

新規プロテアソーム阻害物質チロペプチンに関する研究

2004 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

百瀬 功

目次

序論	1
本論	
第1章 新規プロテアソーム阻害物質チロペプチンの探索、生産および単離精製	11
第1節 実験材料と方法	11
第2節 結果	
1. 探索	17
2. 生産菌の同定	17
3. チロペプチンの単離精製	20
第3節 考察	22
第4節 小括	24
第2章 チロペプチンの構造決定	25
第1節 実験材料と方法	25
第2節 結果	
1. チロペプチンの物理化学的性質	50
2. チロペプチン A の構造	51
3. チロペプチン B の構造	55
第3節 考察	58
第4節 小括	60
第3章 チロペプチンの合成	61
第1節 実験材料と方法	61
第2節 結果	
1. 合成計画	69

	2. チロペプチン A の合成	70
	3. チロペプチン B の合成	70
第3節	小括	72
第4章	チロペプチンの生物活性	73
第1節	実験材料と方法	73
第2節	結果	
	1. 酵素阻害活性	77
	2. 細胞内プロテアソームに対するチロペプチンの影響	78
	3. 細胞増殖抑制活性	81
	4. 急性毒性	81
第3節	考察	82
第4節	小括	84
第5章	チロペプチン類縁体の分子設計と合成	85
第1節	実験材料と方法	87
第2節	結果	
	1. チロペプチン A とプロテアソームの三次元複合体構造モデルの構築	98
	2. チロペプチン類縁体の合成	101
	3. チロペプチン類縁体のプロテアソーム阻害活性	103
第3節	考察	106
第4節	小括	108
第6章	チロペプチン類縁体の抗癌活性	109
第1節	実験材料と方法	109

第2節	結果	
	1. PC-3 細胞に対する増殖抑制作用	115
	2. TP-110 による細胞周期への影響	116
	3. TP-110 による p21 ^{CIP1/WAF1} および p27 ^{KIP1} への影響	117
	4. TP-110 によるアポトーシスの誘導	119
	5. TP-110 の急性毒性および薬物動態	121
	6. マウス移植 PC-3 細胞腫瘍に対する TP-110 の抗腫瘍活性	122
	7. 各種癌細胞に対する増殖抑制活性	123
第3節	考察	125
第4節	小括	130
総括		131
謝辞		134
参考文献		135

略語

AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APCI-MS	atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry
Aq	aqueous solution
ATP	adenosine triphosphate
Bn	benzyl
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
Boc-LRR-MCA	<i>t</i> -butoxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-arginine 4-methyl-coumaryl-7-amide
Boc-L-Phe-OSu	<i>t</i> -butoxycarbonyl-L-phenylalanine- <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester
CDK	cyclin-dependent kinase
COSY	correlation spectroscopy
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	dimethylsulfoxide
DTT	dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylenebis(oxyethylenitrilo)tetraacetic acid
FAB-MS	fast atom bombardment mass spectrometry
FBS	fetal bovine serum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOObt	3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HS	horse serum
IAP	inhibitor of apoptotic protein
IC ₅₀	50 % inhibitory concentration
IL	interleukin
IR	infrared
ISP	international <i>Streptomyces</i> Project
LD ₅₀	50 % lethal dose
MP	melting point
NGF	neurite growth factor
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear overhauser effect
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PGPH	post-glutamyl-peptide hydrolyzing
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
R _f	rate of flow
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	sodium dodecylsulphate
Suc-LLVY-MCA	succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine 4-methyl-coumaryl-7-amide
TFA	Trifluoroacetic acid
TMS	tetramethylsilane

TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UV	ultraviolet
WSCl·HCl	water-soluble carbodiimide hydrochloride
Z-LLE-MCA	benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutamic acid α -(4-methyl-coumaryl-7-amide)
Z-Leu-Leu-al	benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucinal
Z-Leu-Leu-Leu-al	benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
Z-VAD-FMK	benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspart-1-yl-fluoromethane

序論

Antibiotics（抗生物質）は、2000年に行われたある新聞社の一般の人を対象にしたアンケート調査によると「20世紀に人類を幸せにしたもの」の一つに挙げられており、抗生物質の有用性が一般の人々の間に広く認知されていることが分かる。抗生物質の歴史は1929年 A. Fleming による青カビの一種 *Penicillium notatum* の生産する penicillin（ペニシリン）の発見により始まった。ペニシリンはブドウ球菌などのグラム陽性菌に対して強い抗菌作用を示し、最初に人の感染症の治療に劇的な成功を収めたのが第二次世界大戦中のことである。日本における抗生物質の研究は、第二次世界大戦中の碧素（ペニシリン）の発酵生産研究に始まり、1957年 Umezawa らによる kanamycin（カナマイシン）の発見によって開花した [1-3]。さらに微生物代謝産物は有用な低分子化合物の宝庫であるという観点から、抗癌抗生物質、酵素阻害物質、免疫調節物質、細胞機能調節物質など多種多様な生理活性を示す低分子化合物の探索研究が精力的に行われた。

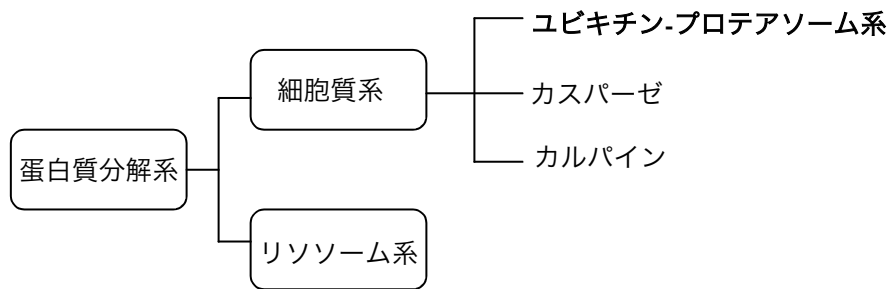
酵素は生物の生産する触媒であり、生物の営むほとんどすべての反応に対し、それぞれに応じた酵素が存在し、それらの反応を生体の生存可能な穏和な条件下で、円滑に行わせて生命の維持に役立っている。これらの酵素反応はすべての生命現象ならびにすべての病態現象に関与している。1965年に Umezawa、Aoyagi らにより始まった微生物代謝産物中からの酵素阻害物質の探索研究は世界で初めての試みであり、種々の特異的な酵素阻害物質が発見されてきた。酵素の特異的な阻害物質はその酵素の正常状態における働きの解明に重要な情報を与え、病態の生化学的解析のための重要なバイオプローブ（生物学的試薬）の役割を果たすものである。また阻害物質の薬理学的研究によって、その酵素活性が阻害されたときに起こる症状を解明すれば、それは原因不明の病態の機序の究明に役立つと考えられる。さらにある酵素の活性が異常に高い病態に対しては、その阻害物質が治療薬となりうることが期待される。このように酵素阻害物質の研究は、癌、炎症、免疫、高血圧症、高脂血症、糖尿病などを含むさまざまな病態の病因解明ならびに治療へのアプローチを可能にした。

現在わが国で臨床応用されている酵素阻害物質として放線菌 *Streptomyces olivoreticuli* により産生される bestatin（ベスタチン）がある [4, 5]。ベスタチンは1976年にアミノペプチダーゼ B の阻害物質として発見され、IL-1（interleukin-1）、IL-2 およびコロニー刺激因子などのサイトカインの産生を生体内

で誘導または増強する免疫調節作用を有し抗腫瘍効果を示す [6-9]。1987 年より成人急性非リンパ性白血病に対する完全寛解導入後の維持強化、生存期間延長のための既存化学療法剤との併用療法に使用されている。その他天然より発見された低分子酵素阻害物質が臨床応用されている例として compactin (コンパクチン) が上げられる [10-11]。コンパクチンはコレステロール生合成の律速酵素である HMG (3-ヒドロキシ-3-メチル-グルタリル) -CoA reductase の阻害物質であり、現在コンパクチンの誘導体が高脂血症の治療薬として広く使用されている。このように微生物代謝産物の中から発見された酵素阻害物質が、有用な医薬品として臨床の場で数多く使用されている。

医薬品開発を念頭において酵素阻害物質の探索を開始するにあたり、対象となる酵素の選択はきわめて重要である。遺伝子は生体の設計図であり、遺伝子から翻訳されるものは蛋白質である。生体情報は遺伝子により司られているが、生体を表現しているのは蛋白質である。生体の営みにおいて、その要求に応じタイミングよく速やかに特定の標的蛋白質を分解したり、場合によっては非特異的に細胞の構成蛋白質を分解したりすることが、多くの生体反応の進行、維持、調節に極めて重要であることがわかってきた。この生体機能調節分子として蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）の生物学的重要性が近年明らかになってきている。

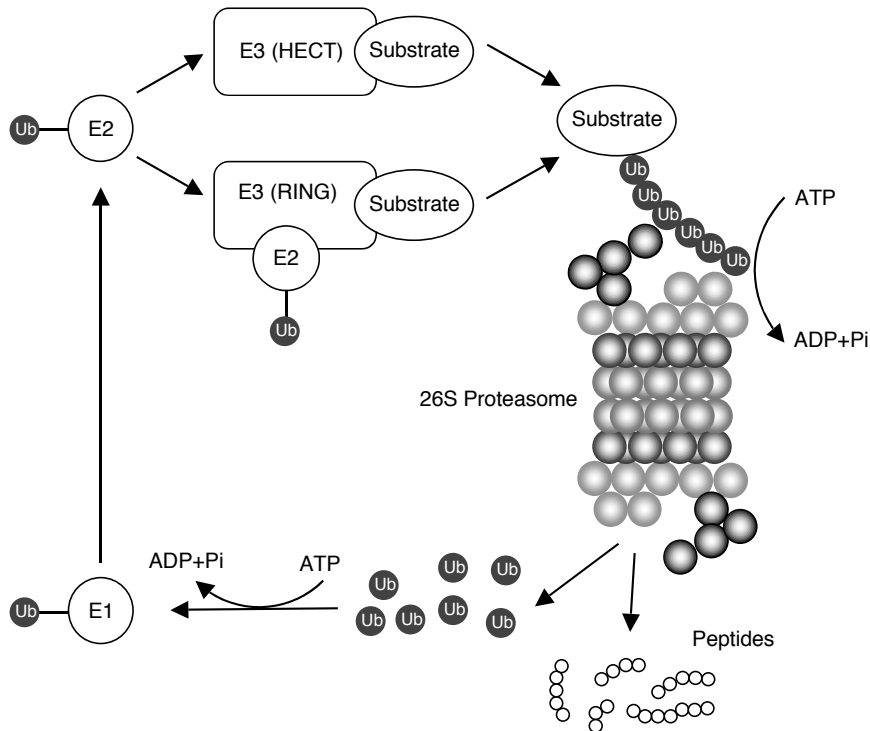
細胞内の蛋白質分解系には、大きく分けて二つのグループに分けることができ、リソソーム系と細胞質系のグループである。細胞内膜構造体であるリソソームは、発見者の C. R. DeDuve が細胞内の消化管であると表現したように、リソソーム内には全種類のプロテアーゼ類が分布しており、特にカテプシン群が大量に分布しているのが特徴である。細胞質に存在するグループにはカルパイン、カスパーゼ、ユビキチン-プロテアソーム系が含まれる。細胞質に存在するプロテアーゼの特徴は、厳密な活性発現調節機構を兼ね備えている点である。これは恒常的に活性化していると細胞自身へのダメージが予想される為であり、カルパインは Ca^{++} 濃度に依存して活性の発現調節が行われ、カスパーゼは通常不活性型のプロカスパーゼ型で存在し、活性化にはそれを切断するプロカスパーゼ分解酵素により制御されている。ユビキチン-プロテアソーム系は基質となる蛋白質がユビキチンと呼ばれる低分子蛋白質の重合により修飾され、このポリユビキチン化した蛋白質をプロテアソームは選択的に分解する。特に細胞内での蛋白質分解の中心的な役割を果たしているのがユビキチン-プロテアソーム系である [12-13]。



細胞内の蛋白質は一定の寿命で常に代謝回転し、その寿命は基本的にはアミノ酸配列によって規定されていると考えられてきた。しかし実際には細胞内の蛋白質分解は、細胞内の状況に応じて選択的に変化する。このことから蛋白質分解に対する意識は、単なる「消化」から「細胞機能調節」へと変遷を遂げている。今でこそ大腸菌の細胞内蛋白質分解の 80%以上が、エネルギー依存的に起こることが知られているが、かつては加水分解反応にエネルギーは必要ないと考えられていた。しかし Gorlberg らによる網状赤血球における ATP 依存性の蛋白質分解が再現されたことや [14]、Hershko らによるその蛋白質分解が多成分による複合反応であることを示唆した研究や [15]、また大腸菌において初めて ATP 依存性のプロテアーゼ Lon が発見されたことがきっかけとなり ATP 依存的な蛋白質分解系の研究が進化した [16, 17]。この蛋白質分解系はユビキチン-プロテアソーム系であり、真核生物に普遍的に存在する分解系である。この分解系は基質となる標的蛋白質をユビキチンと呼ばれる低分子蛋白質の重合により修飾し、このポリユビキチン鎖が分解シグナルとなり、標的蛋白質はプロテアソームによって分解される。出芽酵母のゲノムプロジェクトからユビキチン-プロテアソーム系に関係する遺伝子数は全遺伝子数の約 1.5~2.0%を占めることが明らかになった。ユビキチン (Ub) はアミノ酸 76 残基から成る分子量 8.6 kDa の低分子蛋白質であり [18, 19]、その一次構造は進化的に高く保存されていて、ユビキチンを有する最も下等な生物である酵母とヒトではわずかにアミノ酸 3 個しか変わらない。このことはユビキチンが生物にとって重要な分子であることを示している。蛋白質のユビキチン化修飾は、標的蛋白質に分解シグナルを付与する反応であり、その概略を Fig. 1 に示す [12, 13]。ユビキチンは、活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2)、リガーゼ (E3) の複合酵素反応により標的蛋白質に共有結合する。この E1-E2-E3 のカスケード反応 (ユビキチンシステム) により、ユビキチンの C 末端の COOH 基と、標的蛋白質中の特定のリジン残基の ϵ -NH₂ 基とがイソペプチド結合する。さらに最初に結合したユビキチンの 48 番目のリジン残基に次のユビキチンがイソペプチド結合し、この反応を繰り返してユビキチ

鎖は鎖状に伸長する。生じたポリユビキチン鎖は、真核生物の ATP 依存性プロテアーゼである 26S proteasome (プロテアソーム) によって捕捉され、標的蛋白質は選択的かつ即効的に分解される。

Fig. 1. Ubiquitin-proteasome pathway.



Ub: Ubiquitin, E1: Ub activating enzyme, E2: Ub conjugating enzyme, E3: Ub ligase.

細胞において E1 は単一分子であるが、E2 と E3 には分子多様性がある。標的蛋白質にユビキチンを連結させる酵素 E3 は、ユビキチン化のタイミングを計り、蛋白質の代謝的安定性を決定する最も重要な酵素である。E3 は HECT 型 E3 と RING 型 E3 に大別できる [20, 21]。HECT 型 E3 は、HECT ドメインというユビキチンとチオエステル結合できる活性システイン残基を含む約 350 アミノ酸からなる領域を有する E3 の総称名であり、E6-AP の他に NEDD4、Rsp5 など多数の分子群が知られている [22-24]。一方、RING 型 E3 は、RING-フィンガードメインという亜鉛を結合するモジュール構造を有する E3 の総称名であり、この範疇に入る酵素は数百種以上存在すると考えられている。さらに RING 型 E3 は RING-フィンガーをサブユニットとしてもつ複合体型酵素と、ドメイン構造としてもつ多機能性酵素の 2 群に細分される [25]。前者には APC/C (anaphase-promoting complex 後期促進因子、別称サイクロソーム) と SCF (Skp1/Cullin-1/Roc1/F-box protein から構成された複合体) があり、後者には、MDM2 (p53 と結合してユビキチン化する癌遺伝子産物) [26]、PARKIN (常染色体劣性若年性パーキンソン病の

原因遺伝子産物) [27-29]、BRCA1 (乳癌抑制遺伝子産物) などが多数あり [30]、年々増加の一途を辿っている。またどの範疇にも含まれない pVHL (von Hippel-Lindau 病の原因遺伝子産物) なども見つかっている [31, 32]。

26S プロテアソームは、触媒ユニットである 20S プロテアソームの両端に調節ユニットである 19S 複合体 (PA700) が会合した分子量 2.5 MDa の巨大な多成分複合体である (Fig. 2) [33, 34]。20S プロテアソームは、 α リングと β リング (各々7種の異なったサブユニットから構成) が $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に会合した円筒型粒子である。本酵素は3種類の蛋白質分解活性を持っており、それぞれの基質特異性から中性アミノ酸、特にチロシンやフェニルアラニンのC末端を切断するキモトリプシン様活性、塩基性アミノ酸のC末端を切断するトリプシン様活性、酸性アミノ酸のC末端を切断するポストグルタミルペプチド加水分解 (PGPH) 活性が知られている。それぞれの酵素活性を司るサブユニットは β リング上に同定されており、さらに触媒部位の活性中心は β リングの内側に存在している [35]。20S プロテアソームは通常不活性型として存在し、 α リングの基質搬入ゲートはほぼ完全に閉まっている。20S プロテアソームの両端に会合する 19S 調節複合体は、lid (蓋部) と base (基底部) から構成されていて [36]、lid は基質識別機能を有しポリユビキチン鎖レセプターとして機能していると考えられている。base は6種の ATPase と2つの大きなサブユニットを含む複合体であり 20S プロテアソームの α リングに直接会合していて、 α リングのゲートを開けるとともに基質蛋白質の高次構造を ATP 依存的に巻き戻し (変性) て、 β リングへの通過を可能にさせる働きを担っている。

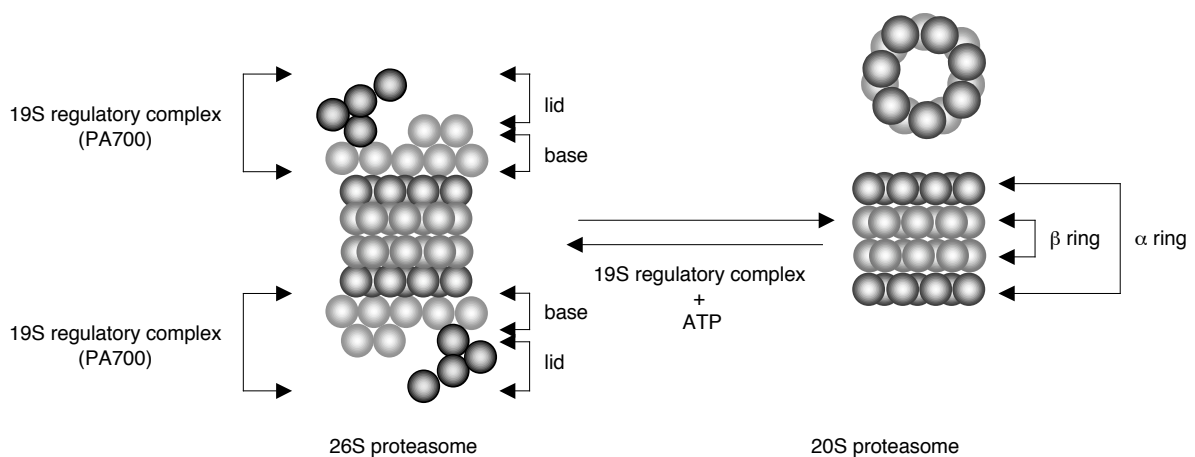


Fig. 2. Schematic model of 26S proteasome.

ユビキチン-プロテアソーム系は様々な生命現象に関与していて、細胞周期・アポトーシス・シグナ

ル伝達・ストレス応答・神経機能・品質管理・免疫応答などの重要な生物現象に普遍的に関わっていることが明らかになってきた。特に細胞周期やシグナル伝達に関与する多種の細胞内機能性蛋白質の分解に関与しており、細胞機能の制御に重要な役割を果たしている。基質となる蛋白質の中には疾病と関連した分子も多く見られ、特に癌の病因、増悪化、病態進行に深く関わっているものがある。細胞には細胞増殖を促進するアクセル役の蛋白質と、それを抑制するブレーキ役の蛋白質がある。通常アクセルとブレーキのバランスにより正常な細胞増殖が保たれている。ところがこれらの蛋白質に異常が生じアクセルが過剰に作動したり、ブレーキが作動不良になったりすると、際限のない細胞増殖すなわち癌になると考えられている。細胞増殖に抑制的に働くブレーキ役の蛋白質として癌抑制遺伝子産物 p53 やサイクリン依存性キナーゼインヒビター p21^{CIP1/WAF1} や p27^{KIP1} などが知られているが、これらの蛋白質はプロテアソームにより分解される [37-39]。また白血病の一種ではプロテアソームによる p27 の分解の亢進が知られている [40]。プロテアソーム阻害物質はこれら蛋白質の分解を抑制し安定化することにより、細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導し、ひいては腫瘍増殖を抑制すると考えられている。またプロテアソームは転写因子である NF-κB の活性化に必要であり、NF-κB のインヒビターである IκB をプロテアソームが分解することにより NF-κB が活性化する [41]。NF-κB は各炎症性サイトカイン (e.g. IL-1, IL-6, TNF-α (tumor necrosis factor-α))、血管新生因子 (e.g. vascular endothelial growth factor)、細胞接着因子 (e.g. intercellular adhesion molecule 1, vascular cellular adhesion molecule 1)、炎症性酵素 (cyclooxygenase 2) や抗アポトーシス因子 (e.g. bcl-2, IAPs (inhibitor of apoptotic protein)) の遺伝子を転写する [42-44]。プロテアソーム阻害物質は IκB の分解を抑制することにより NF-κB の活性化を阻害し、癌の増悪化、腫瘍の増殖や薬剤抵抗性を軽減できるのではないかと考えられている。したがってプロテアソームは新しい癌治療の分子標的としてきわめて有望であり、その阻害物質は優れた癌治療薬になる可能性が示唆されている。

プロテアソームはスレオニンプロテアーゼであり、活性中心のアミノ酸は N 末端 1 番目のスレオニンである。このようなプロテアーゼは、Ntn (N-terminal nucleophile) hydrolase と呼ばれるスーパーファミリーに属し、基質蛋白質のカルボニル炭素への求核攻撃において、N 末端のアミノ酸側鎖 (セリン、スレオニン、システイン) が N 末端のフリーのアミノ基へプロトンを受け渡すことにより活性化する [45]。プロテアソームによる蛋白質分解の反応機構について Fig. 3. に示す [46, 47]。

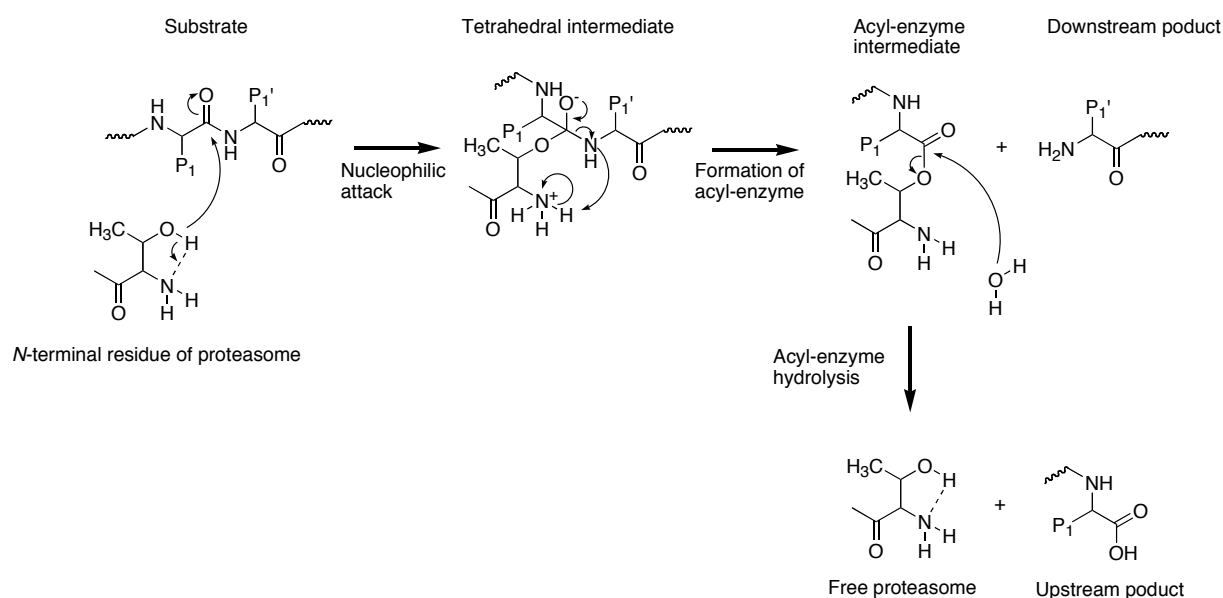


Fig. 3. Proteasome catalytic mechanism.

プロテアソームの阻害物質は、近年いくつか知られている (Fig. 4)。MG132 はアルデヒド基を有するペプチド系阻害物質であり元来カルパインの阻害物質として合成された化合物であるが、プロテアソーム阻害活性を有していることが分かり、現在試薬として最も広く用いられている化合物である [48, 49]。また MG132 をリード化合物として数々の類縁体研究が行われ、ペプチドアルデヒド系化合物である CEP1612 や、vinyl sulfone 系化合物である NLVS などが合成された [50-52]。Lacatcystin (ラクタシスチン) は放線菌の生産するマウス神経芽細胞 (Neuro 2A) の神経突起伸長を誘導する物質として発見されたが、その生体内標的分子はプロテアソームであることが判明し脚光を浴びた化合物である [53, 54]。Epoxomicin (エポキシマイシン) も放線菌により生産され抗腫瘍活性を有する化合物として見出されたが、やはりその標的はプロテアソームであった [55-57]。プロテアソーム阻害物質の探索を目的として、微生物の代謝産物から発見された物質として TMC-95 がある [58]。PS-341 は MG132 をリード化合物として合成された阻害物質であるが、*in vivo* において顕著な抗腫瘍活性を示した [59-64]。2003 年に PS-341 は米国で多発性骨髄腫の治療薬として承認され、プロテアソーム阻害物質として世界で初めて臨床応用された。これにより優れたプロテアソーム阻害物質は医薬品になることが立証された。

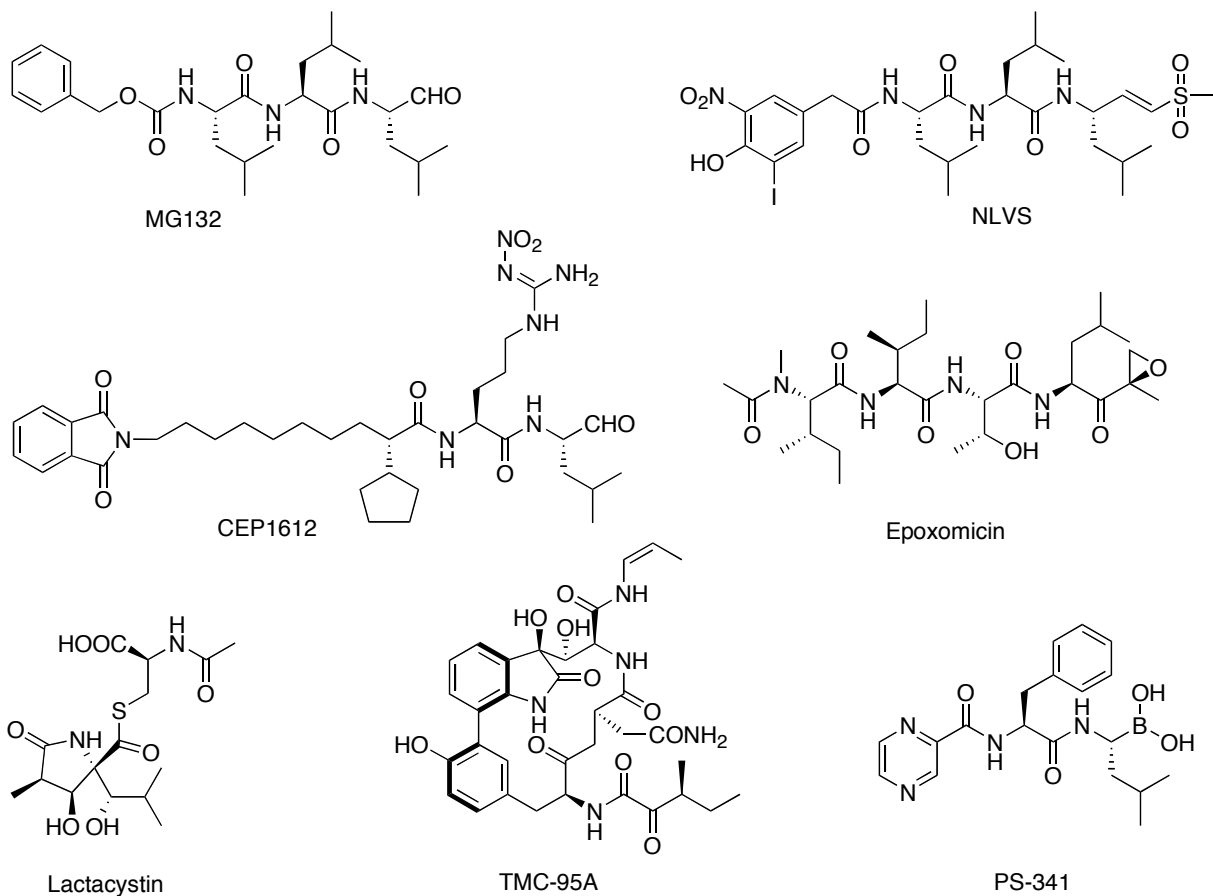


Fig. 4. Proteasome inhibitors.

そこでプロテアソーム阻害物質の重要性に注目し、まだ阻害物質として MG132 とラクタシスチンしかなかった 1996 年頃よりプロテアソーム阻害物質の探索を開始した。酵素阻害物質の探索には、多様な化学構造を持ち且つ有用な低分子化合物の宝庫である微生物の代謝産物を用いた。天然より単離された化合物がそのまま医薬品になることは稀である。化学合成によるアプローチの情報が増加している今、化学合成は非常に重要である。リード化合物を天然に求め、化学合成により薬理活性の高いものへと変換して、医薬品へと開発していくのが最も理想的な展開であると考えられる。したがって探索研究において得られた化合物は化学合成により構造活性相関を調べ最適化することにした。最適化に適した手段として分子モデリング法を用いた。分子モデリングとは、分子シミュレーション計算法や分子グラフィックス法を駆使して、分子の立体構造と性質の関係を解明し、未知の分子の性質を予測しようとする化学研究手段のひとつです。その利点は、成功の可能性を減らさず、より少数の化合物の

合成で目的を達する点である。標的蛋白質の一次構造であるアミノ酸の配列は、機能を知るうえで多くの情報を提供する。さらにアミノ酸が立体的に配置された蛋白質の三次元立体構造はより多くの情報を与え、立体構造を知ることで機能の詳細を分子レベルで確認することができる。また酵素の三次元構造情報は、阻害物質の理解ならびに応用において重要な意味を持つてくる。その応用が合理的な分子設計に基づいた阻害物質の創製である。酵素と基質の間には、水素結合、静電的相互作用、疎水的相互作用、CH/π相互作用等の多くの相互作用が関与している。酵素と阻害物質の間にも同様な相互作用があると考えられ、これらの知見に基づいた阻害物質の合成研究から、有用な阻害物質が開発されている。つまり創薬において、特に低分子の化合物を医薬品にする場合、標的とした蛋白質の立体構造情報は、薬の形を示唆してくれる重要な情報源になる。そこで天然から得られたプロテアソーム阻害物質の最適化のために、論理的で効率的な方法である構造情報に基づいた薬剤設計 (structure-based drug design) を行い、プロテアソームと阻害物質複合体の立体構造情報に基づいた阻害物質をデザインした。

本論文は新規プロテアソーム阻害物質チロペプチンの生産菌、単離精製、構造決定、類縁体合成および生物活性について述べたものであり、以下にその要約を記載する。

第 1 章では、プロテアソーム阻害物質の探索、チロペプチンの生産菌の同定、単離精製について述べる。微生物の代謝産物よりプロテアソーム阻害物質の探索を行い、新規阻害物質チロペプチンを見出した。本生産菌は形態学的特徴、生理学的性質、化学分類学的特徴、16S リボゾーム RNA の部分塩基配列の解読により、*Kitasatospora* 属と同定した。また本菌株の培養液より、溶媒抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによりチロペプチンを単離精製した。

第 2 章では、チロペプチンの構造決定について述べる。チロペプチンの物理化学的性質および各種 NMR スペクトルに基づき構造決定をした。チロペプチンはアルデヒド基を有するペプチド化合物であり、アルデヒド基の α 位が異性化し NMR による解析が困難であったため、アルコール体へと導き構造決定を行った。

第 3 章では、チロペプチンの化学合成について述べる。L-チロシノールを出発原料として 10 工程、高収率でチロペプチン A および B を合成した。

第4章では、チロペプチンの生物活性について述べる。チロペプチン A は *in vitro* においてプロテアソームのキモトリプシン様活性に強い阻害活性を示し、ラット神経細胞様 PC-12 細胞においても細胞内のプロテアソームを阻害した。

第5章では、チロペプチン類縁体の分子設計と合成について述べる。チロペプチン A とプロテアソームの立体構造複合体モデルを構築し、そこから得られた情報を基に類縁体をデザインし強力な阻害物質を合成した。

第6章では、チロペプチン類縁体の生物活性について述べる。ヒト前立腺癌 PC-3 細胞を用いて、その細胞増殖に与える影響について調べ、さらにマウスにおける抗腫瘍効果を検討した。

第1章 新規プロテアソーム阻害物質チロペプチンの探索、生産および単離精製

プロテアソームは細胞周期やシグナル伝達に関与する多種の細胞内機能性蛋白質の分解に関与しており、細胞機能の制御に重要な役割を果たしている。基質となる蛋白質の中には癌の病因、増悪化、病態進行と関連した分子が見られることから、プロテアソームは癌治療の新しい分子標的として有望である。本章では微生物代謝産物よりプロテアソーム阻害物質の探索を行い、一放線菌の培養液中に新規なプロテアソーム阻害物質チロペプチンを見出した。そこでプロテアソーム阻害物質の探索、チロペプチン生産菌の同定、チロペプチンの発酵生産および単離精製について言及する。

第1節 実験材料と方法

1. プロテアソームの調製

プロテアソームは Ugai らの方法 [65]を改良しマウス肝臓より粗精製したものを用いた。本研究で用いたプロテアソームの調製方法を Fig. 1-1 に示す。すなわち、ICR マウス（メス）7匹分の肝臓 9.7 g をホモジナイズ緩衝液（1 mM DTT (dithiothreitol)、2 mM ATP (adenosine triphosphate)、0.25 M sucrose を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5））25 ml 中でホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートは 96,000 ×g（35,000 rpm）で1時間超遠心分離し、上清画分をさらに 125,000 ×g（40,000 rpm）で5時間超遠心分離した。得られた沈殿画分にスタンダード緩衝液（1mM DTT、2mM ATP、20% glycerol を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0））3.5 ml を加え、ピペッティングにより溶解し、不溶画分は 20,000 ×g（13,000 rpm）で1時間遠心分離により除去した。得られた上清画分を粗酵素液として使用し、-70°Cにて保存した。

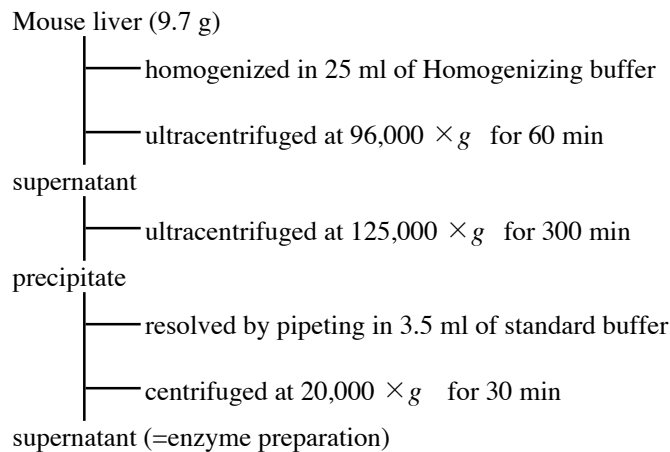


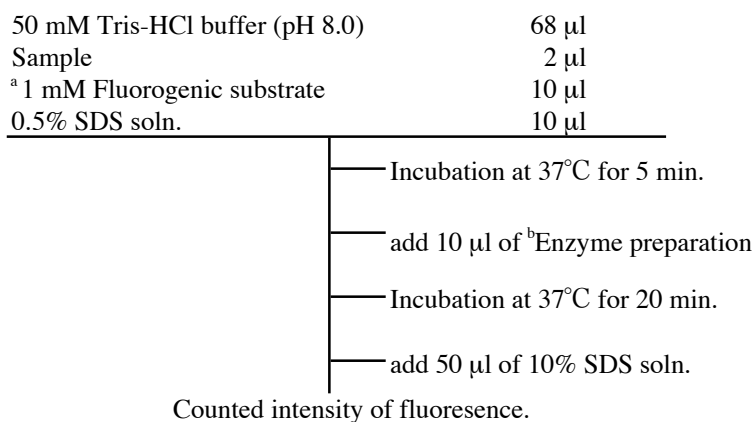
Fig. 1-1. Preparation of proteasome.

2. プロテアソーム活性の測定

プロテアソームの活性は、96 穴マイクロプレート (Nalgen Nunc International, Tokyo, Japan) 中で、酵素反応により生成する 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) を 360 nm の励起波長 (EX_{360} nm) による 460 nm の蛍光放射 (EM_{460} nm) を、蛍光光度計 (Cytoflur 2350 Fluorescence Measurement System; Millipore Corporation, Bedford, MA) を用いて測定した。プロテアソームは前項に示したように粗精製したものを、基質としてプロテアソームのキモトリプシン様活性の測定には succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine 4-methyl-coumaryl-7-amide (Suc-LLVY-MCA) を用い、トリプシン様活性には *t*-butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-arginine 4-methyl-coumaryl-7-amide (Boc-LRR-MCA)、PGPH 活性には benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-glutamic acid \square -(4-methyl-coumaryl-7-amide) (Z-LLE-MCA) を使用した (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan)。プロテアソーム活性は、以下の方法により測定した (Fig. 1-2)。すなわち 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 68 \square に、サンプル 2 μ l、1mM の蛍光基質 10 μ l、0.5% Sodium dodecylsulphate (SDS) 水溶液 10 μ l を加えた混合液を 37°C で 5 分間プレインキュベートし、これに粗酵素液 10 μ l を加え、37°C で 20 分間反応させた。10% SDS 水溶液 50 μ l を加えることにより反応を停止し、蛍光光度計にてその蛍光強度 (EX_{380} nm/ EM_{460} nm) を測定した。

阻害活性は、サンプルの存在下 (A) と非存在下 (B) での蛍光強度と、それぞれに対する酵素無添

加時の蛍光強度 (A') および (B') を測定し、阻害率 (%) を計算式 $[1-(A-A')/(B-B')]\times 100$ により計算した。50% 阻害率を示すサンプルの濃度を IC₅₀ 値とした。



^a) Suc-LLVY-MCA for the chymotrypsin-like activity
 Boc-LRR-MCA for the trypsin-like activity
 Z-LLE-MCA for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing (PGPH) activity

^b) Partially purified from mouse liver.

Fig. 1-2. Assay method for the proteasome activities.

3. プロテアソーム阻害物質の探索

前記の測定系を用いて、放線菌、細菌、担子菌の培養液に含まれる微生物代謝産物のプロテアソーム阻害物質を探索した。すなわち、小試験管に放線菌、細菌、担子菌の培養液上清 1 ml およびブタノール 1 ml を加えてよく攪拌し、遠心分離 (2,500 rpm、5 min) により 2 層に分配した。ブタノール画分 100 μ l を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、真空ポンプにて濃縮乾固した。残渣にメタノール 100 μ l を加えよく溶かした後、この溶液を試験サンプルとして、プロテアソームに対する阻害活性を測定した。阻害活性を示した試験サンプルは、続いて予備抽出試験および pH、熱に対する安定性試験を行った。

予備抽出試験は、まず培養液を遠心分離 (2,500 rpm、10 min) し、菌体と上清に分けた。菌体は上清と同量のメタノールで抽出した。培養液上清は 1 ml ずつ小試験管 4 本に分注し、2 本に酢酸エチルを 1 ml ずつ加え、そのうち一方を pH 2 にもう一方を pH 8 に調整した。残りの上清 2 本にはブタノールを 1 ml ずつ加え、同様に pH 2、8 にそれぞれを調整した。これらをよく振盪攪拌し、遠心分離 (2,500

rpm、10 min) の後、それぞれの上層 100 μ l ずつを 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、減圧下で濃縮乾固しメタノール 100 μ l に再溶解した。下層は pH を 7 付近に再調整し、同様に 100 μ l ずつを 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、濃縮後、水 100 μ l で再溶解した。安定性試験は 1 ml ずつ小試験管に分注したものを、pH を 2、7、9 にそれぞれ調整し、湯浴中 60°C で 30 分間加温後、pH を 7 に再調整した。以上の操作により得られた各画分およびスタンダードとして培養液原液と 1/4 に希釈した培養液のプロテアソーム阻害活性を測定した。

4. 菌株

チロペプチン生産菌は宮城県加美郡小野田町の土壌より分離した放線菌であり、産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託申請し、FERM P-18233 として受託された。

5. チロペプチン生産菌の同定

チロペプチン生産菌の各種培地での培養性状および生理学的性質は、常法に基づき Shirling と Gottlieb [66]、あるいは Waksman の方法 [67]に従って調べた。菌の形態は、培養性状試験に用いた寒天プレート上で、27°C、4~21 日間培養し観察した。微細形態は光学顕微鏡 (Model S; Nikon Corp., Tokyo, Japan) および走査型電子顕微鏡 (Model S-570; Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan) を用いて観察した。気菌糸、基生菌糸および溶解性色素の色調については、「色の標準」(Japan Color Research Institute, Saitama, Japan) [68]および「カラー・ハーモニー・マニュアル・1958」(Container Corporation of America, Chicago) [69]を用いて記載した。炭素源の利用については Pridham と Gottlieb の方法 [70]に従った。全菌体の還元糖組成はセルロース TLC により分析した [71]。細胞壁中の 2,6-ジアミノピメリン酸の光学異性体の判定は Becker ら [72]および Staneck と Roberts の方法 [73]に従った。リン脂質は Minnikin らの方法 [74]に従い、メナキノンは Tamaoka らの方法 [75]により HPLC およびマススペクトルを測定することにより決定した。菌体中の脂肪酸は Suzuki と Komagata の方法 [76]により分離、測定した。DNA の分析は Hamada らにより記載された方法 [77]で行った。

6. チロペプチンの生産

2.0% ガラクトース、2.0% デキストリン、1.0% バクトソイトン (Becton, Dickinson and Co., Sparks,

MD)、0.5% コーン・スチープ・リカー、1.0% グリセロール、0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% CaCO_3 、シリコン消泡剤 (KM-70; Shin-Etsu Chemical Co., Tokyo, Japan) 1 滴を含む液体培地 (pH 7.4) を三角フラスコ (500 ml 容) に 110 ml ずつ分注し、オートクレーブにより 121°C で 20 分滅菌したものに、寒天斜面培地に培養した放線菌 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株を接種し、30°C で 3 日間回転振盪培養した。この培養液を種母培養液とした。

2.0% グリセロール、2.0% デキストリン、1.0% バクトソイトン、0.3% 酵母エキス、0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% CaCO_3 、シリコン消泡剤 1 滴を含む液体培地 (pH 7.4) を振盪フラスコ (500 ml 容) に 125 ml ずつ分注し、オートクレーブにより 121°C で 20 分滅菌したものに上記種母培養液をそれぞれ 3 ml ずつ接種し、27°C で 4 日間往復振盪培養した。

7. チロペプチンの単離精製

培養 4 日目の培養液 10 リットルを遠心分離 (6,000 rpm、10 min) により、菌体と上清に分離した。培養液上清を、10 リットルの酢酸エチルにより抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水およびろ過後減圧下で濃縮乾固することにより油状残渣 2.9 g を得た。この残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (72 g、シリカゲル 60; Merck, Darmstadt, Germany) に付し、クロロホルム、クロロホルム-メタノール (50 : 1、v/v) およびクロロホルム-メタノール (10 : 1、v/v) により順次溶出した。活性画分のあるクロロホルム-メタノール (10 : 1、v/v) の溶出画分を減圧下で濃縮乾固し粗抽出物 1.6 g を得た。この粗抽出物を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (40 g) に付し、トルエン-アセトン (5 : 1、v/v)、トルエン-アセトン (4 : 1、v/v)、トルエン-アセトン (3 : 1、v/v) およびトルエン-アセトン (2 : 1、v/v) により順次溶出した。活性画分のあるトルエン-アセトン (3 : 1、v/v) の溶出画分を減圧下で濃縮乾固し粗抽出物 466 mg を得た。この粗抽出物をセファデックス LH-20 (500 ml) に供し、メタノールで溶出した。得られた画分を減圧下で濃縮乾固し 306 mg の粗抽出物を得た。これを高速液体クロマトグラフィー (カラム : Capcell pak UG120、2.0×25 cm; Shiseido Co., Tokyo, Japan、流速 : 10 ml/min、検出 : UV 220 nm) に供し、アセトニトリル-水 (30 : 70、v/v) で溶出した。この溶出液を減圧下で濃縮乾固することによりチロペプチン A および B を含む粗抽出物 99 mg を得た。これを再度高速液体クロマトグラフィー (カラム : Capcell pak UG120) に供し、アセトニトリル-水 (25 :

75、v/v) で溶出した。この溶出液を減圧下で濃縮乾固することによりチロペプチン A および B を含む粗抽出物 14.1 mg を得た。更にこの粗抽出物 14.1 mg を高速液体クロマトグラフィー (カラム: Capcell pak UG120) に供し、メタノール-3 mM 炭酸アンモニウム水溶液 (40 : 60、v/v) で溶出することによりチロペプチン A および B を分離精製し、それぞれ白色粉末としてチロペプチン A を 1.4 mg と B を 1.1 mg の収量で得た。

第2節 結果

1. 探索

プロテアソーム阻害物質を Fig. 1-2 に示す方法を用いて、約 6,000 株の微生物培養液上清中に探索し、一放線菌 MK993-dF2 株が培養液中にプロテアソーム阻害物質を生産していること見出した。

この阻害物質の溶媒への移行性を調べるため予備抽出試験、pH および熱安定性を調べた。この阻害物質は菌体内にはなく培養液上清にのみ存在し、pH は 2 もしくは 8 においてもブタノールおよび酢酸エチルに抽出された。また pH2、7、9 で 60°C、30 分間加温しても阻害活性に変化は見られなかった。よってこの阻害物質は pH 2~8 の条件下でブタノールおよび酢酸エチルで抽出できる疎水性物質であり、また pH 2~9 で 30 分間 60°C の加熱条件下においても安定な化合物であることが分かった。

2. 生産菌の同定

この生産菌は平成 10 年 5 月、微生物化学研究センターにおいて、宮城県加美郡小野田町の土壌より分離した放線菌で、MK993-dF2 の菌株番号が付された。MK993-dF2 株は形態的特徴から放線菌である

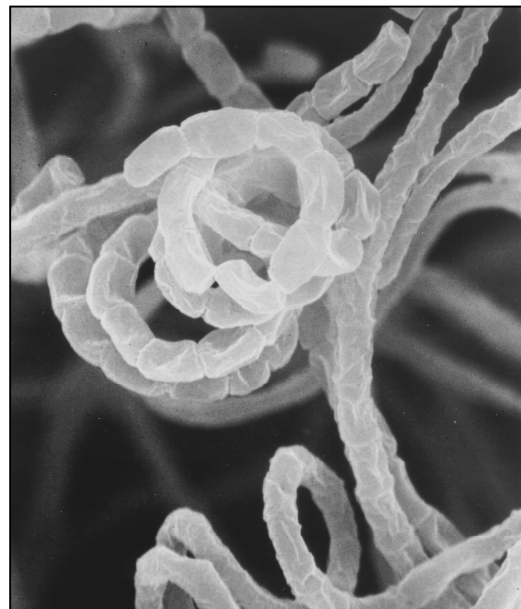
ことが判明した。本菌は、よく分枝した基生菌糸より、らせん形成を有する気菌糸を伸長し、円筒形の胞子を連鎖する。胞子の表面は平滑、その大きさは約 $0.5\sim 0.7\times 0.9\sim 1.5\ \mu\text{m}$ である。

MK993-dF2 株の電子顕微鏡写真を Fig.

1-3 に示す。輪生枝、菌束糸、胞子囊および運動性胞子は認められない。

MK993-dF2 株の各種寒天培地におけるコロニー性状の観察結果を Table 1-1

に示す。種々の培地で、にぶ黄~うす黄茶の発育上に、明るい灰~明るい茶



1.0 μm

Fig. 1-3. Scanning electron micrograph of strain MK993-dF2 on glucose-asparagine agar after incubation at 27 °C for 10 days.

灰の気菌糸を着生する。溶解性色素は かすかに茶を帯びる培地もある。本菌の生理学的性質は Table 1-2 に示す。イースト・スターチ寒天培地での生育温度範囲は 10~37°Cの範囲であり、生育至適温度は 24~30°Cである。トリプトン・イースト・ブロス (ISP-培地 1)、ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP-培地 6) およびチロシン寒天培地 (ISP-培地 7) でのメラニン様色素の生成は認められなかった。スターチの水解性は培養後 4 日目頃より認められ、その作用は中等度である。硝酸塩の還元反応は陰性である。炭素源の資化性は D-グルコースを資化して発育し、L-アラビノース、D-フルクトース、シュクロース、イノシトール、ラムノースおよびラフィノースは資化しない。D-キシロースおよび D-マンニトールはおそらく資化しない。

Table 1-1. Cultural characteristics of strain MK993-dF2.

Medium	Growth	Aerial mycelium	Soluble pigment
Sucrose-nitrate agar	Colorless	None	None
Yeast extract-malt extract agar (ISP No. 2)	Pale yellowish brown [2 gc, Bamboo ~ 2 ie, Lt Mustard Tan]	Grayish white ~ light brownish gray [2 fe, Covert Gray]	Faint, brownish
Oatmeal agar (ISP No. 3)	Pale yellow [1 ca, Pale Yellow] ~ dusty yellow [1 1/2 gc, Dusty Yellow]	Grayish white ~ light gray [1 fe, Grieger]	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No. 4)	Pale yellowish brown [2 ie, Lt Mustard Tan] ~ dark brown [3 nl, Dk Brown]	Light gray [1 fe, Grieger]	Faint, brownish
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	Dusty yellow [1 1/2 gc, Dusty Yellow] ~ pale olive [1 1/2 ie, Lt Olive]	Yellowish gray [1 cb, Parchment]	Faint, brownish
Tyrosine agar (ISP No. 7)	Pale yellowish brown [2 ie, Lt Mustard Tan]	Yellowish gray [1 1/2 ec, Putty] ~ light brownish gray [2 fe, Covert Gray]	Faint, brownish

Observation after incubation at 27 °C for 21 days.

Table 1-2. Physiological characteristics of strain MK993-dF2.

Temperature range for growth	10~37°C
Optimum temperature	24~30°C
Formation of melanoid pigment	(-)
Hydrolysis of starch	+
Reduction of nitrate	-
Utilization of	
L-Arabinose	-
D-Fructose	-
D-Glucose	+
Inositol	-
D-Mannitol	(-)
Raffinose	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
D-Xylose	(-)

+ : positive; (-): probably negative; - : negative

MK993-dF2 株の化学分類学的な特徴について以下に記載する。細胞壁ペプチドグリカンの構成成分である 2,6-ジアミノピメリン酸の光学異性体は *meso* 型および LL-型を含有する。全菌体中の還元糖はリボース、マンノース、ガラクトースおよびグルコースを含有し、ラムノース、キシロースおよびアラビノースは含有しない。よって全菌体中の糖パターンは C である。呼吸鎖電子伝達系の電子授与体イソプレノイド・キノンであるメナキノンは、主要な成分として MK-9(H₆) および MK-9(H₈) を含有する。生体膜の主要構成成分であるとともに、生体膜に関わる各種生理機能にも関与しているとされるリン脂質はホスファチジルエタノールアミンを含み、ホスファチジルメチルエタノールアミン、ホスファチジルコリンおよび未知のグルコサミン含有リン脂質を含まず、PII 型を示す。そのリン脂質、あるいは糖脂質中の脂肪酸は 12-メチルテトラデカン酸、ヘキサデカン酸および 13-メチルテトラデカン酸を主成分として含有する。また *Mycobacterium* 属をはじめとする抗酸性菌とその近縁細菌に限り、これらの細胞表面の疎水性や抗酸性に関与していると考えられているミコール酸は認められなかった。本菌の DNA、GC 含量は 73.9 モル%であった。

以上の結果より、MK993-dF2 株は *Kitasatospora* 属 [78,79] に属するものと考えられる。また、MK993-dF2 株の 16S リボゾーム RNA の部分塩基配列 (*Escherichia coli* numbering system の 59 番目から

489 番目) を解読し、このデータをもとに国立遺伝学研究所 日本 DNA データバンク (DDBJ) で相同性検索 (FASTA および BLAST) を行ったところ、*Kitasatospora* 属と高い相同性を示した。そこで、MK993-dF2 株を *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 とした。

3. チロペプチンの単離精製

チロペプチンの単離精製法を Fig. 1-4 に示す。*Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株の培養液上清 9.2 リットルを、10 リットルの酢酸エチルにより抽出を行い、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過後減圧下で濃縮乾固することにより油状残渣 2.9 g を得た。この残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム-メタノール (10 : 1, v/v) により溶出した。活性画分を減圧下で濃縮乾固し粗抽出物 1.6 g を得た。さらにこの粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエン-アセトン (3 : 1, v/v) により溶出した。活性画分を減圧下で濃縮乾固し粗抽出物 466 mg を得た。次ぎにこの粗抽出物をセファデックス LH-20 (500 ml) に供し、メタノールにより溶出した。得られた画分を減圧下で濃縮乾固し 306 mg の粗抽出物を得た。これを高速液体クロマトグラフィーに供し、アセトニトリル-水 (30 : 70, v/v) で溶出した。この溶出液を減圧下で濃縮乾固することによりチロペプチン A および B を含む粗抽出物 99 mg を得た。これを再度高速液体クロマトグラフィーに供し、アセトニトリル-水 (25 : 75, v/v) で溶出した。この溶出液を減圧下で濃縮乾固することによりチロペプチン A および B を含む粗抽出物 14.1 mg を得た。さらにこの粗抽出物 14.1 mg を高速液体クロマトグラフィーに供し、メタノール-3 mM 炭酸アンモニウム水溶液 (40 : 60, v/v) で溶出することによりチロペプチン A および B を分離精製し、それぞれ白色粉末としてチロペプチン A を 1.4 mg および B を 1.1 mg の収量で得た。

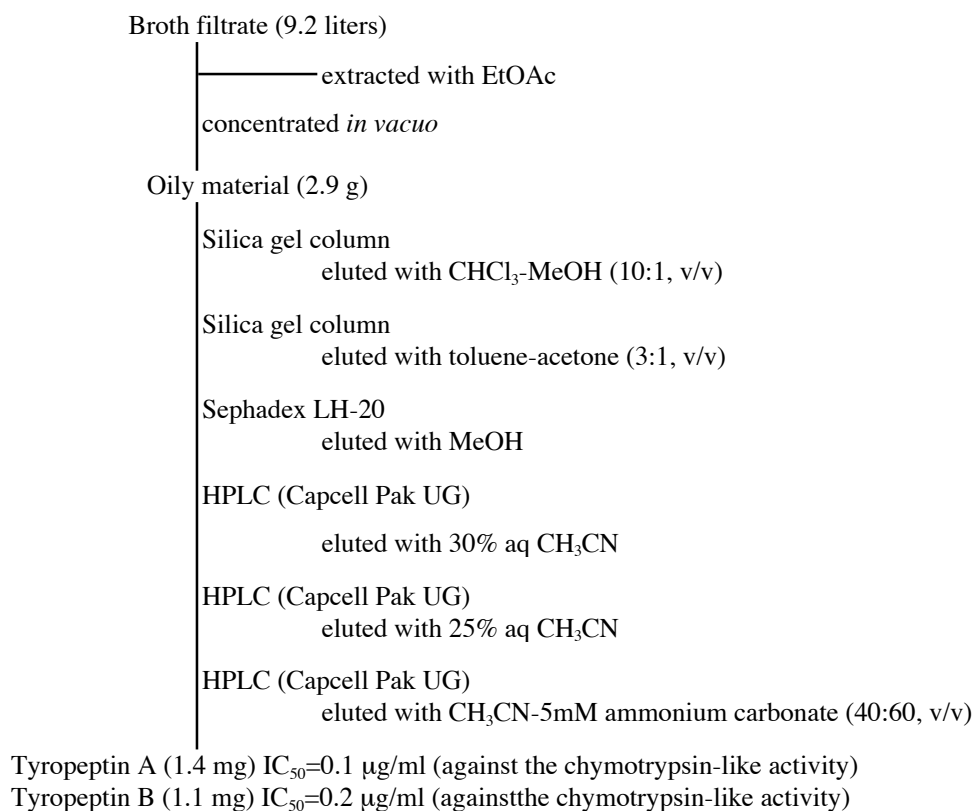
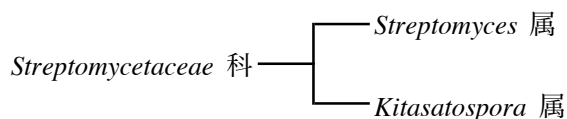


Fig. 1-4. Isolation of tyropeptins A and B.

第3節 考察

我々は放線菌の代謝産物を中心に、プロテアソーム阻害物質の探索を行った。その結果、宮城県加美郡小野田町の土壌より分離された放線菌 MK993-dF2 株の培養液中にプロテアソーム阻害物質が含まれていることを見出した。まずこの放線菌の同定を行った。

放線菌は土壌放線菌の代表であり、土壌 1 g には 100 万個以上の放線菌が生息しており、自然界の物質循環と環境浄化の面で重要な役割を果たしている。この土壌放線菌の大部分の 95% は *Streptomyces* 属の放線菌である。*Streptomyces* 属は *Streptomycetaceae* 科に属し、この科は *Kitasatospora* 属の 2 属から成る。本科に属する放線菌の特徴を次に記す。よく伸長した分岐する基生菌糸と気菌糸を着生する好気性菌である。基生菌糸の分断はほとんど認められない。多核体菌糸である。基生菌糸上に胞子を着生する菌株も認められる。大部分の菌株は気菌糸上に薄い繊維状の膜に覆われた鎖状の分節胞子を着生する。これらの連鎖は短いもので 25 個、長いもので 50 個以上の胞子から成る。胞子の運動性は観察されていない。極性リン脂質は両属共にジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトールマンノシドを含む PII 型、脂肪酸組成は直鎖、分枝鎖飽和脂肪酸から成る 2c 型、メナキノンの主要成分は MK-9 (H_6 , H_8)、GC 含量は 67~79mol% である。このように *Streptomyces* 属と *Kitasatospora* 属の形態ならびに培養性状はほとんど同じであるが、化学分類学的特徴は若干異なる。*Streptomyces* 属の細胞壁アミノ酸組成はグリシンと LL-ジアミノピメリン酸であるが、*Kitasatospora* 属はグリシンと LL-ジアミノピメリン酸および *meso*-ジアミノピメリン酸をほぼ等量含んでいる。また全菌体糖組成において *Streptomyces* 属は特徴とする糖を持たないが、*Kitasatospora* 属はガラクトースを有する。



我々の見出した MK993-dF2 株は、よく分岐した基生菌糸より、らせん形成を有する気菌糸を伸長し、円筒形の胞子を連鎖する (Fig. 1-3)。各種寒天培地におけるコロニー性状の観察 (Table 1-1) や生理学的性質 (Table 1-2) 等の形態的、培養性状の特徴および化学分類学的特徴により、特に LL-および *meso*-型のジアミノピメリン酸を共に含んでいて、またガラクトースを含有していることから、MK993-dF2

株は *Kitasatospora* 属に属するものと考えた。また 16S リボゾーム RNA の部分塩基配列も *Kitasatospora* 属と高い相同性を示した。

現在、*Kitasatospora* 属は *K. azatica*、*K. cheerisanensis*、*K. cineracea*、*K. cochleata*、*K. cystarginea*、*K. griseola*、*K. kifunensis*、*K. mediocidica*、*K. niigatensis*、*K. paracochleata*、*K. phosalacinea*、*K. putterlickiae*、*K. setae* の 13 菌種が承認されている [80-84]。また *Streptomyces atroaurantiacus* も分類学的研究から推察して本属に含まれると考えられる [16]。MK993-dF2 株はその性状からは *K. cystarginea* もしくは *K. paracochleata* に近い種であると推察されるが、種の決定にはさらに詳細な検討が必要である。そこで本菌株を *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株とした。

次に MK993-dF2 株の培養液よりプロテアソーム阻害物質の単離精製を試みた (Fig. 1-4)。*Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株の培養液上清 9.2 リットルを酢酸エチルによる溶媒抽出法、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを 2 回、セファデックス LH-20 を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーで異なる溶媒系に 3 回供することにより単一の活性分画 A を 1.4 mg、B を 1.1 mg の収量で得た。そしてそれぞれをチロペプチン A および B と命名した。

地球上にいる微生物の中で、人が純粋培養できるものは 1 % 以下であると推察されている。まして人類が二次代謝産物に関する情報を持っているのはさらにその 1 % 以下であると推察されており、まだまだ微生物の代謝産物には無限の可能性が潜んでいる。そこから得られた天然有機化合物には人知の遠く及ばない骨格や、長い進化を物語る抜群の生物活性を持つ化合物が多数存在する。今後もそこから得られた化合物が医療や福祉の向上に貢献することを期待する。

第4節 小括

本章では、プロテアソーム阻害物質を微生物培養液中に見出し、以下のことを明らかにした。

- (1) 微生物代謝産物よりプロテアソーム阻害物質の探索を行い、MK993-dF2 株がプロテアソーム阻害物質を生産していることを見出した。
- (2) MK993-dF2 株について形態学的特徴、生理学的性質、化学分類学的特徴、16S リボゾーム RNA の部分塩基配列の解読により、放線菌 *Kitasatospora* 属と同定し、本菌株を *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 とした。
- (3) MK993-dF2 株の培養液 10 リットルより、溶媒抽出法、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによりチロペプチン A を 1.4 mg、チロペプチン B を 1.1 mg 単離した。

第2章 チロペプチンの構造決定

第1章に記述したように、放線菌 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株の培養液よりプロテアソーム阻害物質チロペプチン A および B を単離することに成功した。本章ではチロペプチンの物理化学的性質および各種 NMR スペクトルの解析に基づき、立体化学を含めた構造決定について言及する。

第1節 実験材料と方法

1. 各種機器分析

融点は柳本製作所製微量融点測定器で測定した。比旋光度はパーキン-エルマー製 241 型旋光度計で測定した。紫外線吸収スペクトルは日立 U-3210 型分光光度計で測定した。赤外線吸収スペクトルは堀場製作所製 FT-210FT 型赤外分光光度計を用いて臭化カリウム (KBr) 錠で測定した。質量スペクトルは日本電子製 JMS-SX 102 型質量分析計を用いて FAB-MS および高分解能 FAB-MS スペクトルを測定した。また LC/MS および APCI-MS は日立製 M-1200H 型質量分析計で測定した。各種核磁気共鳴スペクトルは日本電子製 JNM-EX400 型核磁気共鳴装置および日本電子製 JNM-A500 型核磁気共鳴装置で測定し、内部標準としてテトラメチルシラン (TMS) を使用した。

2. チロペプチン A の各種スペクトルデータ

チロペプチン A のメタノール (MeOH) 中での UV スペクトルは Fig. 2-1 に、IR スペクトルは Fig. 2-2 に示す。APCI-MS スペクトルは Fig. 2-3 に示す。チロペプチン A の重メタノール中で測定した ^1H NMR、 ^{13}C NMR の各スペクトルはそれぞれ Fig. 2-4、Fig. 2-5 に示す。

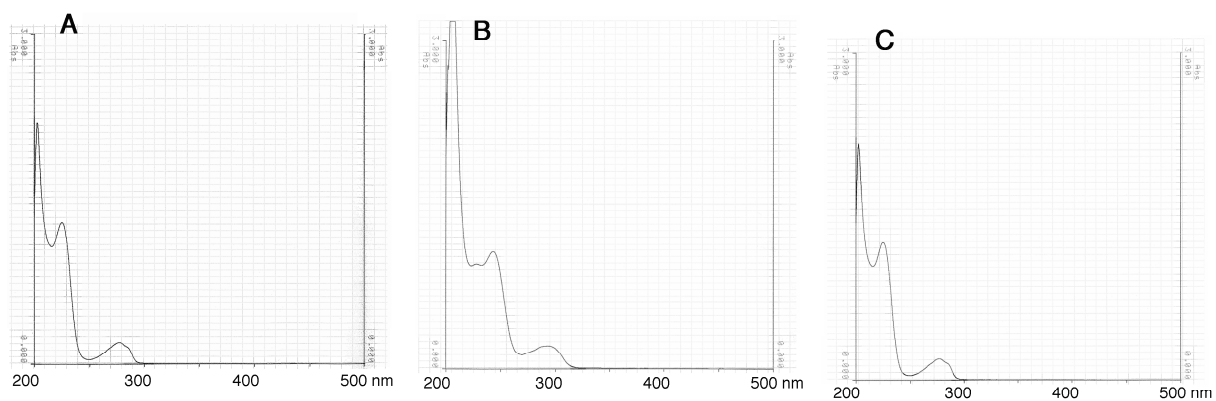


Fig. 2-1. UV spectra of tyropeptin A.

UV spectra of tyropeptin A were determined in MeOH (A), 0.05 M NaOH/MeOH (B) or 0.05M HCl/MeOH (C).

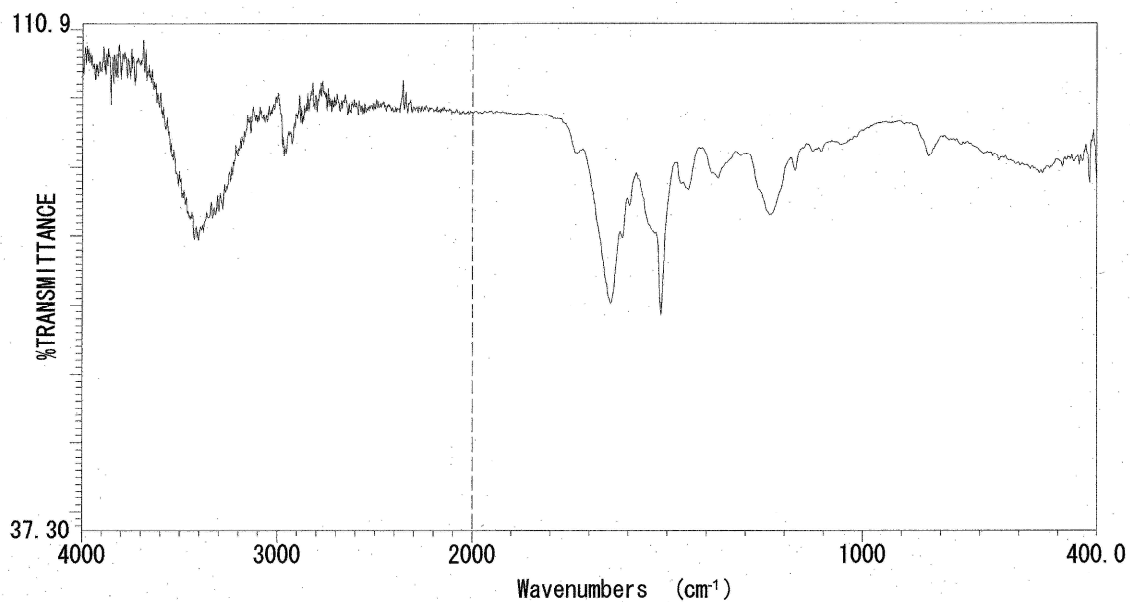


Fig. 2-2. IR spectrum of tyropeptin A.

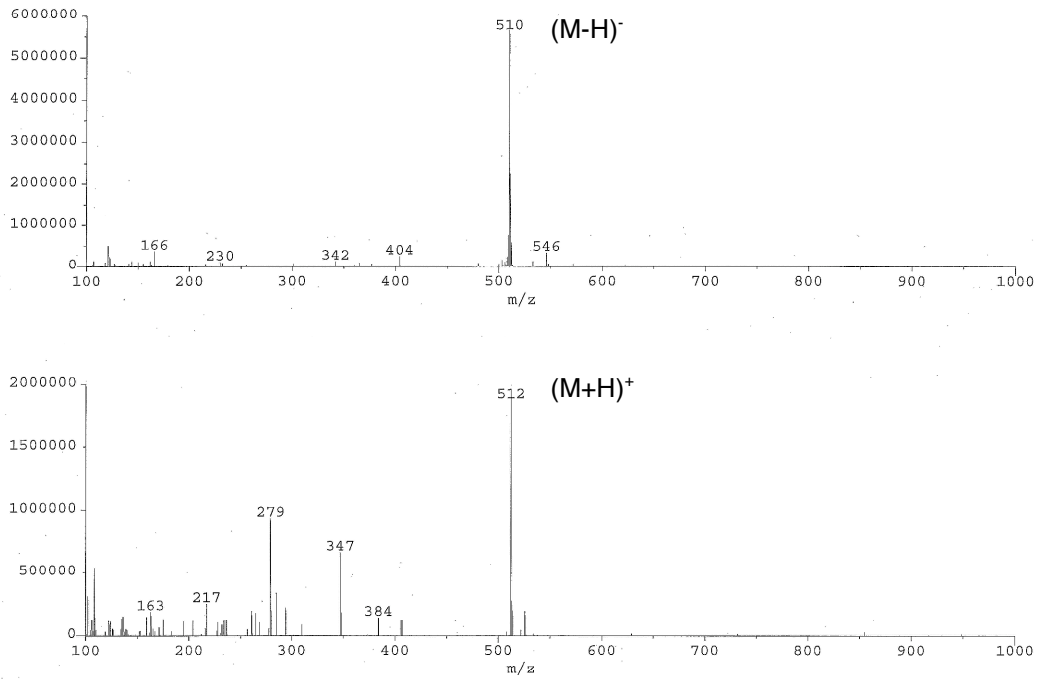


Fig. 2-3. APCI-MS spectra of tyropeptin A.

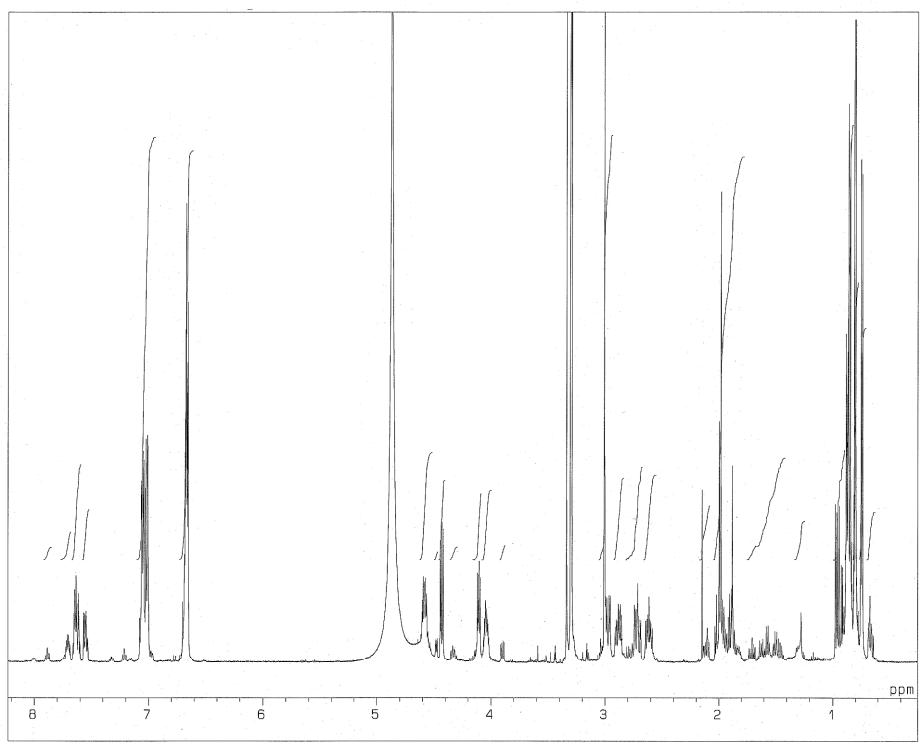


Fig. 2-4. ^1H NMR spectrum of tyropeptin A.

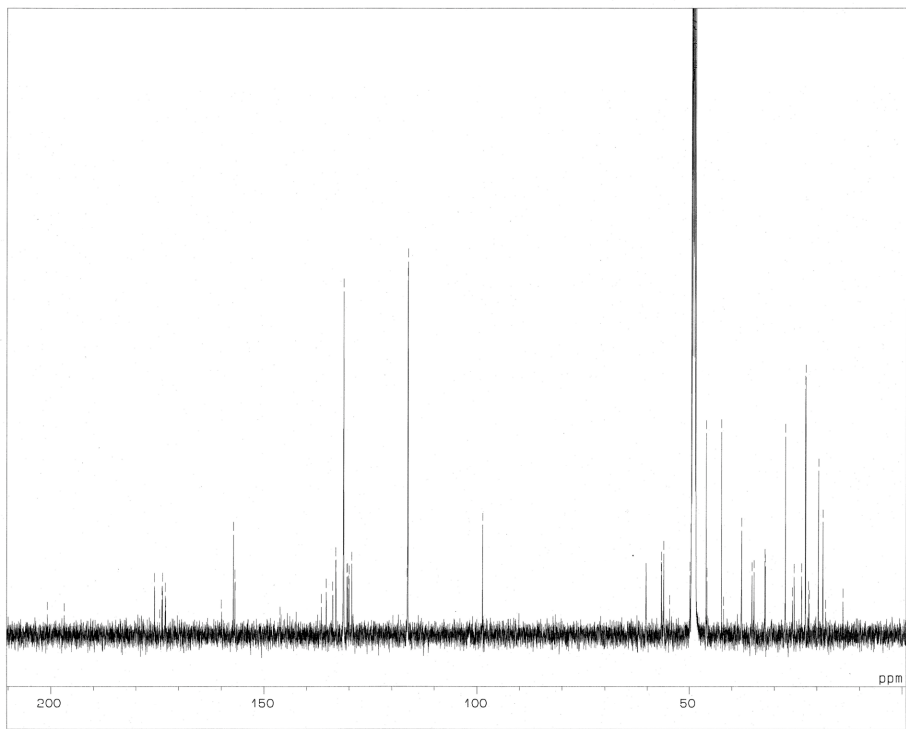


Fig. 2-5. ^{13}C NMR spectrum of tyropeptin A.

3. チロペプチン B の各種スペクトルデータ

チロペプチン B のメタノール中での UV スペクトルは Fig. 2-6 に、IR スペクトルは Fig. 2-7 に示す。APCI-MS スペクトルは Fig. 2-8 に示す。チロペプチン B の重メタノール中で測定した ^1H NMR、 ^{13}C NMR の各スペクトルはそれぞれ Fig. 2-9、Fig. 2-10 に示す。

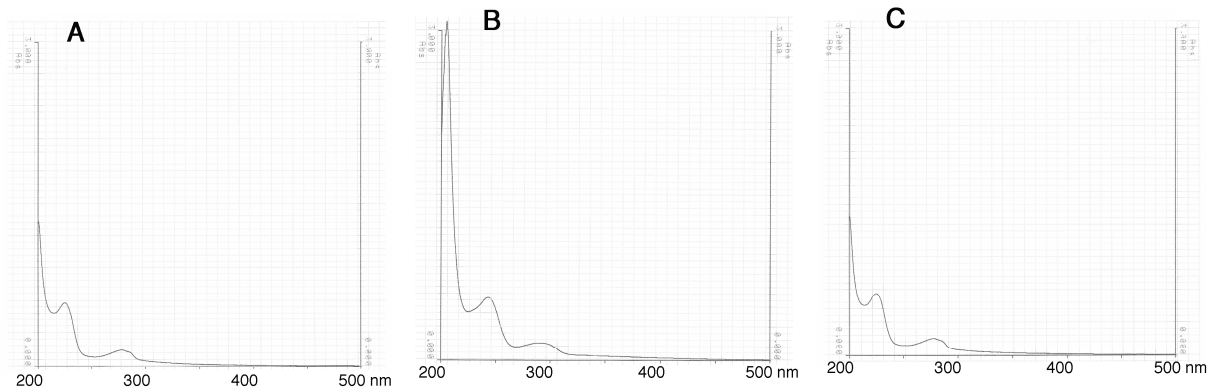


Fig. 2-6. UV spectra of tyropeptin B.

UV spectra of tyropeptin B were determined in MeOH (A), 0.05 M NaOH/MeOH (B) or 0.05M HCl/MeOH (C).

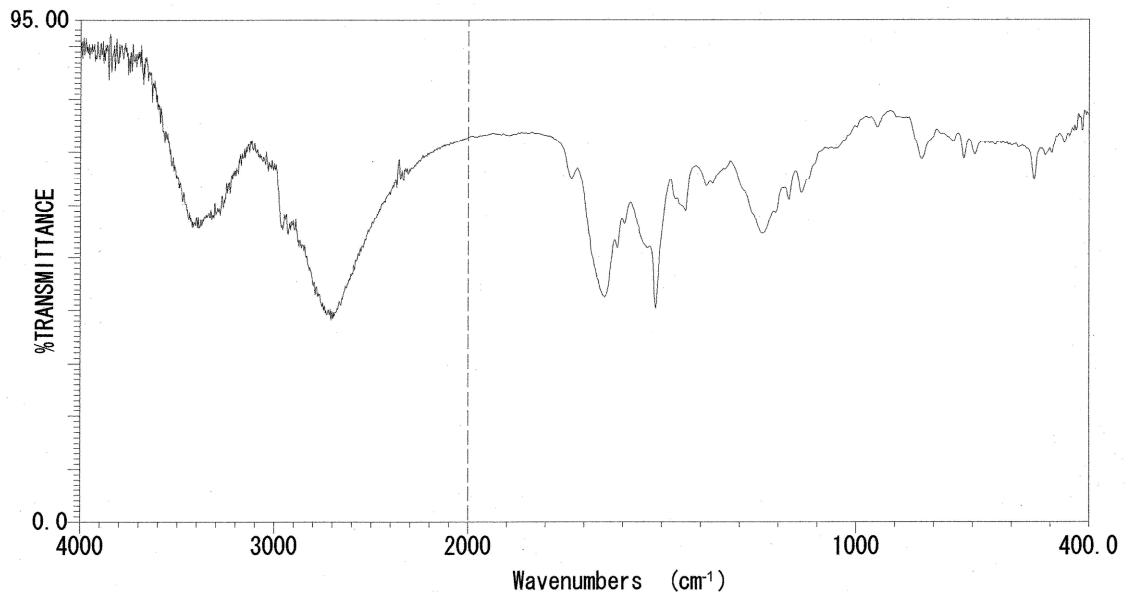


Fig. 2-7. IR spectrum of tyropeptin B.

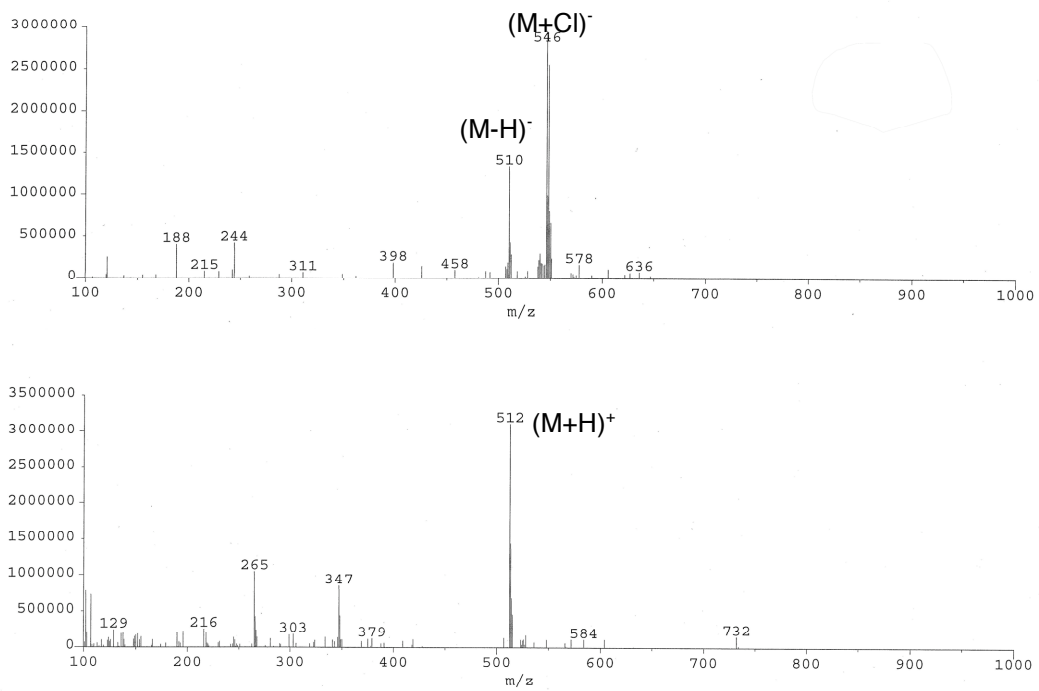


Fig. 2-8. APCI-MS spectra of tyropeptin B.

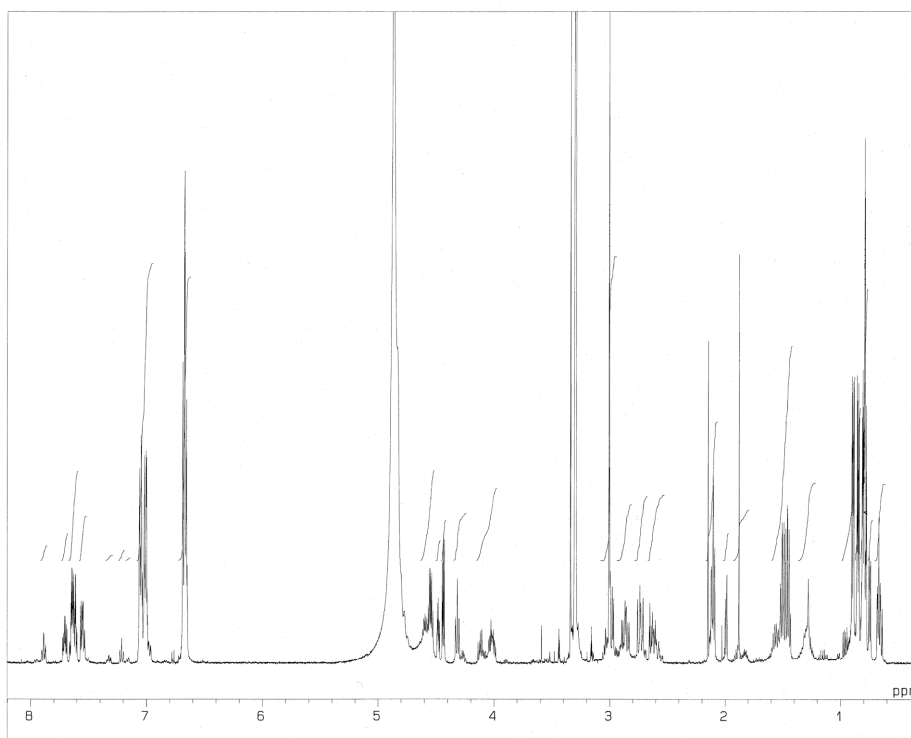


Fig. 2-9. ^1H NMR spectrum of tyropeptin B.

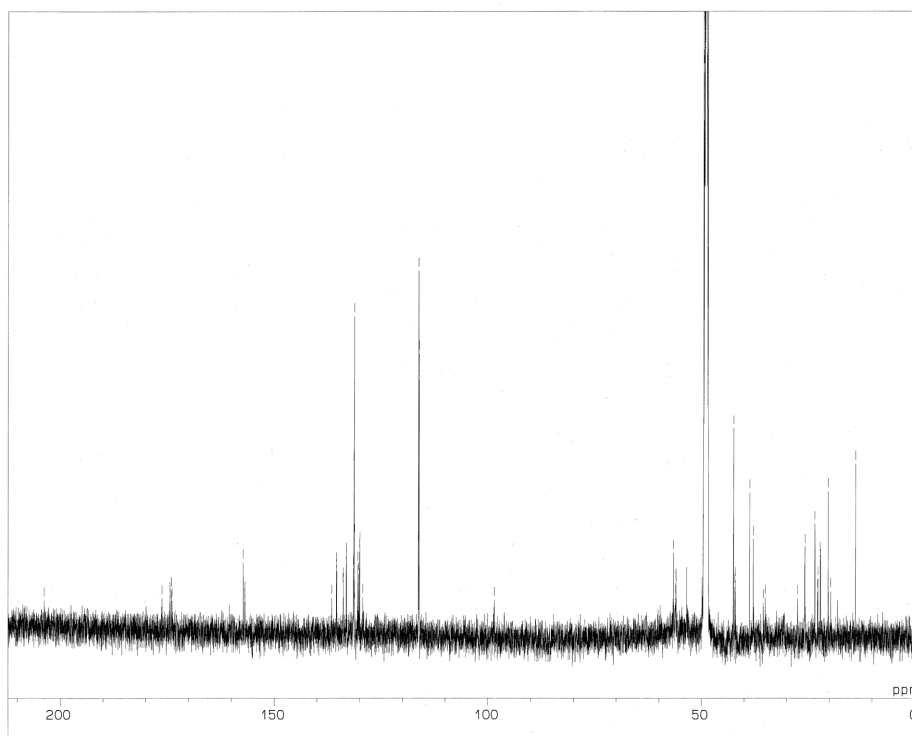


Fig. 2-10. ^{13}C NMR spectrum of tyropeptin B.

4. チロペプチン A の還元

チロペプチン A (8.3 mg) をメタノール (2 ml) に溶解し、氷冷下で水素化ホウ素ナトリウム (8.3 mg) を加え、2 時間室温で攪拌した。この反応液にアセトン (1 ml) を加え、溶媒を減圧下で留去した。残渣を高速液体クロマトグラフィー (カラム: Capcell pak UG 120, 2.0×25 cm, 移動相: MeOH - 2 mM 炭酸アンモニウム水溶液 (40 : 60)、流速: 10 ml/min、検出: UV 220 nm) により精製し、**1** を 3.3 mg、**2** を 2.3 mg の収量で単離した。

1: IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3280, 2960, 1640, 1620, 1550, 1510, 1450, 1390, 1230. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 225 (4.17), 277 (3.41). $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -32.7° (*c* 0.3, MeOH). HRFAB-MS (*m/z*) 514.2913 (M+H)⁺; calcd for C₂₈H₄₀O₆N₃, 514.2917, **1** の重メタノール中で測定した ¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HMQC、HMBC の各スペクトルはそれぞれ Fig. 2-11、Fig. 2-12、Fig. 2-13、Fig. 2-14、Fig. 2-15、Fig. 2-16 に示す。

2: IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3280, 2960, 1630, 1550, 1520, 1460, 1380, 1240. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 225 (4.06), 277 (3.30). $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ 0° (*c* 0.2, MeOH). HRFAB-MS (*m/z*) 514.2913 (M+H)⁺; calcd for C₂₈H₄₀O₆N₃, 514.2917. **2** の重メタノール中で測定した ¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、Decoupling spectrum の各スペクトルはそれぞれ Fig. 2-17、Fig. 2-18、Fig. 2-19、Fig. 2-20 に示す。

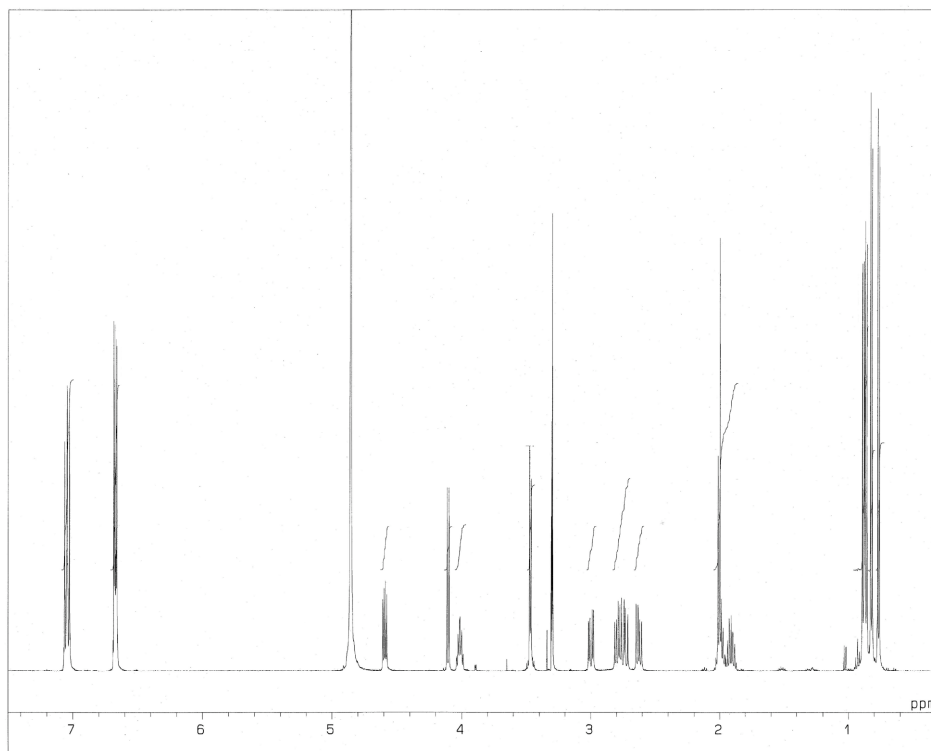


Fig. 2-11. ^1H NMR spectrum of **1**.

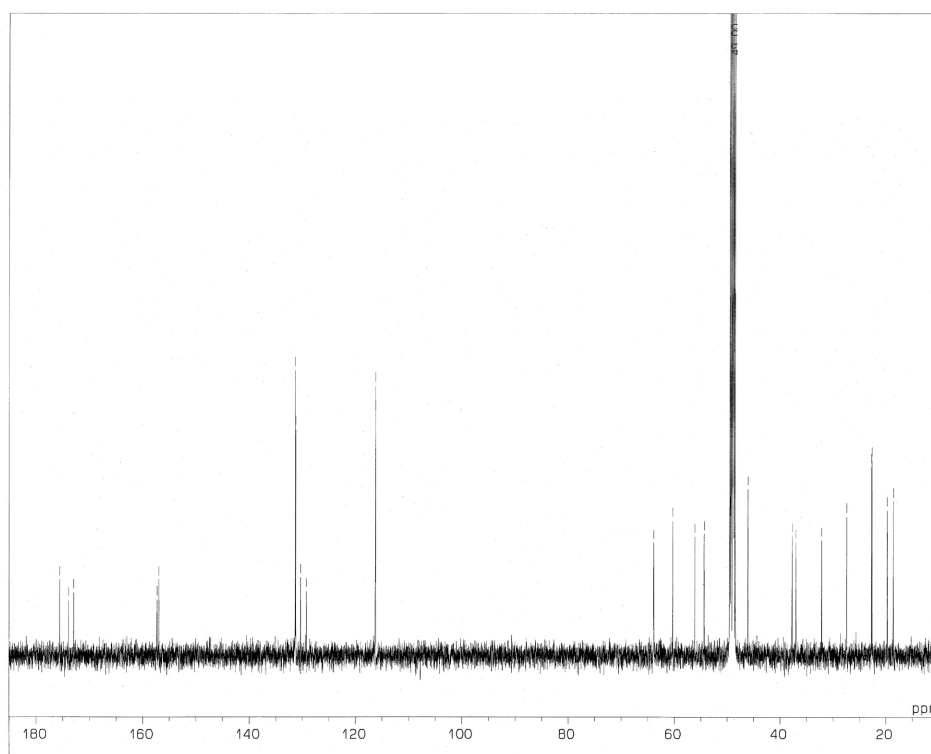


Fig. 2-12. ^{13}C NMR spectrum of **1**.

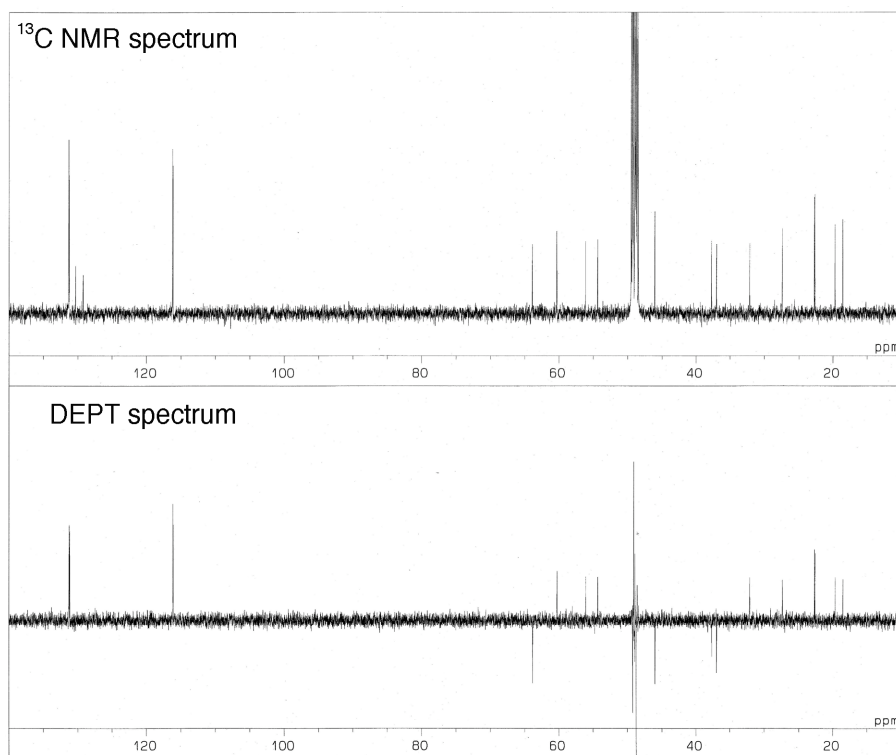


Fig. 2-13. DEPT spectrum of **1**.

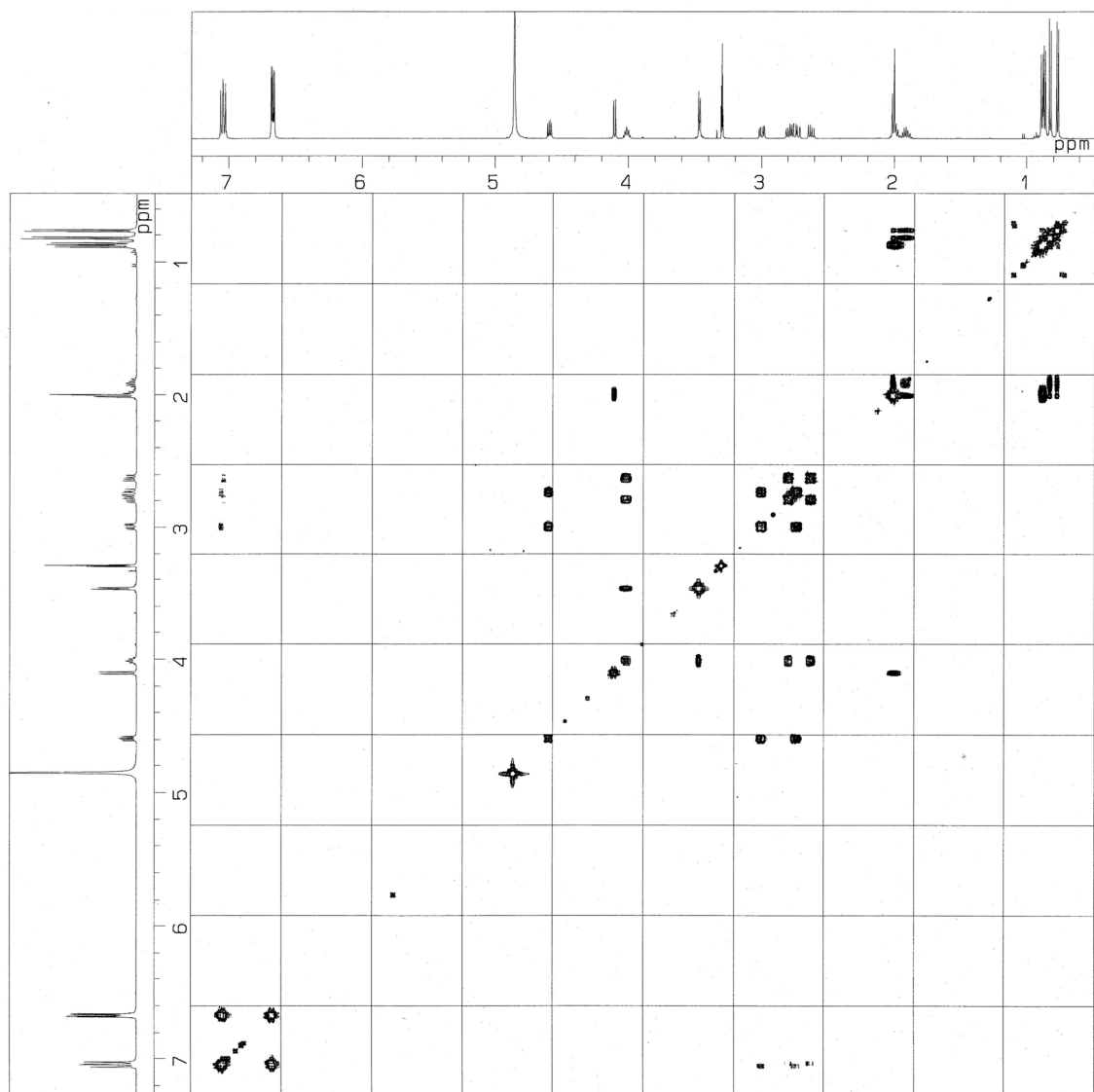


Fig. 2-14. ^1H - ^1H COSY spectrum of **1**.

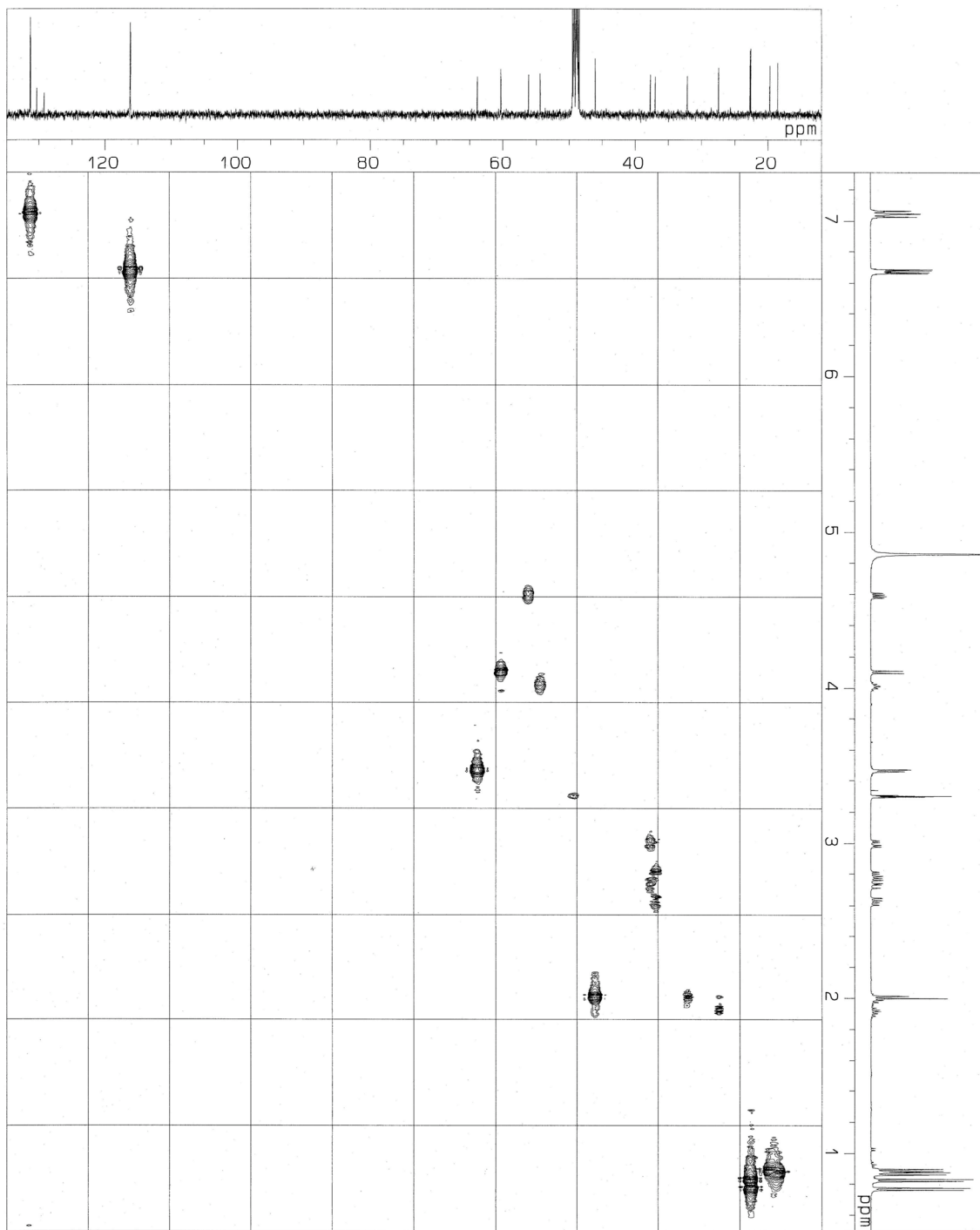


Fig. 2-15. HMQC spectrum of 1.

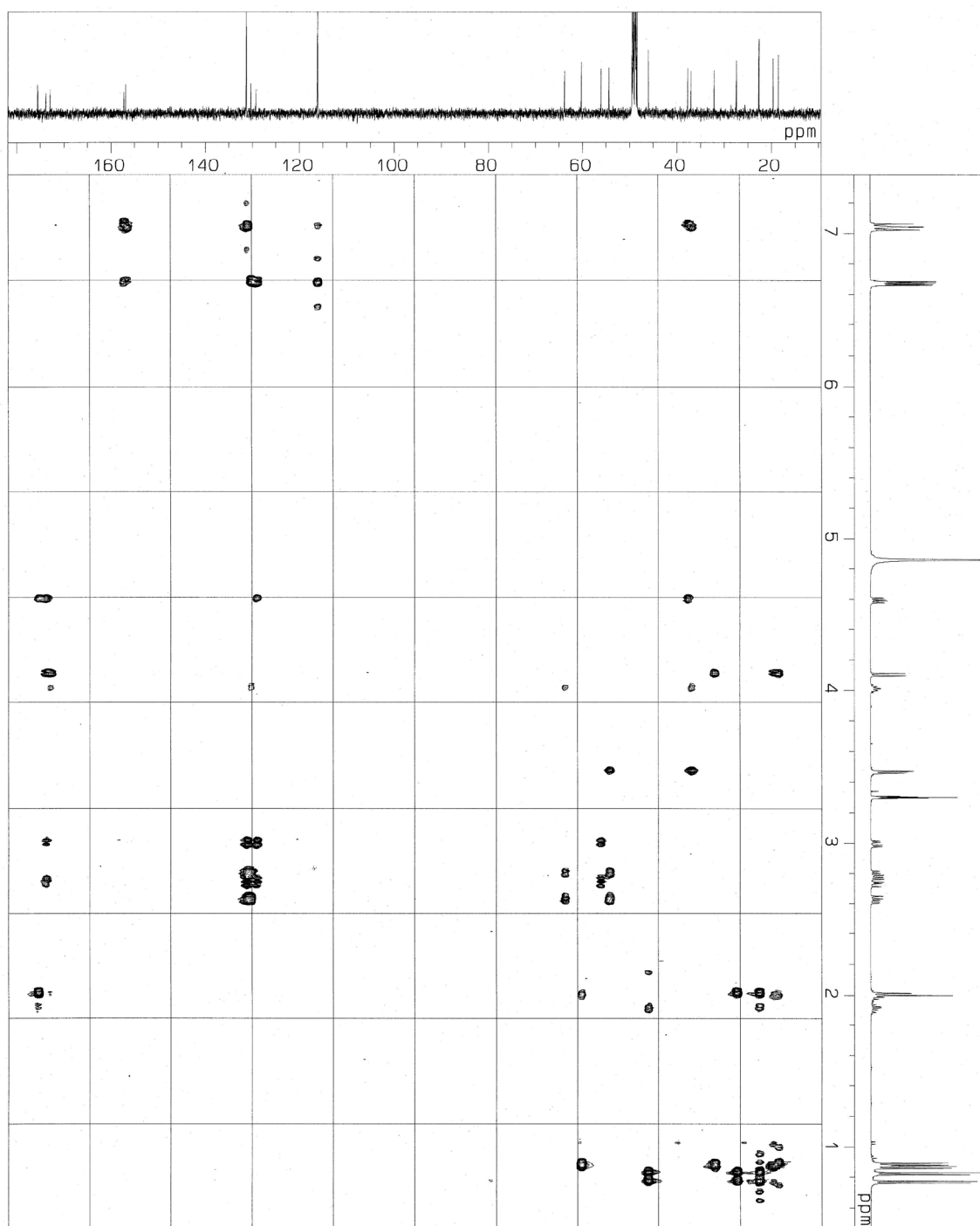


Fig. 2-16. HMBC spectrum of 1.

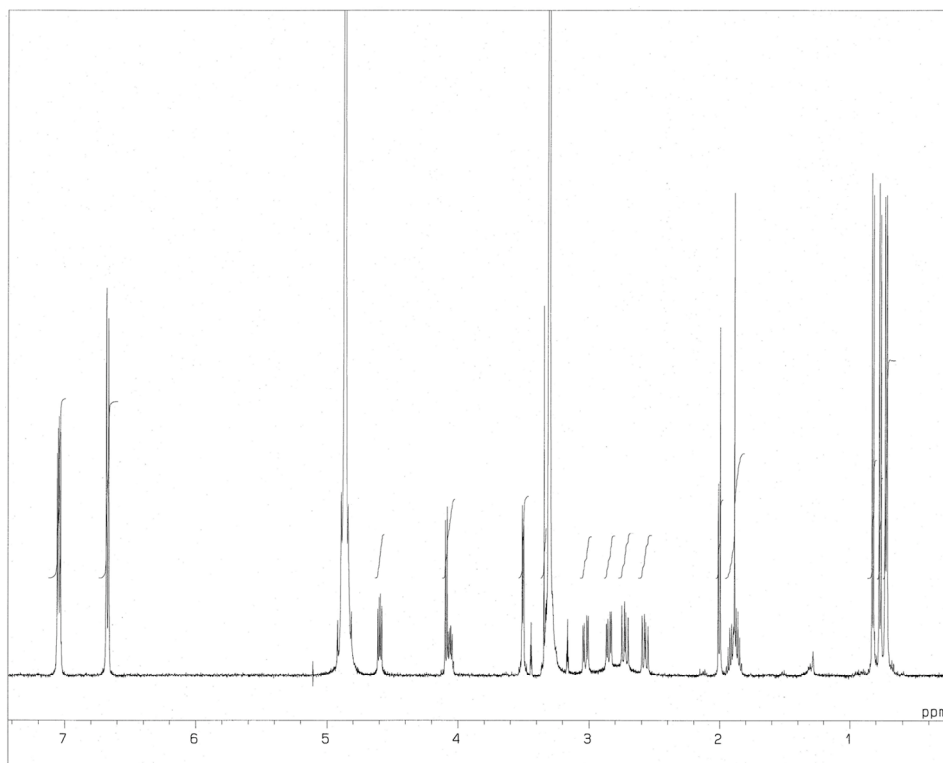


Fig. 2-17. ^1H NMR spectrum of **2**.

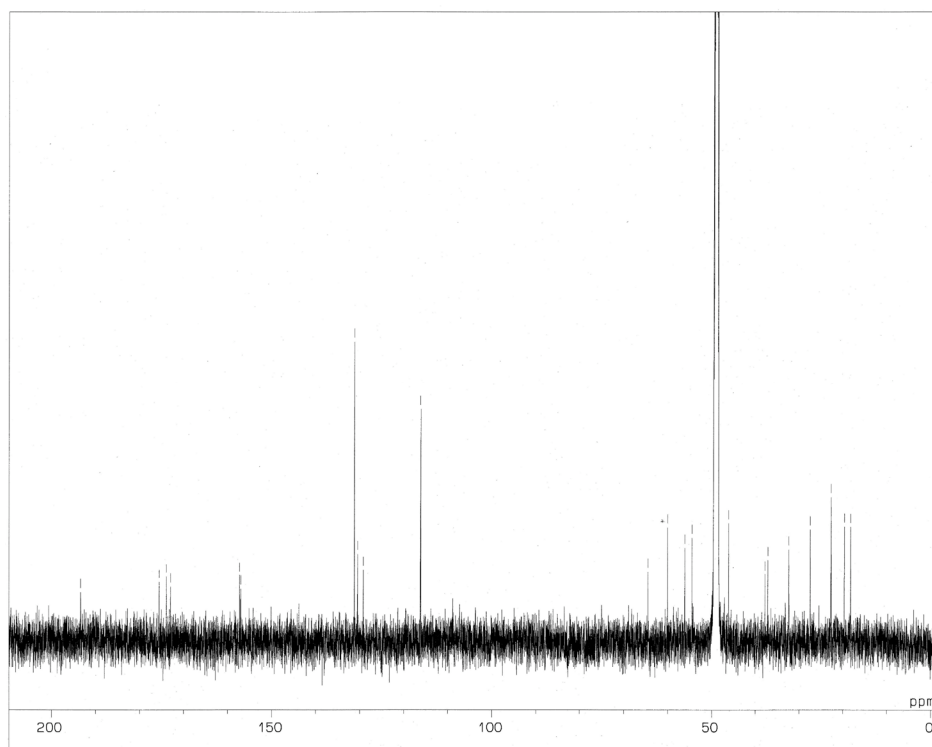


Fig. 2-18. ^{13}C NMR spectrum of **2**.

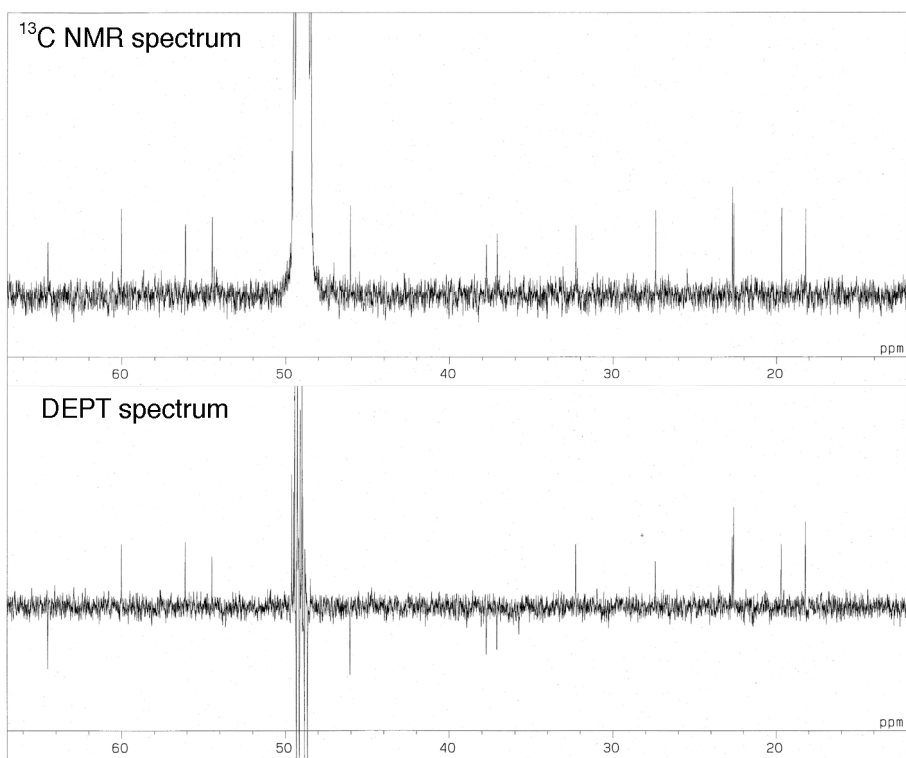


Fig. 2-19. DEPT spectrum of **2**.

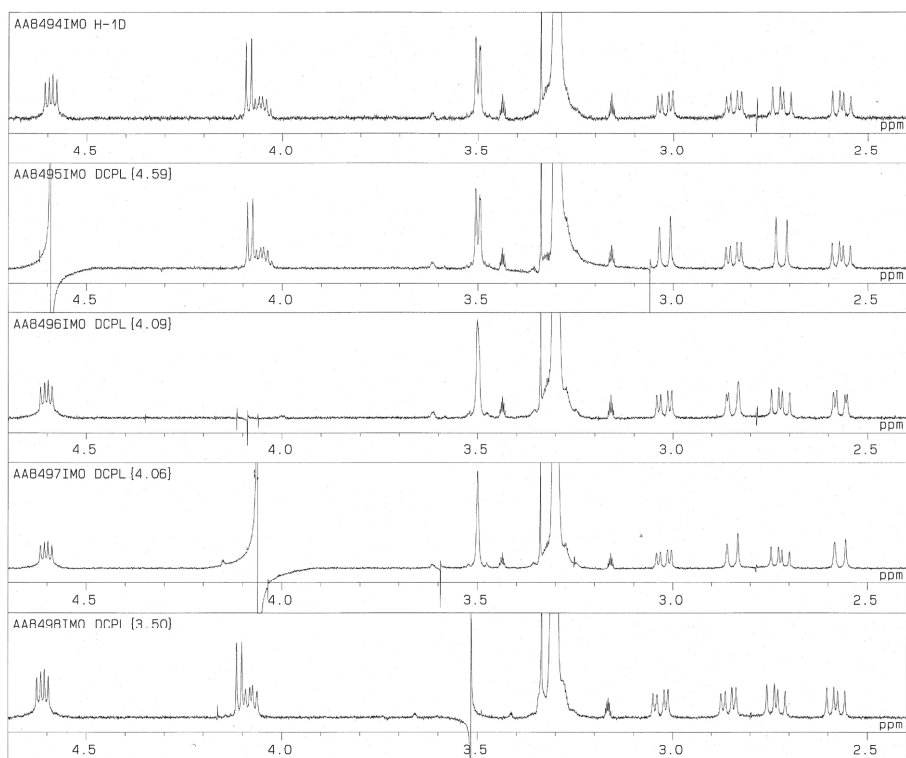


Fig. 2-20. Decoupling spectrum of **2**.

5. チロペプチン B の還元

チロペプチン B (7.0 mg) をメタノール (2 ml) に溶解し、氷冷下で水素化ホウ素ナトリウム (7.0 mg) を加え、2 時間室温で攪拌した。この反応液にアセトン (1 ml) を加え、減圧下で濃縮乾固した。残渣を高速液体クロマトグラフィー (カラム : Capcell pak UG120、移動相 : MeOH - 2 mM 炭酸アンモニウム水溶液 (40 : 60, v/v)、流速 : 10 ml/min、検出 ; UV 220 nm) により精製し、**3** を 3.3 mg、**4** を 2.3 mg の収量で単離した。

3: IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3300, 2960, 1650, 1520, 1450, 1360, 1240. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 225 (4.18), 278 (3.42). $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -30.8° (c 0.23, MeOH). HRFAB-MS (m/z) 514.2905 (M+H)⁺; calcd for C₂₈H₄₀O₆N₃, 514.2917. **5** の重メタノール中で測定した ¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HMQC、HMBC の各スペクトルはそれぞれ Fig. 2-21、Fig. 2-22、Fig. 2-23、Fig. 2-24、Fig. 2-25、Fig. 2-26 に示す。

4: IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3430, 2630, 1640, 1520, 1450, 1380, 1240. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 225 (4.06), 277 (3.30). $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ 0° (c 0.1, MeOH) HRFAB-MS (m/z) 514.2908 (M+H)⁺; calcd for C₂₈H₄₀O₆N₃, 514.2908. **4** の重メタノール中で測定した ¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY の各スペクトルはそれぞれ Fig. 2-27、Fig. 2-28、Fig. 2-29、Fig. 2-30 に示す。

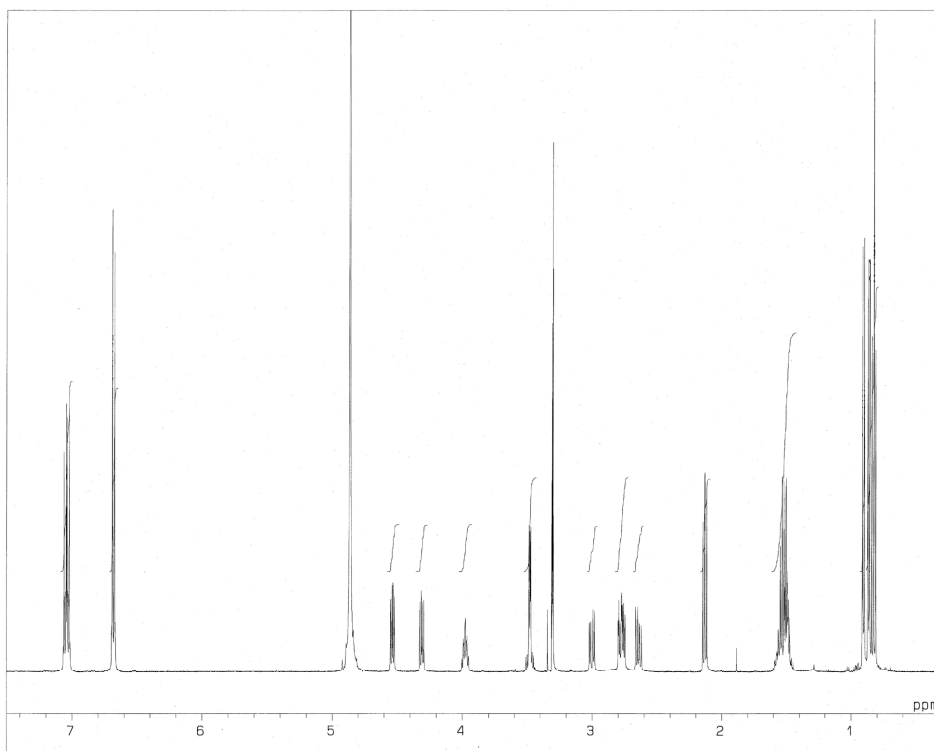


Fig. 2-21. ^1H NMR spectrum of **3**.

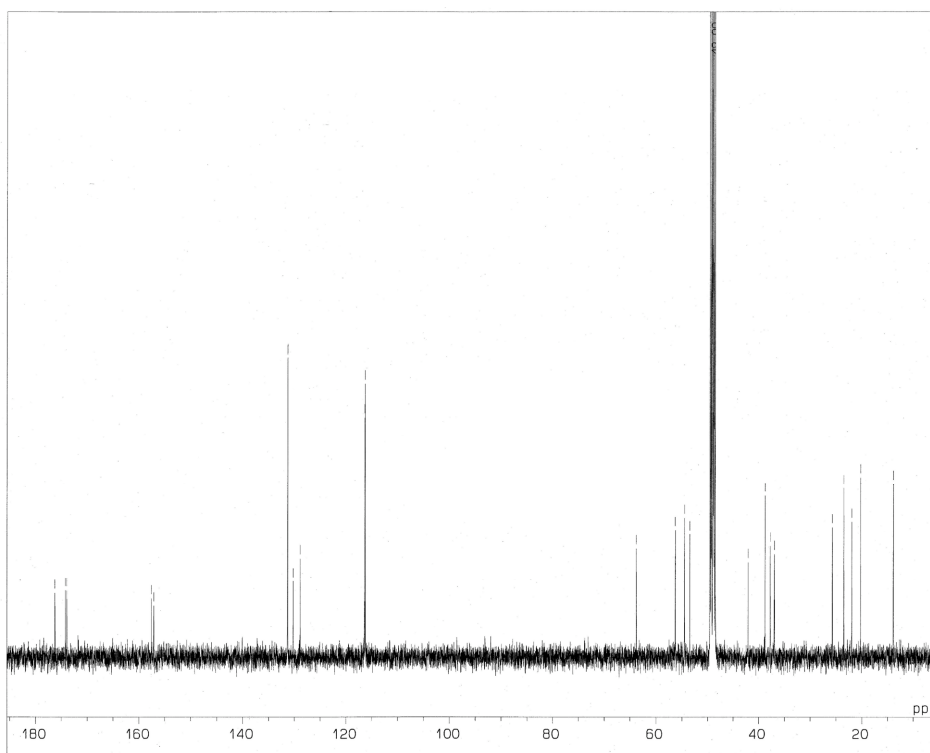


Fig. 2-22. ^{13}C NMR spectrum of **3**.

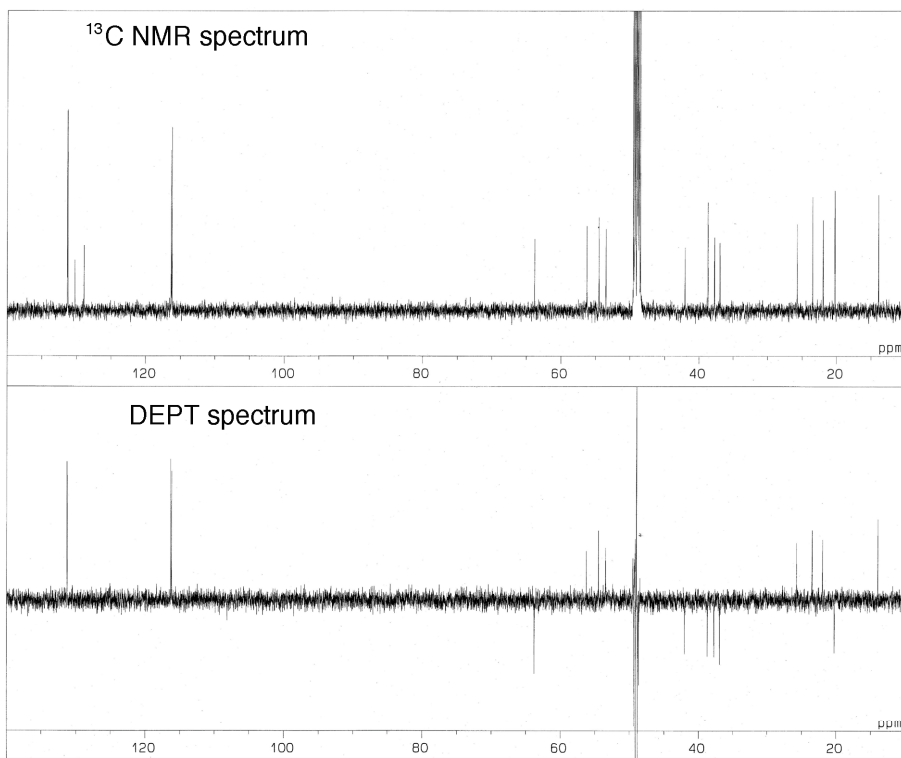


Fig. 2-23. DEPT spectrum of **3**.

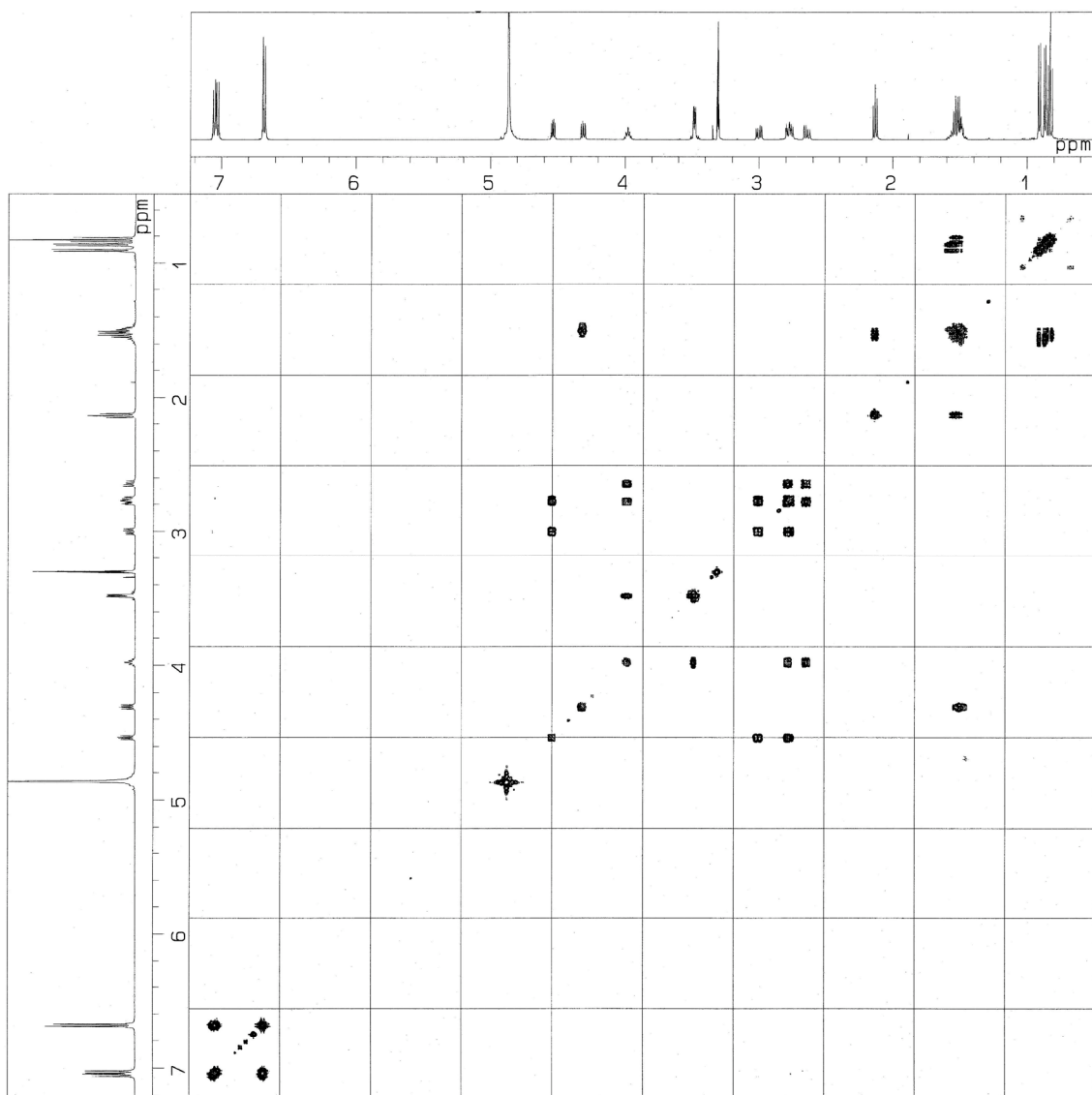


Fig. 2-24. ^1H - ^1H COSY spectrum of **3**.

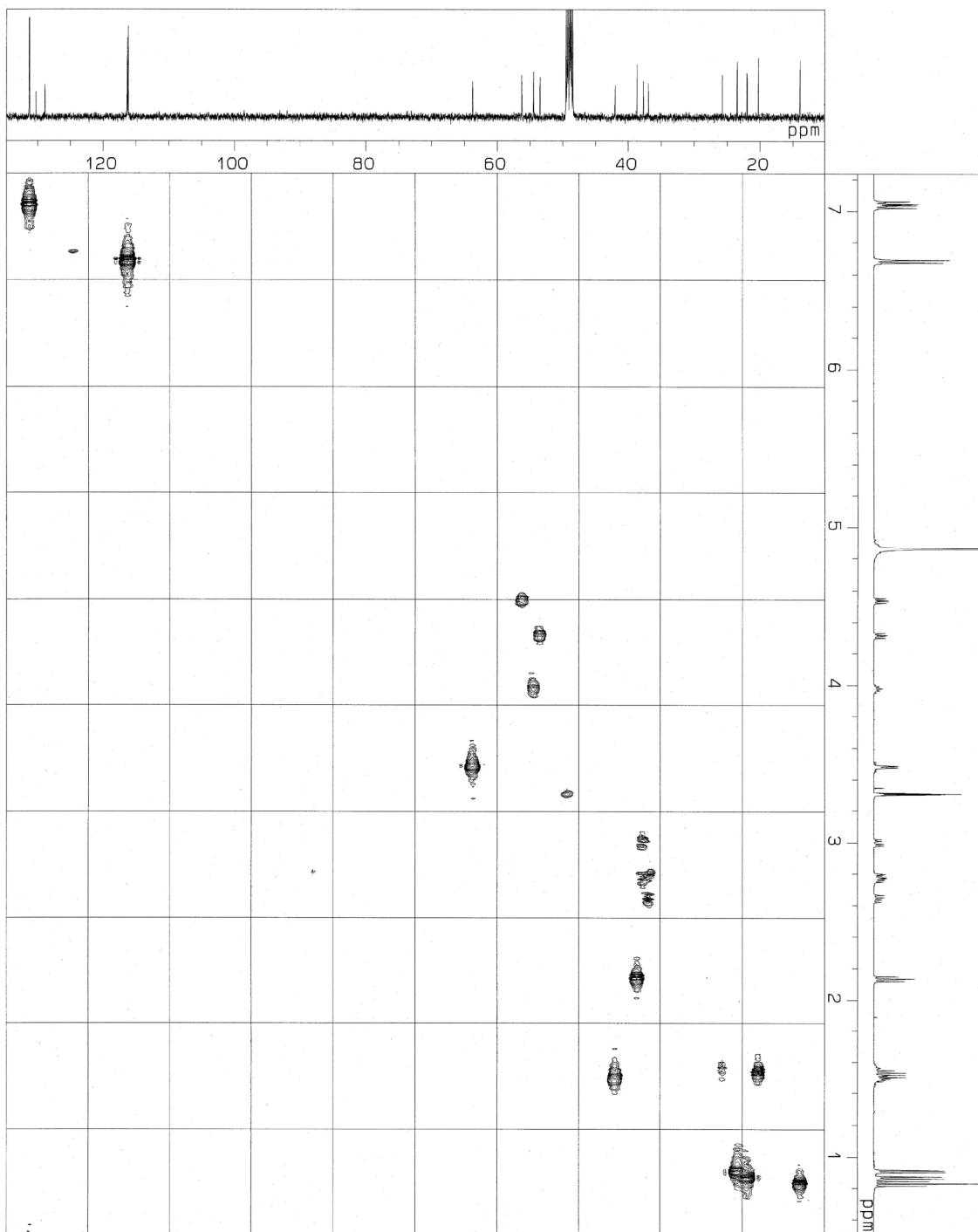


Fig. 2-25. HMQC spectrum of **3**.

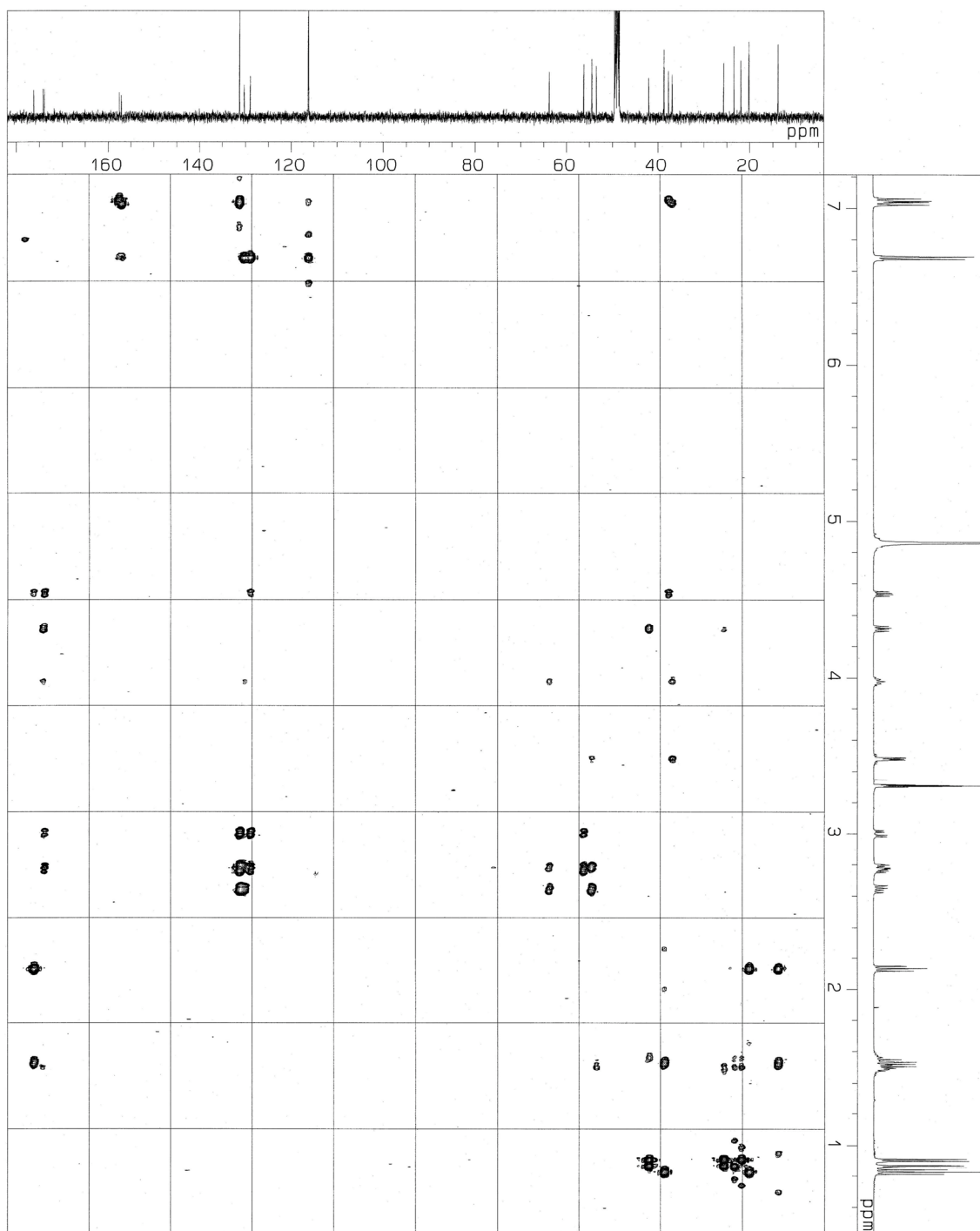


Fig. 2-26. HMBC spectrum of 3.

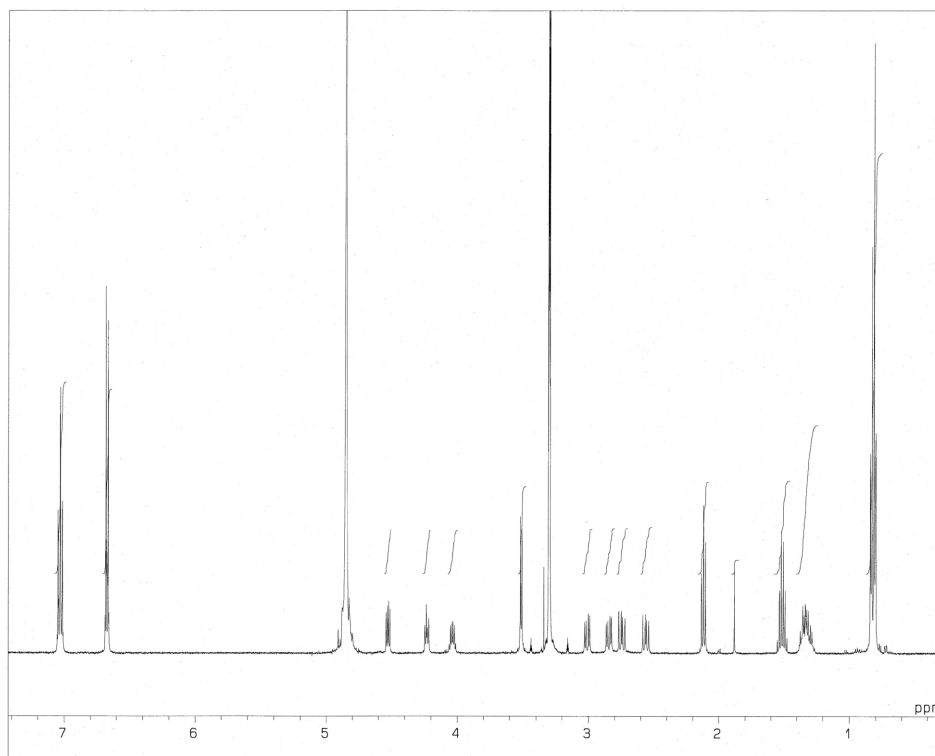


Fig. 2-27. ^1H NMR spectrum of **4**.

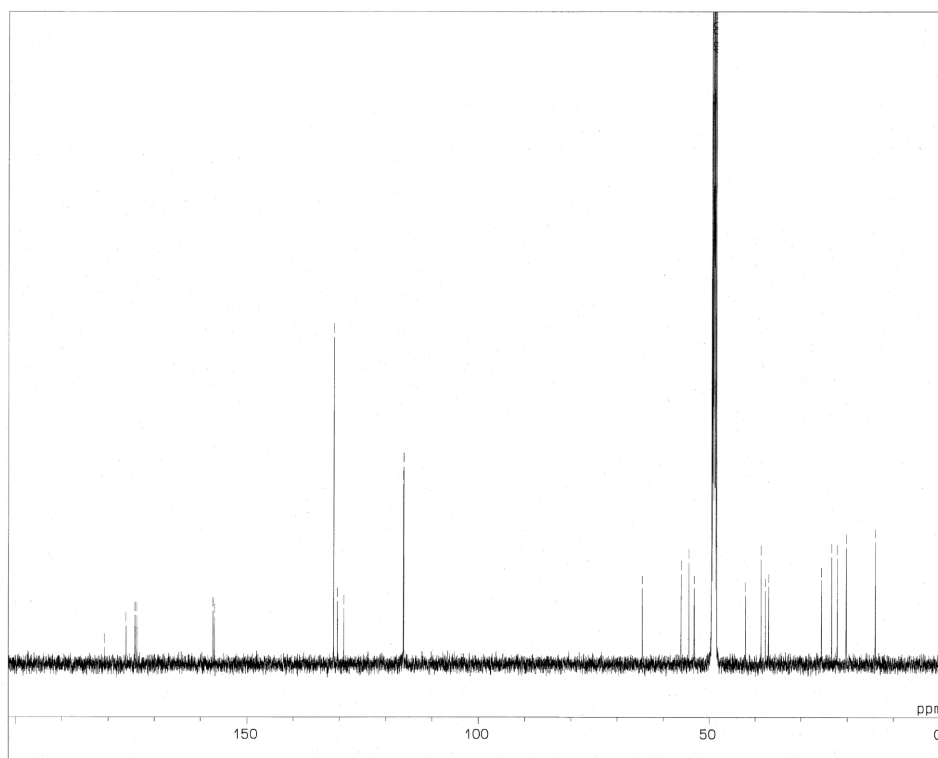


Fig. 2-28. ^{13}C NMR spectrum of **4**.

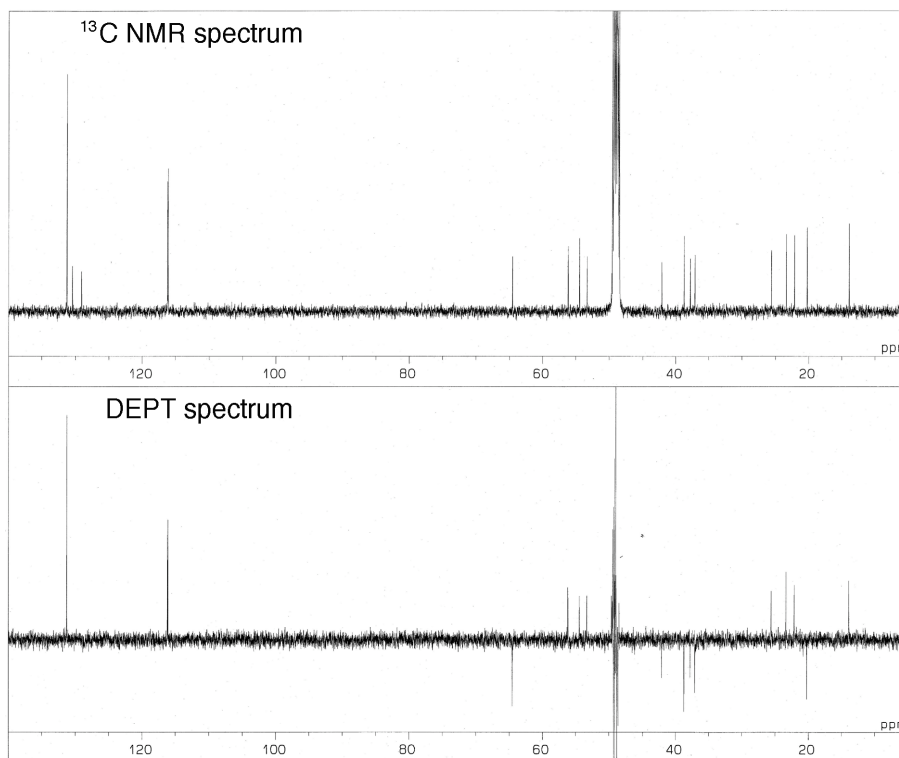


Fig. 2-29. DEPT spectrum of **4**.

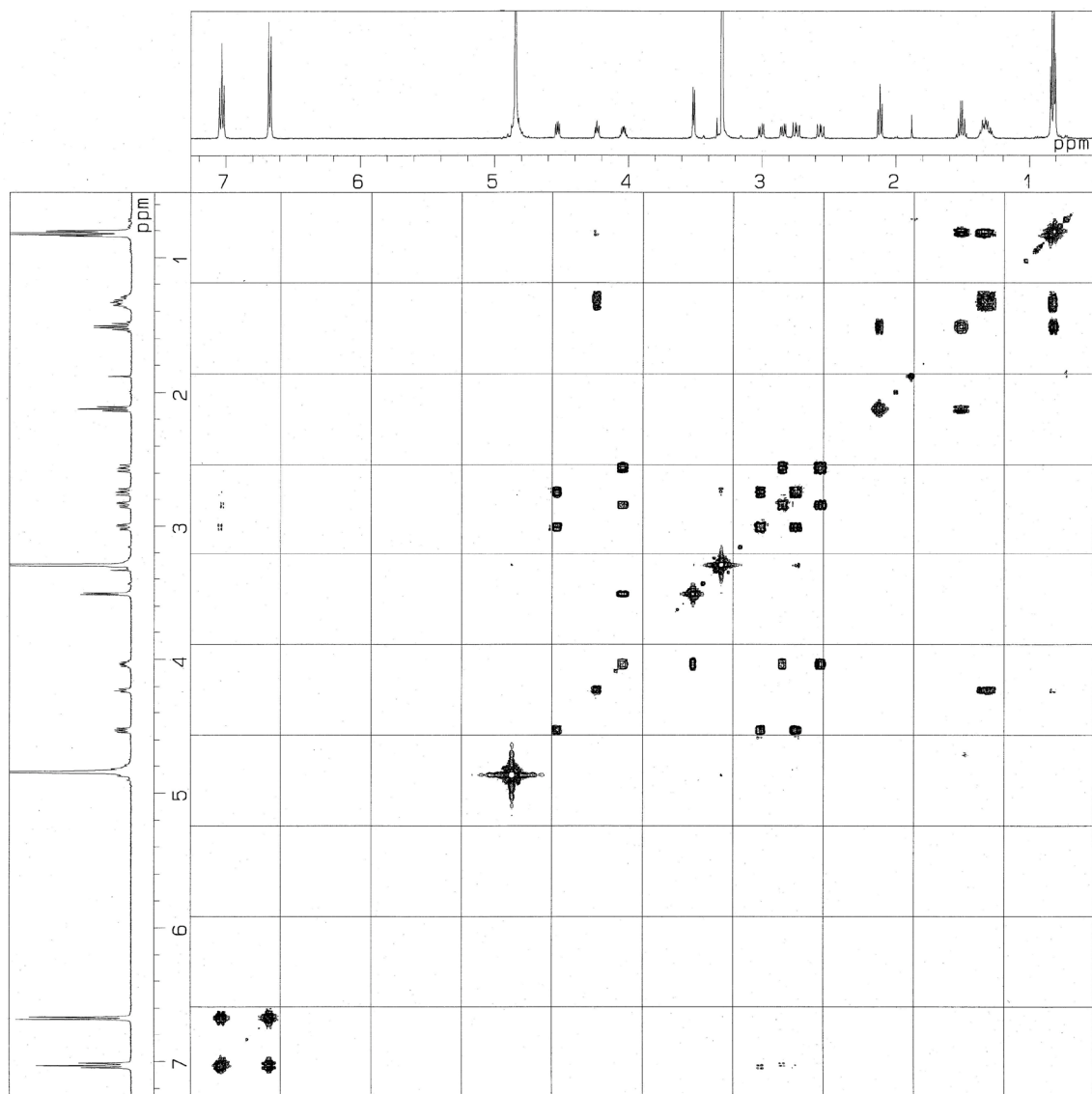


Fig. 2-30. ^1H - ^1H COSY spectrum of **4**.

6. ジヒドロクロペプチンの絶対構造の決定

ジヒドロクロペプチン (1、2、3 もしくは 4 を各 0.2 mg ずつ) をガラスチューブに取り、6N-HCl (0.5 ml) に溶解し密封した。これらを 105°C で 18 時間加水分解し、塩酸を減圧下で留去して酸分解物を得た。この酸分解物は Mitchell ら [83] および Nagai ら [84] の方法により L-フェニルアラニンとのジペプチド (ジアステレオマー) へ導き、LC/MS により酸分解物の立体化学を決定した。すなわち、ジヒドロクロペプチンの酸分解物および既知のアミノ酸 (0.2 mg) を 20 mg/ml 炭酸水素ナトリウム水溶液 50 μ l に溶解し、ここに 40 mg/ml の *tert*-ブトキシカルボニル-L-フェニルアラニン-N-ヒドロキシサクシンイミドエステル (Boc-L-Phe-OSu) -1,4-ジオキサン溶液 50 μ l を加え、室温で 18 時間放置した。この反応液を減圧下で濃縮乾固し、残渣をトリフルオロ酢酸 50 μ l に溶解して、これを室温で 1 時間放置した。トリフルオロ酢酸を減圧留去することにより L-フェニルアラニンとのジペプチドを得た。これを水 30 μ l に溶解し LC/MS により分析を行った。

分析条件；測定機器：日立製作所製 M-1200H 質量分析計、カラム：Pegasil ODS (4.6×150 mm、Senshu Scientific Co., Tokyo, Japan)、流速：1.0 ml/min、移動相：溶媒 A から溶媒 B への直線的グラジエント (0 ~100%、60 min、溶媒 A：15% 酢酸アンモニウム水溶液-酢酸-水-アセトニトリル (v/v)、80：1：880：720、溶媒 B、80：1：1600：0)、検出：UV 254 nm および質量分析計 (陽イオン検出モード)、イオン化法；大気圧化学イオン化 (APCI) 法。

第2節 結果

1. チロペプチンの物理化学的性質

チロペプチン A および B の物理化学的性質を Table 2-1 に示す。チロペプチン A および B の物理化学的性質は互いによく類似していた。チロペプチン A および B の分子式は、高分解能 FAB マススペクトルにより決定し、共に同じ分子式であった。UV スペクトルはチロペプチン A および B ともに 225 nm および 277 nm に極大吸収があり、共通の発色団構造を持つことが示唆された。チロペプチンの溶解性は、メタノール、ジメチルスルフォキシドには可溶で、クロロホルム、酢酸エチル、水にはわずかに溶け、ヘキサンには不溶である。TLC での呈色反応はいずれの物質もリンモリブデン酸-硫酸、ライドンスミス、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン、塩化鉄 (III) およびアニスアルデヒド-硫酸試薬に陽性反応を示し、ニンヒドリン試薬には陰性であった。

Table 2-1. Physico-chemical properties of tyropeptins A and B.

	Tyropeptin A	Tyropeptin B
Appearance	White powder	White powder
MP	100~102 °C	91~94 °C
$[\alpha]_D^{23}$	-15.1 ° (C 0.1, MeOH)	-14.6 ° (C 0.2, MeOH)
Molecular formula	C ₂₈ H ₃₇ N ₃ O ₆	C ₂₈ H ₃₇ N ₃ O ₆
APCI-MS (<i>m/z</i>)	512 (M+H) ⁺ 510 (M-H) ⁻	512 (M+H) ⁺ 510 (M-H) ⁻
HRFAB-MS (<i>m/z</i>)		
Calcd:	512.2751 (as C ₂₈ H ₃₈ N ₃ O ₆)	512.2757 (as C ₂₈ H ₃₈ N ₃ O ₆)
Found:	512.2761 (M+H) ⁺	512.2761 (M+H) ⁺
UV λ_{max} nm, (log ϵ) in		
MeOH	225 (4.08), 278 (3.51)	225 (4.42), 277 (3.62)
MeOH-HCl	225 (4.07), 278 (3.52)	225 (4.41), 277 (3.61)
MeOH-NaOH	243 (4.07), 288 (3.52)	243 (4.34), 293 (3.64)
IR ν_{max} KBr cm ⁻¹	3420, 2970, 1730, 1640, 1520, 1440, 1370, 1230	3380, 2700, 1730, 1650, 1520, 1440, 1390, 1240
TLC (Rf value) ^a	0.24	0.24

^a Silica gel TLC (Merck Art. 105715) : CHCl₃-MeOH (10 : 1)

2. チロペプチン A の構造

チロペプチン A はペプチド結合に特異的に反応するライドン-スミス試薬に陽性反応を示し、IR スペクトルより 1640 および 1520 cm^{-1} にアミドカルボニルの特徴的な吸収を示したことから、分子内にペプチド結合を有する化合物であると考えられた。またアルデヒド、ケトンに反応する 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬に陽性反応を示し、IR スペクトルより 1730 cm^{-1} にアルデヒド基の特徴的な吸収を示したことから、分子内にアルデヒド基を有するペプチド化合物であると推定した。

分子式は高分解能 FAB-MS スペクトル、 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルにより $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ と決定した。

チロペプチン A の ^1H および ^{13}C NMR スペクトル (500 および 125 MHz) の帰属を Table 2-2 に示す。重メタノール中で測定した ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは複雑なスペクトルを示し、解析が困難であった。これはアルデヒド基の α 位の異性体およびアルデヒド基の水和物の存在 ($\delta_{\text{C}} 98.7$ および $\delta_{\text{H}} 4.45$) によるものと推測された。これらの異性体は HPLC 等では分離不可能であった。そこでチロペプチン A のアルデヒド基を水素化ホウ素ナトリウムによりアルコールへと還元することにより、2つのジヒドロチロペプチン A (ジアステレオマー) へと導き、各々を HPLC により分離し **1** および **2** を得た (Fig. 2-31)。これら誘導体 **1** および **2** の NMR スペクトルは単純化し解析が容易になった。それぞれのシグナルは帰属可能となり、結果を Table 2-2 に示す。したがって **1** および **2** の構造を各種 NMR の解析により決定し、チロペプチン A の構造を推定した。

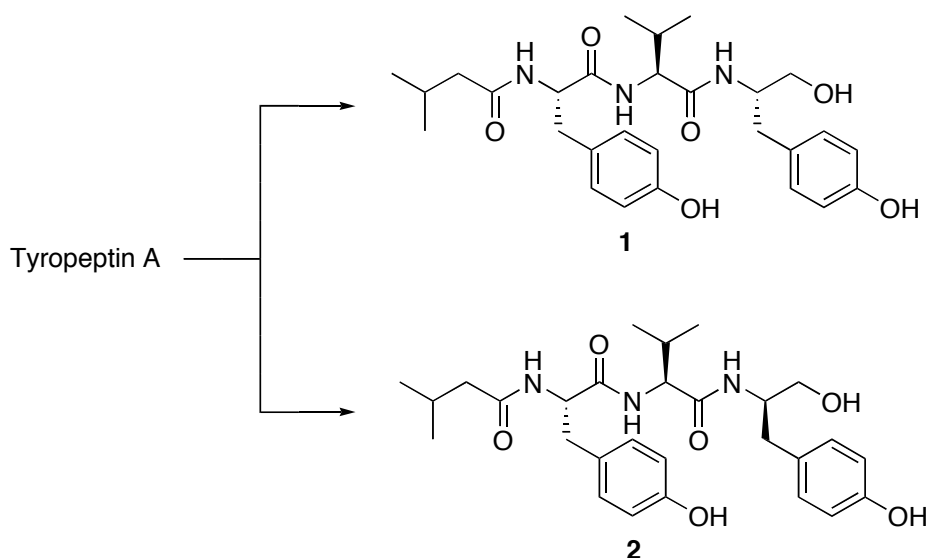


Fig. 2-31. Conversion of tyropeptin A to dihydrotyropeptin A.

Table 2-2. The ^{13}C and ^1H NMR assignments of tyropeptin A, **1** and **2** in CD_3OD .

Position	Tyropeptin A		1		2	
	δ_{C} (mult.)	δ_{H}	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult., J (Hz))	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult., J (Hz))
Isovaleryl						
CH ₃	22.6 (q)	0.75	22.6 q	0.77 (d, 6.6)	22.6 (q)	0.77 (d, 6.6)
	22.7 (q)	0.81	22.7 q	0.82 (d, 6.6)	22.7 (q)	0.82 (d, 6.6)
CH	27.4 (d)	1.90	27.4 (d)	1.92 (m)	27.4 (d)	1.89 (m)
CH ₂	46.1 (t)	1.99	46.1 t	2.01 (d, 7.4)	46.1 (t)	2.01 (d, 6.8)
C=O	175.6 (s)		175.6 (s)		175.5 (s)	
Tyrosyl						
α -CH	56.1 (d)	4.59	56.1 (d)	4.59 (dd, 5.2, 9.8)	56.1 (d)	4.59 (dd, 5.2, 9.6)
β -CH ₂	37.8 (t)	2.72	37.7 t	2.73 (dd, 9.8, 14.0)	37.8 (t)	2.72 (dd, 9.6, 14.2)
		3.00		2.99 (dd, 5.2, 14.0)		3.03 (dd, 5.2, 14.2)
γ -C	129.4 (s)		129.2 (s)		129.2 (s)	
δ -CH	131.3 (d)	7.03	131.2 (d)	7.06 (d, 8.4)	131.2 (d)	7.06 (d, 8.4)
ϵ -CH	116.2 (d)	6.67	116.2 (d)	6.67 (d, 8.4)	116.2 (d)	6.68 (d, 8.4)
ζ -C	157.2 (s)		157.3 (s)		157.3 (s)	
C=O	173.9 (s)		173.9 (s)		173.9 (s)	
Valyl						
α -CH	60.3 (d)	4.12	60.3 (d)	4.10 (d, 7.0)	60.0 (d)	4.09 (d, 6.8)
CH	32.3 (d)	1.98	32.2 (d)	1.99 (m)	32.3 (d)	1.89 (m)
CH ₃	18.6 (q)	0.86	18.6 q	0.87 (d, 6.6)	18.2 (q)	0.73 (d, 6.8)
		0.89		0.88 (d, 6.6)		0.73 (d, 6.8)
C=O	173.1 (s)		173.0 (s)		173.0 (s)	
Tyrosinal or Tyrosinol						
α -CH	56.6 (d)	4.05	54.4 (d)	4.01 (m)	54.5 (d)	4.06 (m)
β -CH ₂	34.8 (t)	2.61	37.0 t	2.63 (dd, 9.8, 13.8)	37.1 (t)	2.57 (dd, 9.4, 13.8)
		2.89		2.79 (dd, 6.4, 13.8)		2.85 (dd, 5.8, 13.8)
γ -C	129.9 (s)		130.3 (s)		130.5 (s)	
δ -CH	131.3 (d)	7.03	131.3 (d)	7.04 (d, 8.4)	131.2 (d)	7.04 (d, 8.4)
ϵ -CH	116.2 (d)	6.67	116.2 (d)	6.68 (d, 8.4)	116.2 (d)	6.68 (d, 8.4)
ζ -C	156.8 (s)		156.9 (s)		157.0 (s)	
CH ₂			63.9 t	3.47 (d, 5.4)	64.5 (t)	3.51 (d, 5.2)
CHO	98.7 (d)	4.45 (hemiacetal)				

NMR spectra were obtained on a JEOL JNM-A500 spectrometer at 500 MHz for ^1H NMR and at 125 MHz for ^{13}C NMR.

まずジヒドロチロペプチン A (**1**) の各種 NMR スペクトル (^1H 、 ^{13}C NMR、DEPT および HMQC) の解析により、**1** は 4 個の 1 級炭素、4 個の 2 級炭素、5 個の 3 級炭素、8 個の無置換芳香族炭素、4 個の置換芳香族炭素および 3 個のカルボニル炭素の計 28 個の炭素原子より成ることを明らかにした。 ^1H - ^1H COSY および HMBC スペクトルの解析から、**1** の分子内にイソバレリル基、チロシン、バリンおよびチロシノール残基の存在が示された (Fig. 2-32)。

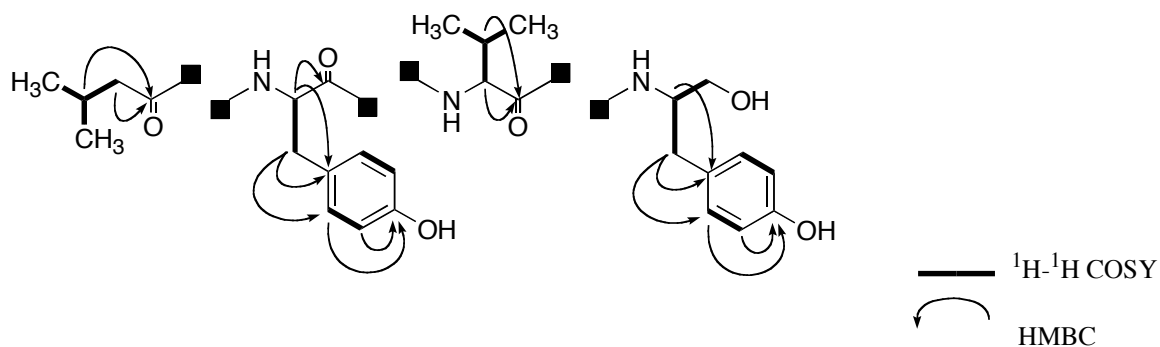


Fig. 2-32. Partial structures of **1**.

1 の酸分解生成物をアビセルセルロース TLC (プロパノール-ピリジン-水-酢酸 (v/v)、15 : 10 : 12 : 3) を用いた解析により、構成アミノ酸であるチロシンおよびバリンの存在を確認した。UV スペクトルで観察された 225 nm、278 nm での極大吸収はチロシンの存在に起因することが明らかとなった。**1** の構成成分であるアシル基、アミノ酸およびアミノアルコールの配列は HMBC スペクトルより得られる遠隔スピン結合の解析により推定した (Fig. 2-33)。すなわちイソバレリル基のカルボニル炭素に帰属される (δ_C 175.6) はチロシン部分の α -メチレン水素 (δ_H 4.59) と遠隔 CH カップリングを示し、チロシン部分のカルボニル炭素 (δ_C 173.9) はバリン部分の α -メチン水素 (δ_H 4.10) と、バリン部分のカルボニル炭素 (δ_C 173.0) はチロシノール部分の α -メチン水素 (δ_H 4.01) とそれぞれ遠隔 CH カップリングを示したことから **1** の部分構造の配列は Fig. 2-33 のようであると決定した。

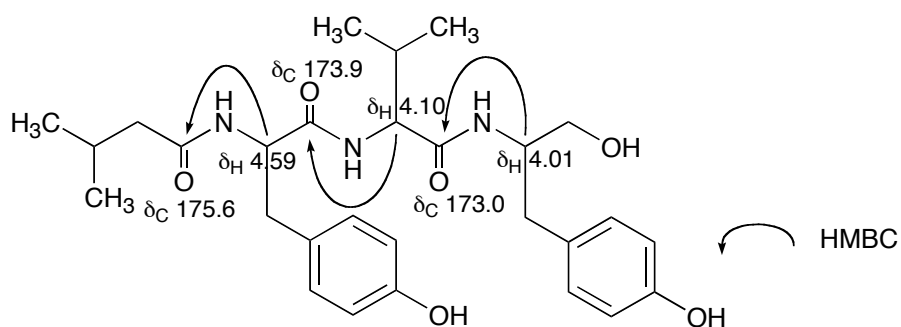


Fig. 2-33. Sequence of partial structures in **1**.

アミノ酸およびアミノアルコールの立体化学は、**1** の酸分解生成物より得た遊離アミノ酸およびアミノアルコールを L-フェニルアラニンと縮合させ、ジアステレオマーのジペプチドへと導き、LC/MS を用いた分析による溶出時間の違いから、それぞれのアミノ酸およびアミノアルコールの立体配置を

決定した。それぞれの L-フェニルアラニンとのジペプチドの溶出時間の比較を Table 2-3 に示す。その結果、**1** に含まれるチロシン、バリン、チロシノールの立体配置は L-体であり、したがってこのジヒドロチロペプチン A (**1**) の構造は、イソバレリル-L-チロシル-L-バリル-L-チロシノールと決定した。

Table 2-3. Determination of the stereochemistries of amino acid in **1** and **2** by LC/MS analysis using [L-Phe] dipeptides method.

Amino acids	Authentic amino acids	Retention time of [L-Phe]-amino acid (minutes)	
		1	2
L-Valine	13.5	13.6	13.3
D-Valine	24.6	-	-
L-Tyrosine	16.1	16.2	16.2
D-Tyrosine	22.8	-	-
L-Tyrosinol	23.6	23.6	-
D-Tyrosinol	27.1	-	26.8

- : Not detected.

もう一方の異性体である **2** は、**1** と同じ分子式であり、¹H および ¹³C NMR スペクトルは共に **1** とよく類似していた (Table 2-2)。詳細な NMR スペクトルの解析により、その平面構造は **1** と同じであることが分かった。しかし **2** の ¹H および ¹³C NMR スペクトルの化学シフトは **1** の化学シフトと比べて、わずかに異なっていた。そこで **2** は **1** のチロシノール部分の不斉中心での立体異性体であると考え、**2** の酸分解生成物を解析し、チロシノールの立体配置が D-配置であることを確認した (Table 2-3)。よって **2** の構造はイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-D-チロシノールと決定した。

以上上記のチロペプチン誘導体である **1** および **2** の構造決定の結果より、チロペプチン A の構造はチロシノール部分がアルデヒド体であるチロシナールであり、よってイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナールであると決定した (Fig. 2-34)。

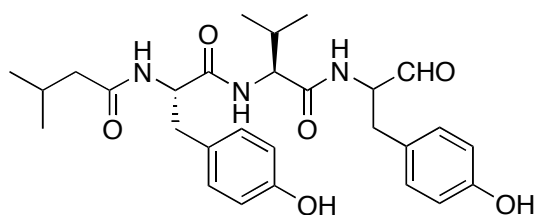


Fig. 2-34. Structure of tyropeptin A.

3. チロペプチン B の構造

チロペプチン B の分子式はチロペプチン A と同一であった。その他 IR スペクトル、UV スペクトルおよび TLC 呈色反応もほぼ同様であった。チロペプチン B の ^1H および ^{13}C NMR スペクトル (500 および 125 MHz) の帰属を Table 2-4 に示す。チロペプチン A の場合と同様に、アルデヒド基の α 位における異性体の存在により ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは複雑なスペクトルを示した。それゆえにチロペプチン B をアルコール体 **3** および **4** へと変換した (Fig. 2-35)。これらの NMR データは Table 2-4 に示す。

構造決定は **1** および **2** と同様な手法により、**3** および **4** の構造をそれぞれブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-L-チロシノールおよびブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-D-チロシノールと決定し、チロペプチン B の構造をブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-DL-チロシナールと決定した (Fig. 2-36, Table 2-5 and Fig. 2-37)。

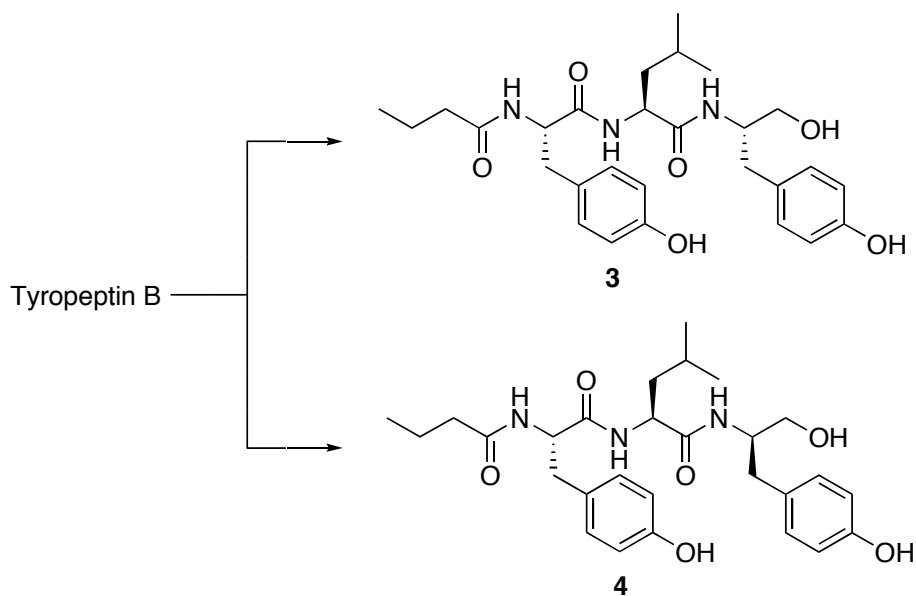


Fig. 2-35. Conversion of tyropeptin B to dihydrotyropeptin B.

Table 2-4. The ^{13}C and ^1H NMR assignments of tyropeptin B, **3** and **4** in CD_3OD .

Position	Tyropeptin B		3		4	
	δ_{C} (mult.)	δ_{H}	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult., J (Hz))	δ_{C} (mult.)	δ_{H} (mult., J (Hz))
n-Butyryl						
CH ₃	13.9 (q)	0.80	13.9 (q)	0.83 (t, 7.6)	13.9 (q)	0.82 (t, 7.6)
CH ₂	20.3 (t)	1.49	20.3 (t)	1.53 (m)	20.2 (t)	1.51 (m)
CH ₂	38.7 (t)	2.10	38.7 (t)	2.13 (t, 7.6)	38.7 (t)	2.12 (t, 7.4)
C=O	176.1 (s)		176.2 (s)		176.2 (s)	
Tyrosyl						
α -CH	56.0 (d)	4.55	56.3 (d)	4.53 (dd, 5.6, 9.4)	56.1 (d)	4.53 (dd, 5.4, 9.4)
β -CH ₂	37.9 (t)	2.74	37.7 (t)	2.77 (dd, 9.4, 14.0)	37.8 (t)	2.74 (dd, 9.4, 14.0)
		3.00		3.00 (dd, 5.6, 14.0)		3.01 (dd, 5.4, 14.0)
γ -C	129.2 (s)		128.9 (s)		129.1 (s)	
δ -CH	131.3 (d)	7.03	131.3 (d)	7.06 (d, 8.4)	131.3 (d)	7.04 (d, 8.2)
ϵ -CH	116.2 (d)	6.67	116.2 (d)	6.68 (d, 8.4)	116.1 (d)	6.68 (d, 8.2)
ζ -C	157.3 (s)		157.6 (s)		157.3 (s)	
C=O	173.8 (s)		173.9 (s)		173.8 (s)	
Leucyl						
α -CH	53.4 (d)	4.30	53.5 (d)	4.31 (dd, 5.8, 9.2)	53.3 (d)	4.23 (dd, 5.6, 9.0)
CH ₂	42.2 (t)	1.47	42.0 (t)	1.49 (m)	42.1 (t)	1.31 (m)
CH	25.7 (d)	1.55	25.7 (d)	1.56 (m)	25.6 (d)	1.35 (m)
CH ₃	22.2 (q)	0.85	22.0 (q)	0.87 (d, 6.4)	22.1 (q)	0.81 (d, 6.2)
	23.4 (q)	0.90	23.5 (q)	0.90 (d, 6.4)	23.4 (q)	0.83 (d, 6.2)
C=O	174.3 (s)		174.2 (s)		174.2 (s)	
Tyrosinal or Tyrosinol						
α -CH	56.6 (d)	4.03	54.5 (d)	3.98 (m)	54.5 (d)	4.03 (m)
β -CH ₂	34.9 (t)	2.88	36.9 (t)	2.64 (dd, 7.6, 13.8)	37.1 (t)	2.56 (dd, 9.2, 14.0)
		2.61		2.78 (dd, 6.6, 13.8)		2.84 (dd, 5.6, 14.0)
γ -C	130.4 (s)		130.2 (s)		130.4 (s)	
δ -CH	131.3 (d)	7.03	131.3 (d)	7.03 (d, 8.4)	131.3 (d)	7.02 (d, 8.2)
ϵ -CH	116.2 (d)	6.67	116.3 (d)	6.68 (d, 8.4)	116.2 (d)	6.68 (d, 8.2)
ζ -C	156.9 (s)		157.1 (s)		157.0 (s)	
CH ₂			63.8 (t)	3.48 (dd, 1.8, 5.4)	64.5 (t)	3.51 (d, 5.4)
CHO	98.7 (s)	4.46 (hemiacetal)				

NMR spectra were obtained on a JEOL JNM-A500 spectrometer at 500 MHz for ^1H NMR and at 125 MHz for ^{13}C NMR.

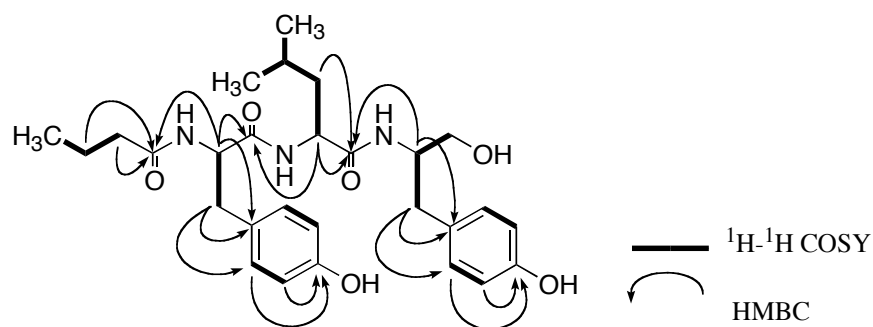


Fig. 2-36. Summary of ^1H - ^1H COSY and HMBC experiments of **3**.

Table 2-5. Determination of the stereochemistries of amino acid in **3** and **4** by LC/MS analysis using [L-Phe] dipeptides method.

Amino acids	Authentic amino acids	Retention time of [L-Phe]-amino acid (minutes)	
		Amino acids in 3	Amino acids in 4
L-Leucine	21.7	21.8	21.1
D-Leucine	30.0	-	-
L-Tyrosine	16.1	16.2	16.2
D-Tyrosine	22.8	-	-
L-Tyrosinol	23.6	23.6	-
D-Tyrosinol	27.1	-	26.8

- : Not detected.

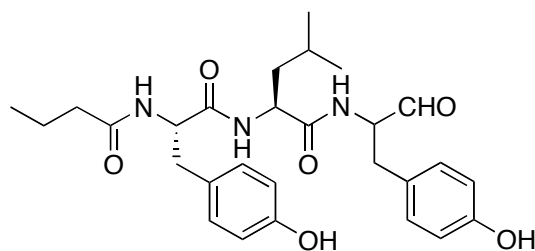


Fig. 2-37. Structure of tyropeptin B.

第3節 考察

放線菌 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 の生産するプロテアソーム阻害物質チロペプチン A および B の物理化学的性質および化学構造の決定について述べた。チロペプチン A は分子式 $C_{28}H_{37}N_3O_6$ であり、呈色反応および IR スペクトルにより、分子内にアルデヒド基を有するペプチド化合物であると推定された。プロテアソームは蛋白分解酵素であることから、チロペプチンの構造は蛋白分解酵素阻害物質の代表的な化合物であるロイペプチン [85-88]の構造と関連性があると考えられた。チロペプチン A を重メタノール中で 1H および ^{13}C NMR スペクトルを測定すると複雑なスペクトルを示し、これはアルデヒド基の α 位の異性体の存在によるものと推測した。そこでチロペプチン A のアルデヒド基をヒドロキシメチル基 (アルコール体) へと還元することにより、2つのジヒドロチロペプチン A (ジアステレオマー) **1** および **2** をほぼ 1:1 の比率で得た (Fig. 2-31)。これらアルコール体は HPLC で分離することができ、それぞれのシグナルは帰属可能になった。**1** の各種 NMR スペクトルの解析および酸加水分解生成物の解析から、**1** の構造をイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-L-チロシノールと決定し、もう一方の異性体 **2** をチロシノールの立体配置が D-配置である、イソバレリル-L-チロシル-L-バリル-D-チロシノールと決定した。以上の結果より、もとのチロペプチン A の構造はチロシノール部分がアルデヒド基であるチロシナールであり、新規化合物であるイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナールと決定した。また同様な手法によりチロペプチン B の構造はブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-DL-チロシナールと決定した。

プロテアソームは蛋白分解酵素の複合体であり、蛋白分解酵素活性の中のキモトリプシン様活性の阻害物質の探索の過程においてチロペプチンを見出した。キモトリプシン様活性の測定には蛍光基質である Suc-LLVY-MCA を用いているが、チロペプチンの構造はこの基質と類似していた (Fig. 2-38)。チロペプチンはロイペプチン等と同じアルデヒド基を有するペプチド系阻害物質であり、スレオニンプロテアーゼに属するプロテアソームの阻害物質として、このような化学構造を持つ阻害物質の存在は妥当である。アルデヒド基を有するペプチド系阻害物質である MG132 はプロテアソーム阻害物質の試薬として広く利用されている [48, 49]。しかしペプチド化合物はペプチド結合を有する等の類似性があるがアミノ酸残基が 1 つ異なるだけで生物活性が全く異なるのが大きな特徴である。よってチロペ

プチンは MG132 と構造の類似性はあるが、詳細な生物活性の評価が必要であり、そこから新たな発見があるものとする。

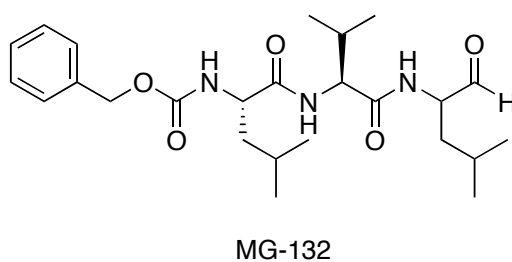
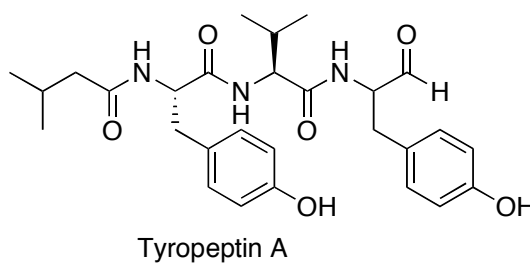
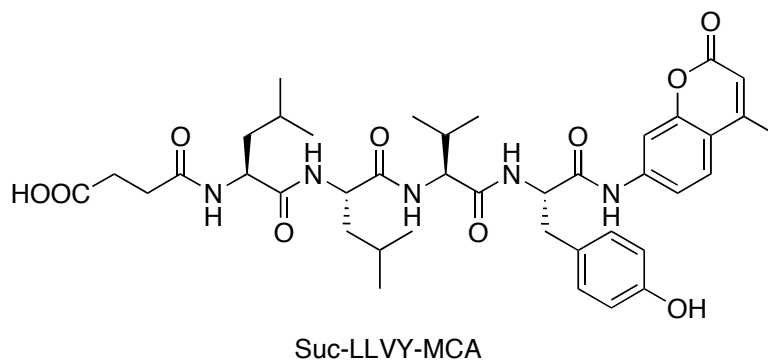


Fig. 2-38. Structures of tyropeptin A, MG132 and Suc-LLVY-MCA (substrate for the chymotrypsin like activity of the proteasome).

第4節 小括

本章では、放線菌 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株の生産する新規プロテアソーム阻害物質チロペプチン A および B の物理化学的性質ならびに各種 NMR スペクトル解析に基づく構造解析について検討し、以下のことを明らかにした。

- (1) チロペプチンは TLC 呈色反応、IR、 ^{13}C NMR および ^1H NMR によりアルデヒド基を有するペプチド化合物であることが分かった。
- (2) チロペプチンはアルデヒド基の α 位の異性体の存在により複雑な NMR スペクトルを示した。そこでアルデヒド基をヒドロキシメチル基へ還元することにより、これら還元体を各々分離することができた。
- (3) ジヒドロチロペプチンの各種 NMR スペクトルおよび酸加水分解物の解析により、ジヒドロチロペプチン A の構造をイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-L-チロシノールおよびイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-D-チロシノールと決定した。ジヒドロチロペプチン B の構造をブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-L-チロシノールおよびブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-D-チロシノールと決定した。
- (4) 以上よりチロペプチン A の構造をイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール、B の構造をブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-DL-チロシナールと決定した。

第3章 チロペプチンの合成

第1章に示したように、チロペプチン A および B を放線菌 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 の培養液より単離することに成功したが、その生産性は極めて低く 10 リットルの培養液よりチロペプチン A を 1.4 mg、B を 1.1 mg しか得ることが出来なかった。チロペプチン A の構造はイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナルであり、B はブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-DL-チロシナルであることを第2章で決定した。そこでチロペプチンを合成的に供給することを考え、その実践的かつ効率的な合成方法の開発を試みた。その結果、L-チロシノールを出発物質として 10 工程を経てチロペプチン A および B の合成に成功した。本章ではそれらの合成について言及する。

第1節 実験材料と方法

各種機器分析

各種機器分析は第2章に示した機器を使用した。

チロペプチン A の合成

(*N-tert*-ブトキシカルボニル)-L-チロシノール (6)

L-チロシノール・塩酸塩 (5) 5.0 g (24.8 mmol) を 1,4-ジオキサン 50 ml に溶解し、ここに氷冷下で 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 49.6 ml (49.6 mmol)、ジ-*t*-ブチリルジカルボネート 5.5 g (25.2 mmol) を順次加え、室温で 3 時間攪拌した。溶媒を減圧下に留去した後、残渣に 5% クエン酸水溶液 50 ml を加え、酢酸エチル 100 ml で 2 回抽出した。有機溶媒層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (150 g、展開溶媒ヘキサン-酢酸エチル、1 : 1 (v/v)) で精製し、*N-tert*-ブトキシカルボニル-L-チロシノール (6) 4.6 g を透明油状物として得た。収率 70%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.42 (9H, s), 2.74 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 3.54 (1H, m), 3.64 (1H, m), 3.81 (1H, br), 4.80 (1H, m), 6.01 (1H, br), 6.74 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.03 (2H, d, $J=8.4$ Hz). APCI-MS m/z 266 (M-H).

(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (7)

化合物 6、4.6 g (17.0 mmol) を *N,N*-ジメチルホルムアミド 45 ml に溶解し、氷冷下で水素化ナトリウム 2.4 g (50.9 mmol) を加え、氷冷下で 10 分間攪拌した。次に氷冷下で反応液に臭化ベンジル 6.4 g (37.4 mmol) を加え、室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣に 5%クエン酸水溶液 200 ml を加え、酢酸エチル 200 ml で 2 回抽出した。有機溶媒層を水洗の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (150 g、展開溶媒ヘキサン-酢酸エチル、10 : 1 (v/v)) で精製し、(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (7) 5.6 g を透明油状物として得た。収率 74%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (9H, s), 2.81 (2H, m), 3.38 (2H, s), 3.90 (1H, m), 4.48 (2H, dd, J=11.6, 24.0 Hz) 4.86 (1H, br), 5.03 (2H, s), 6.87 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.08 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.25~7.45 (10H, m). FAB-MS *m/z* 448 (M+H)⁺.

(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル) -*L*-バリン- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (8)

化合物 7、2.0 g (4.5 mmol) を塩化メチレン 20 ml に溶解し、氷冷下でトリフロロ酢酸 5 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒をトルエン共沸により減圧下に留去し、残渣を塩化メチレン 20 ml に溶解した。これに氷冷下でトリエチルアミン 498 mg (4.9 mmol)、*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-*L*-バリン 1.1 g (4.9 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・水和物 1.0 g (6.7 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 1.1 g (5.8 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。この反応液に 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 300 ml を加え、クロロホルム 250 ml で 2 回抽出した。有機溶媒層は 4%クエン酸水溶液および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (60 g、展開溶媒トルエン-アセトン、50 : 1 (v/v)) で精製し、(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル) -*L*-バリン- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (8) 2.0 g を無色固体として得た。収率 80%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.84 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.91 (3H, dd, J=6.2 Hz), 1.44 (9H, s), 2.82 (2H, d, J=6.8 Hz), 3.37 (2H, s), 3.86 (1H, m), 4.23 (1H, m), 4.47 (2H, dd, J=11.8, 17.8 Hz), 5.00 (1H, br), 5.02 (2H, s), 6.20 (1H, br), 6.86 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.07 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.30~7.45 (10H, m). APCI-MS *m/z* 547 (M+H)⁺.

(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (**9**)

化合物 **8**、2.0 g (3.6 mmol) を塩化メチレン 8 ml に溶解し、氷冷下でトリフロロ酢酸 2 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒をトルエン共沸により減圧下に留去し、残渣を塩化メチレン 20 ml に溶解した。これに氷冷下でトリエチルアミン 397 mg (3.9 mmol)、(*O*-ベンジル-*N*-*tert*-ブトキシカルボニル) -*L*-チロシン 1.5 g (3.9 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・水和物 823 mg (5.4 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 854 mg (4.6 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。この反応液に 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 300 ml を加え、クロロホルム 250 ml で 2 回抽出した。有機溶媒層を水および飽和塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣はカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 100 g、展開溶媒クロロホルム) で精製し、(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (**9**) 2.6 g を無色固体として得た。収率 91%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.78 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.84 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.41 (9H, s), 2.08 (1H, m), 2.79 (2H, br), 2.98 (2H, d, J=6.4 Hz), 3.36 (2H, br), 4.13 (1H, m), 4.25 (2H, m), 4.48 (2H, dd, J=11.8, 17.8 Hz), 4.97 (2H, s), 4.99 (2H, s), 6.19 (1H, d, J=6.0 Hz), 6.49 (1H, d, J=8.0 Hz), 6.84 (2H, d, J=8.4 Hz), 6.87 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.05 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.09 (2H, d, J= 8.4 Hz), 7.25~7.45 (15H, m). APCI-MS *m/z* 801 (M+H)⁺.

イソバレリル- (*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (**10**)

化合物 **9**、820 mg (1.1 mmol) を塩化メチレン 8 ml に溶解し、氷冷下でトリフロロ酢酸 2 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒はトルエン共沸により減圧下に留去し、残渣を *N,N*-ジメチルホルムアミド 10 ml に溶解した。これに氷冷下でトリエチルアミン 117 mg (1.2 mmol)、イソ酪酸 237 mg (2.3 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・水和物 243 mg (1.6 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 252 mg (1.4 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。この反応液に 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 280 ml を加え、クロロホルム 250 ml で 2 回抽出した。有機溶媒層を 4%クエン酸水溶液および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下に留去した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g、展開溶媒クロロホルム) で精製し、イソバレリル- (*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (**10**) 411 mg を無

色固体として得た。収率 51%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.77 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.84 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.85 (3H, d, $J=6.0$ Hz), 0.88 (3H, d, $J=6.0$ Hz), 1.98~2.09 (4H, m), 2.80 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 2.97 (2H, d, $J=7.2$), 3.37 (2H, s), 4.12 (1H, dd, $J=6.4, 8.4$ Hz), 4.23 (1H, m), 4.47 (2H, s), 4.62 (1H, dd, $J=7.0, 14.2$ Hz), 4.96 (2H, s), 4.98 (2H, s), 5.99 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 6.16 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 6.50 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 6.84 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 6.85 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.06 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.07 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.25~7.45 (15H, m). APCI-MS m/z 784 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

イソバレリル-L-チロシル-L-バリル-L-チロシノール (1)

化合物 10、381 mg (0.49 mmol) は *N,N*-ジメチルホルムアミド 20 ml に溶解し、触媒量の 10%パラジウム炭素触媒を加え、水素雰囲気下、室温で 18 時間攪拌した。触媒をセライトろ過により除去したのち、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 g、展開溶媒クロロホルム-メタノール、10 : 1 (v/v)) で精製し、イソバレリル-L-チロシル-L-バリル-L-チロシノール (1) 241 mg を無色固体として得た。収率 96%。

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} -36.2^\circ$ (c 0.5, MeOH). IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ 3280, 2960, 1640, 1620, 1550, 1520, 1450, 1390, 1230. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 225 (4.24), 278 (3.49). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 0.77 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.82 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.87 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.89 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 1.92 (1H, m), 1.99 (1H, m), 2.01 (2H, d, $J=7.4$ Hz), 2.63 (1H, dd, $J=7.6, 12.0$ Hz), 2.74 (1H, dd, $J=9.8, 14.2$ Hz), 2.79 (1H, dd, $J=6.4, 13.8$ Hz), 3.00 (1H, dd, $J=5.0, 14.0$ Hz), 3.47 (1H, d, $J=5.2$ Hz), 4.02 (1H, m), 4.11 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 4.60 (1H, dd, $J=5.2, 9.6$ Hz), 6.67 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 6.68 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.04 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.06 (2H, d, $J=8.4$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 18.6, 19.7, 22.6, 22.7, 27.4, 32.2, 37.0, 37.7, 46.1, 54.4, 56.1, 60.3, 63.9, 116.2, 116.2, 129.2, 130.3, 131.2, 131.3, 156.9, 157.2, 173.0, 173.9, 175.6. HRFAB-MS (m/z) 514.2914 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_3$, 514.2917.

イソバレリル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール

化合物 1、100 mg (0.20 mmol) をジメチルスルホキシド 1 ml に溶解し、トリエチルアミン 118 mg (1.17 mmol) を加え、氷冷下で 5 分間攪拌した。さらにあらかじめジメチルスルホキシド 0.5 ml に溶解しておいた三酸化硫黄・ピリジン複合体 93 mg (0.6 mmol) を氷冷下でゆつくりと滴下した後、室温

で1時間攪拌した。この反応液に4%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機溶媒層は5%炭酸水素ナトリウム水溶液、水および飽和塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー（7 g、展開溶媒トルエン-アセトン、2:1から1:1 (v/v)）で精製し、チロペプチン A 74 mg を無色固体として得た。収率75%。

$[\alpha]_D^{22} -17.0^\circ$ (c 0.5, MeOH). IR (KBr) ν_{\max} 3290, 2960, 1730, 1640, 1520, 1450, 1370, 1230. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) 225 (4.18), 278 (3.46). HRFAB-MS (m/z) 512.2759 (M+H)⁺; calcd for C₂₈H₃₈O₆N₃, 512.2761.

チロペプチン B の合成

(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-ロイシル-(ジ-*O*-ベンジル)-*L*-チロシノール (**11**)

化合物7、3.6 g (8.0 mmol) を塩化メチレン 32 ml に溶解し、氷冷下でトリフロロ酢酸 8 ml を加え、室温で1時間攪拌した。溶媒はトルエン共沸により減圧下に留去し、残渣を塩化メチレン 32 ml に溶解した。これに氷冷下でトリエチルアミン 890 mg (8.8 mmol)、(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-ロイシン 2.2 g (8.8 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・水和物 1.9 g (12.1 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 2.0 g (10.4 mmol) を順次加え、室温で18時間攪拌した。この反応液をクロロホルムで希釈し5%炭酸水素ナトリウム水溶液、4%クエン酸水溶液、飽和食塩水および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（60 g、展開溶媒トルエン-アセトン、50:1 (v/v)）で精製し、(*N*-*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-ロイシル-(ジ-*O*-ベンジル)-*L*-チロシノール (**11**) 3.9 g を無色固体として得た。収率86%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.92 (6H, d, J=5.2 Hz), 1.43 (9H, s), 1.62 (3H, br), 2.81 (2H, d, J=8.0 Hz), 3.37 (2H, d, J=3.6 Hz), 4.05 (1H, m), 4.20 (1H, m), 4.48 (2H, dd, J=12.2, 20.6 Hz), 4.82 (1H, br), 5.02 (2H, s), 6.37 (1H, br), 6.86 (2H, d, J=8.2 Hz), 7.07 (2H, d, J=8.2 Hz), 7.30~7.45 (10H, m). APCI-MS m/z 561 (M+H)⁺.

(*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-ロイシル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール
(12)

化合物 **11**、3.9 g (6.9 mmol) を塩化メチレン 32 ml に溶解し、氷冷下でトリフロロ酢酸 8 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒はトルエン共沸により減圧下に留去し、残渣を塩化メチレン 40 ml に溶解した。これに氷冷下でトリエチルアミン 771 mg (7.6 mmol)、(*O*-ベンジル-*N-tert*-ブトキシカルボニル) -*L*-チロシン 2.8 g (7.6 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・水和物 1.4 g (10.4 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 1.7 g (9.0 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。この反応液をクロロホルムで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、4%クエン酸水溶液および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (100 g、展開溶媒クロロホルム) で精製し、(*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-ロイシル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (**12**) 4.5 g を無色固体として得た。収率 80%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (6H, d, $J=6.4$ Hz), 1.41 (9H, s), 1.47~1.62 (3H, m), 2.79 (2H, m), 2.97 (2H, d, $J=6.8$ Hz), 3.37 (2H, d, $J=3.6$ Hz), 4.18 (1H, m), 4.22 (2H, m), 4.34 (1H, m), 4.49 (2H, dd, $J=12.0, 16.8$ Hz), 4.92 (1H, br), 4.97 (2H, s), 4.99 (2H, s), 6.32 (1H, s), 6.34 (1H, s), 6.85 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 6.87 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.05 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.08 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.25~7.45 (15H, m). APCI-MS m/z 814 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

ブチリル- (*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-ロイシル- (ジ-*O*-ベンジル) -*L*-チロシノール (**13**)

化合物 **12**、1.0 g (1.2 mmol) を塩化メチレン 8 ml に溶解し、氷冷下でトリフロロ酢酸 2 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒はトルエン共沸により減圧下に留去し、残渣を *N,N*-ジメリルホルムアミド 10 ml に溶解した。これに氷冷下でトリエチルアミン 136 mg (1.2 mmol)、酪酸 238 mg (2.7 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・水和物 284 mg (1.9 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 295 mg (1.6 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。この反応液をクロロホルムで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、4%クエン酸水溶液および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g、展開溶媒クロロホルム) で精製し、ブチリル- (*O*-ベンジル) -*L*-チロシル-*L*-ロイシル- (ジ-*O*-

ベンジル) -L-チロシノール (**13**) 435 mg を無色固体として得た。収率 45%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.85 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.86 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.87 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.40~1.65 (5H, m), 2.12 (2H, t, $J=7.6$ Hz), 2.80 (2H, d, $J=8.0$), 2.96 (2H, d, $J=6.8$ Hz), 3.38 (2H, d, $J=3.6$ Hz), 4.20 (1H, m), 4.31 (1H, m), 4.43 (2H, dd, $J=12.0, 14.4$ Hz), 4.60 (1H, dd, $J=7.2, 14.4$ Hz), 4.95 (2H, s), 4.97 (2H, s), 6.00 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 6.31 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 6.40 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 6.84 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 6.85 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 7.07 (4H, d, $J=8.8$ Hz) 7.25~7.45 (15H, m). APCI-MS m/z 784 (M+H) $^+$, 782 (M-H) $^-$.

ブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-L-チロシノール (**3**)

化合物 **13**、405 mg, (0.52 mmol) は *N,N*-ジメチルホルムアミド 8 ml に溶解し、触媒量の 10%パラジウム炭素触媒を加え、水素雰囲気下、室温で 18 時間攪拌した。触媒をセライトろ過により除去したのち、ろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 g、展開溶媒クロロホルム-メタノール、10 : 1 (v/v)) で精製し、ブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-L-チロシノール (**3**) 262 mg を無色固体として得た。収率 99%。

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -36.2° (c 0.5, MeOH). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ 3320, 2960, 1640, 1620, 1520, 1450, 1360, 1240. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm ($\log \epsilon$) 225 (4.24), 278 (3.49). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 0.87 (3H, t, $J=7.6$ Hz), 0.86 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 1.49 (2H, m), 1.53 (2H, m), 1.56 (1H, m), 2.13 (2H, t, $J=7.6$ Hz), 2.64 (1H, d, $J=7.6, 13.8$ Hz), 2.77 (1H, dd, $J=9.0, 13.6$ Hz), 2.78 (1H, dd, $J=6.4, 13.6$ Hz), 3.00 (1H, dd, $J=5.2, 14.0$ Hz), 3.48 (2H, dd, $J=1.8, 5.2$ Hz), 3.98 (1H, m), 4.31 (1H, dd, $J=5.8, 9.2$ Hz), 4.54 (1H, dd, $J=5.6, 9.2$ Hz), 6.68 (4H, d, $J=8.4$ Hz), 7.03 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.06 (2H, d, $J=8.4$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 13.9, 20.2, 22.0, 23.5, 25.7, 36.9, 37.7, 38.7, 42.0, 53.5, 54.5, 56.2, 63.8, 116.2, 116.2, 129.1, 130.3, 131.3, 131.3, 156.9, 157.3, 173.9, 174.2, 176.2. HRFAB-MS (m/z) 514.2910 (M+H) $^+$; calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_3$, 514.2917.

ブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-DL-チロシノール

化合物 **3**、100 mg (0.20 mmol) をジメチルスルホキシド 1 ml に溶解し、ここにトリエチルアミン 118 mg (1.17 mmol) を加え、氷冷下で 5 分間攪拌した。さらにあらかじめジメチルスルホキシド 0.5 ml に溶解しておいた三酸化硫黄・ピリジン複合体 93 mg (0.6 mmol) を氷冷下でゆっくりと滴下した後、

室温で1時間攪拌した。この反応液に4%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機溶媒層は5%炭酸水素ナトリウム水溶液、水および飽和塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(7g、展開溶媒トルエン-アセトン、3:1から2:1(v/v))で精製し、チロペプチンB 51mgを無色固体として得た。収率51%。

$[\alpha]_D^{22} -14.8^\circ$ (c 0.6, MeOH). IR (KBr) $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$ 3290, 2960, 1730, 1650, 1520, 1450, 1380, 1240. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm ($\log \epsilon$) 225 (4.34), 278 (3.63). HRFAB-MS (m/z) found, 512.2765 (M+H)⁺; calcd for C₂₈H₃₈O₆N₃, 512.2761.

第2節 結果

1. 合成計画

チロペプチンは分子内にアルデヒド基を有するペプチド化合物である。ペプチドの合成反応は古くから研究されていて、いくつもの方法論が確立されている。ペプチド合成でもっとも注意する点はラセミ化であり、ラセミ化を起さぬよう合成を進める必要がある。*tert*-ブトキシカルボニル基に代表されるウレタン（エステル-アミド）型の保護基で、アミノ酸のアミノ基を保護すると、そのカルボキシル基を活性化してペプチド鎖を延長する際に、ラセミ化が起り難いことが知られている。これはラセミ化反応で形成するオキサゾリン環が、ウレタン型の保護基では形成しないためと説明されている。したがってウレタン型の保護基で保護したアミノ酸を1個ずつ縮合すれば、ラセミ化の心配なくペプチド鎖を延長できる。この原理に基づくペプチド合成法を逐次延長法といい、合成すべきペプチドのC末端からN末端の方向へアミノ酸を1個ずつ延長する方法である。チロペプチンの合成はこの逐次延長法を適用した。出発原料としてL-チロシノールを選択し、アミノ基を*tert*-ブトキシカルボニルで保護した。なお*tert*-ブトキシカルボニル基の除去はトリフロロ酢酸処理により容易に除去できる。またL-チロシノールの他の官能基である2つの水酸基は、トリフロロ酢酸処理でも安定なベンジル基で保護することにした。ペプチド結合を形成させるために、縮合剤を使用するが、もっとも一般的な縮合剤は1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）である。しかし、DCCは反応系内で難溶性の1,3-ジシクロヘキシル尿素が生成し、主生成物との分離が困難であったりする。そこで、近年縮合剤として、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC、別名；水溶性カルボジイミド（WSCl））塩酸塩が主流になりつつある。WSCl-HClは副成する尿素誘導体は第三アミンの性質を持っているため、酸性水溶液による洗浄で簡単に除去できるという利点がある。またDCCの場合と同様に、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）や3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアゾール（HOObt）などの酸性の添加剤と組み合わせて使用すれば反応速度が速くなり、副反応も抑えられる。そこでチロペプチン合成の際の縮合剤と添加剤の組み合わせにはWSCl-HClとHOBtを使用した。これを用いてチロペプチンのペプチド鎖の合成を試み、保護アミノ酸の縮合反応のくり返しによりトリペプチドを形成し、さらに脂肪酸との縮合により、N-アシルトリペプチドを得た。ベンジル基はパラジ

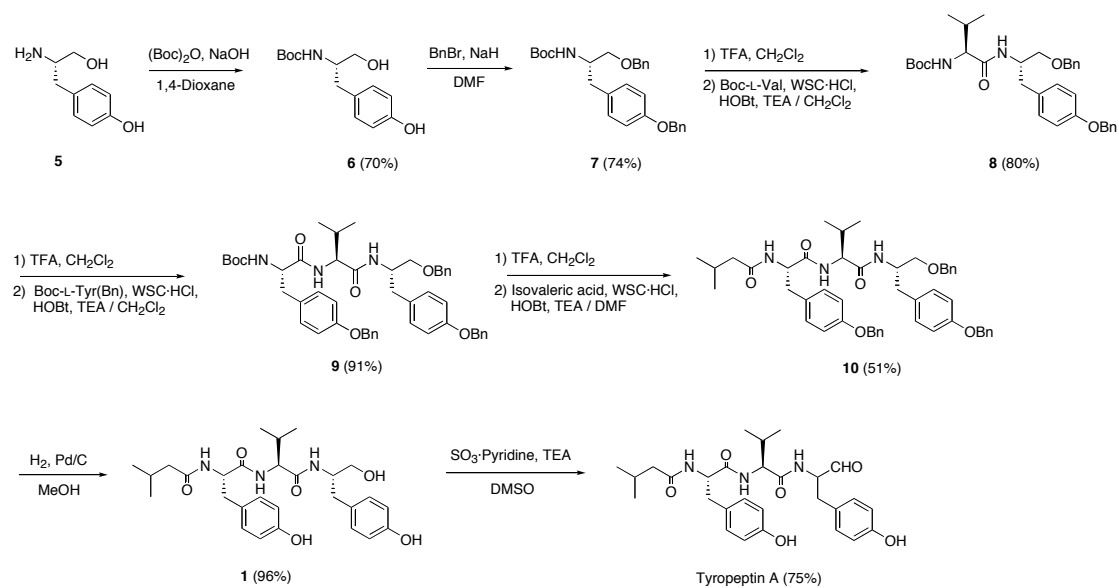
ウム触媒を用いた水素添加により脱保護し、チロシノール部分の一級水酸基を、三酸化硫黄-ピリジン複合体を用いたジメチルスルホキシド酸化によりアルデヒド基へと導いた。

2. チロペプチン A の合成

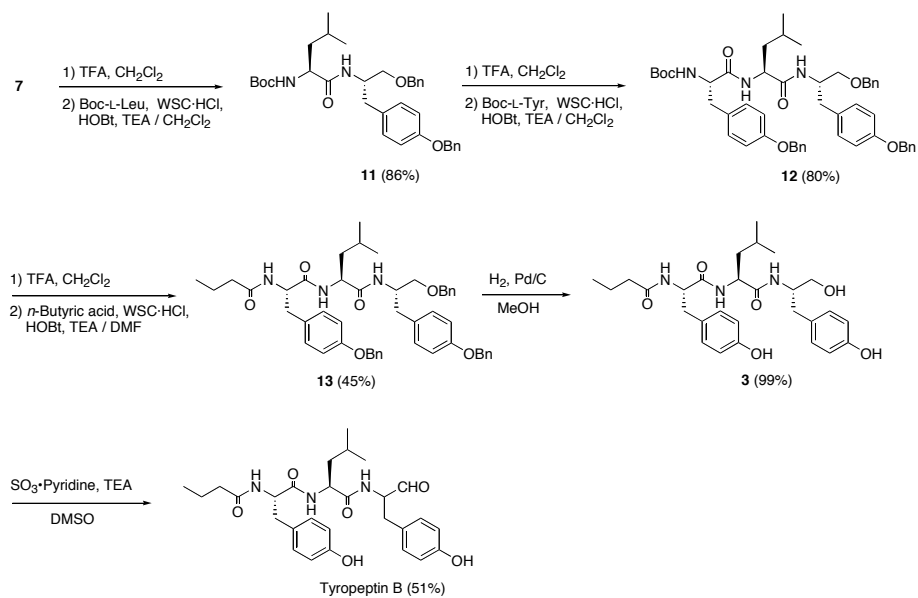
チロペプチン A は Scheme 3-1 に示した経路で合成した。まず出発物質である L-チロシノール (5) のアミノ基を *tert*-ブトキシカルボニル基で保護し、次に 2 つの水酸基をベンジル基で保護し 7 を得た。7 の *tert*-ブトキシカルボニル基を脱保護の後、縮合剤として WSCI-HCl および添加剤として HOBT を用いて *N-tert*-ブトキシカルボニル-L-バリンと縮合し、ジペプチド 8 を得た。同様に、8 の *tert*-ブトキシカルボニル基を脱保護の後、*N-tert*-ブトキシカルボニル-L-チロシン (ベンジル) と縮合しトリペプチド 9、さらに同様にイソ酪酸と逐次縮合をして *N*-アシルトリペプチド 10 を得た。10 のベンジル基はパラジウム炭素触媒を使った水素添加により除去し、イソバレリル-L-チロシル-L-バレリル-L-チロシノール (1) を得た。合成した 1 は、天然由来チロペプチン A の還元体である 1 の物理化学的性質および NMR スペクトルデータと完全に一致した。さらに 1 の一級水酸基を選択的に三酸化硫黄・ピリジン複合体を用いて DMSO 中で酸化し、チロペプチン A を合成した。合成したチロペプチン A は天然のチロペプチン A と同様に、チロシノールのアルデヒド基の α 位で異性化を起していたが、NMR スペクトルデータ、物理化学的性質およびプロテアソームに対する阻害活性は、天然物と完全に一致した。このようにして 5 から 10 工程、全工程収率 14% で効率良く、チロペプチン A を合成することに成功した。

3. チロペプチン B の合成

チロペプチン B は Scheme 3-2 に示した経路で合成した。チロペプチン B は前項のチロペプチン A の合成経路とほぼ同じ経路を経て、*N-tert*-ブトキシカルボニル-L-バリン、イソ酪酸の代わりに、*N-tert*-ブトキシカルボニル-L-ロイシン、酪酸を用いて合成した。その結果、出発原料 7 から 8 工程、全工程収率 16% で効率良く、チロペプチン B を合成することに成功した。



Scheme 3-1. Synthesis of tyropeptin A.



Scheme 3-2. Synthesis of tyropeptin B.

第3節 小括

本章では、チロペプチン A および B の合成を行い、以下のことを明らかにした。

- (1) L-チロシノールを出発原料として用い、10 工程を経てチロペプチン A を全工程収率 14%で、B を全工程収率 16%で合成することができた。

第4章 チロペプチンの生物活性

第 1 章においてプロテアソームの阻害物質としてチロペプチンを単離した。本章ではチロペプチンのプロテアソーム阻害活性を中心に生物活性について言及する。

はじめにプロテアソーム阻害活性について検討した。序論に述べたようにプロテアソームは複雑な分子構造をした巨大な多成分複合体であり、各種蛋白質分解酵素の集合体である。少なくとも 3 つの異なる蛋白質分解酵素活性が知られており、それぞれ異なる基質特異性を有することからキモトリプシン様活性、トリプシン様活性および PGPH 活性と呼ばれている。それぞれの酵素活性に対するチロペプチンの阻害活性を測定し、さらに動力学的解析を行うことによりその阻害様式を調べた。

次に培養細胞を用いて細胞内のプロテアソーム活性に与えるチロペプチンの影響について検討した。ラット副腎髄質褐色細胞腫から樹立した細胞株である PC12 細胞は、神経成長因子(NGF)刺激により、細胞増殖を停止し、神経突起の伸長を伴う神経様の細胞へと分化する特徴を持つ。この細胞をプロテアソーム阻害物質であるラクタシスチンまたは MG132 で処理すると、神経突起を伸長し形態変化を示すことが知られている [89, 90]。このことからユビキチン-プロテアソーム経路はこの細胞の神経突起伸長に重要な役割を果たすと考えられる。したがって PC12 細胞はプロテアソーム阻害物質の性質を調べる上での優れた実験モデルである。そこで PC12 細胞を用いて、チロペプチンの細胞透過性や細胞内プロテアソーム活性への影響について検討し、また PC12 細胞以外の細胞に対するチロペプチンの細胞増殖抑制効果について調べた。

第1節 実験材料と方法

1. 酵素活性測定法

プロテアソームの活性は、第 1 章に示した方法により測定した。 α -キモトリプシン、m-カルパインおよびカテプシン L の酵素活性は、プロテアソームの活性測定と同様に、96 穴マイクロプレート中で、合成基質から酵素反応により生成する AMC の量を蛍光光度計 (Cytofluor 2350 Fluorescence Measurement System ; Millipore Corporation, Bedford, MA) で蛍光強度 (EX_{380nm}/EM_{460nm}) を測定することにより定量

した。

α -キモトリプシン活性は、以下の方法によって測定した。100 mM 塩化ナトリウムおよび 1 mM 塩化カルシウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 78 μ l に、サンプル 2 μ l、1mM 蛍光基質 (Suc-LLVY-MCA) 10 μ l 加えた混合液を 37°C で 5 分間プレインキュベートし、そこに α -キモトリプシン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 10 μ l を加え、37°C で 30 分間反応した。10% SDS を 50 μ l 加え反応を停止し、蛍光強度を測定した。

m-カルパイン活性は、以下の方法によって測定した。2 mM 2-メルカプトメタノール、2 mM 塩化カルシウムを含む 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 78 μ l に、サンプル 2 μ l、1mM 蛍光基質 (Suc-LLVY-MCA) 10 μ l 加えた混合液を 37°C で 5 分間プレインキュベートし、ここに m-カルパイン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 10 μ l を加え、37°C で 15 分間反応した。10% SDS を 50 μ l 加え反応を停止し、蛍光強度を測定した。

カテプシン L 活性は、以下の方法によって測定した。1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) および 8 mM L-システインを含んだ 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 78 μ l に、サンプル 2 μ l、1mM 蛍光基質 (Z-Phe-Arg-MCA ; Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) 10 μ l 加えた混合液を 37°C で 5 分間プレインキュベートし、ここに m-カルパイン (Calbiochem Corporation, San Diego, CA) 10 μ l を加え、37°C で 15 分間反応させた。10% SDS を 50 μ l 加え反応を停止し、蛍光強度を測定した。

2. PC12 細胞の培養

PC12 細胞は I 型コラーゲンでコートしたディッシュを用いて、10%ウマ血清 (HS、horse serum) および 5%ウシ胎児血清 (FBS、fetal bovine serum) を含む RPMI1640 培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) で 37°C、95% air および 5% CO₂ で培養した。

3. 細胞内プロテアソーム活性

PC12 細胞 (2 \times 10⁶) を I 型コラーゲンでコートした 6 cm 丸シャーレに 10 % FBS を含む RPMI1640 培地 5 ml に各濃度のチロペプチン A、MG132 およびラクタシスチンを加え 14 時間培養した。細胞は Ca²⁺、Mg²⁺ 不含リン酸緩衝食塩水 (PBS (-)、phosphate-buffered saline (-) ; Gibco BRL, Grand Island, NY)

で2回洗浄の後、セルスクレイパーを用いて細胞を掻き集めた。集めた細胞は1 mM DTT、2 mM ATP および0.25 M シュクロースを含む50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 62.5 μ l に懸濁し、これを凍結融解法により細胞性蛋白質を抽出した。不要な細胞片は、96,000 \times g (35,000 rpm) で30分間超遠心分離を行うことにより除去し、上清に含まれる蛋白質10 μ gあたりのプロテアソーム活性を測定した。プロテアソームの活性測定法は第1章に示した。蛋白質濃度はBio-Rad Protein Assay Kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて測定した。

4. ユビキチン化蛋白質の検出

PC12細胞 (1×10^6) をI型コラーゲンでコートした6 cm 丸シャーレに10% FBSを含むRPMI1640培地5 mlに各濃度のチロペプチンA、MG132およびラクタシスチンを加え14時間培養した。この細胞をPBS (-) で洗浄の後、シャーレに高塩濃度界面活性剤緩衝液 (350 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、1mM PMSF (フェニルメチルスルフォニルフルオライド)、20% グリセロール、0.5 mM EDTA、0.1 mM EGTA (ethylenebis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid)、1% NP-40 および50 μ g/ml ロイペプチンを含む20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH 7.9)) 150 μ lを加えることにより細胞を溶解した。溶細胞液を15,000 \times g (13,000 rpm) で5分間遠心分離し、不溶性物質を除去した。上清に等量の2% SDS、10% 2-メルカプトエタノール、30% グリセロールおよび0.01% BPB (プロモフェノールブルー) を含む250 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) を加え5分間煮沸した。これを4-20% グラジエントゲルを用いたSDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) により蛋白質を分離し、このゲルから蛋白質をPVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写した。この膜は5%スキムミルクを含むSTE 緩衝液 (0.15 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) でブロッキングし、ユビキチン化蛋白質へのラビットポリクローナル抗体 (Affiniti Research Products, Exeter, UK) を用いて抗体反応を行い、ECL ウェスタンブローディング検出システム (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) を用いて陽性抗体反応すなわちユビキチン化蛋白質を検出した。

5. PC12細胞の分化誘導

PC12細胞はI型コラーゲンでコートした24穴プレートに 1×10^4 個の細胞を播布し、10% HS および

5% FBS を含む RPMI1640 培地 1 ml で 24 時間培養した。この培地除去後、PBS (-) で 1 回洗浄し、1% FBS を含む RPMI1640 培地 1 ml を加え、各濃度のチロペプチン A もしくは NGF (50 ng/ml) を添加し、48 時間培養後、細胞の形態を光学顕微鏡で観察した。

6. 細胞毒性の測定

各細胞を 96 穴プレートの 1 穴に 1×10^5 個播き、10 % FBS を含む DMEM (ダルベッコ変法イーグル) 培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 100 μ l にて培養した。24 時間前培養し、測定サンプルを加えさらに 48 時間培養した。細胞数は MTT 法を用いて測定した [91]。すなわち PBS(-)に MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を溶かした 5 mg/ml の溶液を、各穴に 10 μ l ずつ加え、37°C で 4 時間静置した。ここに 20% SDS 溶液を 100 μ l ずつ加え 37°C で一晩静置した。これをマイクロプレートリーダー (Labsystems multiscan MS ; Dainippon Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) で 570 nm (サンプル) および 690 nm (レファレンス) の吸光度を測定することにより細胞数を測定した。

7. 急性毒性の測定

チロペプチン A および B を少量の Tween 80 および 10% DMSO を含む生理的食塩水に溶解し、実験 1 日目に 0.1ml ずつ ICR マウス (メス、4 週令、Charles River Japan, Yokohama, Japan) の尾部の静脈内に単回投与した。経過観察は 14 日間行い、生存したマウスは解剖し各臓器を肉眼により観察した。

第2節 結果

1. 酵素阻害活性

プロテアソームの3種類の酵素活性に対するチロペプチン A の阻害活性を測定した (Table 4-1)。チロペプチン A のキモトリプシン様活性に対する 50% 阻害濃度 (IC_{50}) 値は $0.2 \mu\text{M}$ であり、トリプシン様活性には $2.9 \mu\text{M}$ の値を示したが、PGPH 活性に対しては $200 \mu\text{M}$ でも阻害活性が認められなかった。チロペプチン B のキモトリプシン様活性に対する IC_{50} 値は、 $0.39 \mu\text{M}$ であり、トリプシン様活性には $7.8 \mu\text{M}$ 、PGPH 活性には $200 \mu\text{M}$ でも阻害活性が認められなかった。

またチロペプチンの阻害活性の特異性を調べるため、他の蛋白質分解酵素に対する阻害活性を測定したところ、消化酵素である α -chymotrypsin、リソソーム系プロテアーゼである cathepsin L およびカルシウム依存性プロテアーゼである m-calpain に対して若干の阻害活性を示した。

Table 4-1. Enzyme inhibitory profiles of tyropeptins A and B.

Enzyme	IC_{50} (μM)			
	Tyropeptin A	Tyropeptin B	MG132	
20S Proteasome	Chymotrypsin-like activity	0.20	0.39	0.11
	Trypsin-like activity	2.9	7.8	4.2
	PGPH activity	>200	>200	4.2
α -Chymotrypsin	1.4	2.0	16	
Cathepsin L	0.37	0.90	-	
m-Calpain	1.5	1.1	-	

- : Not determined

次にチロペプチン A が最も強い阻害活性を示すプロテアソームのキモトリプシン様活性に対する酵素阻害様式を調べた。各濃度のチロペプチン A および基質を用いて動力学的解析を行い、Lineweaver-Burk (LB) プロットとして示した (Fig. 4-1)。チロペプチン A のキモトリプシン様活性に対する酵素阻害反応は可逆的であり、酵素阻害様式は基質に対して拮抗型であった。 K_m 値は $118 \mu\text{M}$ であり、 K_i 値は Dixon プロットにより $0.22 \mu\text{M}$ と求めた。

また同様な方法によりチロペプチン B のプロテアソームキモトリプシン様活性に対する LB プロット

トおよび Dixon プロットを行い、 K_m 値および K_i 値を、それぞれ $143 \mu\text{M}$ および $0.25 \mu\text{M}$ として求めた。

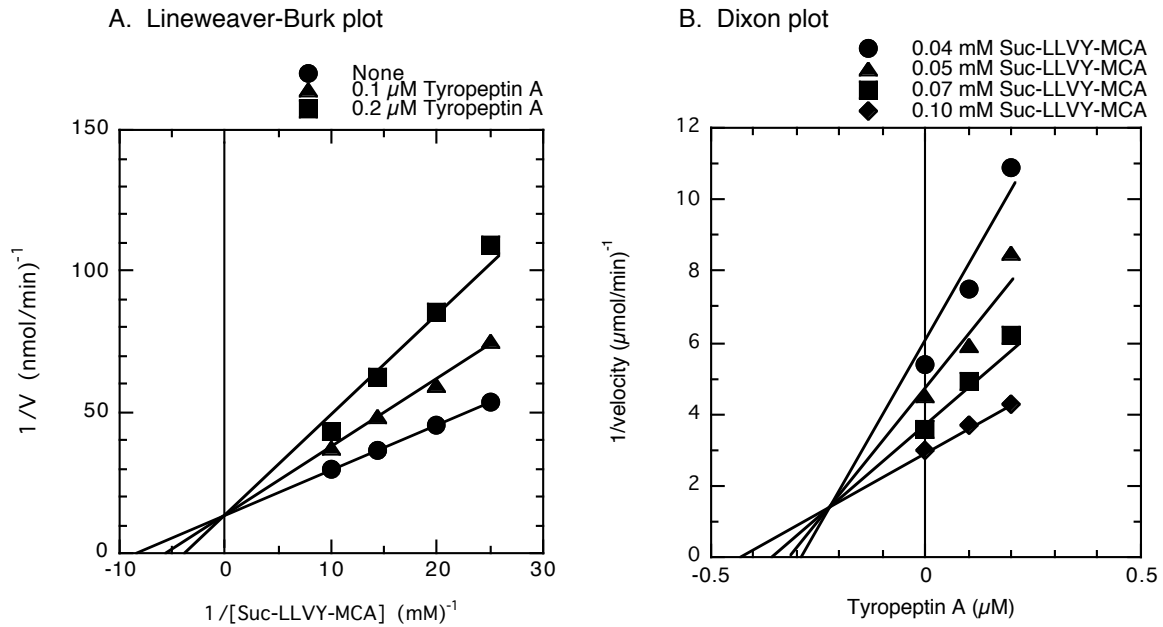


Fig. 4-1. Lineweaver-Burk (A) and Dixon (B) plots for the chymotrypsin-like activity of 20S proteasome with tyropeptin A.

2. 細胞内プロテアソームに対するチロペプチンの影響

細胞内のプロテアソームを阻害するには、阻害物質が細胞膜を通過し細胞質に到達することが必須になる。そこで培養細胞を用いてチロペプチン A による細胞内のプロテアソーム活性に与える影響について検討した (Fig. 4-2)。細胞はラット由来の神経細胞様 PC12 細胞を用い、その培地にチロペプチン A を添加すると PC12 細胞内のプロテアソーム活性は低下した。その効果は薬剤容量依存的であり、プロテアソーム阻害物質として知られているラクタシスチンや MG132 でも同様な結果が認められた。

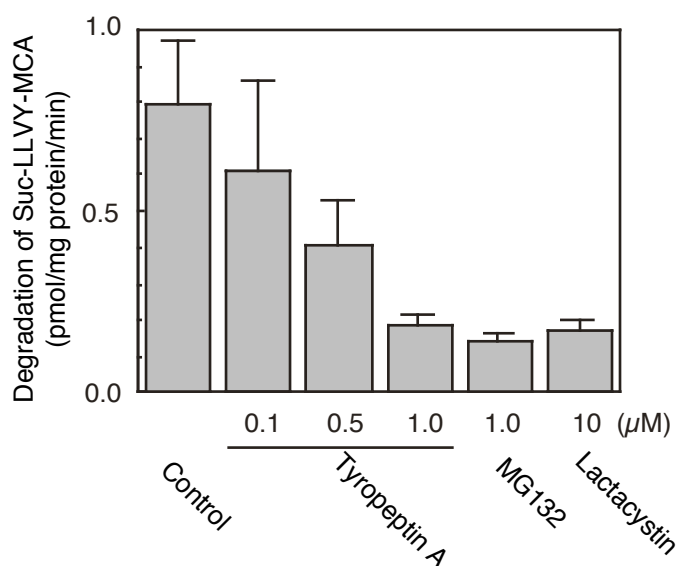


Fig. 4-2. Effect of tyropeptin A on intracellular proteasome activity in PC12 cells. PC12 cells were incubated for 14h in the absence or presence of indicated concentrations of tyropeptin A, MG132 or lactacystin. The proteasome activity in PC12 cells was measured with Suc-LLVY-MCA as a substrate.

細胞内のプロテアソーム活性を阻害すると、プロテアソームの基質であるユビキチン化蛋白の蓄積が考えられる。そこで PC12 細胞をチロペプチン A で処理した時の、細胞内ユビキチン化蛋白の蓄積を測定した (Fig. 4-3)。無処理の細胞ではユビキチン化蛋白の蓄積は認められないが、チロペプチン A で処理した細胞では、高分子量領域にスメア状のユビキチン化蛋白が認められ、ラクタシスチンや MG132 と同様にその蓄積が認められた。チロペプチン A の処理濃度を上げるとスメアがより濃く現れ、その効果は薬剤容量依存的であり、1.0 μM のチロペプチン A で最も顕著に効果が認められた。

また PC12 細胞はプロテアソームの機能を阻害されることにより、神経突起を伸長することが知られている。そこでチロペプチン A による PC12 細胞の神経突起伸長作用について検討した (Fig. 4-4)。チロペプチン A は NGF と同様に、0.08~1.2 μM の濃度で神経突起の伸長を示した (写真は 0.29 μM だけ示した)。

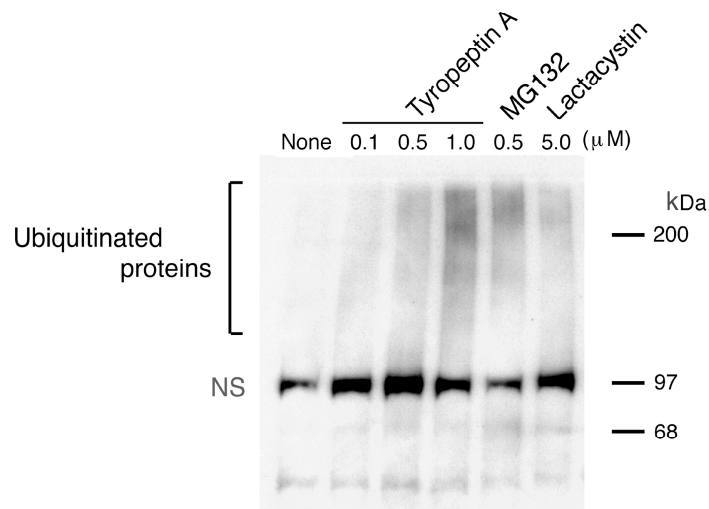


Fig. 4-3. Accumulation of ubiquitinated proteins caused by proteasome inhibitors. PC12 cells were incubated for 14 h in the absence or presence of the indicated concentrations of tyropeptin A, MG132 or lactacystin. Cell proteins were immunoblotted with an antibody against ubiquitinated proteins. Number on the right: molecular weight markers. NS: nonspecific binding.

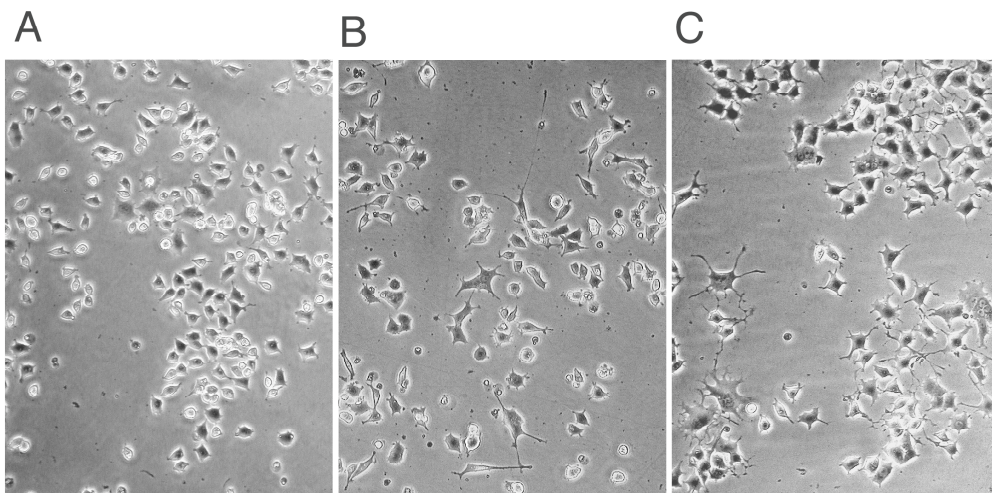


Fig. 4-4. Neurite outgrowth on PC-12 cells caused by tyropeptin A. PC-12 cells were treated with the vehicle (A), 0.29 μM tyropeptin A (B), or 50 ng/ml of NGF (C). Cells were photographed after 48 h of cultivation.

3. 細胞増殖抑制活性

プロテアソームの機能を阻害すると、細胞増殖の抑制やアポトーシスを誘導することが知られている。そこで各種癌細胞におけるチロペプチンの増殖抑制効果について検討した (Table 4-2)。チロペプチン A の各細胞に対する IC₅₀ 値は、5~39 μ M であった。チロペプチン B は A と較べて弱い増殖抑制効果を示し、おおよそ 2~3 倍の IC₅₀ 値であった。これはプロテアソーム阻害活性と同様な傾向である。

Table 4-2. Growth inhibition by tyropeptins on tumor cells.

Cells	IC ₅₀ (μ M)	
	Tyropeptin A	Tyropeptin B
Jurkat	13	47
HL-60	9	20
HeLa S3	33	100
MCF-7	8	29
HCT-8	39	100
TK-1	18	39
PC12	5	16

Cells were incubated with a test sample at 37°C for 48h. Cell growth was determined using MTT.

4. 急性毒性

マウスに対する *in vivo* での急性毒性試験を行った。チロペプチン A および B をそれぞれ 2 mg マウス静脈内に単回投与した。マウスは実験終了時 (14 日目) まで生存しており、それらを解剖して内蔵を観察したが、異常所見は見当たらなかった。よって LD₅₀ (50% lethal dose) 値は 100 mg/kg 以上である。

第3節 考察

プロテアソームは 3 つの異なる蛋白分解活性を有していて、それぞれの酵素活性に対するチロペプチンの阻害活性を調べた。チロペプチン A はキモトリプシン様活性に最も強い阻害活性を示し、0.2 μM の IC_{50} 値を示した。しかしトリプシン様活性に対しては 2.9 μM の阻害活性しか示さず、PGPH 活性に対しては 200 μM でも阻害活性を示さなかった。MG132 はプロテアソーム阻害剤として広く試薬として使われている化合物であるが、やはりキモトリプシン様活性に対して最も強い阻害活性を示すが、トリプシン様活性や PGPH 活性にも阻害活性を示した。このことからチロペプチンは MG132 とは異なる阻害スペクトルを示し、キモトリプシン様活性に特異性の高い阻害物質であることが明らかとなった。チロペプチンはペプチド化合物であることから、プロテアソームに疑似基質として認識されることにより阻害活性が生じると考えられる。そこでキモトリプシン様活性に対する酵素阻害様式を調べるために動力的解析を行った。LB プロット、Dixon プロットによりチロペプチンの酵素阻害反応は可逆的であり、酵素阻害様式は基質に対して拮抗型であることが分かった。

Kawashima らの研究で、ロイペプインの類縁体である acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal は、PC12 細胞の亜種である PC12h 細胞に神経突起の伸長作用を示した [92]。しかし他のプロテアーゼ阻害剤 (acetyl-leucyl-leucyl-metioninal、ロイペプチン、E64、soybean trypsin inhibitor、hirubudin、aprotinin、diisofluorophosphate、6-アミノカプロン酸、ペプスタチン A は神経突起の伸長作用を示さなかった [4]。MG132 (benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) は PC12 細胞の神経突起の伸長を示すことが知られていて [93, 94]、また MG132 はプロテアソームの阻害物質として知られているが、同時にカルパインも阻害することが知られている。MG132 よりロイシンが 1 つ少ない benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucinal は MG132 と同程度にカルパインを阻害するが、プロテアソームをほとんど阻害しない。この benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucinal はいずれの濃度においても PC12h 細胞の神経突起の伸長を誘導しなかった [93, 94]。またプロテアソームの特異的阻害剤であるラクタシスチンは PC12 細胞に神経突起の伸長を誘導した [89]。これらの結果から、PC12 細胞においてプロテアソーム活性の阻害と神経突起の伸長が相関することが示唆された。

PC12 細胞はプロテアソーム阻害物質の性質を調べる上で優れた実験モデルであることから、PC12

細胞に与えるチロペプチンの影響を調べた。PC12 細胞をチロペプチンで処理すると薬剤容量依存的に細胞内プロテアソーム活性が低下し、プロテアソームの基質であるユビキチン化蛋白の蓄積が認められた。さらにチロペプチンにより神経突起の伸長作用が認められたことから、チロペプチンは細胞膜を通じて細胞内へ透過し、細胞内プロテアソームを阻害することが分かった。

第4節 小括

本章では、チロペプチンの *in vitro* およびラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞におけるプロテアソーム阻害活性について検討し、以下のことを明らかにした。

- (1) チロペプチン A はプロテアソームのキモトリプシン様活性に対して $0.2 \mu\text{M}$ (IC_{50} 値) の阻害活性を示し、トリプシン様活性には $2.9 \mu\text{M}$ であり、PGPH 活性には $200 \mu\text{M}$ でも阻害せず、その特異性を示した。
- (2) キモトリプシン様活性に対して、チロペプチン A の酵素阻害反応は可逆的あり、酵素阻害様式は基質に対して拮抗型であった。
- (3) チロペプチン B は A よりも阻害活性が弱く約 2 分の 1 程度であったが、特異性には変わりはなかった
- (4) PC12 細胞においてチロペプチン A は細胞膜を透過し細胞内のプロテアソームを阻害した。細胞内に、その基質であるユビキチン化蛋白を蓄積し、神経突起の伸長をともなう形態変化を起こした。

第5章 チロペプチン類縁体の分子設計と合成

前章までに述べたように、チロペプチンはプロテアソーム阻害物質として機能することが分かったが、既存のプロテアソーム阻害物質である MG132 に比べて阻害活性が弱く、酵素阻害物質としては中程度の阻害活性であった。そこで阻害活性のより強い化合物を求め、チロペプチン類縁体の合成に着手した。強活性チロペプチン類縁体を論理的に設計する手法として、標的であるプロテアソームの立体構造情報に基づいた薬物の分子設計 (structure based drug design) を行い、すなわちプロテアソームとチロペプチンとの三次元構造複合体モデルを構築し、そこから得た情報をもとにして類縁体を合成した。

序論にも述べたが、プロテアソームには 26S プロテアソームと 20S プロテアソームの 2 種類がある (Fig. 5-1) [12]。26S プロテアソームは 20S プロテアソームの両端に 19S 調節複合体と呼ばれる 2 つの末端調節部位 (別名、PA700) が付いた形をしている [33, 34]。触媒部位である 20S プロテアソームは真中が空洞である巨大なシリンダー型をしており、 α リングおよび β リングのそれぞれ 2 つの積み重なりにより成り立っている。それぞれのリングは 7 つの異なった α サブユニットおよび β サブユニットにより構成されている。20S プロテアソームの各々のサブユニットは全てクローニングされ塩基配列が決定されている。そしてそれらの塩基配列の相同性よりグループ分けがなされている [95]。

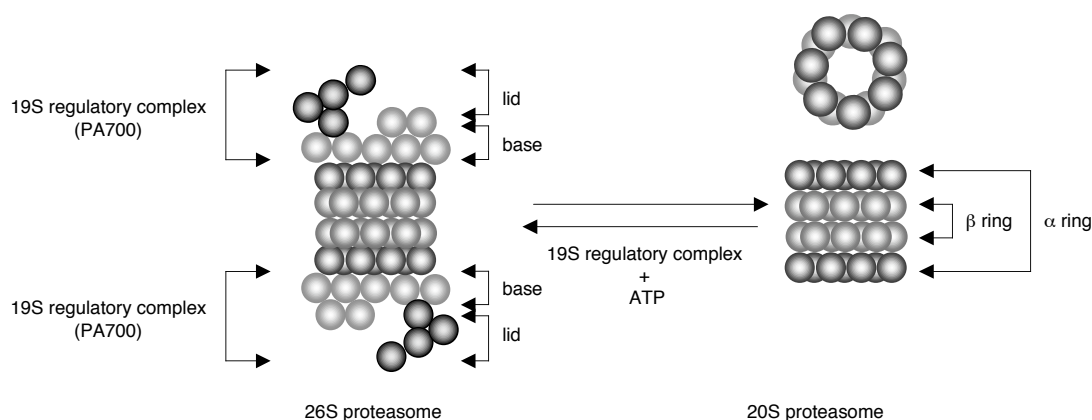


Fig. 5-1. Schematic model of 26S proteasome.

蛋白質分解活性は β リング上の β サブユニットにコードされており、活性部位はリングの内側に存在する。20S プロテアソームの 3 種類の蛋白質分解活性を触媒するサブユニットはそれぞれ同定され、

PGPH 活性は $\beta 1$ サブユニット、トリプシン様活性は $\beta 2$ サブユニット、キモトリプシン様活性は $\beta 5$ サブユニットにそれぞれ活性中心がある (Fig. 5-2)。このことは Groll らによる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 20S プロテアソームの結晶構造解析により証明されている [35]。2002 年にはホ乳類の 20S プロテアソームとしては初めてウシの 20S プロテアソームの結晶構造が解析された [96, 97]。詳細な解析の結果、ウシと酵母の 20S プロテアソームの立体構造には $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ および $\beta 7$ サブユニットにおいて違いがあることが認められた。

本章では、チロペプチン A とウシの 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を司るサブユニットに結合した三次元複合体モデルの構築について述べ、このモデルを用いたチロペプチン A 類縁体の論理的で且つ効果的な分子設計およびそれらの合成について言及する。

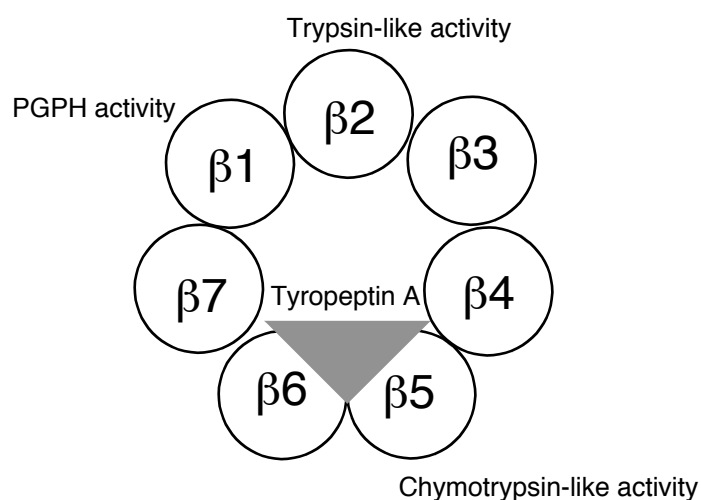


Fig. 5-2. Cross-sectional view of β ring.

第1節 実験材料と方法

1. 各種機器分析

各種機器分析は第2章と同様な機器により測定した。

2. 分子モデリング

チロペプチン A と 20S プロテアソームの複合体モデルの構築には、ウシの 20S プロテアソームの結晶の X 線データを利用した [96, 97]。その座標データは Protein Data Bank (アクセスコード、1IRU) より引用した。複合体モデルでのチロペプチン A の立体構造は Insight II (Accelrys) の Discover プログラムにより最適化を行った。CH/ π 相互作用は CHPI プログラムにより探索した [98]。このプログラムは短距離間にある CH グループと π 系の電子との相互作用を探索するために作られたプログラムであり、これは CH グループのみならず NH、OH および SH との間の XH/ π 相互作用 (X=C、N、O および S) も探索できる。

3. 化学合成

N 末端を変換したチロペプチン A 類縁体の合成

シクロヘキシルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-101)

TP-101 はチロペプチン A と同様な方法により合成した。すなわち (*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (ジ-*O*-ベンジル) -L-チロシノール (**9**) を用い、イソ酪酸の代わりにシクロヘキシル酢酸と縮合し、シクロヘキシルアセチル- (*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (*O*-ベンジル) -L-チロシノールベンジルエーテルを合成した。このベンジル基を脱保護の後、一級水酸基を酸化しアルデヒド基へと導き、シクロヘキシルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-101) を合成した。

MP 153~155°C. $[\alpha]_D^{25}$ -33.3° (c 0.33, MeOH). Rf 0.32 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 552 (M+H)⁺, 550 (M-H). HRFAB-MS (*m/z*) 552.3082 (M+H)⁺; calcd for C₃₁H₄₂O₆N₃, 552.3074. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2930, 1730, 1640, 1540, 1515, 1230, 825. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.64~0.83 (2H, m), 0.86 (3H, d, J=7.2

Hz), 0.88 (3H, d, J=7.2 Hz), 1.10~1.20 (3H, m), 1.37 (1H, br d, J=12.8 Hz), 1.50~1.55 (2H, m), 1.56~1.65 (3H, m), 1.97 (1H, m), 1.98 (2H, d, J=7.0 Hz), 2.62 (1H, m), 2.72 (1H, m), 2.89 (1H, m), 2.99 (1H, dd, J=4.4, 14.4 Hz), 4.05 (1H, m), 4.12 (1H, dd, J=3.4, 7.4 Hz), 4.44 (1H, dd, J=4.0, 7.2 Hz), 4.60 (1H, ddd, J=2.8, 4.4, 10.4 Hz), 6.66 (2H, d, J=8.4 Hz), 6.67 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.02 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.05 (2H, d, J=8.4 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 18.6, 19.7, 27.2, 27.3, 27.3, 32.2, 33.9, 34.1, 35.3, 36.9, 37.8, 44.9, 56.0, 56.6, 60.2, 98.8, 116.2, 116.2, 129.4, 130.4, 131.3, 131.4, 156.9, 157.3, 173.2, 173.9, 175.5.

フェニルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-102)

TP-102 はチロペプチン A と同様な方法により合成した。すなわち化合物 **9** を用い、イソ酪酸の代わりにフェニル酢酸と縮合し、フェニルアセチル- (*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (*ジ-O*-ベンジル) -L-チロシノールを合成した。このベンジル基を脱保護の後、一級水酸基を酸化しアルデヒド基へと導き、フェニルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-102) を合成した。

MP 103~107°C. $[\alpha]_D^{26}$ -37.4° (*c* 0.27, MeOH). Rf 0.29 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 546 (M+H)⁺, 544 (M-H)⁻. HRFAB-MS (*m/z*) 546.2625 (M+H)⁺; calcd for C₃₁H₃₆O₆N₃, 546.2604. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3300, 2960, 1730, 1640, 1550, 1515, 1240, 830. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.81 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.85 (3H, dd, J=2.0, 6.8 Hz), 1.92~2.00 (1H, m), 2.74 (1H, ddd, J=2.3, 10.1, 14.2 Hz), 2.89 (1H, m), 2.98 (1H, dd, J=4.6, 14.2 Hz), 3.45 (2H, d, J=12.4 Hz), 4.04 (1H, m), 4.10 (1H, dd, J=2.8, 7.2 Hz), 4.43 (1H, dd, J=4.2, 6.6 Hz), 4.60 (1H, m), 6.64 (2H, d, J=8.0 Hz), 6.65 (2H, d, J=8.0 Hz), 6.96~7.08 (5H, m), 7.21 (4H, d, J=8.0 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 18.6, 19.7, 32.2, 35.4, 37.8, 43.6, 56.1, 56.7, 60.3, 98.7, 116.2, 116.3, 127.9, 129.1, 129.6, 130.1, 130.5, 131.3, 131.4, 136.6, 156.8, 157.3, 173.1, 173.6, 174.0.

ヘプタノイル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-105)

TP-105 はチロペプチン A と同様な方法により合成した。すなわち化合物 **9** を用い、イソ酪酸の代わりに *n*-ヘプタン酸と縮合し、ヘプタノイル- (*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (*ジ-O*-ベンジル) -L-チロシノールを合成した。このベンジル基を脱保護の後、一級水酸基を酸化しアルデヒド基へと導き、ヘプタノイル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-105) を合成した。

MP 135~142°C. $[\alpha]_D^{25} -32.6^\circ$ (*c* 0.38, MeOH). Rf 0.32 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 540 (M+H)⁺, 538 (M-H). HRFAB-MS (*m/z*) 540.3080 (M+H)⁺; calcd for C₃₀H₄₂O₆N₃, 540.3074. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2960, 1730, 1640, 1540, 1515, 1230, 825. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.86 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.87 (3H, t, J=6.8 Hz), 0.88 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.10~1.30 (6H, m), 1.45 (2H, m), 1.95 (1H, m), 2.12 (2H, t, J=7.4 Hz), 2.62 (1H, m), 2.72 (1H, m), 2.89 (1H, m), 2.98 (1H, dd, J=4.4, 14.0 Hz), 4.04 (1H, m), 4.12 (1H, m), 4.43 (1H, dd, J=4.0, 6.8 Hz), 4.58 (1H, m), 6.60~6.70 (4H, m), 6.99~7.08 (4H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 14.4, 18.6, 19.7, 23.6, 27.0, 29.8, 32.2, 32.7, 35.3, 36.9, 37.8, 56.0, 56.6, 60.2, 98.7, 116.2, 129.3, 130.4, 131.3, 131.4, 156.8, 157.2, 173.1, 173.9, 176.3.

N,N-ジメチルグリシル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-111)

TP-111 はチロペプチン A と同様な方法により合成した。すなわち化合物 **9** を用い、イソ酪酸の代わりに *N,N*-ジメチルグリシンと縮合し、*N,N*-ジメチルグリシル-(*O*-ベンジル)-L-チロシル-L-バリル-(ジ-*O*-ベンジル)-L-チロシノールを合成した。このベンジル基を脱保護の後、一級水酸基を酸化しアルデヒド基へと導き、*N,N*-ジメチルグリシル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-111) を合成した。

MP 104~108°C. $[\alpha]_D^{24} -18.2^\circ$ (*c* 0.55, MeOH). Rf 0.1 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 513 (M+H)⁺, 511 (M-H). HRFAB-MS (*m/z*) 513.2712 (M+H)⁺; calcd for C₂₇H₃₇O₆N₄, 513.2713. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3290, 2960, 1720, 1640, 1550, 1520, 1240, 830. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.64 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.88 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.99 (1H, m), 2.20 (6H, s), 2.62 (1H, m), 2.78 (1H, dd, J=9.0, 14.0 Hz), 2.94 (1H, mdd, J=4.0, 15.0 Hz), 3.02 (1H, d, J=14.0 Hz), 3.47 (1H, d, J=5.6 Hz), 4.05 (1H, m), 4.12 (1H, d, J=7.2 Hz), 4.48 (1H, dd, J=3.6, 5.6 Hz), 4.62 (1H, m), 6.64~6.72 (4H, m), 7.00~7.08 (4H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 18.7, 19.7, 32.2, 34.8, 37.0, 38.1, 45.8, 55.6, 56.6, 60.1, 98.7, 116.1, 116.2, 128.8, 130.4, 131.1, 131.2, 156.8, 157.3, 172.0, 173.0, 173.5.

ナフチル基を有するチロペプチン A 類縁体の合成

(*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル)-L-チロシル-L-バリル-(ジ-*O*-アセチル)-L-チロシノール (**14**)

化合物 **14** はチロペプチン A 合成の中間体である (*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル)-L-チロ

シル-L-バリル- (ジ-O-ベンジル) -L-チロシノールと同様な方法により合成した。すなわち、(*N-tert*-ブトキシカルボニル) -L-チロシノールをピリジン中無水酢酸で処理し、(*N-tert*-ブトキシカルボニル-ジ-O-アセチル) -L-チロシノールを得た。これをトリフルオロ酢酸で処理し、次に *N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩および 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール存在下で (*N-t*-ブトキシカルボニル) -L-バリンと縮合し、ジペプチドへ得た。さらに *tert*-ブトキシカルボニル基を除去後、同様に (*N-t*-ブトキシカルボニル-O-ベンジル) -L-チロシンと縮合し、(*N-tert*-ブトキシカルボニル-O-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (ジ-O-アセチル) -L-チロシノール (**14**) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.76 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.85 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.41 (9H, s), 2.07 (3H, s), 2.16 (1H, m), 2.26 (3H, s), 2.78 (2H, m), 3.03 (2H, m), 4.04 (2H, d, J=5.2 Hz), 4.14 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.42 (1H, m), 4.93 (1H, d, J=6.4 Hz), 5.02 (2H, s), 6.41 (1H, br), 6.48 (1H, d, J=8.8 Hz), 6.91 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.99 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.11 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.18 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.30~7.45 (5H, m). APCI-MS *m/z* 704 (M+H)⁺.

(*N-tert*-ブトキシカルボニル) -L-チロシル-L-バリル- (ジ-O-アセチル) -L-チロシノール (**15**)

化合物 **14**、2.3 g (3.3 mmol) をメタノール 30 ml および酢酸エチル 10ml に溶解し、10%パラジウム炭素触媒 230 mg を加え、水素雰囲気下、室温で 18 時間攪拌した。触媒をセライトろ過により除去した後、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒クロロホルム-メタノール、5 : 1) で精製し、(*N-t*-ブトキシカルボニル) -L-チロシル-L-バリル- (ジ-O-アセチル) -L-チロシノール (**15**) 927 mg を無色粉体として得た。収率 97%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD) δ 0.89 (3H, d, J=7.2 Hz), 0.93 (3H, d, J=7.2 Hz), 1.39 (9H, s), 2.04 (1H, m), 2.06 (3H, s), 2.25 (3H, s), 2.70~2.85 (3H, m), 2.99 (1H, dd, 5.4, 13.7 Hz), 3.97 (1H, dd, J=7.3, 11.0 Hz), 4.09 (2H, dd, 8.2, 14.7 Hz), 4.24 (1H, m), 4.37 (1H, m), 6.74 (2H, d, J=8.2 Hz), 7.01 (2H, d, J=8.2 Hz), 7.04 (2H, d, J=8.2 Hz), 7.23 (2H, d, J=8.2 Hz). APCI-MS *m/z* 614 (M+H)⁺.

(*N-tert*-ブトキシカルボニル-O-アセチル) -L-チロシル-L-バリル- (ジ-O-アセチル) -L-チロシノール (**16**)

化合物 **15**、600 mg (0.98 mmol) をピリジン 5 ml に溶解し、無水酢酸 2.5 ml (26.6 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。溶媒をトルエン共沸により減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマ

トグラフィー（展開溶媒クロロホルム）で精製し、(*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-アセチル)-*L*-チロシル-*L*-バリル-（ジ-*O*-アセチル)-*L*-チロシノール (**16**) 542 mg を無色粉体として得た。収率 83%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.86 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 1.41 (9H, s), 2.07 (3H, m), 2.15 (1H, m), 2.26 (6H, s), 2.76 (1H, dd, $J=8.0, 13.6$ Hz), 2.84 (1H, dd, $J=6.4, 13.6$ Hz), 3.09 (2H, m), 4.05 (2H, d, $J=5.2$ Hz), 4.14 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 4.29 (1H, m), 4.41 (1H, m), 4.98 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 6.42 (1H, br), 6.56 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.00 (2H, d, $J=8.2$ Hz), 7.02 (2H, d, $J=8.2$ Hz), 7.19 (2H, d, $J=8.2$ Hz), 7.20 (2H, d, $J=8.2$ Hz). APCI-MS m/z 656 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

1-ナフチルアセチル-（*O*-アセチル)-*L*-チロシル-*L*-バリル-（ジ-*O*-アセチル)-*L*-チロシノール (**17**)

化合物 **16**、522 mg (0.8 mmol) を塩化メチレン 4 ml に溶解し、氷冷下でトリフルオロ酢酸 4 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒をトルエン供沸により減圧下で留去し、残渣を塩化メチレン 14 ml に溶解し、これにトリエチルアミン 242 mg (2.4 mmol)、1-ナフチル酢酸 447 mg、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール 164 mg (1.2 mmol)、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・塩酸塩 201 mg (1.1 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。この反応液を酢酸エチルで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、4%クエン酸水溶液および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒クロロホルム）で精製し、1-ナフチルアセチル-（*O*-アセチル)-*L*-チロシル-*L*-バリル-（ジ-*O*-アセチル)-*L*-チロシノール (**17**) 300 mg を無色固体として得た。収率 75%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.74 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.81 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 1.93 (1H, m), 2.05 (3H, m), 2.24 (3H, s), 2.28 (3H, s), 2.75~2.80 (3H, m), 2.88 (1H, dd, $J=5.4, 14.2$ Hz), 3.95 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 3.98 (2H, s), 4.07 (1H, dd, $J=4.4, 11.2$ Hz), 4.37 (1H, m), 4.59 (1H, dd, $J=7.9, 13.2$ Hz), 6.75 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 6.78 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 6.97 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.19 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 7.32 (1H, d, $J=7.2$), 7.43 (1H, d, $J=7.6$ Hz), 7.49 (2H, m), 7.81~7.90 (3H, m). APCI-MS m/z 724 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

1-ナフチルアセチル-*L*-チロシル-*L*-バリル-*L*-チロシノール (**19**)

化合物 **17**、293 mg (0.4 mmol) をメタノール 15 ml に溶解し、炭酸カリウム 300 mg を加え、室温で 2 日間攪拌した。溶媒を減圧下で留去した後、残渣を酢酸エチルで希釈した。これを 5%炭酸水素ナトリウム水溶液、4%クエン酸水溶液および水で順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒クロロホルム-メタノール、25 : 1）で精製し、1-ナフチルアセチル-L-チロシル-L-バリル-L-チロシノール (**19**) 184 mg を無色固体として得た。収率 55%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 0.78 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.83 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 1.93 (1H, m), 2.61 (1H, dd, $J=7.6, 14.0$ Hz), 2.76 (2H, m), 2.95 (1H, dd, $J=5.0, 14.0$ Hz), 3.45 (2H, d, $J=5.2$ Hz), 3.97 (2H, s), 4.08 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 4.62 (1H, dd, $J=4.8, 9.2$ Hz), 6.59 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 6.66 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 6.89 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.01 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.25 (1H, d, $J=6.4$ Hz), 7.38 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 7.45 (2H, m), 7.75~7.88 (3H, m). APCI-MS m/z 598 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

1-ナフチルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-104)

化合物 **19**、76 mg (0.13 mmol) を *N,N*-ジメチルホルムアミド 0.8 ml に溶解し、トリエチルアミン 51 mg (0.51 mmol) を加え氷冷下で 5 分間攪拌した。さらにあらかじめジメチルスルホキシド 0.8 ml に溶解しておいた三酸化硫黄・ピリジン複合体 80.8 mg (0.51 mmol) を氷冷下でゆっくりと滴下した後、室温で 3 時間攪拌した。この反応液を酢酸エチルで希釈し、4 %クエン酸水溶液、水、5 %炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水にて順次洗浄の後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒クロロホルム-メタノール、25 : 1）で精製し、1-ナフチルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-104) 74 mg を無色粉体として得た。収率 55%。

MP 154~156°C. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -18.2° (c 0.33, MeOH). Rf 0.45 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=10/1$). APCI-MS m/z 596 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 594 ($\text{M}-\text{H}$). HRFAB-MS (m/z) 596.2764 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_3$, 596.2761. IR (KBr) $\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$ 3410, 3290, 1720, 1640, 1540, 1520, 1230, 780. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 0.74 (3H, dd, $J=3.2, 6.6\text{Hz}$), 0.81 (3H, dd, $J=3.2, 6.6\text{Hz}$), 1.94 (1H, m), 2.63~2.79 (2H, m), 2.84~2.91 (2H, m), 3.97 (2H, s), 4.03 (1H, dd, $J=6.8, 9.2\text{Hz}$), 4.13 (1H, m), 4.42 (1H, d, $J=2.4\text{Hz}$), 4.55 (1H, m), 6.56 (2H, t, $J=8.4\text{Hz}$), 6.71 (4H, t, $J=8.4\text{Hz}$),

7.02 (2H, dd, J=3.2, 8.4Hz), 7.27 (1H, d, J=8.0Hz), 7.41 (1H, t, J=8.0Hz), 7.49 (2H, m), 7.81 (2H, d, J=8.0Hz), 7.87 (1H, d, J=8.0Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 18.0, 19.2, 31.1, 34.8, 36.9, 40.9, 55.0, 55.7, 59.6, 97.7, 115.6, 115.7, 123.9, 126.0, 126.4, 127.1, 127.4, 128.5, 128.6, 129.2, 129.3, 130.4, 130.6, 131.1, 132.5, 134.4, 155.8, 156.1, 172.0, 172.6, 172.7.

2-ナフチルアセチル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール (TP-103)

TP-103 は途中 1-ナフチル酢酸の代わりに 2-ナフチル酢酸を用いて TP-104 と同様な方法により **16** から合成した。収率 **16** から 45%。

MP 176~181°C. $[\alpha]_D^{26} -38.8^\circ$ (c 0.4, MeOH). Rf 0.50 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 596 (M+H)⁺, 594 (M-H)⁻. HRFAB-MS (*m/z*) found, 596.2756 (M+H)⁺; calcd for C₃₅H₃₈O₆N₃, 596.2761. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2965, 1725, 1640, 1540, 1515, 1230, 825. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.77 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.82 (3H, dd, J=2.4, 6.8 Hz), 1.88~1.95 (1H, m), 2.62 (1H, m), 2.76 (1H, ddd, J=2.4, 10.0, 14.0 Hz), 2.88 (1H, m), 2.98 (1H, dd, J=4.4, 14.0 Hz), 3.63 (2H, d, J=9.4 Hz), 4.05 (1H, m), 4.10 (1H, dd, J=2.6, 7.4 Hz), 4.43 (1H, dd, J=4.2, 6.2 Hz), 4.62 (1H, m), 6.60 (2H, dd, J=2.2, 8.6 Hz), 6.65 (2H, d, J=8.4 Hz), 6.98 (2H, d, J=3.2, 8.6 Hz), 7.01 (2H, dd, J=1.4, 8.4 Hz), 7.18 (1H, d, J=8.4 Hz), 7.41~7.46 (2H, m), 7.59 (1H, s), 7.72 (1H, d, J=8.4 Hz), 7.74~7.81 (2H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 18.6, 19.7, 32.2, 34.9, 37.7, 43.8, 56.2, 56.7, 60.3, 98.7, 116.2, 116.3, 126.8, 127.1, 128.3, 128.6, 128.8, 129.1, 129.2, 130.3, 130.5, 131.3, 131.4, 133.9, 134.1, 135.0, 156.8, 157.3, 173.1, 173.6, 173.9.

チロペプチン A のメチル化類縁体の合成

イソバレルル- (*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (ジ-*O*-アセチル) -L-チロシノール (**21**)

化合物 **21** は **17** と同様な合成方法により **14** から合成した。収率は **14** から 88%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.75 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.85 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.86 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.87 (3H, d, J=6.8 Hz), 2.02 (2H, d, J=2.0 Hz), 2.07 (3H, s), 2.13 (2H, m), 2.25 (3H, s), 2.77 (1H, dd, J=7.2, 14.0 Hz), 2.84 (1H, dd, J=6.8, 14.0 Hz), 2.97 (1H, dd, J=7.8, 14.2 Hz), 3.05 (1H, dd, J=6.2, 14.2 Hz), 4.06 (2H, d, J=5.2 Hz), 4.12 (1H, dd, J=6.4, 8.4 Hz), 4.38 (1H, m), 4.60 (1H, dd, J=7.2, 14.0 Hz), 5.00 (2H, s), 6.01 (1H, d, J=7.2

Hz), 6.34 (1H, d, J=8.4 Hz), 6.60 (1H, d, J=8.8 Hz), 6.90 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.98 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.11 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.19 (2H, d, J=8.8), 7.30~7.40 (5H, m). APCI-MS m/z 688 (M+H)⁺.

イソバレリル- (*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (*O*-メチル) -L-チロシノール (**22**) .

化合物 **21** を **19** と同様な方法により脱アセチル化した。脱アセチル化した **21** (172 mg, 0.28 mmol) をメタノール 6 ml に溶解した。塩化メチレン 2 ml、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン 14.8 mg (0.11 mmol) およびトリメチルシリルジアゾメタン 300 mg (2.63 mmol) を順次加え、室温で 24 時間攪拌した。溶媒を減圧下で留去し、イソバレリル- (*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (*O*-メチル) -L-チロシノール (**22**) 294 mg を無色粉体として得た。収率 100%。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.81 (3H, d, J=6.4 Hz), 0.85 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.86 (3H, d, J=6.4 Hz), 0.89 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.97~2.02 (4H, m), 2.71 (1H, dd, J=7.2, 14.0 Hz), 2.82 (2H, m), 3.03 (1H, dd, J=5.8, 14.2 Hz), 3.49 (2H, m), 3.72 (3H, s), 4.05 (1H, m), 4.07 (1H, d, J=7.2 Hz), 4.61 (1H, dd, J=6.0, 8.8 Hz), 5.00 (2H, s), 6.79 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.88 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.12 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.14 (2H, d, J=8.8), 7.30~7.40 (5H, m). APCI-MS m/z 618 (M+H)⁺, 616 (M+H)⁻.

イソバレリル-L-チロシル-L-バリル-*O*-メチル-DL-チロシノール (TP-106)

TP-106 は **15** および TP-104 と同様な方法により **22** から合成した。収率は **22** から 38%。

MP 145~147°C. $[\alpha]_D^{24}$ -32.1° (c 0.43, MeOH). Rf 0.50 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS m/z 526 (M+H)⁺, 524 (M-H)⁻. HRFAB-MS (m/z) 526.2917 (M+H)⁺; calcd for C₂₉H₄₀O₆N₃, 526.2917. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2960, 1735, 1635, 1545, 1515, 1245, 1035, 830. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.75 (3H, d, J=6.4 Hz), 0.81 (3H, d, J=6.4 Hz), 0.86 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.89 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.90 (1H, m), 1.98 (1H, m), 1.99 (2H, d, J=6.8 Hz), 2.61~2.75 (2H, m), 2.89~3.05 (2H, m), 3.65 (3H, s), 4.06~4.14 (2H, m), 4.44 (1H, dd, J=4.2, 7.0 Hz), 4.59 (1H, m), 6.67 (2H, m), 6.77 (2H, d, J=8.2 Hz), 7.04 (2H, m), 7.11 (2H, d, J=8.2 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 17.7, 18.1, 22.3, 22.4, 26.2, 30.7, 34.3, 37.1, 45.6, 54.5, 55.3, 55.6, 59.2, 96.9, 114.0, 115.6, 127.4, 129.8, 130.0, 130.2, 155.9, 158.3, 171.7, 172.8, 173.6.

(*N*-tert-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル) -L-チロシル-L-バリル- (*O*-メチル) -L-チロシノール (**23**)

化合物 **23** は **19** および **22** と同様な方法により **14** から合成した。収率は **14** から 82%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.75 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.85 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.43 (9H, s), 2.23 (1H, m), 2.73 (1H, dd, J=6.8, 13.7 Hz), 2.81 (1H, dd, J=8.0, 13.7 Hz), 2.98 (1H, dd, J=7.0, 14.2 Hz), 3.06 (1H, dd, J=5.9, 14.2 Hz), 3.50 (1H, m), 3.66 (1H, dd, 2.5, 11.2 Hz), 3.76 (3H, s), 4.13 (2H, dd, 4.9, 7.3 Hz), 4.23 (1H, dd, J=6.1, 12.0 Hz), 4.93 (1H, d, J=4.9 Hz), 5.03 (2H, s), 6.35 (1H, br), 6.55 (1H, br), 6.80 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.93 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.11 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.12 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.30~7.40 (5H, m). APCI-MS *m/z* 634 (M+H)⁺.

(*N-tert*-プトキシカルボニル-*O*-アセチル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (*O*-アセチル-*O*-メチル) -*L*-チロシノール (**24**)

化合物 **24** は **15** および **16** と同様な方法により **23** から合成した。収率は **23** から 92%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.79 (3H, d, J=7.2 Hz), 0.86 (3H, d, J=7.2 Hz), 1.42 (9H, s), 2.07 (3H, s), 2.14 (1H, m), 2.26 (3H, s), 2.70 (1H, dd, J=8.0, 14.0 Hz), 2.80 (1H, dd, J=6.0, 14.0 Hz), 3.08 (2H, m), 3.77 (3H, s), 4.03 (2H, d, J=5.2 Hz), 4.13 (1H, m), 4.28~4.41 (2H, m), 4.92 (1H, d, J=6.4 Hz), 6.25 (1H, br), 6.52 (1H, d, J=8.4 Hz), 6.82 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.02 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.09 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.20 (2H, d, J=8.6 Hz). APCI-MS *m/z* 628 (M+H)⁺.

1-ナフトルアセチル-*L*-チロシル-*L*-バリル-*O*-メチル-DL-チロシナール (TP-108)

TP-108 は **17**、**19** および TP-104 と同様な方法により **24** から合成した。収率は **24** から 64%。

MP 208~210°C. [α]_D²⁶ -27.4° (*c* 0.19, MeOH). R_f 0.47 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 610 (M+H)⁺, 608 (M-H)⁻. HRFAB-MS (*m/z*) 610.2930 (M+H)⁺; calcd. for C₃₆H₄₀O₆N₃, 610.2917. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2960, 1730, 1640, 1540, 1510, 1250, 780. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0.75 (3H, dd, J=2.4, 6.8 Hz), 0.82 (3H, dd, J=2.4, 6.8 Hz), 1.94 (1H, m), 2.64~2.72 (2H, m), 2.81~2.97 (2H, m), 3.66 (3H, d, J=3.2 Hz), 3.96 (2H, s), 4.03 (1H, t, J=7.0 Hz), 4.12 (1H, m), 4.44 (1H, dd, J=2.4, 4.0 Hz), 4.56 (1H, m), 6.57 (2H, dd, J=5.6, 8.6 Hz), 6.76 (4H, m), 7.10 (2H, dd, J=2.2, 8.6 Hz), 7.27 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.40 (1H, t, J=8.0 Hz), 7.48 (2H, m), 7.79 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.86 (1H, d, J=8.8 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 18.2, 19.3, 31.2, 34.8, 37.2, 41.2, 55.3, 55.5, 55.8, 59.8, 98.0, 114.4, 116.0, 124.1, 126.1, 126.5, 127.2, 127.7, 128.7, 128.8, 129.3,

130.7, 130.8, 130.9, 131.4, 132.8, 134.7, 156.4, 158.9, 172.3, 172.5, 172.8.

(*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O*-メチル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (*ジ-O*-アセチル) -*L*-チロシノール (**25**)

化合物 **25** は **22** と同様な方法により **15** から合成した。収率は **15** から 40%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD) δ 0.76 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.85 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.41 (9H, s), 2.07 (3H, m), 2.15 (1H, m), 2.27 (3H, s), 2.73~2.85 (2H, m), 3.03 (2H, t, J=5.8 Hz), 3.76 (3H, s), 4.02 (2H, d, J=4.4 Hz), 4.13 (2H, dd, 6.6, 7.4 Hz), 4.24 (1H, dd, J=7.4, 14.0 Hz), 4.41 (1H, m), 4.90 (1H, br), 6.36 (1H, br), 6.44 (1H, d, J=8.4 Hz), 6.83 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.00 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.11 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.19 (2H, d, J=8.6 Hz).
APCI-MS *m/z* 628 (M+H)⁺.

1-ナフチルアセチル- (*O*-メチル) -*L*-チロシル-*L*-バリル-*DL*-チロシナール (TP-109)

TP-109 は TP-108 と同様な方法により、**25** を 1-ナフチル酢酸と縮合し、脱アセチル化および酸化を順次行うことにより TP-109 を合成した。収率は **25** から 14%。

MP 150~153°C. [α]_D²³ -18.2° (*c* 0.17, MeOH). R_f 0.45 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 610 (M+H)⁺, 608 (M-H)⁻. HRFAB-MS (*m/z*) 610.2901 (M+H)⁺. calcd. for C₃₆H₄₀O₆N₃, 610.2917. IR (KBr) ν_{max}cm⁻¹ 3270, 2960, 1740, 1640, 1540, 1510, 1250, 780. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0.75 (3H, dd, J=4.0, 6.8 Hz), 0.81 (3H, dd, J=4.0, 6.8 Hz), 1.95 (1H, m), 2.60~2.92 (4H, m), 3.73 (3H, d, J=4.4 Hz), 3.97 (2H, s), 4.02 (1H, m), 4.03~4.08 (1H, m), 4.41 (1H, d, J=4.0 Hz), 4.59 (1H, m), 6.56 (2H, dd, J=8.8, 10.8 Hz), 6.72 (4H, m), 7.03 (2H, dd, J=3.2, 8.8 Hz), 7.30 (1H, d, J=8.8 Hz), 7.41 (1H, t, J=8.8 Hz), 7.45~7.53 (2H, m), 7.81 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.88 (1H, d, J=8.8 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 18.0, 19.1, 30.9, 34.8, 36.8, 41.0, 54.7, 55.3, 55.6, 59.3, 97.6, 114.1, 115.5, 123.8, 125.9, 126.3, 127.0, 128.2, 128.5, 128.6, 128.9, 129.0, 130.2, 130.4, 130.8, 132.3, 134.3, 155.6, 158.6, 171.8, 172.3, 172.4.

イソバレリル- (*O*-メチル) -*L*-チロシル-*L*-バリル- (*O*-メチル) -*DL*-チロシナール (TP-107)

TP-107 は **22** および TP-104 と同様な方法により **1** から合成した。収率 27%。

MP 158~161°C. [α]_D²⁴ -28.0° (*c* 0.25, MeOH). R_f 0.41 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 540 (M+H)⁺,

538 (M-H)⁻. HRFAB-MS (*m/z*) 540.3109 (M+H)⁺; calcd for C₃₀H₄₂O₆N₃, 540.3074. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2960, 1730, 1640, 1550, 1510, 1250, 1040. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.79 (3H, m), 0.86 (3H, m), 0.87 (3H, m), 0.88 (3H, d, J=6.8 Hz), 2.03 (2H, br), 2.04 (1H, m), 2.13 (1H, m), 2.78 (1H, m), 2.97~3.06 (3H, m), 3.76 (6H, s), 4.21 (1H, m), 4.62 (1H, m), 4.64 (1H, m), 5.99 (1H, m), 6.44 (1H, m), 6.78~6.86 (4H, m), 7.06~7.18 (4H, m). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 17.5, 19.1, 22.3, 22.4, 26.1, 30.3, 34.2, 36.8, 45.8, 54.6, 55.3, 55.4, 58.6, 59.8, 114.2, 114.3, 127.5, 128.2, 130.2, 130.3, 158.7, 158.8, 170.7, 171.3, 173.0, 198.9.

1-ナフチルアセチル- (*O*-メチル) -L-チロシル-L-バリル- (*O*-メチル) -DL-チロシナール (TP-110)

TP-110 は **22** および TP-104 と同様な方法により、**19** から合成した。収率 52%。

MP 192~194°C. $[\alpha]_D^{28}$ -12.0° (*c* 0.25, DMF). Rf 0.62 (CHCl₃/MeOH=10/1). APCI-MS *m/z* 624 (M+H)⁺, 622 (M-H)⁻. HRFAB-MS (*m/z*) 624.3065 (M+H)⁺; calcd for C₃₇H₄₂O₆N₃, 624.3074. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3280, 2960, 1730, 1640, 1540, 1510, 1250, 1040, 780. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 0.76 (3H, dd, J=4.8, 6.0Hz), 0.82 (3H, dd, J=4.8, 6.0Hz), 1.95 (1H, m), 2.66~2.73 (2H, m), 2.80~2.96 (2H, m), 3.68 (3H, d, J=5.2Hz), 3.74 (3H, d, J=4.0Hz), 3.96 (2H, s), 4.00 (1H, t, J=7.6Hz), 4.03~4.18 (1H, m), 4.42 (1H, d, J=4.0Hz), 4.58 (1H, m), 6.58 (2H, t, J=8.8Hz), 6.76 (4H, dd, J=2.0, 8.8Hz), 7.20 (2H, dd, J=3.2, 8.8Hz), 7.30 (1H, d, J=8.4Hz), 7.41 (1H, t, J=8.4Hz), 7.45~7.52 (2H, m), 7.81 (2H, d, J=8.4Hz), 7.88 (1H, d, J=8.4Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 18.1, 19.2, 30.9, 34.7, 36.9, 41.2, 54.7, 55.3, 55.4, 55.5, 59.6, 97.6, 114.1, 114.2, 123.9, 125.9, 126.3, 127.0, 128.4, 128.5, 128.6, 129.1, 130.3, 130.4, 130.5, 131.0, 132.4, 134.4, 158.5, 158.7, 171.9, 172.4, 172.5.

4. プロテアソーム阻害活性の測定

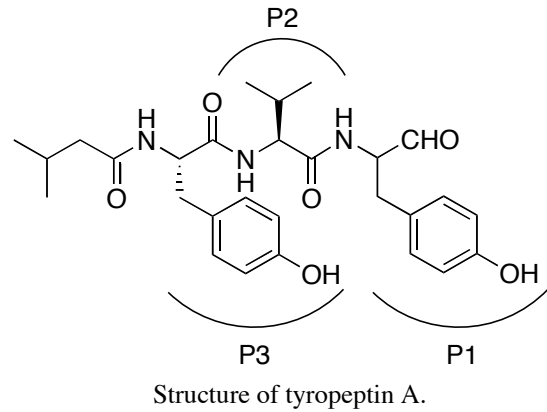
プロテアソームの活性は第 1 章に示した方法で測定した。ただし 20S プロテアソームはヒト白血病 HL-60 細胞より第 1 章に示した方法で粗精製したものをを用いた。

第2節 結果

1. チロペプチン A とプロテアソームとの三次元複合体構造モデルの構築

プロテアソームのキモトリプシン様活性の活性中心アミノ酸は、 $\beta 5$ サブユニットの1番目のスレオニンである。しかし酵母 20S プロテアソームの結晶構造の解析により、キモトリプシン様活性の活性部位は、 $\beta 5$ サブユニットのみならず $\beta 6$ サブユニットとの2つのサブユニットの会合により形成されていることが分かった [35]。おそらくホ乳類の 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性も酵母と同様に、 $\beta 5$ サブユニットと $\beta 6$ サブユニットの会合により形成されと考えられる。そこでチロペプチン A がホ乳類の 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性部位に結合した三次元構造モデルを構築するために、ウシの 20S プロテアソームの全体構造から $\beta 5$ サブユニットと $\beta 6$ サブユニットに関する情報のみを選び出し複合体モデルを構築した。プロテアソームの $\beta 5/\beta 6$ 部位に結合したチロペプチン A の複合体モデルの1つの可能性を Fig. 5-3 に示す。Fig. 5-3A は、チロペプチン A の $\beta 5/\beta 6$ 部位への推定結合様式を示す。この分子モデリングは、まずチロペプチン A の C 末端アルデヒド基が、 $\beta 5$ サブユニットにあるキモトリプシン様活性の活性中心アミノ酸である N 末端1番のスレオニンの水酸基とヘミアセタールを形成していると考えられる。さらに $\beta 5$ サブユニットの21番スレオニン、47番グリシン、49番アラニンおよび $\beta 6$ サブユニットの125番アスパラギン酸は基質もしくはペプチド阻害物質の主鎖であるペプチド結合を認識すると考えられている。そこでチロペプチン A は1番スレオニンとヘミアセタールを形成し、且つ21番スレオニン、47番グリシン、49番アラニン、125番アスパラギン酸の4アミノ酸と β シート様の5つの水素結合を形成すると仮定し、この条件を十分に満たすチロペプチン A の最適なコンフォメーションを検索した。その結果、チロペプチン A が $\beta 5/\beta 6$ 部位に無理なく収まるモデルを得ることができた (Fig. 5-3B)。Fig. 5-3B は結合モデルの全体概略図を示す。チロペプチン A は $\beta 5$ サブユニットと $\beta 6$ サブユニットの間に収まり、両サブユニットに埋もれる形で存在する。そしてこの結合モデルにおいて4つの CH/ π 相互作用が確認できた (Fig. 5-3A)。CH/ π 相互作用というのは、CH (炭素に結合した水素) と π 電子系の間にはたらく水素結合様の弱い引力であり、近年この CH/ π 相互作用が、蛋白受容体とそのリガンドの複合体形成や、蛋白質の三次元構造形成のための折り畳みにおいて重要な働きを成している事が明らかとなってきた[99]。チロペプチン A と $\beta 5/\beta 6$ 部位の複合体にお

いて、 $\beta 5$ サブユニットの 31 番バリン、33 番リジン、49 番アラニンの側鎖の CH 水素は、共にチロペプチン A の P1 位チロシナール残基の π 電子系との間に CH/ π 相互作用を示した。また $\beta 5$ サブユニットの 20 番アラニンと 49 番アラニンの α 位の CH 水素は、チロペプチン A の P3 位チロシン残基の π 電子系との間に CH/ π 相互作用を示した。ところがチロペプチン A



の *N* 末端のイソバレリル基は $\beta 5/\beta 6$ 部位との間にいかなる水素結合や CH/ π 相互作用を観察できなかった。しかしながらこの複合体モデルはチロペプチン A の *N* 末端イソバレリル基の近傍に大きな空白領域（ポケット）の存在を示唆し、この空間のごく一部をチロペプチン A のイソバレリル基が領有していることが分かった (Fig. 5-3C)。そこでチロペプチン A の *N* 末端構造の一部に、このポケットの形状に相補し且つ分子間相互作用を示す部分構造を取り入れる事により、キモトリプシン様活性に対する阻害活性を増強できるのではないかと考え、*N* 末端のイソバレリル基の代わりに種々の置換基をデザインし導入した。

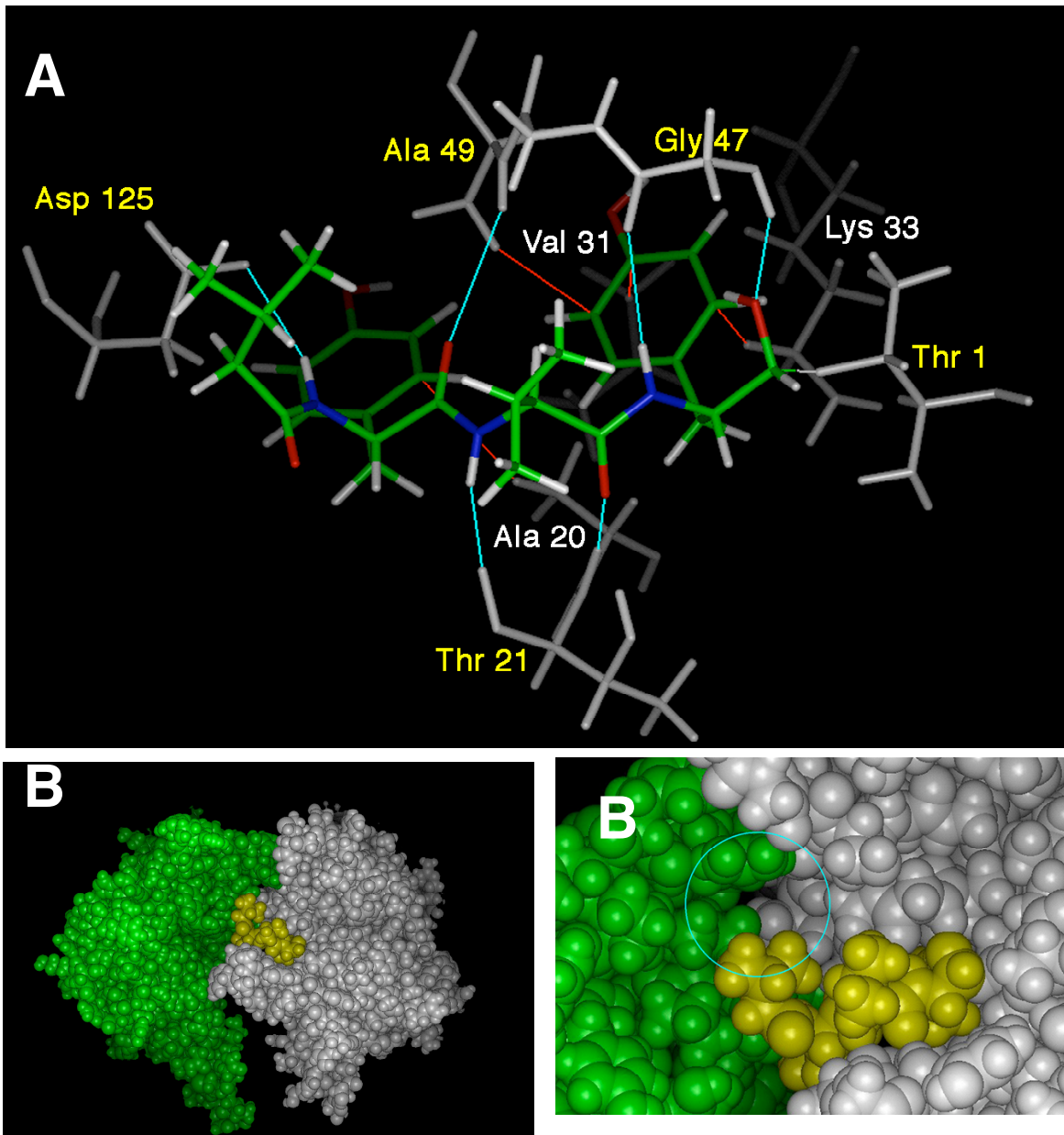
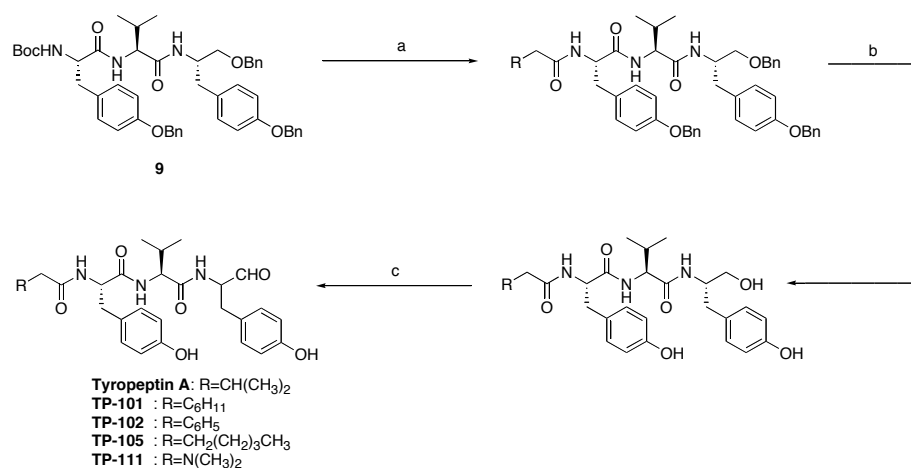


Fig. 5-3. Binding model of Tyropeptin A bound to the site responsible for the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome. (A) Expected binding mode of tyropeptin A to $\beta 5/\beta 6$ site. Tyropeptin A, \square yellow; Hydrogen bond, \square sky blue; CH/ π interaction, red; $\beta 5/\beta 6$ site, \square atom colors. (B) Overview of binding model of tyropeptin A bound to the $\beta 5/\beta 6$ site of the 20S proteasome. Subunit $\beta 5$, gray; Subunit $\beta 6$, magenta; Tyropeptin A, yellow. (C) Binding model of tyropeptin A in the $\beta 5/\beta 6$ site. Subunit $\beta 5$, gray; Subunit $\beta 6$, green; Tyropeptin A, yellow.

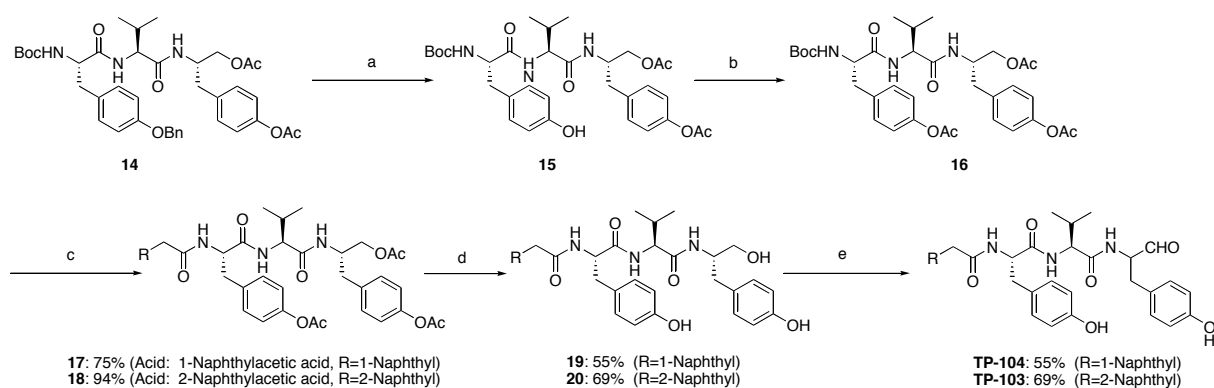
2. チロペプチン類縁体の合成

作成した複合体モデルに基づき、チロペプチン A の *N* 末端イソバレリル基を他に変換したチロペプチン A 類縁体を設計し、第 3 章のチロペプチン A の合成方法と同様の方法を用いて合成した。(Scheme 5-1)。すなわちチロペプチン A 合成の重要な中間体である (*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-*O*-ベンジル)-*L*-チロシル-*L*-バリン- (ジ-*O*-ベンジル)-*L*-チロシノール (**9**) の *tert*-ブトキシカルボニル基を脱離し、種々の酸 ($R\text{-CH}_2\text{COOH}$) と縮合した。得られた *N*-アシルトリペプチドはパラジウム炭素触媒を用いて水素添加によるベンジル基の脱保護の後、一級水酸基をアルデヒド基へ酸化することにより、*N* 末端部分を変換したチロペプチン A 類縁体 (TP-101、TP-102、TP-105 および TP-111) を合成した (Scheme 5-1A)。また Scheme 5-1A の方法で *N* 末端にナフチル酢酸を導入させた場合、次の水素添加の過程でナフタレン部分も還元されることが分かった。溶媒、触媒、温度、時間等の検討を行ったがやはりナフタレン部分の還元は回避できなかった。そこで Scheme 5-1B に示すように、水酸基の保護基としてベンジル基の代わりにアセチル基を用いてナフチル基を持った類縁体 (TP-103 および TP-104) を合成した。

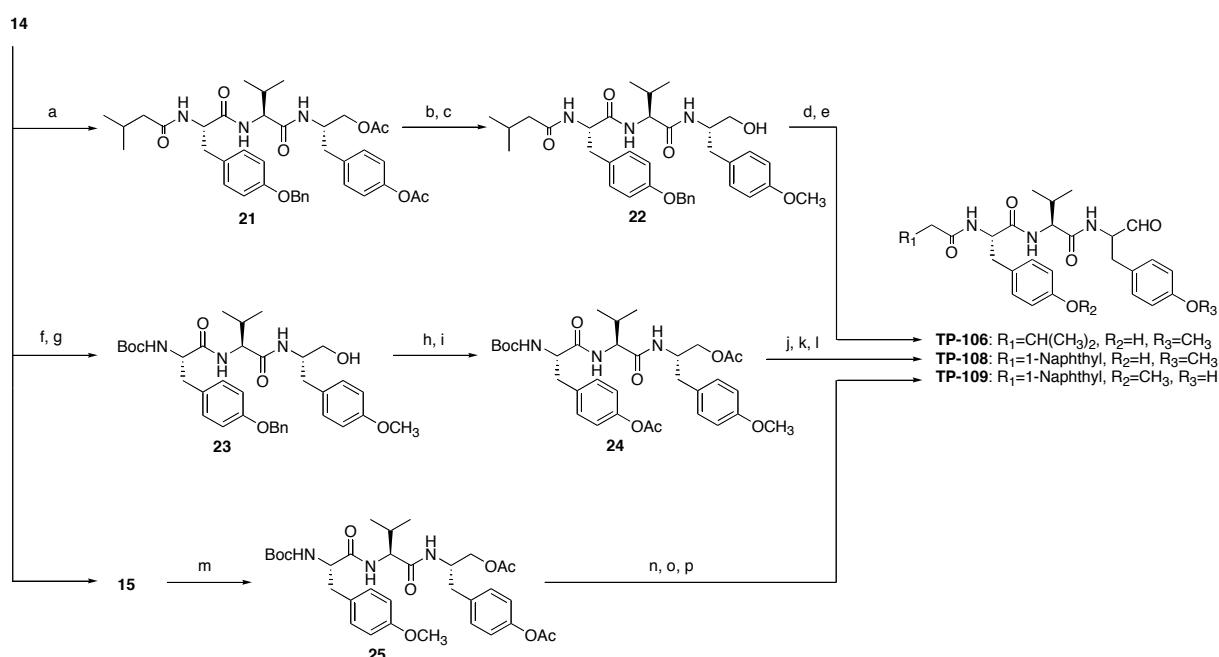
さらに構造活性相関におけるチロペプチン A および TP-104 のフェノール性水酸基の役割を調べるために、Schemes 5-2A および 5-2B に示した合成工程で、メチル化類縁体を合成した。



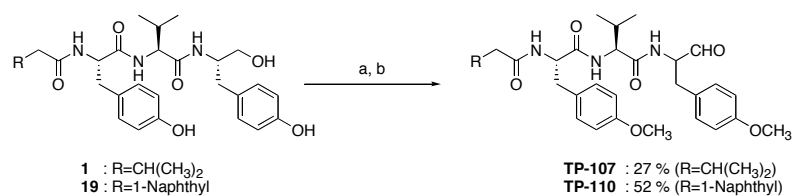
Scheme 5-1A. Synthesis of tyropeptin A and its derivatives. (a) i. TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h; ii. $R\text{-CH}_2\text{COOH}$, WSC-HCl, HOBT, TEA, DMF, rt, 18 h (b) H_2 , Pd/C, DMF, rt, 18 h. (c) $\text{SO}_3\text{-Pyridine}$, TEA, DMSO, rt, 1 h.



Scheme 5-1B. Synthesis of naphthyl derivatives of tyropeptin A. (a) H_2 , Pd/C, MeOH, EtOAc, rt, 18 h, 97 % (b) Ac_2O , Pyridine, rt, 18 h, 83 % (c) i. TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h; ii. Acid, WSC-HCl, HOBT, TEA, DMF, rt, 18 h (d) K_2CO_3 , MeOH, rt, 2 d (e) SO_3 -Pyridine, TEA, DMSO, rt, 3 h.



Scheme 5-2A. Synthesis of *O*-methyl derivatives of tyropeptin A. (a) i. TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h; ii. Isovaleric acid, WSC-HCl, HOBT, TEA, DMF, rt, 18 h, 88 % (b) K_2CO_3 , MeOH, rt, 18 h, quant. (c) $TMSCHN_2$, DIEA, $CHCl_3$, MeOH, rt, 24 h, quant. (d) H_2 , Pd/C, MeOH, rt, 3 d, 60 % (e) SO_3 -Pyridine, TEA, DMSO, rt, 3 h, 63 % (f) K_2CO_3 , MeOH, rt, 2 d, 85 % (g) $TMSCHN_2$, DIEA, $CHCl_3$, MeOH, rt, 3 d, 97 % (h) H_2 , Pd/C, MeOH, rt, 18 h (i) Ac_2O , Pyridine, rt, 18 h, 92 % from **23** (j) i. TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h; ii. 1-Naphthylacetic acid, WSC-HCl, HOBT, TEA, DMF, rt, 18 h, 92 % (k) K_2CO_3 , MeOH, rt, 18 h, 98 % (l) SO_3 -Pyridine, TEA, DMSO, rt, 3 h, 71 % (m) $TMSCHN_2$, DIEA, $CHCl_3$, MeOH, rt, 24 h, 40 % (n) i. TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h; ii. 1-Naphthylacetic acid, WSC-HCl, HOBT, TEA, DMF, rt, 18 h, 70 % (o) K_2CO_3 , MeOH, rt, 18 h, 45 % (p) SO_3 -Pyridine, TEA, DMSO, rt, 3 h, 43 %.



Scheme 5-2B. Synthesis of di-*O*-methyl derivatives of tyropeptin A. (a) $TMSCHN_2$, DIEA, MeOH, $CHCl_3$ (b) SO_3 -Pyridine, TEA, DMSO.

3. チロペプチン類縁体のプロテアソーム阻害活性

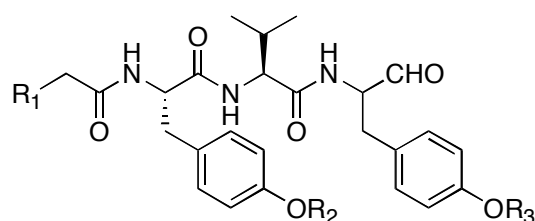
20S プロテアソームに対するチロペプチン A 類縁体の阻害活性を Table 5-1 に示す。チロペプチン A の N 末端のイソプロピルをシクロヘキシルに変換すると (TP-101)、チロペプチン A に比べてキモトリプシン様活性に対する阻害活性が 4 倍増強した。フェニルに芳香族化するとチロペプチン A に比べて 5 倍強くなった (TP-102)。さらに 2-ナフチル型にすると 10 倍向上した (TP-103)。ナフチルの置換様式は 2-ナフチル型よりも 1-ナフチル型の方が強い阻害活性を示すことが分かった (TP-104)。またナフチル型と同じ長さの炭素数のアルキル鎖を持った TP-105 は、TP-104 よりも阻害活性が弱いことが分かった。よって 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性に対して最も強い阻害活性を示した化合物は、1-ナフチル類縁体である TP-104 であり、チロペプチン A に比べて 20 倍強い阻害活性を示した。またそれは MG132 よりも強い阻害活性を示した。

TP-104 の阻害活性が向上した理由は、作業仮説としたプロテアソームのキモトリプシン様活性部位である $\beta 5/\beta 6$ 部位の空白領域 (ポケット) を、TP-104 の 1-ナフチル部分が占有し、且つその部分において新たに CH/ π 相互作用もしくは疎水結合が形成したことに起因するのではないかと考えた。この仮説を証明するために、TP-104 が $\beta 5/\beta 6$ 部位に結合した複合体モデルを構築した (Fig. 5-4)。Fig. 5-4A には、 $\beta 5/\beta 6$ 部位におけるチロペプチン A と TP-104 の三次元立体構造の比較を示した。明らかに左側に示したチロペプチン A の N 末端近傍のポケット (Fig. 5-4A, left) を、右に示した TP-104 の 1-ナフチル部分が充填していることが分かった (Fig. 5-4A, right)。すなわちこのポケットの形状に TP-104 のナフチル部分が高い相補性を示した。Fig. 5-4B には $\beta 5/\beta 6$ 部位に対する TP-104 の推定結合様式を示す。期待したように、ナフチル部分と $\beta 5/\beta 6$ 部位の間に新たに CH/ π 相互作用が観察された。 $\beta 5$ サブユニットの 50 番アラニンおよび $\beta 6$ サブユニットの 127 番バリンのそれぞれの側鎖の CH 水素が、TP-104 のナフチル部分と CH/ π 相互作用を示した。この新たな CH/ π 相互作用の形成により、TP-104 は $\beta 5/\beta 6$ 部位に高い親和性を示すようになったと推測される。以上により TP-104 はキモトリプシン様活性に強い阻害活性を示したと考えられる。

次ぎにチロペプチン A および TP-104 の水酸基の酵素阻害に対する役割を調べた。チロペプチン A の O-メチル化体 (TP-106、TP-107) は、キモトリプシン様活性に対してチロペプチン A とほぼ同程度の阻害活性を示したが、トリプシン様活性に対しては阻害活性が減少した。換言すれば TP-106 および

TP-107 はチロペプチン A に比べて阻害特異性が向上したと言える。そこで阻害活性の特異性の向上の為に、最も阻害活性の強かった 1-ナフチル型の類縁体である TP-104 の *O*-メチル化体を合成した。TP-104 の *O*-メチル化体である TP-108、TP-109 および TP-110 は、TP-104 よりもキモトリプシン様活性に対する阻害活性は若干低下したが、トリプシン様活性に対する阻害活性は著しく減少し、特に TP-110 はトリプシン様活性および PGPH 活性に対しては 100 μ M の濃度でも阻害活性を示さなかった。

Table 5-1. Inhibitory activities of the 20S proteasome by tyropeptin A derivatives.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μ M)		
				Chtmotrypsin-like activity	PGPH activity	Trypsin-like activity
Tyropeptin A	CH(CH ₃) ₂	H	H	0.14	68	5
TP-101	C ₆ H ₁₁	H	H	0.033	17	3
TP-102	C ₆ H ₅	H	H	0.027	16	2
TP-103	2-Naphthyl	H	H	0.014	4.7	0.7
TP-104	1-Naphthyl	H	H	0.007	4.9	1.2
TP-105	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	H	H	0.037	20	2
TP-106	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	0.19	21	21
TP-107	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	0.12	56	37
TP-108	1-Naphthyl	H	CH ₃	0.018	38	6
TP-109	1-Naphthyl	CH ₃	H	0.020	31	6
TP-110	1-Naphthyl	CH ₃	CH ₃	0.027	>100	>100
TP-111	N(CH ₃) ₂	H	H	1.2	>100	7.8
MG132				0.068	1.4	4.5

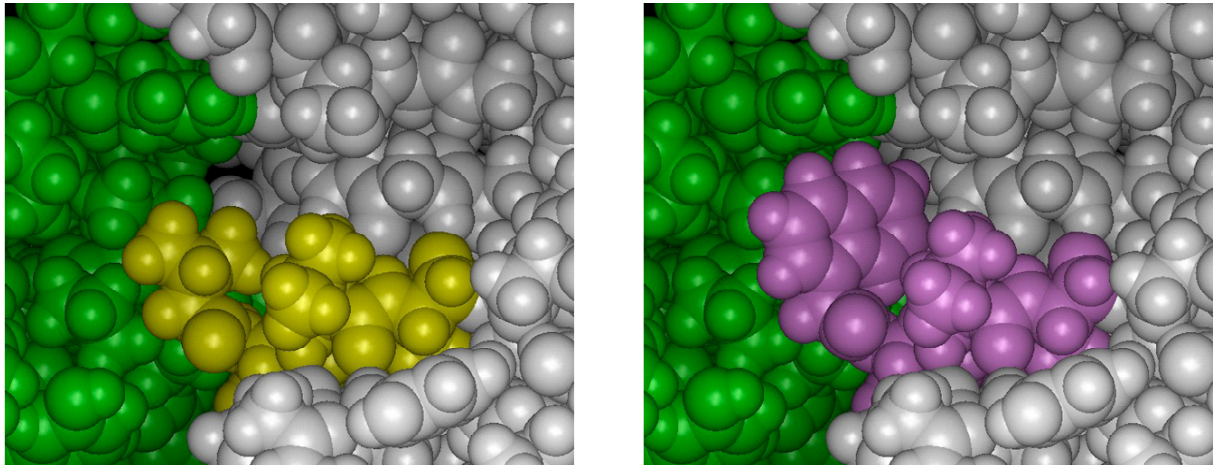
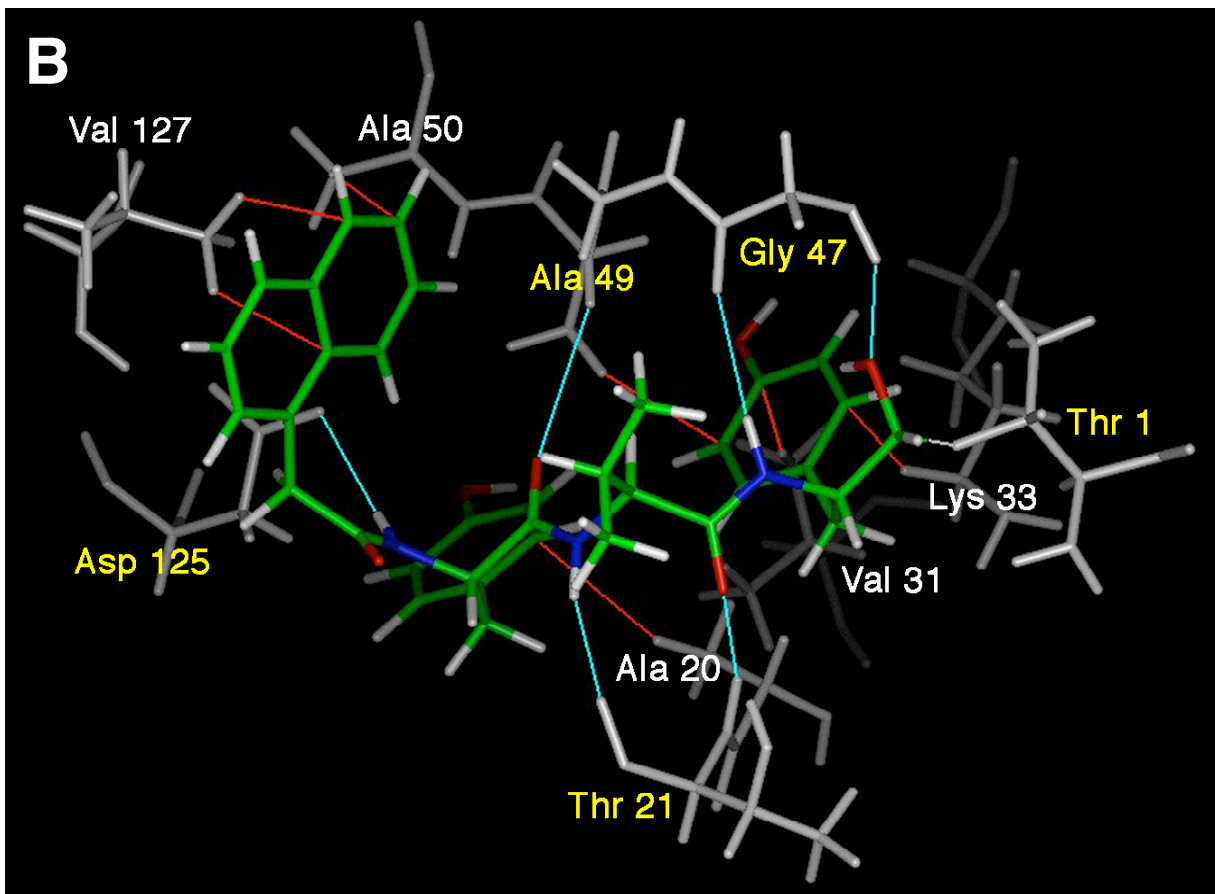
A**B**

Fig. 5-4. Binding model of TP-104 bound to the $\beta 5/\beta 6$ site of the 20S proteasome. (A) Comparison with structures of tyropeptin A and TP-104 in the $\beta 5/\beta 6$ site. Binding model of TP-104 in the $\beta 5/\beta 6$ site (right) compared to the tyropeptin A (left). Tyropeptin A is colored in yellow and TP-104 in violet. (B) Expected binding mode of TP-104 to the $\beta 5/\beta 6$ site. Tyropeptin A is yellow; Hydrogen bond, cyan; CH/ π interaction, red; $\beta 5/\beta 6$, atom colors.

20S プロテアソームの立体構造は、1995 年に世界で初めて古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 由来の 20S プロテアソームが X 線結晶解析され、その立体構造が明らかになった [100]。1997 年には酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から真核生物の 20S プロテアソームが解析された [35]。真核生物の 20S プロテアソームにおけるキモトリプシン様活性の活性中心は、 $\beta 5$ サブユニットの N 末端 1 番目のスレオニンであるが、活性部位は $\beta 5$ のみならず $\beta 6$ サブユニットとの 2 つのサブユニットの会合により形成されていて、これらは変異を利用した実験と X 線結晶解析の結果から明らかになった [101、102]。Garcia-Echeverria らはホモロジーモデリングの手法を用いて、酵母の 20S プロテアソームの結晶構造からヒトの 20S プロテアソームの構造モデルを推定し [103]、その推定上のヒト 20S プロテアソームモデルに基づき、プロテアソーム阻害物質を開発した [104, 105]。

2002 年にはウシから単離したホ乳類の 20S プロテアソームの結晶構造が明らかになり、ウシの $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ および $\beta 7$ サブユニットの立体構造は酵母の各サブユニットと異なることが分かった [6, 7]。しかし未だにヒト由来の 20S プロテアソームの結晶構造は解析されていない。ヒトとウシのプロテアソームのアミノ酸配列を比較してみると、 $\beta 5$ サブユニットでは 100% の相同性を示す。しかしヒトと酵母の間では 65% の相同性しか示さない。他方の $\beta 6$ サブユニットでもヒトとウシの間では 100% の相同性を示すが、ヒトと酵母の間では 48% の相同性しか示さない（ヒトのプロテアソームのアミノ酸配列は Swiss-Prot データベースより入手した）。ウシの $\beta 5$ および $\beta 6$ サブユニットのアミノ酸配列はヒトと完全に一致したことから、ウシの $\beta 5/\beta 6$ 部位の構造モデルはヒトの $\beta 5/\beta 6$ 部位を十分に反映すると考えた。

そこで $\beta 5/\beta 6$ 部位のアミノ酸配列がヒトと完全に同一であるウシのプロテアソームを用いてチロペプチン A との複合体構造モデルを構築し、そこから得られた情報を基に、阻害活性の向上を目指したチロペプチン A 類縁体の分子設計を行った。ここに記述したモデルではチロペプチン A は $\beta 5/\beta 6$ 部位によく収まっていることを証明した (Fig. 5-3)。この結合モデルはチロペプチン A の近傍に大きな空白領域（ポケット）の存在を示し、よってこのポケットを充填するような化合物はキモトリプシン様活性に対して強い阻害活性を示すと推察した。そこで種々のチロペプチン A 類縁体を合成し、その 1 つである TP-104 はチロペプチン A に比べてキモトリプシン様活性に対して阻害活性が 20 倍向上した (Table 5-1)。TP-104 と $\beta 5/\beta 6$ 部位の複合体モデルを解析した結果、TP-104 の 1-ナフチル部分はチロペ

プチン A の N 末端近傍の大きなポケットを埋め、そのポケットの形状に高い相補性を示した (Fig. 5-4)。さらに TP-104 のナフチル部分と 20S プロテアソームの $\beta 5/\beta 6$ 部位の間に新たな CH/ π 相互作用を形成した。したがって TP-104 のキモトリプシン様活性に対する強力な阻害活性は、 $\beta 5/\beta 6$ 部位への親和性の向上に起因すると考えられた。このようにウシのプロテアソームとチロペプチン A の結合モデルは 20S プロテアソームの阻害物質の論理的な分子設計を可能にした。

チロペプチン A の O-メチル化はキモトリプシン様活性の阻害活性の特異性を向上させることが分かった。例えば TP-104 の O-ジメチル体である TP-110 は、キモトリプシン様活性を $0.027 \mu\text{M}$ の IC_{50} 値で阻害するが、トリプシン様活性と PGPH 活性には $100 \mu\text{M}$ の濃度でも阻害活性を示さなかった。これは以下の理由により説明できる。トリプシン様活性部位は、 $\beta 2$ および $\beta 3$ サブユニットの会合により形成されており、この $\beta 2/\beta 3$ 部位の S1 および S3 ポケットは $\beta 5/\beta 6$ 部位の各々のポケットに比べて狭い [35]。したがって TP-110 が $\beta 2/\beta 3$ 部位に適合できないと推察し、よって TP-110 はトリプシン様活性に阻害活性を示さないと考察する。このように TP-110 は特徴的な阻害特異性を有し、MG132 やチロペプチン A、TP-104 とは異なった性質を示す。それゆえに TP-110 はホ乳類の 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性に有効でかつ選択性の高い阻害物質であると言える。

第4節 小括

この章では、チロペプチン A のプロテアソームに対する阻害活性の向上を目指し、チロペプチン類縁体を合成した。すなわちチロペプチン A とウシ 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を司る $\beta 5$ および $\beta 6$ サブユニットとの三次元複合体モデルを構築し、このモデルから得られた情報を基に、阻害活性の強いチロペプチン A 類縁体を論理的且つ効果的な分子設計を行い合成した。以下に明らかにした事項について述べる。

- (1) ウシの 20S プロテアソームとチロペプチン A との複合体立体構造モデルを構築した。
- (2) 分子モデリング実験から得られた情報を基に、チロペプチン類縁体を分子設計し合成した。
- (3) 合成したチロペプチン類縁体 TP-104 は、プロテアソームのキモトリプシン様活性に対して非常に強い阻害活性 ($IC_{50}=0.007 \mu M$) を示し、チロペプチン A よりも 20 倍阻害活性の高い阻害物質を合成することに成功した。
- (4) TP-104 のジメチル体である TP-110 は、プロテアソームのキモトリプシン様活性に対して $0.027 \mu M$ の IC_{50} 値を示すが、トリプシン様活性および PGPH 活性には $100 \mu M$ でも阻害活性を示さず、特異性の高い阻害物質を合成することに成功した。

第6章 チロペプチン類縁体の抗癌活性

前章に記述したように、分子モデリング法を用いて種々のチロペプチン類縁体を合成した。その中にはリード化合物として用いたチロペプチン A よりプロテアソームのキモトリプシン様活性に対して 20 倍阻害活性が強い化合物 TP-104 や、キモトリプシン活性に高い選択性を示す化合物 TP-110 を合成することができた。本章では、これらチロペプチン類縁体の抗癌活性について言及する。

第1節 実験材料と方法

1. 細胞培養

ヒト前立腺癌 PC-3 細胞 (Dainippon Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) は、100 units/ml ペニシリン G、100 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシン、0.29 mg/ml L-グルタミンおよび 1.13 mg/ml 炭酸水素ナトリウムを含む DMEM 培地に 10 % FBS (Vitromex; Sanko Junyaku Co., Tokyo, Japan) を加え 37°C、5% CO₂ 雰囲気下で培養した。

2. 細胞増殖測定

各細胞は 96 穴プレートの 1 穴に Table 6-1 の条件の 10% 血清を含む培地 100 μ l にて培養した。測定サンプルは培養と同時に添加し、細胞数は MTT 法を用いて測定した [91]。

Table. 6-1. 細胞培養条件

由来	名称	種類	培地	血清	培養時間 (h)	細胞数/well
Human	LOX	Melanoma	DMEM	FBS	72	5×10^3
	DMS273	Lung	DMEM	FBS	72	5×10^3
	LX-1	Lung	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	DU 145	Prostate	DMEM	FBS	72	5×10^3
	PC-3	Prostate	DMEM	FBS	72	5×10^3
	LNCaP	Prostate	DMEM	FBS	72	5×10^3
	SC-6	Stomach	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	HCT-8	Colon	RPMI1640	HS	72	5×10^3
	DLD-1	Colon	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	HL-60	Leukemia	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	Jurkat	T Lymphoma	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	RPMI 8226	Multiple myeloma	RPMI1640 ¹⁾	FBS	72	1×10^4
	PrSC	Prostate stroma	DMEM ²⁾	FBS	72	1×10^4
	NHLF	Normal fibroblast	DMEM	FBS	72	5×10^3
Mouse	Colon 26	Adenocarcinoma	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	B16B16	Melanoma	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	3LL	Lung carcinoma	DMEM	FBS	72	5×10^3
	P388D1	Monocyte	RPMI1640	FBS	72	1×10^4
	LB32T	B Lymphocyte	RPMI1640 ¹⁾	FBS	72	1×10^4
	RAW264.7	Macrophage	DMEM	FBS	72	5×10^3
	L1210	Lymphoid leukemia	RPMI1640	FBS	48	1×10^4
	EL4	Tymoma	RPMI1640	FBS	48	1×10^4

¹⁾ 1 mM ピルビン酸、0.55 μ M 2-メルカプトエタノール、0.1 mM non-essential amino acid (Gibco BRL, Grand Island, NY) を加えた。

²⁾ 5 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor)、5 μ g/ml Insulin、1.4 μ M hydroxycortisoneを加えた。

3. 細胞周期

PC-3 細胞(5×10^5)を直径 10 cm 丸シャーレに 10% FBS を含む DMEM 培地 5 ml で TP-110 と共に 37°C で 24 時間培養した。培地を除去後、PBS (-) で一度洗浄し、トリプシン処理により細胞を剥がした。ここに 10% FBS を含む DMEM 培地を加え 1,000 rpm、5 分間遠心分離により細胞を回収した。この細胞を再度 PBS (-) に懸濁し 1,000 rpm、5 分間の遠心分離により洗浄した。PBS (-) 除去後、氷冷 70% エタノールを 5 ml 加え、4°C で 1 晩、細胞を固定化した。1,000 rpm、5 分間遠心分離により回収した細胞を、900 μ l の PBS (-) に懸濁し、ここに 0.2 M RNase A (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) を 10 μ l

加え 37°C で 15 分間処理した。3,000 rpm、5 分間の遠心分離により沈澱した細胞を、900 μ l の PBS (-) によく懸濁し、ここに PBS (-) に溶かした 500 μ l/ml ヨウ化プロビジウム (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 溶液を 100 μ l 加えよく攪拌した。染色した細胞は FACSCalibur (Becton-Dicjinson Immunocytometer Systems, San Jose, CA) で細胞周期を測定した。

4. ヘキスト 33342 染色

PC-3 細胞 (1×10^5) を 35 mm 丸シャーレに 10% FBS を含む DMEM 培地 1 ml で 48 時間培養した。培地を新鮮なものに交換後、TP-110 を 0.16 μ M 加え 37 °C で 24 時間培養した。ここに 5 μ g/ml のヘキスト 33342 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を加えさらに 37°C で 90 分間培養した。染色した細胞を蛍光顕微鏡 (LEICA DM IRB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) にて観察した。

5. ウェスタンブロット

p21 および p27 蛋白質はウェスタンブロット法で検出した。すなわち PC-3 細胞 (2×10^5) を 35 mm 丸シャーレに 10% FBS を含む DMEM 培地 1ml で 24 時間培養し、ここに各濃度の TP-110 を加え、さらに 37°C で各時間培養した。この細胞を 100 μ M Na_3VO_4 を含む PBS (-) で 2 度洗浄し、lysis 緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、10% グリセロール、1 mM EDTA、50 mM NaF、50 mM β -glycerophosphate、1 mM Na_3VO_4 、25 μ g/ml アンチパイン、25 μ g/ml ロイペプチン、25 μ g/ml ペプスタチン) を 100 μ l 加え 4°C で 15 分間放置した。得られた細胞抽出液を 15,000 rpm、10 分間遠心分離し不溶物を取り除き、各サンプルの蛋白濃度を調整後、1/3 量の 4 \times SDS sample buffer (グリセロール 4 ml、SDS 0.92 g、2-メルカプトエタノール 2 ml、ブロモフェノールブルー 2 mg、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 3.32 ml) を加えた。これを 100°C で 5 分間煮沸後、氷冷中で急冷したものを電気泳動用のサンプルとし、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によりそれぞれの蛋白質を分離した。ゲル中の蛋白質を PVDF 膜 (Immobilon-P ; Millipore Corporation, Bedford, MA) へ転写し、この PVDF 膜は 5% スキムミルクを含む STE 緩衝液 (0.15 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA) で室温、1 時間ブロッキングを行い、次ぎに抗 p21 抗体 (sc-397 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) もしくは抗 p27 抗体 (sc-528 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) で抗原抗体反応を行った。これを 0.1%

Tween-20 を含む TBS 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl) で洗浄後、HRP (hoseradish peroxidase) 標識二次抗体 (Anti-Rabbit Ig, HRP-Linked Whole Antibody; Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) で反応させた。これを洗浄後、ECL ウェスタンブロットティング検出システム (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) により化学発光させ、X 線フィルム (RX-U; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) に感光させることにより目的抗原のシグナルを検出した。

5. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

p21 および p27 の mRNA は RT-PCR 法により測定した。PC-3 細胞 (3×10^6) を 10 cm 丸シャーレに 10% FBS を含む DMEM 培地 10 ml で 24 時間培養した。ここに各濃度の TP-110 を加え、さらに 24 時間培養した。これらの細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) を用いて total RNA を抽出、精製した。得られた total RNA のすべての mRNA から Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI) を用いて cDNA を合成した。PCR による cDNA の増幅には Promega PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI) を使用した。p21 の特異的プライマーとして 5'-ATGTCAGAACCGGCTGG-3' および 5'-TAGGGCTTCCTCTTGGA-3' [106]、p27 のプライマーとして 5'-CCTCTTCGGCCCGGTGGAC-3' および 5'-TCTGCTCCACAGAACCGGC-3' [107]、GAPDH のプライマーには 5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3' および 5'-GTCTTACTCCTTGGAGGCCATGT-3' を用いた [108]。PCR は各サイクルでの反応生成物量を測定し、反応生成物量が指数関数的に増加するサイクル数を設定し、反応条件を最適化した。PCR 反応生産物は 2% アガロースゲルで電気泳動後、SYBR Green I nucleic acid gel stain (Molecular Probes, Eugene, OR) により検出し、FLA-5000 (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan) にて定量した。

6. DNA フラグメンテーション

PC-3 細胞 (5×10^5) を直径 6 cm 丸シャーレに 10% FBS を含む DMEM 培地 5 ml で培養し、同時に各濃度の TP-110 および / もしくはカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK (benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspart-1-yl-fluoromethane、Calbiochem Corporation, San Diego, CA) を添加し、37°C で 14 および 24 時間培養した。細胞を PBS (-) で 2 度洗浄し、セルスクレイパーを用

いて回収した。この細胞に lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA·4Na、0.5% Triton-X 100) を 200 μ l 加え、室温で 10 分間処理した。これを 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し不溶物を除去後、上清に 0.2 M RNase A を 4 μ l 加え 37°C で 1 時間処理した。ここに 20 mg/ml の Proteinase K (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 4 μ l を加え 37°C で 1 時間処理した。さらに 5 M NaCl を 40 μ l およびイソプロパノールを 240 μ l 加え -20°C で一晩放置した。これを 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し上清を除き、70% エタノール 200 μ l を加え攪拌後再度 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し上清を除去した。ここに TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA·4Na) を 12 μ l 加え DNA フラグメンテーションサンプルとした。これを 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、DNA を臭化エチジウムにより検出した。

7. 急性毒性

TP-110 は 5% HCO-60 (Nikko Chemicals Co., Tokyo, Japan) および 5% DMSO を含む生理食塩水に溶解し、実験 1 日目に ICR マウス (6 週令、メス) の尾部の静脈内に 0.1ml ずつ単回投与した。腹腔内投与、皮下投与、経口投与の場合は、0.25ml ずつ単回投与した。経過観察は 14 日間行い、生存したマウスは解剖し各臓器を肉眼により観察した。

8. TP-110 の定量

マウス血清中の TP-110 含量は HPLC 法により定量した。血清 200 μ l に等量のブタノールを加え、激しく攪拌した。これを遠心分離しブタノール層 100 μ l を回収した。ここに 10 mg/ml NaBH₄ (メタノール) 溶液 10 μ l を加え室温で 1 時間放置した。これを高速液体クロマトグラフにより測定し定量した。カラムは Capcell pak UG 120 (150×4.6 ϕ ; Shiseido Co., Tokyo, Japan) を使用し、移動相は 5~95% アセトニトリル-水 (0~10 分までリニアグラジエント、10~15 分まで 95% アセトニトリル-水)、流速 1 ml/min、検出 UV 220 nm で測定した。これらの条件下において TP-110 の溶出時間は 11.0 min であった。

9. 抗腫瘍活性の評価

SCID マウス (オス、6 週令、Charles River Japan, Yokohama, Japan) は SPF 環境下 (温度 23±1°C、湿度 55±5%) で飼育し、滅菌水および滅菌処理した食餌 (Oriental Yeast, Co., Tokyo, Japan) を与えた。

PC-3 細胞 (5×10^6) をマウスの左側鼠径部皮下に注射により移植し、その日を day 0 とした。TP-110 は 5% HCO-60 および 5% DMSO を含む生理食塩水に溶解し、腹腔内に注射した。抗腫瘍活性は腫瘍容積により評価した。尚、腫瘍容積は次式により算出した。

$$\text{腫瘍容積 (mm}^3\text{)} = \text{腫瘍の長径 (mm)} \times \text{腫瘍の短径 (mm)}^2 \times 0.5$$

第2節 結果

1. PC-3 細胞に対する増殖抑制作用

前章で合成したチロペプチン類縁体の中で、プロテアソームに対して最も強い活性を示した TP-104 およびプロテアソームのキモトリプシン様活性に特異性の高い阻害活性を示した TP-110 について、ヒト前立腺癌 PC-3 細胞の増殖に与える影響を調べた (Fig. 6-1)。各類縁体は薬剤容量依存的に細胞増殖を抑制し、各々の IC₅₀ 値はチロペプチン A が 12 μM 、TP-104 が 0.44 μM 、TP-110 が 0.049 μM および MG132 が 0.93 μM であり、TP-110 が最も強い増殖抑制作用を示した。次に TP-110 の各濃度での細胞増殖の経時変化を調べた (Fig. 6-2)。TP-110 はいずれの濃度においても 24 時間後迄は増殖し、その後高濃度の 0.10 μM 以上では細胞数が減少し細胞死が誘導され、中間濃度の 0.025 μM では 72 時間まで一定の細胞数を保ち、低濃度の 0.0063 μM では無添加の場合と同様に細胞が増殖した。また濃度は異なるが MG132 も類似した増殖経過を示した。

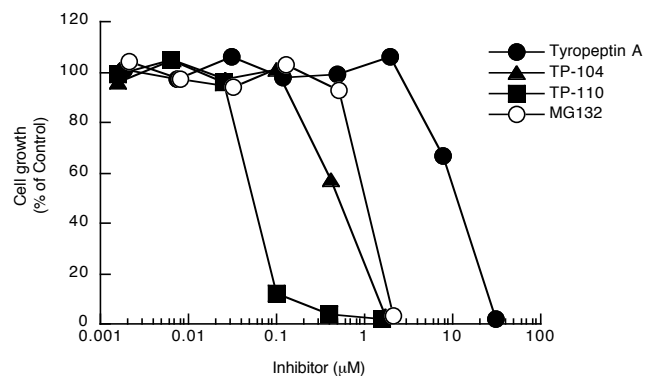


Fig. 6-1. Effect of tyropeptins on PC-3 cells growth. Cells were incubated with a test sample for 72 h. Cell growth was determined by MTT.

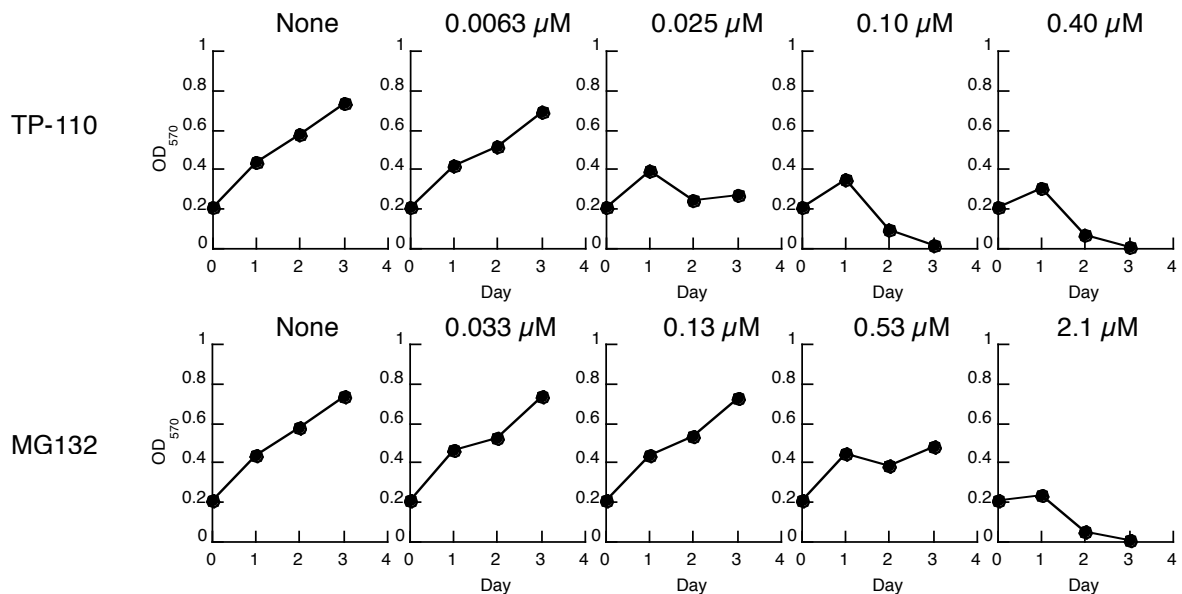


Fig. 6-2. Effect of TP-110 on PC-3 cells growth. Cells were incubated with various concentrations of TP-110 or MG132 for indicated times. Cell growth was determined by MTT.

2. TP-110 による細胞周期への影響

そこで PC-3 細胞の増殖抑制効果が非常に強い TP-110 を用いて、PC-3 細胞の細胞周期に与える影響について調べた。TP-110 (0.16 μM) で 24 時間処理した細胞を、フローサイトメトリーで解析した細胞の分布を Fig. 6-3 に示す。縦軸は細胞数を示し、横軸は細胞の DNA に結合したヨウ化プロビジウムの蛍光量を示す。200 をピークとした細胞群は G1 期に属し、400 をピークとした細胞群は G2 もしくは M 期に属する。G1 期と G2/M 期の中間の DNA 量を持つ細胞群は S 期であり、また 200 以下に分布する細胞群は Sub G1 期に属す。TP-110 で処理すると G1 および Sub G1 期の細胞数を増加させ、S 期および G2/M 期の細胞数を減少させた。

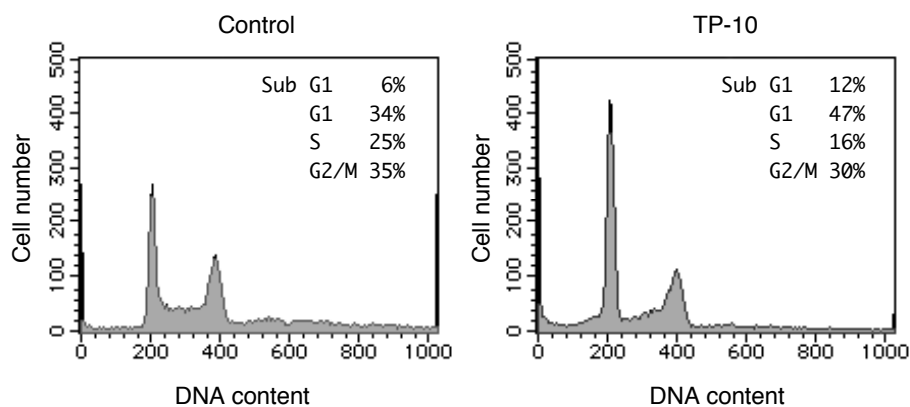


Fig. 6-3. Effect of TP-110 on cell cycle progression. PC-3 cells were cultured with 0.16 μ M of TP-110 for 24 h. Cells were examined using FACS analysis to determine cell cycle status.

3. TP-110 による p21^{CIP1/WAF1} および p27^{KIP1} への影響

フローサイトメトリーによる解析から、TP-110 は PC-3 細胞の細胞周期の S 期移行を阻害し G1 期で停止した。細胞周期の制御において中心的な働きをしている蛋白質としてサイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) およびそのインヒビターである CDK インヒビターがある。細胞周期の進行にはサイクリン、CDK、負への制御には CDK インヒビターが大きな役目を果たしている。特に G1 期の停止においては CDK インヒビターである p21^{CIP1/WAF1} および p27^{KIP1} が重要な働きをしており、これらの働きにより細胞周期の S 期への移行を阻害し G1 期で停止する。また p21 および p27 はプロテアソームの基質となり分解される事が知られている [37, 38]。そこで p21 および p27 に対する TP-110 の影響について調べた。

PC-3 細胞を各濃度の TP-110 で処理し、p21 および p27 蛋白質を、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により調べた (Fig. 6-4)。PC-3 細胞を各濃度の TP-110 で 14 時間処理すると、p21 および p27 は薬剤濃度依存的に蓄積量が増大した (Fig. 6-4A)。MG132 にも同様な効果が認められた。また TP-110 の処理濃度を 0.16 μ M に固定し経時変化を調べると、時間経過とともに蓄積量が増加した (Fig. 6-4B)。

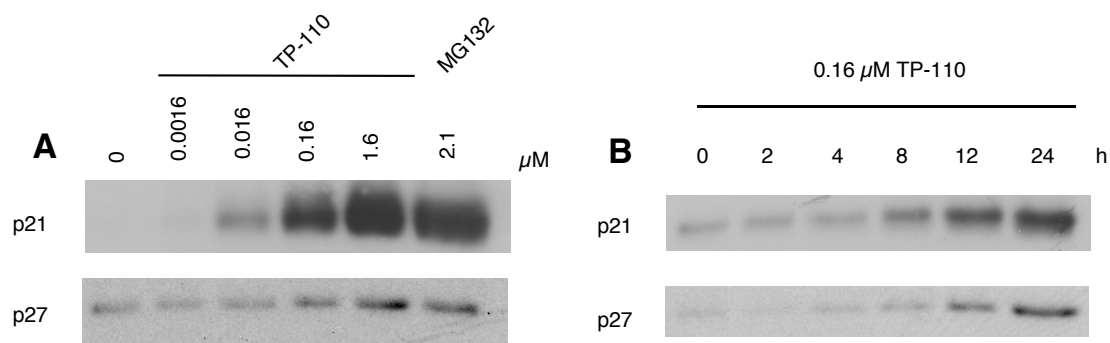


Fig. 6-4. Accumulation of p21^{CIP1/WAF1} and p27^{KIP1} in PC-3 cells by TP-110. (A) PC-3 cells were cultured with the indicated concentrations of TP-110 or MG132 for 12 h. The protein extracts were applied to Western blot using an anti-p21 antibody or an anti-p27 antibody. (B) PC-3 cells were cultured with 0.16 μ M of TP-110 for the indicated times.

TP-110 による p21 および p27 の蓄積量の増大は、プロテアソームによる分解の抑制のためであると推察されたが、p21 および p27 遺伝子の発現誘導の可能性もある。そこで TP-110 処理による PC-3 細胞の p21 および p27 の mRNA の発現を RT-PCR により測定した (Fig. 6-5)。PC-3 細胞を各濃度の TP-110 で 24 時間処理すると、TP-110 の濃度増加にしたがい p21 の mRNA が増加し、その発現誘導が認められた。一方 p27 の mRNA 量は一定で変化はなかった。

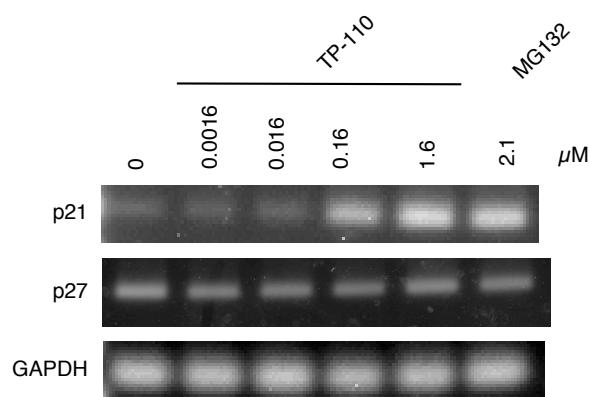


Fig. 6-5. Induction of p21^{Cip1/Waf1} expression in PC-3 cells by TP-110. PC-3 cells were cultured with the indicated concentrations of TP-110 or MG132 for 24 h. p21 and p27 mRNA expression were assessed by RT-PCR.

4. TP-110 によるアポトーシスの誘導

フローサイトメトリーによる解析から、TP-110 は G1 期の細胞を増加させると共に sub-G1 期の細胞も増加させた。これは細胞死の誘導を意味することから細胞死について検討した。PC-3 細胞を TP-110 (0.16 μM) で 24 時間処理し、DNA に特異的に結合する蛍光色素であるヘキスト 33342 で染色後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した (Fig. 6-6)。無処理の細胞では核が均一に青く染まるが、TP-110 処理した細胞では一部の細胞内の所々が非常に強く染まり、特に明るい蛍光を発する箇所が確認出来た (図中矢印)。これがクロマチン凝縮であり、TP-110 はアポトーシスの形態学的特徴の 1 つである、クロマチン凝縮を起こす作用があることが認められた。

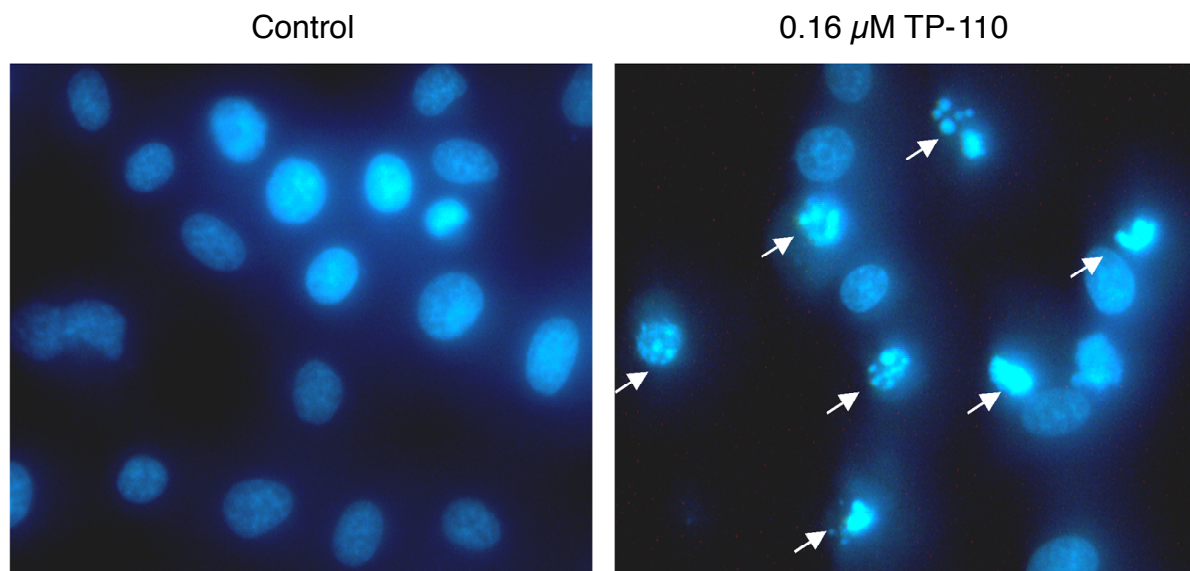


Fig. 6-6. Induction of apoptosis in PC-3 cells by TP-110. PC-3 cells were cultured with 0.16 μM of TP-110 for 24 h. Cells were stained with Hoechst 33342.

またアポトーシスの生化学的特徴の 1 つとして DNA 断片化がある。そこで PC-3 細胞を各濃度の TP-110 で 14 時間もしくは 24 時間処理し、細胞より抽出した DNA をアガロース電気泳動により、DNA の断片化を調べた (Fig. 6-7)。PC-3 細胞における DNA の断片化は、14 時間よりも 24 時間後において顕著に認められ、TP-110 の濃度に依存してその程度が増大した。よって TP-110 によるアポトーシス誘導が確認できた。

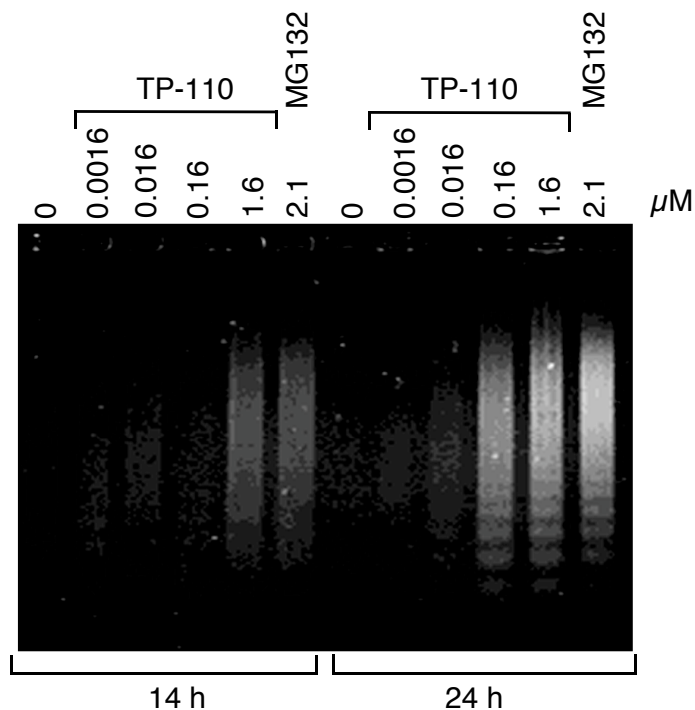


Fig. 6-7. Induction of apoptosis in PC-3 cells by TP-110. PC-3 cells were cultured with the indicated concentrations of TP-110 for 14 or 24 h. Fragmented DNA was isolated and electrophoresed.

アポトーシスの進行過程において中心的役割を担っているものにカスパーゼがある。TP-110 で誘導される DNA の断片化は、カスパーゼの作用によるものと考えられることから、TP-110 による DNA 断片化におけるカスパーゼ阻害物質の影響について検討した (Fig. 6-8)。カスパーゼ全般の阻害剤である Z-VAD-FMK を用いて検討したところ、TP-110 による DNA 断片化は Z-VAD-FMK の添加により顕著に抑制され、その効果は薬剤容量依存的であった。

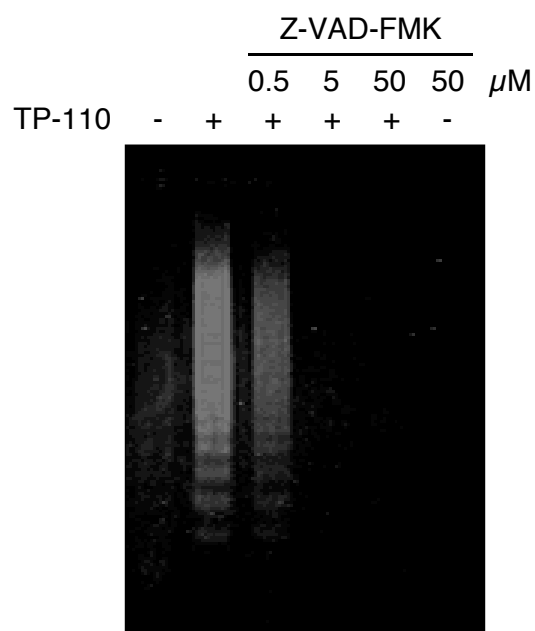


Fig. 6-8. Effect of caspase inhibitor on TP-110-induced apoptosis. PC-3 cells were cultured with $0.16 \mu\text{M}$ of TP-110 and/or the indicated concentrations of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 24 h. Fragmented DNA was isolated and electrophoresed.

5. TP-110 の急性毒性および薬物動態

TP-110 は *in vitro* で PC-3 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。そこでマウスを用いた *in vivo* における PC-3 細胞腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討するために、急性毒性および薬物動態について検討し、投与量および投与経路を決定した。

TP-110 をマウスに各投与経路にて単回投与した。1 mg/mouse では静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、経口投与のいずれの投与経路においても 14 日間生存した。しかし経口投与を除き、他の投与経路では外見上異常が認められた。静脈内投与では 1 mg もしくは 0.5 mg/mouse で 2 日目まで体重が減少し、5 日目頃迄尾部全体に炎症が認められた。その後回復し 14 日目の解剖では異常所見は認められなかった。腹腔内投与では 1~0.25 mg/mouse で体重減少が認められ、7 日目頃まで注射部位が炎症を起こしていた。14 日目の解剖において、若干の肝臓、脾臓の肥大が見られた。皮下投与では 1~0.25 mg/mouse で注射部位に炎症が見られ、14 日目の解剖において腹腔内投与の場合と同様に肝臓、脾臓の肥大が認められた。

次に各投与経路による TP-110 の血清中濃度の経時変化を調べた。TP-110 をマウスに各投与経路で 1 mg 投与し、血清中の TP-110 濃度を HPLC により測定した (Fig. 6-9)。TP-110 を腹腔内に投与すると、徐々に血清中へ移行し 2 時間で最大の TP-110 濃度 15 $\mu\text{g/ml}$ に達した。その後緩やかに減少したが 8 時間後でも約 5 $\mu\text{g/ml}$ 残留していた。24 時間後には血清中より消失した。静脈内投与の場合、投与直後から急速に減少し、2 時間後から腹腔内投与と似た減少曲線を示した。皮下投与と経口投与では血清中に TP-110 は検出できなかった。

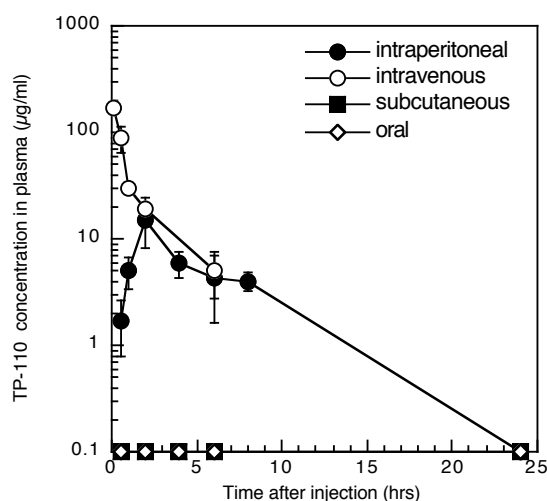


Fig. 6-9. Concentration of TP-110 in plasma after the administration in mice. TP-110 was administered via indicated route with 1 mg/mouse. Concentration of TP-110 in plasma was measured using HPLC.

6. マウス移植 PC-3 細胞腫瘍に対する TP-110 の抗腫瘍活性

ヒト前立腺癌 PC-3 細胞を T および B リンパ球を欠損する免疫不全マウスである SCID マウスの鼠経部に皮下移植し、腫瘍の大きさが 100 mm^3 以上になった移植後 5 日目より、TP-110 を週に 2 回投与した (Fig. 6-10)。投与経路は、前項 5 の急性毒性の結果および薬物動態の結果をふまえて複数回投与可能な腹腔内投与とした。

TP-110 は 10 mg/kg の投与量において腫瘍の増殖が有意に抑制され、*in vivo* において抗腫瘍活性が認められた。2.5 mg/kg ではその効果は極めて弱いものであった。

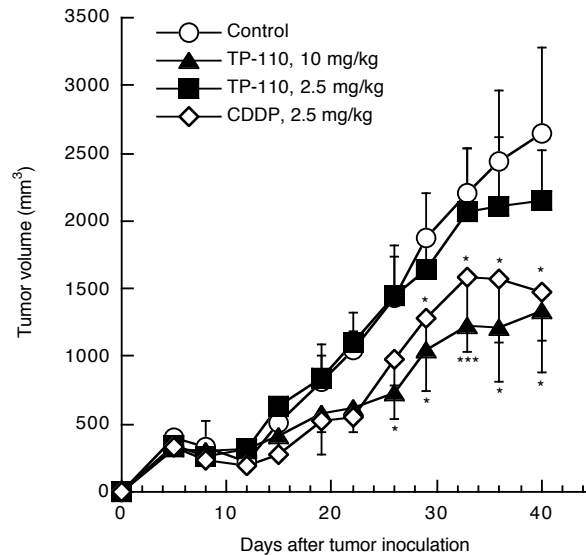


Fig. 6-10. Antitumor effect of TP-110 on PC-3 cell growth *in vivo*. SCID mice were inoculated subcutaneously with 5×10^5 PC-3 cells on day 0. TP-110 was administered intraperitoneally twice per week. Each group consisted of 5 mice. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ in comparison with control (Student's *t*-test).

7. 各種癌細胞に対する増殖抑制活性

また PC-3 細胞以外の各種癌細胞に対する増殖抑制活性を調べた (Table 6-2)。PC-3 細胞と同様に、TP-110 はいずれの細胞においてもチロペプチン A、TP-104 に比べて強い増殖抑制効果を示した。MG132 は種々の細胞にほぼ同等な IC_{50} 値を示したが、チロペプチン類縁体は細胞種により様々な IC_{50} 値を示し、最も強い効果を示す細胞種と逆に示さない細胞種では 100 倍以上の差があった。また TP-110 においては、PC-3 細胞よりも強い増殖抑制効果を示す細胞種があった。

Table 6-2. Effect of tyropeptin A derivatives on various cell growth.

			IC ₅₀ (μ M)			
			Tyropeptin A	TP-104	TP-110	MG132
Human	LOX	Melanoma	8.4	0.55	0.051	0.88
	DMS273	Lung	12	0.67	0.050	0.99
	LX-1	Lung	18	0.52	0.051	0.97
	DU 145	Prostate	47	1.8	0.66	1.2
	PC-3	Prostate	12	0.44	0.048	0.93
	LNCaP	Prostate	19	0.44	0.021	0.84
	SC-6	Stomach	>31	>1.7	0.27	1.1
	HCT-8	Colon	7.8	0.50	0.18	0.27
	DLD-1	Colon	22	0.86	0.13	1.4
	HL-60	Leukemia	6.1	1.2	0.013	0.46
	Jurkat	T Lymphoma	7.6	0.25	0.045	1.1
	RPMI 8226	Multiple myeloma	1.5	0.15	0.010	0.21
	PrSC	Prostate stroma	15	0.84	0.061	0.95
	NHLF	Normal fibroblast	16	1.0	0.059	0.44
	Mouse	Colon 26	Adenocarcinoma	>31	>1.7	0.32
B16B16		Melanoma	16	1.1	0.10	1.7
3LL		Lung carcinoma	>31	>1.7	0.29	1.3
P388D1		Monocyte	>31	1.5	0.14	1.1
LB32T		B Lymphocyte	5.5	1.0	0.21	1.1
RAW264.7		Macrophage	16	0.96	0.18	1.1
L1210		Lymphoid leukemia	>31	>1.7	0.24	1.1
EL4		Tymoma	>31	>1.7	0.21	1.1

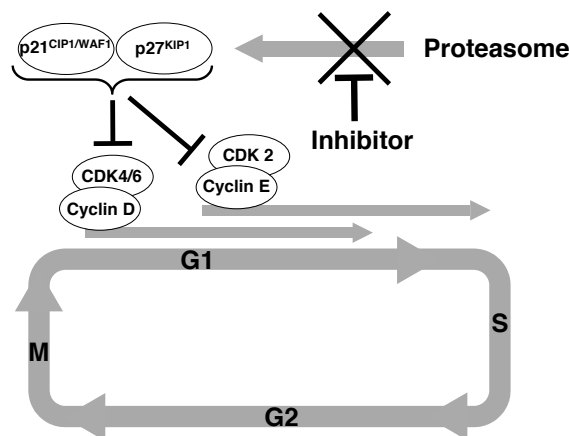
第3節 考察

前立腺癌はアンドロゲン依存性の癌であり、有効な治療法として抗アンドロゲン物質による治療が施されているが、多くの場合アンドロゲン非依存性となり再発し問題になっている。ヒト前立腺癌 PC-3 細胞はアンドロゲン非依存性の癌細胞株であり、有効な治療法がないことからこの PC-3 細胞を用い、チロペプチン類縁体の細胞増殖に与える影響について検討した。チロペプチン類縁体 TP-104 はプロテアソームに対して強い阻害活性を示し、また TP-110 はプロテアソームのキモトリプシン様活性に対して高い阻害特異性を示す。これらによる PC-3 細胞の増殖に与える影響について検討したところ、TP-110 が強い増殖抑制活性を示した (Fig. 6-1)。これはキモトリプシン様活性に高い阻害特異性を有するためというよりは、むしろ TP-110 の化学構造において水酸基の *O*-メチル化により脂溶性が向上し細胞膜の透過性が高くなったために強い増殖抑制活性を示すと考えられる。これは TP-104 の *O*-モノメチル体である TP-108 や TP-109 も TP-104 より強い増殖抑制活性を示し、またチロペプチン A をメチル化した TP-106 や TP-107 もチロペプチン A に比べて強い増殖抑制活性を示したことから示唆される (data not shown)。そこで PC-3 細胞に対して強い増殖抑制活性を示す TP-110 を選択し以降の実験を行った。

PC-3 細胞の増殖に与える TP-110 の影響についてさらに詳細に検討するために、細胞増殖の経時変化を調べた (Fig. 6-2)。いずれの TP-110 濃度においても 1 日目は増殖し、その後高濃度の TP-110 では細胞死が誘導され、中間濃度では細胞数が一定に保たれ、低濃度では増殖した。これは 1 日目以降に細胞死のシグナルが伝達されることを意味し、PC-3 細胞においては TP-110 による細胞死の誘導シグナルの伝達に 24 時間要することが推測される。ちなみに PC-3 細胞よりも TP-110 に高い感受性を示すヒト多発性骨髄腫 RPMI8226 細胞 (Table 6-2) では、0.025 μ M の TP-110 処理で 1 日後にはすでにスタート時の細胞数の半数以下になっており (data not shown)、PC-3 細胞に比べて早い時期に細胞死の誘導シグナルが伝達されることに起因するのかもしれない。このシグナル伝達のスピードの違いが感受性と相関するかどうかについては今後の研究課題である。

次に細胞周期に与える影響について検討した。PC-3 細胞を TP-110 で処理すると、細胞周期は S 期移行が阻害され G1 期で停止した (Fig. 6-3)。細胞周期の進行において重要な働きをするのはサイクリン、サイクリン依存的キナーゼ (CDK)、そのインヒビターである CDK インヒビターである。サイクリンと CDK は複合体を形成し、細胞周期を正に制御するアクセルに例えられ、CDK インヒビターは負に制御するブレーキに例えられる。このブレーキ役の CDK インヒビターの中で G1 期の停止に関連するものに p21^{CIP1/WAF1} および p27^{KIP1} がある [109-113]。これらはサイクリン/CDK 複合体に結合することでキナーゼ活性を阻害し、細胞内に過剰に発現させると細胞周期を G1 期に停止させることが知られている。またこれら p21 および p27 はプロテアソームにより分解され、細胞内での発現量が制御されている [37, 38]。またいくつかの白血病細胞において、プロテアソームによる p27 の分解が亢進しており、p27 の発現量が減少していることも知られている [40]。そこで PC-3 細胞を TP-110 で処理し、p21 および p27 の量的変化を調べた。TP-110 の処理濃度にしたがい、p21 および p27 の蛋白量が増加し、また時間経過にともない p21 および p27 とともに蓄積量が増大した (Fig. 6-4)。このように p21 および p27 の蓄積量が増大することにより細胞周期の S 期移行が阻害され G1 期で停止したと考えられる。

Fig. 6-11. Role of p21^{CIP1/WAF1} and p27^{KIP1} on cell cycle progression



この TP-110 による p21 および p27 の蛋白量の増大はプロテアソームによる分解抑制のためであると考えられるが、p21 および p27 遺伝子の転写活性化による発現誘導の可能性もある。そこで p21 および p27 の mRNA の発現量を測定した。p21 の mRNA は TP-110 の添加により増加し、p21 の発現誘導が認められた。よって TP-110 による p21 蛋白の蓄積は mRNA の発現誘導もしくは発現誘導に加えてプロ

テアソームによる分解抑制の両作用によると考えられる。一方 p27 の mRNA は一定で変化がなかったことから、p27 蛋白の蓄積はプロテアソームによる分解の抑制であろうと考える。今後 p21 の分解抑制の作用を証明するためには、p21 の半減期に与える TP-110 の影響について調べる予定である。また PC-3 細胞はシグナル伝達で p21 の上流に位置する p53 が欠損していて、どこから p21 の発現シグナルが伝達されるのかも興味を持たれる。

またフローサイトメトリーによる解析から、TP-110 は sub-G1 の細胞群を増加させ、すなわち細胞死へと導くことが示唆された (Fig. 6-3)。細胞死にはネクロシスとアポトーシスの2つに分類される。ネクロシスは栄養不足、毒物、外傷などの外的環境要因による受動的細胞死である。アポトーシスは個体の増殖制御機構でプログラムされた能動的細胞死であり、別名プログラム細胞死ともいわれる。様々な生態システムの中で不要となった細胞、感染細胞、形質転換した細胞を除去する厳密に制御されたプロセスであり、また胚形成、変態、内分泌依存性の組織萎縮、正常組織のターンオーバーにも関与している。ネクロシスとアポトーシスのプロセスは多くの点で異なっている。ネクロシスの初期段階では、細胞とそのオルガネラ (ミトコンドリア等) が形質膜の破壊のために膨張する。次に細胞内容物が漏出し、炎症を生じ、最終的には細胞自体が崩壊する。一方アポトーシス細胞の特徴としては、細胞膜リン脂質構造の変化、クロマチン凝集、核の縮小化、ヌクレオソーム間の DNA 開裂 (DNA 断片化)、細胞の萎縮、膜の胞状突起化、および細胞崩壊による膜結合性アポトーシス小体の出現が起こる。こうしたアポトーシス小体は、その後他の細胞により貪食される。このように、正常なアポトーシスは、プログラムされ高度に調整された生理学的反応であり、細胞死が起こっても周囲組織の二次的損傷を生じない。癌細胞は正常細胞のアポトーシス制御機構に異常が生じることによって異常増殖を起こしたものと考えられている。アポトーシスは、ネクロシスよりも短期間に完結し、しかも炎症を伴わない細胞死である。したがって、アポトーシス誘導物質は、有効な抗癌剤として期待されており、アドリマイシンやビンブラスチンに代表される多くの抗癌剤の作用機構は、アポトーシス誘導によるものである。

そこで TP-110 によるアポトーシス誘導能の有無について検討した。DNA に特異的に結合する蛍光色素を用いて、蛍光顕微鏡下でアポトーシスに特徴的な形態学的変化を調べたところ、TP-110 はアポトーシスの特徴の1つであるクロマチン凝縮を引き起こした (Fig. 6-6)。またアポトーシスに特徴的な

生化学的指標としてクロマチン DNA のオリゴヌクレオソーム単位 (180-200 bp) の切断がある [114]。TP-110 は PC-3 細胞に DNA の断片化を引き起こした (Fig. 6-7)。以上により、TP-110 は PC-3 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。アポトーシスの進行過程において中心的役割を担っているものはカスパーゼである。カスパーゼはアスパラギン酸特異性システインプロテアーゼであり、Fas や TNF- α 等のサイトカイン刺激やミトコンドリアを経由したアポトーシスシグナル伝達により、イニシエーターカスパーゼ (カスパーゼ 8、9、10、12) が活性化する。これらのイニシエーターカスパーゼがいったん活性化すると、下流側のエフェクターカスパーゼ (カスパーゼ 3、6、7) が開裂、活性化し、細胞骨格や核蛋白質を分解してアポトーシスを誘導する。そこで TP-110 による DNA 断片化におけるカスパーゼ阻害物質の影響について検討したところ、カスパーゼ全般的な阻害剤である Z-VAD-FMK の添加により DNA 断片化は顕著に抑制された。よって TP-110 による DNA 断片化はカスパーゼに関連したプロセスで進行することが分かった (Fig. 6-8)。

次ぎに本来の目的である癌治療実験を行うため、マウスに対する急性毒性および薬物動態を調べ、投与量および投与経路を決定した。TP-110 をマウスに 1 mg 投与すると、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、経口投与のいずれの投与経路においても、実験終了の 14 日間生存した。腹腔内投与では、TP-110 は注射部位から徐々に吸収され 2 時間後に血清中濃度は最大となり、その後緩やかに減少した (Fig. 6-9)。静脈内投与では投与後 TP-110 は急速に減少した。皮下投与と経口投与では血清中に TP-110 は認められなかった。またマウス尾静脈からの投与では、尾部の炎症が認められたことから複数回尾静脈からの投与は困難である為、腹腔内投与にて *in vivo* 癌治療実験を行った。

PC-3 細胞を皮下移植した実験腫瘍マウスを用いて、TP-110 の抗腫瘍活性を測定した (Fig. 6-10)。その結果、TP-110 を 10 mg/kg を週に 2 回投与したマウスでは腫瘍の増殖が有意に抑制され、*in vivo* において TP-110 は抗腫瘍活性を示した。このように TP-110 は *in vitro* のみならず、*in vivo* においても有効性を示した。

また PC-3 細胞以外の各種癌細胞に対しても TP-110 は強い増殖抑制効果を示し (Table 6-2)、それらに対する抗腫瘍活性についても期待が持たれる。MG132 はいずれの細胞株に対してもほぼ同等な IC₅₀ 値を示すが、チロペプチン類縁体は細胞種に対し様々な IC₅₀ 値を示し、最も強い効果を示す細胞と逆に示さない細胞では 100 倍以上の活性の開きがあり、これはチロペプチン類縁体の 1 つの特徴である

と考える。すなわち MG132 とは違った作用を有する可能性があり、それについても興味を持たれるところである。またチロペプチン類縁体が低濃度で増殖抑制される細胞とそうでない細胞の違いを明らかにすることは、チロペプチン類縁体の応用を考える上において非常に重要なことである。例えば、種々の癌細胞の遺伝子発現プロファイルを調べるだけで TP-110 への感受性がわかると、より安全で効率の良い癌治療を施すことができるようになると思う。

第4節 小括

本章では、チロペプチン類縁体の細胞増殖への影響について検討した。また癌移植マウスにおける *in vivo* 癌治療実験を行い、以下のことを明らかにした。

- 1) プロテアソーム阻害物質チロペプチン類縁体はヒト前立腺癌 PC-3 細胞において増殖抑制活性を示した。なかでも TP-110 は特に強い効果を示し、その IC₅₀ 値は 0.049 μ M であった。
- 2) TP-110 は PC-3 細胞において細胞周期の S 期移行を阻害し G1 期に停止した。そのとき PC-3 細胞内の p21^{CIP1/WAF1} および p27^{KIP1} の蛋白量を増加させた。
- 3) TP-110 は PC-3 細胞にクロマチン凝縮や DNA 断片化を示し、アポトーシスを誘導した。
- 4) PC-3 細胞移植マウスにおいて TP-110 は、有意に腫瘍増殖を抑制し抗腫瘍効果を示した。

総括

蛋白質分解酵素であるプロテアソームは、細胞周期やシグナル伝達に関与する多種の細胞内機能性蛋白質の分解に関与しており、細胞機能の制御に重要な役割を果たしている。基質となる蛋白質の中には癌の進行、増悪化に深く関わっているものがあり、プロテアソーム阻害物質はこれら蛋白質の分解を抑制し安定化することにより、細胞増殖を抑制、アポトーシスの誘導、ひいては腫瘍増殖を抑制すると考えられている。したがってプロテアソームは癌治療の新しい分子標的としてきわめて有望であり、その阻害物質は優れた癌治療薬になると考えられている。

そこで微生物代謝産物からプロテアソーム阻害物質の探索を行い、新規阻害物質チロペプチンを見出した。

第1章では、微生物代謝産物よりプロテアソーム阻害物質の探索を行い、土壌より単離した一菌株 MK993-dF2 株の培養液中に新規プロテアソーム阻害物質チロペプチンを生産していることを見出した。チロペプチンの生産菌株である MK993-dF2 株について形態学的特徴、生理学的性質、化学分類学的特徴、16S リボゾーム RNA の部分塩基配列の解読により、放線菌 *Kitasatospora* 属と同一種と判定し、本菌株を *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 とした。本菌株の培養液 10 リットルより、溶媒抽出法、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによりチロペプチン A を 1.4 mg、B を 1.1 mg 単離した。

第2章では、新規プロテアソーム阻害物質チロペプチン A および B の物理化学的性状ならびに各種 NMR スペクトル解析に基づく構造解析について検討した。チロペプチンは TLC 呈色反応、IR、¹³C NMR および ¹H NMR によりアルデヒド基を有するペプチド化合物であることが分かった。しかしチロペプチンは、アルデヒド基の α 位において異性体が存在し、またそれぞれを分離することができず複雑な NMR スペクトルを示した。そこでアルデヒド基をヒドロキシメチル基へ還元することにより、それぞれの異性体を分離することができ、その解析を容易にした。各アルコール体の各種 NMR スペクトルを解析し、それぞれの平面構造を決定した。各アミノ酸残基の立体構造は、酸加水分解生成物の解析により決定し、以上によりチロペプチン A の構造をイソバレリル-L-チロシル-L-バリル-DL-チロシナール、B の構造をブチリル-L-チロシル-L-ロイシル-DL-チロシナールと決定した。

第 3 章では、チロペプチンの合成について検討した。チロペプチンは *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株の培養により発酵生産できるが、その生産性は極めて低かった。そこでチロペプチンを合成的に大量に供給することを計画し、その実践的かつ効率的な合成方法の開発を行った。L-チロシノールを出発物質として 10 工程を経てチロペプチン A および B を収率よく合成した。

第 4 章では、チロペプチンのプロテアソーム阻害活性について検討した。チロペプチン A はプロテアソームのキモトリプシン様活性に対して $0.2 \mu\text{M}$ (IC_{50} 値) の阻害活性を示した。またトリプシン様活性には $2.9 \mu\text{M}$ であり、PGPH 活性には $200 \mu\text{M}$ でも阻害活性が認められなかった。最も強い阻害活性を示したキモトリプシン様活性に対して、チロペプチン A の酵素阻害反応は可逆的あり、その阻害様式は基質に対して拮抗型であることを明らかにした。チロペプチン B は A よりも阻害活性が弱く約 2 分の 1 程度であった。またラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞を用いた実験において、チロペプチン A が細胞膜を透過し細胞内のプロテアソームを阻害することを明らかにするとともに、細胞内にプロテアソームの基質であるユビキチン化蛋白の蓄積を認めた。さらに神経突起の伸長をとまなう形態変化を観察した。

第 5 章では、チロペプチンの阻害活性の増強と特異性の増大を図るため、チロペプチン類縁体の合成を行った。分子モデリングの手法を用いて、まずチロペプチン A とウシの 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性を司る $\beta 5$ および $\beta 6$ サブユニットに結合した三次元複合体モデルを構築した。そのモデルから得られた情報を基に、チロペプチン A 類縁体を分子設計し合成した。合成したチロペプチン類縁体 TP-104 は、プロテアソームのキモトリプシン様活性に対して IC_{50} 値 $0.007 \mu\text{M}$ の強い阻害活性を示し、リード化合物として用いたチロペプチン A よりも 20 倍阻害活性が向上した。また合成類縁体である TP-110 は、プロテアソームのキモトリプシン様活性に対して強い阻害活性を示すが、トリプシン様活性および PGPH 活性には $100 \mu\text{M}$ でも阻害活性を示さず、非常に特異性の高い阻害物質であった。

第 6 章では、これらチロペプチン類縁体の抗癌活性について検討した。チロペプチン類縁体はヒト前立腺癌 PC-3 細胞において増殖抑制活性を示し、類縁体の中でも TP-110 は特に強い効果を示し、その IC_{50} 値は $0.03 \mu\text{M}$ であった。そして細胞周期の S 期移行を阻害し G1 期に停止し、PC-3 細胞内の p21^{CIP1/WAF1} および p27^{KIP1} の蛋白量を増加させた。さらに TP-110 は PC-3 細胞にクロマチン凝縮や DNA

断片化を示し、アポトーシスを誘導することを明らかにした。また PC-3 細胞移植マウスにおいて TP-110 は、有意に腫瘍増殖を抑制し、*in vivo* でも抗腫瘍効果を示した。

以上のように、天然よりプロテアソーム阻害物質を探索し、新規阻害物質チロペプチンを見出した。チロペプチンをリード化合物として誘導体研究を行い、阻害活性ならびに特異性を改善するとともに、*in vivo* で抗腫瘍活性を示す阻害物質を創製し、創薬に一つの途を開いた。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜りました静岡大学農学部教授岡部満康博士に深く感謝致します。また本論文の御校閲と適切な御教示を賜りました同大学農学部教授朴龍洙博士、同大学農学部教授河岸洋和博士、岐阜大学農学部教授加藤宏治博士、信州大学農学部教授柴井博四郎博士に深謝致します。

本研究をまとめるに際し、御指導、御鞭撻を賜りました財団法人微生物化学研究会理事長野々村禎昭博士ならびに微生物化学研究センターセンター長赤松稷博士に衷心より感謝致します。

また本研究の遂行にあたり、貴重な御助言、御指導を賜りました元微生物化学研究所所長竹内富雄博士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました沼津創薬医科学研究所所長池田大四郎博士ならびに元微生物化学研究所飯沼寛信博士に心から感謝致します。また本研究を遂行するにあたり、御指導、御助言を賜りました元微生物化学研究所浜田雅博士、長縄博博士、澤力博士、沼津創薬医科学研究所國元節子博士に深謝致します。

スクリーニング系の構築をはじめ多岐にわたり、多大なる御協力、御援助を頂きました微生物化学研究センター生物活性推進グループ関澤隆一博士に深く感謝致します。生産菌の同定に際しては、同センター生物活性推進グループ本間淑子氏、木下直子氏、橋爪秀樹氏に、合成実験に際しては、日吉創薬化学研究所廣沢世平博士、財団法人微生物化学研究会特定研究推進グループ阿部雅年氏、微生物化学研究センター分子構造検討グループ渡辺匠博士、元微生物化学研究所松本直樹博士に、計算化学に際しては、微生物化学研究センター分子構造検討グループ梅沢洋二博士に、機器分析に際しては、同センター分子構造検討グループ澤竜一博士、久保田由美子氏に、生物活性の評価に際しては、沼津創薬医科学研究所飯島正富博士、川田学博士、増田徹氏、大庭俊一氏、井上裕幸氏、山崎洋子氏、微生物化学研究センター生物活性推進グループ細川信夫博士、野坂千里氏に多大な御協力、御援助を頂きました。心より感謝致します。

最後に、ここにお名前を挙げるのでできなかった微生物化学研究センター各グループならびに沼津創薬研究所の皆様にも大変にお世話になりました。慎んで感謝致します。

参考文献

1. Takeuchi, T.; T. Hikiji, K. Nitta, S. Yamazaki, S. Abe, H. Takayama & H. Umezawa: Biological studies on kanamycin. *J. Antibiotics* 10:107-114, 1957
2. Umezawa, H.; H. Mezawa, M. Ueda, K. Maeda, K. Yagishita, S. Kondo, Y. Okami, R. Utahara Y. Osato, K. Nitta & T. Takeuchi: Production and isolation of a new antibiotic. kanamycin. *J. Antibiotics* 10: 181-188, 1957
3. Maeda, K.; M. Ueda, K. Yagishita, S. Kawaji, S. Kondo, M. Murase, T. Takeuchi, Y. Okami & H. Umezawa: Studies on kanamycin. *J. Antibiotics* 10: 228-231 1957
4. Suda, H.; T. Takita, T. Aoyagi & H. Umezawa: The structure of bestatin. *J. Antibiotics* 29: 100-101, 1976
5. Nakamura, H.; H. Suda, T. Takita, T. Aoyagi & H. Umezawa. X-ray structure determination of (2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid, a new amino acid component of bestatin. *J. Antibiotics* 29: 102-103, 1976
6. Umezawa, H.; T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada & T. Takeuchi: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiotics* 29: 97-99, 1976
7. Abe, F.; K. Shibuya, M. Uchida, K. Takahashi, H. Horinishi, A. Matsuda, M. Ishizuka, T. Takeuchi & H. Umezawa: Effect of bestatin on syngeneic tumors in mice. *Gann* 75: 89-94, 1984
8. Shibuya, K.; E. Hayashi, F. Abe, K. Takahashi, H. Horinishi, M. Ishizuka, T. Takeuchi & H. Umezawa: Enhancement of interleukin 1 and interleukin 2 releases by ubenimex. *J. Antibiotics* 40: 363-369, 1987
9. Ishizuka, M.; T. Masuda, S. Mizutani, T. Takeuchi & H. Umezawa: Antitumor cells found in tumor-bearing mice given ubenimex. *J. Antibiotics* 40: 697-701, 1987
10. Endo, A.; M. Kuroda & Y. Tsujita: ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J. Antibiotics* 29: 1346-1348, 1976
11. Endo, A.; Y. Tsujita, M. Kuroda & K. Tanzawa: Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur. J. Biochem.* 77: 31-36, 1977

12. Coux, O.; K. Tanaka & A. L. Goldberg: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847, 1996
13. Hershko, A. & A. Ciechanover: The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479, 1998
14. Etlinger, J. D. & A. L. Goldberg: A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 54-58, 1977
15. Ciechanover, A.; Y. Hod & A. Hershko: A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 1100-5, 1978
16. Charette, M. F.; G. W. Henderson & A. Markovitz: ATP hydrolysis-dependent protease activity of the lon (capR) protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4728-4732, 1981
17. Chung, C. H. & A. L. Goldberg: The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4931-4935, 1981
18. Schlesinger, D. H.; G. Goldstein & H. D. Niall: The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14: 2214-2218, 1975
19. Schlesinger, D. H. & G. Goldstein: Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature* 255:42304, 1975
20. Zachariae, W. & K. Nasmyth: Whose end is destruction: cell division and anaphase-promoting complex. *Genes & Dev.* 13: 2039-2058, 1999
21. Deshaies, R. J.: SCF and Cullin/RING-H2-based ubiquitin-ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 435-467, 1999
22. Scheffner, M.; J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra & P. M. Howley: The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505, 1993
23. Kumar, S.; K. F. Harvey, M. Kinoshita, N. G. Copeland, M. Noda & N. A. Jenkins: cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse Nedd4 gene. *Genomics* 40: 435-443, 1997
24. Huibregtse, J. M.; M. Scheffner, S. Beaudenon & P. M. Howley: A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2563-2567, 1995

25. Patton, E. E.; A. R. Willems & M. Tyers: Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends Genet.* 14: 236-243, 1998
26. Honda, R.; H. Tanaka & H. Yasuda: Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420: 25-27, 1997
27. Shimura, H.; N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka & T. Suzuki: Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25: 302-5, 2000
28. Imai, Y.; M. Soda & R. Takahashi: Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275: 35661-35664, 2000
29. Zhang, Y.; J. Gao, K. K. Chung, H. Huang, V. L. Dawson & T. M. Dawson: Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13354-13359, 2000
30. Lorick, K. L.; J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama & A. M. Weissman: RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11364-11369, 1999
31. Iwai, K.; K. Yamanaka, T. Kamura, N. Minato, R. C. Conaway, J. W. Conaway, R. D. Klausner & A. Pause: Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12436-12441, 1999
32. Lisztwan, J.; G. Imbert, C. Wirbelauer, M. Gstaiger & W. Krek: The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* 13: 1822-1833, 1999
33. DeMartino, G.N. & C. A. Slaughter: The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274: 22123-22126, 1999
34. Voges, D.; P. Zwickl & W. Baumeister: The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 1015-1068, 1999
35. Groll, M.; L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik & R. Huber: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386: 463-471, 1997

36. Glickman, M. H.; D. M. Rubin, H. Fu, C. N. Larsen, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, R. Vierstra, W. Baumeister, V. Fried & D. Finley: Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.* 26: 21-28, 1999
37. Maki, C.G. & P. N. Howley: Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell Biol.* 17: 355-363, 1997
38. Pagano, M.; S. W. Tam, A. M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P. R. Yew, G. F. Draetta & M. Rolfe: Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: 682-685, 1995
39. Ciechanover, A.; J. A. DiGiuseppe, B. Bercovich, A. Orian, J. D. Richter, A. L. Schwartz & G. M. Brodeur: Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 139-143, 1991
40. Chiarle, R.; L. M. Budel, J. Skolnik, G. Frizzera, M. Chilosi, A. Corato, G. Pizzolo, J. Magidson, A. Montagnoli, M. Pagano, B. Maes, C. De Wolf-Peeters & G. Inghirami: Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 95: 619-26, 2000
41. Palombella, V. J.; O. J. Rando, A. L. Goldberg, & T. Maniatis: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78: 773-785, 1994
42. Baldwin A.S.: The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 649-683, 1996
43. Wang, C. Y.; M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel & A. S. Baldwin Jr.: NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683, 1998
44. Viatour, P.; M. Bentires-Alj, A. Chariot, V. Deregowski, L. de Leval, M. P. Merville & V. Bours: NF- κ B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia*. 17: 1349-1356, 2003
45. Brannigan, J. A.; G. Dodson, H. J. Duggleby, P. C. Moody, J. L. Smith, D. R. Tomchick & A. G. Murzin: A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378:

416-419, 1995

46. Kisselev A. F. & A. L Goldberg: Proteasome inhibitor: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol.* 8: 739-758, 2001
47. Orłowski, M. & S. Wilk: Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 1-16, 2000
48. Tsubuki, S.; H. Kawasaki, Y. Saito, N. Miyashita, M. Inomata & S. Kawashima: Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1195-1201, 1993
49. Jensen, T. J.; M. A. Loo, S. Pind, D. B. Williams, A. L. Goldberg & Riordan Jr. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83: 129-35, 1995
50. Iqbal, M.; S. Chatterjee, J. C. Kauer, M. Das, P. Messina, B. Freed, W. Biazzo & R. Siman: Potent inhibitors of proteasome. *J. Med. Chem.* 38: 2276-2277, 1995
51. Sun, J, S. Nam, C. S. Lee, B. Li, D. Coppola, A. D. Hamilton, Q. P. Dou & S. M. Sebti: CEP1612, a dipeptidyl proteasome inhibitor, induces p21 WAF1 and p27KIP1 expression and apoptosis and inhibits the growth of the human lung adenocarcinoma A-549 in nude mice. *Cancer Res.* 61: 1280-1284, 2001
52. Bogyo, M.; J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg & H. Ploegh: Covalent modification of the active site threonine of proteasomal β subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of β inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6629-6634, 1997
53. Omura, S.; T. Fujimoto, K. Otaguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka & Y. Sasaki: Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neurogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiotics* 44: 113-116, 1991
54. Fenteany, G.: R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey & S. L. Schreiber: Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268: 726-31, 1995
55. Hanada, M.; K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi & T. Oki: Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J. Antibiotics* 45: 1746-1752, 1992
56. Sin, N.: K. B. Kim, M. Eloffson, L. Meng, H. Auth, B. H. Kwok & C. M. Crews: Total synthesis of the

- potent proteasome inhibitor epoxomicin: a useful tool for understanding proteasome biology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2283-2288, 1999
57. Meng, L.; R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin & C. M. Crews: Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10403-8, 1999.
58. Koguchi, Y.; J. Kohno, M. Nishio, K. Takahashi, T. Okuda, T. Ohnuki & S. Komatsubara: TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J. Antibiotics* 53: 105-109, 2000
59. Adams, J.; M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y-T. Ma, L. Plamonda & R. L. Stein: Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 333-338, 1998
60. Adams, J.; V. J. Palombella, E. A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D. D. Lazarus, J. Maas, C. S. Pien, S. Prakash & P. J. Elliott: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 59: 2615-2622, 1999
61. Hideshima, T.; P. Richardson, D. Chauhan, V. J. Palombella, P. J. Elliott, J. Adams & K. C. Anderson: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 61: 3071-3076, 2001
62. Hideshima, T.; D. Chauhan, P. Richardson, C. Mitsiades, N. Mitsiades, T. Hayashi, N. Munshi, L. Dang, A. Castro, V. Palombella, J. Adams & K. C. Anderson: NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277: 16639-16647, 2002
63. Mitsiades, N.; C. S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, G. Fanourakis, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T. A. Libermann, S. P. Treon, N. C. Munshi, P. G. Richardson, T. Hideshima & K. C. Anderson: Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14374-14379, 2002
64. Richardson, P. G.; B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S. V. Rajkumar, G. Srkalovic, M. Alsina, R. Alexanian, D. Siegel, R. Z. Orlowski, D. Kuter, S. A. Limentani, S. Lee, T.

- Hideshima, D. L. Esseltine, M. Kauffman, J. Adams, D. P. Schenkein & K. C. Anderson: A phase II study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *New Engl. J. Med.* 348: 2609-2617, 2003
65. Ugai, S.; T. Tamura, N. Tanahashi, S. Takai, N. Komi, C. H. Chung, K. Tanaka & A. Ichihara: Purification and characterization of the 26S proteasome complex catalyzing ATP-dependent breakdown of ubiquitin-ligated proteins from rat liver. *J. Biochem.* 113: 754~768, 1993
66. Shirling, E. B. & D. Gottlieb: Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriology* 16: 313~340, 1966
67. Waksman, S. A.: Classification, identification and descriptions of genera and species. *In The Actinomycetes*, Vol. II. pp. 1~363, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1961
68. 日本色彩研究所 (財) : 色の標準 Guide to colour standard. 日本色彩社, 東京, 1951
69. Taylor, H. D.; L. Knoche & W. C. Granville: *Color harmony manual*, 4th edn, Container Corporation of America, Chicago, 1958
70. Pridham, T. G. & D. Gottlieb: The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species determination. *J. Bacteriology* 56: 107~114, 1948
71. Miyadoh, S.: Identification procedure at the genus level. *In Identification Manual of Actinomycetes. Ed., S. Miyadoh et al.*, pp. 9~19, Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo, 2001
72. Becker, B.; M. P. Lechevalier, R. E. Gordon & H. A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiology* 12: 421~423, 1964
73. Staneck, J. L. & G. D. Roberts: Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiology* 28: 226~231, 1974
74. Minnikin, D. E.; P. V. Patel, L. Alshamaony & M. Goodfellow: Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriology* 27: 104~117, 1977
75. Tamaoka, J.; Y. Katayama-Fujimura & H. Kuraishi: Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriology* 54: 31~36, 1983
76. Suzuki, K. & K. Komagata: Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform

- bacteria. Int. J. Syst. Bacteriology 33: 188~200, 1983
77. Hamada, M.; N. Kinoshita, S. Hattori, A. Yoshida, Y. Okami, K. Higashide, N. Sakata & M. Hori: *Streptomyces kasugaensis* sp. nov.: A new species of genus *Streptomyces*. Actinomycetol. 9: 27~36, 1995
78. Omura, S.; Y. Takahashi, Y. Iwai & H. Tanaka: *Kitasatosporia*, a new genus of the order actinomycetales. J Antibiotics 35: 1013-1019, 1982
79. Zhang, Z.; Y. Wang & J. Ruan: A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). Int. J. Syst. Bacteriology 47: 1048~1054, 1997
80. Nakagaito, Y.; A. Shimazu, A. Yokota & T. Hasegawa: Proposal of *Streptomyces atroaurantiacus* sp. nov., *Streptomyces kifunensis* sp. nov. and transferring *Kitasatosporia cystarginea* Kusakabe and Isono to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces cystargineus* comb. nov. J. Gen. Appl. Microbiol. 38: 627-633, 1992
81. Tajima, K.; Y. Takahashi, A. Seino, Y. Iwai & S. Omura: Description of two novel species of the genus *Kitasatospora* Omura et al. 1982, *Kitasatospora cineracea* sp. nov. and *Kitasatospora niigatensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1765-71, 2001
82. Groth, I.; B. Schütze, T. Boettcher, C. B. Pullen, C. Rodriguez, E. Leistner & M. Goodfellow: *Kitasatospora putterlickiae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil, transfer of *Streptomyces kifunensis* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora kifunensis* comb. nov., and emended description of *Streptomyces aureofaciens* Duggar 1948. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 2033-2040, 2003
83. Mitchell, A. R.; S. B. H. Kent, I. C. Chu & R. B. Merrified: Quantitative determination of D- and L- amino acids by reaction with *tert*-butyloxycarbonyl-L-leucine-*N*-hydroxysuccinimide ester and chromatographic separation as L,D- and L,L-dipeptides. Anal. Chem. 50: 637-640, 1978
84. Nagai, M; K. Ogawa, Y. Muraoka, H. Naganawa, T. Aoyagi & T. Takeuchi: Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase, produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. II. Structure determination and inhibitory activities. J. Antibiotics 44: 956-961, 1991
85. Aoyagi, T.; T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda & H. Umezawa: Leupeptins, new proteinase inhibitors from actinomycetes. J. Antibiotics 22: 283-286, 1969
86. Aoyagi, T.; S. Miyata, M. Nanbo, F. Kojima, M. Ishizuka, T. Takeuchi & H. Umezawa: Biological activities

- of leupeptins. *J. Antibiotics* 22: 558, 1969
87. Kondo, S.; K. Kawamura, J. Iwanaga, M. Hamada, T. Aoyagi, K. Maeda, T. Takeuchi & H. Umezawa: Isolation and characterization of leupeptins produced by Actinomycetes. *Chem. Pharm. Bull.* 17: 714-721, 1969
 88. Kawamura, K.; S. Kondo, K. Maeda & H. Umezawa: Structures and syntheses of leupeptins Pr-LL and Ac-LL. *Chem. Pharm. Bull.* 17: 1902-1909, 1969
 89. Obin, M.; E. Mescos, X. Gong, A. L. Haas, J. Joseph & A. Taylor: Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274: 11789-11795, 1999
 90. Tsubuki, S.; H. Kawasaki, Y. Saito, N. Miyashita, M. Inomata & S. Kawashima: Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1195-1201, 1993
 91. Mosman, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983
 92. Saito, Y. & S. Kawashima: The neurite-initiating effect of a tripeptide aldehyde protease inhibitor on PC12h cells. *J. Biochem.* 106: 1035-1040, 1989
 93. Ohtani-Kaneko, R.; K. Takada, M. Iigo, M. Hara, H. Yokosawa, S. Kawashima, K. Ohkawa & K. Hirata: Proteasome inhibitors which induce neurite outgrowth from PC12h cells cause different subcellular accumulation of multi-ubiquitin chains. *Neurochem. Res.* 23: 1435-1443, 1998
 94. Tsubuki, S.; Y. Saito, M. Tomioka, H. Ito & S. Kawashima: Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptide aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J. Biochem.* 119: 572-576, 1996
 95. Heinemeyer, W.; N. Tröndle, G. Albrecht & D. H. Wolf: PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry* 33: 12229-12237, 1994
 96. Unno, M.; T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka & T. Tsukihara: Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution. *J. Biochem.* 131:

171-173, 2002

97. Unno, M.; T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka & T. Tsukihara: The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10: 609-618, 2002
98. Nishio, M.; M. Hirota & Y. Umezawa: *The CH/π Interaction. Evidence, Nature and Consequences* (Wiley-VCH, New York), 1998
99. Umezawa, Y. & M. Nishio: CH/π interactions as demonstrated in the crystal structure of guanine-nucleotide binding proteins, Src homology-2 domains and human growth hormone in complex with their specific ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 6: 493-504, 1998
100. Löwe, J.; D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister & R. Huber: Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268: 533-539, 1995
101. Heinemeyer, W.; M. Fisher, T. Krimmer, U. Stachon & D. H. Wolf: The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272: 25200-25209, 1997
102. Groll, M.; W. Heinemeyer, S. Jäger, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf & R. Huber: The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10976-10983, 1999
103. Furet, P.; P. Imbach, P. Fürst, M. Lang, M. Noorani, J. Zimmermann & C. Garcia-Echeverria: Modeling of the binding mode of a non-covalent inhibitor of the 20S proteasome. Application to structure-based analogue design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 1321-1324, 2001
104. Garcia-Echeverria, C.; P. Imbach, D. France, P. Fürst, M. Lang, M. Noorani, D. Scholz, J. Zimmermann & P. Furet: A new structural class of selective and non-covalent inhibitors of the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 1317-1319, 2001
105. Furet, P.; P. Imbach, P. Fuerst, M. Lang, M. Noorani, J. Zimmermann & C. Garcia-Echeverria: Structure-based optimisation of 2-aminobenzylstatine derivatives: Potent and selective inhibitors of the chymotrypsin-like activity of the human 20S proteasome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 1331-1334, 2002
106. Kawada, M.; I. Usami, S. Ohba, T. Someno, J. Kim, Y. Hayakawa, K. Nose & M. Ishizuka: Hygrolidin induces p21 expression and abrogates cell cycle progression at G1 and S phases. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 298: 178-183, 2002

107. Taniguchi, T.; H. Endo, N. Chikatsu, K. Uchamaru, S. Asano, T. Fujita, T. Nakahata & T. Motokura:
Expression of p21^(Cip1/Waf1/Sdi1) and p27^(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis.
Blood 93: 4167-4178, 1999
108. Yang, D.; O. M. Zack Howard, Q. Chen & J. J. Oppenheim: Immature Dendritic Cells Generated from
Monocytes in the Presence of TGF- β 1 Express Functional C-C Chemokine Receptor 6. J. Immunol. 163:
1737-1741, 1999
109. Harper, J. W.; G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi & S. J. Elledge: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is
a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75: 805-816, 1993
110. Xiong, Y.; G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi & D. Beach: p21 is a universal inhibitor of
cyclin kinases. Nature 366: 701-704, 1993
111. Kato, J. Y.; M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massague & C. J. Sherr: Cyclic AMP-induced G1 phase arrest
mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. Cell 79: 487-496, 1994
112. Toyoshima, H. & T. Hunter: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to
p21. Cell 78: 67-74, 1994
113. Polyak, K.; M. H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J. M. Roberts, P. Tempst & J. Massague: Cloning
of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.
Cell 78: 59-66, 1994
114. WYLLIE, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease
activation. Nature 284: 555-556, 1980