

研究課題名 低分子生理活性物質の分子機構の解明

所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所

研究者氏名 中村 和彦

## 1. 研究計画の概要

### 研究の趣旨・目的

低分子生理活性物質は化学的には繰り返し構造を有しないために、複雑な生合成系を持って生体内で作られる。したがって実験室的にも、生体外で少数の酵素群によって合成できる DNA や大腸菌による大量生産が可能なタンパク質などとは異なり、生化学的手段では合成が困難であり、安定したサンプルの供給に限界がある。有機化学的手法によって化学的に供給できれば、生体機能解明に向けての研究に対する意義は、大きいものと考えられる。

生体機能解明そのものを目的とする生化学と、分子構造の構築を目指す有機合成化学は別々の進化を遂げたことは多くの研究者の指摘するところである。多官能性生理活性物質の合成研究には近年、大きな進歩が見られるが、実際の生体機能研究に結びついた例は非常に少ない。このことは、生理活性物質を開発・生産の手段とする諸産業(医薬・食品など)にとっても、重大な問題点である。従って、生体機能の解明を目的とした化学的な合成研究をなしえることによって、この問題点を克服できるものと考えられる。

また、このような研究手法は産官学で共有することが適当であり、その点から公的研究機関である産業技術総合研究所による研究の実施が必要であると考えられる。

近年、コンビナトリアル化学を志向した固相合成技術が大きく進歩した。コンビナトリアル化学は多品種・同時合成を大きな特色とするが、それ以外でも精密有機合成に多く応用が可能であると考えられる。本研究では生理活性物質の化学的合成に際して固相合成技術を応用し、生体機能を解明する目的を志向した合成を進めることを目的とする。またその化学的性質を明らかにし、構造と機能の密接な関係に基づく生理活性物質の本態を明らかにすることを旨とする。合わせて、生体機能研究に十分な量を供給し、生物機能解明へと展開する。

### 研究計画の概要

#### (1) 新規固相反応の開発

近年、固相合成技術は大きな進歩を見たが、その性質上、適用範囲は一部の化合物群に限定されていることが多い。この問題点はかねてより指摘されており、多くの研究グループによって多彩な反応へと適用する努力がなされているが、汎用性の高い手段は得られていない。

本研究では、リンカーと呼ばれる固相と反応基質を連結する反応デバイスを開発する。この新規リンカーは基質側では(一種の保護基として)多彩な反応に耐えうるものであると同時に、固相結合側では通常のカルボン酸として振る舞うために従来の固相反応担体の優れた長所を十分に生かすものである。我々はこれまで、この目的にそう反応デバイスとしてシリル型リンカーを開発し、またペプチドの固相合成についても実績を積んできた。本研究では、これらを元に新規反応デバイスの開発を行う。

#### (2) 生理活性物質の合成

コンビナトリアル化学の発展により、少量多品種の合成技術には長日の進歩を見るに至った。しかし、固相合成は同時に多段階反応の迅速処理という利点も持つ。これは、むしろプレパラティブスケールの合成に有利な特徴である。この特徴に着目した生理活性物質の研究は、世界的に見ても数少ない。本研究では、固相合成を活用して生理活性物質の調製的合成を進め、活性物質の生物検定に耐えうる量を高純度で得ることを目的に合成研究を行う。

#### (3) 生理活性物質の機能解明

得られた生理活性物質の化学的性質に着目した作用機序解明を目指す。これにはNMRなどの分光学的手段による配座解析や、特異的分子間相互作用の検出を目的とした化学的研究を含む。また、in vivo, in vitro の生物活性検定によって生体機能の全体像の解明を進める。また、内因性生理活性物質の機能解明によって難治性疾患の治療薬の研究開発に寄与できるものと考えられる。

研究計画の詳細報告

(単位：百万円)

研究項目	所要経費			
	12年度	13年度	14年度	合計
1. 新規固相反応の開発				
(1) 固相反応リンカーの設計と合成	← 3.5	3.0 →		6.5
(2) 新規リンカーによる合成研究			← 4.2 →	4.2
(3) 自動反応システムへの組み込み		← 1.0	2.0 →	3.0
2. 生理活性物質の合成				
(1) アミロイド親和性分子プローブ	← 3.0	0.5 →		3.5
(2) アミロイド会合阻害剤		← 2.0	0.5 →	2.5
(3) デヒドロペプチド		← 3.2	3.5 →	6.7
(4) その他モデル分子の合成	← 2.0	1.5	1.0 →	4.5
3. 生理活性物質の機能解明				
(1) アミロイド会合の分子機構	← 4.2	2.0 →		6.2
(2) アミロイド会合阻害剤の評価と解析		← 1.5	2.0 →	3.5
(3) 新規分子間相互作用の検討と予備実験		← 1.0	3.0 →	4.0
所要経費(合計) (管理費を含む)	12.7	15.7	16.2	44.6

## 研究成果の概要

### 研究成果の概要

本研究では生理活性物質としてシート構造に配向性を示すペプチド性化合物を選んだ。これら化合物は、生体一次代謝産物と二次代謝産物の中間に位置し、化学構造と生理活性の関係が明確である。同時に合成的な困難さがあり、方法論の開発には化学として興味があるとともに、生化学的手法との相違を際立たせることが出来る。この点から、生物学研究に与えるインパクトに期待して研究を進めた。以下にその概要について述べる。

- (1) 新規固相反応の開発：シート構造を有する生理活性物質としてデヒドロペプチドを選択した。デヒドロペプチドは剛直な立体構造を有し、ペプチドのもっとも単純な模倣物質・誘導体と考えられる反面、酸及び塩基条件で不安定で合成は困難となる。本研究において、セレン原子を有する固相合成に対応した反応素子(リンカー)を新たに設計し、効率合成の方法論について検討した。この結果、側鎖結合の合成戦略による新規合成法を開発するに至った。
- (2) 生理活性物質の合成：上記方法論に基づき、植物毒性物質 AM-toxin および細胞接着分子 RGD conjugate の合成を行った。これらの合成によって、種々の難合成化合物の合成法についてその確立を達成した。また、分子プローブの設計・合成の一環として、アミロイド会合形成機構の蛍光プローブの合成や会合阻害剤の合成を進めた。
- (3) 生理活性物質の機能解明：分子プローブの調製によって、シート構造からなる会合体を形成することが知られているアミロイドの会合形成機構について検討した。会合体形成には特定のアミノ酸配列が重要であることを示し、この分子機構を元に設計・合成した会合阻害剤は、アミロイドの神経毒性発現を抑制することを見出した。

### 波及効果、発展方向、改善点等

近年の固相合成法の発展にもかかわらず、繰り返し構造を持たない高活性の生体物質の合成は困難な状況は続いていた。しかし、本研究で新たな方法論が確立されたことによって、デヒドロペプチド以外の異常ペプチド類の合成法について、道が開けたと考えている。異常ペプチド類の中には研究上のニーズが高い、糖ペプチド(タンパク)・リン酸化ペプチド・硫酸化ペプチドなどのシグナル伝達物質などや、抗生物質の構造である環状ペプチド・膜構成成分であるリポプロテインも含まれ、これらの効率合成が我々ないし他研究グループの手によって、将来的に考えられることから波及効果は大きいと考えられる。

また、アミロイドの会合形成による神経毒性のメカニズムを単純な実験系で検討したことは、内外から高い評価を受けており、今後のアルツハイマー症に関する分子生物学的研究に与えるインパクトは大きいものと考えられる。会合体形成は微視的には分子間相互作用と同義であって、こうした興味ある生物現象を導く、多くの生理活性分子の生物機能を明らかにしようとする研究に、影響を与えるものと考えている。

本研究の主な成果については、国際学術雑誌数誌に掲載された。また、国際学会での発表や国内学会の発表を積極的に進め、その研究成果が高く評価されている。また、外部機関におけるセミナーなどの場を通じて、意見交換を行って、将来の研究の発展に備えている。

多くの研究者の指摘にあるように、こうした分子の振るまいが実際の巨視的な生物現象に直接的に対応しているかどうかは、今後の研究を待たなければならない。特に、in vivo での実験系の確立は是非とも必要である。これには、代謝系や生体内動態の研究者との共同作業が必要である。

## 研究成果公表等の状況

### (1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0件	1件	14件	15件
国際	6件	1件	9件	16件
合計	6件	2件	23件	31件

### (2) 特許等出願件数

合計 4件 (うち国内4件、国外0件)

### (3) 受賞等

0件 (うち国内0件、国外0件)

### (4) 主な原著論文による発表の内訳

#### 国外誌

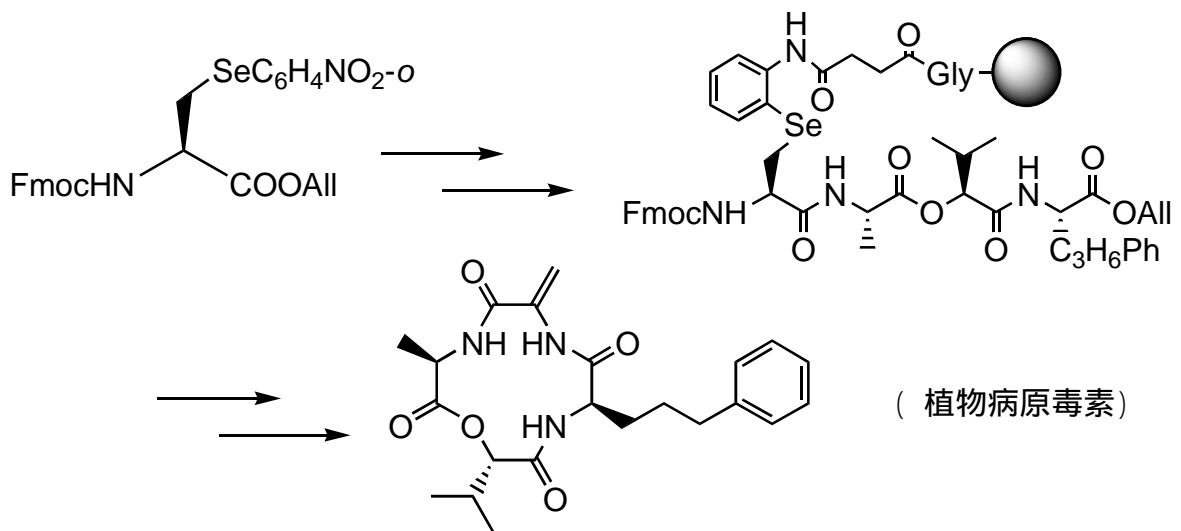
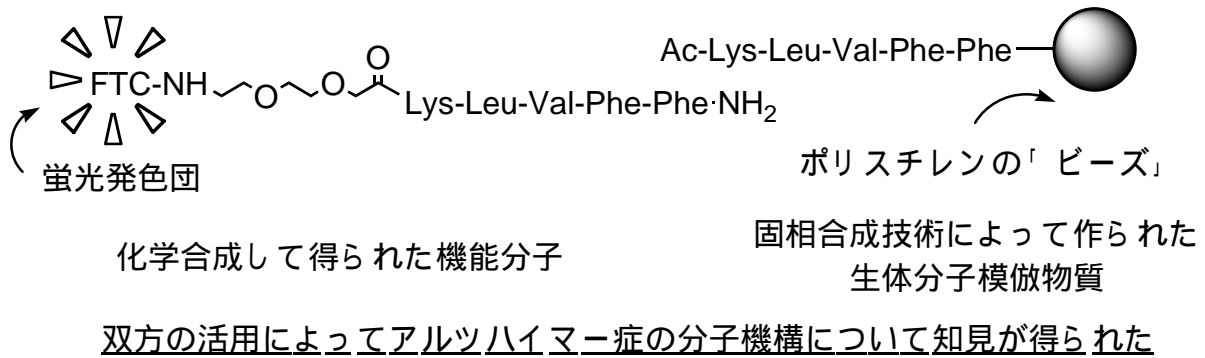
1. Nakamura, K.; Nishiya, H.; Nishiyama, S. "Synthesis of a cyclic diaryl ether under solid-phase conditions" *Tetrahedron Lett.* **2001**,42, 6311-13.
2. Watanabe, K.; Segawa, T.; Nakamura, K.; Kodaka, M.; Konakahara, T.; Okuno, H. "Identification of the molecular-interaction site of amyloid  $\beta$  peptide by using a fluorescence assay" *J. Pept. Res.* **2001**, 58, 342-346.
3. Horikawa, E.; Kodaka, M.; Nakahara, Y.; Okuno, H.; Nakamura, K. "Solid-phase synthesis of dehydropeptide, AM-toxin II, using a novel selenyl linker by side-chain tethered strategy" *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8337-8339.
4. Watanabe, K.; Nakamura, K.; Akikusa, S.; Okada, T.; Konakahara, T.; Kodaka, M. Okuno, H. "Inhibitors of fibril formation and cytotoxicity of  $\beta$ -amyloid peptide composed of KLVFF recognition element and flexible hydrophilic disrupting element" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 290, 121-124.
5. Akikusa, S.; Nakamura, K.; Watanabe, K.; Horikawa, E.; Konakahara, T.; Kodaka, M.; Okuno, Y. "Practical assay and molecular mechanism of aggregation inhibitors of  $\beta$ -amyloid" *J. Pept. Res.* **2003**, 61, 1-6.
6. Nakamura, K.; Ohnishi, Y.; Horikawa, E.; Konakahara, T.; Kodaka, M.; Okuno, H. "New selenyl linker for solid-phase synthesis of dehydropeptides" *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5445-5448.

(5) 主要雑誌への研究成果発表

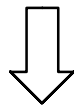
<b>Journal</b>	<b>Impact Factor</b>
Surface Science	
Journal of Catalyst	2.189
Catalysis Letters	3.118
Chemical Communications	1.852
Bulletin of the Chemical Society of Japan	3.902
	1.376

低分子生理活性物質の分子機構の解明

## 低分子生理活性物質の分子機構の解明



基質先行導入型のリンカーの設計によって、高い汎用性と簡便な操作性  
生理活性物質の合成に新たな道を開く  
誘導体の調製によって生物機能解明のツールを開発



生物機能を化学的に解明