

生体膜脂質に作用する天然有機化合物の探索と
生物活性発現機序に関する研究

2015

京都大学薬学研究科

医薬創成情報科学専攻

システムケモセラピー・制御分子学分野

杉山 龍介

目次

序論.....	1
第一章 膜脂質に結合する天然有機化合物の探索	
1. 1. 脂質結合化合物探索系の構築.....	6
1. 2. 微生物培養抽出物のスクリーニング.....	8
1. 3. 考察.....	9
1. 4. 実験項.....	10
第二章 放線菌が産生する heronamide 類に関する研究	
2. 1. Heronamide 類の単離と構造修正.....	11
2. 1. 1. 8-Deoxyheronamide C および heronamide 類の単離.....	11
2. 1. 2. Heronamide A の構造修正.....	13
2. 1. 3. Heronamide C の化学変換と 8-deoxyheronamide C の絶対立体化学.....	15
2. 1. 4. 小括.....	16
2. 2. Heronamide 類の作用機序.....	18
2. 2. 1. 分裂酵母に対する生育阻害活性.....	18
2. 2. 2. 表面プラズモン共鳴測定による標的脂質分子の探索.....	19
2. 2. 3. 分裂酵母の遺伝子変異株を用いた活性発現メカニズムの解析.....	21
2. 2. 4. 小括.....	24
2. 3. 考察.....	25
2. 4. 実験項およびスペクトルデータ.....	27
第三章 放線菌の複合培養液から得られる新規アルカロイド群に関する研究	
3. 1. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ)類の単離・構造決定と作用機序解析.....	34
3. 1. 1. 5aTHQ 類の単離.....	34
3. 1. 2. 5aTHQ-10a の全合成と絶対立体化学.....	37
3. 1. 3. 分裂酵母に対する 5aTHQ 類の生育阻害活性.....	40

3. 1. 4. 5aTHQ 類の脂質親和性の解析	41
3. 1. 5. 5aTHQ 類が形成する凝集体の物性解析	44
3. 1. 6. 小括	46
3. 2. Streptoaminal 類の単離・構造決定・全合成と生合成機構	47
3. 2. 1. Streptoaminal 類の単離	47
3. 2. 2. Streptoaminal-9n の相対立体化学	52
3. 2. 3. Streptoaminal-9n の全合成と絶対立体化学	53
3. 2. 4. Streptoaminal 類の生物活性	56
3. 2. 5. 5aTHQ 類および streptoaminal 類の生合成解析	59
3. 2. 6. 小括	62
3. 3. 考察	63
3. 4. 実験項およびスペクトルデータ	68
結語	97
参考文献	99
論文目録	104
謝辞	105

略語一覽

9-BBN	: 9-borabicyclo[3.3.1]nonane
AmB	: amphotericin B
ATR	: attenuated total reflectance
Boc	: <i>tert</i> -butoxycarbonyl
CD	: circular dichroism
Cfw	: calcofluor white
COSY	: correlation spectroscopy
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DIC	: differential interference contrast
DIEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	: <i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMPC	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
DOPC	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPE	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
dppf	: 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EGTA	: ethylene glycol tetraacetic acid
ESI	: electrospray ionization
FT	: fourier transform
GTPase	: guanosine triphosphate hydrolase
HMBC	: hetero-nuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: hetero-nuclear multiple quantum coherence
IR	: infrared
IT	: ion trap
LC	: liquid chromatography
MS	: mass spectrometry
MIC	: minimum inhibitory concentration
MsCl	: methanesulfonyl chloride
MTPA	: α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid
NMR	: nuclear magnetic resonance
NOESY	: NOE correlated spectroscopy

OD	:	optical density
ODS	:	octadecylsilyl
ORF	:	open reading frame
PBS	:	phosphate buffered saline
PDA	:	photo diode array
PIPES	:	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PKS	:	polyketide synthase
POPC	:	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
ppm	:	parts per million
RNA	:	ribonucleic acid
RP-HPLC	:	reversed-phase high-performance liquid chromatography
RU	:	resonance unit
SD	:	standard deviation
SM	:	sphingomyelin
SPR	:	surface plasmon resonance
THF	:	tetrahydrofuran
TNM	:	theonellamide
TOCSY	:	totally correlated spectroscopy
TOF	:	time-of-flight
TsCl	:	<i>p</i> -toluenesulfonyl chloride
UV	:	ultra violet

序論

近年、様々な生物種のゲノムが解読され、生命現象を包括的に捉えられる時代となってきた。それに伴い、セントラルドグマを構成する DNA・RNA・タンパク質の解析方法がめざましい発展を遂げ、創薬を出口としたゲノム創薬という新しいパラダイムまで誕生した。一方で、ビタミンや金属など、遺伝子に直接コードされていない生体分子の生理機能についての理解は後れを取っているのが現状である。この大きな原因として、遺伝学を直接適用できない分子種には機能解析のための画一的な方法論が存在せず、有効な解析手段に乏しいことが挙げられる。生体膜の主成分である脂質も、そのような分子種の一つである。

両親媒性を有する脂質分子は、水溶液中でミセルや二重膜構造といった、生体には欠かせない膜構造を形成する。生体膜を構成する主な脂質分子種はグリセロリン脂質・スフィンゴ脂質・ステロールであり、たとえば不飽和炭化水素鎖を多く持つグリセロリン脂質は、膜に柔軟性や流動性を与えていると考えられている。1970年代から広く受け入れられていた流動モザイクモデル⁽¹⁾のように、脂質は従来、膜構造を構成する単なる媒質分子と考えられてきた。しかし、生体膜は特定の環境の内外を仕切るための構造体であると同時に、内外の情報や物質の交換を行う器官でもある。細胞膜を構成する脂質とタンパク質は重量比で 1 : 1 に近く、両者の間には何らかの相互作用が存在すると考えるのが自然である。実際に近年では、膜中のスフィンゴ脂質とステロールがタンパク質と会合して融点の高い会合体を作り、シグナル伝達などの生命活動を効果的に行うためのプラットフォームとして機能するという考え方（脂質ラフト仮説）が受け入れられつつある（**Figure 1**）⁽²⁾。これは、脂質が形成する流動性の低い微小環境に生理的な機能を付与しようという点が斬新であった。

多くの生命現象が生体膜上で営まれる以上、必然的に様々な疾患と生体膜微小環境との関連性にも注目が集まっている⁽³⁾。例えば、アルツハイマー病の原因とされるアミロイドタンパク質の凝集はコレステロールに富む膜ドメインで起こり、多くのウイルスは脂質ラフトドメインから侵入と発芽を行う。がん細胞の浸潤・転移も細胞膜中のコレステロールに富む微小環境がカギとなる現象で、特定の膜ドメインから低分子量タンパク質の不活化酵素が排除され、Rho1 タンパク質が活性化することが重要であるとされる⁽⁴⁾。そのため、生体膜微小環境に関する理解の深化は創薬の観点からも重要な課題といえる。

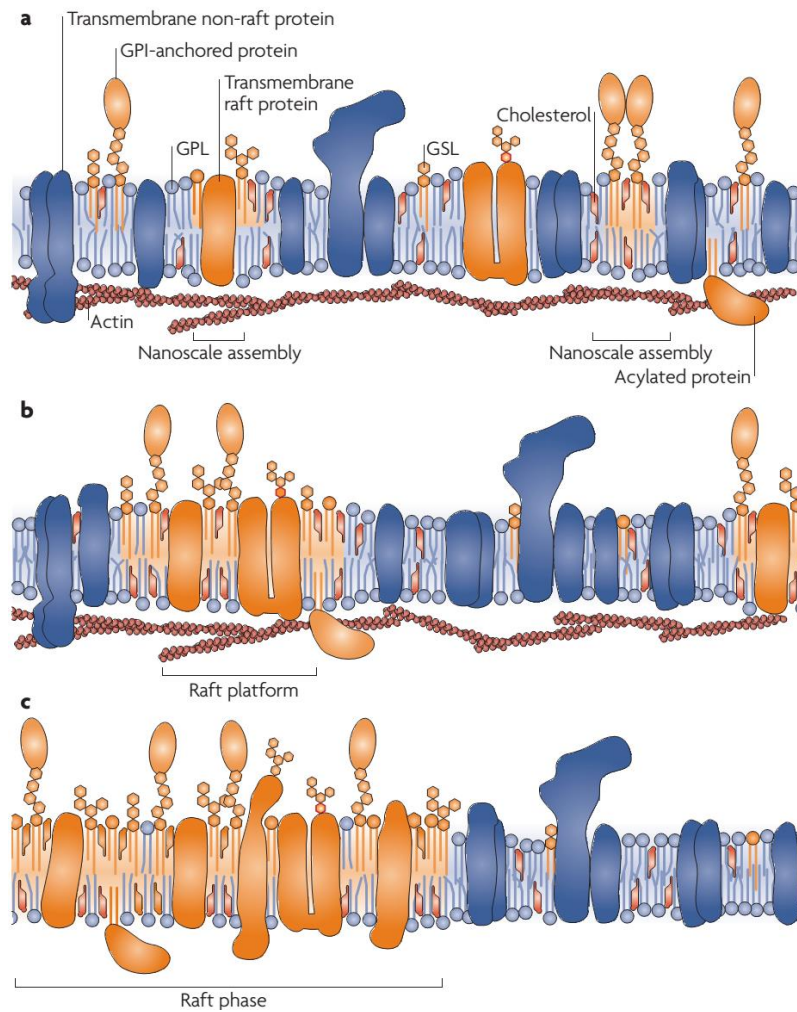


Figure 1. Raft-based heterogeneity in cell membranes. (a) Nanoscale assemblies of sterols such as cholesterol, sphingolipids such as sphingomyelin and glycosphingolipids (GSLs), and proteins in the plasma membrane fluctuate in composition. GPI-anchored proteins, transmembrane raft proteins and acylated cytosolic proteins are postulated constituents of these assemblies, which can be modulated by actin filaments. Not much is known about the state of nanoscale assemblies in the cytosolic leaflet of the membrane. Transmembrane non-raft proteins are excluded from these assemblies. **(b)** In response to external signals or the initiation of membrane trafficking events, raft platforms are formed from fluctuating assemblies through lipid–lipid, lipid–protein and protein–protein oligomerizing interactions. These platforms are important for membrane signalling and membrane trafficking. **(c)** Micrometre-sized raft ‘phases’ can be induced at equilibrium. This state can be seen in model systems such as giant unilamellar vesicles (GUVs) and also in giant plasma membrane vesicles (GMPVs) or plasma membrane spheres released from the cell. Reprinted from *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *11*, 688.⁽⁵⁾ Copyright © (2010) Macmillan Publishers Ltd.

しかし、脂質ラフト仮説の提唱から 20 年近くが経ってもなお、生体膜微小環境の実態はベールに包まれたままである。例えば、その形成メカニズムは全く不明であり、現時点では、膜タンパク質が脂質分子とクラスター化して細胞膜に輸送されるという脂質シエルモデル⁽⁶⁾や、ゴルジ体で脂質ラフトが形成されるという仮説⁽⁷⁾が議論されているに過ぎない。検証がなかなか進まない原因の一つは、冒頭で述べたように、脂質分子が遺伝子に直接コードされておらず、タンパク質などと同列の機能解析手法を適用できないためと考えられる。そこで著者は、生体膜微小環境の構造・機能の理解を目的とする新しい解析手法として、ケミカルジェネティクス（化学遺伝学）の適用を構想した。

化学遺伝学とは、特定の細胞内標的をもつ低分子化合物を用いて生命現象を理解しようとする方法論であり、古典的な遺伝学における「遺伝子変異の導入」を「化合物処理」に置き換えたものといえる。本来は、タンパク質の機能解析において遺伝学と相補する強力なツールとして用いられてきた方法論であり、短いタイムスパンで、可逆的に、複数のアイソフォームが存在していてもそれらを同時に機能変調することが可能であるなどの利点がある。実際に、タンパク質の機能を変調する多くの化合物がこれまでに見出され、標的タンパク質の生理的役割を分子レベルで解明する大きな助けとなってきた⁽⁸⁾。化学遺伝学の最も注目すべき点は、脂質分子などの、遺伝学が直接的に適用できない生体分子にも応用可能であると考えられることである。すなわち、特定の脂質分子に直接結合し、その機能をかく乱する低分子化合物があれば、作用メカニズム解析を通じて標的脂質の生理機能に迫れると期待できる（Figure 2）。

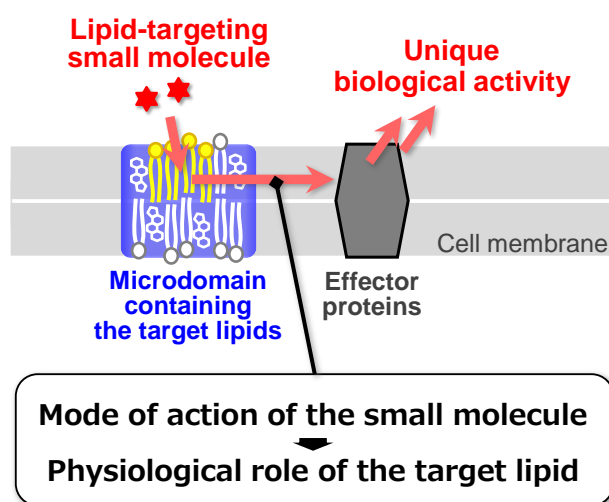


Figure 2. Strategy of this study. The author focuses on small molecules which induce unique phenotypes by binding to membrane lipids. Morphological changes caused by these compounds may be due to perturbation of the protein functions regulated by their target lipid molecules or membrane microdomains. Therefore, mode of actions of these compounds are expected to be linked with physiological functions of their target lipids.

脂質膜と相互作用する化合物はペプチドをはじめ、ポリエンマクロリドやサポニン、リポペプチドなど、これまでに多数報告されている (**Figure 3**)。しかし、リボソーム性ペプチドを除く低分子化合物においては、脂質との相互作用が分子レベルで明らかになっているものは無いといってよい。最も精力的に研究されているポリエン系抗真菌薬 **amphotericin B (AmB)** でさえ、40 年前に提唱されたエルゴステロールとの相互作用モデル⁽⁹⁾の真偽が未だに議論されているのが現状である。より複雑な生体膜と **AmB** との作用様式に至っては全く未解明であり、有機合成を基盤としたアプローチからようやく議論が始まったところである⁽¹⁰⁾。加えて、**AmB** を含むほとんどの脂質認識化合物は、ポア形成や膜溶解などの激しい膜傷害性を有するため、生体膜の機能解析ツールには適していない。生体膜の理解のためには、脂質分子を認識して生体膜の機能にはたらきかける化合物が必須であるが、現実には、そのような化合物はほとんど知られていない。

最近、所属研究室を含む研究グループにより、海綿由来の二環性ペプチド **theonellamide (TNM)** 類が、膜中のステロールに結合することで分裂酵母の膜タンパク質の機能を亢進することが明らかにされた (**Figure 3**)⁽¹¹⁾。TNM 類は、生体膜脂質の化学遺伝学的解析に適用可能な数少ない化合物の一つであり、実際に、TNM 類をツールとした生体膜構造の解析が進められている⁽¹²⁾⁽¹³⁾。一方、TNM 類の欠点として、海綿由来であり、非常に複雑な分子構造を有するため、有機化学的手法による量的供給や構造展開が難しい点が挙げられる。ツール化合物が単純であるほど、構造活性相関やプローブ化など、より多面的なアプローチが実現可能であることを考えると、そのような化合物の新規取得は必須である。また、生体膜の機能変調という生物活性を示す化合物の希少性から、直接的に創薬への可能性を拓くことも期待できる。

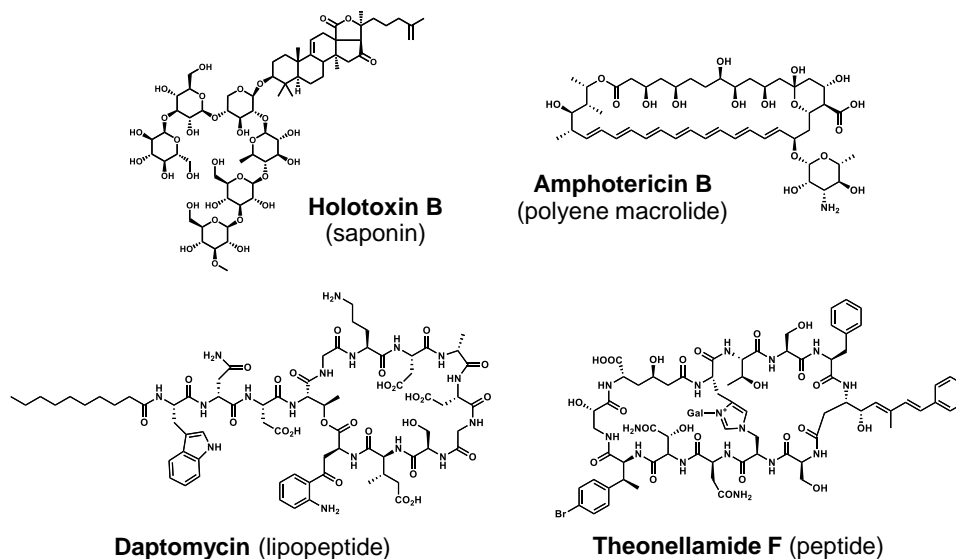


Figure 3. Natural products known to bind membrane lipids.

このような背景のもと著者は、特定の膜脂質に結合しユニークな表現型を示す天然有機化合物の新規取得とその作用機序解明を本研究の目的とし、膜脂質が制御する生理現象の理解を目指した。第一章では、分裂酵母をモデルに、膜脂質に結合する天然物の探索系を構築し、ヒット化合物として heronamide 類、5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ)類を見出した。第二章では、heronamide 類が飽和炭化水素鎖から成る脂質に結合し、分裂酵母に対して細胞壁の異常合成を引き起こす、新しいクラスの脂質結合化合物であることを明らかにした。そして第三章では、5aTHQ 類が凝集体を形成することで脂質膜に結合するという興味深い性質を示すことを明らかにした。また、2種類の細菌を複合培養した場合のみ 5aTHQ 類が生産されるという実験結果に着目した研究を展開し、スピロヘミアミナル構造を有する streptoaminal 類を発見したほか、両化合物群の生合成機構に関する知見を得た。次頁より、各章ごとに研究成果の詳細を述べる。

第一章 膜脂質に結合する天然有機化合物の探索

1. 1. 脂質結合化合物探索系の構築

生体膜脂質に結合する新しい天然物を取得するため、分裂酵母を用いたスクリーニング系の構築を行った。分裂酵母は単細胞真核生物であり、真核細胞の基本的な性質を知る際の有用なモデルとして広く利用されている。遺伝子操作技術が確立されているほか、生長の方向性が観察しやすい円筒状の細胞であり、膜ステロールの局在も細胞周期依存的に制御されていることが知られている⁽¹⁴⁾。そのため、化合物処理による表現型を脂質の局在や脂質代謝遺伝子の機能と結びつけやすいと考え、本研究で用いるモデル生物に採用した。

まず一次スクリーニングでは、酵母のステロール生合成変異株の薬剤に対する感受性変化を利用した。酵母の膜ステロールであるエルゴステロールの生合成遺伝子を欠損した変異株は、膜ステロールの分子構造が変化し、脂質を標的とする化合物に対して感受性が低下することが知られている (**Figure 1-1**)⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。例えば、*erg2* 遺伝子を破壊した分裂酵母細胞はエルゴステロールに特異的に結合する amphotericin B (AmB) を高濃度で処理しても生育が見られる。また、膜ステロールの変化が細胞膜全体の物性に影響するためか、スフィンゴ脂質を標的とする syringomycin E のように、ステロール以外の膜脂質を標的とする薬剤に対しても同様の阻害パターンを示すことがある。反対に、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide など、細胞内で効果を発揮するような薬剤に対しては、おそらく細胞膜透過性の向上により、感受性が上昇する傾向がある。そのため、*erg* 遺伝子破壊株よりも野生株の生育をよく阻害するサンプルには、何らかの膜脂質に作用する化合物が含まれていると期待できる (**Figure 1-3**)。

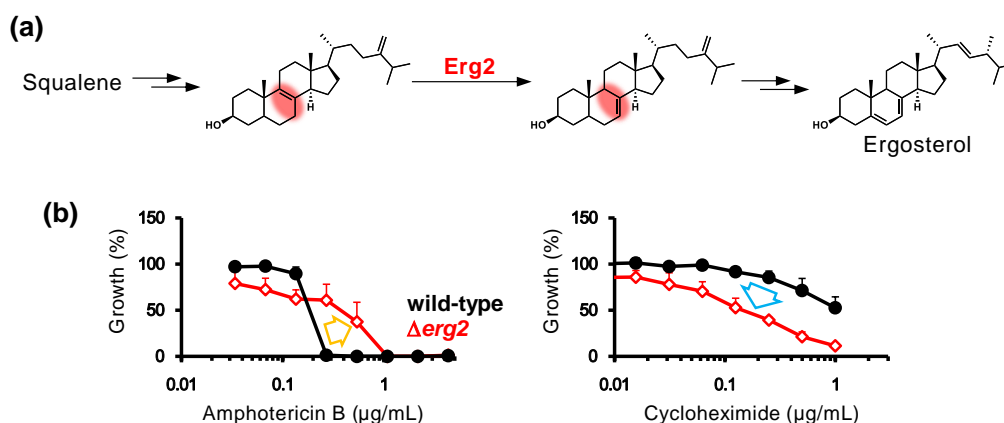


Figure 1-1. Strategy of the 1st screening for membrane-targeting natural products. (a) Biosynthetic pathway of ergosterol in fission yeast. **(b)** Growth curves of $\Delta erg2$ (red) and wild-type (black) cells treated with amphotericin B (left) or cycloheximide (right) for 24h are shown.

一次スクリーニングで得られたヒットサンプルに対し、「膜脂質への結合を起点に細胞の生命活動をかく乱する化合物」を含むものをより絞り込むため、既知物質の排除を目的とした2種類の2次スクリーニングを行った (**Figure 1-2**)。1つ目は、LC-MSを用いた成分分析である。今回著者が1次スクリーニングに用いたサンプルは、放線菌の培養液抽出物ライブラリーである。放線菌はAmBやpimaricinなどの多様なポリエンマクロリドを生産することが知られている。ポリエンマクロリドはエルゴステロールを認識することで興味深い生物活性を示すが、1960年代から盛んに探索・作用解析が行われている上、ポア形成などの膜傷害性があるため、生体膜の解析ツールの開拓を志向する本研究の目的には適さない。そこで、ヒットサンプルからポリエンマクロリドを含むものを排除し、新規性の高い化合物を含むと予想されるサンプルに注力することとした。ポリエンマクロリドは300 nm前後に3本の極大吸収波長をもつ特徴的なUVスペクトルを示すため、フォトダイオードアレイ付LC-MSによる分析から、サンプルに含まれるポリエンマクロリドを同定した (**Figure 1-2**)。

2つ目は、分裂酵母細胞の形態観察である。正常な分裂酵母細胞は長径10-20 μm 程度のシリンダー型をしている。しかし、脂質結合物質の膜傷害性により、例えばAmB処理細胞ではポア形成由来の浸透圧変化によると考えられる液胞の肥大化が観察される (**Figure 1-2**)⁽¹⁷⁾。サンプル処理細胞の顕微鏡観察から、液胞の肥大化や激しい膜傷害がみられるものは除き、特徴的な形態変化を示すもの、あるいは明視野では大きな変化を示さないものについて活性成分の単離を進めることとした。

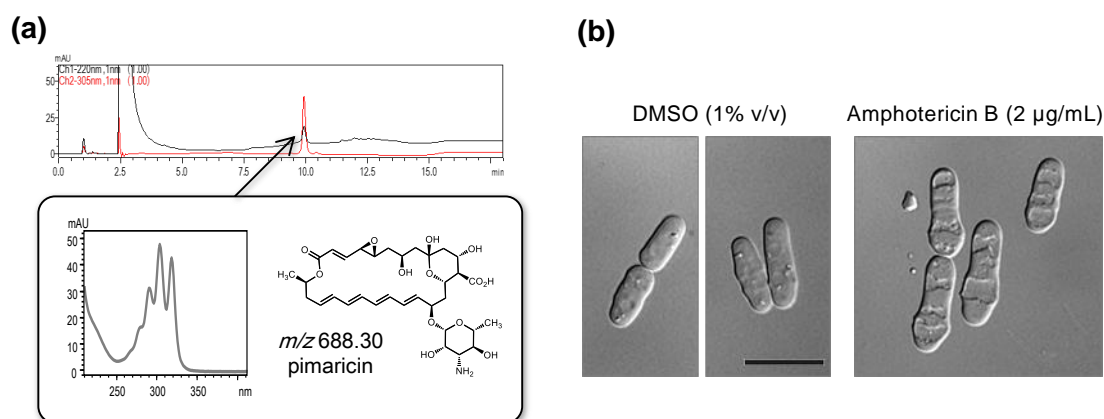


Figure 1-2. Strategy of the 2nd screening for membrane-targeting natural products. (a) LC-MS profiling of microbial broth extracts. Well-known polyene macrolides such as pimaricin can be identified from their characteristic UV spectra and m/z values. **(b)** Morphological change of fission yeast cells treated with compounds causing membrane damage. AmB-treated cells form large vacuoles probably due to channel formation by AmB. Scale bars indicate 10 μm .

1. 2. 微生物培養抽出物のスクリーニング

約 2,000 株の微生物培養液抽出物 (ブロス) について野生株・*erg2* 破壊株・*erg31/erg32* 破壊株の感受性の差を評価し、ステロール変異株に対する生育阻害が野生株より弱いものを探索した (Figure 1-3)。野生株の生育が 20%以下まで阻害されたブロスについて、濃度依存性と選択性を確認するため段階希釈を行い、再試験に付した。その結果、わずかでも *erg* 破壊株が耐性化するブロスは 66 サンプル得られた。続く LC-MS 解析から、そのうち 25 サンプルにポリエンマクロリドが含まれていることがわかった。並行して酵母の形態観察を行い、顕著な膜傷害性が見られるブロスを排除した。以上 3 段階のスクリーニングの結果、4 サンプルを精製対象株と選定して大量培養を行い、活性本体の単離を進めた (Figure 1-3)。

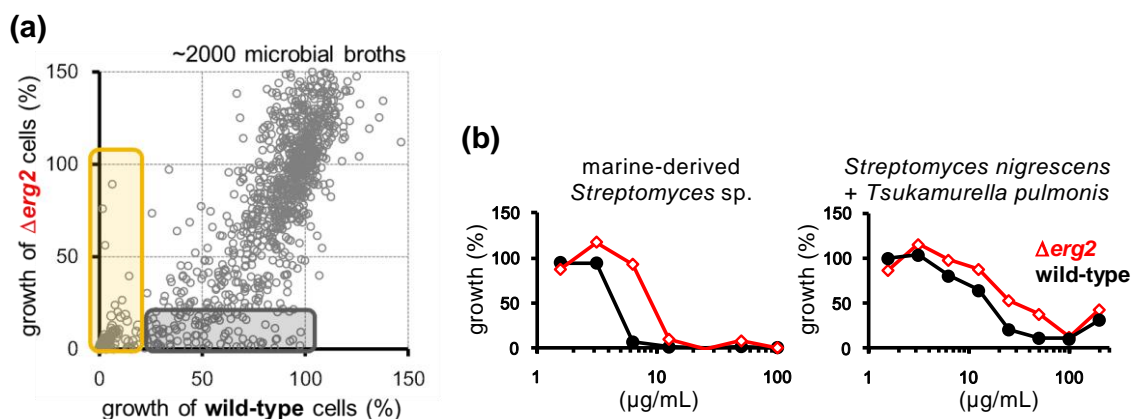


Figure 1-3. Result of the screening. (a) Growth of wild-type and $\Delta erg2$ cells treated with microbial culture extracts for 24 h are plotted. Broths plotted in the yellow square are expected to contain membrane-targeting natural products. (b) Growth curves of $\Delta erg2$ (red) and wild-type JY1 (black) cells treated with the hit broths for 24 h are shown. Culture broth of marine-derived *Streptomyces* sp. (left) contained heronamides (Chapter 2), while the combined-culture of *S. nigrescens* and *T. pulmonis* (right) produced 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and streptoaminals (Chapter 3).

1.3. 考察

第1章では、脂質に結合する低分子化合物を見出すためのスクリーニング系を構築し、約2,000の微生物培養液抽出物から4個のヒットブロスを選定した。1次スクリーニングで得た66サンプルの4割以上にポリエンマクロリドが含まれていたことから、本スクリーニング系が脂質結合物質を効率よく選別できるものと判断できる。精製対象株4サンプルのうち2つは、それぞれ第2章で述べる heronamide 類と、第3章で述べる 5aTHQ 類を見出した培養液である (Figure 1-3)。残り2サンプルについては現在、活性本体の特定には至っていない。

ユニークな生物活性を示す新しい脂質結合物質を得るためには、スクリーニングにどのような天然リソースを用いるかが重要である。Heronamide 類を含む海洋放線菌は、陸上由来のものに比べて十分に探索されていない海洋微生物のライブラリー180株から得たヒットである。5aTHQ 生産菌もまた、放線菌とミコール酸含有細菌の複合培養液 (第3章で詳述) 320株から見出されたものである。そのため、真菌や海洋生物、植物などの抽出物をスクリーニングに付すことで、全く異なるタイプの脂質結合物質が得られると期待される。所属研究室では最近、著者の構築したスクリーニング系を用いて、真菌の培養抽出物1920サンプルから脂質結合物質の探索を行った。1次スクリーニングを通過した株は13サンプルと減少したが、主に放線菌によって生産されるポリエンマクロリドを含むものは1つも無かった (Data not shown)。精製対象株に選定した培養抽出物の1つから、脂質との結合が知られていない化合物グループに含まれる新規天然物が見出されたことから、多様な天然資源をスクリーニングに付す重要性が確認できた。

改善すべき点として、ポリエンマクロリドを含む培養液中に他の有用な脂質結合化合物も含まれている可能性を否定できず、現行の探索系ではそのような培養液を選別できない点が挙げられる。しかし、後述の heronamide 類や 5aTHQ 類など、所属研究室が本スクリーニングによってこれまでに得た活性本体の構造を考慮すると、脂質に結合する化合物には、従来知られるよりはるかに広い構造多様性があることが予想される。そのため、まずは本スクリーニングで選別可能なブロスからヒット化合物を多数取得し、様々な脂質結合物質の物理化学的・生物学的性質に関する知見を深めた上で、より探索困難な微量活性成分に挑戦していけばよいと考えられる。

1. 4. 実験項

Yeast strains. *S. pombe* strains used in this study are JY1 (h^-) and *erg* mutants (h^- *ura4-C190T leu1-32 erg2::ura4⁺*, h^- *ura4-C190T leu1-32 erg31::ura4-FOAR erg32::ura4⁺*).⁽¹⁶⁾

1st Screening: Growth inhibitory activity against fission yeast cells. The author screened microbial broths for membrane binding molecules that exhibit selective growth inhibition; culture broths that preferentially inhibited growth of wild-type cells compared to $\Delta erg2$ or $\Delta erg31 \Delta erg32$ cells could contain membrane binders. Growth inhibition was tested as follows. Mid-log phase inoculum in YE5S medium was diluted to 0.0033 OD₅₉₅ and cells were exposed to broth extracts dissolved in DMSO (1% v/v) at 30 °C for 24 h. After incubation, the turbidity was measured at OD₅₉₅ using an EnVision-2103 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). Broths that exhibited less growth inhibition against *erg* mutant cells were re-evaluated for their selectivity.

2nd Screening-1: LC-MS analysis. 2 μ L of the 5-fold diluent of microbial extracts dissolved in DMSO were injected to LC-ESI-MS. Analytical condition was as follows; column, Imtakt Cadenza HS-C₁₈ $\phi 3 \times 150$ mm; solvent, 10% aq. MeOH during 0-2 min, 10-100% aq. MeOH gradient during 2-12 min, 100% MeOH gradient during 12-20 min; flow rate, 0.25 mL/min. Broths containing the peaks whose UV absorption were typical for polyene macrolides were eliminated from the candidates.

2nd Screening-2: Morphological effects. Mid-log phase inoculum of wild-type yeast cells in YE5S medium was diluted to 0.3 OD₅₉₅ and cells were exposed to broth extracts dissolved in DMSO (1% v/v) at 30 °C. After incubation for 1, 3, 9 and 24 h, morphological changes of the yeast cells were observed by microscopy.

第二章 放線菌が産生する heronamide 類に関する研究

2. 1. Heronamide 類の単離と構造修正

2. 1. 1. 8-Deoxyheronamide C および heronamide 類の単離

スクリーニングでヒットとして同定された放線菌 *Streptomyces* sp. NSU893 の培養抽出物から、生物活性を指標に活性成分の単離を行った。まず培養液(5 L)から濾取した菌体を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1)にて抽出し、濃縮後に二層分配を行った ($\text{CHCl}_3/60\% \text{ MeOH}$)。クロロホルム層を濃縮乾固し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)による分画を行ったところ、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:1) 溶出画分に目的の活性が見られた。本画分を ODS カラムクロマトグラフィー ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) によりさらに分画し、活性画分(90% MeOH 溶出画分) を逆相 HPLC により精製することで (Cosmosil-5C₈-MS, $\phi 20 \times 250$ mm, 74% aq MeOH)、活性成分 **1** (22.3 mg) を得ることに成功した。

活性化合物 **1** の分子式は、高分解能 MS から $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}$ と決定した(m/z 434.3045, calcd for 434.3054, $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{NO}$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺)。分子式および各種二次元 NMR 解析から、化合物 **1** は heronamide C (**4**) の 8 位デオキシ体であることがわかった (Figure 2-1, Table 2-1)。Heronamide A (**2**), B (**3**) および C (**4**) は、2010 年に Capon, R. J. らによって *Streptomyces* 属放線菌から単離されたポリエンマクロラクタムである⁽¹⁸⁾。NSU893 株の培養抽出物を精査したところ、予想通り heronamide C (**4**) 及び A (**2**) が検出され、それぞれ 22.9 mg と 17.0 mg の収量で得られた。類縁のポリエンマクロラクタムである BE-14106 および ML-449 の生合成研究において、8 位の水酸基はポリケチド合成酵素で環構造が形成された後にシトクロム P450 により導入されることが示唆されている⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾。このことから、8-deoxyheronamide C (**1**) は heronamide C (**4**) の生合成前駆体であると推測された。

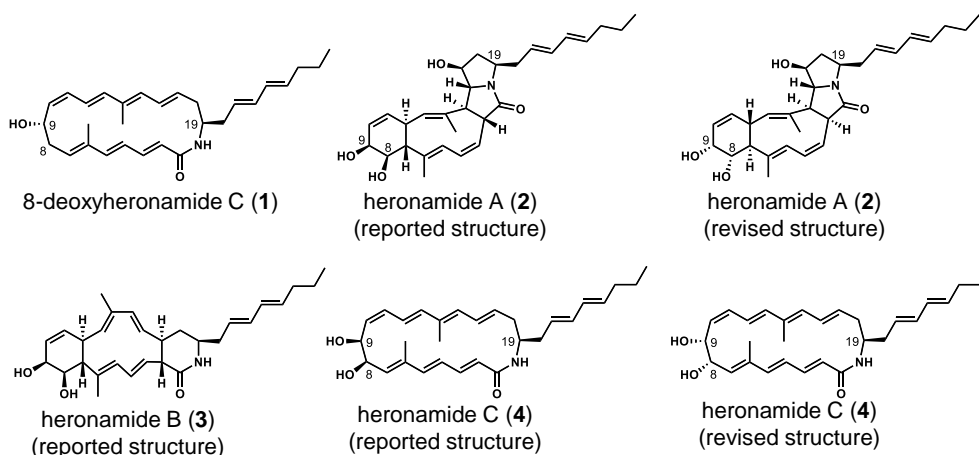


Figure 2-1. Structures of heronamides.

Table 2-1. NMR data of 8-deoxyheronamide C (1) in pyridine-*d*₅ at 40 °C

	¹ H (mult., <i>J</i> in Hz) ^a	¹³ C (mult.) ^a	HMBC	NOESY
1	-	168.6 (s)		
2	6.27 (m ^b)	124.5 (d)	C-1, C-4	NH
3	7.37 (dd, 10.6, 14.9)	142.1 (d)	C-1, C-5	H-5
4	6.26 (m ^b)	125.3 (d)	C-2	H ₃ -28
5	6.36 (d, 15.0)	145.1 (d)	C-3, C-4, C-7, C-28	H-3, H-7
6	-	135.6 (s)		
7	5.57 (br. dd)	134.4 (d)	C-5, C-8, C-28	H-5, H-8a
8a	2.41 (m ^c)	37.5 (t)	C-6, C-9	H-7, H-8b
8b	3.09 (ddd, 4.9, 10.0, 12.4)			H-8a, H-9, H ₃ -28
9	5.00 (m)	68.6 (d)		H-8b, H-12, H ₃ -28
9-OH	6.62 (br. s)	-		
10	5.78 (dd, 8.4, 10.7)	135.7 (d)	C-12	H-11
11	6.27 (m ^b)	129.6 (d)	C-9	H-10
12	6.26 (m ^b)	124.9 (d)	C-10	H-9, H ₃ -29
13	6.22 (d, 15.3)	137.4 (d)	C-11, C-15, C-29	
14	-	134.3 (s)		
15	6.13 (d, 11.3)	131.7 (d)	C-13, C-17, C-29	H-17
16	6.47 (dd, 11.3, 15.2)	131.5 (d)	C-18	H-18a, H ₃ -29, NH
17	5.87 (ddd, 5.3, 10.6, 15.2)	131.6 (d)		H-15, H-18b, H-19
18a	2.09 (m)	42.0 (t)	C-17, C-19	H-16, H-18b, NH
18b	2.56 (ddd, 2.6, 8.1, 12.8)			H-17, H-18a, H-19
19	4.56 (m)	50.8 (d)		H-17, H-18a, H ₂ -20, H-21, NH
20a	2.40 (m ^c)	39.4 (t)	C-18, C-19, C-22	H-19, H-21, H-22, NH
20b	2.46 (m ^c)			
21	5.78 (m)	129.3 (d)	C-19, C-20, C-23	H-19, H ₂ -20, H-23
22	6.23 (dd, 10.3, 15.1)	133.5 (d)	C-20, C-21, C-24	H ₂ -20, H-24
23	6.06 (dd, 10.3, 15.1)	131.5 (d)	C-25	H-21, H ₂ -25
24	5.63 (dt, 7.4, 15.1)	133.6 (d)	C-22, C-25, C-26	H-22, H ₂ -25, H ₂ -26
25	2.01 (dt, 7.4, 7.4)	35.3 (t)	C-23, C-24, C-26, C-27	H-23, H-24, H ₂ -26, H ₃ -27
26	1.36 (tq, 7.4, 7.4)	23.2 (t)	C-24, C-25, C-27	H-24, H ₂ -25, H ₃ -27
27	0.86 (t, 7.4)	14.2 (q)	C-25, C-26	H ₂ -25, H ₂ -26
28	1.80 (s)	12.1 (q)	C-5, C-6, C-7	H-4, H-8b, H-9
29	1.75 (s)	13.0 (q)	C-13, C-14, C-15	H-12, H-16
NH	7.62 (d, 10.3)	-	C-1	H-1, H-16, H-18a, H-19, H ₂ -20

^aChemical shift values were normalized using residual solvent peaks, δ_{H} 7.22 ppm and δ_{C} 123.9 ppm.

^{b,c}Signals overlapped.

2. 1. 2. Heronamide A の構造修正

Heronamides A (2) および C (4) の各種スペクトルデータは文献値と一致したが、NOESY スペクトル解析の結果、Capon, R. J. らが報告した構造には矛盾があることが示唆された (Figure 2-2)。例えば、2 位と 15 位のプロトンは、カップリング定数 (9.2 Hz) が大きいことからトランス配置であると決定されているが、両プロトン間の強い NOESY 相関はこれらがシス配置であることを示していた。そこで詳細な NMR 解析と改良 Mosher 法⁽²¹⁾ の適用により、化合物 2 の絶対立体化学を再検討することとした。

まず、NOESY スペクトルの詳細な解析結果を述べる (Figure 2-2)。2 位水素および 7 位水素はいずれも 5 位・13 位の水素と相関を示している他、5 位・13 位水素間でも NOESY 相関が観測された。加えて、2 位・13 位・15 位水素は互いに近い距離にあることが判明したことから、2 位・5 位・7 位・13 位・15 位水素はすべて、化合物 2 の十員環の同一面に配向していることが示された。一方、29 位水素には 4 位・28 位・12 位・16 位水素との相関が、28 位水素には 4 位・8 位・12 位水素との相関が見られ、8 位水素・12 位水素間の相関と併せることで、これらの水素がもう片面に配向していることが明らかとなった。これらの配置は、7 位・8 位水素間および 7 位・12 位水素間のカップリング定数が大きいことから支持され、同時に、各水素間がアンチ配座であることを意味した。さらに、化合物 2 に acetone dimethylacetal を反応させた誘導体 5 の NOESY 解析から、8 位・9 位の水酸基は報告構造と同様 *syn*-1,2-diol であることが確認された (Figure 2-3)。以上の解析から、heronamide A (2) の正しい相対立体化学を 2*S**, 7*S**, 8*S**, 9*R**, 12*R**, 15*S**, 16*R**, 17*S**, 19*R** と決定した。

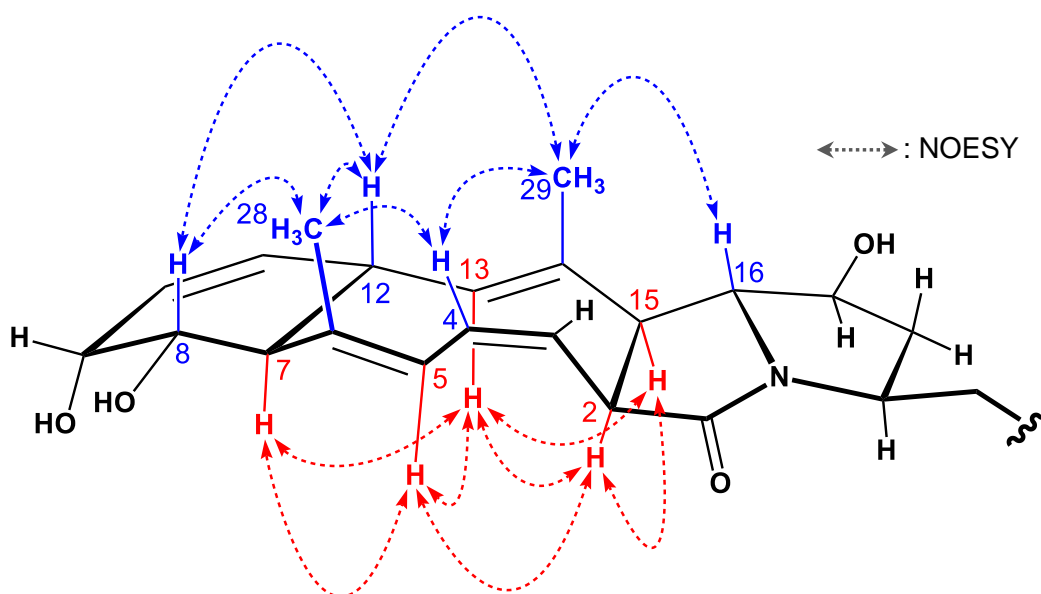


Figure 2-2. Key NOESY correlations of heronamide A.

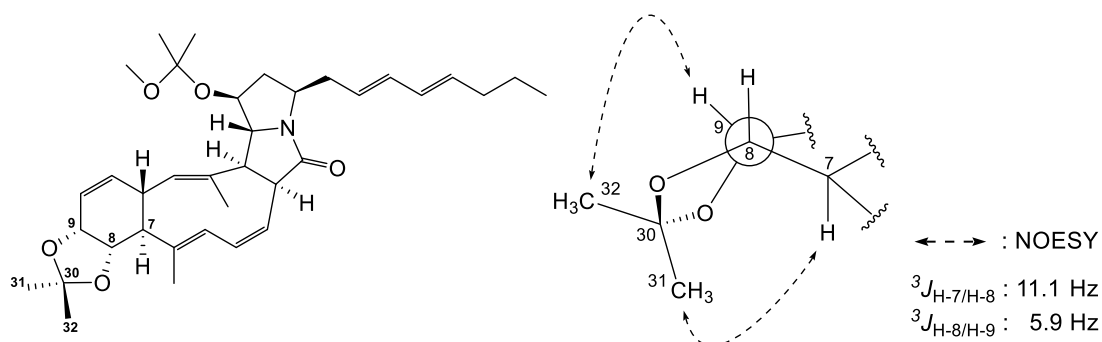


Figure 2-3. The relative stereochemistry of the diol functionality. Isopropylidene derivative **5** was prepared (left) and the NOESY spectrum and $^3J_{\text{HH}}$ values were analyzed (right).

Heronamide A (**2**)の絶対立体化学は、改良 Mosher 法⁽²¹⁾で決定した。Capon, R. J.らも本法で heronamide A の立体構造を報告したが、その適用は 17 位水酸基のみであり、8 位・9 位水酸基の絶対立体化学は直接証明されていない⁽¹⁸⁾。著者は heronamide A (**2**)を 9,17-bis-MTPA エステル体 **6** へと変換した。(R)-MTPA エステルと(S)-MTPA エステルの化学シフト値の差を解析したところ、17*S* および 9*R* という結果が得られ、これらは NOESY 相関から導いた修正構造に矛盾しなかった (**Figure 2-4**)。以上の結果から、heronamide A (**2**)の絶対立体化学を 2*S*, 7*S*, 8*S*, 9*R*, 12*R*, 15*S*, 16*R*, 17*S*, 19*R* と決定し、報告構造の改訂に至った。

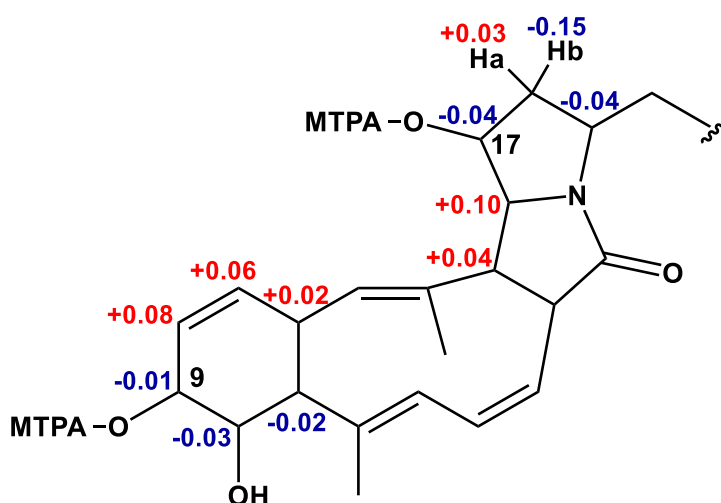


Figure 2-4. $\Delta\delta$ ($= \delta_S - \delta_R$, ppm) values for the bis-9,17-(S)- and bis-9,17-(R)-MTPA esters of heronamide A.

2. 1. 3. Heronamide C の化学変換と 8-deoxyheronamide C の絶対立体化学

Capon, R. J.らは、heronamides A (2), B (3), C (4)の推定生合成経路として、分子内環化付加反応を経由するユニークな仮説を提唱している。すなわち、heronamide C (4)は[6+6]環化付加反応によって heronamide B (3)へ、16, 17 位の二重結合がエポキシ化された後に、 S_N2 反応と続く[6+4]環化付加反応が起こると heronamide A (2) へと変換されると推測されている (Figure 2-5)⁽¹⁸⁾。化合物 1 はこれら heronamide 類の生合成中間体と考えられるため、8 位,9 位,19 位の絶対立体化学は保存されていると予想し、構造のよく似た heronamide C (4) および先に構造修正を行った heronamide A (2)との比較解析から求めることとした。著者は、heronamide C (4)を DMSO 中、室温で攪拌すると heronamide A (2)が生成することを偶然発見した。LC-MS 分析から、heronamide A (2)と同一の質量と保持時間を示すピークは、攪拌時間に依存して増加することがわかった (Figure 2-6)。このピークを HPLC で分離・精製後、NMR 解析から、生成物は確かに heronamide A (2)であることが確認できた。この結果から、heronamide A (2)と C (4)の 8,9,19 位の絶対立体化学が同一であることが支持された。

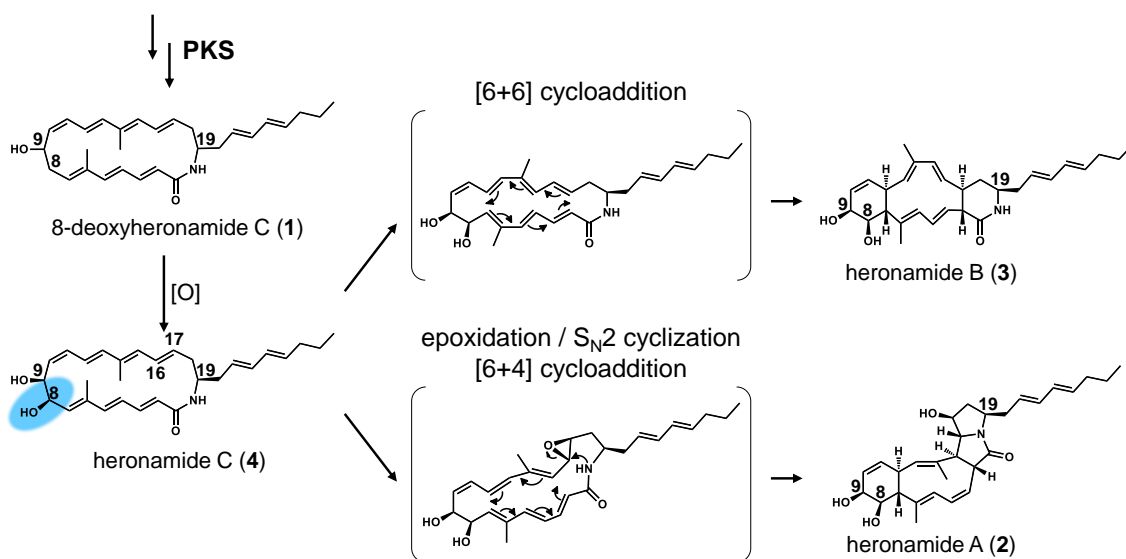


Figure 2-5. Plausible model for the biosynthesis of heronamides. Based on the biosynthetic route of BE-14106 in *Streptomyces* sp. DSM 21069,⁽¹⁹⁾ it is expected that heronamide C (4) is produced by oxidation of 8-deoxyheronamide C (1) that is a PKS product. Heronamide A (2) is proposed to be produced from heronamide C (4) through epoxidation and tandem electrocyclization, whereas heronamide B (3) is produced by cyclization of heronamide C (4).⁽¹⁸⁾ This model suggests that heronamides should share the same absolute configurations at C8, C9 and C19.

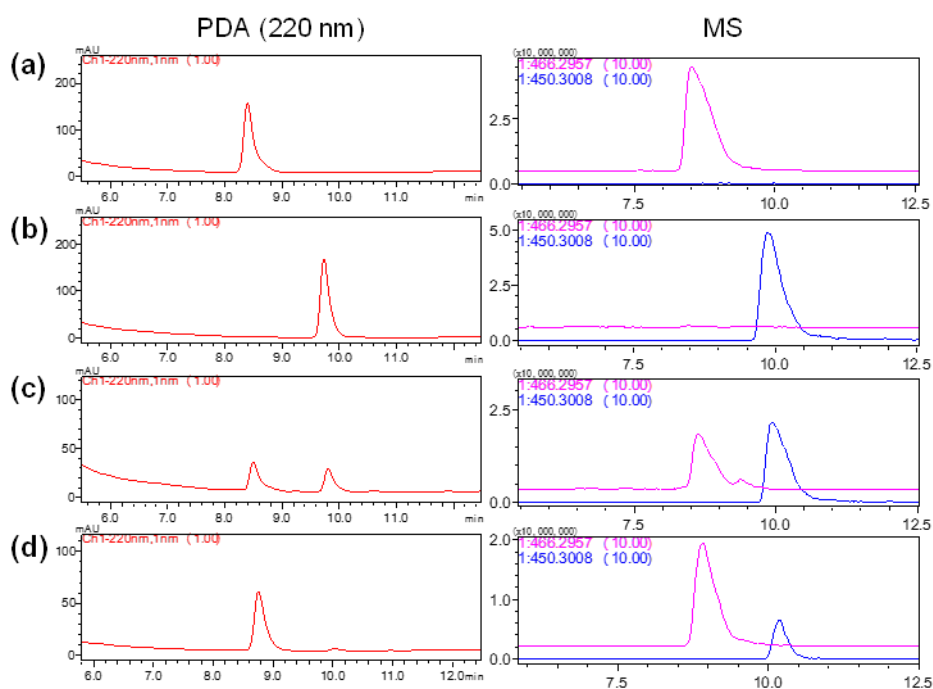


Figure 2-6. Spontaneous conversion of heronamide C (4) to heronamide A (2). LC-MS analysis of heronamides. Heronamide C (4) was dissolved in DMSO at a concentration of 0.5 mM and stirred at room temperature for 10 days. PDA (left) and MS (right) chromatograms for (a) heronamide A (2), (b) heronamide C (4), (c) a stirred solution of heronamide C (4), and (d) co-injection of heronamide A (2) and the stirred solution of heronamide C (4) are shown.

NOESY スペクトル解析から導いた heronamide C (4)の相対立体化学は、Capon, R. J.らの報告構造とは矛盾し、heronamide A (2)修正構造に対応することがわかったため、先の結果と併せて heronamide C (4)の立体構造修正に至った (Figure 2-7)。化合物 1 の NOESY 相関は化合物 4 とよく似ており、両者の 8 位, 9 位の相対立体化学は保存されていると考えられた。また、両化合物の CD スペクトルを測定すると、2つのポリエン構造に由来すると思われる分裂型のピークが観測され、その符号が一致していたことから、化合物 1 と化合物 4 は絶対立体化学も同一であると考えられた (Figure 2-7)。これまでの結果を総合し、化合物 1, 2, 4 の 8, 9, 19 位の立体化学は共通していると判断できるため、化合物 1 の絶対立体化学を 9*S*, 19*R* と決定するに至った。

2.1.4. 小括

第 2 章第 1 節では、脂質認識化合物の探索においてヒットした海洋放線菌の代謝産物から、活性本体として新規ポリエンマクロラクタム 8-deoxyheronamide C (1)を取得することに成功した。また、類縁化合物 heronamide A (2)および C (4)の NMR 解析から 2010

年の報告構造に誤りがあったことを見出し、立体構造修正を行った。さらに、化合物 **2**, **4** の修正構造を参考に、新規化合物 **1** についてもその絶対立体化学を明らかにした。

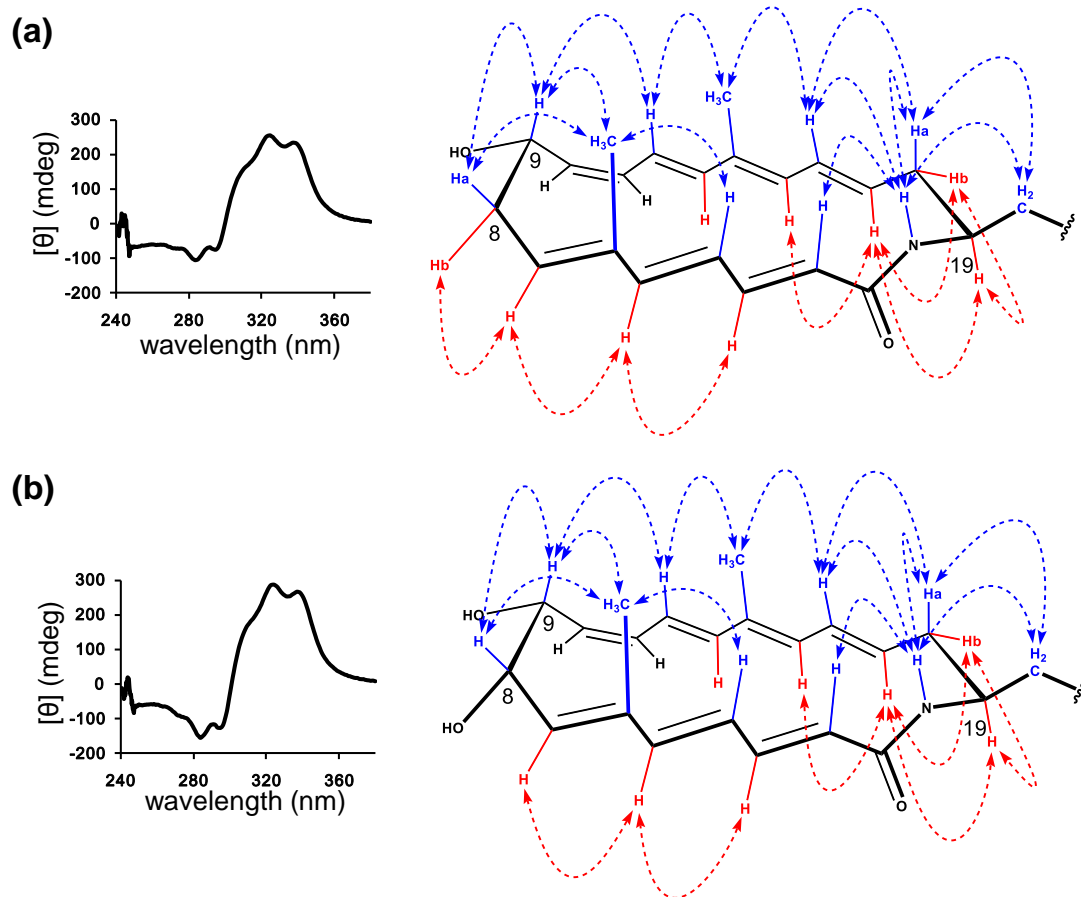


Figure 2-7. Absolute stereochemistry of 8-deoxyheronamide C (1) and heronamide C (2). (a) CD spectrum and key NOESY correlations of 8-deoxyheronamide C (1). (b) CD spectrum and key NOESY correlations of heronamide C (4). CD spectra were measured in DMSO at a concentration of 100 μ M.

2. 2. Heronamide 類の作用機序

2. 2. 1. 分裂酵母に対する生育阻害活性

8-Deoxyheronamide C (**1**)および類縁の heronamide 類が生体膜脂質に結合するかどうかを明らかにするため、まず、分裂酵母の種々ステロール生合成遺伝子破壊株および野生株に対する生育阻害活性を検証した (Figure 2-8)。分裂酵母のステロール生合成酵素のうち、B 環の共役ジエンを形成する酵素をコードする遺伝子 *erg2* と *erg31/erg32*、および側鎖を修飾する酵素をコードする遺伝子 *erg5* と *erg4* は生育に必須ではない⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。そこで、それらの遺伝子破壊株を用いて heronamide 類の生育阻害活性を試験した。活性成分として単離した化合物 **1** は、*erg2* および *erg31/erg32* 遺伝子の破壊株に対する生育阻害活性が野生株と比較して顕著に減弱した (Figure 2-8)。また、生合成のさらに下流に位置する *erg4*, *erg5* 遺伝子の破壊株に対しても生育阻害活性は弱かった。これらの変異株は AmB に対する耐性化は見られないことから、化合物 **1** は少なくとも AmB とは異なる作用機序を有することが示唆された。

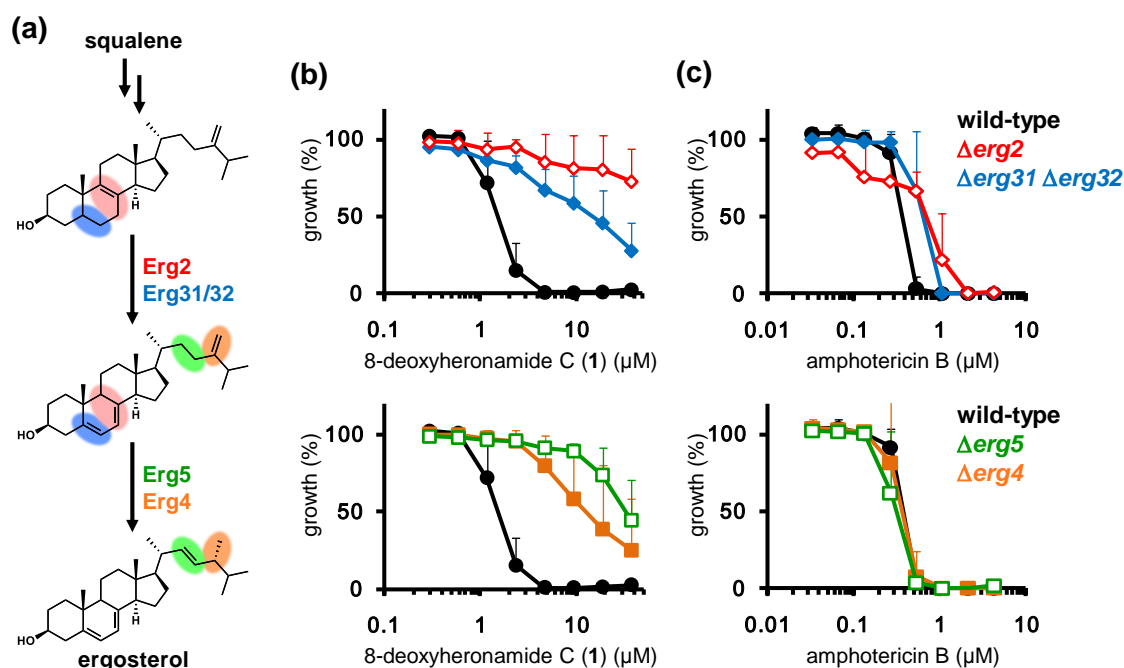


Figure 2-8. Effect of 8-deoxyheronamide C (1**) and amphotericin B on the growth of wild-type and *erg* mutant cells. (a) Biosynthetic pathway of ergosterol in fission yeast. (b)(c) Growth curves of $\Delta erg2$ (red), $\Delta erg31 \Delta erg32$ (blue), $\Delta sts1/erg4$ (orange), $\Delta erg5$ (green) and wild-type (black) cells treated with (b) 8-deoxyheronamide C (**1**) or (c) amphotericin B are shown. Data represent means of three independent experiments. Error bars, s.d.**

化合物 **1, 2, 4** の間では生育阻害活性に明瞭な違いが見られた。化合物 **1** の生育阻害活性は細胞のステロール構造に依存した非常に高い選択性を示すのに対し (**Figure 2-8**)、化合物 **4** は MIC 0.28 μM という低濃度で生育阻害を示すものの、選択性はほとんど見られなかった (**Figure 2-9**)。また、化合物 **2** は生育阻害を全く示さなかった。興味深いことに、化合物 **4** の 2 つの水酸基をアセチル化した誘導体 **7** は生育阻害活性を消失した。これらのことから、heronamide 類の生物活性には二十員環ポリエーテルラクトン構造と水酸基の存在が重要であることが示唆された。

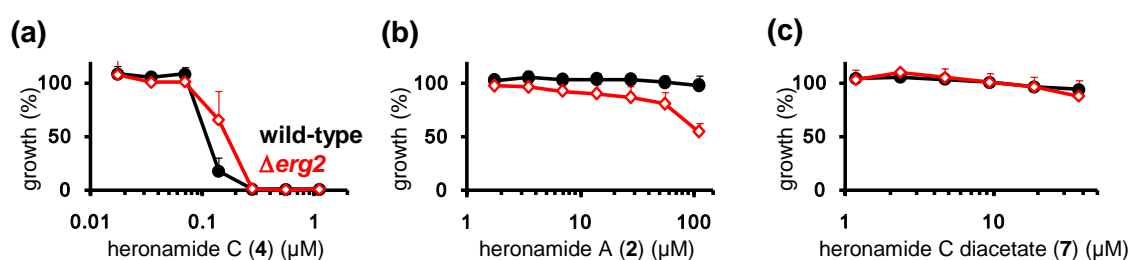


Figure 2-9. Effect of heronamides on the growth of wild-type and *erg* mutant cells.

Growth curves of Δerg2 (red) and wild-type (black) cells treated with (a) heronamide C (**4**), (b) heronamide A (**2**) or (c) heronamide C diacetate (**7**) are shown. Data represent means of three independent experiments. Error bars, s.d.

2. 2. 2. 表面プラズモン共鳴測定による標的脂質分子の探索

化合物 **1** の選択的生育阻害活性は脂質認識物質に特徴的な傾向である。そこで著者は化合物 **1** の標的脂質分子を明らかにするため、Biacore T200 を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析により脂質との物理的相互作用を評価した。まず、リポソームを固定するセンサーチップの種類を検討した。脂質膜固定化に用いられる市販のセンサーチップには HPA や L1 などがあるが、化合物の疎水性に起因する非特異的結合がしばしば問題となる。村田・松森らの手法⁽²²⁾⁽²³⁾を参考に条件検討を行った結果、CM3 チップにドデシルアミンを固定化したものが非特異的結合を最も抑えられることを見出し、これを解析に採用した。

続いて、種々のリポソームを固定化したセンサーチップに対して PBS 緩衝液 (5% DMSO) に溶解させた heronamide 類を流し、センサーグラムを取得した。まず、化合物 **1** の顕著なステロール変異株選択性から、その標的分子はエルゴステロールであると予想されたため、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)、POPC/ergosterol (8:2)および POPC/cholesterol (8:2)を固定化した際のセンサーグラムの差を比較した。こ

の実験系では、amphotericin B はエルゴステロールを含有させた場合のみ脂質膜への結合が検出され、センサーグラムが劇的に変化する。しかし、化合物 **1** が示すセンサーグラムはステロールの種類や含有量に依存しなかった (Figure 2-10)。

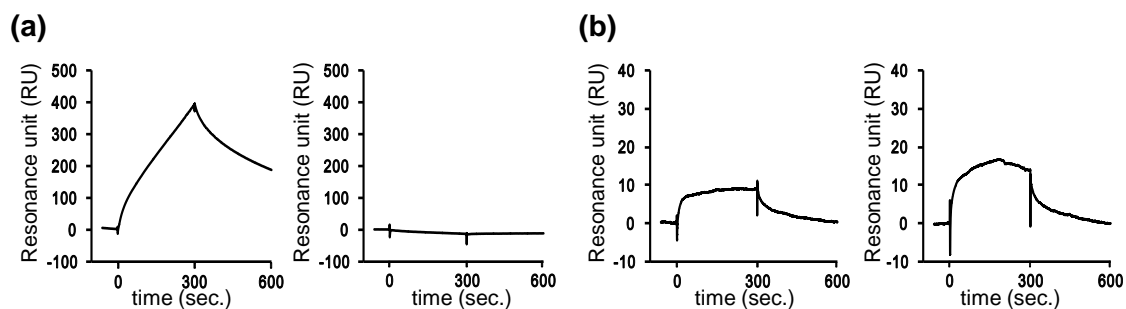


Figure 2-10. Binding of amphotericin B and 8-deoxyheronamide C to ergosterol-containing lipid membrane. Liposomes consisting of POPC with (left) or without (right) 20 mol% ergosterol were immobilized on a dodecylamine-modified CM3 sensorchip. Elution of (a) 20 μ M amphotericin B or (b) 8-deoxyheronamide C (**1**) was started at time 0 and kept for 300 sec. The flow rate was 10 μ L/min.

細胞膜と相互作用する分子にとって、脂質膜の流動性が大きな影響を与えることがあるため、次に、ホスファチジルコリンのアシル鎖の不飽和度を検討した。その結果、アシル鎖が両方とも不飽和脂肪酸から成る 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) では化合物 **1** の親和性は POPC と同じか、やや弱いことを示すセンサーグラムとなり、一方で、飽和アシル鎖のみで構成される 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) に対しては化合物 **1** の結合量が増加し、興味深いことに、解離がほとんど起こらなくなった (Figure 2-11)。分裂酵母の細胞膜中のグリセロリン脂質は、ほとんどが炭素数 18 で二重結合を 1 つ含むアシル鎖から成るが、主要なスフィンゴ脂質のアシル鎖は t18:0/26:0 型という飽和の炭化水素であることが知られている⁽²⁴⁾。そこで化合物 **1** がスフィンゴ脂質を標的とする可能性を調べるため、ブタ脳由来のスフィンゴミエリン (SM) 混合物からなるリポソームを用いたところ、DMPC 膜の結果と同じく、脂質膜との不可逆的な結合が見られた。これらの測定は 30°C で行ったが、この温度では DMPC 膜は liquid-disordered 相、ステロールを 20% 含む DMPC 膜は liquid-ordered 相、SM 膜はゲル相である。このことから、脂質膜の流動性が化合物 **1** と脂質との結合に影響を与えるのではなく、化合物 **1** が飽和炭化水素鎖からなる脂質を特異的に認識する可能性が高いと考えられた。

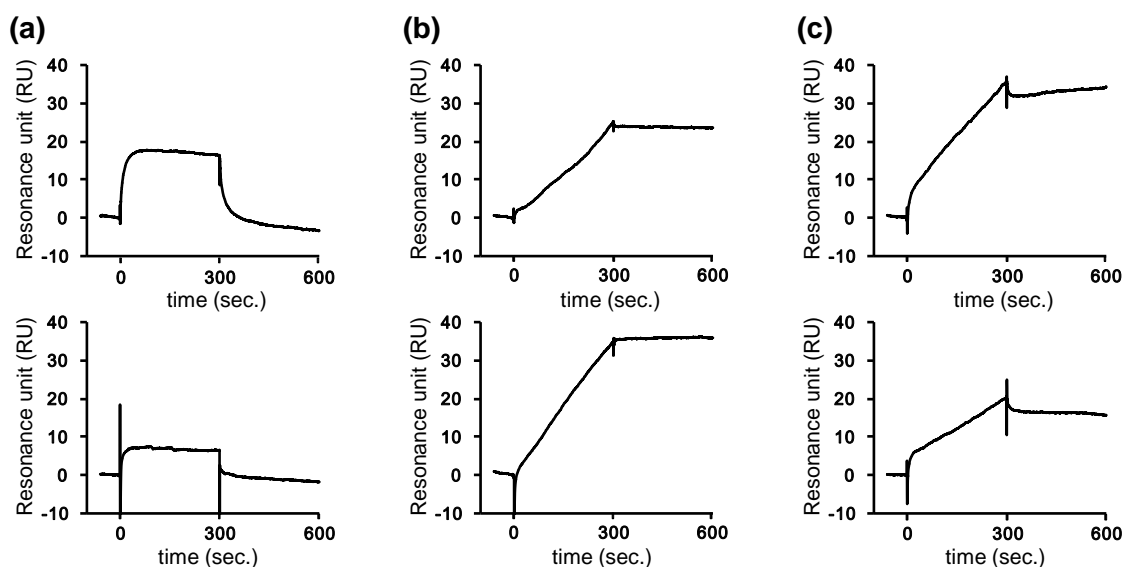


Figure 2-11. SPR sensorgrams for binding of 8-deoxyheronamide C (1) to lipid membranes. DOPC (a), DMPC (b) or SM (c) liposomes with (upper) or without (lower) 20 mol% sterols (ergosterol in a, b and cholesterol in c) were captured on a dodecylamine-modified CM3 sensorchip. In this experiment, we used DMPC, not DPPC, both of which possess saturated acyl chains, because of the ease of treatment; the transition temperature of DMPC (~24 °C) is lower than DPPC (~43 °C). Experiments were conducted at 30 °C. Elution of 20 μ M compound 1 was started at time 0 and kept for 300 sec. We could not test higher concentrations of compound 1 due to its low solubility. The flow rate was 10 μ L/min.

化合物 1 の 1/10 以下の濃度で酵母の生育を阻害する heronamide C (4)は、SPR 解析において化合物 1 より 10 倍程度高い親和性を示した (Figure 2-12)。例えば DMPC/ergosterol リポソームに対して 300 秒時点での結合量を比較すると、化合物 1 は約 25 RU であったのに対し、化合物 4 は約 200 RU であった。また、化合物 4 の生育阻害活性には脂質認識化合物に特有の選択性が見られなかったが、リポソームへの親和性は、その強度を除いて化合物 1 と同じ傾向を示した。Heronamide A (2)は試した全てのリポソームに対して、非特異的な結合を示す箱形のセンサーグラムを示すのみであり、生物活性を失った heronamide C diacetate (7)は脂質膜に全く結合しなかった。

2. 2. 3. 分裂酵母の遺伝子変異株を用いた活性発現メカニズムの解析

Heronamide 類が示す分裂酵母に対する生育阻害活性と SPR 解析でみられた脂質膜との親和性に良い相関がみられたことから、本化合物群が酵母細胞においても飽和炭化水素鎖を持つ脂質と相互作用している可能性が高いと考えられた。そこで、脂質膜との関係を解明すべく、heronamide 類が細胞形態に与える影響を精査した。

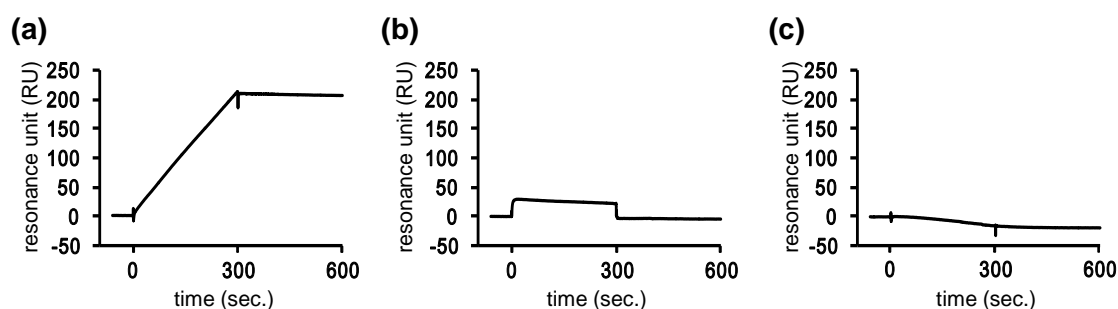


Figure 2-12. Affinity of heronamides to liposomes. Sensorgrams for binding of heronamides to 20 mol % ergosterol-containing DMPC liposomes captured on a dodecylamine-modified CM3 sensor chip are shown. The affinity of **(a)** heronamide C (**4**), **(b)** heronamide A (**2**) and **(c)** heronamide C diacetate (**7**) are compared. Similar results were obtained for more than three experiments, and the characteristic sensorgrams are shown. Elution of 20 μ M heronamides was started at time 0 and maintained for 300 s. Flow rate was 10 μ L/min.

化合物 **1** 及び **4** で処理した酵母細胞を顕微鏡観察したところ、明視野では AmB 処理細胞の液胞肥大化のような、顕著な膜傷害性は認められなかった。一方、ホルマリンで固定した酵母の細胞壁を calcofluor white (Cfw) で染色して観察したところ、細胞の成長端及び分裂面で強い蛍光が見られた (**Figure 2-13**)。Cfw が染色する 1,3- β -グルカンは分裂酵母の細胞壁を構成する主成分の一つで、細胞の成長端及び分裂面は細胞壁のリモデリングが盛んに行われる部位である。すなわち、この強力な蛍光シグナルは化合物処理により細胞壁合成が異常に活性化された可能性を示唆した。

この表現型は、*css1* 遺伝子の温度感受性株を非許容温度で培養した際の表現型とよく似ていた (**Figure 2-14**)。Css1 はホスホスフィンゴリパーゼ C 活性を有する酵素であり、スフィンゴ脂質の代謝制御を行うと考えられている⁽²⁵⁾。そのため、heronamide 類処理および *css1* 遺伝子の機能低下による細胞壁異常は、スフィンゴ脂質の機能が阻害された結果と考えられた。これらの現象は、膜脂質の恒常性が細胞壁合成の制御を担っていることを意味しており、同時に、heronamide 類が生細胞においても飽和アシル鎖をもつ脂質、特にスフィンゴ脂質を標的としている可能性を強く支持した。

さらに、興味深いことに、3 β -ヒドロキシステロールを認識する抗真菌化合物 theonellamide (TNM) 類で処理した際にも酵母の細胞壁異常が起こることが報告されている (**Figure 2-14**)⁽¹¹⁾。TNM の表現型は、1,3- β -グルカン合成酵素である Bgs1 と、small GTPase である Rho1 の機能に依存することが示されている。Rho1 の dominant-negative 変異タンパク質を過剰発現した細胞、および *bgs1* 遺伝子の機能低下株を化合物 **1** で処理すると、TNM 処理と同じく、細胞壁異常の表現型は起こらなかったため、heronamide 類の作用も Bgs1 と Rho1 の機能に依存することが明らかになった (**Figure 2-15**)。

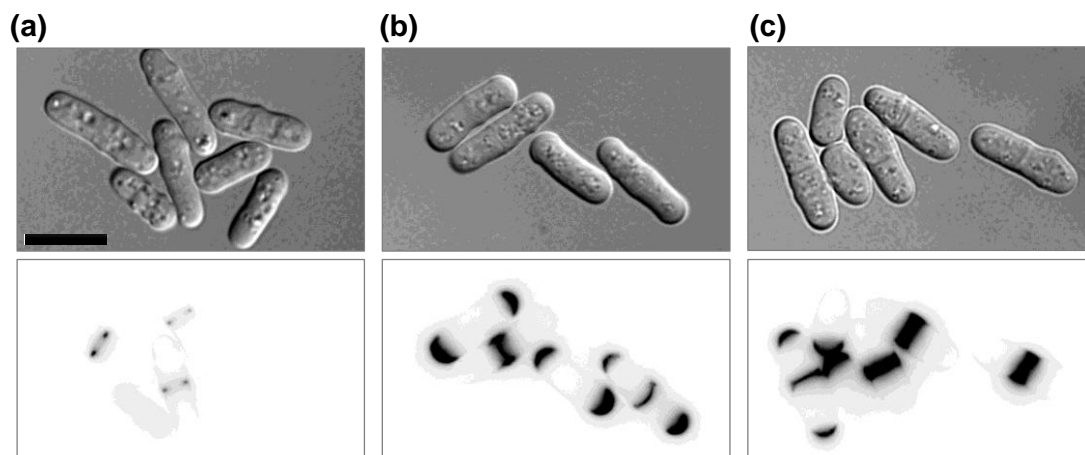


Figure 2-13. Cell wall abnormalities induced by heronamides. Wild-type cells were exposed to **(a)** DMSO (1% v/v, solvent for compounds), **(b)** 8-deoxyheronamide C (**1**) (10 μM), or **(c)** heronamide C (**4**) (1 μM) for 2 h. Cells were fixed with formalin and stained with calcofluor white (Cfw) to visualize cell wall material. Differential interference contrast (DIC; upper) and Cfw (lower) images are shown. Scale bars indicate 10 μm .

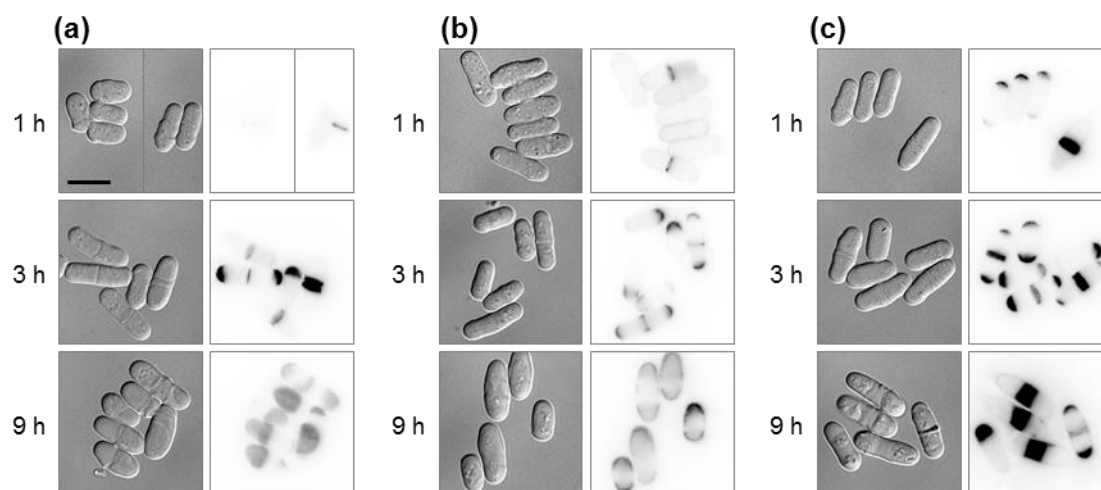


Figure 2-14. Time course analysis of accumulation of cell wall material by genetic or chemical genetic perturbation. **(a)** Temperature-sensitive *cssI* mutant cells were cultured at non-permissive temperature (37 $^{\circ}\text{C}$). Wild-type cells were treated with **(b)** 8-deoxyheronamide C (**1**, 30 μM), or **(c)** theonellamide A (1.1 μM) at 30 $^{\circ}\text{C}$. Cells were harvested after 1, 3 or 9 h treatment, fixed, and stained with Cfw. Scale bars, 10 μm . DIC (left) and Cfw (right) images are shown.

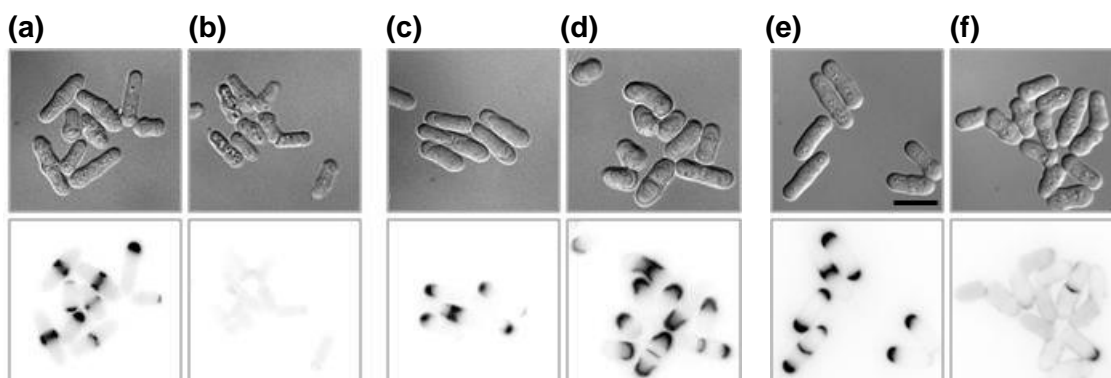


Figure 2-15. Involvement of Rho1 and Bgs1 in the abnormal accumulation of cell wall material by 8-deoxyheronamide C (1). (a)-(d) Effect of Rho1 overexpression. Cells transformed with empty vector (a) or pREP81-Rho1T20N (b) were grown at 30 °C for 16 h in EMM liquid medium and then challenged with compound 1 (10 μM) for additional 2 h. Effect of overexpression of Rho1 using pREP41-Rho1 (d) was also examined and compared with those of vector control (c). (e)(f) Effect of *bgs1* mutation. Wild-type (e) or *bgs1* temperature-sensitive mutant cells (f) were incubated with compound 1 (10 μM) at 27 °C for 2 h. The intense Cfw signals were not observed in *bgs1* mutant cells. In all experiments, cells were fixed and stained with Cfw. Differential interference contrast (DIC, upper) and Cfw (lower) images are shown. Scale bar, 10 μm.

2. 2. 4. 小括

第2章第2節では、化合物1の酵母に対する生育阻害活性から、本化合物が脂質を認識すると予想されたため、SPRを用いて脂質膜との相互作用を解析した。SPRと形態観察の結果から、heronamide類が酵母細胞膜のスフィンゴ脂質を標的とし生物活性を発現する可能性が示唆された。興味深いことに、heronamide類が誘導する細胞壁の異常合成という表現型は、構造と標的が全く異なるTNM類と同一の経路に依存していることも示された。

2. 3. 考察

Heronamide 類の作用と脂質ラフトの関連

脂質ラフトはスフィンゴ脂質とステロールが豊富な膜ドメインであり、生体膜が形成する機能性マイクロドメインとして盛んに研究されている⁽²⁾⁽²⁶⁾。本研究では、heronamide 類が DMPC やスフィンゴミエリンなどの飽和炭化水素鎖から成る脂質と特異的に結合することが明らかにされた。分裂酵母に対する細胞壁合成の活性化は、膜ステロールに結合することが知られる TNM 類⁽¹¹⁾や、*cssI* 遺伝子の機能低下⁽²⁵⁾によっても引き起こされる。これらの事実から著者は、スフィンゴ脂質とステロールから成る膜ドメイン、すなわち脂質ラフトが細胞壁の恒常性維持に関与しており、「heronamide 処理」、「TNM 処理」、「*cssI* 機能低下」はいずれもこの膜ドメインの機能破綻を起こすという点で共通しているという作用モデルを提唱した (**Figure 2-16**)。実際に、Bgs1 は 13 回膜貫通型の膜タンパク質であると予想されており、非イオン性界面活性剤で可溶化されない画分に含まれることから、脂質ラフトに局在するタンパク質と考えられている⁽²⁷⁾。また、heronamide 処理または *cssI* 機能低下による細胞壁成分の蓄積が TNM 処理と比べて緩やかに起こることから (**Figure 2-14**)、脂質ラフトドメインにおけるスフィンゴ脂質とステロールの役割は識別可能であると考えている。

特定の *erg* 遺伝子破壊株は、AmB や TNM のようなステロール結合物質だけでなく、スフィンゴ脂質に作用しチャネル形成を誘導する syringomycin E に対しても耐性を示す⁽²⁸⁾。これは、ステロール分子種の構造変化により、スフィンゴ脂質を含む他の膜脂質の組成や、それに伴う脂質ラフトの機能が影響を受けるためと考えられ、ステロールを標的としない 8-deoxyheronamide C (**1**)が *erg* 遺伝子破壊株に対してほとんど生育阻害を示さない理由の候補として挙げられる。しかし、より高い親和性を示す heronamide C (**4**) に対しては耐性を示さないことも含め、その詳細は不明である。特に、生物活性や脂質親和性に顕著な影響を与える 8 位水酸基の役割に興味を持たれる。

ポリエンマクロラクタム化合物群の生物活性

ポリエンマクロラクタムの多くは興味深い生物活性を示すことが知られており、例えば vicenistatin は抗腫瘍活性を示し⁽²⁹⁾、incednine は Bcl-xL を制御する⁽³⁰⁾。Heronamide 類も、HeLa 細胞に対し液胞の巨大化を誘導することが報告されている⁽¹⁸⁾。しかし、それらの作用メカニズムに着目した研究はほとんど行われておらず、incednine のビオチン化プローブと *in vitro* で結合するタンパク質に関する論文が 1 例報告されているのみである⁽³¹⁾。本研究では、heronamide 類が飽和炭化水素鎖から成る脂質を特異的に認識することを明らかにしたが、これはポリエンマクロラクタムに属する天然物の分子標的を明らかにした初の報告である。一連の化合物は、ポリエンラクタム骨格と水酸基や糖などの親水性官能基により両親媒性の構造となっている点が共通している。heronamide 類に

おいては、この両親媒性構造が酵母に対する生物活性の発現や脂質との親和性に重要な役割を果たすことが示された。ポリエンマクロラクタム化合物全般が膜脂質と相互作用するのか、その作用メカニズムに heronamide 類との共通点があるのかは、興味深い点である。Heronamide 類が誘導する現象の詳細を解明していくことで、ポリエンマクロラクタム化合物の活性発現の基本原則が明らかになると期待される。

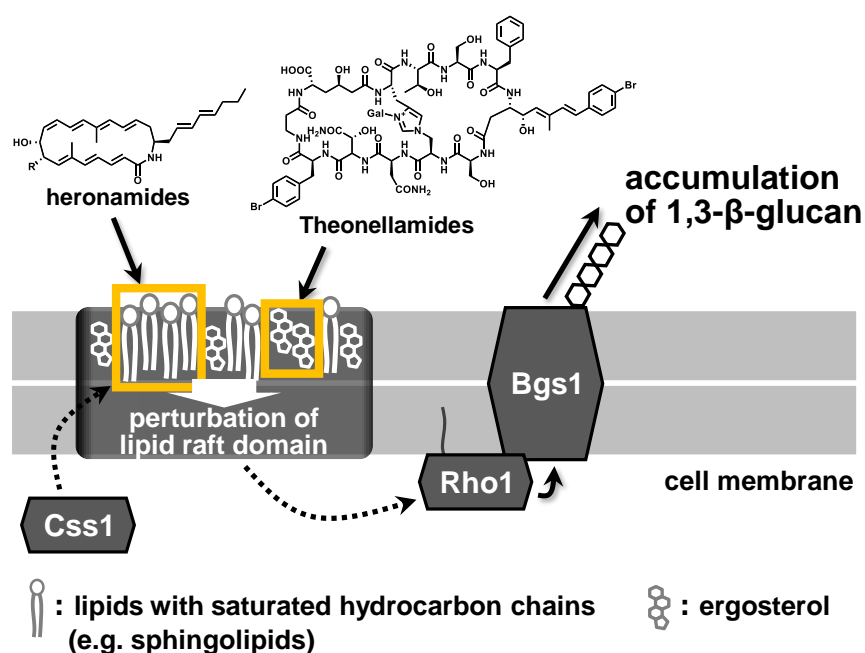


Figure 2-16. Model for the mechanisms of action of heronamides. Heronamides bind to lipids with saturated hydrocarbon chains, e.g. sphingolipids, while *css1* mutation changes sphingolipid species. Theonellamides bind to 3 β -hydroxysterols. Membrane domains targeted by heronamides, might also be perturbed by *css1* mutation. In addition, membrane domains recognized by theonellamides can be overlapped with those colored in black, since lipid raft domains consist of lipids with saturated alkyl chains and sterols. All three perturbations induce overproduction of cell wall material, which requires Rho1 and Bgs1 at least in the case of heronamides and theonellamides. How perturbation of membrane domain structures affect the functions of Rho1 and Bgs1 remains to be revealed (dotted lines).

2. 4. 実験項およびスペクトルデータ

General procedure. All solvents and reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (Merck TLC Silicagel 60 F254). Column chromatography was performed on SilicaFlash® F60 (Silicycle, 40-63 μm) and Cosmosil 75C₁₈-OPN (Nacalai Tesque, Inc., 75 μm). IR spectra were recorded on a FT/IR-4100 FT-IR spectrophotometer (JASCO) equipped with a ZnSe ATR plate. UV-Vis absorptions were measured on a U-2910 Double-Beam spectrometer (HITACHI). Optical rotations were measured on a P-2200 digital polarimeter (JASCO) using the sodium D line (589 nm). Mass spectra were measured by JMS-700 (JEOL) and LCMS-IT-TOF (SHIMADZU). ¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C-NMR spectra (125 MHz) were recorded on a JNM-ECA 500 spectrometer (JEOL). In the NMR spectra, chemical shift values (in ppm) are shown relative to the solvents: δ_{H} 7.26 (CDCl₃), 3.31 (CD₃OD) or 7.22 (pyridine-*d*₅), and δ_{C} 77.16 (CDCl₃), 49.00 (CD₃OD) or 123.90 (pyridine-*d*₅) ppm. The following abbreviations are used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad.

Chemical compounds. Heronamides were isolated as described below. The isopropylidene derivative (5) and MTPA esters (6) of heronamide A and heronamide C diacetate (7) were prepared as described previously.⁽¹⁸⁾ 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), porcine brain sphingomyelin (SM) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. SM used in this study contained *N*-stearoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine as the most major constituent, around 50%. Ergosterol was from Acros Organics, cholesterol was from Nacalai Tesque, and amphotericin B was from LKT Laboratories, Inc. Nystatin and calcofluor white were purchased from Sigma. TNM-A was from the laboratory stock.

Yeast strains. *S. pombe* strains used in this study are JY1 (*h*⁻), HM123 (*h*⁻ *leu1-32*), *erg* mutants (*h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg2::ura4*⁺, *h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg31::ura4-FOAR erg32::ura4*⁺, *h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg4::ura4*⁺, and *h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg5::ura4*⁺),⁽¹⁶⁾ KGY2550 (*h*⁻ *css1-2*),⁽²⁵⁾ and KP165 (*h*⁻ *leu1-32 bgs1-i2*).⁽³²⁾ Rho1 was overexpressed in HM123 cells using pREP vectors.⁽³³⁾

Isolation of heronamides. Heronamides were obtained from the mycelium of *Streptomyces* sp. Mycelium collected from a 5 L culture was extracted with MeOH. The MeOH extract (3.0 g) was concentrated and partitioned between 60% MeOH and CHCl₃. The CHCl₃ layer (1.2 g) was fractionated by SiO₂ column chromatography (CHCl₃/MeOH), followed by ODS flash column chromatography (H₂O/MeOH). Fractions containing 8-deoxyheronamide C (83 mg) were subjected to RP-HPLC (Cosmosil-5C₈-MS) to give 14.5 mg of 8-deoxyheronamide C. Heronamides C (16.1 mg)

and A (11.6 mg) were also purified by RP-HPLC (Cosmosil-5C₈-MS) from other fractions. The physico-chemical properties including UV, NMR and MS data of heronamides A and C were comparable to those reported.⁽¹⁸⁾

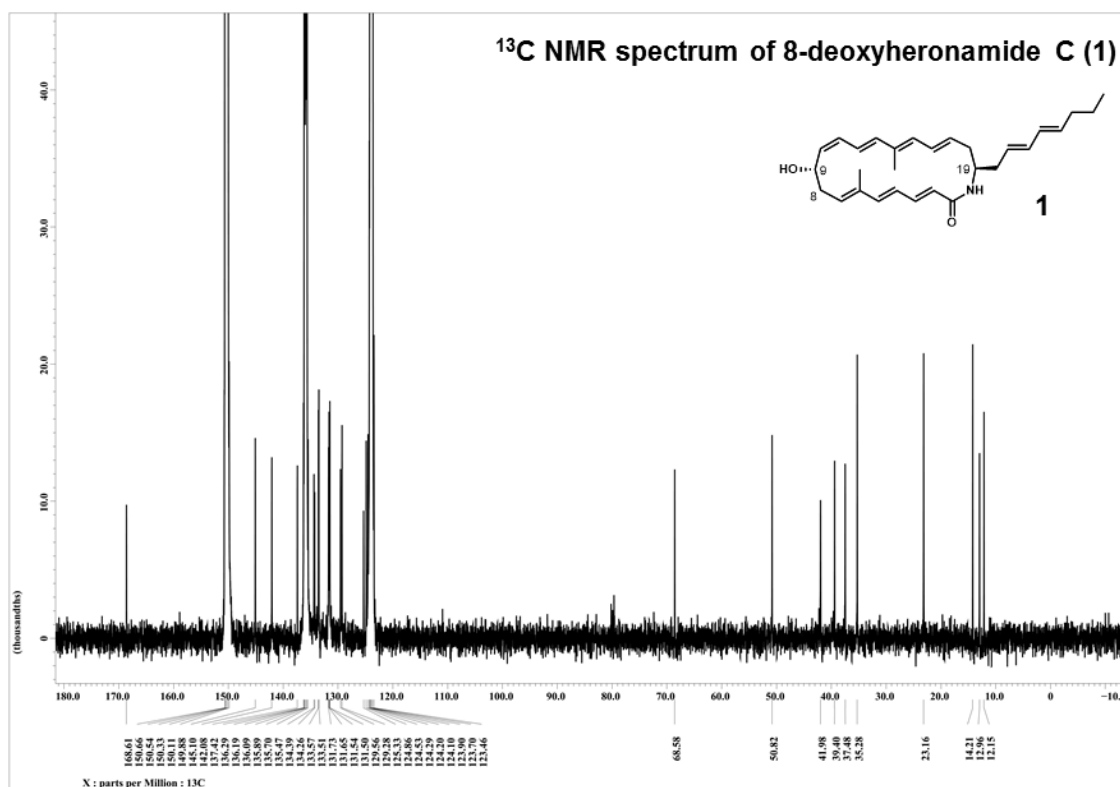
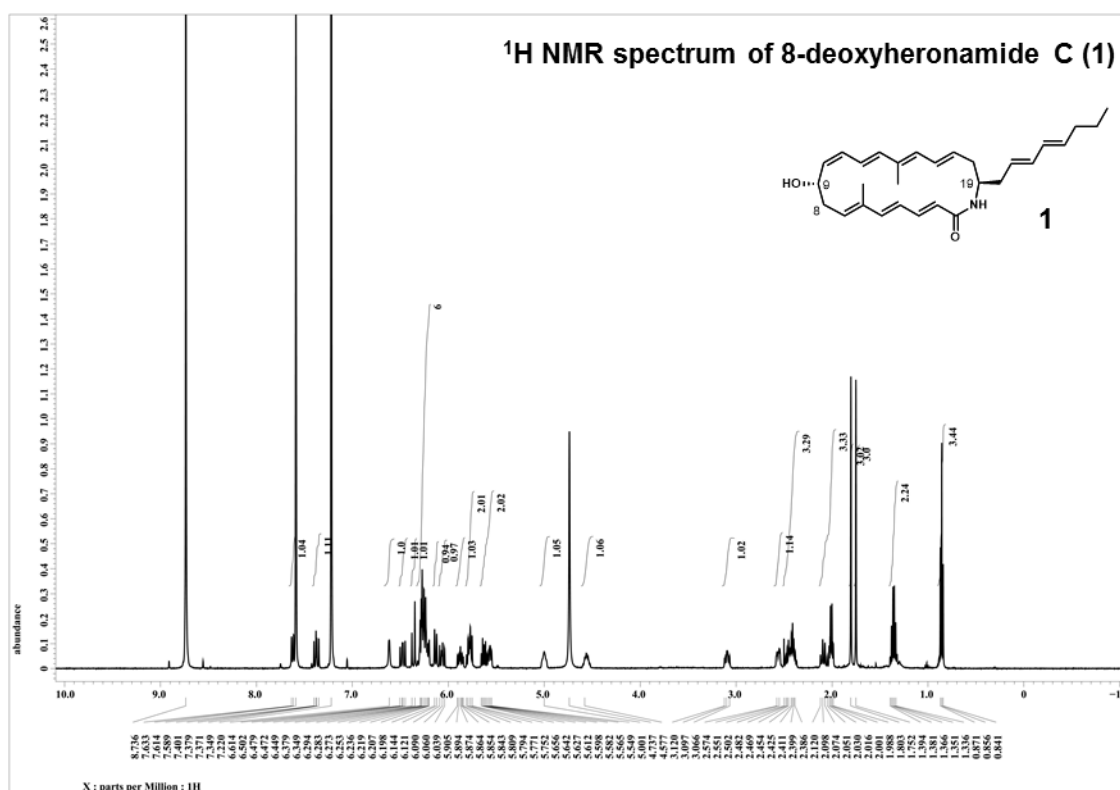
Preparation of liposomes for SPR analysis. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared as described previously.⁽²³⁾ Phospholipid (POPC, DOPC, DMPC or SM) with or without 20 mol% sterol (ergosterol or cholesterol) were dissolved in chloroform in a round-bottom flask. The solvent was evaporated and the resulting lipid film was further dried in vacuo for over 2 hours. After hydrating with 1 mL of PBS buffer [10 mM phosphate buffer (pH 7.4), 2.7 mM potassium chloride, and 137 mM sodium chloride], the mixture was vortexed, sonicated, and subjected to three cycles of freezing (−80 °C), thawing (60 °C), and vortexing (5 s) to form multilamellar vesicles (MLVs). The MLV suspension was passed through double 100 nm polycarbonate filters 19 times with LiposoFast-Basic (AVESTIN Inc.) at room temperature to form LUVs. The LUVs were diluted with the same PBS buffer to produce a suspension with a final lipid concentration of 0.5 mM for injection into the SPR instrument.

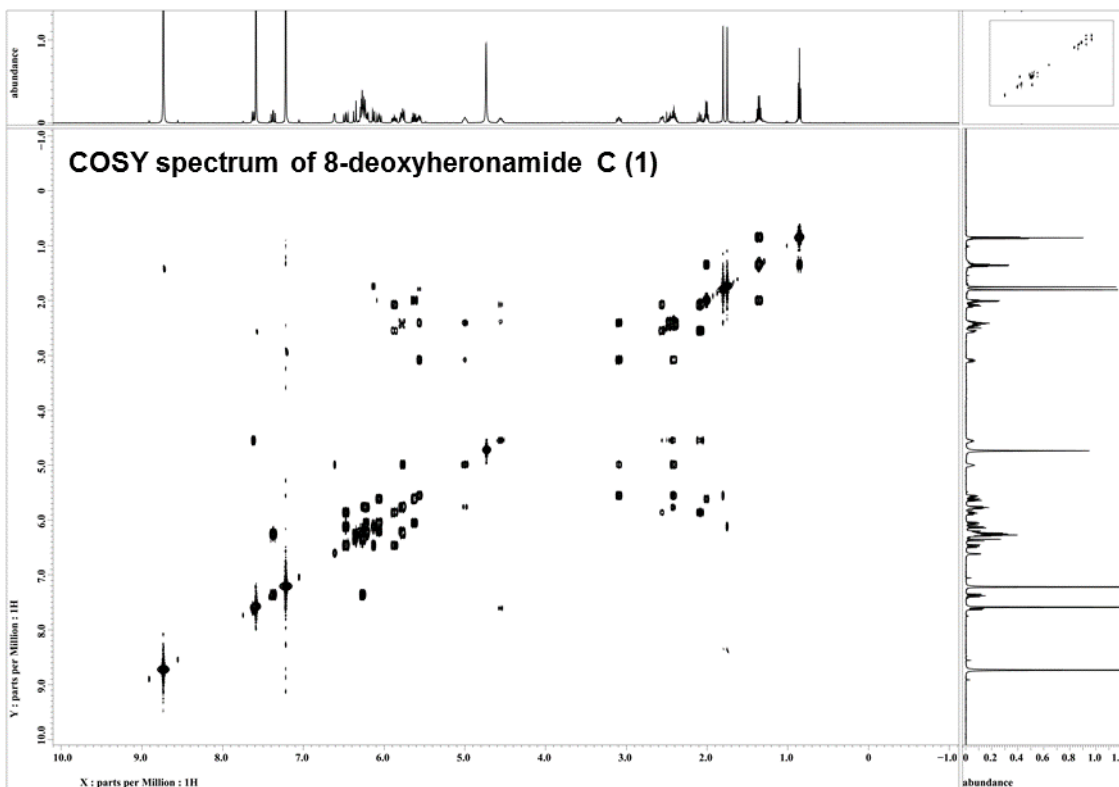
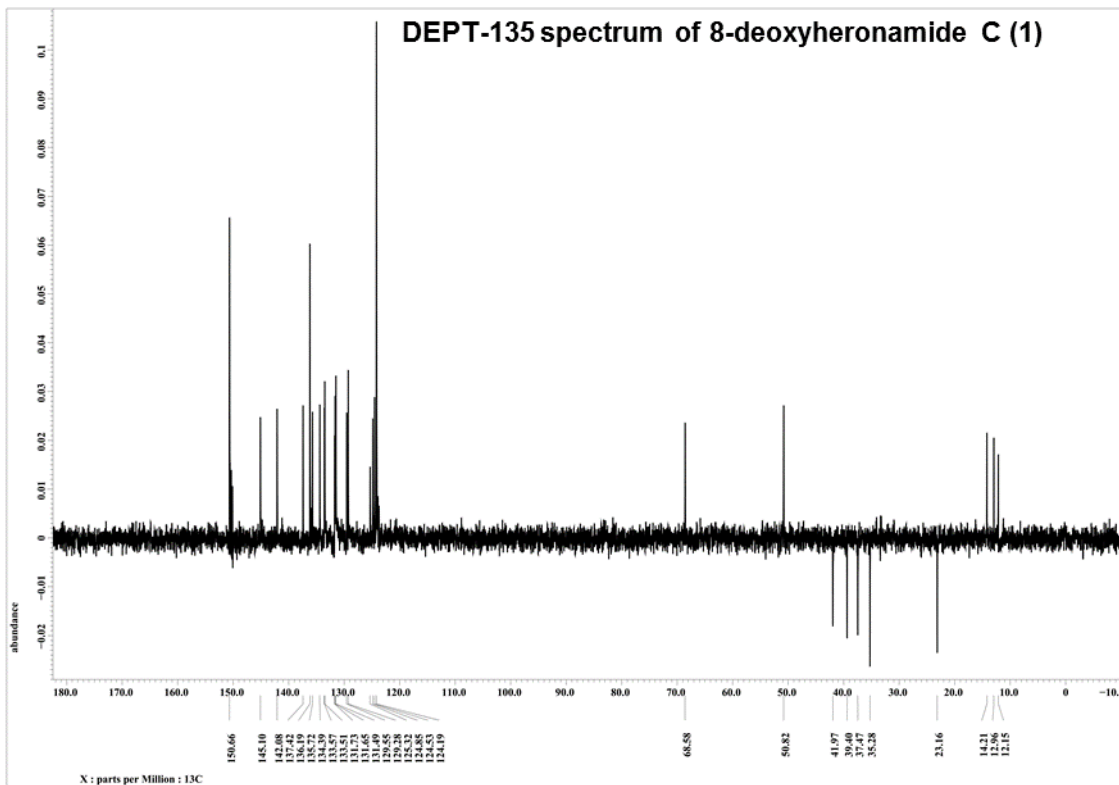
Surface plasmon resonance experiments. 8-Deoxyheronamide C (**1**) (1.9 mg, 4.4 μmol), heronamide C (**4**) (3.2 mg, 7.1 μmol), heronamide A (**2**) (1.4 mg, 3.0 μmol) and heronamide C diacetate (**7**) (1.2 mg, 2.2 μmol) was dissolved in DMSO and stored as a 1 mM stock solution. 5 μL of the compound stock solutions were diluted to 50 μM with 95 μL of PBS buffer. This solution was further diluted with PBS buffer containing 5% DMSO to give 10 and 20 μM heronamide solutions. We ensured that all these solutions, together with the running buffer, had a same DMSO concentration. The SPR experiments were performed at 30 °C using a dodecylamine-modified CM3 sensor chip mounted on a Biacore T200 system (GE Healthcare), and the running buffer was PBS buffer containing 5% DMSO (pH 7.4). The unmodified CM3 sensor chip was first washed three times with a 50 mM NaOH/2-propanol solution [3:2 (v/v)] at a flow rate of 20 μL/min for 2 min. Dodecylamine was immobilized in one of the flow cells (fc2) of the CM3 chip with an amino coupling method while the other flow cell (fc1) was left untouched to serve as the control lane. The sensor chip was activated for 7 minutes by injecting a solution mixture (1:1 v/v, 70 μl) of 390 mM EDC and 100 mM NHS. Dodecylamine (1 mg/mL) in 10 mM acetate buffer containing 10% DMSO (pH 5.0, 35 μl) was then injected for crosslinking. Remaining NHS ester groups on the sensor chip were deactivated by converting them to amide groups with an injection of 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5). The obtained modified sensor chip was washed with 10% DMSO to remove nonspecifically bound molecules. For the immobilization of liposomes on the sensor surface, the dodecylamine-modified sensor chip was first conditioned by an injection of running buffer at a rate of 10 μL/min for 5 min. The liposome suspension (0.5 mM) was then injected at a flow rate of 2 μL/min for 30 min, followed

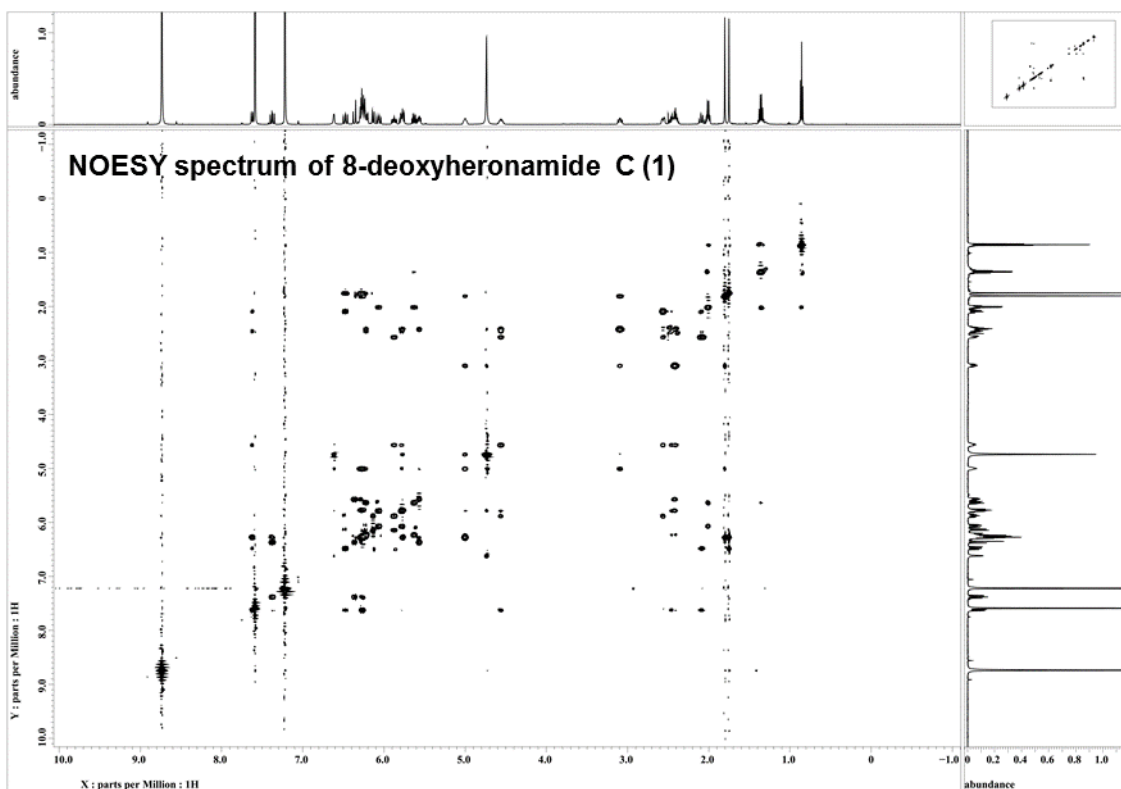
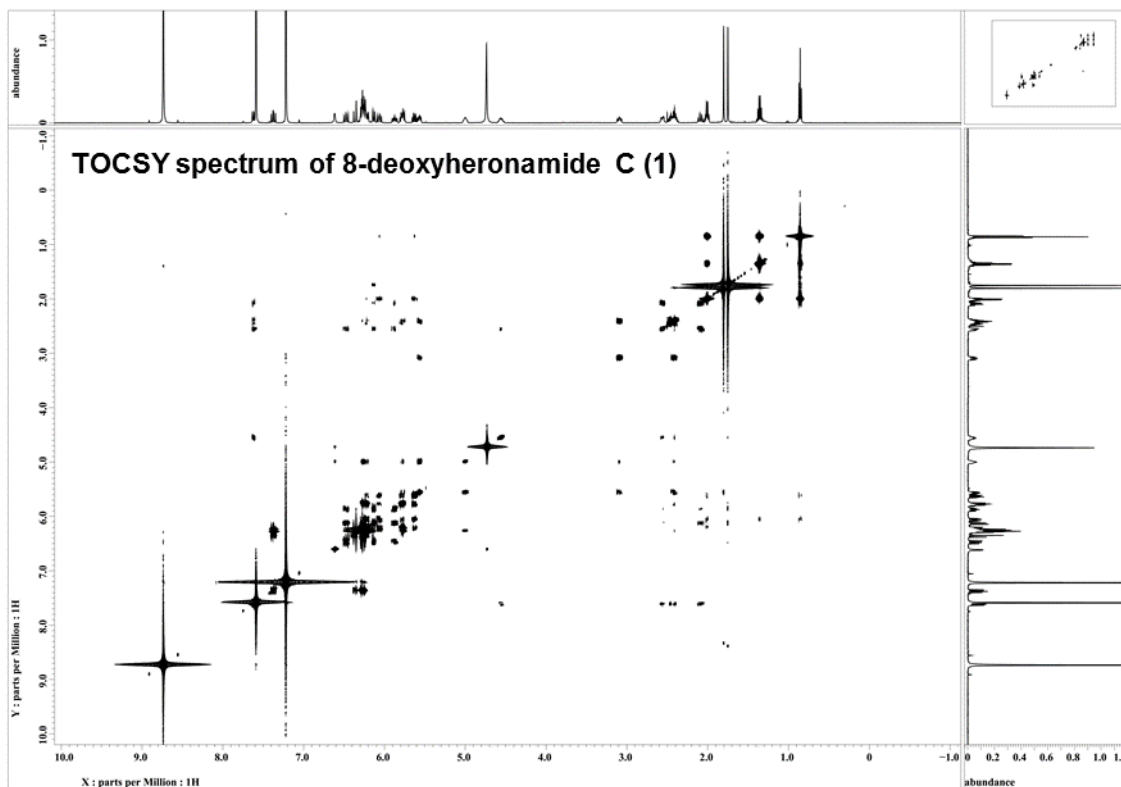
by the injection of 50 mM NaOH at a rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 2 min, three times to generate a stable sensorgram, which indicated the formation of a stable liposome layer on the sensor surface. Heronamide solutions, at a concentration of 10 or 20 μM , were then injected at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ and the association was observed for 300 s. Then the running buffer was injected at the same flow rate for another 300 s, and the dissociation of heronamides from the surface was monitored.

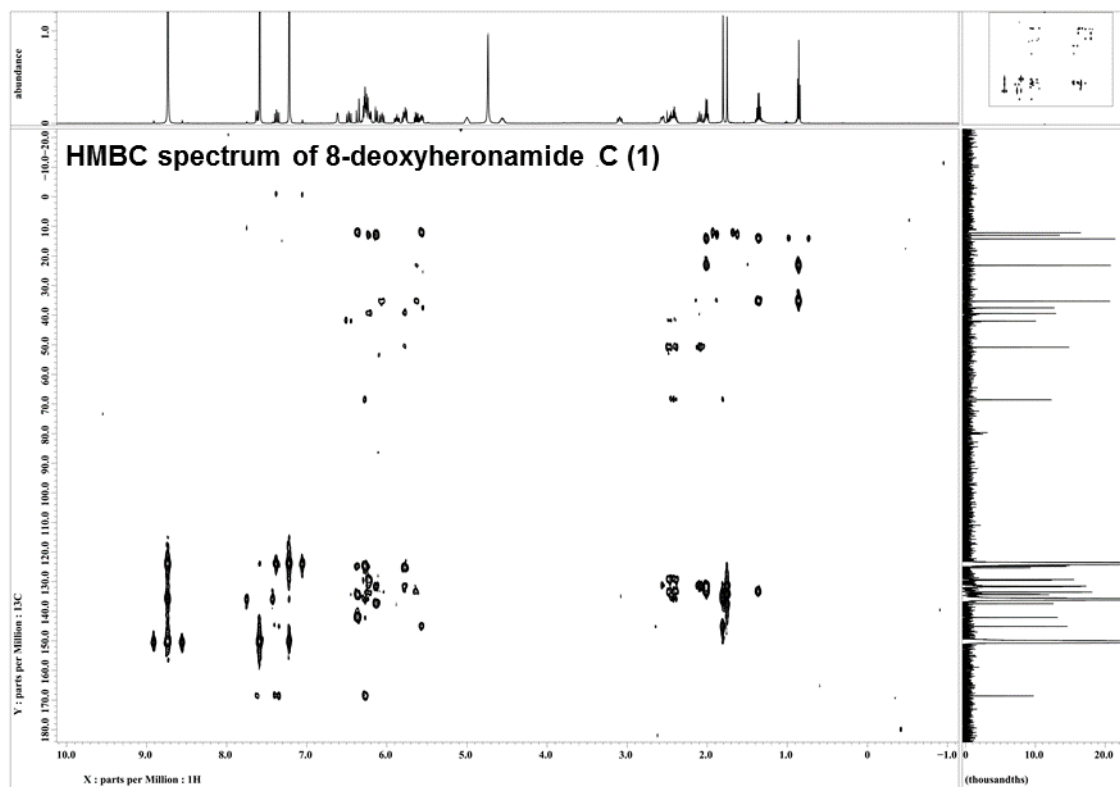
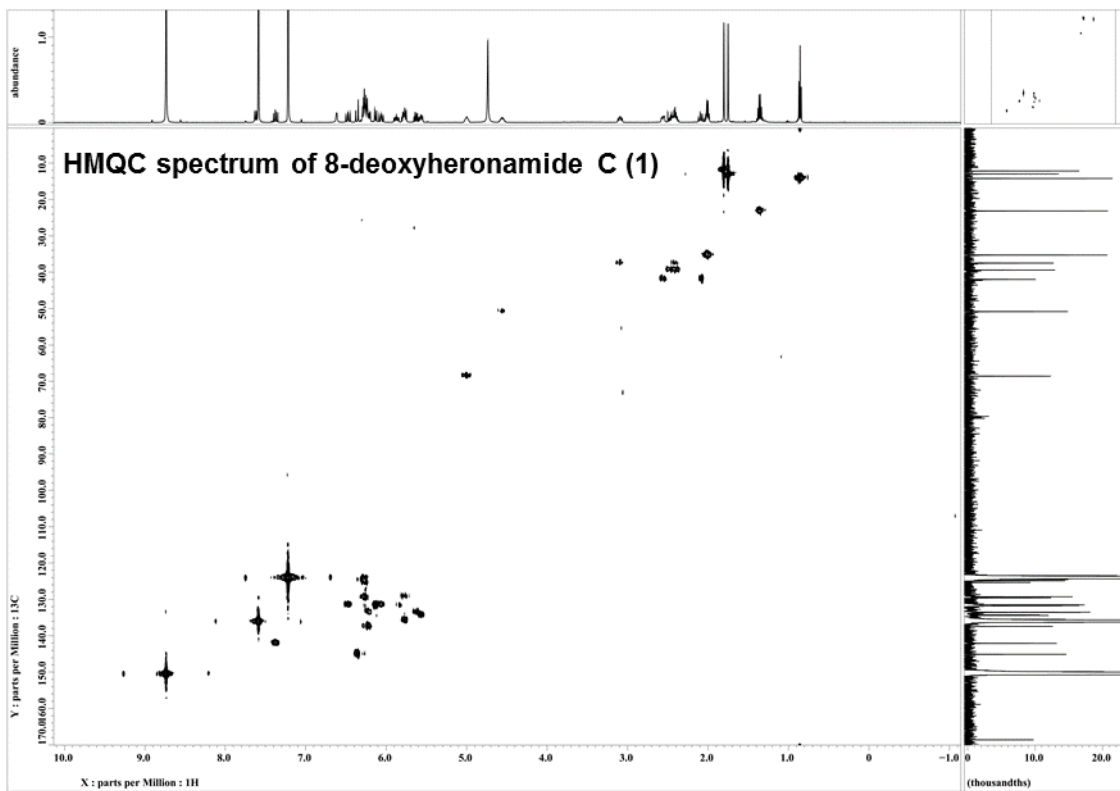
Microscopy. For calcofluor white (Cfw) staining, cells were fixed with formalin, washed with PEM buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4), followed by resuspended in a Cfw solution of PEM buffer (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). To collect images, the author used a MetaMorph system (Universal Imaging Corp.) with an Olympus IX81 fluorescence microscope equipped with an UPLSAPO $\times 100$ lens.

NMR spectroscopic data









第三章 放線菌の複合培養液から得られる新規アルカロイド群に関する研究

3. 1. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ)類の単離・構造決定と作用機序解析

3. 1. 1. 5aTHQ 類の単離

第 1 章のスクリーニングの結果、*Streptomyces nigrescens* HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-80596 の複合培養液が、酵母の *erg* 遺伝子破壊株に対して低い生育阻害活性を示し、細胞膜に作用する化合物の含有が期待された (Figure 1-3)。そこで、上記の生物活性を指標に培養抽出物の分画操作を行い、活性本体の単離を行った。まず、培養液から菌体を濾取し、クロロホルム・メタノール混合溶媒 (1:1) で抽出した。続いて、濃縮した抽出物をヘキサンと 90%メタノールで二層分配した。活性が見られたヘキサン層をシリカゲルカラム、ODS カラムクロマトグラフィーに付し、活性本体として疎水性物質の混合物を得た。混合物の各成分は、一般的な ODS カラムによる HPLC では分離できなかったが、コレステロールを担持した HPLC カラムを用いることで 8 成分を精製することに成功した (Figure 3-1)。

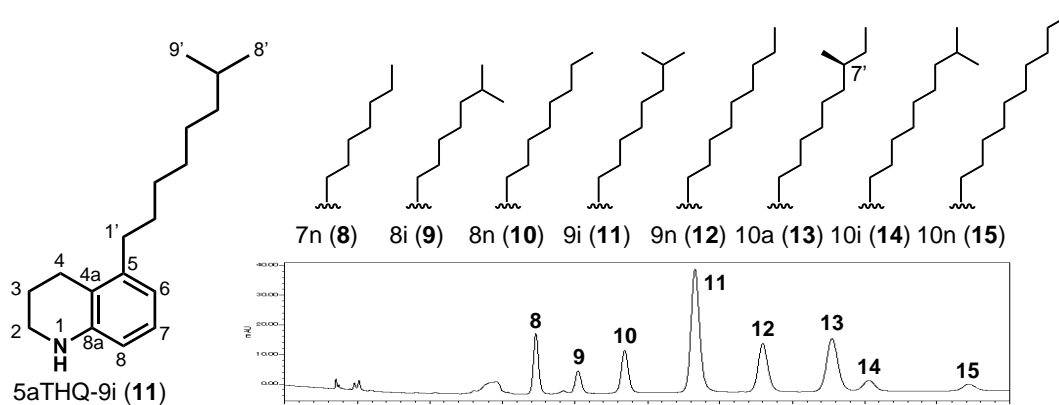


Figure 3-1. Structures and HPLC profiles of 5aTHQs. Structures of the most abundant metabolite 5aTHQ-9i (11) and the alkyl chains of metabolites 8–15. An HPLC chromatogram of the extract of the combined-culture broth of *S. nigrescens* and *T. pulmonis* acquired at 220 nm is also shown. Fractions containing 5aTHQs (8–15) were analyzed on a COSMOSIL Cholester column by isocratic elution of 90% MeOH.

LC-MS 解析から、化合物 8 から 15 の分子量が 231, 245, 259, 273 と 14 ごとに分布していることがわかり、これらの化合物が多様なアルキル鎖をもつ可能性が示唆された。最も含有量の多い化合物 11 の分子式は、高分解能 MS から $C_{18}H_{29}N$ と決定された (m/z 260.2374, calcd for 260.2373, $C_{18}H_{30}N [M + H]^+$)。 1H , ^{13}C , DEPT, HMQC NMR スペクトルの

Table 3-1. ¹H and ¹³C NMR data of 5aTHQs (8-15) in CDCl₃

position	5aTHQ-7n (8)		5aTHQ-8i (9)	
	δ_C (mult.)	δ_H (mult. <i>J</i> in Hz)	δ_C (mult.)	δ_H (mult. <i>J</i> in Hz)
1-NH	-	n.d. ^a	-	n.d. ^a
2	41.8 (t)	3.29 (t, 5.5)	41.8 (t)	3.30 (t, 5.5)
3	22.4 (t)	2.00 (tt, 5.6, 6.5)	22.7 (t)	2.00 (tt, 5.6, 6.5)
4	23.6 (t)	2.72 (t, 6.5)	23.7 (t)	2.72 (t, 6.6)
4a	120.5 (s)	-	119.6 (s)	-
5	142.0 (s)	-	142.0 (s)	-
6	119.2 (d)	6.57 (d, 7.5)	118.1 (d)	6.60 (d, 7.5)
7	126.5 (d)	6.93 (dd, 7.7, 7.7)	126.4 (d)	6.94 (dd, 7.7, 7.7)
8	113.3 (d)	6.45 (d, 7.9)	112.5 (d)	6.50 (d, 8.0)
8a	143.7 (s)	-	145.1 (s)	-
1'	33.0 (t)	2.50 (br. dd)	33.0 (t)	2.50 (br. dd)
2'	30.4 (t)	1.54 (m)	30.4 (t)	1.53 (m)
3'	30.0 (t)		30.3 (t)	
4'	29.4 (t)		27.5 (t)	1.28-1.39 (4H, m)
5'	32.0 (t)	1.24-1.40 (8H, m)	39.1 (t)	1.17 (m)
6'	22.8 (t)		28.1 (d)	1.55 (m)
7'	14.3 (q)	0.89 (t, 6.9)	22.8 (q)	0.88 (6H, d, 6.5)
8'				

position	5aTHQ-8n (10)		5aTHQ-9i (11)	
	δ_C (mult.)	δ_H (mult. <i>J</i> in Hz)	δ_C (mult.)	δ_H (mult. <i>J</i> in Hz)
1-NH	-	n.d. ^a	-	4.67 (br.s)
2	41.8 (t)	3.30 (t, 5.4)	41.8 (t)	3.29 (t, 5.4)
3	22.7 (t)	2.02 (tt, 5.7, 6.3)	22.5 (t)	2.00 (tt, 5.4, 6.6)
4	23.7 (t)	2.72 (t, 6.5)	23.7 (t)	2.73 (t, 6.6)
4a	119.7 (s)	-	120.3 (s)	-
5	142.0 (s)	-	142.1 (s)	-
6	118.2 (d)	6.61 (d, 7.5)	119.0 (d)	6.57 (d, 7.4)
7	126.4 (d)	6.95 (dd, 7.7, 7.7)	126.5 (d)	6.94 (dd, 7.7, 7.7)
8	112.5 (d)	6.52 (d, 7.9)	113.2 (d)	6.43 (d, 7.9)
8a	145.1 (s)	-	144.0 (s)	-
1'	33.0 (t)	2.50 (br. dd)	33.0 (t)	2.51 (br. dd)
2'	30.4 (t)	1.54 (m)	30.3 (t)	1.56 (m)
3'	30.0 (t)		30.0 (t)	1.39 (m)
4'	29.7 (t)		30.0 (t)	
5'	29.5 (t)	1.23-1.40 (10H, m)	27.5 (t)	1.27-1.34 (4H, m)
6'	32.1 (t)		39.2 (t)	1.18 (m)
7'	22.8 (t)		28.1 (d)	1.54 (m)
8'	14.3 (q)	0.89 (t, 6.7)	22.8 (q)	0.88 (6H, d, 6.3)
9'				

^aNot determined.

position	5aTHQ-9n (12)		5aTHQ-10a (13)	
	δ_C (mult.)	δ_H (mult. J in Hz)	δ_C (mult.)	δ_H (mult. J in Hz)
1-NH	-	n.d. ^a	-	3.49 (br.s)
2	41.8 (t)	3.28 (t, 5.4)	41.8 (t)	3.27 (t, 5.4)
3	22.6 (t)	2.02 (tt, 5.5, 6.3)	22.6 (t)	1.98 (tt, 5.5, 6.6)
4	23.7 (t)	2.71 (t, 6.5)	23.7 (t)	2.71 (t, 6.6)
4a	119.9 (s)	-	119.8 (s)	-
5	142.0 (s)	-	142.0 (s)	-
6	118.5 (d)	6.53 (d, 7.5)	118.4 (d)	6.52 (d, 7.4)
7	126.4 (d)	6.91 (dd, 7.7, 7.7)	126.4 (d)	6.91 (dd, 7.7, 7.7)
8	112.7 (d)	6.38 (d, 8.0)	112.7 (d)	6.37 (d, 7.9)
8a	144.7 (s)	-	144.8 (s)	-
1'	33.0 (t)	2.49 (br. dd)	33.0 (t)	2.50 (br. dd)
2'	30.4 (t)	1.55 (m)	30.4 (t)	1.55 (m)
3'	30.0 (t)		30.1 (t)	
4'	29.7 (t)		30.1 (t)	
5'	29.7 (t)	1.22-1.41 (12H, m)	27.2 (t)	1.23-1.41 (9H, m)
6'	29.5 (t)		36.8 (t)	
7'	32.1 (t)		34.5 (d)	
8'	22.8 (t)		29.6 (t)	1.12 (m)
9'	14.3 (q)	0.89 (t, 6.9)	11.6 (q)	0.86 (t, 7.2)
10'			19.4 (q)	0.85 (d, 6.3)

position	5aTHQ-10i (14)		5aTHQ-10n (15)	
	δ_C (mult.)	δ_H (mult. J in Hz)	δ_C (mult.) ^b	δ_H (mult. J in Hz)
1-NH	-	n.d. ^a	-	n.d. ^a
2	41.8 (t)	3.30 (t, 5.7)	41.8 (t)	3.32 (t, 5.7)
3	22.5 (t)	2.01 (tt, 5.5, 6.3)	22.6 (t)	2.04 (tt, 5.6, 6.3)
4	23.7 (t)	2.72 (t, 6.6)	23.7 (t)	2.73 (t, 6.5)
4a	120.2 (s)	-	119.8 (s)	-
5	142.0 (s)	-	142.0 (s)	-
6	118.8 (d)	6.59 (d, 7.4)	118.4 (d)	6.65 (d, 7.5)
7	126.4 (d)	6.94 (dd, 7.6, 7.6)	126.4 (d)	6.97 (dd, 7.7, 7.7)
8	113.0 (d)	6.48 (d, 8.0)	112.7 (d)	6.37 (d, 7.8)
8a	144.3 (s)	-	144.8 (s)	-
1'	33.0 (t)	2.50 (br. dd)	33.0 (t)	2.50 (br. dd)
2'	30.4 (t)	1.54 (m)	30.4 (t)	1.54 (m)
3'	30.1 (t)		30.0 (t)	
4'	30.0 (t)		29.8 (t)	
5'	29.8 (t)	1.24-1.40 (8H, m)	29.8 (t)	
6'	27.6 (t)		29.7 (t)	1.22-1.40 (14H, m)
7'	39.2 (t)	1.15 (m)	29.5 (t)	
8'	28.1 (d)	1.52 (m)	32.1 (t)	
9'			22.8 (t)	
10'	22.8 (q)	0.86 (6H, t, 6.8)	14.3 (q)	0.88 (t, 6.9)

^aNot determined.

^bAssigned by HMQC and HMBC data.

解析から、化合物 **11** が一級炭素 2 つ、二級炭素 9 つ、三級炭素 4 つ、四級炭素 3 つから成ることが明らかにされた (**Figure 3-2, Table 3-1**)。COSY スペクトルから芳香族水素のスピ系列 H-6/H-7/H-8 が見出され、HMBC 相関によって 1,2,3-三置換ベンゼンの水素であることがわかった。8a 位炭素の化学シフト値の低磁場シフトから、8a 位に窒素原子が結合している可能性が示唆された。2 位炭素原子の化学シフト値と、2 位水素から 8a 位炭素への HMBC 相関から、この窒素原子は 2 位炭素を介して別のスピ系列 H₂-2/H₂-3/H₂-4 と結合していると判断した。さらに、3 位水素から 4a 位炭素、4 位水素から 5 位および 8a 位炭素への HMBC 相関によって 4 位炭素と 4a 位炭素が結合していることがわかり、以上の結果から、化合物 **11** が 1,2,3,4-tetrahydroquinoline 環をもつことが明らかになった。最後に、1'位水素から 4a 位および 5 位炭素、2'位水素から 5 位炭素への HMBC 相関が観測され、1 つのアルキル鎖が 5 位炭素に結合していることが判明した。2 つの等価なメチル基と残りの分子量から isononyl 基の存在が明らかとなり、最終的に化合物 **11** の構造を **Figure 3-1** に示すように決定した。

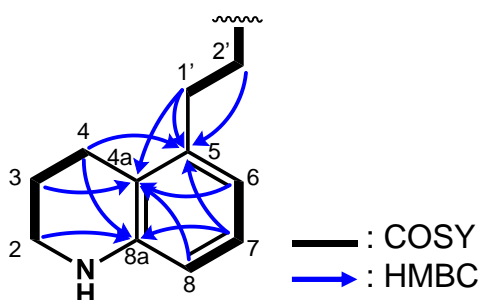


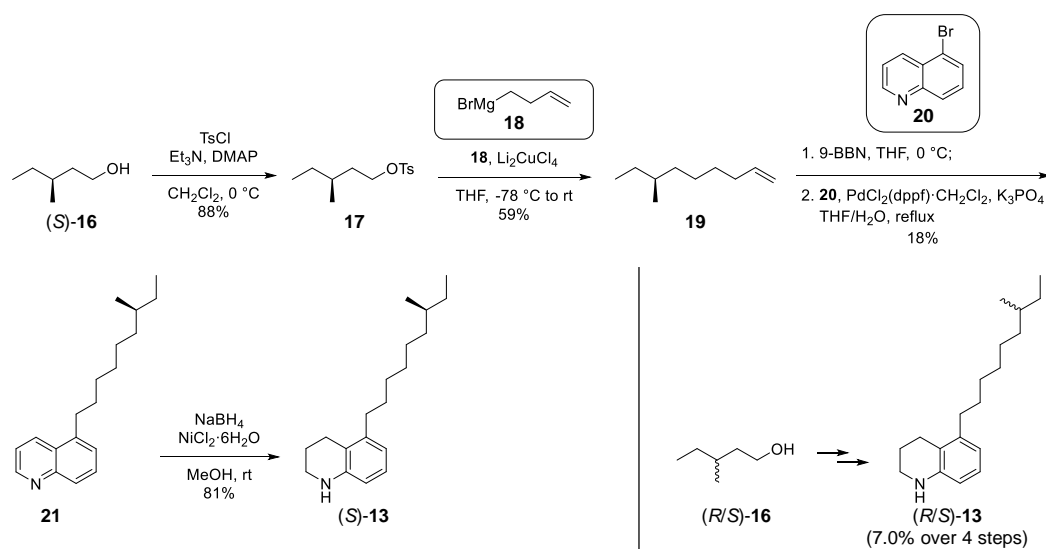
Figure 3-2. COSY and key HMBC correlations for 5aTHQ-9i (11).

5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ)構造は化合物 **8** から **15** に共通していたため、これらを 5aTHQ 類と命名した。各化合物のアルキル鎖には多様性が見られ、炭素数は 7 から 10、末端構造にはノルマル型、イソ型、アンテイソ型が確認された。各化合物の命名は、アルキル鎖の炭素数と末端構造をもとに行った。例えば、化合物 **11** のアルキル鎖は炭素数 9 かつイソ型であったため、5aTHQ-9i と命名した。残り 7 化合物も同様に、5aTHQs-7n (**8**), -8i (**9**), -8n (**10**), -9n (**12**), -10a (**13**), -10i (**14**), -10n (**15**)とした (**Figure 3-1**)。

3. 1. 2. 5aTHQ-10a の全合成と絶対立体化学

化合物 **8** から **15** のうち、5aTHQ-10a (**13**)はアルキル側鎖の 7'位に不斉炭素を有していた。そこで、5aTHQ-10a (**13**)の絶対立体化学を決定するため、5aTHQ-10a (**13**)のラセ

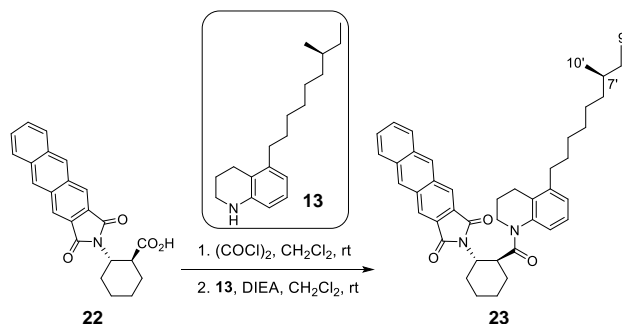
ミ体および7'S体をホウ素—アルキル鈴木・宮浦カップリング⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾を用いて合成することとした (**Scheme 3-1**)。分岐メチル基を持つ光学活性アルケン **19** は、文献をもとに、市販の(*S*)-3-methyl-1-pentanol (**16**)から2段階で合成した⁽³⁶⁾。アルケン **19** と 9-BBN の反応によりアルキルボランを生成させ、パラジウム触媒の存在下、5-bromoquinoline (**20**)とクロスカップリングを行うことでアルキルキノリン **21** を得た。最後に、化合物 **21** のキノリン環を、Ni(II)の存在下水素化ホウ素ナトリウムによって還元し、目的の(*S*)-5aTHQ-10a (**13**)を4段階、7.5%収率で合成することに成功した。5aTHQ-10a (**13**)のラセミ体は、3-methyl-1-pentanol (**16**)のラセミ体を出発物質に、同様の手法で合成した。それぞれのNMR および MS データは天然物のものと一致し、化合物 **13** の平面構造が正しいことを確認した。合成した(*S*)-**13** の比旋光度は+6.9 (*c* 0.50, 20 °C in MeOH)と、天然物のものと符号・絶対値ともによく一致しており(+6.7 under the same condition)、天然型 5aTHQ-10a (**13**)の絶対立体化学が*S*体であることが示唆された。しかし、*R*体の合成および化合物情報の取得ができなかったため、本結果をもって絶対立体化学を確定するには不十分と考えた。



Scheme 3-1. Synthesis of racemic 5aTHQ-10a (13**) and its (*S*)-enantiomer**

そこで、大類—赤坂法を化合物 **13** に適用し、絶対立体化学を決定することとした (**Scheme 3-2, Figure 3-3**)。(*1S,2S*)-2-(Anthracene-2,3-dicarboximido)cyclohexancarboxylic acid (**22**)をアルコールと縮合すると、アシル基のかさ高さや強い磁気異方性効果により、反応点から離れた位置にある不斉炭素であっても、得られたジアステロマーを HPLC や NMR で識別可能となる。実際に、アンテイソ型の長鎖アルコールの絶対立体化学決定にも適用されている⁽³⁷⁾⁻⁽³⁹⁾。種々条件検討の結果、このカルボン酸 **22** を酸クロリドへ

と活性化することで、化合物 **13** のラセミ体との縮合に成功し、ジアステレオ混合物を得た (化合物 **23a**)。合成した *S* 体および天然物についても同様の反応を行い、対応するアミド **23b**, **23c** を合成した。化合物 **23a** の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを重メタノール中 -20°C で測定したところ、 $9'$ 位のメチル基のシグナルが δ_{H} 0.829 ppm および 0.837 ppm、存在比 1:1 の2つのトリプレットに分離した (Figure 3-3)。これにより、 $7'R$ および $7'S$ の各ジアステレオマーを区別できると考えた。一方、化合物 **23b** および **23c** では、 δ_{H} 0.837 ppm の1つのトリプレットしか観察されなかった (Figure 3-3)。この結果から、天然型 5aTHQ-10a (**13**)の絶対立体化学を $7'S$ と確定するに至った。大類一赤坂法はこれまで、立体化学が決定困難な不斉炭素をもつカルボン酸・アルデヒド・アルコールの構造決定に貢献してきた⁽⁴⁰⁾⁻⁽⁴⁶⁾。本研究成果は、大類一赤坂法を光学活性アミンの立体化学決定に適用した初の報告である。



Scheme 3-2. Condensation of natural or synthesized 5aTHQ-10a (13**) with the chiral-labeling carboxylic acid **22****

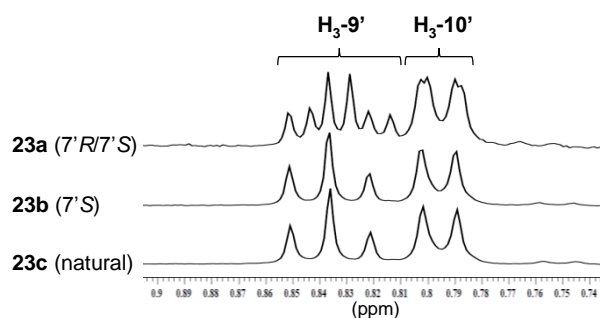


Figure 3-3. Application of the Ohruï–Akasaka method to 5aTHQ-10a (13**).** $^1\text{H NMR}$ signals of the two methyl groups, $\text{H}_3\text{-}9'$ and $\text{H}_3\text{-}10'$, in amide **23** are shown. Compounds **23a–c** were derived from synthesized racemic **13**, synthesized (*S*)-**13**, and natural **13**, respectively. The NMR spectra were measured in CD_3OD at -20°C .

3. 1. 3. 分裂酵母に対する 5aTHQ 類の生育阻害活性

得られた 5aTHQ 類が膜脂質に作用する可能性を、分裂酵母を用いて検証した。第 1 章および第 2 章で述べたように、エルゴステロール生合成遺伝子の欠損株は、膜脂質に作用する薬剤が効きづらい傾向にある⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。5aTHQ-9n は野生株の生育を中程度の濃度で阻害したが、*erg* 遺伝子破壊株($\Delta erg2, \Delta erg31 \Delta erg32, \Delta sts1/erg4, \Delta erg5$)に対しては、200 μM の化合物存在下でもほとんど阻害を示さなかった (Figure 3-4)。この阻害パターンから、5aTHQ-9n (12) は膜脂質を標的とする予想され、当初の目的に沿った化合物が得られていることが確認できた。また、アミノ基をメチル化した誘導体 24 は、野生株に対しても阻害活性を全く示さなかった。

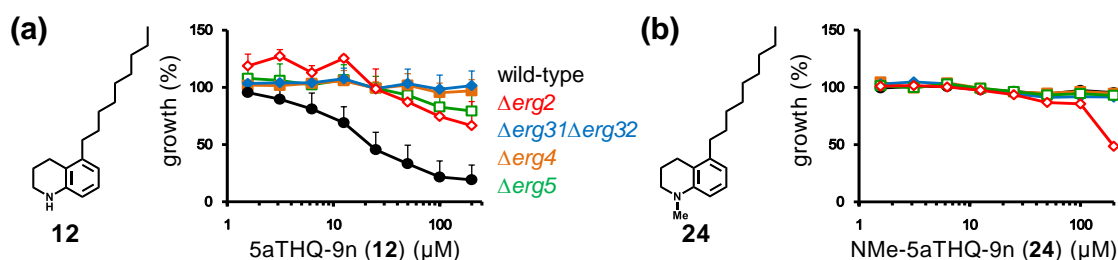


Figure 3-4. Growth inhibitory activities of 5aTHQ-9n (12) against fission yeast cells. The effects of (a) 5aTHQ-9n (12) and (b) *N*-methyl-5aTHQ-9n (24) were examined against the wild-type (black), $\Delta erg2$ (red), $\Delta erg31\Delta erg32$ (blue), $\Delta sts1/erg4$ (orange), and $\Delta erg5$ (green) cells. Cells were treated with compounds 12 and 24 for 24 h. Data represent the mean values of three independent experiments. Error bars indicate the SD.

続いて、多様なアルキル側鎖をもつ化合物 8-15 の構造活性相関を検証した (Figure 3-5)。この結果から、2つの法則性を見出すことができた。1つ目は、側鎖の炭素数が小さいほど阻害活性が強いという点である。5aTHQ-7n (8) が最も強力であり、野生株に対する MIC は 6.3 μM であった。側鎖の炭素数が 8, 9 となるに従って阻害活性は低下し、5aTHQ-10n (15) に至っては 200 μM でも阻害を全く示さなかった。2つ目は、側鎖の分岐構造は活性には影響しないという点である。例えば、5aTHQ-8i (9) と 8n (10) の間で、野生株に対する阻害活性や選択性における明らかな差を見ることはできなかった。5aTHQ-9i (11) と 9n (12)、または 10a (13), 10i (14), 10n (15) 間でも同様の傾向が見られた。以上より、5aTHQ 類の生物活性は、アルキル鎖の長さよりもその炭素数が重要である可能性が示唆された。

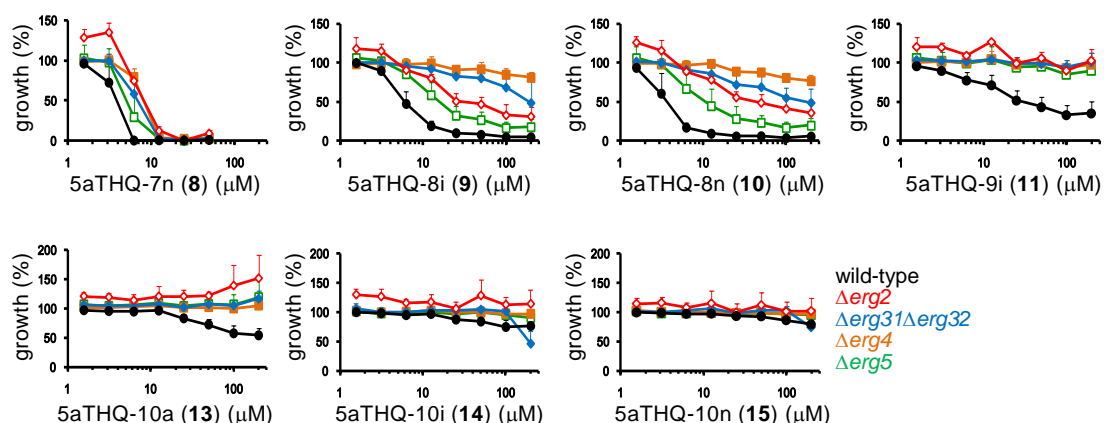


Figure 3-5. Structure-activity relationships of 5aTHQs. Growth inhibitory activities of 5aTHQs were examined against the wild-type (black), $\Delta erg2$ (red), $\Delta erg31\Delta erg32$ (blue), $\Delta sts1/erg4$ (orange), and $\Delta erg5$ (green) cells. Cells were treated with compounds **8-15** for 24 h. Data represent the mean values of three independent experiments. Error bars indicate the SD.

3. 1. 4. 5aTHQ 類の脂質膜親和性の解析

5aTHQ 類がどのような脂質分子種と相互作用するかは、第 2 章に倣い、Biacore T200 による SPR 測定で評価した。第 2 章ではセンサーチップに CM3 を採用していたが、5aTHQ 類はリガンドを固定化していない CM3 チップにも結合を示したため、再度条件検討を行い、非特異的結合が最も少ない CM5 チップへと変更して以下の実験を行った。まず、DOPC, POPC, DMPC 単独またはエルゴステロールを 20 mol% 加えたものについてリポソームを作成し、センサーチップに固定化後、5aTHQ-9n (**12**) をアナライトとして流すことで脂質膜への結合能を解析した。その結果、5aTHQ-9n (**12**) は、ホスファチジルコリンのアシル鎖の種類やステロールの有無には依存せず、測定したすべての人工膜に対してほとんど同形のセンサーグラムを示した (**Figure 3-6**)。いずれの脂質分子を用いた場合でも、センサーチップへのアナライトの結合を示す Resonance Unit が化合物添加終了後も一定の値を保っている様子が見られたことから、一度脂質膜に結合した 5aTHQ-9n (**12**) の解離は極めて難しく、この化合物が多様な脂質膜と高い親和性をもつ可能性が示唆された。

5aTHQ 類が特異的に結合する標的脂質を明らかにすることはできなかったが、これらのセンサーグラムには興味深い特徴が見られた。すなわち、化合物添加の終了直前 (145 秒時点) における縦軸の値を化合物濃度に対してプロットすると、5~10 μM を境に、センサーチップへの結合量が急激に上昇していることがわかった (**Figure 3-7**)。

続いて、5aTHQs-7n (**8**), -8n (**10**), -10n (**15**) および化合物 **12** のメチル化体 **24** を用いて、POPC から成る脂質膜との相互作用を比較解析した (**Figure 3-7**)。酵母に対する生育阻

害活性を示さない 5aTHQ-10n (**15**) および *N*-メチル化体 **24** は、80 μM という高濃度でも脂質膜に全く結合しなかった。一方、5aTHQs-7n (**8**), -8n (**10**) については、脂質膜との結合を示すセンサーグラムが観測された。さらに、5aTHQ-9n (**12**) と同じく、特定の濃度を境に結合能が劇的に向上するという結果が得られた。境界濃度は化合物によって異なり、5aTHQ-9n (**12**) の約 10 μM に対し、5aTHQ-7n (**8**) は約 40 μM 、5aTHQ-8n (**10**) は約 20 μM であった。

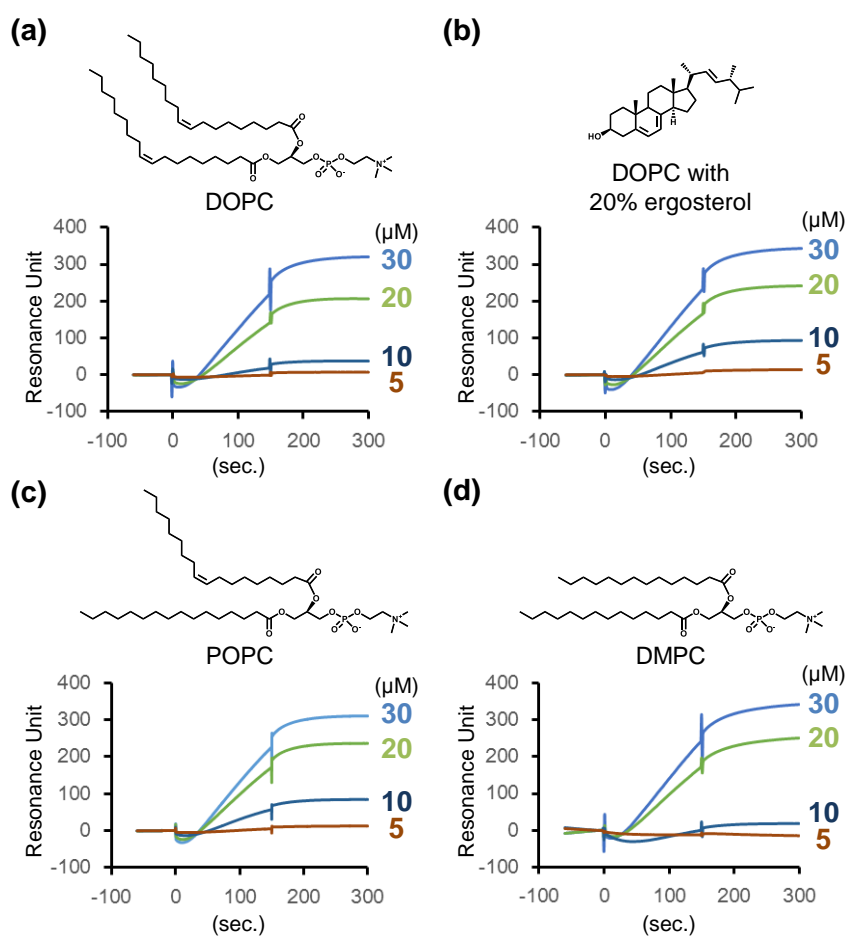


Figure 3-6. Affinity of 5aTHQ-9n (12**) to liposomes.** Chemical structures of the phospholipids and ergosterol used for the SPR experiments and sensorgrams for binding of compound **12** to liposomes are shown. **(a)** DOPC, **(b)** 20 mol % ergosterol-containing DOPC, **(c)** POPC and **(d)** DMPC liposomes were captured on a dodecylamine-modified CM5 sensor chip. Elutions of various concentrations of 5aTHQ-9n (**12**) were started at time 0 and maintained for 150 s. Flow rate was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

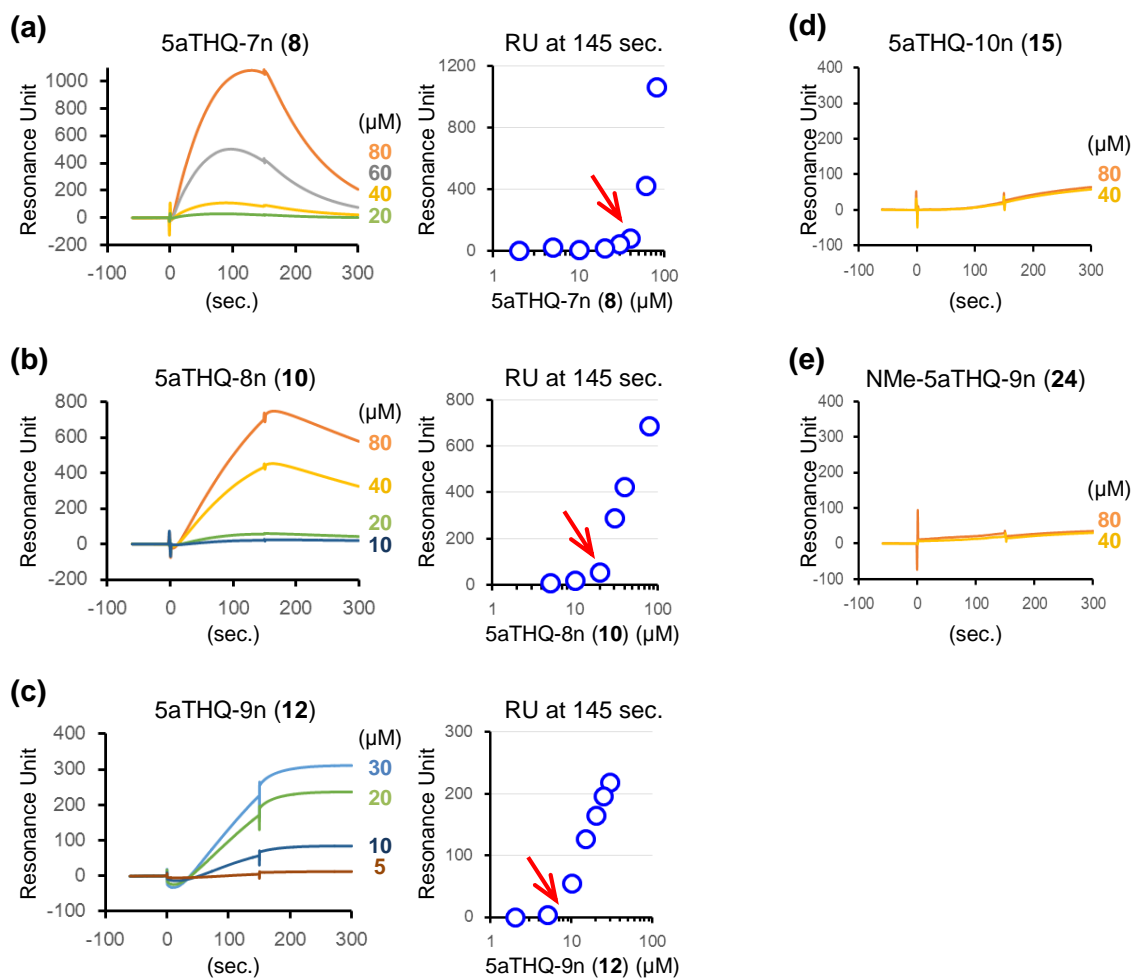


Figure 3-7. Sensorgrams for binding of 5aTHQs to POPC liposomes. Liposomes were captured on a dodecylamine-modified CM5 sensor chip. The affinity of **(a)** 5aTHQ-7n (**8**), **(b)** 5aTHQ-8n (**10**), **(c)** 5aTHQ-9n (**12**), **(d)** 5aTHQ-10n (**15**) and **(e)** NMe-5aTHQ-9n (**24**) are compared. Similar results were obtained for more than three experiments, and the characteristic sensorgrams are shown. Elution of various concentrations of 5aTHQ-9n (**12**) were started at time 0 and maintained for 150 s. Flow rate was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. For compounds **8**, **10** and **12**, resonance unit values at time 145 s were plotted against concentrations of analytes. Drastic enhancement of the binding to liposomes can be seen above the concentrations indicated by red arrows.

3. 1. 5. 5aTHQ 類が形成する凝集体の物性解析

先の SPR 解析において、脂質膜への結合が急激に上昇する濃度域で何が起きているのかを明らかにすることとした。まず、目視では、高濃度の 5aTHQ 水溶液は白く半透明であったことから、高濃度では凝集体を形成する可能性が示唆された(**Figure 3-8**)。そこで、SPR で用いた PBS 緩衝液 (5% DMSO) 中の 5aTHQ 類の吸光度を様々な濃度で測定し、水溶液の白濁が開始する濃度を求めた。

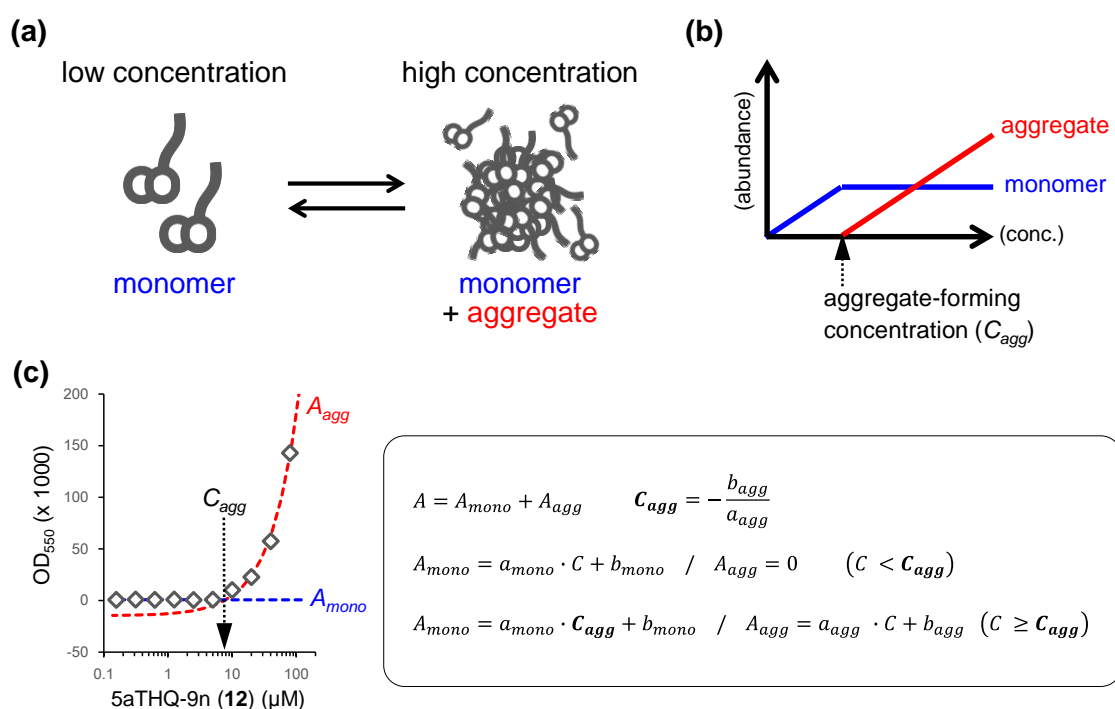


Figure 3-8. Aggregate formation of 5aTHQs in aqueous solution. (a) When the concentration of 5aTHQs is higher than the threshold, 5aTHQs are expected to form aggregates. (b) A schematic for the abundance of the 5aTHQ monomers and aggregates in aqueous solutions against 5aTHQ concentration. Aggregate-forming concentration (C_{agg}) means the threshold to form aggregates. (c) OD_{550nm} of 5aTHQ-9n (12) dissolved in PBS buffer (+5% DMSO) are plotted as diamonds against concentrations of the compound. Absorbance curve (A) is defined as shown and fitted using linear least-squares method. The x-intercept of the fitted absorbance curve for the 5aTHQ aggregates (A_{agg}) was defined as C_{agg} .

モノマーの UV 吸収が無視できる 550 nm における吸光度を濃度に対してプロットし、**Figure 3-8** のモデルをもとに、吸光度曲線を 2 つの一次関数の和を用いて近似した。すなわち、実測吸光度はモノマー・凝集体それぞれの吸光度 A_{mono} と A_{agg} の和であり、 A_{mono} と A_{agg} は異なる吸光係数をもつ一次関数で表せると考えた。このとき、凝集体の吸光度 A_{agg} の x 切片を凝集体形成濃度として算出した。

結果を **Table 3-2** に示す。実際の吸光度曲線と近似曲線の決定係数 R^2 はほぼすべての実験で 0.995 以上であり、推定モデルが妥当であることが示唆された。5aTHQ-7n (**8**), -8n (**10**), -9n (**12**)において、凝集体形成濃度と、脂質膜への結合が高まる濃度との間により相関が見られた。この結果から、5aTHQ 類は水溶液中で凝集体を形成することで脂質膜と結合できるという可能性が示唆された。

Table 3-2. Aggregate-forming concentration of 5aTHQs

	5aTHQ-7n (8)	5aTHQ-8n (10)	5aTHQ-9n (12)	5aTHQ-10n (15)	NMe-5aTHQ-9n (24)
Aggregate-forming concentration (μM)*	32.6 \pm 4.4	24.4 \pm 0.9	10.3 \pm 2.9	3.9 \pm 1.2	6.2 \pm 1.9
Minimal concentration for membrane-binding (μM)**	\approx 40	\approx 20	\approx 10	—	—

*Data represent the mean and SD values of three independent experiments.

Values were deduced by SPR experiments (Figure 3-7**).

水溶液中の 5aTHQ が実際にどのような形状の凝集体をとっているのかについては、現時点では十分な知見は得られていない。動的光散乱による粒径の測定結果から、溶液の白濁が見られる濃度域では、直径 100~300 nm 程度の比較的均質な粒子が存在していることが判明した (**Figure 3-9**)。脂質のような両親媒性分子が通常形成するミセルは直径 10 nm 程度であるため、この凝集体はミセルではないと予想されるが、凝集体の構造を明らかにするためには、電子顕微鏡観察などの別角度からの実験が今後必要である。

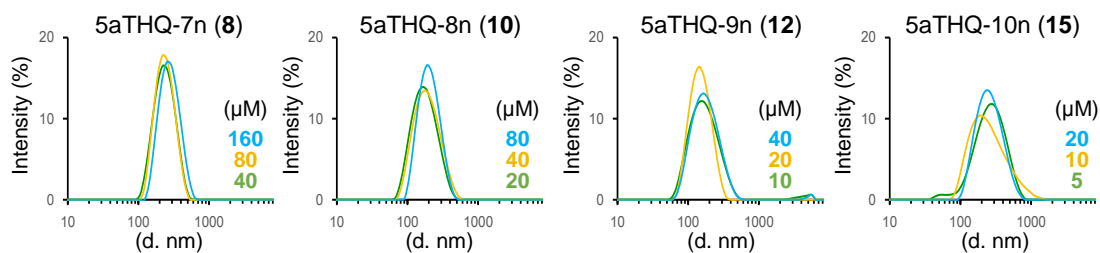


Figure 3-9. Particle size distribution of the 5aTHQ aggregates. Compounds **8**, **10**, **12** and **15** were dissolved in PBS buffer (+5% DMSO) at three concentrations higher than their aggregate-forming concentrations (**Table 3-2**). Size distributions of the particles were measured by dynamic light scattering.

3. 1. 6. 小括

第3章第1節では、放線菌の複合培養液から新規天然物 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ)類を見出すことに成功し、全合成と誘導體化によって側鎖の絶対立体化学を含む分子構造を決定した。また、酵母に対する生育阻害活性と SPR 解析から、多様な側鎖構造の混合物である 5aTHQ 類は、その炭素数が 1 違うだけで、生物活性と物性に大きな差があることが判明した。さらに、5aTHQ 類の作用機序については、水中で凝集体を形成することで脂質膜との親和性が顕著に上がるというユニークなモデルが推測された。以上の結果から、本化合物群が分子構造・物理特性ともに、全く新しいクラスの脂質結合化合物であることを明らかにした。

3. 2. Streptoaminal 類の単離・構造決定・全合成と生合成機構

3. 2. 1. Streptoaminal 類の単離

5aTHQ 類は、3. 1.節で述べてきた特異な生物活性だけでなく、*S. nigrescens* あるいは *T. pulmonis* の純粋培養液からは全く検出されないという、生合成的にも興味深い特徴を備えていた (Figure 3-10)。尾仲らは、細胞表層にミコール酸という超長鎖脂肪酸をもつ *Tsukamurella* 属などの細菌を放線菌と共培養すると、放線菌の二次代謝産物プロファイルが大きく変化することを報告している⁽⁴⁷⁾。この現象は「複合培養法」として、従来の純粋培養では見つからない新しい化合物の探索などに利用されはじめている⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾。そこで、5aTHQ 類を含む培養液には、新しい構造と機能をもつ天然物が他にも含有されているのではないかと期待し、培養抽出物の網羅的な LC-MS 解析を行った。

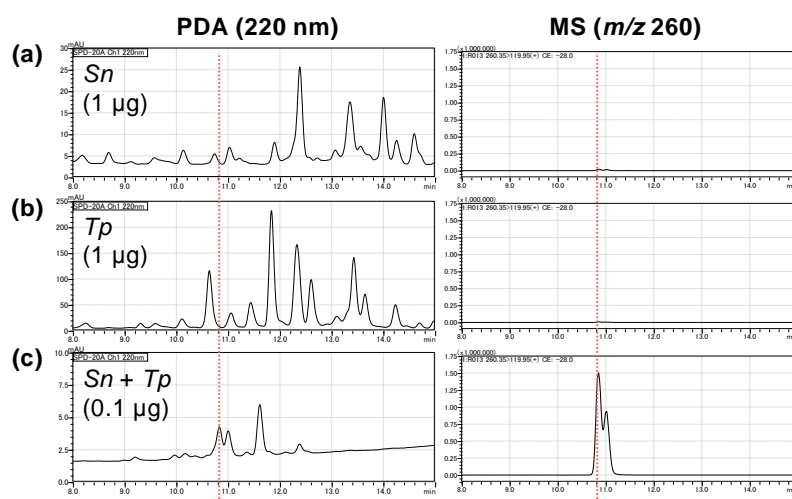


Figure 3-10. LC-MS analysis of the culture extracts. Pure cultures of (a) *Streptomyces nigrescens* (*Sn*) and (b) *Tsukamurella pulmonis* (*Tp*), and a combined-culture of (c) *S. nigrescens* and *T. pulmonis* were extracted, fractionated by silica gel column chromatography and subjected to the LC-MS analysis. PDA (left) and MS (right) chromatograms are shown. It is noted that the sample amount of the *Sn* + *Tp* fraction (c) was one-tenth of other samples to avoid saturation of the ion peak. Red dashed lines indicate the retention time of 5aTHQ-9i (11).

まず、*S. nigrescens* の純粋培養液と *T. pulmonis* との複合培養液を各種分画後、LC-MS 解析から、各培養液間で生産量に変化が見られる代謝物を探索した。その結果、 m/z 270, 284, 298, 312, 326 と、5aTHQ と同じく分子量 14 ごとに連続したピーク群が 90% MeOH 層から見出された (Figure 3-11a)。純粋培養液でもわずかに生産がみられたが、分子量が 5aTHQ と比較的近いことから、両者には生合成上の関連があると推測し、この化合

物群を単離・構造決定することとした。

90% MeOH 層を、分子量を指標にシリカゲル・ODS・NH-シリカを用いたカラムクロマトグラフィーで分画し、多様な側鎖をもつ一連の化合物群を得た。LC-MS 解析から、8 化合物以上を含むこの混合物の成分パターンは、5aTHQ のものとよく似ていることがわかった (**Figure 3-11b**)。しかし、これらは HPLC で検出可能な UV 吸収がほとんどなく、ピークのテーリングも相まって、各成分の精製は 5aTHQ よりも困難であった。ごくわずかな UV 吸収を参考に C₈ カラムによる分取 HPLC を行い、得られたフラクションの LC-MS 解析から各成分を集める方法をとることで、低収率ながら、3 成分を TFA 塩として取得することに成功した (**Figure 3-12**)。

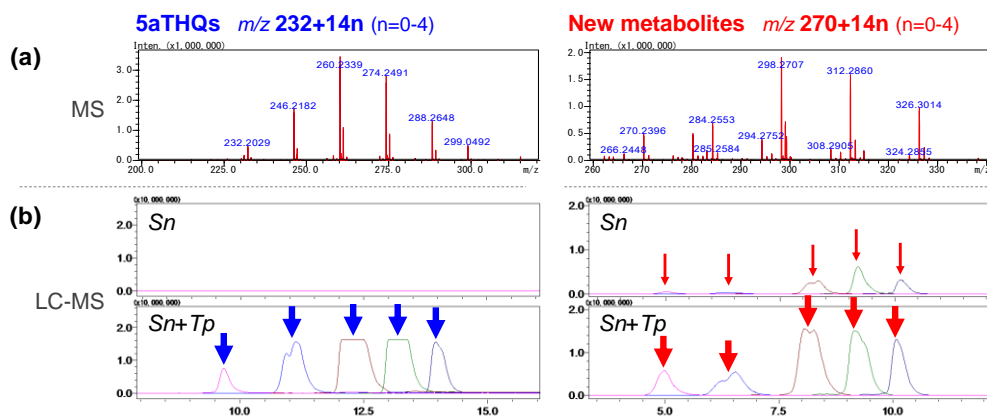


Figure 3-11. MS analysis of 5aTHQs and another series of new metabolites. (a) MS spectra of the mixture of 5aTHQs or new metabolites possessing a variety of alkyl chains. **(b)** LC-MS chromatograms of two metabolite groups. (upper) A pure culture of *S. nigrescens* (*Sn*) and (lower) a combined-culture of *S. nigrescens* and *T. pulmonis* (*Tp*) were extracted, fractionated by silica gel column chromatography and subjected to the LC-MS analysis. Peaks in MS chromatograms corresponding to 5aTHQs (blue) and new metabolites (red) are shown by arrows.

化合物 **25** の分子式は、高分解能 MS から C₁₈H₃₅NO₂ と決定された ($m/z\ 298.2731$, calcd for 298.2741, C₁₈H₃₆NO₂ [M + H]⁺). ¹H, ¹³C, DEPT, HMQC NMR スペクトルの解析から、化合物 **25** が一級炭素を 1 個、二級炭素を 14 個、三級炭素を 2 個、四級炭素を 1 個含むことが明らかにされ、それらはすべて sp³ 炭素であった (**Table 3-3**)。不飽和度が 2 であること、8 個のメチレン炭素が非等価な水素原子を持つことから、化合物 **25** は 2 つの環構造を持つと予想された。¹H NMR スペクトルにおける高磁場領域 ($\delta_H\ 1.23-1.99\ \text{ppm}$) では多数のシグナルの重複が見られたが、COSY, TOCSY, そして HMQC-TOCSY NMR スペクトルの解析から 2 つのスピンの系列があることを見出した (**Figure 3-12**)。8 位水

素の化学シフト値から、スピン系列 $H_2-8/H_2-9/H_2-10/H_2-11$ の 8 位炭素に窒素原子が結合していることが示唆された。8 位および 11 位水素から 6 位の四級炭素への HMBC 相関が見られたことから、このスピン系列がピペリジン環を形成していることが判明した。もう一つのスピン系列 $H-2/H_2-3/H-4/H_2-5$ は、2 つのオキシメチン炭素を含んでいた。4 位・5 位水素から 6 位炭素への HMBC 相関は、5 位炭素が 6 位の四級炭素と結合していることを示唆した。6 位炭素の特徴的な化学シフト値 (δ_c 86.9 ppm) はヘミアミナル構造の存在を示しており、2 位炭素に酸素原子が結合していることを考慮すると、化合物 **25** がピペリジン環の 6 位炭素を共有する形でテトラヒドロピラン環を構成している可能性が示唆された。4 位炭素—11 位炭素、5 位炭素—11 位炭素、5 位炭素—10 位炭素間の弱い HMBC 相関は、スピロヘミアミナルである 7-aza-1-oxaspiro[5,5]undecan-4-ol 構造を支持していた。最後に、アルキル基が 2 位炭素に直接結合していることが COSY 相関から明らかとなった。残りのシグナルがメチレン基 8 個、メチル基 1 個であることから、このアルキル鎖は炭素数 9 の直鎖型であると考えられた。以上の結果から、化合物 **25** の平面構造を **Figure 3-12** のように決定した。

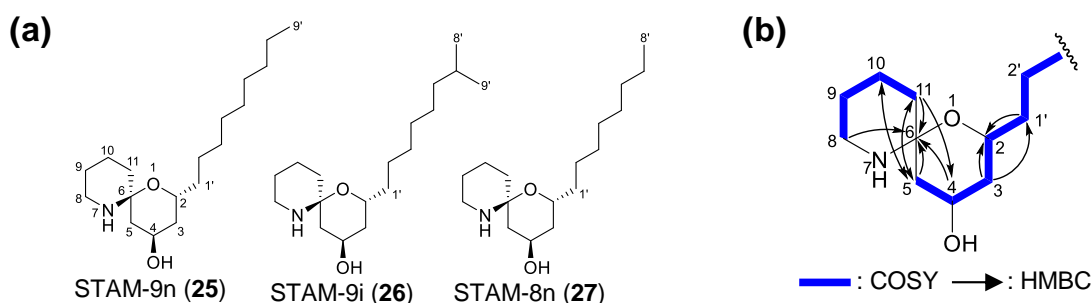


Figure 3-12. Structure of streptoaminals. (a) Structures of STAM-9n (**25**), STAMs-9i (**26**) and -8n (**27**). **(b)** COSY and key HMBC correlations for the core structure of STAM-9n (**1**).

スピロヘミアミナル構造は、精製した化合物 **25**, **26**, **27** で共通していた (**Table 3-4**)。このユニークな構造的特徴と、*Streptomyces* 属放線菌から生産されることから、これらの化合物群を streptoaminal (STAM)類と命名した。各成分の命名は 5aTHQ 類に倣い、STAM-9n (**25**), STAM-9i (**26**), STAM-8n (**27**)とした。すなわち、例えば化合物 **25** が、炭素数 9 かつノルマル型のアルキル鎖を持つことを表す命名とした (**Figure 3-12**)。化合物 **25-27** の HPLC における溶出順序は、それぞれ 5aTHQ-9n (**12**), -9i (**11**), -8n (**10**)と一致していた。本研究では STAM 類の 3 成分しか精製できなかったが、この特徴から、STAM 類は 5aTHQ 類と同様の側鎖多様性を有することが示唆された。

Table 3-3. NMR data of STAM-9n (25) in CD₃OD*

	¹ H (mult., <i>J</i> in Hz)	¹³ C (mult.)	¹ H/ ¹³ C HMBC
2	4.04 (m)	67.8 (d)	
3a	1.56 (ddd, 2.2, 11.8, 13.7)	38.0 (t)	C-2, C-4, C-1'
3b	1.82 (ddd, 2.1, 5.9, 13.7)		
4	4.24 (m)	63.9 (d)	C-2, C-6
5a	1.76 (dd, 2.7, 14.9)	39.2 (t)	C-3, C-4, C-6, C-10, C-11
5b	1.99 (ddd, 1.5, 3.6, 14.9)		
6	-	86.9 (s)	
8a	3.06 (ddd, 3.6, 11.4, 13.2)	41.2 (t)	C-6, C-9, C-10
8b	3.13 (ddd, 3.1, 6.6, 13.2)		
9a	1.67 (m)	23.1 (t)	C-10
9b	1.83 (m)		
10a	1.62 (m)	18.7 (t)	C-5, C-9
10b	1.89 (m)		
11a	1.70 (ddd, 3.9, 12.1, 14.1)	37.1 (t)	C-4, C-5, C-6, C-9, C-10
11b	1.82 (m)		
1'a	1.51 (m)	36.9 (t)	C-2, C-2', (C-3')
1'b	1.60 (m)		
2'a	1.34 (m)	26.6 (t)	C-3, (C-3')
2'b	1.58 (m)		
3'		30.7 (t)	
4'		30.7 (t)	
5'		30.7 (t)	
6'	1.25-1.44 (12H, m)	30.5 (t)	(between C-3' and C-9')
7'		33.1 (t)	
8'		23.7 (t)	
9'	0.90 (t, 7.2)	14.4 (q)	C-7', C-8'

*Chemical shift values are shown relative to the residual solvent signals (δ_{H} 3.31 ppm and δ_{C} 49.00 ppm). The spectrum was recorded at room temperature.

Table 3-4. NMR data of STAMs-9i (26) and -8n (27) in CD₃OD*

position	STAM-9i (26)		STAM-8n (27)	
	δ_C (mult.)	δ_H (mult. <i>J</i> in Hz)	δ_C (mult.)	δ_H
2	67.8 (d)	4.04 (m)	67.8 (d)	4.04
3a	38.0 (t)	1.56 (ddd, 2.0, 11.8, 13.6)	38.0 (t)	1.56
3b		1.82 (ddd, 1.9, 5.7, 13.6)		1.82
4	63.9 (d)	4.24 (m)	63.9 (d)	4.24
5a	39.2 (t)	1.76 (dd, 2.8, 14.9)	39.2 (t)	1.76
5b		1.99 (ddd, 1.6, 3.5, 14.9)		1.99
6	86.9 (s)	-	86.9 (s)	-
8a	41.2 (t)	3.06 (ddd, 3.5, 11.5, 13.2)	41.2 (t)	3.06
8b		3.14 (ddd, 2.9, 6.6, 13.2)		3.13
9a	23.1 (t)	1.66 (m)	23.1 (t)	1.67
9b		1.84 (m)		1.83
10a	18.7 (t)	1.62 (m)	18.7 (t)	1.62
10b		1.89 (m)		1.89
11a	37.1 (t)	1.70 (ddd, 3.9, 12.1, 14.0)	37.1 (t)	1.70
11b		1.83 (m)		1.82
1'a	36.9 (t)	1.51 (m)	36.9 (t)	1.51
1'b		1.60 (m)		1.60
2'a	26.6 (t)	1.34 (m)	26.6 (t)	1.34
2'b		1.58 (m)		1.58
3'	30.9 (t)		30.7 (t)	
4'	30.7 (t)	1.25-1.44 (6H, m)	30.6 (t)	
5'	28.5 (t)		30.4 (t)	1.26-1.44 (10H)
6'	40.2 (t)	1.19 (m)	33.0 (t)	
7'	29.2 (d)	1.53 (m)	23.7 (t)	
8'	23.0 (q)	0.88 (d, 7.2)	14.4 (q)	0.91
9'				

*Chemical shift values are shown relative to the residual solvent signals (δ_H 3.31 ppm and δ_C 49.00 ppm). These spectra were recorded at room temperature.

3. 2. 2. Streptoaminal 類の相対立体化学

STAM-9n (**25**)の三か所の不斉炭素の相対立体化学は、化学変換と詳細な NMR 解析により決定した。まず、化合物 **25** が互変異性を示すことに注目した。化合物 **25** の ^1H NMR スペクトルを様々な温度で測定したところ、低温ではマイナーシグナルの減弱が見られ、その変化は可逆的であった (**Figure 3-13**)。このことから、化合物 **25** はスピロヘミアミナル体で安定なのではなく、イミン体との互変異性状態にあることが示唆された。この性質を利用し、化合物 **25** に acetone dimethylacetal を酸性条件で作用させることで、イミン体のアセトナイド誘導体 **28** を得た (**Scheme 3-3**)。アセトナイドで保護した 1,3-ジオールは、2つのメチル基の ^{13}C 化学シフト値をもとに、*anti* 配座か *syn* 配座かを決定することができる⁽⁵⁰⁾。それぞれの ^{13}C 化学シフト値は 30.5 ppm, 20.1 ppm であったため、この 1,3-ジオールが *syn* 配座であることが明らかとなった。

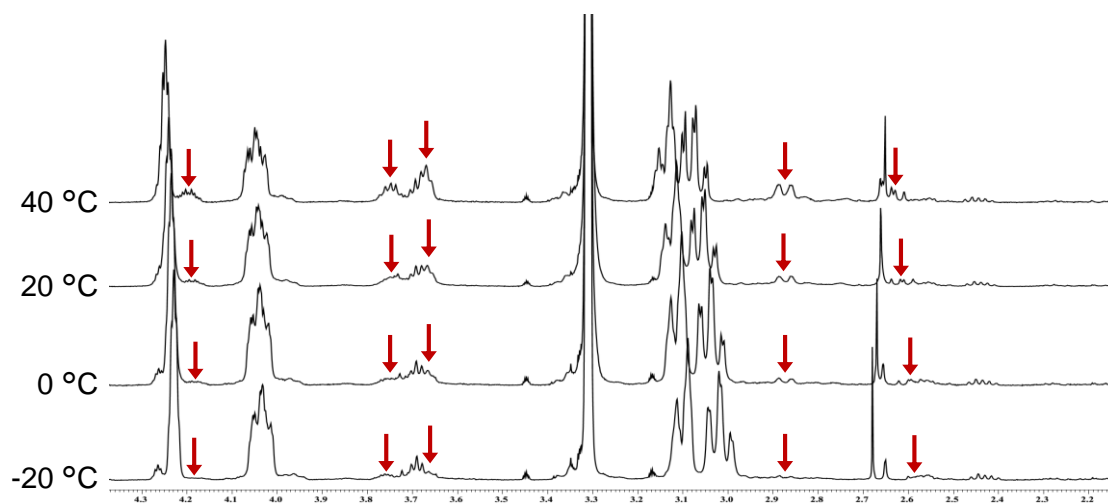
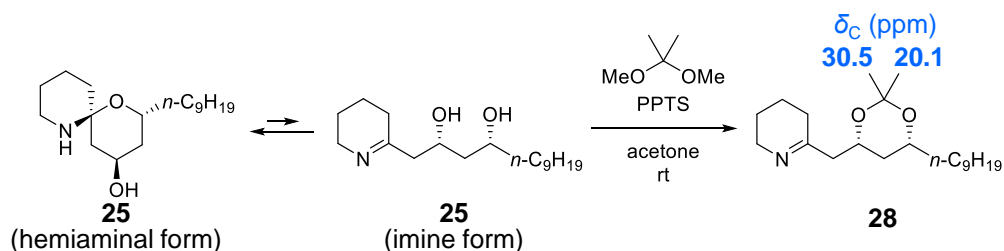


Figure 3-13. Temperature dependency of the ^1H NMR spectrum of STAM-9n (**25**, TFA salt). Spectra measured in CD_3OD at 40 °C, 20 °C (room temperature), 0 °C and -20 °C are shown. Arrows indicate signals derived from the minor tautomer.



Scheme 3-3. Structures of the tautomers of STAM-9n (**25**) and its isopropylidene derivative **28**

続いて、NOESY 相関と水素間のカップリング定数から、スピロヘミアミナール構造の安定コンホメーションを導いた (**Figure 3-14**)。4 位水素と 3 位・5 位の 4 つの水素との間のカップリング定数がいずれも小さいことから ($^3J_{\text{HH}}$ 2.2 - 5.9 Hz)、4 位水素がエクアトリアル位に配向していることが判明した。一方、2 位水素は 3 位水素の 1 つと 11.8 Hz という高いカップリング定数を示したため、アキシアル位に配向していると予想された。これらの観測は種々の NOESY 相関によっても支持され、2 つの酸素原子が *syn* の関係にあるという先の結果とも矛盾しなかった。加えて、2 位・8 位水素間の NOESY 相関によって、スピロ原子の相対立体化学が決定づけられた。この相関が観測されるためには、スピロヘミアミナール構造が次の 3 つの条件を満たす必要がある。すなわち、①2 つの六員環が椅子型配座であること、②1 位酸素原子と 7 位窒素原子が、それらの属さない環から見てアキシアル位に配向していること、そして③三か所の不斉炭素の相対立体化学が $2R^*$, $4R^*$, $6S^*$ であること、の 3 条件である。以上の結果から、STAM-9n (**25**) の相対立体化学を **Figure 3-14** のように決定した。

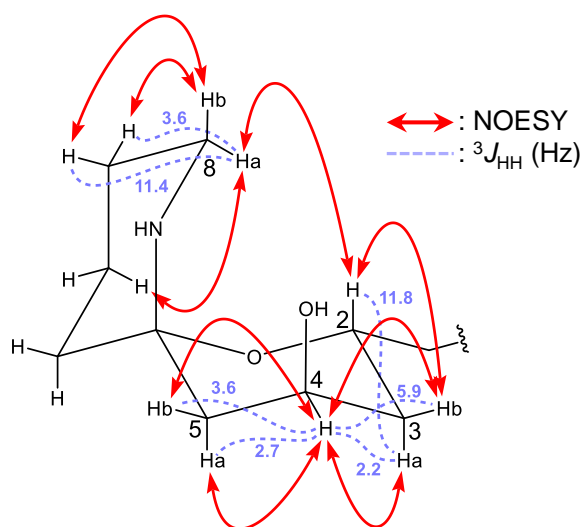
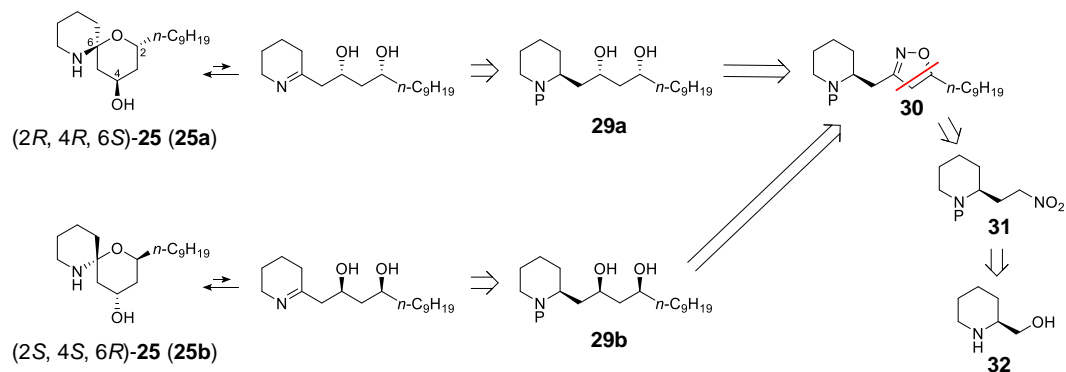


Figure 3-14. Key NOESY correlations and $^3J_{\text{HH}}$ values of STAM-9n (**25**).

3. 2. 3. Streptoaminal-9n の全合成と絶対立体化学

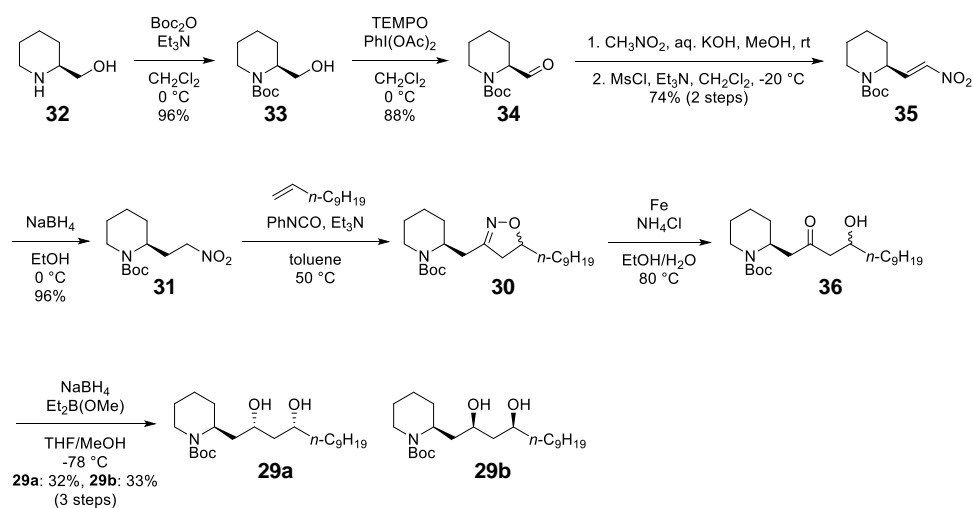
続いて、STAM 類の絶対立体化学を決定するため、STAM-9n (**25**) の各エナンチオマーの全合成を行った。逆合成解析を **Scheme 3-4** に示す。STAM 類の互変異性を考慮し、最終目的物は *syn*-1,3-ジオール構造をもつイミン体とした。各イミンはジアステレオマーである化合物 **29a**, **29b** からそれぞれ得られると考えた。化合物 **29a**, **29b** はジアステレオ混合物として得たイソキサゾリン **30** を立体選択的に還元した後で分離することとした⁽⁵¹⁾。化合物 **30** は 1-undecene とニトロ化合物 **31** の環化付加反応⁽⁵²⁾により得られると予想し、化合物 **31** は市販の光学活性アルコール **32** を出発物質として合成できると考え

た。



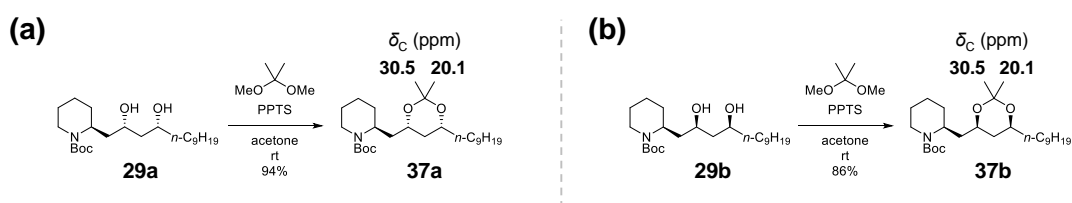
Scheme 3-4. Retrosynthetic analysis of STAM-9n (25**)**

まず、(*S*)-(+)-2-hydroxymethylpiperidine (**32**)を原料にニトロ化合物 **31** を合成した (**Scheme 3-5**)。化合物 **32** のアミノ基を Boc 保護し、TEMPO 酸化によってアルコールをアルデヒドへと酸化した。Henry 反応でアルデヒド **34** をニトロメタンと縮合後、メシル化と続く脱離反応によって α,β -不飽和ニトロ化合物 **35** とした。化合物 **35** の二重結合を水素化ホウ素ナトリウムで還元することで、5 段階、60%と良好な収率で化合物 **31** の合成に成功した。

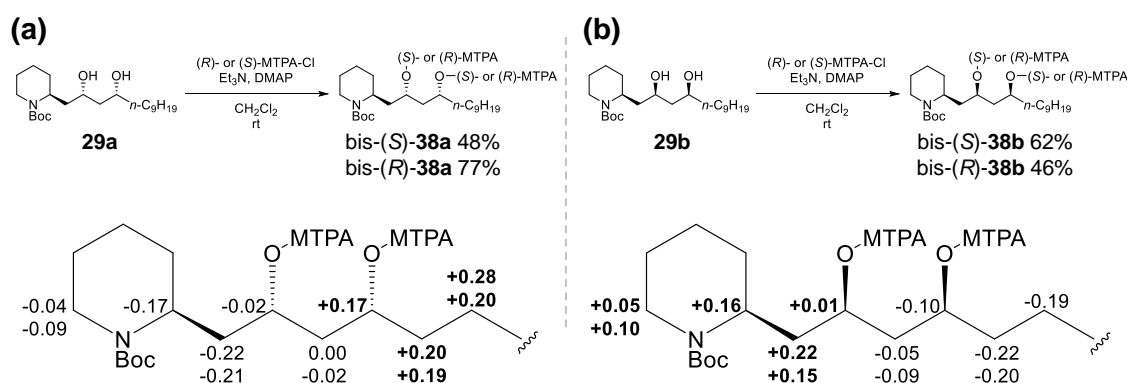


Scheme 3-5. Synthesis of syn-1,3-diols **29a and **29b****

次に、*syn*-1,3-ジオール部分の絶対立体化学が異なるジアステレオマー**29a**, **29b** を合成した (Scheme 3-5)。化合物 **31** のニトロ基をフェニルイソシアネート存在下、塩基性条件でニトリルオキシドへと活性化した。これに末端アルケンである 1-undecene を加えることで、[3+2]環化付加反応によりイソキサゾリン **30** のジアステレオ混合物を得た⁽⁵²⁾。化合物 **30** の状態ではジアステレオマーの分離は困難であったため、混合物のまま次の反応に付した。イソキサゾリン環の *N-O* 結合を一電子還元により開裂させ⁽⁵³⁾、続く加水分解により β -ヒドロキシケトン **36** を合成した。化合物 **36** のジクロロメタン溶液を -78°C に冷却し、diethylmethoxyborane 存在下、水素化ホウ素ナトリウムを作用させることで、 β -ヒドロキシケトン **36** を *syn*-1,3-ジオールへと立体選択的に還元した⁽⁵¹⁾。ジアステレオマー**29a**, **29b** はシリカゲルカラムで容易に分離可能であった。化合物 **29a**, **29b** のジオールをアセトニド化し、2つのメチル基の ^{13}C 化学シフト値から、確かに *syn*-1,3-ジオールが選択的に得られていることを確認した (Scheme 3-6)⁽⁵⁰⁾。それぞれの絶対立体化学は、bis-MTPA エステルを作成し、改良 Mosher 法で決定した⁽²¹⁾。化学シフト値の比較の結果、**29a** が(2'*S*,4'*R*)体、**29b** が(2'*R*,4'*S*)体であることが明らかとなった (Scheme 3-7)。

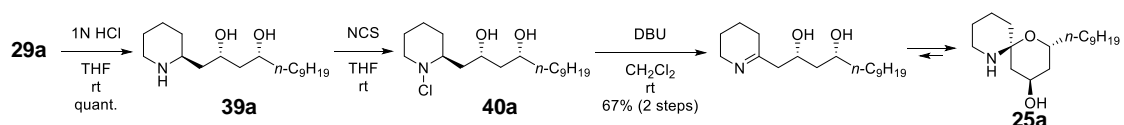


Scheme 3-6. Relative stereochemistry of diols **29a** (a) and **29b** (b)



Scheme 3-7. Absolute stereochemistry of *syn*-1,3-diols **29a** (a) and **29b** (b). $\Delta\delta$ ($= \delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$, ppm) values for the bis-(S)- and bis-(R)-MTPA esters **38a** and **38b** are shown.

最後に、ジオール **29a**, **29b** から最終目的物であるイミンを合成した (**Scheme 3-9**)。化合物 **29a** のアミノ基について、Boc 基を脱保護後、*N*-chlorosuccinimide によりクロロ化物 **40a** とした。これに対して DBU による脱塩化水素化を行うことで、目的のイミンへと変換した。イミンは予想通りヘミアミナル体 **25a** へと異性化した。化合物 **29b** についても同様の変換を行い、**25a** のエナンチオマーである **25b** を 3 段階・69% 収率で合成した。化合物 **25a**, **25b** について、天然の STAM-9n (**25**) と同じ条件で HPLC 精製を行い、共通の原料 **32** から 11 段階を経て、両化合物の TFA 塩を最終目的物として得た。



Scheme 3-9. Synthesis of (2*R*, 4*R*, 6*S*)-STAM-9n (25a**)**

化合物 **25a**, **25b** の各種 NMR およびマススペクトルが天然物 **25** と完全に一致したため、STAM-9n (**25**) の各エナンチオマーの全合成が達成された (**Figure 3-15**)。天然物 **25**, 合成品 **25a**, **25b** の比旋光度はそれぞれ、+16.2, +21.7, -17.4 であった (c 0.15, 20 °C in MeOH)。よって、天然の STAM-9n (**25**) の絶対立体化学を *2R*, *4R*, *6S* と決定した。STAM-9i (**26**), STAM-8n (**27**) の比旋光度は同一条件でそれぞれ +14.9, +14.3 であったため、スピロヘミアミナル骨格の絶対立体化学は保存されていると判断できる。

3. 2. 4. Streptoaminal 類の生物活性

精製した Streptoaminal 類の生物活性を調べたところ、5aTHQ 類とは異なる特徴が示された。まず、分裂酵母の *erg* 遺伝子破壊株に対する STAM-9n (**25**) の生育阻害活性をみると、脂質結合物質に特有な変異株の耐性化は起こらなかった (**Figure 3-16**)。 *erg* 欠損株は野生株よりも高い感受性を示したため、STAM 類が細胞内に標的をもつ可能性が示唆された。5aTHQ 類の構造活性相関では、アルキル鎖の炭素数が小さいほど酵母に対する阻害活性が強いという傾向が見られた (3. 1. 3 項)。STAM 類では、STAM-9n (**25**) と STAM-9i (**26**) の間で活性に差が見られないほか、STAM-8n (**27**) は阻害活性がわずかに弱かった。また、合成した (+)-STAM-9n (**25a**) と (-)-STAM-9n (**25b**) は、いずれも天然の STAM-9n (**25**) と同等の活性を示した。以上の結果から、STAM 類におけるアルキル鎖の影響は 5aTHQ 類とは異なること、スピロヘミアミナル骨格の絶対立体化学は活性に影響しないことが判明した。

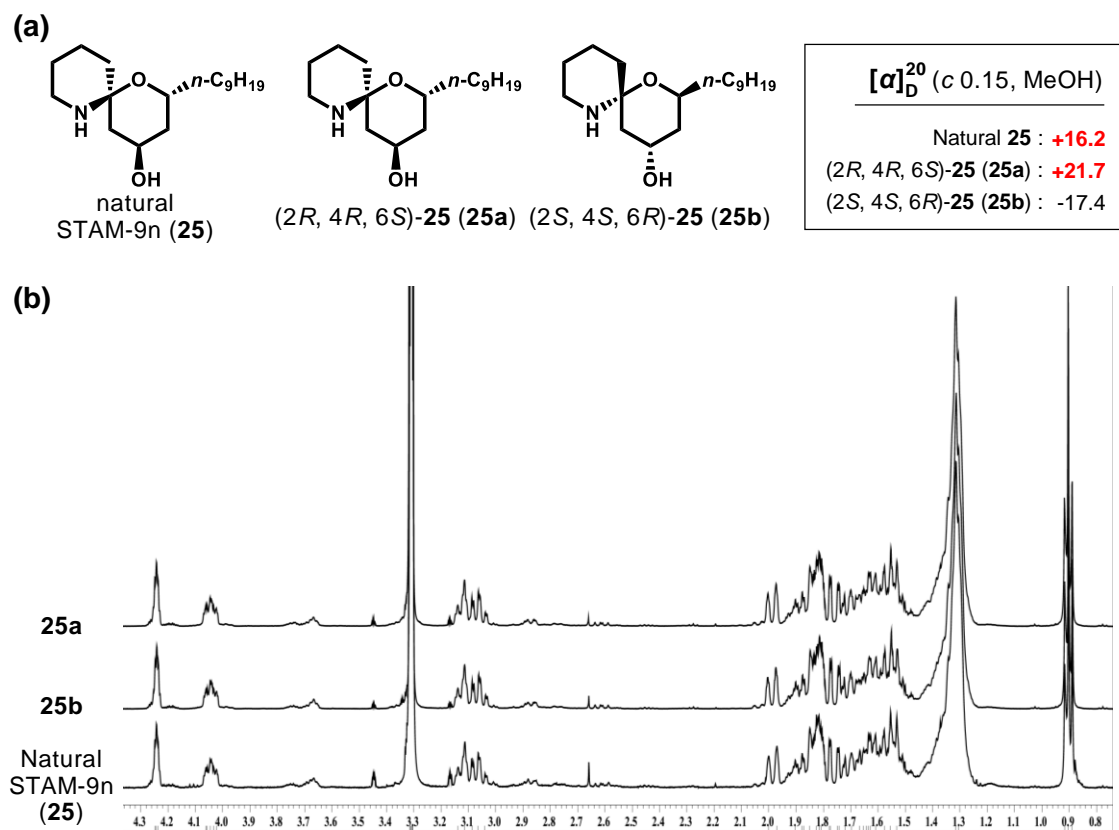


Figure 3-15. Absolute stereochemistry of natural STAM-9n (25). (a) Optical rotations and (b) ^1H NMR spectra (CD_3OD , room temperature, 500 MHz) of natural STAM-9n (25), synthesized (2R,4R,6S)-25 (25a) and (2S,4S,6R)-25 (25b) are shown.

続いて、合成した(+)-STAM-9n (25a)の枯草菌 *Bacillus subtilis*, 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 大腸菌 *Escherichia coli* に対する生育阻害活性を、ペーパーディスクアッセイで評価した (Figure 3-17)。抗菌活性をほとんど示さない 5aTHQ とは対照的に、化合物 25a はすべての被検菌に対して阻止円を形成した。精製した天然型の STAMs-9n (25), -9i (26), -8n (27)は、収量が少なかったため同試験を行えなかったが、様々な側鎖の混合物である天然 STAM 類の粗精製物は、化合物 25a と同様の活性を示した。この結果から、5aTHQ 類と STAM 類は、共通の生合成経路をもつと予想される一方で、母骨格の違いにより全く異なる生物活性を示すという興味深い関係性にあることが示唆された。

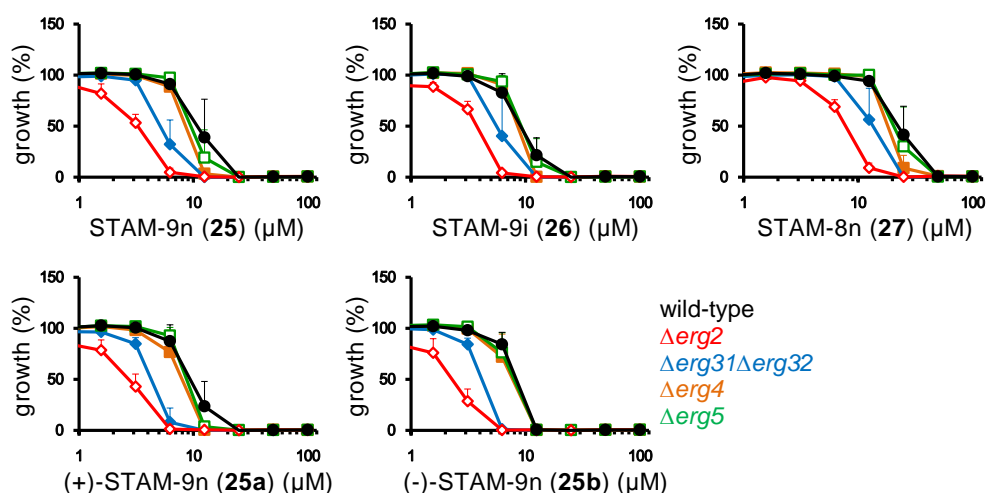


Figure 3-16. Structure-activity relationships of STAMs. Growth inhibitory activities of STAMs were examined against the wild-type (black), $\Delta erg2$ (red), $\Delta erg31\Delta erg32$ (blue), $\Delta sts1/erg4$ (orange), and $\Delta erg5$ (green) cells. Cells were treated with natural **25-27** or synthesized **25a** or **25b** for 24 h. Data represent the mean values of three independent experiments. Error bars indicate the SD.

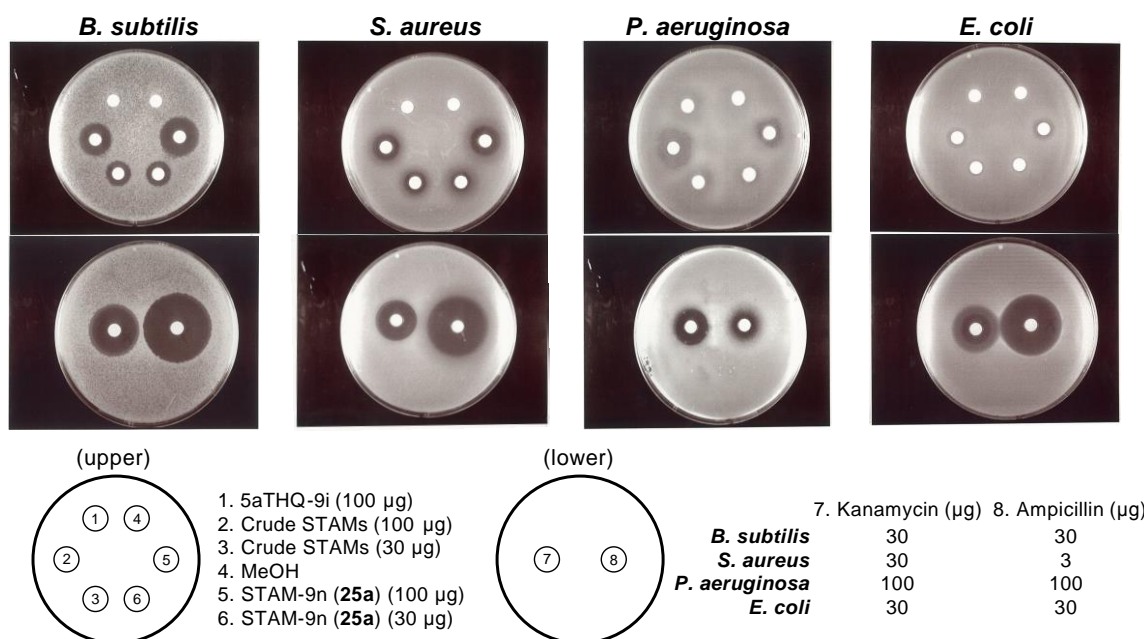


Figure 3-17. Antibacterial activities of STAMs. Growth inhibitory activities of the STAM compounds were examined against *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Synthesized (+)-STAM-9n (**25a**), 5aTHQ-9i (**11**), natural STAMs with a variety of alkyl chains, kanamycin, ampicillin or MeOH were loaded onto the disks. Bacteria were incubated at 30 °C for 24 h. Similar results were obtained for three experiments, and the characteristic results are shown.

3. 2. 5. 5aTHQ 類および streptoaminal 類の生合成解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 尾仲研究室との共同研究として、5aTHQ 類・STAM 類の生合成経路解明を目指した。先方は生産菌の遺伝子操作および培養を、著者は種々条件における培養液の抽出・分画と各成分の HPLC・LC-MS・NMR 解析を担当した。

まず、5aTHQ 類が複合培養応答性の二次代謝産物かどうかを確かめた。先に述べたように、5aTHQ 類は *S. nigrescens* および *T. pulmonis* の純粋培養液からは検出されず、両者を複合培養して初めて生産される (Figure 3-10)。そこで、*T. pulmonis* と同じくミコール酸含有細菌であり、放線菌の二次代謝を誘導することが知られる *Rhodococcus erythropolis* および *Corynebacterium glutamicum* を *S. nigrescens* と複合培養した際の 5aTHQ 類の生産量を確認した⁽⁴⁷⁾。その結果、*C. glutamicum* との複合培養液でも 5aTHQ 類がわずかに生産されることがわかった (Figure 3-18)。このことから、5aTHQ 類の生合成遺伝子は *S. nigrescens* が持っている可能性が高いと予想された。なお、この実験は STAM 類を見出す以前に行ったものであり、複合培養菌の違いによる STAM 生産量の差は確認できていない。

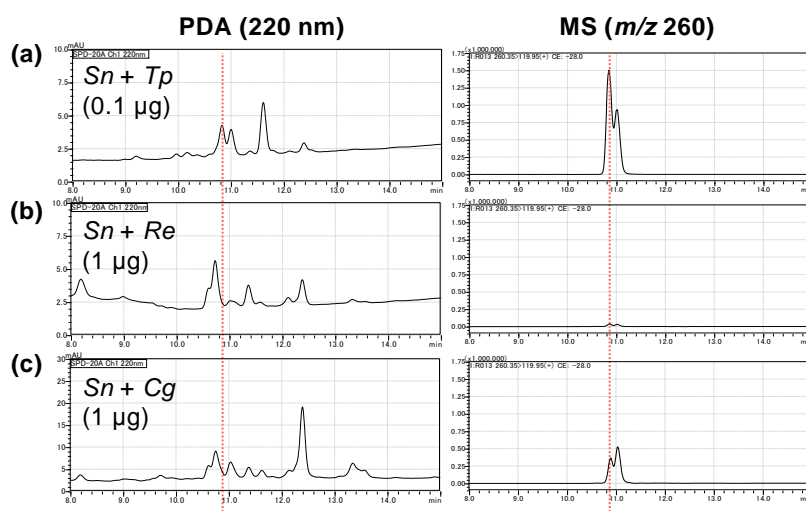


Figure 3-18. LC-MS analysis of the culture extracts. Combined-cultures of (a) *S. nigrescens* (*Sn*) and *T. pulmonis* (*Tp*), (b) *S. nigrescens* and *Rhodococcus erythropolis* (*Re*) and (c) *S. nigrescens* and *Corynebacterium glutamicum* (*Cg*) were extracted, fractionated by silica gel column chromatography and subjected to the LC-MS analysis. PDA (left) and MS (right) chromatograms are shown. It is noted that the sample amount of the *Sn + Tp* fraction (a) was one-tenth of other samples to avoid saturation of the ion peak. Red dashed lines indicate the retention time of 5aTHQ-9i (11).

次に、**Figure 3-19** のように 5aTHQ 類の炭素骨格が一筆書きできることから、5aTHQ 類は、ポリケチド合成酵素(PKS)群によって生合成されると予想した。そこで、 ^{13}C 標識酢酸による同位体トレーサー実験からこの予想を裏付けた。すなわち、 $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムまたは $[1,2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムを添加した培養液から 5aTHQ 類を単離・精製し、 ^{13}C NMR においてシグナル強度の上昇または ^{13}C - ^{13}C 結合による NMR シグナルの分裂が確認される炭素を同定した。その結果、5aTHQs-8i (**9**), -8n (**10**), -9i (**11**), -9n (**12**), -10a (**13**)のほぼすべての炭素が酢酸ユニットから成ることが明らかとなり、予想通り、PKS または脂肪酸合成酵素によって生合成される可能性が示唆された (**Figure 3-19**)。脂肪酸鎖の末端構造の分岐は、バリンやイソロイシンに由来する脂肪酸を生合成スターターとして用いることにより生じることが知られている⁽⁵⁴⁾。これらの事実は、分岐メチル基をもつ 5aTHQ 類の末端構造が酢酸標識されないという実験結果を支持した。本実験も STAM 類については解析を行っていないが、母骨格の炭素数が 5aTHQ 類と同じであり、炭素鎖の一筆書きも可能であるため、対応する部位に酢酸が取り込まれると推測される。

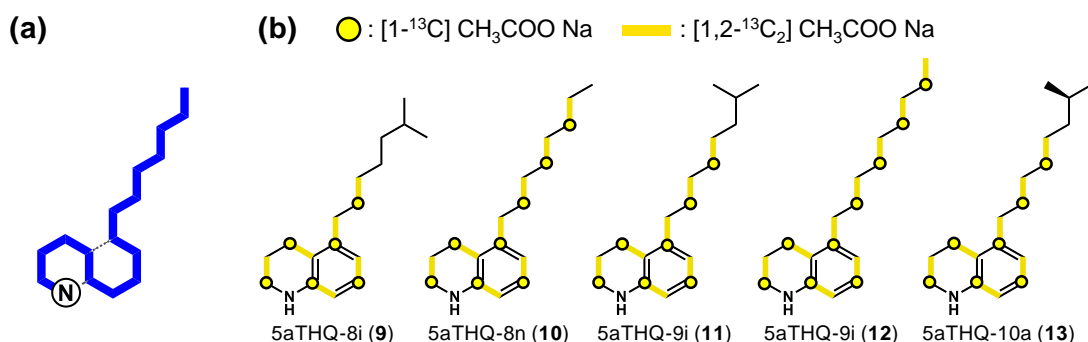


Figure 3-19. ^{13}C -labeling of 5aTHQs. (a) The carbon skeleton of 5aTHQs colored by blue can be drawn with a single stroke, which indicates that they are made from several C_2 -units. (b) Incorporation of $[1-^{13}\text{C}] \text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ and $[1,2-^{13}\text{C}_2] \text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ are highlighted by yellow blobs and yellow lines, respectively.

さらに、*S. nigrescens* のドラフトゲノム解析から、5aTHQ 類生合成の責任遺伝子が同定された。ゲノム情報から PKS に特有の配列を探索し、推定生合成遺伝子クラスターとして、II 型の PKS とアミノ基転移酵素を含む 9 つの ORF が見出された (**Figure 3-20**)。これら遺伝子を *Streptomyces lividans* TK23 に異種宿主発現させたところ、5aTHQ 類の生産が確認された (**Figure 3-21**)。アミノ基転移酵素をコードする *orf6* を除いた遺伝子クラスターの異種発現では 5aTHQ 類が生産されなかった事実と併せて、本遺伝子群が 5aTHQ 類の生合成を制御していることが明らかになった。興味深いことに、STAM 類も 5aTHQ 類と同様の傾向を示した (**Figure 3-21**)。すなわち、ORF1-9 は *S. nigrescens* に固有な他のタンパク質を使うことなく、5aTHQ 類・STAM 類双方の生合成を同時に担っている可能性が示唆された。

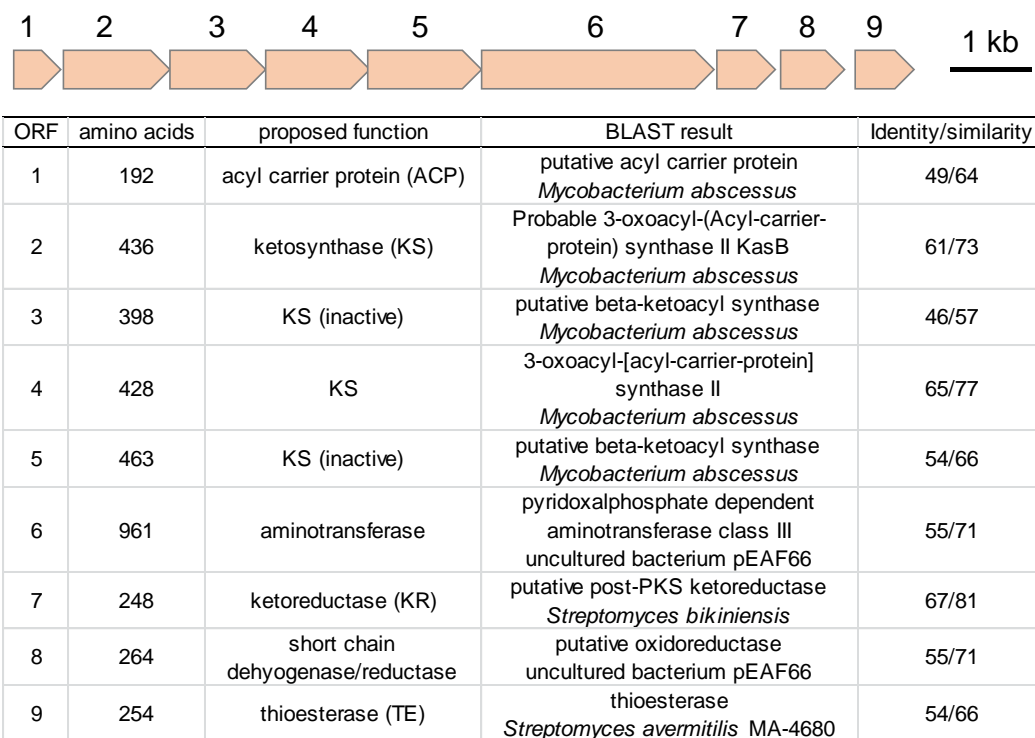


Figure 3-20. A gene cluster found in *S. nigrescens* responsible for biosynthesis of 5aTHQs and STAMs.

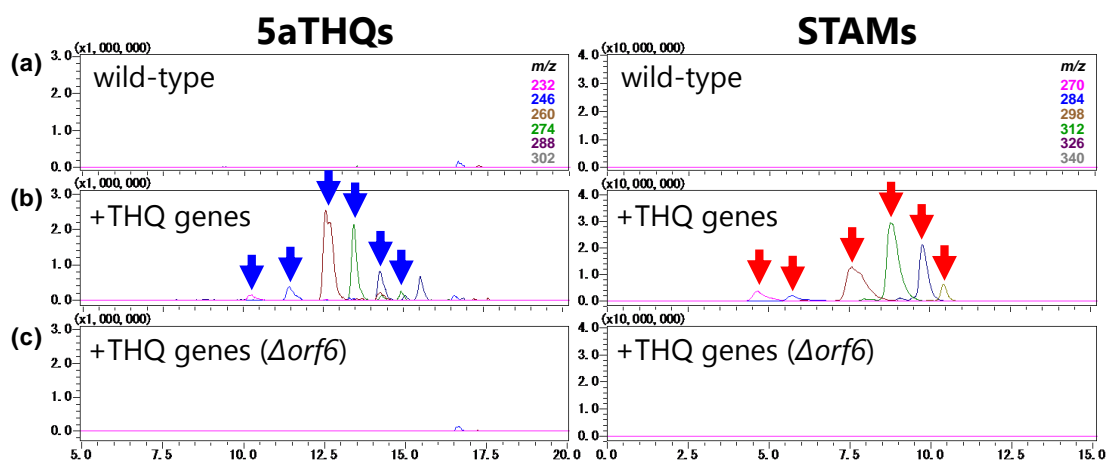


Figure 3-21. Heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for 5aTHQs and STAMs in *S. lividans*. Cultures of (a) *S. lividans* TK23 (wild-type), (b) *S. lividans* TK23 expressing the gene cluster responsible for biosynthesis of 5aTHQs (THQ genes, *orf1-orf9*), and (c) *S. lividans* TK23 expressing the THQ genes except for *orf6*, which encodes aminotransferase, were extracted, fractionated by silica gel column chromatography and subjected to the LC-MS analysis. MS chromatograms of 5aTHQs (left) and STAMs (right) are shown.

3.2.6. 小括

第3章第2節では、ユニークな構造・活性をもつ5aTHQ類が生産される「複合培養」という条件に着目し、代謝物の網羅解析から、培養液中に新規天然物が他にも含まれている可能性を検証した。その結果、天然でも極めて稀なスピロヘミアミナル構造を有する streptoaminal (STAM)類を見出すことに成功した。STAM類は幅広い抗菌活性を示し、5aTHQとは異なる生物活性を有していた。また、ポリケチド合成酵素を含む遺伝子クラスターが *S. nigrescens* のゲノム中に存在し、5aTHQ類・STAM類双方の生合成を担っていることを明らかにした。

3.3. 考察

5aTHQ 類・STAM 類の構造新規性

1,2,3,4-テトラヒドロキノリン (THQ)環は天然アルカロイドや合成医薬品を問わず、様々な生理活性物質に見られる炭素骨格である (Figure 3-22)⁽⁵⁵⁾⁻⁽⁵⁷⁾。また、放線菌だけでなく、真菌、植物をはじめ幅広い生物種において THQ アルカロイドの生産が報告されている。そのような中で、THQ 環にアルキル鎖が結合しただけという極めて単純な構造の 5aTHQ 類が「未報告」の「天然物」であり、その上、前例の無い生物活性をも示したという事実は意義深い。5aTHQ 類の発見は、複合培養現象による生産活性化あってこそであり、誰も手にしたことのない構造をもつ二次代謝産物が、微生物、特に放線菌には未だ数多く眠っている可能性を示唆する。加えて、構造的な特徴の希薄さからこれまで見向きもされなかったような化合物にも、ユニークな生物活性が秘められている可能性に留意する必要があると考えている。

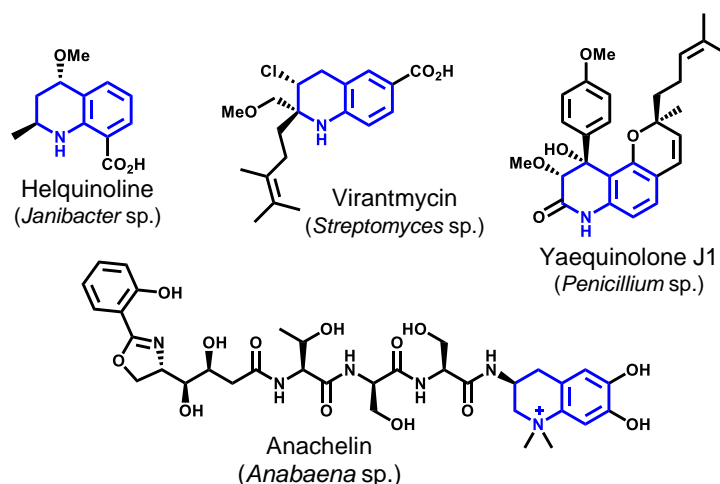


Figure 3-22. Structures of natural products containing a tetrahydroquinoline ring.

一方、STAM 類のスピロヘミアミナール骨格は、天然物でも非常に稀な構造単位である。既知のスピロヘミアミナール骨格は、いずれかの環が五員環か sp² 炭素を含むものしか報告が無く、完全にピペリジン環とテトラヒドロピラン環から成る骨格は STAM 類が初である (Figure 3-23)⁽⁵⁸⁾⁻⁽⁶²⁾。こちらも分子全体としては単純な構造であり、5aTHQ 類とは明らかに異なる生物活性を示すことから、スピロヘミアミナール環が活性発現に重要な役割を果たしている可能性が高い。また、STAM 類の全合成研究により、安価な原料から短工程で本骨格を構築できることが示されたほか、合成法を大きく改変せずとも、多様性を指向した置換基の導入は難しくないと予想される。以上の考察から、スピ

ロヘミアミナル環は創薬における新しいスキップフォールドとして利用可能なのではないかと期待している。

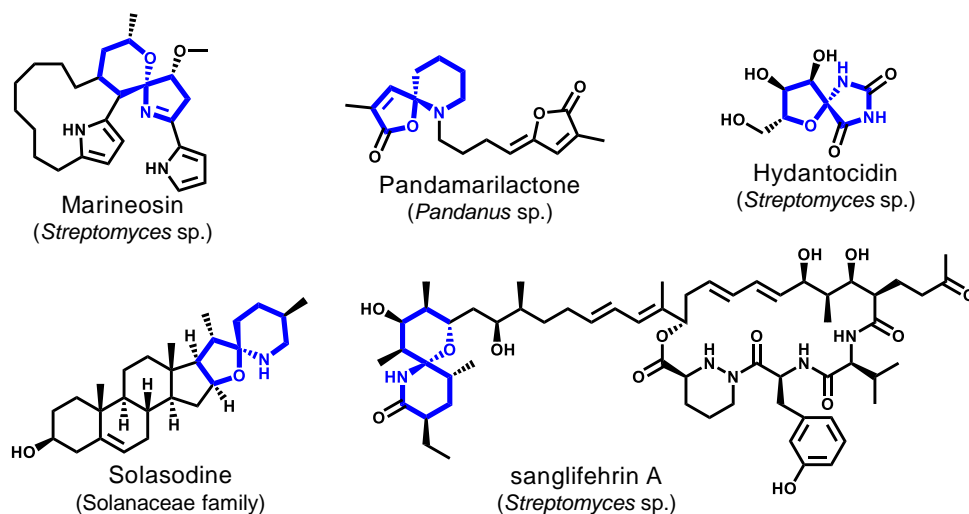


Figure 3-23. Structures of natural products possessing a spirohemiaminal moiety.

5aTHQ 類の推定作用モデル

酵母の生育阻害を引き起こす濃度域が凝集体形成濃度と相関しているかを考察してみると、まず、5aTHQs-10n (15)は低い凝集体形成濃度を示し、高い濃度でも脂質膜に結合せず、生育阻害を示さない (Figure 3-5, Table 3-2)。続いて 5aTHQ-9n (12)は、凝集体形成濃度を超えると脂質膜に不可逆的に結合し、脂質結合物質に特徴的な生育阻害を示す。一方、5aTHQs-7n (8)や-8n (10)は脂質膜への結合は凝集体形成濃度を境に検出されるものの可逆的であり、また、凝集体形成濃度以下であっても生育阻害を示す。さらに、5aTHQs-7n (8)や-8n (10)は *erg* 遺伝子変異株に対する選択性が低く、細胞内でも作用する可能性が考えられた。以上の結果を踏まえ、Figure 3-24 のような推定作用モデルを提唱する。

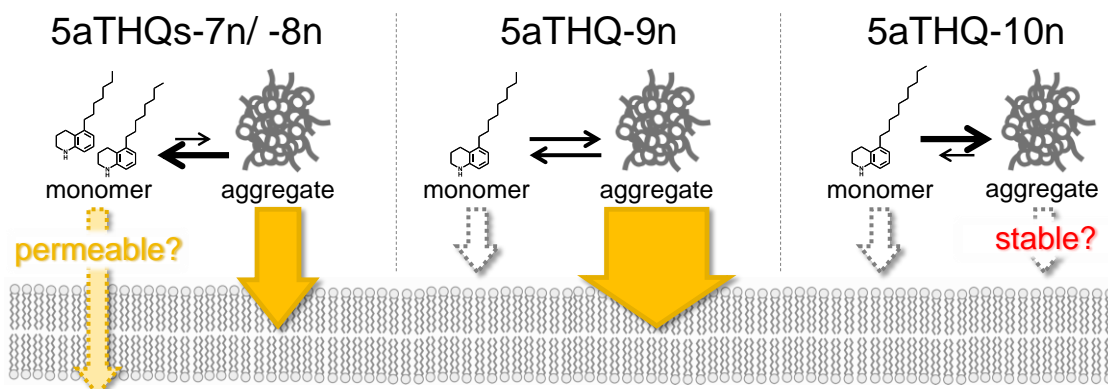


Figure 3-24. Plausible model for the interactions between 5aTHQs and lipid membranes.

5aTHQ-9n (12)が脂質膜と高い親和性を示す要因は、アミノ基とアルキル鎖による適度な両親媒性構造であると予想される。5aTHQs-7n (8)や-8n (10)のように側鎖が短いと、モノマーの水溶性が高まるため、凝集体が脂質膜に結合しても、一部がモノマーとして水中へと解離しやすいと考えられる。また、モノマーが単純拡散によって膜を透過することで、凝集体形成濃度以下でも生育阻害を示すのかもしれない。一方、5aTHQs-10n (15)のように側鎖が長くなると、側鎖間の疎水性相互作用が強いために凝集体が水中で安定に存在し、脂質膜と融合しづらいと予想される。

天然の低分子化合物が、生物活性を発現する構造単位として凝集体を形成する例はわずかである。たとえば、surfactin⁽⁶³⁾や daptomycin⁽⁶⁴⁾などのリポペプチドは、化合物のミセルが細胞膜と融合し、界面活性剤のように膜構造を破壊することで細胞毒性を示すと考えられている。また、海洋微生物由来のシデロフォア marinobactin については、単独ではミセルを形成して存在しており、Fe(III)と結合することでリポソームへと高次構造が変化することが示されている⁽⁶⁵⁾。多くの両親媒性化合物が数百 μM ~数 mM の高い臨界ミセル濃度をもつのに対し、5aTHQ 類は数~数十 μM という低濃度で、100 nm を超える比較的大きな凝集体を形成する点が特徴的である。分裂酵母は細胞膜の外側に細胞壁をもつため、このような巨大な凝集体が直接細胞膜と結合し生物活性に寄与するかは議論の余地があるが、なぜ *erg* 遺伝子の破壊株には効かないのかという点も含め、脂質膜との詳細な相互作用様式に興味を持たれる。

アルキル側鎖の多様性

本研究では 5aTHQ 類の各成分ごとに生物活性や物理化学的性質を検証し、炭素数 1 つでそれらが劇的に変わることを示した。特定の化合物群が多様なアルキル鎖を持ち、それが生理活性に寄与しているという報告としては、結核菌 *mycobacterium tuberculosis* が生産する mycobactin と exochelin が代表例として挙げられる⁽⁶⁶⁾。両化合物は共通のシデロフォア構造をもち、前者は炭素数 20 程度、後者は炭素数 5~10 の炭化水素鎖が付加している。肺などに感染した結核菌は炭素鎖の短い exobactin を放出して宿主生体中の鉄イオンを集め、それを菌体表面に局在させた炭素鎖の長い mycobactin に受け渡すことで効率よく鉄を取りこめるという仮説が提唱されている⁽⁶⁶⁾。しかし、この仮説は実験的には証明されておらず、また、mycobactin の中での炭素鎖の多様性についても議論はされていない。他には、surfactin などのリポペプチドにアシル鎖の多様性が知られているが、炭素数 1 ごとや分岐構造ごとの分離は煩雑であるため、ほとんどの研究では混合物として使用されているのが現状である。

5aTHQ 類は、生産菌の生息環境では混合物として存在すると考えられるため、化合物の生理的な役割を考察するためには、混合状態での生物活性や脂質結合性を検証する必要があると考えている。また、5aTHQ 類・STAM 類が多様な長さ・分岐構造のアルキル側鎖をもつ生理的意義についても、さらなる検証が必要である。単純に、生合成酵素の

基質許容性や基質の組成比が反映されているのか、それとも、混合物として最適な生理活性を示すように進化的に選択されてきたのかは興味深い。なお、合成誘導体による構造活性相関の予備検討では、炭素数がより大きいもの、小さいものはいずれも生物活性・脂質親和性をもたないことを示唆する結果が得られている。

5aTHQ 類・STAM 類の推定生成経路

両化合物群の推定生成経路を **Figure 3-25** に示す。*S. nigrescens* から得られた遺伝子クラスター (*orf1-9*)には、PKS の基本構成単位であるアシル基転移酵素 (AT)と脱水酵素 (DH)が含まれていない (**Figure 3-20**)。そのため、この9つの遺伝子だけで両化合物群を生合成できるとは考えにくい。しかし実際は、これら遺伝子を異種宿主発現するだけで *S. lividans* TK23 株は両化合物群を生合成した。5aTHQ 類・STAM 類が多様なアルキル鎖を持つことを考慮すると、本酵素群は脂肪酸合成酵素 (FAS)と協調して両化合物群を生合成していると予想される。すなわち、FAS によって作られた多様な長さ・分岐構造をもつ脂肪鎖をスターターに、PKS やアミノ基転移酵素が、FAS の AT や DH を利用しつつ母骨格を形成していくと考えている。FAS と PKS が共働して二次代謝産物の生産に関わる利用される例としては、phlorocaprophenone 類や zeamine 類などが報告されている⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾。また、*S. nigrescens* と *S. lividans* 異種発現で側鎖の組成比が異なるという結果も、異種間の脂肪酸一次代謝の差が反映されたと考えればこの仮説と矛盾しない。

興味深いことに、5aTHQ 類と STAM 類の生合成上の分岐は、たった一か所の酸化度で説明できる。黄色でハイライトした酸素がアルコールならば STAM 類へ (*route A*)、ケトンならば 5aTHQ 類へと (*route B*)、脱水を伴いながら縮環していくと予想される (**Figure 3-25**)。純粋培養時の STAM 生産量は複合培養時の約 1/10 にとどまるため、複合培養では生合成経路全体の活性化と経路の分岐が同時に起こっていることになるが、メカニズムの詳細は不明である。*S. lividans* 異種宿主発現株で両化合物群とも生産されていることから、少なくとも *T. pulmonis* が STAM 類を構造変換している可能性は低いと考えられる。あくまで推測に過ぎないが、もし放線菌が構造・活性の異なる2種類の化合物を、生育環境に応じて同一の生合成酵素群から作り分けているとするならば、非常に興味深い生存戦略といえる。例えば、STAM 類の幅広い抗菌活性を効率よく発揮させるため、脂質結合能をもつ 5aTHQ 類の凝集体をキャリアとして利用するのは理に適っているように思える。5aTHQ 類・STAM 類の詳細な作用機序だけでなく、両者の相乗効果や生産菌にとっての役割も、特に興味深い研究課題である。

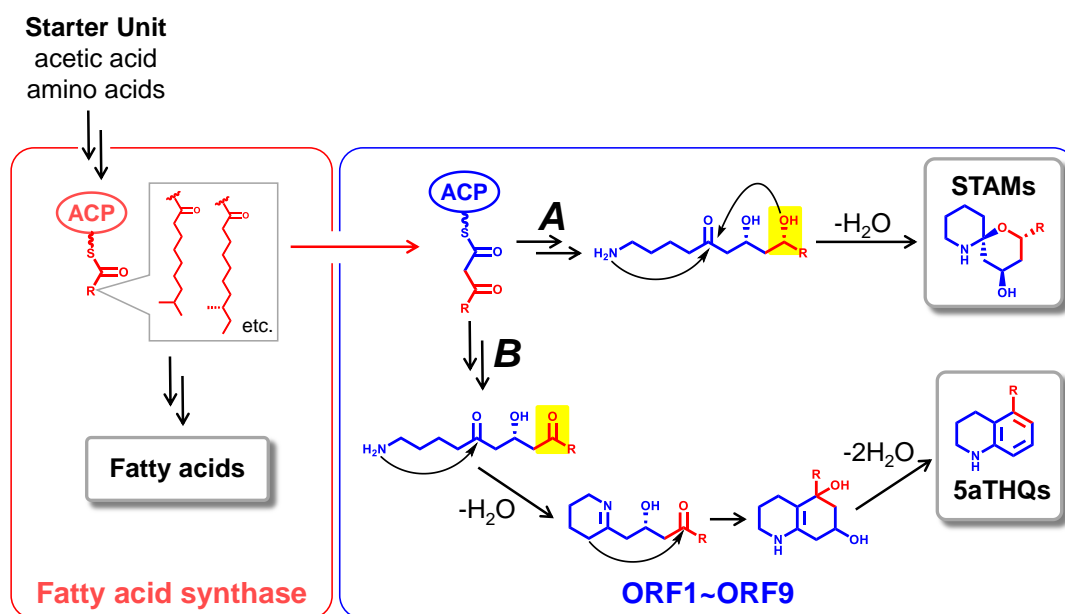


Figure 3-25. Plausible biosynthetic pathway for 5aTHQs and STAMs.

3. 4. 実験項およびスペクトルデータ

General procedure. All reactions were carried out under N₂ atmosphere with dehydrated solvents under anhydrous conditions, unless otherwise noted. All solvents and reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (Merck TLC Silica gel 60 F254 or NH₂ Silica Gel 60F₂₅₄ Plate-wako). Column chromatography was performed on SilicaFlash[®] F60 (Silicycle, 40-63 μm), NH-Silica (Fuji Silysia) or Cosmosil 75C₁₈-OPN (Nakalai Tesque, Inc., 75 μm). IR spectra were recorded on a JASCO FT/IR-4100 FT-IR spectrophotometer equipped with a ZnSe ATR plate. Optical rotations were measured on a JASCO P-2200 digital polarimeter using the sodium D line (589 nm). Mass spectra were measured by JEOL JMS-700 and SHIMADZU LCMS-IT-TOF. ¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C-NMR spectra (125 MHz) were recorded on a JEOL JNM-ECA 500 spectrometer. In the NMR spectra, chemical shift values (in ppm) are shown relative to the solvents: δ_H 7.26 (CDCl₃) or 3.31 (CD₃OD), and δ_C 77.16 (CDCl₃) or 49.00 (CD₃OD). The following abbreviations are used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad.

Yeast strains. *Schizosaccharomyces pombe* strains used in this study are JY1 (*h*⁻) and *erg* mutants (*h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg2::ura4*⁺, *h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg31::ura4-FOA^R erg32::ura4*⁺, *h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg4::ura4*⁺, and *h*⁻ *ura4-C190T leu1-32 erg5::ura4*⁺).⁽¹⁶⁾

Isolation of 5aTHQs. Mycelium harvested from the combined-culture of *S. nigrescens* HEK616 and *T. pulmonis* TP-B0596 (800 mL) was extracted with CHCl₃/MeOH (1:1). The extract was concentrated and partitioned between 90% MeOH and *n*-hexane. The *n*-hexane layer was fractionated by silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc), followed by ODS column chromatography (H₂O/MeOH). Fractions containing 5aTHQs (65 mg) were subjected to repeated RP-HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS with 84% MeOH, then COSMOSIL Cholester with 89% MeOH) to afford 5aTHQs-7n (**8**, 2.8 mg), -8i (**9**, 1.9 mg), -8n (**10**, 4.1 mg), -9i (**11**, 16.2 mg), -9n (**12**, 6.4 mg), -10a (**13**, 9.0 mg), -10i (**14**, 1.9 mg) and -10n (**15**, 1.5 mg).

Isolation of STAMs. Mycelium harvested from the combined-culture of *S. nigrescens* HEK616 and *T. pulmonis* TP-B0596 (1 L) was extracted with CHCl₃/MeOH (1:1). The extract was concentrated and partitioned between 90% MeOH and *n*-hexane. The 90% MeOH layer was fractionated by ODS column chromatography (H₂O/MeOH), followed by silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH). The *n*-hexane layer was also subjected to silica gel column chromatography (*n*-hexane/EtOAc then CHCl₃/MeOH). Fractions containing STAMs were combined and purified by NH-silica column chromatography (*n*-hexane/EtOAc) to afford STAMs with various alkyl chains (86.5 mg). 41.6 mg of the crude STAMs were further separated by RP-HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS, 67%

MeOH/H₂O with 0.1% TFA) with the help of LCMS to yield pure STAMs-9n (**25**, 2.4 mg), -9i (**26**, 3.0 mg) and -8n (**27**, 2.1 mg) as TFA salts.

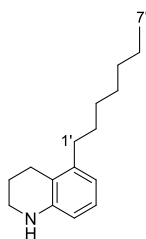
Preparation of liposomes for SPR analysis. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared as described previously.⁽²³⁾ Phospholipid (POPC, DOPC, DMPC) with or without 20 mol% ergosterol were dissolved in chloroform in a round-bottom flask. The solvent was evaporated and the resulting lipid film was further dried in vacuo for over 2 hours. After hydrating with 1 mL of PBS buffer [10 mM phosphate buffer (pH 7.4), 2.7 mM potassium chloride, and 137 mM sodium chloride], the mixture was vortexed, sonicated, and subjected to three cycles of freezing (−80 °C), thawing (60 °C), and vortexing (5 s) to form multilamellar vesicles (MLVs). The MLV suspension was passed through double 100 nm polycarbonate filters 19 times with LiposoFast-Basic (AVESTIN Inc.) at room temperature to form LUVs. The LUVs were diluted with the same PBS buffer to produce a suspension with a final lipid concentration of 0.5 mM for injection into the SPR instrument.

Surface plasmon resonance experiments. 5aTHQs-7n (**8**), -8n (**10**), -9n (**12**), -10n (**15**) and *N*-methyl-5aTHQ-9n (**24**) were dissolved in DMSO and stored as a 1 mM stock solution. 20 μL of the compound stock solutions were diluted to 50 μM with 380 μL of PBS buffer. This solution was further diluted with PBS buffer containing 5% DMSO to give various concentration of 5aTHQ solutions. Detailed conditions were as described at Chapter 2 except for contact time. 5aTHQ solutions were then injected at a flow rate of 10 μl/min and the association was observed for 150 s. Then the running buffer was injected at the same flow rate for another 150 s, and the dissociation of 5aTHQs from the surface was monitored.

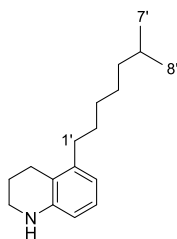
Growth inhibition assay against fission yeast cells. Growth inhibition was tested as described previously.² Briefly, mid-log phase inocula in YE5S medium were diluted to 0.0033 OD₅₉₅ and cells were exposed to compounds dissolved in DMSO (1% v/v) at 30 °C for 24 h. After incubation, the turbidity was measured at OD₅₉₅ using an iMark microplate reader (BIO-RAD).

Antibacterial assay. Growth inhibitory activity of synthesized (+)-STAM-9n (**25a**) against bacteria was examined by disk-diffusion assay. The test organisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were suspended in NBRC 802 media (1% of poypepton, 0.2% of yeast extract and 0.1% of MgSO₄·7H₂O) with 0.5% agar medium and overlaid on solid medium plates with 2% agarose. Compound **25a**, STAMs with various alkyl chains, 5aTHQ-9i (**11**), ampicillin and kanamycin were loaded onto paper disks (ϕ6 mm) which were dried and placed on the agar plates. After incubation at 30 °C for 24 h, growth inhibitory zone was measured.

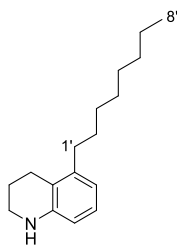
Physico-chemical properties of 5aTHQs. The ^1H and ^{13}C NMR chemical shift values of metabolites **8-15** are summarized in **Table 3-1**.



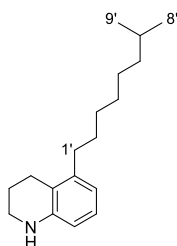
5aTHQ-7n (8). Pale yellow oil; IR (neat) 3403 (br), 2925 (s), 1589 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.55), 248 (3.83), 298 (3.23) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 232.2060, found 232.2063.



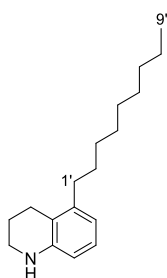
5aTHQ-8i (9). Pale yellow oil; IR (neat) 3396 (br), 2926 (s), 1590 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.45), 248 (3.74), 295 (3.18) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 246.2216, found 246.2220.



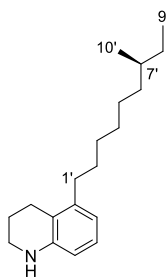
5aTHQ-8n (10). Pale yellow oil; IR (neat) 3394 (br), 2925 (s), 1589 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.43), 248 (3.74), 297 (3.19) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 246.2216, found 246.2224.



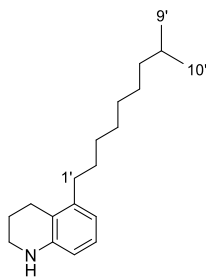
5aTHQ-9i (11). Pale yellow oil; IR (neat) 3395 (br), 2925 (s), 1589 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.52), 248 (3.80), 297 (3.22) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 260.2374, found 260.2380.



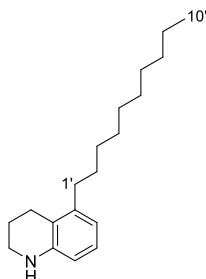
5aTHQ-9n (12). Pale yellow oil; IR (neat) 3401 (br), 2925 (s), 1589 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.56), 247 (3.86), 297 (3.28) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 260.2374, found 260.2373.



5aTHQ-10a (13). Pale yellow oil; IR (neat) 3398 (br), 2925 (s), 1590 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.56), 248 (3.85), 298 (3.26) nm; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +6.7$ (c 0.50, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 274.2529, found 274.2539.

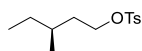


5aTHQ-10i (14). Pale yellow oil; IR (neat) 3398 (br), 2925 (s), 1590 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.43), 248 (3.81), 294 (3.25) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 274.2529, found 274.2522.

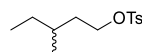


5aTHQ-10n (15). Pale yellow oil; IR (neat) 3396 (br), 2925 (s), 1589 (m) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 208 (4.45), 248 (3.78), 293 (3.21) nm; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 274.2529, found 274.2537. ^{13}C NMR spectrum with a high S/N ratio was not obtained due to the low yield.

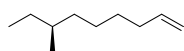
Synthesis and structure determination of 5aTHQ-10a (13).



(S)-3-Methylpentyl *p*-toluenesulfonate 17. To a solution of (*S*)-3-methyl-1-pentanol **16** (619 μL , 5.00 mmol) in dry CH_2Cl_2 (20 mL) were added Et_3N (2.09 mL, 15.0 mmol), DMAP (305 mg, 2.5 mmol) and TsCl (1.05 g, 5.5 mmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred for 4 h, the reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and the mixture was extracted with CHCl_3 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane/*EtOAc* = 4:1) to give tosylate (*S*)-**17** (1.13 g, 88%) as a colorless oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +6.3$ (*c* 1.0, CHCl_3); the MS and ^1H NMR data were identical to those reported.⁽³⁶⁾

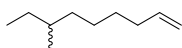


(R/S)-3-Methylpentyl *p*-toluenesulfonate 17. 3-methyl-1-pentanol **16** (1.21 mL, 9.79 mmol), Et_3N (4.09 mL, 29.4 mmol), DMAP (605 mg, 4.95 μmol) and TsCl (2.09 g, 11.0 mmol) were subjected to the procedure as described for (*S*)-**17** to yield racemic **17** (2.75 g, 100%): the MS and ^1H NMR data were identical to those of (*S*)-**17**.

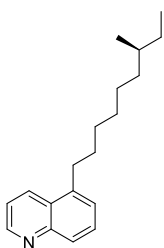


(S)-7-Methyl-1-nonene 19. 4-Bromo-1-butene **18** (511 μL , 5.53 mmol) was added to a solution of

Mg (143 mg, 5.89 mmol) and a catalytic amount of I₂ in dry THF (2 mL) at -20 °C and gradually warmed to room temperature. After 1 h, the mixture was cooled to -78 °C and a solution of Li₂CuCl₄ in THF (0.1 M, 920 μL, 92.0 μmol) was added. Subsequently, to the stirred solution was added (*S*)-**17** (472 mg, 1.84 mmol) in dry THF (4 mL) dropwise. The reaction mixture was slowly warmed to room temperature and stirred for 2 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl and ice, then extracted with *n*-hexane three times. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated carefully. The residue was distilled (80 °C/31 Torr) to give (*S*)-**19** as a colorless oil (153 mg, 59%): [α]_D²⁰ +5.4 (*c* 0.50, CHCl₃); the MS and ¹H NMR data were identical to those reported.⁽³⁶⁾

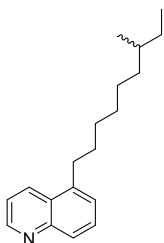


(*R/S*)-**7-Methyl-1-nonene 19**. 4-bromo-1-butene **18** (675 mg, 5.00 mmol), Mg (129 mg, 5.34 mmol), I₂ (one drop), racemic **17** (427 mg, 1.67 mmol), and Li₂CuCl₄ in THF (0.1 M, 835 μL, 83.5 μmol) were subjected to the procedure as described for (*S*)-**19**, to yield racemic **19** (125 mg, 53%): the MS and ¹H NMR data were identical to those of (*S*)-**19**.

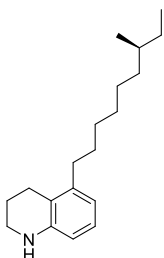


(*S*)-**5-(7-Methylnonyl)quinoline 21**. To a solution of (*S*)-**19** (74 mg, 528 μmol) in dry THF (1 mL) were added 9-BBN in THF (0.5 M, 1.06 mL, 528 μmol) at 0 °C. After being stirred for 2 h, aqueous K₃PO₄ (3 M, 148 μL, 444 μmol), PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (45.8 mg, 56.1 μmol) and 5-bromoquinoline **20** (77.6 mg, 373 μmol) were added to the solution. The reaction mixture was heated to 65 °C and refluxed for 19 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered through a silica gel bed and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Since fractionation of the residue on a silica gel column chromatography was insufficient to obtain pure (*S*)-**21**, the crude mixture was subjected to reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS, 81% MeOH) to yield (*S*)-**21** as a pale brown oil (17.8 mg, 18%): IR (neat) 2927 (s), 1709 (m) cm⁻¹; UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 231 (4.67), 292 (3.71), 302 (3.69), 315 (3.58) nm; [α]_D²⁰ +8.1 (*c* 0.13, CHCl₃); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₉H₂₈N [M+H]⁺ 270.2216, found 270.2222; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 8.90 (1H, dd), 8.37 (1H, d), 7.97 (1H, d), 7.62 (1H, t), 7.41 (1H, dd), 7.37 (1H, d), 3.05 (2H, t), 1.71 (2H, m), 1.42 (2H, m), 1.36-1.22 (7H, m), 1.10 (2H, m), 0.85 (3H, t) and 0.83 (3H, d) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 150.0, 148.9, 139.6,

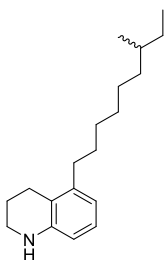
132.4, 129.3, 127.8, 127.1, 126.4, 120.7, 36.7, 34.5, 32.5, 31.2, 30.0, 29.9, 29.6, 27.2, 19.4 and 11.6 ppm.



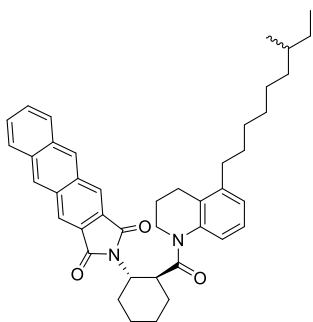
(R/S)-5-(7-Methylnonyl)quinoline 21. Racemic **19** (110 mg, 0.75 mmol), 9-BBN in THF (0.5 M, 1.5 mL, 0.75 mmol), aqueous K₃PO₄ (3 M, 200 μ L, 0.60 mmol), PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (80.8 mg, 100 μ mol) and 5-bromoquinoline **20** (112 mg, 0.54 mmol) were subjected to procedures as described for (*S*)-**21**, to yield a crude mixture containing racemic **21** (93.5 mg) after silica gel column chromatography. This mixture was used in the next reaction without further purification. HR-ESI-MS m/z calcd for C₁₉H₂₈N [M+H]⁺ 270.2216, found 270.2218.



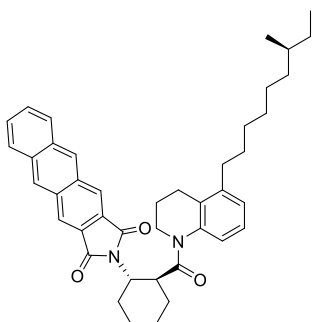
(S)-5-(7-Methylnonyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ-10a, 13). To a solution of (*S*)-**21** (14.0 mg, 52.0 μ mol) in dry MeOH (800 μ L) were added NiCl₂·6H₂O (4.3 mg, 18.1 μ mol) and NaBH₄ (5.0 mg, 132 μ mol) at 0 °C. After being stirred for 10 min, the reaction mixture was diluted with CHCl₃, filtered through silica-gel bed and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to reversed-phase HPLC (COSMOSIL Cholester, 94% MeOH) to yield (*S*)-**13** as a pale yellow oil (15.1 mg, 81%): [α]_D²⁰ +6.9 (*c* 0.50, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for C₁₉H₃₂N [M+H]⁺ 274.2529, found 274.2521; the IR, ¹H and ¹³C NMR data were identical to those of natural **13**.



(*R/S*)-5-(7-Methylnonyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ-10a, 13). The crude mixture containing racemic **21** (93.5 mg) was treated with NiCl₂·6H₂O (16.5 mg, 3.47 mmol) and NaBH₄ (131 mg, 69.5 μmol) as described for (*S*)-**13**, to yield racemic **13** (19.2 mg, 13% over 2 steps): HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₉H₃₂N [M+H]⁺ 274.2529, found 274.2525; the IR and ¹H NMR data were identical to those of natural **13**.

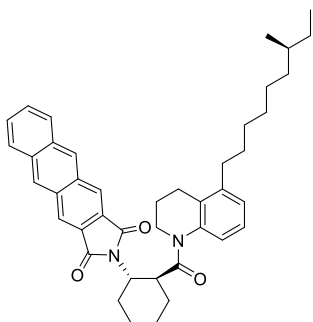


Amide 23a. To a solution of (*1S,2S*)-2-(anthracene-2,3-dicarboximido)cyclohexane carboxylic acid **22** (5.1 mg, 13.7 μmol) and catalytic DMF (0.5 μL) in dry CH₂Cl₂ (500 μL) were added oxalyl chloride (5.7 μL, 65.9 μmol) at room temperature. After being stirred for 30 min, the solvent and excess oxalyl chloride were evaporated under reduced pressure for 10 min. Synthesized racemic **13** (1.2 mg, 4.4 μmol) and DIEA (15.3 μL, 87.8 μmol) which were dissolved in dry CH₂Cl₂ (500 μL) was added to the acyl chloride, and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was filtered through a silica-gel bed and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS, 92% MeOH) to yield **23a** as a yellow powder (0.9 mg, 33%): IR (neat) 2925 (m), 1759 (m), 1702 (s), 1649 (m) cm⁻¹; UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 211 (4.65), 239 (4.75), 299 (4.76), 384 (3.80), 404 (3.86) nm; HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₄₂H₄₉N₂O₃ [M+H]⁺ 629.3738, found 629.3750; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H 8.79 (2H, s), 8.47 (2H, br.s), 8.16 (2H, dd), 7.66 (2H, dd), 7.22 (1H, br.s), 7.12 (1H, br.s), 7.01 (1H, d), 4.55 (1H, m), 4.12 (1H, m), 3.99 (1H, br.s), 3.10 (1H, br.s), 2.43 (1H, m), 2.37-2.26 (2H, m), 2.17-2.07 (2H, m), 1.90-1.66 (5H, m), 1.57-1.43 (5H, m), 1.36-1.15 (10H, m), 1.08 (1H, m), 1.00 (1H, m), 0.85-0.77 (6H, m) ppm.



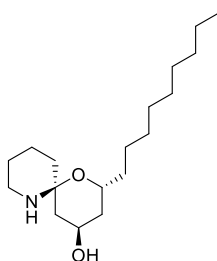
Amide 23b. Acid **22** (4.5 mg, 12.1 μmol), oxalyl chloride (5.0 μL, 58.2 μmol), DMF (0.3 μL),

synthesized (*S*)-**13** (1.1 mg, 3.9 μmol) and DIEA (13.5 μL , 77.6 μmol) were subjected to the procedure as described for **23a**, to yield **23b** (1.7 mg, 68%). IR (neat) 2925 (m), 1759 (m), 1702 (s), 1649 (m) cm^{-1} ; HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 629.3738, found 629.3751; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 8.79 (2H, s), 8.47 (2H, br.s), 8.16 (2H, dd), 7.66 (2H, dd), 7.23 (1H, br.s), 7.12 (1H, br.s), 7.01 (1H, d), 4.55 (1H, m), 4.11 (1H, m), 4.00 (1H, br.s), 3.09 (1H, br.s), 2.43 (1H, m), 2.37-2.26 (2H, m), 2.17-2.04 (2H, m), 1.90-1.63 (5H, m), 1.57-1.43 (5H, m), 1.37-1.14 (10H, m), 1.08 (1H, m), 1.00 (1H, m), 0.86-0.77 (6H, m) ppm.

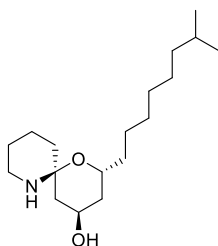


Amide 23c. Acid **22** (5.7 mg, 15.2 μmol), oxalyl chloride (6.9 μL , 77.4 μmol), DMF (0.3 μL), natural **13** (1.4 mg, 5.2 μmol) and DIEA (18.0 μL , 103 μmol) were subjected to procedures as described for **23a**, to yield **23c** (2.8 mg, 86%): HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 629.3738, found 629.3725. The ^1H NMR spectrum in CD_3OD was quite identical to that of amide **23b**.

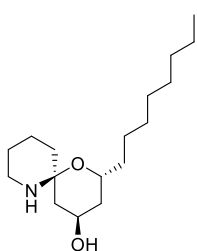
Physico-chemical properties of STAMs. The ^1H and ^{13}C NMR chemical shift values of metabolites **25-27** are summarized in **Tables 3-2,3**.



STAM-9n (25, TFA salt). Colorless oil; IR (neat) 3391 (br), 2926 (s), 1675 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +16.2$ (c 0.15, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298.2741, found 298.2726.

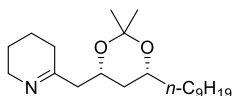


STAM-9i (26, TFA salt). Colorless oil; IR (neat) 3401 (br), 2927 (s), 1676 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +14.9$ (c 0.15, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298.2741, found 298.2731.

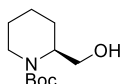


STAM-8n (27, TFA salt). Colorless oil; IR (neat) 3401 (br), 2927 (s), 1673 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +14.3$ (c 0.15, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 284.2584, found 284.2571.

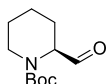
Derivatization and total synthesis of STAM-9n (25).



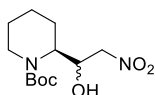
Isopropylidene derivative 28 from STAM-9n (25). A solution of STAM-9n (0.9 mg, 3.0 μmol), pyridinium-*p*-toluenesulfonate (~3 mg) in 2,2-dimethoxypropane (500 μL) and dry acetone (500 μL) was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 , then extracted with EtOAc three times. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by preparative TLC with NH-Silica to yield an isopropylidene derivative **28** as a colorless oil (0.6 mg, 56%): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +8.1$ (c 0.13, CHCl_3); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.3054, found 338.3066; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} 4.20 (1H, m), 3.88 (1H, m), 3.50 (2H, m), 1.68 (2H, m), 1.61 (2H, m), 1.54 (1H, ddd), 1.71-1.23 (26H, m), 1.43 (3H, s), 1.31 (3H, s), 1.09 (1H, dd) and 0.90 (3H, t) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} 99.9, 70.2, 68.7, 38.1, 37.5, 33.1, 30.7, 30.5 (q), 30.4, 23.7, 23.4, 20.1 (q), 27.2, 19.8 and 14.4 ppm. The chemical shift values of carbons were measured by DEPT135 and HMBC data.



1-Boc-(S)-2-piperidinemethanol 33. To a mixture of (S)-2-piperidinemethanol **32** (290 mg, 2.52 mmol) and Et₃N (1.05 mL, 7.56 mmol) cooled to 0°C in CH₂Cl₂ (10 mL), was added (Boc)₂O (636 μL, 2.77 mmol) drop wise. The reaction mixture was further stirred at the same temperature for 1 h. It was then treated with saturated aqueous NH₄Cl and the organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and then concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography to afford **33** as a colorless oil (522 mg, 96%): IR (neat) 3435 (br), 1689 (s), 1666 (s) cm⁻¹; [α]_D²⁰ -33.4 (c 0.59, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₁H₂₁NO₃Na [M+Na]⁺ 238.1414, found 238.1413; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 4.28 (1H, m), 3.93 (1H, br. d), 3.80 (1H, ddd), 3.59 (1H, ddd), 2.85 (1H, m), 2.38-2.17 (1H, br.), 1.70-1.54 (4H, m) and 1.50-1.35 (11H, m) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 156.4, 79.9, 61.9, 61.8, 52.6, 40.1, 28.6, 25.4 and 19.7 ppm.

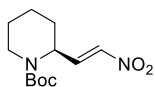


1-Boc-(S)-piperidine-2-carboxaldehyde 34. To a solution of compound **33** (522 mg, 2.42 mmol) cooled to 0 °C in CH₂Cl₂ (10 mL) was added iodobenzene diacetate (1.04 g, 3.15 mmol) and TEMPO (18.9 mg, 121 μmol). The reaction mixture was gradually warmed to room temperature and further stirred for 3 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and then the residue was subjected to silica gel column chromatography to afford **34** as a colorless oil (452 mg, 88%): IR (neat) 1737 (m), 1688 (s) cm⁻¹; [α]_D²⁰ -53.9 (c 0.13, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₁H₁₉NO₃Na [M+Na]⁺ 236.1257, found 236.1243; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 9.56 (1H, s), 4.53 (1H, br. d), 3.93 (1H, br. d), 2.87 (1H, br. d), 2.14 (1H, br. d), 1.70-1.15 (5H, m) and 1.44 (9H, s) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 201.5, (156.0, 155.4), 80.5, (61.6, 60.8), (43.2, 42.0), 28.4, 24.9, 23.7 and 21.0 ppm.

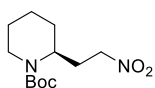


1-Boc-(S)-2-(2-hydroxy-1-nitroethyl)piperidine. To a mixture of nitromethane (542 μL, 10.1 mmol) and potassium hydroxide (3 M in MeOH, 677 μL) in MeOH (5 mL), was added aldehyde **34** (432 mg, 2.03 mmol) dissolved in MeOH (5 mL) drop wise. The reaction mixture was further stirred at room temperature for 2 h, then quenched with acetic acid (150 μL). The diluted solution by saturated aqueous NH₄Cl was extracted three times with EtOAc and the organic layer was combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and then concentrated under reduced pressure. This residue was used in the next reaction without further purification. HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₂H₂₂N₂O₅Na [M+Na]⁺

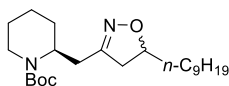
297.1421, found 297.1410.



1-Boc-(S,E)-2-(2-nitrovinyl)piperidine 35. To a mixture of the nitroalcohol and Et₃N (849 μ L, 6.09 mmol) cooled to -78 °C in CH₂Cl₂ (10 mL), was added MsCl (157 μ L, 2.03 mmol) drop wise. After stirring for 1 h, it was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and the organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and then concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography to afford **35** as a colorless oil (382 mg, 74% over 2 steps). IR (neat) 1691 (s), 1529 (m) cm⁻¹; [α]_D²⁰ -74.6 (c 0.38, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₂H₂₀N₂O₄Na [M+Na]⁺ 279.1315, found 279.1302; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H 7.22 (1H, dd), 6.94 (1H, dd), 5.07 (1H, br. s), 4.02 (1H, br. d), 2.80 (1H, br. t), 1.82 (2H, m), 1.75-1.64 (2H, m), 1.46 (9H, s) and 1.50-1.38 (2H, m) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ _C 154.8, 141.4, 140.8, 80.7, 49.4, 40.5, 29.0, 28.5, 25.1 and 20.0 ppm.

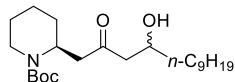


1-Boc-(S)-2-(2-nitroethyl)piperidine 31. To a mixture of compound **35** (368 mg, 1.44 mmol) cooled to 0 °C in EtOH (5 mL), was added NaBH₄ (54.3 mg, 1.44 mmol) portionwise. After stirring for 1 h, the diluted solution by saturated aqueous NH₄Cl was extracted three times with EtOAc and the organic layer was combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and then concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography to afford **31** as a colorless oil (357 mg, 96%). IR (neat) 1684 (s), 1555 (m) cm⁻¹; [α]_D²⁰ -48.7 (c 0.58, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₁₂H₂₂N₂O₄Na [M+Na]⁺ 281.1472, found 281.1462; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H 4.37 (2H, m), 4.30 (1H, ddd), 4.02 (1H, br. s), 2.71 (1H, br. t), 2.46 (1H, br. s), 2.05 (1H, m), 1.80 (1H, br. s), 1.73-1.50 (4H, m), 1.43 (9H, s) and 1.41 (1H, m) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ _C 155.0, 80.2, 72.9, 47.9, 38.7, 29.1, 28.4, 27.7, 25.5 and 19.2 ppm.

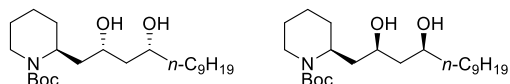


Isoxazoline 30. To a mixture of compound **31** (108 mg, 418 μ mol), 1-undecene (258 μ L, 1.25 mmol) and phenylisocyanate (136 μ L, 1.25 mmol) in toluene (8 mL), was added Et₃N (29.1 μ L, 209 μ mol). The reaction mixture was heated to 50 °C and stirred for 10 h. After cooling to room temperature, the solution was diluted with EtOAc. The white precipitates were removed by filtration and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography to afford a diastereomeric mixture of **30**. This mixture was used in the next reaction

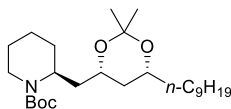
without further purification. HR-ESI-MS m/z calcd for $C_{23}H_{43}N_2O_3$ $[M+H]^+$ 395.3268, found 395.3264.



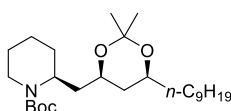
β -Hydroxyketone 36. To the crude mixture containing compound **30** dissolved in EtOH/H₂O (3:2, 20 mL), was added iron powder (233 mg, 4.18 mmol) and NH₄Cl (224 mg, 4.18 mmol). The reaction mixture was heated to 80 °C and stirred for 14 h. After cooling to room temperature, the solution was filtered and dried by silica gel column. The filtrate was concentrated under reduced pressure. This residue containing a diastereomeric mixture of **36** was used in the next reaction without further purification. HR-ESI-MS m/z calcd for $C_{23}H_{43}NO_4Na$ $[M+Na]^+$ 420.3084, found 420.3079.



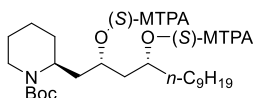
Diols 29a and 29b. To a mixture of the diastereo-mixture of compound **36** cooled to -78 °C in THF/MeOH (4mL/1mL), was added diethylmethoxyborane (1 M in THF, 627 μ L, 627 μ mol) drop wise. After stirring for 1 h, NaBH₄ (23.7 mg, 627 μ mol) was added and stirred at -78 °C for 3 h. The reaction mixture was quenched with acetic acid (200 μ L) and warmed to room temperature. After 1 h, it was treated with saturated aqueous NaHCO₃ and the organic layer was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and then concentrated under reduced pressure. The residue was azeotroped a few times with methanol until the boronate was completely hydrolyzed. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography to afford **29a** (54.2 mg, 32% over 2 steps) and **29b** (54.8 mg, 33% over 2 steps) as colorless oils. **29a**: IR (neat) 3335 (br), 1686 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{20}$ -16.8 (*c* 0.22, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $C_{23}H_{46}NO_4$ $[M+H]^+$ 400.3421, found 400.3419; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 4.30 (1H, m), 3.94 (1H, br. d), 3.87 (1H, m), 3.82 (1H, m), 3.41 (2H, br. s), 2.82 (1H, dt), 1.86 (1H, ddd), 1.67-1.36 (12H, m), 1.44 (9H, s), 1.32-1.21 (13H, m) and 0.87 (3H, t) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 155.8, 80.1, 72.9, 72.0, 48.5, 43.0, 39.6, 39.4, 38.1, 32.0, 30.2, 29.82, 29.75, 29.7, 29.5, 28.6, 25.6, 25.5, 22.8, 19.2 and 14.3 ppm. **29b**: IR (neat) 3335 (br), 1655 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{20}$ -26.3 (*c* 0.25, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $C_{23}H_{46}NO_4$ $[M+H]^+$ 400.3421, found 400.3423; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 8.90 (1H, dd), 4.43 (1H, br. d), 3.95 (1H, br. d), 3.79 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.21 (2H, br. s), 2.67 (1H, dt), 1.96 (1H, t), 1.74 (1H, m), 1.64-1.35 (11H, m), 1.47 (9H, s), 1.32-1.22 (13H, m) and 0.87 (3H, t) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C 156.8, 80.6, 72.8, 69.4, 46.1, 42.4, 39.6, 38.3, 37.9, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3, 28.5, 25.64, 25.57, 22.8, 19.3 and 14.3 ppm.



Isopropylidene derivative from diol 29a (37a). A solution of compound **29a** (9.0 mg, 22.5 μmol), pyridinium-*p*-toluenesulfonate (2.8 mg) in 2,2-dimethoxypropane (500 μL) and dry acetone (500 μL) was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 , then extracted with EtOAc three times. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography to afford **37a** as a colorless oil (9.3 mg, 94%). IR (neat) 1680 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -12.7 (c 0.086, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{NO}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 462.3554, found 462.3541; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 4.40 (1H, m), 3.92 (1H, dd), 3.88-3.79 (2H, m), 2.86 (1H, br. t), 1.90 (1H, br. s), 1.74-1.25 (24H, m), 1.46 (9H, s), 1.41 (3H, s), 1.32 (3H, s), 1.07 (1H, dd) and 0.90 (3H, t) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} 145.4, 101.4, 70.4, 38.4, 37.6, 33.1, 30.7, 30.7, 30.5 (q), 30.5, 29.5, 28.8, 26.8, 23.8, 20.1 (q), 20.0 and 14.5 ppm.

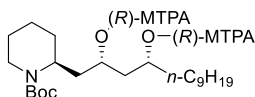


Isopropylidene derivative 37b. Compound **29b** (8.0 mg, 20.0 μmol), pyridinium-*p*-toluenesulfonate (2.5 mg), 2,2-dimethoxypropane (500 μL) were subjected to the procedure as described for **37a** to yield **37b** (7.5 mg, 86%). IR (neat) 1679 (s) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -20.7 (c 0.22, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{NO}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 462.3554, found 462.3555; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 4.45 (1H, br. s), 3.93 (1H, dd), 3.88-3.78 (2H, m), 2.85 (1H, m), 1.90 (1H, ddd), 1.68-1.24 (24H, m), 1.46 (9H, s), 1.42 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.10 (1H, dd) and 0.90 (3H, t) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} 99.9, 80.7, 70.4, 67.8, 38.6, 37.6, 33.1, 30.7, 30.7, 30.5 (q), 30.5, 28.9, 26.9, 26.1, 23.8, 20.1 (q) and 14.5 ppm.

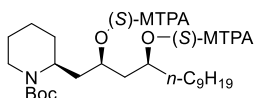


Bis-(S)-MTPA ester 38a. To a solution of the mixture containing **29a** (2.6 mg, 6.5 μmol), Et_3N (9.0 μL , 64.6 μmol) and DMAP (one drop) in CH_2Cl_2 (1 mL), (*R*)-MTPA-Cl (9.6 mg, 38.0 μmol) in toluene (1 mL) was added dropwise at room temperature. The reaction is left under stirring for 14 h at room temperature. The reaction mixture was quenched with saturate aqueous NaHCO_3 , then extracted with CHCl_3 three times. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS, 93%

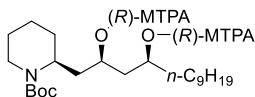
MeOH/H₂O) to afford bis-(*S*)-**38a** as white powder (2.6 mg, 48%). IR (neat) 1743 (m), 1689 (s) cm⁻¹; [α]_D²⁰ -30.7 (c 0.18, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₄₃H₅₉NO₈F₆Na [M+Na]⁺ 854.4037, found 854.4033; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ _H 7.56-7.50 (4H, m), 7.47-7.39 (6H, m), 5.14 (1H, m), 5.00 (1H, m), 4.19 (1H, m), 3.93 (1H, dd), 3.56 (3H, s), 3.53 (3H, s), 2.84 (1H, br. d), 2.10-1.95 (3H, m), 1.74-1.22 (23H, m), 1.42 (9H, s) and 0.90 (3H, t) ppm.



Bis-(*R*)-MTPA ester 38a. 29a (2.1 mg, 5.2 μ mol), (*S*)-MTPA-Cl (14.4 mg, 57.0 μ mol), Et₃N (7.2 μ L, 51.8 μ mol) and DMAP (one drop) were subjected to procedures as described for bis-(*S*)-**38a**, to yield bis-(*R*)-**38a** (2.6 mg, 77%). IR (neat) 1746 (m), 1685 (s) cm⁻¹; [α]_D²⁰ +49.0 (c 0.17, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₄₃H₅₉NO₈F₆Na [M+Na]⁺ 854.4037, found 854.4022; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ _H 7.57-7.50 (4H, m), 7.46-7.40 (6H, m), 5.02 (1H, m), 4.97 (1H, m), 4.35 (1H, m), 3.97 (1H, dd), 3.57 (3H, s), 3.55 (3H, s), 2.93 (1H, br. t), 2.21 (1H, m), 2.12-1.99 (2H, m), 1.88 (1H, m), 1.64-0.96 (22H, m), 1.43 (9H, s) and 0.91 (3H, t) ppm.

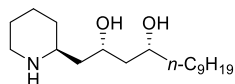


Bis-(*S*)-MTPA ester 38b. 29b (1.5 mg, 3.8 μ mol), (*R*)-MTPA-Cl (9.6 mg, 38 μ mol), Et₃N (15.7 μ L, 113 μ mol) and DMAP (one drop) were subjected to procedures as described for bis-(*S*)-**38a**, to yield bis-(*S*)-**38b** (1.9 mg, 62%). IR (neat) 1744 (m), 1687 (s) cm⁻¹; [α]_D²⁰ -47.3 (c 0.13, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₄₃H₅₉NO₈F₆Na [M+Na]⁺ 854.4037, found 854.4052; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ _H 7.63-7.57 (4H, m), 7.56-7.51 (6H, m), 5.07 (2H, m), 4.37 (1H, m), 3.87 (1H, dd), 3.62 (3H, s), 3.57 (3H, s), 2.80 (1H, br. t), 2.28 (1H, m), 2.02 (1H, m), 1.82 (1H, m), 1.75-1.04 (23H, m), 1.41 (9H, s) and 0.91 (3H, t) ppm.

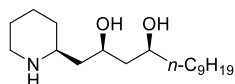


Bis-(*R*)-MTPA ester 38b. 29b (1.6 mg, 3.9 μ mol), (*S*)-MTPA-Cl (9.6 mg, 38 μ mol), Et₃N (10.9 μ L, 78 μ mol) and DMAP (one drop) were subjected to procedures as described for bis-(*S*)-**38a**, to yield bis-(*R*)-**38b** (1.5 mg, 46%). IR (neat) 1748 (m), 1684 (s) cm⁻¹; [α]_D²⁰ +19.5 (c 0.10, MeOH); HR-ESI-MS *m/z* calcd for C₄₃H₅₉NO₈F₆Na [M+Na]⁺ 854.4037, found 854.4032; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ _H 7.64-7.58 (4H, m), 7.57-7.51 (6H, m), 5.18 (1H, m), 5.06 (1H, m), 4.21 (1H, m), 3.83 (1H, dd),

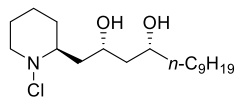
3.57 (3H, s), 3.54 (3H, s), 2.70 (1H, br. dd), 2.12-1.99 (2H, m), 1.91 (1H, m), 1.57-1.23 (21H, m), 1.42 (9H, s) and 0.90 (3H, t) ppm.



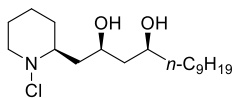
Deprotected diol 39a. To a solution of compound **29a** (18.0 mg, 45.0 μmol) in CH_2Cl_2 (750 μL), 4 M HCl in 1,4-dioxane (250 μL) was added dropwise at room temperature. The reaction is left under stirring for 2 h at room temperature. The reaction mixture was quenched with aqueous NaOH (1 M), then extracted with CHCl_3 three times. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to yield **39a** as a colorless oil (14.4 mg, quant.). IR (neat) 3306 (br) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -5.2 (*c* 0.48, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 300.2897, found 300.2910; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 3.90 (1H, m), 3.72 (1H, m), 2.99 (1H, m), 2.69 (1H, m), 2.62 (1H, dt), 1.79 (1H, m), 1.74 (1H, br. d), 1.62-1.24 (23H, m), 1.12 (1H, m) and 0.90 (3H, t) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} 72.3, 70.1, 56.4, 47.5, 45.9, 44.9, 38.8, 33.3, 33.1, 30.84, 30.78, 30.7, 30.5, 26.9, 26.6, 25.6, 23.7 and 14.5 ppm.



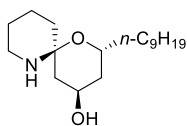
Deprotected diol 39b. Compound **29b** (13.6 mg, 34.0 μmol) was subjected to the procedure as described for **39a** to yield **39b** as a colorless oil (11.0 mg, quant.). IR (neat) 3368 (br) cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +3.7 (*c* 0.37, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 300.2897, found 300.2906; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 3.92 (1H, m), 3.74 (1H, m), 3.02 (1H, m), 2.73 (1H, m), 2.62 (1H, dt), 1.79 (1H, m), 1.67-1.25 (24H, m), 1.20 (1H, m) and 0.90 (3H, t) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} 71.4, 68.3, 54.5, 47.5, 45.5, 45.0, 38.7, 33.8, 33.1, 30.9, 30.8, 30.7, 30.5, 26.7, 26.6, 25.6, 23.8 and 14.5 ppm.



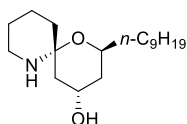
N-Chlorinated diol 40a. To a mixture of compound **39a** (9.4 mg, 31.3 μmol) in THF (1 mL), *N*-chlorosuccinimide (5.0 mg, 37.6 μmol) was added at room temperature and left under stirring for 1 h. The reaction mixture was quenched with water, then extracted with EtOAc three times. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. This mixture was used in the next reaction without further purification. HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{ClNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.2507, found 334.2495.



N-Chlorinated diol 40b. Compound **39b** (6.1 mg, 20.4 μmol) and *N*-chlorosuccinimide (3.3 mg, 24.4 μmol) were subjected to the procedure as described for **40a** to yield **40b**. This mixture was used in the next reaction without further purification. HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{ClNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.2507, found 334.2488.

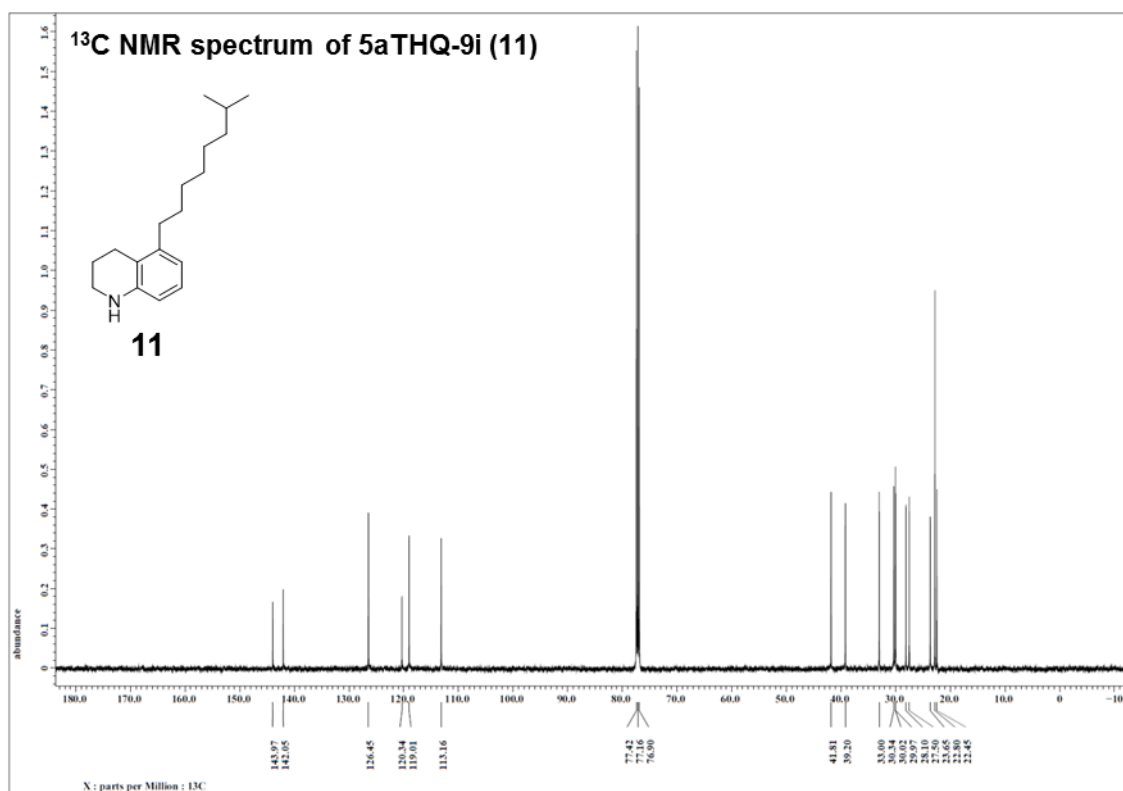
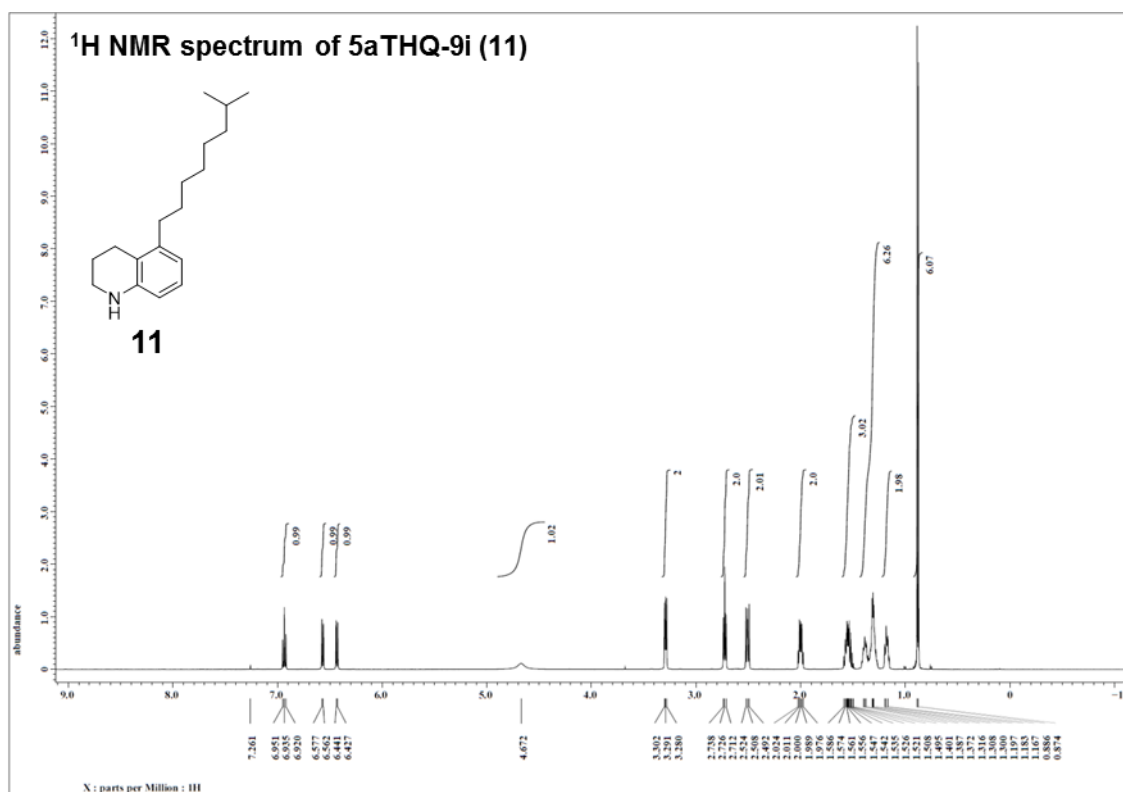


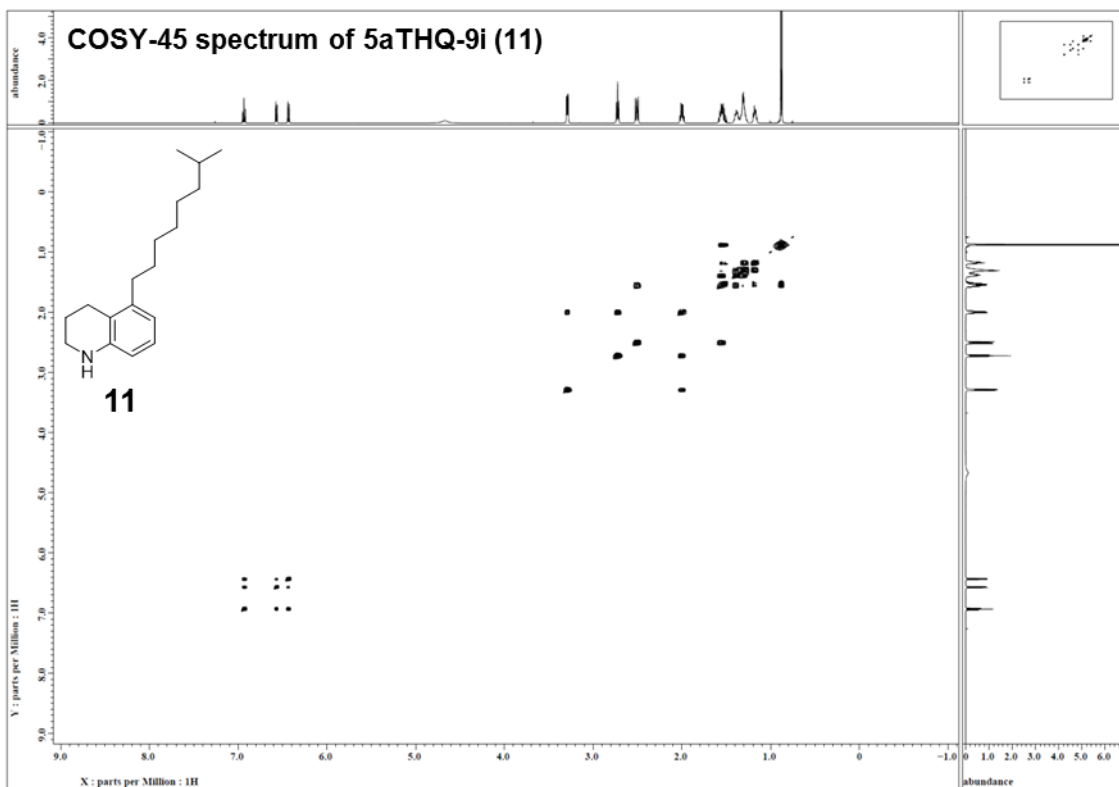
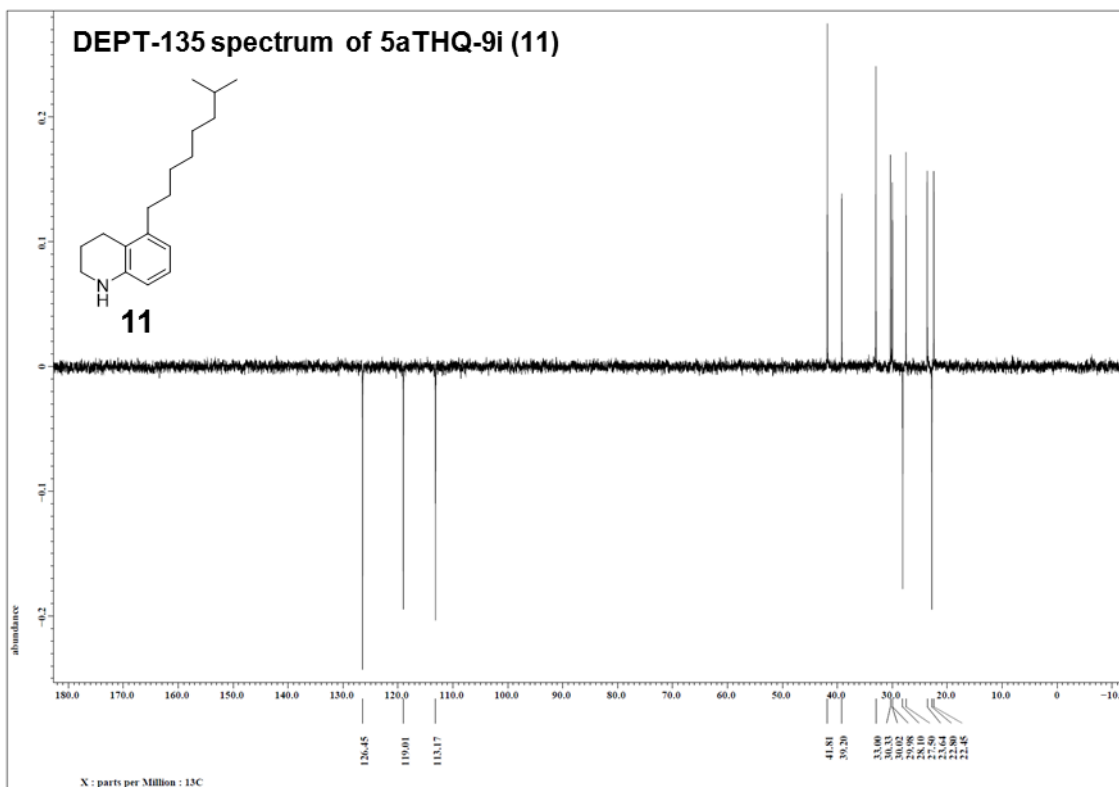
(2R,4R,6S)-STAM-9n (25a). To a solution of the mixture containing **40a** in CH_2Cl_2 (1 mL), DBU (9.3 μL , 62.6 μmol) was added dropwise at room temperature. The reaction is left under stirring for 10 h at room temperature. The reaction mixture was directly subjected to silica gel column chromatography. Fractions containing the product were combined and concentrated under reduced pressure. The residue was further purified by NH-silica column chromatography to yield **25a** (6.3 mg, 67% over 2 steps). A half of the free-base of **25a** was subjected to reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS, 63% MeOH/H₂O with 0.1% TFA) to afford a pure TFA salt as a colorless oil (3.3 mg): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +21.7$ (c 0.15, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298.2741, found 298.2733; the IR, ¹H and ¹³C NMR data were identical to those of natural **25**.

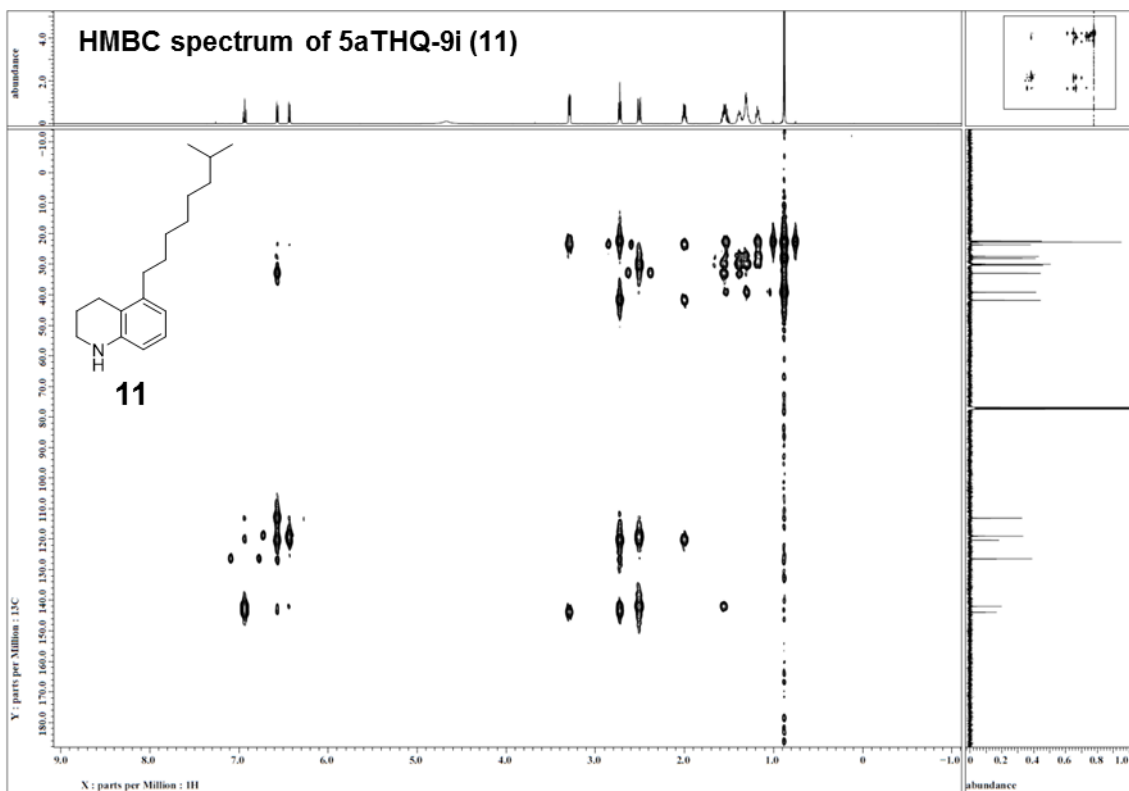
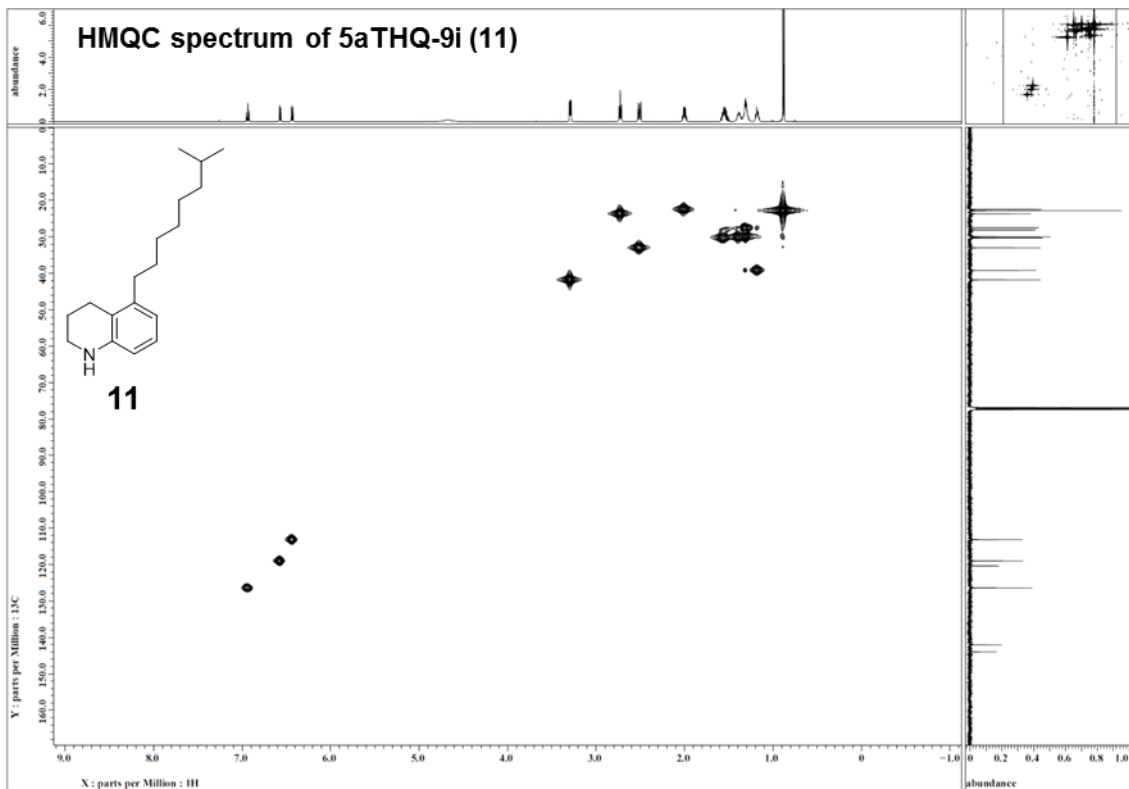


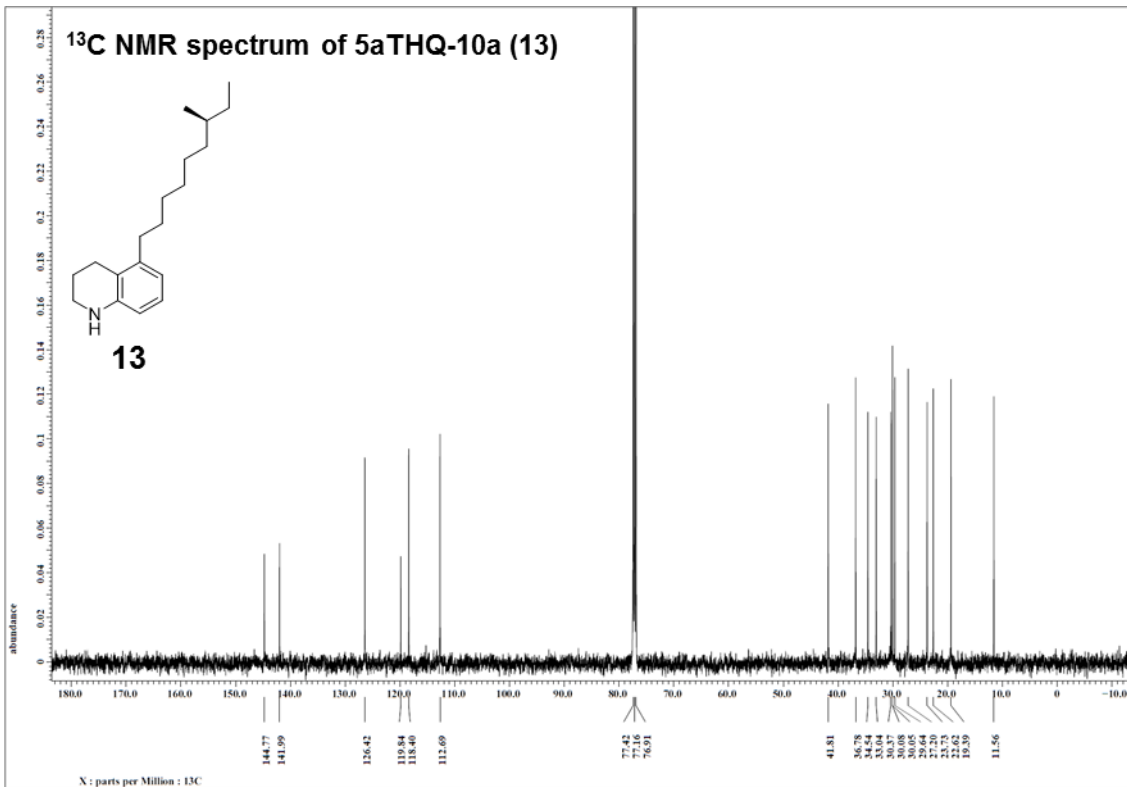
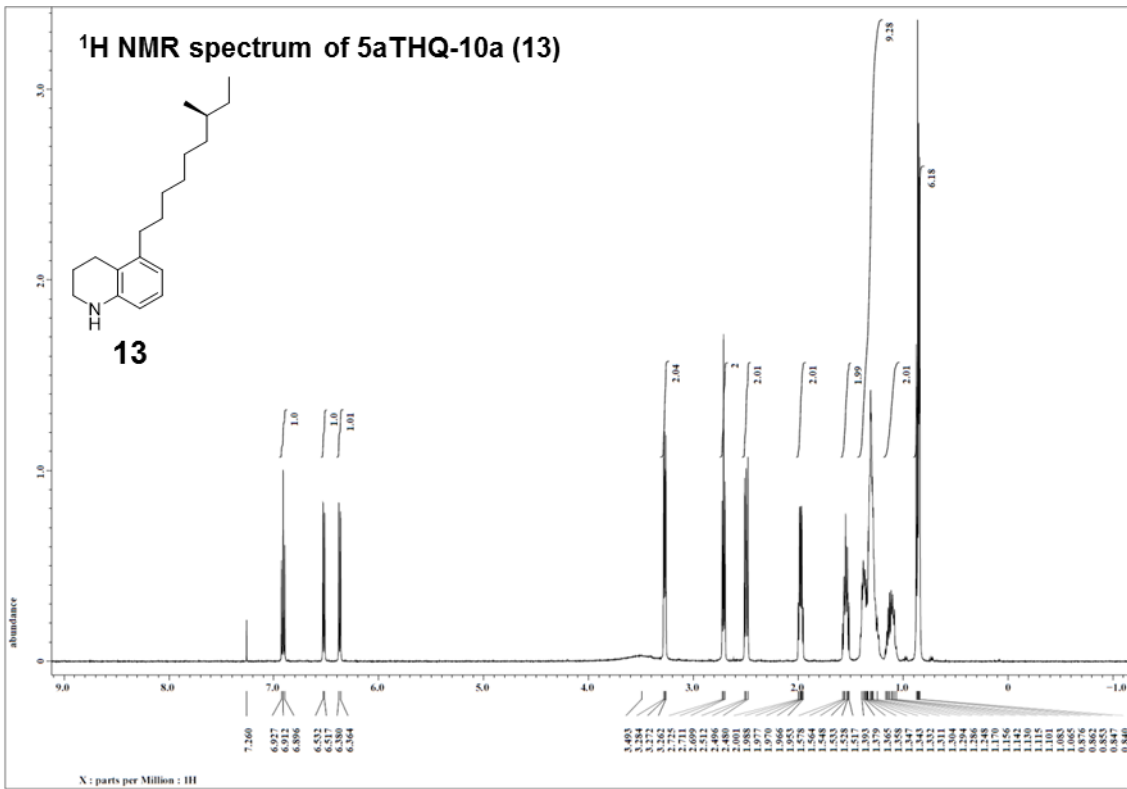
(2S,4S,6R)-STAM-9n (25b). The crude mixture containing **40b** and DBU (6.1 μL , 40.8 μmol) were subjected to the procedure as described for **25a** to yield **25b** (4.2 mg, 69% over 2 steps). The free-base of **25b** was subjected to reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₈-MS, 63% MeOH/H₂O with 0.1% TFA) to afford a pure TFA salt as a colorless oil (3.8 mg): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -17.4$ (c 0.15, MeOH); HR-ESI-MS m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298.2741, found 298.2729; the IR, ¹H and ¹³C NMR data were identical to those of natural **25**.

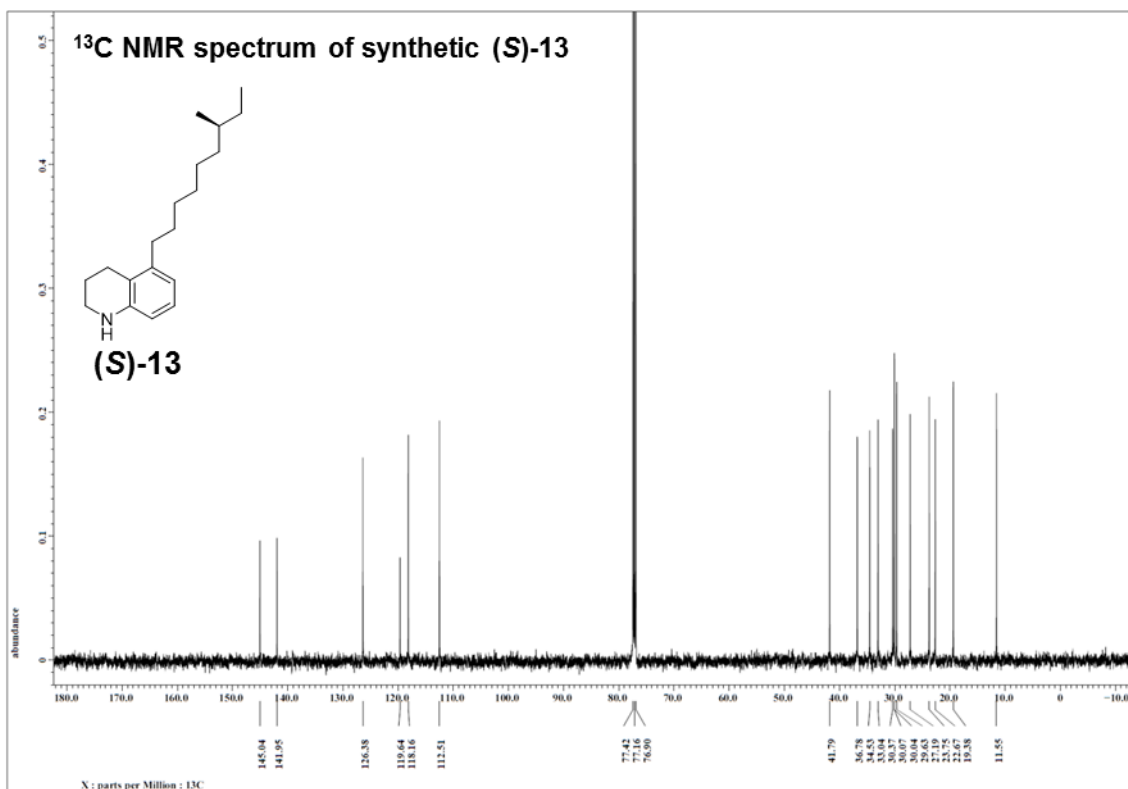
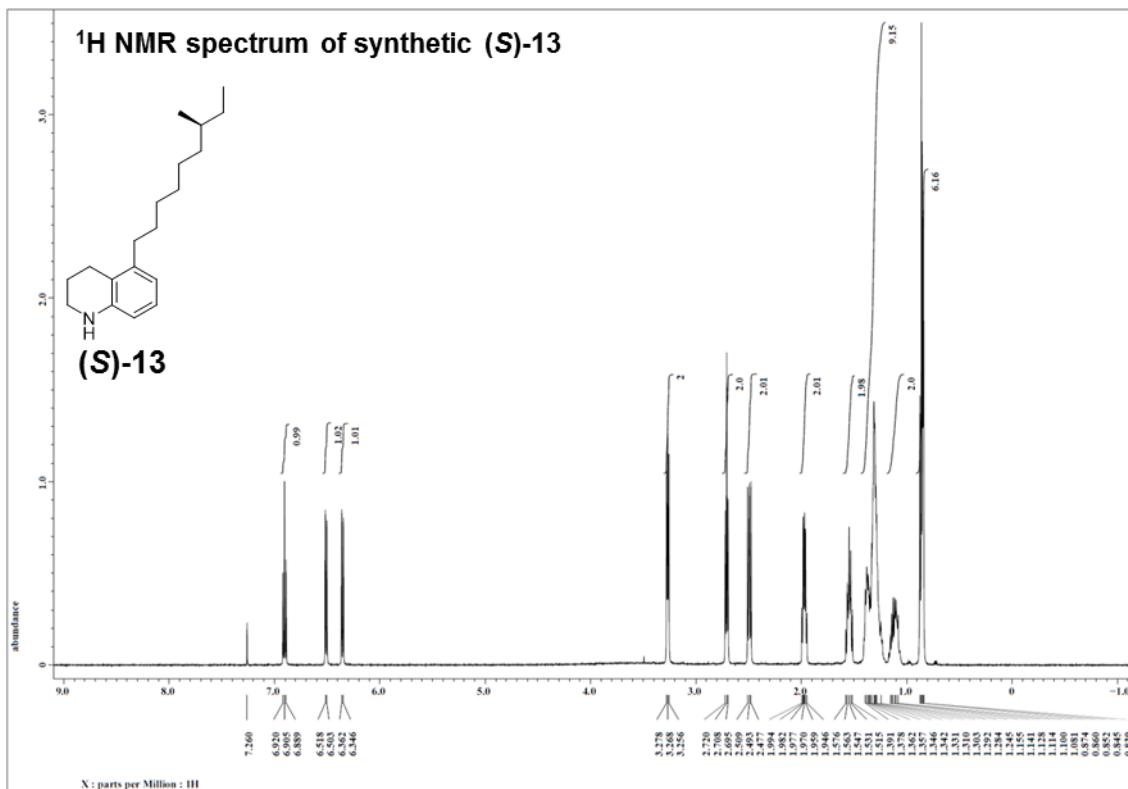
NMR spectroscopic data

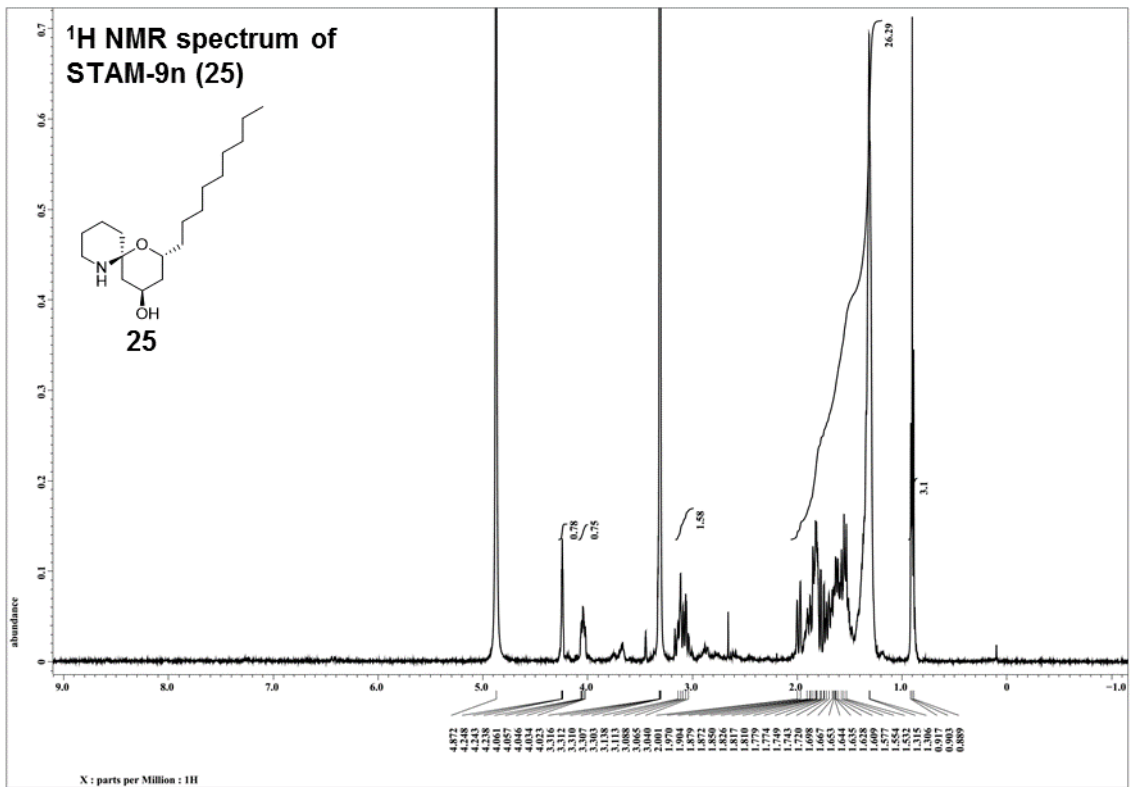
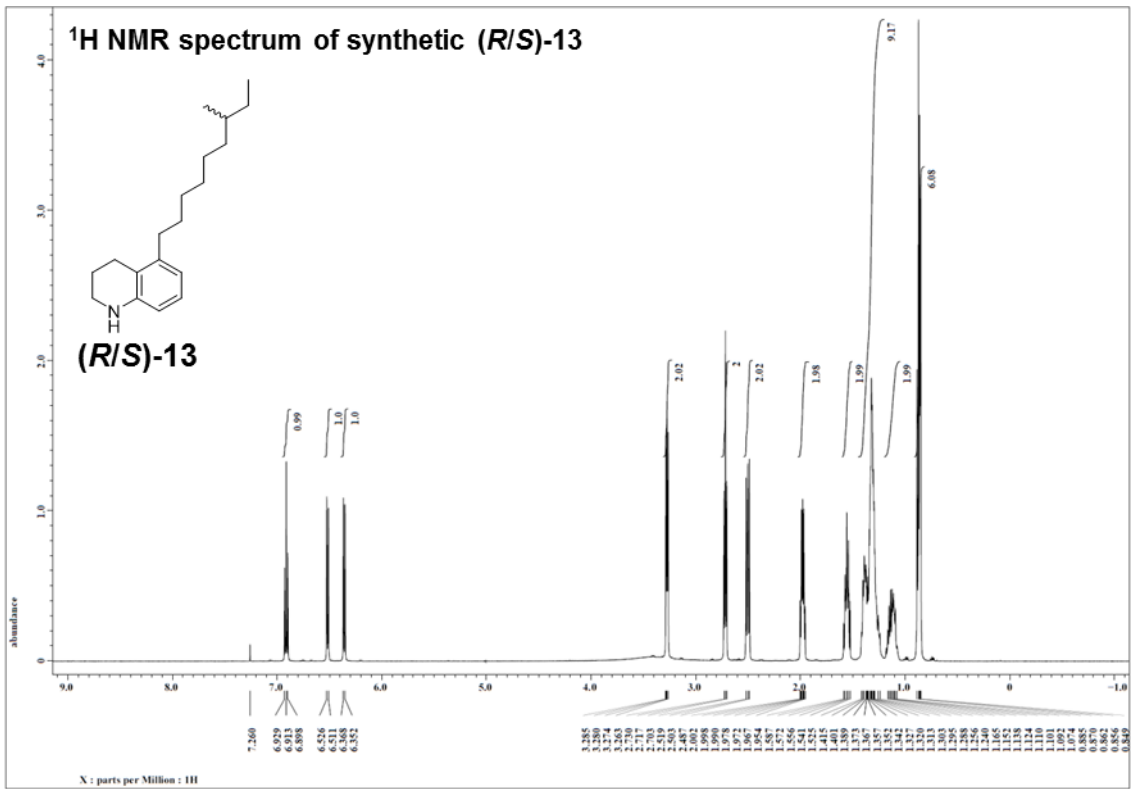


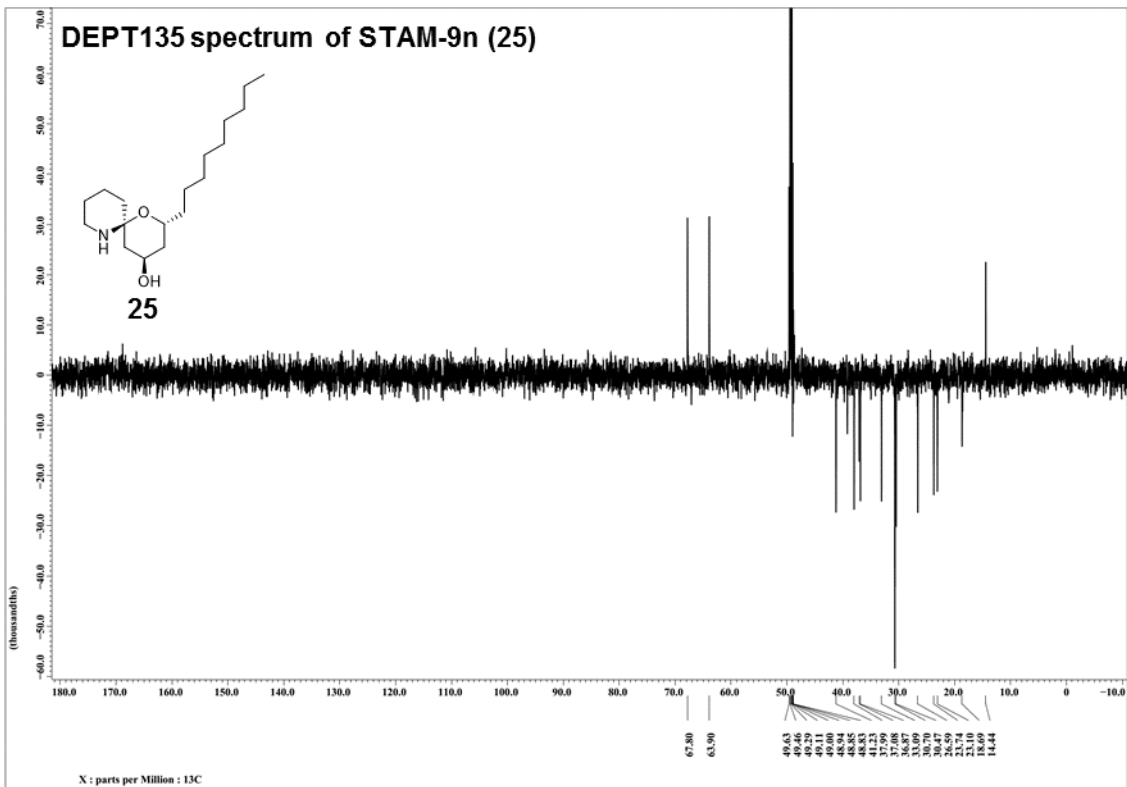
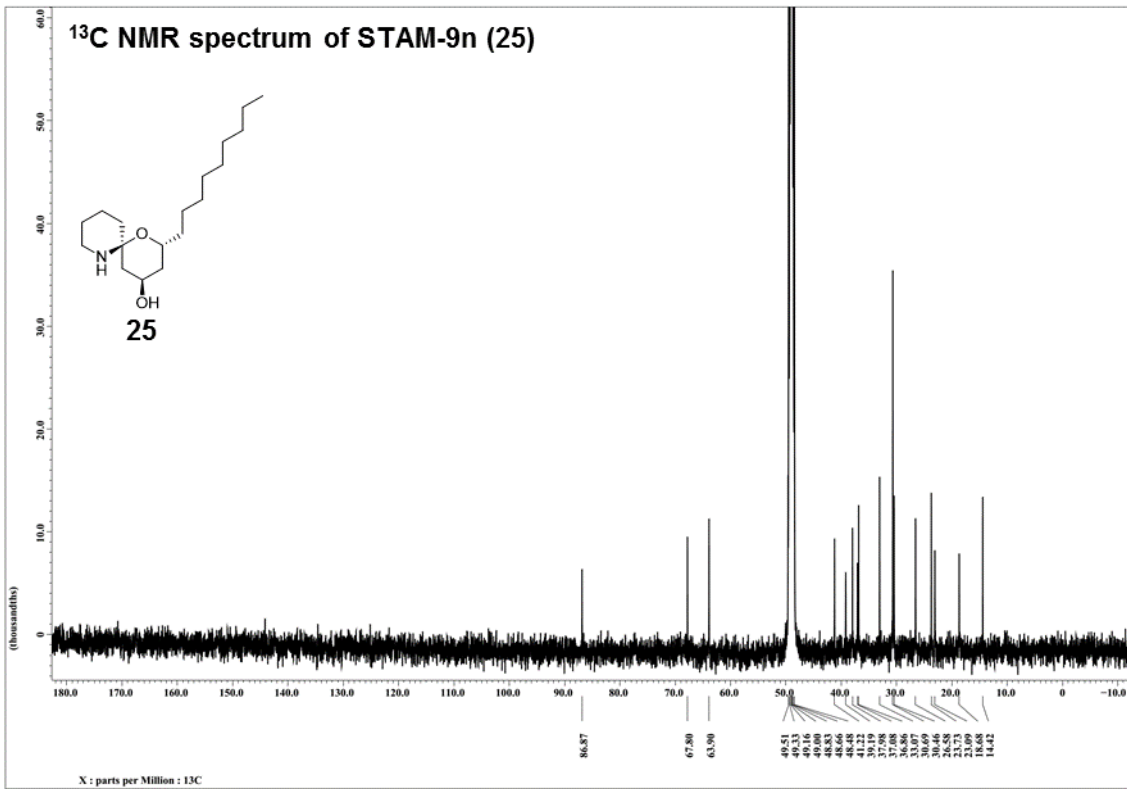


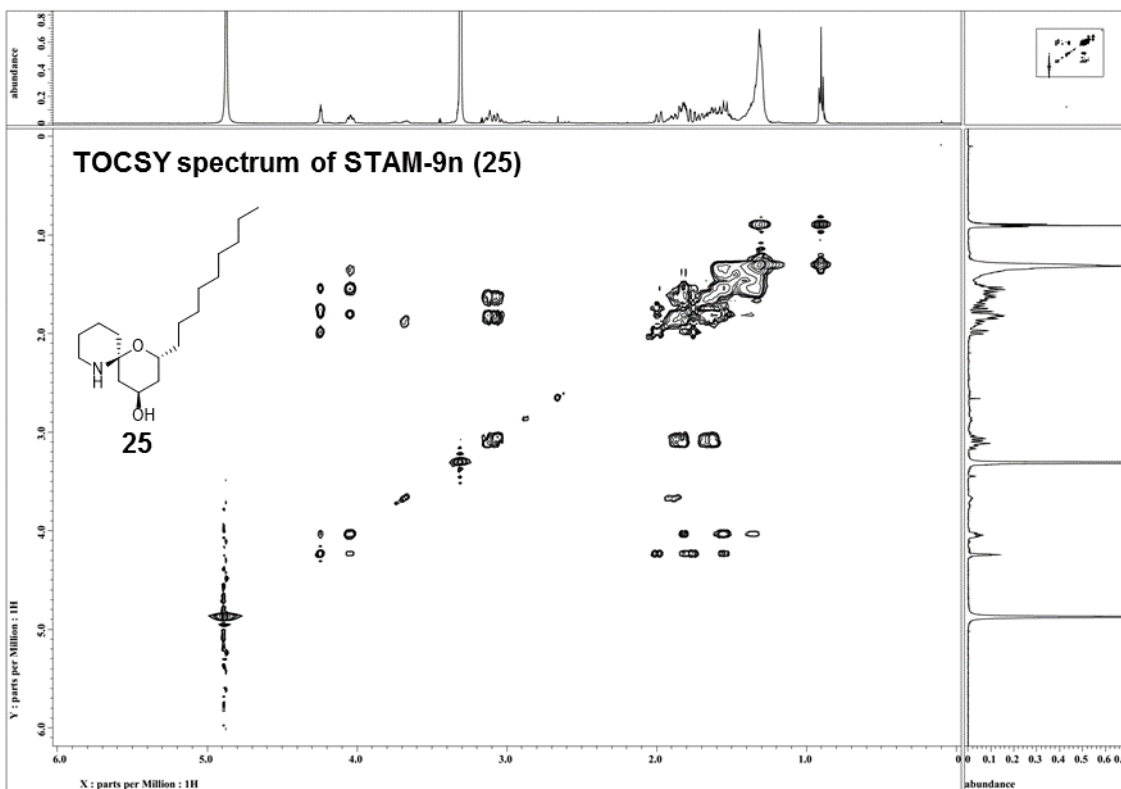
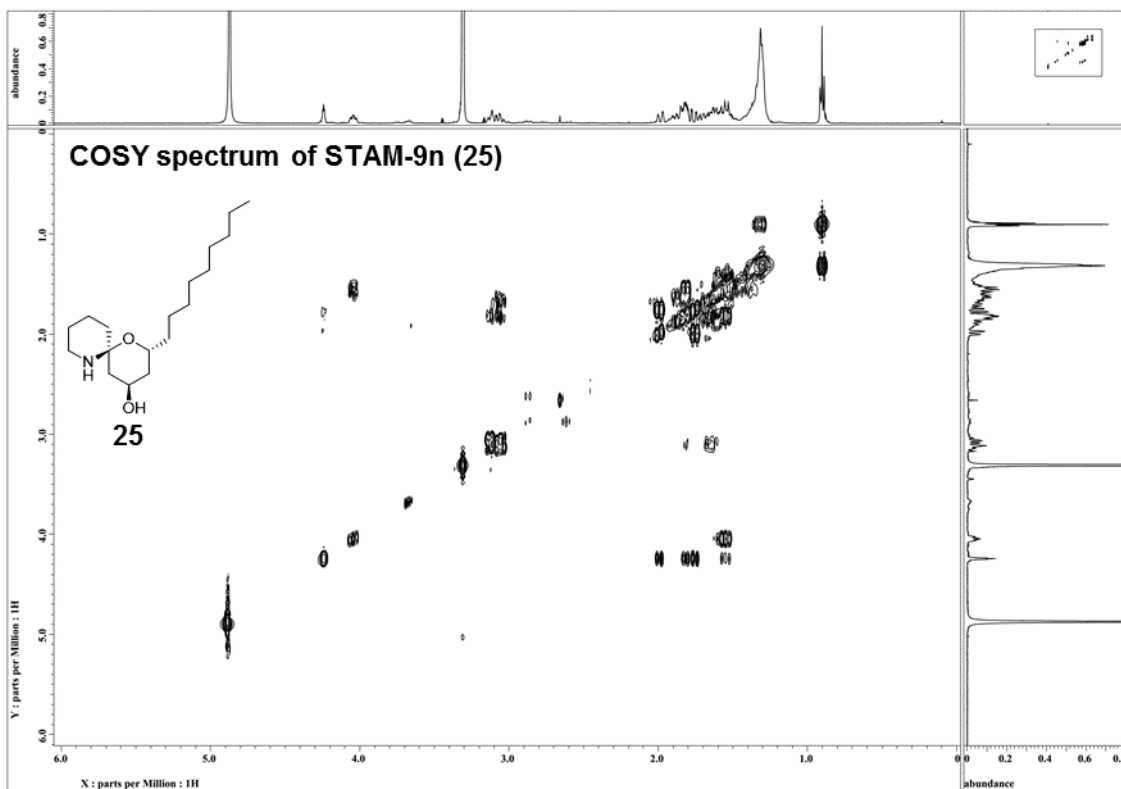


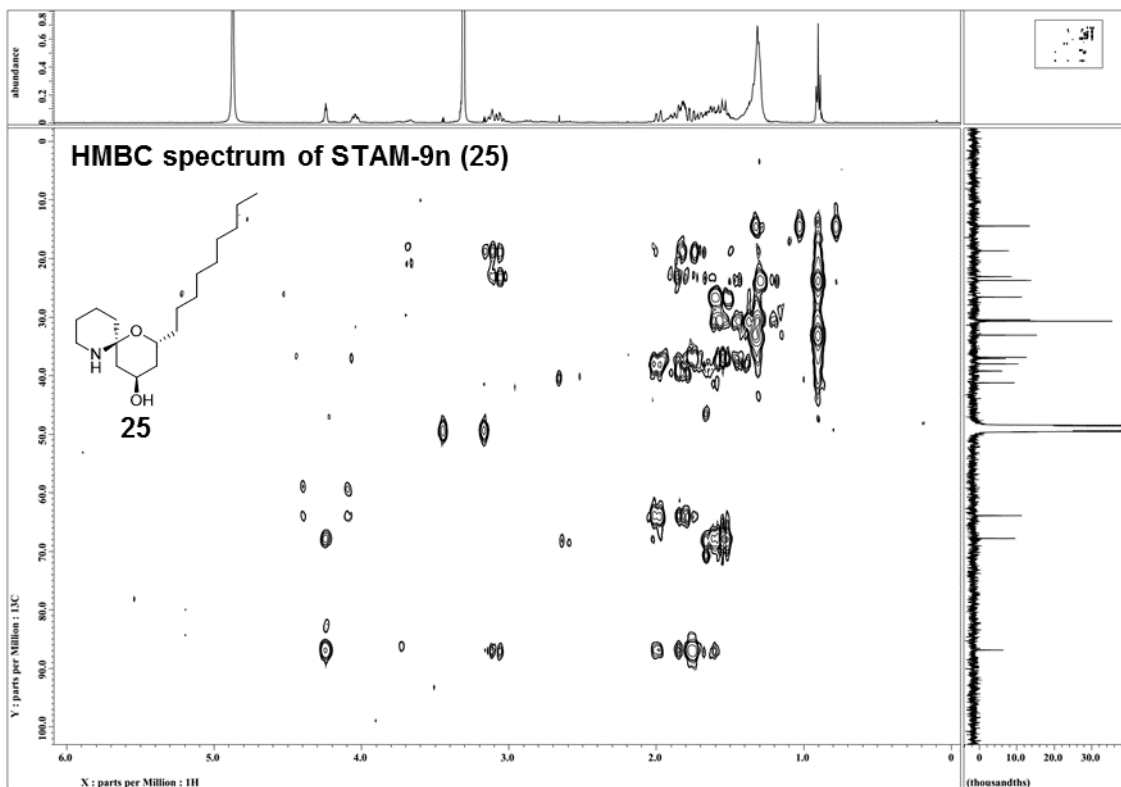
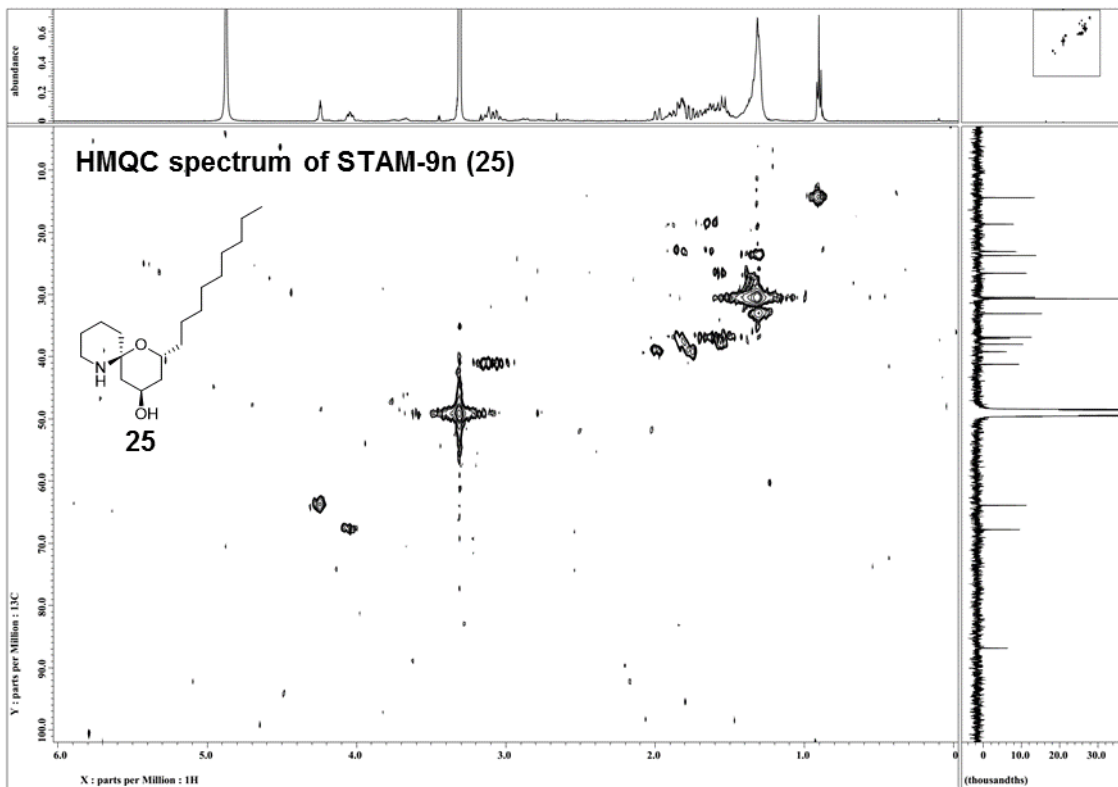


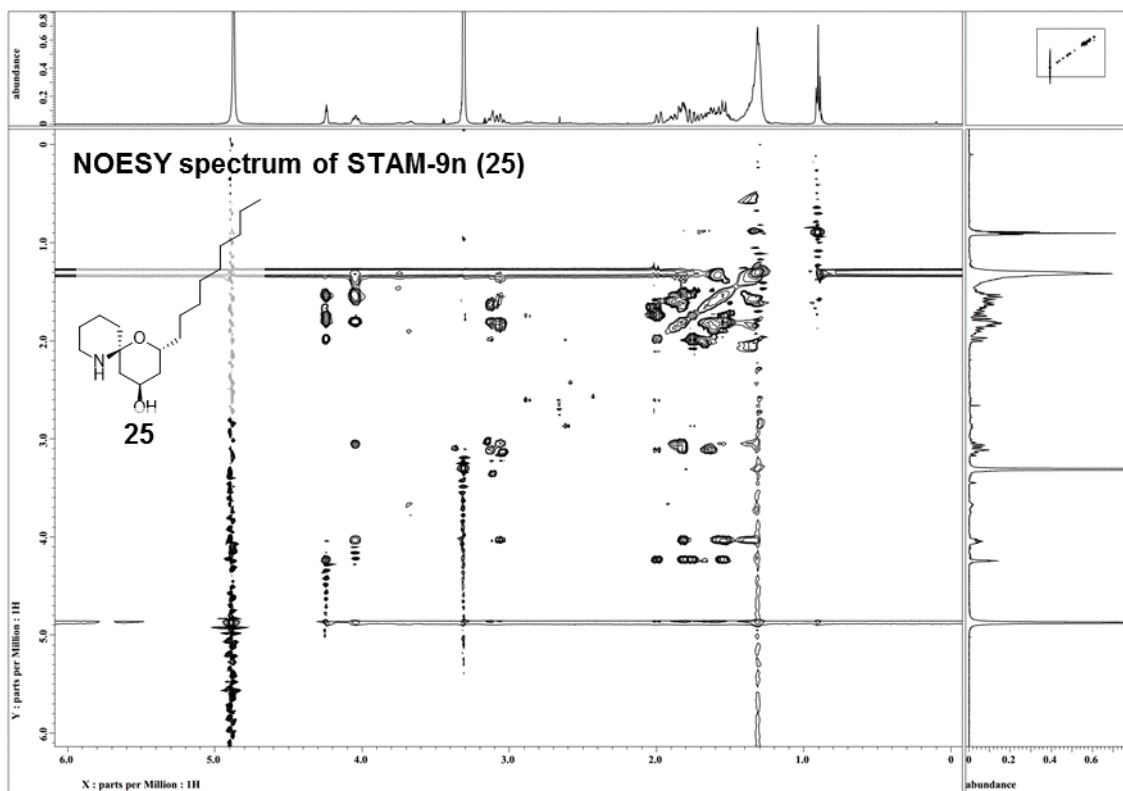
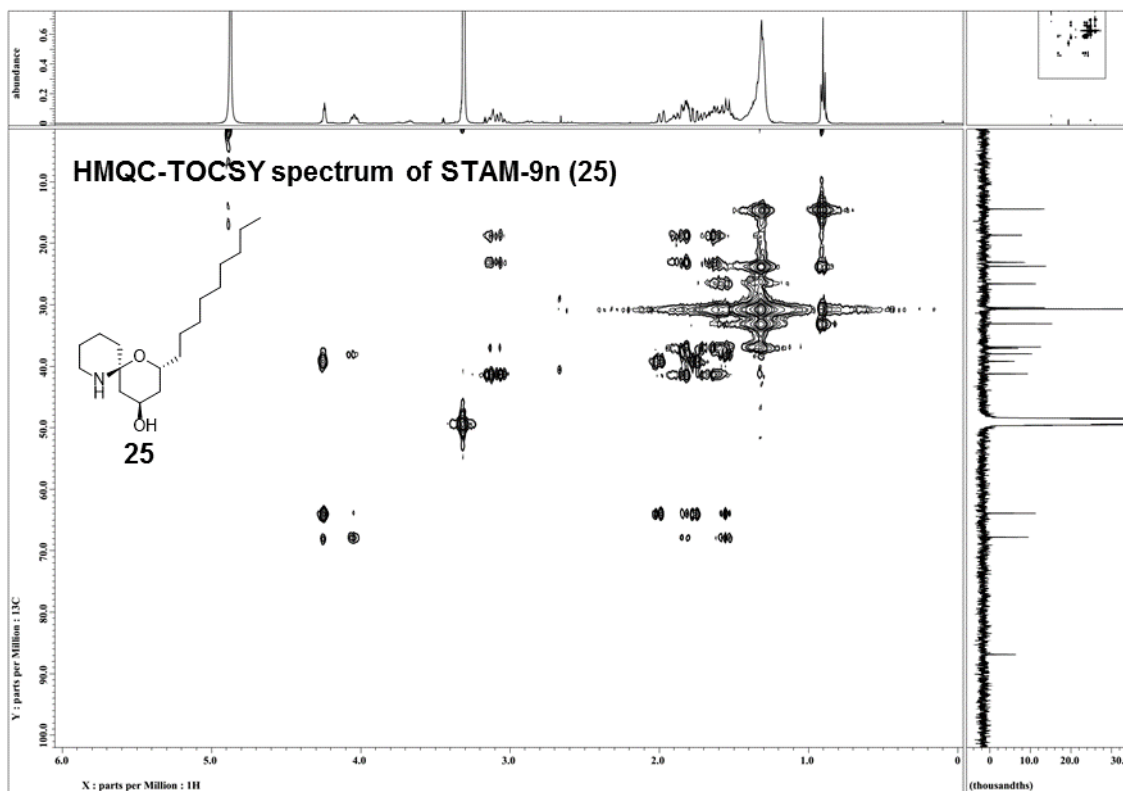


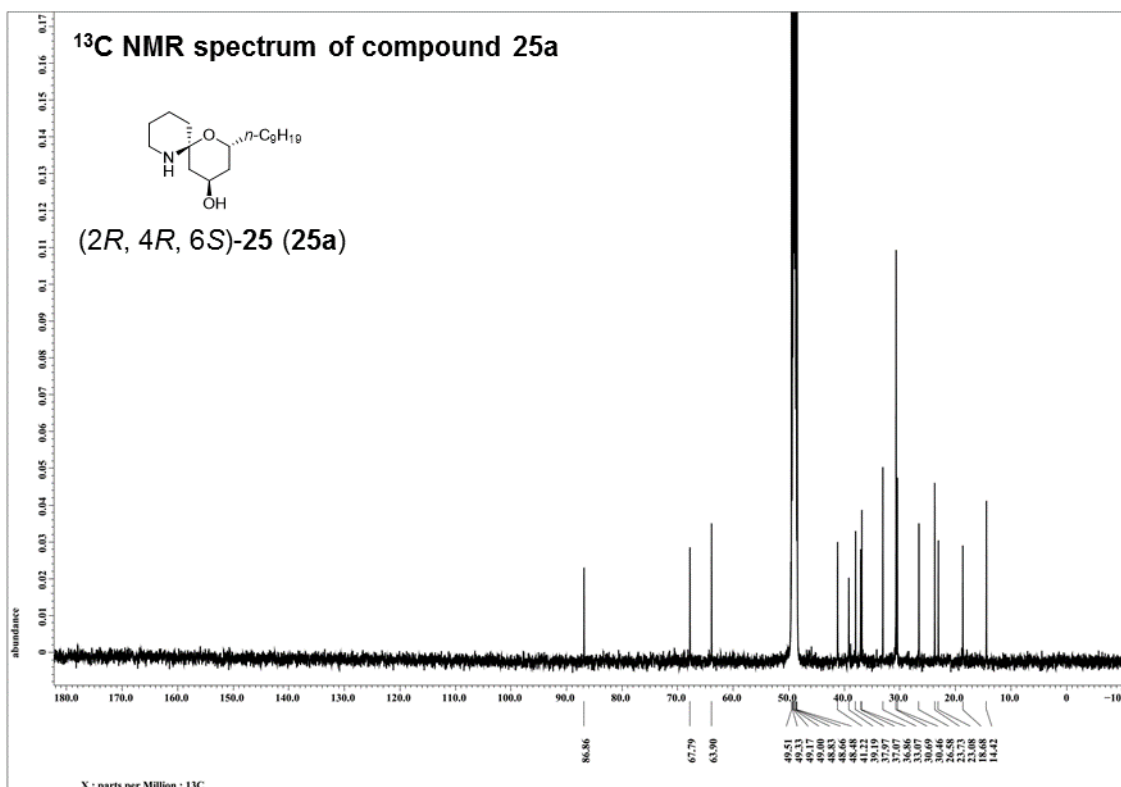
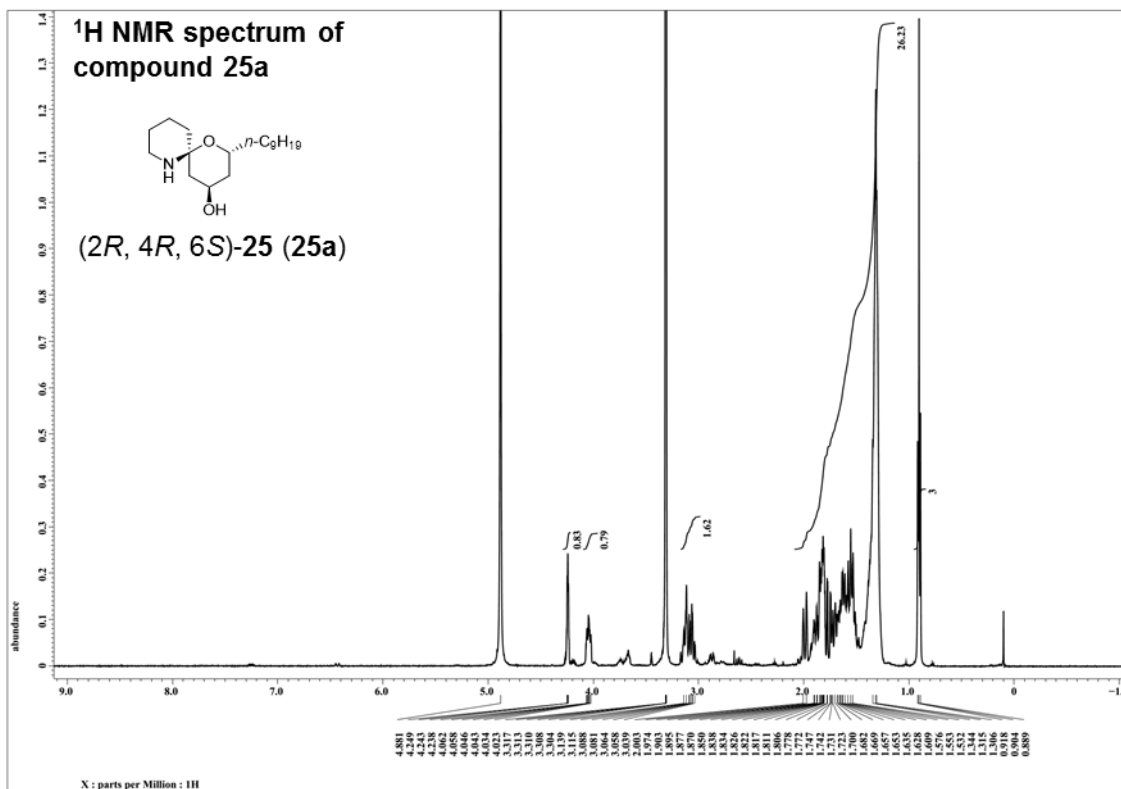


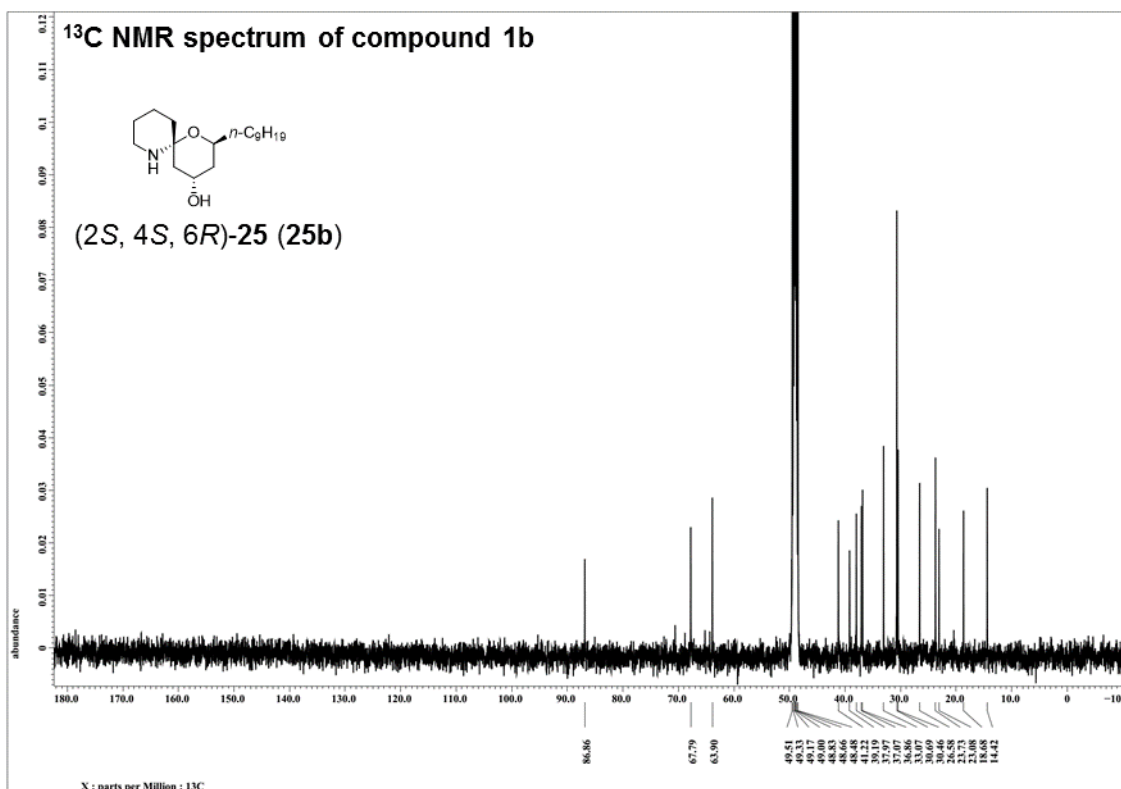
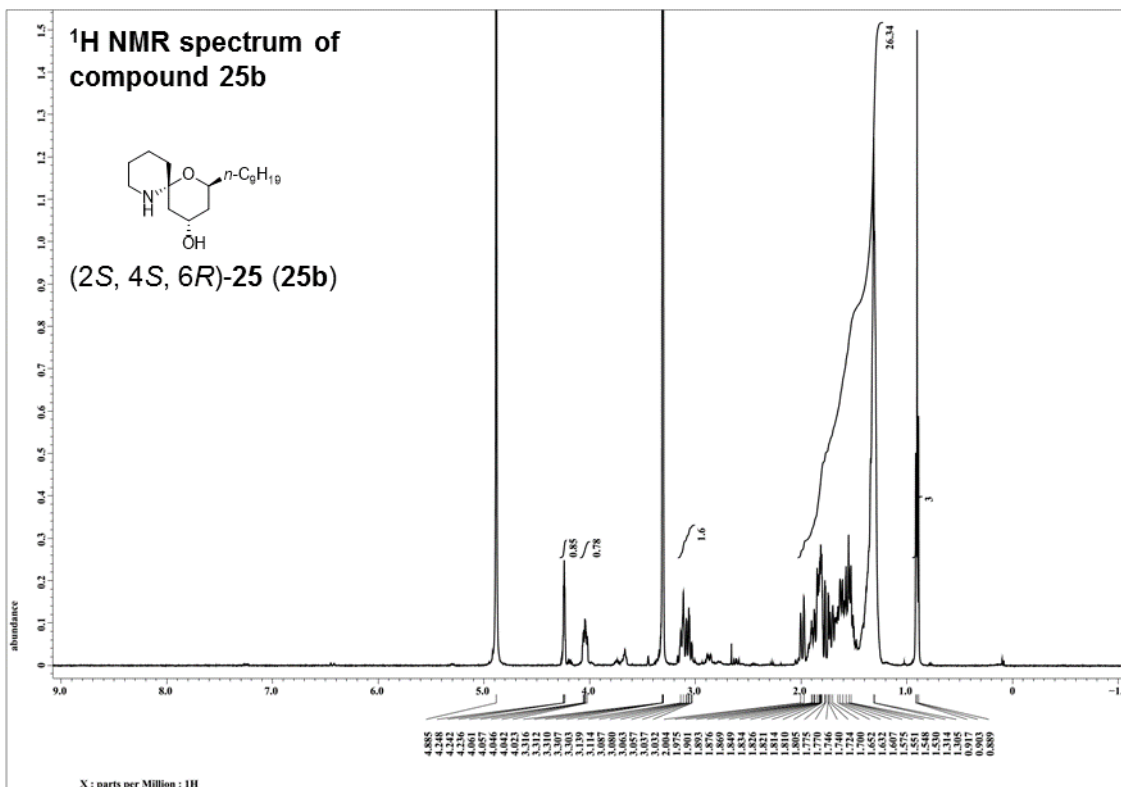












結語

本論文では、膜脂質に結合しユニークな生物活性を示す新しい天然有機化合物の取得と作用解析を目的とした研究を展開した。その結果、化合物探索系の構築と、heronamide 類・5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ) 類という 2 種類の化合物群の取得に成功した。また、続く作用機序解析から、いずれの化合物群も、構造・活性ともに新しいクラスの脂質結合物質であることが示された。これまでに知られている脂質結合化合物は、主に細胞毒性などを指標としたスクリーニングで見出された化合物グループの一部が、結果として脂質との結合性を示すものであったと解釈することができる。一方本研究では、はじめから脂質との結合を前提とした生理活性物質を取得目標とすることで、既知・新規を問わず、従来とは全く異なるクラスの化合物を脂質分子と関連付けられることを示した。化合物取得後の作用機序解析に重点を置いたため、結果的に 2 種類の化合物群の取得にとどまったが、所属研究室では数万サンプルの天然資源ライブラリーを利用可能である。そのため、今後も探索を継続することで、様々な化合物グループについて、脂質への結合能が新たに見出されてくると期待できる。

生体膜の解析ツールとしては、heronamide 類と 5aTHQ 類はそれぞれ異なる用途での適用が予想される。まず、heronamide 類は、theonellamide (TNM) 類と組み合わせた利用が効果的である。すなわち、スフィンゴ脂質の機能変調およびステロールの機能変調という 2 つの視点から類似の表現型を観察することで、両脂質が構成する膜ドメインである脂質ラフトの機能に迫れると期待できる。また、最近、東北大院薬の叶らにより heronamide C の提唱構造および修正構造の全合成が達成された⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾。これにより、複雑な構造をもつ TNM 類では困難な、合成誘導体による構造活性相関の展開が可能となった。実際に、水酸基の立体が反転している heronamide C 提唱構造では、二十員環のコンホメーションが大きく変化しており、生育阻害活性も天然物の 1/40 程度まで減弱することが示されている⁽⁷⁰⁾。さらに、本研究で明らかにした heronamide 類の分子標的が、よく似た両親媒性構造をもつポリエンマクロラクタム化合物全般に適用できるかどうか大きなポイントである。たとえば vicenistatin は、これまで分子標的は不明ながらも合成経路が既に確立されており、大員環のメチル基や糖の構造が抗腫瘍活性に影響するといった知見がある⁽⁷¹⁾。「ポリエンマクロラクタム＝脂質結合物質」であることが明らかになれば、わずかに構造の異なる多様な化合物をツールとして利用可能となり、膜脂質との相互作用モデルおよび膜脂質の機能に関する知見が飛躍的に蓄積していくと期待される。

一方 5aTHQ 類については、なぜ *erg* 遺伝子破壊株には効かないのかという点を明らかにしていくことで、膜ステロールの構造が細胞膜全体の性質に与える影響を明らかに

できると期待される。SPR 解析では、エルゴステロールの有無で人工膜との親和性に変化は見られないという結果が得られている。そのため、*erg* 遺伝子破壊株の細胞膜にも結合はするがその後の生育抑制に至るシグナル伝達が機能しないのか、それとも変異株の細胞膜にはやはり結合できないのかを判断することが重要と考えている。このような判断には、蛍光官能基などにより可視化した 5aTHQ 類の細胞内局在を経時的に観察するのが有効である。所属研究室では既に、5aTHQ 類の活性を保持する蛍光誘導体の開発に着手しており、それらを用いた解析に期待がかかる。また、凝集体の形成が脂質との相互作用や生物活性の発現に重要な役割を果たすという点も興味深い特徴であり、凝集体の構造解明も重要な課題である。

両化合物群に共通する大きな課題の一つは、エフェクタータンパク質の同定である。脂質分子に結合することで特徴的な表現型を誘導する化合物は、その脂質が構成する微小環境に存在するタンパク質の機能を変調するはずである。Heronamide 類についてはこれまでに Rho1・Bgs1 タンパク質の関与が確認されているが、脂質ラフトに局在するとされるタンパク質は多数知られるため、膜脂質の結合から Rho1 に至る過程に他のエフェクタータンパク質も関わっていると考えるのが自然である。著者はこれまでに、出芽酵母の生育必須遺伝子を機能低下させた変異株コレクション (878 の DAmP 変異株⁽⁷²⁾) の heronamide 類・5aTHQ 類に対する感受性を網羅解析したが、有力なエフェクタータンパク質候補の同定には至っていない。分裂酵母でも同様の手法を適用し、化合物処理による表現型を精査することで、特定の遺伝子変異株の表現型との類似性を見出すことが可能と考えられる。

最後に、本研究で得られた重要な副産物である streptoaminal (STAM)類について触れる。放線菌、特に *Streptomyces* 属は、抗生物質をはじめ、創薬の観点からも重要な二次代謝産物を多数生産することが古くから知られる。しかし、1つの放線菌培養液から化学分析により見出される化合物数は多くても 10 種程度なのに対し、放線菌のゲノム上にコードされる生合成遺伝子クラスターは 20–40 個にも上ると見積もられている⁽⁷³⁾⁽⁷⁴⁾。複合培養法は、幅広い放線菌に適用可能なことも相まって、そのような休眠二次代謝産物を覚醒させる有効な手段といえる。一方で、複合培養法は 2010 年に報告された新しい現象であり、実際に生産が活性化される新規化合物の同定例はまだ数報にとどまるため、5aTHQ 類・STAM 類のようにユニークな構造・活性の天然物取得につながることを示せたのは大きい。放線菌とミコール酸含有細菌の微生物間コミュニケーションの解析モデルとして両化合物群を利用し、生産調節の分子メカニズムを解明すれば、休眠二次代謝産物の生産活性化の合理的なコントロールが実現可能と期待される。さらに、5aTHQ 類の脂質結合能、STAM 類の幅広い抗菌活性、同一酵素群による生合成、そして複合培養による生産制御を関連付けることに成功すれば、「二次代謝産物の生理的役割」という、実験的な証明が難しい研究テーマにも挑戦できると期待している。

参考文献

- (1) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720.
- (2) Simons, K.; Ikonen, E. *Nature* **1997**, *387*, 569.
- (3) Simons, K.; Ehehalt, R. *J. clin. Invest.* **2002**, *110*, 597.
- (4) Goetz, J. G.; Minguet, S.; Navarro-Lérida, I.; Lazcano, J. J.; Samaniego, R.; Calvo, E.; Tello, C.; Osteso-Ibáñez, T.; Pellinen, T.; Echarri, A.; Cerezo, A.; Klein-Szanto, A. J. P.; Garcia, R.; Keely, P. J.; Sánchez-Mateos, P.; Cukierman, E.; Del Pozo, M. A. *Cell* **2011**, *146*, 148.
- (5) Simons, K.; Gerl, M. J. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *11*, 688.
- (6) Anderson, R. G.; Jacobson, K. *Science* **2002**, *296*, 1821.
- (7) Klemm, R. W.; Ejsing, C. S.; Surma, M. A.; Kaiser, H. J.; Gerl, M. J.; Sampaio, J. L.; de Robillard, Q.; Ferguson, C.; Proszynski, T. J.; Shevchenko, A.; Simons, K. *J. Cell. Biol.* **2009**, *185*, 601.
- (8) Lehár, J.; Stockwell, B. R.; Giaever, G.; Nislow, C. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 674.
- (9) de Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57.
- (10) Palacios, D. S.; Dailey, I.; Siebert, D. M.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6733.
- (11) Nishimura, S.; Arita, Y.; Honda, M.; Iwamoto, K.; Matsuyama, A.; Shirai, A.; Kawasaki, H.; Takeya, H.; Kobayashi, T.; Matsunaga, S.; Yoshida, M. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 519.
- (12) Nishimura, S.; Ishii, K.; Iwamoto, K.; Arita, Y.; Matsunaga, S.; Ohno-Iwashita, Y.; Sato, S. B.; Takeya, H.; Kobayashi, T.; Yoshida, M. *PLoS One* **2013**, *8*, e83716.
- (13) Arita, Y.; Nishimura, S.; Ishitsuka, R.; Kishimoto, T.; Ikenouchi, J.; Ishii, K.; Umeda, M.; Matsunaga, S.; Kobayashi, T.; Yoshida, M. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 604.
- (14) Wachtler, V.; Rajagopalan, S.; Balasubramanian, M. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 867.
- (15) Hampsey, M. *Yeast* **1997**, *13*, 1099.
- (16) Iwaki, T.; Iefuji, H.; Hiraga, Y.; Hosomi, A.; Morita, T.; Giga-Hama, Y.; Takegawa, K. *Microbiology* **2008**, *154*, 830.
- (17) Bhuiyan, M. S.; Ito, Y.; Nakamura, A.; Tanaka, N.; Fujita, K.; Fukui, H.; Takegawa, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1075.
- (18) Raju, R.; Piggott, A. M.; Conte, M. M.; Capon, R. J., R. J. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4682.
- (19) Jørgensen, H.; Degnes, K. F.; Sletta, H.; Fjærvik, E.; Dikiy, A.; Herfindal, L.; Bruheim, P.; Klinkenberg, G.; Bredholt, H.; Nygard, G.; Doskeland, S. O.; Ellingsen, T. E.; Zotchev, S. B. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1109.
- (20) Jørgensen, H.; Degnes, K. F.; Dikiy, A.; Fjærvik, E.; Klinkenberg, G.; Zotchev, S. B. *Appl.*

Environ. Microbiol. **2010**, *76*, 283.

- (21) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092.
- (22) Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807.
- (23) Espiritu, R. A.; Matsumori, N.; Murata, M.; Nishimura, S.; Kakeya, H.; Matsunaga, S.; Yoshida, M. *Biochemistry* **2013**, *52*, 2410.
- (24) Shui, G.; Guan, X. L.; Low, C. P.; Chua, G. H.; Goh, J. S.; Yang, H.; Wenk, M. R. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 1008.
- (25) Feoktistova, A.; Magnelli, P.; Abeijon, C.; Perez, P.; Lester, R. L.; Dickson, R. C.; Gould, K. L. *Genetics* **2001**, *158*, 1397.
- (26) Lingwood, D.; Simons, K. *Science* **2010**, *327*, 46.
- (27) Liu, J.; Tang, X.; Wang, H.; Oliferenko, S.; Balasubramanian, M. K. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 989.
- (28) Kaulin, Y. A.; Takemoto, J. Y.; Schagina, L. V.; Ostroumova, O. S.; Wangspa, R.; Teeter, J. H.; Brand, J. G. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, *37*, 339.
- (29) Shindo, K.; Kamishohara, M.; Odagawa, A.; Matsuoka, M.; Kawai, H. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1076.
- (30) Futamura, Y.; Sawa, R.; Umezawa, Y.; Igarashi, M.; Nakamura, H.; Hasegawa, K.; Yamasaki, M.; Tashiro, E.; Takahashi, Y.; Akamatsu, Y.; Imoto, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1822.
- (31) Kobayashi, H.; Harada, H.; Nakamura, M.; Futamura, Y.; Ito, A.; Yoshida, M.; Iemura, S.; Shin-ya, K.; Doi, T.; Takahashi, T.; Natsume, T.; Imoto, M.; Sakakibara, Y. *BMC Chem. Biol.* **2012**, *12*, 2.
- (32) Deng, L.; Sugiura, R.; Ohta, K.; Tada, K.; Suzuki, M.; Hirata, M.; Nakamura, S.; Shuntoh, H.; Kuno, T. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27561.
- (33) Nakano, K.; Arai, R.; Mabuchi, I. *Genes Cells* **1997**, *2*, 679.
- (34) Chemler, S. R.; Trauner, D.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 4544.
- (35) Jana, R.; Pathak, T. P.; Sigman, M. S. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1417.
- (36) Mori, K.; Suguro, T.; Uchida, M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3119.
- (37) Ohru, H.; Terashima, H.; Imaizumi, K.; Akasaka, K. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2002**, *78*, 69.
- (38) Imaizumi, K.; Terashima, H.; Akasaka, K.; Ohru, H. *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 1243.
- (39) Ohru, H.; Matsui, M. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2007**, *83*, 127.
- (40) Akasaka, K.; Ohru, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 153.
- (41) Akasaka, K.; Tamogami, S.; Beeman, R. W.; Mori, K. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 201.
- (42) Lu, Y. J.; Beeman, R. W.; Campbell, J. F.; Park, Y.; Aikins, M. J.; Mori, K.; Akasaka, K.; Tamogami, S.; Phillips, T. W. *Naturwissenschaften* **2011**, *98*, 755.

- (43) Mori, K.; Ohtaki, T.; Ohrui, H.; Berkebile, D. R.; Carlson, D. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1089.
- (44) Akasaka, K.; Carlson, D. A.; Ohtaka, T.; Ohrui, H.; Mori, K.; Berkebile, D. R. *Med. Vet. Entomol.* **2009**, 23, 126.
- (45) Shikichi, Y.; Akasaka, K.; Tamogami, S.; Shankar, S.; Yew, J. Y.; Mori, K. *Tetrahedron* **2012**, 68, 3750.
- (46) Mori, K.; Akasaka, K.; Matsunaga, S. *Tetrahedron* **2014**, 70, 392.
- (47) Onaka, H.; Mori, Y.; Igarashi, Y.; Furumai, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 400.
- (48) Hoshino, S.; Zhang, L.; Awakawa, T.; Wakimoto, T.; Onaka, H.; Abe, I. *J Antibiot* **2014**, 68, 342.
- (49) Hoshino, S.; Wakimoto, T.; Onaka, H.; Abe, I. *Org Lett* **2015**, 17, 1501.
- (50) Evans, D. A.; Rieger, D. L.; Gage, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7099.
- (51) Chen, K.; Hardtmann, G. E.; Prasad, K.; Repič, O.; Shapiro, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 155.
- (52) Mukaiyama, T.; Hoshino T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5339.
- (53) Jiang, D.; Chen, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 9181.
- (54) van der Hoeven, R. S.; Steffens, J. C. *Plant Physiology* **2000**, 122, 275.
- (55) Katritzky, A. R.; Rachwal, S.; Rachwal, B. *Tetrahedron* **1996**, 52, 15031.
- (56) Sridharan, V.; Suryavanshi, P. A.; Menendez, J. C. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 7157.
- (57) Nammalwar, B.; Bunce, R. A. *Molecules* **2013**, 19, 204.
- (58) Boonlarppradab, C.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Org. Lett.*, **2008**, 10, 5505.
- (59) Laluces, H. M. C.; Nakayama, A.; Nonato, M. G.; dela Cruz, T. E.; Tan, M. A. *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* **2015**, 5, 151.
- (60) Nakajima, M.; Itoi, K.; Takamatsu, Y.; Kinoshita, T.; Okazaki, T.; Kawakubo, K.; Shindo, M.; Honma, T.; Tohjigamori, M.; Haneishi, T. *J. Antibiot.* **1991**, 44, 293.
- (61) Briggs, L. H.; Harvey, W. E.; Locker, R. H.; McGillivray, W. A.; Seelye, R. N. *J. Chem. Soc.* **1950**, 3013.
- (62) Zhang, L.; Liu, J. O. *J. Immun.* **2001**, 166, 5611.
- (63) Heerklotz, H.; Seelig, J. *Biophys. J.* **2001**, 81, 1547.
- (64) Chen, Y.; Sun, T.; Sun, Y.; Huang, H. W. *Biochemistry* **2014**, 53, 5384.
- (65) Martinez, J. S.; Zhang, G. P.; Holt, P. D.; Jung, H.; Carrano, C. J.; Haygood, M. G.; Butler, A. *Science* **2000**, 287, 1245.
- (66) Gobin, J.; Moore, C. H.; Reeve, J. R.; Wong, D. K.; Gibson, B. W.; Horwitz, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 5189.
- (67) Austin, M. B.; Saito, T.; Bowman, M. E.; Haydock, S.; Kato, A.; Moore, B. S.; Kay, R. R.; Noel, J. P. *Nat Chem Biol.* **2006** 2, 494.

- (68) Masschelein, J.; Mattheus, W.; Gao, L.; Moons, P.; Houdt, R. V.; Uytterhoeven, B.; Lamberigts, C.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Herdewijn, P.; Aertsen, A.; Michiels, C.; Lavigne, R. *PLoS One* **2013**, *8*, e54143.
- (69) Sakanishi, K.; Itoh, S.; Sugiyama, R.; Nishimura, S.; Kakeya, H.; Iwabuchi, Y.; Kanoh, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 1376.
- (70) 叶直樹; 伊藤俊哉; 寺嶋優太; 坂西航平; 岩渕好治; 藤田航平; 杉山龍介; 西村慎一; 掛谷秀昭; 第 57 回 天然有機化合物討論会 (2015)
- (71) Fukuda, H.; Nishiyama, Y.; Nakamura, S.; Ohno, Y.; Eguchi, T.; Iwabuchi, Y.; Usui, T.; Kanoh, N. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2872.
- (72) Breslow, D. K.; Cameron, D. M.; Collins, S. R.; Schuldiner, M.; Stewart-Ornstein, J.; Newman, H. W.; Braun, S.; Madhani, H. D.; Krogan, N. J.; Weissman, J. S. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 711.
- (73) Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Challis, G. L. Thomson, N. R. James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C. H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Rabinowitsch, E.; Rajandream, M. A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. A. *Nature* **2002**, *417*, 141.
- (74) Ikeda, H.; Shin-ya, K.; Omura, S. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 233.

Reprint Permission for *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *11*, 688. (For **Figure 1** of this thesis).

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 27, 2016

This is a License Agreement between Ryosuke Sugiyama ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3797320995040
License date	Jan 27, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Molecular Cell Biology
Licensed content title	Revitalizing membrane rafts: new tools and insights
Licensed content author	Kai Simons and Mathias J. Gerl
Licensed content date	Oct 1, 2010
Volume number	11
Issue number	10
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Screening and target identification for natural products targeting membrane lipids
Expected completion date	Mar 2016
Estimated size (number of pages)	120
Total	0 JPY
Terms and Conditions	

論文目録

Sugiyama, R.; Nishimura, S.; Kakeya, H.

“Stereochemical reassignment of heronamide A, a polyketide macrolactam from *Streptomyces* sp.”

平成 25 年 3 月発行 *Tetrahedron Letters* 第 54 巻第 12 号 1531 頁～1533 頁に掲載

Sugiyama, R.; Nishimura, S.; Matsumori, N.; Tsunematsu, Y.; Hattori, A.; Kakeya, H.

“Structure and biological activity of 8-deoxyheronamide C from a marine-derived *Streptomyces* sp.: Heronamides target saturated hydrocarbon chains in lipid membranes”

平成 26 年 3 月発行 *Journal of the American Chemical Society* 第 136 巻第 14 号 5209 頁～5212 頁に掲載

Sugiyama, R.; Nishimura, S.; Ozaki, T.; Asamizu, S.; Onaka, H.; Kakeya, H.

“5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*”

平成 27 年 3 月発行 *Organic Letters* 第 17 巻第 8 号 1918 頁～1921 頁に掲載

Sugiyama, R.; Nishimura, S.; Ozaki, T.; Asamizu, S.; Onaka, H.; Kakeya, H.

“Discovery and chemical synthesis of streptoaminals, antimicrobial [5,5]-spirohemiaminals from the combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*”

投稿準備中

謝辞

本研究を遂行するにあたり、長年のご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科・掛谷秀昭教授に厚く御礼申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科・大野浩章教授ならびに松崎勝巳教授には、本論文の査読をして頂き、多くのご教示を賜りました。深甚なる感謝の意を表します。

東京大学大学院農学生命科学研究科・尾仲宏康教授、浅水俊平助教、尾崎太郎助教には、heronamide 類生産菌の培養と、5aTHQ 類生産菌の複合培養ならびに遺伝子操作を行って頂いたほか、本研究を進める上で様々なアイデアを賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

Streptomyces sp. NSU893 培養液をご供与下さいました佐藤誠造博士と片山政志博士（日本水産株式会社）、分裂酵母変異株を提供して下さいました竹川薫教授（九州大院農）、Kathleen L. Gould 教授（Vanderbilt Univ.）、久野高義教授（神戸大院医）、中野賢太郎准教授（筑波大院生命環境）、そして SPR 測定実験をご指導頂きました村田道雄教授（大阪大院理）、松森信明教授（九州大院理）、中川泰男博士（大阪大院理）に深く感謝申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科・服部明准教授ならびに西村慎一助教には、研究者としての基礎的な技能について多岐にわたるご指導を頂いたほか、私生活においても様々な場面でご助力を賜りました。心より感謝申し上げます。

掛谷研究室において様々なお助言、ご指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科・石川文洋助教、酒井佑宜博士（現 横浜薬科大薬・講師）、恒松雄太博士（現 静岡県立大院薬・助教）、高橋伸明博士、そして研究生活の中で苦楽を共にした先輩、同期、後輩に深謝いたします。

最後に、大学院生活を支えてくれた家族ならびに妻の長年の理解と協力に心から感謝します。

2016年3月
杉山 龍介