ネオカルジノスタチン様人工分子の設計と合成

平 間 正 博*

Design and Synthesis of Neocarzinostatin Analogues

Masahiro HIRAMA*

The first generation of 10 membered ring analogues (11~13) of the neocarzinostatin chromophore (1) could undergo the thiol or radical triggered Masamune-Bergman type cycloaromatization, but they were not able to show the antibiotic nor antitumor activities. New analogues (27~29) of the second generation exhibited the remarkable DNA cleaving activities as well as the biological activities. The unprecedented guanine specific DNA cleavage by the simple chiral alcohol 28 is striking, while the complex of the possible intercalator 29 with the neocarzinostatin apoprotein (2) did not show an evident specificity.

Key words : Neocarzinostatin chromophore analogue; Synthesis; DNA cleavage; Base specific cleavage; Design of DNA cleaving molecule ; Binding structure; Neocarzinostatin complex; Antitumor activity; Masamune-Bergman cycloaromatization; Triggering mechanism.

1. はじめに

ネオカルジノスタチン(NCS)は、1965年に石田らにより *Streptomyces carzinostaticus* の培養濾液から得られた強力な抗癌性抗生物質で¹⁾, 1977年以来、胃癌や肝癌、膀胱癌、急性白血病、膀胱癌等の治療に使用されている²⁾。NCSは、新奇なジエンジイン構造を有する活性本体の不安定クロモフォア(1)が、アポタンパク[アポ NCS (2): 11 kd]に非共有結合的に会合した複合体である。従って、抗体等との共有結合の開裂なしにターゲット部位での作用発現が可能な抗癌剤として、ミサイル療法に

用い得る抗癌剤としても注目されており、トランスフェリン・リセプターを標的とするトランスフェリン・NCSコンジュゲート等も最近開発された³⁾。アポタンパク2から遊離したクロモフォア(1)は、光や熱、5以上のpHに対して極めて不安定で、スキーム1のようにチオールによって活性化されて正宗・バークマン型環化反応を起こすと推定され⁴⁾, T(>A)特異的にDNAを切断する。しかし、そのDNA認識とそれに関わる相互作用、およびピラジカルによる水素引き抜きの化学構造レベルの詳細な解明は、まだ十分になされていない⁵⁾。また、1はアポタンパク2に特異的に会合して安定化され、患部近

Scheme 1

* 東北大学理学部化学第二学科 ()

* Department of Chemistry, Faculty of Science, Tohoku University ()

傍まで運ばれるが、複合体の高次構造、特異的な結合や安定化に関与する相互作用も未解明である。これらの問題は、生体高分子(DNAやタンパクキャリアー)による生物活性低分子の分子認識の観点から非常に面白い問題

10
 Ala- Ala- Pro- Thr- Ala- Thr- Val- Thr- Pro- Ser- Ser- Gly- Leu- Ser- Asp- Gly- Thr- Val- Val- Lys-
 30
 Val- Ala- Gly- Ala- Gly- Leu- Gln- Ala- Gly- Thr- Ala- Tyr- Asp- Val- Gly- Gln- Cys- Ala- Trp- Val-
 50
 Asp- Thr- Gly- Val- Leu- Ala- Cys- Asp- Pro- Ala- Asn- Phe- Ser- Ser- Val- Thr- Ala- Asp- Ala- Asn-
 70
 Gly- Ser- Ala- Ser- Thr- Ser- Leu- Thr- Val- Arg- Arg- Ser- Phe- Glu- Gly- Phe- Leu- Phe- Asp- Gly-
 90
 Thr- Arg- Trp- Gly- Thr- Val- Asn- Cys- Thr- Thr- Ala- Ala- Cys- Gln- Val- Gly- Leu- Ser- Asp- Ala-
 110
 Ala- Gly- Asp- Gly- Pro- Glu- Gly- Val- Ala- Ile- Ser- Phe- Asn

2

であると同時に、新規な人工 DNA 切断分子の設計にも重要な示唆を与えると期待される。そこで私達は、コンピュータ・モデリングによって複合体の構造と安定化機構について推定する一方⁶⁾、NMR 解析⁷⁾とモデル分子の複合化⁸⁾によって実証的な研究も進めている。また、合目的にデザインした、炭素ラジカル発生機能を持った NCS クロモフォア様分子を人工合成し、その分解様式を明らかにして、ラジカル発生の構造化学的研究を展開する。そして NCS より安定で、DNA 認識部位を結合したハイブリッドやタンパクとの複合体を設計し、塩基配列をより厳密に識別し切断する超天然物分子^{*1)}を合成したいと考えている。最近合成した第二世代モデルは、抗菌・抗腫瘍細胞活性のほか、塩基特異的 DNA 切断作用を示した。私達の基礎研究が抗癌剤開発のブレイクスルーになればと念じている。これまでの合成研究の経緯と最新の結果を紹介する。

2. 第一世代モデル

2.1. 第一世代 10 員環モデル(11-13)の設計 トリガーによって炭素ラジカルを発生する機能を持ち、しかも天然物 1 より安定な分子をどのようにデザインするか。まず、1 と同じ不飽和結合配列を持った歪みの小さな 10 員環アナログを考えた。Dreiding モデルで組めないほど歪みの大きな 9 員環では合成も困難が予想される。環歪みがチオールトリガーによる芳香環化に必要な条件であるかを明らかにするためにも、10 員環モデル 7-10 の安定性と反応性を分子力場計算と分子軌道法計算によって予測した(表 1)。結合角の歪みと歪みエネルギーから明かなように、10 員環モデルは 9 員環化合物よりもずっと安定であり、原子間距離 ab と生成熱から、10 員環モデルでも速やかに渡環反応が起こると期

注1)「超天然物」を①弱い結合(非共有結合)による複合(会合)分子型天然物、②天然物の機能を超える人工分子、または③両者のハイブリッド、と広義に定義したい。

Table 1

Compound	MM2 (85) ^a		MNDO ^a	
	Strain Energy (kcal/mol)	ab (Å)	Heat of Formation (kcal/mol)	ab (Å)
7	25.85	2.95	117.5	2.97
8	Δ11.02	-----	Δ10.3 127.8	3.03
9	14.83	3.12	101.1	3.20
10	-----	-----	Δ9.7 110.8	3.20

a) Calculated by Prof. Y. Fukazawa (Hiroshima University).

待された。そこで、エポキシドよりも合成が容易で、しかもマイケルアクセプターとして機能できる共役ケトン 11, 13 や脱離基を持った 12 を設計、合成し、どのような分解様式を示すか検討した。

2.2. モデル 11-13 の合成 スキーム 2 およびスキーム 3 に示した経路で 11-13 を合成した^{9,10)}。10 員環の生成は、アルキンを直接 Pd(PPh₃)₄-CuI-アミン系と処理しても酸化カップリングが優先して成功しなかったが、アルキニルスズ化合物に変換後、パラジウム触媒と加熱すると好収率で進行した。12 の構造は、X 線結晶構造解析によって確認した(図 1)⁹⁾。11-13 は、空気に対しては不安定であるが、1 と異なり、アルゴン雰囲気下では、室温で室内光下に安定である。

2.3. 芳香環化反応とトリガー 1 の分解反応にならって、ケトン 1 を 0.1 M 酢酸/エタノール溶液中、空気存在下にメチルチオグリコレート(10 当量)と攪拌

Scheme 4

Scheme 6

Scheme 5

由来する⁹⁾。また、ケトン13の分解では、酸素の有無によって骨格の異なったテトラヒドロベンゾインダン誘導体が得られた(スキーム6)¹⁰⁾。これも、求核剤誘導型分解(スキーム7)と、ラジカル($\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{SR}$)開始型分解(スキーム8)によって合理的に理解できる*2。

2.4. 酸化的ラジカルトリガーによるクロモフォア(1)

の芳香環化反応 天然クロモフォア1においても酸化的ラジカル開始型分解が起こることは、チオールが共存

注2) この求核剤誘導型分解は、1のpath b経路(スキーム1)の分解の可能性を示唆した。最近、実際に京大の斎藤烈らは、この反応経路が水溶液中で起こり易いことを見出している。

Anaerobic Condition :

Scheme 7

Aerobic Condition: $\text{RSH} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{RS}\cdot + \cdot\text{OOH}$

Scheme 8

する好氣的条件下でのみ生成する F-O (図 2) が, 12 位が酸化されたケトン 21 であることから明らかになった (スキーム 9)¹¹⁾. 21 は酸素雰囲気下でもチオールがなければ生成しないので, チオールが酸素 ($^3\text{O}_2$) と反応して生成したヒドロペルオキシラジカル ($\cdot\text{OOH}$) をトリガーとする生成物である。したがって, 生体内における 1 のトリガー機構は, グルタチオンによる求核剤誘導型ばかりでなく, この酸化的ラジカルトリガーも関与している可能性がある。

以上のチオールとモデル化合物との反応は, すべて 1 と比較のため酢酸酸性下で行ってきたが, トリエチルア

ミン存在下にチオールの求核性を増大させると, チオール (3 当量) の共役付加・芳香環化は極めて速やかに進行し, エタノール/1,4-シクロヘキサジエン中で, 14a を 54%, 14b を 11% 与えた (スキーム 10)¹²⁾. 1 の分子内のアミノ糖も, チオールトリガーを自ら活性化する機能を担っていると考えられる。

なお, 11 の反応 (スキーム 10) を 1,4-シクロヘキサジエン- d_8 /エタノール中で行っても重水素は全く取り込まれなかったので, ラジカル中間体を支持するデータは得られなかった。過剰のチオールの SH を引き抜いていると考えられる。

Fig. 2

Scheme 9

Scheme 10

2.5. 非環状モデル 22-24 の反応性とクムレン生成のシミュレーション 合成が容易で環歪みのない非環状モデル 22, 23 を合成して(スキーム 10)チオールとの反応性を調べた(スキーム 11)¹³⁾. ケトン 22 は, 酢酸酸性アルコール中では反応が遅く, 100 当量のチオールを加え

ると芳香環化が起きた。しかし, 反応加速のためアミンを添加すると, 期待する 1,8-共役付加に加えて 1,4-付加が起こり, 渡環反応は全く起こらない。塩化物 23 も嫌気的条件下にはほとんど反応せず, 4' 位にゆっくり S_N 反応を受けたのみであった。一方, 好氣的条件下で

Scheme 11

Scheme 12

はチオールが付加したインダン誘導体が生成した¹³⁾。しかし、10員環アナログに比べて反応が遅いので、生物活性を担う機能分子としては適当ではないことが分かった。

なお、4'位に立体障害を付与すると(24, スキーム 12), アミン存在下に期待どおりビニロガス S_N2' 反応が起きた。熱的には室温で安定な共役インエンクムレン 25 を単離することに成功した。10員環アナログではクムレンやアレン中間体は単離できないので、非環状モデルの渡環反応は予想どおり遅いことが確認された。これを1,4-シクロヘキサジエン中で加熱すると、一次反応速度で分解し($k=1.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2}=1.1 \text{ h}$) 正宗・バークマン型環化反応によってビニルインダン 26 を生成した¹⁴⁾。1,4-シクロヘキサジエン- d_8 中で反応させると、2位と10位に90%以上重水素が取り込まれたので、ビラジカル中間体の関与が証明された。

3. 第二世代モデル

3.1. 第一世代モデルの総括と第二世代の設計 これまで述べたように、10員環共役ケトン 11, 13 は正宗・

バークマン型芳香環化を室温で容易に起こすこと、しかもチオールのような求核剤ばかりでなく、 $RS\cdot$ や $HOO\cdot$ のようなラジカルもトリガーになることが明らかになった。しかし、それらに抗菌活性やDNA切断活性はほとんど認められなかった。極端な脂溶性とDNA認識部位を持たないのが主要原因と考えられる。

そこで、NCSクロモフォアの第二世代10員環モデルとして、チオアセテート 27 やアルコール 28, ナフトエート 29 を設計した(図 3)。クロモフォア 1 のナフトエートは、アポタンパクとの会合に最も重要な部位であることが、NMR による NCS 複合体中のクロモフォア結合部位の構造解析(図 4)⁷⁾や、モデル化合物(30-33)の NCS アポタンパクへの複合化とその会合定数(図 5)⁸⁾によって明らかになった。また、DNA塩基へのインターカレーターとして 1 の T 特異的 DNA 切断にも重要な役割を果たしていると推定されている⁵⁾。従って、29 はアポタンパクと複合体を形成する可能性や、塩基特異的な DNA 切断活性を示す可能性がある。

3.2. 第二世代モデル 27-29 の合成 ラセミ体の 27¹²⁾および光学的に純粋な 28, 29 の合成¹⁵⁾をスキーム

Fig. 3 The second generation of NCS-Chr analogues.

Fig. 4 The binding structure of NCS complex : whole (bottom) and binding site structure (up)⁷⁾.

cf. K_a of NCS-Chr (1) = 1.4×10^5 [K. Edo, et al. *J. Antibiot.*, 41, 554 (1988)]

Fig. 5 The binding constants of the model compounds to the NCS apoprotein (2)⁸⁾.

13, 14 にまとめた。

3. 3. ラジカル中間体の確認 27 は、メタノール／1,4-シクロヘキサジエン(100 当量)中炭酸カリと処理すると、生成したトリガーのチオレート 36 が分子内共役付加して正宗・バークマン型環化を引き起こし、34 と

35 を 28% 与えた(スキーム 15)。MeOH/1,4-シクロヘキサジエン- d_8 中では 2 位にそれぞれ 51% および 68% 重水素が取り込まれたので、エンインアレノン 37 を経てビラジカル 38 を生成していることは確実である¹²⁾。

34 の 7 位の水素は反応条件下に容易にメタノールプロ

Scheme 13

Scheme 14 (i) $(\text{COCl})_2$, DMSO, Et_3N , -60°C ; (ii) Br_2 , CH_2Cl_2 , 0°C ; (iii) propargyl magnesium bromide, ether, -88°C ; (iv) BuLi , THF-HMPA, -78°C , and then 3,3-dimethylpent-4-yn-1-al; (v) TESCl , py; (vi) BuLi , THF, -78°C , and then Bu_3SnCl ; (vii) $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$, THF, 60°C , 89 h; (viii) THF- H_2O -AcOH (8:1:4); (ix) $(\text{COCl})_2$, DMSO, Et_3N , -60°C ; (x) THF- H_2O -AcOH (1:1:1); (xi) $\text{Me}_2\text{HN}^+(\text{CH}_2)_3\text{N}=\text{C}=\text{NEt Cl}^-$, ArCO_2H , CH_2Cl_2 .

トンと交換するので結論はできないが、活性な2位の σ フェニルラジカルと比較して、カルボニル基によってさらに安定化された7位のベンジル π ラジカルには C-H 結合を切断する能力はなく、チオールの SH や分子酸素によって捕捉されて 34 または 35 を生成したと考えられる。

また、29 は、アミン存在下にエタノール/1,4-シクロヘキサジエン中でチオールと処理すると、速やかにインダン誘導体 39 を好収率で与えた¹⁵⁾。

3.4. 第二世代モデルの生物活性と DNA 切断特異性期待どおり、チオアセテート 27 やアルコール 28 は、それぞれ *M. luteus* や *B. licheniformis* に対して顕著な抗菌

Scheme 15

活性を示した。パルプディスク法による後者の生育最小阻止量は $5.3 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ (cf. NCS, $1.1 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$) であり, NCS に比較すれば千分の一以下の活性である。予期に反してナフトエート 29 単独の活性は弱かったが, NCS アポタンパク水溶液に懸濁させると活性が現われた。水溶性のアポタンパクが 29 を脂溶性ポケットに取り込んで, キャリヤーとして機能していると考えられる。28 や, 29 のアポタンパク複合体の抗腫瘍活性も明瞭で, 特に 28 の K 562 白血病細胞に対する IC_{50} は, $0.9 \mu\text{M}$ であった。これは NCS (IC_{50} , $0.01 \mu\text{M}$) の百分の一の強度である。28 および 29-アポタンパク複合体は, DNA (スーパーコイル pBR 322 プラスミド, Form I) をそれぞれ Form II および Form III まで切断した¹⁵⁾。

さらに面白いことには, 期待した 29-アポタンパク複合体は明確な塩基特異性を示さなかったが³⁾, 意外にも 28 が顕著なグアニン塩基特異的な DNA 切断活性を示した(図 6)¹⁵⁾。メチルチオグリコレートを添加しないと切断が起こらないので, アルキル化機構によらないと思われる。このようなインターカレーターや糖鎖部分を持たない単純なアルコールが, DNA 塩基を識別して切断できることは画期的な発見である。系は異なるけれども, カリチマイシンやエスペラマイシンの DNA 切断配列特異性を決定する最も重要な因子は, 糖鎖よりむしろそ

注3) その後, 弱いながら 5'-GCT, 5'-GGT のような配列選択性が認められた。

Fig. 6 Autoradiogram of a 10% polyacrylamide/7 M urea slab gel electrophoresis for sequence analysis. The 5'-end-labeled pBR 322 DNA (*Bam* HI-*Sph* I -fragment) was cleaved by 10 mM of the compounds 28 (Lane 4) in the presence of methyl thiothioglycolate (10 mM) at pH 7.5. Lane 1 shows intact DNA, and Lanes 2 and 3, the Maxam-Gilbert sequencing Ladders for C+T and A+G, respectively.

のアグリコン部にあるのではないかとする杉浦の仮説¹⁶⁾を支持する結果でもある。

4. 結 語

第二世代モデルは、単独、またはアボタンパクとの複合化によって面白い DNA 切断活性や抗腫瘍活性を示すようになった。28 の塩基認識を支配する因子を明らかにして、さらに、他の塩基や、5 塩基対以上を識別できる、概念的に新しい配列特異的 DNA 切断分子の設計と合成を進めて行きたい。東北大学医学部の石田、江戸、水柿先生等の息の長い研究を礎にした私達の有機合成化学的アプローチが、癌化学療法研究者に少しでもお役に立てれば幸いである。

謝辞 生物活性を評価して下さったポーラ化成工業(株)の小松秀雄、三木豊彦、檜谷季宏氏、DNA 切断活性を調べて頂いた上、有益な助言を頂いた京都大学化研の杉浦幸雄教授と上杉志成氏、NCS に関していろいろ教えて頂いた東北大学医学部薬剤部の水柿道直教授、江戸清人助教授(現、県立福島医科大学)、ならびに、藤原憲秀博士を始めとする共同研究者諸氏、およびサントリー(株)生医研の石黒正路、今城精一両博士、広島大学理学部の深沢義正教授にも心からお礼申し上げます。

(平成3年7月24日受理)

文 献

- 1) N. Ishida, K. Miyazaki, K. Kumagai, M. Rikimaru, *J. Antibiot.*, **18**, 68 (1955)
- 2) 江戸清人, 石田名香雄, *医学のあゆみ*, **129**, 373 (1984); 江戸清人, 水柿道直, 石田名香雄, *化学*

と生物, **23**, 31 (1985)

- 3) 小出芳夫, *BIO INDUSTRY*, **5**, 339 (1988); Y. Kohgo, H. Kondo, J. Kato, K. Sasaki, N. Tsushima, T. Nishisato, M. Hirayama, K. Fujikawa, N. Shintani, Y. Mogi, Y. Niitsu, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 91 (1990)
- 4) 藤原憲秀, 平間正博, *現代化学*, 7月号, 14頁(1990)
- 5) S.M. Meschwitz, I.H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3047 (1991)
- 6) M. Ishiguro, S. Imajo, M. Hirama, *J. Med. Chem.*, **34**, 2366 (1991)
- 7) T. Tanaka, M. Hirama, M. Ueno, S. Imajo, M. Ishiguro, M. Mizugaki, K. Edo, H. Komatsu, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3175 (1991)
- 8) 高橋和信, 鈴木敏夫, 田中俊之, 平間正博, 投稿準備中
- 9) M. Hirama, K. Fujiwara, K. Shigematsu, Y. Fukazawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4120 (1989)
- 10) K. Fujiwara, A. Kurisaki, M. Hirama, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 4329 (1990)
- 11) T. Tanaka, K. Fujiwara, M. Hirama, *ibid.*, **31**, 5947 (1990)
- 12) M. Tokuda, K. Fujiwara, M. Hirama, *Synlett*, **1991**, 651
- 13) 藤原憲秀, 酒井弘美, 平間正博, 未発表
- 14) K. Fujiwara, H. Sakai, M. Hirama, *J. Org. Chem.*, **56**, 1688 (1991)
- 15) 五味測琢也, 藤原憲秀, 平間正博, 上杉志成, 杉浦幸雄, *J. Am. Chem. Soc.* in press
- 16) Y. Sugiura, Y. Uesawa, Y. Takahashi, J. Kuwahara, J. Golik, T.W. Doyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7672 (1989)

会員増強運動にご協力を!!

本協会では会員増強運動を展開しております。お知り合いの友人・学生に是非ご入会をお勧め下さいますようお願い申し上げます。本協会の財政基盤は会費に大きく依存しています、あなたの行動が明日の協会を支えます。

なお、入会申込書は、本年度協会誌の毎号に綴込みのものをご使用下さい。また、事務局にご一報下されば直ちにお送りいたします。

事務局：社団法人 有機合成化学協会 会員係

〒101 東京都千代田区神田駿河台 1-5 化学会館 (☎03-3292-7621)