タンパク質複合体化制御機構の解析を指向した多環状グアニジン系天然物の全合成研究

長澤 和夫*
下川 淳

Synthetic Studies on Cyclic Guanidine Natural Products for the Elucidation of Their Controlling Mechanism of Protein-protein Interaction

Kazuo Nagasawa* and Jun Shimokawa

The stereoselective synthetic method for *anti*- and *syn*-fused tricyclic guanidine compounds **14** and **19** were developed by a successive 1,3-dipolar cycloaddition reaction of nitron with two olefins. These two compounds, **14** and **19**, were applied for the relative stereochemistry determination of batzelladine F(**5**) left hand tricyclic guanidine moiety. Based upon this strategy, asymmetric total syntheses of batzelladine A (**1**) and batzelladine D(**3**) were also achieved. With the synthetic **1** and **3** in hand, their target protein was examined using immobilized CD 4 and gp 120 affinity gels. The results indicated that batzelladines A(**1**) and D(**3**) bind specifically to CD 4.

Key words: batzelladine, guanidine, alkaloid, total synthesis, photoaffinity probe, gp 120, CD 4, HIV, protein-protein interaction

はじめに

タンパク質は多くの場合、互いに作用し合い複合体を形成することにより機能を発現する。特異性を持ったタンパク質の複合体化はあらゆる生命現象に関与していることから、これらの複合体化を制御する低分子化合物は、生命現象解明のためのツールや疾病に対する創薬リードとして非常に重要である¹⁾。

Batzelladine 類は、バハマ産およびジャマイカ産海綿より単離された多環状グアニジンアルカロイドである(図 1)^{2,3)}。Batzelladine A-E は、HIV 表層に存在するエンベロープ糖タンパク質 gp 120 とヒト T 細胞の表層に存在するタンパク質 CD 4 との結合(感染)を阻害する²⁾。一方 batzelladine F-I は、CD 4 に恒常的に結合しているチロシンキナーゼ p 56^{lck} の解離を促進することが知られている³⁾。p 56^{lck} は TCR(T 細胞抗原レセプター)を介するシグナル伝達系において、ZAP-70 とともに重要な役割を果たす。すなわち抗原提示細胞からの抗原を認識した p 56^{lck} は、TCR の細胞内領域に存在する ITAM(チロシン活性化モチーフ)をリン酸化する。これにより Syk ファミリーチロシンキナーゼである ZAP-70 が結合し活性化され、リン酸化による種々のシグナル分子の活性化を経て IL-2 の産生につながる(図 2)。

従って batzelladine A-E および F-I は、それぞれ膜タンパク質 CD 4 の細胞外領域および細胞内領域において、情報伝達等に関与するタンパク質間の複合体化を制御する低分子化合物と捉えることができる。これらは構造が非常に類似しているにも関わらず、それぞれ CD 4 の細胞外および細胞内の異なる領域でのタンパク質間複合体化に関与していることも大変興味深い。

我々は batzelladine 類の標的タンパク質と結合部位を明らかにし、これらによるタンパク質の複合体化の制御機構を解析することを目的として、batzelladine 類の全合成研究に取り組んでいる。本稿では batzelladine A(**1**) および D(**3**) の全合成研究、また batzelladine D 骨格を有するフォトアフィニティプローブ分子を用いた標的タンパク質の解析に関する最近の知見について述べる。

1. 環状グアニジン骨格合成法の開発

Batzelladine 類は特徴的な 3 環性もしくは 2 環性グアニジン骨格を有している。これらの合成には、環上の不斉炭素の制御とグアニジン官能基の効率よい導入が重要となる。これまでに、*N*-アシルイミニウムの環化反応⁴⁾、aza-Diels-Alder 反応⁵⁾、立体選択的アシルラジカルの環化反応⁶⁾、生合成的なビスエノンに対するグアニジンのダブルマイケル反応⁷⁾、Biginelli 反応⁸⁾、カルボジイミド-イミンの[4+2]環化反応を用いた合成方法⁹⁾が、それぞれ開発されている。また後者 3 つにより、batzelladine D(**3**)^{8b,9)}、E(**4**)^{7b)}、F(**5**)^{8a)}の全合成が達成されている。

* 東京農工大学大学院共生科学技術研究院生命工学専攻

* Department of Biotech. & Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

Fig. 1 Representative structures of batzelladine alkaloids.

我々は様々な誘導体を立体選択的に合成することを視野にいれ、ピロリジンの酸化により得られるニトロンと2種類のオレフィンを用いた、連続的1,3-双極環化付加反応による合成を検討することとした。本手法では、ピロリジン環の2位および5位に立体選択的に側鎖を導入することが可能である。また同時に、側鎖β位に環化反応の足がかりとなる水酸基を立体選択的に導入することも特徴である。そこで、本手法によるトランス型3環性グアニジン14(スキーム1)およびシス型3環性グアニジン19(スキーム2)の立体選択的合成を検討した¹⁰⁾。

ピロリジンをセレン酸化して得られるニトロン6と1-hexeneによる1,3-双極環化付加反応を行ったところ、エキソ付加体であるイソオキサゾリジン7が選択的に得られた。7に対し、Tufarielloらが報告している方法に基づき¹¹⁾、非プロトン性溶媒であるジクロロメタン中、低温下でmCPBA酸化を行ったところ、イソオキサゾリジン環が開裂すると同時に位置選択的にニトロンが再生し8が得られた。得られた8に対し、再度1-

Fig. 2 Control of protein-protein interactions by batzelladines.

^a Reagents and conditions: (a) 1-hexene, toluene, 100 °C, 60%; (b) mCPBA, CH₂Cl₂, 0 °C; (c) 1-hexene, toluene, 100 °C, 65%; (d) Pd/C, H₂, EtOH; (e) bis-Cbz-2-methyl-2-thiopseudourea, HgCl₂, Et₃N, DMF, 81%; (f) DEAD, PPh₃, toluene, 95%; (g) NaH, MeOH, THF, 75%; (h) (1) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; (2) Pd/C, H₂, EtOH, 78%.

Scheme 1 Synthesis of 14.

hexeneを用いて1,3-双極環化付加反応を行ったところ、立体選択的に9が得られた。これは、8に対してオレフィンがピロリジン環上の側鎖と反対側からエキソ付加したためと考えられる。次に9のN-O結合を還元し、側鎖β位の水酸基の立体化学が制御された2,5-2置換ピロリジン10を得ることができた。10に対しチオウレア誘導体と塩化水銀を用いたグアニジノ化反応を行い11とし、ついで光延反応条件下による環化反応を行い12

とした。12 に対しメタノール中、水素化ナトリウムを作用させ、1 つの Cbz 基のみを選択的に脱保護後、水酸基のメシル化を伴う環化反応を行い、3 環性グアニジン骨格を構築した。最後に Cbz 基の脱保護を行い、目的とするトランス型 3 環性グアニジン 14 を合成することができた。一方シス型 3 環性グアニジン 19 は、9 より合成することができた。すなわち、9 の 2 級水酸基の立体化学を反転し 15 とし、ついで Tufariello-Ali の条件下¹²⁾で *m*CPBA 酸化することにより、位置選択的にニトロロン 16 を得た。次に 16 に対し酸化白金を用いるニトロンの立体選択的な還元反応、ヒドロキシルアミンの還元反応を行い、シス 2,5-2 置換ピロリジン 17 を合成することができた。17 は 14 の合成と同様の工程を経ることにより、シス型 3 環性グアニジン 19 へ導くことができた。

^a Reagents and conditions: (a) (1) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C ; (2) CsOAc , 18-C-6 , toluene, 100°C ; (3) K_2CO_3 , MeOH , 43% (3 steps); (b) *m*CPBA, CH_2Cl_2 , 0°C ; (c) (1) PtO_2 , H_2 , EtOH ; (2) Pd/C , H_2 , EtOH , 49% (3 steps); (d) bis-Cbz-2-methyl-2-thiopseudourea, HgCl_2 , Et_3N , DMF ; (e) DEAD, PPh_3 , toluene, 78%; (f) NaH , MeOH , THF , 75%; (g) (1) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 ; (2) Pd/C , H_2 , EtOH , 67%.

Scheme 2 Synthesis of 19.

得られた化合物は非常に対称性のよい化合物であり、14 および 19 の ^1H NMR のスペクトルデータは非常に類似していた。しかしながら、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、4,5,7,8 位のケミカルシフトがそれぞれ異なることがわかった。

ところで、私達が 14 および 19 の立体選択的な合成を行った当時、batzelladine F(5) の左側 3 環性グアニジン骨格の相対立体配置の決定について、Murphy^{7c)}, Snider¹³⁾ らの報告がなされていたものの、依然として不確かであった。そこで、合成した化合物 14 および 19 と、天然物 5 の ^{13}C NMR スペクトルデータとの比較を行ったところ、5 の特徴的な炭素のケミカルシフトはシス型 3 環性グアニジン 19 と一致することがわかった。これより batzelladine F(5) の左側 3 環性グアニジン骨格は、シス型の相対立体配置を有していることが明らかとなった (図 3)。

^{13}C -NMR data of 5, 14 and 19.

Position	5	14	19
1	-	14.2	14.2
2	-	23.6	23.5
3	26.2	28.4	28.4
4	35.8	36.3	35.6
5	51.6	53.1	51.5
6	34.8	34.4	34.8
7	57.4	56.4	57.5
8	31.1	31.9	31.1
9	151.2	151.7	151.2

Spectral were measured in CDCl_3 (150 MHz) and chemical shifts were represented by ppm.

Fig. 3 Structure determination of batzelladine F(3) left hand tricyclic guanidine.

以上のように、連続的 1,3-双極環化付加反応による立体選択的な 3 環性グアニジン骨格の合成法を確立し、5 の相対立体配置の決定にも応用することができた。

2. Batzelladine D(3)の全合成

Batzelladine D(3)は、3 環性グアニジン骨格上に 5 つの不斉炭素を有するカルボン酸 20 とアルコール 22 とのエステル化反応により合成できると考えられる (スキーム 3)。

20 は、先に開発した連続的 1,3-双極環化付加を基盤とし、ニトロロン 6 と 2 つのオレフィン化合物、クロトン酸メチル 23 と 1-ウンデセン 24 から立体選択的に合成できると考えられる。実際これら 3 つの基質を用い、立

Scheme 3 Retrosynthetic analysis of 3.

体選択的に3環性グアニジンカルボン酸20を合成することができた¹⁴⁾。そこで3を合成するべく、別途合成したグアニジンアルコール22とのエステル化反応を種々試みた(スキーム4)。しかしこれら両者の反応は、様々な条件下において全く進行しなかった。高温条件下でエステル化反応を行うと、カルボン酸20の分解が進行することもわかった。また、カルボン酸20をジアゾメタンと反応させて得られるメチルエステル21を用い、様々な条件下でのエステル交換反応も試みたが、反応は全く進行しなかった。これらの結果は、カルボン酸官能基が、剛直な構造を有する3環性グアニジン平面に対してアキシアル位に位置するため、その反応性が非常に低くなっているためであると考えられた。そこで環状グアニジンの平面性を緩和することを目的とし、2環性グアニジンカルボン酸26を合成し、アルコール22とのエステル化反応を試みた。その結果、EDCI, DMAPを用いて反応を行ったところ40%の収率でエステル化反応が進行することがわかった。そこでこれらの知見をもとに(+)-batzelladine D(3)の全合成を検討することとした。

Scheme 4 Esterification of 20, 21 and 26 with 22.

L-(+)-リノゴ酸より6工程で得られる、文献既知の光学活性ニトロソ 28¹⁵⁾を原料として合成を行うこととした(スキーム5)。28に対し1-ウンデセン(24)との1,3-双極付加環化反応を行ったところ、イソオキサゾリジン29が単一のジアステレオマーとして得られてきた。これは24が28のTIPSエーテル基と反対側からエキソ付加により反応が進行したためと考えられる。次にキラル源として用いた29の水酸基の除去を行うこととした。まず29にフッ化セシウムを作用させアルコール30を得た。30の水酸基に脱離基としてトシル基やハロゲンを導入後還元反応を試みたが、立体障害が大きいため S_N2 反応が進行せず目的とする31は得られなかった。そこで立体障害の影響が少ないラジカル反応であるBarton-

McCombie法を検討することとした。すなわち phenyl chlorothionoformate を用いて水酸基をチオカルボニル化した後、AIBN 存在下、トリブチルスズヒドリドを反応させることにより、51%の収率で31を得ることができた¹⁸⁾。そこで31に対し塩化メチレン中でmCPBAを作用させ酸化し、位置選択的にニトロソを得、ついでクロトン酸メチル23との1,3-双極付加環化反応を行い、イソオキサゾリジン32を立体選択的に得た。この際、クロトン酸メチルはニトロソの立体障害の小さい側からエキソ付加により反応する。32のエステル基を $LiAlH_4$ により還元してアルコールとした後、2つの水酸基をTBS基で保護し33を得た。ついで33から常法によりグアニジン35を得、その後、光延反応による分子内環化反応を経て二環性グアニジン36を得た。36に対し低温下TBAFを作用させることにより、1級TBSエーテル基を選択的に脱保護し37とし、ついでJones酸化を行い2環性グアニジンカルボン酸38を得た。

^a Reagents and conditions: (a) 1-undecene (24), toluene, 90 °C, 75%; (b) CsF, EtOH, 90 °C, 98%; (c) (1) PhOC(S)Cl, DMAP, pyridine, rt.; (2) $n-Bu_3SnH$, AIBN, toluene, 100 °C, 51% (2 steps); (d) (1) mCPBA, CH_2Cl_2 , 0 °C; (2) methyl crotonate (23), toluene, 110 °C, 75% (2 steps); (e) (1) $LiAlH_4$, Et_2O , 0 °C; (2) TBSCl, imidazole, CH_2Cl_2 , rt, 88% (2 steps); (f) Pd/C, H_2 , EtOH, rt; (g) bis-Cbz-2-methyl-2-thiopseudourea, $HgCl_2$, Et_3N , DMF, 0 °C to rt, 84% (2 steps); (h) DEAD, PPh_3 , toluene, rt, 64%; (i) TBAF, THF, rt, 97%; (j) Jones reagent, acetone, 0 °C.

Scheme 5 Synthesis of the bicyclic guanidine carboxylic acid 38.

次にエステル化反応および3の全合成を検討した(スキーム6)。カルボン酸38およびアルコール22に対しEDCI, DMAPを用いてエステル化反応を室温で行ったところ、望むエステル39および α 位が異性化した40が1:1で生成した。そこで本反応を0 °Cで行ったところ、異性化を伴うことなく68%の収率で39のみを得ることができた。得られた39に対し、HFピリジンによるTBS基の脱保護、接触還元によるCbz基の脱保護、ついで光延反応による分子内環化を行い三環性グアニジン41を得た。最後にTFAによりBoc基を脱保護し、その後HPLCによる精製(ODSカラム, 45% CH_3CN 水

^a Reagents and conditions: (a) **22**, EDCI, DMAP, CH₂Cl₂; (b) (1) HF-pyridine, THF, 0 °C, 81%; (2) Pd/C, H₂, EtOH, rt; (3) DEAD, PPh₃, toluene, rt; (c) TFA, CH₂Cl₂, rt, 66% (3 steps).

Scheme 6 Total synthesis of (-)-batzelladine D(3).

溶液-0.1% TFA)を行い(-)-batzelladine D(3)の全合成を達成した¹⁶⁾。

3. Batzelladine A(1)の全合成

Batzelladine A(1)は、batzelladine 類の中で最も強力な gp 120-CD 4 結合阻害活性を有する (IC₅₀ 29 μM)²⁾。これまでに 1 の全合成例はなく、Gin¹⁷⁾および Elliott⁵⁾らによる合成研究が報告されているのみである。Gin らは 1 の 6 位の絶対立体配置についても報告している。1 の合成計画をスキーム 7 に示した。1 は 3 と同様の 3 環性グアニジンカルボン酸前駆体 **38**, α,β-不飽和エステル構造を有する左側 2 環性グアニジンカルボン酸 **42**, およびアルコール **22** からなる。そこで新たに **42** の合成法を開発する必要がある。**42** の合成は、1,3-双極環化反応を基盤とした方法論により得られる **43** の、1 級アルコールの酸化を経て合成することを計画した。

アルコール **50** の合成は以下のように行った(スキーム 8)。1,10-デカンジオールより 3 工程で調製した α,β-不飽和エステル **44** と、光学活性ニトロン **28** との 1,3-双極付加環化反応により **45** を単一のジアステレオマーとして得た。**45** のエステルを LiAlH₄ により還元しアルコールとし、ついでフッ化セシウムによる TIPS 基の脱保護を行いジオール **46** を得た。ジオール **46** に対し、ピロリジン中 TBSCl を 1.2 等量用いることにより、一級水酸基のみを選択的に TBS エーテルとして保護した後、Barton-McCombie 法によりピロリジン環上の水酸基を除去し **47** を得た。ついで、N-O 結合の還元反応は水酸化パラジウムを用いることにより MPM 基の脱保護を伴うことなく進行し、ピロリジン **48** を得た。そこで **48** に対し、グアニジノ化反応、光延反応による環化反応、TBAF による TBS エーテル基の脱保護を行い、2 環性

Scheme 7 Retrosynthetic analysis of 1.

^a Reagents and conditions: (a) **44**, toluene, 90 °C; (b) (1) LiAlH₄, Et₂O, 0 °C; (2) CsF, EtOH, 90 °C (59% from **28**); (c) (1) TBSCl, pyridine, rt; (2) PhOC(S)Cl, DMAP, pyridine, rt; (3) n-Bu₃SnH, AIBN, toluene, 100 °C, 44% (3 steps); (d) Pd(OH)₂/C, H₂, EtOH, rt; (e) bis-Boc-2-methyl-2-thiopseudourea, HgCl₂, Et₃N, DMF, rt, 71% (2 steps); (f) DEAD, PPh₃, toluene, rt; (g) TBAF, THF, rt, 81% (from **49**); (h) (1) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, -78 °C to rt; (2) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, t-BuOH-H₂O, rt; (3) TMSCHN₂, benzene-MeOH, rt, 71% (from **51**).

Scheme 8 Synthetic studies of α,β-unsaturated bicyclic guanidine ester **52**.

グアニジナルコール **50** を得た。

アルコール **50** から **52** への変換は、エステル **51** を経て行うことを計画した。**50** から 3 工程で得られるメチ

ルエステル **51** に対し, Sharpless の方法に従い¹⁸⁾, フェニルセレンニル化と続く酸化反応による反応を検討したが, フェニルセレンニル化反応が進行せず, 7 位の異性化が進行した化合物が原料とともに得られた。そこで三枝法¹⁹⁾についても試みようとしたが, 前駆体であるシリルケテンアセタールを得ることができなかった。

そこで次に, **50** からの酸化反応による直接的な変換法について検討することとした(表 1)。

Table 1 Oxidation of **50** to **53** or **54**.

Reagents	Solvent	Temp (°C)	53 (%)	54 (%)
TPAP (5 mol%) - NMO (4 eq)	CH ₂ Cl ₂	rt	47	0
PCC (4 eq)	CH ₂ Cl ₂	rt	6	0
PDC (4 eq)	CH ₂ Cl ₂	rt	36	0
Swern oxid.	CH ₂ Cl ₂	-78°C	0	94

最近 Nicolaou らは, 1 級アルコールに対して IBX を作用させると α,β -不飽和アルデヒドが得られることを報告している²⁰⁾。そこで **50** に対して IBX 酸化反応を試みることにした。その結果, α,β -不飽和アルデヒド **53** が低収率(13%)ながら, 位置選択的に得られることがわかった。そこで, さらなる酸化反応の検討を行った結果, TPAP-NMO 酸化を用いることにより, 47%の収率で **53** が得られることがわかった。なお本酸化反応は, PCC や PDC でも低収率ながら同様に進行する。興味深いことに, Swern 酸化を行うと **54** のみが高収率で得られた。本 TPAP 酸化反応のメカニズムは, ルテニウムアルコキシド **55** が形成した後に, イミニウムを形成しながらルテニウムが配位した **56** が生成し, ついでアルコールの酸化を伴いながら **57** となり, アルデヒドの α 位に存在する酸性度の高いプロトンが脱離することで **53** が得られると考えている(スキーム 9)²¹⁾。

Scheme 9 Proposed mechanism of TPAP oxidation of **50**.

α,β -不飽和アルデヒド **53** に対し, Kraus 酸化後, トリメチルシリルジアゾメタンを用いて直接メチルエステル化することにより **52** を得ることができた(スキーム

10)。**52** はビニロガスなウレタン構造を有しているため塩基性条件での加水分解は困難である。実際, 水酸化リチウムを用いた場合には, 加水分解より先に基質の分解反応が進行した。そこでプロパンチオールとメチルリチウムから調製されるチオラートを, HMPA 中で反応させ脱メチル化反応を行ったところ, カルボン酸 **58** を得ることができた。そこでカルボン酸 **58** に対し BOPCl, トリエチルアミンを用いてアルコール **22** と縮合反応を行い **59** を得, ついで DDQ による MPM 基の脱保護を行うことで, **1** の左側 2 環性グアニジン構造を有するアルコール **60** を得ることができた。

60 を用いて **1** の全合成を行った(スキーム 11)。**60** に

^a Reagents and conditions: (a) (1) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, t-BuOH-H₂O, rt; TMSCHN₂, rt, 65% (23% SM recovery); (b) n-PrSLi, HMPA, rt, (c) **22**, BOPCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 54% (from **52**); (d) DDQ, CH₂Cl₂-H₂O, rt, 66%.

Scheme 10 Synthesis of bisguanidine alcohol **60**.

^a Reagents and conditions: (a) EDCI, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C, 60%; (b) HF-pyridine, THF, 0 °C, 89%; (c) (1) Pd/C, H₂, EtOAc, rt; (2) DEAD, PPh₃, toluene, rt; (d) TFA-CH₂Cl₂, rt, 24% (from **62**).

Scheme 11 Total synthesis of (+)-batzelladine A (**1**).

対し光学活性 2 環性グアニジンカルボン酸 38 とのエステル化反応を低温下行ったところ、 α 位が異性化することなく 61 を 60% の収率で得た。そこで 61 に対し、HF-ピリジンによる TBS 基の脱保護、接触還元による Cbz 基の脱保護、光延反応による分子内環化反応により 3 環性グアニジン 63 を合成した。最後に TFA により 4 つの Boc 基を脱保護し、その後 HPLC による精製 (ODS カラム, 50% CH_3CN 水溶液-0.1% TFA) を行い, (+)-batzelladine A(1) の合成を行うことができた²²⁾。合成した 1 の種々のスペクトルデータおよび旋光度は, Patil らが報告したそれらと一致したことから, 絶対配置を含めた 1 の構造を決定(確認)することができた。

4. アフィニティゲルを用いる batzelladine A, D の標的タンパク質の解析

Batzelladine 類の活性発現機構を解析する上で, 標的タンパク質を同定することが必須である。そこで合成した 1 および 3 を用い, CD 4, gp 120 をそれぞれ固定化したアフィニティゲルとの結合解析実験により, 標的タンパク質の同定を行うこととした。

N-ヒドロキシスクシンイミドによって活性化されたアガロースゲルに CD 4 および gp 120 を結合させた 2 種類のアフィニティゲルを調製し, PBS バッファーに溶解した種々濃度の batzelladine D(3) とともにインキュベートした。その後, 遠心分離によってアガロースゲルを沈殿させ, 上清中に存在する 3 の化合物量を HPLC により定量した。その結果, CD 4 アガロースゲルを用いた場合, 上清中に存在する遊離した 3 の量が大きく減少することがわかった。このことは, 3 が CD 4 に結合していることを意味する。そこで, batzelladine A(1), D(3) の標的タンパク質と推定された CD 4 に対する 1 と 3 のそれぞれの結合定数を調べることにした。

先に調製した CD 4 アガロースゲルを用い, 1 および 3 それぞれについて濃度依存的な CD 4 に対する結合量(上清中に存在する遊離した batzelladine 類の量に基づく)を測定した。これらを scatchard plot 解析して得たグラフを図 4 に示した。

得られたグラフは, 両化合物とも高い直線性を示すことがわかった。直線の傾きより得られる K_a 値, すなわち CD 4 に対する結合定数は, batzelladine A($3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)の方が batzelladine D($1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)のそれより大きいことがわかる。これより CD 4 に対する結合能は, batzelladine A (1)の方が強く, これは両化合物の gp 120-CD 4 結合阻害活性の強さの序列と一致することがわかった。さらに, リガンドのタンパク質に対する最大結合濃度を示すグラフ x 軸の切片が, batzelladine A と D についてほぼ 1 点で交わることから, それぞれの

Fig. 4 Scatchard plot analysis of batzelladine A(1) and batzelladine D(3) with CD 4 affinity gel. (Cb: Concentration of CD 4 bound batzelladines of 1 and 3. Cf: Concentration of free batzelladines of 1 and 3.)

CD 4 上に存在する結合部位の数は等しいことがわかった。以上の結果から, batzelladine A(1)および D(3)の gp 120-CD 4 結合阻害活性は, CD 4 と結合することにより発現し, その活性の強さは結合強度に比例することが明らかとなった²³⁾。

5. フォトアフィニティプローブ 64 を用いる結合部位解析の検討

アフィニティゲルを用いた実験により, 1 および 3 は CD 4 に結合することがわかったが, 次に batzelladine 類が CD 4 と結合した後, いかに gp 120 との複合体化を阻害しているか興味を持たれる。

Hamilton らは, ポリ環状グアニジン構造を持つ化合物と, ある一定の間隔でアスパラギン酸(Asp)が導入されたオリゴペプチドとを混合すると, グアニジンとアスパラギン酸中のカルボン酸残基とが静電的およびイオンの相互作用を介して複合体を形成し, ランダム構造が α -ヘリックス構造に安定化されることを報告している(図 5)²⁴⁾。

一方, 1998 年に報告された gp 120-CD 4 複合体の X 線結晶構造から²⁵⁾, CD 4 上に存在する gp 120 との複合体形成に用いられるアミノ酸配列には, アスパラギン酸残基が複数存在することがわかる(図 6)。従って, 複数のグアニジン官能基を有する batzelladine 類も, CD 4 上に存在するアミノ酸のカルボン酸残基を介して相互作用し, 結合阻害活性を示している可能性がある。

現在までに, gp 120-CD 4 阻害活性を指標とした構造活性相関に基づくフォトアフィニティプローブ 64(図 7)を合成し, その CD 4 への結合部位の同定について検討を行っている。

すなわち, batzelladine A, D の合成中間体を用いた構

Fig. 5 Stabilization of tetraaspartate peptide by tetraguanidinium compound.

Fig. 6 X-ray structure of CD4-gp120 complex, and schematic representation of interaction of 1 with Asp in CD4.

Fig. 7 Photoaffinity probe of batzelladine derivative 64.

造活性相関研究により, gp 120-CD 4 結合阻害活性発現には 3 環性グアニジン骨格に加え, グアニジン官能基が少なくとも 1 つは必要であることがわかった。そこで, batzelladine D 骨格とジアジリンおよびビオチン官能基を有する 64 をフォトアフィニティプローブ化合物とし

て合成した。64 を用いて CD 4 をビオチンラベル化し, これを western blotting 法を用いてストレプトアビジンで検出後, 得られるバンドをタンデム質量分析装置により解析することにより, batzelladine A(1)および D(3)の CD 4 への結合部位の同定が期待できる。

まず合成した 64 のラベル化の選択性を確かめるために, 64 とそれぞれ単独の CD 4, gp 120 による光照射ラベル化(図 8, lane 1, lane 2), さらに 64 と CD 4 と gp 120 を混合した条件下での光照射ラベル化実験を行った(lane 3)。その結果, いずれの場合にも CD 4 が選択的にラベル化されることが確認された。そこで次に 64 と CD 4 を用い, 1 および 3 を共存させた条件下での, ラベル化の阻害について検討を行った。まず CD 4 と 64 を混合した後に光を照射しなかった場合には, 結合に由来するバンドが検出されないこと(lane 4), 光を照射した場合にはバンドが観測されることを確認した(lane 5)。そこで同条件下, batzelladine A(1)および D(3)をそれぞれ共存させ光照射したところ, 明らかにラベル化の低下が観測された(lane 6, lane 7)。一方, 塩酸グアニジンを共存させた場合にはラベル化の阻害は観測されなかった(lane 8)。以上より, 64 は CD 4 に対して batzelladine A(1)および D(3)と同じ結合部位で結合していることが示唆され, 64 を用いた結合部位の解析が可能であることがわかった²⁶⁾。

Irradiation was performed with 365 nm for 20 min at 0 °C. lane 1: CD4 and 64, lane 2: gp120 and 64, lane 3: CD4, gp120 and 64, lane 4: CD4 and 64 without irradiation, lane 5: CD4 and 64 with irradiation, lane 6: CD4, 64 and 1 with irradiation, lane 7: CD4, 64 and 3 with irradiation, lane 8: CD4, 64 and guanidine-HCl with irradiation.

Fig. 8 Western blotting analysis of CD 4 and gp 120 with 64.

現在, 得られたバンドを酵素で消化し, その分解物をタンデム質量分析装置で解析している。これまでに結合部位の確定には至っていないが, 今後さらに解析を進め, リガンド結合部位を明らかにするとともに, batzelladine 類の gp 120-CD 4 結合阻害活性メカニズムを分子レベルで解明することを計画している。

おわりに

Batzelladine 類をタンパク質間の複合体化を制御する低分子化合物と捉え, これらの制御機構を解明することを目的に batzelladine A, D の全合成を行った。この際, 連続的な 1, 3- 双極環化付加反応が batzelladine 類の共

通母核である環状グアニジン構造を合成する上で、一般的かつ非常に有効な手法であることを見出した。本合成手法を基盤として、標的タンパク質とリガンド結合部位解析のためのプローブ分子の合成を行い、batzelladine A, D の標的が CD 4 であることを明らかにした。現在、1 および 3 の構造類縁化合物で、T 細胞内におけるタンパク質間の複合体化を制御する batzelladine F (5) やその類縁化合物の合成にも取り組んでいる。Batzelladine A や D の結合部位とともに、5 の標的タンパク質や結合部位が同定され、それらのタンパク質間の複合体化制御機構が明らかになれば、本メカニズムを基盤とする、他のタンパク質を標的とした新たな複合体化制御低分子化合物の設計も可能になる。今後これらをツールとする生命現象の解明にも取り組んでいきたい。

謝 辞 本稿で述べた研究成果は、石渡貴徳氏(2002 年修士卒)、共著者でもある下川淳氏(現、東京大院博士課程 2 年)、飯島有美氏(現、東京農工大院修士課程 2 年)の献身的な努力と鋭い観察力により得られたものです。深く感謝申し上げます。また本研究に関してご指導ご助言いただきました中田忠教授(東京理科大学)、橋本祐一教授(東京大学)に深謝いたします。Gp 120-CD 4 の阻害活性に関しては、田中晴雄教授、千葉春美助手(北里大薬学部)に行ってくださいました。またタンパク質のラベル化実験では菅沼雅美博士(埼玉県立がんセンター)にご指導いただきました。これらの先生にお礼申し上げます。また本研究は上原記念生命科学財団、文部科学省研究費(17035025)より助成を賜りました。お礼申し上げます。

(2006 年 2 月 1 日受理)

文 献

- 1) P. L. Toogood, *J. Med. Chem.*, **45**, 1543 (2002)
- 2) A. D. Patil, N. V. Kumar, W. C. Kokke, M. F. Bean, A. Freyer, J. C. De Brosse, S. Mai, A. Truneh, D. J. Faulkner, B. Carté, A. L. Breen, R. P. Hertzberg, R. K. Johnson, J. W. Westley, B. C. M. Potts, *J. Org. Chem.*, **60**, 1182 (1995)
- 3) A. D. Patil, A. J. Freyer, P. B. Taylor, B. Carté, G. Zuber, R. K. Johnson, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **62**, 1814 (1997)
- 4) S. Louwrier, M. Ostendorf, A. Tuynman, H. Himestra, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 905 (1996)
- 5) M. C. Elliott, M. S. Long, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2003 (2004)
- 6) P. A. Evans, T. Manangan, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 6637 (2001)
- 7) (a) B. B. Snider, J. Chen, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6977 (1996); (b) *idem*, *ibid.*, **39**, 5697 (1998); (c) G. P. Black, P. J. Murphy, N. D. A. Walshe, *ibid.*, **54**, 9481 (1998)
- 8) (a) A. S. Franklin, S. K. Ly, G. H. Mackin, L. E. Overman, A. J. Shaka, *J. Org. Chem.*, **64**, 1512 (1999); (b) F. Cohen, L. E. Overman, S. K. L. Sakata, *Org. Lett.*, **1**, 2169 (1999); (c) F. Cohen, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10782 (2001)
- 9) M. A. Arnold, S. G. Duron, D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 6924 (2005)
- 10) K. Nagasawa, H. Koshino, T. Nakata, *Tetrahedron Lett.*, **42**,

4155 (2001)

- 11) (a) J. J. Tufariello, G. B. Mullen, J. J. Tegeler, E. J. Trybulski, S. C. Wong, Sk. A. Ali, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2435 (1979); (b) J. J. Tufariello, J. M. Puglis, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 1489 (1986)
- 12) Sk. A. Ali, M. I. M. Wazeer, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 137 (1993)
- 13) B. B. Snider, M. V. Busuyek, *J. Nat. Prod.*, **62**, 1707 (1999)
- 14) K. Nagasawa, T. Ishiwata, Y. Hashimoto, T. Nakata, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 6383 (2002)
- 15) A. Goti, M. Cacciarini, F. Cardona, A. Brandi, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2853 (1999)
- 16) T. Ishiwata, T. Hino, H. Koshino, Y. Hashimoto, T. Nakata, K. Nagasawa, *Org. Lett.*, **4**, 1921 (2002)
- 17) S. G. Duron, D. Y. Gin, *Org. Lett.*, **3**, 1551 (2001)
- 18) K. B. Sharpless, R. F. Lauer, A. Y. Teranishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6137 (1973)
- 19) (a) Y. Ito, T. Hirao, T. Saegusa, *J. Org. Chem.*, **43**, 1011 (1978); (b) J. Tsuji, I. Minami, I. Shimizu, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5635 (1983); (c) I. Minami, K. Takahashi, I. Shimizu, T. Kimura, J. Tsuji, *Tetrahedron*, **24**, 1971 (1986)
- 20) K. C. Nicolaou, Y.-L. Zhong, P. S. Baran, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7596 (2000)
- 21) (a) S. Murahashi, N. Komiya, H. Terai, T. Nakae, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15312 (2003); (b) K. Tanaka, T. Kobayashi, H. Mori, S. Katsumura, *J. Org. Chem.*, **69**, 5906 (2004)
- 22) J. Shimokawa, K. Shirai, A. Tanatani, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1559 (2004)
- 23) J. Shimokawa, T. Ishiwata, K. Shirai, H. Koshino, A. Tanatani, T. Nakata, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *Chem. Eur. J.*, **11**, 6878 (2005)
- 24) T. Haack, M. W. Peczu, X. Salvatella, J. S.-Quesada, J. Mendoza, A. D. Hamilton, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11813 (1999)
- 25) A. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Nature*, **393**, 648 (1998)
- 26) J. Shimokawa, Y. Iijima, H. Chiba, H. Tanaka, M. Suganuma, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *in preparation*

PROFILE

長澤和夫 東京農工大学大学院共生科学技術
研究院生命工学専攻・助教授

〔経歴〕1993 年早稲田大学大学院理工学研究
科博士課程修了, 1993-2000 年理化学研究所
有機合成化学研究室研究員, 2001-04 年東京
大学分子細胞生物学研究所助教授, 2004 年 4
月より現職。1997-99 年ハーバード大学博士
研究員(岸義人教授)。〔専門〕有機合成化
学。〔連絡先〕Tel. & Fax : [redacted] e-
mail: [redacted]

下川 淳 東京大学大学院薬学研究科 博士
後期課程在学

〔経歴〕2003 年東京大学薬学部薬学科修了,
2005 年東京大学大学院薬学系研究科修士課
程修了, 同年より同博士後期課程在籍。2005
年より日本学術振興会特別研究員。〔専門〕
有機合成化学, 天然物合成化学。〔連絡先〕

Tel. [redacted]
Fax : [redacted] e-mail: [redacted]