

(中扉)

東京大学大学院理学系研究科、教授

橘 和夫

「複合体形成に基づく膜タンパク質の機能制御」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

1. 研究実施の概要

膜タンパク質の多くは、細胞外側からのメッセンジャー分子との結合、神経筋肉での膜電位変化、あるいは網膜での光といった刺激により活性化され、細胞内での酵素活性の変化や無機イオン流入により細胞内での一連の生理変化をもたらす。しかし情報伝達の達成と同時にこれらは静止状態に戻るため、この活性化状態は生理的条件下で一過性であり、活性化に伴う立体構造変化に関する情報は推定の域を出るものはない。本研究課題では、膜タンパク質の活性化状態に強い親和性を示す天然毒などの外因性分子を用いて活性化状態の寿命を延ばすことでその立体構造情報を取得解析し、膜タンパク質の活性化に関する構造的根拠を解明することを目的としてきた。

このためここでの研究遂行の骨子は、(1) 同位体など構造情報取得の手掛りが導入可能な有機合成によるリガンド分子の調達、および(2) こうしたリガンドが調達された場合での脂質二重膜内での複合体に関する構造情報取得のための方法論の開発、の二つに大別される。具体的な対象分子複合体として、サンゴ礁領域での魚による食中毒シガテラの主要原因化合物であり膜系では最も強い会合定数 (10 pM) を有するものの一つであるポリ環状エーテル天然物シガトキシンと、この分子の毒性発現の際の標的細胞成分とされ、神経細胞および筋肉に発現している電位依存性ナトリウムチャンネルタンパク質 (Voltage-sensitive sodium channel; 以下 VSSC) の組合せを念頭に置き、天然からの量的調達が望めないこのリガンドを合成により調達するとともに、ここで想定される複合体形成様式の一般性を検証する目的で細胞膜貫通長を有するポリ環状エーテル分子種の集積を行なうことを前提としてきた。ここで強い親和性が見出された複合体の構造情報は主として(1) 光親和性標識法と質量分析を用いるタンパク質での結合部位の特定、(2) 特定された膜貫通部位とリガンド分子の双方への同位体標識、(3) 膜への再構成による複合体の調製、(4) NMR による標識部位間の距離情報の取得、(5) そして以上で得られた知見に基づく計算化学による脂質二重膜中内でのドッキング・モデルの作成というスキームにより得る計画であった。以下に、得られた成果のうち、主要なものに関して報告する。

(1) ポリ環状エーテル天然物の単離・構造決定

シガテラ中毒の多発する仏領ポリネシア産のウツボ内臓および生産生物である渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* 中のシガトキシン新規同族体 16 成分の構造を得た。また食中毒の原因貝類より電位依存性ナトリウムチャンネル (以下 VSSC) に親和性を有するプレベトキシン新規同族体 3 種を単離・構造決定し、以上に関してマウス毒性と VSSC に対する親和性における構造活性相関を得た。加えて、魚の大量斃死をもたらす瀬戸内海産の赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* に一連のポリ環状エーテル、ギムノシン類の存在を認め、これらがこれまでこの類の分子では報告のない VSSC に依存しない細胞毒性を有することが示された。このうち主要成分であるギムノシン-A を単離し、構造決定を達成した。また、

次項に述べるように本分子の全合成も達成している。

(2) シガトキシンおよび関連ポリエーテル系天然物の全合成研究

本プログラム以前に見出していたラクトン由来エノールエステルB-アルキル鈴木—宮浦反応を基盤とする収束的エーテル環連結法に関して、連結する分子の種類に応じた反応条件の多様化、最適化によりこれを一般化することが出来た。これを鍵反応として、シガトキシン分子群のうち現在最も毒性の強い51-ヒドロキシCTX3Cの全合成を進め、現在までにFGHIJKLM環部の合成を達成した。これをABCD環部とE環を介して連結することによりCTX3Cの全合成を達成する予定であるが、想定外であったF環側連結部位の立体障害が判明し、現在この解決を図っている。

シガトキシン生産生物の培養により単離構造決定され中程度のマウス毒性を有するガンビエロールに関しては、各々合成した部品を上記方法論によりF環で連結することにより8環性ポリエーテル骨格を合成し、さらに、H環の官能基化とトリエン側鎖の導入を行い、全合成を達成した。この方法により合成したH環オレフィン、メチル基、および側鎖に関するいくつかの合成類縁体に関してマウス毒性を調べたところ、この部分の構造の毒性に対する関与がかなりあるという知見を得た。この一方、A環側の改変は生理活性への影響が少ないことが確認され、本全合成で供給可能となった本分子のこの部位での修飾による標的生体分子の同定等が可能であることが示された。

また、上記鈴木-宮浦反応を活用することで、本プログラムで単離構造決定された細胞毒性ポリエーテル化合物ギムノシン-Aの全合成を達成した。

(3) チャネル活性化の新規モニター系およびタンパク質膜貫通部位モデル系の開発

細胞膜中で形成した複合体の構造解析を行なうためには、膜中での対象タンパク質の純度と濃度を高めた再構成系の供給が望ましい。そこで既報に従い電気ウナギ発電器官よりVSSCを精製し透析によりこれをリン脂質二重膜に再構成したところ、プレベトキシンによる強い親和性が再現できた。次に二重膜内外のイオン分布を操作することで、電位感受性蛍光剤によりモニター可能な膜電位を有するリポソームを調製した。ここにプレベトキシンを投与した結果、再現性に問題を来しているもののVSSC活性化による脱分極が観測された。その後これにVSSC活性化作用を有するアルカロイドであるベラトリジンを共存させることで再現性が上がることを見出した。この結果を踏まえ、本法をシナプトソームおよび組換えDNAによりVSSCを発現させた動物細胞に用いたところ、再構成リポソームに比較して高い再現性およびプレベトクシン濃度への依存性を与えることを見出し、これにより電気生理的手法を用いないチャネル機能のモニターが可能となることが示された。

ポリ環状エーテル分子と膜タンパク質との親和性は、後者に共通する膜貫通ヘリックスの束への前者の挿入により、これが束の中での相対三次元構造の変化を伴う場合に活

性化をもたらすものと想定している。この作業仮説が正しければ膜タンパク質に非特異的な一般的親和性を有するはずであり、これを検証する目的で、上記ナトリウムチャンネルに加えて、脂質二重膜貫通構造の形成が可能なモデルペプチドによる膜タンパク質モデル作成を試みている。このうち、膜貫通オリゴマーによるチャンネル形成が提唱されているミツバチ毒のペプチド成分メリチン(26残基)に関し、コレステロールの添加により構造が安定化されることを見出した。

(4) 膜タンパク質構造解析の方法論開発

同位体標識した試料を用いる固体NMRによる膜中での認識様式観測の有効性を検証するモデルとして、リン脂質中で膜含有ステロールと複合体を形成することでイオン透過性チャンネルを形成するとされているアンホテリシンB(AmB)に関し、エルゴステロールおよびコレステロールそれぞれとの連結体を調製し二重膜中での分子配向性を調べた結果、前者に顕著なイオン透過性増大活性が認められた。AmBにC13標識したリン脂質との連結体を脂質二重膜に再構成した系の固体NMR(REDOR)による原子間距離測定により、従来AmBに提唱されていたモデルのうちsingle-lengthチャンネルを支持する結果を得た。

低分子と膜タンパク質の複合体構造解析に際し、チャンネルタンパク質に作用することが知られる薬物semotiadil誘導体による光親和性標識の結果、標識体に関するESI-MS/MS解析がきわめて有効であることを見出した。また、L型カルシウム・チャンネルに関して、液体ヘリウム温度での電子顕微鏡による単分子構造解析により、従来提唱された本チャンネルタンパク質の構造モデルを支持する結果を得た。

計算化学的なアプローチとして、静的状態の結晶構造に基づく分子動力学法により得た光受容膜タンパク質ロドプシンのレチナール光異性化による構造変化モデルを用いて、他のGTP結合タンパク質共役受容体膜タンパク質のリガンド認識による構造変化モデルと関連づけることができた。

2. 研究構想

レセプターやイオンチャネルなどの膜結合タンパク質は、生命活動の根源とも言える細胞内外のシグナル伝達に深く関与している。これらの生理機能を分子構造レベルで理解するためには静止時および活性化状態それぞれの立体構造を知る必要があるが、これらは一般にX線結晶解析や NMR 分光法に適さず、構造研究が著しく遅れている。特にこれらの膜貫通部位は、細胞外でのリガンドの結合による構造変化を細胞内での酵素活性の制御として伝えるなど、その膜内における相対配置が重要であるにも拘らず、NMR による原子配置情報が異方性と緩和時間の関係で取得困難であるために、その構造研究は大きく立ち遅れている。

近年になり、植物プランクトンである渦鞭毛藻が産生するシガトキシンおよびプレベトキシンが神経細胞膜のナトリウムチャネルの膜貫通セグメントに結合することが提唱され、我々もこれを支持する実験結果を得ていた。同様のポリ環状エーテル構造に富む天然物が主に海洋生物から分離構造決定されているが、これらは同時に非常に強い生物活性を有しているので「超活性天然物」と呼ばれている。なかには、マイトトキシンのように猛毒として知られるフグ毒テトロドトキシンの 2000 倍の毒性（有効モル投与量）を有するものも含まれる。

これらの化合物は共通して梯子状ポリエーテル構造を有しているが、ナトリウムチャネルを用いた結合実験を通じて、分子の全長およびエーテル環のサイズと配列が膜タンパク質との相互認識と密接に関連していることが分かってきた。本研究代表者らは、梯子状ポリエーテル化合物が結合する膜タンパク質の部位には構造的特徴（構造モチーフ）が存在し、その結合強度は前者の構造に対応したアミノ酸残基の空間的配置に依存すると推定した。すなわち、これら分子中のエーテル酸素の三次元配置を変化させれば、結合相手のアミノ酸配列を特異的に認識させることができ、これにより膜貫通部位を特異的に識別できるリガンド分子を創製できる。これを発展させれば、細胞の不活性化機構により一過性にしか結合しない本来の内因性リガンドとは異なる結合部位を有する低分子を開発することができ、これらの長寿命複合体形成に基づく生理機構の分子的解析からその機能改変までの広範な研究分野に利用可能である。

これらの研究遂行には、精密な構造解析および高度な化学合成の知識と経験が必須であるが、本プログラム申請時点での本チームの構成はこの研究課題にもっともふさわしいと判断された。例を挙げると、橘、村田、安元、中村らは、マイトトキシン、シガトキシン、ゾーザンテラトキシンなど代表的な超活性天然物の単離・構造決定を世界に先駆けて成し遂げ、また、佐々木、橘らは超活性天然物基本構造の化学合成において実績を挙げた。また、中山はテトロドトキシンの認識に基づくナトリウムチャネルの単離を行うなど、化学からの膜結合タンパク質研究の第一人者である。加えて、得られる実験データの集積により脂質二重膜中での分子複合体構造の視覚化に必須である計算化学的手法を担うべく、石黒の参加を得た。

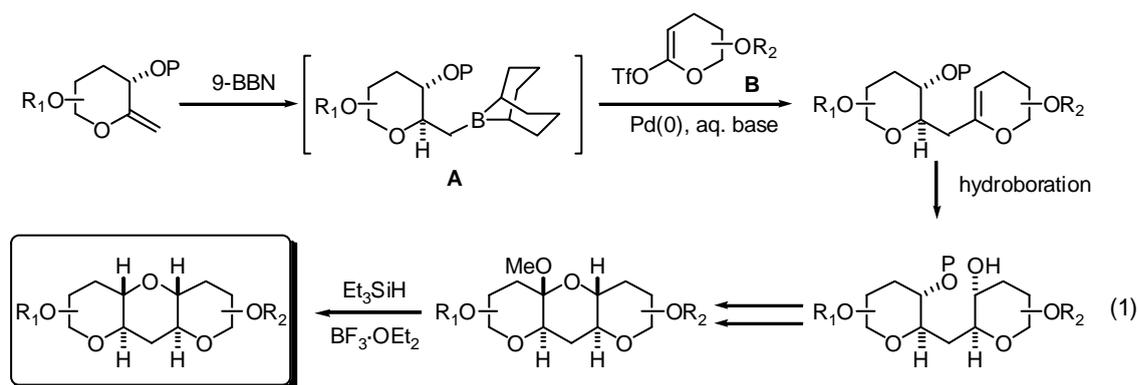
3. 研究成果

3.1 “複合体構造解析グループ(橋・村田・佐々木グループ)”

(1) 研究内容及び成果

【1】鈴木-宮浦カップリング反応を基盤とする収束的ポリ環状エーテル骨格構築法の開発

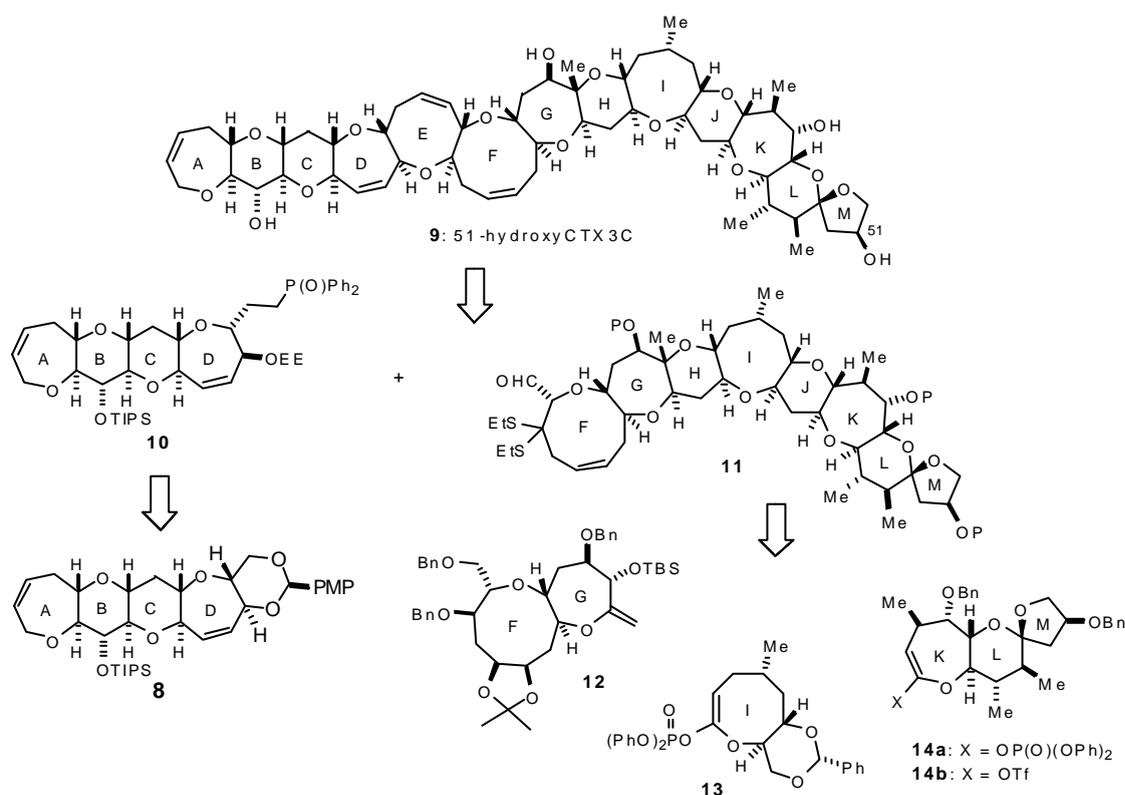
シガトキシン類をはじめとする巨大ポリ環状エーテル系天然物の効率的化学合成を実現するためには、エーテル環フラグメントを連結してポリ環状エーテル骨格を構築する収束的合成法の確立が不可欠である。我々は、環状エキソエノールエーテルを9-BBNでヒドロホウ素化して得られる*B*-アルキルボラン **A**とラクトン由来エノールトリフラート **B**との鈴木-宮浦カップリング反応によるエーテル環連結と、還元的エーテル化による6員環閉環を組み合わせた収束的なポリ環状エーテル骨格構築法を開発した(eq 1)。さらに、反応基質としてラクトン由来エノールホスフェートを用いることにより、6員環だけでなく7~9員環などの中員環エーテルも基質として利用できるようになり、より一般性の高い合成法へと展開することができた (eq 2, Table 1)。



次に、本反応を用いてシガトキシン類のABCD環部の合成を行った (Scheme 1)。カップリング生成物3cのエノールエーテル部位を立体選択的にヒドロホウ素化し、得られたアルコールを酸化してケトン4とした。これをシリルエノールエーテルに変換した後、Pd(OAc)₂により酸化してエノン5を得た。さらに、メチルケタール化、Et₃SiHBF₃·OEt₂還元によりC環を構築し、得られた6より6工程でトリエン7へと導いた。第1世代のGubbs触媒による閉環メタセシス反応でA環7員環エーテルを構築し、ABCD環部8の合成を完了した。

出法の開発などのために化学合成による量的供給が切望されている。前述の鈴木 - 宮浦カップリング反応を基盤とする収束的ポリ環状エーテル骨格構築法を用いて、シガトキシン同族体の中で最も毒性が強いとされる 51 ヒドロキシCTX3C(9) の全合成研究を行った。

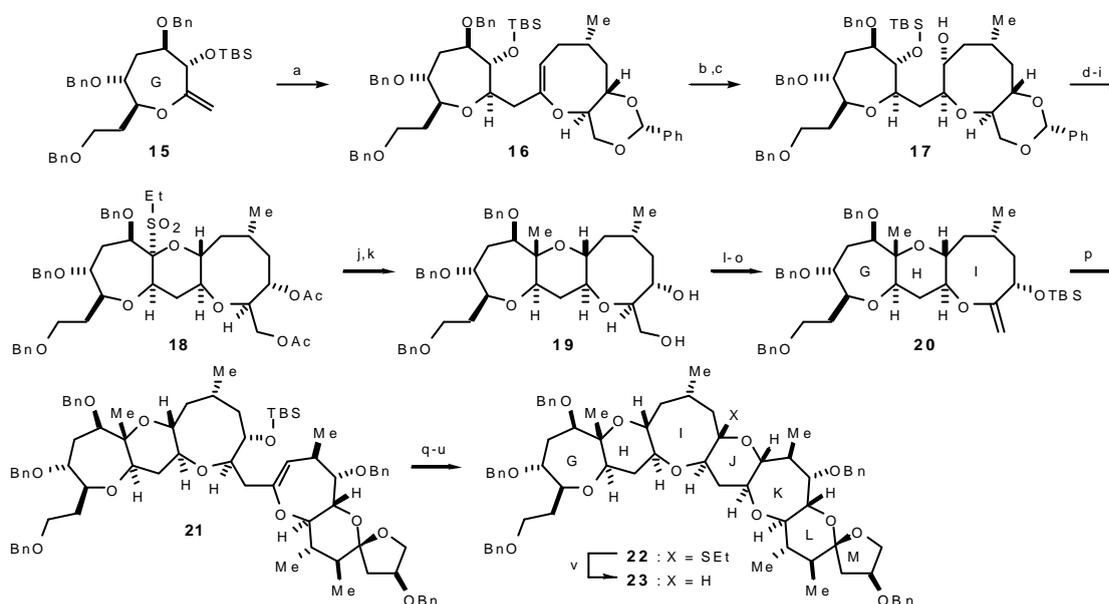
【合成計画】 51 ヒドロキシCTX3C(9) を ABCD 環部 10 と FGHIJKLM 環部 11 に分割し、両者を Horner Wittig 反応によりカップリングし、ヒドロキシチオケタール環化により E 環を閉環することで合成することを計画した (Scheme 2)。ABCD 環部フラグメント 10 は、前述の 8 より容易に合成可能であり、FGHIJKLM 環部フラグメント 11 は、鈴木 - 宮浦カップリング反応を基盤とする収束的ポリ環状エーテル合成法を利用して H 環および J 環での連結によって合成することを計画した。



Scheme 2. Retrosynthetic analysis of 51-hydroxyCTX3C.

【GHIJKLM環部の合成】 G環エキソエノールエーテル15とI環エノールホスフェート13を鈴木 - 宮浦カップリング反応により連結し85%の収率で16を得た (Scheme 3)。得られた16のヒドロホウ素化では目的のアルコール17は低収率であったが、ジメチルジオキシラン (DMDO)によるエポキシ化の後、Et₃SiH/BH₃ THFを用いて低温で還元することにより17を

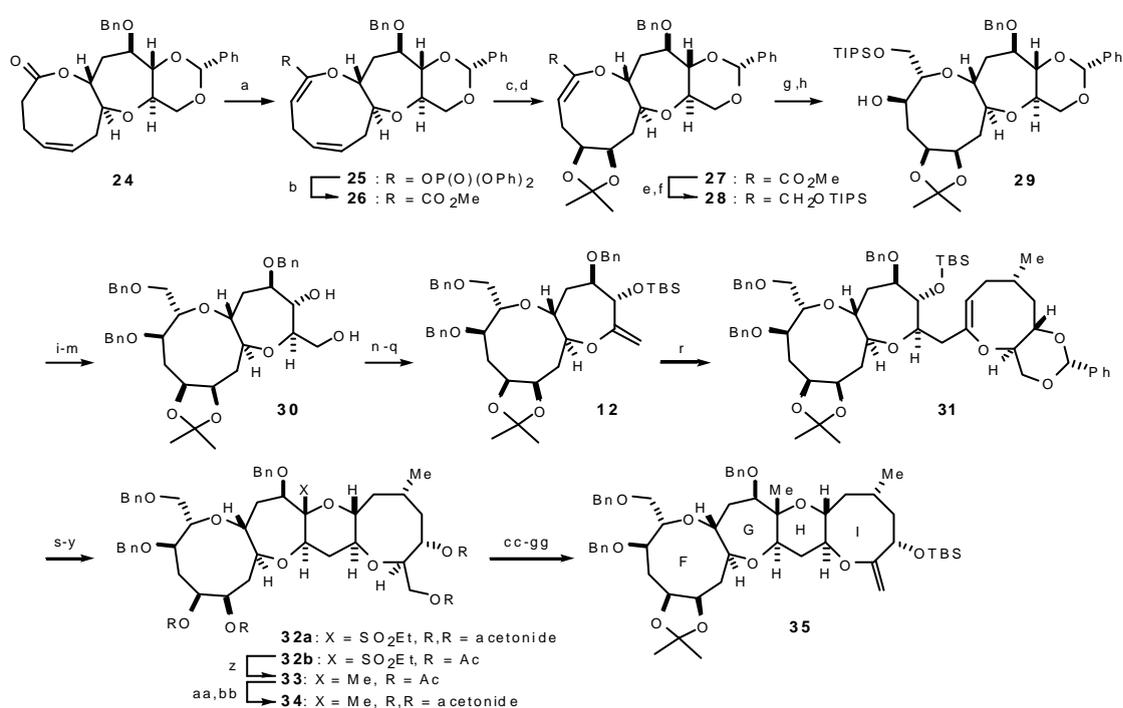
単一生成物として収率良く得ることができた。次いで、H環を混合チオケタールとして閉環、この酸化で得られるスルホン18をAlMe₃で処理することにより核間メチル基を立体選択的に導入した。アセチル基を除去したジオール19よりGHI環エキソエノールエーテル20へと導き、KLM環エノールホスフェート14aとの鈴木-宮浦カップリングを試みたが、望む生成物21はほとんど得られなかった。詳細な反応条件の検討の結果、エノールトリフラート14bを用いて0 °Cで反応を行うことにより71%の収率で21を得ることができた。さらに、エノールエーテル部の立体選択的ヒドロホウ素化を経て合成した混合チオケタール22のラジカル還元によりGHIJKLM環部23の合成を達成した。



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) **15**, 9-BBN, THF, rt; then 1 M aq. NaHCO₃, **13**, Pd(PPh₃)₄, DMF, 50 °C, 85%; (b) DMDO, acetone, -78 → -20 °C; (c) Et₃SiH, BH₃, THF, CH₂Cl₂, -20 °C, 60% (2 steps); (d) KO^tBu, PMBCl, TBAI, THF, rt, 80%; (e) TBAF, THF, rt, 97%; (f) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, quant.; (g) DDQ, CH₂Cl₂, pH 7 phosphate buffer, rt; (h) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt; then Ac₂O, DMAP, Et₃N, 0 °C, 84% (3 steps); (i) *m*CPBA, CH₂Cl₂, rt, 96%; (j) AlMe₃, CH₂Cl₂, -78 → 0 °C; (k) K₂CO₃, MeOH, rt, 83% (2 steps); (l) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt; (m) CSA, MeOH-CH₂Cl₂, 0 °C, 84% (2 steps); (n) I₂, PPh₃, imidazole, THF, rt, 94%; (o) KO^tBu, THF, 0 °C, 87%; (p) **20**, 9-BBN, THF, rt; then 3 M aq. Cs₂CO₃, **14b**, Pd(PPh₃)₄, DMF, 0 °C, 71%; (q) BH₃, THF, THF, rt; then 3 M NaOH, 30% H₂O₂, rt, 81%; (r) EVE, CSA, CH₂Cl₂, rt; (s) TBAF, THF, rt; (t) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt; (u) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt; (v) Ph₃SnH, AIBN, toluene, reflux, 56% (5 steps).

【FGHI環部の合成】当初、GHIJKLM環フラグメント23からF環の構築を経由するFGHIJKLM環部の合成を検討したが困難であった。そこで、23の合成により得られた反応条件を基に、二重結合を保護したFG環12にI環13、KLM環14bを順次連結する、より収束性の高い合成経路を検討した(Scheme 4)。ラクトン由来エノールホスフェートのPd(0)触媒によるカルボニル化反応を新たに開発し、ラクトン24からα,β-不飽和エステル26を合成した。次に、F環部二重結合の保護のために、AD-mix-αを用いて位置選択的なジヒド

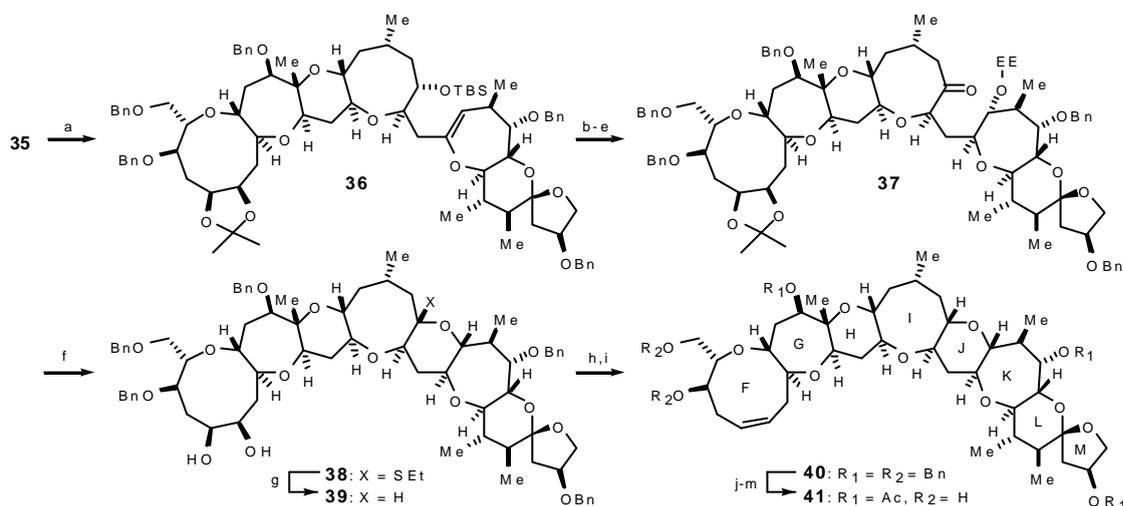
ロキシル化を行い、生じたジオールをアセトニドとして保護し27とした。さらに2工程で得られる28のDMDOによるエポキシ化、続くEt₃SiH/BH₃ THF還元によりアルコール29を単一生成物として得ることができた。さらに保護基の変換を行い、ジオール30を経てFG環エキソエノールエーテル12へと導き、13との鈴木-宮浦カップリング反応により31を得た。スルホン32aへと誘導し、AlMe₃による核間メチル基の導入を試みたが、3環性化合物18の場合と異なりαメチル体のみを与えた。種々検討の結果、テトラアセテート体32bをtブチルメチルエーテル中AlMe₃で処理することにより、目的とするβメチル体33を主生成物として合成することができた。さらに保護基の変換を行い、34を経てFGHI環エキソエノールエーテル35の合成を完了した。



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) KHMDS, (PhO)₂P(O)Cl, THF-HMPA, -78 °C; (b) Pd(PPh₃)₄, CO, MeOH, Et₃N, DMF, 50 °C, 75% (2 steps); (c) AD-mix- α , MeSO₂NH₂, *t*BuOH-THF-H₂O, 0 °C; (d) Me₂C(OMe)₂, CSA, CH₂Cl₂, rt, 79% (2 steps); (e) DIBALH, CH₂Cl₂, -78 °C, 91%; (f) TIPSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, 0 °C; (g) DMDO, CH₂Cl₂, -20 °C; (h) Et₃SiH, BH₃ THF, CH₂Cl₂, -20 \rightarrow 0 °C, 76% (3 steps); (i) TBAF, THF, rt, 97%; (j) KO^{*t*}Bu, BnBr, THF, rt, 98%; (k) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt; (l) Me₂C(OMe)₂, CSA, CH₂Cl₂, rt, 78% (2 steps); (m) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt, 86%; (n) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt; (o) CSA, MeOH-CH₂Cl₂, 0 °C, 82% (2 steps); (p) I₂, PPh₃, imidazole, benzene, rt; (q) KO^{*t*}Bu, THF, 0 °C, 86% (2 steps); (r) **12**, 9-BBN, THF, rt; then 1 M aq. NaHCO₃, **13**, Pd(PPh₃)₄, DMF, 50 °C; (s) DMDO, CH₂Cl₂, -20 °C; then Et₃SiH, BH₃ THF, -20 °C, 70% (3 steps); (t) EVE, CSA, CH₂Cl₂, rt; (u) TBAF, THF, rt, 94% (2 steps); (v) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 96%; (w) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt.; (x) Ac₂O, pyr, rt; (y) *m*CPBA, NaHCO₃, CH₂Cl₂, rt, 69% (3 steps); (z) AlMe₃, *t*BuOMe, 0 °C; (aa) K₂CO₃, MeOH, rt; (bb) Me₂C(OMe)₂, CSA, CH₂Cl₂, rt, 58% (3 steps); (cc) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt, 89%; (dd) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt; (ee) CSA, MeOH-CH₂Cl₂, 0 °C, 83% (2 steps); (ff) I₂, PPh₃, imidazole, benzene, rt; (gg) *t*-BuOK, THF, 0 °C, 86% (2 steps).

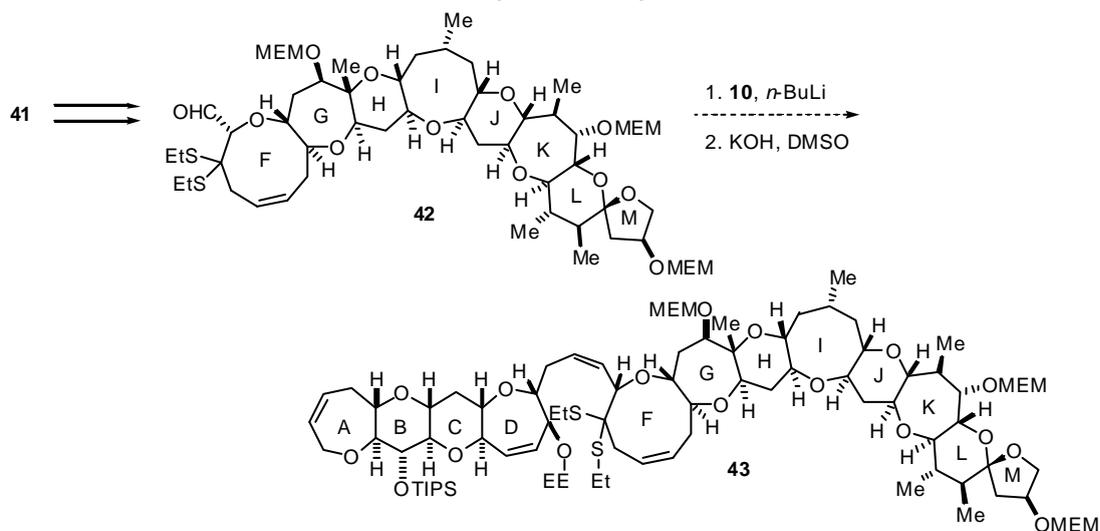
【FGHIJKLM環部の合成】FGHI環35と14bの鈴木-宮浦カップリング反応は、59%の収率で望む36を与えた (Scheme 5)。立体選択的のヒドロホウ素化を経てケトン37へと導き、

EtSH/Zn(OTf)₂処理により混合チオケタール**38**とした。次いで、ラジカル還元による脱硫を行い8環性化合物**39**の合成に成功した。9員環上の*vic* ジオールをギ酸オルトエステルへと変換後、Ac₂O中加熱分解することにより二重結合を導入し**40**を得た。さらに保護基の変換を行い、FGHIJKLM環ジオール**41**の合成を達成した。



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) **35**, 9-BBN, THF, rt; then 3 M aq. Cs₂CO₃, **14b**, Pd(PPh₃)₄, DMF, rt, 59%; (b) BH₃ THF, THF, rt; then aq. NaOH, H₂O₂, rt, 57%; (c) EVE, CSA, CH₂Cl₂, rt; (d) TBAF, THF, rt; (e) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt; (f) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt, 64% (4 steps); (g) Ph₃SnH, AIBN, toluene, reflux, 98%; (h) HC(OMe)₃, PPTS, CH₂Cl₂, rt; i) Ac₂O, reflux, 69% (2 steps); (j) LiDBB, THF, -78 °C; (k) Me₂C(OMe)₂, CSA, CH₂Cl₂, rt; (l) Ac₂O, pyr, rt; (m) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt, 69% (4 steps).

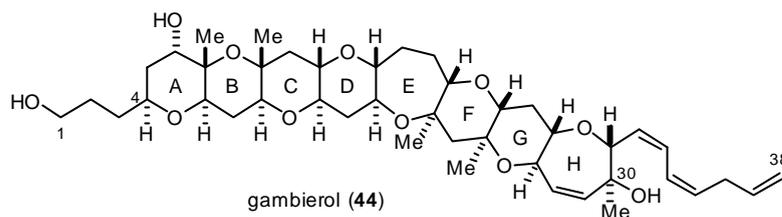
こうして得られた**41**からアルデヒド**42**へと誘導し、ホスフィンオキシド**10**とのHorner Wittig反応によるカップリングを試みたが、F環部9員環上アルデヒド部位の予想外の立体障害により達成することができなかった (Scheme 6)。



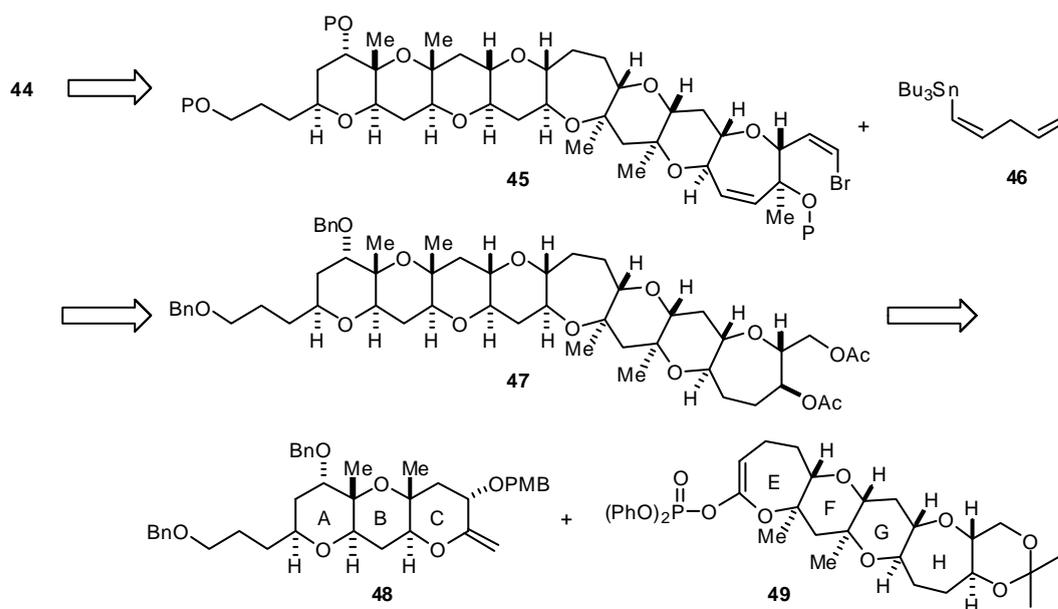
Scheme 6

【3】神経毒ガンビエロールの全合成と構造活性相関

ガンビエロール(44)は渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の培養藻体からマウス致死成分として単離・構造決定されたポリ



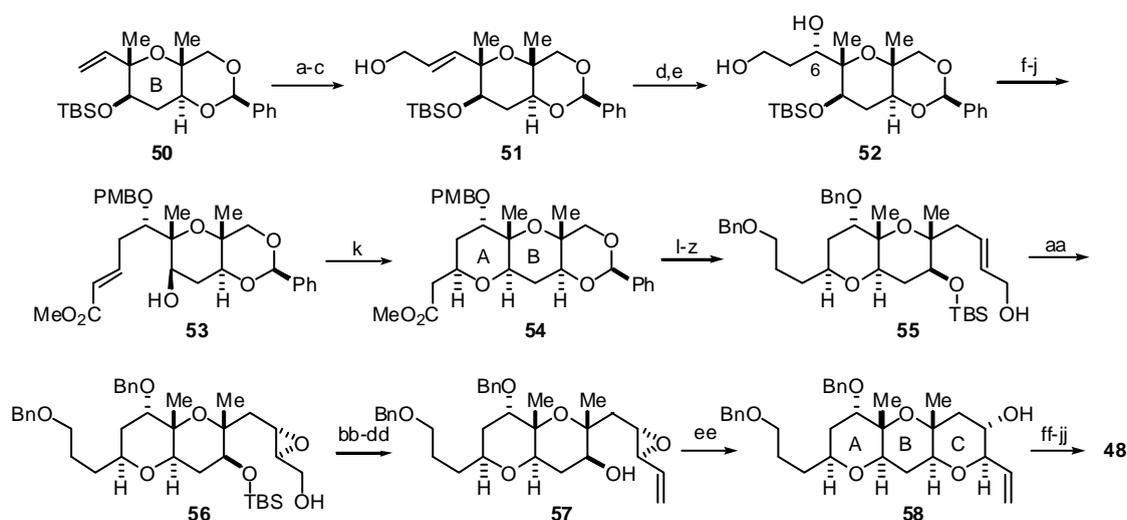
環状エーテル系天然物である。その毒性は腹腔内投与による最小致死量 (MLD) が50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と強く、またマウスの中毒症状が食中毒シガテラの主要原因毒シガトキシンのそれと類似していることから、ガンビエロールのシガテラ中毒への関与が推定されている。またごく最近、ガンビエロールがブレベトキシンの電位依存性 Na^+ チャネルへの結合を弱いながらも阻害することが報告された。しかし天然からは極微量しか試料が得られず、毒性発現機構の解明や詳細な生物活性の評価を行うためには、化学合成による試料の供給ルートを開発することが不可欠である。またガンビエロールは8環性ポリエーテル骨格と不安定なトリエン側鎖から成る特徴的な化学構造を有しており、有機合成化学の標的分子として興味深い。このような背景から、ガンビエロールの全合成研究が国内外で活発に展開されている。我々は、前述の鈴木-宮浦カップリング反応を用いる収束的ポリ環状エーテル骨格構築法を合成戦略の基盤とし、ガンビエロールの最初の全合成を達成した。また、本全合成によって試料供給が初めて可能となり、マウスの組織病理学所見および構造活性相関について有用な知見を得ることができた。



Scheme 7. Retrosynthetic analysis of gambierol.

【合成計画】ガンビエロールの不安定でしかも立体選択的構築の困難な共役(Z,Z)-ジエンを含むトリエン側鎖は、(Z)-ビニルプロミド **45** と(Z)-ビニルスズ **46** の Stille 反応により全合成の最終段階で導入することとした (Scheme 7)。また、**45** の前駆体となる8環性ポリエーテル骨格 **47** を、ABC 環部エキソエノールエーテル **48** と EFGH 環部エノールホスフェート **49** の鈴木 - 宮浦カップリング反応により合成する収束的な合成計画を立案した。

【ABC環部の合成】B環に相当する文献既知化合物**50**を出発物質とし、アルコール**53**の分子内hetero Michael反応によりA環を構築し、最後にC環を構築する直裁的な合成を計画した (Scheme 8)。まず、化合物**50**の二重結合を酸化開裂してアルデヒドとし、Horner Emmons反応により増炭した後、エステル部分を還元してアリルアルコール**51**を得た。Sharpless不斉エポキシ化によりエポキシアルコールとし、続くRed Al還元によりエポキシドを位置選択的に開裂してC6位水酸基を導入した。得られた1,3 ジオール**52**をアニシリデンアセタールとして保護した後、DIBALHにより位置選択的に還元開裂し、続く酸化とWittig反応による増炭、TBS基の除去によりアルコール**53**を得た。こうして得た**53**をTHF中NaHで処理すると、分子内hetero Michael反応が円滑に進行し、望む環化体**54**が単一の立体異性体として得られた。



Scheme 8. Reagent and conditions: (a) OsO₄, NMO, aq. THF, rt; then NaIO₄, rt; (b) (*i*PrO)₂P(O)CH₂CO₂Et, KO^tBu, THF, -78 → 0 °C; (c) DIBALH, CH₂Cl₂, -78 °C, 87% (3 steps); (d) (-)-DET, Ti(OⁱPr)₄, TBHP, 4 Å MS, CH₂Cl₂, -28 °C; (e) Red-Al, THF, 0 °C, quant. (2 steps); (f) *p*MeOC₆H₄CH(OMe)₂, PPTS, CH₂Cl₂, rt; (g) DIBALH, CH₂Cl₂, 0 °C, 80% (2 steps); (h) SO₃pyr, Et₃N, DMSO, CH₂Cl₂, 0 °C; (i) Ph₃P=CHCO₂Me, toluene, 80 °C, quant. (2 steps); (j) TBAF, HOAc, THF, 35 °C, 91%; (k) NaH, THF, rt, 86%; (l) DIBALH, CH₂Cl₂, -78 °C; (m) Ph₃PCH₂Br, NaHMDS, THF, 0 °C, 91% (2 steps); (n) 9-BBN, THF, rt; then aq. NaHCO₃, H₂O₂, rt; (o) BnBr, KO^tBu, Bu₄NI, THF, rt, 94% (2 steps); (p) DDQ, CH₂Cl₂, pH 7 phosphate buffer, rt; (q) BnBr, KO^tBu, Bu₄NI, THF, rt, 93% (2 steps); (r) *p*TsOH, MeOH, CHCl₃, rt, 95%; (s) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, 0 °C; (t) CSA, MeOH, rt, 92% (2 steps); (u) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 95%; (v) Tebbe reagent, THF, 0 °C, 90%; (w) 9-BBN, THF, rt; then aq. NaHCO₃, H₂O₂, rt; (x) SO₃pyr, Et₃N, DMSO, CH₂Cl₂, 0 °C; (y) (*i*PrO)₂P(O)CH₂CO₂Et, KO^tBu, THF, -78 → 0 °C, 90% (3 steps); (z) DIBALH, CH₂Cl₂, -78 °C, 98%; (aa) *m*CPBA, CH₂Cl₂, 0 °C, 99%; (bb) SO₃pyr, Et₃N, DMSO, CH₂Cl₂, 0 °C; (cc) Ph₃PCH₂Br, NaHMDS, THF, 0 °C, 87% (2 steps); (dd) TBAF, THF, rt, 98%; (ee) PPTS, CH₂Cl₂, rt, 98%; (ff) PMBCl, KO^tBu, Bu₄NI, THF, rt; (gg) OsO₄, NMO, aq. THF, rt; then NaIO₄, rt; (hh) NaBH₄, MeOH, rt, 86% (3 steps); (ii) I₂, PPh₃, imidazole, C₆H₆, rt, 95%; (jj) KO^tBu, THF, 0 °C, 91%.

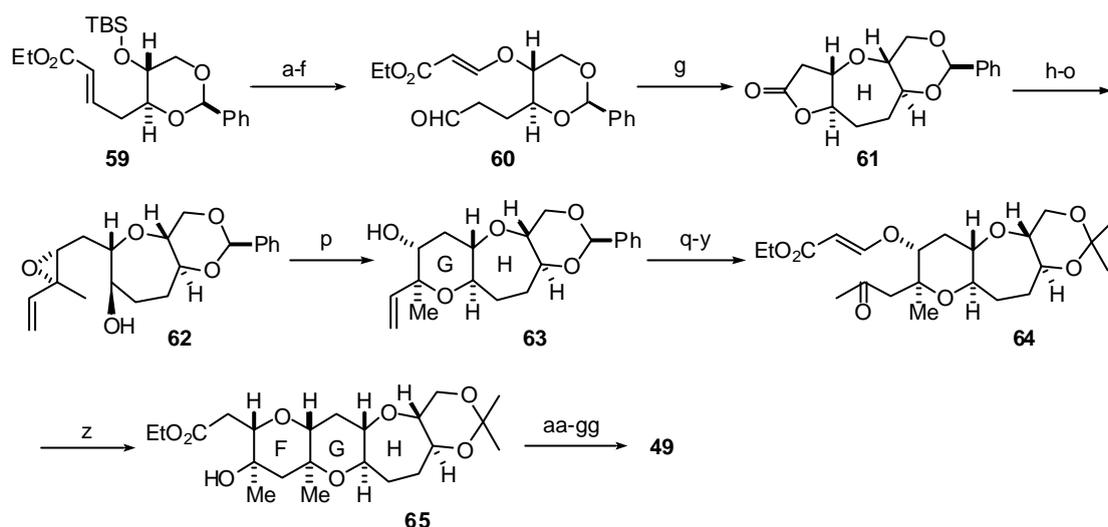
次に、ヒドロキシエポキシド57の6-endo環化によるC環の構築を行った。化合物54から導いたアリルアルコール55のSharpless不斉エポキシ化反応は、望む α エポキシド56を主生成物とする約6:1の立体異性体の混合物を与えた。一方、*m*CPBA酸化では56のみが単一生成物としてほぼ定量的に得られた。さらに3段階でヒドロキシエポキシド57へと導き、酸処理により6-endo環化を行い3環性化合物58を高収率で得た。さらに6段階の反応を経てABC環部フラグメント48へと導いた（化合物50から36段階，全収率18%）。

【EFGH環部の合成】当初、EFGH環部の第一世代合成法として、鈴木-宮浦カップリング反応を利用した収束的合成ルートを開拓したが、効率の点で問題を残していた。そこで、理研の中田らにより開発されたSmI₂を用いる還元的エーテル環構築法をF環およびH環の構築に利用し、G環の構築に6-endo環化を用いるより効率的な合成計画を立案した（Scheme 9）。

文献既知化合物59を出発物質として、 β アルコキシアクリル酸ユニットの導入を経てアルデヒド60を合成した。中田らの方法に従い、60をMeOH存在下THF中室温でSmI₂処理すると還元的環化反応が速やかに進行し、H環に相当するラクトン61が収率70%で得られた。Sharpless不斉エポキシ化反応を含む8工程でビニルエポキシド62へと変換し、酸処理による6-endo環化を行い、G環を構築した。63よりメチルケトン64へと誘導し、再びSmI₂を用いる還元的環化反応を行うことによりFGH環部65を単一生成物として収率87%で得た。次いで、E環をラクトンとして閉環し、Nicolaouらの手法を改良した反応条件でEFGH環部エノールホスフェート49へと変換した（化合物59から33段階，全収率22%）。

【ガンビエロールの全合成】ABC環部エキソエノールエーテル48を9-BBNでヒドロホウ素化して*B*-アルキルボランとし、これとEFGH環部エノールホスフェート49の鈴木-宮浦カップリング反応を、塩基としてC₂CO₃を用いてPdCl₂(dppf)触媒存在下DMF中50 °Cで行ったところ、目的とするカップリング生成物66を86%で得ることができた（Scheme 10）。化合物66のヒドロホウ素化をBH₃ THF錯体を用いてTHF中室温で行うと、望むアルコールを単一生成物として収率87%で与え、続くTPAP酸化によりケトン67とした。PMB基を除去した後、EtSH/Zn(OTf)₂で処理することにより混合チオケタールとしてD環を閉環した。この際アセトニドが同時に除去されるので、one-potでアセチル化を行いジアセテート68とした。ラジカル還元による脱硫を行い、8環性ポリエーテル骨格47の合成を完了した。

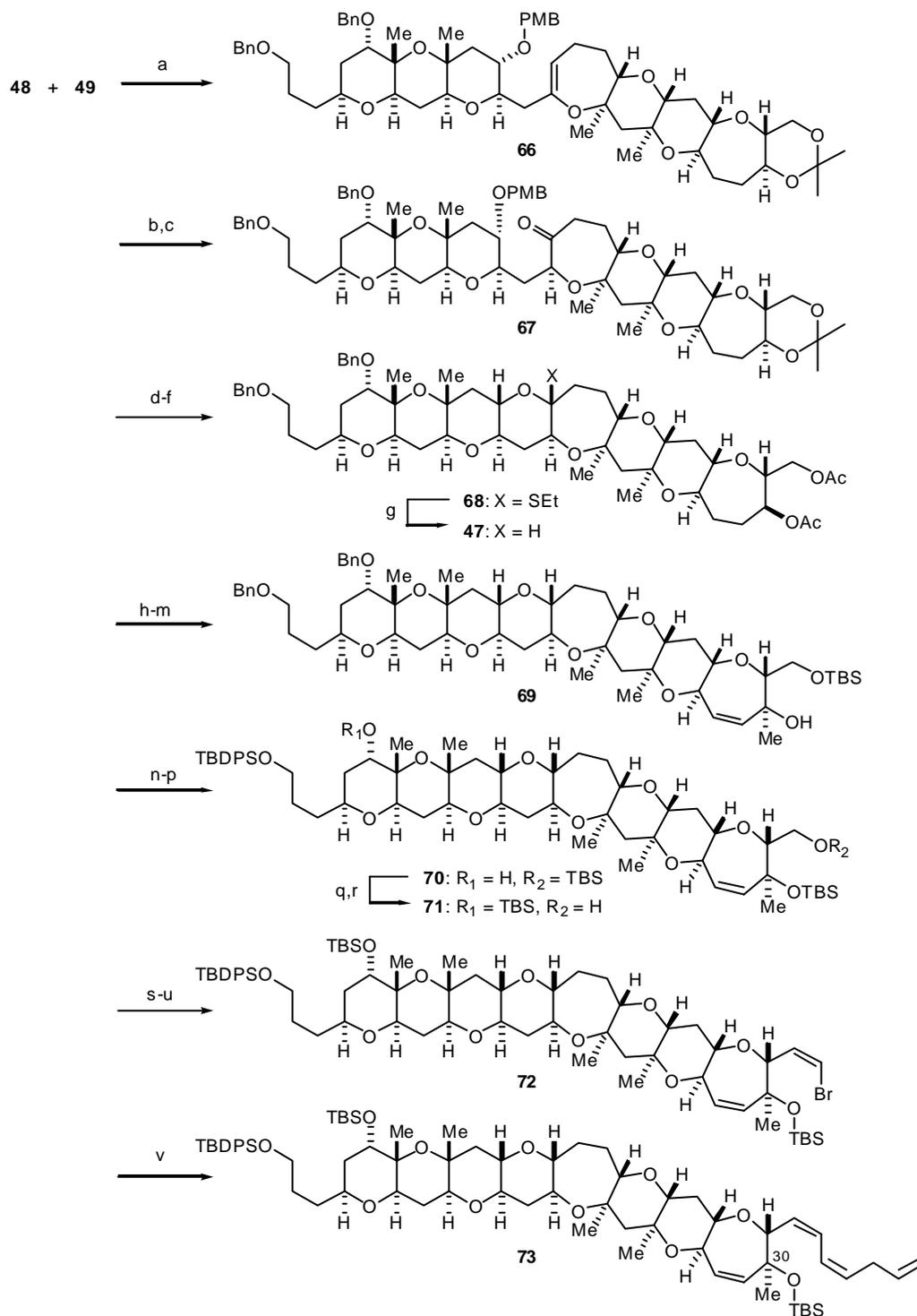
伊藤 三枝法によるH環二重結合の導入とC30位メチル基の立体選択的導入を経て三級アルコール69へと導き、さらに保護基の変換を行って70を経て一級アルコール71とした。70を酸化して得られるアルデヒドをジブロモオレフィンへと変換後、上西らの方法により立体選択的に還元して(2) ビニルプロミド72へと誘導した。次いで、(2) ビニルスズ46との



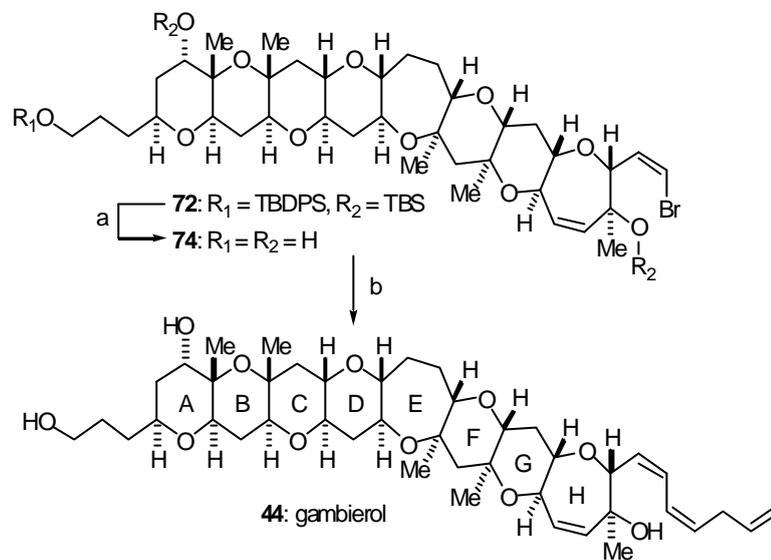
Scheme 9. Reagents and conditions: (a) O_3 , MeOH, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$; then $NaBH_4$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 96%; (b) I_2 , PPh_3 , imidazole, THF, rt, 99%; (c) 1,3-dithiane, $nBuLi$, THF, $-20 \rightarrow 0\text{ }^\circ\text{C}$; (d) TBAF, THF, rt, 95% (2 steps); (e) ethyl propiolate, NMM, CH_2Cl_2 , rt; (f) MeI, $NaHCO_3$, aq. MeCN, rt, 94% (2 steps); (g) SmI_2 , MeOH, THF, rt, 70%; (h) DIBALH, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$; (i) $Ph_3P=C(Me)CO_2Et$, toluene, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 97% (2 steps); (j) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, quant.; (k) DIBALH, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$; (l) (-)-DET, $Ti(OiPr)_4$, TBHP, CH_2Cl_2 , $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 97% (2 steps); (m) SO_3 pyr, Et_3N , DMSO, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$; (n) Ph_3PCH_2Br , $NaHMDS$, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 94% (2 steps); (o) TBAF, THF, rt; (p) PPTS, CH_2Cl_2 , rt, 88% (2 steps); (q) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$; (r) EtSH, $Zn(OTf)_2$, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2 , rt, 85% (2 steps); (s) $Me_2C(OMe)_2$, PPTS, CH_2Cl_2 , rt, 92%; (t) 9-BBN, THF, rt; then aq. $NaHCO_3$, 30% H_2O_2 , rt; (u) SO_3 pyr, Et_3N , DMSO, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$; (v) $MeMgBr$, toluene, $-78\text{ }^\circ\text{C}$; (w) TPAP, NMO, 4Å MS, CH_2Cl_2 , rt, 86% (4 steps); (x) TBAF, THF, rt; (y) ethyl propiolate, NMM, CH_2Cl_2 , rt, 99% (2 steps); (z) SmI_2 , MeOH, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 87%; (aa) TMSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 96%; (bb) DIBALH, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$; (cc) $Ph_3P=CHCO_2Bn$, toluene, rt, 95% (2 steps); (dd) TBAF, HOAc, THF, rt, 93%; (ee) H_2 , Pd/C, MeOH, THF, rt; (ff) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, Et_3N , THF, toluene, rt; then DMAP, toluene, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 99% (2 steps); (gg) KHMDS, $(PhO)_2P(O)Cl$, THF, HMPA, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, quant.

Stille反応をCoreyらの条件($Pd(PPh_3)_4/CuCl/LiCl$)で行い、ガンビエロール保護体72を収率66%で得ることに成功した。しかし、73の脱シリル化を種々の反応条件下で試みたが、C30位のTBS基を除去することができなかった。反応条件を厳しくすると、不安定なトリエン側鎖を失った化合物や二重結合の異性化した化合物を含む複雑な混合物を与えるのみであり、ガンビエロールの生成は確認できなかった。

そこで、不安定なトリエン側鎖の導入前にシリル保護基をすべて除去し、水酸基を無保護のままStille反応を行うこととした (Scheme 11)。ビニルプロミド72をTHF中フッ化水素・ピリジン錯体で処理すると、トリオール74を定量的に得ることができた。最後に、46とのStille反応を前述の $Pd(PPh_3)_4/CuCl/LiCl$ 触媒系を用いて行うことにより、43%の収率でガンビエロール(44)を得ることに成功し、ここに最初の全合成を達成した。合成品の 1H , ^{13}C NMR, HRMSおよびCDスペクトルは天然物と完全に一致し、さらに天然物とほぼ同等のマウス致死毒性 (MLD 50 ~ 75 $\mu\text{g/kg}$, ip) を示すことを確認した。これにより、ガンビエロールの絶対立体配置を含む全構造を確認することができた。



Scheme 10. Reagents and conditions: (a) **48**, 9-BBN, THF, rt; then **49** (1.4 eq.), aq. Cs₂CO₃, PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂, DMF, 50 °C, 86%; (b) BH₃ THF, THF, rt; then aq. NaOH, 30% H₂O₂, rt, 87%; (c) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 98%; (d) DDQ, pH 7 buffer, CH₂Cl₂, rt; (e) EtSH, Zn(OTf)₂, CH₂Cl₂, rt; (f) Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, rt, 75% (3 steps); (g) Ph₃SnH, AIBN, toluene, 110 °C, 95%; (h) NaOMe, MeOH, CH₂Cl₂, rt; (i) TBSCl, imidazole, DMF, 0 °C; (j) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 69% (3 steps); (k) LiHMDS, TMSCl, Et₃N, THF, -78 °C; (l) Pd(OAc)₂, MeCN, rt; (m) MeMgBr, toluene, -78 °C, 94% (3 steps); (n) TBSOTf, Et₃N, CH₂Cl₂, rt; (o) LiDBB, THF, -78 → -45 °C; (p) TBPSCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, rt, 99% (3 steps); (q) TBSOTf, Et₃N, CH₂Cl₂, rt; (r) CSA, MeOH, CH₂Cl₂, 0 °C, 93% (2 steps); (s) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt; (t) CBr₄, PPh₃, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C; (u) *n*Bu₃SnH, Pd(PPh₃)₄, C₆H₆, rt, 82% (3 steps); (v) **46**, Pd(PPh₃)₄, CuCl, LiCl, DMSO/THF (1:1), 60 °C, 66%.



Scheme 11. Reagents and conditions: (a) HF·pyr, THF, rt, quant.; (b) **46**, Pd(PPh₃)₄, CuCl, LiCl, DMSO/THF (1:1), 60 °C, 43%.

【ガンビエロールの病理組織学所見】 今回の全合成により、ガンビエロールの生物活性を詳細に検討するために必要な試料の調達が可能になった。ガンビエロールがシガテラ中毒に関与している可能性を考慮し、*in vivo*における生物活性を詳しく評価するために、合成ガンビエロールをマウスに経口投与し、急性毒性の評価と組織損傷部の電子顕微鏡観察を行った。

藻類毒の多くは、経口投与による致死量が腹腔内投与の場合の数百～千倍高いことが知られている。しかし、ガンビエロールの場合、マウスに対する経口投与の最小致死量が80～150 μg/kgと腹腔内投与による致死量と近い値であり、非常に強い経口毒であることが明らかになった。また、透過型電子顕微鏡による組織病理学的観察の結果から、ガンビエロールの標的臓器が第一に肺であることがわかった。また、心臓も障害を受けており、その結果として全身性の鬱血が観察された。

【ガンビエロールの構造活性相関】 次に、8環性化合物**47**を出発物質として種々の構造改変体を合成し、マウス致死毒性を指標とした構造活性相関を検討した。1位及び6位水酸基に関して4種類の化合物(75～78)、H環官能基とトリエン側鎖に関して14種類の化合物(79～92)、合計18種類の構造改変体(Figure 1)を合成し、体重15～17gのddY系雄マウスに腹腔内投与した際の致死毒性を指標にして活性評価を行った(Table 2)。

6 エピ体**75**はガンビエロールと同等の致死毒性を示した。また、6 デオキシ体**76**、

1-O-メチルエーテル体77、1-デオキシ体78はいずれも天然物に比べると多少活性の低下が見られるものの顕著な致死毒性を示したことから、1位および6位水酸基はガンビエロールの毒性発現にはそれほど関与していないと考えられる。

H環を修飾した化合物では、30-デスメチル体79がガンビエロールの約5分の1の活性を示したのに対して、28,29-ジヒドロ体80では約120分の1に活性が低下し、化合物81においては活性が失われた。これらの結果より、H環に関して30位メチル基は活性発現に必須の構造ではないが、C28,C29位二重結合は毒性発現に極めて重要な構造要因であることが明らかとなった。

トリエン側鎖に関しては、末端二重結合を還元した37,38-ジヒドロ体82がガンビエロールと同等の活性を示し、共役二重結合に関する幾何異性体83, 84では約2分の1、約5分の1の致死毒性を保持していたのに対して、(3Z)-モノエン体85では活性が著しく低下し、(3E)-モノエン体86は致死毒性を示さなかった。従って、共役二重結合、特に(3Z)-オレフィン、の存在が毒性発現に重要であることがわかる。

また、化合物81, 87~92がまったく活性を示さないことから、ポリエーテル骨格あるいはトリエン側鎖単独では毒性発現に十分な構造ではないことが明らかとなった。

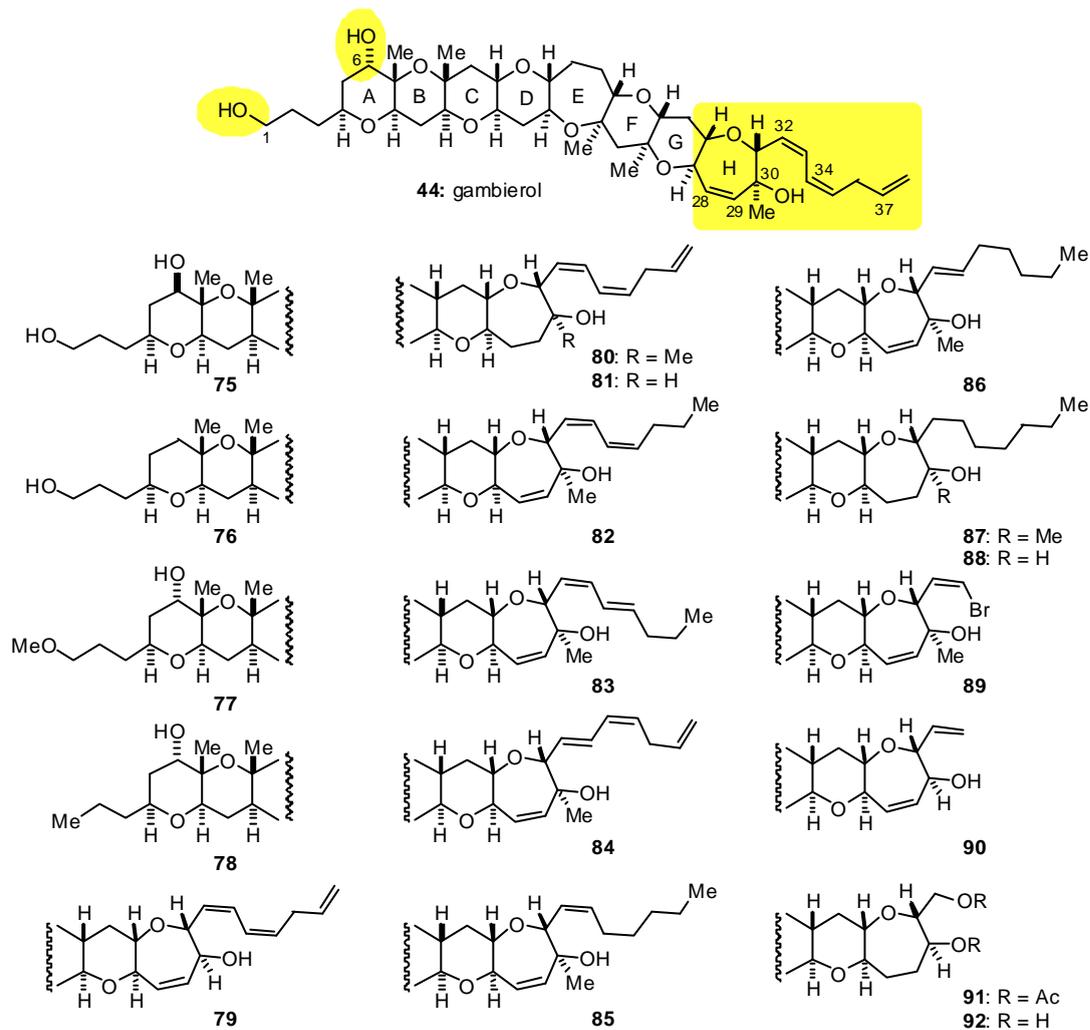


Figure 1. Structural analogues of gambierol.

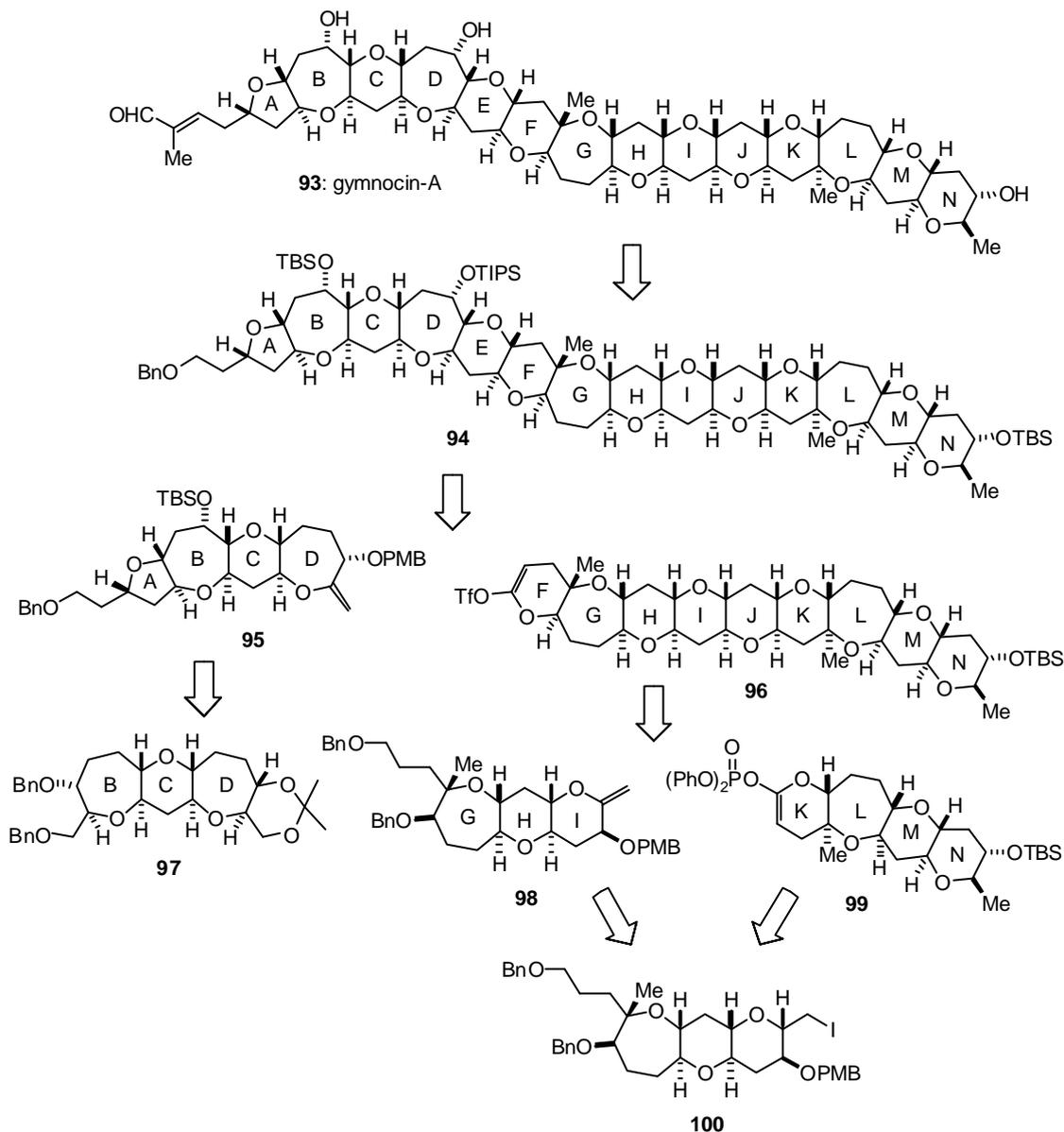
Table 1. Minimal lethal dose values (mg/kg) of compounds **44**, **75** ~ **92** in mice.

Compd	Minimal lethal dose (mg/kg)		Compd	Minimal lethal dose (mg/kg)
Gambierol (44)	0.05	0.075	84	0.34
75	0.065		85	1.7
76	0.19		86	>12.9
77	0.44		87	>12.9
78	0.20		88	>7.6
79	0.34		89	>7.6
80	8.0		90	>6.1
81	>11.9		91	>8.2
82	0.065		92	>18.3
83	0.13			

【4】細胞毒性ポリ環状エーテル・ギムノシン Aの全合成

ギムノシン A(93)は赤潮原因渦鞭毛藻*Karenia mikimotoi*から佐竹らにより単離・構造決定されたポリ環状エーテル化合物であり、従来知られる中で最大の14個のエーテル環が縮環した構造を持つ。また、これまでのポリ環状エーテル系海産毒と異なり、マウスリンパ腫細胞 P388に対して細胞毒性 ($EC_{50} = 1.3 \mu\text{g/mL}$) を示す点で興味を持たれる。しかし、その活性発現機構はまったく不明であり、特異なポリ環状エーテル構造と強力な細胞毒性との相関を明らかにするためには化学合成による試料供給と構造類縁体の合成が不可欠である。我々は、鈴木-宮浦カップリング反応を基盤とする収束的ポリ環状エーテル合成戦略を駆使することによりギムノシン Aの最初の全合成を達成した。本全合成により、鈴木-宮浦カップリング反応を基盤とする我々の合成方法論がポリ環状エーテル合成におけるフラグメントカップリングプロセスとして極めて有効であることを実証した。

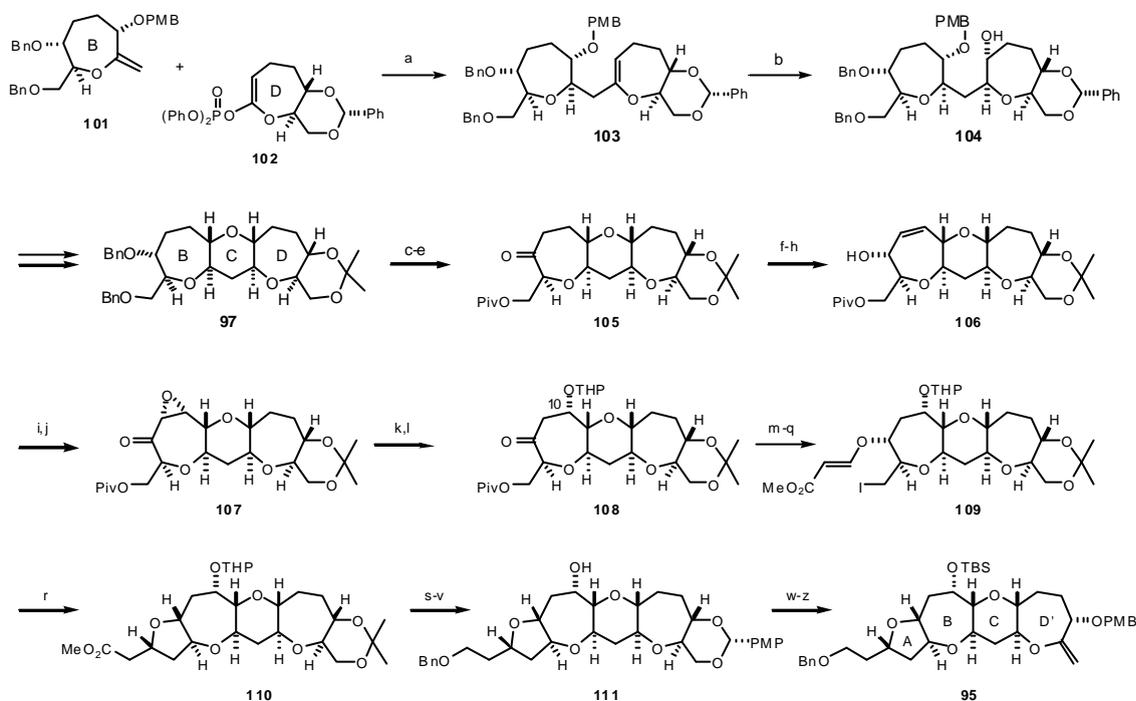
【合成計画】ギムノシン A(93)の全合成を行う上で、14環性巨大ポリエーテル骨格をいかにして効率的に合成するかが最大のポイントとなる。そこで、2メチル2ブテナール側鎖を合成の最終段階で導入することとし、14環性ポリエーテル骨格94をABCD環部95とFGHIJKLMN環部96の鈴木-宮浦カップリングにより合成することを計画した (Scheme 12)。ABCD環部フラグメント95については、A環を分子内ラジカル環化により構築することとしBCD環96を設定した。一方、FGHIJKLMN環部フラグメント96は、分子の対称性を考慮して、GHI環部98とKLMN環部99に分割することにより、共通の合成中間体100より合成することとした。



Scheme 12. Retrosynthetic analysis of gymnocin A.

【ABCD環部の合成】 B環エキソエノールエーテル**101**とD環エノールホスフェート**102**の鈴木 - 宮浦カップリングにより化合物**103**を合成し、続く立体選択的ヒドロホウ素化によりアルコール**104**とした (Scheme 13)。さらに、メチルケタールの $\text{Et}_3\text{SiH}/\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 還元によりC環を閉環しBCD環部**97**を合成した。3工程でケトン**105**へと導き、伊藤 - 三枝法によりエノンとした後、Luche還元によりアリルアルコール**106**を選択的に得た。次いで、*m*CPBA酸化によりエポキシ化した後、水酸基を酸化して α,β -エポキシケトン**107**へと誘導した。宮下らの方法に従ってエポキシドを位置選択的に還元し、生じた水酸基をTHPエーテルとして保護し**108**を得た。ケトンを立体選択的に還元し、 β -アクリル酸ユニットの導

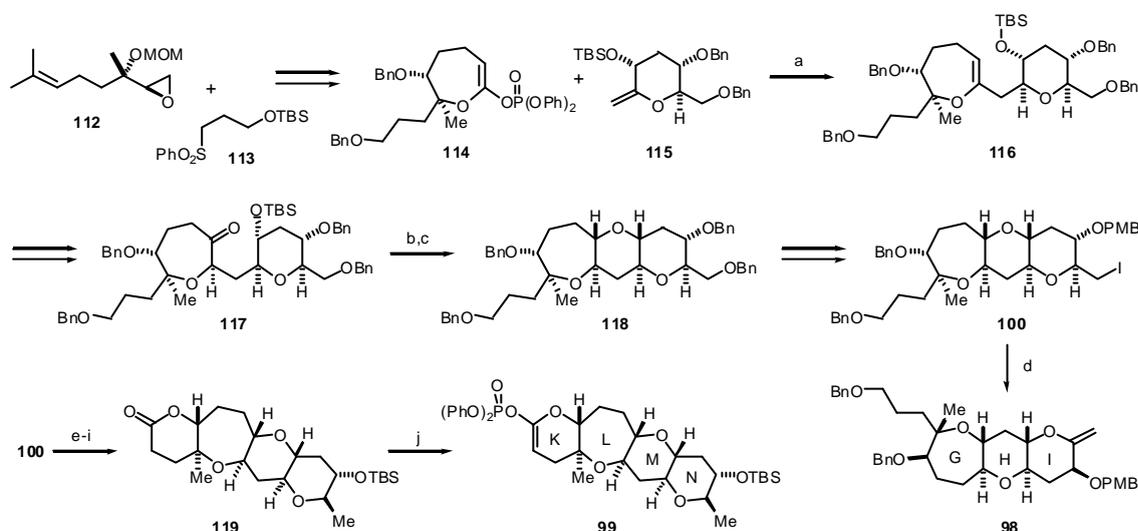
入を経て、ヨウ素体109へと導いた。分子内ラジカル環化反応によりA環部テトラヒドロフラン環を構築し、得られたエステル110より111を経て、ABCD環部エキソエノールエーテル95を合成した。



Scheme 13. Reagents and conditions: (a) **101**, 9-BBN, THF, rt; then 1 M aq. NaHCO₃, Pd(PPh₃)₄, **102**, DMF, 50 °C; (b) BH₃ SMe₂, THF, rt; then H₂O₂, NaOH, 0 °C → rt, 54% (two steps); (c) LiDBB, THF, -78 °C; (d) PivCl, pyr, CH₂Cl₂, rt, 85% (two steps); (e) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 94%; (f) LiHMDS, TMSCl, Et₃N, THF, -78 °C. (g) Pd(OAc)₂, MeCN, rt, 96% (two steps); (h) NaBH₄, CeCl₃ 7H₂O, MeOH, rt, 88%; (i) *m*CPBA, NaHCO₃, CH₂Cl₂, rt, 83%; (j) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 81%; (k) Na[PhSeB(OEt)₃], AcOH, EtOH, 0 °C → rt, quant.; (l) DHP, CSA, CH₂Cl₂, rt; (m) L-Selectride, THF, -78 °C; (n) LiAlH₄, THF, 0 °C, 85% (three steps); (o) TsCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, rt, 81%; (p) methyl propiolate, NMM, CH₂Cl₂, 35 °C; (q) NaI, acetone, reflux, 72% (two steps); (r) *n*Bu₃SnH, Et₃B, PhMe, -78 °C, quant.; (s) LiAlH₄, THF, 0 °C; (t) KO^tBu, BnBr, THF, rt; (u) CSA, MeOH, rt; (v) *p*MeOPhCH(OMe)₂, CSA, CH₂Cl₂, rt, 71% (four steps); (w) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt, 95%; (x) DIBALH, CH₂Cl₂, 0 °C, 93%; (y) I₂, PPh₃, imidazole, THF, rt, 86%; (z) KO^tBu, THF, 0 °C, quant.

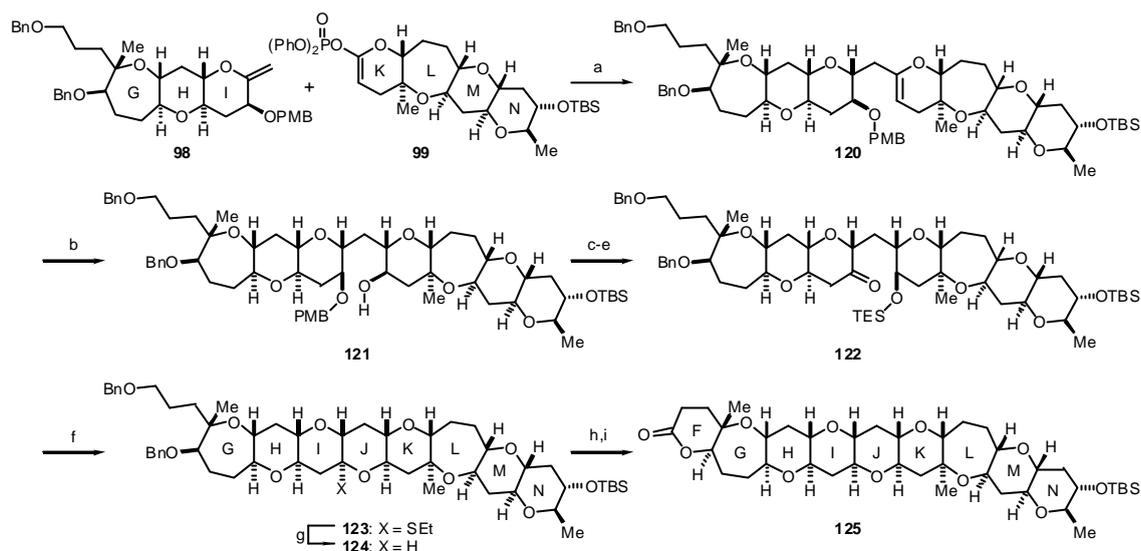
【GHI環及びKLMN環部の合成】 ゲラニオールから5工程で得られる文献既知のエポキシド112とスルホン113のアニオンとのカップリングを経て合成した7員環エノールホスフェート114と、エキソエノールエーテル115を鈴木 - 宮浦反応により連結し、カップリング生成物116とした (Scheme 14)。116のヒドロホウ素化を経てケトン117とし、メチルケタール化と Et₃SiH/BF₃ OEt₂還元により6員環エーテルを閉環して3環性エーテル118を合成した。さらに5工程で共通中間体であるヨウ素体100へと導き、塩基処理によりGHI環部エキソエノールエーテル98を得た。一方、100より5工程で得られるラクトン119を経てKLMN環部エノールホスフェート99を合成した。

【FGHIJKLMN環部の合成】 GHI環部エキソエノールエーテル**98**をヒドロホウ素化して得られるアルキルボランとKLMN環部エノールホスフェート**99**をDMF中 Cs_2CO_3 水溶液と触媒量の $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ の存在下50℃で反応させたところ、望むカップリング生成物**120**を収率良く得た (Scheme 15)。この**120**をヒドロホウ素化してアルコール**121**とし、保護基の変換、酸化を行ってケトン**122**に誘導した。EtSH/ $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ 処理により混合チオケタール**123**とし、ラジカル還元によりGHIJKLMN環部**124**を合成した。さらに、ベンジル基を除去し、得られたジオールを $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ により酸化してFGHIJKLMN環部ラクトン**125**の合成を完了した。



Scheme 14. Reagents and conditions: (a) **114**, 9-BBN, THF, rt., then aq. Cs_2CO_3 , **115**, $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, DMF, 50 °C, 86%; (b) $p\text{TsOH}$, MeOH, rt, 84%; (c) Et_3SiH , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , rt, quant.; (d) $\text{KO}t\text{Bu}$, THF, 0 °C, 91%; (e) $n\text{Bu}_3\text{SnH}$, AIBN, toluene, 100 °C; (f) DDQ, CH_2Cl_2 , pH 7 phosphate buffer, rt, 63% (2 steps); (g) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , 0 °C, 94%; (h) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, MeOH, rt; (i) TPAP, NMO, 4Å MS, CH_2Cl_2 , rt, 61% (2 steps); (j) KHMDS, $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, THF/HMPA, -78 °C.

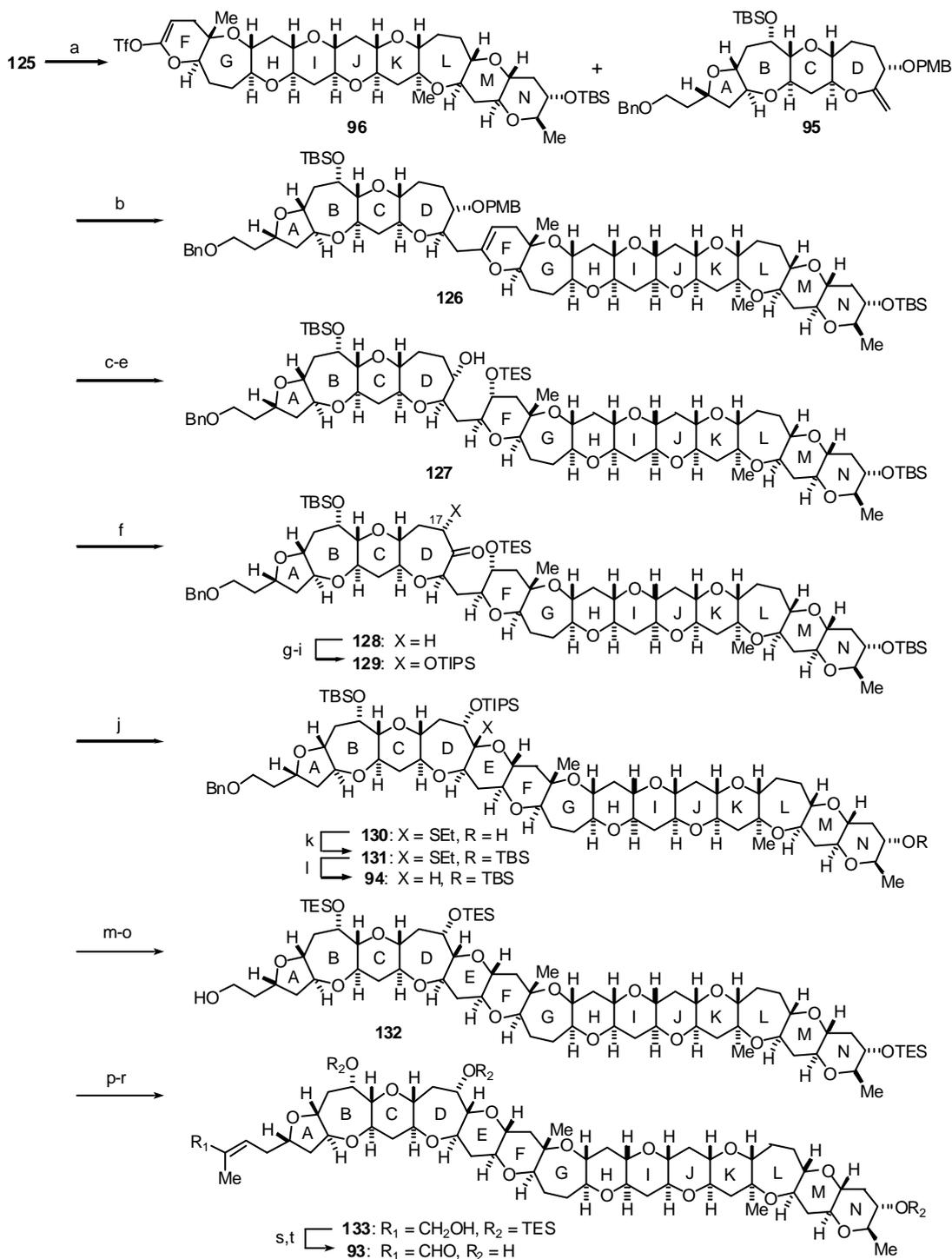
【ギムノシン Aの全合成】 以上のようにしてABCD環部およびFGHIJKLMN環部の合成が完了したので、鈴木 - 宮浦カップリングによる両フラグメントの連結を行った (Scheme 16)。まず、エノールトリフラート**96**をラクトン**125**よりComins試薬を用いて合成した。エキソエノールエーテル**95**を9-BBNでヒドロホウ素化して得られる*B*-アルキルボランと、エノールトリフラート**96**を Cs_2CO_3 水溶液と $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 触媒存在下DMF中室温で反応させたところ、カップリング反応は円滑に進行し、望むカップリング生成物**126**を高収率で得ることができた。次いで、**126**をヒドロホウ素化し、生じた水酸基をTESエーテルとして保護した後、PMB基を除去してアルコール**127**とした。これを酸化して得られるケトン**128**をシリルエノールエーテルへと導いた後、 OsO_4 酸化することによりD環上の17位水酸基を立体選択的に



Scheme 15. Reagents and conditions: (a) **98**, 9-BBN, THF, rt; then aq. Cs_2CO_3 , **99**, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DMF, 50°C ; (b) BH_3 , THF, THF, $-20 \rightarrow 0^\circ\text{C}$; then aq. NaOH , H_2O_2 , rt, 72% from **118**; (c) TESOTf , 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , 0°C , 81%; (d) DDQ, CH_2Cl_2 , pH 7 phosphate buffer, rt, 90%; (e) TPAP, NMO, 4\AA MS, CH_2Cl_2 , 91%; (f) EtSH , $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, CH_2Cl_2 , rt, 87%; (g) $n\text{Bu}_3\text{SnH}$, AIBN, toluene, 100°C , 92%; (h) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOAc/MeOH , rt; (i) $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$, toluene, 93% (2 steps).

導入することができた。TIPSエーテル**129**として保護した後、 CH_2Cl_2 中 $\text{EtSH}/\text{Zn}(\text{OTf})_2$ で処理することにより混合チオケタールの閉環を試みたが、目的とする**131**はごく低収率でしか得られなかった。種々条件検討の結果、溶媒としてニトロメタンを用いることにより混合チオケタール**131**とその脱シリル体**130**の混合物を収率良く得ることに成功した。**130**は再度シリル化することにより容易に**131**に導くことができた。最後に、**131**のラジカル還元による脱硫を行い、ギムノシン Aの14環性ポリエーテル骨格**94**の合成を完了した。

最後に、2-メチル-2-ブテナール側鎖の導入を行った。側鎖を導入した後に、TBS基およびTIPS基を除去することは困難であることがわかったので、**94**の段階でこれらの保護基をTES基に変換した。アセトニトリル中 70°C でTBAFを作用させてTBSおよびTIPS基を除去した後、TESエーテルとして保護し、LiDBBを用いて還元的脱ベンジル化を行い一級アルコール**131**とした。次いでアルデヒドへと酸化し、Wittig反応と続くDIBALH還元によりアリルアルコール**132**に導いた。最後に、TES基をTASFで除去し、 MnO_2 を用いてアリルアルコール部位を官能基選択的に酸化することにより、ギムノシン A (**92**)の全合成を達成した。得られた**92**の ^1H , ^{13}C NMRおよびHRMSスペクトルは天然物のものと完全に一致した。

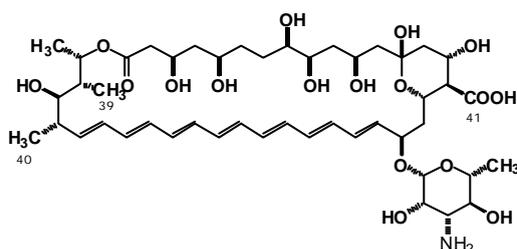


Scheme 16. Reagents and conditions: (a) KHMDS, THF/HMPA, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, Comins' reagent, $-78 \rightarrow 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 80%; (b) **95**, 9-BBN, THF, rt, then **96**, 3 M Cs₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, DMF, rt, 81%; (c) BH₃ SMe₂, THF, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{rt}$, then NaOH, H₂O₂, rt, 75%; (d) TESOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt; (e) DDQ, CH₂Cl₂, pH 7 phosphate buffer, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 79% (two steps); (f) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 95%; (g) LiHMDS, TMSCl, Et₃N, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$; (h) OsO₄, NMO, THF-H₂O, rt; (i) TIPSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt, 85% (three steps); (j) EtSH, Zn(OTf)₂, MeNO₂, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{rt}$, **130**: 40%; **131**: 38%; (k) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt, 71%; (l) Ph₃SnH, AIBN, toluene, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, 98%; (m) TBAF, 4 Å MS, MeCN, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; (n) TESOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, rt; (o) LiDBB, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 73% (three steps); (p) TPAP, NMO, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt; (q) Ph₃P=C(Me)CO₂Me, CH₂Cl₂, rt; (r) DIBALH, CH₂Cl₂, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 66% (three steps); (s) TASF, THF-DMF, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{rt}$; (t) MnO₂, CHCl₃, rt, 91% (two steps).

【 5 】膜結合分子が形成する複合体の構造と機能

生理活性物質のなかには、細胞膜にイオン透過性チャネルを形成することによって、生理活性を発現する例が数多く知られている。その代表的化合物であるアンフォテリシン B (AmB, 1) は、発見以来四十数年を経た現在でも最も重要な抗真菌物質の一つであり、感染症治療に広く使用されている。AmB の抗菌活性は、膜含有ステロールに対する分子認識の違いによって説明されている。すなわち、AmB は真菌細胞膜に存在するエルゴステロールを認識してチャネル複合体（会合体）を形成するが、その親和性はヒト細胞膜に含まれるコレステロールに比べ一桁以上高いと言われている。一方で、この親和性の差が一桁程度であるために、投与量によっては重篤な副作用を起こす危険性も高く、医薬品としての欠点となっている。このように AmB が細胞膜中に形成する分子複合体の構造は、約 30 年前に提唱された樽板モデル (図 1) が契機となり、多くの科学者の関心を集め薬理学的および物理化学的研究が行なわれてきたが、その実体は依然として不明である。これは、このような系に対して、直接的に構造情報を与える NMR や X 線結晶解析が適用できず、UV や CD スペクトル、計算化学といった手法に頼らざるをえないためである。

そこでわれわれは、細胞膜中における有機化合物の分子相互認識のモデルとしてこの AmB



アンフォテリシン B (AmB, 1)

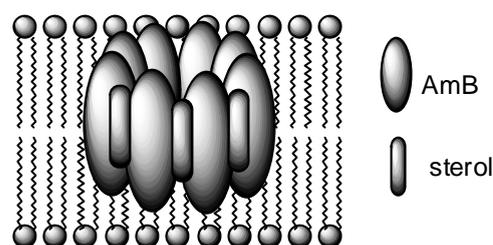


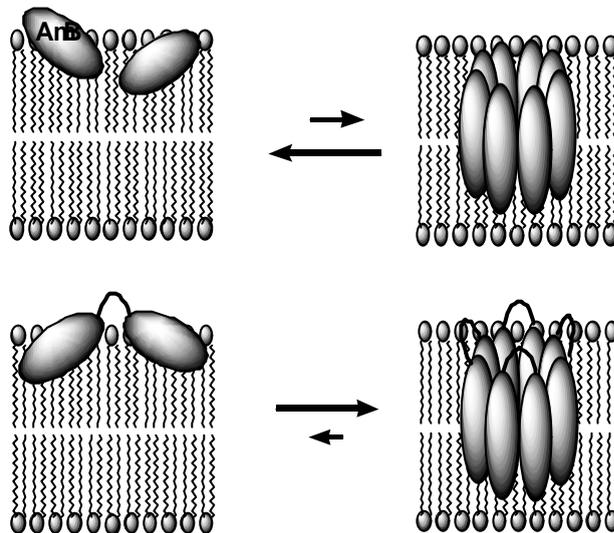
図 1 . AmB イオンチャネルの樽板モデル

分子複合体に着目し、固体 NMR を用いてその複合体構造の解明を目指した。その過程で膜中での低分子自己会合体の構造解析に有効な方法論の開発することにも重点を置いた。

AmB は膜中において、非会合体と会合体の平衡混合物として存在すると考えられている。AmB 単量体では非会合状態に平衡が片寄っており、会合体構造を選択的に観測するのは困難である。そこで、まず AmB の二量体および相互作用するステロールとの連結体を合成し、会合状態を安定化させることを試みた (図 2)。同時に、隣り合う AmB を位置特異的に標識し、固体 NMR によって会合体の構造を解明することを目指すこととした。以下、その詳細を示す。

a. アミノ基同士を連結

AmB において比較可能な官能基は、アシル基に限られる。そこでアミノ基同士を連結し、二量体の調製を行った。得らないうち、ヒト血球細胞に作用させたところ、AmB の EC₅₀ に対し、アミノ基を有する二量体 4 は 0.3 μM と非常に



二量体に変換された二量体

図 2 . 連結によって期待される会合体の安定化

AmB の会合状態は、UV スペクトル上の吸光度低下の程度で見積もることが可能であると報告されている。リポソーム中での UV スペクトルを観測したところ、二量体 4 は AmB に較べて顕著に小さい吸収を示した (図 3)。これは AmB に較べて二量体 4 のヘプタエン部分がリポソーム脂質膜中でより接近していることを示しており、会合状態が安定化されていると解釈できる。

次に、リン脂質リポソームを調製し、カリウムイオン(K⁺)の流入活性を pH の上昇で観測した (実際にはリン酸の ³¹P NMR 化学シフト変化を用いた。図 4)。すなわち、pH 勾配のあるリポソームを調製し、このリポソームに対して AmB や二量体を作用させる。イオンチャネルが形成され K⁺ が流入すると、プロトンがリポソーム外に流出し pH 勾配が解消される。これによって、低磁場側に新たな ³¹P NMR ピークを与えることになる (例えば図 4 の左下のスペクトル; all-or-none 型と呼ばれる

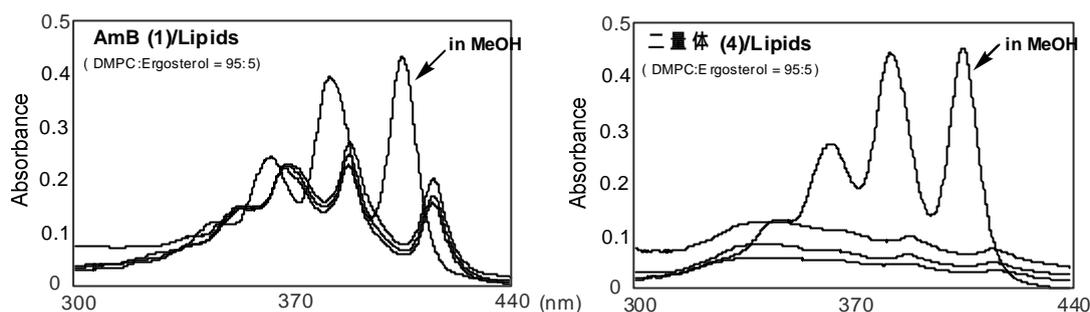


図3 . アンフォテリシン B と二量体 (4) のリポソーム中における UV スペクトル
 スペクトルのトレースは、AmB (左) では上から順番にメタノール中、AmB-脂質分子数比が、1/200, 1/
 二量体 (右) では、上から順番にメタノール中、二量体-脂質分子数比が 0.5/200, 0.5/100, 0.5/20

方式のイオン流入が起こっていることを示す)。すなわち、AmB は エルゴステロールを含む LUV (Large Unilamellar Vesicles) リポソームに対してコンダクタンスの比較的大きなイオンチャンネルを形成することができるが、コレステロールおよびステロールなしでは、コンダクタンスおよび K^+ 選択性の低いチャンネルが形成される。アミノ基を持ちリンカーの長さを異にする二量体3と4は、エルゴステロール存在下、同程度のチャンネル形成能を示した。これらの作用は AmB よりも少し弱いものの AmB と類似したエルゴステロール選択性を示した。以上のデータから、二量体3 および4 が AmB と機能的・構造的に類似したチャンネルをリン脂質膜中に形成していると考えられる。なお、直接連結した2はチャンネル形成作用を示さなかった(スペクトルは省略した)。

上記の二量体はリンカー部分が長く、また比較的疎水性が高いため、次に短鎖かつ親水性の高い酒石酸をリンカーとして用いた *N*-連結二量体(5,6)を同様に調製した。これらの二量体について上記と同様の活性測定を行った結果、やはりアミノ基を有する6において顕著な溶血活性が認められた。その EC_{50} 値は $0.03 \mu M$ であり、上記の二量体をはるかに凌ぐ活性を示した。また、上記と同様にUVスペクトルや ^{31}P NMR を用いたチャンネル活性試験を行った結果からも、6における安定なチャンネル形成が示唆された。これは、リンカーが短くなることで、AmB ユニット同士がより相互作用しやすくなったためと考えられる。

b. カルボキシル基を連結した二量体

次にわれわれは効率的な NMR 用試料調製のために、合成がより簡便なカルボン酸同士をつないだ *C*-連結二量体を調製してイオン透過作用を調べた。数種の誘導体を調製したが、このうち遊離のアミノ基を有する二量体7は非常に強力な溶血性 (EC_{50} $0.25 \mu M$, AmB は $1.5 \mu M$) を示した。さらに、二量体7のイオンチャンネル形成作用

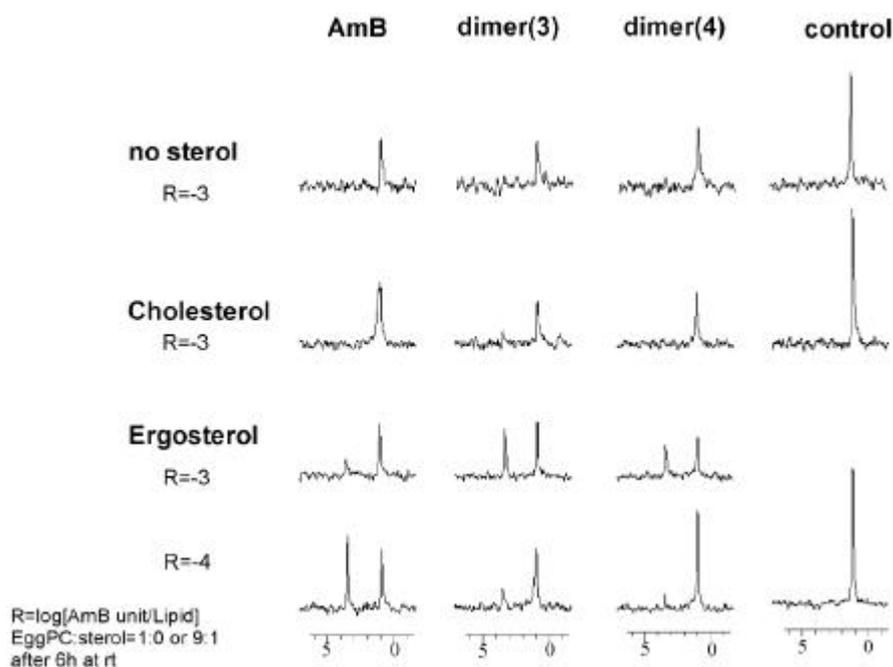
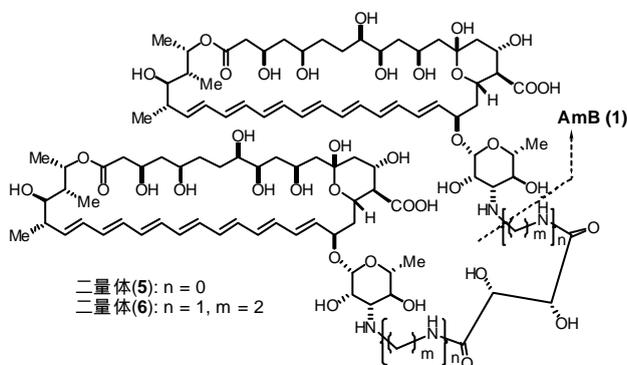


図4 . アンフォテリシン B と二量体のイオンチャネル活性 (^{31}P NMR スペクトル)

リポソームに K^+ が流入するにつれて H^+ が流出し、内部の pH が上昇する。その結果、右側のシグナル ($\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$ 由来) が消失し、左側のシグナル ($\text{H}^{31}\text{PO}_4^{2-}$ 由来) 強度が増加する。この左側のシグナルの強度増加は AmB 誘導体のチャネル形成活性によるものである。AmB, Dimers の各スペクトルのピーク強度がコントロールに較べて低下しているのは、リポソームの破壊もしくは K^+ 以外のイオンの透過によるものと考えられる。AmB の $R=-3$ において左のピーク強度が低下しているのはリポソームの破壊が進んだためと考えられる。



を ^{31}P NMR 測定によるリポソーム K^+ 流入試験で調べたところ、二量体 7 は AmB や二量体 4 とは異なり、ステロールに依存しないコンダクタンスの小さな非特異的チャネルを形成していると考えられた(図 5)。したがって、二量体 7 が形成するチャネル会合体は、構造はある程度類似しているものの、チャネル機能は AmB と明確に異なっていることが明らかとなった。

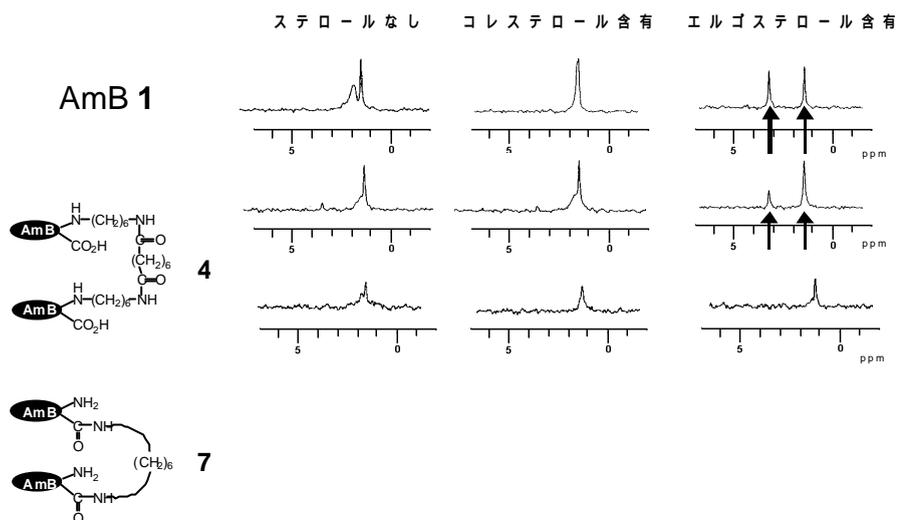
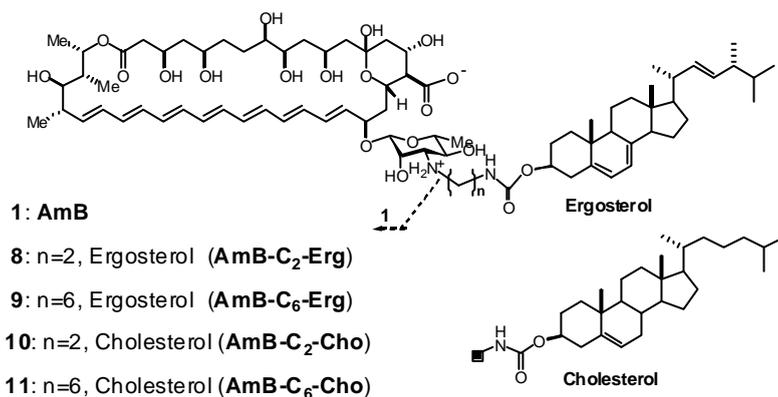


図5 . AmB 二量体の ^{31}P NMR を用いたリポソームに対するイオン透過活性試験
卵黄 PC/ステロール = 9/1 or 10/0、脂質/AmB = 1000/1、室温で 6h 放置後測定した。AmB 誘導体はリポソーム調製後に添加した。

c . AmB - ステロール連結体

さらに AmB の抗菌活性の発現に必須であると考えられているステロールを特異的に認識する機構を調べる目的で連結体を調製し、その活性を調べた。抗菌活性のモデルとして AmB とエルゴステロール さらに副作用のモデルとしてコレステロールとの連結体を作成した。AmB のアミノ基とステロールの3位ヒドロキシル基をエチレンカルバメートで連結した誘導体 (8 および 10) を調製し、また別途ヘキサメチレンカルバメートでつないだ連結体 (9 および 11) をそれぞれ作成した。



これら4つの化合物についてイオンチャネル活性を³¹P NMR によるリポソーム K⁺流入試験で調べたところ、2つの顕著な傾向が認められた。図6に示すように、エルゴステロール連結体(8, 9)がコレステロール連結体(10, 11)より顕著に強い活性を示し、また、短いリンカーの誘導体(8, 10)が長いもの(9, 11)より強い活性を示した。特に8の活性はAmBに匹敵するものであった。これらの結果は、当初のねらい通りAmBとエルゴステロールの分子認識が連結分子8において再現できたことを示している。さらに、短いリンカーの誘導体で活性が高かったことから、会合体においてAmBのアミノ基はステロールの3位の近傍に位置していることが示唆された。

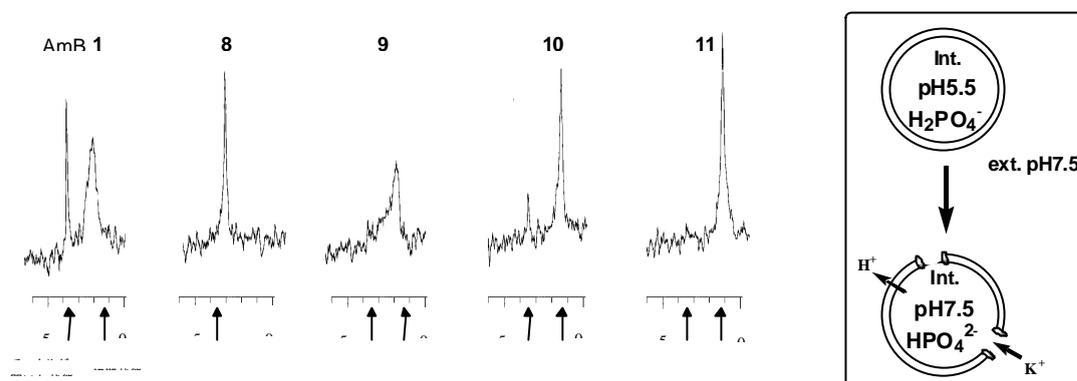


図6．ステロール連結分子の³¹P NMR を用いたリポソームに対するイオン透過活性試験
卵黄 PC/AmB 誘導体 = 10000/3、室温で 3h 放置後測定。リポソームは AmB 誘導体をあらかじめ混合して調製した。

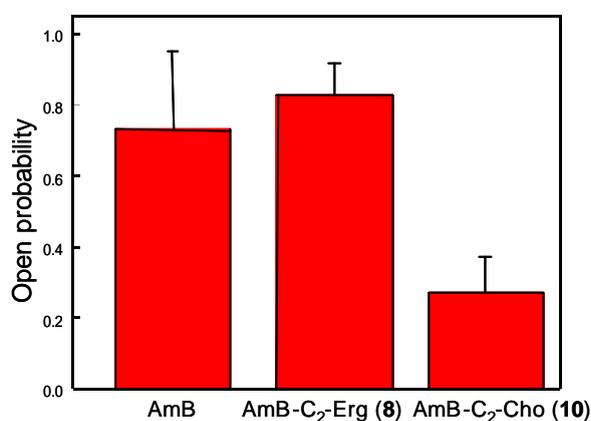


図7．ステロール連結体のチャネル開確率

また、8と10について単一チャネル電流測定を行った結果、エルゴステロール連結体8においてチャネルの開確率がコレステロール連結体10より顕著に高いことが明らかとなった(図7)。この8の開確率はエルゴステロール膜におけるAmBのそれと近い値を示した。また、8の単一チャネルのコンダクタンスは28 pSであり、AmBのそれと同等かそれ以上の値を示した。この結果からも、AmBとエルゴステロールの分子認識が連結分子8において再現できたことが明らかとなった。

d. AmB のチャンネル形成におけるコレステロール、飽和 PC の影響

天然物が形成する膜複合構造の解析法の確立を目指して、固体 NMR を用いた AmB - 脂質複合体の構造研究を開始した。その準備として、AmB のイオンチャンネル複合体が安定に形成される脂質組成を調査した。卵黄フォスファチジルコリン (卵黄 PC) リポソームを用いたイオン透過実験を行ったところ、コレステロール、アシル鎖長の異なるフォスファチジルコリン (PC) の添加効果から、AmB のイオンチャンネル活性が脂質二重膜の疎水領域の長さに依存することが明らかとなった。

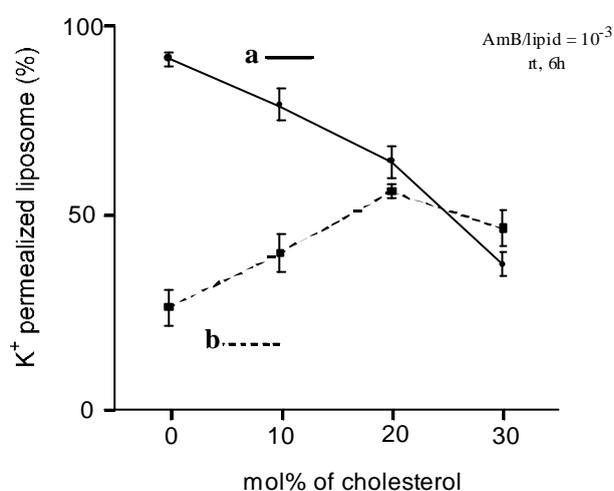


図 8 AmB チャンネル活性のコレステロール濃度依存性

一般的にコレステロールは AmB のイオンチャンネルを安定化すると考えられていた。そこで卵黄 PC リポソームのイオン透過実験を用いて、AmB のチャンネル活性に対するコレステロールの作用を確認した。AmB とコレステロール、卵黄 PC を予め混合した CHCl_3 -MeOH 溶液から形成した薄膜でリポソームを作製したところ、予想に反してコレステロールが阻害的な働きを示した (図 8 a)。一方、コレステロールと卵黄 PC のみから作成したリポソーム水溶液に対して AmB を添加した場合は、促進的な働きがみられた (図 8 b)。この結果、コレステロールは水中からの AmB の結合を促進するが、膜中でのチャンネル形成は阻害することが判明した。コレステロールはリン脂質二重膜の物理化学的性質にさまざまな変化をもたらす。膜に結合した AmB に対する阻害効果は、コレステロールが卵黄 PC の膜の厚さを僅かに増したためであると予想された (表 1 上段)。そこで膜の厚さの小さな変化が AmB の活性に及ぼす影響を、アシル鎖長の異なる飽和 PC の添加実験により調査した。C₁₀ から C₁₈ までの 5 つの飽和 PC を卵黄 PC に対して 20% 添加した影響を試験したところ、C₁₀、C₁₂ で大きな促進効果

が、 C_{18} で阻害効果がみられた(図9)。AmBの疎水部分は約22であるが、表1下段に示したPC二重膜の疎水領域長と比較すると、活性促進効果を有する C_{10} 、 C_{12} PCはAmBの疎水部分より短い疎水領域の膜を形成することがわかる。このことからAmBとPCの間には疎水領域長に基づいた分子認識が存在することが明らかとなった。

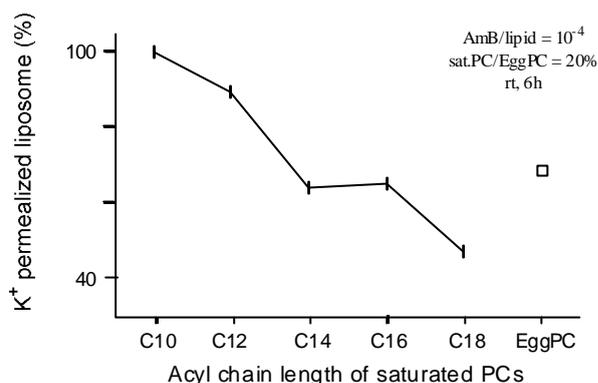
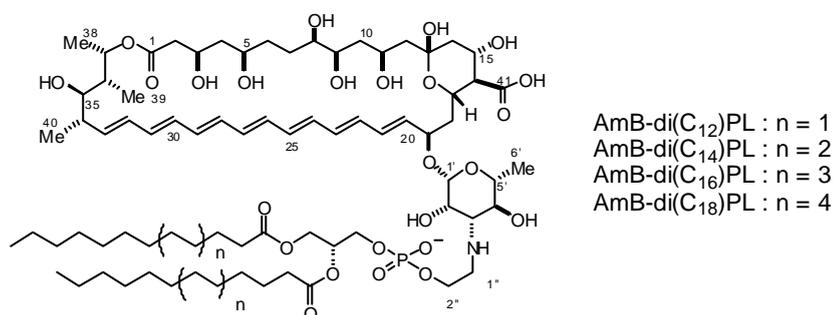


図9 AmBチャネル活性のアシル鎖長依

表1二分子膜の疎水領域長

卵黄PC	~25.8
卵黄PC +	~29.8
30% cholesterol	
di(C ₁₀)PC	15.5
di(C ₁₂)PC	19.5
di(C ₁₄)PC	23
di(C ₁₆)PC	36
di(C ₁₈)PC	40.5



AmB-di(C₁₂)PL : n = 1
 AmB-di(C₁₄)PL : n = 2
 AmB-di(C₁₆)PL : n = 3
 AmB-di(C₁₈)PL : n = 4

チャネル活性 : $C_{12} > C_{14} > C_{16} > C_{18}$

図10 AmB - リン脂質連結分子

e. AmB - リン脂質連結分子の作製とそのイオン透過活性

AmBと C_{12} から C_{18} までアシル鎖長の異なる4つのリン脂質を共有結合で繋いだAmB - リン脂質連結分子を調製した(図10)。これらのイオン透過実験を行ったところ、連結されたリン脂質のアシル鎖長が短いほど大きな活性が見られた。AmB - リン脂質連結分子では連結したリン脂質を交換不可能な境界脂質としてAmB周囲に固定化できる。連結分子の活性が連結されたリン脂質の長さに依存することは、AmBに隣接する数分子の脂質がチャネルの構造と機能に影響を与えていることを示す。

f. REDORを用いたAmB-リン脂質会合体の構造研究

固体NMRを用いた脂質膜中での構造解析を行うため、 ^{13}C 標識 AmB の生合成的手法による調製を行った。 ^{13}C 標識体の存在下で AmB 生産菌 *Streptomyces nodosus* を培養し、 ^{13}C 標識化された AmB を単離した。その結果、U- ^{13}C グルコースを取り込ませると、全ての炭素に ^{13}C が取り込まれ、その平均標識率は50%程度にも達していた。また、[3- ^{13}C]プロピオン酸を取り込ませた場合、標識率は15%程度に低下するものの、予期していた39、40、41位の3箇所に位置特異的に ^{13}C 標識された AmB を得ることができた。

AmBの形成するイオンチャンネルの推定構造として、細胞膜をAmB一分子で貫通したsingle-lengthチャンネルと二分子で貫通したdouble-lengthチャンネルが提案されている(図11)。前出のイオン透過実験の結果は、AmBが単分子の長さをもって脂質二重膜を認識していることを示しており、single-lengthチャンネルを支持するものであった。われわれはこの推定構造を確認するために固体NMRによる原子間距離測定を試みた。

リン脂質二重膜の表面に存在する ^{31}P とAmB分子上の複数の ^{13}C の相対的な核間距離を測定すれば、膜表面から近い部分を決定することができ、single-lengthチャンネルとdouble-lengthチャンネルの区別が可能となる。核間距離の見積もりは ^{31}P - ^{13}C 間の双極子相互作用の観測を必要とする。固体NMR測定では高い分解能を得るために、試料のマジック角回転(MAS)により双極子相互作用を消去してしまう。スペクトルの分解能を損なうことなく異核間双極子相互作用を観測するにはREDOR法が最適であると考えられた。[3- ^{13}C]プロピオン酸を取り込ませたAmBを用いて、DMPCとの混合分散液の ^{13}C { ^{31}P }REDORSペクトルを測定した(図14)。

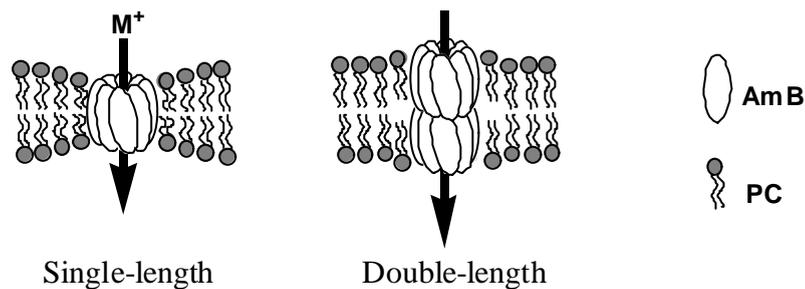


図11 AmBチャンネルの推定構造

通常のスペクトルに相当するFull-Echo(図 1 4 下)では全ての ^{13}C NMRが観測されるが、REDOR差スペクトルでは膜表面に近く、 ^{13}C - ^{31}P 双極子相互作用の影響を受けた ^{13}C のみが見られる。AmBのREDOR差スペクトルでは分子両端の標識部位全て(C 3 9、C 4 0、C 4 1)が確認されたが、分子中央部に位置する共役二重結合のシグナルは全く見られなかった。この結果は、single-lengthチャンネルに一致する。一方、DMPCより厚い膜を形成する C_{18} のアシル鎖を持つDSPCを用いて同様の測定を行ったところ、REDORはAmB分子の片側(C 4 1)でしか観測されなかった(データ省略)。前出のイオン透過実験で使用した飽和PCの中では、DSPCのみがAmBのチャンネル活性を阻害した(図 9)。REDORから得られた構造情報と対応させると、single-lengthチャンネル形成の可否がAmBのイオンチャンネル活性に重要であると結論付けられる。

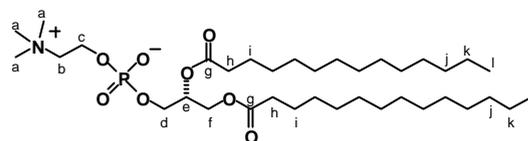
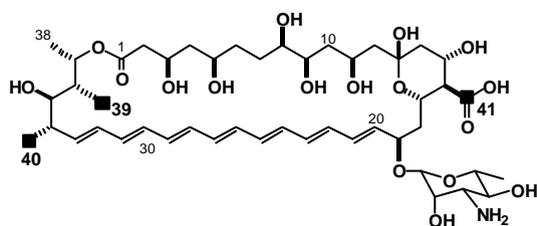


図 1 2 AmB のプロピオン酸による標識位置 ()

図 1 3 リン脂質の ^{13}C NMR帰属

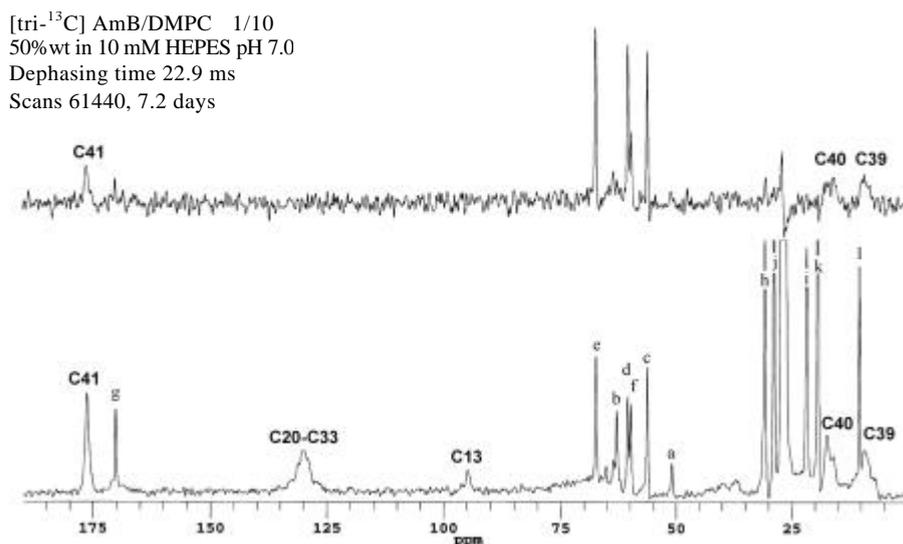


図 1 4 ^{13}C 標識AmB / DMPCの $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDORスペクトル

上 : REDOR差スペクトル、下 : Full-Echoスペクトル

以下に本研究における研究成果を要約する。

AmB の会合体構造を安定化すべく連結体の調製を行った。アミノ基を持ち、ある程度の長さのリンカーで連結した *N*-連結 AmB 二量体 (4) は AmB と同レベルのコンダクタンスを持つイオンチャンネルを形成し、そのステロール選択性も類似していることを見出した。

酒石酸をリンカーとして用いた *N*-連結二量体 (6) は 4 よりもさらに強い溶血活性を示し、安定なチャンネル会合体が形成されていることが示唆された。

カルボキシル基同士を連結した二量体 7 の形成するチャンネルは、構造はある程度類似しているものの、チャンネル機能は AmB と明確に異なっていることを明らかにした。

テロールを連結した場合は、短いリンカーで繋いだ連結体においてイオンチャンネル活性が高く、さらにエルゴステロール連結体の方がコレステロール連結体より顕著に強い活性を示した。このことは、連結体においても AmB のエルゴステロール選択性が再現できたことを示している。AmB のイオンチャンネル形成が、膜中ではコレステロールによって顕著に阻害されることを明らかにした。

AmB のイオンチャンネル活性がリン脂質の脂肪酸部分の鎖長に大きく左右されることを示し、その作用が直接的な分子認識に基づいていることを AmB - PC 連結分子を調製することによって実証した。

生合成的に標識した AmB を用いて固体 NMR を測定して原子間距離を見積もった結果、AmB はリン脂質膜中で single-length チャンネルに相当する会合体を形成していることを示した。

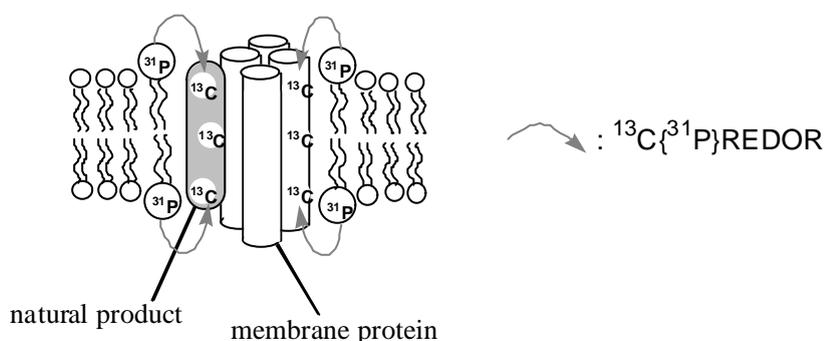
これらの結果は、当初の予想通りこれらの連結体によって会合体構造が安定化されることを示唆しており、固体 NMR 測定における有用な分子プローブとなると予想される。しかがって、上記の ^{13}C 標識 AmB を連結体へと導くことで、チャンネル複合体の構造情報を得ることが可能となることが明らかとなった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

脂質二重膜系での構造研究には固体 NMR の手法が有効であり、グラミシジンなどのペプチド性イオンチャンネルやロドプシンなどの膜タンパク質の構造研究に威力を発揮しているが、固体 NMR 測定のためには ^{13}C や ^{15}N などの NMR 核種によって試料を標識する必要がある。AmB やステロールのような有機化合物の場合、ペプチドやタンパク質とは異なり標識体の調製が困難であるため、固体 NMR の適用はまだほとんど行われていない。本研究では、上述のようにチャンネル複合体構造の安定化のために連結分子を調製し、さらに脂質二重膜中での構造解析を行うために固体 NMR の手法を新たに導入した。その際、生合成と化学誘導の併用により多様な標識パターンを持った試料調製に成功した。したがって、本研究は天然物化学研究一般に固体 NMR を

導入する先駆的な研究になったと考える。また、本研究において AmB の関わるチャンネル会合体の構造を解明できれば、そのステロール認識機構の詳細に迫ることができ、より副作用の少ない薬剤の設計も可能になると期待される。同時に、本研究の方法論は AmB 以外のポリエンマクロライド抗生物質一般にも応用可能であり、この種の抗生物質における分子作用機構の理解と副作用の低減に大きく寄与できるものと確信する。

天然有機化合物のなかには、ポリエンマクロライドの他にも、膜タンパク質と結合する海産ポリエーテルなど生体膜中で分子複合体を形成することによって特異な機能を発現する化合物が数多く知られており、本グループにおいて中心的な研究対象となっている。これら有機化合物が膜中で形成する複合体の構造は、基礎科学的にも医薬品開発の面でも興味深い研究対象であるが、X線解析や溶液 NMR といった構造生物学的方法論の適用が困難であり未解明のままである。本研究で着目した膜複合構造における膜表面から結合分子までの距離は重要な情報であるが、この距離の測定に本研究では $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDORを利用し、顕著な成果を挙げることができた。生体膜の主成分はその極性部分にリン酸を持つため同位体標識する必要がなく、試料調製が簡便である。これら手法は天然物だけでなく膜結合性ペプチドや膜たんぱく質の測定にも有利であり、今後、膜結合分子の研究に広く適用されることが期待される。



$^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDORで得られる膜複合体の構造情報

3.2 “微量ポリエーテル化合物の構造決定と構造活性相関に関する研究（安元・佐竹グループ）”

(1) 研究内容

Ciguatoxin (CTX)とbrevetoxin (BTX)に代表されるポリエーテル化合物は、エーテル環が梯子状に連結したポリエーテル構造を有し、単細胞藻類の渦鞭毛藻によって生産される。ポリエーテル化合物は、電位依存性ナトリウムチャンネル (VSSC) 等の膜タンパクと結合し、Na イオンや Ca イオンの細胞内流入を増大させ、生体情報解明に関する重要な研究試薬となっている。CTX 類や BTX は魚類や二枚貝に蓄積され、構造的な修飾を受けて多様な類縁体を生じる。本研究は、新規手法の導入によって微量にしか得られない多数の類縁体の構造の決定の方法論の開発や新規ポリエーテル化合物の探索・構造決定を行い、ポリエーテル化合物と膜タンパクとの相互作用を解析することを目的とした。

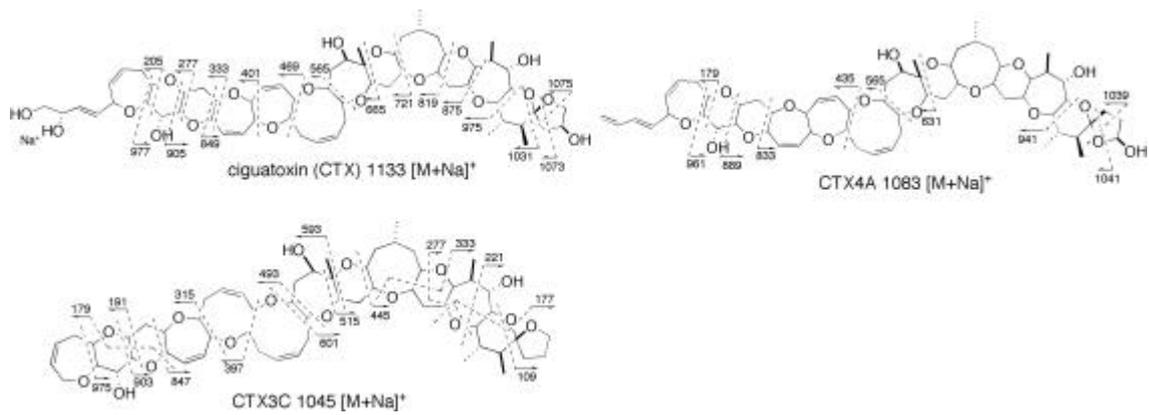
(2) 研究成果

【1】微量シガトキシン同族体のMS/MS分析による構造決定

仏領ポリネシアで毒化する代表的シガテラ魚ドクウツボとその近縁種の筋肉と内臓、肉食魚バラフエダイ筋肉、藻食魚ナンヨウブダイ筋肉からシガトキシン(CTX)同族体を抽出・精製した。また、毒の第一次生産者である渦鞭毛藻Gambierdiscus toxicusの異なる地域で採集した3株も抽出に用いた。ウツボ内臓から23画分、ウツボ筋肉から5画分、ナンヨウブダイ筋肉から7画分、3株のG. toxicusから14画分の合計53試料を得た。分析に供した試料の大部分は単一成分ではなく、かつ10 µg以下の微量であった。

まず、絶対配置を含めて構造既知のCTX、CTX4A、CTX3Cを用いて開裂イオンを観測した。Na付加イオンを前駆イオンとしたCTXとCTX4AのMS/MSスペクトルの開裂様式は、硫酸基を有するイエソトキシン等のチャージリモートフラグメンテーションと同様に、化学構造を忠実に反映しており、同族体構造決定のひな形として有用な事が判明した。特にCTXでは、末端ジオールにNaイオンが固定されてチャージサイトとして機能し、良質なスペクトルを与えた。

供試した3株のG. toxicusからは、既知のCTX4AとCTX3Cに加えて、あらたに3成分の存在が認められた。その中の2成分は、CTX4AとCTX3CのM環が開環した成分、M-seco-CTX4AおよびM-seco-CTX3Cと同定した。他の1成分は、M-seco-CTX3Cのメチルアセタールと推定した。A環からL環までの環構成は、すべてCTX4AまたはCTX3Cと同一であった。したがって魚体中で生じる同族体群の基本骨格も、CTX4AまたはCTX3Cと同一と推定された。



図

1 CID MS/MS実験におけるciguatoxin類の特徴的解裂イオンと解裂位置

魚から得られた同族体群は、1成分を除いて、B環からL環までの構造が、CTX4AまたはCTX3Cの環構造を保持している事を示し、代表的な修飾はCTX4AのC1 C4側鎖の酸化、あるいはA環やM環の酸化または開環である事が明かとなった。CTX4Aを前駆体とする同族体の側鎖またはA環の構造と同一の根拠となるフラグメントイオンを図2aに示す。次に、CTX3C同族体でのA環の構造変化と、同一の根拠となるフラグメントイオンを図2bに示す。L-M環が酸化または開環した場合のフラグメントイオンを図4に示した。CTX3C同族体の中の1成分のみは、L環のC47に水酸基が置換していると推定された。根拠となったフラグメントイオンを図2cに示した。

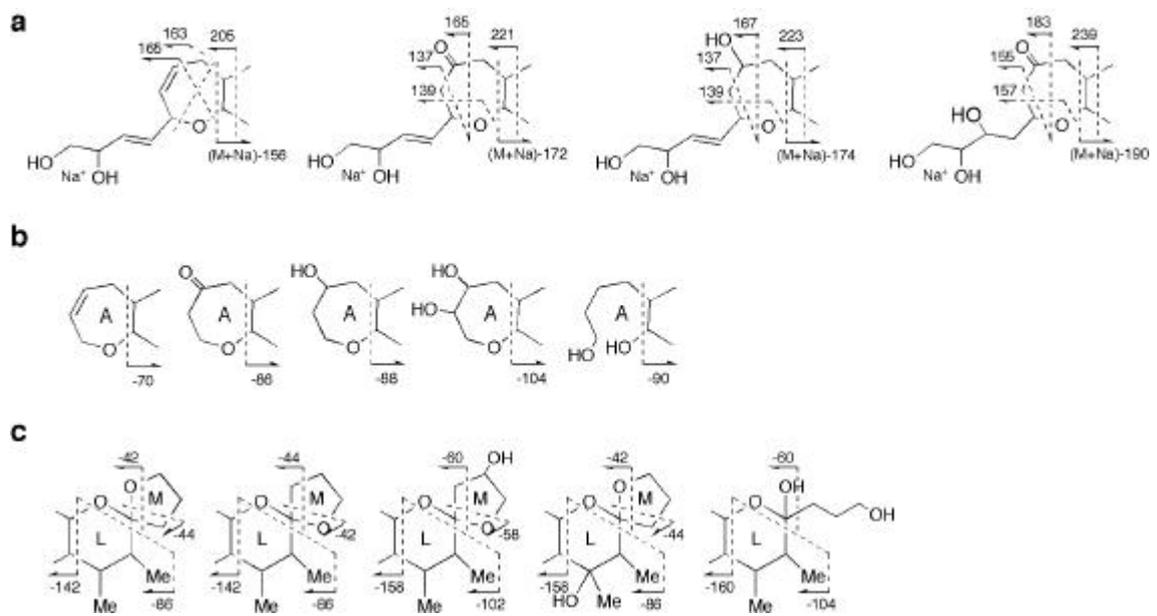


図2 CTX類縁体の末端構造変化と解裂イオン

以上の解析から、タヒチで調整された53画分には、20成分の同族体が存在し、その

中の17成分について推定構造を得た。CTX4A同族体群として、CTX4A、M-secoCTX4A、52-epi-54-deoxyCTX、CTX、52-epi-CTX、54-deoxy-50-hydroxy-CTX、7-oxo-CTX、7-hydroxy-CTX、3-hydroxy-7-oxo-CTXの9成分が同定された。CTX3Cの同族体としては、CTX3C、49-epi-CTX3C、51-hydroxy-CTX3C、3-hydroxy-CTX3C、51-hydroxy-3-oxo-CTX3C、2,3-dihydroxy-CTX3C、2,3,51-hydroxy-CTX3C、A-seco-51-hydroxy-CTX3Cの8成分が同定された。構造の修飾は分子両末端の酸化による水酸基やケトンの生成およびスピロケタール環の開環であった。マウス毒性がVSSCとの相互作用に基づいていると仮定すると、末端への極性基の導入（最大で水酸基4、ケトン1）は、VSSCとの結合あるいは膜透過性を阻害しないか、あるいは従来モデルとは異なる作用機構の存在が示唆された。また、食用魚として重要なバラフエダイやナンヨウブダイの筋肉では、51-epi-54-deoxy-CTX、CTX4A、CTX3Cの比率が高く、検出法を策定する上で重要な知見であった。

【2】赤潮渦鞭毛藻 *Karenia* (=formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi* の生産する細胞毒 *gymnocin* 類の単離・構造決定

赤潮による魚類の大量斃死は国内のみならず世界各地で発生し、沿岸の水産業に壊滅的な打撃を与え問題となっている。魚類の大量死には、化学物質の関与が考えられているが、魚毒成分の化学構造が解明された例は、渦鞭毛藻 *Karenia* (*Gymnodinium*) *brevis* の生産する毒プレベトキシン類とハプト藻 *Prymnesium parvum* の生産するプリムネシン類などごく僅かである。国内の代表的な赤潮形成種である渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* は、瀬戸内海を中心として西日本各地で発生し、大量の魚類斃死を引き起こしているが、研究室培養した藻体では強力な魚毒性を示さず、その魚類斃死機構は、未解明のままであった。我々は、*K. mikimotoi* の魚毒成分探索研究の過程で、*gymnocin* と命名した細胞毒性化合物群を発見し、構造研究を開始した。しかしながら、*gymnocin* 類は溶解性に制限があるため、精製時に使用できるカラム、溶媒が制限され、純粋な試料を得ることが困難であった。また、NMR スペクトルのシグナルが激しく重複している等の理由によりその構造決定は難航した。これらの問題を解決して *gymnocin-A* および *gymnocin-B* の単離・構造決定に成功した。

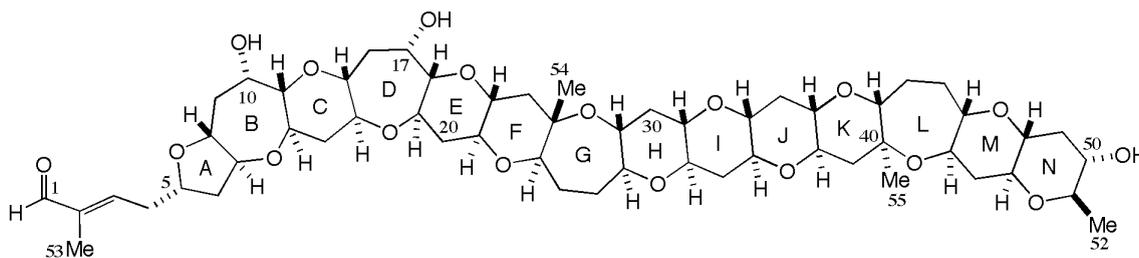


図6 *Gymnocin-A* の構造

渦鞭毛藻 *K. mikimotoi* は 1984 年 7 月に和歌山県串本で分離された単藻培養株を用いた。培養は 3 L 容カブ型フラスコを用いて、T 1 栄養源添加海水培地 2L 中、25 °C で 28 日間行った。定定期に達した藻体は、連続遠心分離により収穫した。収穫した藻体を hexane/acetone(1:9) で脱脂した後、80%PrOH で 3 回抽出した。溶媒留去後、hexane/80% MeOH、CHCl₃/40% MeOH 分配を行った。Gymnocin 類を含む CHCl₃ 相を DEAE セルロース (CHCl₃, MeOH, CHCl₃/AcOH(3:1))、JAIGEL W251 (80% PrOH)、Develosil RPAQUEOUS (29% PrOH) で順次精製を行った。Gymnocin 類は、メタノールやアセトニトリル等の有機溶媒にほとんど溶解せず、クロロホルム、プロパノール等にしか溶解しなかった。そのため、通常の ODS カラムを使用できなかったが、含水プロパノールと RPAQUEOUS カラムを用いたことにより、溶出位置が安定し、精製効率が増した。この方法を用いて、1.5mg の gymnocin-A、3.2mg の gymnocin-B を蓄積し、構造解析を行った。類縁体成分に関しては、現在精製法の改良を行っている。構造決定における第 2 の問題は、分子量の決定であった。Gymnocin-A の ESIMS スペクトルをプロパノール溶媒で測定すると、m/z 1051 と 2082 にピークが観測された。当初、1051 のピークを 2 価イオンピーク、2082 のピークを [M+Na]⁺ ピークと推定し、分子量 2060 の巨大ポリエーテルと考えられた。しかしながら、¹³C-NMR では、55 本のシグナルしか観測されず、分子量が 2000 を越すことに疑問が持たれた。そこで、gymnocin-A をクロロホルムに溶解して FAB MS を測定し直したところ、[M+H]⁺、[M+Na]⁺ のピークがそれぞれ 1029、1051 に観測された。さらに Li⁺付加イオン [M+Li]⁺ が m/z 1035 に観測されたことから、m/z 2082 は 2 分子会合した [2M+Na]⁺ イオンと推定され、gymnocin-A の分子量を 1028 と推定することができた。さらに、高分解能 FAB MS と NMR スペクトルの解析から分子式を C₅₅H₈₀O₁₈ ([M+Na]⁺ 1051.5244, Δ +0.2 mmu) と推定した。Gymnocin-A は、分子内に H-K 環部分の 4 個連続した 6 員環構造と E-I 環と J-N 環部分の 6/6/7/6/6 員環のくり返し構造を有するため、NMR シグナルの重なり合いが激しく解析が困難であった。構造の確定は、FAB CID MS/MS 法を用いて行った。Gymnocin は、チャージリモートフラグメンテーションを生じるに都合の良い極性官能基を持たないため、シガトキシン類と同様にナトリウム付加イオンを前駆イオンに用いた。ナトリウムイオンは、チャージサイトの役割を果たし、はしご状ポリエーテル化合物に特有のチャージリモートフラグメンテーションの結果生じたフラグメントイオンが観察された。特に NMR シグナルの重なり合いが激しいために解析が困難であった H-K 環の開裂に対応するプロダクトイオンが m/z 837、767、711、655、599 に観測され、これらの値が 6 員環の開裂に特徴的な 56 および 70 マスユニット差であったことから 4 個連続した 6 員環構造の確認を行うことができた。ナトリウムイオンは、7 員環上の水酸基と近接するエーテル環の酸素部分に付加したと考えられた。絶対配置は、新 Mosher 法により決定した。

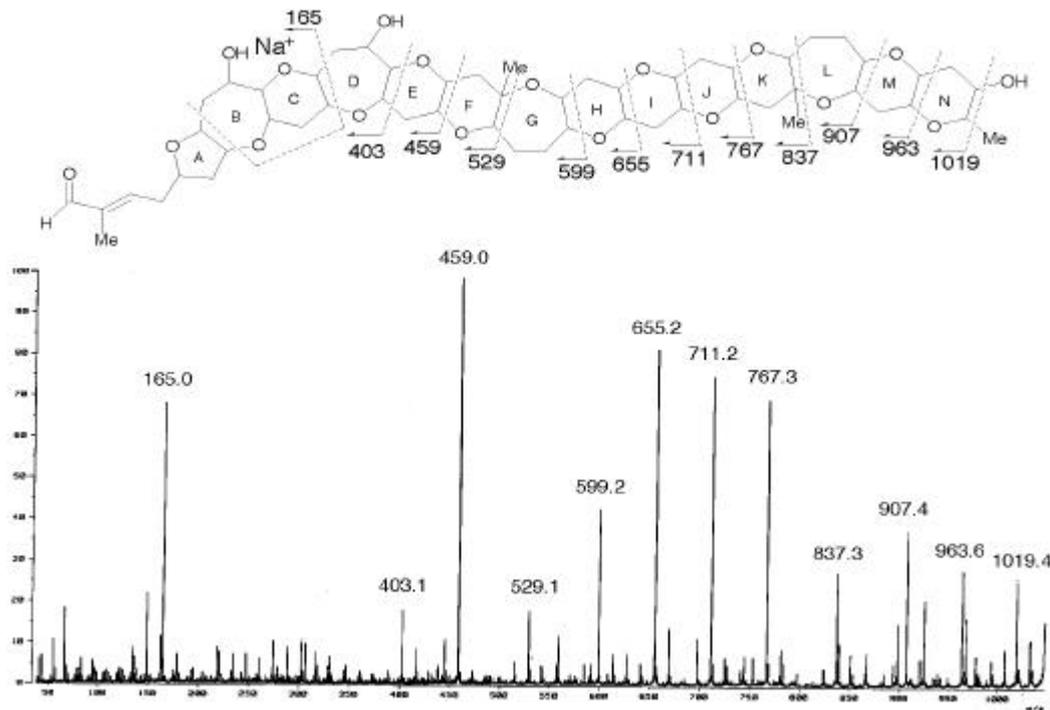


図4 Gymnocin-A の MS/MS スペクトルと解裂位置

Gymnocin-B の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、gymnocin-B が gymnocin-A と同様にはしご状ポリエーテル化合物であることを示唆した。分子末端の共役したアルデヒドや二重結合のシグナルは観測されたが、角間メチルの数やオキシ領域のシグナル形状などは、両者の間で大きく異なっており、gymnocin-B の基本骨格は、gymnocin-A と異なっていることが示唆された。各種 NMR スペクトルの解析の結果、gymnocin-B は、分子末端に 2-methyl-2-butenal 側鎖を有し、5/7/6/6/6/6/7/7/6/7/6/6/6/6/7 員エーテル環が縮環したはしご状ポリエーテル化合物と推定した。分子末端構造は、gymnocin-A と一致したが、エーテル環部分の環構成や連続したエーテル環の数 (15 個) は gymnocin-A と大きく異なっていた。Gymnocin-B の構造を確認するために、MS/MS スペクトルを測定したところ、2 種の関連プロダクトイオン群が観測される興味深い現象が観察された。

Gymnocin-A と gymnocin-B は、マウスリンパ腫細胞 P388 に対して、それぞれ、1.3 $\mu\text{g/ml}$ 、1.5 $\mu\text{g/ml}$ で細胞毒性を発現した。構造未決定の gymnocin 類の中には、1.5 ng/ml の強力な毒性を有する物もあり、gymnocin-A と gymnocin-B は gymnocin 類の中では、弱い活性であった。粗抽出物で行った魚毒性試験では、溶解性を考慮して界面活性剤に懸濁して行った。その結果、gymnocin 換算で、淡水魚赤ひれに対して 2ppm で毒性を示した。しかしながらこの値は、プレバトキシン (PbTx-3) の 250 分の 1 と弱い活性であり、K. mikimotoi による魚類斃死を説明するのに十分な活性ではなかった。Gymnocin の魚毒性の低さは水に対する溶解性と拡散に起因していることが考えられ、今後 K. mikimotoi による魚類斃死とギムノシンとの関係および主成分の構造を

解明したいと考えている。

【3】ニュージーランド産渦鞭毛藻 *Amphidinium carterae* の生産する抗カビ・溶血化合物 amphidinol 類縁体の構造と活性

渦鞭毛藻 *Amphidinium* 属は、多種多様な生理活性物質を生産している。ヒラムシに共生する *Amphidinium* sp. からは、細胞毒性物質 amphidinolide 類、沖縄産の *A. klebsii* からは amphidinol-1 (AM1)、神奈川県三浦半島産の *A. klebsii* からは AM2-AM8 (AM7 と AM8 は構造未決定) が単離されている。ニュージーランドで採取された *Amphidinium carterae* を入手し成分検索を行ったところ、AM2 および AM4 と同時に、5 成分の新規類縁体 AM9-AM13 を単離した。

AM9 の分子式は、高分解能マスペクトルから $C_{70}H_{118}O_{23}$ と推定され AM3 の分子式と一致した。2 次元 NMR スペクトルの解析から AM9 は AM3 の 20, 21 位の水酸基が 18, 22 位に置換した水酸基が位置異性体と推定した。AM10 の分子式は、高分解能マスペクトルから $C_{66}H_{112}O_{23}$ と推定され、AM4 よりメチレン 2 個少ない構造と推定された。2 次元 NMR スペクトルの解析から AM10 は AM4 の 16, 18 位のメチレンが欠落した構造と推定した。AM11 は、分子量 1476、分子式 $C_{71}H_{121}O_{28}Na$ と推定された。2 次元 NMR スペクトルの解析から、AM11 は AM2 の 1 位水酸基に硫酸エステルが置換した構造と推定した。同様に、AM12 ($C_{68}H_{115}O_{26}Na$) と AM13 ($C_{70}H_{117}O_{26}Na$) は、それぞれ AM4 と AM9 の 1 位硫酸エステル体と推定した。渦鞭毛藻 *Amphidinium* も株の遺伝的性質により、生産量、生産物が異なる事が明かとなった。

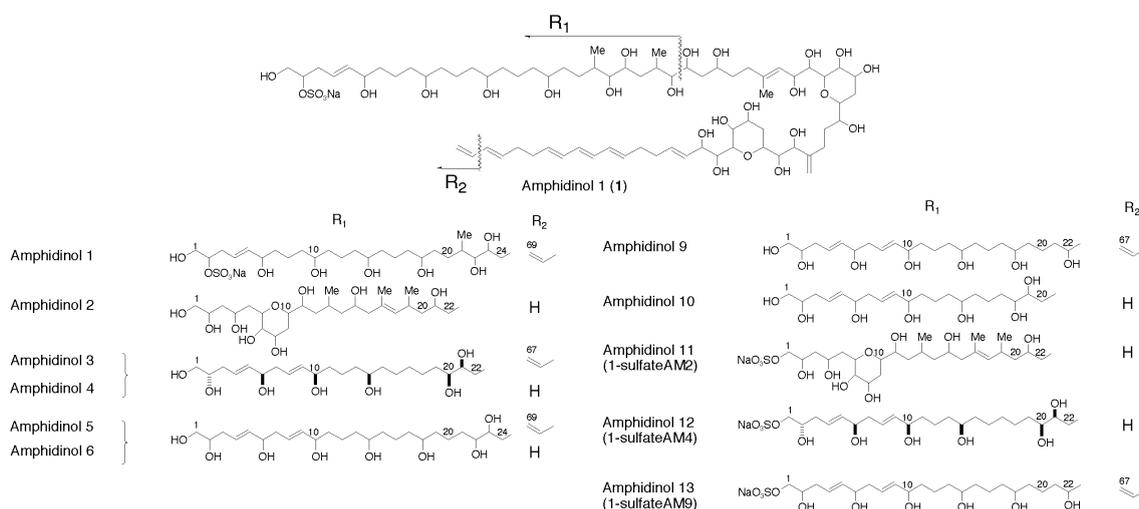


図 5 Amphidinol 類の構造

AM2, AM4 に加えて今回単離した 5 成分の抗カビ、溶血、細胞毒性試験を行い、構造の各種活性に与える影響を調査した (Table)。黒カビ *Aspergillus niger* を用いた抗カビ活性試験では、

AM2, AM4, AM9 は、同程度の活性を示したが、AM11, AM12, AM13 は、活性が3-6 倍以上低下した。溶血活性は、AM2, AM11 が5 倍程度他類縁体より弱い傾向にあった。マウスリンパ腫細胞P388 に対する細胞毒性は、類縁体間で大きな違いが見られなかった。1 位に結合した硫酸エステルは、amphidinol 類の抗カビ活性と溶血活性を低下させた。親水性部分の水酸基の結合位置や疎水性部分の二重結合は、活性にほとんど影響を与えなかったが、炭素鎖の少ないAM10 の溶血活性は低下した。

表 1 Amphidinol 類の生物活性

	Antifungal activity ¹ ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	Hemolytic activity ² (nM)	Cytotoxicity ³ ($\mu\text{u}/\text{ml}$)
AM2	44	1160	15
AM4	58	207	25
AM9	33	176	37
AM10	154	6530	35
AM11	256	28900	23
AM12	>100	2990	27
AM13	132	2020	33

【4】渦鞭毛藻 *Ostreopsis siamensis* の生産する palytoxin 類縁体 ostreosin-D の構造決定

渦鞭毛藻 *Ostreopsis siamensis* は古くから有毒種として知られ、形態や分布域からシガテラへの関与が注目されていた。毒の性状解明は進んでいなかったが、我々は、沖縄県阿嘉島で分離した *O. siamensis* の生産する有毒成分 ostreocin-D の単離に成功し、palytoxin 類縁体であることを明かとした。Palytoxin は、分子内に水酸基、エーテル環、共役二重結合、アミド、アミノ基など多彩な官能基を有し分子量 2700 を越す、世界で最も有名な巨大天然物の一つである。

Ostreocin-D は、分子量が 2736 で palytoxin より 44 マスユニット小さく、メチル基 2 個、水酸基 1 つが水素に置換された構造と推定された。各種 NMR スペクトルの解析からメチル基の置換位置は、3,26 位と推定されたが、水酸基の置換位置は、重なり合いが激しく決定する事が出来なかった。そこで、シグナルの重なり合いを解消するために、オゾン分解により二重結合で解裂したフラグメント調製を試みた。その結果、フラグメント C,D,F,G を得た。フラグメント D,F,G の ¹H-NMR スペクトルは palytoxin 由来のフラグメントと一致し、立体を含めて 50 位以降の構造が同一である事が明かとなり、構造変化は、フラグメント C にあると考えられた。フラグメント C の NMR スペクトルを詳

細に検討した所、19位と44位の水酸基が水素に置換し、新たに42位に水酸基が置換した構造を推定した。

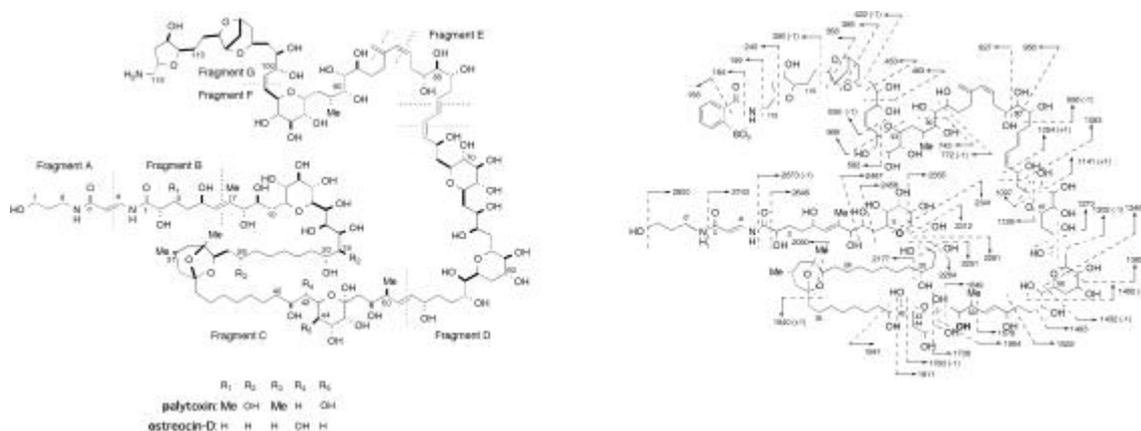


図6 Palytoxin と ostreocin-D の構造とオゾン分解の解裂位置

Ostreocin-D の構造確認は、CID MS/MS スペクトルによって行った。Ostreocin-D には、チャージサイトに適した酸性官能基が存在しないため、末端のアミノ基または水酸基に 2-sulfo benzoate を導入した ostreocin-D 2-sulfo benzamide と N-acetylostreocin-D 2-sulfo benzoate を調製した。両者の MS/MS スペクトルを測定したところ、いずれの化合物においても 2-sulfo benzoate をチャージサイトとしたチャージリモートフラグメンテーションにより生じたプロダクトイオンが観測された。ostreocin-D 2-sulfo benzamide は 2818 を前駆イオンとして測定した。プロダクトイオン m/z 2645 と 2588 は C3 位のメチル基の脱離を示した。プロダクトイオン m/z 2251, 2221, 2207, and 2178 が観測され、それぞれ、30, 14, 30 マスユニット差で観測され、水酸性メチン、メチレン、水酸性メチンの連続した解裂パターンから 19 位の水酸基が水素に置換されたことが示された。プロダクトイオン 1694, 1708, 1738, and 1781 は 43 位から 46 位の解裂により生じ、水酸基とアセタールの位置の証明となった。プロダクトイオン 1781, 1811, and 1824 は 41 位および 42 位水酸基の位での解裂により生じたもので、42 位への水酸基の置換が証明された。以上の事から ostreocin-D の構造を 42-hydroxy-3,26-didemethyl-19,44-dideoxypalytoxin と決定した。

Palytoxin は、初め、腔腸動物イワシナギンチャクより単離され、その後魚類、カニ類、紅藻類等海洋生物に広く分布する事が確認され、高死亡率食中毒クルペオトキシズムやカニ中毒の原因毒としても重要な化合物である。今回食物連鎖下位の渦鞭毛藻から palytoxin 類縁体を単離構造決定したことにより、長い間不明のままであった palytoxin の起源生物に関して、その一部の解明に成功した。

3.3 “ポリオール・ペプチド毒グループ(大場グループ)”

(1) 研究内容及び成果

天然には生理活性を有する化合物がさまざま存在し、これらは生物界の多様な適応様式を生み出す大きな原動力のひとつとなっている。なかでも、毒(トキシン)は、その強い生理活性作用とともに著しい標的分子選択性を持つ点で、古くから多くの研究者に注目されてきた。

毒を産生する生物は、陸・水を問わずあらゆる所に生息している。しかし、ひとたび毒成分に目を移すと、その化学構造はまちまちであり、すなわち毒という形質が生物進化の過程で独立に何度も獲得されてきたということに気付く。

故・中村英士教授は2つの特異な海洋天然毒、すなわちイモ貝毒「 μ -コノトキシン GIIIA」と渦鞭毛藻由来に由来する「ゾーザンテラトキシン」の単離・構造決定を行った。我々の研究グループは、これを受け、その分子作用メカニズムを明らかにするために以下の研究計画を立てた。

- 1 人工的な分子修飾による、標的タンパクとの相互作用様式の解析(μ -コノトキシン GIIIA)
- 2 構造類縁体分子の探索による、生理活性を誘起する構造の特定(ゾーザンテラトキシン)

以下では、このふたつに関する我々のグループの研究成果について報告する。

【1】イモ貝毒 μ -コノトキシン GIIIA の化学修飾と、ナトリウムイオンチャネルへの結合様式の解析

イモ貝(図1)は、その毒矢で獲物となる魚などを瞬間的に麻痺させることで知られる。その毒は極めて強力で、過って刺されたヒトが時に死に至ることがあることもある。

イモ貝の一種 *Conus geographus* の有する毒成分のひとつ μ -コノトキシン GIIIA は、ヒドロキシプロリンを含む22アミノ酸からなる強力なペプチド毒で、分子内に3つのジスルフィド結合をもつ。その標的となる分子は筋肉のナトリウムイオンチャネル($IC_{50} = 0.10 \mu M$)であり、他のナトリウムイオンチャネルには全く効果を示さない。我々は、 μ -コノトキシン GIIIA の選択的なナトリウムイオンチャネルとの結合様式の解明を目的とし、 μ -コノトキシン GIIIA を化学的に修飾した分子プローブを幾つか作成した。

同様の作用を持つ毒分子としてフグ毒テトロドトキシンが有名であるが、化学修飾のしやすさを考えると、ペプチド性の μ -コノトキシン GIIIA は研究対象として重要であろう。我々は、まずこれまでのアミノ酸置換の実験結果から、毒活性に影響の少ないこと分かっている5位スレオニンの修飾を試みた。得られたこの誘導体[Cys⁵]GIIIA は、ナトリウムイオンチャネルへの結合に起因するマウス骨格筋の収縮を阻害し($IC_{50} = 1.9 \mu M$)、修飾による活性の消失は少ないことが分かった。続いて、この導入された5位システインにマレイミドを介して様々な分子タグをカップルさせたところ、タグの化学的性質に応じたナトリウムイオンチャネル阻害活性の変化が観察された(Nakamura *et al.*, 2001a)。この結果は、 μ -コノトキシン GIIIA とナトリウムイオン



図1 イモ貝

チャンネルの複合体形成の様式を反映したものであると考えられる。とりわけ興味深い例としては、5位マレイミドにアビジンなどの巨大分子を結合させるとチャンネル阻害活性は失われるが、スペーサーによって5位システインからアビジンまでの距離を延ばすと活性は失われないことが分かった。すなわちこのことは、これまで μ -コノトキシン GIIIA の作用部位はナトリウムイオンチャンネルポアの入り口付近だと考えられていたが、実際にはポア入り口よりも深い所にある可能性を示唆する。

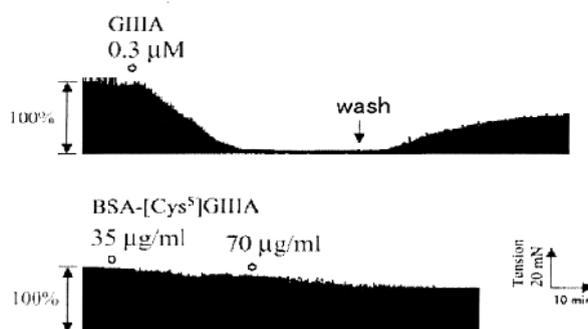
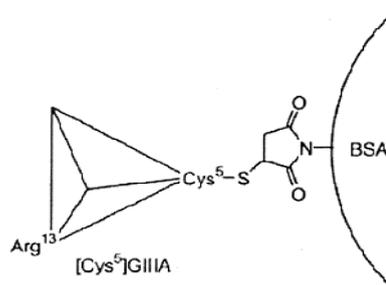
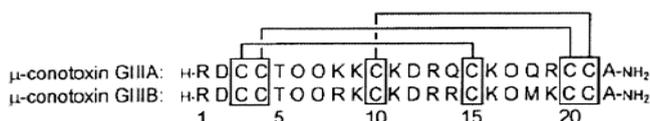


図2 マウス骨格筋収縮阻害
上は天然型コノトキシンGIIIA

この研究過程で作成された“スペーサーなしの μ コノトキシン GIIIA アビジン複合体”は、前述のようにナトリウムイオンチャンネル阻害活性が全くなかった(図2)ことから、 μ -コノトキシン GIIIA の5位に巨大な分子を結合したものは、活性中心部位の立体構造を保持したまま弱毒化された「理想的な抗原」と看做することができると考えた。そこで、我々は5位にBSAを結合させたBSA[Cys⁵]GIIIAを合成し(図3)、ウサギに対し免疫を行ないポリクローナル抗体を得ることに成功した(Nakamura *et al.*, 2002)。果たしてこの得られた抗体は、天然型(活性型) μ -コノトキシン GIIIA を強く認識した。しかし、失活型であるジスルフィド結合の切れた直鎖型 μ -コノトキシン GIIIA や活性中心と考えられる13位のアルギニン(Arg¹³)を別なアミノ酸で置換することで活性を失った誘導体は認識しなかった。一方、5位がアミノ酸置換を受けた活性型誘導体は強く認識した。(ω-コノトキシンやテトロドトシンは毒活性はあるが、全く認識しなかった)つまり、得られた抗体は期待した通り活性型 μ -コノトキシン GIIIA のみを認識したといえる。

生物毒に対する抗体作成は、抗血清や毒の活性機序解明のツールとして重要であるが、その毒性の強さゆえに免疫処理が困難であった。そのため、これまでは毒分子をホルマリンや熱で失活させることで抗原としていたが、この方法では肝心の活性型の毒分子を認識する抗体ができなくなることが多かった。今回の我々の方法は、意図的に活性中心サイトから遠い位置のアミノ酸に大きな分子を結合させ、活性中心構造を保ちながら毒性を落とすことで、活性型の毒分子を認識する抗体作成のための抗原とすることが可能になったものとみなすことができる。



一方、活性中心と考えられる13位のアルギニンについても誘導体の合成による考察を行なった。 μ -コノトキシン GIIIA の活性にはアルギニン側鎖のグアニジル基とチャンネルとの相互作用が重要であると思われた。そこで、ペプチド主鎖からグアニジル基までの距離が少しずつことなる異常アミノ酸をいくつか合成し、ペプチド合成により13位にアルギニンアナログを有する誘導体を作った(図4)。

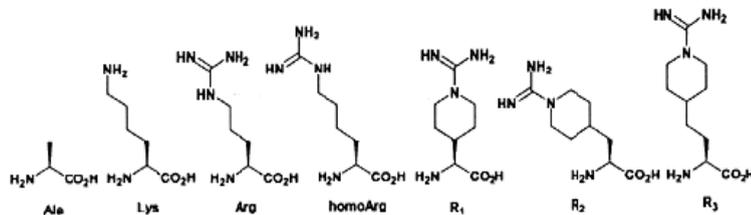
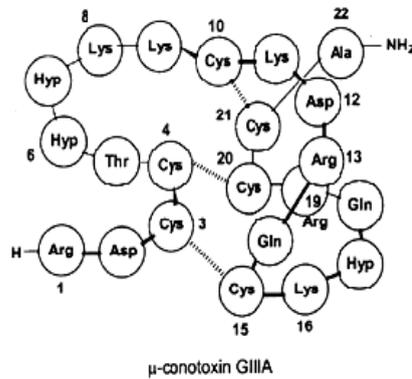


図4 コノトキシンの立体モデルと13位に導入された異常アミノ酸の構造

得られたペプチド群の分子全体の3次元構造が天然型と基本的に変わっていないことは、CDスペクトルのパターンおよび、アミノ酸残基のプロトンに由来するNMRシグナルのケミカルシフト値に大きな変化がないことにより確認している。その結果、グアニジル基の方向性が僅かに異なるだけで活性が著しく損なわれることが分かった。このことは、ナトリウムイオンチャネル阻害活性には13位アミノ酸側鎖のグアニジル基の方向性が非常に重要であることを示唆する(Nakamura *et al.*, 2001b)。

興味深いことに、テトロドトキシンにおいてもグアニジルが活性に重要であると考えられている。μ-コノトキシン GIIIA とテトロドトキシンの活性発現機序に関する類似性に関係があるのかが今後注目されることになる。

【2】渦鞭毛藻 *Symbiodinium* 属からの巨大ポリオール分子の探索

単細胞植物プランクトンの渦鞭毛藻(図5)は、シガトキシンやプレベトキシン、マイトキシンをはじめとする様々なポリエーテル性の毒分子を産生することで知られているが、その他にゾーザンテラトキシンなどのポリオール型の毒分子も産することが明かとなっている。冒頭に述べたように、このゾーザンテラトキシン(図6)は故・中村英士教授により

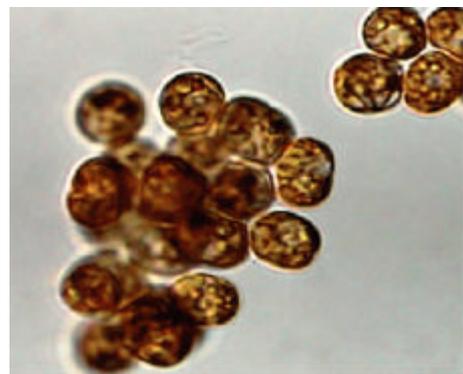


図5 渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp.

Symbiodinium 属の渦鞭毛藻(Strain Y-6)から発見され、構造決定された血管収縮作用を示す巨大分子である。構造中に62員環ラクトンを有し、その特異な構造と活性に興味をもたれた。我々は、こうしたポリエーテル型の巨大な生理活性化合物が同じ渦鞭毛藻類に他にも見つかるのではないかと考え、様々な培養株の *Symbiodinium* 属を探索した所、ゾーザンテラトキシンと分子量が近く構

造的にも類似性が見られる化合物が幾つか見つかった。

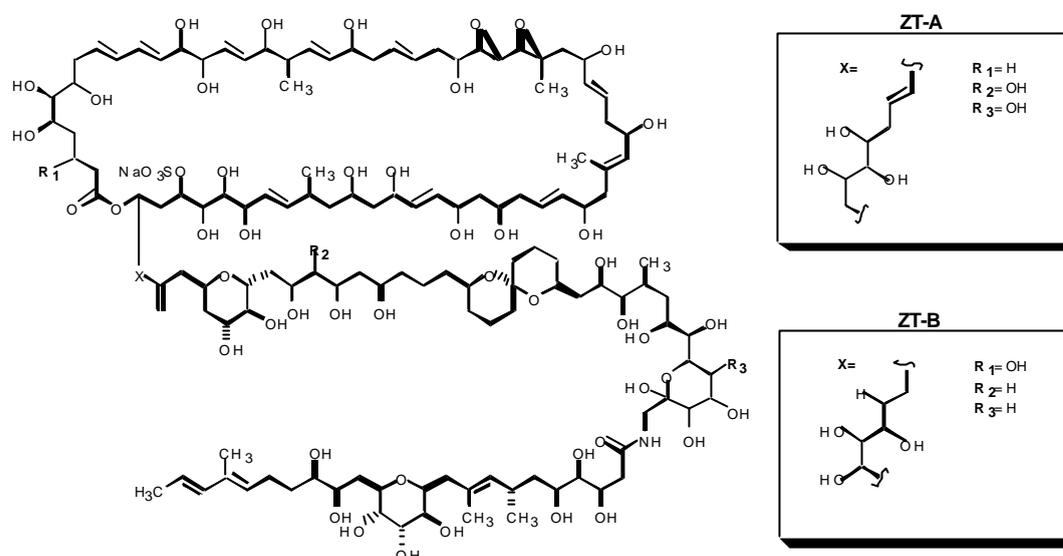


図6 ゾーザンテラトキシンA、Bの構造

これら化合物の構造解析は、その分子の巨大さゆえに困難を極めたが、最初に全平面構造が決定されたのは Strain HA3-5 から単離された分子量 2717 ($C_{128}H_{222}N_2O_{54}S_2$) の zooxanthellamide A (図7) であった (Onodera *et al.*, 2003)。この化合物は2個のアミド基を境に3つのユニットから構成されており、また直鎖状でエポキシドはなく大局的にはゾーザンテラトキシンとは異なる。しかし、スピロ環など部分的には共通する構造も多いため合成的な共通性が示唆される。最近、この zooxanthellamide A に類似した化合物でラクトン環を持ったものが見つかった。これらの化合物のもつ生理活性の強さにはそれぞれ大きな違いがあり、その構造・活性の相関に興味をもたれるところである。現在は、既に単離された類縁化合物の平面構造を決定を進めている。さらに他の培養株から類縁化合物が見つかるかどうかを探索するとともに、構造・活性相関のさらなる検討およびターゲット分子の特定を急いでいる。

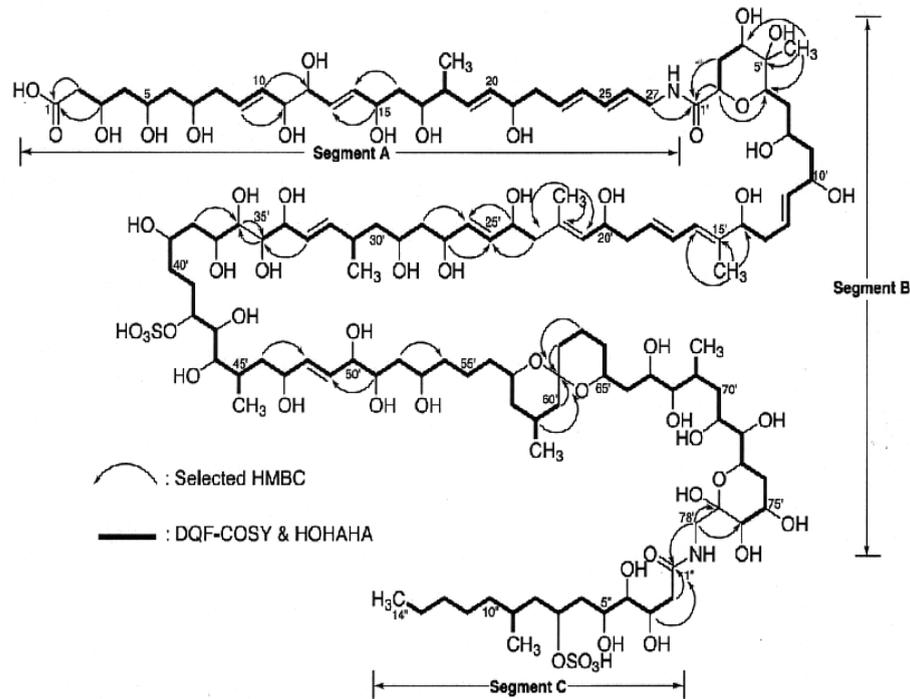
(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究により成功した活性型 μ -コノトキシン GIIIa の抗体作成法は、これまで困難であった他の活性型の毒分子の抗体作成への応用が期待されたため、特許の出願を行なった。また、このような抗体の使用に関する応用可能性として、我々は免疫共沈降による毒のターゲット分子の釣り上げを考えている。毒分子は同定されているが、ターゲット分子が不明なままのものは多い。活性型の毒分子をよく認識する抗体を用いることで、さまざまなターゲット分子を釣り上げることが容易に可能かもしれない。

タイムリーにも、2001年、佐藤主税らによってナトリウムイオンチャネルのX線結晶解析の論文がネイチャー誌に報告され、その特異な構造に注目が集まった。この構造は、これまでの想像とは全く異なる、幾つものポアが入り組んだものであった。我々の開発した μ -コノトキシン GIIIa 誘導体プローブが、その構造の役割を説明する有用なツールとなることを期待している。

最近、渦鞭毛藻から新たな天然有機化合物を探索しようという気運が再び高まりつつあるように思われる。これまでの故・中村英士教授と我々の新規ポリオール化合物群の発見が、そうした流れの先鞭をつけたものと自負している。渦鞭毛藻からの天然有機化合物の探索が有効なのは、その化合物のバリエーションだけではなく、研究室規模での培養が可能であるという点にもある。われわれの用いた *Symbiodinium* 属の渦鞭毛藻は、本来は海産無脊椎動物に共生しているものが多いが、人工的に単離して培

養することが可能である。様々な共生宿主生物（シャコ貝、サンゴ、ヒラムシ、イソギンチャク、ウミウシなど）から沢山の *Symbiodinium* 株が単離・培養されてきている。



現在われわれは、これらの様々な *Symbiodinium* 株の系統解析を遺伝子を用いて調べている。5.8SrRNA の ITS 領域、および 18SrRNA の V1 領域の塩基配列をユニバーサルなプライマーを用いて PCR で増幅し、DNA シークエンサーで読む。このデータ群に基づき分子系統解析を行なうことで、それらの類縁関係が推定できる。われわれは最近、進化的に近縁な株同士は似た化合物を作り、遠縁なものは異なる化合物を作る傾向が見られることを見出した（未発表）。従って、こうした分子系統的な解析により、より効率的に新たな有用化合物を見つける指標になる可能性がある。また、ある有用化合物の類縁化合物を見つけるならば、あらかじめ遺伝子解析により、より近縁な宿主を選ぶことによって、より効率良く発見することができるかもしれない。

3.4 “ 活性評価グループ (中山グループ) ”

天然物毒の中には、動物の神経や筋肉など、いわゆる興奮性膜の電位作動性イオンチャネルを主要な標的分子としているものが多い。これらの毒は、生体膜上においてチャネルタンパク分子と巨大分子量の超分子複合体を形成する。本グループでの研究は、超分子複合体が形成される時の分子相互の認識と作用様式を、その高次構造も含め分子レベルで明らかにすることを目的とした。その達成のため、以下のようにサブテーマを設定して進めた。

(1) 研究内容および成果

I. 光学活性な薬物とそのエナンチオマーのチャネル結合部位：光アフィニティラベル法に

よる比較解析

光学活性な薬物 semotiadil のうち、(S)体は心筋 Na チャネルに結合するが(R)体は L 型 Ca チャネルに結合し、それぞれ抗不整脈薬、降圧薬となりうることが知られているが、このような違いが生じる機構やこれらの薬物がそれぞれのチャネル分子のどこに結合するかを、光アフィニティラベル法を用いて明らかにした。

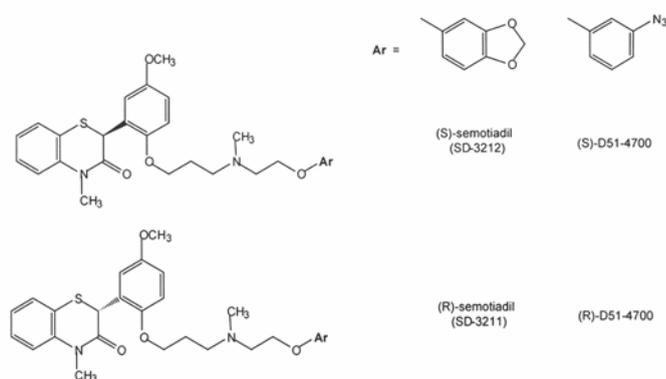


図 1 . (S)- および (R)-semotiadil とそれらの光ラベル用アナログの構造

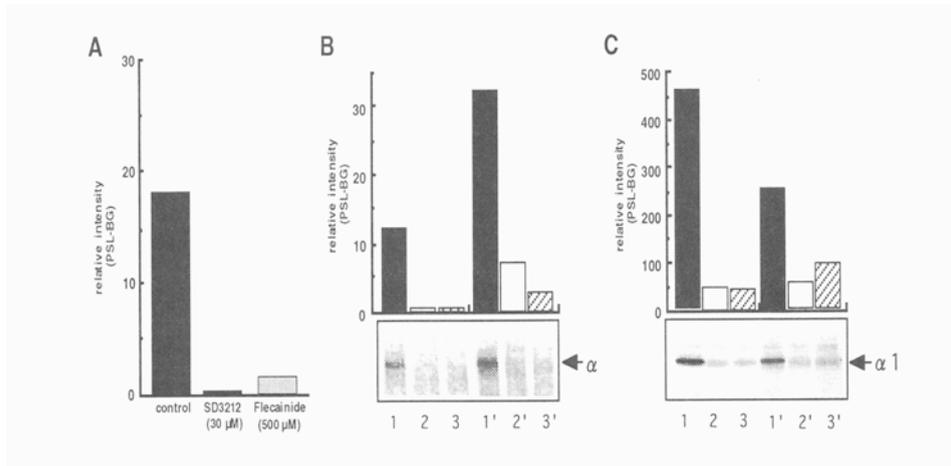


図2. $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ での光ラベルへの各種薬物の効果。(A). (S)- $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ に対する (S)- semotiadil と flecanide の効果。(B). (R)-または (S)- $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ による Na チャネルの光ラベルへの (R)-(lane2, 2')または(S)- semotiadil (3, 3')の添加の影響。(C). (R)-または (S)- $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ による Ca チャネルの光ラベルへの (R)-(lane2, 2')または(S)- semotiadil (3, 3')の添加の影響。

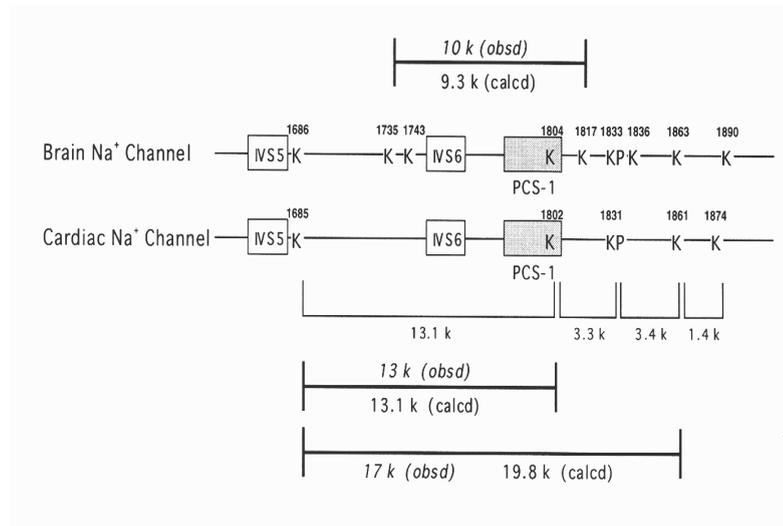


図3. (S)- $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ で光ラベルされた Na チャネル IVS6 フラグメントの同定

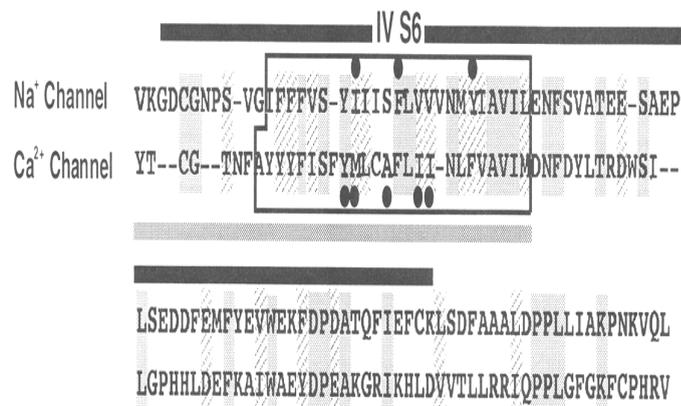


図4. (S)-または(R)- $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ で光ラベルされた部位の Na チャネルまたは Ca チャネルでの比較

その結果、[1] (S)- $[^3\text{H}]\text{-D51-4700}$ による Na チャネルの光ラベルが flecanide でも顕著に

抑制されることから、(*S*)-semotiadil はイオン透過孔の近傍に結合すること(図2)、[2] その部位は一次構造上で IVS6 を含む 13 kDa のフラグメント(脳 Na チャネルでは 10 kDa)にあることを明らかにした(図3)。[3] また、対応する構造部が L 型 Ca チャネルでは (*R*)-semotiadil 結合部位であり(図3)、この部位を構成するアミノ酸残基に起因する環境の違いが、Na チャネルと Ca チャネルにおける薬物の立体構造選択性の実現に寄与するものと考察した⁽¹⁾。

II. 光アフィニティラベル部位の迅速かつ高感度解析法

光アフィニティラベル法は、(1)標的分子の同定や、(2)上述の I のようにその結合部位を一次構造上で確定する化学的手法として普遍的に用いられるようになってきたが、(2)の場合、ラベルされたアミノ酸残基の同定まで至る例は殆んどなかった。この実現をめざし、薬物結合タンパク HSA を(*R*)-[³H]-D51-4700 (FNAK)で光ラベルし、ラベルフラグメントを光ラベルに用いるリガンドを認識する抗体でつりあげ、これを進歩が著しい質量分析計で解析することにより、迅速・高感度解析法を確立した。

この方法により、ラベルタンパク質の消化物を直接質量分析する方法では得られなかったラベルフラグメントが、高い S/N 比で分析できた(図5では $m/z = 2557, 1322$ の2つ)。

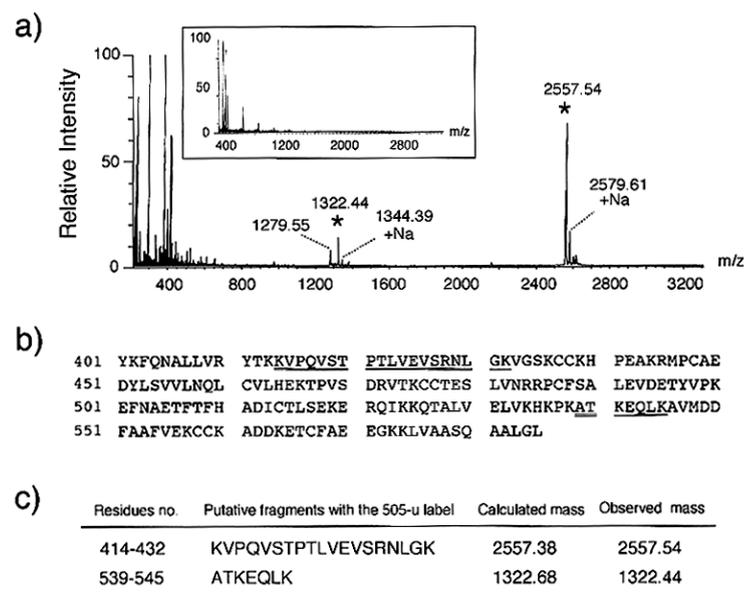


図5. [³H]-FNAK で光ラベルされた HAS フラグメントの MALDI-TOF-MS 分析。

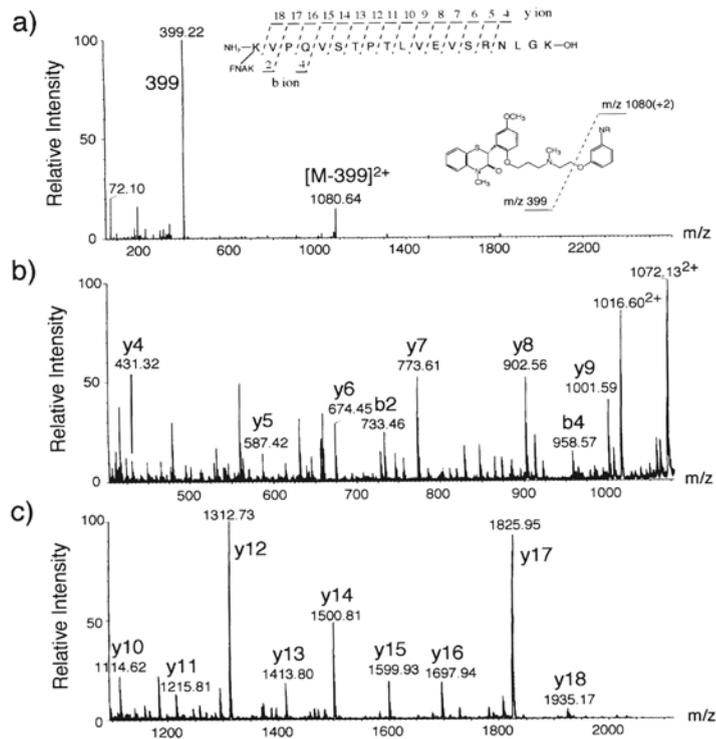


図6. ^3H -FNAK で光ラベルされた HSA のフラグメントの一つ ($m/Z = 2557.54$) の ESI-MS/MS 分析の結果。

また、ESI-MS/MS 分析から、2つのラベルフラグメント中のラベルアミノ酸残基は Lys-414 (図6) および Lys-541 であることが同定できた⁽²⁾。

この結果と X 線結晶解析されている HSA の立体構造を組み合わせた「ドッキングモデル」

で、FNAK の結合部位は「サイト2」とよばれる薬物結合部位内にあることを示している。また、FNAK は中鎖脂肪酸・ミリスチン酸の結合とアロステリック相互作用を示す我々の観測もこの結合モデルとよく対応していた⁽²⁾。<本研究は“計算化学グループ”のサントリー生有研・石黒正路博士、益田勝吉博士との共同によるものである。>

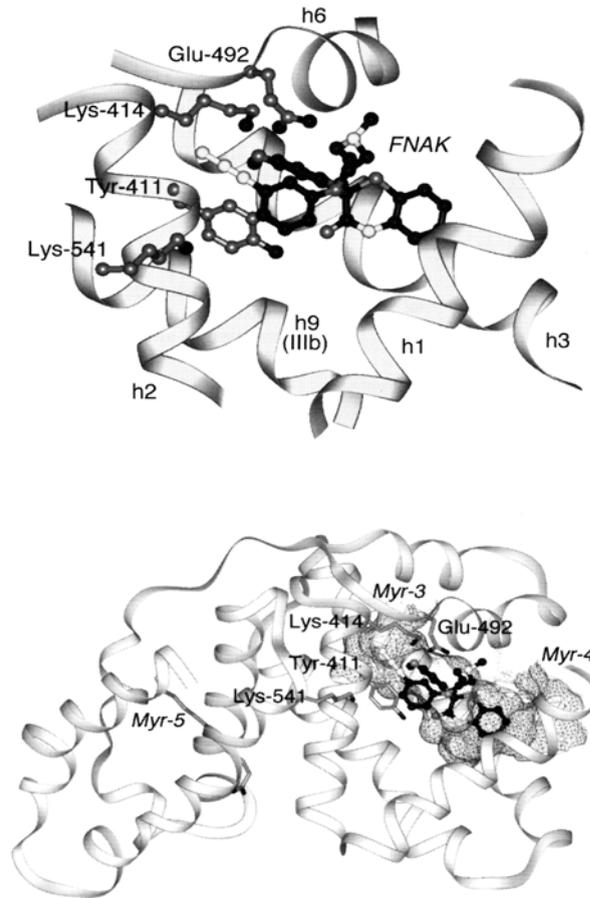


図7. 光ラベルで同定された $[^3\text{H}]$ -FNAKの結合部位と、HSA 3次元構造(結晶解析による)とのドッキングモデル(上図)、さらに、3箇所のミリスチン酸結合部位(Myr-3, 4, 5)との相互関係も示した(下図)。

III. Ca^{2+} チャネルの立体構造の解析

L型Caチャネルの三次元立体構造を明らかにすべく、段階的に進めた。まず、高純度に精製した5種のサブユニット($\alpha 1, \alpha 2, \beta, \gamma, \delta$)から成るL型Caチャネル複合体および2種のサブユニット($\alpha 1, \beta$)だけから成る複合体を用いて、超低温電子顕微鏡を用いた単分子(single particle)構造解析を行い、各サブユニットの相対的空間配置が図9の模式図で示される結果を得た⁽³⁾。これはCaチャネルの三次元立体構造を実測した世界で初めての例である。<産総研・生物情報解析研究センターの村田和義博士との共同研究>

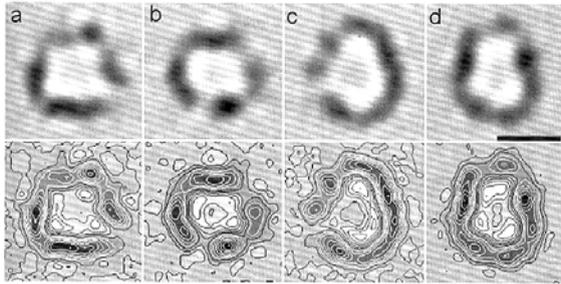


図 8. L 型 Ca チャネル α_1 - β 複合体単分子の negative stain 電子顕微鏡像。

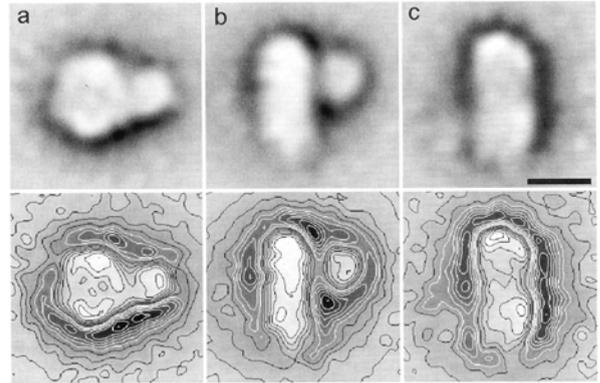


図 9. 全サブユニットを含む L 型 Ca チャネル単分子の negative stain 電子顕微鏡像。

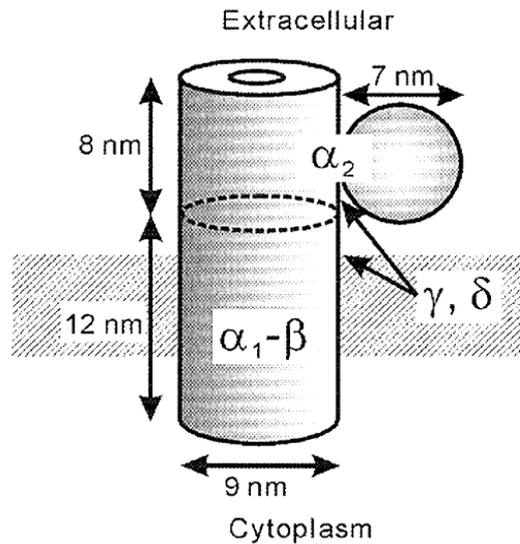


図 10. 単分子構造解析から得られた L 型 Ca チャネル立体構造の模式図。

IV. 心筋 ATP 感受性 K^+ チャネルの分子構成

ATP 感受性 K チャネル (K_{ATP}) は、細胞内の ATP 濃度を感知してチャネルの開閉を制御する内向き整流性の K チャネルで、イオンポア部分 (K_{ir}) とスルホニルウレア結合部 (SUR) の 2 つのサブユニットから成ることは知られていたが、 K_{ir} , SUR はそれぞれ数種の亜種があり、(1)心筋で機能する K_{ATP} がどの亜種サブユニットから成るのか、(2)またそれは心筋のミトコンドリアあるいは形質膜のいずれに局在して機能しているかが不明であった。我々は K_{ir} , SUR の各亜種を区別できる特異的なペプチド抗体を作製して調べた結果、(1)心筋で機能する K_{ATP} は、 $K_{ir6.2}$ と $SUR2A$ がそれぞれ 4 個から成ると考えられるヘテロ 8 量体で、(2)それは従来いわれてきたミトコンドリアではなく、形質膜に局在することを証明した⁽⁴⁾。この結果は、各サブユニット遺伝子をノックアウトした清野らの実験結果とよく対応した。

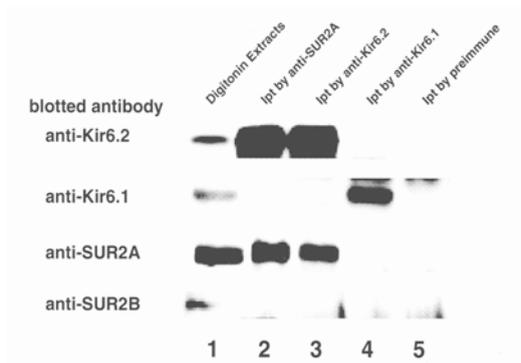


図 10. 作製したペプチド抗体は Kir, SUR それぞれの亜種に特異的に反応する。

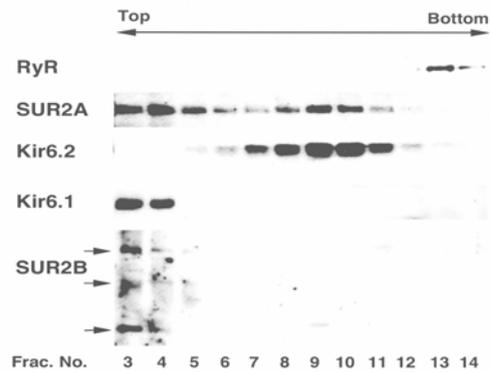


図 11. 心筋から可溶化精製した KATP 標品のシヨ糖密度勾配遠心。SUR2A と Kir6.2 が複合体を形成する。

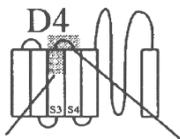
V. 脳虚血疾患における神経細胞保護薬創製を志向した神経型 Na⁺チャネルの特異的阻害剤の開発

紺野らによってカリウドバチから単離された新規 Na チャネル毒β-PMTX は、チャネルを開いたままにしておくことで神経毒作用を示す。しかし神経特異的に作用する点は、本研究目的の一つの条件を充たしている。もう一つの条件は、Na チャネルの開口を阻害することであり、この2つの要件を満たす誘導体を作成するのが目的である。まず、β-PMTX の結合部位を同定することで、神経特異的作用の分子基盤を明らかにした。

表 1. 脳型と心筋型 Na チャネルのドメイン交換キメラ体とその活性

Wild-Type/Chimera	Amino Acid Sequence	Modification Ratio Mean ± S.D. (Number of Observations)
wild type rBII		0.26 ± 0.03 (n = 5)
wild type rH1		0 (n = 4)
BHHH		0 (n = 3)
HBBB		0.43 ± 0.06 (n = 4)
HHHB		0.82 ± 0.06 (n = 4)
BBBH		0 (n = 3)
rH1 chimera 1		0.73 ± 0.11 (n = 4)
rH1 chimera 2		0 (n = 3)
rH1 chimera 3		0 (n = 4)

表 11. 作製した 脳型と心筋型 Na チャネルの点変異体とその活性

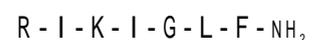
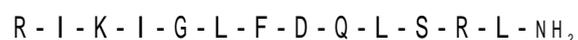
Wild-Type/Chimera	Amino Acid Sequence	Modification Ratio Mean ± S.D. (Number of Observations)
		
wild type rBII	1609-1625 MF LAELI EK YFVSP TLF	0.26 ± 0.03 (n = 5)
rBII chimera 1	TV-SDI-Q- - - F- - - - -	0 (n = 6)
rBII-E1616Q	- - - - - Q- - - - - - - -	0 (n = 6)
rBII-E1616K	- - - - - K- - - - - - - -	0 (n = 4)
rBII-V1620F	- - - - - - - - - - F- - - - -	0.24 ± 0.10 (n = 3)
rBII-E1613R	- - - - - R- - - - - - - -	0.15 ± 0.03 (n = 3)
rBII-E1613D	- - - - - D- - - - - - - -	0.27 ± 0.04 (n = 3)
wild type rH1	1608-1624 TVLS DII QKYFFSP TLF	0 (n = 4)
rH1 chimera 1	MF-AEI-E- - - V- - - - -	0.73 ± 0.11 (n = 4)
rH1 chimera 4	MF-AEL- - - - - - - - -	0 (n = 3)
rH1 chimera 5	- - - - - E- - - V- - - - -	0.75 ± 0.14 (n = 4)
rH1-Q1615E	- - - - - E- - - - - - - -	0.32 ± 0.04 (n = 4)
rH1-F1619V	- - - - - - - - - - V- - - - -	0.22 ± 0.07 (n = 4)
rH1-D1612N&F1619V	- - - - - N- - - - - V- - - - -	0 (n = 4)
rH1 chimera 5&D1612N	- - - - - N- - - - - E- - - V- - - - -	0.67 ± 0.11 (n = 3)

解析法は分子生物学的手法によるもので、PMTX 感受性の脳型 Na チャンネル (rBII) と非感受性の心筋型 Na チャンネル (rH1) を軸に、両チャンネルの 4 つのドメインを相互に入れ替えたキメラチャンネルで候補部位を絞っていき (表 1) 最終的には点変異法によってドメイン IV の S3-S4 リンカー部にある Glu-1616 が脳型 Na チャンネルの PMTX 結合に不可欠な役割を果たしており、心筋型チャンネルでは Gln に置換されていることが明らかになった。 < 広島大・医・瀬山一正教授グループとの共同研究 > ⁽⁵⁾。

これをふまえ、β-PMTX のアナログを合成し、Na チャンネル阻害活性をもつものを探した。

全てのアミノ酸残基を D 体に置き換えたアナログも含めいくつかの誘導体を検討した中に、

β-PMTX の N 末端から 7 番目のアミノ酸から成るペプチド P7 が Na チャンネル阻害活性をもつことを見出した。その阻害活性は IC₅₀=500 μM で十分に高くはないが、P7 は心筋型 Na チャンネルには全く作用せず、脳型チャンネルを選択的に阻害する点で目的要件を満たしている (図 13)。 また、β-PMTX と混合して効果を調べた実験では、β-PMTX のチャンネル不活性化延長効果と P7 のチャンネル電流阻害効果の両方が観察されたことから (図 13 左)、その結合部位はβ-PMTX のそれとは違っていることがわかり⁽⁶⁾、興味深い。これをツールにして、脳型チャンネル選択性を実現する新たな機能部位が探索できよう。



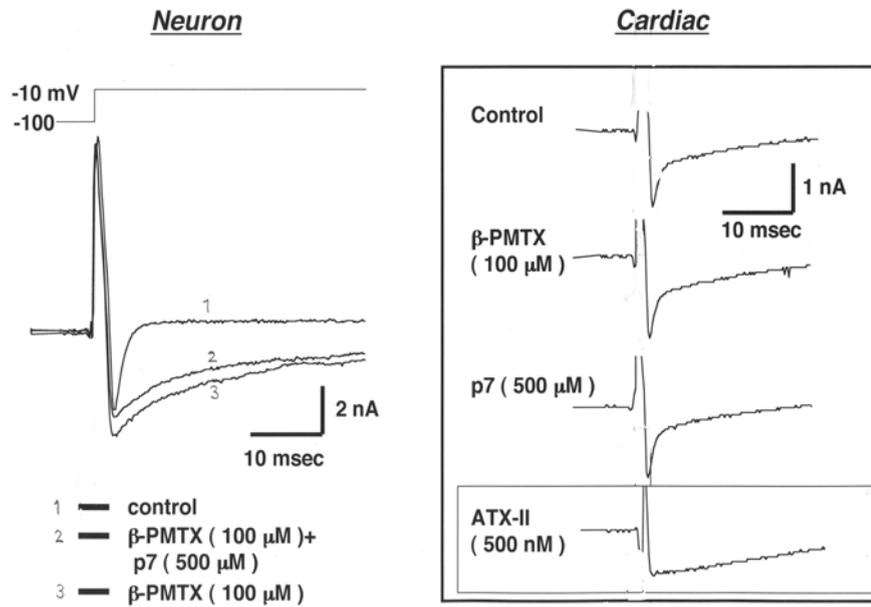


図 13. β -PMTX のペプチドアナログ p7 は、 β -PMTX とは異なる部位に結合して脳型 Na チャンネルを阻害する。心筋型 Na チャンネルには作用しない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1 . 光アフィニティラベル部位の迅速かつ高感度解析法

光アフィニティラベル法は、(1)標的分子の同定や、(2)研究 I のようにその結合部位を一次構造上で確定する化学的手法として普遍的に用いられるようになってきたが、(2)の場合、ラベルされたアミノ酸残基の同定まで至る例は殆んどなかった。本研究により、ラベル部位をアミノ酸残基レベルで同定する迅速・高感度解析法が確立した。

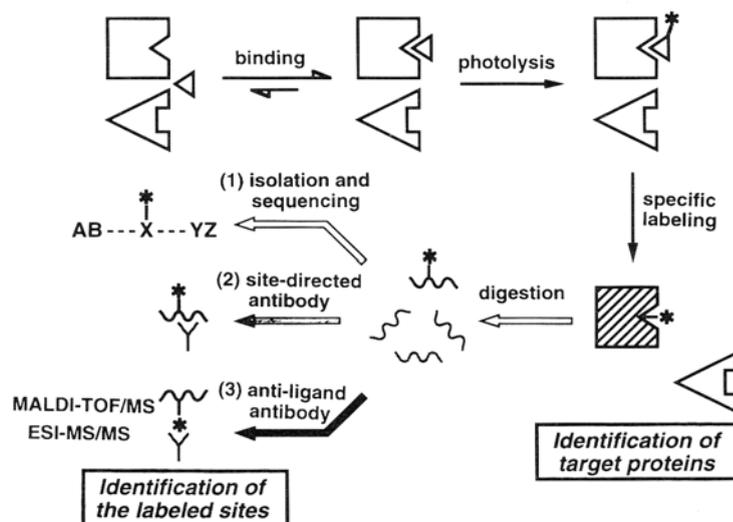


図 14. 光アフィニティラベルとラベル部位の同定。左下(3) が本研究で確立した迅速・高感度解析法。

生体内標的分子と特異的に結合する内在性リガンドや薬物は多数あり、その結合部位の解析は新たな疾患治療薬を開発する上でも不可欠である。特に現行の薬物の7割が光学活性体であることを考えると、本研究 I で示した光学活性薬物の結合部位解析の実績は意義深い。

本手法の活用によって、リガンドと標的分子の相互作用点が pinpoint で解析され、それを基盤にした新薬の開発研究が進むものと期待される。

2. Ca^{2+} チャネルの立体構造の解析

これは Ca チャネルの三次元立体構造を実測した世界で初めての例である。我々の発表後、欧米の3つの研究室から同じ Ca チャネルの単分子解析が報告されたが、基本的に我々の結果と同等であった。我々はさらに、これら複合体のより高い分解能での解析も現在、産総研・生物情報解析研究センターの村田和義博士との共同で鋭意進めている。

同精製標品を用いた結晶化もいくつかの条件で試みたが、結晶化条件では不安定で、未だ成功していない。一種類のサブユニットから成る K チャネルに比べ、特段の工夫が必要であることを示唆しているのかもしれない。

2001年、産総研・佐藤らのグループによって電気ウナギ発電器官 Na チャネルの single particle の解析結果が報告されたが、数種のサブユニットから成る L 型 Ca チャネル複合体の我々の解析結果は、これと相俟って、膜タンパク質の立体構造解析実現にさらに一歩近づけた意義は大きい。これらの成果は、今後の研究を活性化することにつながるものであり、実際、毒物や薬物との複合体解析をめざす研究が、我々も含めた日本のグループによって遂行されようとしている。

3. 脳虚血疾患における神経細胞保護薬創製を志向した神経型 Na^+ チャネルの特異的阻害剤の開発

新規 Na チャネル毒 PMTX (神経特異的) の結合部位を同定した知見を活かし、その

アナログで脳型 Na チャネルの特異的ブロッカーを作り上げれば、脳卒中などの急性神経疾患で起こる神経細胞死保護薬の創製に貢献できる。現行の薬には、このような効果をもった良いものがないことも、その開発が望まれている要因でもある。

実際にこのような作用をもつ PMTX のペプチドアナログとして P7 が作出できた。P7 はその阻害活性の強さから、プロトタイプに位置づけられるものであるが、*in vivo* の実験系でも脳-血管関門を通過できること、また脳型 Na チャネルの特異的ブロッカーであることが示されており、有望である。最近、より強い阻害活性を示すいくつかの P7 アナログを作ることができたのでより一層の展開を図る。

引用業績

- (1) H. Yoshikawa et al., *Heterocycles*, **59**, 613-622 (2003).
- (2) K. Kawahara et al., *Biochem. J.*, **363**, 223-232 (2002).
- (3) K. Murata et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 284-291 (2001).
- (4) A. Kuniyasu et al., *FEBS Lett.*, **552**, 259-263 (2003).
- (5) E. Kinoshita et al., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 1457-1463 (2001).
- (6) S. Yokote et al., in preparation.

3.5 “ 計算化学グループ (石黒グループ) ”

(1) 研究内容及び成果

A . NMRと分子動力学計算による構造解析によるminiANPの立体構造

miniANP (MCHFGGRMDRISCYR-NH₂) は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の約半分の大きさで、ANP と同等の活性を有する合成ペプチドである。その配列は、アラニンスキャンとファージディスプレイによって最適化されている。1 回膜貫通型レセプター (NPR-A) と結合するとセカンドメッセンジャーのcGMPを産生し、Na利尿作用、血管拡張作用、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の抑制作用などの生理作用を引き起こす。

miniANP は、そのサイズの小ささから構造と活性に強い相関があると考えられる。これまでに、疎水性残基の Phe⁴、Met⁸、Ile¹¹ が活性に重要であることが明らかにされているが、それ以上の構造と活性の相関は得られていない。そこで、本研究では NMR と分子動力学計算による構造解析に基づいてアナログペプチドをデザインし、その構造と活性から miniANP のレセプター結合型構造の検討を行った。

レセプターの結合部位の環境が明らかでないため、水中と DMSO 中において構造解析を行った (図1)。水中と DMSO 中の両者に、Gly⁶-Arg⁷-Met⁸-Asp⁹ のターン様構造 (濃い線の部分) が見られる。溶媒効果の異なる 2 つの溶液において共通な構造であるため、我々はこの構造はレセプター結合型構造でも保持されているものと仮定した。一方で、Phe⁴ と Ile¹¹ の配置は、水中と DMSO 中で大きく異なる。水中では離れているのに対して、DMSO 中では近い配置となっている。Phe⁴ と Ile¹¹ が活性に重要であることと、これまでに発表されている ANP 関連ペプチドの溶液構造において、Phe⁴ と Ile¹¹ の対応する残基が近い位置にあることから、我々は Phe⁴-Ile¹¹ の近接配置も活性に関連すると仮定した。

次いで、真空中高温での分子動力学計算により、miniANP の構造探索を行い、特に、溶液構造の特徴に基づく拘束条件をかけることによって、Gly⁵ と Gly⁶ の二面角 ϕ の分布を調べた。用いた拘束条件は、(1) Gly⁶-Arg⁷-Met⁸-Asp⁹ のターン構造と、(2) Phe⁴-Ile¹¹ の近接配置である。拘束条件がない場合、拘束条件(1)の場合、拘束条件(1)+(2)の場合のそれぞれについて 100 個ずつ構造を発生させた。図 2 は横軸が二面角 ϕ の値で、縦軸が構

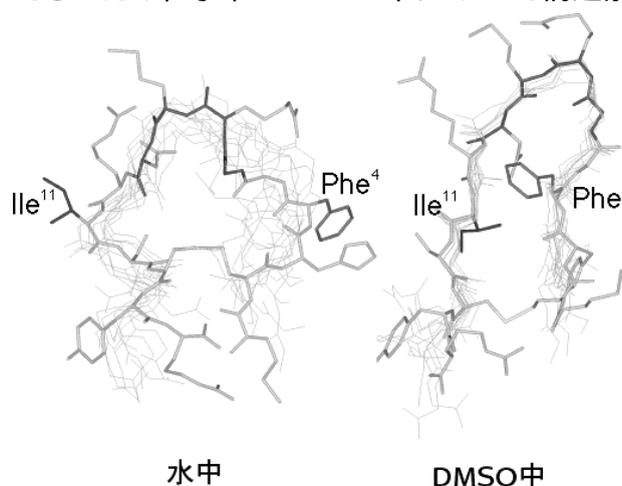


図 1 miniANP の溶液構造

造の数を表す。Gly⁵ において、拘束が無い場合は、二面角φが正である構造の数と負である構造の数は、ほぼ同数存在するのに対して、拘束条件(1)では負に偏る。一方、拘束条件(1)+(2)の場合は、正に偏ることが分かった。Gly⁶ の場合も同様の傾向が見られる。ゆ

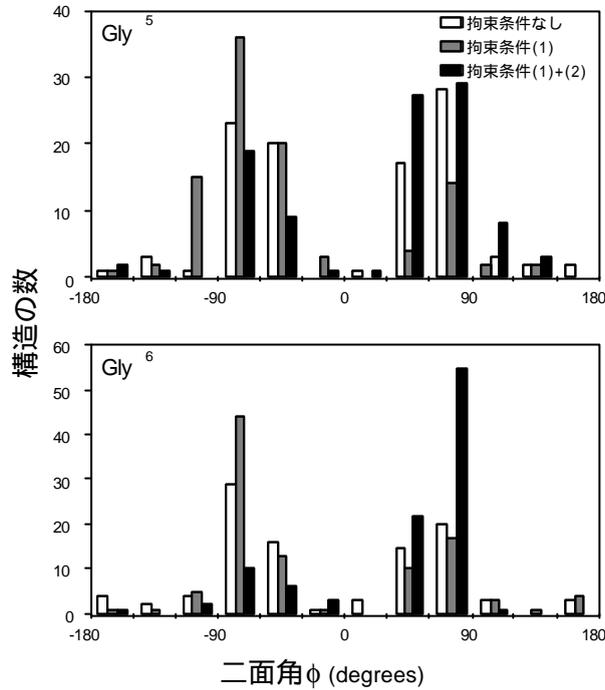


図2 グリシンの二面角φの分布

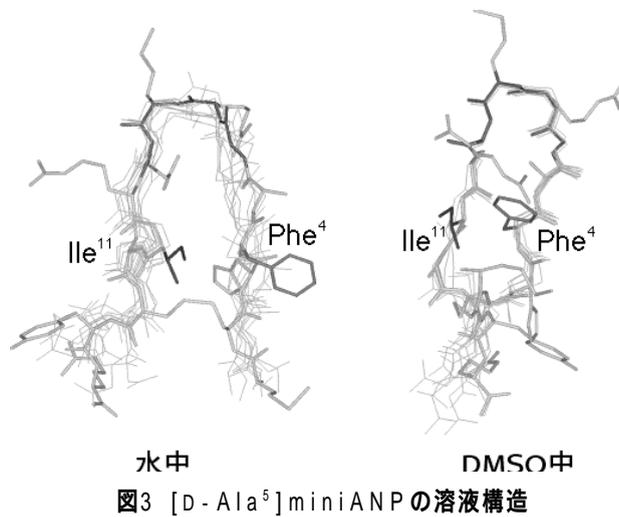


図3 [D-Ala⁵]miniANPの溶液構造

配置が見られる(図3左)。Phe⁴-Ile¹¹の近接配置は水中の miniANP では見られなかった特徴である。[D-Ala⁵]miniANP は、DMSO 中でも同様な構造である(図3右)。一方、[D-Ala⁶]miniANP では、ターン様構造も Phe⁴-Ile¹¹ の近接配置も見られなかった。また、[D-Ala⁵,D-Ala⁶]miniANP では、Phe⁴と Ile¹¹ は近いが、ターン様構造は1残基ずれた構造であった。したがって、D-Ala⁵ は Phe⁴と Ile¹¹ を近づけるはたらきをし、これがレセプター結合型構造により近いために活性が上昇したものと結論づけられる。一方、D-Ala⁶ は、活性

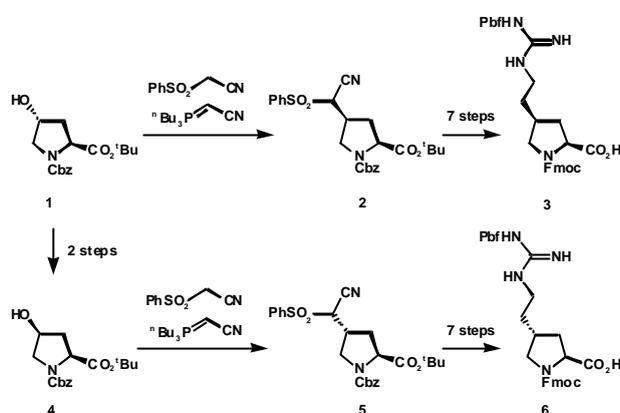
えに、Gly⁶-Arg⁷-Met⁸-Asp⁹のターン構造と Phe⁴-Ile¹¹の近接配置が miniANP のレセプター結合型構造と仮定すると、Gly⁵, Gly⁶の二面角φが正であることもレセプター結合型構造の特徴であると予想される。通常、二面角φはグリシンを除く天然のアミノ酸では負の値で、正であるのは D-アミノ酸に典型的な特徴である。このことから miniANP の Gly⁵, Gly⁶ はファージディスプレイにおいて D-アミノ酸の代わりに選択されたと推測される。

上述の仮定を証明するために、[D-Ala⁵]miniANP, [D-Ala⁶]miniANP, [D-Ala⁵,D-Ala⁶]miniANP を作成した。NPR-A を発現した CHO 細胞における cGMP の産生活性を測定した結果、miniANP (EC₅₀=458±11pmol) に対する相対活性 (EC₅₀_{analog}/ EC₅₀_{miniANP}) は上記の順で 0.38, 8.2, 2.9 となった。これから D-Ala⁵ は活性を強めるが、D-Ala⁶ は活性を弱めることが分かった。

構造と活性の相関をより詳細にするために、アナログペプチドの構造解析を行った。水中の[D-Ala⁵]miniANP では、ターン様構造と Phe⁴-Ile¹¹の近接

に重要なターンを壊すために、活性が低下したと考えられる。Gly⁶はファージディスプレイにより最適な残基として選択されているので、D-Ala⁶置換体の結果を併せると、Glyの小さなサイズがレセプターとの結合に必要であると示唆される。

ペプチドに導入するための4-(2'-グアニジルエチル)プロリン修飾体(3, 6)の合成は、Scheme 1に示すように、4-ヒドロキシプロリン(1, 4)に改良光延反応[4]を施すことにより行った。固相合成法により化合物(3, 6)から、それぞれ [(2S,4S)-4-(2'-guanidyl)Pro⁷]miniANP(7)と [(2S,4R)-4-(2'-guanidyl)Pro⁷]miniANP(8)を作成した。



Scheme 1

NPR-Aを発現したCHO細胞におけるcGMPの産生活性をTable 1に示す。アナログペプチド(7, 8)は、miniANPとほぼ同等の活性を示した。

Table 1 miniANPとアナログペプチドの生理活性

Peptide	生理活性	相対活性
	EC50 (nM)	EC50 _{analog} /EC50 _{miniANP}
miniANP	5.11 ± 0.29	1
7	10.80 ± 1.13	2.1
8	17.04 ± 9.09	3.3

ペプチド(7, 8)は、プロリンの5員環に対して、2'-グアニジルエチル基の出る方向が異なるにも関わらず、ほぼ同等の活性を示した。そこで、構造解析により、2'-グアニジルエチル基の方向と活性の相関を明らかにすることとした。まずはNMRにより水中の構造解析を行った。miniANPと同様に、柔軟性のために2つのアナログペプチドの全体構造は決定できなかった。しかし、Gly⁶-Asp⁹においてよりはっきりとしたターン構造が観測された。この結果より、プロリンにより狙った位置にターン構造が固定化されていることが確認された。ターン構造以外は柔軟であるため、2つのペプチドの構造は、2'-グアニジルエチル基の方向だけが異なると考えられる。そこで、InsightII(Accelrys, San Diego, CA)のSearch Compare モジュールを用いて、2つの修飾プロリンの2'-グアニジルエチル基のコンフォメーション解析を行った。Search Compareでは、あるボンドを指定した角度刻みに回転させ、立体障害のないものだけを選択することができる。これらをエネルギー最小化することによって、安定に存在する全てのコンフォメーションをサンプリングすることができ

る。モデルとして Gly-Pro-Met-Asp のターン構造を用いた。プロリンの4位にメチル基だけを付加したものをを用いて、まずはプロリンの5員環のコンフォメーション解析を行った。得られた構造にそれぞれ、2'-グアニジルメチル基を付加することによって、目的のペプチド(7,8)のターン構造を作成した。2'-グアニジリエチル基の2つのメチレンと結合している3つのボンドを10°刻みに360°回転させた。ターン構造を形成する水素結合CO(Gly)-NH(Asp)を固定し、エネルギー最小化を行い、エネルギーとRMSDから等価と判断されるコンフォメーションを除くと、ペプチド(7)で34個、ペプチド(8)で45個のコンフォメーションが得られた。同様な解析を、miniANPのターン構造(Gly-Arg-Met-Asp)のアルギニンに対して行い、150個の構造を得た。これより、レセプターと相互作用するグアニジル基の位置は、ターン構造から比較的にまっすぐ伸びた狭い領域であることが分かった。

本研究では、NMRと分子動力学計算を組み合わせた構造解析に基づいてアナログペプチドをデザインし、その構造と活性を比較することによって、レセプター結合型構造の特徴を明らかにすることができた。特に、Phe⁴-Ile¹¹の近接配置、Gly⁶-Arg⁷-Met⁸-Asp⁹のターン様構造、Gly⁵の二面角φが正の値であることが明らかになった。さらに、miniANPのArg⁷を4-(2'-グアニジリエチル)プロリンで置換することによって、活性に重要なグアニジル基を失うことなく、ターン構造を固定化することができた。また、その空間分布を調べることによって、レセプター結合型構造におけるグアニジル基の方向を決定した。4-(2'-グアニジリエチル)プロリン以外の他の修飾プロリンも比較的容易に合成することができる。したがって、本研究の手法は、ターン構造における一般的な構造解析法として用いることができる。NPR-Aの細胞外領域の結晶構造が決定されたことから、これらの構造と照らし合わせることによって、レセプターとの相互作用の詳細を明らかにできると期待している。

B. パリトキシン NMR スペクトルの完全帰属

パリトキシンはきわめて毒性の高い海産天然有機化合物であり、ウサギに対するLD₅₀は25ng/kgに達する。また、パリトキシンは様々な筋肉の収縮と細胞膜の脱分極を引き起こす。最近ではNa/K-pumpに結合してATPaseとしての活性を妨害することが明らかとなった。パリトキシンは糖鎖やタンパク、核酸などの生体高分子を除く化合物としては2番目に大きい天然有機化合物である。分子式はC₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₄であり、64の不斉中心を持っている。最初、この化合物の構造決定は化学的な分解反応によって得られたフラグメントの構造をX線結晶回折や¹H-NMRを用いて解析することによって明らかにされた。また、その絶対立体化学は合成的な手法で決定された。しかし、化合物全体のNMRスペクトルは完全に帰属されていなかった。パリトキシン類縁体の存在も知られており、それら化合

物の構造決定や、さらにターゲットとなるタンパク質との相互作用研究のためにNMR スペクトルの完全帰属を計画した。実験は 17.6 テスラ超伝導磁石を備えた NMR 装置を用い、各種の多次元 FT-NMR スペクトルを取得し完全帰属を達成した。

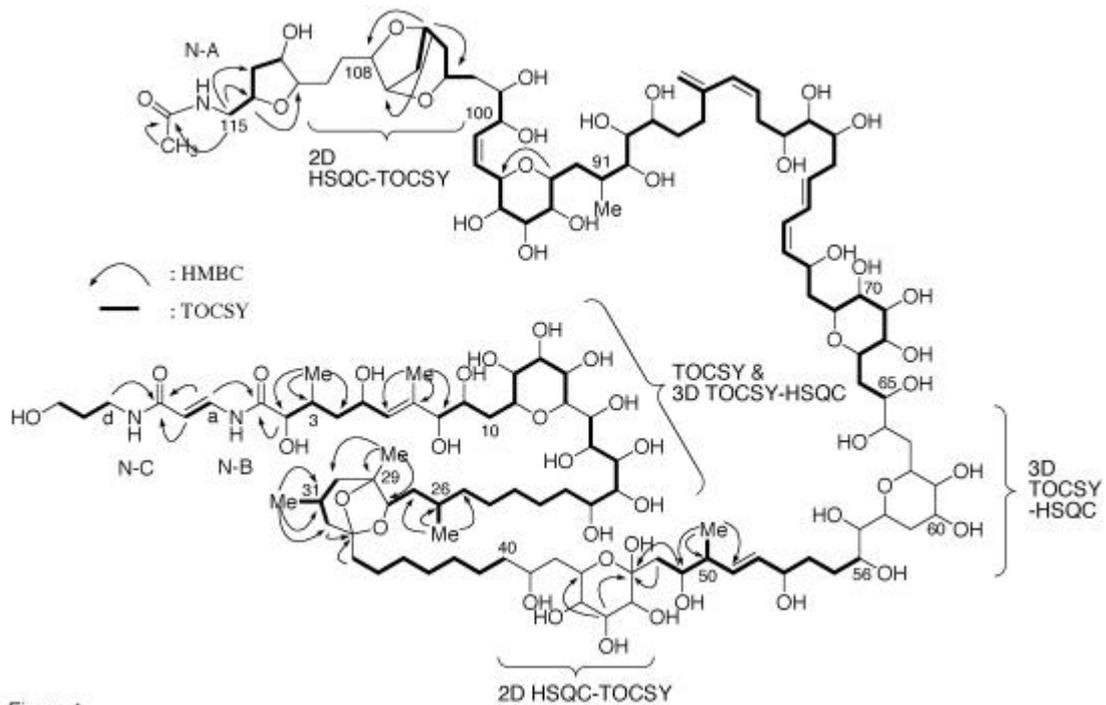


Figure 1

図 4

サンプルは重メタノールに溶解し、測定はブルカー・バイオスピン社製 DMX-750 (プロトン共鳴周波数 750.13MHz) を用いて行った。スピン スピン結合に基づく同種核間の相関情報を得る為に DQF-COSY, TOCSY を測定した。異種核間に関しては ^1H と ^{13}C の直接結合によるスピン スピン結合に基づく HSQC、二結合以上離れた長距離スピン スピン

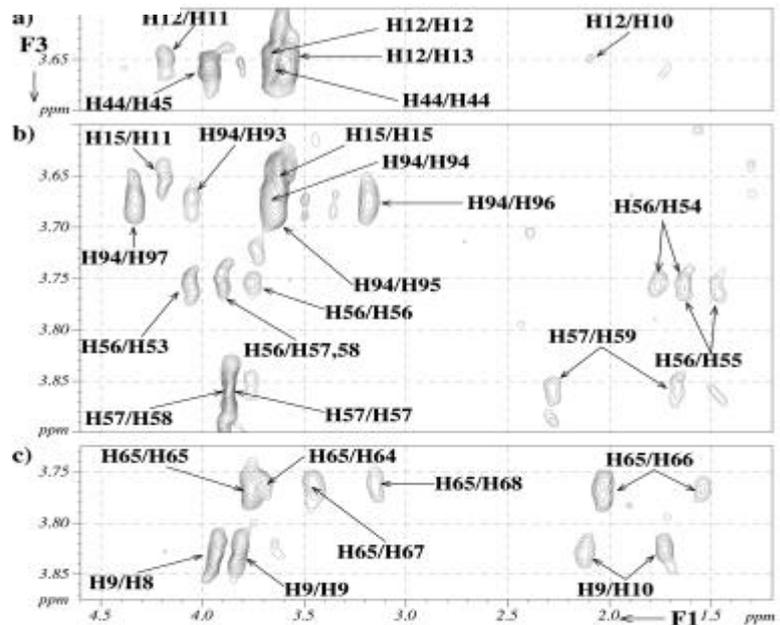


Figure 2

図 5

結合を検出する HMBC を測定した。シグナルの重なりのためにこれらのスペクトルで解析不可能な部分については 2D-HSQC-TOCSY、3D-TOCSY-HSQC を測定し ^{13}C 化学シフトの分散を利用して帰属を行った。図 4 に帰属に用いた手法と分子構造の関係を示す。図 5 に 3D-TOCSY-HSQC のスペクトルを示す。N-アセチルパリトキシンの ^1H および ^{13}C の帰属を分子構造とともに記したものを図 6 と図 7 に示す。

図 6 ^1H -NMR Assignment of *N*-Acetylpalytoxin

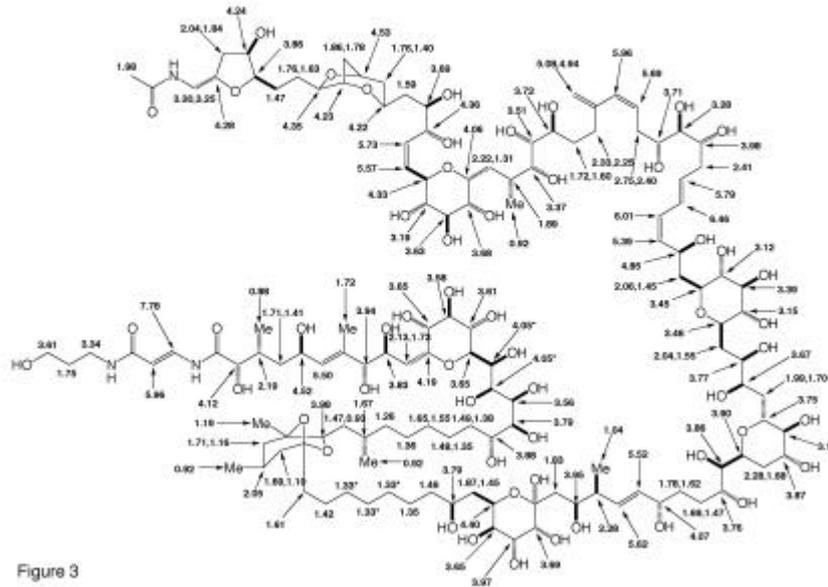
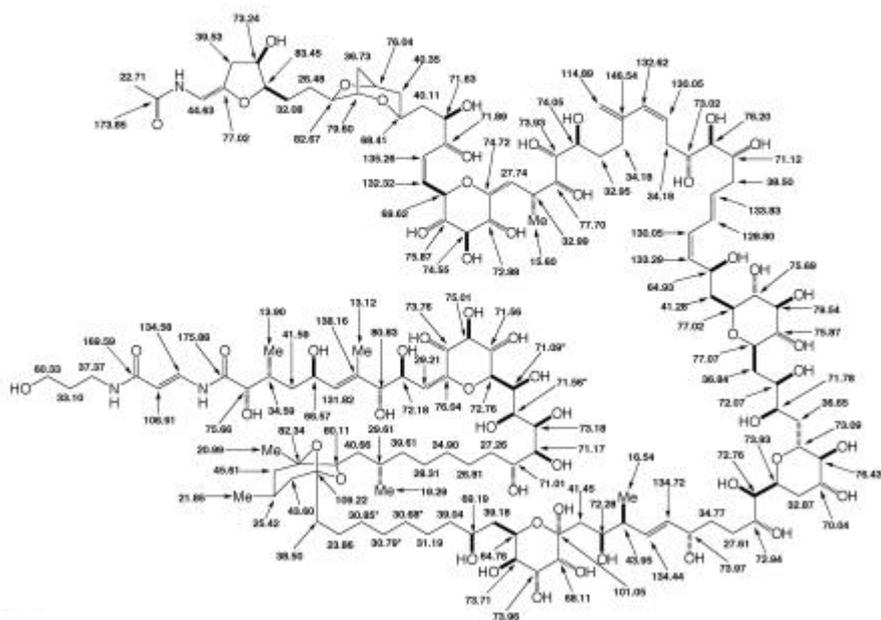


図 7 ^{13}C -NMR Assignment of *N*-Acetylpalytoxin



質レセプターGPCR の構造と構造変化およびリガンド認識

GPCR は膜を7回貫通するドメインを有することで共通しており、そのアミノ酸配列の相同性からいくつかのファミリーに分類される。なかでも光受容膜蛋白質であるロドプシンと高い相同性を有する GPCR では、それぞれの膜貫通ドメインにおいて保存度の高いアミノ酸残基が存在し、これらのアミノ酸残基は GPCR の機能に重要な関与をしているとされる。

最近 X 線結晶構造解析によるロドプシンの詳細な立体構造が明らかにされた。この構造から GPCR において良く保存されたアミノ酸残基が果たす役割についていくつかの部分について推測が可能となった。特に TM6 に存在する保存度の高い Pro はこのヘリックスに特徴的な折れ曲がり (キルク) 構造をもたらし、最近の研究から TM6 が活性化に伴ってヘリックスの軸を中心に回転することが示され、このような構造と GPCR の機能との関わりを解明することは本研究の重要な課題となった。

GPCR の構造変化および機能に関する研究においてはロドプシンについて最も詳細な研究が行われている。ロドプシンは蛋白質であるオプシンの Lys296 に 11 - シスレチナールが共有結合で結合してシッフ塩基を形成した膜蛋白質である。クロモフォアの UV 吸収 (λ_{\max}) は 498nm という長波長領域にシフトしており、ロドプシンに光照射すると、さらに長波長シフトした UV 吸収を示すきわめて不安定なバソロドプシン (Batho) となり、11 - シスが 11 - トランスに変化したオールトランス型のクロモフォアとなる。この高エネルギーで不安定な Batho はクロモフォアとオプシンの熱的な構造変化を伴って、順次ルミロドプシン (Lumi)、メタロドプシン I (Meta-I)、メタロドプシン Ib (Meta-Ib) そしてメタロドプシン II (Meta-II) と呼ばれる中間体へと変化する。一方、より生理的条件下では Lumi はメタロドプシン I₃₈₀ (Meta-I₃₈₀) と呼ばれる中間体を経て Meta-II に変化する (図 8)。

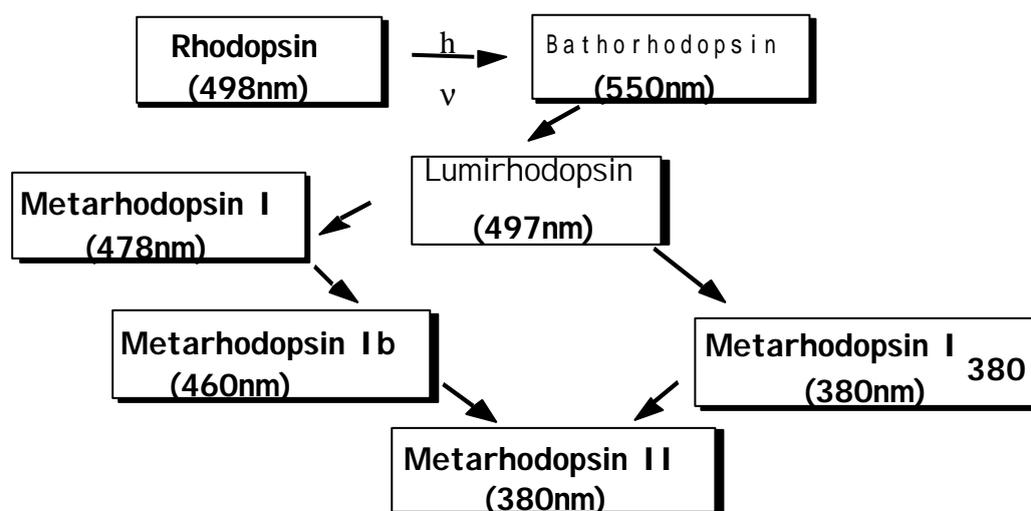


図 8 ロドプシンの光中間体の発生経路

G 蛋白質の活性化は Meta-II において生じるため、ロドプシンに結合した 11 - シスレチナールはインバースアゴニストであり、Meta-II に結合したオールトランスレチナールはフルアゴニストになる。このようにロドプシンにおいては光照射によって同じクロモフォアがインバースアゴニストからフルアゴニストに変化するため、スペクトル変化により構造変化を観測することができる。しかし、実際にどのように異性化が生じさらに蛋白質の構造変化が誘導されるかと言う構造的情報は全くなく、このような構造変化についてコンピュータを用いたシミュレーションを行った。その結果、構造変化についての重要な知見を得て、構造変化中間体の立体構造モデルを作成することができた。

ロドプシンから Batho への変化は早く、200fs 以内で生じる。このような条件のもとレチナールの異性化について分子動力学法によりシミュレートすると、異性化した二重結合にひずみが生じ約 30 度にねじれた構造となることが示された。この不安定なバソロドプシンの構造のひずみを解消するには、TM3 および TM4 の構造が変化することが必要

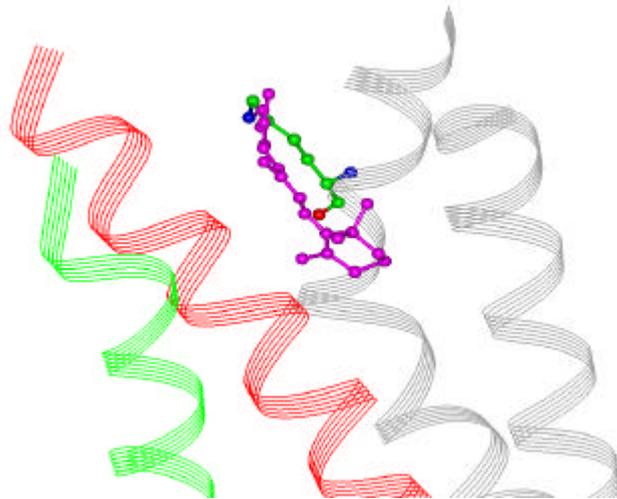


図 9 バソロドプシンのクロモフォア (紫色) の構造

であることが示された (図 9)。クロモフォアであるレチナールはオプシンの構造変化に伴い β - イオン部が 6 番目のヘリックスから 4 番目のヘリックスへと向きを変えることが示され

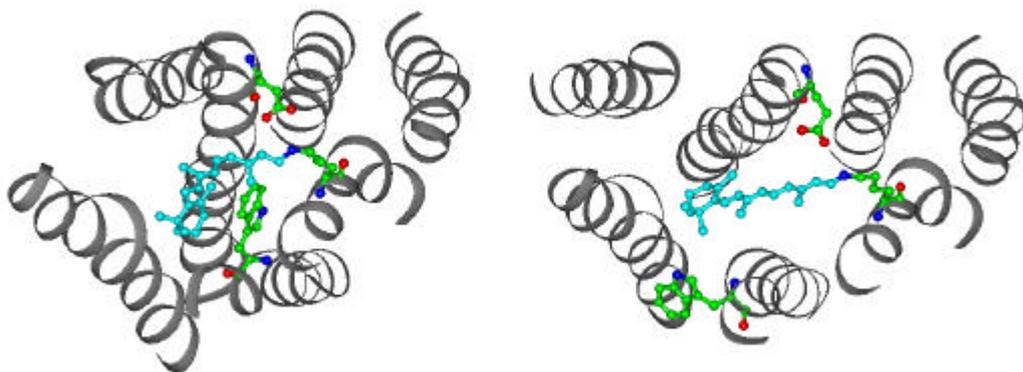


図 10 ロドプシン (不活性型、左) とメタロドプシン (活性型) の立体構造モデル

ており、このような構造変化に対応した構造がえられた。

さらに Meta-II へはそれぞれ、数msの時間で構造的変化する。これは蛋白質の二次構造の空間的な動きを伴う大きな構造変化に十分な時間である。KhoranaとHubellらは6番目の膜貫通ヘリックス全体が大きく回転し膜蛋白質の構造が相当大きく変化することを示した。このような構造変化はTM3とTM4の動きに従って、TM6がTM3の方向に動くということから理解できる。この際TM6に存在するキंकしたヘリックスが立体的な障害を避けるために回転が必要になると説明される。このようにして、ロドプシンの活性化モデルを作成した。このモデルはロドプシンの構造変化を説明するばかりでなく、G蛋白質との相互作用や活性化の機構についても新しい視点をもたらした。また、活性化状態の生成に必須なTM6の回転はレセプターのリガンド認識に重要な構造的特異性を与える。すなわち、TM6の回転の前後ではリガンド結合部位におけるTM6が関与するアミノ酸残基が異なり、フルアゴニストとアンタゴニストを認識するアミノ酸残基が異なることが示された。

ロドプシンの光活性化中間体の構造モデルはGPCRがとる多様な構造に対応していると考えられることから、それぞれの中間体の構造を基にしてレセプターの立体構造モデルを組み立てると、それぞれのリガンドの結合の特異性が検討できる。図10にロドプシンの結晶構造とMeta-II構造モデルを比較した図を示す。保存度の非常に高いTM6のTrp残基の位置の大きな変化はアゴニストとアンタゴニストを認識するアミノ酸残基が異なることを示唆している。

ロドプシンでは、リガンド(レチナール)がインバースアゴニストからフルアゴニストに急速に変化するため途中の中間体の活性化についての詳細な情報が得られない。しかし、他のGPCRではインバースアゴニスト、アンタゴニスト、

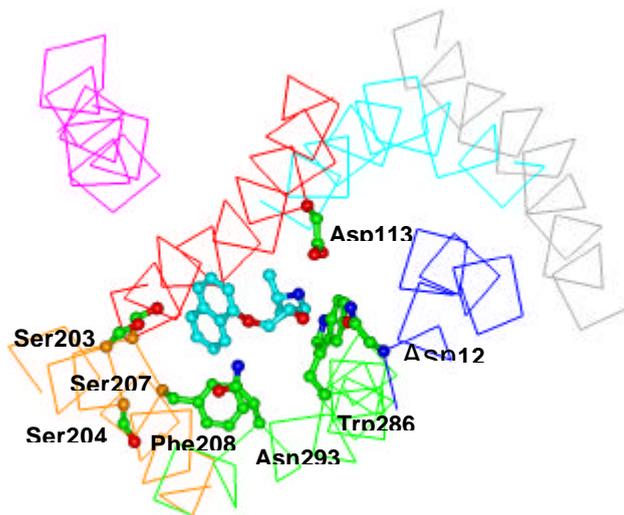


図11 不活性型 β -アドレナリンレセプターに結合したプロプラノロール(インバースアゴニスト)

パーシャルアゴニスト、そしてフルアゴニストがそれぞれ異なる化合物として存在するため、それぞれが結合するレセプター構造の活性化の程度が

わかる。

アドレナリンβ2 レセプターのインバースアゴニストであるプロプラノロールはレセプターを完全に不活性化させる。ロドプシンが吸収する光エネルギーがほとんど Meta-1 の生成に費やされることを考えると、β2 レセプターのインバースアゴニストが結合する構造は Meta-1 に近い構造をとっているものと考えられる。図11はプロプラノロールとレセプターの複合体の構造モデルを示した。リガンドのアミンはTM3 上で保存された Asp 残基と相互作用する。一方、ナフチル基は TM5 および 6 の芳香族アミノ酸残基と芳香環クラスターを形成する。この相互作用はレセプターの不活性構造を安定化する。このようにロドプシンの光活性中間体の構造と GPCR のリガンド結合構造には強い構造的相関があることが示された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ANPレセプターは膜を一回貫通ドメインを有し、二量化により活性化される。このようなレセプター活性化の機構は多くのレセプターで共通したものである。このため、このレセプターに作用するリガンドのレセプター結合構造を明らかにできたことは、今後レセプター・リガンドの相互作用をレセプター構造とともに研究する場合に重要な知見となると期待され、多くのペプチド性リガンドによって活性化されるレセプターのリガンド認識や活性化の機構を明らかにできるものと期待される。また、新しい非ペプチド性ANP様リガンドのデザインが可能になると期待される。

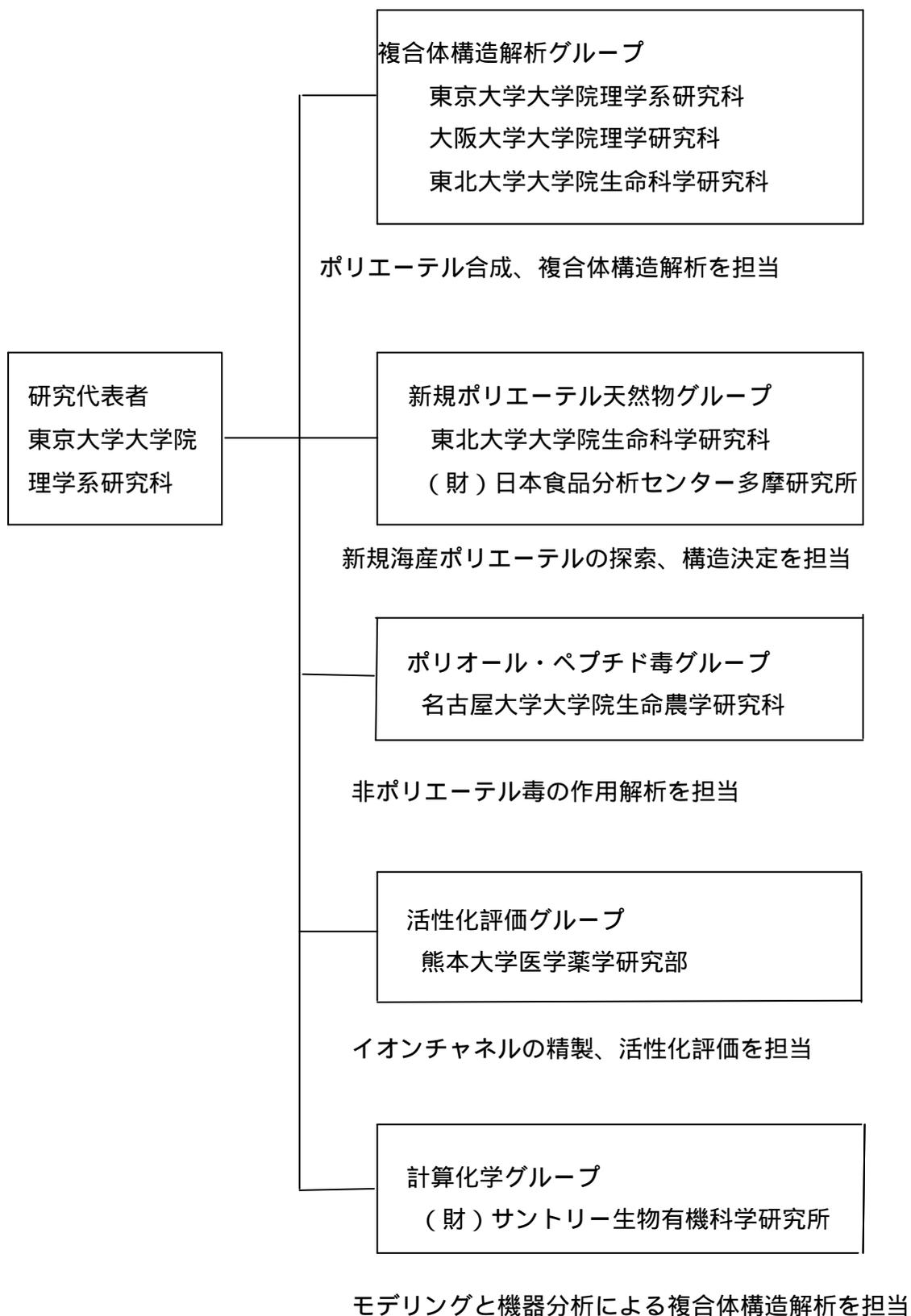
パリトキシンはカルシウムポンプである膜蛋白質に作用する強力なリガンドである。このトキシンの蛋白質への作用構造の解明にはリガンドのHおよび¹³Cの帰属が必須である。パリトキシンのような巨大な非ペプチド性分子のHおよび¹³Cの帰属自体が困難な課題であったが、本研究により達成されたことは今後のパリトキシン関連分子の作用構造の詳細を研究する足がかりとなる。パリトキシンが作用する Na-K ポンプの立体構造モデルなどを用いることによって、リガンドと膜蛋白質ポンプとの構造活性相関の研究が展開できるものと期待できる。

GPCRは細胞における情報伝達に関連するレセプターのなかで最も広汎に存在する膜蛋白質であり、本研究により得られたレセプターの活性化過程における中間体構造モデルはロドプシンの構造情報伝達機構のみならず、GPCR一般における情報伝達の機構とリガンド認識機構を明らかにできる大きな手がかりを提供するものである。いままで薬理的にのみ評価されてきたリガンドの機能を、対応するレセプターの構造モデルから明確にできるものと期待される。さらに、ヒトゲノム配列の解明によって得られるGPCRの構造を持つがそのリガンドの構造が明らかでないオーファンレセプターの機能についても構

造モデルから予測が可能になると予測でき、今後の創薬のための新しいターゲットの発見に結びつくと期待される。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

複合体構造解析グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
橋 和夫	東京大学大学院 理学系研究科	教授	研究チームの統括、企画調製 ポリエーテルのデザイン	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
此木 敬一	同上	助手	複合体形成の評価、 光ラベル化	平成 10 年 12 月 平成 2 年 7 月
山垣 亮	同上	助手	複合体の質量分析	平成 11 年 9 月 平成 5 年 11 月
福沢 世傑	同上	助手	複合体形成の評価、 光標識化	平成 12 年 10 月 平成 5 年 11 月
小林 好真	同上	大学院生	固体 NMR による複合体構造 解析	平成 11 年 4 月 平成 2 年 3 月
不破 春彦	東京大学大学院 理学系研究科 東京大学大学院 薬学系研究科	大学院生 助手	ポリエーテルの合成	平成 11 年 4 月 平成 5 年 3 月
高倉 宏之	同上	CREST 研究 員	ポリエーテルの合成	平成 11 年 6 月 平成 4 年 3 月
クリシュナ モハン	同上	CREST 研究 員	ポリエーテルの合成	平成 11 年 11 月 平成 2 年 10 月
杉山 直幸	同上	大学院生 CREST 研究 員	光標識化タンパク質の解析	平成 15 年 4 月 平成 5 年 11 月
矢野 亜津子	同上	CREST 技術 員	Na ⁺ チャネルの精製と 再構成	平成 11 年 3 月 平成 2 年 11 月 平成 13 年 11 月 平成 5 年 11 月
佐々木 啓孝	同上	大学院生 研究補助員	NMR による複合体形成の 評価	平成 14 年 4 月 平成 5 年 11 月
沼口 紫	同上	研究チーム 事務員	経理事務等の総括、 予算管理	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
村田 道雄	東京大学大学院 理学系研究科 大阪大学大学院 理学研究科	教授	複合体の構造解析	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
大石 徹	大阪大学大学院 理学研究科	助教授	ポリエン連結分子の合成	平成 12 年 4 月 平成 5 年 11 月
松森 信明	同上	助手	ポリエン連結の作成と 固体 NMR の測定	平成 11 年 4 月 平成 5 年 11 月
松岡 茂	同上	大学院生 CREST 研究 員	アンフォテリシン B 連結分子の調製	平成 11 年 4 月 平成 5 年 11 月
山瀬 博司	同上	客員研究員	アンフォテリシン B 連結分子の調製	平成 14 年 4 月 平成 5 年 11 月
蓮台 俊宏	同上	大学院生	ポリエンポリオール分子の 標識、固体 NMR の測定	平成 14 年 4 月 平成 5 年 11 月
山本 恵子	同上	研究補助員	研究データの収集、解析、 文献調査、事務処理補助	平成 11 年 10 月 平成 2 年 8 月

吉田尚子	大阪大学大学院 理学研究科	研究補助員	研究データの収集、 文献調査、事務処理補助	平成12年10月 平成3年1月
田村麻里子	同上	研究補助員	同上	平成13年2月 平成5年11月
佐々木 誠	東京大学大学院 理学系研究科 東北大学大学院 生命科学研究所	教授	ポリエーテルのデザイン、 合成	平成10年12月 平成5年11月
及川雅人	同上	助教授	ポリエーテルの合成	平成15年1月 平成5年11月
高倉宏之	同上	CREST 研究 員	ポリエーテルの全合成	平成14年10月 平成5年11月

新規ポリエーテル天然物グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
安元 健	日本食品分析 センター 多摩研究所	学術顧問	新規海産ポリエーテル化合 物の探索	平成10年12月 平成5年11月
五十嵐友二	同上	試験研究課 課長	ポリエーテル化合物の単離	平成12年4月 平成5年11月
佐竹真幸	東北大学大学院 生命科学研究所	助教授	ポリエーテル化合物の 構造決定	平成10年12月 平成5年11月
村田和也	同上	大学院生	ポリエーテル化合物の 活性測定	平成10年12月 平成2年3月
大藤克也	同上	大学院生	新規ポリエーテル化合物の 単離	平成10年12月 平成4年3月
渡辺龍一	同上	大学院生	ナトリウムチャンネルに作用 する化合物の単離	平成14年4月 平成5年11月

ポリオール・ペプチド毒グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中村英士	名古屋大学大院 生命農学研究科	教授	ポリオールとペプチドのライ ブラリー作成、相互作用解 析法の開発	平成10年12月 平成2年10月
大場裕一	同上	助手	ポリオールとペプチドの 相互作用解析法の開発	平成12年10月 平成5年11月
呉 純	同上	大学院生	蛋白との相互作用の 解析手法の開発	平成10年12月 平成1年3月
加藤真由美	同上	大学院生	ポリオールの構造解析	平成10年12月 平成3年3月
中村光裕	同上	大学院生	ペプチドの合成、 相互作用の解析	平成11年4月 平成5年3月
小野寺健一	同上	大学院生	ポリオールの構造解析	平成11年4月 平成5年3月

堀口 健男	北海道大学大学院理学研究科	助教授	共生藻の分離、培養株の作成	平成 10 年 12 月 平成 3 年 3 月
佐藤 一紀	三菱化学生命科学研究所	主任研究員	ペプチドの固相合成	平成 10 年 12 月 平成 3 年 3 月
大泉 康	東北大学大学院薬学研究科	教授	作用機構	平成 10 年 12 月 平成 3 年 3 月

活性化評価グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中山 仁	熊本大学大学院医学薬学研究部	教授	Na チャネルへのポリエーテル化合物結合と活性化の評価	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
國安 明彦	同上	助教授	Na チャネルの再構成と結合能の評価、Ca チャネルの精製	平成 10 年 12 月 平成 5 年 3 月
川原 浩一	同上	助手	光ラベル化されたイオンチャネルの高感度分析	平成 12 年 4 月 平成 5 年 11 月
大神 信孝	同上	大学院生	Na チャネルの精製	平成 10 年 12 月 平成 3 年 3 月
清水 英介	同上	大学院生	神経 Na ⁺ チャネル特異的に作用する PMTX 結合部位の同定	平成 13 年 4 月 平成 5 年 11 月
村田 和義	生物情報解析研究センター	研究室長	Ca ²⁺ チャネルの二次元結晶解析	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月

計算化学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
石黒 正路	サントリ 生物有機科学研究所	部長研究員	膜タンパク質複合体モデリング	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
岩下 孝	同上	主任研究員	膜タンパク質複合体の固体 NMR	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
当麻 洋子	同上	研究員	膜タンパク質複合体モデリング	平成 10 年 12 月 平成 3 年 3 月
紙 圭一郎	同上	研究員	膜タンパク質の NMR による構造解析	平成 10 年 12 月 平成 4 年 3 月
菅 由紀子	同上	研究員	膜タンパク質リガンドの構造解析	平成 10 年 12 月 平成 4 年 3 月
菅瀬 謙治	同上	研究員	膜タンパク質リガンドの構造解析	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
川田 剛	同上	研究員	膜タンパク質の機能解析	平成 10 年 12 月 平成 5 年 11 月
益田 勝吉	同上	研究員	膜タンパク質の質量分析	平成 11 年 4 月 平成 5 年 11 月

5 . 究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 11 年 12 月 10 日	橘チーム ミーティング	東京大学大学院 理学系研究科	15 名	各研究グループにおける研究進捗状況の報告と討議および今後の取り進めにつき意識あわせを実施

(2) 招聘した研究者等

なし

6 . 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内 4件、海外 57件)

1. A. Morohashi, M. Satake, H. Naoki, H. F. Kaspar, Y. Oshima, T. Yasumoto: "Brevetoxin B4 Isolated from Greenshell Mussels *Perna canaliculus*, the Major Toxin Involved in Neurotoxic Shellfish Poisoning in New Zealand", *Natural Toxins*, **7**, 45-48 (1999).
2. M. Inoue, M. Sasaki and K. Tachibana: "A Convergent Synthesis of the *trans*-Fused Hexahydrooxonine Ring System and Reproduction of Conformational Behavior Shown by Ring F of Ciguatoxin", *Tetrahedron*, **55**, 10949-10970 (1999).
3. M. Sasaki, M. Inoue, K. Takamatsu and K. Tachibana: "Stereocontrolled Synthesis of the JKLM Ring Fragment of Ciguatoxin", *J. Org. Chem.*, **64**, 9399-9415 (1999).
4. M. Inoue, M. Sasaki, and K. Tachibana: "A Convergent Synthesis of Decacyclic Ciguatoxin Model Containing the F-M Ring Framework", *J. Org. Chem.*, **64**, 9416-9429 (1999).
5. M. Sasaki, H. Fuwa, M. Ishikawa, and K. Tachibana: "A General Method for Convergent Synthesis of Polycyclic Ethers Based on Suzuki Cross-Coupling; Concise Synthesis of the ABCD Ring System of Ciguatoxin" *Organic Lett.*, **1**, 1075-1077 (1999).
6. K. Konoki, M. Hashimoto, M. Murata, and K. Tachibana: "Maitotoxin-induced Calcium Influx in Erythrocyte Ghosts and Rat Glioma C6 Cells, and Blockade by Gangliosides and Other Membrane Lipids.", *Chemical Research in Toxicology*, **12**, 12993-1001 (1999).
7. M. Ishiguro: "A Mechanism of Primary Photo-activation Reactions of Rhodopsin: Modeling for the Intermediates in the Rhodopsin Photocycle", *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 444-451 (2000).
8. M. Sasaki, K. Noguchi, H. Fuwa, and K. Tachibana: "Convergent Synthesis of an HIJK Ring

- Model of Ciguatoxin via Suzuki Cross-coupling Reaction”, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 1425-1428 (2000).
9. Y. Kobayashi and K. Tachibana: “NMR Observation on Transbilayer Distribution of *N*-[¹³C]Methylated Chlorpromazine in Asymmetric Lipid Bilayer of Unilamellar Vesicles”, *Chem. Lett.*, **4**, 302-303 (2000).
 10. A. Morohashi, M. Satake, Y. Oshima, and T. Yasumoto: “Absolute Configuration at C45 in 45-Hydroxyessotoxin, a Marine Polyether Toxin Isolated from Shellfish”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1761-1763 (2000).
 11. M. Sasaki, T. Koike, R. Sakai, and K. Tachibana: “Total Synthesis of (-)-Dysiherbaine, a Novel Neuroexcitotoxic Amino Acid”, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3923-3926 (2000).
 12. M. Sasaki, S. Honda, T. Noguchi, H. Takakura, and K. Tachibana: “Palladium-catalyzed Carbonylation of Lactone-derived Enol Phosphates: Stereoselective Construction of Functionalized Cyclic Ethers from Lactones”, *Synlett*, **2000**, 838-840.
 13. H. Fuwa, M. Sasaki, and K. Tachibana: “Synthetic Studies on a Marine Polyether Toxin, Gambierol: Stereoselective Synthesis of the FGH Ring System via *B*-Alkyl Suzuki Coupling”, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 8371-8375 (2000).
 14. T. Yasumoto, T. Igarashi, A.-M. Legrand, P. Cruchet, M. Chinain, T. Fujita, and H. Naoki: “Structural Elucidation of Ciguatoxin Congeners by Fast-atom Bombardment Tandem Mass Spectroscopy”, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4988-4989 (2000).
 15. A. Morohashi, M. Satake, H. Nagai, and T. Yasumoto: “The Absolute Configuration of Gambieric Acids A-D, Potent Antifungal Polyethers Isolated from the Marine Dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus*”, *Tetrahedron*, **56**, 8995-9001 (2000).
 16. K. Konoki, N. Sugiyama, M. Murata, K. Tachibana, and Y. Hatanaka: “Development of Biotin-avidin Technology to Investigate Okadaic Acid-promoted Cell Signaling Pathway”, *Tetrahedron*, **56**, 9003-9014 (2000).
 17. K. Murata, N. Odahara, A. Kuniyasu, Y. Sato, H. Nakayama, and K. Nagayama: “Asymmetric Arrangement of Auxiliary Subunits of Skeletal Muscle Voltage-gated L-Type Ca²⁺ Channel”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 284-291 (2001).
 18. H. Takakura, K. Noguchi, M. Sasaki, and K. Tachibana: “Synthetic Studies on Ciguatoxin: A Highly Convergent Synthesis of the GHIJKLM Ring System via *B*-Alkyl Suzuki Coupling”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1090-1093 (2001).
 19. 佐々木 誠、井上将行: “ポリエーテル系天然物の化学合成—新しい中員環エーテルの構築法とエーテル環連結法の開発”, *有機合成化学協会誌*, **59**, 193-205 (2001).
 20. E. Kinoshita, H. Maejima, K. Yamaoka, K. Konno, N. Kawai, E. Shimizu, S. Yokote, H.

- Nakayama, and I. Seyama: "Novel Wasp Toxin Discriminates between Neuronal and Cardiac Sodium Channels", *Mol. Pharmacol.*, **59**, 1457-1463 (2001).
21. T. Yasumoto: "The Chemistry and Biological Function of Natural Marine Toxins", *Chem. Rec.*, **3**, 228-242 (2001).
 22. H. Fuwa, M. Sasaki, and K. Tachibana: "Synthetic Studies on a Marine Polyether Toxin, Gambierol: Stereoselective Synthesis of the EFGH Ring System via *B*-Alkyl Suzuki Coupling", *Tetrahedron*, **57**, 3019-3033 (2001).
 23. R. Sakai, T. Koike, M. Sasaki, K. Shimamoto, C. Oiwa, A. Yano, K. Suzuki, K. Tachibana, and H. Kamiya: "Isolation, Structure Determination and Synthesis of Neodysiherbine A, a New Excitatory Amino Acid from a Marine Sponge", *Org. Lett.*, **3**, 1479-1482 (2001).
 24. M. Sasaki, T. Shida, and K. Tachibana: "Synthesis and Stereochemical Confirmation of the HI/JK Ring System of Prymnesins, Potent Hemolytic and Ichthyotoxic Glycoside Toxins Isolated from the Red Tide Alga", *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5725-5728 (2001).
 25. K. Kawahara, T. Gotoh, S. Oyadomari, A. Kuniyasu, S. Kohsaka, M. Mori, and H. Nakayama: "Nitric Oxide Inhibits the Proliferation of Murine Microglial MG5 Cells by a Mechanism Involving p21 but Independent of p53 and Cyclic Guanosine Monophosphate", *Neurosci. Lett.*, **310**, 89-92 (2001).
 26. T. Ukena, M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, T. Yasumoto, T. Fujita, and Y. Kan: "Structure Elucidation of Ostreocin-D, a Palytoxin Analog, Isolated from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*", *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 2585-2588 (2001).
 27. M. Nakamura, Y. Niwa, Y. Ishida, T. Kohno, K. Sato, Y. Oba, and H. Nakamura: "Modification of Arg-13 of δ -Conotoxin GIIIA with Piperidinyl-Arg Analogs and Their Relation to the Inhibition of Sodium Channels", *FEBS Lett.*, **503**, 107-110 (2001).
 28. H. Fuwa, M. Sasaki, and K. Tachibana: "Synthetic Studies toward Gambierol. Convergent Synthesis of the Octacyclic Polyether Core", *Org. Lett.*, **3**, 3549-3552 (2001).
 29. M. Nakamura, Y. Ishida, T. Kohno, K. Sato, Y. Oba, and H. Nakamura: "Synthesis of [Cys⁵] μ -Conotoxin GIIIA and Its Derivatives as a Probe of Na⁺ Channel Analysis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 374-378 (2001).
 30. M. Sasaki, M. Ishikawa, H. Fuwa, and K. Tachibana: "A General Strategy for the Convergent Synthesis of Fused Polycyclic Ethers via *B*-Alkyl Suzuki Coupling. Synthesis of the ABCD Ring Fragment of Ciguatoxins", *Tetrahedron*, **58**, 1889-1911 (2002).
 31. N. Matsumori, N. Yamaji, S. Matsuoka, T. Oishi, and M. Murata: "Amphotericin B Covalent Dimers Forming Sterol-dependent Ion-permeable Membrane Channels", *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4180-4181 (2002).

32. K. Kawahara, A. Kuniyasu, K. Masuda, M. Ishiguro, and H. Nakayama: "Efficient Identification of Photolabelled Amino Acid Residues by Combining Immunoaffinity Purification with MS: Revealing the Semotiadilbinding Site and Its Relevance to Binding Sites for Myristates in Domain III of Human Serum Albumin", *Biochem. J.*, **363**, 223-232 (2002).
33. M. Sasaki, T. Noguchi, and K. Tachibana: "Intramolecular Radical Cyclization—Ring-closing Metathesis Approach to Fused Polycyclic Ethers. Convergent Synthesis and Conformational Analysis of the (E)FGH Ring System of Ciguatoxin", *J. Org. Chem.*, **67**, 3301-3310 (2002).
34. M. Sasaki, C. Tsukano, and K. Tachibana: "Studies toward the Synthesis of Gymnocin A, a Cytotoxic Polyether: A Highly Convergent Entry to the F-N Ring Fragment", *Org. Lett.*, **4**, 1747-1750 (2002).
35. N. Yamaji, N. Matsumori, S. Matsuoka, T. Oishi, and M. Murata: "Amphotericin B Dimers with Bisamide Linkage Bearing Powerful Membrane-permeabilizing Activity", *Org. Lett.*, **4**, 2087-2089 (2002).
36. H. Takakura, M. Sasaki, S. Honda, and K. Tachibana: "Progress toward the Total Synthesis of Ciguatoxins: A Convergent Synthesis of the FGHIJKLM Ring Fragment", *Org. Lett.*, **4**, 2771-2774 (2002).
37. H. Fuwa, M. Sasaki, M. Satake, and K. Tachibana: "Total Synthesis of Gambierol", *Org. Lett.*, **4**, 2981-2984 (2002).
38. H. Fuwa, N. Kainuma, K. Tachibana, and M. Sasaki: "Total Synthesis of (-)-Gambierol", *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14983-14992 (2002).
39. M. Satake, M. Shoji, Y. Oshima, H. Naoki, T. Fujita, and T. Yasumoto: "Gymnocin-A, a Cytotoxic Polyether from the Notorious Red Tide Dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi*", *Tetrahedron Lett.*, **43**, 5829-5832 (2002).
40. S. Matsuoka and M. Murata: "Cholesterol Markedly Reduces Ion Permeability Induced by Membrane-bound Amphotericin B", *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 429-434 (2002).
41. T. Ukena, M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, T. Fujita, H. Naoki, and T. Yasumoto: "Structural Confirmation of Ostreocin-D by Application of Negative-ion Fast-atom Bombardment Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometric Methods", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 2387-2393 (2002).
42. T. Hirano, I. T. Lim, D. M. Kim, X.-G. Zheng, K. Yoshihara, Y. Oyama, H. Imai, Y. Shichida, and M. Ishiguro: "Constraints of Opsin Structure on the Ligand-binding Site: Studies with Ring-fused Retinals", *Photochem. Photobiol.*, **76**, 606 (2002).

43. M. Nakamura, Y. Oba, T. Mori, K. Sato, Y. Ishida, T. Matsuda, H. Nakamura: "Generation of Polyclonal Antibody against μ -Conotoxin GIIIA using an Immunogen of [Cys⁵] μ -Conotoxin GIIIA Site-specifically Conjugated with Bovine Serum Albumin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 1037-1041 (2002).
44. H. Yoshikawa, E. Shimizu, K. Kawahara, A. Kuniyasu, T. Shibano, and H. Nakayama: "Photochemical Identification of the Binding Region for (*S*)-Semotiadil on Sodium Channels: Comparison with that for (*R*)-Semotiadil on Skeletal Muscle Calcium Channel", *Heterocycles*, **59**, 613-622 (2003).
45. M. Ishiguro, T. Hirano, and Y. Oyama: "Modelling of Photointermediates Suggests a Mechanism of the Flip of the β -Ionone Moiety of the Retinylidene Chromophore in the Rhodopsin Photocascade", *ChemBioChem*, **4**, 228-231 (2003).
46. S. Matsuoka and M. Murata: "Membrane Permeabilizing Activity of Amphotericin B is Affected by Chain Length of Phosphatidylcholine Added as Minor Constituent", *Biochim. Biophys. Acta*, **1617**, 109-115 (2003).
47. 佐々木 誠、不破晴彦: "海産ポリエーテル、ガンビエロールの全合成", *化学と生物*, **41**, 283-285 (2003).
48. M. Izumikawa, M. Murata, K. Tachibana, Y. Ebizuka, and I. Fujii: Cloning of Modular Type I Polyketide Synthase Genes from Salinomycin Producing Strain of *Streptomyces albus*. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3401-3405 (2003).
49. S. Matsuoka, N. Matsumori, and M. Murata: "Amphotericin B – Phospholipid Covalent Conjugates: Dependence of Membrane-permeabilizing Activity on Acyl-chain Length", *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 3882-3884 (2003).
50. 不破晴彦、佐々木 誠: "解説：ガンビエロールの全合成 - 107 段階の軌跡", *化学*, **58**, 32-37 (2003).
51. 不破晴彦、佐々木 誠: "海産ポリエーテル毒ガンビエロールの全合成", *有機合成化学協会誌*, **61**, 742-751(2003).
52. H. Sasaki, S. Fukuzawa, J. Kikuchi, S. Yokoyama, H. Hirota, and K. Tachibana: Cholesterol Doping Induced Enhanced Stability of Bicelles. *Langmuir*, **19**, 9841-9844 (2003).
53. H. Sasaki, M. Araki, S. Fukuzawa, and K. Tachibana: The Packing of Lipid Chains Changes the Character of Bacteriorhodopsin Reconstituted in a Model Membrane. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3583-2585 (2003).
54. K. Onodera, H. Nakamura, Y. Oba, and M. Ojika: "Zooxanthellamide A, a Novel Polyhydroxy Metabolite from a Marine Dinoflagellate of *Symbiodinium* sp.", *Tetrahedron* **59**, 1067-1071 (2003).

55. M. Sasaki, C. Tsukano and K. Tachibana: Synthetic Entry to the ABCD Ring Fragment of Gymnocin-A, a Cytotoxic Polyether. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 4351-4354 (2003).
56. H. Fuwa, N. Kainuma, M. Satake and M. Sasaki; Synthesis and Biological Evaluation of Gambierol Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2519-2522 (2003).
57. M. Sasaki, Y. Iwamuro, J. Nemoto and M. Oikawa: Studies toward the Total Synthesis of Azaspiracids: Synthesis of the FGHI Ring Domain. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6199-6201 (2003).
58. C. Tsukano and M. Sasaki: Total Synthesis of Gymnocin-A. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14294-14295 (2003).
59. E. Ito, F. Suzuki-Toyota, K. Toshimori, H. Fuwa, K. Tachibana, M. Satake and M. Sasaki: Pathological Effects on Mice by Gambierol, Possibly One of the Ciguatera Toxins. *Toxicon*, **42**, 733-740 (2003).

(Proceedings)

1. M. Nakamura, Y. Niwa, Y. Ishida, T. Kohno, K. Sato, Y. Oba, and H. Nakamura: "Modification to Arg-13 of μ -Conotoxin GIIIA with Piperidyl-Arg Analogs and Their Evaluations", *Peptide Science 2001*, H. Aoyagi, ed., pp. 203-204 (2001).
2. M. Nakamura, Y. Oba, K. Sato, Y. Ishida, T. Mastuda, and H. Nakamura: "Generation of Polyclonal Antibody against Peptide Toxin μ -Conotoxin GIIIA", *Peptide Science 2001*, H. Aoyagi, ed., pp. 385-386 (2001).

(2) 口頭発表

招待、口頭講演 (国内 75件、海外 26件)

1. 佐々木 誠、野口哲司、橘 和夫 (東大院理)
「シガトキシン FGH 環部の合成と配座解析」
・日本化学会第 76 春季年会 (神奈川、1999.3.30)
2. 此木敬一、藤本 さやか、高橋匡輝、村田道雄、橘 和夫 (東大院理)
「シガトキシンモデル化合物によるマイトトキシンの作用阻害」
・日本化学会第 76 春季年会 (神奈川、1999.3.30)
3. 佐々木 誠、不破春彦、石川 誠、橘 和夫 (東大院理)
「鈴木クロスカップリング反応を用いる収束的ポリエーテル骨格合成法の開発とシガトキシン合成への応用」
・第 75 回有機合成シンポジウム (東京、1999.6.4)
4. 橘 和夫 (東大院理)
「 Construction of Bioassay Protocol to Evaluate Recognition and Activation of

- Membrane-bound Proteins by Ladder-shaped Polyether Using Reconstituted Systems.」
- ・天然物ゴードン会議 (New Hampshire, U.S.A., 1999.7.26)
5. 安元 健、五十嵐 友二 (日本食品分析センター)
 - 「海洋天然物の複雑な構造と微量への挑戦」
 - ・ Second Euroconference on Marine Natural Products (サンチャ・デ・コンポスラ スペイン、1999.9.19)
 6. 佐々木 誠 (東大院理)
 - 「シガトキシンの合成研究 新しい中員環エーテル構築法とエーテル環連結法の開発」
 - ・ 第 18 回理研シンポジウム (埼玉、1999.7.16)
 7. 佐々木 誠、不破春彦、石川 誠、野口勝彦、橘 和夫 (東大院理)
 - 「収束的ポリ環状エーテル合成法の開発とシガトキシン合成への応用」
 - ・ 日本化学会第 77 秋季年会 (札幌、1999.9.24)
 8. 村田道雄、出村哲夫 (阪大院理)
 - 「ポリアミン・ATP 複合体の立体配座解析 スペルミンモデル化合物の調製と複合体の NMR 」
 - ・ 日本化学会第 78 春季年会 (千葉、2000.3.29)
 9. 安元 健、五十嵐 友二 (日本食品分析センター)、Anne-Marie Legrand, Philippe Cruchet (レイ・マラルデ医学研究所) 藤田剛司、直木秀夫 (サントリー生有研)
 - 「微量シガトキシン同族体の MS / MS 分析による構造決定」
 - ・ 第 41 回天然有機化合物討論会 (名古屋、1999.10.14)
 10. 佐々木 誠、不破春彦、石川 誠、橘 和夫 (東大院理)
 - 「鈴木クロスカップリング反応を用いる環状ポリエーテル連結法の開発とシガトキシン合成への応用」
 - ・ 有機合成化学講習会 (東京、1999.10.19)
 11. 佐々木 誠 (東大院理)
 - 「Synthetic Studies toward Marine Natural Product Ciguatoxin 」
 - ・ Seoul National University-The University of Tokyo Joint Symposium (Seoul, Korea, 1999.11.22)
 12. 橘 和夫 (東大院理)
 - 「Why are Marine Sponges Immune to Cytotoxins which They Accommodates? 」
 - ・ 海洋天然物ゴードン会議 (Ventura, California, U.S.A., 2000.2.28)
 13. 松森信明、永楽哲嗣、松岡 茂、村田 道雄 (阪大院理)
 - 「ポリエーテル抗生物質と膜脂質分子の相互作用 アンホテリシン B 二量体の調製と分光

学的研究」

- ・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 14. 松岡 茂、松森信明、村田道雄(阪大院理)
「ポリエン抗生物質と膜脂質分子の相互作用 アンホテリシンB リン脂質連結分子の分光学的研究」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 15. 野口勝彦、佐々木 誠、橘 和夫(東大院理)
「シガトキシンHIJK環部の立体選択的合成」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 16. 不破春彦、佐々木 誠、橘 和夫(東大院理)
「海産ポリエーテル化合物ガンピエロールの合成研究」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 17. 佐々木 誠(東大院理)
「海産ポリエーテル系天然物の合成研究」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 18. 佐々木 誠、石川 誠、橘 和夫(東大院理)
「シガトキシンCTX3CのABCD環部の合成」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 19. 中村英士(名大院生命農)
「5位に修飾アミノ酸を含有する μ コノトキシンGAアナログの合成と活性」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 20. 此木敬一、本田香織、橘 和夫(東大院理)村田道雄(阪大院理)
「光親和性標識による超活性海産ポリエーテル毒マイトトキシンの作用標的分子の探索」
・日本化学会第78春季年会(千葉、2000.3.29)
- 21. 佐竹真幸、大島泰克(東北大院農)
「海産ポリエーテル化合物イエソトキシンの生合成」
・平成12年度 日本水産学会春季大会(東京、2000.4.2)
- 22. 山垣 亮、橘 和夫(東大院理/CREST)、中西洋志(工技院・生命)
「ESI/四重極/飛行時間質量分析計を用いた糖鎖の構造分析」
・第48回 質量分析総合討論会(名古屋、2000.5.11)
- 23. 杉山直幸、武津勝司、此木敬一、橘 和夫(東大院理/CREST)、村田道雄(阪大院理)
「クロイソカイメンの自己防御機構に関わるオカダ酸結合たんぱく質」
・第42回 天然有機化合物討論会(沖縄 2000.11.7)

24. 中村光裕、石田行知、河野俊之、佐藤一紀、中村英士（名大院生命農 / 三菱化学生命研）
「 μ -conotoxin への修飾アミノ酸の導入と活性制御」
・第 37 回 ペプチド討論会（名古屋 2000.10.19）
25. 杉山直幸、貝原麻美、此木敬一、橘 和夫（東大院理）
「Why are Marine Sponges Immune to Cytotoxins which They Accommodate?」
・マリンバイオテクノロジー国際会議（Townsville, Australia 2000.9.30）
26. 川原浩一、國安明彦、中山 仁（熊大薬）、後藤知巳、親泊政一、森 正敬（熊大医）、高坂 新一（国立神経センター）
「Co-Induction of Argininosuccinate Synthase, Cationic Amino Acid Transporter-2, and Nitric Oxide Synthase in Activated Marine Microglial Cells」
・第 30 回北米神経科学学会（New Orleans, USA 2000.11.7）
27. 佐々木 誠（東大院理）
「A New Strategy for Convergent Synthesis of Polyether Natural Products」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.15）
28. 山垣 亮、橘 和夫（東大院理）
「Structure Analysis of Carbohydrates using an Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.18）
29. 杉山直幸、武津勝司、此木敬一、橘 和夫（東大院理）
「Okadaic Acid-binding Proteins form the Sponge *Halichondria okadai*: A Clue to the Molecular Mechanisms of Self-resistance」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.18）
30. 藤井 勲、海老塚 豊（東大院薬）、藤田剛司、直木英夫（サントリー生有研）、村田道雄（阪大院理）、泉川美穂、橘 和夫（東大院理）
「Analyses of Biosynthetic Mechanisms and Cloning of Biosynthetic Genes for Polyethers」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.18）
31. 村田道雄、松森信明、松岡 茂（阪大院理）、此木敬一（東大院理）
「Molecular Recognition of Membrane Components by Polyether Toxins and Polyenemacrolides」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.16）
32. 松岡 茂、永楽哲嗣、山路奈保子、松森信明、村田道雄（阪大院理）
「Cross-linked Analogs of Amphotericin B: Bioactivity and Spectroscopic Properties」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.18）

32. 佐竹真幸、大藤克也、庄司光葉、大島泰克（東北大院農）、安元 健（日本食品分析センター）
「Unique Structures of Two Polyether Compounds, Azaspiracid and Gymnocin-A」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.19）
33. 安元 健（日本食品分析センター）
「Chemistry in Marine Ecotoxicology」
・2000 環太平洋国際化学会議（Hawaii Honolulu, USA 2000.12.19）
34. 太田小代、佐竹真幸、大島泰克（東北大院農）、Lesley Rhodes（コースロン研究所）
「渦鞭毛藻由来の抗カビ成分アンフィジノール-4 の構造と生合成」
・日本農芸化学会 2001 年度大会（京都、2001.3.2）
35. 志田 健、佐々木 誠、橘 和夫（東大院理）
「プリムネシン HIJK 環部の合成研究」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
36. 不破春彦、佐々木 誠、橘 和夫（東大院理）
「ガンビエロールの全合成研究 FGHI 環部の合成」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
37. 高倉宏之、野口勝彦、佐々木 誠、橘 和夫（東大院理）
「シガトキシンの全合成研究 GHIJKLM 環部の合成」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
38. 野口勝彦、高倉宏之、佐々木 誠、橘 和夫（東大院理）
「シガトキシンの全合成研究 GHI 環部の合成」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
39. 小池竜樹、佐々木 誠、橘 和夫（東大院理）、酒井隆一、大岩智恵、神 久男（北里大 水産）
「新規興奮性アミノ酸ネオダイシハーベインの構造と全合成」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
40. 永楽哲嗣、松森信明、村田道雄（阪大院理）
「アンフォテリシン B-ステロール連結分子の生物活性と複合体形成」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
41. 山路 奈保子、松岡 茂、松森信明、村田道雄（阪大院理）、三上 襄（千葉大）
「アンフォテリシン B 二量体の生物活性と複合体形成」
・日本化学会 第 79 春季年会（神戸、2001.3.28）
42. 松岡 茂、松森信明、村田道雄（阪大院理）
「アンフォテリシン B-リン脂質連結分子のチャンネル様複合体形成」

- ・日本化学会 第 79 春季年会 (神戸、2001.3.28)
- 43. 蓬台俊宏、松岡 茂、村田 道雄 (阪大院理)
「渦鞭毛藻の生産するポリエンポリオール化合物アンフィジノール類の立体配位と炭素標識パターン」
 - ・日本化学会 第 79 春季年会 (神戸、2001.3.28)
- 44. 庄司光葉、佐竹真幸、大島泰克 (東北大院生命科学)、直木秀夫(サントリー生有研)、安元健 (日本食品分析センター)
「渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* の生産する細胞毒ギムノシン - A の構造」
 - ・平成13年度日本水産学会春季大会 (藤沢、2001.4.4)
- 45. 高倉宏之、野口勝彦、本多集吾、佐々木 誠、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「シガトキシンの全合成研究」
 - ・第 79 回有機合成シンポジウム (東京、2001.6.6)
- 46. 大藤克也、佐竹真幸、大島泰克 (東北大院生命科学)、T. MacMahon(Marine Institute)、K. James (Cork Institute of Technology)、直木秀夫 (サントリー生有研)、安元 健 (日本食品分析センター)
「Azaspiracid and Its Analogs」
 - ・第 10 回海洋天然物化学国際シンポジウム (名護、2001.6.25)
- 47. 佐竹真幸、大島泰克 (東北大院生命科学)
「Biosynthesis of Yessotoxin, a Marine Polycyclic Ether Compound」
 - ・第 10 回海洋天然物化学国際シンポジウム (名護、2001.6.25)
- 48. 佐々木 誠、高倉宏之、本多集悟、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「Studies toward Total Synthesis of Ciguatoxins」
 - ・第 10 回海洋天然物科学国際シンポジウム (名護、2001.6.25)
- 49. 山垣 亮、橘 和夫 (東大院理)
「Structure Analyses and Ion Abundance in CID-MS/MS Spectra of Isomeric Oligosaccharides Using Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry: Distinguishing between Isomeric Oligosaccharides」
 - ・第 11 回中国有機マスマスペクトロメトリーシンポジウム (中国 ウルムチ、2001.8.10)
- 50. 橘 和夫 (東大院理)
「ポリ環状エーテル海産毒による生体分子認識」
 - ・日本化学会第 80 秋季年会 (千葉、2001.9.20)
- 51. 佐々木 啓孝、福沢世傑、橘 和夫 (東大院理)、横山茂之 (理研 GSC)、菊地 淳、廣田 洋 (理研 GSC・横浜市大院総理)
「生体膜モデルとして用いた磁場配向性脂質二重膜とチャネル形成ペプチドの相互作用

用」

・日本化学会第 80 秋季年会(千葉、2001.9.22)

52. 山垣 亮、橘 和夫 (東大院理) 中西洋志 (生産技術研)

「Structural Characterization of Glycosylation of Proteins Based on the Ion Abundance in the Mass Spectra」

・ComBio 2001 (International Proteomics Conference 2001)(オーストラリア キャンベラ、2001.10.1)

53. 大藤克也、佐竹真幸、大島泰克 (東北大院生命科学) 安元 健 (日本食品分析センター) 直木秀夫 (サントリー生有研)

「新規二枚貝食中毒 “アザスピロ酸中毒” 原因毒アザスピロ酸類の構造」

・第 43 回天然有機化合物討論会 (大阪、2001.10.2)

54. 中村光裕、大場裕一、松田 幹、中村英士 (名大院生命農) 佐藤一紀 (福岡女子大) 石田行知 (三菱化学生命研)

「イモ貝由来のペプチド毒 δ -conotoxin GIIIA のポリクローナル抗体の作成とその性質」

・第 38 回ペプチド討論会 (長崎、2001.10.3)

55. 中村光裕、丹羽 由香利、大場裕一、中村英士 (名大院生命農) 佐藤一紀 (福岡女子大) 石田行知、河野俊之 (三菱化学生命研)

「13 位にピペリジン環を有するアルギニン類縁体を導入した δ -conotoxin GIIIA アナログ活性」

・第 38 回ペプチド討論会 (長崎、2001.10.3)

56. 佐々木 誠、高倉宏之、本多集吾、石川 誠、野口勝彦、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)

「シガトキシンの全合成研究」

・第 43 回天然有機化合物討論会 (大阪、2001.10.4)

57. 越後谷 玲子、佐竹真幸、大島泰克 (東北大院生命科学)

「渦鞭毛藻 *Amphidinium carterae* が生産する amphidinol 類縁体の構造決定」

・日本農芸化学会東北支部第 134 回大会 (山形、2001.10.20)

58. 栄喜健介、佐竹真幸、大島泰克 (東北大院生命科学)

「海産毒イエットキシンの起源と新規類縁体の構造決定」

・日本農芸化学会東北支部第 134 回大会 (山形、2001.10.20)

59. 小野寺 健一、大場裕一、中村英士、小鹿 一 (名大院生命農)

「渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. より得られた新規ポリオール化合物」

・日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台、2002.3.26)

60. 佐々木 誠、塚野千尋、開沼紀子、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「細胞毒性ポリエーテル、ギムノシン-A の全合成研究」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.27)
61. 志田 健、佐々木 誠、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「プリムネシン CDE/FG 環部および HI/JK 環部の合成と立体配座解析」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.27)
62. 不破春彦、佐々木 誠、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「ガンピロエールの全合成研究」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.27)
63. 佐々木 誠、岩室裕子、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「新規貝毒アザスピロ酸 FGHI 環部の合成研究」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.27)
64. 永楽哲嗣、松森信明、大石 徹、村田道雄 (阪大院理)
「アンフォテリシン B-ステロール連結分子の生物活性とイオンチャネル形成」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.27)
65. 山路 奈保子、松岡 茂、松森信明、村田道雄、三上 襄 (阪大院理、千葉大真菌医学
研)
「アンフォテリシン B 二量体の生物活性とイオンチャネル形成」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.27)
66. 松岡 茂、松森信明、村田道雄 (阪大院理)
「アンフォテリシン B のイオンチャネル形成におけるコレステロールの影響」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.28)
67. 原田綾子、福沢世傑、横山茂之、橘 和夫 (東大院理)、廣田 洋 (理研 GSC)、伏谷 伸
宏 (東大院農生科)
「細胞毒性ステロイドアルカイドリテラジン B の標的分子の探索」
・日本化学会第 81 春季年会 (東京、2002.3.29)
68. 山垣 亮、マリカ・ハムディ、山崎智弘、橘 和夫 (東大院理)
「ゲルろ過クロマトグラフィーと MALDI-MS を組み合わせた膜親和性ペプチドの探索」
・第 50 回日本質量分析学会 (京都、2002.5.16)
69. 福沢世傑、武内のり子、橘 和夫 (東大院理)、廣田 洋 (理研 GSC・横浜市大院総理)
「海産アルカロイド、ゾアンタミンの抗骨粗鬆症作用機序に関する研究」
・第 6 回マリンバイオテクノロジー学会 (東京、2002.5.25)
70. 佐々木 誠 (東北大院生命科学)
「海産ポリエーテル系天然物の全合成研究」

- ・有機合成化学協会東北・北海道支部講演会（仙台、2002.6.27）
- 71. 佐々木 誠（東北大院生命科学）
 - 「タンパク質の機能解明のツールとしての海産毒の全合成研究」
 - ・大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質と低分子鍵物質の相互作用解明を目指した化学合成」(大阪、2002.7.25)
- 72. 福沢 世傑（東大院理）
 - 「海産無脊椎動物由来の生物活性物質の作用機序」
 - ・日本化学会第82秋季年会（大阪、2002.9.27）
- 73. 武内 のり子、福沢 世傑、橘 和夫（東大院理）、廣田 洋（理研GSC・横浜市大院総理）
 - 「海産アルカロイド、ゾアントミンの抗骨粗鬆症作用機序に関する研究」
 - ・日本化学会第82秋季年会（大阪、2002.9.28）
- 74. 庄司光葉、佐竹真幸、大島泰克（東北大院生命科学）、直木秀夫、藤田剛司（サントリー生有研）、安元 健（日本食品分析センター）
 - 「赤潮渦鞭毛藻*Gymnodinium mikimotoi*の生産する細胞毒ポリエーテル化合物Gymnocin-Aの構造決定」
 - ・第44回天然有機化合物討論会（東京、2002.10.9）
- 75. 松岡 茂、松森信明、山路 奈保子、永楽哲嗣、大石 徹、村田道雄（阪大院理）
 - 「アンフォテリシンB誘導体が生体膜中に形成するチャネル複合体」
 - ・第44回天然有機化合物討論会（東京、2002.10.11）38.
- 76. 不破春彦、佐々木 誠、橘 和夫（東大院理、東北大院生命科学）
 - 「ガンビエロールの全合成」
 - ・第44回天然有機化合物討論会（東京、2002.10.10）
- 77. R. Watanabe, R. Samusawa, M. Satake, and Y. Oshima（東北大院生命科学）
 - 「Development of Saxitoxin-induced Affinity Gel」
 - ・10th International Conference of Harmful Algae（Florida, U.S.A., 2002.10.25）
- 78. M. Satake, K. Eiki, Y. Oshima, T. Mitsuya, K. Sekiguchi, K. Koike, and T. Ogata（東北大院生命科学）
 - 「Yessotoxin Production by *Protoceratium reticulatum* in Japan and Structures of Its New Analogs」
 - ・10th International Conference of Harmful Algae（Florida, U.S.A., 2002.10.25）
- 79. 佐々木 啓孝、福沢世傑、橘 和夫（東大院理）、横山茂之（理研 GSC）、菊地 淳、廣田 洋（理研 GSC・横浜市大院総理）
 - 「膜貫通ペプチド再構成系としてのバイセルに関する研究」
 - ・日本生物物理学会第40回年会（名古屋、2002.11.2）

80. 不破春彦、佐々木 誠、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「ガンビエロールの全合成」
・第 82 回有機合成シンポジウム (東京、2002.11.5)
81. K. Kawahara, S. Oyadomari, T. Gotoh, H. Nakayama, and M. Mori (熊本大薬、熊本大医)
「The Role of ER Stress in Overactivation-induced Apoptosis of Mouse Microglial Cells」
・32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience (Florida, U.S.A., 2002.11.5)
82. E. Shimizu, K. Kawahara, M. Kajizono, A. Kuniyasu, and H. Nakayama (熊本大薬)
「Role of a Scavenger Receptor CD36 for β -Amyloid Peptide Clearance in Microglia」
・32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience (Florida, U.S.A., 2002.11.6)
83. 高倉宏之 (東北大院生命科学、CREST)
「シガトキシンの全合成研究」
・有機化学仙台シンポジウム - 第 17 回有機合成化学若手研究者の仙台セミナー (仙台、2002.11.28)
84. 杉山直幸、此木敬一、橘 和夫 (東大院理)
「クロイソカイメン由来オカダ酸結合タンパク質の光親和性標識部位」
・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.19)
85. 佐々木 啓孝、福沢世傑、橘 和夫 (東大院理)
「バイセルに再構成したバクテリオロドプシンに関する研究」
・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.19)
86. 矢野 亜津子、橘 和夫 (東大院理、CREST)
「プレベトキシンと電位依存性ナトリウムチャネルの相互作用の定量的解析」
・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
87. 志田 健、佐々木 誠、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「プリムネシン CDE/FG 環部モデルの合成研究」
・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
88. 塚野千尋、佐々木 誠、橘 和夫 (東大院理、東北大院生命科学)
「細胞毒性ポリエーテル ギムノシン-A の全合成研究」
・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
89. 開沼紀子、不破春彦、橘 和夫 (東大院理)、佐竹真幸、佐々木 誠 (東北大院生命科学)
「ガンビエロール構造類縁体の合成と構造活性相関」
・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
90. 蓮台俊宏、松岡 茂、松森 信明、村田道雄 (阪大院理)
「渦鞭毛藻由来天然物アンフィジノール類の脂質二重膜中における会合体構造の NMR 解析」

- ・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
- 91. 矢里仁資、佐々木 智子、村田道雄、大石 徹 (阪大院理)
 - 「複反応点ワンポット合成法による梯子状ポリエーテル化合物の合成研究」
 - ・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
- 92. 池内宏貴、松森信明、植野嘉之、松岡 茂、村田道雄 (阪大院理)
 - 「固体 NMR 測定を目指した同位体標識アンフォテリシン B の生合成的調製」
 - ・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
- 93. 植野嘉之、大石 徹、池内宏貴、松森信明、村田道雄 (阪大院理)
 - 「アンフォテリシン B のイオンチャネル活性に対するフッ化ステロールの効果」
 - ・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
- 94. 土川博史、大石 徹 (阪大院理)、吉田 学、森澤正昭 (東大院理臨海実験所)
 - 「ユウレイボヤ精子活性化誘引物質 (SAAF) の全合成」
 - ・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
- 95. 相根岳志、出村哲夫、丸吉京介、松森信明、村田道雄 (阪大院理)
 - 「同位体標識によるスペルミジン-ATP 複合体の立体配座解析 (2) -固体 NMR-」
 - ・日本化学会第 83 春季年会 (東京、2003.3.20)
- 96. M. Sasaki (東北大院生命科学)
 - 「Total Synthesis of Gambierol」
 - ・Japan-U.S. Seminar on Bioorganic Marine Chemistry (Awaji, Japan, 2003.6.25)
- 97. K. Tachibana (東大院理)
 - 「Synthesis and Molecular Recognition of Polycyclic Etherall Marine Toxins」
 - ・Japan-U.S. Seminar on Bioorganic Marine Chemistry (Awaji, Japan, 2003.6.26)
- 98. M. Sasaki (東北大院生命科学)
 - 「Total Synthesis of Polycyclic Ethers based on *B*-Alkyl Suzuki-Miyaura Coupling」
 - ・2nd Japanese-Sino Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists (Shima-gun, Japan, 2003.9.24)
- 99. 小野寺健一、中村英士、大場裕一、小鹿 一、Feng Jueb、大泉康 (名大院生命農、東北大院薬)
 - 「海洋渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. より得られた新規ポリオール化合物 Zootoxanthellamide 類」
 - ・第 45 回天然有機化合物討論会 (京都、2003.10.7)
- 100. 塚野千尋、佐々木 誠 (東北大院生命)
 - 「細胞毒性ポリ環状エーテル、ギムノシン A の全合成研究」
 - ・第 84 回有機合成シンポジウム (東京、2003.11.18)
- 101. M. Sasaki (東北大院生命科学)

「Total Synthesis of Polycyclic Ethers Based on B-Alkyl Suzuki-Miyaura Coupling」
・ 1st International COE Symposium “Giant Polyether Natural Products-Isolation and Synthesis-”
(仙台、2003.11.26)

ポスター発表 (国内 1件、海外 0件)

1. 佐々木啓孝 福沢世傑 橘 和夫 (東大院理)

「DSCを用いたバイセル溶液の観測」

・ 日本生物物理学会第41回年会 (新潟、2003.9.23)

(3)特許出願 (国内 6件、海外 1件)

国内

1. 佐々木 誠、橘 和夫、不破春彦

「新規な環状ポリエーテル化合物の合成法」 科学技術振興事業団 (2000.1.20)

2. 中村英士

「受容体認識部位が保存された生理活性物質の非活性化誘導体及びその使用方法」科学技術振興事業団 (2000.3.10)

3. 佐々木 誠、不破春彦、橘 和夫

「環状ポリエーテル化合物の製造方法」 科学技術振興事業団 (2000.6.16)

4. 村田道雄、松森信明

「ポリエンマクロライド系抗生物質の多量体」 科学技術振興事業団 (2000.8.24)

5. 此木敬一、杉山直幸、橘 和夫

「オカダ酸に結合する新規タンパク質およびその遺伝子」 科学技術振興事業団 (2000.9.28)

6. 佐々木 誠・不破春彦・橘 和夫

「ガンビエロールの製造方法」 科学技術振興事業団 (2002.7.12)

海外

1. 佐々木 誠、不破春彦、橘 和夫

「Method for Producing Cyclic Polyether Compounds」 科学技術振興事業団 (2002.2.19)

(4)新聞報道等

新聞報道

「海産ポリエーテル毒ガンビエロールの完全化学合成」

日経産業新聞 2002年(平成14年)7月19日

日本工業新聞 2002年（平成14年）7月18日

日刊工業新聞 2002年（平成14年）7月18日

化学工業日報 2002年（平成14年）7月18日

7. 結び

CREST 事業に採択された時点で設定した「研究終了時に得られると期待された研究成果」の大半は終了時点で達成されていない。この事実を省みて原因を考察すると以下の2点が挙げられる。

シガトキシンの全合成に関しては、本研究者らまたは他所によりすでに成功例があるものを用いる合成スキームを設定した箇所で、鍵段階として想定した部分以外での困難が結果的には大きな障害となった。同様のサイズの天然物全合成における先達の例を見ればこれは当然予見すべきことであったのも事実である。中間評価時に本事業のポストドク制度等が十分生かされていないとの指摘を受けたが、天然物合成に関しては従事希望の大学院生が多かったこともあり、研究のアクティビティー自体は想定していた規模で進めて来られたと思っている。シガトキシンの合成はすでに東北大学で達成されていることもあり、今後は達成後の構造多様化を考慮したルートを意識して進めている。すでに達成したガンビエロールとギムノシン-A の合成実績を踏まえて、膜タンパク質との複合体形成に関する研究部分にて得られる知見をもとに設計された同位体標識物を含むポリエーテルを自由自在に合成することが目標となる。

もう一つの原因としては、本事業のお陰で着手には至ったものの、膜タンパク質の関わる分子認識を始めとして研究室としては確立していない方法論に挑む場合、研究者が変わると結果の再現性が得られず論文発表になかなか至らないなどの問題が多々生じることを身にしみて感じた。特に学生の入れ替わりの激しい大学研究室では既報の追試の域をなかなか出られない場合が多い。これに加えて本研究室所属の教官の交代により（これに関しても当初から予見すべきであった点である）、研究室としての新規テーマの継続性を維持することが困難であった。この点で時間的な見通しが甘かったという反省はあるが、予定しているシガトキシン全合成の達成がなされた暁に研究を一挙に進展させるための準備は、他機関での成果も含めて着実に進んできたと思う。従って合成以外の分野に関しては他機関を含めた各研究室の研究体制において確立しつつあり、上記の問題点の多くがすでに排除されるに至った結果、今後の研究進展は大幅に加速されると思っている。

これに加えてポリエーテル群の膜タンパク質への特異的あるいは非特異的親和性を調べる手段として放射性同位体を用いることで実験の制約を受ける現法に加え、基板に低分子を固定して表面プラズモン共鳴を適用する方法、同じく基板に調製した膜タンパク質

再構成系をプローブ顕微鏡で解析する方法、さらに再構成リポソーム存在下でのキャピラリー電気泳動による蛍光標識低分子の泳動度の変化による方法の開発、検証を開始しており、ポリ環状エーテル多成分集積体の迅速なデータ取得を可能とする予定である。

本研究の目標は全合成で供給されるシガトキシンを用いた構造解析であり、このため前項に記した一連の手法により得られる情報に基づきポリエーテル認識部位ペプチドモデルをデザイン、合成し、固体NMRに使用するための同位体標識を可能とするまでを達成したい。

さらに得られる情報と確立した有機合成法を用いて膜貫通ペプチドとポリエーテルの双方に関して構造デザインでのチューニングを進めることで、複合体形成機構の一般的機構解明を行なうことが現時点での長期的目標である。