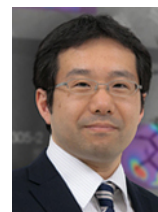


田中生体機能合成化学研究室  
Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory



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. 共役イミンの隠された反応性の開拓と生体分子の新奇修飾、およびその機能の解明
2. 「生体内合成化学治療」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. 分子イメージングによる糖鎖パターン認識の解明と分子ターゲティング

キーワード：

共役イミン、生体分子修飾、合成化学治療、生理活性天然物合成、分子イメージング、糖鎖認識、生体内ターゲティング

研究目的

有機合成化学の分野では、様々な効率的結合形成反応が開発されていますが、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ます。私達は、生体内アミンに由来する共役イミン誘導体の「見過ごされてきた新奇な反応性」を、生体内アミンが関与する真の生物活性構造をヒントにして、有機合成化学的に再開拓しています。また、これらの反応が生体内で実際に進行していることを証明し、その反応性が持つ「生物学的意義」を解明します。さらにこれら新奇反応を逆に利用して、生きている動物内での生理活性分子の多段階合成にチャレンジしています。例えば、私達が「生体内合成化学治療」と呼ぶ方法で、血中内や標的臓器上での反応や試薬開発を行い、ある時間枠にピンポイントで生理活性天然物を直接動物内で合成して治療の実現を目指しています。このために、糖鎖分子が生体内で行っている複雑な「パターン認識機構」を分子イメージング法により初めて解析するとともに、これを生きている動物内の目的部位に対して、様々な生体分子を自由自在にターゲティングするために積極的に活用しています。平成26年度までに以下の成果を得ています。

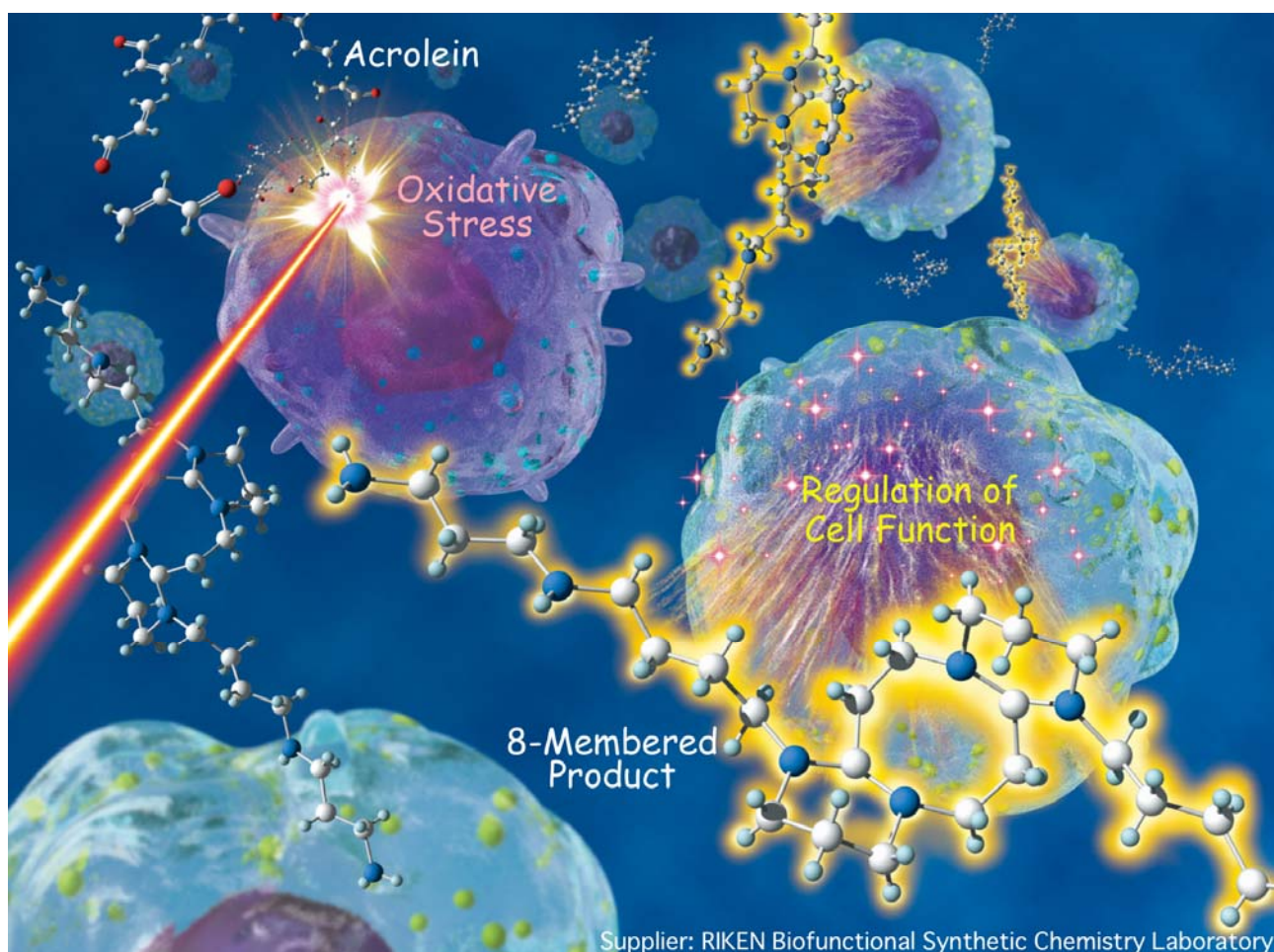
（1）『生体内のアミノアルコールやジアミンから得られる共役イミンの新奇反応性開拓とジアミン誘導体の不斉合成』（プラディプタ、田中）

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]、さらに[4+2+2]環化反応を起こすことを発見しました。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ました。私達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ました。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、見出した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ました。さらにこれらの生成物を有機合成反応における新しい触媒として利用する試みも始めています。本研究は、ロシアカザン大学アレクサンドルブトラーフ研究所、長崎大学環境科学科と共同で実施しています。

（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』（筒井、高松、プラディプタ、田中）

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、実は生体内での酸化ストレス過程や機能発現に関与していることを見出しています。すなわち、ポリアミンと、ポリアミンから酸化酵素によって生じる毒性物質アクロレインが速やかに反応し、中間に生じる共役イミンが[4+4]環化反応を起こします。通常は、生成する8員環化合物（1,5-ジアザシクロオクタン）はアクロレインの毒性を中和しますが、酸化ストレス過程では[4+4]反応が過剰に進行し、8員環化合物のヒドロゲルが生じ、これが酸化ストレスをさらに亢進させると考えています。このように、酸化ストレスにおける新しい機構を提唱するとともに、ポリアミンは酸化酵素に

よって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ました。私達が見出した新奇なポリアミンの反応性は、細胞の増殖や転写活性の制御、さらにはアミロイドの蓄積制御に携っている証拠も掴んでいます。さらに現在、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、私達が発見した「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ます。本研究は、グローバル研究クラスタ・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、理研前田バイオ工学研究室、理研吉田化学遺伝学研究室、京都大学大学院薬学研究科、早稲田大学先進理工学部と共同で実施しています。



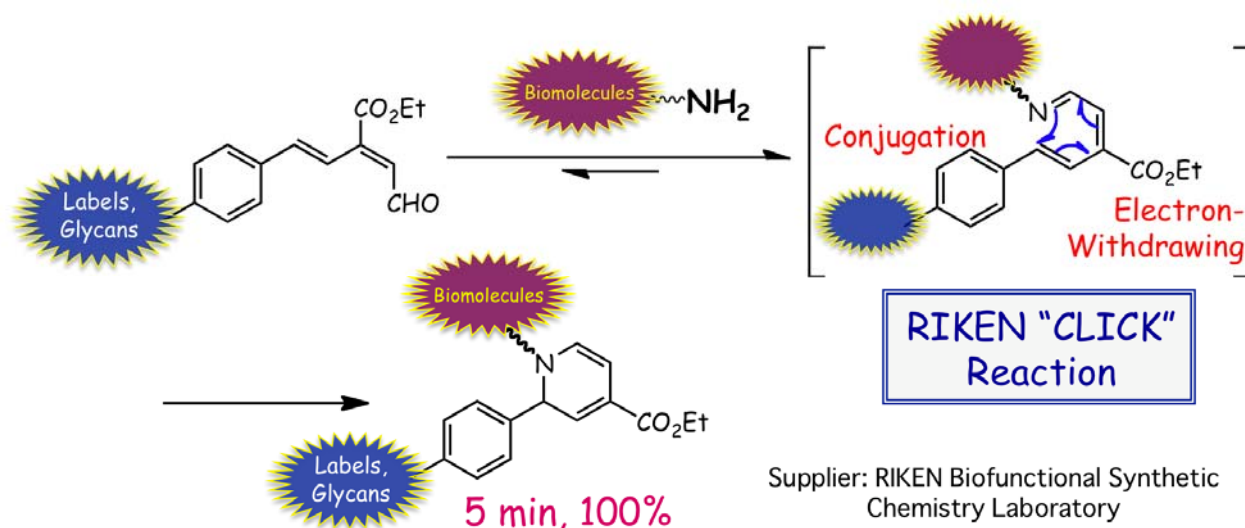
(3) 『脂質代謝物によるタンパク質翻訳後修飾に学ぶ生理活性天然物合成、および生体内の特定タンパク質上での超生理活性天然物の全ワンポット合成研究』（岩田、坪倉、田中）

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ありません。私達は、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ました。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 A 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ました。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きました。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きました。さらにこの研究過程において、シアナミドとルイス酸を用いた水中での効率的なアミノ基のグアニジン化法

を開発しました。本研究は早稲田大学先進理工学部、および大阪大学大学院理学研究科と共同で実施しています。

#### (4) 『共役イミンの 6π-アザ電子環状反応による生体高分子や生細胞の革新的 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』 (小椋、田中)

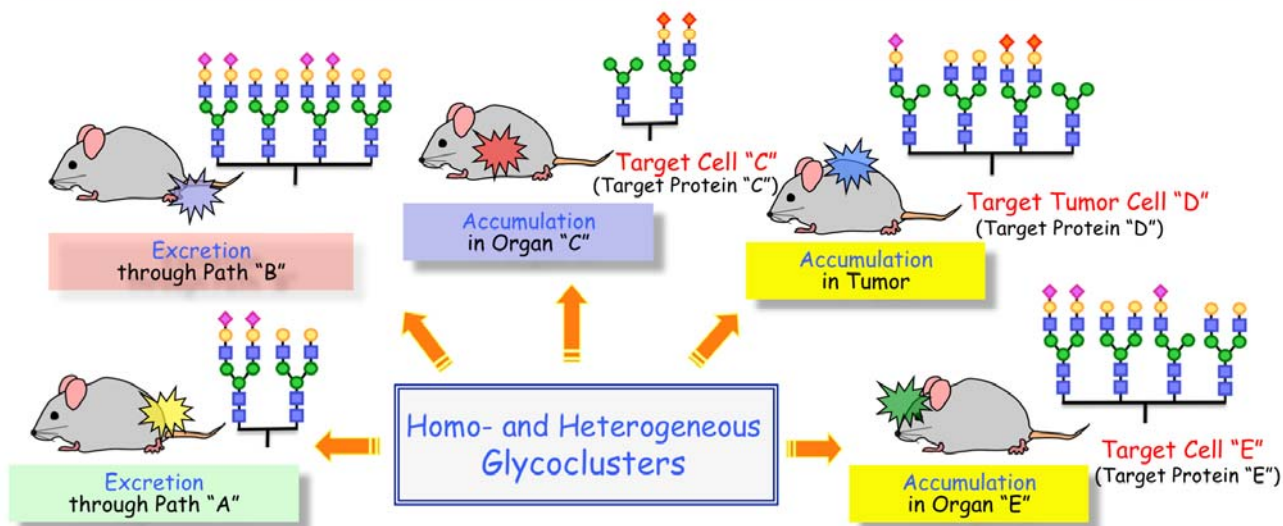
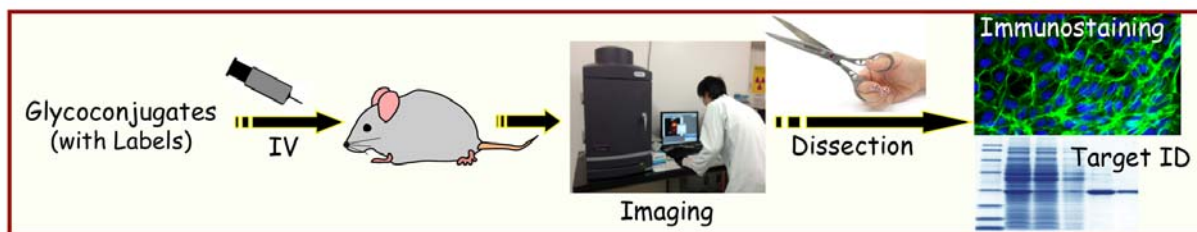
これまでに私達は、海産天然物による酵素阻害機構に学んだ共役イミンの速やかな 6π-アザ電子環状反応を活用して、様々な生体分子や細胞表面のアミノ基を効率的に標識し、PET を代表とする侵襲的 (動物を生きたまま) イメージングを実現してきました。さらに第二世代の方法論として、6π-アザ電子環状反応を歪み解消のクリック反応と併用することでさらに進化させ、不安定または極少量のサンプルを含め、様々な生体高分子や生細胞にも適応可能な金属ポジトロン放出核種/配位子標識と、汎用的な PET イメージング法を検討しました。その結果、PET 標識とイメージングの効率性を飛躍的に向上させ、さまざまな疾患の診断や生物製剤の開発に大きく貢献するプロトコルを実現しました。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ました。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、グローバル研究クラスター・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、ロシアカザン大学アレクサンドルブトレルフ研究所、理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、理研統合生命医科学研究センターと共同で実施しています。



#### (5) 『診断と治療を改革する糖鎖複合体の開発』 (小椋、田中)

上記で開発した 6π-アザ電子環状反応を利用して、特殊な細胞や人工デンドリマー基盤に様々な糖鎖構造を導入し、その動態を分子イメージングにより検討しました。その結果、様々な糖鎖構造を使い分けることにより、生きている動物内での臓器や癌組織レベルでの集積や排出プロセスを制御できるだけでなく、さらに細胞レベルの集積までも制御できることが判明しました。さらにこの集積を NMR や計算化学を用いて分子レベルで解析しています。本研究は、上記4で述べた PET に加えて MRI による診断、さらには放射線治療も視野に入れて検討を行っており、診断と治療を改革する糖鎖複合体の開発に大きな期待が寄せられています。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、ロシアカザン大学アレクサンドルブトレルフ研究所、グローバル研究クラスター・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、仁科センター、統合生命医科学研究センター・統合生命医科学研究センターと共同で実施しています。



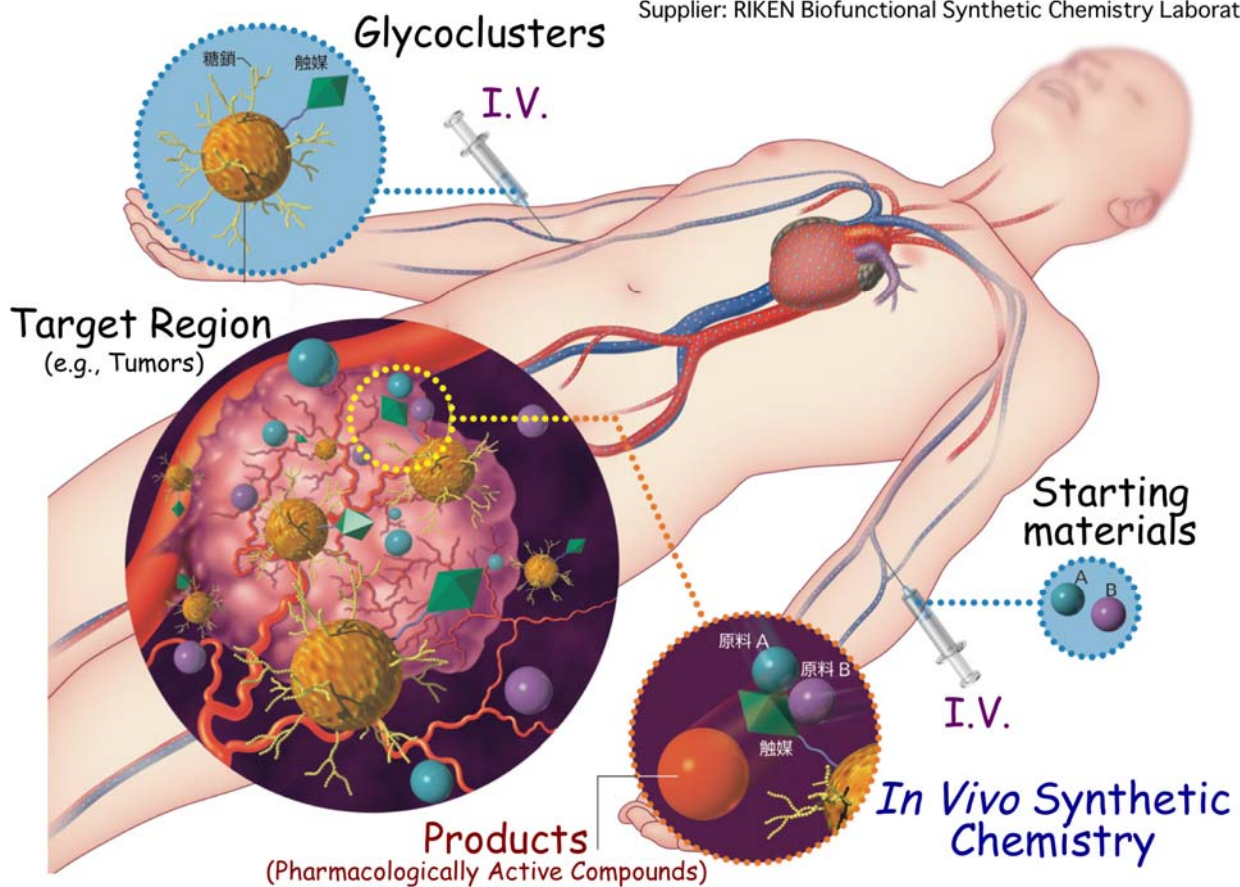


Supplier: RIKEN Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory

(6) 『糖鎖の弱い相互作用を効果的に利用した動物内での選択的分子ターゲティング』（泰地、田中）  
 糖鎖分子の相互作用は非常に弱いものです。これを著しく向上させ、実際に糖鎖が生体内で行っている認識を実現するために、私達の上記の研究例も含めて、通常はクラスター化して『多価効果』や『パターン認識』を発現させます。一方、これまでにない全く新しい概念として、私達はこの糖鎖の弱い相互作用を逆手に取り、動物内で高い認識を達成します。既に細胞レベルではこれを実現しており、随時成果を報告していきませんが、『タンパク質やペプチド分子の強い相互作用』、『糖鎖分子の弱い相互作用』、そして『官能基選択的な結合形成反応』の3者を生体内で同時に働かせることにより、これを可能としました。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、グローバル研究クラスター・理研-マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループと共同で実施しています。

(7) 『生きている動物内で生理活性分子を全合成する：『生体内合成化学治療』の実現』（坪倉、高松、プラディプタ、ヴォン、田中）  
 以上述べてきた全ての知見を総合して、研究室の大きな目標の1つである『生体内合成化学治療』に挑んでいます。生きている動物内での糖鎖パターン認識を有効に活用して、動物内の標的臓器上で、ある時間枠にピンポイントで生理活性天然物を直接合成して治療の実現を目指しています。この戦略により、薬剤の副作用やペプチド薬剤の安定性を根本から解決します。既に、細胞表面や動物内で効率的な有機合成化学反応を実現しつつあり、近く研究成果を報告いたします。有機合成化学者が初めて、『生きている細胞や動物内での多段階有機合成』を実現します。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、グローバル研究クラスター・理研-マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、バーゼル大学化学科（スイス）と共同で実施しています。

Supplier: RIKEN Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory



(8) 『ごく普通の官能基が示す、細胞内や動物内での「思いもよらない」反応性：生理活性分子検出とその生体内制御の新展開』 (ヴォン、プラディプタ、泰地、サイジトバタロバ、田中)

さらに、これらの研究過程において、ごく普通の官能基が実は多種多様な反応を示すことを幾つか発見しており (固定観念により隠されて見抜けなかった反応性)、このセレンディピティーを細胞内や動物内での重要な生体物質の検出や、疾患などで過剰発現する生体活性物質の同定、さらには抗体に代わる高感度検出戦略や生体内での分子機能制御へと繋げています。『分子認識』とは全く異なる、『有機合成化学反応』を用いた生体検出と機能制御の新戦略の創出を目指しています。本研究は、理研ライフサイエンス技術基盤研究センター、グローバル研究クラスター・理研—マックスプランク連携研究センター・システム糖鎖生物学研究グループ、大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター、ロシアカザン大学アレクサンドルブトレールフ研究所と共同で実施しています。

-----  
**Key Sentence :**

1. Exploring the Overlooked Reactivity of Conjugated Imines and Functional Studies of Novel Modification of Biomolecules
2. Therapeutic *In Vivo* Synthetic Chemistry: Multi-step Synthesis in Live Animals
3. Molecular Imaging of Glycan Pattern Recognition: Application to Molecular Targeting

**Key Word :**

Conjugated imine, Modification of biomolecules, Therapeutic *in vivo* synthetic chemistry, Synthesis of bioactive natural products, Molecular imaging, Glycan recognition, *In vivo* targeting

**Purpose of Research :**

研究年報

Although many efficient bond-forming reactions have been developed in the field of synthetic organic chemistry, their utility typically fails to translate in complex mixtures present in cellular or living biosystems. As such, only a handful of effective labeling or conjugation methods in biosystems are readily available. To address this issue, we are synthetically exploring the unique reactivity of conjugated imines for their potential in novel chemical reactions. The benefit of this approach is that since a large part of amine-containing biomacromolecules are biosynthesized through imine chemistry, imine-mediated chemical reactions will not face the same challenges that classical synthetic organic chemical reactions face within living systems. In parallel to this work, our studies have also shown that the unique reactivity of imines could be involved in pathways that regulate biologically important processes.

Besides usage in methods of labeling or conjugation, the novel reactivity of imines could alternatively be used in the multi-step synthesis of biofunctional molecules within living biosystems. Through a concept we refer to as “Therapeutic *In Vivo* Synthetic Chemistry”, we aim to develop an adaptable system where a cascade of organic transformations can be directly executed at target regions within the body during predefined times to generate a bioactive molecule that elicits a localized biological effect. Towards this goal, we are analyzing, with the use of molecular imaging, the complex “pattern recognition” mechanisms of natural glycans *in vivo* and applying the glycan-based interactions to direct various linked biomolecules to desired organs and tissues.

**(1) Exploring the novel reactivity of conjugated imines from alkanolamines and diamines: Application to the asymmetric synthesis of chiral diamines (Pradipta, Tanaka)**

We have discovered that *N*-alkyl conjugated imines, derived from natural alkanolamines and diamines can participate in [4+2], [4+4], or [4+2+2] cycloadditions. Further studies have demonstrated that neighboring hydroxyl or amino groups of the conjugated imines significantly contributes to the acceleration of these cycloadditions. These reactions were subsequently applied in the stereoselective, one-pot synthesis of chiral diamine derivatives, thereby establishing their promise as an effective method to synthesize bioactive molecules via [4+2], [4+4], or [4+2+2] cycloaddition reactions. We are also applying these products as new catalysts of innovative organic transformations. This work is being performed in collaboration with A. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University (Russia) and Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University.

**(2) Novel reactivity of conjugated imines from polyamines: Elucidation of their biological function (Tsutsui, Takamatsu, Pradipta, Tanaka)**

□In addition to elucidating the novel reactivity of conjugated imines, we discovered that their unexplored reactivity could also regulate biofunctional processes. One such example currently being explored is a formal [4+4] cycloaddition reaction between conjugated imines (derived from polyamines) and the toxin acrolein (derived from enzyme-catalyzed oxidation of polyamines) to generate eight-membered 1,5-diazacyclooctane derivatives. Although the formation of diazacyclooctanes neutralizes the toxin acrolein, our studies have shown that the resultant diazacyclooctane hydrogel, which is produced under oxidative stress conditions, further accelerates the oxidative stress process. From reactivity profiles studies of the unsaturated imines, we conclude that the polyamines are in constant dynamic structural change mediated by amine oxidase. On the other hand, we hypothesize that monomeric 1,5-diazacyclooctane may be involved with regulating cell division, transcriptional activity, and/or amyloid accumulation. Further investigations of the regulation mechanisms caused by the reactivity of the polyamine-derived imines are currently underway with the use of isotope labeled NMR spectroscopy and by various molecular biology techniques. This work is being performed in collaboration with the Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN, Bioengineering Laboratory,, RIKEN, Chemical Genetics Laboratory, RIKEN, the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, and the Faculty of Science and Technology, Waseda University.

**(3) Mimicking post-translational modification of arginine by lipid metabolites: One-pot synthesis and bioactivity remodeling of natural products (Iwata, Tsubokura, Tanaka)**

Despite only a few previous reports having investigated post-translational protein modification of arginine, we were inspired by a rather rare example involving lipid metabolites. As a consequence, we have developed a novel, one-pot chemical reaction, which operates through multiple transformations starting from simple starting materials, to produce 2-aminoimidazole derivatives. This reaction is dependent on the reactivity of conjugated imines derived from guanidine substituents. Application of this chemical reaction has led to the successful synthesis of the first library of 2-aminoimidazole derivatives, which includes the promising anti-angiogenic, alkaloid natural product, ageladine A. This promising one-pot synthesis of 2-aminoimidazole derivatives has established the basis for future work, which may include (i) medicinal chemistry studies to identify pharmaceutical candidates with potent anti-angiogenic activity; (ii) selective biolabeling studies for the less-reactive arginine residues in/on live cells; or (iii) synthesis of the bioactive natural products on target proteins in living biosystems. In parallel to this work, we have also developed a novel method of Lewis acid-catalyzed guanidination of amino groups by cyanamide in water. These studies are being performed in collaboration with the Faculty of Science and Technology, Waseda University and the Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University.

#### **(4) Innovative PET (Positron Emission Tomography) imaging and bioconjugation based on 6 $\pi$ -azaelectrocyclization (Ogura, Tanaka)**

Previous studies of marine natural products and their enzyme inhibitory mechanisms lead us to the discovery and development of an efficient labeling method selective for amino groups present on biomolecules and the surface of live cells. This method, which is dependent on a rapid 6 $\pi$ -azaelectrocyclization of conjugated imines, has shown a wide range of utility such as its use with noninvasive PET imaging. We improved upon the labeling method through incorporation of positron emitter metal/ligand complexes, which are readily applicable to a variety of biomolecules, as well as to whole live-cell based PET imaging. This improved method could potentially be used for future diagnosis and protein- or cell-based drug discovery. An efficient bioconjugation method was also developed using the principles of the azaelectrocyclization-based labeling technique. With the use of a dialdehyde probe, two amino groups of biomolecules can be linked. As such, bifunctional molecules such as peptides, glycopeptides, and fluorophores can be efficiently introduced onto the surface of proteins and live cells. These studies are being performed in collaboration with Center for Life Science Technologies (CLST), RIKEN, Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN, A. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Synthetic Organic Chemistry Laboratory, RIKEN, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, and Center for Integrative Medical Sciences (IMS), RIKEN.

#### **(5) Innovative diagnostic and therapeutic glycoconjugates (Ogura, Tanaka)**

One of the hurdles that prevent protein therapeutics from greater clinical usage is the lack of a general organ-selective biotargeting system, as well as greater control over excretion profiles. One approach to address this issue is to utilize glycans to direct protein accumulation in specific organs. Our research has introduced various glycan structures onto specific cells or artificial dendrons, through the 6 $\pi$ -azaelectrocyclization protocols described above, as a means to investigate “homogeneous” and “heterogeneous” glycocluster dependence on *in vivo* dynamics. Through the use of molecular imaging, results have shown that glycan composition on cell or dendron templates can directly control accumulation towards specific organ and tumor cells, as well as affect their excretion profiles. We are now applying these glycoconjugates not only to PET and MRI diagnosis, but also to therapeutics, by using newly emerging techniques. This work is being performed in collaboration with CLST, RIKEN, A. Butlerov Institute of Chemistry, Institute of Physics, and Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University and Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, and the Global Research Cluster, RIKEN.

#### **(6) Selective *in vivo* targeting using “weak interaction” of glycans (Taichi, Tanaka)**

Individual interaction of the single molecule of glycans is very weak. Including our research project

discussed above, the glycans are generally clustered to enhance and mimic the glycan interaction in nature, i.e., multivalency effects and pattern recognition. On the other hand, we are developing a totally new concept for selective targeting in live system, by making advantage of the “weak interaction” of the glycans. More specifically, (1) “strong interaction” of protein or peptide molecules, (2) “weak interaction” of the glycans, and (3) selective bond-forming reactions, will simultaneously and synergistically be worked to achieve the selective recognition in live cells and animals. This work has been performed in collaboration with CLST, RIKEN and Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN.

**(7) Total synthesis of bioactive compounds in live animals: therapeutic *in vivo* synthetic chemistry** (Tsubokura, Takamatsu, Pradipta, Vong, Tanaka)

Through the amalgamation of all research areas actively pursued in our lab, we are ultimately challenging to develop a model system where bioactive compounds can be synthesized within living animals, which we refer to as “Therapeutic *In Vivo* Synthetic Chemistry”. The main benefit of this approach is that a cascade of organic transformations can be directly executed at target regions within the body during predefined times to generate a bioactive molecule that elicits a localized biological effect. This method entirely circumvents the off-target and peptide instability problems associated with the currently applied drugs. We will soon be reporting an example of an organic transformation on the surface of live cells and in animals, which will be the first example of *in vivo* multi-step synthesis. This work has been performed in collaboration with CLST, RIKEN and Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN, and the Department of Chemistry, University of Basel.

**(8) “Unexpected” and “unexplored” reactivity of common functional groups in cell and animal: detection and regulation of biofunctional molecules** (Vong, Pradipta, Taichi, Saigitbatalova, Tanaka)

These researches have also led us to discover that simple functional groups, which are regularly used for organic synthesis, exhibit previously unrecognized reactivity in living biosystems. As such, we hope to exploit their reactivity to develop an assay for the sensitive detection and regulation of important biomolecules implicated in various disease states. To accomplish this, rather than use “molecular recognition” probes (e.g. antibodies or artificial synthetic receptors), our detection and regulation strategy will instead pursue a novel approach that will be driven by the “unexpected” and “unexplored” chemoselectivity of synthetic organic chemical reactions. This work has been performed in collaboration with CLST, RIKEN and Systems Glycobiology Research Group, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Global Research Cluster, RIKEN, and A. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University.



***Principal Investigator***

田中 克典      Katsunori Tanaka

***Research Staff***

Ambara Rachmat Pradipta

筒井 歩      Ayumi Tsutsui

小椋 章弘      Akihiro Ogura

泰地 美沙子      Misako Taichi

Kenward Vong

***Students***

岩田 隆幸      Takayuki Iwata

高松 正之      Masayuki Takamatsu

坪倉 一輝      Kazuki Tsubokura

Elena Saigithbatalova