

海洋シアノバクテリア由来ペプチド性化合物の
構造と生物活性

2015年度

岩 崎 有 紘

学位論文 博士（理学）

海洋シアノバクテリア由来ペプチド性化合物の
構造と生物活性

2015年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

岩 崎 有 紘

目次

第一章	序論	1
第二章	沖縄県久良波で採集した <i>Lyngbya</i> 属シアノバクテリア集合体より見出したペプチド類の構造と生物活性	9
第一節	生物試料の採集と同定	10
第二節	各種新規生物活性物質の単離	11
第三節	環状デプシペプチド kurahamide の構造	13
第四節	環状デプシペプチド kurahamide の生物活性	20
第五節	鎖状リポペプチド kurahyne の構造	21
第六節	鎖状リポペプチド kurahyne の生物活性	28
第七節	鎖状デプシペプチド maedamide の構造	31
第八節	鎖状デプシペプチド maedamide の生物活性	44
第九節	第二章の結論	46
第三章	沖縄県謝花で採集した <i>Okeania</i> 属シアノバクテリアより見出した jahanyne の構造と生物活性	47
第一節	生物試料の採集と同定	48
第二節	鎖状リポペプチド jahanyne の単離	49
第三節	鎖状リポペプチド jahanyne の構造	51
第四節	鎖状リポペプチド jahanyne の生物活性	61
第五節	第三章の結論	63
第四章	Kurahyne の作用機序の解明	65
第一節	ヒトがん細胞パネルスクリーニングアッセイによる作用機序予測	66
第二節	小胞体ストレス誘導活性の評価	69
第三節	細胞質内カルシウムイオン濃度の変動解析	70
第四節	蛍光プローブを用いた細胞内局在部位の解析	71
第五節	アフィニティー精製による生体内結合分子の推定	73
第六節	小胞体膜上の Ca^{2+} -ATPase に対する阻害活性の評価	75
第七節	第四章の結論	77
第五章	総括	79
第六章	実験の部	83
第一節	測定機器と一般操作	83
第二節	第二章の実験	86
第三節	第三章の実験	147
第四節	第四章の実験	168
参考文献		175
謝辞		181

略号表

Abu	2-amino-2-butenic acid
ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
Ahp	3-amino-6-hydroxy-2-piperidone
Ahppa	4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid
Ala	alanine
Asp	aspartic acid
aq.	aqueous
Ba	butanoic acid
BMMs	bone marrow-derived macrophages
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
COSY	correlated spectroscopy
CPA	cyclopiazonic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIPEA	diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum
ESIMS	electron spray ionization mass spectrometry
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
L-FDLA	<i>N</i> -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide
FITC	fluorescein isothiocyanate
Glu	glutamic acid
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)tetramethyluronium hexafluorophosphate
HL60	human promyelocytic leukemia cells
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole

HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
Ile	isoleucine
IR	infrared absorption
Leu	leucine
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTPA	α -methyl- α -trifluoromethylphenylacetic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	NOE correlated spectroscopy
ODS	octadecyl-bounded silica
PBS	phosphate buffered saline
PCC	pyridinium chlorochromate
PCR	polymerase chain reaction
PGME	phenylglycine methyl ester
Phe	phenylalanine
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Pro	proline
PVDF	polyvinylidene difluoride
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park memorial institute medium
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS	<i>t</i> butyldimethylsilyl
TE	Tris-EDTA
TFA	trifluoroacetic acid
TG	thapsigargin
THF	tetrahydrofuran

Thr	threonine
TLC	thin layer chromatography
TRAP	tartarate-resistant acid phosphatase
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Tyr	tyrosine
UV	ultraviolet
Val	valine
Z-VAD-FMK	<i>N</i> -benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone

第一章 序論

天然物探索研究の重要性

生物の代謝産物である天然物には、特異な生物活性を示す化合物が含まれる。有機化学が誕生するはるか以前から、人類はこうした天然物を利用してきた。人々は、活性本体となる化合物の構造や作用機序を知ることなく、天然物のもたらす薬効や毒性を医療や狩猟に活用してきた。19世紀初頭の有機化学の誕生と、その後の発展によって確立された方法論は、これら天然物の理解を飛躍的に深めた。すなわち天然物のもたらす生物活性を、活性本体となる化合物の構造という観点から捉えることが可能となった。このような背景のもと、陸上植物や菌類から特異な生物活性と構造を有する化合物が次々と発見されてきた。

これらのうちの幾つかの化合物は医療に応用されてきた。放線菌 *Streptomyces griseus* より発見された結核の特効薬である streptomycin¹ や、アオカビ *Penicillium notatum* より発見された抗生物質 penicillin G² は、結核や感染症による死亡率を激減させ、人類の平均寿命の向上に貢献した。また、ヨモギ属の一年草である *Artemisia annua* (和名：クソニンジン) 由来のセスキテルペン artemisinin³ や、放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来の18員環マクロライド avermectin⁴ は、マラリアやオンコセルカ症といった深刻な感染症に対する特効薬の開発を導いた。

一方、生命現象解明のツールに利用されている天然物もある。土壌細菌 *Streptomyces tsukubaensis* 由来のマクロライド FK506⁵ の作用機序解明研究は、FK506 binding protein (FKBP) の発見と calcineurin の阻害に基づく免疫抑制機構の発見に結びついた⁶。また、イチイ科の灌木 *Taxus brevifolia* (和名：セイヨウイチイ) から発見されたジテルペン taxol⁷ は、チューブリン脱重合阻害剤として生化学実験に使用されている。

これらの事例から明らかなように、新しい天然物の発見は、関連する学問分野のブレイクスルーや人類の生活水準の飛躍的向上を導きうる。したがって、新たな天然物の探索は天然物化学者の最も重要な使命のひとつと考えられる。

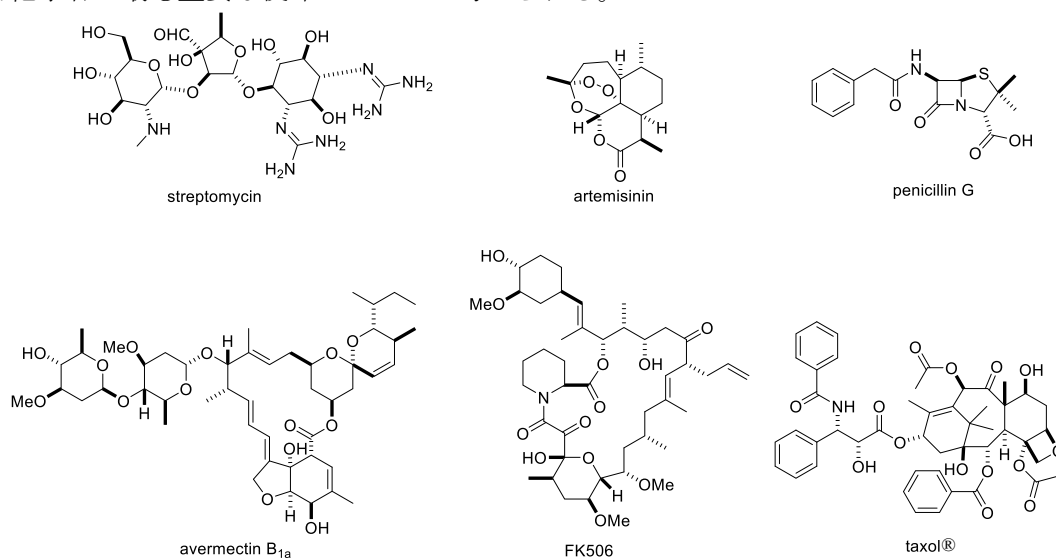


Figure 1-1. 代表的な有用天然物

海洋天然物化学における海洋微細藻類の重要性

天然物化学が生物の代謝産物の化学である以上、その探索源としてどのような生物を選択するかが重要である。古くから行われてきた陸上植物や菌類をソースとした探索研究に加え、20世紀半ばより海洋生物からの探索研究が盛んに行われるようになった。その結果、陸上の生物とは全く異なる構造や生物活性を有する化合物が多数発見されてきた。Ciguatoxin⁸ はシガテラ食中毒の原因物質のひとつとして、ドクウツボから発見された海洋天然物である。多数のエーテル環が連結した特異な構造は前例が無く、のちに発見された maitotoxin⁹ や brevetoxins¹⁰ とともに、梯子状ポリエーテルと呼ばれる化合物の一群を形成した。これらの化合物は、電位依存性イオンチャネルの開口活性を有する強力な神経毒として知られており、一部は生化学試薬としても利用されている¹¹。また、カイメン *Halichondria okadai* (和名：クロイソカイメン) より発見された halichondrin B¹² は、チューブリン重合阻害作用を有する抗腫瘍性ポリエーテルマクロライドである。全合成の達成¹³と各種誘導体の生物活性評価をもとに、マクロライド部を構造最適化した化合物 eribulin が、転移性乳がんの治療薬として上市されている¹⁴。

こうした有用な化合物が発見されてきたなかで、これらの物質の真の生産者としての海洋微細藻類の関与が指摘されている¹⁵。抗腫瘍性ペプチドである dolastatin 10 は、海洋軟体動物 *Dolabella auricularia* (和名：タツナミガイ) から発見された¹⁶化合物であるが、後に海洋シアノバクテリア *Symploca* sp. からも見出されている¹⁷。また、強力なプロテインホスファターゼ阻害剤である calyculin A は、*Discodermia* 属のカイメンから発見された¹⁸化合物であったが、メタゲノム解析による生合成遺伝子探索と、続く蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析によって、その真の生産者が *Entotheonella* 属のバクテリアであることが明らかとされている¹⁹。以上のように、海洋微細藻類は有用な二次代謝産物の優れた生産者であると考えられる。

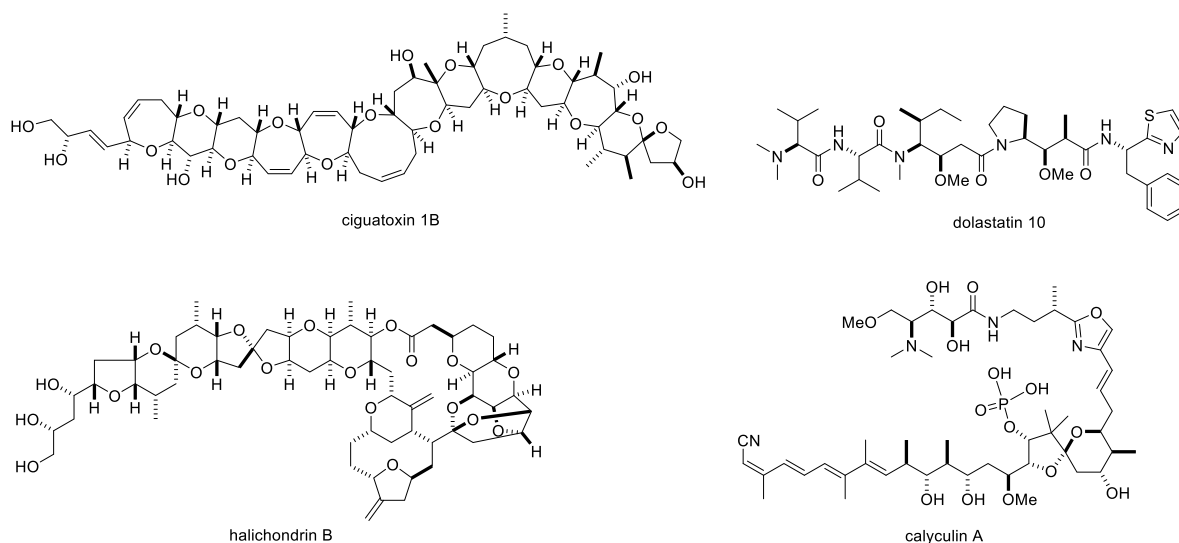


Figure 1-2. 代表的な海洋天然物

日本近海に生息する海洋シアノバクテリアの天然物探索源としての有望性

海洋微細藻類の一種であるシアノバクテリアは、光合成をおこなう原核生物であり、30億年以上前から地球に存在している。温度変化や乾燥など、幅広い環境に適応できる能力を持ち、南極や砂漠、温泉に至るまで、陸海を問わず地球上に広く分布している。なかでもユレモ科 (*Oscillatoriaceae*) に分類される海洋シアノバクテリアは、*Lyngbya*、*Okeania*、*Moorea* といった属をふくみ、多様な二次代謝産物を生産していることが報告されている²⁰。

大西洋や南太平洋に生息するユレモ科の海洋シアノバクテリアを対象とした物質探索研究は、Scripps 研究所の Gerwick や Florida 大学の Luesch らによって進められてきた。その結果、抗腫瘍性デプシペプチド apratoxin A²¹ (*Lyngbya majuscula* 由来) や、抗マラリア活性を示すマクロライド bastimolide A²² (*Okeania hirsuta* 由来)、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン E の強力な阻害剤である grassystatin A²³ (*Okeania lorea* 由来) といった化合物が見出されてきた。しかしながら日本近海に生息するユレモ科海洋シアノバクテリアからの物質探索研究は、ほぼ未開拓の分野である。

このような背景のもと、著者の所属研究室では日本近海に生息するユレモ科海洋シアノバクテリアにふくまれる二次代謝産物の探索研究に取り組んできた。

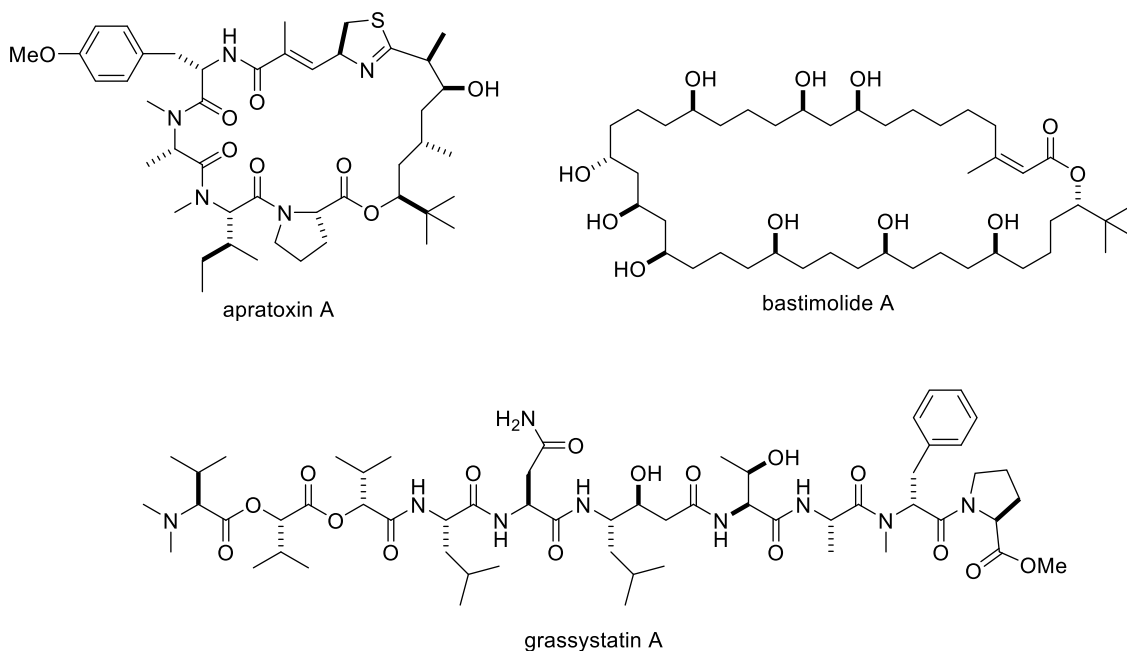


Figure 1-3. シアノバクテリア由来の天然物

著者の所属研究室におけるこれまでの成果

著者の所属研究室では、これまでに日本近海に生息する海洋シアノバクテリアより、以下に述べる化合物を見出し、生物有機化学的研究を展開してきた。

Biselyngbyaside 類²⁴

Biselyngbyaside は、2009 年に Teruya、Sasaki らによって、沖縄本島の備瀬崎で採集した *Lyngbya* 属シアノバクテリアから単離されたマクロライド配糖体である。その後、Morta、Watanabe らによって、種々の類縁体やアグリコンである biselyngbyolide 類が発見された。さらに、本化合物が小胞体膜上に存在する Ca^{2+} ATPase (SERCA) と結合してその働きを阻害することが、Morita らによる共結晶 X 線構造解析を通じて明らかにされた²⁵。またアグリコンの一種である biselyngbyolide A の全合成は、2014 年に Tanabe らによって達成されている²⁶。

Bisebromoamide 類²⁷

Bisebromoamide は、2009 年に Teruya、Sasaki らによって、沖縄本島の備瀬崎で採集した *Lyngbya* 属シアノバクテリアから単離された鎖状ペプチドである。のちに同属のシアノバクテリアより類縁体の norbisebromoamide も発見された。本化合物がアクチン重合体の安定化剤であること、および Raf/MEK/ERK 経路と PI3K/Akt/mTOR 経路を阻害することでアポトーシスを誘導することが Sumiya²⁸、Suzuki²⁹ らによってそれぞれ見出された。本化合物の全合成は、2010 年に Gao³⁰、2011 年に Li³¹ らによってそれぞれ達成されており、2010 年の初の全合成の際には、チアゾリン部の絶対立体配置の訂正が行われた。

Tomurulin

Tomurulin は、Same、Ohno らによって、石垣島のトムル崎で採集した *Symploca* 属のシアノバクテリアから単離されたポリケチドである。本化合物は不斉点を持たず、また天然物には珍しいアクリルアミド構造を有するという特徴を持つ。その後、Ohno らによって、本化合物がミトコンドリア呼吸鎖の complex I に対して選択的な阻害活性を示すことが見出された。

以上の背景のもと、特異な構造と生物活性を有する新規天然物の発見を目的として、海洋シアノバクテリアに含まれる二次代謝産物の探索研究に着手した。

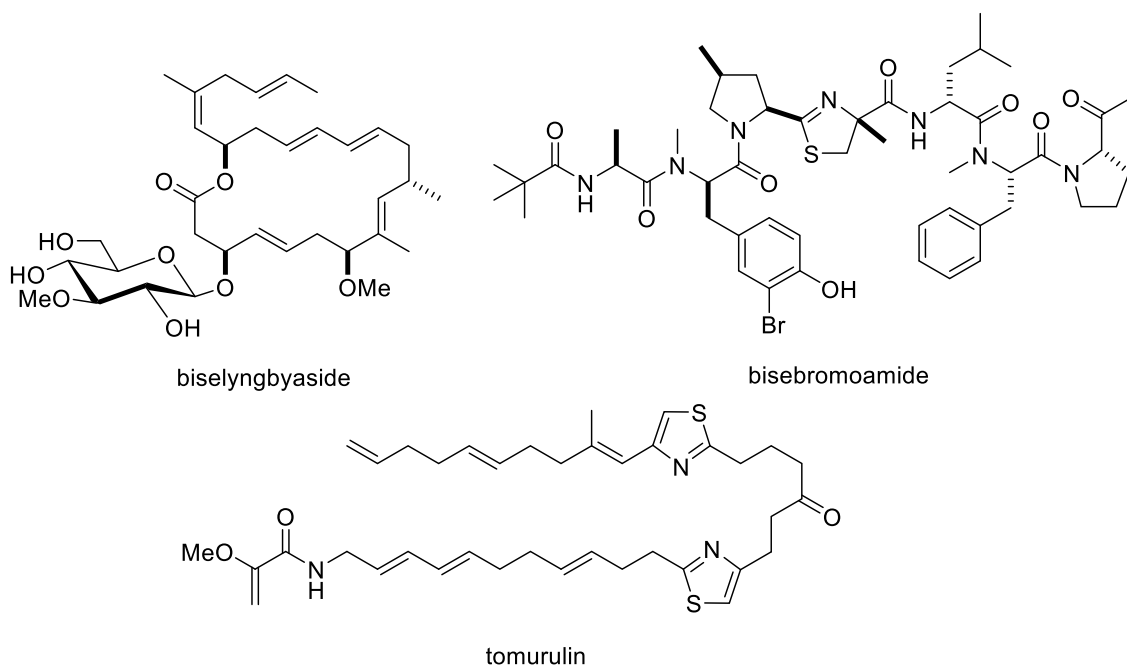


Figure 1-4. 著者の所属研究室で見出した海洋シアノバクテリア由来の天然物

海洋シアノバクテリアの予備的スクリーニング (第二章、第三章の研究の序論)

予備的スクリーニングとして、日本各地の海岸でユレモ科海洋シアノバクテリアを採集し、その粗抽出物の生物活性の評価を行った。スクリーニング方法の概要を以下に示す。

【サンプル採集】

採集地域は、温暖で生物相が豊かな南日本の地域（三重県志摩半島、鹿児島県徳之島、奄美大島、沖縄県沖縄本島、渡嘉敷島、久米島、石垣島など）を中心に行った。採集時期は、年間で最も潮位が低くなる春先の大潮の時期を中心に行った。採集場所は潮間帯で行い、徒歩で移動しながらユレモ科シアノバクテリアを目視で選別し、素手で採集した。なお、本スクリーニングにおいては、既知化合物の再発見を避ける目的から、前述の biselyngbyaside 類や bisebromoamide 類を生産するシアノバクテリアはあらかじめ除外した。

【生物活性の評価】

採集したサンプルを MeOH で抽出した。得られた粗抽出物に含まれる脂溶性物質を分配操作によって取得した。このものの HeLa 細胞に対する増殖阻害活性を MTT 法を用いて評価した。

40 種類以上の海洋シアノバクテリアについて評価を行ったところ、特定の外観（黒い粒状。Figure 1-5）のユレモ科海洋シアノバクテリアが際立って強い生物活性を示すことが明らかとなった。具体的には、本タイプの海洋シアノバクテリアは粗抽出物の段階で IC₅₀ が 1 µg/mL を下回った（通常は 10 - 100 µg/mL 以上。100 µg/mL 以上の濃度ではアッセイを行っていない）。

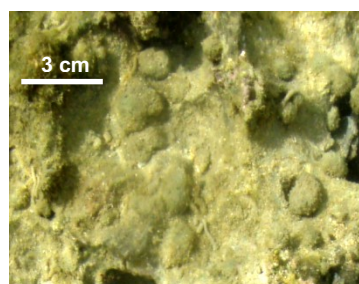
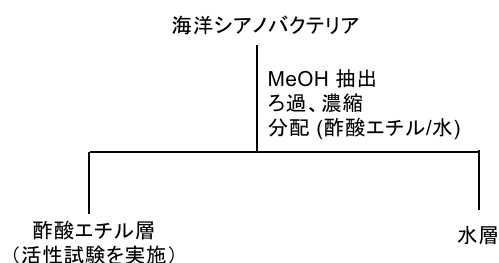


Figure 1-5. シアノバクテリア外観。黒い粒状の海洋シアノバクテリア (左写真)。その他の海洋シアノバクテリア (右写真)。

以上の予備検討の結果をもとに、第二章と第三章では、沖縄県久良波と沖縄県謝花で採集した黒い粒状のユレモ科海洋シアノバクテリアに含まれる新規生物活性物質の探索研究を行った。

ケミカルバイオロジー分野における天然物の重要性 (第四章の研究の序論)

ケミカルバイオロジーは、有機化学的手法を駆使して、生命現象を分子レベルで理解することを目指す学問分野である。生物活性物質は、生命現象に何らかの影響を与える化合物であり、ケミカルバイオロジー研究における最適なツールとなる。以上の考えのもと、様々な生物活性天然物の作用機序や標的分子が同定されてきた。海洋軟体動物 *Dolabella auricularia* (和名：タツナミガイ) から発見された **aurilide**³² は、強力な細胞毒性を示す環状リポペプチドである。2011年に Uesugi らによって、**aurilide** の作用機序が解明された³³。すなわち **aurilide** が **prohibitin** と結合して、その機能を阻害すること、これにともないミトコンドリア融合を制御しているタンパク質である **OPA-1** がプロセッシングを受け、ミトコンドリアの断片化を引き起こすためにアポトーシスが誘導されることが解明された。本研究によって **prohibitin** の新たな機能が解明された。また海洋軟体動物 *Aplysia kurodai* (和名：アメフラシ) から発見された **aplyronine A**³⁴ は、強力な抗腫瘍性を示すマクロライドである。2013年に Kita らによって、**aplyronine A** が細胞骨格タンパク質であるアクチンおよびチューブリンとの複合体を形成して細胞死を引き起こすことが明らかとされた³⁵。この研究は、近年、創薬標的として注目を集めているタンパク質/タンパク質間相互作用を、低分子によって実際に制御できる可能性を示すものである。

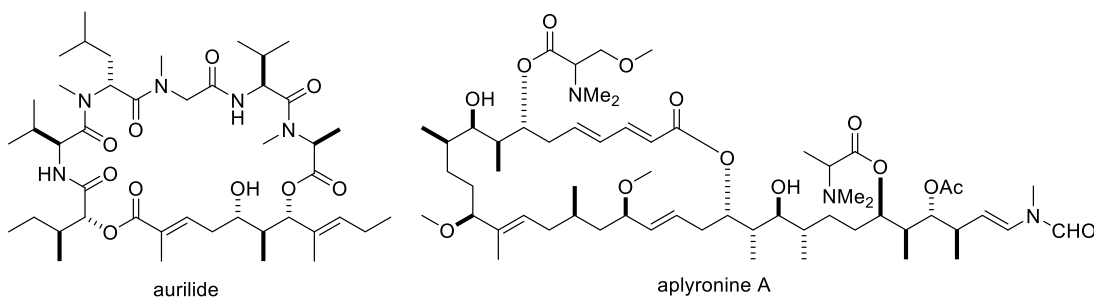


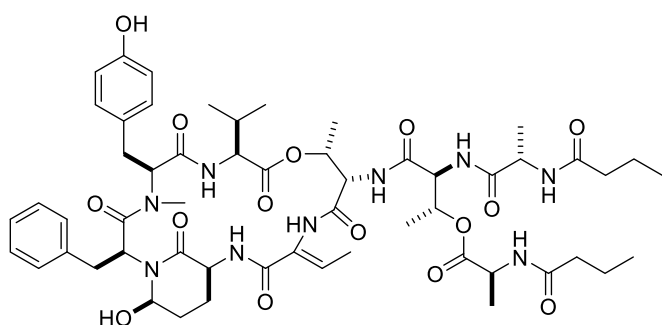
Figure 1-6. ケミカルバイオロジーにおけるツールとなった海洋天然物

以上述べてきたように、生物活性を示す天然物の有用性のひとつは、ケミカルバイオロジーのツールとして、生命現象の解明研究に利用できる点にある。しかしながら、これまでに発見された天然物の数に対して、その作用機序や標的分子が解明された例はごくわずかである。これは生物活性物質の構造と、その標的分子の多様性により、作用機序解明のための確立された方法論が存在しないためと考えられる。結果として大多数の天然物は、その詳細な作用も標的分子も明らかにされないまま、埋もれていく現状にある。すなわちほとんどの場合、天然物を発見した研究者が、実質上その天然物を最後に扱う研究者となっている。このような状況において、限られた天然物資源を有効に活用するためには、天然物を発見した研究者が、その有用性を示すことが必要であると考えられる。

以上の背景のもと、第四章では著者が見出した新規生物活性物質 **kurahyne** のケミカルバイオロジー分野における有用性を明らかにすることを目的として、詳細な生物活性の評価と作用機序解明研究に取り組んだ。

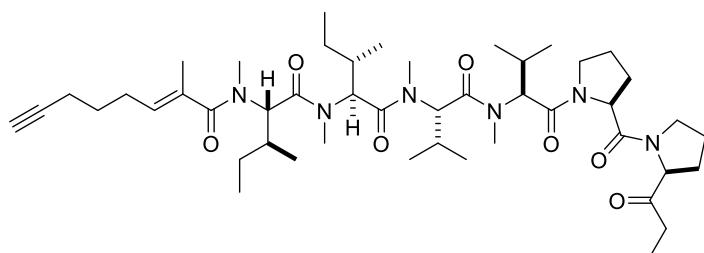
第二章 沖縄県久良波で採集した *Lyngbya* 属シアノバクテリア集合体より見出したペプチド類の構造と生物活性

本章では、沖縄県恩納村久良波で採集した *Lyngbya* 属シアノバクテリア集合体から見出した 3 種の新規ペプチド化合物、kurahamide (1)³⁶、kurahyne (2)³⁷、maedamide (3)³⁸ の構造と生物活性について述べる。



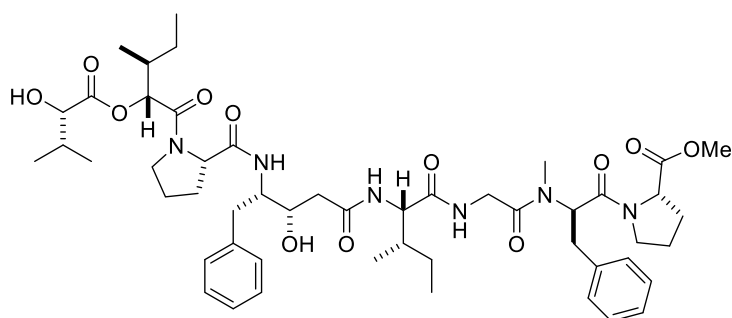
kurahamide (1)

生物活性
細胞増殖阻害
セリンプロテアーゼ阻害活性



kurahyne (2)

生物活性
細胞増殖阻害
アポトーシス誘導活性
小胞体ストレス誘導活性
破骨細胞分化阻害活性



maedamide (3)

生物活性
細胞増殖阻害
アポトーシス誘導活性
キモトリプシン阻害活性

第一節 生物試料の採集と同定

海洋シアノバクテリアの採集は、2013年3月に沖縄県恩納村久良波付近の海岸で行った。本シアノバクテリアは特徴的な外観（黒い粒状）を有しており、顕微鏡による観察の結果、多数の種類シアノバクテリアが混在していることが明らかとなった（Figure 2-1）。

このうち全体の50%以上を占めていた優占種のシアノバクテリアについて、以下2通りの方法で同定を行った。

- ・形態観察による同定：

細胞の薄さと鞘の厚みより、本シアノバクテリアが *Lyngbya* 属であると同定した。

- ・遺伝子配列を利用した系統解析：

16S rDNA を取得し、その配列 (accession No. AB857842) を元に系統樹を作製した (第六章 Figure 6-1)。その結果、本シアノバクテリアは *Oscillatoria miniata* NAC8-50 とクレードを形成し、*Trichodesmium* 属と近縁であることがわかった。しかしながら、詳細な属名を同定するには至らなかった。

これらの結果を踏まえ、形態観察による同定結果を採用し、本シアノバクテリア集合体中の優占種を *Lyngbya* 属であると同定した。

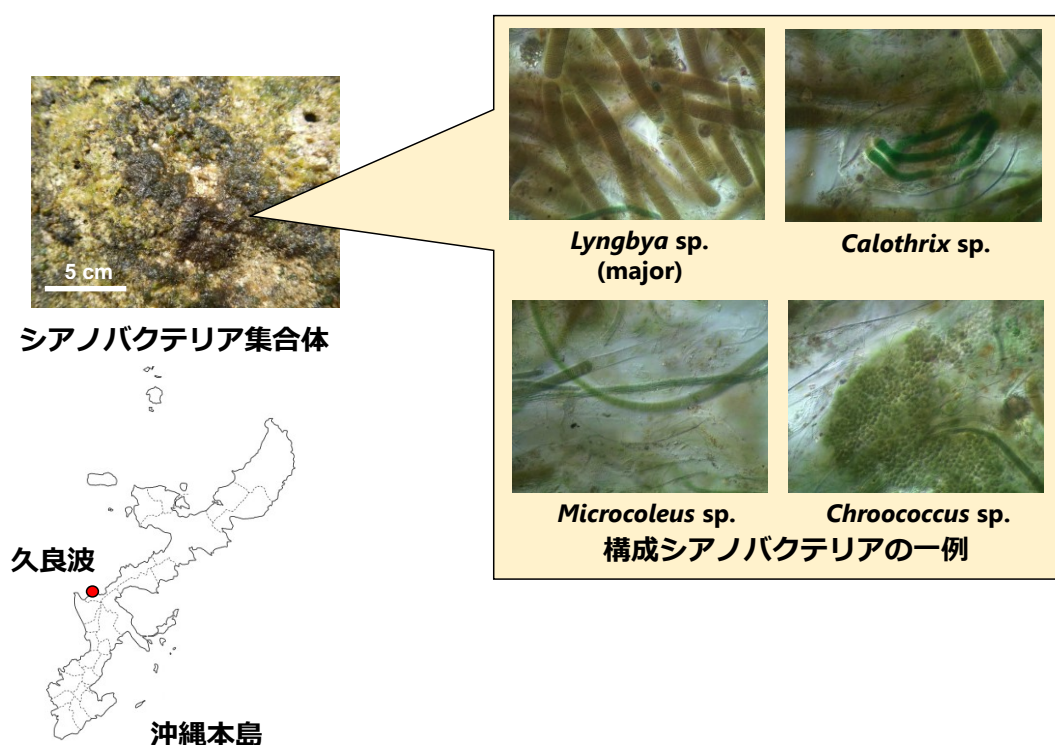


Figure 2-1. 久良波で採集した海洋シアノバクテリア集合体

なお、本シアノバクテリア集合体からは、化合物 **1~3** 以外の生物活性物質として kalkipyron³⁹、yoshinone A⁴⁰、koshikalide⁴¹、grassypeptolide⁴² 類縁体が単離された (Figure 2-2)。通常はひとつのシアノバクテリアサンプルから 3 種類以上の骨格の異なる二次代謝産物が得られることはほとんどない。合計 7 種もの二次代謝産物が得られた事実は、本サンプルがシアノバクテリアの集合体であり、多様な種が共存することと関連すると考えられる。以上の結果から、本シアノバクテリア集合体が、高い生物活性物質生産能を持つことが明らかとなった。

また、これらの化合物の単離、構造決定の結果、精製の過程でみとめられた細胞増殖阻害活性は、主に grassypeptolide (IC₅₀ 2.5 ng/mL) と kalkipyron (IC₅₀ 1.0 ng/mL 以下。ただし殺細胞活性は弱い) によるものであることがわかった。したがって、以下の節で述べる化合物 **1~3** は、本シアノバクテリア集合体中で最も強い細胞増殖阻害活性を示す化合物ではない。

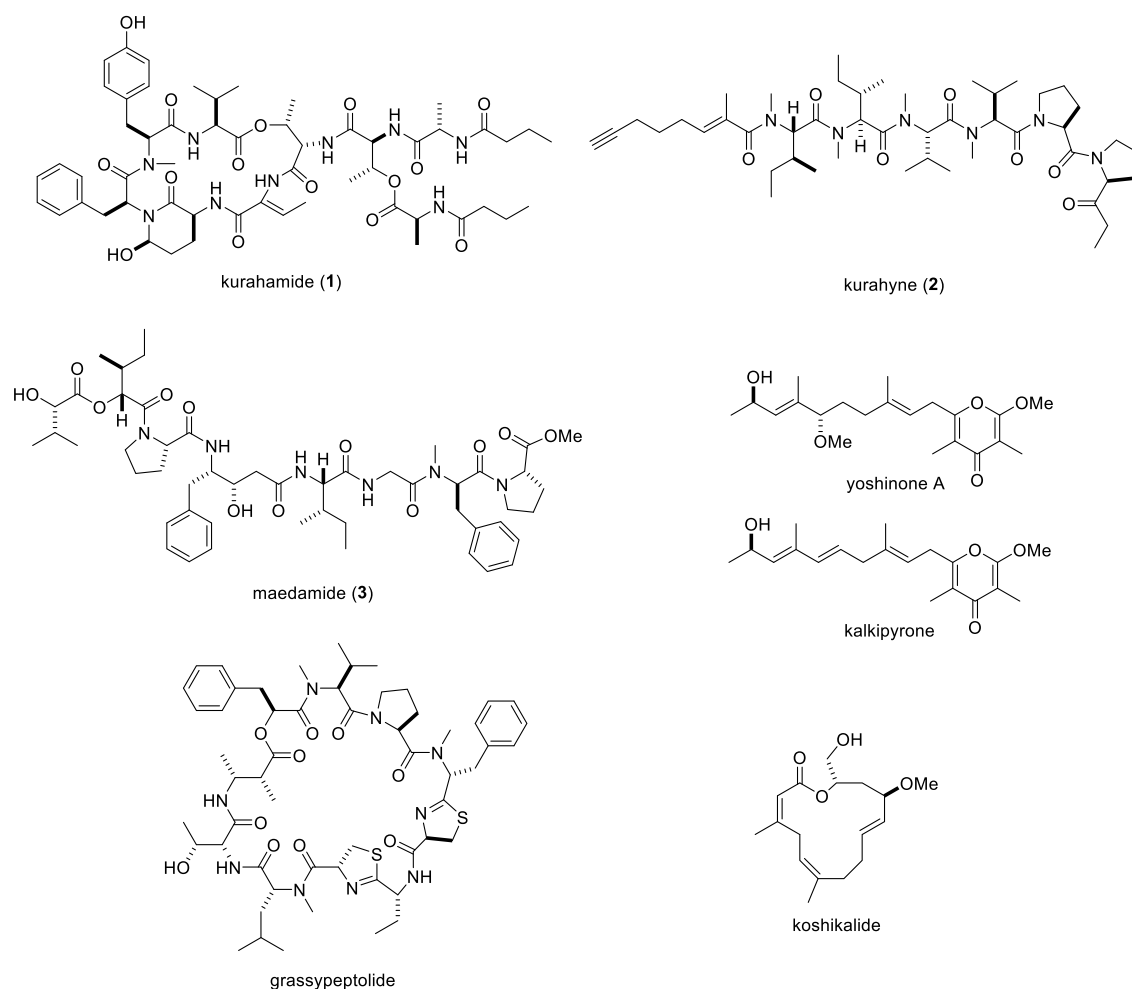


Figure 2-2. 久良波で採集した海洋シアノバクテリア集合体から得られた化合物

第三節 環状デブシペプチド kurahamide の構造

単離した kurahamide (1) の構造を決定した。平面構造は、高分解能質量スペクトルと各種 NMR スペクトルの解析により決定した。絶対立体配置は、NOESY スペクトルの解析および分解反応とキラルカラムを用いた HPLC 分析を組み合わせで決定した。

第一項 Kurahamide (1) の平面構造

Kurahamide (1) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{55}H_{77}N_9O_{15}$ であることがわかった (m/z 1126.5458, calcd for $[M+Na]^+$ 1126.5437)。

1H NMR スペクトルにおいて、2.58 ppm に観測されたメチル水素のシグナルより、窒素原子に結合するメチル基の存在が推定された。また、4.74、4.63、4.37、4.27、4.17、4.08、4.07、3.64 ppm に観測されたアミノ酸 α 位のメチン水素と考えられるシグナルより、複数のアミノ酸残基の存在が推定された。また、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、175.4、174.8、174.4、173.8、172.9、172.4、171.3、170.81、170.78、165.1 ppm に観測されたシグナルより、kurahamide (1) がアミドまたはエステル結合を多数有することが推定された。以上の情報をもとに、1 をペプチド性の化合物であると推定した。

これらに加え、COSY、HMBC、HMQC、NOESY スペクトルの詳細な解析を通じて、1 の平面構造を決定した (Figure 2-3, Table 2-1)。はじめに各種スペクトル (第六章 Figure 6-2~7) の解析を通じて、1 に含まれる 11 個の部分構造 (Val、*N*-Me-Tyr、Phe、3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp)、2-amino-2-butenic acid (Abu)、2 つの Thr、2 つの Ala および 2 つの butanoic acid (Ba)) の存在を明らかにした。これらの部分構造のシーケンスは、HMBC および NOESY スペクトルの解析を組み合わせで決定した。HMBC スペクトルにおいて、以下に示す 8 つの相関が観測された：Val の NH (δ 7.48) / *N*-Me-Tyr の C-1 (δ 172.4)、*N*-Me-Tyr の *N*-Me (δ 2.58) / Phe の C-1 (δ 172.9)、Phe の H-2 (δ 4.63) / Ahp の C-5 (δ 76.2)、Ahp の NH (δ 6.84) / Abu の C-1 (δ 165.1)、Thr-1 の NH (δ 7.11) / Thr-2 の C-1 (δ 171.3)、Thr-2 の H-2 (δ 4.37) / Ala-1 の C-1 (δ 174.8)、Thr-2 の H-3 (δ 5.19) / Ala-2 の C-1 (δ 173.8)、Ala-2 の NH (δ 6.59) / Ba-2 の C-1 (δ 174.4)。また、NOESY スペクトルにおいて、以下に示す 2 つの相関が観測された：Abu の NH (δ 7.49) / Thr-1 の H-2 (δ 4.27)、Ala-1 の NH (δ 6.71) / Ba-1 の H-2 (δ 1.91)。以上の情報をもとに、kurahamide (1) の部分構造のシーケンスが、Val-*N*-Me-Tyr-Phe-Ahp-Abu-Thr-1-Thr-2(-Ala-2-Ba-2)-Ala-1-Ba-1 であることが明らかとなった。加えて HMBC スペクトルにおいて、Thr-1 の H-3 (δ 5.13) / Val の C-1 (δ 175.4) 間で相関が観測されたことから、Thr-1 と Val 間で環構造を形成していることが明らかとなった。

Abu 部位の 2 位に存在する二重結合の幾何配置は以下のように決定した。HMBC スペクトルにおいて、通常は 4 結合以上離れた水素と炭素の間では相関は観測されない。しかし Weiss-Lopez らによると、水素と炭素の立体配置が“W”字型の平面である場合には、4 結合離れた水素 / 炭素原子間での相関が観測されることが報告されている⁴³。実際に、Paul らは、このことを利用し、海洋天然物 molassamide に含まれる Abu 部位の二重結合の幾何配置の決定を行っている⁴⁴。これらの背景の下、HMBC スペクトルの解析を行ったところ、kurahamide (1) においても、Abu の H-4 / C-1 間で、4 結合離れた水素 / 炭素間の相関が観測された。以上の結果より、1 の Abu の 2 位に存在する二重結合の幾何配置は *Z* であると決定した。

以上の考察により、kurahamide (1) の平面構造を以下のように決定した (Figure 2-3)。

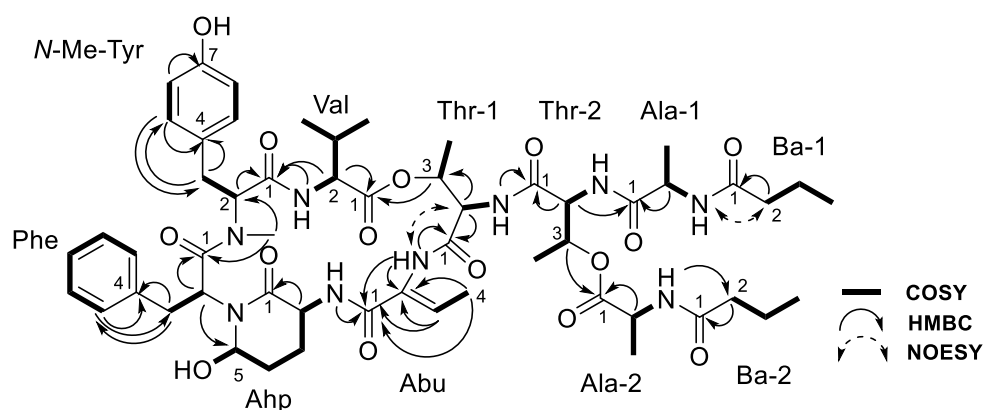


Figure 2-3. kurahamide (1) の平面構造

Table 2-1. Kurahamide (1) の NMR スペクトルデータ (溶媒: CD₃CN)

position	δ_C^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
Val					
1	175.4				
2	59.9	4.08, m	3, NH	1, 3, 4, 5, 1 (<i>N</i> -Me-Tyr)	3, 4, 5, NH
3	31.8	1.85, m	2, 4, 5	2, 4, 5	2, 4, 5, NH
4	20.07 ^c	0.69, d (7.0)	3	2, 3, 5	2, 3, <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Tyr)
5	19.3	0.62, d (7.0)	3	2, 3, 4	2, 3, NH, <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Tyr)
NH		7.48, br	2	2, 1 (<i>N</i> -Me-Tyr)	2, 3, 5, 2 (<i>N</i> -Me-Tyr), <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Tyr)
<i>N</i>-Me-Tyr					
1	172.4				
2	63.2	4.74, dd (11.5, 2.8)	3a, 3b	1, 3, 4, <i>N</i> -Me, 1 (Phe)	3a, 2 (Phe), 5/9, NH (Val)
3a	34.4	3.10, dd (14.6, 2.8)	2, 3b	2, 4, 5/9	2, 3b, 5/9
3b		2.51, dd (14.6, 11.5)	2, 3a	2, 4, 5/9	3a, 5/9
4	130.2				
5/9	132.1	6.84, d (8.6)	6/8	3, 4, 9/5, 6/8, 7	2, 3a, 3b, 6/8
6/8	117.0	6.61, d (8.6)	5/9	4, 8/6, 7	5/9
7	157.4				
<i>N</i> -Me	32.1	2.58, s		2, 1 (Phe)	2 (Val), 4 (Val), 5 (Val), NH (Ahp), NH (Val)
Phe					
1	172.9				
2	52.7	4.63, dd (11.7, 4.4)	3a, 3b	1, 3, 1 (Ahp), 5 (Ahp)	3b, 5/9, 2 (<i>N</i> -Me-Tyr), NH (Ahp)
3a	36.4	2.68, dd (14.7, 11.7)	2, 3b	2, 4, 5/9	3b, 5/9, 5 (Ahp)
3b		1.78, m	2, 3a		2, 3a, 5/9
4	138.5				
5/9	131.0	6.64, dd (8.2, 1.7)	6/8, 7	3, 7	2, 3a, 3b, 5 (Ahp), 6/8, 4b (Ahp)
6/8	129.4	7.00, m	5/9, 7	4, 8/6	5/9
7	127.8	6.95, m	5/9, 6/8	5/9	
Ahp					
1	170.78 ^d				
2	50.1	3.64, ddd (2.4, 6.7, 12.7)	3a, 3b, NH	1	3b, NH
3a	22.9	2.08, m	2, 3b, 4a, 4b		3b, OH, NH
3b		1.44, m	3a, 4a, 4b	1, 5	2, 3a, 4a
4a	30.8	1.57, m	3a, 3b, 4b, 5	2	3b, 5, OH
4b		1.49, m	3a, 3b, 4a, 5	2	5, 5/9 (Phe)
5	76.2	4.99, br s	4a, 4b, OH		4a, 4b, OH, 3a (Phe), 5/9 (Phe)
OH		4.06, m	5		3a, 4a, 5, NH (Abu)
NH		6.84, d (6.7)	2	1 (Abu)	2, 3a, 2 (Phe), NH (Abu), <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Tyr)
Abu					
1	165.1				
2	129.4				
3	136.9	5.66, qd (7.1, 0.8)	4, NH	1, 2	4
4	14.9	1.79, dd (7.1, 0.7)	3, NH	1, 2, 3	3
NH		7.49, br s	3, 4	1, 2, 3, 1 (Thr-1)	NH (Ahp), 2 (Thr-1), 3 (Thr-1), NH (Thr-1), OH (Ahp)
Thr-1					
1	170.81 ^d				
2	57.5	4.27, d (9.4)	NH	1, 3, 4	3, 4, NH, NH (Abu)
3	73.6	5.13, q (7.3)	4	1, 4, 1 (Val)	2, 4, NH (Abu)
4	20.10 ^c	1.05, d (7.3)	3	2, 3	2, 3, NH
NH		7.11, d (9.4)	2	2, 3, 1 (Thr-2)	2, 4, 2 (Thr-2), 3 (Thr-2), NH (Abu)
Thr-2					
1	171.3				
2	58.2	4.37, dd (8.0, 4.6)	3, NH	1, 3, 4, 1 (Ala-1)	3, 4, NH, NH (Thr-1)
3	71.7	5.19, dq (4.6, 6.4)	2, 4	4, 1 (Ala-2)	2, 4, NH, NH (Thr-1)
4	17.9	1.02, d (6.4)	3		2, 3, NH
NH		7.04, d (8.0)	2	2, 3, 1 (Ala-1)	2, 3, 4, 3 (Ala-1), 2 (Ala-1)

Ala-1					
1	174.8				
2	50.5	4.17, dq (7.3, 7.0)	3, NH	1, 3	3, NH, NH (Thr-2)
3	18.1	1.09, d (7.0)	2	1, 2	2, NH, NH (Thr-2)
NH		6.71, d (7.3)	2	1, 2	2, 3, 2 (Ba)
Ala-2					
1	173.8				
2	49.8	4.07, m	3, NH	1, 3	3, NH
3	18.1	1.08, d (7.5)	2	1, 2	2, NH
NH		6.59, m	2	2, 3, 1 (Ba-2)	2, 3, 2 (Ba)
Ba-1					
1	174.4				
2	39.01 ^e	1.91, m	3	1, 3, 4	3, NH (Ala)
3	20.26 ^f	1.35, tq (7.7, 7.7)	2, 4	1, 2, 4	2, 4
4	14.47 ^g	0.68, t (7.7)	3	2, 3	3
Ba-2					
1	174.4				
2	38.77 ^e	1.91, m	3	1, 3, 4	3, NH (Ala)
3	20.36 ^f	1.35, tq (7.7, 7.7)	2, 4	1, 2, 4	2, 4
4	14.55 ^g	0.67, t (7.7)	3	2, 3	3

^aMeasured at 100MHz. ^bMeasured at 400 MHz. ^{c,d,e,f,g}These carbon signals are interchangeable.

第二項 Kurahamide (1) の絶対立体配置

Kurahamide (1) の絶対立体配置を決定した。Ahp を除くすべてのアミノ酸ユニットの立体配置は、1 の酸加水分解物を各アミノ酸へと分取し、キラルカラムにおける保持時間を標品と比較することを通じて決定した。Ahp 部の絶対立体配置は、

(i) NMR スペクトルの解析による Ahp 部の相対立体配置の決定

(ii) 化合物 1 の分解反応による Ahp 部由来の Glu の取得と、その立体配置の決定を組み合わせて解明した。

Ahp 部以外のアミノ酸ユニットの立体化学の決定

Ahp 部を除く各アミノ酸の絶対立体配置を決定するために、1 を 9M HCl 中、110 °C 下で 23 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。調製した分解物に対し、逆相 HPLC を用いて精製し、各アミノ酸ユニットを分取した。得られた各アミノ酸ユニットについて、キラルカラムを用いて分析し、その保持時間を標品と比較し、各アミノ酸ユニットの絶対立体配置を決定した。キラルカラムにほとんど保持されなかったアミノ酸 (Ala および Thr) については、Marfey 誘導体⁴⁵に導き、逆相カラムにおける保持時間を別途調製した標品の Marfey 誘導体と比較することで、絶対立体配置を決定した。結果として、Ahp 部を除くすべてのアミノ酸部は L 体からなることが明らかとなった (Table 2-2)。

Table 2-2. Kurahamide (1) の構成アミノ酸の HPLC における保持時間 (Ahp をのぞく)

アミノ酸 種類	化合物 (1) 由来 保持時間 (min)	L 体標品 保持時間 (min)	D 体標品 保持時間 (min)
Val	6.1	<u>6.1</u>	3.8
N-Me-Tyr	13.2	<u>13.2</u>	10.8
Phe	8.6	<u>8.6</u>	5.9
Thr	6.4	<u>6.4</u>	18.2
Ala	9.1	<u>9.1</u>	23.6

下線：一致。

各アミノ酸の詳細な分析条件は実験項を参照。

続いて Ahp 部の絶対立体配置を決定した。以下、i)、ii) のように決定した。

i) NMR スペクトルの解析による Ahp 部の相対立体配置の決定

Ahp 部の 2 位と 5 位の相対立体配置を決定するために、 ^1H NMR スペクトルと NOESY スペクトルの解析を行った。H-2 (δ 3.64) / H-3a (δ 2.08) 間の結合定数が大きく (12.7 Hz)、H-2 (δ 3.64) / H-3b (δ 1.44) 間の結合定数が小さい (2.4 Hz) ことより、H-2 および H-3a がそれぞれ axial 位にあることが推定された。また H-5 (δ 4.99) / 4a (δ 1.57) および H-5 (δ 4.99) / 4b (δ 1.49) 間の結合定数がいずれも小さい (H-5 が broad singlet として観測された) ことより、OH-5 が axial 位にあることが推定された。これらを裏付けるように、NOESY スペクトルにおいて、H-3a (δ 2.08) / OH-5 (δ 4.06) 間で相関が観測された。以上の結果をもとに、Ahp 部の相対立体配置を $2S^*$ 、 $5R^*$ と決定した (Figure 2-4)。

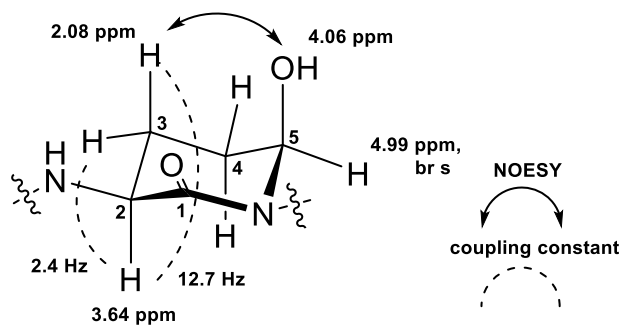


Figure 2-4. Ahp 部の相対立体配置

ii) 化合物 1 の分解反応による Ahp 部由来の Glu の取得と、その立体配置の決定

Ahp 部の絶対立体配置を決定するために、分解反応を行った。オゾン酸化と続く酸化的後処理により、Ahp 部のヘミアミナル部位をカルボン酸に酸化した。このものを酸加水分解に付し、得られた分解物から HPLC を用いて Glu を分取した。キラルカラムによる分析の結果、1 由来の Glu の立体化学は L 体 ($2S$ 体) であることが判明した (Table 2-3)。分解物中の Glu の立体化学は Ahp の 2 位の立体化学を反映している。このことと、前述の相対立体配置に関する情報とを組み合わせ、Ahp 部の立体化学を $2S$ 、 $5R$ であると解明した。

Table 2-3. Kurahamide (1) 由来の Glu の HPLC における保持時間

アミノ酸 種類	化合物 (1) 由来 保持時間 (min)	L 体標品 保持時間 (min)	D 体標品 保持時間 (min)
Glu	16.4	<u>16.4</u>	11.3

下線：一致。

詳細な分析条件は実験項を参照。

以上の結果、kurahamide (1) の絶対立体配置を Figure 2-5 に示すように決定した。

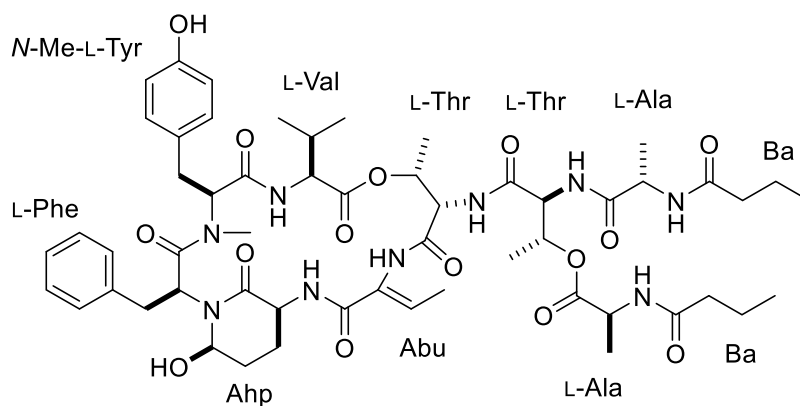


Figure 2-5. Kurahamide (1) の絶対立体配置

結果として、kurahamide (1) は、dolastatin 13⁴⁶ の新規類縁体であった (Figure 2-6)。アミノ酸 6 残基からなる特徴的な環構造は、他の海洋シアノバクテリア由来の化合物 (たとえば lyngbyastatins 4-10⁴⁷, somamides⁴⁸, symprostatin 2⁴⁹, molassamide など) と共通する。

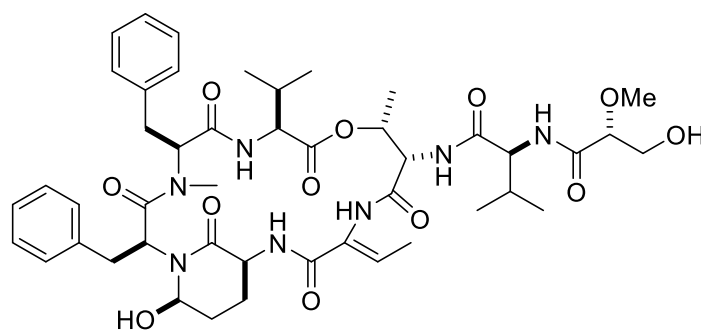


Figure 2-6. Dolastatin 13 の構造

第四節 環状デプシペプチド kurahamide の生物活性

Kurahamide (1) の生物活性の評価を行った。その結果 1 は、ヒトがん細胞に対する増殖阻害活性とセリンプロテアーゼの阻害活性を有することがわかった。

第一項 Kurahamide (1) のヒトがん細胞に対する増殖阻害活性の評価

Kurahamide (1) の細胞増殖阻害活性を、MTT 法により評価した。付着性の細胞株としてヒト子宮頸癌細胞である HeLa 細胞を、浮遊性の細胞株としてヒト前骨髄球性白血病細胞である HL60 を用いた。その結果、1 はヒトがん細胞に対して弱い細胞増殖阻害活性を有することが明らかとなった (Table 2-4)。

Table 2-4. Kurahamide (1) の細胞増殖阻害活性

細胞種類	50% 増殖阻害濃度 (μM)
HeLa (ヒト子宮頸癌細胞)	16
HL60 (ヒト前骨髄球性白血病細胞)	2.5

第二項 Kurahamide (1) のセリンプロテアーゼ阻害活性の評価

Dolastatin 13 の類縁体は、セリンプロテアーゼの阻害活性を有する事が報告されている^{44,47}。そこで 1 のセリンプロテアーゼ阻害活性の評価を行った。セリンプロテアーゼとしては、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼを選択し、ポジティブコントロールとしては、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を選択した。酵素活性は、プロテアーゼによる分解反応で色素を放出する基質を用い、比色定量法により評価した。その結果、1 はキモトリプシンとエラスターゼを選択的かつ強力に阻害する事がわかった (Table 2-5)。

Table 2-5. Kurahamide (1) のセリンプロテアーゼ阻害活性

化合物	50% 阻害濃度 (μM)		
	トリプシン	キモトリプシン	エラスターゼ
kurahamide (1)	> 100	9.0	0.10
PMSF	1100	200	860

これらの酵素選択性は、同様の環構造を有する他の dolastatin 13 類縁体に共通するものであった。一群の dolastatin 13 類縁体において、酵素基質複合体の X 線構造解析によって、Ahp 部の N 末端側に隣接するアミノ酸残基が酵素の基質認識ポケットに結合することが明らかとされている⁵⁰。Kurahamide (1) において、当該アミノ酸残基は Abu である。キモトリプシンやエラスターゼは中性かつ疎水性のアミノ酸残基を認識して、その C 末端を切断し、トリプシンは塩基性のアミノ酸残基を認識し、その C 末端を切断する⁵¹。Abu の疎水的な性質はキモトリプシンやエラスターゼに認識される一方、トリプシンには認識されないことが予想され、これによって 1 による酵素阻害活性の選択性が発現していると考えられる。

第五節 鎖状リポペプチド kurahyne の構造

単離した kurahyne (2) の構造を決定した。平面構造は、高分解能質量スペクトルと各種 NMR スペクトルの解析により決定した。絶対立体配置は、分解・誘導反応とキラルカラムを用いた HPLC 分析を組み合わせて決定した。

第一項 Kurahyne (2) の平面構造

Kurahyne (2) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{47}H_{78}N_6O_7$ であることがわかった (m/z 839.5991, calcd for $[M+H]^+$ 839.6010)。

1H NMR スペクトルにおいて、3.38、3.27、3.26、2.86 ppm に観測されたメチル水素のシグナルより、窒素原子に結合する 4 つのメチル基の存在が推定された。また、5.54、5.53、5.49、5.40、4.50 ppm に観測されたアミノ酸 α 位のメチン水素と考えられるシグナルより、複数のアミノ酸残基の存在が推定された。また、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、173.4、170.91、170.88、170.6、170.3、169.2 ppm に観測されたシグナルより、kurahyne (2) がアミドまたはエステル結合を多数有することが推定された。以上の情報をもとに、2 をペプチド性の化合物であると推定した。

これらに加え、COSY、HMBC、HMQC、NOESY スペクトルの詳細な解析を通じて、2 の平面構造を決定した (Figure 2-7, Table 2-6)。はじめに各種スペクトル (第六章 Figure 6-8~13) の解析を通じて、2 に含まれる 5 個のアミノ酸残基 (2 つの *N*-Me-Ile、2 つの *N*-Me-Val および Pro) の存在を明らかにした。また、208.5 ppm に観測された炭素に対する HMBC スペクトルの相関と、その周辺の構造解析を行った結果、2-(1-oxo-propyl)-pyrrolidine (Opp) 部位の存在が明らかとなった。さらに、83.8 および 69.4 ppm に観測された炭素、ならびに 1.80 ppm に観測された水素の周辺の構造解析を行った結果、2-methyloct-2-en-7-ynoic acid (Fatty acid) 部位の存在が明らかになった。

これらの部分構造のシーケンスは、HMBC および NOESY スペクトルの解析を組み合わせ決定した。HMBC スペクトルにおいて、以下に示す相関が観測された：*N*-Me-Ile-2 の *N*-Me (δ 2.86) / Fatty acid の C-1 (δ 173.4)。また、NOESY スペクトルにおいて、以下に示す 7 つの相関が観測された：*N*-Me-Ile-2 の H-2 (δ 5.54) / *N*-Me-Ile-1 の *N*-Me (δ 3.26)、*N*-Me-Ile-1 の H-2 (δ 5.53) / *N*-Me-Val-2 の *N*-Me (δ 3.27)、*N*-Me-Val-2 の H-2 (δ 5.49) / *N*-Me-Val-1 の *N*-Me (δ 3.38)、*N*-Me-Val-1 の H-2 (δ 5.40) / Pro の H-5a (δ 4.03)、*N*-Me-Val-1 の H-2 (δ 5.40) / Pro の H-5b (δ 3.72)、Pro の H-2 (δ 4.50) / Opp の H-7a (δ 3.45)、Pro の H-2 (δ 4.50) / Opp の H-7b (δ 3.05)。以上の情報をもとに、kurahyne (2) の部分構造のシーケンスが、Fatty acid-*N*-Me-Ile-2-*N*-Me-Ile-1-*N*-Me-Val-2-*N*-Me-Val-1-Pro-Opp であることが明らかとなった。

Fatty acid 部位の 2 位に存在する二重結合の幾何配置は、C-9 位のビニルメチル炭素の化学シフトが 14.4 ppm であったことと、NOESY スペクトルにおいて H-4 (δ 1.96) / H-9 (δ 1.75) 間で相関が観測されたことより、*E* 配置であると決定した⁵²。

以上の考察により、kurahyne (2) の平面構造を以下のように決定した (Figure 2-7)。

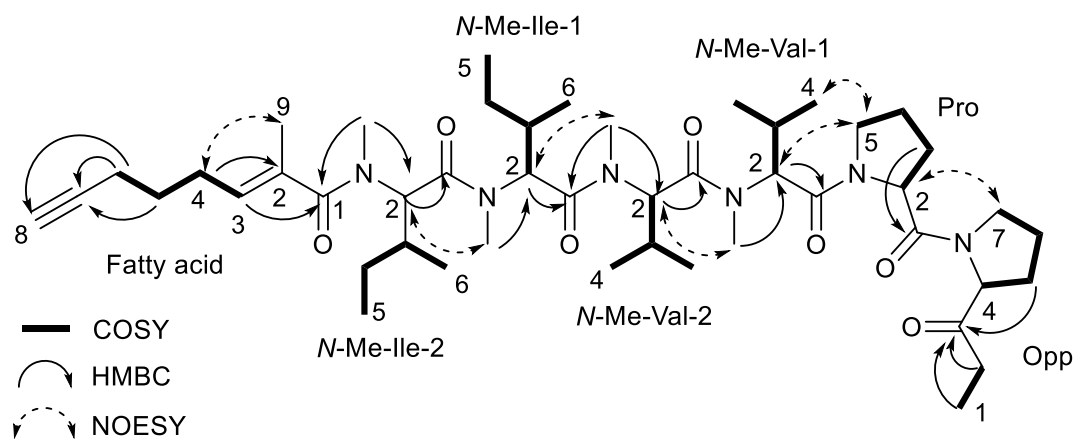


Figure 2-7. kurahyne (2) の平面構造

Table 2-6. Kurahyne (2) の NMR スペクトルデータ (溶媒: C₆D₆)

position	δ_C^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
Opp					
1	7.7	0.96, 3H, dd (7.8, 7.8)	2a, 2b	2, 3	2a, 2b
2a	33.44 ^c	2.29, 1H, dq (18.7, 7.8)	1, 2b	1, 3	1, 2b, 4
2b		2.07, 1H, dq (18.7, 7.8)	1, 2a	1, 3	1, 2a, 4
3	208.5				
4	64.1	4.41, 1H, dd (8.6, 4.7)	5a, 5b	5, 6	2a, 2b, 5a, 5b
5a	27.77 ^d	1.35, 1H, m	4, 5b, 6a, 6b	3, 4, 6, 7	4
5b		1.18, 1H, m	4, 5a, 6a, 6b	3, 6, 7	4
6a	25.01 ^e	1.43, 1H, m	5a, 5b, 6b, 7a, 7b	4, 5, 7	7b
6b		1.31, 1H, m	5a, 5b, 6a, 7a, 7b	4, 5, 7	7a
7a	46.7	3.45, 1H, m	6a, 6b, 7b	4, 5, 6	6b, 7b, 2 (Pro)
7b		3.05, 1H, m	6a, 6b, 7a	5, 6	6a, 7a, 2 (Pro)
Pro					
1	170.3				
2	58.1	4.50, 1H, dd (8.5, 4.0)	3a, 3b	3, 4	3a, 3b, 7a (Opp), 7b (Opp)
3a	28.6	1.82, 1H, m	2, 3b, 4a, 4b	1, 2, 4, 5	2, 4b, 5b
3b		1.64, 1H, m	2, 3a, 4a, 4b	1, 2, 4, 5	2, 4a
4a	24.96 ^e	1.81, 1H, m	3a, 3b, 4b, 5a, 5b	2, 3, 5	3b
4b		1.43, 1H, m	3a, 3b, 4a, 5a, 5b	2, 5	3a, 5a
5a	47.9	4.03, 1H, m	4a, 4b, 5b	2, 3, 4	4b, 5b, 2 (N ^o -Me-Val-1)
5b		3.72, 1H, m	4a, 4b, 5a	3, 4	3a, 5a, 2 (N ^o -Me-Val-1), 4 (N ^o -Me-Val-1)
N^o-Me-Val-1					
1	169.2				
2	59.7	5.40, 1H, d (11.2)	3	1, 3, 4, 5, N ^o -Me	3, 4, 5, N ^o -Me, 5a (Pro), 5b (Pro)
3	28.1	2.47, 1H, m	2, 4, 5	1, 2, 4	2, 4, 5, N ^o -Me
4	19.7	1.22, 3H, d (6.5)	3	2, 3, 5	2, 3, 5b (Pro)
5	18.6	0.77, 3H, d (7.0)	3	2, 3, 4	2, 3, N ^o -Me
N ^o -Me	30.9	3.38, 3H, s		2, 1 (N ^o -Me-Val-2)	2, 3, 5, 2 (N ^o -Me-Val-2)
N^o-Me-Val-2					
1	170.88 ^f				
2	58.6	5.49, 1H, d (10.7)	3	1, 3, 4, 5, N ^o -Me (N ^o -Me-Val-1)	3, 4, 5, N ^o -Me, N ^o -Me (N ^o -Me-Val-1)
3	27.71 ^d	2.55, 1H, m	2, 4, 5	2, 4, 5	2, 4, 5, N ^o -Me
4	19.9	0.94, 3H, d (6.4)	3	2, 3, 5	2, 3
5	18.0	0.79, 3H, d (7.0)	3	2, 3, 4	2, 3, N ^o -Me
N ^o -Me	30.70 ^g	3.27, 3H, s		2, 1 (N ^o -Me-Ile-1)	2, 3, 5, 2 (N ^o -Me-Ile-1)
N^o-Me-Ile-1					
1	170.6				
2	57.0	5.53, 1H, d (11.2)	3	1, 3, 4, 6, N ^o -Me (N ^o -Me-Val-2)	3, 4a, 5, 6, N ^o -Me (N ^o -Me-Val-2)
3	33.42 ^c	2.37, 1H, m	4a, 4b, 6	2	2, 5, 6, N ^o -Me
4a	24.1	1.35, 1H, m	3, 4b, 5	3, 5, 6	2
4b		1.03, 1H, m	3, 4a, 5	3, 5, 6	
5	10.9	0.86, 3H, m	4a, 4b	3, 4	2, 3, N ^o -Me
6	15.77	0.86, 3H, m	3	2, 3, 4	2, 3
N ^o -Me	30.63 ^g	3.26, 3H, s		2, 1 (N ^o -Me-Ile-2)	3, 5, 2 (N ^o -Me-Ile-2)

N-Me-Ile-2

1	170.91 ^f					
2	56.6	5.54, 1H, d (11.2)	3	1, 3, 4, 6, <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Ile-1), 1 (Fatty acid)	3, 4a, 4b, 5, 6, <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Ile-1)	
3	33.1 ^c	2.37, 1H, m	4a, 4b, 6	2	2, 4a, 5, 6, <i>N</i> -Me	
4a	24.6	1.39, 1H, m	3, 4b, 5	2, 3, 5, 6	2, 3, 4b, <i>N</i> -Me	
4b		1.19, 1H, m	3, 4a, 5	3, 5, 6	2, 4a	
5	11.0	0.90, 3H, m	4a, 4b	3, 4	2, 3	
6	15.83	0.92, 3H, d (8.5)	3	2, 3, 4	2, 3	
<i>N</i> -Me	31.9	2.86, 3H, s		2, 1 (Fatty acid)	3, 4a, 3 (Fatty acid), 9 (Fatty acid)	

Fatty acid

1	173.4				
2	133.6				
3	129.1	5.38, 1H, dt (7.5, 1.6)	4, 9	1, 4, 9	4, 5, <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Ile-2)
4	26.6	1.96, 2H, m	3, 5	2, 3, 5, 6	3, 9, 5
5	28.0	1.34, 2H, m	4, 6	3, 4, 6, 7	4, 6
6	18.2	1.93, 2H, dt (7.3, 2.9)	5, 8	4, 5, 7, 8	5
7	83.8				
8	69.4	1.80, 1H, t (2.9)	6		
9	14.4	1.75, 3H, br s	3	1, 2, 3	4, <i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Ile-2)

^a Measured at 100MHz. ^b Measured at 400 MHz. ^{c, d, e, f, g} These carbon signals are interchangeable, respectively.

第二項 Kurahyne (2) の絶対立体配置

Kurahyne (2) の絶対立体配置を決定した。すべてのアミノ酸ユニットの立体配置は、2 の酸加水分解物を各アミノ酸へと分取し、キラルカラムにおける保持時間を標品と比較することを通じて決定した。Opp 部の絶対立体配置は、

- (i) 誘導反応と酸加水分解を利用し、2 の Opp 部由来のアルコールを単離
- (ii) 別途合成した標品と、(i) で得たアルコールとの HPLC における保持時間の比較を組み合わせて解明した。

Opp ユニットの立体化学の決定

Opp 部位の絶対立体配置を決定するために、kurahyne (2) を加水分解して Opp ユニットを得る事を試みた。酸加水分解条件下で、ケトンの α 位の不斉点がエピ化することが予想されたため、まず NaBH_4 を用いて 2 のケトンをアルコールに還元した。このものを 6 M HCl 中、110 °C 下で 45 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。調製した分解物に対し、逆相 HPLC を用いて精製を行い、Opp 部位由来のアルコールをジアステレオマー混合物として得た。得られた天然由来アルコールを L-FDLA を用いて Marfey 誘導体⁴⁵とし、逆相カラムにおける保持時間を別途合成した標品の Marfey 誘導体と比較した。結果として、2 由来のアルコールの Marfey 誘導体は、4*S* の立体化学を持つ標品と保持時間が一致した (Figure 2-8、Table 2-7)。以上の結果をもとに、Opp 部の絶対立体配置を 4*S* と決定した。

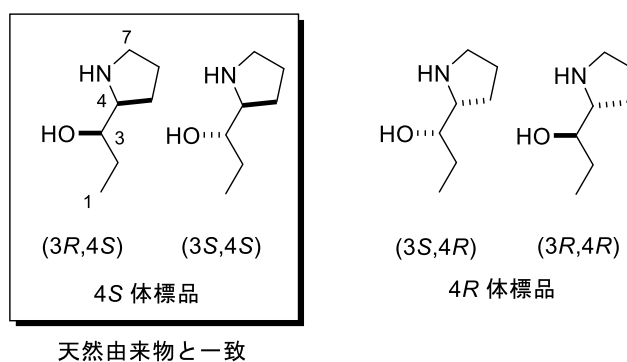


Figure 2-8. Opp 由来アルコール標品の構造

Table 2-7. Opp 由来アルコールの Marfey 誘導体の HPLC における保持時間

化合物 (2) 由来物	4 <i>S</i> 体標品	4 <i>R</i> 体標品
保持時間 (min)	保持時間 (min)	保持時間 (min)
14.8	<u>14.8</u>	16.4
15.8	<u>15.8</u>	17.4

下線：一致。

詳細な分析条件は実験項を参照。

アミノ酸ユニットの立体化学の決定

Opp 部の立体化学を決定する際に調製した酸加水分解物を利用して、各アミノ酸の絶対立体配置を決定した。酸加水分解物を、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸へと分離した。得られたアミノ酸について、キラルカラムを用いて保持時間を分析した。得られた保持時間を標品と比較し、各アミノ酸ユニットの絶対立体配置を決定した。なお、*N*-Me-Ile については、キラルカラムによる分析の前に、逆相の HPLC を用いて相対立体配置（天然体もしくは *allo* 体）を決定した。結果として、すべてのアミノ酸ユニットは L 体からなることが明らかとなった (Table 2-8)。

Table 2-8. Kurahyne (2) の構成アミノ酸の絶対立体配置

アミノ酸 種類	化合物 (2) 由来 保持時間 (min)	L 体標品 保持時間 (min)	D 体標品 保持時間 (min)	天然体標品 保持時間 (min)	<i>allo</i> 体標品 保持時間 (min)
<i>N</i> -Me-Val	5.2	<u>5.2</u>	3.0	—	—
Pro	5.1	<u>5.1</u>	3.0	—	—
<i>N</i> -Me-Ile ^a	5.3 ^a	—	—	<u>5.3^a</u>	5.1 ^a
<i>N</i> -Me-Ile	12.9	<u>12.9</u>	6.6	—	—

下線：一致。 ^a 相対立体配置を決定するために、逆相カラムを使用。

各アミノ酸の詳細な分析条件は実験項を参照。

以上の結果、kurahyne (2) の絶対立体配置を Figure 2-9 に示すように決定した。

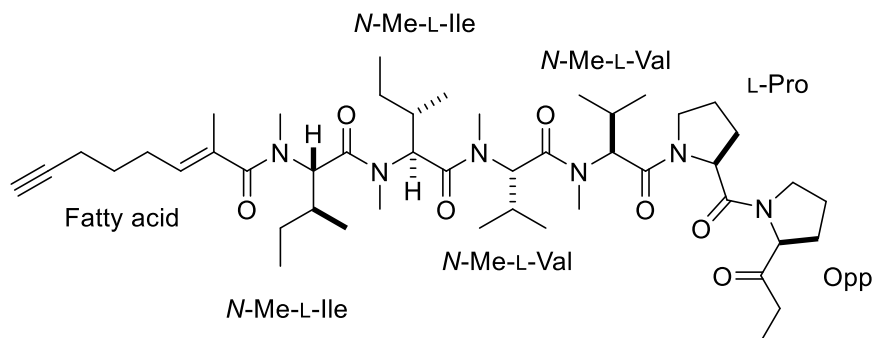
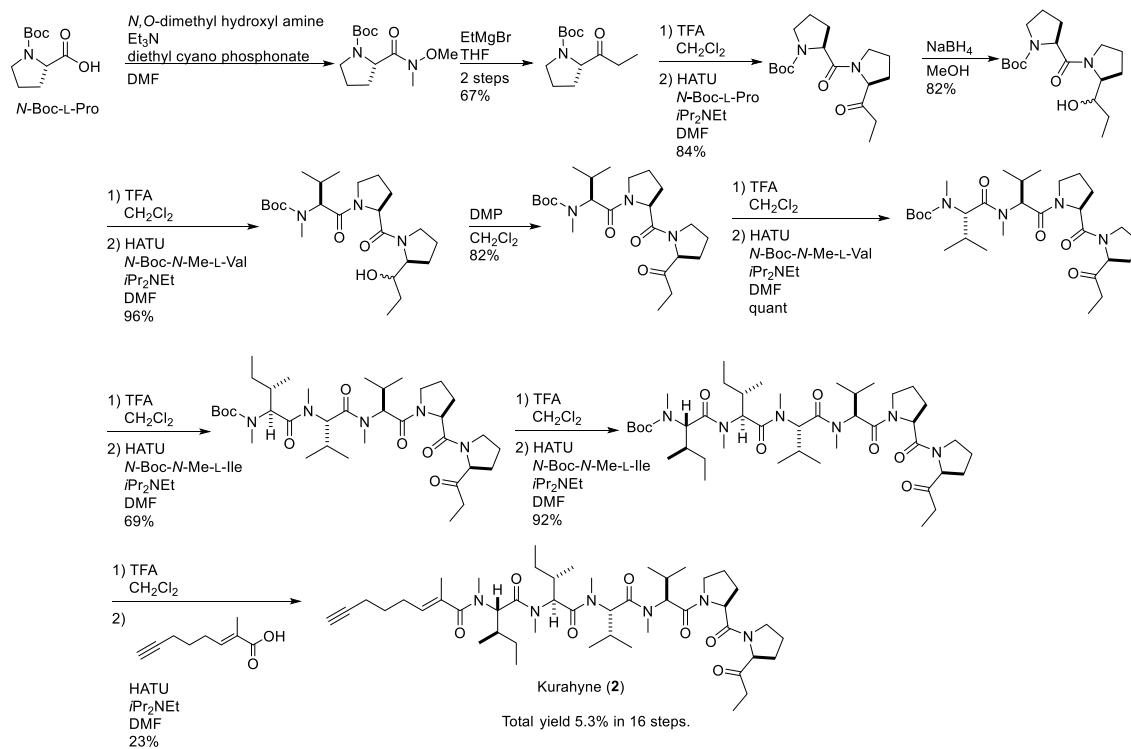


Figure 2-9. Kurahyne (2) の絶対立体配置

結果として、kurahyne (2) は、末端アセチレンとケトンをもつ鎖状のリポペプチドであった。これまでに、Opp 部位²⁷と Fatty acid 部位⁵³とは、それぞれ天然から 1 例ずつしか報告が無い部分構造であった。このような珍しい部分構造を併せ持つ kurahyne (2) は、構造の新規性が高い化合物であった。

また kurahyne (2) の構造決定の正しさは、当研究室の Okamoto らによる全合成によって確かめられた⁵⁴ (Scheme 2-2)。



Scheme 2-2. Kurahyne (2) の全合成

N-Boc-L-Pro を出発原料とし、16 段階、総収率 5.3% で kurahyne (2) が全合成された。天然品と合成品とで、各種スペクトルデータが完全に一致したことから、kurahyne (2) の構造の正しさが確認された (Figure 2-10)。

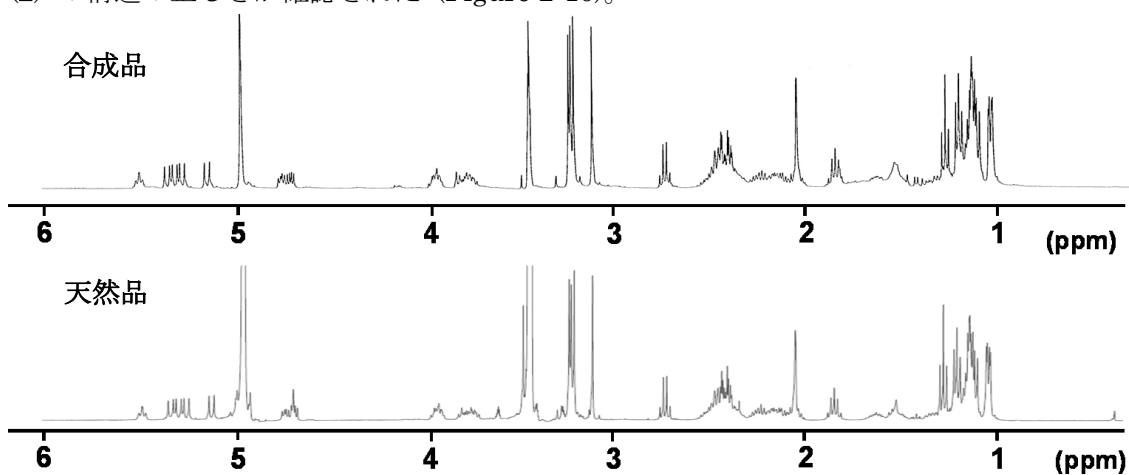


Figure 2-10. 天然品と合成品の kurahyne (2) の ¹H NMR スペクトルの比較
(400 MHz, CD₃OD)

第六節 鎖状リポペプチド kurahyne の生物活性

Kurahyne (2) の生物活性の評価を行った。その結果 2 は、ヒトがん細胞に対する増殖阻害活性と HeLa 細胞に対するアポトーシス誘導活性、さらに破骨細胞の分化阻害活性を有することがわかった。

第一項 Kurahyne (2) のヒトがん細胞に対する増殖阻害活性の評価

Kurahyne (2) の細胞増殖阻害活性を、MTT 法により評価した。その結果、2 はヒトがん細胞に対して細胞増殖阻害活性を有することが明らかとなった (Table 2-9)。

Table 2-9. Kurahyne (2) の細胞増殖阻害活性

細胞種類	50% 増殖阻害濃度 (μM)
HeLa	3.9
HL60	1.5

第二項 Kurahyne (2) のアポトーシス誘導活性の評価

Kurahyne (2) のアポトーシス誘導活性を、トリパンブルー色素排除試験と DNA の断片化解析により評価した。結果として、2 は HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

トリパンブルー色素排除試験による評価

HeLa 細胞に対し、kurahyne (2) を 1、3、10 μM の各濃度で処理し、48 時間培養した。その後、トリパンブルー色素排除試験を行い、細胞の生存率の評価を行った (Figure 2-11A)。Kurahyne (2) 単独処理時 (図中白線) には、細胞増殖阻害活性を示す濃度域において、濃度依存的に細胞の生存率が低下した。一方、50 μM の汎 caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK を共存させた場合 (図中水色線)、細胞の生存率の回復が認められた。これらの結果より、kurahyne (2) によって引き起こされる細胞死は caspase 依存的であることが強く示唆された。

DNA の断片化解析による評価

アポトーシスの過程において、DNA はクロマチン単位 (約 150 bp) で切断されることが知られている。そのためアポトーシスを起こしている細胞の DNA を電気泳動すると、はしご状のパターンが認められる。このことを利用して、2 によるアポトーシス誘導活性の評価を行った。HeLa 細胞に対して kurahyne (2) を 0.1、1.0、10 μM の各濃度で処理し、36 時間培養した。その後 DNA を抽出し、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、断片化の程度を評価した (Figure 2-11B)。結果として、kurahyne (2) が濃度依存的に DNA の断片化を誘導していることを明らかにした。これらの結果より、kurahyne (2) の処理によって DNA がクロマチン単位にまで切断されたことが示唆された。

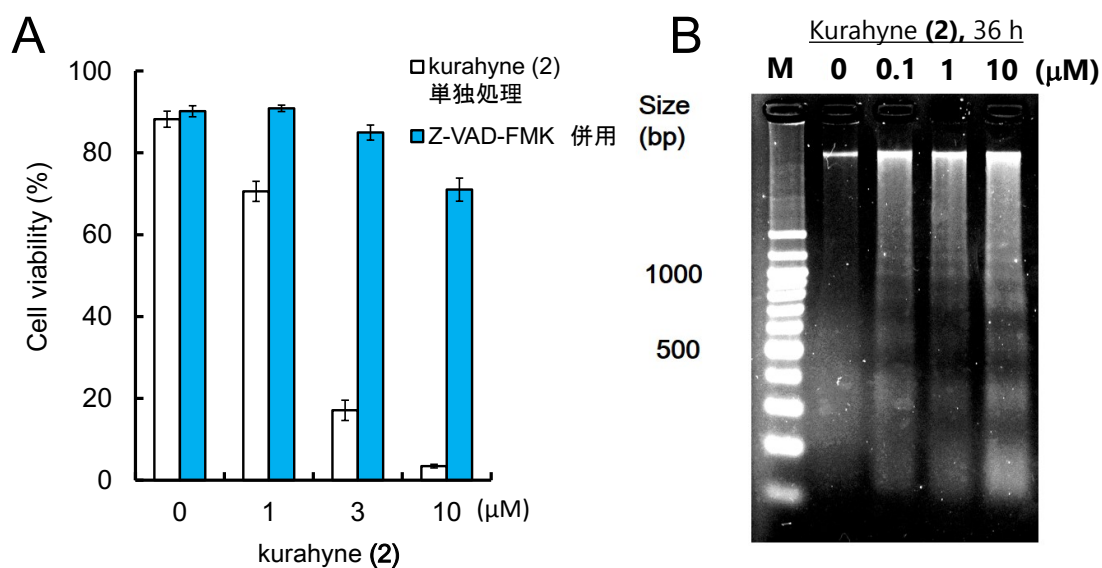


Figure 2-11. Kurahyne (2) によるアポトーシス誘導活性の評価 A) トリパンブルー色素排除試験による評価。薬剤処理後 48 時間培養し、その後に細胞の生存率の評価を行った。白は単独処理。水色は 50 μM の Z-VAD-FMK を併用。B) DNA 断片化の程度による評価。薬剤処理後 36 時間培養し、その後に DNA を抽出し、電気泳動を行った。

以上の結果をもとに、kurahyne (2) が HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導していることを明らかにした。Kurahyne (2) がアポトーシスを誘導する作用機序については、四章で詳述する。

第三項 Kurahyne (2) の破骨細胞分化阻害活性の評価

Kurahyne (2) のさらなる有用性を見出すことを目的として、慶應義塾大学応用化学科清水史郎准教授の協力の下、破骨細胞分化阻害活性の評価を、マウス骨髄由来マクロファージ (BMMs) を用いた分化誘導アッセイにより評価した。マウス大腿骨より採集した BMMs は、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) によって破骨細胞へと分化誘導される。生じた破骨細胞は、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) を発現しており、その酵素活性を利用した染色法 (TRAP 染色) を用いて分化誘導活性の評価を行った (Figure 2-12A)。結果として、kurahyne (2) は IC_{50} 0.78 μ M で TRAP 染色される細胞の生成を阻害した (Figure 2-12B)。一方、2 は IC_{50} 1.96 μ M で BMMs の増殖を阻害することがわかった (Figure 2-12C)。以上の結果より、kurahyne (2) は BMMs に対して細胞増殖阻害を示すより、わずかに低濃度で破骨細胞の分化を阻害することが明らかとなった。

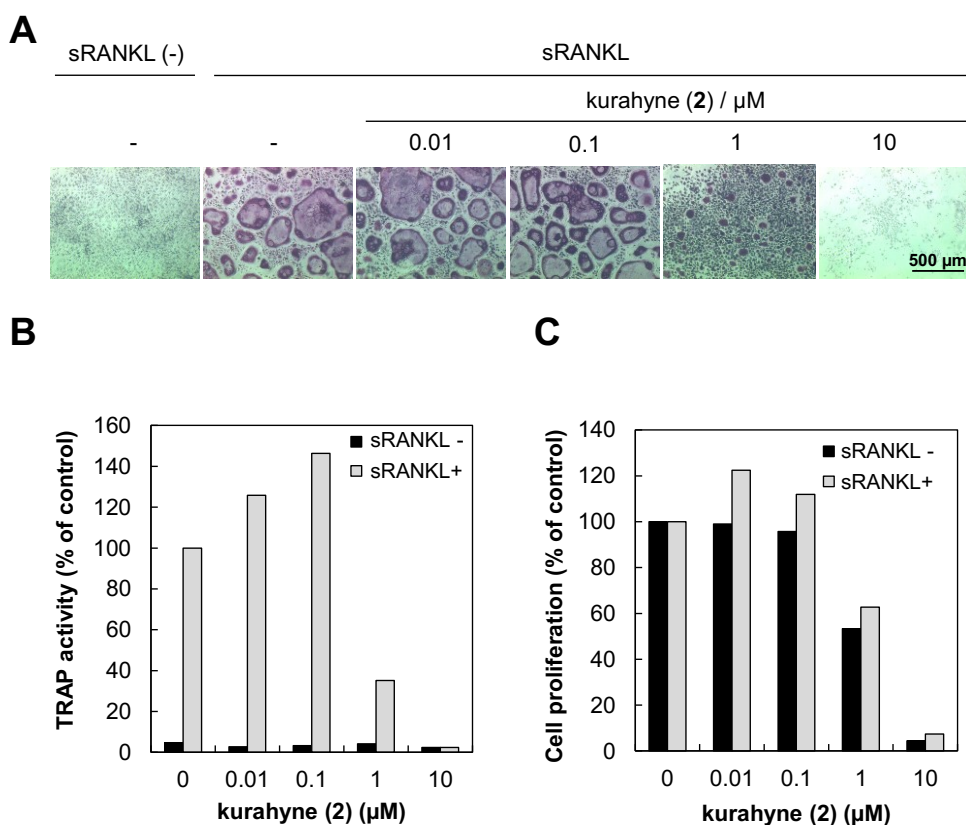


Figure 2-12. Kurahyne (2) による破骨細胞分化阻害活性の評価 A) 薬剤処理後 72 時間の BMMs の TRAP 染色写真。sRANKL の処理濃度は 100 ng/mL。スケールバーは 500 μ m。B) TRAP 染色の比色定量結果。色素を DMSO に溶解し、570 nm の吸光度を測定した。独立した 2 回の実験の平均値を示した。C) BMMs に対する kurahyne (2) の細胞増殖阻害活性の評価。MTT 法により評価をした。独立した 2 回の実験の平均値を示した。

第七節 鎖状デブシペプチド maedamide の構造

単離した maedamide (**3**) の構造を決定した。平面構造は、高分解能質量スペクトルと各種 NMR スペクトルの解析により決定した。絶対立体配置は、分解・誘導反応とキラルカラムを用いた HPLC 分析を組み合わせ推定した。最終的には全合成の達成によって、その絶対立体配置を明らかにした。

第一項 Maedamide (**3**) の平面構造

Maedamide (**3**) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{51}H_{75}N_6O_{12}$ であることがわかった (m/z 963.5414, calcd for $[M+H]^+$ 963.5443)。

1H NMR スペクトルにおいて、4.09 および 3.94 ppm に観測された互いに 17.5 Hz でカップリングしていると考えられるメチン水素のシグナルより、Gly ユニットの存在が推定された。また、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、177.2、174.1、174.00、173.95、173.3、171.3、170.3、170.2 ppm に観測されたシグナルより、maedamide (**3**) がアミドまたはエステル結合を多数有することが推定された。以上の情報をもとに、**3** をペプチド性の化合物であると推定した。さらに、低磁場に観測された炭素に結合する 2 つのメチン水素の存在 (δ_H 4.17 / δ_C 76.3 および δ_H 5.01 / δ_C 77.6) より、**3** にヒドロキシ酸が 2 つ存在することが推定された。

これらに加え、COSY、HMBC、HMQC、NOESY スペクトルの詳細な解析を通じて、**3** の平面構造を決定した (Figure 2-13, Table 2-10)。はじめに各種スペクトル (第六章 Figure 6-14~23) の解析を通じて、**3** に含まれる 7 個の部分構造 (*O*-Me-Pro、*N*-Me-Phe、Gly、Ile、Pro、Isoleucic acid および Valic acid) の存在を明らかにした。加えて 4.20 および 4.13 ppm の水素の周辺の構造解析を行った結果、4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid (Ahppa) 部位の存在が明らかとなった。

これらの部分構造のシークエンスは、HMBC および NOESY スペクトルの解析を組み合わせ決定した。CD₃OD を溶媒とした HMBC スペクトルにおいて、以下に示す 3 つの相関が観測された：Gly の H-2a (δ 4.09) / Ile の C-1 (δ 174.00)、Gly の H-2b (δ 3.94) / Ile の C-1 (δ 174.00) および Isoleucic acid の H-2 (δ 5.01) / Valic acid の C-1 (δ 177.2)。また、CD₃OH を溶媒とした HMBC スペクトルにおいて、以下に示す 2 つの相関が観測された：Ahppa の NH (δ 6.77) / Pro の C-1 (δ 173.3) および Ile の NH (δ 8.06) / Ahppa の C-1 (δ 174.1)。さらに CD₃OD を溶媒とした NOESY スペクトルにおいて、以下に示す 6 つの相関が観測された：*O*-Me-Pro の H-5a (δ 3.38) / *N*-Me-Phe の H-2 (δ 5.55)、*O*-Me-Pro の H-5b (δ 3.37) / *N*-Me-Phe の H-2 (δ 5.55)、*N*-Me-Phe の *N*-Me (δ 3.03) / Gly の H-2a (δ 4.09)、*N*-Me-Phe の *N*-Me (δ 3.03) / Gly の H-2b (δ 3.94)、Pro の H-5a (δ 3.86) / Isoleucic acid の H-2 (δ 5.01) および Pro の H-5b (δ 3.53) / Isoleucic acid の H-2 (δ 5.01)。以上の情報をもとに、maedamide (**3**) の平面構造を、Valic acid-Isoleucic acid-Pro-Ahppa-Ile-Gly-*N*-Me-Phe-*O*-Me-Pro であると明らかにした (Figure 2-13)。

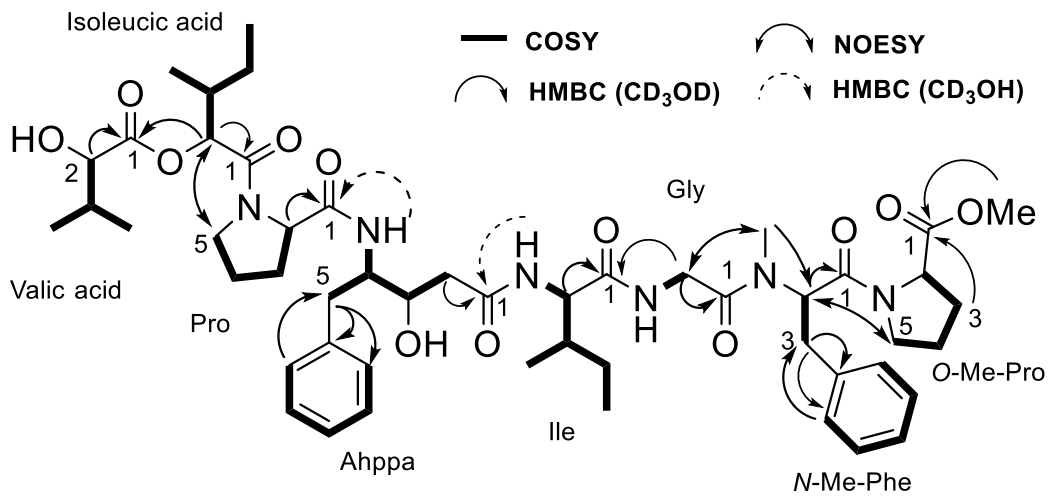


Figure 2-13. Maedamide (3) の平面構造

Table 2-10. Maedamide (3) の NMR スペクトルデータ (溶媒 : CD₃OD)

position	δ_C^a	$\delta_H^b(J \text{ in Hz})$	COSY	HMBC (H→C)	selected NOESY
Valic acid					
1	177.2				
2	76.3	4.17, d (4.4)	3	1, 3, 4, 5	
3	33.2	2.16, m	2, 4, 5	2, 4	
4	19.3	1.07, d (7.0)	3	2, 3, 5	
5	17.1	0.96, m	3	2, 3, 4	
Isoleucic acid					
1	171.3				
2	77.6	5.01, d (6.2)	3	1, 3, 4, 6, 1 (Val-acid)	5a (Pro), 5b (Pro)
3	37.2	1.94, m	2, 4a, 4b, 6	2, 4, 6	
4a	26.4	1.46, m	3, 4b, 5	2, 3, 5, 6	
4b		1.31, m	3, 4a, 5	2, 3, 5, 6	
5	12.0 ^d	0.97, m	4a, 4b	3, 4	
6	14.9	1.05, d (6.7)	3	2, 3, 4	
Pro					
1	173.3				
2	62.4	4.35, m	3a, 3b	1, 3, 4, 5	
3a	30.4	1.97, m	2, 3b, 4a, 4b	1, 2, 4	
3b		1.64, m	2, 3a, 4b		
4a	24.8	1.76, m	3a, 4b, 5b		
4b		1.36, m	3a, 3b, 4a, 5a, 5b		
5a	48.4	3.86, m	4b, 5b	3, 4	2 (Ile-acid)
5b		3.53, m	4a, 4b, 5a	4	2 (Ile-acid)
Ahppa					
1	174.1				
2a	41.2	2.38, m	2b, 3	1, 3, 4	
2b		2.37, m	2a, 3	1, 3, 4	
3	71.1	4.13, m	2a, 2b, 4	2	
4	56.0	4.20, m	3, 5a, 5b, NH ⁱ	5	
5a	37.8	2.98, m	4, 5b	3, 4, 6, 7/11	
5b		2.92, m	4, 5a	3, 4, 6, 7/11	
6	140.1				
7/11	130.5 ^e	7.29, m	8/10	5, 6, 11/7, 8/10, 9	
8/10	129.40 ^f	7.24, m	7/11, 9	6, 7/11, 10/8, 9	
9	127.6 ^g	7.16, m	8/10	7/11, 8/10	
NH ^c		6.77	4	1 (Pro)	
Ile					
1	174.00				
2	59.7	4.28, d (6.5)	3, NH ⁱ	1, 3, 4, 6	
3	37.9	1.92, m	2, 4a, 4b, 6	4, 5	
4a	25.7	1.54, m	3, 4b, 5		
4b		1.21, m	3, 4a, 5		
5	11.9 ^d	0.91, t (7.5)	4a, 4b	3, 4	
6	16.1	0.95, m	3	2, 3, 4	
NH ^c		8.06	2	2, 1 (Ahppa)	
Gly					
1	170.3 ^h				
2a	41.9	4.09, d (17.5)	2b, NH ⁱ	1, 1 (Ile)	N-Me (N-Me-Phe)
2b		3.94, d (17.5)	2a, NH ⁱ	1, 1 (Ile)	N-Me (N-Me-Phe)
NH ^c		8.09	2a, 2b		

<i>N</i> -Me-Phe						
1	170.2 ^h					
2	57.8	5.55, dd (8.3, 7.8)	3a, 3b	1, 3, 4, <i>N</i> -Me		5a (<i>O</i> -Me-Pro), 5b (<i>O</i> -Me-Pro)
3a	35.7	3.20, dd (14.2, 8.3)	2, 3b	1, 2, 4, 5/9		
3b		2.82, dd (14.2, 7.8)	2, 3a	1, 2, 4, 5/9		
4	138.6					
5/9	130.4 ^e	7.22, d (4.5)	6/8	3, 4, 9/5, 6/8, 7		
6/8	129.36 ^f	7.29, m	5/9, 7	5/9, 8/6, 7		
7	127.5 ^g	7.17, m	6, 8	5/9, 6/8		
<i>N</i> -Me	30.6	3.03, s		2, 1 (Gly)		2a (Gly), 2b (Gly)
<i>O</i> -Me-Pro						
1	173.95					
2	60.6	4.36, m	3a, 3b	3, 4, 5		
3a	29.9	2.18, m	2, 3b, 4a, 4b	1, 2, 4, 5		
3b		1.85, m	2, 3a, 4a, 4b			
4a	26.0	1.89, m	3a, 3b, 4b, 5a, 5b	2, 3, 5		
4b		1.80, m	3a, 3b, 4a, 5a, 5b	3		
5a	48.3	3.38, m	4a, 4b, 5b	3, 4		2 (<i>N</i> -Me-Phe)
5b		3.37, m	4a, 4b, 5a	3, 4		2 (<i>N</i> -Me-Phe)
<i>O</i> -Me	52.7	3.71, s		1		

^a Measured at 100 MHz. ^b Measured at 400 MHz. ^c These proton signals were observed in CD₃OH
^{d, e, f, g, h} These carbon signals are interchangeable, respectively.

第二項 Maedamide (3) の絶対立体配置

Maedamide の絶対立体配置を決定した。すべての α アミノ酸と α ヒドロキシ酸の立体化学は、maedamide の酸加水分解物を各アミノ酸へと分取し、キラルカラムにおける保持時間を標品と比較することを通じて決定した。Ahppa 部の絶対立体配置は、分解・誘導反応と改良 Mosher 法⁵⁵をくみあわせて決定した。これらの結果として、maedamide の絶対立体配置 (3') を提唱した。

その後、構造の確認を行うべく提唱構造 (3') の全合成を行った。結果として、3' の提唱構造が誤りであることがわかった。そこでスペクトルデータの詳細な解析を通じて、Ile 部の立体が異なる新たな構造 (3) を提唱した。新たな提唱構造 3 の全合成を行ったところ、そのスペクトルデータが maedamide のデータと完全に一致した。以上のようにして maedamide の絶対立体配置を 3 であると解明した。

以下に、これらの経緯と詳細を述べる。

Ahppa ユニットの立体化学の決定

Ahppa 部の 3 位の絶対立体配置は、改良 Mosher 法⁵⁵を用いて *S* であると決定した (Figure 2-14)。

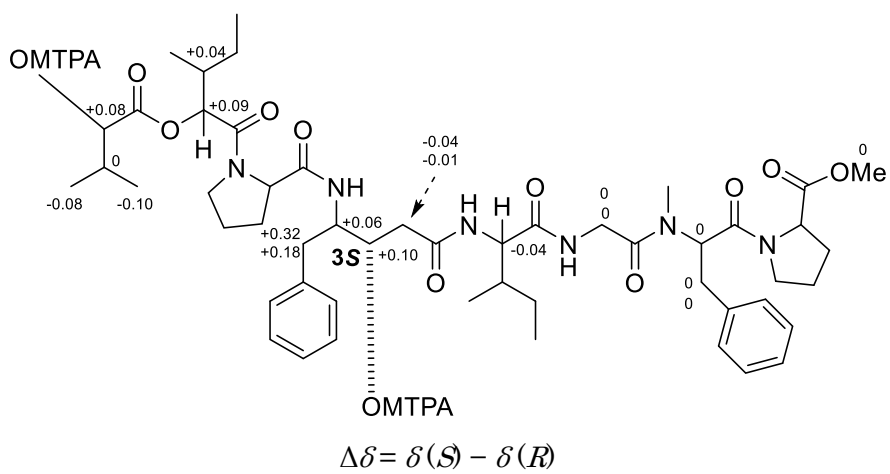
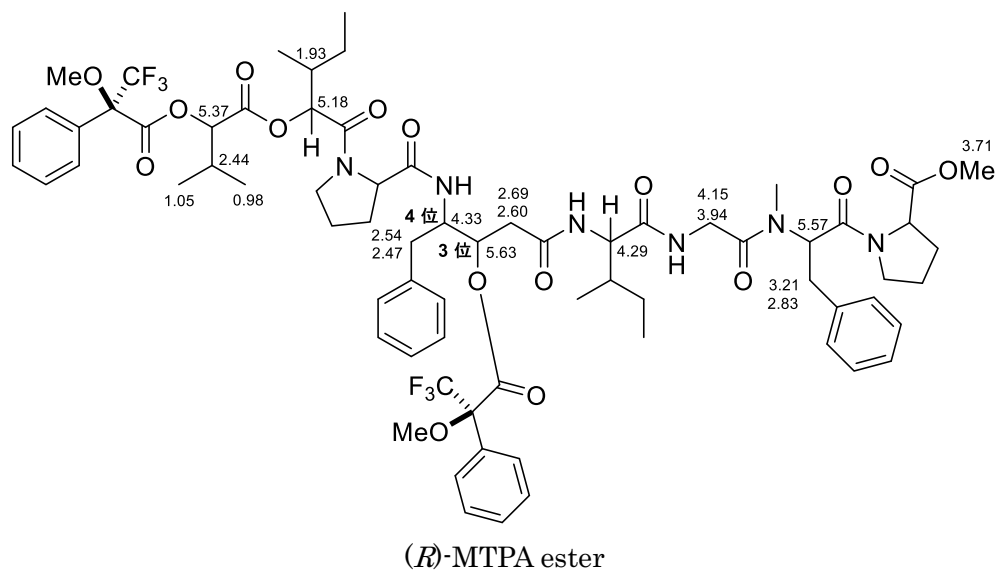
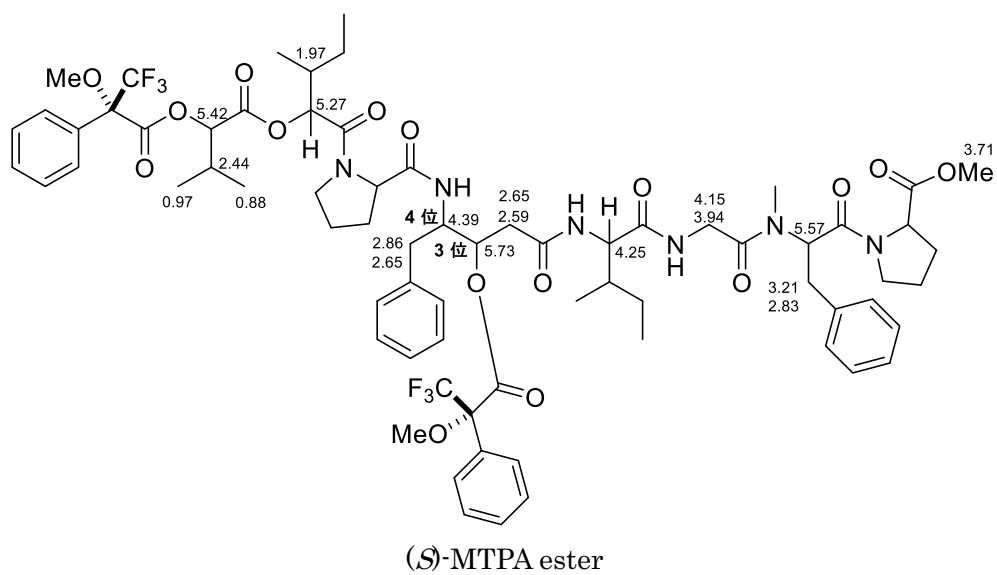


Figure 2-14. 改良 Mosher 法による Ahppa 部位 3 位の絶対立体配置の決定

Ahppa 部の 4 位の絶対立体配置は、以下の分解、誘導反応を通じて決定した。Maedamide (3) を 9M HCl 中、110 °C 下で 17.5 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。このものをオゾン酸化し、酸化的後処理を行い、Ahppa 部由来の Asp を調製した。逆相 HPLC を用いて Asp を単離し、標品とのキラルカラムにおける保持時間を比較した。その結果、3 由来の Asp は L 体であることがわかった (Table 2-11)。以上の結果より、Ahppa 部の 4 位の絶対立体配置は S であることがわかった。

Table 2-11. Maedamide (3) の Ahppa 部 4 位の絶対立体配置決定

アミノ酸 種類	化合物 (3) 由来 保持時間 (min)	L 体標品 保持時間 (min)	D 体標品 保持時間 (min)
Asp	5.6	<u>5.6</u>	4.7

下線：一致。 詳細な分析条件は実験項を参照。

Ahppa 部以外の立体化学の決定

Maedamide (3) を 9 M HCl 中、110 °C 下で 25 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。調製した分解物に対し、逆相 HPLC を用いて精製を行い、各ユニットへと分離した。得られた各ユニットについて、キラルカラムを用いて保持時間を分析した。得られた保持時間を標品と比較し、各ユニットの絶対立体配置を決定した。結果として、N-Me-Phe が D 体、Ile および Isoleucic acid が *allo*-D 体、残りのユニットの立体化学は L 体であると結論づけた (Table 2-12)。

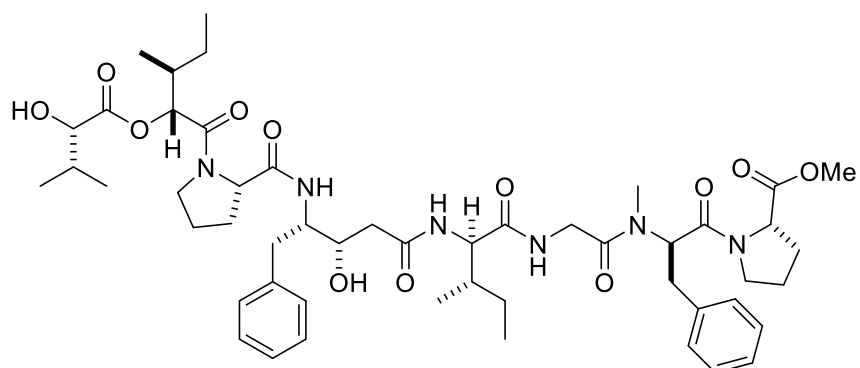
Table 2-12. Maedamide (3) の構成ユニットの絶対立体配置

アミノ酸 種類	化合物 (3) 由来 保持時間 (min)	L 体標品 保持時間 (min)	D 体標品 保持時間 (min)	<i>allo</i> -L 体標品 保持時間 (min)	<i>allo</i> -D 体標品 保持時間 (min)
Pro	5.4	<u>5.4</u>	2.9	—	—
N-Me-Phe	14.4	16.4	<u>14.4</u>	—	—
Ile	15.2	6.4	7.9	11.1	<u>15.2</u>
Isoleucic acid	13.7	26.8	16.1	22.4	<u>13.7</u>
Valic acid	15.9	<u>15.9</u>	10.2	—	—

下線：一致。 詳細な分析条件は実験項を参照。

のちに Ile 残基について、L 体と *allo*-D 体との間で標品の取り違いがあったことが判明した。したがって、これらのアミノ酸の正しい保持時間は L 体: 15.2 min、*allo*-D 体: 6.4 min である。

以上の結果をもとに、maedamide の構造を **3'** のように提唱した (Figure 2-15)。

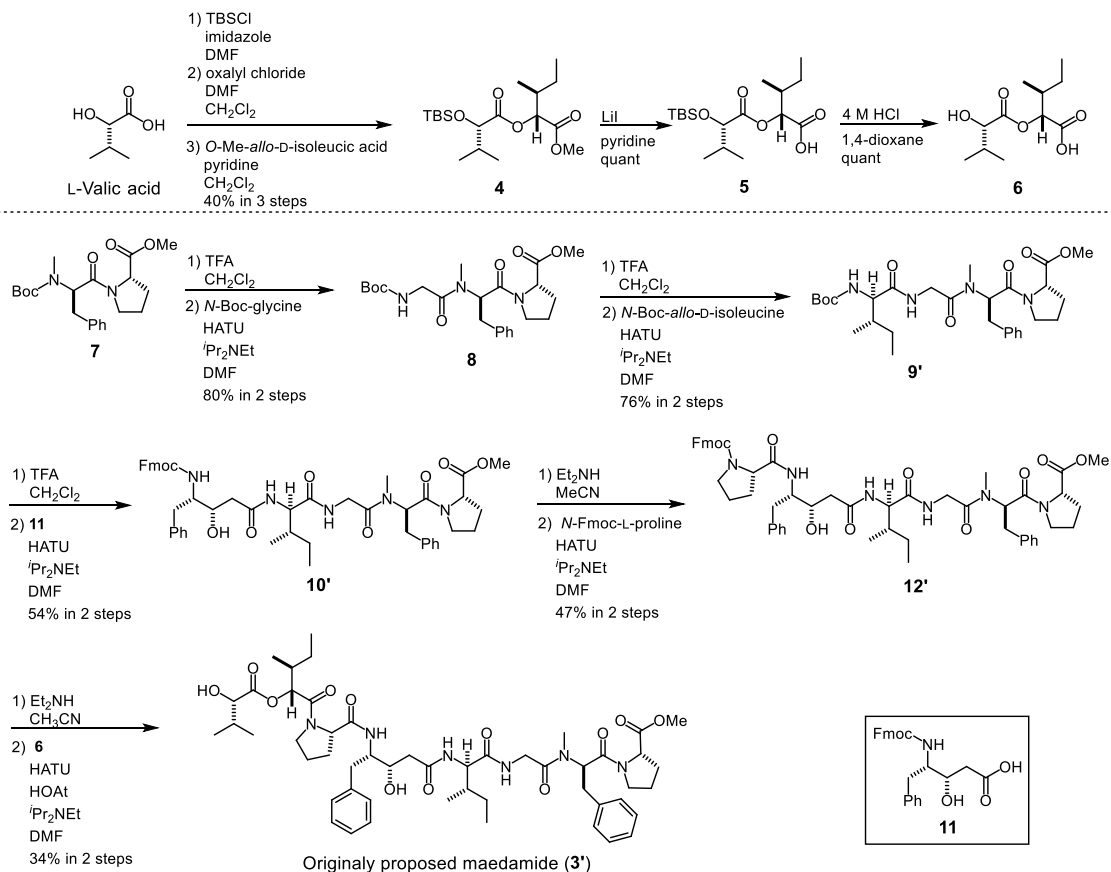


Originally proposed structure (**3'**)

Figure 2-15. Maedamide の初期の提唱構造

提唱構造 **3'** の全合成と構造改訂

Maedamide の構造を確認すべく、当研究室の Takayanagi とともに提唱構造 **3'** の全合成を達成した (Scheme 2-3)。



Scheme 2-3. Maedamide 初期提唱構造 (**3'**) の全合成

L-Valic acid より、5 工程の変換によりエステル **6** を合成した。一方、既知のジペプチド **7** に対し、既知の γ アミノ酸誘導体 **11** をふくむアミノ酸 4 ユニットの縮合し、ヘキサペプチド **12'** を得た。最後にヘキサペプチド **12'** とエステル **6** を縮合し、maedamide の提唱構造 **3'** の合成を達成した (10 段階、総収率 5.2%)。

しかしながら、**3'** の NMR スペクトルデータは、maedamide のデータと一致しなかった (Figure 2-16)。

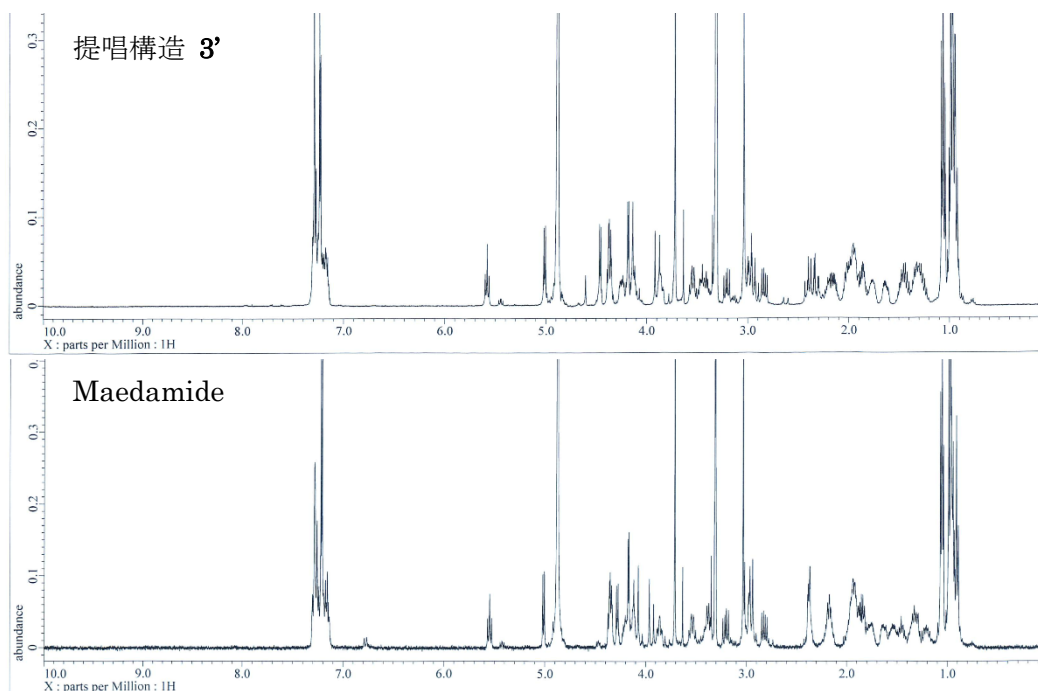


Figure 2-16. Maedamide と化合物 **3'** の ¹H NMR スペクトルの比較
(400 MHz, CD₃OD)

NMR スペクトルデータの詳細な検討を行ったところ、天然品と **3'** との化学シフトのずれは、特に Ile 周辺で大きいことがわかった。また、海洋シアノバクテリア由来の鎖状リポペプチドで、類似のアミノ酸シーケンスを有する *tasiamide* において、対応する位置の Ile の立体化学が L 体であった⁵⁶。以上の事実を踏まえ、maedamide の真の構造が **3'** における *allo*-D-Ile 残基を L-Ile 残基に置き換えた **3** であると推定した (Figure 2-17)。

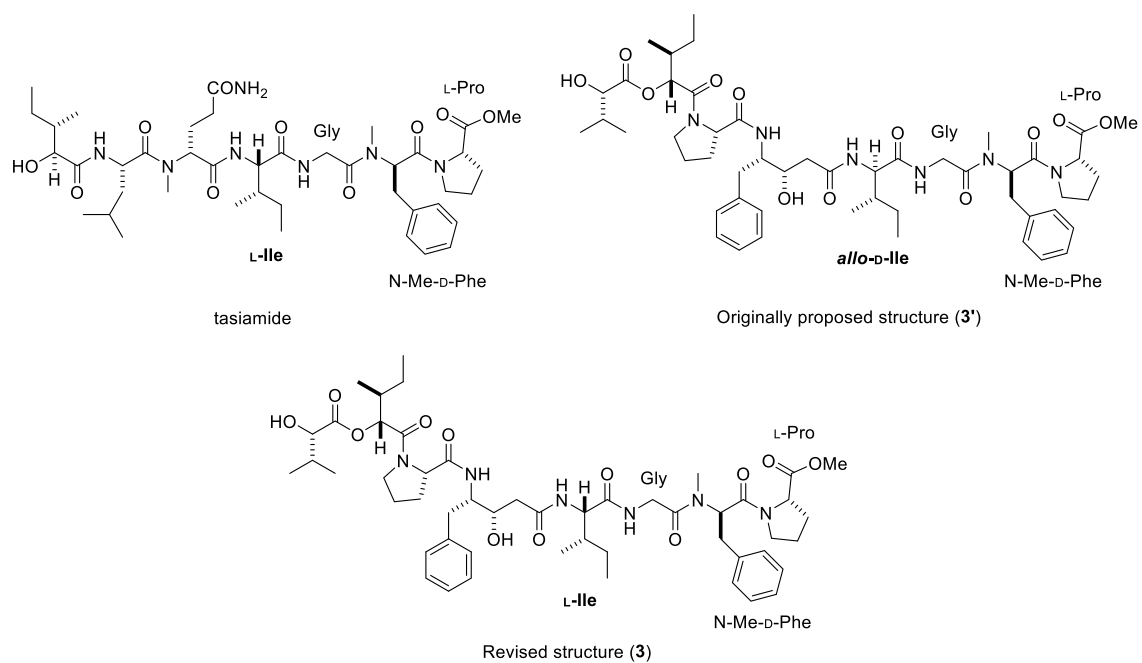
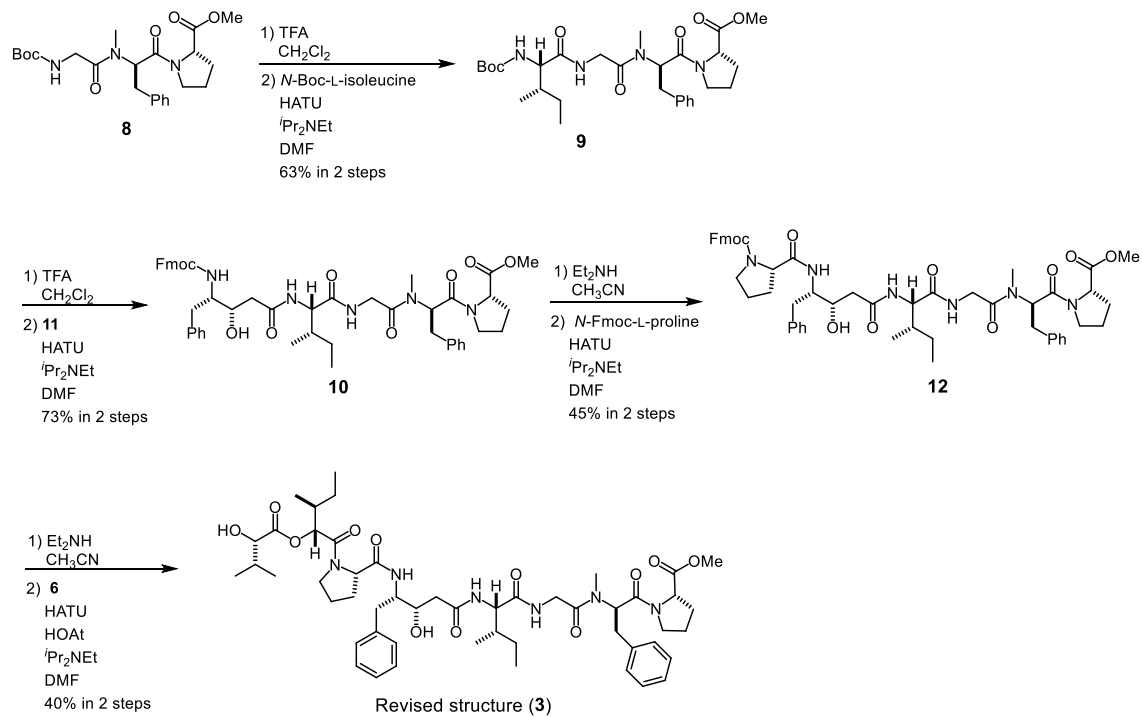


Figure 2-17. Tasiamide、maedamide 初期提唱構造 (3')、および新たな提唱構造 (3)

Maedamide の真の構造を明らかにするために、新たな提唱構造 **3** の全合成を達成した (Scheme 2-4)。



Scheme 2-4. Maedamide 新たな提唱構造 **3** の全合成

初期提唱構造 **3'** 合成時の中間体であるトリペプチド **8** に対し、Boc 保護した L-Ile を縮合してテトラペプチド **9** を得た。化合物 **9** に対し、各ユニットを縮合して新たな提唱構造 **3** を合成した (10 段階、総収率 6.6%、化合物 **7** より)。

合成した **3** と、maedamide の各種スペクトルデータは完全に一致した (Figure 2-18)。

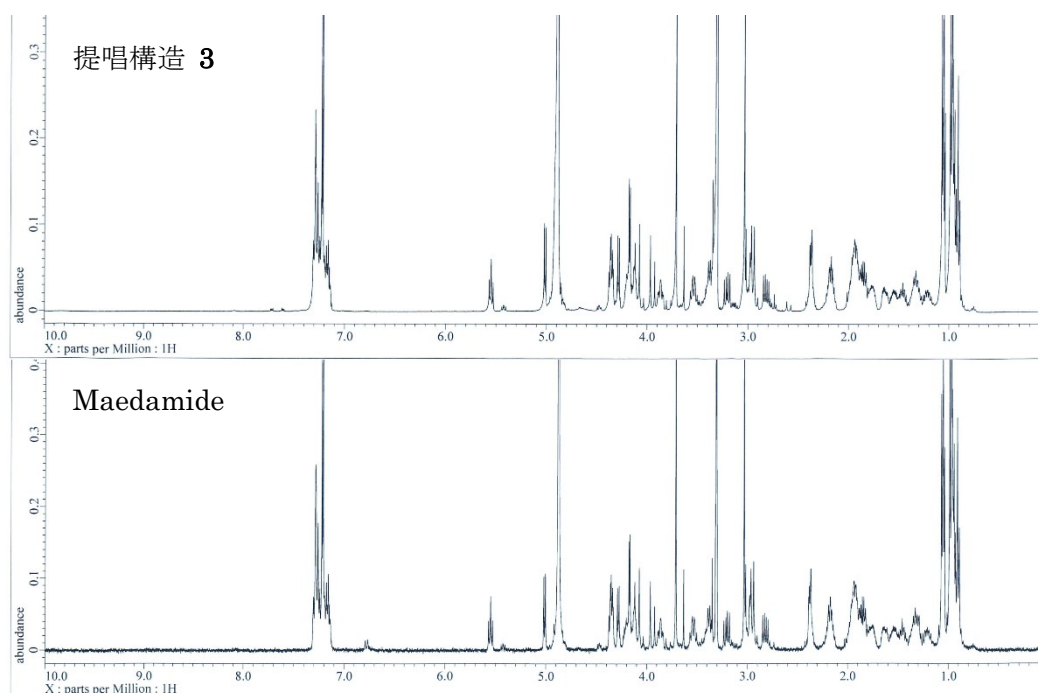


Figure 2-18. Maedamide と化合物 **3** の ^1H NMR スペクトルの比較
(400 MHz, CD_3OD)

以上の結果より、maedamide の構造が **3** であることを明らかにした。結果として maedamide (**3**) は、アミノ酸 **6** ユニット、および α ヒドロキシ酸 **2** ユニットからなる鎖状のデプシペプチドであることがわかった。また、その C 末端から 4 残基分のアミノ酸ユニットの構造は、海洋シアノバクテリア *Symploca* 属由来の鎖状ペプチド tasiamide と共通であった⁵⁶。さらに、特徴的な異常アミノ酸ユニット Ahppa は、同じく *Symploca* 属由来の鎖状ペプチド tasiamide B にも共通に含まれる部分構造であった⁵⁷。

第八節 鎖状デプシペプチド **maedamide (3)** の生物活性

Maedamide (**3**) の生物活性の評価を行った。その結果 **3** は、ヒトがん細胞に対する増殖阻害活性と HeLa 細胞に対するアポトーシス誘導活性を示すことがわかった。さらにキモトリプシンの阻害活性を有することを明らかにした。

第一項 Maedamide (**3**) のヒトがん細胞に対する増殖阻害活性の評価

Maedamide (**3**) の細胞増殖阻害活性を、MTT 法により評価した。その結果、**3** はヒトがん細胞に対して細胞増殖阻害活性を有することが明らかとなった (Table 2-13)。

Table 2-13. Maedamide (**3**) の細胞増殖阻害活性

細胞種類	50% 増殖阻害濃度 (μM)
HeLa	4.2
HL60	2.2

第二項 Maedamide (**3**) のアポトーシス誘導活性の評価

Maedamide (**3**) のアポトーシス誘導活性を、トリパンブルー色素排除試験により評価した。結果として、**3** は HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。トリパンブルー色素排除試験による評価

HeLa 細胞に対し、maedamide (**3**) を 10、100 μM の各濃度で処理し、48 時間培養した。その後、トリパンブルー色素排除試験を行い、細胞の生存率の評価を行った (Figure 2-19)。Maedamide (**3**) 単独処理時 (図中白線) には、濃度依存的に細胞の生存率が低下した。一方、50 μM の汎 caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK を共存させた場合 (図中水色線)、細胞の生存率の回復が認められた。これらの結果より、maedamide (**3**) によって引き起こされる細胞死に caspase が関与することが明らかとなった。従って、**3** は HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することがわかった。

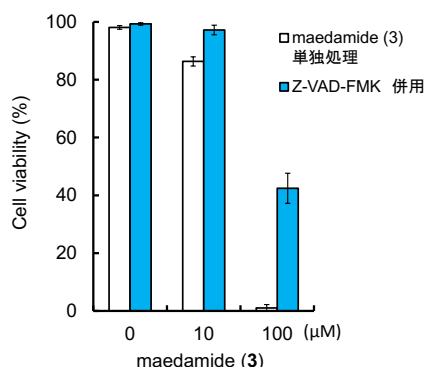


Figure 2-19. Maedamide (**3**) によるアポトーシス誘導活性の評価 (トリパンブルー色素排除試験による評価)。薬剤処理後 48 時間培養し、その後に細胞の生存率の評価を行った。白は単独処理。水色は 50 μM の Z-VAD-FMK を併用。

第三項 Maedamide (3) のセリンプロテアーゼ阻害活性の評価

Maedamide (3) の有する γ -アミノ酸 Ahppa が、たんぱく質分解酵素のアンタゴニストとなりうることを考え、セリンプロテアーゼ阻害活性の評価を行った。セリンプロテアーゼとしては、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼを選択し、ポジティブコントロールとしては、PMSF を選択した。酵素活性は、プロテアーゼによる分解反応で色素を放出する基質を用い、比色定量法を実施する事で評価した。

結果として、3 はキモトリプシンを選択的かつ強力に阻害する事がわかった (Table 2-14)。

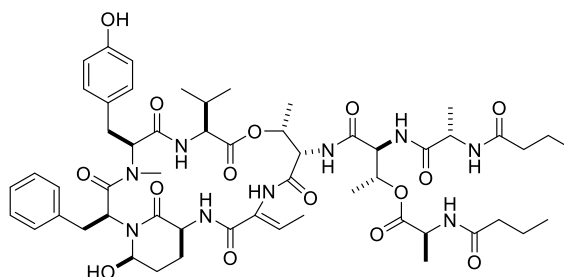
Table 2-14. Maedamide (3) のセリンプロテアーゼ阻害活性

化合物	50% 阻害濃度 (μM)		
	トリプシン	キモトリプシン	エラスターゼ
Maedamide (3)	> 1000	45	>1000
PMSF	1800	850	870

第九節 第二章の結論

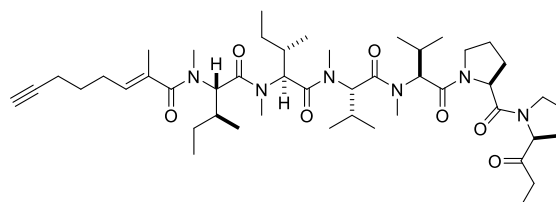
以上のように、第二章では、沖縄県久良波で採集した *Lyngbya* 属を主とするシアノバクテリア集合体より見出した 3 種の化合物、kurahamide (1)、kurahyne (2)、maedamide (3) の単離、構造決定および生物活性について述べた。

Kurahamide (1) は dolastatin 13 の新規類縁体であった。生物活性として、1 がヒトがん細胞に対して弱い増殖阻害活性を示すことを明らかにした。さらに 1 が、セリンプロテアーゼのうち、キモトリプシンとエラスターゼを強力に阻害する一方、トリプシンは阻害しないことを明らかにした。本選択性の発現要因を、構造類縁体と酵素との結合情報をもとに推定した。



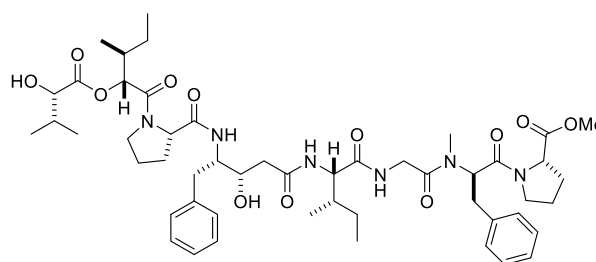
Kurahamide (1)

Kurahyne (2) は、末端アセチレンとケトン分子の両端に有する鎖状のリポペプチドであった。生物活性として、2 がヒトがん細胞に対して増殖阻害活性を示すことを明らかにした。さらに 2 が、HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することと、マウス骨髄由来マクロファージの破骨細胞への分化を阻害することを明らかにした。



Kurahyne (2)

Maedamide (3) は、アミノ酸 6 ユニット、および α ヒドロキシ酸 2 ユニットからなる鎖状のデプシペプチドであった。生物活性として、3 がヒトがん細胞に対して増殖阻害活性を示すことを明らかにした。さらに 3 が、HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することと、キモトリプシンの活性を阻害することを明らかにした。さらに 3 の全合成を達成した。

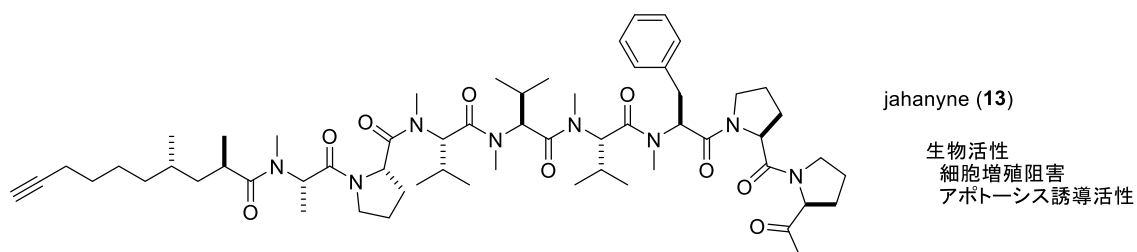


Maedamide (3)

本シアノバクテリア集合体からは、化合物 1~3 に加え、kalkipyron³⁹、yoshinone A⁴⁰、koshikalide⁴¹、grassypeptolide⁴² 類縁体が単離された。以上の結果から、本タイプのシアノバクテリア集合体が、生物活性物質生産能が高いことが明らかとなった。

第三章 沖縄県謝花で採集した *Okeania* 属シアノバクテリアより見出した jahanyne の構造と生物活性

本章では、沖縄県本部町謝花付近の海岸で採集した *Okeania* 属シアノバクテリアから見出した新規ペプチド化合物、jahanyne (13)⁵⁸ の構造と生物活性について述べる。



第一節 生物試料の採集と同定

海洋シアノバクテリアの採集は、2013年3月に沖縄県本部町謝花付近の海岸で行った (Figure 3-1)。特徴的な外見 (黒い粒状) を手掛かりとして、採集を行った。

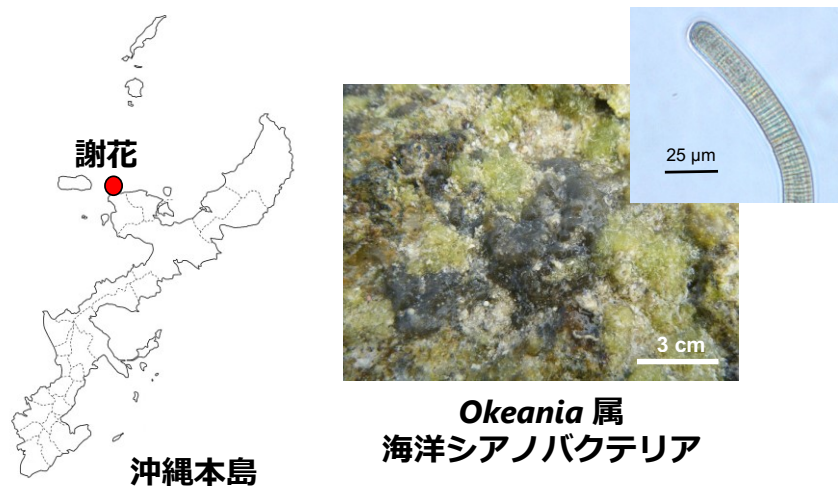
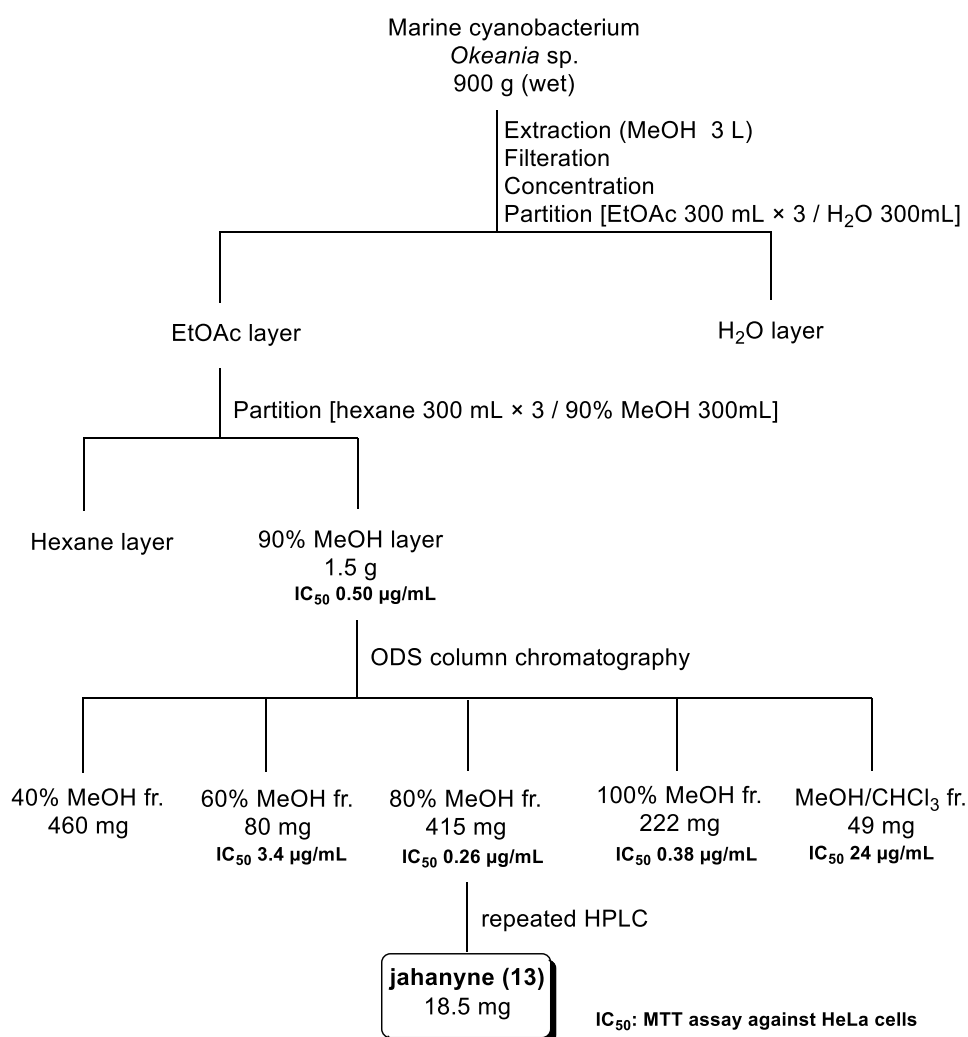


Figure 3-1. 謝花で採集した *Okeania* 属の海洋シアノバクテリア

採集したシアノバクテリアは、当初、細胞の薄さと鞘の厚みより *Lyngbya* 属であると同定された (形態観察による同定)。その後、16S rDNA の遺伝子配列 (accession No. LC089730 および LC089731) を利用した系統解析を実施した結果、本シアノバクテリアは *Okeania* 属に分類されることがわかった (第六章 Figure 6-28 および 6-29)。なお、*Okeania* 属は 2013 年に Paul らによって新たに提唱された *Lyngbya* 属の近縁属であり、*Lyngbya* 属と非常に類似した外観を有する⁵⁹。

第二節 鎖状リポペプチド jahanyne の単離

前述の *Okeania* 属シアノバクテリア集合体 900 g を MeOH で抽出し、抽出液をろ過、濃縮した。得られた MeOH 抽出物を EtOAc/水で分配し、EtOAc 層については、さらに hexane / 90% MeOH aq. で分配した。HeLa 細胞を用いた細胞増殖阻害活性試験により、90% MeOH aq. 層に活性物質が濃縮されていることがわかった ($IC_{50} = 0.50 \mu\text{g/mL}$)。そこで 90% MeOH aq. 層 (1.5 g) を、ODS カラムクロマトグラフィーによって 5 つの画分に分画した。強力な細胞増殖阻害活性が認められた 80% MeOH aq. 溶出画分について、細胞増殖阻害活性を指標とした高速液体クロマトグラフィーによる精製を繰り返した。その結果、活性物質として新規ペプチド性化合物、jahanyne (**13**, 18.5 mg) を得た (Scheme 3-1)。



Scheme 3-1. Jahanyne (13) の分離精製

なお、本シアノバクテリアからは、化合物 **13** 以外の生物活性物質として 80% MeOH aq. 溶出画分より kalkipyron³⁹、kurahyne B⁵⁴ が単離された (Figure 3-2)。合計 3 種の骨格が異なる二次代謝産物が得られた事実は、本シアノバクテリアが、高い生物活性物質生産能を持つことを示唆した。また、これらの化合物の単離、構造決定の結果、精製の過程でみとめられた細胞増殖阻害活性は、主に kalkipyron (IC₅₀ 1.0 ng/mL 以下。ただし殺細胞活性は弱い) によるものであることがわかった。したがって、以下の節で述べる化合物 **13** は、本シアノバクテリア中で最も強い細胞増殖阻害活性を示す化合物ではない。

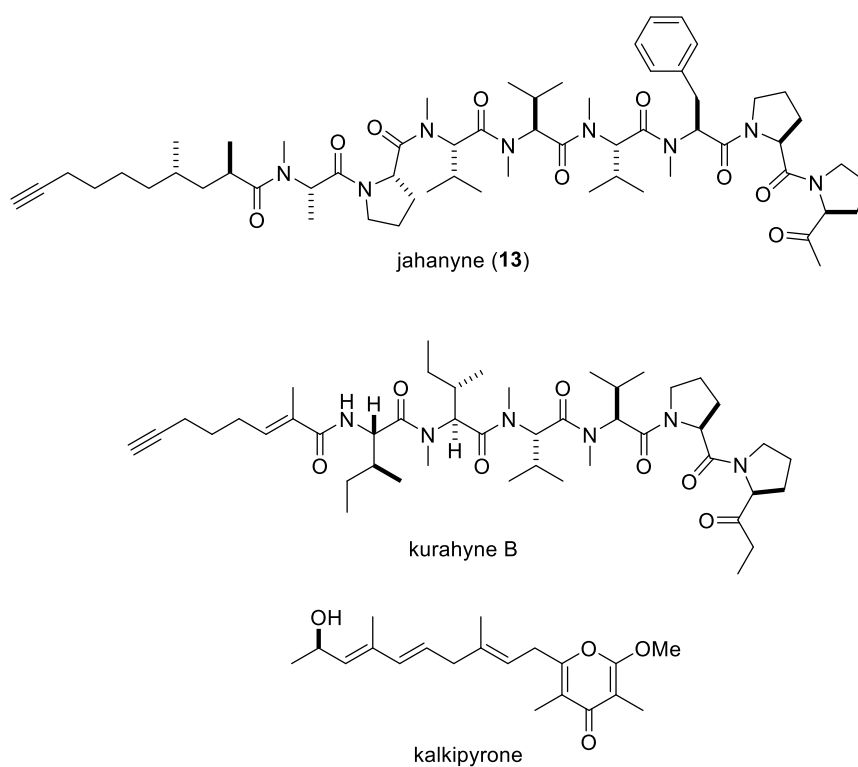


Figure 3-2. 謝花で採集した海洋シアノバクテリア集合体から得られた化合物

第三節 鎖状リポペプチド jahanyne の構造

単離した jahanyne (**13**) の構造を決定した。平面構造は、高分解能質量スペクトルと各種 NMR スペクトルの解析により決定した。絶対立体配置は、分解反応や不斉合成、HPLC を用いた分析などを組み合わせて決定した。

第一項 Jahanyne (**13**) の平面構造

Jahanyne (**13**) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{60}H_{94}N_8O_9$ であることがわかった (m/z 1093.7046, calcd for $[M+Na]^+$ 1093.7041)。

1H NMR スペクトルにおいて、3.10、3.03、2.96、2.92、2.14 ppm に観測されたメチル水素のシグナルより、窒素原子に結合するメチル基が 5 つ存在することが推定された。また、5.88、5.30、5.06、5.03、4.93、4.84、4.72 ppm に観測されたアミノ酸 α 位のメチン水素と考えられるシグナルより、7 つのアミノ酸残基の存在が推定された。さらに 7.22-7.29 ppm に観測された 5H 分のシグナルより、Phe 残基がひとつ存在することが推定された。また、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、208.3、179.3、174.7、172.5、172.1、171.8、171.1、170.9、170.5 ppm に観測されたシグナルより、jahanyne (**13**) がカルボニル基を多数有することが推定された。以上の情報をもとに、**13** をペプチド性の化合物であると推定した。

これらに加え、COSY、HMBC、HMQC、NOESY スペクトルの詳細な解析を通じて、**13** の平面構造を決定した (Figure 3-3, Table 3-1)。

はじめに各種スペクトル (第六章 Figure 6-30~35) の解析を通じて、**13** に含まれる 7 個のアミノ酸残基 (3 つの *N*-Me-Val、2 つの Pro、1 つの *N*-Me-Phe および 1 つの *N*-Me-Ala) の存在を明らかにした。また、208.3 ppm に観測された炭素に対する HMBC スペクトルの相関と、その周辺の構造解析を行った結果、2-(1-oxo-ethyl)-pyrrolidine (Oep) 部位の存在が明らかとなった。さらに、85.0 および 69.6 ppm に観測された炭素、ならびに 2.19 ppm に観測された水素の周辺の構造解析を行った結果、2,4-dimethyldec-9-ynoic acid (Fatty acid) 部位の存在が明らかになった。

これらの部分構造のシークエンスは、HMBC および NOESY スペクトルの解析を組み合わせ決定した。HMBC スペクトルにおいて、以下に示す 5 つの相関が観測された：*N*-Me-Ala の *N*-Me (δ 3.03) / Fatty acid の C-1 (δ 179.3)、*N*-Me-Val-3 の *N*-Me (δ 3.10) / Pro-2 の C-1 (δ 174.7)、*N*-Me-Val-2 の *N*-Me (δ 2.92) / *N*-Me-Val-3 の C-1 (δ 172.1)、*N*-Me-Val-1 の *N*-Me (δ 2.14) / *N*-Me-Val-2 の C-1 (δ 170.9)、*N*-Me-Phe の *N*-Me (δ 2.96) / *N*-Me-Val-1 の C-1 (δ 171.1)。また、NOESY スペクトルにおいて、以下に示す 5 つの相関が観測された：*N*-Me-Ala の H-2 (δ 5.30) / Pro-2 の H-5a (δ 3.66)、*N*-Me-Ala の H-2 (δ 5.30) / Pro-2 の H-5b (δ 3.55)、*N*-Me-Phe の H-2 (δ 5.88) / Pro-1 の H-5a (δ 3.73)、*N*-Me-Phe の H-2 (δ 5.88) / Pro-1 の H-5b (δ 3.58)、Pro-1 の H-2 (δ 4.72) / Oep の H-

6a (δ 3.84)。以上の情報をもとに、jahanyne (13) の平面構造が、Fatty acid-*N*-Me-Ala-Pro-2-*N*-Me-Val-3-*N*-Me-Val-2-*N*-Me-Val-1-*N*-Me-Phe-Pro-1-Oep であることが明らかとなった (Figure 3-3)。

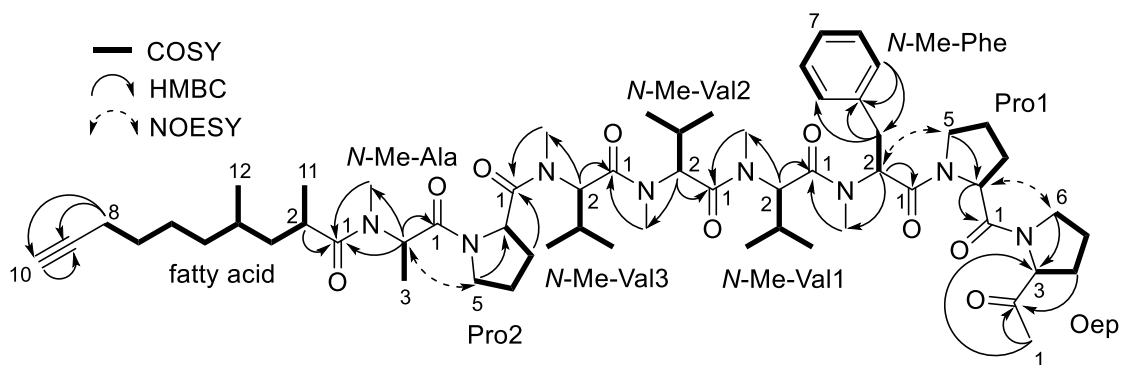


Figure 3-3. Jahanyne (13) の平面構造

Table 3-1. Jahanyne (13) の NMR スペクトルデータ (溶媒 : CD₃OD)

position	δ_C^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	HMBC (H \rightarrow C)	selected NOESY
Oep					
1	26.8	2.18, s		2, 3	
2	208.3				
3	66.8	4.61, dd (9.0, 5.0)	4a, 4b	4, 5	
4a	28.7	2.23, m	3, 4b, 5a, 5b	2, 3, 5, 6	
4b		1.90, m	3, 4a, 5a, 5b	2, 3, 5, 6	
5a	25.81 ^c	2.06, m	4a, 4b, 5b, 6a, 6b	3, 4, 6	
5b		1.96, m	4a, 4b, 5a, 6a, 6b	3, 4, 6	
6a	48.3	3.84, m	5a, 5b, 6b	3, 4, 5	2 (Pro1)
6b		3.65, m	5a, 5b, 6a	3, 4, 5	
Pro1					
1	172.5				
2	59.78 ^d	4.72, dd (9.1, 3.8)	3a, 3b	1, 3	6a (Oep)
3a	29.4	2.29, m	2a, 3b, 4a, 4b	1, 2, 5	
3b		2.02, m	2a, 3a, 4a, 4b	1, 5	
4a	25.78 ^c	2.09, m	3a, 3b, 4b, 5a, 5b	3, 5	
4b		1.96, m	3a, 3b, 4a, 5a, 5b	3, 5	
5a	48.9	3.73, m	4a, 4b, 5b	3, 4	2 (<i>N</i> -Me-Phe)
5b		3.58, m	4a, 4b, 5a	2, 3, 4	2 (<i>N</i> -Me-Phe)
<i>N</i>-Me-Phe					
1	170.5				
2	56.6	5.88, dd (11.9, 4.5)	3a, 3b	1, 3, <i>N</i> -Me	5a (Pro1), 5b (Pro1)
3a	35.1	3.10, m	2, 3b	1, 2, 4, 5/7	
3b		3.02, m	2, 3a	1, 2, 4, 5/7	
4	138.3				
5/9	130.5	7.22, m	6/8	3, 4, 9/5, 6/8, 7	
6/8	129.6	7.29, m	5/9, 7	4, 5/9, 8/6, 7	
7	128.1	7.25, m	6/8	5/9, 6/8	
<i>N</i> -Me	31.3	2.96, s		2, 1 (<i>N</i> -Me-Val1)	2 (<i>N</i> -Me-Val1)
<i>N</i>-Me-Val1					
1	171.1				
2	60.0	5.03, d (10.8)	3	1, 3, 4, 5, <i>N</i> -Me	<i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Phe)
3	28.1	2.15, m	2, 4, 5	2	
4	20.2	0.83, d (6.8)	3	2, 3, 5	
5	18.0	0.64, d (7.2)	3	2, 3, 4	
<i>N</i> -Me	30.2	2.14, s		2, 1 (<i>N</i> -Me-Val2)	2 (<i>N</i> -Me-Val2)
<i>N</i>-Me-Val2					
1	170.9				
2	59.83 ^d	4.93, d (11.1)	3	1, 3, 4, 5, <i>N</i> -Me	<i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Val1)
3	28.2	2.31, m	2, 4, 5	2	
4	20.4	0.87, d (6.8)	3	2, 3, 5	
5	18.3	0.76, d (6.8)	3	2, 3, 4	
<i>N</i> -Me	30.9	2.92, s		2, 1 (<i>N</i> -Me-Val3)	2 (<i>N</i> -Me-Val3)
<i>N</i>-Me-Val3					
1	172.1				
2	60.0	5.06, d (11.2)	3	1, 3, 4, 5, <i>N</i> -Me, 1 (Pro2)	<i>N</i> -Me (<i>N</i> -Me-Val2)
3	28.2	2.32, m	2, 4, 5	2	
4	18.8	0.91, d (7.2)	3	2, 3, 5	
5	19.9	0.83, d (6.8)	3	2, 3, 4	
<i>N</i> -Me	30.8	3.10, s		2, 1 (Pro2)	

Pro2					
1	174.7				
2	58.8	4.84, dd (8.9, 4.3)	3a, 3b	3	
3a	29.8	2.26, m	2a, 3b, 4a, 4b	1, 2, 4, 5	
3b		1.72, m	2a, 3a, 4a, 4b	1	
4a	25.78 ^c	2.04, m	3a, 3b, 4b, 5a, 5b	2, 5	
4b		1.97, m	3a, 3b, 4a, 5a, 5b	2, 3, 5	
5a	48.4	3.66, m	4a, 4b, 5b	2, 3, 4	2 (<i>N</i> -Me-Ala)
5b		3.55, m	4a, 4b, 5a	2, 3, 4	2 (<i>N</i> -Me-Ala)
<i>N</i> -Me-Ala					
1	171.8				
2	52.6	5.30, q (7.4)	3	1, 3, <i>N</i> -Me, 1 (Fatty acid)	5a (Pro2), 5b (Pro2)
3	14.2	1.27, d (7.4)	2	1, 2	
<i>N</i> -Me	31.4	3.03, s		2, 1 (Fatty acid)	
Fatty acid					
1	179.3				
2	34.8	2.95, m	3a, 3b, 11	1, 3, 4, 11	
3a	42.5	1.52, m	2, 3b, 4	1, 2, 4, 5, 11, 12	
3b		1.30, m	2, 3a, 4	1, 2, 4, 5, 11, 12	
4	31.8	1.43, m	3a, 3b, 5a, 5b, 12	3, 5, 12	
5a	37.5	1.33, m	4, 5b, 6a		
5b		1.12, m	4, 5a, 6a, 6b		
6a	27.1	1.48, m	5a, 5b, 6b		
6b		1.33, m	5b, 6a, 7		
7	29.8	1.48, m	6b, 8		
8	18.9	2.17, m	7	6, 7, 9, 10	
9	85.0				
10	69.6	2.19, m		9	
11	17.8	1.07, d (6.8)	2	1, 2, 3	
12	20.1	0.89, d (6.4)	4	3, 4, 5	

^a Measured at 100 MHz. ^b Measured at 400 MHz. ^{c, d} These carbon signals are interchangeable, respectively.

第二項 Jahanyne (13) の絶対立体配置

Jahanyne (13) の絶対立体配置を決定した。すべてのアミノ酸ユニットの立体配置は、13 の酸加水分解物を各アミノ酸へと分取し、キラルカラムにおける保持時間を標品と比較することを通じて決定した。

Oep 部の絶対立体配置は、

(i) 誘導反応と酸加水分解を利用し、13 の Oep 部由来のアルコールを単離

(ii) 別途合成した標品と、(i) で得たアルコールとの HPLC における保持時間の比較を組み合わせて解明した。

脂肪酸部に含まれる 2 箇所の不斉点の絶対立体配置は、

(i) 誘導反応と酸加水分解を利用し、13 に含まれる脂肪酸を単離

(ii) 単離した脂肪酸に PGME 法⁶⁰を適用し、2 位の絶対立体配置を決定

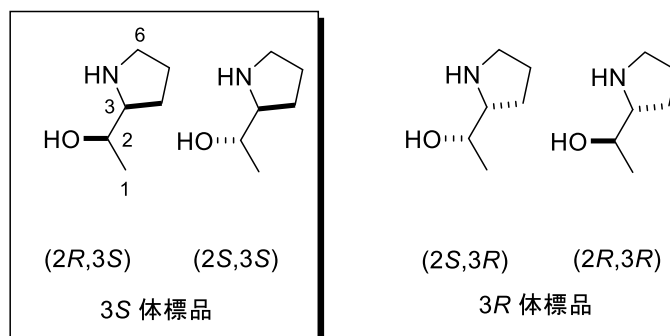
(iii) ¹H NMR の化学シフトに基づき、2 箇所の不斉点同士の相対立体配置を予測

(iv) 上記の予測を基に、脂肪酸部標品の不斉合成を行い、天然品由来物とスペクトルデータを比較

を組み合わせて解明した。

Oep ユニットの立体化学の決定

Oep 部位の絶対立体配置を決定するために、jahanyne (13) を加水分解して Oep ユニットの得る事を試みた。酸加水分解条件下で、ケトンの α 位の不斉点がエピ化することが予想されたため、まず NaBH₄ を用いて 13 のケトンアルコールに還元した。このものを 9 M HCl 中、110 °C 下で 24 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。逆相 HPLC を用いて精製を行い、Oep 部位由来のアルコールをジアステレオマー混合物として得た。得られた天然由来アルコールを L-FDLA を用いて Marfey 誘導体とし、逆相カラムにおける保持時間を別途合成した標品の Marfey 誘導体と比較した⁴⁵。結果として、13 由来のアルコールの Marfey 誘導体は、3*S* の立体化学を持つ標品と保持時間が一致した (Figure 3-4、Table 3-2)。以上の結果をもとに、Oep 部の絶対立体配置を 3*S* と決定した。



天然由来物と一致

Figure 3-4. Oep 由来アルコール標品の構造

Table 3-2. Oep 由来アルコールの Marfey 誘導体の HPLC における保持時間

化合物 (13) 由来物 保持時間 (min)	3 <i>S</i> 体標品 保持時間 (min)	3 <i>R</i> 体標品 保持時間 (min)
8.1	<u>8.1</u>	9.6
8.8	<u>8.8</u>	10.3

下線：一致。

詳細な分析条件は実験項を参照。

アミノ酸ユニットの立体化学の決定

各アミノ酸ユニットの絶対立体配置を決定するために、jahanyne (13) を 9 M HCl 中、110 °C 下で 24 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。酸加水分解物を、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸へと分離し、それぞれキラルカラムを用いて保持時間を分析した。得られた保持時間を標品と比較し、各アミノ酸ユニットの絶対立体配置を決定した。キラルカラムにほとんど保持されなかった *N*-Me-Ala については、Marfey 誘導体に誘導し、逆相カラムにおける保持時間を別途調製した標品の Marfey 誘導体と比較することで、絶対立体配置を決定した⁴⁵。結果として、すべてのアミノ酸部は L 体からなることが明らかとなった (Table 3-3)。

Table 3-3. Jahanyne (13) の構成アミノ酸の絶対立体配置

アミノ酸 種類	化合物 (1) 由来 保持時間 (min)	L 体標品 保持時間 (min)	D 体標品 保持時間 (min)
<i>N</i> -Me-Ala	6.0	<u>6.0</u>	9.4
Pro	5.6	<u>5.6</u>	3.0
<i>N</i> -Me-Val	4.5	<u>4.5</u>	3.0
<i>N</i> -Me-Phe	13.1	<u>13.1</u>	11.8

下線：一致。 各アミノ酸の詳細な分析条件は実験項を参照。

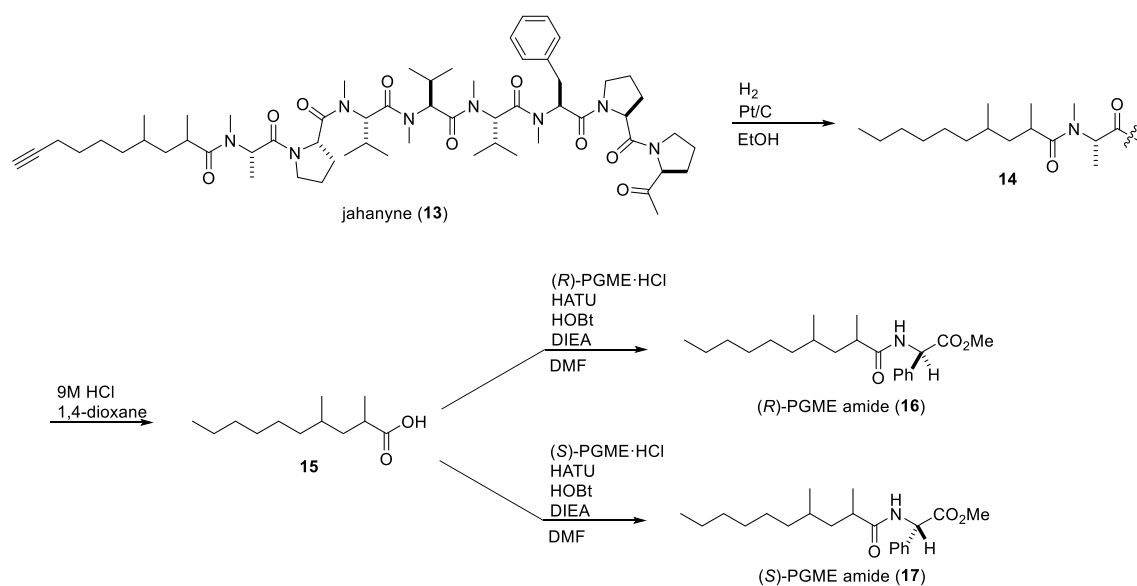
脂肪酸部の立体化学の決定

(i) 脂肪酸部の単離

Jahanyne (13) の脂肪酸部を単離した。酸加水分解にあたり、末端アルキンの高い反応性が収率の低下を引き起こすことが予測された。そこで水素雰囲気下、白金-炭素触媒を用いて末端アルキンをアルカンへと還元し、還元体 14 を得た。次に 4.5 M HCl 中、50 °C 下で 9 時間攪拌し、酸加水分解物を調製した。得られた酸加水分解物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、jahanyne (13) 由来の脂肪酸 15 を得た (Scheme 3-2)。

(ii) PGME 法による 2 位の絶対立体配置の決定

得られた脂肪酸 **15** に対し、PGME 法を適用した。*(R)* および *(S)*-PGME とそれぞれ縮合し、対応するアミド (**16** および **17**) を得た (Scheme 3-2)。¹H NMR における両化合物の化学シフトの差より、脂肪酸部の 2 位の絶対立体配置を *R* であると決定した⁶⁰ (Figure 3-5)。



Scheme 3-2. *(R)* および *(S)*-PGME amide の調製

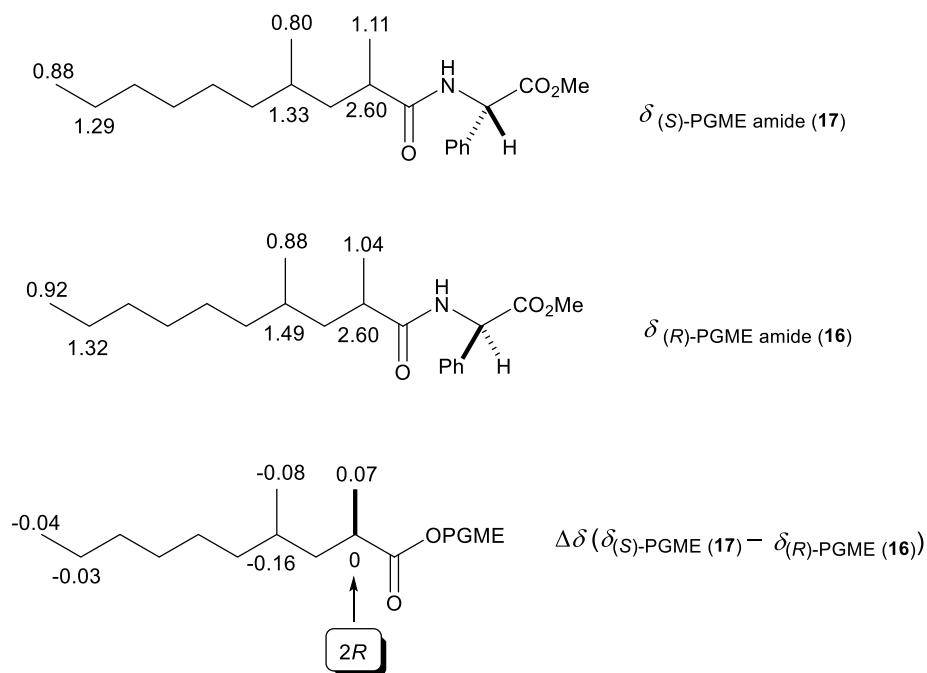


Figure 3-5. PGME 法による脂肪酸部 2 位の絶対立体配置の決定

(iii) ^1H NMR の化学シフトを用いた相対立体配置の予測

^1H NMR の化学シフトを用い、脂肪酸部の 2 か所の不斉点の相対立体配置を予測した。Schmidt らにより、1,3-dimethyl 構造を有するアルキル鎖の相対立体配置は、両メチル基に挟まれる 2 つのメチレン水素の化学シフトの差によって予測できることが報告されている⁶¹。例えばアミド基の α 位と γ 位にメチル基を有する基質において、両メチル基が *anti* の関係にある場合、 $\Delta\delta$ 値は 0.2~0.3 ppm、*syn* の関係にある場合は、0.7~0.8 ppm となる。Jahanyne (**13**) において、脂肪酸部 3 位の両メチレン水素の化学シフトの差は 0.22 ppm であった。以上の結果より、**13** の脂肪酸部の両メチル基の相対立体配置は *anti* であると予測した。さらに、2 位の絶対立体配置が *R* であることから、その絶対立体配置が *2R,4S* であると予測した (Figure 3-6)。

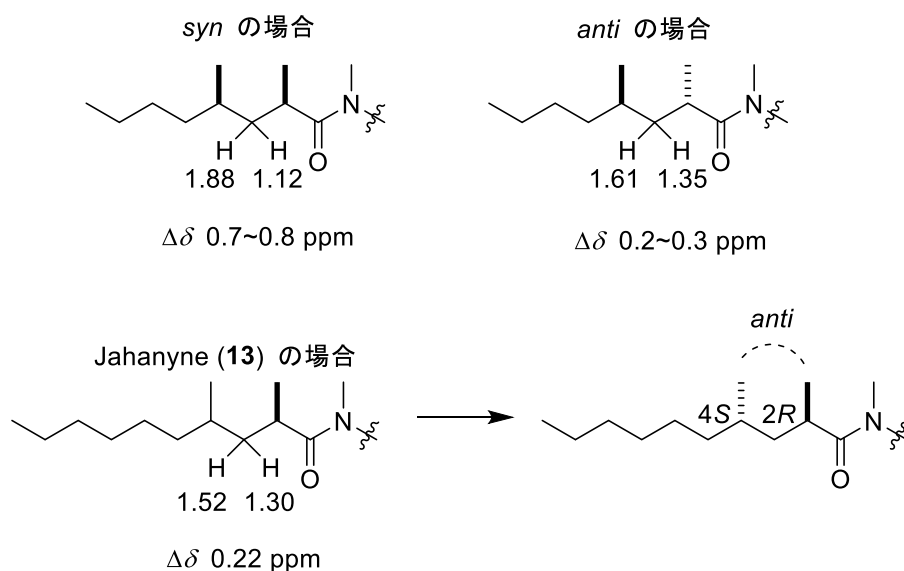
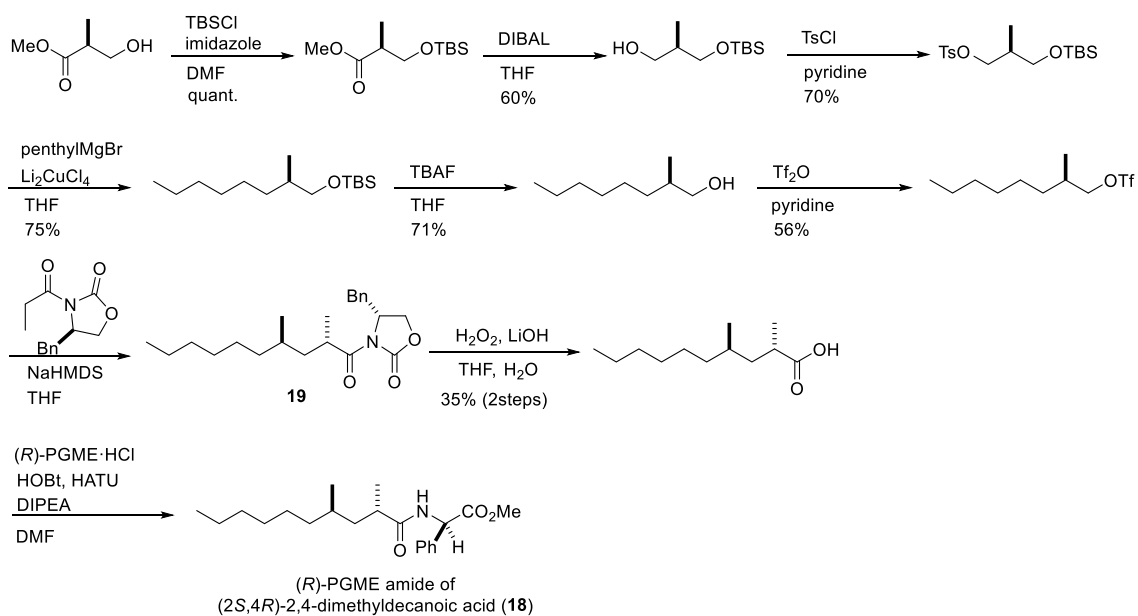


Figure 3-6. ^1H NMR の化学シフトに基づく脂肪酸部相対立体配置の予測

(iv) 脂肪酸部標品の不斉合成による絶対立体配置の決定

上記の予測構造を踏まえ、標品の不斉合成を行う事で脂肪酸部の絶対立体配置を確定した。具体的には (2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldecanoic acid の (*R*)-PGME amide (**18**) を合成し、その NMR スペクトルを天然由来脂肪酸の (*S*)-PGME amide **17** と比較した。前述の予測が正しければ、天然由来の **17** と合成品 **18** とがエナンチオマーの関係になるため、その NMR スペクトルは一致するはずである。

Methyl (*S*)-3-hydroxy-2-methylpropionate を出発原料とし、7 段階で既知の oxazolidinone **19**⁶² を合成した。続く不斉補助基の除去と、(*R*)-PGME との縮合により、目的の (*R*)-PGME amide **18** を合成した (Scheme 3-3)。



Scheme 3-3. (2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldecanoic acid の (R)-PGME アミド (**18**) の合成

合成した (R)-PGME amide (**18**) の ^1H NMR スペクトルは、天然由来の (S)-PGME amide (**17**) と一致した (Figure 3-7)。以上の結果より、jahanyne (**13**) の脂肪酸部の絶対立体配置を 2*R*,4*S* であると決定した。

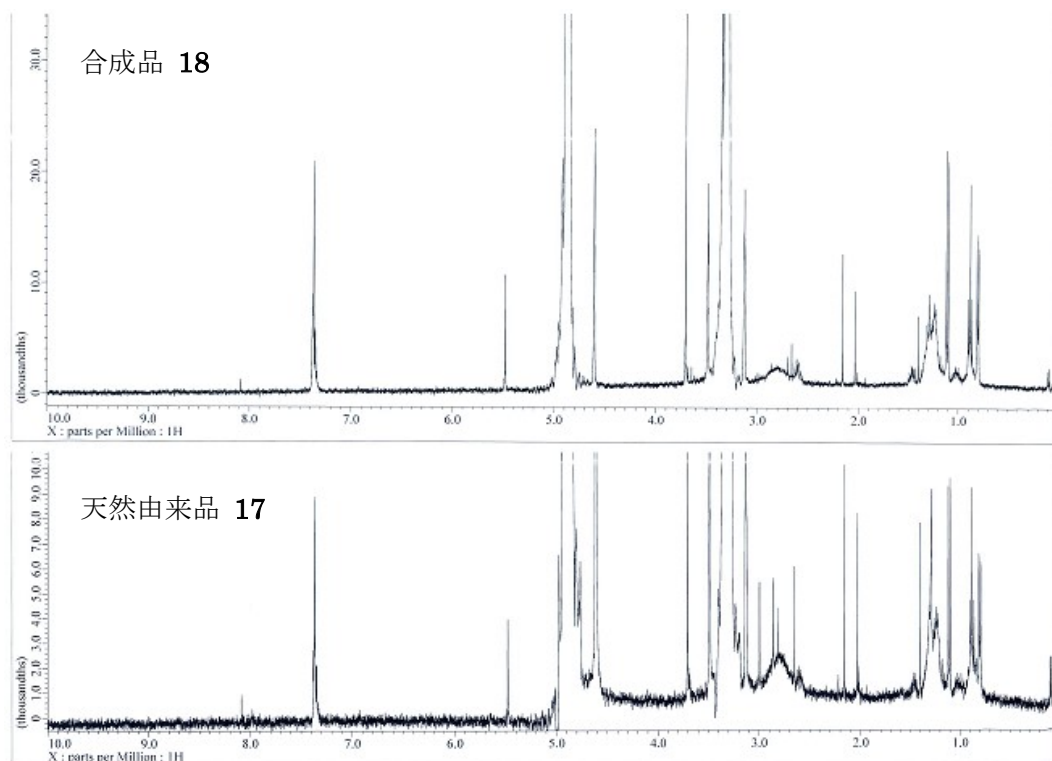


Figure 3-7. 合成 amide **18** と天然由来 amide **17** の ^1H NMR スペクトルの比較 (400 MHz, CD_3OD)

結果として、jahanyne (13) の絶対立体配置を Figure 3-8 に示すように決定した。

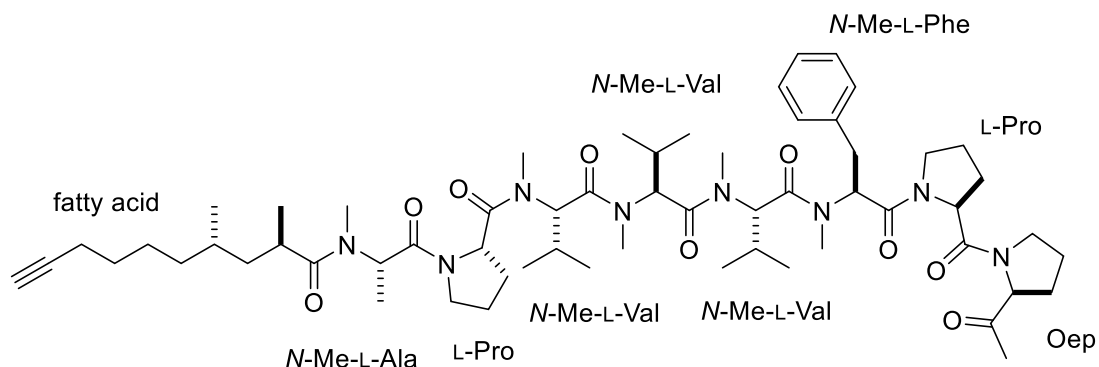


Figure 3-8. Jahanyne (13) の絶対立体配置

Jahanyne (13) は、末端アセチレンとケトンをもつ鎖状のリポペプチドであった。また、その構造は Figure 3-9 に示すように、部分的に kurahyne (2) に似ている部分があった（ケトンを含む側鎖をもつピロリジン環や、脂肪酸の末端に存在するアセチレンなど）。

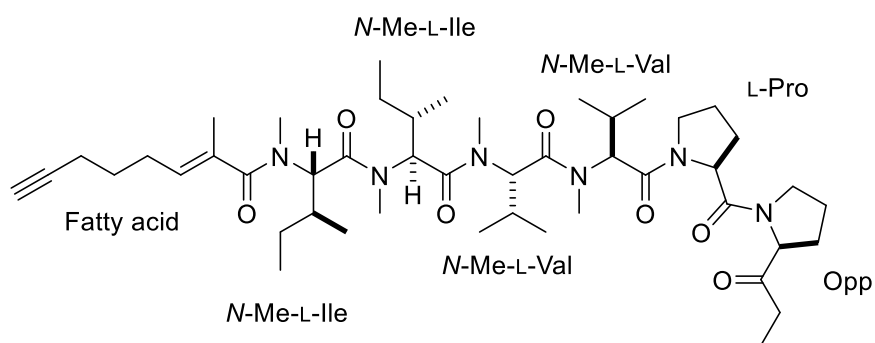


Figure 3-9. Kurahyne (2) の絶対立体配置

第四節 鎖状リポペプチド jahanyne の生物活性

Jahanyne (13) の生物活性の評価を行った。その結果 13 は、ヒトがん細胞に対する増殖阻害活性と HeLa 細胞に対するアポトーシス誘導活性を有することがわかった。

第一項 Jahanyne (13) のヒトがん細胞に対する増殖阻害活性の評価

Jahanyne (13) の細胞増殖阻害活性を、MTT 法により評価した。その結果、13 はヒトがん細胞に対して細胞増殖阻害活性を有することが明らかとなった (Table 3-4)。

Table 3-4. Jahanyne (13) の細胞増殖阻害活性

細胞種類	50% 増殖阻害濃度 (μM)
HeLa	1.8
HL60	0.63

第二項 Jahanyne (13) のアポトーシス誘導活性の評価

Jahanyne (13) のアポトーシス誘導活性を、トリパンブルー色素排除試験と DNA の断片化解析により評価した。結果として、13 は HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

トリパンブルー色素排除試験による評価

HeLa 細胞に対し、jahanyne (13) を 1、3、10 μM の各濃度で処理し、48 時間培養した。その後、トリパンブルー色素排除試験を行い、細胞の生存率を評価した (Figure 3-10A)。Jahanyne (13) 単独処理時 (図中白線) には、細胞増殖阻害活性を示す濃度域において、濃度依存的に細胞の生存率が低下した。一方、50 μM の caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK を共存させた場合 (図中水色線)、細胞の生存率の回復が認められた。これらの結果より、jahanyne (13) によって引き起こされる細胞死に caspase が関与することが強く示唆された。

DNA の断片化解析による評価

Kurahyne (2) (第二章第六節) と同様に、13 によるアポトーシス誘導活性を評価した。HeLa 細胞に対して jahanyne (13) を 0.1、1.0、10 μM の各濃度で処理し、24 時間培養した。その後 DNA を抽出し、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、断片化の程度を評価した (Figure 3-10B)。結果として、jahanyne (13) が濃度依存的に DNA の断片化を誘導していることを明らかにした。これらの結果より、jahanyne (13) の処理によって DNA がクロマチン単位にまで切断されたことが示唆された。

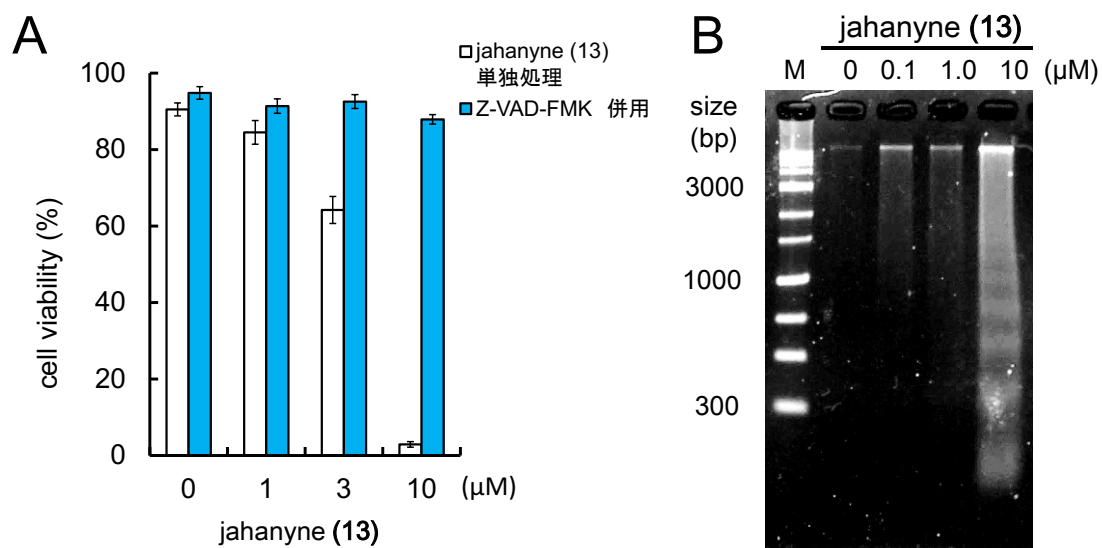


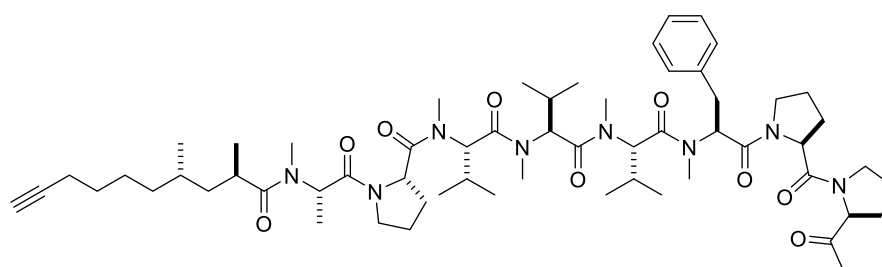
Figure 3-10. Jahanyne (13) によるアポトーシス誘導活性の評価 A) トリパンプルー色素排除試験による評価。薬剤処理後 48 時間培養し、その後に細胞の生存率の評価を行った。白は単独処理。水色は 50 μM の Z-VAD-FMK を併用。B) DNA 断片化の程度による評価。薬剤処理後 24 時間培養し、その後に DNA を抽出し、電気泳動を行った。

以上の結果をもとに、jahanyne (13) が HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導していることを明らかにした。

第五節 第三章の結論

以上のように、第三章では沖縄県謝花で採集した *Okeania* 属シアノバクテリアより見出した新規リポペプチド、jahanyne (**13**) の単離、構造決定および生物活性について述べた。

Jahanyne (**13**) は、末端アセチレンとケトンをもつ鎖状のリポペプチドであった。また、その構造は部分的に kurahyne (**2**) に似ている部分があった（ケトンを含む側鎖を有するピロリジン環や、脂肪酸の末端に存在するアセチレンなど）。生物活性として、**13** がヒトがん細胞に対して増殖阻害活性を示すことを明らかにした。さらに **13** が、HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することを明らかにした。



Jahanyne (**13**)

また、本研究を通じて、日本近海に生息する黒い粒状の *Okeania* 属海洋シアノバクテリアが、新規生物活性物質の探索源として有用であることを明らかにした。

第四章 Kurahyne の作用機序の解明

第二章で kurahyne (2) が HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することを明らかにした。Kurahyne (2) のさらなる有用性を明らかにすることを目的として、アポトーシス誘導機構の作用機序解明研究に着手した。

具体的には、以下 6 種のアッセイを実施し、2 の作用機序を解明した。

- i) ヒトがん細胞パネルスクリーニングアッセイによる作用機序予測
- ii) 小胞体ストレス誘導活性の評価
- iii) 細胞質内カルシウムイオン濃度の変動解析
- iv) 蛍光プローブを用いた細胞内局在部位の解析
- v) アフィニティー精製による生体内結合分子の推定
- vi) 小胞体膜上の Ca^{2+} -ATPase に対する阻害活性の評価

結果として kurahyne (2) は、小胞体膜上の Ca^{2+} ATPase (SERCA) を標的とし、その活性を阻害することでアポトーシスを誘導していることを明らかとした⁶³。

第一節 ヒトがん細胞パネルスクリーニングアッセイによる作用機序予測

Kurahyne (2) の作用機序に関する手がかりを得ることを目的として、公益財団法人がん研究会、矢守隆夫先生、且慎吾先生の協力の下、39 種類のヒトがん細胞パネル (JFCR39) を用いたスクリーニングアッセイを行った⁶⁴。本アッセイは、以下の手順を経る。

1. スクリーニングを行いたい化合物を用い、39 種のヒトがん細胞に対する増殖阻害活性を評価する。
2. 結果を基に、感受性プロファイルのフィンガープリントを作成する。このフィンガープリントは化合物の作用機序に基づき、特有のパターンを示す。
3. 得られたフィンガープリントを、作用機序既知の化合物のフィンガープリントと比較し、類似性の高い化合物をリストアップする。フィンガープリントの比較には COMPARE プログラムを利用し、類似性の評価には相関係数 r を用いる。
4. 相関係数 r の値をもとに、当該化合物の作用機序を予測する。
 $0.75 \leq r$ の化合物：同様の作用機序を持つことが強く示唆される。
 $0.50 \leq r < 0.75$ の化合物：同様の作用機序を持つことが示唆される。
 $r < 0.50$ の化合物：異なる作用機序を持つことが示唆される。

実際の結果を以下に示す。Kurahyne (2) を各がん細胞に処理し、個々の GI_{50} を求めた (Table 4-1)。この結果を元にフィンガープリントを作成し、作用機序既知の薬剤とフィンガープリントの類似性を比較した。その結果、既存の抗がん剤の中には $0.50 \leq r$ を示す化合物が存在しなかった。以上の結果より、2 の作用機序が既存の抗がん剤と異なることが強く示唆された。さらに、抗がん剤以外の薬剤について比較を行ったところ、既知の SERCA 阻害剤である thapsigargin (TG)⁶⁵ と cyclopiazonic acid (CPA)⁶⁶ が $r > 0.70$ を示し、作用機序の類似性が示唆された (Figure 4-1)。

これらの結果を元に、kurahyne (2) の生体内標的分子が CPA や TG と同じ SERCA であると仮説をたて、以下の実験で検証を行った。

Table 4-1. JFCR39 に対する kurahyne (2) の細胞増殖阻害活性

Type of Cancer	Cell Type	GI ₅₀ (μM) ^a	Type of Cancer	Cell Type	GI ₅₀ (μM) ^a
Breast	HBC-4	12.3	Melanoma	A549	7.24
	BSY-1	3.09		DMS273	5.50
	HBC-5	10.5		DMS114	4.90
	MCF-7	3.98		LOX-IMVI	3.89
	MDA-MB-231	4.17		Ovary	OVCAR-3
Central nervous system	U251	8.32		OVCAR-4	11.0
	SF-268	5.62		OVCAR-5	11.2
	SF-295	10.7		OVCAR-8	14.5
	SF-539	10.0		SK-OV-3	11.2
	SNB-75	14.5	Kidney	RXF-631L	5.89
	SNB-78	16.6		ACHN	13.5
	Colon	HCC2998	14.8	Stomach	St-4
KM-12		12.9	MKN1		15.1
HT-29		4.47	MKN7		7.41
HCT-15		11.5	MKN28		12.9
HCT-116		5.13	MKN45		7.94
Lung	NCI-H23	13.8		MKN74	3.72
	NCI-H226	7.24	Prostate	DU-145	13.8
	NCI-H522	2.40		PC-3	4.47
	NCI-H460	9.55			

^a GI₅₀ values were determined by the sulforhodamine B (SRB) assay.

なお SRB アッセイによる GI₅₀ は、MTT アッセイよりもやや高めに出る傾向がある⁶⁷。

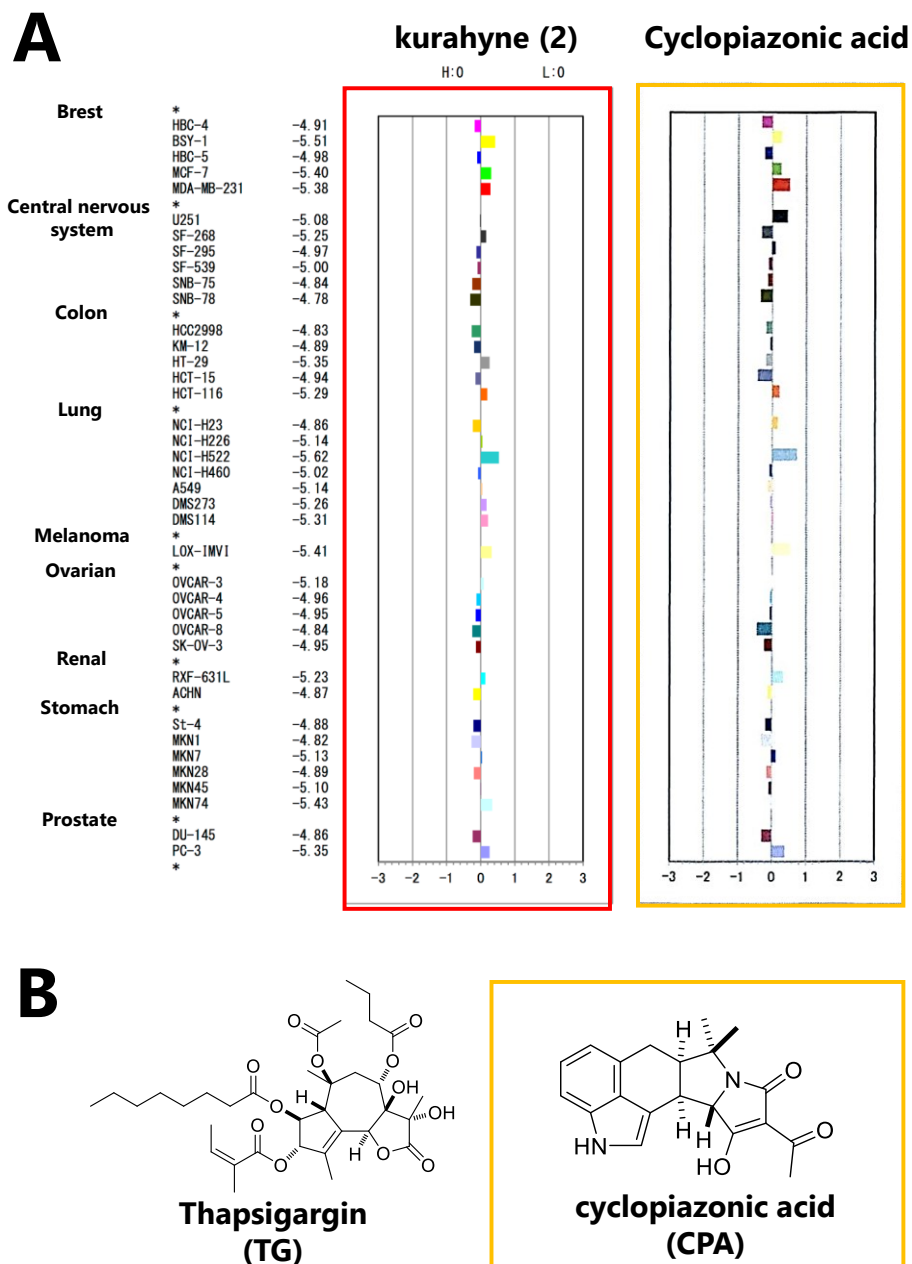


Figure 4-1. フィンガープリントを用いた kurahyne (2) の作用機序予測 A) Kurahyne (2、赤枠) と CPA (黄枠) のフィンガープリント B) Kurahyne (2) と $r > 0.70$ を示した化合物の構造式。いずれも SERCA 阻害活性を示す。

第二節 小胞体ストレス誘導活性の評価

TG および CPA が引き起こすアポトーシスは、小胞体ストレスの誘導に基づくものであることが知られている⁶⁸。以上の背景のもと、kurahyne (2) の小胞体ストレス誘導活性を評価した。

具体的には過去の文献⁶⁹にならい、分子シャペロンである binding immunoglobulin protein (BiP)、および転写因子 C/EBP homologous protein (CHOP) を小胞体ストレスマーカーとして利用し、その発現量を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて評価した。これらの小胞体ストレスマーカーは、小胞体内でのミスホールディングされたたんぱく質の蓄積に対する応答として発現するものであり、それぞれたんぱく質の正常な折り畳みの促進 (BiP) と、アポトーシスの誘導 (CHOP) に関与している。

結果として、kurahyne (2) を処理した HeLa 細胞において、BiP および CHOP の発現が確認された (Figure 4-2)。このことから、2 が小胞体ストレスを誘導する活性を持つことを明らかにした。

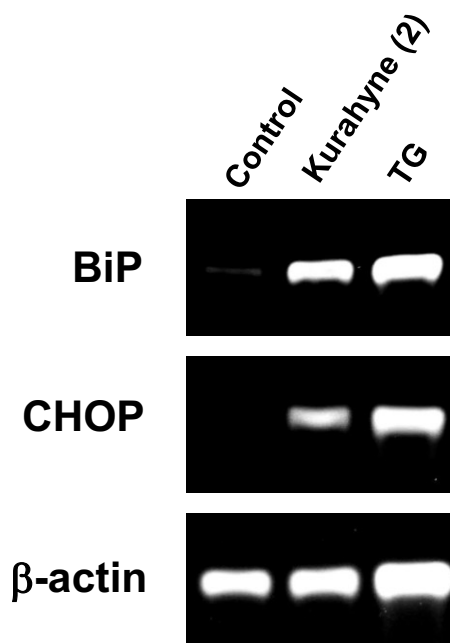


Figure 4-2. Kurahyne (2) による小胞体ストレスマーカーの発現解析

HeLa 細胞に対して kurahyne (2, 10 μ M) を処理し、6 時間培養後、RT-PCR による解析を行った。TG (1 μ M) はポジティブコントロール。

第三節 細胞質内カルシウムイオン濃度の変動解析

小胞体は細胞内で Ca^{2+} を蓄える役割を持つ。TG および CPA は小胞体膜上に存在する Ca^{2+} 流入ポンプ SERCA を阻害する。すなわち、TG および CPA を細胞に投与すると、細胞質から小胞体への Ca^{2+} 輸送が止まるため、細胞質内の Ca^{2+} 濃度が上昇する。以上の背景のもと、kurahyne (2) を処理した細胞の細胞質内 Ca^{2+} 濃度の時間変化を観察した。

実際の観察にあたっては、 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬 Fura-2 を用い、遊離時と Ca^{2+} 錯体形成時との励起波長の違いを利用して、細胞質内 Ca^{2+} 濃度を定量した⁷⁰。この際、細胞外からの Ca^{2+} 流入の可能性を否定するために、 Ca^{2+} を含まない培地を調製してアッセイを行った。結果として、kurahyne (2) は濃度依存的に細胞質内の Ca^{2+} 濃度を上昇させた (Figure 4-3)。このことから、kurahyne が小胞体からの Ca^{2+} の流出を引き起こしていることが明らかとなった。また、既知の SERCA 阻害剤 (thapsigargin および cyclopiazonic acid) と比べ、kurahyne (2) は薬剤添加後の細胞質内の Ca^{2+} 濃度の上昇がゆっくりである傾向が見られた。このことから、kurahyne (2) がこれら既知の阻害剤とは異なる様式で SERCA の活性を阻害する可能性が示唆された。

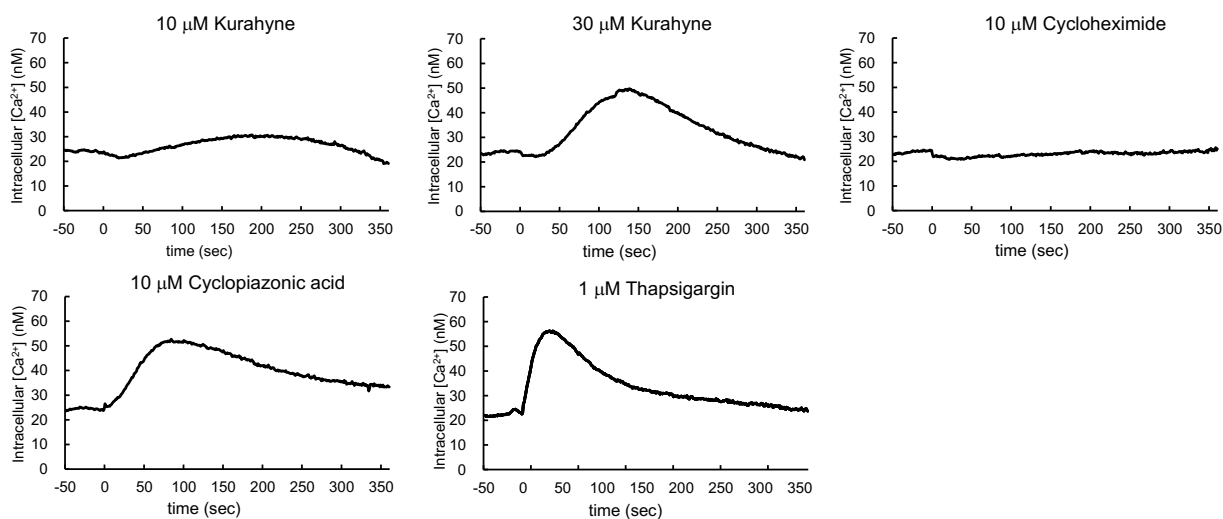


Figure 4-3. 細胞質内 Ca^{2+} 濃度の変動に与える kurahyne (2) の影響

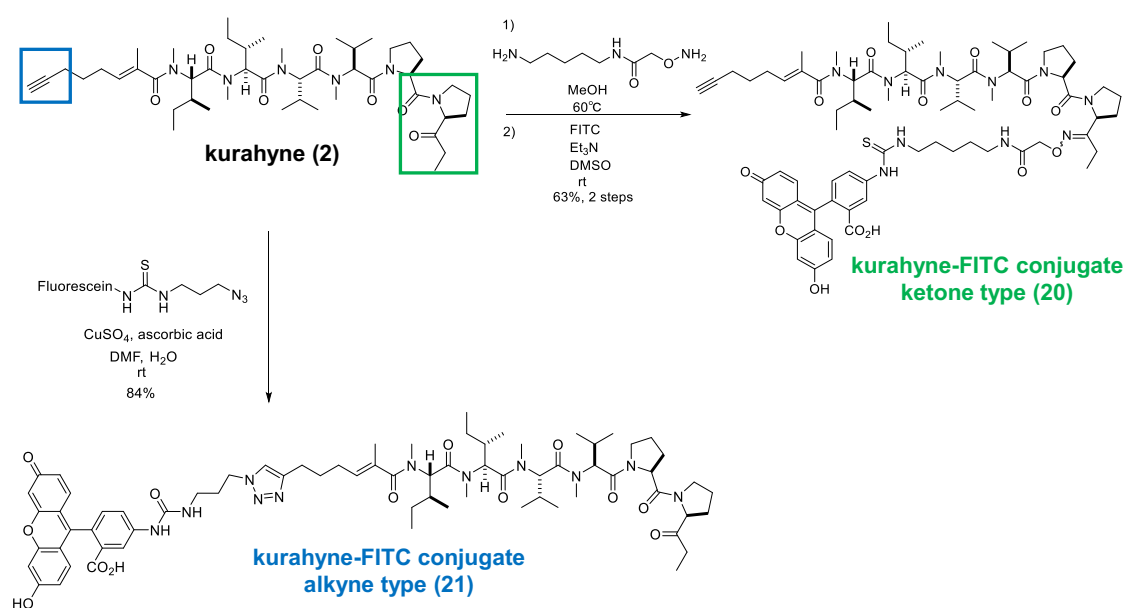
TG および CPA はポジティブコントロール。Cycloheximide (タンパク合成阻害に基づくアポトーシス誘導剤) はネガティブコントロール。いずれも $t = 0$ の時点で薬剤を添加した。

第四節 蛍光プローブを用いた細胞内局在部位の解析

TG および CPA は SERCA に直接結合してその活性を阻害することが知られている⁷¹。Kurahyne (**2**) も同様であるならば、**2** の細胞内における局在部位は小胞体であると考えられる。以上の背景のもと、**2** の蛍光プローブを合成し、細胞内の局在部位の解析を行った。

蛍光プローブの合成と生物活性の評価

Kurahyne (**2**) の蛍光プローブを合成し、生物活性の評価をした。合成にあたっては **2** の両端にそれぞれ存在する末端アセチレンとケトンをもつ基を足掛かりとして 2 種類のプローブ **20** および **21** を合成した (Scheme 4-1)。



Scheme 4-1. kurahyne 蛍光プローブ (**20** および **21**) の合成

合成したプローブの生物活性の評価を行った。MTT 法を用いて HeLa 細胞に対する増殖阻害活性の評価を行ったところ、オリジナルの kurahyne (**2**) の IC₅₀ が 3.9 μM であったのに対して、**20** の IC₅₀ が 82 μM、**21** の IC₅₀ が 59 μM であった。これらの結果から、両プローブとも細胞増殖阻害活性を保持していることがわかった。

続いて、小胞体ストレスマーカーの発現誘導活性を評価した。その結果、蛍光プローブ **21** にのみ BiP の発現誘導活性がみとめられた (Figure 4-4)。以上の結果から、蛍光プローブ **21** は kurahyne (**2**) の生物活性を保持していると考え、**21** を用いて細胞内局在部位の解析を行う事とした。

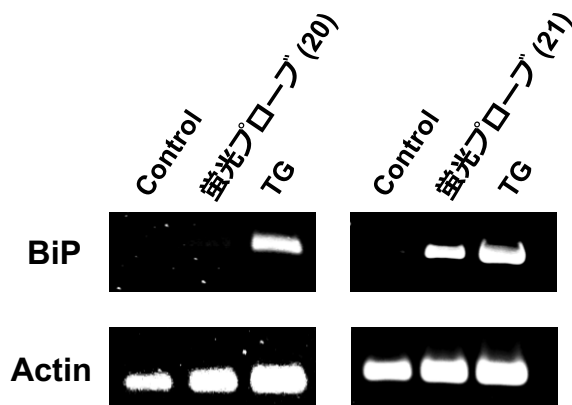


Figure 4-4. Kurahyne 蛍光プローブ **20** および **21** の小胞体ストレスマーカー発現誘導活性。HeLa 細胞に対して蛍光プローブ **20** または **21** (各 100 μ M) を処理し、6 時間培養後、RT-PCR による解析を行った。TG (1 μ M) はポジティブコントロール。

細胞内局在部位の解析

蛍光プローブ **21** を用いて細胞内局在部位の解析を行った。蛍光タンパク質 DsRed を小胞体に発現させた HeLa 細胞に対し、10 μ M の **21** を処理し、6 時間培養後に蛍光顕微鏡による観察を行った (Figure 4-5)。

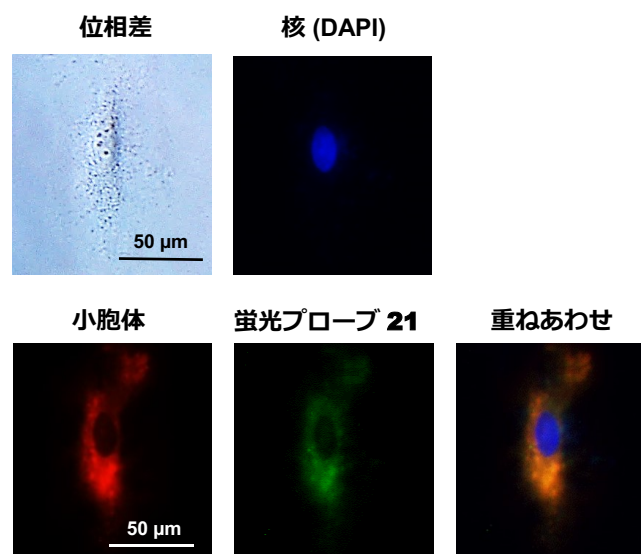


Figure 4-5. Kurahyne 蛍光プローブ **21** の細胞内局在部位の観察。蛍光タンパクを小胞体に発現させた HeLa 細胞に対して蛍光プローブ **21** (10 μ M) を処理し、6 時間培養後、蛍光顕微鏡による観察を行った。

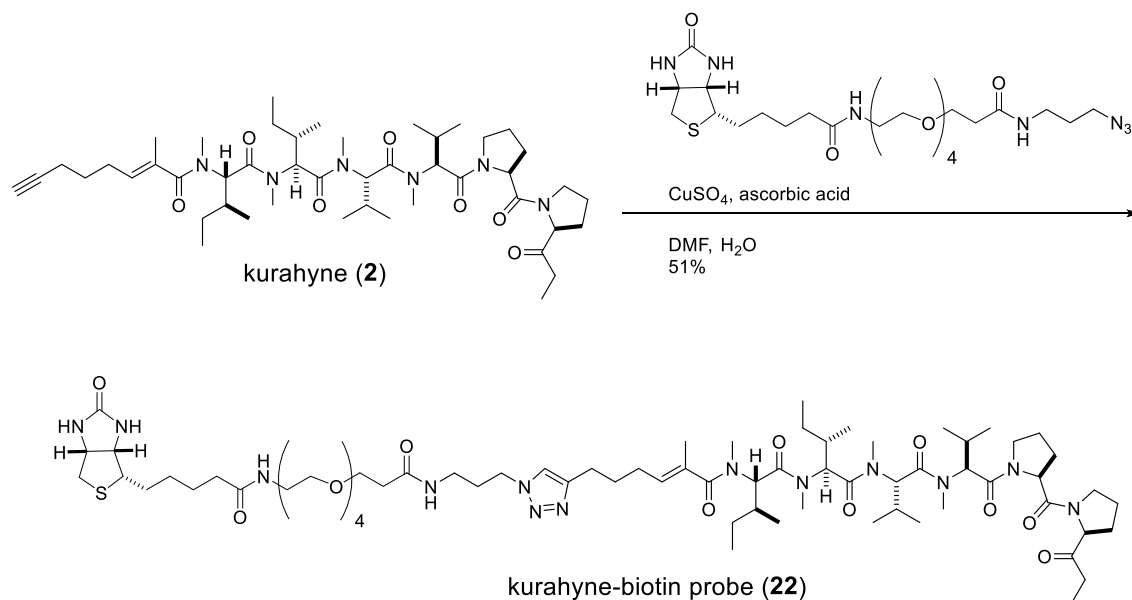
結果として、kurahyne 蛍光プローブ **21** の細胞内局在部位は、小胞体の局在部位と一致した。これらのことより kurahyne (**2**) が、細胞内において小胞体に局在することが強く示唆された。

第五節 アフィニティー精製による生体内結合分子の推定

TG および CPA は SERCA に直接結合してその活性を阻害することが知られている⁷¹。Kurahyne (**2**) も同様であるならば、**2** のプローブ分子を合成し、細胞破碎液のアフィニティー精製を行うことで、SERCA と **2** との直接的な相互作用を証明することができると考えられる。以上の背景のもと、**2** のビオチンプローブを合成し、HeLa 細胞破碎液のアフィニティー精製を行った。

ビオチンプローブの合成

Kurahyne (**2**) のビオチンプローブを合成した。設計にあたっては、蛍光プローブ作成時の構造活性相関情報を用いた。すなわち蛍光プローブ **21** が活性を保持していたことから、**2** の末端アセチレンは活性に関与しないと考えられる。そこで、末端アセチレンに対する Click 反応を用いてビオチン部を導入した (Scheme 4-2)。



Scheme 4-2. kurahyne ビオチンプローブ (**22**) の合成

Kurahyne ビオチンプローブを用いた SERCA のアフィニティー精製

ビオチンプローブ **22** を用いて SERCA のアフィニティー精製を行った。プローブ **22** を NeutrAvidin ビーズ上に固定し、HeLa 細胞の破碎液と混合した。結合タンパク質の溶出には SDS バッファーを用い、SERCA の検出には SERCA 2 抗体を用いたウェスタンブロット法を用いた。結果として、ビオチンプローブ **22** と SERCA とが結合することが明らかとなった (Figure 4-6)。このことから、kurahyne (**2**) と SERCA とが結合することが強く示唆された。

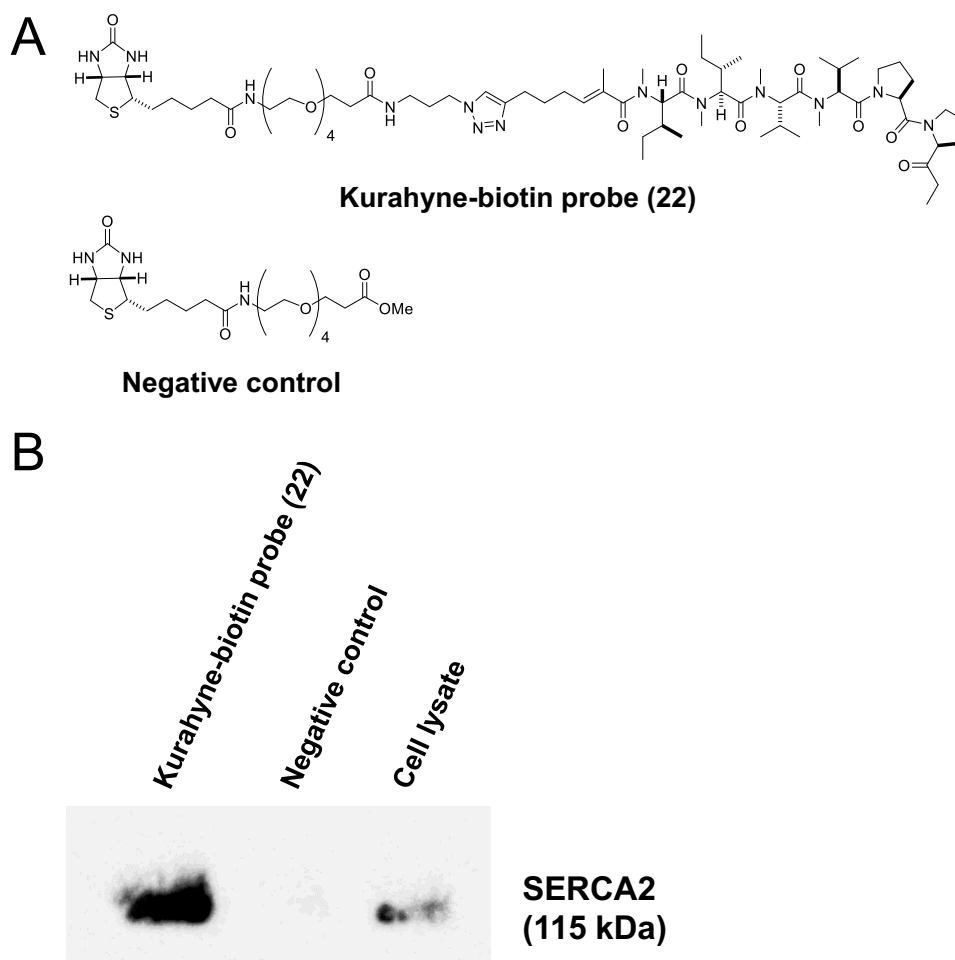


Figure 4-6. Kurahyne ビオチンプローブ (**22**) による SERCA のアフィニティー精製
A) Kurahyne ビオチンプローブ (**22**) とネガティブコントロールの構造 B) SERCA2 抗体を用いたウェスタンブロット法による SERCA の検出

第六節 小胞体膜上の Ca^{2+} -ATPase に対する阻害活性の評価

Kurahyne (2) によって、SERCA が阻害されている直接の証拠を得ることを目的として、共役酵素アッセイを用いて SERCA 阻害活性の評価を行った。SERCA は ATPase であるため、その酵素活性は ADP の生成速度に置き換えられる。生成した ADP は系中に存在する pyruvate kinase による phosphoenolpyruvate の脱リン酸化反応を進行させる。その結果生じる pyruvic acid は、同じく系中に存在する lactate dehydrogenase の基質となり、補酵素 NADH からヒドリドを受け取って lactic acid に還元される。この反応系において、SERCA の酵素活性 (=ADP の生成速度) は、NADH の減少速度に置き換えられる。したがって、NADH が吸収する 340 nm の UV の吸光度の変化を測定することで、SERCA の酵素活性を評価できる (Figure 4-7)。以上の反応系を利用して、kurahyne (2) による SERCA 阻害活性の評価を行った⁷²。なお本実験は、東京大学分子細胞生物学研究所豊島近教授の協力の下で実施された。

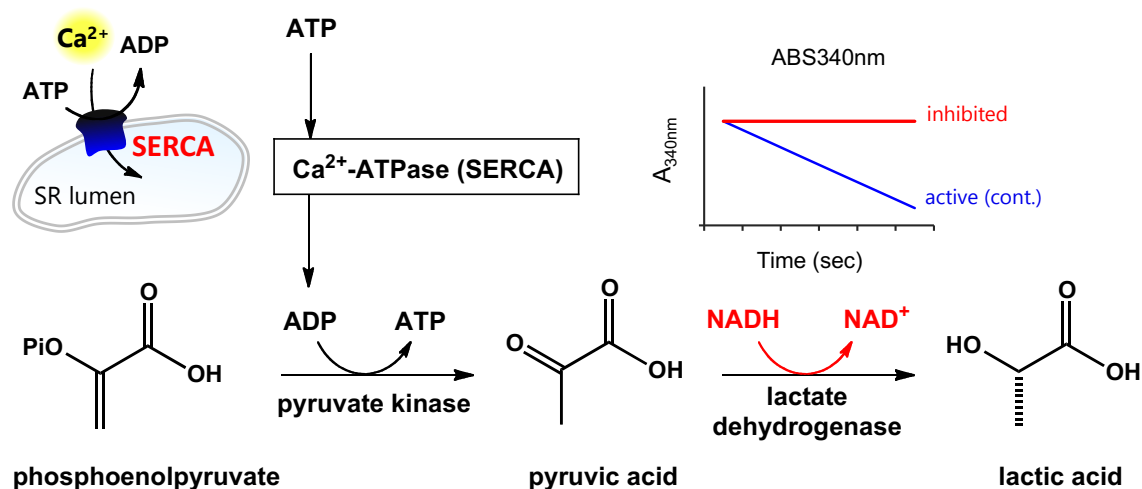


Figure 4-7. SERCA 活性評価系 (共役酵素アッセイ) の模式図

結果として、kurahyne (2) は濃度依存的に SERCA の酵素活性を阻害していることがわかった (Figure 4-8)。

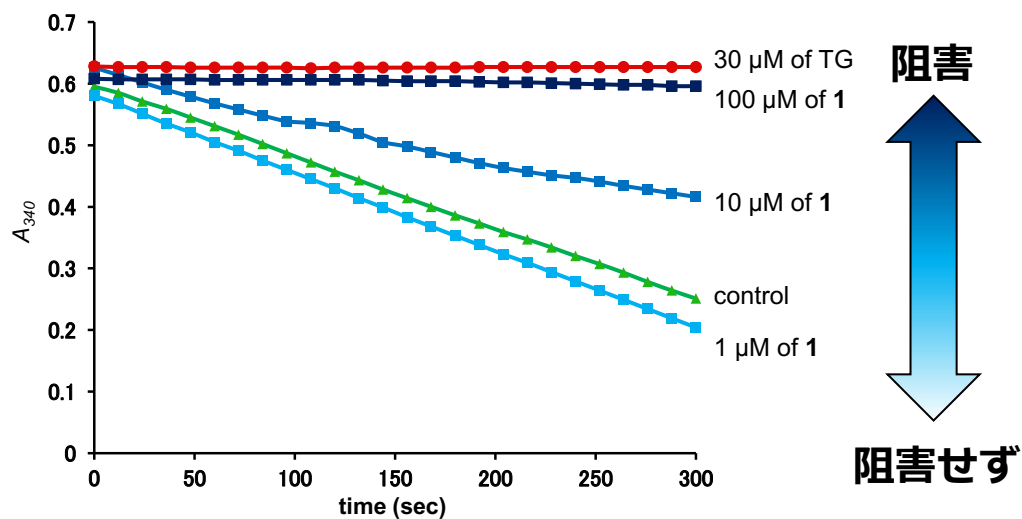


Figure 4-8. Kurahyne (2) による SERCA 阻害活性

1, 10, 100 μM の kurahyne (2) を処理。TG はポジティブコントロール。

第七節 第四章の結論

前節までの研究を元に、kurahyne (2) のアポトーシス誘導機構に関する以下 6 つの事実が得られた。

- (1) Kurahyne (2) の作用機序は既知の SERCA 阻害剤と類似すると考えられる。
(第一節より)
- (2) Kurahyne (2) は小胞体ストレスを誘導する。(第二節より)
- (3) Kurahyne (2) は小胞体からの Ca^{2+} の流出を引き起こす。(第三節より)
- (4) Kurahyne (2) は細胞内で小胞体に局在すると考えられる。(第四節より)
- (5) Kurahyne (2) は SERCA と結合すると考えられる。(第五節より)
- (6) Kurahyne (2) は SERCA の活性を阻害する。(第六節より)

これらの結果を踏まえ、kurahyne (2) の作用機序を以下の様であると解明した (Figure 4-9) :

Kurahyne (2) は小胞体膜上の Ca^{2+} ポンプである SERCA に結合し、その活性を阻害する。これによって小胞体から Ca^{2+} が流出し、小胞体ストレスが誘導される。その結果、アポトーシスが誘導され、細胞は死に至る。

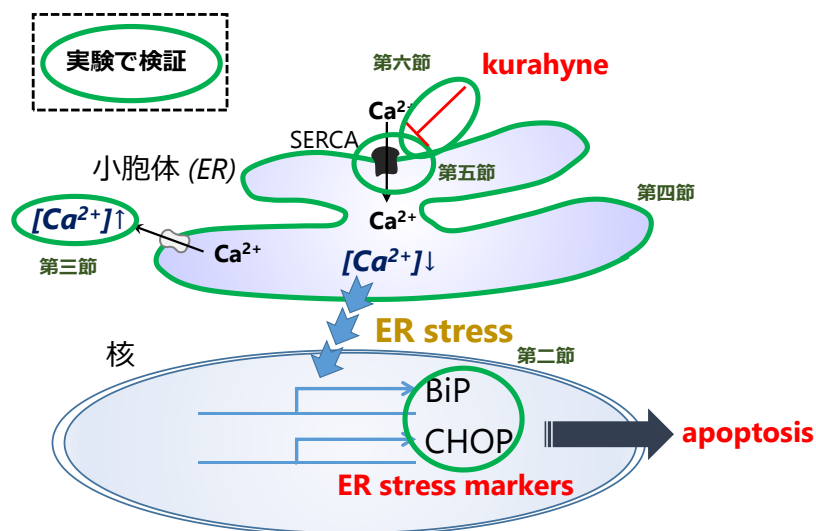


Figure 4-9. Kurahyne (2) の作用機序

SERCA が制御する Ca^{2+} は生体内におけるセカンドメッセンジャーとして重要であり、それゆえ SERCA は有望な創薬標的として注目されている。例えばある種のがんでは特定のアイソフォームの SERCA が発現することが知られており⁷³、アイソフォーム選択的な SERCA 阻害剤はがんの分子標的治療薬のリード化合物となると考えられている⁷⁴。また、熱帯性マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の SERCA 様膜タンパク PfATP6 は、抗マラリア薬の創薬標的として注目を集めている⁷⁵。さらに SERCA は生物の生存に重要なたんぱく質であるため、変異が起きにくく、薬剤耐性も生じにくいと考えられている。以上の点から SERCA は創薬ターゲットとして重要であり、実際に前立腺がんの治療薬として、thapsigargin を利用したプロドラッグが開発されている⁷⁴。

一方、SERCA を標的とする化合物としては、前述の thapsigargin⁶⁵、cyclopiazonic acid⁶⁶ に加え、これまでに biselyngbyaside²⁵、ivermectin⁷⁶、curcumin⁷⁷ などが知られている。本研究を通じて見出した kurahyne (2) の構造は、既知の SERCA 阻害剤とは全く異なり、従来の阻害剤とは違う部位に結合して SERCA の活性を阻害していることが予測される。このことは、第三節で述べた細胞質内の Ca^{2+} 濃度の変動パターンからも示唆される。新たな阻害様式の発見は、新たな創薬リードの創出を意味し、ひいては first-in-class の新薬の開発に結び付きうる。このような観点のもと、今後は kurahyne (2) と SERCA との結合部位の解明や、kurahyne (2) による SERCA 阻害活性のアイソフォーム選択性の解明が望まれる。

併せて、kurahyne (2) の人工類縁体の合成と、その構造活性相関研究に基づく、高活性構造簡略体の創出も期待される。第四節で述べた蛍光プローブの構造活性相関情報より、SERCA 阻害に重要な kurahyne (2) の部分構造は、C 末端に存在する Opp 部位周辺であることが予測される。そこで kurahyne (2) の C 末端を保存した人工類縁体の創出が重要である。前述のように、kurahyne (2) の全合成は当研究室の Okamoto らによって達成されている⁵⁴。その際、C 末端の Opp 部からアミノ酸を順次縮合していく合成戦略が採用されており、本合成ルートを流用することで、種々の人工類縁体が容易に合成できる。

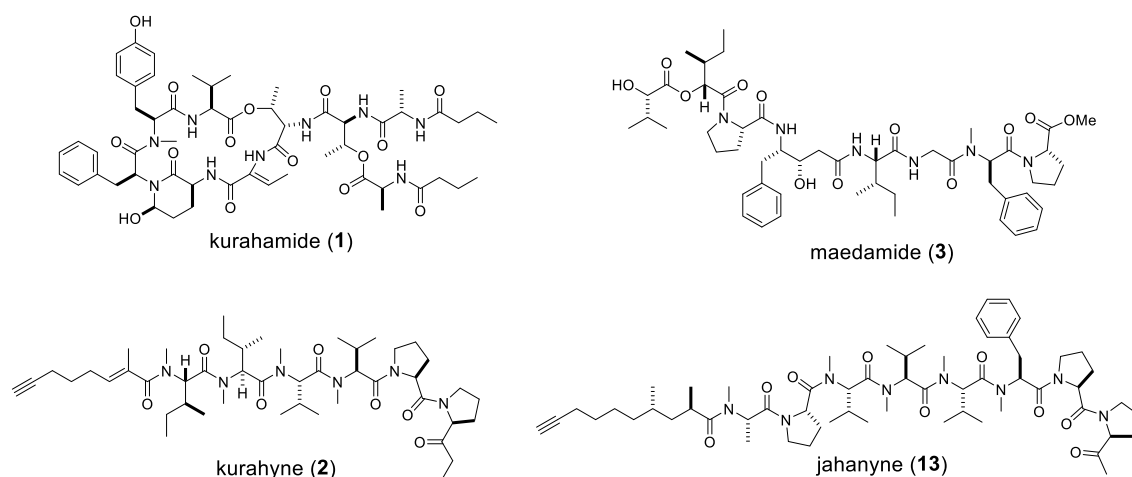
構造活性相関を明らかにする別のアプローチとして、自然界からの構造類似体の獲得があげられる。著者はすでに、kurahyne (2) の nor 体である kurahyne B⁵⁴ や、末端アルキンやケトンといった類似した官能基を有する鎖状リポペプチド jahanyne (13)⁵⁸ を発見している。これら kurahyne 類似の母骨格を有する化合物の報告はこれまでに無く、日本近海に生息するユレモ科シアノバクテリア特有の物質である可能性が考えられる。これらの化合物の詳細な生物活性の評価や、構造類似天然物のさらなる探索が望まれる。

以上のように本研究をきっかけとして、kurahyne (2) をリードとした新たな創薬研究の潮流が生じることを期待したい。

第五章 総括

特異な構造と生物活性を有する天然物の発見を通じた科学への貢献を目指して、海洋シアノバクテリアに含まれる新規生物活性物質の探索研究を行った。

結果として、沖縄本島に生息するユレモ科海洋シアノバクテリアより、これまで存在が知られていなかった 4 種の海洋天然物、kurahamide (1)、kurahyne (2)、maedamide (3)、jahanyne (13) を単離し、その構造を決定した。このうち、kurahyne (2) と jahanyne (13) については構造の新規性が高く、日本近海のユレモ科海洋シアノバクテリアの生物活性物質探索源としての有用性を明らかにした。さらに、これらの化合物がアポトーシス誘導活性を示すことや、プロテアーゼ阻害活性を示すことを見出した。特に kurahyne (2) に関しては、生体内標的分子を解明し、そのアポトーシス誘導機構を明らかにした。Kurahyne (2) がターゲットとする SERCA は、Ca²⁺ シグナリングに関わる重要な創薬標的であり、今後の詳細な研究によって、抗がん剤や抗マラリア薬開発に対する kurahyne (2) の貢献が期待される。



シアノバクテリア集合体から得られる二次代謝産物の多くは、外敵に対する防御物質と考えられている。例えば pitipeptolide A は 2001 年に Luesch らによって海洋シアノバクテリア *Lyngbya majuscula* より発見された化合物であるが⁷⁸、Paul らにより、周辺に生息する草食生物（ウニ、エビ、カニなど）に対して摂食忌避を誘導することが明らかにされた⁷⁹。この論文の中で Paul らは、シアノバクテリアがサンゴ礁域においてマット (=集合体) を形成して繁茂できるのは、草食生物に対する防御物質を保有していることと関係があるだろうと述べている。また 2010 年には Tan らによって、*Lyngbya majuscula* の生産する dolastatin 16 や majusculamide A といった化合物が、フジツボやエボシガイなどの蔓脚類の幼生に対する付着変態阻害活性を示すことが明らかにされた⁸⁰。こうした化合物は、シアノバクテリアの生存域の確保に役立っていると考えられる。

このようにシアノバクテリア集合体内では、外敵の近寄りにくい環境下で、独自の生態系が構築されていると考えられる。このような観点において、黒い粒状のシアノバクテリア集合体が形成する生態系内での、今回見出した天然物の真の生産者や役割に興味をもたれる。

本研究に関連する今後の課題については、主に以下の 3 点が存在する。

1. 日本近海のユレモ科海洋シアノバクテリアからのさらなる天然物探索

本研究を通じて、日本近海のユレモ科海洋シアノバクテリアの天然物探索源としての有用性が明らかとなった。本生物は南西諸島を中心に、日本各地の海岸に生息しており、さらなる探索研究による新規天然物の発見が望まれる。特にこれらの海洋シアノバクテリアに特有の成分と考えられる kurahyne (2) や jahanyne (13) の新たな構造類似体の発見が期待される。

2. 化合物の真の生産者の特定

本研究で見出した化合物は、海洋シアノバクテリア集合体より単離した。それゆえ集合体中のどの生物が、その真の生産者であるかについては特定できていない。共生生物の分離・培養と、ゲノム解析にもとづく生合成遺伝子クラスターの探索を通じて、化合物の真の生産者の特定が望まれる。さらに生産者の特定を足掛かりとして、これらの物質の生態系における役割の解明へとつなげていきたい。

3. Kurahyene (2) の詳細な SERCA 阻害機構の解明

SERCA 阻害剤としての kurahyne (2) の有用性を明らかにすべく、詳細な SERCA 阻害機構の解明が望まれる。具体的には、共結晶 X 線構造解析にもとづく結合部位の特定や、アイソフォーム選択性の評価があげられる。これらの解析により、既知の SERCA 阻害剤に対する kurahyne (2) の優位性が明確になる。さらに合成類縁体や、構造類似天然物の生物活性評価を通じて、詳細な構造活性相関を解明することも重要である。こうした研究を通じて kurahyne (2) の高活性構造簡略体を創成し、医薬品リード化合物へと展開していくことが期待される。特に近年、がんの異常増殖能を標的とする従来型の抗がん剤（核酸合成阻害剤 5-fluorouracil や、微小管脱重合阻害剤 paclitaxel® など）では治療効果の乏しいがんの存在が明らかとなってきた。例えばある種の前立腺がんは増殖速度が遅く、増殖能に依存せずに抗がん作用を示す薬剤の開発が望まれている⁷⁴。SERCA は細胞の生存そのものに重要な生体分子であり、SERCA を標的とする kurahyne (2) のような化合物は、こうした増殖速度の遅いがんに対する治療薬への応用が期待される。

現代の天然物化学は、周辺領域との融合が加速してきている。すなわち、単なる天然物の単離、構造決定にとどまらず、発見した天然物をツールとした生命現象の解明や、その生合成経路の探索がさかんに行われている。その一方で、研究するに値するユニークな構造や生物活性をもつ天然物が不足していることを嘆く声も、関連分野の研究者からあがっている⁸¹。

このような状況のもと、未知の天然物に最初に出会う探索研究の従事者は、その化合物の価値を明らかにする責務があると考えます。誰もが分かるような強力な生物活性や、新奇構造を持つ天然物はさておき、一見すると何の変哲もない化合物の潜在的な面白さを引き出すことこそ、現代の天然物探索に求められていると考えます。本研究ではこのような考えのもと、**kurahyne (2)** の作用機序解明をはじめ、発見した新規天然物の有用性の評価を行ってきた。こうした努力を通じて、従来ならば既知化合物の山に埋もれていってしまう天然物から、真に有用な化合物が見いだされることを期待したい。

第六章 実験の部

第一節 測定機器と一般操作

General.

Chemicals and solvents were the best grade available and used as received from commercial sources. All NMR spectral data were recorded on a JEOL ECX-400 spectrometer for ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz). ^1H NMR chemical shifts (referenced to residual solvent signals, C_6HD_5 : δ 7.16, CHD_2OD : δ 3.31, CHD_2CN : δ 1.93, CHCl_3 : δ 7.26, H_2O : δ 4.79) were assigned using a combination of data from COSY and HMQC experiments. Similarly, ^{13}C NMR chemical shifts (referenced to solvent signals, C_6D_6 : δ 128.06, CD_3OD : δ 49.0, CD_3CN : δ 118.2, CDCl_3 : δ 77.16) were assigned based on HMBC and HMQC experiments. ESI mass spectra were obtained on an LCT premier EX spectrometer (Waters). Optical rotations were measured with a DIP-1000 polarimeter (JASCO). IR spectra were recorded on a RT/IR-4200 instrument (JASCO). Fluorescence micrographs were taken with Eclipse Ti-S (Nikon). Chromatographic analyses were performed using an HPLC system consisting of a pump (model PU-2080, Jasco) and a UV detector (model UV-2075, Jasco). TLC analysis was conducted on E. Merck precoated silica gel 60 F254 (Merck). The silica gels, BW-820 MH (Fuji Silysia), was used for column chromatography. The ODS silica gels, Cosmosil 75C₁₈-OPN (Nacalai Tesque), was used for reversed-phase column chromatography. Moisture sensitive reactions were performed under an atmosphere of nitrogen.

Cell growth analysis.

Cells were cultured at 37 °C with 5% CO_2 in DMEM (for HeLa cells, Nissui) or RPMI (for HL60 cells, Nissui) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 units/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-glutamine, and 2.25 mg/mL NaHCO_3 . HeLa cells were seeded at 2×10^4 cells/well in 96-well plates (Iwaki) and cultured overnight. HL60 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96-well plates. Various concentrations of compounds were then added, and cells were incubated for 72 h. Cell proliferation was measured by the MTT assay.

Trypan blue dye exclusion assay

HeLa cells were seeded at 4×10^4 cells/well in 24-well plates (Iwaki, Japan), cultured overnight, and then preincubated with or without 50 μ M Z-VAD-FMK (Promega, Madison, WI) for 30 min. The cells were then treated with various concentrations of compounds for 48 h. They were then stained with 0.8 mg/mL trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and the cell viability was determined by counting the number of stained (killed) cells.

Analysis of DNA fragmentation

HeLa cells, treated with various concentrations of compounds for 24 or 36 h, were washed with phosphate-buffered saline (PBS; 8 g/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1.15 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/L KH_2PO_4). The cells were then resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) at 4 °C for 10 min. After centrifugation at 17,700 g at 4 °C for 5 min, the supernatant was treated with 0.2 mg/mL RNase A at 37 °C for 1 h. The samples were treated with 0.2 mg/mL proteinase K at 50 °C for 30 min, and to the lysates were added 5 M NaCl (0.5 M of total) and isopropyl alcohol (50% of total). After the mixtures were cooled overnight at -20 °C, DNA was collected by centrifugation at 17,700 g for 15 min. The pellet was finally dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA). The DNA was then electrophoresed on 2% agarose gel and stained with 1.0 μ g/mL ethidium bromide. The gel was visualized and photographed under UV light.

Protease inhibition assays.

Serine protease-inhibitory activities were determined as previously reported with slight modifications^{47a}. Elastase inhibitory activity was assessed using high-purity porcine pancreatic elastase (Sigma, E0258). The assay buffer used was 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Assay buffer (73.4 μ L), elastase solution (75 μ g/mL in assay buffer, 5 μ L), and various concentrations of compounds (6.6 μ L, dissolved in MeOH) were preincubated for 15 min at room temperature in a 96-well plate. After this time, 15 μ L of substrate solution was added (2 mM *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide in assay buffer) to each well, and the reaction was followed by measuring the absorbance at 405 nm for 30 min. Inhibitory activities against chymotrypsin and trypsin were determined using α -chymotrypsin from bovine pancreas (Sigma, C4129) and trypsin from porcine pancreas (Sigma T0303), with 2 mM *N*-succinyl-Gly-Gly-Phe-*p*-nitroanilide as a substrate solution for chymotrypsin and 2 mM *N* ^{α} -benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride for trypsin. The assay buffer was 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 1 mM CaCl₂ (pH 7.8). Assay buffer (40 μ L), enzyme solution (5 μ L, 1 mg/mL in assay buffer), and various concentrations of compounds (5 μ L, dissolved in MeOH) were preincubated for 10 min at 37 °C, before 25 μ L of substrate solution was added. The reaction was followed by measuring the absorbance at 405 nm for 30 min. PMSF (Nacalai tesque, Japan) was used as a positive control. Enzyme activity in each well was calculated based on the slope of the reaction curve compared to that of the solvent control.

第二節 第二章の実験

第二章 第一節の実験

Collection, and identification of the sample.

The marine cyanobacterial samples were collected at Kuraha, Okinawa Prefecture, Japan, at a depth of 0-1 m in March 2013. A cyanobacterial filament was isolated under a microscope. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's specifications. The 16S rRNA genes were PCR-amplified from isolated DNA using the primer set 16S 27F, a universal primer, and 23S 30R, a cyanobacterial-specific primer. The PCR reaction contained DNA derived from a cyanobacterial filament, 12.5 μ L of GoTaq (Promega), 1.0 μ L of each primer (10 pM) and 10.5 μ L H₂O for a total volume of 25 μ L. The PCR reaction was performed as follows: initial denaturation for 10 min at 95 °C, amplification by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C, and final elongation for 7 min at 72 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. The obtained DNA was sequenced with 16S 27F, 16S 1494R and 23S 30R primers. The 16S rRNA gene sequence is available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number AB857842. From the phylogenetic tree inferred from 959 bp of 16S rRNA gene sequences revealed that the present cyanobacterium (Maeda 130904A, accession no. AB857842) formed a clade with *Oscillatoria miniata* NAC8-50 (GU724208), and closely related with *Trichodesmium* spp. However, the most cyanobacterium was morphologically classified into the genus *Lyngbya* because it was composed of short cells with a thick sheath.

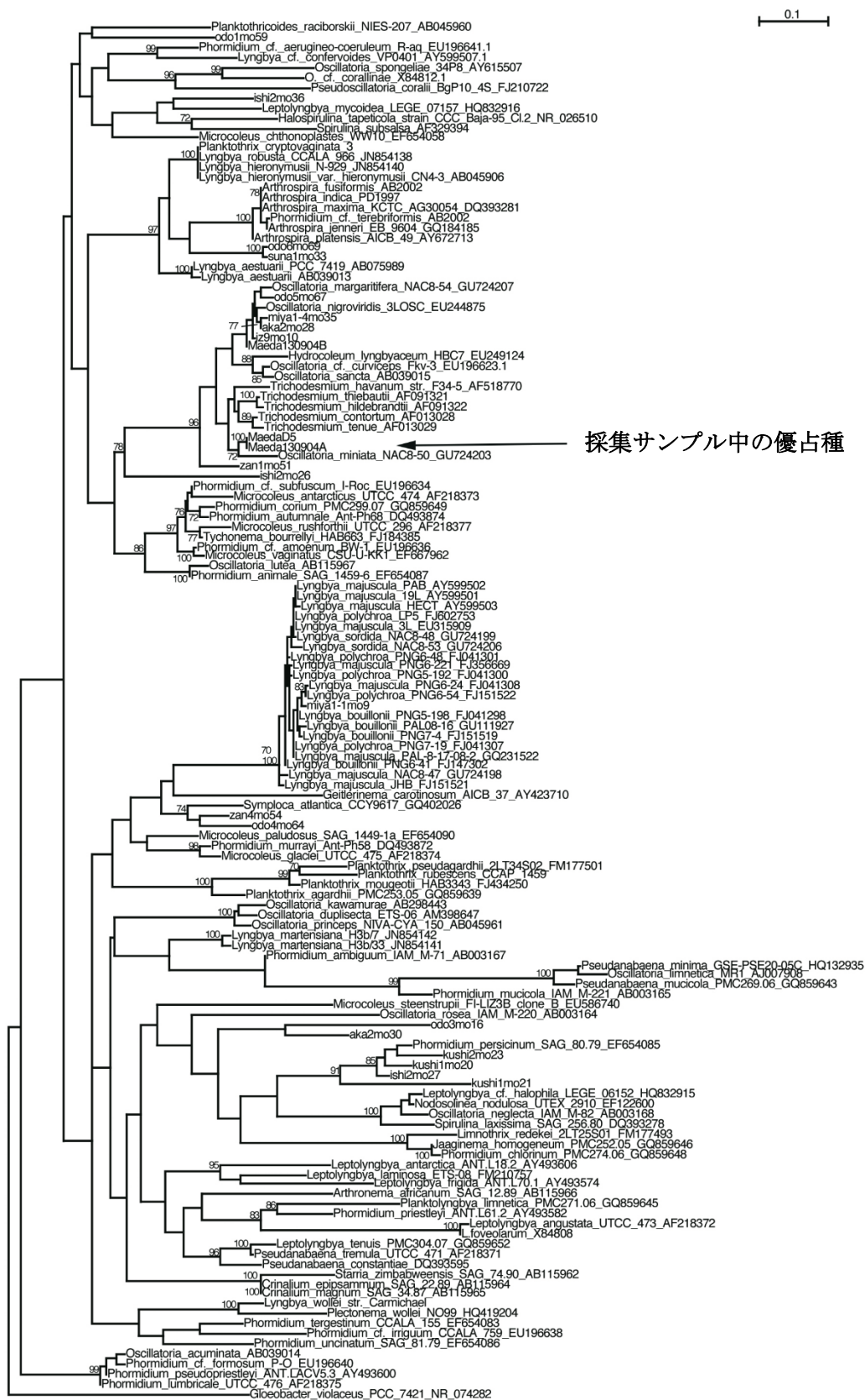


Figure 6-1. 優占種のシアノバクテリアの系統解析 (16S rRNA 領域)

Extraction, and preseparation.

The collected cyanobacteria (2.3 kg) were extracted with methanol (4 L) for one week. The extract was filtered, and the filtrate was concentrated. The residue was partitioned between ethyl acetate (3 × 0.4 L) and water (0.4 L). The material obtained from the organic layer was partitioned between 90% aqueous methanol (0.4 L) and hexane (3 × 0.4 L). The aqueous methanol fraction (1.3 g) was first separated by column chromatography on ODS (13 g) eluted with 40% aqueous methanol, 60% aqueous methanol, 80% aqueous methanol, and methanol.

Isolation of kurahamide (1)

The fraction (313 mg) eluted with 60% aqueous methanol was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 65% MeOH] in six batches to give a fraction that contained kurahamide (7.5 mg, *t_R* = 33.0 min). This fraction was further separated by HPLC [Cosmosil Cholester (φ20 × 250 mm); flow rate 5mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 40% MeCN] to give kurahamide (1) (3.7 mg, *t_R* = 40.0 min).

Kurahamide (1): colorless oil; [α]^{28D} -28.4 (*c* 0.2, CH₃OH); IR (film) λ_{\max} 3288, 2965, 1735, 1653, 1636, 1534, 1446, 1382, 1202 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMBC and NOESY data, see Table 2-1; HRESIMS *m/z* 1126.5458 [M+Na]⁺ (calcd for C₅₅H₇₇N₉O₁₅Na, 1126.5437).

Isolation of kurahyne (2) and maedamide (3)

The fraction (439 mg) eluted with 80% aqueous methanol was subjected to HPLC [Cosmosil Cholester ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 50% MeCN] in eight batches to give a fraction that contained kurahyne and maedamide (312 mg, t_R = after 42.0 min, last collected fraction). This fraction was further separated by HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 80% MeOH] in six batches to give kurahyne (2) (29.9 mg, t_R = 57.5 min) and a fraction that contained maedamide (64.4 mg, t_R = 39.3 min). This fraction was further purified twice by HPLC [Cosmosil Cholester ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 65% MeCN; t_R = 29.4 min; 23.0 mg] [Cosmosil Cholester ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 58% MeCN, 0.1% TFA] to give maedamide (3) (18.0 mg, t_R = 55.0 min).

Kurahyne (2): colorless oil; $[\alpha]^{29}_D$ -258 (c 0.20, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 3474, 2963, 2875, 1723, 1635, 1448 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMBC and NOESY data, see Table 2-6; HRESIMS m/z 839.5991 [M+H]⁺ (calcd for C₄₇H₇₉N₆O₇, 839.6010).

Maedamide (3): colorless oil; $[\alpha]^{25}_D$ +53 (c 0.10, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 3319, 2964, 2878, 1730, 1648, 1528, 1437 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMBC and NOESY data, see Table 2-10; HRESIMS m/z 963.5414 [M+H]⁺ (calcd for C₅₁H₇₅N₆O₁₂, 963.5443).

Acid hydrolysis of kurahamide (1), chiral HPLC analysis and Marfey's analysis.

Kurahamide (1) (0.5 mg) was treated with 9 M HCl (100 μ L) for 23 h at 110 °C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and could be separated into each component, except for a mixture of Ala and Thr. [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O. Retention times (min) of components: Ala and Thr (t_R = 10.5 min), Val (t_R = 12.6 min), *N*-Me-Tyr (t_R = 31.2 min), Phe (t_R = 42.4 min)]

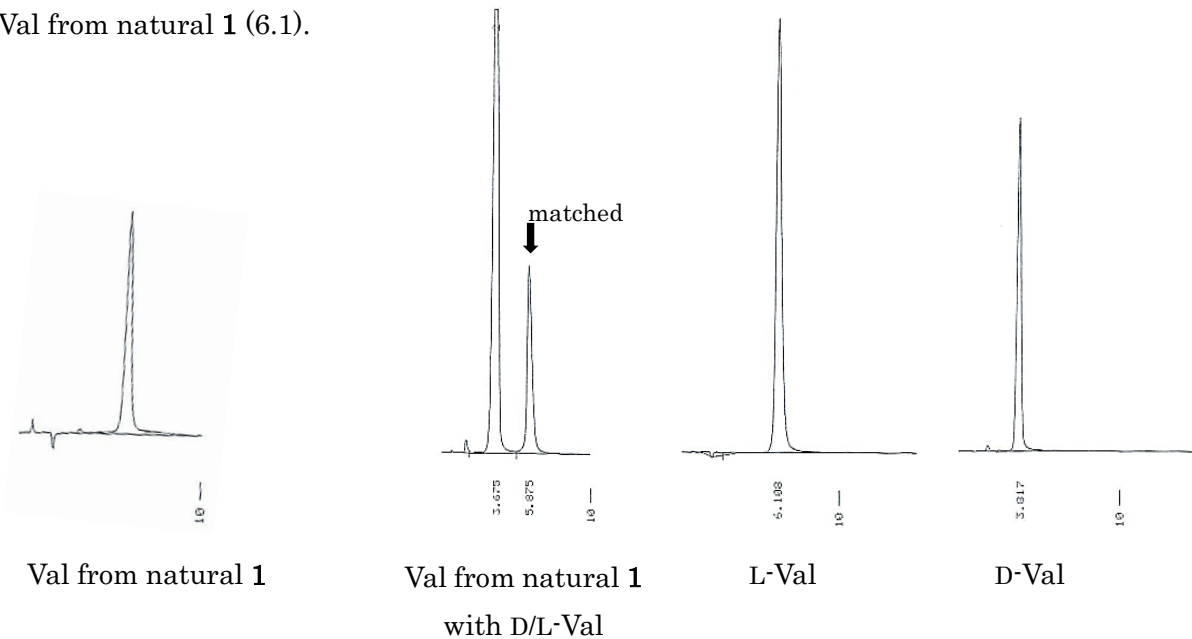
Each fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards. [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄, 2.0 mM CuSO₄ - MeOH (95:5) and 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (90:10)] With 2.0 mM CuSO₄, the retention times (t_R min) for authentic standards were D-Val (3.8) and L-Val (6.1). With 2.0 mM CuSO₄ - MeOH (95:5), the retention times for authentic standards were *N*-Me-D-Tyr (10.8) and *N*-Me-L-Tyr (13.2). With 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (90:10), the retention times for authentic standards were D-Phe (5.9) and L-Phe (8.6). The retention times (min) (and the respective HPLC conditions) of the amino acids in the hydrolysate were 6.1 (100:0), 13.2 (95:5), and 8.6 (90:10), indicating the presence of L-Val, *N*-Me-L-Tyr and L-Phe in the hydrolysate.

The Ala- and Thr-containing fraction was dissolved in H₂O (100 μ L). A 1.0% 1-fluoro-2,4-dinitro-phenyl-5-L-leucinamide (Marfey's reagent) solution in acetone (200 μ L) and 50 μ L of 1 M NaHCO₃ were added, and the mixture was heated at 80 °C for 3min. The solution was cooled to room temperature, neutralized with 1 M HCl, and evaporated to dryness. The residue was resuspended in 50 μ L of MeCN - H₂O (1:1), and the solution was analyzed by reversed-phase HPLC. [Cosmosil 5C₁₈-AR-II (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent 0.02 M NaOAc - MeOH (45:55)] The retention times (t_R min) of the derivatized amino acids in the hydrolysate matched those of L-Thr (6.4) and L-Ala (9.1), but not L-*allo*-Thr (6.6), D-*allo*-Thr (11.1), D-Thr (18.2) or D-Ala (23.6).

Val: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: L-Val (6.1), D-Val (3.8).

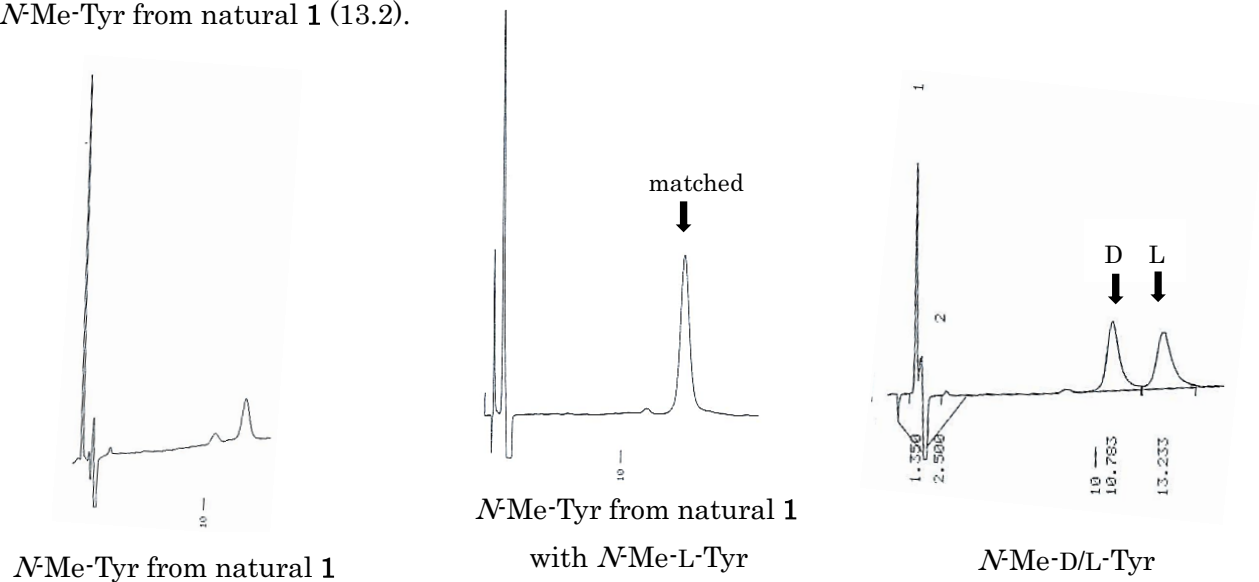
Val from natural 1 (6.1).



N-Me-Tyr: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄ – MeOH (95:5)

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-L-Tyr (13.2), *N*-Me-D-Tyr (10.8).

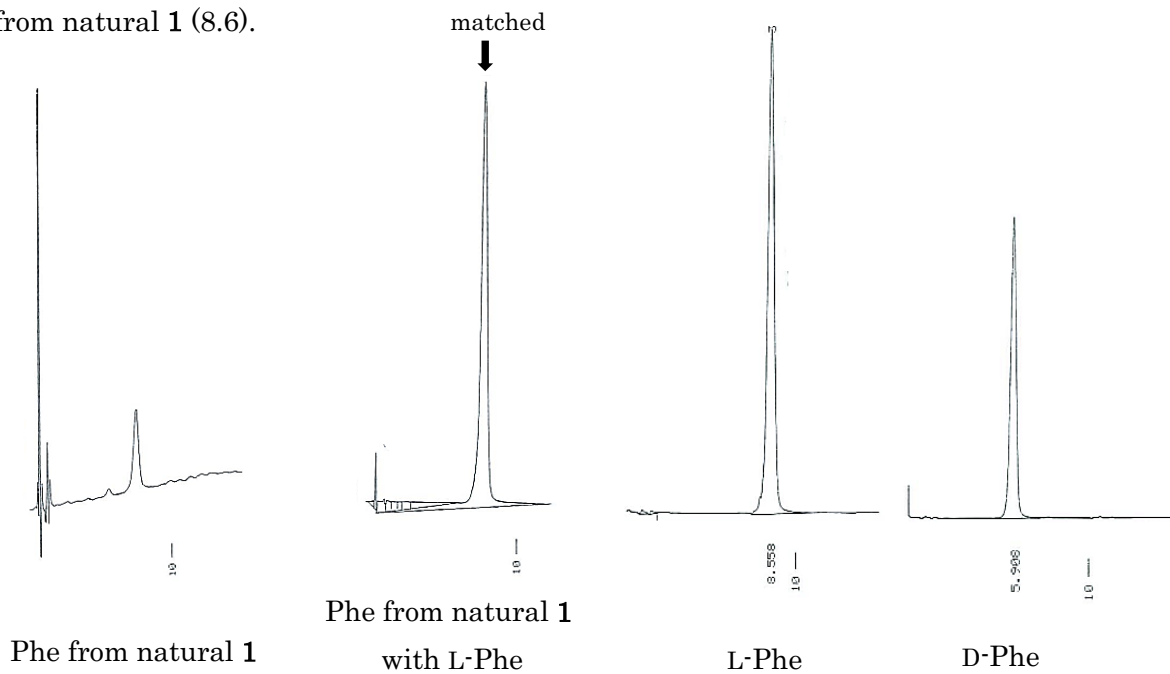
N-Me-Tyr from natural 1 (13.2).



Phe: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min;
detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄ – MeCN (90:10)

t_R (min): Authentic samples: L-Phe (8.6), D-Phe (5.9).

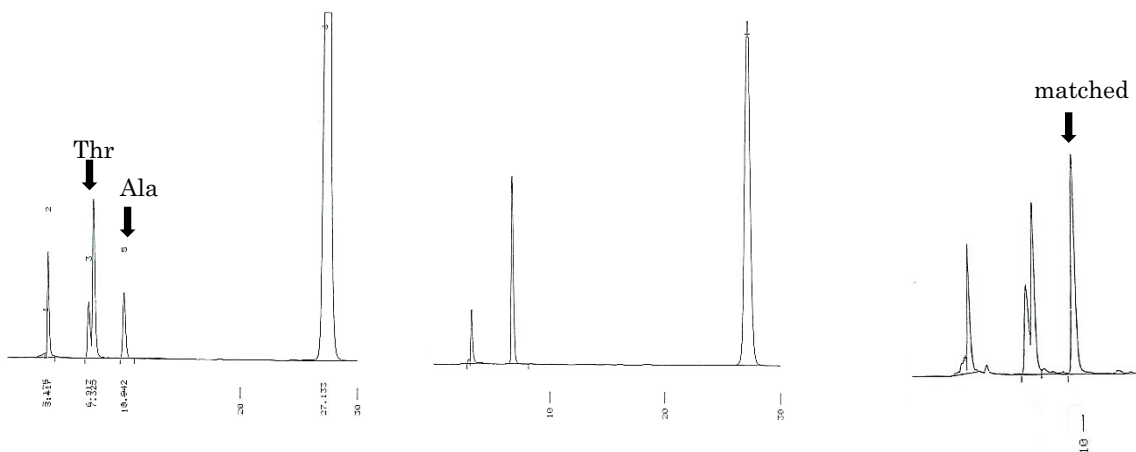
Phe from natural **1** (8.6).



Ala: column, Cosmosil 5C₁₈-AR-II ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV
340 nm; solvent, 0.02 M NaOAc - MeOH (45:55)

t_R (min): Marfey derivatives of authentic samples: L-Ala (9.1), D-Ala (23.6).

Marfey derivatives of Ala from natural **1** (9.1).



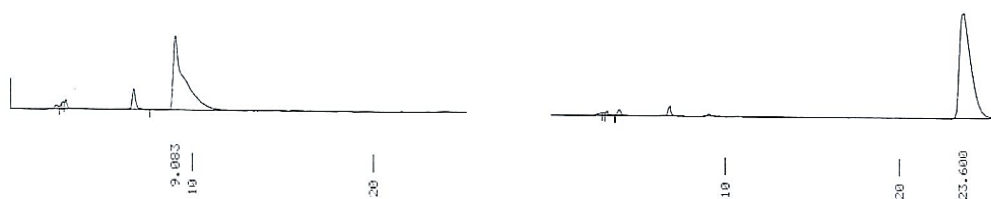
Ala from natural **1**

[Other peaks are derived from
reagents and Thr]

Residues of reagents

Ala from natural **1**

with L-Ala



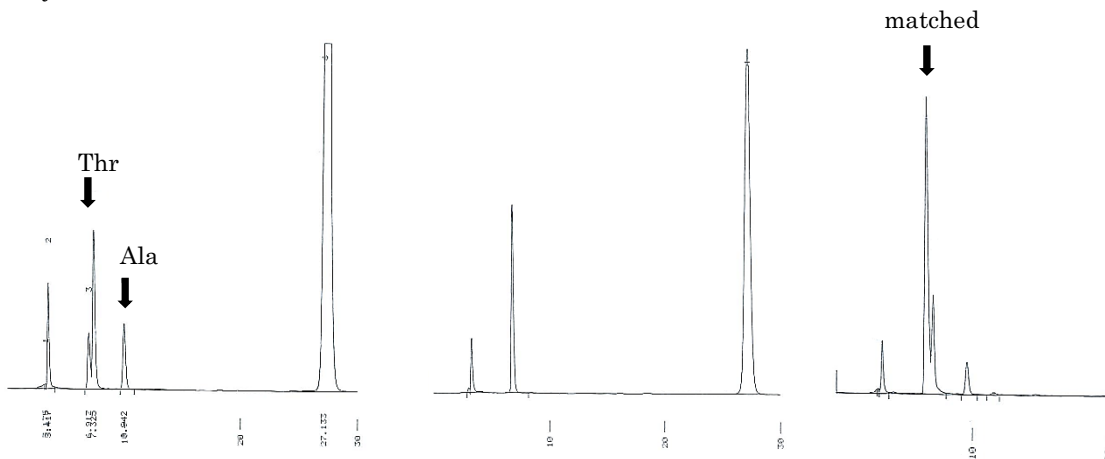
L-Ala

D-Ala

Thr: column, Cosmosil 5C₁₈-AR-II (ϕ4.6 × 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent, 0.02 M NaOAc - MeOH (45:55)

t_R (min): Marfey derivatives of authentic samples: L-Thr (6.4), D-Thr (18.2), L-*allo*-Thr (6.6), D-*allo*-Thr (11.1).

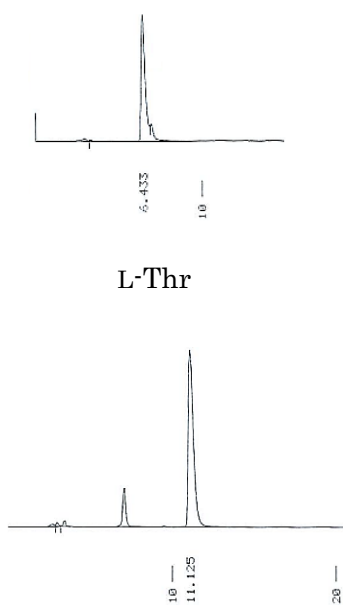
Marfey derivatives of Thr from natural 1 (6.4).



Thr from natural 1
[Other peaks are derived from reagents and Ala]

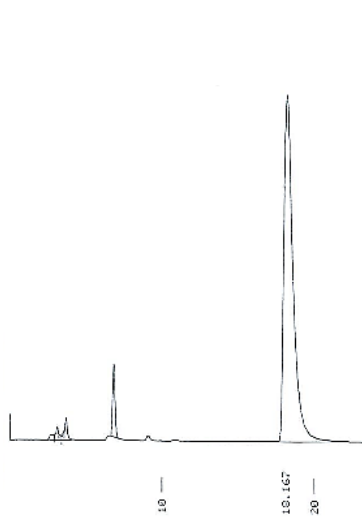
Residues of reagents

Thr from natural 1
with L-Thr



L-Thr

D-*allo*-Thr



D-Thr



L-*allo*-Thr

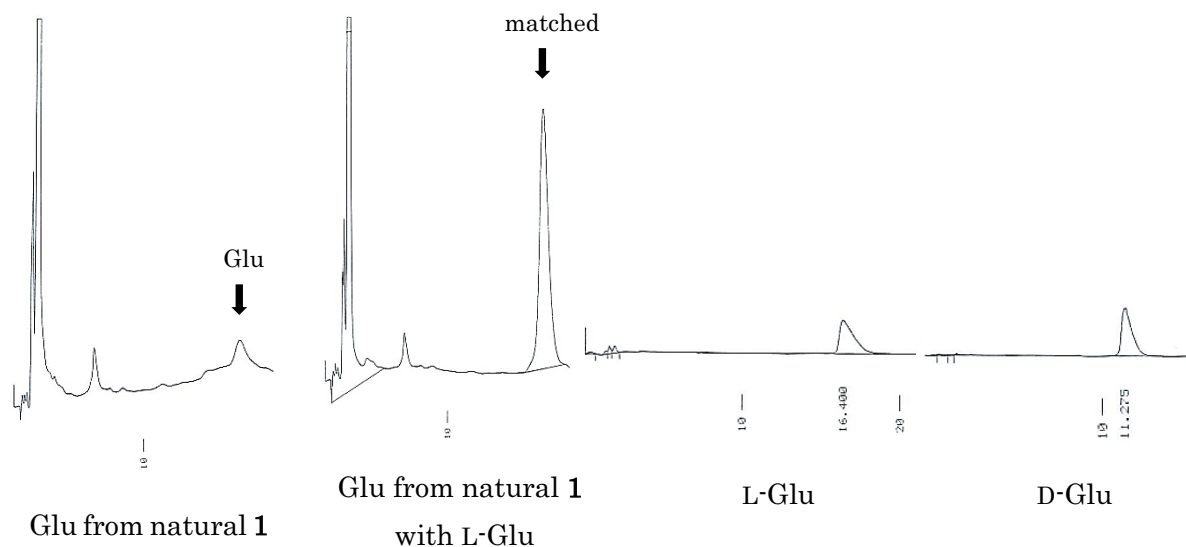
Oxidation, acid hydrolysis and chiral HPLC analysis.

Kurahamide (**1**) (0.5 mg) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.0 mL), and PCC (2.0 mg) was added. The reaction mixture was allowed to stand for 12 h at room temperature, after which it was washed with H₂O. The CH₂Cl₂ portion was dried under N₂. The PCC-oxidized kurahamide was heated with 9 M HCl (100 μL) for 23 h at 110 °C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and could be separated to give a Glu-containing fraction. [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (φ20 × 250 mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent TFA - H₂O (0.1:99.9). Retention time (*t_R* min): Glu (10.9)] The Glu-containing-fraction was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by chiral HPLC, and the retention time was compared to those of authentic standards. [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (φ4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄] The retention times (*t_R* min) for authentic standards were D-Glu (11.3) and L-Glu (16.4). The retention time (min) of Glu in the hydrolysate was 16.4, indicating the presence of L-Glu in the hydrolysate.

Glu: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (φ4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: L-Glu (16.4), D-Glu (11.3).

Glu from natural **1** (16.4).



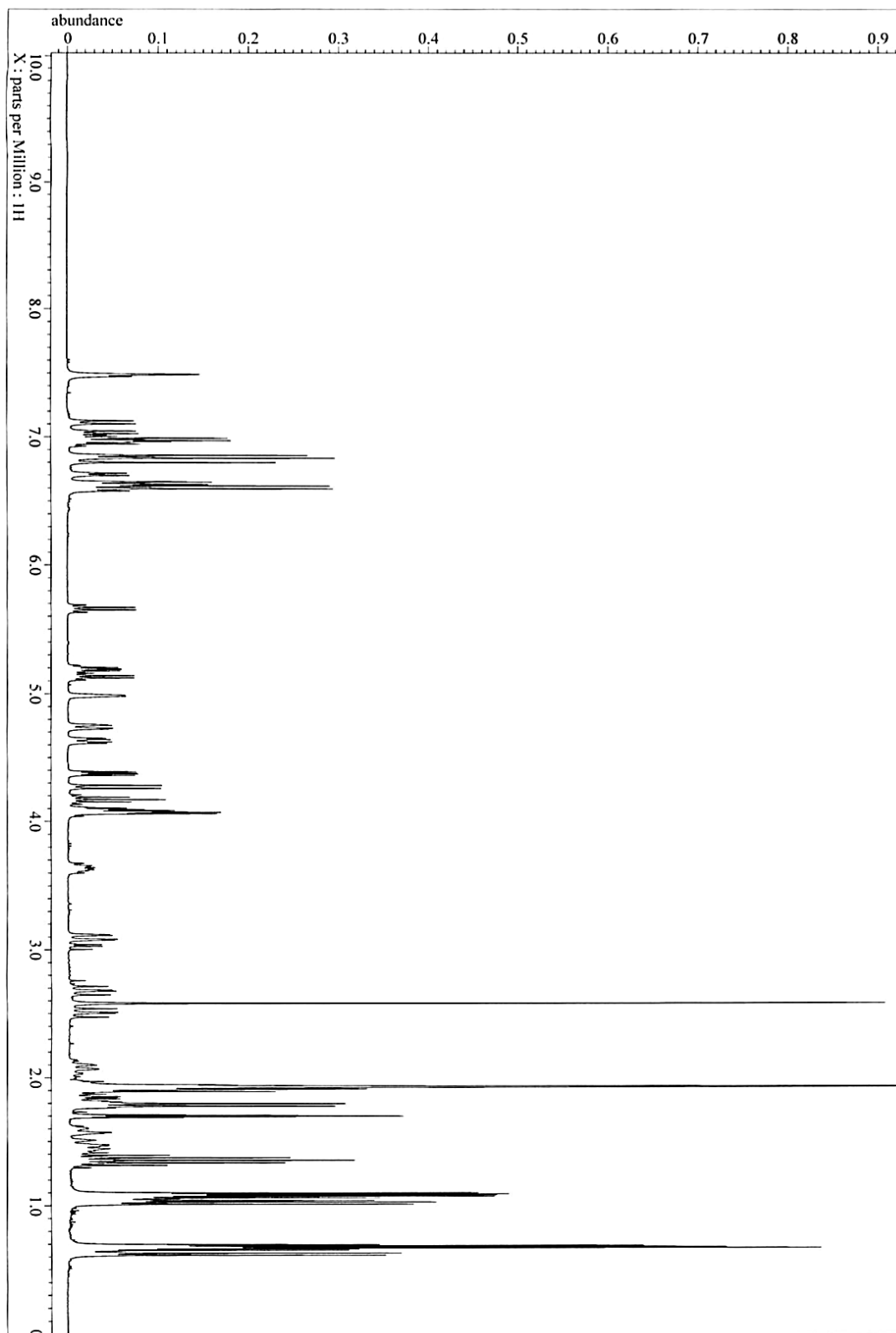


Figure 6-2. ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) spectrum of kurahamide (1)

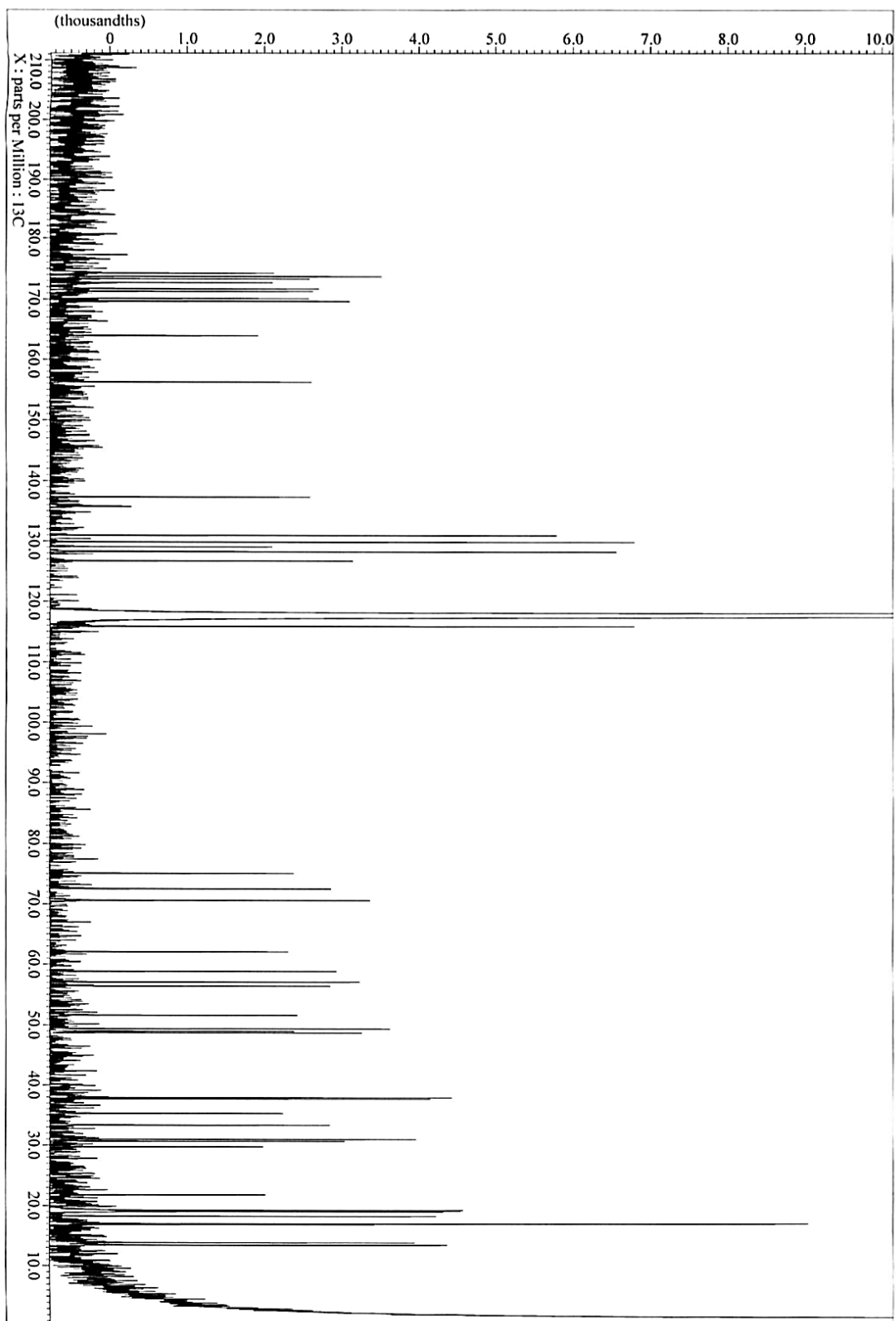


Figure 6-3. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) spectrum of kurahamide (1)

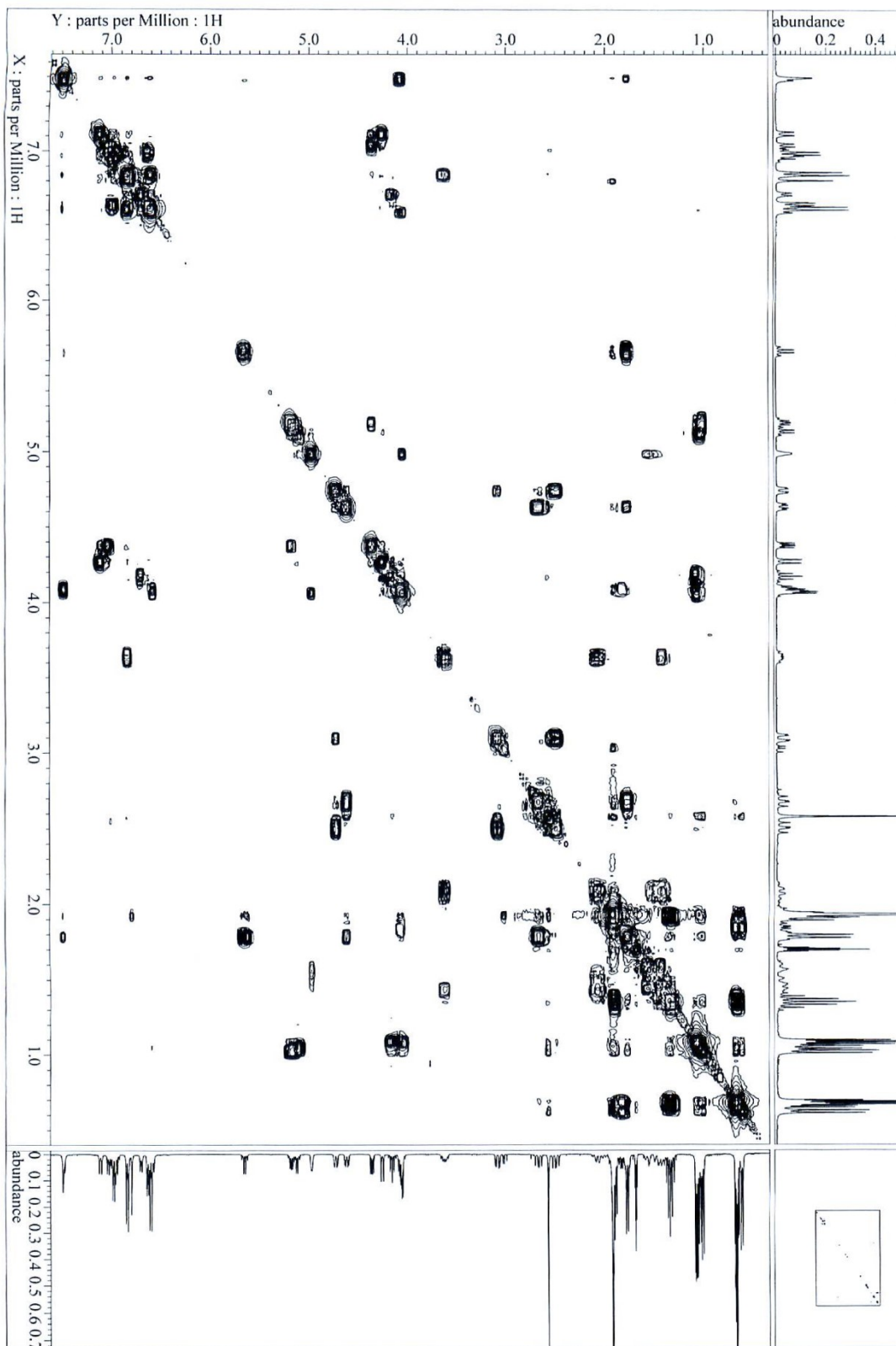


Figure 6-4. COSY (400 MHz, CD₃CN) spectrum of kurahamide (1)

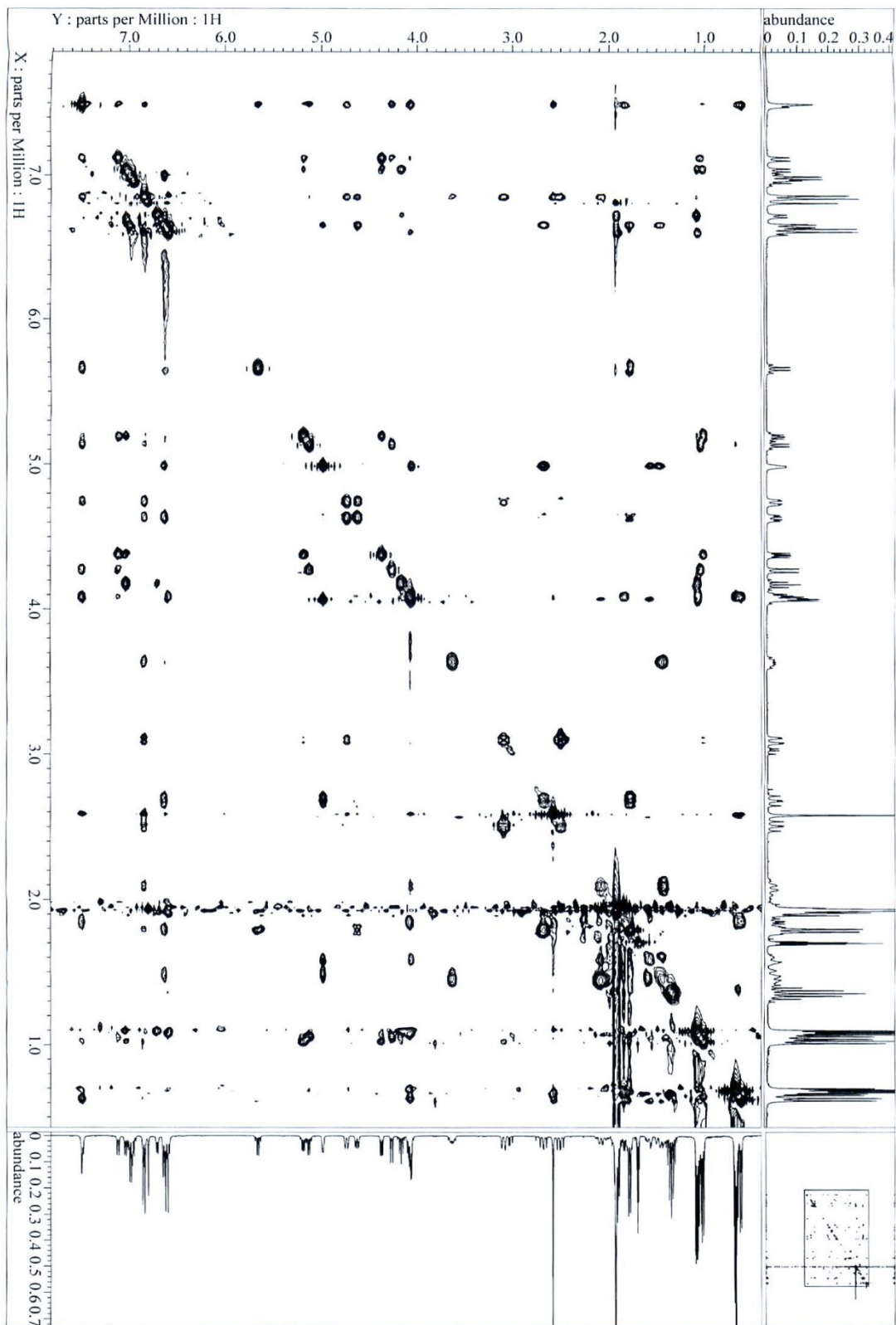


Figure 6-5. NOESY (400 MHz, CD₃CN) spectrum of kurahamide (1)

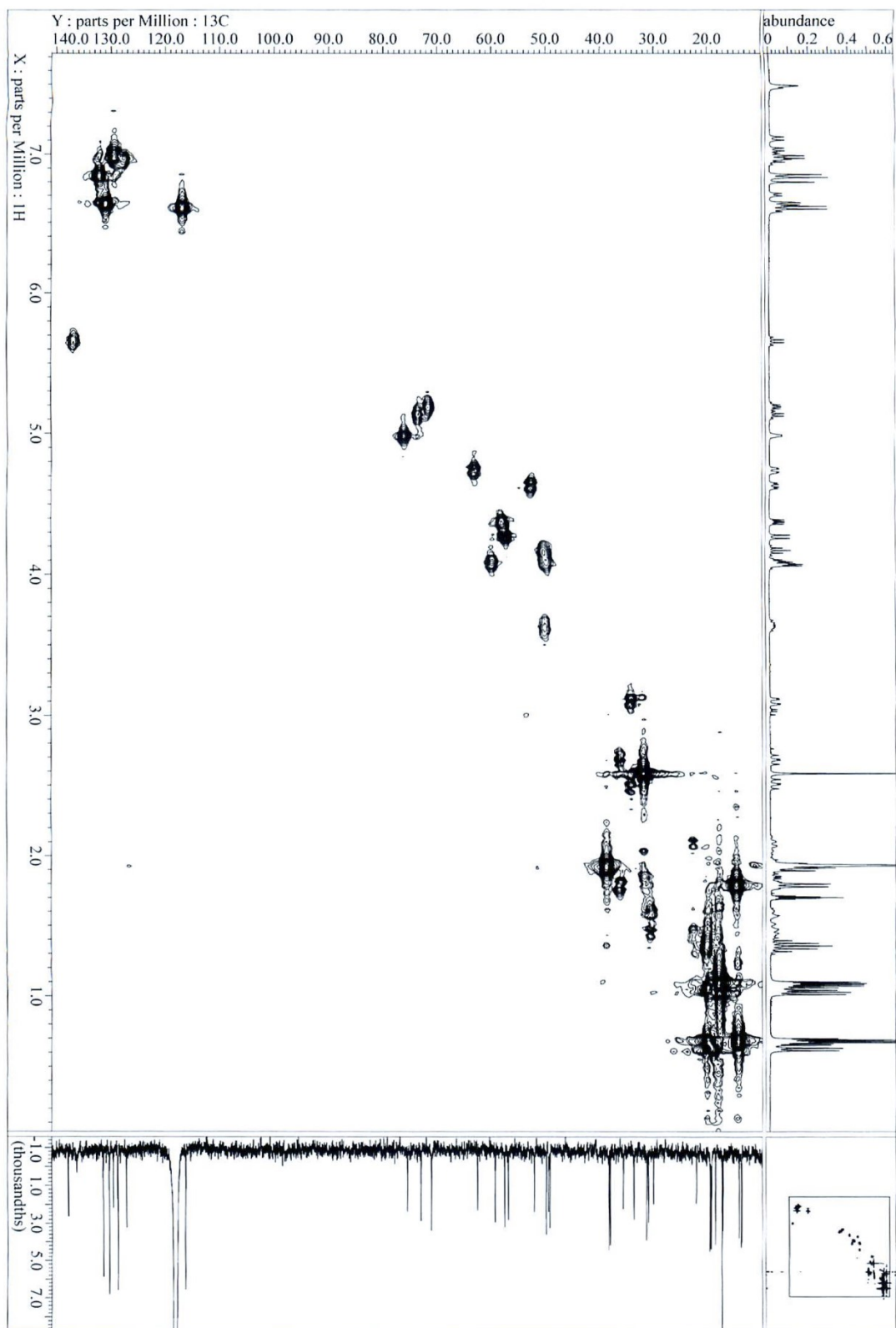


Figure 6-6. HMQC (400 MHz, CD_3CN) spectrum of kurahamide (1)

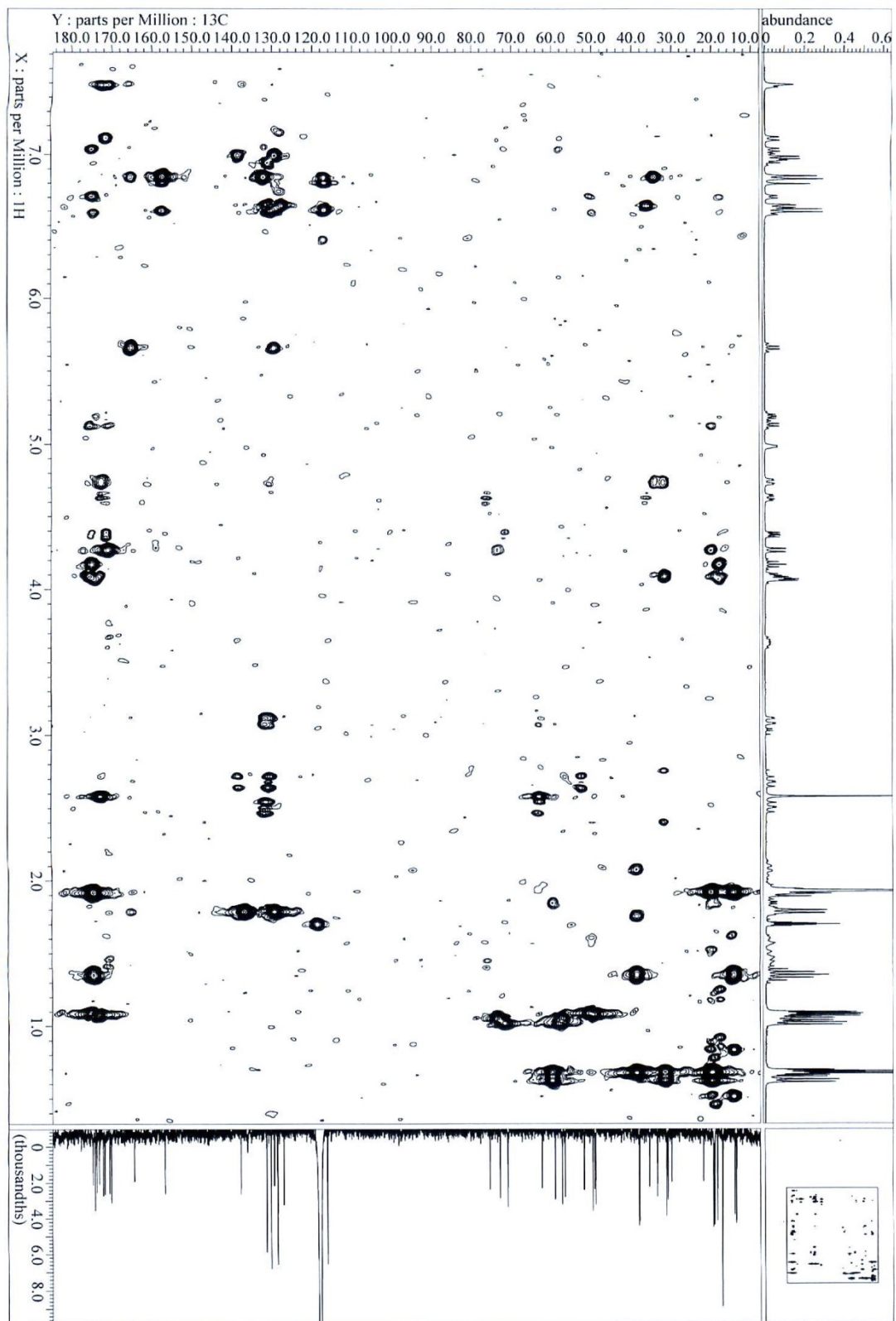


Figure 6-7. HMBC (400 MHz, CD₃CN) spectrum of kurahamide (1)

第二章 第五節の実験

Reduction-acid hydrolysis of kurahyne (2).

To a mixture of kurahyne (2) (2.4 mg, 2.9 μmol) in MeOH (0.6 mL) at room temperature was added sodium borohydride (30 mg, 790 μmol). After the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, it was diluted with EtOAc (5 mL) and H₂O (5 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). The organic layer and the extracts were combined, washed with saturated aqueous NaCl (10 mL), dried with Na₂SO₄, and concentrated to give a colorless oil (1.8 mg). An aliquot of the residual oil (0.8 mg) and 6 M HCl (0.1 mL) were charged in a reaction tube, sealed under reduced pressure, and heated at 110 °C for 45 h. The mixture was evaporated to dryness and could be separated into each component. [Conditions for HPLC separation of amino acids: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O. Retention times of components: Pro (t_R = 11.6 min), *N*-Me-Val (t_R = 13.5 min), *N*-Me-Ile (t_R = 20.2 min)], [Conditions for HPLC separation of 2-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine (Opp derivatives): column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeOH/H₂O/TFA = 1/99/0.1. Retention times: 7.8, 8.9 min]

HPLC analysis of amino acid components

With regard to *N*-Me-Ile, the fraction dissolved in H₂O (50 μL) was analyzed by reversed-phase HPLC, and the retention times were compared to those of *N*-Me-Ile and *N*-Me-*allo*-Ile. [Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O] The retention time of *N*-Me-Ile in the hydrolysate matched that of *N*-Me-Ile (t_R = 5.3 min), but not *N*-Me-*allo*-Ile (t_R = 5.1 min).

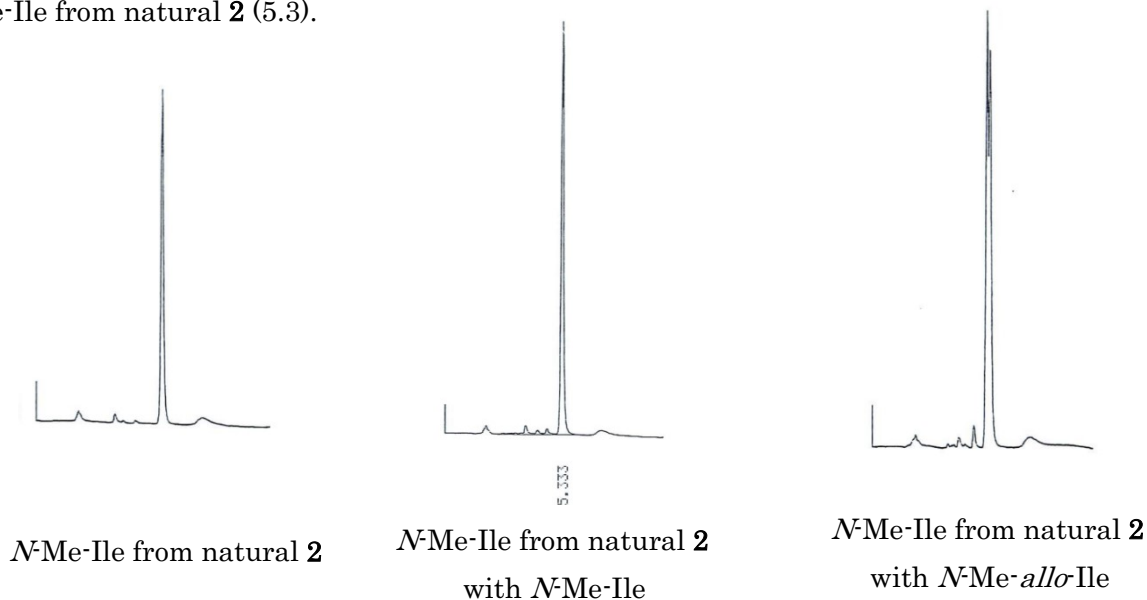
Further, each fraction that contained amino acids was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by chiral HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards. [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄] The retention times of the amino acids in the hydrolysate matched those of L-Pro (t_R = 5.1 min), *N*-Me-L-Val (t_R = 5.2 min) and *N*-Me-L-Ile (t_R = 12.9 min), but not D-Pro (t_R = 3.0 min), *N*-Me-D-Val (t_R = 3.0 min) or *N*-Me-D-Ile (t_R = 6.6 min).

N-Me-Ile:

Condition 1: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent, H₂O

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-Ile (5.3), *N*-Me-*allo*-Ile (5.1).

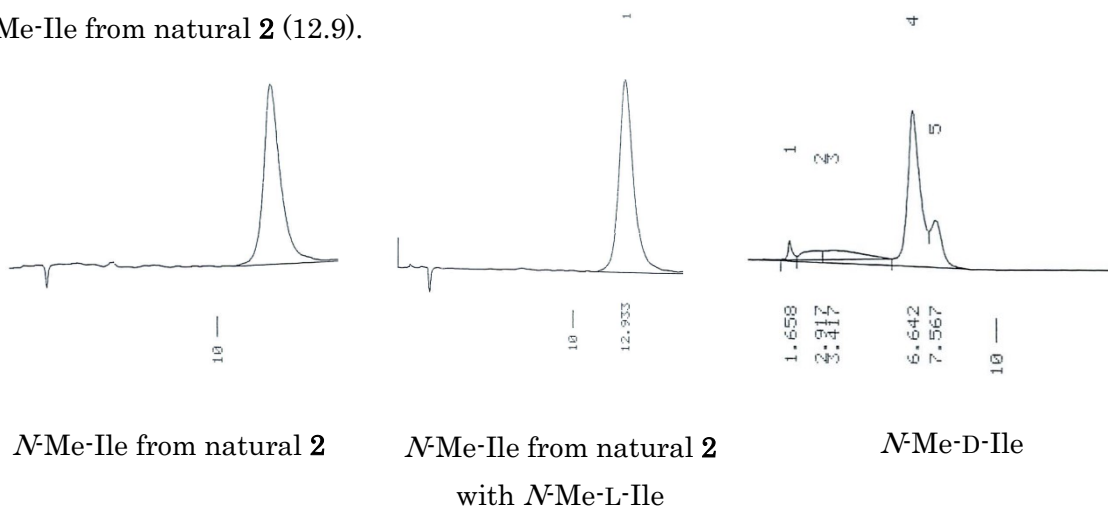
N-Me-Ile from natural **2** (5.3).



Condition 2: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-L-Ile (12.9), *N*-Me-D-Ile (6.6).

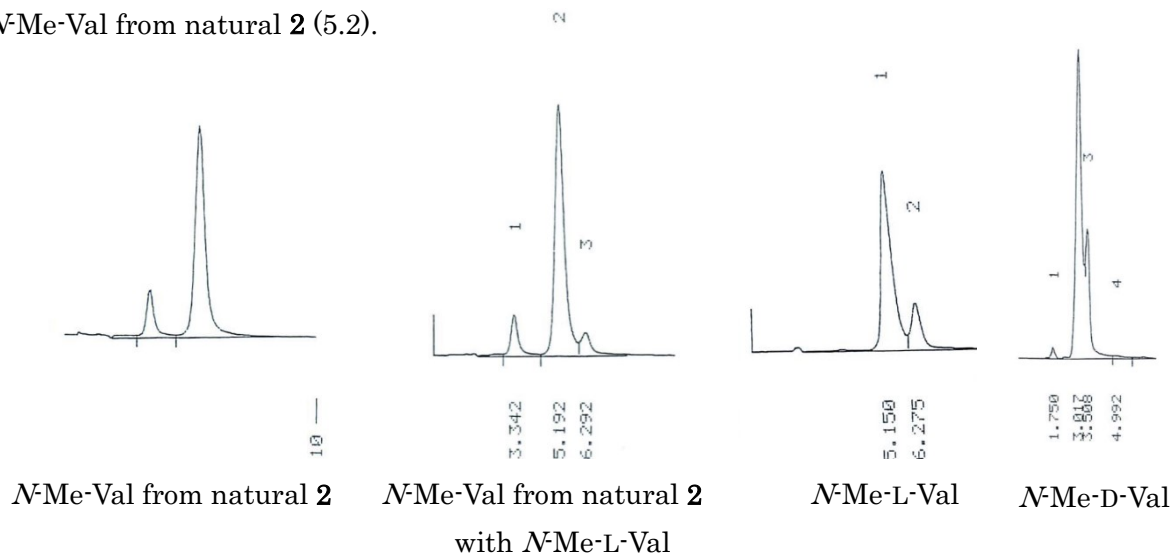
N-Me-Ile from natural **2** (12.9).



N-Me-Val: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min;
detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-L-Val (5.2), *N*-Me-D-Val (3.0)

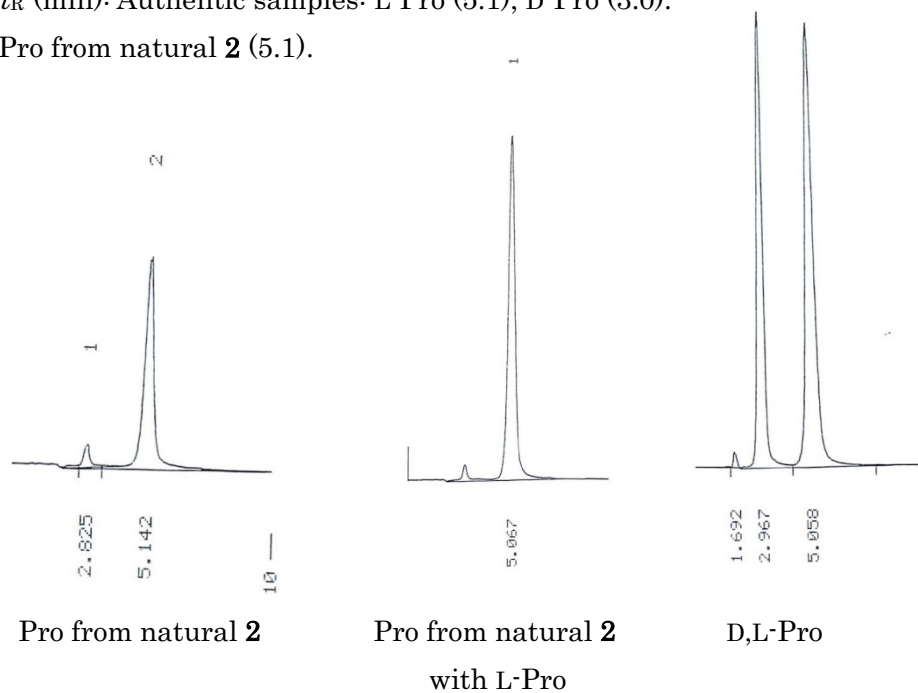
N-Me-Val from natural **2** (5.2).



Pro: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min;
detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: L-Pro (5.1), D-Pro (3.0).

Pro from natural **2** (5.1).



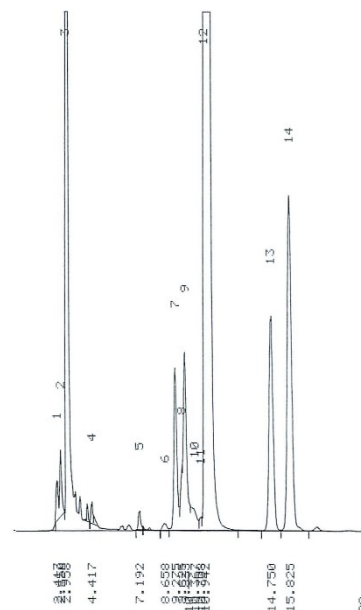
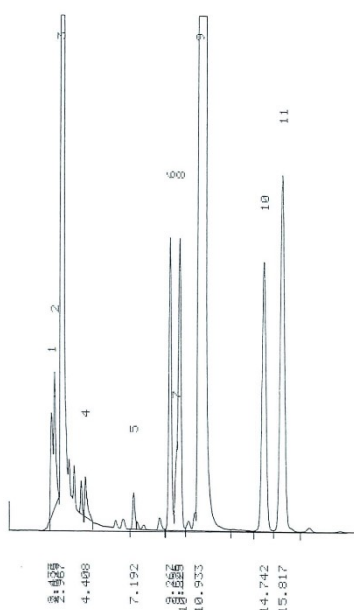
Marfey's analysis of Opp derivatives

The 2-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine-containing fraction was dissolved in H₂O (50 μ L). A 1.0% 1-fluoro-2,4-dinitro-phenyl-5-L-leucinamide (Marfey's reagent) solution in acetone (100 μ L) and 25 μ L of 1 M NaHCO₃ were added, and the mixture was heated at 80 °C for 3 min. The solution was cooled to room temperature, neutralized with 1 M HCl, and evaporated to dryness. The residue was resuspended in 100 μ L of MeCN/H₂O (1:1), and the solution was analyzed by reversed-phase HPLC. [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate 1 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent 0.02 M NaOAc - MeCN (53:47)] The retention times of the derivatized Opp in the hydrolysate matched those of Marfey derivatives of 2(*S*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine authentic samples (t_R = 14.8 min, 15.8 min), but not Marfey derivatives of 2(*R*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine authentic samples (t_R = 16.4 min, 17.4 min).

2-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine: column, Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ4.6 × 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent, 0.02 M NaOAc - MeCN (53:47)

t_R (min): Marfey derivatives of authentic samples: 2(*R*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*] (16.4, 17.4), 2(*S*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*] (14.8, 15.8).

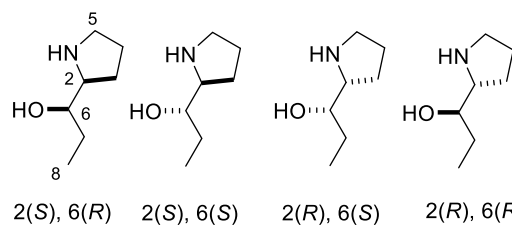
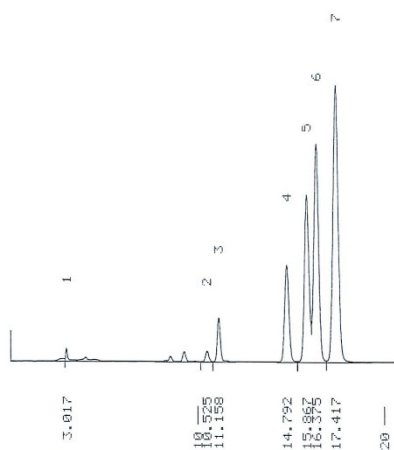
Marfey derivatives of 2-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine from natural **2** (14.8, 15.8).



2-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine
[6*S*, 6*R*] from natural **2**

2(*S*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine
[6*S*, 6*R*]

with 2-(1-hydroxypropyl)-
pyrrolidine [6*S*, 6*R*] from natural **2**



2(*R*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*]

2(*S*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*]

2-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine

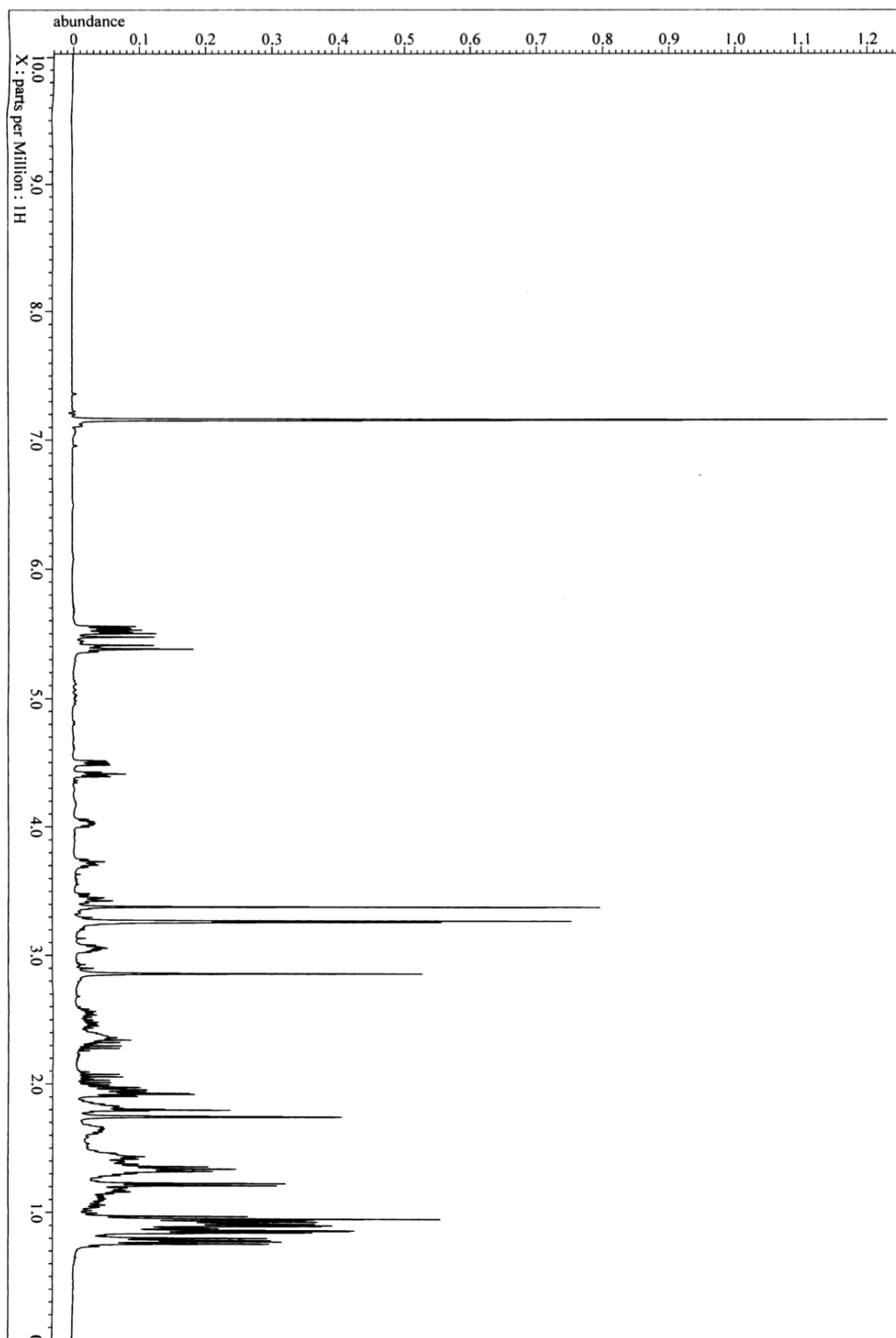


Figure 6-8. ^1H NMR (400 MHz, C_6D_6) spectrum of kurahyne (2)

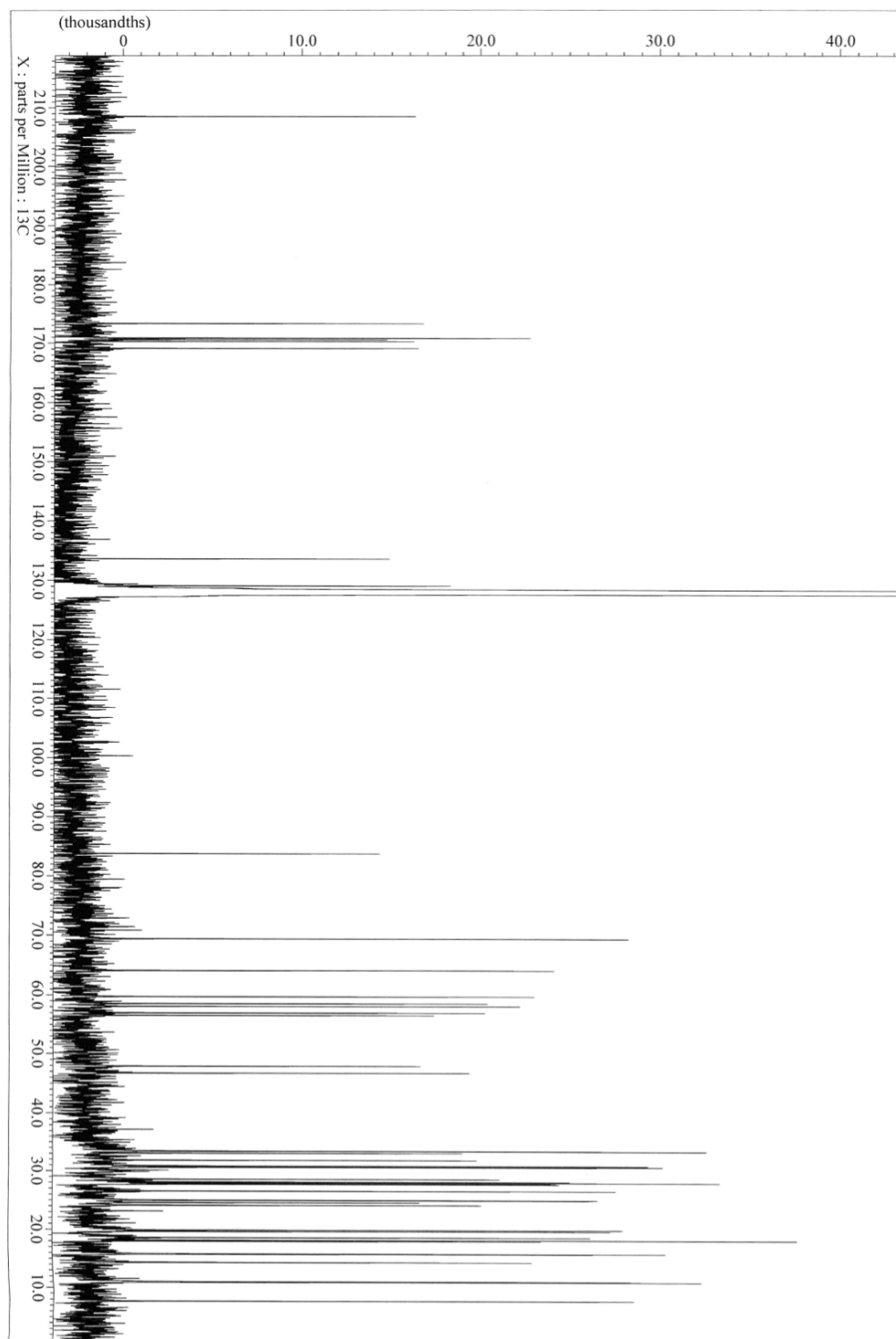


Figure 6-9. ^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6) spectrum of kurahyne (2)

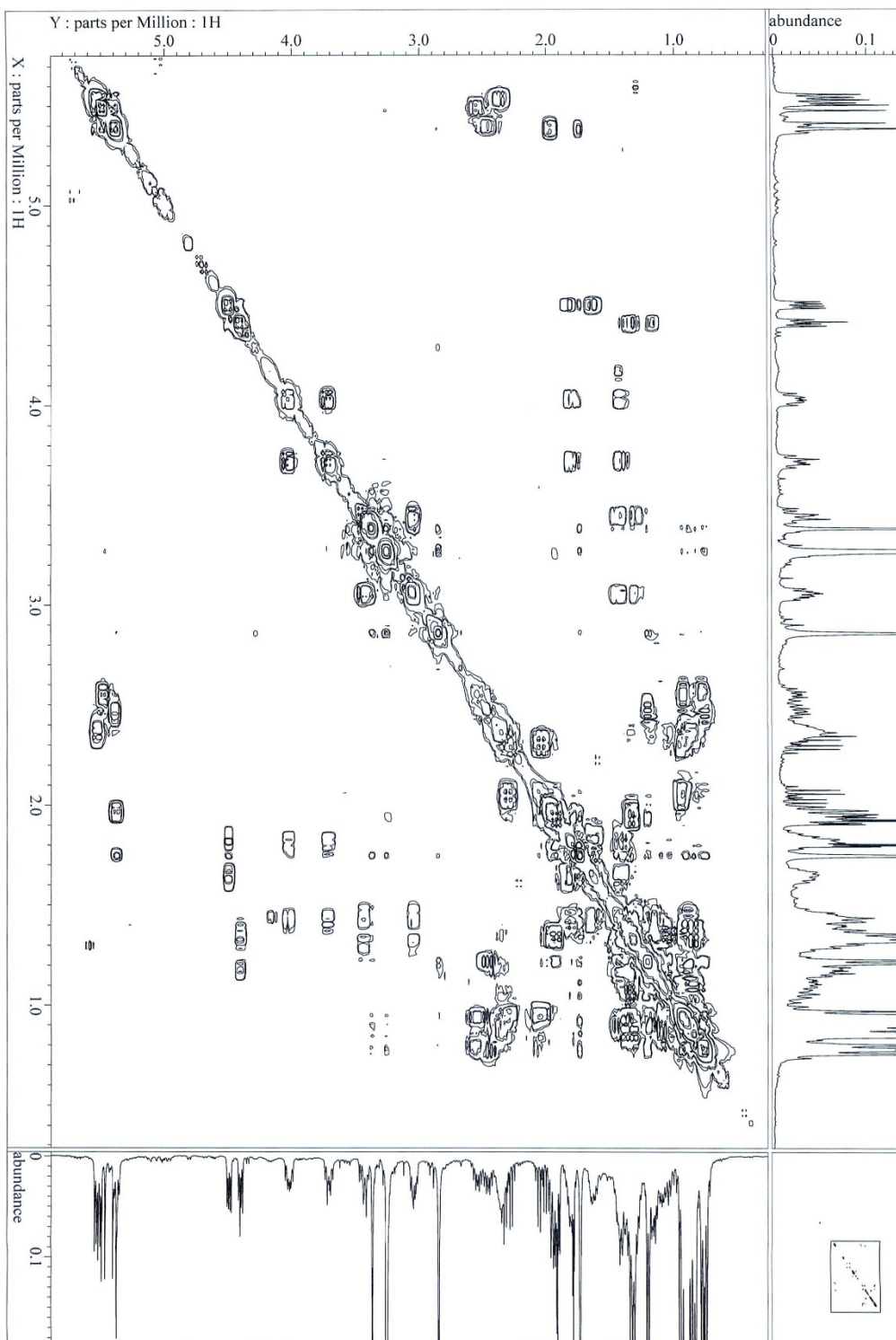


Figure 6-10. COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kurahyne (2)

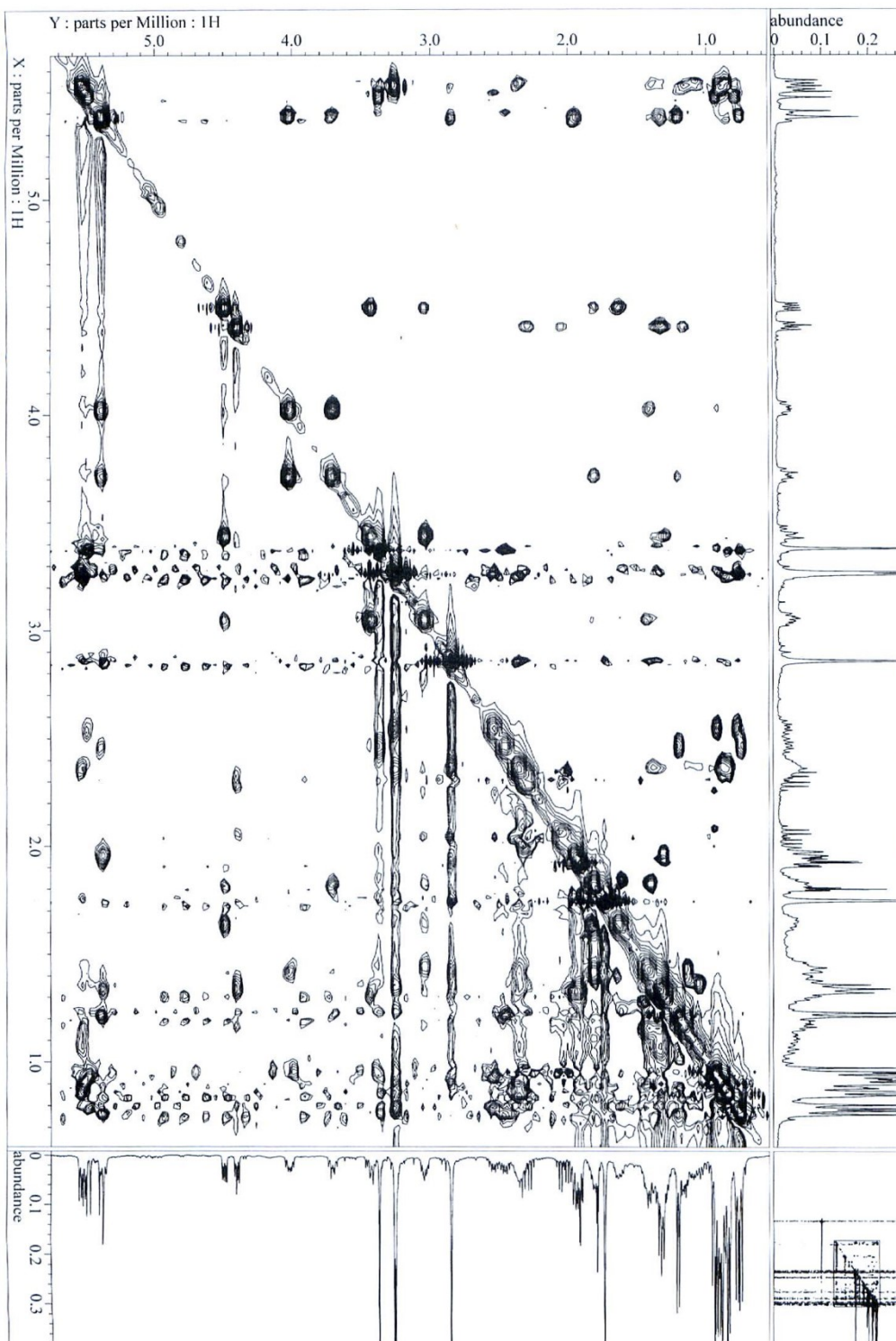


Figure 6-11. NOESY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kurahyne (2)

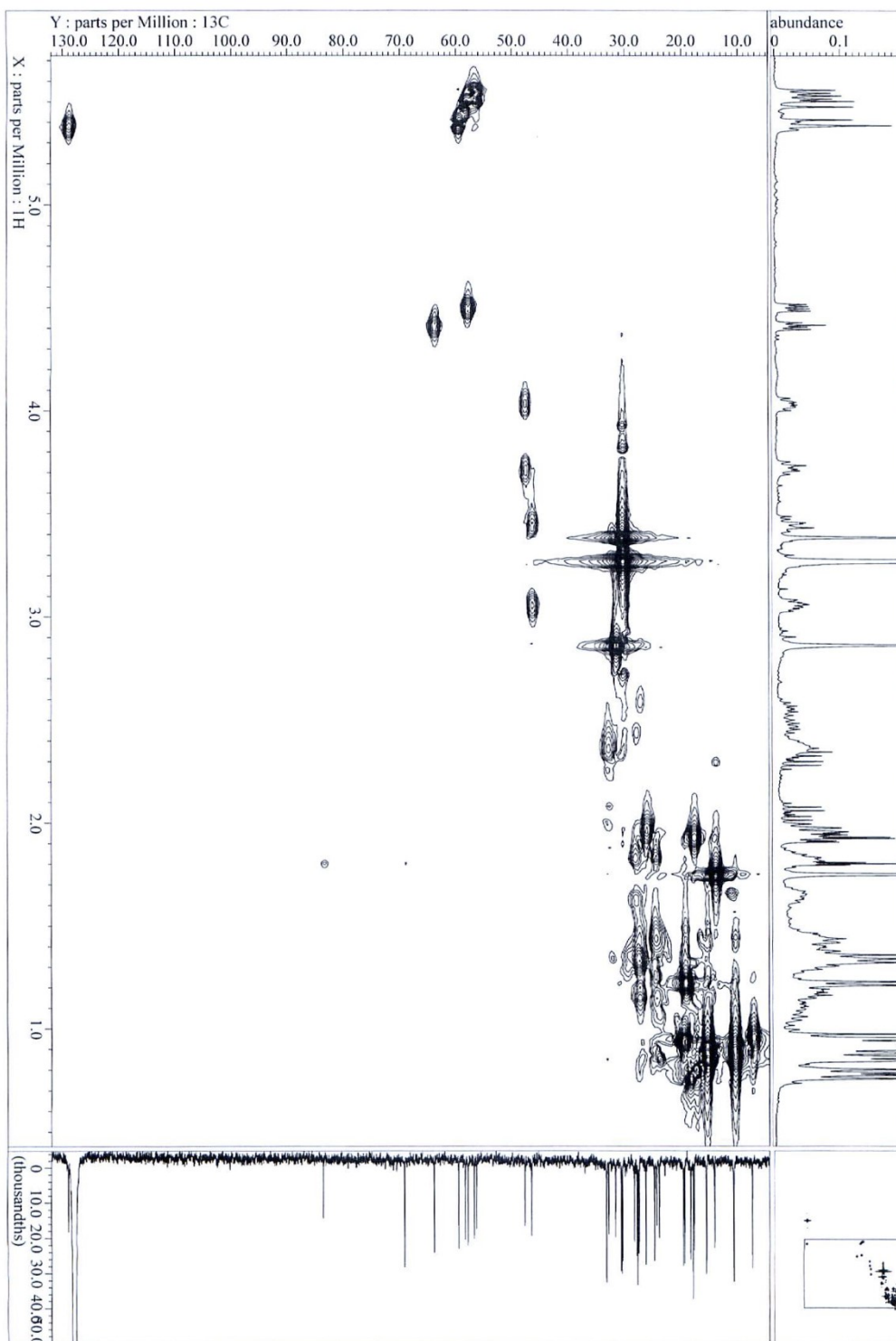


Figure 6-12. HMQC (400 MHz, C_6D_6) spectrum of kurahyne (2)

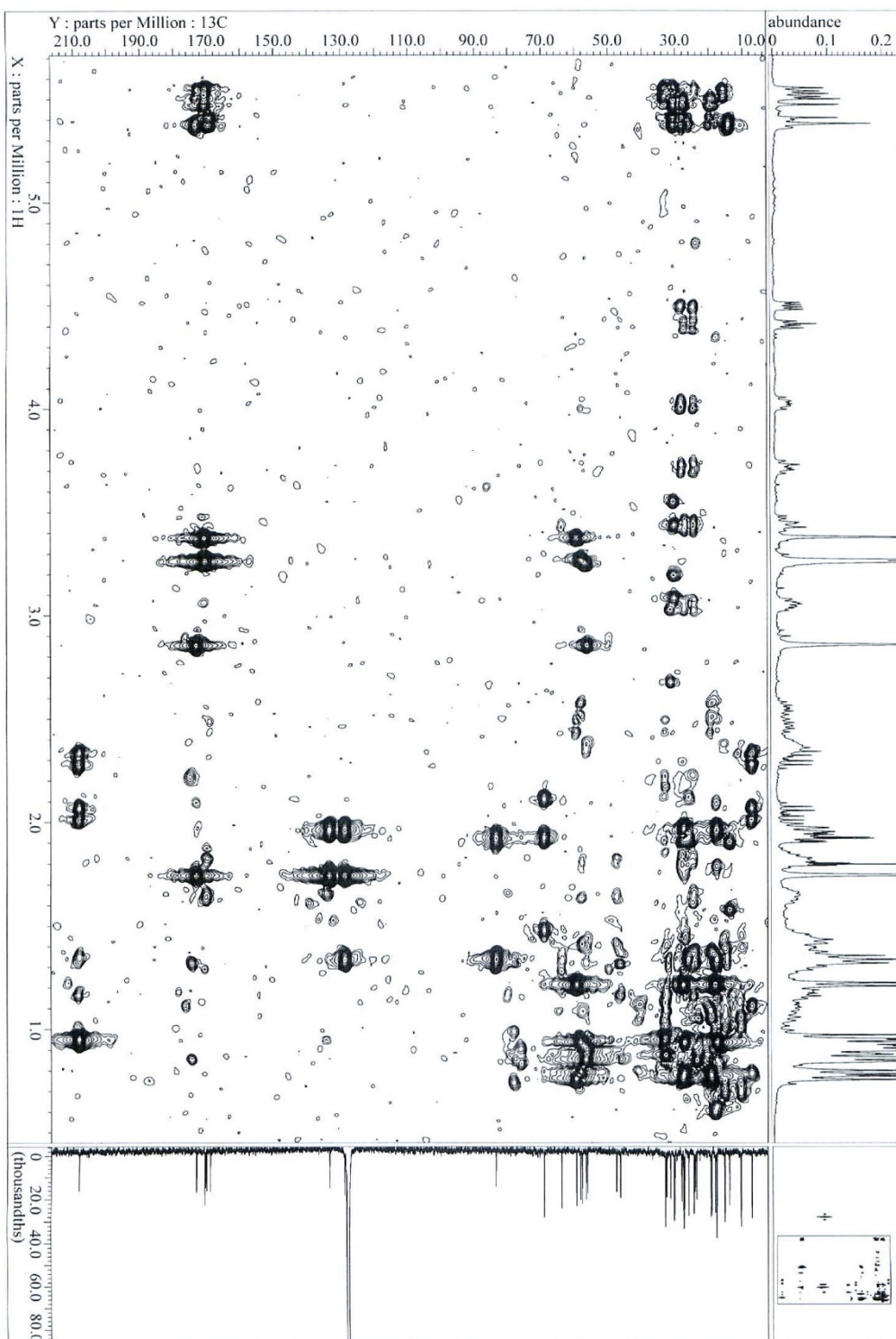


Figure 6-13. HMBC (400 MHz, C_6D_6) spectrum of kurahyne (2)

第二章 第六節の実験

Osteoclast differentiation inhibitory activity

Materials: Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) was purchased from R&D systems Inc.

Purification of recombinant human receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL): The biologically active domain of human RANKL (sRANKL; 140 a.a. - 317 a.a.) was expressed in *E. coli* strain BL21 as a glutathione *S*-transferase fusion protein, purified with Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare Life Sciences), and dialyzed against PBS. The purity of sRANKL was confirmed by SDS-PAGE analysis.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining assay: Eight-week-old female mice were purchased from Charles River Japan Inc. Bone marrow cells were collected from their tibiae and femora and were cultured in α -MEM (Life Technologies) in the presence of M-CSF (10 ng/ml) supplemented with 10% FBS for 72 h. The floating cells were then removed, and attached cells were used as bone marrow-derived macrophage (BMMs). To induce osteoclast differentiation, BMMs were further cultured with sRANKL (100 ng/ml) and M-CSF (10 ng/ml) for 72 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Wako) and stained for TRAP. To quantify the TRAP activity, TRAP-stained cells were lysed with DMSO and absorbance was measured at 570 nm.

MTT cell proliferation assay: BMMs were treated with or without sRANKL (100 ng/mL) followed by addition of chemicals for 72 h. 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) was added and incubated at 37 °C for 4 h. The amount of formazan was measured at 570 nm.

Determination of the absolute configuration in maedamide (3) except for an Ahppa moiety.

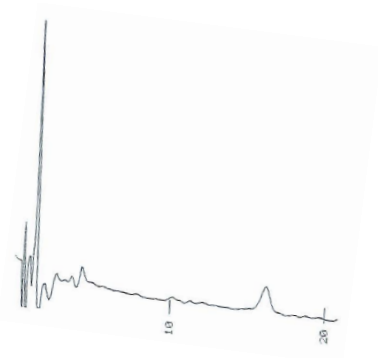
Maedamide (1) (0.9 mg) was treated with 9 M HCl (100 μ L) for 25 h at 110 °C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and could be separated into each component. The retention times of the isolated components were matched with those of the corresponding authentic standards. [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O. Retention times (min) of components: Pro (t_R = 3.2 min), Ile (t_R = 4.6 min), *N*-Me-Phe (t_R = 12.8 min)], [Conditions for HPLC separation: column, ODS HG-5 (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeCN-H₂O-TFA (10:90:0.1). Retention time (min) of component: valic acid (t_R = 9.1 min)], [Conditions for HPLC separation: column, ODS HG-5 (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeCN-H₂O-TFA (15:85:0.1). Retention time (min) of component: isoleucic acid (t_R = 12.5 min)].

Each fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards. [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄, 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (90:10) and 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (90:15)] With 2.0 mM CuSO₄, the retention times (t_R min) for authentic standards were D-Pro (2.9), L-Pro (5.4), D-Ile (7.9), L-Ile (6.4), D-*allo*-Ile (15.2), L-*allo*-Ile (11.1). With 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (90:10), the retention times for authentic standards were D-valic acid (10.2), L-valic acid (15.9), *N*-Me-D-Phe (14.4) and *N*-Me-L-Phe (16.4). With 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (85:15), the retention times for authentic standards were D-isoleucic acid (16.1), L-isoleucic acid (26.8), D-*allo*-isoleucic acid (13.7) and L-*allo*-isoleucic acid (22.4). The retention times (min) (and the respective HPLC conditions) of the amino acids in the hydrolysate were 5.4, 15.2 (100:0), 15.9, 14.4 (90:10), and 13.7 (85:15), indicating the presence of L-Pro, D-*allo*-Ile, L-valic acid, *N*-Me-D-Phe and D-*allo*-isoleucic acid in the hydrolysate.

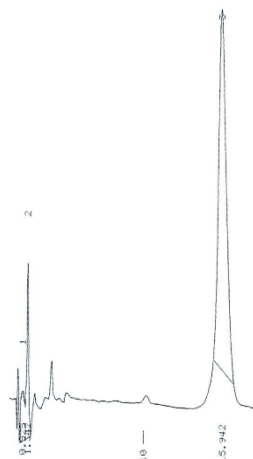
Valic acid: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min;
detection at 254 nm; solvent, MeCN - 2.0 mM CuSO₄ (10:90)

t_R (min): Authentic samples: L-Valic acid (15.9), D-Valic acid (10.2)

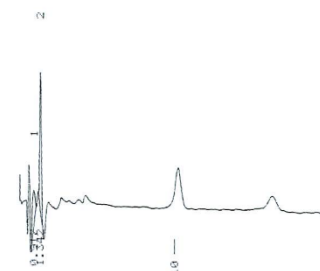
Valic acid from natural **3** (15.9).



Valic acid from natural **3**



Valic acid from natural **3**
with L-Valic acid

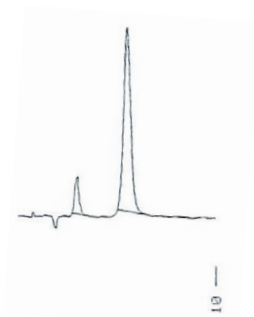


Valic acid from natural **3**
with D-Valic acid

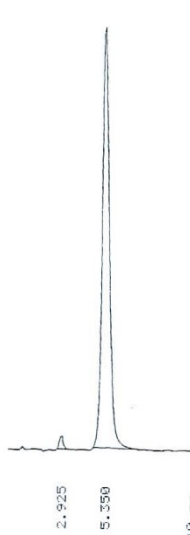
Pro: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min;
detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: L-Pro (5.4), D-Pro (2.9).

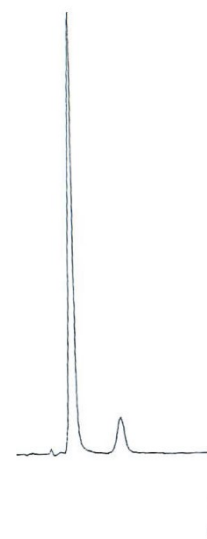
Pro from natural **3** (5.4).



Pro from natural **3**



Pro from natural **3**
with L-Pro

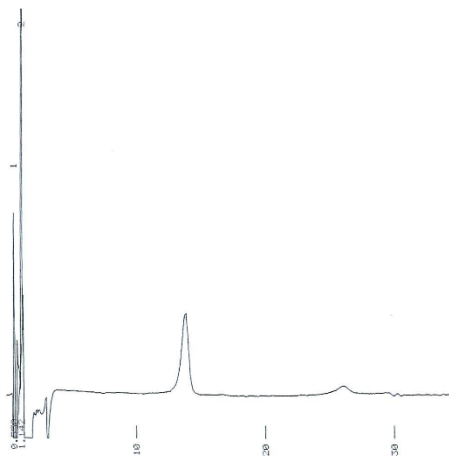


Pro from natural **3**
with D-Pro

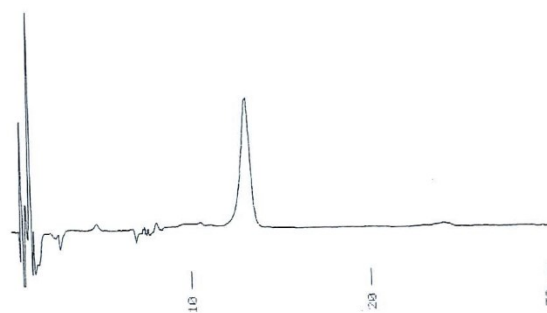
Isoleucic acid: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, MeCN - 2.0 mM CuSO₄ (15:85)

t_R (min): Authentic samples: L-Isoleucic acid (26.8), D-Isoleucic acid (16.1), L-*allo*-Isoleucic acid (22.4), D-*allo*-Isoleucic acid (13.7)

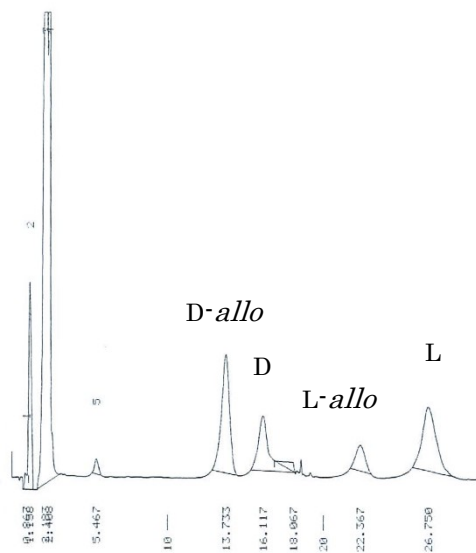
Isoleucic acid from natural **3** (13.7).



Isoleucic acid from natural **3**



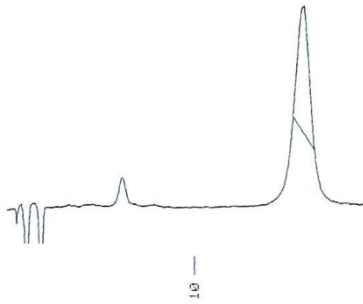
Isoleucic acid from natural **3**
with D-*allo*-isoleucic acid



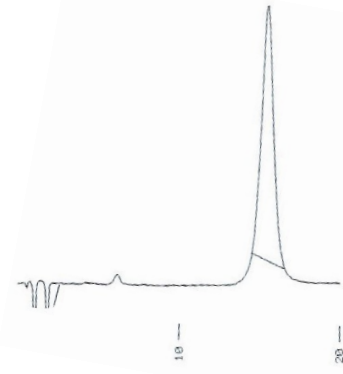
D,L, D-*allo* L-*allo* Isoleucic acid

Ile: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

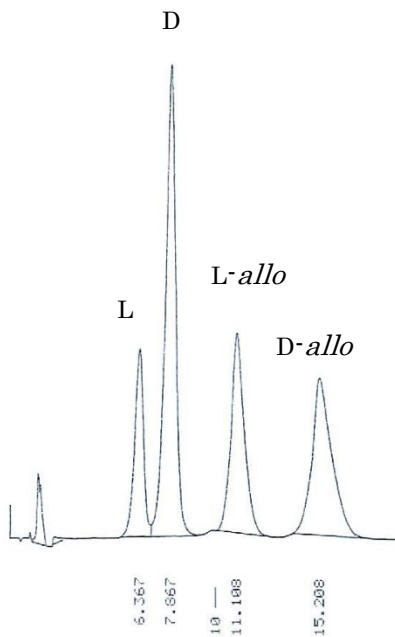
t_R (min): Authentic samples: L-Ile (6.4), D-Ile (7.9), L-*allo*-Ile (11.1), D-*allo*-Ile (15.2), Ile from natural **3** (15.2).



Ile from natural **3**



Ile from natural **3**
with D-*allo*-Ile



D,L, D-*allo* L-*allo* Ile

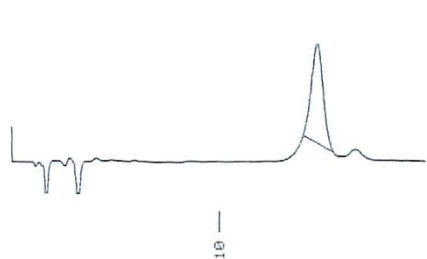
のちに L 体と D-*allo* 体との間で標品の取り違いがあったことが判明した。

したがって、これらのアミノ酸の正しい保持時間は L 体: 15.2 min、D-*allo* 体: 6.4 min である。

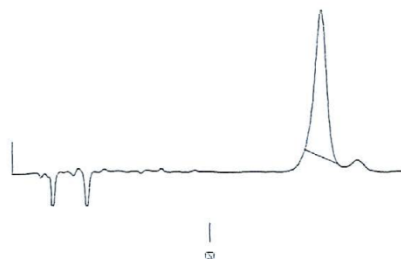
N-Me-Phe: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min;
detection at 254 nm; solvent, MeCN – 2.0 mM CuSO₄ (10:90)

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-L-Phe (16.4), *N*-Me-D-Phe (14.4)

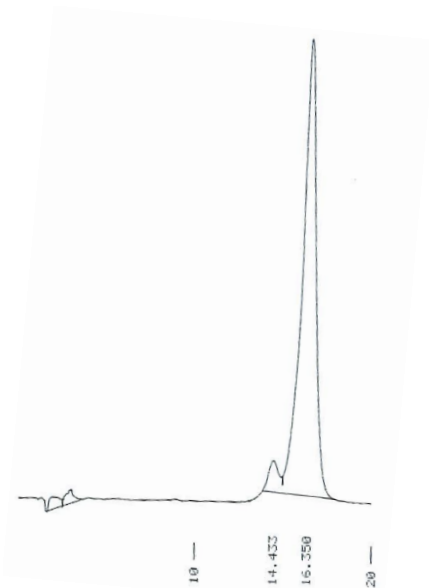
N-Me-Phe from natural **3** (14.4).



N-Me-Phe from natural **3**



N-Me-Phe from natural **3**
with *N*-Me-D-Phe

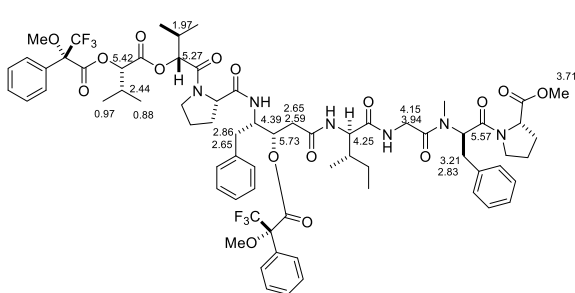


N-Me-Phe from natural **3**
with *N*-Me-L-Phe

Determination of the absolute configuration of C-3 in an Ahppa moiety.

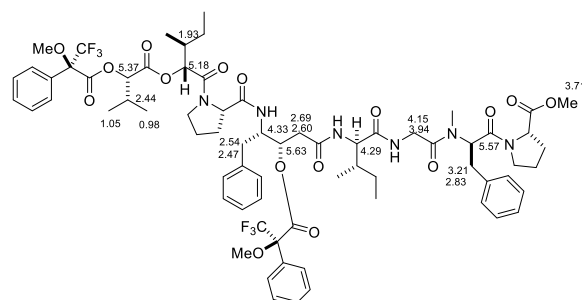
To a stirred solution of maedamide (**3**) (1.0 mg, 1.0 μmol) in pyridine (100 μL) were added 3 drops of (*R*)-MTPACl and 4-(dimethylamino)pyridine (1.3 mg). The mixture was stirred at room temperature for 2 h and concentrated to give oil, which was purified by HPLC [Condition for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeOH-H₂O (89:11). Retention time: 48.9 min] to afford (*S*)-MTPA ester (0.9 mg, 0.64 μmol , 64%) as a colorless oil: HRESIMS m/z 1395.6190 [$M+H$]⁺ (calcd for C₇₁H₈₉N₆O₁₆F₆, 1395.6239).

To a stirred solution of maedamide (**3**) (1.5 mg, 1.5 μmol) in pyridine (100 μL) were added 3 drops of (*S*)-MTPACl and 4-(dimethylamino)pyridine (1.5 mg). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h and concentrated to give oil, which was purified by HPLC [Condition for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeOH-H₂O (90:10). Retention time: 42.5 min] to afford (*R*)-MTPA ester (0.7 mg, 0.50 μmol , 33%) as a colorless oil: HRESIMS m/z 1417.6077 [$M+Na$]⁺ (calcd for C₇₁H₈₈N₆O₁₆F₆Na, 1417.6059).



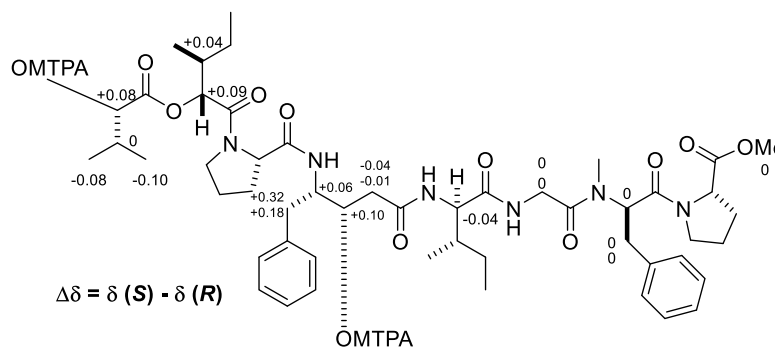
(*S*)-MTPA ester

with selected proton chemical shifts



(*R*)-MTPA ester

with selected proton chemical shifts



Chemical shift differences ($\Delta\delta$) between the MTPA derivatives

Determination of the absolute configuration of C-4 in an Ahppa moiety.

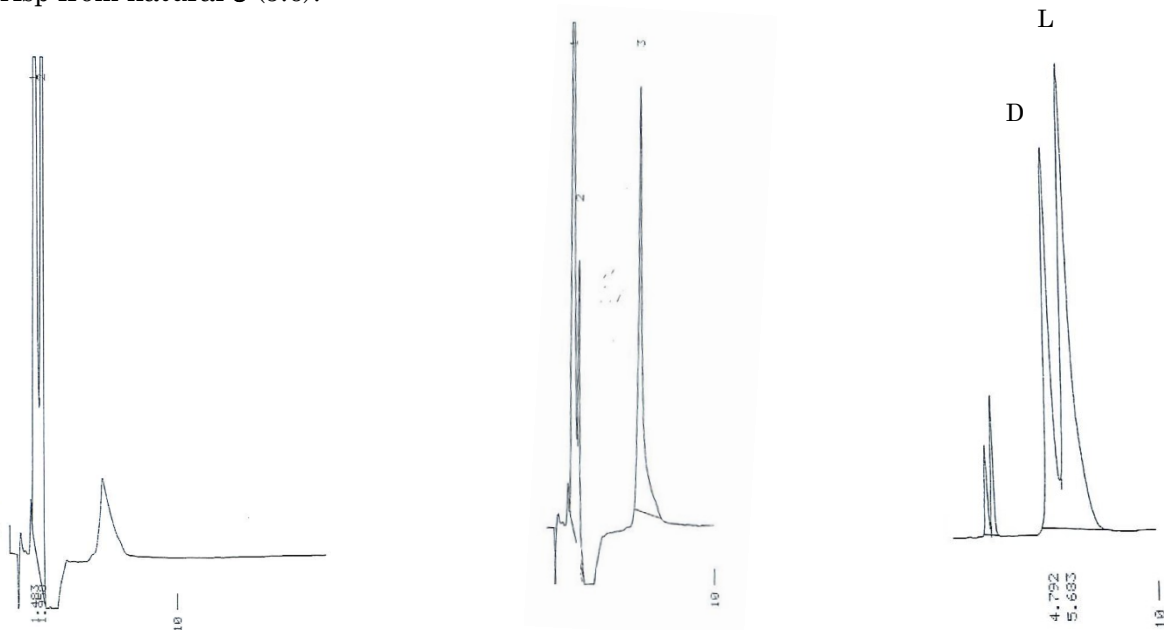
Maedamide (**3**) (0.5 mg) was treated with 9 M HCl (100 μ L) for 17.5 h at 110 $^{\circ}$ C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness. Ozone was bubbled through a cooled (-78° C) stirred solution of hydrolysate in MeOH (1 mL) for 30 min, and the reaction mixture was concentrated. 30% hydroperoxide (100 μ L) and formic acid (100 μ L) were added, and the solution was stirred for 11 h at room temperature. Then, the mixture was stirred for 1 h at 80 $^{\circ}$ C and evaporated to dryness. The residue could be separated into a component containing Asp. [Condition for HPLC separation of Asp: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent TFA-H₂O (0.1:100). Retention time of Asp: 3.1 min)]

Asp from **3** was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral HPLC, and the retention time was compared to that of authentic standards. [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄] The retention times (t_R min) for authentic standards were D-Asp (4.7), L-Asp (5.6). The retention time (min) of Asp from **3** was 5.6, indicating that the absolute configuration of C-4 in Ahppa moiety was *S*.

Asp: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄

t_R (min): Authentic samples: L-Asp (5.6), D-Asp (4.7)

Asp from natural **3** (5.6).



Asp from natural **3**

Asp from natural **3**
with L-Asp

D,L-Asp

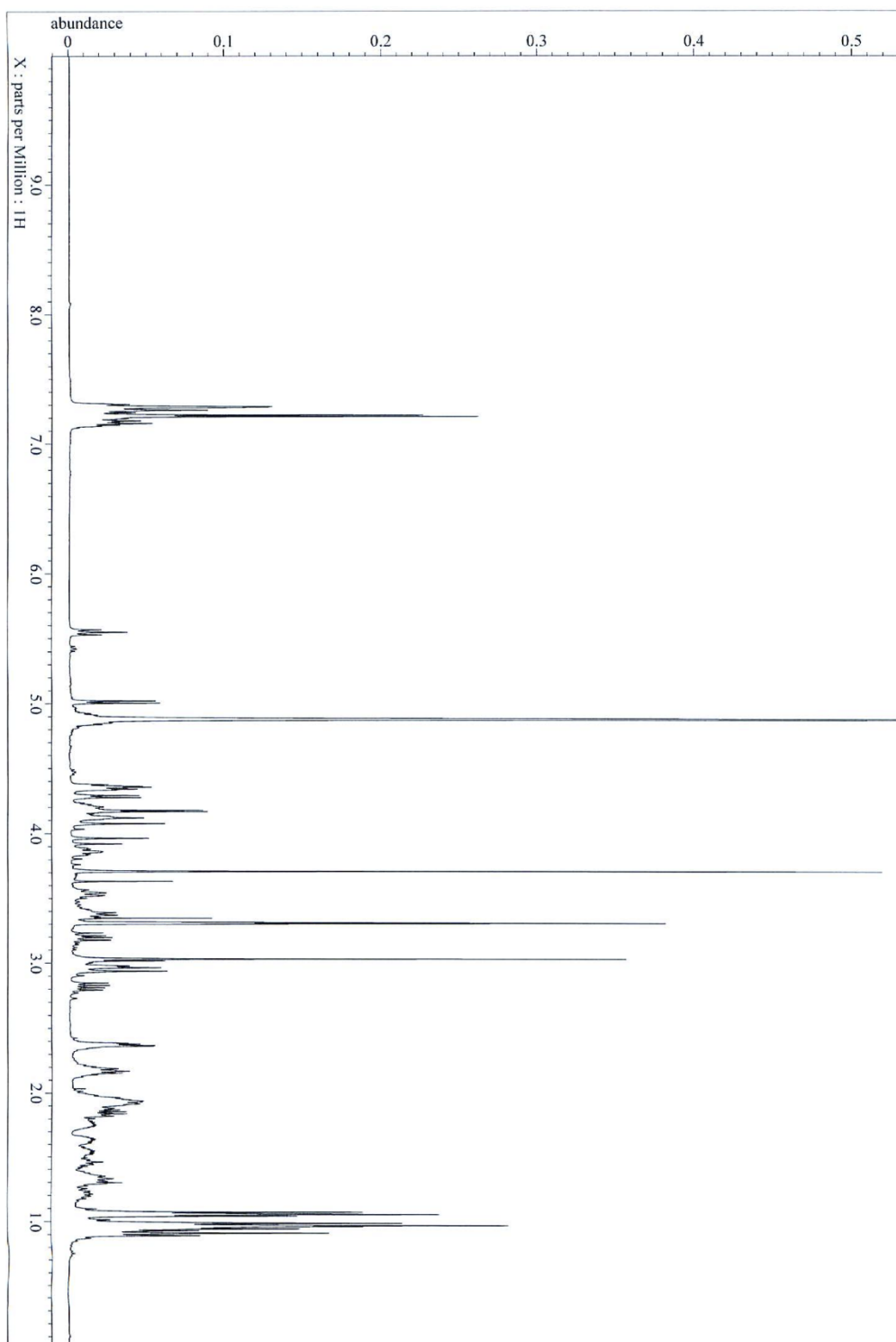


Figure 6-14. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of maedamide (**3**)

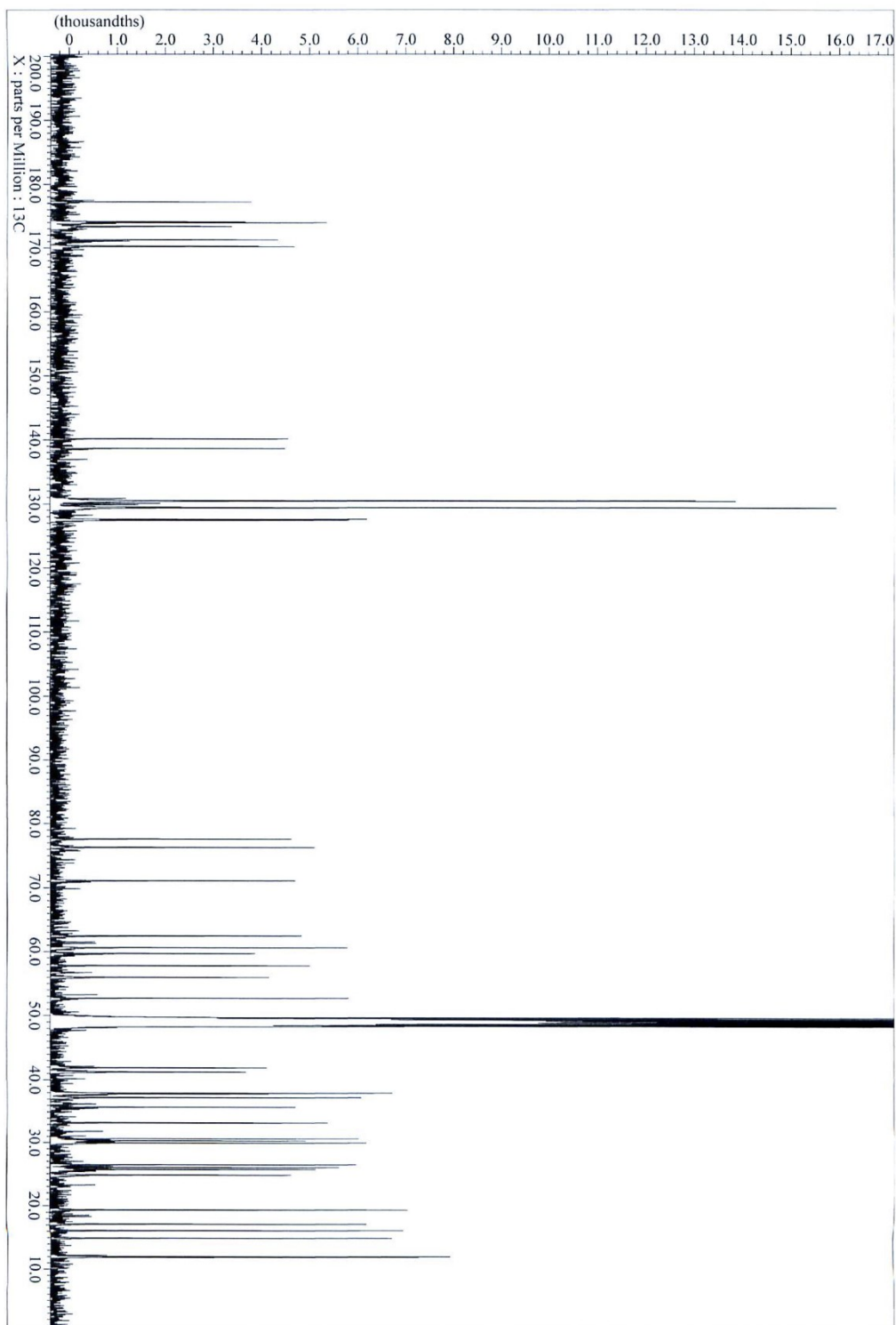


Figure 6-15. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of maedamide (3)

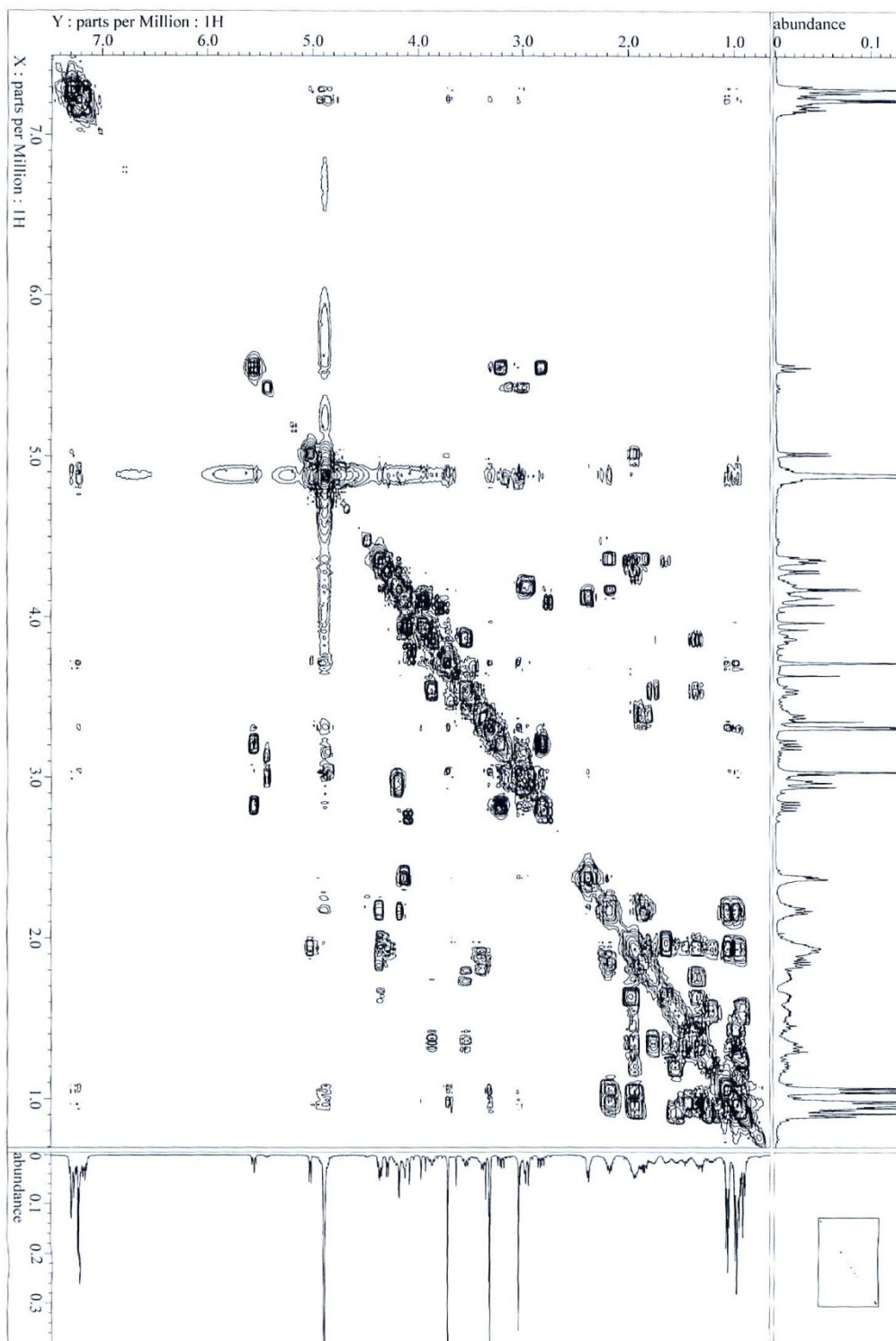


Figure 6-16. COSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of maedamide (3)

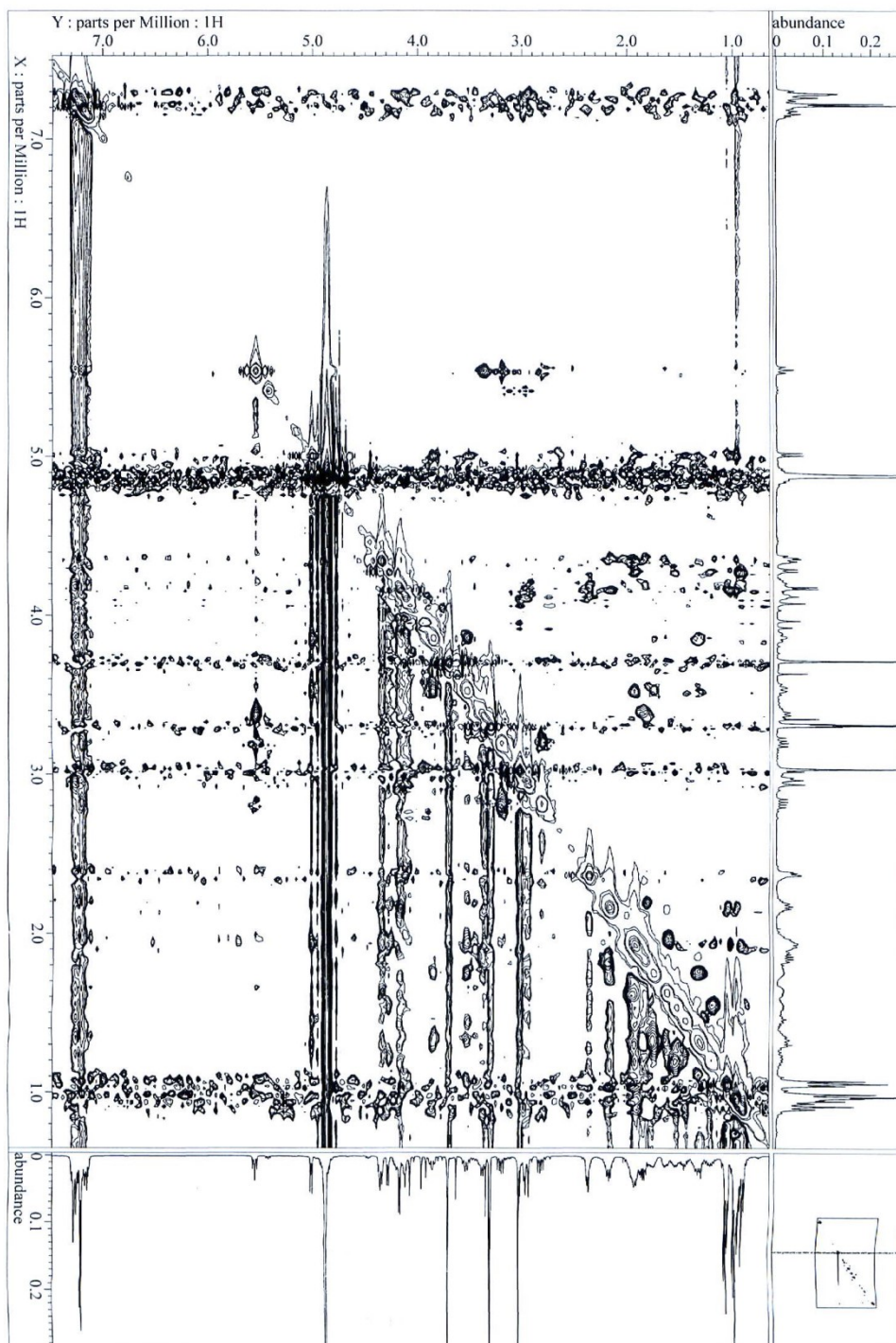


Figure 6-17. NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of maedamide (3)

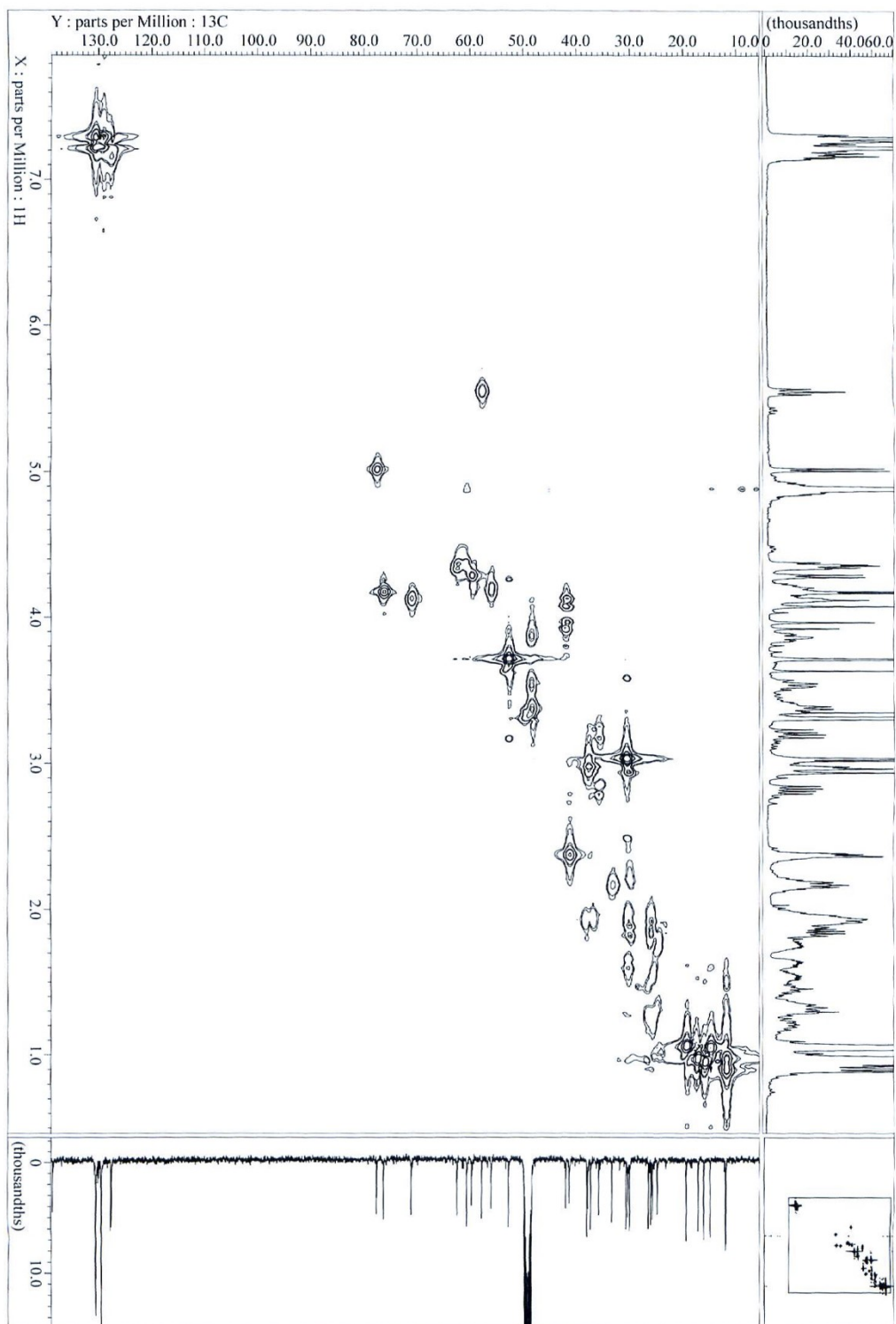


Figure 6-18. HMQC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of maedamide (**3**)

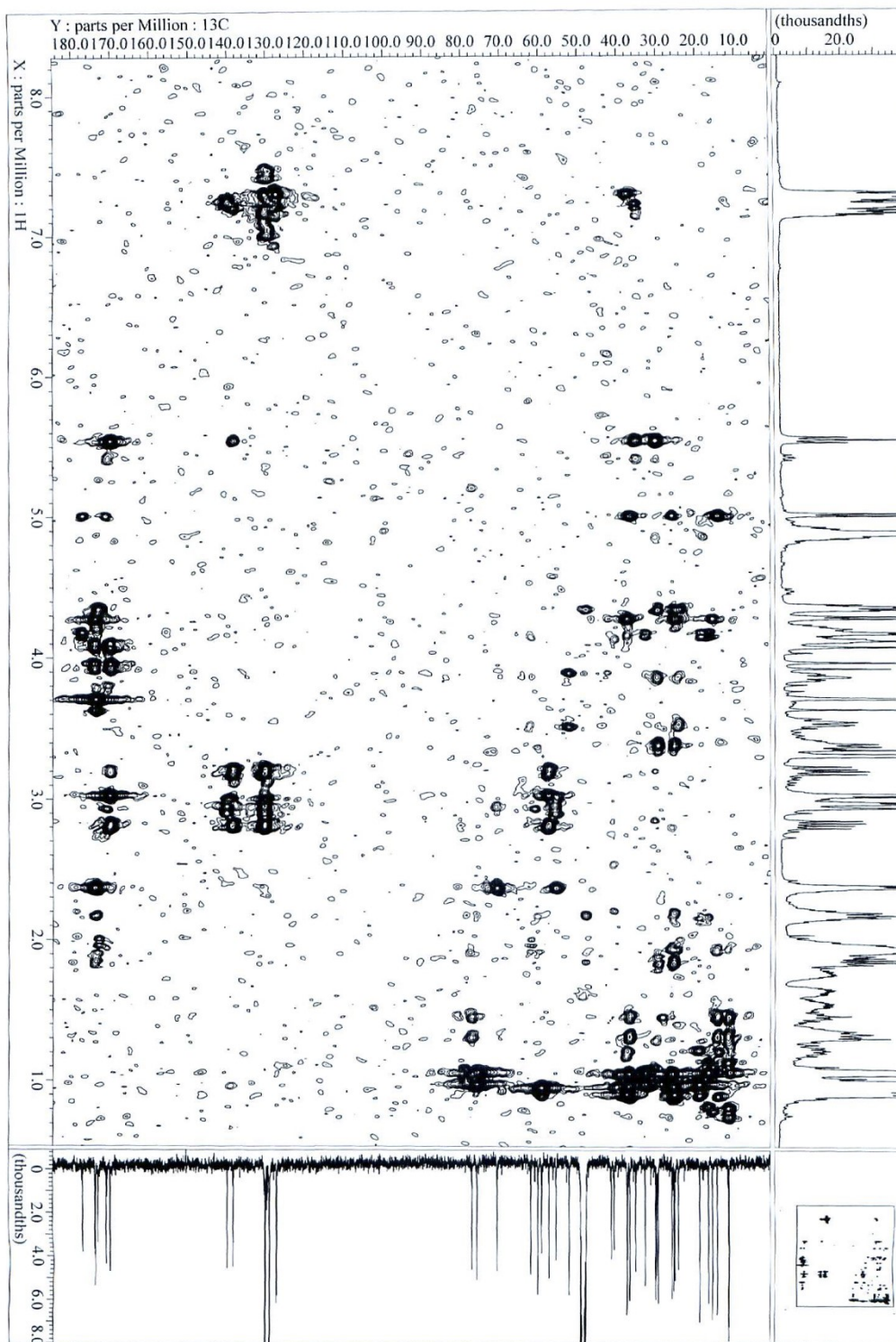


Figure 6-19. HMBC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of maedamide (3)

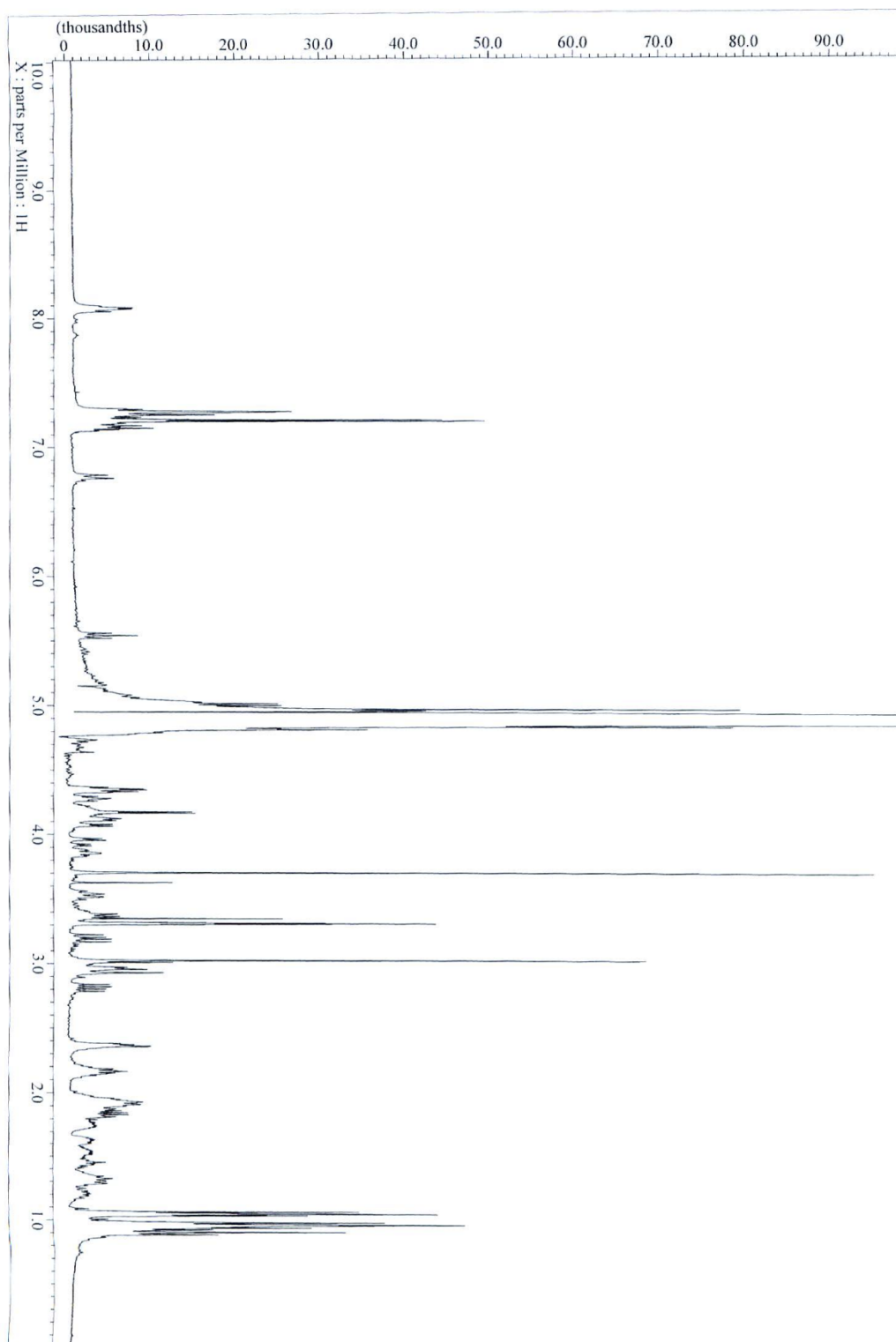


Figure 6-20. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OH) spectrum of maedamide (3)

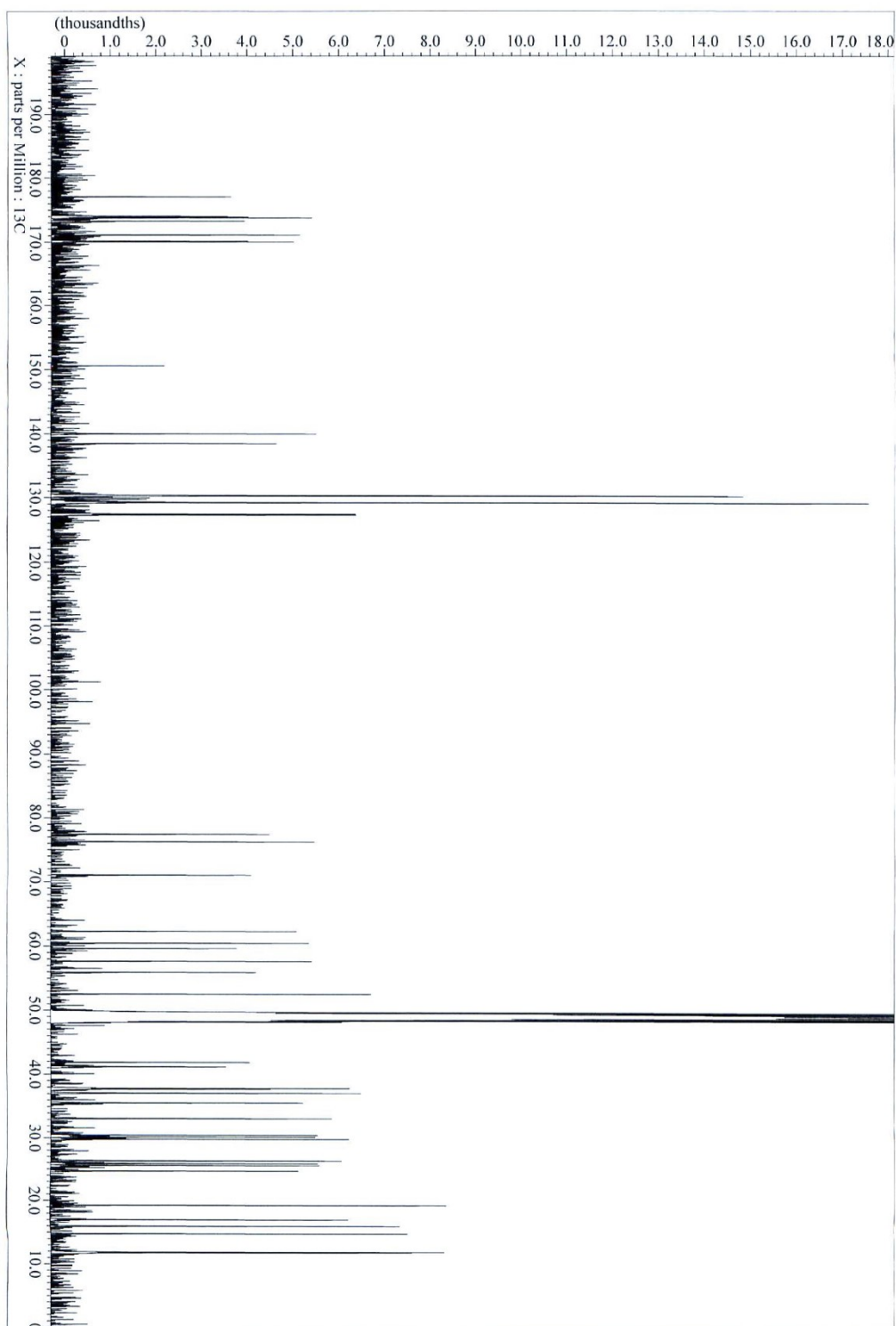


Figure 6-21. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OH) spectrum of maedamide (3)

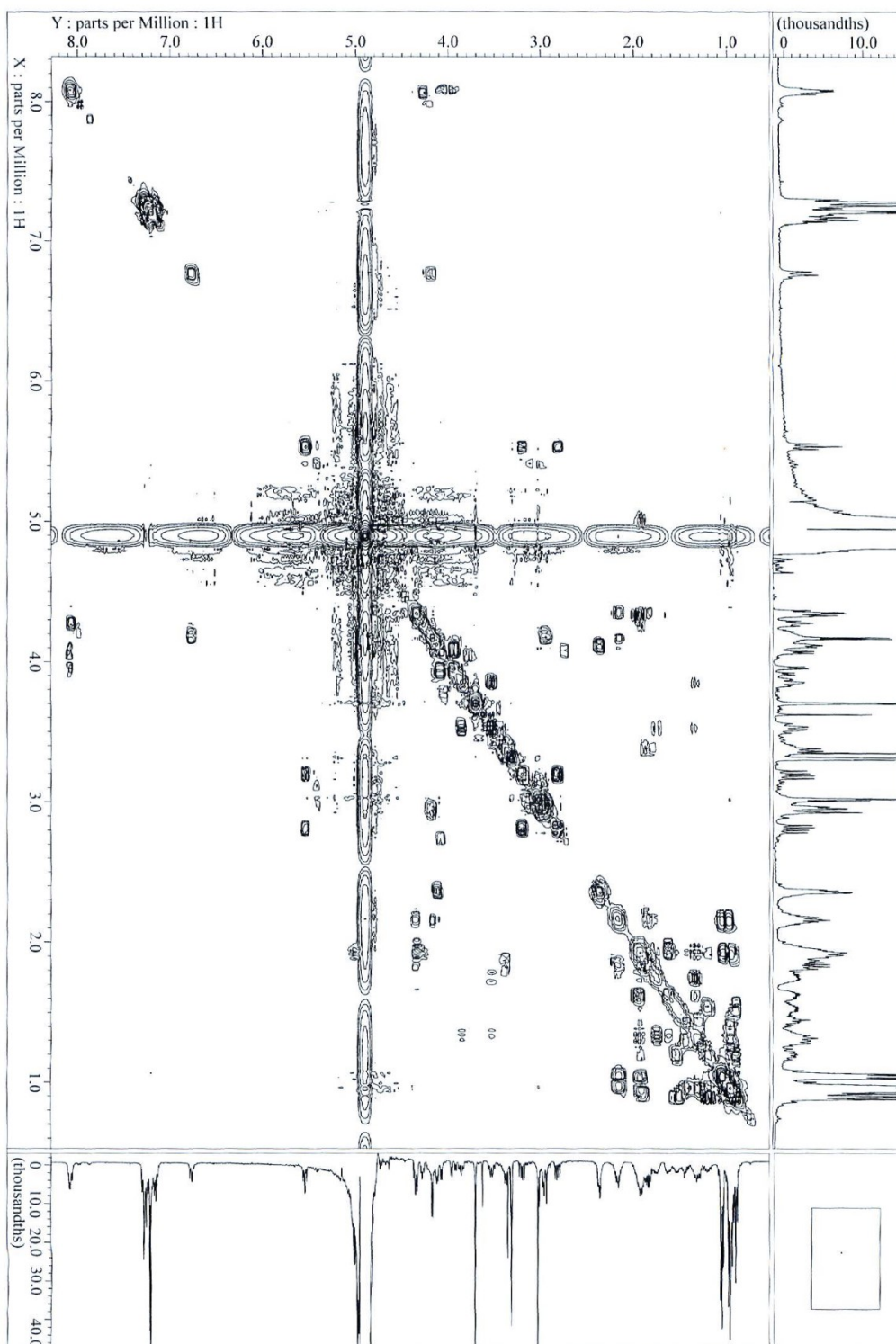


Figure 6-22. COSY (400 MHz, CD₃OH) spectrum of maedamide (**3**)

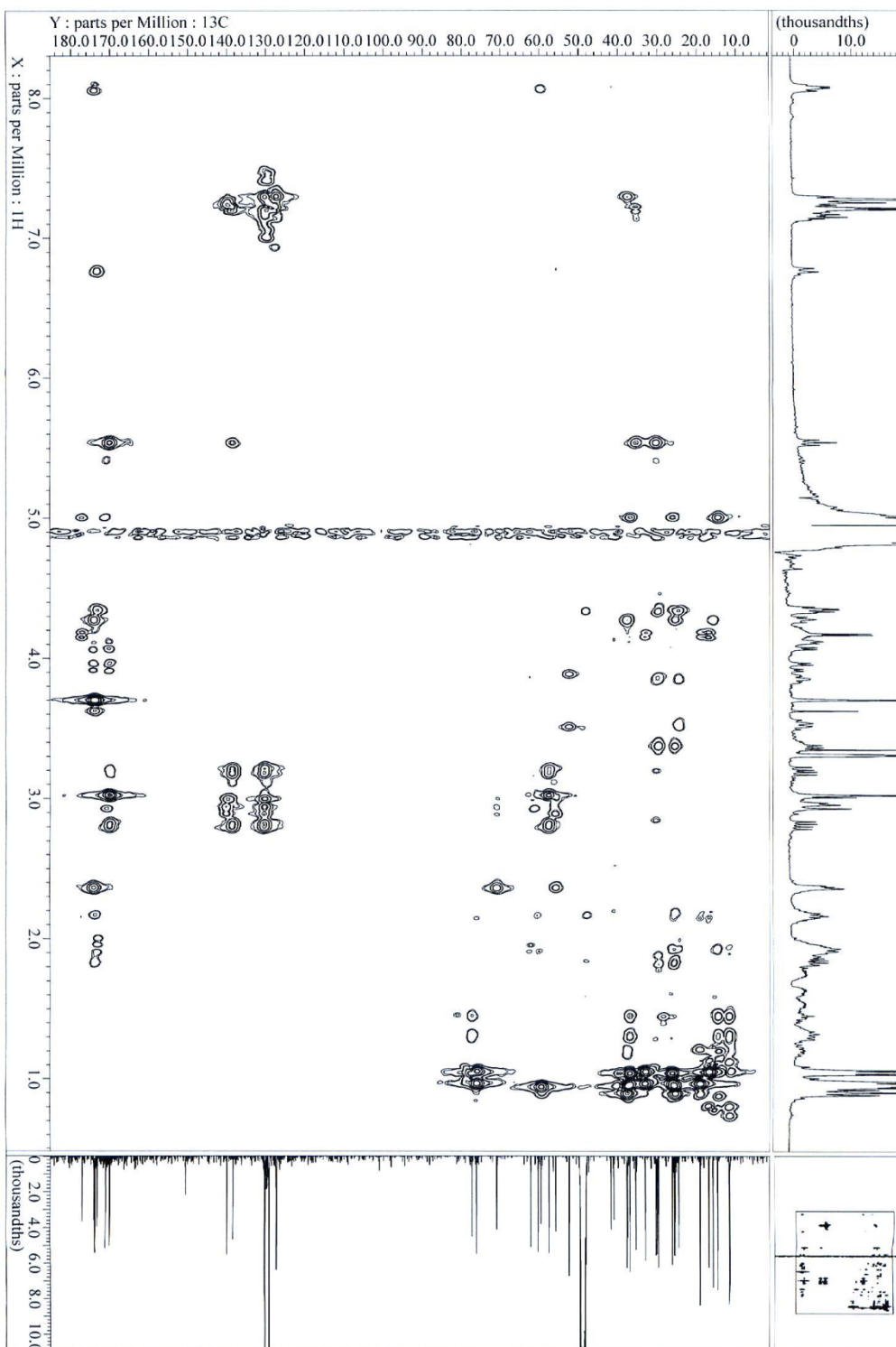
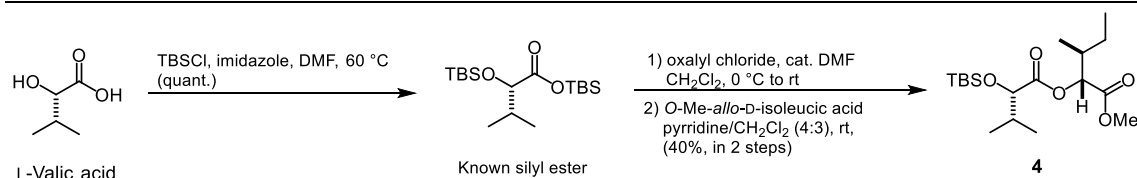


Figure 6-23. HMBC (400 MHz, CD_3OH) spectrum of maedamide (**3**)

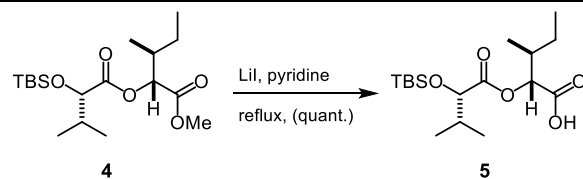
Total synthesis of originally proposed maedamide (3') and maedamide (3)

Ester 4.



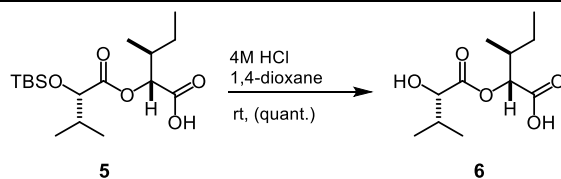
L-valic acid was converted to the known silyl ester according to the previous report⁸² (quant.). To a stirred solution of silyl ester (228 mg, 0.658 mmol) in CH_2Cl_2 (1.6 mL) were added a solution of oxalyl chloride (85 mg, 0.67 mmol) in CH_2Cl_2 (0.4 mL) and DMF (two drops) at 0°C . The mixture was stirred for 90 min and allowed to warm to room temperature. After stirring for 60 min at room temperature, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (2 mL) and evaporated to give a crude oil. To the crude oil was added a solution of *O*-Me-*allo*-*D*-isoleucic acid (68 mg, 0.47 mmol) in CH_2Cl_2 /pyridine (3:4, 1.05 mL) at room temperature. After stirring for 96 h, the mixture was diluted with THF (8 mL) and filtered over celite. The filtrate were concentrated and dissolved with EtOAc (10 mL). The solution was washed with water (8 mL), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (8 mL) and brine (8 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (hexane:EtOAc, 35:1) to give **4** as a colorless oil (68 mg, 0.19 mmol, 40%): $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -13$ (c 1.0, CHCl_3); IR (film) λ_{max} 2961, 1757, 1472 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CHCl_3) δ 5.04 (d, $J=3.6$, 1H), 4.11 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.99 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.94-0.89 (m, 18H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 170.5, 76.8, 74.8, 52.2, 36.8, 32.9, 26.2, 25.9, 19.3, 18.4, 16.7, 14.7, 11.8, -4.8, -5.4; HR (ESI) m/z 383.2255, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 383.2230.

Carboxylic acid 5.



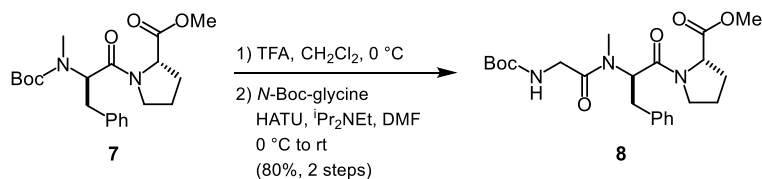
To a stirred solution of **4** (69 mg, 190 μ mol) in pyridine (2.0 mL) was added LiI (254 mg, 1.90 mmol) at room temperature. After stirring for 6 h at reflux, the mixture was evaporated. The residual oil was suspended with 10% aqueous citric acid and extracted with EtOAc (10 mL \times 3). The combined organic layer was washed with saturated aqueous sodium thiosulfate (5 mL) and brine (5 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated to give **5** (69 mg, quant.): $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -15$ (c 1.0, CHCl_3); IR (film) λ_{max} 2962, 1730, 1473 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CHCl_3) δ 5.08 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.13-2.00 (m, 2H), 1.43 (m, 1H), 1.34 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.95-0.88 (m, 18H), 0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.7, 173.2, 76.7, 74.2, 36.7, 32.9, 26.2, 25.9, 19.3, 18.4, 16.7, 14.6, 11.8, -4.8, -5.4; HR (ESI) m/z 345.2109, calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{O}_5\text{Si}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 345.2097.

Carboxylic acid 6.



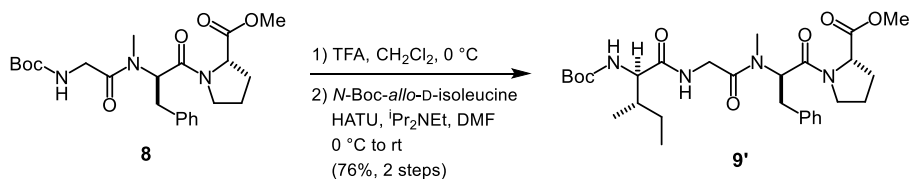
Carboxylic acid **5** (15 mg, 43 μ mol) was dissolved in 0.2 M solution of HCl in 1,4-dioxane (0.15 mL), and the solution was stirred at room temperature for 96 h. The mixture was evaporated, and the residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 9:1 to 1:1) to give **6** as a colorless oil (10 mg, quant): $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +14$ (*c* 0.2, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 3397, 2966, 1719, 1617, 1419 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.12 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 2.11 (m, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.42 (m, 1H), 1.34 (m, 1H), 1.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.94 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 175.5, 175.5, 77.1, 76.5, 37.9, 33.3, 27.4, 19.3, 16.9, 15.0, 12.1; HR (ESI) *m/z* 231.1240, calcd for C₁₁H₁₉O₅ [M-H]⁻ 231.1232.

Tripeptide 8.



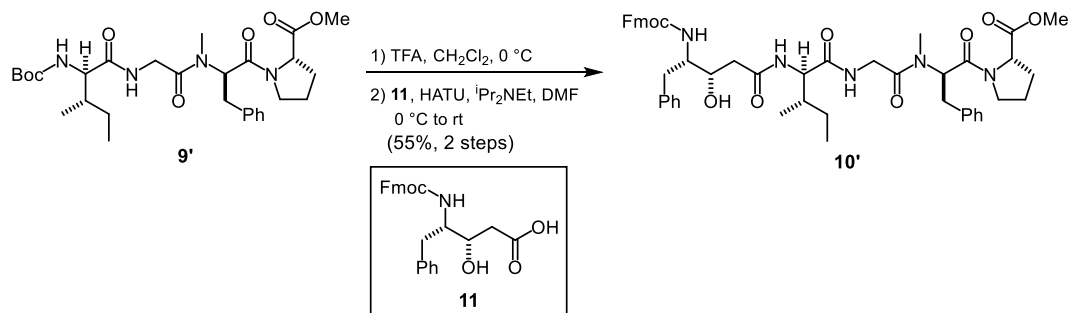
To a stirred solution of known dipeptide **7** (357 mg, 0.914 mmol)⁸³ in CH₂Cl₂ (12 mL) was added TFA (3 mL) at 0 °C. After stirring for 2.5 h, the mixture was diluted with benzene (4 mL) and evaporated. To a stirred solution of the residual oil, *N*-Boc-glycine (175 mg, 0.999 mmol) and HATU (342 mg, 0.899 mmol) in DMF (3 mL), was added DIPEA (0.35 mL) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 14 h, the mixture was diluted with EtOAc (15 mL), washed with 10% aqueous citric acid (10 mL), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (10 mL) and brine (10 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (hexane:EtOAc, 2:1) to give **8** as a colorless oil (325 mg, 0.726 mmol, 80%): [α]_D²⁹ +52 (*c* 1.0, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 2978, 1743, 1646, 1498, 1456 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.27-7.14 (m, 5H), 5.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 8.9, 5.7 Hz, 1H), 3.98 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.50-3.34 (m, 2H), 3.20 (dd, *J* = 13.9, 8.0 Hz, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.84 (dd, *J* = 13.9, 7.5 Hz, 1H), 2.20 (m, 1H), 1.97-1.81 (m, 3H), 1.44 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 174.0, 171.3, 170.2, 158.3, 138.6, 130.5, 129.4, 127.6, 80.5, 60.6, 57.8, 52.7, 48.3, 43.0, 35.7, 30.5, 29.9, 28.7, 25.9; HR (ESI) *m/z* 470.2245, calcd for C₂₃H₃₃N₃O₆Na [M+H]⁺ 470.2267.

Tetrapeptide 9'



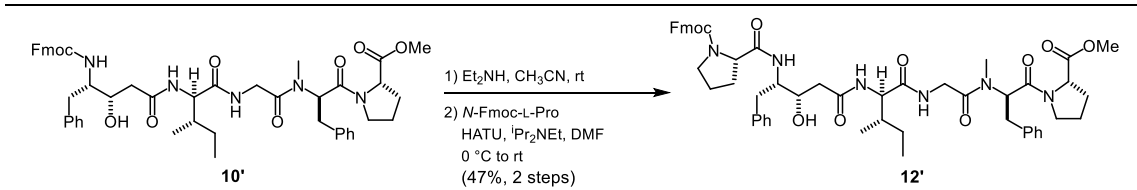
To a stirred solution of tripeptide **8** (165 mg, 0.369 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added TFA (0.8 mL) at 0 °C. After stirring for 2.5 h, the mixture was diluted with benzene (1.5 mL) and evaporated. To a stirred solution of the residual oil, *N*-Boc-*allo*-D-isoleucine (102 mg, 0.441 mmol) and HATU (183 mg, 0.481 mmol) in DMF (0.4 mL), was added DIPEA (0.16 mL) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 3 h, the mixture was diluted with EtOAc (10 mL), washed with 10% aqueous citric acid (8 mL), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (8 mL) and brine (8 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 40:1) to give **9'** as a colorless oil (157 mg, 0.280 mmol, 76%): [α]_D²⁹ +46 (*c* 1.0, CHCl₃); IR (film) λ_{max} 3323, 2972, 1744, 1648, 1499, 1456 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24-7.12 (m, 5H), 6.75 (br s, 1H), 5.56 (dd, *J* = 7.8, 6.8 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.12 (dd, *J* = 17.6, 4.1 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 17.6, 3.9 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.42-3.30 (m, 2H), 3.27 (dd, *J* = 13.6, 7.8 Hz, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.82 (dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.99-1.78 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.43 (m, 1H), 1.17 (m, 1H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 171.9, 168.1, 167.9, 156.0, 137.1, 129.6, 128.5, 126.8, 80.0, 59.1, 58.0, 56.5, 52.4, 47.0, 41.4, 37.8, 35.1, 29.8, 29.0, 28.4, 26.4, 25.2, 14.4, 11.9; HR (ESI) *m/z* 583.3090, calcd for C₂₉H₄₄N₄O₇Na [M+Na]⁺ 583.3108.

Pentapeptide 10'



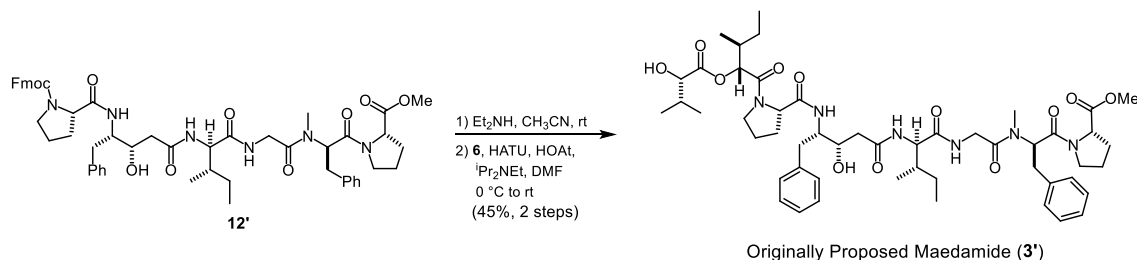
To a stirred solution of tetrapeptide **9'** (30 mg, 54 μ mol) in CH₂Cl₂ (1.0 mL) was added TFA (0.3 mL) at 0 °C. After stirring for 2 h, the mixture was diluted with benzene (0.8 mL) and evaporated. To a stirred solution of the residual oil, known carboxylic acid **11**⁸⁴ (28 mg, 65 μ mol) and HATU (29 mg, 76 μ mol) in DMF (0.1 mL), was added DIPEA (0.03 mL) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 2 h, the mixture was diluted with EtOAc (5 mL), washed with 10% aqueous citric acid (4 mL), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (4 mL) and brine (4 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 60:1 to 50:1) to give **10'** as a colorless oil (26 mg, 29 μ mol, 54%); IR (film) λ_{max} 3307, 2959, 1744, 1654, 1534, 1451 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, J = 6.8, 2H), 7.59-7.51 (m, 2H), 7.43-7.37 (m, 2H), 7.34-7.28 (m, 2H), 7.25-7.15 (m, 10H), 6.94 (brs, 1H), 6.10 (d, J = 8.3, 1H), 5.54 (dd, J = 7.6, 7.6, m, 1H), 5.17 (d, J = 10.0, 1H), 4.50-4.38 (m, 4H), 4.33 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.10-4.04 (m, 2H), 3.93 (dd, J = 17.3, 2.9, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.40-3.24 (m, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.92 (m, 1H), 2.84 (m, 1H), 2.43-2.09 (m, 3H), 1.99-1.77 (m, 4H), 1.38 (m, 1H), 1.18 (m, 1H), 0.93 (t, J = 7.3, 3H), 0.87 (d, J = 6.8, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.8, 172.6, 171.5, 168.4, 167.9, 156.6, 144.1, 143.9, 141.4, 138.0, 137.1, 129.6, 129.5, 128.7, 128.6, 127.8, 127.2, 126.9, 126.7, 125.3, 124.7, 120.1, 68.6, 66.7, 59.1, 56.6, 56.5, 52.4, 47.5, 46.9, 41.5, 41.2, 38.9, 37.0, 35.2, 30.0, 29.0, 26.5, 25.2, 14.7, 11.8; HR (ESI) m/z 874.4423, calcd for C₅₀H₆₀N₅O₉ [M+H]⁺ 874.4391.

Hexapeptide 12'



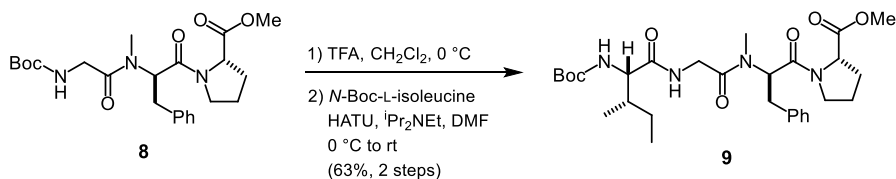
To a stirred solution of pentapeptide **10'** (26 mg, 30 μmol) in CH₃CN (1.2 mL) was added diethylamine (0.4 mL) at rt. After stirring for 3 h, the mixture was evaporated. To a stirred solution of the residual oil, known *N*-Fmoc-L-Pro (14 mg, 42 μmol) and HATU (18 mg, 47 μmol) in DMF (5 drops), was added DIPEA (2 drops) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 3 h, the mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (3 mL) and extracted with EtOAc (5 mL × 3). The combined organic layer was washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (4 mL) and brine (4 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 60:1) to give **12'** as a colorless oil (14 mg, 14 μmol, 47%): [α]_D²⁹ -3.4 (*c* 1.0, CHCl₃); IR (film) λ_{max} 3317, 2961, 1747, 1645, 1539, 1452 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 7.24-7.13 (m, 10H), 6.74 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.51 (dd, *J* = 8.2, 7.1 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.42-4.34 (m, 3H), 4.31-4.16 (m, 3H), 4.11 (m, 1H), 3.99 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.42-3.23 (m, 5H), 2.97 (s, 3H), 2.96 (m, 1H), 2.90 (dd, *J* = 13.9, 7.1 Hz, 1H), 2.79 (d, *J* = 13.9, 6.7 Hz, 1H), 2.54 (m, 1H), 2.31-2.13 (m, 2H), 2.12-1.70 (m, 7H), 1.57 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.18 (m, 1H), 0.88-0.80 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.8, 172.6, 171.9, 171.8, 168.6, 167.9, 156.2, 143.9, 143.8, 141.4, 138.1, 137.0, 129.5, 129.2, 129.1, 128.8, 128.5, 128.0, 127.3, 126.9, 126.5, 125.2, 120.2, 69.5, 68.0, 61.2, 59.1, 56.9, 56.6, 54.0, 52.4, 47.2, 46.9, 41.5, 41.4, 38.2, 36.2, 35.2, 30.0, 28.9, 26.5, 25.1, 24.3, 14.7, 11.8; HR (ESI) *m/z* 971.4871, calcd for C₅₅H₆₇N₆O₁₀ [M+H]⁺ 971.4919.

Originally proposed maedamide (3').



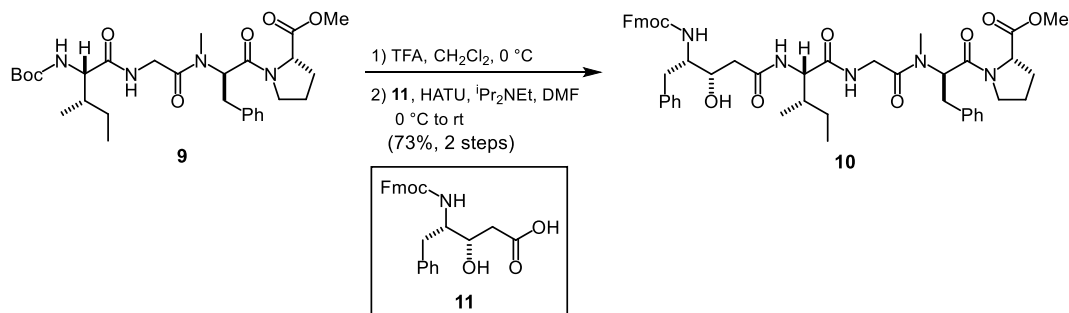
To a stirred solution of hexapeptide **12'** (19 mg, 19 μ mol) in CH₃CN (1.2 mL) was added diethylamine (0.4 mL) at rt. After stirring for 1 h, the mixture was evaporated. To a stirred solution of the residual oil, carboxylic acid **6** (4.6 mg, 20 μ mol), HATU (18 mg, 47 μ mol) and HOAt (2.9 mg, 21 μ mol) in DMF (0.1 mL), was added DIPEA (3 drops) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 1 h, the mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (3 mL) and extracted with EtOAc (5 mL \times 3). The combined organic layer was washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (4 mL) and brine (4 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by reversed-phase HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 80% MeOH] to give originally proposed maedamide (**3'**) as a colorless oil (6.3 mg, 6.5 μ mol, 34%, t_R = 42.5 min.): [α]_D²⁷ -4.5 (c 4.0, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 3392, 2967, 2877, 1735, 1648, 1534, 1437 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.31-7.15 (m, 10H), 5.58 (dd, J = 8.2, 8.2 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.39-4.34 (m, 2H), 4.24 (m, 1H), 4.18 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.16 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.90 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.58-3.39 (m, 3H), 3.21 (d, J = 14.2, 8.2 Hz, 1H), 3.03 (s, 3H), 3.00-2.92 (m, 2H), 2.83 (dd, J = 14.2, 7.3 Hz, 1H), 2.44-2.30 (m, 2H), 2.23-2.11 (m, 2H), 2.06-1.82 (m, 6H), 1.77 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.51-1.40 (m, 2H), 1.36-1.22 (m, 3H), 1.07 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.01-0.91 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 177.4, 174.6, 174.3, 174.0, 173.1, 171.4, 170.4, 170.1, 140.0, 138.6, 130.5, 130.4, 129.44, 129.37, 127.6, 127.5, 77.7, 76.3, 71.5, 62.4, 60.6, 58.2, 57.8, 56.3, 52.7, 42.0, 41.5, 37.8, 37.7, 37.2, 35.7, 33.4, 30.6, 30.3, 29.9, 27.3, 26.4, 26.0, 24.7, 19.3, 17.3, 15.0, 14.9, 12.1, 12.0; HR (ESI) m/z 963.5447, calcd for C₅₁H₇₅N₆O₁₂ [M+H]⁺ 963.5443.

Tetrapeptide 9.



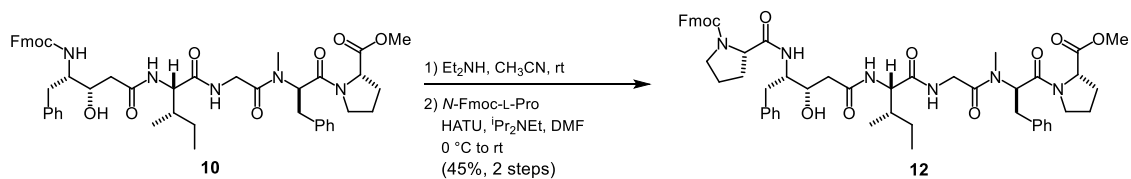
To a stirred solution of tripeptide **8** (148 mg, 0.331 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added TFA (1.2 mL) at 0 °C. After stirring for 1 h, the mixture was diluted with benzene (1.5 mL) and evaporated. To a stirred solution of the residual oil, *N*-Boc-L-isoleucine (107 mg, 0.463 mmol) and HATU (201 mg, 0.529 mmol) in DMF (0.3 mL), was added DIPEA (0.15 mL) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 1.5 h, the mixture was diluted with EtOAc (10 mL), washed with 10% aqueous citric acid (8 mL), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (8 mL) and brine (8 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 80:1) to give **9** as a colorless oil (116 mg, 0.207 mmol, 63%): [α]_D²⁹ +36.1 (*c* 1.0, CHCl₃); IR (film) λ_{max} 3327, 2966, 1747, 1653, 1499, 1455 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.15 (m, 5H), 6.84 (br s, 1H), 5.57 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 8.8, 5.9 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 18.0, 4.0 Hz, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.89 (dd, *J* = 18.0, 3.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.40-3.29 (m, 2H), 3.27 (dd, *J* = 13.6, 8.8 Hz, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.82 (dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.98-1.79 (m, 4H), 1.44 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.09 (m, 1H), 0.91-0.86 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 171.7, 168.1, 168.0, 155.9, 137.1, 129.6, 128.5, 126.9, 80.0, 59.4, 59.1, 56.4, 52.4, 47.0, 41.3, 37.7, 35.1, 29.8, 29.0, 28.5, 25.2, 24.7, 15.8, 11.7; HR (ESI) *m/z* 561.3286, calcd for C₂₉H₄₅N₄O₇ [M+H]⁺ 561.3288.

Pentapeptide 10.



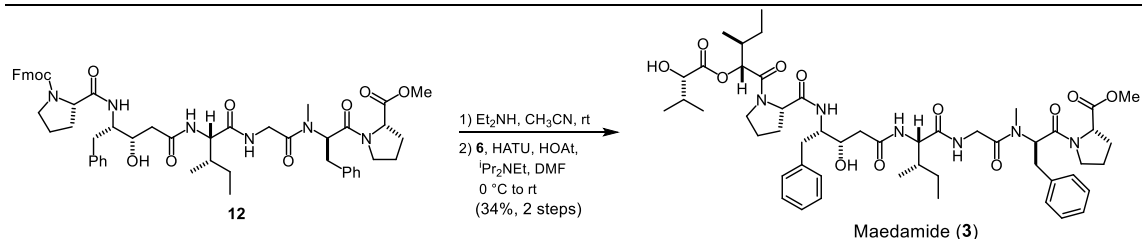
To a stirred solution of tetrapeptide **9** (80.0 mg, 143 μ mol) in CH₂Cl₂ (2.7 mL) was added TFA (0.9 mL) at 0 °C. After stirring for 2 h, the mixture was diluted with benzene (0.8 mL) and evaporated. To a stirred solution of the residual oil, known carboxylic acid **11**⁸⁴ (70.0 mg, 163 μ mol) and HATU (68.0 mg, 179 μ mol) in DMF (0.3 mL), was added DIPEA (0.06 mL) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 2 h, the mixture was diluted with EtOAc (10 mL), washed with 10% aqueous citric acid (8 mL), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (8 mL) and brine (8 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 60:1 to 50:1) to give **10** as a colorless oil (91.0 mg, 104 μ mol, 73%): $[\alpha]_{\text{D}}^{29}$ -2.0 (*c* 1.0, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 3309, 2961, 1746, 1653, 1539, 1451 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.05 (m, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.63-7.56 (m, 2H), 7.40-7.25 (m, 4H), 7.23-7.08 (m, 10H), 6.90 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.45 (dd, *J* = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 4.31-4.25 (m, 2H), 4.25-4.05 (m, 5H), 3.99 (dd, *J* = 17.4, 6.2 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 17.4, 4.7 Hz, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.21-3.13 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.92 (dd, *J* = 16.0, 5.1 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 14.2, 10.2 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 14.2, 7.4 Hz, 1H), 2.53-2.40 (m, 2H), 2.05 (m, 1H), 1.95-1.48 (m, 5H), 1.17 (m, 1H), 0.95-0.86 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 174.05, 173.97, 173.9, 170.2, 170.1, 158.9, 145.3, 142.5, 140.3, 138.6, 130.5, 130.4, 129.4, 129.3, 128.8, 128.1, 127.5, 127.3, 126.42, 126.37, 120.9, 79.5, 71.0, 68.0, 60.5, 57.9, 57.8, 52.6, 48.1, 41.9, 41.4, 39.0, 38.0, 35.6, 30.5, 29.8, 25.8, 16.1, 11.9; HR (ESI) *m/z* 874.4353, calcd for C₅₀H₆₀N₅O₉ [M+H]⁺ 874.4391.

Hexapeptide 12.



To a stirred solution of pentapeptide **10** (90.0 mg, 104 μmol) in CH₃CN (3.0 mL) was added diethylamine (1.0 mL) at rt. After stirring for 3 h, the mixture was evaporated. To a stirred solution of the residual oil, *N*-Fmoc-L-Pro (45.0 mg, 133 μmol) and HATU (53.0 mg, 139 μmol) in DMF (0.3 mL), was added DIPEA (6 drops) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 3 h, the mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (6 mL) and extracted with EtOAc (8 mL × 3). The combined organic layer was washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (8 mL) and brine (8 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃:MeOH, 60:1) to give **12** as a colorless oil (46 mg, 47 μmol, 45%): [α]_D²⁹ +6.6 (*c* 1.0, CHCl₃); IR (film) λ_{max} 3318, 2961, 1746, 1648, 1533, 1452 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.43-7.30 (m, 4H), 7.25-7.11 (m, 10H), 6.93 (brs, 1H), 5.30 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 4.44-4.33 (m, 2H), 4.31-4.10 (m, 8H), 3.71 (s, 3H), 3.60-3.42 (m, 2H), 3.29 (m, 1H), 3.17-3.07 (m, 3H), 2.95 (s, 3H), 2.94 (m, 1H), 2.77 (dd, *J* = 15.0, 7.2 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 15.0, 6.8 Hz, 1H), 2.35 (dd, *J* = 14.4, 9.5 Hz, 1H), 2.21-2.02 (m, 4H), 1.97-1.76 (m, 6H), 1.31 (m, 1H), 1.03 (m, 1H), 0.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 0.65 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.5, 172.6, 172.5, 171.9, 168.4, 167.8, 155.4, 143.8, 141.5, 141.4, 139.5, 137.1, 129.6, 129.5, 128.5, 128.3, 128.1, 127.5, 127.2, 126.9, 126.3, 125.2, 120.3, 70.0, 68.0, 60.7, 59.3, 58.3, 57.6, 56.4, 52.4, 47.4, 47.2, 46.8, 41.7, 40.9, 36.6, 36.3, 35.1, 30.3, 30.1, 29.0, 25.3, 25.0, 24.9, 15.9, 11.4; HR (ESI) *m/z* 993.4670, calcd for C₅₅H₆₆N₆O₁₀Na [M+Na]⁺ 993.4738.

Maedamide (3).



To a stirred solution of hexapeptide **12** (18 mg, 19 μ mol) in CH₃CN (1.2 mL) was added diethylamine (0.4 mL) at rt. After stirring for 1 h, the mixture was evaporated. To a stirred solution of the residual oil, carboxylic acid **3** (4.4 mg, 19 μ mol), HATU (18 mg, 48 μ mol) and HOAt (2.9 mg, 21 μ mol) in DMF (0.1 mL), was added DIPEA (7 drops) at 0 °C, and the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 1 h, the mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (3 mL) and extracted with EtOAc (5 mL \times 3). The combined organic layer was washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate (4 mL) and brine (4 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residual oil was purified by reversed-phase HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 80% MeOH] to give maedamide (**3**) as a colorless oil (7.0 mg, 7.3 μ mol, 40%, t_R = 41.0 min.): $[\alpha]_D^{29}$ +17 (c 0.1, CH₃OH); IR (film) λ_{max} 3318, 2966, 2877, 1734, 1646, 1533, 1437 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.29-7.16 (m, 10H), 5.55 (dd, J = 8.3, 7.8 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.28 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.17 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.09 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 3.94 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.53 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.20 (dd, J = 14.2, 8.3 Hz, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.98 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.82 (dd, J = 14.2, 7.8 Hz, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.97-1.80 (m, 6H), 1.76 (m, 1H), 1.64 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.36-1.31 (m, 2H), 1.21 (m, 1H), 1.07 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.97-0.95 (m, 9H), 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 177.2, 174.1, 174.00, 173.95, 173.3, 171.3, 170.3, 170.2, 140.1, 138.6, 130.5, 130.4, 129.40, 129.36, 127.6, 127.5, 77.6, 76.3, 71.1, 62.4, 60.6, 59.7, 57.8, 56.0, 52.7, 48.4, 48.3, 41.9, 41.2, 37.8, 37.9, 37.2, 35.7, 33.2, 30.6, 30.4, 29.9, 26.4, 26.0, 25.7, 24.8, 19.3, 17.1, 16.1, 14.9, 12.0, 11.9; HR (ESI) m/z 985.5224, calcd for C₅₁H₇₄N₆O₁₂Na [M+Na]⁺ 985.5262.

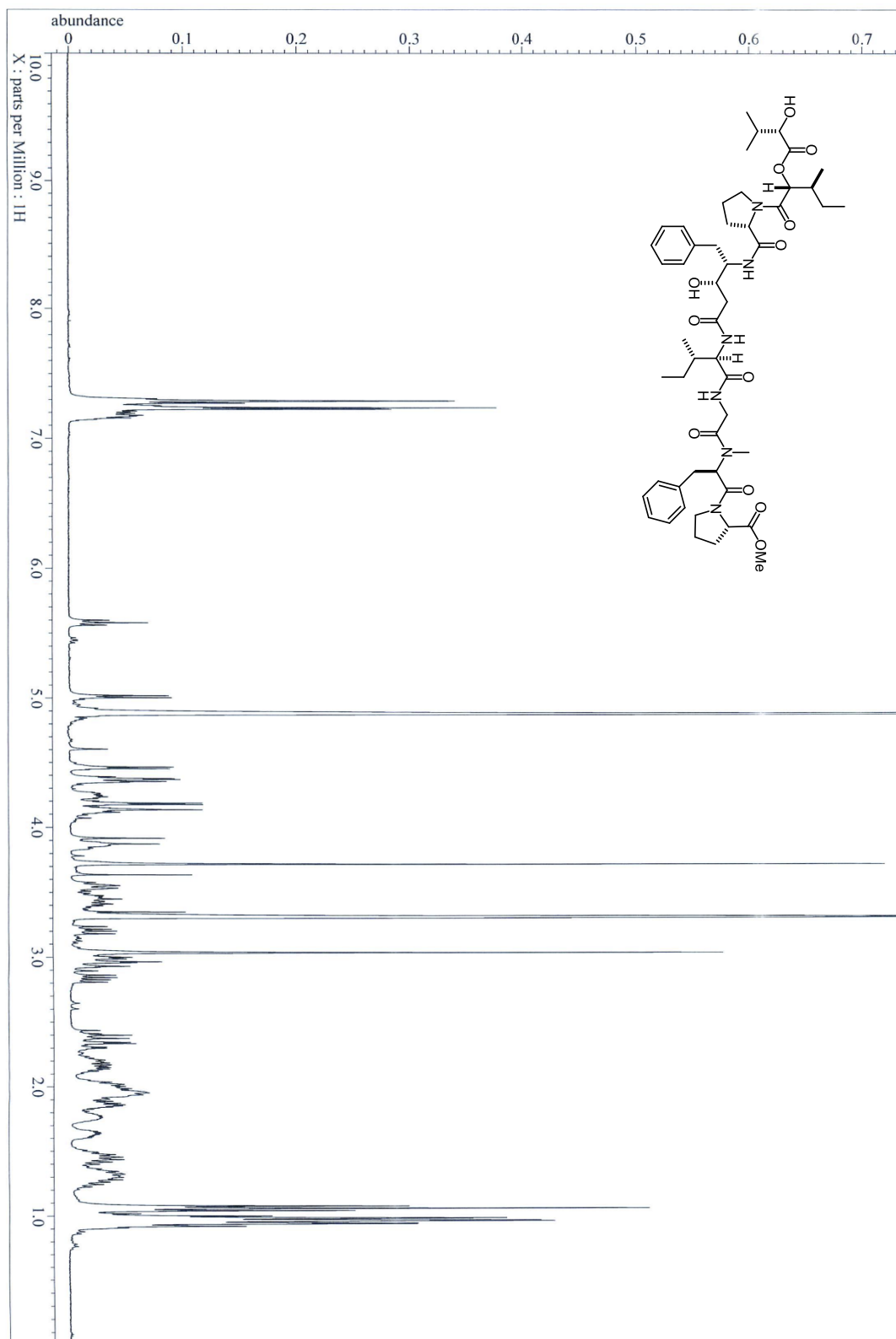


Figure 6-24. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of originally proposed maedamide (**3'**)

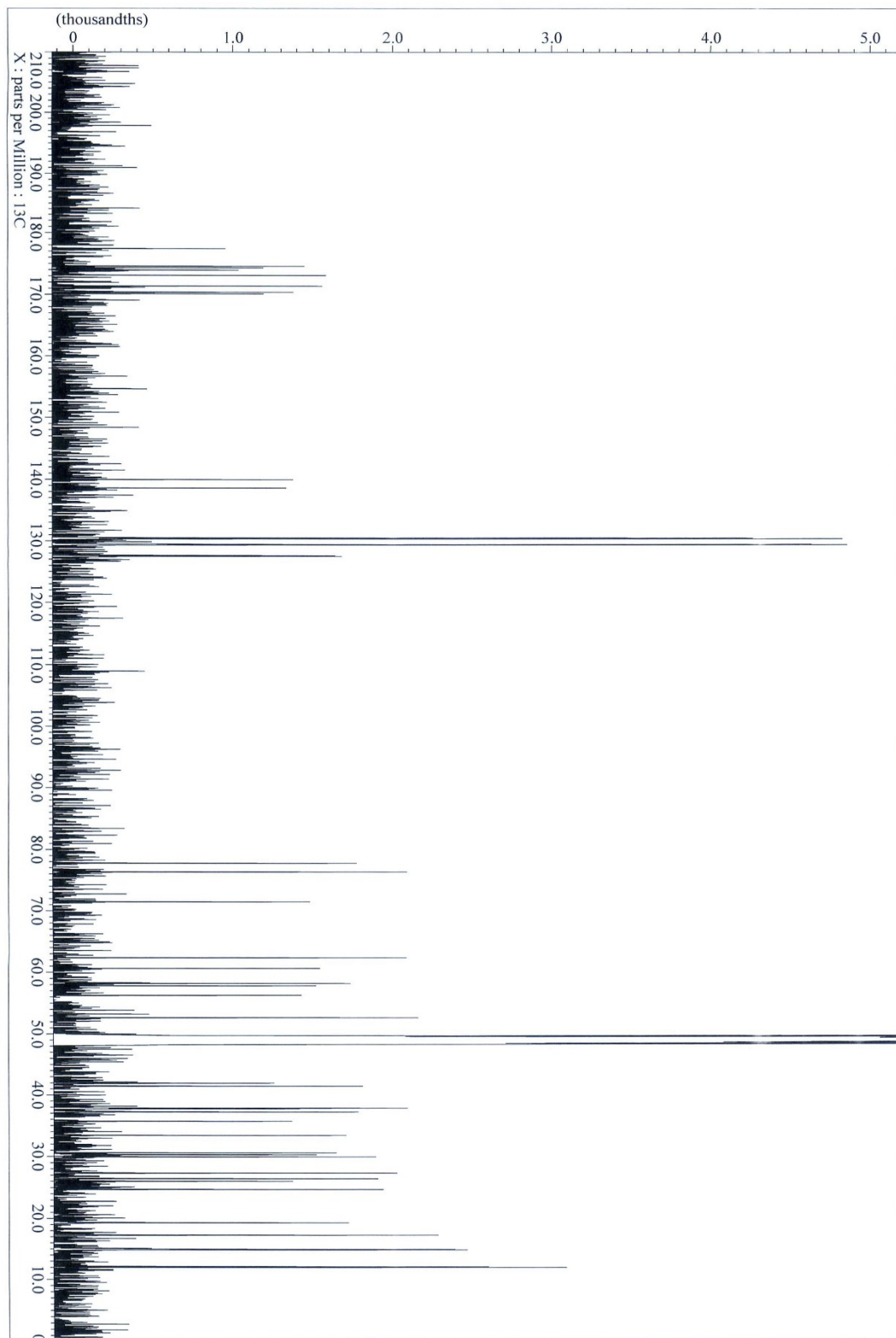


Figure 6-25. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of originally proposed maedamide (**3'**)

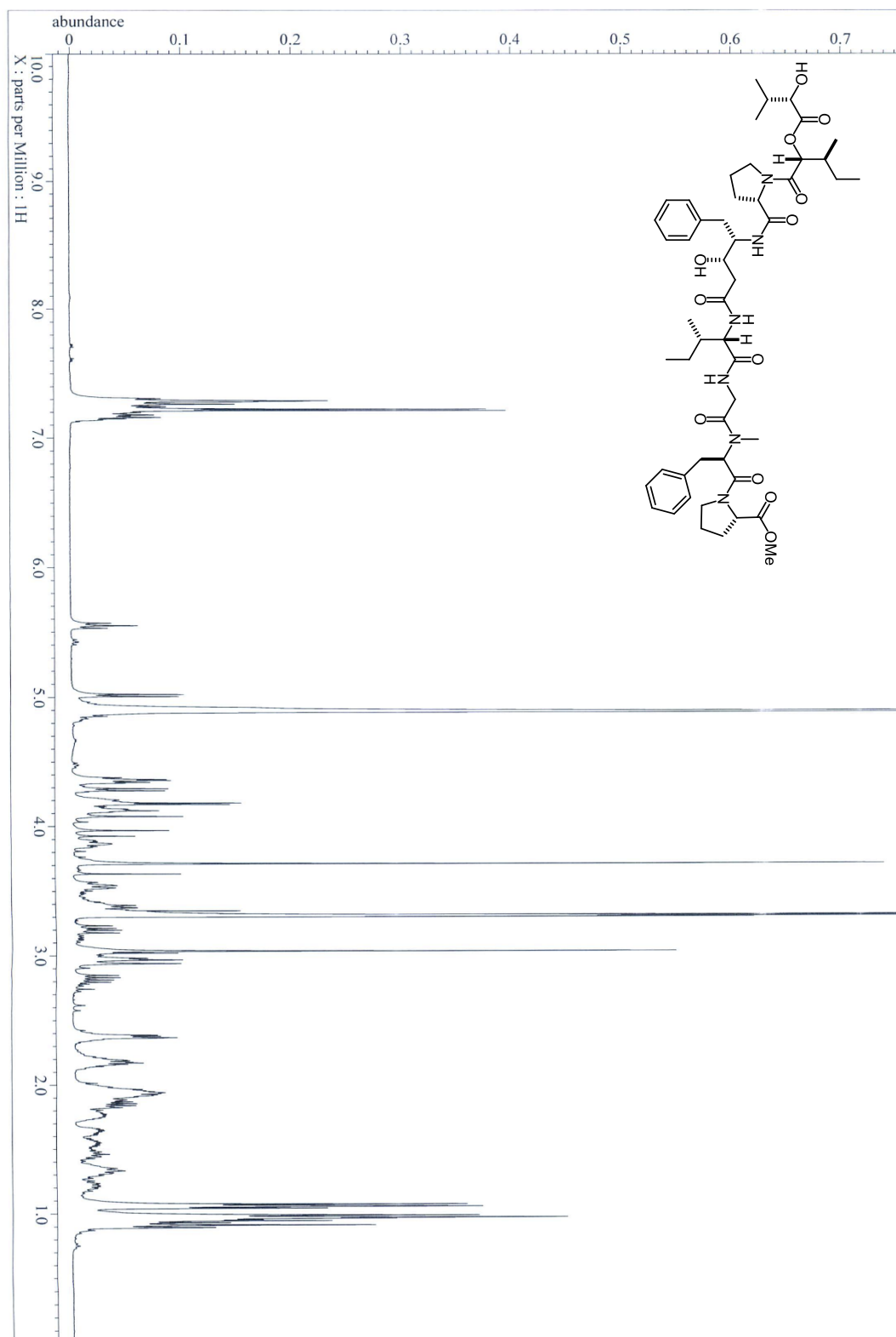


Figure 6-26. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of synthetic maedamide (3)

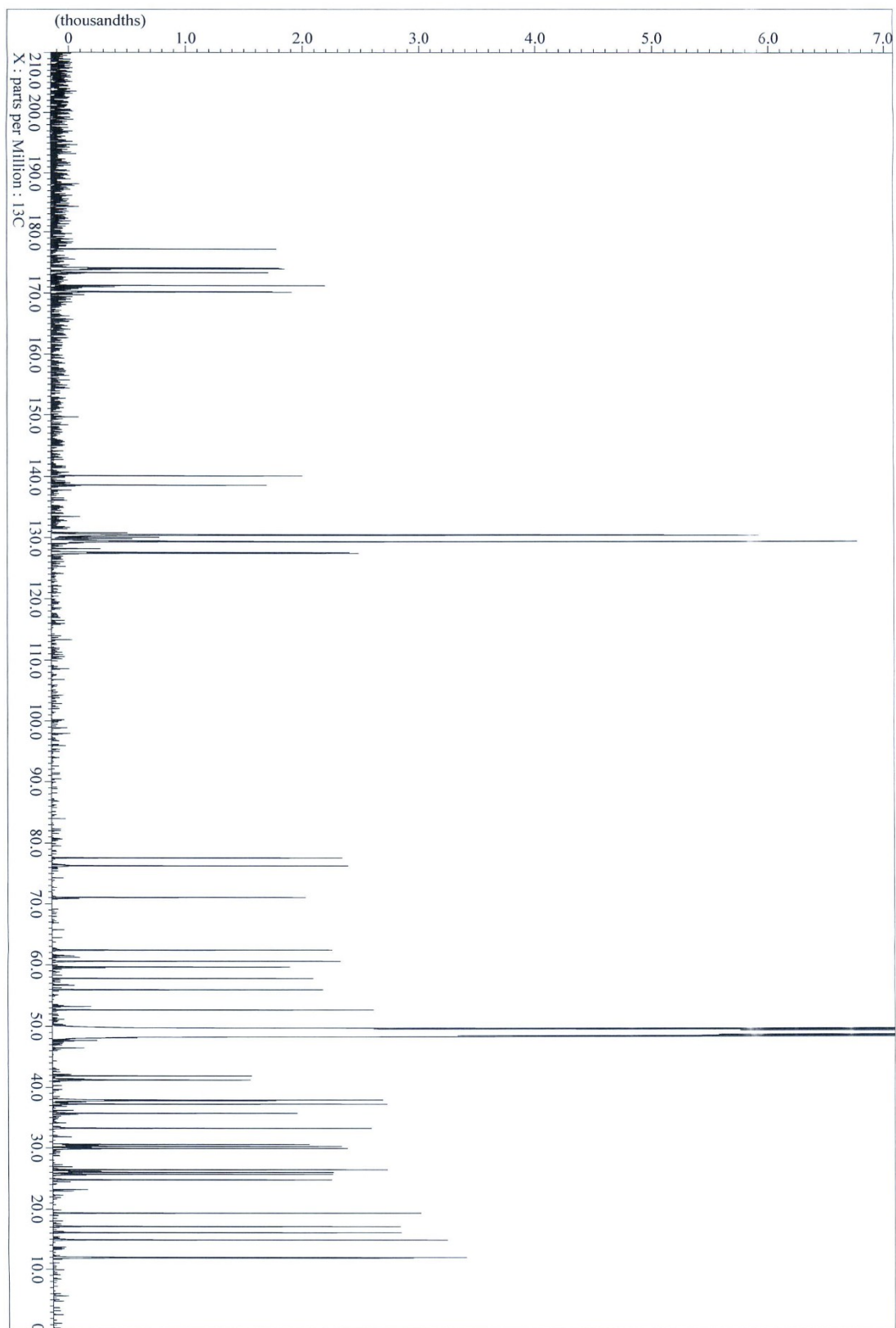


Figure 6-27. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of synthetic maedamide (**3**)

第三節 第三章の実験

第三章 第一節の実験

Collection, and identification of the marine cyanobacterium.

The marine cyanobacterium was collected at the coast near Jahana, Okinawa Prefecture, Japan, at a depth of 0-1 m in March 2013. A cyanobacterial filament was isolated under a microscope and crushed with freezing and thawing. The 16S rRNA genes were PCR-amplified from isolated DNA using the primer set CYA 106F, a cyanobacterial-specific primer, and 23S 30R, a cyanobacterial-specific primer. The PCR reaction contained DNA derived from a cyanobacterial filament, 12.5 μ L of TakaraTaq (TaKaRa Bio), 1.0 μ L of each primer (10 pM) and H₂O for a total volume of 25 μ L. The PCR reaction was performed as follows: initial denaturation for 10 min at 94 °C, amplification by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C and 1 min at 72 °C, and final elongation for 7 min at 72 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. The obtained DNA was sequenced with CYA 106F and 23S 30R primers. These sequences are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers LC89730 and LC089731. From the phylogenetic tree inferred from 739 and 766 bp of 16S rRNA gene sequences revealed that the present cyanobacterium (1303-13, accession No. LC89730 and LC89731) formed a clade with *Okeania sp.* A voucher specimen, named 1303-13, has been deposited at Keio University.

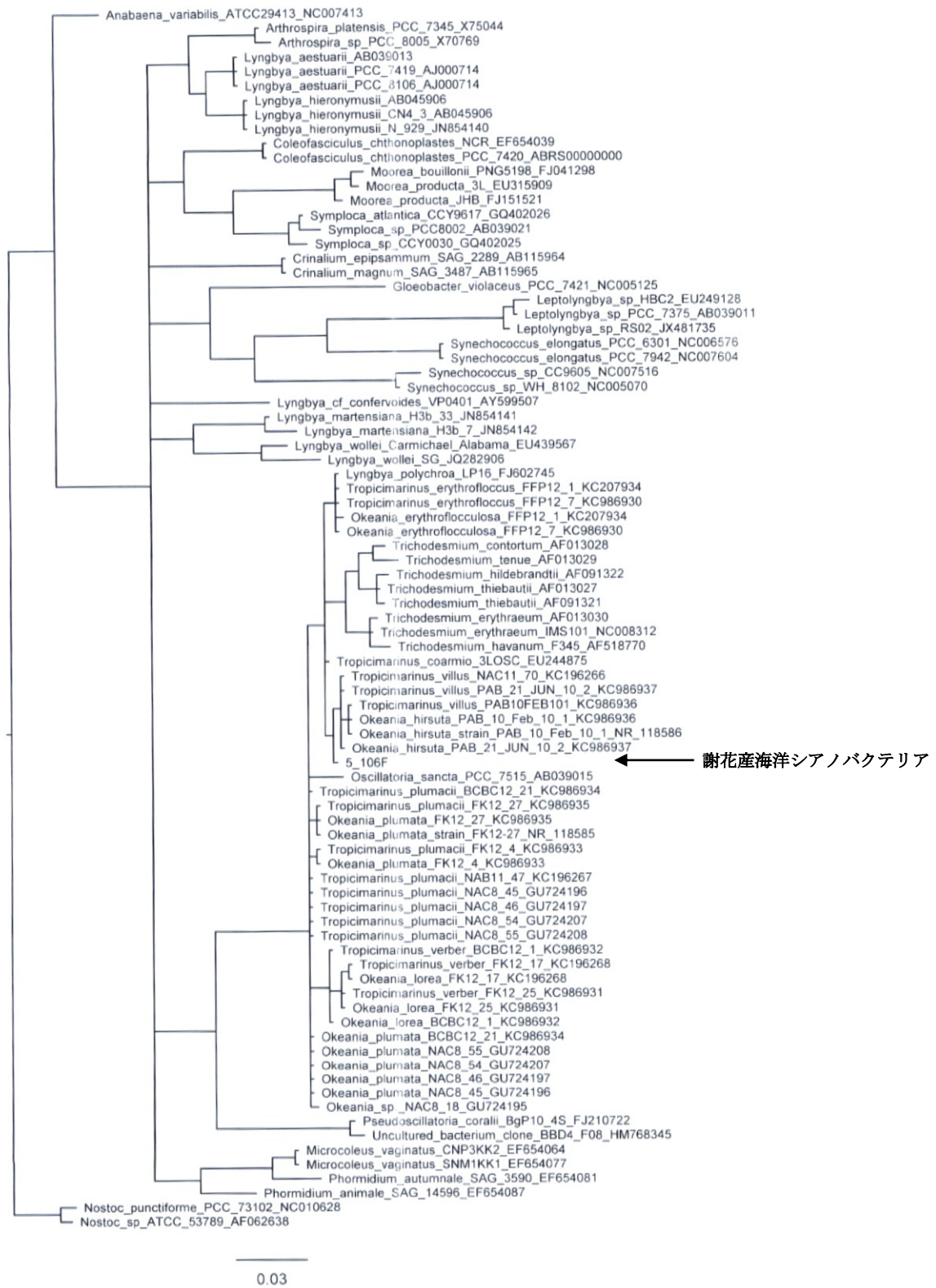


Figure 6-28. 謝花産シアノバクテリアの系統解析 (16S rRNA 領域)

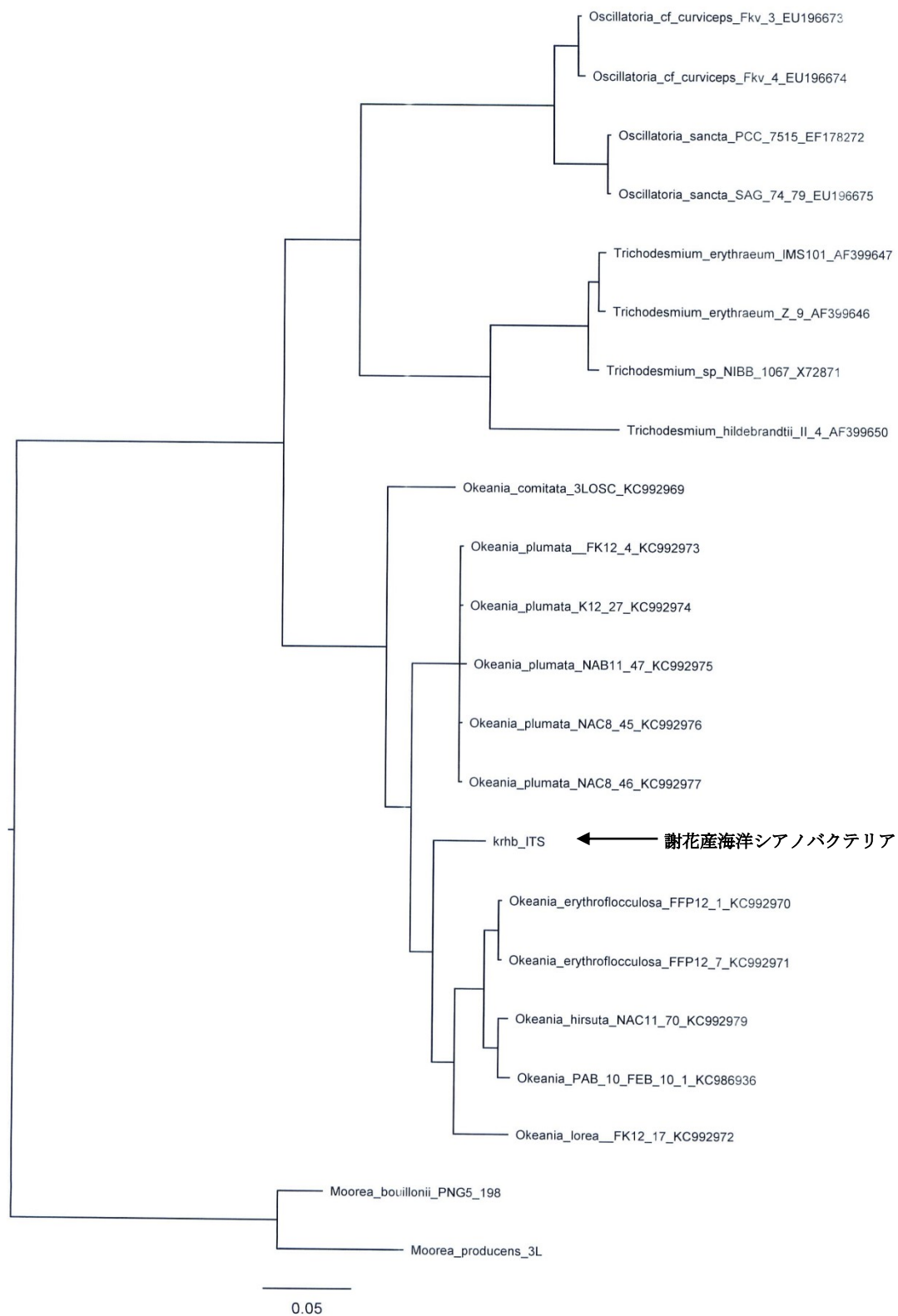


Figure 6-29. 謝花産シアノバクテリアの系統解析 (ITS 領域)

Extraction, and isolation of jahanyne (13)

The collected cyanobacterium (900 g) was extracted with methanol (3 L) for one week. The extract was filtered, and the filtrate was concentrated. The residue was partitioned between ethyl acetate (3 × 0.3 L) and water (0.3 L). The material obtained from the organic layer was partitioned between 90% aqueous methanol (0.3 L) and hexane (3 × 0.3 L). The aqueous methanol fraction (1.5 g) was first separated by column chromatography on ODS (15 g) eluted with 40% aqueous methanol, 60% aqueous methanol, 80% aqueous methanol, and methanol. The fraction (415 mg) eluted with 80% aqueous methanol was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 85% MeOH] in seven batches to give a fraction that contained jahanyne (34 mg, *t_R* = 28.7 min). This fraction was further separated by HPLC [Cosmosil Cholesterol (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 65% MeCN] to give jahanyne (**13**) (18.5 mg, *t_R* = 37.3 min).

Jahanyne (13): colorless oil; [α]^{30D} -330 (*c* 0.10, CH₃OH); IR (film) 2964, 2116, 1724, 1636, 1442 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMBC and NOESY data, see Table 3-1; HRESIMS *m/z* 1093.7046 [M+Na]⁺ (calcd for C₆₀H₉₄N₈O₉Na, 1093.7041).

Acid hydrolysis of jahanyne (13).

To a mixture of jahanyne (**13**) (1.0 mg, 0.9 μmol) and 9 M HCl (0.1 mL) were charged in a reaction tube, sealed under reduced pressure, and heated at 110 °C for 24 h. The mixture was evaporated to dryness and could be separated into each component. [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (φ4.6 × 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O. Retention times of components: *N*-Me-Ala (*t_R* = 3.0 min), Pro (*t_R* = 3.2 min), *N*-Me-Val (*t_R* = 3.7 min), *N*-Me-Phe (*t_R* = 12.0 min)]

Chiral HPLC analysis of amino acid components, Pro, *N*-Me-Val and *N*-Me-Phe.

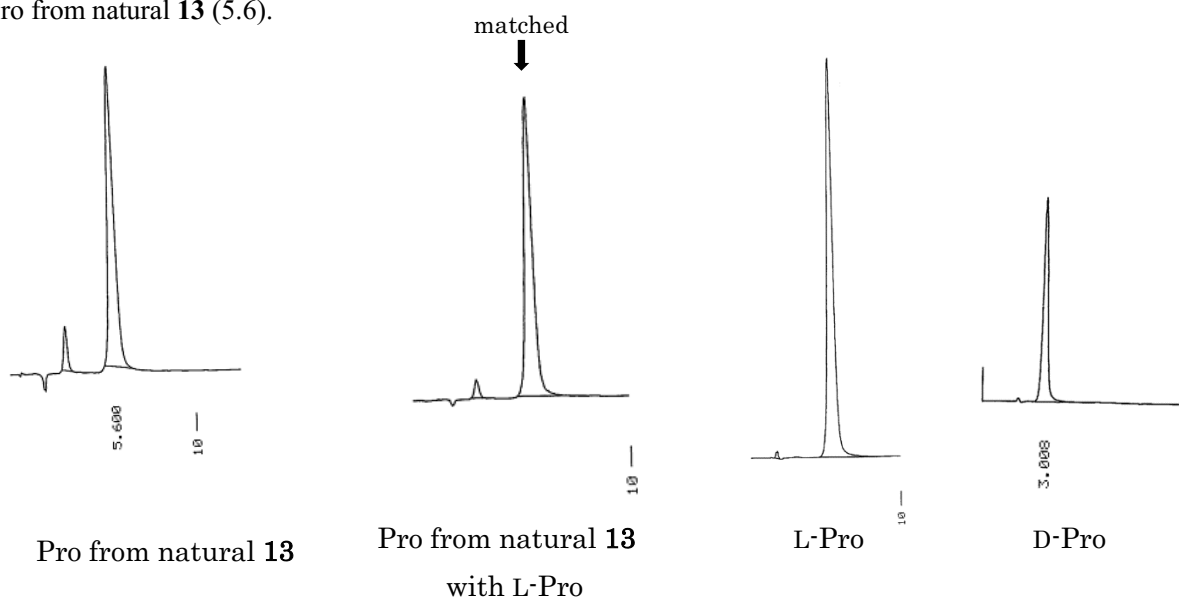
Each fraction that contained amino acids except for *N*-Me-Ala was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by chiral HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards. [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (φ4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄] The retention times of Pro and *N*-Me-Val in the hydrolysate matched those of L-Pro (*t_R* = 5.6 min) and *N*-Me-L-Val (*t_R* = 4.5 min), but not D-Pro (*t_R* = 3.0 min) or *N*-Me-D-Val (*t_R* = 3.0 min). [DAICEL CHIRALPAK (MA+) (φ4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄/MeCN = 90/10] The retention times of *N*-Me-Phe in the hydrolysate

matched those of *N*-Me-L-Phe ($t_R = 13.1$ min), but not *N*-Me-D-Phe ($t_R = 11.8$ min).

Pro: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: L-Pro (5.6), D-Pro (3.0).

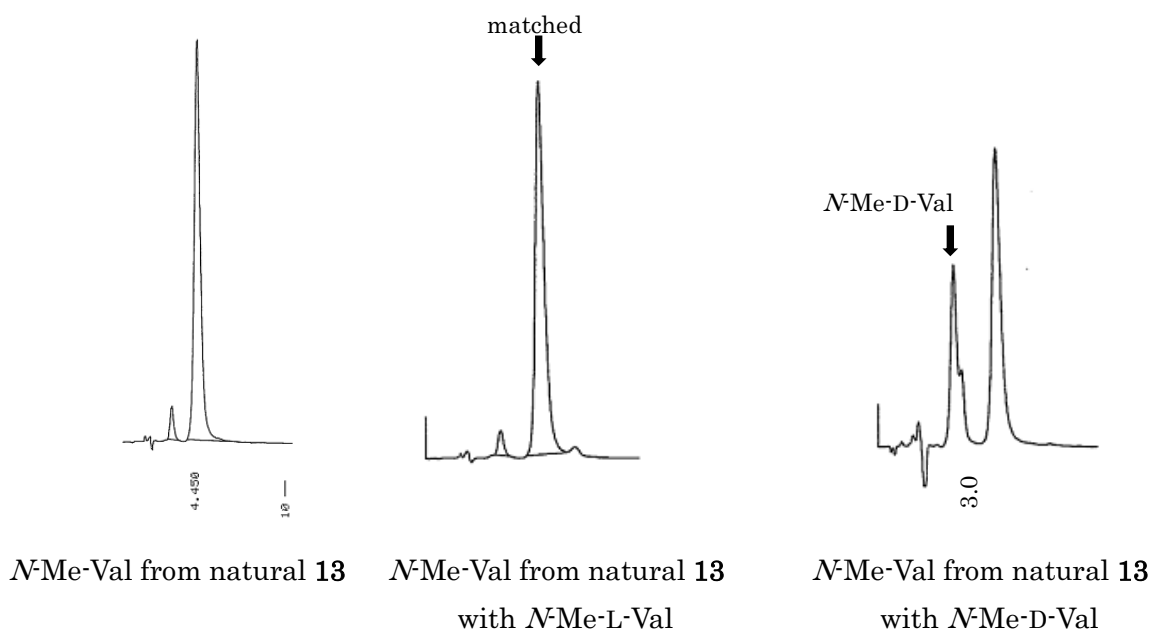
Pro from natural **13** (5.6).



N-Me-Val: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-L-Val (4.5), *N*-Me-D-Val (3.0).

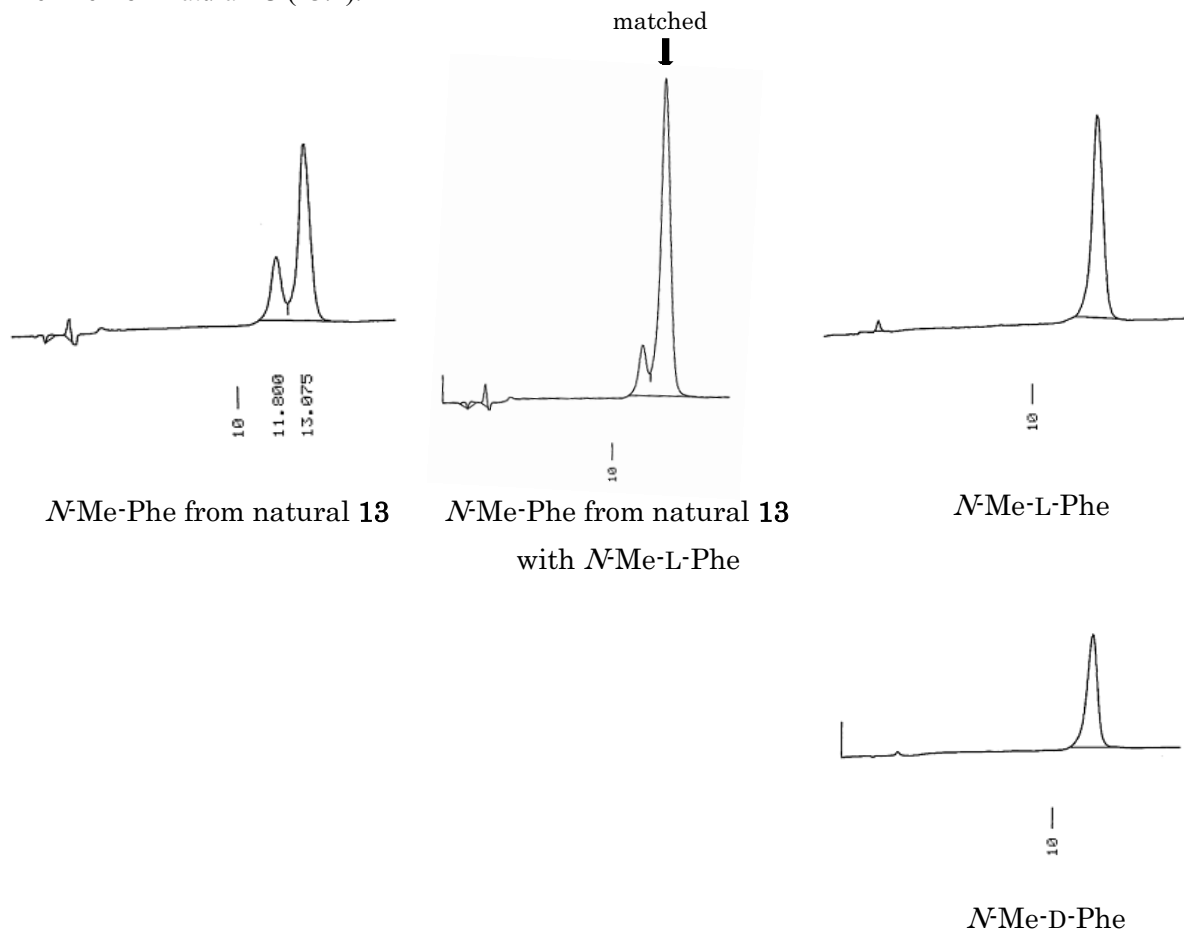
N-Me-Val from natural **13** (4.5).



N-Me-Phe: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄ - MeCN (90:10)

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-L-Phe (13.1), *N*-Me-D-Phe (11.8).

N-Me-Phe from natural **13** (13.1).



Marfey's analysis of *N*-Me-Ala.

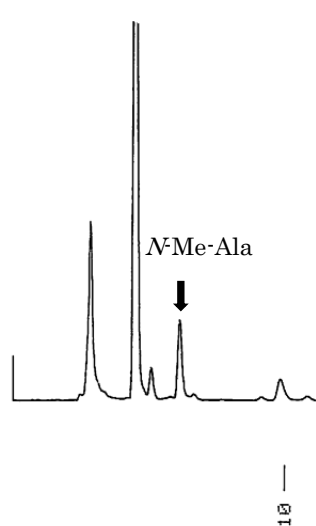
The *N*-Me-Ala-containing fraction was dissolved in H₂O (100 μ L). A 1.0% 1-fluoro-2,4-dinitro-phenyl-5-L-leucinamide (Marfey's reagent) solution in acetone (200 μ L) and 50 μ L of 1 M NaHCO₃ were added, and the mixture was heated at 80 $^{\circ}$ C for 3 min. The solution was cooled to room temperature, neutralized with 1 M HCl, and evaporated to dryness. The residue was resuspended in 100 μ L of MeCN/H₂O (1:1), and the solution was analyzed by reversed-phase HPLC. [Cosmosil 5C₁₈-AR-II ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent 0.02 M NaOAc - MeOH (40:60)] The retention times of the derivatized *N*-Me-Ala in the hydrolysate matched those of Marfey derivative of *N*-Me-L-Ala authentic samples ($t_R = 6.0$ min), but not Marfey derivative of *N*-Me-D-

Ala authentic samples ($t_R = 9.4$ min).

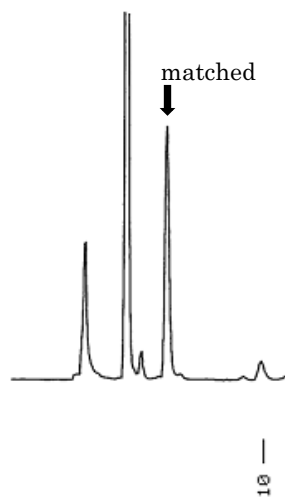
N-Me-Ala: column, Cosmosil 5C₁₈-AR-II ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent, 0.02 M NaOAc - MeOH (40:60)

t_R (min): Marfey derivatives of authentic samples: *N*-Me-L-Ala (6.0), *N*-Me-D-Ala (9.4).

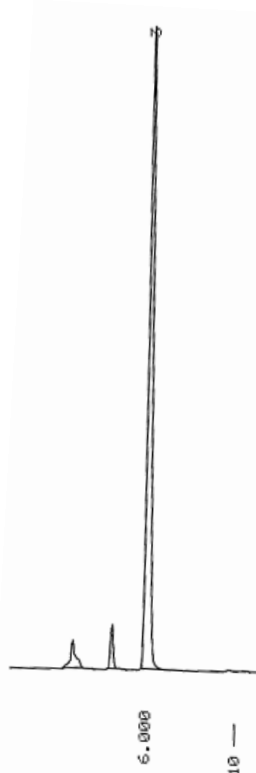
Marfey derivatives of *N*-Me-Ala from natural **13** (6.0).



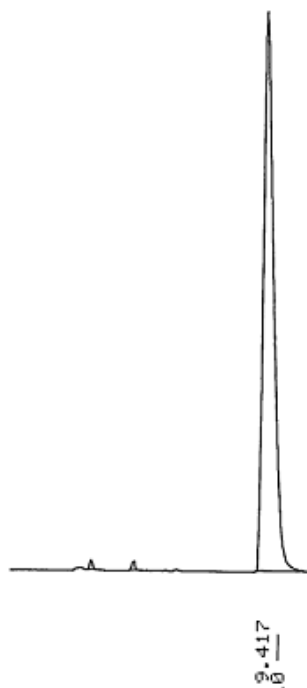
N-Me-Ala from natural **13**



N-Me-Ala from natural **13**
with *N*-Me-L-Ala



N-Me-L-Ala



N-Me-D-Ala

NaBH₄ reduction-acid hydrolysis of 13.

To a mixture of jahanyne (**13**, 0.8 mg, 0.7 μ mol) in MeOH (0.5 mL) at room temperature was added sodium borohydride (30 mg, 790 μ mol). After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, it was diluted with EtOAc (5 mL) and H₂O (5 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). The organic layer and the extracts were combined, washed with saturated aqueous NaCl (10 mL), dried with Na₂SO₄, and concentrated to give a colorless oil (0.8 mg). An aliquot of the residual oil (0.4 mg) and 9 M HCl (0.1 mL) were charged in a reaction tube, sealed under reduced pressure, and heated at 110 °C for 24 h. The mixture was evaporated to dryness and could be separated into Oep derivatives. [Conditions for HPLC separation of 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine (Oep derivatives): column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeOH/H₂O/TFA = 1/99/0.1. Retention times: 3.4, 3.8 min]

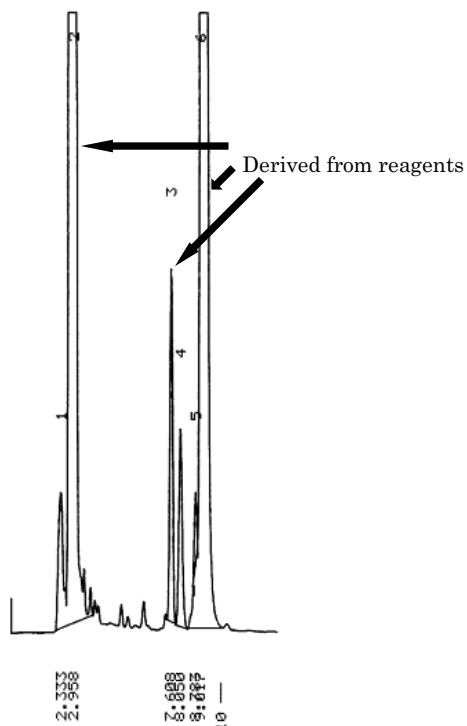
Marfey's analysis of Oep derivatives.

The 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine-containing fraction was dissolved in H₂O (100 μ L). A 1.0% 1-fluoro-2,4-dinitro-phenyl-5-L-leucinamide (Marfey's reagent) solution in acetone (200 μ L) and 50 μ L of 1 M NaHCO₃ were added, and the mixture was heated at 80 °C for 3 min. The solution was cooled to room temperature, neutralized with 1 M HCl, and evaporated to dryness. The residue was resuspended in 100 μ L of MeCN/H₂O (1:1), and the solution was analyzed by reversed-phase HPLC. [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent 0.02 M NaOAc - MeCN (50:50)] The retention times of the derivatized Oep in the hydrolysate matched those of Marfey derivatives of 2(*S*)-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine authentic samples (t_R = 8.1 min, 8.8 min), but not Marfey derivatives of 2(*R*)-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine authentic samples (t_R = 9.6 min, 10.3 min).

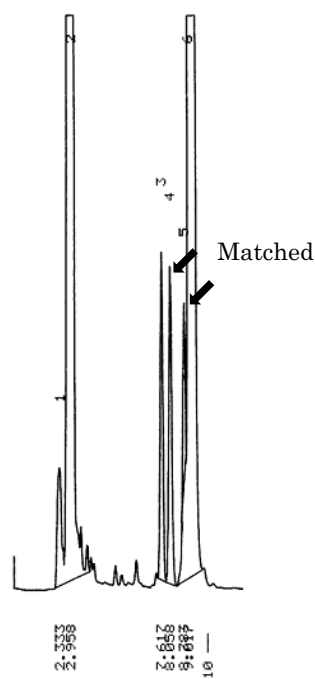
2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine: column, Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ4.6 × 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection, UV 340 nm; solvent, 0.02 M NaOAc - MeCN (50:50)

t_R (min): Marfey derivatives of authentic samples: 2(*R*)-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*] (9.6, 10.3), 2(*S*)-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*] (8.1, 8.8).

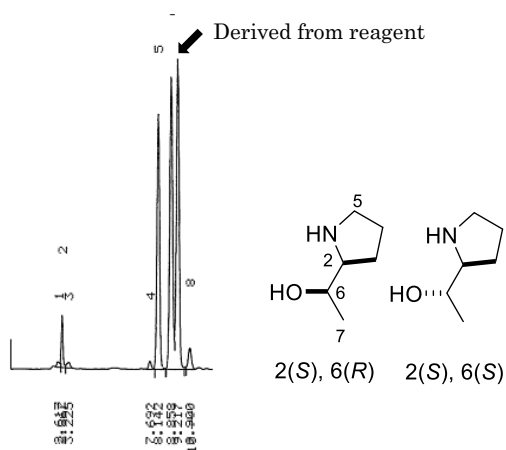
Marfey derivatives of 2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine from natural **13** (8.1, 8.8).



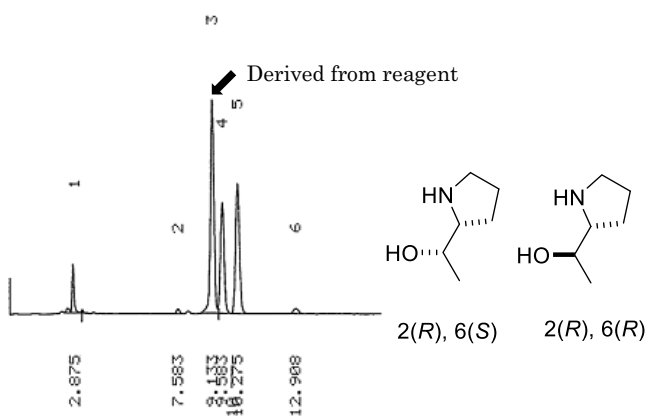
2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*] from natural **13**
(Other peaks are derived from reagents)



2-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*] from natural **13**
with 2(*S*)-(1-hydroxypropyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*]

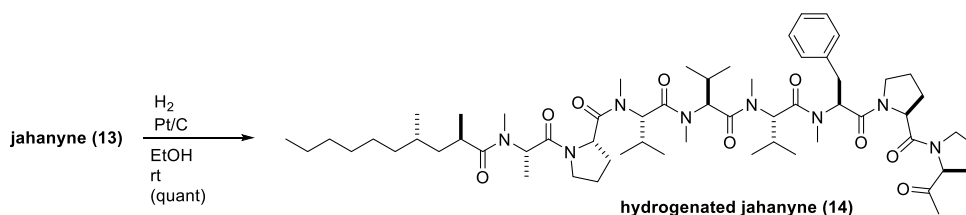


2(*S*)-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*]



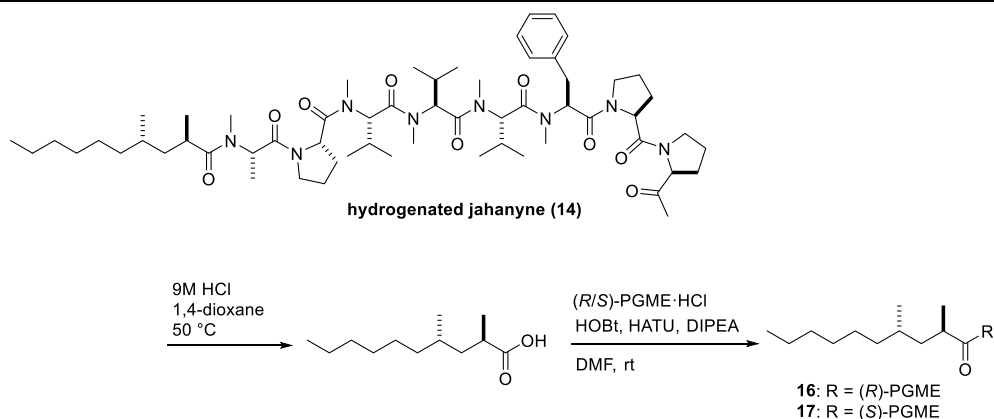
2(*R*)-(1-hydroxyethyl)-pyrrolidine [6*S*, 6*R*]

Hydrogenated jahanyne (14).



To a mixture of jahanyne (**13**, 2.0 mg, 1.9 μ mol) in EtOH (1 mL) at room temperature was added Pt/C (0.3 mg). After the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 10 h, the catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated in vacuo to give hydrogenated jahanyne (**14**, 2.0 mg, quant.). HRESIMS m/z 1075.7538 [M+H]⁺ (calcd for C₆₀H₉₉N₈O₉, 1075.7535). ¹H NMR (CD₃OD) δ ppm of **5**: 7.31-7.22 (m, 5H), 5.87 (dd, 1H, $J = 11.9, 4.5$ Hz), 5.31 (q, 1H, $J = 7.4$ Hz), 5.06 (d, 1H, $J = 11.4$), 5.02 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz), 4.93 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz), 4.84 (m, 1H), 4.72 (dd, 1H, $J = 9.1, 4.3$ Hz), 4.61 (dd, 1H, $J = 8.8, 5.1$ Hz), 3.84 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 3.67-3.52 (m, 4H), 3.12 (m, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 3.01 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 2.95 (m, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.35-2.21 (m, 5H), 2.18 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.13 (m, 1H), 2.1-1.8 (m, 8H), 1.72 (m, 1H), 1.6-1.2 (m, 16H), 1.12 (m, 1H), 1.07 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.91 (d, 3H, $J = 7.2$), 0.88 (d, 3H, $J = 9.6$ Hz), 0.87 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.83 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.83 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.76 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz) 0.64 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz).

PGME derivatives of the natural 2,4-dimethyldec-9-ynoic acid (**16** and **17**).

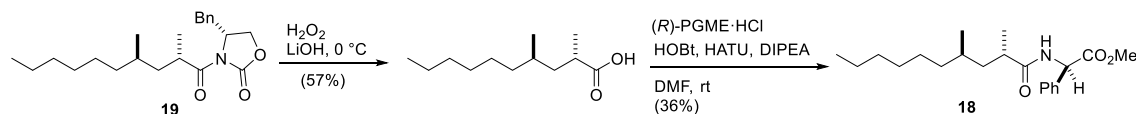


To a mixture of hydrogenated jahanyne (**14**, 1.0 mg, 0.93 μmol) in 1,4-dioxane (100 μL) was added 9 M HCl (100 μL). After the reaction mixture was stirred for 9 h at 50°C, the mixture was concentrated in vacuo and purified with SiO_2 chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1) to afford 2,4-dimethyldec-9-ynoic acid.

A half portion of the fatty acid was mixed with HATU (6.8 mg, 18 μmol), HOBt (4.2 mg, 2.7 μmol), (*R*)-PGME-HCl (2.8 mg, 14 μmol) and DIPEA (6 μL) in DMF (100 μL), which was allowed stirred at room temperature. After 3.5 h, 1.0 mL of EtOAc was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with saturated aqueous NH_4Cl (3 \times 1.0 mL), concentrated, and purification by reversed-phase HPLC on Cosmosil 5C₁₈-MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm) with $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (20:80) to afford an (*R*)-PGME derivative of the natural 2,4-dimethyldec-9-ynoic acid (**16**). HRESIMS m/z 370.2364 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_3\text{Na}$, 370.2358). ¹H NMR (CD_3OD) δ ppm of **16**: 7.39-7.34 (m, 5H), 5.44 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.60 (m, 1H), 1.49 (m, 1H), 1.36-1.27 (m, 12H), 1.04 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 0.92 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.88 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz).

The remaining portion of the fatty acid was mixed with HATU (6.8 mg, 18 μmol), HOBt (4.2 mg, 2.7 μmol), (*S*)-PGME-HCl (2.8 mg, 14 μmol) and DIPEA (6 μL) in DMF (100 μL), which was allowed stirred at room temperature. After 3.5 h, The reaction mixture was separated as described above to afford a (*S*)-PGME derivative of the natural 2,4-dimethyldec-9-ynoic acid (**17**). HRESIMS m/z 348.2549 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{NO}_3$, 348.2539). ¹H NMR (CD_3OD) δ ppm of **17**: 7.39-7.34 (m, 5H), 5.48 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.60 (m, 1H), 1.49 (m, 1H), 1.39-1.21 (m, 13H), 1.11 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 0.88 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz), 0.80 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz).

(*R*)-PGME amide of (2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldecanoic acid (18).



To a stirred solution of (*R*)-4-benzyl-3-((2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldecanoyl)oxazolidin-2-one⁶² (**19**, 3.0 mg, 8.3 μmol) in a mixed solvent of THF (0.25 mL) and H₂O (0.15 mL) was added LiOH·H₂O (8.0 mg, 0.19 mmol) and 33% H₂O₂ (30 μL, 0.33 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred for 2 h at 0°C and concentrated in vacuo. The residue was diluted with H₂O (0.4 mL), washed with CH₂Cl₂ (3×3.0 mL), acidified with 9 M HCl until pH reached under 2, and extracted with CH₂Cl₂ (3×3.0 mL). The CH₂Cl₂ extracts were concentrated in vacuo and purified with SiO₂ chromatography (hexane/ethyl acetate = 9/1) to afford (2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldec-9-ynoic acid (1.0 mg, 4.7 μmol, 57%). A half portion of (2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldec-9-ynoic acid (0.5 mg, 2.4 μmol) was mixed with HATU (3.4 mg, 8.9 μmol), HOBt (2.1 mg, 1.4 μmol), (*R*)-PGME·HCl (1.4 mg, 6.9 μmol) and DIPEA (2 μL) in DMF (100 μL), which was allowed stirred at room temperature. After 3 h, 1.5 mL of EtOAc was added to the reaction mixture. The organic layer was washed with saturated aqueous NH₄Cl (3×1.0 mL), concentrated, and purification by reversed-phase HPLC on Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ20 × 250 mm) with H₂O/MeCN (20:80) to afford an (*R*)-PGME amide of (2*S*,4*R*)-2,4-dimethyldecanoic acid (**18**, 0.3 mg, 0.09 μmol, 36%). HRESIMS *m/z* 348.2533 [M+H]⁺ (calcd for C₂₁H₃₄NO₃, 348.2539). ¹H NMR (CD₃OD) δ ppm of **18**: 7.39-7.34 (m, 5H), 5.48 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.60 (m, 1H), 1.49 (m, 1H), 1.39-1.21 (m, 13H), 1.11 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.88 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz), 0.80 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz).

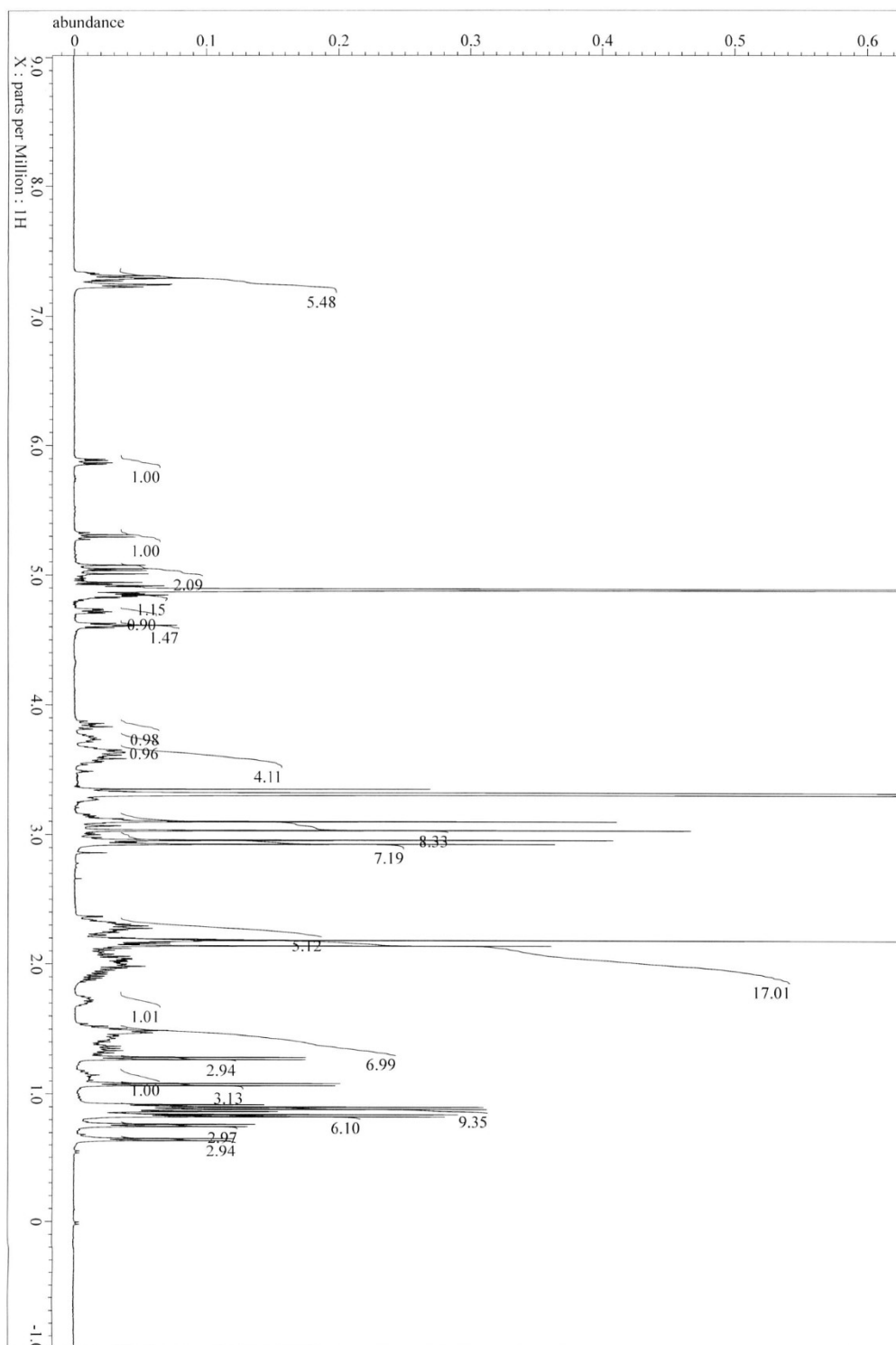


Figure 6-30. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of jahanyne (13)



Figure 6-31. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of jahanyne (13)

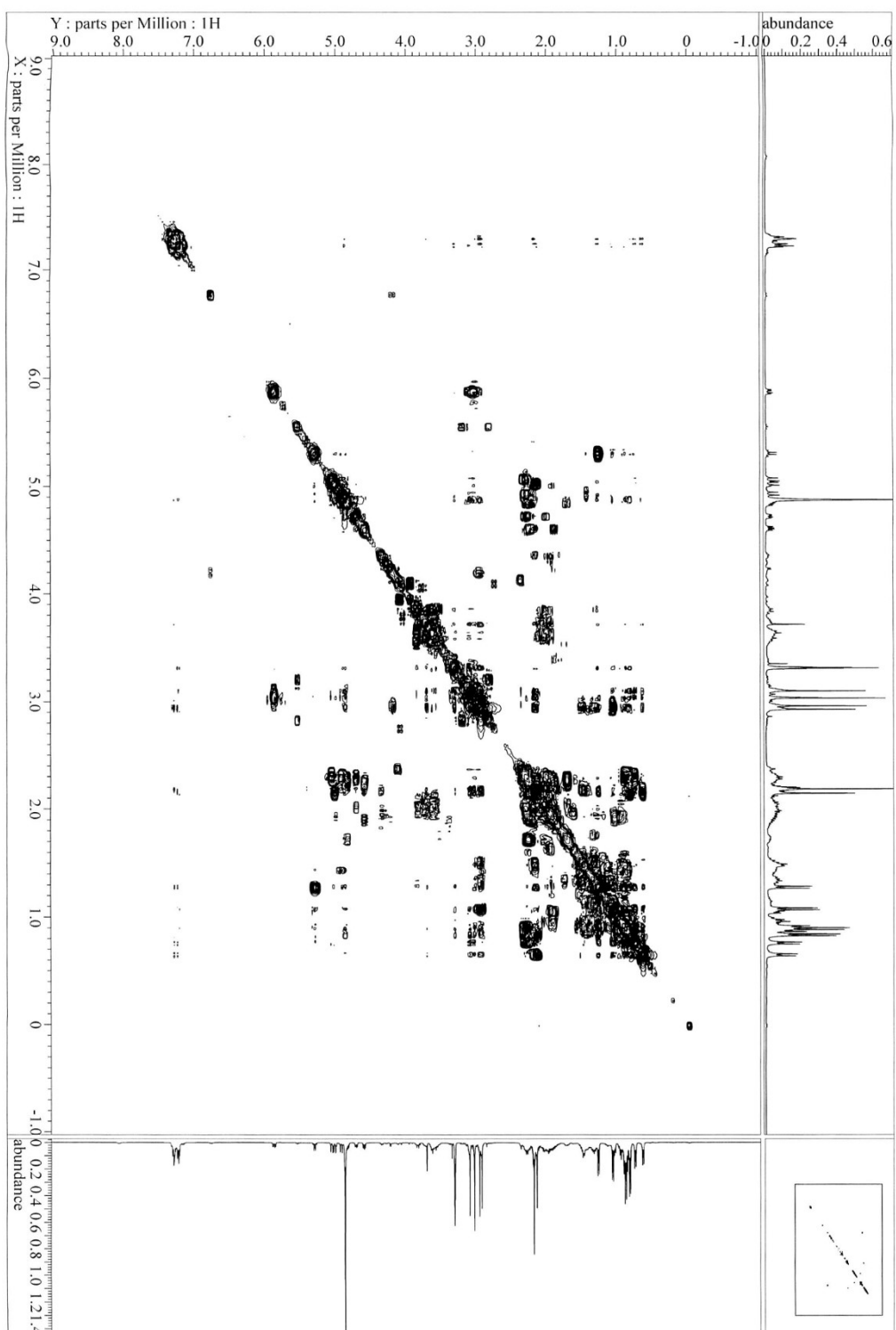


Figure 6-32. COSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of jahanyne (**13**)

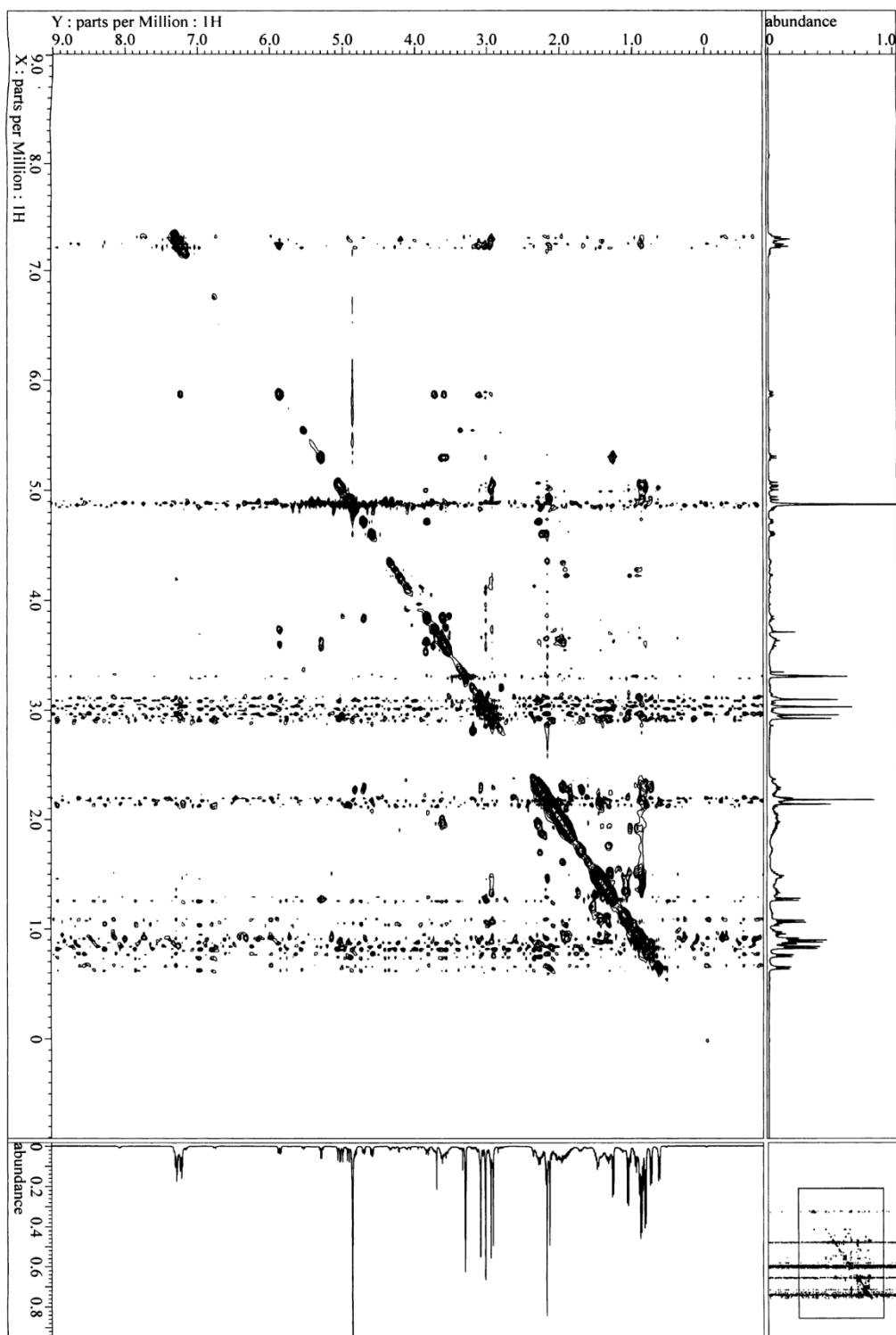


Figure 6-33. NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of jahanyne (13)

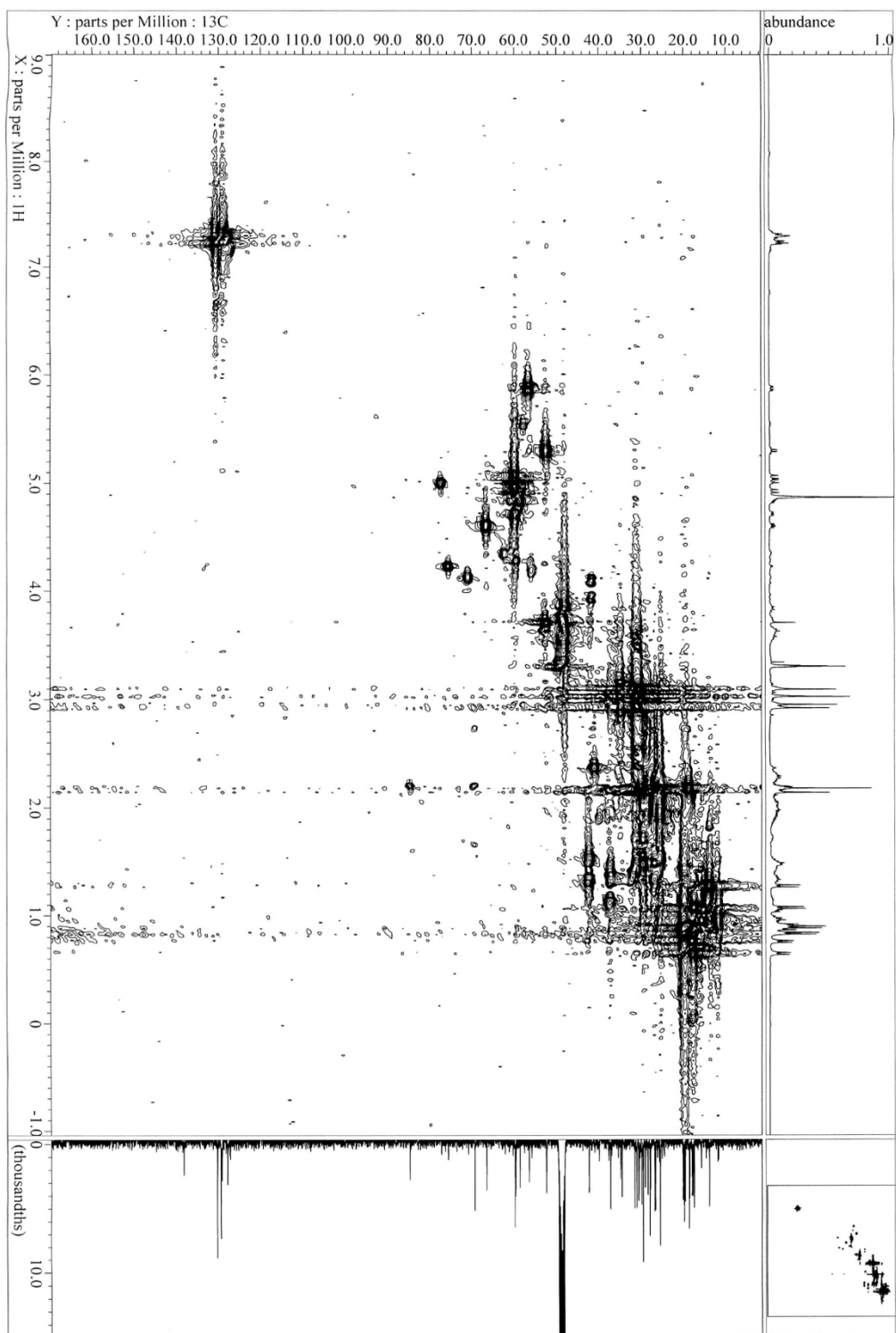


Figure 6-34. HMQC (400 MHz, CD_3OD) spectrum of jahanyne (13)

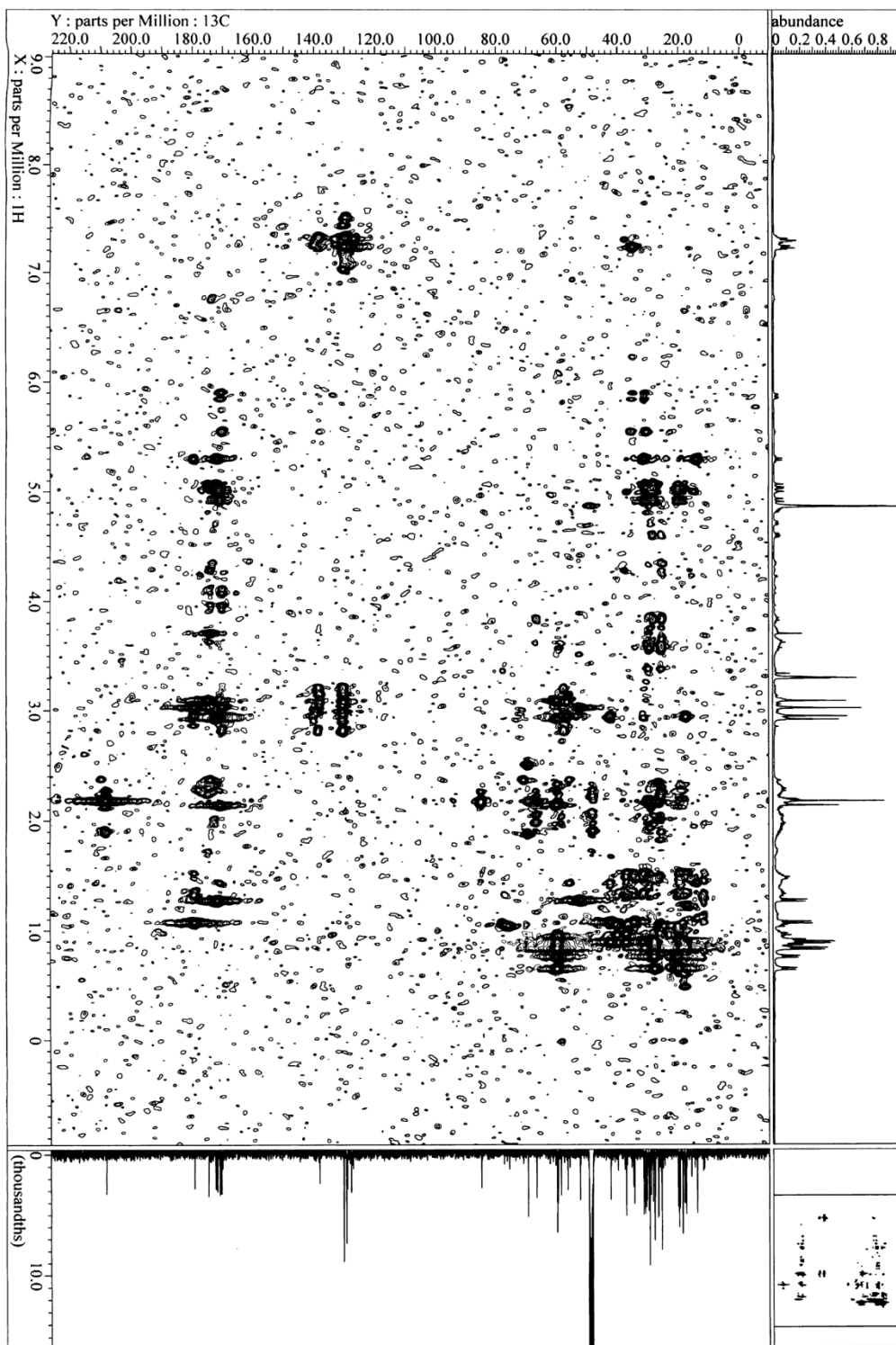


Figure 6-35. HMBC (400 MHz, CD_3OD) spectrum of jahanyne (13)

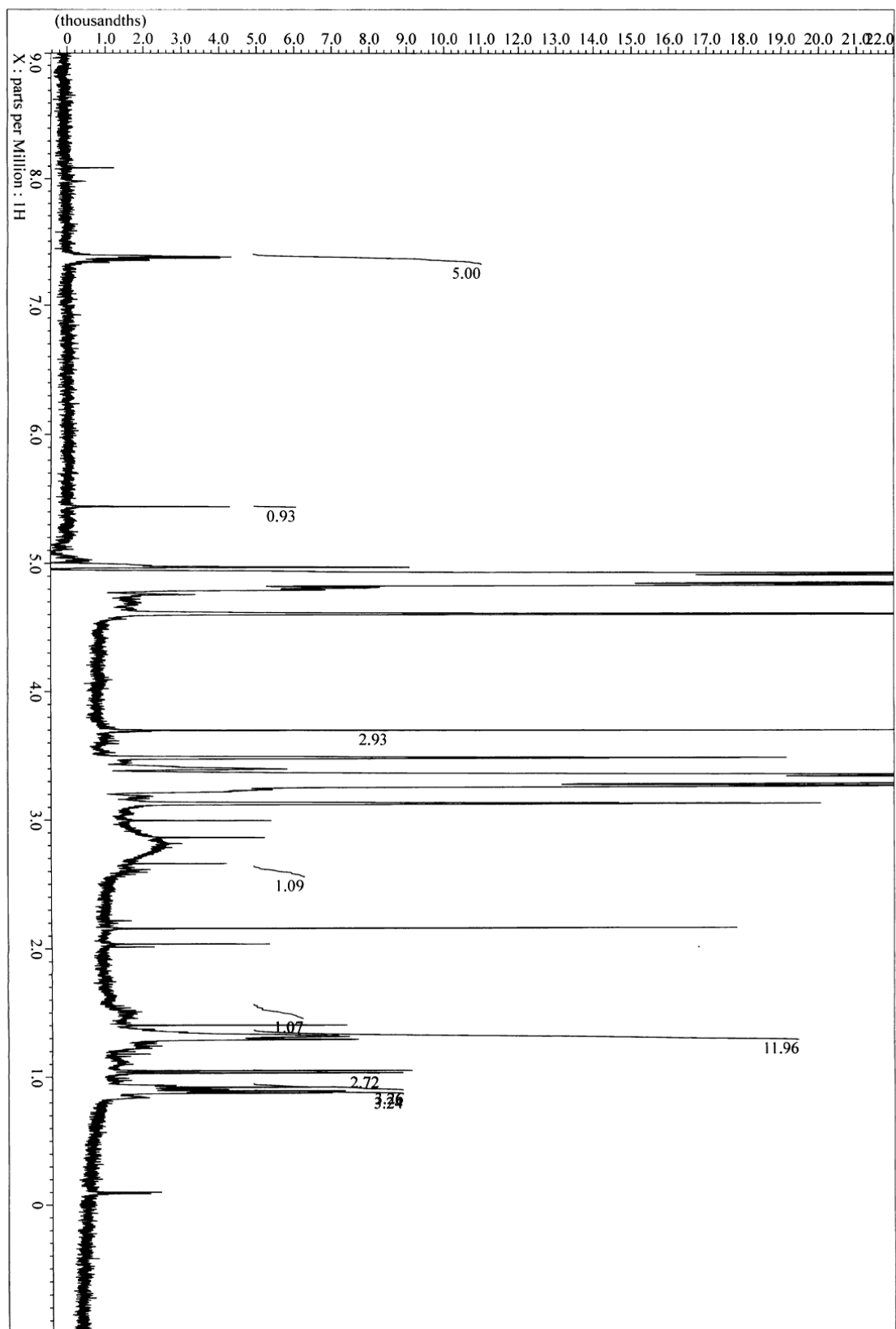


Figure 6-36. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of
(R)-PGME amide of the natural fatty acid (**16**)

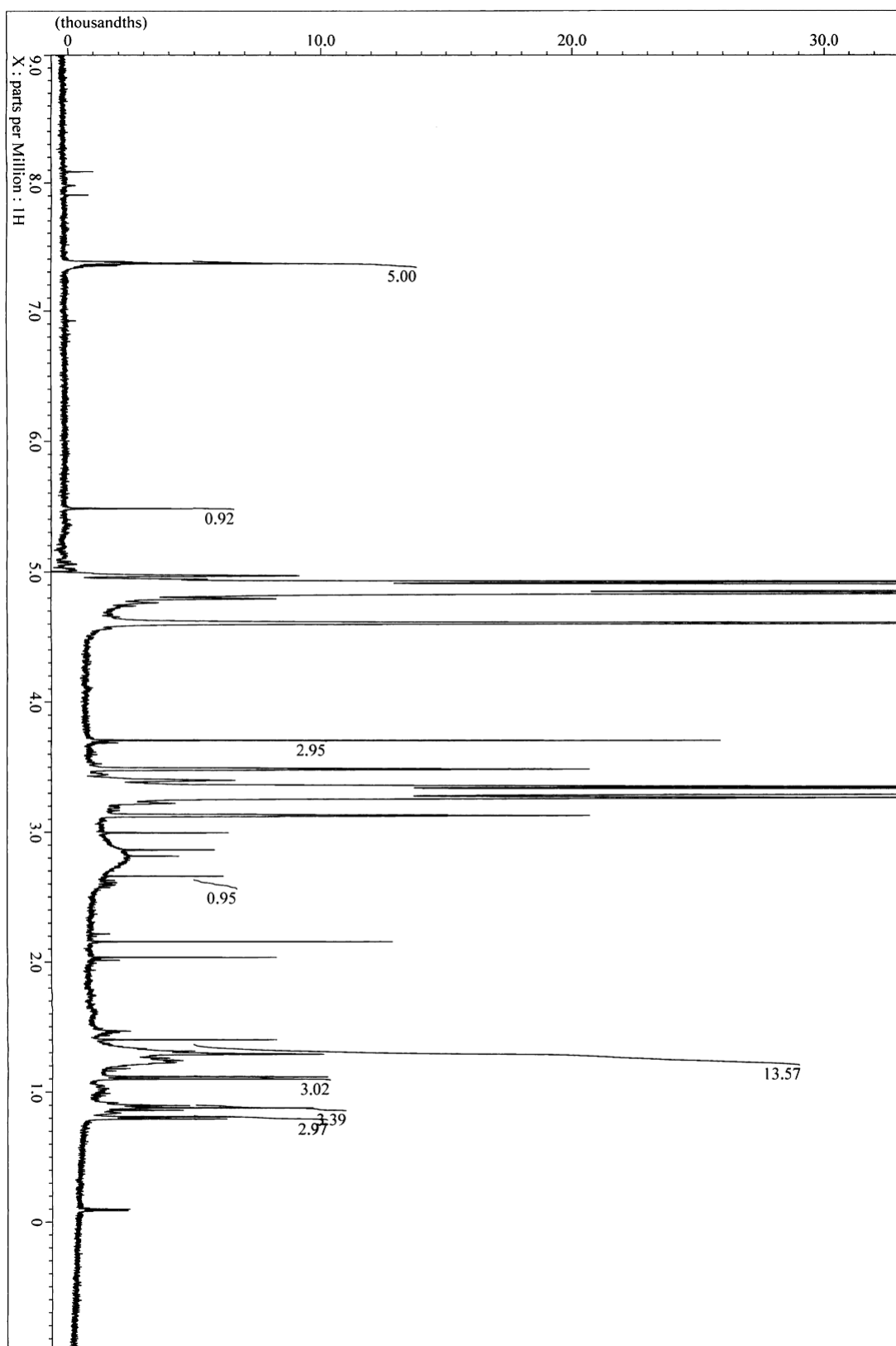


Figure 6-37. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of
(*S*)-PGME amide of the natural fatty acid (17)

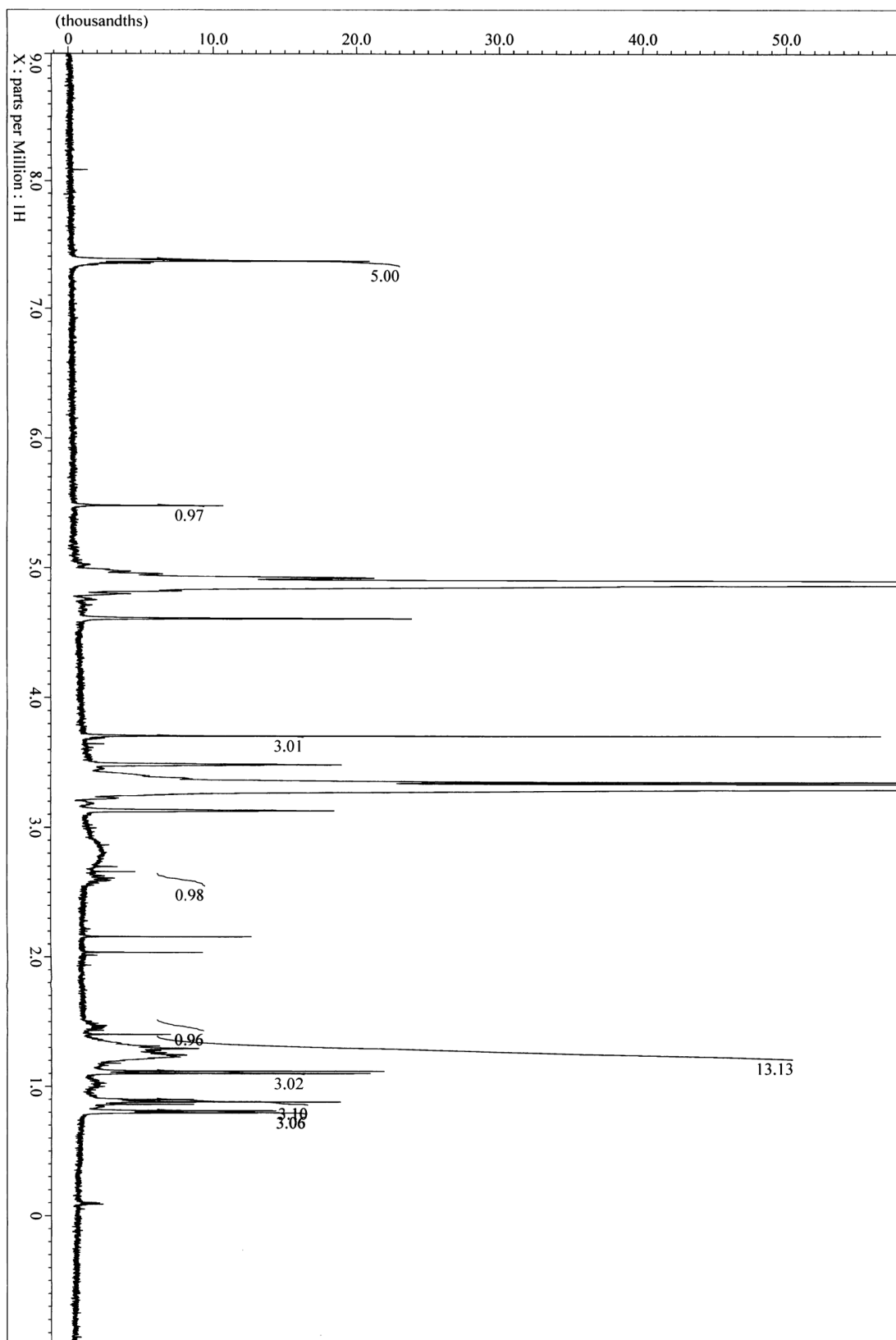


Figure 6-38. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of
(R)-PGME amide of *(2S,4R)*-2,4-dimethyldecanoic acid (**18**)
 167

第四節 第四章の実験

第四章 第二節の実験

Detection of mRNA of ER stress markers.

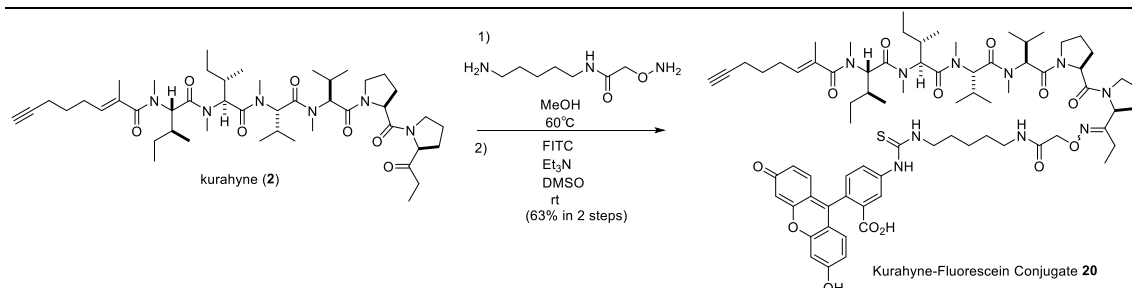
HeLa cells were seeded at 8×10^5 cells/mL in a 6-well plate and cultured overnight. The cells were treated with the compounds for 6 h. Total RNA was isolated from the cells using TRIzol® Reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was then carried out with 2 µg of total RNA and 0.5 µg of Oligo (dT) using the SuperScript™ First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen). PCR was performed with 5 µL of cDNA solution, 1 µM of specific primers, 0.2 mM dNTP mixture, PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), and 1.25 units of TaKaRa Taq (TaKaRa Bio) to a total volume of 50 µL. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 20 cycles of 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min. The amplified PCR products were then electrophoresed on 2% agarose gel and stained with 1.0 µg/mL of ethidium bromide. The gel was visualized and photographed with UV light. The primers were as follows: for BiP, 5'-GCTGTAGCGTATGGTGCTGC-3' and 5'-ATCAGTGTCTACAACATC-3', for CHOP, 5'-CTGCAGAGATGGCAGCTGAGTC-3' and 5'-TGCTTGGTGCAGATTCACCATTC-3', for β-actin, 5'-GGAGAAGCTGTGCTACGTCG-3' and 5'-CGCTCAGGAGGAGCAATGAT-3'.

第四章 第三節の実験

The analysis of the cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells.

HeLa S₃ cells grown to confluence in a flask were washed and suspended in PBS loaded with 4 µM fura-2/AM (Dojindo) at 37 °C in the dark for 1 h. The cells were then washed three times with PBS to remove excess fura-2/AM and extracellular Ca²⁺, and the washed cells were resuspended in PBS at 4 °C. Changes in the intracellular Ca²⁺ concentrations were measured at 37 °C using a dual-wavelength spectrofluorometer (CAF-110, Jasco). Fura-2 fluorescence intensities were monitored with excitation wavelengths of 340 and 380 nm (F340 and F380) and emission at 500 nm, and the ratio of the emissions (F340/F380) was calculated. The maximum fluorescence ratio (R_{max}) was obtained in the presence of 1 mM CaCl₂ and 0.2% Triton X-100, and the minimum fluorescence ratio (R_{min}) was obtained in the presence of 20 mM EGTA (Nacalai Tesque). The Ca²⁺ concentrations were calculated using the method of Grynkiewicz et al⁷⁰.

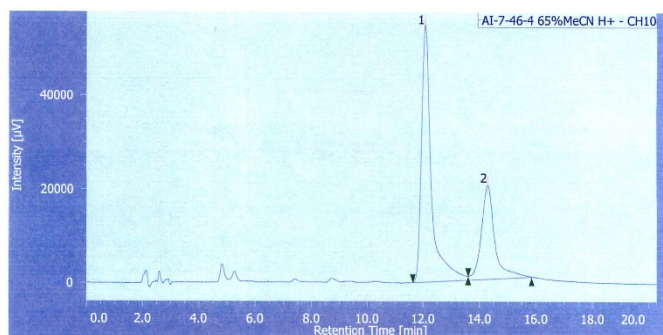
Preparation of kurahyne-fluorescein conjugate **20.**



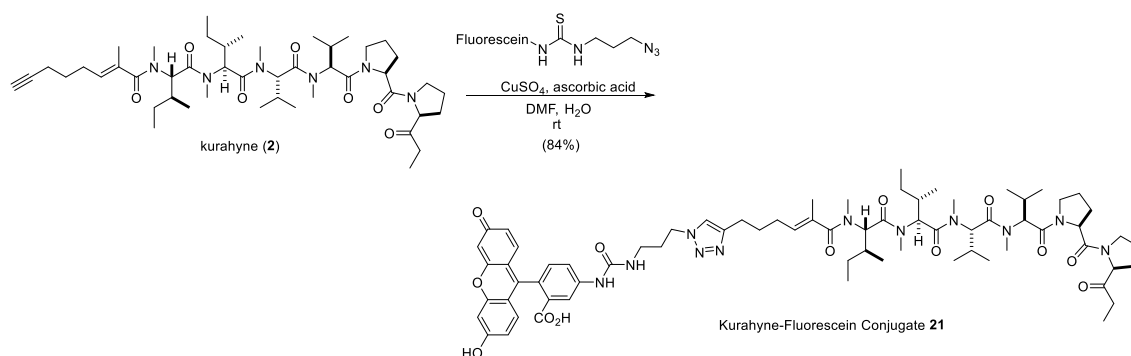
To a solution of kurahyne (**2**) (0.7 mg, 0.8 μmol) in MeOH (3 drops) was added 2-(aminooxy)-*N*-(5-aminopentyl)acetamide²⁸ (8.1 mg, 46 μmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, and then at 60 °C for 0.5 h. The mixture was separated by preparative TLC (chloroform-MeOH 9:1) to afford the crude amine (1.6 mg), which was used for the next reaction without further purification.

To a solution of the crude amine (1.6 mg) and triethylamine (0.1 mL) in DMSO (0.3 mL) was added fluoresceinisothiocyanate (1.5 mg, 3.9 μmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, and purified by reversed-phase HPLC (Cosmosil 5C₁₈AR-II (ϕ 20 × 250 mm), 80% MeOH in 0.1% TFA) to give **20** (0.7 mg, 0.5 μmol , 63% in 2 steps) as a mixture of two stereoisomers. The identity was verified by mass spectral analysis of the isolated compound. HRESIMS m/z 1385.7524 [M+H]⁺ (calcd for C₇₅H₁₀₅N₁₀O₁₃S, 1385.7583). The purity of compound **20** was confirmed by reversed-phase HPLC analysis as indicated below.

kurahyne-fluorescein conjugate **20**: column, Cosmosil 5C₁₈-AR-II (ϕ 4.6 × 250 mm); flow rate 1mL/min; detection, UV 254 nm; solvent, 65% MeCN in 0.1% TFA



Preparation of kurahyne-fluorescein conjugate **21**.

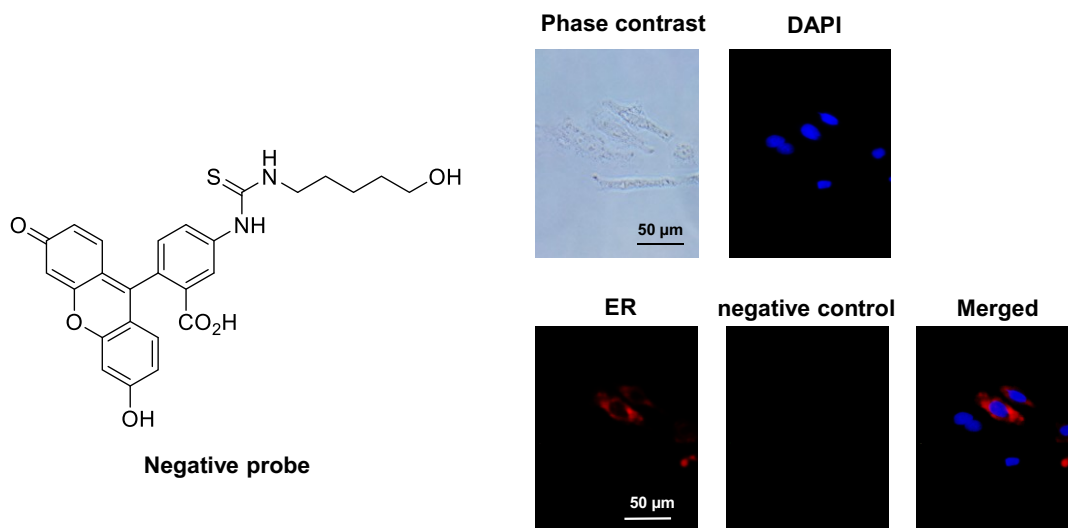


To a stirred solution of **2** (0.9 mg, 1 μmol) and known azido⁸⁵ (1.6 mg, 3.2 μmol) in DMF (100 μL), a solution of CuSO_4 (10 mg) and ascorbic acid (10 mg) in H_2O (20 μL) was added at room temperature. After stirring at room temperature for 1 hour, the reaction mixture was concentrated and purified by reversed-phase HPLC to give **21** (1.2 mg, 0.91 μmol , 84% yield). [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈AR-II (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent, 80% MeOH in 0.1% TFA. The retention time of **3**: 27.3 min.]; ¹H NMR (CD_3OD) δ 8.28 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.82 (dd, J = 7.6, 1.9 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 8.4, 1H), 7.13 (brs, 1H), 7.02 (brs, 2H), 6.89 (brs, 2H), 5.48 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 5.23 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 5.19 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.66 (dd, J = 8.2, 5.2 Hz, 1H), 4.61 (dd, J = 9.1, 4.9 Hz, 1H), 4.50 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.85-3.77 (m, 2H), 3.70-3.59 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.56 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 2.36-2.09 (m, 12H), 2.09-1.88 (m, 5H), 1.88-1.81 (m, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.38 (m, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.97-0.81 (m, 18H), 0.77 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.76 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ESIMS m/z 1312.7350 (calcd for $\text{C}_{71}\text{H}_{98}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1312.7346).

Transfection and fluorescent imaging.

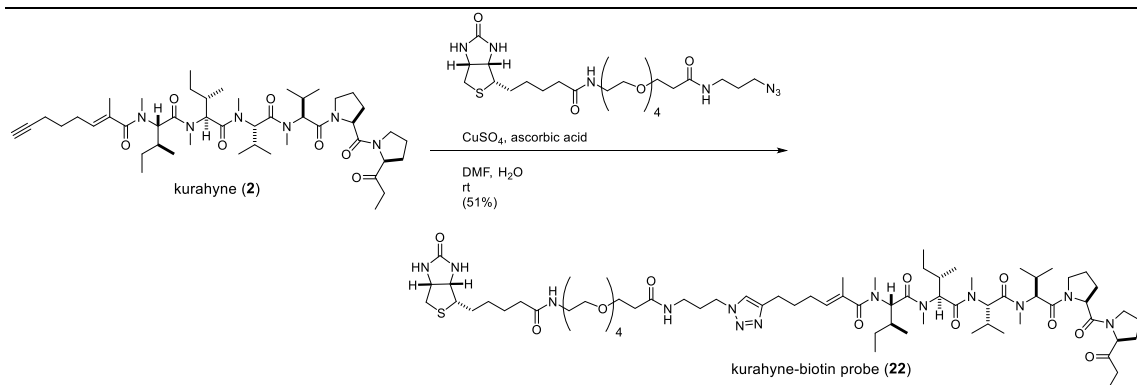
HeLa cells were seeded at 5×10^3 cell/well in a 96 well plate and cultured overnight in antibiotic-free medium. The vector, pDsRed2-ER (Clontech Laboratories), was introduced into the cells using Via Fect™ transfection reagent (Promega) according to the manufacture's protocol. After cultivation for two days, the cells were treated with the test compounds for 6 hours, then washed with PBS, and fixed with 4% paraformaldehyde solution in PBS for 10 min at room temperature. After cell fixation, the cells were washed with PBS, and then treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI dissolved in PBS for 10 min at room temperature. The cells were washed with PBS and fluorescence images were observed by a fluorescent microscope.

Subcellular localization of a negative probe.



Negative probe was not localized in HeLa cells.

Preparation of kurahyne-biotin conjugate **22**.



To a stirred solution of **2** (1.5 mg, 1.8 μ mol) and known azide⁸⁶ (4.2 mg, 7.3 μ mol) in DMF (100 μ L), a solution of CuSO₄ (10 mg) and ascorbic acid (10 mg) in H₂O (20 μ L) was added at room temperature. After stirring at room temperature for 2 hours, the reaction mixture was concentrated and purified by reversed-phase HPLC to give **22** (1.3 mg, 0.92 μ mol, 51% yield). [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈MS-II (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate, 5.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent, 75% MeOH. The retention time of **22**: 38.1 min.]; ¹H NMR (CD₃OD) δ 7.80 (s, 1H), 5.49 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.29 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 5.25 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 4.66 (dd, J = 8.5, 5.5 Hz, 1H), 4.49 (dd, J = 8.1, 5.5 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.30 (dd, J = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 3.86-3.78 (m, 2H), 3.74 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.63-3.60 (m, 12H), 3.53 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.21 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.20 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 3.07 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 2.93 (dd, J = 13.0, 5.2 Hz, 1H), 2.76-2.68 (m, 3H), 2.57 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.37-2.15 (m, 10H), 2.12-1.84 (m, 8H), 1.81 (s, 3H), 1.76-1.55 (m, 3H), 1.49-1.38 (m, 2H), 1.28 (m, 1H), 1.10 (m, 1H), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.99-0.83 (m, 18H), 0.81-0.76 (m, 6H); ESIMS m/z 1412.8961 (calcd for C₇₁H₁₂₂N₁₃O₁₄S [M+H]⁺ 1412.8955).

Affinity purification of kurahyne-biotin conjugate **22 binding proteins in cell lysate.**

HeLa cells grown to confluence in 10 dishes (ϕ 100 mm) were washed twice with PBS, and collected with a scraper on ice. The cells were concentrated by centrifugation and lysed in 1.2 mL of lysis buffer (50 mM Tris [pH 7.4], 0.1 M NaCl, 20% (v/v) glycerol, 1 mM CaCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.8% (w/v) n-dodecyl β -D-maltoside, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.003% (w/v) aprotinin) with a pestle on ice. All of the following experiments that used cell lysate were conducted at 4 °C unless otherwise noted. To remove most of the intrinsic biotin-binding proteins, the suspensions were centrifuged (15000 rpm, 20 min) and treated with NeutrAvidin agarose resin (200 μ L, Thermo) equilibrated with lysis buffer with a rotator for 2 hours. The supernatants were collected by filtration to give the cell lysate with a concentration of 3 mg protein/mL.

Solutions of biotin probes **22** or negative control in DMSO (1 mM, 5 μ L) and lysis buffer (200 μ L) were added to the NeutrAvidin agarose resin (10 μ L) in 1.5 mL Eppendorf tubes. After the incubation with a rotator for 2 hours, the cell lysate (200 μ L) was added, and further incubated for 12 h. Then, the resin was centrifuged, and the supernatant was removed. The resin was washed with 200 μ L of equilibration buffer (50 mM Tris [pH 7.4], 0.1 M NaCl, 20% (v/v) glycerol, 1 mM CaCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol), and binding proteins were eluted with 40 μ L of laemmli buffer (Bio-Rad) with a rotator for 2 hours. SDS-PAGE was performed by using a precast 10% polyacrylamide gel. Proteins in the gels after electrophoresis were transferred to PVDF membranes using the Trans-Blot® SD semi-dry blotting system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Proteins were detected with rabbit monoclonal anti-SERCA2 ATPase antibody (1:250000, Abcam) and HRP-linked antibody (1:1000, Cell Signaling Technology). The HRP-conjugated bands were visualized and detected with Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

第四章 第六節の実験

Inhibition of Ca²⁺-ATPase activity.

Sarcoplasmic reticulum (SR) vesicles containing SERCA1a was obtained according to our previous paper²⁵. ATPase activity was measured with SR vesicles containing SERCA1a at 25°C. The reaction mixture contains 65 mM MOPS, pH 7.0, 129 mM KCl, 6.5 mM MgCl₂, 0.18 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 0.2 mM nicotinamide adenine dinucleotide, 0.5 mM phosphoenolpyruvate, 0.1% C₁₂E₈, 18 units lactate dehydrogenase, 24 units pyruvate kinase, and 0.025 mg/ml of protein in SR. ATP (2 mM) was then added to start the reaction, which was monitored for 3 min at 340 nm in the presence of kurahyne (2) or TG at various concentrations.

参考文献

- ¹ Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S. A. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66.
- ² Fleming, A. *Brit. J. Exp. Path.* **1929**, *10*, 226.
- ³ Miller, L. H.; Su, X. *Cell* **2011**, *146*, 855.
- ⁴ Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y. L.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Omura, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 361.
- ⁵ Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antinot.* **1987**, *40*, 1249.
- ⁶ Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, *66*, 807.
- ⁷ Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325.
- ⁸ (a) Scheuer, P. J.; Takahashi, W.; Tsutsumi, J.; Yoshida, T. *Science* **1967**, *155*, 1267; (b) Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8929.
- ⁹ Kishi, Y. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 339.
- ¹⁰ (a) Lin, Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Engen, D. V.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J. C.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6773; (b) Shimizu, Y.; Chou, H. N.; Bando, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 514.
- ¹¹ (a) Dechraoui, M.; Naar, J.; Pauillac, S.; Legrand, A. *Toxicon* **1997**, *37*, 125; (b) Gusovsky, F.; Daly, J. W. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1633.
- ¹² Uemura, D.; Takahashi, K.; Yamamoto, T.; Katayama, C.; Tanaka, J.; Okumura, Y., Hirata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4796.
- ¹³ Aicher, T. D.; Buszek, K. R.; Fang, F. G.; Forsyth, C. J.; Jung, S. H.; Kishi, Y.; Matelich, M. C.; Scola, P. M.; Spero, D. M.; Yoon, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3162.
- ¹⁴ Gourmelon, C.; Frenel, J. S.; Campone, M. *Expert Opin. Pharmacother.* **2011**, *12*, 2883.
- ¹⁵ Wilson, M. C.; Piel, J. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 636.
- ¹⁶ Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynski, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883.
- ¹⁷ Luesch, H.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S L.; Corbett, T. H. *J. Nat. Prod.*

2001, 64, 907.

- ¹⁸ Ishihara, H.; Martin, B. L.; Brautigan, D. L.; Karaki, H.; Ozaki, H.; Kato, Y.; Fusetani, N.; Watabe, S.; Hashimoto, K.; Uemura, D.; Hartshorne, D. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 159, 871.
- ¹⁹ Wakimoto, T.; Egami, Y.; Nakashima, Y.; Wakimoto, Y.; Mori, T.; Awakawa, T.; Ito, T.; Kenmoku, H.; Asakawa, Y.; Piel, J.; Abe, I. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 648.
- ²⁰ Burja, A. M.; Banaigs, B.; Abou-Mansour, E.; Burgess, J. G.; Wright, P. C. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9347.
- ²¹ Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 123, 5418.
- ²² Shao C.; Linington, R. G.; Balunas, M. J.; Centeno, A.; Boudreau, P.; Zhang, C.; Engene, N.; Spadafora, C.; Mutka, T. S.; Kyle, D. E.; Gerwick, L.; Wang, C.; Gerwick, W. H. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 7849.
- ²³ Kwan, J. C.; Eksioğlu, E. A.; Liu, C.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5732.
- ²⁴ (a) Teruya, T.; Sasaki, H.; Kitamura, K.; Nakayama, T.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2421; (b) Morita, M.; Ohno, O.; Suenaga, K. *Chem. Lett.* **2012**, 41, 165; (c) Morita, M.; Ohno, O.; Teruya, T.; Yamori, T.; Inuzuka, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron* **2012**, 68, 5984; (d) Ohno, O.; Watanabe, A.; Morita, M.; Suenaga, K. *Chem. Lett.* **2014**, 43, 287; (e) Watanabe, A.; Ohno, O.; Morita, M.; Inuzuka, T.; Suenaga, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, 88, 1256.
- ²⁵ Morita, M.; Ogawa, H.; Ohno, O.; Yamori, T.; Suenaga, K.; Toyoshima, C. *FEBS Lett.* **2015**, 589, 1406.
- ²⁶ Tanabe, Y.; Sato, E.; Nakajima, N.; Ohkubo, A.; Ohno, O.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2858.
- ²⁷ (a) Teruya, T.; Sasaki, H.; Fukazawa, H.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2009**, 11, 5062; (b) Sasaki, H.; Teruya, T.; Fukazawa, H.; Suenaga, K. *Tetrahedron* **2011**, 67, 990.
- ²⁸ Sumiya, E.; Shimogawa, H.; Sasaki, H.; Tsutsumi, M.; Yoshita, K.; Ojika, M.; Suenaga, K.; Uesugi, M. *ACS Chem. Biol.*, **2011**, 6, 425.
- ²⁹ Suzuki, K.; Mizuno, R.; Suenaga, K.; Teruya, T.; Tanaka, N.; Kosaka, T.; Oya, M. *Cancer Medicine* **2013**, 2, 32.
- ³⁰ Gao, X.; Liu, Y.; Kwong, S.; Xu, Z.; Ye, T. *Org. Lett.* **2010**, 12, 3018.
- ³¹ Li, W.; Yu, S.; Jin, M.; Xia, H.; Ma, D. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2124.
- ³² (a) Suenaga, K.; Mutoh, T.; Shibata, T.; Itoh, T.; Kigoshi, H.; Yamada, K. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6771; (b) Suenaga, K.; Mutoh, T.; Shibata, T.; Itoh, T.; Fujita, T.; Takada,

- N.; Hayamizu, K.; Takagi, M.; Irifune, H.; Kigoshi, H.; Yamada, K. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8509.
- ³³ Sato, S.; Murata, S.; Orihara, T.; Shirakawa, T.; Suenaga, K.; Kigoshi, H.; Uesugi, M. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 131.
- ³⁴ Yamada, K.; Ojika, M.; Ishigaki, T.; Yoshida, Y.; Ekimoto, H.; Arakawa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11020.
- ³⁵ Kita, M.; Hirayama, Y.; Yoneda, K.; Yamagishi, K.; Chinen, T.; Usui, T.; Sumiya, E.; Uesugi, M.; Kigoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18089.
- ³⁶ Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Ohno, O.; Suda, S.; Suenaga, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87*, 609.
- ³⁷ Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. *RSC Adv* **2014**, *4*, 12840.
- ³⁸ (a) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4126; (b) Takayanagi, A.; Iwasaki, A.; Suenaga, K. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4947.
- ³⁹ Graber, M. A.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 677.
- ⁴⁰ Inuzuka, T.; Yamamoto, K.; Iwasaki, A.; Ohno, O.; Suenaga, K.; Kawazoe, Y.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6711.
- ⁴¹ Iwasaki, A.; Teruya, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 959.
- ⁴² Kwan, J. C.; Ratnayake, R.; Abbound, K. A.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8012.
- ⁴³ (a) Araya-Maturana, R.; Delgado-Castro, T.; Cardona, W.; Weiss-Lopez, B. E. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 253. (b) Araya-Maturana, R.; Pessoa-Mahana, H.; Weiss-Lopez, B. E. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 445.
- ⁴⁴ Gunasekera, S. P.; Miller, M. W.; Kwan, J. C.; Luesch, H.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 459.
- ⁴⁵ Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591.
- ⁴⁶ Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Dufresne, C.; Cerny, R. L.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Kizu, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5015.
- ⁴⁷ (a) Matthew, S.; Ross, C.; Rocca, J. R.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 124; (b) Taori, K.; Matthew, S.; Rocca, J. R.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1593; (c) Kwan, J. C.; Taori, K.; Paul, V. J.; Luesch, H. *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 528.
- ⁴⁸ Nogle, L. M.; Williamson, R. T.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 716.
- ⁴⁹ Harrigan, G. G.; Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Nagle, D. G.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 655.
- ⁵⁰ Lee, A. Y.; Smitka, T. A.; Bonjouklian, R.; Clardy, J. *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 113.

- ⁵¹ (a) Linington, R. G.; Edwards, D. J.; Shuman, C. F.; McPhail, K. L.; Matainaho, T.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 22; (b) Salvador, L. A.; Taori, K.; Biggs, J. S.; Jakoncic, J.; Ostrov, D. A.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1276.
- ⁵² Carey, L.; Clough, J. M.; Pattenden, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 3005.
- ⁵³ Balunas, M. J.; Linington, R. G.; Tidgewell, K.; Fenner, A. M.; Ureña, L. D.; Togna, G. D.; Kyle, D. E.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 60.
- ⁵⁴ Okamoto, S.; Iwasaki, A.; Ohno, O.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2719.
- ⁵⁵ Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092.
- ⁵⁶ Williams, P. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1336.
- ⁵⁷ (a) Williams, P. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1006; (b) Sun, T.; Zhang, W.; Zong, C.; Wang, P.; Li, Y. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 364.
- ⁵⁸ Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Ogawa, H.; Nguyen, K. A.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 652.
- ⁵⁹ Engene, N.; Paul, V. J.; Byrum, T.; Gerwick, W. H.; Thor, A.; Ellisman, M. H. *J. Phycol.* **2013**, *49*, 1095.
- ⁶⁰ Nagai, Y.; Kusumi, T. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1853.
- ⁶¹ Schmidt, Y.; Lehr, K.; Colas, L.; Breit, B. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7071.
- ⁶² Li, S.; Liang, S.; Tan, W.; Xu, Z.; Ye, T. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2695.
- ⁶³ Iwasaki, A.; Ohno, O.; Katsuyama, S.; Morita, M.; Sasazawa, Y.; Dan, S.; Simizu, S.; Yamori, T.; Suenaga, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5295.
- ⁶⁴ Yamori, T.; Matsunaga, A.; Sato, S.; Yamazaki, K.; Nakanishi, O.; Kohno, H.; Nakajima, Y.; Komatsu, H.; Andoh, T.; Tsuruo, T. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4042.
- ⁶⁵ Christensen, S. B.; Larsen, I. K.; Rasmussen, U.; Christophersen, C. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 649.
- ⁶⁶ Holzapfel, C. W. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2101.
- ⁶⁷ Vanicha, V.; Kanyawim, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112.
- ⁶⁸ (a) Goeger, D. E.; Riley, R. T.; Dorner, J. W.; Cole, R. J. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 978; (b) Sagara, Y.; Inesi, G. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 13503.
- ⁶⁹ (a) Brüning, A. *Methods Enzymol.* **2011**, *491*, 127; (b) Kaufman, R. J. *Genes Dev.* **1993**, *13*, 1211; (c) Wang, X. Z.; Lawson, B.; Brewer, J. W.; Zinszner, H.; Sanjay, A.; Mi, L. J.; Boorstein, R.; Kreibich, G.; Hendershot, L. M.; Ron, D. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4273.
- ⁷⁰ Gryniewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440.
- ⁷¹ (a) Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H.; Ogawa, H. *Nature* **2000**, *405*, 647; (b)

- Takahashi, M.; Kondou, Y.; Toyoshima, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5800.
- ⁷² Warren, G. B.; Toon, P. A.; Birdsall, N. J. M.; Lee, A. G.; Metcalfe, J. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 622.
- ⁷³ (a) Gélébart, P.; Kovács, T.; Brouland, J. P.; Gorp, R.; Grossmann, J.; Rivard, N.; Panis, Y.; Martin, V.; Bredoux, R.; Enouf, J.; Papp, B. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26310;
(b) Pacifico, F.; Ulianich, L.; De Micheli, S.; Treglia, S.; Leonardi, A.; Vito, P.; Formisano, S.; Consiglio, E.; Di Jeso, B. *J. Mol. Endocrinol.* **2003**, *30*, 399.
- ⁷⁴ Denmeade, S. R.; Isaacs, J. T. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 14.
- ⁷⁵ Cardi, D.; Pozza, A.; Arnou, B.; Marchal, E.; Clausen, J. D.; Andersen, J. P.; Krishna, S.; Møller, J. V.; Maire, M.; Jaxel, C. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26406.
- ⁷⁶ Bilmen, J. G.; Wootton, L. L.; Michelangeli, F. *Biochem. J.* **2002**, *366*, 255.
- ⁷⁷ Bilmen, J. G.; Khan, S. Z.; Javed, M. H.; Michelangeli, F. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6318.
- ⁷⁸ Luesch, H.; Pangilinan, R.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 304.
- ⁷⁹ Cruz-Rivera, E.; Paul, V. J. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 213.
- ⁸⁰ Tan, L. T.; Goh, B. P. L.; Tripathi, A.; Lim, M. G.; Dickinson, G. H.; Lee, S. S. C.; Teo, S. L. M. *Biofouling* **2010**, *26*, 685.
- ⁸¹ 日本化学会 編 『CSJ Current Review 19 生物活性分子のケミカルバイオロジー 標的の同定と作用機構』, 化学同人, **2015**, 12.
- ⁸² Pettit, G. R.; Smith, T. H.; Arce, P. M.; Flahive, E. J.; Anderson, C. R.; Chapuis J. C.; Xu, J. P.; Groy, T. L.; Belcher P. E.; Macdonald, C. B. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 476.
- ⁸³ Ma, Z.; Song, N.; Li, C.; Zhang, W.; Wang, P.; Li, Y. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 1139.
- ⁸⁴ Meloni, M. M.; Taddei, M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 337.
- ⁸⁵ Lin, P.; Ueng, S.; Tseng, M.; Ko, J.; Huang, K.; Yu, S.; Adak, A. K.; Chen, Y.; Lin, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286.
- ⁸⁶ Peddibhotla, S.; Dang, Y.; Liu, J. O.; Romo, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12222.

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 理工学研究科 後期博士課程在学中に、同大学理工学部 末永聖武教授の指導のもとに行ったものである。

学部、修士、博士課程に渡って、一貫して研究のご指導を頂いた末永聖武教授に心より感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり、貴重なお時間を割いてご指導くださいました慶應義塾大学理工学部 井本正哉教授、藤本ゆかり教授、犀川陽子准教授に心より感謝申し上げます。

実験や論文作成にあたって、日常的にご指導くださいました工学院大学先進工学部 大野修准教授（著者が博士課程 1, 2 年次の末永研助教）に心より感謝申し上げます。

学部、修士の時に実験をご指導くださいました琉球大学教育学部 照屋俊明准教授（著者が学部、修士時の末永研助手のち助教）に心より感謝申し上げます。

第二章の実験は、以下の皆様のご支援のもとに行ったものです。

海洋シアノバクテリアの同定を行って頂きました琉球大学 理学部 須田彰一郎教授、澄本慎平修士（当時の所属。現慶應義塾大学大学院 後期博士課程在学中）に感謝致します。

Kurahyne の破骨細胞分化阻害活性試験を行って頂いた、慶應義塾大学理工学部 応用化学科 清水史郎准教授、笹澤有紀子助教（現順天堂大学）、勝山俊氏に感謝いたします。

Kurahyne の構造決定の妥当性を、全合成の達成を通じて証明した末永研 岡本慎一朗氏に感謝いたします。また **maedamide** の初期提唱構造の誤りに気づき、著者とともに全合成を達成して真の構造を解明した元末永研 高柳綾乃修士に感謝いたします。

第三章の実験は、以下の皆様のご支援のもとに行ったものです。

海洋シアノバクテリアの同定を行って頂きました末永研 澄本慎平修士に感謝いたします。また **jahanyne** の発見にあたり、分離精製を進めた元末永研 **Kim Anh Nguyen** 修士に感謝いたします。

第四章の実験は、以下の皆様のご支援のもとに行ったものです。

JFCR39 スクリーニングアッセイを行って頂いた、公益財団法人 がん研究会 矢守隆夫博士（現医薬品医療機器総合機構 審査センター長）、且慎吾博士に深く感謝いたします。

SERCA 阻害活性試験を行って頂いた、東京大学分子細胞生物学研究所 豊島近教授、森田真布博士に深く感謝いたします。

細胞質内 Ca^{2+} 濃度の定量にあたり、蛍光分光光度計を貸して下さった神奈川大学理学部 上村大輔教授に感謝いたします。

細胞内局在部位の解析において、小胞体に蛍光タンパクを発現させた細胞の調製にご協力くださった元神奈川大学理学部 川添嘉徳研究員、慶應義塾大学理工学部 生命情報学科 宮本憲二准教授、加納満大氏に感謝いたします。

本研究を行うにあたって、現役、OB を問わず、末永研究室の学生の皆様には、日々支えて頂きました。ここに感謝いたします。

本研究を行うにあたって、以下の支援を頂きました。

博士課程初年度の研究の一部は、KLL 後期博士課程研究助成金によって行われました。ここに感謝いたします。また、博士課程初年度の金銭的に厳しい状況下で、学生支援機構第一種奨学金、慶應義塾大学大学院奨学金をいただき、慶応工学会給費奨学生に採用して頂きました。学費、生活費を工面するにあたり、大変たすかりました。関係者の皆様に心から感謝申し上げます。

博士課程二年次には、慶應義塾大学大学院助教（有期・研究奨励）に採用頂きました。金銭面での支えになったことはもちろんのこと、山梨県立吉田高校での出張講義をはじめ、数多くの発表の機会を与えて頂き、ありがとうございました。これらの経験を通じ、プレゼンテーション能力が大変向上しました。関係者の皆様に心から感謝申し上げます。

博士課程三年次には、慶應義塾大学理工学部助教（有期）に採用頂きました。関係者の皆様に心から感謝申し上げます。また博士課程 3 年次の研究は、JSPS 科研費 15H06584（研究活動スタート支援）の助成を受けたものです。ここに感謝いたします。

最後に、以下の方々に感謝いたします。

3 年の長きに渡って、私達夫婦の研究生生活と家庭生活を支えてくださいました早川家のご両親、佳延さんと正子さんに心より感謝いたします。

後継ぎとして入った会社を辞め、大学に復学した私を見守ってきて下さった父 全孝、母 由子に心から感謝いたします。

最後に、私を信じ、この 3 年間の挑戦を全面的に支えてくれた妻 陽子に心から感謝いたします。

岩崎 有紘

論文リスト

- 1) Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Ohno, O.; Suda, S.; Suenaga, K. Kurahamide, a Cyclic Depsipeptide Analog of Dolastatin 13 from a Marine Cyanobacterial Assemblage of *Lyngbya* sp. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87*, 609-613.
- 2) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. Kurahyne, an acetylene-containing lipopeptide from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12840-12843.
- 3) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. Maedamide, a novel chymotrypsin inhibitor from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4126-4128.
- 4) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Ogawa, H.; Nguyen, K.A.; Suenaga, K. Jahanyne, an apoptosis-inducing lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 652-655.
- 5) Takayanagi, A.; Iwasaki, A.; Suenaga, K. Total synthesis and stereochemical reassignment of maedamide. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4947-4949.
- 6) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Katsuyama, S.; Morita, M.; Sasazawa, Y.; Dan, S.; Simizu, S.; Yamori, T.; Suenaga, K. Identification of a Molecular Target of Kurahyne, an Apoptosis-inducing Lipopeptide from Marine Cyanobacterial Assemblages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5295-5298.

参考論文リスト

- (1) Teruya, T.; Iwasaki, A.; Suenaga, K. 20-*N*-Methylpurpuramine E: New Bromotyrosine-derived Metabolite from Okinawan Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, *81*, 1026-1027.
- (2) Iwasaki, A.; Teruya, T.; Suenaga, K. Isolation and structure of koshikalide, a 14-membered macrolide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 959-960.
- (3) Inuzuka, T.; Yamamoto K.; Iwasaki, A.; Ohno, O.; Suenaga, K.; Kawazoe, Y.; Uemura, D. An inhibitor of the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells, yoshinone A, and its analogs, isolated from the marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6711-6714.
- (4) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Matsubara, T.; Shimada, S.; Sato, T.; Suenaga, K. Mebamamides A and B, Cyclic Lipopeptides Isolated from the Green Alga *Derbesia marina*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 901-908.
- (5) Okamoto, S.; Iwasaki, A.; Ohno, O. Suenaga, K. Isolation and Structure of Kurahyne B and Total Synthesis of Kurahynes *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2719-2725.