発癌プロモーター，テレオシジンの合成と生物活性

遠 藤 泰 之*

Synthesis and Biological Activity of Tumor Promoter, Teleocidins.

Yasuyuki ENDO*

This review deals with isolation, determination of the structure, conformational analysis and structure-activity relationships of teleocidins. Teleocidins exhibit potent tumor-promoting activity as well as many important biological activities connected with cell proliferation and cell differentiation. Teleocidins and diterpene esters containing TPA are classified as TPA-type promoters because they bind equally to the phorbol ester receptor and exhibit their biological activities. Structural requirements for tumor promoting activity, which are common in the TPA-type promoter, are also discussed.

1. はじめに

発癌の過程は単に一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および内的因子が関与している。この発癌多段階説では、化学発癌にはイニシエーションとプロモーションの独立した過程が存在し、それぞれイニシエーターとプロモーターと呼ばれる化学物質により誘起されると考えられている。多段階発癌説を提唱し、実験的に確立したのは1941年、Berenblumによってである¹⁾。その実験はマウス皮膚に微量の(それだけでは腫瘍を発生させない量の)イニシエーターを一度だけ塗布した後に、プロモーターを反復塗布することにより腫瘍を誘発する実験である。この発癌二段階試験は現在でもプロモーターの最終的な試験法として用いられている。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継続するのに対し、プロモーター単独で反復塗布した場合、あるいは後でイニシエーターを塗布した場合には腫瘍は発生しない。これは区別される発癌の2つの過程が存在することを示す。即ち少量のイニシエーターの作用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しない。一方、プロモーターは自身には発癌性は無く、イニシエーションを既に受けた細胞に対して作用し、腫瘍を発生させるが、

その作用は持続性が無く可逆的である。近年、著しい進展を見せたイニシエーションの研究により、イニシエーション過程は7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), benzo[a]pyrene (BaP)等のイニシエーターの代謝活性化により生じる ultimate mutagen のDNAへの共有結合による化学修飾と、その結果生じる複製や修復のミスによる遺伝情報の変化、そして癌遺伝子の活性化として説明されている。これに対して、プロモーターは長い間、発癌の単なる補助的役割をしているとしか考えられていなかった。しかし、Berenblumがプロモーターとして用いたクロトン油の成分研究から、1967年、Heckerらが有効成分として12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)を単離構造決定^{2,3)}、プロモーターを単一物質として扱うことが可能となり、プロモーション過程の研究が開始された。現在では、プロモーション過程はイニシエーションを受けた細胞(潜在的癌細胞とも言える)に対する遺伝情報発現あるいは分化に関連した過程であると考えられている。プロモーターの重要性が再認識されたのはWHOの疫学的調査によりヒトの癌の80%以上が環境中の発癌因子に起因しているとの報告⁴⁾、発癌二段階モデルの理論的考察によりイニシエーターの除去よりもプロモーターの除去が発癌防止に効果がある⁵⁾との考えによるところも大きい。TPAの単離以来、類似の構造をもつ多くのditerpene ester類に活性が見出されている。藤木らは環境中に存在するditerpene ester類以外の強力なプロモーターの発見を目的として数百の化合物を独自のプロモーターのスクリーニング法により検索

* 東京大学薬学部 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo ()

し、アミノ酸由来の teleocidin 類⁶⁾とポリアセテート系の aplysiatoxin 類⁷⁾に TPA に匹敵する強い発癌プロモーター活性を見出した。現在までに発見された強力なプロモーターの殆んどを占めるこれら三系統の化合物は、その由来、構造が大きく異なるにもかかわらず、細胞膜に存在する phorbol ester レセプター (TPA レセプター) に同様に結合し、多くの共通した生物活性を示すことから TPA タイプのプロモーターと包括されている⁸⁾。phorbol ester 類, teleocidin 類は $10^{-8} \sim 10^{-9}$ M という低濃度で多くの酵素活性誘導, 細胞の膜表面の変性, 分化の促進等, 多様な生理活性を示す。これは phorbol ester 類, teleocidin 類の発癌プロモーターとしての作用はその一つの面であり, 細胞の増殖, 分化調節物質として極めて重要な物質であることを示している。本稿では teleocidin 類の単離構造決定, 合成, 構造活性相関と, それらを基礎として TPA タイプのプロモーターの活性発現に必要な構造条件について述べる。

2. Teleocidin 類の単離, 構造決定

Teleocidin 類は 1960 年, 高島らにより放線菌 *Streptomyces medicoidicus* から皮膚刺激性物質として初めて単離された⁹⁾。その主成分「teleocidin B」が dihydroteleocidin B bromoacetate に誘導され, 1966 年, 平田らにより X 線結晶解析で構造決定された¹⁰⁾。後に藤木, 坂井らは *Streptomyces medicoidicus* の菌体抽出物を精査し, teleocidin A-1, A-2, teleocidin B-1~B-4 の 6 種を単離構造決定した (図 1)。Teleocidin A-1 (1), A-2 (2) は 19 位の異性体であり, A-1 は C-19 R, A-2 は C-19 S と構造が決定された¹¹⁾。Teleocidin A-1 は Moore らが 1979 年にハワイの藍藻類 *Lyngbya majuscula* から単離した Lyngbyatoxin A¹²⁾ と同一の化合物であった。Teleocidin B-1~B-4 は 19 位, 22 位の 2 つの不斉炭素に起因する 4 種の異性体であり, その構造は 3~6 のように決定された¹³⁾。平田らが構造決定した「teleocidin B」は teleocidin B-4 である。Teleocidin A, B の各異性体の構造上の相違点はインドール環 6, 7 位に置換したテルペノイド側鎖だけで, 共通するインドール環 3 位から 4 位への 9 員環ラクタム構造が teleocidin 類を特徴づける構造である。この基本構造 (一) -indolactam-V (7)¹⁴⁾ は小清水らにより *Streptovorticillium blastmyceticum* から 6 と共に単離された¹⁵⁾。(一) -indolactam-V は teleocidin 類の生合成経路において重要な位置を占めており, 7 の閉環前駆体 *N*-methyl-L-valyl-L-tryptophanol (8) の単離¹⁶⁾によって teleocidin 類の生合成は図 2 のように推定されている¹⁷⁾。Teleocidin 関連化合物として坂井らは *Streptovorticillium*

Fig. 1

olivoreticuli から 6 と共に olivoretin A (9)¹⁸⁾, B (10)¹⁹⁾, C (11)¹⁹⁾, E (12)²⁰⁾ を単離した。Olivoretin 類はいずれも 14-O-methylteleocidin 類である。また, *Streptomyces medicoidicus* からは *N*-13-desmethyl 体である 13 を単離している²⁰⁾。一方, 小清水らは *Streptovorticillium blastmyceticum* から (一) -13-*N*-desmethylindolactam-V (14), (一) -14-O-acetylindolactam-V (15)¹⁵⁾, 2 位および 3 位酸化成績体 (16~19)^{21, 22)}, methylene を介した 7 の二量体である blastmycetin A (20)²¹⁾ を単離し, (一) -indolactam-V の生体内代謝を検討した結果, teleocidin 類は生体内で *N*-13-脱メチル化, 2 位の酸化により不活性化の方向に代謝が進行することを報告している²³⁾。

3. Teleocidin 類の合成

Teleocidin 類は発癌プロモーション活性あるいは細胞の増殖, 分化を調節する重要な生理活性究明の手段とし

Fig. 2

て、また、インドールを含む9員環ラクタムという特異な骨格の構築とインドールのベンゼン環部位への置換基の導入の興味から合成の格好な対象となった。

3.1. (一)-Indolactam-V の合成 (一)-Indolactam-V (7) は前述のように teleocidin 類を特徴づける基本構造であり、合成を化学構造と生理活性の関連を追求する観点から考える場合、重要な化合物である。筆者らは teleocidin 類の強力なプロモーション活性が証明された時点で、その活性発現の最小単位が7の構造にあると考え、その合成を行った(図3)。出発物質として4-nitrogramine (21) を選び、通常の tryptophan 合成法に準じて *N*-acetyl-4-nitrotryptophan ethyl ester (22) とした後に、*N* 保護基を Boc に変換し、水素化ホウ素リチウムでエステルをアルコールに還元して *N*-Boc-4-nitrotryptophanol (23) を得た。23 のアルコールを (+)-*N*-tosylvalyl ester として diastereomer を分離し、加水分解することにより効率よく光学活性体((-)-23, (+)-23)を得た。*S*-配置をもつ(-)-23 は接触還元の後、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 25 および 26 に導いた。9員環の構築には *N*-ヒドロキシコハク酸イミドを用いる活性エステル法を利用し、25 から導いた活性エステル 27 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*-13-desmethylindolactam-V (14) を

- a) $\text{CH}_3\text{CONHCH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, Na/ EtOH
 b) NaOH/H₂O c) H₂O, Δ d) SOCl_2 , EtOH e) HCl, EtOH
 f) BocN_3 , NaHCO₃/ dioxane-H₂O g) LiBH_4 /THF h) H₂, Pd-C, 1 atm/ EtOH i) $(\text{CH}_3)_2\text{CHCOCOOCH}_3/\text{CHCl}_3$ j) $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{THF}$
 k) KOH/H₂O-MeOH l) *N*-hydroxysuccinimide, DCC/ MeCN
 m) $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ n) $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ o) CH_3I , NaHCO₃/ MeOH

Fig. 3

得た。14 を *N*-メチル化することにより目的とする(一) indolactam-V (7) を得た。また、teleocidin 類の絶対配置を決定し、構造活性相関を検討する目的で、エステル 26 からは(+)-*epi*-indolactam-V (28) を、*R*-配置をもつ(+)-23 からは同様の方法で(+)-indolactam-V (29), (-)-*epi*-indolactam-V (30) を合成した。これらの9位, 12位の異性体4種の中で7だけがプロモーション活性を有している。

また、NMR および CD スペクトルにより、7 が teleocidin 類と同一の絶対配置をもつことが明らかとなり、teleocidin 類の 9 位は *S*、従って 12 位も *S* 配置であることが確立された^{14,24}。

最近、Ley らは 2,6-dinitrotoluene から高収率で得られる 4-aminoindole (31) を原料として (±)-indolactam-V の合成を報告した²⁵ (図 4)。この合成法では 31 の 4-アミノ基に先に methyl 2-oxoisovalerate を縮合、還元してエステル部分を導入した 32 に対して塩化亜鉛を用いて nitroethylene を付加して 33 に導き、次にニトロ基の α 位にヒドロキシメチル基を導入し、ニトロ基を還元してアミノエステル 35 を得ている。35 を加水分解後、9 員環形成には diphenylphosphoryl azide (DPPA) を使い、最後に *N*-メチル化して (±)-体の 7 を得ている。

また、後藤らは、インドールの 3 位置換基の効果によるインドールのベンゼン環部位への求電子反応の検討から *L*-トリプトファンを原料とする合成法を報告している (図 5)²⁶。この合成法では、*L*-トリプトファンから導いた *N*-carbobenzoxytryptophanol (38) を米光らの方法により DDQ 酸化して β -ケト体 39 とし、39 のニトロ化により 40% の収率で 4-ニトロ体 40 を得ている。40 は接触還元、水素化ホウ素ナトリウム還元により 4-

- a) $(\text{CH}_3)_2\text{CHCOCOOCH}_3$, p-TsOH/ CHCl_3 b) Mg/MeOH, ultrasound
c) $\text{Me}_3\text{SiSO}_3\text{CF}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ d) $\text{CH}_2=\text{CHNO}_2$, $\text{SnCl}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $n\text{-Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$
e) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, NaOMe/ DMF f) dihydropyran, $\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+\text{p-TsO}^-/\text{CH}_2\text{Cl}_2$
g) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ h) NaOH/EtOH- H_2O i) DPPA, $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$
j) H^+/MeOH k) MeI, $\text{NaHCO}_3/\text{EtOH}$

Fig. 4

- a) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pyridine}$ b) DDQ/THF- H_2O c) HNO_3 d) H_2 , Pd-C, 1 atm/MeOH
e) $\text{NaBH}_4/\text{DMF-H}_2\text{O}$ f) $(\text{CH}_3)_2\text{CHCOCOOH}$, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{DMF}$ g) *N*-hydroxy-succinimide, DCC/ MeCN h) H_2 , Pd-C, 1 atm/ MeOH i) MeI, $\text{NaHCO}_3/\text{MeOH}$

Fig. 5

amino-*N*-Cbz-tryptophanol (41) に導き、イソプロピル基を含む C_5 ユニットを導入した後に活性エステル 42 とし、9 員環を形成し、7 を得ている。

後に詳しく述べるが teleocidin 類の構造活性相関の観点から考えるとインドール環 6,7 位の側鎖は活性増強に寄与しているが、側鎖の立体構造と活性の間には特異性が無い。従って、側鎖の疎水性の大きさが活性に影響を与えていることが予想され、(−)-indolactam-V の 6 位あるいは 7 位のアルキル体の合成が行われている。その一つの試みとして筆者らは tetrahydrobenzo [g] indole (43) から 7 と同様の合成法で (−)-indolactam-V-tetramethylene (44) を合成した²⁴。(−)-Indolactam-V の 7 位に直接アルキル基を導入する方法の開発は teleocidin 類の構造活性相関のためにさらに重要である (図 6)。小清水らは (−)-14-*O*-acetylindolactam-V (15) をニトロベンゼン中で Friedel-Crafts アシル化を行い、7-acylindolactam-V (45) を生成し、LAH でケトン還元して 7-alkylindolactam-V (46) を得ている²⁷。また、筆者らは、(±)-7-iodo-14-*O*-acetylindolactam-V (47) のパラジウム触媒によるアルキル基導入、あるいは 1-*N*, 14-*O* を保護した 48 に対するトリフルオロ酢酸銀を用いた Friedel-Crafts アルキル化により 46 を得ている²⁸。

(−)-Indolactam-V (7) の合成は teleocidin 類の構造と活性を考察する上で重要である。7 とその異性体の合成は分子内の親水性官能基と立体構造の役割を検討する上で、また 46 の合成は分子内の疎水性部分の役割を検

a) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pyridine}$ b) $\text{RCOCl}/\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ c) $\text{NaOH}/\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ d) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ e) $\text{I}_2/\text{pyridine-dioxane}$ f) $\text{R}'\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $(\text{o}-\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}/\text{MeCN}$ g) H_2 , $\text{Pd}-\text{C}$ L atm/ EtOH h) $\text{KOH}/\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ i) TBDMSCl , $\text{imidazole}/\text{DMF}$ j) $\text{NaH}, \text{Ac}_2\text{O}/\text{THF}$ k) $\text{R}''\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{Cl}$, $\text{CF}_3\text{COOAg}/\text{MeNO}_2$ l) $n\text{-Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-/\text{THF}$

Fig. 6

討する上で、共に構造活性相関に関して多くの情報を与えてくれたものである。

3.2. Teleocidin A, B の合成 Teleocidin A, B の全合成も合成化学的には興味を持たれている。側鎖の立体配置に関しては、全ての異性体が存在しているために合成の関心は 6,7 位置置換インドールの効率的な合成法に向けられている。

一つの合成法は既に側鎖となる置換基を含むピロール類からのインドール環の形成である。Kozikowski らは、そのモデル反応として、原料のケトン体 49 をトリフルオロメタンスルホン酸亜鉛(II)を用いてピロール環の 2 位に閉環して 50 を得ている(図 7)²⁹⁾。最近、夏目らは置換ピロールの 3 位への閉環による新しいインドール環形成反応を用いて teleocidin A の全合成を完成させた(図 8)³⁰⁾。その方法は *N*-tosylpyrrole (51) をコハク酸エステルのハーフクロライドでアシル化してインドール環のベンゼン部分となる C_4 ユニットの導入し、次に *N*-methyl valine methyl ester でバリンの導入を行い、得られた 53 のケトンに対して geranyl bromide で Grig-

Fig. 7

a) $\text{EtOCO}(\text{CH}_2)_2\text{COCl}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ b) $\text{KOH}/\text{THF}-\text{H}_2\text{O}$ c) 1) ClCOOEt , $\text{Et}_3\text{N}/\text{THF}$ 2) methyl *N*-methyl-L-valinate $\cdot \text{HBr}$ d) geranyl bromide, Mg/THF e) $p\text{-TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{C}_6\text{H}_6$ f) Lawesson's reagent/ THF g) MeI/DMF h) ethyl 3-bromo-2-hydroxyiminopropanoate, $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ i) $\text{Al}-\text{Hg}/\text{THF}-\text{H}_2\text{O}$ j) $\text{NaBH}_4/\text{EtOH}$ k) 1) $\text{KOH}/\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ 2) $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$ 3) $\text{DPPA}, \text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}$

Fig. 8

nard 反応を行って linalyl 基を導入して置換基のそろった 2-置換ピロール 54 を得ている。54 のアミドをチオアミドに変換後、ヨウ化メチルによって収率良くインドール環に閉環している。ここで 7 位置換基の異性体 (55, 56) を分離し、それぞれ 3 位にアミノ酸を導入した後に DPPA を用いて 9 員環形成を行い、55 から teleocidin A-1 (1) を、56 からは teleocidin A-2 (2) を合成している。

7 位置換インドール合成のもう一つの方法はインドール環の 7 位に直接側鎖を導入する方法である。最近、後藤らはインドール環 7 位への分子内アルキル基導入反応を用いて teleocidin B の全合成を完成させた (図 9)^{31,32)}。初めに、1-geranyl-3-carbomethoxyindole (60) の末端二重結合を開裂して保護した 61 を $\text{BF}_3 \cdot \text{etherate}$ 、トリフルオロ酢酸で処理することにより 7 位に閉環した 62 を得ている。62 は側鎖に C_1 ユニットの導入した三級アルコール 63 に導き、 $\text{BF}_3 \cdot \text{etherate}$ により 6 位に閉環して、teleocidin B の側鎖部分の炭素鎖を含む 64 を得ている。さらに 1-N-アルキル基を後の段階で切断するために N- α 位を過酸化ベンゾイルで酸化し、次いで 4 位をニトロ化して 65、N- α 位を更に酸化してアミドとして異性体 (66, 67) を分離している。66 は加水分解、脱炭酸、還元を経て 68 に導いて、先ず、3 位にアミノ酸ユニット、次に 4 位アミノ基にバリンに相当する C_9 ユニットの導入し (69)、活性エステル法により 9 員環を形成後、末端

二重結合を形成して (±)-teleocidin B-4 ((±)-6) を合成している。また、67 からは同様に (±)-teleocidin B-3 ((±)-5) が得られている。

4. Teleocidin 類の立体配座

Teleocidin 類は溶液中において特異な性質を示す。筆者らは (−)-indolactam-V (7) の合成の際、その重メタノール中の NMR スペクトルが、各プロトンに対し 1:2 の比率で分裂して存在する現象を観測した。この現象は、室温で 2 つの安定な立体配座異性体 (conformer) 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。この 2 つの conformer 間の詳細な研究は (±)-14-O-acetylindolactam-V ((±)-15) を用いて行った^{33,34)}。15 を重クロロホルム中、 -30°C で NMR 測定を行うと 2 つの conformer, A と B が 1:2.7 の比率で存在している。しかし、15 の結晶を -40°C で重クロロホルムに溶解し、直ちに -30°C で測定すると conformer A のみのピークが観測され、一度室温に戻し、再度 -30°C で測定すると、もはや conformer A, B の平衡状態に達している。この平衡の熱力学的パラメーターを求めるために NMR の低温における連続測定で conformer の比率の変化を追うと、この平衡速度から $\Delta G^\circ = -18.9 \text{ kcal/mol}$ (-10°C) のエネルギー障壁をもつ関係であることが明らかとなった。また、同様に -20°C , 0°C での平衡速度を求めることにより、 $\Delta H^\circ = -21.6$

a) m-CPBA b) HIO_4 c) NaBH_4 d) BzCl/pyridine e) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$ f) NaOMe/MeOH g) $\text{PCC}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ h) $(\text{CH}_3)_2\text{CHBr}$, Mg/THF
 i) $\text{PCC}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ j) MeLi k) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ l) $(\text{BzO})_2$ m) $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$ n) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$ o) $\text{MnO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ p) 1) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2) BH_3/THF
 q) HCHO , $\text{Me}_2\text{NH}/\text{AcOH}$ r) $\text{O}_2\text{NCH}_2\text{COOCH}_3$, $\text{Et}_3\text{N}/\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ s) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ t) 1) $(\text{CH}_3)_2\text{CHCOCOOH}/\text{DMF}$ 2) NaBH_3CN u) N-hydroxy-succinimide, DCC/MeCN v) H_2 , PtO_2/MeOH x) $\text{MsCl}/\text{pyridine}$ y) $\text{NaSePh}/\text{MeOH}$ z) NaBH_4 , LiCl/EtOH aa) $\text{KIO}_4/\text{THF}-\text{MeOH}$ bb) CH_3I , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/\text{EtOH}$

Fig. 9

kcal/mol, $\Delta S^\ddagger = +9.4$ kcal/K $\cdot$ s $^{-1}$ の値を得た。このことは conformer A 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, $+20^\circ\text{C}$ で約 6 秒, $+37^\circ\text{C}$ では約 1.2 秒であると計算される。従って, 2 つの conformer を分離することは不可能である。

Conformer の立体構造は 7 および 15 の NMR のケミカルシフト, カップリング定数, NOE の分析から推測し, 経験的分子力場計算 (MM 2) により適正化して conformer A, B に対して図 10 に示すようにそれぞれ SOFA 型と TWIST 型の立体配座を推定した。

この 2 つの conformer の存在は teleocidin 類すべてについて一般的に認められ, その溶液中の立体構造も NMR のケミカルシフト値の類似から 7 の場合と同様の SOFA 型と TWIST 型をとっている。また, conformer 間の平衡の比率および速度についても天然の teleocidin 類が 7 と同様のエネルギー状態にある。実際に, 現在までに X 線結晶解析がなされた teleocidin 類 4 種の中で, teleocidin B-2 (4), B-4 (6) の 2 種は TWIST 型に近い結晶構造を, olivoretin B (10), C (11) の 2 種は SOFA 型

に近い結晶構造をとっている。溶液中の比率は化合物, 溶媒によって少しずつ異なるが, その値から TWIST 型と SOFA 型の安定性には 0~1.5 kcal/mol 程度の差しかない。従って, 生体内での挙動や生理活性を考える場合, TWIST 型と SOFA 型双方を活性構造となる可能性があるものとして考えなければならない。

2 つの conformer 間の平衡は 9 員環ラクタムのアミド C-N 結合の *cis-trans* 異性化に起因しており, teleocidin 類の特異な 9 員環構造が分子の挙動にも関与している。これは分子の立体構造と生理活性の関連を考える上で極めて重要なことである。

5. プロモーターの構造活性相関

化学構造の異なる TPA タイプのプロモーター, 即ち diterpene ester 類, teleocidin 類, aplysiatoxin 類は同一のレセプターを介して生理活性を発現する。発癌プロモーターの活性発現に必要な構造を考える場合, TPA タイプのプロモーターに共通する活性構造の条件を検討する必要がある。そこで, 先ず, diterpene ester 類の,

Fig. 10 Conformations of indolactam-V

次に teleocidin 類の構造と活性について述べる。

5.1. Diterpene ester 類の構造と活性 強力なプロモーション活性をもつ Diterpene ester 類は構造的、合成的に近縁の 3 種の diterpene 骨格、即ち Tigllane 骨格, Ingenane 骨格, Daphnane 骨格をもつ化合物に分類される。それぞれの代表的なプロモーター, TPA (70), 3-tetradecanoyl ingenol (3 TI, 71)³⁴⁾, Pimelea factor P₂ (72)³⁵⁾を図 11 に示す。これらの構造を見るとケトンやアルコールの親水性部分と直鎖のアルキル基等の疎水性部分がはっきりと分かれて存在していることが判る。化合物とレセプターとの相互作用を考える場合、レセプターにより認識される結合部位あるいは反応部位である親水性官能基と、膜との相互作用による透過性あるいはレセプターとの結合の安定性に寄与する疎水性部分に分けて考えることが必要である。

まず、親水性官能基について考察すると、

- 1) TPA の 4 位 OH の β 配置を逆転させた 4- α -TPA は活性を示さない。これは 4 位の配置の逆転により骨格の conformation が変化したことによる³⁶⁾。
- 2) TPA の 4 位 OH をメチル化した 4-O-Me-TPA では活性は大幅に低下する³⁶⁾。
- 3) TPA の 20 位 OH をアシル化した TPA-20-ester では活性は低下する³⁶⁾。

以上の事実から Diterpene ester 類のいずれにも存在する 20 位 OH は活性発現に不可欠である。4 位 OH に関しては 4-deoxy 体に活性があるとの報告があり³⁷⁾, その必要性については確証がない。また、9 位 OH の必要性については検討されていない。

次に、疎水性部分に関しては、

Fig. 11

- 1) TPA, 3 TI とともに長鎖脂肪酸エステルをもたない phorbol, ingenol に活性はない³⁸⁾。
- 2) Phorbol の 12 位, 13 位の OH を炭素数 2,4,6...の脂肪酸のジエステルとすると炭素数の増大に従って活性は上昇し、炭素数 10 の phorbol-12,13-didecanoate (PDD) で TPA に匹敵する活性を示し、さらに 12,14 と炭素数が大きくなり過ぎると活性は低下する³⁸⁾。
- 3) Ingenol の 3 位 OH に対して、同様に炭素数の異なる脂肪酸のエステルとすると炭素数 14 の 3 TI で活性は極大を示す³⁸⁾。
- 4) Daphnane 骨格をもつ Pimelea factor P₂ で 1 位からオルトエステル部位への環状構造となっても TPA と同等の活性を示す³⁸⁾。

以上から diterpene ester 類の活性発現にはこの疎水性部分も大きく関与しており、1 位(あるいは 3 位)から 12 位近傍にかけての大きな疎水性部分が存在することが重要である。

5.2. Teleocidin 類の構造と活性 Teleocidin 類に共通の基本構造、(-)-indolactam-V (7) は 9 位, 12 位が S, S の絶対配置を有する。その鏡像体である (+)-indolactam-V (29) は R, R 配置を, epimer である (+)-*epi*-indolactam-V (28) と (-)-*epi*-indolactam-V (30) は 9 位, 12 位がそれぞれ S, R, R, S の配置をとっている。これらの indolactam-Vs について ³H-TPA のレセプターへの結合阻害試験等、プロモーション活性の指標となる数種の生化学試験を行うと 7 のみがプロモーターとしての活性を示したが、他の 3 種の異性体は不活性であった³⁹⁾。7 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、この構造はプロモーション活性発現に必要な構造を基本的に満たしている⁴⁰⁾。そこで indolactam-V を基礎として構造修飾あるいは類縁体の合成が行われ、teleocidin 類の構造活性相関の解析が可能となった。

Teleocidin 類の構造活性相関を親水性官能基から考察すると、

- 1) 9 位, 12 位が S, S 配置を有する (-)-indolactam-V のみが活性を示し、他の異性体が一不活性であることから活性発現に対する構造の要求性は 9 位, 12 位を含む 9 員環部分即ち親水性部分に関しては厳密なものであり、conformation も重要な要因である。(-)-indolactam-V の代謝物として見出された (-)-N-desmethyindolactam-V (14) や (-)-2-oxoindolactam-V (17, 19) の活性が低下あるいは消失するのは conformation の大きな変化によるも

のと考えられる。

- 2) (–)-Indolactam-V の 14 位 OH をメチル化した 14-O-methylindolactam-V は活性を示さない。同様に、天然から得られた 14-O-methylteleocidin 類である olivoretin 類(9~12)も活性がない⁴⁰⁾。従って、14 位 OH がプロトン供与体であることが活性発現に不可欠である。(–)-14-O-acetylindolactam-V (15) は (–)-indolactam-V と同等の活性を示すが、その活性はエステラーゼ阻害剤によって抑制された⁴¹⁾ことから加水分解して作用を発現しているものと推定されている。
- 3) (±)-Indolactam-V の 1 位 NH をアルキル化した場合、1-N-methyl 体は若干の活性低下を示すが、アルキル基を長鎖にした 1-N-prenyl 体あるいは (±)-1-N-geranylindolactam-V (73) は (–)-indolactam-V よりも活性が上昇する⁴⁰⁾。これは 1 位 NH が活性発現には不必要であることを示す。

次に、疎水性部分について考察する。

- 1) Diterpene ester 類の場合、基本骨格である phorbol, あるいは ingenol が不活性であるのに対し、(–)-indolactam-V にはかなりの活性が認められる。これは (–)-indolactam-V には既に TPA の長鎖エステル部分の一部に相当する疎水性構造が含まれているとみられ、12 位イソプロピル基がそれに対応すると推定される。実際に 12 位イソプロピル基をメチル、イソブチル、*t*-ブチルに置換した化合物 indolactam-A (74), -L (75), -TL (76) を合成し⁴²⁾、その生理活性を検討すると、活性は $A \ll V \approx L < TL$ とアルキル基の大きさに従って上昇する⁴³⁾。さらに 12 位にテトラデカノイル基を置換した indolactam-TD (77) は teleocidin A, B に近い活性を示した。
- 2) (–)-Indolactam-V (7) の活性は種々の生物試験の結果から総合して teleocidin A, B の約 1/50 である。この活性の差は teleocidin 類の 6 位、7 位に置換した疎水性部分の欠損のためである。7 の 7 位への置換基導入は活性を上昇させる。7 の 7 位に長鎖のアルキル基を導入した 7-decylindolactam-V (78) は、teleocidin A, B に匹敵する活性を示した⁴³⁾。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、活性の変化は置換基の疎水性パラメーター π の変化によって支配されていることを示した⁴⁴⁾。
- 3) Teleocidin A 2 種, teleocidin B 4 種の異性体はすべて同等の活性を示す⁸⁾ことから、この疎水性部分

Fig. 12

は厳密な立体特異性をもたないことを示している。

これは上記の 78 が teleocidin A, B と同等の活性を示すことから確認された。

以上の疎水性部分についての考察を総合すると diterpene ester 類の 3 位から 12 位にわたる疎水性部分が teleocidin 類の 12 位イソプロピル基から 7 位にわたる領域に相当していることを示唆している。これを支持する事実として 12 位に長鎖アルキル基を導入した化合物としてデザインした indolactam-TD (77) が teleocidin A, B に近い活性を示したことが挙げられる。

6. プロモーターの活性構造の相互関係

化学構造の異なるプロモーターが同一のレセプターに結合して作用を発現することは、これらに共通する活性な構造の条件が存在することである。また、その構造に基づいた基質の構造からのレセプターの結合部位の構造の推定は、プロモーターの作用解明の上で重要であると考えられる。この点に関して、コンピュータ的手法を用いたプロモーターの分子重ね合わせによる共通な構造の抽出が報告されている。Jeffrey らは teleocidin 類の活性構造を 9 位、12 位が天然物とは逆の *R,R* 配置の TWIST 型であると想定して TPA との重ね合わせを行い、TPA の 3 位 C=O, 4 位 OH, 9 位 OH, 20 位 OH が、teleocidin の 11 位 C=O, 13 位 N, 1 位 NH, 14 位 OH にそれぞれ対応するとしている(図 13a)⁴⁵⁾。Wender らは teleocidin の活性構造に 9 位、12 位が *S,S* 配置の TWIST 型を用い、TPA の 4 位 OH, 9 位 OH, 20 位 OH が teleocidin の 13 位 N, 1 位 NH, 14 位 OH にそれぞれ対応するとしている(図 13b)⁴⁶⁾。しかし、これらに共通する問題点が 2 つある。第一に、teleocidin 類の構造活性相関、立体構造に関する検討が不十分である点であ

Fig. 13

る。特に、前者は9位、12位の絶対配置を天然物とは逆の *R,R* 配置として計算している。第二に、分子重ね合わせの際に、N,O等のヘテロ原子の位置のみを対象とし、官能基の化学的性質を考慮していない点である。

以上の問題点を考慮して、筆者は坂井らと協同して teleocidin と TPA の対応性の検討を行った。第一に、基盤となる teleocidin 類の構造と活性に関して十分な検討を行い、2つの conformation, TWIST 型と SOFA 型双方を可能性のある活性構造として TPA との重ね合わせを行い、その結果、より合致する conformation を活性な構造と仮定してレセプターの形状を推定する。第二に、分子重ね合わせの際にはヘテロ原子の原子位置のみではなく、基質とレセプターの特異的結合を観点に加えている⁴⁷⁾。特に、水素結合を考える場合、プロトン供与体と受容体を区別し、その方向性も考慮に入れる。これはヘテロ原子自体の位置に大きなずれがあってもレセプターとの水素結合の方向によっては結合が可能だからである。

(-)Indolactam-V の TWIST 型と SOFA 型の座標を鋳型として TPA の基本骨格である phorbol acetate の結晶構造との間で、電荷分布、静電ポテンシャル、水素結合性等を計算しながら重ね合わせを行った。その結果、(-)Indolactam-V の TWIST 型と phorbol の間では2個の共通する水素結合の形成が可能であるのに対し、SOFA 型と phorbol との間では3個の共通する水素結合の形成が可能であり、SOFA 型の方が一致が良い。この

Fig. 14

重ね合わせでは phorbol の 3 位 C=O はプロトン受容体として (−)-indolactam-V の 11 位 C=O と, phorbol の 4 位 OH, 20 位 OH はプロトン供与体として (−)-indolactam-V の 10 位 NH, 14 位 OH にそれぞれ対応している。次に, 疎水性部分の一致を検討するために, SOFA 型 teleocidin と, phorbol acetate の結晶構造を参考にして得られる TPA の構造を重ね合わせると, 3 個の共通の水素結合形成とともに共通する疎水性サイトの存在が確認された。そのサイトは TPA の 12 位長鎖脂肪酸エステルを 3 位近傍にかけた配置をとることにより teleocidin B の 7 位から 12 位イソプロピル基にわたる疎水性部分と対応している (図 14)⁵¹⁾。これは, teleocidin A, B の活性を保持し, 単純化した 7-decylindolactam-V (78) が phorbol の 12 位にテトラデシル基をもつ TPA に対応し, indolactam の 12 位にテトラデシル基をもつ indolactam-TD (77) が ingenol の 3 位にテトラデシル基をもつ 3 TI に対応することを示している。

この結果から予想されたレセプターの水素結合部分や形状は他の TPA タイプのプロモーター, 即ち 3 TI, aplysiatoxin に対しても一致を示した。

7. おわりに

発癌プロモーター teleocidin 類の合成と活性, そして活性発現に必要な構造条件を diterpene ester 類と総合して述べてきた。最近, 蛍光標識化^{48,49)}した TPA の細胞内動態の研究が報告され, 蛍光標識化された teleocidin 類も合成され⁵⁰⁾機能解明が進行している。Diterpene ester, teleocidin は多様な生理活性を示し, プロモーターとしての作用はその一つの面であり, これらはより一般的に細胞の増殖, 分化の調節物質と考えた方がよい。この構造活性相関を基にし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新しい化合物のデザインとそれらの合成は細胞生物学ばかりでなく, 癌化学療法剤, 細胞分化の制御による医薬の創製に寄与をするに違いない。

(昭和 62 年 10 月 9 日受理)

文 献

- 1) I. Berenblum, *Cancer Res.*, **1**, 44 (1941)
- 2) E. Hecker, *Naturwissenschaften*, **54**, 282 (1967)
- 3) B.L. van Duuren, *Prog. Exp. Tumor Res.*, **11**, 31 (1969)
- 4) R. Doll, *Nature*, **265**, 589 (1977)
- 5) 山崎洋, 蛋白質・核酸・酵素, **25**, 334 (1980)
- 6) H. Fujiki, M. Mori, M. Nakayasu, M. Terada, T. Sugimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**,

- 776 (1979)
- 7) 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, and I.B. Weinstein eds.) Japan sci. soc. press, Tokyo/VNU science press, Utrecht, p.37 (1984)
- 8) 藤木博太, 代謝, **22**, 9 (1984)
- 9) M. Takashima, H. Sakai, K. Arima, *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 660 (1962)
- 10) H. Harada, N. Sakabe, Y. Hirata, Y. Tomie, I. Nitta, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 2523
- 11) S. Sakai, Y. Hitotsuyanagi, N. Aimi, H. Fujiki, M. Suganuma, T. Sugimura, Y. Endo, K. Shudo, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5219 (1986)
- 12) J.H. Cardelina II, F.J. Marner, R.E. Moore, *Science*, **204**, 193 (1979)
- 13) Y. Hitotsuyanagi, H. Fujiki, M. Suganuma, N. Aimi, S. Sakai, Y. Endo, K. Shudo, T. Sugimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4233 (1984)
- 14) Y. Endo, K. Shudo, K. Furuhashi, H. Ogura, S. Sakai, N. Aimi, Y. Hitotsuyanagi, Y. Koyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 358 (1984)
- 15) K. Irie, M. Hirota, N. Hagiwara, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, H. Tokuda, Y. Ito, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1269 (1984)
- 16) 一柳幸生, 山口啓一, 緒方惟治, 相見則郎, 坂井進一郎, 藤木博太, 菅沼雅美, 杉村隆, 遠藤泰之, 首藤紘一, 小山泰正, 第 27 回天然有機化合物討論会講演要旨集, p.624 (1985)
- 17) 林英雄, 日本農芸化学会誌, **61**, 826 (1987)
- 18) S. Sakai, N. Aimi, K. Yamaguchi, Y. Hitotsuyanagi, C. Watanabe, K. Yokose, Y. Koyama, K. Shudo, A. Itai, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 354 (1984)
- 19) Y. Hitotsuyanagi, K. Yamaguchi, K. Ogata, N. Aimi, S. Sakai, Y. Koyama, Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, Y. Iitaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3774 (1984)
- 20) S. Sakai, Y. Hitotsuyanagi, K. Yamaguchi, N. Aimi, K. Ogata, T. Kuramochi, H. Seki, R. Hara, H. Fujiki, M. Suganuma, Y. Endo, K. Shudo, Y. Koyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4884 (1986)
- 21) K. Irie, N. Hagiwara, T. Kurome, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 285 (1987)
- 22) 萩原宣行, 入江一浩, 林英雄, 荒井基夫, 徳田春邦, 小清水弘一, 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, p.738 (1987)
- 23) N. Hagiwara, K. Irie, H. Tokuda, K. Koshimizu, *Carcinogenesis*, **8**, 963 (1987)
- 24) Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, M. Hasegawa, S.

- S. Sakai, *Tetrahedron*, **42**, 5905 (1986)
- 25) S.E. de Laszlo, S.V. Ley, R.A. Porter, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 344
- 26) S. Nakatsuka, T. Masuda, K. Sakai, T. Teramae, T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5735 (1986)
- 27) K. Irie, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2679 (1986)
- 28) Y. Endo, Y. Sato, K. Shudo, *Tetrahedron*, **43**, 2241 (1987)
- 29) A.P. Kozikowski, X.-M. Cheng, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4047 (1985)
- 30) H. Muratake, M. Natsume, *ibid.*, **28**, 2265 (1987)
- 31) T. Masuda, K. Ueda, O. Asano, S. Nakatsuka, T. Goto, *Heterocycles*, **26**, 1475 (1987)
- 32) S. Nakatsuka, T. Masuda, T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3671 (1987)
- 33) Y. Endo, M. Hasegawa, A. Itai, K. Shudo, M. Tori, Y. Asakawa, S. Sakai, *ibid.*, **26**, 1069 (1985)
- 34) W. Adolf, E. Hecker, *Z. Krebsforsch.*, **84**, 325 (1975)
- 35) S. Zayed, A. Hatez, W. Adolf, *Experientia*, **33**, 1554 (1977)
- 36) E. Hecker, "Carcinogenesis, Vol.2. Mechanisms of tumor promotion and cocarcinogenesis". (T.J. Slaga, A. Sivak, R.K. Boutwell eds.), Raven press, New York, p.11 (1978)
- 37) H. Fujiki, M. Mori, T. Sugimura, M. Hirota, H. Ohigashi, K. Koshimizu, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **98**, 9 (1980)
- 38) E. Hecker, "Cellular Interaction by Environmental Tumor Promoters". (H. Fujiki, E. Hecker, R.E. Moore, T. Sugimura, I.B. Weinstein eds.), Japan sci. soc. press, Tokyo/VNU science press, Utrecht, p.3 (1984)
- 39) H. Fujiki, M. Suganuma, M. Nakayasu, Y. Endo, K. Shudo, T. Sugimura, *Gann*, **75**, 866 (1984)
- 40) H. Fujiki, M. Suganuma, H. Hakii, M. Nakayasu, Y. Endo, K. Shudo, K. Irie, K. Koshimizu, T. Sugimura, *Proc. Japan. Acad.*, **61**, 45 (1985)
- 41) K. Irie, H. Tokuda, N. Hagiwara, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, Y. Ito, *Int. J. Cancer*, **36**, 485 (1985)
- 42) Y. Endo, E. Hasegawa, A. Itai, K. Shudo, *Tetrahedron*, in press.
- 43) 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)
- 44) K. Irie, N. Hagiwara, H. Tokuda, K. Koshimizu, *Carcinogenesis*, **8**, 547 (1987)
- 45) A.M. Jeffrey, R.M.J. Liskamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 241 (1986)
- 46) P.A. Wender, K.F. Koehler, N.A. Sharkey, M.L. Dell'Aquila, P.M. Blumberg, *ibid.*, **83**, 4214 (1986)
- 47) A. Itai, Y. Kato, Y. Iitaka, Proceeding for Symposium on "Three-Dimensional Structures and Drug Action", Tokyo p.195 (1987)
- 48) P.L. Tran, M.A. Deugnier, *Carcinogenesis*, **6**, 433 (1985)
- 49) R.M. Liskamp, A.R. Brothman, J.P. Arcoleo, O.J. Miller, I.B. Einstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 920 (1985)
- 50) K. Irie, N. Hagiwara, K. Koshimizu, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3267 (1987)
- 51) A. Itai, Y. Kato, N. Tomioka, Y. Iitaka, Y. Endo, M. Hasegawa, K. Shudo, H. Fujiki, S. Sakai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* in press (1988)