FK 506 および FKBP プローブ試薬, (C₈, C₉-¹³C₂)-FK 506 の全合成

—イムノフィリンと、その免疫抑制剤リガンドの化学と生物学—

中 塚 正 志*・Stuart L. Schreiber**

Total Synthesis of FK 506 and an FKBP Probe Reagent, (C₈, C₉-¹³C₂)-FK 506 —Chemistry and Biology of the Immunophilins and Their Immunosuppressive Ligands—

Masashi NAKATSUKA* and Stuart L. SCHREIBER**

Asymmetric syntheses of FK 506 and (C₈, C₉-¹³C₂)-FK 506 are reported. The latter compound was designed to facilitate an investigation of the interactions between FK 506 and its receptor, the recently discovered immunophilin, FKBP. The synthesis involved the preparation of intermediates 7-9 in nonracemic forms. The key coupling reactions included a Cram-selective addition of the vinyl Grignard reagent derived from bromide 9 to aldehyde 8 and the addition of the lithioanion of phosphonamide 7 to aldehyde 43, followed by thermal elimination. Dithiane 44 was then hydrolyzed, and glycolic ester 6(or 6*) was added *via* an aldol reaction that allowed the introduction of ¹³C labels at C₈ and C₉. Elaboration to FK 506 proceeded *via* a Mukaiyama lactamization reaction and a selective deprotection/oxidation sequence, the efficiency of which was critically dependent upon the order of protecting group removal.

¹³C labeled FK 506 (2)-FKBP drug protein complex was examined by ¹³C NMR; the experiments did not show an enzyme bound tetrahedral intermediate, but revealed a noncovalent, fully reversible interaction of the drug with its receptor.

Also delineated are the recent researches aiming at understanding the structural basis for the molecular recognition of immunosuppressants by immunophilins and the biological consequences of their interactions.

Key words : FK 506; Total synthesis; Immunophilin; FKBP; Immunosuppressant; PPIase; Cyclosporin A; Cyclophilin; Rapamycin; Probe reagent.

1. はじめに

ここ数年来、T リンパ球の機能を理解しようとなされた研究は、多くの重要な成果をもたらした。T 細胞表面リセプター¹⁾や核転写因子²⁾のようなシグナル伝達器官の機能・構造研究は、細胞生物学全体の中でも、最も理

解の進んだ分野である。この背景にはモノクローナル抗体や同位体標識した核酸など、有用なプローブ試薬の利用があげられるが、こと細胞質内でのシグナル伝達過程については謎のままである。

1987 年に構造が決められた天然物 FK 506³⁾(1)と、1980 年頃より免疫抑制剤として使われ出し、臓器移植に多大の寄与をもたらしてきた Cyclosporin A⁴⁾(CsA, 3)は、T 細胞の初期活性化遺伝子(IL-2、-3、および-4、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、γ-IF)の発現を、選択的、且つ強力に阻害するので、T 細胞活性化へとつながる事象を研究するのに、これらの薬物は重要な手段となり得る(図1)。

最近の重要な発見として、1 および 3 の細胞質内結合

* 住友製薬(株)研究所()

** ハーバード大学

* Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd. ()

** Department of Chemistry, Harvard University ()

Fig. 1

Fig. 2

蛋白がそれぞれ見つかり、さらにこの FKBP⁵⁾ ($K_d=0.4$ nM) および cyclophilin^{6,7)} ($K_d=30$ nM) が共に、蛋白プロリン *cis-trans* 異性化酵素 (PPIase, 図 2) としての機能を有し、そしてこの作用が薬物により強力に阻害されることが明らかとなった。この異性化酵素阻害作用は非常に選択的で、FK 506 は cyclophilin の異性化作用を阻害しない代わりに、CsA も FKBP を阻害しない (薬物 < 5 μ M)。こうした知見は、シグナル伝達過程に介在すると言われる他の蛋白に関する研究報告⁸⁾ とあわせて、immunophilin とも呼ぶべきこうした蛋白が、T 細胞活性化につながるシグナル伝達過程に深くかかわっていることを示していると考えられる。この仮説を論理的に推し進めてゆけば、イムノフィリンに結合してその作用を阻害することで、自己免疫疾患や臓器移植拒絶に有効な免疫抑制剤を、合理的にデザインできよう。FK 506 は、動物試験から、毒性について危惧されたが、人肝、腎、脾臓移植に際する拒絶反応を抑制するのに安全且つ非常に効果的という報道は、New York Times の一面にふさわしい記事であった⁹⁾。

ペプチド中プロリンアミド結合の *cis-trans* 回転異性

体間の相互変換には 15~20 Kcal のエネルギーが必要である¹⁰⁾。FKBP や cyclophilin がこれを触媒するという事は、こうした酵素がプロリン含有残基を認識することであり、この認識には、酵素-プロリルテトラヘドラル中間体か、または、歪んだアミド中間体かを経ていると考えられる (図 3)。いずれの中間体も、アミド共

Fig. 3

役状態でなくなり、異性化のための回転エネルギーは小さくなっており、イムノフィリンの触媒作用の説明となり得る。イムノフィリンの分子認識の対象となる基質には、FK 506 や CsA のような天然物、蛋白、合成ペプチド^{47b)}をはじめ非天然有機分子⁵³⁾が知られている。例えば、Cyclophilin は蛋白基質 RNaseA の折れたたみを触媒す

るし¹¹⁾, rapamycin(48)はFKBPに強く結合し, その異性化作用を阻害する⁴⁹⁾。我々はFK 506とFKBP間の分子認識についての理解を得るために, FK 506の不斉全合成と, プローブ試薬として8, 9位両炭素が¹³Cで標識された化合物(C₈, C₉-¹³C₂)-FK 506(2)の合成を行った^{12, 13)}。

2は以下のような理由により目的物として選んだ。ピペコリン酸(ホモプロリン)アミドカルボニル基は, さらに α 位カルボニル(と β 位ヘミケタール)につながり, この8, 9位カルボニル基は高い求電子性を持っていると思われる。そこで一つの可能性として, FK 506による阻害作用の発現は, 先述したようなFKBP認識部位における安定化テトラヘドラル中間体の形成が考えられる。このようなカルボニル α 位の求電子基に, 酵素の求核基が反応して共有結合を生成する例は, クロロメチルケトンとパパインの錯体において, X線構造解析により明らかにされている¹⁴⁾。もしテトラヘドラル中間体を実在するならば, 水中におけるFK 506-FKBPの¹³C NMRは, sp²炭素がsp³炭素にかわる訳だから, 容易に判断がつく筈である。

FKBPは, mRNAから翻訳された後には修飾を受けて

いない一本鎖蛋白である。我々は人FKBP相補DNAのcloning^{15, 16)}とoverexpression¹⁵⁾を行うにあたり, 新たに開発したECPCR法¹⁷⁾(後述)を利用した。

この総説においては, 合成¹⁸⁾の他, プローブ試薬2を用いたFKBPとの錯体の¹³C NMRの結果¹⁹⁾および, 我々の研究室でのこの分野での成果を中心に簡単に解説したいと思う。

2. FK 506の全合成

2.1. FK 506の全合成デザイン 1, 2の収束的な合成手法として, 我々は部分5~9をそれぞれ合成し, それらを選択的に結合させる手段を取った(図4)。各部分への切断は, 対称性の考慮により, 2方向延伸反応²⁰⁾が利用できるようにして, 大幅な反応段数の減少をはかり, また, 入手可能な¹³Cラベル化合物から容易に誘導できる中間体を用いた。

C1-N7ピペコリン酸部分5は, 酒石酸によるDL体アミノ酸の分割後²¹⁾, tBoc化で, C8-C9部分6は, プロモ酢酸(両炭素を¹³Cでラベルした化合物も比較的安価で入手できる)を対応するベンジルアルコールで置換後ジアゾメタン処理して得られる。

Fig. 4

Fig. 5

2.2. シクロヘキサン部分9のグルーブおよび面選択的付加反応による触媒の不斉合成^{19a, c)}(図5) ジビニルカルビノール10の触媒の不斉エポキシ化は、最初の不斉合成²²⁾に、速度論的分割を組み合わせたもので²³⁾、生成物を非常に高い光学純度で得ることができる。アルコールの p -メトキシベンジル(PMB)保護は、 $0^\circ C$ 臭化 p -メトキシベンジルを用いると Payne 転位体を生じずきれいに進行し、続くエポキシドの位置選択的開裂による2炭素延長反応では、 $BF_3 \cdot OEt_2$ 共存下エトキシアセチレンを付加させ²⁴⁾、反応粗生成物をメチル化することで、目的物13へと高収率で誘導できた。次に13のアセチレンを水銀触媒により水和し、PMBの脱保護、続く δ -ラクトン環化によって15へと誘導した。シリルケテンアセタールの調製と、その Ireland-Claisen 転位反応を行い、ジアゾメタン処理でメチルエステル17とした。ハイドロボレーションは文献²⁵⁾通りの立体位置選択性で進行し、続く3工程の後19へと導いた。アルデヒドの

アセチレンへの変換は、ジアゾフォスフォネート試薬²⁶⁾を用い、メチル基の導入と、続く ZrH 付加/ブROM化反応⁴⁰⁾によって位置立体選択的に目的物9が合成された。

2.3. C20-C26部分8の不斉合成^{18k)}(図6) 22の野依還元²⁷⁾により生じた不斉中心は、以後で新たに4つの不斉中心を誘導することになる。 β -ヒドロキシエステル23の α -アリル化²⁸⁾は非常に選択的に進行する。ただし、メチルエステルが、リチウム試薬に混在するブトキシドと容易に交換をおこすため、用いる LDA は、Li 金属、ジイソプロピルアミンおよび α -メチルスチレンによる調製法²⁹⁾が必須である。還元して得られたジオールを、無水系 DDQ 酸化条件³⁰⁾に付し、分子内環化した25を得た。ヨードエーテル化によるアルコールオレフィンの保護(4.75/1のヨードメチル基ジアステレオマー混合物)、DIBAL による1, 3-ジオキサン環の位置選択的開裂、そして Swern 酸化によって26が得られる。

Fig. 6

クロチルスズはその立体化学によらずエリスロ選択的に付加することが知られている³¹⁾。そして基質アルデヒド 26 とルイス酸とで環状中間体をつくり、立体障害の少ない側よりクロチル基が攻撃すれば、目的とした化合物 28 が得られるはずである(図 7)。そこで我々は立体選択的に C 24, C 25 の不斉中心を誘導すべく、様々のル

Fig. 7

イス酸(TiCl_4 , MgBr_2 , Et_3AlCl 等), 滴下法, プレ錯化法を検討したが³²⁾, 唯一 SnCl_4 を用いた時だけ目的物 28 を 60% で与えた。他に, 位置異性体付加物 29 も 20% で生じる。しかしながら, この合成法は, スケールアップすると再現性がよくない。異性体 29 の分離も非常に困難になることから新たな条件検討が必要となった。

アリルシランの β -アルコキシアルデヒドへの付加は, $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ を用いた時, “キレートコントロール” 付加物を与える³³⁾。 BF_3 が 5 配位をとるとは考えにくいので, 弱い静電的な相互作用が効いていると考えられる。反応中間体もはっきりとはわからないし, またクロチルシランがスレオ選択的な付加をするという点も違うけれど, 実際反応を行ってみると, 幸運にも, 29 は全く生じな

いうえ, フラン環上のヨードメチル基の立体についても単一な 28 が 68% の収率で, カラム分離精製できた。後はアルコールをトリイソプロピルシリル(TIPS)基で保護した後オゾン分解して 8 が得られる。

2.4. C10-C19 部分 7 の 2 方向延伸反応による合成
我々の合成法は, クラス C2 方向延伸反応²⁰⁾を利用する。この方法は, 同時に 2 方向に鎖を伸ばしていくので, もし末端の区別反応が可能となれば, 1 方向段階的な延伸反応に比べて, 飛躍的なステップ数の節約となる。この方法論の有用性は Streptovaricin A アンサ鎖の合成³⁴⁾, Mycotin A ポリオール部分の合成³⁵⁾や, Hikizimycin の全合成³⁶⁾から明らかである。

合成は C2 対称軸を有する L-アラビトール 30 から出発した¹⁸⁾(図 8)。Moffatt の試薬によりクロロアセテート 31 とし, 加水分解によりビスエポキシドとする。32 の両エポキシドを, エトキシアセチレンアニオンで開裂, アセチレンの水和と γ -ラクトンへの閉環を一挙に行って 33 へと導く。立体選択的なジエノレートのメチル化³⁷⁾の後, 一たん水酸基の保護基をベンジルへ変換する。(ベンジル保護 33 のジメチル化は立体選択性悪く, 一方シリル保護基のままでは 34 からの反応条件に耐えない)ラクトンの加水分解後, すべての水酸基, カルボキシル基をメチル化すると 35 が得られるが, 中央のベンジル基を脱保護して得られたアルコールのラクトン化は, グループ選択的な末端区別反応により, ジアステレオマー選択的な反応が可能かどうかという鍵となる反応であ

Fig. 8

Fig. 9

る³⁸⁾。選択的なラクトン化はPPTS触媒により達成できた(図9)。この過程は中央の chirotopic だが、不斉中心でない炭素を stereogenic にする。36からの5工程は、問題なく進行して39を与えた。39と、対応するアニオンとの置換反応により7へ誘導した他、C19-C20 オレフィン合成検討用に40, 41も合成した。

化合物7, 40あるいは41の合成について、2方向延伸反応と、1方向段階的延伸反応との比較が可能である。上記の方法では、7はアラビトールより17段階6.0%の通算収率で得ることができたが、別法によれば、40は28段階通算2.3%¹⁸ⁱ⁾で、41は25段階通算3.1%^{18a)}で合成されている。

2.5. C27-C28 3置換オレフィンの合成^{18o)} ビニルプロマイド9からハロゲン金属交換で生成するビニル金属はCram 選択的にアルデヒドに付加すると予想できる(図10)。実際には、アルキルリチウムとの変換で生じたビニルリチウムは、基質中のヨードエテル部が先に反応し目的物をわずかししか与えなかったが、ビニルマグネシウムに変換後反応させると、77%の収率、望ましい立体選択性($\alpha/\beta=4.5/1$)で付加体を与えた。ジアステレオマーはRfが全く違うので、カラム分離は容易である。

生じた2級アルコールをピペコリン酸誘導体5と低温で縮合させた後、ヨードエテル部を還元的に開裂、酸

化して 43 とした。

2.6. C19-C20 オレフィンの合成 C19-C20 オレフィン合成にあたっては, 7 の他, 40, 41 から発生させた S=O または P=O の α -アニオンで, 縮合を検討したが, 7 が最も効率的であった。

7 の α -リチオ化物とアルデヒド 43 との反応では, 2 つのジアステレオマー混合物を与えるが, 極性の低い方の混合物からは加熱によって “(Me₃N)₂PO₂H” が脱離し, 目的トランス体 44 (36% 通算収率) を与え, 極性の高い方からはシス体を生じた。

2.7. C8-C9 位の導入, 大環状閉環そして合成の完了 (図 10) 44 のジチアン加水分解によるアルデヒドの合成は簡単にはゆかず, 収率は試みたすべての方法で 35% を越えなかった。よって無水メタノール中 Stork の試薬⁴¹⁾ (PhI(OTFA)₂) で一たんジチアンをジメチルアセタールとした後酸加水分解する, 2 段階法を取らざるを得なかった。

α -プロモ酢酸よりグリコール酸誘導体を幾つか合成したが, 結局 O-2,4-ジメトキシベンジルグリコール酸メチルだけが, 後の段階で高収率に脱保護が可能な中間体を与えることがわかった。試みた C2 ユニット (表 1)

のうち, 反応性の低い *p*-メトキシベンジル (PMB) や 3,4-ジメトキシベンジル (3,4-DMB) 置換体を用いた時には, DDQ による脱保護条件下, 10 位水酸基を保護している TES がはずれてしまうらしい。

44 のジチアン加水分解で得られたアルデヒドと, 6 のリチウムエノレートとのアルドール反応は良好に進行し, 粗生成物は LiOH で処理して, 付加体のメチルエステル部を選択的に加水分解する。*t*Boc 基脱保護のため, 粗有機層抽出物を TESOTf で処理し, シリカゲルカラムの後 (中間体シリルカーバメート, C8 位シリルエステルは加水分解される) 得られた C10 位 TES 保護, C9, C10 位立体異性体混合のアミノ酸を向山法⁴²⁾で環化させると, マクロラクタム 46 をアルデヒドより通算収率 53% で得ることができた。4 つの立体異性体混合物であるマクロラクタム (C9 位 PMB 保護体) では, シリカゲルカラムによりそれぞれが分離できたが, 個別に DDQ 酸化に対する反応性をみても大差がないため, 以後の反応は混合物で行う方が簡便である。DDQ で 9 位 2,4-DMB と 22 位 PMB を脱保護できたが再現性は乏しかった (15~50%)。9 位を PMB や 3,4-DMB 基で保護した場合, その脱保護はなおさら困難であり, これは多分

Table 1

Two Carbon Aldol ReagentComments

Aldol reaction satisfactory, but *t*Bu ester could not be removed.

Aldol reaction (with dianion) and subsequent cyclization satisfactory, but PMB could not be removed.

Aldol reaction (with dianion) and subsequent cyclization satisfactory, but DMB removal was low yielding.

Unstable; 2,4-DMB labile to acid.

Trichloroethyl ester unstable to LDA.

Aldol reaction satisfactory, but TES ether was unstable to silica gel aging.

6

Best reagent studied. See text.

隣接 C8 位カルボニルの電子吸引性によっている⁴³⁾と思われる、新海らのほぼ同様の化合物において、9 位 PMB がうまく脱保護されている¹³⁾のとは好対照である。得られたジオールを Dess-Martin 試薬(DMP)で酸化、10 位 TES 基を脱保護して、再び DMP 酸化した後、トリケトン 47 を HF 処理して、最終目的物 FK 506(1)が得られた。

こうして一応の全合成は達成されたが、上述の脱ベンジル化反応は改善せねばならない。そこで我々は、低収率の原因が、TES 保護基の脱落にあると考え、ベンジル基の脱保護より前に、TES を加水分解し、さらにケトンへ酸化した後、DDQ による脱ベンジル化反応を試みた。この方法は、C10 位の立体異性体の混ざりを早い段階でなくし、異性体の数を 4 つから C9 位の 2 つだけにして、反応の所見を容易にしたばかりか、DDQ 脱保護において、再現性よく(70~75%)ジオールを与えることを可能にした。生成した α -ヒドロキシ- β -ケトアミドの 2 つのジアステレオマーは、非常に違った極性を示したが、それぞれ DMP 酸化で同一のトリケトン 47 となる。

白色の粉末として得られた、合成 FK 506 は、500 MHz ¹H NMR, 125 MHz ¹³C NMR, IR, 旋光度がすべて天然産のものと一致した。

8, 9 位 ¹³C ラベルした FK 506(2)は、ラベルした 6 を使用し、全く同様の反応を繰り返して合成した。

3. FKBP

人 FKBP は、最初人脾臓細胞質抽出物を FK 506 アフィニティーマトリックス上に展開して取り出した^{5a, 45)}。これから N 末 16 残基のアミノ酸配列が確認されたが、続いてこの情報を基にしたオリゴヌクレオチドを合成し、それらを primer とした 4 段階の PCR (polymerase chain reaction)⁴⁴⁾を行って、人の全 FKBP cDNA を決定した¹⁵⁾。多量の蛋白を得るためには、その遺伝子コードを *E. coli* のプラスミドに組み込み、かつ、遺伝子が実際翻訳されるようにしなければならない。そのためには、翻訳されるべき遺伝子コードの前後に制限酵素切断部位と、*E. coli* 中で蛋白産生を促すオリゴヌクレオチド配列を導入しておけばよい。ECPCR 法¹⁷⁾とは(図 11)、*E. coli* 中での cloning と overexpression に必要な情報を持った、Expression Cassette を含むプライマーを用いる PCR 法である。得られた cDNA 2 重鎖は、適当なエンドヌクレアーゼ(EcoRI と Hind III, 図 12)を作用させて両端を粘着性末端とし、同様の処理で挿入部分をつくっておいたプラスミドに組み込む。*E. coli* にプラスミドを移し、増殖させ、産生する多くの蛋白中より目的とする蛋白を取り出す。

hrFKBP はアミノ酸 107 残基よりなる分子量 11819 の一本鎖蛋白である。このようにして数十 mg の rFKBP を容易に手に入れることができる。

Fig. 11

Fig. 12

4. ^{13}C ラベル FK 506 (2) と FKBP との NMR 実験

2 は $CDCl_3$ 中アミド結合回転異性体混合物として存在し, *cis* 体が主である。極性溶媒 (MeOH) 中でも同様のパターンが観察され, 漸次重水を添加しても同じで, ~40% を越えれば不均一になってしまうけれど, それ以下の濃度においては, 水和物やヘミケタールに相当するピークは全く観測されない。

2 はリン酸緩衝液にも殆ど溶けないけれど, ここへ小過剰の rFKBP を添加するとただちに系は均一となる。そしてその ^{13}C NMR から次の2つのことが容易にわかる。まず, テトラヘドラル中間体が示すと思われる δ 90~130 ppm の領域には, 何ら新たなピークを見い出せない。そして, もとの領域に1組のシグナルだけが観察できる (図13)。これは, 薬物蛋白複合体では, FK 506 が一方の回転異性体だけで存在していることを示し, またシフト値はケトンとアミド官能基がそのまま残っていることを示唆する。この錯体をグアニジン塩酸塩で変性後, 薬物をクロロホルム抽出すると, ほぼ定量的に, 未変化の2が回収される。以上の実験から, FK 506 と FKBP との相互作用は可逆的であり, 求電子的カルボニルに対し共役結合を生成したような中間体はできないと結論できる。それではどのような中間体なのだろうか。

Cyclophilin⁶⁾ は分子量 17737 で FKBP とは全く相同性のない蛋白であるが, 免疫に深くかわり, FKBP と同

じく PPIase 作用を有している。Fischer ら^{7b)} は水銀化合物で cyclophilin を処理すると, 活性中心のシステインが変性し, PPIase 作用がなくなると報じ, PPIase 作用の機構としてアミドカルボニルに対するシステイン付加によるテトラヘドラル中間体の生成を提唱した。しかし, その後我々は cyclophilin 中の4つのシステインを1つずつアラニンに変異させた4つの変異蛋白をつくり, その PPIase 作用を検討した結果, 作用に殆ど差異のないことを明らかにした⁴⁶⁾。つまり, cyclophilin の PPIase 作用にはシステイン残基は何ら関係のないことが明白である。機構として, 我々は歪んだアミド結合中間体 (induced fit mechanism)⁴⁷⁾ を提唱している (図3)。

FK 506 と FKBP との相互作用はどうであろうか。FK 506 は結晶構造において2つのカルボニルの二面体角は約 92° である。通常 α -ジケト化合物は二面体角 180° の *anti* 型が安定であるが, *N*, *N*-ジアルキル- α -ケトアミドの場合, $A^{1,3}$ 歪みのため不安定化すると考えられる。FK 506 の9位カルボニルは隣のアミド平面とホモプロリン環に対してほぼ直交する形となるが, これは歪んだペプチジルプロリルアミドのカルボニルがプロリン環の面とほぼ直交しているのと似ている。本質的な違いは FK 506 の構造が安定構造であるのに対し, ペプチドの場合は基底状態より 15~20 Kcal¹⁰⁾ エネルギー的に不安定な構造という点である (図14)。我々は FK 506 の構造が, こうした蛋白の歪んだアミド構造に酷似し, リセプターにうまくはまるのだろうと考えている。

Fig. 13

Perpendicular dicarbonyl:

Fig. 14

Fig. 15

5. Immunophilins の作用は

FKBP や Cyclophilin は T 細胞におけるシグナル伝達過程においてどのような役割を果たしているのだろうか。

Rapamycin (48) は古い化合物⁴⁸⁾であるが、骨格は部分的に FK 506 と非常に類似している。この化合物も強い免疫抑制作用を示し⁴⁹⁾、体内における主たるリセプターは FKBP ($K_d = 0.2 \text{ nM}$) である⁵⁰⁾ことがわかっているが、その作用機作は全く違う。T 細胞リセプター (TCR) が抗原によって刺激を受けると、未知の機構によってシグナルは細胞質を通して核へと伝えられる。刺激は、遺伝子の転写を制御する因子を活性化して、例えばリンホカイン IL-2 遺伝子の転写、蛋白の産生分泌を引き起こす。IL-2 は、T 細胞表面に現れた IL-2 リセプターを刺激するが、このリンホカインリセプター (LKR) からのシグナルも未知の機構によって、細胞質を通して核へ伝達される。そして別の遺伝子が活性化され、蛋白の産生、細胞の分化、増殖へとつながる。FK 506 は CsA と同じく TCR シグナル経路を阻害するのに対し^{49, 51)}、ラバマイシン (RP) は LKR シグナル経路を阻害する (図 15)。そして FK 506 による阻害作用の発現は RP によって抑えられ、逆に RP による LKR シグナル伝達阻害は FK 506 の添加により抑制される。

FKBP と Cyclophilin は PPIase 作用があり、これが、FK 506 と RP、後者では CsA によって強力に阻害され

ることが知られている。これらの蛋白はかなり多量に遍在しているらしく、人 T 細胞株 Jukart では細胞質中濃度が 5 nM 程度と見積られている⁵²⁾。しかしながら FK 506 も RP も免疫抑制作用の発現は nM 以下 ($\text{IC}_{50} \sim 0.5 \text{ nM}$) であり、PPIase 阻害作用を直接免疫抑制作用と結びつける必然性は乏しい。

こうした事実を検証するために 506 BD (49) が合成された⁵³⁾ (図 1)。この非天然リガンドは、FK 506 のリセプター結合部分の 3 次元構造を模してつくられたが、FK 506 の 16~26 位にかけての部分が単純化されている。506 BD は FKBP に対し、高い親和性 ($K_d = 20 \text{ nM}$) を示しかつ PPIase 作用を阻害 ($K_i = 5 \text{ nM}$) したけれど、免疫抑制作用は全く示さなかった。ただし、506 BD は、FK 506 および RP によるそれぞれの免疫抑制作用を阻害した。

以上の事実から、我々は次のような推論を行っている。つまり、遍在蛋白である FKBP や cyclophilin は、その基本作用は蛋白の折り畳みに必要な foldases であり、免疫抑制剤リガンドがついた時はじめて T 細胞活性化経路を阻害するようになる。そしてその effector 部分は、FK 506 または RP の、FKBP に結合する部分の反対側の部分ではないかという推論である。

6. おわりに

CsA の発見は臓器移植に新しい時代を画した。そしてより効果的な薬物を見い出すべく配座解析からの誘導

体づくりが行われている⁵⁵⁾。しかしながら CsA-Cyclophilin 錯体上の CsA 配座が NMR 的に解析されて⁵⁶⁾, それが CsA の結晶解析データとは全く違うらしいことがわかってきており, さらに錯体の X 線解析も行われつつある⁵⁷⁾ことから, こうして新しく得られる知見は新薬創製に, より合理的な情報をもたらすであろうと期待される。FK 506 は, その効果の強さから, 新たな免疫抑制剤として期待されている。そして CsA, RP など天然化合物は免疫を抑制するという点は同じでも, それぞれ作用機作が違っており, T 細胞活性化のためのシグナル伝達機構の解明に有用な試剤となっている。

ここで報告した研究は, 現代化学と分子生物学の手法を基にして, 天然物とその同族体を合成し, 一方で生体内蛋白を量産あるいは変異させて, T 細胞のシグナル伝達過程を理解しようとしたものである。まだまだ多くの未知の部分の解明が必要であるが, 進展は着実だと思われる。我々は FK 506-FKBP 錯体の NMR による構造解析³⁹⁾と X 線解析⁵⁹⁾も完了しており, より分子のレベルの相互作用について理解が進むものと期待している。

謝辞 本研究の遂行にあたって, 協力いただいた研究室の皆様, 特に合成関係では, J.A. Ragan, T. Sammakia, D.B. Smith, D.E. Uehling の各博士に, FKBP との NMR 実験においては, M.K. Rosen, R.F. Standaert の学生諸氏と A. Galat 博士に深く感謝致します。

(平成 3 年 3 月 22 日受理)

文 献

- 1) W. Knapp, P. Rieber, B. Dorken, R.E. Schmidt, H. Stein, A.E.G. Kr. v.d. Borne, *Immunol. Today*, **10**, 253 (1989)
- 2) G.R. Crabtree, *Science*, **243**, 355 (1989)
- 3a) H. Tanaka, A. Kuroda, H. Marusawa, H. Hatanaka, T. Kino, T. Goto, M. Hashimoto, T. Taga, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5031 (1987)
- b) T. Kino, H. Hatanaka, M. Hashimoto, M. Nishiyama, T. Goto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka, *J. Antibiot.*, **40**, 1249 (1987)
- 4a) J. Showstack, P. Katz, W. Amend, L. Bernstein, H. Lipton, M. O'Leary, A. Bindman, O. Salvatierra, *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1086 (1989)
- b) T.E. Starzl, A.J. Demetris, D.V. Thiel, *ibid.*, **321**, 1092 (1989)
- c) J.O. Oates, A.J.J. Wood, B.B. Kahan, *ibid.*, **321**, 1725 (1989)
- 5a) M.W. Harding, A. Galat, D.E. Uehling, S.L. Schreiber, *Nature*, **341**, 758 (1989)
- b) J.J. Siekierka, S.H.Y. Hung, M. Poe, C.S. Lin, N.H. Sigal, *ibid.*, **341**, 755 (1989)
- c) R.B. Freedman, *ibid.*, **341**, 692 (1989)
- 6a) R.E. Handschumacher, M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge, D.W. Speicher, *Science*, **226**, 544 (1984)
- b) V.F.J. Quesniaux, M.H. Schreier, R.M. Wenger, P.C. Hiestand, M.W. Harding, M.H.V. Van Regenmortel, *Transplantation*, **46**, 23 S (1988)
- c) M.W. Harding, R.E. Handschumacher, *ibid.*, **46**, 29 S (1988)
- 7a) N. Takahashi, T. Hayano, M. Suzuki, *Nature*, **337**, 473 (1989)
- b) G. Fisher, B. Wittmann-Liebold, K. Land, T. Kiefhaber, F.X. Schmid, *ibid.*, **337**, 476 (1989)
- 8a) B.H. Shieh, M.A. Starnes, S. Seavello, G.L. Harris, C.S. Zuker, *Nature*, **338**, 67 (1989)
- b) S. Schneuwly, R.D. Shortridge, D.C. Larrivee, R. Ono, M. Ozaki, W.L. Pak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5390 (1989)
- c) M. Tropsch, *J. Biol. Chem.*, **263**, 14433 (1988)
- 9a) L.K. Altman, *New York Times*, October 18, 1989, p.1
- b) T. Starzl, J. Fung, R. Venkatarammam, S. Todo, A.J. Demetris, A. Jain, *The Lancet*, 1000 (1989)
- c) A.W. Thomson, *Immunol. Today*, **11**, 35 (1990)
- d) 落合武徳, サイエンス, **62** (1989)
- e) 木野 亨, 田中洋和, 化学と工業, **44**, 88 (1991)
- 10) R.E. Galardy, J.R. Alger, M. Liakopoulou-Kyriakides, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **19**, 123 (1982)
- 11) K. Lang, F.X. Schmid, G. Fisher, *Nature*, **329**, 268 (1987)
- 12a) M. Nakatsuka, J.A. Ragan, T. Sammakia, D.B. Smith, D.E. Uehling, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5583 (1990)
- b) J.A. Ragan, R.F. Standaert, S.L. Schreiber, *Strategies and Tactics in Organic Synthesis*, Vol.3, in press
- 13) For the first total synthesis of FK 506, see :
a) T.K. Jones, S.G. Mills, R.A. Reamer, D. Askin, R. Desmond, R.P. Volante, I. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1157 (1989)
b) T.K. Jones, R.A. Reamer, R. Desmond, S.G. Mills, *ibid.*, **112**, 2998 (1990)
- 14) J. Drenth, K.H. Kalk, H.M. Swen, *Biochemistry*, **15**, 3731 (1976)
- 15) R.F. Standaert, A. Galat, G.L. Verdine, S.L. Schreiber, *Nature*, **346**, 671 (1990)
- 16) N. Maki, F. Sekiguchi, J. Nishimaki, K. Miwa, T. Hayano, N. Takahashi, M. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5440 (1990)
- 17a) K.D. MacFerrin, M.P. Terranova, S.L. Schreiber, G.L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1937 (1990)

- b) S.L. Schreiber, G.L. Verdine, *Tetrahedron*, **47**, 2543 (1991)
- 18a~r) For a listing of FK 506 synthetic studies through March, 1990, see: reference 12a.
- s) R.-L. Gu, C.J. Sih, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3283, 3287 (1990)
- t) M. Stocks, P. Kociensk, *ibid.*, **31**, 1637 (1990)
- u) A.V. Rama Rao, T.K. Chakraborty, K. Laxma Reddy, *ibid.*, **31**, 1439 (1990)
- v) A.V. Rama Rao, T.K. Chakraborty, A.V. Purandare, *ibid.*, **31**, 1443 (1990)
- w) P. Kociensk, M. Stocks, D. Donald, M. Perry, *Synlett*, **1**, 38 (1990)
- x) R.G. Linde II, M. Egbertson, R.S. Coleman, A. Brian Jones, S.J. Danishefsky, *J. Org. Chem.*, **55**, 2771 (1990)
- y) A. Villalobos, S.J. Danishefsky, *ibid.*, **55**, 2776 (1990)
- z) A. Brian Jones, A. Villalobos, R.G. Linde II, S.J. Danishefsky, *ibid.*, **55**, 2786 (1990)
- @ R.E. Ireland, P. Wipf, T.D. Roper, *ibid.*, **55**, 2284 (1990)
- 19) M.K. Rosen, R.F. Standaert, A. Galat, M. Nakatsuka, S.L. Schreiber, *Science*, **248**, 863 (1990)
- 20) S.L. Schreiber, *Chem. Scr.*, **27**, 563 (1987)
- 21) V.S. Rodwell, *Methods Enzymol.*, **17**, Part B, 174 (1971)
- 22) Y. Gao, R.M. Hanson, J.M. Klunder, S.Y. Ko, H. Masamune, K.B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5765 (1987)
- 23a) S.L. Schreiber, T.S. Schreiber, D.B. Smith, *ibid.*, **109**, 1525 (1987)
- b) D.B. Smith, Z. Wang, S.L. Schreiber, *Tetrahedron*, **46**, 4793 (1990)
- 24) M. Yamaguchi, I. Hirao, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 391 (1983)
- 25) D.A. Evans, G.C. Fu, A.H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6917 (1988)
- 26a) D. Seyferth, R.S. Marmor, P. Hilbert, *J. Org. Chem.*, **36**, 1379 (1971)
- b) E.W. Colvin, B.J. Hamill, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 151 (1973)
- c) *Idem*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 869 (1977)
- d) J.C. Gilbert, Y. Weerasooriya, *J. Org. Chem.*, **44**, 4997 (1979)
- 27) R. Noyori, T. Ohkuma, M. Kitamura, H. Takaya, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5856 (1987)
- 28a) G. Frater, U. Muller, W. Gunther, *Tetrahedron*, **40**, 1269 (1984)
- b) D. Seebach, J. Aebi, D. Wasmuth, *Org. Synth.*, **63**, 109 (1984)
- 29a) M.T. Reetz, W.F. Maier, *Liebigs. Ann. Chem.*, 1471 (1980)
- b) J. Mulzer, P. De Lasalle, A. Chucholowski, U. Blaschek, G. Bruntrup, I. Jibril, G. Huttner, *Tetrahedron*, **40**, 2211 (1984)
- 30) Y. Oikawa, T. Nishi, O. Yonemitsu, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 4037 (1983)
- 31) Y. Yamamoto, H. Yatagai, Y. Ishihara, N. Maeda, K. Maruyama, *Tetrahedron*, **40**, 2239 (1984)
- 32a) G.E. Keck, D.E. Abbott, M.R. Wiley, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 139 (1987)
- b) G.E. Keck, E.P. Boden, *ibid.*, **25**, 265, 1879 (1984)
- c) G.E. Keck, D.E. Abbott, *ibid.*, **25**, 1883 (1984)
- d) G.E. Keck, D.E. Abbott, E.P. Boden, E.E. Enholm, *ibid.*, **25**, 3927 (1984)
- 33) M.T. Reetz, K. Kessler, A. Jung, *ibid.*, **25**, 729 (1984)
- 34) Z. Wang, S.L. Schreiber, *ibid.*, **31**, 31 (1990)
- 35) S.L. Schreiber, M.T. Goulet, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 8120 (1987)
- 36) N. Ikemoto, S.L. Schreiber, *ibid.*, **112**, 9657 (1990)
- 37) S. Takano, K. Chiba, M. Yonaga, K. Ogasawara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1980, 616
- 38a) T.R. Hoyer, D.P. Peck, P.K. Trumper, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5618 (1981)
- b) T.R. Hoyer, D.P. Peck, T.A. Swanson, *ibid.*, **106**, 2738 (1984)
- 39) G.D. Van Duyn, R.F. Standaert, P.A. Karplus, S.L. Schreiber, J. Clardy, *Science*, **252**, 839 (1991)
- 40) E.J. Corey, E.J. Trybulski, L.S. Melvin, Jr., K.C. Nicolaou, J.A. Secrist, R. Lett, P.W. Sheldrake, J.R. Falck, D.J. Brunelle, M.F. Haslinger, S. Kim, S. Yoo, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4618 (1978)
- 41) G. Stork, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 287 (1989)
- 42) E. Bald, K. Saigo, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.*, 1163 (1975)
- 43) R.W. Armstrong, J.-M. Beau, S.H. Cheon, W.J. Christ, H. Fujioka, W.-H. Ham, L.D. Hawkins, H. Jin, S.H. Kang, Y. Kishi, M.J. Martinelli, W.W. McWhorter, M. Mizuno, M. Nakata, A.E. Stutz, F.X. Talamas, M. Taniguchi, J.A. Tino, K. Ueda, J. Uenishi, B. White, M. Yonaga, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7530 (1989)
- 44) R.K. Saiki, S. Sharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, *Science*, **230**, 1350 (1985)
- 45a) M.G. Goebel, *Cell*, **64**, 1051 (1991)
- b) M.W. Albers, J. Liu, S.L. Schreiber, *Nature*, **351**, 527 (1991)

- 46) J. Liu, M.W. Albers, C.-M. Chen, S.L. Schreiber, C.T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2304 (1990)
- 47a) R.K. Harrison, R.L. Stein, *Biochemistry*, **29**, 1684 (1990)
- b) M.W. Albers, C.T. Walsh, S.L. Schreiber, *J. Org. Chem.*, **55**, 4984 (1990)
- 48a) D.C.N. Swindells, P.S. White, J.A. Findlay, *Can. J. Chem.*, **56**, 2491 (1978)
- b) J.A. Findlay, L. Radics, *ibid.*, **58**, 579 (1980)
- c) *Idem*, *ibid.*, **59**, 49 (1981)
- 49) B.E. Bierer, P.S. Mattila, R.F. Standaert, L.A. Herzenberg, S.J. Burakoff, G. Crabtree, S.L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9231 (1990)
- 50) H. Fretz, M.W. Albers, A. Galat, R.F. Standaert, W.S. Lane, S.J. Burakoff, B.E. Bierer, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 1409 (1991)
- 51) B.E. Bierer, S.L. Schreiber, S.J. Burakoff, *Transplantation*, **49**, 1168 (1990)
- 52) J.J. Siekierka, M.J. Staruch, S.H.H. Hung, N.H. Sigal, *J. Immunol.*, **143**, 1580 (1989)
- 53) B.E. Bierer, P.K. Somers, T.J. Wandless, S.J. Burakoff, S.L. Schreiber, *Science*, **250**, 556 (1990)
- 54) S.L. Schreiber, *ibid.*, **251**, 283 (1991)
- 55a) S.L. Schreiber, N.J. Anthony, B.D. Dorsey, R.C. Hawley, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 6577 (1988)
- b) K.E. Miller, D.H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8351 (1989)
- c) D.H. Rich, C.-Q. Sun, D. Guillaume, B. Dunlap, D.A. Evans, A.E. Weber, *J. Med. Chem.*, **32**, 1982 (1989)
- 56a) G. Wider, C. Weber, R. Traber, H. Widmer, K. Wuthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9015 (1990)
- b) S.W. Fesik, R.T. Gampe, Jr., T.F. Holzman, D.A. Egan, R. Edalji, J.R. Luly, R. Simmer, R. Helfrich, V. Kishore, D.H. Rich, *Science*, **250**, 1406 (1990)
- 57) M. Zurini, J. Kallen, V. Mikol, G. Pfluegl, J.N. Jansonius, M.D. Walkinshaw, *FEBS Lett.*, **276**, 63 (1990)
- 58a) T.J. Wandless, S.W. Michnick, M.K. Rosen, M. Karplus, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2339 (1991)
- b) S.W. Michnick, M.K. Rosen, T.J. Wandless, M. Karplus, S.L. Schreiber, *Science*, **252**, 836 (1991)
- c) M.K. Rosen, S.W. Michnick, M. Karplus, S.L. Schreiber, *Biochemistry*, **30**, 4774 (1991)

勤務先・住所などの変更についてお願い

住所、勤務先などに移動のあった場合は下記ひな型に従い「はがき」でご連絡下さるようお願い致します。変更通知のない場合は当協会からの諸通知や、会誌などが届きません。会員諸氏のご協力をお願い申し上げます。

会 員 No.	氏 名	
新・勤務先(所在地) ✧ 郵便番号ならびに電話番号	旧	
新・住 所(自宅) ✧ 郵便番号ならびに電話番号	旧	
◎連絡先は○を付けご指定下さい。		

あて先 有機合成化学協会 会員係 106 東京都港区麻布台 2-2-12 三貴ビル ☎03-3582-4293
特にお願ひ!!

会社の寮、公営・(集合)住宅等の入居者は名称、棟号、室番号まで住所を明記して下さい。