

平成26年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書 〔追跡評価用〕

◆記入に当たっては、「平成26年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書等記入要領」を参照してください。

平成26年 4月25日現在

研究代表者 氏名	磯部 稔	所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)	名古屋大学・名誉教授
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		
課題番号	16002007		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 磯部 稔 (名古屋大学・名誉教授) 研究分担者 安立 昌篤 (名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教) 研究分担者 久世 雅樹 (名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教)		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成16年度	69,000 千円
平成17年度	37,900 千円
平成18年度	34,696 千円
平成19年度	34,009 千円
平成20年度	24,900 千円
総計	200,505 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

有機合成化学から生物有機化学までを統一概念とするところが本研究の独創的なところである。本研究で展開される手法と結果の解析方法を、合理的分子設計にフィードバックする。例えば、分子科学においてアフィニティが著しく高い点で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将来の社会に貢献するという意義も深い。また、研究成果自体も純粋に生物有機化学としての価値も高い。

研究代表者は、研究期間中は合成と解析を総合的に進めた。研究分担者等はそれぞれの専門分野において、合成・生物活性・タンパク質機能・部位特異的修飾などから協力した。

(1) フグ毒で有名な麻痺性食中毒原因物質テトロドトキシン(TTX)の世界初の不斉全合成を達成しており、研究期間中にはさらに各種類縁体・11-デオキシ TTX の合成 (*Chem. Euro. J.* 2004, 10, 452) (*Chem. Asian J.* 2006, 1-2, 125)、第2段の不斉全合成を完成している (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 4782)。本研究期間終了後にも改良合成 (*Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2010, 83, 66) (*Synthesis*, 2010, 1992)や5,11-ジデオキシアナログの合成(*J. Org. Chem.* 2013, 78, 1699)、等を完成した。TTX 合成を総説にまとめた (Nishikawa, T.; Isobe, M. *The Chemical Record*, 2013, 13, 286)。さらに高位同族体チリキトキシンの全合成に成功した (*Chem. Eur. J.* 2014, 20, 1247)。研究期間終了後は、名古屋大学西川・安立と化学合成、また生物学的な解析はもっぱら東北大山下らとの共同研究によって、5,11-ジデオキシ体がフグ毒抽出物と合成標品とを同定する事で、その超微量試料によって生合成的な新知見を確立した。

(2) シガトキシン CTX は、シガテラ毒の本体であり、作用様式は異なるものの TTX と同じナトリウムチャンネルタンパクを標的タンパク質とする。研究期間中にその合成研究を行い(*Org. Lett.* 2006, 8, 1205)(*Chem. Lett.* 2006, 35, 464)(*Tetrahedron* 2007, 63, 5886)、期間終了直前(2008.9)にその全合成を達成した(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 2941)。全合成と総合的研究については、総説に解説した(*Nat. Prod. Rep.*, 2010, 27, 1204)。

その後、生物研究者との共同研究のためにミニ CTX を合成したが、そこで研究は止まっている。シガトキシンの作用機作については、オカダ酸と交叉抗体作用があるというハワイ大学 Hokama らとの共同研究がきっかけの一つとなり、シガトキシンの側鎖を含む 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ハワイ大学 Hokama らとの共同研究により研究期間中に見つけた(*J. Clin. Lab. Anal.* 2006, 20, 126)(*J. Clin. Lab. Anal.* 2008, 22, 239)。

(3) セレウリド (*B. Cereus* 菌の生産する 36 員環状デプシペプチドで、嘔吐毒性を持ち乳製品を汚染する)の構造については、同菌の産生する同族体による分子多様性を微量解析した(*Int. J. Mass Spectrometry* 2004, 235, 123)。化学合成を改良し、異方性効果をもつ金属 Eu を用いた NMR による解析法および X-線結晶解析と総合した手法を開発した。類似構造を持つカリウム選択的イオノフォア・バリノマイシン (抗生物質・無毒)とも比較することによりその 3 次元構造と生物機能の差を解明し、下痢性食中毒物質セレウリドの合成と機能を解明した。発表は期間ぎりぎりとなった(*Chem. Asian J.* 2009, 4, 688) (*Synthesis*, 2009, 2184)。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか (続き)

- (4) 下痢性貝毒オカダ酸 OKA の 2 型タンパク質脱リン酸酵素阻害剤とトートマイシン TTM 1 型酵素阻害剤 について、タンパク質との相互作用解析のために設計した多数の TTM 光親和性標識体・蛍光標識体・4 炭素原子を 100%¹³C で標識した化合物・第 2 世代光親和性標識体など 20 種類以上の類縁体を合成した (*Tetrahedron* **2007**, *63*, 2593)。実際にタンパク質脱リン酸酵素 PP1 γ との相互作用解析を行い、さらに天然 TTMDA よりも阻害活性が 50%程度強い類縁体を創製した(*Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1747)。オカダ酸および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 法で決定しているが、微量で検出可能な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% ¹³C で標識した化合物を合成し、相互作用の詳細を研究した (*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)。研究期間後、より一般的なタンパク質・基質分子相互作用にも適用可能な超微量分析法を開発した(*Tetrahedron*, **2010**, *66*, 1735)。さらに総説としてまとめた(*Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 410)。
- (5) トビイカ発光タンパク質シンプレクチンとその発光素子間相互作用について詳細な分子機構を解明し、研究期間中に天然系より 200%発光能の強い分子を創製した(*Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **2008**, *84*, 386)。一般的な研究ツールとしても開発可能性を秘めている。期間終了後にもさらに分子を設計をすすめ、セレンテラジンの類縁体を多数合成し(*Tetrahedron*, **2011**, *67*, 1150, *Heterocycles*, **2012**, *86*, 1323)その発光能・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(Dynamic Chirality)という新概念を導入してその発光機構解明に成功した(*Chemistry An Asian J.* **2011**, *6*, 2080)。
- (6) 昆虫卵休眠覚醒における時間読みタンパク質とその調節ペプチドの測時機構の研究(*J. Insect Physiology* **2006**, *52*, 461)を推進した。金属・糖タンパク質分子の動的なコンフォメーション変化を、銅イオンのリガンド位置の変化として読みとる Pin-Point 修飾方法 (位置選択的な酸化修飾と Nano-LC-ESI-Q-TOF-MS、MS/MS 法によって修飾アミノ酸の位置を決定して、すでに報告した半定量的にその変化を追跡する方法 (*J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9268) をもとに改良した。測時機構がタンパク質分子のコンフォマーに対応しているという作業仮説をたて、研究期間中にその妥当性を示す結果を得た(*Chem BioChem.* **2006**, *7*, 1590)。さらにタンパク質分子上で起こる変化を超微量 (ピコモル) で検出し、糖部分の分子多様性について (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2527)、その休眠性や熱帯種との比較を行った(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2009**, *73*, 1578)。
- (7) 抗マラリア活性物質マリンガマイドの立体構造決定 (*Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 114)と全合成 (*Tetrahedron* **2007**, *63*, 3217)を期間中に完成した。
- 期間後の発展は、書籍(「天然物化学・生物有機化学 II —全合成・生物有機化学—」朝倉化学大系 14 巻 278 ページ (朝倉書店) 2008.6.30)と総説(化学と生物・文書館, 日本農芸化学会 依頼原稿 「天然物化学 その魅力と領域---立体制御合成の奥義」 ---前編 (7・8 月号) 525-536、609-615, **2012.**)にまとめた。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2)論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

(A): 論文発表 *Original Article* 原著論文

1. Syntheses of N-Acylisoxazolidine Derivatives, related to a partial structure found in Zetekitoxin AB, a golden frog poison. Nishikawa, T.; Urabe, D.; Isobe, M. *Heterocycles*, **2009**, *79*, 379-385.
2. Differentiation of Coelenteramide Sulfates from Phosphates by means of Hydrogen/Deuterium Exchange with Ion Trap Mass Spectrometry. Doi, I.; Kuse, M.; Nakashima, Y.; Tani, N.; Isobe, M. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan (JMSS)*, **2009**, *57*, 89-95.
3. Total Synthesis of Ciguatoxin. Hamajima, A.; Isobe, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2941-2945.
4. Higher Structure of Cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*, with special comparison with Valinomycin, an antibiotic from *Streptomyces fulvissimus*. Makarasen, A.; Yoza, K.; Isobe, M. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 688-698.
5. Novel Stereocontrolled Synthesis of Highly-functionalized Cyclobutanes by Epoxide Opening through a Carbanion Intermediate in Heteroconjugate Addition. Adachi, M.; Yamauchi, E.; Komada, T.; Isobe, M. *Synlett.* **2009**, 1157-1161.
6. Molecular Heterogeneity of TIME-EA4, a Timer Protein in Silkworm Diapause Eggs. Pitchayawasin-Thapphasaraphong S.; Tani, N.; Isobe, M.; Kai, H.; Kurahashi, T.; Kato, J.; Trisunan, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2009**, *73*, 1578-1585.
7. Synthesis of four Lysine-linked cereulide analogs showing K⁺ ionophoric activity as lead compounds for emetic toxin-detection by immunoassays. Makarasen, A.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Synthesis*, **2009**, (#13) 2184-2194.
8. ¹H NMR Aided Elucidation of Products Derived from Photodegradation of Ethyl 3-azido-4,6-difluorobenzoate in 2,2,2-Trifluoroethanol. Sydnes, M. O.; Kuse, M.; Doi, I.; Isobe, M. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 3863-3870.
9. Selective protein modification by the hydroperoxide intermediate in a photoprotein, aequorin. Doi, I.; Kuse, M.; Nishikawa T.; Isobe, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 3399-3404.
10. Substituent effect of imino-O-arenesulfonates, a coupling partner in Suzuki-Miyaura Reaction for substitution of the Pyrazine Ring: A Study for the Synthesis of Coelenterazine Analogs. Makarasen, A.; Kuse, M.; Nishikwa, T.; Isobe, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **2009**, *82*, 870-878.
11. A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in starfish, *Asterina pectinifera*. Mita, M.; Yoshikuni, M.; Ohno, K.; Shibata, Y.; Paul-Prasanth, B.; Pitchayawasin, S.; Isobe, M.; Nagahama, Y. *Proc. National Academy of Sciences*, **2009**, *106*, 9507-9512.
12. Oxidatively Induced Cu for Mn Exchange in Protein Phosphatase 1 Active Site Analysis. Miyazaki, A.; Sydnes, M. O.; Isobe, M.; Ohinata, H.; Miyazu, M.; Takai, A. *Bioorganic Med. Chem.*, **2009**, *17*, 7978-7986.
13. Prevention of Copper-Induced Calcium Influx and Cell Death by Prion-Derived Peptide in Suspension-Cultured Tobacco Cells. Kagenishia, T.; Yokawa, K.; Kuse, M.; Isobe, M.; Bouteaua, F.; Kawano, T. *Z. Naturforsch.* **2009**, *64 c*, 411 - 417.
14. Development of a new protein labeling strategy, oxidation labeling part 1: Preliminary evaluation and synthesis of tautomycin containing a metal coordinating unit. Sydnes, M. O.; Miyazaki A.; Isobe, M.; Ohinata, H.; Miyazu, M.; Takai, A. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 1735-1741.
15. Synthesis of an Advanced Intermediate Bearing Two Hydroxy Groups for (-)-Tetrodotoxin and Its Analogs. Nishikawa, T.; Koide, Y.; Adachi, M.; Isobe, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **2010**, *83*, 66-68.
16. Synthesis of Glycocinnasperimicin D, Nishiyama, T.; Kusumoto, Y.; Okumura, K.; Hara, K.; Kusaba, S.; Hirata, K.; Kamiya, Y.; Isobe, M.; Nakano, K.; Kotsuki, H.; Ichikawa, Y.

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか (続き)

(*Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 600 – 610.

17. Scalable Synthesis of a New Dihydroxylated Intermediate for Tetrodotoxin and its Analogs, Nishikawa, T.; Hiramatsu, T.; Araki, H.; Isobe, M. *Synthesis*, **2010**, 1992-1998.
18. Chiral Cyclobutane Synthesis by Exploiting a Heteroatom-Directed Conjugate Addition. Tsao K-W.; Isobe, M. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 5338-5341.
19. Suzuki-Miyaura Coupling for General Synthesis of Dehydrocoelenterazine applicable for 6-position Analogs directing toward Bioluminescence Studies. Phakhodee, W.; Toyoda, M.; Zhou J. M.; Khunnawutmanotham, N.; Isobe, M. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 1150-1157.
20. Synthesis of bicyclo[4.2.0]octan-2-ol, a substructure of solanoelepin A. Isobe, M.; Niyomchon, S.; Cheng, C-Y.; Hasakunpaisarn, A. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 1847-1850.
21. Synthetic Study on Suspendole, an Indole Sesquiterpene Alkaloid: Stereocontrolled Synthesis of the Sesquiterpene Segment Bearing All Requisite Stereogenic Centers. Sugino, K.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Synlett*, **2011**, 647-650.
22. Dynamic Chirality Determines Critical Roles for Bioluminescence in Symplectin-Dehydrocoelenterazine System, Kongjinda, V.; Nakashima, Y.; Tani, N.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Yu, C-H.; Harada, N.; Isobe, M. *Chemistry An Asian J.* **2011**, *6*, 2080-2091.
23. Concise Synthesis of Deformylflustrabromine, a Marine Indole Alkaloid, through a Propargyl Dicobalt Hexacarbonyl Complex Isaji, H.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 1079-1081.
24. Three types of reaction of carbon nucleophile toward methoxyphenyl-acetylenic sulfones, Cheng, C-Y.; Isobe, M. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 9957-9965.
25. Total Synthesis of Polygalolide A. Adachi, M.; Yamada, H.; Isobe, M.; Nishikawa, T., *Org. Lett.*, **2011**, 6532-6535.
26. Stereocontrol with Trimethylzincate toward Gibberellin Synthesis. Isobe, M.; Chiang, C.-T.; Tsao, K.-W.; Cheng, C.-Y.; Bruening, R., *Euro J. Org. Chem.*, **2012**, *11*, 2109-2113.
27. Synthetic studies on pactamycin, a potent antitumor antibiotic. Matsumoto, N.; Tsujimoto, T.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Royal Chem. Soc. Adv.*, **2012**, *2*, 9448-9462.
28. Chemical Synthesis of Coelenterazine and Its analogs: New Route toward four Segment-Couplings. Chou, C.-M.; Tung, Y.-W.; Lin, M.-I.; Chang, D.; Phakhodee, W.; Isobe, M. *Heterocycles*, **2012**, *86*, 1323-1339.
29. Cobalt-mediated Synthesis of the Tricyclo[5.2.1.0^{1,6}]decene Framework in Solanoelepin A. Tsao, K.-W.; Cheng, C.-Y.; Isobe, M. *Org. Letters*, **2012**, *14*, 5274-5277.
30. An Improved Synthesis of (-)-5,11-Dideoxytetrodotoxin. Adachi, M.; Imazu, T.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 1699-1705.
31. Stereocontrolled Total Synthesis of Polygalolide A. Yamada, H.; Adachi, M.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Chem. Asian J.*, **2013**, *8*, 1428-1435.
32. First identification of 5,11-dideoxytetrodotoxin in marine animals, and characterization of major fragment ions of tetrodotoxin and its analogs by high resolution ESI-MS/MS. Yotsu-Yamashita, M.; Abe, Y.; Kudo, Y.; Ritson-Williams, R.; Paul, V. J.; Konoki, K.; Cho, Y.; Adachi, M.; Imazu, T.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Mar. Drugs*, **2013**, *11*(8), 2799-2813.
33. Total Synthesis of Chiriquitoxin, an Analogue of Tetrodotoxin Isolated from the Skin of a Dart Frog. Adachi, M.; Imazu, T.; Sakakibara, R.; Satake, Y.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 1247-1251.

(B1): 論文発表 *Review Article in English: 英文総説*

1. C-Glycosylation, Nishikawa, T.; Adachi, M.; Isobe, M. *Glycoscience*, (Ed. Fraser-Reid, B., Tatsuta, K., Thiem J.) Chapter 3.8, p756-811, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**.
2. Interactions between TIME and PIN could play a role in the system that controls the duration of diapause development and synchronization with seasonal cycles in the silkworm *Bombyx mori*. Kai, H.; Tani, N.; Isobe, M. *Entomol. Res.* **2008**, *38*, 179-187.
3. Elegant Total Synthesis of Natural Product, Chapter 8-Medium size Ether Ring, Isobe, M.; Pattarawarapan, M.; Phakhodee, W.; Charoonniyomporn, S.; Hamajima, A. *Submitted on*

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか (続き)

Jan 19, 2009. To be published from Wiley-VCH in July, 2014.

4. Tautomycin's Interactions with Protein Phosphatase 1, Sydnes, M. O.; Isobe, M. *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 410-420.
5. Isobe, M.; Hamajima, A. Ciguatoxin: developing the methodology for total synthesis, *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, *27*, 1204-1226. DOI: 10.1039/paper no. B919467N.
6. Conjugate Addition Approach for Natural Product Synthesis, inspired by Gibberellin and Solanoelepin A Targets. Isobe, M. *Pure & Appl. Chem.*, **2013**, *85*, 1149-1160.
7. Synthesis of Tetrodotoxin, A Classic but still Fascinating Natural Product. Nishikawa, T.; Isobe, M. *The Chemical Record*, **2013**, *13*, 286-302.
8. Isobe, M.; Ploysuk, C. The [2,3]-Wittig Rearrangement, Chapter __ *Molecular Rearrangements in Organic Synthesis*, Edited by Christian Rojas, Wiley-VCH **2014**.

(B2): 論文発表 *Review Article in Japanese: 日本語総説*

1. 磯部 稔・西川俊夫、薬学雑誌Review「誌上シンポジウム」 多国間学術拠点形成事業「アジアの最先端有機化学」(斎藤直樹編) YAKUGAKU ZASSHI **2009**, *129*, 401-406.
2. 下村脩著(他 共同執筆・磯部 稔・村上龍男・長野哲雄・大隅典子・高橋真理子)「クラゲの光に魅せられて」ノーベル化学賞の原点p89-148: 朝日新聞社(ノーベル化学賞受賞記念・下村脩講演会---パネル討論会「光の魅力、探求する喜び」に加筆修正) **2009.6.10**.
3. 磯部 稔・西川俊夫・市川義康「テトロドトキシンの合成 p232-234」「グリコシンアスペリミジンの合成 p81-82」「天然物の全合成 2000-2008(日本)」分担執筆・有機合成化学協会編・化学同人 **2009.6**.
4. 磯部 稔「」化学と生物・文書館, 日本農芸化学会 依頼原稿 「天然物化学その魅力と領域---立体制御合成の奥義」---前編 (7月号) 525-536, **2012**.
5. 磯部 稔「」化学と生物・文書館, 日本農芸化学会 依頼原稿 「天然物化学その魅力と領域---立体制御合成の奥義」---後編 (8月号) 609-615, **2012**.

(C): 招待講演リスト (公的国際会議分) *Invited and Plenary Lectures at International Conferences*

1. Natural Product Synthesis and Bioorganic Approach Elucidating the Molecular Mechanism, **Invited Lecture** at PERCH Program, Pataya, Thailand May 3-7 (**2009**).
2. Invited Lecture Serise by Malaysian Chemical Society, June-July (**2009**).
3. Start-up Symposium of ACP II, **Invited Lecture** Chiba, Japan, organized by Atsushi Nishida, Aug, **2009**.
4. Naito International Conference "Chemical Biology 2"—An Emerging Field Inspired by Natural Product Chemistry" (organized by Hiroyuki Osada), **Invited Paper**; Gatoh Kingdom Sapporo, **2009**, Sep 8-11.
5. , "Stereocontrol in Synthesis of Natural Products", 5th Japanese-Sino Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists (Organizer, Qin), **Plenary Lecture**, Chendu, China, October, **2009**.
6. "Heteroconjugate Addition-based Synthesis of Natural Products", **Invited Lecture**, *International Conference on Organic Synthesis (IUPAC ICOS-18)*, Bergen, Norway, August **2010**.
7. 13th Marine Natural Products, **Plenary Lecture**, "Marine Natural Product Synthesis with new Methodologies and Strategies for Motivation", Phuket, Thailand, October **2010**.
8. Nagoya Medal Symposium Panel Discussion: Nagoya, Japan, October **2010**.
9. PreSymposium **Invited Lecture**, Int. Conf. Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia-5 Khaoshung, Taiwan, November **2010**.
10. "New Molecular Science from Synthetic and Bioorganic Chemistry related to Natural Products" **Plenary Lecture** at 14-ACC (Asian Chemical Congress): Bangkok, Thailand, September 5-8, **2011**.
11. "New Molecular Science from Synthetic and Bioorganic Chemistry related to Natural Products" Start-up Symposium of Chemical Biology of Natural Products, **Plenary Lecture** at

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか (続き)

- at JSPS New Research Field Project, Keio University, Yokohama, Japan, Oct. 11, 2011.
12. **Invited Lecture** at IUPAC ICOS-19, Melbourne, Australia July 1-6, 2012.
 13. Invited Lecture at 1st International Symposium on Natural Product Synthesis and Process Methods for Drug Manufacture, Chongqing, China, September 26-28, 2012.
 14. 2nd Junior ACP **Invited Lecture**, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, December 8, 2012.
 15. 7th Asian Core Program ICCEOCA-7, *Invited Lecture*, Singapore, December 11-15, 2012.
 16. **Invited Lecture** at the 2nd Thai-Taiwan Mini-Symposium, Mahidol University, Thailand, Jan. 18, 2013.
 17. PACCON 2013 **Invited Lecture**, Tide Hotel, Bansang, Thailand Jan 22-25, 2013.
 18. ISOR-11, **Invited Lecture** Taipei, Taiwan Nov. 19-22, 2013.
 19. PACCON 2014 **Invited Lecture**, Centara Hotel & Convention Center, Khon Kaen, Thailand Jan 8-10, 2014.
- (以後は予定)
20. **Plenary Lecture** at IUPAC ICOS-20, Budapest, Hungary June 29-July 4, 2014.
 21. **Plenary Lecture** at 22nd *Isoprenoid Conference*, Prague, Czech Republic Sep 7-10, 2014.
 22. M. Isobe, **Invited Lecture** at 2nd International Symposium on Natural Product Synthesis and Process Methods for Drug Manufacture, Nanjing, China, September 21-24, 2014.

1.特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(3)研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

2008年3月に名古屋大学を定年退職し、研究期間内は同高等研究院特任教授として研究を継続した。残念ながら終了前の2008年度に申請した科研費（特別推進研究の2年間の継続申請）が不採択となったためと定年退職により研究費申請資格が無くなったため、2009年度以降研究費は得ていない。幸い、2009年度以降日本を離れ海外（台湾）の大学に滞在し、国家会(National Science Council-Taiwan)から Chair Professor として2014.4まで台湾國立清華大學において細々と教育・研究を継続する機会を得た。上記の期間後はすべて名古屋大学および清華大學との共同研究による研究成果である。

(4)特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

特別推進研究では、低分子化合物とその生理活性の標的タンパク質との相互作用研究法について、他に例を見ない方法論を創出した。1995年にESI-MSをイオン源としてQuadropole-TOFハイブリッド型が英国マイクロマス社によって発売されたことに始った。これに超微量試料をノンスプリットで全量をキャピラリー液体クロマト（ナノHPLC）装置を試作し、ESI型質量分析で検出することにより、標的タンパク質の変動を、多面的にとらえる事が可能となった。ナノHPLCの試作には市販品の仕様では目的を達成できないために、装置メーカーによる技術的な協力を必要とした。しかし本特別推進開始時期までに、ピコモルの修飾タンパク質の修飾位置を特定するための準備段階は良好であったが、さらに改良を重ねた。また超微量のタンパク質とリガンドの動態（変化）についても追跡する事が可能である。具体的にはnanoHPLC-Q-TOF-MS/MS2を基盤としていたが、本研究費によりIT-MS（イオントラップ）検出器を設置することにより、MS_n（多段階質量分析）が可能となり、感度・精度ともに飛躍的に向上した。本研究成果がこれらの装置の発展に直接反映しているかどうかはわからないが、逆にこの分野がバイオサイエンスに質量分析を最終検出装置として有効であることを示す事による貢献はあったと考えられる。世界中のESI-MSに関連する報文数は2005-1116報、2006-1221報、2007-1424報、2008-1575報、2009-1740報である。最近ではさらに質量分析検出器の高性能化が分子種選択濃縮・多段階フラグメンテーション・高分解能化しているため、ESI-MSとしての統計は2010年の1875報を頂点として、その後は超伝導磁石を用いたFTMSや高性能技術MSに移転している。ただし今日まで、MSへの試料導入部分の改善はほとんどないために、超微量試料のほぼ全量をMSに導入することができる研究代表者のキャピラリーHPLCは、きわめて先導性の高い手法である。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況 (学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等)

著しく生理活性の強い天然有機化合物としてテトロドトキシンやシガトキシンをみなす。これらに共通する標的ナトリウムチャンネルタンパク質の研究は、主として別分野である生化学領域で進歩してきた。必要な研究用類縁化合物は化学合成により供給する以外には無いので両分野の融合が必要だ。ただし分野をまたがって引用することは多くない。研究期間中に研究代表者らが発表したこれらの分子の化学合成は、全9報で引用回数の合計は234回(平均26回/報)であった。また、質量分析を検出法とする超微量分析関連研究論文については9報74回、タンパク質脱リン酸酵素阻害では4報33回、生物発光5報51回、などなどとなっている。テトロドトキシンに関する論文はSciFinderによれば世界中で32881報、研究終了後は3129報、テトロドトキシン自身の分子に関しては1065報、しかしテトロドトキンの全合成を完成した論文は、我々の2ルートと、米国J. DuBois、東工大・佐藤の合わせても4ルートのみで、シガトキシンは東北大平間らと我々の2ルートのみである。しかし、これらの全合成では、文献を引用はしても相互に研究果実を活用する事は全くない。むしろ、他グループの研究を活用する事は創造性に欠け独自性も無いものと判断されるのが実情である。しかし、その後の展開は別で、合成から生物研究へは、例えば東北大学の山下らが我々の合成標品を用いてふぐ卵巢中の5,11-dideoxytetrodotoxinを確実な分子同定へ活用したこと(*Marine Drugs, Mar. Drugs* 2013, 11, 2799)、方法は高分解能LCMSである。シガトキシンでも、ハワイ大学のHokamaと研究代表者の共同研究(*J. Clinical Laboratory Analysis* 2006, 20, 126; 2008, 22, 239, 期間中に2報発表)の例がある。

超微量分析の例では、昆虫休眠覚醒に関与する時間読みタンパク質の時間進行をタンパク質のコンフォメーション変化によるものとして、それぞれのコンフォーマー上のヒスチジンリガンドが第3金属の銅イオンの触媒する水酸化ラジカルによって酸化修飾され、変わったオキシヒスチジンが質量16Da増加することをnanoHPLC-Q-TOF(IT)-MS/MS(n)で読み取る事を原理としている。コンピューターで発生させた3次元構造上の変化位置を追跡して、コンフォメーションを推定する手法である。測時開始時間をそろえた時計タンパク質を実験ごとに1マイクログラム(数ピコモル)をもちいて、そのトリプシン消化ペプチド全量をnanoHPLC-Q-TOF-MSで読むことができた。この手法では、限界もあるがタンパク質の動的な変化を実験的に化学修飾で捕らえる手法としては数少ない成功例である。2006年の*ChemBioChem*の引用数は僅かに16件である。*Chem BioChem*. 2006, 7, 1590の研究が、世界の沢山の研究グループにインパクトを与えたかどうかはまだわからないが、分析系装置はSCMマグネットを用いたFTMS時代となり今後増々重要な領域となる事は間違いない。ピコモル、フェムトモルで実タンパク質の挙動を捕らえることができるのは、唯一この手法であろう。X-線結晶解析やその他の分析技術と合わせて、総合的なアプローチが必要であると考えられる。

以上の様に、当特別推進研究では、これまで全く手がかりさえなかったきわめて困難な研究課題に対して、研究手法や研究の進め方に関する力強い手がかりを示し、先導的な役割を果たしている。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況 (続き)

(2) 論文引用状況 (上位 10 報程度を記述してください。)(引用数は SciFinder による)

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	An Efficient Total Synthesis of Optically Active Tetrodotoxin. Nishikawa, T.; Urabe, D.; Isobe, M. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2004 , <i>43</i> , 4782-4785.	テトロドトキシン不斉全合成の速報。第一世代の合成は、酸素原子導入を段階的に進められるため、生合成仮説に基づく多くの化合物を合成することができる。類縁体の系統的な合成が可能なルートとして重要である。	48
2	Synthesis of Model Compound Containing an Indole Spiro- β -lactam Moiety with Vinylchloride in Chartelline. Nishikawa, T.; Kajii, S.; Isobe, M. <i>Chem. Lett.</i> 2004 , <i>33</i> , 440-441.	インドール環とスピロ型 4 員環ラクタム等の特異的な構造をもつ化合物チャリテリンのモデル化合物に関する合成研究。	39
3	Convergent Synthesis of the Right-Hand Segment of Ciguatoxin. Hamajima, A.; Isobe, M. <i>Org. Lett.</i> 2006 , <i>8</i> , 1205-1208.	シガトキシンの右側部分の合成。巨大分子の部分合成には、抗原抗体のエピトープ検索などに供することができるために注目される。	35
4	Stereocontrolled Synthesis of 8,11-Dideoxytetrodotoxin, An Unnatural Analogue of Puffer Fish Toxin. Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. <i>Chem. Euro. J.</i> 2004 , <i>10</i> , 452-462.	テトロドトキシン不斉全合成の方法を利用して、酸素原子導入を段階的に進める手法 (上記 #1) をもとに 8,11-デオキシ TTX を合成した。10 年後に (2013 年) 天然から検出された。	24
5	Stereocontrolled syntheses of α -C-mannosyltryptophan and its analogues. Nishikawa, T.; Koide, Y.; Kajii, S.; Wada, K.; Ishikawa, M.; Isobe, M. <i>Org. Biomol. Chem.</i> 2005 , <i>3</i> , 687-700.	炭素原子の直結した C-マンノシドは、糖タンパク質成分として報告され注目を集めているが、その生理的意義を解明するための化学合成が求められている。ここではその立体制御合成を報告した。	24
6	Novel Synthesis of Bromoindolenine with Spiro- β -lactam in Chartelline. Nishikawa, T.; Kajii, S.; Isobe, M. <i>Synlett</i> 2004 , 2025-2027.	インドール環とスピロ型 4 員環ラクタム等の特異的な構造をもつ化合物チャリテリンの部分合成に関する合成研究。	23
7	Total synthesis of malyngamide X and its 7'S- <i>epi</i> Isomer. Suntornchashwej, S.; Suwanborirux, K.; Isobe, M. <i>Tetrahedron</i> 2007 , <i>63</i> , 3217-3226.	ウミウシから得られる特異な構造を持つ抗マラリア活性海洋天然物。遠隔位に不斉炭素原子をもち、この両ジアステレオマーを不斉合成した。どちらもが天然物と一致するためキラル溶質法を開発して天然型が 7(R) と決定した。	18
8	One-Pot Reductive Monoalkylation of Nitro Aryls with Hydrogen over Pd/C. Sydnes, M.O.; Isobe, M. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2008 , <i>49</i> , 1199-1202.	芳香族ニトロ基を単一フラスコ反応により還元モノアルキル化する反応を開発した。	17
9	An Efficient Total Synthesis of Optically Active Tetrodotoxin from Levoglucosenone. Urabe, D.; Nishikawa, T.; Isobe, M. <i>Chem. Asian J.</i> 2006 , <i>1</i> -2, 125-135.	テトロドトキシン不斉全合成の詳細本論文。第一世代の合成は、酸素原子導入を段階的に進められるため、生合成仮説に基づく多くの化合物を合成することができる。実際に期間終了後も多数のデオキシ TTX 体合成を達成している。	17
10	The Molecular Mechanism of the Termination of Insect Diapause, Part 1: A Timer Protein, TIME-EA4, in the Diapause Eggs of the Silkworm <i>Bombyx mori</i> is a Metallo-Glycoprotein. Isobe, M.; Kai, H.; Kurahashi, T.; Suwan, S.; Pitchayawasin-T. S.; Franz, T.; Tani, N.; Higashi, K.; Nishida, H. <i>Chem BioChem.</i> 2006 , <i>7</i> , 1590-1598.	昆虫休眠覚醒時には、いわゆる時計タンパク質 TIME-EA4 が 38 日間の時間を可逆的に計測している。この分子機構は金属・糖タンパク質である時計タンパク質に休眠ホルモンが (その後 PIN ペプチド) 熱安定な複合体を形成し、覚醒時にはタンパク質のコンフォメーションを変化させる事が、計時機構の実態である。これをタンパク質のピンポイント修飾解析法を開発して解明した。	16

【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Total Synthesis of Ciguatoxin. Hamajima, A.; Isobe, M. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2009 , <i>48</i> , 2941-2945.	海洋毒性物質として最強のシガトキシンは、分子量1100不斉炭素原子数54エーテル環数13をもつ複雑構造のポリエーテル化合物で、その7-8-9員エーテル環閉環にコバルト錯体を活用するなど、独自の合成手法を開発して全合成した。	30
2	Higher Structure of Cereulide, an emetic toxin from <i>Bacillus cereus</i> , with special comparison with Valinomycin, an antibiotic from <i>Streptomyces fulvissimus</i> . Makarasen, A.; Yoza, K.; Isobe, M. <i>Chem. Asian J.</i> 2009 , <i>4</i> , 688-698.	セレウス菌により生産される嘔吐毒セレウリドの構造決定と化学合成を皮切りにした研究の集大成。毒性発現がカリウム特異的リガンド機能をもつこと、抗生物質バリノマイシン（無毒）と類似高次構造を持ちながら、構成アミノ酸オキシ酸の配列差が生理機能の差をもたらす事を説明。	8
3	Tautomycin's Interactions with Protein Phosphatase 1, Sydnes, M. O.; Isobe, M. <i>Chem. Asian J.</i> 2010 , <i>5</i> , 410-420.	トートマイシンは1型選択的タンパク質脱リン酸酵素阻害剤である。この両者の分子間相互作用を、2型選択的阻害剤オカダ酸と比較しつつ、これまでのNMRや蛍光スペクトル等の手法を総合的に解説した。	3
4	Oxidatively Induced Cu for Mn Exchange in Protein Phosphatase 1g: A New Method for Active Site Analysis. Miyazaki, A.; Sydnes, M. O.; Isobe, M.; Ohinata, H.; Miyazu, M.; Takai, A. <i>Bioorganic Med. Chem.</i> , 2009 , <i>17</i> , 7978-7986.	昆虫休眠の時間読みタンパク質のコンフォメーションの時間変化を、スーパーオキシドディスムターゼの銅イオンを活用したタンパク質高次構造解析を例として一般化した。さらに金属タンパク質の金属を銅イオンに置き換えてこの手法の有用性を示した。	2
5	Development of a new protein labeling strategy, oxidation labeling part 1: Preliminary evaluation and synthesis of tautomycin containing a metal coordinating unit. Sydnes, M. O.; Miyazaki A.; Isobe, M.; Ohinata, H.; Miyazu, M.; Takai, A. <i>Tetrahedron</i> , 2010 , <i>66</i> , 1735-1741.	生理活性低分子が標的タンパク質と分子間相互作用を解析する際に、光親和性反応と放射活性を用いない新しい超微量（ピコモル以下）手法として、タンパク質脱リン酸酵素1型選択的阻害剤トートマイシンを例として、キャピラリーLCマスをを用いる手法を提案した。	1
6	Dynamic Chirality Determines Critical Roles for Bioluminescence in Symplectin-Dehydrocoelenterazine System, Kongjinda, V.; Nakashima, Y.; Tani, N.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Yu, C-H.; Harada, N.; Isobe, M. <i>Chemistry An Asian J.</i> 2011 , <i>6</i> , 2080-2091.	タンパク質酵素基質間相互作用を、発光タンパク質Symplectinと酸化型発光基質（人工合成物）を用いて反応中間体のみ発生する不斉炭素原子の違いにより、発光能を著しく制御する。動的な不斉中心精密立体化学解析。	1
7	Stereocontrol with Trimethylzincate toward Gibberellin Synthesis. Isobe, M.; Chiang, C.-T.; Tsao, K.-W.; Cheng, C.-Y.; Bruening, R., <i>Euro J. Org. Chem.</i> , 2012 , <i>11</i> , 2109-2113.	亜鉛アート錯体が共役付加反応性を示すという1977年の著者自身の論文を、植物ホルモン・ジベレリンのA環の立体制御合成に活用した。	1
8	Cobalt-mediated Synthesis of the Tricyclo[5.2.1.0 ^{1,6}]decene Framework in Solanoclepin A. Tsao, K.-W.; Cheng, C.-Y.; Isobe, M. <i>Org. Letters</i> , 2012 , <i>14</i> , 5274-5277.	シガトキシンの合成研究で基盤を培ったコバルトの化学を、天然物のトリシクロ環合成法として開発した。具体的には農業害虫ジャガイモシスト線虫孵化遊出促進物質ソラノエクレピンAの部分合成を達成。	1
9	Molecular Heterogeneity of TIME-EA4, a Timer Protein in Silkworm Diapause Eggs. Suthasinee Pitchayawasin-Thapphasaraphong, Naoki Tani, Minoru Isobe, Hidenori Kai, Takuya Kurahashi, Junko Kato, Saikwan Trisunan, <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 2009 , <i>73</i> , 1578-1585.	昆虫休眠の覚醒に関する時間読みタンパク質は、金属糖タンパク質である。卵休眠の状況が異なる熱帯（タイ）地域での休眠卵が、糖鎖構造の結合様式が異なる事、アミノ酸に変異のあることを解析。	1
10	Total Synthesis of Chiriquitoxin, an Analogue of Tetrodotoxin Isolated from the Skin of a Dart Frog. Adachi, M.; Imazu, T.; Sakakibara, R.; Satake, Y.; Isobe, M.; Nishikawa, T. <i>Chem. Eur. J.</i> 2014 , <i>20</i> , 1247-1251.	フグ毒テトロドトキシンのアナログで、南米産の毒ガエルなどから超微量得られていたチリキトキシンの推定構造物質を、テトロドトキシン合成に準じた方法で完成した。	1

3.その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1)研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

最近始った Research Gate（あまり公式なデータベースではないようで、これまで上にあげた米国化学会の SciFinder とは異なるが）によると、そこに登録されている代表研究者の原著論文（総数の 7-8 割？）に対する閲覧総数が 8437 件、論文のダウンロード 287 件・引用がおよそ 2000 件、プロフィールの閲覧 777 件、ちなみに先週 1 週間での閲覧が 140 件・引用 19 件（毎日 24-5 件）などと記されている。これが社会への還元の程度にいかに関連するかどうかはよくわからないが、統計母数の少ない化学分野における追跡調査の回答のひとつとして加えてみます。

この研究は、社会では化学と生物学との両分野にまたがる例えば薬業界や食品業界におけるきわめて基礎的な分野の中で、研究推進方法が全く無いかあるいはきわめて限定的な分野に関して、そこに先導的な手法や方針を提供するものと考えている（*化学と生物・文書館* 525-536 頁、609-615 頁、2012）（*Pure & Appl. Chem.*, 2013, 85, 1149）。残念ながら、当研究成果が直裁的に社会の発展に貢献する状況には至っていない。しかしながら、学術の分野では、昆虫生理学の専門・鳥取大学甲斐英則、医学生理学の専門・旭川医科大・高井章、海洋毒物学の専門・山下まり（*Marine Drugs, Mar. Drugs* 2013, 11, 2799）、名古屋市衛生研の安形則夫、その他多数の共同研究者との協力体制と、半ばプロフェッショナルなポスドクおよび大学院学生とともに、問題解決にあたる困難さと楽しさを共有でき、多くの成果を発表できたことは収穫である。研究分野についても、境界領域の開発は大学の制度の中では容易ではないが、この研究費補助金は 5 年間の長期間で、それを乗り越えた共同研究を可能にしたことは意義深い。共同研究者（食品化学・医学など）また若い世代に与えた影響は大きく、間接的ながら今後の社会によく還元されるものと信ずる。

上記報告ではあまり触れなかったが、我々のトビイカ生物発光の研究について一言。下村脩らのノーベル賞授賞に繋がった研究のように、40 年も昔の基礎的な研究でしかも主題ではない（副題）ものが、現在では GFP のように社会に役立っている例もある。現在投稿中の段階ではあるが、代表研究者らはイカから取り出した（遺伝子発現ではない）発光タンパク質を用いて、その発光基質が人工合成基質と発光器官内で交換する手法で基質交換をモデル化することに成功した。これも将来には新しい研究手段となるかもしれない。また、植物の走光性や反重力性伸張研究に、我々の合成した安定フッ素化発光基質の一部が使われており（*Biochem. Biophysic. Res. Communi.* 2004, 324, 40; 2005, 332, 823; *Naturforsch.* 2009, 64 c, 411）発展を続けている。

3.その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）

(2)研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポストク等の研究終了後の動向を記述してください。）

若手共同研究者のうち、助教であったもの1名は国立大学の助教授に、ポストクであったもの3名は国内で助手に2名と国外で Assistant Professor1名に昇格した。