

## 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

電位依存性チャネルの完全化学合成と新機能創製

## 2. 氏名

井上 将行

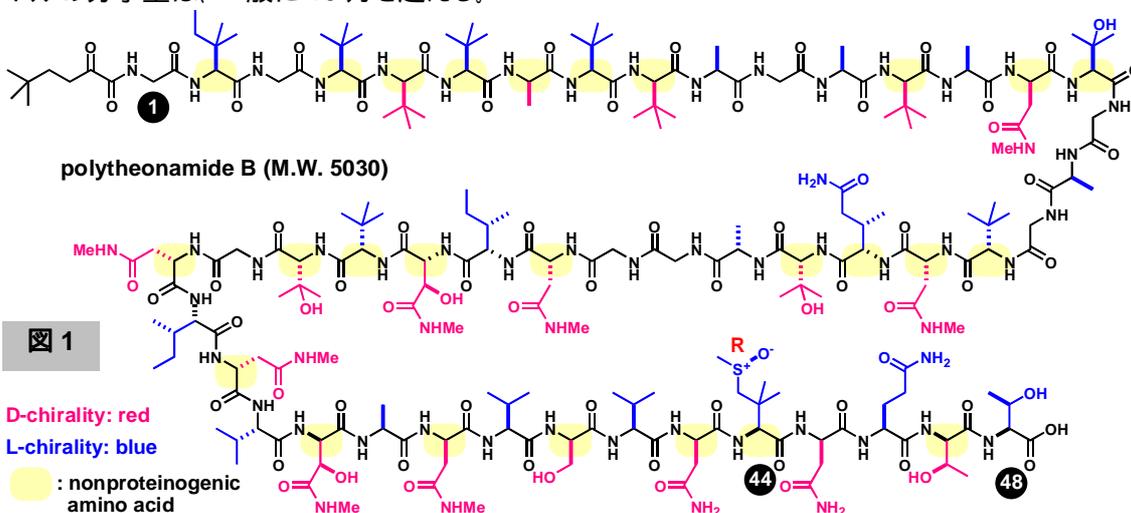
## 3. 研究のねらい

神経細胞の基本構成分子である電位依存性イオンチャネルは、我々のあらゆる感覚・感情・思考・動作を複雑かつ巧妙に統御する超高機能ナノデバイスである。しかし、電位依存性チャネルは分子量 10 万を超える膜タンパク質であるため、原子レベルでの構造制御は極めて困難である。一方有機合成化学では、三次元的な原子配列を制御できる。このような背景から、電位依存性チャネルを形成しかつ化学合成可能な天然毒ポリセオナミド B(1)に注目した。1 は非リボソーム起源ペプチド中で最大の分子量(5000)をもち、1 価カチオン特異的に透過する長さ 30 Å、内径 4 Å の細胞膜貫通型ナノチューブを形成する。本研究では、1 を基盤分子とした電位依存性チャネルの化学的構築・動的構造解析・高機能化を目的とした。

## 4. 研究成果

【はじめに】

我々の神経の細胞膜に存在するイオンチャネルは、リガンドや電気的刺激により迅速に開閉が制御され、特定の無機イオンを選択的に透過させる。神経細胞はこの基本構成分子であるイオンチャネルを巧妙に使い、信号伝達を制御する。巨大かつ高機能な膜タンパク質であるイオンチャネルの分子量は、一般に 10 万を超える。



ポリセオナミド B (1)は、伏谷・松永らによって、海綿 *Theonella swinhoei* より単離・構造決定された天然有機化合物である(図 1)<sup>[1]</sup>。現在までに知られるペプチド天然物の中で、最大の分子であり(分子量 5000)、培養癌細胞に対して pM レベルの極低濃度で毒性を示す。多くの非タンパク質構成アミノ酸を含む 48 残基が D 体, L 体交互に並ぶことが、最大の構造的特長である。この特異なアミノ酸ユニットの存在と配列によって、タンパク質にはないフォールディング様式であるβ-ヘリックスを形成する<sup>[2]</sup>。結果的に、長さ 3 nm・内径 0.4 nm の細胞膜貫通型ナノチューブとなり、単分子でイオンチャネル機能をもつ。細胞膜にこのナノチューブが挿入した際の、一価カチオンの自由な透過が、1 の細胞毒性発現機構と予想される(図 2)<sup>[3]</sup>。我々は、1 が一般的イオンチャネルタンパク質に比べて、10 分の 1 以下の分子量でありながら類似の機能を有することに着目し、1 を分子基盤とした有機合成化学によるチャネル機能の構築と人工制御を計画した。まず、1 に含まれる多くの非タンパク質構成アミノ酸などの部分構造と、細胞毒性・ナノチューブの構造安定性・チ

ヤネル挙動との関係の解明を第一の研究目的とした。さらに、得られる構造 機能相関の合理的デザインへの活用による、チャンネル機能の人工制御を第二の目的とした。すなわち、化学物質・光・電位変化などの外部刺激に応答する部位の有機合成化学的な付加による、新たな人工制御チャンネル、選択的細胞毒性物質の創製を計画した。以上の研究には、**1** の効率的な分子供給が最も重要な研究基盤となる。我々は、ポリセオナミド B の世界初の化学合成を達成し、その構造と機能について重要知見を得た。

#### 【合成計画】

非リボソーム由来ペプチドは、通常の遺伝子にコードされていないことから遺伝子発現による調達は極めて困難であり、有機化学的構築が唯一の大量供給方法である。我々は、ポリセオナミド B とその合成類縁体の詳細な機能解析、さらに新機能付与を実現するため、柔軟かつ収束的な合成戦略を立案した。すなわち、アミノ酸・ペプチドフラグメント・全体構造の三種の階層構造に合成戦略を分割した。自動固相合成した非タンパク質構成アミノ酸を含むペプチド部分構造を順次連結し、全合成を達成する計画である。本戦略は、自由自在なアミノ酸の置換、ペプチド部分構造の置換を可能にし、合成類縁体の網羅的構築に適している。

#### 【非タンパク質構成アミノ酸の合成】

**1** に存在する数多くの非タンパク質構成アミノ酸に対して、それぞれ異なるルートを開発し、合成した。図 2 に例として、**1** のみに含まれる特徴的なアミノ酸である、R-スルホキッドを有する第 44 番目残基の合成概略を示した。

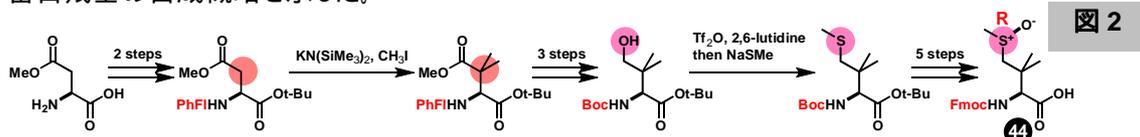


図 2

#### 【4大フラグメントの設計と自動固相合成】

合成した非タンパク質構成アミノ酸を含むペプチドを自動固相合成機により調達した(図 3)。まず、担持するポリマー・アミノ酸の縮合条件・ペプチドの長さ等を、最適化した。15 残基以上のペプチドの合成では、収率が極端に低下したため、48 残基の **1** の全体構造を 10 残基程度の 4 大フラグメント[A(1-11), B(12-25), C(26-32), D(33-48)]に分割する合成計画を立てた。フラグメント連結反応の効率を考慮し、各フラグメントの C-末端(第 11, 25, 32 番目残基)は、連結反応の際にラセミ化する可能性がない Gly とし、N-末端(第 12, 26, 33 番目残基)は、立体的に小さいアミノ酸を配置した。また、フラグメント D(33-48)は、多くの極性官能基を含むため、アルコールを *t*-ブチル(*t*-Bu)基で、第 1 級アミド基をトリフェニルメチル(Tr)基で保護した。以上のように設計した A(1-11), B(12-25), C(26-32), D(33-48)の Fmoc 法による固相合成に成功した。

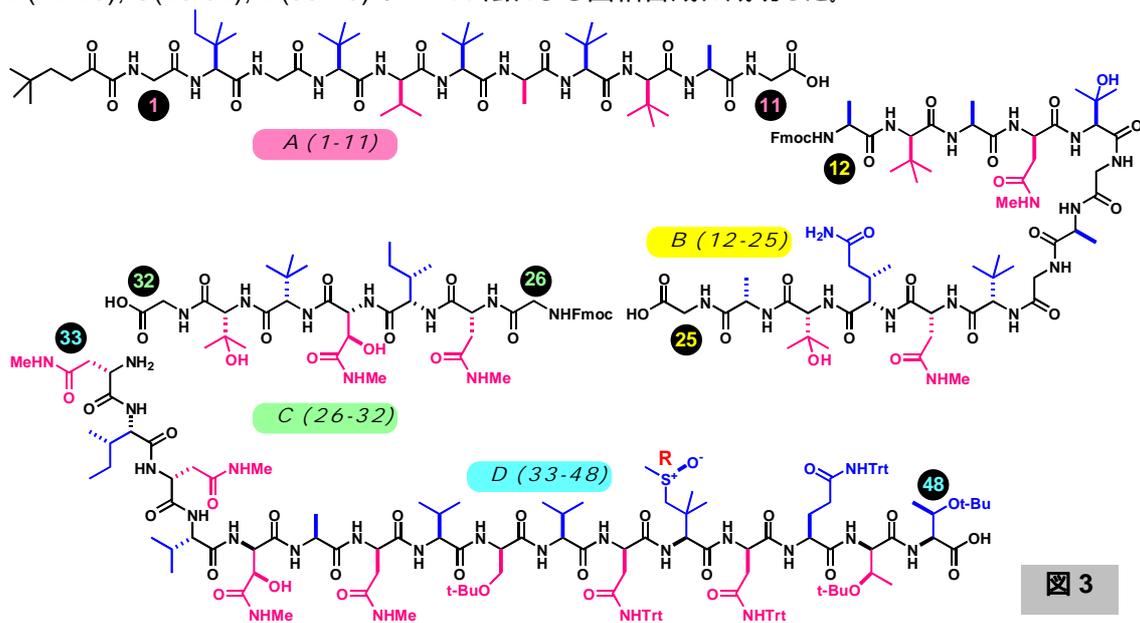


図 3

## 【4 大フラグメントの連結とポリセオナミド B の全合成】

合成した 4 大フラグメントの連結反応を検討した。フラグメント同士の連結は、一般的なアミノ酸縮合条件では、極めて困難であった。そこで、相本らによって開発されたチオエステルを経由する連結法を適用した(図 4)<sup>[4]</sup>。フラグメント C(26-32)の C-末端のカルボン酸をチオエステルへと誘導し、フラグメント D(33-48)存在下、銀塩で処理すると、全体構造の半分に相当する CD(26-48)が高収率で得られた。さらに、CD(26-48)をチオエステル化した B(12-25)と連結し、BCD(12-48)を合成した。最後に、チオエステルへと誘導した A(1-11)を BCD(12-48)と縮合し、保護された 1 の合成に成功した。以上のように、チオエステルを用いる縮合方法は、極めて強力であり、分子量 5000 を超えるペプチドの連結にも有効であった。

アルコールを保護する 3 個の *t*-Bu 基と、アミド基を保護する 3 個の Tr 基を、酸条件で同時除去し、非リボソーム由来の最大のペプチドであるポリセオナミド B の世界初の全合成を達成した。

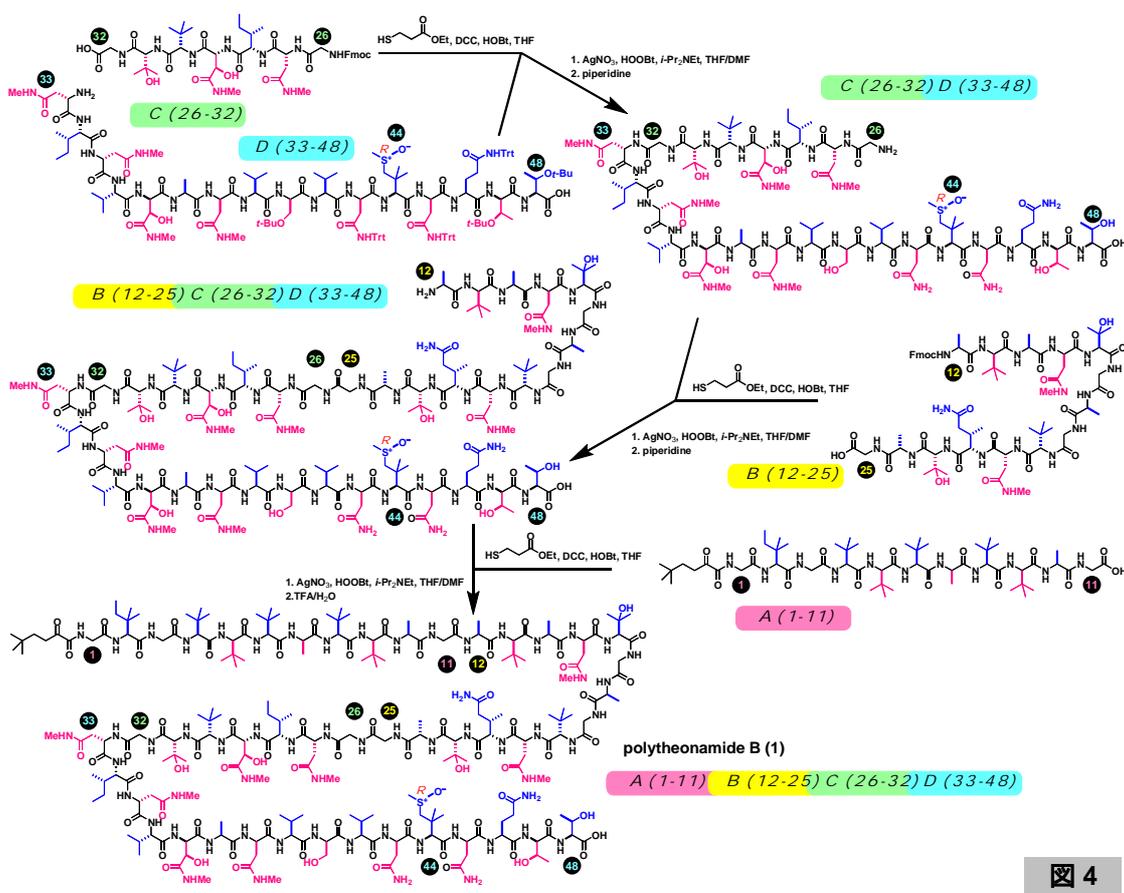


図 4

## 【ポリセオナミド B とフラグメントの機能評価】

柔軟かつ収束的な全合成ルートの開発は、フラグメントの機能評価を初めて可能にした。全合成した 1 と、フラグメントの細胞毒性を評価した(図 5)。その結果、1 は、強力な毒性(72 pM)を有するが、フラグメントはほとんど活性をもたないことが明らかになった。またチャンネル機能の評価をした結果、フラグメントは細胞膜にイオンを透過させないことがわかった。以上の結果から、1 の全体構造の毒性・チャンネル機能への重要性が示唆された。

【おわりに】

分子量 5000 の巨大ペプチドである 1 の全合成ルートの開発を達成した。本合成では、728 原子の三次元的配列を有機合成化学により完全制御したことになる。結果的に、アミノ酸・ペプチド部分構造・全体構造の階層に分けた合成戦略が極めて有効であった。開発した方法論は、1 だけではなく、類縁体の網羅的合成に利用できる。ポリセオナミド B のチャンネル機能の原子レベルでの解明と、本分子に対する有機合成化学的な新機能付与・創製に向けた、化学基盤を構築できた。

	P388 (mouse leukemia) cytotoxicity	EC <sub>50</sub> (nM)
[参考文献]	A (1-11) B (12-25) C (26-32) D (33-48)	0.072
[1] Hamada, T.; Matsunaga, S.; Yano, G.; Fusetani, N. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> <b>2005</b> , 127, 110.	polytheonamide B (1) A (1-11)	>22,300
[2] 濱田季之, 松永茂樹, 矢野元, 伏谷伸宏, 第 43 回天然有機化合物討論会講演要旨集 <b>2001</b> , 169; 濱田季之, 松永茂樹, 伏谷伸宏, 藤原正子, 藤田憲一, 第 37 回天然有機化合物討論会講演要旨集 <b>1995</b> , 695.	B (12-25) C (26-32) D (33-48)	1,500 >8,000 2,050
[3] Oiki, S.; Muramatsu, I.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. <i>Nippon Yakurigaku Zasshi</i> <b>1997</b> , 110, 195.	A (1-11) B (12-25) C (26-32) D (33-48)	>2,000 1,040
[4] Aimoto, S. <i>Biopolymers</i> <b>1999</b> , 51, 247.	B (12-25) C (26-32) D (33-48)	864

図 5

## 5. 自己評価

本研究では、(1)ポリセオナミドの全合成、(2)誘導体調製と機能解析、(3)制御自在なナノデバイスの創製を目的とした。3年半の研究期間において、項目(1)、(2)を実現することができた。また、(1)、(2)を基礎データとして利用し、項目(3)の達成のための新しい分子を設計・合成を開始した。結果的に、1の全合成を基盤として、論理的に研究展開することで、当初の提案の多くの部分において、構造機能と制御に対する最先端の成果が得られた。以下に、具体的な知見と成果を述べる。

項目(1)では、分子量 5000 のポリセオナミド B (1)の全合成の課題を、階層構造別(アミノ酸・ペプチドフラグメント・全体構造)に解決した。固相合成された分子量 1000 を超えるペプチドフラグメントは、物性予測が極めて困難であり、精製等に予想以上の詳細な検討を要した。さらに、全体構造への連結・最終脱保護では、合成中間体の反応性と溶解度の低さから、再現性が得られる強力かつ温和な条件を設定・実行に時間を要したが、最終的には1の全合成が達成できた。本全合成は、有機合成化学とタンパク質合成化学に大きなインパクトを有する重要研究成果である。

項目(1)の達成により、ペプチドフラグメント・ポリセオナミドBおよびその誘導体の機能評価[項目(2)]が初めて可能になった。その結果、1の機能に、ペプチド鎖の長さおよびC末端の極性アミノ酸残基が極めて大きな影響をもつことを明らかにした。これらの機能・構造解析は、本分子を基盤とした、最小化されたチャネルあるいは極低濃度で働く細胞毒性物質の設計指針を与える知見である。

項目(1)、(2)における研究から、項目(3)の具現化には、1あるいはその誘導体の量的な調達が必要なことが明らかになった。そこで、より短総工程数で実現できる1と同様の機能を持つと予想される分子の設計に着手した。今後、1だけではなく新設計分子を基盤として、項目(3)の研究を遂行する。

## 6. 研究総括の見解

電位依存性チャネルを形成する天然有機分子ポリセオナミドBの全合成を達成し、さらに、ポリセオナミドBを構造基盤とした新しい機能を持つチャネル群を人工構築することを目指して研究を行い、アミノ酸・ペプチド部分構造・全体構造を、階層構造別に精密に化学構築したうえ、159工程の反応を経てポリセオナミドBの全合成に成功した。目標とした非常に複雑で興味深いペプチドの合成を成し遂げ、さらにその周辺の化学を発展させた。リスクの大きな研究を達成し、さきがけ研究としての意義は認められる。今後の新しい展開を期待する。

## 7. 研究成果リスト

## A. さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

## (1) 論文(原著論文)発表

1. M. Inoue, T. Usuki, N. Lee, M. Hirama, T. Tanaka, F. Hosoi, S. Ohie, T. Otani, "Antitumor Eneidyne Chromoprotein C-1027: Mechanistic Investigation of the Chromophore-Mediated Self-Decomposition Pathway," *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7896-7903.
2. M. Inoue, T. Sato, M. Hirama, "Asymmetric Total Synthesis of (-)-Merrilactone A: Use of a Bulky Protective Group as Long-Range Stereocontrolling Element," *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4843-4848.
3. M. Inoue, K. Miyazaki, Y. Ishihara, A. Tatami, Y. Ohnuma, Y. Kawada, K. Komano, S. Yamashita, N. Lee, M. Hirama, "Total Synthesis of Ciguatoxin and 51-HydroxyCTX3C," *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9352-9354.
4. M. Inoue, N. Lee, S. Kasuya, T. Sato, M. Hirama, M. Moriyama, Y. Fukuyama, "Total Synthesis and Bioactivity of an Unnatural Enantiomer of Merrilactone A: Development of an Enantioselective Desymmetrization Strategy," *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3065-3075.
5. M. Inoue, I. Ohashi, T. Kawaguchi, M. Hirama, "Total Synthesis of the C-1027 Chromophore Core. Extremely Facile Eneidyne Formation via  $\text{SmI}_2$ -Mediated 1,2-Elimination," *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1777-1779.

## (2) 受賞

1. 2007年 Novartis Chemistry Lectureship 2008/2009
2. 2008年 Asian Core Program Lectureship Award 2009 (Singapore and Korea)  
"Total Synthesis and Biological Evaluation of Polytheonamide B"
3. 2009年 第5回 日本学術振興会賞  
"海洋環状ポリエーテル類の全合成研究"

## (3) 著書

1. M. Inoue, "Exploring the Chemistry and Biology of Antitumor Eneidyne Chromoprotein C-1027," *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 501-510.
2. 井上将行, 佐藤隆章, 平間正博 "メリラクトンAの全合成: 遠隔不斉誘導と不斉非対称化" *有機合成化学協会誌* **2007**, *65*, 419-429.

## (4) 依頼解説記事

1. M. Inoue, "Zipper synthesis in water," *Nature* **2007**, *449*, 667-669.
2. 井上将行, 平間正博, "高反応性エンジン系抗腫瘍性物質の機能と合成," *ファルマシア* **2008**, *44*, 130-134.

## (5) 招待講演

【国内】

1. 井上将行, "天然毒で細胞膜にイオンを通す," さきがけライブ 2006, 東京, 2006年12月15-16日
2. 井上将行, "有機合成化学によるイオンチャネル機能の制御・構築," 第7回 日本蛋白質科学会年会  
「Chemical Biologyと蛋白質科学の接点」, 仙台, 2007年5月24-26日
3. 井上将行, "巨大複雑天然物の全合成—イオンチャネルの人工制御へ向けて," SORST ジョイントシンポジウム 「有機合成力」—そのダイナミズム, 東京, 2008年1月30日
4. 井上将行, "有機合成化学によるイオンチャネル機能の制御・構築,"

天然物パワー：『ものとり，合成，機能解明』～大学発天然物薬学研究～（日本薬学会第128年会），横浜，2008年3月28日

- 井上将行，“天然型精密巨大分子の合成と機能，”  
第2次先端ウォッチングイブニングセッション 精密巨大分子の化学（日本化学会第88春季年会），東京，2008年3月28日

【海外】

- M. Inoue, “Total Synthesis of Neuromodulatory Natural Products,”  
The 10th International Chemical Conference, Taipei (Synthetic Chemistry),  
Hsinchu, Taipei, October 28-30, 2005.
- M. Inoue, “Total Synthesis of Ciguatoxins: a Radical Route to Polycyclic Ethers,”  
PACHIFICHEM, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2005.
- M. Inoue, “Total Synthesis of Neuromodulatory Natural Products,”  
PACHIFICHEM, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2005.
- M. Inoue, “Total Synthesis of Polytheonamide B,”  
4th Japanese-Sino Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists, Chiba,  
Japan, September 22-27, 2007.
- M. Inoue, “Total Synthesis of Polytheonamide B,”  
13th Korea-Japan Seminar on Organic Chemistry, Daejeon, Korea, October  
26-29, 2007.

B. その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

- M. Inoue, Y. Ishihara, S. Yamashita, M. Hirama, “Convergent Assembly of Polycyclic Ethers via Acyl Radical Addition to Unactivated Enol Ether,” *Org. Lett.* **2006**, 8, 5801-5804
- M. Inoue, S. Yamashita, Y. Ishihara, M. Hirama, “Two Convergent Routes to the Left Wing Fragment of Ciguatoxin CTX3C Using O,S-Acetals As Key Intermediates,” *Org. Lett.* **2006**, 8, 5805-5808.
- K. Komano, S. Shimamura, M. Inoue, M. Hirama, “Total Synthesis of the Maduropeptin Chromophore Aglycon,” *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14184-14186.
- M. Inoue, N. Lee, K. Miyazaki, T. Usuki, S. Matsuoka, M. Hirama, “Critical Importance of the 9-Membered F-Ring of Ciguatoxin for Potent Bioactivity: Total Synthesis and Biological Evaluation of F-Ring-Modified Analogs,” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 27, 8611-8614.
- K. Hagiwara, M. Himuro, M. Hirama, M. Inoue, “A Concise Route to the C<sub>2</sub>-Symmetric Tricyclic Skeleton of Ryanodine,” *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1035-1037.

(2) 招待講演

【国内】

- 井上将行，“複雑縮環天然有機化合物の全合成，”  
第18回万有札幌シンポジウム『有機合成の夢と挑戦』，札幌，2006年7月8日
- 井上将行，“抗腫瘍性物質 C-1027 の機能と合成，”  
第24回有機合成化学セミナー，淡路，2007年9月12-14日
- 井上将行，“天然物全合成効率化のための新戦略，”  
有機合成化学講習会，東京，2007年11月21-22日
- 井上将行，“官能基密集型天然物の合成研究，”  
有機合成化学の若い力(日本薬学会第129年会)，京都，2009年3月26日
- 井上将行，“有機合成化学によるイオンチャンネル機能の制御・構築，”  
ケミカルバイオロジー研究の最前線 新研究分野としての未来(日本化学会第89春

季年会), 千葉, 2009年3月27日

【海外】

1. M. Inoue, "Total Synthesis and Biological Application of Fused Polycyclic Ethers," 5th Tateshina Conference on Organic Chemistry, Tateshina, Japan, November 11-13, 2005.
2. M. Inoue, "Exploring the Chemistry and Biology of Antitumor Eneidyne Chromoprotein C-1027," International COE Symposium for Young Scientists on Frontiers of Molecular Science, Tokyo, Japan, August 25-26, 2006.
3. M. Inoue, "Symmetry-Driven Synthesis of Polycyclic Natural Products," China Novartis Institutes for Biomedical Research, Shanghai, China, October 24, 2008.