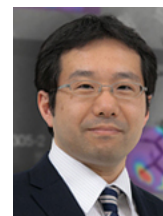


田中生体機能合成化学研究室
Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory



准主任研究員 田中 克典 (博士(理学))
TANAKA, Katsunori (Ph.D.)

キーセンテンス：

1. イミンの隠された反応性の開拓と新奇翻訳後修飾の解明
2. 非侵襲的「合成化学医療」の実現：血中内や特定臓器上での反応・試薬開発と生理活性物質合成
3. 鋳型誘起合成とフロー法を用いた生体内機能性分子の創製と標的指向型天然物合成

キーワード：

共役イミン、翻訳後修飾、非侵襲的動物内合成、合成化学医療、生理活性天然物合成、生体内鋳型誘起合成、マイクロフロー合成

研究目的

有機合成化学の分野では、様々な効率的な結合形成反応が開発されているが、これを生体内や細胞内での標識、あるいは機能性分子の複合化のために積極的に利用する試みは非常に限られている。我々は、生体内アミンに由来するイミン誘導体の「見過ごされてきた新奇な反応性」を、実際に生体内で起こっている反応やその反応産物の構造をヒントにして、有機合成化学的に再開拓している。さらにこのイミンの新奇な反応を逆に有効に利用して、細胞内や生きている動物内で目的とする生体分子の標識化を行ったり、天然物などの真に重要な生理活性分子を効率的に全合成することを目的としている。平成24年度では、特に以下に示すテーマを中心に研究を進め、新奇なイミンの反応性の発見に基づく効率的な有機合成や、これまでに見過ごされてきた重要な生物活性に関する興味深い知見を得た。

1. 『生体内のアミノアルコールやジアミンから得られる共役イミンの新奇反応性開拓とジアミン誘導体の不斉合成』（田中，プラディプタ）

生体内に存在するある種のアミノアルコールやジアミンから得られる共役イミンが、速やかに[4+2]や[4+4]環化反応を起こすことを発見した。計算化学を用いて、この原因を詳細に調べたところ、隣接位にある水酸基やアミノ基が反応促進に大きく関わっていることを見出した。我々はこの反応を利用して、これまでに合成することが非常に困難であった光学活性ジアミン化合物をほぼワンステップで高立体選択的に、しかも試薬を混ぜ合わせるだけで簡便に合成することに成功した。このように、これまでに不安定であったためにほとんど調べられていなかった *N*-アルキル共役イミンが、実は様々な反応を起こしていることを突き止めるとともに、[4+2]や[4+4]環化反応を介することで、有機合成化学的に利用可能な反応剤として進化させることができた。本研究は大阪大学大学院理学研究科と共同で実施した。

2. 『ポリアミンから得られる共役イミンの新奇反応性とその生体制御機構の解明、およびポリアミン生体反応に学ぶ生体寛容性スマート材料の創製』（田中，筒井）

上記1で述べたように、共役イミンが様々な反応を起こすことを突き止めるとともに、これらの「見過ごされていた共役イミンの反応性」が、実は生体機能を高度に操っていることも見出した。すなわち、ポリアミンから得られる共役イミンが、生体内での様々な条件に従って多種多様な新奇反応を示し、ダイナミックにその構造を変化させていることを発見した。生体内の分子の濃度勾配や酵素活性によって、イミンの反応性が高度に制御されている。さらに、我々が見出した新奇なポリアミンの反応性は、細胞の酸化ストレスや細胞の増殖、あるいは転写活性の制御に顕著に携っている証拠を掴んだ。標識体や細胞丸ごとのNMR、あるいは様々な分子生物学的な手法を用いて、我々が発見した「共役イミン反応に基づく生体制御のしくみ」に対して分子レベルでの解析をさらに進めている。

一方、共役イミン反応が生体内でダイナミックに構造を変化させることを逆に効果的に利用して、生体内で利用できる「スマートヒドロゲル」の開発に取り組んだ。マイクロ流路での共役イミン反応を行うことにより、マイクロ/ナノゲルを合成し、新規な生体寛容性材料を基盤とする細胞接着材料やドラッグデリバリーシステム（DDS）、あるいはトランスフェクタント材料を創製しうる可能性を見出した。本研究

は、京都大学大学院薬学研究科、早稲田大学先進理工学部、POSTECH（韓国）と共同で実施した。

3. 『脂質代謝物によるタンパク質翻訳後修飾に学ぶ生理活性天然物合成、および生体内の特定タンパク質上での超生理活性天然物の全ワンポット合成』（田中、岩田（研修生））

タンパク質の構成アミノ酸中でも、アルギニンの翻訳後修飾について、その反応性が有機合成化学的に検討されたことはほとんどない。我々は、多くの報告例はないものの、アルギニン残基が脂質代謝物により翻訳後修飾を受けることに注目し、アルギニン由来イミンの新しい反応性を追求した。その結果、ほとんど例のないイミダゾール複素環のライブラリー合成に成功するとともに、この方法を利用して、Ageladine を代表とする複雑かつ真に有用な生理活性アルカロイド天然物を、簡単な原料から複数の行程を全て1ポットで全合成することに成功した。さらに、この全1ポット合成により、関連する様々な生理活性アルカロイド天然物のライブラリー型ワンポット合成を可能とし、天然物を凌駕して医薬品に利用できる超天然物類縁体の探索戦略への道を築いた。また、このように有機合成化学的に開発した全1ポット合成を利用して、細胞内での反応性が低い（従ってバイオオルソゴナルな）アルギニン残基の選択的な標識化や、生きている動物内の特定タンパク質上での生理活性天然物合成の基礎を築いた。本研究は大阪大学大学院理学研究科と共同で実施した。

4. 『共役イミンの6 π -アザ電子環状反応による革新的PET（陽電子断層撮影）イメージング、および生体分子複合法の開発』（田中）

これまでに我々は、海産天然物による酵素阻害機構に学んだ共役イミンの速やかな6 π -アザ電子環状反応を活用して、様々な生体分子や細胞表面のアミノ基を効率的に標識し、PETを代表とする侵襲的（動物を生きたまま）イメージングを実現してきた。さらに第二世代の方法論として、6 π -アザ電子環状反応をさらに進化させ、不安定または極少量のサンプルを含め、様々な生体分子に適応可能な汎用的PETイメージング法を検討した。その結果、細胞や生体分子の標識とPETイメージングの効率性を飛躍的に向上させ、さまざまな疾患の診断や生物製剤の開発に大きく貢献する反応開発を実現した。

一方、同反応を活用して、アミノ基同士を接着させる方法論を新たに開発し、細胞表面やタンパク質上に機能成分を効率良く導入することにも成功した。また、細胞表層の特定の分子に反応した際にのみに光る効率的プローブも開発した。本研究は、理研分子イメージングセンター、理研基幹研システム糖鎖生物学研究グループ、理研基幹研袖岡有機合成化学研究室、東京医科歯科大学生体材料工学研究所、大阪大学大学院理学研究科、および医学研究科と共同で実施した。

----- Key Sentence :

1. Exploring Unrevealed Reactivity of Imines and Post-Translational Modification
2. Establishment of Noninvasive Synthetic Surgery: Multi-step Synthesis in Living Animal
3. Synthesis of Biofunctional Molecules by In Vivo Templated and Microfluidic Approach

Key Word :

Conjugated imine, Post-translational modification, Noninvasive organic synthesis in live animals, Synthetic surgery, Bioactive natural products synthesis, In vivo Templated synthesis, Microfluidic synthesis

Purpose of Research :

Although many efficient bond-forming reactions have been developed in the synthetic organic chemistry field, they are rarely applied to the labeling or the conjugation methods in/on the live cells or in live animals. We are synthetically exploring the overlooked and therefore unique reactivity of the imines, which are readily derived from the various amines in biosystem, hinted by the true bioactive structures of the biomacromolecules in vivo system. The new reactivity of imines could then be used to challenge the labeling of the target biomolecules and even the multi-step synthesis of the truly important biofunctional molecules, such as the bioactive natural products, directly in living animals. In 2013, we have realized the efficient synthetic transformations and revealed the important biological functions that had been overlooked, based on the discovery of the new reactivity of conjugated imines

as listed in the following examples.

1. Exploring new reactivity of conjugated imines from aminoalcohols and diamines: application to asymmetric synthesis of chiral diamines (Tanaka, Pradipta)

We have found that the conjugated imines, derived from the natural aminoalcohols and diamines could participate in the smooth [4+2]- and [4+4]-cycloadditions. Theoretical analysis showed that the neighboring hydroxy or amino groups of the conjugated imines significantly contribute to the acceleration of the cycloadditions. These reactions were applied to the stereoselectively synthesis of the chiral diamine derivatives, nearly in one-pot procedure simply by mixing the starting reagents. We have thus unveiled that so-far unexplored *N*-alkyl conjugated imines, due to their instability, could actually involve in the various organic transformations. Namely, we have established these imines as the promising reactants for efficient synthetic transformations through the [4+2]- and [4+4]-cycloaddition reactions. This work was performed in collaboration with Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University.

2. New reactivity of conjugated imines from polyamines: Elucidation of their biological functions and application to biocompatible smart materials (Tanaka, Tsutsui)

In addition to elucidating the new reactivity of the conjugated imines, we have discovered that these unexplored reactivity could regulate the biofunctions. For examples, the conjugated imines derived from the polyamines could participate in the various organic transformations and provide the unique products, of which constituents could dynamically depend on the conditions in certain biological systems; the reactivity and product structures are precisely controlled by the concentration and/or the enzymatic activity nearby polyamines. Such imine reactivity might then regulate the oxidative stress, cell division, or the transcriptional activity. We are continuously investigating the regulation mechanisms caused by the reactivity of the polyamine-derived imines, based on the NMR of the labeled compounds and the various molecular biology techniques.

We also challenged to prepare the biocompatible smart hydrogel, by much making use of the unique properties of the product structures obtained by the polyamine-derived imino-reaction, which could dynamically be changed in response to the certain biological conditions. By applying the imino-reaction under the microfluidic conditions, the micro/nano-gel were prepared which could be utilized as the new materials for cell adhesion, DDS (Drug Delivery System), as well as for the transfectants of the anionic molecules. This work was performed in collaboration with Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Faculty of Science and Technology, Waseda University, and POSTECH (Korea).

3. Synthesis of bioactive natural products learning from post-translational modification of arginine by lipid metabolites: one-pot natural products synthesis on target proteins in live animals (Tanaka, Iwata (student trainee))

There are very few reports for investigating the arginine reactivity as the post-translational modification of the proteins. We explored the new reactivity of the conjugated imines derived from the guanidine, based on the rather rare arginine post-translational modification by lipid metabolites. We have succeeded in the first library synthesis of the 2-aminoimidazole derivatives, and the method was successfully applied to the one-pot synthesis of the alkaloid natural product, i.e., ageladine as the very promising anti-angiogenic MMP inhibitor (Matrixmetalloproteinase), through the multiple transformation starting from the simple materials. Such one-pot synthesis could allow us to prepare the various library of the related natural products which could lead to the promising pharmaceutical candidates, to be much more potent than the parent compound. The one-pot synthesis could also establish the basis on (i) the selective labeling of the less-reactive arginine residue (therefore bioorthogonal) in/on the live cells or (ii) the synthesis of the bioactive natural products on the target proteins in live animals. This work was performed in collaboration with Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University.

4. Innovative PET (Positron Emission Tomography) imaging and bioconjugation based on

6 π -azaelectrocyclization (Tanaka)

We have so far established the efficient labeling of the amino groups of the biomolecules and on the live cell surface, and achieved the noninvasive imaging such as PET, by using the rapid 6 π -azaelectrocyclization of the conjugated imines, that was developed through our previous investigation of the enzyme inhibitory mechanism by the marine natural products. We this year improved the method, that is readily applicable to variety of the biomolecules- and the whole live-cell based PET. The improved method could efficiently and generally be used for future diagnosis and/or protein-based drug discovery.

The efficient bioconjugation method was also developed using the same azaelectrocyclization. Newly developed dialdehyde probes could link the two amino groups of the biomolecules; thus the bifunctional molecules, such as peptides or the glycopeptides, were efficiently introduced on the proteins and on the live cell surfaces. The innovative labeling probes, which could only be fluorescent when reacted with the target molecules on the live cell surface, could also be developed. These works were performed in collaboration with RIKEN CMIS, RIKEN ASI, Systems Glycobiology Research Group, RIKEN ASI, Synthetic Organic Chemistry Laboratory, Institute of Biomaterials and Bioengineerings, Tokyo Medical and Dental University, Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, and Department of Molecular Biology and Biochemistry, Graduate School of Medicine/Faculty of Medicine, Osaka University.

Principal Investigator

田中 克典 Katsunori Tanaka

Research Staff

Ambara Rachmat Pradipta

筒井 歩 Ayumi Tsutsui

Students

岩田 隆幸 Takayuki Iwata

坂口 拓 Taku Sakaguchi