

熊本大学学位論文

ビオチン化イノシトールリン酸の合成と表面プラズモン共鳴法への応用
—PH domain および HIV-1 Gag とイノシトールリン脂質との結合解析—

2012

安楽 健作

**Synthesis of Biotinylated Inositol Phosphates Relevant to
Surface Plasmon Resonance Study**

—Analysis of Binding between Phosphatidylinositol and PH domain or HIV-1 Gag—

Kensaku Anraku

Synthesis of Biotinylated Inositol Phosphates Relevant to Surface Plasmon Resonance Study

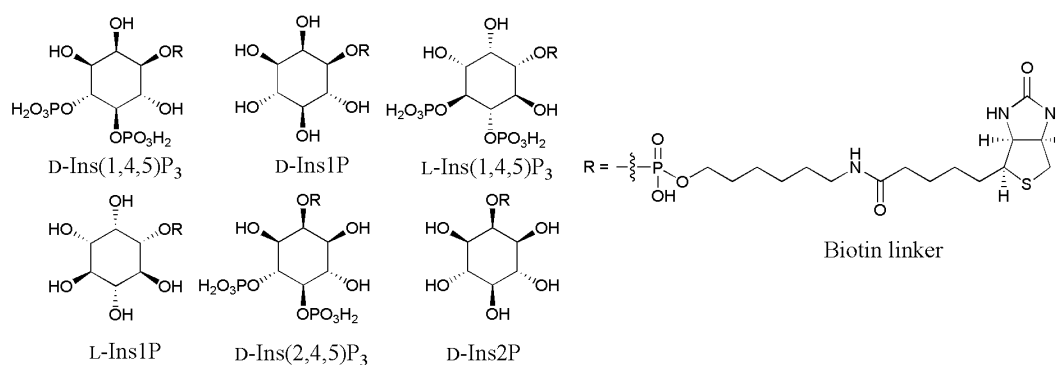
–Analysis of Binding between Phosphatidylinositol and PH domain or HIV-1 Gag–

Kensaku Anraku

Inositol phosphates play important roles as second messengers in intracellular signal transduction. In order to study the relative affinity and specificity in the binding inositol phosphate and diverse Pleckstrin Homology (PH) domain or Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag by Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis, biotinylated inositol phosphates, to be immobilized on avidin sensorchip, were synthesized. Each inositol phosphate showed specific binding to PH domain. Furthermore, a detailed binding mode of phosphatidylinositols and HIV-1 Gag was proposed based on the SPR analysis.

1) Design and Synthesis of Biotinylated Inositol Phosphates

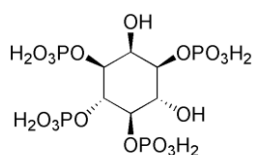
Six bifunctional molecules containing biotin and various inositol phosphates were synthesized. These compounds were designed on the basis of X-ray structure of the complex of *D-myo*-inositol 1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) and Phospholipase C δ (PLC δ) PH domain considering the application to the biotin-avidin techniques. The building blocks of inositol moiety were synthesized starting with optically resolved *myo*-inositol derivatives and assembled with the biotin linker through a phosphate linkage. The dissociation constant (K_D) of biotinylated Ins(1,4,5)P₃ binding of PLC δ_1 PH domain was 0.25 μ M in pull-down analysis, which was comparable to that of non-tethered Ins(1,4,5)P₃.



2) Design and Synthesis of Biotinylated Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate Targeting Grp1 Pleckstrin Homology Domain

D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, Ins(1,3,4,5)P₄, is formed by the direct phosphorylation of the Ins(1,4,5)P₃ by the Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase. The synergistic involvement of Ins(1,3,4,5)P₄ in the Ins(1,4,5)P₃-mediated mobilization of Ca²⁺ and the subsequent regulation of the store-operated Ca²⁺-influx still remains as a subject of controversy. Thus, a bifunctional molecule containing biotin

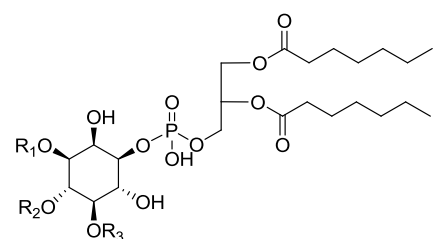
and Ins(1,3,4,5)P₄ was synthesized. This molecule was designed on the basis of X-ray structure of the complex of Ins(1,3,4,5)P₄ and Grp1 (general receptor of phosphoinositides 1) PH domain and synthesized by using synthetic strategy of biotinylated Ins(1,4,5)P₃. The K_D of biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ binding of original Grp1 PH domain was 0.14 μ M in pull-down analysis, which was comparable to that of unmodified Ins(1,3,4,5)P₄. Furthermore, biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ distinguished between Grp1 PH domain and PLC δ ₁ PH domain in SPR analysis.



Ins(1,3,4,5)P₄

3) Highly Sensitive Analysis of Interaction between HIV-1 Gag and Phosphoinositide Derivatives

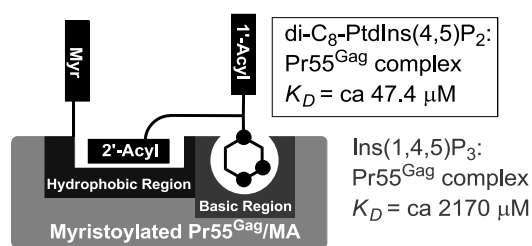
HIV-1 Gag protein is the principal structural component of the HIV particle. Localization of the precursor of Gag (Pr55^{Gag}) protein to the plasma membrane initiates virus assembly. Recent studies indicated that *D-myo*-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) regulates Pr55^{Gag} localization and assembly. The binding affinity between Pr55^{Gag} or its N-terminal MA domain and various phosphoinositide derivatives were determined using a highly sensitive SPR sensor and biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ as a PtdIns(4,5)P₂ analog. The dissociation constant (K_D) for Pr55^{Gag} complexed with Ins(1,4,5)P₃ (an inositol with divalent phosphate groups and devoid of lipid groups) was 2,170 μ M, while the K_D for di-C₈-PtdIns (a lipid-containing inositol devoid of divalent phosphate groups) was 186 μ M, and the K_D for di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ (an inositol with both lipid and divalent phosphate groups) was 47.4 μ M. These results suggest that the contribution of hydrophobic acyl chains is greater than negatively charged inositol phosphates in Pr55^{Gag}/MA-binding.



di-C₈-PtdIns: R₁,R₂,R₃=H

di-C₈-PtdIns(4,5)P₂: R₁=H,R₂,R₃=PO₃H₂

di-C₈-PtdIns:
Pr55^{Gag} complex
 K_D = ca 186 μ M



In addition to understanding on the biological function of PH domain and HIV-1 Gag, biotinylated inositol phosphates would contribute to the exploring of inhibitor targeting PH domain and HIV-1 Gag.

略語表

本論文では以下の略語を使用した。

Ac ₂ O	acetic anhydride
AcOEt	ethyl acetate
Allyl-Br	allyl bromide
Bu ₂ SnO	dibutyltin oxide
CA	capsid
CAN	ceric ammonium nitrate
DABCO	diazabicyclo[2.2.2]octane
di-C ₈ -	1,2-di- <i>O</i> -heptanoylglyceryl
di-C ₄ -	1,2-di- <i>O</i> -butanoylglyceryl
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EtOH	ethanol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1
Ins(1,3,4)P ₃	<i>D-myo</i> -inositol 1,3,4-trisphosphate
Ins(1,3,4,5)P ₄	<i>D-myo</i> -inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate
Ins(1,4,5)P ₃	<i>D-myo</i> -inositol 1,4,5-trisphosphate
STP	sodium triphosphate
MA	matrix
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -chloroperbenzoic acid
MeOH	methanol
MPMCl	<i>para</i> -methoxybenzyl chloride
MS4A	molecular sieve 4A
Pd-C	palladium-carbon
PH	pleckstrin homology
PLC	phospholipase C

Pr55 ^{Gag}	Gag 55-kDa precursor
PtdIns	phosphatidylinositol
PtdIns(3,4)P ₂	<i>D-myo</i> -phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PtdIns(4,5)P ₂	<i>D-myo</i> -phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PtdIns(3,4,5)P ₃	<i>D-myo</i> -phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
<i>p</i> -TsOH·H ₂ O	<i>para</i> -toluenesulfonic acid monohydrate
SPR	surface plasmon resonance
TCA	trichloroacetic acid
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1) Design and Synthesis of Biotinylated Inositol Phosphates Relevant to the Biotin-Avidin Techniques.

Kensaku Anraku, Teruhiko Inoue, Kenji Sugimoto, Takashi Morii, Yasuo Mori, Yoshinari Okamoto, and Masami Otsuka.

Organic & Biomolecular Chemistry, **6**, 1822-1830 (2008).

2) Highly Sensitive Analysis of Interaction between HIV-1 Gag and Phosphoinositide Derivatives Based on Surface Plasmon Resonance.

Kensaku Anraku, Ryota Fukuda, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka and Mikako Fujita.

Biochemistry, **49**, 5109-5116 (2010).

3) Design and Synthesis of Biotinylated Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate Targeting Grp1 Pleckstrin Homology Domain.

Kensaku Anraku, Teruhiko Inoue, Kenji Sugimoto, Kota Kudo, Yoshinari Okamoto, Takashi Morii, Yasuo Mori, and Masami Otsuka.

Bioorganic & Medicinal Chemistry, **19**, 6833-6841 (2011).

目次

緒論	1
第 1 章	ビオチン-アビジン法への応用を目的としたビオチン化イノシトールリン酸類の設計と合成	
第 1 節	序論.....	8
第 2 節	ビオチン化イノシトールリン酸の設計と合成及びその評価	
2-1)	ビオチン化イノシトールリン酸の設計と合成	10
2-2)	Ins1P 部位の合成	10
2-3)	Ins(1,4,5)P ₃ 部位の合成	11
2-4)	D-Ins(2,4,5)P ₃ 部位及び Ins2P 部位の合成	12
2-5)	Ins(1,4,5)P ₃ 部位とビオチンリンカー部位のカップリング反応	13
2-6)	ビオチン化イノシトールリン酸の最終脱保護反応	14
2-7)	ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P ₃ と PLCδ ₁ PH domain との結合解析	14
第 3 節	小括.....	16
第 2 章	Grp1 pleckstrin Homology (PH) domain を標的とした ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成	
第 1 節	序論.....	17
第 2 節	ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P ₄ の合成及びその評価	
2-1)	ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P ₄ の設計.....	18
2-2)	Ins(1,3,4,5)P ₄ 部位の合成.....	18
2-3)	Ins(1,3,4,5)P ₄ 部位とビオチンリンカー部位とのカップリング反応.....	19
2-4)	Grp1 PH domain とビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P ₄ との 蛋白結合実験における評価.....	20
2-5)	SPR 法を用いたビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P ₄ の評価.....	21
2-6)	Grp1 PH domain とビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P ₄ との理論的結合解析.....	24

第3節	小括	25
第3章	SPR法を用いた HIV-1 Gag とイノシトールリン脂質誘導体との 高感度結合解析	
第1節	序論	27
第2節	Pr55 ^{Gag} 及び MA domain とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析	
2-1)	SPR測定系の構築と MA domain の精製	30
2-2)	Pr55 ^{Gag} 及び MA domain の発現と精製	31
2-3)	BIACORE を用いた結合実験	32
2-4)	Pr55 ^{Gag} 及び MA domain とイノシトールリン脂質との解析に用いたイノシ トールリン脂質誘導体	33
2-5)	Pr55 ^{Gag} とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析	33
2-6)	MA domain とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析	35
第3節	考察	36
第4節	小括	40
第4章	総括	41
実験の部		44
第1章	実験の部	45
第2章	実験の部	62
第3章	実験の部	72
参考文献		75
謝辞		78

緒論

病を癒すことは、人類が始まって以来の課題である。先人たちは、経験に基づいた医療行為を行うために、自然の中から種々のものを利用して薬として使い、長い歴史の間にそれらを体系化して薬学の基本を作り上げてきた。19世紀初頭に、草根木皮における有効成分の抽出に成功し、成分分離の近代的薬学が誕生した。さらに、19世紀後半には、近代的合成化学が登場し、現在でも有効使用されるアスピリンが開発された。(Figure 0-1)

合成化学の進歩はめざましく、分離した有効成分を、たとえその構造が複雑を極めたものであっても達成できる時代となった。その例として、2010年11月に米国食品医薬品局(FDA)から承認された、乳がん治療薬であるハラヴェン(Halaven: エリブリンメシル酸塩)が挙げられる¹⁾。(Figure 0-1)

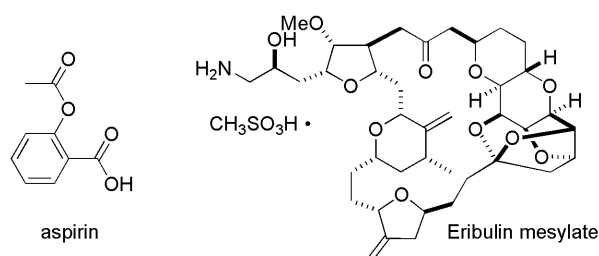


Figure 0-1. Structures of Aspirin and Eribulin mesylate.

エリブリンは、キラル中心が19個あり、工程数が35段階あるにもかかわらず、その有効性を信じ、開発研究を続けた製薬企業から上市されたものである。エリブリンの開発は、岸らが達成したハリコンドリンBの全合成研究に基づく²⁾。すなわち、全合成をおこなう上で生成する合成中間体を類縁化し、そのうえで誘導体を構築することで達成された。

(Figure 0-2)

ハリコンドリンの生合成経路は、現在のところ解明されていない。たとえ解明されたとしても、海綿が生産する経路を、人工的に再現することは極めて困難である。現在メタゲノム法を介した、生合成遺伝子クローンをを用いた物質生産誘導研究が精力的に行われているが^{3),4)}、現段階ではすぐに応用することは難しい。したがって、全合成研究において開発されたオリジナルの合成経路をもとに、活性を維持させたままの中間体を類縁化し、それらから合成された誘導体の活性を評価することで目的が達成される。(target-oriented synthesis) このとき合成経路はできる限り短く、高収率で得られる反応を用いる必要がある。これらの概念をもとに合成されたものが、まさしくエリブリンである。岸らは、全合成完了後、各中間体の活性試験を行ったところ、ハリコンドリンBの右半分がハリコンドリンBと全く同等の抗腫瘍性活性を保持していることを見出し、さらにエステラーゼに耐性をもつ類縁体を見出した。

さらに、Ni/Cr カップリング反応の触媒化⁵⁾をはじめ、大量供給を目的とした合成方法論の開発に成功した。

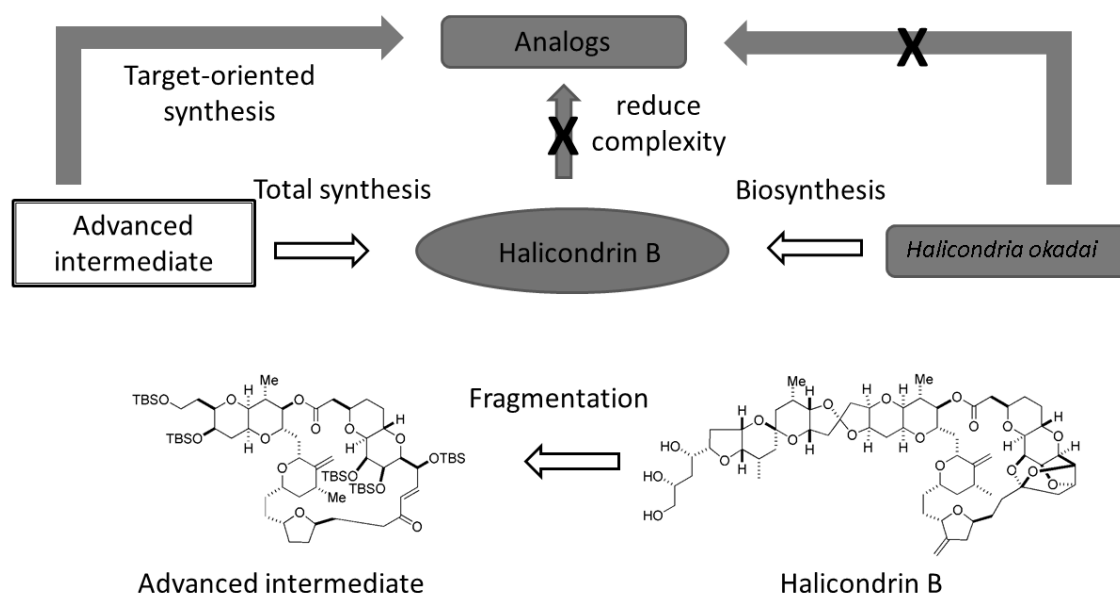


Figure 0-2. Synthesis of Halicondrin B analogs.

合成化学の発展とともに、創薬研究も長足の進歩を遂げた。コンビナトリアルケミストリーによって構築されたケミカルライブラリーを土台としたハイスループットスクリーニングは、時間・労力・資金を最小限に抑えられる手法である。しかしながら創薬開発研究においては、新しい着想に基づき、これまでにない成果が期待できるスクリーニング法を構築し、さらに選り出されたリード化合物の作用機序の解明が求められる。

免疫抑制薬 FK506 の開発はこれに値する⁶⁾。すなわち、天然生理活性物質をスクリーニングする方法を開発し、全く新しい機序で免疫抑制活性をもつ化合物として見出され、さらに治療の改善・進歩へ著しく貢献した。*In vitro* の免疫移植モデルとして、混合リンパ球反応 (MLR) を用いて、それぞれ別の個体マウスから調製したリンパ球を試験管の中で培養し、T リンパ球の増殖を測定した。この系は移植免疫反応を直接反映するものであり、生理活性物質を発見するためのスクリーニングには最適であった。(Figure 0-3)

FK506 の開発はその後の生命科学の発展に大きく貢献した。Schreiber らは、FK506 構造に着目し、これをアフィニティーゲルに固定化することで、結合蛋白質 (FKBP) を同定した⁷⁾。

(Figure 0-3) 結果として、FK506 が FKBP と複合体を形成し、これがさらにカルシニューリンに結合する。そしてその Nuclear Factor Activated T-cells (NFAT) 脱リン酸化反応を阻害することにより、IL-2 に代表される種々のサイトカインの発現を抑制することが示された。すなわち、FK506 が免疫担当細胞内のシグナル伝達を解明したのである⁸⁾。FK506 開発のように、化合物から生命現象を解明する領域は、ケミカルバイオロジー (Chemical Biology) と呼ばれる。

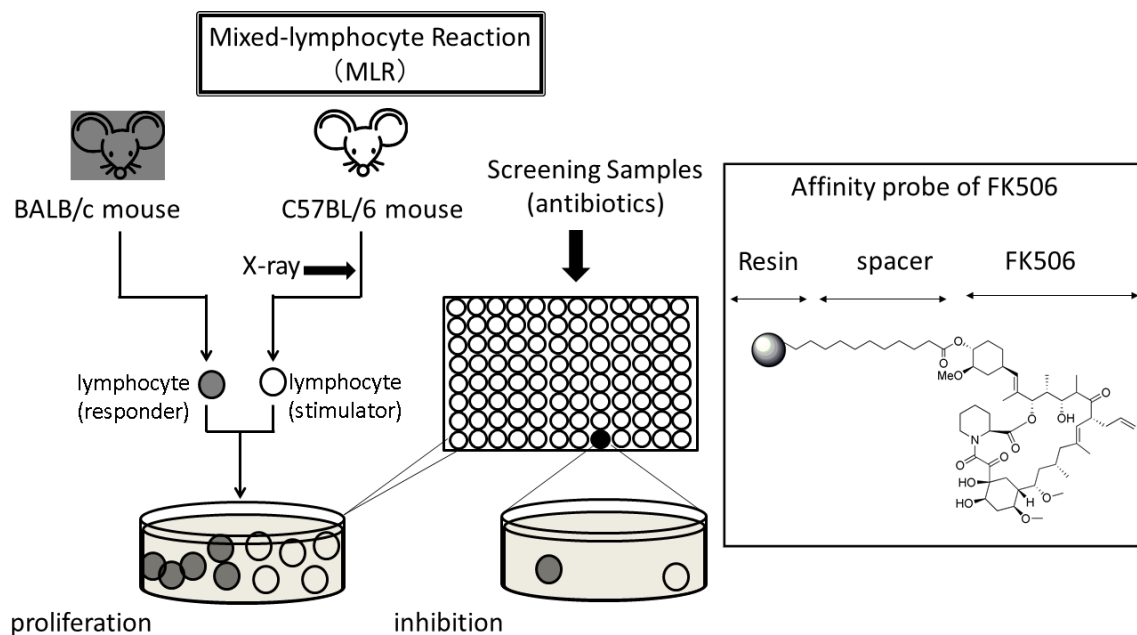


Figure 0-3. Construction of immune suppression screening and FK506 probe.

本手法は、微生物などから産生される 2 次代謝産物に限らず、生体内に存在する生理活性物質にも応用できる。細胞内セカンドメッセンジャーなどを土台にアフィニティープローブを作製し、樹脂などに固定することができれば、新規の結合蛋白を同定することができる。さらにハイスループットスクリーニング法に応用できるため、ケミカルライブラリーの中から、新規の人工化合物を探索できるかもしれない。

近年細胞内シグナル伝達を標的とした創薬研究が進められている。多細胞生物は、外界からの刺激を受けると、細胞膜上および細胞質中の因子が、次々にシグナルを受け渡し、またクロストークしながら、最終的に核内の転写因子による特定遺伝子の転写調節や、アポトーシスなどの効果をもたらす。例えば、細胞内に存在する *D-myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$)は、細胞外からの刺激に基づいて、細胞内の Ca^{2+} 上昇を引き起こす代表的なセカンドメッセンジャーである⁹⁾。

細胞に外部から刺激が加わると、受容体型チロシンキナーゼ (tyrosine kinase-linked receptor) や G 蛋白共役型受容体 (G protein-linked receptor) を介して phospholipase C γ (PLC γ) や phospholipase C β (PLC β) が活性化される。これらは細胞膜の構成成分である Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) をジアシルグリセロール (DG) と $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ に加水分解する。 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ は細胞内 Ca^{2+} ストア上の $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 受容体に作用し、 Ca^{2+} 放出を引き起こす。一方で細胞膜上には電位作動性 (voltage-dependent) カルシウムチャネル、容量性 (capacitive-dependent) カルシウムチャネルが存在し、それぞれが活性化を受けると細胞外からの Ca^{2+} の流入が起こる。(Figure 0-4)

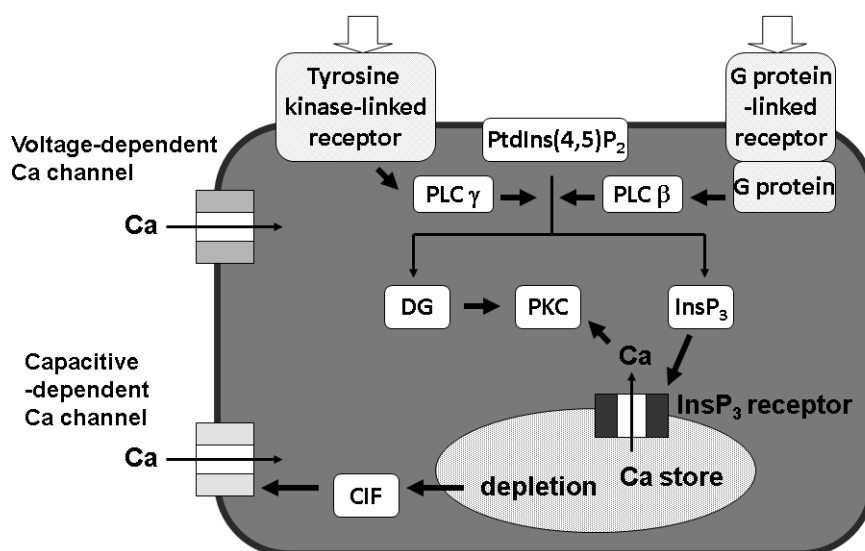


Figure 0-4. Calcium Signaling.

Ins(1,4,5)P₃はその骨格に、*myo*-イノシトール (*myo*-inositol) 構造を有している。(Figure 0-5) イノシトール骨格には、9 種類の異性体が考えられるが、生体内に確認されているのは、最も安定な構造を持つ *myo*-イノシトールである¹⁰⁾。*myo*-イノシトールは、1 位及び3 位から6 位までの水酸基がエクアトリアルであり、2 位だけがアキシアルをもつメゾ化合物である。したがって、*myo*-イノシトールの水酸基が非対称に置換された場合、2 位の水酸基をもとに、時計回りか反時計回りで、1 位から6 位が決定される。反時計回りの場合には D 体となり、時計回りの場合は、L 体となる。*myo*-イノシトールは、主に食物を介して生体内に取り込まれるビタミン様化合物である。

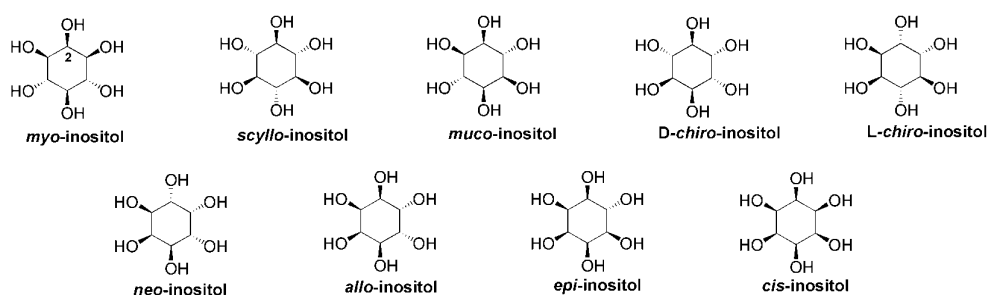


Figure 0-5. A family of nine potential stereoisomeric cyclohexane hexols.

myo-イノシトールは、グルコース 6 リン酸から、Ins3P を経由して生合成される¹⁰⁾。(Figure 0-6) 生体内には Ins(1,4,5)P₃に限らず、リン酸の数、位置が異なる様々なイノシトールリン酸が存在する。さらに、ジフォスフェイト体である InsP₇や InsP₈が確認されている¹¹⁾。これら

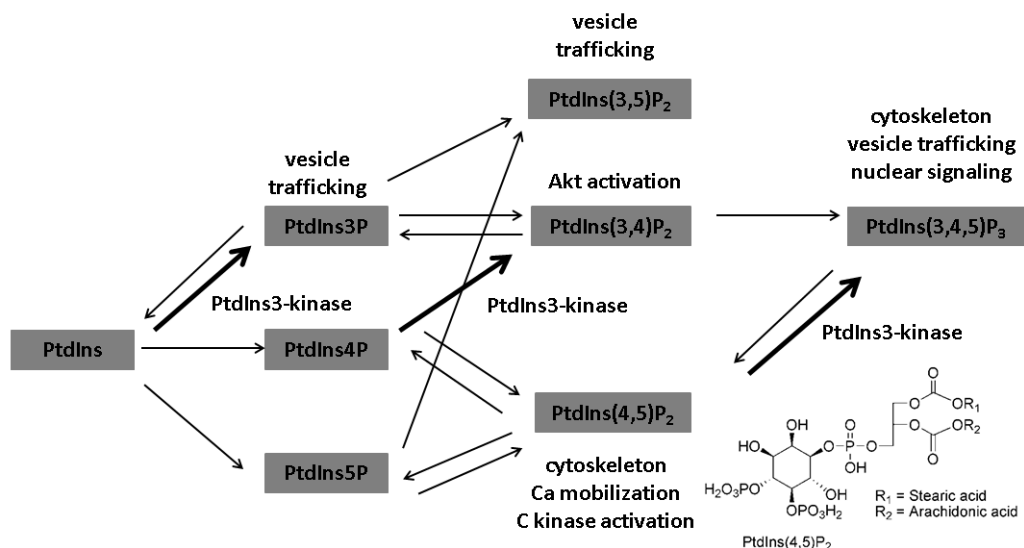


Figure 0-7. Metabolism and function of phosphatidylinositols.

カルシウムシグナル伝達経路において、電位作動性チャネルに対してはニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムなどの拮抗剤が知られ、高血圧、狭心症、不整脈などの治療に用いられているが、Ins(1,4,5)P₃を介したCa²⁺ストアからのCa²⁺放出については臨床治療に用いられる阻害剤は開発されていない。

イノシトールリン酸類と相互作用する分子は種々知られるが、Pleckstrin Homology (PH) domainは代表的なものである¹⁶⁾。PH domainはphospholipase C (PLC)を含むシグナル伝達に関わる多くの蛋白質中に見出されており、PLC中のPH domainはPtdIns(4,5)P₂の認識部位であることが明らかにされている^{17), 18)}。(Figure 0-8)したがって、イノシトールリン酸とPH domainとの結合解析システムを構築できれば、カルシウムシグナル伝達経路を制御できる化合物を創出できるものと考えられる。

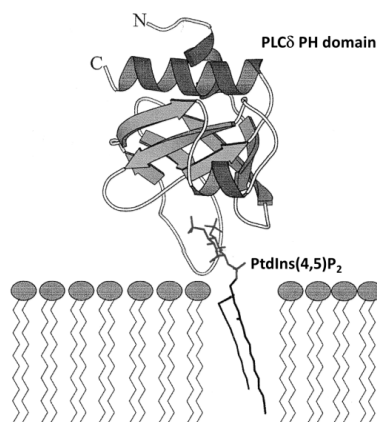


Figure 0-8. Schematic representation of PLCδ PH domain binding to PtdIns(4,5)P₂ in membrane¹⁸⁾.

一方、イノシトールリン脂質は HIV-1 の複製に関与していることが近年明らかとなってきた^{19), 20)}。HIV-1 粒子が放出される際にはウイルス蛋白質 Gag の前駆体蛋白質 Pr55^{Gag} の脂質二重膜への移行が必須である。(Figure 0-9)

これには Pr55^{Gag} の MA 領域がミリスチル化を受けることに加え、脂質二重膜の構成成分であるイノシトールリン脂質分子 PtdIns(4,5)P₂ に結合することが重要であるとされている。そこで、イノシトールリン脂質及びイノシトールリン酸と Pr55^{Gag} との結合解析システムを構築できれば、Pr55^{Gag} と PtdIns(4,5)P₂ との結合メカニズムを解析することができ、さらには阻害剤の開発に応用できるものと考えられる。

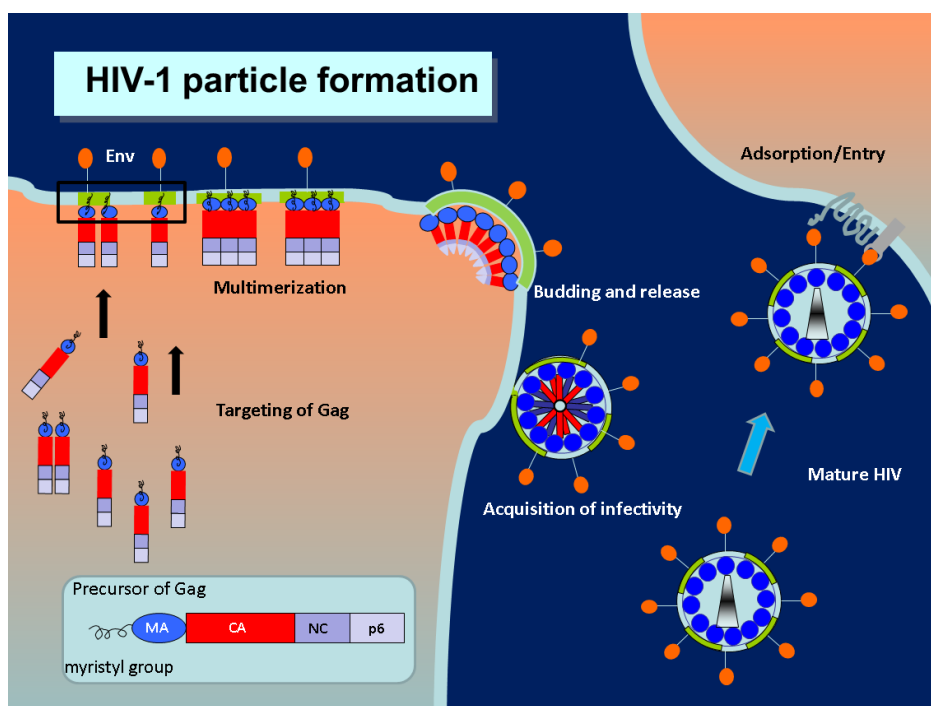


Figure 0-9. HIV-1 particle formation and membrane localization of Pr55^{Gag}.

これらの点を踏まえ、本研究ではイノシトールリン酸の構造を基盤として、はじめにビオチン化イノシトールリン酸を合成した。さらに、合成した化合物をビオチン-アビジン法に応用することで、細胞内シグナル伝達蛋白質である PH domain 類及び HIV-1 構造蛋白質 Pr55^{Gag} との結合を解析した。

第1章

ビオチン-アビジン法への応用を目的としたビオチン化イノシトールリン酸類の設計と合成

第1節 序論

カルシウムシグナル伝達経路において、D-*myo*-Inositol 1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃)は細胞外からの情報に基づいて、細胞内の Ca²⁺動態を制御する重要なセカンドメッセンジャーである⁹⁾。細胞外からの情報を受け取ると、Gタンパク共役型受容体またはチロシンキナーゼ受容体を介して、phospholipase C (PLC)が活性化される。PLCは細胞膜上の Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂)を、Ins(1,4,5)P₃と diacylglycerol (DG)とに加水分解し、それぞれ異なったシグナル経路を作り出す。親水性に富む Ins(1,4,5)P₃は、サイトゾルへと拡散し、細胞内小胞体上の Ca²⁺チャンネル連動型受容体を活性化し、結果として Ca²⁺の放出を引き起こす。

(Figure 0-4)

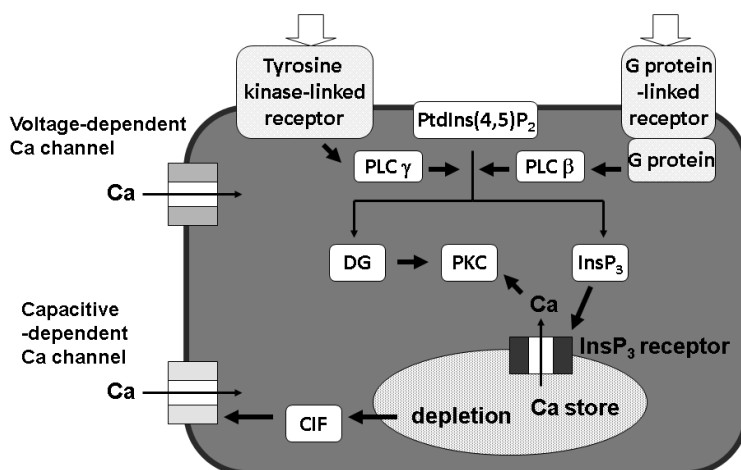


Figure 0-4. Calcium Signaling.

Pleckstrin homology (PH) domain は、約 120 のアミノ酸からなる pleckstrin に相同性をもつ蛋白質である。Pleckstrin は血小板において、優先的に protein kinase C の基質として働くもので、PH domain 類はこの pleckstrin に相同領域を持つ^{16), 21), 22)}。これまでに 100 以上の PH domain が報告されており、それぞれが膜結合や細胞内シグナル伝達、細胞骨格制御に参画している²³⁾⁻²⁶⁾。この PH domain がいくつかの例において、イノシトールリン脂質やその head group (例、イノシトールリン酸)に結合することが報告されている^{17), 27), 28)}。例として、PLCδ PH domain はその立体構造に基づいて、Ins(1,4,5)P₃ を特異的に認識する部位であり、PtdIns(4,5)P₂ と結合するが、その親和性は、平衡解離定数 (K_D) が 1.7 μM であると言われている^{17), 18)}。

(Figure 0-8)

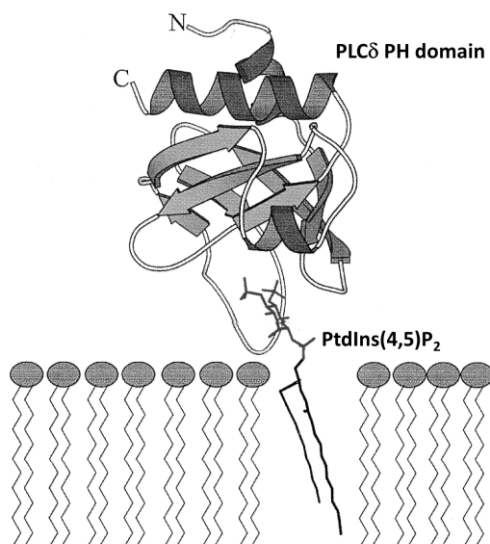


Figure 0–8. Schematic representation of PLC δ PH domain binding to PtdIns(4,5)P₂ in membrane ¹⁸⁾.

PH domain とイノシトールリン脂質及びその head group との結合解析はこれまでにほとんど報告がない。著者はイノシトールリン脂質の head group であるイノシトールリン酸に着目し、多くの領域で重要な PH domain とイノシトールリン酸との結合親和性や特異性を解析するためにビオチン化イノシトールリン酸 (biotinylated inositol phosphate) を設計合成することとした。

ビオチン–アビジン系を用いた技術は ²⁹⁾、PH domain とイノシトールリン酸との結合解析にとどまらず、PH domain を制御するイノシトールリン酸類似薬物の開発、さらには放射標識を使わずに新規の PH domain 蛋白質を発見できる可能性を秘めている。そこで、Ins(1,4,5)P₃ を筆頭に 6 種類のビオチン化イノシトールリン酸 (D-Ins(1,4,5)P₃, L-Ins(1,4,5)P₃, D-Ins(2,4,5)P₃, D-Ins1P, L-Ins1P and Ins2P) の合成を行った。

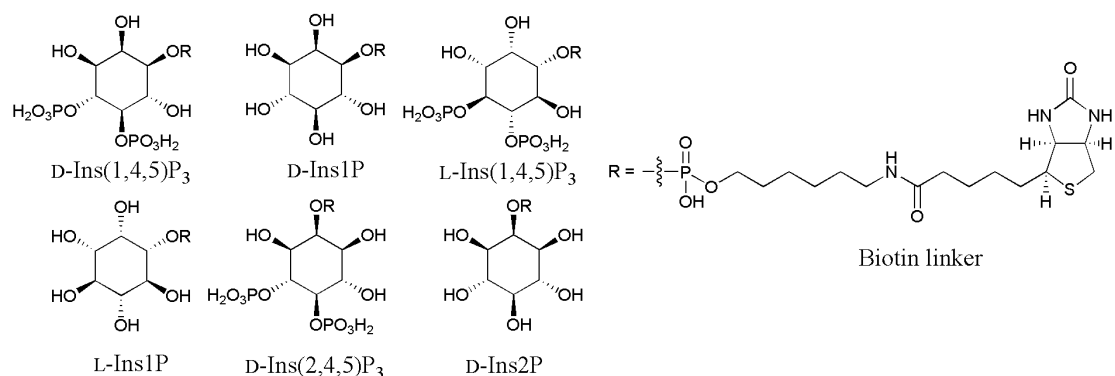


Figure 1–1. Biotinylated inositol phosphates.

第2節 ビオチン化イノシトールリン酸類の設計と合成及びその評価

2-1) ビオチン化イノシトールリン酸の設計及び合成

ビオチン化イノシトールリン酸の設計及び合成は **Figure 1-2** にもとづいて行った。*Ins(1,4,5)P₃* と PLC δ PH domain との複合体の X 線結晶構造解析の結果によれば¹⁸⁾、*Ins(1,4,5)P₃* の 4,5-位のリン酸が結合ポケットに完全に収まっていることから、1 位もしくは 2 位のリン酸に biotin linker を導入することができれば、PH domain との結合に最小限の影響しか与えないと考えた。

myo-イノシトールを出発原料として、6 つある水酸基を保護及び脱保護を繰り返す手法を用いてイノシトール部位を合成する。このとき、ラセミ中間体として生成するジアセタール化合物 **1** の光学分割を行うこととする³⁰⁾。1 位が水酸基で、その他がアセチル基もしくは保護したリン酸基を所有したイノシトール部位 **14a** を得る。最終的に 2 置換型ホスホラアミダイトユニットリン酸化法³¹⁾を用いて、イノシトール部位とビオチンリンカー部位とを結合させ、脱保護を行うことで目的物を得る経路を採用した。またビオチンは、硫黄元素をその骨格に持つため、最終的に存在させる保護基には接触還元法を使用しなければならないベンジル基、これに類似する保護基は残さないこととした。

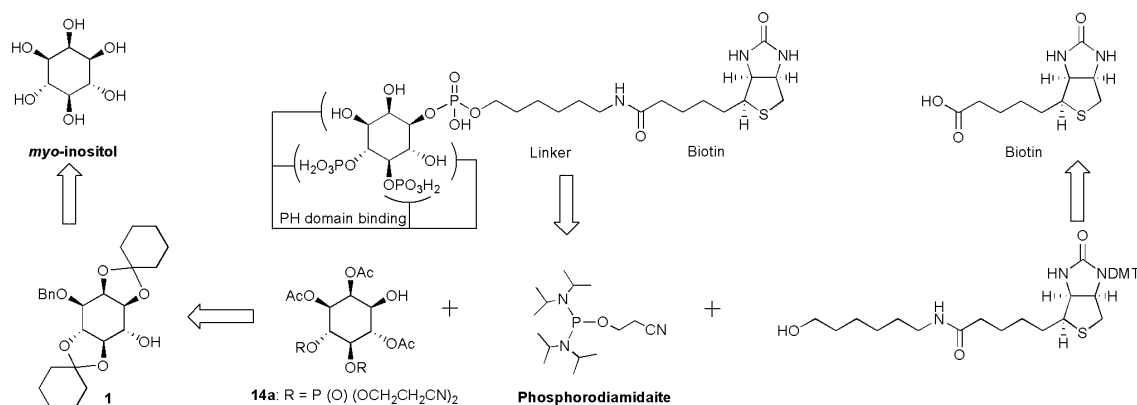
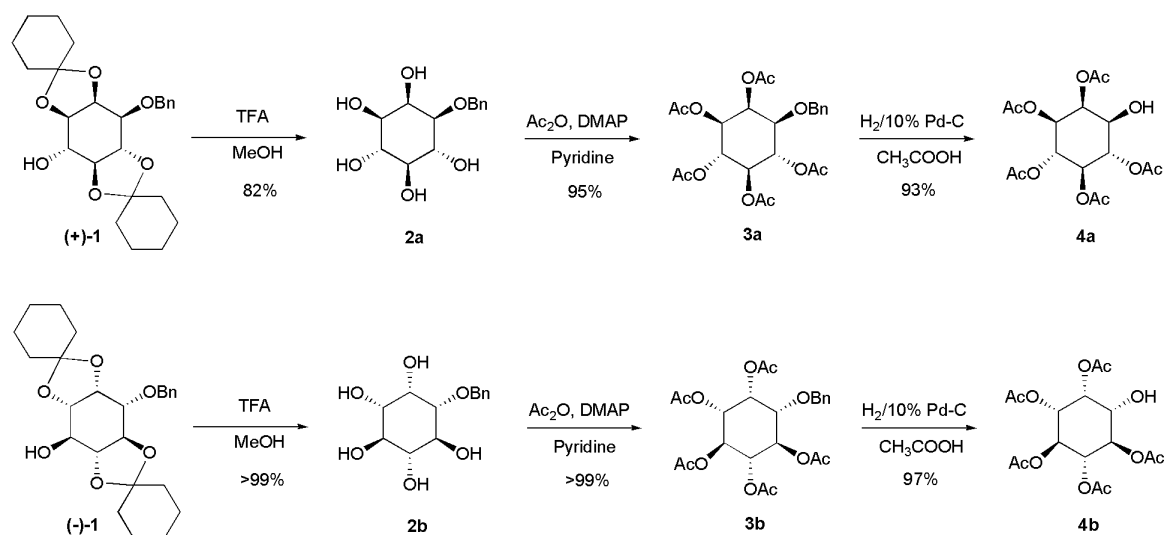


Figure 1-2. Design of Biotinylated *Ins(1,4,5)P₃*.

2-2) *Ins1P* 部位の合成

D-*Ins1P* と L-*Ins1P* の合成法を **Scheme 1-1** に示す。Billington らの方法³⁰⁾によって光学分割した D-1-*O*-benzyl-2,3,5,6-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (+)-**1** を D-*Ins1P* の出発原料とした。シクロヘキシリデンアセタール(+)-**1** を酸加水分解し、1 位以外が全て水酸基である **2a** をアセ

チル化することで、全て保護された **3a** を得た。10%パラジウム存在下で、水素雰囲気下、接触還元を行うことで、目的とする D-Ins1P 部位、**4a** を 3 ステップ合計 73% で得た。エナンチオマーである L-Ins1P 部位、**4b** は L-1-*O*-benzyl-2,3:5,6-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (**-**)-**1** を出発原料として、同じ経路をもとに合成した。

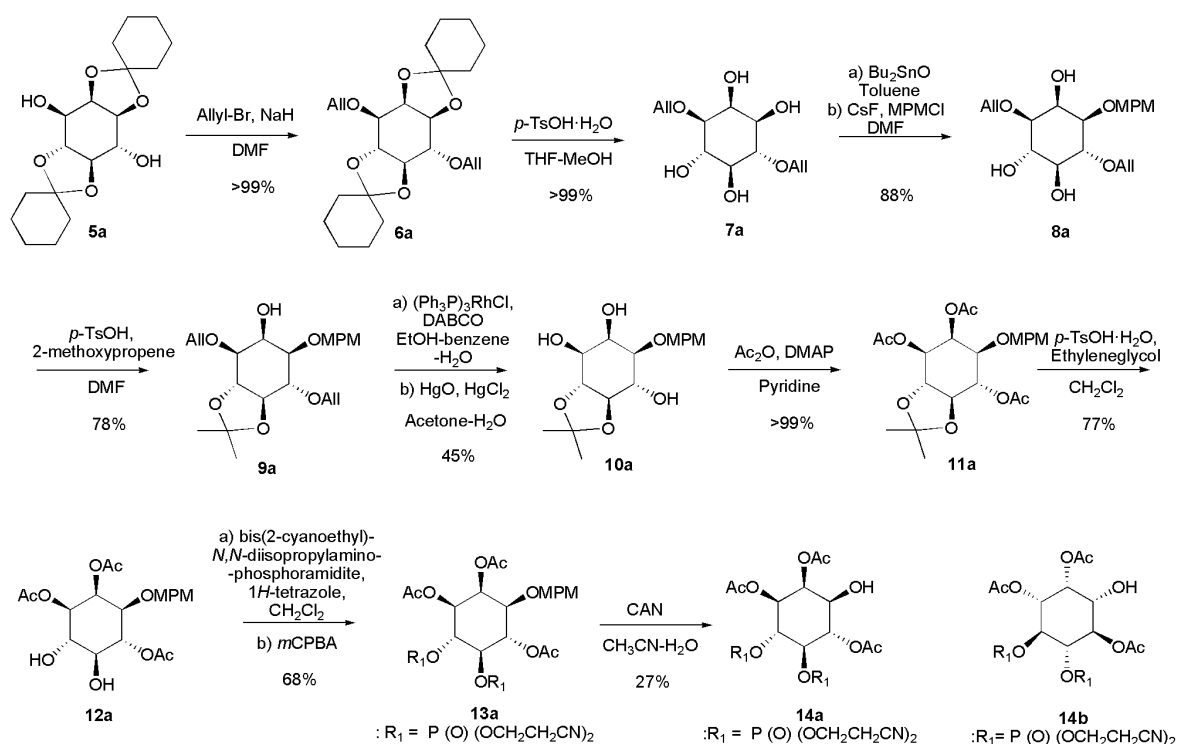


Scheme 1-1. Synthesis of Ins1P moiety.

2-3) Ins(1,4,5)P₃ 部位の合成

D-Ins(1,4,5)P₃ と L-Ins(1,4,5)P₃ 部位の合成法を **Scheme 1-2** に示す。出発原料である D-1,2:4,5-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol **5a** は(**-**)-**1** のベンジル基を接触水素化することで得た。**5a** の 2 つの水酸基をアリル化することで、ジアリル体である **6a** を定量的に得て、*p*-トルエンスルホン酸を H₂O 存在下で加熱還流することで、アセタールを加水分解した **7a** を定量的に得た。**7a** がもつ 1,2-位の *cis*-ジオールの 1 位のみを選択的に MPM 基で保護するために、ジブチルスズオキサイドを用いた手法を採用した^{32),33)}。*cis*-1,2-ジオールのスタニレンアセタール化合物を、フッ化セシウム存在下で、MPMCl と、温度を制御しながら反応させることで、目的とする 1 位のみが MPM 基で保護された **8a** を 88% の高収率で得ることができた。**8a** がもつ 4,5-位の水酸基を定法にて、イソプロピリデンアセタールで保護した **9a** を収率 78% で得た。**9a** のアリル基を異性化し³⁴⁾、HgO 及び HgCl₂ が作り出す酸性条件下で、プロペニルエーテルを加水分解した **10a** を収率 45% で得た。**10a** の 2,3,6-位の水酸基を、アセチル基で保護した化合物 **11a** を定量的に得て、酸性条件下、エチレングリコールとのアセタール置換反応を行うことで、目的とする中間体 **12a** を収率 77% で得た。4,5-位が水酸基である **12a** は、リン酸基を目的とする位置に導入できる中間体である。1 置換型のリン酸化試薬である Bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylaminophosphoramidite は、Uhlmann と Eagles が開発した最も利用率の高いリン酸化試薬の一つである³⁵⁾。このアミダイトと **12a** を 1*H*-tetrazole 存在下、室温で反応させる

ことで、重リン酸化体を TLC 上で確認した。引き続き、*m*CPBA を加え、さらに 5 分間攪拌することで、目的とするリン酸化体 **13a** を収率 68% で得た。化合物 **13a** を CH₃CN-H₂O 混合溶媒中で硝酸アンモニウムセリウム CAN と反応させることで³⁶⁾、MPM 基を酸化的に開裂させた **14a** を収率 27% で得た。エナンチオマーの L-Ins(1,4,5)P₃ 部位である **14b** は、D-2,3:5,6-di-*O*-cyclo-hexylidene-*myo*-inositol (+)-**1** を出発原料として、同じ経路をもとに合成した。

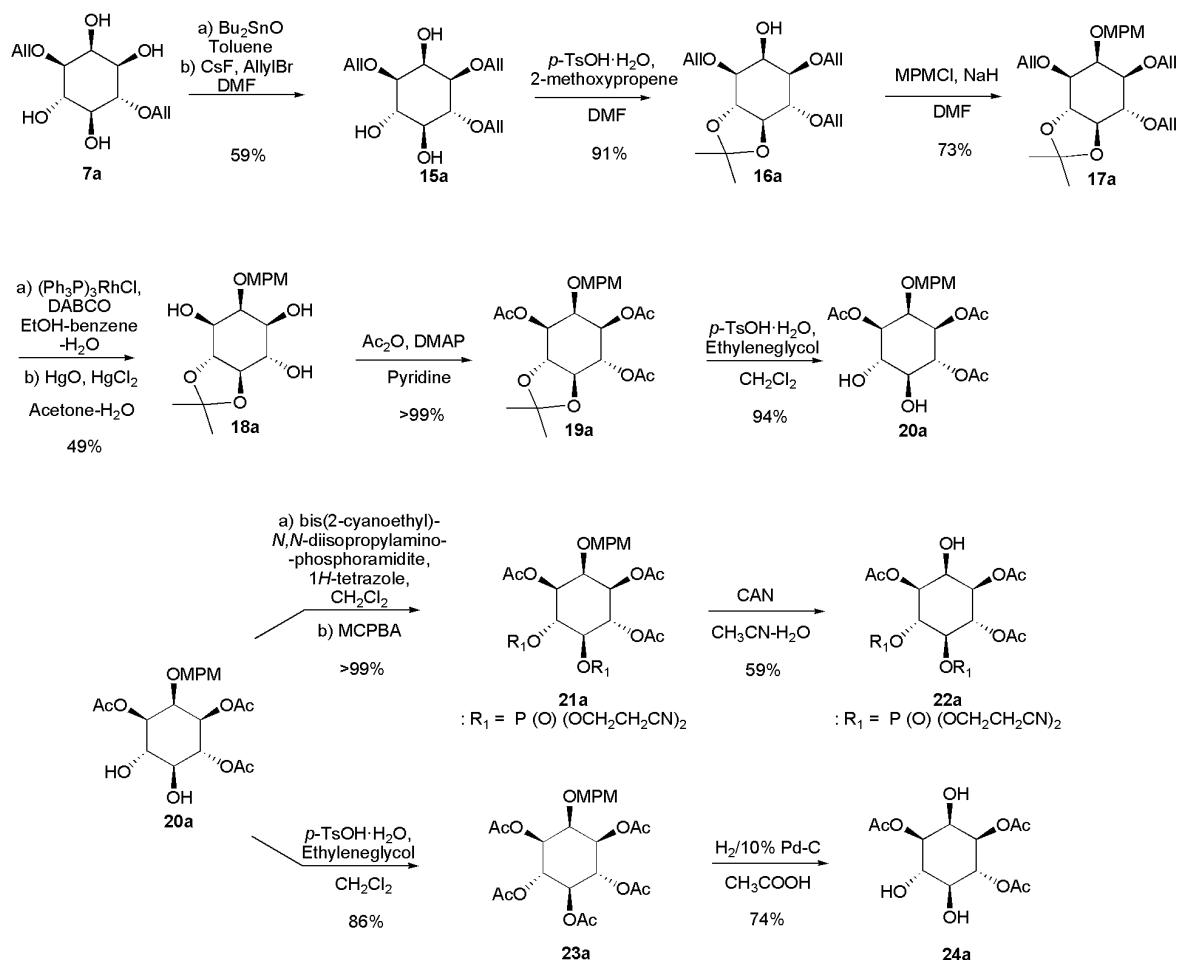


Scheme 1-2. Synthesis of Ins(1,4,5)P₃ moiety.

2-4) D-Ins(2,4,5)P₃ 部位及び Ins2P 部位の合成

D-Ins(2,4,5)P₃ の合成法を Scheme 1-3 に示す。D-Ins(1,4,5)P₃ の合成中間体でもある **7a** の 1-位のみを選択的にアリル基を、ジブチルスズオキサイド法を用いて導入した化合物 **15a** を収率 59% で得た^{32), 33)}。**15a** がもつ 4,5-位の水酸基にイソプロピリデンアセタールを導入した **16a** を収率 91% で得て、さらに 1-位を MPM 基で保護した **17a** を収率 73% で得た。**17a** のアリル基を脱保護した **18a** を収率 49% で得て、結果として生じた水酸基を、アセチル基で保護した **19a** を定量的に得た。さらに、先に導入したイソプロピリデンアセタールを置換反応で脱保護した化合物 **20a** を収率 94% で得た。**20a** の 4,5-位の水酸基にリン酸基を導入して **21a** を定量的な収率で得て、CAN を用いて MPM を脱保護することで、目的とする D-Ins(2,4,5)P₃ 部位 **22a** を収率 59% で得た。一方で、Ins2P 部位である 2-ヒドロキシペンタアセテート、**24a** は、**20a**

を完全にアセチル化し（収率 86%）、MPM を脱保護（収率 74%）することで、2 ステップ合計 64%で得た。

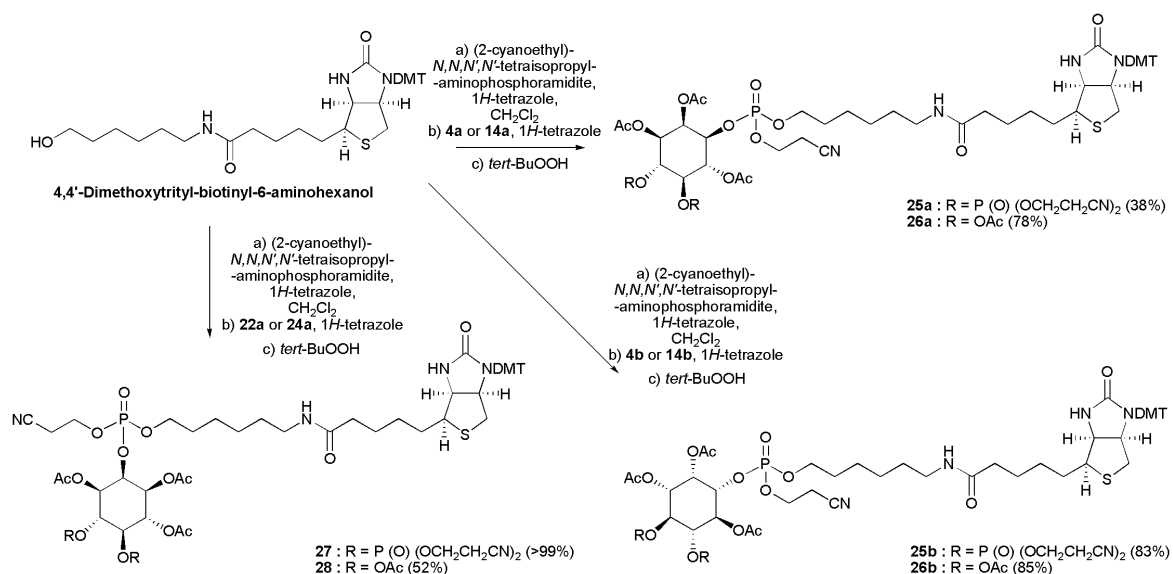


Scheme 1-3. Synthesis of Ins(2,4,5) P_3 and Ins2P moieties.

2-5) Ins(1,4,5) P_3 部位とビオチンリンカー部位のカップリング反応

イノシトール部位とビオチンリンカー部位とのカップリング反応を **Scheme 1-4** に示す。ビオチンリンカーは Pon らが報告したビオチン化 DNA の合成法を応用した³⁷⁾。ビオチンリンカー部位を 2 置換型ホスホラアミダイトである (2-cyanoethyl) *N,N,N',N'*-tetra-isopropylaminophosphoramidite³¹⁾と 1*H*-tetrazole 存在下で反応させ、TLC 上で目的とする 1 置換型となったホスホラアミダイトを確認後、ただちにイノシトール部位 (**4a**, **14a**, **4b**, **14b**, **22a** or **24a**) と 1*H*-tetrazole との混合液を添加することで、カップリング反応を進行させた。TLC 上で目的物を確認後、*t*-BuOOH を加え 5 分間さらに攪拌することで、亜リン酸 (III) からリン

酸 (V) に酸化した化合物 **25a** (収率 38%)、**26a** (収率 78%)、**25b** (収率 83%)、**26b** (収率 85%)、**27** (収率 >99%)と **28** (収率 52%)を得た。それぞれの化合物において、MS スペクトル上でビオチンの硫黄元素の酸化は確認されなかった。



Scheme 1-4. Coupling of inositol moiety and biotin moiety.

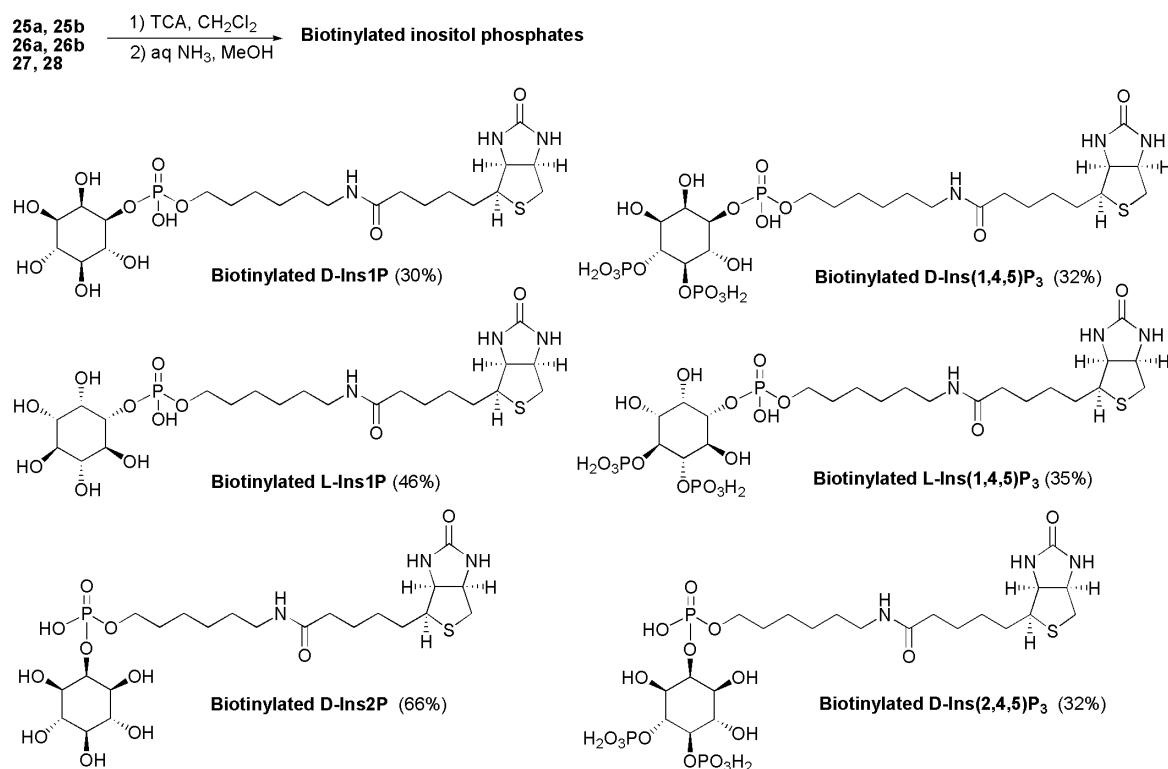
2-6) ビオチン化イノシトールリン酸の最終脱保護反応

ビオチン化イノシトールリン酸を得るための最終的な脱保護反応を **Scheme 1-5** に示す。はじめに、ビオチンリンカー部位がもつ DMTr 基を、TCA を用いて脱保護した。さらに、28% $\text{NH}_3\text{-MeOH}$ (1:1)の条件下、55°C で 10 時間加熱攪拌したものを濃縮し、陰イオン交換樹脂を用いて精製した。一度樹脂に吸着させた化合物を、ギ酸とギ酸アンモニウムの勾配をかけることで溶出し、モノリン酸体及びトリリン酸体である目的化合物ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ (収率 32%)、D-Ins1P (収率 30%)、L-Ins(1,4,5)P₃ (収率 35%)、L-Ins1P (収率 46%)、D-Ins(2,4,5)P₃ (収率 52%)と Ins2P (収率 66%)を得た。

2-7) ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ と PLCδ₁ PH domain との結合解析

合成したビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ と PLCδ₁ PH domain との結合解析を、ストレプトアビジンビーズを使用したプルダウン試験をもとに行った。その結果を **Figure 1-3** に示す。PLCδ₁ PH domain がビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ の濃度 (横軸、 μM) に比例して、結合量 (縦軸、結合分率%) が増加していることがわかる。この結合曲線をもとに、Fitting を行い、平衡解離定数 (K_D) を算出すると、 $K_D = 0.25 \pm 0.02 \mu\text{M}$ であった。この値は、天然の D-Ins(1,4,5)P₃ と PLCδ

PH domain との K_D ($0.21 \mu\text{M}$)¹⁷⁾と同じ親和性を示している。すなわち、ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ は、ビオチン部位を持ちながらも、生体内の Ins(1,4,5)P₃ と同じ機能を維持しているものといえる。杉本と森井らは³⁸⁾、本研究において合成したビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ を用いて、PLC δ_1 PH domain の蛍光バイオセンサーの開発に応用している。なお、ビオチン化 Ins(1,4,5)P₃ を含むビオチン化イノシトールリン酸と PH domain との結合解析の詳細は、第 2 章においても述べる。



Scheme 1–5. Final deprotection of biotinylated inositol phosphates.

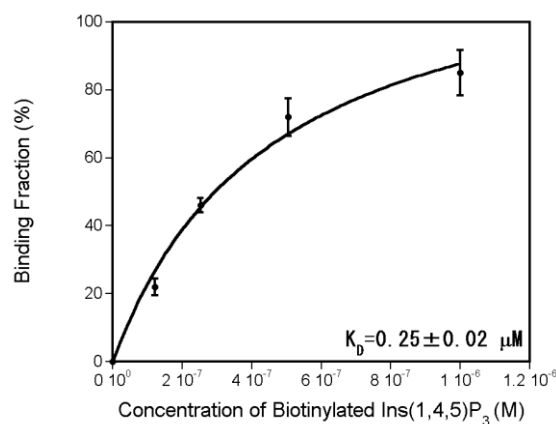


Figure 1–3. Binding curve between biotinylated Ins(1,4,5)P₃ and PLC δ_1 PH domain. Calculated K_D values are shown. Experiment was performed in duplicate.

第3節 小括

D-Ins(1,4,5)P₃を筆頭に、6種類のビオチン化イノシトールリン酸を設計合成した。PLCδ PH domain と D-Ins(1,4,5)P₃との複合体の X 線結晶解析結果をもとに、1位もしくは2位のリン酸にビオチンリンカーを導入できれば、PH domain との結合にほとんど影響をおよぼさないものと予測し設計した。光学分割したシクロヘキシリデンアセタール化合物 **(+)-1** もしくは **(-)-1** を出発原料として、6つある水酸基の保護と脱保護を繰り返すことで目的とするイノシトール部位を得ることができた。イノシトール部位とは別に合成したビオチンリンカー部位を、2置換型ホスホラアミダイトを用いてイノシトール部位とカップリングさせ、さらに脱保護を行うことで、目的とするビオチン化イノシトールリン酸の合成に成功した。本化合物は、生体内の Ins(1,4,5)P₃と同等の機能をもつバイオリジカルツールであることがプルダウン試験の結果から証明された。第2章において、本化合物と PH domain 類との詳細な結合解析について述べる。

第2章

Grp1 pleckstrin homology (PH) domain を標的としたビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成

第1節 序論

第1章で述べたように、D-*myo*-Inositol 1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃)を代表とするイノシトールリン酸は、細胞内シグナル伝達を担うセカンドメッセンジャーである^{9), 39)}。Ins(1,4,5)P₃は、phospholipase C (PLC)が Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂)を加水分解することによって生成する。Ins(1,4,5)P₃がサイトゾルへ拡散することにより、細胞内小胞体に結合し細胞内 Ca²⁺の放出を引き起こすが、一方で Ins(1,4,5)P₃は Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase によって、イノシトール部位の3位がリン酸化され Ins(1,3,4,5)P₄へと代謝される^{39), 40)}。これまでに、PtdIns(4,5)P₂の加水分解によって生じた Ins(1,4,5)P₃と、Ins(1,4,5)P₃ 3-キナーゼによって生じた Ins(1,3,4,5)P₄の2つのメッセンジャーが協奏的に機能することが報告されている⁴¹⁾⁻⁴³⁾。すなわち、Ins(1,4,5)P₃と Ins(1,3,4,5)P₄が、カルシウム動員とそれに続く細胞膜上のカルシウムチャネルの開口を引き起こし、細胞外からもカルシウムを動員させるというものである。しかし、これらの報告については議論が多く、Ins(1,4,5)P₃と Ins(1,3,4,5)P₄との連動した細胞内カルシウム動員は未解決の点が多い。

Ins(1,4,5)P₃と Ins(1,3,4,5)P₄が作り出すこのカルシウムシグナル伝達経路を、それぞれのイノシトールリン酸に分けて観察することができれば、上述の問題を解決できるかもしれない。第1章で述べたように、著者は、Ins(1,4,5)P₃と結合する蛋白質との結合解析を目的として、固定化部位と Ins(1,4,5)P₃の両方の機能をもつ、ビオチン化イノシトールリン酸(例. ビオチン化 Ins(1,4,5)P₃)の合成に成功している⁴⁴⁾。さらに、ビオチン化 Ins(1,4,5)P₃をストレプトアビジンビーズに固定化することで、バイオロジカルツールとして生体内の Ins(1,4,5)P₃と同様に働くことも証明している。

そこで、上述した Ins(1,4,5)P₃と Ins(1,3,4,5)P₄の細胞内における機能を、同じ実験条件下で、また同時に観察するために、ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄の設計合成を計画した。はじめに、Ins(1,3,4,5)P₄の標的蛋白質として、General Receptor of Phosphoinositide 1 (Grp1) pleckstrin homology (PH) domain⁴⁵⁾を選定し、Grp1 PH domainに基づいた分子設計と合成を行った。次に、Grp1 PH domainとビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄とのプルダウン試験を行った。さらに、ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄と第1章で示したビオチン化 Ins(1,4,5)P₃を、同じ実験条件下、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、Grp1 及び PLCδ₁ PH domain との結合解析を実施した。

第2節 ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の合成及びその評価

2-1) ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計

ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成は、**Figure 2-1** に基づいて行った。Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との X 線結晶解析結果⁴⁵⁾を観察すると、3,4,5-位が結合ポケットの中に完全ににおさまっていることから、1 位のリン酸にビオチンリンカー部位を導入することができれば、PH domain との結合に最小限の影響しか与えないと考えた。*myo*-イノシトールを出発原料として、6 つある水酸基の保護及び脱保護を繰り返す手法を用いる。目的とする 1 位が水酸基で、その他がアセチル基もしくは保護したリン酸基を所有するイノシトール部位 **38** を得る。2 置換型ホスホラアミダイトユニットリン酸化法を用いて³¹⁾、イノシトール部位とビオチンリンカー部位とを結合させ、脱保護を行うことで目的物を得る経路を採用した。

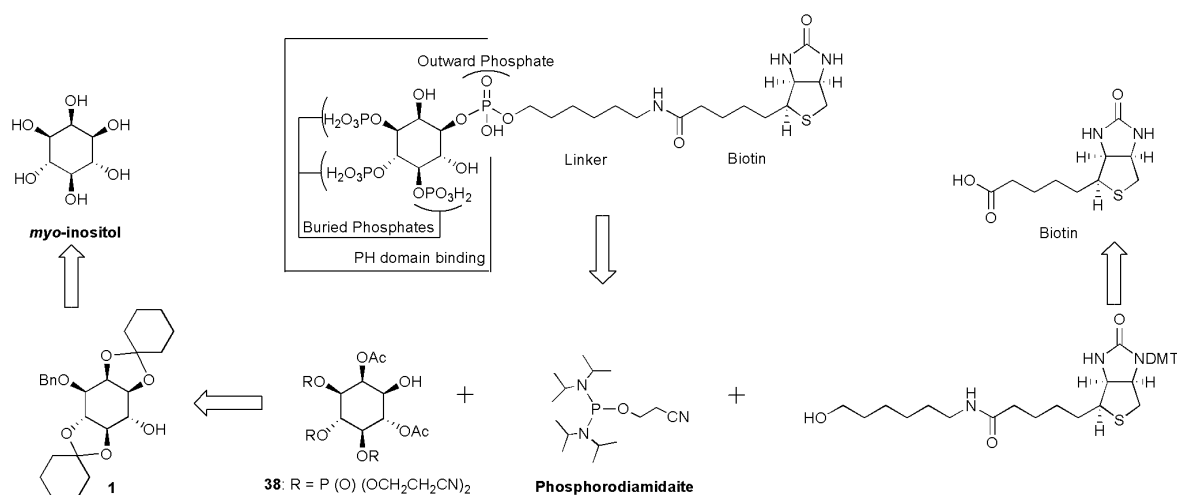
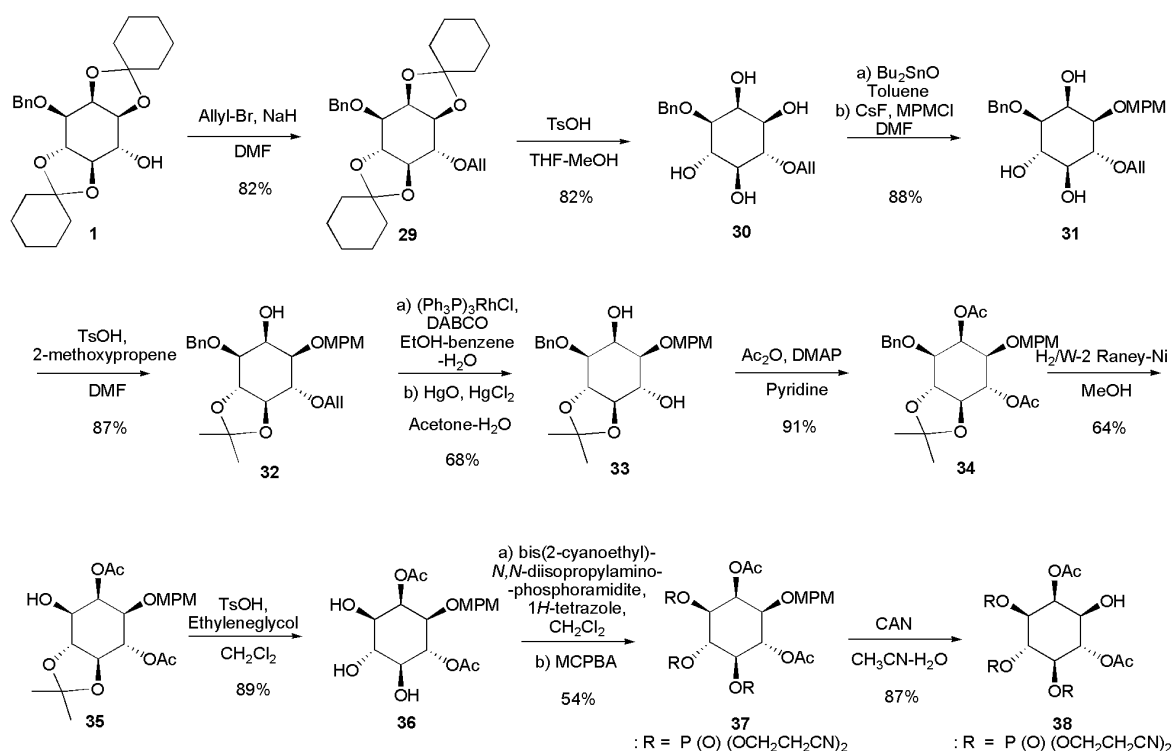


Figure 2-1. Design of Biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄.

2-2) Ins(1,3,4,5)P₄ 部位の合成

ラセミ体における Ins(1,3,4,5)P₄ 部位の合成法を **Scheme 2-1** に示す。DL-3-*O*-benzyl-1,2:4,5-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol **1** を出発原料とした。化合物 **1** の 6-位の水酸基をアリル基で保護した化合物 **29** を収率 82% 得て、酸性条件下で脱アセタール化した化合物 **30** を収率 82% (2 ステップ合計 67%) で得た。化合物 **30** の *cis*-1,2-ジオールを、ジブチルスズオキサイド法^{32), 33)}を採用して、1 位に選択的に MPM 基を導入した化合物 **31** を収率 88% で得た。4,5-位の水酸基を、定法を用いてイソプロピリデンアセタール化した化合物 **32** を収率 87% で得た。アリル基の異性化³⁴⁾、それに続く酸性化によって、アリル基を脱保護した化合物 **33** を収率 68% で得た。化合物 **33** のすべての水酸基をアセチル化して化合物 **34** を収率 91% で得た。及

川らの W-2 Raney Nickel 接触還元法⁴⁶⁾を用い、化合物 **34** の 2 つの芳香族において、ベンジル基のみを脱保護した化合物 **35** を収率 64% で得た。このとき、副生成物として 2 位から 3 位にアセチル基が転移した化合物がわずかに得られたが、目的物 **35** を優位に得ることができた。アセタール交換反応を行うことで、4,5-位を水酸基に戻した化合物 **36** を収率 89% で得た。化合物 **36** の 3,4,5-位の水酸基に、一置換型ホスホラアミダイト (bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylaminophosphoramidite)³⁵⁾ を 1*H*-tetrazole 存在下で反応させ、*m*CPBA で酸化することで目的とする化合物 **37** を収率 54% で得た。最終的に CAN を用いて⁴⁷⁾、1 位の MPM 基を酸化的条件下で脱保護することで、目的とする Ins(1,3,4,5)P₄ 部位、**38** を収率 87% で得た。



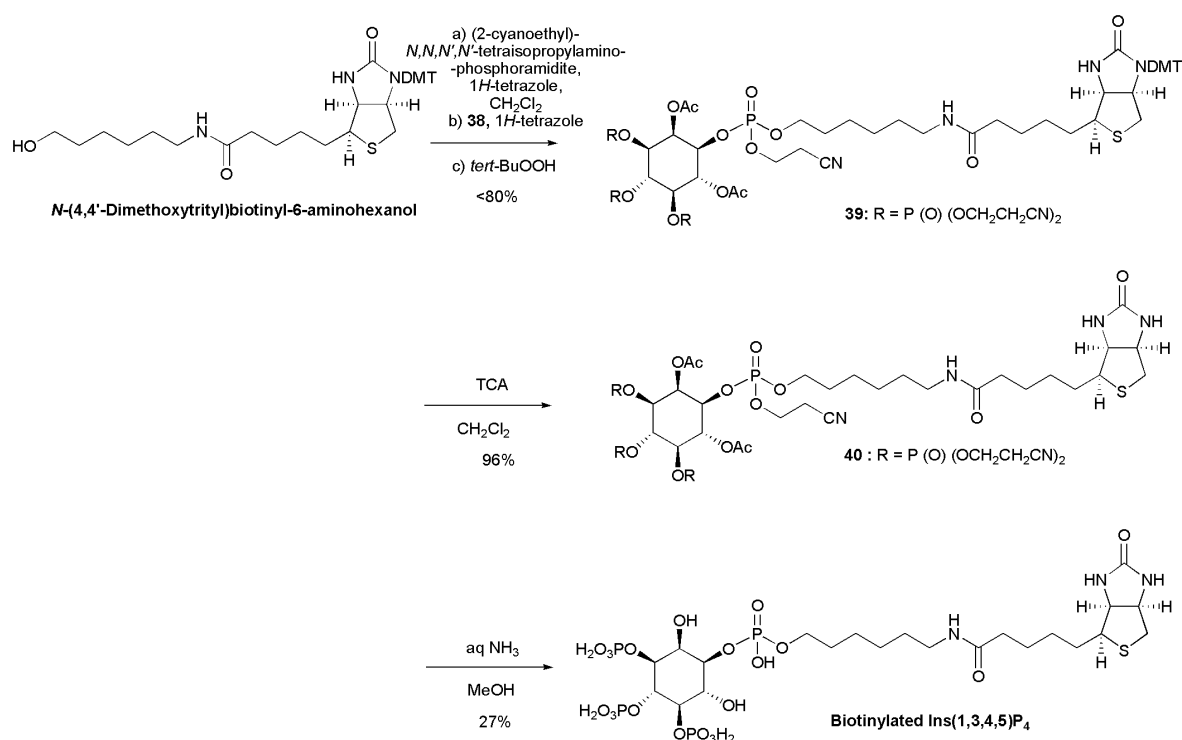
Scheme 2-1. Synthesis of Ins(1,3,4,5)P₄ moiety.

2-3) Ins(1,3,4,5)P₄ 部位とビオチンリンカー部位とのカップリング反応

Ins(1,3,4,5)P₄ 部位とビオチンリンカー部位とのカップリング反応を **Scheme 2-2** に示す。Ponらの合成法³⁷⁾を応用し、合成したビオチンリンカー部位を、2 置換型ホスホラアミダイト ((2-cyanoethyl) *N,N,N',N'*-tetraisopropylaminophosphoramidite)³¹⁾ を 1*H*-tetrazole 存在下で反応させ、1 置換型となったアミダイトを TLC 上で確認後、引き続き Ins(1,3,4,5)P₄ と 1*H*-tetrazole との混合液を加えた。目的化合物を TLC 上で確認後、*t*-BuOOH で亜リン酸 (III) からリン酸 (V) への酸化を行うことで目的とする化合物 **39** を収率 80% で得た。次に、TCA を用いてビ

オチン部位が所有する DMTr 基を脱保護した化合物 **46** を収率 96% で得て、28% NH₃-MeOH (1:1) の条件下、55°C で 10 時間加熱攪拌したものを濃縮した。残渣を、陰イオン交換樹脂を用い、樹脂に吸着させた化合物を、ギ酸とギ酸アンモニウム混合液の勾配をかけることで、テトラリン酸体である目的化合物ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ を収率 27% で得ることができた。

蛋白質結合実験に使用するビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ は D-3-*O*-benzyl-1,2:4,5-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (–)-**1** を出発原料として合成したもので実施した。



Scheme 2–2. Coupling of Ins(1,3,4,5)P₄ moiety and biotin moiety.

2-4) Grp1 PH domain とビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ との蛋白結合実験における評価

生化学的な実験は、光学分割を行った D-3-*O*-benzyl-1,2:4,5-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (–)-**1** を原料として合成したビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ を、ストレプトアビジンビーズに固定化した。ストレプトアビジンビーズを利用したプルダウン試験結果を **Figure 2–2** に示す。Grp1 PH domain を様々な濃度に調製したビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ 固定化ビーズとともにインキュベーションした。結合画分濃度を[B]として、非結合画分濃度を[S]とすると、[B]を、[B]と[S]の合計で除すると結合分率を算出できる。縦軸に結合分率(%)を、横軸にビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の濃度としてプロットすると、結合曲線が得られる。(Figure 2–2b)

この結合曲線から、Fitting を行うと平衡解離定数 (K_D) = $0.14 \pm 0.04 \mu\text{M}$ が得られた。この値は、これまでに報告された Grp1 PH domain と生体内の Ins(1,3,4,5)P₄ との K_D ($0.10 \mu\text{M}$)⁴⁸⁾ と

同様の親和性を示している。よって、ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ は、1 位が修飾されていたとしても、Ins(1,3,4,5)P₄ の機能が維持できているものといえる。

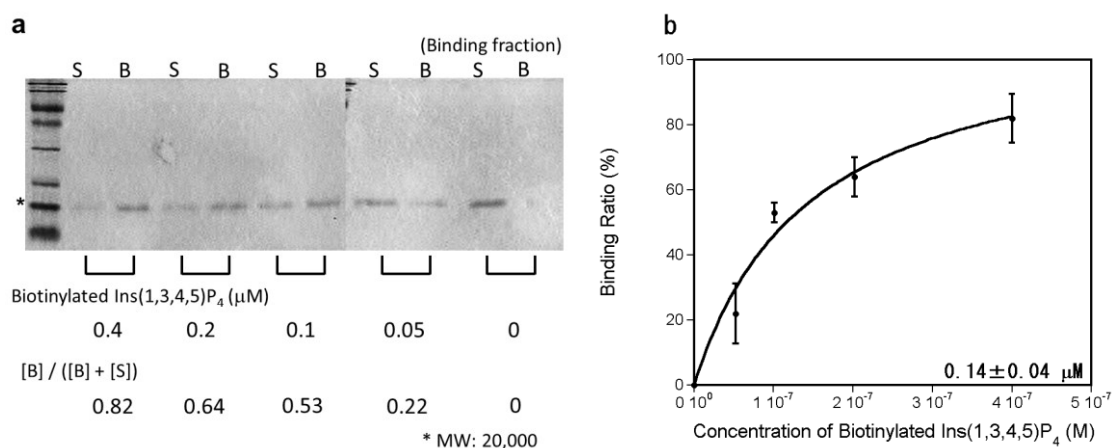


Figure 2-2. A SDS-polyacrylamide electrophoretic analysis for the Grp1 PH domain and biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ binding. **(a)** After biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ immobilized beads was incubated with 0.10 μM Grp1 PH domain, the unbound supernatant fraction [S] was obtained, then bound fraction [B] was obtained by eluting the beads using 50 μM unmodified Ins(1,3,4,5)P₄ solution. Each fraction was subjected to 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by quantitation with CBB staining. The binding ratio [B]/([B]+[S]) was calculated by the bound fraction [B] divided by the sum of bound fraction [B] and non-binding fraction [S]. **(b)** The fraction of Grp1 PH domain bound to biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ immobilized beads [B]/([B]+[S]) was plotted against the biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ concentrations. A solid curve represents the best fit for the theoretical dissociation equation.

2-5) SPR 法を用いたビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ の評価

上述したようにストレプトアビジンに固定化したビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ が、生体内の Ins(1,3,4,5)P₄ と同様に Grp1 PH domain と結合することが証明できた。そこで、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法に基づいた装置である BIACORE を土台とした PH domain との結合解析を計画した。SPR とは、センサーチップのガラスと金の界面における反射光の消失エネルギーを測定するもので、このエネルギー変化が金薄膜近傍での媒質の屈折率に依存して変動する。すなわち、媒質の屈折率の変化に応じて、光の谷が I から II へと移動するが、(Figure 2-3) この移動度の経時変化がセンサーグラムと呼ぶグラフとして表示される。一方の分子をセンサーチップに固定し、もう一方の分子をアナライトとして流路に流すと、センサーチップ表面で 2 分子間の結合もしくは解離反応が起こると質量変化が生じ、結果として媒質の屈折率変動するため、その現象を経時的に観察することができる。

すでにストレプトアビジンが共有結合しているセンサーチップを用いて、そこに濃度を調製したビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ を固定化することで、PH domain との結合解析を行った。

(Figure 2-4) このとき、ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ と Grp1 PH domain との結合が選択的であるかどうかを判断するために、第 1 章で合成したビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃, D-Ins(3,5,6)P₃

(L-isomer of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$)⁴⁴)を、同じ手法を用いてストレプトアビジンセンサーチップ上に固定化した。これにより、同じ緩衝液条件下で、同時に結合量を比較することができる。

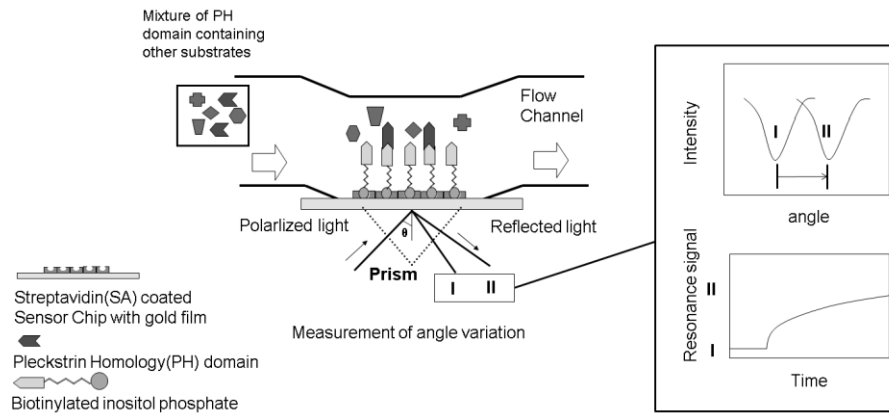


Figure 2–3. Principle of BIAcore.

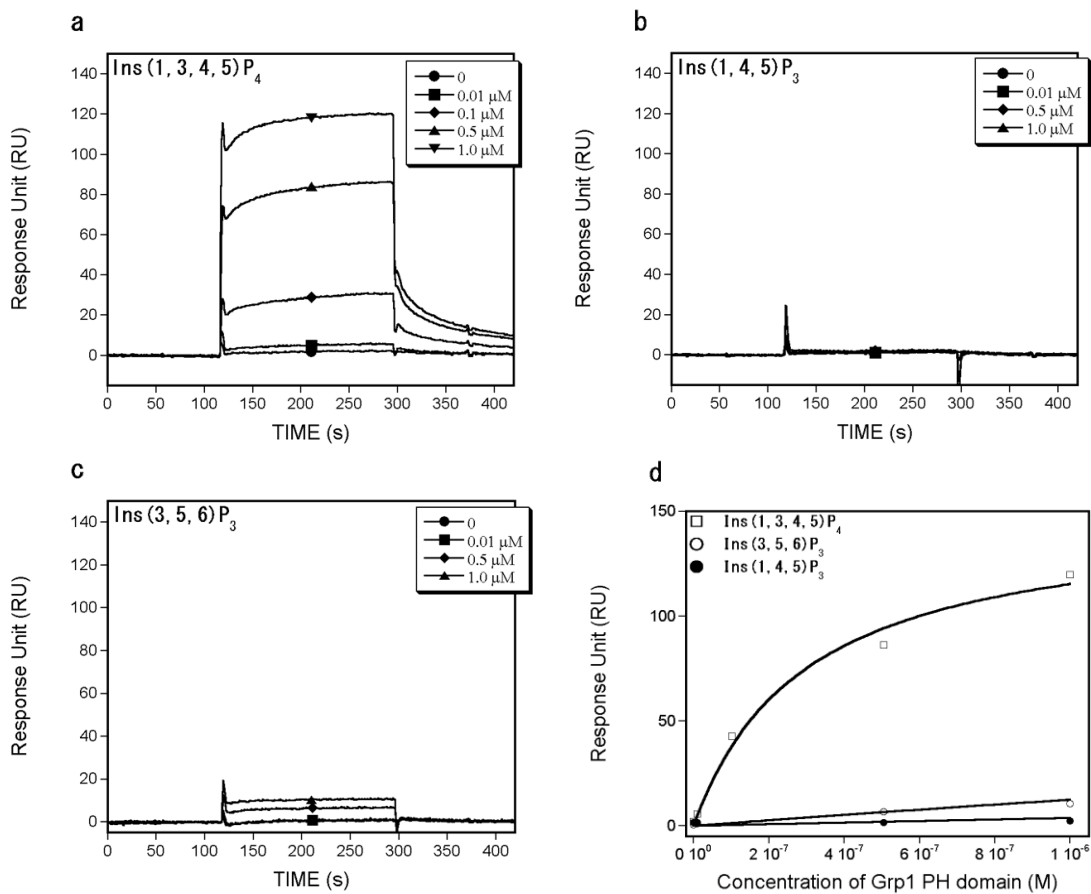


Figure 2–4. SPR analyses for the Grp1 PH domain and biotinylated $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and $\text{Ins}(3,5,6)\text{P}_3$ binding assay. Sensorgram of biotinylated $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (a), $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (b) and $\text{Ins}(3,5,6)\text{P}_3$ (c) at various concentrations of Grp1 PH domain at 25°C (20 $\mu\text{l}/\text{min}$). (d) The average of Response Unit (RU) at the equilibrium state (260-270 s) of Grp1 PH domain bound to biotinylated $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, $\text{Ins}(3,5,6)\text{P}_3$ and $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ were plotted against concentrations of Grp1 PH domain.

Figure 2-4a に示すようにビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ だけが、Grp1 PH domain の濃度に比例して結合量が増加している。様々な濃度に調製した Grp1 PH domain に対応した結合量 (RU) の平均値をプロットすることで K_D 値を算出し、おおよその K_D (0.3 μ M) が得られた。

(Figure 2-4d) 一方で、Ins(1,4,5)P₃ ($K_D \gg 1.0 \mu$ M) と Ins(3,5,6)P₃ ($K_D \gg 1.0 \mu$ M) ではほとんど結合が観察されなかった。(Figure 2-4b, c)

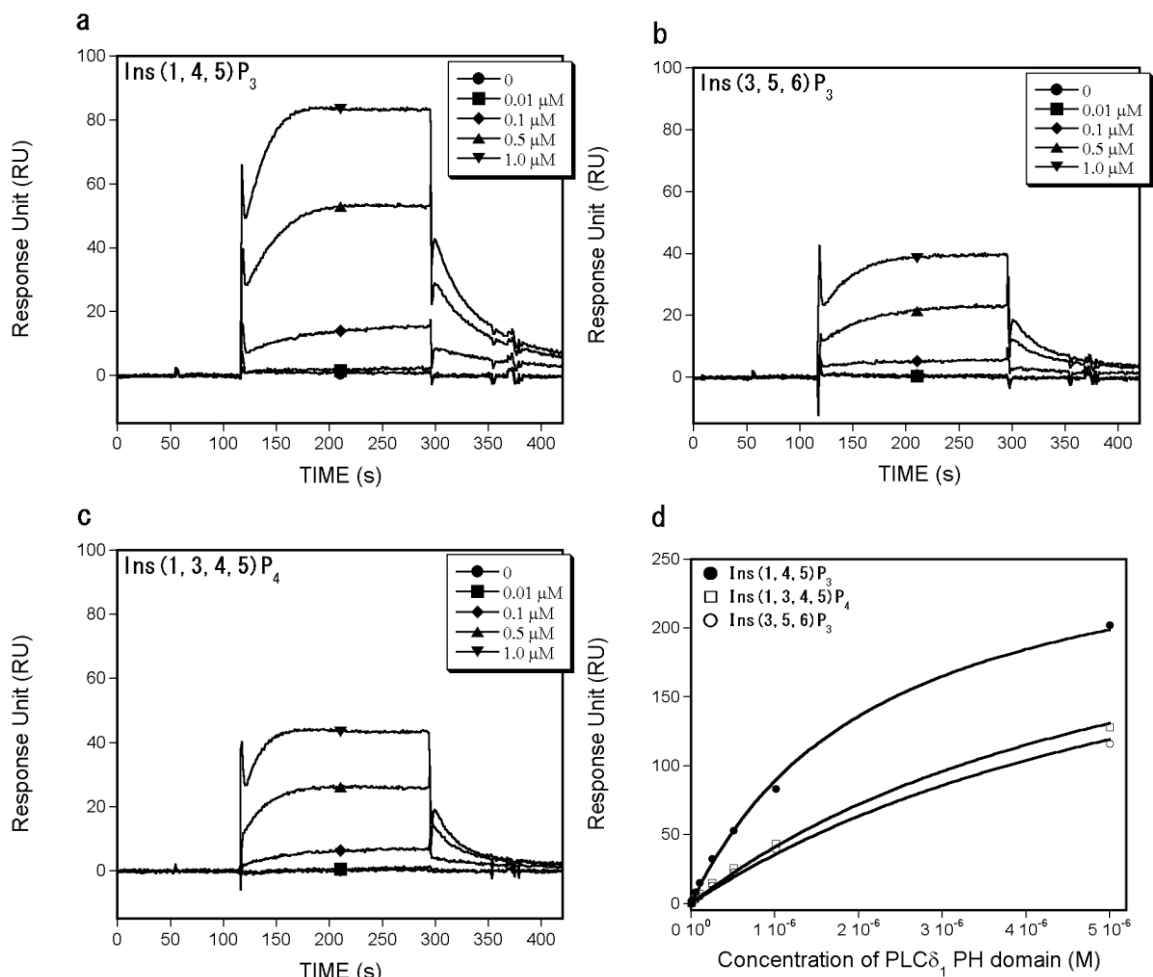


Figure 2-5. SPR analyses for the PLC δ_1 PH domain and biotinylated Ins(1,4,5)P₃, Ins(3,5,6)P₃ and Ins(1,3,4,5)P₄ binding assay. Sensorgram of biotinylated Ins(1,4,5)P₃ (a), Ins(3,5,6)P₃ (b) and Ins(1,3,4,5)P₄ (c) at various concentrations of PLC δ_1 PH domain at 25°C (20 μ l/min). (d) The average of Response Unit (RU) at the equilibrium state (260-270 s) of PLC δ_1 PH domain bound to biotinylated Ins(1,4,5)P₃, Ins(1,3,4,5)P₄, and Ins(3,5,6)P₃ were plotted against concentrations of PLC δ_1 PH domain.

次に、Grp1 PH domain ではなく、PLC δ_1 PH domain を調製し、同様にセンサーチップ上に流した。PLC δ_1 PH domain は高い親和性で、ビオチン化 Ins(1,4,5)P₃ に結合した。(Figure 2-5a and 5d) $K_D = 2.2 \mu$ M) 一方で、Ins(1,3,4,5)P₄ ($K_D > 5.0 \mu$ M) や Ins(3,5,6)P₃ ($K_D > 5.0 \mu$ M) には、低い親和性しか示さなかった。(Figure 2-5b, c and 5d) したがって、ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ 及び Ins(1,4,5)P₃ が、それぞれ Grp1 PH domain と PLC δ_1 PH domain を単独で認識したといえる。

また BIACORE は、速度論的解析が可能な装置である。しかしながら、**Figure 2-4a** 及び **5a** のセンサーグラムを観察すると、結合領域において、急激な上昇の後に結合平衡に達し、さらに解離領域において、急激な減少が観察されている。この場合、結合及び解離における速度定数を算出することができない。

2-6) Grp1 PH domain とビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ との理論的結合解析

Grp1 PH domain とビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ との理論的な結合解析を行うために、molecular docking study を行った。はじめに Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体における結合解析を行った。次に Grp1 PH domain とビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ のモデルとして、1位のリン酸基にヘキシル型 (C₆) の炭素鎖を導入した D-Ins(1,3,4,5)P₄ と Grp1 PH domain との結合解析を行った。その結果を **Figure 2-6** に示す。なお、モデル内における数値はアミノ酸と Ins(1,3,4,5)P₄ 及び炭素鎖 (C₆) をもつ Ins(1,3,4,5)P₄ との距離が 3.0 Å 以内の場合を示す。

Ins(1,3,4,5)P₄ の場合 (**Figure 2-6a**)、Ins(1,3,4,5)P₄ の3位のリン酸基が、Lys273 (2.0, 2.7 Å: NH₂)、Arg284 (1.8 Å: NH、1.9 Å: NH)、Arg305 (2.2 Å: NH₂) と相互作用している。また4位のリン酸が、Lys273 (1.9 Å: NH₂)、Lys343 (2.0, 2.6 Å: NH₂)、His355 (1.6 Å: NH)、Tyr295 (1.6 Å: OH) と相互作用している。さらに5位のリン酸が、Lys343 (1.8 Å: NH₂) と Asn354 (2.0 Å: NH₂) とに相互作用し、1位のリン酸が、Thr280 (2.2, 2.1 Å: OH) と相互作用している。

一方で、炭素鎖 (C₆) をもつ Ins(1,3,4,5)P₄ の場合 (**Figure 2-6b**)、Ins(1,3,4,5)P₄ の3位のリン酸は、Lys273 (1.2 Å: NH₂) と Arg284 (1.2 Å: NH、2.4 Å: NH) に相互作用している。また4位のリン酸は、Lys343 (1.3, 2.6 Å: NH₂) と His355 (1.3 Å: NH) と相互作用している。さらに、5位のリン酸は Lys343 (1.2 Å: NH₂) と Asn354 (1.8 Å: NH₂) に相互作用している。しかしながら、Ins(1,3,4,5)P₄ に観察された1位のリン酸基と Thr280 との相互作用は観察されず、炭素鎖 (C₆) が Grp1 PH domain の結合ポケットの外側に位置していた。3.0 Å 以内の距離をそれぞれの複合体において平均化すると、炭素鎖 (C₆) を持つ Ins(1,3,4,5)P₄ のほうが、Ins(1,3,4,5)P₄ よりも短い。一方で、相互作用している箇所はほとんど変わらない。

次に静電的相互作用とファンデルワールス力に基づいた docking score を算出したところ、Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体において -567 Kcal が、Grp1 PH domain と炭素鎖 (C₆) を持つ Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体において -565 kcal が U_dock value として得られた。Grp1 PH domain と修飾されていない Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体の方が、わずかに安定な複合体であることが確認された。これらの結果から、Ins(1,3,4,5)P₄ と炭素鎖 (C₆) をもつ Ins(1,3,4,5)P₄ が同じ結合ポケットに、適切に作用していることが示唆された。一方で、ビオチンリンカー部位とストレプトアビジンとにおいて、同様の結合解析を行ったところ、リンカー部分が外側にあることが確認された。したがって、Grp1 PH domain とビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ との結合解析

において、ビオチンリンカー部位における炭素 6 個分のリンカーの長さは適当であるといえる。

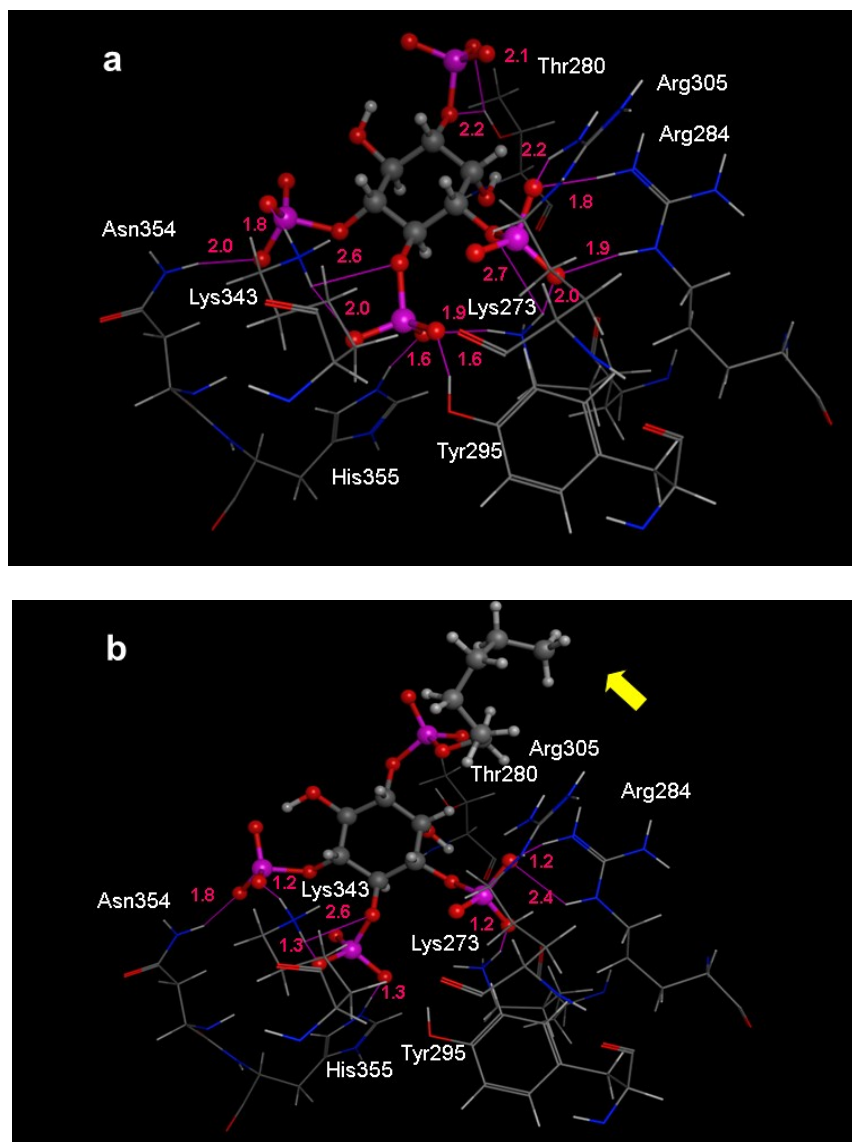


Figure 2–6. Docking studies of Grp1 PH domain-unmodified Ins(1,3,4,5)P₄ (a) and Grp1 PH domain- Ins(1,3,4,5)P₄ with hexyl (C₆) (b) complexes. The values show the interaction between amino acids and phosphates within 3.0 Å distance. The arrow indicates the position of hexyl (C₆).

第 3 節 小括

第 2 章では、生体内の Ins(1,3,4,5)P₄ と同等の機能をもつビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成を行った。ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ は、Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との X 線結晶解析結果⁴⁵⁾をもとに設計し、ホスホラアミダイトユニットリン酸化法を適用して合成した。

イノシトール部位の合成と、ビオチンリンカー部位とを 2 置換型ホスホラアミダイトを用いてカップリングさせることで、目的とするビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ の合成に成功した。ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ は、Grp1 PH domain と $K_D=0.14 \mu\text{M}$ で結合し、この K_D 値から修飾していない Ins(1,3,4,5)P₄ の結果と同等の親和性を持つことが証明された。すなわち、1 位にビオチンリンカーを導入しても、Grp1 PH domain との結合には影響を及ぼさないことが示された。ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ とビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ とを、BIAcore のセンサーチップに固定化し、PH domain 類との結合解析を行った。ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ は、Ins(1,3,4,5)P₄ に高い親和性をもつ Grp1 PH domain を特異的にまた高い親和性で認識したが、Ins(1,4,5)P₃ に高い親和性をもつ PLC δ_1 PH domain には親和性を示さなかった。一方で、ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ は PLC δ_1 PH domain を、比較的高い親和性で認識したが、Grp1 PH domain にはわずかししか結合しなかった。これらの結果より、それぞれのビオチン化イノシトールリン酸は、相互作用すると考えられる PH domain によって特異的に認識されていることが示された。今後、ビオチン化イノシトールリン酸がもつ特有の機能を用いて、Grp1 PH domain や PLC δ_1 PH domain 阻害剤の開発につなげたい。

第3章

SPR法を用いた HIV-1 Gag とイノシトールリン脂質誘導体との高感度結合解析

第1節 序論

HIV-1 のウイルス粒子形成において、Precursor of Gag protein (Pr55^{Gag})は重要な構造蛋白質である^{49), 50)}。翻訳後、ミリスチル化を受けた Pr55^{Gag} は細胞膜へと移行することで、他の成分を取り込み、未成熟なウイルス粒子を形成する。 Pr55^{Gag} はそれぞれ matrix (MA)⁵¹⁾、capsid (CA)⁵²⁾、nucleocapsid (NC)⁵³⁾と p6⁵⁴⁾の4つの主領域と、スペーサーペプチドといわれる p2 と p1 から構成される。 Pr55^{Gag} のN末端にある MA domain は細胞膜結合領域、CA domain は Pr55^{Gag} の多量体形成領域、NC domain はウイルスゲノムパッケージング領域とされている。また p6 領域はウイルスの出芽を制御しているものと考えられており、この出芽及び放出に伴って、ウイルスプロテアーゼにより Pr55^{Gag} が再構築され、感染性をもつ成熟 HIV となる。

(Figure 0-9)

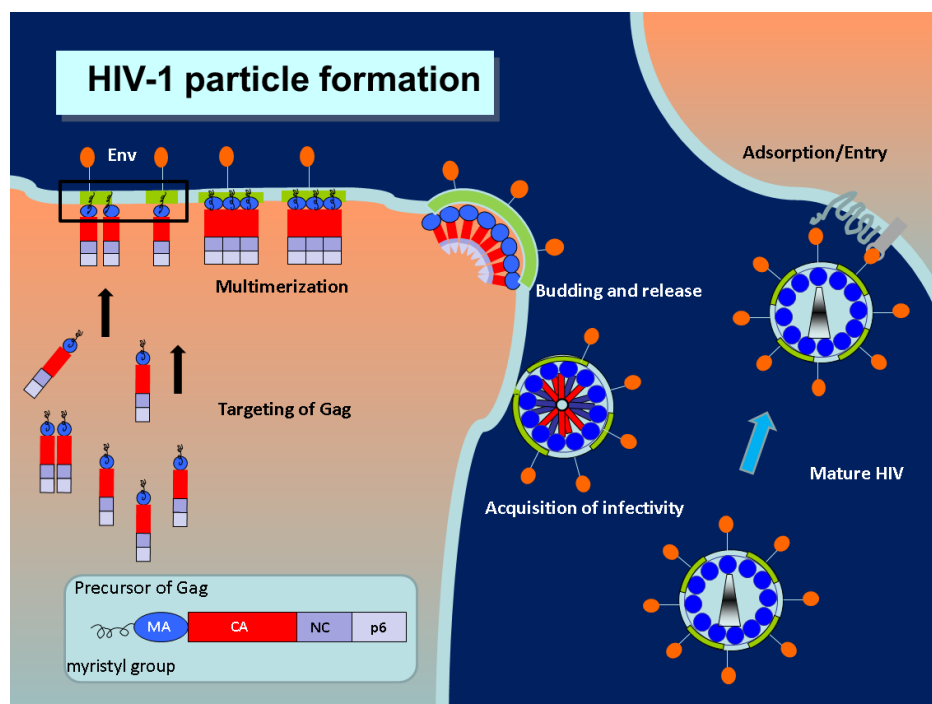


Figure 0-9. HIV-1 particle formation and membrane localization of Pr55^{Gag} .

Pr55^{Gag} の細胞膜移行は、幾千もの Pr55^{Gag} が細胞膜上の lipid raft に共局在化することによって達成されるが⁵⁵⁾、このプロセスは、 Pr55^{Gag} の N 末端にあるミリスチル基と MA domain に存在する塩基性領域によるものと考えられている。すなわち、MA domain の N 末端グリシンに結合したミリスチル基がフリップされることで、蛋白の外側に露出する。このとき、

Pr55^{Gag} の多量体化がこのフリップを促進するというもので、この現象はミリストイルスイッチと呼ばれてきた^{56), 57)}。一方、MA domain の塩基性領域は、酸性に荷電した細胞膜のリン脂質と結合する⁵⁸⁾。このミリストイル基と塩基性領域の両方が、MA domain の表面に存在し、共同的に機能を果たすことで、強い膜結合を生み出すものと考えられている。最近報告された知見から、Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂)が、MA domain がもつ塩基性領域に結合する分子であることが示された^{19), 20), 59)}。PtdIns(4,5)P₂は、イノシトールリン脂質の中で最も多く存在し、少なくとも3つのセカンドメッセンジャー(Ins(1,4,5)P₃⁹⁾、PtdIns(3,4,5)P₃⁶⁰⁾及びジアシルグリセロール (DG) の Precursor である^{61), 62)}。また PtdIns(4,5)P₂は、他の細胞過程であるエキソサイトーシス、細胞骨格制御、細胞内小胞輸送などに関与する⁶³⁾。

小野らは、Pr55^{Gag} の細胞膜移行を制御する細胞側の因子が PtdIns(4,5)P₂であることを以下の手法をもとに明らかにした¹⁹⁾。はじめに、phosphoinositide 5-phosphatase IV を強発現すると、PtdIns(4,5)P₂が減少し、Pr55^{Gag}が細胞膜に存在できなくなり、結果として late endosome へ移行することを確認した。次に、ADP-ribosylation factor 6 を強発現させることで、PtdIns(4,5)P₂が豊富なエンドソーム構造を形成させると、細胞膜よりも PtdIns(4,5)P₂ リッチなエンドソームに移行することを確認した。これらの報告は、mass spectrometric protein footprinting⁵⁹⁾や NMR を用いた解析²⁰⁾によって追試が行われ、Pr55^{Gag} と PtdIns(4,5)P₂ とが直接結合していることが証明された。

さらに、Saad らは NMR を用いた PtdIns(4,5)P₂ と MA との結合解析から、PtdIns(4,5)P₂ と MA domain との複合体が形成されることにより、MA domain のコンフォメーション変化に伴いミリストイル基が露出することを報告し、この結果に基づいて、“extended Lipid”モデルを提唱した²⁰⁾。(Figure 3-1) このモデルは、PtdIns(4,5)P₂ のイノシトールリン酸部位とジアシルグリセロールの 2'-アシル基が MA domain のクレフトに結合することで、ミリストイル基は細胞膜側へと露出される。このとき、ジアシルグリセロールの 1'-アシルは細胞膜にとどまることで、MA domain と PtdIns(4,5)P₂ とのより安定な複合体が形成されるというものである。また、その模式図を Figure 3-2 に示す。

さらに、Saad らは MA domain とイノシトールリン脂質との結合解析において、炭素鎖が異なる2種類のイノシトールリン脂質(炭素鎖=2 or 6)を使用しており、炭素鎖=6の方が、炭素鎖=2と比較して MA domain と強く結合することも報告している²⁰⁾。

上述のように、Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質との結合が HIV-1 複製において重要であることは知られているが、Pr55^{Gag} や MA domain とイノシトールリン脂質との複合体における結合機序および結合親和性には不明な点が残る。そこで、Pr55^{Gag}/MA とイノシトールリン脂質との複合体において、*in vitro* の系で、高感度で測定法できる表面プラズモン共鳴 (SPR) 法をもとにした結合解析を計画した。方法として、BIAcore のセンサーチップ上にイノシトールリン脂質の類縁体であるビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ を固定化し、そこへ Pr55^{Gag} や MA domain

を流すことで、平衡解離定数 (K_D) を求め、Pr55^{Gag}/MA domain とイノシトールリン脂質との複合体における生物学的重要性を検討することとした。

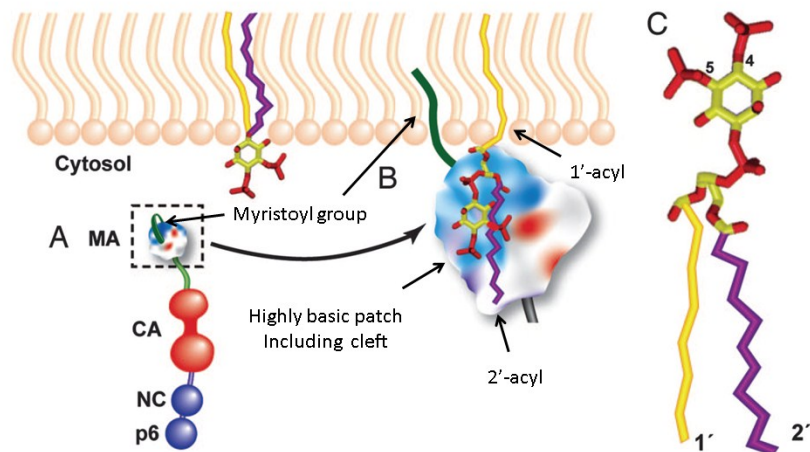


Figure 3–1. Binding of the MA domain of Pr55^{Gag} to PtdIns(4,5)P₂. (A) Organization of the Gag precursor protein, Pr55^{Gag}. Matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC), and p6 domains are shown. The N-terminal myristic acid moiety covalently attached to MA is shown tucked back in its sequestered conformation. The highly basic patch of MA is depicted surrounded with blue. (B) PtdIns(4,5)P₂ association with the MA domain. PtdIns(4,5)P₂ is embedded in the inner (cytosolic) leaflet of the lipid bilayer. The 1' and 2' acyl chains of PtdIns(4,5)P₂ are shown in right side. According to the model proposed by Saad *et al.*, after binding between MA and PtdIns(4,5)P₂, the myristic acid flips out into the exposed conformation and inserts into the lipid bilayer, and the 2' acyl chain is extruded from the membrane and sequestered by MA. (C) Structure of PtdIns(4,5)P₂ with phosphates on the 4 and 5 position of the inositol ring shown by “4” and “5” and the 1'- and 2'-acyl chains indicated. Note that the 2' acyl chain is more “kinked” than the 1' chain, indicating a lower degree of saturation of the 2' chain. This figure is derived from Freed *et al.*⁶⁴⁾

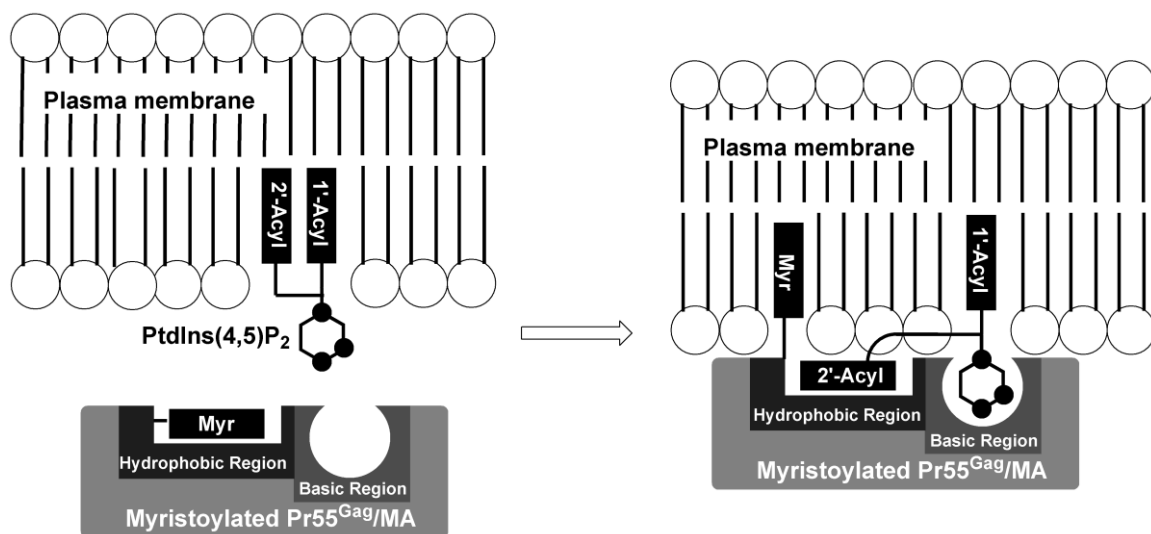


Figure 3–2. Binding model of the Pr55^{Gag}/MA to PtdIns(4,5)P₂.

イノシトールリン脂質に対する Pr55^{Gag} や MA domain の結合親和性を測定するために、リン酸の数や、位置が異なるイノシトールリン脂質、グリセロール部位を持たないイノシトールリン酸を用いることとした。たとえば、1) 細胞内カルシウム放出を担う Ins(1,4,5)P₃⁹⁾、2) Ras family の GTPase の活性化に参与する Ins(1,3,4,5)P₄⁶⁵⁾、3) 細胞膜の構成成分である Phosphatidylinositol (PtdIns)よりもアシル側鎖が短い Di-C₈-PtdIns⁶⁶⁾、4) 細胞内に最も多く存在する PtdIns(4,5)P₂よりもアシル側鎖が短い Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂⁶³⁾、5) セカンドメッセンジャーとして機能する PtdIns(3,4)P₂ 及び PtdIns(3,4,5)P₃よりもアシル側鎖が短い Di-C₈-PtdIns(3,4)P₂ 及び Di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃を用いた。この中で、PtdIns(3,4,5)P₃⁶⁰⁾は細胞外からの情報に基づいて PtdIns 3-kinase 活性化されることによって、PtdIns(4,5)P₂から生成するものである。

(Figure 3-4)

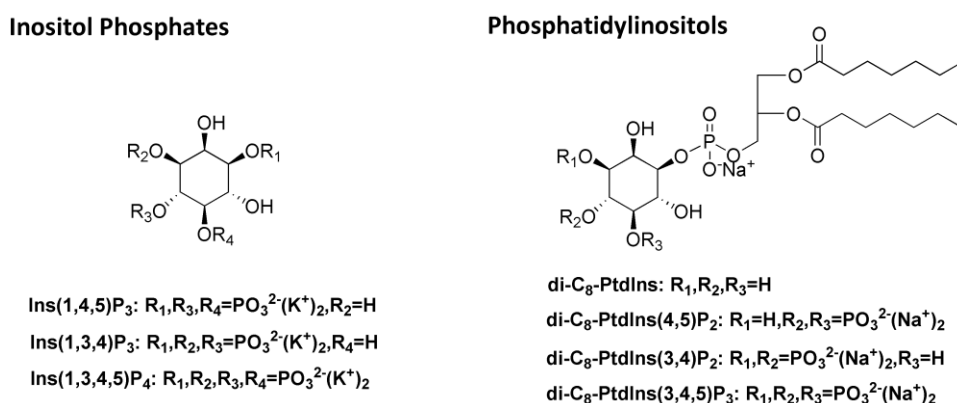


Figure 3-4. Inositol phosphates and phosphatidylinositols.

第2節 Pr55^{Gag} 及び MA domain とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析

2-1) SPR 測定系の構築と MA domain の精製

SPR 法を用いると高感度な測定を行うことができるため、Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質との比較的弱い結合解析にも適すると考えた^{67),68)}。SPR の測定は2つの系を組み合わせることができる。イノシトールリン脂質類縁体をセンサーチップ上に固定化し、そこにアナライトとして蛋白質を流す方法と、その逆である。今回、高分子量の蛋白質を流した方が、センサーチップ上のシグナルが大きくなるものと考え、前者を採用した。したがって、リガンドにイノシトールリン脂質誘導体を、アナライトに Pr55^{Gag} もしくは MA domain を用いた。第2章で記述した、ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄は、リガンドとして好適であると考え、ビオチン-アビジン法を用いて BIACORE のセンサーチップ上に固定化した。イノシトールリン脂質側をリガンド

として設定できたので、少量の蛋白質でも解析可能であると判断し、より生体内の条件に近い蛋白質を得るため、大腸菌からではなく、哺乳細胞から得ることとした。したがって今回調製した MA domain はすべてミリスチル化されており、実際、三隅、高宗らが行った MALDI-TOF-MS の結果、ミリスチル化されていない MA domain は観察されなかった。

(Figure 3-5)

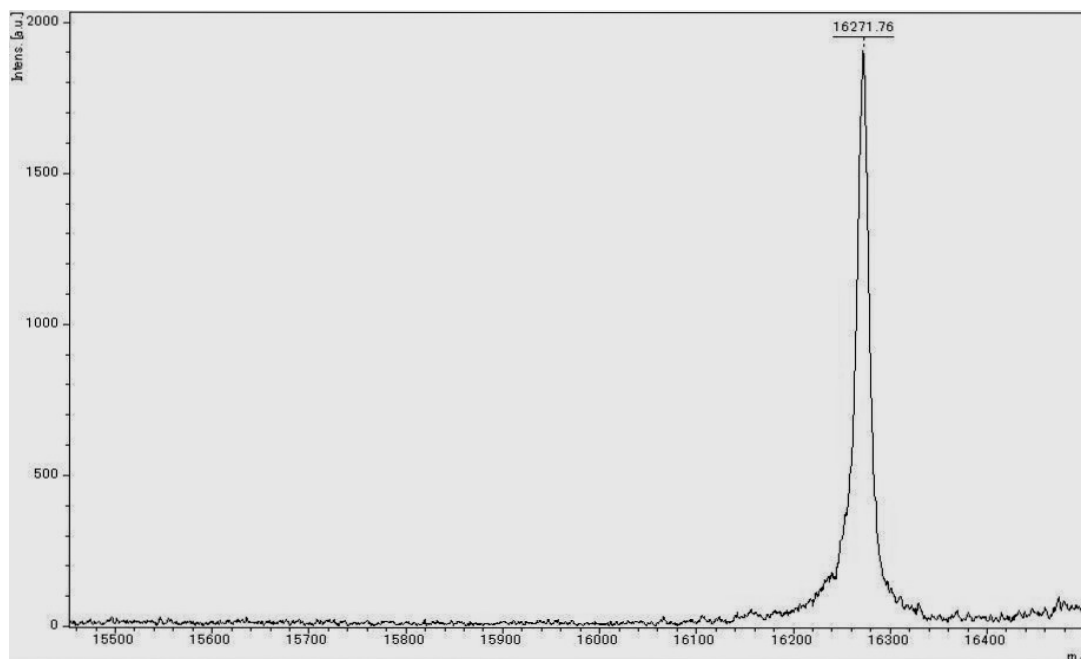


Figure 3-5. MALDI-TOF-MS spectrometry data of myristoylated MA with C-terminal FLAG: $M_{r_{calc}} = 16271.22$, $M_{r_{meas}} = 16271.76$. Un-myristoylated MA: $M_{r_{calc}} = 16063.04$ was not observed.

2-2) Pr55^{Gag} 及び MA domain の発現と精製

C 末端に FLAG タグを付けた、全長の Pr55^{Gag}、MA domain 及び CA domain の発現ベクターを作製した。プラスミドベクターは、プロモーター領域が異なる pSG5 と pEF1/MycHisA の 2 種類を採用し、293T 細胞を用いて蛋白質を発現させた。なお、蛋白質の発現量は、抗 FLAG 抗体を用いて、ウエスタンブロットにて確認した。pEF1/MycHisA を土台としたベクターを用いた場合、MA と CA domain の両方が、pSG5 よりも強く発現した。(MA domain: 10 倍、CA domain: 2 倍) 一方で、Pr55^{Gag} は pEF1/MycHisA を土台とした場合、pSG5 と比較して、明らかに発現量が少なかった。そこで、Pr55^{Gag} の発現は pSG5 ベクターを、MA と CA domain は、pEF1/MycHisA を採用した。293T 細胞から発現させた蛋白質は、抗 FLAG アガロースビーズを用いて精製し、SDS-PAGE によってプロテインマーカーとのバンド強度を比較することで、各蛋白質濃度を算出した。MA、CA domain 及び Pr55^{Gag} において、それぞれ 2.0、5.5、0.08 μ M であった。(Figure 3-6)

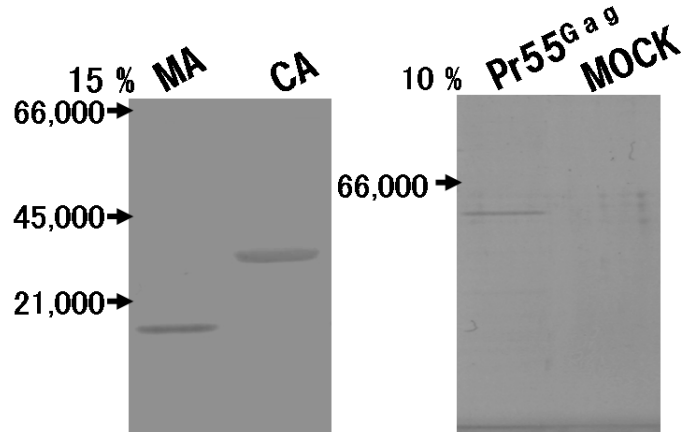


Figure 3-6. SDS-PAGE analysis of Gag-related proteins. After purification, protein solutions were resolved on 10% and 15% SDS-PAGE gels and visualized by CBB staining. Protein concentrations estimated by comparison to molecular weight marker intensity were: MA = 2.0, CA = 5.5, and Pr55^{Gag} = 0.08 μ M.

2-3) BIACORE を用いた結合実験

精製した蛋白質を、透析を用いて BIACORE 測定用の緩衝液に置換した。BIACORE 測定用の緩衝液には、センサーチップ上への非特異な結合を防ぐために 0.5 mg/ml の BSA を、また蛋白質の安定化を目的として 2% (v/v) のグリセロールを添加した⁶⁹⁾。結合解析条件は、25°C、流速 20 μ L/min で結合を 3 分間観察したのち、解離を 3 分間観察した。また希釈した NaOH 溶液を注入することでセンサーチップを再生した。**Figure 3-7** に、ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ を固定化したセンサーチップに、0.08 μ M Pr55^{Gag} と 2.0 μ M MA domain を注入したときの結果を示す。Pr55^{Gag}、MA domain とともに注入直後から時間変化に応じて結合が観察された。一方で、CA domain において結合は確認されなかった。

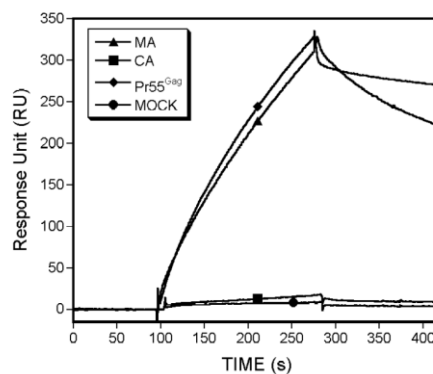


Figure 3-7. Binding activity of Gag-related proteins to biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄. Each protein was injected over a biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ immobilized sensor chip at flow rate of 20 μ L/min for 180 s.

2-4) Pr55^{Gag} 及び MA domain とイノシトールリン脂質との解析に用いたイノシトールリン脂質誘導体

Pr55^{Gag} 及び MA とイノシトールリン脂質誘導体との複合体における K_D は、競合実験法をもとに行った。今回使用した競合剤を **Figure 3-8** に示す。セカンドメッセンジャーである Ins(1,4,5)P₃、Ins(1,4,5)P₃ の位置異性体である Ins(1,3,4)P₃、3 位がリン酸化された Ins(1,3,4,5)P₄ をイノシトールリン酸類とした。Pr55^{Gag} 及び MA と競合剤との結合が、イノシトール骨格に基づく結合であるかどうかを確認するために、Sodium Triphosphate (STP)を採用した。一方、イノシトールリン脂質として、2 価のリン酸基をイノシトール環にもたない Di-C₈-PtdIns、2 価のリン酸基をイノシトール環状にもつ Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂、Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ の位置異性体である Di-C₈-PtdIns(3,4)P₂、3 位がリン酸化された Di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ を用いた。

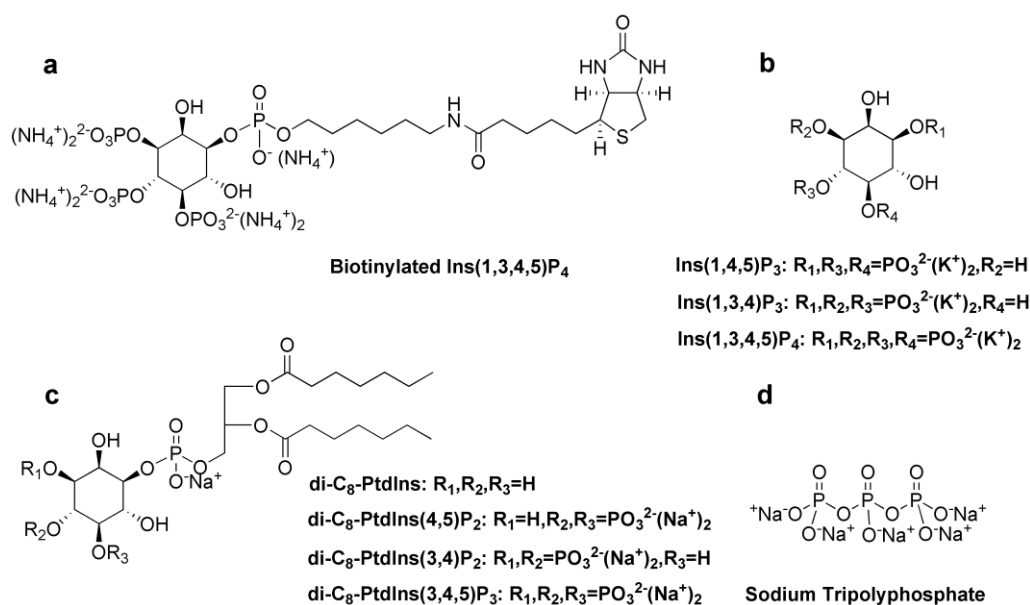


Figure 3-8. Structures of biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ (a), inositol phosphates (b), phosphatidylinositols (c), and sodium triphosphate (d).

2-5) Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析

様々な濃度に調製した競合剤と Pr55^{Gag} とをインキュベーションしたものを、ビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ が固定化されているセンサーチップ上に流した。**Figure 3-9a,c,e,g,i,k,m,o** に各競合剤にもとづいたセンサーグラムを、**Figure 3-9b,d,f,h,j,l,n,p** に K_D 値を示す。**Figure 3-9a** より、Ins(1,4,5)P₃ の濃度が増すにつれて、RU 値が減少している。すなわち、Ins(1,4,5)P₃ がセンサーチップ上の Ins(1,3,4,5)P₄ と濃度依存的に競合し、Pr55^{Gag} との結合が Ins(1,3,4,5)P₄ から Ins(1,4,5)P₃ へと置き換わっている。しかし、5 mM の Ins(1,4,5)P₃ を用いても完全に置き換わ

ることはなかった。天然の PtdIns は、疎水性の高さから今回の緩衝液には溶解しないため、飽和炭素鎖を6つ持つ水溶性の Di-C₈-PtdIns を用いた。結果として、Ins(1,4,5)P₃ よりも強く競合した。(Figure 3-9i) Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ はさらに強く競合し、250 μM Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ を用いた場合、センサーチップ上の Ins(1,3,4,5)P₄ と完全に置き換わった。(Figure 3-9k)

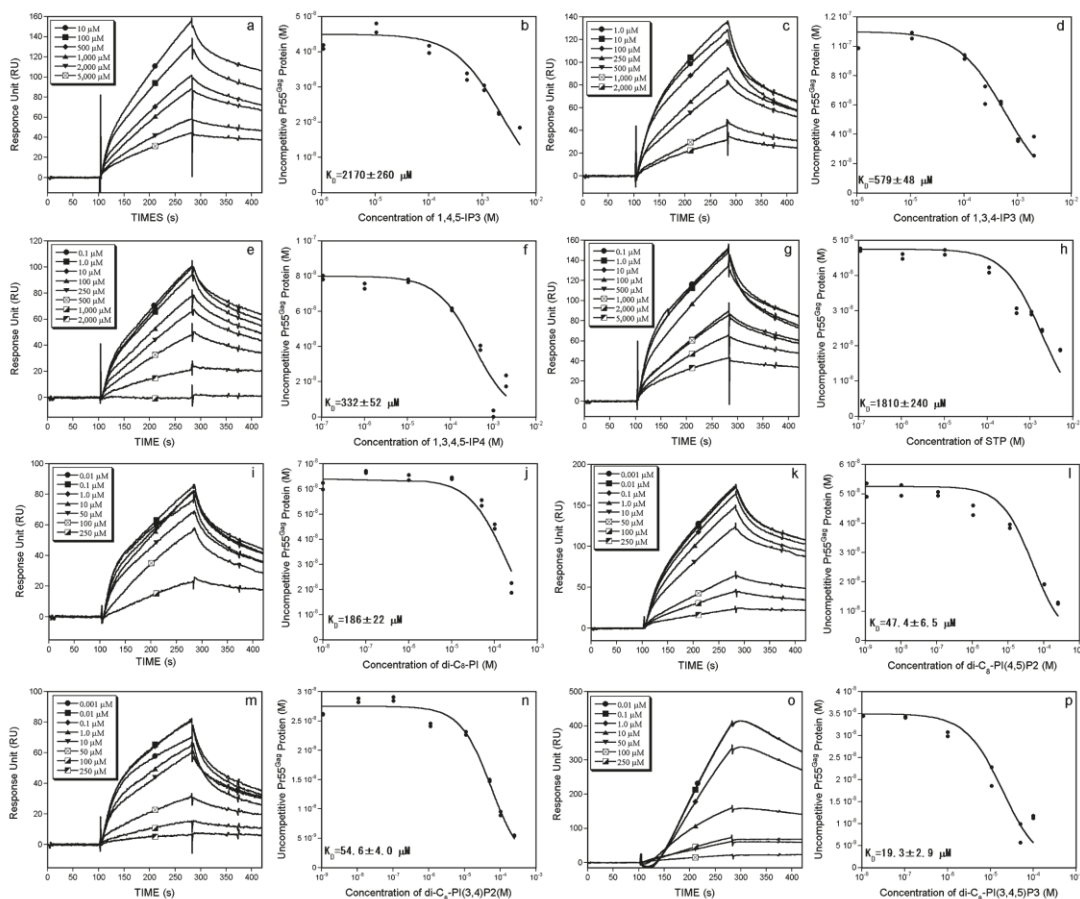


Figure 3-9. Competition assay and calculation of the equilibrium dissociation constants (K_D) for Pr55^{Gag}-competitor complexes. The equilibrium mixtures of Pr55^{Gag} and competitors Ins(1,4,5)P₃ (a), Ins(1,3,4)P₃ (c), Ins(1,3,4,5)P₄ (e), STP (g), di-C₈-PtdIns (i), di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ (k), di-C₈-PtdIns(3,4)P₂ (m), and di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₂ (o) were injected over the biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ immobilized sensor chip at a flow rate of 20 μl/min for 180 s. The average response unit (RU) for the increasing concentration of each competitor was measured at 160-170 s, and each RU datum was converted to a concentration of uncompetitive Pr55^{Gag} protein used for the construction of competition curves between uncompetitive Pr55^{Gag} and Ins(1,4,5)P₃ (b), Ins(1,3,4)P₃ (d), Ins(1,3,4,5)P₄ (f), STP (h), di-C₈-PtdIns (j), di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ (l), di-C₈-PtdIns(3,4)P₂ (n), and di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₂ (p). Calculated K_D values are shown. Each experiment was performed in duplicate.

他の競合剤を含めた結果を Table 1 に示す。Ins(1,3,4)P₃ と Pr55^{Gag} との K_D (579 μM) (Figure 3-9d) は Ins(1,4,5)P₃ (K_D =2170 μM) と比較して 4 倍強く結合した。Ins(1,3,4,5)P₄ と Pr55^{Gag} との K_D (332 μM) (Figure 3-9f) は、Ins(1,3,4)P₃ よりも 2 倍強く結合した。一方で、リン酸が 3 つ連なった STP は Pr55^{Gag} と K_D =1810 μM (Figure 3-9h) で結合し、Ins(1,4,5)P₃ (K_D =2170 μM) と

ほぼ同様の親和性を示した。Di-C₈-PtdIns(3,4)P₂と Pr55^{Gag}との K_D (54.6 μ M) (**Figure 3–9n**)は、di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ (K_D =47.4 μ M)と比較してほぼ同様の親和性を示した。一方で、di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ (K_D =19.3 μ M)(**Figure 3–9p**)は、di-C₈-PtdIns(4,5)P₂よりも2倍強く結合した。1,3,4-位と 1,3,4,5-位にリン酸基をもつイノシトール誘導体と Pr55^{Gag}との結合力の強さは、Ins(1,3,4)P₃ > di-C₈-PtdIns > di-C₈-PtdIns(3,4)P₂, Ins(1,3,4,5)P₄ > di-C₈-PtdIns > di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃の順となり、1,4,5-位にリン酸基をもつ場合と同様の順となった。

Table 1. K_D values for Pr55^{Gag} or MA complexed with phosphoinositide-related compounds.

Proteins	Competitors	K_D (μ M)	
Pr55 ^{Gag}	Inositol phosphates		
	Ins(1,4,5)P ₃	2,170 \pm 260	
	Ins(1,3,4)P ₃	579 \pm 48	
	Ins(1,3,4,5)P ₄	332 \pm 58	
	phosphates		
	STP	1,810 \pm 240	
	Phosphatidylinositol		
	di-C ₈ -PtdIns	186 \pm 22	
	di-C ₈ -PtdIns(4,5)P ₂	47.4 \pm 6.5	
	di-C ₈ -PtdIns(3,4)P ₂	54.6 \pm 4.8	
	di-C ₈ -PtdIns(3,4,5)P ₃	19.3 \pm 2.9	
	MA	Inositol phosphates	
		Ins(1,4,5)P ₃	568 \pm 52
Ins(1,3,4,5)P ₄		526 \pm 57	
Phosphatidylinositols			
di-C ₈ -PtdIns		178 \pm 29	
di-C ₈ -PtdIns(4,5)P ₂		5.64 \pm 1.43	
di-C ₈ -PtdIns(3,4)P ₂		2.51 \pm 1.56	
di-C ₈ -PtdIns(3,4,5)P ₃		6.02 \pm 0.97	
di-C ₄ -PtdIns(4,5)P ₂	86.6 \pm 2.2		

2-6) MA domain とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析

それぞれの競合剤と MA domain との競合実験を行った。その結果を **Table 1** に示す。Ins(1,4,5)P₃ と MA domain における K_D (568 μ M) (**Figure 3–10b**)は、Ins(1,3,4,5)P₄ (K_D =526 μ M) (**Figure 3–10d**)と比較して同様の親和性を示した。Di-C₈-PtdIns と MA domain との K_D は、178 μ M

(Figure 3–10f)となり、一方で di-C₈-PtdIns(4,5)P₂、di-C₈-PtdIns(3,4)P₂、di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ はそれぞれ $K_D=5.64 \mu\text{M}$ 、 $2.51 \mu\text{M}$ 、 $6.02 \mu\text{M}$ で結合した。(Figure 3–10h,j,l)

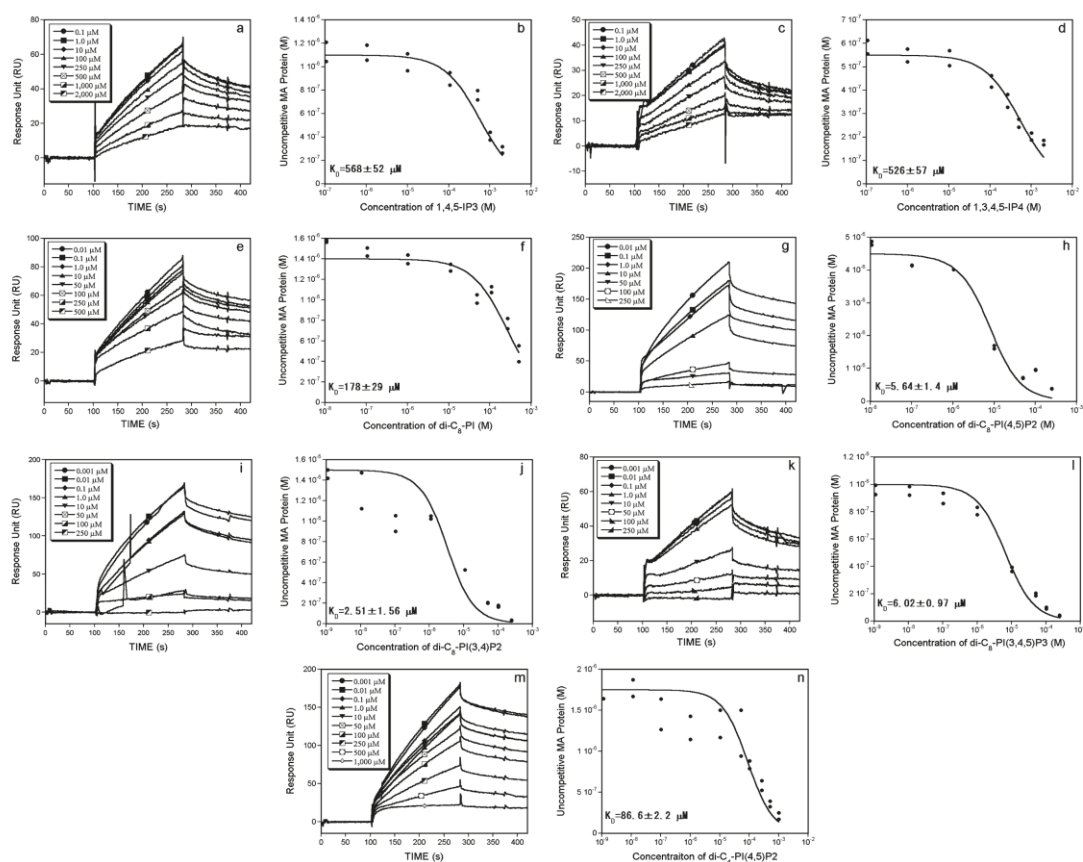


Figure 3–10. Competitive assay and calculation of the equilibrium dissociation constants (K_D) for MA-competitor complexes. The arrangement is the same as that in **Figure 3–9** (a,b: Ins(1,4,5)P₃; c,d: Ins(1,3,4,5)P₄; e,f: di-C₈-PtdIns; g,h: di-C₈-PtdIns(4,5)P₂; i,j: di-C₈-PtdIns(4,5)P₂; k,l: di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃; m,n: di-C₄-PtdIns(4,5)P₂).

MA domain とそれぞれの競合剤との結合力の強さは、Ins(1,4,5)P₃ > di-C₈-PtdIns > di-C₈-PtdIns(4,5)P₂, また Ins(1,3,4,5)P₄ > di-C₈-PtdIns > di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ の順となり、この傾向は Pr55^{Gag} の場合と同様であった。さらに、炭素数が 2 つの飽和アシル基をもつ di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ と MA domain との親和性を求めたところ、 $K_D=86.6 \mu\text{M}$ (Figure 3–10n)であり、飽和炭素数 6 の di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ の方が 15 倍強く MA domain に結合した。

第 3 節 考察

本実験において、はじめに Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質誘導体との結合解析を行うために、SPR 法を土台とした高感度の測定系を構築した。本系は、 $2000 \mu\text{M}$ 以上の K_D であっても

検出することができる。この系をもとに、Pr55^{Gag} と様々なイノシトールリン脂質誘導体との K_D を算出した。なお、今回実験に用いた蛋白質は、哺乳細胞から精製したものであり、MS スペクトルの結果より、ミリストイル化が確認された。(Figure 3-5)

Pr55^{Gag} は PtdIns(4,5)P₂ に直接結合することが、これまでに報告されている^{19), 20), 59)}。しかし、PtdIns(4,5)P₂ のアシル部位とイノシトールリン酸部位の両部位が、Pr55^{Gag} との結合にどのように寄与しているかは解明されていない。そこで、より詳細な解析を行うことを目的として、はじめに2価のリン酸基を3つもつ Ins(1,4,5)P₃ と Pr55^{Gag} との K_D を算出した。Ins(1,4,5)P₃ は、1位にアシル部位をもたないイノシトールリン酸である。結果として、Ins(1,4,5)P₃ は $K_D = 2170 \mu\text{M}$ で Pr55^{Gag} に結合し、弱い親和性を示した。次に、2価のリン酸基を持たず、1位に飽和炭素鎖6のアシル部位をもつ di-C₈-PtdIns と Pr55^{Gag} との結合を観察した。驚いたことに、di-C₈-PtdIns は Pr55^{Gag} に $K_D = 186 \mu\text{M}$ で結合し、Ins(1,4,5)P₃ (2170 μM) よりも12倍強かった。さらに、2価のリン酸基を2つ持ち、1位に飽和炭素鎖6をもつ di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ は Pr55^{Gag} に $K_D = 47.4 \mu\text{M}$ で結合した。McLaughlin と Aderem は、Pr55^{Gag} のミリストイル基が脂質二重膜に $K_D \approx 100 \mu\text{M}$ で結合することを報告しているが⁷⁰⁾、今回求めた di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ の K_D (47.4 μM) は、ミリストイルよりも強く脂質二重膜に結合することを示唆している。また、di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ は、Ins(1,4,5)P₃ よりも46倍、また di-C₈-PtdIns よりも4倍強く Pr55^{Gag} に結合した。これらの結果は、MA domain との結合においても、同様の結果が得られている。すなわち、イノシトールリン酸のリン酸基と1位に結合したアシル部位の両方が、Pr55^{Gag} とのタイトな結合に必要であり、さらにアシル部位の方が、2価のリン酸よりも、強く結合に寄与していることが示唆された。

これまでに、NMR を用いた結合解析結果から、PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との結合様式が示されている²⁰⁾。PtdIns(4,5)P₂ のイノシトールリン酸部位とジアシルグリセロールの2'-アシル基が MA domain のクレフトに結合することで、ミリストイル基は細胞膜側へと露出される。このとき、ジアシルグリセロールの1'-アシルは細胞膜にとどまることで、MA domain と PtdIns(4,5)P₂ とのより安定な複合体が形成されるというものである。したがって、イノシトール部位とアシル部位が、それぞれ荷電的な相互作用と疎水性相互作用の両方を介して Pr55^{Gag} に結合する。

本研究の結果より、Pr55^{Gag} と di-C₈-PtdIns とが $K_D = 186 \mu\text{M}$ で結合し、Pr55^{Gag} と Ins(1,4,5)P₃ が $K_D = 2170 \mu\text{M}$ で結合したことで、アシル部位が示す疎水性相互作用が、イノシトール部位が示す荷電的相互作用よりも Pr55^{Gag} との結合に大きく寄与していることが示された。(Figure 3-11) さらに、Alfadhli らは、リポソームを用い、ミリストイル化 MA domain とミリストイル化されていない MA domain と今回の実験と同じ di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ との結合実験から、di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ がミリストイル基を Pr55^{Gag} から露出させることを示している⁷¹⁾。

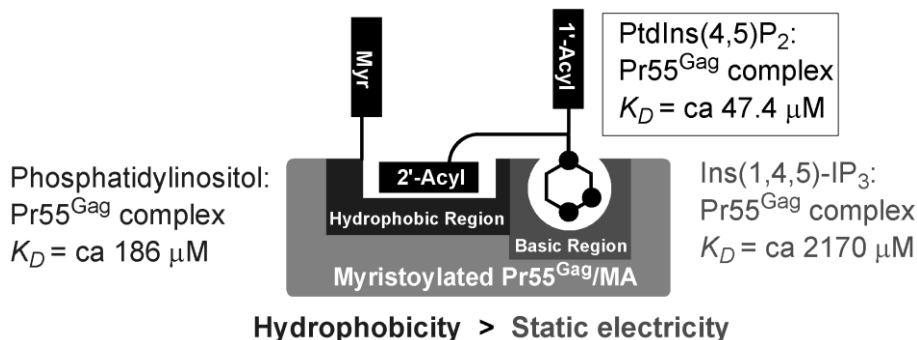


Figure 3–11. Binding model of the Pr55^{Gag}/MA and PtdIns(4,5)P₂ proposed in this assay.

Ins(1,4,5)P₃ の構造が、Pr55^{Gag} との結合に重要であることを確かめるために、Sodium triphosphate (STP)と Pr55^{Gag} との親和性を求めたところ、 $K_D = 1810 \mu\text{M}$ で結合した。Ins(1,4,5)P₃ と Pr55^{Gag} との K_D (2170 μM) とほとんど変わらない弱い結合であり、Ins(1,4,5)P₃ の立体構造だけでは、Pr55^{Gag} の認識に寄与しないことが示された。一方で、Ins(1,3,4)P₃ や Ins(1,3,4,5)P₄ がそれぞれ、 $K_D = 579 \mu\text{M}$ 、332 μM で結合し、この K_D は、Ins(1,4,5)P₃ よりも親和性が強いことから、3-位のリン酸基が Pr55^{Gag} との結合に役割を果たしているのかもしれない。一方で、Ins(1,3,4,5)P₄ と Pr55^{Gag} との K_D (332 μM) から、3 位のリン酸基の存在に加えて、その他のリン酸基の存在の重要性も示唆される。Ins(1,4,5)P₃ や Ins(1,3,4)P₃ のイノシトールリン酸と比較して、di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ や di-C₈-PtdIns(3,4)P₂ の K_D (47.4 μM 、54.6 μM) は、ほとんど変わらない。これは、リン酸基が示す荷電的相互作用が、アシル部位が示す疎水性相互作用に覆われているのかもしれない。Di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ は、Pr55^{Gag} と K_D (19.3 μM) で結合し、この値は di-C₈-PtdIns(3,4)P₂ や di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ の K_D (54.6 μM 、47.4 μM) よりも強く結合していることを示している。Chukkapalli らは⁷²⁾、リポソームを用いた実験において、天然のアシル側鎖をもつ PtdIns(4,5)P₂ や PtdIns(3,4,5)P₃ と Pr55^{Gag} との結合解析を行っている。このとき、それぞれの Pr55^{Gag} に対する親和性はほぼ同様の値であった。これは、実験に用いた PtdIns(4,5)P₂ や PtdIns(3,4,5)P₃ が炭素鎖 17 や 19 のアシル部位をもっており、著者が用いた di-C₈-PtdIns 型と炭素鎖の長さが異なることによって生じた違いと予想される。

MA domain とイノシトールリン脂質との親和性は、Pr55^{Gag} とほぼ同様の K_D を示した。すなわち、Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂、Di-C₈-PtdIns(3,4)P₂、Di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ はそれぞれ、 $K_D = 5.64 \mu\text{M}$ 、2.51 μM 、6.02 μM で結合した。Saad らは、NMR を用いた実験から、di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ 及び di-C₄-PtdIns(3,4,5)P₃ (ともに炭素鎖 2) と MA domain との K_D (150 μM 、81 μM) を報告している²⁰⁾。本研究の実験では、同じ Di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ と MA domain との結合において $K_D = 86.8 \mu\text{M}$ (Figure 3–10n) が得られた。この値は、Saad らが報告した値と整合するものである。また、値の違いは SPR 法と NMR 法の違いと予測した。したがって、これらの結果から炭素鎖の長さ

が、親和性に関与することが示される。 K_D にはわずかな差があるものの Saad と我々の結果から、ウイルス複製段階において、Pr55^{Gag}がウイルスプロテアーゼの作用を受けて開裂し、MA domain となった後も、依然としてイノシトールリン脂質に結合することを示している。

また、MA domain とよりリン酸基を多く持つ Ins(1,3,4,5)P₄ との K_D (526 μ M)が、Ins(1,4,5)P₃ との K_D (568 μ M)と、ほとんど変わらない。以前の実験結果で、MA domain は全長 Pr55^{Gag} とは異なる構造をとることが報告されている⁷³⁾。したがって、Ins(1,3,4,5)P₄ と Ins(1,4,5)P₃ とのそれぞれにおいて、 K_D に差がないものと考えられる。

Saad は、NMR を使用した実験において²⁰⁾、di-C₈型のアシル部位をもつ化合物と MA domain とを作用させると、蛋白質のアグリーゲーションを起こすと報告している。すなわち、これが原因となって K_D が算出できないと述べている。幸いにも、本研究ではアグリーゲーションや沈殿は観察されず、競合曲線は di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ と di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ の両方において、濃度依存性を示している。これらは実験条件によるものと思われる。すなわち、BIACORE 緩衝液中に 0.5 mg/ml BSA、2% (v/v) glycerol 及び 0.005% tween 20 を添加したことで、アグリーゲーションがほぼ無視できる程度になったものと思われる。

本研究では、ミリストイル化 MA domain を用いているため、Di-C₈-PtdInsP 類が、MA domain の疎水性領域よりも、ミリストイル基と優先的に結合する可能性がある。しかしながら、すでに Alphadhali らは di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ 及び di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ が、MA domain からミリストイル基を露出させることを、また di-C₄ よりも di-C₈ の方がその作用が強いことを報告している⁷¹⁾。さらに、Saad らは、NMR を用いた実験から MA domain の疎水性領域が di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ の 2'-アシル基と作用することを、核オーバーハウザー効果から見出している²⁰⁾。したがって、本研究の系においても、2'-アシル基が MA domain の疎水性領域に結合し、同様にミリストイル基を露出させているものと考えられる。

第1章、第2章でも述べたように、PH domain はイノシトールリン脂質結合モチーフをもつ蛋白質として知られており、その数は100を超える^{17), 27), 28)}。PLC δ PH domain は、Ins(1,4,5)P₃ 及び Ins(1,3,4,5)P₄ とそれぞれ $K_D = 0.21 \mu\text{M}$ ¹⁷⁾、13.4 μM ²³⁾で結合することが知られている。PLC δ PH domain と Ins(1,4,5)P₃ との結合親和性は、主に Ins(1,4,5)P₃ といくつかのアミノ酸との水素結合に基づく¹⁸⁾。この PH domain とイノシトールリン脂質との結合は、荷電的な結合が優先的に起こるため、Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質との複合体とは異なり、アシル基がある場合、逆に親和性が弱まる。

Pr55^{Gag} と di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃ との複合体 ($K_D = 19.3 \mu\text{M}$) と、di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ との複合体 ($K_D = 47.4 \mu\text{M}$) における親和性を比較すると、高い親和性はあるものの、2つの複合体間にほとんど差がない。これは、Pr55^{Gag} の疎水性領域とアシル部位との強い疎水性相互作用と、イノシトール部位との弱い荷電的な相互作用に基づいた結合であることに理由がある。Saad らは²⁰⁾、di-C₄-PtdIns(4,5)P₂ の Ins(1,4,5)P₃ 部位が、MA domain の塩基性アミノ酸と荷電的な相

相互作用することを示している。すわなち、4,5-位のリン酸が、Arg22 と Arg76 と塩を含む架橋を形成し、一方で、1位のリン酸が Lys27 と His33 と優先的に結合していることを示した。これらが、Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質との弱い荷電的相互作用を生み出しているもの考えられる。

第4節 小括

HIV-1 Pr55^{Gag} は、HIV 粒子形成において重要な構造蛋白質であり、Pr55^{Gag} の膜移行がウイルスの粒子形成の最初の段階である。最近の研究から、D-*myo*-phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) が Pr55^{Gag} の膜移行とウイルス粒子形成を制御することが示された。今回、Pr55^{Gag} もしくは Pr55^{Gag} の N 末端にある膜結合領域、MA domain とイノシトールリン酸を含む様々なイノシトールリン脂質誘導體との結合を、高感度に測定できる SPR 法を用いて実施した。イノシトールリン酸部位と、アシル部位とに分けて、Pr55^{Gag}/MA domain との平衡解離定数 K_D を算出した。結果より、Ins(1,4,5)P₃ と Pr55^{Gag} との複合体において $K_D = 2170 \mu\text{M}$ が得られた。また水溶性型 di-C₈-PtdIns と Pr55^{Gag} との複合体において、 $K_D = 186 \mu\text{M}$ を得た。さらに、水溶性型 di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との複合体において $K_D = 47.4 \mu\text{M}$ を得た。この傾向は、MA domain とイノシトールリン脂質誘導體との結合においても観察された。本結果より、PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との結合においては、PtdIns(4,5)P₂ のアシル部位の方が、イノシトールリン酸部位よりも、大きく結合に関与していることが示唆された。また Pr55^{Gag} とイノシトールリン脂質との結合において、イノシトール部位のリン酸の数と位置が影響を及ぼすことが示され、一方で、MA domain とイノシトールリン脂質との結合においては、観察されなかった。

本実験結果より、イノシトールリン酸部位とアシル部位の両方を含む構造をもとにした分子設計を行えば、PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との結合を阻害する新規の抗 HIV 薬を創製できるものと考えられる。

第4章

総括

イノシトールリン酸類は、細胞内セカンドメッセンジャーとして機能する。またその1位にジアシルグリセロール部位を所持する場合、イノシトールリン脂質として、細胞骨格制御からセカンドメッセンジャーまで、さまざまな機能をもつ生体分子となる。イノシトールリン酸類の構造を基盤として、ビオチン化イノシトールリン酸の設計合成を行い、本化合物が PH domain 類及び HIV-1 Pr55^{Gag} を識別することが、ビオチン-アビジン法を用いた表面プラズモン共鳴から明らかになった。本知見は、PH domain 類及び HIV-1Gag の生物学的機能を解明するためのバイオリジカルツールを提供するだけでなく、これらの蛋白質を標的とした阻害剤の開発に応用できるものと考えている。

第1章 ビオチン-アビジン法への応用を目的としたビオチン化イノシトールリン酸類の設計と合成

カルシウムシグナル伝達経路を標的として、代表的なセカンドメッセンジャーである D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) の構造に着目し、ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ の設計合成を行った。Ins(1,4,5)P₃ の標的蛋白質を Phospholipase C (PLC) Pleckstrin Homology (PH) domain とし、PLCδ PH domain と Ins(1,4,5)P₃ との X 線結晶解析結果をもとに、1位もしくは2位のリン酸にビオチンリンカーを導入した化合物を設計した。*myo*-イノシトールがもつ6つの水酸基の保護と脱保護を繰り返すことで、目的とするイノシトール部位を得ることができた。イノシトール部位とは別に合成したビオチンリンカー部位を、2置換型ホスホラアミダイトを用いてイノシトール部位とカップリングさせ、さらに脱保護を行うことで、目的とするビオチン化イノシトールリン酸の合成に成功した。本化合物は生体内の Ins(1,4,5)P₃ と同等の機能をもつバイオリジカルツールであることがプルダウン試験の結果から証明された。本合成法は、ビオチンに限らず、他の塩基性条件に安定であるプローブの導入においても可能である。また、ビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ は、Ins(1,4,5)P₃ と直接的に作用する分子、さらに固定化の概念を応用すれば、間接的に作用する分子でも解析が可能である。

第2章 Grp1 pleckstrin homology (PH) domain を標的としたビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成

PtdIns(4,5)P₂ の加水分解によって生じた Ins(1,4,5)P₃ と、Ins(1,4,5)P₃ 3-キナーゼによって生じた Ins(1,3,4,5)P₄ の2つのメッセンジャーが協奏的に機能することが報告されている。すなわ

ち、Ins(1,4,5)P₃ と Ins(1,3,4,5)P₄ が、カルシウム動員とそれに続く細胞膜上のカルシウムチャネルの開口を引き起こし、細胞外からもカルシウムを動員させるというものである。しかしながら、この説には議論が多い。Ins(1,4,5)P₃ と Ins(1,3,4,5)P₄ が作り出すこのカルシウムシグナル伝達経路を、それぞれのイノシトールリン酸に分けて観察することができれば、これらの問題を解決できるかもしれない。そこで、生体内の Ins(1,3,4,5)P₄ と同等の機能をもつビオチン化 Ins(1,3,4,5)P₄ の設計と合成を行った。Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との X 線結晶解析結果をもとにビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ を設計し、ビオチン化 Ins(1,4,5)P₃ の合成法を応用した。ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ は、Grp1 PH domain と $K_D=0.14 \mu\text{M}$ で結合し、この K_D 値は修飾していない Ins(1,3,4,5)P₄ の結果と同等の親和性を持つことが証明された。ビオチン化 D-Ins(1,3,4,5)P₄ と同様に第 1 章で合成したビオチン化 D-Ins(1,4,5)P₃ を用いて、BIAcore のセンサーチップに固定化し、PH domain 類との結合解析を行った。それぞれのビオチン化イノシトールリン酸は、相互作用すると考えられる PH domain によって特異的に認識された。BIAcore を使用すると、Ins(1,4,5)P₃ と Ins(1,3,4,5)P₄ の細胞内における機能を、同じ実験条件下で、また同時に観察することができる。すなわち、上述したように Ins(1,4,5)P₃ と Ins(1,3,4,5)P₄ とに分けて、同じ条件下で結合解析を行えば、カルシウムシグナル伝達経路における新しい知見を見出せるかもしれない。その一例として、ビオチン化イノシトールリン酸がもつ特有の機能を用いると、Grp1 PH domain や PLC δ PH domain の特異的阻害剤の開発が可能である。

第 3 章 SPR 法を用いた HIV-1 Gag とイノシトールリン脂質誘導体との高感度結合解析

HIV-1 Pr55^{Gag} は、HIV 粒子形成において重要な構造蛋白質である。Pr55^{Gag} の膜移行がウイルスの粒子形成の最初の段階である。最近の研究から、PtdIns(4,5)P₂ が Pr55^{Gag} の膜移行とウイルス粒子形成を制御することが示された。そこで、Pr55^{Gag} もしくは、Pr55^{Gag} の N 末端にある膜結合領域、MA domain とイノシトールリン酸を含む様々なイノシトールリン脂質との結合を、高感度に測定できる SPR 法を用いて実施した。Di-C₈-PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との複合体において $K_D=47.4 \mu\text{M}$ が得られた。この K_D は、炭素鎖が di-C₈ 型と短いにもかかわらず、ミリスチル基と細胞膜との K_D (100 μM) よりも強く、細胞膜上の PtdIns(4,5)P₂ と直接結合していることを示唆している。さらに、Pr55^{Gag} と di-C₈-PtdIns とが $K_D=186 \mu\text{M}$ で結合し、Pr55^{Gag} と Ins(1,4,5)P₃ が $K_D=2170 \mu\text{M}$ で結合したことで、アシル部位が示す疎水性相互作用が、イノシトール部位が示す荷電的相互作用よりも Pr55^{Gag} との結合に大きく寄与していることが示された。これまでに PtdIns(4,5)P₂ と Pr55^{Gag} との結合様式モデルが示されている。すなわち PtdIns(4,5)P₂ のイノシトールリン酸部位とジアシルグリセロールの 2'-アシル基が MA domain のクレフトに結合することで、ミリスチル基は細胞膜側へと露出される。このとき、ジアシルグリセロールの 1'-アシルは細胞膜にとどまることで、MA domain と PtdIns(4,5)P₂ とのよ

り安定な複合体が形成されるというものである。本研究における結果は、このモデルと整合する。本研究結果より、イノシトールリン酸部位とアシル部位の両方を含む構造をもとにした分子設計を行えば、 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ と Pr55^{Gag} との結合を阻害する新規の抗 HIV 薬を創製できるものと考えられる。

実験の部

合成試薬は、Aldrich、Fluka、Kanto Chemical、Nacalai tesque 及び Wako より購入した。薄層クロマトグラフィー(TLC)は、Merck TLC sheets silica 60 F₂₅₄ を用い、リンモリブデン酸のエタノール溶液もしくは KMnO₄ の塩基性溶液に浸漬後、加熱することで発色させた。クロマトグラフィーには Silica Gel 60N (40–100 mesh) を用いた。イオン交換樹脂には Dowex 1X8 (Cl⁻, 50–100 mesh) を用いた。旋光度は JASCO Dip-1000 にて測定した。NMR は JEOL JMN-AL300 で測定し、内部標準物質に SiMe₄ もしくは HDO を用いた。IR は、第 1 章の実験においては JASCO IR A-100 で測定し、第 2 章の実験においては JASCO FT/IR-410 で測定した。元素分析は Yanaco MT-5S で測定した。High resolution MS (HRMS) は、JEOL JMS-DX303HF で測定し、positive FAB と negative FAB は NBA (HMPA を含む場合と含まない場合) をマトリクスとして測定した。

第 1 章 実験の部

D-1-O-Benzyl-2,3:5,6-di-O-cyclohexylidene-myoinositol ((+)-1)

L-1-O-Benzyl-2,3:5,6-di-O-cyclohexylidene-myoinositol ((-)-1)

ラセミ体である化合物 **1** を (R)-camphoric acid と反応させることで、ジアステレオマーであるカンファーエステルを得た。それぞれのジアステレオマーを再結晶とシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分割し、続いてエステルの加水分解を行うことで、目的とする光学活性な(+)-**1** と(-)-**1** を定量的に得た。[α]_D²⁵ = +23.32、-23.16 (c 0.1, CHCl₃)

D-1-O-Benzyl-myoinositol (2a)

D-1-O-benzyl-2,3:5,6-di-O-cyclohexylidene-myoinositol (+)-**1** (0.86 g, 2.0 mmol) を MeOH (30 ml) に溶解し、TFA (30 ml) を加えた。室温で 24 時間攪拌後、濃縮した。残渣を AcOEt で洗浄することで **2a** (0.43 g, 82%) を白色結晶として得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ 3.03–3.22 (m, 3H), 3.52 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.01 (s, 1H), 4.55 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 7.15–7.35 (m, 5H).

¹³CNMR (CD₃OD) δ 70.8, 73.0, 73.2, 73.7, 74.1, 76.5, 81.1, 128.6, 129.1, 129.3, 139.9.

IR (KBr) 3350, 2850, 1360, 1200, 1060, 1030 cm⁻¹.

MS (EI) m/z 271 (M+H)⁺. Anal. Calcd for C₁₃H₁₈O₆: C, 57.77; H, 6.71. Found: C, 57.80; H, 6.88.

L-1-O-Benzyl-myoinositol (2b)

2a の合成法に従い、L-1-O-Benzyl-2,3:5,6-di-O-cyclohexylidene-myoinositol (-)-**1** (0.65 g, 1.5 mmol) から **2b** (0.40 g, >99%) を得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ 3.03–3.22 (m, 3H), 3.52 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 3.66 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 4.55 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 7.15–7.35 (m, 5H).

¹³CNMR (CD₃OD) δ 70.8, 73.0, 73.2, 73.7, 74.1, 76.5, 81.1, 128.6, 129.1, 129.3, 139.9.

IR (KBr) 3350, 2900, 1060, 1030 cm⁻¹.

MS (EI) m/z 271 (M+H)⁺.

Anal. Calcd for C₁₃H₁₈O₆: C, 57.77; H, 6.71. Found: C, 57.49; H, 6.75.

D-1-O-Benzyl-2,3,4,5,6-penta-O-acetyl-myoinositol (3a)

2a (0.43 g, 1.6 mmol)を pyridine (40 ml)に溶解し、そこに acetic anhydride (1.5 ml, 16 mmol) と、4-dimethylaminopyridine (0.10 g, 0.80 mmol)を加えた。室温で 24 時間攪拌後、濃縮した。残渣を Hexane–AcOEt の混合液で再結晶し、**3a** (0.73 g, 95%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.60 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 3.60 (dd, $J=10.1, 2.9$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 4.94 (dd, $J=10.6, 2.7$ Hz, 1H), 5.08 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.39–5.52 (m, 2H), 5.76 (s, 1H), 7.22–7.34 (m, 5H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.5, 20.7, 20.8, 66.6, 69.1, 69.5, 70.9, 71.1, 71.8, 74.4, 127.8, 128.1, 128.5, 136.9, 169.6, 169.7, 169.8, 169.9, 170.0.

IR (KBr) 2900, 1740, 1360, 1210, 1130 cm^{-1} .

MS (EI) m/z 480 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$: C, 57.50; H, 5.87. Found: C, 57.46; H, 5.94.

L-1-O-Benzyl-2,3,4,5,6-penta-O-acetyl-myoinositol (3b)

3a の合成法に従い、**2b** (0.38 g, 1.4 mmol)から **3b** (0.66 g, >99%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.99–2.01 (m, 12H), 2.20 (s, 3H), 3.60 (dd, $J=10.1, 2.9$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J=12.1$ Hz), 4.66 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 4.94 (dd, $J=15.5, 2.8$ Hz, 1H), 5.08 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.39–5.52 (m, 2H), 5.76 (s, 1H), 7.22–7.34 (m, 5H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.5, 20.7, 20.8, 66.6, 69.1, 69.5, 70.9, 71.1, 71.8, 74.4, 127.8, 128.1, 128.5, 136.9, 169.6, 169.7, 169.8, 169.9, 170.0.

IR (KBr) 2900, 1740, 1360, 1220, 1130 cm^{-1} .

MS (EI) m/z 480 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$: C, 57.50; H, 5.87. Found: C, 57.56; H, 5.91.

D-2,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-myoinositol (4a)

3a (0.70 g, 1.4 mmol)を acetic acid (30 ml)に溶解し、10% palladium–carbon (50 mg)を加え、水素雰囲気下 10 時間室温で攪拌した。混合液をセライト濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 –MeOH=14:1)にて精製し、**4a** (0.52 g, 93%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.00 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 3.90 (dd, $J=10.1, 2.9$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J=10.6, 2.7$ Hz, 1H), 5.15 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.31 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.45 (t, $J=10.1$ Hz, 1H), 5.59 (t, $J=2.9$ Hz, 1H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.5, 20.7, 20.8, 68.7, 69.2, 70.4, 70.8, 72.4, 169.7, 169.8, 169.9, 170.3, 171.0.

IR (KBr) 3400, 1740, 1360, 1210, 1040 cm^{-1} .

MS (EI) m/z 391 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: C, 49.23; H, 5.68. Found: C, 48.93; H, 5.81.

L-2,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-myoinositol (4b)

4a の合成法に従い、3b (0.62 g, 1.3 mmol) から 4b (0.49 g, 97%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.00 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 3.90 (dd, $J=10.1, 2.9$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J=10.6, 2.7$ Hz, 1H), 5.14 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.31 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.45 (t, $J=10.1$ Hz, 1H), 5.59 (t, $J=2.9$ Hz, 1H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.4, 20.5, 20.7, 20.8, 68.8, 69.2, 69.4, 70.5, 70.7, 72.5, 169.7, 169.8, 169.9, 170.2, 171.0.

IR (KBr) 3400, 1740, 1370, 1220, 1030 cm^{-1} .

MS (EI) m/z 391 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}-2\text{H}_2\text{O}$: C, 48.12; H, 5.81. Found: C, 47.83; H, 5.58.

D-3,6-Di-O-allyl-1,2:4,5-di-O-cyclohexylidene-myoinositol (6a)

(-)-1 (1.9 g, 4.5 mmol) を MeOH (50 ml) に溶解し、10% palladium-carbon (0.80 g) を加え、水素雰囲気下、室温で2日間攪拌した。セライト濾過後濃縮し、再結晶 (Hexane-AcOEt=1:1) にて、5a (1.5 g, 95%) を白色結晶として得た。5a (2.0 g, 5.9 mmol) を DMF (30 ml) に溶解し、NaH (0.58 g, 24 mmol) と allyl bromide (1.0 ml, 12 mmol) を加えた。Ar 雰囲気下室温で24時間攪拌し、MeOH にて反応を停止した。混合液を濃縮後、AcOEt にて希釈し、 H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄後、 Na_2SO_4 を用いて乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane-AcOEt=5:1) にて精製し、7a (2.6 g, >99%) を無色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.38–1.76 (m, 20H), 3.31 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J=10.6, 6.4$ Hz, 1H), 3.77 (dd, $J=10.1, 4.2$ Hz, 1H), 3.97 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 4.06 (t, $J=4.9$ Hz, 1H), 4.22–4.37 (m, 4H), 4.45 (t, $J=4.4$ Hz, 1H), 5.17–5.36 (m, 4H), 5.89–6.05 (m, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 23.5, 23.7, 23.8, 23.9, 24.9, 25.0, 35.2, 36.3, 36.4, 37.6, 70.9, 71.2, 74.9, 76.0, 76.5, 78.4, 80.4, 80.8, 110.5, 112.6, 117.1, 117.8, 134.8, 134.9.

IR (KBr) 2920, 2850, 1440, 1360, 1260, 1160 cm^{-1} .

MS (EI) m/z 420 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_6$: C, 68.54; H, 8.63. Found: C, 68.55; H, 8.77.

D-3,6-Di-O-allyl-myoinositol (7a)

6a (2.6 g, 6.3 mmol) を THF- H_2O (5:1, 60 ml) の混合溶媒に溶解し、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.30 g, 1.6 mmol) を加え、3時間加熱還流した。Et₃N にて中和後、濃縮した。真

空乾燥後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂-MeOH=7:1)にて精製し、**7a** (1.8 g, >99%)を白色結晶として得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ 3.02–3.42 (m, 4H), 3.61 (t, *J*=9.7 Hz, 1H), 3.98–4.13 (m, 3H), 4.22–4.24 (m, 2H), 5.02–5.25 (m, 4H), 5.82–5.99 (m, 2H).

¹³CNMR (CDCl₃) δ 71.0, 72.1, 73.1, 73.6, 75.1, 76.3, 80.7, 82.5, 116.7, 117.4, 136.6, 137.2.

IR (KBr) 3420, 2900, 1420, 1350, 1100, 1070, 930 cm⁻¹.

MS (FAB) *m/z* 261 (M+H)⁺.

Anal. Calcd for C₁₂H₂₀O₆: C, 55.37; H, 7.74. Found: C, 55.21; H, 7.80.

D-3,6-Di-O-allyl-1-O-(*p*-methoxybenzyl)-*myo*-inositol (8a**)**

7a (0.62 g, 2.4 mmol)と dibutyltin oxide (0.75 g, 3.0 mmol)との混合物を、toluene (50 ml)中で、Dean–Stark 装置を用いて、H₂O を除きながら、加熱還流した。濃縮後、残渣に cesium fluoride (0.76 g, 5.0 mmol)を加え、真空乾燥後、加熱した DMF (30 ml)に溶解させた。生じた懸濁液に -78 °C で *p*-methoxybenzyl chloride (0.47 ml, 3.0 mmol)を加え、その後、室温で24時間攪拌した。反応混合液を CHCl₃ で希釈し、セライト濾過後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂-MeOH=12:1)にて精製し、**8a** (0.80 g, 88%)を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.53 (bs, 1H), 2.88–2.95 (m, 2H), 3.14 (dd, *J*=9.4, 2.8 Hz, 1H), 3.31–3.40 (m, 2H), 3.63–3.93 (m, 5H), 4.07–4.44 (m, 5H), 4.63 (s, 2H), 5.16–5.33 (m, 4H), 5.87–6.04 (m, 2H), 6.88 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.28 (d, *J*=8.6 Hz, 2H).

¹³CNMR (CDCl₃) δ 55.3, 66.9, 71.2, 72.2, 74.0, 78.8, 79.4, 80.0, 113.9, 116.9, 117.9, 129.5, 129.9, 134.4, 135.1, 159.4.

IR (KBr) 3450, 2900, 1510, 1250, 1100, 1040 cm⁻¹.

MS (FAB) *m/z* 381 (M+H)⁺.

Anal. Calcd for C₂₀H₂₈O₇: C, 63.14; H, 7.42. Found: C, 63.00; H, 7.44.

D-3,6-Di-O-allyl-1-O-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-O-isopropylidene-*myo*-inositol (9a**)**

8a (1.4 g, 3.8 mmol)を DMF (30 ml)に溶解し、2-methoxypropene (0.52 ml, 10 mmol)に続けて、真空乾燥させた *p*-toluenesulfonic acid (95 mg, 0.50 mmol)を加えた。Ar 雰囲気下、24時間攪拌した。Et₃N にて中和後、AcOEt にて希釈した。有機層を H₂O と saturated aqueous NaCl にて洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させた。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane–AcOEt=3:2)にて精製し、**9a** (1.2 g, 78%)を無色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.38 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 2.73 (bs, 1H), 3.25–3.46 (m, 3H), 3.75–3.46 (m, 10H), 4.60 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 5.13–5.31 (m, 4H), 5.83–5.99 (m, 2H), 6.83 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 26.6, 26.7, 55.0, 69.3, 70.4, 72.1, 72.7, 75.9, 76.6, 77.8, 78.8, 80.4, 111.3, 113.6, 116.2, 117.2, 129.3, 134.4, 134.9, 159.1.

IR (KBr) 3500, 3080, 3000, 2900, 1610, 1510, 1240, 1080 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 421 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_7$: C, 65.70; H, 7.67. Found: C, 65.67; H, 7.76.

D-1-O-(*p*-Methoxybenzyl)-4,5-O-isopropylidene-*myo*-inositol (10a)

9a (0.55 g, 1.3 mmol) を EtOH–benzene– H_2O (7:3:1, 22 ml) の混合溶液に溶解し、diazabicyclo[2.2.2]octane (0.15 g, 1.3 mmol) を加え、続けて tris(triphenylphosphine)rhodium(I) chloride (0.12 g, 0.13 mmol) を加え、5 時間加熱還流した。濃縮後、AcOEt で希釈し、 H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣を acetone– H_2O (10:1, 5 ml) の混合溶媒に溶解し、mercury(II) oxide (0.28 g, 1.31 mmol) を加えた。混合液に、mercury(II) chloride (0.35 g, 1.3 mmol) の acetone– H_2O (10:1, 5 ml) の混合液を滴下した。滴下時間を含めて 5 分間室温で攪拌し、1M NaOH で中和した。セライト濾過した後、濃縮し saturated aqueous NaCl 溶液で希釈した。水層から目的物を CH_2Cl_2 で抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 –MeOH=12:1)で精製し、**10a** (0.20 g, 45%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 1.31 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.16–3.21 (m, 2H), 3.54–3.86 (m, 5H), 3.98 (s, 1H), 4.48 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.78 (bs, 1H), 6.77 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.44$ Hz, 2H).

IR (KBr) 3350, 2900, 1520, 1250, 1070 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 340 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_7-1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 58.61; H, 6.94. Found: C, 58.63; H, 7.06.

D-2,3,6-Tri-O-acetyl-1-O-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-O-isopropylidene-*myo*-inositol (11a)

10a (0.39 g, 1.2 mmol) を pyridine (10 ml) に溶解し、4-dimethylaminopyridine (25 mg, 0.21 mmol) に続き、acetic anhydride (0.47 ml, 5.0 mmol) を加えた。室温で 12 時間攪拌し、toluene で希釈した。混合液を共沸した後、残渣を AcOEt で希釈した。有機層を H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane–AcOEt=1:1)で精製し、**11a** (0.43 g, >99%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.35 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 2.00 (s, 6H), 2.10 (s, 3H), 3.39–3.49 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 4.00 (t, $J=10.1$ Hz, 1H), 4.2 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.93 (dd, $J=10.8, 2.7$ Hz), 5.35 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 6.80 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J=8.2$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.4, 20.5, 20.6, 20.8, 26.5, 26.6, 55.1, 67.7, 70.0, 70.7, 71.6, 74.6, 76.5, 77.2, 112.5, 113.7, 128.9, 129.4, 159.3, 169.5, 170.0.

IR (KBr) 3000, 1750, 1510, 1370, 1230, 1060 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 467 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{10}-1/5\text{H}_2\text{O}$: C, 58.77; H, 6.52. Found: C, 58.88; H, 6.60.

D-2,3,6-Tri-*O*-acetyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-*myo*-inositol (12a)

11a (0.36 g, 0.77 mmol)を CH_2Cl_2 (10 ml)に溶解し、ethylene glycol (89 μl , 1.5 mmol)を加えた。続いて、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate (10 mg, 0.051 mmol)を加え、室温で 10 分間攪拌した。混合液を、 Et_3N (0.10 ml, 0.72 mmol)で中和後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 - $\text{MeOH}=12:1$)で精製し、**12a** (0.17 g, 77%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.03 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 3.39–3.56 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.88 (s, 1H), 4.05 (bs, 2H), 4.29 (t, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J=13.0$ Hz, 1H), 5.16 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 6.85 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J=8.4$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.6, 20.8, 55.0, 67.2, 70.8, 70.9, 71.0, 72.9, 73.0, 74.0, 113.6, 129.1, 129.2, 159.2, 170.1, 170.5, 170.9.

IR (KBr) 3430, 2900, 1740, 1370, 1230, 1030 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 427 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{10}-1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 55.17; H, 6.25. Found: C, 55.22; H, 6.01.

Bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylaminophosphoramidite

本化合物は、Uhlmann と Engels の方法をもとに合成した³⁵⁾。phosphorus trichloride を脱水 ethyl ether に溶解し、そこに 2 等量の diisopropylamine を -78°C 下で滴下した。減圧蒸留によって (Diisopropylamino)dichlorophosphine を得て、 -20°C 下で保存した。(Diisopropylamino)dichlorophosphine を脱水 CH_2Cl_2 に溶解し、diisopropylamine 存在下、2-cyanoethanol と反応させることで、目的とする **Bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylaminophosphoramidite** を得た。

D-2,3,6-Tri-*O*-acetyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol (13a)

12a (0.25 g, 0.60 mmol)を CH₂Cl₂ (10 ml)に溶解し、bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylamino-phosphoramidite (0.77 ml, 3.0 mmol)を加え、続いて 1*H*-tetrazole (0.21 g, 3.0 mmol)を加えた。Ar 雰囲気下室温で 1.5 時間攪拌後、*m*-chloroperbenzoic acid (0.86 g, 5.0 mmol)を少量ずつ加え、さらに 5 分間攪拌した。混合液を CH₂Cl₂ で希釈し、saturated aqueous NaHCO₃ で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂-MeOH=13:1)で精製し、**13a** (0.30 g, 68%)を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.10 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.78–2.85 (m, 8H), 3.60 (dd, *J*=10.2, 2.4 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.25–4.47 (m, 9H), 4.50–4.58 (m, 2H), 4.80 (dd, *J*=18.7, 9.3 Hz, 1H), 5.06 (dd, *J*=10.1, 2.6 Hz, 1H), 5.38 (t, *J*=4.9 Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 6.80 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.15 (d, *J*=8.2 Hz, 2H).

¹³CNMR (CDCl₃) δ 19.2, 19.3, 19.4, 19.4, 20.6, 20.9, 55.1, 62.6, 62.7, 62.8, 62.9, 66.3, 68.5, 70.4, 71.4, 73.2, 76.5, 77.3, 113.7, 116.6, 116.7, 116.9, 117.0, 128.6, 129.3, 159.3, 169.7, 169.8, 170.0.

IR (film) 2970, 2250, 1740, 1510, 1410, 1370, 1240, 1030, 940cm⁻¹.

MS (FAB) *m/z* 799 (M+H)⁺.

Anal. Calcd for C₂₀H₂₆O₁₀-1/2H₂O : C, 55.17; H, 6.25. Found: C, 55.22; H, 6.01.

D-2,3,6-Tri-*O*-acetyl-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl) phosphoryl]-*myo*-inositol (14a)

13a (0.30 g, 0.37 mmol)を CH₃CN-H₂O (9:1, 10 ml)の混合溶媒に溶解し、diammonium cerium(IV) nitrate を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)で精製し、**14a** (68 mg, 27%)を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.08 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.90–2.97 (m, 8H), 3.97 (dd, *J*=10.1, 2.9 Hz, 1H), 4.30–4.41 (m, 8H), 4.68–4.86 (m, 2H), 5.21 (dd, *J*=9.9, 2.9 Hz, 1H), 5.35 (t, *J*=9.9 Hz, 1H), 5.50 (dd, *J*=5.3, 2.9 Hz, 1H).

¹³CNMR (CDCl₃) δ 20.1, 20.2, 20.2, 20.3, 20.8, 21.0, 21.5, 64.7, 64.8, 64.9, 68.1, 70.7, 71.7, 73.3, 78.4, 78.9, 118.6, 118.7, 118.8, 118.9, 171.5, 172.0, 172.2.

IR (KBr) 3420, 2960, 1740, 1370, 1220, 1030cm⁻¹.

D-1,3,6-Tri-*O*-allyl-*myo*-inositol (15a)

8a の合成法に従って、**7a** (0.52 g, 2.0 mmol)から **15a** (0.36 g, 59%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.53 (s, 1H), 2.88–2.95 (m, 2H), 3.18 (dd, $J=4.8, 2.8$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J=9.3, 2.8$ Hz, 1H), 3.37 (t, $J=9.3$ Hz, 1H), 3.65 (t, $J=9.3$ Hz, 1H), 3.91 (t, $J=9.3$ Hz, 1H), 4.11–4.42 (m, 7H), 5.15–5.34 (m, 7H), 5.87–6.02 (m, 3H).

IR (KBr) 3450, 2900, 1110, 1030, 990, 910 cm^{-1} .

Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_6$: C, 59.98; H, 8.05. Found: C, 59.96; H, 8.09.

D-1,3,6-Tri-*O*-allyl-4,5-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol (16a)

9a の合成法に従って、**15a** (0.33 g, 1.1 mmol) から **16a** (0.34 g, 91%) を無色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.42 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 2.62 (s, 1H), 3.29–3.36 (m, 2H), 3.53 (dd, $J=9.9, 3.2$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J=9.9, 8.6$ Hz, 1H), 4.00 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.13–4.38 (m, 7H), 5.14–5.34 (m, 6H), 5.87–6.02 (m, 3H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 27.3, 27.4, 69.9, 71.1, 72.7, 72.8, 76.5, 77.2, 78.3, 79.3, 81.5, 112.0, 116.9, 117.9, 118.0, 134.9, 135.0, 135.5.

IR (KBr) 3480, 3080, 3000, 2900, 1640, 1460, 1420, 1370, 1230, 1080, 1000, 920 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 341 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_6$: C, 63.51; H, 8.29. Found: C, 63.27; H, 8.47.

D-1,3,6-Tri-*O*-allyl-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol (17a)

16a (0.76 g, 2.2 mmol) を DMF (30 ml) に溶解し、NaH (0.24 g, 3.0 mmol) を加え、引き続き *p*-methoxybenzyl chloride (0.44 ml, 3.0 mmol) を加えた。Ar 雰囲気下、室温で 24 時間攪拌後、反応を MeOH で停止した。MeOH を減圧留去した後、AcOEt で希釈した。有機層を H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane–AcOEt=3:1) で精製し、**17a** (0.75 g, 73%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.42 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 3.23–3.33 (m, 2H), 3.46 (dd, $J=10.4, 2.8$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.85–3.91 (m, 1H), 4.01–4.46 (m, 8H), 4.77 (s, 2H), 5.12–5.33 (m, 6H), 5.84–5.99 (m, 3H), 6.86 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8.6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 26.9, 27.0, 55.2, 70.6, 72.3, 72.4, 74.7, 76.3, 77.1, 77.4, 78.0, 79.4, 82.0, 111.5, 113.6, 116.3, 116.6, 116.7, 129.5, 131.0, 134.8, 135.0, 135.3, 159.1.

IR (film) 3030, 3000, 2900, 1610, 1460, 1370, 1220, 1100, 1030 cm^{-1} .

MS (EI) m/z 461 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_7-1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 66.50; H, 7.94. Found: C, 66.80; H, 7.83.

D-2-O-(*p*-Methoxybenzyl)-4,5-O-isopropylidene-*myo*-inositol (18a)

10a の合成法に従って、**17a** (0.29 g, 0.63 mmol) から **18a** (0.11 g, 49%) を無色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 1.41 (s, 6H), 3.26–3.30 (m, 2H), 3.65–3.67 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.83–3.96 (m, 2H), 4.09 (s, 1H), 4.58 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8.6$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CD_3OD) δ 27.1, 27.2, 55.7, 71.2, 71.8, 72.1, 73.3, 78.8, 80.2, 83.0, 112.4, 114.7, 130.9, 131.7, 160.9.

IR (KBr) 3350, 2900, 1510, 1250, 1070 cm^{-1} .

Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7 \cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$: C, 58.95; H, 7.18. Found: C, 58.79; H, 7.16.

D-1,3,6-Tri-O-acetyl-2-O-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-O-isopropylidene-*myo*-inositol (19a)

12a の合成法に従って、**18a** (0.10 g, 0.30 mmol) から **19a** (0.14 g, >99%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.35 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 2.00 (s, 6H), 2.10 (s, 3H), 3.39–3.49 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 4.00 (t, $J=10.1$ Hz, 1H), 4.24 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.93 (dd, $J=10.8$, 2.7 Hz, 1H), 5.35 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 6.80 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J=8.2$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.3, 20.5, 20.6, 20.8, 26.5, 26.6, 55.1, 67.7, 70.0, 70.7, 71.6, 74.6, 76.5, 77.2, 112.5, 113.7, 128.9, 129.4, 159.3, 169.5, 170.0.

IR (KBr) 3000, 1750, 1520, 1370, 1220, 1100, 1060, 1030 cm^{-1} .

Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$: C, 59.22; H, 6.48. Found: C, 59.04; H, 6.57.

D-1,3,6-Tri-O-acetyl-(*p*-methoxybenzyl)-*myo*-inositol (20a)

13a の合成法に従って、**19a** (0.12 g, 0.27 mmol) から **20a** (0.14 g, 94%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.98 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 3.49–3.56 (m, 1H), 3.67–3.75 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.00–4.06 (m, 2H), 4.53–4.63 (m, 2H), 4.78 (dd, $J=10.3$, 2.2 Hz, 1H), 4.92 (dd, $J=10.4$, 2.6 Hz, 1H), 5.41 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.6, 20.7, 20.8, 55.1, 71.2, 71.3, 72.0, 72.9, 73.1, 74.6, 113.6, 129.5, 129.8, 159.2, 169.9, 170.6, 170.8.

IR (KBr) 3450, 2900, 1740, 1510, 1360, 1230, 1030 cm^{-1} .

Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{10} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 55.17; H, 6.25. Found: C, 55.47; H, 6.15.

D-1,3,6-Tri-*O*-acetyl-2-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol (21a)

14a の合成法に従って、**20a** (0.14 g, 0.32 mmol)から **21a** (0.26 g, >99%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.11 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.71–2.85 (m, 8H), 3.42–3.62 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.10–4.59 (m, 10H), 4.80 (dd, $J=18.7, 9.3$ Hz, 1H), 5.05 (dd, $J=10.1, 2.6$ Hz, 1H), 5.38 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J=8.4$ Hz, 2H).

IR (film) 2960, 2250, 1740, 1610, 1510, 1410, 1360 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 799 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

D-1,3,6-Tri-*O*-acetyl-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol (22a)

14a の合成法に従って **21a** (0.24 g, 0.30 mmol)から **22a** (0.12 g, 59%)を無色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 2.02 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.88–2.94 (m, 8H), 4.18–4.40 (m, 9H), 4.81–4.93 (m, 2H), 5.01 (dd, $J=10.4, 2.6$ Hz, 1H), 5.14 (dd, $J=9.7, 2.6$ Hz, 1H), 5.56 (t, $J=10.1$ Hz, 1H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CD_3OD) δ 20.1, 20.2, 20.3, 20.7, 20.9, 21.2, 21.3, 64.7, 64.8, 64.9, 68.4, 70.8, 71.9, 72.1, 78.4, 78.9, 118.6, 118.8, 118.9, 119.0, 171.6, 171.8, 171.9.

IR (KBr) 3400, 2950, 1740, 1360, 1220, 1030 cm^{-1} .

1,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-2-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-*myo*-inositol (23a)

20a (0.12 g, 0.27 mmol)を pyridine (15 ml)に溶解し、4-dimethylaminopyridine (30 mg, 0.25 mmol)を加え、続いて acetic anhydride (0.15 ml, 1.6 mmol)を加えた。室温で12時間攪拌し、toluene で希釈した。混合液を共沸で減圧留去した後、残渣を AcOEt で希釈した。有機層を H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane–AcOEt=1:1)で精製し、**23a** (0.12 g, 86%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.99 (s, 15H), 3.80 (s, 3H), 4.12 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.97 (dd, $J=10.3, 1.8$ Hz, 2H), 5.14 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.61 (t, $J=9.9$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=7.5$ Hz, 2H).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ 20.3, 20.4, 20.4, 55.1, 70.0, 70.9, 71.1, 74.1, 74.6, 113.7, 129.4, 129.6, 159.3, 169.5, 170.0.

IR (KBr) 2950, 1740, 1360, 1230, 1040 cm^{-1} .

Anal.Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$: C, 56.47; H, 5.92. Found: C, 56.39; H, 5.93.

1,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-*myo*-inositol (**24a**)

23a (0.11 g, 0.21 mmol)を acetic acid (10 ml)に溶解し、10% palladium-carbon (50 mg)を加え、水素雰囲気下、室温で10時間攪拌した。セライト濾過後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 -MeOH=14:1)で精製し、**24a** (61 mg, 74%)を白色結晶として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 2.01 (s, 9H), 2.10 (s, 6H), 3.12 (bs, 1H), 4.33 (s, 1H), 5.03 (dd, $J=10.3, 2.4$ Hz, 2H), 5.20 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.60 (t, $J=10.1$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20.4, 20.5, 20.6, 68.2, 69.5, 70.7, 70.8, 169.7, 169.8.

IR (KBr) 3420, 2950, 1740, 1370, 1230, 1040 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 391 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anal.Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}-1/3\text{H}_2\text{O}$: C, 48.49; H, 5.76. Found: C, 48.53; H, 5.68.

6- $\{N^1$ -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl}amino-1-hexanol (biotin linker)

Biotin linker は Pon らの手法を応用して合成した³⁷⁾。すなわち、*N*-Hydroxysuccinimide-biotin を 6-amino-1-hexanol と反応させることで、6-biotinylamino-1-hexanol を得た。OH 基に TBS 基を導入した後、 N^1 位を dimethoxytrityl 化した。最終的に脱シリル化行い目的とする 6- $\{N^1$ -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl}amino-1-hexanol を得た。

D-2,3,6-Tri-*O*-acetyl-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol 1- $\{6$ -(N^1 -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate} (**25a**)

6- $\{N^1$ -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl}amino-1-hexanol (97 mg, 0.15 mmol)を CH_2Cl_2 (5 ml)に溶解し、2-cyanoethyl *N, N, N', N'*-tetraisopropylaminophosphoramidite (48 μl , 0.15 mmol)を加え、続けて、1*H*-tetrazole (11 mg, 0.15 mmol)を加えた。Ar 雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。そこに、**14a** (84 mg, 0.12 mmol)と 1*H*-tetrazole (11 mg, 0.15 mmol)を加え、同じ条件で2時間攪拌した。混合液に、*tert*-butylhydroperoxide (0.10 ml, 0.78 mmol)を加え、室温でさらに2時間攪拌し、溶媒が半量となるまで濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 -MeOH=13:1, 0.5% Et_3N)で精製し、**25a** (45 mg, 38%)を無色油状物質として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.36–1.67 (m, 14H), 2.03–2.29 (m, 11H), 2.43–2.45 (m, 1H), 2.70–2.80 (m, 10H), 3.08–3.20 (m, 3H), 3.79 (s, 6H), 4.02–4.29 (m, 15H), 4.67–4.81 (m, 3H), 5.22–5.26 (m, 1H), 5.49 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.63–5.73 (m, 2H), 5.99 (bs, 1H), 6.80 (d, $J=8.4$ Hz, 4H), 7.11–7.29 (m, 9H).
IR (KBr) 3400, 2950, 1750, 1700, 1650, 1510, 1220, 1130 cm^{-1} .
MS (FAB) m/z 1440 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

L-2,3,6-Tri-*O*-acetyl-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol
1-{{[6-(N^1 -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate}} (25b)

25a の合成法に従い、**14b** (84 mg, 0.12 mmol)から **25b** (0.14 g, 83%)を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.36–1.67 (m, 14H), 2.03–2.29 (m, 11H), 2.43–2.45 (m, 1H), 2.70–2.82 (m, 10H), 3.07–3.20 (m, 3H), 3.79 (s, 6H), 4.02–4.29 (m, 15H), 4.67–4.81 (m, 3H), 5.22–5.26 (m, 1H), 5.49 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.63–5.73 (m, 2H), 5.99 (bs, 1H), 6.80 (d, $J=8.4$ Hz, 4H), 7.11–7.29 (m, 9H).
IR (KBr) 2920, 1750, 1700, 1510, 1250, 1220, 1030 cm^{-1} .

D-2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-*myo*-inositol
1-{{[6-(N^1 -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate}} (26a)

25a の合成法に従い、**4a** (0.26 g, 0.40 mmol)から **26a** (0.13 g, 78%)を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.22–1.66 (m, 14H), 1.96–2.27 (m, 18H), 2.42–2.47 (m, 1H), 2.67–2.71 (m, 2H), 3.05–3.18 (m, 3H), 3.79 (s, 6H), 4.01–4.30 (m, 6H), 4.68–4.74 (m, 1H), 5.05–5.22 (m, 2H), 5.44–5.52 (m, 2H), 5.71–5.76 (m, 2H), 5.97 (bs, 1H), 6.80 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 7.12–7.32 (m, 9H).
IR (KBr) 2900, 1700, 1510, 1220, 1040 cm^{-1} .
MS (FAB) m/z 1152 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

L-2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-*myo*-inositol
1-{{[6-(N^1 -(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate}} (26b)

25a の合成法に従い、**4b** (39 mg, 0.10 mmol)から **26b** (98 mg, 85%)を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.24–1.66 (m, 14H), 2.00–2.30 (m, 18H), 2.44 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 2.66–2.72 (m, 2H), 3.07–3.19 (m, 3H), 3.78 (s, 6H), 4.01–4.33 (m, 6H), 4.67–4.72 (m, 1H), 5.04–5.20 (m, 2H), 5.44–5.60 (m, 3H), 5.71 (s, 1H), 5.87–5.93 (m, 1H), 6.80 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 7.12–7.28 (m, 9H).
IR (KBr) 2900, 1710, 1700, 1510, 1220, 1040 cm^{-1} .

D-1,3,6-Tri-*O*-acetyl-4,5-di-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol
2-[[6-(*N*¹-(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate] (27)

25a の合成法に従い、**22a** (81 mg, 0.12 mmol) から **27** (0.17 g, >99%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.24–1.87 (m, 14H), 2.03–2.19 (m, 11H), 2.42–2.46 (m, 1H), 2.70–2.78 (m, 8H), 2.95–3.23 (m, 5H), 3.79 (s, 6H), 4.08–4.30 (m, 15H), 4.66–5.05 (m, 4H), 5.50–5.67 (m, 2H), 6.04–6.22 (m, 2H), 6.80 (d, *J*=7.7 Hz, 4H), 7.11–7.28 (m, 9H).

MS (EI) *m/z* 1440 (M+H)⁺.

1,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-*myo*-inositol
2-[[6-(*N*¹-(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate] (28)

25a の合成法に従い、**24a** (39 mg, 0.10 mmol) から **28** (59 mg, 52%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.20–1.74 (m, 14H), 2.02–2.46 (m, 19H), 2.81 (t, *J*=6.0 Hz, 2H), 3.08–3.20 (m, 3H), 3.79 (s, 5H), 4.16–4.34 (m, 6H), 5.02–5.24 (m, 4H), 5.48–5.54 (m, 4H), 5.90 (s, 1H), 6.80 (d, *J*=8.8 Hz, 4H), 7.12–7.28 (m, 9H).

IR (KBr) 2920, 1750, 1500, 1220, 1030 cm⁻¹.

D-1-*O*-[(Biotinylamino-1-hexyl) hydrogen phosphoryl]-*myo*-inositol
4,5-bis(hydrogenphosphate) : Biotinylated D-*myo*-inositol 1,4,5-triphosphate.

25a (45 mg, 0.031 mmol)を CH₂Cl₂ (10 ml)に溶解し、trichloroacetic acid (30 mg)を加え、室温で 30 分間攪拌した。濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH=7:1)で精製し、dimethoxytrityl 基を脱保護した化合物を得た。得られた化合物を MeOH (5 ml)に溶解し、28% aqueous NH₄OH (5 ml)を加え、55°C で 10 時間攪拌した。濃縮後、陰イオン交換クロマトグラフィーに吸着させた。0.05–0.25 M formic acid を含む 0.5–2.5 M ammonium formate 溶液にて溶出させ、biotinylated inositol phosphate が含まれる溶離液を、Briggs test⁷⁴⁾で確認した。溶離液を、凍結乾燥を繰り返すことで余分な塩を除き、アンモニウム塩の形で **Biotinylated D-*myo*-inositol 1,4,5-triphosphate** (23 mg, 32%)を白色結晶として得た。

¹H NMR (D₂O) δ 1.22–1.58 (m, 14H), 2.09 (t, *J*=7.1 Hz, 2H), 2.63 (d, *J*=13.0 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J*=13.0, 4.9 Hz, 1H), 3.02 (d, *J*=6.6 Hz, 2H), 3.15–3.21 (m, 1H), 3.58 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 3.72–3.96 (m, 5H), 4.11–4.29 (m, 3H), 4.33–4.48 (m, 1H).

^{13}C NMR (D_2O) δ 27.3, 27.9, 28.4, 30.3, 30.5, 30.9, 32.4, 38.2, 41.9, 42.3, 58.0, 62.9, 64.7, 69.1, 72.8, 73.4, 78.2, 79.7, 81.1, 168.0, 179.3.

IR (KBr) 3400, 3200, 2900, 1700, 1400, 1030 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 746 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

FABHRMS Calcd m/z for $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$ 744.1370. Found: 744.1358($\text{M}-\text{H}^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}-5/2\text{NH}_3-5/2\text{H}_2\text{O}$: C, 31.71; H, 6.59; N, 9.25. Found: C, 31.51; H, 6.64; N, 9.29.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -3.8$ (c 0.1, H_2O).

**L-1-O-[(Biotinylamino-1-hexyl) hydrogen phosphoryl]-myo-inositol
4,5-bis(hydrogen phosphate) : Biotinylated L-myo-inositol 1,4,5-triphosphate.**

Biotinylated D-Ins(1,4,5) P_3 の合成法に従い、**25b** (0.14 g, 0.094 mmol) からアンモニウム塩の形で **Biotinylated L-Ins(1,4,5) P_3** (27 mg, 35%)を白色結晶として得た。

^1H NMR (D_2O) δ 1.22–1.58 (m, 14H), 2.09 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.63 (d, $J=13.0$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J=13.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.02 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.15–3.21 (m, 1H), 3.58 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 3.72–3.96 (m, 5H), 4.11–4.29 (m, 3H), 4.33–4.48 (m, 1H).

^{13}C NMR (D_2O) δ 27.3, 27.9, 28.4, 30.3, 30.5, 30.9, 32.4, 38.2, 41.9, 42.3, 58.0, 62.9, 64.7, 69.1, 72.8, 73.4, 73.5, 78.2, 79.7, 81.1, 168.0, 179.3.

IR (KBr) 3200, 2900, 1700, 1400, 1200, 1030 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 746 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

FABHRMS Calcd m/z for $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$ 744.1370. Found: 744.1306 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}-3\text{NH}_3-3\text{H}_2\text{O}$: C, 31.06; H, 6.75; N, 9.88. Found: C, 30.90; H, 6.51; N, 10.00.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23.5$ (c 0.1, H_2O)

**D-1-O-[(Biotinylamino-1-hexyl) hydrogen phosphoryl]-myo-inositol
: Biotinylated D-myo-inositol 1-phosphate.**

Biotinylated D-Ins(1,4,5) P_3 の合成法に従い、**26a** (0.13 g, 0.087 mmol)からアンモニウム塩の形で **Biotinylated D-Ins1P** (20 mg, 30%)を白色結晶として得た。

^1H NMR(D_2O) δ 1.26–1.65 (m, 14H), 2.13 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.63 (d, $J=13.0$ Hz, 1H), 2.89 (dd, $J=13.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.06 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.18–3.23 (m, 2H), 3.41–3.66 (m, 3H), 3.79 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 4.12 (s, 1H), 4.29–4.33 (m, 1H), 4.48–4.52 (m, 1H).

^{13}C NMR (D_2O) δ 27.3, 27.9, 28.4, 30.3, 30.5, 30.9, 32.4, 38.2, 41.9, 42.4, 58.1, 62.9, 64.7, 69.0, 73.4, 74.0, 74.1, 74.9, 76.6, 78.7, 168.0, 179.3.

IR (KBr) 3400, 2900, 1700, 1200, 1030 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 586 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

FABHRMS Calcd m/z for $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{PS}$ 584.2043. Found: 584.2057($\text{M}-\text{H}^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{PS}-\text{NH}_3-5/3\text{H}_2\text{O}$: C, 41.77; H, 7.38; N, 8.86. Found: C, 42.10; H, 7.11; N, 8.46.

L-1-O-[(Biotinyl-6-aminoethyl) hydrogen phosphoryl]-*myo*-inositol
:Biotinylated L-*myo*-inositol 1-phosphate.

Biotinylated-D-Ins(1,4,5) P_3 の合成法に従い、**26b** (0.17 g, 0.15 mmol)からアンモニウム塩の形で **Biotinylated-L-Ins1P** (41 mg, 46%)を白色結晶として得た。

^1H NMR(D_2O) δ 1.24–1.52 (m, 14H), 2.12 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.65 (d, $J=13.0$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J=13.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.05 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.16–3.22 (m, 2H), 3.38–3.64 (m, 3H), 3.77–3.79 (m, 3H), 4.10–4.11 (m, 1H), 4.27–4.31 (m, 1H), 4.46–4.64 (m, 1H).

^{13}C NMR (D_2O) δ 27.3, 27.9, 28.5, 30.4, 30.5, 30.9, 32.4, 38.2, 42.0, 42.4, 58.1, 62.9, 64.8, 69.1, 73.5, 74.1, 75.0, 76.7, 78.7, 78.8, 168.0, 179.3.

IR (KBr) 3400, 2900, 1700, 1200, 1030 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 586 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

FABHRMS Calcd m/z for $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{PS}$ 584.2043. Found: 584.2083($\text{M}-\text{H}^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{PS}-4/3\text{NH}_3-2\text{H}_2\text{O}$: C, 41.01; H, 7.51; N, 9.42. Found: C, 41.20; H, 7.20; N, 9.24.

D-2-O-[(Biotinylamino-1-hexyl) hydrogen Phosphoryl] -*myo*-inositol
4,5-bis(hydrogen phosphate) : Biotinylated D-*myo*-inositol 2,4,5-triphosphate.

Biotinylated D-Ins(1,4,5) P_3 の合成法に従い、**27** (0.16 g, 0.094 mmol)からアンモニウム塩の形で **Biotinylated D-Ins(2,4,5) P_3** (31 mg, 32%)を白色結晶として得た。

^1H NMR (D_2O) δ 1.22–1.58 (m, 14H), 2.09 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.63 (d, $J=13.0$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J=13.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.02 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.15–3.21 (m, 1H), 3.58 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 3.72–3.96 (m, 5H), 4.11–4.29 (m, 3H), 4.33–4.48 (m, 1H).

^{13}C NMR (D_2O) δ 27.2, 27.9, 28.5, 30.3, 30.7, 30.9, 32.4, 38.4, 41.9, 42.3, 58.0, 63.1, 64.7, 69.5, 72.8, 73.7, 79.7, 81.1, 168.0, 179.3.

IR (KBr) 3200, 2900, 1700, 1460, 1200, 1050 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 746 (M+H)⁺.

FABHRMS Calcd m/z for C₂₂H₄₁N₃O₁₇P₃S 744.1370. Found: 744.1327(M-H⁺).

Anal. Calcd for C₂₂H₄₂N₆O₁₇P₃S-4NH₃-3H₂O : C, 30.45; H, 6.97; N, 11.30. Found: C, 30.23; H, 6.60; N, 11.28.

[α]_D²⁵ = +23.2 (c 0.1, H₂O).

2-O-[(Biotinylamino-1-hexyl) hydrogen phosphoryl]-*myo*-inositol

: Biotinylated D-*myo*-inositol 2-phosphate.

Biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ の合成法に従い、**28** (59 mg, 0.050 mmol) からアンモニウム塩の形で **Biotinylated Ins2P** (20 mg, 66%) を白色結晶として得た。

¹H NMR (D₂O) δ 1.22–1.58 (m, 14H), 2.09 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.63 (d, $J=13.0$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J=13.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.02 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.15–3.21 (m, 2H), 3.58 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 3.72–3.96 (m, 5H), 4.11–4.29 (m, 3H), 4.33–4.48 (m, 1H).

¹³C NMR (D₂O) δ 27.3, 27.9, 28.4, 30.3, 30.5, 30.9, 32.4, 38.2, 41.9, 42.3, 58.0, 62.9, 64.7, 69.1, 72.8, 73.4, 78.2, 79.7, 81.2, 168.0, 179.3.

IR (KBr) 3200, 2900, 1700, 1400, 1200, 1040 cm⁻¹.

MS (FAB) m/z 586 (M+H)⁺.

FABHRMS Calcd m/z for C₂₂H₃₉N₃O₁₁PS 584.2043. Found: 584.2056(M-H⁺).

Anal. Calcd for C₂₂H₄₀N₃O₁₁PS-11/5NH₃-13/3H₂O : C, 37.69; H, 7.94; N, 10.39. Found: C, 37.49; H, 7.54; N, 10.70.

Biotinylated Ins(1,4,5)P₃ と PLC δ ₁ PH domain との結合試験

1) プラスミドコンストラクト

杉本らの方法を用いて⁷⁵⁾、PLC δ ₁ PH domain の cDNA (residue 11–140) を、rat brain cDNA library (CLONTECH Labs. Inc.) から PCR を用いて増幅し、pBLZ vector に挿入することで得た。

2) PLC δ ₁ PH domain の精製

PLC δ ₁ PH domain プラスミドを、大腸菌 BL21 (DE)-pLysS star cell にトランスフォームし、得られた蛋白質を Hitrap Desalting column を用いて、0–1M NaCl の濃度勾配を 10 mM phosphate buffuer (pH 7.0) にかけることで溶出した。蛋白質を、Mono S ion exchange column を用いて、

0–1 M NaCl の濃度勾配を 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)にかけることで、目的とする蛋白質を得た。精製した PLC δ_1 PH domain は、15% SDS–ポリアクリルアミド電気泳動後、CBB 染色を行うことで可視化し、また MALDI–TOF mass を用いて確認した。(calcd 15723, found 15700)

3) Pull–down 試験

Biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ と PLC δ_1 PH domain との K_D は、SDS–ポリアクリルアミドゲル電気泳動法をもとに算出した。85 nmol/ml の binding capacity をもつ Streptavidin beads (200 μ l) を、30 mM HEPES、50 mM NaCl、0.005% Tween 20、3 mM EDTA (pH 7.4) に溶解した 5 nmol biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ に加え、4°C で 6 時間インキュベーションした。同じ緩衝液で beads を洗浄し、チューブに、100、50、25、10、0 μ l となるように分割した。この体積は、biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ の 1.0、0.5、0.25、0.1、0 μ M 溶液に相当する。それぞれに分割した beads に、500 μ l の PLC δ_1 PH domain (0.2 μ M) を加え、同じ緩衝液にて、4°C で 10 分間インキュベーションした。1000 rpm で 1 分間遠心後、上清を非結合画分(S)として得て、beads から PLC δ_1 PH domain を、native Ins(1,4,5)P₃ と競合溶出させることで、結合画分(B)として得た。それぞれの画分(S と B)を、20% trichloroacetic acid を 500 μ l 加え、15000 rpm で遠心した。それぞれの沈殿を、SDS–ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、CBB で染色した。バンド強度は、NIH image (version 1.6) で、それぞれのバンドに基づくドット数を数値化することで定量した。PLC δ_1 PH domain の biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ に対する結合分率 $Q=[B]/([B]+[S])$ を、biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ 濃度に対してプロットし、理論的な K_D を以下の式を用いて算出した。; $Q_{fit} = [\text{biotinylated D-Ins(1,4,5)P}_3]/(K_D + [\text{biotinylated D-Ins(1,4,5)P}_3])$ 、このとき、 $[\text{biotinylated D-Ins(1,4,5)P}_3]$ は biotinylated D-Ins(1,4,5)P₃ の濃度を示す。

第2章 実験の部

DL-6-*O*-Allyl-3-*O*-benzyl-1,2:4,5-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (29)

1 (0.50 g, 1.2 mmol)をDMF (30 ml)に溶解し、60% NaH (0.58 g, 14 mmol)を加え、続けて allyl bromide (1.0 ml, 12 mmol)を加えた。Ar 雰囲気下、24 時間攪拌後、MeOH で反応を停止した。濃縮後、AcOEt で希釈し、H₂O と saturated aqueous NaCl で洗浄した。Na₂SO₄ で乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane–AcOEt = 5:1)で精製し、**29** (0.45 g, 82%)を白色結晶として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.42–1.75 (20H, m), 3.28 (1H, dd, *J* = 9.9, 9.5 Hz), 3.63 (1H, dd, *J* = 10.64, 6.6 Hz), 3.73 (1H, dd, *J* = 10.3, 4.2 Hz), 3.97–4.06 (2H, m), 4.29–4.35 (3H, m), 4.81 (1H, d, *J* = 12.5 Hz), 4.89 (1H, d, *J* = 12.5 Hz), 5.18 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 5.33 (1H, d, *J* = 17.4 Hz), 5.89–6.00 (1H, m), 7.25–7.43 (5H, m).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 23.5, 23.8, 23.9, 24.9, 25.0, 35.2, 36.3, 36.4, 37.6, 71.1, 71.5, 74.6, 76.2, 76.6, 78.4, 80.3, 80.7, 110.4, 112.5, 117.0, 127.6, 128.1, 128.3, 134.9, 138.1.

IR (KBr) 2930, 2860, 1650, 1110, 740 cm⁻¹.

MS (FAB) *m/z* 471 (M+H)⁺.

Anal. Calcd for C₂₈H₃₈O₆: C, 71.46; H, 8.14. Found: C, 71.52; H, 8.27.

DL-6-*O*-Allyl-3-*O*-benzyl-*myo*-inositol (30)

29 (0.45 g, 0.95 mmol)をTHF–H₂O (5:1, 60 ml)の混合溶媒に溶解し、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate (*p*-TsOH·H₂O) (0.30 g, 1.6 mmol)を加え、3 時間加熱還流した。Et₃N にて中和し、濃縮した。真空乾燥後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂–MeOH = 10:1)にて精製し、**30** (0.24 g, 82%)を白色結晶として得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ: 3.09–3.29 (3H, m), 3.39 (1H, dd, *J* = 9.5, 9.4 Hz), 3.67 (1H, dd, *J* = 9.5, 9.54 Hz), 4.00 (1H, dd, *J* = 2.8, 2.7 Hz), 4.23 (2H, d, *J* = 5.9 Hz), 4.54 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 4.62 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 4.99 (1H, dd, *J* = 10.5, 2.8 Hz), 5.16 (1H, dd, *J* = 17.2, 2.0 Hz), 5.87–5.96 (1H, m), 7.15–7.34 (5H, m).

¹³C NMR (CD₃OD) δ: 71.0, 73.0, 73.1, 73.8, 75.1, 76.3, 80.9, 82.4, 116.7, 128.6, 129.1, 129.3, 137.1, 139.9.

IR (KBr) 3410, 2870, 1640, 1120, 750 cm⁻¹.

Anal. Calcd for C₁₆H₂₂O₆: C, 61.92; H, 7.15. Found: C, 61.72; H, 7.23.

DL-6-*O*-Allyl-3-*O*-benzyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-*myo*-inositol (31)

30 (0.47 g, 1.5 mmol)と dibutyltin oxide (0.45 g, 1.8 mmol)との混合物を、toluene (50 ml) 中で、Dean-Stark 装置を用いて、H₂O を除きながら 3 時間加熱還流した。濃縮後、残渣に cesium fluoride (0.30 g, 2.0 mmol)を加え、真空乾燥した。残渣を、加熱した DMF (30 ml)を用いて、100 °C で溶解した。生じた懸濁液に−78 °C で *p*-methoxybenzyl chloride (0.25 ml, 1.8 mmol)を加え、Ar 雰囲気下、室温に戻しながら 24 時間攪拌した。反応混合液を CHCl₃ で希釈し、セライト濾過後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂–MeOH = 14:1)で精製し、**31** (0.58 g, 88%)を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.54 (1H, bs), 2.92 (2H, bs), 3.19 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.8 Hz), 3.29 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.9 Hz), 3.37 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 3.66 (1H, dd, *J* = 9.4, 9.4 Hz), 3.81 (3H, s), 3.94 (1H, dd, *J* = 9.9, 9.5 Hz), 4.16 (1H, s), 4.26 (1H, dd, *J* = 12.5, 5.9 Hz), 4.40 (1H, dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz), 4.59 (2H, s), 4.64 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 4.71 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 5.16 (1H, dd, *J* = 10.5, 1.8 Hz), 5.28 (1H, dd, *J* = 17.2, 1.6 Hz), 5.92–6.01 (1H, m), 6.88 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.25–7.35 (7H, m).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 55.2, 67.0, 71.8, 72.2 (3-*O*-CH₂-C₆H₄-OMe and 6-*O*-CH₂-CH=CH₂), 74.1, 74.2, 79.0, 79.3, 80.0, 113.8, 116.9, 127.9 (2,6-CH, methoxyphenyl and 2,6-CH, phenyl), 128.0, 128.5, 129.5, 129.9, 135.1, 137.7, 159.4.

IR (KBr) 3400, 3030, 2920, 1610, 1030, 760 cm⁻¹.

Anal. Calcd for C₂₄H₃₀O₇: C, 66.96; H, 7.02. Found: C, 66.86; H, 7.04.

DL-6-*O*-Allyl-3-*O*-benzyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol (32)

31 (0.75 g, 1.7 mmol)を DMF (30 ml)に溶解し、2-methoxypropene (0.52 ml, 10 mmol)に続けて、真空乾燥させた *p*-toluenesulfonic acid (0.25 g, 1.3 mmol)を加えた。Ar 雰囲気下、24 時間攪拌した。Et₃N にて中和後、AcOEt にて希釈した。有機層を H₂O と saturated aqueous NaCl で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane–AcOEt = 2:1)で精製し、**32** (0.72 g, 87%) を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.43 (3H, s), 1.45 (3H, s), 2.63 (1H, bs), 3.27–3.37 (2H, m), 3.50 (1H, dd, *J* = 9.9, 3.1 Hz), 3.80 (3H, s), 3.86 (1H, dd, *J* = 9.7, 9.2 Hz), 4.07 (1H, dd, *J* = 9.7, 9.7 Hz), 4.14 (1H, s), 4.25 (1H, dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz), 4.36 (1H, dd, *J* = 12.8, 5.3 Hz), 4.50 (3H, m), 4.82 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 5.16 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 5.32 (1H, dd, *J* = 17.2, 1.5 Hz), 5.89–6.00 (1H, m), 6.86 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.26–7.38 (7H, m).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 26.9, 27.0, 55.2, 69.8, 71.5, 72.4, 72.9, 75.9, 77.1, 78.0, 79.0, 80.6, 111.6, 113.8, 116.5, 127.7, 127.9, 128.3, 129.6, 129.9, 135.1, 138.0, 159.4.

IR (KBr) 3450, 2930, 1610, 1070, 790 cm^{-1} .

HRMS(FAB) m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_7\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 493.2202. Found: 493.2216.

DL-3-*O*-Benzyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol (33)

32 (0.10 g, 0.21 mmol) を EtOH–benzene– H_2O (7:3:1, 22 ml) の混合溶媒に溶解し、diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (0.034 g, 0.30 mmol) に続き、tris(triphenylphosphine)rhodium(I) chloride (0.028 g, 0.030 mmol) を加え、5 時間加熱還流した。濃縮後、AcOEt で希釈し、 H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥し、濃縮した。残渣を acetone– H_2O (10:1, 5 ml) の混合溶媒に溶解し、mercury(II) oxide (0.046 g, 0.21 mmol) を加えた。混合液に、mercury(II) chloride (0.057 g, 0.21 mmol) を acetone– H_2O (10:1, 5 ml) に溶解した混合液を滴下した。滴下時間を含めて 5 分間室温で攪拌し、1M NaOH で中和した。セライト濾過した後、saturated aqueous NaCl で希釈した。水層を CH_2Cl_2 で抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 –MeOH = 15:1) で精製し、**33** (0.061 g, 68%) を白色結晶として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.45 (3H, s), 1.47 (3H, s), 2.60 (1H, bs), 2.62 (1H, bs), 3.22–3.24 (2H, m), 3.56 (1H, dd, $J = 10.1, 2.8$ Hz), 3.80 (3H, s), 4.08 (2H, t, $J = 9.7$ Hz), 4.24 (1H, s), 4.50 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 4.66 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 4.69 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 4.85 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 6.89 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.25–7.38 (7H, m).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 27.2, 27.3, 55.7, 69.0, 70.7, 72.1, 72.5, 76.5, 77.6, 78.6, 81.7, 112.5, 114.4, 128.3, 128.4, 128.8, 129.7, 130.1, 138.3, 160.0.

IR (KBr) 3570, 2990, 2930, 1070, 790 cm^{-1} .

HRMS(FAB) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 431.2070. Found: 431.2048.

DL-3-*O*-Benzyl-2,6-di-*O*-acetyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol (34)

33 (0.33 g, 0.76 mmol) を pyridine (10 ml) に溶解し、4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.024 g, 0.20 mmol) に続き、acetic anhydride (Ac_2O) (0.19 ml, 2.0 mmol) を加えた。室温で 12 時間攪拌し、toluene で希釈した。混合液を共沸で減圧留去した後、残渣を AcOEt で希釈した。有機層を H_2O と saturated aqueous NaCl で洗浄後し、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane–AcOEt = 2:1) で精製し、**34** (0.36 g, 91%) を白色結晶として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.41 (3H, s), 1.46 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.16 (3H, s), 3.34–3.40 (2H, m), 3.61 (1H, dd, $J = 10.3, 3.1$ Hz), 3.80 (3H, s), 4.03 (1H, t, $J = 10.9, 9.8$ Hz), 4.32 (1H, d, $J = 11.7$ Hz),

4.59–4.74 (3H, m), 5.38 (1H, dd, $J = 10.3, 9.9$ Hz), 5.83 (1H, dd, $J = 3.3, 3.2$ Hz), 6.87 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.16–7.19 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.26–7.38 (5H, m).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 21.0, 21.1, 26.8, 26.8, 55.2, 67.5, 71.2, 71.2, 71.6, 74.6, 76.6, 76.9, 77.0, 112.2, 113.8, 127.7 (2,6- $\underline{\text{C}}\text{H}$, methoxyphenyl and 2,6- $\underline{\text{C}}\text{H}$, phenyl), 128.4, 129.2, 129.5, 137.5, 159.4, 169.8, 170.3.

IR (KBr) 2990, 1740, 1260, 1100, 740 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 515 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$: C, 65.36; H, 6.66. Found: C, 65.06; H, 6.72.

DL-2,6-Di-*O*-acetyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-4,5-*O*-isopropylidene-*myo*-inositol (35)

34 (0.38 g, 0.74 mmol)を MeOH (25 ml)に溶解し、W-2 Raney Nickel (0.20 g) を加え、水素雰囲気下、50 °C で3 時間攪拌した。セライト濾過後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane–AcOEt = 1:1)で精製し、**35** (0.20 g, 64%) を無色油状物質として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.42 (3H, s), 1.46 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.18 (3H, s), 2.51 (1H, bs), 3.41–3.47 (2H, m), 3.80 (3H, s), 3.92 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.35 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 4.60 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 5.36 (1H, dd, $J = 10.3, 9.6$ Hz), 5.65 (1H, s), 6.87 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.19 (2H, d, $J = 8.6$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 20.9, 21.1, 26.7 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ x2, acetal), 55.2, 68.9, 70.1, 71.2, 71.7, 76.3, 76.8, 77.6, 112.4, 113.8, 129.1, 129.6, 159.4, 169.8, 170.8.

IR (KBr) 3450, 1750, 1250, 1070, 790 cm^{-1} .

HRMS(FAB) m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 447.1631. Found: 447.1624.

DL-2,6-Di-*O*-acetyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-*myo*-inositol (36)

35 (0.20 g, 0.47 mmol)を CH_2Cl_2 (10 ml)に溶解し、ethylene glycol (28 μl , 0.50 mmol)を加えた。続けて、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.0095 g, 0.05 mmol)を加え、室温で10 分間攪拌した。混合液を、 Et_3N (0.10 ml, 0.72 mmol)で中和後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 –MeOH = 7:1)で精製し、**36** (0.16 g, 89%)を白色結晶として得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.91 (3H, s), 2.02 (3H, s), 3.20–3.27 (3H, m), 3.41–3.57 (3H, m), 3.67 (3H, s), 4.21 (1H, d, $J = 11.2$ Hz), 4.47 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 5.00 (1H, t, $J = 9.9$ Hz), 5.55 (1H, dd, $J = 6.0, 2.9$ Hz), 6.77 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.19 (2H, d, $J = 8.6$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 21.0, 21.1, 55.7, 71.2, 71.8, 72.4, 74.2, 74.4, 75.3, 76.8, 114.7, 130.6, 130.8, 131.3, 172.4.

IR (KBr) 3400, 1740, 1250, 1070, 820 cm^{-1} .

HRMS(FAB) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 407.1318. Found: 407.1319.

Preparation of bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylaminophosphoramidite

本化合物の合成法は、第 1 章実験の部に記載した。

DL-2,6-Di-*O*-acetyl-1-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-3,4,5-tri-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol (37)

36 (0.25 g, 0.66 mmol) を CH₂Cl₂ (10 ml) に溶解し、bis(2-cyanoethyl) *N,N*-diisopropylaminophosphoramidite (0.64 ml, 2.5 mmol) を加え、続けて 1*H*-tetrazole (0.21 g, 3.0 mmol) を加えた。Ar 雰囲気下、室温で 1.5 時間攪拌後、*m*-chloroperbenzoic acid (0.087 g, 0.51 mmol) を少量ずつ加え、さらに 5 分間攪拌した。混合液を、CH₂Cl₂ で希釈し、saturated aqueous NaHCO₃ で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂-MeOH = 12:1)で精製し、**37** (0.33 g, 54%) を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.07 (3H, s), 2.21 (3H, s), 2.77–2.86 (12H, m), 3.61 (1H, d, *J* = 10.1 Hz), 3.80 (3H, s), 4.27–4.53 (16H, m), 4.81 (1H, dd, *J* = 18.9, 9.4 Hz), 5.33 (1H, dd, *J* = 9.9, 9.8 Hz), 5.90 (1H, s), 6.86 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.17 (2H, d, *J* = 8.6 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 19.5, 19.6, 19.6, 20.8, 21.0, 55.2, 62.7, 62.8, 62.9, 63.0, 63.1, 67.1, 70.4, 71.8, 73.4, 73.9, 76.1, 76.7, 113.7, 116.7, 116.9, 117.0, 117.1, 117.2, 129.0, 129.6, 159.6, 169.9, 170.1.

IR (KBr) 3130, 2250, 1750, 1280, 1040, 750 cm⁻¹.

HRMS(FAB) *m/z* calcd for C₃₆H₄₅N₆O₁₈P₃Na (M+Na)⁺ 965.1901. Found: 965.1913.

DL-2,6-Di-*O*-acetyl-3,4,5-tri-*O*-[bis(2-cyanoethyl) phosphoryl]-*myo*-inositol (38)

37 (0.14 g, 0.15 mmol) を CH₃CN-H₂O (9:1, 10 ml) の混合溶媒に溶解し、diammonium cerium(IV) nitrate (CAN) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂-MeOH = 7:1)で精製し、**38** (0.11 g, 87%) を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ: 2.08 (3H, s), 2.12 (3H, s), 2.87 (12H, t, *J* = 6.1 Hz), 3.86 (1H, dd, *J* = 5.8, 2.9 Hz), 4.23–4.38 (12H, m), 4.58 (1H, dd, *J* = 17.8, 9.0 Hz), 4.70–4.75 (2H, m), 5.22 (1H, dd, *J* = 9.7, 9.7 Hz), 5.68 (1H, s).

¹³C NMR (CD₃OD) δ: 20.1 (-CH₂-CH₂-CN x2), 20.2 (-CH₂-CH₂-CN x2), 20.3 (-CH₂-CH₂-CN x2), 20.9, 21.4, 64.8 (-CH₂-CH₂-CN x2), 64.9 (-CH₂-CH₂-CN x2), 64.9 (-CH₂-CH₂-CN x2), 65.0, 68.2, 72.5, 73.4, 75.4, 77.8, 78.4, 118.6 (-CH₂-CH₂-CN x2), 118.8 (-CH₂-CH₂-CN x2), 118.8 (-CH₂-CH₂-CN x2), 171.8, 172.3.

IR (KBr) 3440, 2250, 1750, 1280, 1040 cm⁻¹.

HRMS(FAB) m/z calcd for $C_{28}H_{37}N_6O_{17}P_3Na$ (M+Na)⁺ 845.1326. Found: 845.1349.

Preparation of 6-{*N*¹-(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl}amino-1-hexanol

本化合物の合成法は、第 1 章実験の部に記載した。

DL-2,6-Di-*O*-acetyl-3,4,5-tri-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol 1-[[6-(*N*¹-(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl)amino-1-hexyl] (2-cyanoethyl)phosphate] (39)

6-{*N*¹-(4,4'-dimethoxytrityl)biotinyl}amino-1-hexanol (0.33 g, 0.51 mmol)を CH_2Cl_2 (5 ml)に溶解し、2-cyanoethyl *N, N, N', N'*-tetraisopropylaminophosphordiamidite (162 μ l, 0.51 mmol)を加え、続けて 1*H*-tetrazole (0.035 g, 0.50 mmol)を加えた。Ar 雰囲気下、15 分間攪拌した。混合液を脱水 AcOEt (30 ml)で希釈し、saturated aqueous NaCl で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、残渣を CH_2Cl_2 (10 ml)に溶解した。そこにあらかじめ pyridine で共沸し、結晶中の H_2O を除き、さらに toluene で共沸することで pyridine を除いて乾燥させた **38** (0.054 g, 0.070 mmol)を CH_2Cl_2 (10 ml)に完全に溶解し、MS4A を加え攪拌した。1*H*-tetrazole (0.10 g, 1.4 mmol)を加え、Ar 雰囲気下、室温でさらに 2 時間攪拌し、*tert*-butylhydroperoxide (0.10 ml, 0.78 mmol)を加えた。室温で 5 分間攪拌後、溶媒が半量となるまで濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 -MeOH = 12:1, 0.5% Et_3N)で精製し、**39** (0.084 g, < 80%)を無色油状物質として得た。

¹H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.14–1.60 (14H, m), 1.92–2.23 (10H, m), 2.38 (1H, d, J = 12.8 Hz), 2.69–2.77 (14H, m), 3.04–3.18 (3H, m), 3.72 (6H, s), 3.94–4.32 (18H, m), 4.51–4.76 (4H, m), 5.34–5.47 (1H, m), 5.87 (2H, bs). 6.75 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.04–7.22 (9H, m).

IR (KBr) 3450, 2950, 2250, 1750, 1650, 790 cm^{-1} .

MS (FAB) m/z 1583 (M+H)⁺.

DL-2,6-Di-*O*-acetyl-3,4,5-tri-*O*-[bis(2-cyanoethyl)phosphoryl]-*myo*-inositol 1-[[6-(biotinylamino-1-hexyl) (2-cyanoethyl)phosphate] (40)

39 (0.075 g, 0.050 mmol)を CH_2Cl_2 (10 ml)に溶解し、Trichloroacetic acid (TCA) (0.10 g, 0.61 mmol)を加え、室温で 30 min 攪拌した。濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2 -MeOH = 3:1)で精製し、**40** (0.058 g, 96%)を無色油状物質として得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.19–1.63 (14H, m), 2.06–2.15 (8H, m), 2.62 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 2.78–2.89 (15H, m), 3.08–3.20 (m, 3H), 3.97–4.42 (18H, m), 4.66–4.80 (2H, m), 5.41 (1H, dd, *J* = 9.6, 9.5 Hz), 5.87 (1H, s).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 20.0, 20.1, 20.2, 20.2, 20.7, 21.6, 26.1, 26.9, 27.4, 29.5, 29.8, 30.2, 31.0, 31.1, 36.9, 40.2, 40.3, 41.1, 57.0, 61.6, 63.4, 64.3, 64.9, 65.0, 65.0, 65.2, 70.5, 70.6, 70.7, 71.4, 74.2, 77.5, 79.4, 118.6, 118.6, 118.7, 118.8, 118.9, 166.0, 171.4, 171.8, 171.9, 175.9, 176.0.

IR (KBr) 3420, 2950, 2860, 2250, 1750, 1700, 1650 cm⁻¹.

MS (FAB) *m/z* 1281 (M+H)⁺.

**DL-1-*O*-[(6-biotinylamino-1-hexyl) hydrogen phosphoryl]-*myo*-inositol
3,4,5-tris(hydrogenphosphate) : Biotinylated DL-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate.**

13 (0.15 g, 0.11 mmol)を MeOH (5 ml)に溶解し、28% aqueous NH₄OH solution (5 ml)を加え、55 °C で 10 時間攪拌した。濃縮後、陰イオン交換クロマトグラフィーに吸着させた。0.05–0.25 M formic acid を含む 0.5–2.5 M ammonium formate 溶液にて溶出させ、biotinylated inositol phosphate が含まれる溶離液を、Briggs test⁷⁴⁾で確認した。溶離液を、凍結乾燥を繰り返すことで余分な塩を除き、biotinylated DL-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (0.028 g, 27%)のアンモニウム塩を白色結晶として得た。

¹H NMR (D₂O) δ: 1.22–1.61 (14H, m), 2.10 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.64 (1H, d, *J* = 13.0 Hz), 2.86 (1H, dd, *J* = 13.2, 5.0 Hz), 3.03 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 3.16–3.23 (1H, m), 3.76–3.99 (5H, m), 4.28 (2H, dd, *J* = 8.1, 4.4 Hz), 4.45–4.60 (5H, m).

HRMS(FAB) *m/z* calcd for C₂₂H₄₂N₃O₂₀P₄S 824.1033. Found: 824.0990 (M –H)⁺.

IR (KBr) 3420, 2960, 1740, 1370, 1220, 1030cm⁻¹.

**Preparation of the optically active D-3-*O*-benzyl-2,3:5,6-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol
(–)-1**

本化合物の合成法は、第 1 章実験の部に記載した。

**D-1-*O*-[(6-Biotinylamino-1-hexyl) hydrogen phosphoryl]-*myo*-inositol
3,4,5-tris(hydrogenphosphate) : Biotinylated D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate.**

光学分割した D-3-*O*-benzyl-1,2:4,5-di-*O*-cyclohexylidene-*myo*-inositol (–)-1 を用いることで、biotinylated D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate を同じ手法を用いて合成した。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 1.34–1.72 (14H, m), 2.23 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.77 (1H, d, $J = 12.8$ Hz), 2.99 (1H, dd, $J = 13.4, 4.9$ Hz), 3.15–3.19 (2H, m), 3.30–3.34 (1H, m), 3.90–4.20 (5H, m), 4.40–4.65 (5H, m). HRMS(FAB) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{20}\text{P}_4\text{S}$ 824.1033. Found: 824.2983 ($\text{M} - \text{H}$) $^+$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19.6$ (c 0.1, H_2O)

Biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄ と PH domain との結合試験

1) プラスミドコンストラクト

坂口らの方法を用いて Grp1 PH domain を⁴⁸⁾、杉本らの方法を用いて PLC δ_1 PH domain の cDNA (residue 11–140)を⁷⁵⁾、PCR を用いて rat brain cDNA library (CLONTECH Labs. Inc.)から増幅し、pBLZ vector に挿入することで得た。

2) 蛋白質精製

Grp1 PH domain のプラスミドを、大腸菌 BL21 (DE)-pLysS star cell にトランスフォームし、得られた蛋白質を Hitrap Desalting column を用いて、0–1M NaCl の濃度勾配を 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)にかけることで溶出した。蛋白質を、Mono S ion exchange column を用いて、0–1 M NaCl の濃度勾配を 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)にかけることで、目的とする蛋白質を得た。また PLC δ_1 PH domain も同様の手法を用いて精製した。精製した PH domain は、15% SDS–ポリアクリルアミド電気泳動後、CBB 染色を行うことで可視化し、また MALDI–TOF mass を用いて確認した。(Grp1; calcd 18329, found 13834, PLC δ_1 ; calcd 15723, found 15700)

3) Pull-down 試験

Biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄ と Grp1 PH domain との K_D は、SDS–ポリアクリルアミドゲル電気泳動法をもとに算出した。85 nmol/ml の binding capacity をもつ、Streptavidin beads (200 μl) を、30 mM HEPES、50 mM NaCl、0.005% Tween 20、3mM EDTA (pH 7.4)に溶解した 5 nmol biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄に加え、4°C で 6 時間インキュベーションした。同じ緩衝液で beads を洗浄し、チューブに、100、50、25、10、0 μl となるように分割した。この体積は、biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₃ の 0.40、0.20、0.10、0.04、0 μM 溶液に相当する。それぞれに分割した beads に、500 μl の Grp1 PH domain (0.2 μM)を加え、同じ緩衝液にて、4°C で 10 分間インキュベーションした。1000 rpm で 1 分間遠心後、上清を非結合画分 (S) として得て、beads から Grp1 PH domain を、native Ins(1,3,4,5)P₄ と競合溶出させることで、結合画分 (B) として得た。そ

それぞれの画分 (S と B) を、20% trichloroacetic acid を 500 μ l 加え、15000 rpm で遠心した。それぞれの沈殿を、SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、CBB で染色した。バンド強度を NIH image (version 1.6) で、それぞれのバンドに基づくドット数を数値化し定量した。Grp1 PH domain の biotilylated D-Ins(1,3,4,5)P₄ に対する結合分率 $Q=[B]/([B] + [S])$ を、biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄ 濃度に対してプロットし、理論的な K_D を以下の式を用いて算出した。; $Q_{fit} = [biotinylated\ D-Ins(1,3,4,5)P_4]/(K_D + [biotinylated\ D-Ins(1,3,4,5)P_4])$ 、このとき、 $[biotinylated\ D-Ins(1,3,4,5)P_4]$ は biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄ の濃度を示す。

4) SPR 分析

SPR 分析は、BIACORE2000 (GE Healthcare, BIACORE AB., Uppsala, Sweden) を使用した。biotinylated InsP_n (biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄, D-Ins(1,4,5)P₃ and D-Ins(3,5,6)P₃) を固定化したセンサーチップを作製するために、streptavidin が共有結合しているセンサーチップ (Sensor Chip SA, GE Healthcare, BIACORE AB., Uppsala, Sweden) を用いた。50 mM NaOH in 1M NaCl を流速 5 μ l/min、25°C で 60 秒間 3 回注入し、続けて 5 μ l の 25 nM biotinylated InsP_n を HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA and 0.005% Tween 20, pH 7.4) に溶解したものを、流速 5 μ l/min、25°C で 60 秒間注入した。測定用の緩衝液は、10 mM HEPES、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005% Tween 20 (pH 7.4) を用いた。精製した PH domain (Grp1 or PLC δ ₁) は、測定用の緩衝液に透析によって置換し、InsP_n が固定化されているセンサーチップ上に流した。結合を 3 分間測定し、流速 20 μ l/min、25°C で 3 分間解離を観察した。測定後のセンサーチップは、50 mM NaOH in 1 M NaCl を 15 秒間注入することで再生した。装置に備え付けの BIAevaluation version 3.1 で解析した。注入開始、注入終了時における屈折変化は、biotin だけを固定化したレーンの値を差し引くことで補正した。それぞれの biotinylated InsP_n の K_D は以下の手法で算出した。PH domain 注入後、それぞれの biotinylated InsP_n 固定化センサーチップに観察された 260–270s の平均 Response Unit (RU) を PH domain 濃度に対してプロットした。しかしながら予想される K_D を超える Grp1 PH domain 濃度を用いても結合は飽和しなかった。Biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄ の固定化量を増減する、流速を下げる、緩衝液条件 (塩濃度、pH など) を調整しても、結合の飽和を確認することはできなかった。そこで、Pull-down 試験の結果から得られた K_D ($K_D = 0.14\ \mu$ M for Grp1 PH domain、 $0.25\ \mu$ M for PLC δ ₁ PH domain) をもとにして、Grp1 PH domain においては $1.0\ \mu$ M を、PLC δ ₁ PH domain においては $5.0\ \mu$ M を最高濃度とした。 K_D (reciprocal of K_A) は、BIAevaluation 3.1 のフィッティングモデルである Steady state affinity model を用いて、以下の式に従い算出した; $Req = K_A * Conc * Rmax / (K_A * Conc * n + 1)$ 、このとき Req は PH domain が結合した biotinylated InsP_n の 260–270s における平均 RU 値を、Conc は PH domain の濃度を、Rmax は、PH domain が結合した場合の最大 RU 値を示し、一方で n

は立体障害因子を示している。上述したように、センサーチップ上の biotinylated InsP₃ 類と D-Ins(1,3,4,5)P₄ の固定化量は同じであるので、フィッティングにおいては、[Fit Local]を binding constant (K_A)に設定し、[Fit Global]を Rmax に設定した。

5) 分子結合解析法

理論的結合解析は、MOE 2009.10.で測定した。Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体 (PDB code: 1FGY) における結晶解析結果をもとに行った。1FGY は Protein Data Bank から引用した。結合解析は、MOE 2009.10.に備え付けの標準法をもとにした。Grp1 PH domain と Ins(1,3,4,5)P₄ との複合体を読み込み、Protonate 3D によって、水素原子と荷電を付与した。得られた複合体を MMFF94x によって最適化し、Site finder によって結合部位に偽原子を配置した。この時の条件を以下に示す。(Alpha Site Setting; Probe Radius 1: 1.4 Å, Probe Radius 2: 1.8 Å, Isolated Donor/Acceptor: 3 Å, Connection Distance: 2.0 Å, Minimum size: 3 Å, and Radius: 2 Å). 結合 simulation は、ASEDock で行った。目的とするリガンドを ASEDock に指定し、LowModeMD によって立体配座解析を行った。その時の条件を以下に示す。(Step1; cutoff: 4.5 Å, RMS (root mean square) gradient: 10 kcal/mol/Å, energy threshold: 500 kcal/mol, Step2; optimize 5 lowest energy or 5 best score conformation, cutoff: 8 Å, RMS gradient: 0.1 kcal/mol/Å).

第3章 実験の部

1) 試薬

Biotinylated D-*myo*-inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate (biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄) (**Figure 3-8a**) は、第2章で述べた方法で合成した。Ins(1,4,5)P₃、Ins(1,3,4)P₃、Ins(1,3,4,5)P₄ (**Figure 3-8b**)と STP (**Figure 3-8d**)は、Wako より購入した。D-*myo*-phosphatidylinositol (di-C₈-PtdIns)、D-*myo*-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (di-C₈-PtdIns(4,5)P₂)、D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (di-C₈-PtdIns(3,4)P₂) と D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (di-C₈-PtdIns(3,4,5)P₃) (**Figure 3-8c**)は、Echelon より購入した。

2) プラスミド、細胞、トランスフェクション

pSG-Gag (p24) cFLAG ベクター⁷⁶⁾を、Pr55^{Gag} CA domain の発現に用いた。Pr55^{Gag} と MA domain の発現用ベクターは、PCR で増幅したそれぞれの配列を、pSG-Gag (p24) cFLAG の gag-p24 遺伝子と入れ替えることで作製した。なお、pSG-Gag (p24) cFLAG は、5'末端に EcoRI と3'末端に XhoI サイトを含む。PCR の鋳型を pNL4-3⁷⁷⁾プラスミドとした。Pr55^{Gag}、MA と CA において、他のベクターとして、pEF-Gag cFLAG、pEF-Gag (p17) cFLAG と pEF-Gag (p24) cFLAG を作製した。これらは、pSG-Gag cFLAG、pSG-Gag (p17) cFLAG と pSG-Gag (p24) cFLAG の EcoRI-XbaI フラグメントを pEF1/Myc-HisA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)の EcoRI と XbaI サイトの間に挿入することで作製した。

293T 細胞は⁷⁸⁾、Dulbecco's modified Eagle medium に 10% heat-inactivated FBS を加えたもので培養した。

リン酸カルシウム共沈殿法⁷⁹⁾で、293T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、37°C で 48 時間培養し、ウエスタンブロットや蛋白精製に使用した。

3) ウエスタンブロット

ウエスタンブロットは、Willey らの方法⁷⁹⁾を用いて行った。トランスフェクション後の細胞ライセートを Laemmli's⁸⁰⁾ sample buffer を用いて調製し、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で分離した。分離した蛋白質を、polyvinylidene fluoride membranes に転写し、membranes を anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Ab) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)とインキュベートした。可視化は、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)を用いた。

4) 蛋白の精製

トランスフェクション後の 293T 細胞を TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, and 10 µg/mL aprotinin, pH 7.8 containing 1 mM dithiothreitol (DTT))で溶解した。12000 rpm、4°C、5 分間の条件で遠心後、上清を Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)と 2 時間、4°C でインキュベートした。この Sepharose CL-4B とのインキュベーションを 2 回繰り返した。上清を mouse ANTI-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)及び 0.5 ng/mL 1x FLAG peptide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)と 8 時間、4°C でインキュベートした。このとき、FLAG 抗体への非特異的に結合する成分を除くために、1x FLAG peptide を加えている。樹脂を TNE buffer plus 1 mM DTT で 5 回洗浄し、150 µg/mL 3x FLAG peptide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を TBS buffer (50 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl, pH 7.4 with 1 mM DTT)に溶解したものを加えた。混合液を 30 分、4°C でインキュベーション後、遠心し、その上清を SPR assay に使用した。

5) 蛋白の定量

cFLAG 蛋白質を SDS-PAGE で分離し、Coomassie Brilliant Blue (CBB)で染色した。それぞれのバンドを ImageJ (version 1.38x)を用いて、蛋白濃度が既知である protein marker のバンド強度と比較することで、cFLAG 蛋白濃度を算出した。

6) SPR 解析

SPR 解析は、BIACORE2000 (GE Healthcare, BIACORE AB., Uppsala, Sweden)を使用した。biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄を固定化したセンサーチップを作製するために、streptavidin が共有結合しているセンサーチップ(Sensor Chip SA, GE Healthcare, BIACORE AB., Uppsala, Sweden)を用いた。biotinylated Ins(1,3,4,5)P₄を HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA and 0.005% Tween 20, pH 7.4)に溶解したものを、目的とする固定化量となるまで注入した。測定用の緩衝液は、10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% Tween 20, 2% (v/v) glycerol, and 0.5 mg/mL BSA (pH 7.8)を用いた。精製した蛋白質は、測定用の緩衝液に透析によって置換し、Ins(1,3,4,5)P₄が固定化されているセンサーチップ上に流した。結合を 3 分間測定し、流速 20 µl/min、25°C で 3 分間解離を観察した。測定後のセンサーチップは、50 mM NaOH in 1 M NaCl の 15 秒間を 3 回、50 mM NaOH の 15 秒間を 3 回と 10 µM Ins(1,3,4,5)P₄を 1 回注入することで再生し、さらに 10 mM NaOH の 15 秒間を 3 回注入することで、前処理を行っ

た。装置に備え付けの BIAevaluation version 3.1 で解析した。注入開始、注入終了時における屈折変化は、biotin だけを固定化したレーンの値を差し引くことで補正した。

7) 平衡解離定数 (K_D)

K_D 値を算出するために、0.08 μM Pr55^{Gag} と 2.0 μM MA を、様々な濃度における競合剤、たとえばイノシトールリン酸、ホスファチジルイノシトールもしくは STP と混合した。STP は Pr55^{Gag} との結合試験に使用した。結合が平衡状態になった後 (25°C の場合、30 分以内に平衡に達する)、それぞれの混合液 (60 μL) を biotinylated D-Ins(1,3,4,5)P₄ 固定化センサーチップに、流速 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で注入した。このとき、平衡溶液中において、競合剤と結合していない遊離の Pr55^{Gag} もしくは MA domain 量を定量した。 K_D は、BIAevaluation 3.1 のフィッティングモデルである solution affinity model を用いて、以下の式に従い算出した ; $A_{\text{free}} = 0.5 \times (B - A - K_D) + (0.25 \times (A + B + K_D)^2 - A \times B)^{0.5}$ 、このとき A は蛋白質の初濃度を示し、 A_{free} は競合剤と結合していない蛋白濃度を示す。また B は、Ins(1,3,4,5)P₄ の初濃度を示す。

参考文献

- 1) Huyck, T. K.; Gradishar, W.; Manuguid, F.; Kirkpatrick, P. *Nature Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 173
- 2) Aicher, T. D.; Buszek, K. R.; Fang, F. G.; Forsyth, C. J.; Jung, S. H.; Kishi, Y.; Matelich, M. C.; Scola, P. M.; Spero, D. M.; Yoon, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3162.
- 3) Fujita, J. M.; Kimura, N.; Sakai, A.; Ichikawa, Y.; Hanyu, T.; Otsuka, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, 75, 2283.
- 4) Brady, S. F.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12903.
- 5) Namba, K.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15382.
- 6) Rühlmann, A.; Nordheim, A. *Immunobiol.* **1997**, 198, 192.
- 7) Schreiber, S. L. *Science* **1991**, 251, 283.
- 8) Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, 66, 807.
- 9) Berridge, M. J. *Nature* **1993**, 361, 315.
- 10) Potter, B. V. L.; Lampe, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, 34, 1933.
- 11) Majerus, P. W. *Sci. STKE.* **2007**, 2007, 283.
- 12) McIntosh, M. T.; Vaid, A.; Hosgood, H. D.; Vijay, J.; Bhattacharya, A.; Sahani, M. H.; Baevova, P.; Joiner, K. A.; Sharma, P. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 11499.
- 13) Michell, R. H.; Heath, V. L.; Lemmon, M. A.; Dove, S. K. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, 31, 52.
- 14) Cantley, L. C. *Science* **2002**, 296, 1655.
- 15) Workman, P.; Clarke, P. A.; Raynaud, F. I. *Cancer Res.* **2010**, 70, 2146.
- 16) Haslam, R. J.; Koide, H. B.; Hemmings, B. A. *Nature* **1993**, 363, 309.
- 17) Lemmon, M. A.; Ferguson, K. M.; O'Brien, R.; Sigler, P. B.; Schlessinger, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, 92, 10472.
- 18) Ferguson, K. M.; Lemmon, M. A.; Sigler, P. B.; Schlessinger, J. *Cell* **1995**, 83, 1037.
- 19) Ono, A.; Ablan, S. D.; Lockett, S. J.; Nagashima, K.; Freed, E. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 14889.
- 20) Saad, J. S.; Miller, J.; Tai, J.; Kim, A.; Ghanam, R. H.; Summers, M. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 11364.
- 21) Tyers, M.; Rachubinski, R. A.; Stewart, M. I.; Varrichio, A. M.; Shorr, R. G. L.; Haslam, R. J.; Harley, C. B. *Nature* **1988**, 333, 470.
- 22) Mayer, B. J. *Cell* **1993**, 73, 629.
- 23) Kavran, J. M.; Klein, D. E.; Falasca, A. L. M.; Isakoff, S. J.; Skolnik, E. Y.; Lemmon, M. A. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 30497.
- 24) Shaw, G. *BioEssays* **1996**, 18, 35.
- 25) Musacchio, A.; Gibson, T.; Rice, P.; Thompson, J.; Saraste, M. *Trends. Biochem. Sci.* **1993**, 19, 343.
- 26) Gibson, T.; Hyvönen, M.; Musacchio, A.; Saraste, M.; Birney, E. *Trends. Biochem. Sci.* **1994**, 19, 349.

- 27) Harlan, J. E.; Hajduk, P. J.; Yoon, H. S.; Fesik, S. W. *Nature* **1994**, 371, 168.
- 28) Hyvönen, M.; Macias, M. J.; Nilges, M.; Oschkinat, H.; Saraste, M.; Wilmanns, M. *EMBO. J.* **1995**, 14, 4676.
- 29) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 123.
- 30) Billington, D. C.; Baker, R.; Kulagowski, J. J.; Mawer, I. M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 4, 314.
- 31) Bannwarth, W.; Trzeciak, A. *Helv.Chim.Acta.* **1987**, 70, 175.
- 32) Nagashima, N.; Ohno, M. *Chem. Lett.* **1987**, 141-144.
- 33) Liu, C.; Potter, P. L. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8335.
- 34) Corey, E. J.; Suggs, W. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 3224.
- 35) Uhlmann, E.; Engels, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1023.
- 36) Johansson, R.; Samuelsson, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1984**, 2371.
- 37) Pon, R. T. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1715.
- 38) Morii, T.; Sugimoto, K.; Makino, K.; Otsuka, M.; Imoto, K.; Mori, Y. *J. Am.Chem. Soc.* **2002**, 124, 1138.
- 39) Batty, I. R.; Nahorski, S. R.; Irvine, R. F. *Biochem. J* **1985**, 232, 211.
- 40) Irvine, R. F.; Schell, M. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 327.
- 41) Morris, A. P.; Gallacher, D. V.; Irvine, R. F.; Petersen, O. H. *Nature* **1987**, 330, 653.
- 42) Changya, L.; Gallacher, D. V.; Irvine, R. F.; Petersen, O. H. *FEBS Lett.* **1989**, 251, 43.
- 43) Changya, L.; Gallacher, D. V.; Irvine, R. F.; Potter, B. V.; Petersen, O. H. *J. Membr. Biol.* **1989**, 109, 85.
- 44) Anraku, K.; Inoue, T.; Sugimoto, K.; Morii, T.; Mori, Y.; Okamoto, Y.; Otsuka, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1822.
- 45) Lietzke, S. E.; Bose, S.; Cronin, T.; Klarlund, J.; Chawla, A.; Czech, M. P.; Lambright, D. G. *Mol. Cell* **2000**, 6, 385.
- 46) Oikawa, Y.; Tanaka, T.; Horita, K.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5397.
- 47) Classon, B.; Garegg, P.; Samuelsson, B. *Acta Chem. Scand.* **1984**, 38b, 419.
- 48) Sakaguchi, R.; Tainaka, K.; Shimada, N.; Nakano, S.; Inoue, M.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Morii, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, 122, 2196.
- 49) Wills, J. W.; and Craven, R. C. *AIDS* **1991**, 5, 639.
- 50) Freed, E. O. *Virology* **1998**, 251, 1.
- 51) Conte, M. R.; Matthews, S. *Virology* **1998**, 246, 191.
- 52) Gamble, T. R.; Yoo, S.; Vajdos, F. F.; von Schwedler, U. K.; Worthylake, D. K.; Wang, H.; McCutcheon, J. P.; Sundquist, W. I.; Hill, C. P. *Science* **1997**, 278, 849.
- 53) Dawson, L.; Yu, X. F. *Virology* **1998**, 251, 141.
- 54) Parent, L. J.; Bennett, R. P.; Craven, R. C.; Nelle, T. D.; Krishna, N. K.; Bowzard, J. B.; Wilson, C. B.; Puffer, B. A.; Montelaro, R. C.; Wills, J. W. *J. Virol.* **1995**, 69, 5455.
- 55) Nguyen, D. H.; Hildreth, J. E. *J. Virol.* **2000**, 74, 3264.

- 56) Resh, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 417.
- 57) Tang, C.; Loeliger, E.; Luncsford, P.; Kinde, I.; Beckett, D.; Summers, M. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 517.
- 58) Zhou, W.; Parent, L. J.; Wills, J. W.; Resh, M. D. *J. Virol.* **1994**, 68, 2556.
- 59) Shkriabai, N.; Datta, S. A.; Zhao, Z.; Hess, S.; Rein, A.; Kvaratskhelia, M. *Biochemistry* **2006**, 45, 4077.
- 60) Toker, A.; and Cantley, L. C. *Nature* **1997**, 387, 673.
- 61) Steinberg, S. F. *Physiol. Rev.* **2008**, 88, 1341.
- 62) Griner, E. M.; Kazanietz, M. G. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 281.
- 63) Caroni, P. *EMBO J.* **2001**, 20, 4332.
- 64) Freed, E. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 11101.
- 65) Lockyer, P. J.; Bottomley, J. R.; Reynolds, J. S.; McNulty, T. J.; Venkateswarlu, K.; Potter, B. V.; Dempsey, C. E.; Cullen, P. J. *Curr. Biol.* **1997**, 7, 1007.
- 66) Divecha, N.; Irvine, R. F. *Cell* **1995**, 80, 269.
- 67) Johnsson, B.; Lofas, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, 198, 268.
- 68) Karlsson, R. *Anal. Biochem.* **1994**, 221, 142.
- 69) Ferguson, C. G.; James, R. D.; Bigman, C. S.; Shepard, D. A.; Abdiche, Y.; Katsamba, P. S.; Myszka, D. G.; Prestwich, G. D. *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, 1475.
- 70) McLaughlin, S.; Aderem, A. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 272.
- 71) Alfadhli, A.; Still, A.; and Barklis, E. *J. Virol.* **2009**, 83, 12196.
- 72) Chukkapalli, V.; Hogue, I. B.; Boyko, V.; Hu, W. S.; Ono, A. *J. Virol.* **2008**, 82, 2405.
- 73) Datta, S. A.; Curtis, J. E.; Ratcliff, W.; Clark, P. K.; Crist, R. M.; Lebowitz, J.; Krueger, S.; Rein, A. *J. Mol. Biol.* **2007**, 365, 812.
- 74) Lampe, D.; Liu, C.; Potter, V. B. L. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 907.
- 75) Sugimoto, K.; Nishida, M.; Otsuka, M.; Makino, K.; Ohkubo, K.; Mori, Y.; Morii, T. *Chem. Biol.* **2004**, 11, 475.
- 76) Fujita, M.; Akari, H.; Sakurai, A.; Yoshida, A.; Chiba, T.; Tanaka, K.; Strebel, K.; Adachi, A. *Microbes Infect.* **2004**, 6, 791.
- 77) Adachi, A.; Gendelman, H. E.; Koenig, S.; Folks, T.; Willey, R.; Rabson, A.; Martin, M. A. *J. Virol.* **1986**, 59, 284.
- 78) Lebkowski, J. S.; Clancy, S.; Calos, M. P. *Nature* **1985**, 317, 169.
- 79) Willey, R. L.; Smith, D. H.; Lasky, L. A.; Theodore, T. S.; Earl, P. L.; Moss, B.; Capon, D. J.; Martin, M. A. *J. Virol.* **1988**, 62, 139.
- 80) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680.

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、終始御指導御鞭撻を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部教授 大塚雅巳 先生に深く感謝の意を表します。

常に誠意のある御指導を賜りました熊本大学附属創薬研究センター准教授 藤田美歌子 先生に心より感謝致します。

種々有益な御助言を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部助教 岡本良成 先生に感謝致します。

本論文作成に対し、有益な御助言と御校閲を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部教授 杉本幸彦 先生、中島誠 先生及び森岡弘志 先生に深く感謝申し上げます。

生物活性評価実験に関して御指導を賜りました京都大学エネルギー理工学研究所教授 森井孝 先生に感謝致します。

生物活性評価実験に関して実験装置を供与して頂き、また御助言を賜りました京都大学大学院工学研究科教授 森泰生 先生に感謝致します。

種々有益な御助言を頂きました熊本保健科学大学保健科学部教授 大川原正 先生、九州保健福祉大学薬学部教授 山崎哲郎 先生に感謝致します。

本研究を行うにあたり御協力を頂きました熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科合同教員室各位に心より感謝致します。

本研究の引き継ぎに関して御指導を頂き、また研究の面白さを教えて頂きました京都大学化学研究所（現日本たばこ医薬総合研究所）井上照彦 博士に感謝致します。

実験手技及び研究に対する考え方を教えて頂きました熊本大学大学院薬学研究科（現九州大学大学院理学研究科助教）濱崎昭行 先生に心より感謝致します。

元素分析および MS スペクトルの測定を行って頂きました熊本大学機器分析センター 西山麻砂美氏、ならびに入口利之氏に感謝致します。

学生生活から現在に至るまで終始御助言を頂きました熊本大学大学院薬学研究科（現第一三共株式会社薬物動態研究所）出口恒夫 博士に心より感謝致します。

種々御討議頂きました熊本大学大学院薬学教育部 舛田岳史 博士、ならびに同教育部（現熊本中央病院臨床検査技師）工藤康太 修士をはじめとする熊本大学薬学部生体機能分子合成学分野の諸氏に感謝致します。

これまでに惜しみない援助を頂きました両親に感謝致します。また暖かく見守ってくれた家族に心より感謝致します。

2012年7月 安楽 健作