

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20510202

研究課題名 (和文) 機能性リン脂質の開発と生体膜関連研究への応用

研究課題名 (英文) Synthesis of functionalized artificial phospholipids for investigation of membrane related biosystems

研究代表者

古田 巧 (Furuta Takumi)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：30336656

研究成果の概要 (和文)：生体膜に関連する生命現象は、その特殊な環境のため解析が難しい。本研究では、膜蛋白質の構造・機能解析や、生理活性物質と生体膜との相互作用等、生体膜に関連した生命現象の解明を目的に、機能性人工リン脂質の設計・合成を行い、効率的な合成法を開発した。本合成法の特徴は、オキシアミノ基を head group に持つ鍵中間体に対し、アルデヒド基を持つ機能性官能基を、合成の後半でおだやかな条件下、安定なオキシム結合を介して簡便に導入できる点にある。本法を固相合成に展開するとともに、合成した機能性リン脂質を用いて膜蛋白質の切断も達成した。

研究成果の概要 (英文)：A method for introduction of various head groups on phospholipid frameworks via oxime bond formation has been developed for the synthesis of cyclen-Cu(II), pyrene, naphthalene and other head group functionalized phospholipids. Furthermore, this synthetic method was expanded to a concise solid support synthesis of artificial phospholipids. The head group functionalized phospholipids, prepared in these synthetic studies, can cleave membrane protein, hemagglutinin.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|-----------|-----------|
| 20年度 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |
| 21年度 | 400,000 | 120,000 | 520,000 |
| 22年度 | 400,000 | 120,000 | 520,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 4,000,000 | 1,200,000 | 5,200,000 |

研究分野：有機合成化学、生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：リン脂質、生体膜、膜蛋白質、固相合成、プローブ分子、加水分解

1. 研究開始当初の背景

生体膜には G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) や、イオンチャネル、トランスポーター等の膜蛋白質が存在し、情報伝達や物質輸送などの重要な役割を果たしている。また生理活性物質の中には、生体膜に直接作用し活性を発現する例も多く知られている。この

ような膜蛋白質の構造・機能解析や生理活性物質と生体膜との相互作用の解明は、学術的に意義深いだけでなく創薬における基礎ともなる重要な研究課題である。一方で、生体膜に関連する現象は膜構造中でのみ発現される場合が多く、その研究は困難を伴う。すなわち動的かつ水に不溶な膜中では、従来の

NMR や X 線解析、さらには生化学的手法が適用できず、十分に研究し難い場合がある。このような場合、ケミカルバイオロジカルな方法が研究の起爆剤となり得る。

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、膜蛋白質の機能制御にも関与するなど生理機能に深く関わる生体分子である。また過酸化脂質などはその生物活性も注目されている。そのため、蛍光色素や光反応基などを付与した機能性リン脂質をプローブとして用いる研究は、膜環境中での膜蛋白質の構造・機能解明など、生体膜に関わる種々の課題に取り組む上で有用な方法となる。

このような背景のもと、膜蛋白質の構造および機能解明をはじめとした生体膜に関連する生体機能の解明を目的に、機能性リン脂質の設計と合成、さらにはそれらを応用する研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究は、次の2項目を主な目的として実施した。

(1) 機能性リン脂質の簡便な合成法の開発

リン脂質の骨格に種々の機能性官能基を速やかに導入でき、多様な構造を持つ機能性リン脂質の簡便な合成を可能にする新規合成法の開発を目的とした。またこの合成法をさらに改良するため、リン脂質の固相合成法も検討した。

(2) 膜蛋白質の膜界面での選択的切断法の開発

上記(1)で確立した新規合成法を用いて、リン脂質の head group に蛋白切断能が知られる種々の機能性ユニットを導入した人工リン脂質を合成し、膜界面での膜蛋白質の選択的切断を検討した。この選択的切断を実現すれば、膜蛋白質の膜外領域を簡便に分離し、構造・機能解析できると考え、検討を行った。

3. 研究の方法

研究目的(1)に対しては、オキシアミノ基を head group に持つ鍵中間体を開発し、アルデヒド基とのオキシム結合形成により、機能性官能基を簡便に導入できるリン脂質の新規合成法を検討した。さらにこの合成法を固相合成法に展開した。

研究目的(2)では、上記の方法で合成したサイクレン銅錯体を head group として持つ人工リン脂質を、膜蛋白質ヘマグルチニン

とともに人工膜(プロテオリポソーム)に再構成し、その蛋白切断能を評価した。

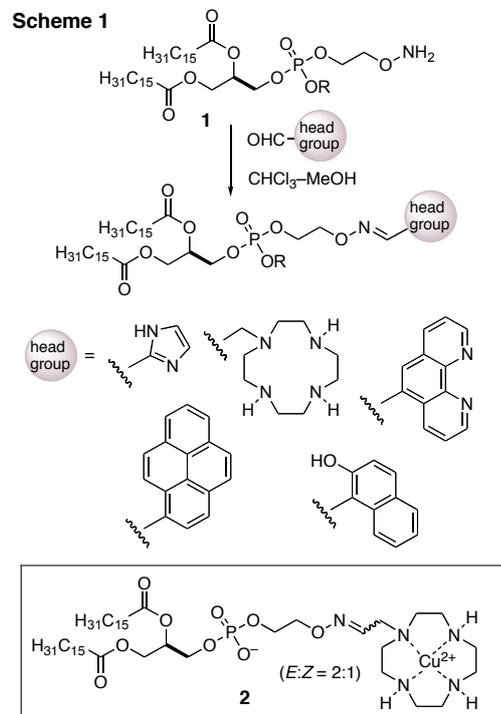
4. 研究成果

以上の研究背景、研究目的および方法に従い研究を実施し、下記のような成果を得た。

(1) 機能性リン脂質の簡便な合成法の確立

Scheme 1 のような新規合成法を確立した。まずオキシアミノ基を head group に持つ鍵中間体 **1** の合成法を確立した。この **1** とアルデヒド基を持つ機能性官能基を有機溶媒中で混合するのみで、所望の機能性リン脂質が得られる新規合成法の開発に成功した。

典型的な両親媒性物質であるリン脂質にさらに機能性官能基を付与したプローブ分子の合成は従来必ずしも容易ではなかった。今回開発した Scheme 1 の方法は、合成の後半でおだやかな反応条件下、安定なオキシム結合を介して、機能性官能基を head group に簡便に導入できる点が特徴であり、官能基許容性も高い合成法である。そのため、多様な構造を持つ機能性リン脂質の合成が可能となった。本方法を用いて、サイクレン銅錯体を head group に持つ人工リン脂質 **2** の合成を達成した。



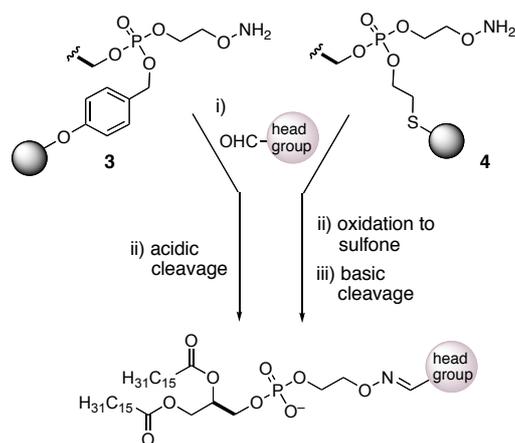
(2) 機能性リン脂質の固相合成法の確立

Scheme 2 のような固相合成法を確立した。成果(1)のオキシアミノ基を持つ鍵中間体

1 を固相上に導入することで、新規な固相合成法を開発することが出来た。この際、リン酸エステル部を Wang resin と結合させた中間体 3 を合成することで、酸性条件下、樹脂から切り出し可能な合成法を開発した。さらに、エチルスルフィド基を固相とのリンカーに利用した中間体 4 では、硫黄原子をスルホンに酸化後、塩基性条件で樹脂から切り出すことができる。これら2種類の相補的な合成法を確立することで、広い基質適用範囲を持つ新規なリン脂質固相合成法の開発に成功した。

両親媒性物質であるリン脂質は、その合成のみならず、精製にも困難が伴っていた。今回その固相合成法を確立したことで、精製の問題点を改善でき、純度の高い機能性リン脂質の簡便な供給が可能となった。

Scheme 2



(3) 膜蛋白質の切断の検討

成果(1)で合成したリン脂質 2 を、インフルエンザウイルスの膜蛋白質であるヘマグルチニンとともに人工膜(プロテオリポソーム)に再構成した。このプロテオリポソームを弱塩基性のバッファー中で攪拌したところ、ヘマグルチニンの切断を確認することが出来た。今後は、この切断反応の膜界面選択性の向上に向け、さらに検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

(1) Synthesis of axially chiral amino acid and

amino alcohols via additive-ligand-free Pd catalyzed domino coupling reaction and subsequent transformations of the product amidoaza[5]helicene.

T. Furuta, J. Yamamoto, Y. Kitamura, A. Hashimoto, H. Masu, I. Azumaya, T. Kan, T. Kawabata, *J. Org. Chem.*, **75**, 7010-7013 (2010). (査読あり)

(2) Perfectly regioselective acylation of a cardiac glycoside, digitoxin, via catalytic amplification of the intrinsic reactivity. K. Yoshida, T. Furuta, T. Kawabata, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 4830-4832 (2010). (査読あり)

(3) Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin. T. Ishii, T. Mori, T. Ichikawa, M. Kaku, Y. Uekusa, M. Akagawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, T. Nakayama, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 4892-4896 (2010). (査読あり)

(4) Binding affinity of tea catechins for human serum albumin: Characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. T. Ishii, K. Minoda, M.-J. Bae, T. Mori, Y. Uekusa, T. Ichikawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, T. Nakayama, *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 816-822 (2010). (査読あり)

(5) Perfectly regioselective and sequential protection of glucopyranosides. W. Muramatsu, K. Mishiro, Y. Ueda, T. Furuta, T. Kawabata, *Eur. J. Org. Chem.*, **74**, 8802-8805 (2010). (査読あり)

(6) Reaction behavior of cumulene: Diels-Alder, Friedel-Crafts, and Pd-catalyzed domino reactions. T. Asakawa, M. Inuma, Y. Wakasugi, M. Kuno, T. Furuta, S. Fujii, K. Tanaka, T. Kan, *Heterocycles*, **80**, 1125-1147 (2010). (査読あり)

(7) Solid supported synthesis of artificial phospholipids. T. Furuta, H. Onuki, M. Mochizuki, M. Ito, M. Inai, T. Wakimoto, T. Kan, *Synlett*, 3373-3377 (2009). (査読あり)

(8) Functional group tolerance in organocatalytic regioselective acylation of carbohydrates. Y. Ueda, W. Muramatsu, K. Mishiro, T. Furuta, T. Kawabata, *J. Org. Chem.*, **74**, 8802-8805 (2009).

(9) Nonenzymatic regioselective acylation of carbohydrates. T. Furuta, T. Kawabata, *Chem. Lett.*, **38**, 640-647 (2009). (査読あり)

(10) Regioselective synthesis of methylated

epigallocatechin gallate via nitrobenzenesulfonyl (Ns) protecting group. Y. Aihara, A. Yoshida, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Akizawa, M. Konishi, T. Kan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4171-4174 (2009). (査読あり)

(11) Identification and characterization of flavonoids as sialyltransferase inhibitors. K. I. P. J. Hidari, K. Oyama, G. Ito, M. Nakayama, M. Inai, S. Goto, Y. Kanai, K. Watanabe, K. Yoshida, T. Furuta, T. Kan, T. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 609-613 (2009). (査読あり)

(12) Concise synthesis of chafuroside A and B. T. Furuta, M. Nakayama, H. Suzuki, H. Tajimi, M. Inai, H. Nukaya, T. Wakimoto, T. Kan, *Org. Lett.*, **11**, 2233-2236 (2009). (査読あり)

(13) Stereocontrolled total synthesis of (-)-myriocin. M. Inai, T. Goto, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, *Tetrahedron:Asymmetry*, **19**, 2771-2773 (2008). (査読あり)

(14) Total synthesis of (-)-serotobenine. Y. Koizumi, H. Kobayashi, T. Wakimoto, T. Furuta, T. Fukuyama, T. Kan, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 16854-16855 (2008). (査読あり)

(15) Efficient synthesis of optically active galocatechin-3-gallate derivatives via 6-endo cyclization. Y. Hirooka, M. Nitta, T. Furuta, T. Kan, *Synlett*, 3234-3238 (2008). (査読あり)

(16) Versatile synthesis of head group functionalized phospholipids via oxime bond formation. T. Furuta, M. Mochizuki, M. Ito, T. Takahashi, T. Suzuki, T. Kan, *Org. Lett.*, **10**, 4847-4850 (2008). (査読あり)

(17) Synthesis and characteristic stereostructure of biphenanthryl ether. Y. Koizumi, S. Suzuki, K. Takeda, K. Murahashi, M. Horikawa, K. Katagiri, H. Masu, T. Kato, T. I. Azumaya, S. Fujii, T. Furuta, K. Tanaka, T. Kan, *Tetrahedron:Asymmetry*, **19**, 1407-1410 (2008). (査読あり)

(18) Synthesis of diazirine possessing an acetophenone derivative as a valuable intermediate for a flavonoid photoaffinity probe. T. Furuta, M. Ueda, Y. Hirooka, K. Tanaka, T. Kan, *Heterocycles*, **76**, 811-817 (2008). (査読あり)

(19) One-pot synthesis of carbazole via tandem Suzuki-Miyaura and amination reaction. Y. Kitamura, S. Yoshikawa, T. Furuta, T. Kan, *Synlett*, 377-380 (2008). (査読あり)

(20) Synthetic studies on altemicidin: stereocontrolled construction of the core framework. T. Kan, Y. Kawamoto, T. Asakawa, T. Furuta, T. Fukuyama, *Org. Lett.*, **10**, 169-171 (2008). (査読あり)

[学会発表] (計 19 件)

(1) 2010年12月19日、Pacifichem 2010 (Honolulu, Hawaii, USA), Pd-catalyzed synthesis of amidoaza[5]helicene and axially chiral amino acid, Junya Yamamoto, Yuki Kitamura, Ayano Hashimoto, Takumi Furuta, Hyuma Masu, Isao Azumaya, Toshiyuki Kan, Takeo Kawabata

(2) 2010年12月17日、Pacifichem 2010 (Honolulu, Hawaii, USA), Synthesis of biaryl DMAP derivatives with an internal carboxylate Reiko Nishino, Takumi Furuta, Takeo Kawabata

(3) 2010年11月6日、第98回有機合成シンポジウム(東京)、Pd触媒ドミノ型ビアリールカップリング反応の開発と軸性不斉アミノ酸合成への展開、古田 巧、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、柘飛雄真、東屋 功、菅 敏幸、川端猛夫

(4) 2010年10月30日、第60回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪)、分子内にカルボキシレートをもつビアリール型 DMAP 触媒の合成、西野玲子、古田 巧、川端猛夫

(5) 2010年8月2日、第37回有機反応懇談会(京都)、分子内にカルボキシレートをもつビアリール型 DMAP 触媒の合成、西野玲子、古田 巧、川端猛夫

(6) 2010年7月16日、日本プロセス化学会2010サマーシンポジウム(東京)、リガンドフリー Pd 触媒ドミノ型反応を利用した新規軸性不斉アミノ酸および関連誘導体の効率的合成、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、古田 巧、柘飛雄真、東屋 功、菅 敏幸、川端猛夫

(7) 2010年3月28日、日本薬学会第130年会(岡山)、分子内にカルボキシレートをもつビナフチル型 DMAP 触媒の合成、西野玲子、古田 巧、川端猛夫

(8) 2010年2月19日、第6回有機元素化学セミナー(京都)、Pd触媒ドミノ型ビアリールカップリング反応の開発と軸性不斉化合物創製、古田 巧

(9) 2009年11月24日、第29回有機合成若手セミナー 明日の有機合成を担う人のために(神戸)、Pd触媒ドミノ型反応を利用した軸性不斉化合物の効率的合成法の開発、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、古田 巧、枅飛雄真、東屋 功、菅 敏幸、川端猛夫

(10) 2009年10月24日、第59回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪)、光学活性軸性不斉アミノ酸の簡便合成、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、古田 巧、東屋 功、枅飛雄真、菅 敏幸、川端猛夫

(11) 2009年9月28日、第20回基礎有機化学討論会(群馬)、Pd触媒ドミノ型反応を利用したアザヘリセンおよび軸性不斉アミノ酸の合成と立体構造、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、古田 巧、東屋 功、枅飛雄真、菅 敏幸、川端猛夫

(12) 2009年8月3日、22nd International Congress on Heterocyclic Chemistry (St. John's), Practical Synthesis of axially chiral amino acid through efficient construction of aza[5]helicenes, Takumi Furuta, Junya Yamamoto, Yuki Kitamura, Ayano Hashimoto, Hyuma Masu, Isao Azumaya, Toshiyuki Kan and Takeo Kawabata

(13) 2009年3月27日、日本薬学会第129年会(京都)、Pd触媒ドミノ型反応を利用した軸性不斉アミノ酸の簡便合成、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、古田 巧、菅 敏幸、川端猛夫

(14) 2008年12月9日、UK/Japan Joint Symposium on Asymmetric Catalysis (Kyoto), Efficient synthesis of azahelicenes through ligand-free Pd-catalyzed domino coupling reaction, Takumi Furuta, Junya Yamamoto, Yuki Kitamura, Ayano Hashimoto, Isao Azumaya, Toshiyuki Kan, Takeo Kawabata

(15) 2008年12月6日、平成20年度日本薬学会東海支部例会(静岡)、人工リン脂質誘導体の固相合成法の開発、小貫 仁、望月雅充、伊藤舞衣、脇本敏幸、古田 巧、菅 敏幸

(16) 2008年10月25日、第58回日本薬学会近畿支部総会・大会(神戸)、Pd触媒ドミノ型反応を利用した軸性不斉化合物の簡便合成、山本純也、北村祐樹、橋本理乃、古田 巧、菅 敏幸、川端猛夫

(17) 2008年7月11日、第43回天然物化学談話会(大阪)、機能性人工リン脂質の効

率的合成法の開発、荻山真美、伊藤舞衣、小貫 仁、望月雅充、古田 巧、菅 敏幸

(18) 2008年7月5日、第54回日本薬学会東海支部総会・大会(名古屋)、Tail groupに機能性官能基を有する人工リン脂質の簡便な合成、荻山真美、伊藤舞衣、小貫 仁、古田 巧、菅 敏幸

(19) 2008年6月24日、17th International Conference on Organic Synthesis (ICOS-17) (Deajeon, Korea), Convenient synthesis of axially chiral biaryls via a Pd-catalyzed domino coupling reaction, Takumi Furuta, Junya Yamamoto, Yuki Kitamura, Ayano Hashimoto, Isao Azumaya, Toshiyuki Kan, Takeo Kawabata

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: チオール基を有するリン脂質誘導体、及びその利用方法

発明者: 古田 巧、菅 敏幸、中山 勉、石井剛志

権利者: 静岡県立大学法人

種類: 特許権

番号: 特願 2008-315988

出願年月日: 2008.12.11

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 巧 (Furuta Takumi)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号: 30336656

(2) 研究分担者

菅 敏幸 (Kan Toshiyuki)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：10221904

(3)連携研究者