シグナル伝達阻害剤の探索, 合成および生物活性

梅澤 一夫*・渡辺 匠**

Isolation, Synthesis, and Biological Activities of Signal Transduction Inhibitors

Kazuo UMEZAWA* and Takumi WATANABE**

Oncogene product functions are mainly disturbance of cellular signal transduction and modification of specific gene expression. Several oncogenes are known to be related to human neoplastic diseases. If these oncogenes play important roles in the progression of cancer, it should be possible to develop new antitumor drugs inhibiting oncogene product activities. We have isolated various signal transduction inhibitors such as tyrosine kinase inhibitors, Ras function inhibitors, and phosphatidylinositol turnover inhibitors from microorganisms and plants. In the present review, we describe isolation, synthesis and biological activities of tyrosine phosphatase and Ras function inhibitors which were recently isolated.

Intracellular tyrosine phosphorylation should be regulated by both tyrosine kinases and tyrosine phosphatases. Therefore, we screened microbial culture filtrates for tyrosine phosphatase inhibitors and isolated a novel nitrosamine dephostatin from *Streptomyces*. We also established a practical synthetic route for dephostatin. Since dephostatin is not stable enough, we synthesized several structurally related dephostatin analogs. Among them a regioisomer of dephostatin showed tyrosine phosphatase inhibitory activity equivalent to that of dephostatin, and also had increased stability.

We isolated conophylline and the novel aglaiastatin from tropical plant extracts as Ras function inhibitors. Conophylline and aglaiastatin induced normal phenotypes in K-ras-expressing cells. Since farnesyl protein transferase (FPTase) is necessary for the Ras activity, we also screened microbial culture filtrates for FPTase inhibitors. As a result, we isolated 4 novel compounds, valinoctin A and B, and saquayamaycin E and F. The absolute configuration of valinoctin A was determined by a synthetic method together with crystallographic analysis.

Key words: Oncogene, Signal transduction, Transcription factor, Tyrosine phosphatase, Ras, Farnesyl transferase, dephostatin, aglaiastatin.

1. はじめに

近年 10 数年で、細胞のがん化の機構の究明が急速に進展し、がん化が、プロトがん遺伝子の活性化およびがん抑制遺伝子の変異や脱落で説明されるようになった。そこで私達はがん遺伝子産物の活性を抑制する低分子化合物を微生物二次代謝産物からスクリーニングしてきた。1991 年までの結果の一部は、本誌に総説として記載し、チロシンキナーゼ阻害物質、Ras 活性阻害物質、イノシトールリン脂質代謝回転阻害物質を紹介した¹⁾。そ

* 慶応義塾大学理工学部応用化学科 ()

** (財)微生物化学研究所生物化学部 ()

* Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University ()

** Department of Biological Chemistry, Institute of Microbial Chemistry ()

の後、私達は生理活性物質スクリーニングの対象を、微生物および植物の二次代謝産物に広げた。一方で、がん遺伝子産物の作用機構も、シグナル伝達蛋白として、それぞれの産物の作用のつながりまで解明されてきた。

本稿ではがん遺伝子産物を中心にしたシグナル伝達の機構と、最近、天然から単離されたチロシンホスファターゼ阻害剤、Ras 活性阻害剤、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の探索、合成、および生物活性について紹介する。

2. がん遺伝子産物とシグナル伝達

がん遺伝子産物の作用は、1)レセプター型チロシンキナーゼを活性化する増殖因子、2)レセプター型チロシンキナーゼ、3)非レセプター型チロシンキナーゼ、4)セリン・スレオニンキナーゼ、5)SH2, SH3 ドメイン(これらは蛋白との総合に必要な部位)を持つシグナル蛋白、6)G 蛋白、7)転写調節因子、に分けられる(表 1)。Sis は

Table 1 Oncogene product functions.

増殖因子	Sis, Wnt 1
増殖因子レセプター	ErbB, ErbB ₂ , Fms, Trk
チロシンキナーゼ	Src, Lck, Fps, Abl
Ser・Thr キナーゼ	Raf, Mos
シグナル蛋白	Crk, Vav
G 蛋白	H-Ras, K-Ras, N-Ras
転写調節因子	Fos, Jun, Myc, Rel

血小板由来増殖因子(PDGF)類似蛋白、Wnt 1 はレセプター不明の増殖因子である。増殖因子レセプターグループは細胞膜貫通部位を持ち、チロシンキナーゼ活性を有する。ErbB, Fms, Trk はそれぞれ上皮増殖因子(EGF)レセプター、コロニー刺激因子(CSF)レセプター、神経増殖因子(NGF)レセプターに類似する。非レセプター型チロシンキナーゼグループ、セリン・スレオニンキナーゼグループ、シグナル蛋白グループは細胞質に局在する。低分子量 G 蛋白グループは細胞膜内側にファルネシル基を介してつながって活性を示す。一方、転写因子グループは核内に局在する。このようにがん遺伝子産物の機能は細胞内シグナル伝達の活性化、または転写調節を行うことである。

PDGF や EGF のような増殖因子は機構の 1 つとして細胞内 MAPK(mitogen-activated protein kinase)を活性化して細胞増殖を誘導する。増殖因子は細胞表面のレセプターに結合して、そのチロシンキナーゼを活性化し、自己リン酸化を誘導する。シグナルはリン酸化チロ

シンを認識する Grb 2, さらに Sos に伝わり、Sos は c-Ras を活性化する(図 1)。c-Ras は c-Raf を活性化し、

Fig.1 Signal transduction from the growth factor to the transcription factor, Y, tyrosine residue; P, phosphate.

c-Raf のキナーゼ活性はスレオニン・チロシンキナーゼの MEK をリン酸化して活性化し、MEK は MAPK の 1 つ ERK をリン酸化して活性化する。ERK はその後、いくつかのステップを経て、TCF(ternary complex factor)のような転写因子を活性化すると考えられている²⁾。図 1 のシグナル伝達因子の中で、増殖因子、レセプター、Grb 2(SH2, SH3 領域を含む)、c-Ras, c-Raf, 転写因子に対応するがん遺伝子産物があることになる。

3. チロシンホスファターゼ阻害物質

3.1. チロシンホスファターゼの役割

細胞内で蛋白質のチロシンリン酸化はチロシンキナーゼとチロシンホスファターゼの両方によって調節されている。脱チロシンリン酸化が積極的に酵素活性を上昇させることもある。例えば細胞性がん遺伝子産物 c-Src の C 末端に近いチロシン残基のリン酸化は c-Src の持つチロシンキナーゼ活性を低下させ、チロシンホスファターゼによる脱リン酸化は活性を再び上昇させる。T リンパ球の持っている CD 45 と呼ばれるチロシンホスファターゼは、c-Src の場合と同様に、c-Fyn や c-Lck のチ

ロシキナーゼ活性化に必要である。細胞周期進行に重要な cdk 2 と cdc 2 はどちらもキナーゼであり、その活性化にいずれの場合もチロシンホスファターゼ CDC 25 を必要とする。

3.2. チロシンホスファターゼ阻害物質のスクリーニング

井本らはチロシンホスファターゼアッセイ系を構築し、阻害物質をスクリーニングした。スクリーニング系には酵素としてがん化した T 細胞 Jurkat の細胞膜に存在する CDC 45 を、基質として、O-リン酸化チロシンを用いた。反応後、マラカイトグリーンを加え、遊離したリン酸を 620 nm の吸収で定量した³⁾。

スクリーニングの結果、放線菌培養液からチロシンホスファターゼを阻害する新規物質が得られ、デホスタチンと命名した^{4,5)}。チロシンホスファターゼ阻害物質としてはバナジン酸塩(NaVO_3)しか知られていない。バナジン酸はリン酸と構造が似ているのでチロシンホスファターゼを阻害すると考えられている。デホスタチンは Jurkat 細胞の CDC 45 チロシンホスファターゼを IC_{50} 約 $1.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で阻害した。バナジン酸より約 10 倍阻害活性が強い。セリン・スレオニンホスファターゼ 2A および 2B は阻害しなかった。阻害様式は基質に拮抗的であった。さらに *in situ* でも、EGF 処理した NRK 細胞の細胞内蛋白チロシンリン酸化状態を持続させる効果があった⁶⁾。さらに静止期の NRK 細胞に EGF や血清を加えたときに起こる DNA 合成の誘導を、デホスタチンは活性化した。

3.3. デホスタチンの全合成

デホスタチンは不安定な化合物であるため保存が難しく、また、生産菌による収率が著しく低いので、十分な量を発酵法によって得ることが難しかった。そこで、デホスタチンを合成的に供給することを目的とし、その合成法を確立した⁷⁾。

実際の合成ルートをスキーム 1 に示した。デホスタチンはベンゼン環に 1 つのニトロサミノ基、およびそれに対し 2 位と 5 位にあたる位置に 2 つのフェノール性水酸基をもっている。これらの置換基に変換可能な窒素、および酸素性官能基を有するベンゼン誘導体であるジメトキシアニリン 1 を出発原料として選択した。この 1 のアミノ基を *tert*-ブトキシカルボニル基(Boc 基)で保護して 2 とし、続いてこの保護アミノ基をメチル化して 3 の化合物を得た。一般に、メチルエーテルを対応するアルコール、もしくはフェノールに変換するために、塩化メチレン中、三臭化ホウ素を作用させるという条件が用いられる。この方法を今回の合成に適用すれば、メチル基

Scheme 1 Total synthesis of dephostatin.

だけではなく同時に Boc 基も除去されて 4 が得られ、このものをニトロ化すれば目的としていたデホスタチンへと導かれると考えたが、化合物 4 は極めて不安定であり、単離することができなかった。また、精製を行わずにニトロ化の条件に付したところ、複雑な混合物を与え、その中にデホスタチンは含まなかった。そこで、4 の不安定性の原因として、メチルアミノ基とフェノール性水酸基の共存を疑い、それを解決するために 2 つの水酸基を保護した状態でニトロ化を行い最後に保護基を除くことにした。水酸基の保護基として、穏和な脱保護法が報告されている *tert*-ブチルメチルシリル基(TBS 基)を用いた。

4 は 3 からの反応系を水で抽出し、この水層を減圧下濃縮したものを用い、これをシリル化して 5 を得た。5 のニトロ化は通常の条件で効率よく進行し、6 を与えた。最後の TBS 基の脱保護にははじめテトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)を試みたが、TBAF 由来と思われる副生成物との分離が困難であった。しかしこれはフッ化水素酸とフッ化ナトリウムから調製した緩衝液を用いることで解決した。こうして合成されたデホスタチンは天然より得られたそれと、すべてのスペクトルデータおよびチロシンホスファターゼ阻害活性において、完全に一致した⁷⁾。

この後、2 つのグループより合成例が報告された。まず、メルクの Hamel らは、ヒドロキノンより誘導される 2,5-ジヒドロキシニトロベンゼンを出発原料とし、水酸基を TBS エーテルとして保護した後、ニトロ基を還元してジヒドロキシアニリン誘導体を得た。アミノ基の

メチルアミノ基への変換は、対応するホルムアミドをボラン還元で付することで行った。このようにして得られた **5** にニトロ化と脱シリル化を順次行うことで目的とするデホスタチンの合成に成功した⁸⁾。なお、最終ステップの脱保護を、Hamel らは、我々が精製が困難であるという理由であきらめた TBAF を用いて行っている。シリカゲルにて精製した後、エーテル-ヘキサンの 1:1 の混合溶媒を加え攪拌し、これをろ過することで純粋なデホスタチンが得られると彼らは報告している。

また、マイアミ大学の Wang らもデホスタチンの合成について報告しているが⁹⁾、これは我々の合成ルートのうち、アミノ基のメチルアミノ基への変換をホルマリンの還元的アミノ化によってワンステップで行っている点だけが異なっている。

3.4. デホスタチン誘導体の合成

より安定で、強力な活性を有する化合物を得ることを目的としてデホスタチンの誘導体の合成を行った。さらに、その過程で合成される化合物について構造活性相関的な考察を行えば、チロシンホスファターゼ阻害活性に必要な構造的要因を明らかにすることができると考えられる。

Fig. 2 Dephostatins analogs.

そこで、図 2 に示した化合物を合成した¹⁰⁾。以前、チロシンキナーゼ阻害剤であり、やはりヒドロキノン骨格を

有するアープスタチンの水酸基の位置を変化させることで安定性が向上したことをヒントに、**7**, **8**, **9** の合成を行った。さらに、水酸基の数を減らした **10**, **11**, あるいは水酸基のかわりにメトキシ基やカルボキシル基を導入した **12**, **13** および **14** を合成した。これらの活性を調べることで水酸基と活性の関係を知ることができる。また、比較的不安定なニトロソ基をアミドやスルホンアミドに変えた **15a-e** についても検討した。合成した誘導体の中で、水酸基の位置を 3, 4 位に変えた **7** のみがデホスタチンと同等のチロシンホスファターゼ阻害活性 (IC₅₀, 3.0 μg/ml) を示した。

7 の合成ルートはスキーム 2 に示した。デホスタチン

Scheme 2 Synthesis of dephostatin analog **7**.

の合成と同様なジメトキシアニリン **16** を出発原料として選択しているが、ルートには多少の変更がある。今回の合成では当初、デホスタチンの場合に最も問題であった **4** の不安定さが、ヒドロキノン骨格をもたないことから解消されることを期待していたのであるが、それは結局変わらず、むしろ、Boc 基の脱保護、シリル化のトータルの収率が 20% 程度に低下する結果となった。そこで、ニトロソ基を導入する際にはメチルアミノ基の脱保護をその直前に行うこととし、また、メチルエーテルの切断にはそのメチルアミノ基の保護基を損なわない条件

を選ぶ必要があった。トリフルオロアセチル基(Tfa 基)は三臭化ホウ素によるメチル基除去の条件に耐える保護基として選択したものであるが、後に、塩化アルミニウム-エタンチオールによるエーテル切断が18に関してはより効率がよいことがわかった。水酸基はデホスタチンと同様にTBS基で保護したが、ニトロソ化を行う前にTfa基をアルカリで除く際にこのTBS基がともにはずれやすいことがわかった。これは溶媒の選択により解決することができ、実際には7%炭酸カリウム水溶液とメタノールを2対5で混和させたものが最も適当であった。その後はデホスタチンの合成と全く同じ条件で7まで導くことができた。なお、このルートはデホスタチン合成にも適用可能である(未発表データ)。

デホスタチンは動物細胞の培養液中で、2時間以内にほとんど分解され、不安定であるが、7は24時間経ってもほとんど分解されないことがわかった。7はラット褐色腫細胞PC 12のNGFによる分化誘導を促進し、MAPKのNGFによるチロシンリン酸化、活性化を持続させることがわかった(論文投稿準備中)。

4. Ras 活性阻害物質

4.1. Ras の作用機構

100近く発見されているがん遺伝子の中で、rasはヒトのがん発生に最も関与するがん遺伝子と考えられている。活性化されたrasがん遺伝子は膵臓で約80%、胆管で約65%、大腸がんでは約40%に検出され、全体の悪性新生物疾患で、20~30%に検出される。rasにはH-ras、K-ras、N-rasの3種類があり、ヒト腫瘍に最も重要なのはK-rasである。そこでK-ras活性を抑制する薬剤は、新しい抗がん剤として期待される。

Rasは比較的、低分子量(約21,000)のG蛋白で、活性型はGTPと結合し、不活性型はGDPと結合している。GDP結合型からGTP結合型への移行は、GDPとGTPの変換で起こり、SosのようなGDPを放出させる蛋白で促進される。一方、GTP結合型からGDP結合型への移行は、Ras自身のGTPase活性により行われ、GTPaseを促進する蛋白GAP(GTPase activating protein)の存在も知られている。

前述のようにc-RasはチロシンキナーゼからMAPKへのシグナル伝達の中心的な存在である(図1)。そこでRasによるがん化や増殖促進機構の1つはc-Rafの活性化であるが、最近、同じ低分子量G蛋白グループのRacやRhoを介して働く機構も提案されている。RacおよびRhoは下流でそれぞれ、JunおよびSRF(serum responsive factor)のような転写因子を活性化すること

が知られている²⁾。

4.2. Ras 活性阻害物質の探索

私達はRas活性阻害物質の探索に2つの方法を採用している。1つは後述のファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤を探索する方法であり、もう1つは活性化されたRasを高発現することによりがん化した細胞の性質、特に形態を正常化する物質を探す方法である。前者はRasに特異的な阻害剤が得られやすいが、膜透過性等で細胞レベルで全く効果のないものも得られ、後者は細胞レベルで確実に効果のあるものが得られるが、作用点がわからなかったり、Ras特異性に乏しいものもスクリーンされる欠点がある。

形態を指標にするアッセイで、正常な線維芽細胞(ラット腎由来NRK細胞やマウス胎児由来NIH 3T3細胞など)はガラス面に接着した時、比較的広がって平坦な形を示し、K-rasでがん化した線維芽細胞(K-ras-NRK細胞やK-ras-NIH 3T3細胞など)は比較的小さく、もりあがった形を示す。そこでK-rasでがん化した細胞のもりあがった形態を平たくさせる(flat conversion)物質を探すのである。スクリーニングにはK-ras-NRK細胞、K-ras-NIH 3T3細胞のほか温度感受性(temperature-sensitive)のK-ras^{ts}-NRK細胞が使われる。K-ras^{ts}-NRK細胞は33℃でがん細胞の形態、39℃で正常細胞の形態を示し、33℃でもK-ras活性が比較的低いので弱い抗Ras物質でもスクリーンされることになる。図3にRas活性阻害物質の構造を示す。この中でオキザノシンとダムナカンタールはK-ras^{ts}-NRK細胞を用いてスクリーニングされ、そのほかはK-ras-NRK細胞の形態変化でスクリーンされた。

オキザノシンは嶋田らにより発見され¹¹⁾、堀らにより抗Ras活性が見いだされた抗生物質である¹²⁾。オキザノシンは細胞内でリン酸化され、オキザノシン-5'-リン酸になると考えられ、この物質はIMPデヒドロゲナーゼを阻害することがわかっている。IMP(inosinate)は酸化されてXMP(xanthylate)に代謝され、さらに、水酸基がアミノ基におきかえられてGMP(guanylate)に代謝される。GMPはリン酸化されてGDPやGTPに変わる。そこでオキザノシンはIMPデヒドロゲナーゼを阻害し、Ras活性に必要なグアニンヌクレオチドの細胞内レベルを低下させることで抗Ras活性を示すことがわかった。オキザノシンはK-ras^{ts}-NRK細胞の表現型を正常化するが、Ras活性がより強いK-ras-NRK細胞には無効であった。オキザノシンはGTPレベルを下げることから、広くG蛋白作用阻害剤として使える可能性がある。実際、オキザノシンはNGFによるラット褐色

Fig. 3 Ras function inhibitors.

腫細胞 PC 12 の形態的分化誘導を阻害した¹³⁾。この分化誘導には G 蛋白の 1 つ, c-Ras が必要ことが知られている。オキザノシンの安定性を向上させるため, 加藤らはリボース部分をサイクリトールにおきかえた化合物を合成したが¹⁴⁾, 抗 Ras 活性が低下した。

ダムナカンタルはタイで採取された植物 *Morinda citrifolia* の根から得られた既知アンスラキノン化合物である¹⁵⁾。K-ras^{ts}-NRK 細胞の表現型を正常化し, やはり K-ras-NRK 細胞には効果がなかった。ras 蛋白の量や局在には変化を与えなかった。ダムナカンタルがどのような機構で抗 ras 効果を示すのかは未だわかっていない。

私達はタイで採取されたキョウチクトウ科植物 *Ervatamia microphylla* の葉のクロロホルム抽出物から強力な抗 Ras 物質を単離した¹⁶⁾。二次元 NMR などでも構造解析し, 新しいビンカアルカロイドであることがわかった。Kam らによりマレーシアのキョウチクトウ科植物 *Tabernaemontana divaricata* の葉からも同じ化合物が

単離され, コノフィリンとして報告された¹⁷⁾。コノフィリンは K-ras^{ts}-NRK だけでなく, K-ras-NRK, K-rasNIH 3 T 3, H-ras-NIH 3 T 3 および N-ras-NIH 3 T 3 細胞の形態をほとんど完全に正常化した。この点ではオキザノシンやダムナカンタルより強力である。コノフィリンの作用は可逆的であり, 増殖抑制や形態変化は除去により回復する。細胞の Ras 量を減少させず局在にも影響を与えなかった。やはりビンカアルカロイドの抗がん剤, ビンブラスチンには抗 Ras 作用はみられなかった。また, ビンブラスチンは K-ras-NRK 細胞の細胞周期に対し G 2/M 期ブロックを示したが, コノフィリンは明確に G 1 期でブロックした。Ras 活性を阻害するロバスタチンは G 1 ブロックを起こすことが知られている。さらに戸井らはコノフィリンがヌードマウスに移植した K-ras-NRK および K-ras-NIH 3 T 3 腫瘍の増殖を筋肉内投与で抑制することを示した¹⁸⁾。一方, L1210 モデルに対しては *in vivo* 抗がん活性はみられなかった。コノフィリンは c-Ras 活性にも阻害効果を示し, ラット褐色腫細胞の NGF による分化誘導を阻害した。コノフィリンのエポキシドの部分が還元されて二重結合の構造であるコノフィリジン¹⁷⁾も抗 Ras 物質として *Ervatamia microphylla* から単離された。コノフィリジンはコノフィリンとほぼ同等の抗 Ras 活性を示した。コノフィリンが Ras 活性を阻害する機構は現在, 検討中である。

最近, 私達はやはりタイの植物 *Aglaia odorata* の葉のクロロホルム抽出物から, 3 つの関連する構造の強力な抗 Ras 物質を単離, 構造決定した¹⁹⁾。1 つは新規物質でアグライアスタチンと命名した。ロカグラオール²⁰⁾とアグライアスタチンが酸化されたピリミジノン化合物²¹⁾は既に類縁の植物から単離されている。いずれの植物二次代謝産物も数 ng/ml の低濃度で K-ras-NRK 細胞の flat conversion を誘導し, 増殖を抑制した。抗 Ras 活性の機構の 1 つとして蛋白合成を阻害し, 細胞の Ras 量を選択的に減少させることがわかった。3 つの化合物の中でアグライアスタチンが最も低濃度で K-ras-NRK 細胞の flat conversion を誘導する。

4.3. ロカグラオールの合成

ロカグラオールと構造的に類似した化合物に, やはり植物から単離されたロカグラミドがあり, この全合成は初め Trost によって報告され²²⁾, 続いて Taylor が報告した²³⁾。Taylor の合成はラセミ体であったが, その合成中間体としてロカグラオールを経由している。スキーム 3 にそのロカグラオールまでの合成ルートを示した。

フロログルシン 23 とアニスアルデヒドのシアノヒドリン 24 を酸性条件下に縮合環化させ 25 とし, これをジ

Scheme 3 Taylor's synthesis of rocaglaol.

メチル硫酸でメチル化し、26を得た。26はTriton Bを触媒としシナムアルデヒドにマイケル付加させることでケトアルデヒド27へと導かれる。Triton BではなくLDAを用いる条件では収率とともに、フェニル基に關するジアステレオ選択性が低下する。27のピナコールカップリングは種々の条件で検討されているが、ヨウ化サマリウムの場合に収率に関して最も良好な結果を与えた。このとき、新たに形成されるジオールはすべてシスなので、2級水酸基を酸化し、水素化ホウ素ナトリウムで還元するとほぼシストランス比が1:1となった。このトランス体がロカグラオールである。最近、私達はこうして得られたロカグラオールの光学分割法を発見している(未発表データ)。

5. ファルネシルトランスフェラーゼ阻害物質

5.1. Rasの翻訳後修飾

Rasは細胞膜へ移行することが活性発現に必須であり、翻訳直後のすべてのRasは、C末端にCAAX配列と呼ばれる保存領域をもつ。ここでCはシステイン、Aは脂肪族アミノ酸、Xはロイシン以外の任意のアミノ酸を示す。そしてRasは、翻訳後修飾の第一段階としてCAAX配列内のシステイン残基にファルミノシル基

が転化され細胞膜に結合する。続いて末端3アミノ酸残基がプロテアーゼによって除去され、新しく生まれたカルボキシル基はカルボキシルメチルトランスフェラーゼによってメチル化されて、最後にK-ras以外のRasはC末端付近のもう1つのシステインがパルミトイル化され、翻訳後修飾が完了する。したがって、ファルネシル化がRasを細胞膜に移行させるための必須の反応である。

蛋白のファルネシル化はファルネシルトランスフェラーゼ(FPTase)により、ファルネシルピロリン酸を基質として行われるが、ファルネシルピロリン酸の前駆体合成を阻害するHMG-CoA還元酵素阻害剤コンパクチンはras発現細胞の表現型を正常化した²⁴⁾。

5.2. ファルネシルトランスフェラーゼ阻害物質の探索

FPTaseの基質となる合成ペプチドとウシ脳より粗精製したFPTaseを用いて、ファルネシル化阻害剤を微生物培養液中に探索した。そして、放線菌の培養液中に阻害活性を見だし、阻害物質の単離精製を行った。その結果、図4に示す2つの新規化合物を得て、バリノクチンAおよびBと命名した²⁵⁾。バリノクチンの平面構造はNMRスペクトルで解析し、バリノクチンAの絶対構造は5.3.に述べるように合成と結晶解析により決定した。

さらに、大腸菌に発現させたヒトRas蛋白質を用いてFPTaseの阻害剤を探索したところ、放線菌の培養液中

Fig.4 Farnesyl transferase inhibitors.

に阻害活性を見だし、阻害物質の単離精製を行った。その結果、さらに、2つの新規化合物を得て、サクアヤマインシン E および F と命名した²⁶⁾。既知のサクアヤマインシン A, B, C, D およびアクアヤマインシンにも同等の阻害活性がみられたが、アドリアマイシンは阻害活性を示さなかった。

5.3. バリノクチン A の合成

バリノクチン A の合成過程をスキーム 4 に示す。バリノクチン A の立体構造を決定するために、まず 3-アミノ-2-ヒドロキシオクタン酸の合成を行った。3-アミノ-2-ヒドロキシオクタン酸は 2 つの不斉炭素を含むので、4 種類の立体異性体が存在する。1-ニトロヘキサン 29 を出発原料とし、これにグリオキシル酸メチル 30 をカップリングさせた。得られた 31 をラネー・ニックル触媒下還元したのち、6 規定塩酸で加水分解することにより 3-アミノ-2-ヒドロキシオクタン酸 33 を得ることができた。この 33 は 4 つの立体異性体の混合物であるが、スレオ体とエリスロ体の溶解度の違いを利用して、両ジアステレオマーを分別結晶法により分離した。33 は

それぞれパラメトキシベンジルオキシカルボニル基 (Moz) でそのアミノ基を保護した。バリノクチン A に含まれるバリンが L 体であったことから、市販の L-バリンベンジルエステルをそれぞれカップリングさせた。これによって得られる Moz-threo-3-アミノ-2-ヒドロキシオクタノイル-L-バリンベンジルエステル (threo-35) および Moz-erythro-3-アミノ-2-ヒドロキシオクタノイル-L-バリンベンジルエステル (erythro-35) は逆層シリカゲルカラムを用いた HPLC により分離した。threo-35 および erythro-35 のそれぞれをヘキサン-酢酸エチルから再結晶した。これら 4 つの立体異性体 (35a-d) は、パラジウム-炭素を用いた加水素分解によってその保護基を除去することにより、バリノクチン A に考え得る 4 つの立体異性体に変換した。天然物のバリノクチン A は、これらの中の 1 つである 35a 由来の (2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシオクタノイル-L-バリン (36a) と TLC において一致し、FPTase に対する阻害活性も一致した。35a の X 線結晶構造解析により、バリノクチン A は (2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシオクタノイル-L-バリンであると決定した。

以上が立体構造解析のために行った合成ルートである。バリノクチン A はその後、津田らにより立体選択的に合成された²⁷⁾。

6. おわりに

デホスタチンは生産菌からの収量が乏しく、合成による供給は大変有用であった。また、不安定性を克服する誘導体も合成することができた。現在は、やはり供給が限られているアグライアスタチンの全合成を検討している。

代表的なシグナル伝達には、既にあげたものの他に、アドレナリン等のホルモンレセプター下流に使われ、 $\alpha\beta\gamma$ サブユニットから構成される G 蛋白によるものやイノシトールリン脂質代謝回転がある。最近では、スフィンゴミエリナーゼからのシグナル伝達も注目されるようになった。生体膜リン脂質の 1 つ、スフィンゴミエリンが加水分解されて、セラミドとリン酸化コリンを生成し、前者はアポトーシスを誘導し、おそらくセラミドから生成されるスフィンゴシン-1-リン酸は増殖因子としての作用が報告されている。

イノシトールリン脂質代謝回転に関しては最近、ホスファチジルイノシトール特異的ホ

Scheme 4 Synthesis of valinocytin A and its stereoisomers.

スホリパーゼCを阻害する新規物質フォリペプチンを放線菌から単離した²⁸⁾。11のアミノ酸から成るペプチドなのでおそらく細胞膜を通過せず、現在、部分合成により酵素阻害の活性部位を探している。

このように有用なシグナル伝達阻害物質、生理活性物質の探索に有機合成は強力で、欠かせない手法になっている。

(平成8年8月28日受理)

文 献

- 1) 梅沢一夫, 有合成, **49**, 1062 (1991)
- 2) C. Block, A. Witlinghofer, *Structure*, **3**, 1281 (1995)
- 3) T.P. Geladopoulos, T.G. Sotiroudis, A.E. Evangeloupoulos, *Anal. Biochem.*, **192**, 112 (1991)
- 4) M. Imoto, H. Kakeya, T. Sawa, C. Hayashi, M. Hamada, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **46**, 1342 (1993)
- 5) H. Kakeya, M. Imoto, Y. Takahashi, H. Naganawa, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **46**, 1716 (1993)
- 6) M. Imoto, S. Tanaka, A. Deguchi, A. Hayakawa, K. Umezawa, *Cellular Pharmacology*, **2**, 199 (1995)
- 7) T. Watanabe, T. Takeuchi, M. Otsuka, K. Umezawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 437
- 8) P. Hamel, Y. Girard, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 8101 (1994)
- 9) L. Yu, A. McGill, P.G. Wang, Z-Y. Zhang, *Biomed. Chem. Lett.*, **5**, 1003 (1995)
- 10) T. Watanabe, T. Takeuchi, M. Otsuka, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **48**, 1460 (1995)
- 11) N. Shimada, N. Yagisawa, H. Naganawa, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **34**, 1216 (1981)
- 12) O. Itoh, S. Kuroiwa, S. Atumi, K. Umezawa, T. Takeuchi, M. Hori, *Cancer Res.*, **49**, 996 (1989)
- 13) Y. Watanabe, N. Shimada, T. Nagatsu, K. Umezawa, *Biogenic Amines*, **10**, 509 (1994)
- 14) H. Kurata, S. Hishiyama, S. Yamamura, K. Kato, S. Fujiwara, K. Umezawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 283 (1996)
- 15) T. Hiramatsu, M. Imoto, T. Koyano, K. Umezawa, *Cancer Lett.*, **73**, 161 (1993)
- 16) K. Umezawa, T. Ohse, T. Yamamoto, T. Koyano, Y. Takahashi, *Anticancer Res.*, **14**, 2413 (1994)
- 17) T.S. Kam, K.Y. Loh, C. Wei, *J. Nat. Prod.*, **56**, 1865 (1993)
- 18) K. Umezawa, T. Taniguchi, M. Toi, T. Ohse, N. Tsutsumi, T. Yamamoto, T. Koyano, M. Ishizuka, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **22**, 35 (1996)
- 19) T. Ohse, S. Ohba, T. Yamamoto, T. Koyano, K. Umezawa, *J. Nat. Prod.*, **59**, 650 (1996)
- 20) F. Ishibashi, C. Satasook, M.B. Isman, G.H. N. Towers, *Phytochemistry*, **32**, 307 (1993)
- 21) U. Kokpol, B. Venaskulchai, J. Simpson, R. T. Weavers, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 773
- 22) B.M. Trost, P.D. Greenspan, B.V. Yang, M. G. Saulnire, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9022 (1990)
- 23) A.E. Davey, M.J. Schaeffer, R.J.K. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, 2657
- 24) N. Matsuda, S. Kageyama, A. Endo, K. Umezawa, *Cellular Pharmacology*, **1**, 219 (1994)
- 25) R. Sekizawa, H. Iinuma, Y. Muraoka, H. Naganawa, N. Kinoshita, H. Nakamura, M. Hamada, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Nat. Prod.*, **59**, 232 (1996)
- 26) R. Sekizawa, H. Iinuma, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, J. Yamaizumi, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **49**, 487 (1996)
- 27) M. Tsuda, Y. Muraoka, T. Takeuchi, R. Sekizawa, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **49**, 1031 (1996)
- 28) H. Ui, T. Miyake, H. Iinuma, M. Imoto, S. Hattori, M. Hamada, T. Takeuchi, S. Umezawa, K. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 7479 (1995)