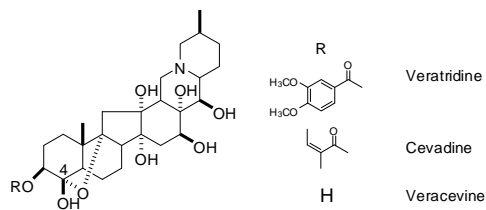


# NATURAL PRODUCT CHEMISTRY

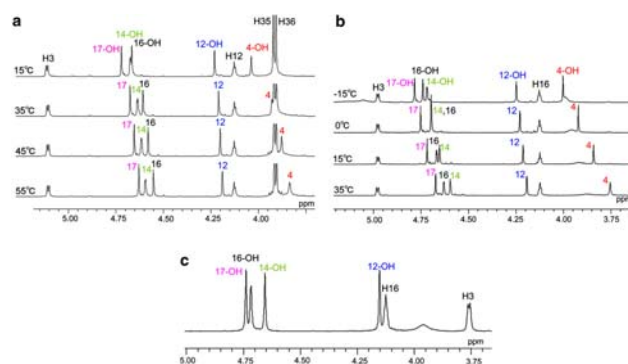
## Annual Research Highlights

### (1) “Conformations of 3-carboxylic esters essential for neurotoxicity in veratrum alkaloids are loosely restricted and fluctuate”

The lipid-soluble veratrum alkaloids, veratridine and cevadine are plant neurotoxins that are agonists of voltage-sensitive sodium channel. Their conformations in a hydrophobic environment were analyzed by NMR spectroscopy in solution phase chloroform at low temperature. The conformations around the 3-carboxylic esters which is essential for their neurotoxicity, was completely different from the previously reported X-ray crystallographic structure. The carbonyl oxygen atom of the carboxylic ester forms a weak intramolecular hydrogen bond with the OH proton at C4 (4-OH) that loosely restricts the conformation of the 3-veratoyl ester in veratridine and the 3-angeloyl ester in cevadine. Methylation at the C4 hydroxyl group of veratridine had much reduced its neurotoxic activity relating to voltage-sensitive sodium channel. The result suggests that the loose conformational restrictions of the carboxylic esters are important for neurotoxicity of the veratrum alkaloids.



**Fig. 1** Structures of veratridine, cevadine, and veracevin.

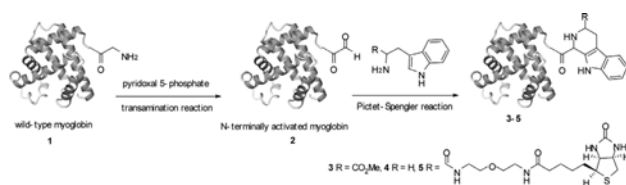


**Fig. 2** OH signal region spectra of veratridine (a), cevadine (b), and veracevin (c). The spectrum of veracevin was acquired at 35 °C.

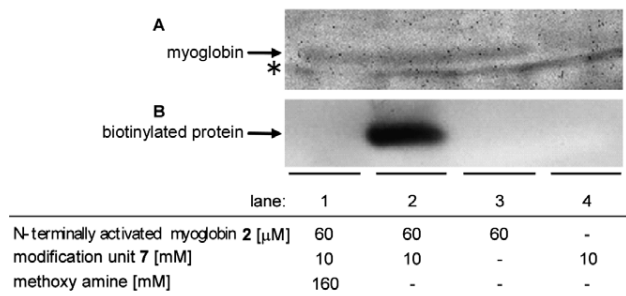
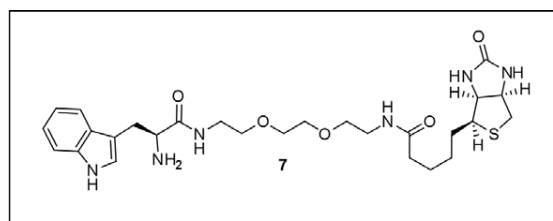
1.-1) *Bioorg. Med.Chem.*, **16**, 3025-3031 (2008)

### (2) “N-Terminal labeling of protein by the Pictet-Spengler reaction”

The Pictet-Spengler reaction was applied to the N-terminal labeling of horse heart myoglobin. This was performed in the following two steps: (1) conversion of the N-terminal glycine residue to an  $\alpha$ -keto aldehyde by a transamination reaction and (2) condensation of the resulting activated myoglobin with tryptamine analogues by the Pictet-Spengler reaction. Ultraviolet (UV)/visible (vis) absorption and circular dichroism (CD) spectral data revealed that the tertiary structure of myoglobin was not altered by the Pictet-Spengler reaction.



**Fig. 3** N-terminal labeling of myoglobin by the Pictet-Spengler reaction



**Fig. 4** (A) Fluorescence detection of the protein moiety by staining with SYPRO Tangenine, and (B) chemiluminescence detection of the biotin moiety with streptavin-HRP. An asterisk indicates the dye front in a 15% SDS-PAGE gel. Inset shows the chemical structure of modification unit 7.

2.-4) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4550-4553 (2008)

研究ハイライト

(1) ベラトリジン類の分子内水素結合による立体配座形成とその神経毒性への関与

ベラトリジン類はユリ科植物の球根に含まれる脂溶性アルカロイド化合物で、電位依存性ナトリウムチャンネルを標的タンパク質とする神経毒である。重クロロホルム中、室温で<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定すると、4-OHシグナルの広幅化が観測された。低温測定により、シグナルの先鋭化が観察され、4-OHプロトンが分子内水素結合をしている事が明らかとなった。4-OHの水素結合の受け手は3位アシル基のカルボニル酸素であり、このエステル結合はその水素結合により、緩やかに立体配座制御されていることが示唆された。ベラトリジン類の活性発現には、4-OHと3-O-アシル基の存在が必須と考えられることから、4-OHとC3位エステルのカルボニル酸素との分子内水素結合形成がベラトリジンの毒性発現に関与していることが示唆された。

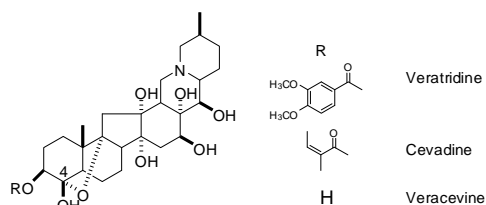


図1 ベラトリジン、セバジン、ベラセビンの構造

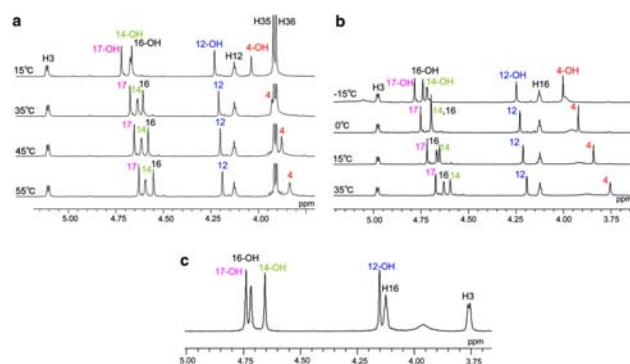


図2 ベラトリジン、セバジン、ベラセビンのOHシグナル領域の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

1.-1) *Bioorg. Med.Chem.*, **16**, 3025-3031 (2008)

(2) ピクテ・スピングラー反応を用いた、機能性タンパク質の部位特異的標識法の開発

β-アリアルエチルアミンとアルデヒドとの縮合環化反応であるピクテ・スピングラー反応を用いてタンパク質の部位特異的の化学標識法を開発した。N末端のグリシンをピリドキサル-5-リン酸により特異的にホルミル化したミオグロビンを調製し、リン酸バッファー(6.5)中、37℃、18時間でビオチンをリンカーを介してトリプトファンと結合させた検出マーカーユニットを用いて標識した。ビオチン化されたミオグロビンが化学発光検出され、競争阻害をかけたバンドではミオグロビンが検出されなかったことから、特異的にアルデヒドを標識している事を確認した。

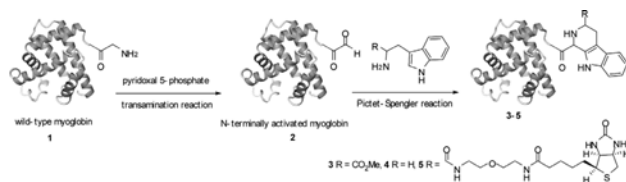


図3 ピクテ・スピングラー反応を用いたミオグロビンのN-末端の標識化

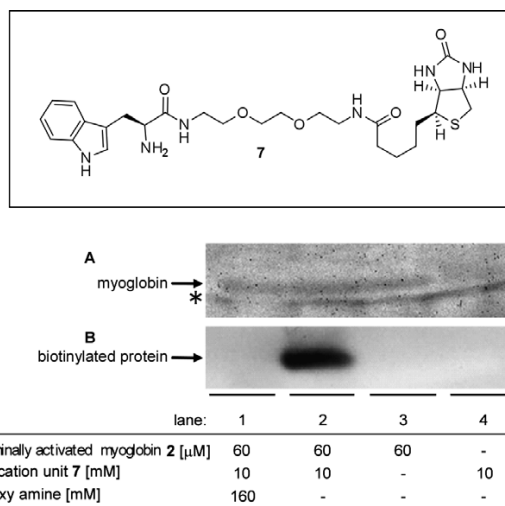


図4 検出ユニットによるホルミル化ミオグロビンの検出

2.-4) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4550-4553 (2008)

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) A. Niitsu, M. Harada, T. Yamagaki, K. Tachibana, "Conformations of 3-carboxylic esters essential for neurotoxicity in veratrum alkaloids are loosely restricted and fluctuate" *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 3205-3031 (2008).
- 2) S. Mimasu, T. Sengoku, S. Fukuzawa, T. Umehara, S. Yokoyama, "Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranylecypromin at 2.25" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 15-20 (2008).
- 3) H. Suzuki, T. Yamagaki, K. Tachibana, K. Fukui, "Fragmentation of Lewis-type trisaccharides in the gas phase experimental and theoretical studies" *Int. J. Mass Spectrom* **278**, 1-9 (2008).
- 4) T. Sasaki, K. Kodama, H. Suzuki, S. Fukuzawa, K. Tachibana, "*N*-Terminal labeling of protein by Pictet-Spengler reaction" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4550-4553 (2008).

### 2. 総説・解説

- 1) 児玉 公一郎、中山 洋、福沢 世傑：「炭素—炭素結合をタンパク質に導入する—遺伝子工学と有機合成化学の融合」, *化学と生物*, **46**, 528 - 530 (2008)