薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (7) 464-477 (1994)

テレオシジンの活性立体配座：新規活性分子のデザインと合成

遠藤泰之,* 大野道博, 首藤紘一
東京大学薬学部, 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

The Active Conformation of Teleocidins: Design and Synthesis of New Active Molecules

Yasuyuki ENDO,* Michihiro OHNO, and Koichi SHUDO

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

(Received February 17, 1994)

This review deals with structure-activity relationships, conformational analysis of teleocidins and creation of new active compounds for the determination of active conformation of teleocidins. Phorbol esters containing 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and teleocidins which are classified as TPA-type tumor promoters exhibit potent tumor-promoting activity as well as many important biological activities connected with cell proliferation and cell differentiation. Teleocidins are known to exist in an equilibrium between two conformational states in solution, the twist and the sofa forms. The low energy barrier between the two conformers makes it difficult to identify the mode of interaction of these promoters with common macromolecular targets. Design and synthesis of molecules having a new skeleton (benzolactams) and producing two conformations of teleocidins solve the problem. Benzolactams become the simplest molecule reproducing the conformation and activity of teleocidin, and will be a useful tool for the study of tumor-promotion and cell differentiation.

Keywords—teleocidin; indolactam-V; benzolactam; 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; tumor-promoter; conformational analysis

1. はじめに

発癌の過程は単に1つのステップで正常細胞が癌細胞に変化するのではなく、複数の過程にそれぞれ外的及び内的因子が関与している。化学発癌において、この発癌多段階説は、第一段階のイニシエーションと第二段階のプロモーションの独立した過程が、それぞれイニシエーターとプロモーターといわれる別の化学物質により誘起されることに対応している。化学発癌多段階説を実証したのは Berenblum であり、1941年のことであった。¹⁾ その実験はマウス皮膚に、それだけでは腫瘍を発生させない量のイニシエーター (benzo[*a*]pyrene) を一度だけ塗布した後に、プロモーター (クロトン油) を反復塗布することにより腫瘍が誘発される実験である。一連の実験により、イニシエーターの作用は一度だけで長期にわたって作用が持続するのに対して、プロモーター単独での反復塗布、あるいはイニシエーターをプロモーターより後で塗布した場合には腫瘍は発生しないことが示された。これは2つの質的に異なる過程が存在するこ

とを明確に示したものである。これは、イニシエーターは不可逆的に細胞に変化を与えるが、それだけでは腫瘍は発生せず、一方、プロモーターはイニシエーションを受けた細胞に可逆的な作用を与えて腫瘍を発生させるという基本概念である。現在では、イニシエーション過程は、近年の遺伝子解析の進歩により、7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA), benzo[*a*]pyrene 等のイニシエーターの代謝活性化により生ずる ultimate mutagen の DNA への共有結合による化学修飾を引金として、ポイントミューテーションによる複数の癌関連遺伝子の変化の蓄積として把握されるようになった。活性化化合物としてのプロモーターの研究は、1967 年、Hecker らがクロトン油の成分からジテルペンエステル 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (**1**, TPA あるいは PMA) を単離構造決定²⁾したことから開始された。その後、同じジテルペンエステル類の ingenol ester,³⁾ daphnane 骨格⁴⁾を有するプロモーターが発見されたが、長い間、発癌プロモーター研究の手段は TPA のみであった。藤木らは環境中に存在する新規プロモーターの独自のスクリーニング法による大規模な検索の結果、1979 年、アミノ酸由来の teleocidin 類 (**2**) に、⁵⁾その後、ポリアセテート系の aplysiatoxin 類 (**3**)⁶⁾に TPA に匹敵する強い発癌プロモーター活性を見出した。Diterpene ester 類, teleocidin 類, aplysiatoxin 類の 3 系統の化合物は、その由来、化学構造が大きく異なるにも拘らず、 10^{-8} — 10^{-11} M という低濃度で多くの酵素誘導、細胞表面の変性、培養細胞の分化の促進あるいは抑制等の共通した多面的作用を示し、TPA タイプの発癌プロモーターと包括されている (Fig. 1).⁷⁾ 一方, okadaic acid 類, microcystin 類, calyculin 類, tautomycin 等はプロモーター活性をもつが、上記の TPA タイプのプロモーターとの共通な性質を示さず、プロテインフォスファターゼの阻害活性を示し、オカダ酸タイプのプロモーターと包括されている。⁸⁾

プロモーション過程はマクロ的にはイニシエーションにより遺伝子レベルの損傷を受けた細胞をクローナルに増殖させて腫瘍に至らせるプロセスと解釈できるが、上記の多面的作用とどのように関連性があるのだろうか。プロモーション過程は増殖、分化に関する細胞の質的变化であることを考えると、その作用は特異的な受容体を介していると考えられる。その機構としてプロテインキナーゼ C (PKC) への結合と活性化が受入れられている。⁹⁾ 一方で近年の遺伝子レベルでの TPA の機能解析により、活性化する癌関連遺伝子、転写活性因子が発見されている。¹⁰⁾ しかし、PKC の活性化とこれらの遺伝子の発現とを直接関連させる実験事実は得られていない。また、蛍光標識 teleocidin 類, phorbol ester 類の培養細胞への取込実験によれば、PKC の活性化の場として従来予想されていた細胞膜上よりも細胞質及び核膜上に明瞭な蛍光像が検出されている。¹¹⁾ 橋本らは、HeLa 細胞において通常 90 kDa 熱ショックタンパク質と結合しているが、TPA と特異的に結合し核内に移行するというステロイド受容体に類似した性

Fig. 1. Structures of TPA-type Tumor Promoters

質を示すタンパク (cytosolic nuclear tumor promoter specific binding protein, CN-TPBP) を見出している。¹²⁾ TPA タイプのプロモーターの多面的作用を説明するためには、細胞内には複数の受容体が存在している可能性が高い。その場合においても、phorbol ester 類と teleocidin 類で異なる活性を示す例はないことから、この2つの化合物群にそれらの受容体に認識されうる共通の分子構造を有していることは間違いない。活性発現に必須な共通要素を発見し、新規の活性物質を見出すことは、プロモーターのアンタゴニストの開発、プロモーターの多面的作用の分離による分化制御薬剤のデザインに繋がるものである。TPA タイプのプロモーターのなかで teleocidin 類は分子量が小さく、官能基が少ないために活性発現の共通要素を抽出するのに適切な対象である。本稿では teleocidin 類の構造活性相関、立体構造上の性質並びに活性を発現しうる立体配座の決定に至るまでを述べる。

2. Teleocidin 類の構造と構造活性相関

Teleocidin 類は、1960 年、高島らにより放線菌 *Streptomyces mediocidicus* から皮膚刺激性物質として初めて単離され、¹³⁾ 1966 年、平田らにより現在の teleocidin B-4 (2) が構造決定された。¹⁴⁾ 次いで、1979 年、Moore らにより lyngbyatoxin A (4, 現在の teleocidin A-1) が藍藻類 *Lyngbya majuscula* から単離構造決定された。¹⁵⁾ 藤木らによる teleocidin のプロモーター作用の発見以来、坂井ら、あるいは小清水らにより放線菌から新規 teleocidin 類が単離され、現在その数は 34 種に及んでいる。¹⁶⁾ Teleocidin 類の構造はアミノ酸 (トリプトファンとバリン) 由来の部分とそれに付加した様々なテルペン側鎖部分から成っている。その構造上の特徴は、筆者らが初めて合成し、(–)-indolactam-V (5, IL-V) と名付けた indole 環の 3 位から 4 位への 9 員環ラクタム構造である (Fig. 2)。¹⁷⁾

Fig. 3 にその合成経路を示す。(–)-IL-V はマウス皮膚発癌二段階試験でも 30 週で 29% の腫瘍発生を示すことから、プロモーション活性発現に必須な構造を基本的に満たしている。¹⁸⁾ IL-V はその後、*Streptoverticillium blastmyceticum* から単離され、¹⁹⁾ 構造から類推されるようにジペプチド由来の前駆体 *N*-methyl-valyltryptophanol の窒素原子の indole 環 4 位への閉環により生合成されることも明らかになっている。²⁰⁾ IL-V はそれ自身活性を保持し、teleocidin 類の生合成の重要な中間体であり、IL-V からのゲラニル化、転位、メチル化を含む teleocidin 類のテルペン側鎖導入機構も解明されている。²¹⁾

(–)-IL-V の合成並びに (–)-IL-V 生産能の高い菌株の発見により、類縁体の合成が行われ、teleocidin 類の構造活性相関の研究が可能となり、数十種の誘導体が有機合成あるいは微生物合成により造られた。Teleocidin 類の生物活性評価にはマウスの発癌二段階試験が最終的試験法であるが、TPA の多面的作用を反映して種々の生化学的な指標、すなわち、マウス皮膚での

Fig. 2

Fig. 3. Preparation of (-)-Indolactam-V ((-)-IL-V) and (+)-Epi-indolactam-V ((+)-Epi-IL-V)

a) $\text{CH}_3\text{CONHCH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$, Na/EtOH b) HCl/AcOH c) $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$ d) $\text{Boc}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ e) LiBH_4/THF f) optical resolution g) H_2 , Pd-C/EtOH h) methyl 2-oxoisovalerate/ CHCl_3 i) $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{THF}$ j) KOH aq/ CH_3OH k) *N*-hydroxysuccinimide, DCC/ CH_3CN l) $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ m) NaHCO_3 aq/ CH_3COOEt n) CH_3I , $\text{NaHCO}_3/\text{CH}_3\text{OH}$

ornithine decarboxylase の誘導,⁵⁾ ヒト前骨髄球性白血病細胞 HL-60 の増殖抑制と培養器壁への付着,⁵⁾ 単球への分化,²²⁾ PKC への結合²³⁾と活性化,⁸⁾ Epstein-Barr ウィルス early antigen の誘導²⁴⁾等が用いられている。Teleocidin 類の活性な立体配座の決定のためには基本的な構造活性相関の情報が不可欠である。活性分子と受容体との結合を考察する際には、受容体の結合部位への水素結合に關与する親水性官能基と疎水性相互作用によってその結合を安定化する疎水性部分の両者を考える必要がある。次に、teleocidin 類の構造活性相関を親水性官能基と疎水性部分に分けて、簡単にまとめる。

親水性官能基に関しては、分子の立体構造がその位置、方向性を決定づけるために重要であるが、後述の分子の立体配座の問題と關連するので、ここでは受容体との水素結合に各官能基がどのような役割をはたしているかを述べる。(-)-IL-V の水素結合可能な官能基の中で、最も重要なものは 14 位水酸基である。(-)-IL-V の 14 位メチルエーテル,²⁵⁾あるいは teleocidin B-4 の 14 位のメチルエーテル (天然から得られる olivoretin 類)²⁶⁾の活性がないことから 14 位水酸基がプロトン供与体として活性発現に不可欠である。一方、1 位イミノ基をアルキル化した場合、1-*N*-methyl-IL-V はやや活性が低下するが、アルキル基を長鎖にした 1-*N*-prenyl 体、1-*N*-geranyl 体では活性が上昇する¹⁸⁾ことから、1 位イミノ基は活性発現には必須ではないと考えられる。アミド部分及び 13 位窒素の修飾に関しては、立体配座を大きく変化させることになるため正確な情報は無い。

(-)-IL-V の活性は種々の生物実験の結果から teleocidin B-4 の数十分の一から数百分の一である。この活性の差は teleocidin 類の 6, 7 位に置換したテルペン側鎖の欠損による。IL-V の 7 位に長鎖アルキル基を導入した 7-decyl-IL-V²⁷⁾あるいは、7-octylindolactam-V²⁸⁾は teleocidin B-4 に近い活性を示した。また、小清水らは 7 位置換体の TPA レセプターへの結合能を重回帰分析により解析し、活性の変化が置換基の疎水性パラメーターに支配されていることを示した。²⁹⁾このように、直鎖アルキル基の置換により teleocidin の活性が再現されること、teleocidin

類のテルペン側鎖の立体配置による活性の変化がないこと⁷⁾の2点から、この疎水性部分は活性増強に重要ではあるが厳密な立体特異性をもたないことを示している。

3. Teleocidin 類の立体構造

3.1. Teleocidin 類の2つの立体配座異性体 分子の立体構造は受容体との水素結合に関与する極性官能基の位置、方向性を維持する上で重要である。IL-Vの9位、12位の2つの不斉炭素に関する4つの立体異性体の合成と活性の評価から、天然のアミノ酸と同じ*S, S*の立体配置をもつ(-)-IL-Vが活性を示し、他の3種の異性体の活性は検出限界以下であった。³⁰⁾これは、極性官能基の配置が厳密な立体特異性を持つことを示している。しかしながら、筆者らはIL-Vの合成の際にこの点に関して重要な知見を得た。IL-Vは重メタノール中のNMRスペクトルが、各プロトンに対し2:1の比率で分裂して観測された。¹⁷⁾この現象は、室温で2つの安定な立体配座異性体が存在し、その相互の変換がNMRで区別して測定しうる速度であることを示している。2つの立体構造はNMRのケミカルシフト、カップリング定数、NOE測定から推測し、経験的分子力場計算(MM2)により適正化してFig. 4に示すようにtwist型(6)、sofa型(7)の立体配座を推定した。³¹⁾

この2つのconformer間の平衡の実測は、結晶状態でsofa型で存在し、重クロロホルム中では、twist型とsofa型が5:2の比率で存在しているIL-V-14-acetateで行った。結晶を低温で溶解して、直ちにNMR観測を行うとsofa型のみが観測され、時間を追って、twist型の比率が増大することから平衡の実在を確認し、その変換速度をNMRで追跡することにより得た熱力学的パラメーター³¹⁾からsofa型が100%の状態から平衡が50%達成するまでの時間が-10°Cで約14分、+23°Cで41秒と算出され、2つのconformerを分離することは不可能であることがわかる。この2つのconformerの存在はteleocidin類で一般的に認められ、結晶構造においても、teleocidin B-4はtwist型を、olivoretin Bはsofa型をとっている。その溶液中の立体構造もNMRのケミカルシフトの類似からIL-Vと同様なtwist型とsofa型で存在する。例えば、teleocidin B-4の場合にも重メタノール中で2:1、重クロロホルム中で6:1でこの2つのconformerが存在している。したがって、2つのconformerの存在はteleocidin類に共通するindolactamの9員環ラクタム構造に一般的な性質である。しかも、溶液中の比率は溶媒、化合物によって異なるが、その値からtwist型とsofa型の安定性には0—1.5 kcal/molの差しかない。したがって、受容体との結合を考える場合、twist型とsofa型の双方が活性構造である可能性をもつ。

3.2. Indolactam 環の理論的な立体配座の分類 Teleocidin類の2つのconformer, twist型とsofa型の構造上の特徴は、9員環ラクタムのアミドがtwist型で、*cis*を、sofa型で*trans*をとっていることであり、この間の平衡は、その活性化エネルギー(室温で19 kcal/mol程度)からもアミド結合の*cis-trans*異性化に大きく依存していることが想定される。しかし、9員環の立体配座は各結合の自由度から考えても、この2つに限定できない。実際に、誘導体の合成により、他の配座の存在が明らかになり、³²⁾立体配座を固定した化合物のデザイン、合成した化合物の立体配座解析の場合にはそれを考慮した上で行わなくてはならない。そこで、indolactamの9員環の可能な立体配座を網羅するために、indolactamの12位と9位の置換基

Fig. 4. Conformations of IL-V in the Twist (Left) and Sofa (Right) Structures

Fig. 5. The 10 Ring Conformations of Indolactam-NS

を除いて単純化した仮想化合物 indolactam-NS の分子動力学計算を用いた検索を行った。³³⁾ その結果、Fig. 5 のように twist 型と sofa 型を含む 10 種類の存在可能な立体配座の存在が明らかになった。Indolactam は 9 員環にアミドとインドールという 2 つの平面性を保持しようとする要素を含んでいるため、可能な立体配座は制限されている。この 10 個の配座は、6 つの *cis* アミド体と 4 つの *trans* アミド体に区分され、アミド平面とインドール平面がほぼ平行でアミドのカルボニル酸素がインドールと反対側に向いている sofa family とインドール側に向いている fold family、そして 2 平面が交差している twist family の 3 つのグループに分類できる。Sofa family と fold family はアミドが *cis*, *trans* の双方が存在するが、twist family では *cis* アミドのみが安定構造を与える。図中の上段と下段は鏡像体の関係にあるが、置換基が存在すると別の配座となるために、区別して定義した。

3.3. Indolactam 環の置換基導入による立体配座の変化 前述の可能な立体配座のうち、indolactam 9 員環の配座を twist 型と sofa 型に規定しているのは置換基の効果である。12 位のイソプロピル基の変換は他のアミノ酸に由来する天然物の存在も予想され、立体配座への影響も大きいと考えられる。IL-V と同様の方法により、イソプロピル基を水素、メチル、イソブチル、*t*-ブチル基に換えた誘導体 (Fig. 6 に示す IL-G (8), IL-A (9), IL-L (10), IL-TL (11)) を合成した。³⁴⁾

また、微生物転換を利用した生合成的方法によって 12 位置換体の合成が報告されている。³⁵⁾ 12 位が無置換の IL-G は室温溶液中でブロードなシグナルを与え、*cis-trans* 異性化よりもエネルギー障壁の低い複数の conformer の平衡にある。−30°C の測定により 2 種のシャープなシグナルに 9:1 の比率で分離され、その major conformer は上記の立体配座の分類のなかで fold 型に相当することが明らかになった。³²⁾ IL-A では fold 型と twist 型の平衡状態にあることが MD 計算によって推定された。また、IL-L と IL-TL では IL-V と同様に twist 型と sofa 型の平衡状態にあり、3 つの化合物の比較によって、12 位置換基の大きさに従って、sofa 型の比率が増大することが判明した。³⁴⁾ これらの結果から、12 位置換基の嵩高さが indolactam の特徴的

Fig. 6. Indolactams for Conformational Analysis and Activity

な立体配座特性を形成する要因の1つとなっており, *twist-sofa* 間の平衡状態にも関与していることが示された. 活性に関しても, 12 位置換基の大きさに従って, その上昇が見出されたが,³⁶⁾ *twist-sofa* 間のエネルギー障壁を考えると, その比率と活性を必ずしも直結できない. むしろ, 疎水性部分の付加による活性上昇と考えたほうがいいと思われる. この点に関しては, 小清水らが indolactam 環のセコ体の微生物菌株を用いた閉環により多種のアミノ酸残基を 12 位にもつ indolactam 類を合成し, 12 位置換基の嵩高さ, 疎水性と活性との関係を定量的に解析し, 確認している.³⁷⁾

13 位のメチル基も indolactam の立体配座の形成に関与している. IL-V の合成中間体である 13-N-desmethyl-IL-V (12) は主として fold 型で, 13 位を酸素原子に変換した 13-O-IL-V (13) も fold 型で存在している.³⁸⁾ 両者とも活性は著しく低下する. 12 位, 13 位の置換基の立体効果が 9 員環ラクタム部分を fold 型から *twist-sofa* の平衡状態に導く大きな要因となっている.

IL-V の他の位置に置換基を付加することによる *twist* 型と *sofa* 型の平衡状態に対する効果も認められる. MD 計算によると, IL-V の 5 位, 12 位, 8α 位へのメチル基の新たな導入により, *sofa* 型が支配的な conformer になることが予測された. 8α-Methyl-IL-V (14) の合成と立体配座解析によって, その配座は *sofa* 型であり, 活性がほとんどないことが明らかになった.³⁹⁾ 同様の結果は小清水らが合成した 5-chloro-IL-V (15),⁴⁰⁾ あるいは, ごく最近, 合成された 5-fluoro-IL-V (16) においても示されている.⁴¹⁾ しかし, これらの *sofa* 型をとる化合物は立体的あるいは電子的に新しい要素を加えることとなり, 必ずしも平衡の活性化エネルギーを高めることだけで, *twist* 型への異性化を妨げているという確証はない. そこで, teleocidin のそれぞれの立体配座を再現しうる新規な化合物のデザインを試みた.

4. Teleocidin 類の活性立体配座の決定

4.1. Benzolactam 類のデザイン 筆者らは teleocidin 類の 2 つの立体配座のいずれが活性に関与しているかを決定するための化合物として, 前節の結果から indolactam 環への修飾によっては達成できないと考えた. その理由として, 置換基の付加によって *twist-sofa* 間の平衡定数は変えられるが, その置換基の立体的要素及び電子的要素が平衡の活性化エネルギーの上昇にどのように結びつくかの説明が困難であり, 確実な配座固定には環を付け加えることになる. しかし, その場合には官能基周辺の立体障害により活性の評価の確実性がなくなることである. そこで, 次のような目標のもとに新規の骨格を有する化合物をデザインすることにした. まず, *twist*, *sofa* の立体配座 2 つをそれぞれ再現した 2 つの化合物を合成し, 一方に強い活性があり, 他方には活性がないことを示すこと. その場合にアミドの *cis-trans* 異性化は効果的に

Fig. 7. Designed Benzolactams for Conformational Restriction

阻害されていること。構造は単純化し、余分な立体的要素を排除することの3点である。単純なアルキル鎖をもつ中員環ラクタムは8員環以下でアミド結合が *cis* 型を、10員環以上で *trans* 型をとり、⁴²⁾ 9員環では *cis-trans* の平衡にあること⁴³⁾ が知られている。8員環は *trans* 型すなわち sofa 型で存在することはほとんど不可能と考えられ、twist 型の固定に最適と思われるが、IL-V の構造からインドール環に隣接するメチレン1個を除いた化合物ではインドールとアミドを含む平面との距離や、そのなす角度は IL-V と大きく変わることが予想される。そこで、IL-V の構造活性相関の結果から活性発現に本質的でないと判断されたインドールのイミノ基を除く、すなわち、Fig. 7 のように IL-V のインドール環をベンゼン環に変換することで単純化し、隣接するメチレンの数で環の大きさを8員環、9員環、10員環に規定した化合物 benzolactam (BL-V8 (17), BL-V9 (18), BL-V10 (19)) をデザインした。

4.2. Benzolactam 類の合成と立体構造 Benzolactam 類の合成は IL-V と同様な方法で行った。8員環の BL-V8 の場合を例にとると、原料の 2-nitrobenzyl bromide を Fig. 8 に示すように通常のアミノ酸合成法に準じて **20** を経てアミノ酸とした後、N 保護基を Boc に変換し、水素化ホウ素リチウムで還元して *N*-Boc-2-nitrophenylalanine ethyl ester (**21**) を得た。**21** はヒドリド還元、接触還元の後、methyl 2-oxoisovalerate と縮合し、シアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元し、エステルの立体異性体の混合物 (**22**) に導いた。**22** から導いたコハク酸イミド活性エステル (**23**) の Boc 基を除去し、塩基性条件で処理することにより、閉環した *N*-desmethyl-BL-V8 (**24**) とその立体異性体 (**25**) を分離した。それぞれを *N*-メチル化することにより BL-V8

Fig. 8. Preparation of Benzolactam-V8 (BL-V8)

a) CH₃CONHCH(COOC₂H₅)₂, NaH/DMF b) HCl/AcOH c) SOCl₂/EtOH d) Boc₂O/CH₂Cl₂ e) LiBH₄/THF f) H₂, Pd-C/EtOH g) methyl 2-oxoisovalerate/CHCl₃ h) NaBH₃CN/THF i) KOH aq/CH₃OH j) *N*-hydroxysuccinimide, DCC/CH₃CN k) CF₃COOH/CH₂Cl₂ l) NaHCO₃ aq/CH₃COOEt m) CH₃I, NaHCO₃/CH₃OH

(17) 及び *epi*-BL-V8 (26) を得た. 9 員環の BL-V9 に関しては 2-nitrophenylethyl bromide を原料として, 同様の方法で行い, BL-V9 (18) 及び *epi*-BL-V9 を得た. 10 員環の BL-V10 の場合には, 途中のアミノ体の段階で *N*-メチル化を行い, 次いで, benzyl 2-triflyloxyisovalerate で *N*-アルキル化した後に同様の活性エステル法によって閉環し, BL-V10 (19) と *epi*-BL-V10 を合成した.

Benzolactam 類 (BL-V8, BL-V9, BL-V10) は溶液中いずれも単一の立体配座を示した. その立体構造は NMR のケミカルシフト, カップリング定数, NOE 測定から, indolactam 類で定義した 10 種の典型的配座すべてを考慮したうえで, Fig. 9 に示すように, 8 員環の BL-V8 に対して *twist* 型の立体配座が再現され, かつ固定されていることが明らかとなった. また, 9 員環の BL-V9 及び 10 員環の BL-V10 は *sofa* 型の立体配座が再現されている. Fig. 10 は BL-V8 と BL-V9 の MM2 で最適化した構造を teleocidin B-4 の *twist* 型, *sofa* 型とそれぞれ重ね合わせたものである. 極性官能基の位置, 方向, 芳香環とアミド平面のなす角度等が良く一致している.

この 3 種の化合物の活性は疎水性部分の欠損によって, かなり低下することが予想された. 実際に, HL-60 細胞の増殖抑制, ^3H -TPA の PKC への結合阻害活性試験で, BL-V9, BL-V10 は活性が無く, BL-V8 にわずかな活性が認められたに過ぎず, 活性立体構造の決定はできなかった. 最近, Kozikowski らにより類似の考察によりデザインされた IL-V の *benzenoid mimics* が報告され, *sofa* 型を示す化合物に活性がないことが示されたが,⁴⁴⁾ 疎水性部分の欠損, 対照となる活性な化合物がないことから, 活性立体配座の決定には至っていないと考えられる.

Fig. 9. Stable Conformation of BL-V8, BL-V9 and BL-V10

Fig. 10. Superposition of Benzolactams and Teleocidin B-4

The left indicates stable conformation of BL-V8 (solid line) and the twist conformation of teleocidin B-4 (broken line). The right indicates stable conformation of BL-V9 (solid line) and the sofa conformation of teleocidin B-4 (broken line).

Fig. 11. Preparation of Benzolactam-V8-310 and Benzolactam-V9-310

a) $\text{CH}_3\text{CONHCH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$, NaH/DMF b) $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{P}^+\text{Ph}_3\text{Br}^-$, $n\text{-BuLi}$ /THF c) HCl/AcOH d) SOCl_2 /EtOH e) Boc_2O / CH_2Cl_2 f) LiBH_4 /THF g) H_2 , Pd-C/EtOH h) HCOOH , AcOH i) BH_3 /THF j) triflate of benzyl DL- α -hydroxyisovalerate, 2,6-lutidine/ CH_2Cl_2 k) N -hydroxysuccinimide, DCC/ CH_3CN l) CF_3COOH / CH_2Cl_2 m) NaHCO_3 aq/ CH_3COOEt n) $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, TsOH/toluene o) PPh_3 /toluene p) **32**, K_2CO_3 /DMF q) pyridinium p -toluenesulfonate/acetone, H_2O

疎水性部分を有する benzolactam 類の合成によって、この点が解決すると思え、骨格の立体配座が teleocidin B-4 の twist 型, sofa 型をそれぞれ再現している BL-V8, BL-V9 の芳香環部に炭素数 10 の直鎖アルキル基を導入した化合物 (BL-V8-310 (**27**) と BL-V9-310 (**28**)) をデザインした。⁴⁵⁾

導入部位は teleocidin の側鎖位置に従い、立体配座に最も影響の少ない位置に、炭素数は indolactam の炭素鎖導入で十分な効果のある decyl 基を選んだ。合成は Fig. 11 に示す。ともに 2-nitro-4-formylbenzyl bromide を出発原料とし、BL-V8-310 の場合は側鎖を Wittig 反応により伸長した後、アミノ酸合成法に従って、アミノアルコール (**29**) にまで誘導した。ニトロ基の還元、 N -メチル化したアミン (**30**) に DL-valine より誘導した benzyl 2-triflyloxyisovalerate で N -アルキル化して valine 部分を導入した。ここで、D-valine から誘導した (R)-triflate⁴⁶⁾ を用いれば、容易に光学活性体が得られる。Benzyl の除去、活性エステル化した後に弱塩基性条件下、高希釈条件で環化させ、BL-V8-310 (**27**) 及び epi-BL-V8-310 (**31**) を分離した。BL-V9-310 の場合は原料のアルデヒドを保護した後に phosphonium 塩 (**32**) とし、DL-serine から誘導したアルデヒド (**33**) と縮合し、次いで、アルキル側鎖を導入し、**34** とした。接触還元で 2 箇所の二重結合とニトロ基を還元して **35** とした後、同様の方法により、BL-V9-310 (**28**) と epi-BL-V9-310 (**36**) を得た。BL-V8-310 と BL-V9-310 は NMR のケミカルシフト、カップリング定数、NOE 測定か

ら、それぞれアルキル鎖のない BL-V8, BL-V9 と同一の溶液中構造を有することを確認した。⁴⁵⁾

4.3. Benzolactam 類の活性

Benzolactam 類の活性の評価は細胞への効果を判定する方法として、HL-60 細胞への増殖抑制、NBT 還元能を指標とした分化誘導能を、TPA 特異的結合タンパクへの結合試験として、PKC と CN-TPBP の 2 種のタンパクに対する親和性試験で

行った。Twist 型に固定されたラセミ体の BL-V8-310 は 10^{-8} M の濃度で HL-60 細胞への顕著な効果を示した。この活性の強さは、IL-V の 30 倍に相当し、teleocidin B-4 に近い（約十分の一）活性である。PKC, CN-TPBP への ^3H -TPA の結合も 1000 倍でそれぞれ 45%, 66% 阻害した。一方、sofa 型の BL-V9-310 は HL-60 細胞に対し、 10^{-6} M 以下で何等の効果も示さず、PKC, CN-TPBP への親和性も認められなかった。BL-V8-310 に関して、その光学活性体を合成して、同様の活性評価を行うと、天然の teleocidin に対応する 2 位、5 位が *S, S* の絶対配置を有する (–)-BL-V8-310 が強力な活性を示し、*R, R* 体 (+)-BL-V8-310 には全く活性が無かった。⁴⁷⁾ これらの結果から teleocidin の溶液中の 2 つの立体配座の中で、受容体との結合に関与する配座は twist 型に近いことが明らかになった。

光学活性体として合成した benzolactam 類の中で、*R, S* の絶対配置を有する (+)-epi-BL-V8-310 ((+)-31) が (–)-BL-V8-310 よりは弱いものの、IL-V と同等の活性を示した。⁴⁷⁾ (+)-31 は立体配座の分類により *r-cis-sofa* 型と呼ぶ構造をとっている。Twist 型と *r-cis-sofa* 型はともにアミドが *cis* で、アミドのカルボニル基は分子の外側へ配向しているという共通点をもつ (Fig. 12)。相違点は 1 位窒素の位置及びアミド平面とベンゼン環のなす角度であり、teleocidin 類の活性発現に対する構造の必要条件に前述の水酸基とともにアミドのカルボニル酸素が重要であることを示唆している。

5. おわりに

Teleocidin の発癌プロモーター作用に興味をもって、初めて indolactam 骨格を合成した 10 年以上前に、この 9 員環骨格が室温溶液中で 2 つの conformer twist 型と sofa 型で存在することを発見して以来、どちらの conformer が活性の発現に直接関与しているかが、常に頭から離れない問題であった。Phorbol ester 類と teleocidin 類の共通の構造的抽出の点からも teleocidin 類の twist 型立体配座が活性構造であるとの知見は大いに有用である。板井、筆者らは TPA と teleocidin B-4 の 2 つの配座で基質と受容体の特異的結合を観点に入れた重ね合せを行っているが、その際、TPA と teleocidin の sofa 型では 3 個の共通の水素結合の形成が、TPA と teleocidin の twist 型では 2 個の共通の水素結合の形成が可能であると見積もられた。後者のモデルでは 2 個の水素結合は teleocidin の 14 位水酸基がプロトン供与体として、アミドのカルボニル酸素がプロトン受容体として作用していることが推測されている。⁴⁸⁾ Twist 型に固定された BL-V8-310 の強い活性からこの 2 つの官能基が受容体との結合に決定的な役割を果たしていることが強く示唆される。基質と生体内受容体との結合を考える時、水素結合はその安定化に重要ではあるが、分子の形状、疎水性相互作用との総和で考えなければならない。特に、多くの極性官能基をもつ基質の場合には、そのすべてが水素結合に関与している訳ではなく、各置換基の重要性の判断が医薬品化学におけるデザインにも重要となると考える。

Fig. 12. Stable Conformations of (–)-BL-V8-310 (Left: Twist Form) and (+)-Epi-BL-V8-310 (Right: *r-cis*-Sofa Form)

Benzolactam 類は indolactam 類よりも構造が単純化された新しい活性物質である。プロモーション機構解明あるいは細胞分化の制御による医薬の創製のための手段として重要なものになると考えている。また、プロモーターの拮抗物質、多様な作用を分離した化合物等のデザインの場合の選択肢を広げる化合物としても重要である。

謝辞 本研究を進めるにあたり、共同研究者としてご協力いただいた東京大学薬学部 板井昭子助教授、埼玉がんセンター 藤木博太副所長に深謝いたします。また、本研究に対し、文部省科学研究費補助金（一般研究 C、がん特別研究）及び上原記念生命科学財団のご援助をいただきました。

引用文献

- 1) I. Berenblum, *Cancer Res.*, **1**, 44 (1941).
- 2) E. Hecker, *Naturwissenschaften*, **54**, 282 (1967); B. L. van Durren, *Prog. Exp. Tumor Res.*, **11**, 31 (1969).
- 3) W. Adolf, E. Hecker, *Z. Krebsforsch.*, **84**, 325 (1975).
- 4) S. Zayed, A. Hatz, W. Adolf, *Experimentia*, **33**, 1554 (1977).
- 5) H. Fujiki, M. Mori, M. Nakayasu, M. Terada, T. Sugimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 976 (1979).
- 6) H. Fujiki, M. Suganuma, T. Tahira, A. Yoshioka, M. Nakayasu, Y. Endo, K. Shudo, S. Takayama, R. E. Moore, T. Sugimura, "Cellular Interaction by Environmental Tumor Promoters," H. Fujiki, E. Hecker, R. E. Moore, T. Sugimura, R. B. Weinstein eds., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/VNU Science Press, Utrecht, 1984, p. 37.
- 7) 藤木博太, 代謝, **22**, 9 (1984).
- 8) H. Fujiki, M. Suganuma, T. Sugimura, *Envir. Carcin. Rev. (J. Envir. Sci. Health.)*, **C7**, 1 (1989); 藤木博太, 実験医学, **9**, 126 (1991).
- 9) Y. Nishizuka, *Nature* (London), **308**, 693 (1984).
- 10) W. Lee, P. Mitchell, R. Tjian, *Cell*, **49**, 741 (1987).
- 11) P. L. Tran, M. A. Deugnier, *Carcinogenesis*, **6**, 433 (1985); R. M. Liskamp, A. R. Brothman, J. P. Arcoleo, O. J. Miller, I. B. Weinstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 920 (1985); K. Irie, S. Okuno, K. Koshimizu, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima, *Int. J. Cancer*, **43**, 513 (1989).
- 12) Y. Hashimoto, K. Shudo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 1126 (1990).
- 13) M. Takashima, H. Sakai, K. Arima, *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 660 (1962).
- 14) H. Harada, N. Sakabe, Y. Hirata, Y. Tomiie, I. Nitta, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 2523.
- 15) J. H. Cardelina II, F. J. Marner, R. E. Moore, *Science*, **204**, 193 (1979).
- 16) 総説: 小清水弘一, 日本農芸化学会誌, **64**, 1221 (1990); 入江一浩, 小清水弘一, 有機合成化学協会誌, **49**, 1070 (1991); K. Irie, K. Koshimizu, *Comments Agric. and Food Chemistry*, **3**, 1 (1993).
- 17) Y. Endo, K. Shudo, T. Okamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3457 (1982); Y. Endo, K. Shudo, K. Furuhashi, H. Ogura, S. Sakai, N. Aimi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 358 (1984).
- 18) H. Fujiki, M. Suganuma, H. Hakii, M. Nakayasu, Y. Endo, K. Shudo, K. Irie, K.

- Koshimizu, T. Sugimura, *Proc. Jpn. Acad.*, **61**, 45 (1985).
- 19) K. Irie, M. Hirota, N. Hagiwara, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, H. Tokuda, Y. Ito, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1269 (1984).
- 20) K. Irie, S. Kajiyama, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 101 (1990).
- 21) K. Irie, S. Kajiyama, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron*, **46**, 2773 (1990).
- 22) D. J. Mangelsdorf, H. P. Koeffler, C. A. Donaldson, J. W. Pike, M. R. Haussler, *J. Cell. Biol.*, **98**, 391 (1984).
- 23) A. Jung, N. Sharky, P. Blumberg, *Cancer Res.*, **46**, 1966 (1986).
- 24) Y. Ito, S. Yamase, J. Fujita, T. Harayama, M. Takashima, H. Imanaka, *Cancer Lett.*, **13**, 29 (1981).
- 25) K. Irie, H. Tokuda, N. Hagiwara, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, *Int. J. Cancer*, **36**, 485 (1985).
- 26) Y. Hitotsuyanagi, K. Ogata, N. Aimi, S. Sakai, Y. Koyama, Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, Y. Iitaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3774 (1984).
- 27) Y. Endo, Y. Sato, K. Shudo, *Tetrahedron*, **43**, 2241 (1987).
- 28) K. Irie, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2679 (1986).
- 29) K. Irie, N. Hagiwara, H. Tokuda, K. Koshimizu, *Carcinogenesis*, **8**, 547 (1987).
- 30) H. Fujiki, M. Suganuma, M. Nakayasu, Y. Endo, K. Shudo, T. Sugimura, *Jpn. J. Cancer Res.*, **75**, 866 (1984).
- 31) Y. Endo, M. Hasegawa, A. Itai, K. Shudo, M. Tori, Y. Asakawa, S. Sakai, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 1069 (1985); Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, M. Hasegawa, S. Sakai, *Tetrahedron*, **42**, 5905 (1986).
- 32) T. Kawai, T. Ichinose, M. Takeda, N. Tomioka, Y. Endo, K. Yamaguchi, K. Shudo, A. Itai, *J. Org. Chem.*, **57**, 6150 (1992).
- 33) T. Kawai, T. Ichinose, Y. Endo, K. Yamaguchi, K. Shudo, A. Itai, *J. Med. Chem.*, **35**, 2248 (1992).
- 34) Y. Endo, M. Hasegawa, A. Itai, K. Shudo, *Tetrahedron*, **43**, 3695 (1987).
- 35) S. Kajiyama, K. Irie, T. Kido, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 5453 (1991).
- 36) M. Hirota, M. Suganuma, S. Yoshizawa, T. Horiuchi, M. Nakayasu, M. Hasegawa, Y. Endo, K. Shudo, H. Fujiki, *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 577 (1987).
- 37) K. Irie, S. Okuno, S. Kajiyama, K. Koshimizu, H. Nishino, A. Iwashima, *Carcinogenesis*, **12**, 1883 (1991).
- 38) Y. Endo, T. Imada, K. Shudo, *Heterocycles*, in press.
- 39) Y. Endo, M. Hirano, M. Takeda, A. Itai, K. Shudo, unpublished results.
- 40) K. Irie, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2679 (1986).
- 41) S. Okuno, K. Irie, Y. Suzuki, K. Koshimizu, H. Nishino, A. Iwashima, *BioMed. Chem. Lett.*, **4**, 431 (1994).
- 42) R. Huisgen, H. Brade, H. Walz, I. Glogger, *Chem. Ber.*, **90**, 1437 (1957); C. A. Swenson, J.

Phys. Chem., **77**, 645 (1973).

- 43) K. L. Williamson, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5082 (1976).
- 44) A. P. Kozikowski, D. Ma, Y-P. Pang, P. Shum, V. Likic, P. K. Mishra, S. Macura, A. Basu, J. S. Lazo, R. G. Ball, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3957 (1993).
- 45) M. Ohno, Y. Endo, M. Hirano, A. Itai, K. Shudo, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 8119 (1993).
- 46) T. P. Kogan, T. C. Somers, M. C. Venuti, *Tetrahedron*, **46**, 6623 (1990).
- 47) Y. Endo, M. Ohno, M. Hirano, M. Takeda, A. Itai, K. Shudo, *BioMed. Chem. Lett.*, **4**, 491 (1994).
- 48) A. Itai, Y. Kato, N. Tomioka, Y. Iitaka, Y. Endo, M. Hasegawa, K. Shudo, H. Fujiki, S. Sakai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 2248 (1988).