

海洋シアノバクテリア由来抗トリパノソーマ物質および
カルシウムポンプ阻害剤の構造と生物活性

2022 年度

栗 澤 尚 瑛

学位論文 博士（理学）

海洋シアノバクテリア由来抗トリパノソーマ物質および
カルシウムポンプ阻害剤の構造と生物活性

2022 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

栗 澤 尚 瑛

目次

第1章 序論

第1節 天然物の探索研究における歴史と発展	1
第2節 海洋天然物とその起源	5
第3節 海洋シアノバクテリア由来生物活性物質の探索研究	10

第2章 新規鎖状ペプチド iheyamide A-C の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と同定	15
第2節 Iheyamide A-C の単離	16
第3節 Iheyamide 類の構造決定	17
第4節 Iheyamide 類の生物活性	28
第5節 考察	30

第3章 新規鎖状デプシペプチド kinenzoline の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と同定	32
第2節 Kinenzoline の単離	33
第3節 Kinenzoline の構造決定	34
第4節 Kinenzoline の生物活性	40
第5節 考察	41

第4章 新規ペプチド-ポリケチドハイブリッド配糖体 iezoside の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と同定	42
第2節 Iezoside の単離	43
第3節 Iezoside の構造決定	44
第4節 (18 <i>R</i> ,19 <i>R</i>)- および (18 <i>S</i> ,19 <i>R</i>)-iezoside の全合成	55
第5節 Iezoside の生物活性	68
第6節 考察	80

第5章 総括

第6章 実験項

第1節 一般操作	92
第2節 第2章の実験	94
第3節 第3章の実験	112
第4節 第4章の実験	122

参考文献

謝辞

略語表

AcCl	acetyl chloride
AcOH	acetic acid
ACP	acyl-carrier protein
ADP	adenosine diphosphate
AgOTf	silver trifluoromethanesulfonate
Ala	alanine
AlEtCl ₂	ethylaluminum dichloride
ATF4	activating transcription factor 4
ATP	adenosine triphosphate
BF ₃ ·Et ₂ O	boron trifluoride diethyl ether complex
BnBr	benzyl bromide
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
CH ₂ Cl ₂	dichloromethane
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CoA	coenzyme A
(COCl) ₂	oxalyl chloride
COSY	correlated spectroscopy
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIBAL	diisobutylaluminium hydride
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMP	2,2-dimethoxypropane
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECD	electronic circular dichroism
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2A
ER	endoplasmic reticulum
Et ₃ N	triethylamine
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
GI ₅₀	half maximal growth inhibitory concentration

GIAO	gauge-independent atomic orbital
H ₂ SO ₄	sulfuric acid
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)tetramethyluronium hexafluorophosphate
Hex ₂ BCl	chlorodicyclohexylborane
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
Ile	isoleucine
<i>i</i> Pr ₂ NEt	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
<i>i</i> -PrMgCl	isopropylmagnesium chloride
Leu	leucine
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
Me ₃ Al	trimethylaluminum
MeCN	acetonitrile
MeI	iodomethane
MeMgBr	methylmagnesium bromide
MeOH	methanol
MMFF	Merck molecular force field
MPLC	medium pressure liquid chromatography
MS4Å	molecular sieve 4Å
MTPA	α -methoxy- α -trifluoromethyl- α -phenylacetic acid
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
<i>n</i> -Bu ₂ BOTf	dibutylboron trifluoromethanesulfonate
<i>n</i> -BuLi	<i>normal</i> -butyllithium
NMM	<i>N</i> -methylmorphiline
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear overhauser effect and exchange spectroscopy
PCC	pyridinium chlorochromate
Pd(OH ₂)	palladium hydroxide
PDC	pyridinium dichromate
PERK	protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
Phe	phenylalanine
PPh ₃	triphenylphosphine

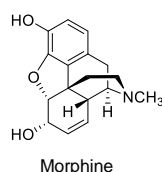
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
Pro	proline
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
RB	retinoblastoma protein
RMSD	root-mean-square deviation
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
Sm(OTf) ₃	samarium (III) trifluoromethanesulfonate
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
TBDPSCl	<i>tert</i> -butyldiphenylchlorosilane
<i>t</i> -BuOCOCl	isobutyl chloroformate
TDDFT	time-dependent density-functional theory
TES	triethylsilyl
TESOTf	triethylsilyl trifluoromethanesulfonate
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
THF	tetrahydrofuran
TMSOTf	trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
TOCSY	totally correlated spectroscopy
Tyr	tyrosine
UPR	unfolded protein response
Val	valine
VinylMgBr	vinylmagnesium bromide

第1章 序論

第1節 天然物の探索研究における歴史と発展

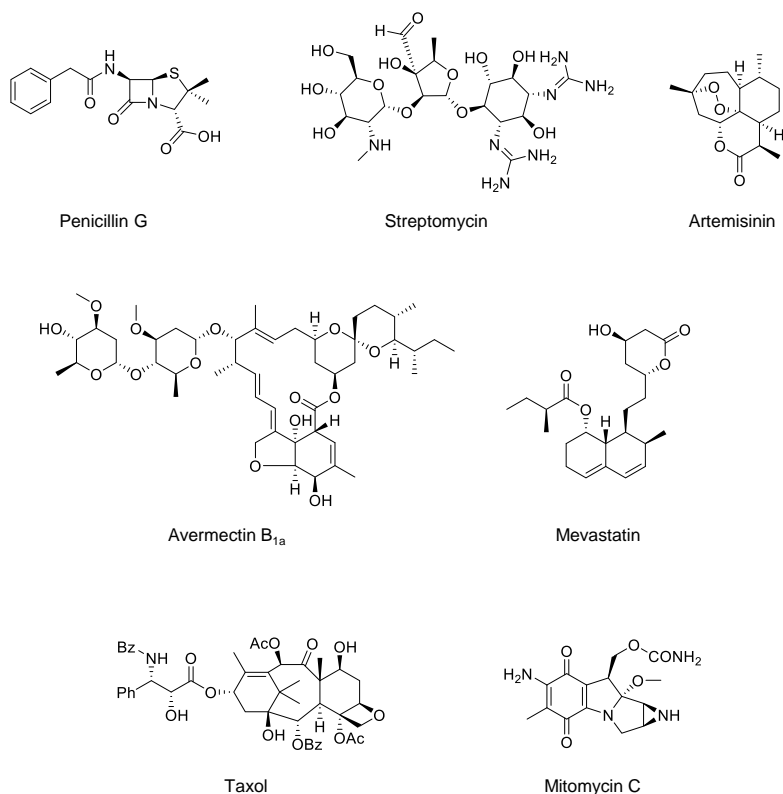
天然物は、生物が長きに渡る生存競争と進化の過程で獲得してきた高機能分子である。タンパク質をはじめとする生体分子に特異的に結合し、さまざまな生命現象を誘起する。限られたアミノ酸の集合体であるタンパク質と比べ、天然物の構造要素は圧倒的に多彩であり、その複雑な化学構造や特異な生物活性は今日まで人々を魅了し、様々な角度から研究が発展してきた。

天然物を用いる研究において全てのスタートとなるのは、天然物の発見である。近代科学の勃興に伴い、動植物の色や香りの成分、生物現象が何に由来するのかという純粋な知的好奇心や、民間伝承で伝えられる動植物の薬理成分の本体がどのようなものかなど、基礎および応用の観点から天然物の探索研究が行われた。アヘンから **morphine** が単離され、アヘンの薬理作用の本体が化学物質であることが明らかとなったのを端緒に¹、黎明期は植物を中心として、次いで陸上の微生物を対象として多くの薬理成分が単離され、その構造や生物活性が明らかにされた。



天然物は、医薬への応用をはじめ人類の発展に大きく寄与した。最も代表的なものとして、アオカビより発見された **penicillin G**²や、放線菌より発見された **streptomycin**³などの抗生物質が挙げられる。これらは1900年代前半まで人類の死亡主因であった結核をはじめとする細菌感染症に劇的な効果を発揮し、大幅な平均寿命の上昇に貢献した。また、マラリアやオンコセルカ症などの寄生虫症に対しては、クソニンジンより単離された **artemisinin**⁴や、放線菌より単離された **avermectin**⁵が著しい治療効果を示し、感染者や重病者を大幅に減少させた。

平均寿命の上昇に伴い顕在化した生活習慣病においても、天然物は同様の活躍を見せている。糸状菌より発見された **mevastatin**をはじめとするスタチン類⁶は、血中コレステロール値を低下させる脂質降下薬として心筋梗塞、脳卒中などの発症予防に大きく貢献した。また、**taxol**⁷や **mitomycin C**⁸をはじめとした多くの天然物が、抗がん剤として使用されている。このように、天然物は医薬のリソースとして極めて大きな役割を果たしてきた。また、複雑な構造を人の手で構造決定・合成するための方法論の確立と、それらを用いた全合成研究が盛んに行われることで有機化学分野の爆発的な発展を促した。



近年では、従来型の探索・合成研究に加えて、天然物の特性を生かした境界領域研究が活発に進行しており、以下に示す領域で天然物が積極的に利用されている。

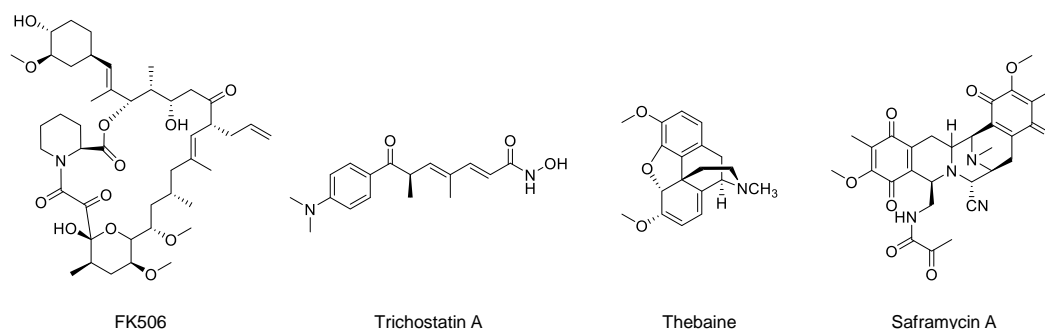
①ケミカルバイオロジー

天然物の高い生体親和性や標的特異性を利用して、それらの標的分子や作用機序を分子レベルで理解し、新たな創薬標的や生命現象を発見するケミカルバイオロジー研究が盛んに行われている。Schreiberらは強力な免疫抑制剤であるFK506⁹について、作製した分子プローブを用いて本化合物とFK506 binding proteinの複合体が脱リン酸化酵素 calcineurinのはたらきを強力に阻害することを発見し、免疫反応に関与するシグナル伝達を網羅的に明らかにした¹⁰。吉田、別府らは白血球細胞分化誘導物質としてtrichostatin A¹¹を再発見し、その標的分子がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) であることを突き止め、低分子でエピジェネティクスを制御できること、HDACが種々の疾病に対する創薬標的として有望であることを発見した¹²。これらの研究は、生化学的な研究では機能や存在が明らかにされなかったタンパク質を見出した点や、低分子が任意のタンパク質の機能を特異的に調節できることを実証した点で高く評価されている。

②シンセティックバイオロジー

三次元的に複雑な天然物を人工的に合成するには、多段階の反応と数多くの試行錯誤を

必要とする。一方で、生物はアミノ酸や脂肪酸といった単純な一次代謝産物を出発原料として天然物をいとも容易く生合成する。近年の分子生物学やゲノム解析の発展に伴い、天然物の設計図である生合成遺伝子の異種発現による天然物生産や、天然物の生合成酵素を用いて複雑天然物を合成する試みが行われている。Smolke らは出芽酵母にオピオイド生合成遺伝子を導入し、砂糖を原料として morphine の生合成中間体である thebaine や hydrocodone を生合成させることに成功している¹³。谷藤、大栗、及川らは saframycin 類の生合成酵素である Sfm C に対し、酵素に受容される非天然型基質を与えることで saframycin 類の複雑な五環性母骨格を 1 日で合成している¹⁴。これらの研究は、酵素の機能や基質の構造を改変することで多様な類縁体を効率的に創出できる点や、限りある生物資源・化学資源を必要以上に消費しない環境面で優れている。



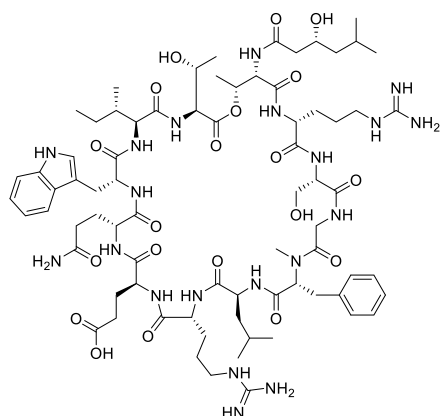
関連分野が発展する一方で、従来の探索研究を取り巻く環境は大きく変化している。世界中で天然物の探索研究が行われた結果、構造・生物活性の新規性が高い天然物を取得する確率が大幅に低下し、研究の意義が問われている。加えて、創薬の場においては物質同定に至るまでの煩雑さや、抽出物の擬陽性などに由来するハイスループット性の低さがネックとなり、多くの製薬企業が創薬を志向した天然物探索研究から撤退していることも、新規天然物の発見数の低下に拍車をかけている。

しかし、新規の化学構造や生物活性をもつ天然物を発見する重要性は、現在においても揺るがない。Tan らの報告¹⁵によると、天然物そのもの、あるいは天然物の構造を基盤とした医薬品と、合成化合物由来の医薬品のケミカルスペース(分子量や極性、不斉炭素数、結合の回転自由度などの物理化学的特性を座標軸とした多次元空間)を比較すると、前者の方がより幅広い空間をカバーし、現代創薬においても天然物のもつ構造多様性が医薬リードとして重要であることが示されている。また、Linington らは 1941-2015 年の約 70 年間で発見された天然物を対象として、新規化合物の報告数や新規性について解析している¹⁶。その結果、直近の 20 年で新規性の高い化合物が発見される割合はやはり低下しているものの、分析技術の進歩に伴い、その絶対数は維持されていると述べている。また、化合物の構造的な特徴は、生物資源により大きく異なることを報告している。すなわち、放線菌や糸状菌、バ

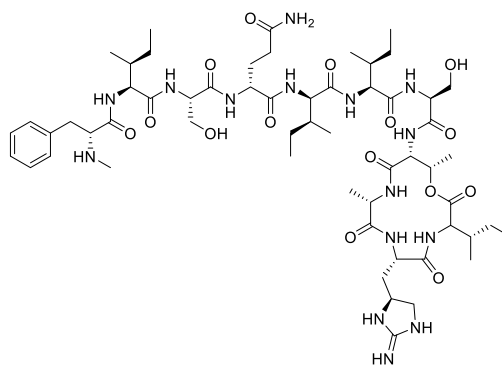
クテリアからそれぞれ発見される化合物の構造は、種ごとにそれぞれ固有の特徴を持つ。以上の報告から、現代の天然物探索には以下の要素が重要であることが述べられている。

- (1) 新規化合物の取得確率の低下に惑わされず、継続的な探索研究を行うこと
- (2) 既知化合物を探索初期の段階で迅速に同定し、排除すること
- (3) 生物活性の評価系に工夫を加えること
- (4) 未知の生物資源を探索対象とすること

(1) を信条とし、天然物の可能性を求めて世界中の研究者が新たな視点から探索研究に臨んでいる。(2) については、人工知能やビッグデータを活用した天然物探索の方法論開発が進んでおり、天然物の粗精製画分を LC-MS/MS で解析し、質量情報から LC 上の各ピークに対応する化合物を網羅的に同定・クラスタリングする手法 (Global natural products social molecular networking: GNPS)¹⁷ や、単離した化合物の HMQC データを入力し、ビッグデータとの比較から人工知能に類似性の高い既知の天然物をピックアップさせる手法 (Small molecule accurate recognition technology: SMART)¹⁸ が開発されている。(3) については世界中で様々な評価系が構築され、新規生物活性物質が取得されている。関水、浜本らは、カイコの細菌感染 *in vivo* モデルが治療に必要な薬剤の投与量や薬物動態が哺乳動物のモデルをよく再現することに着目し、簡便な *in vivo* 抗菌物質アッセイとして天然物のスクリーニングを行うことで新規の構造と作用点を有する lysocin E を発見した¹⁹。(4) については、これまで探索対象とされてこなかった難培養性の微生物が大きな注目を集めている。Lewis らは難培養性の微生物を土壌中で培養できる iChip を作製し、得られた菌体の抽出物をスクリーニングすることで、非常にユニークな作用機序をもつ強力な抗生物質 taixobactin を見出した²⁰。以上の例のように、未だ多くの魅力的な新規天然物が自然界に眠っていることは自明である。それらが発見し有効活用するためには、ルーチンワーク的な探索研究から脱却し、研究者の創意工夫やパラダイムシフトが求められる時代に突入している。



Lysocin E

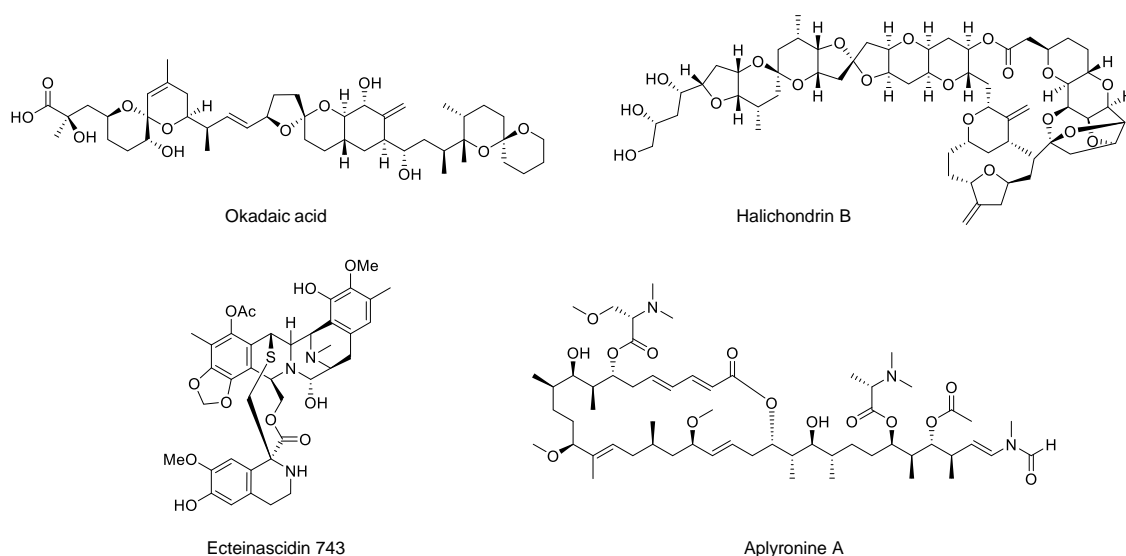


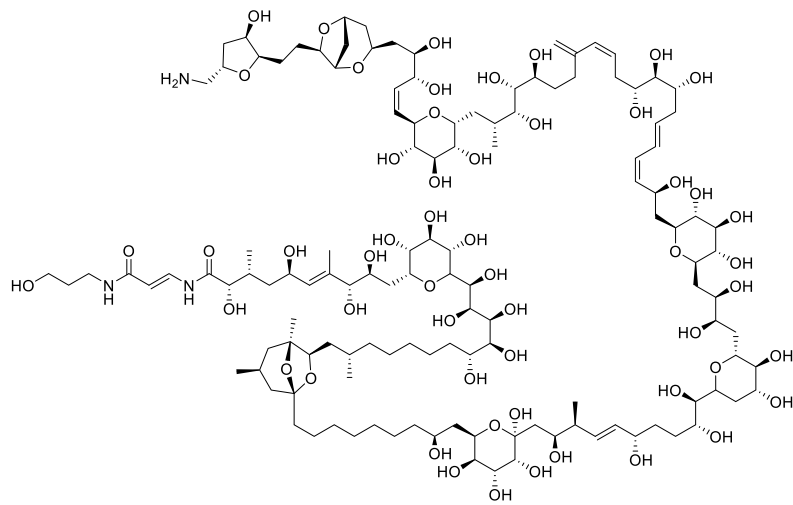
Taixobactin

第2節 海洋天然物とその起源

植物や陸上微生物に続き、天然物の探索対象として脚光を浴びたのは海洋生物である。フグ毒や貝毒、シガテラ毒などの食中毒は発生地域において古来より知られるところであり、特異な生物活性を示す天然物が水圏に存在することは、近代天然物化学が発展する以前より示唆されていた。その後、海洋天然物の中には高度なハロゲン化を受けたものや、巨大なポリエーテル化合物など、陸上生物が産生する天然物とは大きく異なる化学構造を有するものがあるため未開の探索資源として注目され、世界中の研究者によって次々と新規天然物が発見され、その構造や生物活性が明らかにされた。

主な海洋天然物のリソースは、カイメンやホヤ、アメフラシなどの無脊椎動物、あるいは海藻である。クロイソカイメン *Halichondria okadai* から単離された okadaic acid²¹ はタンパク質脱リン酸化酵素 protein phosphatase 2A の強力な阻害剤であり²²、生化学試薬として使用されている。同じくクロイソカイメンより単離された halichondrin B²³ は、チューブリンの重合阻害に由来する強力な抗がん活性を基に、構造を簡略化した eribulin が難治性乳がんに対する抗がん剤として臨床で利用されている²⁴。ホヤからも特徴的な生物活性物質が多数発見されており、*Ecteinascidia turbinata* からは強力な DNA アルキル化剤として ecteinascidin 743²⁵ が発見され、抗がん剤として実用化されている。アメフラシ *Aplysia kurodai* から単離された aplyronine A²⁶ は、細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンのタンパク質間相互作用を安定化するユニークな機序²⁷ により強力な抗がん活性を示す。*Palythoa* 属のイワスナギンチャクからはこれまで構造決定されてきた中でも最大級のポリオール天然物として palytoxin が単離されており、Na⁺/K⁺-ATPase を極めて強力に阻害することで顕著な毒性を発揮する²⁸。以上のように、海洋天然物もまた創薬や分子生物学の発展における有望なケミカルツールとして、多くの探索研究や微量な天然物の量的供給を目的とした全合成研究が盛んに行われてきた。





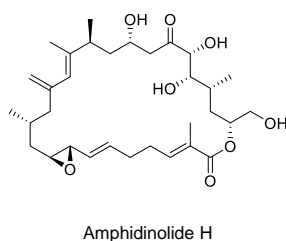
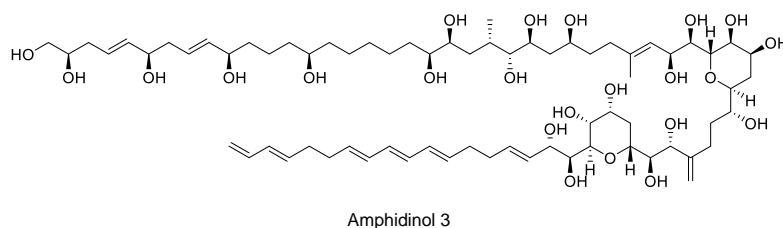
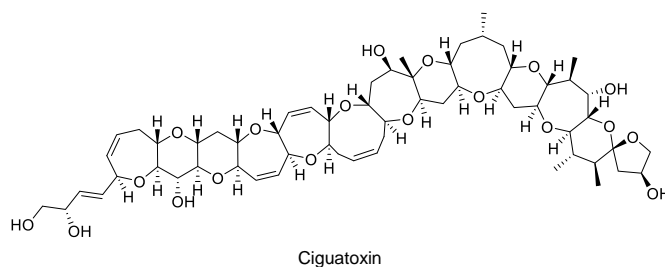
Palytoxin

これら海洋天然物、特に軟体生物より単離されるものについては、天然物の「真の生産者」について長い議論が行われてきた。同種の生物を採集して含有成分を分析しても、採集時期や地域によってそのプロファイルが大きく異なることや、陸上微生物と同一、あるいは類縁体がカイメンやホヤから単離されることなどを状況証拠として、海洋天然物の起源は共生あるいは食物連鎖によって高等生物の体内に取り込まれた微生物であると予想されてきた。近年のメタゲノム解析技術の発展により、多数の微生物を体内に共生させるカイメンであっても網羅的なゲノム解析が行えるようになり、海洋天然物における真の生産者の多くは次に示すような微細藻類であることが直接的に明らかとなってきている。

①渦鞭毛藻

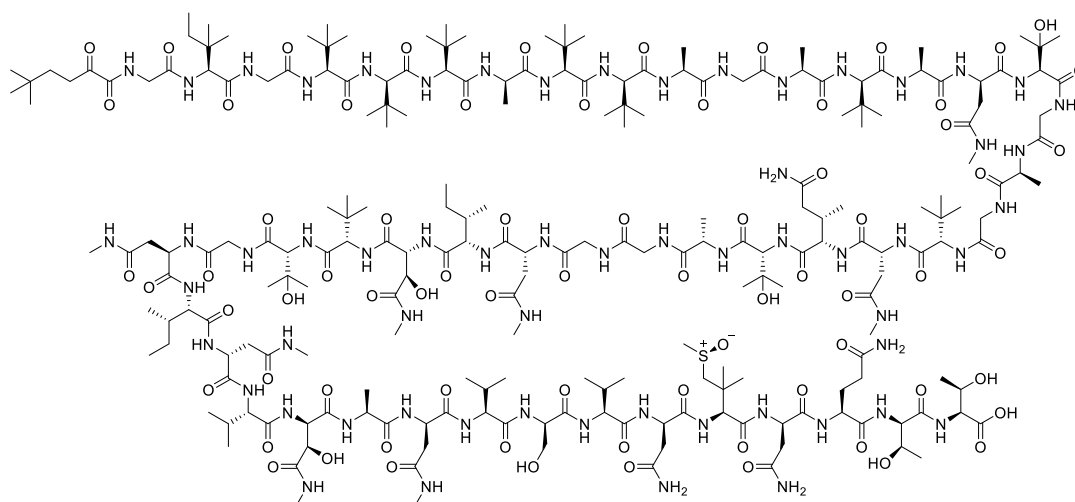
渦鞭毛藻は植物性プランクトンの一種であり、環境の変化に応じて有毒物質を産生する。海中で大繁殖することで赤潮の発生原因となるほか、貝類や魚類が食物連鎖を通じて渦鞭毛藻を体内に蓄積し、これらが貝毒やシガテラ毒の原因となっている。渦鞭毛藻は、梯子状ポリエーテル類に代表されるような他の生物種がつくる天然物とは大きくかけ離れた巨大なポリオール天然物を産生することが特徴である。前述の palytoxin や okadaic acid など渦鞭毛藻が真の生産者であり、天然物そのものや類縁体が単離されている²⁹。渦鞭毛藻が産生する毒成分は、その強力な毒性や人々に与える健康被害の観点から大きく注目されたほか、巨大かつ多数の不斉点を有する繰り返し構造は *J*-based configuration analysis (JBCA) 法³⁰ やユニバーサル NMR データベース法³¹ といった構造決定の方法論開発に多大な影響を与えている。

ドクウツボからシガテラ毒の原因物質の一つである ciguatoxin³² が発見されており、これは渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* 由来の成分が、食物連鎖の過程でドクウツボの体内に蓄積されたと推定されている。実際に、本種がいくつかの ciguatoxin 類縁体を産生することが確かめられている³³。また、一部の渦鞭毛藻については人工的に培養が可能であり、*Amphidinium klebsii* の培養株からは強力な抗真菌活性や溶血活性をもつ amphidinol 3³⁴ が発見されている。ヒラムシの体内から分離した *Amphidinium* 属渦鞭毛藻からは、顕著な細胞毒性物質として amphidinolide H³⁵ などの複数のマクロライド群が単離された。

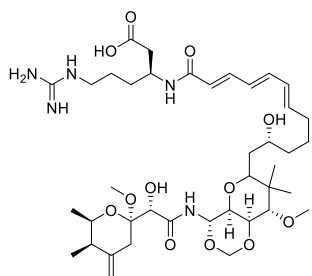


②海洋細菌

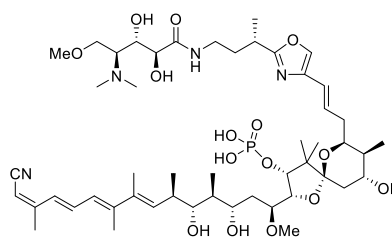
様々な天然物を含有するカイメンの中でも、*Theonella swinhoei* は際立って多様な二次代謝産物を含有することが知られている。近年、本カイメンから発見された強力な細胞毒性物質である onnamide A³⁶ や polytheonamide B³⁷をはじめとする天然物のほとんどが、共生している *Entotheonella* 属細菌によって生合成されることに加え、本種が現時点で単離されていない未知のペプチド生合成遺伝子を有していることが判明した³⁸。また、カイメン *Discodermia calyx* から単離された calyculin A³⁹ もまた *Entotheonella* 属細菌によって産生されており、本種は宿主であるカイメンに対する毒性を軽減するために calyculin A を過剰にリン酸化し、不活性前駆体として蓄積していることが明らかとなっている⁴⁰。これら *Entotheonella* 属は高い二次代謝産物産生能を持つだけでなく、独自の生合成マシナリーを有することから新たな創薬資源として注目されており、本種のメタゲノム解析や培養条件の検討が活発に試みられている。



Polytheonamide B



Onnamide A

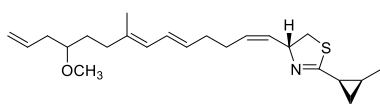


Calyculin A

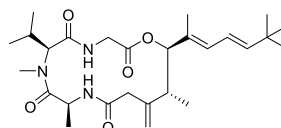
③海洋シアノバクテリア

シアノバクテリアは光合成を行う原核生物であり、約 30 億年前から地球に生息すると推定されている原始的な生物である。環境を問わず様々な地域に生息しており、長い進化と生存競争の過程で高い二次代謝産物の産生能を獲得している。とりわけ亜熱帯-熱帯のサンゴ礁に生息する海洋シアノバクテリアからは多彩な天然物が見出されるが、これはサンゴ礁の豊かな生態系に由来する多様な外敵に抵抗するためと考えられる。実際に、カリブ海のキュラソーで採集された海洋シアノバクテリア *Lyngbya majuscula* から curacin A⁴¹、antillatoxin⁴²、barbamide⁴³ がそれぞれ甲殻類、魚類、軟体動物と異なる生物種に対する毒性を指標に単離されている。

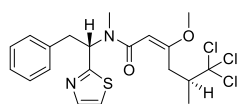
海洋環境において、海洋シアノバクテリアは海藻、カイメン、ホヤなどに共生していることが多く、食物連鎖を介してアメフラシやウミウシなどに海洋シアノバクテリア由来の物質が蓄積している。上述した生物から単離された天然物の一部は、後に海洋シアノバクテリアからも単離されている。Dolastatin 10 は当初、タツナミガイから単離された強力な抗がん活性を示す鎖状ペプチドであるが⁴⁴、その後 Moore、Luesch らにより *Symploca* 属の海洋シアノバクテリアから再発見され、真の生産者が海洋シアノバクテリアであることが判明した⁴⁵。同様の例として、軟体生物から aplysiatoxin⁴⁶ や auriide⁴⁷ などの海洋天然物が単離され、後にこれらの類縁体が海洋シアノバクテリアから再発見されている^{48,49}。



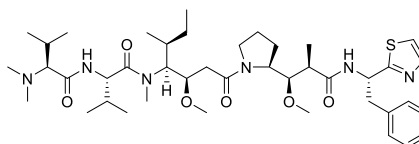
Curacin A



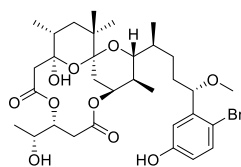
Antillatoxin



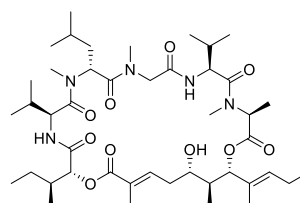
Barbamide



Dolastatin 10



Aplysiatoxin



Auriide

第3節 海洋シアノバクテリア由来生物活性物質の探索研究

海洋シアノバクテリア由来の物質探索における年間の報告数は、海洋天然物のうちわずかに3-4%を占めるのみである⁵⁰。これは、海洋シアノバクテリアが一般に難培養性であることや、二次代謝産物産生能の高い種は、亜熱帯から熱帯にかけての限られた地域にしか生息しないためだと考えられる。一方で、天然物の探索資源としては比較的マイナーであるため、新規生物活性物質の探索源として有望である。また、海洋天然物の直接の生産者を採集することで大幅な収率の向上が見込めることや⁴⁵、共生・捕食生物が忌避するような新規生物活性物質を産生する可能性もおおいに考えられるため、海洋シアノバクテリアを対象とした物質探索研究は有効である。

これまでの探索研究の動向

国外においてはハワイ・カリブ海地域に生息する海洋シアノバクテリアの物質探索研究が活発に行われている。その多くはブラインシュリンプや各種哺乳類細胞に対する毒性を指標として単離されており、いくつかの分子について作用機序や標的分子が明らかにされている。

前述した dolastatin 10^{44,45} や curacin A⁴¹、gatorbulin-1⁵¹ はチューブリンと結合して重合を阻害する。微小管ダイナミクスを制御する薬剤は抗がん剤として有望であり、前節で述べた taxol⁷ や eribulin²⁴ が抗がん剤として利用されている。Dolastatin 10 の誘導体は臨床試験で強い毒性が認められたために臨床薬の開発は断念されたが、これをがん特異的な抗原である CD30 モノクローナル抗体と結合し、腫瘍選択性を向上させた brentuximab vedotin が現在抗がん剤として上市されている⁵²。

Scytophycin 類⁵³ や lyngbyastatin 1⁵⁴、lyngbyabellin A⁵⁵ は細胞骨格の主要成分であるアクチンと結合することで前者は重合、後者2つは脱重合を阻害する。アクチンの重合を制御する天然物は海洋シアノバクテリアから頻繁に発見されており、上記の化合物の炭素骨格を中心として種々の類縁体が報告されている。

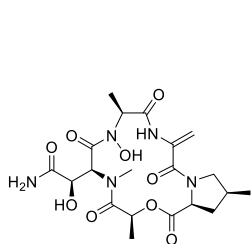
Antillatoxin⁴² は強力な電位依存性 Na⁺ チャネルの開口剤、kalkitoxin⁵⁶ や hoiamide A⁵⁷ は阻害剤としてはたらき、神経細胞に対する強力な細胞毒性や魚毒性を示す。

Apratoxin A⁵⁸ および coibamide A⁵⁹ は、リボソームで合成されたタンパク質を小胞体内へ輸送するチャネル Sec61 α を標的とし、タンパク質のフォールディングや翻訳後修飾を阻害することで非常に強い細胞毒性を示す^{60,61}。これらは作用のユニークさから複数のグループで構造活性相関研究が行われており^{62,63}、新しいタイプの抗がん剤として注目されている。

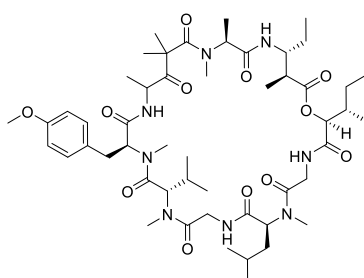
Lyngbyastatin 4⁶⁴ は、セリンプロテアーゼであるキモトリプシンおよびエラスターゼを選択的に阻害する。また、grassystatin A⁶⁵ をはじめとした statine unit を分子内に有するペプチド群が、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン E の強力な阻害剤として多数発見されている。

海洋シアノバクテリアから単離される生物活性物質の特徴として、上述した細胞骨格タ

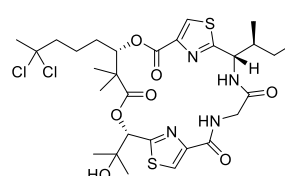
ンパク質やチャネル、プロテアーゼに作用を示すものが比較的多い。一方で、それ以外にも多くの興味深い生物活性を有する天然物が発見されている。Largazole は HDAC の強力な阻害剤であり、良好な抗がん活性を示す^{66,67}。前述した autilide⁴⁷ はプロヒビチンの機能を阻害することでミトコンドリアの断片化を誘導し、アポトーシスを引き起こす⁶⁸。この他にも、構造・生物活性ともに興味深い分子が次々と報告されており、探索研究だけでなく量的供給や構造活性相関を志向した合成研究、作用機序解析が盛んに行われている。



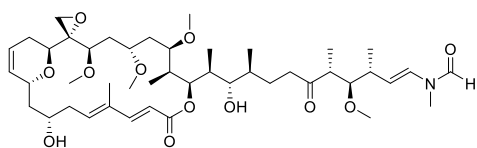
Gatrobulin-1



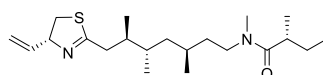
Lyngbyastatin 1



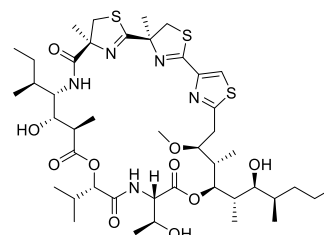
Lyngbyabellin A



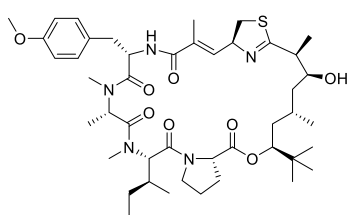
Scytophycin A



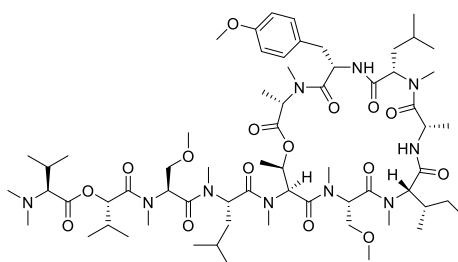
Kalkitoxin



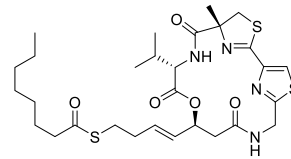
Hoiamide A



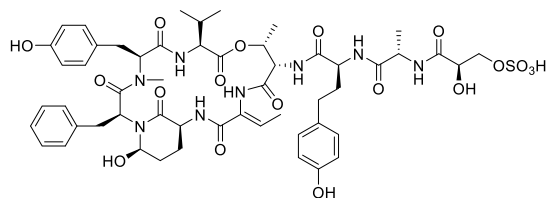
Apratoxin A



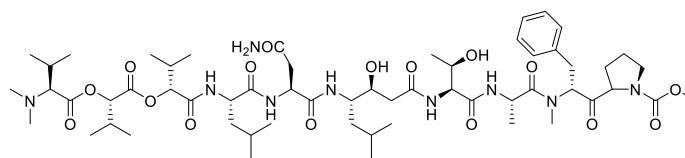
Coibamide A



Largazole



Lyngbyastatin 4



Grassystatin A

著者の所属研究室におけるこれまでの探索研究

大西洋や南太平洋に生息する海洋シアノバクテリアの探索研究は盛んに行われてきたものの、日本近海に生息する海洋シアノバクテリアは比較的未開拓の探索資源であった。著者の所属する研究室はこの点に着目し、サンゴ礁を中心とした多様な生態系を育てている沖縄・奄美大島に生息する海洋シアノバクテリアの成分研究に取り組んできた。その結果、以下に示すような興味深い新規生物活性物質を複数取得し、その機能を明らかにしている。

Biselyngbyaside 類

Biselyngbyaside⁶⁹は照屋、佐々木らにより 2009 年に報告された 18 員環マクロライド配糖体である。いくつかの類縁体やアグリコンである biselyngbyolide 類が数多く単離されており⁷⁰、佐藤や田辺ら、また他グループによってこれらの全合成が達成されている⁷¹。本化合物群は森田らにより、小胞体膜上のカルシウムポンプである SERCA に結合し、機能を阻害することで小胞体ストレスを誘導してアポトーシスを導くことが判明した⁷²。また、その際に既存の SERCA 阻害剤とは異なる位置に結合することを共結晶 X 線構造解析により明らかにしている。

Bisebromoamide

Bisebromoamide⁷³は照屋、佐々木らにより 2009 年に報告された、分子内に複数の異常アミノ酸を含む鎖状ペプチドである。2010 年に Ye らによる全合成が報告され、その際に立体配置が訂正されている⁷⁴。上杉らにより、本化合物は細胞骨格の主要成分であるアクチンと結合し、重合を促進することでアポトーシスを誘導することが判明している⁷⁵。

Caldorazole

Caldorazole は大野、佐名らにより 2022 年に報告された分子内にアクリルアミドを有するポリケチドである⁷⁶。本化合物はミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害することで強力な細胞毒性を示すほか、細胞密度依存的な細胞毒性を示す。

Kurahyne

Kurahyne は岩崎らにより 2014 年に報告された末端アルキンを有するペプチド-ポリケチドハイブリッド化合物である⁷⁷。本化合物は biselyngbyaside 類と同様に、SERCA を阻害することで小胞体ストレスを誘導し、がん細胞に対し細胞毒性を示す⁷⁸。2015 年に当研究室の岡本らにより全合成が達成されている⁷⁹。

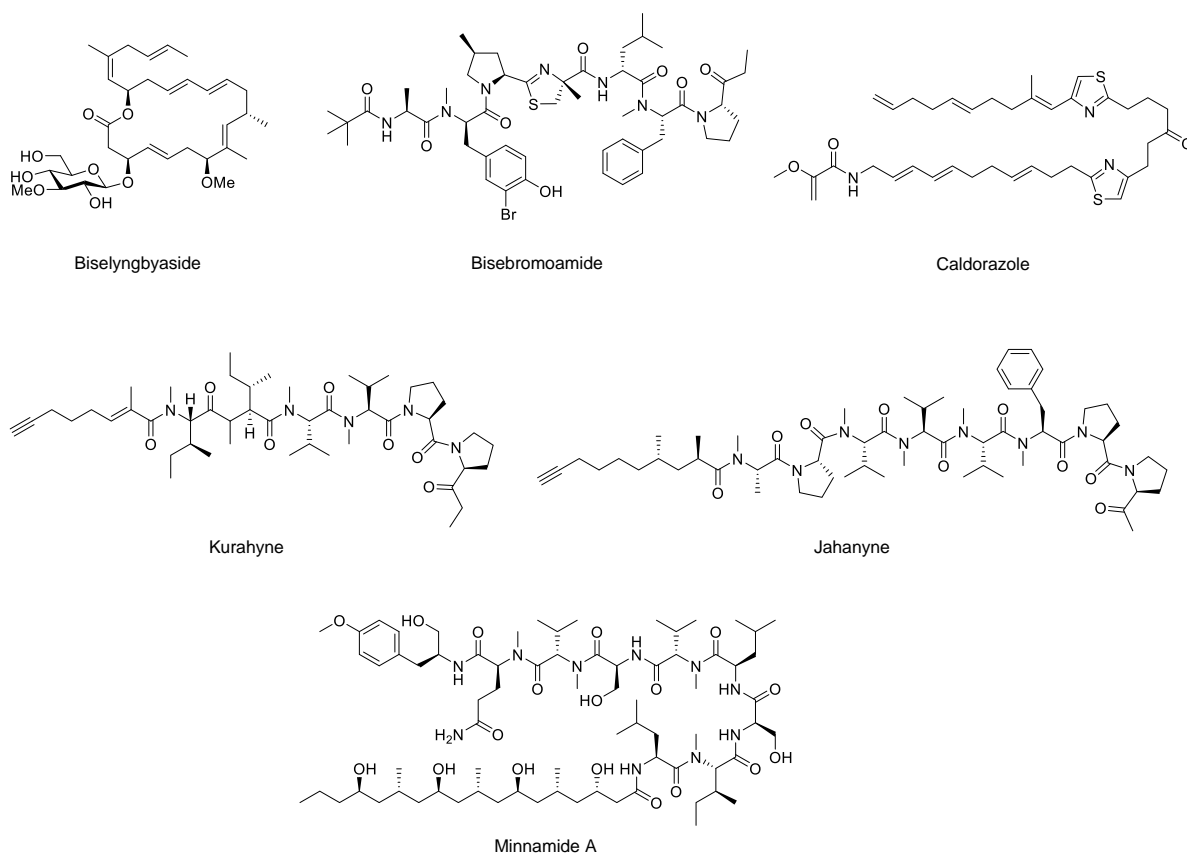
Jahanyne

Jahanyne は岩崎らにより 2015 年に報告された、末端アルキンを有するペプチド-ポリケチドハイブリッド化合物である⁸⁰。2018 年に当研究室の岡本ら、また複数のグループによ

り全合成が達成されている⁸¹。本化合物はがん細胞に対し細胞毒性を示すが、類似した構造の kurahyne とは異なる作用メカニズムを介することが示唆されている。最近、Chandrasekhar らのモデル化合物を用いた実験で Bcl-2 を標的分子とし、機能を阻害することでアポトーシスを誘導する機序が提案されている⁸²。

Minnamide A

Minnamide A は澄本らにより 2019 年に報告されたペプチド-ポリケチドハイブリッド化合物であり、水酸基と β -branch 型のメチル基が交互に並ぶ特徴的な繰り返し構造をもつ⁸³。がん細胞に対し、銅イオンが関与する脂質過酸化を介してネクローシス様の細胞死を誘導する。最近、所属研究室との共同研究において、Naman らのグループが海洋シアノバクテリアから同様の繰り返し構造を有する wenchangamide 類を単離しており⁸⁴、産生種の起源や生合成について興味もたれる。



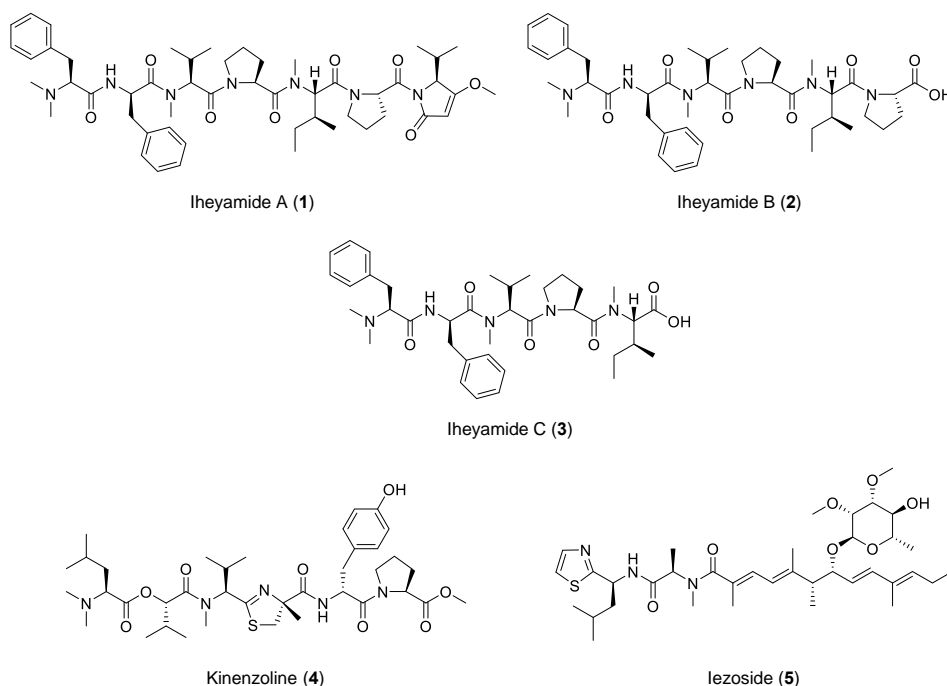
海洋シアノバクテリアの産生する天然物の多様性の由来

海洋シアノバクテリアは、なぜこれほどまでに構造・生物活性ともに多彩な天然物を産生するのだろうか。Gerwick らは、地理的に大きく離れた3種の海洋シアノバクテリア *Moorea producens* (アメリカ、ジャマイカ、キュラソー)および1種の *Moorea bouillonii* (パプアニューギニア)についてゲノム解析を行い、以下の興味深い結果を報告している⁸⁵。

- (1)全遺伝子のうち、平均して約20%が二次代謝産物の生合成に関わる。
- (2)生合成遺伝子クラスターにおいて、休眠遺伝子やどのような天然物を生合成するか不明なクリプティック遺伝子が多数存在する。
- (3)(2)のクリプティック遺伝子の一部が、各株に特異的な遺伝子である。

Moorea 属の海洋シアノバクテリアに限った研究であるものの、(1)および(2)は海洋シアノバクテリアが二次代謝産物の産生者として極めて優秀である理由をよく説明している。また、(3)の結果は、同種であってもそれぞれの生息地で各株固有のオリジナルな生合成遺伝子を保有していることを示している。これは、それぞれの生息地の固有の海洋環境に応じて海洋シアノバクテリアが生存・繁殖に有利な天然物を生産するようになり、遺伝子の多様化が進んでいることに起因すると考えられる。

これらの結果をふまえると、未踏の地に生息する海洋シアノバクテリアは、新規化合物を産生している可能性が高い。筆者はこの点に着目し、国内の沖縄・奄美大島の亜熱帯において、所属研究室がこれまで採集活動を行わなかった地域を中心に海洋シアノバクテリアの採集を行い、含まれる二次代謝産物の探索研究を行った。その結果、下に示す5種類の新規天然物を単離し、その構造と生物活性を明らかにした。それぞれの化合物について、第2章、第3章、および第4章で詳細に説明する。



第2章 新規鎖状ペプチド iheyamide A-C の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と同定

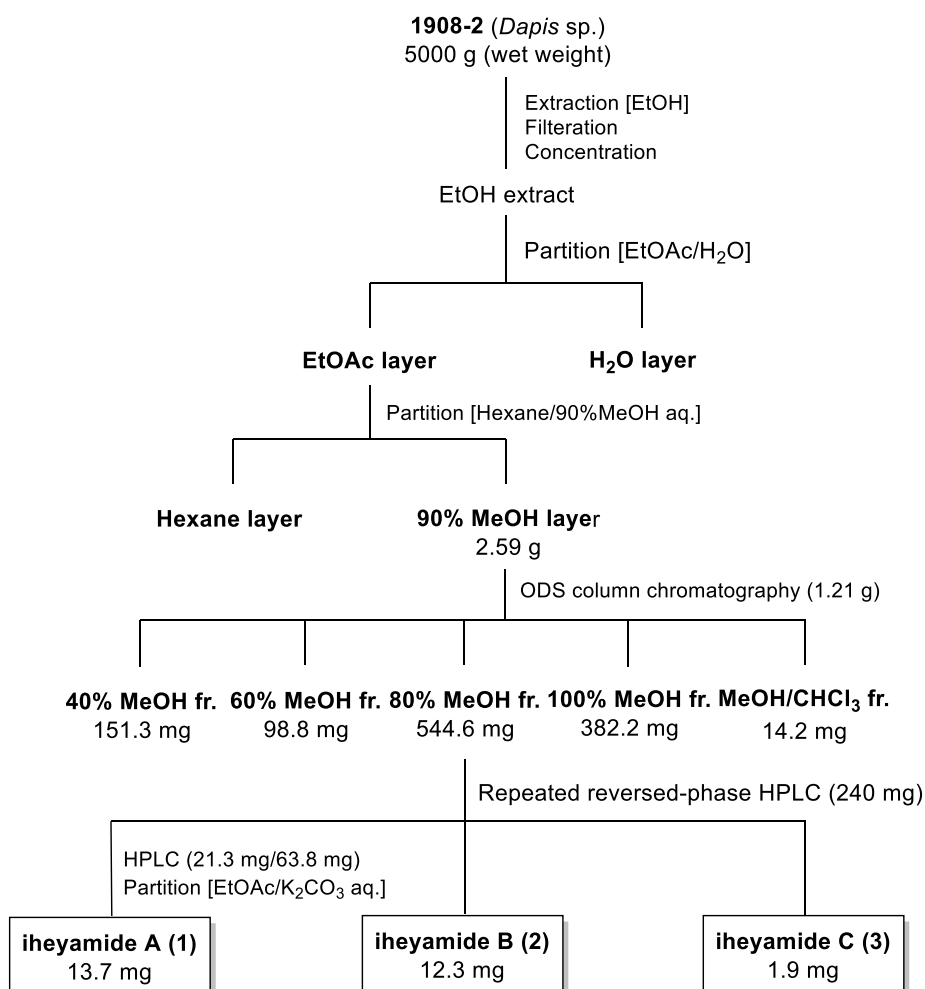
海洋シアノバクテリアの採集は、2019年8月に沖縄県島尻郡伊平屋村の野甫島にて行った (Figure 2-1)。採集された海洋シアノバクテリア 1908-2 に対し、16S rDNA の遺伝子配列 (accession No. LC514420) を利用した系統解析を実施した結果、本シアノバクテリアは *Dapis* sp. であることが判明した (第6章 第2節)。なお、本種は2018年に Engene らにより *Lyngbya* sp. から分類学的に区別された新属のシアノバクテリアである⁸⁶。



Figure 2-1. 野甫島で採集した海洋シアノバクテリア 1908-2 (*Dapis* sp.)

第2節 Iheyamide A-C の単離

採集した海洋シアノバクテリア *Dapis* sp. 5000 g (湿重量) を EtOH で抽出し、抽出液を濾過、濃縮した。得られた EtOH 抽出物を EtOAc/水で分配し、EtOAc 層についてさらに hexane/90% MeOH aq. で分配した。90% MeOH aq. 画分の一部について、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、80% MeOH aq. 画分について高速液体クロマトグラフィーにより精製した。予備検討より iheyamide A (1) は塩基性物質であることが示唆されたため、分取後に EtOAc/K₂CO₃ aq. で分配し、EtOAc 層を濃縮して iheyamide A (1, 13.7 mg) を得た。また、¹H NMR スペクトルから iheyamide A (1) の類縁体と予想された化合物を含む画分について分取を行い、TFA 塩として iheyamide B (2, 12.3 mg) および iheyamide C (3, 1.9 mg) を得た (Scheme 2-1)。



Scheme 2-1. Iheyamide A-C (1-3) の精製スキーム

第3節 Iheyamide 類の構造決定

第1項 Iheyamide A (1) の平面構造の決定

Iheyamide A (1) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{51}H_{74}N_7O_8$ であることが分かった (m/z 912.5595, calcd for $[M+H]^+$ 912.5599)。

Figure 2-2 および Table 2-1 に NMR データとその解析結果を示す。まず、 1H NMR スペクトルにおいて 2.33 ppm (H-50/51, s) に 6H 分に相当するシグナル、2.96 (H-31, s) および 3.09 (H-20, s) ppm に 3H 分のシグナルが観測されたことから、*N,N*-ジメチル基が1つ、*N*-メチルアミド基が2つ存在することが示唆された。また、3.91 ppm (H-1, s) に比較的低磁場シフトした 3H 分のシグナルが観測されたことから、エノールが *O*-メチル化されたエノールエーテルを1つもつことが示唆された。さらに、5.24 ppm (H-3, s) のメチン水素の存在から、三置換オレフィンの存在が示唆された。三置換オレフィンに *O*-メチル基が結合したエノールエーテル構造は、H1/C4 および H3/C4 の HMBC 相関からも支持された。加えて、7.10-7.20 ppm において 10H 分に相当するシグナルが観測されたため、一置換ベンゼンを2個含むことが示唆された。この予測は、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて 8 個の芳香族炭素 (139.3, 137.7, 130.3, 130.2, 129.7, 129.4, 127.9, 127.6 ppm) が観測されたことから支持された。さらに、 ^{13}C NMR スペクトルにおいてアミドまたはエステル由来のカルボニル炭素と考えられる 7つのシグナル (174.7, 173.9, 172.9, 172.7, 172.6, 170.5, 169.7 ppm) が観測されたことから、本化合物をペプチド性の化合物であると判断した。

2次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、本化合物は isopropyl-*O*-Me-pyrrolinone (iPr-*O*-Me-pyr)、2つの Pro、*N*-Me-Ile、*N*-Me-Val、Phe、および *N,N*-diMe-Phe からなるヘプタペプチドであることが明らかとなった。また、H-42/C-41、H-33/C-41、H-33/C-32、H-31/C-32、H-31/C-27 の5つの HMBC 相関から、(*N,N*-diMe-Phe)-(Phe)-(*N*-Me-Val) のシーケンスを有することが判明した。また、H-23/C-21 と H-20/C-21 の2つの HMBC 相関から、(Pro)-(*N*-Me-Ile) のシーケンスを有することが判明した。加えて、H-25a/H-27 および H-13/H-15 の2つの NOESY 相関から、(*N,N*-diMe-Phe)-(Phe)-(*N*-Me-Val)-(Pro)-(*N*-Me-Ile)-(Pro) のようにシーケンスを決定した。分子式を考慮すると、残りの iPr-*O*-Me-pyr は必然的に C 末端側に存在することから、iheyamide A (1) の平面構造を一義的に Figure 2-2 に示すとおりに決定した。

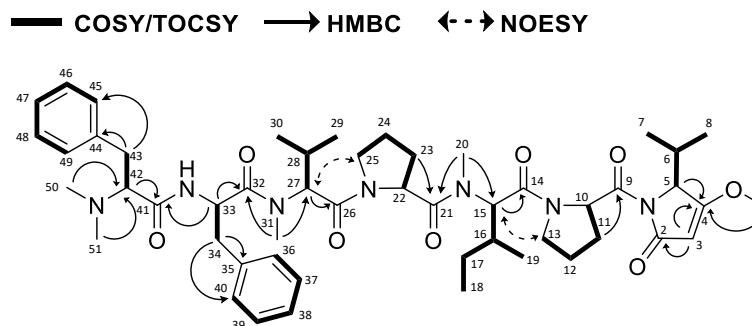


Figure 2-2. Iheyamide A (1) の平面構造

Table 2-1. Iheyamide A (1) の NMR スペクトルデータ (CD₃OD)

residue	position	δ_c , type ^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	Selected TOCSY	Selected HMBC	Selected NOESY
iPr-O-Me-pyr	1	59.6, CH ₃	3.91, s			4	
	2	172.6, C					
	3	95.2, CH	5.24, s			2, 4	
	4	182.0, C					
	5	65.5, CH	4.58, d (2.8)	6		4	
	6	29.7, CH	2.52, m	5, 7, 8			
	7	16.0, CH ₃	0.84, d (6.7)	6			
	8	18.9, CH ₃	1.10, d (7.2)	6			
Pro	9	172.9, CH					
	10	61.9, CH	5.48, dd (8.8, 4.5)	11a, 11b			
	11a	29.9, CH ₂	1.84, m	10, 11b, 12b		10	
	11b		2.32, m	10, 11a,		10, 12	
	12a	25.4, CH ₂	1.87, m	12b, 13			
	12b		2.03, m	12a, 13			
N-Me-Ile	13	49.2, CH ₂	3.68-3.77, m	12a, 12b			15
	14	170.5 C					
	15	59.7, CH	5.08, d (10.3)	16		14	13
	16	34.3, CH	2.05, m	15, 19	17a, 17b		
	17a	25.4, CH ₂	1.06, m	16, 17b, 18			
	17b		1.53, m	16, 17a, 18			
	18	19.9	0.88, t (7.4)	17a, 17b			
	19	15.6	0.93, d (6.6)	16			
Pro	20	31.0	3.09, s			15, 21	
	21	174.7, C					
	22	58.7, CH	4.79, dd (8.6, 4.6)	23a, 23b			
	23a	29.9, CH ₂	1.77, m	22, 23b,		21	
	23b		2.21, m	22, 23a, 24a		21, 24	
	24a	25.9, CH ₂	2.05, m	23b, 24b, 25a			
	24b		1.87, m	24a, 25a			
	25a	48.8, CH ₂	3.72, m	24a, 25b			27
25b		3.65, m	24a, 25a				
N-Me-Val	26	169.7, C					
	27	61.5, CH	4.91, m	28		26	25a
	28	28.4, CH	2.10, m	27, 29, 30			
	29	18.8, CH ₃	0.49, d (6.7)	28			
	30	10.9, CH ₃	0.89, d (6.9)	28			
	31	31.1, CH ₃	2.96, s			27, 32	
Phe	32	173.9, C					
	33	52.0, CH	4.91, m	34a, 34b		32, 41	
	34a	38.4, CH ₂	2.54, m	33, 34b		35, 36/40	
	34b		2.86, m	33, 34a		35, 36/40	
	35	137.7, C					
	36/40	130.2, CH	7.10, m	37/39		38	
	37/39	129.4, CH	7.15, m	36/40, 38			
	38	127.9, CH	7.20, m	37/39		37/39	
N,N-diMe-Phe	41	172.7, C					
	42	71.2, CH	3.26, dd (10.0, 5.0)	43		41	
	43	37.0, CH ₂	2.84-3.00, m	42		44, 45/49	
	44	139.3, C					
	45/49	130.3, CH	7.15, m	46/48		47	
	46/48	129.7, CH	7.19, m	45/49, 47			
	47	127.6, CH	7.17, m	46/48		46/48	
	50/51	42.6, CH ₃	2.33, s			42	

^a Measured at 100 MHz.

^b Measured at 400 MHz.

第 2 項 Iheyamide B (2) の平面構造

Iheyamide B (2) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{43}H_{63}N_6O_7$ であることが分かった (m/z 775.4756, calcd for $[M+H]^+$ 775.4758)。

1H NMR および ^{13}C NMR において、本化合物は iheyamide A (1) と類似のスペクトルを示したが、iPr-O-Me-pyr 部分に相当するシグナルが消失していた。このことに加え、分子量から iheyamide B (2) は iheyamide A (1) から iPr-O-Me-pyr を欠いた構造であることが予想された。2次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、当初の予想通り、iheyamide B (2) は iPr-O-Me-pyr 部分を欠いた iheyamide A (1) の類縁体であると決定した (Figure 2-3 および Table 2-2)。

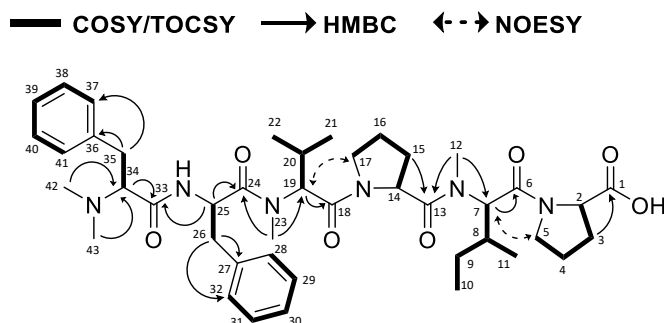


Figure 2-3. Iheyamide B (2) の平面構造

Table 2-2. Iheyamide B (2) の NMR スペクトルデータ (CD₃OD)

residue	position	δ_c , type ^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	Selected HMBC	Selected NOESY
Pro	1	175.1, C				
	2	60.5, CH	4.37, dd (9.0, 4.9)	3a, 3b		
	3a	30.3, CH ₂	1.99, m	2, 3b	1	
	3b		2.25, m	2, 3a, 4a, 4b		
	4a	25.8, CH ₂	1.94, m	3b, 4b, 5a, 5b		
	4b		2.05, m	3b, 4a, 5a, 5b		
<i>N</i> -Me-Ile	5a	48.4, CH ₂	3.63, m	4a, 4b		7
	5b		3.77, m	4a, 4b		7
	6	171.1, C				
	7	59.6, CH	5.10, d (11.4)	8	6	5a
	8	34.4, CH	2.07, m	7, 9, 11		
	9a	25.5, CH ₂	1.08, m	8, 9b, 10		
Pro	9b		1.56, m	8, 9a, 10		
	10	10.9	0.89, t (7.0)	9a, 9b		
	11	15.4	0.97, d (6.5)	8		
	12	31.0	3.13, s		7, 13	
	13	174.8, C				
	14	58.6, CH	4.80, dd (8.6, 4.8)	15a, 15b		
<i>N</i> -Me-Val	15a	29.9, CH ₂	1.78, m	15b	13	
	15b		2.25, m	15a, 16a, 16b		
	16a	25.9, CH ₂	1.94, m	15b, 16b, 17a, 17b		
	16b		2.05, m	15b, 16a, 17a, 17b		
	17a	48.4, CH ₂	3.63, m	16a, 16b		19
	17b		3.77, m	16a, 16b		
Phe	18	169.7, C				
	19	61.8, CH	4.88, m	20	18	17a
	20	28.6, CH	2.17, m	19, 21, 22		
	21	18.9, CH ₃	0.63, d (6.7)	20		
	22	19.8, CH ₃	0.92, d (6.7)	20		
	23	31.2, CH ₃	3.01, s		19, 24	
<i>N,N</i> -diMe-Phe	24	173.5, C				
	25	53.4, CH	4.71, dd (8.8, 5.9)	26a, 26b	24, 33	
	26a	37.4, CH ₂	2.54, dd (14.7, 8.8)	25, 26b	27, 28/32	
	26b		2.89, dd (14.7, 5.9)	25, 26a	27, 28/32	
	27	137.1, C				
	28/32	129.8, CH	7.02, m	29/31	30	
	29/31	129.9, CH	7.22, m	28/32, 30		
	30	128.1, CH	7.21, m	29/31	29/31	
	NH		8.69, d (6.1)	25		
	33	167.7, C				
<i>N,N</i> -diMe-Phe	34	70.3, CH	3.99, dd (10.7, 4.7)	35a, 35b		
	35a	35.6, CH ₂	3.02, m	34, 35b	36, 37/41	
	35b		3.29, m	34, 35a	36, 37/41	
	36	135.0, C				
	37/41	130.3, CH	7.13, m	38/40	39	
	38/40	130.0, CH	7.22, m	37/41, 39		
	39	128.9, CH	7.23, m	38/40	38/40	
	42/43	42.5, CH ₃	2.98, br, s		34	

^a Measured at 100 MHz.

^b Measured at 400 MHz.

第3項 Iheyamide C (3) の平面構造

Iheyamide C (3) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{38}H_{56}N_5O_6$ であることが分かった (m/z 678.4231, calcd for $[M+H]^+$ 678.4231)。

1H NMR および ^{13}C NMR において、本化合物は iheyamide B (2) と類似したスペクトルを示した。加えて、分子量から本化合物は iheyamide B (2) から Pro を欠いた類縁体であると予想されたが、 CD_3OD を NMR 測定溶媒に用いると各アミノ酸の α 位メチン水素が溶媒由来の DHO シグナルと重なり帰属が困難であった。そこで、測定溶媒を重アセトニトリル CD_3CN に変更することで問題を解消した (Table 2-3)。

2次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、iheyamide C (3) の平面構造を Figure 2-4 に示すように決定した。C-30/C-31 および C-28/C-29 を結合する直接的な HMBC および NOESY 相関は観測されなかったが、化学シフトから H-30 がベンジル位、H-29 がアミノ酸の α 位に由来する水素であると判断し、*N,N*-diMe-Phe が含まれることを確認した。結果として、iheyamide C (3) は iheyamide B (2) から Pro を欠いた類縁体であった。

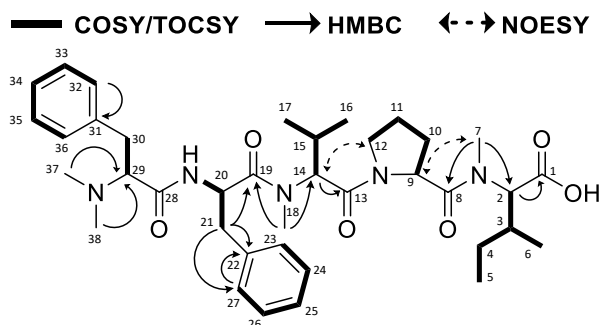


Figure 2-4. Iheyamide C (3) の平面構造

Table 2-3. Iheyamide C (3) の NMR スペクトルデータ (CD₃CN)

residue	position	δ_c , type ^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	Selected HMBC	Selected NOESY
N-Me-Ile	1	172.6, C				
	2	62.5, CH	4.65, d (10.6)	3	1	
	3	33.6, CH	2.01, m	4, 6		
	4a	25.6, CH ₂	1.46, m	3, 4b, 5		
	4b		2.03, m	3, 4a, 5		
	5	10.8	0.84, t (7.0)	9a, 9b		
	6	16.0	0.94, d (6.7)	3		
Pro	7	32.6	3.04, s		2, 8	9
	8	174.1, C				
	9	57.8, CH	4.73, dd (8.6, 4.6)	10a, 10b		7
	10a	29.2, CH ₂	1.74, m	15b	13	
	10b		2.14, m	15a, 16a, 16b		
	11	25.5, CH ₂	1.82, m	10a, 10b, 12a, 12b		
N-Me-Val	12a	48.2, CH ₂	3.56, m	11		14
	12b		3.74, m	11		14
N-Me-Val	13	168.9, C				
	14	60.8, CH	4.85, d (10.9)	15	13	12a, 12b
	15	28.3, CH	2.13, m	14, 16, 17		
	16	18.9, CH ₃	0.63, d (6.4)	15		
	17	19.5, CH ₃	0.87, d (6.4)	15		
Phe	18	31.0, CH ₃	2.98, s		14, 19	
	19	172.4, C				
	20	52.7, CH	4.80, m	21a, 22b, NH		
	21a	37.3, CH ₂	2.62, dd (14.2, 9.1)	20, 21b	19, 22, 23/27	
	21b		2.86, m	20, 21a	19, 22, 23/27	
	22	137.1, C				
	23/27	129.5, CH	7.20, m	24/26	24/26	
	24/26	129.8, CH	7.02, m	23/27, 25	25	
25	127.7, CH	7.19, m	24/26			
N,N-diMe-Phe	NH		7.57, d (6.6)	20		
	28	166.5, C				
	29	68.4, CH	4.00, m	30		
	30	34.7, CH ₂	3.14, m,	29		
	31	135.6, C				
	32/36	129.6, CH	7.22, m	33/35	31, 33/35	
	33/35	130.1, CH	7.13, m	32/36, 34	34	
34	128.3, CH	7.23, m	33/35			
	37/38		2.82, br, s		29	

^a Measured at 100 MHz.

^b Measured at 400 MHz.

第 4 項 Iheyamide 類の絶対立体配置の決定

Iheyamide A-C (1-3) の絶対立体配置は、それぞれの化合物を酸加水分解した後、各構成アミノ酸を分取してキラルカラムにおける保持時間を標品と比較することで決定した。Iheyamide A (1) の *iPr-O-Me-pyr* のイソプロピル基が結合する C-5 位の絶対立体配置は、天然物をオゾン酸化後、酸加水分解を行うことで Val に誘導し、キラルカラムにおける保持時間を標品と比較することで決定した⁸⁷。

Iheyamide A (1) の絶対立体配置の決定

Iheyamide A (1) を 6 M HCl 中、110 °C 下で 20 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸を分取した。得られた各アミノ酸について、キラルカラムを用いて保持時間を分析し、標品の保持時間と比較することで絶対立体配置を決定した。結果として、Phe のみ D 体であり、他の構成アミノ酸はすべて L 体であることが明らかとなった (Table 2-4)。

また、iheyamide A (1) を -78 °C で 20 分間オゾン酸化し、その後 6 M HCl 中、110 °C 下で 17 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて Val を分取し、キラルカラムを用いて標品の保持時間と比較した。その結果、*iPr-O-Me-pyr* 由来の Val は L 体と保持時間が一致したことから、C-5 位の絶対立体配置を S と決定した (Table 2-4)。

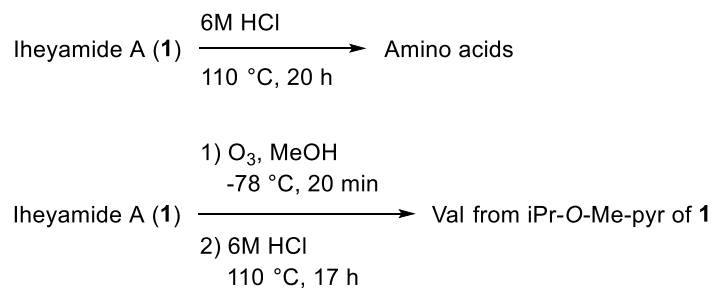


Table 2-4. Iheyamide A (1) の構成アミノ酸のキラルカラムにおける保持時間

アミノ酸	1 由来保持時間 (min)	L 体由来保持時間 (min)	D 体由来保持時間 (min)
<i>N,N</i> -diMe-Phe	13.3	<u>13.3</u>	8.1
Phe	4.2	5.5	<u>4.2</u>
<i>N</i> -Me-Val	5.0	<u>5.0</u>	3.2
Pro	4.7	<u>4.7</u>	2.6
<i>N</i> -Me-Ile	14.0	<u>14.0</u>	8.0
Val*	6.1	<u>6.1</u>	3.2

**iPr-O-Me-pyr* 由来

Iheyamide B (2) の絶対立体配置の決定

Iheyamide B (2) を 6 M HCl 中、110 °C 下で 20 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸を分取した。得られた各アミノ酸について、キラルカラムを用いて保持時間を分析し、標品の保持時間と比較することで絶対立体配置を決定した。結果として、iheyamide A (1) と同様に Phe のみ D 体であり、他の構成アミノ酸はすべて L 体であることが明らかとなった (Table 2-5)。

Table 2-5. Iheyamide B (2) の構成アミノ酸のキラルカラムにおける保持時間

アミノ酸	1 由来保持時間 (min)	L 体由来保持時間 (min)	D 体由来保持時間 (min)
<i>N,N</i> -diMe-Phe	13.3	<u>13.3</u>	8.1
Phe	4.2	5.5	<u>4.2</u>
<i>N</i> -Me-Val	5.0	<u>5.0</u>	3.2
Pro	4.7	<u>4.7</u>	2.6
<i>N</i> -Me-Ile	14.0	<u>14.0</u>	8.0

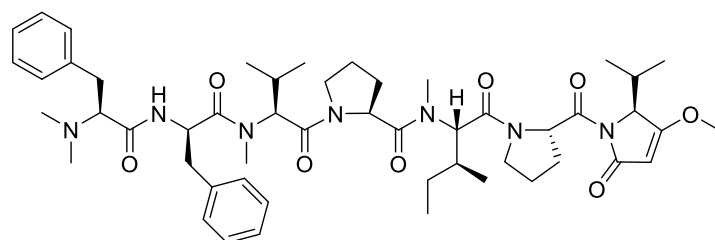
Iheyamide C (3) の絶対立体配置の決定

Iheyamide C (3) を 6 M HCl 中、110 °C 下で 20 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸を分取した。得られた各アミノ酸について、キラルカラムを用いて保持時間を分析し、標品の保持時間と比較することで絶対立体配置を決定した。結果として、iheyamide A (1) と同様に Phe のみ D 体であり、他の構成アミノ酸はすべて L 体であることが明らかとなった (Table 2-6)。

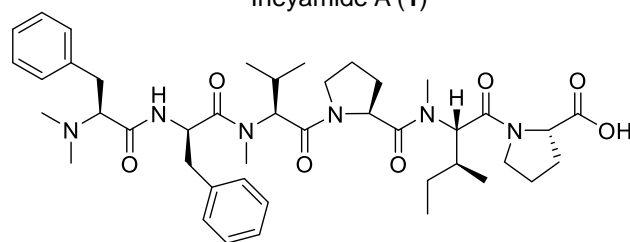
Table 2-6. Iheyamide C (3) の構成アミノ酸のキラルカラムにおける保持時間

アミノ酸	1 由来保持時間 (min)	L 体由来保持時間 (min)	D 体由来保持時間 (min)
<i>N,N</i> -diMe-Phe	13.3	<u>13.3</u>	8.1
Phe	4.2	5.5	<u>4.2</u>
<i>N</i> -Me-Val	5.0	<u>5.0</u>	3.2
Pro	4.7	<u>4.7</u>	2.6
<i>N</i> -Me-Ile	14.0	<u>14.0</u>	8.0

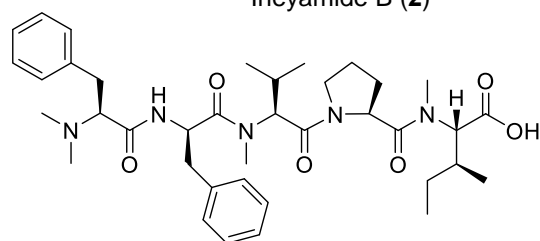
以上より、iheyamide A-C (1-3) の絶対立体配置を Figure 2-5 に示すように決定した。



lheyamide A (1)



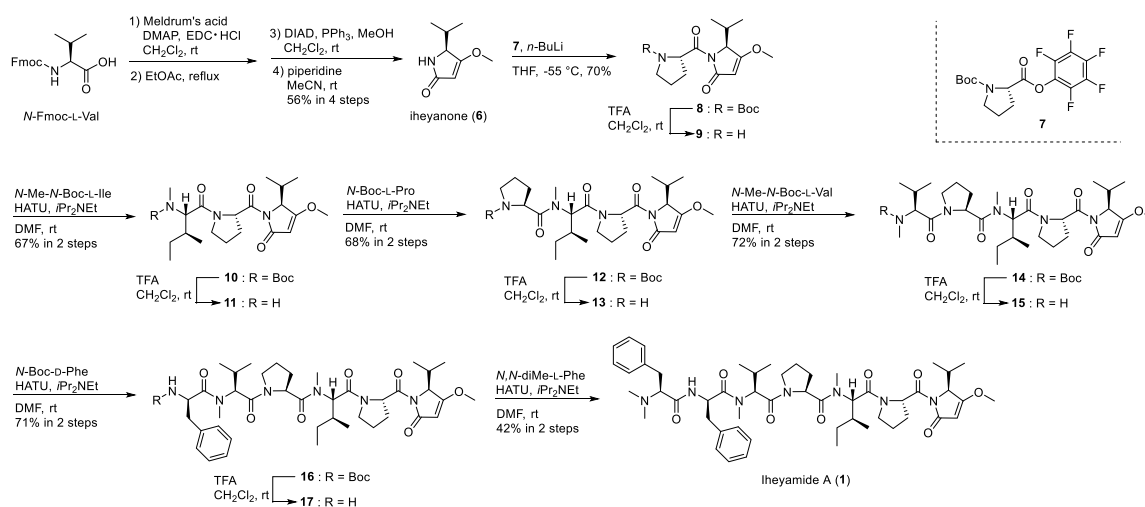
lheyamide B (2)



lheyamide C (3)

Figure 2-5. lheyamide A-C (1-3) の絶対立体配置

Iheyamide A (**1**) の構造は、当研究室の寺沼らによる全合成によって確かめられた⁸⁸ (Scheme 2-2)。N-Fmoc-L-Val を出発原料とし、メルドラム酸と縮合後に還流することでピロリノン環を構築した。続く光延反応にて *O*-メチル化し、Fmoc 基を脱保護することで iheyaneone (**6**) を得た。その後、構成アミノ酸を順次縮合していくことで最短直線工程 15 段階、総収率 3.8% で iheyamide A (**1**) の全合成が達成された。天然品と合成品の各種スペクトルデータは完全に一致したことから、構造の正しさが確かめられた (Figure 2-6 および Figure 2-7)。



Scheme 2-2. Iheyamide A (**1**) の全合成

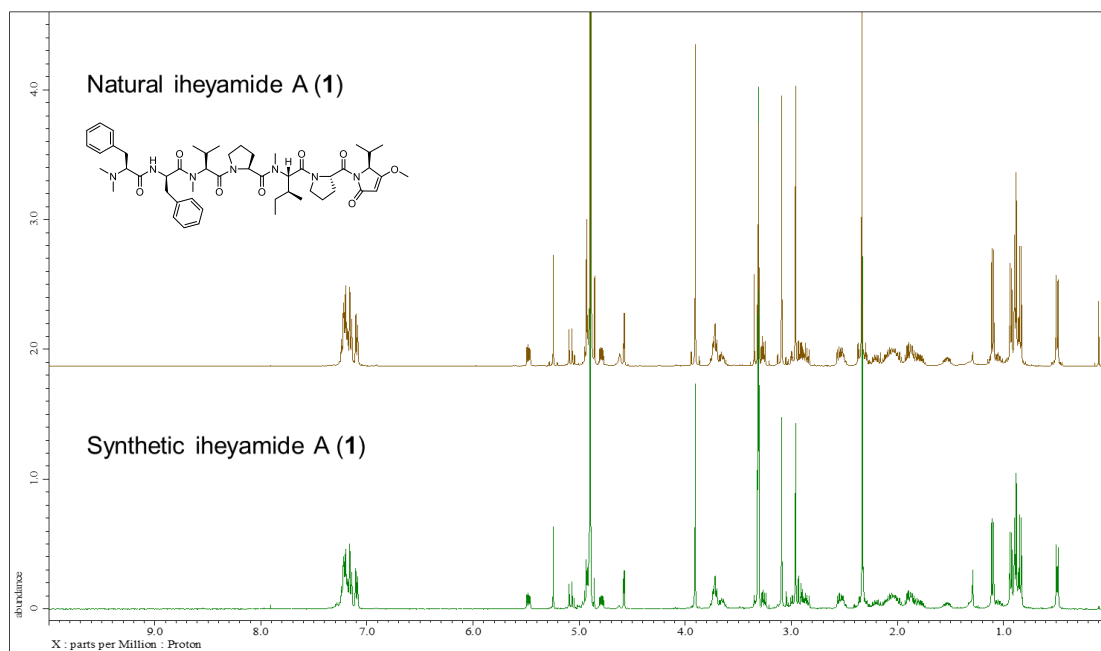


Figure 2-6. 天然品と合成品の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) スペクトルデータの比較

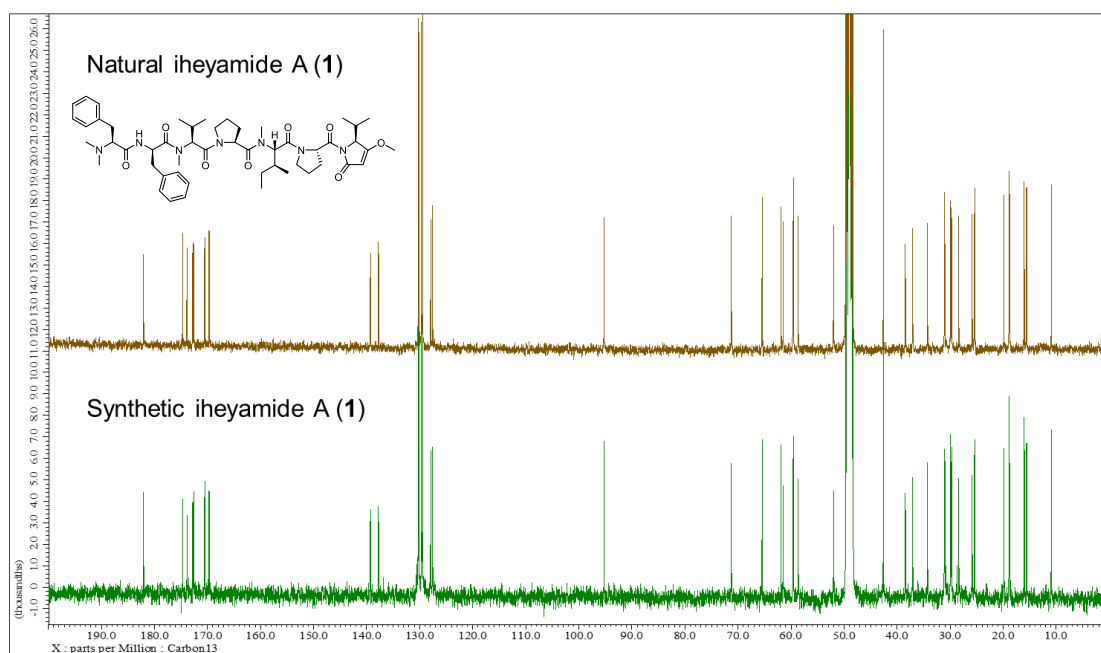


Figure 2-7. 天然品と合成品の ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) スペクトルデータの比較

第 4 節 Iheyamide 類の生物活性

Iheyamide A-C (1-3) について、アフリカ睡眠病の原因寄生虫である *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*)、ナガナ病の原因寄生虫である *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*)、およびヒト正常肺線維芽細胞 WI-38 に対する増殖阻害活性を、前者は Alamar Blue assay により、後者は MTT assay により評価した(第 6 章 第 1 節参照)。その結果、Iheyamide A (1) は IC₅₀ 1.5 μM で抗トリパノソーマ活性を示す一方で、WI-38 に対しては IC₅₀ 18 μM であり、約 12 倍の選択毒性を示した。また、類縁体である iheyamide B (2) および C (3) はいずれも 20 μM で増殖阻害活性を示さなかったことから、C 末端側の iPr-O-Me-pyr が抗トリパノソーマ活性に必須であることが示唆された (Table 2-7)。

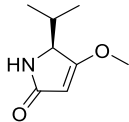
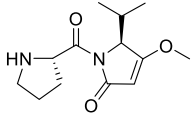
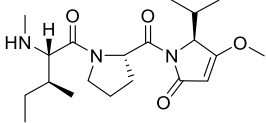
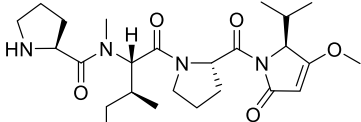
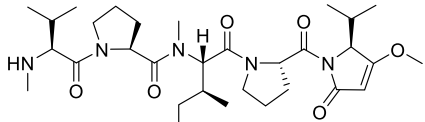
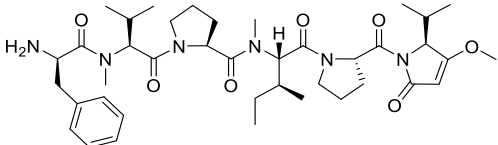
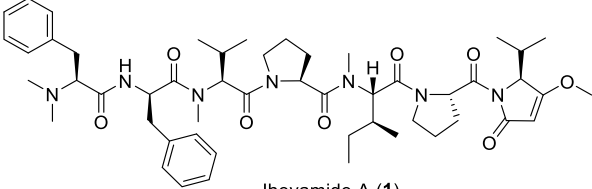
Table 2-7. Iheyamide A-C (1-3) の増殖阻害活性

Compounds	IC ₅₀ values (μM)		
	<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. b. brucei</i>	WI-38 cells
Iheyamide A (1)	1.5	1.5	18
Iheyamide B (2)	>20	>20	>20
Iheyamide C (3)	>20	>20	>20
Pentamidine ^a	0.005	0.001	-

^a positive control.

また、前述した全合成研究で入手した iheyamide A (1) の合成品、および iPr-O-Me-pyr 側からの合成中間体ペプチドを用いて、同様の活性評価を行った⁸⁸。その結果、合成した iheyamide A (1) は天然品と同等の抗トリパノソーマ活性を示した。また、iPr-O-Me-pyr 側からのペプチド鎖の伸長に伴い、抗トリパノソーマ活性が増強されることが判明した (Table 2-8)。

Table 2-8. 合成した Theyamide A (1) および合成中間体の増殖阻害活性

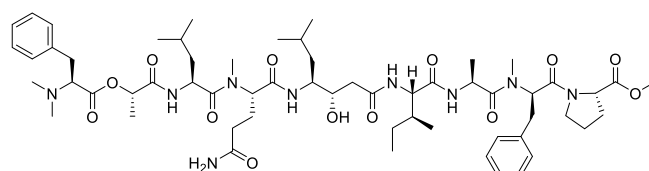
Compounds	IC ₅₀ (μM)	
	<i>T. b. brucei</i>	WI-38 cells
 Iheyane (6)	35	>50
 9	33	>50
 11	24	>50
 13	15	>50
 15	17	>50
 17	6.2	>50
 Theyamide A (1)	1.8	>20
Pentamidine ^a	0.005	-

^a positive control.

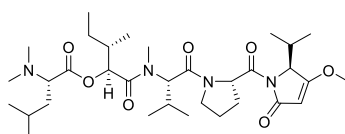
第5節 考察

第2章では、伊平屋村(野甫島)で採集した海洋シアノバクテリア *Dapis* sp. より単離した新規鎖状ペプチド iheyamide A-C (**1-3**) の構造決定と生物活性について述べた。

Iheyamide A (**1**) は、構造的な特徴として *N,N*-ジメチル型のアミノ酸とエノールエーテルを含むピロリノン環 (iPr-*O*-Me-pyr) をもつ。Iheyamide A (**1**) と同様に *N,N*-diMe-Phe を有する天然物としては grassystatin F⁸⁹が発見されているほか、N末端が *N,N*-ジメチル化されているアミノ酸を含む天然物が海洋シアノバクテリアから多数発見されている。iPr-*O*-Me-pyr は Val に対し酢酸が1分子付加し、環化後に *O*-メチル化されることで形成されると考えられる。同様の構造を有する天然物としてやはり海洋シアノバクテリアから mirabimide 類⁹⁰が発見されているほか、C末端側のアミノ酸がピロリノン環になった海洋シアノバクテリア由来のペプチドが多数発見されている。



Grassystatin F



Mirabimide A

Iheyamide A (**1**) の構造の正しさは、前述した全合成によって確かめられた。海洋シアノバクテリアより得られた類縁体 iheyamide B (**2**) および C (**3**) と、合成によって供給された各種中間体の構造活性相関から、抗トリパノソーマ活性の発現には iPr-*O*-Me-pyr が必須であり、またペプチド鎖の伸長に伴い活性が増強されることが判明した。

熱帯の発展途上国では、マラリア、結核、エイズといった三大感染症のみならず、トリパノソーマや赤痢アメーバなどの寄生虫を原因とする感染症が横行しており、これらは顧みられない熱帯病 (Neglected tropical disease) として治療薬の開発が望まれている。Iheyamide 類の生物活性評価に用いた *T. brucei* は致死性のヒト感染症であるアフリカ睡眠病や家畜感染症であるナガナ病の病原体であり、アフリカを中心に感染例が確認されている。トリパノソーマ原虫の生息地に依存した風土病であるため、需要の観点から治療薬の開発が遅れていることや、体内に侵入後、自身の抗原性を変化させることで免疫系により攻撃を受けることを回避するため、ワクチンの開発も困難である⁹¹。現時点で数種類の治療薬が臨床で利用されているが (Figure 2-8)、その多くは *T. brucei* が脳に侵入する第二ステージに進行すると薬効を失ってしまう事や、第二ステージで利用できる薬剤は強い急性毒性を有すること

が問題である。近年、どの治療ステージでも有効な経口治療薬として fexinidazole が上市されているが⁹²、耐性原虫の出現を考慮すると新規の化学構造や作用機序を有するリード化合物の継続的な創出が求められている。

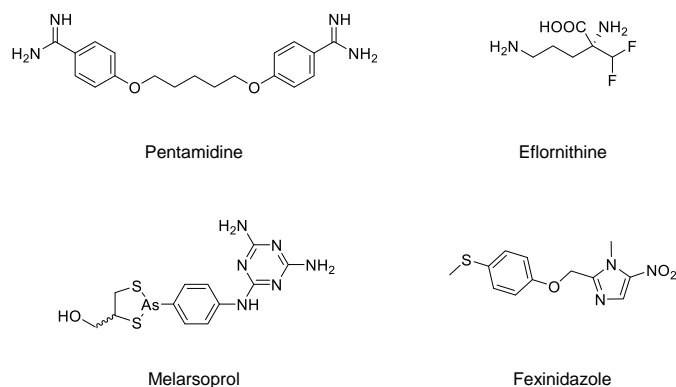


Figure 2-8. 代表的なアフリカ睡眠病の治療薬

興味深いことに、海洋シアノバクテリアの産生する二次代謝産物の多くがマラリアやトリパノソーマ原虫を対象として良好な選択毒性を示すことが近年明らかになっており⁹³、寄生虫を原因とする感染症の治療薬として有望なケミカルスペースを保有することが示唆されている。当研究室でも実際に、複数の抗トリパノソーマ活性や抗マラリア活性を有する新規天然物を発見している^{94,95}。Itheyamide A (**1**) もまた、現存の治療薬と異なるペプチド性の化学構造をもち、ヒト細胞と比較して *T. brucei* に対し中程度の選択毒性を与えたことから、アフリカ睡眠病に対する新規リード化合物や新規創薬標的を発見するケミカルツールとして期待される。

第3章 新規鎖状デプシペプチド kinenzoline の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と同定

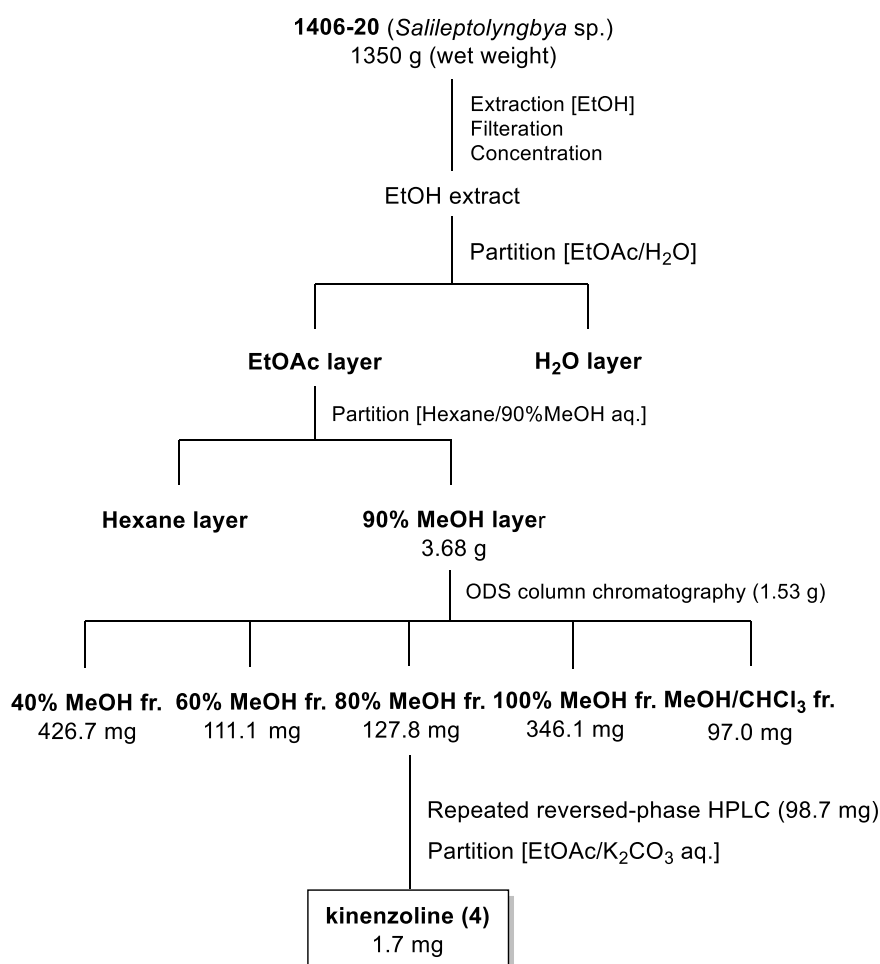
海洋シアノバクテリアの採集は、2014年6月に鹿児島県大島郡徳之島にて行われた (Figure 3-1)。採集された海洋シアノバクテリア 1406-20 に対し、16S rDNA の遺伝子配列 (accession No. LC610901) を利用した系統解析を実施した結果、本シアノバクテリアは *Salileptolyngbya* sp. であることが判明した (第6章 第3節)。なお、本種は2018年に Dong らにより提唱された新属のシアノバクテリアである⁹⁶。



Figure 3-1. 徳之島で採集した海洋シアノバクテリア 1406-20 (*Salileptolyngbya* sp.)

第2節 Kinenzoline の単離

採集した海洋シアノバクテリア *Salileptolyngbya* sp. 1350 g (湿重量) を EtOH で抽出し、抽出液を濾過、濃縮した。得られた EtOH 抽出物を EtOAc/水で分配し、EtOAc 層についてさらに hexane/90% MeOH aq. で分配した。90% MeOH aq. 画分の一部について、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、80% MeOH aq. 画分について高速液体クロマトグラフィーにより精製した。予備検討より kinenzoline (4) は塩基性物質であることが示唆されたため、分取後に EtOAc/K₂CO₃ aq. で分配し、EtOAc 層を濃縮して kinenzoline (4, 1.7 mg) を得た (Scheme 3-1)。



Scheme 3-1. Kinenzoline (4) の精製スキーム

第3節 Kinenzoline の構造決定

第1項 Kinenzoline (4) の平面構造の決定

Kinenzoline (4) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{38}H_{59}N_5O_8S$ であることが分かった (m/z 746.4135, calcd for $[M+H]^+$ 746.4163)。

Figure 3-2 および **Table 3-1** に NMR データとその解析結果を示す。まず、 1H NMR スペクトルにおいて、4:1 の比率で回転異性体が観測された。続いて、5.10、5.04、4.30 ppm に低磁場シフトしたメチン水素が観測されたことから、3つのアミノ酸を有することが示唆された。さらに、2次元 NMR 解析の結果、同様にアミノ酸の α 位に由来すると考えられる低磁場シフトした4.87および3.31 ppm のメチン水素が 溶媒由来の DHO および CHD_2OD シグナルに隠れていることが確認された。さらに、HMQC より 5.10 ppm のメチン水素が結合する炭素の化学シフトは、76.6 ppm と比較的低磁場に観測された。以上の結果から、本化合物が4つのアミノ酸と1つのヒドロキシ酸で構成されていることが示唆された。さらに、2.36 (H-37/38, s) ppm に 6H 分に相当するシグナル、3.11 (H-25, s) および 3.66 (H-1, s) ppm に 3H 分のシグナルが観測されたことから、*N,N*-ジメチル基が1つ、*N*-メチルアミド基が1つ、メチルエステルが1つ存在することが示唆された。加えて、芳香族領域に 6.72 (H-11/15, 2H, 8.7 Hz) および 7.05 (H-12/14, 2H, 8.7 Hz) ppm の2つのシグナルが観測されたことから、パラ二置換ベンゼンを1つもつことが示唆され、化学シフトから Tyr であると推定された。この推測は、 ^{13}C NMR において4つの芳香族炭素 (157.9、131.7、127.8、116.3 ppm) が観測されたことから支持された。さらに、 ^{13}C NMR において6つのアミドまたはエステルと推定されるシグナル (175.7、173.8、173.2、172.6、171.4、171.1 ppm) が観測されたことから、上で述べた5つのアミノ酸およびヒドロキシ酸に加え、 α 位水素を欠いた異常アミノ酸が1つ存在することが示唆された。解析の結果、3.24 (H-18a) および 3.60 (H-18b) ppm のメチレン水素、1.37 (H-19) ppm の1つのメチル水素より観測される H-19/C-17、H-18a/C-17、H-18b/C-17、H-18a/C-20 の HMBC 相関から、これらのシグナルは 2-methylthiazoline (2-MeTzn) に帰属された。

2次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、本化合物は *N,N*-diMe-Leu、Valic acid、*N*-Me-Val、2-MeTzn、Tyr、*O*-Me-Pro からなるヘキサペプチドであることが明らかとなった。また、H-27/C-31、H-25/C-26、H-25/C-21、H-21/C-20、H-19/C16、H-8/C-16 の6つの HMBC 相関から、(*N,N*-diMe-Leu)-(Valic acid)-(*N*-Me-Val)-(2-MeTzn)-(Tyr) のシーケンスを有することが判明した。分子式を考慮すると、残りの *O*-Me-Pro は必然的に C 末端側に存在することから、kinenzoline (4) の平面構造を **Figure 3-2** に示すとおりに一義的に決定した。

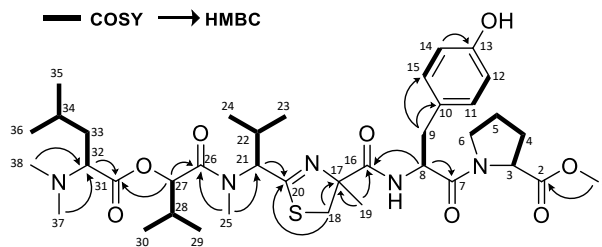


Figure 3-2. Kinenzoline (4) の平面構造

Table 3-1. Kinenzoline (4) の NMR スペクトルデータ (CD₃OD)

residue	position	δ_c , type ^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	Selected HMBC
Pro-O-Me	1	52.7, CH ₃	3.66, s		2
	2	173.8, C			
	3	60.4, CH	4.30, dd (8.8, 4.1)	4a, 4b	
	4a	29.9, CH ₂	1.88, m	3, 4b, 5a, 5b	
	4b		2.07, m	3, 4a, 5a, 5b	
	5a	25.4, CH ₂	1.70, m	4a, 4b, 5b, 6a, 6b	
	5b		1.89, m	4a, 4b, 5a, 6a, 6b	
	6a	48.3, CH ₂	3.02, m	5a, 5b, 6b	
Tyr	6b		3.60, m	5a, 5b, 6a	
	7	171.4, C			
	8	53.7, CH	4.87, m	9	7, 16
	9	39.0, CH ₂	2.94, m	8	10, 11/15
	10	127.8, C			
	11/15	131.7, CH	7.05, d (8.7)	12/14	
	12/14	116.3, CH	6.72, d (8.7)	11/15	13
2-MeTzn	13	157.9, C			
	16	175.7, C			
	17	86.0, C			
	18a	41.4, CH ₂	3.24, d (11.4)		17, 20
	18b		3.60, d (11.4)		17
N-Me-Val	19	24.6, CH ₃	1.37, s		16, 17
	20	171.1, C			
	21	61.8, CH	5.04, d (10.5)	22	20
	22	29.1, CH	2.45, m	21, 23, 24	
	23	19.5, CH ₃	0.86, d (6.9)	22	
	24	20.8, CH ₃	0.99, d (6.3)	22	
Valic acid	25	30.8, CH ₃	3.11, s		21, 26
	26	172.6, C			
	27	76.6, CH	5.10, d (7.0)	28	26, 31
	28	31.4, CH	2.20, m	27, 29, 30	
	29	18.8, CH ₃	1.06, d (6.9)	28	
N,N-diMe-Leu	30	18.5, CH ₃	1.08, d (6.9)	28	
	31	173.2, C			
	32	66.7, CH	3.31, m	33a, 33b	31
	33a	18.8, CH ₂	1.43, m	32, 33b, 34	
	33b		1.71, m	32, 33a, 34	
	34	26.0, CH	1.61, m	33a, 33b, 35, 36	
	35	22.5, CH ₃	0.95, d (6.4)	34	
	36	23.5, CH ₃	0.91, d (6.4)	34	
	37/38	41.9, CH ₃	2.36, s		32

^a Measured at 100 MHz.

^b Measured at 400 MHz.

第 2 項 Kinenzoline の絶対立体配置の決定

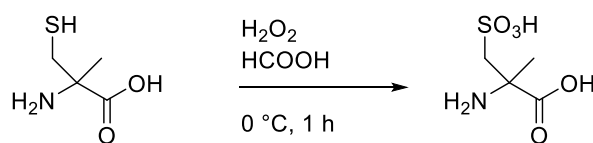
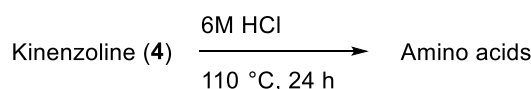
Kinenzoline (4) の絶対立体配置は、それぞれの化合物を酸加水分解した後、各構成アミノ酸を分取してキラルカラムにおける保持時間を標品と比較することで決定した。2-MeTzn の立体配置は、酸加水分解に続くチオール基の酸化により得られる 2-methylcysteic acid について、キラルカラムにおける保持時間を標品と比較することで決定した。

2-MeTzn に隣接する *N*-Me-Val の α 位は、通常条件で酸加水分解すると 1:1 の比率で完全にエピ化したことから、オゾン酸化によりチアゾリン環を開裂した後に酸加水分解を行うことで元の立体化学を保持した *N*-Me-Val を調製した⁹⁷。

Kinenzoline (4) の絶対立体配置の決定

Kinenzoline (4) を 6M HCl 中、110 °C 下で 24 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸を分取した。得られた Pro、Tyr、Valic acid、*N,N*-diMe-Leu について、キラルカラムを用いて保持時間を分析し、標品の保持時間と比較することで絶対立体配置を決定した。結果として、Tyr は D 体であり、Pro、Valic acid、*N,N*-diMe-Leu は L 体であることが明らかとなった。また、2-methylcysteine を含む画分を酸化して得られた 2-methylcysteic acid は R 体の標品の保持時間と一致したことから、C-17 位の絶対立体配置を R と決定した (Table 3-2)。

また、kinenzoline (4) を -78 °C で 30 分間オゾン酸化し、その後 6M HCl 中、110 °C 下で 18 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて *N*-Me-Val を分取し、キラルカラムを用いて標品の保持時間と比較した。その結果、*N*-Me-Val は L 体と保持時間が一致した (Table 3-2)。



2-methylcysteine from 4

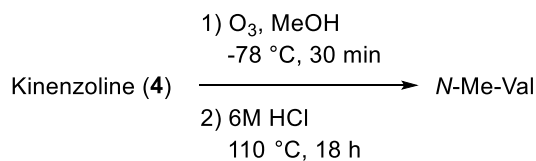


Table 3-2. Kinenzoline (4) の構成アミノ酸のキラルカラムにおける保持時間

アミノ酸	4 由来保持時間 (min)	L 体由来保持時間 (min)	D 体由来保持時間 (min)
<i>N,N</i> -diMe-Leu	10.6	<u>10.6</u>	6.4
Valic acid	9.2	<u>9.2</u>	5.4
<i>N</i> -Me-Val	5.2	<u>5.2</u>	3.3
2-MeTzn	4.9*	<u>4.9**</u>	5.8***
Tyr	6.7	9.6	<u>6.7</u>
Pro	4.3	<u>4.3</u>	2.5

*2-methylcysteic acid に誘導

**(*R*)-2-methylcysteic acid の保持時間

***(*S*)-2-methylcysteic acid の保持時間

以上より、kinenzoline (4) の絶対立体配置を **Figure 3-3** に示すように決定した。

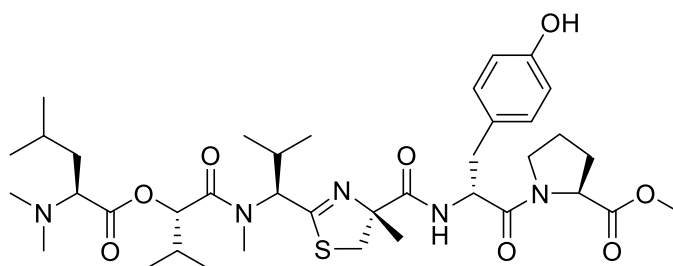
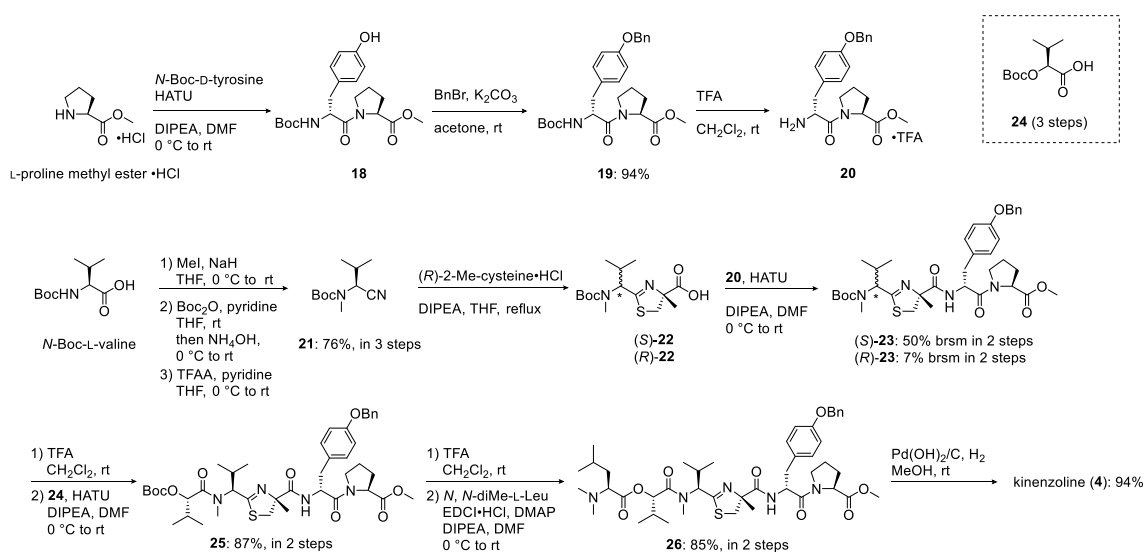


Figure 3-3. Kinenzoline (4) の絶対立体配置

Kinenzoline (**4**) の構造は、当研究室の大友らによる全合成によって確かめられた⁹⁸ (Scheme 3-2)。L-Pro methyl ester と D-Tyr を縮合したのちベンジル保護したジペプチド **20** と、*N*-Boc-L-Valine から 4 工程で合成した (2-MeTzn)-(*N*-Me-Val) のジペプチド **22** を縮合し、テトラペプチド (**S**)-**23** を得た。**(S)**-**23** に対し L-valic acid (**24**) および *N,N*-diMe-L-Leu を順次縮合し、最後にベンジル基を脱保護することで kinenzoline (**4**) の合成が達成された。天然品と合成品の各種スペクトルデータは完全に一致したことから、構造の正しさが確かめられた (Figure 3-4 および Figure 3-5)。



Scheme 3-2. Kinenzoline (**4**) の全合成

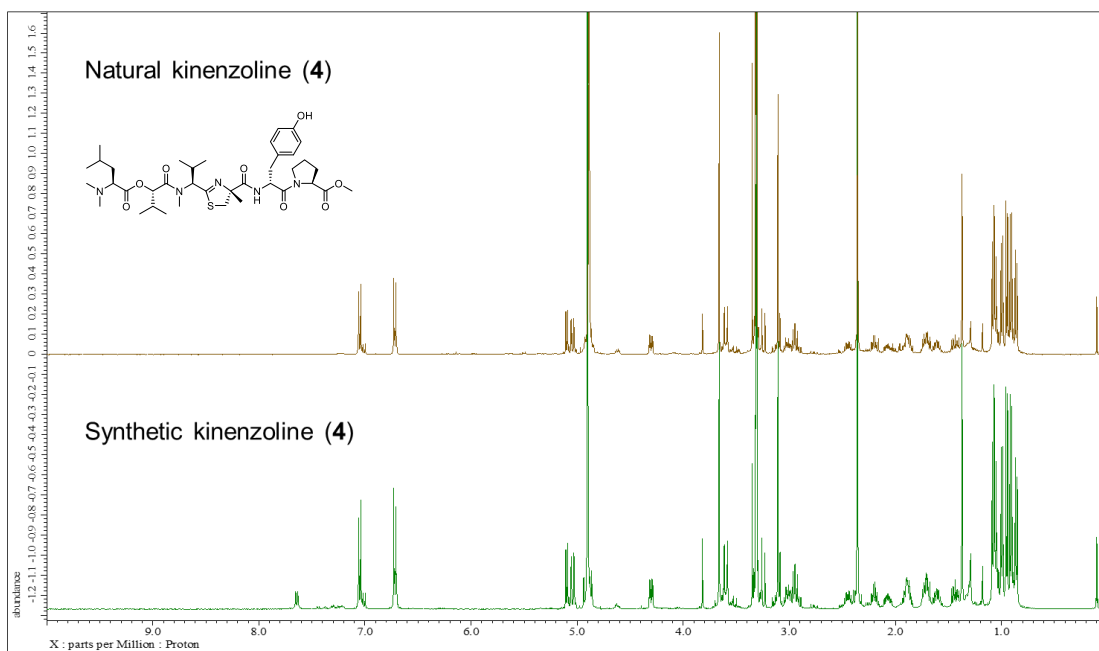


Figure 3-4. 天然品と合成品の ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) スペクトルデータの比較

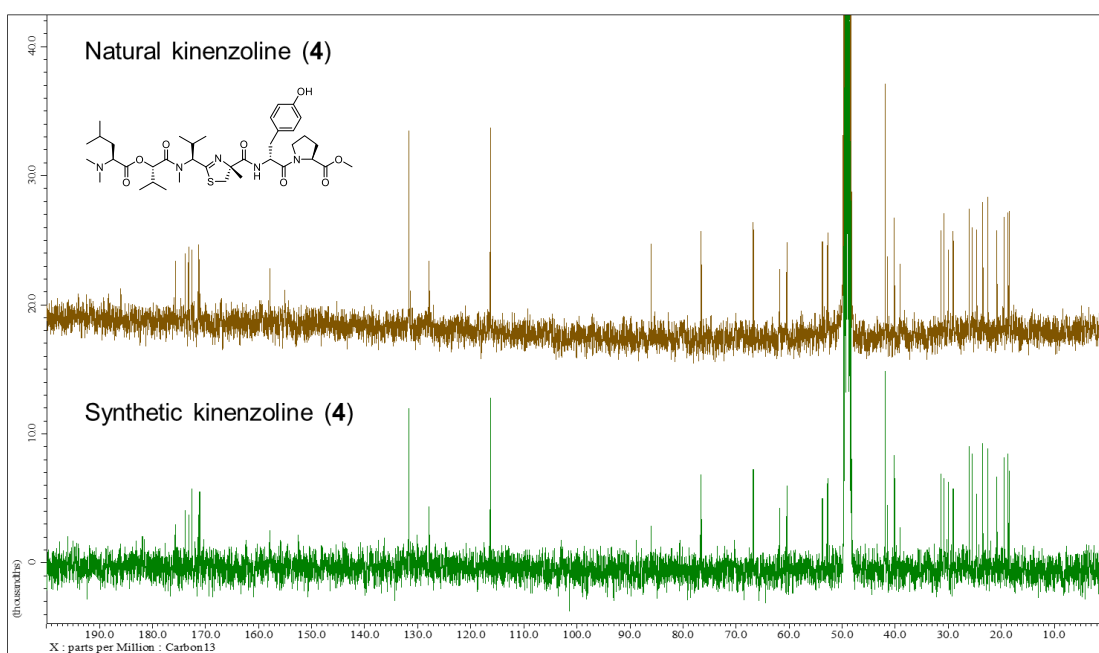


Figure 3-5. 天然品と合成品の ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) スペクトルデータの比較

第4節 Kinezoline の生物活性

Kinezoline (4) について、アフリカ睡眠病の原因寄生虫 *T. b. rhodesiense* およびヒト正常肺線維芽細胞 WI-38 に対する増殖阻害活性を評価した。その結果、kinezoline (4) は IC₅₀ 5.0 μM で抗トリパノソーマ活性を示す一方で、WI-38 に対しては 20 μM で毒性を示さなかった。加えて、合成品の kinezoline (4) も同様に増殖阻害活性を評価したところ、天然物と同等の抗トリパノソーマ活性を示した。合成により十分量を供給できたため、WI-38 に対する毒性を高濃度で検討したところ、100 μM でも毒性を示さなかった (Table 3-3)。

Table 3-3. Kinezoline (4) の増殖阻害活性

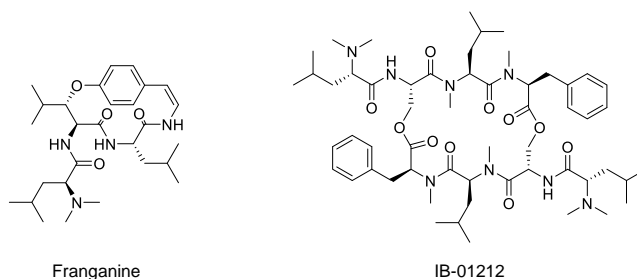
Compounds	IC ₅₀ values (μM)	
	<i>T. b. rhodesiense</i>	WI-38 cells
Natural kinezoline (4)	5.0	>20
Synthetic kinezoline (4)	4.5	>100
Pentamidine ^a	0.001	-
Adriamycin ^a	-	0.73

^a positive control.

第5節 考察

第3章では、徳之島で採集した海洋シアノバクテリア *Salileptolyngbya* sp. より単離した新規鎖状デプシペプチド kinenzoline (4) の構造決定と生物活性について述べた。

Kinenzoline (4) は、構造的な特徴として *N,N*-ジメチル型のアミノ酸、ヒドロキシ酸、および 2-MeTzn などの複数の異常アミノ酸をもつ。Kinenzoline (4) と同様に *N,N*-diMe-Leu を有する天然物としては植物 *Discaria Americana* から franganine⁹⁹ が、海綿に内生する *Clonostachys* 属の海洋細菌から IB-01212¹⁰⁰ が単離されている。また、2-MeTzn は海洋シアノバクテリア由来の天然物として bisebromoamide⁷³、largazole⁶⁶ など多く見出されている。2-MeTzn は cysteine が環化し、その後 SAM 由来のメチル基が導入されることで形成されると考えられる。



Kinenzoline (4) の構造の正しさは、前述した全合成によって確かめられた。また、本化合物がヒト細胞と比較して 20 倍以上の抗トリパノソーマ活性を示すことを明らかにした。Kinenzoline (4) の選択毒性は優れており、抗トリパノソーマ薬のリード化合物として期待される。また、シーケンスは異なるものの、本化合物は①*N,N*-ジメチルアミノ酸 ②五員環の複素環 ③ D 型の芳香族アミノ酸 を含む点で同じく抗トリパノソーマ活性を示す iheyamide A (1) (第2章)と共通している。これらが共通の作用機序を介して同様の活性を示すのか、興味もたれる。

第4章 新規ペプチド-ポリケチドハイブリッド配糖体 *iezoside* の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と同定

海洋シアノバクテリアの採集は、2020年7月に沖縄県国頭郡伊江村の伊江島にて行った (Figure 4-1)。採集された海洋シアノバクテリア 2007-23 に対し、16S rDNA の遺伝子配列 (accession No. LC697001) 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 Vermifilaceae 科に含まれることが判明した (第6章 第4節)。さらに、2007-23 を構成するフィラメントの形態観察を行った結果、細胞の体長や厚み、色から本種は Vermifilaceae 科に属する *Leptochromothrix valpauliae* と良い一致を示した¹⁰¹ (Table 4-1)。以上より、2007-23 を *Leptochromothrix valpauliae* と同定した。なお、本種は2021年に Berthold らにより新たに提唱された新属新種のシアノバクテリアである¹⁰¹。

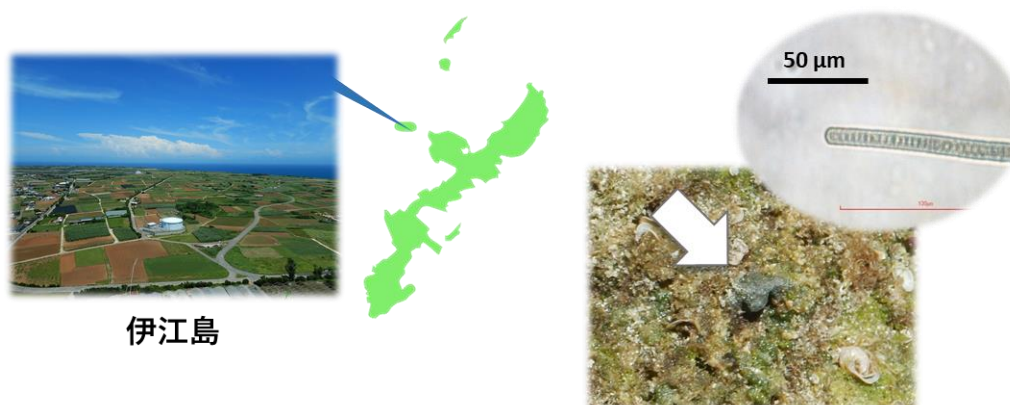


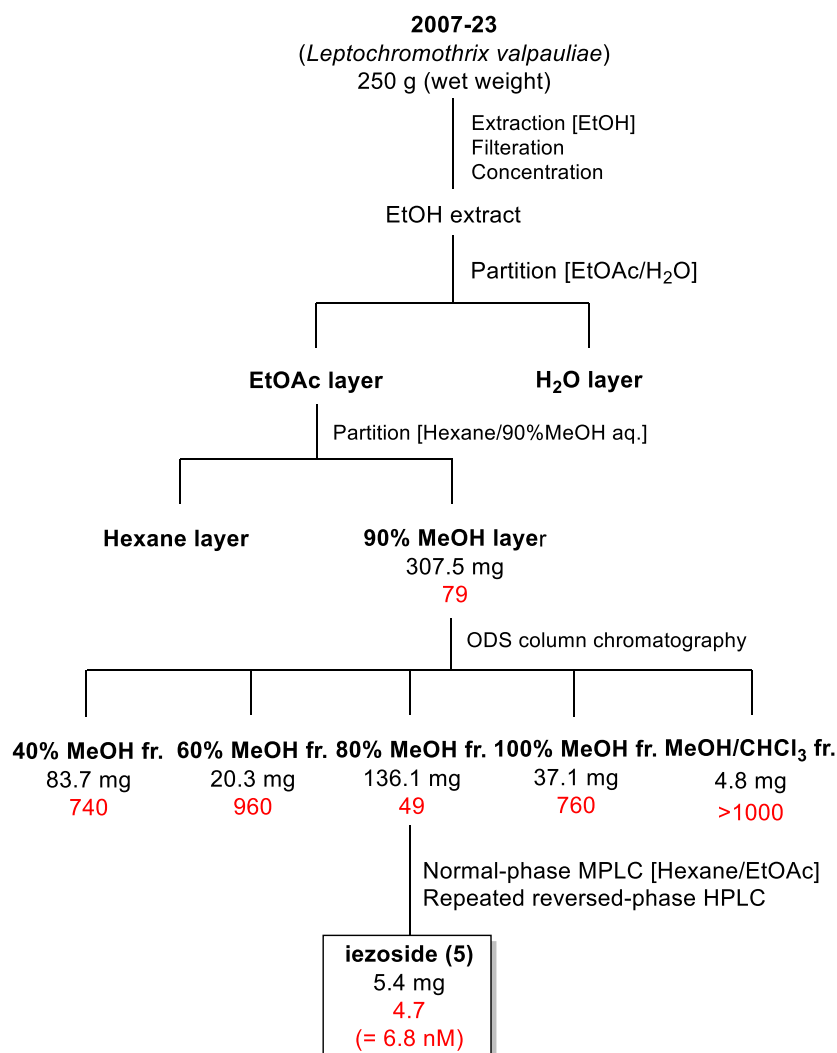
Figure 4-1. 伊江島で採集した海洋シアノバクテリア 2007-23 (*Leptochromothrix valpauliae*)

Table 4-1. 海洋シアノバクテリア 2007-23 と Vermifilaceae 科シアノバクテリアの形態比較

	2007-23 (<i>iezoside</i> producing cyanobacterium)	<i>Leptochromothrix valpauliae</i>	<i>Leptochromothrix engenei</i>	<i>Ophiophycus aeruginus</i>	<i>Vermifilum ionodolium</i>
Cell Color	light to dark green	light to dark green, or blue green	pink to red	olive green, grey, blue green, purple	young light to dark green or grey to gold
Cell shape	discoid	discoid	discoid	discoid	discoid
Cell width (μm)	8.8-10.0 (9.5 ± 0.4)	8.7-9.9 (9.3 ± 0.3)	8.8-9.9 (9.5 ± 0.3)	12.6-15.4 (14.5 ± 0.8)	9.7-14.6 (11.9 ± 1.1)
Cell length (μm)	2.4-4.1 (3.4 ± 0.6)	2.2-3.8 (2.8 ± 0.4)	3.3-5.0 (3.8 ± 0.4)	2.4-4.4 (3.2 ± 0.5)	1.9-4.1 (2.8 ± 0.4)

第2節 Iezoside の単離

採集した海洋シアノバクテリア *Leptochromothrix valpauliae* 250 g (湿重量)を EtOH で抽出し、抽出液を濾過、濃縮した。得られた EtOH 抽出物を EtOAc/水で分配し、EtOAc 層についてさらに 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 (MTT assay) により、90% MeOH aq. 画分に非常に強力な増殖阻害活性 (IC_{50} 79 ng/mL) が認められたため、これを指標として精製を行った。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、特に強力な増殖阻害活性を示した 80% MeOH aq. 画分について中圧カラムを用いた順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、および高速液体クロマトグラフィーにより精製した。その結果、活性物質として新規ペプチド-ポリケチドハイブリッド配糖体である iezoside (5, 5.4 mg) を得た(Scheme 4-1)。



Scheme 4-1. Iezoside (5) の精製スキーム

赤字は IC_{50} (ng/mL) を示している。

第3節 Iezoside の構造決定

第1項 Iezoside の平面構造の決定

Iezoside (5) の分子式は、高分解能質量スペクトルより、 $C_{37}H_{59}N_3O_7S$ であることが分かった (m/z 690.4167, calcd for $[M+H]^+$ 690.4152)。 CD_3OD 、 $CDCl_3$ 、 C_6D_6 溶媒を用いて iezoside (5) の NMR スペクトルを測定すると、一部の水素および炭素において顕著にブロードしたシグナルが観測された。 $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 冷却下で測定しても同様の現象が見られた。検討の結果、 $(CD_3)_2CO$ を用いた際に最もブロードニングが抑えられた NMR スペクトルが得られたため、これを NMR 溶媒として使用した。

Figure 4-2a および **Table 4-2** に NMR データとその解析結果を示す。まず、7.70 (H-1, d, $J=3.2\text{ Hz}$) および 7.48 (H-2, d, $J=3.2\text{ Hz}$) ppm に小さな結合定数を有する一対のメチン水素が観測されたことから、C 末端側に一置換チアゾール (Thz) が存在することが示唆された。この推定は、174.3 (C-3)、143.4 (C-1)、119.6 (C-2) ppm の 3 つの sp^2 炭素シグナルの存在からも支持された。また、5.40 (H-4) および 4.99 (H-10) ppm にアミノ酸の α 位水素に由来する 2 つのメチン水素が観測され、COSY 相関 (H-4/H-5/H-6/H-7/H-8 および H-10/H-11) からそれぞれ Leu および Ala のアミノ酸残基を有することが示唆された。加えて、5 つの HMBC 相関 (H-1/C-3、H-2/C-3、H-4/C-3、H-4/C-9、H-11/C-9) と 1 つの NOE 相関 (H-11/H-12) により、(Thz)-(Leu)-(N-Me-Ala) のシーケンスを有することが判明した。N-Me-Ala の H-10 および H-11 の 1H NMR シグナルは $(CD_3)_2CO$ 溶媒中でも著しくブロード化され、 ^{13}C NMR スペクトルでは対応する C-10 と C-11 炭素が観測されなかった。この現象は N-Me-Ala 残基の N-Me-アミド基に起因する遅い配座交換に由来すると考えられる。

続いて、4.82 (H-30)、3.60 (H-34)、3.56 (H-31)、3.44 (H-33)、3.40 (H-37)、3.37 (H-32)、3.36 (H-36) および 1.19 (H-35) ppm におけるシグナルの COSY および HMBC 相関から、2,3-O-dimethyl-5-methylpentose を部分構造に持つことが明らかとなった。また、 $^1J_{C30-H30}=170\text{ Hz}$ であることや¹⁰²、それぞれの結合定数および NOE 相関の解析により、 α -ラムノースと同様の相対立体配置を持つことが明らかになった (**Figure 4-2b**)。

さらに、6.43 (H-15)、6.23 (H-21)、6.19 (H-16)、5.52 (H-23)、5.40 (H-20) ppm にある 5 つのオレフィンメチン水素と 1.91 (H-26)、1.78 (H-27)、1.72 (H-29) の 3 つのビニルメチル基の COSY、NOESY、HMBC スペクトル相関より、C-13 から C-17 の $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和カルボニル基と C-20 から C-23 の共役ジエン基の 2 つの不飽和系が存在することが判明した。C-14、C-17、C-22 の 3 つの三置換オレフィンの幾何配置は、それぞれのビニルメチル基の ^{13}C NMR シフト (14.7 (C-26)、15.8 (C-27)、12.5 (C-29) ppm) に基づき全て E 体と決定した¹⁰³。さらに、H-26/C-13 の HMBC 相関により C-13 のカルボニル炭素と C-14 を結びつけ、COSY 相関の H-23/H-24/H-25 からポリケチドの末端にエチル基が存在することを明らかにした。最後に、H-27/C-18 の HMBC 相関と H-28/H-18/H-19/H-20 の COSY 相関により、上述した 2 つの不飽和系が連結した奇数の炭素を持つポリケチド鎖の存在が明らかとなった。

ここまで明らかにしたペプチド、糖、ポリケチドの部分構造は、H-12/C-13 および H-19/C-

30 の HMBC 相関より連結した。以上より、iezoside (5) の平面構造を **Figure 4-2a** に示す通りに決定した。

N-Me-Ala 残基で観察されたように、一部の ^{13}C NMR シグナル (C-14、C-15、C-17、C-18、C-19、C-27、C-28) において、顕著なブロードニングが観測されるか、もしくは検出されなかった。この現象は、C-12/C-26、C-26/C-16、C-15/C-27 の間の立体反発によるものと考えられた。アミド炭素である C-13 と、C-14 と C-16 の2つのオレフィンは、共鳴安定化効果により同一平面上にある配座が安定であると考えられる。しかし、C-12/C-26、C-26/C-16、C-15/C-27 間の立体反発により、この安定配座を妨げていることが予想される。実際に、C-15 の化学シフト (^1H : 6.43 ppm、 ^{13}C : 128.7 ppm) からアミド基と C-14 のオレフィンが同じ平面上にないことが支持される。共鳴安定化と立体反発の相反する効果、加えて *N*-Me-Ala の *N*-Me-アミド基に由来するロータマーにより、 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和アミド基のコンフォメーションが著しく不安定化し、複数の立体配座間で遅い配座交換が引き起こされていることが考えられる。

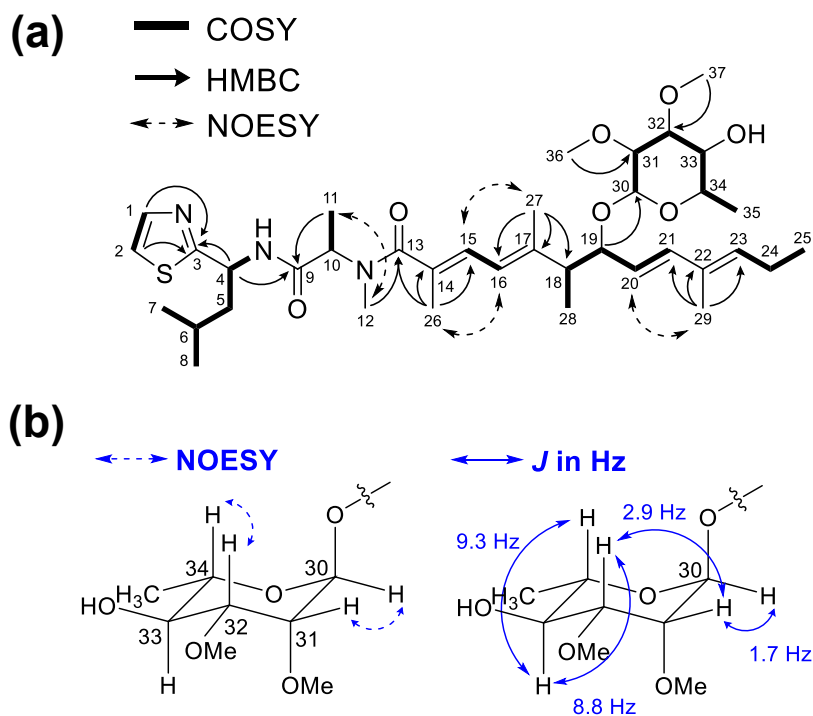


Figure 4-2. (a) Iezoside (5) の平面構造

(b) 2,3-*O*-dimethyl- α -rhamnose における NOESY 相関および結合定数

Table 4-2. Iezoside (**5**) の NMR スペクトルデータ $\{(CD_3)_2CO\}$

residue	position	δ_c , type ^a	δ_H (J in Hz) ^b	COSY	Selected HMBC	Selected NOESY
Thz	1	143.4, CH	7.70, d (3.2)	2	3	
	2	119.6, CH	7.48, d (3.2)	1	3	
	3	174.3, C				
Leu	4	50.3, CH	5.40, m	5, NH	3, 9	
	5	45.0, CH ₂	1.85, m	4, 6		
	6	25.6, CH	1.77, m	5, 7, 8		
	7	21.96, CH ₃	0.96, d (6.4)	6		
	8	23.4, CH ₃	0.96, d (6.4)	6		
N-Me-Ala	NH		7.74, d (8.5)	4		
	9	171.4, C				
Fatty acid	10	CH ^c	4.99, br	11		
	11	CH ₃ ^c	1.35, d (6.7)	10	9	12
	12	32.0, CH ₃ ^d	2.86, s		13	11
	13	174.9, C				
	14	131.1, C				
	15	128.7, CH ^d	6.43, d (11.3)	16		27
	16	122.0, CH	6.19, d (11.3)	15		26
	17	144.4, C				
	18	49.1, CH	2.46, dq (6.5, 6.9)	19, 28		
	19	78.9, CH	4.12 dd (6.5, 8.6)	18, 20	30	
20	125.4, CH	5.40, dd (8.6, 16.0)	19, 21		29	
21	139.5, CH	6.23, d (16.0)	20			
22	133.1, C					
23	135.9, CH	5.52, t (7.7)	24			
24	22.02, CH ₂	2.14, dq (7.7, 7.5)	23, 25			
25	14.2, CH ₃	0.96, t (7.5)	24			
26	14.7, CH ₃	1.91, d (0.9)			13, 14, 15	
27	15.8, CH ₃	1.78, s			16, 17, 18	
28	15.3, CH ₃	1.18, d (6.9)	18			
29	12.5, CH ₃	1.72, s			21, 22, 23	
2,3-O-dimethyl-rhamnose	30	94.5, CH	4.82, d (1.7)	31		31
	31	77.8, CH	3.56, dd (1.7, 2.9)	30, 32		30
	32	82.7, CH	3.37, dd (2.9, 8.8)	31, 33		34
	33	72.5, CH	3.44, dd (8.8, 9.3)	32, 34		
	34	69.8, CH	3.60, qd (6.3, 9.3)	33, 35		32
	35	18.4, CH ₃	1.19, d (6.3)	34		
	36	59.0, CH ₃	3.36, s		31	
	37	57.4, CH ₃	3.40, s		32	

^a Measured at 100 MHz.

^b Measured at 400 MHz.

^c These signals were not detected.

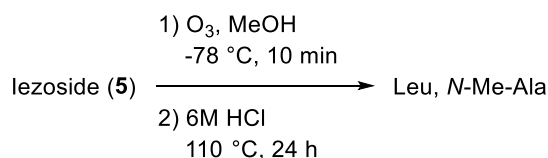
^d These chemical shifts were determined based on HMQC spectra.

第 2 項 Iezoside の絶対立体配置の決定

ペプチド部分の Leu および *N*-Me-Ala の絶対立体配置については、iezoside (5) をオゾン酸化後、酸加水分解物を調製し、分取したそれぞれのアミノ酸をキラルカラム、もしくは Marfey 法¹⁰⁴における保持時間を標品と比較することで決定した。糖部分については、改良 Mosher 法¹⁰⁵により C-33 位の立体化学を決定し、第 1 項で明らかにした相対立体配置と併せることで決定した。ポリケチド部分の C-18 および C-19 位については、可能な 4 種のジアステレオマーについてモデル化合物を用いた計算化学的手法により推定した。

ペプチド部分の絶対立体配置の決定

各アミノ酸ユニットの絶対立体配置を決定するために、iezoside (5) の構成アミノ酸の分取を試みた。第 3 章の kinenzoline (4) の立体化学と同様、チアゾールやチアズリンなどの複素環を有する場合、天然物を直接酸加水分解すると複素環の α 位がエピ化することが報告されている⁹⁷。そこで、まずオゾン酸化により Thz の結合を切断し、その後に酸加水分解することにより Leu を得ることとした。



Izoside (5) を -78°C で 10 分間オゾン酸化し、その後 6 M HCl 中、 110°C 下で 24 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。その後、逆相 HPLC を用いて各アミノ酸を分取した。

Leu について、キラルカラムを用いて保持時間を分析し、得られた保持時間を標品と比較した。結果として、Leu は L 体であることが判明した。

N-Me-Ala はキラルカラムではほとんど保持されなかったため、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 誘導体と比較した。結果として、*N*-Me-Ala は D 体であることが判明した。

C-33 位および糖部分の絶対立体配置の決定

Izoside (5) に対して過剰量の (*S*)-MTPA chloride もしくは (*R*)-MTPA chloride を作用させ、MTPA エステル 5'a および 5'b を調製した。得られた MTPA エステルの化学シフトの差 $[\Delta\delta(\delta_S-\delta_R)]$ を算出した結果、2,3-*O*-dimethylpentose 部分に含まれる C-33 位の絶対立体配置を *S* 体と決定した (Figure 4-3)。第 1 項で明らかにした相対立体配置と併せ、糖部分を 2,3-*O*-dimethyl- α -L-rhamnose と決定した。

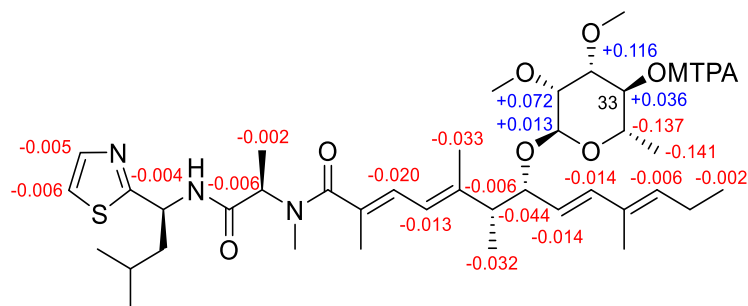


Figure 4-3. Iezoside (5) における MTPA エステルの化学シフトの差 [$\Delta\delta(\delta_S-\delta_R)$]

ポリケチド部分の絶対立体配置の決定

ポリケチド部分の C-18 および C-19 位の絶対立体配置については、オゾン酸化で得られる当該の不斉点を含む分解産物について、合成した各ジアステレオマー標品と ^1H NMR を比較することで決定することを試みた。しかし、合成したモデル標品 (Figure 4-4) をオゾン酸化に供すると、複雑な生成物が得られるのみであった(データ省略)。

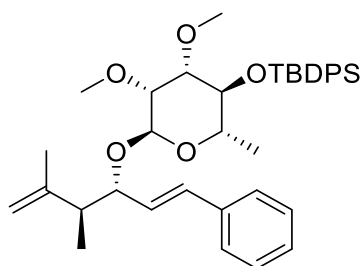


Figure 4-4. モデル標品の構造

以上の結果から、分解反応によって目的物を得る事は困難

であると判断し、計算化学的手法を用いて NMR の化学シフトや結合定数、ECD スペクトルの計算を行い、天然物の値と比較することで不斉点の立体化学を決定することを試みた。

まず、モデル化合物の検討を行った。Iezoside (5) におけるペプチド部分は、C-18 および C-19 位から距離が遠いため、不斉点周辺の理論化学シフトにほとんど影響を与えないと考えた。また、Iezoside (5) の電子円二色性 (ECD) スペクトルは脂肪酸部分の不飽和アミドと共役ジエンのねじれに由来するコットン効果が観測されると予想される。ペプチド部分から抜粋した 2-methylthiazole、およびペプチド側の末端を *N,N*-ジメチルアミド基とした脂肪酸の理論 UV-vis スペクトルを求めると、2-methylthiazole の UV 吸収強度は脂肪酸の 1/6 程度であった (Figure 4-5)。ECD スペクトルの強度は発色団の距離の二乗に反比例し、モル吸光係数の二乗に比例することから、末端チアゾール基の ECD スペクトルに対する寄与は無視できると判断した。加えて、脂肪酸末端のメチル基 (C-25) も化合物のコンフォメーションにほとんど影響を与えないと判断した。以上より、計算時間の短縮を目的としてペプチド部分および C-25 を削除した可能な 4 種のジアステレオマー 27 を計算モデル化合物に選定した (Figure 4-6)。

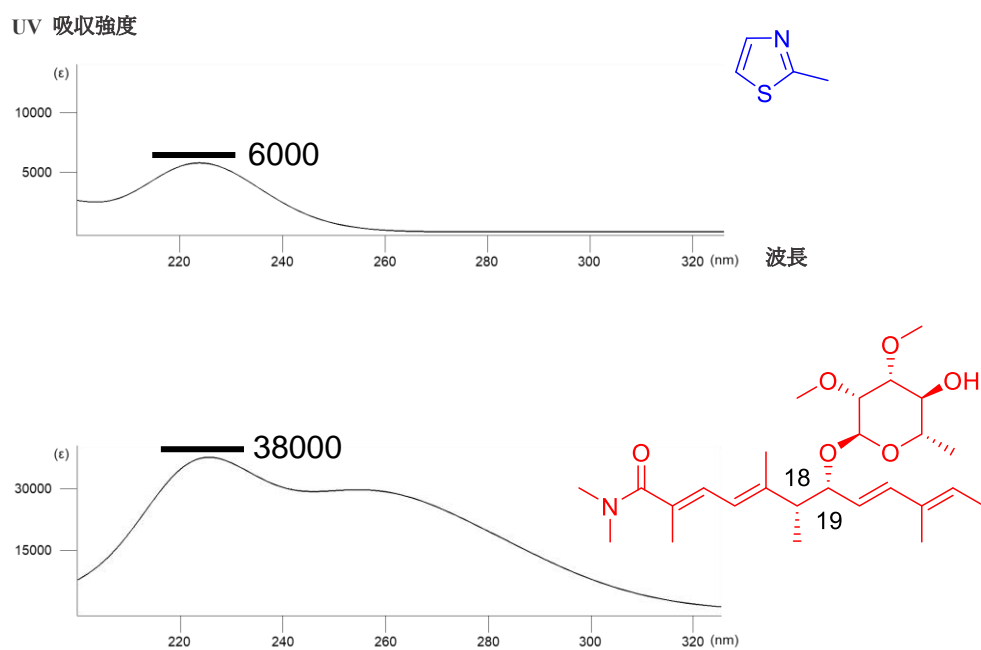


Figure 4-5. 2-methylthiazole およびモデル化合物 (18R,19R)-27 の理論 UV-vis スペクトル

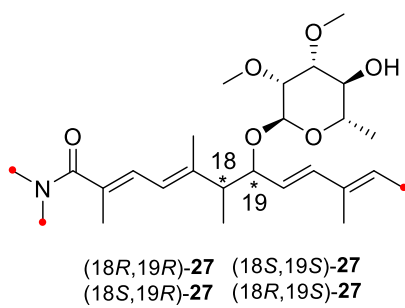


Figure 4-6. 計算に使用したモデル化合物の構造
赤い点で示した炭素と水素は統計解析の対象外とした。

近年、計算化学的手法により多くの天然物の絶対立体配置が決定されている¹⁰⁶。しかし、これまでに報告されている計算化学を活用した分子のほとんどは剛直な環状化合物であり、多数の安定配座を有する柔軟な鎖状分子における適用例は少ない。また、そのような分子においては、正しく分子の安定配座を見積もるための手法がいくつか考案されているが^{107,108}、普遍的に利用できる手法は未だ存在しない。

Izoside (**5**) は柔軟な鎖状分子であるだけでなく、¹H および ¹³C NMR においてシグナルの顕著なブロードニングや消失が観察されたことから、配座交換の速度が遅く、複数の安定配座が同時に存在することが示唆されている。このような分子の性質を考慮し、配座占有率の算出では、従来使用されている電子エネルギーではなく、コンフォメーション変化に由来するエントロピー項の違い (Gibbs 自由エネルギー) も考慮することとした。具体的には Spartan²⁰¹⁰⁹ を用い、それぞれのジアステレオマーについて以下の計算を行った。

- [1] MMFF¹¹⁰ を力場として分子力学法による配座探索を行い、各モデル化合物について 104976 配座を得た。これに対し 500 配座を上限とし、最安定配座から 40 kJ/mol 以内に収まる配座を選抜した。
- [2] Hartree-Fock 法¹¹¹ (HF/3-21G) を用いて [1] で得られた配座の構造最適化を行い、最安定配座から 40 kJ/mol 以内に収まる配座を選抜した。
- [3] 密度汎関数法¹¹² (B3LYP/6-31G*) を用いて [2] で得られた配座のエネルギー計算を行い、最安定配座から 15 kJ/mol 以内に収まる配座を選抜した。
- [4] [3] で得られた配座について、B3LYP/6-31G* で再び構造最適化および振動計算を行い、Gibbs 自由エネルギーを基に最安定配座から 10 kJ/mol 以内に収まる配座を選抜した。

ここまでの計算で、室温で 1% 以上を占める配座としてそれぞれ (18*S*,19*R*)-**27**: 21 配座、(18*R*,19*R*)-**27**: 33 配座、(18*R*,19*S*)-**27**: 19 配座、(18*S*,19*S*)-**27**: 19 配座 を得た。これらについて、各配座の Boltzmann 分布を求めた。

- [5] [4] で得られた各配座について、GIAO 法¹¹³ により、理論化学シフトを B3LYP/6-31G* で計算し、配座の占有率との加重平均を求めることで化学シフトを得た。統計解析においては、Goodman らの標準偏差 (¹³C: 2.306 ppm; ¹H: 0.185 ppm) と自由度 (¹³C: 11.38; ¹H: 14.18) を用いて、配座の確からしさを示す DP4 解析を実施した¹¹⁴。結合定数については、Fermi 接触相互作用を考慮して B3LYP/PCJ-0//B3LYP/6-31G* を用いて計算した¹¹⁵。
- [6] [4] で得られた各配座について、Boltzmann 分布を基に各配座の ECD スペクトルを TDDFT によって計算した。

以上の計算により得られた各モデル化合物の $|\Delta\delta|_{\max}$ 、実験値からの偏差二乗平均平方根 (RMSD) および DP4 期待値について、Table 4-3 についてまとめた。

Table 4-3. 各モデル化合物の $|\Delta\delta|_{\max}$ 、RMSD および DP4 期待値

Compound	¹³ C			¹ H			
	$ \Delta\delta^{13\text{C}} _{\max}$	RMSD	DP4	$ \Delta\delta^1\text{H} _{\max}$	RMSD	DP4	³ J _{H18-H19}
	(ppm)	(ppm)	(%)	(ppm)	(ppm)	(%)	(Hz)
(18 <i>R</i> ,19 <i>R</i>)- 27	3.8	1.32	65.1	0.33	0.15	16.3	6.5
(18 <i>S</i> ,19 <i>R</i>)- 27	3.4	1.37	34.8	0.30	0.13	70.0	9.9
(18 <i>R</i> ,19 <i>S</i>)- 27	4.8	2.09	0.1	0.28	0.15	6.1	8.8
(18 <i>S</i> ,19 <i>S</i>)- 27	8.2	2.72	0.0	0.30	0.15	7.6	8.6
Iezoside (5)	-	-	-	-	-	-	6.5

¹³C NMR の理論化学シフトにおいては、(18*R*,19*R*)-**27** と (18*S*,19*R*)-**27** が他の2つの異性体 (18*S*,19*S*)-**27** および (18*R*,19*S*)-**27** に比べて RMSD が有意に小さく、iezoside (**5**) は (18*R*,19*R*) または (18*S*,19*R*) のどちらかであることが示唆された。(18*R*,19*R*)-**27** は DP4 解析において (18*S*,19*R*)-**27** と比較した際、約2倍の妥当性があった。一方で、¹H NMR の理論化学シフトにおいては、全てのジアステレオマーの RMSD が Goodman らの標準偏差に収まっており、(18*S*,19*R*)-**27** がわずかながら最も低い値を示した。そのため、¹H および ¹³C NMR の化学シフトの比較のみで天然物の立体化学が (18*R*,19*R*)-**27** と (18*S*,19*R*)-**27** のどちらであるか決定するのは困難であった。

そこで、4種のモデル化合物について当該の不斉点のメチン水素である H-18 と H-19 の結合定数 (³J_{H18-H19}) を計算によりそれぞれ求めた。その結果、(18*R*,19*R*)-**27** のみが天然物の結合定数をよく再現し、他のジアステレオマーはそれよりも大きな結合定数を示したことから、iezoside (**5**) の絶対立体配置は 18*R*,19*R* であることが示唆された。

絶対立体配置の結論は、C-18/C-19の配座分布の観点からも合理的に説明できる。計算の結果、(18*R*,19*R*)-**27** 以外のジアステレオマーは H-18 と H-19 がアンチペリプラナー型の配座が高い配座占有率を示した (Figure 4-7)。一方で、(18*R*,19*R*)-**27** はアンチペリプラナー型 (49%) と 2つのゴーシュ型のうちの 1つ (37%) の 2つが主要な配座として得られた。この配座占有率の違いにより、(18*R*,19*R*)-**27** の $^3J_{\text{H18-H19}}$ が他のジアステレオマーよりも小さな値になったと考えられる。

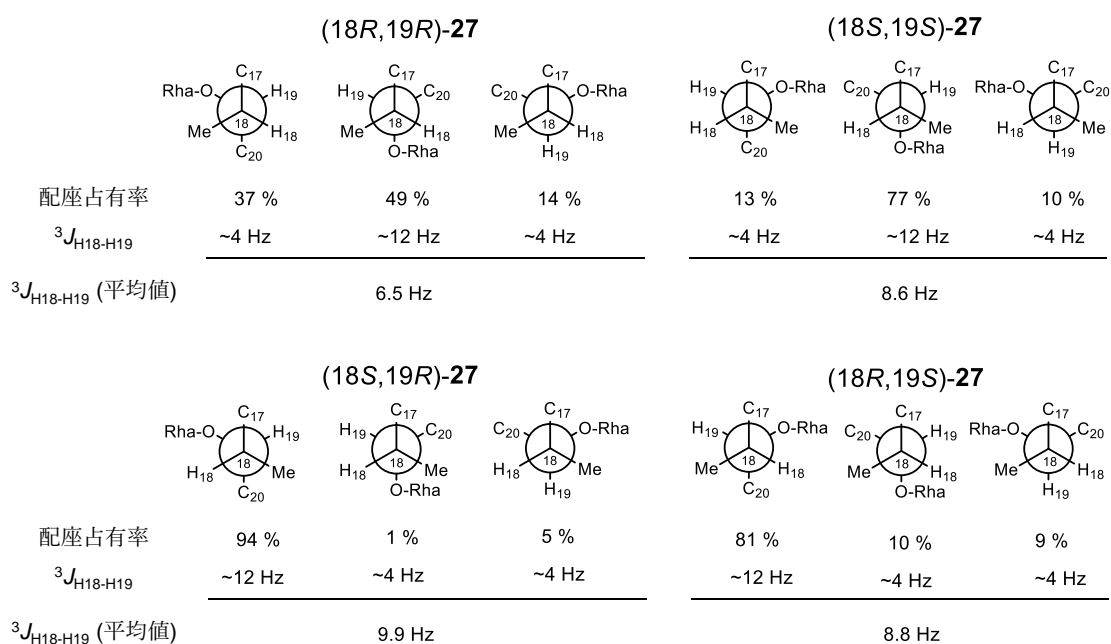


Figure 4-7. 各モデル化合物における配座占有率

(18*R*,19*R*)-**27** と (18*S*,19*S*)-**27** は疑似的なエナンチオマーの関係にあるものの、(18*R*,19*R*)-**27** では H-18/H-19 がゴーシュ型となる配座の占有率が 37%を占めるのに対し、(18*S*,19*S*)-**27** では 13% にとどまっている。この違いは、C-17 に結合しているビニルメチル基に起因すると考えられる。C-19 と隣接する酸素原子に対して、C-19 から見た Newman 投影式を示すと (Figure 4-8)、(18*S*,19*S*)-**27** の場合、C-17 に結合するビニルメチル基と C-19 に結合する 2,3-*O*-dimethyl-L- α -rhamnose のアノマー位水素が立体障害を避けるため、熱力学的に不安定な eclipsed conformation を形成する。一方、(18*R*,19*R*)-**27** では staggered conformation となり、ゴーシュ型の配座が比較的安定に形成される。このような理由で (18*R*,19*R*)-**27** においては H-18/H-19 ゴーシュ型の配座占有率が増大し、 $^3J_{\text{H18-H19}}$ の値が (18*S*,19*S*)-**27** よりも 2.1 Hz 小さくなっていると予想される。

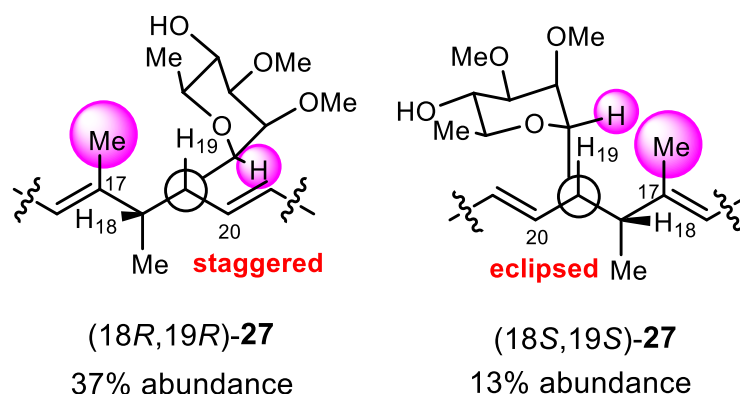


Figure 4-8. (18R,19R)-27 と (18S,19R)-27 におけるゴージュ型配座の安定性

次に、iezoside (5) の ECD スペクトルを、理論計算で求めた各モデル化合物のスペクトルと比較した (Figure 4-9)。Iezoside (5) の示す ECD スペクトルは、C-13 から C-17 までの $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和アミドおよび C-20 から C-23 までのジエンの発色団の間の相互作用に由来すると考えられる。結果として、(18R,19R)-27 は iezoside (5) の ECD スペクトルを良好に再現した。(18S,19R)-27 も、260 nm と 230 nm にそれぞれ正と負のコットン効果を示すものの、それに加えて 280 nm で正のコットン効果が観測された。解析の結果、280 nm のコットン効果は主に $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和アミド部分の HOMO と LUMO 軌道間の相互作用に由来し、その強度はアミド基と C-14 から C-17 におけるジエンとのキラルなねじれに依存することが判明した。Iezoside (5) のペプチド部分を省略しているモデル化合物 27 の ECD は、アミド基のねじれを反映しないため、ECD スペクトルの 280 nm におけるコットン効果は考慮せず、天然物の立体配置は (18R,19R)-27 および (18S,19R)-27 のどちらかであると考えられた。

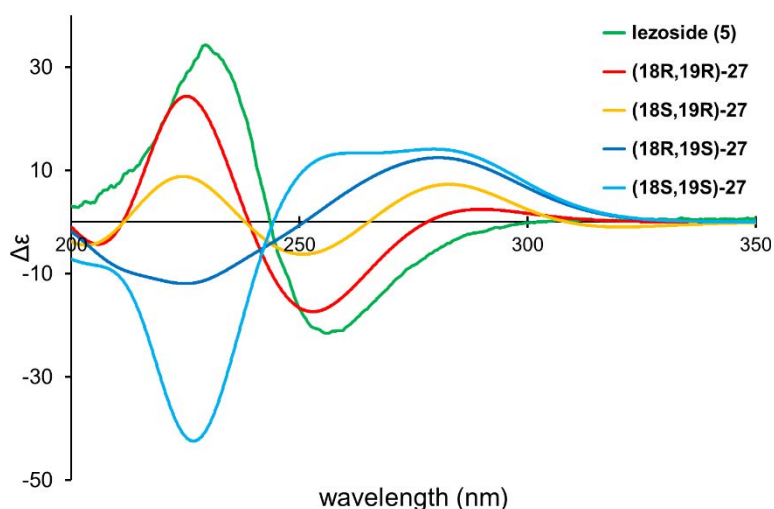


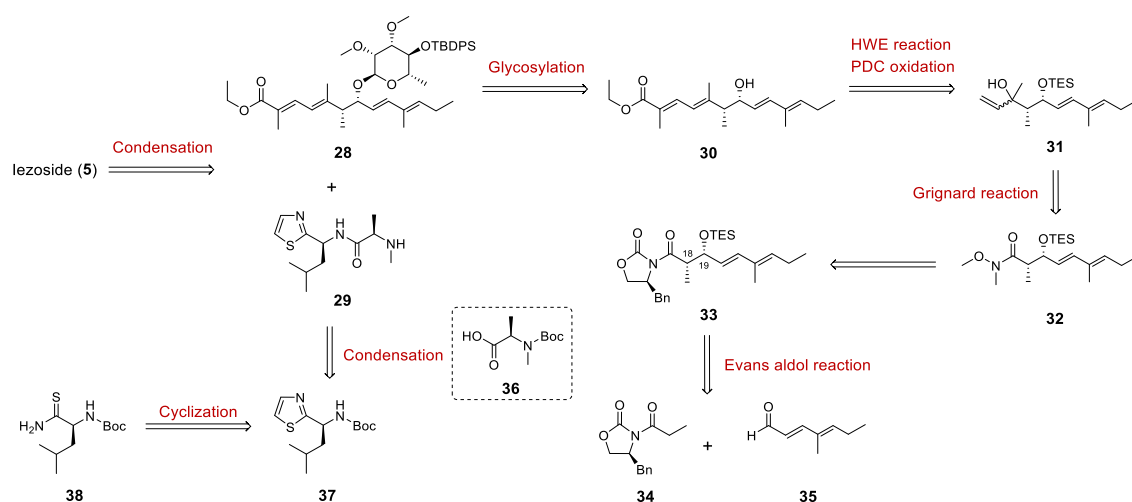
Figure 4-9. Iezoside (5) および各モデル化合物の実測および理論 ECD スペクトル

ここまで得られた結果を総合的に判断して、iezoside (**5**) のポリケチド部の絶対立体配置は *18R,19R* であることが示唆された。しかし、 $^3J_{\text{H18-H19}}$ の値においては *18R,19R* がもっともらしいものの、理論化学シフトや ECD スペクトルの比較では *18S,19R* の可能性を完全に排除することができなかった。そこで、iezoside (**5**) が *18R,19R* であることを実証するため、(*18R,19R*)-iezoside (**5**) および (*18S,19R*)-iezoside (**5'**) の全合成を行い、確かめる事とした。また、これによって本項で実施した DFT 計算の精度を検証した。

第4節 (18*R*,19*R*)- および (18*S*,19*R*)- iezoside の全合成

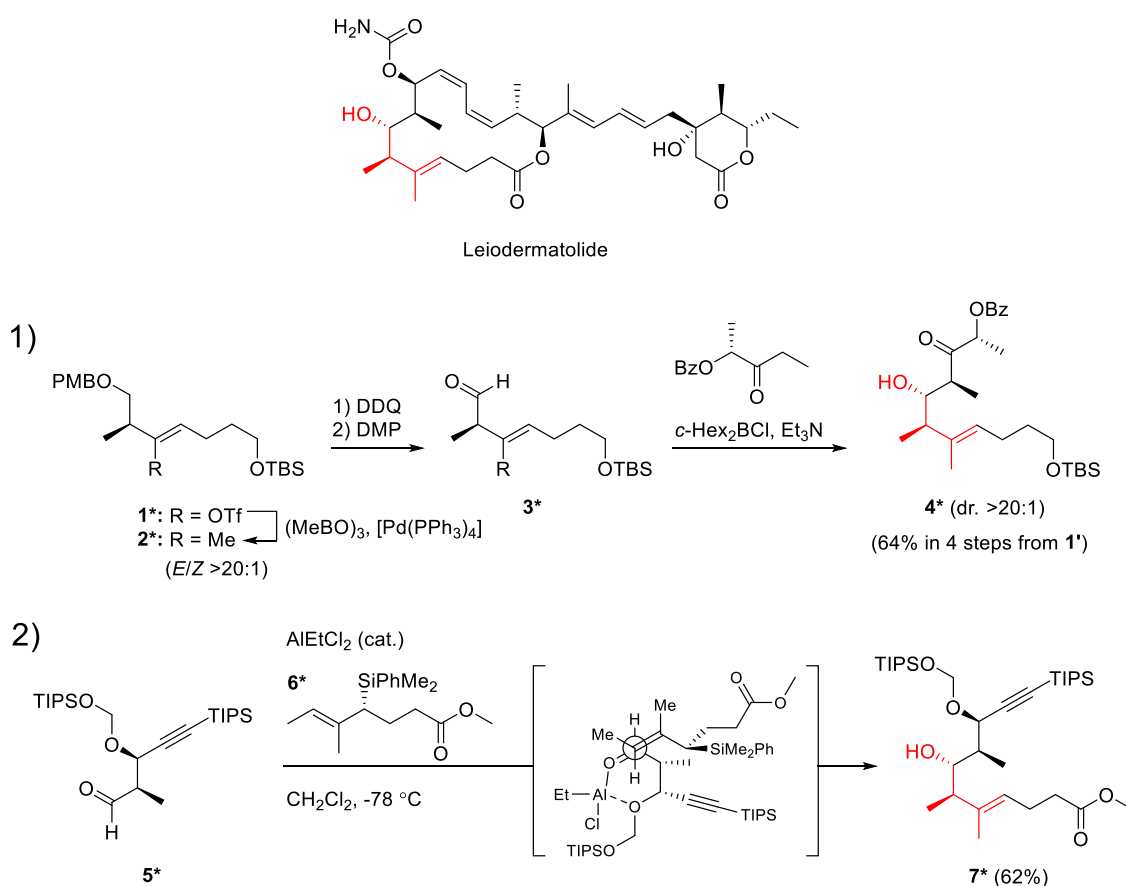
第1項 (18*R*,19*R*)-iezoside の合成戦略

(18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) の逆合成解析を **Scheme 4-2** に示す。(18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) はポリケチド配糖体 **28** とトリペプチド **29** を別々に合成し、最後に縮合する収束的な合成法を採用することとした。対応するポリケチド配糖体 **28** については、構造活性相関研究への展開を見据えて合成終盤でグリコシル化を行うこととした。不飽和エステル **30** は、三級アリルアルコール **31** を PDC を用いた転位反応により末端アルデヒドとし、続く Horner-Wadsworth-Emmons 反応で炭素鎖を伸長することとした。三級アリルアルコール **31** は Weinreb アミド **32** に2度の Grignard 反応を行うことで合成することとした。C-18 および C-19 の2つの不斉点については、Evans-*syn*-aldol 反応¹¹⁶により構築し、右側のジエンは既知反応¹¹⁷より合成することとした。トリペプチド **29** は、Leu 由来のチオアミド **38** を既知反応¹¹⁸により環化することでチアゾール **37** を構築し、その後 *N*-Boc-*N*-Me-D-Ala (**36**) と縮合することで合成することとした。



Scheme 4-2. (18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) の逆合成解析

本合成において鍵となるのは① C-17 から C-19 にかけての三連続置換基 (ビニルメチル基-メチル基-水酸基) の構築、②グリコシル化である。①については、主鎖に対し三連続で置換基が並ぶことで立体障害が増大するため、その合成には工夫を要する。また、このような部分構造を有する天然物は非常に稀で、統一的な構築手法は存在しない。同様の部分構造を持つ *leiodermatolide* の全合成研究において、Paterson らは不斉炭素を有するビニルトリフラートに対し、トリメチルボロキシンのを用いた鈴木-宮浦カップリングによってビニルメチル基を導入し、末端水酸基をアルデヒドに変換後、彼らの研究グループが見出した *c*-Hex₂BCl 支配型の *anti*-aldol 反応¹¹⁹ により立体選択的に水酸基を構築している¹²⁰。一方、Krische らはアルデヒド **5*** とアリルシラン **6*** に対しルイス酸である AlEtCl₂ を触媒量作用させ、アルミニウムのキレーションによりアルデヒド **5*** の配座を固定することで立体選択的な細見・櫻井アリル化反応¹²¹ を行い、一挙に当該の部分構造を有する化合物 **7*** を合成している¹²² (Scheme 4-3)。

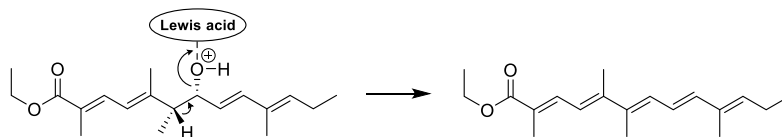


Scheme 4-3. *Leiodermatolide* の全合成におけるビニルメチル基-メチル基-水酸基の構築

1) Paterson らによる合成 2) Krische らによる合成

これらの反応は高収率かつ高い立体選択性を与えているが、いずれも複雑な基質を設計する必要があり、その合成に多段階を要している。Iezoside (5) は当該のビニルメチル基が $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和アミド中に組み込まれているため、基質設計がさらに煩雑になる上、脱離基が脱離する過程での望まない異性化が懸念される。このような背景を鑑み、iezoside (5) のポリケチド部分の炭素鎖は、先に末端エチル基側の共役ジエンを構築した後、Evans-*syn*-aldol 反応¹¹⁶により二箇所の不斉点を一挙に構築し、その後クロム酸を用いた酸化的転位により三級アリルアルコールから不飽和アルデヒドを構築することを計画した。

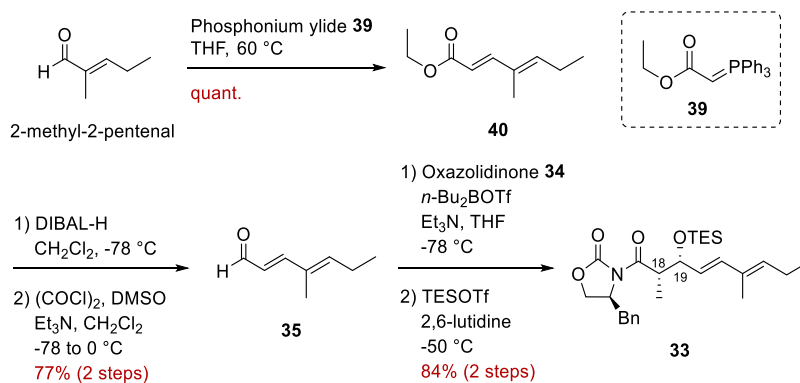
②については、iezoside (5) は $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和アミドと共役ジエンの間にグリコシド結合が形成されている前例の無い構造を有している。合成終盤でのグリコシル化を行う際、ルイス酸がグリコシルドナーより先にアクセプターの水酸基に配位した場合、オキソニウムカチオンの生成に加え、共鳴安定効果により水酸基がより脱離しやすくなることによる不飽和ペンタエンエステルの生成が懸念される (Scheme 4-4)。そこで、本合成では比較的穏やかなルイス酸性を有するルイス酸を用いたグリコシル化を検討することとした。グリコシド結合の立体選択性に関しては、ラムノース型の糖はグリコシル化の際に α -グリコシド結合が優先して生成されることが報告されているため¹²³、良い立体選択性が得られると考えた。



Scheme 4-4. ルイス酸添加時に予想される脱水反応

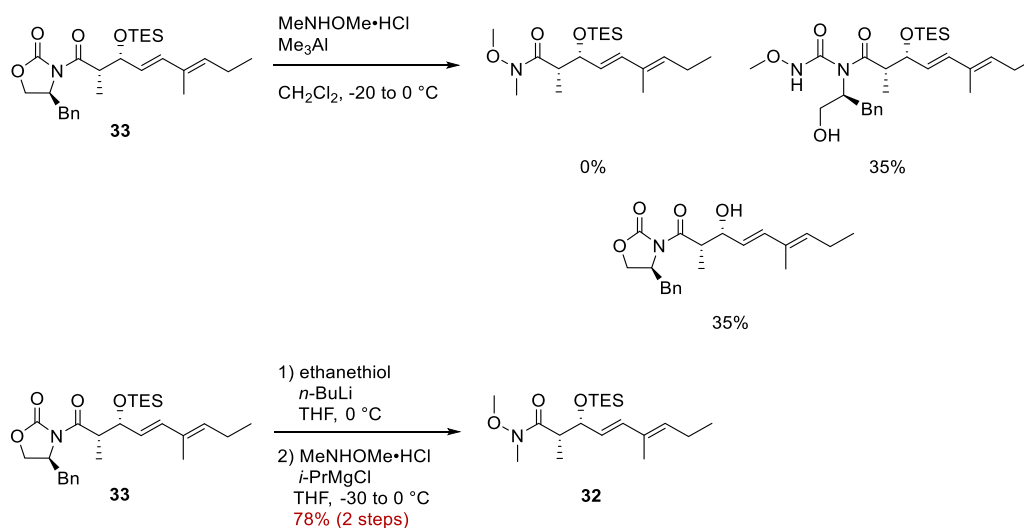
第2項 (18*R*,19*R*)-iezoside の合成

まず、脂肪酸部の合成に着手した (Scheme 4-5)。購入可能な 2-methyl-2-pentenal を出発原料とし、既知のホスホニウムイリド **39** を用いて加熱条件下 Wittig 反応を行うことで既知のエステル **40** を得た¹¹⁷。DIBAL を2当量用いてエステルをアリルアルコールに還元し、続く Swern 酸化によってアルデヒド **35** を合成した。Evans-*syn*-aldol 反応¹¹⁶を用いて (18*R*,19*R*)-アルドール体を単一のジアステレオマーとして合成し、TESOTf、2,6-lutidine 条件下で水酸基を保護することで **33** を得た。得られたジアステレオマーの水酸基の絶対立体配置については、**33** の TES 基脱保護体に対し改良 Mosher 法¹⁰⁵を適用することで 19*R* 体であることを確認した。18 位については、同じく **33** の脱保護体を LiBH₄ で還元し、1,3-ジオールとした後アセトニド保護を行い、生成した六員環の結合定数および NOE 相関から C-19 位に結合する水酸基と *syn* の関係にあることを確かめた (第6章 第4節参照)。以上より、目的物の立体化学を確認した。



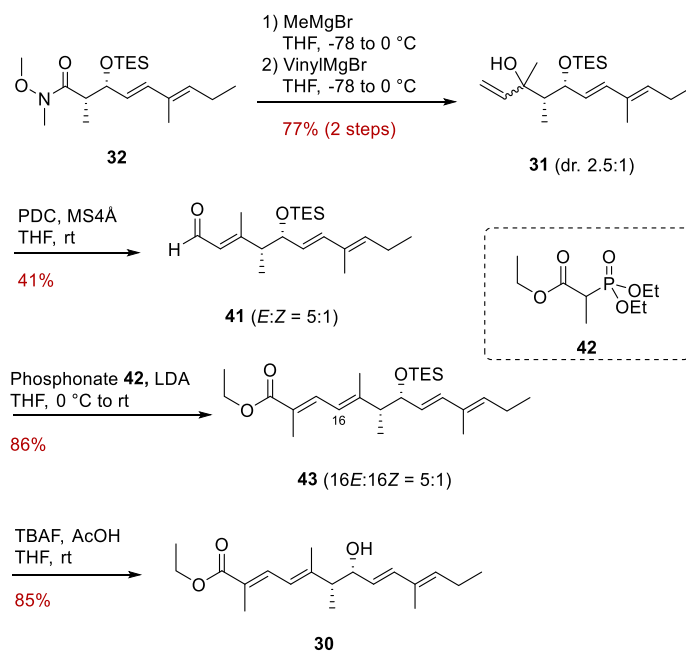
Scheme 4-5. (18*R*,19*R*)-アルドール体 **33** の合成

続いて、 Me_3Al を用いてアルドール体 **33** を Weinreb アミド **32** へ変換しようと試みたが、望む化合物は得られず、代わりに環状カーバメートが開環した生成物、および原料の脱 TES 体得られた。本反応は $-30\text{ }^\circ\text{C}$ の低温条件下で行っても同様の結果を与えた。立体化学は異なるものの、類似した構造のアルドール体で同様の結果を与える事が複数の先行研究から報告されていたため、Evans および清田らの既報¹²⁴を参考にまずチオエステル化し、続いて *N,O*-dimethylhydroxylamine の付加を行ったところ良好な収率で目的物 **32** が得られた (Scheme 4-6)。



Scheme 4-6. Weinreb アミド **32** への変換

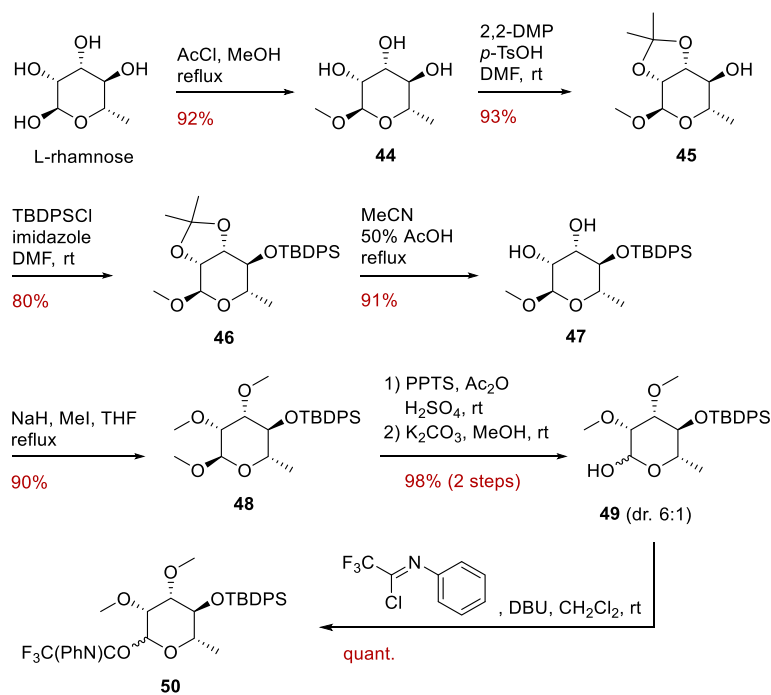
次に、三置換オレフィンを有する不飽和アルデヒド **41** の構築を行った (Scheme 4-7)。Weinreb アミド **32** に対し MeMgBr および VinylMgBr を作用させ、二度の Grignard 反応により三級アリルアルコール **31** のジアステレオマー混合物 (2.5:1) を得た。続いて、**31** に対しクロム酸を用いた酸化転位により、不飽和アルデヒド **41** を合成することを試みた。PCC を用いた反応では目的物は一切得られず、複雑な生成物を与えた。反応系中の酸性度を減弱する目的で PCC をアルミナに担持させた担体を用いて反応を行ったが、こちらも複雑な生成物を与えるのみであった。一方で、PDC を用いた反応においては、収率 41%、*E:Z* = 5:1 の異性体比で目的の不飽和アルデヒド **41** を与えた。得られたアルデヒドに対して、市販のホスホネート **42** を用いて Horner-Wadsworth-Emmons 反応に供することで、*E* 体特異的に不飽和エステル **43** を合成した。TES 基の除去においては、TBAF を用いた条件では複雑な生成物を与えた。これは、TBAF の塩基性により逆アルドール反応が進行したことが予想されたため、TBAF/酢酸条件下で穏和に TES 基を除去することでグリコシル化のアクセプターとなる不飽和エステル **30** を合成した。PDC 酸化の際に生成した不要な 16*Z* 体は、ここで分離することができた。以上の反応により、iezoside (**5**) ポリケチド部分の全炭素鎖を構築した。



Scheme 4-7. 不飽和エステル **30** の合成

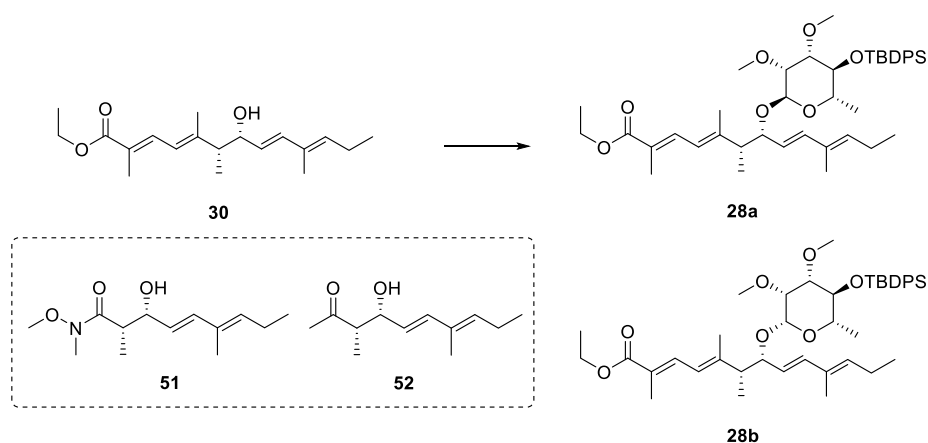
糖部分である 2,3-*O*-dimethyl- α -L-rhamnose の合成は、Schroeder らの既報¹²⁵を参考に行った (Scheme 4-8)。市販の L-rhamnose に対しヘミアセタール部位をメチルアセタールとした後、2位と3位の水酸基をアセトニドで保護した **45** を得た。次に4位の水酸基を TBDPSCI、imidazole 条件下で保護し、アセトニドを脱保護後、強塩基条件下で2位と3位の水酸基をメチル化することで **48** を得た。糖 **48** をアセタートへ変換した後、続く脱アセチル化によってジアステレオマー比 6:1 で糖 **49** を得た。

続いて、グリコシル化を行うためのドナー調製を行った。これまでに様々なグリコシル化のドナー/ルイス酸の組み合わせが設計・報告されているが¹²⁶、今回は比較的中性に近い条件で行うことができ、調製が簡便かつ精製可能なイミドイル糖¹²⁷を選択した。糖 **49** に対し 2,2,2-trifluoro-*N*-phenylacetimidoyl chloride を DBU 存在下作用させ、イミドイル糖 **50** を得た。



Scheme 4-8. イミドイル糖 **50** の合成

合成した不飽和エステル **30** およびイミドイル糖 **50** を用いて、MS4Å 存在下でグリコシル化を検討した (Table 4-4)。強いルイス酸性を示す $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ や TMSOTf を使用すると、反応を開始後、即座に複雑な生成物を与え目的物は全く得られなかった。また、安定な基質である Weinreb アミド **51** や、ケトン **52** を用いたグリコシル化も検討したが、反応が進行せず原料回収となった。これは、 β -ヒドロキシカルボニル構造が分子内で強固な水素結合を形成し、水酸基の反応性が大幅に低下しているためと予想された。検討の結果、不飽和エステル **30** に対し、穏和なルイス酸である $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ ¹²⁸ や AgOTf ¹²⁹ を用いることでグリコシル化が進行することを発見し、最終的に $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ を用いて収率 59 % で目的の α -グリコシド **28a** を得た。

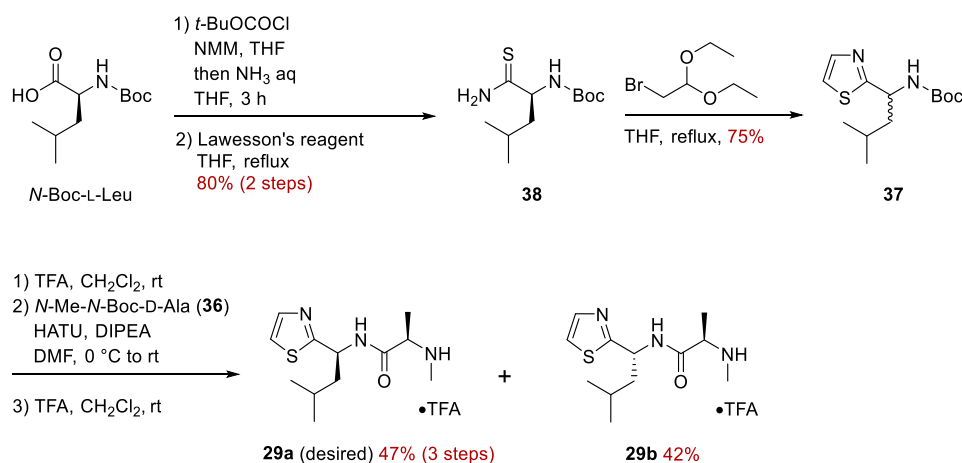


Entry	基質	ルイス酸	溶媒	反応温度 (°C)	収率 (%)	
					28a	28b
1	30	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	CH_2Cl_2	-78	0	
2	30	TMSOTf	CH_2Cl_2	-78	0	
3	51	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	CH_2Cl_2	-78 to rt	0**	
4	52	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	CH_2Cl_2	-78 to rt	0**	
5	30	$\text{Sm}(\text{OTf})_3$	Mixture*	-20 to 0	58	19
6	30	AgOTf	CH_2Cl_2	rt	49	15

* $\text{Et}_2\text{O}/1,4\text{-dioxane} = 4:1$ **Starting material was recovered.

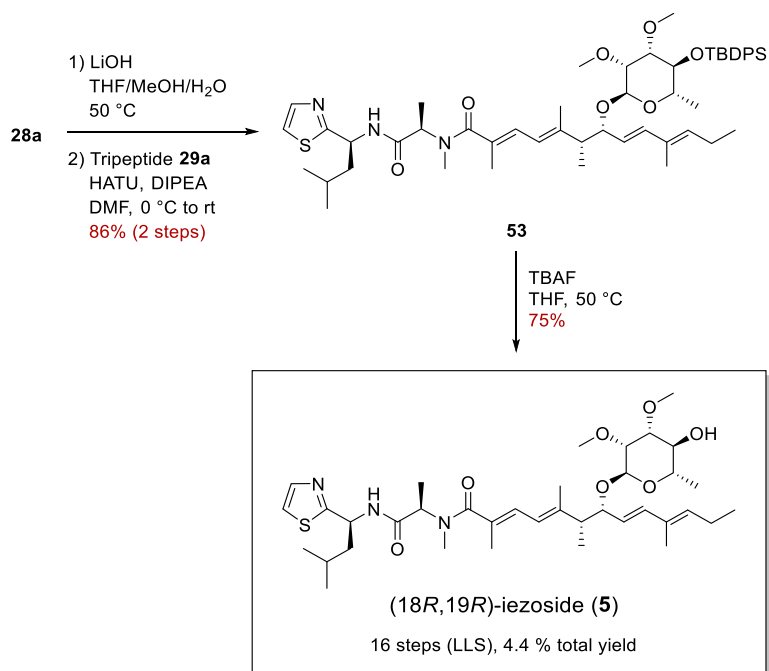
Table 4-4. グリコシル化の条件検討

次に、トリペプチド **29** の合成を行った (Scheme 4-9)。L-Leu を原料として先行研究¹³⁰を基にチオアミド **38** に変換し、Holzapfel の報告¹³¹ を参考に末端チアゾールを有するジペプチド **37** を合成した。Holzapfel らは末端チアゾールを合成する際、隣接するアミノ酸の立体化学は保持されると報告している。しかし、得られたジペプチドは約 25% がラセミ化しており、また収率の再現性も乏しかった(データ省略)。続いて Wills、Nagendra のチアゾール合成法¹¹⁸ を検討した。こちらもアミノ酸の立体化学が保持されると報告しているが、得られたジペプチドはラセミ体であった。最終的に、後者の反応で合成したラセミ体のジペプチド **37** の Boc 基を除去し、*N*-Me-*N*-Boc-D-Ala (**36**) を縮合した。再度 Boc 基を除去後、HPLC を用いてジアステレオマーを分離し、所望の立体配置を持つトリペプチド **29a** を単離した。生成物 **29a** 中の L-Leu の立体配置は天然物と同様にオゾン酸化、酸加水分解により分取し、キラルカラムを用いて L 体であることを確かめた。



Scheme 4-9. トリペプチド **29** の合成

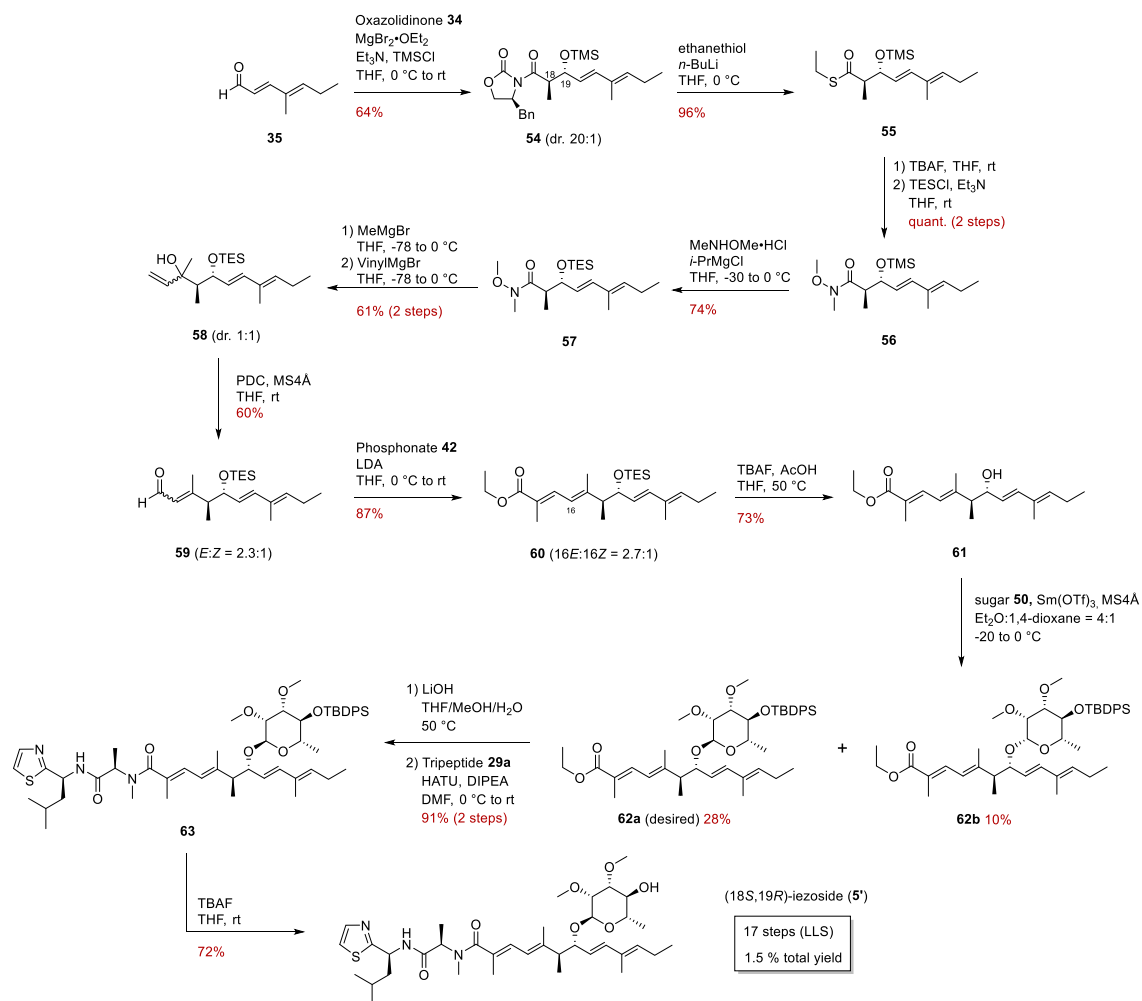
その後、グリコシド **28a** を塩基性条件下で加水分解し、トリペプチド **29a** と縮合を行うことで良好な収率でグリコシド **53** を得た。最後に、加熱条件下 TBAF を作用させることで TBDPS 基を脱保護し、(18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) の全合成を達成した (Scheme 4-10, 2-methyl-2-pentenal からの最長直線工程数: 16 段階、総収率: 4.4 %)。



Scheme 4-10. (18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) の全合成

第3項 (18*S*,19*R*)-iezoside の合成

(18*S*,19*R*) 体については、2箇所の不斉点を Evans-*anti*-aldol 反応¹³²によって構築し、その他の合成については (18*R*,19*R*) 体と同様の手法で合成した (Scheme 4-11)。最終的に、(18*S*,19*R*)-iezoside (5') の全合成を達成した(2-methyl-2-pentalenal からの最長直線工程数: 17段階、総収率: 1.5%)。



Scheme 4-11. (18*S*,19*R*)-iezoside (5') の合成

第4項 Iezoside の天然品と合成品のスペクトルデータの比較

合成した (18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) および (18*S*,19*R*)-iezoside (**5'**) の各種スペクトルデータを天然品のデータと比較したところ、(18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) が天然品と良い一致を示した (Figure 4-10, 4-11)。以上より、iezoside (**5**) の全ての絶対立体配置を決定するとともに、その全合成を達成した。また、立体決定のために行った DFT 計算が本合成を通じて妥当であることが示された。

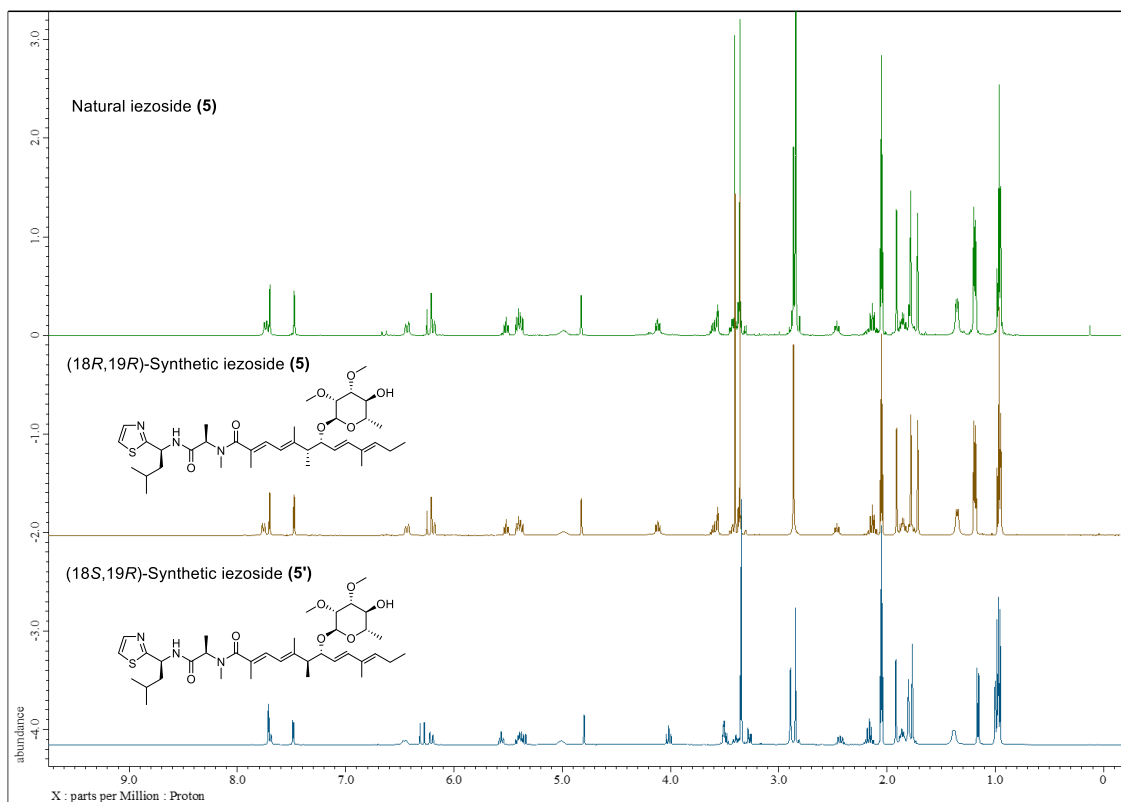


Figure 4-10. 天然品と合成品の ^1H NMR $\{(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 400 \text{ MHz}\}$ スペクトルデータの比較

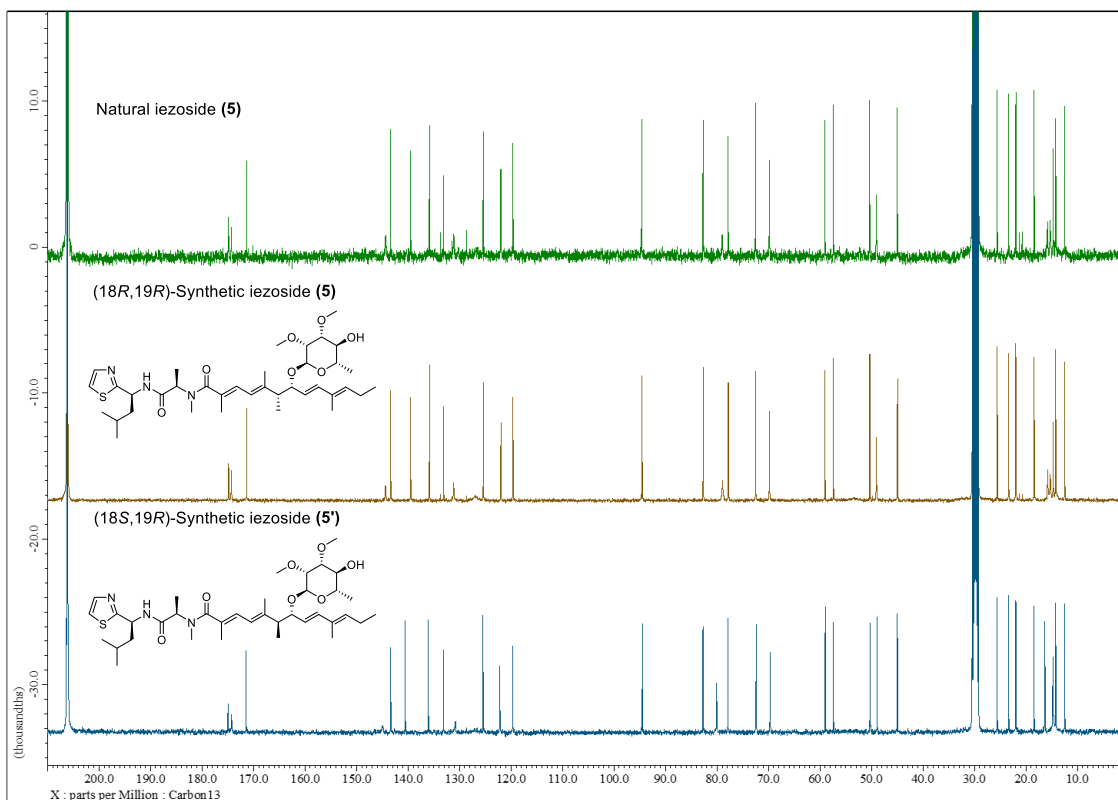


Figure 4-11. 天然品と合成品の ^{13}C NMR $\{(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 100 \text{ MHz}\}$ スペクトルデータの比較

第5節 Iezoside の生物活性

第1項 Iezoside のがん細胞増殖阻害活性

海洋シアノバクテリアより単離した天然品の iezoside (**5**)、合成した (18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) および (18*S*,19*R*)-iezoside (**5'**) について、子宮頸がん細胞 HeLa に対する増殖阻害活性を測定した (Table 4-5)。その結果、天然品の iezoside (**5**) は IC₅₀ 6.8 ± 0.3 nM で極めて強力な増殖阻害活性を示した。また、合成した (18*R*,19*R*)-iezoside (**5**) は天然品と同等の増殖阻害活性を示す (IC₅₀ 6.7 ± 0.4 nM) 一方で、そのジアステレオマーである (18*S*,19*R*)-iezoside (**5'**) は約 280 倍活性が低下した (IC₅₀ 1880 ± 70 nM)。この結果から、C-18 位の立体配置が増殖阻害活性に重要であることが示唆された。

Table 4-5. HeLa に対する増殖阻害活性

Compound	IC ₅₀ (nM)
Natural iezoside (5)	6.8 ± 0.3
(18 <i>R</i> ,19 <i>R</i>)-iezoside (5)	6.7 ± 0.4
(18 <i>S</i> ,19 <i>R</i>)-iezoside (5')	1880 ± 70
Adriamycin (positive control)	650 ± 82

また、iezoside (5) が HeLa に誘導する表現型を観察すると、iezoside (5) は HeLa に対し処理後 24 時間で細長い紡錘形の形態変化を誘導し、その後アポトーシス様の細胞死を誘導した (Figure 4-12)。興味深いことに、 IC_{50} 以上の濃度域でも約 20-30% の細胞が生存していた (Figure 4-13)。

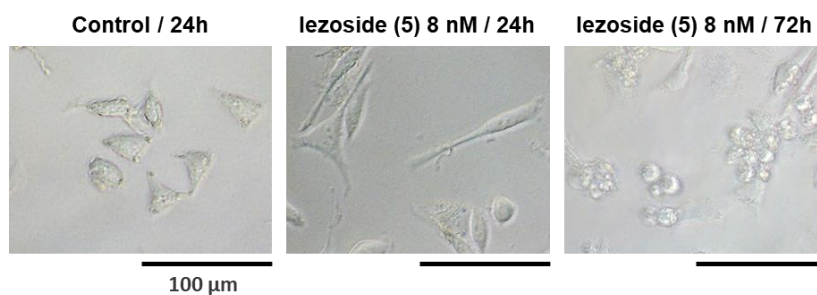


Figure 4-12. HeLa に対する iezoside (5) が誘導する表現型の変化

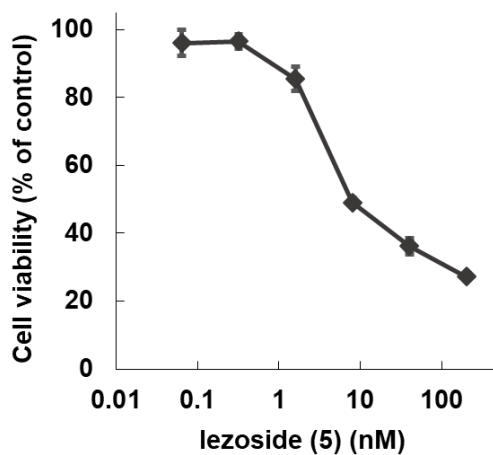


Figure 4-13. HeLa に対する iezoside (5) の増殖阻害活性

第2項 Iezoside の細胞周期遅延活性

プロテアソーム阻害剤や HDAC 阻害剤など、細胞周期を G₁ 期で停止させる薬剤は HeLa に特徴的な形態変化を誘導することが報告されている¹³³。そこで iezoside (5) が誘導する表現型に着目し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期に与える影響を解析した。その結果、iezoside (5) 10 nM、24 時間処理した HeLa において、G₁ 期細胞の有意な増加および S 期細胞の有意な減少が認められた (Figure 4-14)。一方で、iezoside (5) が誘導する S 期細胞の減少は穏やかであり、G₂/M 期細胞もコントロールと同程度の割合で観察された。このことから、iezoside (5) は細胞周期を G₁/S 期で停止させるのではなく、G₁/S 期において細胞周期を遅延させることが示唆された。

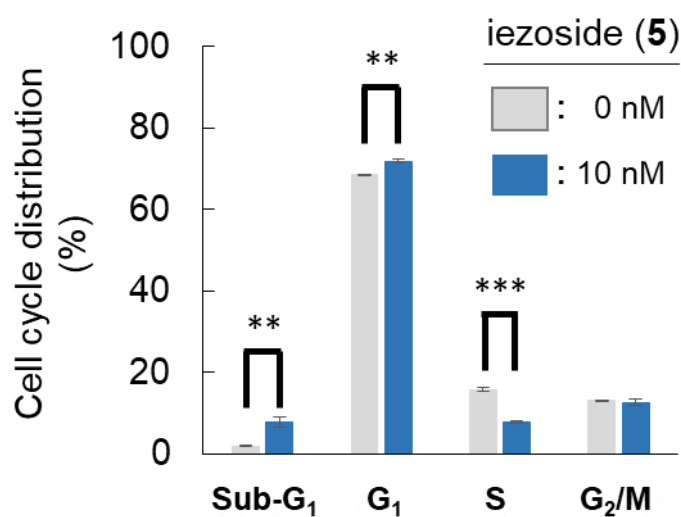


Figure 4-14. Iezoside (5) 処理による細胞周期への影響
(** : $p < 0.05$, *** : $p < 0.005$)

第3項 がん細胞パネルスクリーニングによる作用機序の推定

がん細胞に対し強力な増殖阻害活性を示す **iezoside (5)** に対し、その作用機序を同定する手がかりとして、公益財団法人がん研究会の協力のもと 39 種類のヒトがん細胞パネルスクリーニングである Japanese Foundation for Cancer Research 39 (JFCR39) を実施した¹³⁴。

本手法では対象化合物の 39 種のヒトがん細胞に対する増殖阻害活性を測定し、得られた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、生物活性物質の標的分子/作用機序に応じてそれぞれ特有のパターンを形成することが知られている。これを利用し、標的分子/作用機序既知の生物活性物質のフィンガープリントと比較することで、生物活性物質の作用機序を推定することができる。また、どのフィンガープリントとも相同性が低い場合、対象化合物は新規の作用機序を有することが期待される。具体的には、相関係数 r について $0.75 \leq r$ の場合は同様の作用機序を持つことが強く示唆され、 $0.50 \leq r < 0.75$ の場合は類似した作用機序を持つことが示唆される。

解析の結果、**iezoside (5)** は 39 種のがん細胞について平均 GI_{50} 87 nM で増殖阻害活性を示した (**Figure 4-15, Table 4-6**)。また、各種がん細胞に対する感受性には大きな開きがあり、特有の標的分子を有することが示唆された。このフィンガープリントを既知の生物活性物質のものと比較した結果、**iezoside (5)** はカルシウムイオノフォアである A23187¹³⁵、小胞体膜上のカルシウムポンプである sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) の阻害剤である thapsigargin¹³⁶ とそれぞれ $r=0.685$ 、 $r=0.620$ で高い相関係数を示した (**Figure 4-16**)。

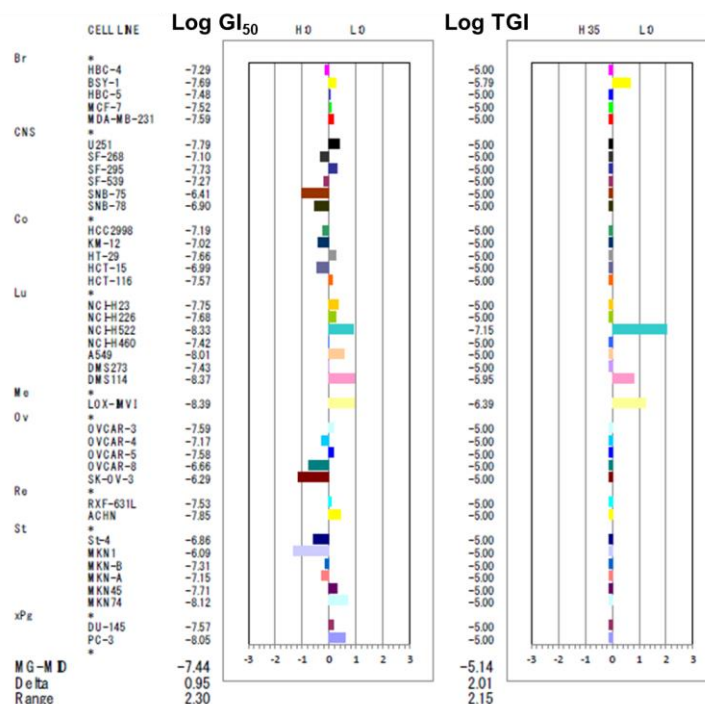
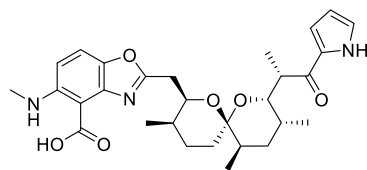
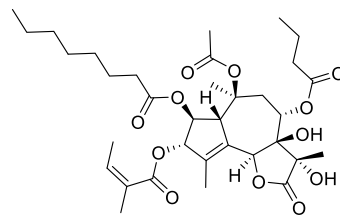


Figure 4-15. Iezoside (5) のフィンガープリント



A23187

Ca²⁺ ionophore



Thapsigargin

SERCA inhibitor

Figure 4-16. Iezoside (5) のフィンガープリントと高い相関係数を示した生物活性物質

Table 4-6. 39 種のがん細胞に対する GI₅₀

Type of cancer	Cell type	GI ₅₀ (nM)	Type of cancer	Cell type	GI ₅₀ (nM)
Breast	HBC-4	51		A549	9.7
	BSY-1	20		DMS273	37
	HBC-5	33		DMS114	4.3
	MCF-7	30	Melanoma	LOX-IMVI	4.0
	MDA-MB-231	26	Ovary	OVCAR-3	26
Central nervous system	U251	16		OVCAR-4	67
	SF-268	80		OVCAR-5	26
	SF-295	19		OVCAR-8	220
	SF-539	54		SK-OV-3	520
	SNB-75	390	Kidney	RXF-631L	30
	SNB-78	130		ACHN	14
Colon	HCC2998	65	Stomach	St-4	140
	KM-12	95		MKN1	800
	HT-29	22		MKN7	49
	HCT-15	100		MKN28	70
	HCT-116	27		MKN45	19
Lung	NCI-H23	18		MKN74	7.5
	NCI-H226	21	Prostate	DU-145	27
	NCI-H522	4.7		PC-3	8.9
	NCI-H460	38			

第4項 細胞質内 Ca^{2+} 濃度の測定

第3項の結果から、iezoside (5) は A23187 や thapsigargin と類似の作用機序を持つことが示唆された。A23187 は Ca^{2+} と直接結合し、細胞外から細胞質内へ Ca^{2+} を運搬するイオノフォアとしてはたらく¹³⁵。一方、thapsigargin は SERCA の機能を阻害することで小胞体内への Ca^{2+} の取り込みを阻害し、リアノジン受容体やイノシトール三リン酸受容体などの Ca^{2+} チャンネルが小胞体内の Ca^{2+} を細胞質に放出し続けることで小胞体ストレスを誘導し、細胞死を誘導する¹³⁶。この2種の薬剤は、細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる点で共通していることから、iezoside (5) も同様の機序を有することが予想された。そこで、 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬である Fura-2 を用い、iezoside (5) を処理した HeLa の細胞質内 Ca^{2+} 濃度を定量した。この際、細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇における Ca^{2+} が細胞内のものに由来するかを確認するため、 Ca^{2+} が含まれない PBS (-) で細胞を洗浄した。結果として、iezoside (5) を処理すると、thapsigargin と同様に細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた (Figure 4-17)。本実験条件では Ca^{2+} イオノフォアは細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘導しないため、iezoside (5) は thapsigargin に類似した作用機序を有することが強く示唆された。

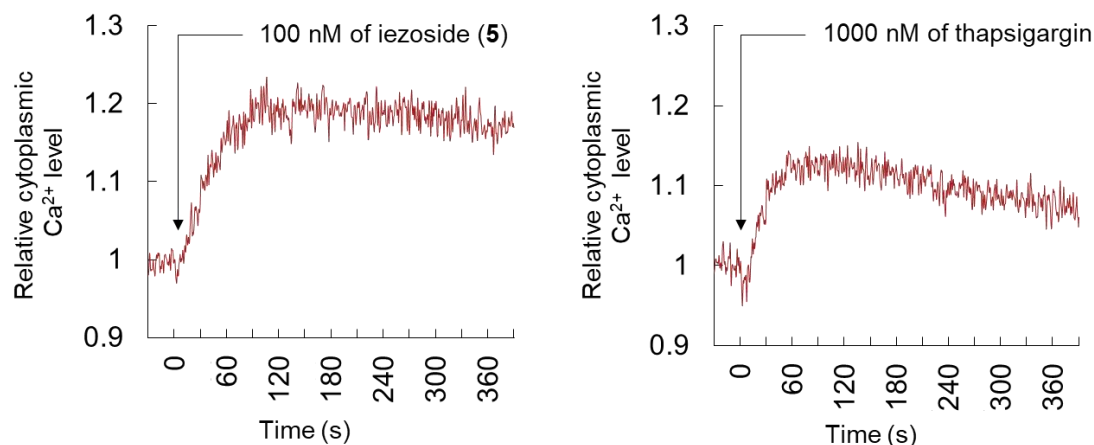


Figure 4-17. Iezoside (5) および thapsigargin 処理時の細胞質内 Ca^{2+} 濃度の変化

第 5 項 Iezoside と既知の SERCA 阻害剤が HeLa に誘導する形態変化の比較

第 4 項の実験から、iezoside (5) が SERCA の機能を阻害して細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが示唆された。そこで、iezoside (5) が HeLa に特徴的な形態変化を誘導することを利用し、既知の SERCA 阻害剤である thapsigargin および cyclopiazonic acid¹³⁷ が同様の形態変化を誘導するか確かめた。その結果、24 時間の薬剤処理において両者は iezoside (5) と酷似した細長い紡錘形の表現型を誘導したことから、iezoside (5) の細胞内標的分子が SERCA であることが強く示唆された (Figure 4-18)。

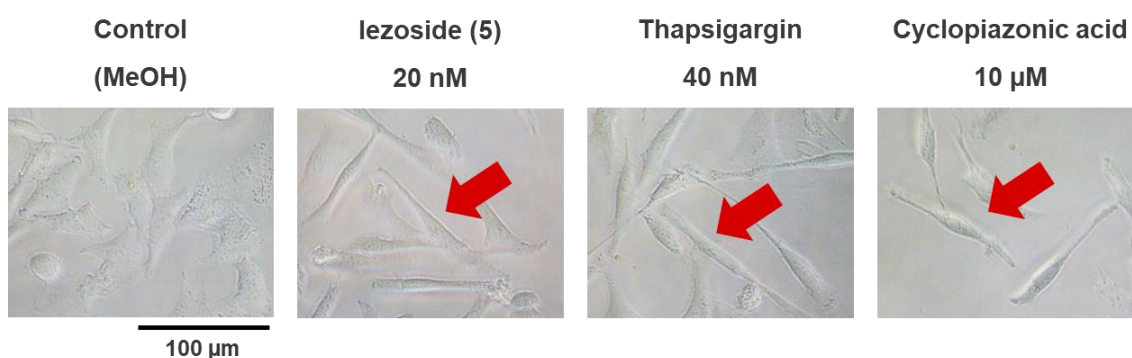


Figure 4-18. HeLa に誘導する形態変化における iezoside (5) と SERCA 阻害剤の比較

第6項 Iezoside の SERCA 阻害活性の評価

これまでの実験結果から、iezoside (5) が SERCA の機能を阻害することが強く示唆された。そこで、ウサギ後肢より単離した骨格筋の筋小胞体を用いて coupled enzyme assay により iezoside (5) の SERCA 阻害活性を評価した¹³⁸。本実験系では、酵素反応に必要なピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素、ホスホエノールピルビン酸、NADH、筋小胞体 (= Ca²⁺ ATPase) を測定バッファー中に混合し、ここに ATP を加えると ATPase が ATP を ADP に、ピルビン酸キナーゼが ADP を利用してホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に、乳酸脱水素酵素が NADH を利用してピルビン酸を乳酸にそれぞれ変換する。この際、NADH は NAD⁺ へ酸化される。NADH の吸収波長である 340 nm の吸光度をモニターし、その消費速度を測定することで間接的に ATPase 活性を評価することができる (Figure 4-19)。

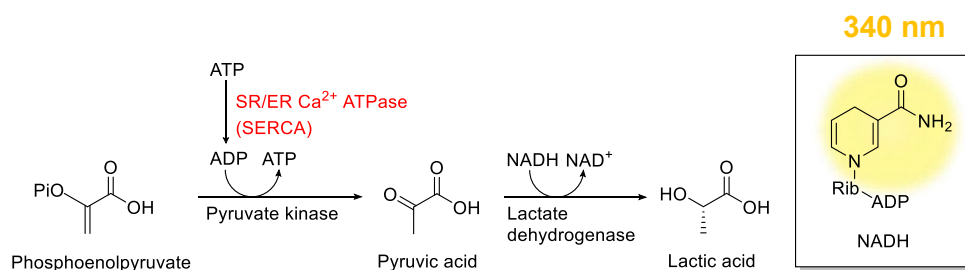


Figure 4-19. Coupled enzyme assay を用いた SERCA 阻害活性の評価法

上記の手法により iezoside (5) の SERCA 阻害活性を測定した結果、iezoside (5) は 50% 阻害濃度 Ki 7.1 nM で SERCA の ATPase 活性を阻害した。現在、最も強力な SERCA 阻害剤として知られている thapsigargin¹³⁹、2 番目に強力な biselyngbyaside⁷² の報告されている Ki 値はそれぞれ 0.2-1.3 および 19 nM であり、iezoside (5) が既存の SERCA 阻害剤において最強クラスの阻害活性を有することが判明した (Figure 4-20)。

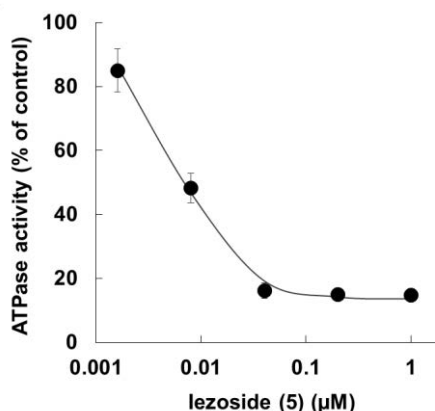


Figure 4-20. Iezoside (5) の SERCA 阻害活性

第7項 Iezoside が誘導する細胞内シグナル伝達の解析

第6項の実験結果から、iezoside (5) の標的分子が SERCA であることが明らかとなった。そこで、iezoside (5) が SERCA を阻害することで誘導される細胞内シグナル伝達について、ウエスタンブロッティングを用いて解析した。

小胞体は、分泌経路において新しく合成されたタンパク質が正しく折りたたまれて成熟していく細胞内小器官である。小胞体内では細胞環境の変化などを受けて折り畳みの不完全なタンパク質が発生しやすく、タンパク質の品質管理機構が発達している。小胞体でタンパク質毒性ストレス(小胞体ストレス)が発生すると、ストレス応答 (UPR) を起こすことで蓄積した不良タンパク質を減少させる。まず、不良タンパク質のさらなる増加を緊急回避する応答として、タンパク質合成の抑制と分解の亢進が起こる。続いて、遺伝子発現誘導による適応応答により、プロテオスタシス制御に関わる多様な UPR 標的遺伝子の発現が誘導される。その代表的な一例として、ストレス下で活性化した PERK は、翻訳開始因子の eIF2 α をリン酸化する。これにより恒常的なタンパク質合成を抑制する一方で、転写因子 ATF4 の選択的な翻訳を促進する。これらの転写因子群によって誘導される UPR 標的遺伝子の多くは、小胞体でのフォールディング促進や、ユビキチン・プロテアソームやオートファジーなどのタンパク質分解系を亢進させ、小胞体ストレスを軽減させる。しかし、過剰な小胞体ストレスにより恒常性の維持が困難と判断されると、これらの UPR シグナル伝達経路はアポトーシスによる細胞死誘導に移行する。例として、上述した ATF4 はアポトーシスの亢進に関わる転写因子 CHOP の発現を誘導することが知られている¹⁴⁰ (Figure 4-21)。

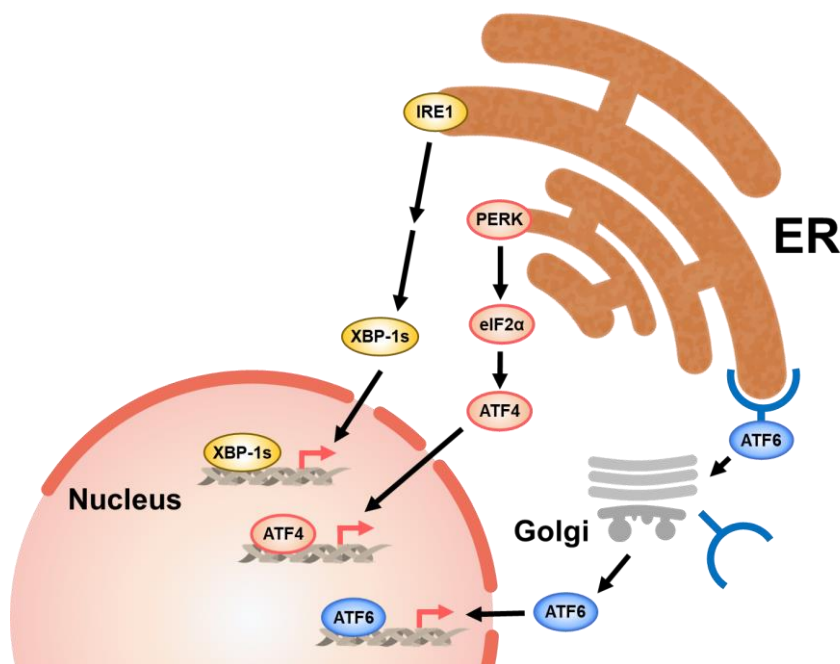


Figure 4-21. 小胞体ストレスにおける代表的な細胞内シグナル伝達¹⁴⁰

Thapsigargin をはじめとする SERCA 阻害剤は、小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させることで小胞体ストレスを誘導し、アポトーシスを導くことが知られている。Thapsigargin を用いた先行研究や SERCA の分子生物学的解析により、以下の知見が得られている。

- ① Thapsigargin は、 IC_{50} 以上の濃度で処理しても細胞が一定数生存する^{141,142}。
- ② Thapsigargin が各種がん細胞株に対し、細胞周期 G_1/S 期 サイクリンキナーゼ阻害因子である p21¹⁴³ の発現を誘導する^{141,144}。
- ③ 小胞体ストレス応答転写因子の 1 つである ATF4 が、p21 の発現を上昇させる。また、thapsigargin は本経路を活性化する¹⁴¹。
- ④ p21 はアポトーシスを抑制するタンパク質としてもはたらく。実際に、p21 を過剰発現した MCF-7 乳がん細胞では thapsigargin の細胞毒性が低下する¹⁴¹。
- ⑤ ラット大動脈内皮細胞において、アミノ酸変異を加えて SERCA の ATPase 活性を低下させると mRNA レベルで p21 の発現量が増加する。また、それに伴う増殖遅延が発生する¹⁴⁵。

これらの先行研究を考慮し、iezoside (5) ががん細胞に示す増殖阻害活性、および細胞周期遅延活性の作用メカニズムの仮説について、次のように考えた。

- (1) Iezoside (5) が SERCA を阻害する。
- (2) 小胞体内の Ca^{2+} が枯渇することで、小胞体ストレスが発生する。
- (3) UPR シグナル伝達経路が活性化し、応答転写因子の 1 つである ATF4 が発現する。
- (4) ATF4 が下流の p21 および CHOP の発現を誘導する。
- (5) CHOP は下流のカスパーゼの活性化、PARP の切断を介してアポトーシスを誘導する。
一方で、p21 は下流の RB の脱リン酸化を亢進し⁴⁸、細胞周期を G_1/S 期で遅延させる。
- (6) p21 がアポトーシスを部分的に抑制する。

上記の仮説に基づき、各タンパク質について iezoside (5) を処理した際の時間依存的な発現変動をウェスタンブロットィングで解析した。

ウエスタンブロッティングより得られた結果を **Figure 4-22** に示す。まず、小胞体ストレスが誘導する各種経路の上流タンパク質(転写因子)となる ATF4 の発現量を解析すると、iezoside (5) 30 nM 処理後 6 時間から発現上昇が認められた。また、細胞周期 G₁/S 期の停止や遅延に関与する p21 は処理後 24 時間で発現上昇が認められた。下流の RB のリン酸化についても、同様のタイムスケールでの脱リン酸化が確認された。また、アポトーシスを誘導する CHOP の発現上昇、PARP の切断は ATF4 の発現上昇に伴い増加した。PARP の切断は iezoside (5) 処理後 24 時間以降に顕著な増加を示しており、MTT assay において処理後 24 時間以降に細胞死が起こり始める観察結果と良く一致する。

以上の結果より、iezoside (5) は SERCA を阻害することで小胞体ストレスを誘導し、ATF4 の発現上昇を鍵としてアポトーシス誘導シグナルと細胞周期遅延シグナルの両方を亢進することを明らかにした (**Figure 4-23**)。また、p21 はアポトーシスを抑制する機能も有していることから、IC₅₀ 以上の濃度の iezoside (5) 処理でも、一定数の細胞が生存するのは両経路が拮抗するためであることが示唆された。

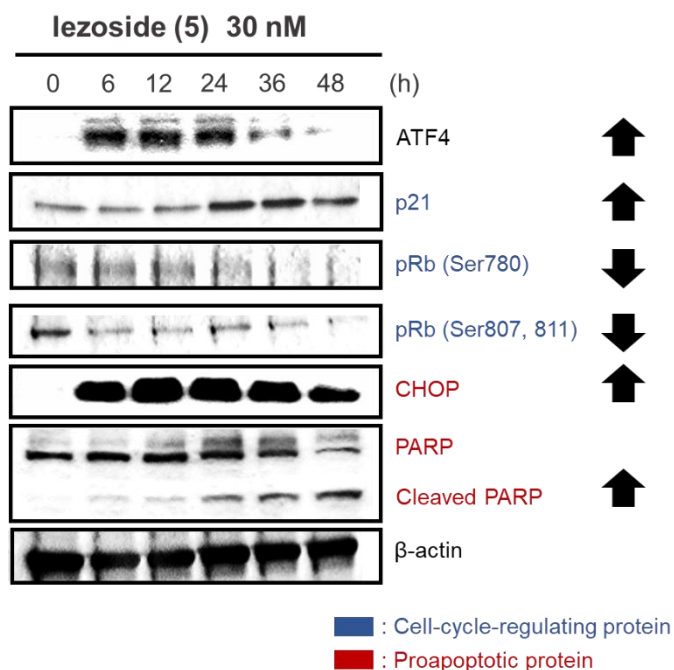


Figure 4-22. Iezoside (5) 処理時間依存的な細胞内シグナル伝達の解析

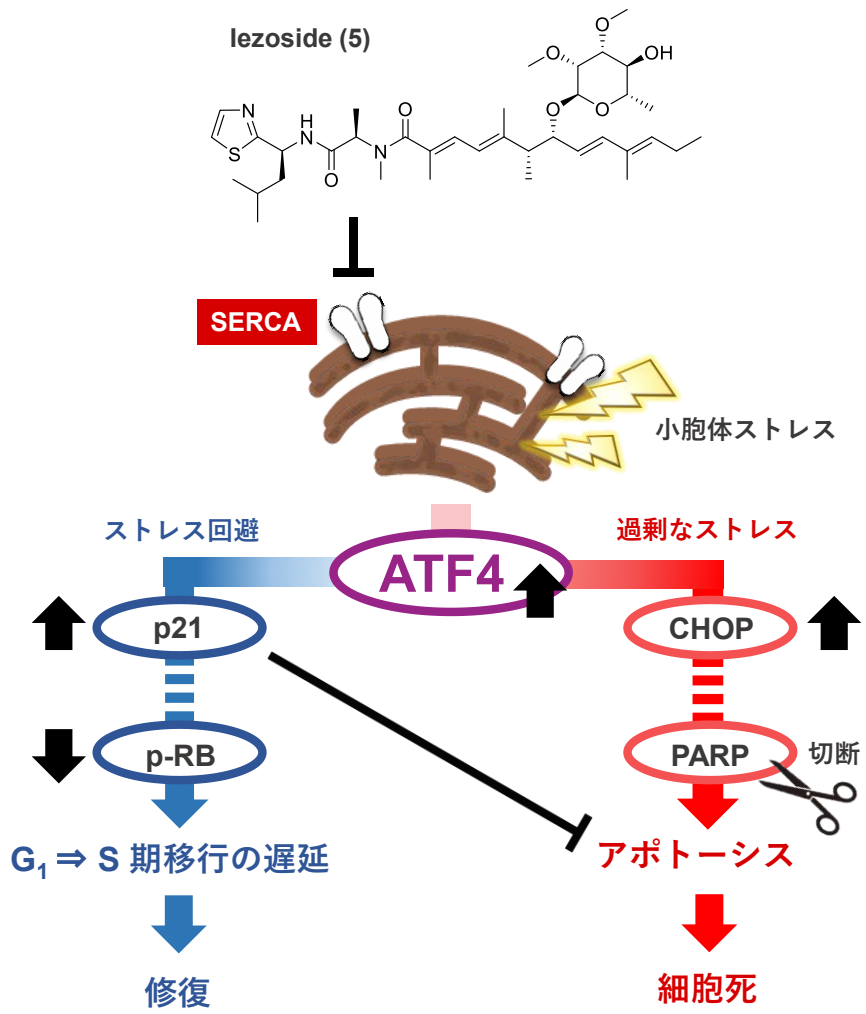


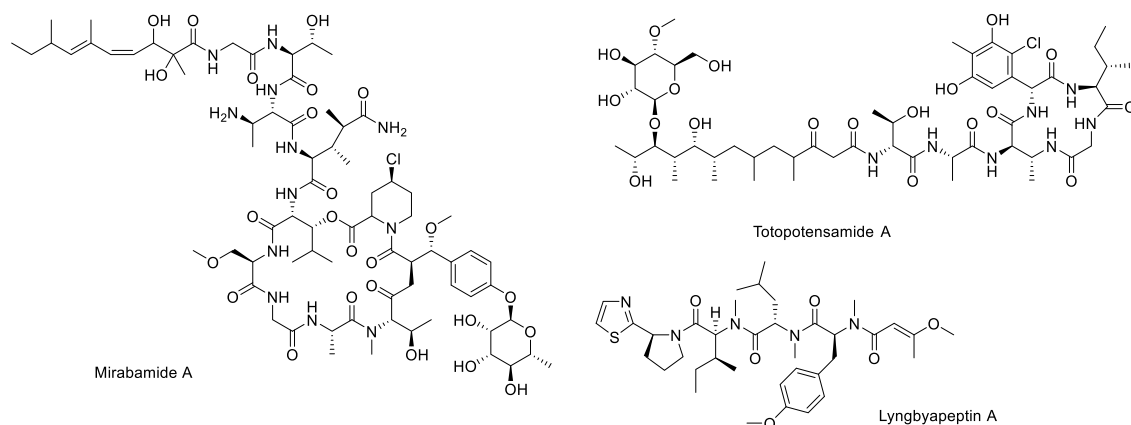
Figure 4-23. Iezoside (5) が亢進する細胞内シグナル伝達経路

第6節 考察

第4章では、伊江島で採集した海洋シアノバクテリア *Leptochromothrix valpauliae* より単離した新規ペプチド-ポリケチドハイブリッド配糖体 **iezoside (5)** の構造決定、全合成、生物活性について述べた。

海洋シアノバクテリアはペプチド-ポリケチドハイブリッド、またはポリケチド配糖体を数多く産生するが、これら三成分を含む海洋シアノバクテリア由来化合物は **iezoside (5)** が初めての例であり、天然物全体を通して珍しいハイブリッド化合物である。ペプチド-ポリケチドハイブリッド配糖体としては、これまでにカイメン *Siliquariaspongia mirabilis* から発見された **mirabamide** 類¹⁴⁷ や、腹足類の軟体動物から分離した *Streptomyces* 属放線菌から発見された **totopotensamide** 類¹⁴⁸ など、海洋環境に生息する生物資源を中心に発見されているがその総数は少ない。

部分構造に着目すると $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -不飽和アミド基と共役ジエン基の間に糖の分岐を有する天然物はこれまでに例がなく、非常に新規性の高い炭素骨格を有している。また、**iezoside (5)** は生合成の観点からも興味深い。ペプチド部分は末端チアゾール基や *N*-Me-Ala などのタンパク質を構成しないアミノ酸が含まれており、非リボソーム経路を介して生合成されていると予想される。末端チアゾール基は Cys の環化と続く脱水・脱炭酸によって形成されたと考えられ¹⁴⁹、**dolastatin 10**⁴⁴ や **lyngbyapeptin** 類¹⁵⁰ をはじめとして海洋シアノバクテリア由来の天然物から時折見出される構造である。ポリケチド部分は、奇数の炭素原子 (C17) からなる主鎖と、C-27 位の β -ブランチメチル基を持つという2つの珍しい特徴を有している。前者については **methylmalonyl CoA** が炭素鎖を伸長する基質として用いられ脱炭酸されるか、あるいは報告されている **Apratoxin A** の生合成¹⁵¹ のように **malonyl ACP** の α 位に SAM 由来の炭素が1つ増炭し、最後に脱炭酸されることで奇数脂肪酸が生成すると考えられる。後者は **malonyl ACP** 由来の C2 単位が **aldol** 反応を起こし、続く脱水と脱炭酸により生成されたと予想される¹⁵² (**Figure 4-24**)。これらの生合成機構はいずれも海洋シアノバクテリアで発見されているものである。



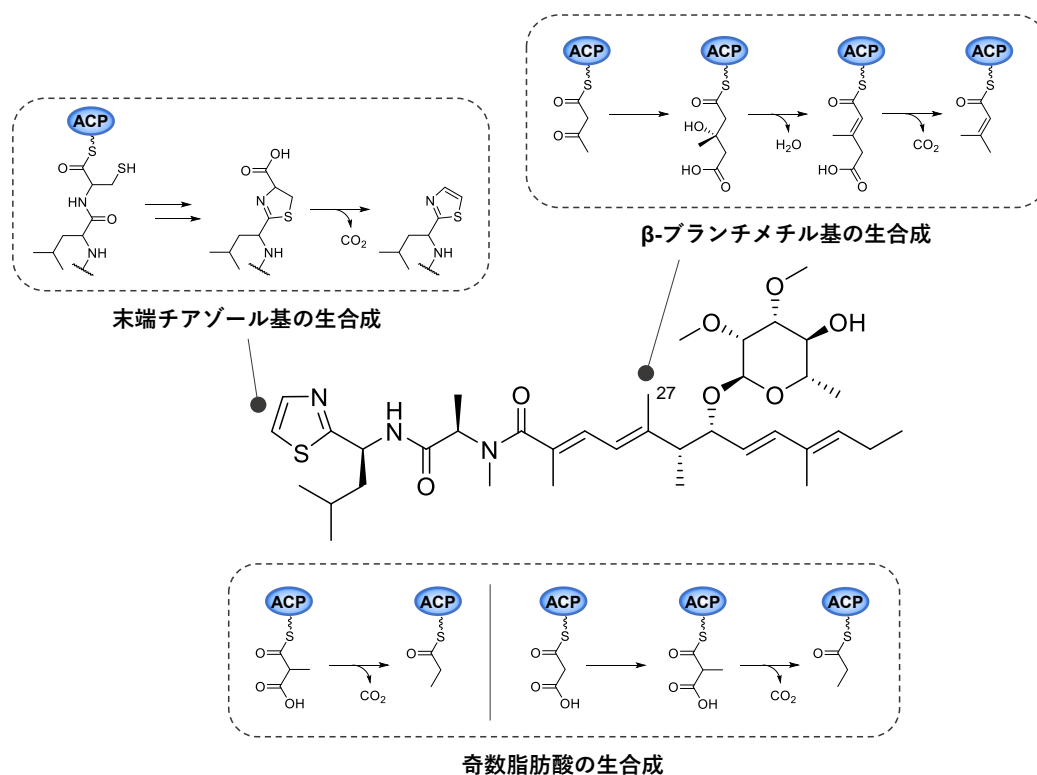


Figure 4-24. Iezoside (5) の推定生成機構

Iezoside (5) の絶対立体配置を含む全構造は、2次元 NMR を中心とした分光学解析、分解/誘導化反応、計算化学、全合成により決定した。計算化学を利用した絶対立体配置の決定では、分子の安定配座についてその配座分布を正しく見積もり、RMSD 値が十分小さいことを確かめる必要がある。多数の安定配座を有すると考えられる iezoside (5) のような鎖状分子では、以下に示す工夫を施している。

(1) 初期配座の設定において、回転できる結合については極力考慮する

天然物の安定配座探索においては、エネルギー障壁が大きく、回転することはないと考えられる結合については、計算時間の短縮を目的として固定することが多い。しかし、柔軟な分子の場合では配座漏れを起こし、正しい配座分布を再現しない危険性がある。

例として、今回計算に使用したモデル化合物 (18*R*,19*R*)-**27** について、(A) ラムノースの配座(メトキシ基の張り出し方向を含む)および共役ジエンをトランソイドに固定した場合、(B) 全ての結合について回転を考慮した場合を比較する (Figure 4-25)。同様の計算手順にて算出される再安定配座から 10 kJ/mol 以内に収まる安定配座の数は、(A) では 12 配座、(B) では 33 配座と大きな開きがある。(A) の条件では配座漏れが存在することで正しい配座分布を再現せず、誤った結論を導く可能性が高い。

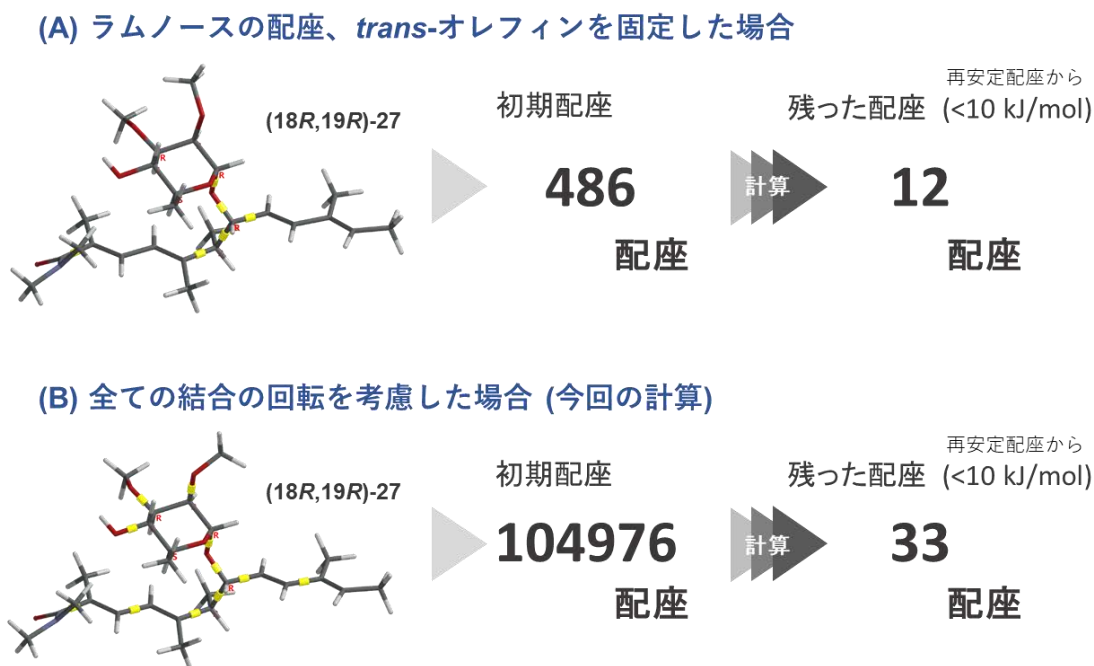


Figure 4-25. 初期配座の拘束条件に伴う安定配座数の変化
黄色で示した部分は、結合の回転を考慮している。

(2) DFT 計算の汎関数の選択

天然物の安定配座探索では、主に ω B97X や B3LYP が DFT 計算の汎関数として利用されていることが多い。しかし、前者ではファンデルワールス力に由来する長距離電子相関による分子の安定化を過大に見積もる傾向があることが報告されている¹⁰⁸。実際に、今回のモデル化合物において ω B97X を汎関数に用いた計算を行うと、分子内の不飽和アミドと共役ジエンが過剰に接近したものが安定配座として多く観測されている(データ省略)。

(3) 構造最適化・振動計算で得られる Gibbs 自由エネルギーを評価項目として利用する

天然物の DFT 計算における構造最適化では多くの場合、電子エネルギーの最小値を与える構造を求め、それを基に配座分布を求める。しかし、分子サイズの増大や配座自由度の増加に伴い、配座間のエントロピー変化は大きくなるため、エントロピー項が与える影響は増大する。そこで電子エネルギーに加え、エントロピー項を考慮した Gibbs 自由エネルギーを評価項目として利用し、振動計算を行うことで配座分布をより正確に見積もることができる。

例として、モデル化合物 (18*R*,19*R*)-**27** についてそれぞれ電子エネルギーあるいは Gibbs 自由エネルギーを評価項目として安定配座の Boltzmann 分布を計算すると、上位の安定配座として得られる【1】および【2】はそれぞれ、評価項目の違いによりその比率が大きく変化した (Figure 4-26)。

	【1】		【2】	
	電子エネルギー	Gibbs 自由エネルギー	電子エネルギー	Gibbs 自由エネルギー
Boltzmann 分布 (%)	9.5	17.1	13.5	6.7

Figure 4-26. 評価項目として利用するエネルギーの違いによる Boltzmann 分布の変化

上記の工夫に基づく配座探索を実施することで、正しい立体化学を有するジアステレオマーの候補を高い精度で絞り込むことに成功した。本計算が高い精度で行えたことと判断できる実験的な証拠として、調製した MTPA エステルの実測値と計算結果の対応が挙げられる。Iezoside (5) の MTPA エステルの $\Delta\delta$ 値をみると、主鎖が全て MTPA 平面側に張り出していることが確認できる (Figure 4-3)。一方、モデル化合物 (18*R*,19*R*)-27 において高い Boltzmann 分布を示す上位安定配座の多くが、主鎖が MTPA 平面側に張り出すようなコンフォメーションを有していたため、今回の計算では天然物の配座分布を良く再現できていると考えられる (Figure 4-27)。加えて、非天然型のモデル化合物 (18*S*,19*R*)-27 においては、H-18 と H-19 の理論結合定数 ($^3J_{H18-H19}$) が 9.9 Hz であったのに対し、合成した (18*S*,19*R*)-iezoside (5') の当該の実測値は 8.6 Hz であり、H-18 と H-19 がアンチペリプラナーの関係にある配座が多数を占め、正しい立体化学である (18*R*,19*R*) 体とは配座分布が有意に異なることを良く再現していた。多数の安定配座を有する柔軟な鎖状分子における汎用的な手法は未だ確立されていないものの、本研究にて実施したプロトコールは、上記の特性を有する分子に計算化学を適用する際の良いモデルケースに成り得る。

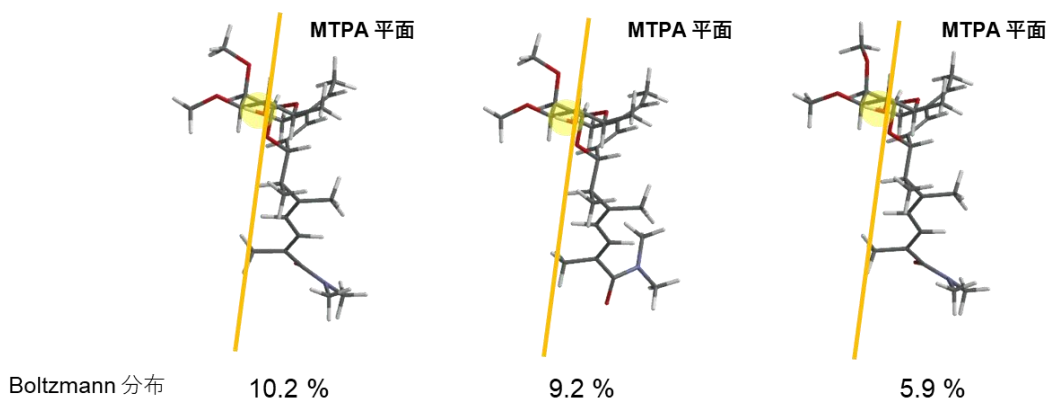


Figure 4-27. 上位安定配座のコンフォメーションと天然物由来 MTPA エステルの対応

In vivo での試験などで化合物の大量供給を必要とする場合、本合成ルートにおけるグリコシル化の際の α/β 選択性や末端チアゾール合成の立体選択性には課題が残る。L-ラムノースはグリコシル化反応において、反応中間体である L-ラムノースのオキソカルベニウムイオンにアルコールが接近するとき、立体的効果と電子的効果の両方が α 体の生成に有利に働くことで高い選択性を与えるとされているが¹²³、筆者の合成において選択性は 3.3:1 に留まった。ラムノースは 4 位に TBDPS 基、3 位に TBS 基のような嵩高い置換基を有する場合、グリコシル化の際に生じるオキソカルベニウムカチオンが *axial rich* な配座を取ることで、 α 選択性が減弱することが報告されている¹²³。今回の合成で利用したイミドイル糖 **50** も 4 位に TBDPS 基、3 位にメトキシ基が配置されていることで、若干ながら β 結合を形成しやすくなったと予想される (**Figure 4-28**)。そのため、グリコシル化の立体選択性は、水酸基をより立体障害の少ないシリル系保護基に変更することで改善が期待される。

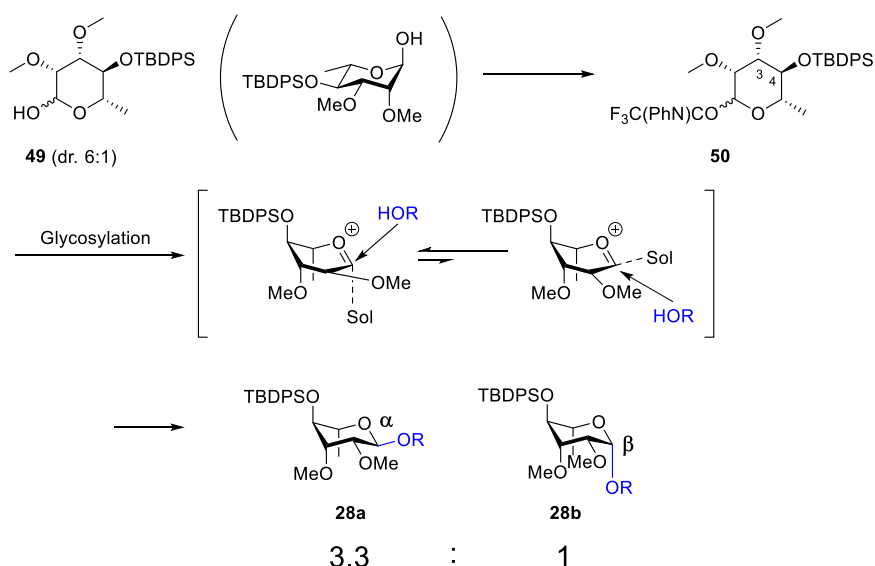


Figure 4-28. 推定されるグリコシル化の α/β 選択性の変化の原因

末端チアゾール合成については、チオアミドとアルデヒドが五員環を形成後、隣接するアミノ酸の α 位が酸触媒などのプロトン源の影響でイミン-エナミン互変異性によりラセミ化が進行することが報告されている¹³¹ (**Figure 4-29**)。Holzapfel らの報告においては、反応系中に炭酸水素カリウムを加えることで隣接するアミノ酸の α 位の立体化学が維持されているが¹³¹、同様の操作を行ったところ収率の再現性に乏しく、得られた目的物の立体選択性も 3:1 程度であった(塩入らも本反応を行うとラセミ化することを述べている¹⁵³)。DIPEA などのかさ高い有機塩を加えた合成も検討したが、目的物が得られなかった(データ省略)。また、最終的に採用した Wills、Nagendra らのチオアミドとプロモアセタールを加熱条件に付す手法¹¹⁸も立体化学を維持すると報告されているが、今回の合成ではラセミ化

が進行した。一方、塩入らによってケトンチアゾールに対する $(\text{Ipc})_2\text{BCl}$ による不斉還元、および光延反応による立体反転を伴うアジド化を行うことで高い立体選択性を与える合成法が報告されている¹⁵³ (Figure 4-30)。工程数は増大するが、筆者が合成したラセミ体は精製、収率の面で課題を抱えるため、第二世代合成を検討する際には有用である。

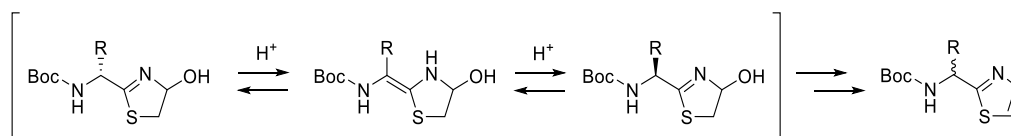


Figure 4-29. 末端チアゾール合成におけるラセミ化の進行メカニズム

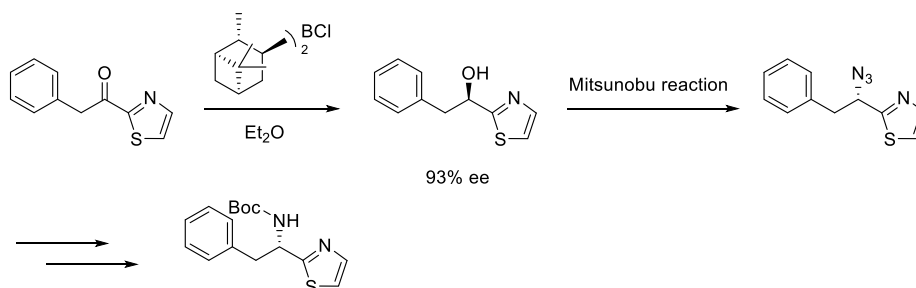


Figure 4-30. 塩入らによる末端チアゾールの合成

既知の強力な阻害剤である *thapsigargin* は複雑な縮環構造を含むセスキテルペンラクトン、*biselyngbyaside* 類は複雑な化学構造をもつ不安定なマクロライドであり、合成にかなりの多段階を要することから、化学合成での量的供給に課題をもつ^{71,154}。近年、Baran および Evans らは短工程かつグラムスケールでの *thapsigargin* の全合成を報告しているものの¹⁵⁵、SERCA の機能調節を志向した骨格レベルでの構造改変は容易ではない。*Izozide* (5) は中分子でありながら構造自体は単純な直鎖化合物であり、かつ分子中のキラリティのほとんどがアミノ酸や糖に由来するため、ペプチド部分を別のアミノ酸、糖部分をラムノース以外の糖に置換した類縁体や、アグリコン、ジアステレオマー、エナンチオマーなどの幅広い類縁体を容易に合成し、それらを用いて生物活性をチューニングすることができる点で大きな利点を有する。加えて、筆者が確立した合成ルートは収束的な合成法であり、このような構造活性相関研究に対応できる。そこで得られた知見から、活性を維持した構造簡略体やさらに強力な活性を示す誘導体を発見することができる。

Izozide (5) の示す強力ながん細胞増殖阻害活性の作用機序を検討した結果、本化合物は小胞体膜上のカルシウムポンプである SERCA を強力に阻害することで HeLa に細長い紡

錘状の形態変化を誘導し、小胞体ストレスを引き起こすことで細胞死と細胞周期遅延の両方を亢進することを明らかにした。

特徴的な形態変化については、小胞体ストレスを誘導する化合物が N-cadherin や vimentin といった間葉系形質を示すタンパク質の発現上昇と E-cadherin などの上皮系形質を示すタンパク質の発現減少¹⁵⁶、および非局在化¹⁵⁷の両方を誘導することで細胞接着が弱くなり、細胞の伸長を誘導することが報告されている。Iezoside (5) が起こす形態変化も、同様のメカニズムに起因すると考えられる。

Iezoside (5) は細胞周期遅延を引き起こすが、興味深いことに全ての SERCA 阻害剤が同様の生物活性を誘起するわけではなく、強力かつ非可逆的な阻害剤である thapsigargin のみが継続的な cyclin E の発現減少に伴う S 期進行遅延を誘導し、cyclopiazonic acid や BHQ などの可逆的な阻害剤では起こらないとの報告がある¹⁵⁸。そのため、iezoside (5) は thapsigargin と同様に非可逆的な SERCA 阻害剤である可能性が示唆される。Thapsigargin が発現を減少させる細胞周期関連タンパク質として cyclin D1 や上述の cyclin E が報告されており^{158,159}、これらは通常時 Cyclin dependent kinase (CDK) と複合体を形成することで下流の RB をリン酸化し、RB を不活性化することで S 期進行を促進する。Thapsigargin を処理すると p21 の発現により CDK-cyclin 複合体の形成が阻害され、下流の RB の脱リン酸化が進行し活性型となることで S 期進行が阻害される。Iezoside (5) はウエスタンブロッティングの解析から p21 の発現および RB の脱リン酸化を亢進しており、上述の cyclin D1 や cyclin E は p21 によって発現制御を受けているため thapsigargin の関与するシグナル伝達と同様の傾向を示す。このことから、iezoside (5) が不可逆型の SERCA 阻害剤であることを支持する。Iezoside (5) は thapsigargin に次ぐ強力な SERCA 阻害剤であるが、その構造は全く異なることから、SERCA に対する結合部位は thapsigargin とは異なると思われる。

SERCA は細胞の Ca^{2+} 濃度を制御する重要なはたらきをもつタンパク質であり、がんや神経変性疾患をはじめとする各種疾病と深い関係を持つ。がんにおいては、組織依存的に SERCA の各アイソフォームの発現量が大きく変動していることが観察されており、SERCA の量・質的異常に伴う細胞周期・アポトーシス・増殖の制御異常とがん化との関連が指摘されている¹⁶⁰。SERCA 阻害剤はアポトーシスやオートファジーの誘導¹⁶¹など、小胞体ストレスを起点とする多角的なシグナル伝達を介して強力な細胞増殖阻害活性を示す。近年では、SERCA 阻害剤は細胞の増殖や分化に関わる Notch シグナル伝達経路を強力に調節することが判明しており、有効な創薬標的として注目されている¹⁶²。SERCA は生物活性物質の標的分子としてはマイナーな部類であり、強力な阻害活性を発揮するファーマコフォアに乏しい。そのため、今回の iezoside (5) の発見には創薬の観点からも大きな意義がある。

一方で、SERCA は正常細胞にも普遍的に発現しているタンパク質のため、抗がん剤をはじめとする治療薬へ応用展開する際は、選択毒性の発現が課題となる。近年、前立腺がんを

はじめとする固形がんを選択的に発現する膜抗原 (PSMA) を特異的に認識するペプチド鎖と thapsigargin を連結したプロドラッグ mipsagargin が開発されている¹⁶³ (Figure 4-31)。Mipsagargin は現在、導出企業先の事業の戦略的見直しにより臨床試験がストップしているが、phase II においては良好な抗がん活性が認められている。選択毒性を獲得した SERCA 阻害剤はがん治療において有望である可能性が示されており、iezoside (5) は新規抗がん剤のリード化合物として十分に期待が持てる。

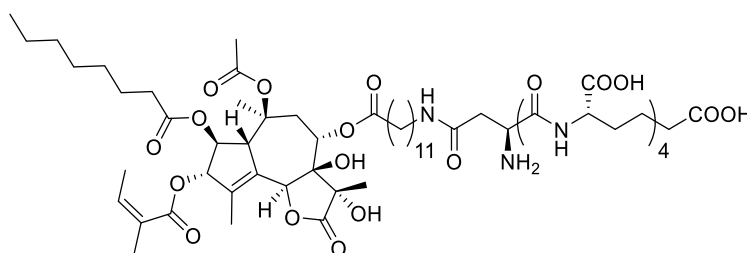


Figure 4-31. Mipsagargin の構造

最後に、化学生態学の観点から考察すると、上で述べたように生物活性物質の標的分子としてはマイナーといえる SERCA に対し、炭素骨格レベルで異なる強力な阻害剤が複数見出されるという事実は興味深い。当研究室では biselyngbyaside 類^{69,70}の他に、SERCA 阻害剤として鎖状リポペプチドである kurahyne^{77,78}を発見している。このことは、海洋シアノバクテリアが新規 SERCA 阻害剤の探索源として極めて有望であるとともに、優先的に SERCA 阻害剤を産生することで海洋環境中での生存競争を有利にする何らかの意義があることを示唆している。第一に考えられることとしては、外敵の捕食を回避するための防御物質である。微生物や植物は外敵と遭遇した際に移動して逃げるができないため、有毒物質を保持することで捕食から身を守るということが、多様な二次代謝産物を産生する理由として一般的に挙げられている。予備的な結果ではあるものの、種々の海洋生物が保持する SERCA 様タンパク質についてヒトの SERCA とのアミノ酸配列相同性を調べると、多くの高等海洋生物が高い相同性を示す一方で、シアノバクテリアの相同性は低い (Table 4-7)。特に、海洋シアノバクテリアが付着した海藻やカイメンを捕食することが知られているウミウシが、類似したアミノ酸配列を持つことは注目すべき点である。海洋シアノバクテリアはこれら上位の捕食者に対し幅広い毒性を発揮する SERCA 阻害剤を産生して捕食されるのを回避する一方で、自身は自己耐性を獲得している可能性が考えられる。

Table 4-7. ヒト SERCA のアミノ酸配列を用いた BLAST 検索による相同性

生物種	学名	配列一致度
魚類	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	78.8%
ホヤ	<i>Styela clava</i>	71.1%
貝類	<i>Pinctada fucata</i>	69.1%
ウミウシ	<i>Elysia chlorotica</i>	68.9%
サンゴ	<i>Stylophora pistillata</i>	67.8%
イソギンチャク	<i>Actinia tenebrosa</i>	67.4%
紅藻	<i>Chondrus crispus</i>	57.2%
緑藻	<i>Edaphochlamys debaryana</i>	54.4%
シアノバクテリア	<i>Microcoleus sp.</i>	38.0%
シアノバクテリア	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>	35.8%
褐藻	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	31.3%
珪藻	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	31.0%
カイメン	<i>Amphimedon queenslandica</i>	29.6%

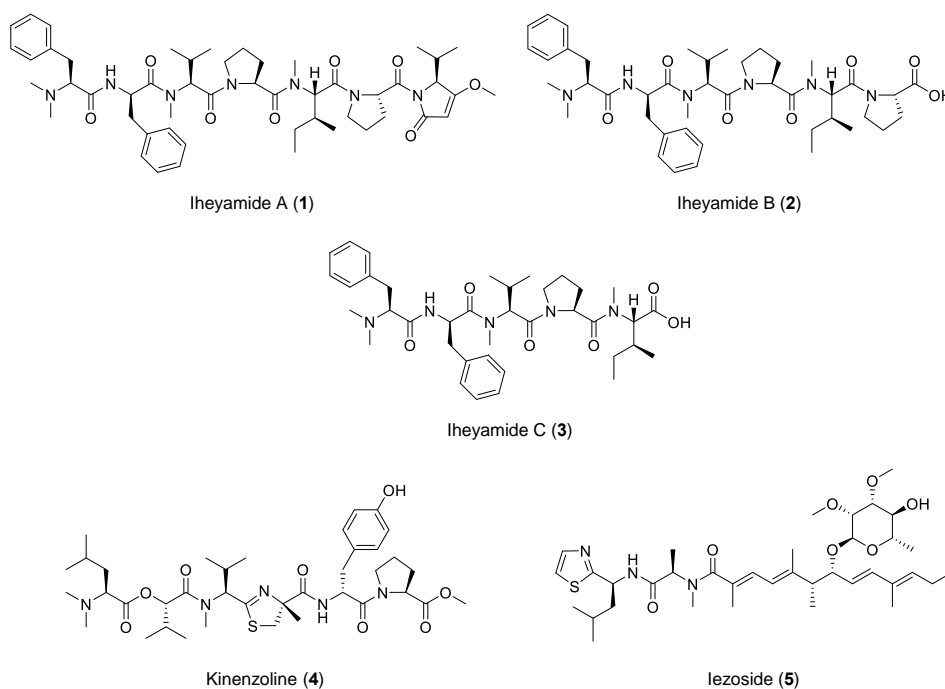
もう1つは、他の海洋生物、特に造礁サンゴの生体機能を攪乱する攻撃物質としての可能性が考えられる。サンゴが高温/低温のストレスを繰り返し受けた際に発現変動が起こる遺伝子についてトランスクリプトーム解析が行われた結果、優位かつ広範に UPR 関連遺伝子および Ca^{2+} の恒常性に関わる遺伝子の発現が上昇するという興味深い結果が得られている¹⁶⁴。すなわち、亜熱帯から熱帯にかけて生息するサンゴは潮の満ち引きによって激しい寒暖差に晒されることで常に小胞体ストレスを受けており、UPR をはたらかせることで自身を修復している。海洋シアノバクテリアは SERCA 阻害剤をはじめとする小胞体ストレス誘導性の天然物を産生することで、サンゴの許容レベルを超えた小胞体ストレスを上乗せし、細胞死を導くよう「駄目押し」しているのかもしれない。その他にも、サンゴが炭酸カルシウムからなる外骨格を形成するためには、 Ca^{2+} ATPase が必須であることが知られている¹⁶⁵。海洋シアノバクテリアは小胞体ストレスの他にも SERCA 阻害剤を利用し、サンゴの外骨格形成を阻害する可能性も考えられる。

この仮説が正しい場合、海洋シアノバクテリアがサンゴを攻撃することには何らかのメリットが存在すると考えられる。当研究室でこれまで採集を行った海洋シアノバクテリアは、今回の *Leptochrothrix valpauliae* を含め多くが死んだサンゴの上に生息しており、砂上や岩場ではあまりみられない。海産シアノバクテリアは底生生物であるため、サンゴは縄張りを獲得する上で潜在的な競争相手となる可能性がある。また、栄養に乏しく付着しづらい砂上や岩場に底生するよりも、豊富な栄養を内包し、物理的に頑丈なサンゴの方が増殖の足場としては都合がよく、好んでサンゴを侵略する可能性も考えられる。今後、iezoside (5) をはじめとする SERCA 阻害剤の海洋環境中における役割を実験的に検証することで、亜熱帯サンゴ礁における未知のケミカルコミュニケーションに新たな知見が得られることが期待される。

第5章 総括

海洋シアノバクテリアの生息地域の違いに由来する二次代謝産物の多様性に着目し、未開拓の離島を中心に海洋シアノバクテリアの採集を行い、特異な構造と生物活性を有する新規天然物の探索研究とその合成、作用機序解明を行った。

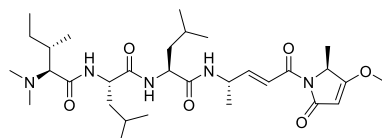
その結果、新規天然物として **iheyamide** 類 (**1-3**)、**kinenzoline** (**4**)、**iezoside** (**5**) の計5種類を発見し、その構造と生物活性を明らかにした。伊平屋村(野甫島)、伊江島は所属研究室が初めてサンプル採集を行った地域であり、またこれらの地域における海洋シアノバクテリア由来新規天然物の報告はない。そのため、固有の海洋環境を形成する離島でのサンプル採集が、新規天然物の探索における指針として有効であることが示された。また、全ての化合物について全合成が達成され、構造の正しさが確認されるとともに、**iheyamide A (1)** および **kinenzoline (4)** は選択的な抗トリパノソーマ活性、**iezoside (5)** は小胞体膜上のカルシウムポンプ SERCA を標的とし、小胞体ストレスを誘導することで強力ながん細胞増殖阻害活性を示すことを見出した。



今後の研究展開として、以下の課題が挙げられる。

[1] 海洋シアノバクテリア由来抗寄生虫活性天然物の更なる探索

第2章で述べたように、**ihexamide A (1)** および **kinenzoline (4)** 以外にも、ヒト細胞と比較して選択的な抗寄生虫活性を示す新規天然物が、所属研究室の探索研究により海洋シアノバクテリアから近年多く見出されている。そのため、海洋シアノバクテリアはマラリアやトリパノソーマなどの寄生中症に対するリード化合物の供給源として有望である。今後も抗寄生虫活性を有する天然物の探索研究を続けていくことで、さらに優れた抗寄生虫活性を有する新規天然物が発見されることが期待される。また、Gerwick らと Luesch らがそれぞれ独自に発見した **gallinamide A (symplostatin 4)**¹⁶⁶ は、強力な抗寄生虫活性を有することが後に見出され、**falcipain (マラリア)**¹⁶⁷ や **cruzain (*Trypanosoma cruzi*)**¹⁶⁸ に代表される各種原虫のシステインプロテアーゼを強力に阻害することが明らかとなっている。第1章で説明したように、海洋シアノバクテリアからは多数のプロテアーゼ阻害剤が発見されていることから、これまでに報告された既知の天然物が、有望な抗寄生虫薬として再発見されることも期待される。

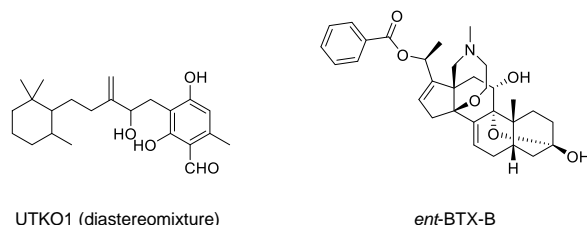


Gallinamide A (symplostatin 4)

[2] Iezoside (5) の構造活性相関研究

Iezoside (5) は、新たなファーマコフォアを有する強力な新規 SERCA 阻害剤である。がんをはじめとする種々の Ca^{2+} の制御異常が関与する疾病に対するリード化合物として有望であるが、**iezoside (5)** を産生する海洋シアノバクテリア *Leptochromothrix valpauliae* の培養による量的供給は困難な上、さらにその後2度伊江島を訪れて本種を探索したが、発見することができなかった。そのため、**iezoside (5)** をリードとして更なる研究を行うためには、化学合成による供給とともに、構造活性相関を検討し、同程度あるいはより強力な活性を示しつつも、合成コストを削減した簡略体を合成する必要がある。上述した研究を通じて、ファーマコフォアのさらなる絞り込みと、構造活性相関を利用し SERCA に対する結合部位を同定することができる。また、構造活性相関を詳細に検討することで、思わぬ知見が得られる可能性がある。例として、がん細胞の遊走阻害活性を指標に単離された **moverastin**¹⁶⁹ の構造活性相関研究により見出された **UTKO1** は、母骨格である **moverastin** よりも強力な遊走阻害活性を示したが、その標的分子は大きく変化した (FTase → 14-3-3ζ)¹⁷⁰。また、ヤドクガエル由来の強力な神経毒である **batrachotoxin** は電位依存性 Na^+ チャンネルの開口剤

であるが、合成された誘導体のエナンチオマー (*ent*-BTX-B) は逆に Na⁺ チャネルの強力な阻害剤としてはたらくという興味深い結果が報告されている¹⁷¹。このように、独自の炭素骨格から意外性を発揮するのが天然物の魅力であり、*iezoside* (**5**) でも構造活性相関研究の展開により有用な分子ツールが創出されることが期待される。



【3】 化学生態学に基づく天然物の産生意義の解明

第 4 章で詳細に述べたように、沖縄・奄美大島に生息する海洋シアノバクテリアは biselyngbyaside 類⁶⁹、*kurahyne*⁷⁷、*iezoside* (**5**) など多種多様な SERCA 阻害剤を産生し、それを自らの生存や繁殖に役立てていることが予想される。海洋シアノバクテリアが産生する天然物の特性を個々に解析してその役割を理解することで、亜熱帯-熱帯地域のサンゴ礁における未知のケミカルコミュニケーションや、サンゴ礁の保全につながることを期待される。

新規天然物の取得確率が低下していることや、医薬品開発における高分子の台頭により、興味深い分子は既に自然界から発見し尽くされ、天然物探索研究の価値が相対的に低下しているような錯覚を感じることも少なくない。しかし、人知を超えた新規の構造を有する天然物を取得し、その特性を明らかにすることは、他のいかなる手法を用いても得る事のできない多くの有用な情報を提供する。また、最新技術を活用することで量的制限などの問題をクリアし、従来の手法や着眼点では発見されてこなかった新規天然物が実際に続々と発見されていることや、他分野との融合により天然物の持つポテンシャルが見直され、新たなサイエンスが展開されていることは、これからの天然物化学や探索研究に希望を与えるものである。本研究で発見された分子が、「古くて新しい」天然物化学の可能性や魅力を広げる一助となることを願い、総括とする。

第 6 章 実験項

第 1 節 一般操作

General Experimental Procedures.

Optical rotations were measured with a JASCO DIP-1000 polarimeter. IR spectra were recorded on a Bruker ALPHA instrument. All NMR spectral data were recorded on a JEOL JNM-ECS400 or a JNM-ECX-400 spectrometer for ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz). ^1H NMR chemical shifts (referenced to residual $(\text{CD}_3)\text{COCHD}_2$, CHCl_3 , and CHD_2OD observed at δ_{H} 2.05, 7.26, and 3.31, respectively) were assigned using a combination of data from COSY and HMQC experiments. Similarly, ^{13}C NMR chemical shifts (referenced to $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, CDCl_3 , CD_3OD observed at δ_{C} 29.84, 77.16, and 49.0, respectively) were assigned based on HMBC and HMQC experiments. HRESIMS spectra were obtained on a Waters LCT Premier XE time-of-flight (TOF) mass spectrometer. Chromatographic analyses were performed using an HPLC system consisting of a pump (model PU-2080, JASCO) and a UV detector (model UV-2075, JASCO). All chemicals and solvents used in this study were the best grade available and obtained from a commercial source (Nacalai Tesque). All heating reactions were carried out using an oil bath. All moisture-sensitive reactions were performed under an atmosphere of argon or nitrogen, and the starting materials were azeotropically dried with toluene before use. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC), and TLC plates were visualized by both UV detection and phosphomolybdic acid solution. Silica Gel 60N (Irregular, 63-212 μm) were used for open column chromatography unless otherwise noted. Automated Flash Chromatography System (AFCS, EPCLC AI-580, YAMAZEN) was also used for purification of synthesized compounds. Molecular mechanics calculations and density functional theory (DFT) calculations were performed with Spartan'20 (Wavefunction)¹⁰⁹ using a workstation (operating system: Windows 10 Professional; CPU: AMD Ryzen Threadripper 3970X, 3.70 GHz, 32 cores; RAM: 256 GB). Time-dependent density functional theory (TDDFT) calculations were run with Gaussian 16W Revision C01 (Gaussian Inc.)¹⁷² on the above workstation with default grids and convergence criteria. Construction of the theoretical ECD spectra were performed using SpecDis Version 1.71³ on a commercial PC (Windows 10). All calculations were performed under vacuum conditions.

Cell Culture

HeLa and WI-38 cells were cultured at 37 °C under humidified 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Nissui, Japan) supplemented 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 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 .

Cell Growth Analysis

HeLa and WI-38 cells were seeded at 4×10^3 cells/well in 96-well plates (Iwaki) and cultured overnight. Various concentrations of compounds were then added, and cells were incubated for 72 h. Cell proliferation was measured by the MTT assay. This assay was performed in triplicate (n=3).

***In Vitro* Antitrypanosomal Assay**

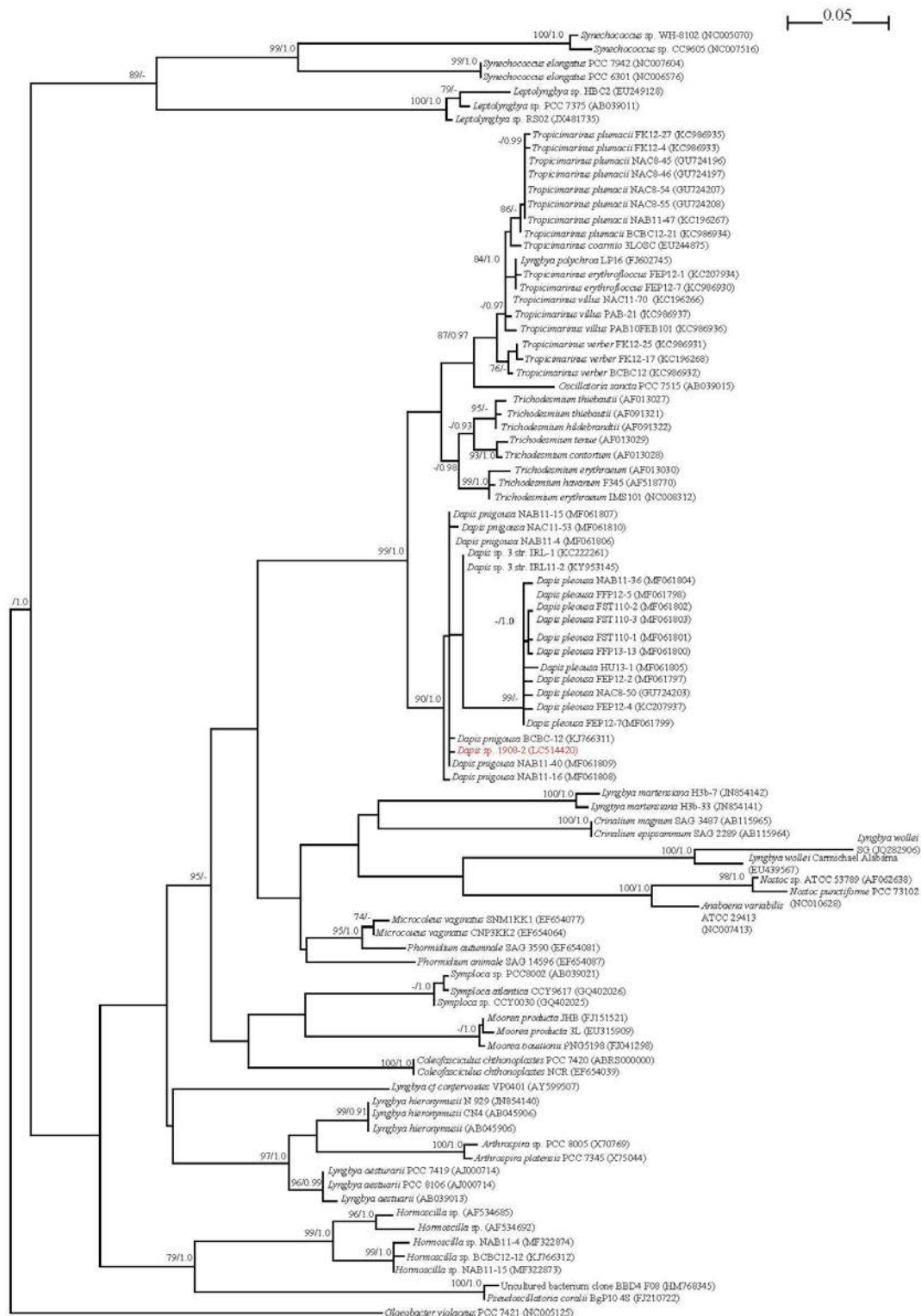
The *Trypanosoma brucei rhodesiense* strains IL-1501¹⁷³ and *Trypanosoma brucei brucei* strains 221¹⁷⁴ were cultured at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere in HMI-9 medium¹⁷⁵ supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). For *in vitro* studies, compounds were dissolved in DMSO and diluted in culture medium prior to being assayed. The maximum DMSO concentration in the *in vitro* assays was 1%.

The compounds were tested in an AlamarBlue serial drug dilution assay¹⁷⁶ to determine the 50% inhibitory concentrations (IC₅₀). Serial drug dilutions were prepared in 96-well microtiter plates containing the culture medium, and wells were inoculated with 4.0×10^4 cells/ml *T. b. rhodesiense* IL-1501 parasites or *T. b. brucei* 221 parasites. Cultures were incubated for 69 h at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. After this time, 10 µl of resazurin (12.5 mg resazurin [Sigma] dissolved in 100 ml phosphate-buffered saline) was added to each well. The plates were incubated for an additional 3h. The plates were read in a SpectraMax Gemini XS microplate fluorescence scanner (Molecular Devices) using an excitation wavelength of 536 nm and an emission wavelength of 588 nm.

第 2 節 第 2 章の実験

Identification of the Marine Cyanobacterium

A cyanobacterial filament was isolated under a microscope and crushed with freezing and thawing. The 16S rDNA genes were PCR-amplified from the isolated DNA using the primer set CYA359F (a cyanobacterial-specific primer) and CYA1371R (a universal primer). The PCR reaction contained DNA derived from a cyanobacterial filament, 0.5 μ L of KOD-Multi & Epi- (Toyobo), 1.0 μ L of each primer (0.5 μ M, respectively), 12.5 μ L of 2 \times PCR Buffer for KOD-Multi & Epi-, and H₂O for a total volume of 25 μ L. The PCR reaction was performed as follows: initial denaturation for 2 min at 94 °C, and amplification by 40 cycles of 10 sec at 98 °C and 1.5 min at 66 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. The obtained DNA was sequenced with CYA359F and CYA1371R primers. This sequence is available in the DDBJ/EMBL/Genbank databases under accession number LC514420. The nucleotide sequence of 16S rRNA gene obtained in this study was used for phylogenetic analysis with the sequences of related cyanobacterial 16S rRNA genes. All sequences were aligned by the SINA web service (version 1.2.11)¹⁷⁷ with default settings. The poorly aligned positions and divergent regions were removed by Gblocks Server (version 0.91b),¹⁷⁸ implementing the options for a less stringent selection, including the ‘Allow smaller final blocks’, ‘Allow gap positions within the final blocks’ and ‘Allow less strict flanking positions’ options. The obtained 887 nucleotide positions were used for phylogenetic analysis. JModeltest (version 2.1.7)^{179, 180} with default settings was used to select the best model of DNA substitution for the Maximum Likelihood (ML) analysis and Bayesian analysis according to the Akaike information criterion (AIC). The ML analysis was conducted by PhyML (version 20131016),¹⁸⁰ using the TIM1+I+G model with a gamma shape parameter of 0.4280, a proportion of invariant sites of 0.4490 and nucleotide frequencies of $F(A) = 0.2519$, $F(C) = 0.2261$, $F(G) = 0.2963$, $F(T) = 0.2257$. Bootstrap resampling was performed on 1,000 replicates. The ML tree was visualized with Njplot (version 2.3).¹⁸¹ The Bayesian analysis was conducted by MrBayes (version 3.2.5)¹⁸² using the GTR+I+G model. The Markov chain Monte Carlo process was set at 2 chains, and 1,000,000 generations were conducted. Sampling frequency was assigned at every 500 generations. After analysis, the first 100,000 trees were deleted as burn-in, and the consensus tree was constructed. The Bayesian tree was visualized with FigTree (version 1.4.0, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). As a result, the cyanobacterium (accession no. LC514420) formed a clade with *Dapis* sp.⁸⁶ Therefore, the cyanobacterium was classified into *Dapis* sp.



Phylogenetic tree inferred from 16S rDNA sequences using the ML method. The phylogeny is rooted with *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. The numbers at the nodes indicate bootstrap values (values <70 % are not shown) and posterior probability (values <0.9 are not shown) for the ML/Bayesian inference.

Collection, Extraction and Isolation

The *Dapis* sp. cyanobacterium (5 kg, wet weight) was collected at Noho Island, Okinawa, Japan, in August 2019. The collected cyanobacterium was extracted with EtOH (2 × 3 L) for 3 days. The extract was filtered, and the filtrate was concentrated. The residue was partitioned between EtOAc (3 × 0.6 L) and H₂O (0.6 L). The material obtained from the organic layer was partitioned between 90% aqueous MeOH (0.3 L) and hexane (3 × 0.3 L), and evaporated to give an aqueous MeOH fraction (2.59 g). 1.21 g of this aqueous MeOH fraction was separated by column chromatography on ODS (12.1 g) eluted with 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH and CHCl₃-MeOH (1:1). 240 mg of the fraction (544.6 mg) eluted with 80% MeOH was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 80% MeOH] in five batches to give two fractions that contained iheyamide A (**1**) (63.8 mg, last collected fraction), and iheyamide B (**2**) and iheyamide C (**3**) (48.8 mg, *t_R* = 21.0 min). 21.3 mg of the fraction that contained iheyamide A (**1**) was further purified by HPLC [Cosmosil Cholester (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 55% MeCN containing 0.1% TFA] to give iheyamide A as TFA salt (**1**, *t_R* = 27.1 min). The fraction was partitioned between EtOAc (3 × 50 ml) and K₂CO₃ aqueous solution (50 ml), and the organic layer was evaporated to give iheyamide A (**1**, 13.7 mg).

Iheyamide A (1): colorless oil; [α]_D²⁵ -117 (*c* 1.06, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 236 nm (4.17); IR (neat) 3300, 1718, 1636, 1437, 1320, 1249 cm⁻¹; HRESIMS *m/z* 912.5595 [M+H]⁺ (calcd for C₅₁H₇₄N₇O₈, 912.5599).

The fraction that contained iheyamides B (**2**) and C (**3**) was further purified by HPLC [Cosmosil PBr (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 88% MeOH containing 0.1% TFA] in four batches to give two fractions that contained iheyamide B (**2**, *t_R* = 31.0 min) and iheyamide C (**3**, *t_R* = 28.0 min), respectively. Each fraction was further purified by HPLC [Cosmosil Cholester (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 40% MeCN containing 0.1% TFA] to give iheyamide B (**2**) (12.3 mg, *t_R* = 32.0 min) and iheyamide C (**3**) (1.9 mg, *t_R* = 45.6 min) as a TFA salt, respectively.

Iheyamide B (2): colorless oil; [α]_D²⁵ -80 (*c* 0.92, MeOH); IR (neat) 3263, 1636, 1457, 1201, 1137 cm⁻¹; HRESIMS *m/z* 775.4756 [M+H]⁺ (calcd for C₄₃H₆₃N₆O₇, 775.4758).

Iheyamide C (3): colorless oil; [α]_D²⁵ -57 (*c* 0.32, MeOH); IR (neat) 3263, 1634, 1456, 1202, 1136 cm⁻¹; HRESIMS *m/z* 678.4231 [M+H]⁺ (calcd for C₃₈H₅₆N₅O₆, 678.4231).

Determination of the Absolute Configuration of iheyamide A (1)

Iheyamide A (**1**, 0.3 mg) was treated with 6 M HCl (100 μ L) for 20 h at 110 $^{\circ}$ C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and could be separated into each component. [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 (3.2), *N*-Me-Val (3.7), *N*-Me-Ile (5.3), Phe (10.4) and *N, N*-diMe-Phe (21.4)].

The *N*-Me-Ile fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards [column, Cosmosil PBr (ϕ 4.6 \times 250 mm); flow rate, 1.0 ml/min; detection 254 nm; solvent, 5% MeCN with 0.1% TFA]. The retention times for authentic standards were 7.0 min (*N*-Me-*allo*-Ile) and 7.7 min (*N*-Me-Ile). The retention time of *N*-Me-Ile from natural **1** was 7.7 min, indicating the presence of *N*-Me-Ile.

Each fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, several conditions]. With 2 mM CuSO₄ as a solvent, the retention times for authentic standards were 2.6 min (D-Pro) and 4.7 min (L-Pro), 3.2 min (*N*-Me-D-Val) and 5.0 min (*N*-Me-L-Val), and 8.0 min (*N*-Me-D-Ile) and 14.0 min (*N*-Me-L-Ile). The retention times of each amino acid from natural **1** were 4.7 min, 5.0 min and 14.0 min, indicating the presence of L-Pro, *N*-Me-L-Val, and *N*-Me-L-Ile, respectively. With 10% MeCN 2 mM CuSO₄ solution as a solvent, the retention times for authentic standards were 4.2 min (D-Phe) and 5.5 min (L-Phe), and 8.1 min (*N, N*-diMe-D-Phe) and 13.3 min (*N, N*-diMe-L-Phe). The retention times of each amino acid from natural **1** were 4.2 min and 13.3 min, indicating the presence of D-Phe and *N, N*-diMe-L-Phe, respectively.

Iheyamide A (**1**, 0.5 mg) was dissolved in 2.5 ml MeOH and ozonized at -78 $^{\circ}$ C for 20 min. The solvent was evaporated, and the product was treated with 6 M HCl (100 μ l) for 17 h at 110 $^{\circ}$ C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and separated into Val from *iPr-O*-Me-pyrrolinone. [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; Val (3.4)]. The fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention time was compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, several conditions]. With 2 mM CuSO₄ as a solvent, the retention times for authentic standards were 3.2 min (D-Val) and 6.1 min (L-Val). The retention time of Val from *iPr-O*-Me-pyrrolinone of natural **1** was 6.1 min, indicating the presence of (*S*)-*iPr-O*-Me-pyrrolinone.

Determination of the Absolute Configurations of Iheyamide B (2) and Iheyamide C (3)

Iheyamide B (**2**, 0.2 mg) and iheyamide C (**3**, 0.2 mg) were treated with 6 M HCl (100 μ L) for 18

h at 110 °C, respectively. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and could be separated into each component, as with iheyamide A (**1**).

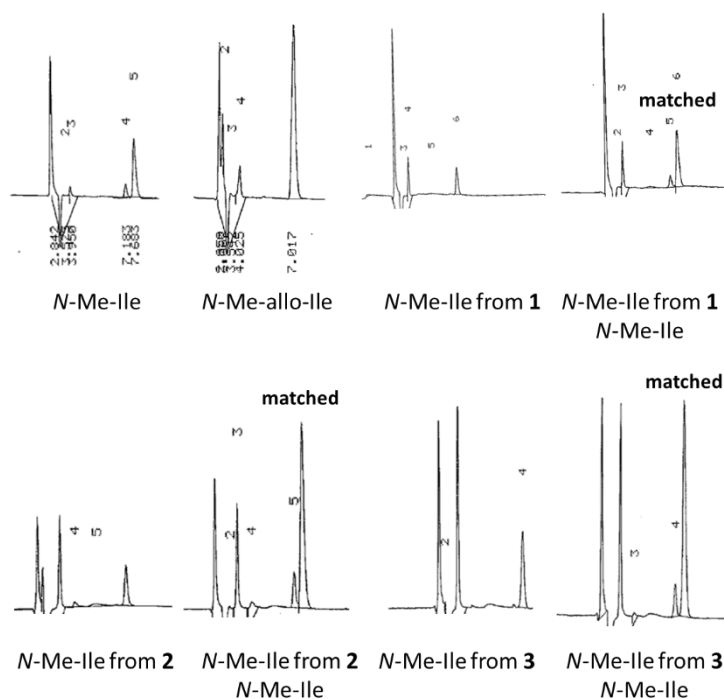
Each fraction was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) (φ4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, several conditions]. With 2 mM CuSO₄ as a solvent, the retention times for authentic standards were the same as those for iheyamide A (**1**). The retention times of each amino acid from natural **2** and **3** were 4.7 min, 5.0 min and 14.0 min, indicating the presence of L-Pro, *N*-Me-L-Val, and *N*-Me-L-Ile, respectively. With 10% MeCN 2 mM CuSO₄ solution as a solvent, the retention times for authentic standards were 4.2 min (D-Phe) and 5.5 min (L-Phe), and 8.1 min (*N*, *N*-diMe-D-Phe) and 13.3 min (*N*, *N*-diMe-L-Phe). The retention times of each amino acid from natural **2** and **3** were 4.2 min and 14.0 min, indicating the presence of D-Phe and *N*, *N*-diMe-L-Phe, respectively.

HPLC analysis of amino acid components

A fraction that contained *N*-Me-Ile was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards.

Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil PBr (φ4.6 × 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent 5% MeCN with 0.1% TFA

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-Ile (7.7), *N*-Me-allo-Ile (7.0)

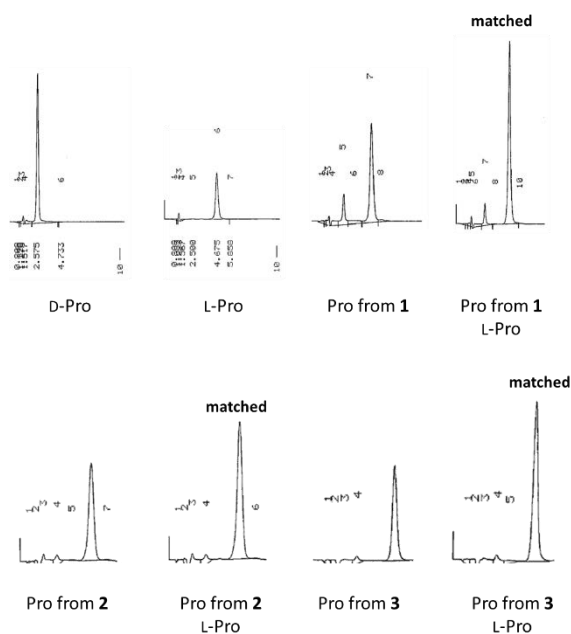


Chiral HPLC analysis

Determination of the absolute configuration of the α -amino acids in iheyamide A (**1**), iheyamide B (**2**), and iheyamide C (**3**)

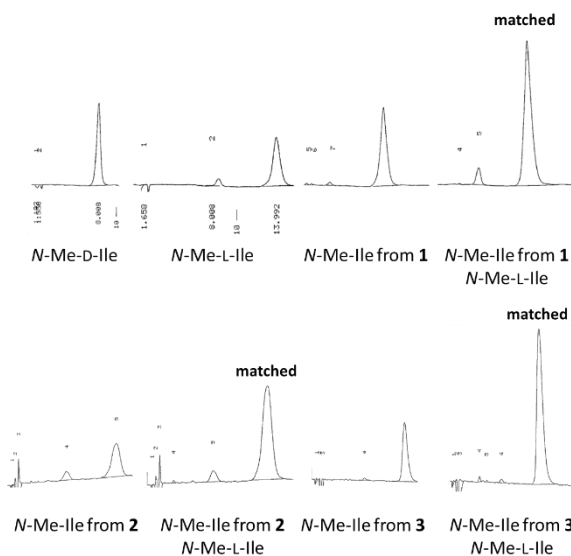
Pro: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

*t*_R (min): Authentic samples: D-Pro (2.6), L-Pro (4.7)



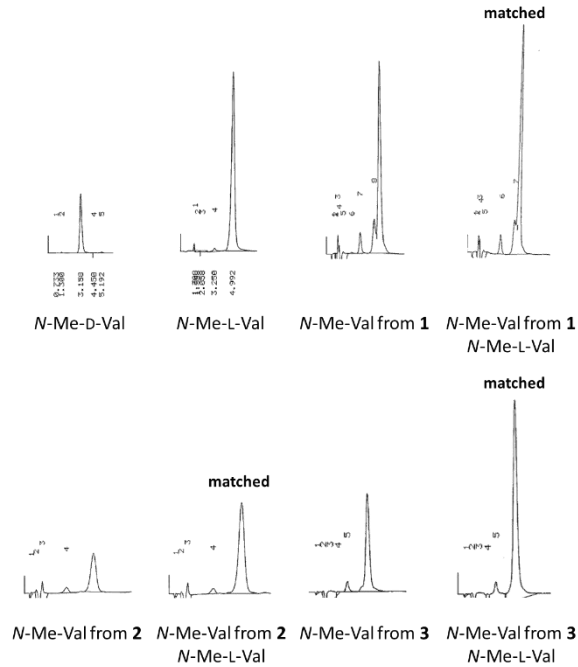
N-Me-Ile: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

*t*_R (min): Authentic samples: *N*-Me-D-Ile (8.0), *N*-Me-L-Ile (14.0)



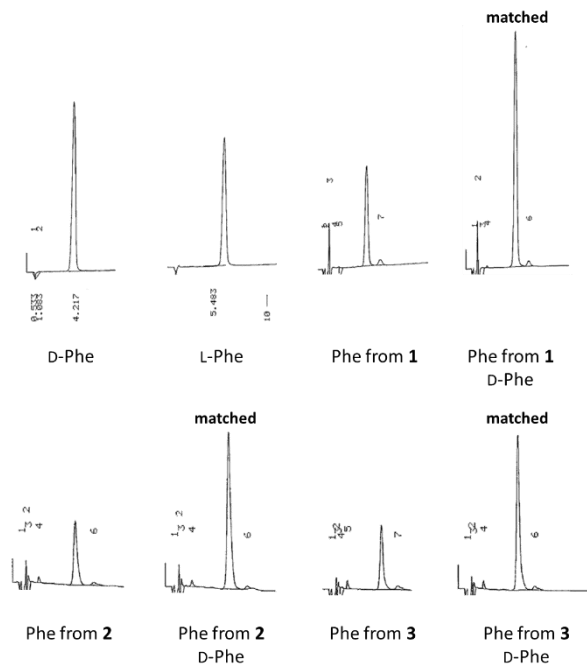
N-Me-Val: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

*t*_R (min): Authentic samples: *N*-Me-D-Val (3.2), *N*-Me-L-Val (5.0)



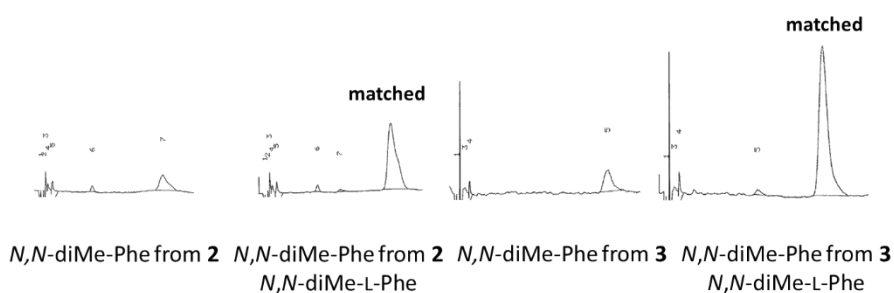
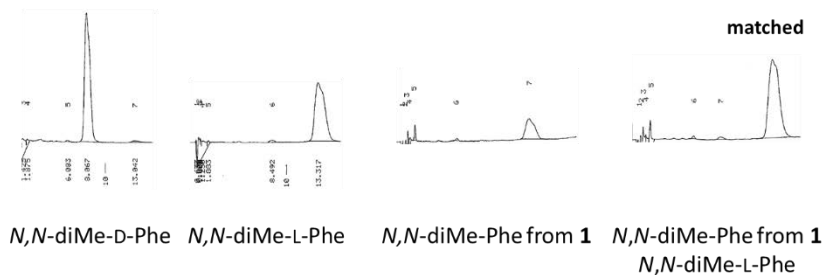
Phe: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 10% MeCN + 2.0 mM CuSO₄.

*t*_R (min): Authentic samples: D-Phe (4.2), L-Phe (5.5)



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

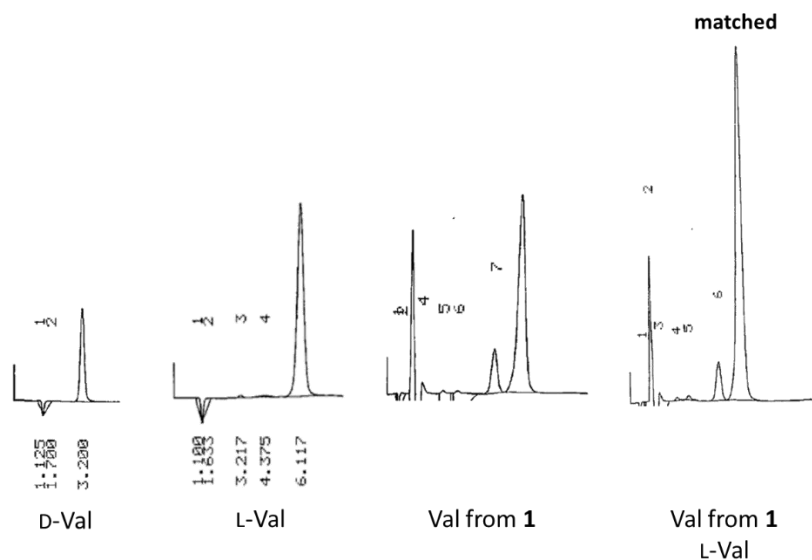
t_R (min): Authentic samples: *N,N*-diMe-D-Phe (8.1), *N,N*-diMe-L-Phe (13.3)



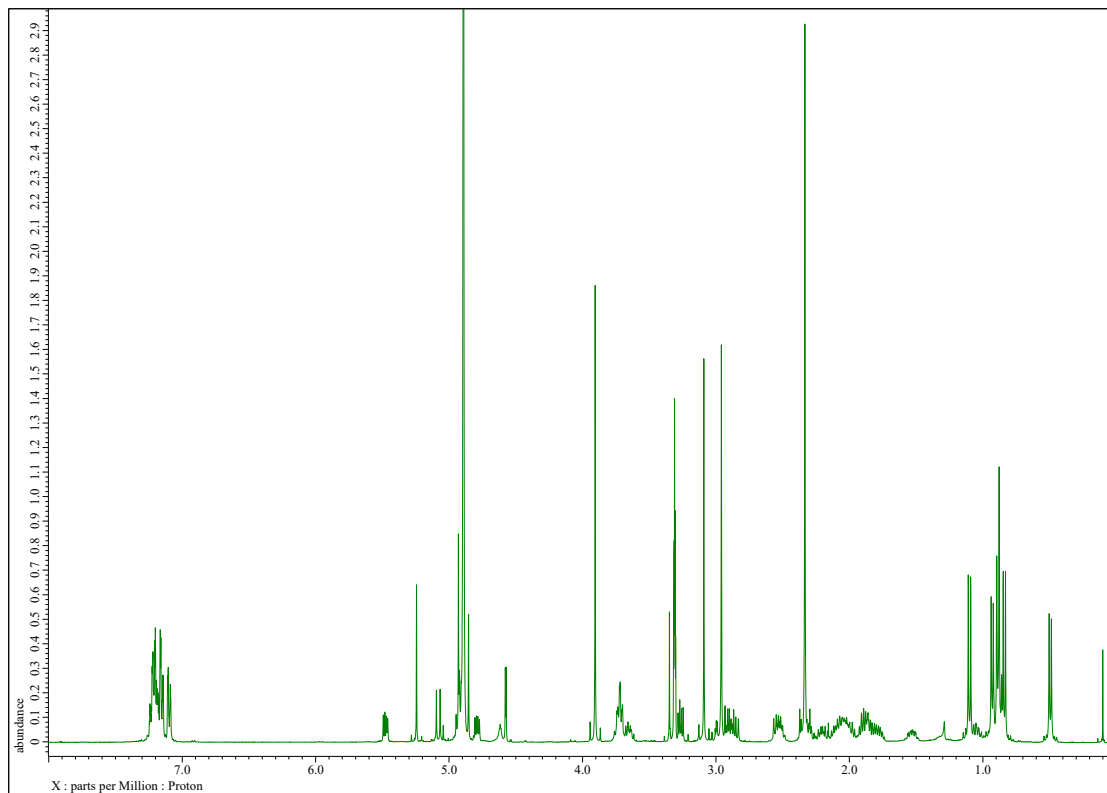
Chiral HPLC analysis of Val from *iPr*-*O*-Me-pyrrolinone of iheyamide A (**1**)

Val from *iPr*-*O*-Me-pyrrolinone of iheyamide A (**1**): 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.

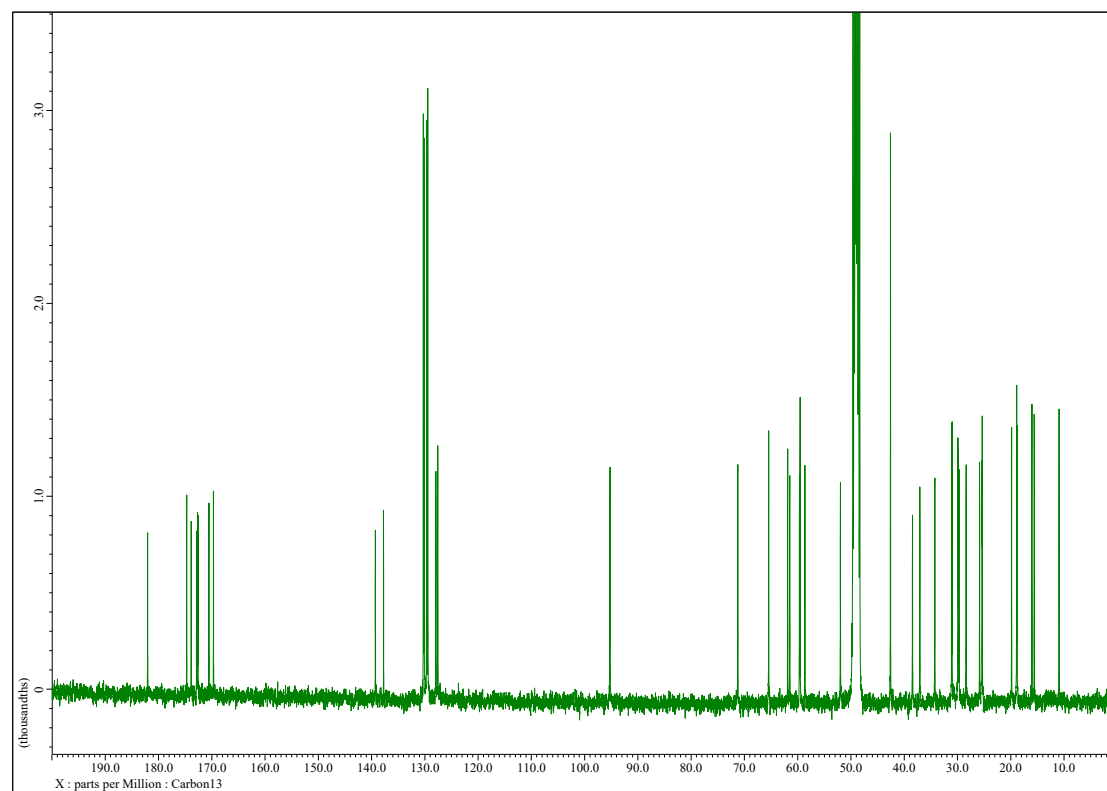
t_R (min): Authentic samples: D-Val (3.2), L-Val (6.1)



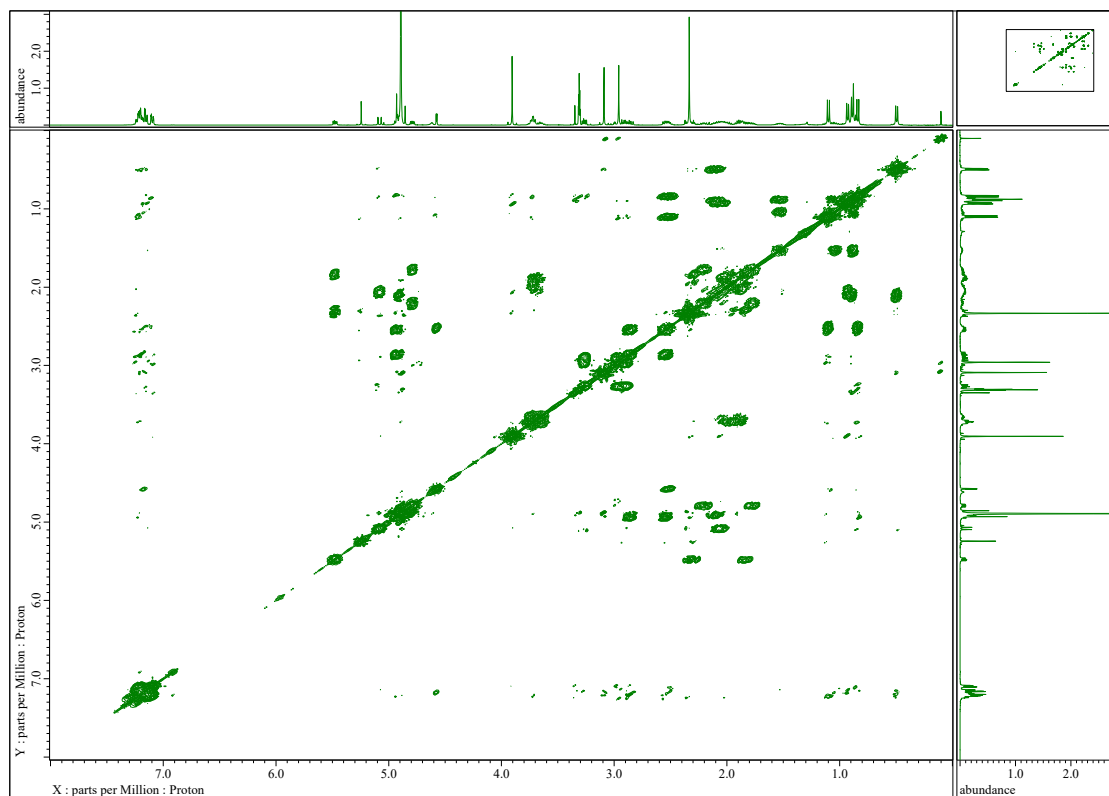
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of iheyamide A (**1**)



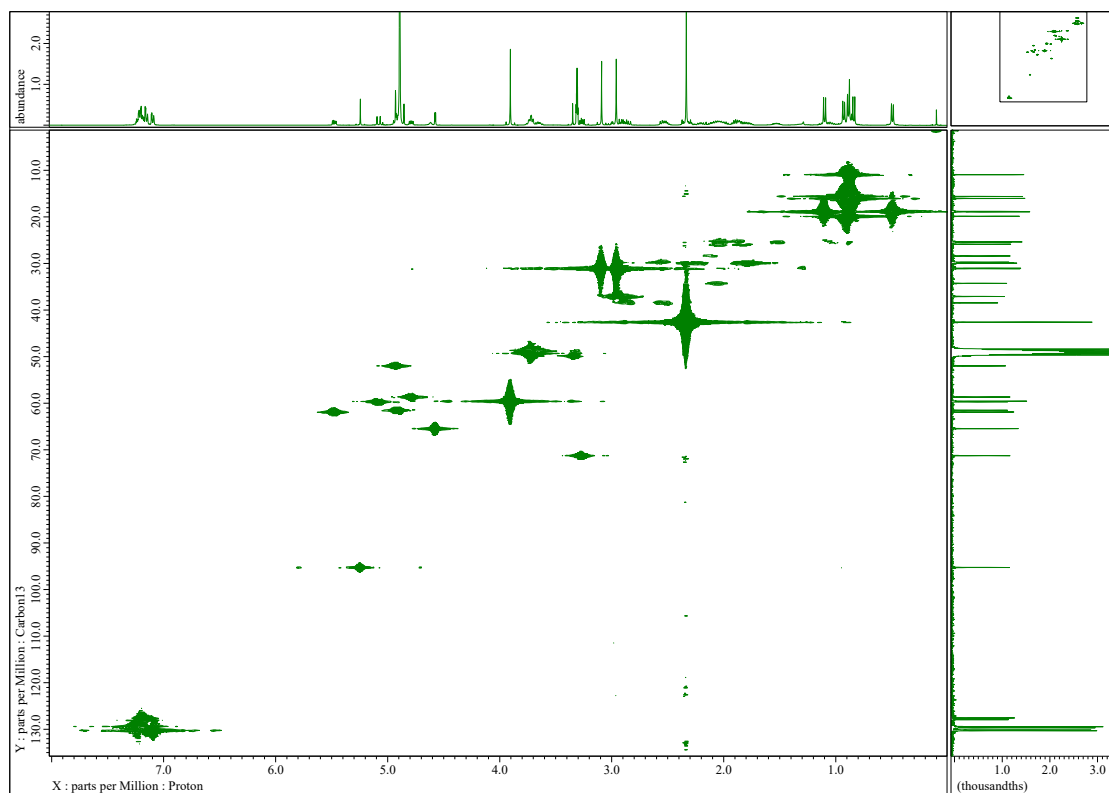
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of iheyamide A (**1**)



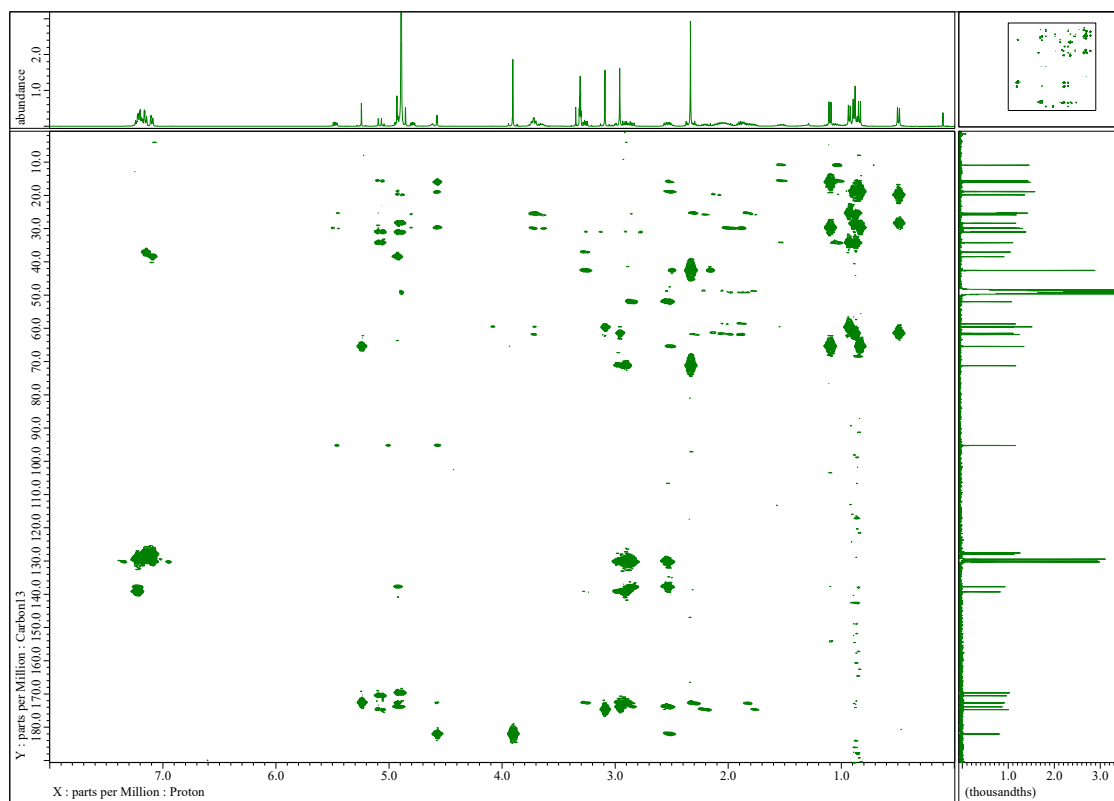
COSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide A (1)



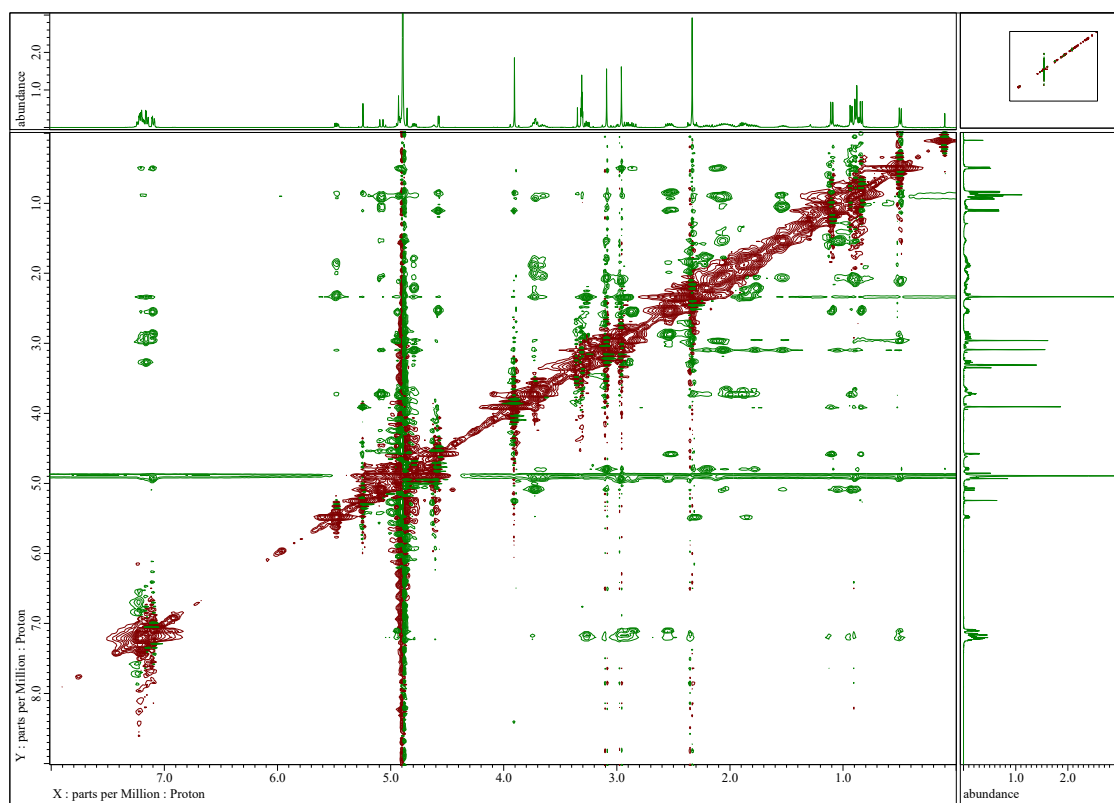
HMQC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide A (1)



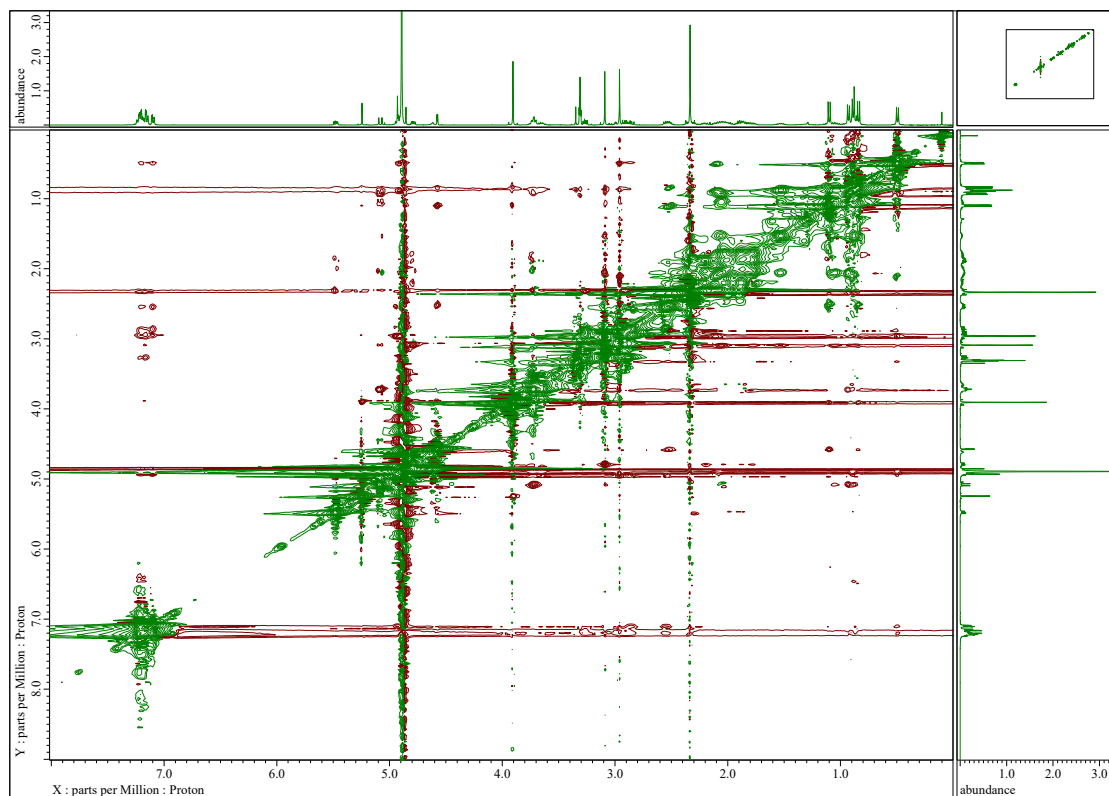
HMBC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide A (1)



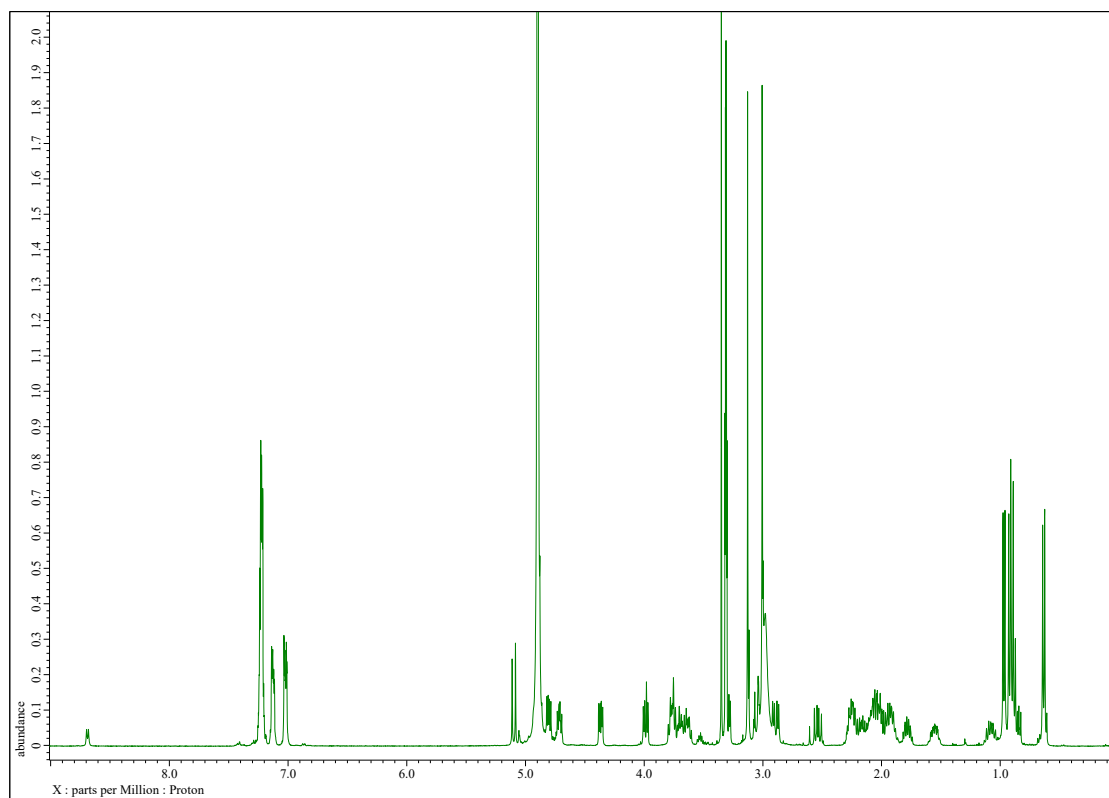
NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide A (1)



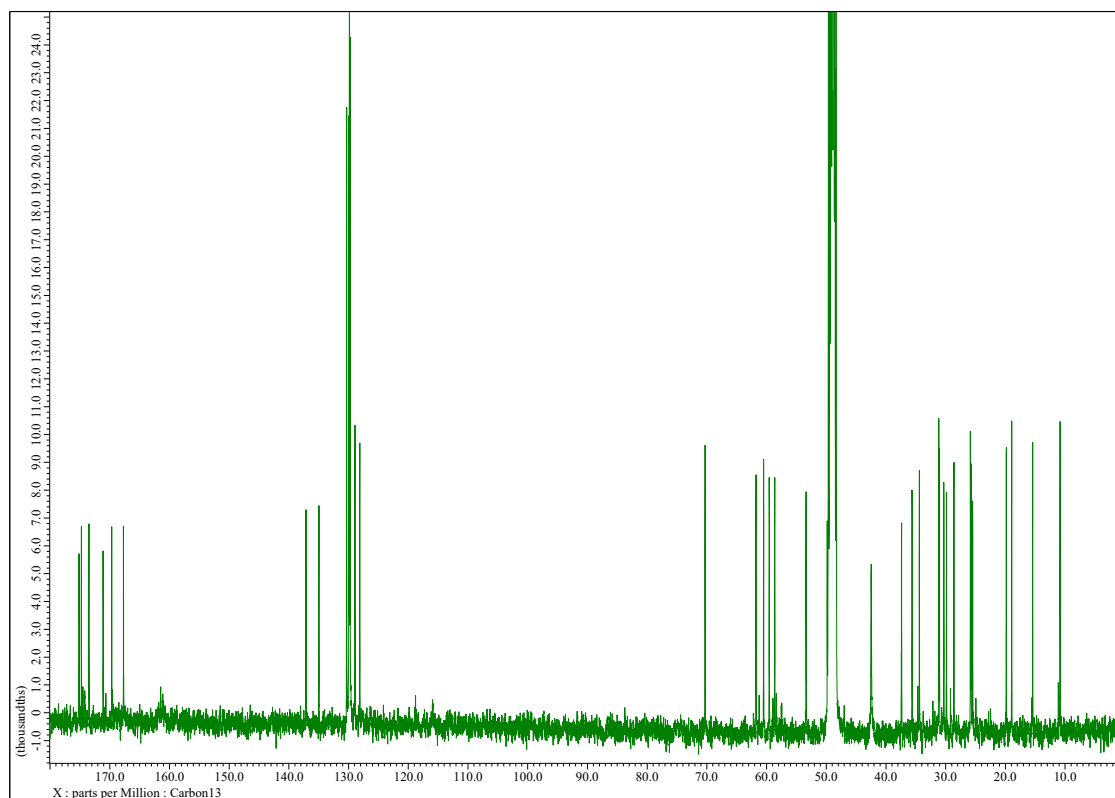
TOCSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide A (1)



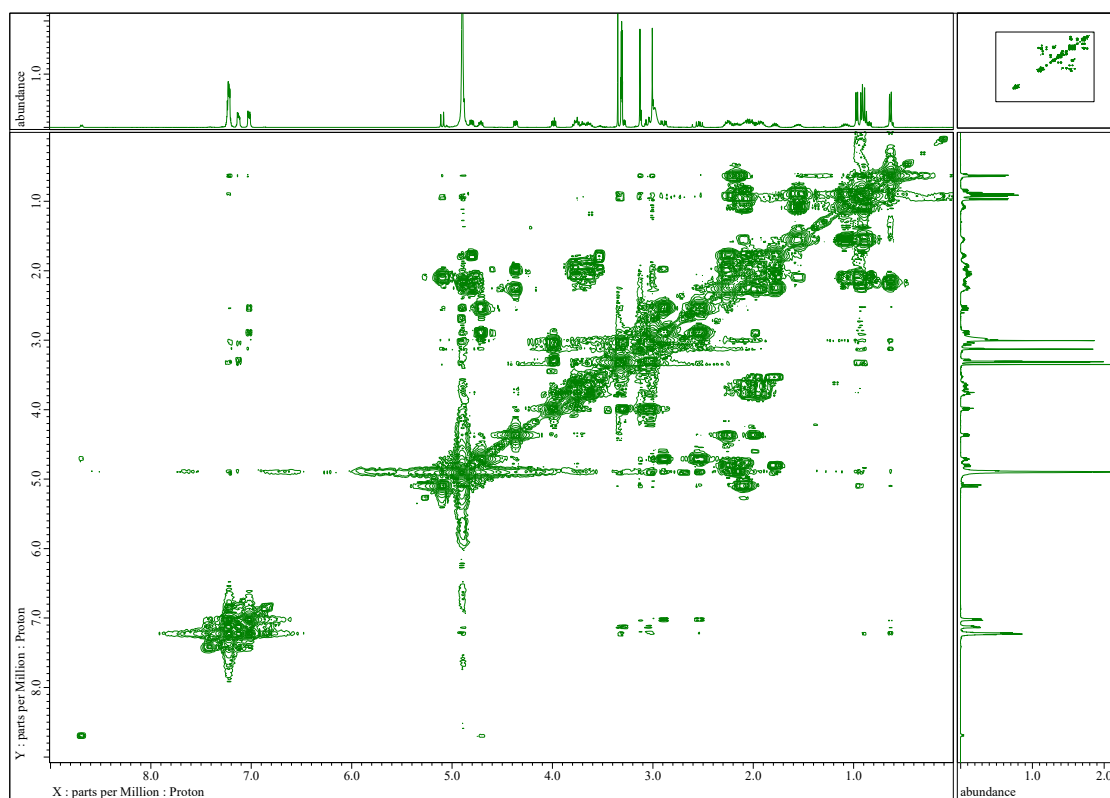
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide B (2)



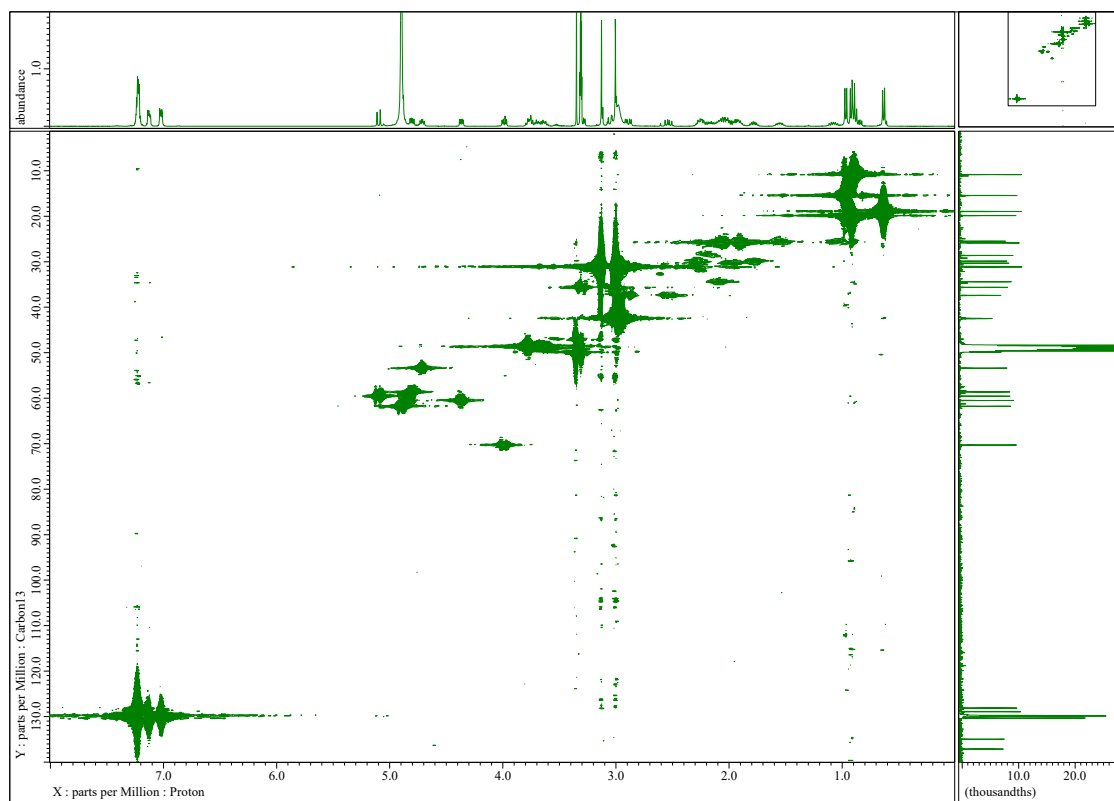
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of iheyamide B (2)



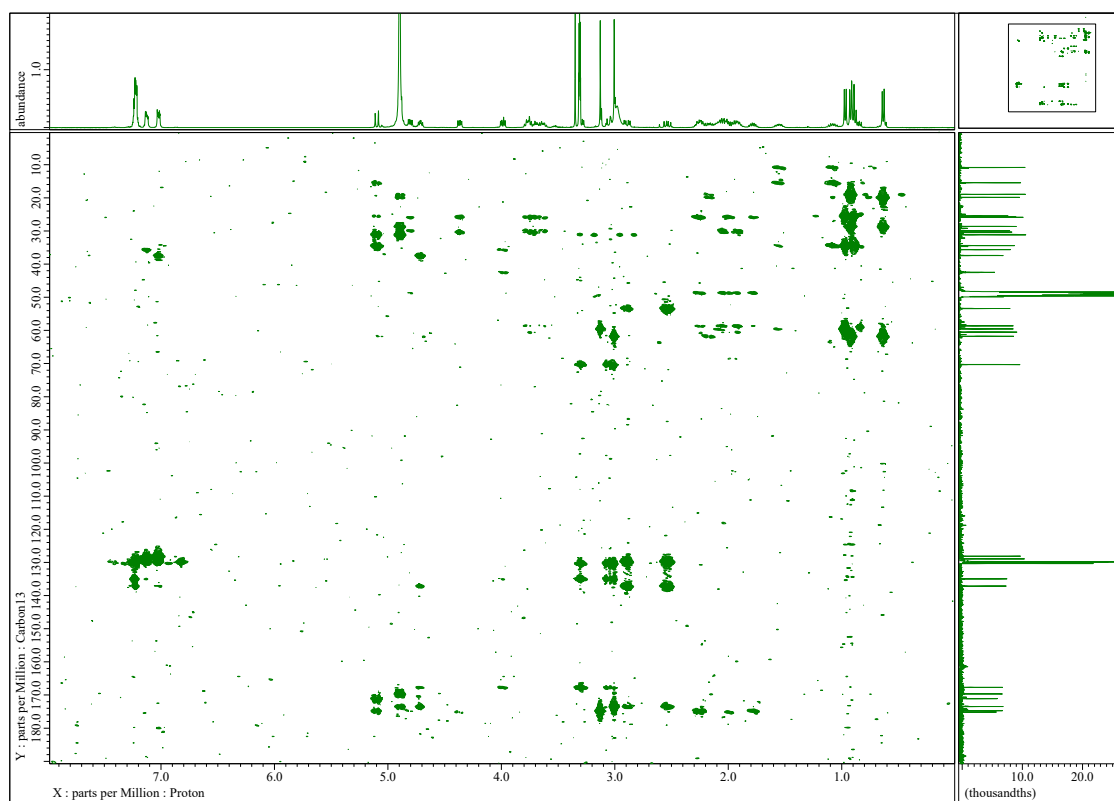
COSY (400 MHz, CD_3OD) spectrum of iheyamide B (2)



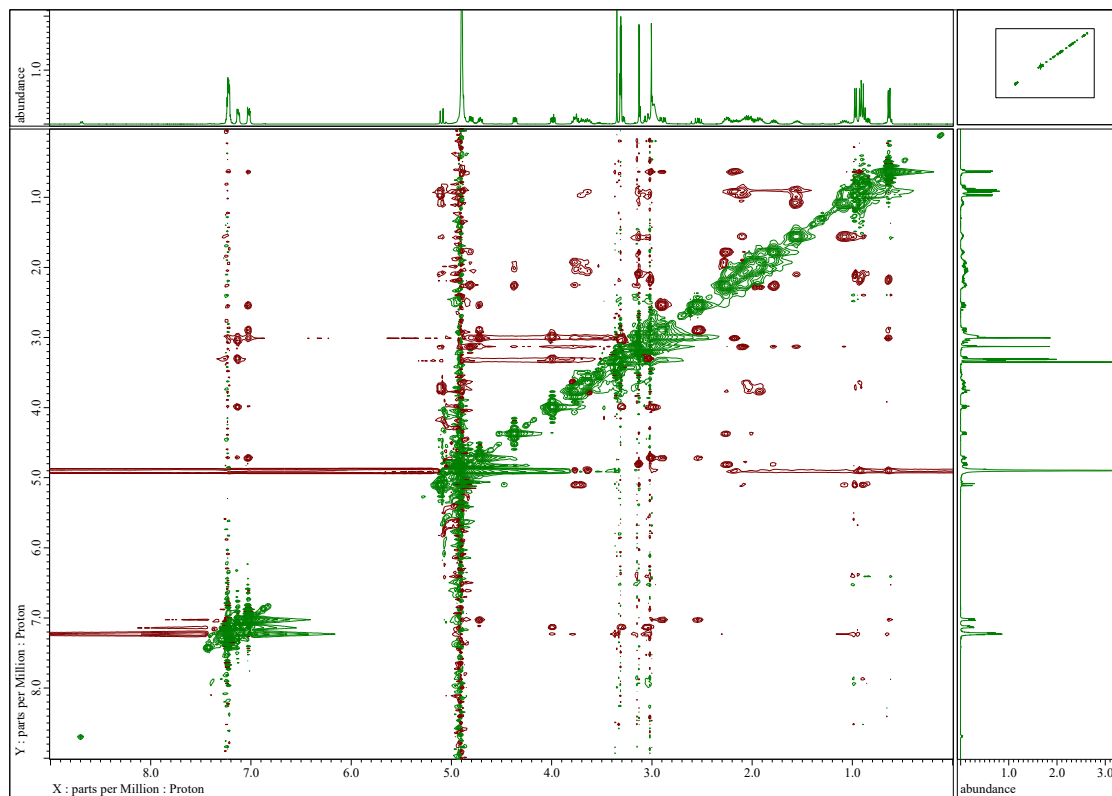
HMQC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide B (2)



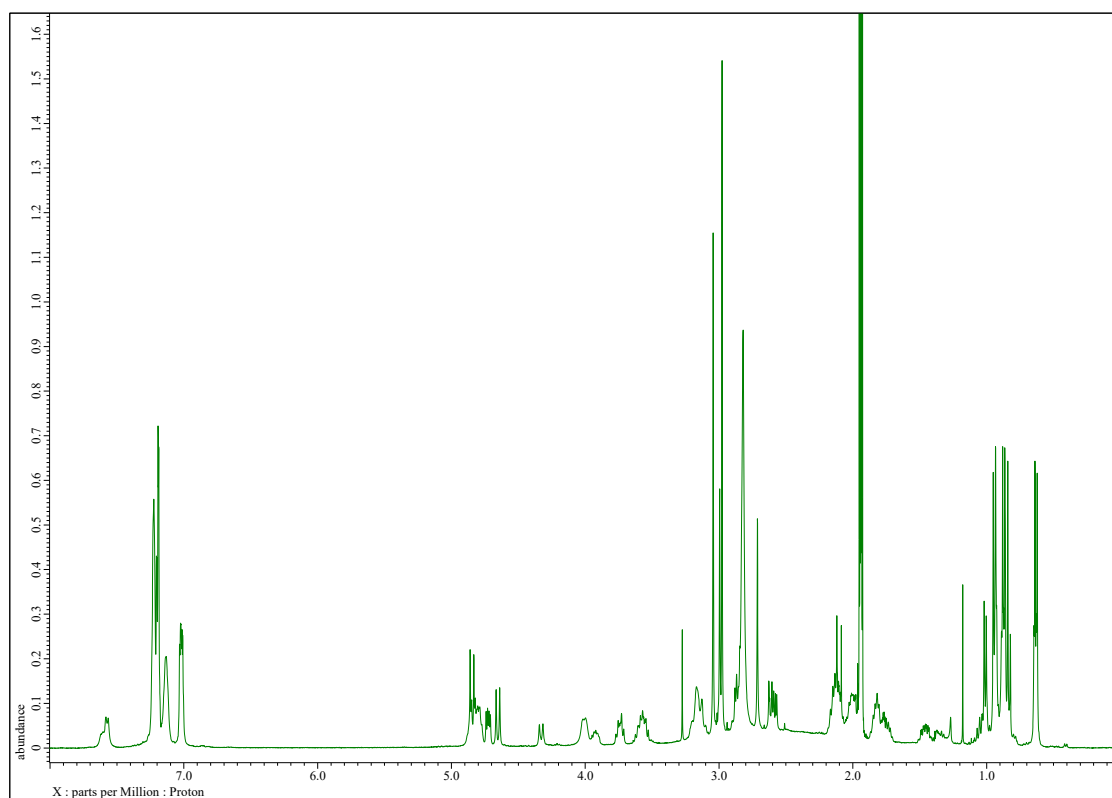
HMBC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide B (2)



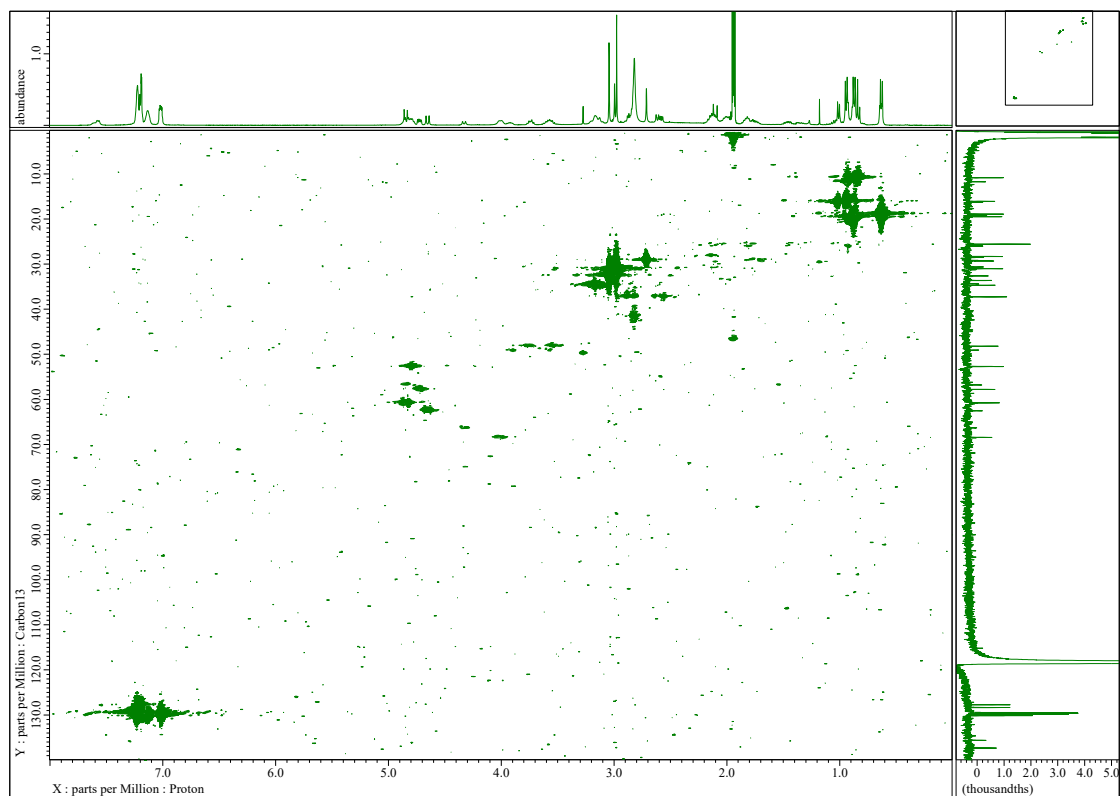
NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of iheyamide B (2)



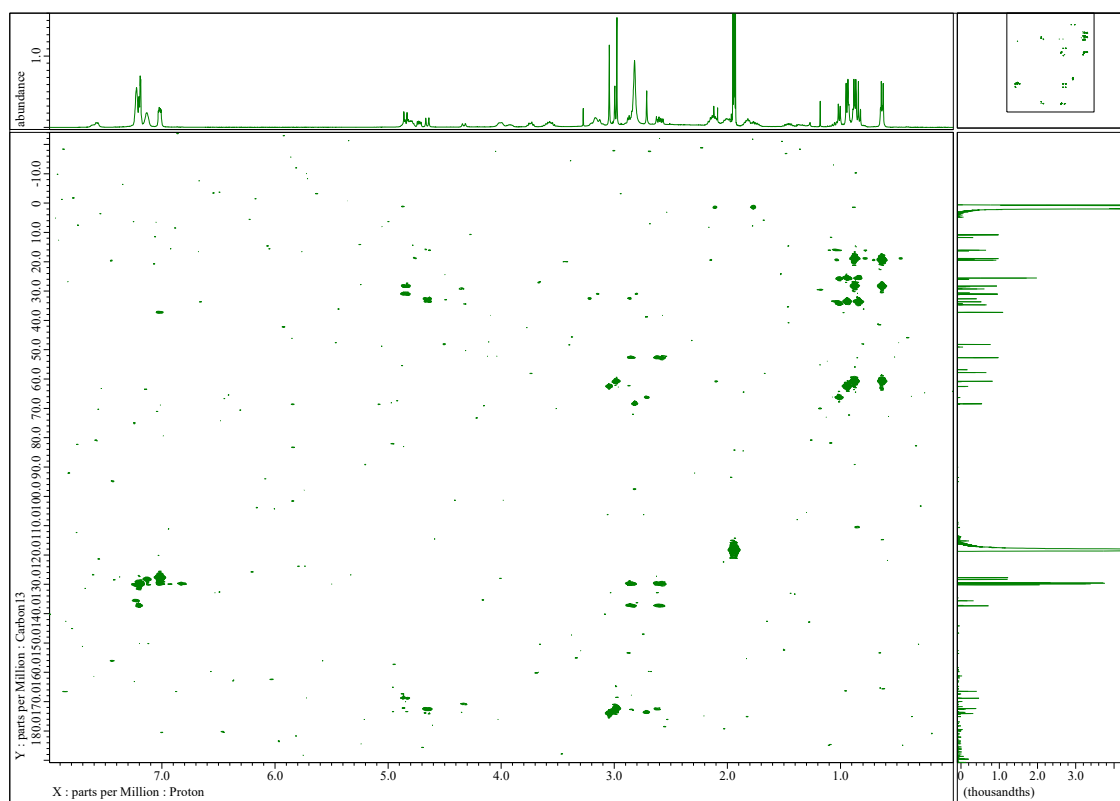
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) spectrum of iheyamide C (3)



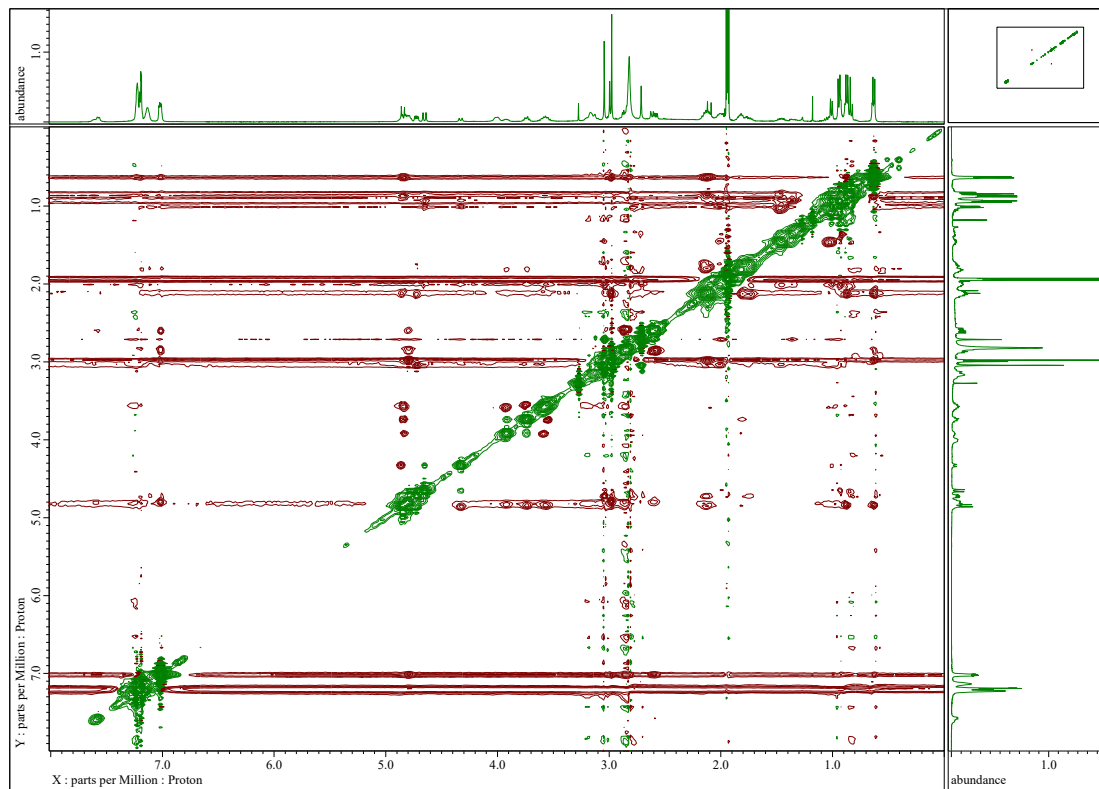
HMQC (400 MHz, CD₃CN) spectrum of iheyamide C (3)



HMBC (400 MHz, CD₃CN) spectrum of iheyamide C (3)



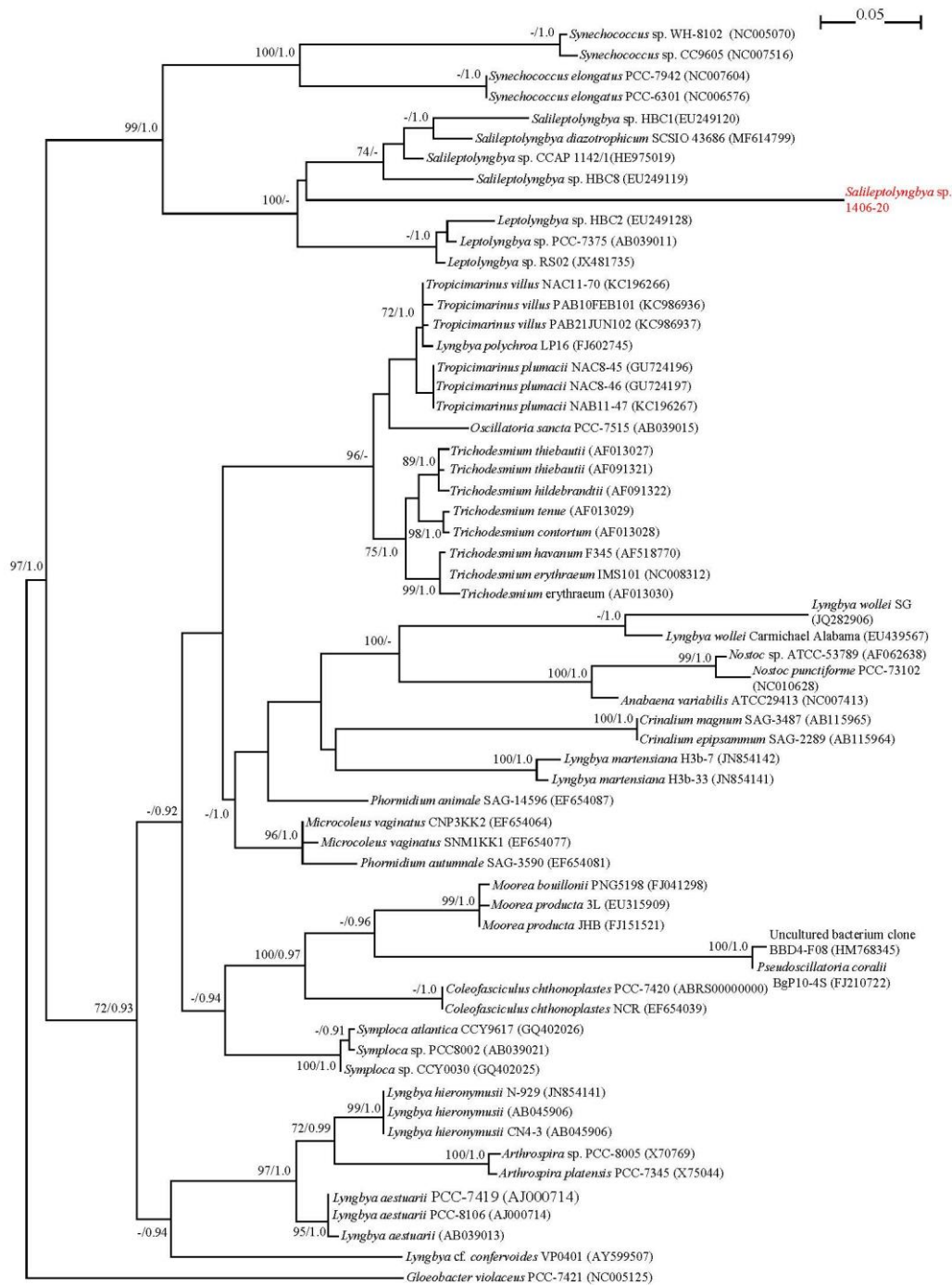
NOESY (400 MHz, CD₃CN) spectrum of iheyamide C (3)



第3節 第3章の実験

Identification of the Marine Cyanobacterium

A cyanobacterial filament was isolated under a microscope and crushed with freezing and thawing. The 16S rDNA genes were PCR-amplified from isolated DNA using the primer set CYA359F (a cyanobacterial-specific primer) and CYA1371R (a universal primer). The PCR reaction contained DNA derived from a cyanobacterial filament, 0.5 μ L of KOD-Multi & Epi- (Toyobo), 1.0 μ L of each primer (0.5 μ M, respectively), 12.5 μ L of 2 \times PCR Buffer for KOD-Multi & Epi-, and H₂O for a total volume of 25 μ L. The PCR reaction was performed as follows: initial denaturation for 2 min at 94 °C, and amplification by 40 cycles of 10 sec at 98 °C and 1.5 min at 66 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. The obtained DNA was sequenced with CYA359F and CYA1371R primers. This sequence is available in the DDBJ/EMBL/Genbank databases under accession number LC610901. The nucleotide sequence of 16S rRNA gene obtained in this study was used for phylogenetic analysis with the sequences of related cyanobacterial 16S rRNA genes. All sequences were aligned by the SINA web service (version 1.2.11)¹⁷⁷ with default settings. The poorly aligned positions and divergent regions were removed by Gblocks Server (version 0.91b),¹⁷⁸ implementing the options for a less stringent selection, including the ‘Allow smaller final blocks’, ‘Allow gap positions within the final blocks’ and ‘Allow less strict flanking positions’ options. The obtained 926 nucleotide positions were used for phylogenetic analysis. JModeltest (version 2.1.7)^{179,180} with default settings was used to select the best model of DNA substitution for the Maximum Likelihood (ML) analysis and Bayesian analysis according to the Akaike information criterion (AIC). The ML analysis was conducted by PhyML (version 20131016),¹⁸⁰ using the GTR+I+G model with a gamma shape parameter of 0.4470, a proportion of invariant sites of 0.4500 and nucleotide frequencies of $F(A) = 0.2461$, $F(C) = 0.2362$, $F(G) = 0.3153$, $F(T) = 0.2024$. Bootstrap resampling was performed on 1,000 replicates. The ML tree was visualized with Njplot (version 2.3).¹⁸¹ The Bayesian analysis was conducted by MrBayes (version 3.2.5)¹⁸² using the GTR+I+G model. The Markov chain Monte Carlo process was set at 2 chains, and 1,000,000 generations were conducted. Sampling frequency was assigned at every 500 generations. After analysis, the first 100,000 trees were deleted as burn-in, and the consensus tree was constructed. The Bayesian tree was visualized with FigTree (version 1.4.0, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). As a result, the cyanobacterium (accession no. LC610901) formed a clade with *Salileptolyngbya* sp.⁹⁶ Therefore, the cyanobacterium was classified into *Salileptolyngbya* sp.



Phylogenetic tree inferred from 16S rDNA sequences using the ML method. The phylogeny is rooted with *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. The numbers at the nodes indicate bootstrap values (values <70 % are not shown) and posterior probability (values <0.9 are not shown) for the ML/Bayesian inference.

Collection, Extraction and Isolation

The cyanobacterium *Salileptolyngbya* sp. (1350 g, wet weight) was collected at Kinenhama beach, Kagoshima, Japan, in June 2014. The collected cyanobacterium was extracted with EtOH (2 × 3 L) for 3 days. The extract was filtered, and the filtrate was concentrated. The residue was partitioned between EtOAc (3 × 0.3 L) and H₂O (0.3 L). The material obtained from the organic layer was partitioned between 90% aqueous MeOH (0.3 L) and hexane (3 × 0.3 L), and the aqueous MeOH layer was evaporated to give an aqueous MeOH fraction (3.68 g). A part of this aqueous MeOH (1.53 g) fraction was separated by column chromatography on ODS (15.3 g) eluted with 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH and CHCl₃-MeOH (1:1). A part of the fraction (98.7 mg) eluted with 80% MeOH was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 80% MeOH] in five batches to give the fraction that contained kinenzoline (**4**, 48.7 mg, last collected fraction). the whole fraction that contained kinenzoline (**4**) was further purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 85% MeOH] to give the fraction that contained kinenzoline (**4**, 13.3 mg, *t_R* = 20.2 min). The fraction was further purified by HPLC [Cosmosil Cholester (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 60% MeCN] to give the fraction that contained kinenzoline (**4**, 2.0 mg, *t_R* = 39.0 min). The fraction was finally purified by HPLC [Cosmosil 5PE-MS (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 70% MeOH containing 0.1% TFA] and partitioned between EtOAc (3 × 20 ml) and K₂CO₃ aqueous solution (20 ml). The organic layer was evaporated to give kinenzoline (**4**, 1.7 mg, *t_R* = 33.4 min).

Kinenzoline (4): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ -88.3 (*c* 0.073, MeOH); IR (neat) 3377, 2925, 1743, 1647, 1514, 1449 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C {¹H} NMR, COSY, and HMBC data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 746.4135 [M+H]⁺ (calcd for C₃₈H₆₀N₅O₈S, 746.4163).

Synthesis of (*R*)- and (*S*)-2-Methylcysteic Acid⁵⁷

A sample of (*R*)-2-methylcysteine hydrochloride (5.0 mg) was treated with 2 mL of a mixture of H₂O₂-HCO₂H (1:9) at 0 °C for 1 h. The product mixture was concentrated to dryness by evaporation to give (*R*)-2-methylcysteic acid. The residue was then reconstituted in 250 μl of H₂O for amino acid analysis by chiral HPLC. Similarly, (*S*)-2-methylcysteine hydrochloride was reacted to yield (*S*)-2-methylcysteic acid.

Determination of the Absolute Configuration of kinenzoline (**4**)

kinenzoline (**4**, 0.2 mg) was treated with 6 M HCl (100 μL) for 24 h at 110 °C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and could be separated into each component [Condition 1 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 (min) of components; Pro (2.9), Tyr (7.1) and *N, N*-diMe-Leu (9.1), Condition 2 for HPLC separation: column, Cosmosil PBr ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate, 1.0 ml/min; detection 215 nm; solvent 5% MeCN containing 0.1% TFA. Retention times (min) of components; 2-methylcysteine (4.0) and valic acid (11.0)]. The fraction of 2-methylcysteine from natural **4** was treated with 2 ml of a mixture of H₂O₂-HCO₂H (1:9) at 0 °C 1 h. The product mixture was concentrated to dryness by evaporation to give 2-methylcysteic acid.

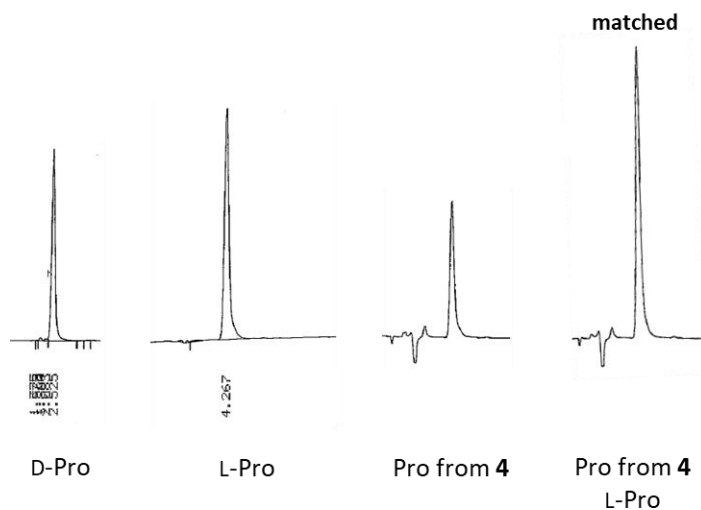
Each fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, several conditions]. With 2 mM CuSO₄ as a solvent, the retention times for authentic standards were 2.5 min (D-Pro) and 4.3 min (L-Pro) and 4.9 min ((*R*)-2-methylcysteic acid) and 5.8 min ((*S*)-2-methylcysteic acid). The retention times of each amino acid from natural **4** were 4.3 min and 4.9 min, indicating the presence of L-Pro and (*R*)-2-methylcysteic acid, respectively. With 5% MeOH-95% 2 mM CuSO₄ solution as a solvent, the retention times for authentic standards were 6.7 min (D-Tyr) and 9.6 min (L-Tyr). The retention times of each amino acid from natural **4** were 6.7 min, indicating the presence of D-Tyr. With 10% MeOH-90% 2 mM CuSO₄ solution as a solvent, the retention times for authentic standards were 6.4 min (*N, N*-diMe-D-Leu) and 10.6 min (*N, N*-diMe-L-Leu). The retention times of each amino acid from natural **4** were 10.6 min, indicating the presence of *N, N*-diMe-L-Leu. With 15% MeCN-85% 2 mM CuSO₄ solution as a solvent, the retention times for authentic standards were 5.4 min (D-valic acid) and 9.2 min (L-valic acid). The retention times of each amino acid from natural **4** were 9.2 min, indicating the presence of L-valic acid.

Kinenzoline (**4**, 0.2 mg) was dissolved in 2.5 mL MeOH and ozonized at -78 °C for 30 min. The solvent was evaporated, and the product was treated with 6 M HCl (100 μ L) for 18 h at 110 °C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and separated into *N*-Me-Val. [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O. Retention times (min) of components; *N*-Me-Val (4.0)]. The fraction was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention time was compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, several conditions]. With 2 mM CuSO₄ as a solvent, the retention times for authentic standards were 3.3 min (*N*-Me-D-Val) and 5.2 min (*N*-Me-L-Val). The retention time of *N*-Me-Val of natural **4** was 5.2 min, indicating the presence of *N*-Me-L-Val.

Determination of the absolute configuration of each amino acids in kinenzoline (4)

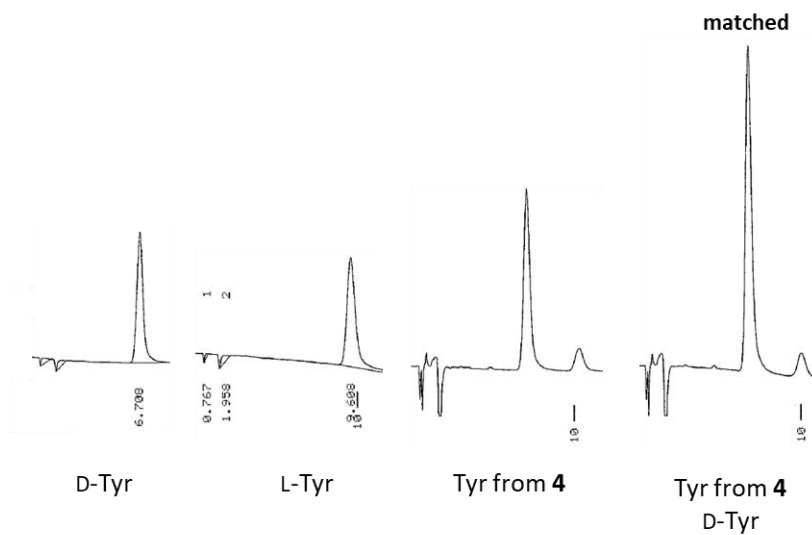
Pro: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: D-Pro (2.5), L-Pro (4.3)



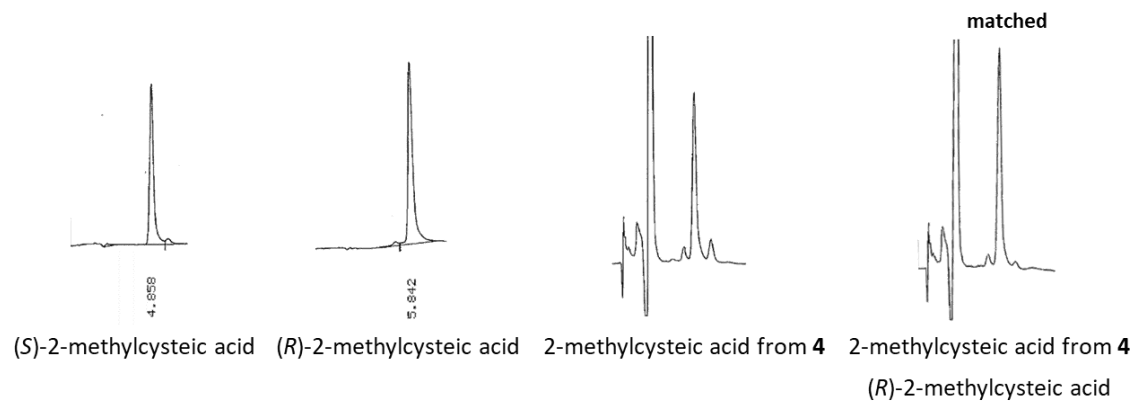
Tyr: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 5% MeOH + 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: D-Tyr (6.7), L-Tyr (9.6)



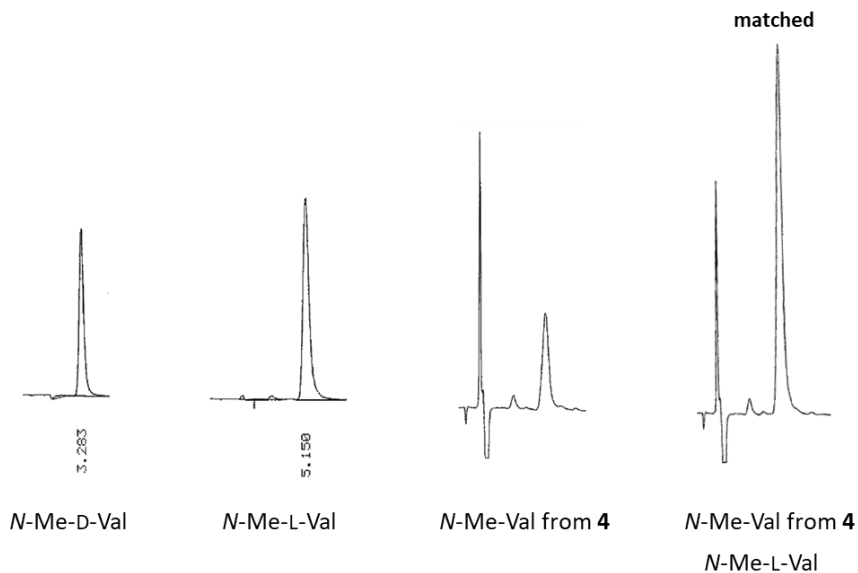
2-methylcysteic acid from 2-MeTzn from **4**: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: (*S*)-2-methylcysteic acid (4.9), (*R*)-2-methylcysteic acid (5.8)



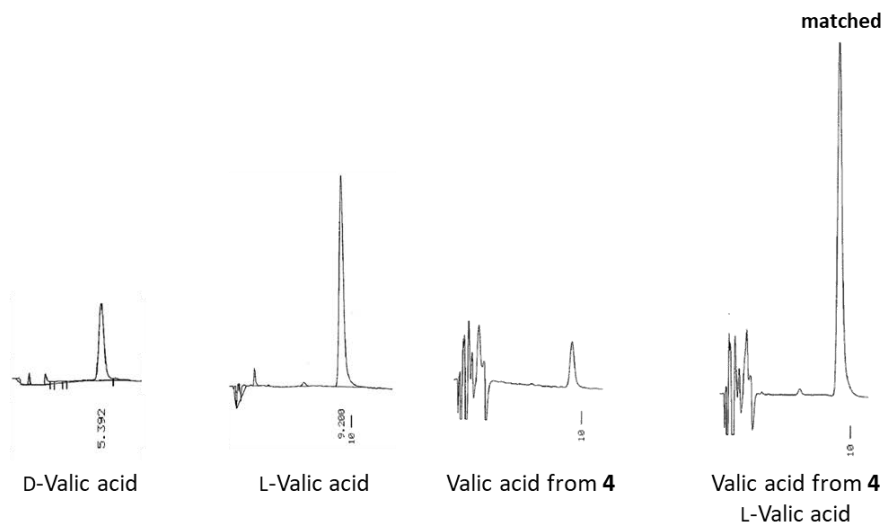
N-Me-Val: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: *N*-Me-D-Val (3.3), *N*-Me-L-Val (5.2)



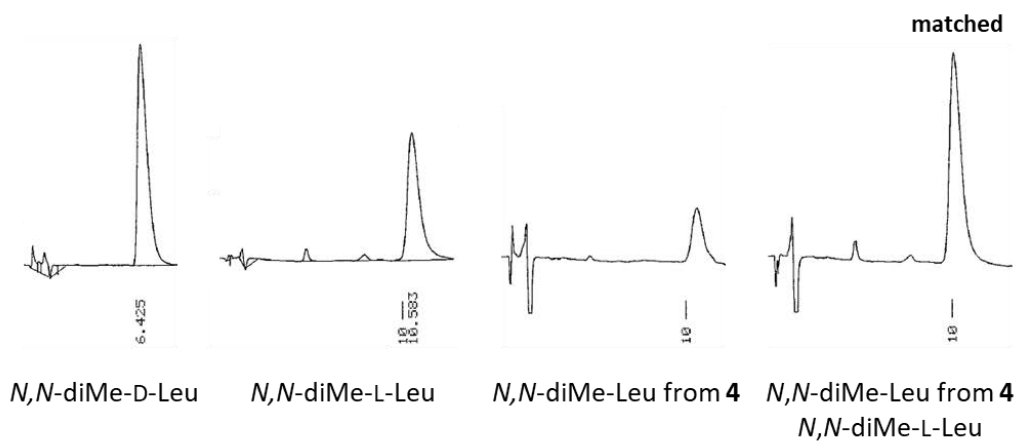
Valic acid: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 15% MeCN + 2.0 mM CuSO₄.

t_R (min): Authentic samples: D-Valic acid (5.4), L-Valic acid (9.2)

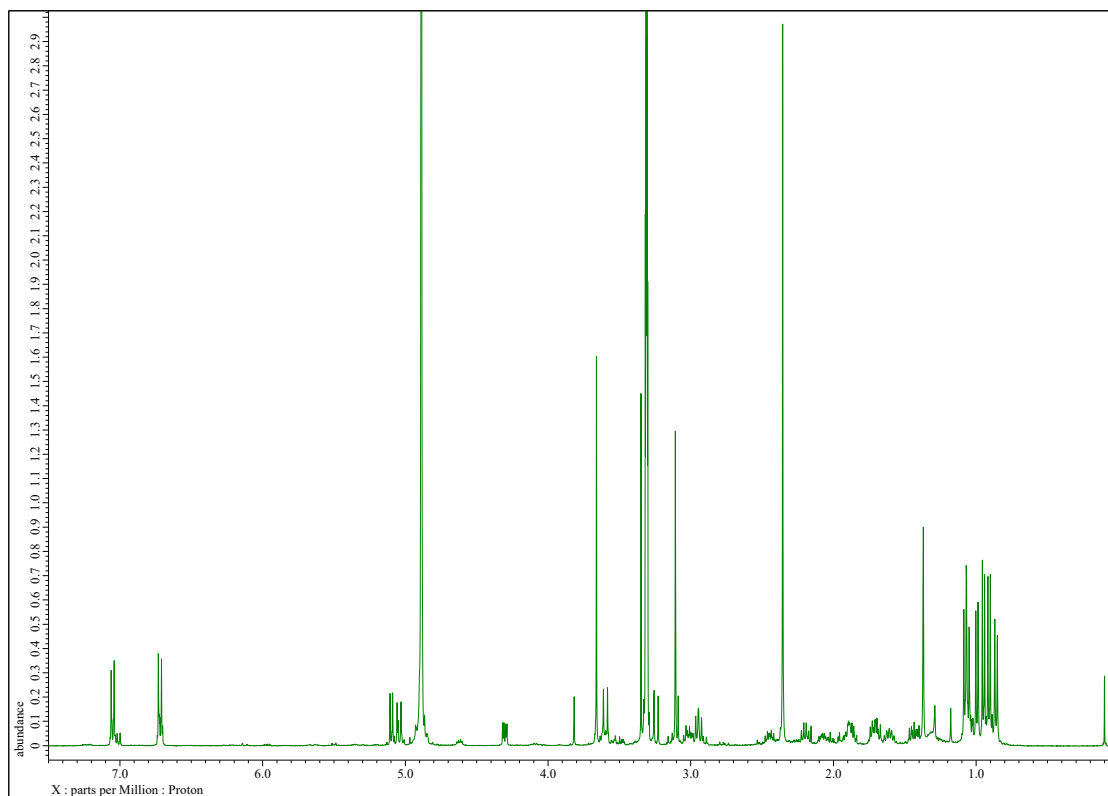


N,N-diMe-Leu: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 10% MeOH + 2.0 mM CuSO₄.

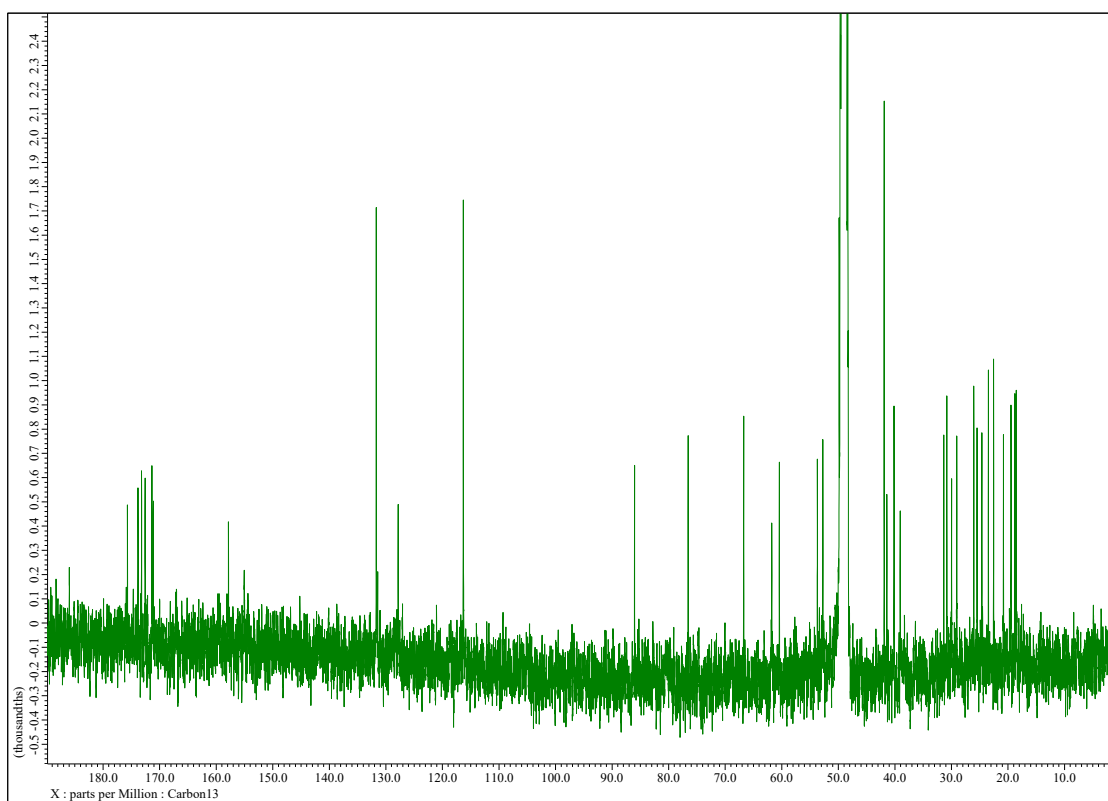
t_R (min): Authentic samples: *N,N*-diMe-D-Leu (6.4), *N,N*-diMe-L-Leu (10.6)



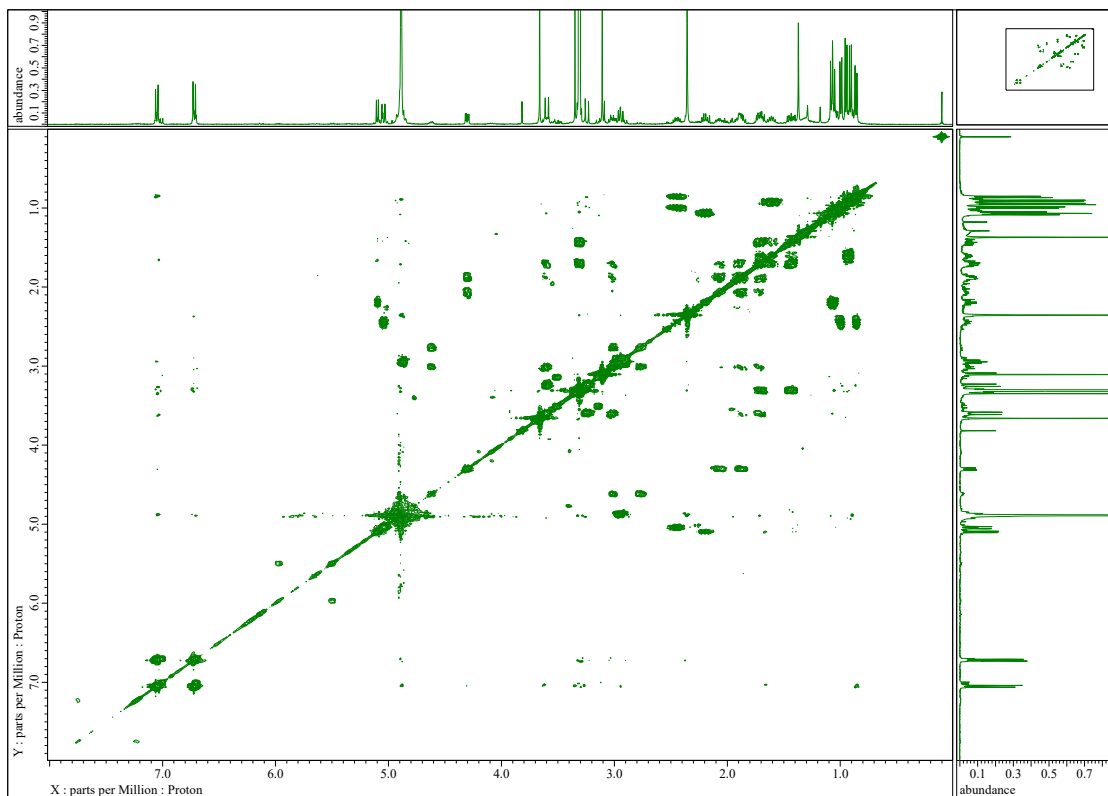
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of kinezoline (**4**)



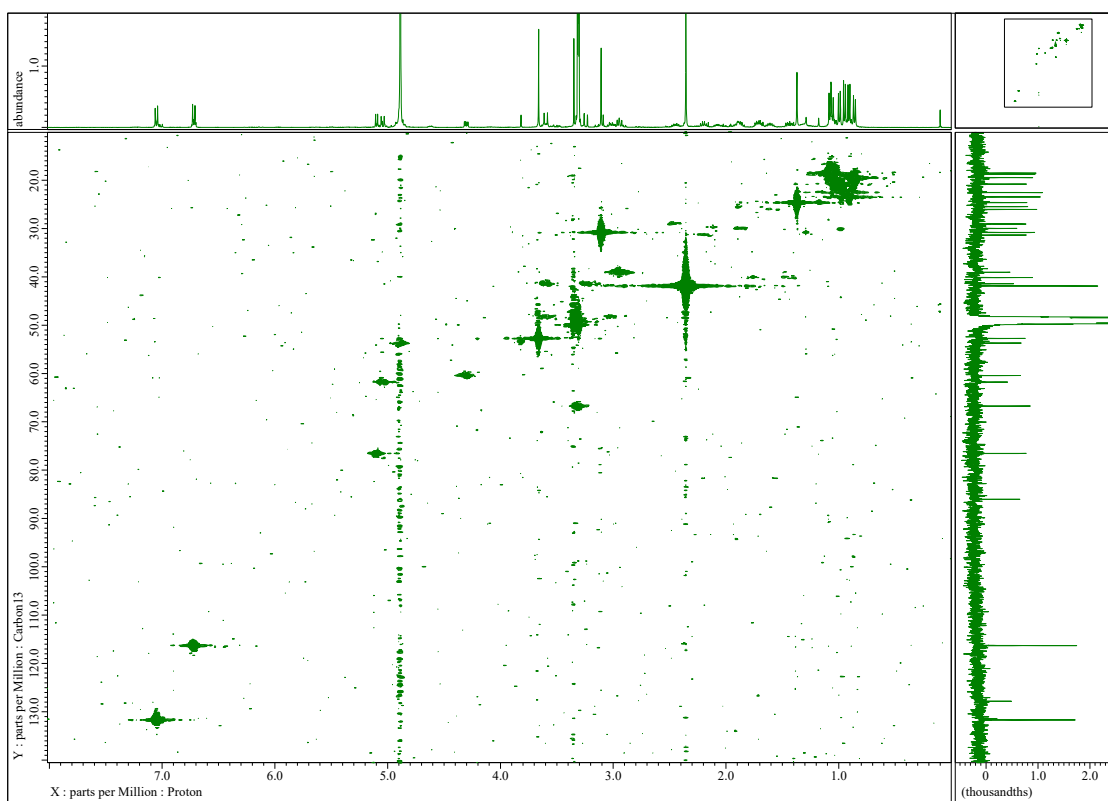
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of kinezoline (**4**)



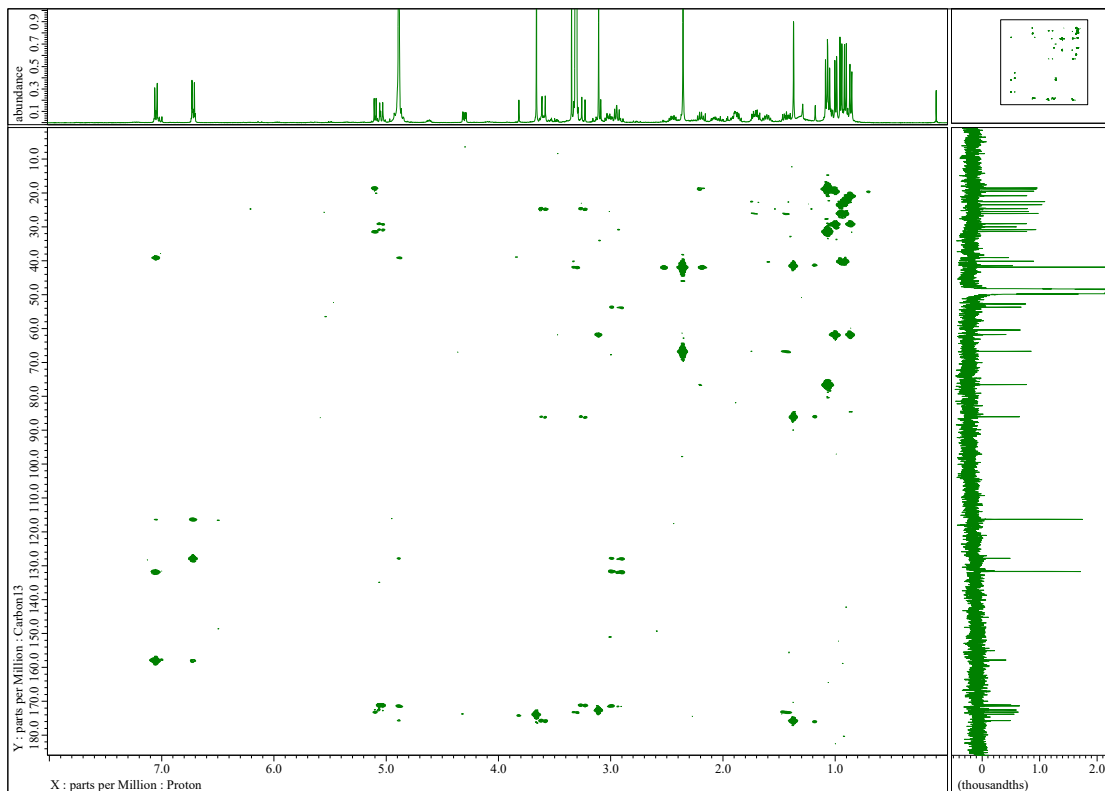
COSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of kinenzoline (4)



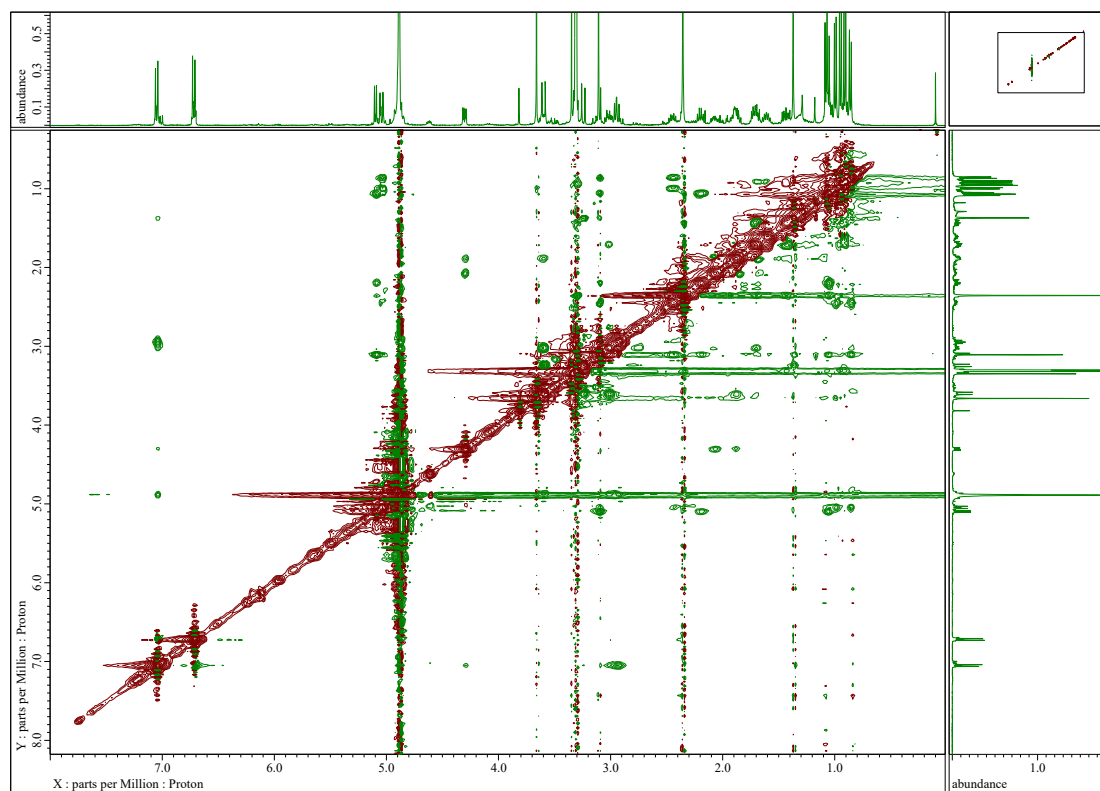
HMQC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of kinenzoline (4)



HMBC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of kinezoline (4)



NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of kinezoline (4)



第4節 第4章の実験

Identification of the Marine Cyanobacterium

A cyanobacterial filament was isolated under a microscope and crushed with freezing and thawing. The 16S rDNA genes were PCR-amplified from isolated DNA using the primer set CYA359F (a cyanobacterial-specific primer) and CYA1371R (a cyanobacterial-specific primer). The PCR reaction mixture contained DNA derived from a cyanobacterial filament, 0.5 μ L of KOD-Multi & Epi- (Toyobo), 1.0 μ L of each primer (0.5 μ M, respectively), 12.5 μ L of 2 \times PCR Buffer for KOD-Multi & Epi-, and H₂O for a total volume of 25 μ L. The PCR reaction was performed as follows: initial denaturation for 2 min at 94 °C, and amplification by 40 cycles of 10 sec at 98 °C and 1.5 min at 66 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. The obtained DNA was sequenced with CYA359F and CYA1371R primers. This sequence is available in the DDBJ/EMBL/Genbank databases under accession number LC697001. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene obtained in this study was used for phylogenetic analysis with the sequences of related cyanobacterial 16S rDNA genes. All sequences were aligned by the SINA web service (version 1.2.11)¹⁷⁷ with default settings. The poorly aligned positions and divergent regions were removed by Gblocks Server (version 0.91b),¹⁷⁸ implementing the options for a less stringent selection, including the ‘Allow smaller final blocks’, ‘Allow gap positions within the final blocks’ and ‘Allow less strict flanking positions’ options. The obtained 681 nucleotide positions were used for phylogenetic analysis. JModeltest (version 2.1.7)^{179,180} with default settings was used to select the best model of DNA substitution for the Maximum Likelihood (ML) analysis and Bayesian analysis according to the Akaike information criterion (AIC). The ML analysis was conducted by PhyML (version 20131016),¹⁸⁰ using the TIM1+I+G model with a gamma shape parameter of 0.4480, a proportion of invariant sites of 0.4950 and nucleotide frequencies of $F(A) = 0.2360$, $F(C) = 0.2261$, $F(G) = 0.3162$, $F(T) = 0.2217$. Bootstrap resampling was performed on 1,000 replicates. The ML tree was visualized with Njplot (version 2.3).¹⁸¹ The Bayesian analysis was conducted by MrBayes (version 3.2.5)¹⁸² using the TIM1+I+G model. The Markov chain Monte Carlo process was set at 2 chains, and 1,000,000 generations were conducted. Sampling frequency was assigned at every 500 generations. After analysis, the first 100,000 trees were deleted as burn-in, and the consensus tree was constructed. The Bayesian tree was visualized with FigTree (version 1.4.0, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). As a result, the cyanobacterium (accession no. LC697001) formed a clade with *Vermifilaceae* family¹⁰¹. Therefore, the cyanobacterium was classified into *Vermifilaceae* family. In addition, morphological observation was performed using a phase contrast microscopy ECLIPSE Ti-S (Nicon, Tokyo, Japan). The mean cell size and standard deviation of 30 cells were measured. The morphological characteristics were summarized in Figure S2. The morphologies of the collected marine cyanobacterium 2007-23 consisted with those of

Collection, Extraction and Isolation

The cyanobacterium *Leptochromotrix valpauliae* (250 g, wet weight) was collected at Ie island, Okinawa, Japan, in July 2020. The collected cyanobacterium was extracted with EtOH (2 × 2 L) for 3 days. The extract was filtered, and the filtrate was concentrated. The residue was partitioned between EtOAc (3 × 0.3 L) and H₂O (0.3 L). The material obtained from the organic layer was partitioned between 90% aqueous MeOH (0.3 L) and hexane (3 × 0.3 L), and the aqueous MeOH layer was evaporated to give an aqueous MeOH fraction (307.5 mg). This aqueous MeOH fraction was separated by column chromatography on ODS (4.0 g) eluted with 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH and CHCl₃-MeOH (1:1). The fraction (136.1 mg) eluted with 80% MeOH was subjected to AFCS [ϕ 11 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (51/49 → 30/70 → 2/98 → 0/100)] in seven batches to give the fraction that contained iezoside (**5**, 7.7 mg, t_R = 52 min, fourth collected fraction). The whole fraction that contained iezoside (**5**) was further purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent 80% MeOH] to give iezoside (**5**, 5.4 mg, t_R = 42.3 min).

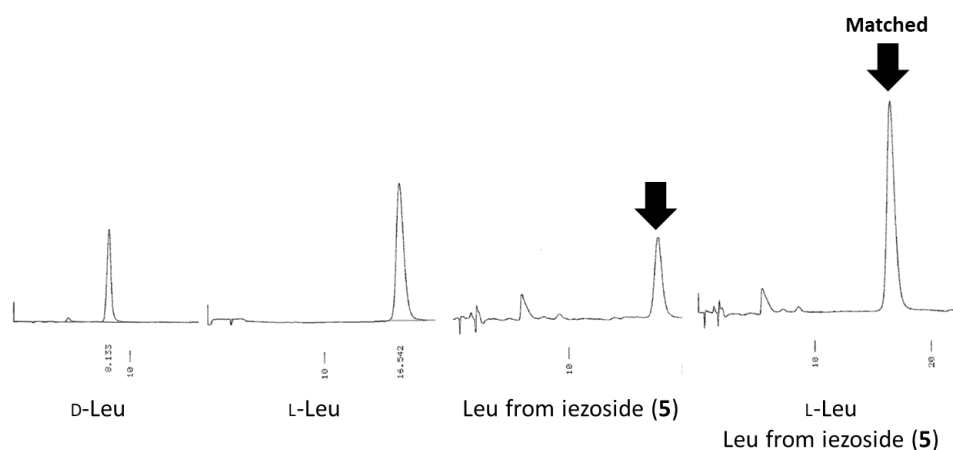
Iezoside (5): colorless oil; [α]_D²⁵ +56 (c 0.38, CHCl₃); IR (neat) 3457, 3288, 2960, 2931, 2873, 2826, 1684, 1618, 1522, 1448, 1397 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C {¹H} NMR, COSY, and HMBC data, see Table 1; HRESIMS m/z 690.4169 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₆₀N₃O₇S, 690.4152).

Ozonolysis, Acid Hydrolysis, and Amino Acid Separation of iezoside (5)

Iezoside (**5**, 0.2 mg) was dissolved in 2.5 mL MeOH and ozonized at -78 °C for 10 min. The solvent was evaporated, and the product was treated with 6 M HCl (100 μ l) for 24 h at 110 °C. The hydrolyzed product was evaporated to dryness and was separated into each amino acid component [Condition for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (ϕ 4.6 × 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O containing 0.1% TFA. Retention times (min) of components; *N*-Me-Ala (3.4) and Leu (12.0)].

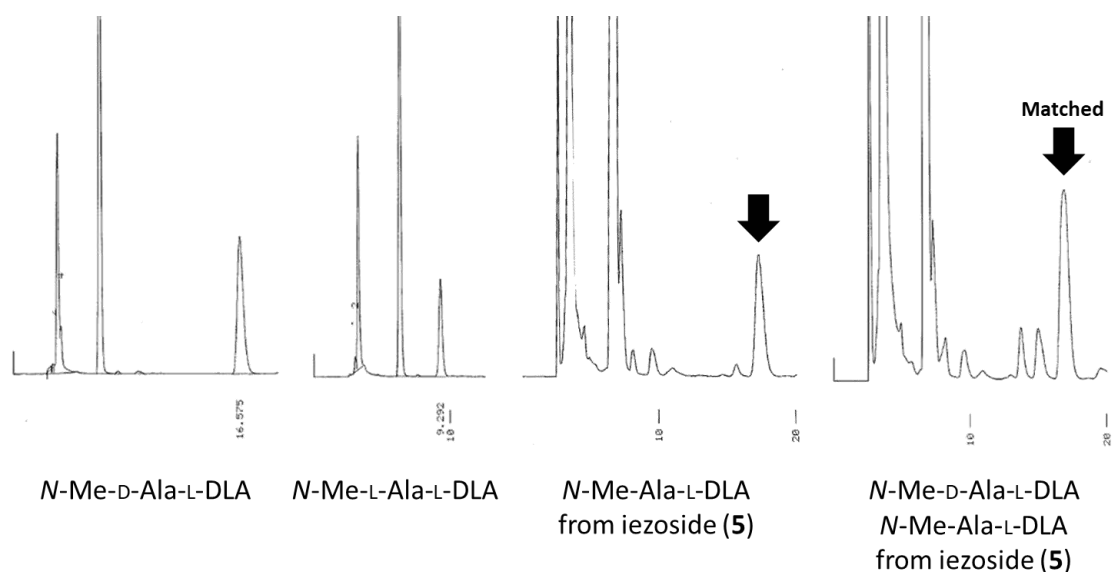
Determination of the Absolute Configuration of Leu of iezoside (5)

Separated Leu was dissolved in H₂O (50 μ L) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention time was compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) (ϕ 4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, several conditions]. With 2 mM CuSO₄ as a solvent, the retention times for authentic standards were 8.1 min (D-Leu) and 16.5 min (L-Leu). The retention time of Leu of natural **5** was 16.5 min, indicating the presence of L-Leu.



Determination of the Absolute Configuration of *N*-Me-Ala of iezoside (5)

Separated *N*-Me-Ala were dissolved in H₂O (50 μ L). Marfey's reagent (0.1% 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamide) solution in acetone (100 μ L) and 50 μ L of 1 M aqueous NaHCO₃ were added to the solution. The mixture was stirred at 80 $^{\circ}$ C for 3 min, and then cooled to room temperature. The reaction was quenched with 1 M aqueous HCl (3 drops), and the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was resuspended in 50% aqueous MeCN and the solution was analyzed by reversed-phase HPLC. The retention time of the derivatized *N*-Me-Ala-L-DLA in the hydrolysate of natural **5** matched that of *N*-Me-D-Ala-L-DLA authentic sample ($t_R = 16.6$ min), but not *N*-Me-L-Ala-L-DLA authentic sample ($t_R = 9.3$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil AR-II ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 55% MeCN 45% 0.02M NaOAc].



Preparation of MTPA Esters and Determination of the Absolute Configuration at C-33 of iezoside (**5**)

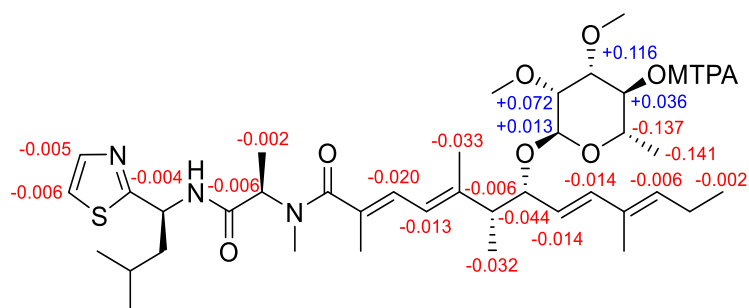
To a solution of **5** (0.2 mg, 0.29 μmol) in dry pyridine (0.1 mL) was added (*R*)-MTPACl (1 drop) at room temperature and the mixture was stirred for 10 min. The reaction mixture was diluted with MeOH (0.2 mL) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC to give iezoside (*S*)-MTPA ester (**5'a**) (0.2 mg, 0.22 μmol , $t_R = 28.7$ min). [Cosmosil 5C₁₈-MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent 90% MeOH].

5'a: ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ_H 7.74 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.66-7.63 (m, 2H), 7.52-7.47 (m, 3H), 7.45 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.41 (dq, $J = 11.4, 1.3$ Hz, 1H), 6.23 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.17 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 5.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.39 (ddd, $J = 8.2, 7.4, 5.6$ Hz, 1H), 5.34 (dd, $J = 16.0, 9.0$ Hz, 1H), 5.20 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.97 (m, 1H), 4.93 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.84-3.70 (m, 2H), 3.68 (dd, $J = 9.9, 2.9$ Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 2.50 (dq, $J = 7.0, 6.7$ Hz, 1H), 2.16-2.10 (m, 2H), 1.89 (m, 1H), 1.88 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H), 1.87-1.76 (m, 2H), 1.84 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.72-1.69 (brs, 6H), 1.33 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.07 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J = 7.7$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H); HRMS (ESI-TOF) m/z 906.4581 [M+H]⁺ (calcd for C₄₇H₆₇F₃N₃O₉S 906.4550).

To a solution of **5** (0.2 mg, 0.29 μmol) in dry pyridine (0.1 mL) was added (*S*)-MTPACl (1 drop) at room temperature and the mixture was stirred for 10 min. The reaction mixture was diluted with MeOH (0.2 mL) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC to give iezoside (*R*)-MTPA ester (**5'b**) (0.2 mg, 0.22 μmol , $t_R = 28.2$ min). [Cosmosil 5C₁₈-MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent 90% MeOH].

5'b: ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ_H 7.75 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.62-7.57 (m, 2H), 7.53-7.47 (m, 3H), 7.46 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.44 (dq, $J = 11.4, 1.3$ Hz, 1H), 6.25 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.18 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 5.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.39 (ddd, $J = 8.2, 7.4, 5.6$ Hz, 1H), 5.35 (dd, $J = 16.0, 8.8$ Hz, 1H), 5.16 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.92 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 4.09 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.90 (dq, $J = 11.0, 6.4$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 2.9, 1.7$ Hz, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.54 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.51 (dq, $J = 7.0, 6.8$ Hz, 1H), 2.18-2.10 (m, 2H), 1.89 (m, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.96 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H); HRMS (ESI-TOF) m/z 906.4583 [M+H]⁺ (calcd for C₄₇H₆₇F₃N₃O₉S 906.4550).

The absolute configuration of C33 was determined as *S* based on the $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$) values shown below.



Calculation of Stable Conformers of Model Compounds 27

Four model compounds (18*R*,19*R*)-27, (18*S*,19*R*)-27, (18*R*,19*S*)-27, and (18*S*,19*S*)-27 were built on Spartan'20. Conformational search with MMFF force field (104976 initial conformers for each isomer) was performed with default settings, and the conformers within 40 kJ/mol from the global minimum conformer were collected. Against these conformers, the following calculation steps were conducted: structure optimization at the HF/3-21G level, followed by conformer narrowing by setting the threshold at 40 kJ/mol from the global minimum conformer; energy estimation with fixing the geometries at the B3LYP/6-31G* level, followed by conformer narrowing by setting the threshold at 15 kJ/mol from the global minimum conformer; and structural optimization and frequency analysis at the B3LYP/6-31G* level, followed by conformer narrowing by setting the threshold at 10 kJ/mol of free energy from the global minimum conformer. The geometry and the energy of these stable conformers are provided in the other file.

Calculation of Chemical Shifts and Coupling Constants

Obtained sets of stable conformers were subjected to chemical shift calculations at B3LYP/6-31G* level on Spartan'20, the program automatically translates the magnetic tensors to chemical shifts followed by empirical corrections. The coupling constants were calculated based on B3LYP/PCJ-0//B3LYP/6-31G* level. The calculated chemical shifts and $^3J_{H18/H19}$ coupling constants of individual conformers were averaged based on the Boltzmann distribution calculated from free energy at 298.15 K. Statistical analyses of the results were carried out using Microsoft Excel Version 2111. The DP4 probability scores were calculated by the Goodman's procedure using their parameters (^{13}C : $\sigma = 2.306$ ppm, $\nu = 11.38$, ^1H : $\sigma = 0.185$ ppm, $\nu = 14.18$)¹¹⁴.

Calculation of ECD Spectra

Obtained sets of stable conformers were subjected to TDDFT calculations by examining 20 excitations at B3LYP/6-31G* level using Gaussian 16. The calculated ECD data of each conformer were averaged based on the Boltzmann distribution calculated from free energy at 298.15 K, and the resulting spectra were visualized by using SpecDis with a half-band width of 0.30 eV.

The Analysis of the Cytosolic Ca²⁺ Concentration in HeLa Cells

HeLa cells grown to confluence in a flask were washed and suspended in PBS(-) loaded with 4 μ M 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 rt. Changes in the intracellular Ca²⁺ concentrations were measured at 37 °C using a dual-wavelength spectrofluorometer (FP-8300, 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).

Inhibition of Ca²⁺ -ATPase Activity

Sarcoplasmic reticulum (SR) vesicles containing SERCA1a were obtained according to our previous paper.⁷² 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 6 min at 340 nm in the presence of iezoside (**5**) at various concentrations.

Protein Extraction

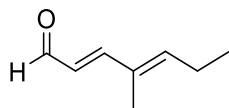
HeLa cells (8×10^4 cells per dish) were incubated to subconfluent and treated with 30 nM iezoside (**5**) for 0, 6, 12, 24, 36, and 48 h in a 100-mm dish, and the cells were washed with PBS(-). Total protein was extracted using 1 \times RIPA buffer (Nacalai Tesque) containing protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) and phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) by incubating at 4 °C for 30 min. After centrifugation (13,500 rpm for 30 min at 4 °C), supernatant was collected as cell lysate and the protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Nacalai Tesque). The supernatant were diluted with 6 \times SDS buffer (Nacalai Tesque) and boiled at 100 °C for 5 min, followed by cooling on ice. The protein extracting solutions were used for western blotting.

Western Blotting

The prepared samples containing 15 μ g total protein were loaded onto SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred onto a PVDF membrane (Merck Millipore) and blocking was performed in TBS (Tris-buffered saline) containing 5% skim milk. The membrane was washed with 0.1% Tween-20 in TBS (TBS-T) and incubated with primary antibodies. After washing the membrane with TBS-T, it was incubated with secondary antibodies. Signals were detected with

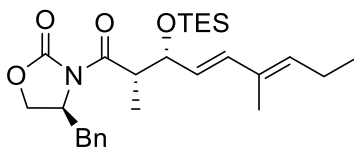
enhanced chemiluminescence using Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque). Primary antibodies against ATF4, p21, P-Rb (S780), P-Rb (S807/811), CHOP, PARP and β -actin were purchased from Cell Signaling Technology. Secondary antibodies, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG were purchased from Cytiva.

Syntheses of compounds



(*2E,4E*)-4-methylhepta-2,4-dienal (**35**): To a solution of oxalyl chloride (2.37 mL, 27.7 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) cooled at -78 °C under argon atmosphere was added a solution of DMSO (2.95 mL, 41.5 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) and the mixture was stirred at -78 °C for 30 min. To the reaction mixture was added a solution of known alcohol (*2E,4E*)-4-methylhepta-2,4-dien-1-ol* (1746 mg, 13.8 mmol) in CH₂Cl₂ (7 mL) and stirred at -78 °C for 30 min. Then, to the mixture was added triethylamine (11.57 mL, 83.0 mmol), and the solution was warmed at room temperature and stirred for 5 min. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (30 mL) and extracted with EtOAc (60 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 37 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (96/4 → 75/25)] to give aldehyde **35** (1314 mg, *t*_R = 32 min, 10.6 mmol, 77% yield in 2 steps) as a yellow oil; [α]_D²⁵ +1.6 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 3394, 2972, 2937, 2879, 1717, 1686, 1457, 1365 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.55 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.09 (dd, *J* = 15.4, 8.2 Hz, 1H), 6.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.25 (dq, *J* = 7.5, 7.7 Hz, 2H), 1.81 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.06 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H); ¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 194.4, 158.1, 146.4, 133.0, 126.9, 22.5, 13.5, 12.3; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 125.0956 [M+H]⁺ (calcd for C₈H₁₃O 125.0966).

*(*2E,4E*)-4-methylhepta-2,4-dien-1-ol used in this reaction was synthesized using the known protocols¹¹⁷ as shown in **Scheme 4-5**.



(*S*)-4-benzyl-3-((*2S,3R,4E,6E*)-2,6-dimethyl-3-((triethylsilyloxy)nona-4,6-dienoyl)oxazolidin-2-one (**33**): To a solution of (*S*)-4-benzyl-3-propionyloxazolidin-2-one (**34**) (1260 mg, 5.40 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) cooled at 0 °C was slowly added a 1 M solution of *n*-Bu₂BOTf (5.90 mL, 5.90 mmol). Triethylamine (0.89 mL, 6.40 mmol) was then added dropwise (internal temperature below 0 °C). The resulting solution was then cooled to -78 °C, and a solution of aldehyde **35** (611 mg, 4.92 mmol) in

CH₂Cl₂ (2 mL) was added slowly. After 3 h, the solution was warmed to 0 °C, and the reaction was quenched by the addition of pH 7.0 aqueous phosphate buffer solution (3 mL) and MeOH (6 mL). MeOH (4 mL) and of 30% aqueous H₂O₂ (2 mL) were added carefully, and the resulting yellow solution was stirred at 0 °C for 30 min. The mixture was extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) and brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give the crude aldol product (2147 mg), which was used for the next reaction without further purification.

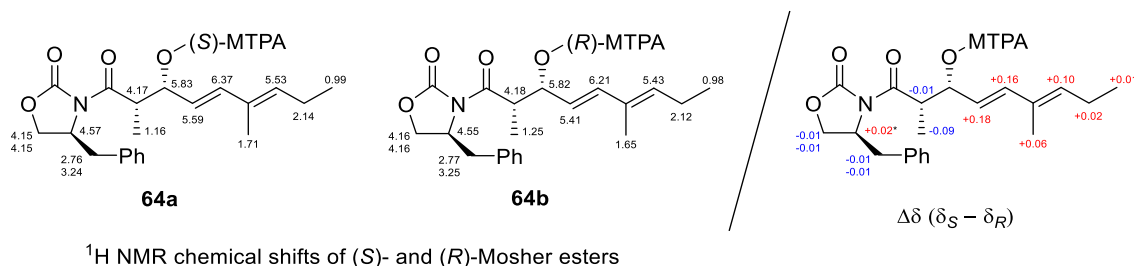
To the crude aldol product (2147 mg) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) cooled at -50 °C were added 2,6-lutidine (1.71 mL, 14.76 mmol) and triethylsilyl trifluoromethanesulfonate (2.22 mL, 1.17 mmol). After stirring for 1 h, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL) and extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (50 mL) and brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 37 × 300 mm; flow rate 30 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (97/3 → 76/24)] to give aldol product **33** (1956 mg, *t*_R = 35 min, 4.15 mmol, 84% yield in 2 steps) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +47 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 2960, 2913, 2876, 1784, 1698, 1456 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.20 (m, 5H), 6.10 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 5.55 (dd, *J* = 15.4, 7.9 Hz, 1H), 5.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.02 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.26 (dd, *J* = 13.4, 3.4 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 13.4, 9.7 Hz, 1H), 2.11 (dq, *J* = 7.4, 7.2 Hz, 2H), 1.69 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 9H), 0.57 (q, *J* = 7.7 Hz, 6H); ¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.0, 153.3, 135.9, 135.6, 135.1, 132.5, 129.6 (2C), 129.0 (2C), 127.5, 127.4, 76.2, 66.1, 55.8, 44.6, 38.1, 21.6, 14.2, 13.2, 12.4, 6.9 (3C), 5.0 (3C); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 340.1908 [M-TESOH+H]⁺ (calcd for C₂₁H₂₆NO₃ 340.1913).

Determination of the absolute configuration at C19 via the modified Mosher method

To a stirred solution of triethylsilyl-deprotected product of **33** (3.4 mg, 9.5 μ mol) in pyridine (0.1 mL) was added (*R*)-MTPACl (1 drop) at room temperature. After stirring for 1 h, saturated aqueous NaHCO₃ (1 mL) was added, and the mixture was extracted with EtOAc (5 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residual oil was purified by PLC (hexane-EtOAc 3:1) to give (*S*)-MTPA ester **64a** (2.2 mg, 3.8 μ mol, 40%) as a colorless oil.

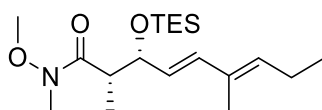
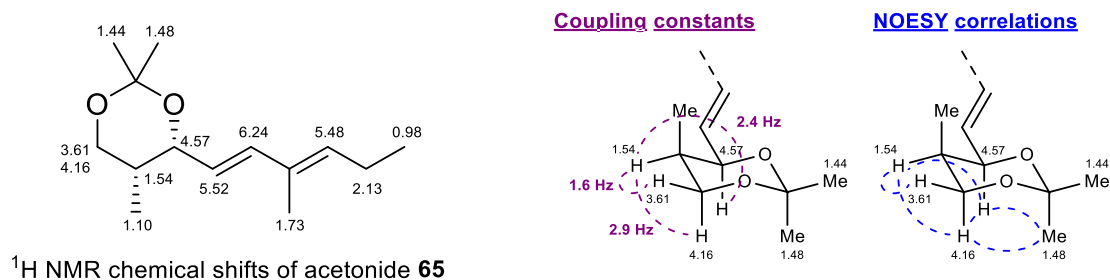
To a stirred solution of triethylsilyl-deprotected product of **33** (2.7 mg, 6.7 μ mol) in pyridine (0.1 mL) was added (*S*)-MTPACl (1 drop) at room temperature. After stirring for 1 h, saturated aqueous NaHCO₃ (1 mL) was added, and the mixture was extracted with EtOAc (5 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residual oil was purified by PLC (hexane-EtOAc 3:1) to give (*R*)-MTPA ester **64b** (1.6 mg, 2.7 μ mol,

40%) as a colorless oil.

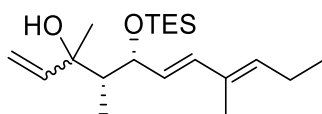


Determination of the relative configuration of C18/C19 via the analyses of proton coupling constants and NOE correlations of acetonide derivative (**65**)

To a stirred solution of triethylsilyl-protected product of **33** (37 mg, 0.11 mmol) in THF (0.5 mL) were added EtOH (3 drops) and lithium borohydride (11 mg, 0.53 mmol) at room temperature. After stirring for 24 h, saturated aqueous NaHCO_3 (1 mL) was added, and the mixture was extracted with EtOAc (5 mL \times 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO_3 (2 mL) and brine (2 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (8 g, hexane-EtOAc 1:1) to give 1,3-diol product (11 mg, 0.061 mmol, 58%) as a colorless oil. To a stirred solution of the diol product (11 mg, 0.061 mmol) in acetone (0.1 mL) and 2,2-dimethoxypropane (0.1 mL) was added pyridinium *p*-toluenesulfonate (3.0 mg, 0.012 mmol) at room temperature. After stirring for 3 h, saturated aqueous NaHCO_3 (1 mL) was added, and the mixture was extracted with EtOAc (5 mL \times 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO_3 (2 mL) and brine (2 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated. The residual oil was purified by PLC (hexane-EtOAc 10:1) to give acetonide **65** (1.3 mg, 5.8 μmol , 9%) as a colorless oil.

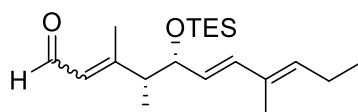


(2*S*,3*R*,4*E*,6*E*)-*N*-methoxy-*N*,2,6-trimethyl-3-((triethylsilyl)oxy)nona-4,6-dienamide (**32**): To a solution of ethanethiol (0.86 mL, 11.92 mmol) in THF (10 mL) under argon atmosphere cooled at -78 °C was added a 1.56 M solution of *n*-butyllithium in hexane (5.29 mL, 8.31 mmol). After the mixture was warmed to 0 °C, to the mixture was added a solution of aldol product **33** (1704 mg, 3.61 mmol) in THF (5 mL). After stirring for 20 min, the reaction mixture was diluted with hexane/EtOAc (30 mL, 1/1). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (40 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (50 mL) and brine (30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give crude thioester (1846 mg). To a stirred suspension of *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (2113 mg, 21.66 mmol) in THF (5 mL) under argon atmosphere cooled at -30 °C were added a 1 M solution of isopropylmagnesium chloride in THF (43.3 mL, 43.32 mmol) and a solution of the crude thioester (1846 mg) in THF (3 mL). The reaction mixture was allowed to slowly warm to 0 °C. After stirring at 0 °C for 2 h, to the reaction mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL), and the mixture was extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (150 g, hexane-EtOAc 10:1) to give Weinreb amide **32** (999 mg, 2.81 mmol, 78% yield in 2 steps) as a colorless oil; [α]_D²¹ -22 (*c* 1.37, CHCl₃); IR (neat) 2960, 2877, 1665, 1459, 1414, 1383 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.10 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 5.51 (dd, *J* = 15.7, 7.6 Hz, 1H), 5.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 4.21 (dd, *J* = 7.9, 7.6 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.09 (brs, 3H), 3.06 (m, 1H), 2.10 (dq, *J* = 7.2, 7.6 Hz, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.94 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H), 0.59 (q, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 176.1, 135.7, 134.7, 132.4, 128.0, 76.2, 61.6, 43.1, 32.2, 21.6, 14.7, 14.2, 12.4, 6.9 (3C), 5.1 (3C); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 224.1672 [M-TESOH+H]⁺ (calcd for C₁₃H₂₂NO₂ 224.1651).

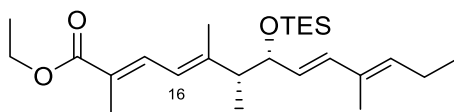


(4*S*,5*R*,6*E*,8*E*)-3,4,8-trimethyl-5-((triethylsilyl)oxy)undeca-1,6,8-trien-3-ol (**31**): To a solution of Weinreb amide **32** (1642 mg, 4.62 mmol) in THF (9 mL) cooled at -78 °C was added a 3 M solution of methylmagnesium bromide in THF (6.16 mL, 18.5 mmol). The reaction mixture was warmed up to 0 °C and stirred for 30 min. The reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give the crude ketone, which was used for the next reaction without further purification.

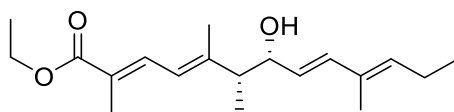
To a solution of the crude ketone (1385 mg) in THF (9 mL) cooled at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ was added a 1 M solution of vinylmagnesium bromide in THF (18.5 mL, 18.5 mmol). The reaction mixture was warmed up to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stirred for 30 min. The mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO_3 (10 mL) and EtOAc (10 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (150 g, hexane-EtOAc 20:1) to give alcohol **31** (1209 mg, 3.57 mmol, 77% yield in 2 steps, major isomer / minor isomer = 2/1) as a colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +12$ (c 0.99, CHCl_3); IR (neat) 3493, 2961, 2878, 1644, 1458, 1380 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ of major isomer 6.04 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 5.95 (dd, $J = 17.1, 10.8$ Hz, 1H), 5.60 (dd, $J = 15.7, 8.3$ Hz, 1H), 5.44 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.41 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 1H), 5.11 (dd, $J = 2.0, 10.8$ Hz, 1H), 4.61 (dd, $J = 1.4, 8.3$ Hz, 1H), 4.07 (s, 1H, OH), 2.14 (dq, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 2H), 1.71 (brs, 3H), 1.43 (dq, $J = 1.4, 7.0$ Hz, 1H), 1.17 (s, 3H), 1.08 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.93 (t, $J = 7.9$ Hz, 9H), 0.55 (q, $J = 7.9$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ of major isomer 146.2, 135.8, 135.5, 132.4, 128.1, 111.9, 77.0, 76.2, 46.7, 28.3, 26.6, 21.7, 14.2, 12.4, 6.9 (3C), 5.5 (3C); HRMS (ESI-TOF) m/z 207.1744 $[\text{M}-\text{TESOH}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}$ 207.1749).



(4*S*,5*R*,6*E*,8*E*)-3,4,8-trimethyl-5-((triethylsilyl)oxy)undeca-2,6,8-trienal (**41**): To a solution of alcohol **31** (488 mg, 1.44 mmol) in THF (15 mL) under argon atmosphere at room temperature were added PDC (1627 mg, 4.32 mmol) and molecular sieves 4 Å (1600 mg). After stirring for 15 h, the mixture was filtered through a pad of Celite and washed with Et_2O . The filtrate and the washings were combined and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 26 \times 300 mm; flow rate 20 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (100/0 \rightarrow 82/18)] to give aldehyde **41** (201 mg, $t_{\text{R}} = 30$ min, 0.60 mmol, 41% yield, $E:Z = 5:1$) as a colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -31$ (c 0.75, CHCl_3); IR (neat) 2960, 2876, 1675, 1458, 1378 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , E isomer) δ 9.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.06 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.41 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.40 (dd, $J = 15.7, 8.1$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 8.1, 7.2$ Hz, 1H), 2.37 (dq, $J = 7.2, 7.0$ Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (dq, $J = 7.9, 7.6$ Hz, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.12 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 9H), 0.55 (q, $J = 7.9$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , E isomer) δ 191.6, 166.4, 136.0, 135.2, 132.3, 128.4, 127.4, 77.0, 51.1, 21.7, 17.2, 14.9, 14.1, 12.5, 7.0 (3C), 5.1 (3C); HRMS (ESI-TOF) m/z 359.2392 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2\text{SiNa}$ 359.2382).

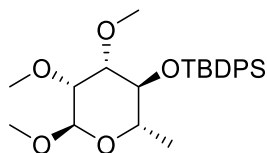


ethyl (6S,7R,8E,10E)-2,5,6,10-tetramethyl-7-((triethylsilyl)oxy)trideca-2,4,8,10-tetraenoate (43): To a solution of triethyl 2-phosphonopropionate (**42**) (0.36 mL, 1.66 mmol) in THF (0.2 mL) under argon atmosphere cooled at 0 °C was added a 0.5 M solution of lithium diisopropylamide in THF-hexane (3.32 mL, 1.66 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then a solution of aldehyde **41** (186 mg, 0.55 mmol) in THF (0.5 mL) was added via cannula, and the mixture was stirred for 30 min, allowed to warm to room temperature, and stirred for 10 min. The reaction mixture was diluted with H₂O (10 mL), and the resulting mixture was extracted with EtOAc (20 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 26 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (100/0 → 92/8)] to give ester **43** (198 mg, *t_R* = 29 min, 0.47 mmol, 86% yield, 16*E*:16*Z* = 5:1) as a colorless oil; [α]_D²³ -90 (*c* 0.99, CHCl₃); IR (neat) 2962, 2876, 1704, 1630, 1458, 1366 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, *E* isomer) δ 7.45 (dq, *J* = 11.8, 0.9 Hz, 1H), 6.11 (dq, *J* = 11.8, 0.9 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 5.43 (dd, *J* = 15.4, 7.7 Hz, 1H), 5.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.20 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.06 (dd, *J* = 7.7, 6.8 Hz, 1H), 2.35 (dq, *J* = 6.8, 7.3 Hz, 1H), 2.12 (dq, *J* = 7.3, 7.7 Hz, 2H), 1.91 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.83 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.11 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H), 0.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 9H), 0.56 (q, *J* = 7.7 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, *E* isomer) δ 169.2, 149.8, 135.2, 134.5, 134.4, 132.6, 128.5, 125.0, 121.9, 77.0, 60.5, 51.2, 21.6, 16.2, 15.3, 14.5, 14.2, 12.54, 12.47, 7.0 (3C), 5.2 (3C); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 289.2150 [M-TESOH+H]⁺ (calcd for C₁₉H₂₉O₂ 289.2168).



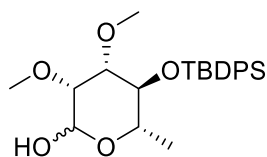
ethyl (2E,4E,6R,7R,8E,10E)-7-hydroxy-2,5,6,10-tetramethyltrideca-2,4,8,10-tetraenoate (30): To a solution of ester **43** (178 mg, 0.42 mmol) in THF (0.2 mL) at room temperature was added a 0.5 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF-AcOH (4.24 mL, 2.12 mmol, Bu₄NF:AcOH = 1:1), and the mixture was stirred at 50 °C for 3 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted with Et₂O (10 mL) and H₂O (20 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (20 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) and then brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 26 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent

gradient condition, hexane/EtOAc (89/11 → 68/32)] to give desired ester **30** (109 mg, $t_R = 28$ min, 0.31 mmol, 85% yield) as a colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -46$ (c 0.60, CHCl_3); IR (neat) 3437, 2978, 2937, 2878, 1707, 1630, 1449, 1369 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45 (dq, $J = 11.8, 0.9$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 6.18 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 5.51 (dd, $J = 7.0, 15.7$ Hz, 1H), 5.46 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.15 (dd, $J = 7.0, 7.3$ Hz, 1H), 2.41 (dq, $J = 7.3, 6.6$ Hz, 1H), 2.12 (dq, $J = 7.6, 7.5$ Hz, 2H), 1.92 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.86 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.69 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.16 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.98 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 169.1, 149.0, 136.3, 135.5, 134.0, 132.4, 127.4, 125.8, 122.1, 75.4, 60.6, 50.1, 21.7, 16.0, 14.7, 14.5, 14.1, 12.7, 12.4; HRMS (ESI-TOF) m/z 289.2136 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_2$ 289.2168).



tert-butyl diphenyl(((2S,3S,4S,5R,6R)-4,5,6-trimethoxy-2-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy)silane (**48**): To a solution of known sugar **47*** (467 mg, 1.12 mmol) in THF (4 mL) under argon atmosphere at 0 °C were added sodium hydride (60% in oil, 180 mg, 4.49 mmol) and methyl iodide (0.6 ml, 8.97 mmol), and the mixture was stirred at 40 °C for 2 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with H_2O (5 mL) and extracted with EtOAc (10 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (40 g, hexane/EtOAc 7:1) to give sugar **48** (421 mg, 1.01 mmol, 90 % yield) as a colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -35$ (c 1.00, CHCl_3); IR (neat) 2931, 2895, 2856, 2827, 1450, 1387 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 6H), 4.66 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.76-3.69 (m, 2H), 3.53 (dd, $J = 2.3, 3.3$ Hz, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 1.21 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 1.04 (s, 9H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.1 (2C), 135.9 (2C), 134.9, 134.3, 129.4, 129.2, 127.5 (2C), 127.3 (2C), 98.7, 81.1, 75.7, 74.0, 69.2, 59.0, 55.3, 55.0, 27.3 (3C), 19.9, 18.6; HRMS (ESI-TOF) m/z 467.2233 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{NaO}_5\text{Si}$ 467.2230).

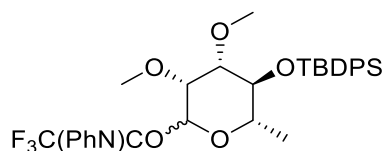
* Known sugar **47** used in this reaction was synthesized using the known protocols¹²⁵ as shown in Scheme 4-8.



(3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-5-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)-3,4-dimethoxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-ol

(49) : To a solution of sugar **48** (521 mg, 1.25 mmol) in acetic anhydride (2.5 mL) under argon atmosphere at 0 °C were added pyridinium *p*-toluenesulfonate (157 mg, 0.63 mmol) and sulfuric acid (50 μ L, 0.01 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 20 min. After completion of the reaction, saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) was added to the reaction mixture, and the mixture was extracted with EtOAc (20 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give the crude acetate (592 mg), which was used for the next reaction without further purification.

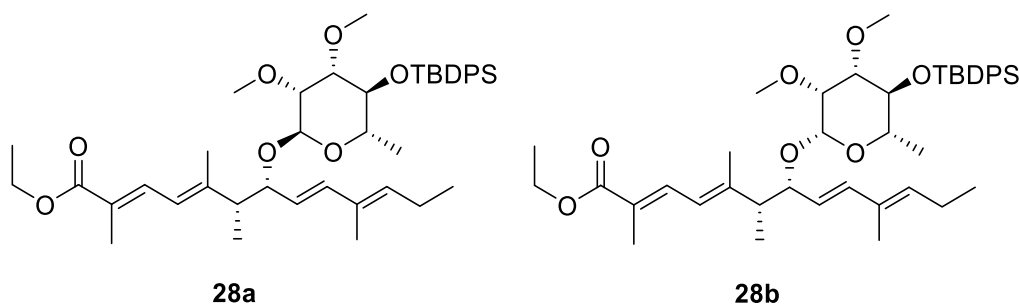
To a solution of the crude acetate (592 mg) in MeOH (8 mL) under argon atmosphere at room temperature was added potassium carbonate (183 mg, 1.32 mmol), and the mixture was stirred for 20 min. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with H₂O (10 mL) and extracted with EtOAc (10 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (40 g, hexane/EtOAc 2:1) to give sugar **49** (528 mg, 1.23 mmol, 98 % yield in 2 steps, major/minor = 6/1) as a white amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -20 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 3425, 2958, 2932, 2857 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 7.75 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 6H), 5.18 (dd, *J* = 3.2, 2.7 Hz, 1H), 3.98 (dq, *J* = 8.8, 6.3 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 8.8, 8.4 Hz, 1H), 3.57 (dd, *J* = 2.9, 2.7 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 8.4, 2.9 Hz, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.07 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, OH), 2.84 (s, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.04 (s, 9H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 136.1 (2C), 135.9 (2C), 134.8, 134.2, 129.4, 129.3, 127.5 (2C), 127.3 (2C), 92.5, 80.6, 76.1, 73.9, 69.7, 59.0, 55.4, 27.3 (3C), 19.9, 18.6; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 453.2093 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₄H₃₄NaO₅Si 453.2073).



(3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-5-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)-3,4-dimethoxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl

2,2,2-trifluoro-*N*-phenylacetimidate (**50**) : To a solution of sugar **49** (85 mg, 0.20 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) under argon atmosphere at room temperature were added 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

(0.059 ml, 0.39 mmol) and 2,2,2-trifluoro-*N*-phenylacetimidoyl chloride (0.062 ml, 0.39 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) and extracted with EtOAc (20 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (40 g, hexane/EtOAc 8:1) to give imidate **50** (123 mg, 0.20 mmol, quant.) as a colorless oil. This product was immediately used in the next reaction.

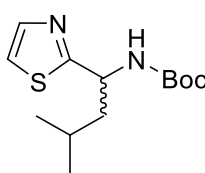


ethyl (2E,4E,6R,7R,8E,10E)-7-(((2R,3R,4S,5S,6S)-5-((tert-butyl diphenylsilyl)oxy)-3,4-dimethoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,6,10-tetramethyltrideca-2,4,8,10-tetraenoate (28a) : To a stirred suspension of samarium (III) trifluoromethanesulfonate (174 mg, 0.292 mmol) and molecular sieves 4 Å (400 mg) in Et₂O/1,4-dioxane (4/1) (2 mL) under argon atmosphere cooled at -20 °C was added a solution of alcohol **30** (89 mg, 0.29 mmol) and imidate **50** (263 mg, 0.44 mmol) in Et₂O/1,4-dioxane (4/1) (1 mL, 0.2 ml × 2 rinse) via a cannula. After warming up to 0 °C and stirring for 2 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite, and washed with EtOAc. The filtrate and washings were combined, washed with saturated aqueous NaHCO₃ (30 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was separated by column chromatography on ODS (6.0 g) eluted with 70% MeOH (30 mL) → MeOH (30 mL). The fraction (265 mg) eluted with MeOH was subjected to AFCS [ϕ 26 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (97/3 → 76/24)] to give the fraction that contained the desired compound (172 mg, *t_R* = 32 min). The fraction was further purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent MeOH, 8 batches] to give α -glycoside **28a** (124 mg, *t_R* = 29.4 min, 0.17 mmol, 59% yield) and β -glycoside **28b** (37 mg, *t_R* = 24.6 min, 0.052 mmol, 18% yield) as a colorless oil, respectively;

α -glycoside **28a**: [α]_D²⁵ -105 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 2966, 2931, 2857, 1702, 1634, 1472, 1388 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 2H), 7.66 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 2H), 7.47 (dq, *J* = 11.8, 0.9 Hz, 1H), 7.40-7.33 (m, 6H), 6.19 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H),

5.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 5.20 (dd, $J = 15.9, 8.8$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.03 (m, 1H), 3.77-3.71 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.37 (dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz, 1H), 3.28 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 2.52 (m, 1H), 2.10 (dq, $J = 7.5, 7.0$ Hz, 2H), 1.95 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.20 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 1.02 (s, 9H), 0.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 169.0, 148.6, 139.9, 136.1 (2C), 136.0, 135.9 (2C), 135.0, 134.4, 134.1, 132.1, 129.3, 129.2, 127.4 (2C), 127.3 (2C), 125.6, 123.2, 122.3, 93.6, 81.4, 79.1, 76.1, 74.2, 69.7, 60.6, 58.9, 55.2, 48.9, 27.2 (3C), 21.6, 19.9, 18.8, 16.0, 15.8, 14.5, 14.0, 12.6, 12.4; $^1J_{\text{CH}}$ of anomer position: 170 Hz; HRMS (ESI-TOF) m/z 741.4174 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{O}_7\text{SiNa}$ 741.4163).

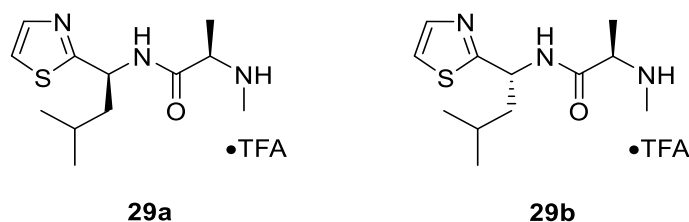
β -glycoside **28b**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -21 (c 1.00, CHCl_3); IR (neat) 2967, 2933, 2857, 1702, 1631, 1458, 1370 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 2H), 7.62 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 2H), 7.44 (dq, $J = 11.8, 0.9$ Hz, 1H), 7.37-7.31 (m, 6H), 6.14 (brd, $J = 11.8$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 5.55 (dd, $J = 15.4, 8.8$ Hz, 1H), 5.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.30 (brs, 1H), 4.20 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.94 (dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 3.68 (dd, $J = 9.1, 9.1$ Hz, 1H), 3.56 (brd, $J = 3.2$ Hz, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.20 (dq, $J = 9.1, 6.3$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 9.1, 3.2$ Hz, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.47 (dq, $J = 6.8, 6.8$ Hz, 1H), 2.11 (dq, $J = 7.2, 7.2$ Hz, 2H), 1.90 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.11 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.98 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 169.1, 149.0, 136.2, 136.1 (2C), 135.9 (2C), 134.8, 134.7, 134.3, 134.2, 132.7, 129.3, 129.2, 127.4 (2C), 127.2 (2C), 126.8, 125.4, 121.9, 101.1, 85.6, 84.0, 76.2, 73.9, 73.1, 61.4, 60.6, 55.2, 49.3, 27.3 (3C), 21.6, 19.9, 18.5, 16.0, 15.0, 14.5, 14.2, 12.6, 12.4; $^1J_{\text{CH}}$ of the anomer position: 160 Hz; HRMS (ESI-TOF) m/z 741.4117 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{O}_7\text{SiNa}$ 741.4163).



tert-butyl (*S*)-(3-methyl-1-(thiazol-2-yl)butyl)carbamate (**37**): To a solution of known thioamide **38*** (211 mg, 0.86 mmol) in THF (3 mL) at room temperature was added bromoacetaldehyde diethyl acetal (0.16 mL, 1.03 mmol) and the mixture was stirred at reflux for 3 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with toluene (5 mL) and concentrated. To the residue was added H_2O (5 mL), and the mixture was extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (15 g, hexane/EtOAc 3:1) to give thiazole **37** (185 mg, 0.69 mmol, 80 % yield) as a yellow solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +0.1 (c 1.00, CHCl_3); IR (neat) 3285, 2958, 2933, 2870,

1703, 1519, 1470, 1390 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.70 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 7.46 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 1.81-1.68 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 0.98 (d, $J = 5.9$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 178.0, 157.9, 143.3, 120.0, 80.6, 52.7, 45.4, 28.7 (3C), 26.0, 23.5, 21.8; HRMS (ESI-TOF) m/z 271.1498 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 271.1480).

*Known thioamide **38** used in this reaction was synthesized using the known protocols¹³⁰ as shown in **Scheme 4-9**.



(R)-N-((S)-3-methyl-1-(thiazol-2-yl)butyl)-2-(methylamino)propenamide (29a) : To a stirred solution of thiazole **37** (67 mg, 0.25 mmol) in CH_2Cl_2 (0.5 mL) was added TFA (1 mL) at room temperature. After stirring for 30 min, the reaction mixture was concentrated to give the crude amine•TFA. To a stirred solution of the crude amine•TFA (126 mg) and *N*-Boc-*N*-Me-D-alanine **36** (100.4 mg, 0.49 mmol) in DMF (0.2 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (0.26 mL, 1.48 mmol) and HATU (188 mg, 0.49 mmol). After stirring at room temperature for 24 h, the mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (10 mL) and extracted with EtOAc (10 mL \times 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO_3 (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (40 g, hexane-EtOAc 2:1) to give peptide (77 mg).

To a stirred solution of the peptide (77 mg) in CH_2Cl_2 (0.5 mL) was added TFA (1 mL) at room temperature. After stirring for 30 min, the reaction mixture was concentrated to give the crude amine•TFA. The crude amine•TFA (149 mg) was purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent 40% MeOH containing 0.1% TFA, 5 batches] to give desired peptide **29a** (42.5 mg, $t_R = 35.9$ min, 0.12 mmol, 47% yield) and undesired peptide **29b** (40.7 mg, $t_R = 41.5$ min, 0.11 mmol, 45% yield) as a colorless oil, respectively;

Desired peptide **29a**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -57$ (c 1.00, CHCl_3); IR (neat) 3224, 3065, 2963, 2875, 1672, 1559, 1471, 1428 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.75 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.37 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.87 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.66 (s, 3H), 1.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.56 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174.4, 170.0, 143.3, 120.7, 58.5, 51.1, 45.1, 31.9, 26.3, 23.3, 21.8, 16.5; HRMS (ESI-TOF) m/z

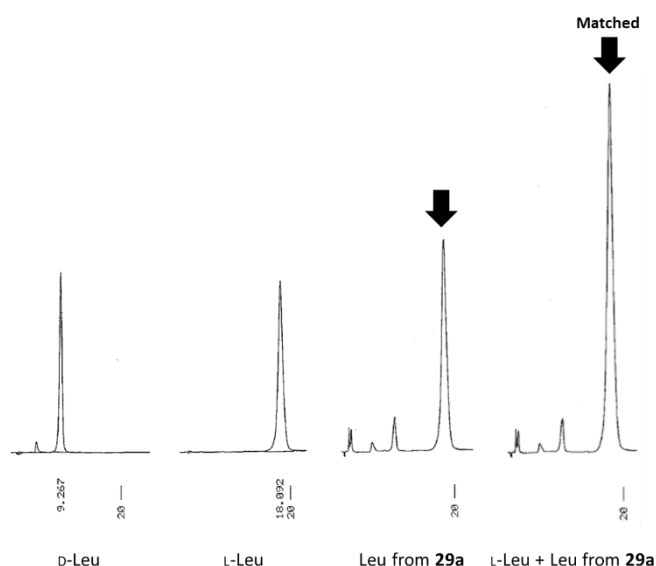
256.1483 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₂₂N₃OS 256.1484).

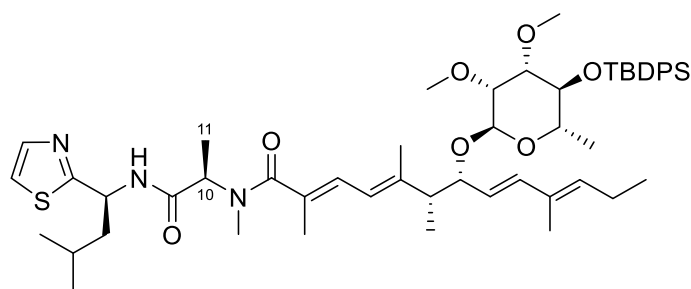
Undesired peptide **29b**: [α]_D²⁵ +49 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 3222, 3057, 2962, 2873, 1671, 1560, 1471, 1426 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.74 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.38 (dd, *J* = 9.5, 5.9 Hz, 1H), 3.89 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.69 (s, 3H), 1.92-1.79 (m, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.00 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 174.7, 169.9, 143.4, 120.5, 58.3, 51.2, 45.1, 31.7, 26.1, 23.3, 21.9, 16.1; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 256.1501 [M+H]⁺ (calcd for C₁₂H₂₂N₃OS 256.1484).

Determination of the absolute configuration of Leu of tripeptide **29a**

Tripeptide **29a** (0.8 mg) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.5 mL) and ozonized at -78 °C for 20 min. The solvent was evaporated, and the product was treated with 6 M HCl (0.1 ml) at 110 °C for 15 h in a sealed tube. The mixture was evaporated to dryness and separated by HPLC [Condition for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (φ4.6 × 250 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O containing 0.1% TFA] to give Leu (*t*_R = 12.8 min).

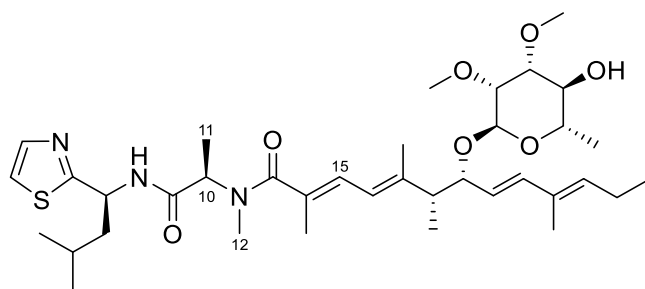
Separated Leu was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention time was compared to those of authentic standards [column, DAICEL CHIRALPAK MA(+) (φ4.6 × 50 mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent, 2 mM CuSO₄]. The retention times for authentic standards were 9.3 min (D-Leu) and 18.1 min (L-Leu). The retention time of Leu from tripeptide **29a** was 18.1 min, indicating the presence of L-Leu.



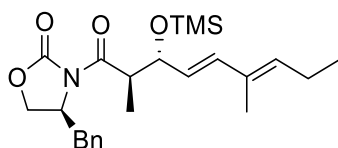


(2*E*,4*E*,6*R*,7*R*,8*E*,10*E*)-7-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-5-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)-3,4-dimethoxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-*N*,2,5,6,10-pentamethyl-*N*-((*R*)-1-(((*S*)-3-methyl-1-(thiazol-2-yl)butyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)trideca-2,4,8,10-tetraenamide (**53**): To a solution of glycoside **28a** (25 mg, 0.036 mmol) in THF/MeOH/H₂O (3/1/1) (0.3 mL) under argon atmosphere at room temperature was added lithium hydroxide monohydrate (4.5 mg, 0.11 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 12 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with AcOH (3 drops) and H₂O (10 mL) and extracted with EtOAc (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give the crude carboxylic acid (33 mg), which was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the crude carboxylic acid (33 mg) and peptide•TFA **29a** (27 mg, 0.073 mmol) in DMF (0.2 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (0.026 mL, 0.15 mmol) and HATU (28 mg, 0.073 mmol). After stirring at room temperature for 3 h, the reaction mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (5 mL) and extracted with EtOAc (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [φ11 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (55/45 → 34/66)] to give glycoside **53** (29 mg, *t_R* = 20 min, 86% yield in 2 steps) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +1.6 (*c* 0.79, CHCl₃); IR (neat) 3427, 2960, 2931, 1636, 1625, 1522, 1457, 1388 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75-7.73 (m, 2H), 7.67-7.64 (m, 3H), 7.39-7.34 (m, 6H), 7.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.45 (dq, *J* = 11.3, 0.9 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.07 (brd, *J* = 11.3 Hz, 1H), 5.44-5.36 (m, 2H), 5.17 (dd, *J* = 15.9, 9.1 Hz, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.80-3.76 (m, 2H), 3.43 (dd, *J* = 3.2, 2.3 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J* = 8.2, 3.2 Hz, 1H), 3.28 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 2.50 (m, 1H), 2.13-2.05 (m, 2H), 1.94 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.89 (m, 1H), 1.80-1.75 (m, 2H), 1.72 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.25-1.21 (m, 6H), 1.02 (s, 9H), 0.98-0.95 (m, 9H); ¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.7, 170.7, 145.1, 142.8, 139.9, 136.0 (2C), 136.0, 135.9 (2C), 135.1, 134.4, 132.1, 129.4, 129.3, 129.2, 127.5 (2C), 127.3 (2C), 123.3, 121.2, 118.4, 93.7, 81.3, 79.6, 77.0, 76.1, 74.2, 69.8, 58.9, 55.2, 49.8, 48.9, 44.8, 29.8, 27.3 (3C), 25.1, 23.1, 22.0, 21.6, 19.9, 18.8, 16.6, 15.2, 14.7, 14.0, 13.2, 12.5 (The carbon signals at C-10 and C-11 were not detected probably due to the conformational exchange.); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 928.5352 [M+H]⁺ (calcd for C₅₃H₇₈N₃O₇SSi 928.5330).



iezoside (**5**) : To a solution of glycoside **53** (29 mg, 0.032 mmol) in THF (0.2 mL) under argon atmosphere at room temperature was added a 1 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF (0.095 mL, 0.095 mmol) and the mixture was stirred at 50 °C for 6 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (3 mL) and extracted with EtOAc (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (3 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by HPLC [Cosmosil PBr (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent 70% MeCN] to give *iezoside* (**5**) (16.4 mg, *t*_R = 36.0 min, 0.024 mmol, 75% yield) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +71 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 3446, 3292, 2961, 2932, 2874, 2826, 1684, 1617, 1522, 1448, 1387 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 7.76 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, NH), 7.70 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 5.52 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.42-5.36 (m, 2H), 4.99 (brm, 1H), 4.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 8.6, 6.5 Hz, 1H), 3.60 (dq, *J* = 9.3, 6.3 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 2.9, 1.7 Hz, 1H), 3.44 (dd, *J* = 9.3, 8.8 Hz, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.37 (dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.86 (s, 3H), 2.46 (m, 1H), 2.14 (dq, *J* = 7.7, 7.5 Hz, 2H), 1.91 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.88-1.83 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.77 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.18 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.99-0.92 (m, 9H); ¹³C {¹H} NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ 174.8, 174.3, 171.3, 144.4, 143.4, 139.5, 135.9, 133.1, 131.1, 125.4, 122.0, 119.6, 94.5, 82.7, 78.9, 77.8, 72.5, 69.8, 59.0, 57.4, 50.3, 49.1, 45.0, 25.6, 23.4, 22.02, 21.96, 18.4, 15.8, 15.3, 14.7, 14.2, 12.5 (As described in the body, the carbon signals at C-10, C-11, C-12, and C-15 were not detected probably due to the conformational exchange.); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 690.4146 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₆₀N₃O₇S 690.4152).



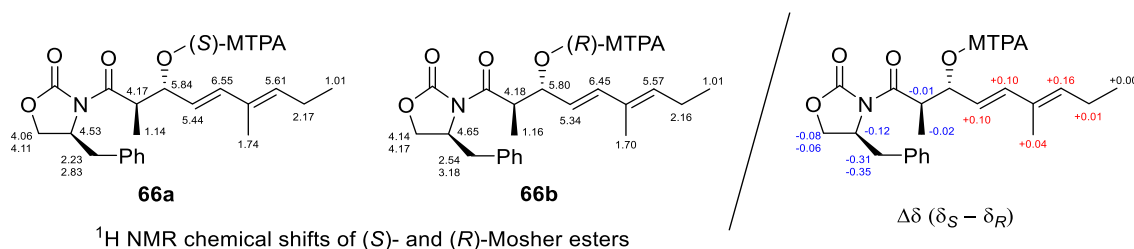
(*S*)-4-benzyl-3-((2*R*,3*R*,4*E*,6*E*)-2,6-dimethyl-3-((trimethylsilyl)oxy)nona-4,6-dienoyl)oxazolidin-2-one (**54**): To a stirred solution of (*S*)-4-benzyl-3-propionyloxazolidin-2-one (**34**) (856 mg, 3.67 mmol)

and magnesium bromide ethyl etherate (238 mg, 0.92 mmol) in THF (3 mL) under argon atmosphere cooled at 0 °C were added triethylamine (1.28 mL, 9.18 mmol), a solution of aldehyde **35** (380 mg, 3.06 mmol) in THF (1 mL), and chlorotrimethylsilane (0.58 mL, 4.59 mmol). After stirring at room temperature for 24 h, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (30 mL) and extracted with EtOAc (50 mL × 3). The organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 37 × 300 mm; flow rate 30 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (96/4 → 75/25)] to give aldol product **54** (842 mg, t_R = 27 min, 64% yield, major / minor = 20/1) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +34 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 2964, 2934, 2876, 1781, 1700, 1455, 1385 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.23 (m, 5H), 6.18 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.52-5.44 (m, 2H), 4.72 (m, 1H), 4.44 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 4.17 (dd, *J* = 9.0, 9.2 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 3.4, 9.2 Hz, 1H), 4.02 (dddd, *J* = 3.3, 3.4, 9.0, 9.5 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 3.3, 13.6 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 9.5, 13.6 Hz, 1H), 2.15 (dq, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 2H), 1.74 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), 1.05 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.08 (s, 9H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 176.0, 153.3, 137.8, 135.6, 135.4, 132.5, 129.6 (2C), 129.1 (2C), 127.4, 127.0, 77.3, 65.8, 55.2, 44.7, 38.2, 21.7, 14.1 (2C), 12.5, 0.72 (3C); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 340.1961 [M-TMSOH+H]⁺ calcd for C₂₁H₂₆NO₃ 340.1913).

Determination of the absolute configuration of C19 via the modified Mosher method

To a stirred solution of trimethylsilyl-deprotected product of **54** (4.4 mg, 12.3 μ mol) in pyridine (0.1 mL) was added (*R*)-MTPACl (1 drop) at room temperature. After stirring for 1 h, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (1 mL) and extracted with EtOAc (5 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 mL) and brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by PLC (hexane-EtOAc 2:1) to give (*S*)-MTPA ester **66a** (2.2 mg, 45%) as a colorless oil.

To a stirred solution of trimethylsilyl-deprotected product of **54** (2.9 mg, 8.1 μ mol) in pyridine (0.1 mL) was added (*S*)-MTPACl (1 drop) at room temperature. After stirring for 1 h, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (1 mL) and the extracted with EtOAc (5 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 mL) and brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by PLC (hexane-EtOAc 3:1) to give (*R*)-MTPA ester **66b** (2.4 mg, 52%) as a colorless oil.

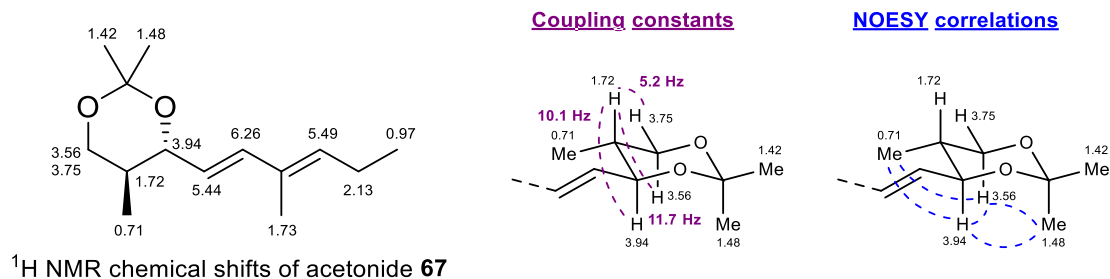


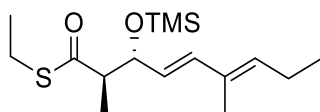
Determination of the relative configuration of C18/C19 via the analyses of proton coupling constants and NOE correlations of acetonide derivative (67)

To a stirred solution of aldol product **54** (81 mg, 0.19 mmol) in MeOH (1 mL) was added potassium carbonate (26 mg, 0.19 mmol) at room temperature. After stirring for 5 min, H₂O (10 mL) was added to the reaction mixture, and the mixture was extracted with EtOAc (20 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give the crude deprotected aldol product (68 mg), which was used for the next reaction without further purification.

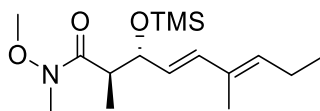
To a stirred solution of the crude product (68 mg) in THF (0.5 mL) were added EtOH (3 drops) and lithium borohydride (20.6 mg, 0.95 mmol) at room temperature. After stirring for 16 h, to the reaction mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ (1 mL), and the mixture was extracted with EtOAc (10 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (8 g, hexane-EtOAc 1:1) to give 1,3-diol product (9.3 mg, 0.05 mmol, 27% in 2 steps) as a colorless oil.

To a stirred solution of the diol product (9.3 mg, 0.05 mmol) in acetone (0.2 mL) and 2,2-dimethoxypropane (0.2 mL) was added pyridinium *p*-toluenesulfonate (2.5 mg, 0.01 mmol) at room temperature. After stirring for 16 h, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (1 mL), and the mixture was extracted with EtOAc (5 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel (5 g, hexane-EtOAc 10:1) to give acetonide **67** (8.5 mg, 0.038 mmol, 75%) as a colorless oil.



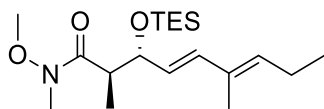


S-ethyl (2*R*,3*R*,4*E*,6*E*)-2,6-dimethyl-3-((trimethylsilyl)oxy)nona-4,6-dienethioate (**55**): To a solution of ethanethiol (0.47 mL, 6.47 mmol) in THF (10 mL) under argon atmosphere cooled at -78 °C was added a 1.56 M solution of *n*-butyllithium in hexane (2.90 mL, 4.51 mmol). After the mixture was warmed to 0 °C, to the mixture was added a solution of aldol product **54** (824 mg, 1.92 mmol) in THF (3 mL). After stirring for 5 min, the reaction mixture was diluted with hexane/EtOAc (10 mL, 1/1). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (30 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (30 mL) and brine (30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (40 g, hexane-EtOAc 40:1) to give thioester **55** (579 mg, 1.84 mmol, 96% yield) as a colorless oil; [α]_D²⁵ -47 (c 1.00, CHCl₃); IR (neat) 2965, 2933, 2875, 1688, 1454, 1373 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.14 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.39 (dd, *J* = 8.0, 15.9 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 7.2, 8.0 Hz, 1H), 2.95-2.78 (m, 2H), 2.72 (dq, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 1H), 2.14 (dq, *J* = 7.3, 7.3 Hz, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H), 1.01 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.06 (s, 9H); ¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 202.7, 137.2, 135.4, 132.4, 126.6, 76.6, 55.7, 23.3, 21.7, 15.0, 14.4, 14.1, 12.5, 0.33 (3C); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 225.1285 [M-TMSOH+H]⁺ calcd for C₁₃H₂₁OS 225.1313).



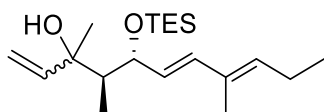
(2*R*,3*R*,4*E*,6*E*)-*N*-methoxy-*N*,2,6-trimethyl-3-((trimethylsilyl)oxy)nona-4,6-dienamide (**56**): To a stirred suspension of *N*,*O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (1151 mg, 11.8 mmol) in THF (5 mL) under argon atmosphere cooled at -30 °C were added a 1 M solution of isopropylmagnesium chloride in THF (23.6 mL, 23.61 mmol) and a solution of thioester **55** (1238 mg, 3.93 mmol) in THF (3 mL). The reaction mixture was allowed to slowly warm to 0 °C. After stirring at 0 °C for 2 h, to the reaction mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL), and the mixture was extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (150 g, hexane-EtOAc 5:1) to give Weinreb amide **56** (908 mg, 2.89 mmol, 74% yield) as a colorless oil; [α]_D²⁵ -16 (c 1.00, CHCl₃); IR (neat) 2964, 2938, 2876, 1662, 1461, 1416, 1386 cm⁻¹; ¹H

NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.16 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 5.46 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.44 (dd, J = 8.0, 15.8 Hz, 1H), 4.27 (dd, J = 7.2, 8.0 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.07 (brm, 1H), 2.14 (dq, J = 7.4, 7.3 Hz, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.00 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.04 (s, 9H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 176.4, 137.1, 135.1, 132.5, 127.4, 77.4, 61.5, 42.2, 32.1, 21.7, 14.3, 14.2, 12.5, 0.46 (3C); HRMS (ESI-TOF) m/z 224.1629 [M-TMSOH+H]⁺ calcd for C₁₃H₂₂NO₂ 224.1651).



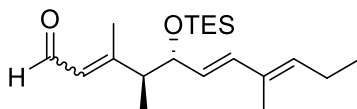
(2*R*,3*R*,4*E*,6*E*)-*N*-methoxy-*N*,2,6-trimethyl-3-((triethylsilyl)oxy)nona-4,6-dienamide (**57**): To a solution of Weinreb amide **56** (1548 mg, 4.94 mmol) in THF (10 mL) under argon atmosphere at room temperature was added a 1 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF (9.9 mL, 9.9 mmol), and the mixture was stirred for 20 min. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (50 mL) and extracted with EtOAc (50 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give the crude alcohol (1651 mg), which was used for the next reaction without further purification.

To a solution of the crude alcohol (1651 mg) in CH₂Cl₂ (5 mL) under argon atmosphere at 0 °C were added chlorotriethylsilane (1.66 mL, 9.87 mmol) and triethylamine (2.82 mL, 19.74 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 20 min. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (30 mL) and extracted with EtOAc (50 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (150 g, hexane-EtOAc 8:1) to give Weinreb amide **57** (1929 mg, 5.42 mmol, quant.) as a colorless oil; [α]_D²⁵ -10 (c 0.82, CHCl₃); IR (neat) 2960, 2913, 2876, 1663, 1459, 1417, 1385 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.15 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 5.45 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.42 (dd, J = 8.3, 16.1 Hz, 1H), 4.27 (dd, J = 7.2, 8.3 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.05 (brm, 1H), 2.14 (dq, J = 7.6, 7.8 Hz, 2H), 1.72 (s, 3H), 1.00 (t, J = 7.8 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 0.89 (t, J = 7.8 Hz, 9H), 0.53 (q, J = 7.8 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 176.3, 137.1, 135.0, 132.5, 127.6, 76.8, 61.5, 42.2, 32.0, 21.7, 14.4, 14.2, 12.5, 6.9 (3C), 5.0 (3C); HRMS (ESI-TOF) m/z 224.1638 [M-TESOH+H]⁺ calcd for C₁₃H₂₂NO₂ 224.1651).



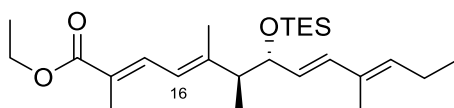
(4*R*,5*R*,6*E*,8*E*)-3,4,8-trimethyl-5-((triethylsilyl)oxy)undeca-1,6,8-trien-3-ol (**58**): To a solution of Weinreb amide **57** (612 mg, 1.95 mmol) in THF (10 mL) cooled at -78 °C was added a 3 M solution of methylmagnesium bromide in THF (2.60 mL, 7.80 mmol). The reaction mixture was warmed up to 0 °C and stirred for 1 h. The mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to give the crude ketone (517 mg), which was used for the next reaction without further purification.

To a solution of the crude ketone (517 mg) in THF (7 mL) cooled at -78 °C was added a 1 M solution of vinylmagnesium bromide in THF (7.80 mL, 7.80 mmol). The reaction mixture was warmed up to 0 °C and stirred for 20 min. The reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL) and EtOAc (10 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (40 g, hexane-EtOAc 20:1) to give a 1:1 mixture of diastereomeric alcohols **58** (400 mg, 1.18 mmol, 61% yield in 2 steps) as a colorless oil. As this product showed extremely complex spectra in ¹H and ¹³C NMR due to the presence of the isomer, we could not assign the NMR data to the structure, and this product was immediately used in the next reaction; [α]_D²⁵ +28 (c 1.00, CHCl₃); IR (neat) 3465, 2961, 2937, 2914, 2878, 1645, 1459, 1380 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 207.1765 [M-TESOH+H]⁺ calcd for C₁₄H₂₃O 207.1749).

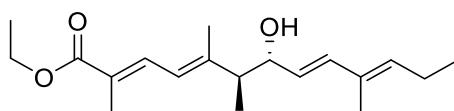


(4*S*,5*R*,6*E*,8*E*)-3,4,8-trimethyl-5-((triethylsilyl)oxy)undeca-2,6,8-trienal (**59**): To a solution of diastereomeric alcohols **58** (452 mg, 1.34 mmol) in THF (15 mL) under argon atmosphere at room temperature were added PDC (1507 mg, 4.00 mmol) and molecular sieves 4 Å (1500 mg). After stirring for 16 h, the mixture was filtered through a pad of Celite and washed with Et₂O. The filtrate and washings were combined and concentrated. The residue was subjected to AFCS [φ37 × 300 mm; flow rate 20 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (100/0 → 81/19)] to give aldehyde **59** (268 mg, *t_R* = 37 min, 0.80 mmol, 60% yield, *E:Z* = 2.3:1) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +15 (c 0.68, CHCl₃); IR (neat) 2958, 2939, 2878, 1717, 1683, 1652, 1458, 1376 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, *E* isomer) δ 10.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.10 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.91 (dq, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 5.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.39 (dd, *J* = 15.6, 8.2 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 8.2, 7.7 Hz,

1H), 2.36 (dq, $J = 7.7, 7.0$ Hz, 1H), 2.19 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 2.14 (dq, $J = 7.4, 7.5$ Hz, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.05-0.97 (m, 6H), 0.92-0.86 (m, 9H), 0.56-0.47 (m, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , *E* isomer) δ 191.5, 167.3, 136.8, 135.3, 132.4, 128.4, 127.6, 77.6, 50.9, 21.7, 16.5, 15.6, 14.1, 12.5, 6.9 (3C), 5.2 (3C); HRMS (ESI-TOF) m/z 205.1607 $[\text{M-TESOH+H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}$ 205.1592).

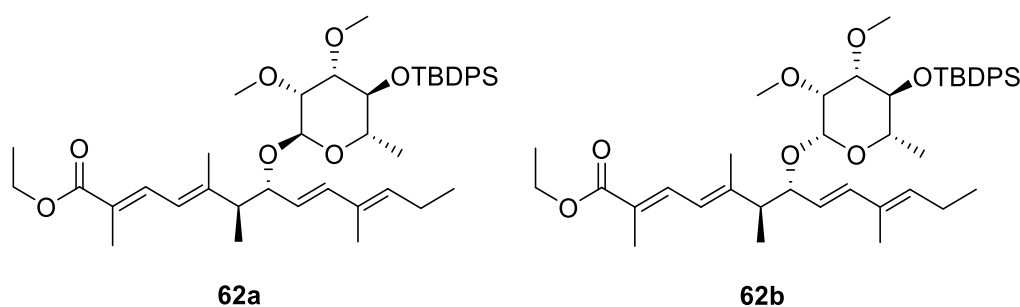


ethyl (6S,7R,8E,10E)-2,5,6,10-tetramethyl-7-((triethylsilyl)oxy)trideca-2,4,8,10-tetraenoate (60): To a solution of triethyl 2-phosphonopropionate (**42**) (0.50 mL, 2.31 mmol) in THF (3 mL) under argon atmosphere cooled at 0 °C was added a 0.5 M solution of lithium diisopropylamide in THF-hexane (4.63 mL, 2.31 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, and then a solution of aldehyde **59** (260 mg, 0.77 mmol) in THF (4 mL) was added to the mixture via a cannula. The reaction mixture was stirred for 30 min, allowed to warm to room temperature, and stirred for 10 min. The reaction mixture was diluted with H_2O (10 mL) and extracted with EtOAc (30 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 37 \times 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (100/0 \rightarrow 80/20)] to give ester **60** (283 mg, $t_R = 33$ min, 0.67 mmol, 87% yield, 16*E*:16*Z* = 2.7:1) as a colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +33$ (c 0.46, CHCl_3); IR (neat) 2960, 2935, 2913, 2876, 1704, 1631, 1601, 1460, 1366 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 16*E* isomer) δ 7.49 (dq, $J = 12.0, 0.9$ Hz, 1H), 6.17 (brd, $J = 12.0$ Hz, 1H), 6.09 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 5.47-5.38 (m, 2H), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.05 (dd, $J = 7.0, 7.7$ Hz, 1H), 2.36 (dq, $J = 7.0, 7.7$ Hz, 1H), 2.14 (dq, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 2H), 1.91 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.87 (brs, 3H), 1.70 (brs, 3H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.02-0.96 (m, 6H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H), 0.56-0.48 (m, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , 16*E* isomer) δ 169.3, 150.0, 136.0, 134.6, 134.5, 132.6, 128.4, 124.8, 122.1, 77.3, 60.5, 50.8, 21.6, 15.64, 15.61, 14.5, 14.2, 12.53, 12.49, 7.0 (3C), 5.2 (3C); HRMS (ESI-TOF) m/z 289.2213 $[\text{M-TESOH+H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_2$ 289.2168).



ethyl (2E,4E,6S,7R,8E,10E)-7-hydroxy-2,5,6,10-tetramethyltrideca-2,4,8,10-tetraenoate (61): To a solution of ester **60** (277 mg, 0.66 mmol) in THF (3 mL) at room temperature was added a 0.5 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF-AcOH (6.59 mL, 3.30 mmol, $\text{Bu}_4\text{NF}:\text{AcOH} = 1:1$),

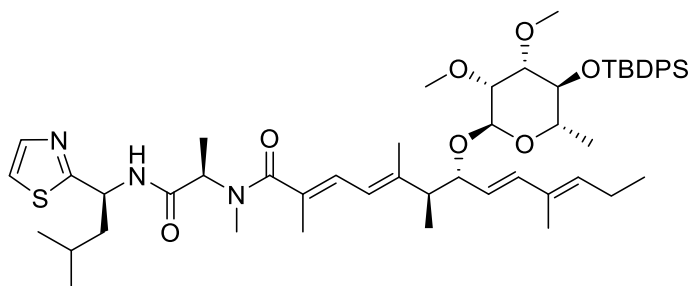
and the mixture was stirred at 50 °C for 3 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with Et₂O (10 mL) and H₂O (20 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (20 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) and brine (20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 37 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (88/12 → 67/33)] to give desired ester **61** (148 mg, *t_R* = 34 min, 0.48 mmol, 73% yield) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +21 (*c* 0.90, CHCl₃); IR (neat) 3453, 2980, 2938, 2880, 1714, 1631, 1451, 1371 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (dq, *J* = 11.9, 0.9 Hz, 1H), 6.29-6.24 (m, 2H), 5.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.49 (dd, *J* = 7.7, 15.3 Hz, 1H), 4.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.02 (ddd, *J* = 2.0, 7.7, 7.7 Hz, 1H), 2.38 (dq, *J* = 7.7, 7.6 Hz, 1H), 2.14 (dq, *J* = 7.3, 7.6 Hz, 2H), 1.94 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.74 (d, *J* = 0.7 Hz, 3H), 1.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, OH), 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H), 0.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.0, 148.7, 138.0, 135.7, 133.7, 132.4, 127.0, 126.2, 123.1, 75.5, 60.6, 50.8, 21.7, 16.1, 14.5, 14.1, 13.9, 12.7, 12.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 289.2156 [M-OH+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₉O₂ 289.2168).



ethyl (2E,4E,6S,7R,8E,10E)-7-(((2R,3R,4S,5S,6S)-5-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)-3,4-dimethoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,6,10-tetramethyltrideca-2,4,8,10-tetraenoate (62a) : To a stirred suspension of samarium (III) trifluoromethanesulfonate (86 mg, 0.14 mmol) and molecular sieves 4 Å (160 mg) in Et₂O/1,4-dioxane (4/1) (1 mL) under argon atmosphere cooled at -20 °C was added a solution of alcohol **61** (44 mg, 0.14 mmol) and sugar **50** (114 mg, 0.19 mmol) in Et₂O/1,4-dioxane (4/1) (1 mL, 0.2 ml × 2 rinse) via a cannula. After warming up to 0 °C and stirring for 1 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite, washed with EtOAc. The organic layer was separated, and the water layer was extracted with EtOAc (20 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (20 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 37 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (100/0 → 82/18)] to give α -glycoside **62a** (29 mg, *t_R* = 44 min, 0.04 mmol, 28% yield) and β -glycoside **62b** (11 mg, *t_R* = 46 min, 0.015 mmol, 10% yield) as a colorless oil, respectively;

α -glycoside **62a**: $[\alpha]_D^{25}$ -27 (*c* 0.47, CHCl₃); IR (neat) 2965, 2930, 2856, 1702, 1635, 1428, 1389 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73-7.69 (m, 2H), 7.63-7.57 (m, 3H), 7.39-7.29 (m, 6H), 6.29 (dq, *J* = 11.9, 0.9 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 5.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.22 (dd, *J* = 8.8, 15.8 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.16-4.07 (m, 2H), 3.99 (dd, *J* = 8.4, 8.8 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 8.4, 8.8 Hz, 1H), 3.57 (dq, *J* = 8.8, 6.2 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 2.0, 3.0 Hz, 1H), 3.252 (dd, *J* = 3.0, 8.4 Hz, 1H), 3.245 (s, 3H), 2.76 (s, 3H), 2.47 (dq, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 2.13 (dq, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 2H), 2.01 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.96 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.12 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H) 0.97 (s, 9H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.8, 149.3, 140.6, 136.2 (2C), 136.1, 135.8 (2C), 134.9, 134.2, 133.9, 132.1, 129.3, 129.1, 127.4 (2C), 127.2 (2C), 125.5, 123.6, 122.4, 93.6, 81.5, 79.6, 76.1, 73.9, 69.5, 60.5, 58.9, 55.3, 48.7, 27.2 (3C), 21.7, 19.8, 18.6, 16.4, 15.2, 14.4, 14.1, 12.7, 12.5; *J*_{CH} value of the anomeric position: 170 Hz; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 741.4202 [M+Na]⁺ (calcd for C₄₃H₆₂O₇SiNa 741.4163).

β -glycoside **62b**: $[\alpha]_D^{25}$ +34 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 2965, 2932, 2857, 1702, 1632, 1428, 1389 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 2H), 7.45 (dq, *J* = 11.8, 1.1 Hz, 1H), 7.38-7.28 (m, 6H), 6.18 (brd, *J* = 11.8 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.52 (dd, *J* = 15.9, 8.6 Hz, 1H), 5.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.25 (brs, 1H), 4.19 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.86 (dd, *J* = 8.6, 8.0 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 9.1, 9.1 Hz, 1H), 3.44 (brd, *J* = 3.2 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.16 (dq, *J* = 9.1, 6.3 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 9.1, 3.2 Hz, 1H), 2.84 (s, 3H), 2.50 (dq, *J* = 8.0, 7.0 Hz, 1H), 2.14 (dq, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H), 1.86 (s, 6H), 1.70 (s, 3H), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.00 (s, 9H), 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 149.2, 137.3, 136.1 (2C), 136.0 (2C), 134.8, 134.8, 134.3, 134.1, 132.7, 129.3, 129.2, 127.4 (2C), 127.2 (2C), 126.6, 125.2, 122.4, 100.8, 85.9, 83.7, 76.4, 73.9, 73.0, 61.4, 60.6, 55.1, 48.8, 27.3 (3C), 21.6, 19.9, 18.5, 15.9, 14.5, 14.2, 14.1, 12.5, 12.4; *J*_{CH} value of the anomeric position: 160 Hz; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 741.4180 [M+Na]⁺ (calcd for C₄₃H₆₂O₇SiNa 741.4163).

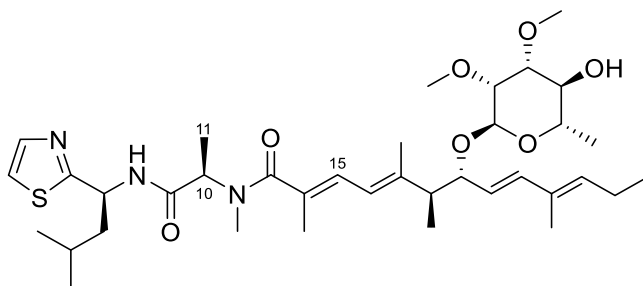


(2*E*,4*E*,6*S*,7*R*,8*E*,10*E*)-7-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-5-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)-3,4-dimethoxy-6-

methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-N,2,5,6,10-pentamethyl-N-((R)-1-(((S)-3-methyl-1-(thiazol-2-yl)butyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)trideca-2,4,8,10-tetraenamide (63) : To a solution of glycoside **62a** (33 mg, 0.046 mmol) in THF/MeOH/H₂O (3/1/1) (0.3 mL) under argon atmosphere at room temperature was added lithium hydroxide monohydrate (5.8 mg, 0.14 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 16 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with AcOH (3 drops) and H₂O (10 mL) and extracted with EtOAc (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated to give the crude carboxylic acid (33.2 mg), which was used for the next reaction without further purification.

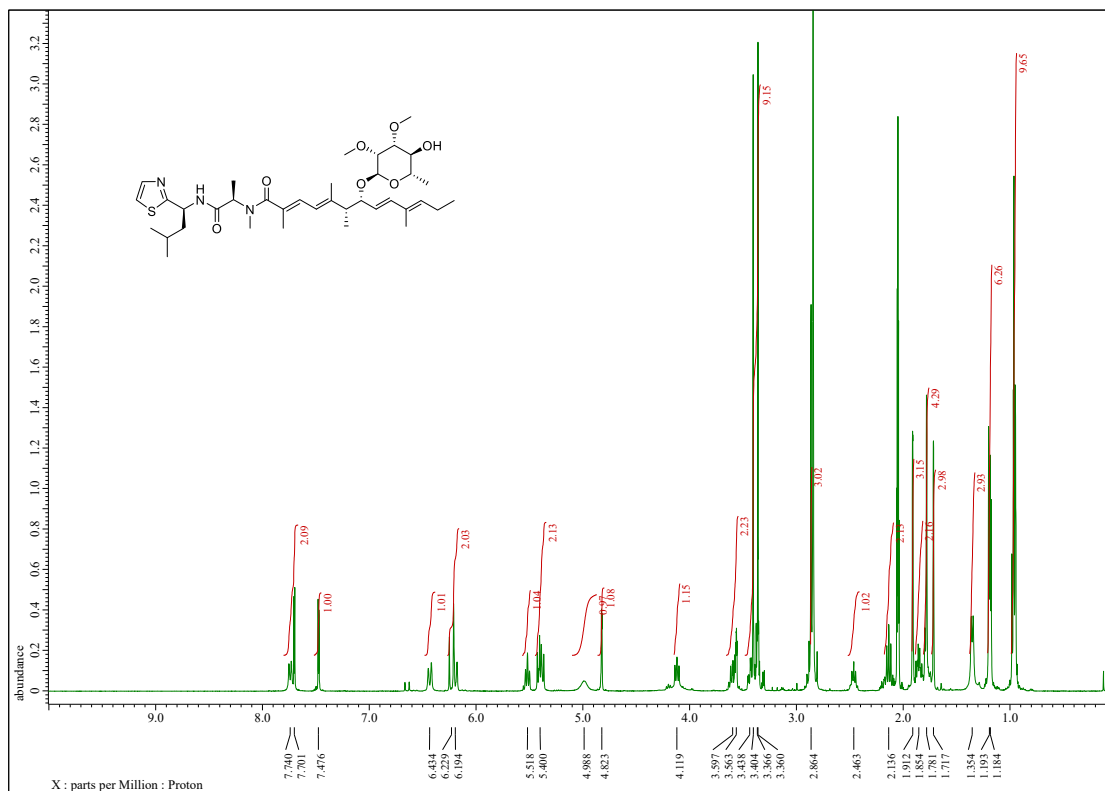
To a stirred solution of the crude carboxylic acid (33.2 mg) and peptide•TFA **29a** (34 mg, 0.092 mmol) in DMF (0.2 mL) cooled at 0 °C were added DIPEA (0.033 mL, 0.19 mmol) and HATU (35 mg, 0.092 mmol). After stirring at room temperature for 3 h, the reaction mixture was diluted with 10% aqueous citric acid (5 mL) and extracted with EtOAc (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was subjected to AFCS [ϕ 11 × 300 mm; flow rate 5 mL/min; detection at 254 nm; solvent gradient condition, hexane/EtOAc (74/26 → 53/47)] to give glycoside **63** (39 mg, t_R = 35 min, 91% yield in 2 steps) as a colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +38$ (*c* 1.00, CHCl₃); IR (neat) 3291, 2961, 2933, 2858, 1685, 1617, 1597, 1525, 1461, 1388 cm⁻¹; ¹H NMR of major rotamer* (400 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 2H), 7.38-7.29 (m, 6H), 7.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH), 6.54 (brd, *J* = 11.3 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 5.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.39 (m, 1H), 5.24 (dd, *J* = 15.4, 8.6 Hz, 1H), 5.12 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 8.6, 8.0 Hz, 1H), 3.74 (dd, *J* = 8.4, 8.4 Hz, 1H), 3.66 (dq, *J* = 8.4, 6.3 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 2.7, 1.8 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 1H), 3.26 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.47 (m, 1H), 2.17-2.08 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.91 (m, 1H), 1.86 (s, 3H), 1.79-1.71 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.00 (s, 9H), 1.01-0.95 (m, 9H); ¹³C NMR of major rotamer* (100 MHz, CDCl₃) δ 175.6, 173.3, 170.8, 142.8, 142.7, 140.2, 136.03 (2C), 135.80 (2C), 135.06, 134.4, 132.1, 129.3, 129.2, 129.0, 128.2, 127.4 (2C), 127.3 (2C), 123.5, 121.1, 118.7, 118.3, 94.0, 81.4, 80.1, 76.2, 74.1, 69.7, 58.9, 55.2, 49.8, 48.3, 44.8, 44.7, 32.8, 27.3 (3C), 25.1, 23.1, 22.0, 21.7, 19.9, 18.7, 16.3, 15.6, 14.7, 14.1, 13.1, 12.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 928.5363 [M+H]⁺ (calcd for C₅₃H₇₈N₃O₇SSi 928.5330).

*Minor rotamer (ratio 2:1) derived from the *N*-methyl amide group of *N*-Me-Ala was detected.

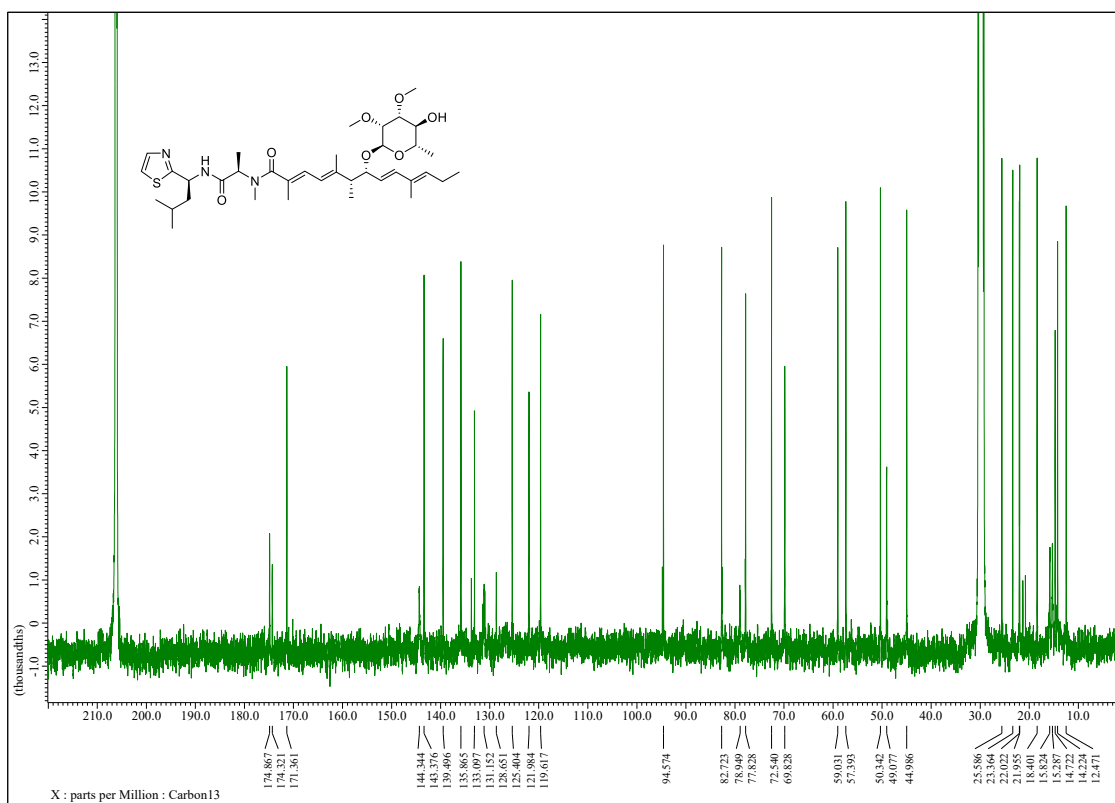


(18*S*,19*R*)-iezoside (**5'**): To a solution of glycoside **63** (20 mg, 0.021 mmol) in THF (0.2 mL) under argon atmosphere at room temperature was added a 1 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF (1 M, 0.064 mL, 0.064 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 7 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃ (3 mL) and extracted with EtOAc (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with brine (3 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. The residue was purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection at 215 nm; solvent 90% MeOH] to give (18*S*,19*R*)-iezoside (**5**) (10.4 mg, *t*_R = 20.4 min, 0.015 mmol, 72% yield) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +119 (*c* 0.75, CHCl₃); IR (neat) 3449, 3289, 2963, 2932, 2874, 1684, 1618, 1598, 1523, 1441, 1396 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 7.71 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.49 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.46 (brd, *J* = 11.3 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.21 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 5.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.39 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 15.9, 8.6 Hz, 1H), 5.01 (brm, 1H), 4.80 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.02 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.54-3.48 (m, 2H), 3.41 (dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.27 (dd, *J* = 9.3, 2.9 Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.82 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 2.16 (m, 2H), 1.92 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.88-1.83 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.38 (brd, *J* = 5.0 Hz, 3H), 1.16 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 1.00-0.95 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ 175.0, 174.3, 171.5, 144.8, 143.4, 140.5, 136.0, 133.1, 130.8, 125.4, 122.2, 119.7, 94.5, 82.7, 80.1, 77.9, 72.4, 69.7, 59.0, 57.4, 50.3, 48.9, 45.0, 30.5, 25.6, 23.4, 22.03, 21.95, 18.4, 16.3, 14.8, 14.7, 14.2, 12.5 (The carbon signals at C-10, C-11, and C-15 were not detected probably due to the conformational exchange around the *N*-Me-Ala residue.); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 690.4188 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₆₀N₃O₇S 690.4152).

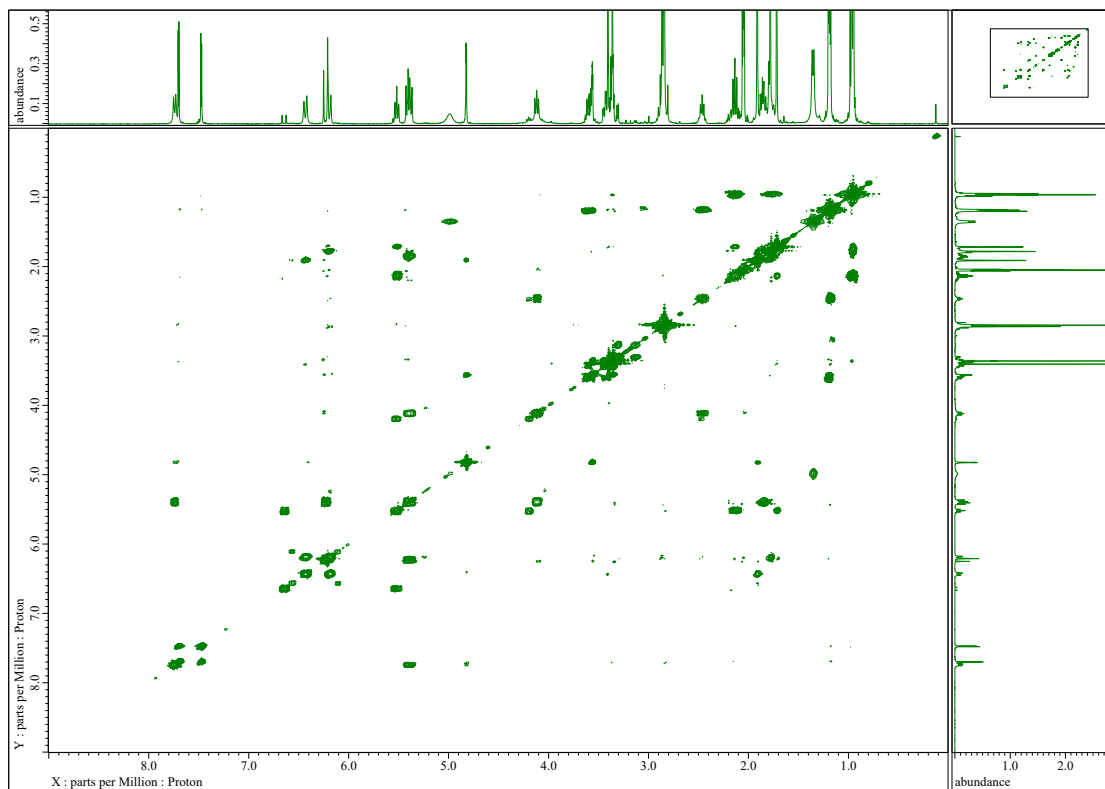
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of iezoside (5)



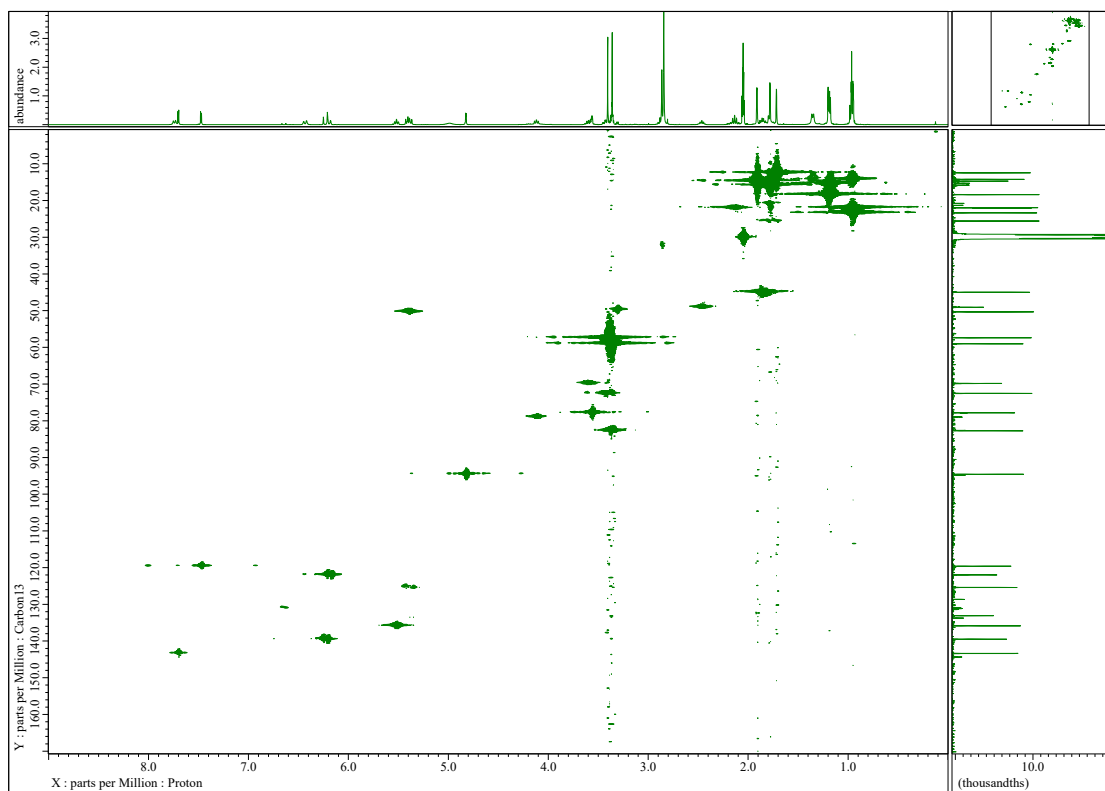
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of iezoside (5)



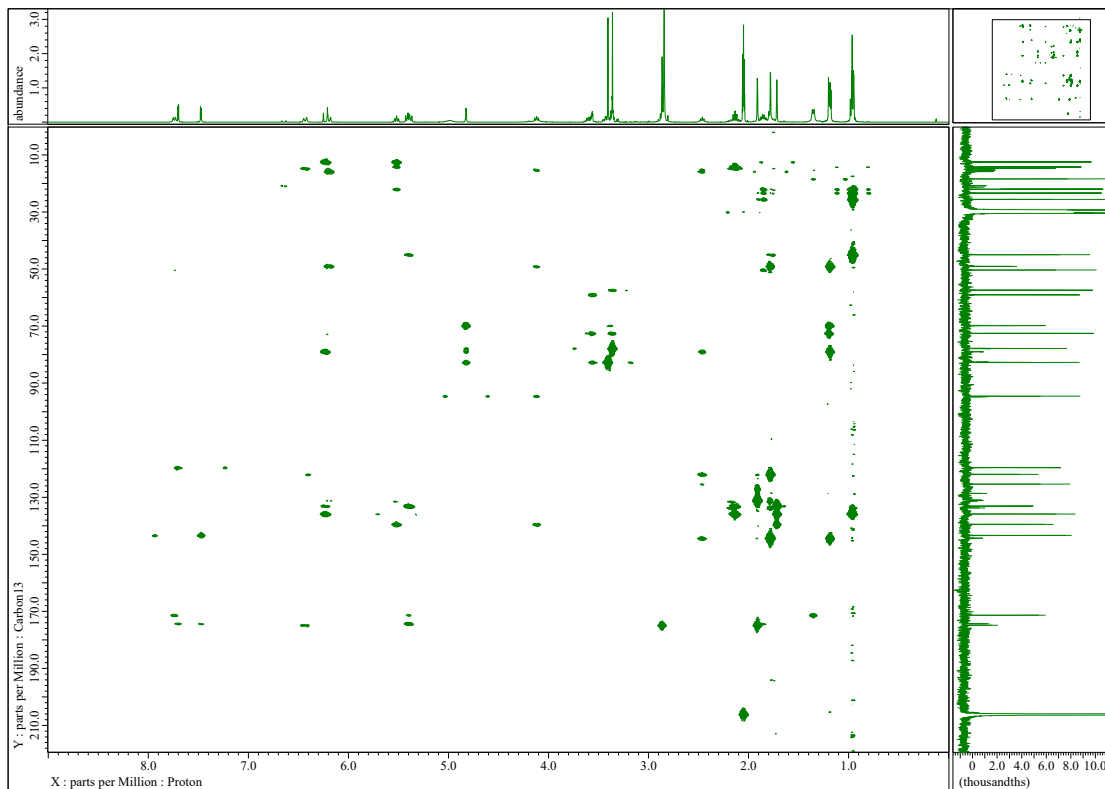
COSY (400 MHz, (CD₃)₂CO) spectrum of iezoside (5)



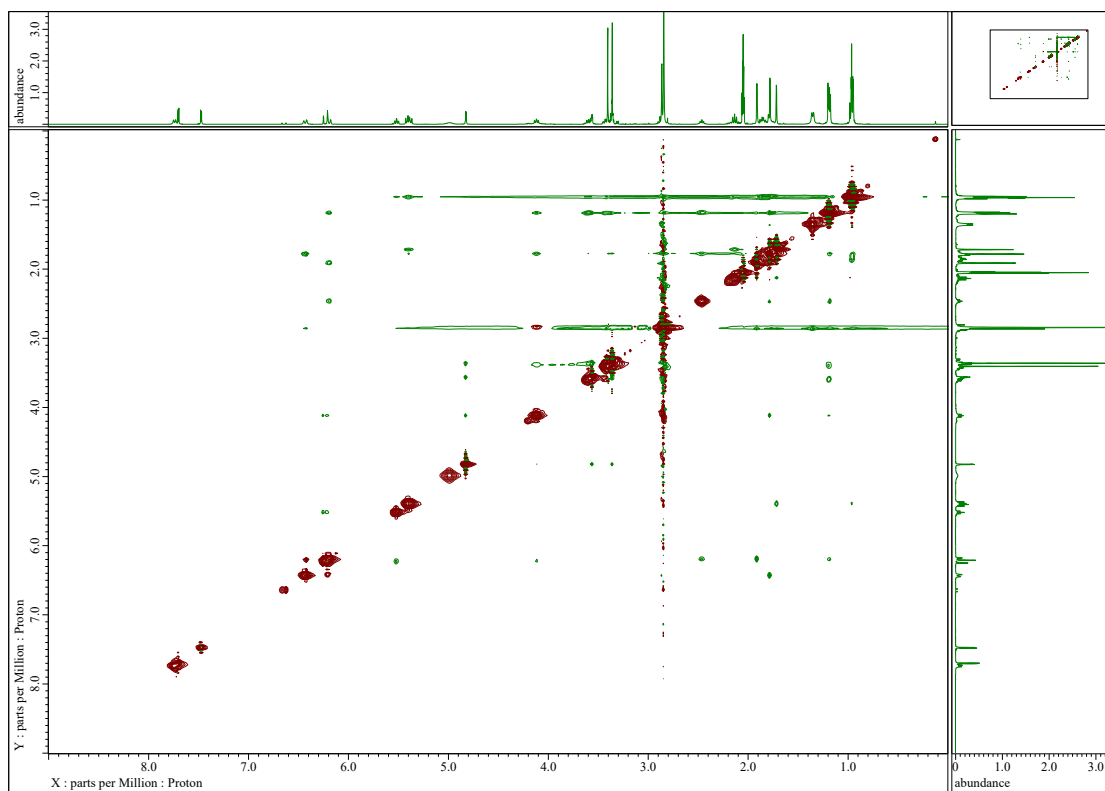
HMQC (400 MHz, (CD₃)₂CO) spectrum of iezoside (5)



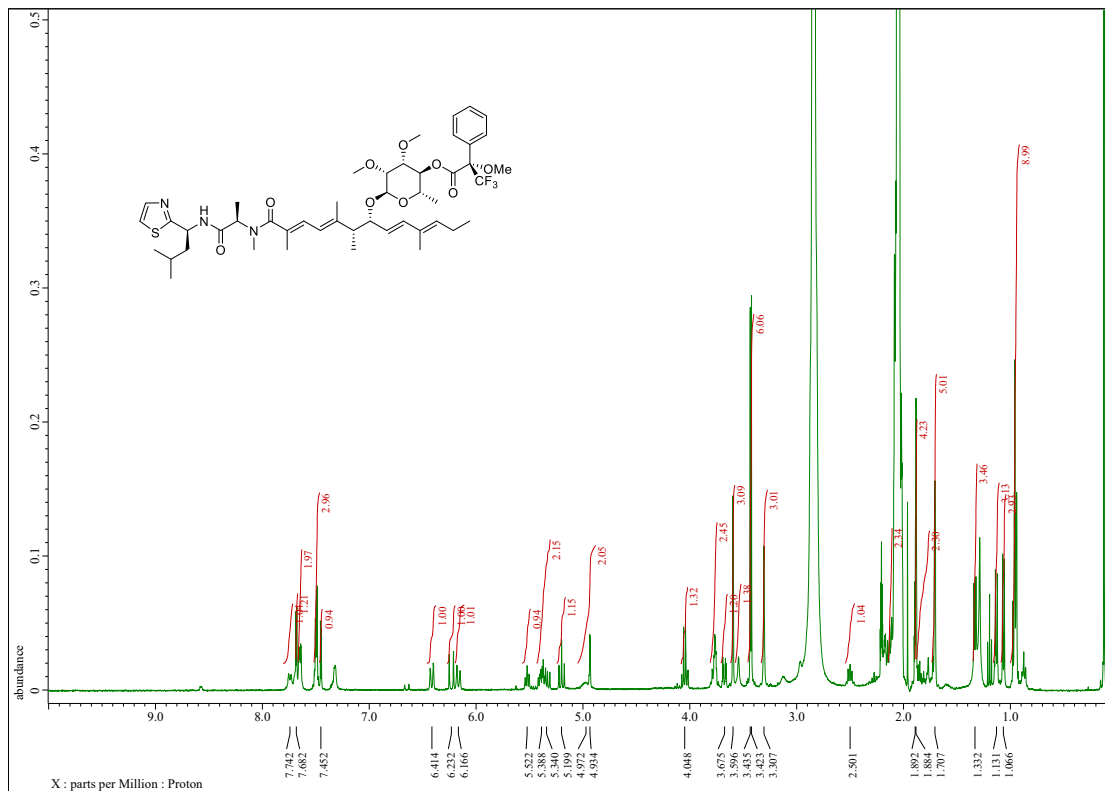
HMBC (400 MHz, (CD₃)₂CO) spectrum of iezoside (5)



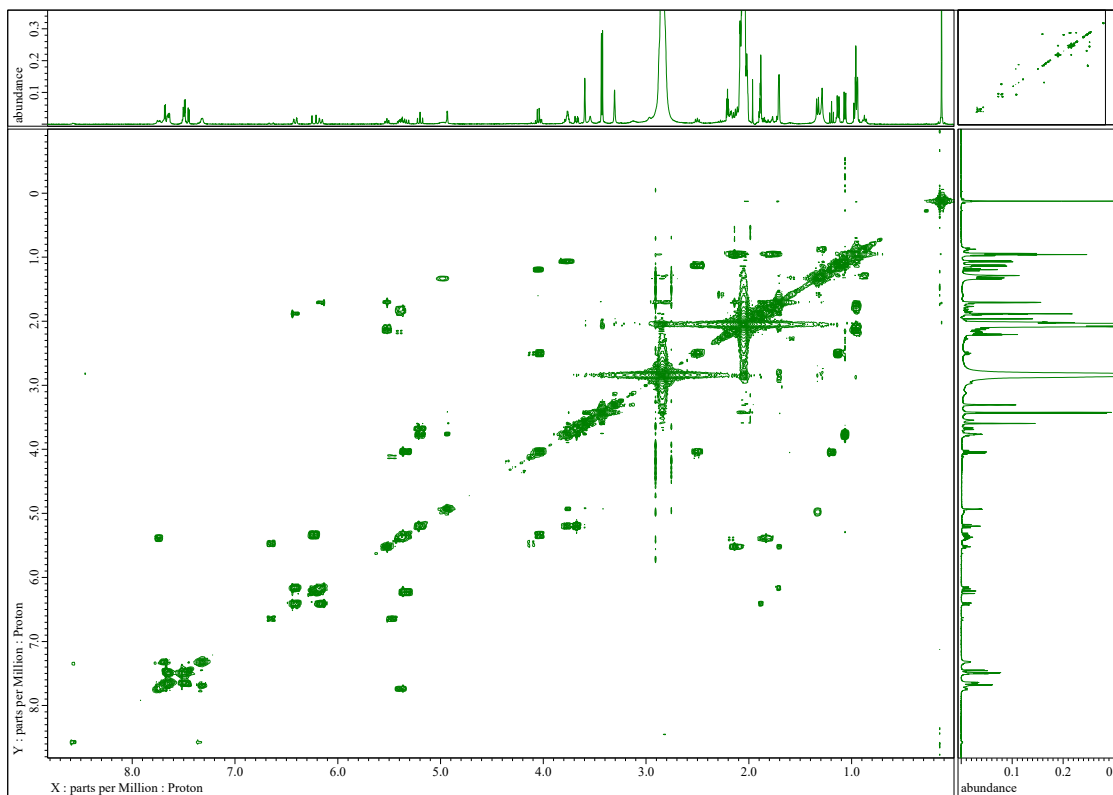
NOESY (400 MHz, (CD₃)₂CO) spectrum of iezoside (5)



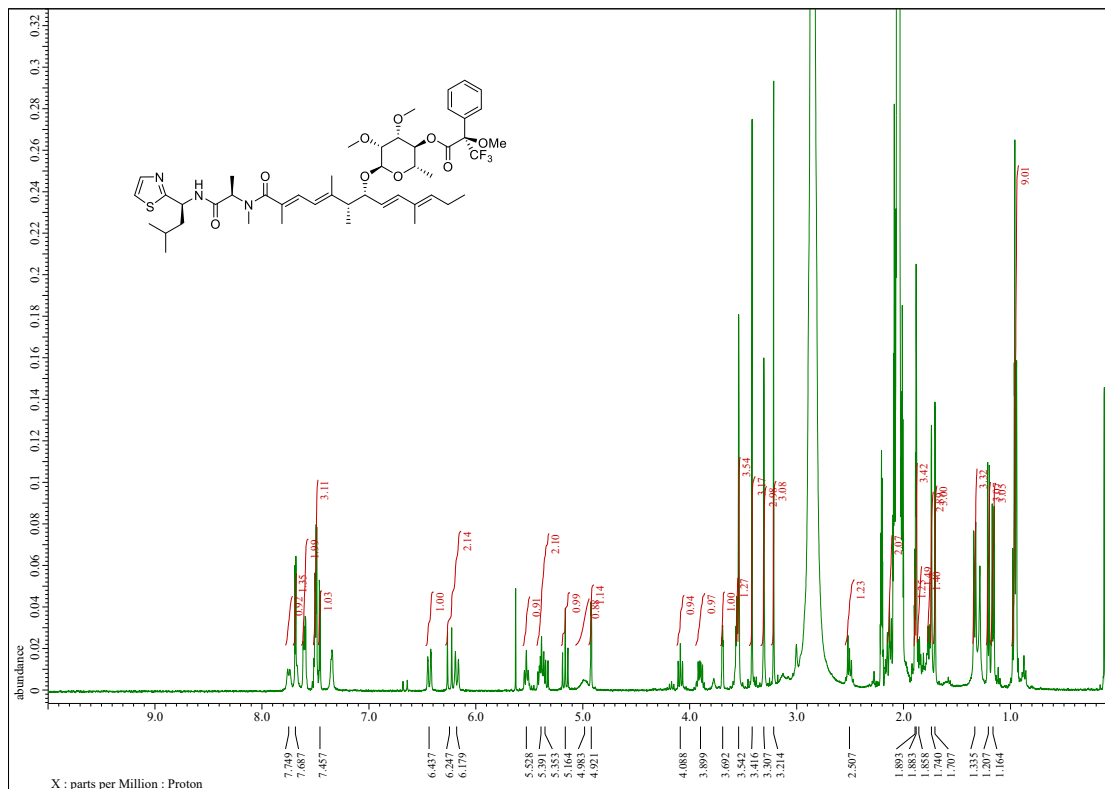
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of iezoside (*S*)-MTPA ester (**5'a**)



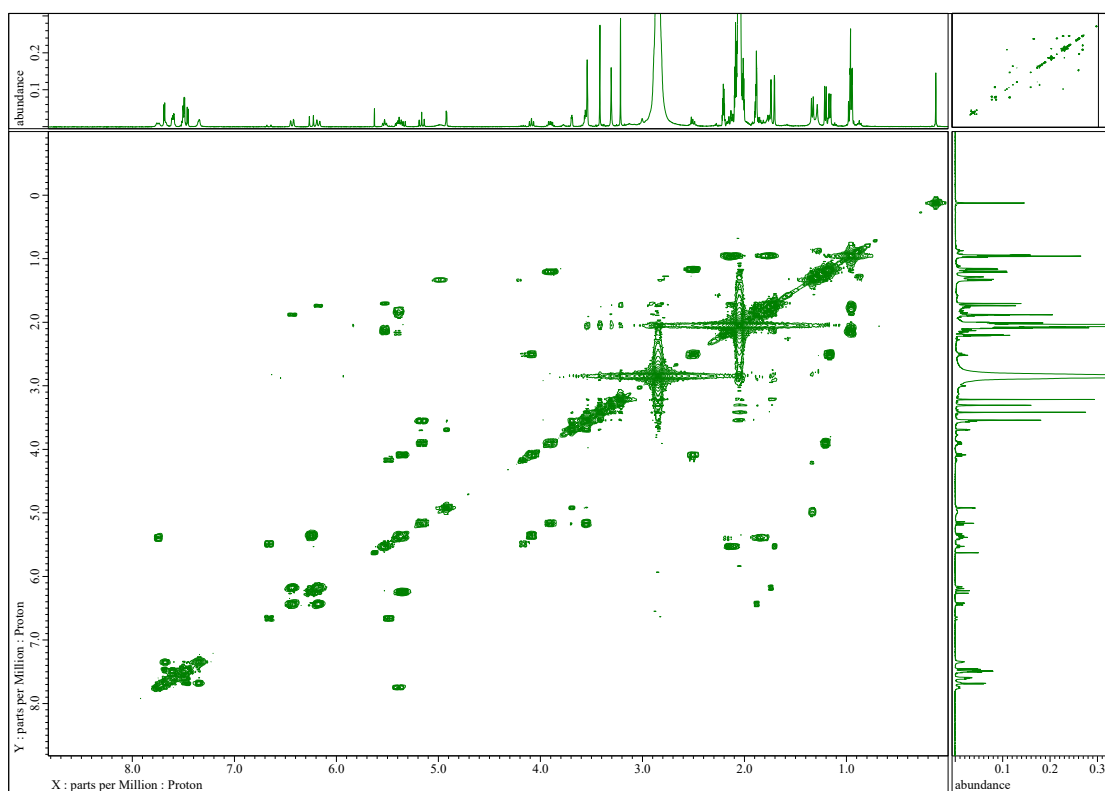
COSY (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of iezoside (*S*)-MTPA ester (**5'a**)



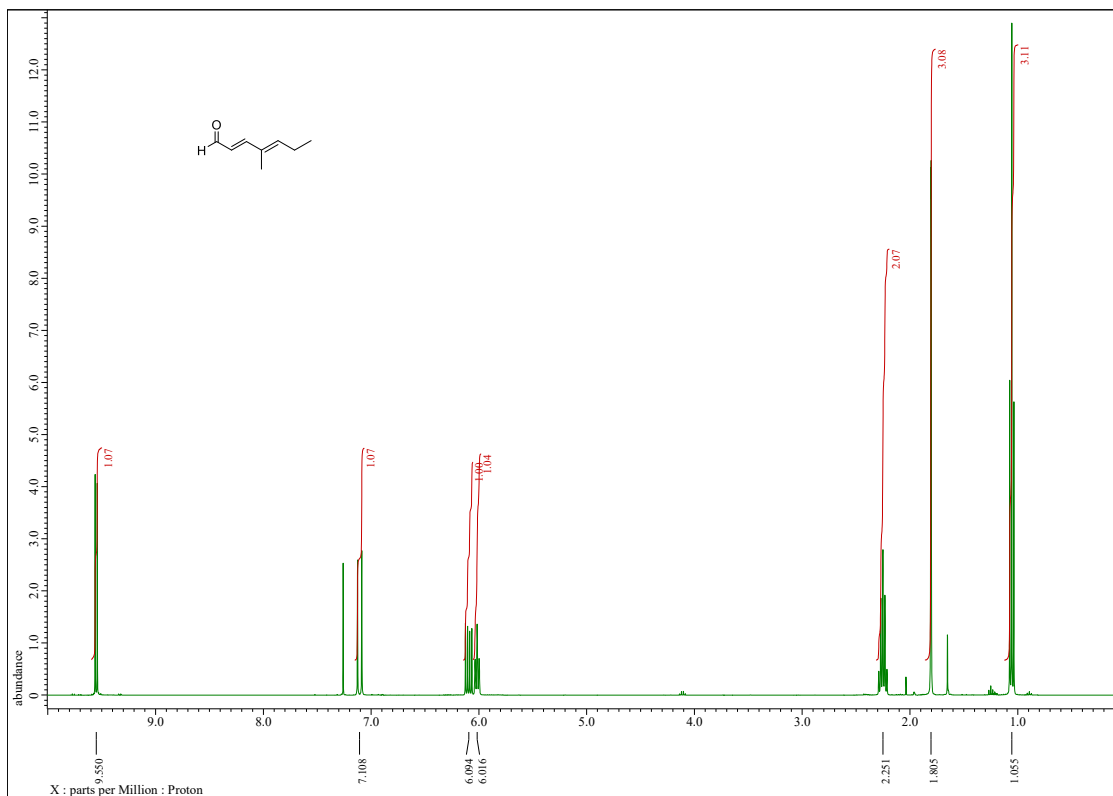
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of iezoside (*R*)-MTPA ester (**5'b**)



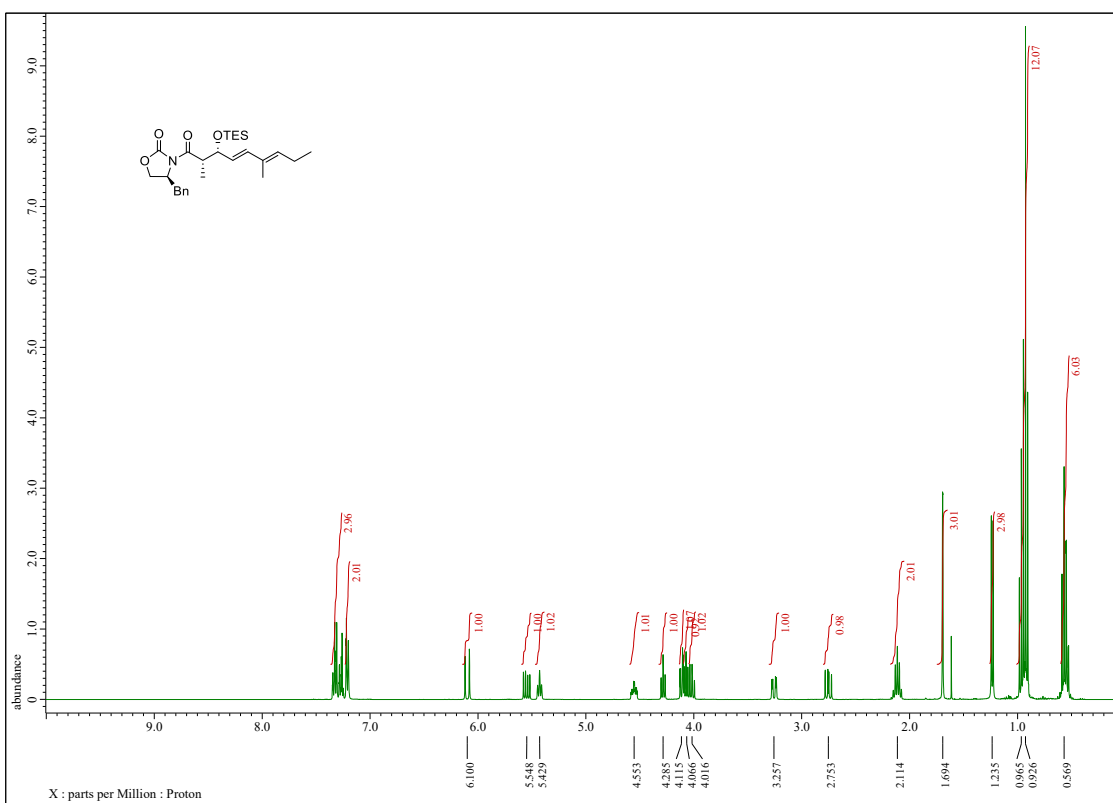
COSY (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of iezoside (*R*)-MTPA ester (**5'b**)



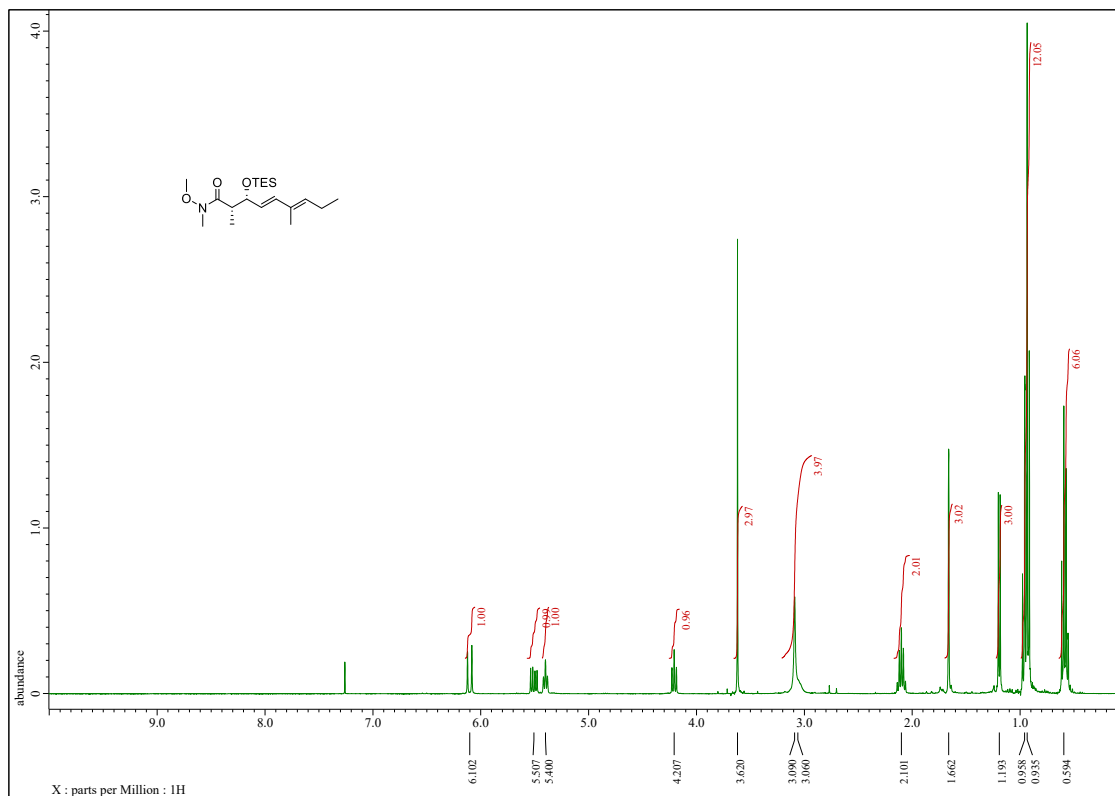
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **35**



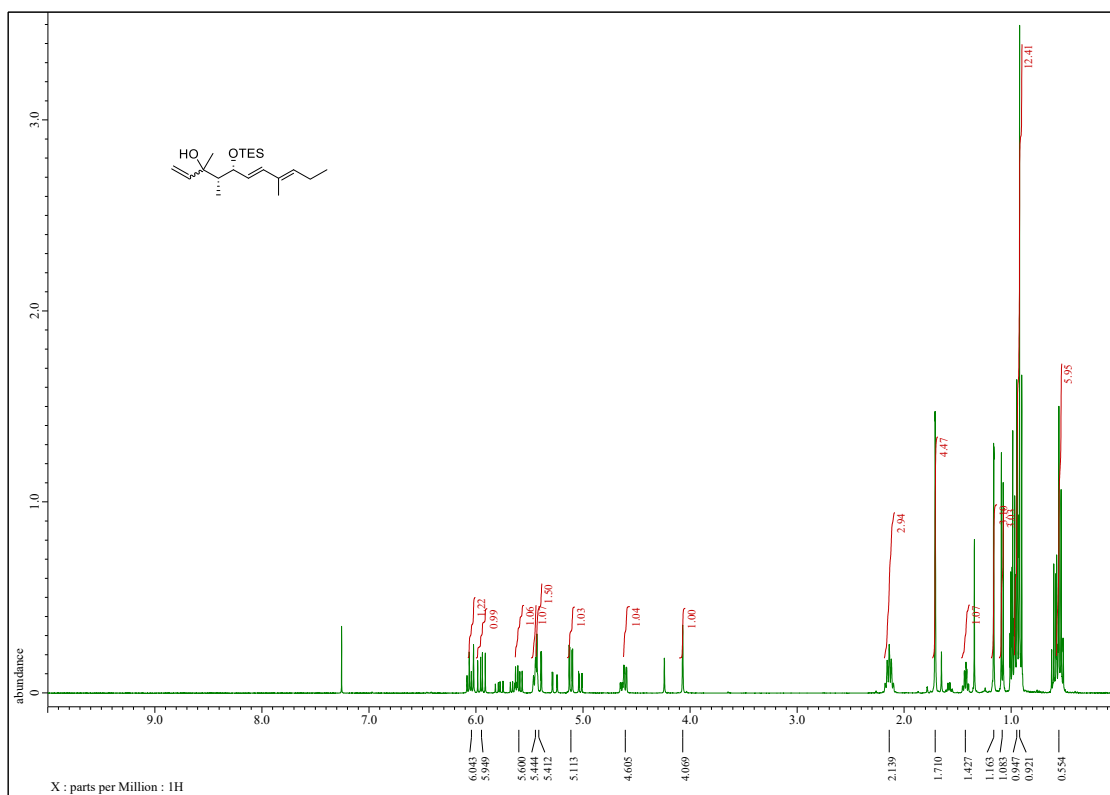
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **33**



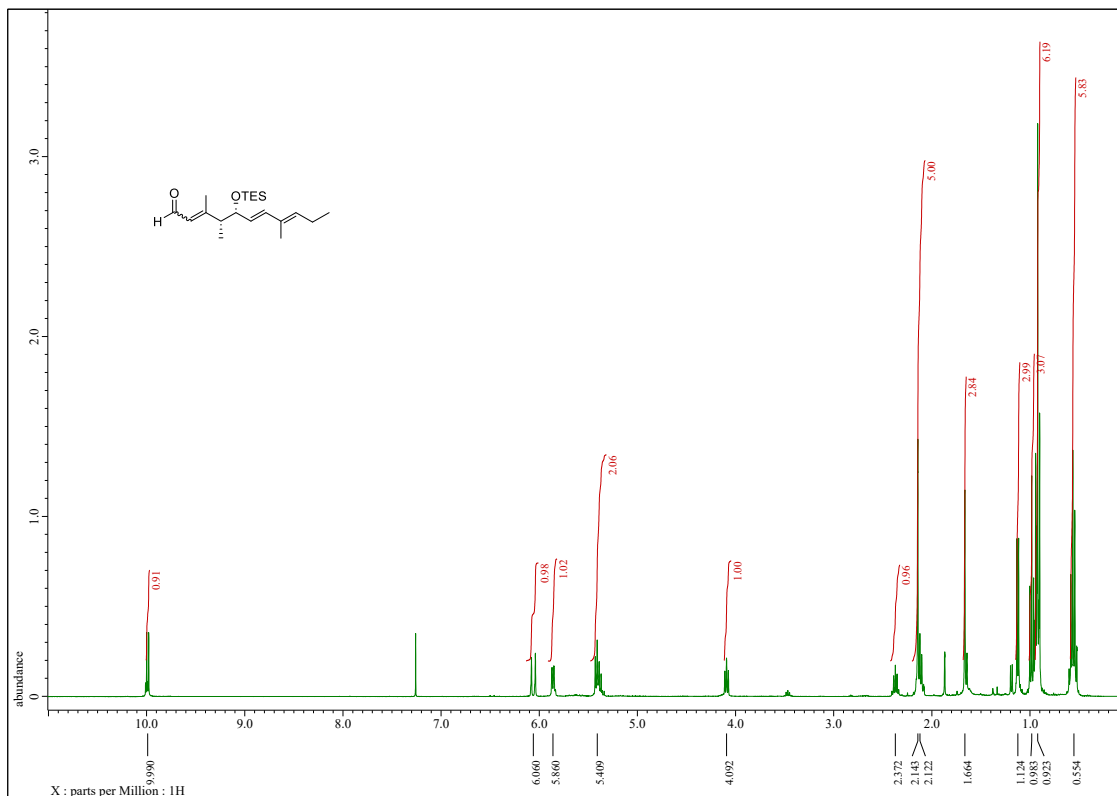
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **32**



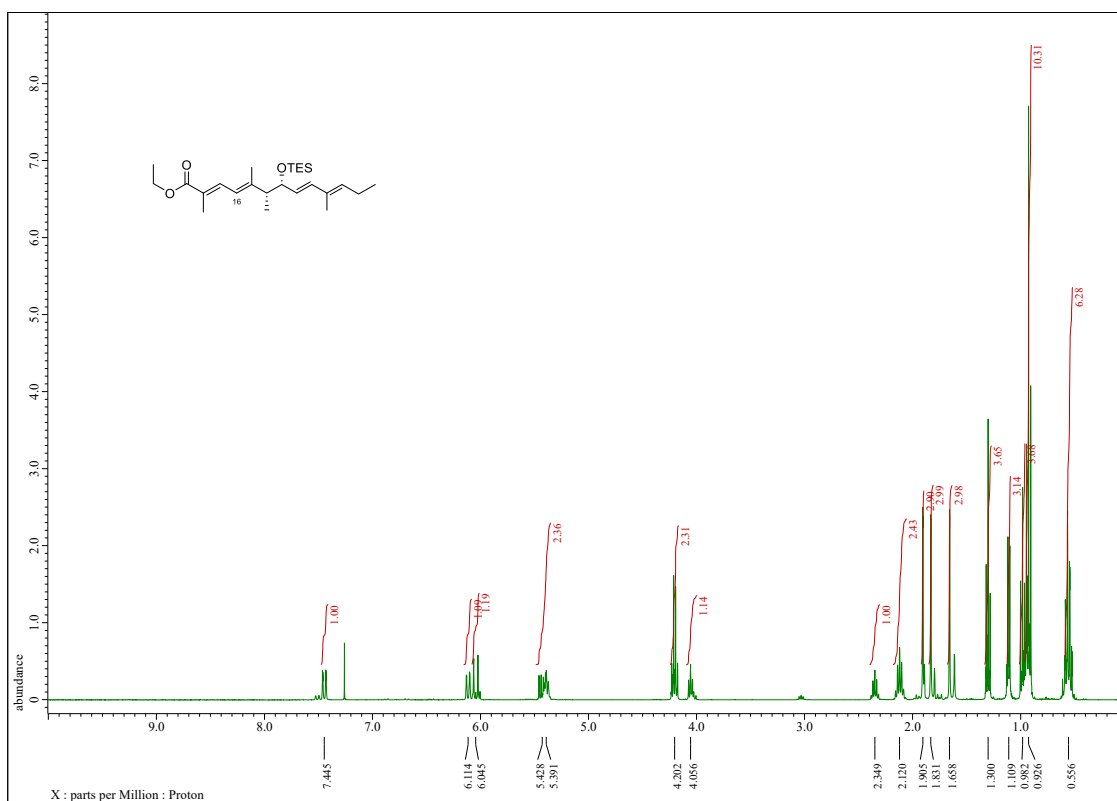
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **31** (dr. 2.5:1)



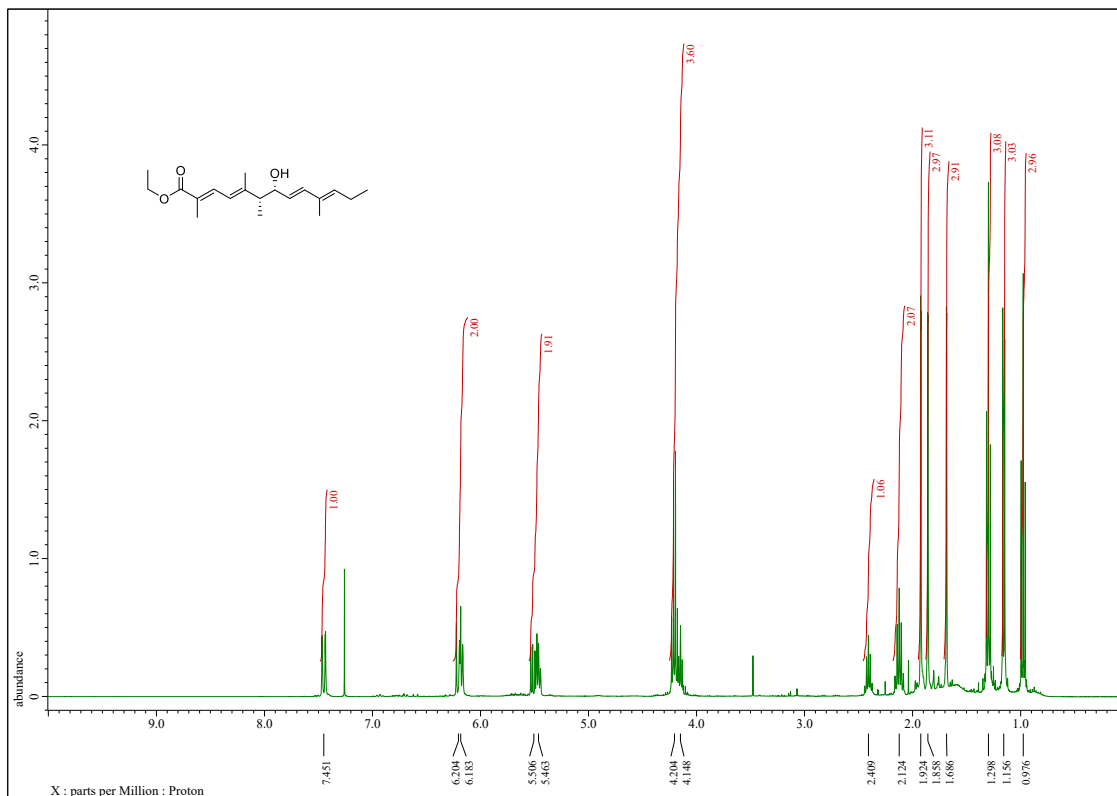
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **41** (*E:Z*=5:1)



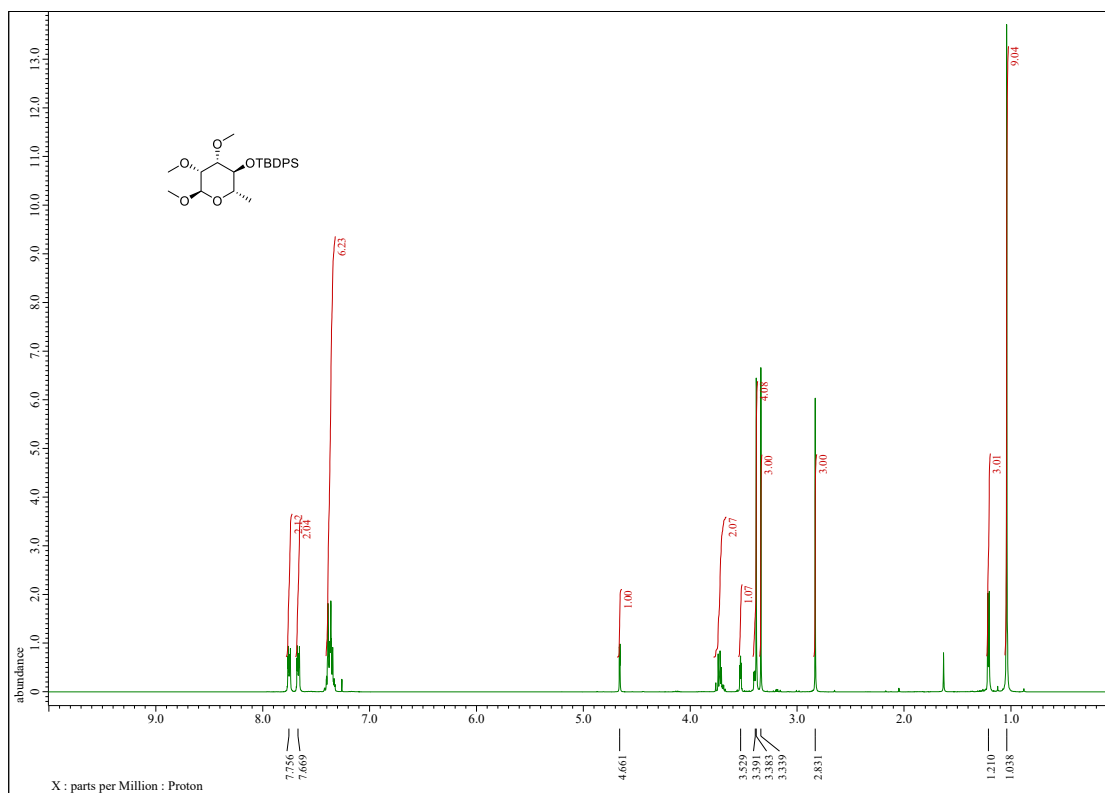
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **43** (16*E*:16*Z*=5:1)



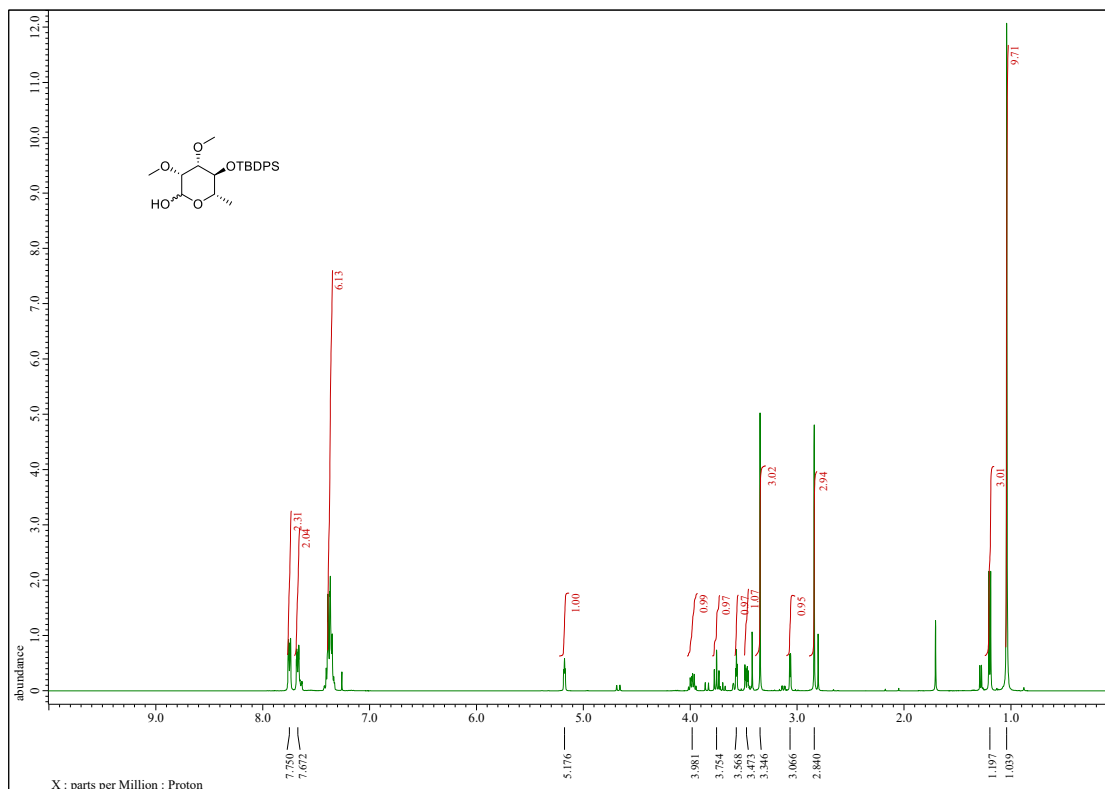
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **30**



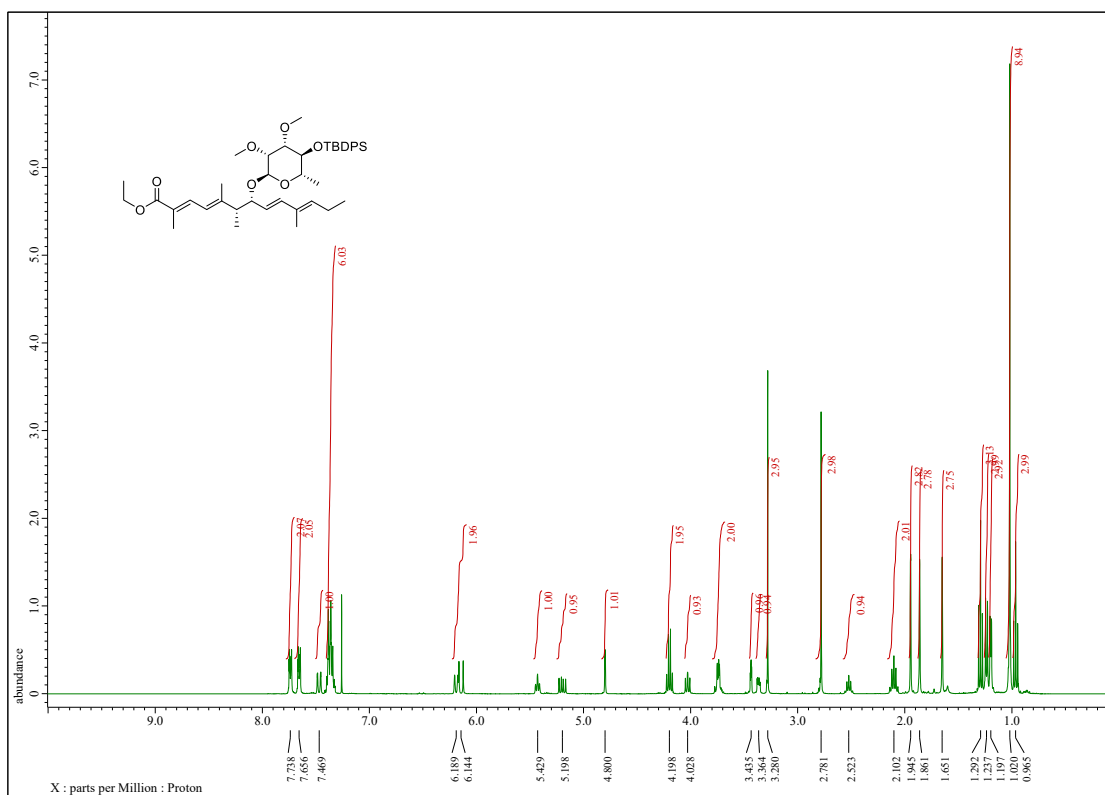
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **48**



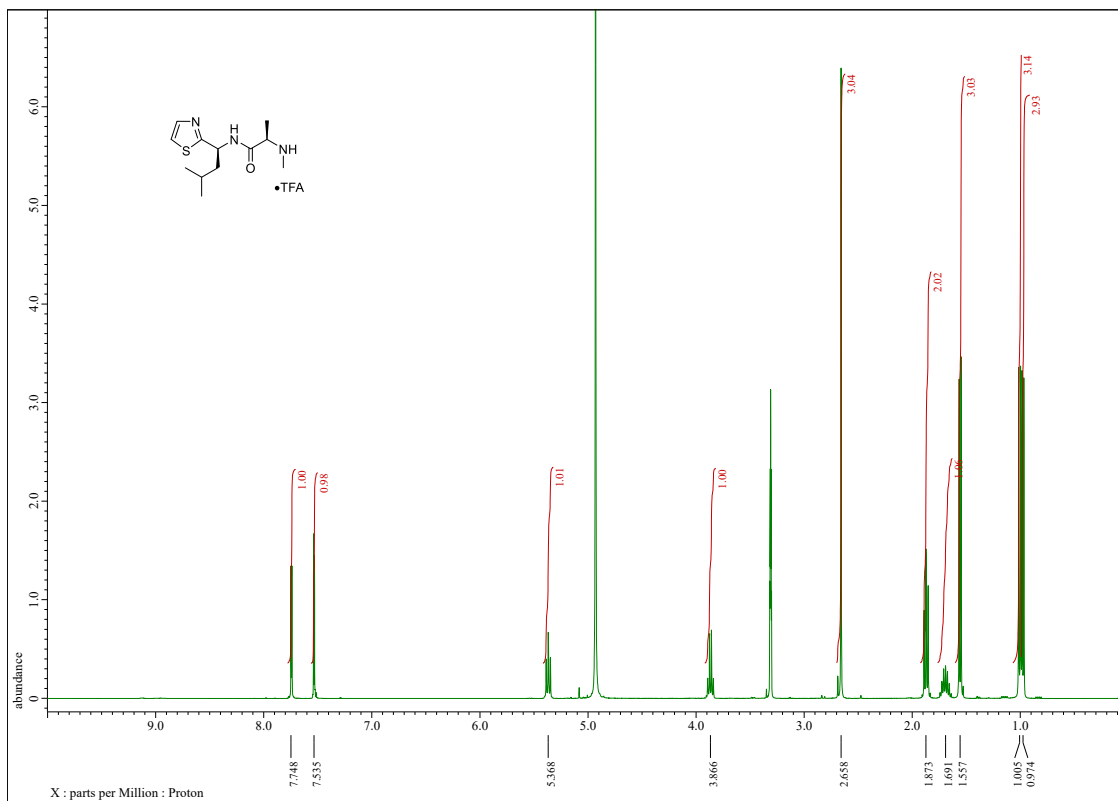
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **49** (dr. 6:1)



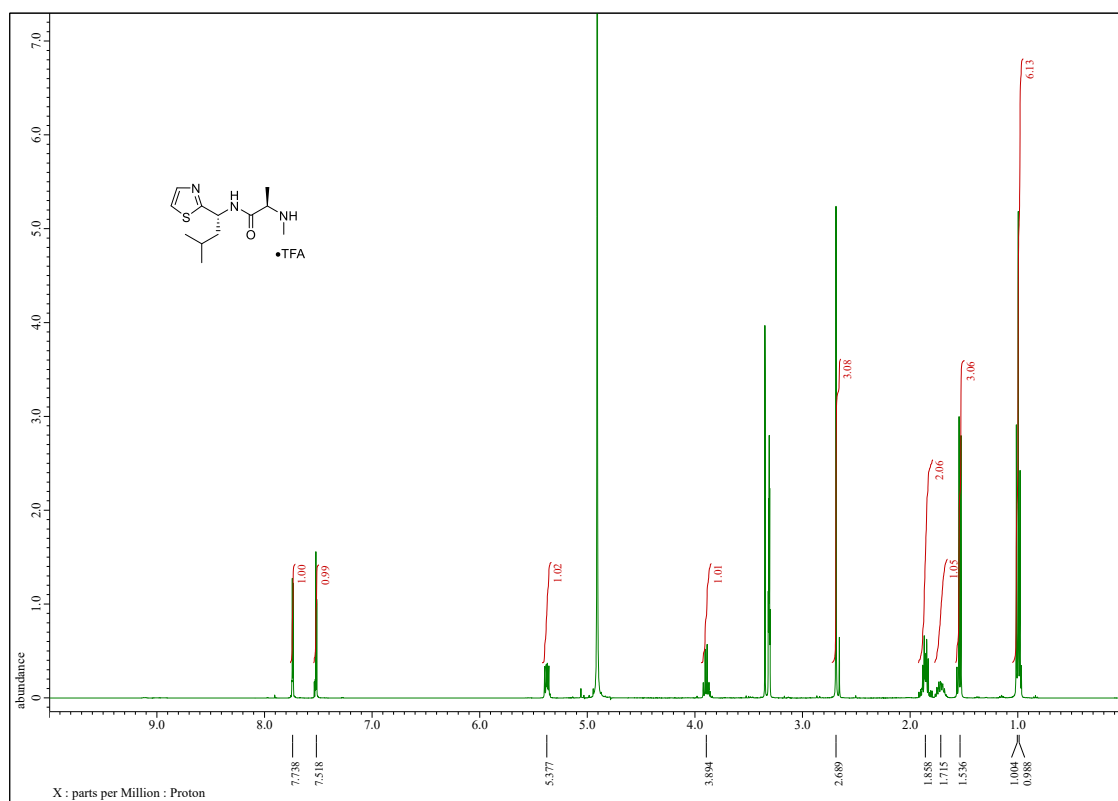
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **28a**



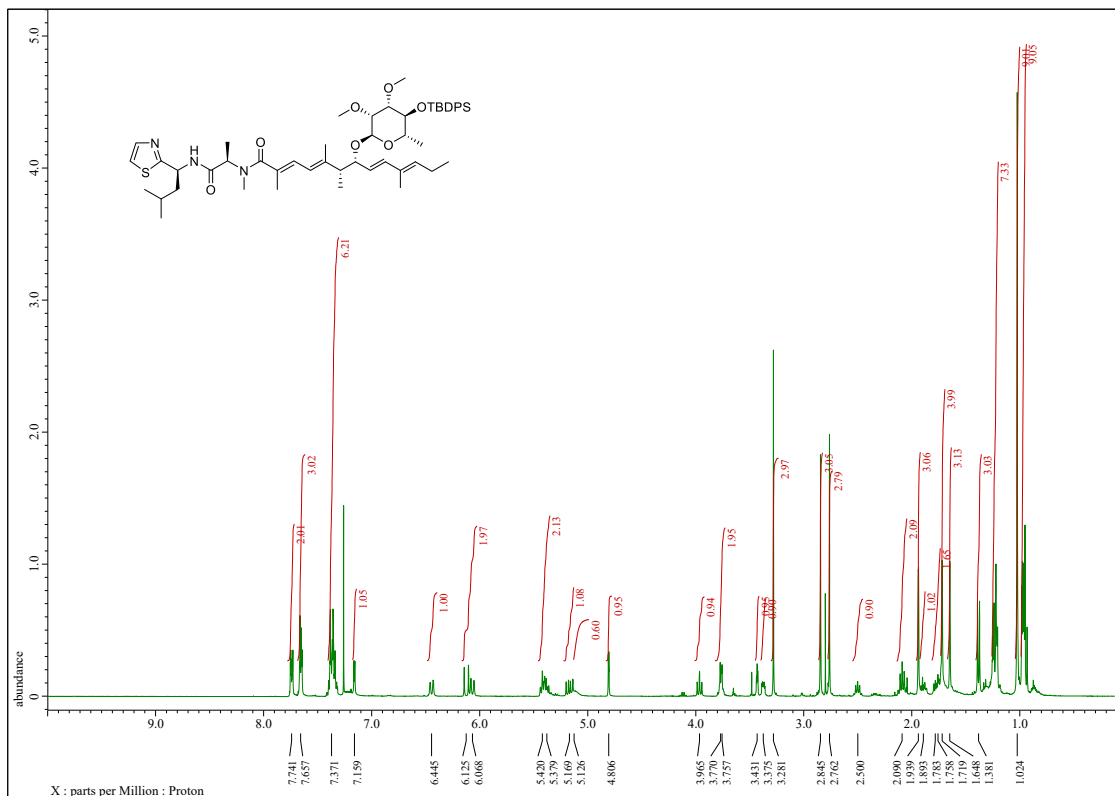
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **29a**



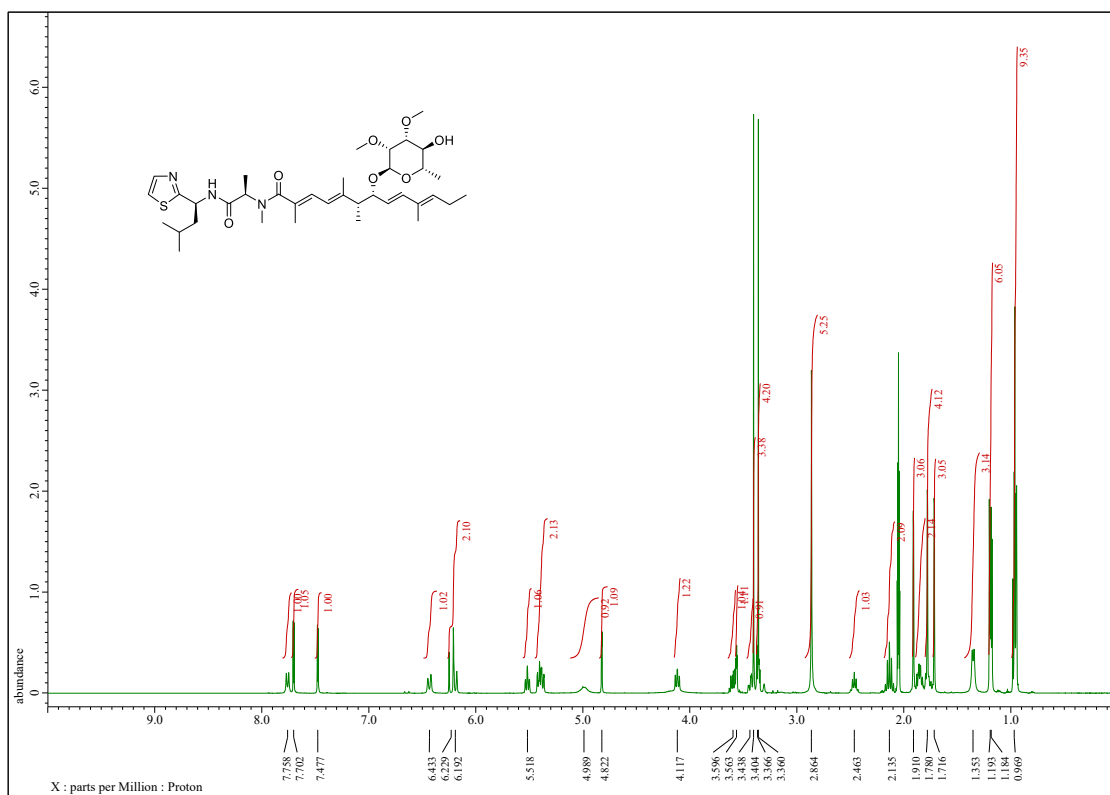
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **29b**



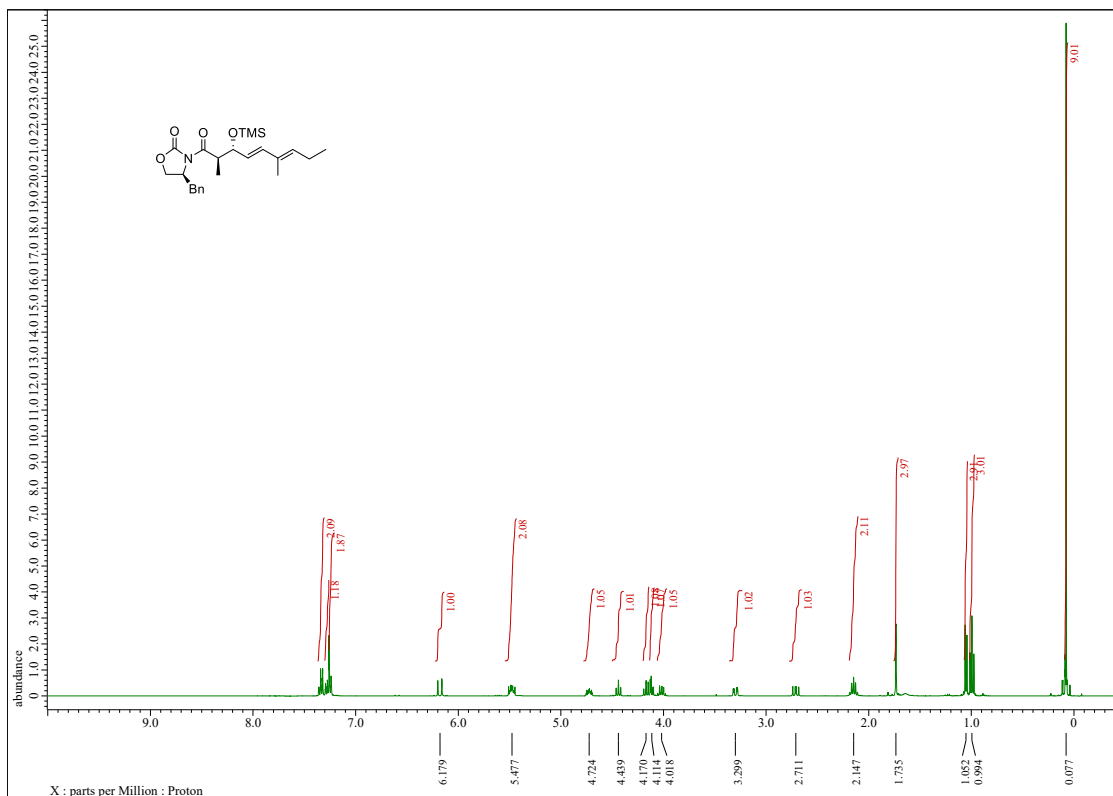
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **53**



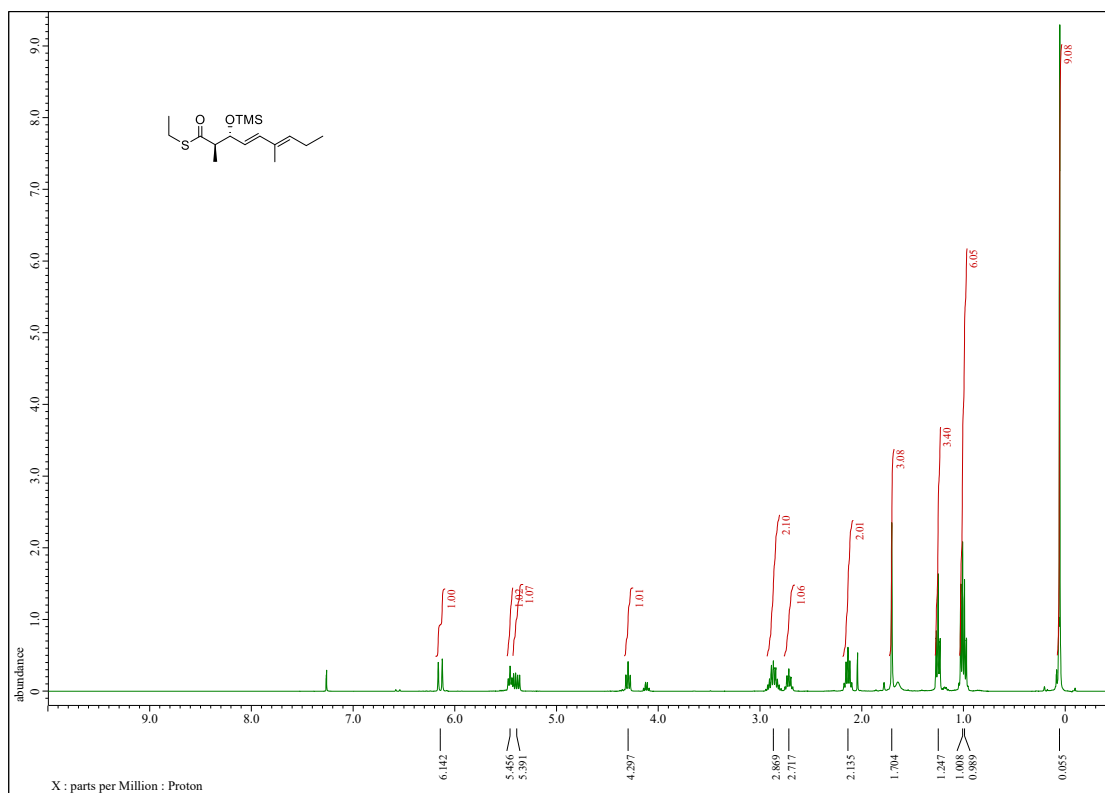
¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) spectrum of (18*R*,19*R*)-iezoside (**5**)



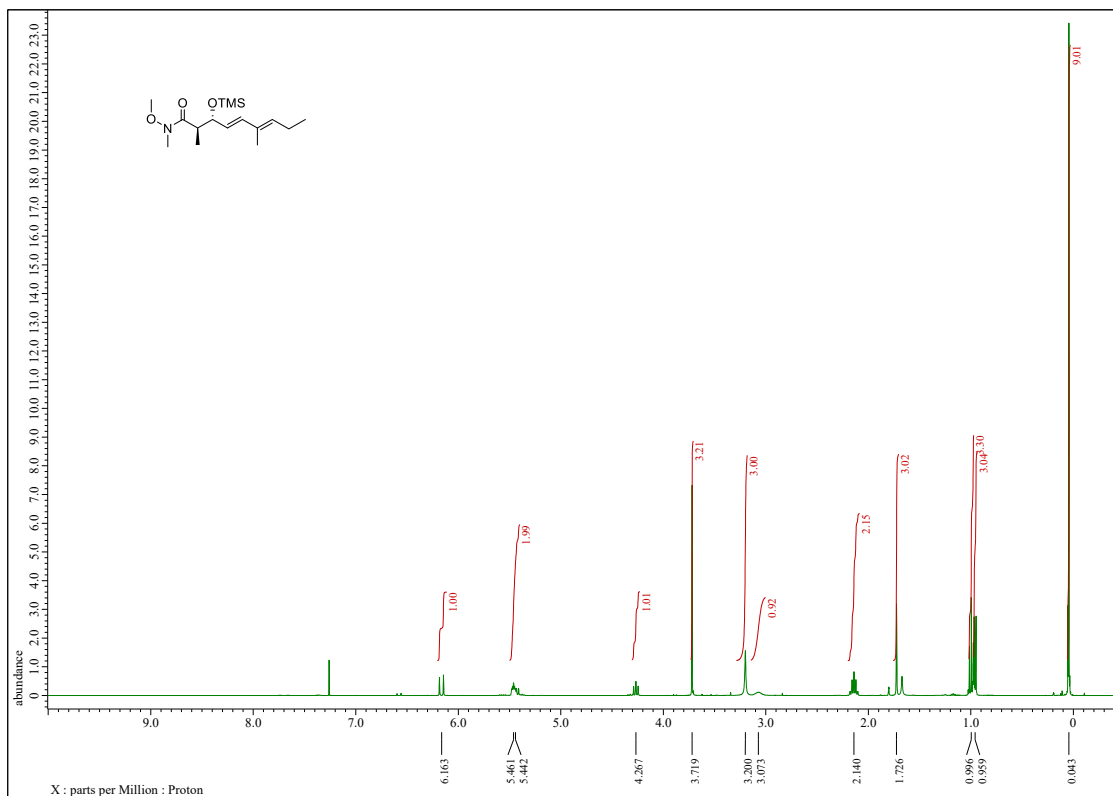
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **54** (dr. 20:1)



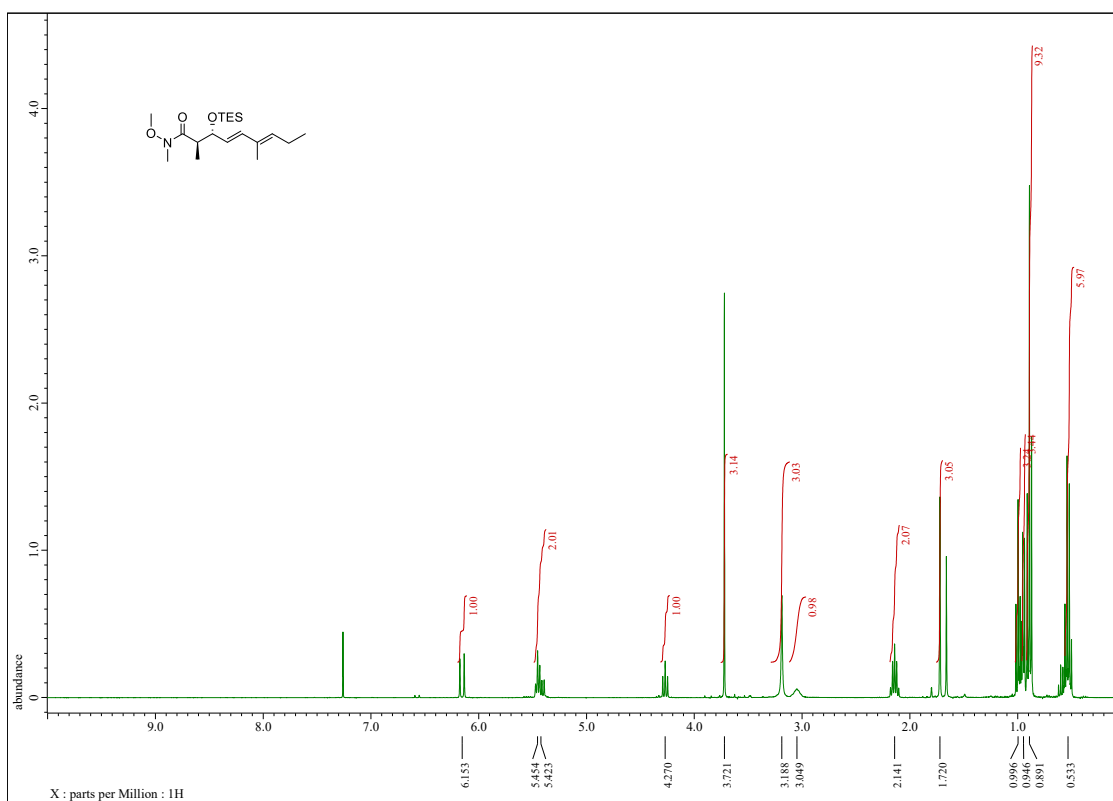
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **55**



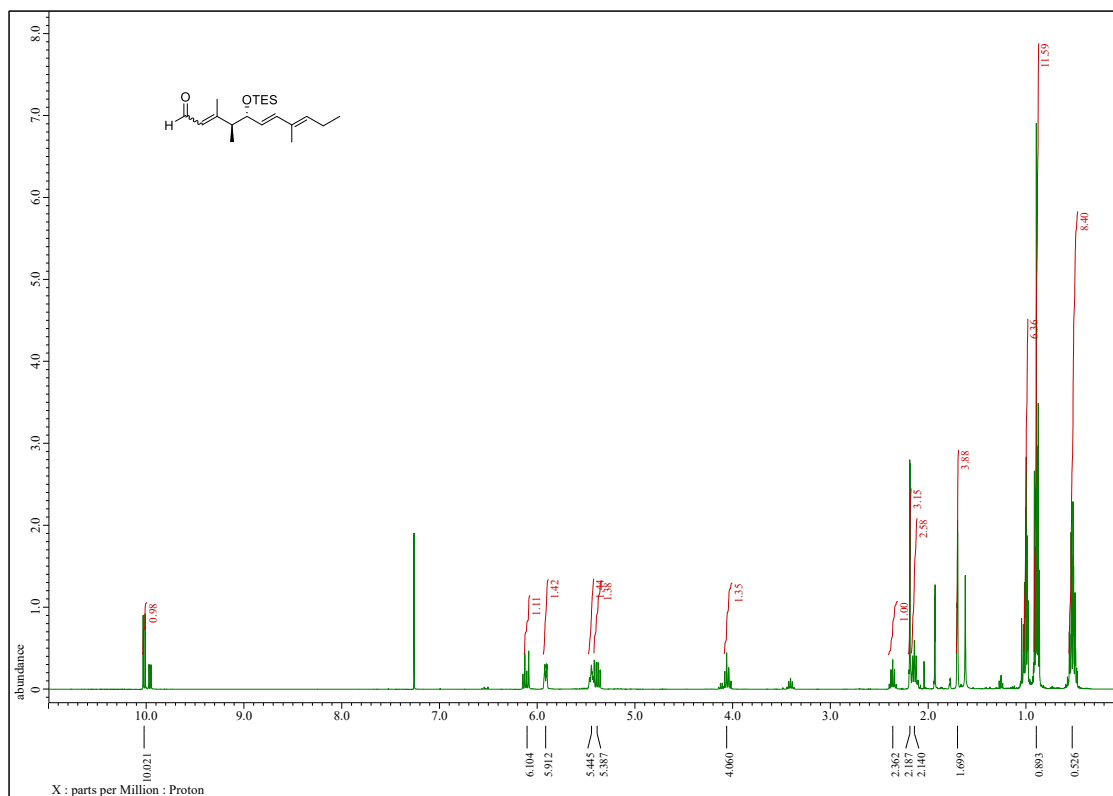
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **56**



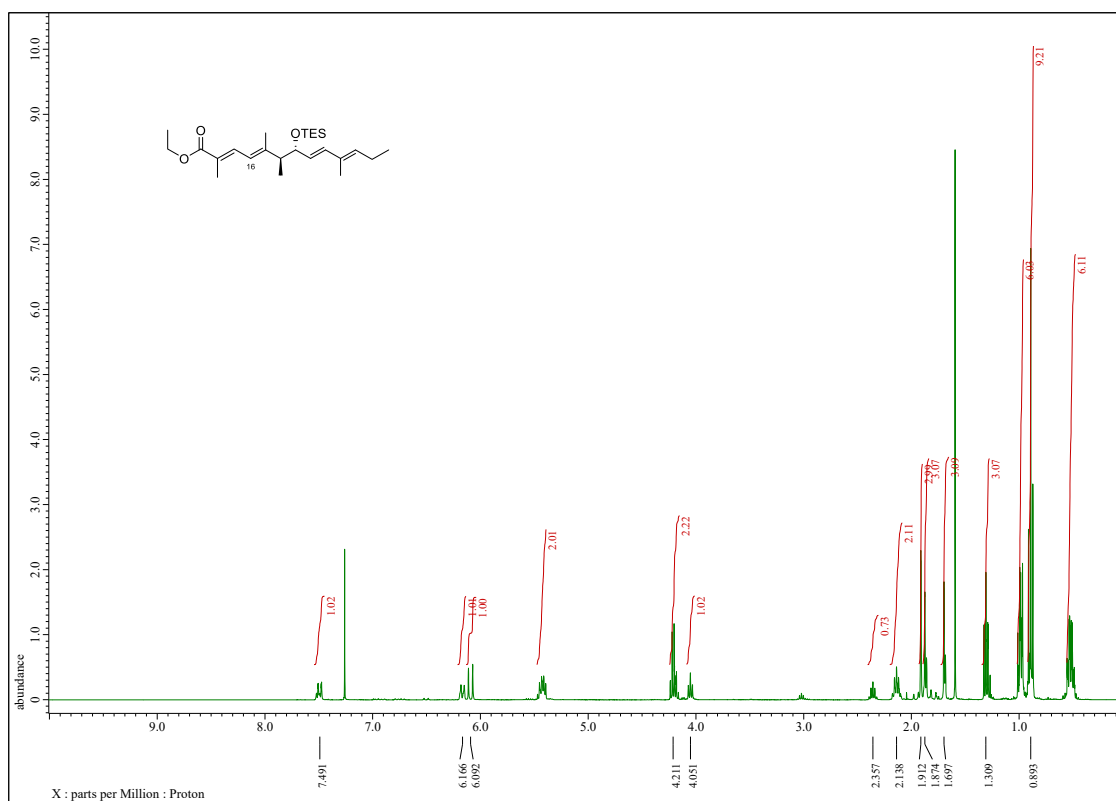
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **57**



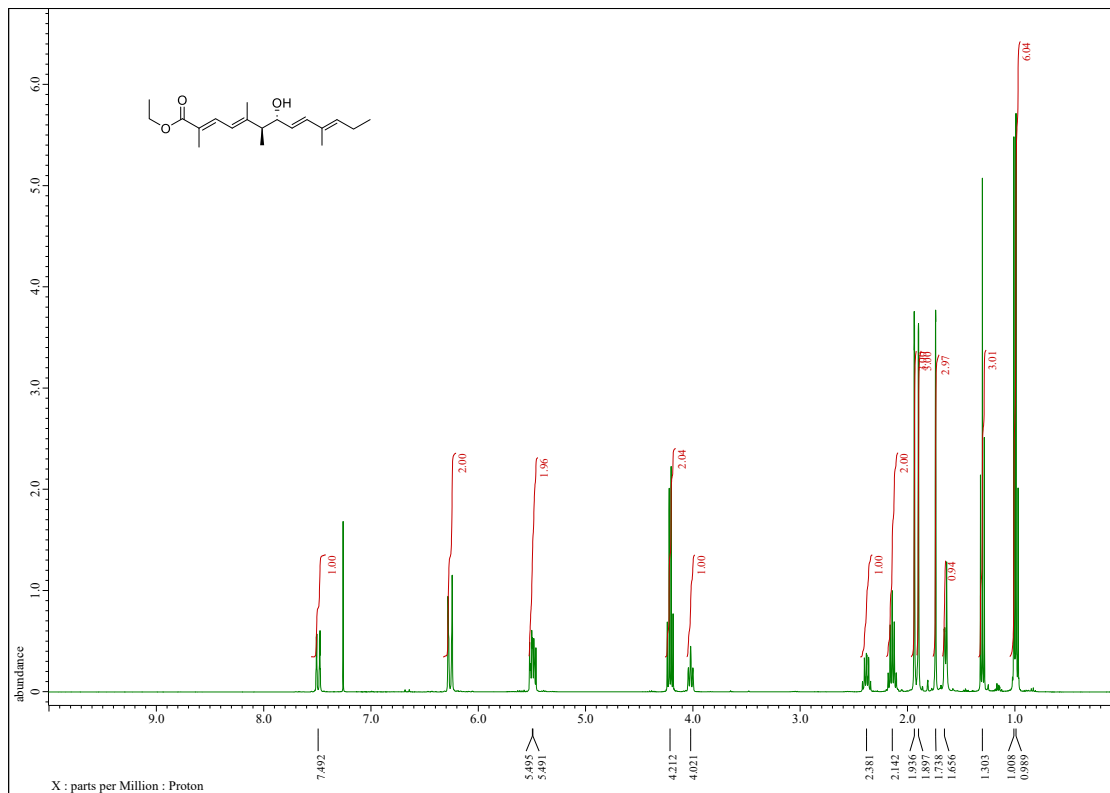
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **59** ($E:Z = 2.3:1$)



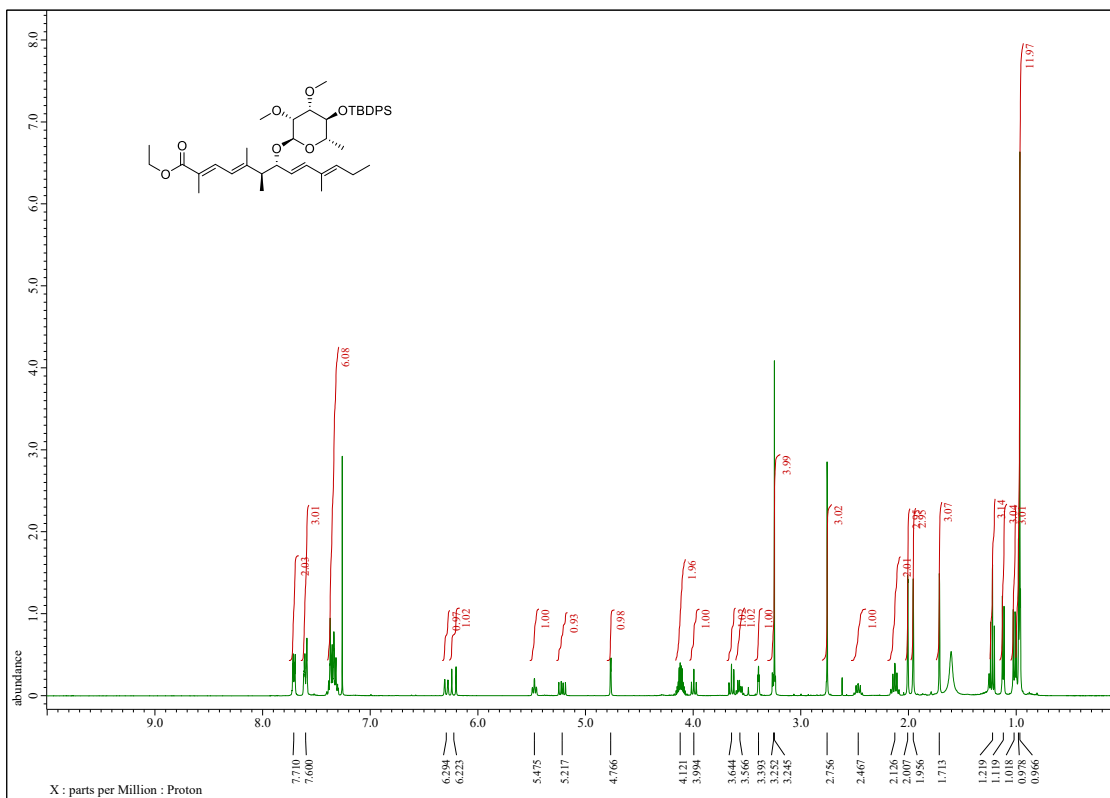
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **60** ($16E:16Z = 2.7:1$)



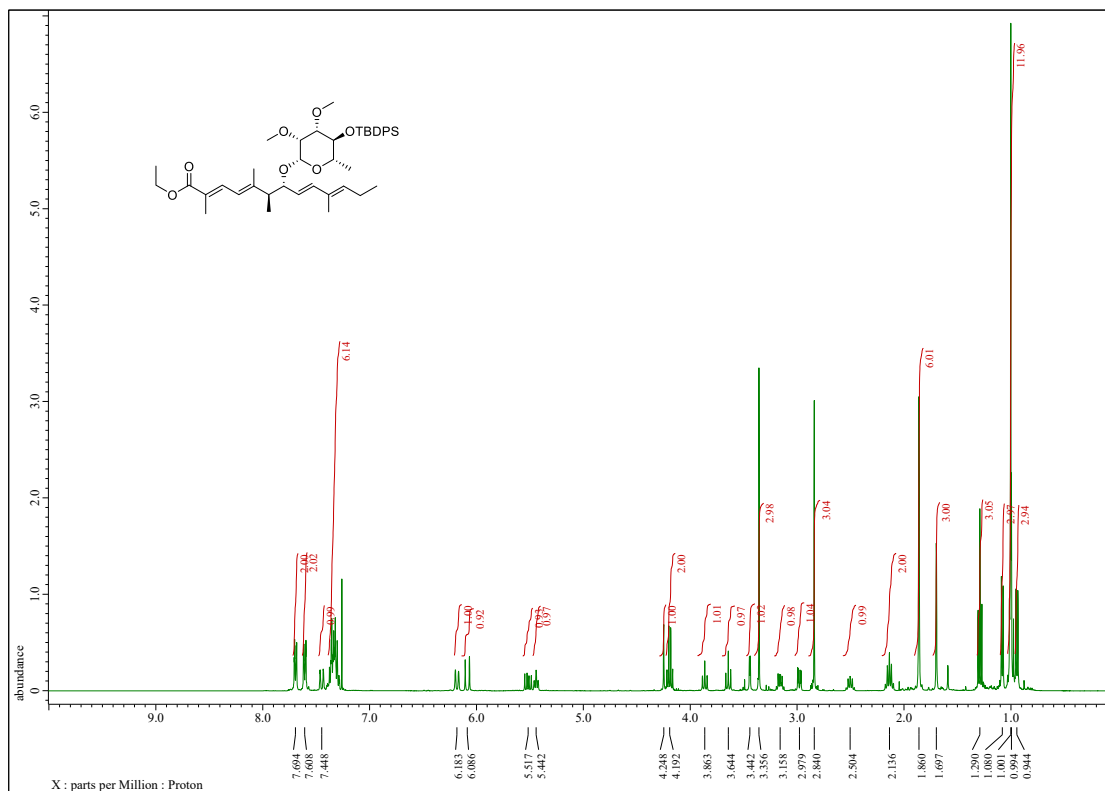
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **61**



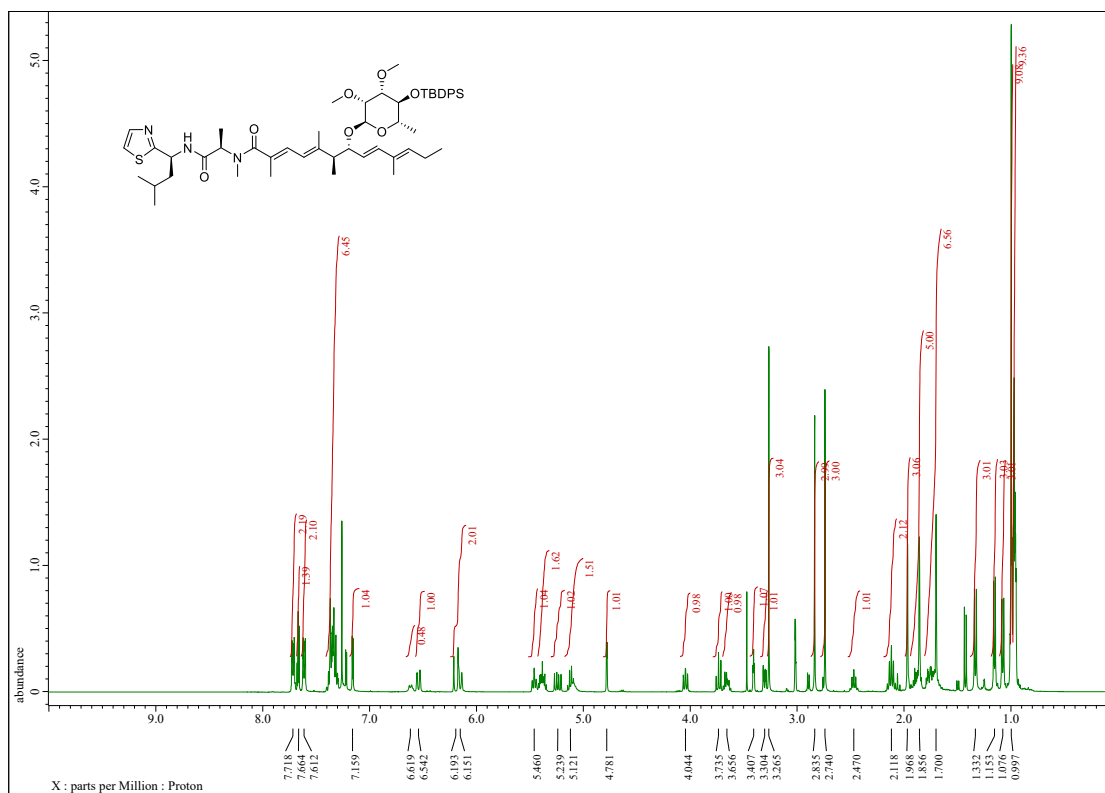
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **62a**



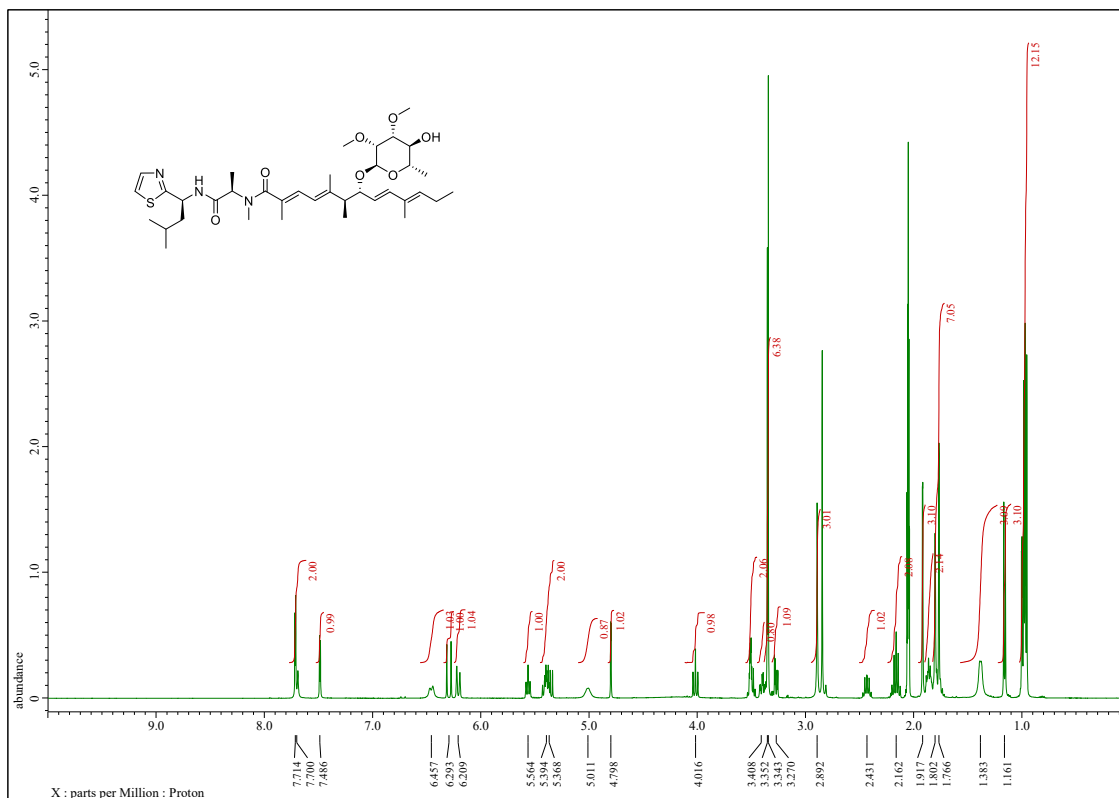
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **62b**



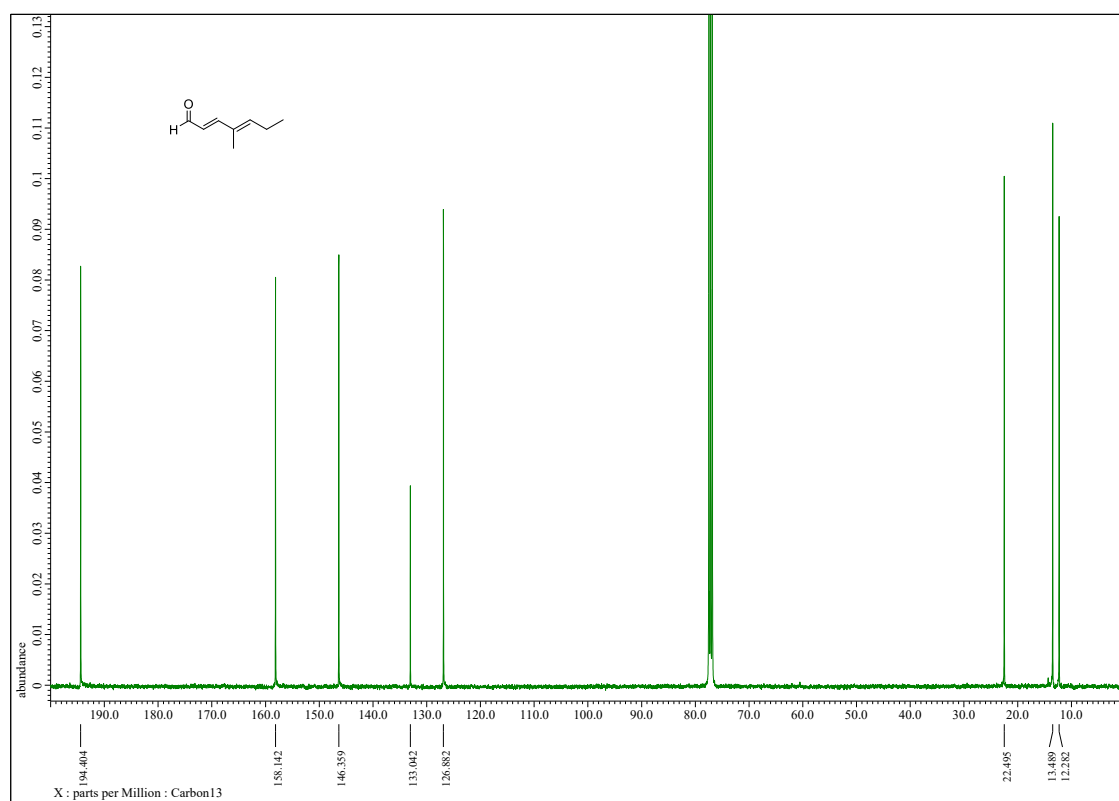
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **63**



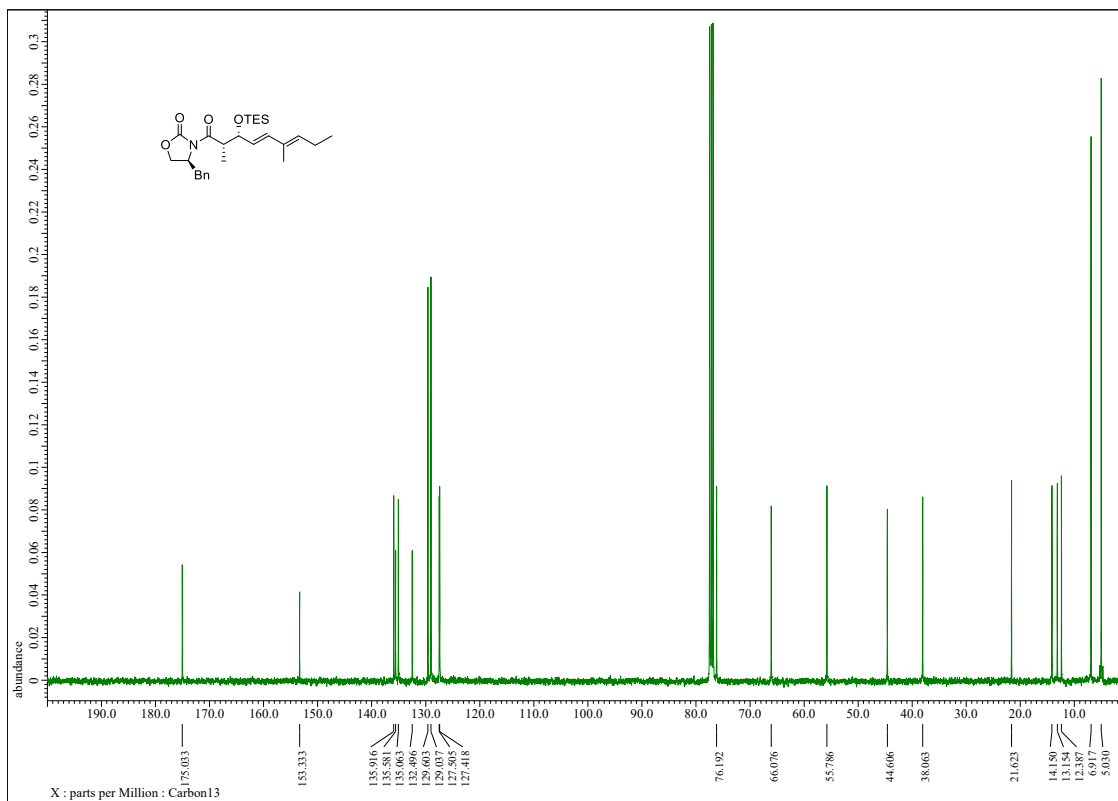
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of (18*S*,19*R*)-iezoside (**5'**)



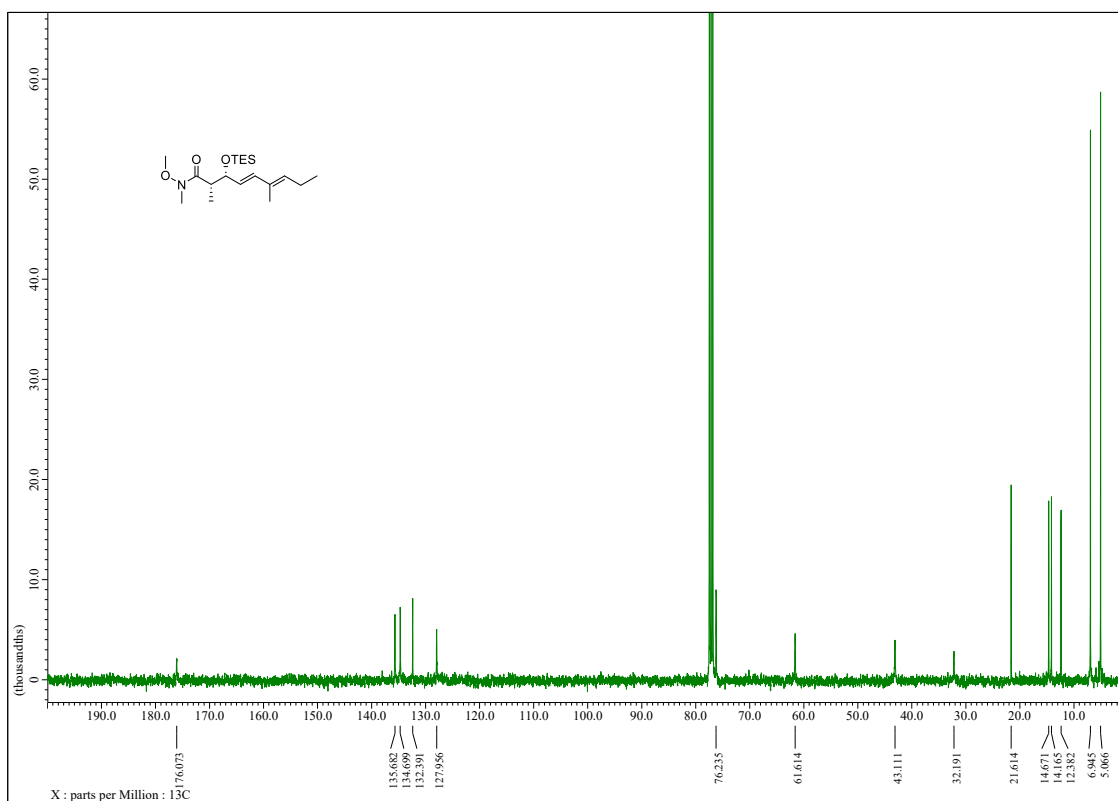
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **35**



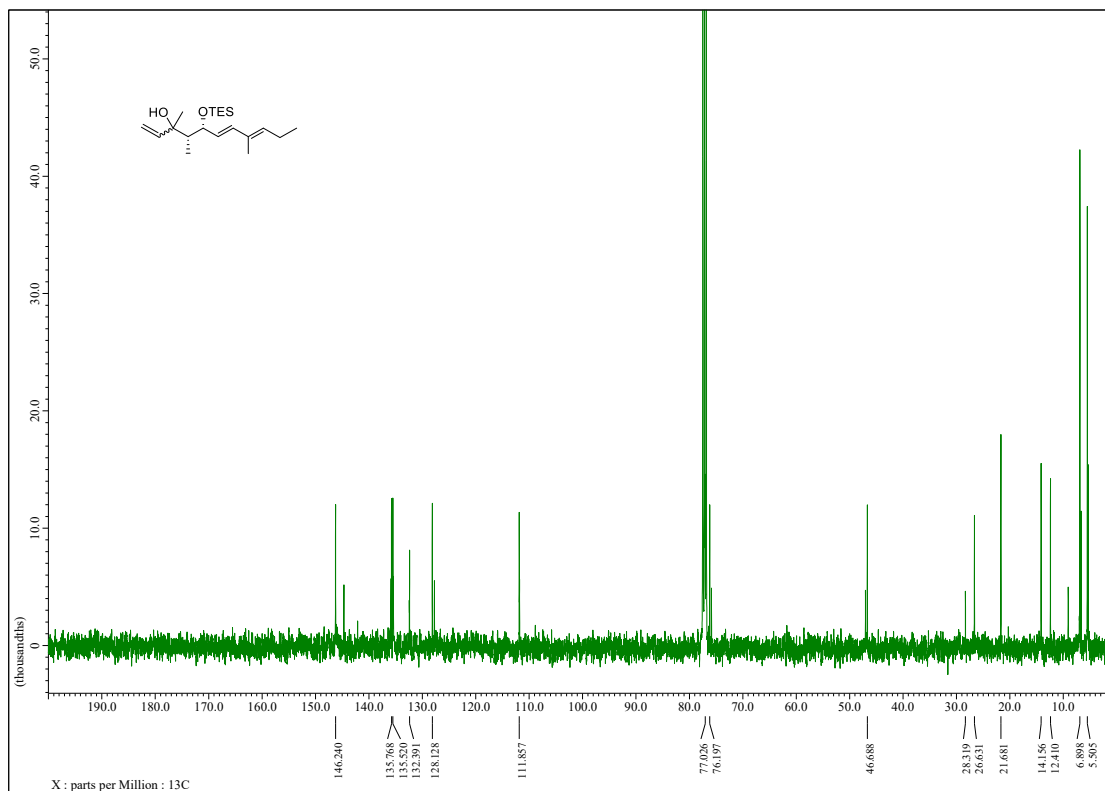
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **33**



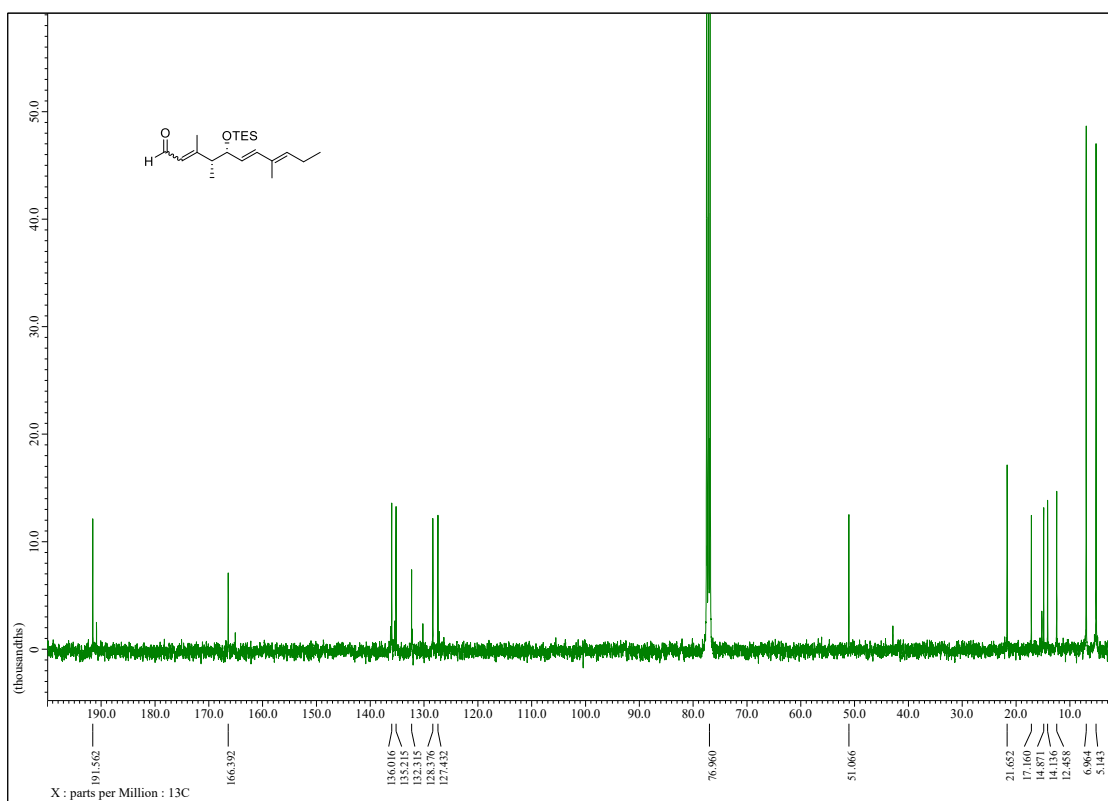
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **32**



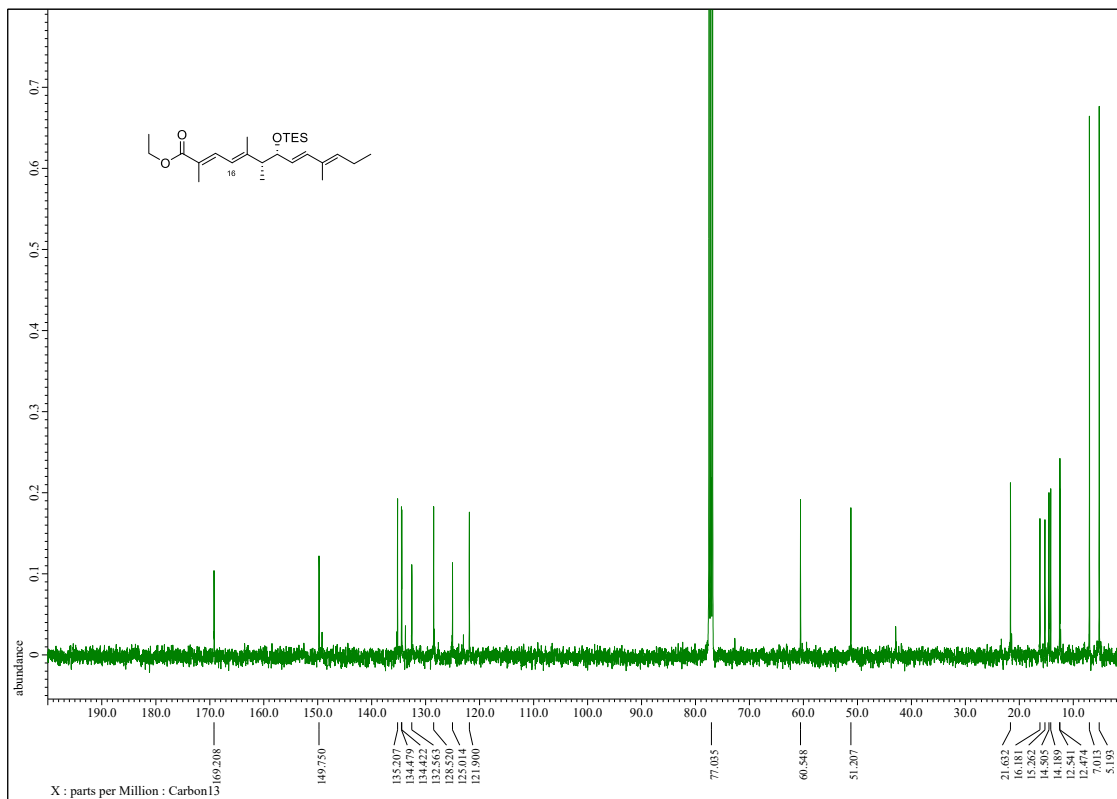
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **31** (dr. 2.5:1)



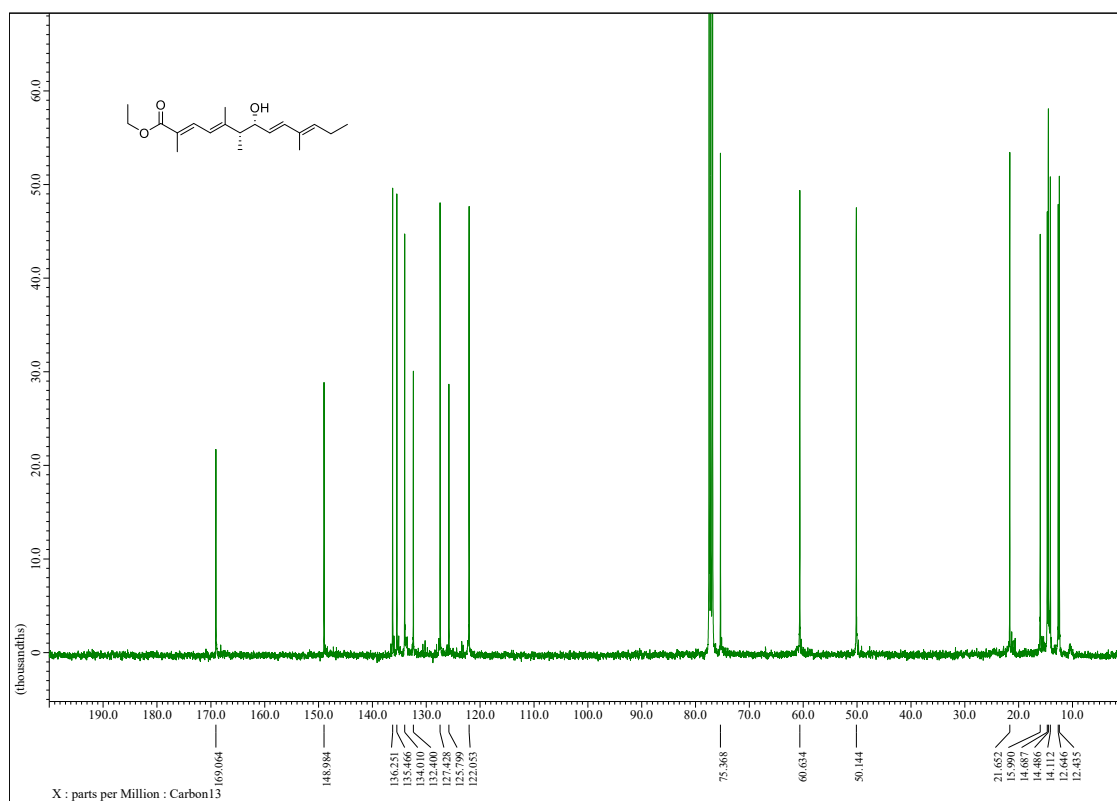
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **41** (*E:Z* = 5:1)



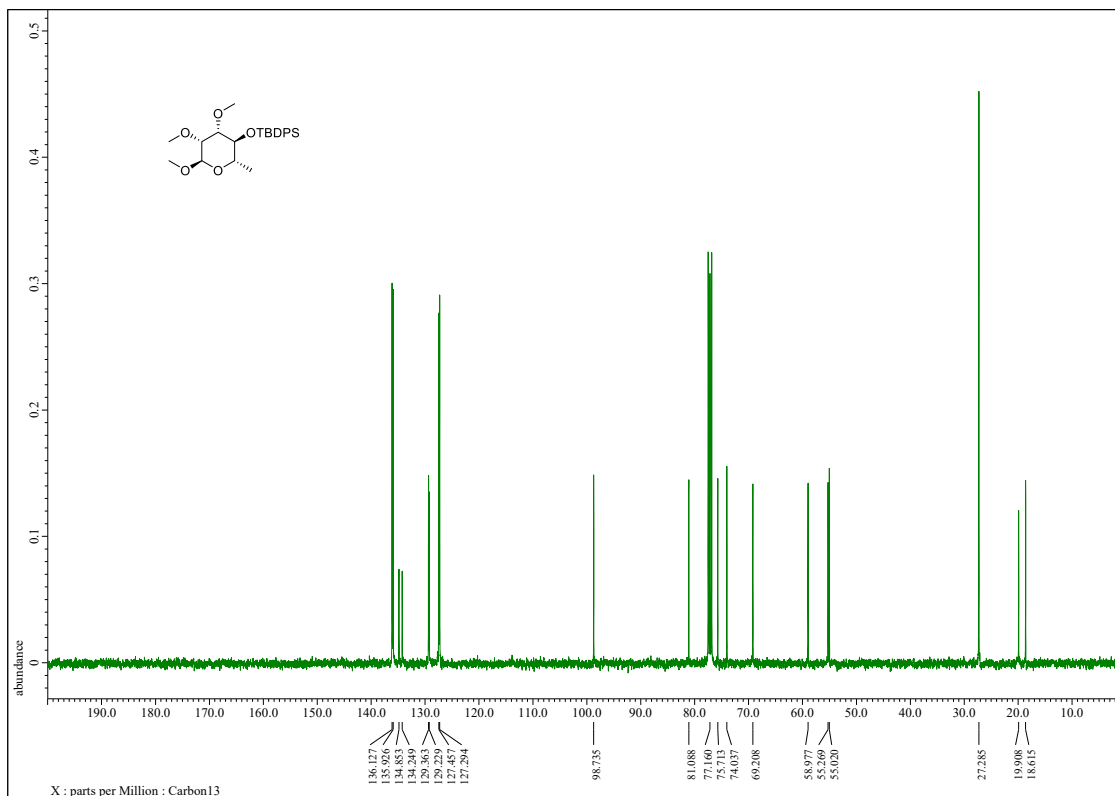
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **43** (16*E*:16*Z* = 5:1)



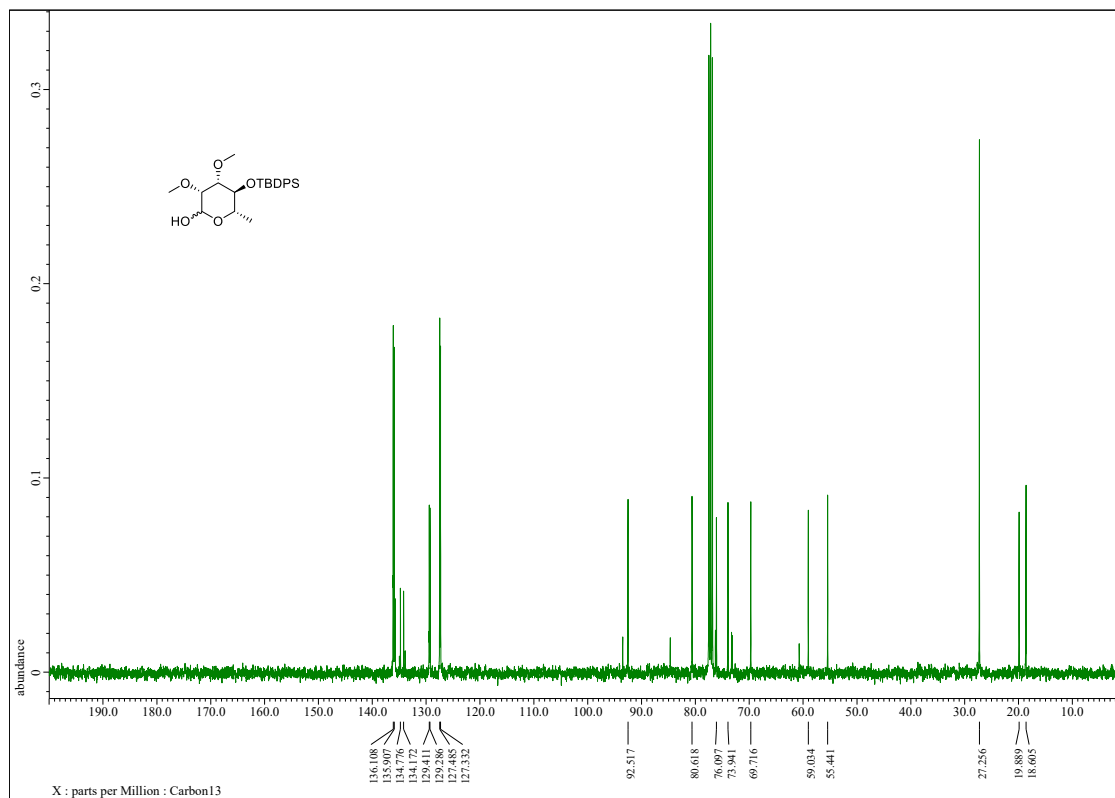
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **30**



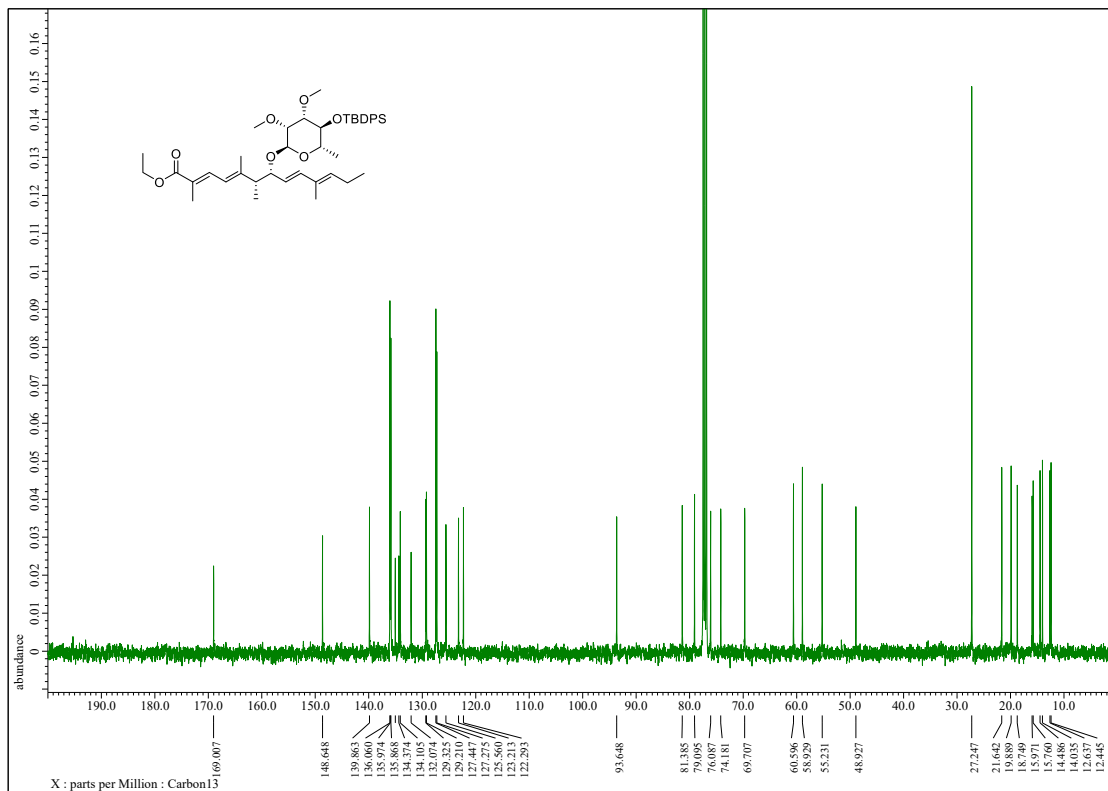
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **48**



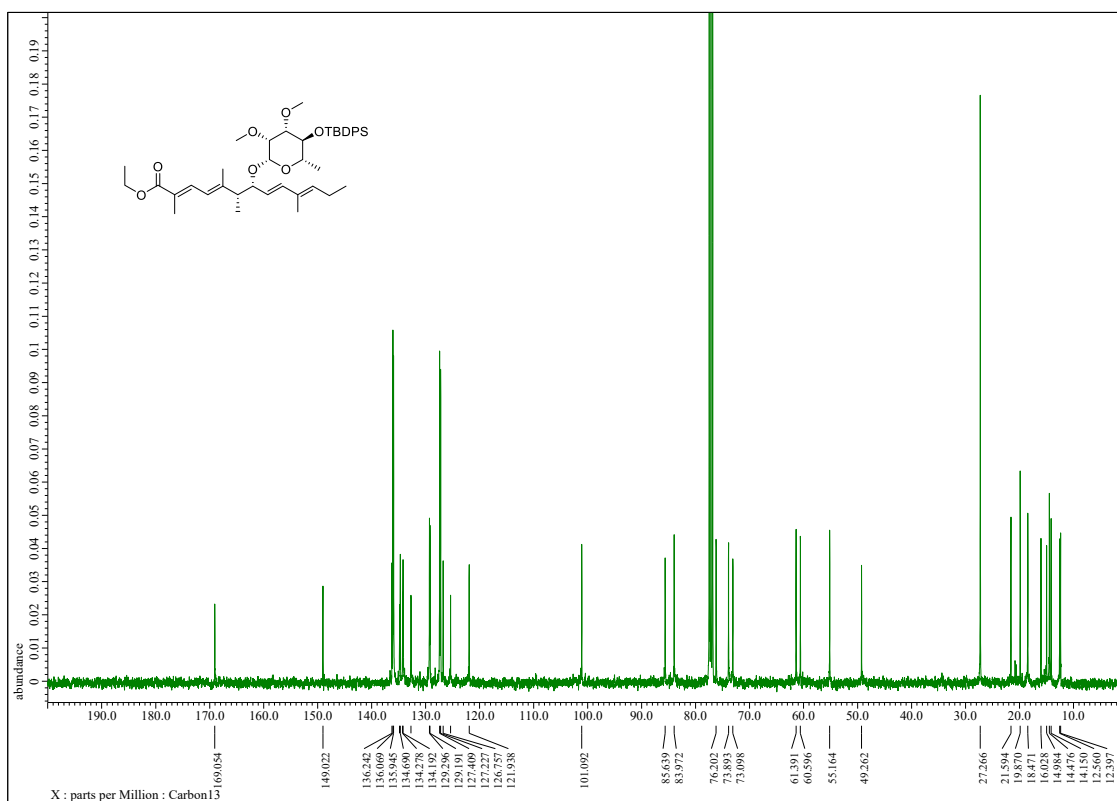
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **49** (dr. 6:1)



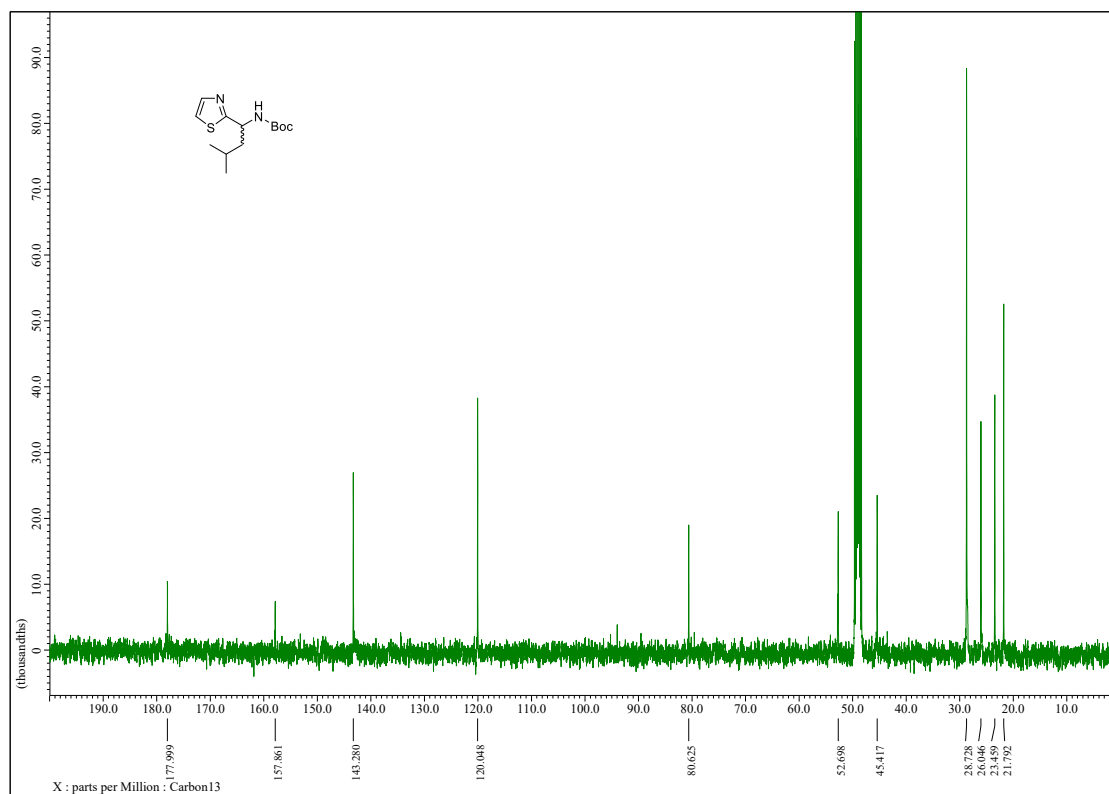
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **28a**



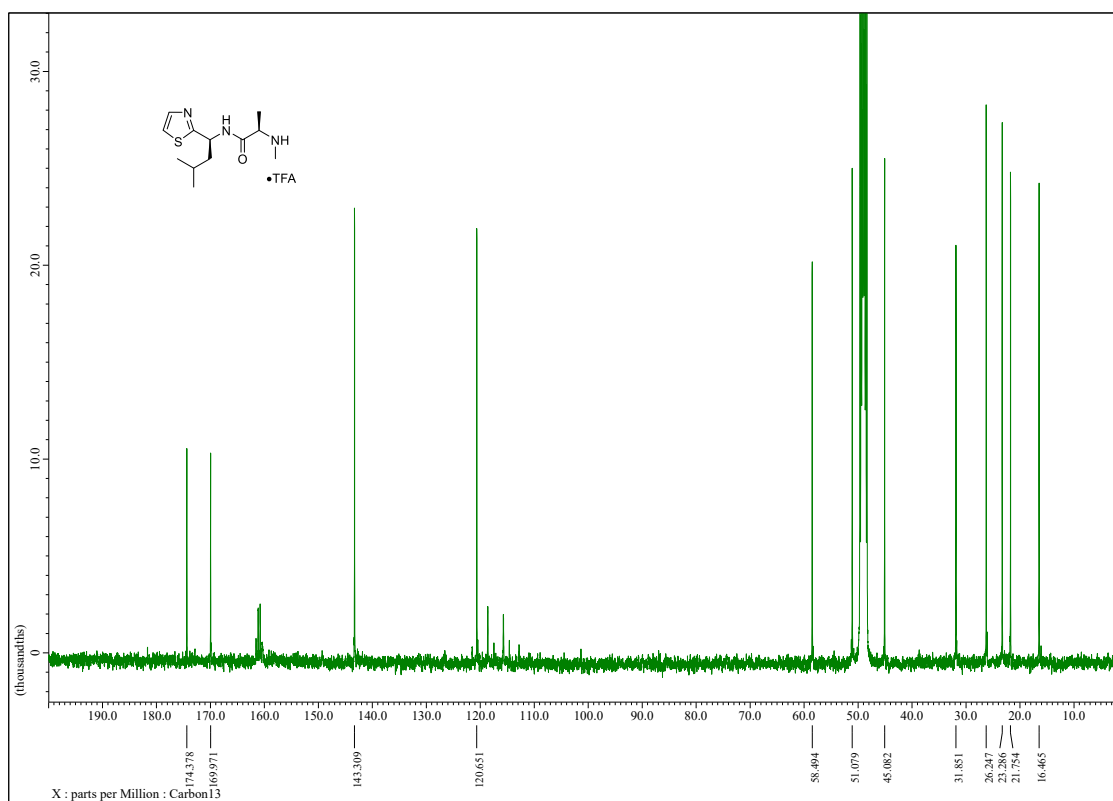
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **28b**



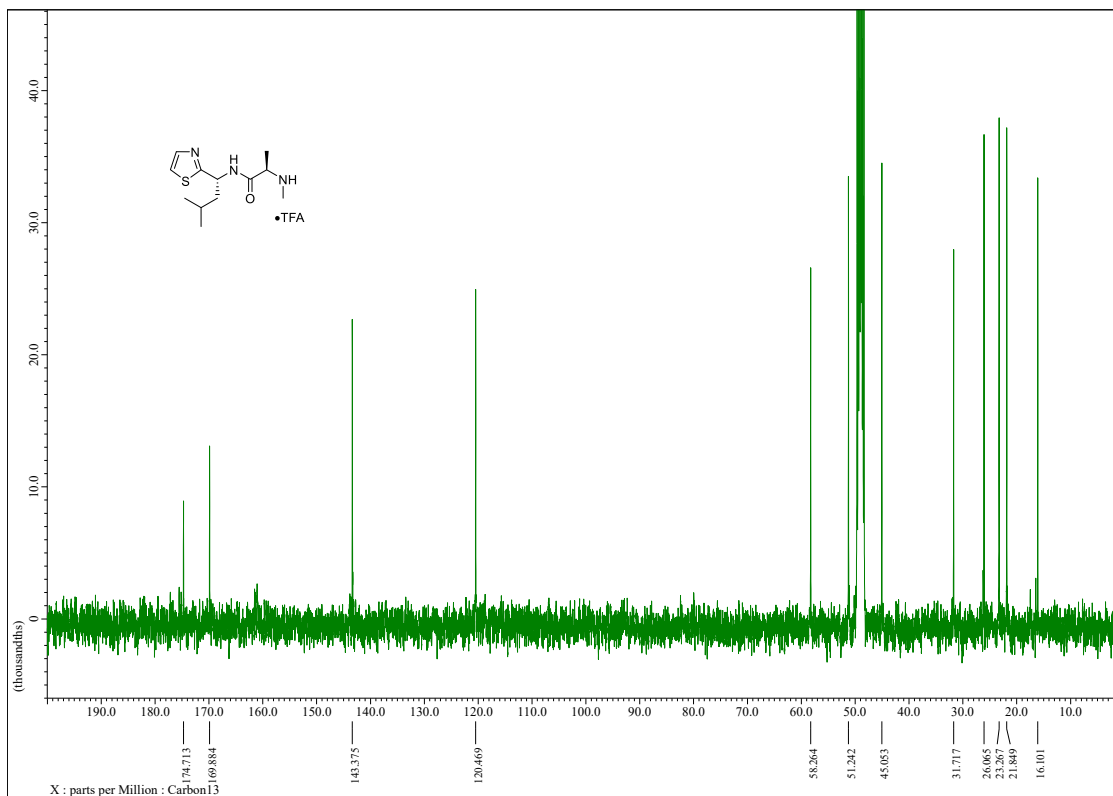
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of **37**



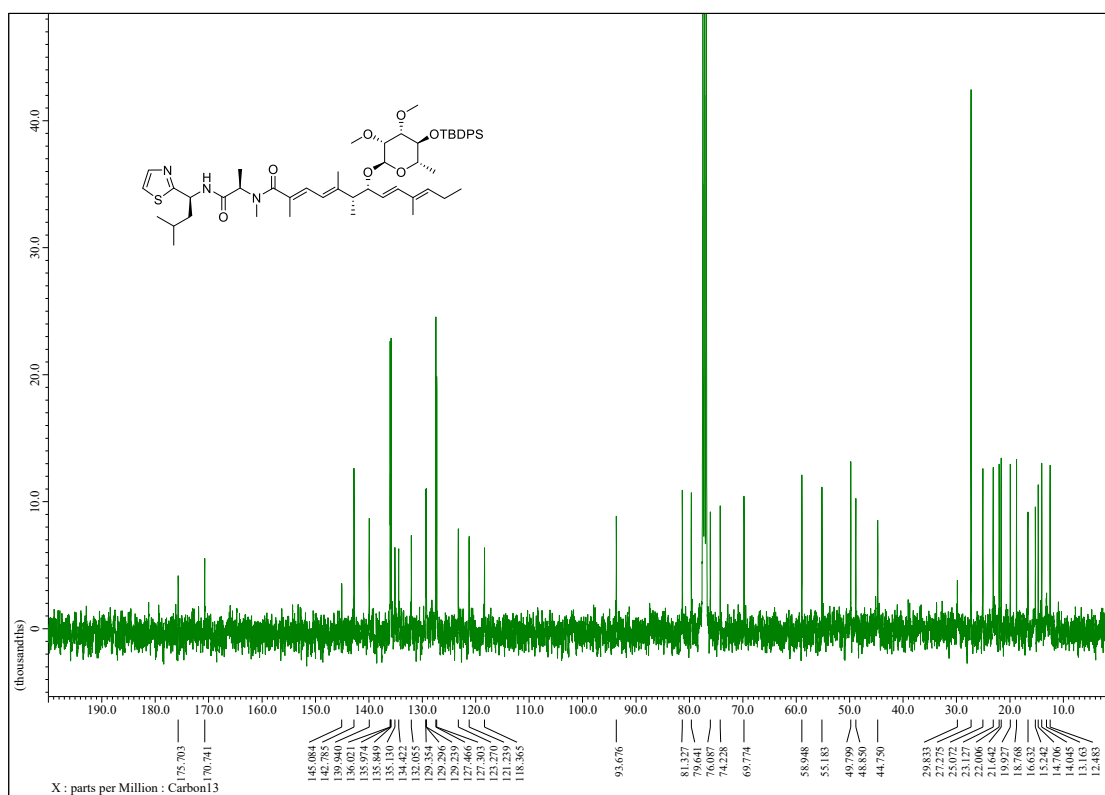
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of **29a**



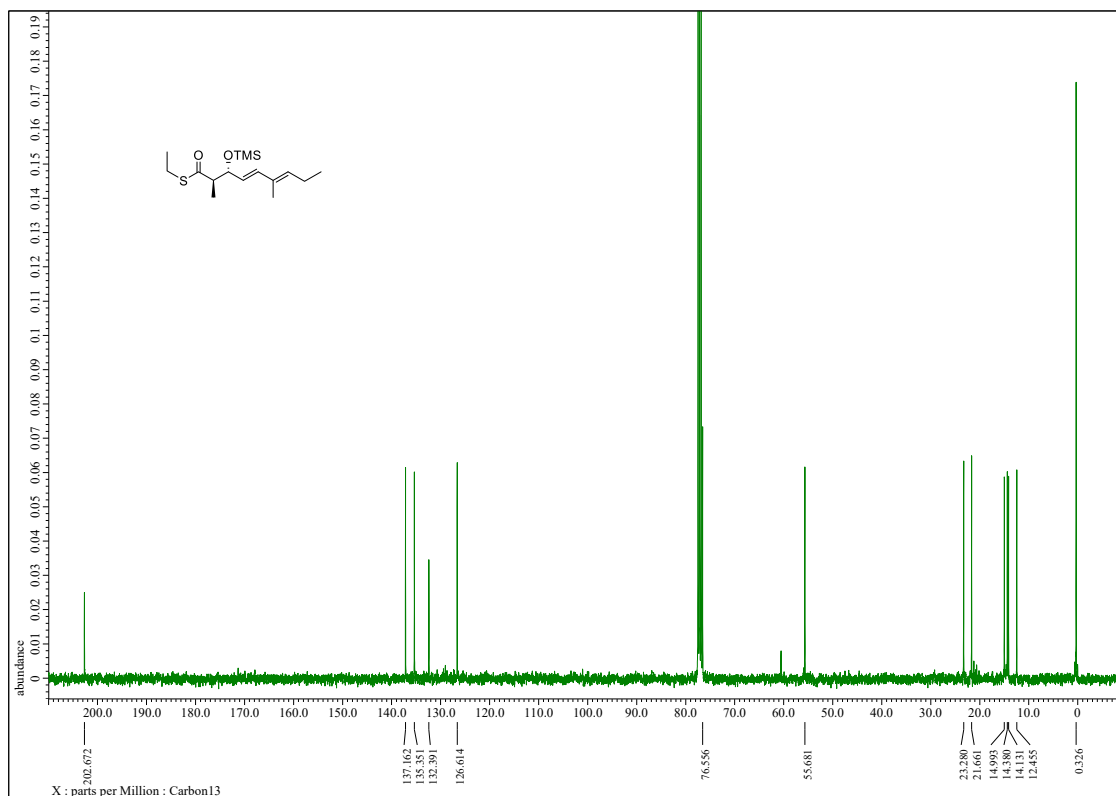
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of **29b**



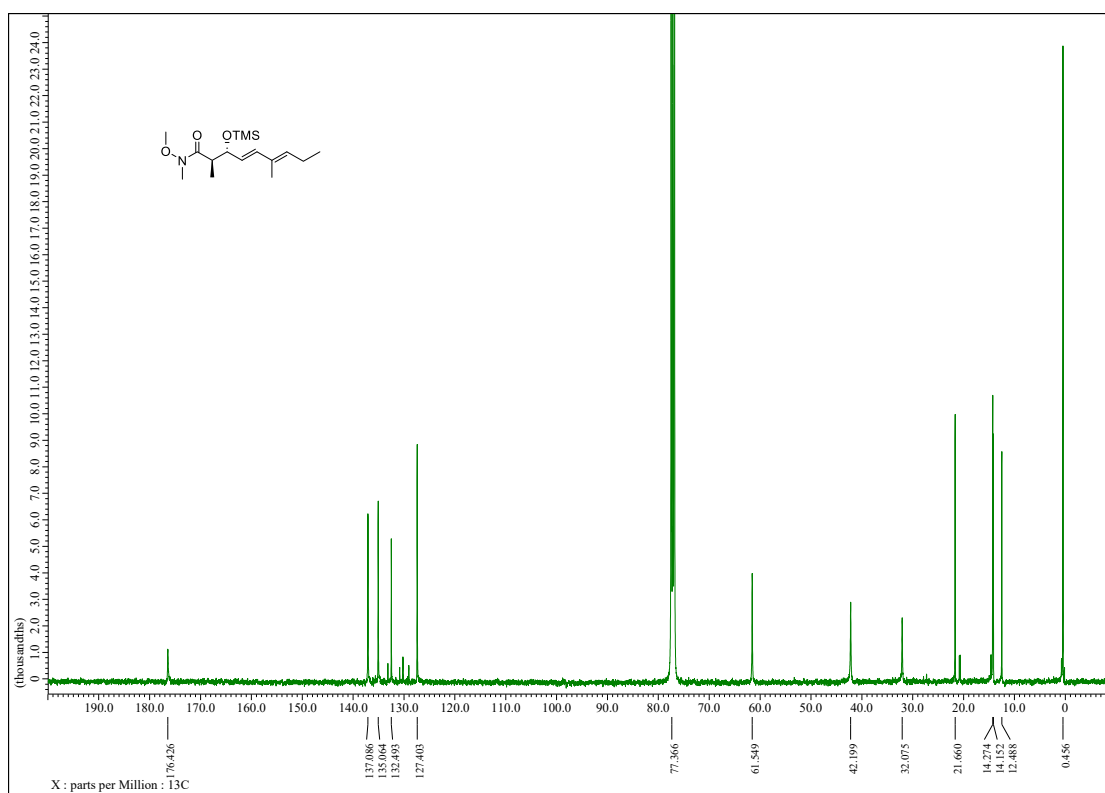
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **53**



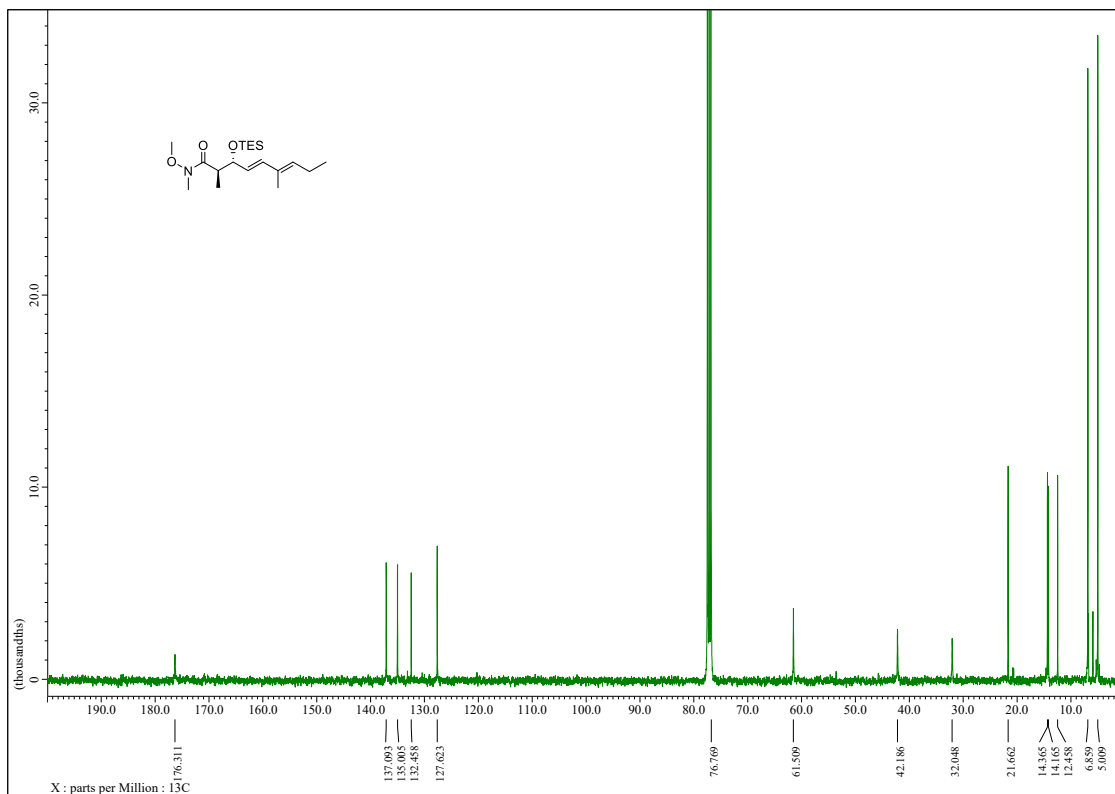
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **55**



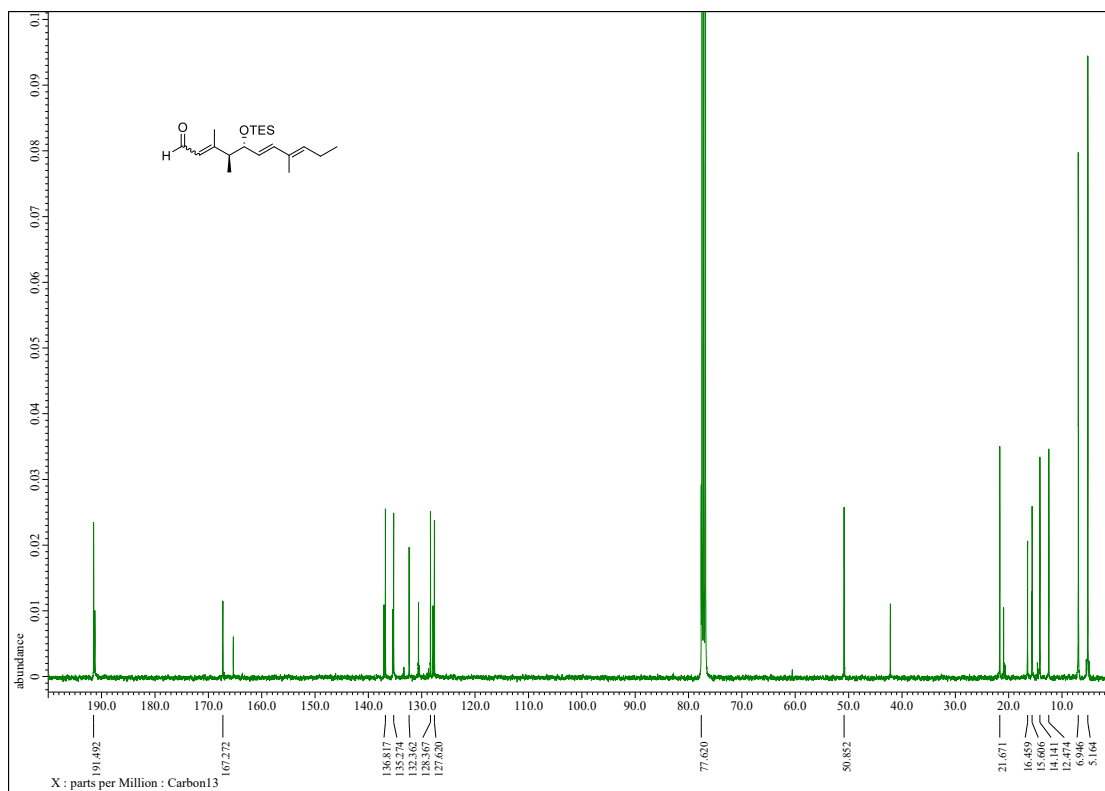
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **56**



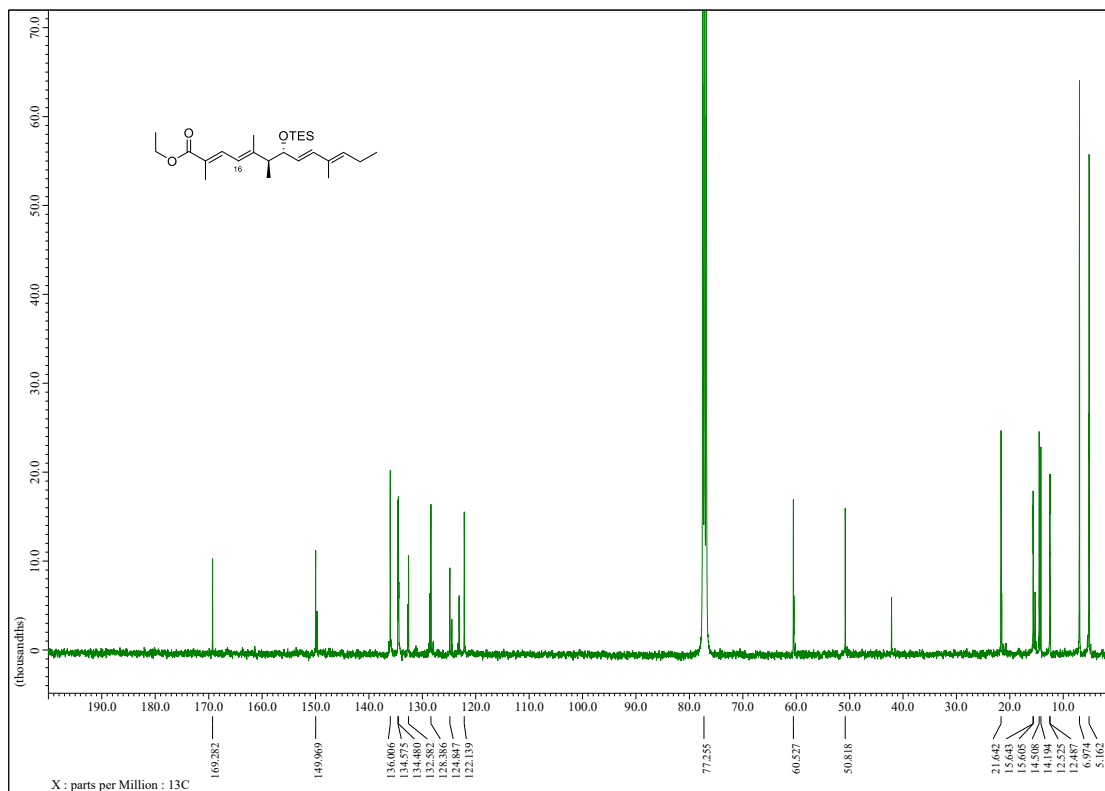
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **57**



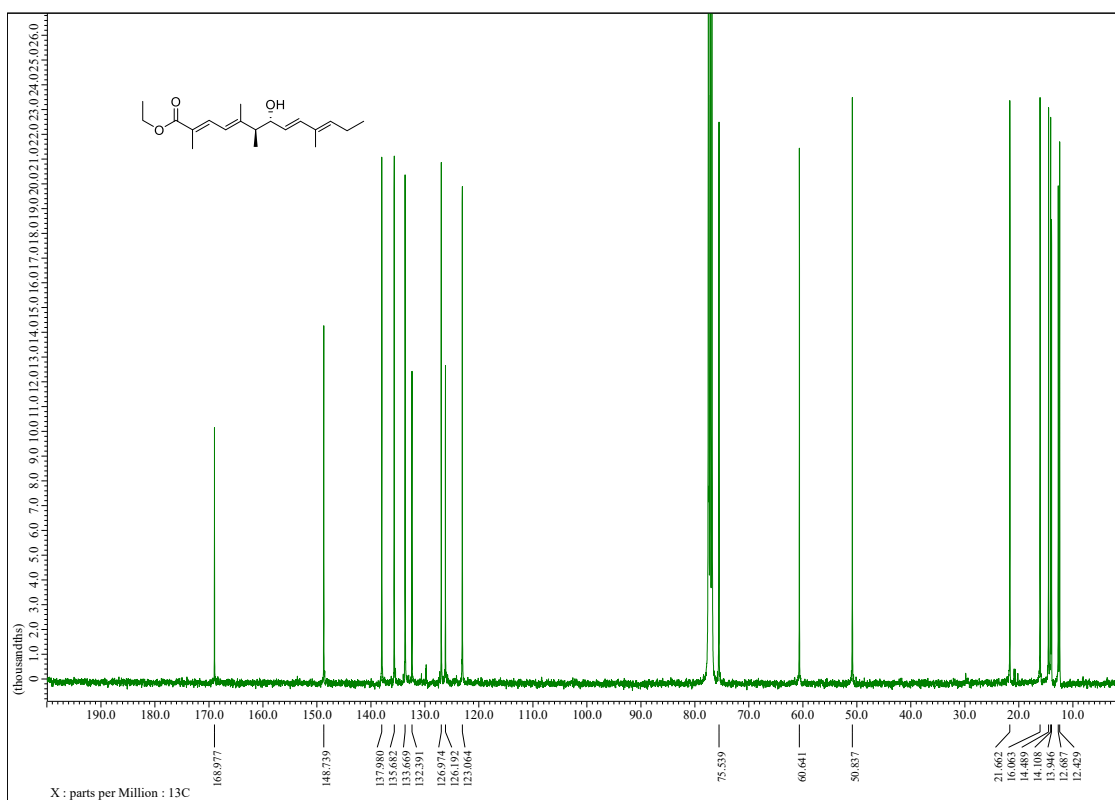
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **59** (*E*:*Z* = 2.3:1)



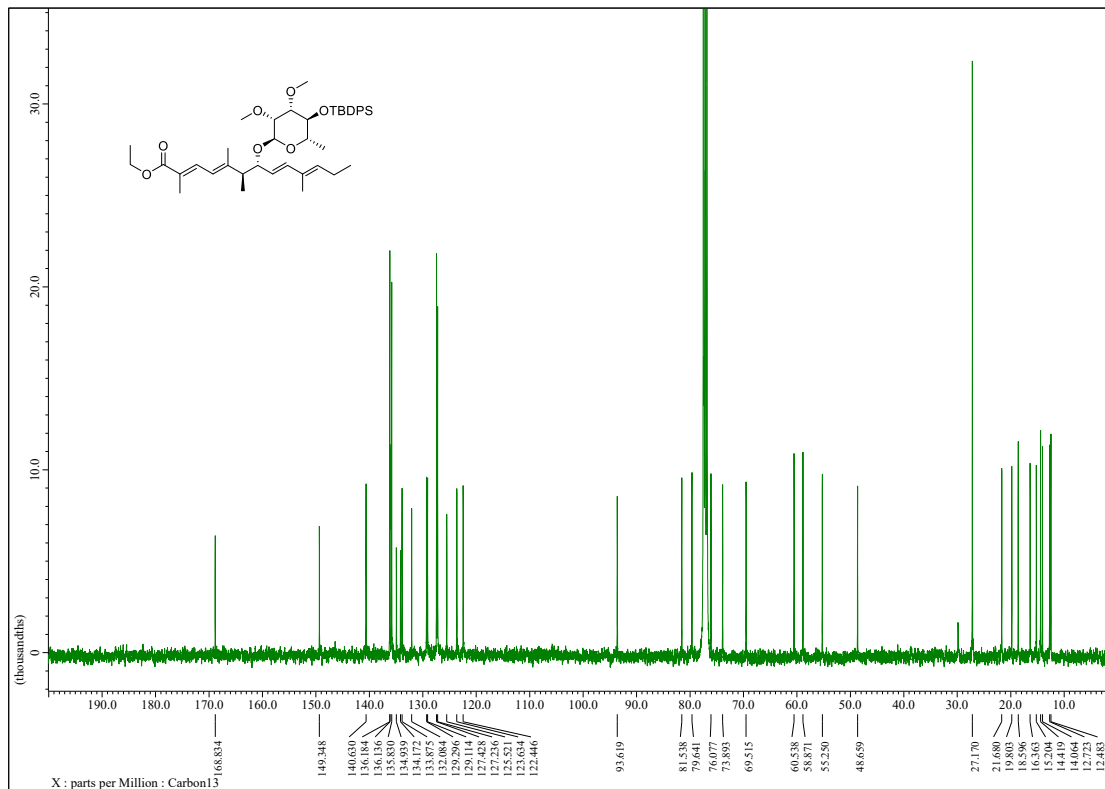
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **60** (16*E*:16*Z*=2.7:1)



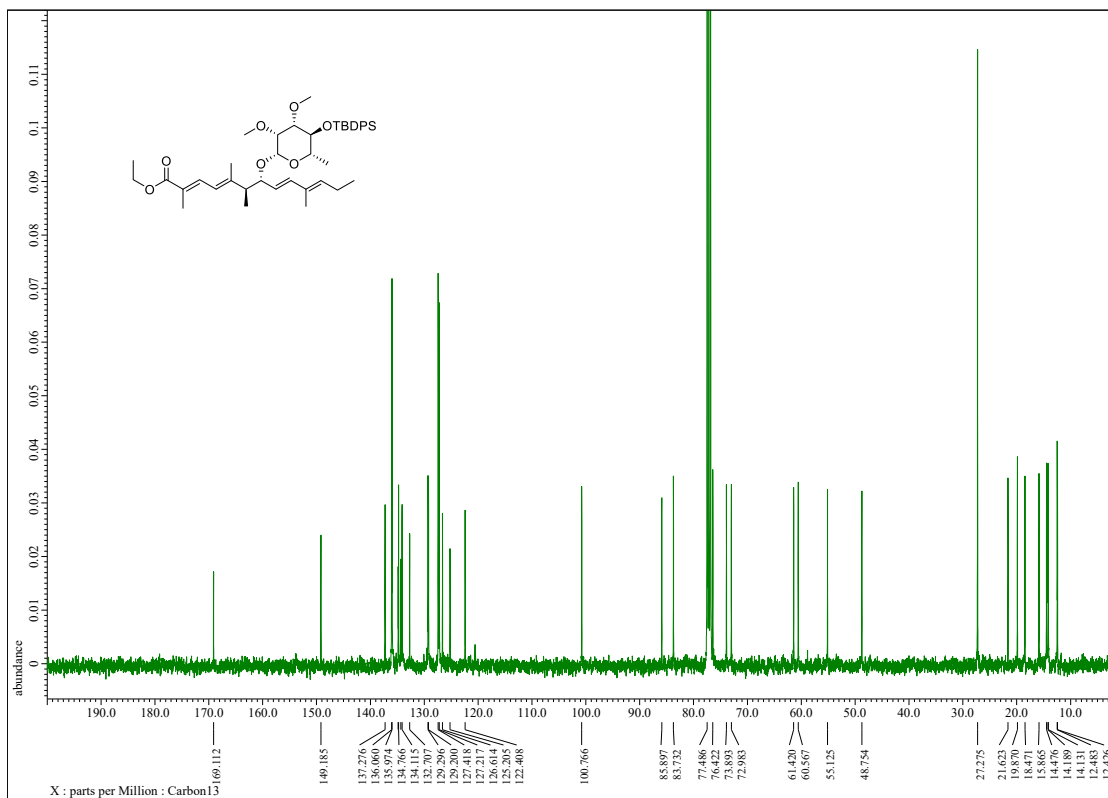
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **61**



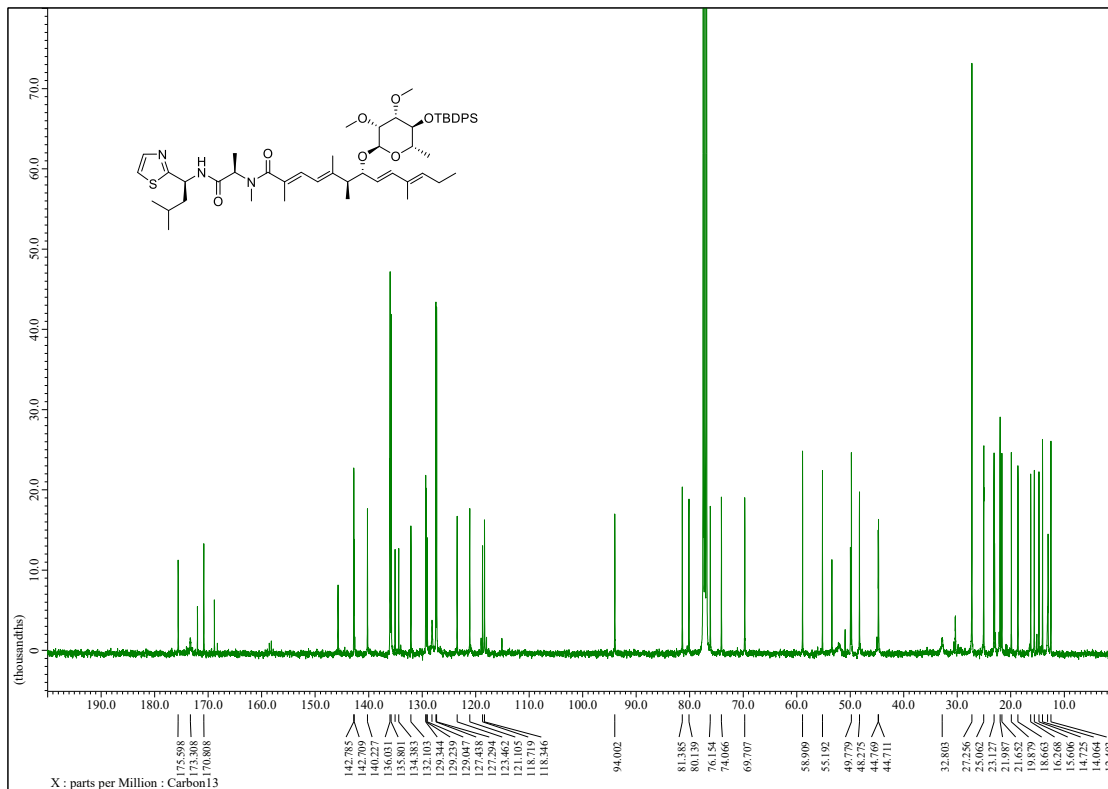
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **62a**



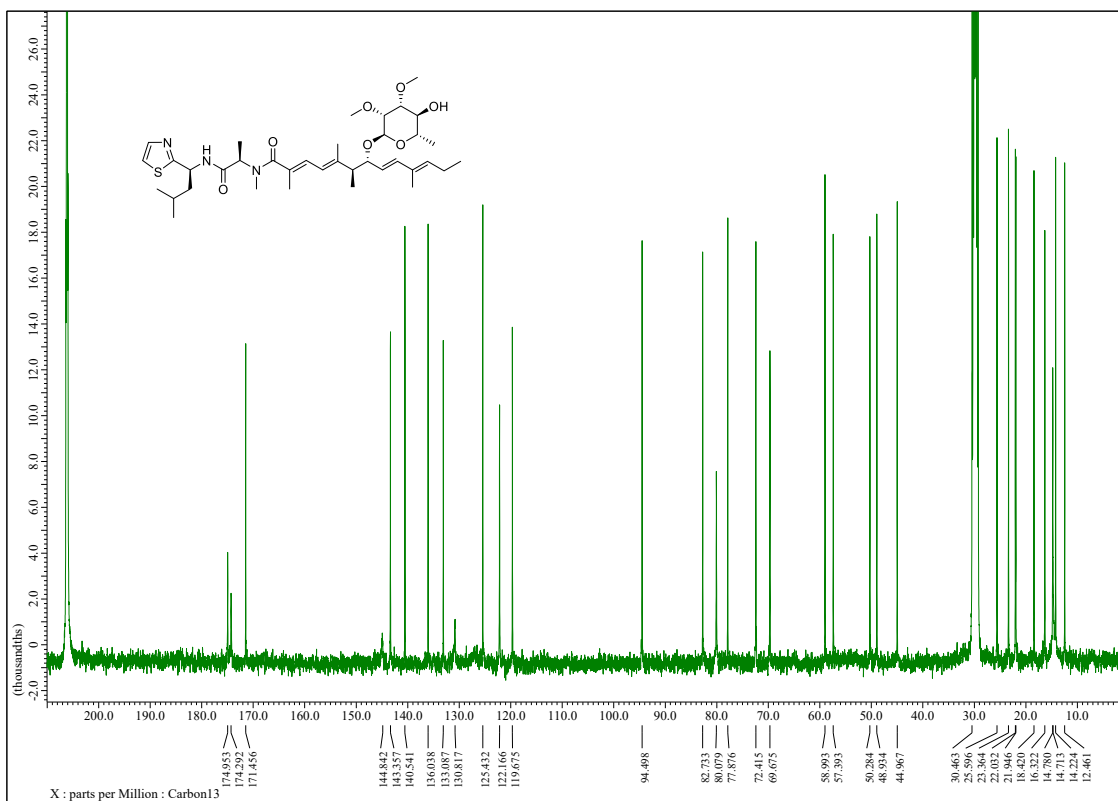
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **62b**



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **63**



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) spectrum of (18*S*,19*R*)-iezoside (**5'**)



参考文献

- 1) Schmitz, R. *Pharm. Hist.* **1985**, *27*, 61-74.
- 2) Fleming, A. *Brit. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- 3) Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S. A. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66-69.
- 4) Miller, L. H.; Su, X. *Cell* **2011**, *146*, 855-858.
- 5) Burg, R.; 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*, 361-367.
- 6) Endo, A. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2010**, *86*, 484-493.
- 7) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- 8) Tomasz, M.; Lipman, R.; Chowdary, D.; Pawlak, J.; Verdine, G. L.; Nakanishi, K. *Science*, **1987**, *235*, 1204-1208.
- 9) Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1249-1255.
- 10) Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, *66*, 807-815.
- 11) (a) Tsuji, N.; Kobayashi, M.; Nagashima, K.; Wakisaka, Y.; Koizumi, K. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 1-6. (b) Yoshida, M.; Hoshikawa, Y.; Koseki, K.; Mori, K.; Beppu, T. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1101-1106.
- 12) Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17174-17179.
- 13) Galanie, S.; Thodey, K.; Trenchard, I. J.; Interrante, M. F.; Smolke, C. D. *Science* **2015**, *349*, 1095-1100.
- 14) Tanifuji, R.; Koketsu, K.; Takakura, M.; Asano, R.; Minami, A.; Oikawa, H.; Oguri, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10705-10709.
- 15) Stone, S.; Newman, D. J.; Colletti, S. L.; Tan, D. S. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 20-32.
- 16) Pye, C. R.; Bertin, M. J.; Lokey, R. S.; Gerwick, W. H.; Linington, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 5601-5606.
- 17) Wang, M.; Carver, J.; Phelan, V.; *et al.* *Nat Biotechnol.* **2016**, *34*, 828-837.
- 18) Zhang, C.; Idelbayev, Y.; Roberts, N.; Tao, Y.; Nannapaneni, Y.; Duggan, B. M.; Min, J.; Lin, E. C.; Gerwick, E. C.; Cottrell, G. W.; Gerwick, W. H. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14243.

- 19) Hamamoto, H.; Urai, M.; Ishii, K.; Yasukawa, J.; Paudel, A.; Murai, M.; Kaji, T.; Kuranaga, T.; Hamase, K.; Katsu, T.; Su, J.; Adachi, T.; Uchida, R.; Tomoda, H.; Yamada, M.; Souma, M.; Kurihara, H.; Inoue, M.; Sekimizu, K. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *11*, 127-133.
- 20) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schaberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. A.; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chen, C.; Lewis, K. *Nature* **2015**, *517*, 455-459.
- 21) Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Engen, D. V.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469-2471.
- 22) Fujiki, H.; Suganuma, M. *Adv. Cancer Res.* **1993**, *61*, 143-194.
- 23) (a) Uemura, D.; Takahashi, K.; Yamamoto, T.; Katayama, C.; Tanaka, J.; Okumura, Y.; Hirata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4796-4798. (b) Hirata, Y.; Uemura, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-710.
- 24) Swami, U.; Chaudhary, I.; Ghalib, M. H.; Goel, S. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *81*, 163-184.
- 25) Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512-4515.
- 26) (a) Yamada, K.; Ojika, M.; Ishigaki, T.; Yoshida, Y.; Ekimoto, H.; Arakawa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11020-11021. (b) Ojika, M.; Kigoshi, H.; Ishigaki, T.; Tsukada, I.; Tsuboi, T.; Ogawa, T.; Yamada, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7441-7442.
- 27) Kita, M.; Hirayama, Y.; Yoneda, K.; Yamagishi, K.; Chinen, T.; Usui, T.; Sumiya, E.; Uesugi, M.; Kigoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18089-18095.
- 28) (a) Moore, R. E.; Scheuer, P. J. *Science* **1971**, *172*, 495-498. (b) Uemura, D.; Ueda, K.; Hirata, Y.; Naoki, H.; Iwashita, T. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2781-2784. (c) Klein, L. L.; McWhorter, W. W.; Ko, S. S.; Pfaff, K. P.; Kishi, Y.; Uemura, D.; Hirata, Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7362-7364. (d) Ko, S. S.; Finan, J. M.; Yonaga, M.; Kishi, Y.; Uemura, D.; Hirata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7364-7367. (e) Fujioka, H.; Christ, W. J.; Cha, J. K.; Leder, J.; Kishi, Y.; Uemura, D.; Hirata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7367-7369. (f) Cha, J. K.; Christ, W. J.; Finan, J. M.; Fujioka, H.; Kishi, Y.; Klein, L. L.; Ko, S. S.; Leder, J.; McWhorter, W. W.; Pfaff, K. P.; Yonaga, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7369-7371. (g) Ishida, Y.; Takagi, K.; Takahashi, M.; Satake, N.; Shibata, S. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 7900-7902.
- 29) (a) Usami, M.; Satake, M.; Ishida, S.; Inoue, A.; Kan, Y.; and Yasumoto, T.; *J. Am. Chem. Soc.*

- 1995, *117*, 5389-5390. (b) Yasumoto, T.; Seino, N.; Murakami, Y.; Murata, M. *Biol. Bull.* **1987**, *172*, 128-131.
- 30) Matsumori, N.; Kaneko, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866-876.
- 31) Higashibayashi, S.; Czechtizky, W.; Kobayashi, Y.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14379-14393.
- 32) Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4380-4386.
- 33) (a) Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1975-1978. (b) Satake, M.; Ishibashi, Y.; Legrand, A. M.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *60*, 2103-2105.
- 34) (a) Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9859-9861. (b) Murata, M.; Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Paul, G. K.; Tachibana, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 870-871.
- 35) Kobayashi, J.; Shigemori, H.; Ishibashi, M.; Yamasu, T.; Hirota, H.; Sasaki, T. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5221-5224.
- 36) Sakemi, S.; Ichiba, T.; Kohmoto, S.; Saucy, G.; Higa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4851-4853.
- 37) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Yano, G.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110-118.
- 38) Wilson, M. C.; Mori, T.; Ruckert, C.; Uria, A. R.; Helf, M. J.; Takada, K.; Gernert, C.; Steffens, U. A. E.; Heycke, N.; Schmitt, S.; Rinke, C.; Helfrich, E. J. N.; Brachmann, A. O.; Gurgui, C.; Wakimoto, T.; Kracht, M.; Crusemann, M.; Hentschel, U.; Abe, I.; Matsunaga, S.; Kalinowski, J.; Takeyama, H.; Piel, J. *Nature*, **2014**, *506*, 58-62.
- 39) Kato, Y.; Fusetani, N.; Matsuanga, S.; Hashimoto, K.; Fujita, S.; Furuya, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2780-2781.
- 40) 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*, 648-655.
- 41) Gerwick, W. H.; Proteau, P. J.; Nagle, D. G.; Hamel, E.; Blokhin, A.; Slate, D. L. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1243-1245.
- 42) Orjala, J.; Nagle, D. G.; Hsu, V.; Gerwick, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8281-8282.
- 43) Orjala, J.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 427-430.
- 44) Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Fujii, Y.; Kizu, H.; Boyd, M. R.; Boettner, F. E.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M.; Chapuis, J. C.; Michel, C. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 9151-9170.

- 45) Luesch, H.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 907-910.
- 46) Kato, Y.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2245-2246.
- 47) Suenaga, K.; Mutou, T.; Shibata, T.; Itoh, T.; Fujita, T.; Takada, N.; Hayamizu, K.; Takagi, M.; Irifune, T.; Kigoshi, H.; Yamada, K. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8509-8527.
- 48) Mynderse, J. S.; Moore, R. E.; Kashiwagi, M.; Norton, T. R. *Science*, **1977**, *196*, 538-540.
- 49) Han, B.; Gross, H.; Goeger, D. E.; Mooberry, S. L.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 572-575.
- 50) Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38*, 362-413.
- 51) Matthew, S.; Chen, Q.-Y.; Ratnayake, R.; Fermaintt, C. S.; Lucena-A. D.; Bonato, F.; Prota, A. E.; Lim, S. T.; Wang, X.; Diaz, J. F.; Risinger, A. L.; Paul, V. J.; Oliva, M. A.; Luesch, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, e2021847118.
- 52) Scott, L. J. *Drugs* **2017**, *77*, 435-445.
- 53) Ishibashi, M.; Moore, R. E.; Patterson, G. M. L.; Xu, C.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5300-5306.
- 54) Harrigen, G. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Nagle, D. G.; Park, P. U.; Biggs, J.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1221-1225.
- 55) Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 611-615.
- 56) Wu, M.; Okino, T.; Nogle, L. M.; Marquez, B. L.; Williamson, R. T.; Sitachitta, N.; Berman, F. W.; Murray, T. F.; McGough, K.; Jacobs, R.; Colsen, K.; Asano, T.; Yokokawa, F.; Shioiri, T.; Gerwick, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12041-12042.
- 57) Pereira, A.; Cao, Z.; Murray, T. F.; Gerwick, W. H. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 893-906.
- 58) Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5418-5423.
- 59) Medina, R. A.; Goeger, D. E.; Hills, P.; Mooberry, S. L.; Huang, N.; Romero, L. I.; Barria, E. O.; Gerwick, W. H.; McPhail, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6324-6325.
- 60) Paatero, A. O.; Kellosalo, J.; Dunyak, B. M.; Almaliti, J.; Gestwicki, J. E.; Gerwick, W. H.; Taunton, J.; Paavilainen, V. O. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 561-566.
- 61) Tranter, D.; Paatero, A. O.; Kawaguchi, S.; Kazemi, S.; Serrill, J. D.; Kellosalo, J.; Vogel, W. K.;

- Richter, U.; Mattos, D. R.; Wan, X.; Thornburg, C. C.; Oishi, S.; McPhail, K. L.; Ishmael, J. E.; Paavilainen, V. O. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2125-2136.
- 62) (a) Chen, Q.-Y.; Liu, Y.; Cai, W.; Luesch, H. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3011-3029. (b) Onda, Y.; Masuda, Y.; Yoshida, M.; Doi, T. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6751-6765.
- 63) Yao, G.; Wang, W.; Ao, L.; Cheng, Z.; Wu, C.; Pan, Z.; Liu, K.; Li, H.; Su, W.; Fang, L. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8908-8916.
- 64) Matthew, S.; Ross, C.; Rocca, J. R.; Paul, V. J.; Luesch, H.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 124-127.
- 65) Kwan, J. C.; Eksioğlu, Liu, C.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5732-5747.
- 66) Taori, K.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1806-1807.
- 67) (a) Ying, Y.; Taori, K.; Kim, H.; Hong, J.; Luesch, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8455-8459. (b) Bowers, A.; West, N.; Taunton, J.; Schreiber, S. L.; Brander, J. E.; Williams R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11219-11222.
- 68) Sato, S.; Murata, A.; Orihara, T.; Shirakawa, T.; Suenaga, K.; Kigoshi, H.; Uesugi, M. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 131-139.
- 69) Teruya, T.; Sasaki, H.; Kitamura, K.; Nakayama, T.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2421-2424.
- 70) (a) Morita, M.; Ohno, O.; Teruya, T.; Yamori, T.; Inuzuka, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 5984-5990. (b) Morita, M.; Ohno, O.; Suenaga, K. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 165-167. (c) Ohno, O.; Watanabe, A.; Morita, M.; Suenaga, K. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 287-289.
- 71) (a) Tanabe, Y.; Sato, E.; Nakajima, N.; Ohkubo, A.; Ohno, O.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2858-2861. (b) Sato, E.; Tanabe, Y.; Nakajima, N.; Ohkubo, A.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2047-2049. (c) Sato, E.; Sato, M.; Tanabe, Y.; Nakajima, N.; Ohkubo, A.; Suenaga, K. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 6770-6777. (d) Kämmler, L.; Maier, M. E. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 4554-4567. (e) Paul, D.; Sahana, M. H.; Mandal, P.; Chakrabarti, P.; Goswami, R. K. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 7151-7164.
- 72) Morita, M.; Ogawa, H.; Ohno, O.; Yamori, T.; Suenaga, K.; Toyoshima, C. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 1406-1411.
- 73) Teruya, T.; Sasaki, H.; Fukazawa, H.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5062-5065.
- 74) Gao, X.; Liu, Y.; Kwong, S.; Xu, Z.; Ye, T. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3018-3021.
- 75) Sumiya, E.; Shimogawa, H.; Sasaki, H.; Tsutsumi, M.; Yoshita, K.; Ojika, M.; Suenaga, K.; Uesugi, M. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 425-431.
- 76) Ohno, O.; Iwasaki, A.; Same, K.; Kudo, C.; Aida, E.; Sugiura, K.; Sumimoto, S.; Teruya, T.;

- Tashiro, E.; Simizu, S.; Matsuno, K.; Imoto, M.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2022**, *24*, 4547-4551.
- 77) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12840-12843.
- 78) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Katsuyama, S.; Morita, M.; Sasazawa, Y.; Dan, S.; Simizu, S.; Yamori, T.; Suenaga, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5295-5298.
- 79) Okamoto, S.; Iwasaki, A.; Ohno, O.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2719-2725.
- 80) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Ogawa, H.; Nguyen, K. A.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 652-655.
- 81) (a) Iwasaki, A.; Fujimura, H.; Okamoto, S.; Kudo, T.; Hoshina, S.; Sumimoto, S.; Teruya, T.; Suenaga, K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9592-9603. (b) Siow, A.; Opiyo, G.; Kavianinia, I.; Li, F. F.; Furket, D. P.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 788-791. (c) Ye, B.; Jiang, P.; Zhang, T.; Ding, Y.; Sun, Y.; Hao, X.; Li, L.; Wang, L.; Chen, Y. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 6741-6747.
- 82) Kallepu, S.; Kavitha, M.; Yeeravalli, R.; Manupati, K.; Jadav, S. S.; Das, A.; Mainkar, P. S.; Chandrasekhar, S. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 63-75.
- 83) Sumimoto, S.; Kobayashi, M.; Sato, R.; Shinomiya, S.; Iwasaki, A.; Suda, S.; Teruya, T.; Inuzuka, T.; Ohno, O.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1187-1190.
- 84) Ding, L.; Bar-S. R.; Aharonovich, D.; Kurisawa, N.; Patial, G.; Li, S.; He, S.; Yan, X.; Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Zhu, C.; Luo, H.; Tian, F.; Fares, F.; Naman, C. B.; Luzzatto-K. T. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 397.
- 85) Leao, T.; Castelao, G.; Korobeynikov, A.; Monroe, E. A.; Podell, S.; Glukhov, E.; Allen, E. E.; Gerwick, W. H.; Gerwick, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 3198-3203.
- 86) Engene, N.; Tronholm, A.; Paul, V. J. *J. Phycol.* **2018**, *54*, 435-446.
- 87) Gunasekera, S. P.; Imperial, L.; Garst, C. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1867-1871.
- 88) Iwasaki, A.; Teranuma, K.; Kurisawa, N.; Rahmawati, Y.; Jeelani, G.; Nozaki, T.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 2587-2593.
- 89) Al-Awadhi, F. H.; Law, B. K.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2969-2986.
- 90) Carmeli, S.; Moore, R. E.; Patterson, G. M. L. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2087-2096.
- 91) Field, M. C.; Horn, D.; Fairlamb, A. H. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 217-231.
- 92) Kaiser, M.; Bray, M. A.; Cal, M.; Trunz, B. B.; Torreele, E.; Brun, R. *Antimicrob. Agents Chemothe.* **2011**, *55*, 5602-5608.
- 93) Rivas, L.; Rojas, V. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *664*, 24-39.

- 94) (a) Iwasaki, A.; Tadenuma, T.; Sumimoto, S.; Shiota, I.; Matsubara, T.; Saito-Nakano, Y.; Nozaki, T.; Sato, T.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 2545-2552. (b) Iwasaki, K.; Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Matsubara, T.; Sato, T.; Nozaki, T.; Saito-Nakano, Y.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 481-488. (c) Iwasaki, A.; Otomo, K.; Kurisawa, N.; Shiota, I.; Rahmawati, Y.; Jeelani, G.; Nozaki, T.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 126-135.
- 95) (a) Ogawa, H.; Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Iwatsuki, M.; Ishiyama, A.; Hokari, R.; Otaguro, K.; Omura, S.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 890-893. (b) Ogawa, H.; Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Kanamori, Y.; Ohno, O.; Iwatsuki, M.; Ishiyama, A.; Hokari, R.; Otaguro, K.; Omura, S.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1862-1866. (c) Takahashi, H.; Iwasaki, A.; Kurisawa, N.; Suzuki, R.; Jeelani, G.; Matsubara, T.; Sato, T.; Nozaki, T.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1649-1655. (d) Ebihara, A.; Iwasaki, A.; Miura, Y.; Jeelani, G.; Nozaki, M.; Suenaga, K. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 11763-11770.
- 96) Zhou, W. G.; Ding, D. W.; Yang, Q. S.; Ahmad, M.; Zhang, Y. Z.; Lin, X. C.; Zhang, Y. Y.; Ling, J.; Dong, J. D. *Phytotaxa* **2018**, *383*, 75-92.
- 97) McDoland, L. A.; Ireland, C. M. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 376-379.
- 98) Kurisawa, N.; Otomo, K.; Iwasaki, A.; Jeelani, G.; Nozaki, T.; Suenaga, K. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 12528-12536.
- 99) Caro, M. S. B.; Oliveira, L. H.; Ilha, V.; Burrow, R. A.; Dalcol, I. I.; Morel, A. F. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1220-1222.
- 100) Cruz, L. J.; Insua, M. M.; Baz, J. P.; Trujillo, M.; Mias, R. A. R.; Oliveira, E.; Giralt, E.; Albericio, F.; Canedo, L. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3335-3338.
- 101) Berthold, D. E.; Lefler, F. W.; Laughinghouse IV, H. D. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2021**, *160*, 107010.
- 102) Bock, K.; Pedersen, C. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 293-297.
- 103) Carey, L.; Clough, J. M.; Pattenden, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 3005-3009.
- 104) Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.
- 105) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 11, 4092-4096.
- 106) Marcarino, M. O.; Cicetti, S.; Zanardi, M. M.; Sarotti, A. M. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 58-76.
- 107) Hehre, W.; Klunzinger, P.; Deppmeier, B.; Driessen, A.; Uchida, N.; Hashimoto, M.; Fukushi, E.; Takata, Y. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 2299-2306.
- 108) Hayasaka, A.; Hashimoto, K.; Konno, K.; Tanaka, K.; Hashimoto, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2022**,

- 95, 833-845.
- 109) *Tutorial and User's Guide, Spartan'20 for Windows, Macintosh and Linux*, Wavefunction Inc., 2020.
- 110) Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.
- 111) Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Hehre, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 939-947.
- 112) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
- 113) Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251-8260.
- 114) Smith, S. G.; Goodman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946-12959.
- 115) Jensen, F. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 1360-1369.
- 116) Evans, D. A.; Rieger, D. L.; Bilodeau, M. T.; Urpi, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1047-1049.
- 117) Zhou, J.-H.; Jiang, B.; Meng, F.-F.; Xu, Y.-H.; Loh, T.-P. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4432-4435.
- 118) (a) Owusu-A., E.; Durow, A. C.; Harding, J. R.; Jordan, A. C.; O'Connell, S. J.; Willis, C. L. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 265-272. (b) Lalithamba, H. S.; Uma, K.; Gowthami, T. S.; Nagenda, G. *Org. Prep. Proced. Int.* **2020**, *52*, 181-191.
- 119) Paterson, I.; Wallace, D. J.; Velázquez, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9083-9086.
- 120) Paterson, I.; Ng, K. K.-H.; Williams, S.; Millican, D. C.; Dalby, S. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2692-2695.
- 121) Lee, J. H. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 131351.
- 122) Siu, Y.-M.; Roane, J.; Krische, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10590-10595.
- 123) Yamada, H. *Trends in Glycosci. Glycotechnol.* **2011**, *23*, 122-133.
- 124) Evans, D. A.; Trenkle, W. C.; Zhang, J.; Burch, J. D. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3335-3338. (b) Asao, H.; Nakamura, Y.; Furuya, Y.; Kuwahara, S.; Baker, B. J.; Kiyota, H. *Helv. Chim. Acta* **2020**, *93*, 1933-1940.
- 125) Zhang, Y. K.; Sanchez-Ayala, M. A.; Sternberg, P. W.; Srinivasan, J.; Schroeder, F. C. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2837-2840.
- 126) Das, R.; Mukhopadhyay, B. *ChemistryOpen* **2016**, *5*, 401-403.
- 127) Yu, B.; Tao, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2405-2407.
- 128) Adinolfi, M.; Barone, G.; Guariniello, L.; Iadonisi, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9005-9008.
- 129) Douglas, S. P.; Whitfield, D. M.; Krepinsky, J. J. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 131-136.
- 130) Patel, B. A.; Abel, B.; Barbuti, A. M.; Velagapudi, U. K.; Chen, Z.-S.; Ambudkar, S. V.; Talele, T. T. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 834-864.

- 131) Bredekamp, M. W.; Holzapfel, C. W.; Snyman, R. M.; van Zyl, W. J. *Synth. Commun.* **1992**, *22*, 3029-3039.
- 132) Evans, D. A.; Tedrow, J. S.; Shaw, J. T.; Downey, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 392-393.
- 133) Futamura, Y.; Kawatani, M.; Kazami, S.; Tanaka, K.; Muroi, M.; Shimizu, T.; Tomita, K.; Watanabe, N.; Osada, H. *Cell Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1620-1630.
- 134) Yamori, T. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *52*, 74-79.
- 135) (a) Reed, P. W.; Lardy, H. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6970-6977. (b) Chaney, M. O.; Demarco, P. V.; Jones, N. D.; Occolowitz, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1932-1933.
- 136) (a) Rasmussen, U.; Brøgger Christensen, S.; Sandberg, F. *Acta Pharm. Suec.* **1978**, *15*, 133-140. (b) Brøgger Christensen, S.; Schaumburg, K. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 396-399. (c) Thastrup, O.; Cullen, P. J.; Drøbak, B. K.; Hanley, M. R.; Dawson, A. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 2466-2470.
- 137) Goeger, D. E.; Rilev, R. T.; Dorner, J. W.; Cole, R. J. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 978-981.
- 138) Eletr, S.; Inesi, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *282*, 174-179.
- 139) Wootton, L.; Michelangeli, F. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6970-6976.
- 140) Iurlaro, R.; Muñoz-Pinedo, C. *FEBS J.* **2016**, *283*, 2640-2652.
- 141) Inoue, Y.; Kawachi, S.; Ohkubo, T.; Nagasaka, M.; Ito, S.; Fukuura, K.; Itho, Y.; Ohoka, N.; Morishita, D.; Hayashi, H. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 3682-3691.
- 142) Kennedy, D.; Mnich, K.; Samali, A. *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 813-821.
- 143) Karimian, A.; Ahmadi, Y.; Yousefi, B. *DNA Repair* **2016**, *42*, 63-71.
- 144) Chen, Y.-J.; Lin, J.-K.; Lin-Shiau S.-Y. *Eur. J. Cell. Biol.* **1999**, *78*, 824-831.
- 145) Cheng, G.; Liu, B.-F.; Yu, Y.; Diglio, C.; Kuo, T. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *329*, 65-72.
- 146) Giacinti, C.; Giordano, A. *Oncogene* **2006**, *25*, 5220-5227.
- 147) Plaza, A.; Gustchina, E.; Baker, H. L.; Kelly, M.; Bewley, C. A. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1753-1760.
- 148) Lin, Z.; Flores, M.; Forteza, I.; Henriksen, N. M.; Concepcion, G. P.; Rosenberg, G.; Haygood, M. G.; Olivera, B. M.; Light, A. R.; Cheatham III, T. E.; and Schmidt, E. W. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 644-649.
- 149) Chang, Z.; Flatt, P.; Gerwick, W. H.; Nguyen, V.-A.; Willis, C. L.; Sherman, D. H. *Gene* **2002**, *296*, 235-247.
- 150) Klein, D.; Braekman, J.-C.; Daloz, D.; Hoffman, L.; Castillo, G.; Demoulin, V. *Tetrahedron Lett.*

- 1999, 40, 695-696.
- 151) Skiba, M. A.; Sikkema, A. P.; Moss, N. A.; Lowell, A. N.; Sturgis, R. M.; Gerwick, L.; Gerwick, W. H.; Sherman, D. H.; Smith, J. L. *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13, 1640-1650.
- 152) Gu, L.; Wang, B.; Kulkarni, A.; Geders, T. W.; Grindberg, R. V.; Gerwick, L.; Hakansson, K.; Wipf, P.; Smith, J. L.; Gerwick, W. H.; Sherman, D. H. *Nature* **2009**, 459, 731-735.
- 153) Irako, N.; Hamada, Y.; Shioiri, T. *Tetrahedron* **1992**, 48, 7251-7264.
- 154) (a) Oliver, S. F.; Högenauer, K.; Simic, O.; Antonello, A.; Smith, M. D.; Ley, S. V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 5996-6000. (b) Ley, S. V.; Antonello, A.; Balskus, E. P.; Booth, D. T.; Christensen, S. B.; Cleator, E.; Gold, H.; Högenauer, K.; Hüniger, U.; Myers, R. M.; Oliver, S. F.; Simic, O.; Smith, M. D.; Søhoel, H.; Woolford, A. J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 12073-12078. (c) Ball, M.; Andrews, S. P.; Wierschem, F.; Cleator, E.; Smith, M. D.; Ley, S. V. *Org. Lett.* **2007**, 9, 663-666. (d) Andrews, S. P.; Ball, M.; Wierschem, F.; Cleator, E.; Oliver, S.; Högenauer, K.; Simic, O.; Antonello, A.; Hüniger, U.; Smith, M. D.; Ley, S. V. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 5688-5712.
- 155) (a) Chu, H.; Smith, J. M.; Felding, J.; Baran, P. S. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 47-51. (b) Chen, D.; Evans, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 6046-6049.
- 156) Zhou, S.; Yang, J.; Wang, M.; Zheng, D.; Liu, Y. *Mol. Med. Rep.* **2020**, 21, 173-180.
- 157) Geng, F.; Zhu, W.; Anderson, R. A.; Leber, B.; Andrews, D. W. *J. Cell. Sci.* **2012**, 125, 2615-2625.
- 158) Simon, V. R.; Moran, M. F. *Cell Prolif.* **2001**, 34, 15-30.
- 159) Furuya, Y.; Lundmo, P.; Short, A. D.; Gill, D. L.; Isaacs, J. T. *Cancer Res.* **1994**, 54, 6167-6175.
- 160) Monteith, G. R.; McAndrew, D.; Faddy, H. M.; Roberts-T., S. J. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 519-530.
- 161) Wang, C.; Li, T.; Tang, S.; Zhao, D.; Zhang, C.; Zhang, S.; Deng, S.; Zhou, Y.; Xiao, X. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, 41, 167-179.
- 162) (a) Pagliaro, L.; Marchesini, M.; Roti, G. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, 14. (b) Kasahara, A.; Cipolat, S.; Chen, Y.; Dorn, G. W.; Scorrano, L. *Science*, **2013**, 342, 734-737.
- 163) (a) Mahalingam, D.; Wilding, G.; Denmeade, S.; Sarantopoulos, J.; Cosgrove, D.; Cetnar, J.; Azad, N.; Bruce, J.; Kurman, M.; Allgood, V. E.; Carducci, M. *Br. J. Cancer* **2016**, 114, 986-994. (b) Mahalingam, D.; Peguero, J.; Cen, P.; Arora, S. P.; Sarantopoulos, J.; Rowe, J.; Allgood, V.; Tubb, B.; Campos, L. *Cancers* **2019**, 11, 833.

- 164) Ruiz-J., L. J.; Palumbi, S. R. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1601298.
- 165) (a) Zoccola, D.; Tambutté, E.; Kulhanek, E.; Puverel, S.; Scimeca, J.-C.; Allemand, D.; Tambutté, S. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1663*, 117-126. (b) Barott, K. L.; Perez, S. O.; Linsmayer, L. B.; Tresguerres. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2015**, *309*, 235-246.
- 166) (a) Linington, R. G.; Clark, B. R.; Trimble, E. E.; Almanza, A.; Urena, L.-D.; Kyle, D. E.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 14-17. (b) Taori, K.; Liu, Y.; Paul, V. J.; Luesch, H. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1634-1639.
- 167) Stolze, S. C.; Deu, E.; Kaschani, F.; Li, N.; Florea, B. I.; Richau, K. H.; Colby, T.; van der Hoorn, R. A. L.; Overkleeft, H. S.; Bogyo, M.; Kaiser, M. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1546-1555.
- 168) Boudreau, P. D. Miller, B. W.; McCall, L.-I.; Almaliti, J.; Reher, R.; Hirata, K.; Le, T.; Siqueira-N. J. L.; Hook, V.; Gerwick, W. H. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 9026-9044.
- 169) Takemoto, Y.; Watanabe, H.; Uchida, K.; Matsumura, K.; Nakae, K.; Tashiro, E.; Shindo, K.; Kitahara, T.; Imoto, M. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1337-1347.
- 170) Kobayashi, H.; Ogura, Y.; Sawada, M.; Nakayama, R.; Takano, K.; Minato, Y.; Takemoto, Y.; Tashiro, E.; Watanabe, H.; Imoto, M. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39259-39268.
- 171) Logan, M. M.; Toma, T.; Thomas-T. R.; Bois, J. D. *Science* **2016**, *354*, 865-869.
- 172) Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- 173) Kuboki, N.; Inoue, N.; Sakurai, T.; Cello, F. D.; Grab, D. J.; Suzuki, H.; Sugimoto, C.; Igarashi, I. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5517-5524.
- 174) Hirumi, H.; Hirumi, K. *J. Parasitol.* **1989**, *75*, 985-989.

- 175) Rätz, B.; Iten, M.; Grether-B. Y.; Kaminsky, R.; Brun, R. *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139-147.
- 176) Huber, W.; Koella, J. C. *Acta Trop.* **1993**, *55*, 257-261.
- 177) Pruesse, E.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1823-1829.
- 178) (a) Talavera, G.; Castresana, J. *Syst. Biol.* **2007**, *56*, 564-577; (b) Castresana, J. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 540-552.
- 179) Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772.
- 180) Guindon, S.; Gascuel, O. *Syst. Biol.* **2003**, *52*, 696-704.
- 181) Perrière, G.; Gouy, M. *Biochimie* **1996**, *78*, 364-369.
- 182) Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D. L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. A.; Huelsenbeck, J. P. *Syst. Biol.* **2012**, *61*, 539-542.

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。

有機化学について全くの素人であった著者を後期博士後期課程から受け入れて下さり、熱心にご指導くださいました末永聖武教授に、心より感謝申し上げます。著者の提案を常に親身に聞いてくださり、沢山のご助言とあたたかい励ましを頂いたおかげで、自由な発想のもと楽しく研究を行うことができました。また、末永研究室での学びは、著者の天然物における研究観を大きく広げる契機となりました。厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、貴重な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 藤本ゆかり教授、荒井緑教授、犀川陽子准教授に心より感謝申し上げます。

末永研究室に進学して以降、常に厚いご指導と激励を頂きました慶應義塾大学理工学部 岩崎有紘専任講師に心より感謝申し上げます。日常的な議論や談義、サンプル採集を通じて天然物の可能性を語り合い、ここに書ききれないほど沢山の事を教えて頂きました。また、研究の試練が訪れるたび親身に相談に乗って頂き、一研究者として成長の機会を何度も与えてくださいました。厚く御礼申し上げます。

抗トリパノソーマ活性の評価において、ご指導頂きました東京大学医学部 野崎智義教授、Ghulam Jeelani 助教に心より感謝申し上げます。著者を自身の研究室の所属学生のように温かくご指導頂き、常に励ましてくださるだけでなく、著者の稚拙な英語の意図を汲み取り、様々なご助言をくださいました。また、野崎研究室のスタッフや学生の皆様には訪れるたびに多くの温かい励ましを頂きました。厚く御礼申し上げます。

ヒトがん細胞パネルスクリーニングを実施して頂きました、公益財団法人がん研究会 且慎吾分子薬理部部長に感謝申し上げます。本実験結果により、iezoside の標的分子同定において大きな突破口を得ることができました。厚く御礼申し上げます。

SERCA 阻害活性試験の実施にあたり、ご指導を頂きました東京大学定量生命科学研究科 豊島近特任教授に感謝申し上げます。ご相談後すぐに評価系を立ち上げて頂いたことで、迅速な iezoside の標的分子同定に至りました。厚く御礼申し上げます。

計算化学を用いた絶対立体配置の決定にあたり、ご指導を頂きました弘前大学農学生命科学部 橋本勝教授に感謝申し上げます。計算化学の面白さや有用性、醍醐味について本研究を通じて学び、様々なご助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

著者の前所属研究室の指導教員である岩手大学農学部 木村賢一教授には、進学後もお

会いするたびに激励の言葉をくださいました。また、前所属研究室で身につけた農芸化学の観点からの天然物の知識や視点は、著者の大きな武器になりました。厚く御礼申し上げます。

学会やシンポジウムで出会い、同じ分野で切磋琢磨してきた友人や、惜しみないご助言や励ましをくださった先生方に、この場を借りて深く御礼申し上げます。

新規化合物を追い求め、共に切磋琢磨した単離班の皆様に感謝申し上げます。特に、修士課程に進学し共に長い時間を過ごした高橋寛樹氏、海老原玲氏、田口黎武氏は、優秀な後輩として日々の討論や成果に刺激を受けると共に、研究を行う上で大きなモチベーションになりました。厚く御礼申し上げます。

有機合成の素人である著者に、何度も丁寧に実験や理論を教えてくださいました合成班の皆様に感謝申し上げます。特に大友啓介氏、寺沼和哉氏は、著者が単離した化合物を全合成し、構造と生物活性の正しさを確かめてくださいました。また、日々の談義は著者にとって楽しい研究生活を送る上で欠かせないものでした。厚く御礼申し上げます。

研究を行うにあたり、博士課程初年度は天野工業技術研究所奨学金、二年次は慶應義塾大学院助教(有期・研究奨励)、三年次は研究のすゝめ奨学金に採用頂き、金銭面での援助を頂きました。関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部は KLL 後期博士課程研究助成金および JSPS 科研費 21J13608 (特別研究員奨励費)の助成を受けたものであり、関係者の皆様に深謝いたします。

最後に、他大学への博士課程進学を快諾し、離れた地から常に著者を金銭面・精神面で支え、いついかなるときも全力で応援してくださいました父 孝信、母 朱美、祖父 光夫、祖母 妙子、祖母 シマに心から感謝いたします。

2022 年 7 月 栗澤 尚瑛