

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔事後評価用〕

平成16年度採択分
平成21年 3月31日現在

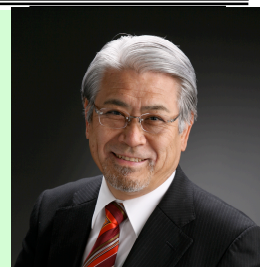
研究課題名 生理活性発現分子機構に基づく生物活性物質の創製

研究課題名 The Innovative Synthesis of Bioactive Molecules based on the Molecular Mechanism of Natural Products' Activity

研究代表者

氏名 磯部 稔 (ISOBE MINORU)

所属研究機関・部局・職 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授



研究の概要:有機合成化学からケミカルバイオロジーを中核とした新総合研究領域を確立した。構造がきわめて複雑または不安定な天然有機化合物全合成を完成し、それに基づいた分子設計により標的タンパク質への作用解析を、ナノLC-MSを用いた新手法を開発して成功させた。

研究分野:生物有機化学

科研費の分科・細目:理学・化学・複合領域:農学・製造学食品・生物有機化学

キーワード:生理活性発現分子機構・全合成・タンパク質分子修飾・相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

天然有機化合物の構造決定技術・有機合成化学・立体制御合成方法論・標的タンパク質探索・タンパク質解析法という領域はそれぞれ単独で成熟あるいは開発されるという状況であった。生理活性物質とタンパク質との相互作用研究法を質量分析で行うという背景は全くなかった。

2. 研究の目的

上にあげた核となる科学を総合化することにより、新科学領域を確立することが学術的な意義である。具体的には、有機合成の最高峰分子（テトロドトキシンやシガトキシン）の全合成を完成し、その水準を背景とした分子設計により、作用タンパク質に結合させてその近傍アミノ酸残基をピンポイントで修飾する手法で解析する。その過程で天然を凌駕する分子創製を目的とした。

3. 研究の方法

まず有機合成の最高峰目的であるシガトキシン全合成とテトロドトキシンの高効率合成を行った。この技術を基にチャンネルタンパク、タンパク質脱リン酸酵素阻害剤、発光タンパク質と発光素子、昆虫休眠覚醒における時間読みタンパク質、その他を具体的な素材として、低分子・高分子の相互作用について、タンパク質のアミノ酸残基を選択的に化学修飾し、修飾位置をナノLCMSで特定する方法を開発した。

4. 研究の主な成果

神経チャンネルタンパク質に作用するフグ・麻痺性食中毒原因物質テトロドトキシン(TTX)の新ルートによる不斉全合成第2段を完成した。同タンパクに作用するシガテラ毒本体のシガトキシン CTX の全合成の立体制御全合成にも成功した。CTXの全合成については、本プロジェクトの中核に位置づけて努力を重ね、2008.9にその全合成を達成した(*Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2941)。

シガトキシンの作用については、オカダ酸と交叉抗体作用があるというHokamaらとの共同研究(*J. Clin. Lab. Anal.* **1992**, *6*, 54)がきっかけの一つとなり、CTXの側鎖を含むABCフラグメントがチャンネルタンパク質にTTXと拮抗的に作用することを見つけた(*J. Clin. Lab. Anal.* **2006**, *20*, 126)。この共同研究によって、CTX右端部が抗体認識に重要であるという事、シガトキシンC4の側鎖をふくむ左端AB環部分が、ナトリウムチャンネルとの相互作用に重要である事がわかった。そこで生物有機化学的研究を推進するために、新たにミニシガトキシンを分子設計した。CTXの左右両端部分構造を持つこの分子は、天然を超えるものとなるだろう。

嘔吐毒セレウリドの合成を行い、高次構造解析およびイオノフォア穴サイズを測定した。これを抗生物質バリノマイシンと比較し、活性・毒性の由来を高次構造に特定した。

[4. 研究の主な成果 (続き)]

タンパク質脱リン酸酵素PP1 γ の阻害機構解明のための設計分子から、天然型より阻害が2倍ほど強い分子を合成した。下痢性貝毒でありタンパク質脱リン酸酵素2型阻害剤でもあるオカダ酸および同1型選択的阻害剤トートマイシンの水溶液中の屈曲型コンフォメーションについてはすでにNMR法で決定している。さらに蛍光自己消光法でも確認した (*Chem. Lett.* **2004**, *33*, 452)。このコンフォマーはタンパク質中では有効ではないと考え、TTMの4炭素原子を100% ^{13}C で標識した化合物で詳細を研究した (*Chem. Asia J.* **2007**, *2*, 377)。タンパク中に於ける分子形状について質量分析を用いて研究を進めた (*Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1747)。

発光タンパク質について、沖縄トビイカのSymplectinを中心に、非天然型発光基質を分子設計した。結合位置のわずかに違うジフロロセレンテラジンABについては、Aは天然型よりも2倍ほど強く光るのに比べて、Bは発光せずむしろ阻害的であることがわかった。これらの類縁体の発光能・発光阻害機能・発光基質分子上に発生する立体化学についての動的不斉という概念を導入して、その発光機構を解明することに成功した (*Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **2008**, *84*, 386)。システイン残基が深く関与することがわかったが、クラゲの発光タンパク質イクオリンもシステイン残基が関与することを光化学で証明した (*Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *in press*)。

カイコ休眠覚醒における時間読みタンパク質TIME-EA4と調節ペプチドPINに関する研究では、タンパク質コア部分がCuZn型SOD(Superoxide Dismutase)とほぼ完全に一致するのに対して、相同性の低い1-40, 90-104は、3次元構造では一面を形成し、その中央部分から調節ペプチドの結合に必要な糖鎖を伸ばし、さらに第2のCuイオンを持つことがわかった (*Chem BioChem.* **2006**, *7*, 1590)。

本研究は、合成化学から生物有機化学までを統一概念とする独創的なものである。ここで展開される手法と結果の解析方法を、分子設計にフィードバックすることは、合理的医薬開発法につながる。アフィニティが著しく高い点では毒性物質として取り扱われるものの、活性発現の原理を理解すれば比活性を下げることで生体系と適当な平衡点を探することも可能となる。従って、ここで展開している分子科学は、創薬の基礎科学としても位置づけることができる。合理的・論理的分子設計に基づく創薬の創製科学の基礎として社会に貢献するという意義も深い。純粋に生物有機化学としての学術価値も高い。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

化学合成においては、テトロドトキシンおよびシガトキシンの全合成は、世界の最高峰達成であると位置づけられる。

チャネルタンパク・発光タンパク・タンパク質脱リン酸酵素・昆虫休眠卵の時間読みタンパク質は、作用が異なるものの統一的なタンパク質選択修飾・解析という手法で解決した。世界でもまだ新しい方法論である。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 1 Total Synthesis of Ciguatoxin. Hamajima, A.; **Isobe, M.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2941-2945.
- 2 Protein Phosphatase Inhibitory Activity of Tautomycin Photoaffinity Probes Evaluated at Femto-molar Level. Sydnnes, M.O.; Kuse, M.; Kurono, M.; Shimomura, A.; Ohinata, H.; Takai, A.; **Isobe, M.** *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1747-1755.
- 3 Synthesis of the second generation photoaffinity probes of tautomycin. Sydnnes, M.O.; **Isobe, M.** *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2593-2603.
- 4 Cysteine 390 is the binding site of luminous substance with symplectin, a photoprotein from Okinawan luminous squid, *Symplectoteuthis oualaniensis*. **Isobe, M.**; Kuse, M.; Tani, N.; Fujii, T.; Matsuda, T. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **2008**, *84*, 386-392.
- 5 The Molecular Mechanism of the Termination of Insect Diapause, Part 1: A Timer Protein, TIME-EA4, in the Diapause Eggs of the Silkworm *Bombyx mori* is a Metallo-Glycoprotein. **Isobe, M.**; Kai, H.; Kurahashi, T.; Suwan, S.; Pitchayawasin-T. S.; Franz, T.; Tani, N.; Higashi, K.; Nishida, H. *Chem BioChem.* **2006**, *7*, 1590-1598.

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~organic/index2.html>