

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12758

研究課題名(和文)長鎖イソプレノイド型アンカー分子の創製

研究課題名(英文)Development of new anchor molecule to fix biologically active molecules on cell surface

研究代表者

品田 哲郎 (Shinada, Tetsuro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30271513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜上には様々な情報伝達分子が存在する。それらを細胞膜上で操ることができれば、膜上での生体応答現象の解析が容易になると考えた。本アイデアを実現するために、細胞膜に分子をつなぎとめる新たな分子錨(アンカー)の創成とその利用を考案した。天然由来のアンカーであるドリコールの全トランス型アナログ(炭素数100)をアンカー分子に想定し、その初めてとなる合成を達成した。

研究成果の概要(英文)：To analyze biological events and signal transduction on cell surface, we envisioned a new anchor molecule to fix biologically active molecules on the cell surface. As a new anchor, we designed a dolichol analog with all trans olefins (C100). The designed molecule is not available from nature and has not been synthesized yet. Therefore, we attempted the first synthesis of the C100 anchor. After extensive studies, the target molecule was successfully synthesized by coupling of C45 and C55 units that was prepared by linkage of three C15 units and a C10 unit. Phosphorylation of the C100 anchor was attempted.

研究分野：天然物化学

キーワード：細胞膜 情報伝達 錨分子 ドリコール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞表面 (脂質二重膜上) には生体機能を司る情報伝達分子が数多く提示されている。膜上に浮かぶ分子による情報伝達を膜上で制御できれば、情報伝達の解析をより有利に操ることができると考えた。そのためには、膜上に分子を固定する錨 (アンカー) が必要である。天然由来のアンカーとしてリン脂質や長鎖イソプレノイド (炭素数 100 程度) であるドリコールが知られている (図 1)。

(2) 本研究では人工的なアンカー分子を新たに創成し、細胞膜上での分子操作を容易にする方法論の開拓を目指した。設計分子として、ドリコールの全トランス型アナログ (C100) を想定した (図 1)。天然由来のドリコールはシス型のオレフィンに富む。これに対して設計分子は、熱力学的により安定なトランス型のオレフィンのみで構成されている。オレフィンの幾何異性が異なることで天然型ドリコールにはない、より剛直な構造的性質と代謝に対する抵抗性が備わったアンカーになると考えた。

(3) C100 は天然から単離されておらず、また、その合成はこれまで報告がなされていない。提案を実現するためには、C100 の化学合成

法を確立する必要があった。

(4) C100 の合成は前人未踏であるとともに、そのアンカーとしての利用は前例がない。このような背景から、挑戦的な課題と位置づけ、その開拓を目指すことにした。

2. 研究の目的

いまだ合成法が確立されていない C100 の合成経路を確立することを第一の目的とした。次に、設計分子のアンカーとしての性能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) C100 の合成

図 2 に示す合成戦略に従い、C45 と C55 をそれぞれ合成する。これらを連結後、脱スルホン化と脱保護を行うことで目的物を合成する。

(2) 機能評価

C100 の末端アルコール部位を足掛かりにリン酸化、蛍光標識化、あるいはスピララベル化した誘導体を合成する。それらを用いて細胞膜との相互作用を蛍光測定、ESR 分光法、膜破壊実験などにより解析する。

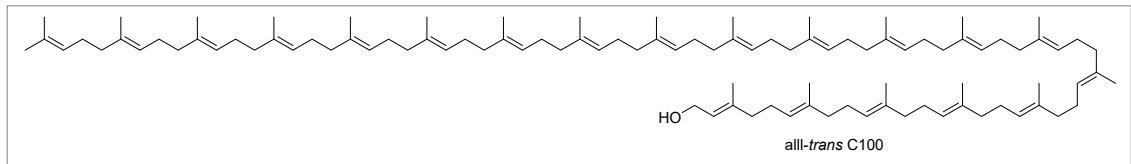
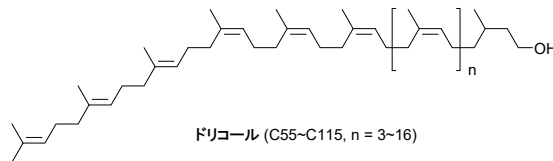


図 1 標的分子の構造

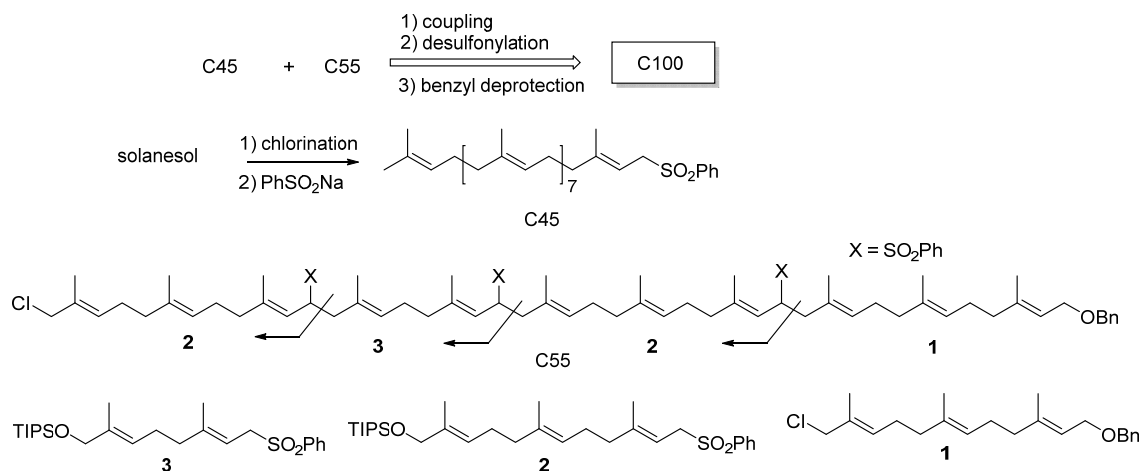


図 2 合成戦略

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

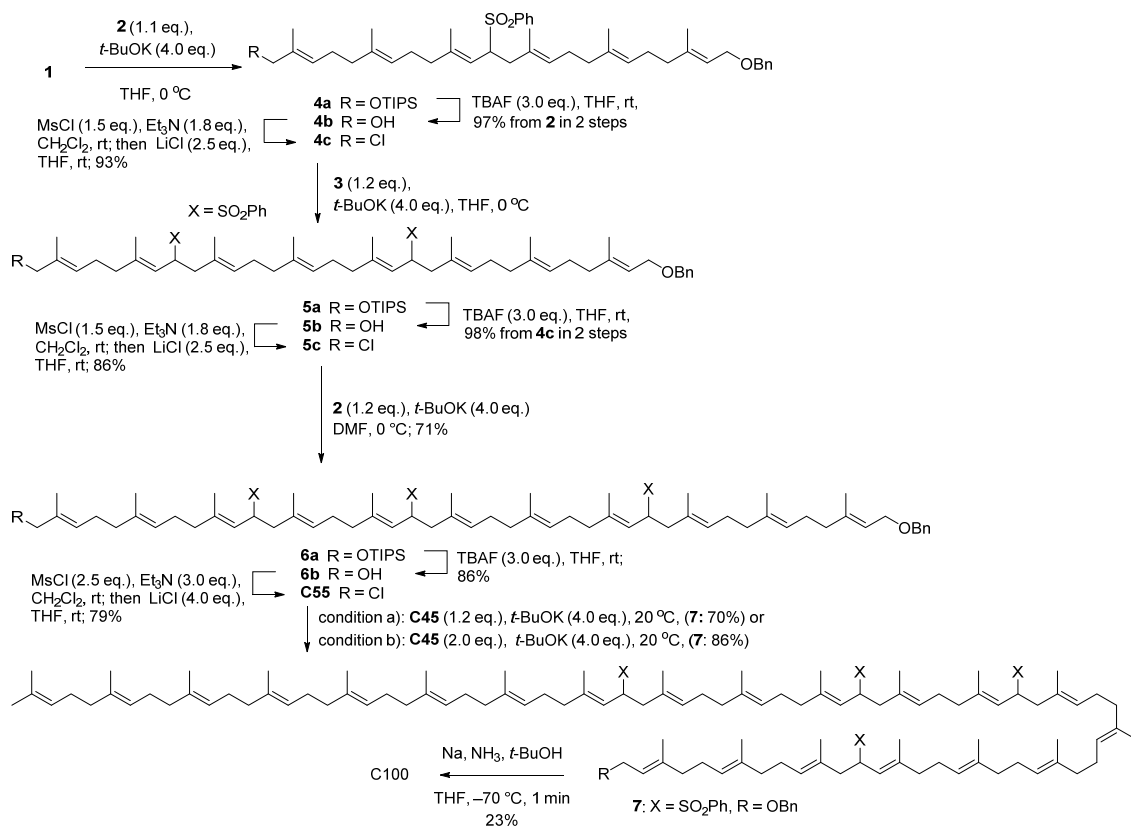


図3 C100の合成

4. 研究成果

(1) 設計分子の合成

①C45の合成

ソラネソールの末端アルコール部位をクロル化後、ベンゼンスルホン酸ナトリウム(PhSO<sub>2</sub>Na)と反応させることによりC45を合成した。

②C55の合成

三つのフラグメント1~3のカップリングによってC55を合成した。クロリド1とスルホン2をテトラヒドロフラン(THF)中0 °C、カリウム *t*-ブトキシド(*t*-BuOK, 4当量)で処理して4aに導いた。テトラブチルアンモニウムフルオライド(TBAF)を用いトリイソプロピルシリル(TIPS)基を除去することで、アルコール4bが1から97%の収率で得られた。得られたアルコールを、メタンスルホニルクロリド(MsCl)によるメシル化後、LiClと処理することで93%の収率でクロリド4cに変換した。同様の方法で、5cを4cから3工程、収率84%で調製した。次いで5cと2の縮合を検討した。反応はTHF中では進行しなかったものの、ジメチルホルムアミド(DMF)を溶媒に用いることで、促進され収率71%で6aを与えた。6aはシリル基の脱保護とクロル化をにより、C55に誘導できた。C100の骨格を構築するために、C45とC55とのカップリングを試みた。C55に対し1.2当量のC45および4.0当量の*t*-BuOKをDMF中で作用させたところ、70%の収率でカップリング生成物

7が得られた。収率は過剰量のC45(2当量)を用いることで86%に向上した。最後に7の4つのベンゼンスルホン(PhSO<sub>2</sub>)およびベンジル(Bn)保護基の除去を試みた。様々な条件を検討した中で、*tert*-ブタノール(*t*-BuOH)の存在下でBirch還元条件(金属ナトリウム(Na)/液体アンモニア(liquid NH<sub>3</sub>), -70 °C)で反応を行うことにより、収率23%でC100が合成できた。しかしながら<sup>1</sup>H-NMRデータの注意深い検証により、20個の三置換オレフィンのうちの6%が望ましくない二置換オレフィンへ異性化していることが明らかになった。この点は1,3-ビス(ジフェニルホスフィノ)プロパンジクロリド[Pd(dppp)Cl<sub>2</sub>]/水素化トリエチルホウ素リチウム(LiBHEt<sub>3</sub>)を用い、低温で還元を行うことで改善できている。現在、収率の向上を含めた、還元条件のさらなる精査を行っている。

(2) 機能評価

C100の機能を評価するためにリン酸化を検討した。モデル化合物として45の炭素数を有するソラネソールを用いてリン酸化を検討した。しかしながら、いずれも複雑な生成物を与えた。反応がうまくいかない理由はアリルアルコール部位の高い反応性に起因するものと考察している。本仮説に基づき、C100の末端アルコール部分を飽和したアナログを再設計し、その合成を試みた。その結果、収率の低下などの問題を解決でき、現在、再設計分子のリン酸化およびプローブ化を

検討している。

(3) 国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

膜上の生命現象を細胞膜上で操作するという挑戦的な課題を掲げ、その基盤となるアンカー分子を設計・合成した。オレフィンの異性化など、まだ改善の余地がのこされているものの、**C100** は有機合成による最長のプレノール合成の記録である。有機合成の限界を押し広げたことは、インパクトの高い成果である。長鎖イソプレノイドの合成で培った様々な知見は、長鎖のプレノールを基質とする新規テルペン生合成機構解明への展開にもつながり、多くの実りある成果をもたらした。今後は、設計分子のアンカー機能の検証をさらに進めることによって、その有効性を実証する予定である。

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 4 件)

- ① Crystal structure and functional analysis of large-terpene synthase belonging to a newly found subclass, Masahiro Fujihashi, Tsutomu Sato, Yuma Tanaka, Daisuke Yamamoto, Tomoyuki Nishi, Daijiro Ueda, Mizuki Murakami, Yoko Yasuno, Ai Sekihara, Kazuma Fuku, Tetsuro Shinada, Kunio Miki, Chem. Sci. 査読有、**2018**, 9, 3754-3758. DOI:10.1039/C8SC00289D
- ② Stereocontrolled Synthesis of 19'-Deoxyperidin, Naoto Kinashi, Shigeo Katsumura, Tetsuro Shinada, Kazuhiko Sakaguchi, Org. Lett, 査読有、**2018**, 20, 582-585. DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03695
- ③ Stereocontrolled synthesis of paracentron, Y. Nishioka, Y. Yano, N. Kinashi, N. Oku, Y. Toriyama, S. Katsumura, T. Shinada, K. Sakaguchi, *Synlett*, 査読有、**2017**, 28, 327-332. DOI: 10.1055/s-0036-1588906
- ④ Facile Synthesis of Deuterium- Labelled Geranylgeraniols, Y. Totsuka, S. Ueda, T. Kuzuyama, T. Shinada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 査読有、**2015**, 44, 575-577. DOI: 10.1246/bcsj.20140384

[学会発表] (計 10 件)

- ① 日本農芸化学会 2018 年度大会、平成 30 年 3 月 15~19 日、愛知県名古屋市、名城大学、Large-terpene 合成酵素の酵素的諸性質の解析と部位特異的変異、菅原啓、西智之、小川佳央、高橋宏忠、上田大次

郎、藤橋雅宏、三木邦夫、保野陽子、品田哲郎、佐藤努、3A17p02

- ② 日本農芸化学会 2018 年度大会、平成 30 年 3 月 15~19 日、愛知県名古屋市、名城大学、Large-terpene 合成酵素の結晶構造解析、藤橋雅宏、佐藤努、田中勇真、山本大輔、西智之、上田大次郎、村上瑞気、保野陽子、関原あい、福和真、品田哲郎、三木邦夫、3A17p01
- ③ 新潟大学コア・ステーション自然科学系附置植物・微生物科学研究センター共催公開セミナー、2017 年 9 月 6 日、新潟県新潟市、新潟大学農学部、品田哲郎、微生物が生産する天然有機化合物の合成と機能解析
- ④ メディカルジャパン：第 4 回日本医療総合展 (大阪)、2017 年 2 月 16 日、大阪府大阪市インテックス大阪、品田哲郎、脳神経関連疾病・がんの攻略にむけた医薬リードの創製研究
- ⑤ 第 2 回 杉本・阿倍野ライフサイエンス談話会、2016 年 12 月 12 日、大阪府大阪市・大阪市立大学あべのメディックス、品田哲郎、医薬リード分子の創出に向けた戦略的分子合成研究
- ⑥ 日本化学会中国四国支部岡山地区講演会一有機化学者による生命科学へのアプローチ、2016 年 12 月 10 日、岡山県岡山市・岡山大学理学部、品田哲郎、生命現象の解明に貢献する有機合成化学：オレフィンの立体制御を切り口として
- ⑦ 大阪市立大学・府立大学ニューテクノフェア 2016、大阪府大阪市、大阪産業創造館、2016 年 12 月 6 日、品田哲郎、がん・脳神経関連疾患を攻略するための分子開発
- ⑧ 静岡大学グリーン科学技術研究所セミナー、天然物化学の新展開、2016 年 11 月 25 日、静岡県静岡市、静岡大学農学部、品田哲郎、生物活性天然物の探索研究：有機合成化学者のチャレンジ
- ⑨ 徳島文理大学薬学部セミナー、2016 年 7 月 7 日、徳島県徳島市、徳島文理大学薬学部、品田哲郎、鎖状テルペン分子が先導する天然物化学
- ⑩ 第 35 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」(平成 27 年 8 月 1 日、京都府京都市、京都府立大学下鴨キャンパス) 坂井健太、荻田祐馬、上田翔太、遠塚悠輔、保野陽子、品田哲郎、テルペン酵素反応機構の解明を指向した

## 重水素化プローブの選択的合成

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/henkan/>

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

品田 哲郎 (SHINADA, Tetsuro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号： 30271513