

アジアサイクラマイド及びその誘導体の構造化学的研究

浅野 晶子

Structural Study of Ascidiacyclamide and its Analogues

Akiko ASANO

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 18, 2007; Accepted November 19, 2007)

Ascidiacyclamide (ASC), cyclo(-Ile-Oxz-D-Val-Thz)₂, is a cytotoxic cyclic peptide isolated from tunicates containing the unusual amino acids, thiazole-4-carboxylic acid (Thz) and 4,5-dihydro-5-methyloxazole (Oxz). The chemical structure of ASC is characterized by a repeated sequence with C₂-symmetry. NMR spectroscopic and X-ray diffraction analyses of ASC have shown the existence of two major conformations; square and folded forms. To better understand the conformational behavior of ASC, the Ile residue was replaced with another amino acid to disturb the C₂-symmetry. This asymmetric modification indicated that the conformational equilibrium between the square and folded forms is related to the bulkiness of the substituted amino acid. Furthermore, desoxazoline-ascidiacyclamide analogues (*d*ASC) were designed for reducing conformational restraints imposed by the Oxz rings, and were all folded. These results suggested that the Oxz rings play a key role in the conformational equilibrium. Regarding this point, we designed ASC diastereomers to modify the conformational restraints induced from the chiral carbons (C α and C β) of Oxz. The two novel conformations, flat-square and reverse-folded forms, were found in the diastereomers. These findings indicated that the C α (Oxz) atoms strongly link to structure changes in ASC, while the C β (Oxz) atoms impose moderate restraints on ASC. The cytotoxicities of ASC analogues were also evaluated for P388 lymphocytic leukemia cells. It was suggested that the conformational flexibility of ASC is important for its cytotoxicity.

Key words—Ascidiacyclamide (ASC); C₂-symmetry; X-ray diffraction; conformational equilibrium ; Oxz ring; cytotoxicity

1. 序論

海洋生物が生成し、含有している成分は、陸上生物に比べて特異な化学構造を有し、様々な興味ある生理活性を示す。このような観点から海洋生物は有効資源と考えられ、今日までに数多くの海洋生物由来の生理活性物質が発見されてきた。

特に無脊椎動物と脊椎動物の間に位置するといふ、系統分類学上特異なホヤからは、医薬あるいはそのリード化合物として望まれる生理活性（抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、免疫抑制作用等）を示すペプチドが相次いで報告されてきた¹⁻⁶⁾。また、その構造からイオンの膜透過を助ける、イオノフォアとしての可能性も期待されている⁷⁻¹¹⁾。

このような生理活性ペプチドの構造は、次のような点で天然のタンパク質中におけるペプチド鎖と異なっている。そしてこれらの特徴は直接、間接的に主鎖のコンフォメーションに影響を与えると考えられる。¹²⁻¹⁷⁾

- ① D-アミノ酸残基や側鎖が特殊なアミノ酸残基を含んでいる。
- ② ペプチド主鎖が環状構造を形成している。
- ③ ペプチド主鎖のアミド結合が一部エステル結合などに置き換わっている。
- ④ イミノ基のメチル化、同一残基内での環状化等様々な化学修飾を受けている。

本研究で取り上げたアシジアサイクラマイド(ASC)¹⁸⁾は、1983年遠藤らによってオーストラリアに生息する複合ホヤから単離された、一連の環状ペプチドの一つであり、抗腫瘍活性を示す。そして生理活性だけでなく、その化学構造も興味深いものである。ASCの化学構造の1つ目の特徴は、分子内に非タンパク質構成アミノ酸であり、ヘテロ環を含むチアゾール(Thz)アミノ酸とオキサゾリン(Oxz)アミノ酸が交互に配置されていることである。2つ目の特徴は、ペプチド環の中心に分子内二回回転対称(C_2 対称)を有することである。そして、そのアミノ酸配列はcyclo(-Ile-Oxz-D-Val-Thz)₂である。このような構造化学的特徴により、ASCがどのようなコンフォメーションをとっているかを知ることは、その生理活性作用機構を明らかにする上で重要である。更に、個々の構成要素について得られる知見は、単なる構造活性相関にとどまらず、天然にはない新規ペプチド、タンパク質を作り出す創薬という観点からも重要な意義があると考えられる。

我々は、ASCの様々な誘導体について、X線結晶構造解析、NMR、CDスペクトル測定によりコンフォメーション解析を行った。本稿では、ASC及びその誘導体の合成法、ASCの C_2 対称性を崩した、非対称誘導体及び、Oxz環のキラリティー

に着目した、ジアステレオマーの構造化学的研究について記述する。

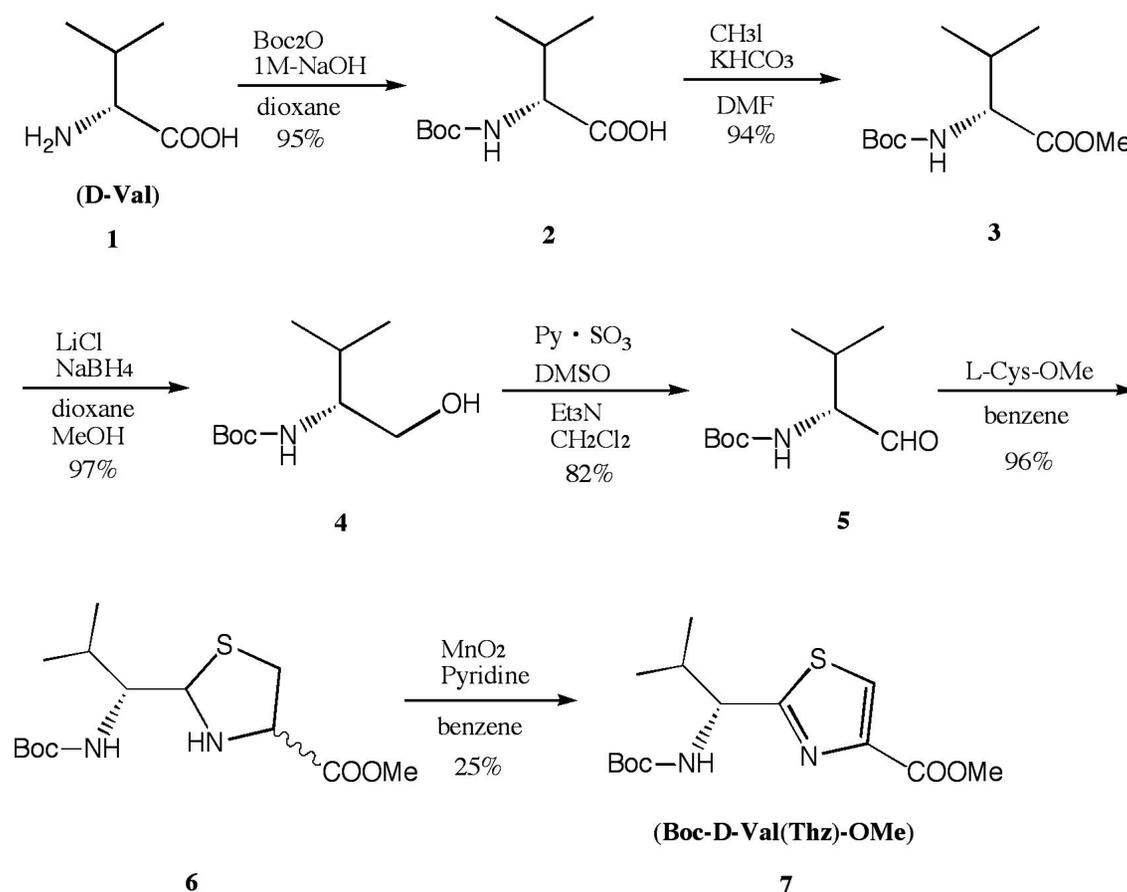
2. ASC 及びその誘導体の合成

各誘導体の合成は、濱田らによる方法¹⁹⁾を参考に行った。Oxzアミノ酸はL-IleとL-Thrから成るジペプチドが縮合環化して形成されると考えられ、一方、Thzアミノ酸はD-ValとCysから成るジペプチドが縮合環化後、酸化芳香化して形成されると考えられる。Thzアミノ酸残基は、通常のペプチド合成条件下では安定であるので、合成原料となるD-Val由来のThzアミノ酸を合成し、^{20, 21)}それを原料としてペプチド縮合に用いた。

Oxz環の構築段階については2カ所考えられた。1つ目は、Thzアミノ酸と同様にL-Ile由来のOxzアミノ酸を合成し、それをペプチド縮合の原料とする方法である。2つ目は、環状ペプチドとした後にOxz環を構築する方法である。しかし、不安定なOxz環は、可能な限り遅い段階での構築が最良であると考え、後者の方法を用いた。

また、Oxz環には α と β の2カ所に不斉炭素が存在するため、その点についても考慮しなければならない。目的のOxz環の立体配置は α がS配置、 β がR配置であり、L-Thrの立体を保持している。しかし、化学合成におけるThr残基の脱水環化は、生合成の場合と異なり、Thr β 位の反転を伴う。よって目的のOxz環の立体配置を得るには、 β がS配置をもつL-*allo*-Thrを用いる必要がある。そこで原料としてL-*allo*-Thrの合成^{22, 23)}を行った。

以上の合成方針をまとめると、まずペプチド縮合の原料となるD-Val由来Thzアミノ酸とL-*allo*-Thrの合成を行い、次にそれらを用いて環状ペプチドの縮合を行う。そして最後にOxz環を構築し、目的の化合物を得る。以下に各合成方法の詳細を述べる。



Scheme 1

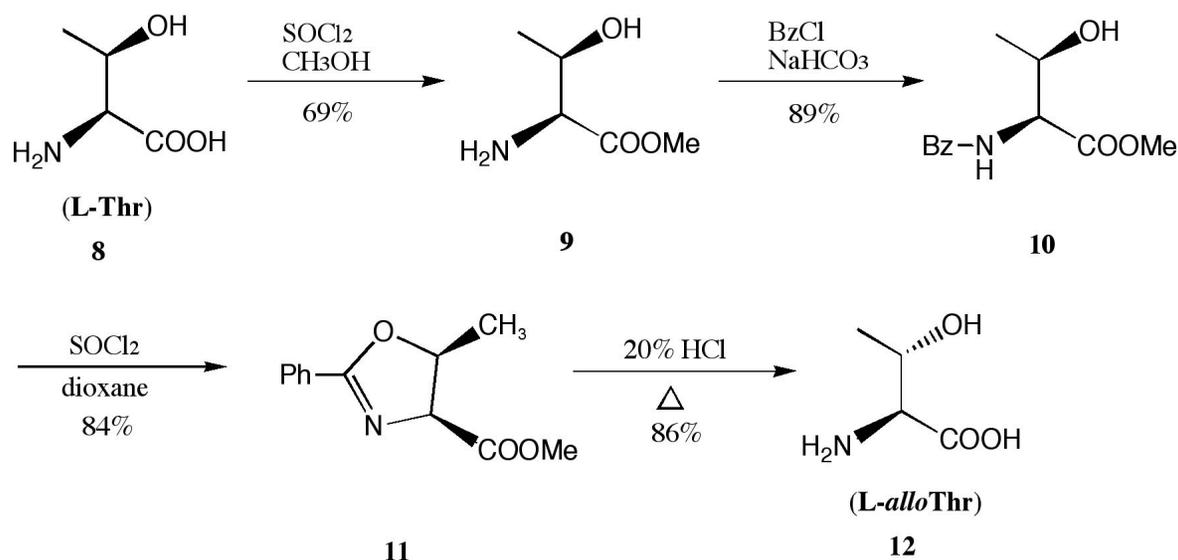
2-1. チアゾールアミノ酸の合成

D-Val 由来の Thz アミノ酸誘導体 (Boc-D-Val(Thz)-OMe) (7) の合成は, Scheme 1 に従って行った. D-Val(1) のアミノ基を Boc (*t*-butyloxycarbonyl) 基で保護した後 (2), ヨウ化メチルを用いてカルボキシル基を OMe (methyl ester) 基で保護した (3). 次に塩化リチウム, 水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元により, アルコール誘導体 (4) とし, ピリジン-三酸化イオウ錯体を用いた酸化により, アルデヒド誘導体 (5) とした. このアルデヒド誘導体と Cys-OMe とを縮合させチアゾリジン誘導体 (6) をエピマーの混合物として合成した. この

混合物を分離することなく, 活性二酸化マンガンで酸化して, 目的の Boc-D-Val(Thz)-OMe (7) を得た.

2-2. L-アロスレオニンの合成

L-*allo*-Thr (12) の合成は Scheme 2 に従って行った. L-Thr (8) のカルボキシル基を OMe 基で保護し (9), 塩化ベンゾイルでアミノ基に Bz (Benzoyl) 基を導入し, Bz-Thr-OMe (10) を合成した. 塩化チオニルで Oxz 環を形成させ (11), 20% 塩酸中で還流することにより目的の L-*allo*-Thr (12) を得た.



Scheme 2

2-3. ペプチド縮合及び環状化

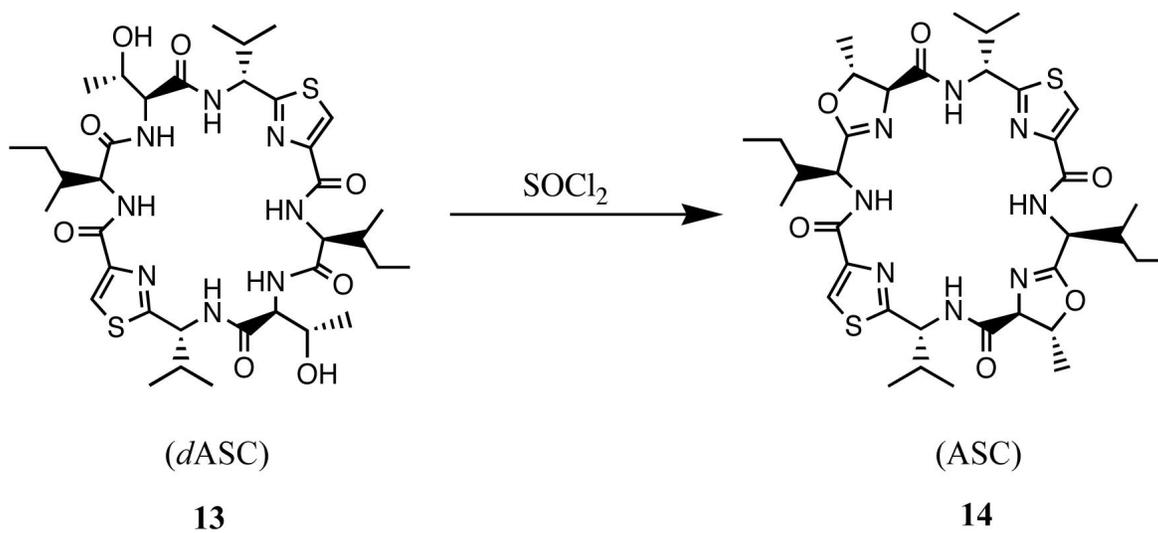
ペプチド縮合は液相法により行った。保護基として、N末端はBoc基、C末端はOMe基を選択した。脱保護の方法は、Boc基が4M塩酸/ジオキサン、OMe基はアルカリけん化により行った。縮合剤にはEDC (1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide) 及びその添加剤として、HOBT (1-hydroxybenzotriazole) を用いた。HOBTは縮合反応に伴うラセミ化を最小限に抑えて、反応速度を大幅に改善する作用がある。²⁴⁾ これらの縮合剤により、3残基のフラグメントを合成し、それらのフラグメント縮合により6残基ペプチドを合成した。しかし、6残基の鎖状ペプチドから、環状化の際の縮合にEDC/HOBTを用いると、収率が10~20%と非常に低かった。そこで、環状化の段階のみ、縮合剤としてPyBOP (benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate)^{25, 26)} を用いることにより、30~60%程度まで収率が改善された。

2-4. オキサゾリン環形成反応

Scheme 3に示すように、塩化チオニルを用いて、最後にOxz環の構築を行った。Thr残基の水酸基が塩化チオニル処理によりOxz環を形成させると考えられるが、各誘導体間において、この段階における収率が20~80%とかなりの差が確認された。なお、ASC(**14**)及びその各誘導体の前駆体化合物であり、Oxz環が形成されていない化合物**13**をDesoxazoline ascidiacyclamide (*d*ASC) という。

3. ASC非対称誘導体の構造化学的研究

ASCの C_2 対称に着目し、ASCの片方のIle残基を異なるアミノ酸残基に置換した、非対称誘導体を合成した。置換アミノ酸残基の側鎖のかさ高さにより、非対称性の程度が異なっている。Fig. 1に置換した4種類のアミノ酸を示した。これらの誘導体を用い、ASCの C_2 対称性とコンフォーメー



Scheme 3

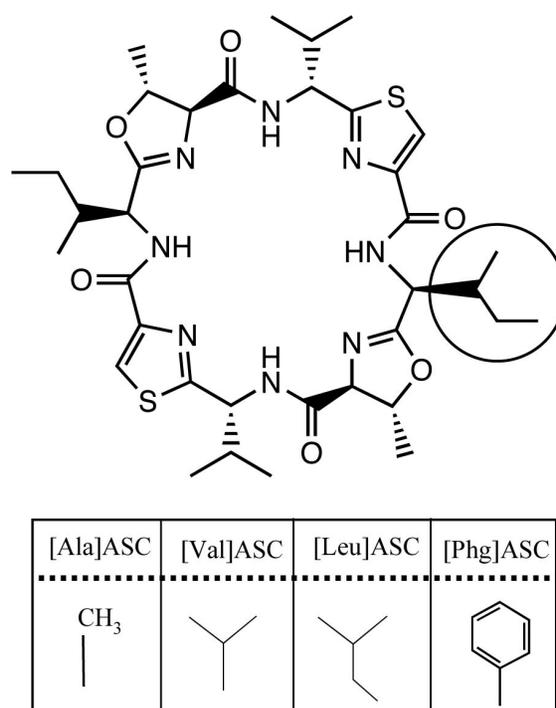


Fig. 1. Chemical structures of asymmetric analogues of ASC. A circled Ile residue was substituted by other amino acid.

シヨンの相関について調べることを目的とした。更に、Oxz環が形成されていない *d*ASC 誘導体についても構造解析等を行い、Oxz環の有無による、コンフォメーションへの影響を検討した。

3-1. ASC 非対称誘導体の X 線結晶構造解析

合成した ASC 非対称誘導体のうち、X 線回折測定可能な結晶が得られた、[Ala]ASC, [Val]ASC, [Phg]ASC 及び *d*ASC 非対称誘導体として [Ala]*d*ASC, [Val]*d*ASC, *d*ASC について X 線結晶構造解析を行った。

Fig. 2(a) に [Ala]ASC の X 線結晶構造解析の結果を示した。その構造は、以前に石田らによって報告されている、ASC の結晶構造²⁷⁻³⁰⁾とは異なっていた。2つの Oxz環を支点に主鎖の骨格が折れたたまっており、2つの Thz環は、スタッキング相互作用可能な位置に、互いにほぼ平行に向き合っていた。更に $N(\text{Xxx}^1)\text{-H}\cdots\text{O}^{\gamma 1}(\text{Oxz}^6)$, $N(\text{D-Val}^3)\text{-H}\cdots\text{O}(\text{Thz}^8)$, $N(\text{Ile}^5)\text{-H}\cdots\text{O}^{\gamma 1}(\text{Oxz}^2)$, $N(\text{D-Val}^7)\text{-H}\cdots\text{O}(\text{Thz}^4)$ 間は、それぞれ水素結合が可能である距離であった (Table 1)。このような特徴をもつコンフォメーションを以下“folded form”と分類した。

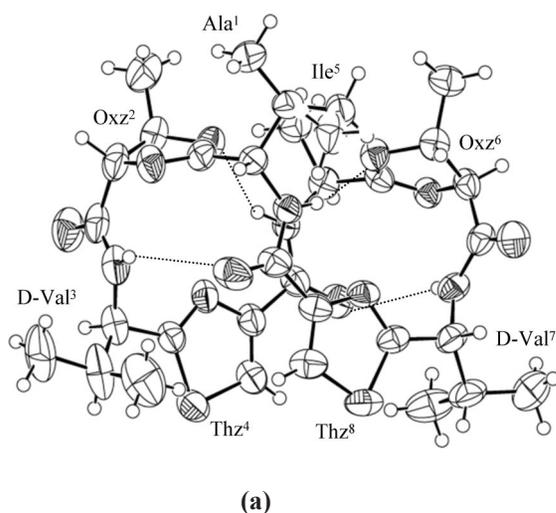


Fig. 2 (b) に [Val]ASC の X 線結晶構造解析の結果を示した。主鎖の骨格が、交互に Oxz環と Thz環を頂点とする、長方形のようになっており、Ile残基と Thz環とのアミド結合部位で折れ曲がっているものの、全体的には分子は開いた構造をとっていた。つまり、ASC の結晶構造²⁷⁻³⁰⁾の特徴とよく一致していた。そして、[Phg]ASC の結晶構造も同様であった。このような特徴をもつコンフォメーションを以下“square form”と分類した。

[Ala]*d*ASC, [Val]*d*ASC, *d*ASC も互いに類似した結晶構造であった。そして、その構造は“folded form”に分類された。つまり、2つの *allo*Thr 残基を支点に主鎖の骨格が折れたたまっており、分子内の2つの Thz 間でのスタッキング相互作用により安定化していた。そして、 $N(\text{Xxx}^1)\text{-H}\cdots\text{O}(\text{Ile}^5)$, $N(\text{D-Val}^3)\text{-H}\cdots\text{O}(\text{Thz}^8)$, $N(\text{Ile}^5)\text{-H}\cdots\text{O}(\text{Xxx}^1)$, $N(\text{D-Val}^7)\text{-H}\cdots\text{O}(\text{Thz}^4)$ 間の距離は、水素結合可能な距離であった (Table 1)。

以上の結果から、ASC 非対称誘導体は、分子の開いた“square form”と、分子が折れたたまった“folded form”の2種類のコンフォメーションに分類できることが明らかとなった。そして、どち

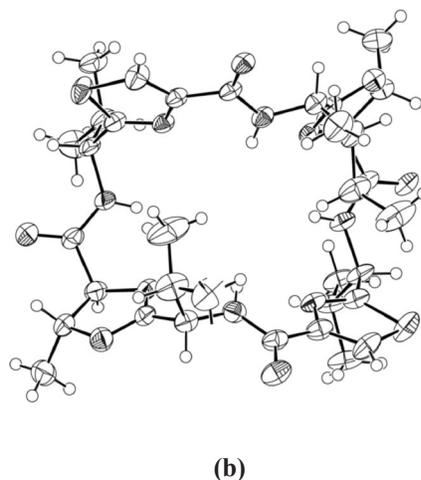


Fig. 2. Crystal structures of (a) [Ala]ASC and (b) [Val]ASC. Dashed lines represent hydrogen bonds.

Table 1. Hydrogen bonds and stacking between the Thz rings of folded form in crystal structures of ASC and dASC analogues

	[Ala]ASC		
	D...A (Å)	<D-H...A (°)	S...S (Å)
N(Xxx ¹)-H...O ¹ (Oxz ⁶)	3.193	153.2	---
N(D-Vaf ¹)-H...O(Thz ⁸)	3.283	138.9	---
N(Ile ⁵)-H...O ¹ (Oxz ²)	3.317	157.1	---
N(D-Vaf ¹)-H...O(Thz ⁴)	3.401	133.6	---
S(Thz ⁴)...S(Thz ⁸)	---	---	4.531

	d[Ala]ASC			d[Val]ASC			dASC		
	D...A (Å)	<D-H...A (°)	S...S (Å)	D...A (Å)	<D-H...A (°)	S...S (Å)	D...A (Å)	<D-H...A (°)	S...S (Å)
N(Xxx ¹)-H...O(Ile ⁵)	3.001	161.4	---	3.026	161.0	---	3.071	161.1	---
N(D-Vaf ¹)-H...O(Thz ⁸)	3.078	155.8	---	3.057	152.6	---	3.051	156.2	---
N(Ile ⁵)-H...O(Xxx ¹)	3.075	161.2	---	3.057	156.8	---	3.081	162.6	---
N(D-Vaf ¹)-H...O(Thz ⁴)	2.968	148.5	---	3.021	144.4	---	3.092	156.2	---
S(Thz ⁴)...S(Thz ⁸)	---	---	4.280	---	---	4.368	---	---	4.852

らにフォールディングするかは、置換アミノ酸によって左右されることが示唆された。つまり、置換アミノ酸のかさ高さが Ile 残基と同程度であれば、 C_2 対称性が保持され“square form”であった。また、置換アミノ酸のかさ高さが Ile 残基より小さいために、 C_2 対称性が失われた誘導体は、“folded form”であった。更に、dASC 誘導体の結晶構造は、非対称の程度にかかわらず、すべて“folded form”であった。よってコンフォメーションのコントロールにおいて、Oxz 環の重要性が示唆された。

3-2. ASC 非対称誘導体の CD スペクトルの測定

溶液状態でのコンフォメーションを検討するために、円二色性 (CD) スペクトルの測定を行った。アセトニトリル (MeCN) 100% から、MeCN に対して 2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE) 濃度を 10, 20, 30, 40, 50, 100% と変化させ、測定した結果を次ページの Fig. 3 に示した。

[Ala]ASC と [Leu]ASC はよく似た CD スペクトルであった (Fig. 3 (a))。よって、これらの誘導体は、溶液中において互によく似たコンフォメー

ションをとっていると考えられる。これらの CD スペクトルは、MeCN 及び TFE 両溶媒中において、220 ~ 270nm にかけて、なだらかな正のコットンを示しており、TFE 濃度の増加による影響をあまり受けていなかった。このように 220 ~ 270nm になだらかな正のコットンを示す CD スペクトルのパターンを type I とした。

一方、ASC, [Val]ASC, [Phg]ASC もまた互によく似た CD スペクトルであった (Fig. 3 (b))。100%MeCN 中では、245nm 付近に小さな負のコットンが、210nm 付近には正のコットンが観測された。このような特徴を示す CD スペクトルのパターンを type II とした。そして TFE 濃度の増加に伴い、245nm におけるモル楕円率は増加し、210nm におけるモル楕円率は低下していた。最終的には 100%TFE 溶媒中において、type I の CD スペクトルを観測した。また 230nm には isochromatic point が見られた。

結晶構造と CD スペクトルとの相関から、type I, type II のスペクトルは、それぞれ“folded form”と“square form”を示しており、[Ala]ASC と [Leu]ASC の溶液中でのコンフォメーション

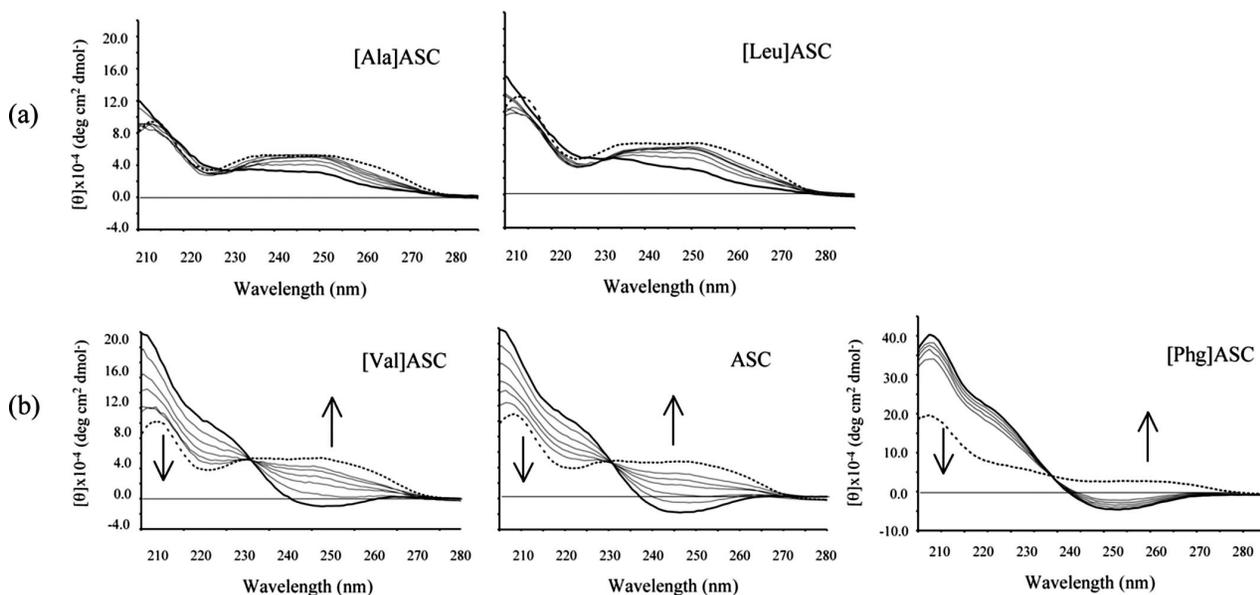


Fig. 3. (a) Type I CD spectra of [Ala]ASC and [Leu]ASC. (b) Changing to type I from type II CD spectra of [Val]ASC, ASC and [Phg]ASC. The spectra were measured in MeCN solution (bold line) as a function of TFE concentration (10, 20, 30, 40 and 50%). Spectra in TFE solution are drawn with dotted lines. The scale of y-axis of spectra of [Phg]ASC are different from others.

は、“folded form”に傾いていることが示唆された。また230nmにおけるisochromatic pointの観測は、2つのコンフォメーションによる平衡の存在を示唆しており、ASC, [Val]ASC, [Phg]ASCは、TFEの影響により、“square form”から“folded form”へとコンフォメーションが変化すると考えられた。

3-3. ASC 非対称誘導体の構造活性相関

各誘導体について、P388 マウスリンパ性白血病細胞に対する細胞毒性試験 (*in vitro*) を行った。得られた結果を Table 2 に示した。ASC の ED_{50} 値は $10.5 \mu\text{g/ml}$ であった。これと類似した値を示した誘導体は、[Val]ASC と [Phg]ASC であった。また、ASC と比較して、[Ala]ASC は約 50%, [Leu]ASC は約 30% 活性が低下していた。そして *d*ASC 非対称誘導体はいずれも活性がなかった。

構造活性相関としては、ASC, [Val]ASC, [Leu]ASC, [Phg]ASC の結晶構造が“square form”であり、[Ala]ASC の結晶構造が“folded form”であったことから、“square form”が活性型コンフォメー

ションである傾向が見られた。更に、活性を全く示さなかった *d*ASC 非対称誘導体の結晶構造は全て“folded form”であった。また、溶液中では、ASC, [Val]ASC, [Phg]ASC が“square form”と“folded form”との間でコンフォメーション平衡の存在を示したのに対し、活性が低下した [Leu]ASC ではコンフォメーション平衡が見られなかった。よって ASC の活性発現には、“square form”と“folded form”の両方のコンフォメーションをとり得る柔軟性が必要であることが示唆された。

4. ASC ジアステレオマーの構造化学的研究

前章の研究結果は、ASC のコンフォメーションにおける、Oxz 環の重要性を示唆するものであった。そこで本章では、Oxz 環に焦点をあて、Oxz 環キラル修飾によるジアステレオマーを合成した。

Oxz 環の前駆体である Thr 残基は、 $C\alpha$ と $C\beta$ の 2 つの不斉炭素をもっており、L-Thr, L-*allo*-Thr, D-Thr 及び D-*allo*-Thr の 4 種類の立体異性体

Table 2. Cytotoxic activities of ASC and its analogues for P388 cells

ASC analogue	ED ₅₀ (μg/ml)	<i>d</i> ASC analogue	ED ₅₀ (μg/ml)
[Ala]ASC	49.0	[Ala] <i>d</i> ASC	>100
ASC (1)	10.5	<i>d</i> ASC (1)	>100
[Leu]ASC	29.5	[Leu] <i>d</i> ASC	>100
[Val]ASC	7.4	[Val] <i>d</i> ASC	>100
[Phg]ASC	12.4	[Phg] <i>d</i> ASC	>100
ASC2	6.6	<i>d</i> ASC2	>100
ASC3	21.5	<i>d</i> ASC3	>100
ASC4	21.5	<i>d</i> ASC4	>100
ASC5	9.8	<i>d</i> ASC5	>100
ASC6	31.8	<i>d</i> ASC6	>100
ASC7	17.5	<i>d</i> ASC7	>100
ASC8	>100	<i>d</i> ASC8	>100
ASC9	8.8	<i>d</i> ASC9	>100
		<i>d</i> ASC10	>100

Table 3. Configurations of 2nd (α, β) and 6th (α, β) in *d*ASC and ASC diastereomers

	Configurations of Thr residues			Configurations of Oxx rings	
	2 nd (α, β)	6 th (α, β)		2 nd (α, β)	6 th (α, β)
<i>d</i> ASC(1)	2 nd (S, S)	6 th (S, S)	ASC(1)	2 nd (S, R)	6 th (S, R)
<i>d</i> ASC2	2 nd (S, S)	6 th (S, R)	ASC2	2 nd (S, R)	6 th (S, S)
<i>d</i> ASC3	2 nd (S, S)	6 th (R, R)	ASC3	2 nd (S, R)	6 th (R, S)
<i>d</i> ASC4	2 nd (S, S)	6 th (R, S)	ASC4	2 nd (S, R)	6 th (R, R)
<i>d</i> ASC5	2 nd (S, R)	6 th (S, R)	ASC5	2 nd (S, S)	6 th (S, S)
<i>d</i> ASC6	2 nd (S, R)	6 th (R, R)	ASC6	2 nd (S, S)	6 th (R, S)
<i>d</i> ASC7	2 nd (S, R)	6 th (R, S)	ASC7	2 nd (S, S)	6 th (R, R)
<i>d</i> ASC8	2 nd (R, R)	6 th (R, R)	ASC8	2 nd (R, S)	6 th (R, S)
<i>d</i> ASC9	2 nd (R, R)	6 th (R, S)	ASC9	2 nd (R, S)	6 th (R, R)
<i>d</i> ASC10	2 nd (R, S)	6 th (R, S)	ASC10*	2 nd (R, R)	6 th (R, R)

*ASC10 was not able to be synthesized.

が存在する。そして、β位の反転を伴って、それぞれ L-*allo*-Oxx, L-Oxx, D-*allo*-Oxx 及び D-Oxx が形成される (Scheme 3)。*d*ASC は分子内に 2 つの L-*allo*-Thr 残基を、ASC は分子内に 2 つの L-Oxx 環をそれぞれ有している。*d*ASC 分子内の 2 カ所の L-*allo*-Thr 残基を、異なる 4 種類の立体配置の

Thr 残基に置換すると、10 通りの組み合わせがあり、そして Oxx 環を形成させることにより、10 種類の ASC ジアステレオマーが考えられる。

天然型の ASC を除く、9 種類のジアステレオマーの合成を行った。Table 3 に、これらジアステレオマーのキラル修飾カ所の立体配置をまとめ

た。ASC10 については、2カ所の D-Thr 残基から D-*allo*-Oxz 環への反応が進まず、合成することができなかった。

4-1. ASC ジアステレオマーの X 線結晶構造解析

合成したジアステレオマーのうち、ASC5, 7, 8 及び *d*ASC2 ~ 10 について、X 線回折測定可能な結晶が得られたので、X 線結晶構造解析を行った。

ASC5 は 2つの Oxz 環を L-*allo*-Oxz 環に置換し

たジアステレオマーである。つまり、2つの Oxz 環のそれぞれの β 位の立体配置のみが修飾されており、 C_2 対称性は保たれている。Fig. 4 (a) は ASC (黒) と ASC5 (グレー) の結晶構造を重ね合わせた図である。この 2つの構造を比較すると、Oxz 環の $C\beta$ 原子どうしが 0.79-0.99Å ずれており、 $C\gamma$ 原子はそれぞれ逆を向いていた。また、D-Val 残基の $C\alpha$ 原子どうしも 0.74-0.81Å ずれていた。このような局所的なずれが見られるものの、全体的な主鎖骨格の構造は、RMS 値が 0.31Å と小さい

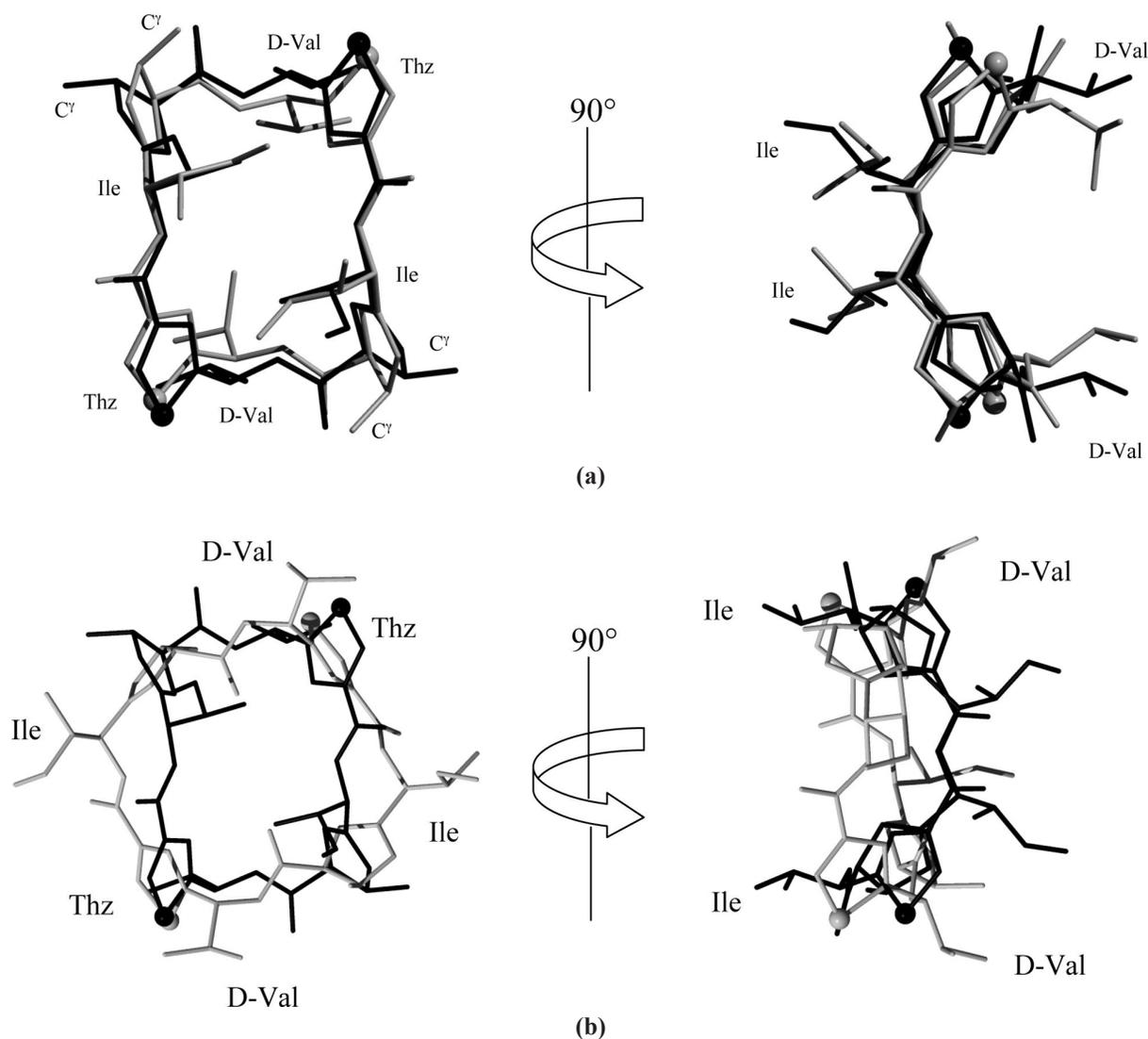


Fig. 4. Superimpositions of the crystal structures of (a) ASC and ASC5, and (b) ASC and ASC7. Molecular fitting was carried out for the peptide backbone. Black and gray sticks represent ASC and ASC5 or ASC7, respectively. Sulfur atoms are drawn as balls, and hydrogen atoms are omitted for clarity.

値となっており、類似構造をとっていた。つまり、ASC5は“square form”に分類されるコンフォメーションであった。

ASC7は片方のOxz環がL-*allo*-Oxz、もう片方がD-*allo*-Oxzに置換されたジアステレオマーである。つまり、一方のOxz環は α 位が、もう一方のOxz環は β 位が修飾されている。Fig. 4 (b)は、ASC(黒)とASC7(グレー)の結晶構造を重ね合わせた図である。ASC7は“square form”であるASCの構造と比較して、主鎖のペプチド環が、より平らに開いた状態であることがわかる。全体的な主

鎖のASCからのずれはRMS値にして1.62Åであった。このような特徴をもつASC7のコンフォメーションを以下“flat-square form”と分類した。また、ASC7においては、ペプチド環中央に“square form”には見られないキャビティーが見られた(Fig. 5)。

ASC8は、2つのOxz環をD-Oxz環に置換したジアステレオマーである。つまり、2つのOxz環のそれぞれの α 位、 β 位共に立体配置が修飾されており、 C_2 対称性は保たれている。ASC8の結晶構造解析の結果をFig. 6に示した。ASC8の結晶

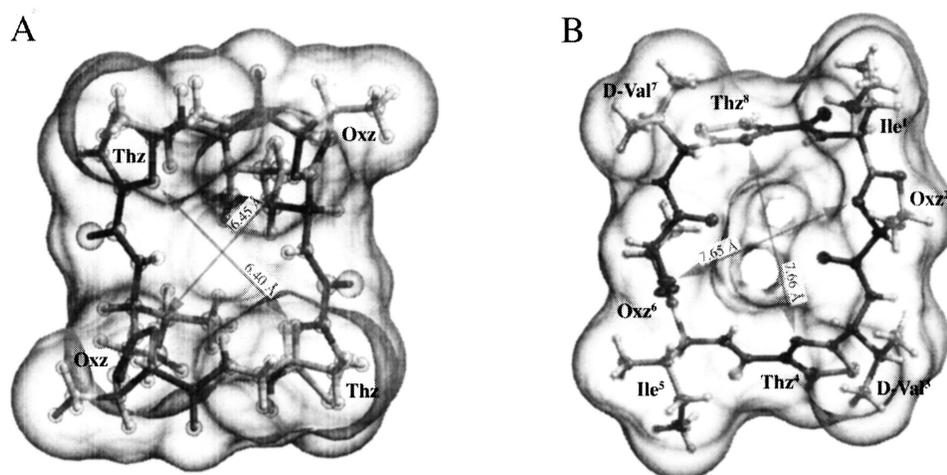


Fig. 5. Molecular structures of (A) the square form of ASC and (B) the flat square form of ASC7 with the accessible surfaces. The accessible surfaces were calculated by MSMS and figures were drawn by Raster 3D.

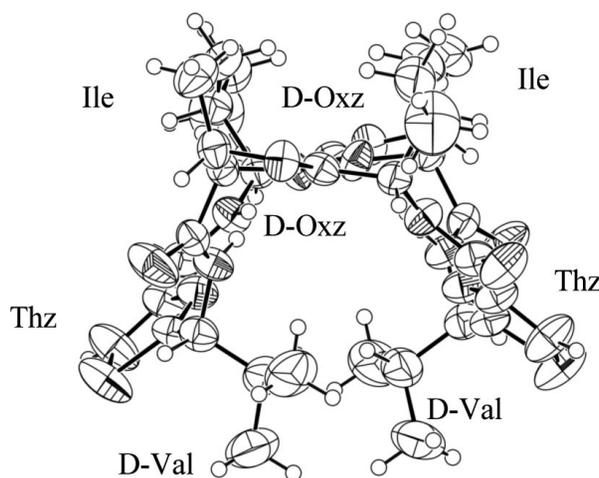


Fig. 6. Crystal structure of ASC8.

構造は、“folded form”同様、Oxz環を支点にペプチド環が折れ曲がっていたが、その向きは反対であった。そして、“folded form”の2つのThz環は、互いにスタッキング相互作用可能な位置に向き合っているのに対し (Fig. 2 (a)), ASC8は、D-Val側鎖のイソプロピル基が、Thz環のスタッキングを邪魔するような位置に存在していた。このようなASC8のコンフォメーションを“reverse-folded form”と分類した。

全ての*d*ASCジアステレオマーは、主鎖の構造が、Thr²とThr⁶残基の2カ所を支点に分子が折れたたまたまており、2つのThz⁴とThz⁸環の間でスタッキング相互作用によって安定な構造をとっていた。そしてN(Ile¹)H···O(Ile⁵), N(D-Val³)H···O(Thz⁸), N(Ile⁵)H···O(Ile¹)及びN(D-Val⁷)H···O(Thz⁴)の4カ所で水素結合可能な距離にあり、“folded form”に分類された。

また、側鎖部分に関しては、置換したThr残基の立体配置によって違いが見られた。L-Thr, L-*allo*-Thr, D-Thr残基の側鎖は主鎖のペプチド環に対して*axial*であったが、D-*allo*-Thr残基の側鎖は*equatorial*に配置していた。Fig. 7にそれぞれの例として、*d*ASC5と*d*ASC8の結晶構造を示した。

このように*d*ASCジアステレオマーは側鎖部分

に多少の違いが見られたものの、ペプチド主鎖のコンフォメーションに及ぼすほどの影響はなかった。

以上の結果をまとめると、ASC5は、ASC(1)と同じ“square form”であった。つまりOxz環β位の立体配置は、結晶構造には影響を及ぼさなかった。ASC7及びASC8は、それぞれ“flat-square form”と“reverse-folded form”のコンフォメーションをとっており、これらは非対称誘導体では見られない新規コンフォメーションであった。ASC7はOxz⁶環α位の立体配置がRに置換されており、ASC8はOxz², Oxz⁶環α位両方の立体配置がRに置換されている。このようにOxz環α位の立体配置は、ペプチド主鎖のコンフォメーションに大きな影響を及ぼした。

一方、*d*ASCジアステレオマーは、キラル修飾にかかわらず、全ての結晶構造が“folded form”であった。つまりOxz環を形成してはじめて様々な構造をとり得ることが示唆された。

4-2. ASCジアステレオマーのCDスペクトル測定

ASC非対称誘導体と同様の方法で、CDスペクトルの測定を行った。その結果をスペクトルのタ

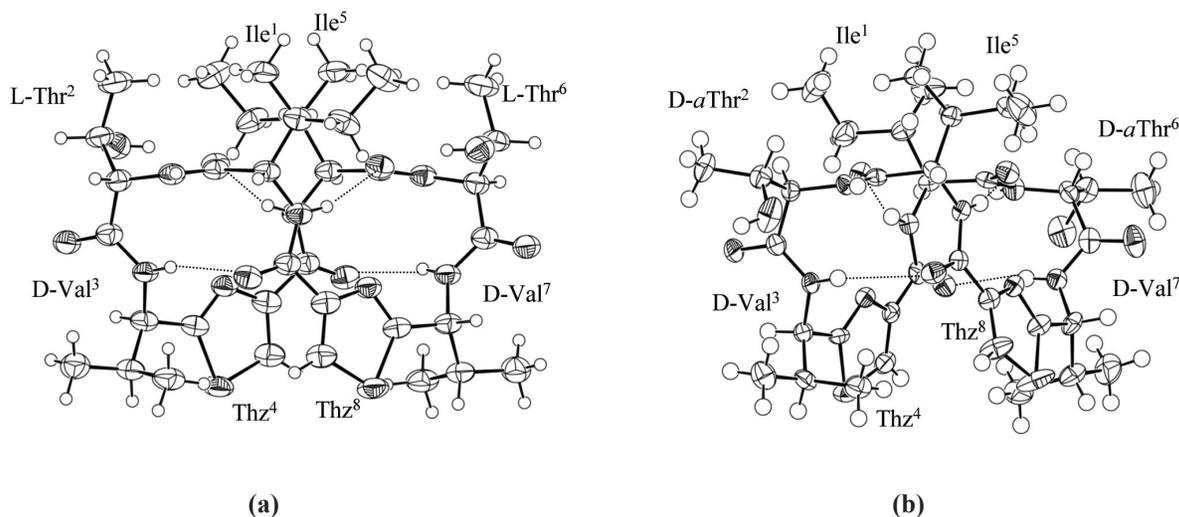


Fig. 7. Crystal structures of (a) *d*ASC5 and (b) *d*ASC8, respectively. Dashed lines represent hydrogen bonds.

イブごとに Fig. 8 (a) ~ (c) に示した。

ASC2 と ASC5 は, MeCN 溶媒中では, 共に 245nm に負のコットンを示し, 210nm 付近では正のコットンを示し, ASC(1) と同じ type II に分類される CD スペクトルであった (Fig. 8 (a)). TFE 濃度の増加とともに 245nm におけるモル楕円率は

増加し, スペクトルは type I へと変化していた。そして 230nm に isochromatic point が存在した。これらの特徴もまた, ASC(1) のスペクトルと類似していた。また 245nm におけるモル楕円率の変化率は, ASC(1) > ASC2 > ASC5 となっていた。つまり ASC5 < ASC2 < ASC(1) の順に TFE の影

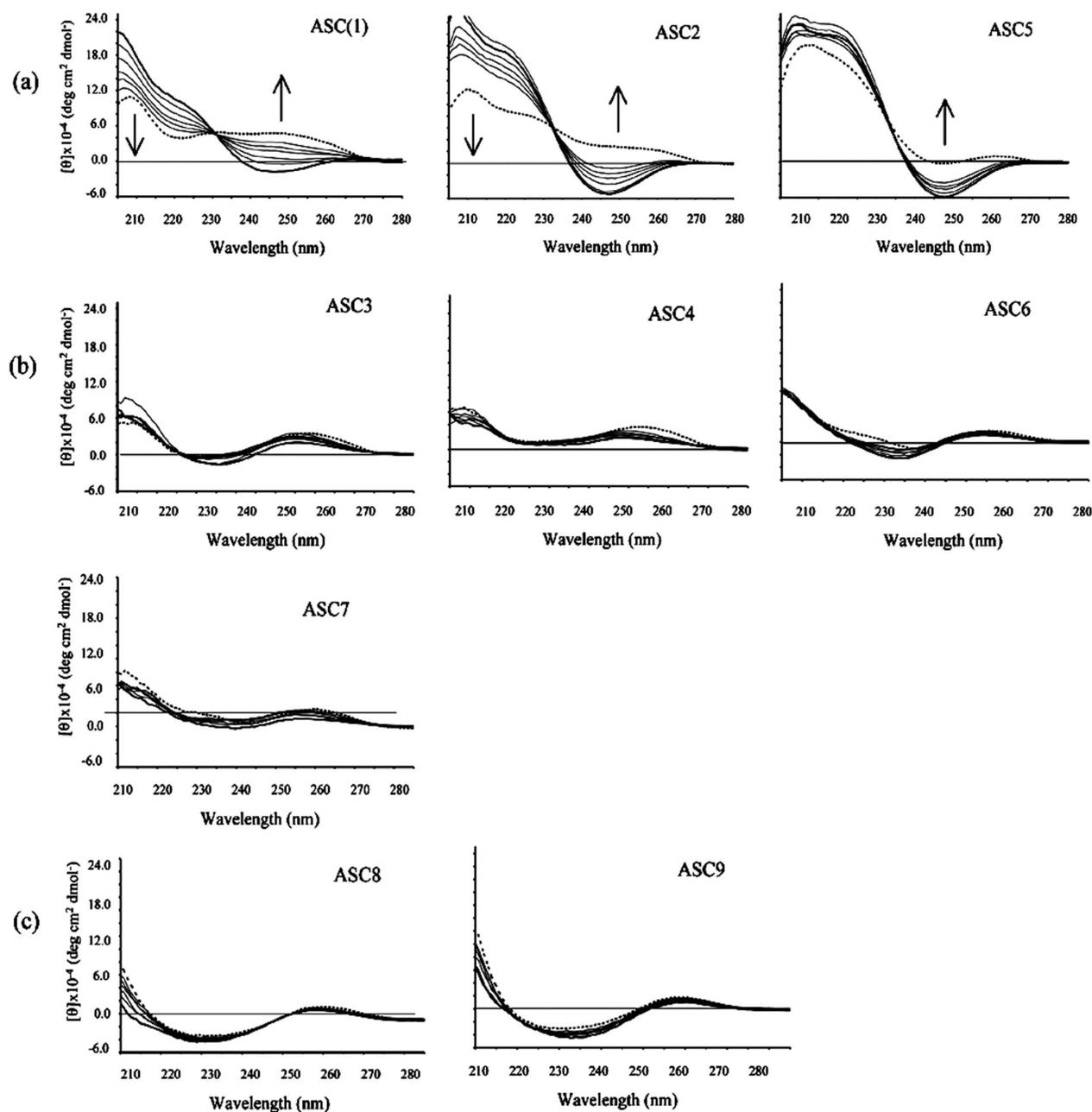


Fig. 8. (a) Changing to type I from type II CD spectra of ASC(1), 2 and 5. (b) Type III CD spectra of ASC3, 4, 6 and 7. (c) Type IV CD spectra of ASC8 and 9. The peptide concentration was approximately 0.04mM. The spectra were measured in MeCN solution (bold line) as a function of TFE concentration (10, 20, 30, 40 and 50%). Spectra in TFE solution are drawn with dotted lines.

響が小さかった。

ASC3, 4, 6, 7 のスペクトルでは 230nm に負、255nm に正のコットンが見られた (Fig. 8 (b)). しかし、モル楕円率の絶対値が、いずれも非常に小さい値であった。そして TFE 濃度の上昇にかかわらず、スペクトルはほとんど変化しなかった。このような特徴を示す CD スペクトルのパターンを type III とした。

ASC8 と ASC9 のスペクトルでは、225nm に負、255nm に正のコットンが見られた (Fig. 8 (c)). これらのモル楕円率の絶対値もまた小さい値であった。そして TFE による影響も小さかった。このような特徴をもつ CD スペクトルのパターンを type IV とした。

以上の結果から、この 3 種類のスペクトルの分類は、各ジアステレオマー誘導体の Oxz² 及び Oxz⁶ の α 位の立体配置の組み合わせによるものであることがわかった。すなわち、両方共が S 配置のジアステレオマー (ASC(1), ASC2, ASC5) は、TFE により type II から type I へのスペクトル変化が観測された。片方が S 配置でもう片方が R 配置のジアステレオマー (ASC3, ASC4, ASC6, ASC7) は、type III のままスペクトル変化が観測されなかった。そして両方共が R 配置のジアステレオマー (ASC8, ASC9) もまた、スペクトルが type IV のまま変化が観測されなかった。結晶構造との相関から、type III は “flat-square form”, type IV は “reverse-folded form” を示していることが示唆された。また “square form” (type II) は、TFE の影響により “folded form” (type I) へと変化したが、その変化率には、Oxz 環 β 位のキラルも関与していることが示唆された。つまり Oxz 環の β 位の絶対配置が S 配置に置換されるほど、TFE によるコンフォメーションの変化率は小さくなっていた (ASC(1)>ASC2>ASC5)。一方、“flat-square form” と “reverse-square form” は、ほとんど TFE の影響を受けず、安定したコンフォメーションである

ことが示唆された。

4-3. ASC ジアステレオマーの構造活性相関

P388 マウスリンパ性白血病細胞に対する、ASC ジアステレオマーの毒性試験 (*in vitro*) の結果を Table 2 に示した。

dASC ジアステレオマーは全て活性がなく、結晶構造も全て “folded form” であった。ASC(1) と比較して、ASC2, 5 は同程度の活性を示した。ASC5 は結晶中、溶液中の両方において、ASC とコンフォメーションが類似していた。ASC2 の結晶構造は明らかとなっていないが、CD スペクトルから推測される、溶液中でのコンフォメーションは、ASC(1) と類似していると考えられる。ASC9 も ASC(1) と同程度の活性を示したが、溶液中でのコンフォメーションが異なっていた。ASC8 と ASC9 は、CD 測定の結果から溶液中で類似したコンフォメーションをとっていると考えられるが、ASC8 の活性は無くなっていた。ASC3, ASC4, ASC6, ASC7 は、ASC(1) の約 40 ~ 70% まで活性が低下していた。これらのコンフォメーションは、結晶中、溶液中の両方において ASC(1) とは異なっていた。

以上、ASC ジアステレオマーにおいても、溶液中において、“folded form” と “square form” の両方のコンフォメーションをとり得る誘導体が活性を示した。そして、このコンフォメーション平衡には、Oxz 環の存在が不可欠であり、更に、2 つの Oxz 環の α 炭素の立体配置が、両方とも S 配置である必要性が示された。

5. 結語

ASC 非対称誘導体の構造解析により、“folded form” と “square form” の 2 つのコンフォメーションが明らかとなった。そして、溶液中においては、この 2 つのコンフォメーションが平衡状態にある

ことが示唆された。

更に、ASC ジアステレオマーの構造解析により、“flat square form”と“reverse folded form”の2つの新規コンフォメーションが明らかとなった。

ASCの構造活性相関としては、“folded form”と“square form”との間のコンフォメーション平衡が関係していることが示唆されたが、このコンフォメーション平衡には C_2 対称性、Oxz環 α 位がS配置をとることが重要であった。

一方、dASC非対称誘導体及びdASCジアステレオマーは全て“folded form”であった。Oxz環は自由度の低い構造のため、ペプチドがとり得るコンフォメーションを制限するようと思われるが、逆にASCに対し適度な柔軟性を与えていることが示唆された。

一般的にポリペプチドが機能するためには、安定なフォールディングとその構造に適度な柔軟性があることが求められる。ASCのコンフォメーションにおける安定性と柔軟性に対し、Oxz環は重要な役割を担っていると考えられる。

謝辞 本研究を行うに当たり、終始懇意なる御指導御鞭撻を賜りました大阪薬科大学 土井光暢教授に心より感謝致します。また、NMRを測定して頂いた、大阪薬科大学 箕浦克彦助教、並びに細胞毒性試験を行って頂いた、大阪薬科大学 山田剛司講師に謹んで御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Ireland C., Scheuer P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5688 (1980).
- 2) Wasyluk J. M., Biskupiak J. E., Costello C. E., Ireland C. M., *J. Org. Chem.*, **48**, 4445 (1983).
- 3) Pettit G. R., Kamano Y., Fujii Y., Herald C. L., Inoue M., Brown P., Gust D., Kitahara K., Schmidt J. M., Doubek D. L., Michel C., *J. Nat. Prod.*, **44**, 482 (1981).
- 4) Pettit G. R., Kamano Y., Brown P., Gust D., Inoue M., Herald C. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 905 (1982).
- 5) Ireland C. M., Durso A. R., Newman Jr., R. A., Hacker M. P., *J. Org. Chem.*, **47**, 1807 (1982).
- 6) Biskupiak J. E., Ireland C. M., *J. Org. Chem.*, **48**, 2302 (1983).
- 7) Van den Brenk A. L., Byriel K. A., Fairlie D. P., Gahan L. R., Hanson G. R., Hawkins C. J., Jones A., Kennard C. H. L., Moubaraki B., Murraray K. S., *Inorg. Chem.*, **33**, 3549 (1994).
- 8) Van den Brenk A. L., Fairlie D. P., Gahan L. R., Hanson G. R., Hambly T. W., *Inorg. Chem.*, **35**, 1095 (1996).
- 9) Grondahl L., Sokolenko N., Abbenate G., Fairlie D. P., Hanson G. R., Gahan L. R., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1227 (1999).
- 10) Rinehart K. L., Gloer Jr., J. B., Hughes R. G., Renis H. E., McGovern J. P., Swynenberg E. B., Stringfellow D. A., Kuentzel S. L., Li L. H., *Science*, **212**, 933 (1981).
- 11) Rinehart K. L., Gloer J. B., Cook J. C., Mizsak S. A., Scahill T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1857 (1981).
- 12) Konnert J., Karle I. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4888 (1969).
- 13) Meyer W. L., Kuyper L. F., Phelps D. W., Cordes A. W., *Chem. Comm.*, 660 (1974).
- 14) Yoshioka H., Aoki T., Goko H., Nakatsu K., Noda T., Sakaibara H., Take T., Nagata A., Abe J., Wakamiya T., Shiba T., Kaneko T., *Tetrahedron Lett.*, 2043 (1971).
- 15) Dobler M., Dunitz J. D., Krajewski J., *J. Mol. Biol.*, **42**, 603 (1969).
- 16) Iitaka Y., Nakamura H., Takeda K., Takita T., *Acta Cryst.*, **B30**, 2817 (1974).
- 17) Karle I. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4379 (1975).
- 18) Hamamoto Y., Endo M., Nakagawa M., Nakanishi T., Mizukawa K., *Chem. Commun.*, 323 (1983).
- 19) Hamada Y., Kato S., Shioiri T., *Tetrahedron Lett.*, **26**, 3223 (1985).
- 20) Hamada Y., Kohda K., Shioiri T., *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5303 (1984).

- 21) Hamada Y., Shibata M., Sugiura T., Kato S., Shioiri T.,
J. Org. Chem., **52**, 1252 (1987).
- 22) Elliott D. F., *J. Chem. Soc.*, 589 (1949).
- 23) Elliott D. F., *J. Chem. Soc.*, 62 (1950).
- 24) König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **106**, 3626 (1973).
- 25) Coste J., Le-Nguyen D., Castro B., *Tetrahedron Lett.*,
31, 205 (1990).
- 26) Albericio F., Cases M., Alsine J., Triolo S. A., Carpino
L. A., Kates S. A., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 4853 (1997).
- 27) Ishida T., Inoue M., Hamada Y., Kato S., Shioiri T.,
Chem. Commun., 370 (1987).
- 28) Ishida T., Tanaka M., Nabaie M., Inoue M., Kato S.,
Hamada Y., Shioiri T., *J. Org. Chem.*, **53**, 107 (1988).
- 29) Ishida T., In Y., Doi M., Inoue M., Hamada Y., Shioiri
T., *Biopolymers*, **32**, 131 (1992).
- 30) Doi M., Shinozaki F., In Y., Ishida T., Yamamoto D.,
Kamigauchi M., Sugiura M., Hamada Y., Kohda K.,
Shioiri T., *Biopolymers*, **49**, 459 (1999).