

## 1. 研究課題名 「超天然物の反応制御と分子設計」

研究代表者 平間 正博

## 2. 研究実施の概要

本研究は、ピラジカルを発生してDNAを切断する低分子とそれを安定化して運ぶ蛋白質複合型抗癌抗生物質や、イオンチャネル蛋白質に結合して猛烈な神経毒性を発揮する天然物の蛋白質複合体の立体構造と機能発現原理を明らかにする。更に、天然物の機能を超越するラジカル発生分子や蛋白質複合体を化学合成する新しい方法論を開拓して、機能性材料や医療応用への可能性を探る。

## 3. 研究実施内容

主要な研究項目は次の4項目である。

- (1) 1, 4-ピラジカル活性種を安定化する蛋白質複合系の原理とデザイン
- (2) 神経毒ポリエーテルのイオンチャネル阻害の原理と修復
- (3) 人工ハプテンによるシガトキシン特異的抗体の創出
- (4) 微量海産生理活性分子、骨そしょう薬ノルゾアンタミンおよび抗がん剤ハロモン等の不斉合成法と作用機構

この1年間の主な成果は、

(1) ピラジカルと平衡状態にあるケダルシジクロモフォアのアンサマクロライド部を完全にアトロブ選択的に構築することができた(重要成果1)。

(2) ケダルシジクロモフォアの、立体制御が困難な2-デオキシ糖(マイカロース)のペーター選択的なグリコシル化法を開発した他、C1027クロモフォアの、グリコシル化自身が困難な3級アルコールの立体選択的グリコシル化法を開発することにも成功した(重要成果2)。

(3) 前年度、C1027複合体(ホロタンパク質)粉末のFT-ESRニューテーション法によっておおよその機構が判明したが、更に、MALDI-TOFMSによる注意深い測定によって、ラジカル発生とタンパク質分解の機構について以下の詳細な結論を得た(重要成果3)。観測されるESRスペクトルは、クロモフォア由来の炭素ラジカルと、ペプチド鎖パーオキシラジカル、更に、クロモフォアとペプチド鎖ラジカル間分子間ラジカル対三重項が重なったものである(しかし、p-ベンザインピラジカル三重項が微量含まれている可能性は残っている)。しかも、C1027複合体中のアポタンパク質が、ゆっくりとクロモフォアp-ベンザインピラジカルによって分解される。切断された短鎖フラグメント(MZ=1444ペプチド)のFAB-MSMSによって、一次配列が明らかになり、存在が不安視されたAsn97のアミノ基がカルボキシル化されたC末であることが確認された。

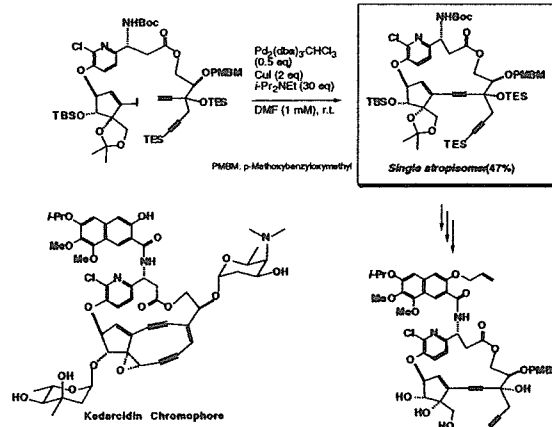
(4) 単純な10員環エンジンの光反応のp-ベンザインピラジカル中間体は、不安定で極低温マトリックスによっても捕捉できる寿命をもたず、開環してジエチニルシクロヘキセンを与えること(IR)が明らかになった(重要成果4)。

(5) 分子間アルキル化と分子内オレフィンメタセシス法を組み合わせた新規効率的連結法を開発し、シガトキシンCTX3Cの完全なABCDE環部の収束的な合成に成功し

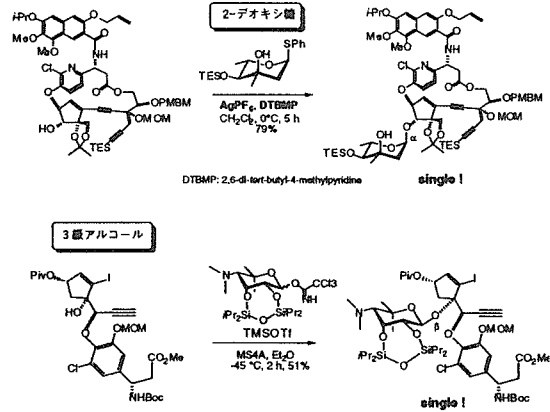
た (重要成果 5)。

(6) 抗腫瘍活性を有するポリハロゲン化テルペン、ハロモンの全合成を検討した結果、(d)-ハロモンを 3 工程で合成する手法の開発に成功し、両鏡像体に分離することにも成功した (重要成果 6)。

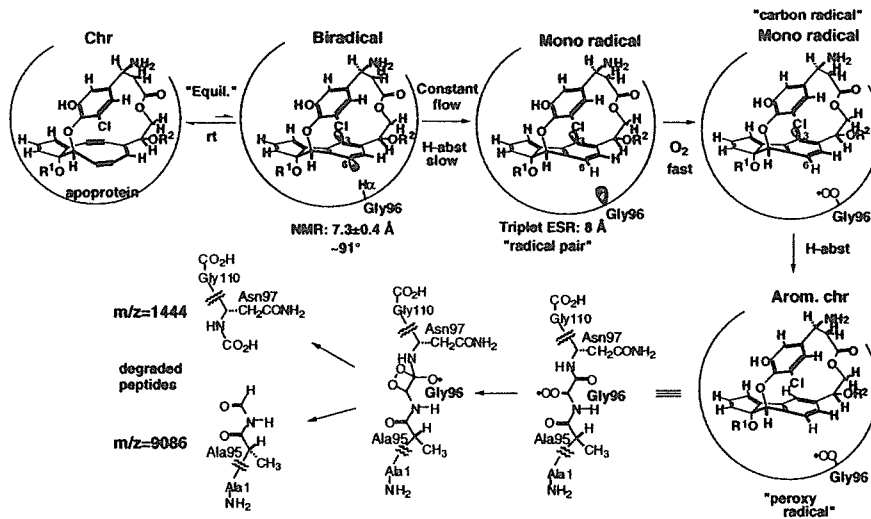
ケダルシジクロモフォア・アンサマクロライド構造のアトロプ選択的構築 (重要成果 1)



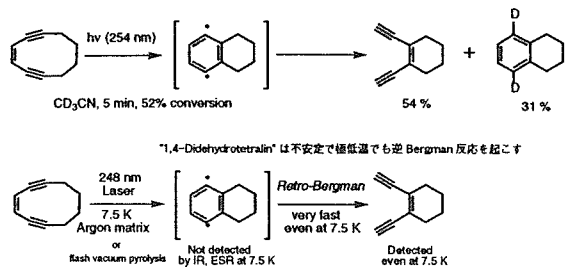
ケダルシジンおよび C 1 0 2 7 クロモフォアの立体選択的グリコシル化法を開発 (重要成果 2)



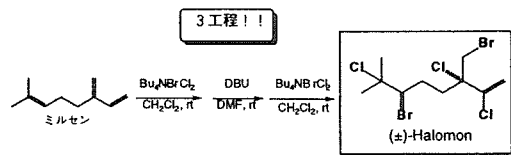
C 1 0 2 7 複合体抗生物質中の常磁性種確定と生成機構およびアポタンパク質分解機構の完全解明 (重要成果 3)



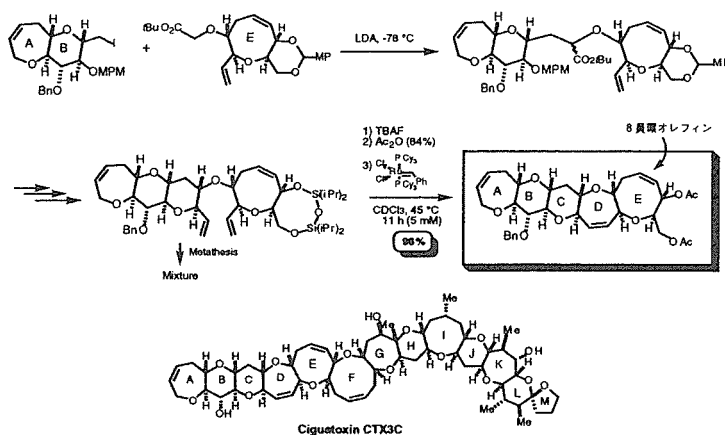
ベンゼン非共役エンジンの光助起 Bergman 反応を究見 (重要成果 4)



抗腫瘍性ハロモンの短工程合成 (重要成果 6)



シガトキシン (CTX3C) のABCDE 環セグメントの収率的短工程合成法の開発  
(重要成果 5)



本研究は、東北大学大学院理学研究科の平間・大石・野田・大栗・井上による「化学合成グループ」をコア研究室として、東北大学反応化学研究所の秋山による「ESRグループ」、東北大学医学部の水柿・富岡による「抗体遺伝子グループ」、筑波大学先端学際領域研究センターの田中による「タンパク構造グループ」、東北大学農学部の佐竹による「チャネルグループ」の協力を得て、有機的に研究を進めている。

#### 4. 今後の課題

(1) C1027の芳香環化クロモフォア複合体の三次元構造を、 $^{13}\text{C}$ および $^{15}\text{N}$ ラベルしたアポタンパク質を調製し、3D-NMR (500, 600, 800 MHz)を用いて精密解析する。C1027について、クロモフォアを安定化するキャリアタンパク質の解離定数を $10^{10}$ まで向上させ、しかも能動的放出機能(ターゲティング)を付与した改変(超)タンパク質を設計し(たとえば、結合ポケットの開口部分残基にフェニルアラニン、チロシンやトリプトファンを置換する)、遺伝子工学的手法によって合成する。また、分解を受けにくいGly96修飾タンパク質として、Gly96- $d_2$ の超タンパク質を合成する手法を開発する。(2) C1027、ケダルシジン、ネオカルジノスタチン、マデュロペプチン、N1999-A2のクロモフォア、シガトキシン、ピナトキシン、ゾアンタミンおよびハロモンの不斉全合成を達成する。(3) ESRによるラジカル観測とTOF-MSによる生体高分子分解を精査する方法論を、DNAとの相互作用研究(DNA切断解析プローブ)に拡張する。(4) ピシクロ[7.3.0]エポキシエンジイン合成モデルの溶液中のスペクトルが、p-ベンザインビラジカルである可能性を証明するため、 $^{13}\text{C}$ ラベルしたモデルを合成する。(5) ABC環とKLM環をリンカーで連結したモデルや、EFG環を中心を持ったシガトキシンを合成する。リンカーは柔軟なポリエチレングリコールや、剛直なメタ-ジエチルベンゼンとする。分子長さ、酸素原子や官能基の有無や位置と、チャネル結合や毒性との相関を調べる。(6) 新しい人工ハプテンの合成と抗シガトキシン抗体調製。(7) 天然型2S配置を認識し、シガトキシンに対する交差活性が最も高い6F12抗体の遺伝子配列が解析できたので、ファージミッドライブラリーを構築し、シガトキシンに対して反応性の高い抗体を発見する。