

# 有機合成化学を支えるケムバイオケム

## ---全合成から活性発現分子機構解明に向けて---

名古屋大学大学院・生命農学研究科 磯部 稔

### 1. はじめに

有機合成の目的はきわめて多様である。ライフサイエンス分野に接するケミカルバイオロジーでは、適切な化合物群を活用して生理活性発現の謎解きを目的としている。両分野は、大学院教育的には本来大きな2本柱となっており、近年急速にその境界領域として発展を続けてきた。演者らは、構造の複雑な天然物全合成研究を推進している。さらに、これを背景として必要分子を設計し、活性発現の第1標的となるタンパク質との相互作用解析に対する新方法論を確立するべく、研究を進めている。いくつかの課題を例として、その最新例を紹介する。

### 2. ナトリウムチャンネルに作用するテトロドトキシン・シガトキシンの全合成研究<sup>1</sup>

これまでチャンネルタンパクに強く作用する天然物として、フグ毒テトロドトキシンの不斉全合成を完成し、さらにシガトキシン全合成まで後一步というところまできている。両者共に糖質から出発して、高い立体制御合成による独特の新手法を開発しつつ進めている。

シガトキシン合成では、アセチレンを基軸としてカップリング・コバルト錯体による中員環閉環反応や、さらにそこから多様な官能基（オレフィン類・ケトンなど）への変換反応を開発してきた。すでに左右両第セグメントのカップリングを終え、F環およびG環の合成を完了し、残すところいよいよA環部と側鎖のみとなった。

### 3. タンパク質脱リン酸酵素阻害剤トートマイシン・オカダ酸の合成と活性発現機構解明<sup>2</sup>

糖質から出発してC-グリコシド化反応により炭素鎖を導入し、その鎖上に不斉誘導するという一般的な手法を開発した。特にヘテロ共役付加反応では、*syn*, *anti* ジアステレオ選択性が切り替え可能なだけでなく、D-, L-の両鏡像体のいずれをも合成可能な方法論である。全合成の後、これらの手法を活用して各種トートマイシンアナログを合成したが、古典的な構造活性相関研究は、必要な官能基の帰属にきわめて有効であると同時に、他の阻害剤の官能基との共通性を議論できる。さらに、ホタルルシフェリンフォスフェートを基質とするフォスファターゼ阻害活性測定法を、ピオチン化ルシフェラーゼを用いた固定化リアクターとシングルフォトンカウンターを用いた生物発光を利用して $10^{-15}$ Mの高感度検出法を開発した。

図1 トートマイシンの屈曲型コンフォメーション

トートマイシンの\*印には、100%<sup>13</sup>Cを4個組み込んだ化合物を全合成した。これを用

いて、NMR と計算機化学により溶液中のコンフォメーションを正確に推定することができた。この分子形状は、90%が図1のような屈曲型で10%は部分的に伸びた形をとるが、フォスファターゼにはフィットしないことが、他の阻害剤との複合結晶のX-線結晶解析から推定できる。その後、トートマイシン分子の両端に2個の発色団（ベンゾフェノンとダンシル）を持つ化合物を合成した際、ダンシルの蛍光強度がベンゾフェノンの有無で著しく変化することがわかった。これは、両発色団の距離が近いことに基づく exciplex のためとされ、この実験からも屈曲型コンフォメーションが支持された。

トートマイシンジカルボン酸は、無水マレイン酸型と平衡となる。これらを液性の変化で一方に傾けておくとそれぞれを単離し、生物発光によるアッセイをしたところ、TTMDA が真の活性型であって、TTM は全く活性を示さなかった。これらの性質を利用して、トートマイシンの2位をオキシム型で各種の光親和性プローブと結合し、フォスファターゼを活性部位近くで修飾することができた。

#### 4 発光タンパク質の発光素子の動きを見る<sup>3</sup>

沖縄のトビイカや富山湾のホタルイカなど、日本海域の発光生物は多い。クラゲの発光ではエクオリンタンパク質のX-線結晶解析も報告され、ペルオキシドとなった発光素子がタンパク中で安定に存在し、カルシウムイオンの到来で発光する。トビイカは酸化型セレンテラジンにシステイン残基のSH基が共役付加しており、カリウムイオンと酸素の存在で発光する。ホタルイカは、セレンテラジンジサルフェートが発光に関与している。海洋の発光タンパク質は、セレンテラジン系発光基質・発光素子をアポタンパク質に組み込んで、発光生物が緊急に必要となる発光に備えているようだ。次にこれまで合成してきた発光素子の中からいくつか紹介し、それぞれの特徴について述べる。

図2 トビイカ発光タンパク質 Symplectin の発光機構

セレンテラジン系の化合物の新しい合成法では、次に示すようなピラジントリフラートにパラジウム触媒でカップリングすることによって、6-位にいろいろな置換化合物を合成することができる。

このようにして必要な分子を合成する新ルートを開拓し、タンパク質分子との相互作用研究に用いることのできる分子設計をいくつか行っている。

図3 ホタルイカ発光タンパク質の光親和性修飾と検出方略

#### 5 昆虫休眠卵にある時間読みタンパク質の測時機構<sup>4</sup>

カイコ卵は、夏に産卵しても休眠ホルモンの作用によりすぐに孵化せずに休眠し、冬を越して春になると一斉に孵化する。これは時計タンパク質が働いていることに起因する。分子

量わずか 17336 の Cu, Zn-SOD (Superoxide Dismutase) の一種であるこのタンパク質は、さらにもう 1 個の Cu イオンをもち、N 結合型の四糖 (または五糖) のメタログリコプロテインである。図 6 のように常に SOD 活性を示すが、時間の進行の中で一過的に ATPase 活性を示す。

図 4 休眠卵産卵から孵化までの時計タンパク機能      図 5 時計タンパク質のアミノ酸配列

この時間経過でタンパクの総分子量に変化はない。しかし、クロマトの挙動などからカラム担体との相互作用が異なるいくつかの形が観察されることなどから、タンパク質のコンフォメーションに大きな変化が有ると考えている。Cu と Zn 金属イオンのリガンドは、SOD としてのコア一部分には、ヒスチジン 6 個とアスパラギン酸 1 個がである。さらにもう 1 個の Cu イオンのリガンドには、N-末端の His (1)-His (2)-が占めている。

図 6 時計タンパク質の酵素機能      図 7 発現時計タンパク・糖鎖タンパク・金属タンパクの質量

これらのリガンド決定には、ピンポイント酸化修飾法を開発して、ナノ LC-MS によって修飾位置を決定する方法をとった。図 8 のように銅イオンにより触媒された水酸化ラジカルが、リガンドヒスチジンを酸化してオキシヒスチジンとなり 16 質量単位増加する。これは、近距離にある周辺のアミノ酸一般に起こる。

図 8 銅イオンによる水酸化ラジカル発生とリガンドヒスチジンの酸化

(Kawagishi, S. *et al. J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 2405. Kurahashi, T.; Isobe, M. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 9268.)

残りの 2 個のリガンドは、一定しない。これは時間の進行と共にリガンドが交換していることを意味する。これを実験的に追跡するために、酸化タンパク質をトリプシンで切断し、酸化ペプチドを検出し、これを MS/MS 解析して酸化アミノ酸を特定した。

図 9 時間読みタンパク質のトリプシン水解ペプチドと T3 グリコペプチドの糖鎖配列超微量決定

図 9 はペプチドのクロマトグラムであり、この中からイオンクロマトにより、質量数が 16, 32, 48 増加したペプチドを検出し、酸化位置を特定した。

一方、T3 ペプチドには NIT モチーフにマンノース型糖鎖が結合している。これを Smith 分解とナノ LC-MS を組み合わせると、1, 6-結合または末端糖鎖は、162→136 となり、1, 2-または 1, 4-結合は 164 に変化する。162 と不変であれば 1, 3-結合を示す。糖鎖構造には 3 種類のバラエティーがあることがわかった。遺伝子発現した糖鎖が無いタンパクでは、時間を読むためのイニシアルフォールディングができない。

図 10 計算機による時間読みタンパク質の一つのコンフォーマー

Zn, Cu-SOD の X-線結晶解析は 25 通りほど知られており、そのいずれもが同じフォールディングをしている。この座標を得て、全アミノ酸残基を計算機上で TIME—EA4 と同じものに置き換えたものを Dreiding Force Field を用いてエネルギー極小化したものが図 10 である。糖鎖は 22-から伸ばした。時間調節ペプチドは、糖鎖と N-末端部分とにはさまれたあたりに

結合し、これが抜け落ちると時間読みが開始する。N-末端の Cu イオンが、不足するリガンドをタンパク表面に求めてより安定な分子形状に移動し、最終的には（時間終了時）His77 まで動いてくると結論している。途中経過は、まだよくわからないが、今後分析感度が良くなれば、読むことができると思われる。

## 6 あとがき

有機合成で得た化合物を、活性発現の分子機構解明のために活用する。例えばタンパク質との相互作用について部位特異的修飾と、ナノ LC/MS による修飾位置特定の点を線をつないでいく。翻ってさらに必要となる分子設計を行い、これを繰り返しより精密な機構を解明する。構造生物学が X-線結晶解析で詳細な構造を示した後、それを動的な解析を目指している。

### <参考文献>

1. a) Hamajima, A.; Isobe, M. *Organic Lett.*, **2006**, 8, 1205-1208. b) Hamajima, A.; Nakata, H.; Goto, M.; Isobe, M. *Chem. Lett.*, **2006**, 35, 464-465. c) Hokama, Y.; Chun, K. E.; Campora, C. E.; Higa, N.; Suma, C.; Hamajima, A.; Isobe, M. *J. Clinical Laboratory Analysis*, **2006**, 20, 126-132.
2. a) Ohyabu, N.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8798-8805. b) Urabe, D.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Chem. Asian J.*, **2006**, 1-2, 125-135.
3. a) Isobe, M.; Kurono, M.; Tsuboi, K.; Takai, A. *Chem. Asia J.*, *in press*. b) Sydnese, M. O.; Isobe, M., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 2593-2603.
4. Isobe, M.; Kai, H.; Kurahashi, T.; Suwan, S.; Pitchayawasin-T. S.; Franz, T.; Tani, N.; Higashi, K.; Nishida, H. *ChemBioChem.*, **2006**, 7, 1590-1598.