

# 超天然物の反応制御と分子設計

平 間 正 博

東北大学大学院理学研究科 教授

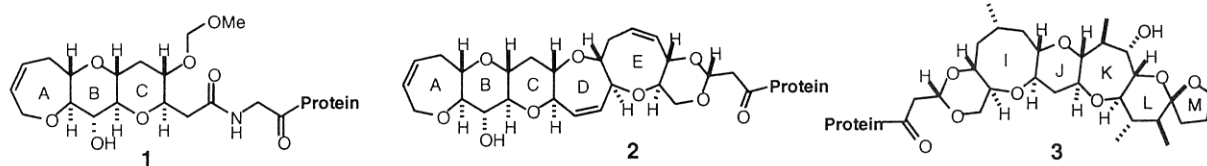
本研究は、ピラジカルを発生して DNA を切断するエンジン系低分子とそれを安定化して運ぶ蛋白質複合型抗癌抗生物質や、イオンチャネル蛋白質に結合して猛烈な神経毒性を発揮するポリエーテル系天然物の蛋白質複合体の立体構造と機能発現原理を明らかにし、また、天然物の機能を超越する分子を化学合成する新しい方法論の開拓を目的としている。今年度の第一の成果は、シガトキシン CTX3C の全合成法を開発したことである。これは、サイエンス誌、*Science*, 294, 1904 (2001) に発表した。効率的な収束的合成法の確立によって、合成シガトキシン類を駆使した、毒魚検定法 (抗体) 開発や神経科学研究への展開が可能になった。国内の各新聞はもとより、米国化学会 *Chemical & Engineering News*、英国医学誌 *The Lancet*、Reuters 等によっても報道された。今後も、有機化学がいかにか我々の生活や他の科学に影響を与える基盤科学であるかを証明して、CREST 研究を大きく発展させて行きたい。

## 1. 合成ハプテンによる抗シガトキシン抗体の調製

(東北大院理) ○大栗博毅・上原久俊・南雲陽子・丸山潤美・新藤由美・平間正博

(生物分子工研) 円谷 健・藤井郁雄、(東北大医療) 富岡佳久・水柿道直

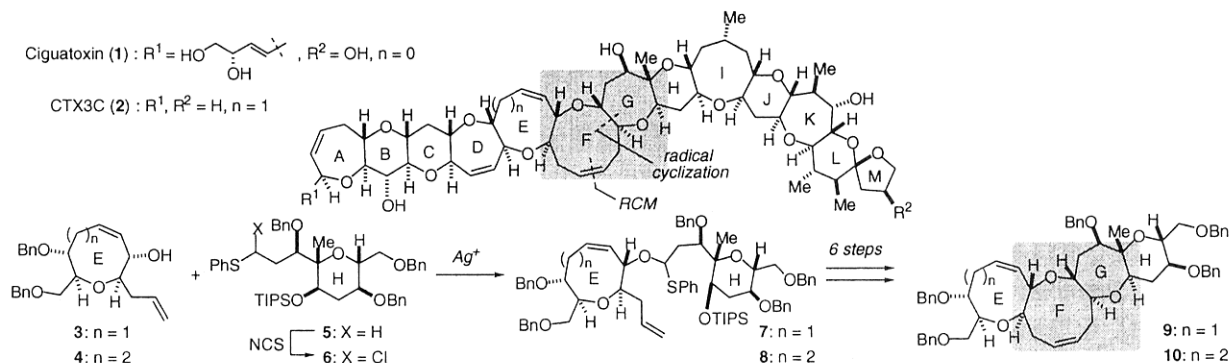
シガトキシン類の全長が約 30 Å あることに着目し、分子左端および右端をサンドイッチ式にそれぞれ抗体で捕捉できれば、簡便で確実なシガテラ毒検定法を確立できると考えた。3-5 環性のハプテンを合成し、コンジュゲート 1-3 を作製した。3 を免疫した場合、CTX3C に強く結合するモノクローナル抗体 3D11 (Kd = 122 nM) の調製に成功した。構造の類似したポリエーテル海産毒との交差活性は弱く、この抗体は CTX3C に特異的に結合することがわかった。



## 2. シガトキシン類の効率的全合成のためのエーテル環連結法の開発

(東北大院理) ○井上将行、王 光星、王 謹、上原久俊、平間正博

当研究室では A-E 環部と H-M 環部の連結、続く FG 環部の構築により CTX3C(2) の全合成に成功した。このエーテル連結法のさらなる一般化・効率化を図る目的で、Ag<sup>+</sup>によるクロロスルフィド 6 の活性化を経る O,S-アセタール(7,8)の構築法を開発し、EFGH 環部(9,10)を短段階で合成した。



## 3. シガトキシン合成アナログの Na チャネル結合能と抗体調製アプローチ

(東北大院農) 佐竹 真幸

【目的】熱帯亜熱帯のサンゴ礁域で多発する魚類食中毒シガテラの原因毒シガトキシン(CTX)は、

電位依存性 Na チャネルの分極を阻害し、細胞内への Na イオン流入を増大させる。CTX の作用発現機構解明を目指して、CTX 合成アナログの Na チャネル結合能をトリチウムプレベトキシシンを用いた競合的 Na チャネル結合試験を行って評価した。

【実験】 平間グループにより合成されたシガトキシシンの A-E 環、E-H 環、I-M 環モデル化合物と A-E 環と I-M 環モデルをエチレングリコールリンカーで接続した 4 種類の化合物を用いた。それぞれの化合物について、PbTx-3 との競合的 Na チャネル結合試験を行った。

【結果・考察】 試験した 4 種類の合成アナログのうち、分子両末端をリンカーで接続した化合物に結合阻害活性が検出された。結合阻害活性は、100  $\mu$ M で約 20% であった。4~6 環性のモデル化合物では、Na チャネル結合活性が検出されなかったことから、CTX 類の活性発現に分子の長さが関与している可能性が示された。

#### 4. C1027 およびクロモフォアモデル化合物で生成する常磁性種の ESR

(東北大多元研) 秋山公男

放線菌の二次代謝生成物である C1027 は、アポ蛋白とエンジイン構造を持つ Chromophore との 1 : 1 複合体である。この複合体の Echo 検出の EPR スペクトルを観測すると、精製直後は、緩和時間の長い ( $T_1 = \sim 10 \mu$ s) シャープな信号 ( $g = 2.0051$ ) を与えるが、保存時間の経過とともに、この信号は弱くなる。精製直後に主成分として観測される  $g$  値の大きい種の帰属を行うために、2 次元 ESEEM (HYSCOR) スペクトルを観測した。スペクトルの解析から少なくとも 2 種の環境の異なる窒素核が弱く相互作用していること示された。この核の NQR 周波数は Glycine および Proline の既報値に相当する値であり、シャープな信号を与えるラジカル種の近傍にこれらのアミノ酸が存在していることを強く示唆している。また、Chromophore モデル化合物では、分子内環化反応が進行する過程で観測される EPR 信号の温度変化を観測した。温度を上昇させると相対的に強度を増す種と比較的に系中に存在するラジカル種が存在していることが判った。 $^{13}\text{C}$  置換した種の EPR では  $^{13}\text{C}$  の Hfs によるスペクトルの広がり観測され、この結果を基に、常磁性種の帰属を確定した。

#### 5. 抗腫瘍性抗生物質 C-1027 における分子認識の解明

(筑波大応用生物化学系) 田中俊之

C-1027 は、DNA 切断活性を示す非常に不安定なクロモフォアと、これを特異的に結合して安定化するアポタンパクから構成されている。アポタンパクが、単独では不安定なクロモフォアを、どのように結合し安定化するかという問題は、蛋白質による低分子認識と運搬の観点から非常に興味深い。我々は既に、C-1027 アポタンパクと芳香環化クロモフォアから成る複合体の三次元 NMR 構造を決定し、クロモフォア結合ポケット中心部における疎水性相互作用と辺縁部における静電的相互作用が、アポタンパクによるクロモフォアの特異的認識を決めていることを明らかにした。今回、クロモフォア結合ポケットのアミノ酸残基を変えた変異アポタンパクを作成し、それらの芳香環化クロモフォア結合能力を NMR とカロリメトリーを用いて測定し、各アミノ酸残基のクロモフォア結合に対する貢献度を調べたので、その結果を報告する。

#### 6. 大腸菌生産用ネオカルチノスタチンアポ蛋白質遺伝子の単離と改変

(東北大医附属病院) 富岡佳久、水柿道直

ネオカルチノスタチン (NCS) の Apo-NCS は、不安定化学種の NCS-*chr* の安定化に寄与している。そこでクロモホア安定化能や標的選択性などに優れる超天然体 apo-NCS を創生する目的で、放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* F-41 で産生される apo-NCS を大腸菌で生産するための遺伝子 (*encsA*) をファージディスプレイ法を利用して単離した。単離した *encsA* 遺伝子が大腸菌発現ベクター pRSET A に挿入し、安定してリコンビナント apo-NCS を得られるようになった。疑似クロモホアにエチジウムプロマイドを用いた蛍光偏光度測定法並びに総蛍光度測定法によって、リコンビナント apo-NCS の疑似クロモホアとの相互作用を簡便に評価する簡易評価系を確立した。本評価系をアミノ酸置換した apo-NCS ミュータントに適用し、その有用性を明らかにした。