) de la Rosa, L. A.; Alfonso, A.; Vilarino, N.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M.; *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 827.
- 6) Leira, F.; Alvarez, C.; Vieties, J. M.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M. *Toxicology in Vitro* **2002**, *16*, 23.
- 7) (a) Suzuki, K.; Nakata, T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3943; (b) Mori, Y.; Takase, T.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2319; (c) Kadota, I.; Ueno, H.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8935.
- 8) (a) Hirama, M.; Oishi, T.; Uehara, H.; Inoue, M.; Maruyama, M.; Oguri, H.; Satake, M. *Science* **2001**, *294*, 1904; (b) 大石 徹, 有機合成化学協会誌, 2003年, 61巻, p562.
- 9) Fu, G.; Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9856.
- 10) Oishi, T.; Watanabe, K.; Murata, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7315.
- 11) (a) Horikawa, Y.; Watanabe, M.; Fujiwara, T.; Takeda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1127; (b) Rahim, M. D.; Fujiwara, T.; Takeda, T. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 763; (c) Oishi, T.; Uehara, H.; Nagumo, Y.; Shoji, M.; Le Brazidec, J.-Y.; Kosaka, M.; Hirma, M. *Chem. Commun.* **2001**, 381.
- 12) Nicolaou, K. C.; Duggan, M. E.; Hwang, C.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2468.
- 13) Vandeputte, J.; Wachtel, J. L.; Stiller, E. T. *Antibiot. Annu.* **1956**, 587.
- 14) (a) Matsumori, N.; Yamaji, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4180; (b) Yamaji, N.; Matsumori, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2087.
- 15) (a) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Danis, R. A.; Simpkins, N. S. *Chem. Commun.* **1986**, 413; (b) Nicolaou, K. C.; Danis, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2208; (c) Nicolaou, K. C.; Danis, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2821.