

序論.....	1
---------	---

第一章 HIF-1 阻害剤 verucopeptin に関する研究

1.1 諸言.....	2
1.2 Verucopeptin の絶対立体化学.....	2
1.2.1 環状デプシペプチド部位の絶対立体化学.....	3
1.2.2 テトラヒドロピラン環周辺の絶対立体化学.....	3
1.2.3 鎖状脂肪酸部位の絶対立体化学.....	7
1.2.4 分岐メチルの相対立体推測法の改良.....	10
1.3 Verucopeptin の作用機序.....	13
1.3.1 HIF-1 標的遺伝子の発現に対する verucopeptin の効果.....	14
1.3.2 HIF-1 α の翻訳段階に対する verucopeptin の効果.....	14
1.3.3 HSP60 に対する verucopeptin の効果.....	17
1.4 結論.....	20
1.5 実験項およびスペクトルデータ.....	22
1.6 参考文献.....	43

第二章 プロリン資化阻害物質 lipopeptide 類に関する研究

2.1 緒言.....	45
2.2 Lipopeptide 類の単離.....	45
2.3 Lipopeptide 類の構造決定.....	48
2.3.1 Lipopeptide B の構造決定.....	48
2.3.2 Lipopeptide A の構造決定.....	53
2.4 Lipopeptide 類の生物活性評価.....	56
2.4.1 分裂酵母のアミノ酸資化に対する lipopeptide 類の効果.....	56
2.4.2 細胞膜に対する lipopeptide 類の効果.....	56
2.4.3 Lipopeptide 類の抗菌活性.....	58
2.5 結論.....	60
2.6 実験項およびスペクトルデータ.....	62
2.7 参考文献.....	67

総括.....	69
---------	----

謝辞

略語一覽

Ac: acetyl

AIB: α -amino isobutyric acid

ATP: adenosine triphosphate

Bn: benzyl

bnip3: BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein interacting protein 3

CD: circular dichroism

DDQ: 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone

DIEA: *N,N*-diisopropylethylamine

DMAP: *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMOG: dimethyloxaloylglycine

DMP: 2,2-dimethoxypropane

DMSO: dimethyl sulfoxide

Et: ethyl

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FDAA: *N*-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-alaninamide

FDLA: *N*-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-leucinamide

FKBP12: FK506 binding protein 12

Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

glut: glucose transporter

HBTU: 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HOBt: hydroxybenzotriazole

HPLC: high pressure liquid chromatography

HRE: hypoxia response element

HSP: heat shock protein

IDH2: isocitrate dehydrogenase 2

LAH: lithium aluminum hydride

LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry

MAP: mitogen activated protein

Me: methyl

MDH: malate dehydrogenase

MEK: MAPK/ERK kinase

MS/MS: tandem mass spectrometry

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1

MTPA: α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid

mRNA: messenger ribonucleic acid

NADH: nicotinamide adenine dinucleotide

NaHMDS: sodium bis(trimethylsilyl)amide
NMR: nuclear magnetic resonance
ODS: octa decyl silyl
PEG: polyethylene glycol
PGME: phenylglycine methyl ester
PHD: prolyl hydroxylase
PKM2: pyruvate kinase M2
PKS: polyketide synthase
PMB: *p*-methoxybenzyl
PPTS: pyridinium *p*-toluenesulfonate
ROS: reactive oxygen species
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
SLF: synthetic ligand of FKBP
S6K: S6 kinase
TBAB: tetrabutylammonium bromide
TCA: tricarboxylic acid
TFA: trifluoroacetic acid
Tf₂O: trifluoromethanesulfonic anhydride
TGF-β: transforming growth factor-β
THF: tetrahydrofuran
THP: tetrahydropyrane
Ts: tosyl
tRNA: transfer ribonucleic acid
Ub: ubiquitin
vegf: vascular endothelial growth factor
VHL: von Hippel-Lindau

序論

年間 64 万人以上の日本人ががんに罹患し、がんは心疾患・脳血管疾患を抑え日本人の死因の第 1 位の疾患である。近年、様々な有効な抗がん剤が開発されがん治療の満足度は向上している。一方で、既存の抗がん剤が効かないがんは難治性がんと呼ばれ、難治性がんの有効な治療薬の開発は遅れているのが現状である。生存に必要な栄養と酸素が不足した環境で生育可能な能力を有するがん細胞内では低酸素誘導因子 HIF-1 が血管新生を促進し、改変したアミノ酸代謝機構が限られた栄養源から効果的な代謝システムを構築している (Figure 1)。がん細胞の生存戦略を標的にする化合物は副作用の少ない抗がん剤になり得る。本研究では特異ながんの代謝メカニズムを標的とした抗がん剤の創製を目指して、HIF-1 (第一章) とアミノ酸資化 (第二章) を阻害する天然有機化合物の探索と作用機序解析を行った。

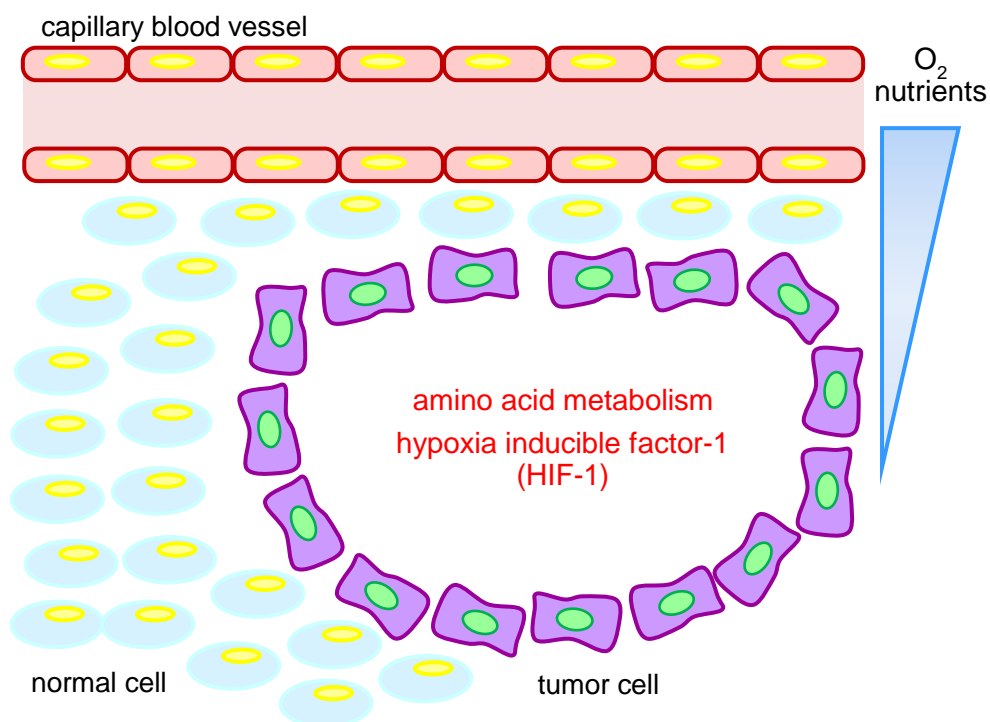


Figure 1. The surrounding environment of tumor lump.

第一章 HIF-1 阻害剤 verucopeptin に関する研究

1.1 諸言

低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor; HIF) は、低酸素環境における細胞の恒常性維持に関わる多様な遺伝子の発現を調節する転写因子である¹。例えば、HIF-1 は血管内皮増殖因子による血管新生を促進し、糖輸送担体によるグルコースの取り込みを上昇させ、解糖系を活性化することでエネルギー産生能を維持させる。HIF はヘテロ二量体として働き、これまでに HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α と HIF-1 β サブユニットが知られている。なかでも酸素濃度依存的にタンパク質量が調節されている HIF-1 α は低酸素環境下でのがん細胞の生存において中心的な役割を果たしており、がん化学療法の標的因子として注目されている。これまでに HIF-1 を標的とした抗がん剤探索が行われ、いくつかの化合物が報告されている²。例えば、rapamycin は mTORC1 複合体の阻害を介して³、geldanamycin は HSP90 の阻害を介して HIF-1 α タンパク質の新生を抑制する⁴。また、echinomycin は HIF-1 の DNA 結合を阻害することで HIF-1 の活性を抑制する⁵。しかし、未だ HIF-1 阻害剤の上市には至っていない。

このような背景のもと本研究では HIF-1 を阻害する化合物の取得を目指した。所属研究室では HIF-1 の DNA 結合配列の制御下でルシフェラーゼ遺伝子を発現する細胞を用いたレポーターアッセイにより、HIF-1 阻害活性を示す微生物培養液抽出物 (ブロス) の探索が行われていた。本スクリーニングでは HIF-1 を制御する新規作用点を標的にする化合物の取得を期待し HIF-1 阻害活性を細胞レベルで評価した。探索源に関しても標的分子へ高い選択性を示す化合物を含むことがあるブロスを探査資源とすることで HIF-1 選択的な阻害剤の取得を目指した。

これまでに所属研究室では約 5000 のブロスを上記スクリーニング系に付し、強力かつ選択的な阻害活性がみられた *Streptomyces* 属放線菌 KUSC-A08 株の培養液抽出物から、二層分配と各種クロマトグラフィーによって verucopeptin (**1**) を単離していた (Figure 1-1)。

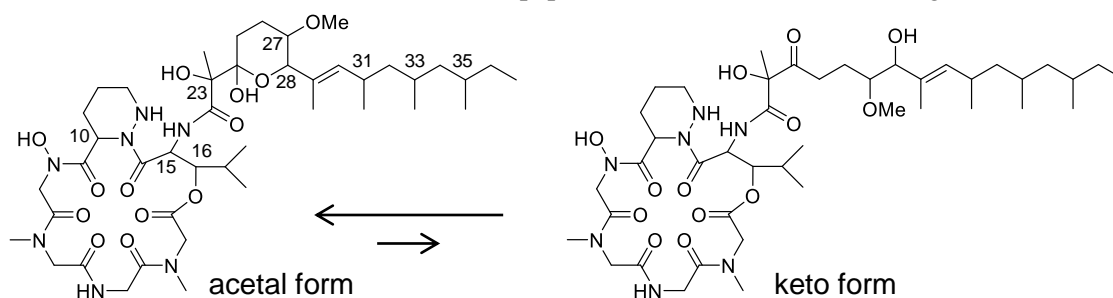


Figure 1-1. Chemical structure of verucopeptin (**1**). The ratio of acetal form and keto form is about 3:1 in CDCl_3 at room temperature.

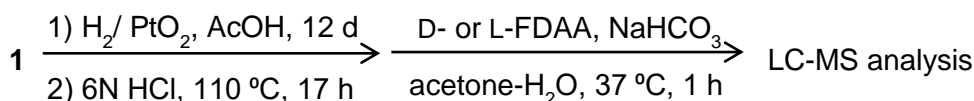
1.2 Verucopeptin の絶対立体化学

Verucopeptin は 1993 年に抗腫瘍物質として報告されたものの⁶、HIF-1 阻害剤としての報告はなかった。本化合物は環状デプシペプチド部位と側鎖脂肪酸部位から構成されており、側鎖脂肪酸部位が THP 環を形成するアセタールフォームと直鎖状のケトフォームが存在する。本化合物の全 9 ヶ所の不斉点の立体構造は未決定であったため、本研究ではまず verucopeptin

の立体構造を決定した。

1.2.1 環状デプシペプチド部位の絶対立体化学

Verucopeptin の環状デプシペプチド部位は glycine、*N*-hydroxy glycine、2 分子の *N*-methyl glycine、piperazic acid、 β -hydroxy leucine で構成されている。不斉点を有する piperazic acid および β -hydroxy leucine の絶対立体配置の決定には改良 Marfey 法⁷を適用することとした。すなわち、**1** を接触水素添加に付すことで piperazic acid を ornithine に導いた後、酸加水分解を行い、L-FDAA と反応させた。得られた混合物を LC-MS によって溶出時間を標品と比較した (Table 1-1)。Piperazic acid については ornithine の FDAA 誘導体との比較により、 β -hydroxy leucine については合成した 4 種類の立体異性体⁸の FDAA 誘導体との比較により、それぞれ、D 体、*L*-erythro 体であると決定した。この結果から環状デプシペプチド部位の絶対立体配置は 10*R*, 15*S*, 16*S* と決定した。



	retention time of standard amino acids ^a (min)		retention time of hydrolysate of natural products (min)
	L	D	
threo-3-hydroxyleucine	17.0 (53.9) ^b	25.8	-
erythro-3-hydroxyleucine	17.1 (55.2) ^b	23.1	17.1 (55.3) ^b
ornithine	29.1	27.6	27.7

a, Samples were analyzed by ODS HPLC on Cosmosil AR-II (ϕ 4.6 \times 250 mm) using a gradient system (30/70 to 80/20 MeCN/H₂O gradient elution containing 0.1% TFA over 50 min, 1 mL/min).

b, 25/75 to 30/70 MeCN/H₂O gradient elution containing 0.1% TFA over 60 min, 1 mL/min.

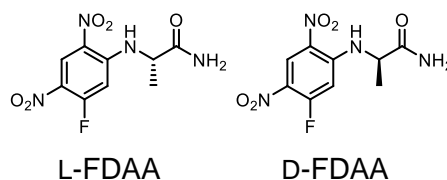


Table 1-1. Advanced Marfey's analysis of verucopeptin (**1**). (a) Preparation of FDAA derivatives. (b) Comparison of the retention time of standards and those of FDAA derivatives derived from verucopeptin.

1.2.2 テトラヒドロピラン環周辺の絶対立体化学

Verucopeptin (**1**) を還元することで得られる誘導体 **2** に対して改良 Mosher 法⁹を適用することで 24, 28 位の絶対立体配置を決定する。23 位は 1,2-diol のアセトニド保護体の NMR 解析により決定できる 23, 24 位の相対立体配置に基づき、27 位は **1** の NMR スペクトル情報を用いた THP 環の配座解析により決定できると考えた。

Verucopeptin を NaBH_4 を用いて還元したところジアステレオマー混合物が得られ、HPLC による精製を経て主成分のジアステレオマー**2**を取得した (Figure 1-2)。

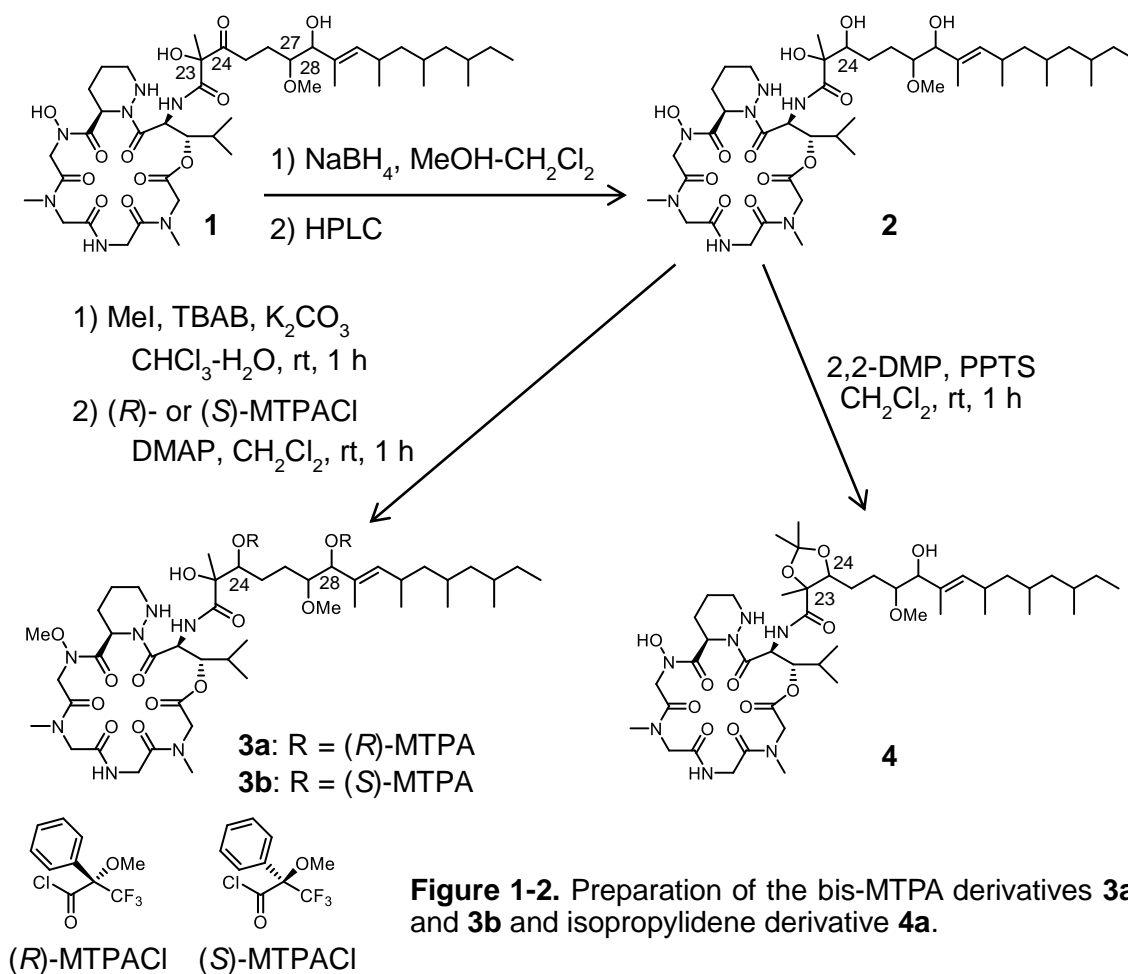


Figure 1-2. Preparation of the bis-MTPA derivatives **3a** and **3b** and isopropylidene derivative **4a**.

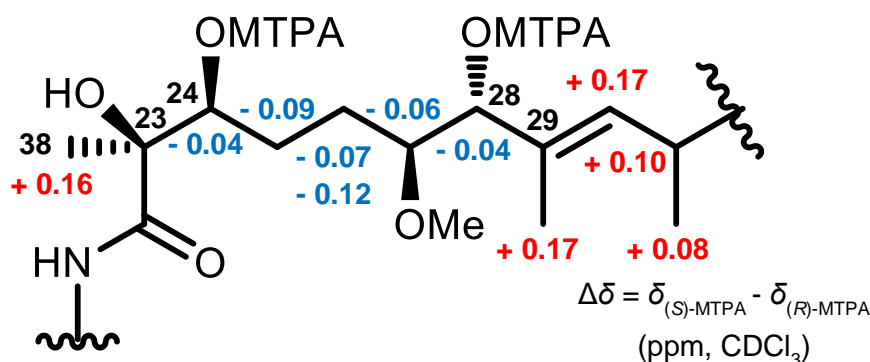


Figure 1-3. $\Delta\delta$ ($\delta_{(\text{S})\text{-MTPA}} - \delta_{(\text{R})\text{-MTPA}}$) values for the MTPA derivatives **3a** and **3b**. $\Delta\delta$ values are shown in ppm.

2 の *N*-hydroxyl 基をメチル基で保護した後、(*S*)- および(*R*)-MTPACI と反応させ、bis-MTPA 体 **3a**、**3b** を得た。化合物 **3a**、**3b** に改良 Mosher 法を適用した結果、38 位のメチル基と 29 位以降の炭化水素鎖は正の値を示し、24 位から 28 位は負の値を示したことから 24、28 位の絶対立体配置はそれぞれ *S*、*R* であると決定した (Figure 1-3)。

次に、**2** の 1,2-diol を isopropylidene 基で保護した **4** を調製し、NMR 解析を行ったところ、

isopropylidene 基の片側のメチルプロトンから 24 位メチンプロトンと 38 位メチルプロトンに、また、24 位メチンプロトンから 38 位メチルプロトンに NOE が観測され、23 位と 24 位の水酸基は *syn* の関係にあることが判明した (Figure 1-4)。

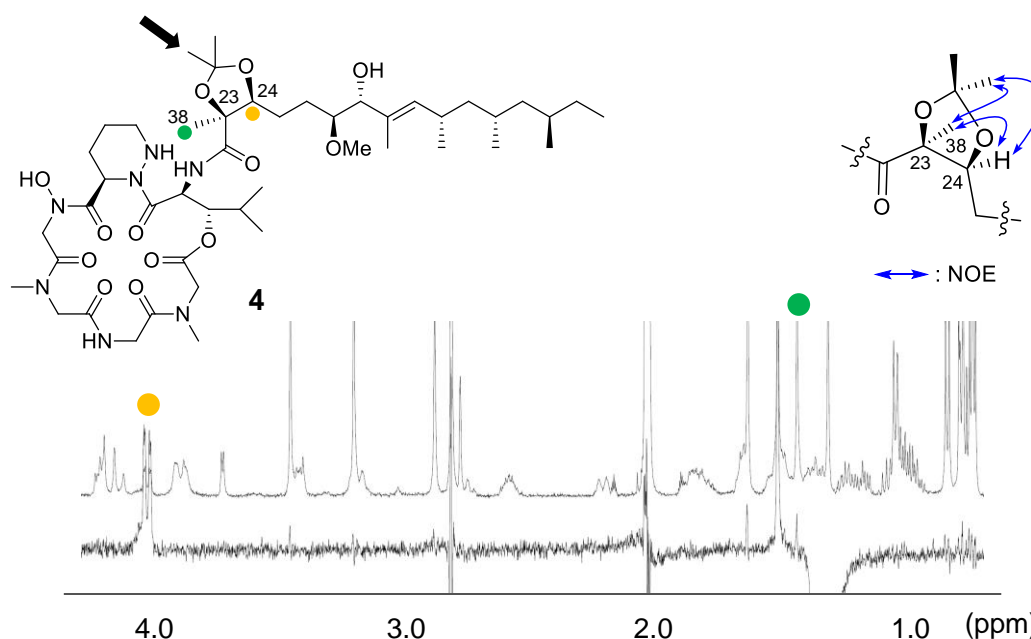


Figure 1-4. NOE analyses of the isopropylidene derivative **4**. ^1H control 1D spectrum (upper, 500 MHz, in acetone- d_6) and NOE difference spectrum (lower) for the derivative **4**. One methyl group in the isopropylidene group (arrow), H-24 (yellow circle), and Me-38 (green circle) mutually showed NOE correlations, indicating that Me-38 and H-24 in **4** are positioned in a *syn* configuration.

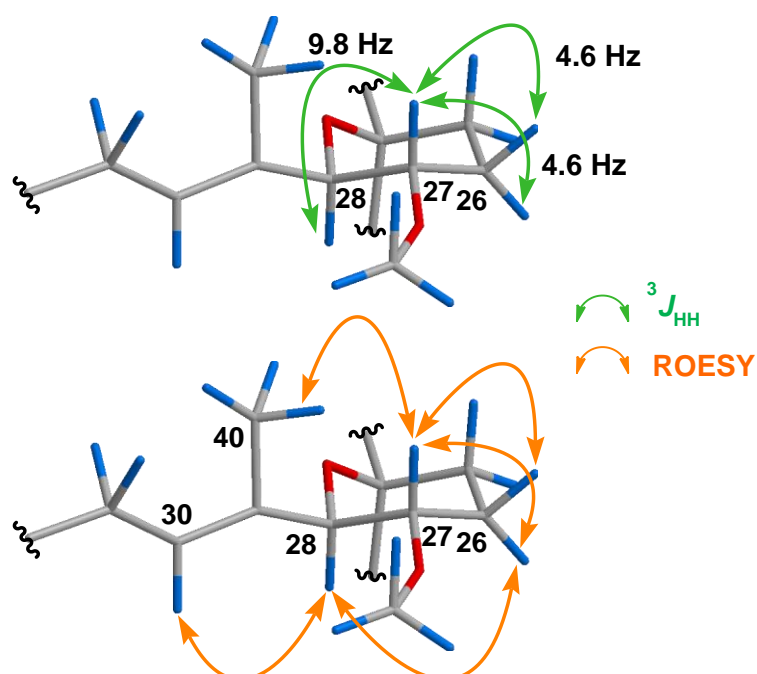


Figure 1-5 Determination of the relative stereochemistry of C27 in verucopeptin (**1**). ROESY correlations (left) and coupling constant values (right) in the tetrahydropyran ring are shown.

この結果と改良 Mosher 法の解析結果から 23 位は *S* と決定された。27 位の立体化学について

は verucopeptin の ^1H NMR スペクトル解析の結果、THP 環の 27, 28 位のプロトンが共にアキシアル位に位置し、そのカップリング定数は 9.8 Hz だったことから *S* と決定した (Figure 1-5)。

1.2.3 鎖状脂肪酸部位の絶対立体化学

31位は29位の二重結合を開裂して得られるカルボン酸に対してPGME法¹⁰を適用することで決定し、33位と35位は合成標品との比較により決定できると考えた。

まず、verucopeptinをNaIO₄存在下RuCl₃で処理することで29位の二重結合を開裂させ、カルボン酸**5**を得た。**5**を(S)-および(R)-PGMEと縮合させ、PGME誘導体**6a**, **6b**へと導いた。それらの¹HNMRスペクトルを解析すると40位のメチル基は負の値を示し、それ以外は正の値を示したことから、31位の絶対立体配置をS配置と決定した (Figure 1-6)。

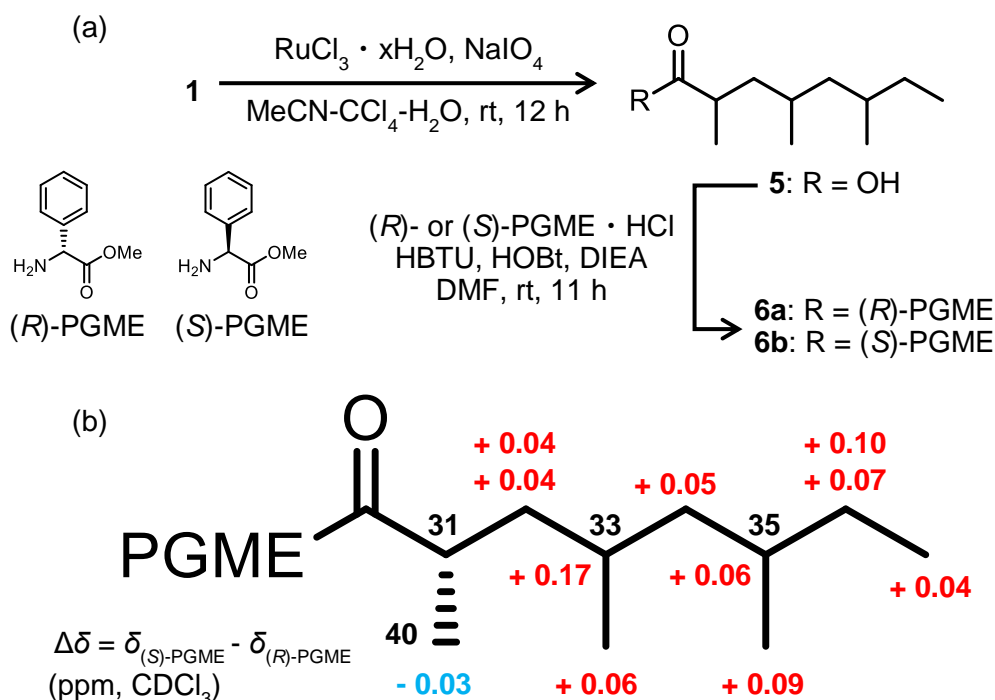
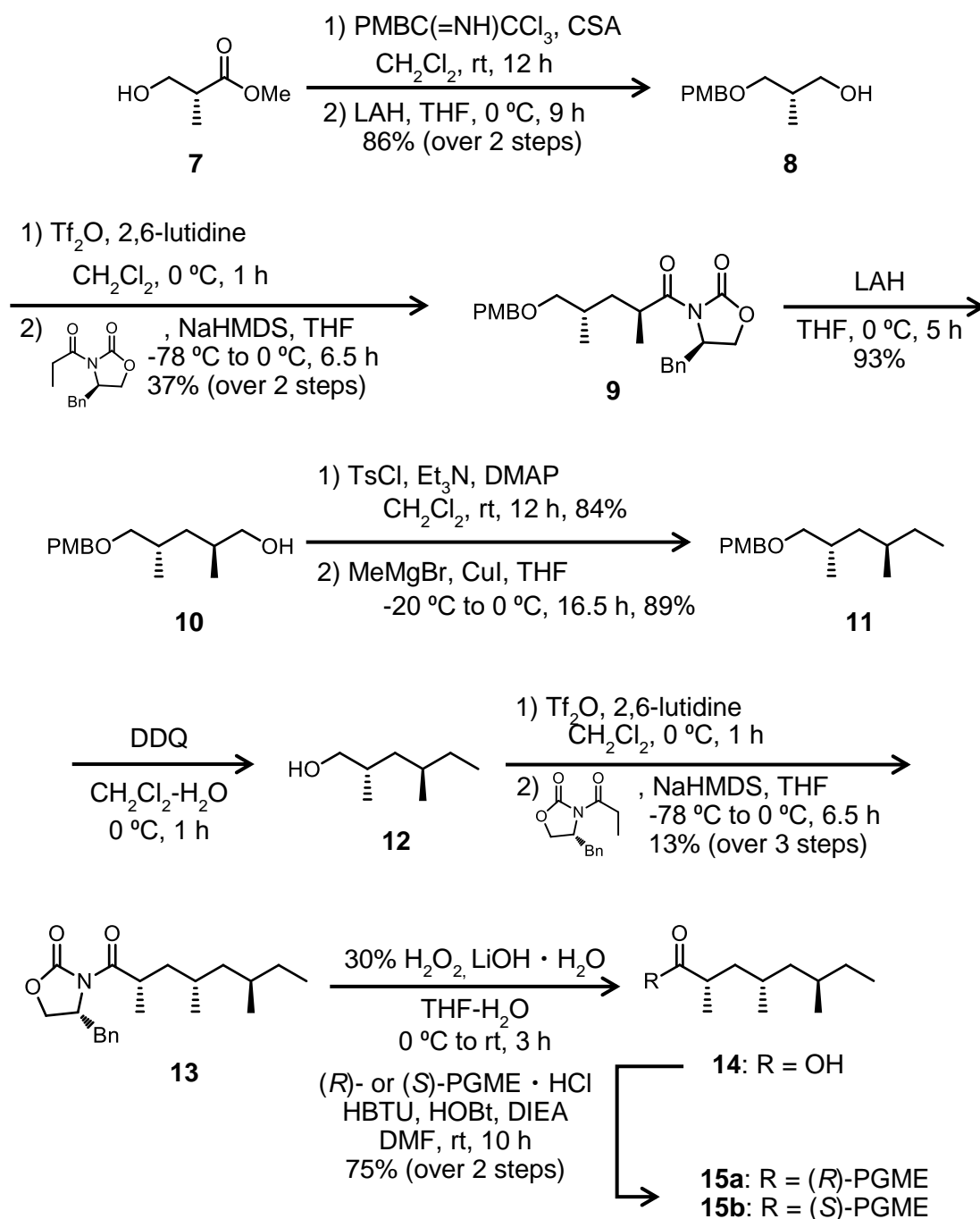


Figure 1-6. (a) Preparation of the PGME derivatives **6a** and **6b**. (b) $\Delta\delta$ ($\delta_{(S)\text{-PGME}} - \delta_{(R)\text{-PGME}}$) values for the PGME derivatives **6a** and **6b**. $\Delta\delta$ values are shown in ppm.

33, 35位の絶対立体配置を決定するために、**5**の4種類の立体異性体の合成を行った。Scheme 1-1に(2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyl octanoic acidの合成経路を示す。出発原料**7**から2工程を経て調製したアルコール**8**をEvans不斉アルキル化反応¹¹に付し、**9**を立体選択的に得た。**9**から4工程を経て調製したアルコール**12**を再びEvans不斉アルキル化反応に付すことで**13**を単一のジアステレオマーとして取得した後、不斉補助基の除去により所望の立体化学を有するカルボン酸**14**へと導いた。残る3つのジアステレオマーも**7**および**9**のエナンチオマーを用いて同様に合成した。得られた4種の立体異性体について、それぞれ、(S)-および(R)-PGME体を調製し、天然由来のものと¹HNMRスペクトルを比較したところ、**6b**と**15b**がそれぞれ非常に良い一致を示した (Figure 1-7)。以上の結果から、**1**の側鎖末端部分については31*S*,

33*S*, 35*R* と決定した。以上の結果から、verucopeptin の立体化学は 10*R*, 15*S*, 16*S*, 23*S*, 27*S*, 28*R*,



Scheme 1-1. Synthesis of (2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctanoic acid (**14**) and its derivatives.

31*S*, 33*S*, 35*R* と決定した (Figure 1-8)。

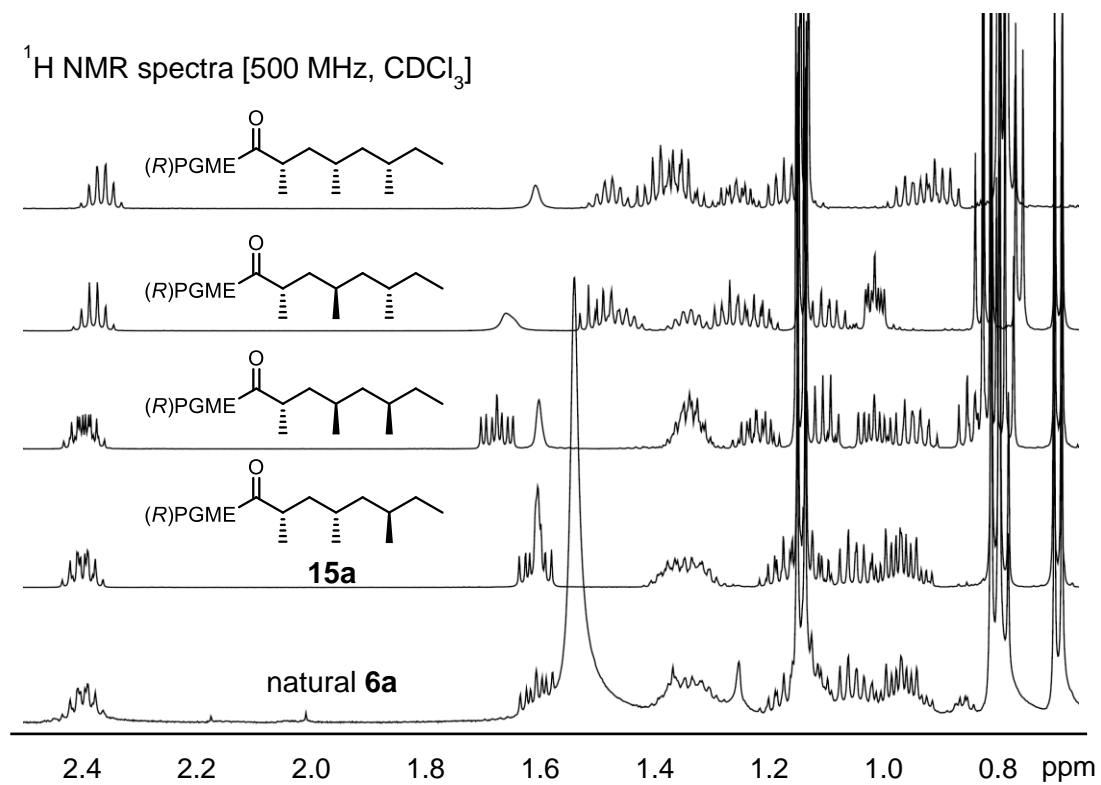


Figure 1-7. Comparison of the ^1H NMR spectra for PGME derivatives of 2,4,6-trimethyloctanoic acids. Aliphatic region of the spectra for natural product-derived **6a** (natural) and synthesized diastereomers **15a**, **S5a**, **S6a** and **S7a** is shown. Spectra were measured in CDCl_3 (500 MHz).

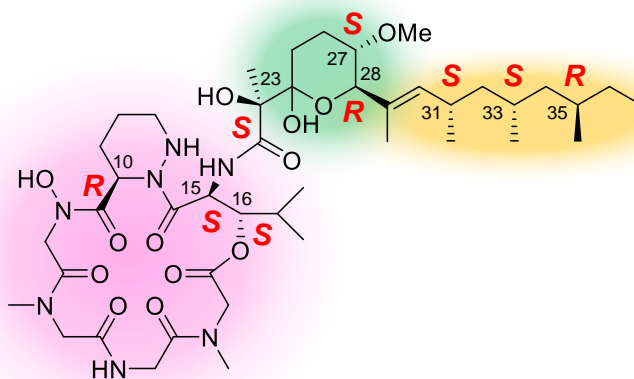


Figure 1-8. The absolute configuration of verucopeptin (**1**).

1.2.4 分岐メチルの相対立体推測法の改良

1.2.3 で verucopeptin の側鎖脂肪酸に存在する 1,3-dimethyl 構造の立体化学の決定のためには考えられる立体化学を有する全ての標品を合成しなければならず、全標品の合成に 1 年以上を要した。そのため、より簡便で合理的な立体化学の推測方法の開発が必要であると考えた。最近、2つのメチル基の間に挟まれたメチレンプロトンのケミカルシフトの差を利用することで 1,3-dimethyl 構造の相対立体配置の推測ができる方法が報告された¹²。1,3-Dimethyl 構造は置換基 R_1 と R_2 間の立体障害を回避するために主に 2 通りのコンホメーションをとり、それらは平衡状態で存在する¹³ (Figure 1-9)。どちらのコンホメーションであってもメチル基の立体が *syn* の場合には二つのメチレンプロトンが置かれる環境が大きく異なるため、ケミカルシフトの差は大きくなり、*anti* の場合には周辺環境の差が小さいため値はゼロに近くなる。既知の 1,3-dimethyl 構造を持つ 86 化合物のメチレンプロトンのケミカルシフトの差を Figure 1-10 に示した。*Anti* 体の **16** と *syn* 体の **19** は相対配置が推測可能だが、*syn* 体の **17** と *anti* 体の **18** の推測は不可能である。その理由として本手法はあくまで経験則であり、1,3-dimethyl 構造近傍のコンホメーションに左右されやすいことが挙げられる。すなわち 1,3-dimethyl 構造の周辺に嵩高い置換基が存在する場合にはメチレンプロトンのケミカルシフト差が大きく影響を受ける。

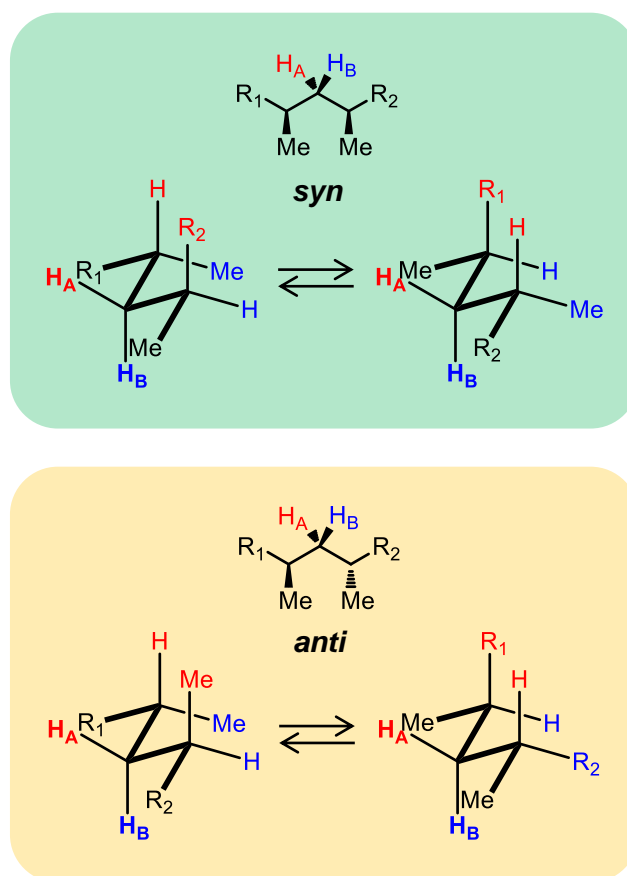


Figure 1-9. Tendencies for $\Delta\delta$ values. Values for *syn* configurations are plotted in green, and *anti* in orange. $\Delta\delta$ for any methylene protons located between methyl-bearing methane carbons (86 compounds, bottom) are plotted. Compounds **16-19** are some examples as mentioned in the text. Compound list is included in Experimental Information.

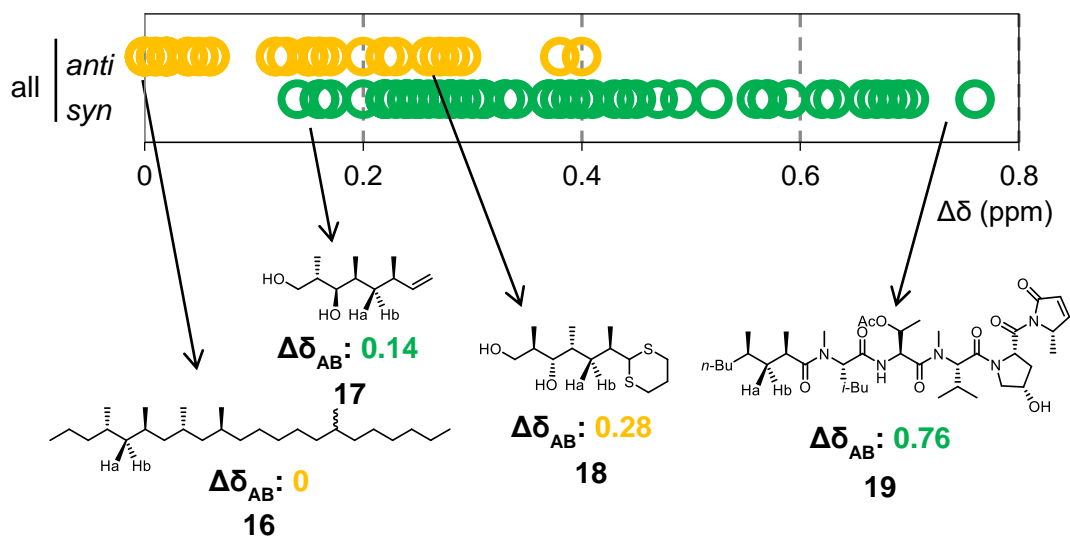


Figure 1-10. Conformational preference of 1,3-dimethyl substituted structure and assignment of the relative stereochemistry. $\Delta\delta$ values for the methylene protons (H_A and H_B) are diagnostic for distinguishing the *syn* and *anti* configurations. However, the differential values are sometimes largely affected by the species of R and R'.

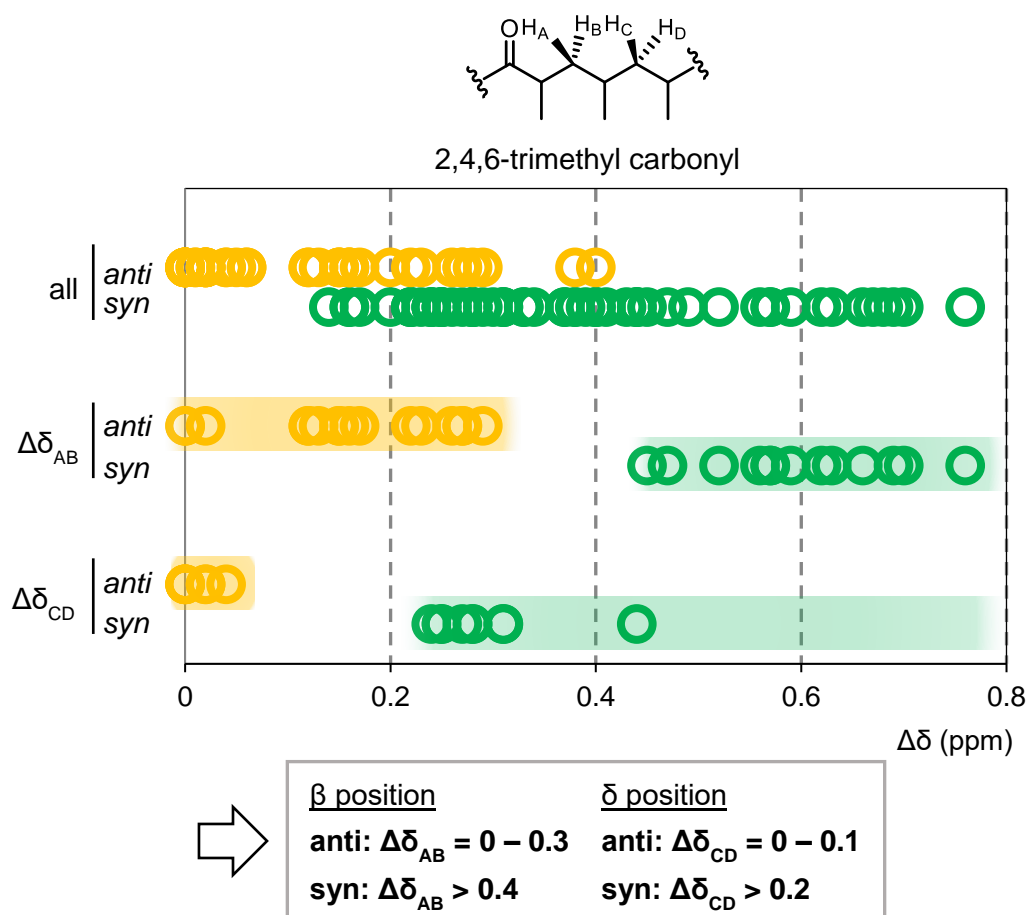


Figure 1-11. Tendencies for $\Delta\delta$ values. Values for *syn* configurations are plotted in green, and *anti* in orange. $\Delta\delta$ for H_A and H_B (31 compounds, middle), $\Delta\delta$ for H_C and H_D (17 compounds, below), and $\Delta\delta$ for any methylene protons located between methyl-bearing methane carbons (86 compounds, top) are plotted. $\Delta\delta$ values described in the below box define the relative configuration in methyl branched chain.

そこで、本研究では既存の 1,3-dimethyl 構造の相対立体配置の推測法の精度向上を目指して脂肪酸及び脂肪酸誘導体における置換基の影響を検証した。Verucopeptin の脂肪酸部位の立体化学決定のために合成した 9 種類の脂肪酸とその誘導体のメチレンプロトンのケミカルシフトの差を CDCl_3 中で測定した (Figure 1-11)。すると、 β 位・ δ 位のいずれであっても *syn* 体と *anti* 体で明瞭にケミカルシフトの差を区別できた。例えば、 α 位と γ 位が *syn* の時のケミカルシフトの差は 0.4 ppm 以上を示し、*anti* の時には約 0–0.3 ppm であった。また、 γ 位と ε 位が *syn* の時には 0.2 ppm 以上を示し、*anti* の時には 4 種類全てが 0 ppm であった。これらの結果から、 β 位のケミカルシフトの差はカルボニル基の影響を受けやすいために大きくなり、 δ 位のケミカルシフトの差はカルボニル基の影響を受けにくい傾向にあるが、 β 位・ δ 位ともにカルボニル基の置換基の影響を受けにくいことが明らかとなった。実際に、**1** の側鎖脂肪酸の場合では 32 位のメチレンプロトンの差は 0.14、34 位では 0 を示したことから正確な立体推測は不可能だったが、**15a** の場合では 2 位は 0.48、4 位は 0 となり 31, 33 位は *syn*、33, 35 位は *anti* と推測できた (Figure 1-12)。これは本手法が脂肪酸および脂肪酸誘導体においては特に有効であることを示している。今後、1,3-dimethyl 構造の近傍にカルボニル基を導入した後にメチレンプロトンのケミカルシフトの差を測定することで、新規化合物であっても ^1H NMR スペクトルの解析のみで 1,3-dimethyl 構造の相対配置が予測できる。さらに、予測された立体化学を持つ標品を合成し物理化学的性質を比較すれば迅速かつ効率的な 1,3-dimethyl 構造の立体化学決定が可能となる。

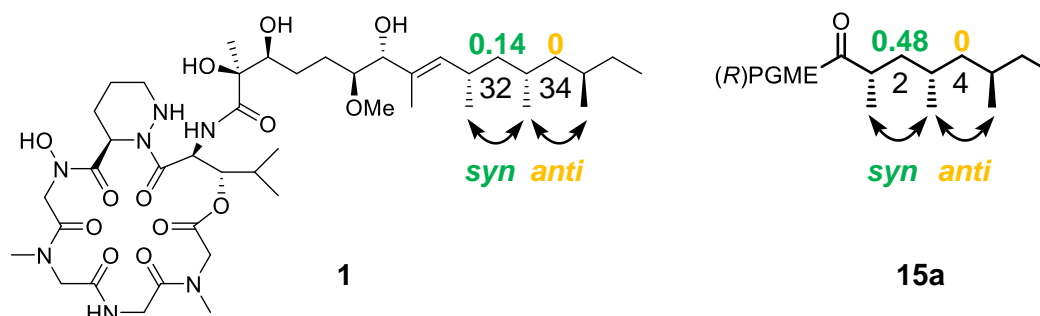


Figure 1-12. $\Delta\delta$ values for verucopeptin (**1**) and PGME derivative (**15a**). $\Delta\delta$ values are shown in ppm.

1.3 Verucopeptin の作用機序

HIF-1 は HIF-1 α と HIF-1 β からなるヘテロ二量体型転写因子である (Figure 1-13)。HIF-1 β タンパクは恒常的に存在している一方で、HIF-1 α タンパクは低酸素環境下でのみ存在する。HIF-1 α の翻訳は mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 経路によって制御されており、翻訳された HIF-1 α は heat shock protein (HSP) 60 や HSP90 によって正しく折りたたまれる¹⁴。通常酸素分圧下では HIF-1 α の分子内のプロリン残基が prolyl hydroxylase (PHD) による水酸化と von Hippel Lindau (VHL) によるユビキチン化を受けた後、速やかにプロテアソームで分解される。一方、低酸素環境下では新生 HIF-1 α は核内へと移行し HIF-1 β と二量体を形成して転写因子として働く。

本研究で HIF-1 阻害剤として再発見された verucopeptin はこれまでに胆がんマウスモデルで抗腫瘍活性を示すことが報告されていたが、その作用機序に関しては全く知見がなかった⁶。そこで、verucopeptin の HIF-1 阻害活性に対する作用機序解析を行った。

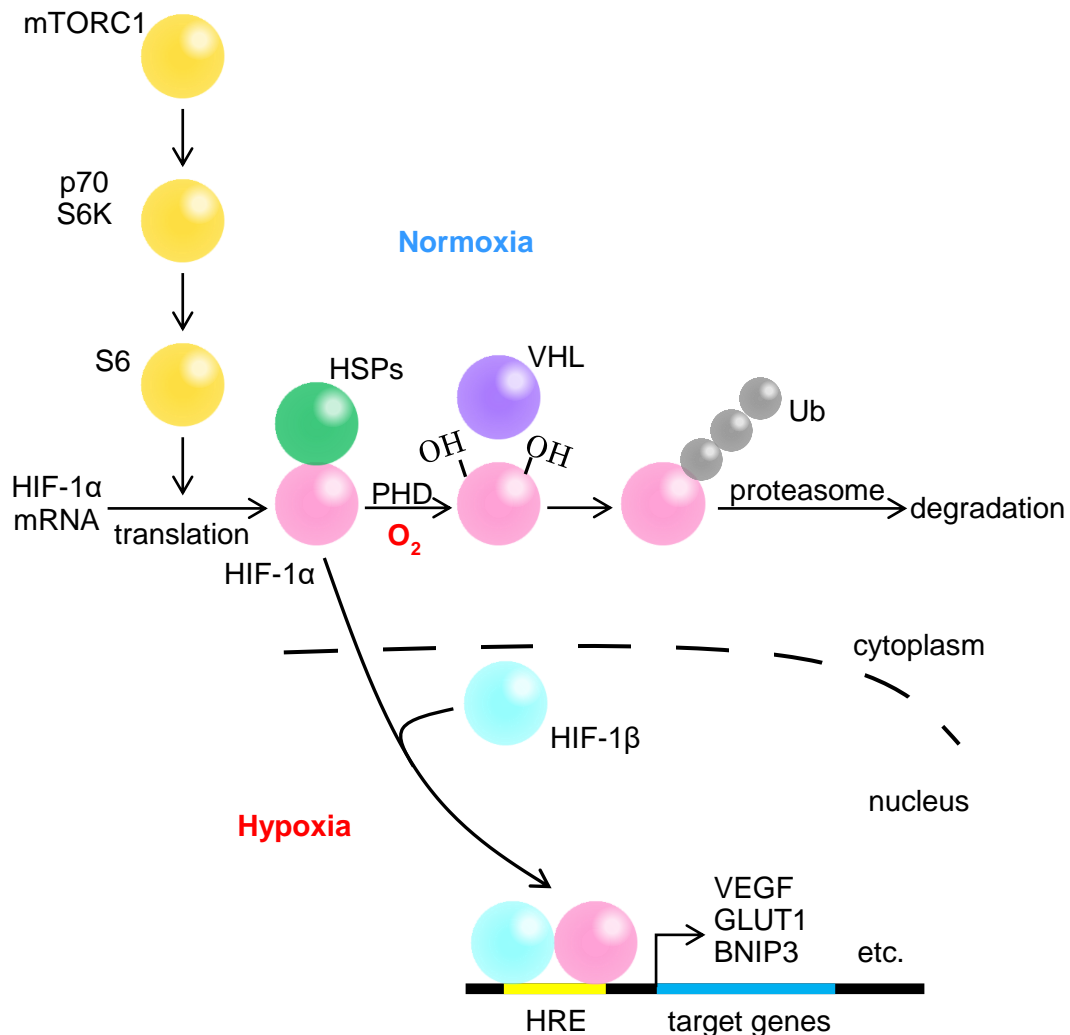


Figure 1-13. HIF-1 activated pathway.

1.3.1 HIF-1 標的遺伝子の発現に対する verucopeptin の効果

まず、verucopeptin 存在下で HIF-1 に制御されている *vegf*, *glut1* そして *bnip3* 遺伝子の発現量を調べた (Figure 1-14)。Verucopeptin による *vegf* の mRNA 量の変化は見られなかったが、*glut1* と *bnip3* は verucopeptin の濃度依存的に mRNA 量が減少した。この結果から、verucopeptin が細胞内で HIF-1 の活性を阻害していることが確認できた。

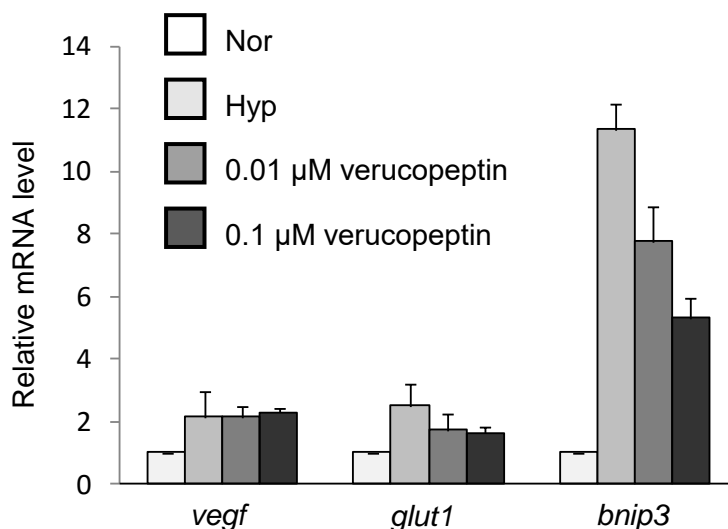


Figure 1-14. Effect of verucopeptin (1) on the mRNA levels of *vegf*, *glut1* and *bnip3*. HT1080 cells were treated with verucopeptin (1) for 24 h in a hypoxic condition. Cells were harvested, and the mRNA levels of *vegf*, *glut1* and *bnip3* were quantitatively analyzed. Verucopeptin (1) decreased the expression levels of *glut1* and *bnip3* in a dose-dependent manner, but not that of *vegf*. Means and SD are shown (n = 4).

1.3.2 HIF-1α の翻訳段階に対する verucopeptin の効果

Verucopeptin を細胞に処理した時の HIF-1α と HIF-1β のタンパク量を調べたところ、verucopeptin の濃度依存的に HIF-1α のタンパク量が減少したのに対し HIF-1β に変化はなかった (Figure 1-15)。

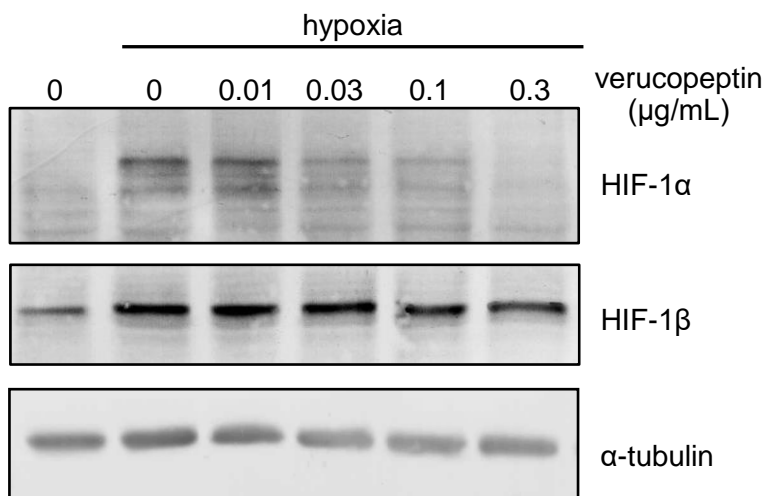


Figure 1-15. Effect of verucopeptin (veru; 1) on the amount of HIF-1α and HIF-1β proteins. HT1080 cells were treated with verucopeptin (1) for 24 h. Protein levels were detected by Western blot analysis.

そこで、HIF-1 α の mRNA 量を調べたところ、verucopeptin を処理した時の HIF-1 α の mRNA 量に変化はなかったことから本化合物が HIF-1 α タンパク質の翻訳を阻害しているもしくは分解を促進していることが予想された (Figure 1-16)。

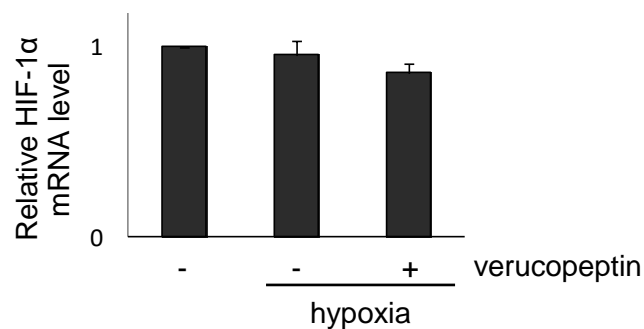


Figure 1-16. Effect of verucopeptin (**1**) on the mRNA level of *hif-1 α* . Cells were treated with or without verucopeptin (veru; **1**) (100 nM) for 4 h. The mRNA level was measured quantitatively. The mRNA level of HIF-1 α was not affected by the concentration of O₂ as reported previously. Verucopeptin (**1**) did not change the amount of *hif-1 α* mRNA. Means and SD are shown (n = 4).

そこでまず、verucopeptin が HIF-1 α の分解に関与しているのかを調べるために、プロテアソーム阻害剤 MG132 と PHD 阻害剤 DMOG¹⁵ を用いた実験を行った (Figure 1-17)。通常酸素下では HIF-1 α はウェスタンブロット法で検出できないが、MG132 を処理した細胞では HIF-1 α の分解が抑制され検出が可能になる。しかし、verucopeptin を MG132 の前に処理した条件では、MG132 による HIF-1 α の蓄積は見られない。加えて、verucopeptin と MG132 を処理する順番を逆にした場合では MG132 を単独で処理した場合と比べて HIF-1 α のタンパク

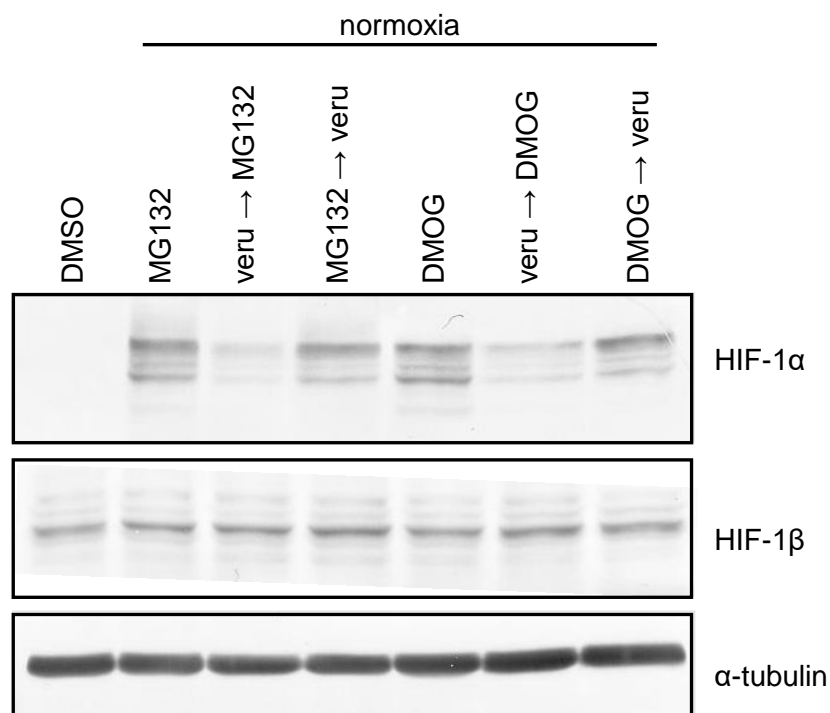


Figure 1-17. Verucopeptin (veru; **1**) did not promote the degradation of HIF-1 α . In normoxia, HT1080 cells were treated with MG132 for 4 h prior to the treatment of verucopeptin for 1 h and vice versa. DMOG was treated for 2 h. Protein levels were detected by Western blot analysis.

量に変化はなかった。MG132 の代わりに DMOG を処理した場合でも、同様の結果を得ることができた。これらの結果から、verucopeptin が HIF-1 α の分解促進には関係しないことが示唆された。

HIF-1 α の翻訳は mTORC1 経路によって制御されている。mTORC1 複合体によって活性化された p70 S6K は S6 リボソームタンパク質をリン酸化し活性化する。活性化した S6 タンパク質は HIF-1 α の翻訳を促進する (Figure 1-13)。Verucopeptin の mTORC1 経路に対する効果を調べた結果、本化合物を処理した細胞では p70 S6K と S6 タンパク質のリン酸化が抑制された (Figure 1-18)。この結果から verucopeptin は mTORC1 経路を抑制していることが明らかとなった。

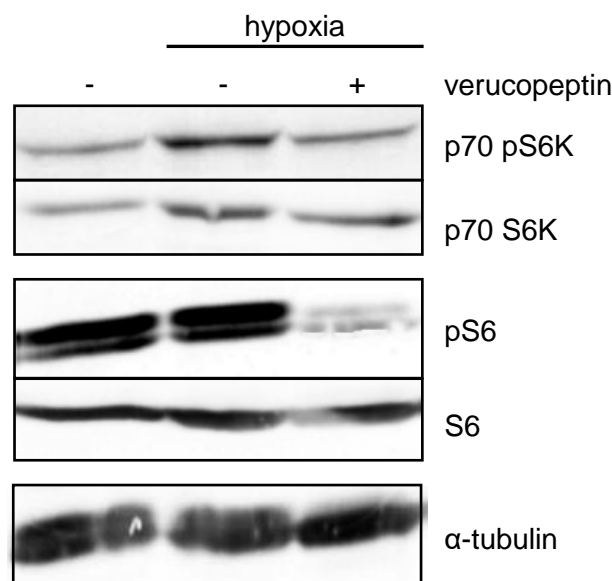


Figure 1-18. Effects of verucopeptin (**1**) on the phosphorylation status of p70S6K, S6, MEK and ERK proteins. Phosphorylation level of these proteins after treatment with verucopeptin (**1**). HT1080 cells were treated with verucopeptin (veru; **1**) (100 nM) for 5 h.

mTORC1 阻害剤である rapamycin は mTOR と FK506 binding protein 12 (FKBP12) との三者複合体を形成することで mTORC1 複合体の活性を抑制する¹⁷。本研究では rapamycin と verucopeptin の分子サイズが類似しており、THP 環を共通構造としていることに着目し、verucopeptin が rapamycin と同様に mTOR と FKBP12 との三者複合体を形成して mTORC1 経路を阻害するという仮説を立てた。この仮説を検証するため、rapamycin と verucopeptin の作用を比較することとした (Figure 1-19)。

この実験のために FKBP12 阻害剤 SLF¹⁸を用いた。Rapamycin は FKBP12 に結合して mTOR を阻害するのに対し、SLF は FKBP12 を阻害するものの mTOR を阻害することはできない。Rapamycin を処理した時では S6 タンパク質のリン酸化は抑制されたが、過剰量の SLF を処理しても S6 タンパク質のリン酸化は抑制されなかった。さらに、rapamycin と SLF を競合させた場合には rapamycin は S6 タンパク質のリン酸化を抑制しなかった。以上の結果から、rapamycin と SLF は FKBP12 に対する結合部位が同じであることが示された。次に、rapamycin と verucopeptin の効果を比較した。これまでの結果と同様に verucopeptin を処理することで S6 タンパク質のリン酸化は抑制された。一方、verucopeptin と SLF を競合させた場合に SLF は

verucopeptin による S6 タンパク質のリン酸化を阻害できなかったことから、verucopeptin と

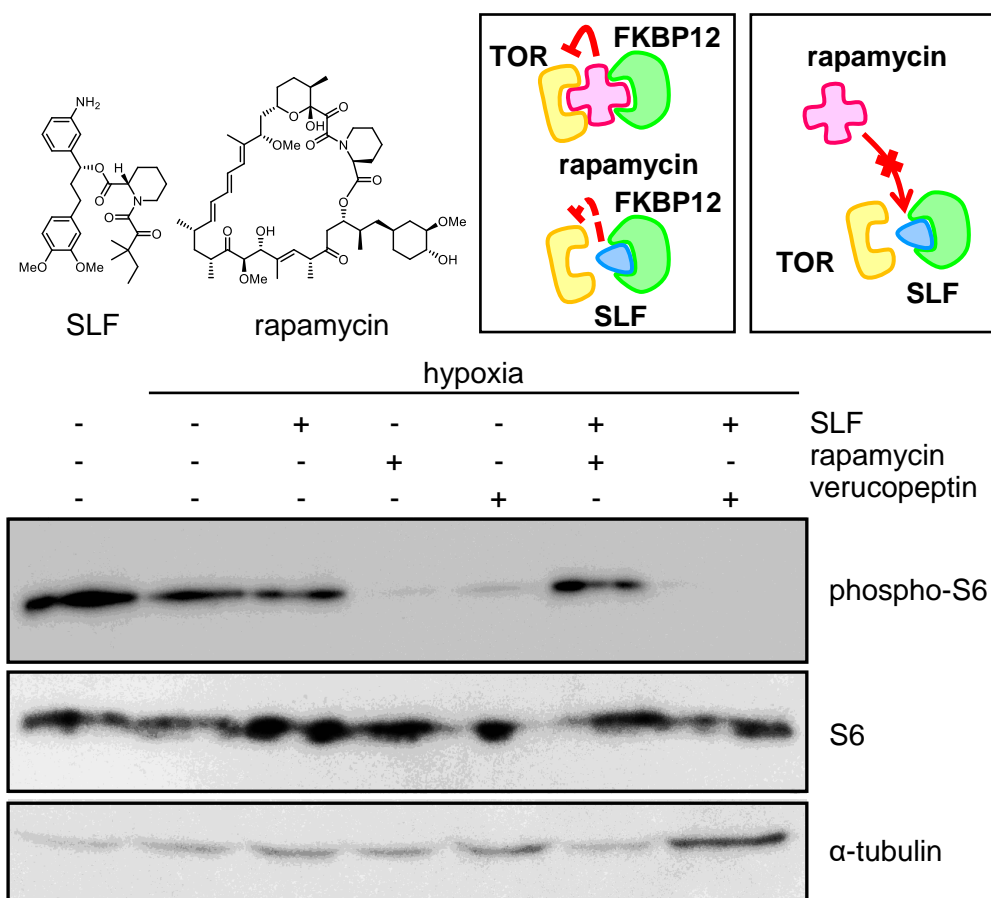


Figure 1-19. Effect of SLF on the activity of verucopeptin (1) and rapamycin. Cells were treated with verucopeptin (1, 100 nM, 4 h) or rapamycin (0.5 nM, 1 h) after pretreatment with SLF (0.1 mM, 1 h). Rapamycin decreased the phosphorylation level of S6 protein, which was abolished by the presence of SLF. In contrast, the effect of verucopeptin (1) was not affected by SLF.

rapamycin の mTORC1 経路に対する阻害様式は異なることが明らかになった。

1.3.3 HSP60 に対する verucopeptin の効果

Verucopeptin の標的タンパク質を探索するため、光親和型ジアジリンリンカーを導入した NHS Sepharose 4B ビーズに verucopeptin を固定した verucopeptin ビーズを作製した¹⁹。常酸素環境下で 24 時間培養したヒト繊維芽肉腫細胞 HT1080 細胞から調製した細胞破碎液と verucopeptin ビーズをインキュベートし、結合タンパクを SDS-PAGE によって分離し銀染色によって可視化した。Verucopeptin ビーズのみに結合したタンパク質を MS/MS 解析に付した結果、熱ショックタンパク質 HSP60 が結合タンパク質である可能性が示された。HSP60 抗体を用いてウェスタンブロット法を行い、verucopeptin と HSP60 の結合を検証した結果、verucopeptin ビーズでのみ HSP60 のバンドが検出され、確かに verucopeptin が HSP60 と結合

していることがわかった (Figure 1-20)。



Figure 1-20. Immunoblot analysis of HSP60 bound to verucopeptin. HT1080 lysates were pre-washed with control beads, followed by incubation with verucopeptin beads or control beads. Protein levels were detected by Western blot analysis with the HSP60 antibody. wcl: whole cell lysate, ctrl: control beads, veru: verucopeptin beads.

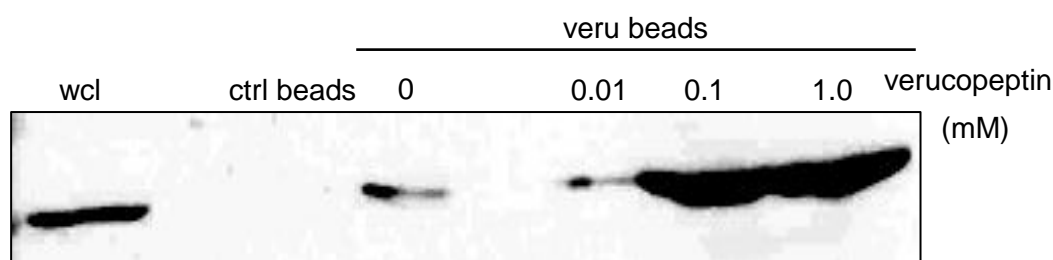
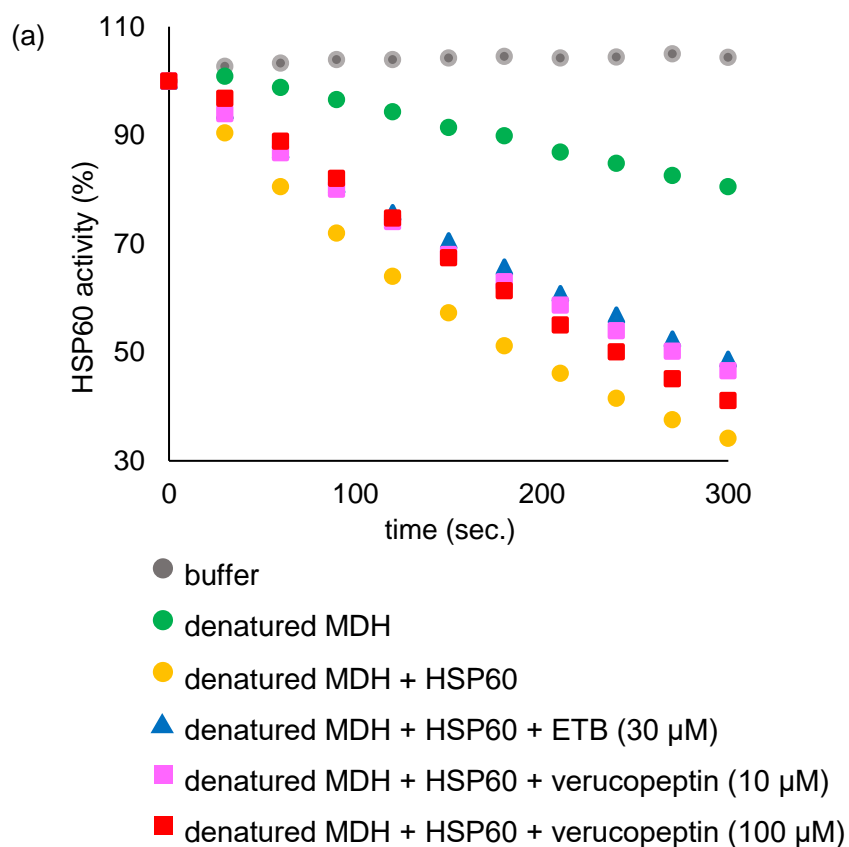


Figure 1-21 Immunoblot analysis of HSP60 bound to verucopeptin. HT1080 lysates were pre-washed with control beads, followed by incubation with free Verucopeptin (0.01, 0.1 or 1 mM) for over night. The verucopeptin beads were treated to HT1080 lysate containing free Verucopeptin for 1 h. Protein levels were detected by Western blot analysis with the HSP60 antibody. wcl: whole cell lysate.

Verucopeptin と HSP60 との結合特異性を検討するために過剰量の verucopeptin の存在下でブルダウン試験を行った (Figure 1-21)。その結果、0.01 から 1 mM のいずれの濃度でも遊離 verucopeptin は verucopeptin ビーズと HSP60 の結合を阻害しなかった。この理由として reaction buffer に対して verucopeptin の溶解性が低いために verucopeptin ビーズと競合できるだけの遊離 verucopeptin が buffer 中に存在していなかったことが考えられた。実際に、0.1 と 1 mM の遊離 verucopeptin を反応系中に添加した条件ではインキュベート中に白い沈殿が観察された。

遊離の verucopeptin の溶解性向上を目指して種々条件を検討したが最適な条件が得られなかったため、HSP60 のシャペロン活性に対する verucopeptin の効果を *in vitro* で測定した (Figure 1-22)。すなわち、塩酸で変性させた malate dehydrogenase (MDH) を HSP60 によりリフォールドさせる実験において、化合物を処理した HSP60 を用い、化合物の効果を検討した²⁰。活性型 MDH はオキサロ酢酸をリンゴ酸へと変換する際に NADH を利用するため、反応系中の NADH 量を測定すれば HSP60 のシャペロン活性を評価できる。NADH 添加から 5 分間、30 秒ごとに NADH 量を測定しプロットした。変性した MDH に HSP60 のみを加えた条件での HSP60 の活性を 100% とした時の各化合物存在下での HSP60 の活性を反応曲線の切片から算出した。その結果、verucopeptin は 10 μ M で 29%、100 μ M で 51% シャペロン活性を抑制した。このことから、verucopeptin は HSP60 に結合し、そのシャペロン活性を抑制することが明らかになった。



(b)

	HSP60 activity (%)
denatured MDH + HSP60	100
denatured MDH + HSP60 + ETB (30 μ M)	64.3
denatured MDH + HSP60 + verucopeptin (10 μ M)	71.0
denatured MDH + HSP60 + verucopeptin (100 μ M)	49.4

Figure 1-22. Effect of verucopeptin (1) on the activity of HSP60. Denatured MDH was rapidly diluted to a concentration 0.14 μ M into a buffer containing HSP60 and HSP10. HSP60 was pre-treated with or without verucopeptin (10 or 100 μ M) or ETB (30 μ M). The activity of HSP60 was determined by measuring the amount of NADH, as described in Experimental information. (a) The amount of NADH was plotted against time. (b) Table of HSP60 activity.

1.4 結論

本研究では HIF-1 阻害剤として放線菌培養液抽出物から取得した verucopeptin の立体構造を決定し、作用機構を明らかにした。その過程で、立体構造を推測することが困難な分岐メチル構造の相対配置推測法を改良することにも成功した。

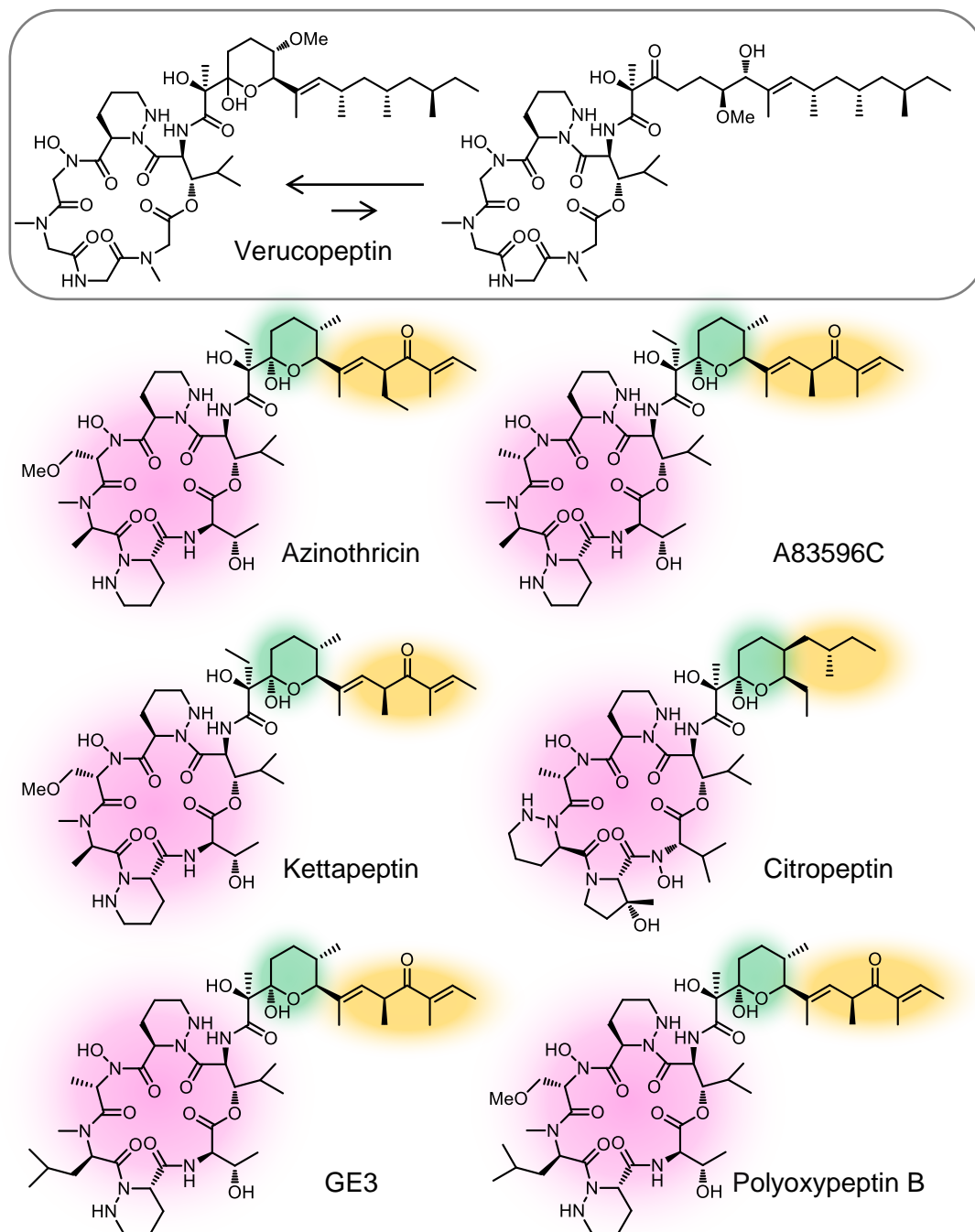


Figure 1-23. Chemical structures of verucopeptin and verucopeptin-related natural products.

Verucopeptin はこれまでにいくつかの類縁体が報告されている²¹ (Figure 1-23)。それら類縁体は共通構造として環状ペプチド部位と側鎖脂肪酸部位を持つが、ケトエステル互変異性を示すのは verucopeptin のみである。Verucopeptin と類縁体群では THP 環の置換基が異

なっている。Verucopeptin の C27 位には methoxy 基が置換している一方で、類縁体群は methyl 基が置換している。この置換基の違いが互変異性の原因である可能性がある。すなわち methoxy 基が methyl 基より少し嵩高いために THP 環のコンホメーションが変化し環状デプシペプチド部位と脂肪酸部位の配置が不安定な状態になる可能性を考えている。また、もう一つの可能性として環状デプシペプチド部位と側鎖脂肪酸部位の立体反発を考えている。Verucopeptin の構成アミノ酸には piperazic acid と β -hydroxy leucine などの嵩高いアミノ酸は 2 つだけなのに対し、類縁体は 6 アミノ酸も存在する。そのため verucopeptin の環状デプシペプチド部位は類縁体のそれに比べてフレキシブルであることが予想される。側鎖脂肪酸との立体反発を避ける場合に、類縁体のペプチド部位は限られたコンホメーションに収束するのに対し、verucopeptin では自由にコンホメーションが変化させることが可能であるため、コンホメーションによって THP 環を開環させた方が安定な場合があるのかもしれない。これらの可能性を検証するため、今後、methoxy 基を methyl 基に変換した類縁体や構成アミノ酸が異なる類縁体を合成し、それら化合物の構造を解析する必要がある。

Verucopeptin は mTORC1 経路と HSP60 を阻害する。細胞系で verucopeptin は 0.1 μ M で HIF-1 α タンパクを減少させ、mTORC1 経路の活性化を抑制するが、HSP60 のシャペロン活性を抑制するには *in vitro* でも 10 μ M の濃度が必要であった。これらの結果から verucopeptin の HIF-1 阻害の主な原因は mTORC1 経路の抑制によるものと予想できる。さらに HSP60 の阻害が HIF-1 α タンパクの減少を誘導すると報告されている²²が、本研究で用いた HT1080 細胞では HSP60 阻害剤存在下で HIF-1 α タンパクの減少を確認することはできなかった。以上の結果から、verucopeptin の HSP60 のシャペロン活性に対する阻害は HIF-1 の抑制には寄与しておらず、mTORC1 経路を抑制することで HIF-1 の活性を阻害していることが示唆された。今後の課題として verucopeptin による HSP60 阻害作用と mTORC1 経路阻害との関係を明らかにする必要がある。

1.5 実験項およびスペクトルデータ

General procedure

All reagents and solvents were used as received from commercial suppliers and were used without further purification. IR spectra were measured using an FTIR spectrometer equipped with ZnSe ATR plate. Optical rotations were determined using the sodium D line (589 nm). NMR spectra were measured on a 500 MHz instrument. ^1H and ^{13}C chemical shifts are shown relative to the solvent; δ_{H} 7.26 and δ_{C} 77.0 for CDCl_3 ; δ_{H} 2.05 and δ_{C} 29.8 for acetone- d_6 . Chemical shifts (δ) are shown in parts per million (ppm) and coupling constants (J) are in hertz (Hz). The following abbreviations are used to describe multiplicities: s = singlet, d = doublet, dd = double doublets, m = multiplet. Mass spectral data were collected with FAB MS or ESI IT-TOF MS. Flash column chromatography was performed over Silica Flash F60 (SiliCycle) using an elution system as described for each experiment.

Isolation of verucopeptin (1).

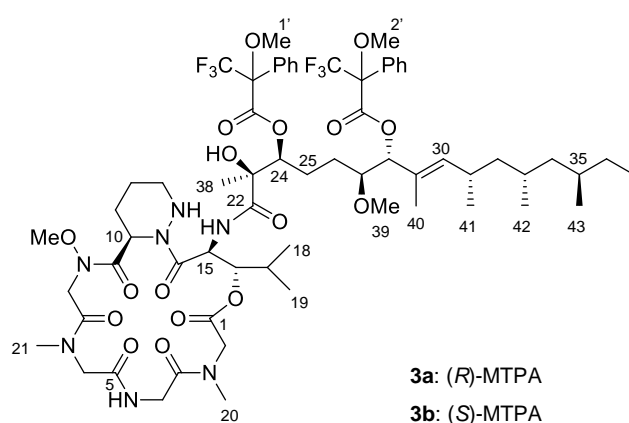
n-BuOH extracts of the culture broth of *Streptomyces* sp. KUSC_A08 (16 L) was extracted with 90% MeOH three times. Combined extracts were evaporated and extracted with CHCl_3 three times. The CHCl_3 extracts were combined and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl_3 -MeOH (50:50) and fractionated on a LH20 gel filtration column with CHCl_3 -MeOH (50:50). Fraction containing verucopeptin were combined and chromatographed on a silica gel column with CHCl_3 -MeOH (45:1 to 20:1). Fractions eluted by CHCl_3 -MeOH (45:1) were subjected to ODS HPLC on CAPCELL PAK UG120 ($\phi 20 \times 250$ mm) with MeCN- H_2O (75:25) to afford verucopeptin (**3**, 121.61 mg) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -91.0 (*c* 0.12, CHCl_3); IR (neat) 3352, 2955, 1644, 1406, 1241, 754 cm^{-1} ; ^1H NMR for the major acetal form (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.11 (*N*-OH), 7.32 (d, $J = 9.7$ Hz), 7.12 (d, $J = 5.9$ Hz), 6.08 (dd, $J = 9.8, 3.1$ Hz, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.27 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.16 (m, 1H), 5.04 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.77 (dd, $J = 9.8, 3.1$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 4.09 (m), 3.88 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.65 (dd, $J = 17.2, 6.5$ Hz, 1H), 3.55 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 3.44 (m), 3.28 (s, 3H), 3.11 (s, 3H/m), 3.04 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.65 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.87 (m), 1.80 (m), 1.72 (m), 1.65 (s), 1.57 (m), 1.50 (m), 1.46 (m), 1.40 (s, 3H), 1.37 (m), 1.26 (m), 1.20 (m), 1.13 (m), 1.06 (d, $J = 6.7$ Hz), 1.02 (m), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz), 0.86 (m), 0.84 (m), 0.80 (m), 0.77 (m); ^{13}C NMR for the major acetal form (CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.2, 172.0, 171.3, 170.8, 170.2, 167.1, 166.8, 137.0, 130.0, 98.4, 80.0, 79.6, 77.6, 75.7, 56.8, 52.5, 51.7, 51.3, 48.4, 46.9, 46.5, 46.1, 45.0, 42.4, 36.7, 34.7, 31.7, 30.4 (2C), 29.6, 27.7, 27.2, 24.1, 23.9, 21.3 (2C), 20.5, 19.4, 19.2, 19.1, 18.3, 11.4; HRMS (ESI) m/z 918.5169 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{NaO}_{13}$, 918.5159. ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts were in agreement with those reported previously.

Advanced Marfey's analysis of verucopeptin.

To a solution of **1** (1.05 mg, 1.17×10^{-3} mmol) in AcOH (1 mL) was added PtO_2 (12.6 mg). After being stirred for 14 days in a hydrogen atmosphere, the reaction mixture was filtered through Celite to remove the catalyst. The filtrate was concentrated *in vacuo* and hydrolyzed in 6 N HCl (0.7 mL) for 17 h at

110 °C. The reaction mixture was dried *in vacuo*. The obtained hydrolysate was dissolved in H₂O (50 μL), to which 1 M NaHCO₃ (20 μL) and L-FDLA (1% w/v in acetone, 100 μL) were added, and the mixture was stirred for 1 h at 37 °C. The solution was neutralized with 1 N HCl (20 μL), evaporated, and then dissolved in MeCN (500 μL). The derivatives were analyzed by LC-ESI-MS or HPLC. HPLC separation was performed on a reversed-phase column (Cosmosil 5C18-AR-II, φ4.6 × 250 mm) with a gradient elution system of H₂O/MeCN containing 0.1% TFA (70:30 to 20:80 for 50 min). ESI-MS was performed in a positive ionization mode.

Synthesis of bis-MTPA derivatives **3a** and **3b**.



To a stirred solution of verucopeptin (**1**, 8.88 mg, 9.92×10^{-3} mmol) in CHCl₃/MeOH (1:1, 1.98 mL) was added NaBH₄ (5.62 mg, 0.15 mmol) at room temperature. After 30 min, PBS buffer was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with PBS buffer (3 times) and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on an ODS column with a stepwise elution of H₂O/MeOH (from 100:0 to 0:100). Fractions eluted with H₂O/MeOH (10:90 and 0:100) were combined and subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C18-AR-II (φ20 × 250 mm) with H₂O/MeCN (40:60) to afford the reduced derivative **2** (4.92 mg, 55%) and its diastereomer (1.98 mg, 22%) as a colorless amorphous solid, respectively.

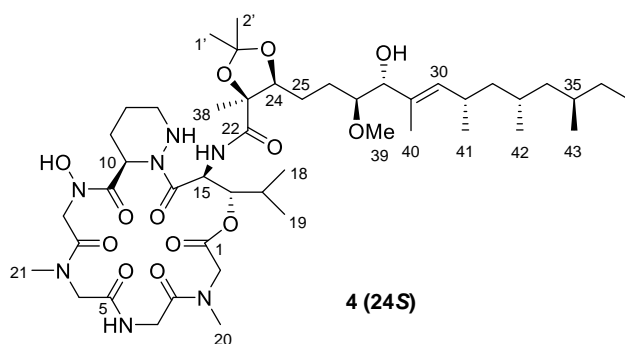
To a stirred solution of **2** (1.85 mg, 2.06×10^{-3} mmol) in CHCl₃ (82.45 μL) was added MeI (2.60 μL, 4.12×10^{-2} mmol), TBAB (6.64 mg, 2.06×10^{-2} mmol) and 1M K₂CO₃ (41.2 μL, 4.12×10^{-2} mmol). After being stirred at room temperature for 30 min, water was added to the reaction mixture. The mixture was chromatographed on an ODS column with a stepwise elution of H₂O/MeCN (from 100:0 to 0:100). Fractions eluted with H₂O/MeCN (10:90 to 0:100) were combined and subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C18-AR-II (φ10 × 250 mm) with H₂O/MeCN (50:50) to afford methylated **2** (0.81 mg, 43%).

The methylated **2** was split into two portions. One portion of the material (0.55 mg, 0.60×10^{-3} mmol) was mixed with DMAP (1.48 mg, 1.21×10^{-2} mmol) and (*S*)-MTPACl (3.05 mg, 1.21×10^{-2} mmol) in CH₂Cl₂ (60.34 μL), which was stirred at room temperature. After 1 h, satd aq NH₄Cl was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with satd aq NH₄Cl (3 times) and concentrated *in vacuo*.

The obtained residue was chromatographed on an ODS column with a stepwise elution of H₂O/MeCN (from 100:0 to 0:100). Fractions eluted with H₂O/MeCN (0:100) were combined and subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C18-AR-II (ϕ 10 × 250 mm) with H₂O/MeCN (10:90) to afford **3a** (0.67 mg, 83%): $[\alpha]_D^{20}$ -27.1 (*c* 0.12, CHCl₃); IR (neat) 3343, 2958, 1745, 1651, 1168 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 4.35 (d, *J* = 17.0 Hz)/3.66 (d, *J* = 19.3 Hz) (Gly or Me-Gly)*, 5.05/3.80 (Gly or Me-Gly)*, 4.56/3.51 (1H) (Gly or Me-Gly)*, 4.49 (d, *J* = 20.4 Hz, H4), 3.99 (H4), 6.81 (4-NH), 5.14 (H10), 2.38 (H11), 1.83 (H11), 1.53 (H12), 1.32 (H12), 3.03 (H13), 2.66 (H13), 4.51 (13-NH), 5.95 (H15), 4.86 (dd, *J* = 10.3, 2.7 Hz, H16), 1.94 (H17), 0.88 (H18), 1.01 (d, *J* = 6.0 Hz, H19), 3.15 (s, H20 or H21)*, 3.00 (s, H20 or H21)*, 3.84 (s, N-OMe), 5.49 (1H, H24), 2.04 (H25), 1.75 (H25), 1.63 (H26), 3.44 (H27), 5.52 (H28), 5.09 (H30), 2.41 (H31), 1.04 (H32), 0.85 (H37 or 42 or 43)*, 1.27 (s, H38), 3.35 (s, H39), 1.51 (s, H40), 0.82 (H41), 0.79 (H37 or 42 or 43)*, 0.77 (H37 or 42 or 43)*, 3.50 (s, H₃-1' or H₃-2')*, 3.54 (s, H₃-1' or H₃-2')*, 7.59-7.29 (phenyl in bis-MTPA) (Chemical shifts were assigned on the basis of the COSY data; *signals could be exchangeable.); HRMS (ESI) *m/z* 1366.6261 [M+Na]⁺ calcd for C₆₄H₉₁F₆N₇NaO₁₇, 1366.6288.

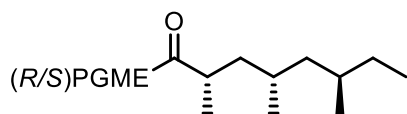
The another portion of the methylated **2** (0.50 mg) was mixed with DMAP (1.34 mg, 1.10 × 10⁻² mmol) and (*R*)-MTPACl (2.78 mg, 1.10 × 10⁻² mmol) in CH₂Cl₂ (54.90 μ L), which was stirred for 1 h at room temperature. The reaction mixture was fractionated as described above to afford **3b** (0.57 mg, 77%): $[\alpha]_D^{20}$ -71.2 (*c* 0.06, CHCl₃); IR (neat) 3356, 2918, 1745, 1652, 1184, 718 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.06/3.81 (Gly or Me-Gly)*, 4.56/3.50 (Gly or Me-Gly)*, 4.38/3.76 (Gly or Me-Gly)*, 4.50 (H4), 3.95 (H4), 6.71 (4-NH), 5.12 (H10), 2.38 (H11), 1.84 (H11), 1.56 (H12), 1.33 (H12), 3.04 (H13), 2.65 (H13), 5.96 (H15), 4.86 (dd, *J* = 10.5, 3.3 Hz, H16), 1.94 (H17), 0.89 (d, *J* = 6.4 Hz, H18), 1.02 (H19), 3.05 (s, H20 or H21)*, 3.14 (s, H20 or H21)*, 3.84 (s, N-OMe), 5.47 (H24), 1.93 (H25), 1.75 (H25), 1.61 (H26), 3.38 (H27), 5.45 (H28), 5.26 (H30), 2.50 (H31), 1.10 (H32), 1.43 (H33), 1.01 (H34), 1.36 (H35), 1.24 (H36), 1.15 (H36), 0.84 (H37), 1.42 (s, H38), 3.24 (s, H39), 1.67 (s, H40), 0.89 (H41), 0.79 (H42), 0.78 (H43), 3.50 (s, H1' or H2')*, 3.48 (s, H1' or H2')*, 7.61-7.34 (phenyl in bis-MTPA) (Chemical shifts were assigned on the basis of the COSY data; *signals could be exchangeable); HRMS (ESI) *m/z* 1366.6275 [M+Na]⁺ calcd for C₆₄H₉₁F₆N₇NaO₁₇, 1366.6288.

Synthesis of isopropylidene derivatives **4** (**24S**).



Reduced derivative **2** (3.62 mg, 4.03×10^{-3} mmol) was mixed with 2,2-DMP (98.76 μ L, 8.06×10^{-1} mmol) and PPTS (5.06 mg, 2.02×10^{-2} mmol) in CH_2Cl_2 (1.34 mL), which was stirred at room temperature. After 1 h, satd aq NaHCO_3 was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with satd aq NaHCO_3 (3 times) and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was chromatographed on an HP20 column with a stepwise elution of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (from 100:0 to 0:100) and CHCl_3 . Fractions eluted with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (50:50 to 0:100) and CHCl_3 were combined and subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C8-MS ($\phi 10 \times 250$ mm) with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (35:65) to afford **4** (2.43 mg, 64%): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -79.9$ (*c* 0.19, CHCl_3); IR (neat) 3339, 2958, 1650, 1489, 1192, 753 cm^{-1} ; ^1H NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz) δ 4.1/3.44 (Gly or Me-Gly)*, 5.20/3.80 (Gly or Me-Gly)*, 5.27 (1H)/3.55 (1H, d, *J* = 17.5 Hz) (Gly or Me-Gly)*, 4.85 (H4), 3.80 (1H, H4), 7.59 (br, 4-NH), 5.14 (1H, H10), 1.89 (H11), 1.70 (H11), 2.22 (1H, H12), 1.54 (H12), 3.13 (H13), 2.72 (H13), 4.85 (13-NH), 6.13 (H15), 6.97 (br, 15-NH), 4.78 (H16), 1.83 (H17), 0.87 (H18), 1.12 (d, *J* = 7.4 Hz, H19), 3.15 (s, H20 or H21)*, 2.85 (s, H20 or H21)*, 3.93 (1H, H24), 1.87 (H25), 1.53 (H25), 1.70 (H26), 3.36 (1H, H27), 4.11 (H28), 5.22 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H30), 2.57 (1H, H31), 1.24 (H32), 1.08 (H32), 1.55 (H33), 1.07 (H34), 1.06 (H34), 1.42 (H35), 1.30 (H36), 1.14 (H36), 0.86 (H37), 1.49 (s, H38), 3.39 (3H, s, H39), 1.67 (s, H40), 0.92 (H41), 0.82 (H42), 0.83 (H43), 1.56 (s, H1'), 1.37 (s, H2') (Chemical shifts were assigned on the basis of the COSY data; *signals could be exchangeable); HRMS (ESI) *m/z* 960.5620 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{N}_7\text{NaO}_{13}$, 960.5628.

PGME derivatives of the natural trimethyloctanoic acid (**6a** and **6b**).



6a: (S)-PGME

6b: (R)-PGME

To a stirred solution of **1** (4.26 mg, 4.76×10^{-3} mmol) in $\text{MeCN}/\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ (2/2/3, 0.32 mL) was added $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (6.50 mg, 0.03 mmol) and NaIO_4 (41.46 mg, 0.19 mmol). After being stirred at room temperature for 12 h, water was added to the reaction mixture. The mixture was chromatographed on an ODS column with a stepwise elution of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (from 100:0 to 0:100). Fractions eluted with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (40:60 to 0:100) were combined and concentrated *in vacuo*. The material was split into two. A portion of the material was mixed with HBTU (13.73 mg, 0.04 mmol), HOBt (6.17 mg, 0.05 mmol), DIEA (11.0 μ L, 0.06 mmol) and (R)-PGME·HCl (7.86 mg, 0.04 mmol) in DMF (0.11 mL), which was stirred at room temperature. After 9 h, satd aq NH_4Cl was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with satd aq NH_4Cl (3 times) and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was chromatographed on an ODS column with a stepwise elution of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (from 100:0 to 0:100) and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1). Fractions eluted with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (0:100) was subjected to ODS HPLC on CAPCELL PACK C18 UG120 ($\phi 20 \times 250$ mm) with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (50:50) to afford **6a** (0.25 mg, 32%).

The remaining portion of the carboxylic acid (0.88 mg) was mixed with HBTU (19.63 mg, 0.05 mmol), HOBt (8.06 mg, 0.06 mmol), DIEA (16.35 μ L, 0.1 mmol) and (S)-PGME·HCl (11.72 mg, 0.06 mmol)

in DMF (0.16 mL), which was stirred for 11 h at room temperature. The reaction mixture was fractionated as described above to afford **6b** (0.25 mg, 32%).

6a: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -84.64 (*c* 0.02, CHCl₃); IR (neat) 3314, 2957, 2922, 2849, 1746, 1648, 1523 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.29-7.37 (5H), 6.4 (NH), 5.60 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.39 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.33 (m, 1H), 1.16 (m, 1H), 1.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.13 (m, 1H), 0.98 (m, 2H), 0.81 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H/ t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.70 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.2, 171.9, 128.9, 128.4, 127.2, 56.1, 52.8, 44.3, 42.6, 38.8, 31.5, 30.2, 27.8, 19.4, 18.8, 18.3, 11.3; HRMS (ESI) *m/z* 356.2196 [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₃₁NNaO₃, 356.2196.

6b: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 154.73 (*c* 0.02, CHCl₃); IR (neat) 3293, 2960, 2927, 1748, 1647, 1527 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.30-7.37 (5H), 6.36 (NH), 5.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.41 (m, 1H), 1.64 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.17 (m, 1H), 1.14 (m, 1H), 1.11 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.03 (m, 2H), 0.87 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 175.9, 171.5, 129.0, 128.5, 127.2, 56.1, 52.7, 44.3, 42.5, 38.8, 31.6, 30.4, 27.9, 19.6, 18.9, 18.3, 11.4; HRMS (ESI) *m/z* 356.2191 [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₃₁NNaO₃, 356.2196.

PGME derivatives of synthetic (2*S*,4*S*,6*R*)- trimethyloctanoic acid (15a and 15b).

(R)-4-benzyl-3-((2*S*,4*S*)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentanoyl)oxazolidin-2-one (**9**).

To a stirred solution of methyl (*S*)-3-hydroxyisobutyrate (2.0 g, 16.90 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (33.90 mL) was added CSA (0.33 g, 1.42 mmol) and PMB trichloroacetimidate (5.27 mL, 25.40 mmol). After being stirred for 12 h at room temperature, the reaction was quenched by addition of satd aq NaHCO₃. The mixture was extracted with CHCl₃, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue in cooled hexane was filtrated through Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was suspended in *n*-hexane/EtOAc (10/1), filtrated through a pad of silica, and used in the next reaction.

A solution of the residue (4.0 g) in anhydrous THF (84.50 mL) was cooled to 0 °C under nitrogen atmosphere, to which LAH (0.67 g, 17.60 mmol) was added. After being stirred for 5.5 h at 0 °C, the reaction was quenched with Na₂SO₄·10H₂O and the slurry was stirred at room temperature. The mixture was filtrated through a pad of silica and washed with CHCl₃. After concentration *in vacuo*, the residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 5/1 to 1/1) to obtain fractions that contain the target alcohol.

A stirred solution of the obtained alcohol (0.11 g) in 1.10 mL of anhydrous CH₂Cl₂ under nitrogen atmosphere was cooled to 0 °C, to which 2,6-lutidine (0.11 mL, 0.81 mmol) and Tf₂O (0.14 mL, 0.81 mmol) were added. After being stirred for 1 h at 0 °C, the reaction was quenched with satd aq NH₄Cl. The organic layer was washed with satd aq NH₄Cl, satd aq NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 10/1) to obtain fractions containing the triflate compound. The fractions were combined and concentrated, and the residue was immediately used in the next reaction.

A stirred solution of (*R*)-4-benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinone (99.80 mg, 0.54 mmol) in anhydrous THF (5.40 mL) under nitrogen atmosphere was cooled to -78 °C, to which 0.34 mL of 1.9 M NaHMDS was added. After being stirred for 15 min at -78 °C, the triflate compound (0.22 g) in 21.60 mL of anhydrous THF was added dropwise. The reaction mixture was stirred at -78 °C, warmed to 0 °C and stirred for 5 h, and then quenched with satd aq NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with CHCl₃, and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 5/1) to give a mixture of **8** and its diastereomer. The mixture was subjected to reversed-phase HPLC (Cosmosil AR-II, ϕ 20 × 250 mm, H₂O/MeCN (35/65)) to yield **9** (74.90 mg, 40%) as a colorless oil. The ratio of **9** and its diastereomer was 11:1, judged from their yield. Compound **9**: [α]_D²⁰ -5.97 (*c* 1.10, CHCl₃); IR (neat) 2932, 2856, 1776, 1206, 701 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.86-7.34 (m, 9H), 4.64 (m, 1H), 4.42 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 4.15 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 3.3, 9.1 Hz, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 3.26 (m, 1H), 2.50 (dd, *J* = 10.5, 13.4 Hz, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.66 (ddd, *J* = 7.2, 8.2, 14.0 Hz, 1H), 1.51 (ddd, *J* = 6.6, 8.7, 14.0 Hz, 1H), 1.16 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 177.4, 159.0, 153.0, 135.5, 130.7, 129.34, 129.31, 128.8, 127.2, 113.7, 75.8, 72.7, 65.89, 55.3, 55.2, 38.0, 37.8, 35.3, 31.3, 17.06 (2C); HRMS (ESI) *m/z* 448.2111 [M+Na]⁺ calcd for C₂₅H₃₁NNaO₅, 448.2094.

(2*S*,4*S*)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentan-1-ol (**10**).

A stirred solution of **9** (0.17 g, 0.39 mmol) in anhydrous THF (1.90 mL) under nitrogen atmosphere was cooled to 0 °C, to which LAH (18.0 mg, 0.48 mmol) was added. After being stirred for 5 h at 0 °C, the reaction was quenched with Na₂SO₄·10H₂O and the slurry was stirred at room temperature. The mixture was filtrated through a pad of silica and washed with EtOAc. After concentration *in vacuo*, the residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 3/1 to 2/1) to yield **10** (90.77 mg, 93%) as a colorless oil: [α]_D²⁰ -14.4 (*c* 0.98, CHCl₃); IR (neat) 3410, 2910, 2851, 1244, 1033, 818 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.44 (dd, *J* = 6.4, 10.5 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 6.4, 10.7 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 6.7, 9.0 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 6.3, 9.0 Hz, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.19 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 159.0, 130.6, 129.1, 113.7, 76.2, 72.6, 68.7, 55.2, 37.2, 32.9, 30.5, 16.9, 16.3; HRMS (ESI) *m/z* 275.1619 [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₂₄NaO₃, 275.1618.

1-(((2*S*,4*R*)-2,4-dimethylhexyl)oxy)methyl-4-methoxybenzene (**11**).

To a stirred solution of **10** (0.65 g, 2.59 mmol) in 17.30 mL of anhydrous CH₂Cl₂ under nitrogen atmosphere were added Et₃N (0.90 mL, 6.48 mmol), DMAP (32.0 mg, 0.26 mmol) and TsCl (0.60 g, 3.17 mmol) at room temperature. After being stirred for 12 h, satd aq NH₄Cl was added. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 5/1) to obtain fractions containing tosylated compounds.

A mixture of CuI (0.45 g, 2.34 mmol) and 1M MeMgBr (23.40 mL, 23.40 mmol) was cooled to -20 °C

under nitrogen atmosphere, to which the tosylated material (0.95 g) in anhydrous THF was added. The mixture was warmed to 0 °C and stirred for 10 h. The reaction was quenched with satd aq NH₄Cl and filtrated through Celite. The organic layer was washed with satd aq NH₄Cl, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 50/1) to yield **11** (0.53 g, 83% over 2 steps) as a colorless oil: [α]_D²⁰ -11.75 (*c* 1.03, CHCl₃); IR (neat) 2957, 2911, 1512, 1245, 1096, 819 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.48 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.34 (dd, *J* = 5.7, 8.9 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J* = 7.4, 9.2 Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.23 (m, 1H), 1.22 (m, 1H), 1.15 (m, 1H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 158.9, 130.8, 128.8, 113.5, 76.3, 72.5, 54.9, 40.6, 31.5, 30.8, 30.3, 18.8, 16.9, 11.3; HRMS (ESI) *m/z* 273.1821 [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₆NaO₂, 273.1825.

(R)-4-benzyl-3-((2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctanoyl)oxazolidin-2-one (**12**).

A stirred solution of **11** (0.24 g, 0.95 mmol) in CH₂Cl₂/H₂O (15:1, 9.50 mL) was cooled to 0 °C, to which DDQ (0.33 g, 1.44 mmol) was added. After being stirred for 1 h at 0 °C, the reaction mixture was quenched with satd aq NaHCO₃. The organic layer was washed with satd aq NaHCO₃, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/Et₂O = 4/1) to obtain a fraction that contained the target alcohol.

A stirred solution of the obtained material (0.28 g) in anhydrous CH₂Cl₂ (4.40 mL) under nitrogen atmosphere was cooled to 0 °C, to which 2,6-lutidine (0.45 g, 3.27 mmol) and Tf₂O (0.55 g, 3.27 mmol) were added. After being stirred for 1 h at 0 °C, the reaction was quenched with satd aq NH₄Cl. The organic layer was washed with satd aq NH₄Cl, satd aq NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 20/1) to obtain a fraction that contained triflated material. The fraction was concentrated *in vacuo*, and the residue was immediately used in the next reaction.

A stirred solution of (*R*)-4-benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinone (0.16 g, 0.71 mmol) in anhydrous THF (7.10 mL) under nitrogen atmosphere was cooled to -78 °C, to which 0.45 mL of 1.9 M NaHMDS was added. After being stirred for 15 min at -78 °C, the triflated material (0.12 g) in 15.10 mL of anhydrous THF was added dropwise. The reaction mixture was stirred at -78 °C, warmed to 0 °C and stirred for 5.5 h, and then quenched with satd aq NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with CHCl₃, and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO₂, *n*-hexane/EtOAc = 5/1) to give a mixture of **12** and its diastereomer. The mixture was subjected to reversed-phase HPLC (YMC Carotenoid, ϕ 20 × 250 mm, H₂O/MeCN (35:65)) to yield **12** (50.6 mg, 15% over 3 steps) as a colorless oil. The ratio of **12** and its diastereomer was 48:1, judged from their yield: [α]_D²⁰ -37.88 (*c* 2.32, CHCl₃); IR (neat) 2959, 2924, 1779, 1697, 1384, 1206, 701 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.19-7.35 (5H), 4.68 (m, 1H), 4.17 (m, 2H), 3.94 (m, 1H), 3.29 (dd, *J* = 3.6, 13.5 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 9.7, 13.3 Hz, 1H), 1.82 (ddd, *J* = 6.4, 8.1, 14.1 Hz, 1H), 1.55

(m, 1H), 1.42 (m, 1H), 1.27 (m, 1H), 1.22 (m, 1H), 1.16 (m, 1H/ d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.16 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.10 (m, 2H), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.86 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 12.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 177.7, 153.0, 135.4, 129.4, 128.9, 127.3, 65.9, 55.3, 43.9, 42.1, 38.0, 35.2, 31.6, 30.3, 28.2, 19.8, 18.9, 17.8, 11.4; HRMS (ESI) m/z 368.2197 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 368.2196.

(R)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**15a**).

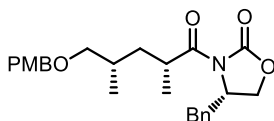
To a stirred solution of **12** (24.90 mg, 5.85×10^{-2} mmol) in THF/ H_2O (4:1, 0.98 mL) was added $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7.36 mg, 0.18 mmol) and 30% aq H_2O_2 (66.30 μL , 0.59 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C, warmed to room temperature and stirred for 2.5 h, and then quenched with satd aq $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. After being acidified with 6 N HCl, the reaction mixture was extracted with CHCl_3 . The organic layers were combined and concentrated *in vacuo* to give a residue containing **14**.

A half portion of the material containing **14** (18.20 mg), HBTU (76.80 mg, 0.20 mmol), HOBt (31.10 mg, 0.20 mmol), DIEA (33.70 mL, 0.20 mmol) and (*R*)-PGME·HCl (42.60 mg, 0.21 mmol) were dissolved in 0.98 mL of anhydrous DMF, which was allowed being stirred for 10 h at room temperature. The reaction was quenched with satd aq NH_4Cl , dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO_2 , *n*-hexane/EtOAc = 3/1) to yield **15a** (8.70 mg, 89%) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -127.05 (c 0.72, CHCl_3); IR (neat) 2959, 2924, 1779, 1697, 1384, 1206, 701 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.29-7.36 (5H), 6.42 (NH), 5.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.39 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.32 (m, 1H), 1.16 (m, 1H), 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.12 (m, 1H), 1.07 (m, 1H), 0.97 (m, 2H), 0.81 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.70 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 175.9, 171.5, 136.8, 128.9, 128.4, 127.2, 56.1, 52.7, 44.3, 42.7, 38.8, 31.5, 30.2, 27.9, 19.4, 18.8, 18.3, 11.3; HRMS (ESI) m/z 356.2200 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 356.2196.

(S)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**15b**).

A solution of the remaining half portion of the material contain **14** (19.10 mg), HBTU (78.50 mg, 0.21 mmol), HOBt (33.0 mg, 0.24 mmol), DIEA (35.50 mL, 0.21 mmol) and (*S*)-PGME·HCl (44.80 mg, 0.22 mmol) in 1.0 mL of anhydrous DMF was allowed stirred for 10 h at room temperature. The reaction was quenched with satd aq NH_4Cl , dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO_2 , *n*-hexane/EtOAc = 3/1) to yield **15b** (6.0 mg, 61% over 2 steps) as a colorless oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +113.41 (c 0.50, CHCl_3); IR (neat) 3300, 2960, 2927, 1749, 1647 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.30-7.37 (5H), 6.36 (NH), 5.59 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.41 (m, 1H), 1.65 (ddd, $J = 6.0, 8.5, 14.0$ Hz, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.25 (m, 1H), 1.17 (m, 1H), 1.14 (m, 1H), 1.11 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.03 (m, 2H), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.79 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 175.9, 171.5, 136.7, 129.0, 128.7, 127.2, 56.1, 52.7, 44.3, 42.5, 38.2, 31.6, 30.4, 27.9, 19.6, 18.9, 18.3, 11.4; HRMS (ESI) m/z 356.2201 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 356.2196.

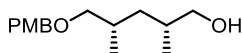
PGME derivatives of synthetic (2*S*,4*S*,6*S*)-trimethyloctanoic acid (S5a/b).



(S)-4-benzyl-3-((2*R*,4*S*)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentanoyl)oxazolidin-2-one (**S1**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **9** (1.7 g, 53% over 4 steps). The ratio of **S1** and its diastereomer was 27:1, judged from their yield.

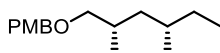
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +21.49$ (*c* 0.73, CHCl_3); IR (neat) 2957, 2931, 2854, 1775, 1694, 1207, 702 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.84-7.34 (9H), 4.66 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.09-4.18 (m, 2H), 3.96 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.28 (dd, *J* = 3.2, 13.5 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 5.5, 8.7 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 6.7, 9.1 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 10.3, 13.9 Hz, 1H), 1.96 (ddd, *J* = 6.2, 7.5, 14.0 Hz, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.25 (ddd, *J* = 6.3, 7.5, 13.6 Hz, 1H), 1.20 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.0 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 177.1, 158.9, 152.9, 135.3, 130.7, 129.2, 128.9, 128.8, 127.1, 113.6, 75.2, 72.4, 65.8, 55.2, 55.1, 37.9 (2C), 35.1, 31.3, 17.9, 17.6; HRMS (ESI) *m/z* 448.2119 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NNaO}_5$, 448.2094; colorless oil.



(2R,4S)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentan-1-ol (**S2**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **10** (0.8 g, 87%).

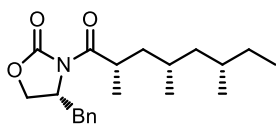
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +5.73$ (*c* 1.07, CHCl_3); IR (neat) 3405, 2910, 2869, 1512, 1246, 1035 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.23 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.40 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.40 (dd, *J* = 5.3, 10.8 Hz, 1H), 3.31 (dd, *J* = 5.8, 10.3 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 5.8, 8.9 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 6.4, 9.7 Hz, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 0.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.90 (m, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 158.8, 130.4, 128.9, 113.5, 75.4, 72.4, 67.3, 54.9, 37.4, 32.9, 30.7, 17.9, 17.4; HRMS (ESI) *m/z* 275.1616 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NaO}_3$, 275.1618; colorless oil.



1-(((2*S*,4*S*)-2,4-dimethylhexyl)oxy)methyl)-4-methoxybenzene (**S3**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **11** (0.6 g, 75% over 2 steps).

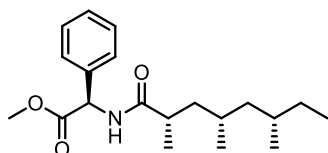
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +12.06$ (*c* 0.84, CHCl_3); IR (neat) 2956, 2910, 1511, 1245, 1095, 819 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 4.47 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.37 (dd, *J* = 7.2, 9.2 Hz, 1H), 3.22 (dd, *J* = 5.3, 9.1 Hz, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.14 (m, 1H), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.97 (m, 1H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.91 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 158.9, 130.9, 128.9, 113.6, 75.7, 72.5, 55.0, 41.1, 31.5, 30.8, 29.0, 19.7, 17.9, 11.1; HRMS (ESI) *m/z* 273.1823 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NaO}_2$, 273.1825; colorless oil.



(*R*)-4-benzyl-3-((2*S*,4*S*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctanoyl)oxazolidin-2-one (**S4**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **12** (41.2 mg, 11% over 3 steps). The ratio of **S4** and its diastereomer was 54:1, judged from their yield.

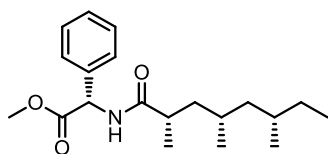
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -20.58 (*c* 0.83, CHCl_3); IR (neat) 2957, 2913, 1778, 1696, 1383, 1204 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.20-7.35 (5H), 4.69 (m, 1H), 4.16 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.30 (dd, $J = 3.5, 13.8$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 9.8, 13.3$ Hz, 1H), 1.92 (ddd, $J = 5.1, 9.0, 13.7$ Hz, 1H), 1.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.51 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.34 (m, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.11 (m, 1H), 1.08 (m, 1H), 0.94 (m, 1H), 0.92 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.86 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 177.6, 153.0, 135.3, 129.4, 128.9, 127.3, 65.8, 55.3, 44.5, 41.3, 38.0, 35.1, 31.4, 29.0, 28.3, 20.6, 19.6, 18.2, 11.1; HRMS (ESI) m/z 368.2197 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 368.2196; colorless oil.



(*R*)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**S5a**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **15a** (8.08 mg, 886% over 2 steps).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -102.90 (*c* 0.81, CHCl_3); IR (neat) 3293, 2956, 2926, 1746, 1648 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.29-7.36 (5H), 6.42 (NH), 5.60 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.39 (m, 1H), 1.68 (ddd, $J = 4.6, 9.7, 14.0$ Hz, 1H), 1.34 (m, 2H), 1.22 (m, 1H), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.10 (m, 1H), 1.02 (m, 1H), 0.95 (m, 1H), 0.85 (m, 1H), 0.83 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.79 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.70 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 175.8, 171.6, 136.8, 128.9, 128.4, 127.2, 56.1, 52.7, 44.9, 41.9, 38.9, 31.3, 28.0, 29.0, 20.2, 19.5, 18.6, 11.2; HRMS (ESI) m/z 356.2199 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 356.2196; colorless oil.



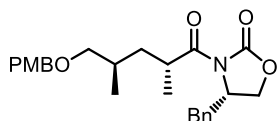
(*S*)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**S5b**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **15b** (9.2 mg, 91% over 2 steps).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 114.56 (*c* 0.92, CHCl_3); IR (neat) 3296, 2957, 2927, 1748, 1645, 697 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.30-7.37 (5H), 6.36 (NH), 5.59 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.41 (m, 1H), 1.72 (ddd, $J = 4.8, 9.5, 14.1$ Hz, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.32 (m, 1H), 1.12 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.17 (m, 1H), 1.05 (m, 1H), 1.04 (m, 1H), 0.92 (m, 1H), 0.89 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 175.8, 171.5, 136.7, 129.0, 128.4, 127.2, 56.2, 52.7, 45.0, 41.7, 38.9, 31.5, 29.1, 28.0, 20.3, 19.7, 18.7, 11.2; HRMS (ESI) m/z 356.2204 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for

C₂₀H₃₁NNaO₃, 356.2196; colorless oil.

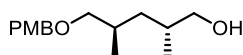
PGME derivatives of synthetic (2*S*,4*R*,6*R*)- trimethyloctanoic acid (S10a/b).



(R)-4-benzyl-3-((2*S*,4*R*)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentanoyl)oxazolidin-2-one (**S6**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **9** (1.7 g, 33% over 4 steps). The ratio of **S6** and its diastereomer was 10:1, judged from their yield.

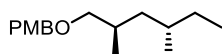
$[\alpha]_D^{20} +7.02$ (*c* 0.71, CHCl₃); IR (neat) 2976, 2934, 2857, 1776, 1695, 1206, 1093, 701 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.86-7.33 (9H), 4.62 (m, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.13 (m, 1H), 4.06 (dd, *J* = 3.0, 9.1 Hz, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.25 (dd, *J* = 3.2, 13.4 Hz, 1H), 3.30 (m, 2H), 2.51 (dd, *J* = 10.2, 13.2 Hz, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.67 (ddd, *J* = 7.0, 8.0, 14.6 Hz, 1H), 1.52 (ddd, *J* = 6.4, 7.5, 13.8 Hz, 1H), 1.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 177.3, 159.0, 152.9, 135.5, 130.7, 129.9 (2C), 113.6, 128.8, 127.1, 75.8, 72.7, 65.8, 55.6 (2C), 37.9, 37.8, 35.2, 31.2, 17.0 (2C); HRMS (ESI) *m/z* 448.2115 [M+Na]⁺ calcd for C₂₅H₃₁NNaO₅, 448.2094; colorless oil.



(2S,4R)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentan-1-ol (**S7**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **10** (0.7 g, 77%).

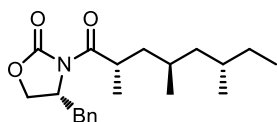
$[\alpha]_D^{20} +15.03$ (*c* 0.92, CHCl₃); IR (neat) 3405, 2912, 2869, 1512, 1244, 1033, 819 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.41 (dd, *J* = 6.5, 10.5 Hz, 1H), 3.36 (dd, *J* = 6.3, 10.5 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 6.3, 8.8 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 6.9, 9.2 Hz, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.18 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 158.9, 139.0, 130.5, 113.5, 76.0, 72.5, 68.4, 55.0, 37.0, 32.8, 30.4, 16.8, 16.2; HRMS (ESI) *m/z* 275.1616 [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₂₄NaO₃, 275.1618; colorless oil.



1-(((2*R*,4*R*)-2,4-dimethylhexyl)oxy)methyl-4-methoxybenzene (**S8**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **11** (0.6 g, 96% over 2 steps).

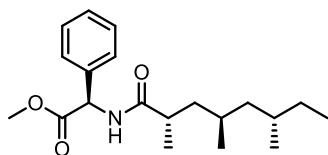
$[\alpha]_D^{20} +12.09$ (*c* 0.82, CHCl₃), IR (neat) 2956, 2910, 2850, 1511, 1246, 1096, 820 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.35 (dd, *J* = 5.8, 8.9 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J* = 7.1, 8.9 Hz, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.23 (m, 2H), 1.16 (m, 1H), 0.97 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 158.9, 130.8, 128.9, 113.6, 76.3, 72.4, 55.0, 40.6, 31.5, 30.8, 30.3, 18.8, 16.9, 11.3; IR (neat) 2956, 2910, 2810, 1511, 1245, 1096, 819 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz); HRMS (ESI) *m/z* 273.1823 [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₆NaO₂, 273.1825; colorless oil.



(*R*)-4-benzyl-3-((2*S*,4*R*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctanoyl)oxazolidin-2-one (**S9**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **12** (36.3 mg, 16% over 3 steps). The ratio of **S9** and its diastereomer was 3:1, judged from their yield.

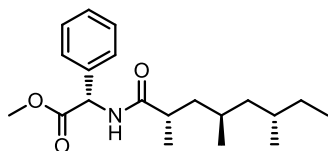
$[\alpha]_D^{20}$ -15.79 (*c* 0.94, CHCl₃); IR (neat) 2960, 2916, 1780, 1698, 1383, 1209 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.20-7.35 (5H), 4.68 (m, 1H), 4.16 (m, 2H), 3.89 (m, 1H), 3.32 (dd, *J* = 3.6, 13.9 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 10.1, 13.0 Hz, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.16 (m, 1H/d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.10 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 177.8, 153.0, 135.5, 129.4, 128.9, 127.3, 65.9, 55.4, 44.7, 41.7, 38.1, 35.3, 31.6, 30.2, 27.9, 19.0 (2C), 16.8, 11.4; HRMS (ESI) *m/z* 368.2198 [M+Na]⁺ calcd for C₂₁H₃₁NNaO₃, 368.2196; colorless oil.



(*R*)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*R*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**S10a**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **15a** (8.0 mg, 82% over 2 steps).

$[\alpha]_D^{20}$ -82.39 (*c* 0.74, CHCl₃); IR (neat) 3282, 2959, 2920, 1751, 1634 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.29-7.36 (5H), 6.38 (NH), 5.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.38 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.27 (m, 1H), 1.23 (m, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.02 (m, 2H), 0.96 (m, 1H), 0.83 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H), 0.77 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.70 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.1, 171.6, 136.7, 128.9, 128.4, 128.3, 56.2, 52.8, 44.4, 42.3, 38.8, 31.6, 30.4, 27.8, 19.4, 18.8, 17.8, 11.4; HRMS (ESI) *m/z* 356.2200 [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₃₁NNaO₃, 356.2196; colorless amorphous solid.

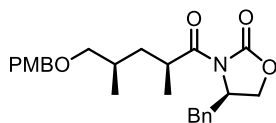


(*S*)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*R*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**S10b**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **15b** (8.5 mg, 88% over 2 steps).

$[\alpha]_D^{20}$ +128.66 (*c* 0.73, CHCl₃); IR (neat) 3295, 2959, 2926, 1748, 1647 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.23-7.37 (5H), 6.38 (NH), 5.58 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.38 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.31 (m, 1H), 1.27 (m, 1H), 1.14 (m, 1H), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.08 (m, 2H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 176.1, 171.5, 136.8, 128.9, 128.5, 127.2, 56.2, 52.7, 44.5, 42.4, 38.8, 31.7, 30.4, 27.8, 19.4, 18.9, 17.6, 11.4; HRMS (ESI) *m/z* 356.2195 [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₃₁NNaO₃, 356.2196; colorless oil.

PGME derivatives of synthetic (2*S*,4*R*,6*S*)- trimethyloctanoic acid (S15a/b).



(S)-4-benzyl-3-((2*R*,4*R*)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentanoyl)oxazolidin-2-one (**S11**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **9** (1.9 g, 32% over 4 steps). The ratio of **S11** and its diastereomer was 23:1, judged from their yield.

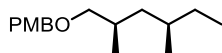
$[\alpha]_D^{20}$ -21.85 (*c* 0.93, CHCl₃); IR (neat) 2958, 2931, 2854, 1775, 1695, 1385, 1207, 1092, 819, 702 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.85-7.35 (9H), 4.67 (m, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.11-4.19 (m, 2H), 3.96 (m, 1H), 3.41 (dd, *J* = 5.8, 9.5 Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 3.5, 13.2 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 7.0, 9.3 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 9.7, 13.2 Hz, 1H), 1.97 (ddd, *J* = 6.2, 8.2, 14.1 Hz, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.25 (ddd, *J* = 6.4, 7.5, 13.6 Hz, 1H), 1.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.00 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 177.2, 158.9, 153.0, 135.3, 130.8, 129.3, 129.0, 128.8, 127.2, 113.6, 75.2, 72.5, 65.8, 55.3, 55.1, 38.0, 37.9, 35.1, 31.3, 18.0, 17.7; HRMS (ESI) *m/z* 448.2106 [M+Na]⁺ calcd for C₂₅H₃₁NNaO₅, 448.2094; colorless oil.



(2R,4R)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2,4-dimethylpentan-1-ol (**S12**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **10** (0.8 g, 85%).

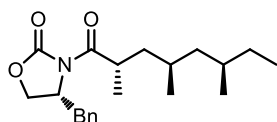
$[\alpha]_D^{20}$ -5.22 (*c* 1.05, CHCl₃); IR (neat) 3362, 2911, 2869, 1511, 1246, 1033, 822 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.23 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.40 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.40 (dd, *J* = 5.3, 10.2 Hz, 1H), 3.31 (dd, *J* = 6.2, 10.5 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 6.0, 9.1 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 7.1, 9.4 Hz, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.90 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 158.9, 130.4, 128.9, 113.5, 75.4, 72.5, 67.3, 54.9, 37.5, 32.9, 30.7, 17.9, 17.4; HRMS (ESI) *m/z* 275.1613 [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₂₄NaO₃, 275.1618; colorless oil.



1-(((2*R*,4*S*)-2,4-dimethylhexyl)oxy)methyl-4-methoxybenzene (**S13**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **11** (0.6 g, 76% over 2 steps).

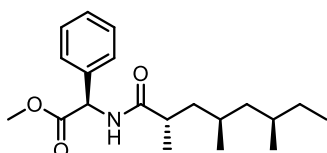
$[\alpha]_D^{20}$ -10.43 (*c* 1.21, CHCl₃); IR (neat) 2910, 2851, 1512, 1245, 1095, 819 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.36 (dd, *J* = 5.5, 9.0 Hz, 1H), 3.21 (dd, *J* = 7.3, 9.3 Hz, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.13 (m, 1H), 0.98 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.97 (m, 1H), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H/ t, *J* = 6.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 159.0, 130.9, 128.9, 113.6, 75.7, 72.5, 55.0, 41.1, 31.5, 30.9, 29.0, 19.7, 18.0, 11.1; HRMS (ESI) *m/z* 273.1821 [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₆NaO₂, 273.1825; colorless oil.



(R)-4-benzyl-3-((2*S*,4*R*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctanoyl)oxazolidin-2-one (**S14**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **12** (39.4 mg, 15% over 3 steps). The ratio of **S14** and its diastereomer was 4:1, judged from their yield.

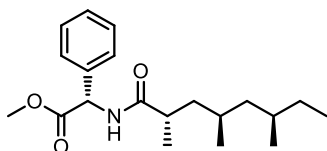
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -41.31 (*c* 0.75, CHCl_3); IR (neat) 2959, 2915, 1779, 1697, 1209 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.20-7.34 (5H), 4.67 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.30 (dd, $J = 2.8, 13.7$ Hz, 1H), 2.70 (dd, $J = 10.0, 13.5$ Hz, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.52 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.42 (m, 1H), 1.34 (m, 1H), 1.24 (m, 1H), 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.08 (m, 1H), 0.99 (m, 1H), 0.91 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 177.8, 152.9, 135.4, 129.4, 128.9, 127.3, 65.9, 55.3, 45.1, 40.6, 38.0, 35.3, 31.5, 29.2, 27.7, 19.7, 19.5, 16.4, 11.2; HRMS (ESI) m/z 368.2198 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 368.2196; colorless oil.



(R)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*R*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**S15a**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **15a** (10.7 mg, 87% over 2 steps).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -117.43 (*c* 0.89, CHCl_3); IR (neat) 3275, 2959, 2915, 1752, 1641, 1535 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.30-7.37 (5H), 6.40 (NH), 5.60 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.36 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.38 (m, 2H), 1.37 (m, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.17 (m, 1H), 1.14 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.97 (m, 1H), 0.90 (m, 1H), 0.80 (m, 3H), 0.79 (m, 3H), 0.78 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.2, 171.6, 136.7, 129.0, 128.5, 127.3, 56.2, 52.7, 44.9, 41.3, 38.7, 31.4, 29.0, 27.8, 20.1, 19.7, 17.5, 11.2; HRMS (ESI) m/z 356.2205 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 356.2196; colorless oil.



(S)-methyl-2-phenyl-2-((2*S*,4*R*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctamido)acetate (**S15b**).

This compound was synthesized in a same manner as that of **15a** (11.3 mg, 92% over 2 steps).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +104.87 (*c* 0.94, CHCl_3); IR (neat) 3307, 2958, 2928, 1749, 1649, 1524 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.30-7.37 (5H), 6.39 (NH), 5.57 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.37 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.42 (m, 2H), 1.34 (m, 1H), 1.23 (m, 1H), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.05 (m, 1H), 0.95 (m, 1H), 0.85 (m, 6H), 0.84 (m, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.1, 171.5, 136.7, 128.9, 128.5, 127.2, 56.2, 52.7, 44.5, 42.1, 38.8, 31.6, 30.4, 27.8, 20.9, 19.4, 17.6, 11.4; HRMS (ESI) m/z

356.2203 [M+Na]⁺ calcd for C₂₀H₃₁NNaO₃, 356.2196; colorless oil .

Compound list S1. List of compounds analyzed in Figure 1-10.

^a Compounds that have been analyzed in reference 12c.

^b Compounds whose $\Delta\delta_{AB}$ values were plotted in Figure 1-11.

^c Compounds whose $\Delta\delta_{CD}$ values were plotted in Figure 1-11.

4,6,8,10,16,18-hexamethyldocosane^a

4,6,8,10,16-pentamethyldocosane^a

(4*R*,6*R*,*E*)-4,6-dimethylocta-2,7-dien-1-ol^a

1-((3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dimethylhexyl)benzene^a

tert-butyl((4*R*,6*R*,*E*)-4,6-dimethylocta-2,7-dienyloxy)diphenylsilane^a

(2*R*,3*S*,4*R*,6*R*)-2,4,6-trimethyloct-7-ene-1,3-diol^a

((2*S*,3*S*)-3-((2*R*,4*R*)-4-methylhex-5-en-2-yl)oxiran-2-yl)methanol^a

(2*S*,4*R*)-2,4-dimethyl-6-phenylhexan-1-ol^a

kalkitoxin^a

(2*E*,4*E*,6*E*,8*S*,10*S*,12*E*,14*S*)-*N*-((*S*)-1-hydroxypropan-2-yl)-8,10,12,14-tetramethylhexadeca-2,4,6,12-tetraenamide^a

(2*E*,4*E*,6*E*,8*S*,10*S*,12*E*,14*R*)-*N*-((*S*)-1-hydroxypropan-2-yl)-8,10,12,14-tetramethylhexadeca-2,4,6,12-tetramide^a

sambutoxin^a

10-(benzyloxymethoxy)-11-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-5,7,9-trimethylundec-2-enoate^a

(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloct-7-ene-1,3-diol^a

((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*R*)-4-methylhex-5-en-2-yl)oxiran-2-yl)methanol^a

tert-butyl((4*R*,6*R*,*E*)-4,6-dimethylocta-2,7-dienyloxy)diphenylsilane^a

(4*S*,6*R*,*E*)-4,6-dimethylocta-2,7-dien-1-ol^a

militarinone^a

(*S*)-3-((3*S*,5*S*)-6-(benzyloxy)-3,5-dimethylhexanoyl)-4-phenyloxazolidin-2-one^a

(2*R*,3*S*,4*R*,6*R*)-6-(1,3-dithian-2-yl)-2,4-dimethylheptane-1,3-diol^a

(4*R*,6*R*,8*R*,*E*)-4,6,8,10-tetramethylundec-2-en-1-ol^a

(2*S*,3*S*,4*R*,6*R*,8*R*)-3-hydroxy-2,4,6,8,10-pentamethylundecanoic acid^a

((2*S*,3*S*)-3-((2*R*,4*R*,6*R*)-4,6,8-trimethylnonan-2-yl)oxiran-2-yl)methanol^a

lardolure^a

tyroscherin^a

((2*R*,3*R*)-3-((2*R*,4*R*,6*R*)-4,6,8-trimethylnonan-2-yl)oxiran-2-yl)methanol^a

tert-butyldiphenyl((4*R*,6*R*,8*R*,*E*)-4,6,8,10-tetramethylundec-2-enyloxy)silane^a

(2*R*,3*S*,4*R*,6*R*,8*R*)-2,4,6,8,10-pentamethylundecane-1,3-diol^a

lardolure^a

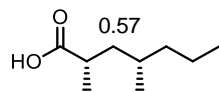
(4*R*,6*R*,8*R*,*E*)-4,6,8,10-tetramethylundec-2-en-1-ol^a
 (2*E*,4*E*,6*E*,8*R*,10*S*,12*E*,14*S*)-*N*-((*S*)-1-hydroxypropan-2-yl)-8,10,12,14-tetramethylhexadeca-2,4,6,12-tetraenamide^a
 4,6,8,10,16,18-hexamethyldocosane^a
 ((2*S*,3*S*)-3-((2*R*,4*R*,6*R*)-4,6,8-trimethylnonan-2-yl)oxiran-2-yl)methanol^a
tert-butyldiphenyl((4*R*,6*R*,8*R*,*E*)-4,6,8,10-tetramethylundec-2-enyloxy)silane^a
 (2*E*,4*E*,6*E*,8*R*,10*S*,12*E*,14*R*)-*N*-((*S*)-1-hydroxypropan-2-yl)-8,10,12,14-tetramethylhexadeca-2,4,6,12-tetraenamide^a
 (5*R*,7*S*,9*S*,10*S*,*E*)-*tert*-butyl 10-(benzyloxymethoxy)-11-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-5,7,9-trimethylundec-2-enoate^a
 (2*R*,3*S*,4*R*,6*R*,8*R*)-2,4,6,8,10-pentamethylundecane-1,3-diol^a
 blasticidin A^a
 (5*R*,7*S*,9*S*,10*S*,*E*)-*tert*-butyl 10-(benzyloxymethoxy)-11-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-5,7,9-trimethylundec-2-enoate^a
 TMC 151^a
 (5*R*,7*S*,9*S*,10*R*,*E*)-*tert*-butyl 10-(benzyloxymethoxy)-11-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-5,7,9-trimethylundec-2-enoate^a
 (2*S*,4*S*)-2,4-dimethyl-6-phenylhexan-1-ol^a
 ((2*R*,3*R*)-3-((2*R*,4*R*,6*R*)-4,6,8-trimethylnonan-2-yl)oxiran-2-yl)methanol^a
 1-((3*S*,5*S*)-6-chloro-3,5-dimethylhexyl)benzene^a
 (2*S*,4*S*,6*S*)-*tert*-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^a

35*S*,38*R* *epi*-Microcolin^{a,b}
 (2*R*,4*S*,6*S*)-*tert*-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^{a,b}
 (4*S*,6*S*,8*R*)-9-*tert*-butoxy-4,6,8-trimethyl-9-oxononanoic acid^{a,b}
 (2*S*,4*S*)-5-acetoxy-2,4-dimethylpentanoic acid^{a,b}
 (5*S*,7*S*,9*S*,10*S*,*E*)-*tert*-butyl (2*S*,4*R*)-*tert*-butyl 2,4-dimethyl-6-phenylhexanoate^{a,b}

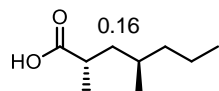
36*S*,38*R* *epi*-Microcolin^{a,b}
 (2*R*,4*S*,6*R*)-*tert*-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^{a,b}
 atpenin A4^{a,b}
 atpenin B^{a,b}
 atpenin A5^{a,b}
 tumonoic acid^{a,b}
 (2*S*,4*S*,6*R*)-*tert*-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^{a,b}
 (4*S*,6*S*)-7-*tert*-butoxy-4,6-dimethyl-7-oxoheptanoic acid^{a,b}
 (2*S*,4*S*)-*tert*-butyl 2,4-dimethyl-6-phenylhexanoate^{a,b}
 (36*S*,38*S*)-*epi*-microcolin A^{a,b}
 (36*R*,38*R*)-microcolon A^{a,b}

tumescenamide C^b

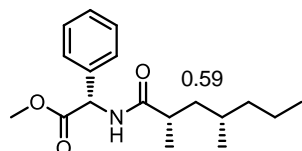
(2*S*,4*S*)-2,4-dimethylheptanoic acid^b



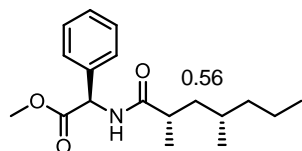
(2*S*,4*R*)-2,4-dimethylheptanoic acid^b



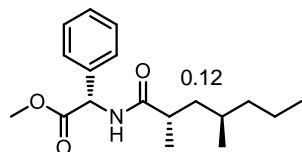
(*S*)-methyl 2-((2*S*,4*S*)-2,4-dimethylheptanamido)-2-phenylacetate^b



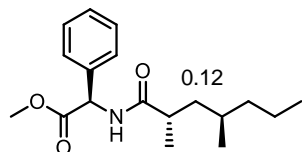
(*R*)-methyl 2-((2*S*,4*S*)-2,4-dimethylheptanamido)-2-phenylacetate^b



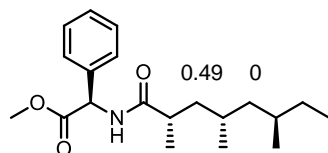
(*S*)-methyl 2-((2*S*,4*R*)-2,4-dimethylheptanamido)-2-phenylacetate^b



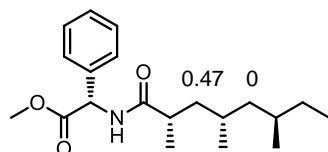
(*R*)-methyl 2-((2*S*,4*R*)-2,4-dimethylheptanamido)-2-phenylacetate^b



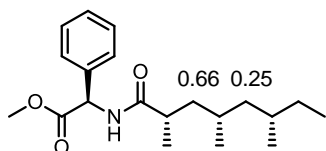
(*R*)-methyl 2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctanamido)acetate (**15a**)^{b,c}



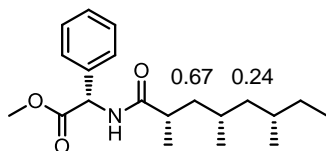
(*S*)-methyl 2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*R*)-2,4,6-trimethyloctanamido)acetate (**15b**)^{b,c}



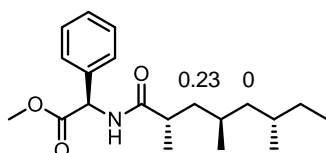
(*R*)-methyl 2-phenyl-2-((2*S*,4*S*,6*S*)-2,4,6-trimethyloctanamido)acetate (**S5a**)^{b,c}



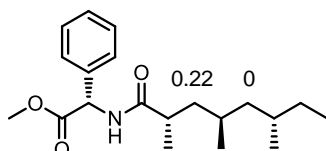
(S)-methyl 2-phenyl-2-((2S,4S,6S)-2,4,6-trimethyloctanamidoacetate (**S5b**)^{b,c}



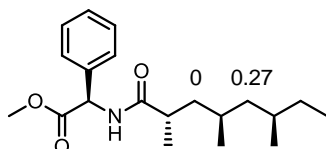
(R)-methyl 2-phenyl-2-((2S,4R,6S)-2,4,6-trimethyloctanamidoacetate (**S10a**)^{b,c}



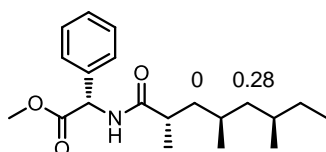
(S)-methyl 2-phenyl-2-((2S,4R,6S)-2,4,6-trimethyloctanamidoacetate (**S10b**)^{b,c}



(R)-methyl 2-phenyl-2-((2S,4R,6R)-2,4,6-trimethyloctanamidoacetate (**S15a**)^{b,c}



(S)-methyl 2-phenyl-2-((2S,4R,6R)-2,4,6-trimethyloctanamidoacetate (**S15b**)^{b,c}



(R)-3-((4S,6S,E)-4,6-dimethyl-8-(methyl((2S,3R)-3-methylpentan-2-yl)amino)oct-2-enoyl)-4-phenyloxazolidon-2-one^{a,c}

(3R,4S,6S)-8-((R)-N,2-dimethylbutanamido)-3,4,6-trimethyloctanoic acid^{a,c}

(2S,4S,6R)-tert-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^{a,c}

ent-vittatalactone^{a,c}

(2S,4S,6S)-tert-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^{a,c}

(4S,6S,8R)-9-tert-butoxy-4,6,8-trimethyl-9-octanonanoic acid^{a,c}

ent-vittatalactone^{a,c}

(2*R*,4*S*,6*S*)-*tert*-butyl 2,4,6-trimethyl-8-phenyloctanoate^{a,c}

(2*S*,3*S*,4*R*,6*R*,8*R*)-3-hydroxy-2,4,6,8,10-pentamethylundecanoic acid^{a,c}

Cell culture.

HT1080 cells were cultured at 37 °C under an O₂ atmosphere (21%) in DMEM (Gibco) containing 10% FCS, penicillin and streptomycin. Hypoxic condition (1% O₂) was prepared in a multi-gas incubator (SANYO).

HIF-1 reporter assay.

x5HRE/HT1080 cells, stable transformant cell lines with a 5xHRE/pGL3/VEGF/E1b reporter plasmid, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. For reporter assay, cells (1.0×10^4) were seeded in 96-well plates (in 100 μ l) and pre-incubated for 24 h. After 1 h from the addition of compounds, the cells were incubated under hypoxia (1% O₂) for 24 h. The cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) 3 times, followed by lysis in 30 μ l of lysis buffer [20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100]. Twenty-microliter of the cellular lysate was employed for the luciferin-luciferase assay [50 mM Tris pH 8.0, 5 mM MgSO₄, 0.125 mM D-luciferin, 0.5 mM ATP, and 0.5 mM CoA]. Epiluminescence was measured using an EnVision luminometer (Perkin Elmer). To calculate the relative luciferase activity, the luminescence units were normalized with total protein content in each well. Cell proliferation was measured by using Alamar Blue.

Western blot analysis.

Before the day of verucopeptin treatment HT1080 cells were plated at a density of 1.5×10^5 cells per a 60 mm tissue culture dish. Compound-treated cells were washed with ice-cold PBS and lysed in extraction buffer A [50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.2% NP-40, 0.2 mM PMSF and 20 nM MG132]. Cell extracts were cleared by centrifuging at $15,000 \times g$ for 10 min at 4°C. Total protein concentration was determined by BCA assay (Nacalai Tesque). Protein extracts (25 μ g) were subjected to SDS-PAGE followed by blotting onto a PVDF membrane. The membrane was briefly washed with PBST buffer [PBS containing 0.1% Tween20] and blocked with blocking buffer (PBST buffer containing 5% non-fat milk or 3% BSA). The membrane was incubated with primary antibody in blocking buffer overnight. After washing with PBST buffer three times, the membrane was incubated with secondary antibody for 1 h. Antibodies used were as follows: anti-human HIF-1 α mAb (clone54, Becton Dickson), anti-human HIF-1 β mAb (D28F3, Cell Signaling Technology), anti-human HSP60 pAb (Santa Cruz), anti-human p70 ribosomal S6 kinase mAb (32D7, Cell Signaling Technology), anti-human phospho-p70 ribosomal S6 kinase (Ser380) mAb (9D9, Cell Signaling Technology), anti-human S6 ribosomal protein mAb (5G10, Cell Signaling Technology), anti-human phosphor-S6 ribosomal protein (Ser235/236) mAb (D57.2.2E, Cell Signaling Technology), anti-human α -tubulin mAb (11H10, Cell Signaling Technology), alkaline phosphatase or horse radish peroxidase-conjugated goat IgG

against mouse or rabbit IgG (Promega) and alkaline phosphatase-conjugated rabbit IgG against goat IgG (Abcam). The results were visualized by the nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP/NBT) colorimetric detection or enhanced chemiluminescence.

Quantitative RT-PCR.

Total RNA was isolated using Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene) according to the manufacturer's instruction. cDNA was synthesized using ReverTra Ace α (Toyobo). PCR reactions were performed using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostic) in ABI Step One Plus (Applied Biosystems). 18S ribosomal RNA was used as an internal control. The following primers were used: 5'-GCAATTATTCATGGAACG-3' (18S sense); 5'-GGACTTAATCAACGCAAGC-3' (18S antisense); 5'-GCAGCTTGAGTTAAACGAACG-3' (VEGF sense); 5'-GGTTCCCGAAACCCTGAG-3' (VEGF antisense); 5'-GGTTGTGCCATACTCATGACC-3' (GLUT1 sense); 5'-CAGATAGGACATCCAGGGTAGC-3' (GLUT1 antisense); 5'-TGCTGCTCTCTCATTTGCTG-3' (BNIP3 sense); 5'-GACTCCAGTTCTTCATCAAAAGGT-3' (BNIP3 antisense); 5'-TTTTTCAAGCAGTAGGAATTGG-3' (HIF-1 α sense); 5'-GTGATGTAGTAGCTGCATGATC-3' (HIF-1 α antisense).

Pull down assay

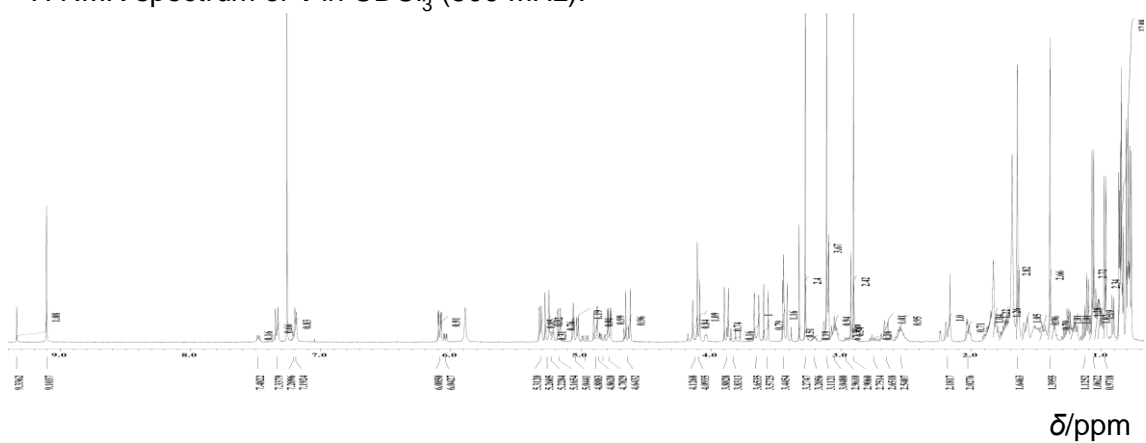
HT1080 cells were washed with ice-cold PBS and lysed in extraction buffer A [50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.2% NP-40, 0.2 mM PMSF and 20 nM MG132]. Cell extracts were cleared by centrifuging at 15,000 \times g for 10 min at 4°C. Total protein concentration was determined by BCA assay (Nacalai Tesque). For pre-wash, the lysate (protein concentration: 1.0 mg/ml) in reaction buffer [50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] (1 ml) was incubated with control beads (10 μ l) at 4 °C for 1 h. After centrifuging, the supernatants was incubated with control beads (10 μ l) or verucopeptin immobilized beads (10 μ l) at 4 °C for 1 h. The reacted beads were washed with reaction beffer and protein bound to the beads eluted with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer [100 mM Tris·HCl (pH 6.8), 4% SDS, 100 mM DTT, bromo phenol blue, 12% glycerol] at 10 °C for 5 min. The methods of SDS-PAGE and western blotting were described in Western blotting analysis section. In the case of the competitive pulldown assay, verucopeptin or DMF was added before incubation with control beads or Verucopeptin immobilized beads and incubated at 4 °C overnight.

Folding assay

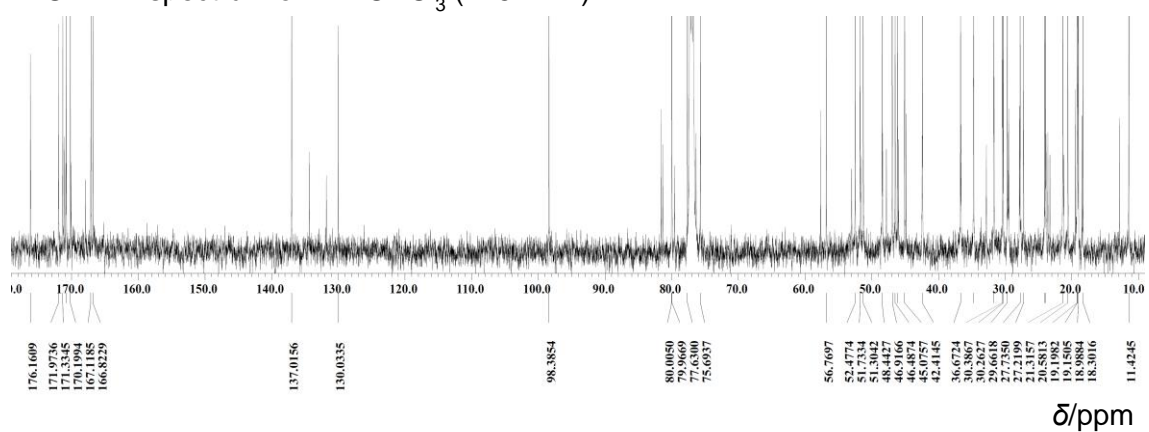
The chaperone activity of human HSP60 (ATGen Co., Ltd. Canada) was measured using malate dehydrogenase (MDH) (ATGen Co., Ltd. Canada). MDH was denatured at a concentration of 1.4 μ M in 10 mM HCl at 25 °C for 2 h and diluted 10-fold into reconstitution buffer [50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM Mg(CH₃COO)₂, 4 mM ATP] containing chaperones (1 μ M HSP60 and 2 μ M HSP10 (ATGen Co., Ltd. Canada)) pre-incubated at 30 °C for 2 h. After addition of folding buffer [100 mM Tris·HCl (pH 7.5), 7 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM ATP], refolding of

denatured MDH was started at 30 °C for 1 h. To measure the chaperone activity of HSP60, refolding sample was added to buffer A [100 mM Tris·HCl (pH 7.5), 7 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM NADH, 1 mM oxalomalate] and measured at OD₅₉₅ using U-2910 Double-Beam spectrometer (HITACHI). To determine HSP60 activity, the intercept of sample containing denature MDH and HSP60 was defined as 100%.

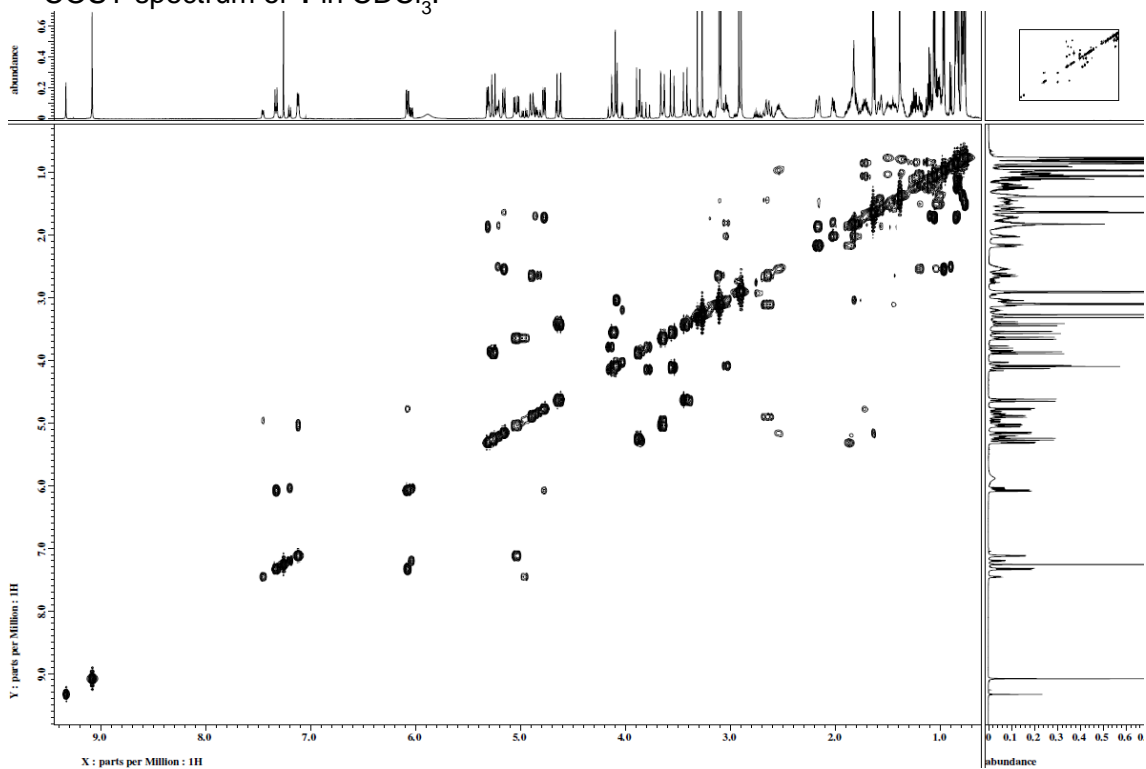
^1H NMR spectrum of **1** in CDCl_3 (500 MHz).



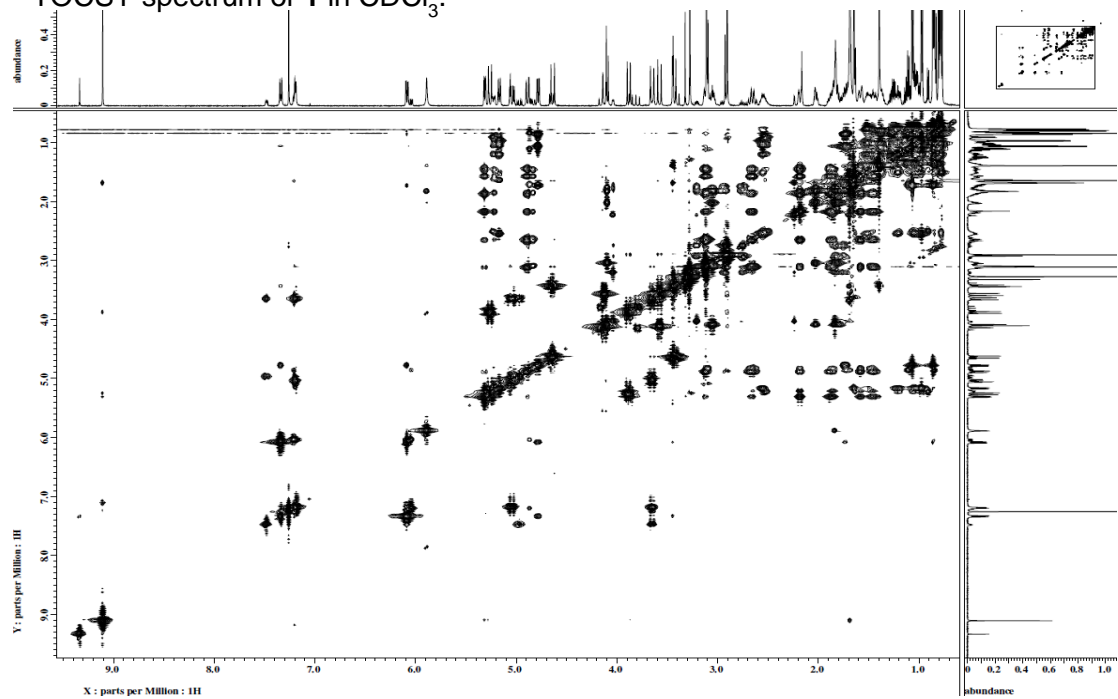
^{13}C NMR spectrum of **1** in CDCl_3 (125 MHz).



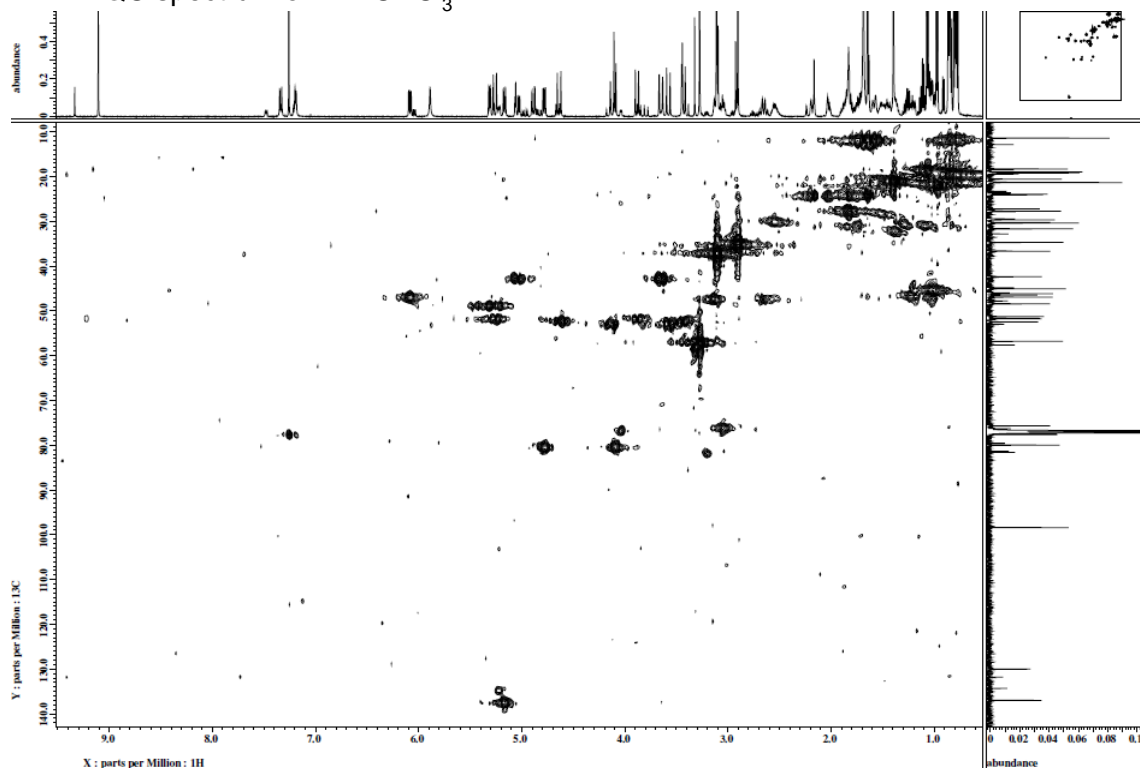
COSY spectrum of 1 in CDCl₃.



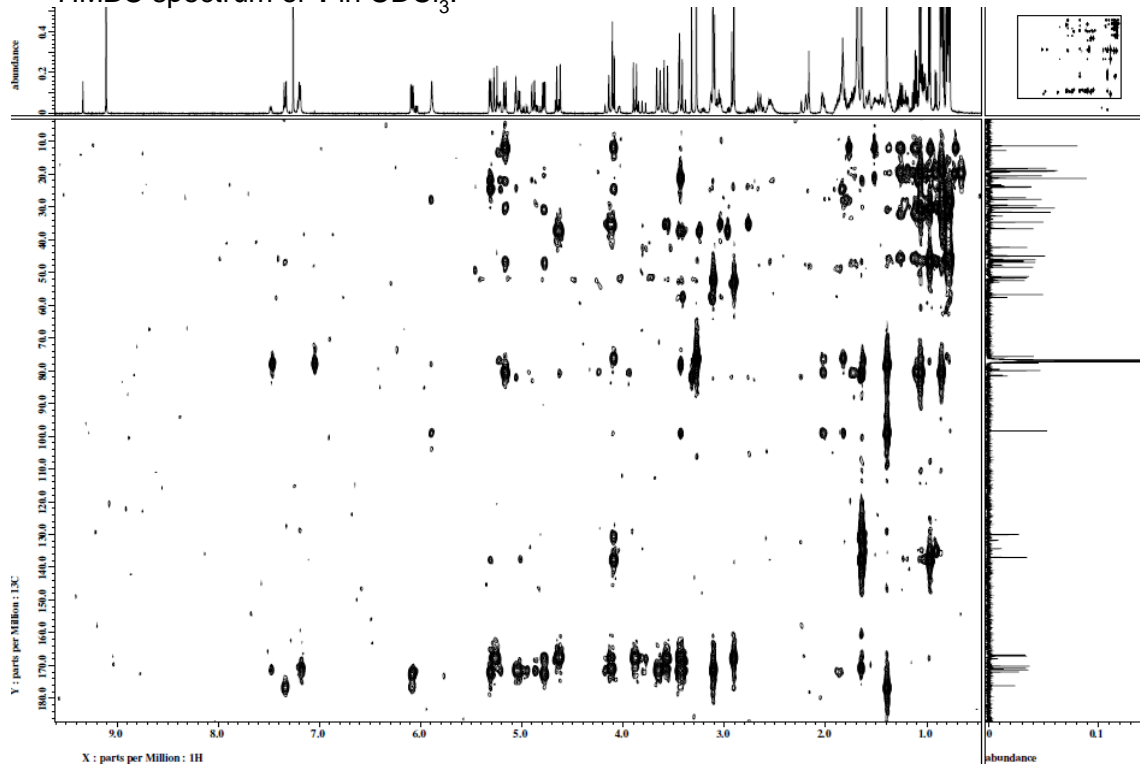
TOCSY spectrum of 1 in CDCl₃.



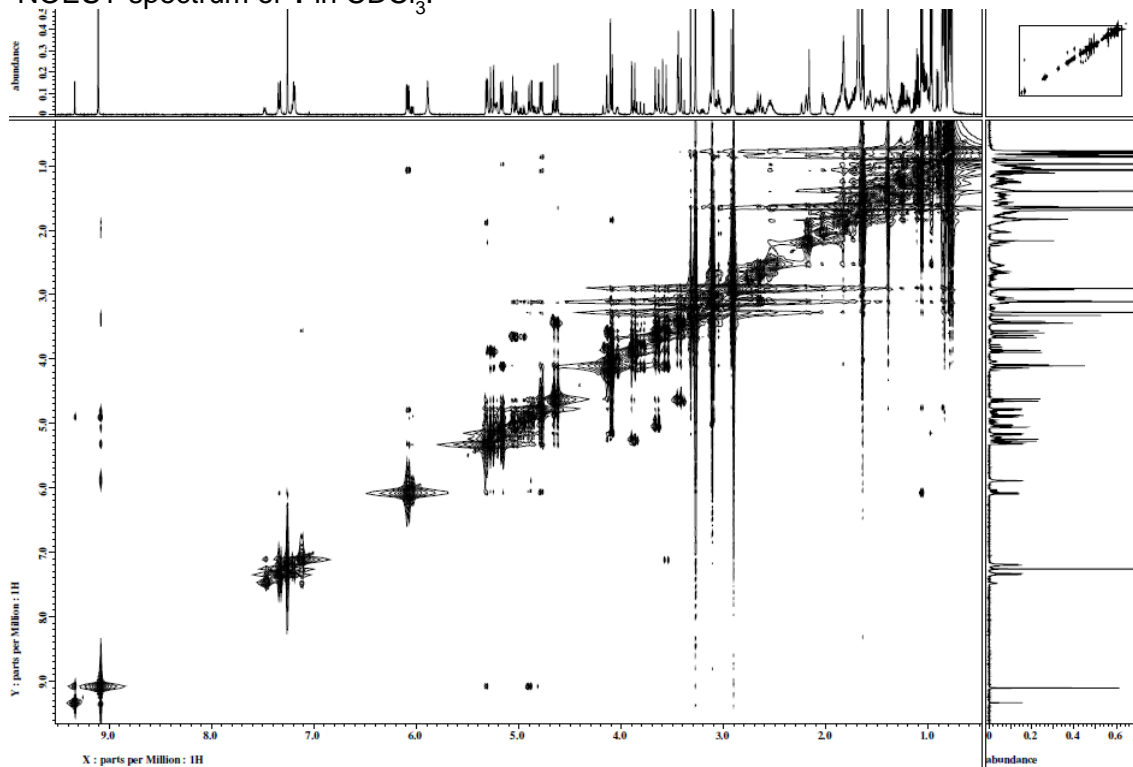
HMQC spectrum of 1 in CDCl₃.



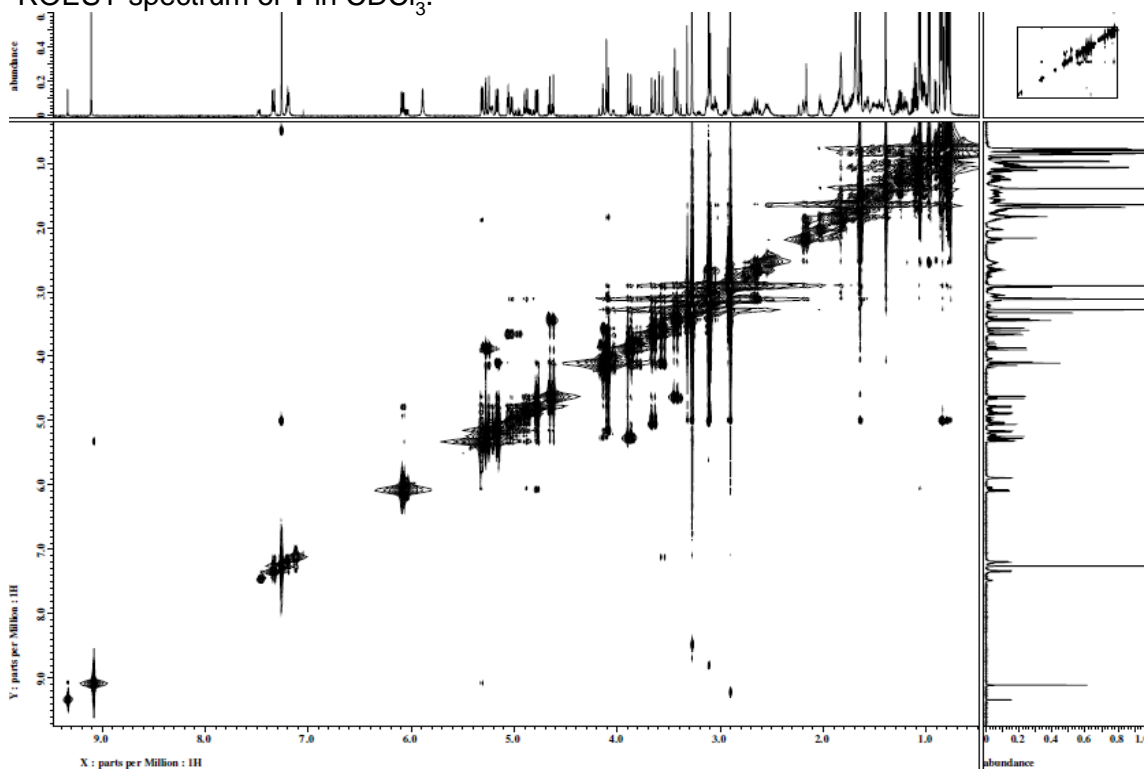
HMBC spectrum of 1 in CDCl₃.



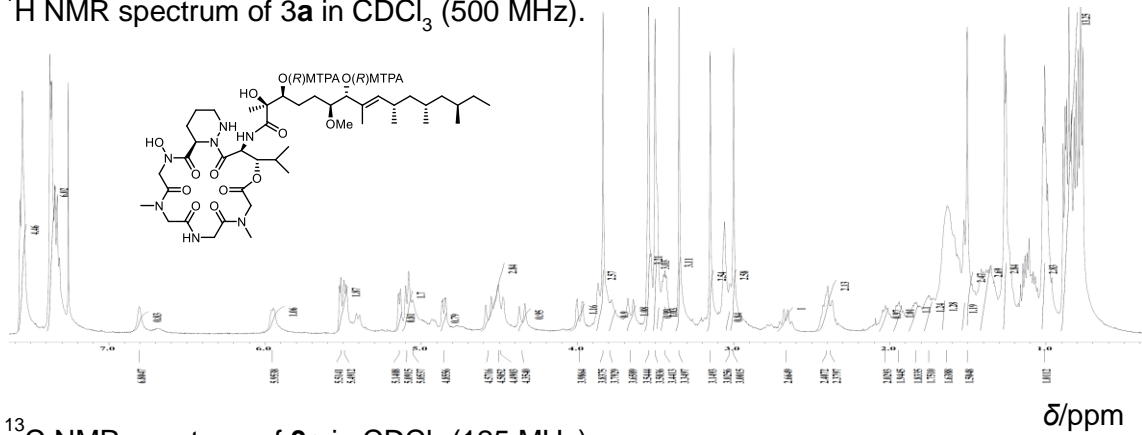
NOESY spectrum of **1** in CDCl_3 .



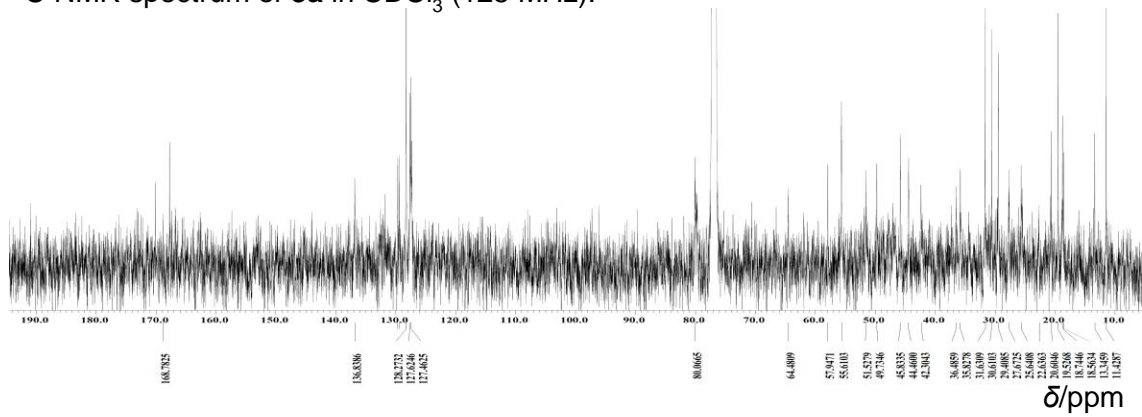
ROESY spectrum of **1** in CDCl_3 .



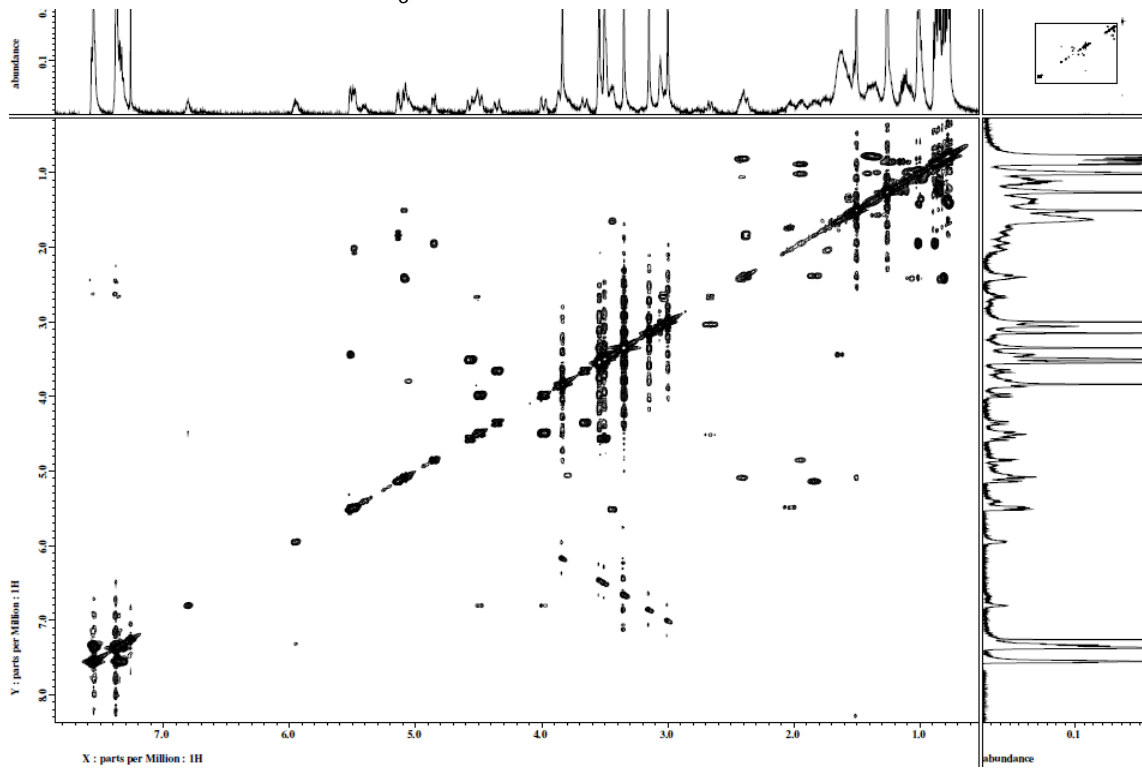
¹H NMR spectrum of **3a** in CDCl₃ (500 MHz).



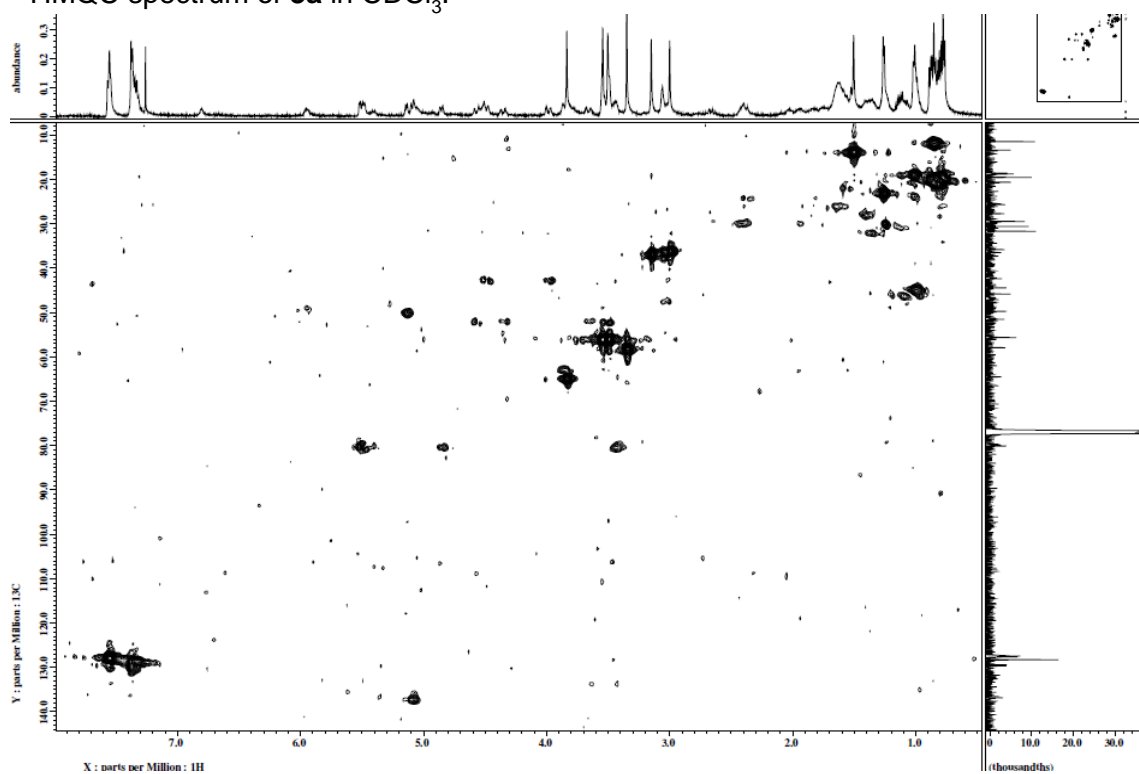
¹³C NMR spectrum of **3a** in CDCl₃ (125 MHz).



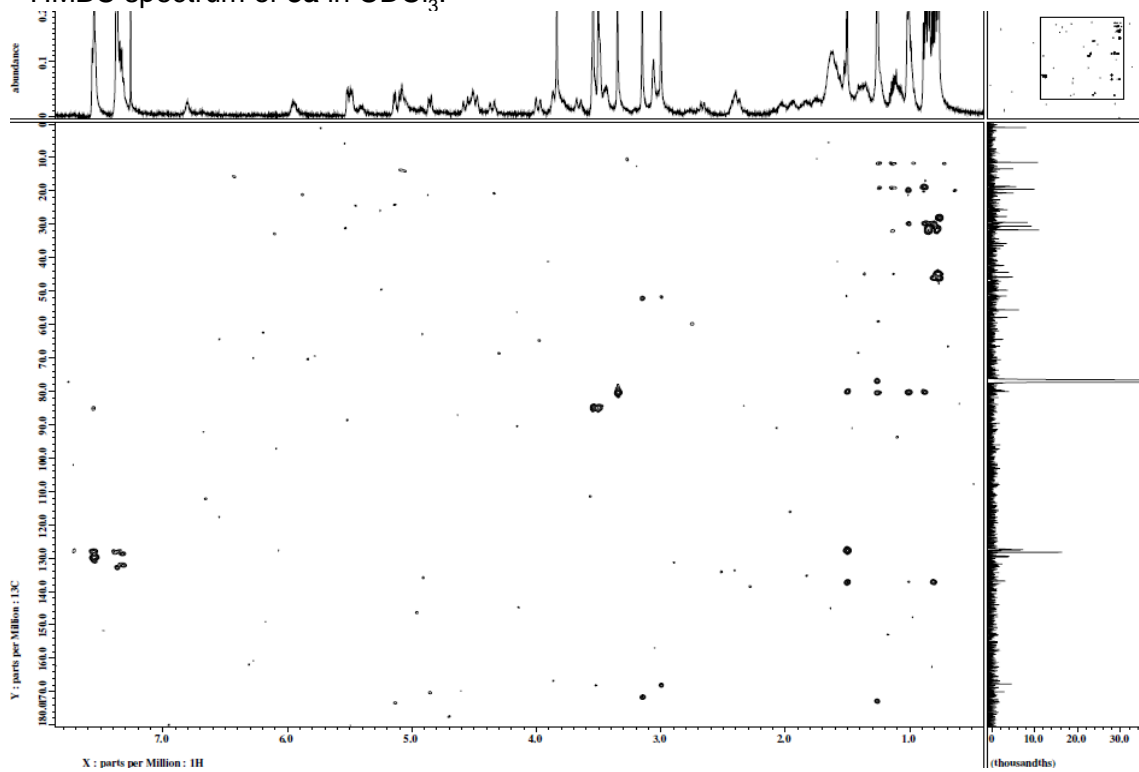
COSY spectrum of **3a** in CDCl₃.



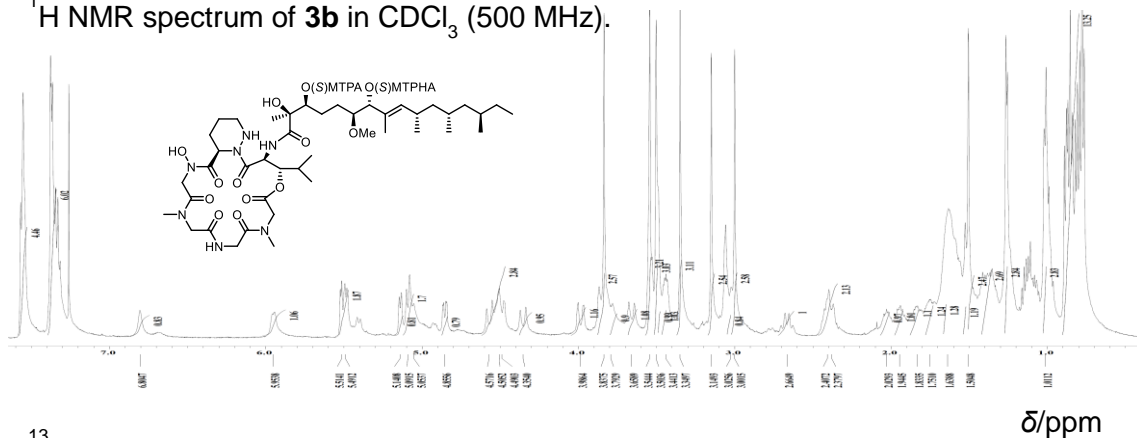
HMQC spectrum of **3a** in CDCl₃.



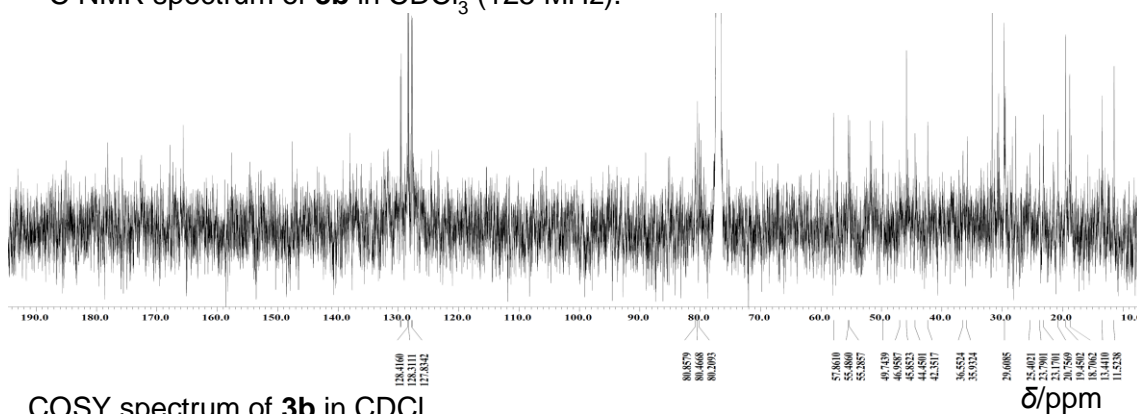
HMBC spectrum of **3a** in CDCl₃.



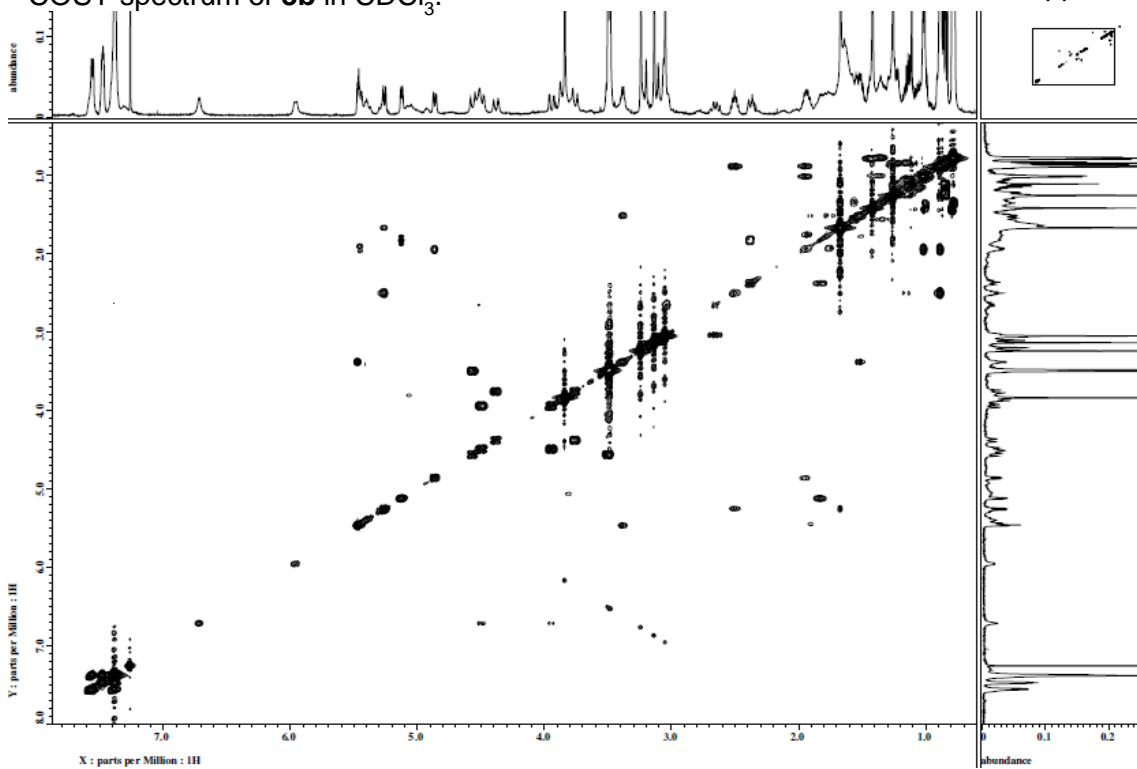
^1H NMR spectrum of **3b** in CDCl_3 (500 MHz).



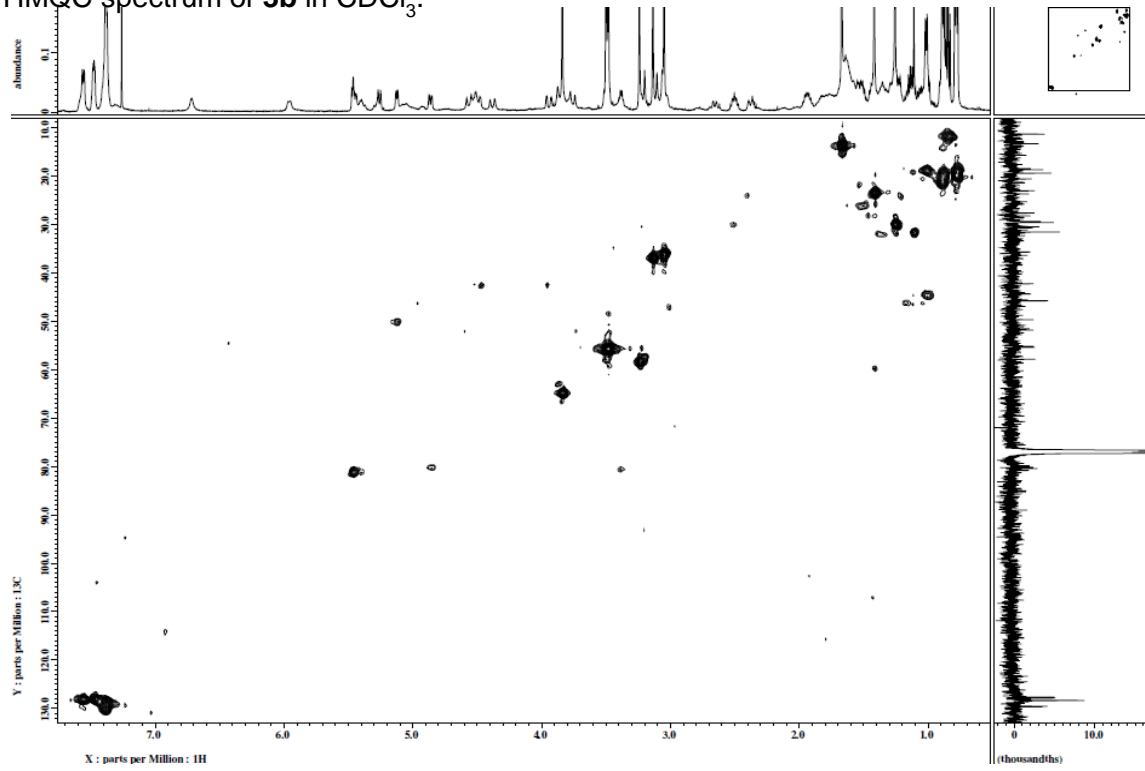
^{13}C NMR spectrum of **3b** in CDCl_3 (125 MHz).



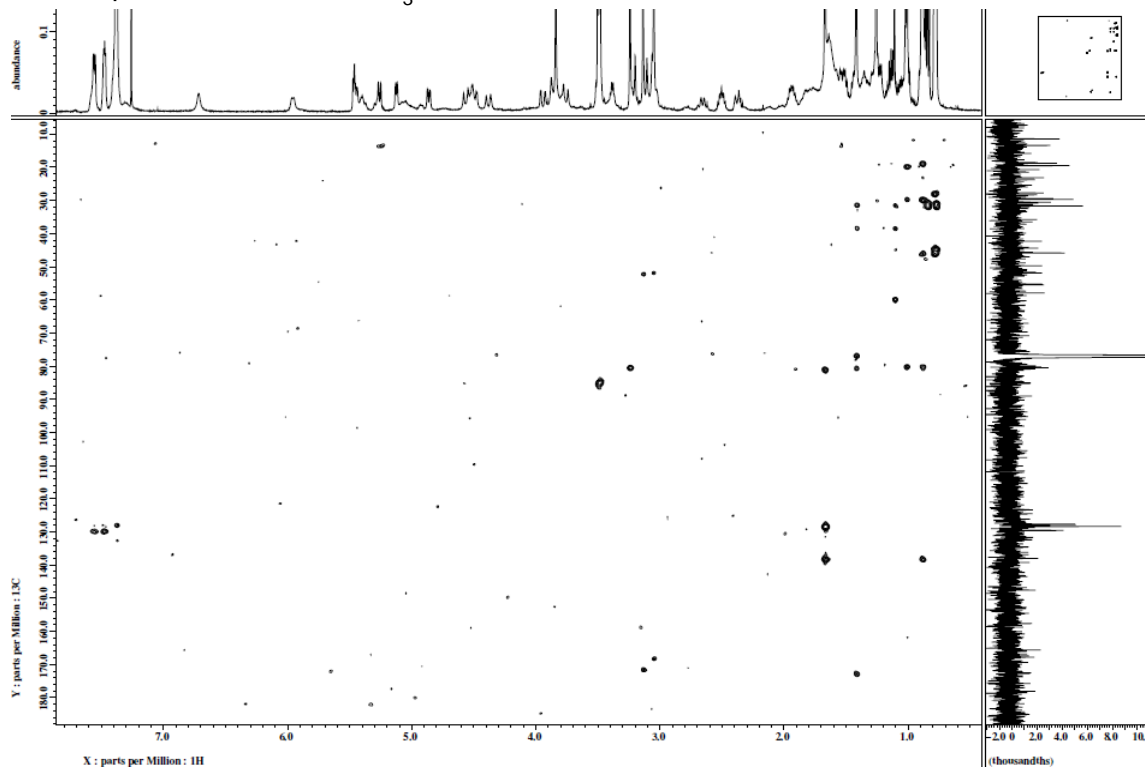
COSY spectrum of **3b** in CDCl_3 .



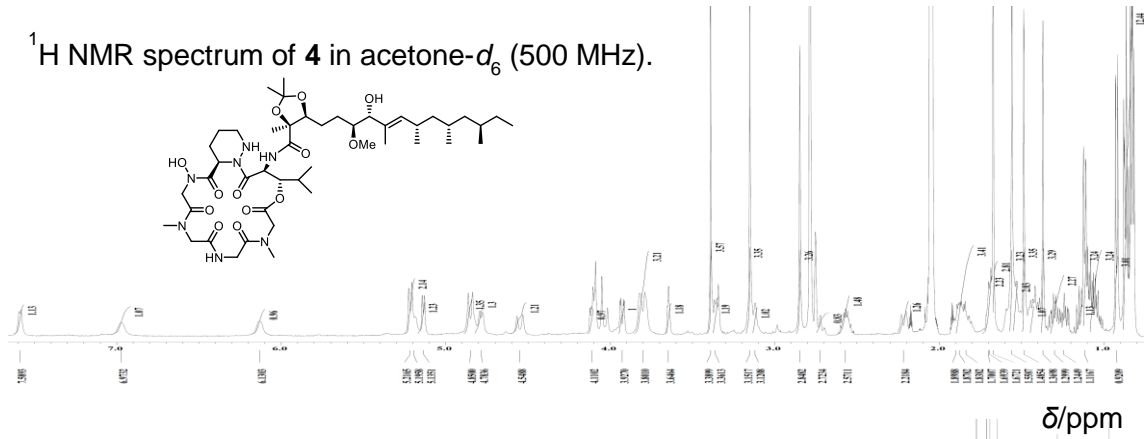
HMQC spectrum of **3b** in CDCl₃.



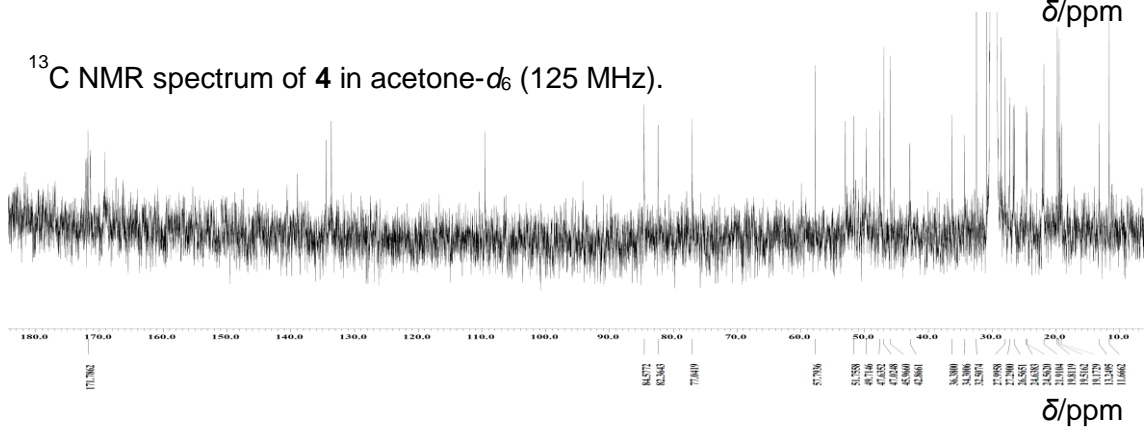
HMBC spectrum of **3b** in CDCl₃.



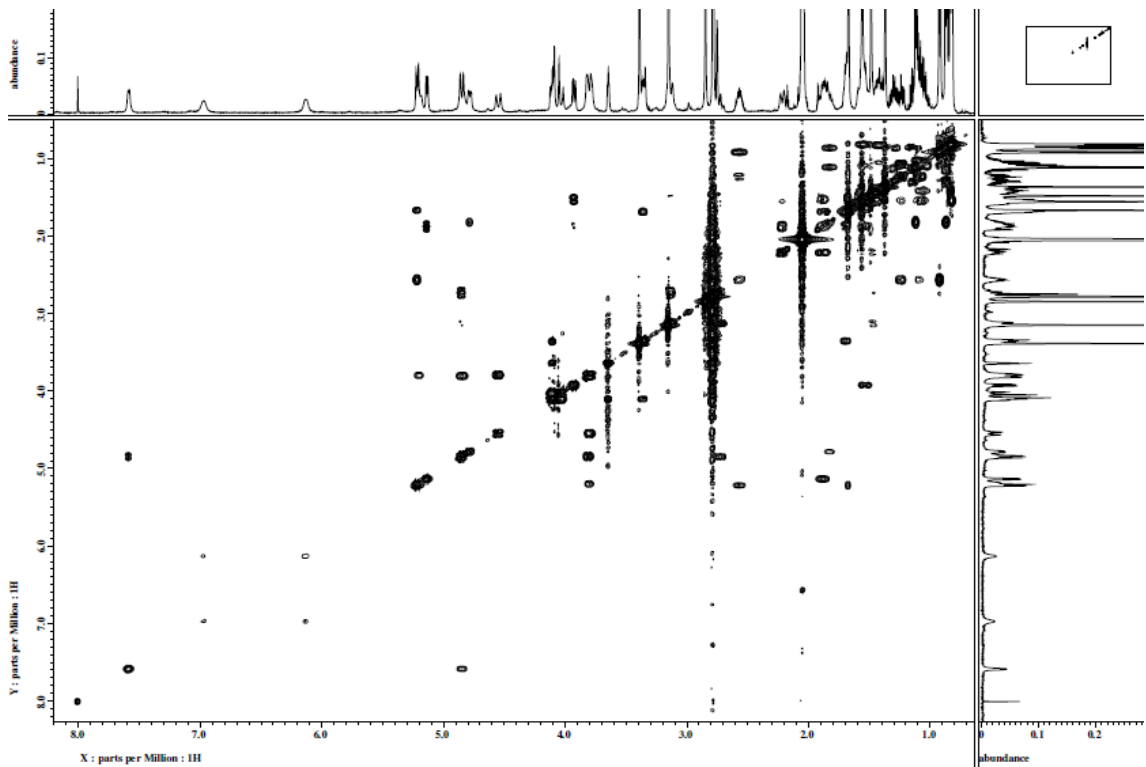
¹H NMR spectrum of **4** in acetone-*d*₆ (500 MHz).



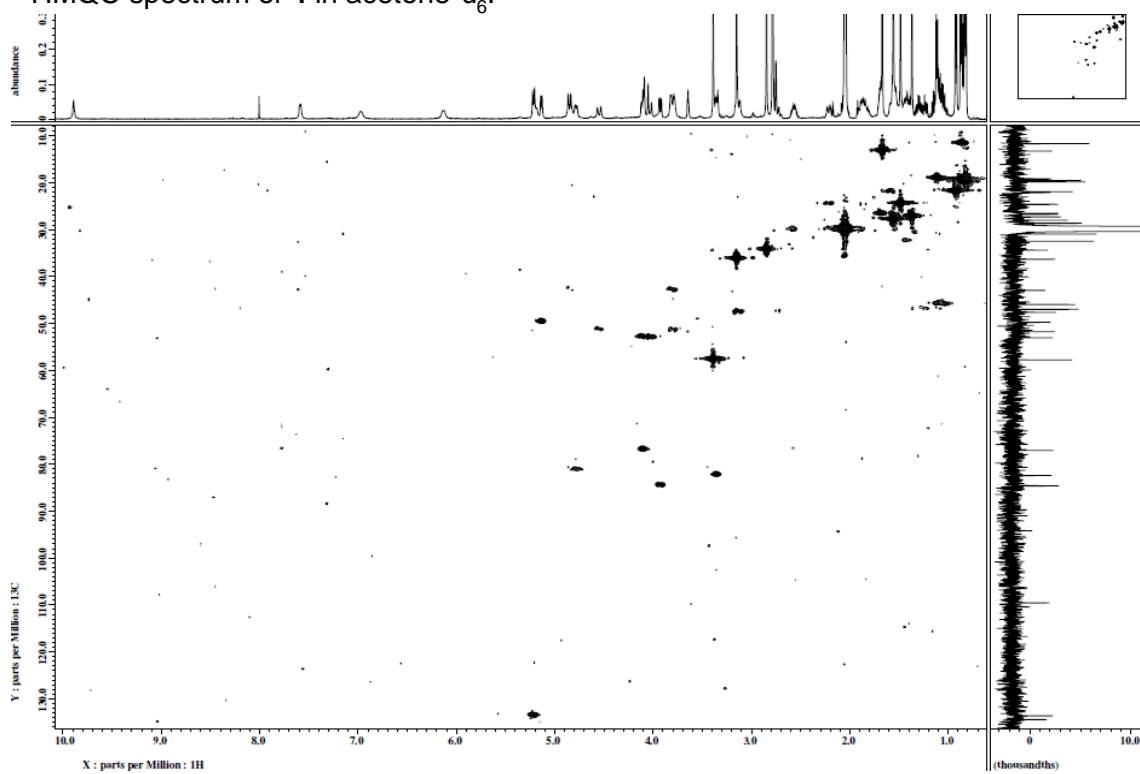
¹³C NMR spectrum of **4** in acetone-*d*₆ (125 MHz).



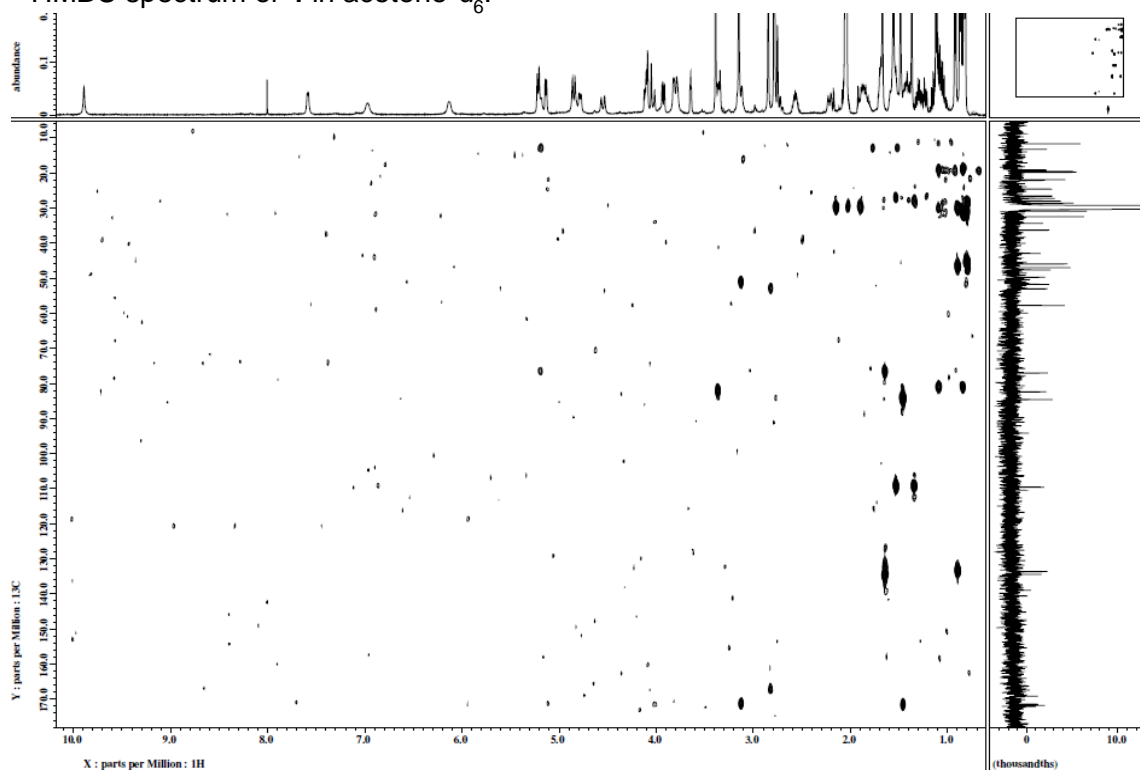
COSY spectrum of **4** in acetone-*d*₆.



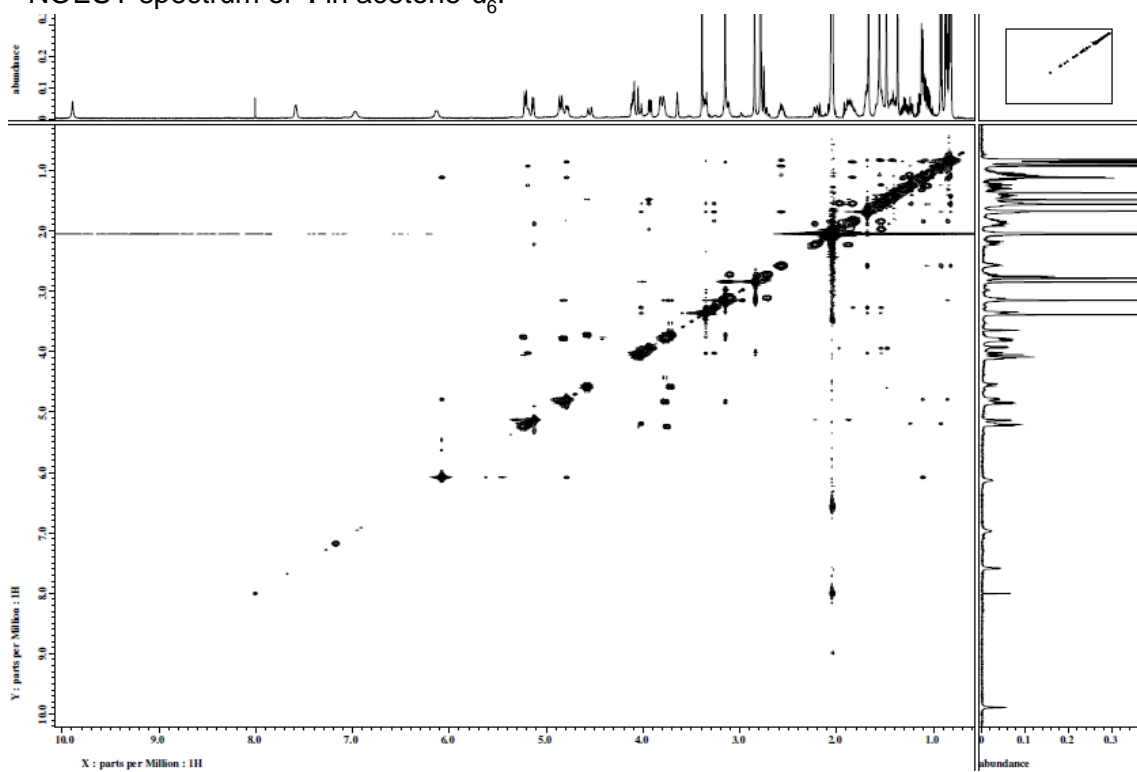
HMQC spectrum of **4** in acetone- d_6 .



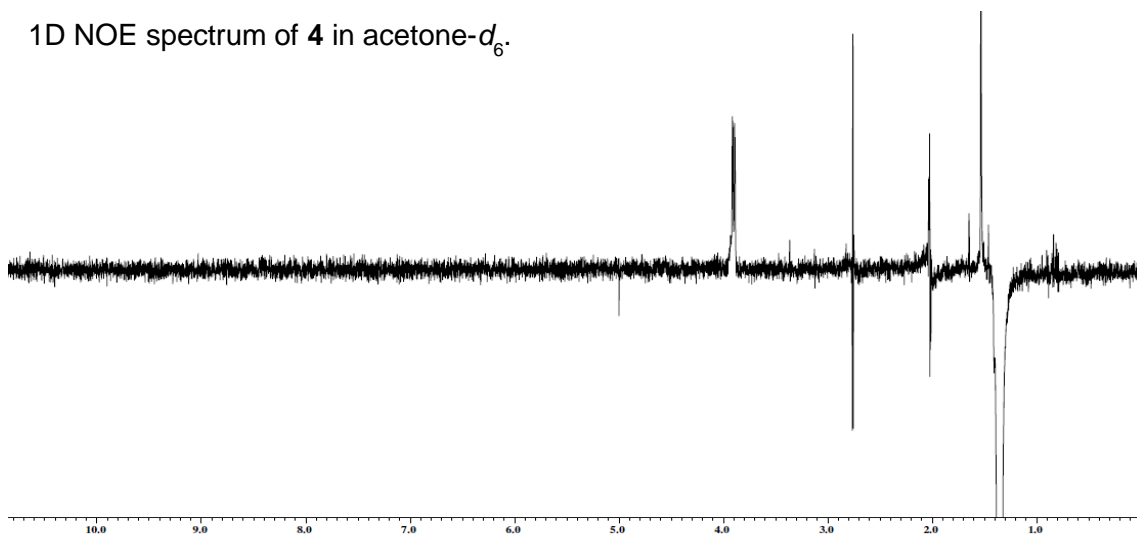
HMBC spectrum of **4** in acetone- d_6 .



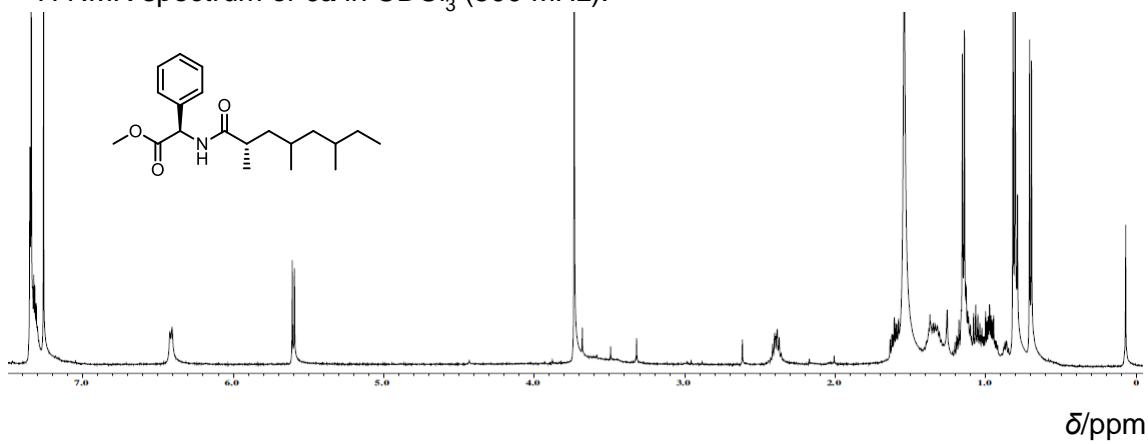
NOESY spectrum of **4** in acetone- d_6 .



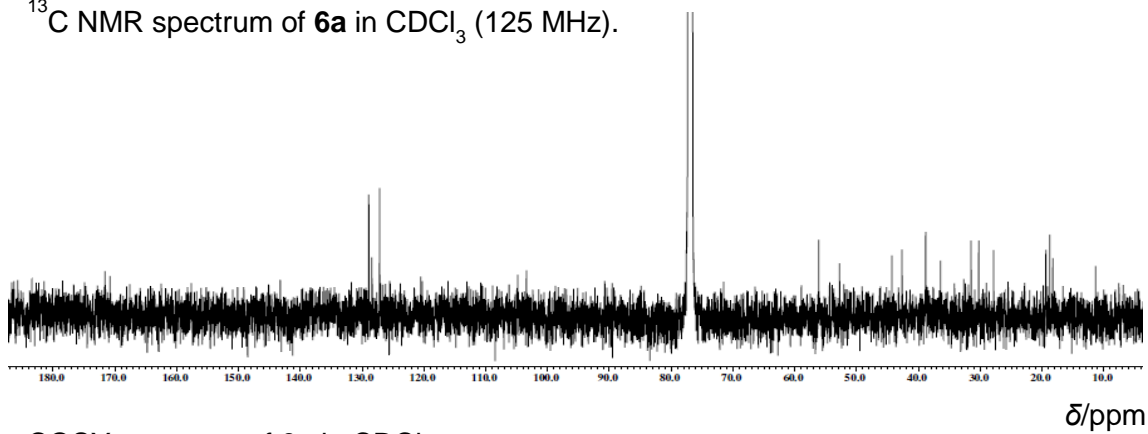
1D NOE spectrum of **4** in acetone- d_6 .



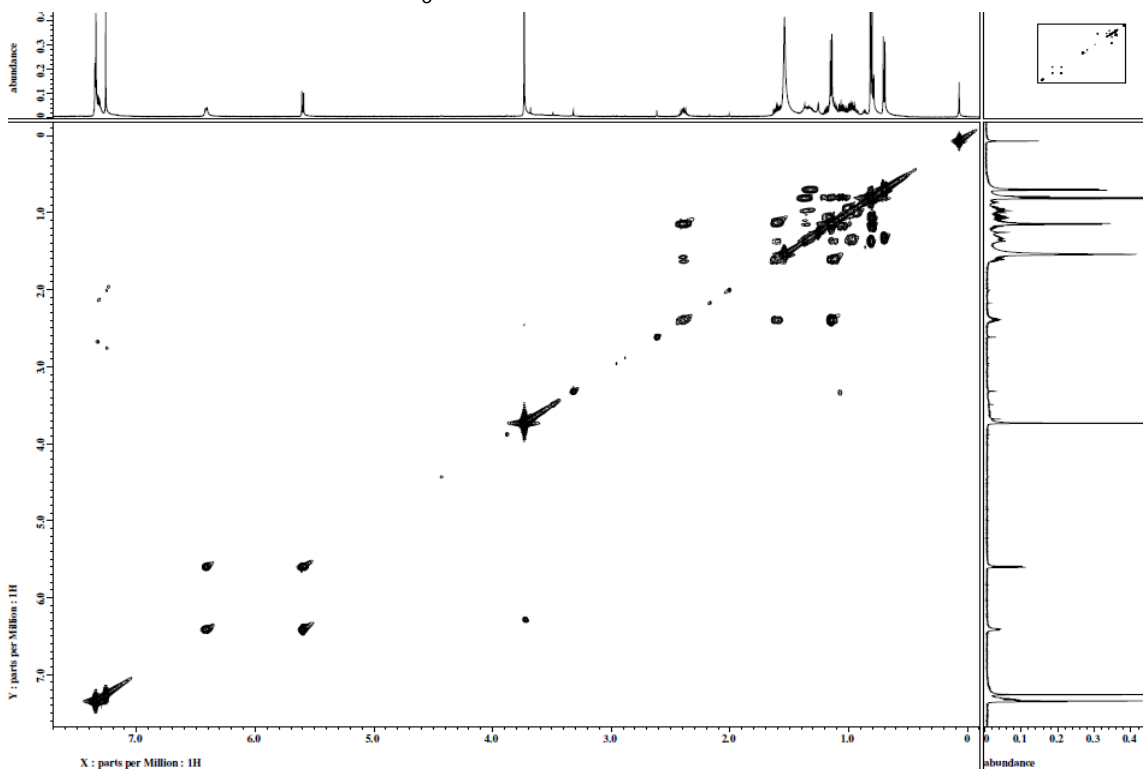
^1H NMR spectrum of **6a** in CDCl_3 (500 MHz).



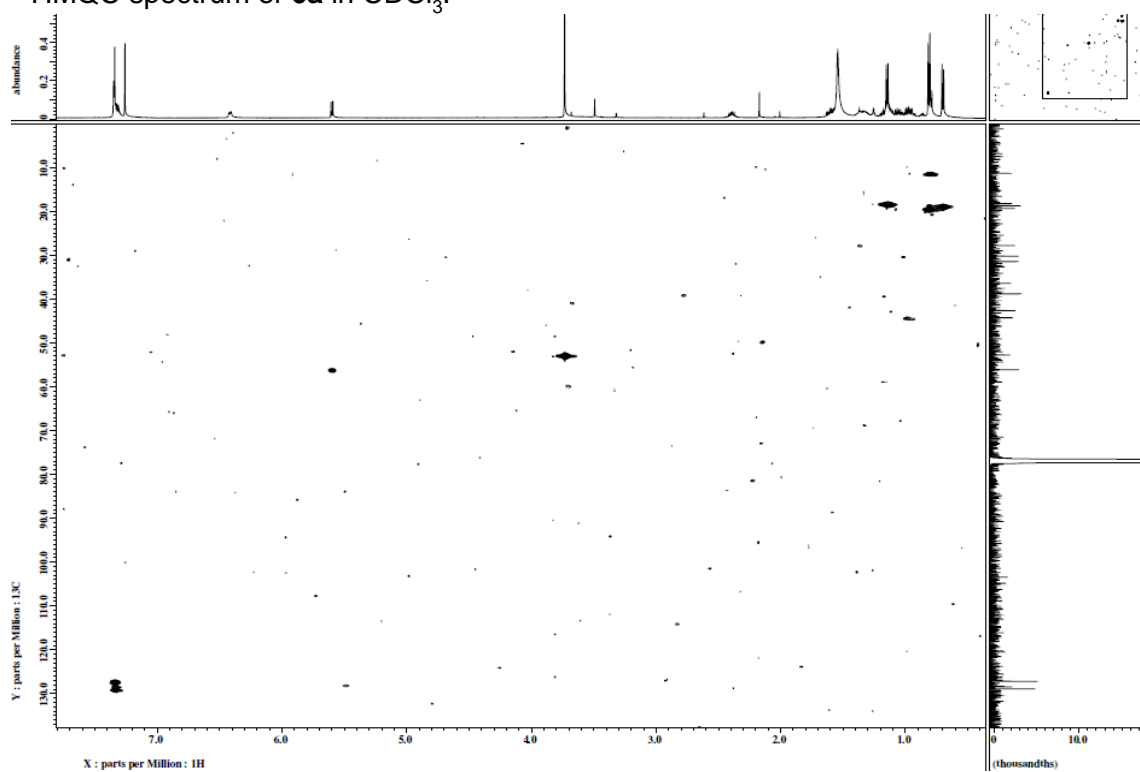
^{13}C NMR spectrum of **6a** in CDCl_3 (125 MHz).



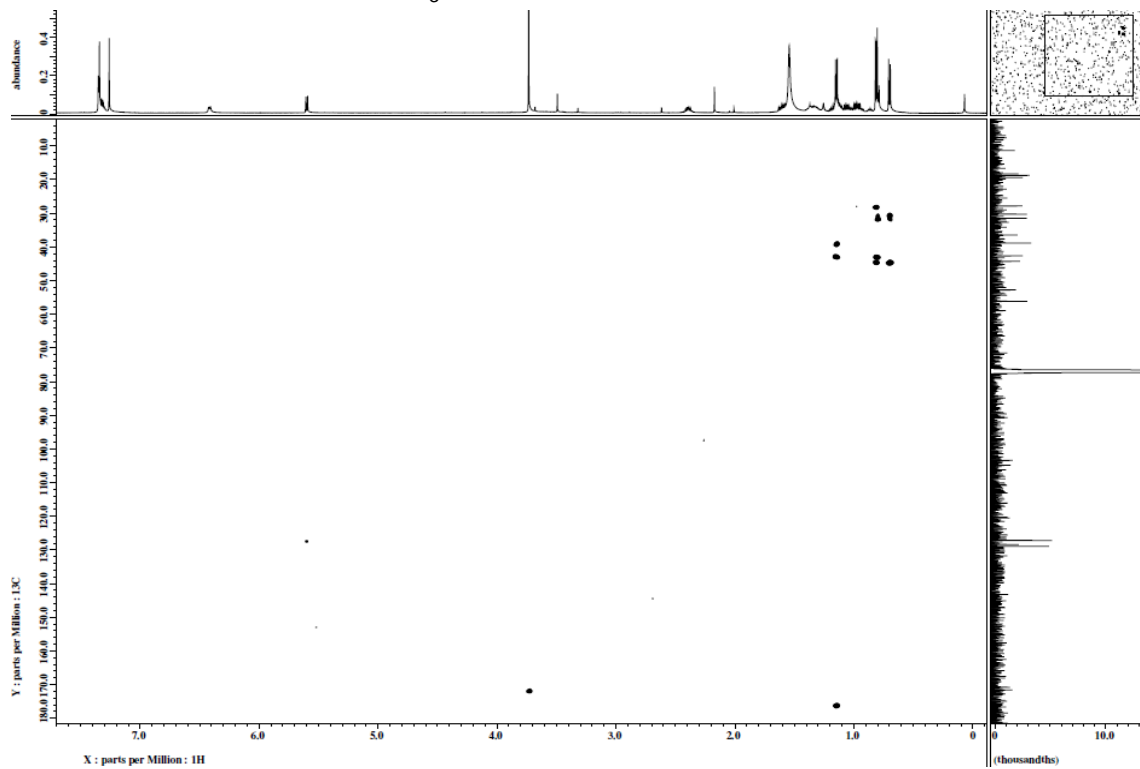
COSY spectrum of **6a** in CDCl_3 .



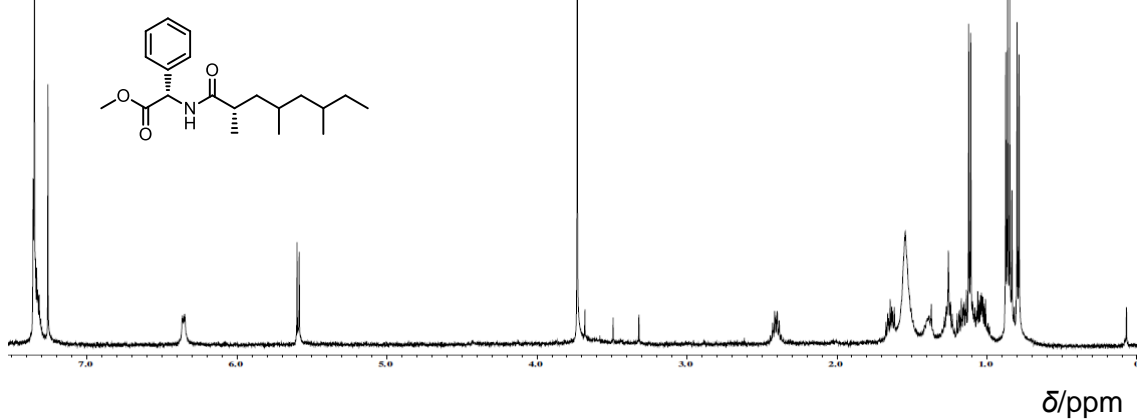
HMQC spectrum of **6a** in CDCl₃.



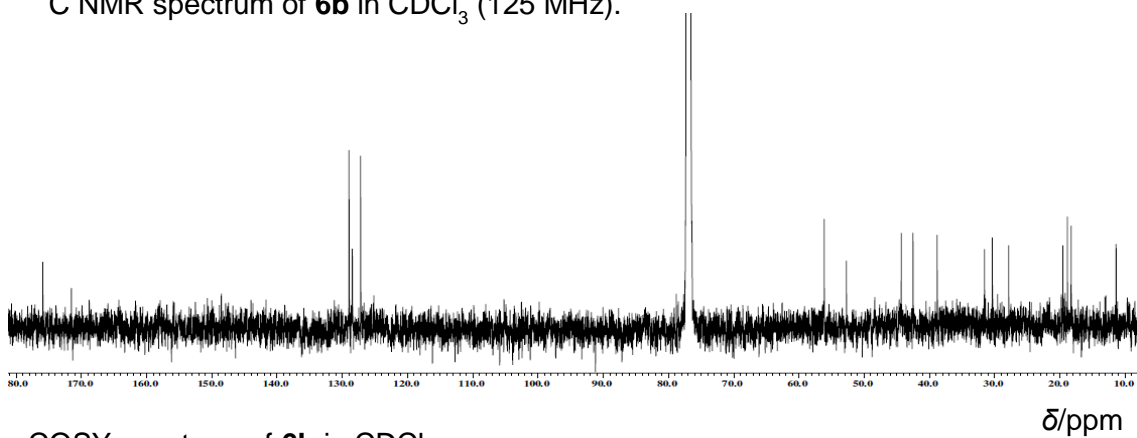
HMBC spectrum of **6a** in CDCl₃.



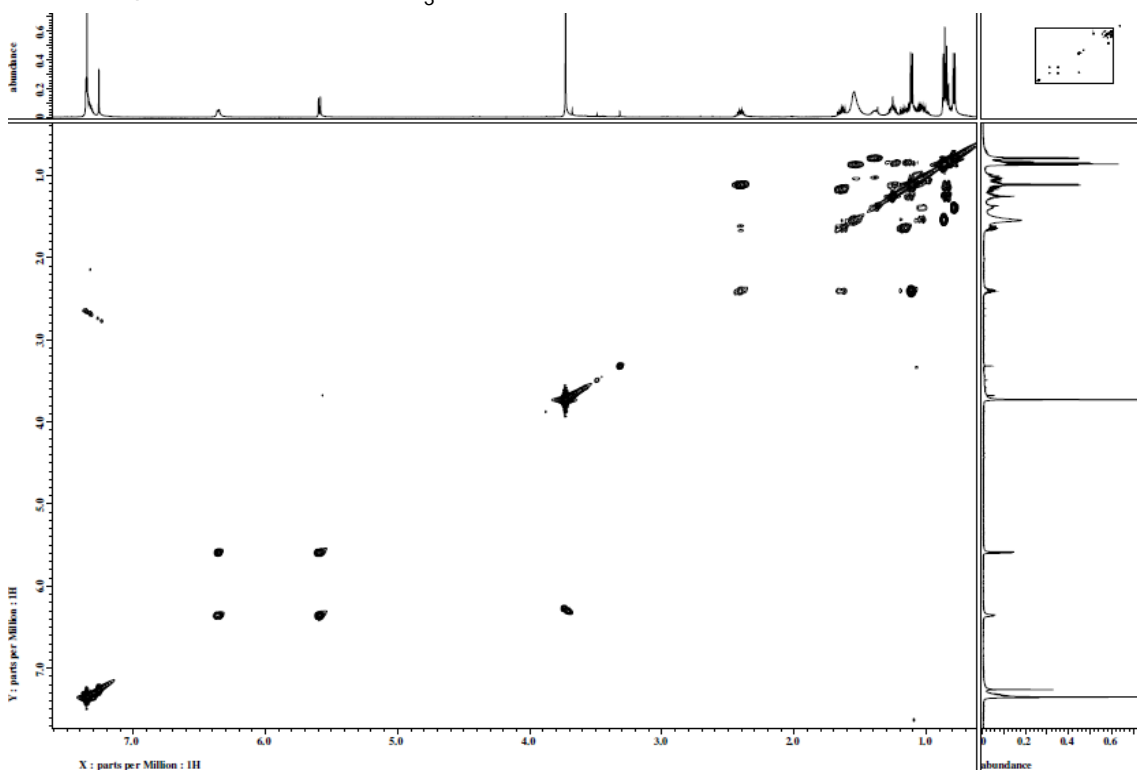
¹H NMR spectrum of **6b** in CDCl₃ (500 MHz).



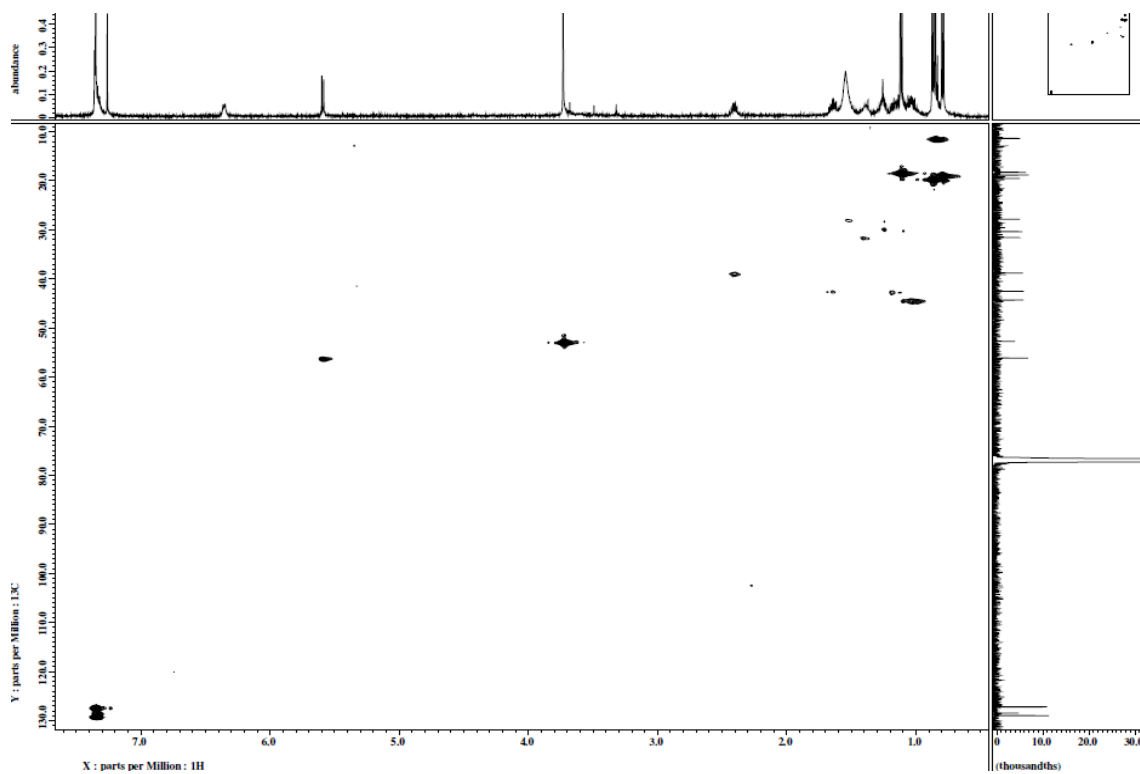
¹³C NMR spectrum of **6b** in CDCl₃ (125 MHz).



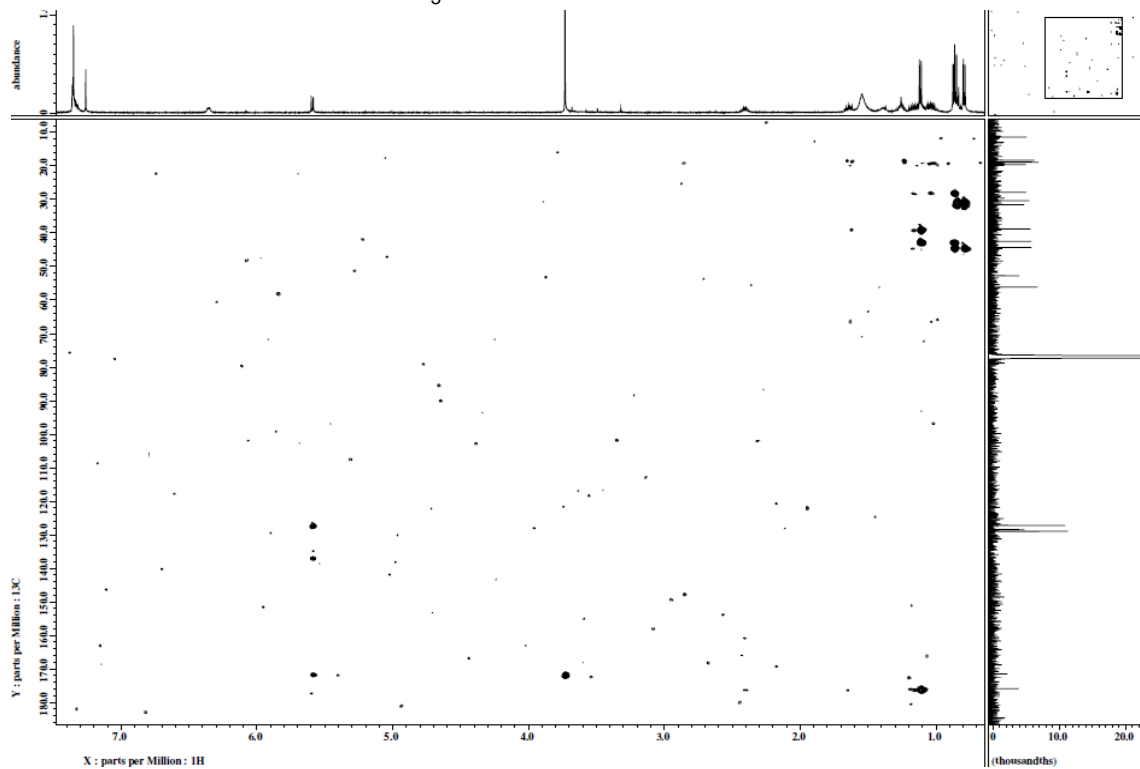
COSY spectrum of **6b** in CDCl₃.



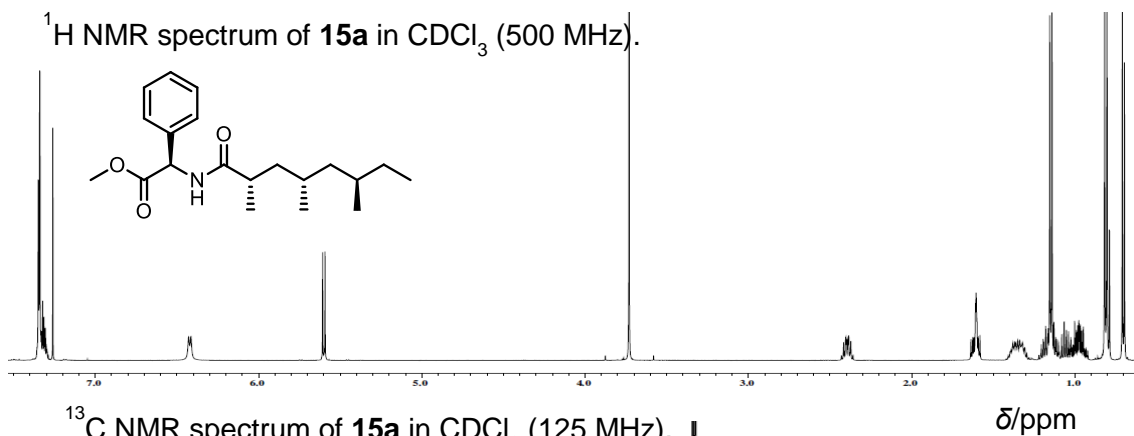
HMQC spectrum of **6b** in CDCl₃.



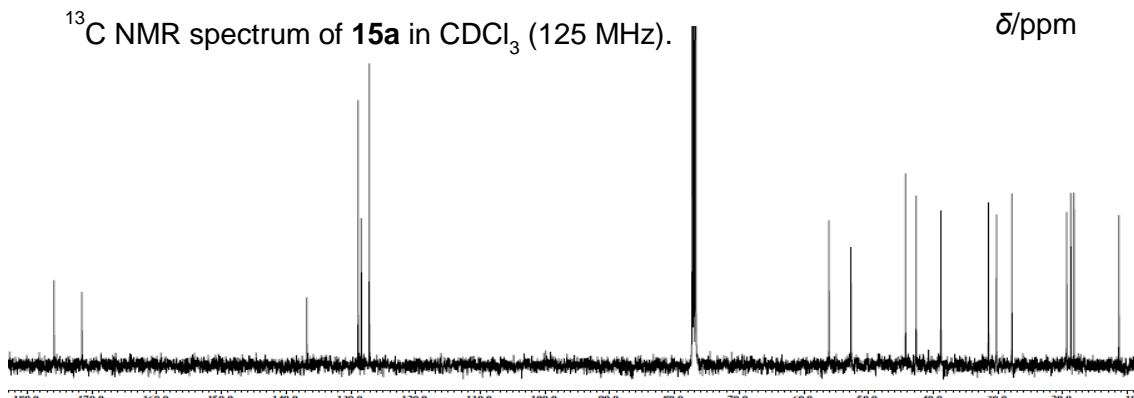
HMBC spectrum of **6b** in CDCl₃.



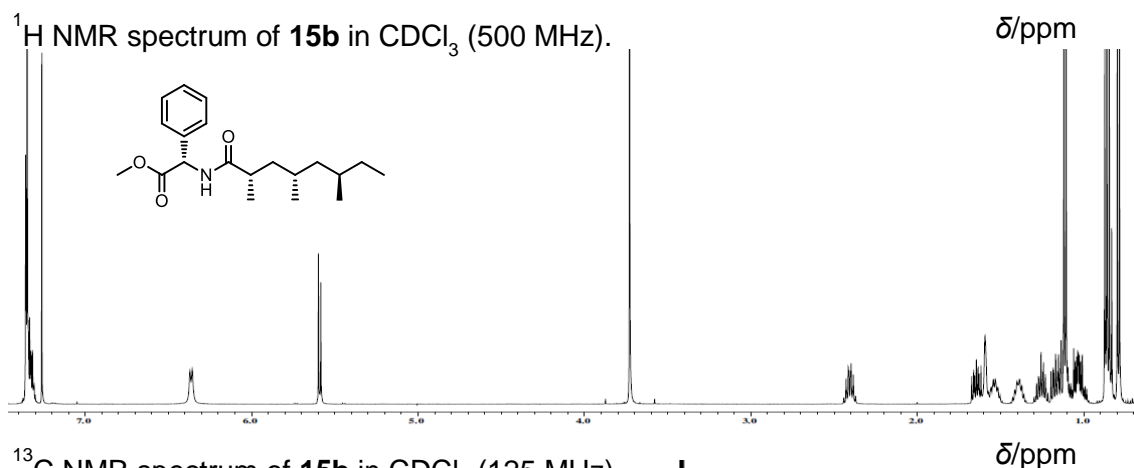
¹H NMR spectrum of **15a** in CDCl₃ (500 MHz).



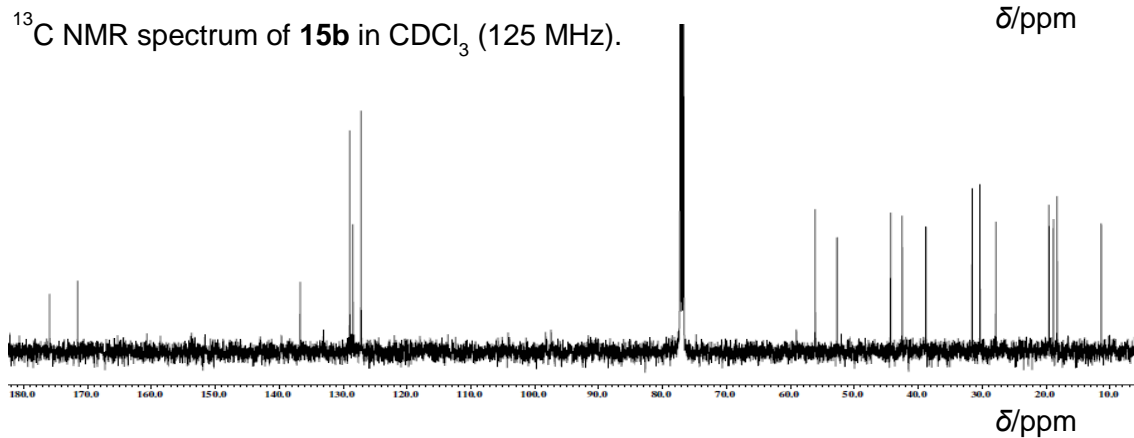
¹³C NMR spectrum of **15a** in CDCl₃ (125 MHz).



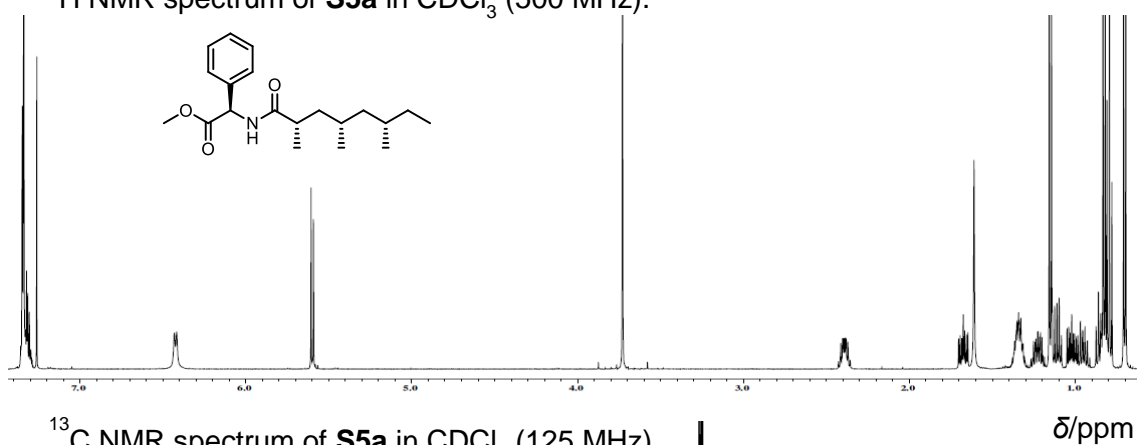
¹H NMR spectrum of **15b** in CDCl₃ (500 MHz).



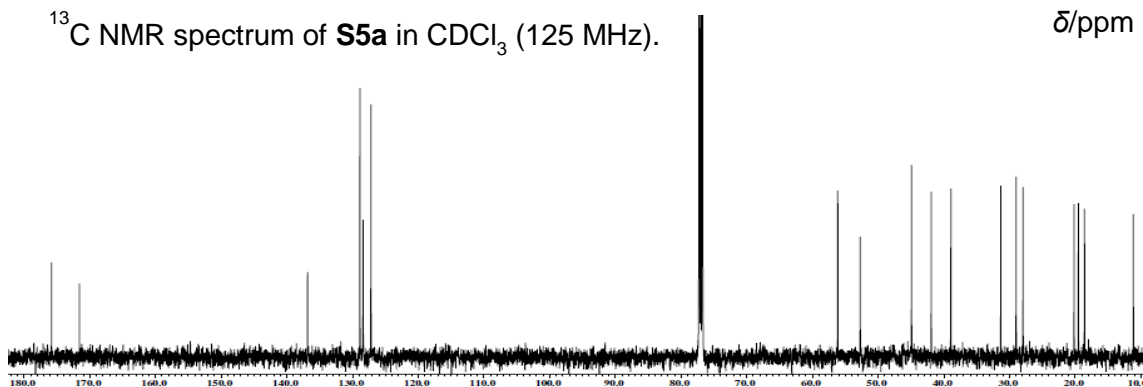
¹³C NMR spectrum of **15b** in CDCl₃ (125 MHz).



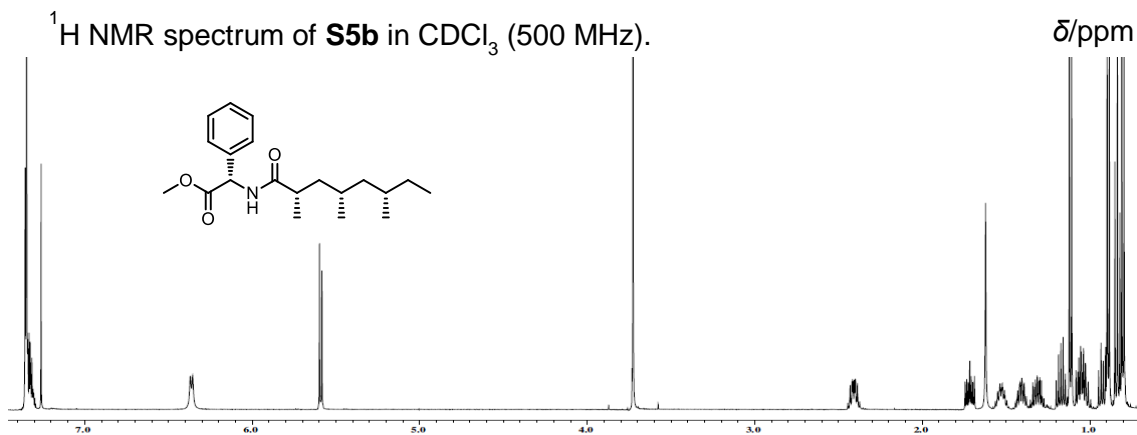
¹H NMR spectrum of **S5a** in CDCl₃ (500 MHz).



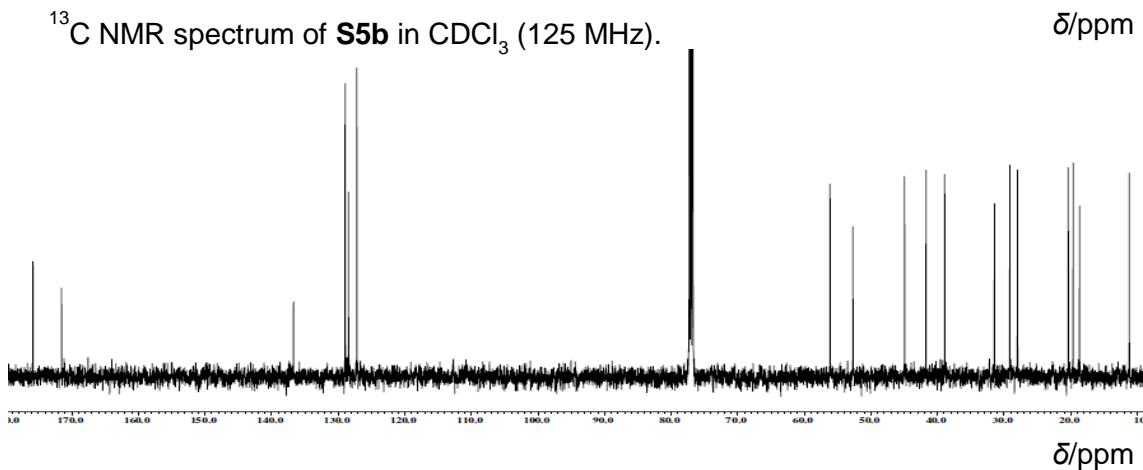
¹³C NMR spectrum of **S5a** in CDCl₃ (125 MHz).



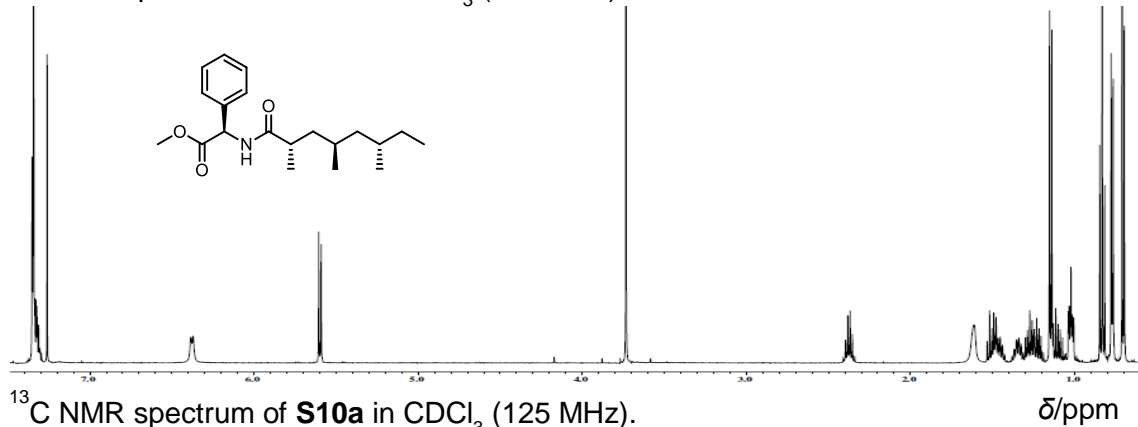
¹H NMR spectrum of **S5b** in CDCl₃ (500 MHz).



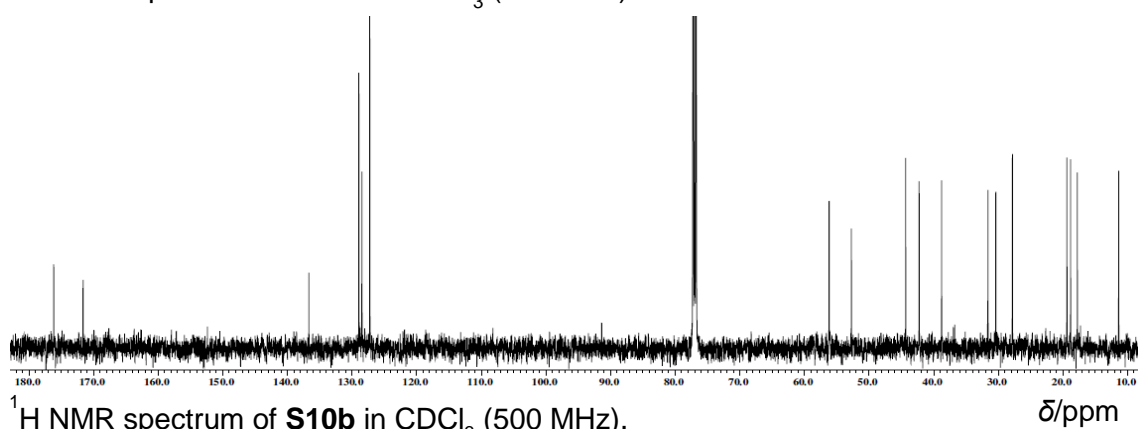
¹³C NMR spectrum of **S5b** in CDCl₃ (125 MHz).



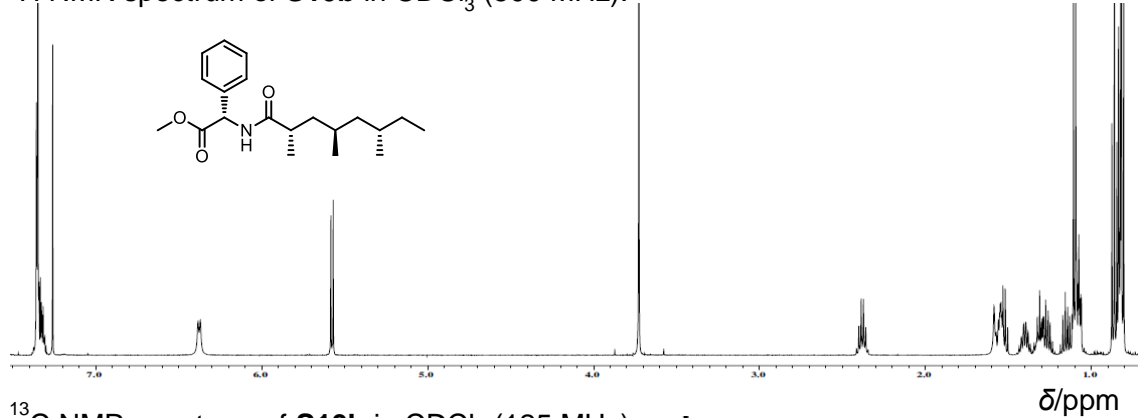
^1H NMR spectrum of **S10a** in CDCl_3 (500 MHz).



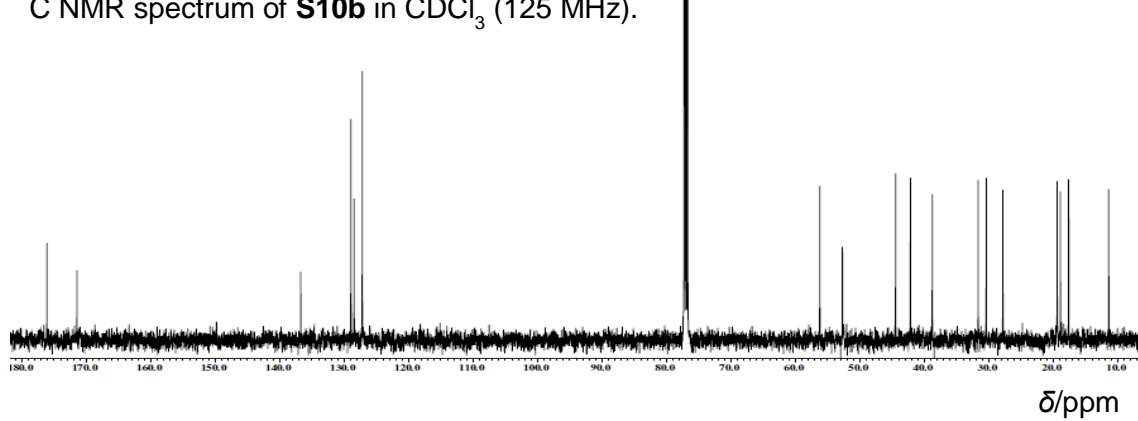
^{13}C NMR spectrum of **S10a** in CDCl_3 (125 MHz).



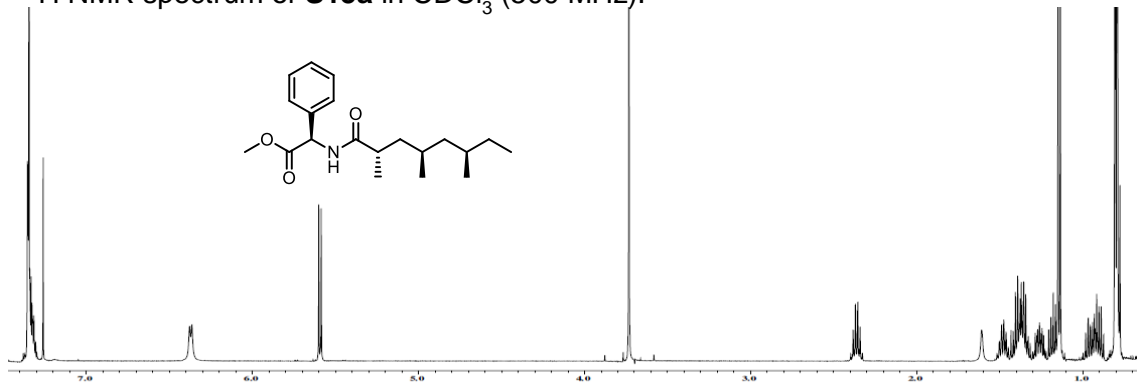
^1H NMR spectrum of **S10b** in CDCl_3 (500 MHz).



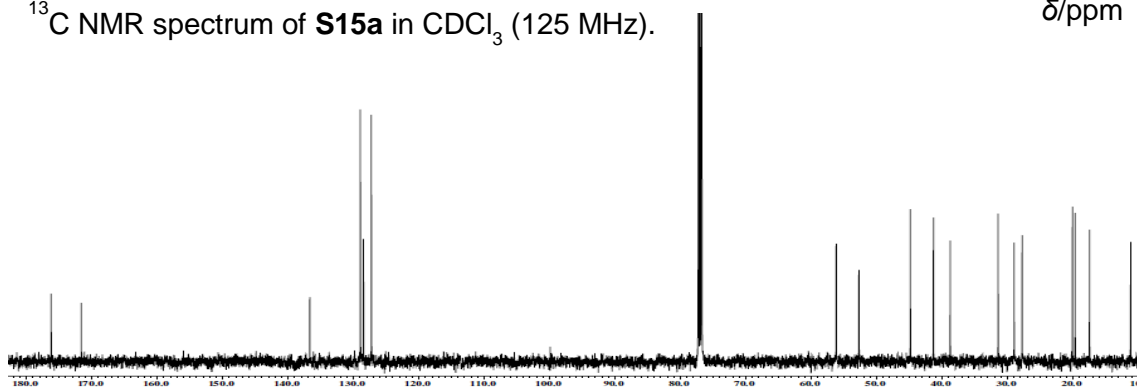
^{13}C NMR spectrum of **S10b** in CDCl_3 (125 MHz).



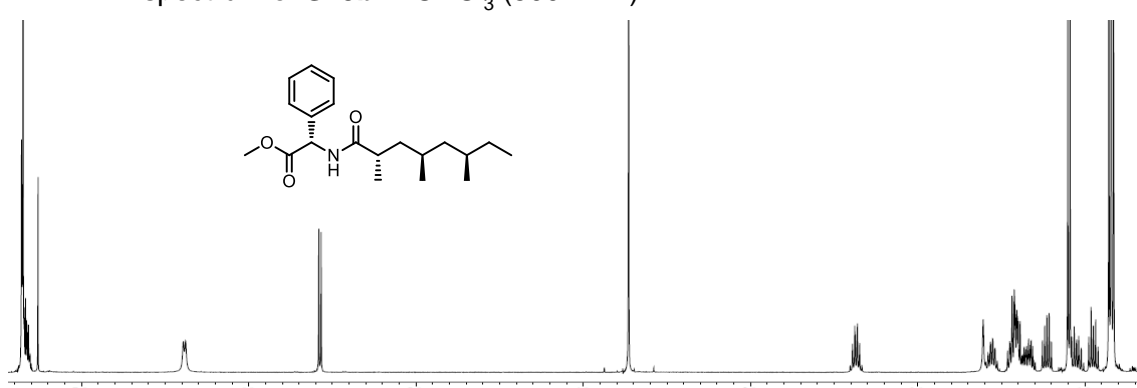
¹H NMR spectrum of **S15a** in CDCl₃ (500 MHz).



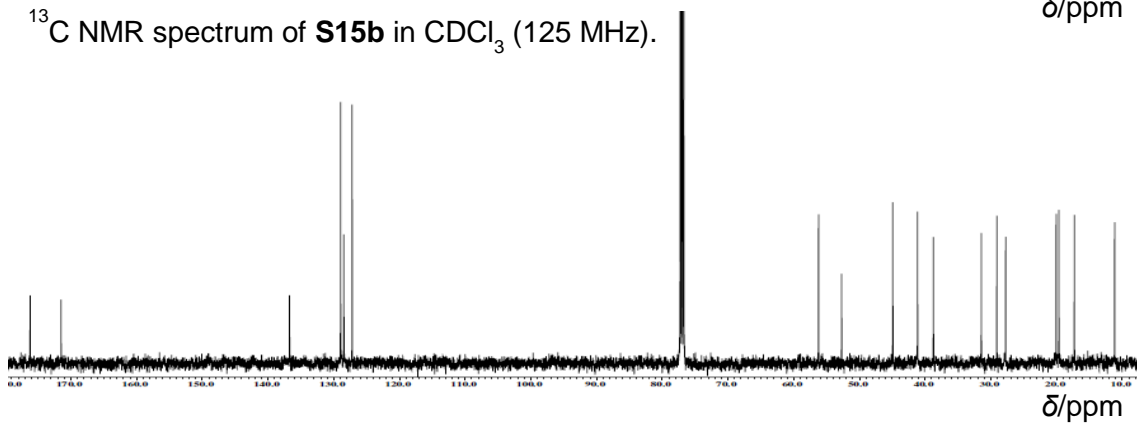
¹³C NMR spectrum of **S15a** in CDCl₃ (125 MHz).



¹H NMR spectrum of **S15b** in CDCl₃ (500 MHz).



¹³C NMR spectrum of **S15b** in CDCl₃ (125 MHz).



1.6 参考文献

- (1) (a) Semenza, G. L. *Annu. Rev. Pathol.* **2014**, *9*, 47-71. (b) Semenza, G. L. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 207-214.
- (2) Masoud, N. G.; Li, W. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2015**, 1-12.
- (3) Hudson, C. C.; Liu, M.; Chiang, G. G.; Otterness, M. D.; Loomis, C. D.; Kaper, F.; Giaccia, J. A.; Abraham, R. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *20*, 7004-7014.
- (4) (a) Isaacs, J. S.; Jung, Y.; Mimnaugh, E. G.; Martinez, A.; Cuttitta, F.; Neckers, L. M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 29936-29944. (b) Mahjeesh, N. J.; Post, D. E.; Willard, M. T.; Kaur, B.; VanMeir, E. G.; Simons, J. W.; Zhong, H. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2478-2482. (c) Porter, J. R.; Ge, J.; Lee, J.; Normant, E.; West, K.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1386-1418.
- (5) (a) Kong, D.; Park, E. J.; Stephan, A. G.; Calvani, M.; Cardellina, J. H.; Monks, A.; Fisher, R. J.; Shoemaker, R. H.; Melillo, G. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9047-9055. (b) VanDyke, M. W.; Dervan, P. B.; *Science*, **1984**, *255*, 1122-1127.
- (6) (a) Nishiyama, Y.; Sugawara, K.; Tomita, K.; Yamamoto, H.; Kamei, H.; Oki, T. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 921-927. (b) Sugawara, K.; Toda, S.; Moriyama, T.; Konishi, M.; Oki, T. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 928-935.
- (7) (a) Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3346-3352. (b) Fujii, K.; Ikai, Y.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5146-5151. (c) Marfey, P. *Carlsberg. Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.
- (8) (a) MacMillan B. J.; Molinski, F. T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1883-1886. (b) MacMillan, B. J.; Ernst-Russell, A. M.; de Ropp, S. J.; Molinski, F. T. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8210-8215.
- (9) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
- (10) Nagai, Y.; Kusumi, T. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *11*, 1853-1856.
- (11) Evans, D. A.; Dow, R. L.; Shih, T. L.; Takacs, J. M.; Zahler, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5290-5313.
- (12) (a) Akiyama, K.; Kawamoto, S.; Fujimoto, H.; Ishibashi, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8427. (b) Schmidt, Y.; Breit, B. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2218-2221. (c) Schmidt, Y.; Lehr, K.; Colas, L.; Breit, B. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7071-7081.
- (13) Stahl, M.; Schopfer, U.; Frenking, G.; Hoffmann, R. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8083-8088.
- (14) Dias, da R. S.; Friedlos, F.; Light, Y.; Springer, C.; Workman, P.; Marais, R. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10686-10691.
- (15) Milkiewicz, M.; Pugh, W. C.; Egginton, S. *J. Physiol.* **2004**, *506*, 21-26.
- (16) Carriere, A.; Cargnello, M.; Julien, L.; Gao, H.; Bonneil, E.; Thibault, P.; Roux, P. P. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 1269-1277.
- (17) (a) Sabatini, M.D.; Erdjument-Bromage, H.; Lui, M.; Tempst, P.; Snyder, H. S. *Cell*, **1994**, *78*, 35-43. (b) Chiu, I. M.; Katz, H.; Berlin, V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 12574-12578.
- (18) (a) Braun, D. P.; Barglow, T. K.; Lin, Y.; Akompong, T.; Briesewits, R.; Ray, T. G.; Haldear, K.; Wandless, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7575-7580. (b) Keenan, T.; Yaeger, R. D.; Courage, L. N.;

- Rollins, T. C.; Pavone, E. M.; Rivera, M. V.; Yang, W.; Guo, T.; Amara, F. J.; Clackson, T.; Gilman, M.; Holt, A. D. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1309-1335.
- (19) Kanoh, N.; Honda, K.; Simizu, S.; Muroi, M.; Osada, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3559-3562.
- (20) Nagumo, Y.; Kakeya, H.; Shoji, M.; Hayashi, Y.; Dohmae, N.; Osada, H. *Biochem. J.* **2005**, *387*, 835-840.
- (21) (a) Maehr, H.; Liu, C-M.; Palleroni, J. N.; Smallheer, J.; Todaro, L.; Williams, H. T.; Blount, F. J. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 17-25. (b) Smitka, A. T.; Deeter, B. J.; Hunt, H. A.; Mertz, P. F.; Ellis, M. R.; Boeck, D. L.; Yao, C. R. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 726-733. (c) Maskey, P. R.; Fotso, S.; Sevvana, M.; Usón, I.; Grünwollny, I.; Laatsch, H. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 309-314. (d) Ueno, M.; Amemiya, M.; Someno, T.; Masuda, T.; Iinuma, H.; Naganawa, H.; Hamada, M.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1658-1665. (e) Hale, J. K.; Manviazar, S.; George, J. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4021-4042. (f) Fujiwara, H.; Yamakni, T.; Ueno, M.; Ishizuka, M.; Shinkawa, T.; Isobe, T.; Ohizumi, Y. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *210*, 1288-1295. (g) Oh, D-C.; Paulsen, M.; Currie, R. C.; Clardy, J. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 391-393.
- (22) Ban, S. H.; Shimizu, K.; Migeishi, H.; Nakamura, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11870-11871.

第二章 プロリン資化阻害物質 lipopeptide 類に関する研究

2.1 緒言

古くから細胞内の代謝経路は研究されてきたが、近年、がん細胞内と正常細胞間で異なっている代謝システムが続々と報告されている¹。例えば HIF-1 は正常細胞での ATP 生成経路である酸化的リン酸化経路を抑制し、一方で解糖系を亢進させることで ATP 合成を促進する (Warburg 効果)²。あるいは、正常細胞ではあまり使われないセリン代謝経路が乳がん細胞では増進しており、セリン代謝経路が活性化することで TCA 回路への α -ケトグルタル酸の供給量を維持している³。代謝を標的とした創薬研究も展開されつつある。例えばクエン酸回路関連酵素 IDH2¹ やセリン代謝酵素 PKM2¹ の阻害剤が抗がん剤として臨床試験中であり、代謝経路の治療標的としての可能性が少しずつ示されている。

著者は本研究第一章で verucopeptin が mTORC1 経路を阻害することを見出した。最近、mTORC1 経路はアミノ酸代謝の調節因子であることが報告された^{4,5}。そこでアミノ酸代謝を標的とした抗がん剤の開発研究に着目した。

アミノ酸代謝経路は個々のアミノ酸から中間体を經由して細胞の生存に必要なエネルギーや生体内小分子化合物を生産している。近年、アミノ酸やその中間体が他の代謝経路に影響を及ぼすことで複雑なアミノ酸代謝ネットワークを形成していることがわかってきた。例えばグルタミンの脱アミノ化物であり HIF の不活性化に必須な α -ケトグルタル酸がミトコンドリア複合体 V を直接阻害することで TOR の活性抑制やカロリー制限下の寿命延長に寄与することが解明された⁶。さらに、がん細胞では正常細胞とアミノ酸代謝ネットワークが異なっており、それががんの悪性化と関係していることも明らかになってきた。例えば、がん細胞内ではプロリンとプロリン代謝酵素量が減少している⁷。減少したプロリンを補うためがん細胞は細胞外のコラーゲンからプロリンを取り込む。また、プロリン代謝酵素が減少したことで ROS の存在量が減少し、アポトーシスの抑制とオートファジーの亢進がおこることによってがん細胞は細胞死を免れる。このような背景からアミノ酸代謝機構は抗がん剤創薬の有望な標的である。そこで、第二章ではアミノ酸代謝を調節する天然物の探索と作用機構解析を行った。

現状では代謝物の機能や、代謝経路間のクロストークの分子機構など、アミノ酸代謝機構に対する知見は限られている。本研究で得られる化合物を利用することで、がん特異的代謝経路で機能亢進している代謝酵素やその産物 (代謝中間体) の代謝機構における役割などの理解に繋がり、さらには創薬標的となる新たな代謝調節因子の提示も期待できる。

2.2 Lipopeptide 類の単離

アミノ酸代謝経路に作用する新規天然物を取得するため、真核生物のモデルである分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*; *S. pombe*) を用いたスクリーニング系を用いた。分裂酵母は全ゲノム解読が終了しており、古くから有用な研究モデルとして用いられてきたことから遺伝子操作技術も確立されている。そのため、新規天然物を取得した後の作用機構を解明する段階でも利用できることを考え、本研究でのモデル生物とした。

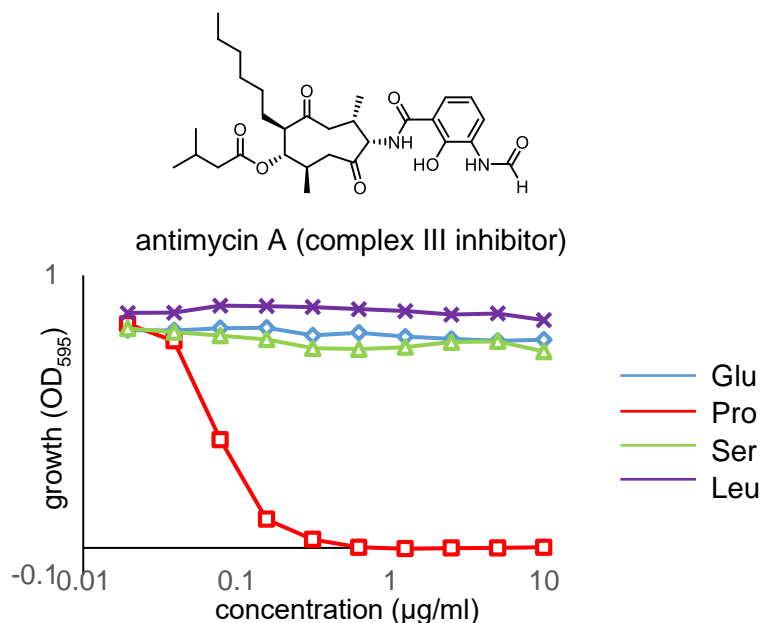


Figure 2-1. Growth curve of wild-type *S. pombe* in MME/P/S/L treated with antimycin A, a mitochondrial complex III inhibitor, for 72 h are shown. Antimycin A inhibited proline utilization selectively. This result suggested that proline metabolism relates to the function of mitochondrial complex III.

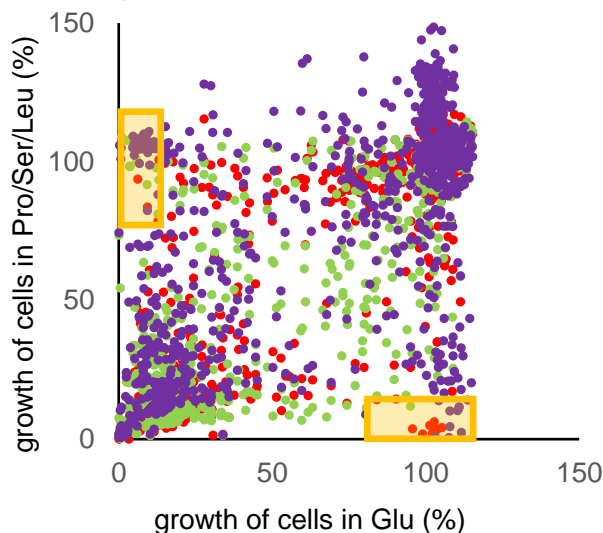


Figure 2-2. Growth of *S. pombe* in MME/P/S/L treated with microbial culture extracts for 72 h are plotted. Broths plotted in orange square are expected to contain characteristic amino acid modulators.

第二章で用いたスクリーニング系では特定のアミノ酸を唯一の窒素源とする培地で分裂酵母を培養し、薬剤に対する感受性を測定した。本研究ではスクリーニングの対象とするアミノ酸としてグルタミン酸 (Glu; E)、セリン (Ser; S)、ロイシン (Leu; L) とプロリン (Pro; P) の4種を設定した。すなわち、分裂酵母をグルタミン酸のみを窒素源とするMM培地で前培養後、窒素源を含まないMM培地での培養を経て、4種のアミノ酸培地に分裂酵母を播種した。分裂酵母を含む各培地にスクリーニングサンプルを加え、30℃で72時間インキュベートした後に培地の濁度を測定することで分裂酵母の生育度を評価した。例えば、ポジティブコントロールとして用いたミトコンドリアのIII型複合体阻害剤 antimycin A はプロリンのみを窒素源とする培地選択的に分裂酵母の生育阻害を示す (Figure 2-1)。この結果は、III型複

合体の機能がプロリンの資化と関連していることを示している。

約 4000 株の微生物培養液抽出物（ブロス）を本スクリーニング系に付し、特定のアミノ酸培地選択的に生育阻害を示すブロスを探索した（Figure 2-2）。4 種全ての培地中で酵母の生育度が 10% 以下まで低下したブロスについては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、4 種のアミノ酸培地中いずれか 1 種のアミノ酸培地に対して生育阻害を示すブロスが 16 サンプル得られ、その再現性も確認できた。得られた 16 サンプルを精製対象株として選定し大量培養を行い、活性化合物の単離を行った。

得られた 16 種の精製対象株からプロリン資化を阻害するブロスとして選定した糸状菌培養液抽出物から生物活性を指標に活性成分の単離を行った（Figure 2-3）。まず、培養液を *n*-BuOH にて抽出し、濃縮後に二層分配した。CHCl₃ 層を濃縮乾固し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Sephadex LH20, MeOH）による分画を行った。活性の見られた画分を ODS カラムクロマトグラフィー（MeOH/H₂O）によりさらに分画し、活性画分（100% MeOH 溶出画分）を 2 度の逆相 HPLC（1: Cosmosil-5C₈-MS, φ20×250 mm, MeCN/H₂O 2: Cosmosil-AR-II, φ20×250 mm, MeCN/H₂O with 0.1% TFA）により精製することで活性成分 lipopeptide A（**16**; 35.6 mg）とその類縁体 lipopeptide B（**17**; 59.0 mg）を得ることに成功した。

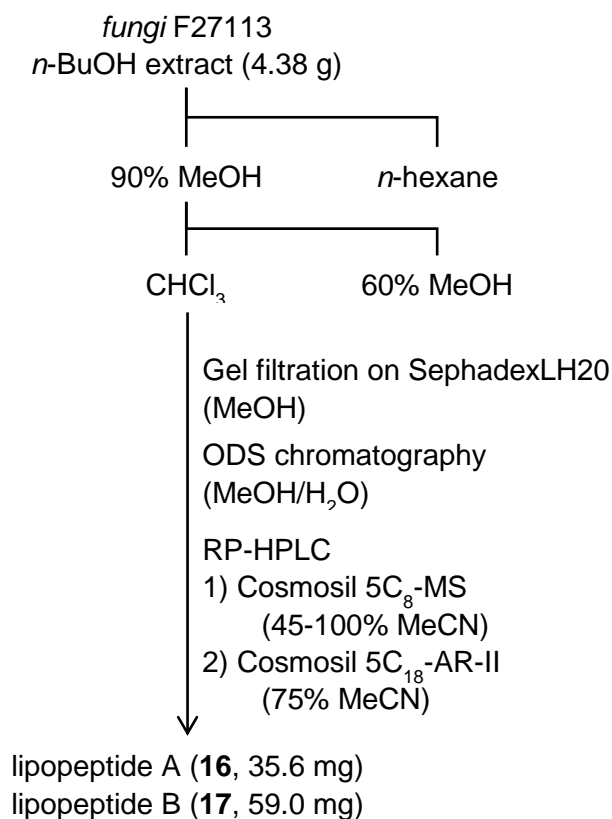


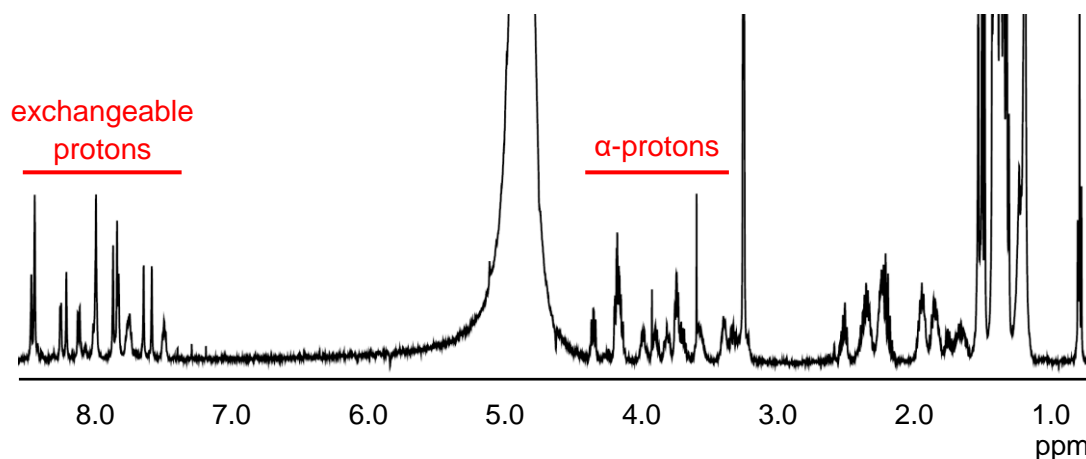
Figure 2-3. Isolation of lipopeptides.

2.3 Lipopeptide 類の構造決定

Lipopeptide 類は ^1H NMR スペクトル中で複数の α プロトン (3.0-4.5 ppm) と交換性プロトン (7.0-9.0 ppm) が観測されたことからペプチド性化合物であることが示唆された (Figure 2-4)。さらに、lipopeptide A の ^1H NMR において複雑な交換性プロトンのピークが観測されたことから、本化合物は混合物であることが予想された。高分解能質量分析の結果から lipopeptide A の分子式は $\text{C}_{89}\text{H}_{152}\text{N}_{20}\text{O}_{22}$ (m/z 1876.1296 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. 1876.1282) と、lipopeptide B の分子式は $\text{C}_{83}\text{H}_{142}\text{N}_{18}\text{O}_{20}$ (m/z 1710.0571 $[\text{M}-\text{H}]^-$, calcd. 1710.0575) と決定した。Lipopeptide 類の構造を決定するにあたって、lipopeptide A は収量が少なく長期保存下で分解物が生成したことから、より多く精製可能で安定な lipopeptide B の構造決定を先行させ、得られた知見をもとに lipopeptide A の構造決定を行うこととした。

2.3.1 Lipopeptide B の構造決定

(a) ^1H NMR spectrum of lipopeptide A [500 MHz, CD_3OH]



(b) ^1H NMR spectrum of lipopeptide B [500 MHz, CD_3OH]

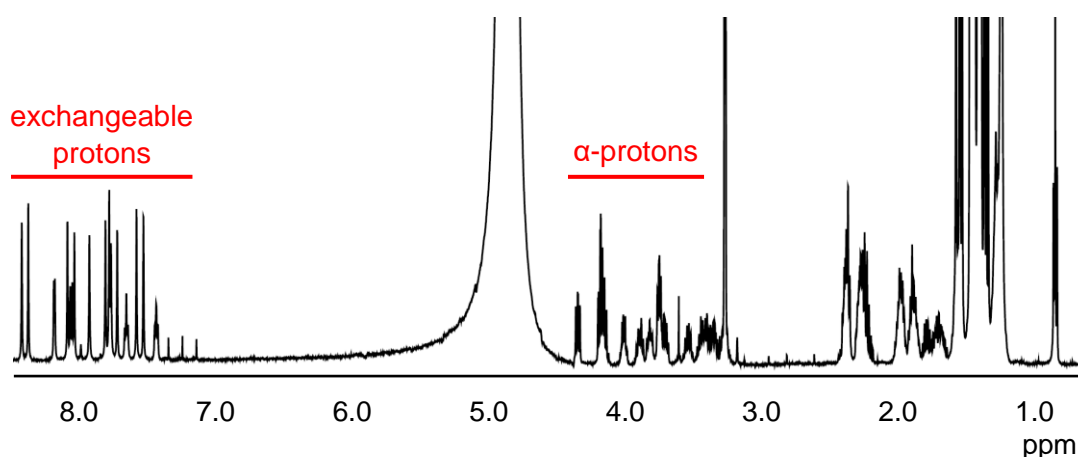


Figure 2-4. (a) ^1H NMR spectrum of lipopeptide A (**16**). (b) ^1H NMR spectrum of lipopeptide B (**17**).

まず、 ^1H NMR スペクトルにおいて 4ppm 付近のメチンプロトンは 2 分子の alanine に、3.3 ppm 付近のメチレンプロトンは 2 分子の β alanine に、2.2 ppm 付近のメチレンプロトンは 3 分

子の proline に由来することが明らかになった (Figure 2-5)。 ^{13}C NMR スペクトルでは 60 ppm 付近に 11 個の第 4 級炭素シグナルが観測され、 ^1H NMR で高磁場領域にオーバーラップした多数のプロトンが観測されたことと合わせて α -amino isobutylic acid (Aib) が 11 個存在することがわかった。さらに 180 ppm 付近の 19 個のカルボニル炭素からこれらのアミノ酸からなるペプチド鎖に脂肪酸が縮合していることが示唆された。

次に、Marfey 法⁸によって lipopeptide B の構成アミノ酸の立体化学を決定した (Figure 2-6)。Lipopeptide B (0.17 mg) を酸加水分解後に L-or D-FDLA と反応させ得られた反応物を LC-MS で分析した。Proline に相当する分子量のピークは L-FDLA 体が先に溶出したことから L-proline が含まれていることが明らかになった。Alanine より 14 マスユニット多い分子量を持つピークは 2 種類の FDLA 体で溶出時間が変わらなかったことから α -amino isobutyric acid の存在が確認できた。Alanine に相当する分子量は 2 つのピークから観測され、1 つは 2 種類の FDLA 体で溶出時間が変わらず、残る 1 つは L-FDLA 体が先に溶出したことから L-alanine と β -alanine が存在することがわかった。以上の結果から、lipopeptide B の構成アミノ酸は、 α -amino

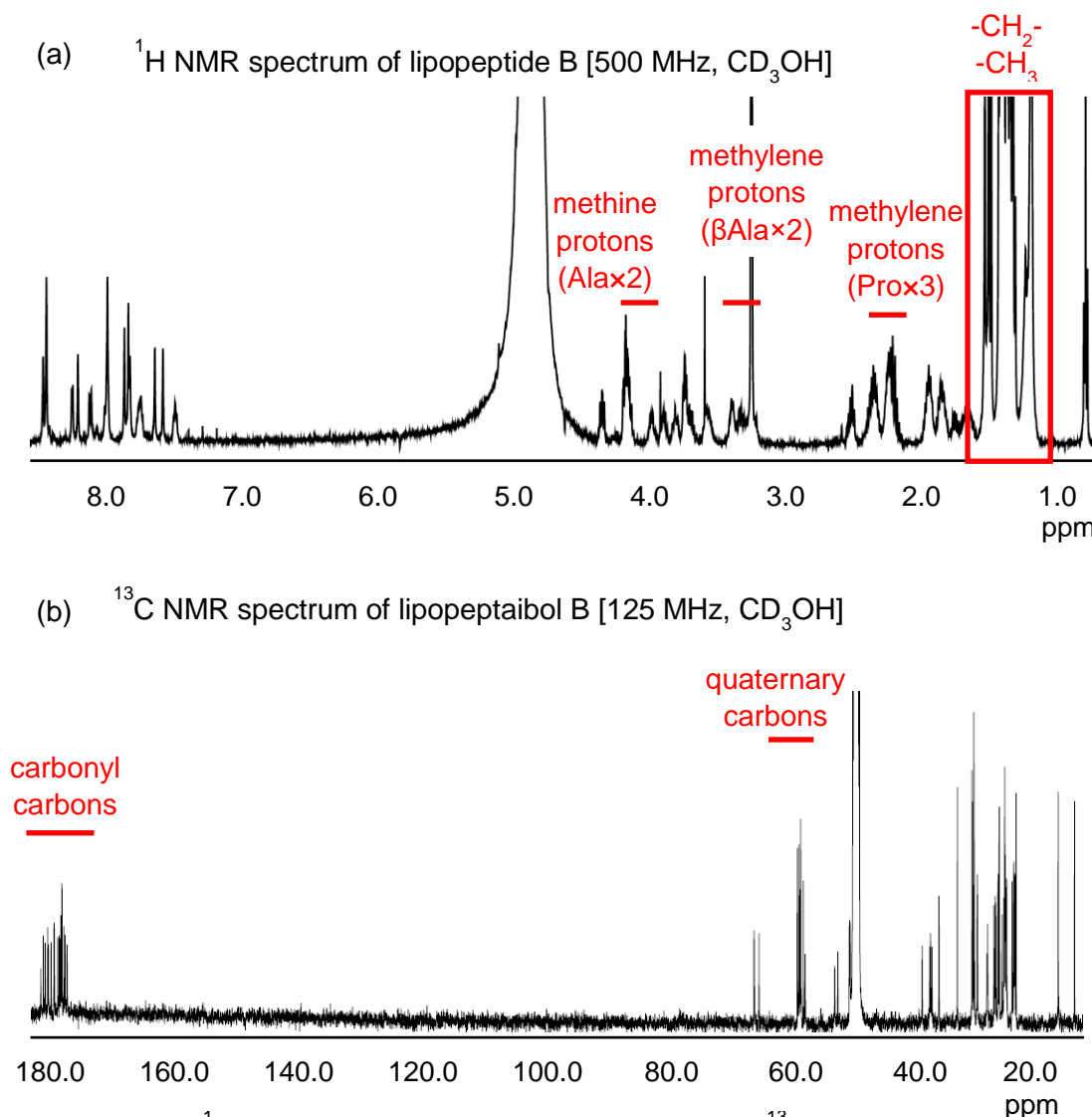


Figure 2-5. (a) ^1H NMR spectrum of lipopeptide B (17). (b) ^{13}C NMR spectrum of lipopeptide B (17).

isobutyric acid (Aib; B)、L-Proline (Pro; P)、L-Alanine (Ala; A) と β Alanine (β Ala; β A) であると決定した。

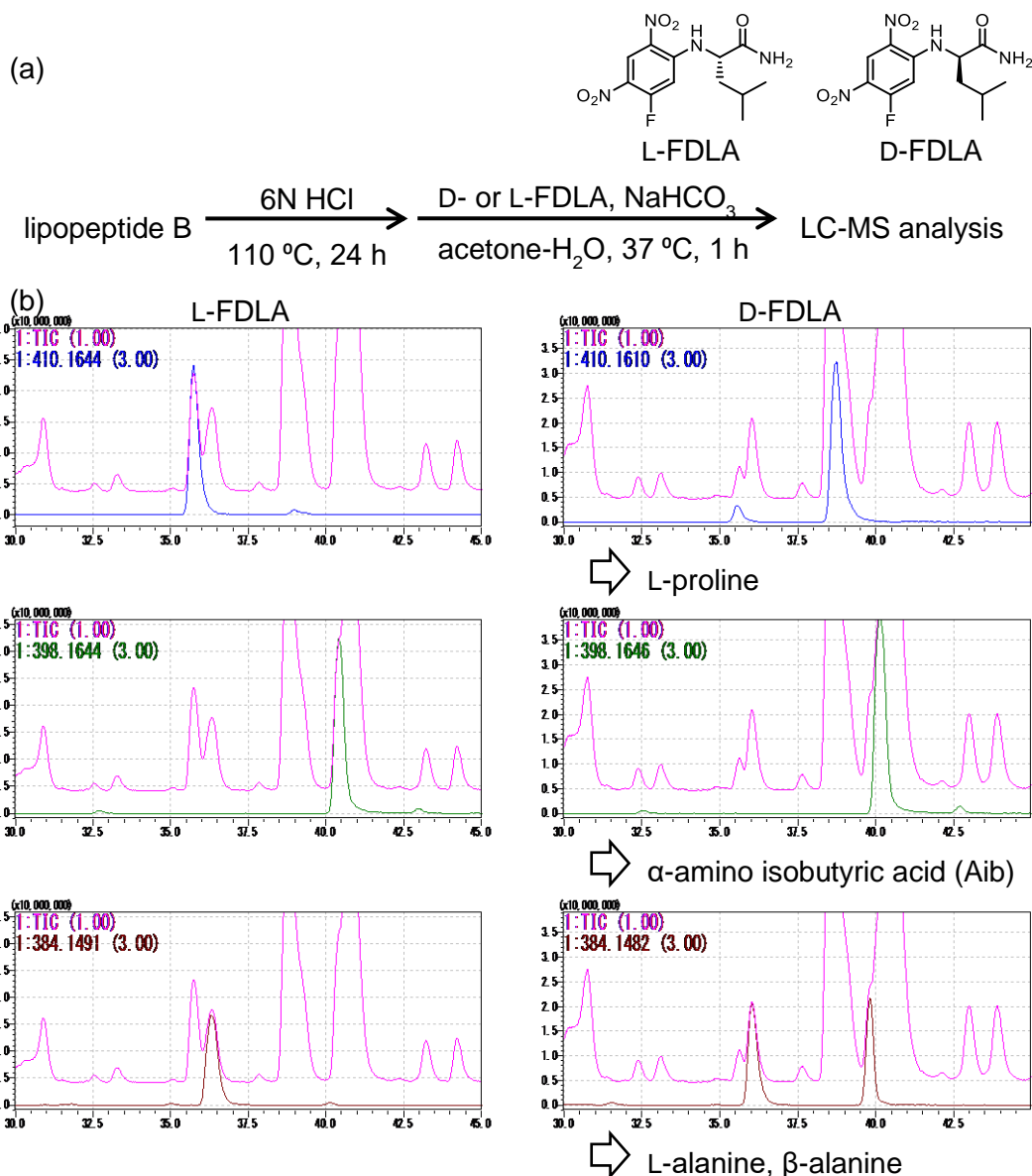


Figure 2-6. (a) Preparation of FDLA derivatives from lipopeptide B. (b) LC-MS analysis of FDLA derivatives.

続いて、構成脂肪酸の同定に着手した (Figure 2-7)。種々条件を検討した結果、lipopeptide B を室温条件下で温和に酸加水分解することで Aib が付加した脂肪酸を得ることに成功した。得られた脂肪酸の分子量から構成脂肪酸は dodecanoic acid であることが示唆された。この結果を確認するため、Aib が縮合した dodecanoic acid の標品を合成し、天然由来の分解物と LC-MS にて物理化学的性質を比較した。その結果、両者の分子量と溶出時間が一致したため、lipopeptide B の構成脂肪酸は dodecanoic acid と決定できた。

最後に、MS/MS 解析によりペプチド鎖の配列を決定することを試みた (Figure 2-8)。脂肪酸を遊離させた酸性条件下で得られたペプチド鎖由来の m/z 1445.1 を親イオンとする MS/MS パターンの解析から lipopeptide B の部分配列を (BP)BPBBPABAABBABBB (括弧内は順不同、B;

Aib, P; Pro, A: β Ala or L-Ala) と解釈できた。MS/MS 解析で判別できなかった部分を明らかにするため lipopeptide B の NMR 解析を行った。Aib-1 のアミドプロトンから Pro-2 の δ 位のプロトン、Pro-2 の δ 位のプロトンから Aib-3 のアミドプロトンに NOESY 相関が観測されたことから N 末端の配列は Aib-Pro の順と決定した。さらに、Ala-9 のメチンプロトンから Aib-10 のアミドプロトンを介して β Ala-11 のアミドプロトンに、 β Ala-11 の α プロトンから Ala-12 のアミドプロトンに、Ala-12 のメチンプロトンから Aib-13 と Aib-14 のアミドプロトンを介して β Ala-15 のアミドプロトンに NOESY 相関が観測されたことから全ての Alanine と β Alanine の位置を決定できた (Figure 2-9)。

以上の結果を合わせて、lipopeptide B の構造は dodecanoyl-BBPBPBBPAB β AABB β ABBB であることを明らかにした (Figure 2-10)。

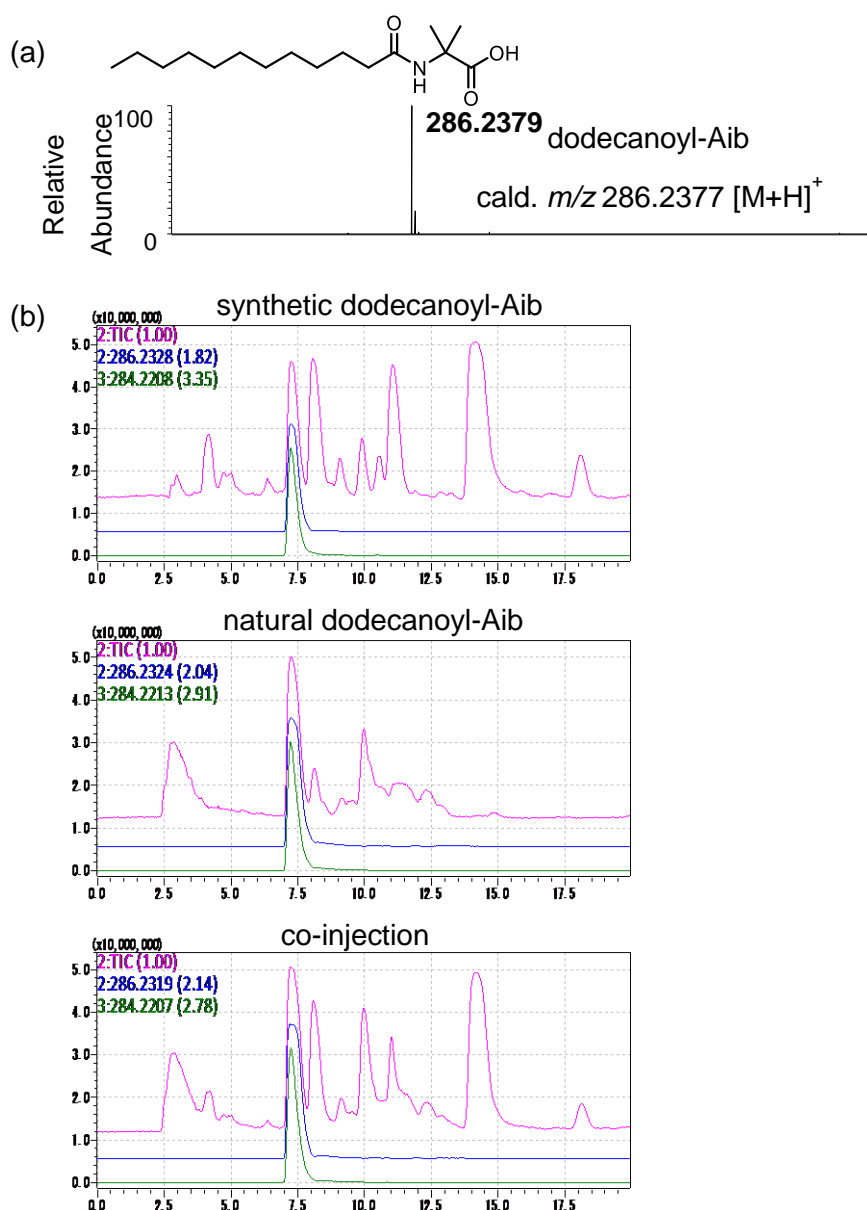


Figure 2-7. (a) Identification of dodecanoyl-Aib. (b) LC-MS analysis of natural and synthetic dodecanoyl-Aib.

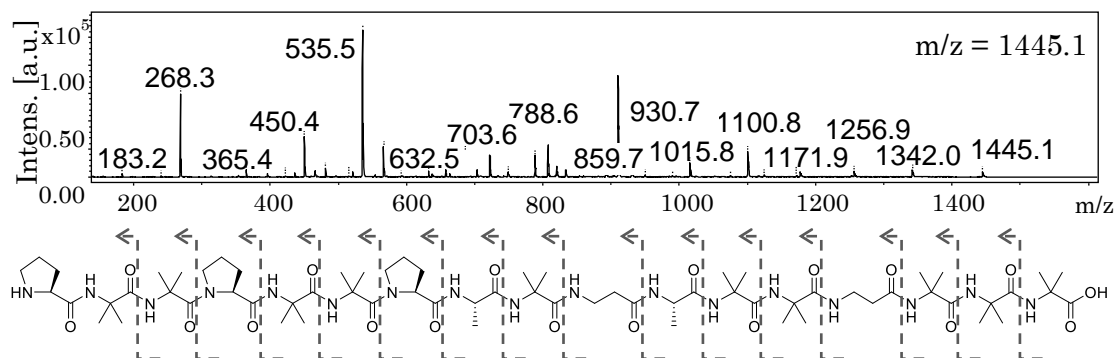


Figure 2-8. MS/MS fragmentation of lipopeptide B (17).

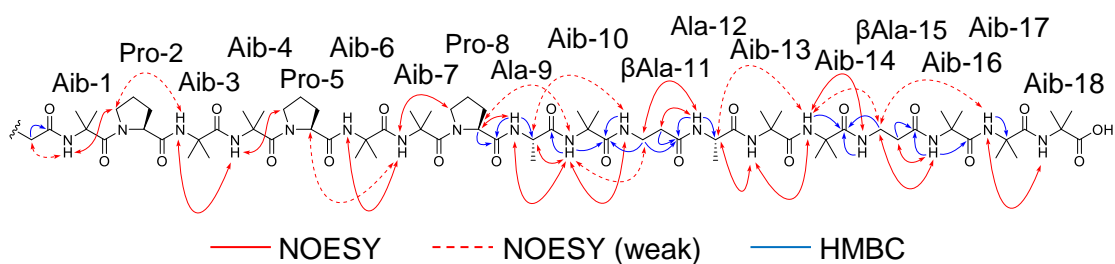


Figure 2-9. NOESY and HMBC correlations of lipopeptide B (17) on DMSO-*d*₆.

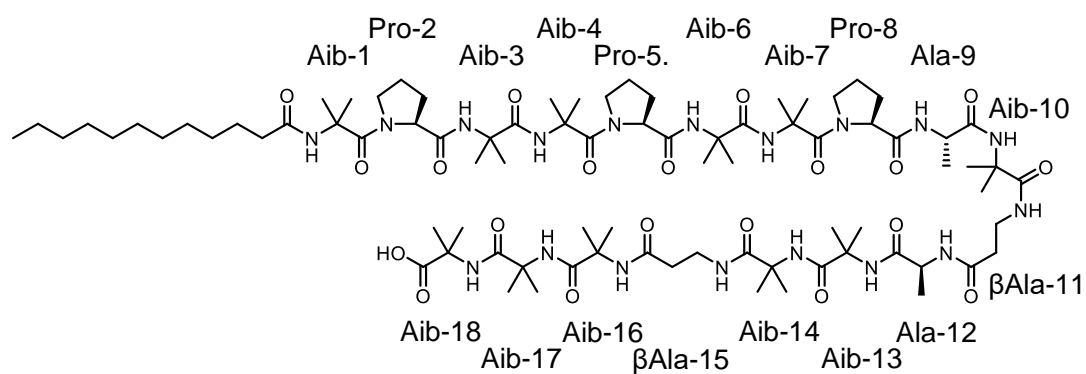


Figure 2-10. Chemical structure of lipopeptide B (17).

2.3.2 Lipopeptide A の構造決定

Lipopeptide A (16) の分子量測定から、lipopeptide A は lipopeptide B よりも分子量が 142 マスユニット多い化合物 (lipopeptide A₁) と 128 マスユニット多い化合物 (lipopeptide A₂) の混合物であることが判明した。この分子量の差はそれぞれ 2 分子の alanine、1 分子の alanine と 1 分子の glycine の組み合わせと予想された。さらに、Edman 分解⁹の結果から lipopeptide A₁ の 2 分子の alanine は L-alanine と β-alanine からなり、lipopeptide A₂ では lipopeptide A₁ の β-alanine が glycine に置換していることが示唆された。lipopeptide A₁ と lipopeptide A₂ の存在比は約 9:1 であった。以上の結果と MS/MS 解析にて lipopeptide A₁ と A₂ の部分配列のフラグメントパターンが lipopeptide B と一致したことを併せて、lipopeptide A は lipopeptide B から L-Ala-βAla が伸長した lipopeptide A₁ と L-Ala-Gly が伸長した lipopeptide A₂ の混合物であることが明らかになった (Figure 2-11)。

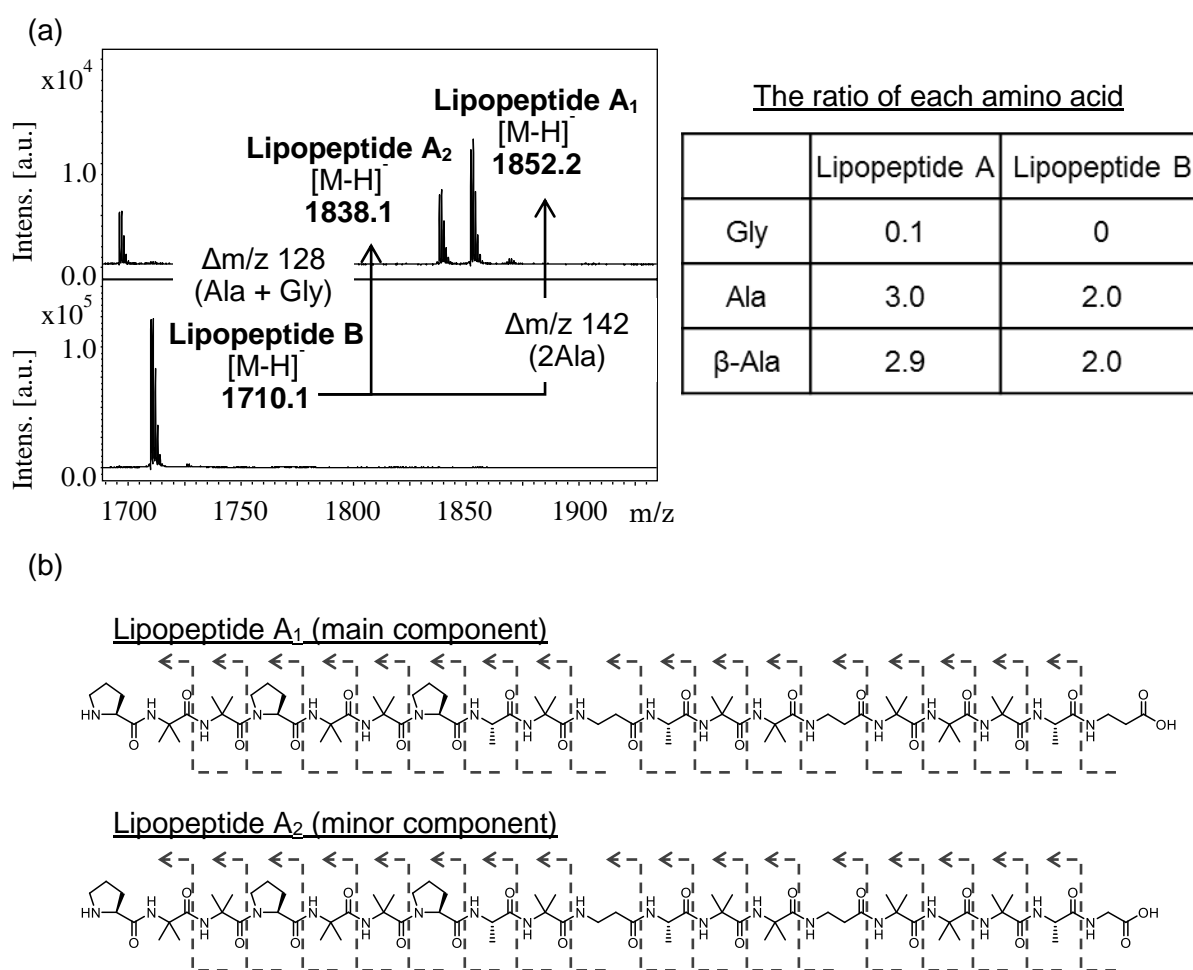


Figure 2-11. (a) LC-MS analysis of lipopeptide A (above). The ratio of each amino acid calculated by the result of Edman degradation (below). (b) MS/MS fragmentation of lipopeptide A₁ and lipopeptide A₂.

次に lipopeptide A₁ と A₂ の分離を試みた。種々条件を検討したものの lipopeptide A₁ と A₂ の良好な分離条件は見つからなかった。そこでまず、主成分である lipopeptide A₁ の構造決定を目指し、lipopeptide B から L-Ala-βAla を伸長させることで lipopeptide A₁ を化学合成し、その物理化学的性質を天然由来の lipopeptide A と比較検討した (Figure 2-12, 2-13)。Fmoc-L-Alanine

と β Alanine-Bn を縮合後 Fmoc 基を脱保護して得た L-Ala- β Ala-Bn と lipopeptide B を縮合して Bn 基保護体の lipopeptide A₁ を得た。その後、Bn 基を接触水素添加条件で脱保護し lipopeptide A₁ の標品を得た。LC-MS にて天然由来の lipopeptide A と合成標品の溶出時間および MS/MS パターンを比較したところ、両者が完全に一致した。これらの結果から、lipopeptide A₁ の構造を dodecanoyl-BBPBPBBPAB β AABB β ABBBA β A と決定することに成功した (Figure 2-14)。

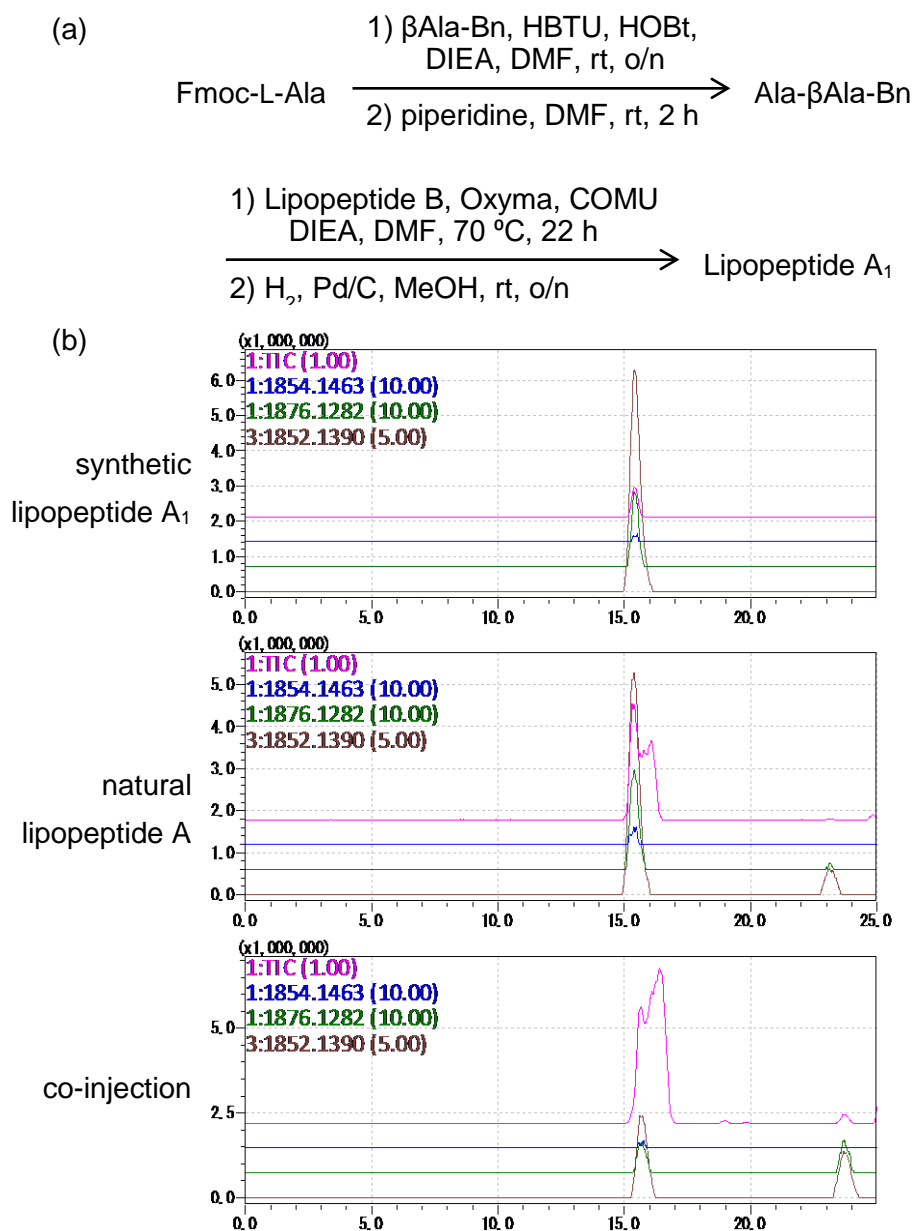


Figure 2-12. (a) Preparation of synthetic lipopeptide A₁. (b) LC-MS analysis of lipopeptide A (16).

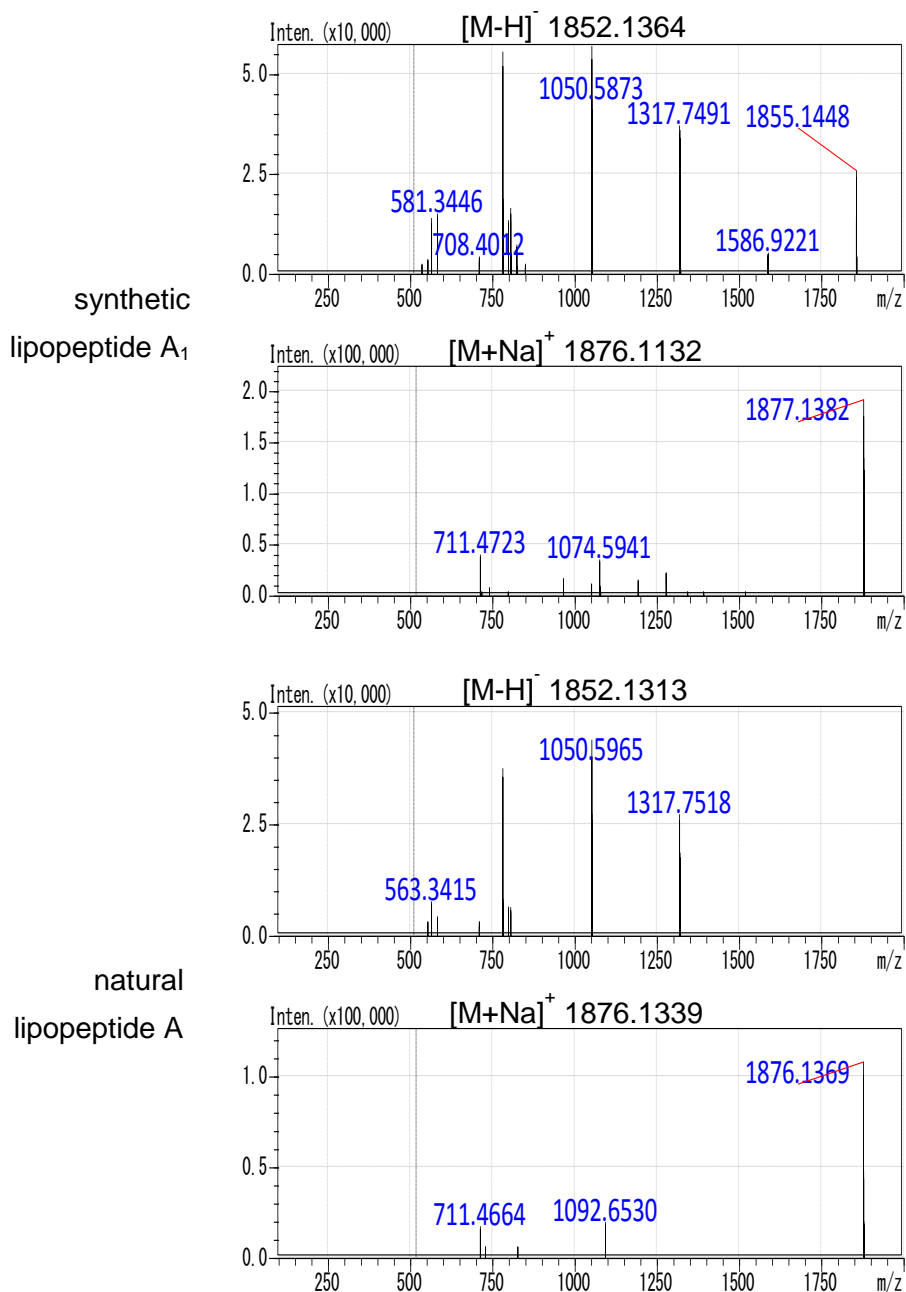


Figure 2-13. Comparison of MS/MS fragment pattern between synthetic lipopeptide A₁ and natural lipopeptide A.

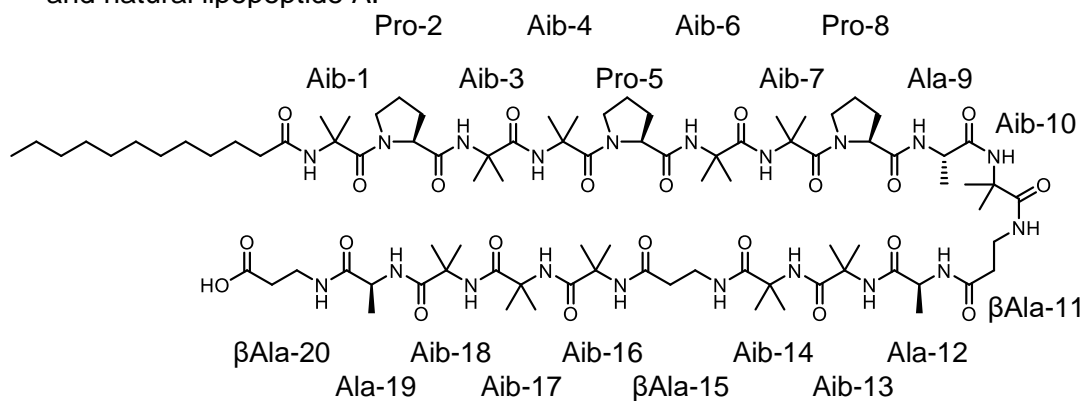


Figure 2-14. Chemical structure of lipopeptide A₁.

2.4 Lipopeptide 類の生物活性評価

2.4.1 分裂酵母のアミノ酸資化に対する lipopeptide 類の効果

天然由来の lipopeptide 類と合成した lipopeptide A₁ のグルタミン酸、プロリン、セリンとロイシンのうち 1 種を含む MM 培地での分裂酵母の生育に対する阻害活性を検討した (Figure 2-15)。その結果、lipopeptide A (16) はプロリン培地での分裂酵母生育に対して 6.3 μg/ml で、残る 3 種類のアミノ酸培地では 25 μg/ml で抑制効果 (IC₁₀₀) を示した。一方、lipopeptide B は検討した全ての条件において酵母の生育を阻害しなかった。さらに合成した lipopeptide A₁ もプロリン培地での分裂酵母の生育を阻害した。以上の結果から lipopeptide A はプロリンの資化を他のアミノ酸より優先的に阻害し、lipopeptide B はアミノ酸資化には影響しないことが明らかになった。また、lipopeptide A の主成分 lipopeptide A₁ もプロリン資化を阻害することが判明した。

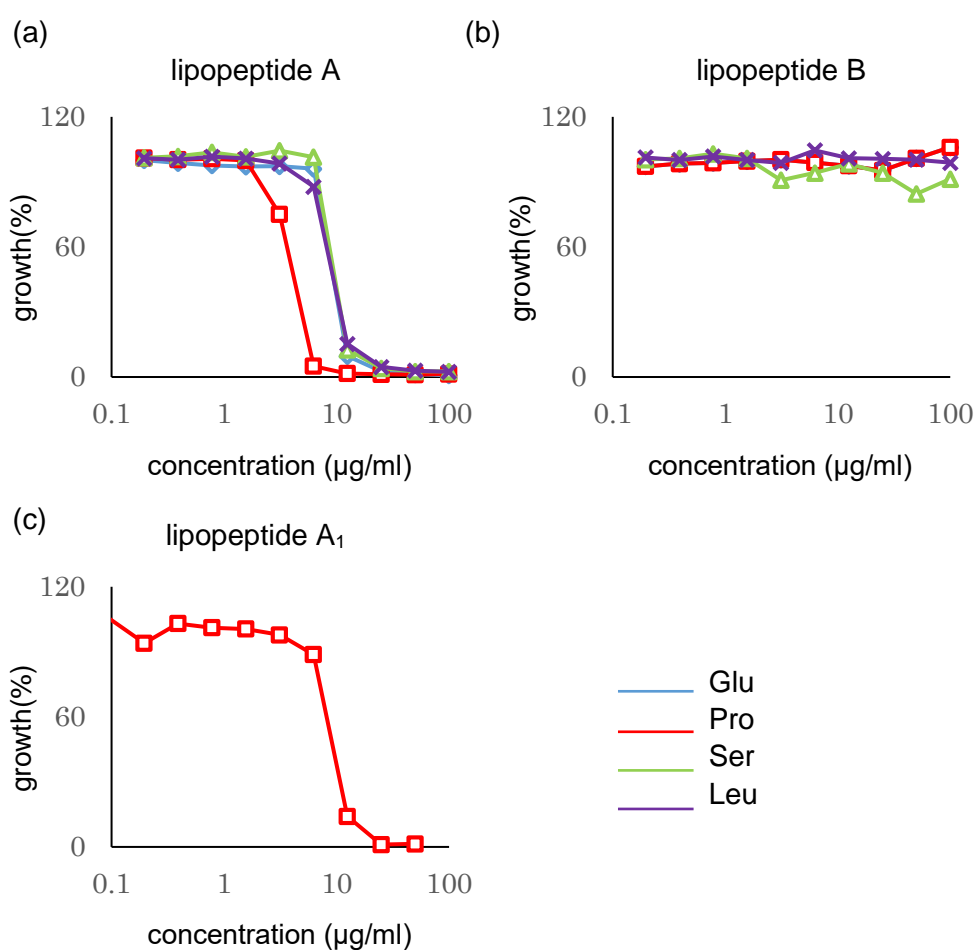


Figure 2-15. Growth curve of *S. pombe* in MME/P/S/L treated with lipopeptides for 72 h are shown. 100% growth was measured OD₅₉₅ without chemicals in each medium. (a) lipopeptide A (16) (b) lipopeptide B (17) (c) lipopeptide A₁.

2.4.2 細胞膜に対する lipopeptide 類の効果

Aib を含むペプチド性化合物はヘリックス構造をとることが知られている¹⁰。そこで lipopeptide 類の二次構造を CD スペクトル¹¹によって解析した。その結果、天然由来 lipopeptide A と合成した lipopeptide A₁ ではヘリックス構造に特徴的な 208 nm と 217 nm 付近に吸収が観

測された。一方で lipopeptide B は吸収が見られなかった (Figure 2-16)。この結果から、lipopeptide A はヘリックス構造をとり、lipopeptide B はランダムコイル構造であることが明らかになった。

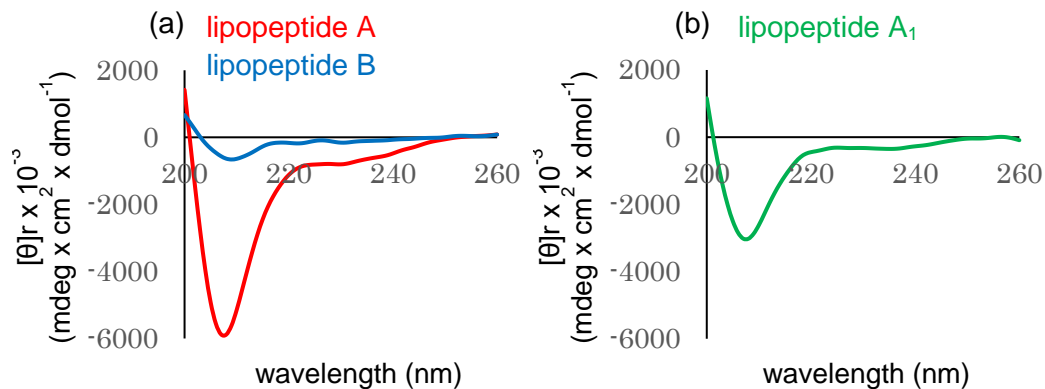


Figure 2-16. CD spectra of lipopeptide A (16) and lipopeptide B (17) (a), lipopeptide A₁ (b) in MeOH. Each spectrum is represented as an average of two measurements. Concentration of peptides used 0.22, 0.24 and 0.22 mM of lipopeptide A, lipopeptide B and lipopeptide A₁, respectively.

ヘリックス構造をとるペプチド性化合物は細胞膜を傷害することが知られている¹²。そこで lipopeptide A の細胞膜障害活性を検討するために溶血試験¹³を行った (Figure 2-17)。膜障害活性のある化合物で赤血球を処理すると赤血球膜の破壊に引き続きヘモグロビンの放出が起こるため、ヘモグロビン由来の吸光度を測定することで化合物の溶血活性が評価できる。Lipopeptide 類を処理した後に放出されたヘモグロビン量を測定した結果、天然由来 lipopeptide A および合成した lipopeptide A₁ は濃度依存的に溶血活性を示した。一方、lipopeptide B は 100 μ g/ml まで検討したものの全く溶血活性を示さなかった。

これらの結果から lipopeptide A はヘリックス構造をとり細胞膜障害活性を示すこと、ランダムコイル構造の lipopeptide B は同活性を持たないことが明らかになった。さらに、2.4.1 と同様に lipopeptide A₁ も細胞膜障害活性を示すことが判明した。

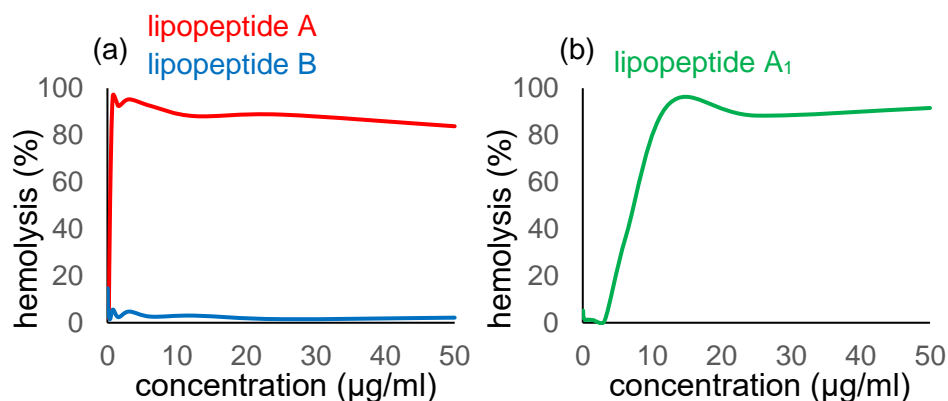


Figure 2-17. Lipopeptide A induced hemolysis. Erythrocytes from sheep were incubated with various concentrations of lipopeptides at 37 °C for 30 min, and the percentage of erythrocytes hemolyzed was determined by measuring the amount of hemoglobin released, as described in Experimental information. (a) lipopeptide A (16) and lipopeptide B (17) (b) lipopeptide A₁

2.4.3 Lipopeptide 類の抗菌活性

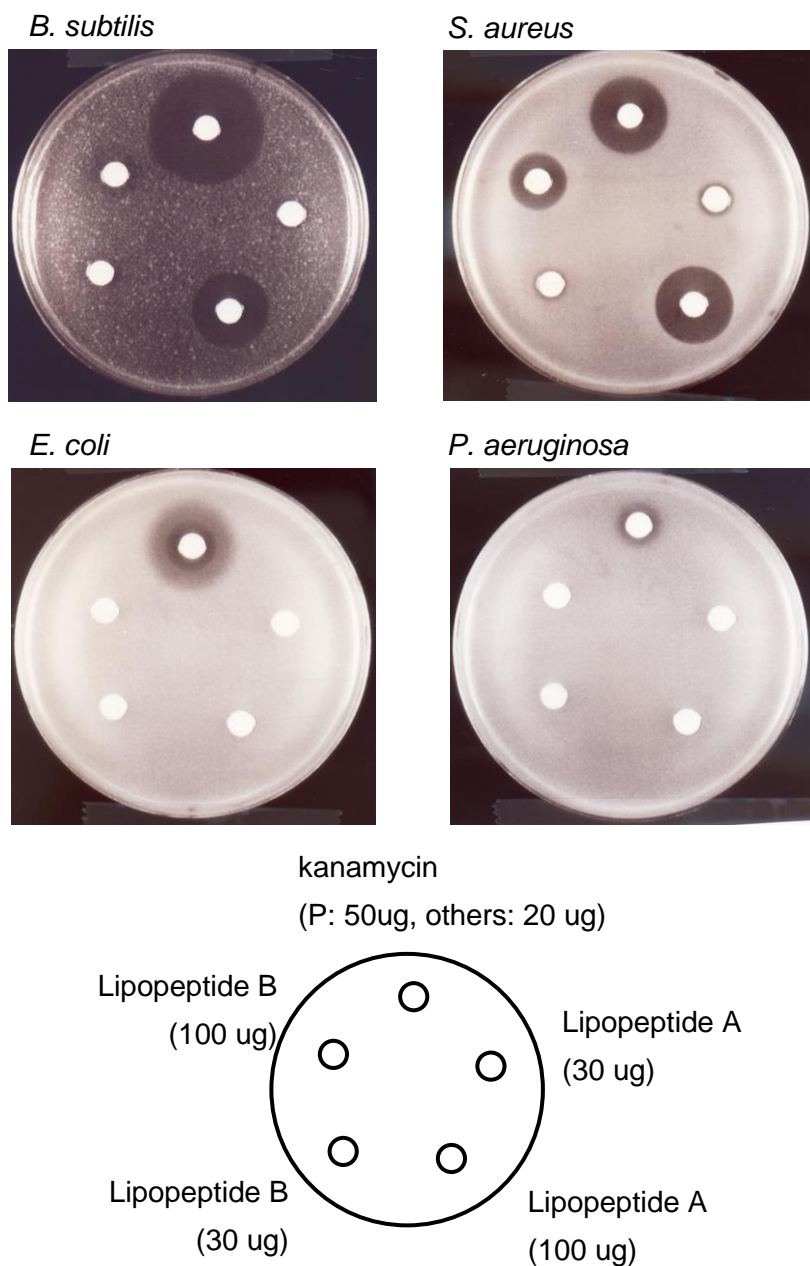


Figure 2-18. Antibacterial activities of lipopeptides. Growth inhibitory activities of the lipopeptides were examined against *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Lipopeptide A, lipopeptide B and kanamycin were loaded onto the disks. Bacteria were incubated at 30 °C for 24 h.

膜障害性ペプチドは抗菌活性を示すことが報告されている¹⁴。そこで枯草菌 *Bacillus subtilis*、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* と大腸菌 *Escherichia coli* に対する lipopeptide 類の抗菌活性をペーパーディスクアッセイによって評価した (Figure 2-18)。各被検菌を播種した寒天培地に 30 μg と 100 μg の lipopeptide 類を塗布したペーパーディスクを設置し、24 時間後の各被検菌の生育を観察した。その結果、2.4.2 でヒツジ赤血球に対する膜障害活性を示した lipopeptide A は *B. subtilis* と *S. aureus* に対して 30 μg において阻

止円を形成した。一方で、膜障害活性のない lipopeptide B は上記 4 種の細菌に対して抗菌活性を示さなかった。

2.5 結論

本章では分裂酵母を用いたスクリーニング系を用いアミノ酸資化を阻害する天然物を探索した。約 4000 株のプロス中でプロリン資化阻害活性のあった糸状菌培養液抽出物からプロリン資化阻物質 lipopeptide A と同活性のない類縁体 lipopeptide B を取得した。各種化学分解や MS/MS 解析、NMR 解析によって lipopeptide B の構造を dodecanoyl-BBPBPBBPAB β AABB β ABBB と決定することに成功した。また lipopeptide A は各種化学分解や MS/MS 解析、NMR 解析の結果から dodecanoyl-BBPBPBBPAB β AABB β ABBBA β A (lipopeptide A₁) と dodecanoyl-BBPBPBBPAB β AABB β ABBBAG (lipopeptide A₂) の混合物であることを明らかにした。さらに、lipopeptide A₁ がプロリン資化阻害活性を有すること、ヘリックス構造をとって膜障害活性を持つことが明らかになった。

著者の解析で lipopeptide A はヘリックス構造、lipopeptide B はランダムコイル構造であることを示したが、この二次構造の差異は C 末端 2 残基の有無に起因することが考えられる。Proline は側鎖の立体障害が大きく、アミドプロトンが存在しないためヘリックスを形成しにくい。また、alanine と aib はヘリックス構造ペプチドに多く見られるアミノ酸である。Lipopeptide A 中には proline が 3 残基存在し、いずれも N 末端に存在している。このことは、本化合物の N 末端側はヘリックス構造をとりにくいことが示唆され、Pro-8 以降の aib と alanine に富む 12 残基の領域がヘリックス構造を形成していると予想される。さらに、 α 位に置換基を持たない glycine は特定のコンホメーションを取りにくく、ヘリックス形成には関与しにくいことが知られている。同様の理由から β alanine もヘリックス形成には積極的には関与しないことが考えられるため、lipopeptide A₁ の Pro-8 から β Ala-20 までの C 末端側部分のみがヘリックスを形成していることが示唆される。一方、ランダムコイル構造の lipopeptide B は Pro-8 以降のアミノ酸が 10 残基しかなく、ヘリックス構造を形成するためのアミノ酸残基数が不足していると考えられる。本仮説を検証するためには lipopeptide A と lipopeptide B の Pro-8 から C 末端までのペプチド鎖をそれぞれ化学合成し、それらのヘリックス構造形成能を検討する必要がある。今後、種々のペプチド性化合物を合成し二次構造を確認することで本仮説の検証が期待できる。さらに、本仮説が実証されれば限られた化学修飾でペプチド性化合物の二次構造が調節できること明らかになり、化学構造はほとんど変わらないものの二次構造が全く異なる化合物の創製が可能となる。ヘリックス構造を持つペプチド性化合物は脂質膜に作用する。しかし、その作用様式や作用する脂質膜の性質に関して未解明な点が多い。本研究で得た知見を基に合成するヘリックス形成能を持つペプチド性化合物とランダムコイル状の化合物を用いて作用様式や脂質膜の性質を比較調査すれば、化合物の一次構造に依存した相互作用を排除しながら化合物—脂質膜間の相互作用様式を理解できる。

第二章ではアミノ酸資化を調節する天然物の探索を行い lipopeptide A の取得に成功した。また本研究に関連して beauvericin¹⁵ と chaetoglobocin B¹⁶ もプロリン資化阻害化合物として取得していた (Figure 2-19)。これらの化合物は化学構造も標的分子も全く異なっていることからアミノ酸資代謝は細胞内の広範なイベントと関連していることが考えられる。複雑に交差した生命現象を理解する場合に関連因子を遺伝子操作により制御し、その結果を解析することは困難である。遺伝子操作は対象とした因子近傍だけでなく広い範囲に長期間影響を及ぼ

すためである。一方、化合物を処理することで関連因子を制御する方法は一過的である場合が多く、影響される範囲が限定され解析が容易となる。本研究のスクリーニング系を用いてさらにアミノ酸資化を制御する天然物を取得し、それぞれの天然物の作用機構に関する知識を集積させることで複雑なアミノ酸代謝機構を理解することができる。

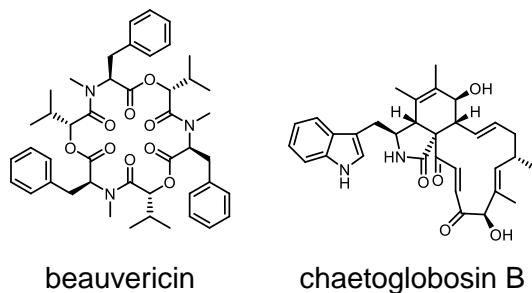


Figure 2-19. Chemical structure of beauvericin and chaetoglobosin B.

2.6 実験項およびスペクトルデータ

General procedure

All reagents and solvents were used as received from commercial suppliers and were used without further purification. IR spectra were measured using an FTIR spectrometer equipped with ZnSe ATR plate. Optical rotations were determined using the sodium D line (589 nm). NMR spectra were measured on a 500 MHz instrument. ^1H and ^{13}C chemical shifts are shown relative to the solvent; δ_{H} 2.50 and δ_{C} 39.5 for DMSO- d_6 and δ_{H} 3.31 and δ_{C} 49.0 for CD_3OH . Chemical shifts (δ) are shown in parts per million (ppm) and coupling constants (J) are in hertz (Hz). The following abbreviations are used to describe multiplicities: s = singlet, d = doublet, dd = double doublets, m = multiplet. Mass spectral data were collected with FAB MS or ESI IT-TOF MS. Flash column chromatography was performed over Silica Flash F60 (SiliCycle) using an elution system as described for each experiment.

Yeast strain and medium.

Wild-type *S. pombe* (JY1: *h*) was used. Media were prepared based on MM medium, although the nitrogen source was replaced by an amino acid: media designated MME, MMP, MMS or MML included glutamate, proline, serine or leucine as a sole nitrogen source, respectively.

Screening of amino acid-specific antiyeast compounds.

Cells were cultured in MME medium at 30 °C for 24 h. And then, Mid-log phase inoculum in MM-N medium was diluted to the OD_{595} of 0.01 (for MME and MMP), 0.02 (for MML) and 0.04 (for MMS). MM-N medium was MM medium without nitrogen source. Cells were exposed to screening samples dissolved in DMSO (1% v/v) at 30 °C for 72 h. After incubation, the turbidity was measured at OD_{595} using iMark microplate reader (BIO-RAD). Broths that exhibited less growth inhibition in any of four media were re-evaluated for their selectivity.

Isolation of lipopeptide A and lipopeptide B.

n-BuOH extracts of the culture broth of *fungi* F27113 (4.38 g) was extracted with 90% MeOH three times. Combined extracts were evaporated and extracted with CHCl_3 three times. The CHCl_3 extracts were combined and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl_3 -MeOH (50:50) and fractionated on a LH20 gel filtration column with MeOH. Fractions containing lipopeptides were combined and chromatographed on a ODS column with MeOH- H_2O (20:80 to 100:0). Fractions eluted by MeOH- H_2O (100:0) were subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C₈-MS ($\phi 20 \times 250$ mm) with MeCN- H_2O (45:55 to 100:0). Fractions containing lipopeptides were subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C₁₈-AR-II ($\phi 20 \times 250$ mm) with MeCN- H_2O containing 0.1% TFA (60:40) to afford lipopeptide A (**16**, 35.6 mg) and lipopeptide B (**17**, 59.0 mg) as colorless amorphous solids, respectively.

Lipopeptide A: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +12.18$ (*c* 0.42, MeOH); IR (neat) 3731, 2983, 2461, 1640, 1421, 1200 cm^{-1} ; HRMS (ESI) m/z 1876.1296 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{89}\text{H}_{152}\text{N}_{20}\text{NaO}_{22}$, 1876.1282.

Lipopeptide B: $[\alpha]_D^{20} +1.56$ (c 0.36, MeOH); IR (neat) 3286, 2984, 1647, 1543, 1173 cm^{-1} ; HRMS (ESI) m/z 1710.0571 $[M+H]^+$ calcd for $\text{C}_{83}\text{H}_{141}\text{N}_{18}\text{O}_{20}$, 1710.0575.; ^1H and ^{13}C NMR see Table 2-1.

Advanced Marfey's analysis of lipopeptide B.

To a solution of **17** (0.17 mg, 9.94×10^{-5} mmol) was added 6 N HCl (0.2 mL), which was reacted for 24 h at 110 °C. The reaction mixture was dried *in vacuo*. The obtained hydrolysate was dissolved in H_2O (50 μL), to which 1 M NaHCO_3 (20 μL) and L- or D-FDLA (1% w/v in acetone, 100 μL) were added, and the mixture was stirred for 1 h at 60 °C. The solution was neutralized with 1 N HCl (20 μL), evaporated, and then dissolved in MeCN. The derivatives were analyzed by LC-ESI-MS. LC separation was performed on a reversed-phase column (Cosmosil 5C₁₈-AR-II, $\phi 3.0 \times 150$ mm) with a gradient elution system of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ containing 0.1% TFA (80:20 to 0:100 for 80 min). ESI-MS was performed in a positive ionization mode.

Synthesis of dodecanoyl-Aib.

Lauric acid (137.1 mg, 6.84×10^{-1} mmol) was mixed with HBTU (233.28 mg, 6.15×10^{-1} mmol), HOBt (83.11 mg, 6.15×10^{-1} mmol), DIEA (107.13 μL , 6.15×10^{-1} mmol) and Aib (63.43 mg, 6.15×10^{-1} mmol) in DMF (6.83 mL), which was stirred for 5 h at room temperature. Satd aq NH_4Cl was added to the reaction mixture. The EtOAc layer was washed with satd aq NH_4Cl (3 times) and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was chromatographed on an ODS column with a stepwise elution of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (from 100:0 to 0:100) and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1). Fractions containing dodecanoyl-AIB was subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C₁₈ AR-II ($\phi 20 \times 250$ mm) with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ containing 0.1% TFA (20:80) to afford dodecanoyl-Aib.

Dodecanoyl-Aib: IR (neat) 3321, 2957, 2916, 1715, 1556, 843 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 2.16 (t, $J = 15.0$ Hz, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.28-1.36 (m, 16H), 1.45 (s, 6H), 0.90 (t, $J = 13.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ 178.1, 175.6, 56.7, 36.8, 33.1, 30.8 (2C), 30.7, 30.5 (2C), 30.2, 26.9, 23.7, 14.4; HRMS (ESI) m/z 286.2379 $[M+H]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_3$, 286.2377.

Synthesis of lipopeptide A₁.

Bn- β Ala (235.06 mg, 6.69×10^{-1} mmol) was mixed with HBTU (383.50 mg, 1.01 mmol), HOBt (142.86 mg, 1.06 mmol), DIEA (174.2 μL , 1.00 mmol) and Fmoc-L-Ala (249.75 mg, 8.02×10^{-1} mmol) in DMF (6.7 mL), which was stirred for 5 h at room temperature. Satd aq NH_4Cl was added to the reaction mixture. The EtOAc layer was washed with satd aq NH_4Cl (3 times) and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed (SiO_2 , n -hexane/EtOAc = 1/2) to yield Fmoc-L-Ala- β Ala-Bn.

The residue containing Fmoc-L-Ala- β Ala-Bn in DMF (5.36 mL) was stirred, to which piperidine (1.34 mL) was added. After being stirred for 3 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was washed with hexane. The residue was subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C₁₈ PAQ ($\phi 20 \times 250$ mm) with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ at 40 °C to afford L-Ala- β Ala-Bn.

L-Ala-βAla-Bn (13.20 mg, 5.28×10^{-2} mmol) was mixed with Oxyrna (13.39 mg, 9.42×10^{-2} mmol), COMU (27.32 mg, 6.38×10^{-2} mmol), DIEA (9.96 μL, 5.72×10^{-2} mmol) and lipopeptide B (9.78 mg, 5.72×10^{-3} mmol) in DMF (1.0 mL), which was stirred for 16.5 h at 70 °C. Satd aq NH₄Cl was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with satd aq NH₄Cl (3 times) and concentrated *in vacuo*. The residue was subjected to ODS HPLC on Cosmosil 5C₁₈ AR-II ($\phi 10 \times 250$ mm) with H₂O/MeCN at 40 °C to afford Bn-lipopeptide A₁.

Bn-lipopeptide A₁ in MeOH (200 μL) was stirred with 10% Pd/C in a hydrogen atmosphere for 15 h. After concentration *in vacuo*, the reaction mixture was added H₂O and extracted with EtOAc (three times). The organic layer was concentrated *in vacuo* to yield lipopeptide A₁ (0.17 mg).

L-Ala-βAla-Bn: $[\alpha]_D^{20}$ -24.71 (*c* 0.03, MeOH); IR (neat) 3064, 1672, 1384, 1173, 741 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.73 (NH), 7.68 (NH), 7.28-7.36 (5H), 5.13 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.84 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 3.50 (m, 2H), 2.61 (dt, *J* = 13.2/6.0 Hz, 2H), 1.41 (d, *J* = 14.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 172.9, 171.1, 129.5, 129.3, 126.2, 125.9, 118.7, 112.1, 67.5, 50.1, 36.5, 34.6, 17.6; HRMS (ESI) *m/z* 251.1387 [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₉N₂O₃, 251.1390.

Synthetic lipopeptide A₁: HRMS (ESI) *m/z* 1876.1296 [M+Na]⁺ calcd for C₈₉H₁₅₂N₂₀NaO₂₂, 1876.1282.

CD spectrum.

The CD spectra were recorded on a JASCO (Tokyo, Japan) model J-720 dichrograph. Cylindrical, fused quartz cells of 1.0 mm path lengths were employed. The data in solution are expressed in terms of $[\theta]T \times 10^{-3}$, the total molar ellipticity (mdeg·cm²·dmol⁻¹). HPLC-grade MeOH was used as solvent.

Hemolytic assay.

Sheep erythrocytes were prepared by washing sheep whole blood (Kohjin Bio Co., Ltd. Japan) with buffer [10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄ and 150 mM NaCl]. Rabbit erythrocyte (4×10^7 cells/ml, 100 μL) was mixed with 100 μl of PBS buffer containing lipopeptides or 0.1% Triton X-100, which were incubated for 30 min at 37 °C. After centrifugation at 2400 rpm for 10 min, 160 μl of the supernatants were moved to another plate, and the absorbance at OD₄₅₀ was measured using iMark microplate reader (BIO-RAD).

Antibacterial assay.

Growth inhibitory activity of lipopeptide A and B against bacteria was examined by disk-diffusion assay. The test organisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were suspended in NBRS 802 media (1% of polypepton, 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. Lipopeptide A, lipopeptide B and kanamycin were loaded onto paper disks (ϕ 6 mm), which were dried

and placed on the agar plates. After incubation at 30 °C for 24 h, growth inhibitory zone was measured.

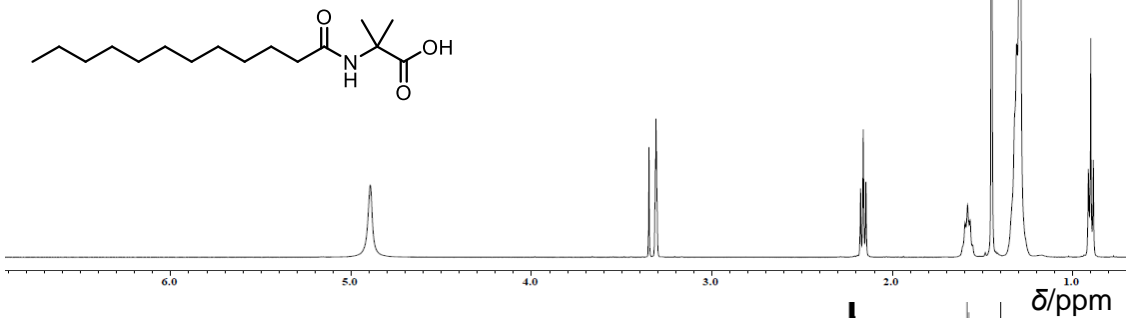
Table 2-1. ¹H and ¹³C NMR data for lipopeptide B in DMSO-*d*₆.

residue	¹³ C	¹ H (mult., J/Hz)	residue	¹³ C	¹ H (mult., J/Hz)
dodecanoyl C=O	172.6-176.0		Aib-10 C=O	174.1	
2	22.1-31.3	2.20	1	56.2-55.6	
3-12	22.1-31.3	1.17-1.51	2	22.1-31.3	1.17-1.51
Aib-1 C=O	172.6-176.0		3	22.1-31.3	1.17-1.51
1	56.2-55.6		NH		7.33 (s)
2	22.1-31.3	1.17-1.51	βAla-11 C=O	171.1	
3	22.1-31.3	1.17-1.51	1	35.7	3.20
NH		8.58 (s)	2	35.1	2.28
Pro-2* C=O	171.6		NH		7.08
1	63.1	4.10 (dd, 16.1)			(dd, 11.1)
2	22.1-31.3	1.85, 2.16	Ala-12 C=O	173.6-173.7	
3	22.1-31.3	1.60, 1.80	1	49.6	4.02
4	48.0-48.2	3.65	2	22.1-31.3	1.20
Aib-3 C=O	172.6-176.0		NH		8.20 (d, 9.2)
1	56.2-55.6		Aib-13 C=O	173.2-173.4	
2	22.1-31.3	1.17-1.51	1	56.2-55.6	
3	22.1-31.3	1.17-1.51	2	22.1-31.3	1.17-1.51
NH		7.56 (s)	3	22.1-31.3	1.17-1.51
Aib-4 C=O	172.6-176.0		NH		8.44 (s)
1	56.2-55.6		Aib-14 C=O	174.6	
2	22.1-31.3	1.17-1.51	1	56.2-55.6	
3	22.1-31.3	1.17-1.51	2	22.1-31.3	1.17-1.51
NH		7.75 (s)	3	22.1-31.3	1.17-1.51
Pro-5* C=O	171.9		NH		7.25 (s)
1	63.3	4.10 (dd, 16.1)	βAla-15 C=O	171.3	
2	22.1-31.3	1.89, 2.17	1	35.5	3.26
3	22.1-31.3	1.57, 1.81	2	36.5	2.28
4	48.0-48.2	3.26, 3.73	NH		7.38
Aib-6 C=O	172.6-176.0				(dd, 11.5)
1	56.2-55.6		Aib-16 C=O	173.0	
2	22.1-31.3	1.17-1.51	1	56.2-55.6	
3	22.1-31.3	1.17-1.51	2	22.1-31.3	1.17-1.51
NH		7.56 (s)	3	22.1-31.3	1.17-1.51
Aib-7 C=O	172.6-176.0		NH		8.05 (s)
1	56.2-55.6		Aib-17 C=O	172.6-176.0	
			1	54.7	
			2	22.1-31.3	1.17-1.51

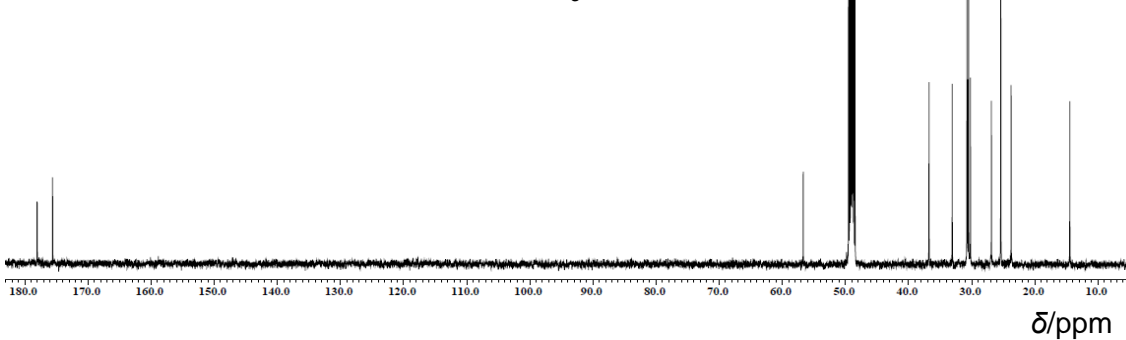
Pro-8	2	22.1-31.3	1.17-1.51	Aib-18	3	22.1-31.3	1.17-1.51
	3	22.1-31.3	1.17-1.51		NH		7.44 (s)
	NH		7.82 (s)		C=O	172.6-176.0	
	C=O	172.2			1	56.2-55.6	
	1	60.3	4.26 (dd, 12.2, 17.2)		2	22.1-31.3	1.17-1.51
	2	22.1-31.3	2.15		3	22.1-31.3	1.17-1.51
	3	22.1-31.3	1.68, 1.81		NH		7.70 (s)
Ala-9	4	48.0-48.2	3.60, 3.79				
	C=O	171.9					
	1	49.4	4.05				
	2	22.1-31.3	1.29				
	NH		7.78 (d, 15.3)				

Signals were obscured in ^1H NMR spectrum and were assigned using 2D NMR experiments. *Due to signal overlap, the Pro signals are interchangeable.

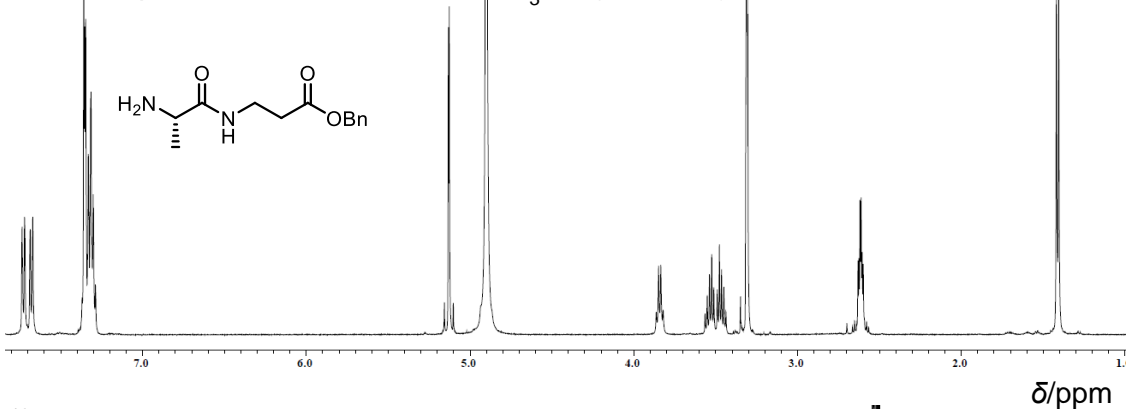
^1H NMR spectrum of dodecanoylAib in CD_3OD (500 MHz).



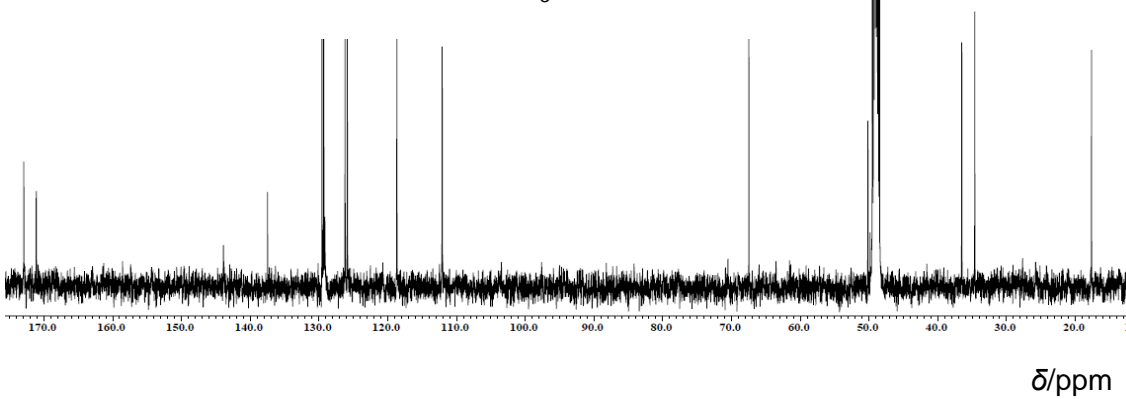
^{13}C NMR spectrum of dodecanoylAib in CD_3OD (500 MHz).



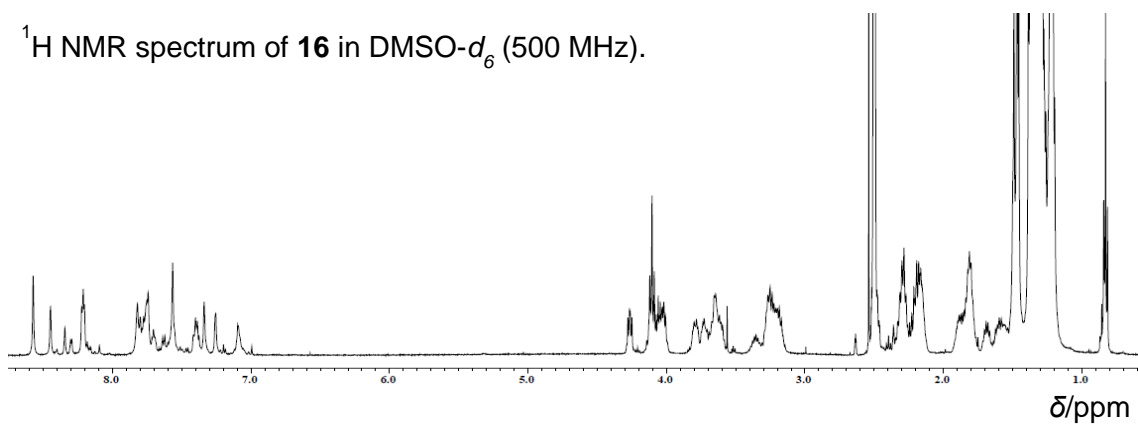
^1H NMR spectrum of L-Ala β AlaBn in CD_3OD (500 MHz).



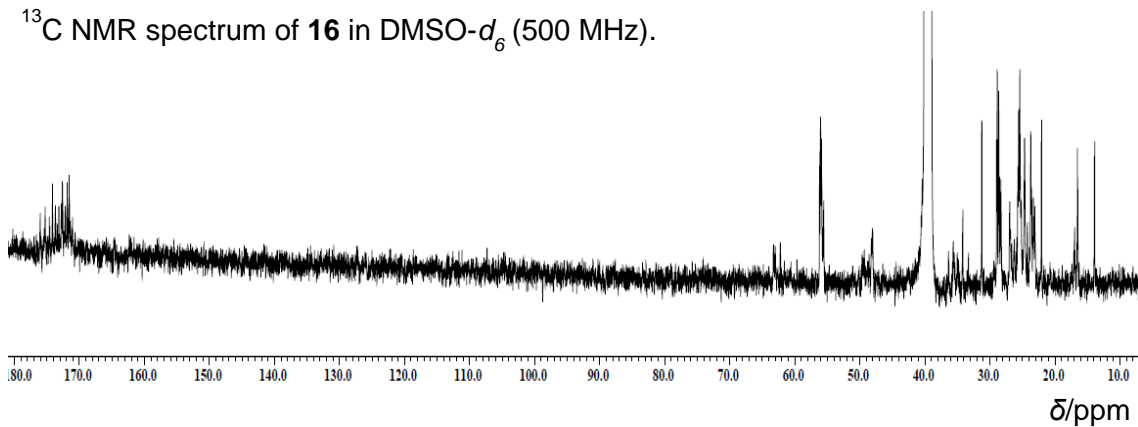
^{13}C NMR spectrum of L-Ala β AlaBn in CD_3OD (125 MHz).



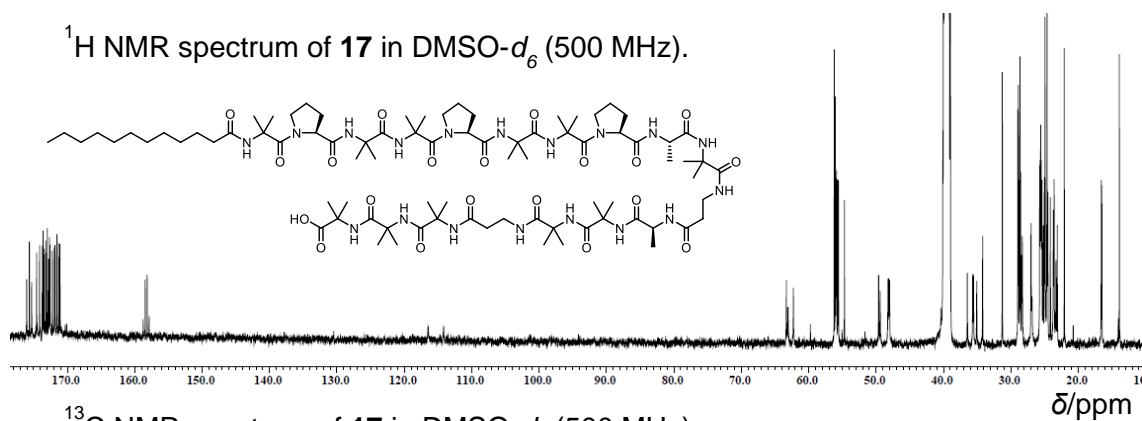
^1H NMR spectrum of **16** in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).



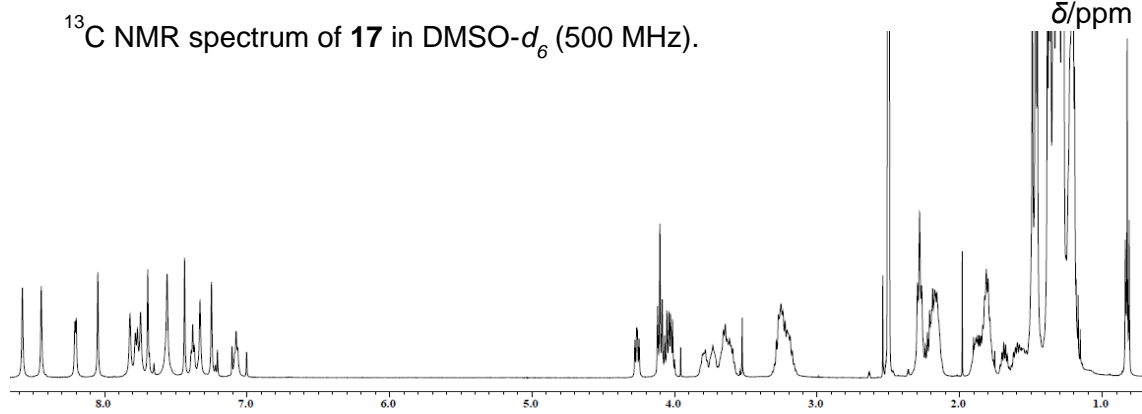
^{13}C NMR spectrum of **16** in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).



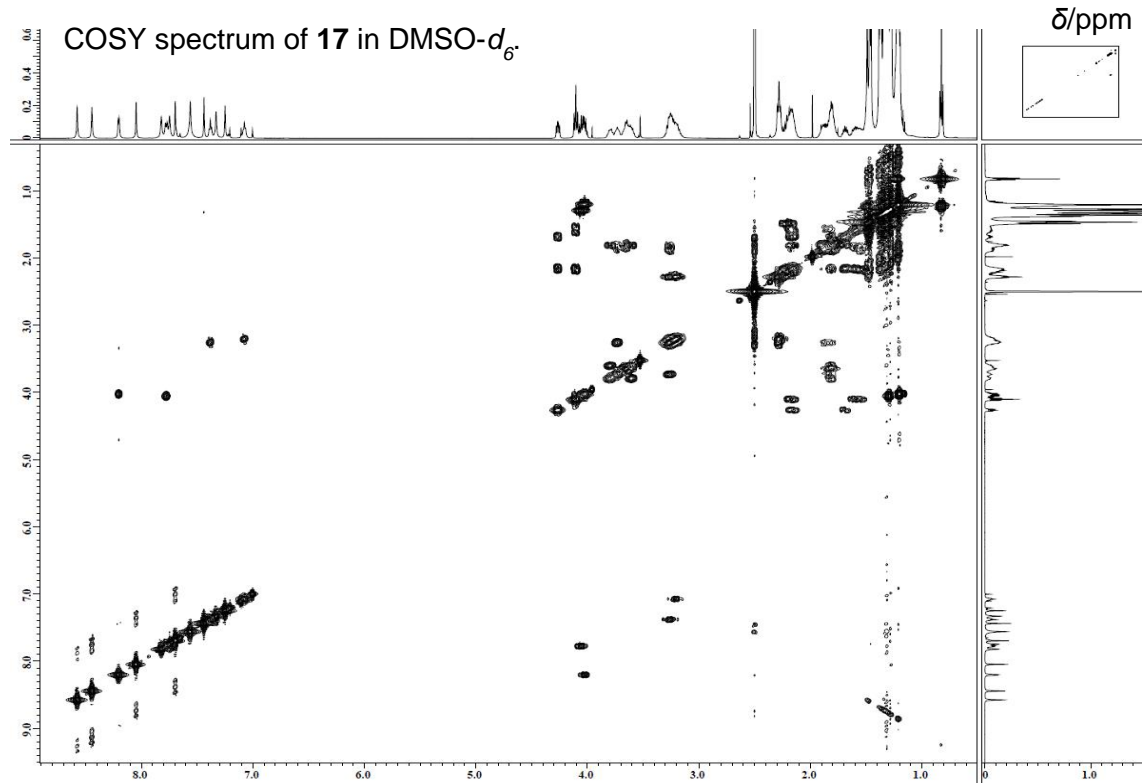
^1H NMR spectrum of **17** in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

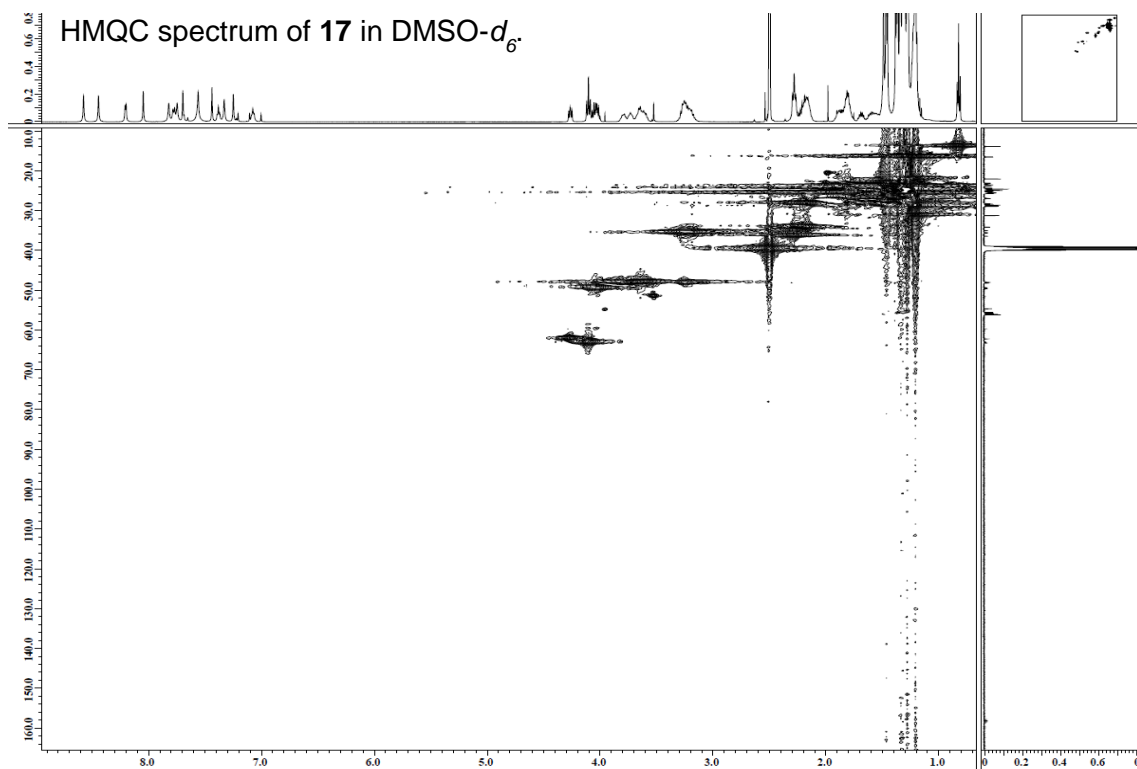
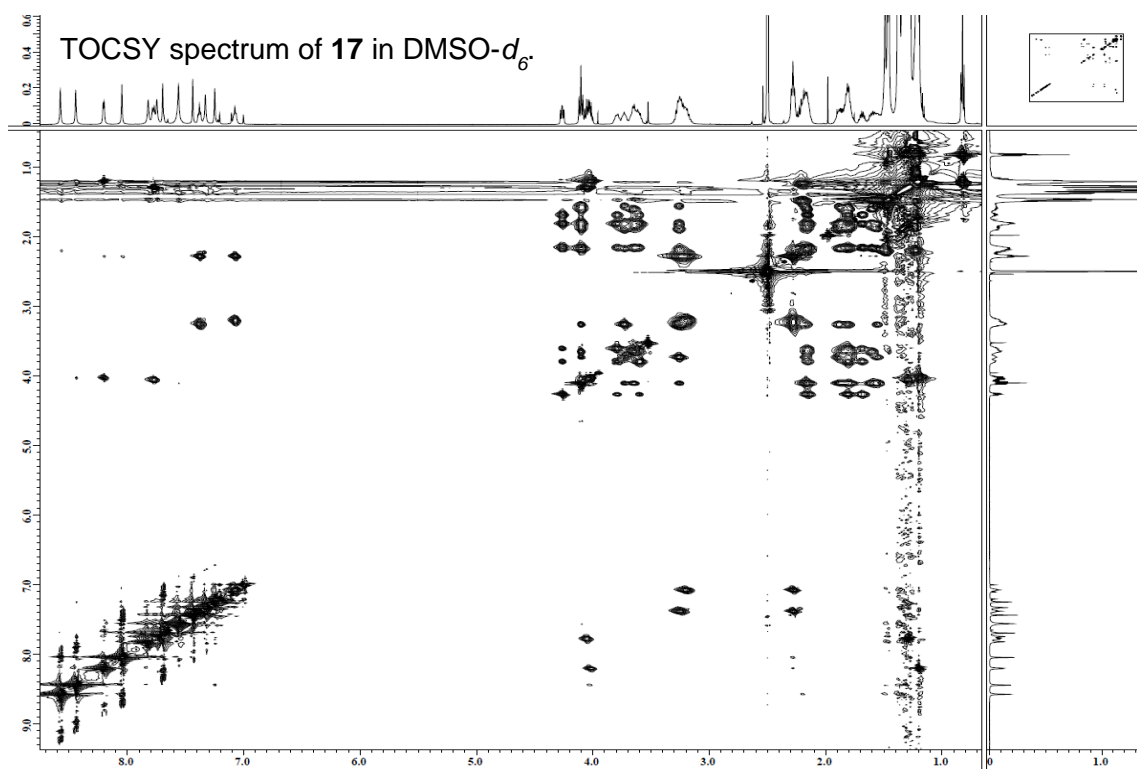


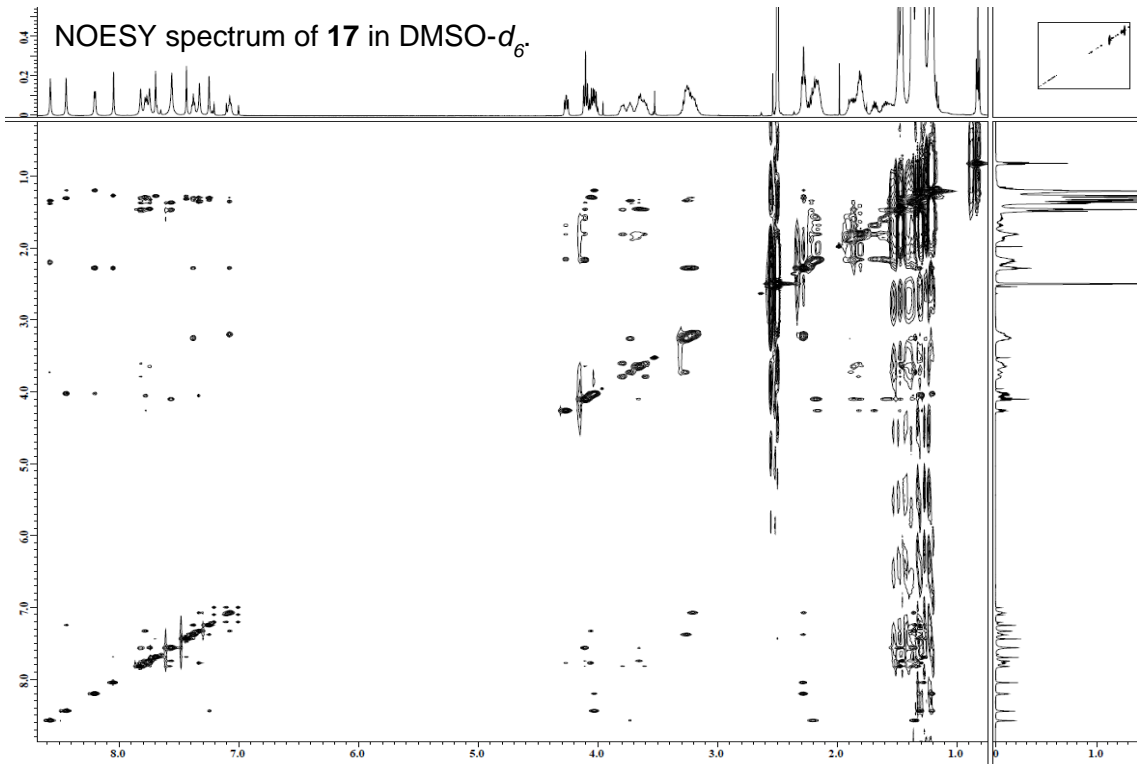
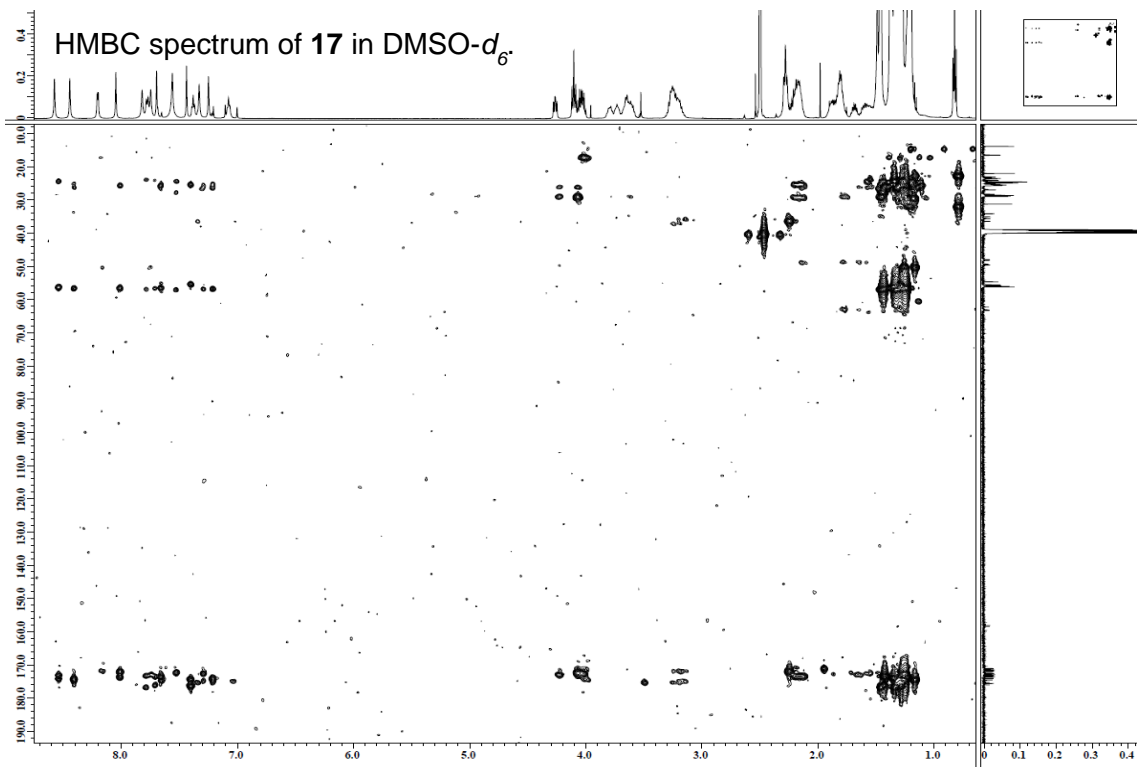
^{13}C NMR spectrum of **17** in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).



COSY spectrum of **17** in $\text{DMSO-}d_6$.







2.7 参考文献

- (1) Ledford, H. *Nature*, **2014**, *508*, 158-159.
- (2) Courtney, R.; Ngo, C. D.; Malik, N.; Ververis, K.; Tortorella, M. S.; Karagiannis, C. T. *Mol. Biol. Rep.* **2015**, *42*, 841-851.
- (3) Possemato, R.; Marks, M. K.; Shaul, D. Y.; Pacold, E. M.; Kim, D.; Birsoy, K.; Sethumadhavan, S.; Woo, H.; Jang, G. H.; Jha, K. A.; Chen, W. W.; Barrett, G. F.; Stransky, N.; Tsun, Z.; Cowley, S. G.; Barretina, J.; Kalaany, Y. N.; Hsu, P. P.; Ottina, K.; Chan, M. A.; Yuan, B.; Garraway, A. L.; Root, E. D.; Mino-Kenudson, M. Brachtel, F. E.; Driggers, M. E.; Sabatini, M. D. *Nature*, **2011**, *476*, 346-350.
- (4) Han, M. J.; Jeong, J. S.; Park, C. M.; Kim, G.; Kwon, H. N.; Kim, K. H.; Ha, H. S.; Ryu, H. S.; Kim, S. *Cell*, **2012**, *149*, 410-424.
- (5) (a) Bonflis, G.; Jaquenoud, M.; Bontron, S.; Ostrowicz, C.; Ungermann, C.; Virgilio, D. C. *Mol. Cell*, **2012**, *46*, 105-110. (b) Abraham, T. R.; *Science*, **2015**, *347*, 128-129. (c) Bar-Peled, L.; Sabatini, M. D. *Trends in Cell Biol.* **2014**, *7*, 400-405. (d) Hara, K.; Yonezawa, K.; Weng, Q.; Kozlowski, T. M.; Belham, C.; Avruch, J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14484-14494.
- (6) Chim, M. R.; Fu, X.; Pai, Y. M.; Vergnes, L.; Hwang, H.; Deng, G.; Diep, S.; Lomenick, B.; Meli, S. V.; Monsalve, C. G.; Hu, E.; Whelan, A. S.; Wang, X. J.; Jung, G.; Solis, M. G.; Fazlollahi, F.; Kaweeteerawat, C.; Quach, A.; Nili, M.; Krall, S. A.; Godwin, A. H.; Chang, R. H.; Faull, F. K.; Guo, F.; Jiang, M.; Trauger, A. S.; Saghatelian, A.; Braas, D.; Christofk, R. H.; Clarke, F. C.; Teitell, A. M.; Petrascheck, M.; Reue, K.; Jung, E. M.; Frand, R. A.; Huang, J. *Nature*, **2014**, *510*, 397-401.
- (7) Sahu, N.; Cruz, D. D.; Gao, M.; Sandoval, W.; Haverty, M. P.; Liu, J.; Stephan, J.; Haley, B.; Classon, M.; Hatzvassiliou, G.; Settleman, J. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 753-761.
- (8) (a) Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3346-3352. (b) Fujii, K.; Ikai, Y.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5146-5151. (c) Marfey, P. *Carlsberg. Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.
- (9) Kimonyo, A.; Bruckner, H. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 813-826.
- (10) Wada, S.; Uruse, T.; Hasegawa, Y.; Ban, K.; Sudani, A.; Kawai, Y.; Hayashi, J.; Urata, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6776-6780.
- (11) (a) Andreetto, E.; Peggion, C.; Crisma, M.; Toniolo, C. *Biopolymers*, **2006**, *84*, 490-501. (b) Toniolo, C.; Polese, A.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Kamphuis, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2744-2745.
- (12) (a) Kobayashi, S.; Takeshima, K.; Park, B. C.; Kim, C. S.; Matsuzaki, K. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 8648-8654. (b) Shenkarav, O. Z.; Paramonov, S. A.; Lyukmanova, N. E.; Gizatullina, K. A.; Zhuravlena, V. A.; Tagaev, A. A.; Yakimenko, A. Z.; Telezhinskaya, N. I.; Kirpichnikov, P. M.; Ovchinnikova, V. T.; Arseniev, S. A. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 838-862.
- (13) Iwamoto, K.; Hayakawa, T.; Murata, M.; Makino, A.; Ito, K.; Fujisawa, T.; Kobayashi, T. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1608-1619.
- (14) (a) Hegde, R. V.; Silver, J.; Patel, M.; Gullo, P. V.; Yarborough, R.; Huang, E.; Das, R. P.; Puar, S. M.; Didomenice, J. B.; Loebenberg, D. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 74-83. (b) Bessin, Y.; Saint, N.; Marri, L.; Marchini, D.; Molle, G. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1667*, 148-156. (c) Beven L.; Duval, D.; Rebuffat,

S.; Riddell, G. F.; Bodo, B.; Wroblewski, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1372*, 78-90.

(15) Gupta, S.; Krasnoff, B. S.; Underwood, L. N.; Renwick, A. A. J.; Roberts, W. D. *Mycopathologia*, **1991**, *115*, 185-189.

(16) Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S.; Kuwano, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1618-1628.

総括

本研究ではがん悪性化に寄与する HIF-1 とアミノ酸代謝を阻害する天然有機化合物の探索を行い、それぞれに対する活性化合物として verucopeptin と lipopeptide A を取得することに成功した。

HIF-1 阻害剤 verucopeptin に関する研究では化学分解、NMR 解析と合成標品との比較から立体構造を明らかにし、その過程で分岐メチルの相対立体配置推測法を改良した。さらに、verucopeptin が mTORC1 経路と HSP60 のシャペロン活性を阻害し、HIF-1 の活性を抑制することを明らかにした。

今後、verucopeptin をリード化合物とした創薬研究を目指すには本化合物の構造活性相関研究と細胞毒性の軽減が問題となる。これまでに verucopeptin 誘導体を得るために種々化学修飾を検討したが、誘導体を得られる条件は見つからなかった。放線菌培養液抽出物からの誘導体探索も試みたが、verucopeptin は探索指標とすべき特徴的な物理化学的性質がないため誘導体を取得することは困難だった。唯一進行した還元反応により取得できた verucopeptin の還元体 **2a** の HIF 機能阻害能は verucopeptin ($IC_{50}=0.2 \mu\text{g/ml}$) と比べて大幅に低下することを明らかにしている ($IC_{50}=8.0 \mu\text{g/ml}$)。これより、verucopeptin の HIF-1 活性化経路の阻害には側鎖脂肪酸の THP 環が重要であることが示唆された。今後、化学合成によるさらなる構造活性相関研究を進めることで verucopeptin の HIF-1 阻害活性に必要な最小構造を明らかにすることが必要となる。

さらに verucopeptin は HIF-1 阻害活性を示す濃度域との分離はできているものの、HT1080 細胞に対する細胞毒性が強い。その原因として verucopeptin の溶解性の低さが考えられる。疎水性の高い verucopeptin は細胞内の多くのタンパク質と疎水性相互作用によって結合し、その非特異的なタンパク質の機能阻害が細胞毒性に寄与していることが予想される。本研究で verucopeptin の結合タンパクとして同定された HSP60 は細胞中でフォールディングに失敗して疎水性領域が露出したままのタンパク質を基質として識別して自身の活性ポケットに取り込む性質を持つ¹。そのため verucopeptin の HSP60 に対する阻害活性は本化合物の疎水性の高さに起因する可能性は十分に考えられる。この可能性を検証するためには verucopeptin の疎水性向上の原因と考えられる側鎖脂肪酸の構造を変換した誘導体を合成し、HSP60 に対する阻害活性を評価する必要がある。今後、HIF-1 選択的に作用する溶解性の高い verucopeptin 誘導体を創出できれば、細胞毒性の低い HIF-1 阻害剤を開発できるかもしれない。

mTORC1 経路はロイシンによって活性化されること²、mTORC1 経路の下流ではタンパク合成などの様々な生存イベントが調節されていること³が知られている。そのため mTORC1 経路はアミノ酸代謝機構のハブ分子の一つであるといえる。ハブ分子である mTORC1 経路を阻害する verucopeptin を研究ツールとして利用すれば mTORC1 経路が制御するアミノ酸代謝機構を解明できるかもしれない。実際に、本研究第二章で用いたスクリーニング系に verucopeptin を供した。しかし、本化合物の培地への溶解性の低さから 4 種類のアミノ酸全てに効果を示さなかった。溶解性が向上した verucopeptin 誘導体の創出によってアミノ酸代謝機構に関する研究も推進すると期待できる。

プロリン資化阻害物質 lipopeptide A に関する研究では各種化学分析によって lipopeptide A の化学構造を決定し、ヘリックス構造を形成することで膜障害活性を示すことを明らかにした。本研究は lipopeptide A はプロリン資化と細胞膜の機能との間に相関があることを示唆した初めての例である。プロリンはミトコンドリアの外膜に存在する proline oxygenase によって proline 5-carboxylate へと酸化された後、数段階を経てミトコンドリア内の TCA 回路へ供給される⁴。本研究ではプロリン培地で培養した分裂酵母内ではミトコンドリアの活動レベルが上昇する知見を得ている。これらの結果は lipopeptide A がミトコンドリア膜を傷害することでプロリンの資化を阻害する可能性を示唆している。しかし、lipopeptide A がどのようにミトコンドリア膜を選択的に障害するのか、細胞にダメージを与えずに細胞膜を通過するのか、ミトコンドリア膜の損傷がどのような経路を介してプロリン資化に影響するのか、など解決していない課題が多く存在する。今後のさらなる作用機序解析によって残る疑問を解明できれば、今まで未知だったアミノ酸代謝機構の一端を明らかにすることができる。

最後に本研究では天然資源から抗がん剤創製に繋がる天然物を取得することに成功した。しかし、得られた天然物の細胞内での挙動を仔細に理解することは困難であった。実際に、小分子化合物の細胞内での挙動を詳細に解析した例は限られており、その原因として使用できる小分子化合物の量が少ないことや選択的に標的分子に作用する化合物が限られていることが考えられる。

最近、天然物の生合成機構がよく理解されてきたことで微生物に天然物を大量に生産させる手法が確立されている。それによって微量しか取得できなかった天然物の作用機構の解析は前進することが期待できる。しかし、特異性の低い標的への作用を解析する方法は現在までにほとんど報告されていない。実際、本研究で行った verucopeptin のプルダウン実験では verucopeptin が細胞内の多くの分子と結合し、その結合タンパク質は細胞内での存在量が多いものしか候補に挙がらなかった。

この問題を解消するには小分子とタンパク質の相互作用様式を今以上に理解する必要があると考える。そのためには小分子と特異的に結合できるタンパク質を探索する必要があり、その探索源として著者は天然物の生産菌に着目したい。ヒト細胞にとって天然物は外界からの“異物”であり、初めから天然物に結合するように設計されたタンパク質は存在しない。一方で、天然物の生産菌内では生合成過程もしくは放出過程で天然物に作用するタンパク質の存在が予想され、そのタンパク質と天然物の相互作用には特異性があることが考えられる。そのため、小分子-タンパク質間の相互作用様式に関する知見を積み上げるために天然物の微生物内での役割を解明することが求められる。

さらに、天然物の本来の役割を理解することは微生物の生理を理解することにも直結するため、対象とする微生物がヒト共生微生物であった場合には新たな疾患治療の戦略を提示できるかもしれない。

- (1) Hartl, U. F.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. *Nature*, **2011**, *475*, 324-332.
- (2) (a) Han, M. J.; Jeong, J. S.; Park, C. M.; Kim, G.; Kwon, H. N.; Kim, K. H.; Ha, H. S.; Ryu, H. S.; Kim, S. *Cell*, **2012**, *149*, 410-424. (b) Bonflis, G.; jaquenoud, M.; Bontron, S.; Ostrowicz, C.; Ungermann, C.; Virgilio, D. C. *Mol. Cell*, **2012**, *46*, 105-110. (c) Abraham, T. R.; *Science*, **2015**, *347*, 128-129. (d) Bar-Peled, L.; Sabatini, M. D. *Trends in Cell Biol.* **2014**, *7*, 400-405.
- (3) (a) Cheng, S.; Quintin, J.; Cramer, A. R.; Shepardson, M. K.; Saeed, S.; Kumar, V.; Giamarellos-Bourboulis, J. E.; Martens, H. A. J.; Rao, A. N.; Aghajani-refah, A.; Manjeri, R. G.; Li, Y.; Ifrim, C. D., Arts, J. W. R.; van der Meer, M. J. W. B.; Deen, M. T. P.; Logie, C.; O'Neill, A. L.; Willems, P.; van de Verrdonk, L. F.; van der Meer, W. M. J.; Ng, A.; Joosten, A. B. L.; Wijmenga, C.; Stunnenberg, G. H.; Xavier, J. R.; Netea, G. M. *Science*, **2014**, *345*, 1250684-1-1250684-8. (b) Zhang, Y.; Nicholatos, J.; Dreier, R. J.; Ricoult, J. H. S.; Widenmaier, B. S.; Hotamisligil, S. G.; Kwiatkowski, J. D.; Manning, D. B. *Nature*, **2014**, *513*, 440-443. (c) Jiang, B.; Liu, L. *Drug Resist. Updates*, **2008**, *11*, 63-76.
- (4) Takagi, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 211-223.