

細胞分化およびタンパク質修飾を調節する
生物活性天然化合物の探索

Studies on the Search for Bioactive Natural Products
Regulating Cellular Differentiation and Protein
Modifications

2023年3月

中村 文彬
Fumiaki NAKAMURA

細胞分化およびタンパク質修飾を調節する
生物活性天然化合物の探索

Studies on the Search for Bioactive Natural Products
Regulating Cellular Differentiation and Protein
Modifications

2023年3月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
化学・生命化学専攻 ケミカルバイオロジー研究

中村 文彬
Fumiaki NAKAMURA

略語一覧表

第1章 序論.....	1
第2章 Kakeromamide A に関する研究.....	5
2-1. 研究背景	5
2-2. Kakeromamide A の単離と精製	7
2-3. Kakeromamide A の平面構造解析	7
2-4. Kakeromamide A の絶対配置	11
2-5. Kakeromamide A の生物活性	11
2-6. 結言	15
2-7. 第2章の実験項.....	16
第3章 Halistanol sulfate 類に関する研究.....	29
3-1. 研究背景	29
3-2. Halistanol sulfate 類の単離と精製.....	30
3-3. Halistanol sulfate 類の構造決定.....	31
3-4. Halistanol sulfate 類の生物活性.....	36
3-5. 結晶構造解析.....	37
3-6. 結言	38
3-7. 第3章の実験項目.....	39
第4章 ヒストン修飾調節活性に注目した活性化化合物の探索	61
4-1. 研究背景	61
4-2. Onnamide 類の単離と精製.....	63
4-3. Onnamide 類の構造決定	64
4-4. Onnamide 類の生物活性.....	69
4-5. 結言	75
4-6. 第4章の実験項目.....	76
第5章 食品に含まれる活性成分の探索研究	99
5-1. 研究背景	99
5-2. FAEE (1) の単離と精製	101
5-3. FAEE (1) の構造決定およびその産生機構の検討	103
5-4. FAEE (1) の生物活性	109
5-5. 構造-活性相関の検討	112
5-6. FAEE (1) のプローブ化	116
5-7. FAEE (1) の細胞内局在の解析	118
5-8. FAEE (1) の標的分子探索	119

5-9. 結言	124
5-10. 第 5 章の実験項.....	125
第 6 章 総括.....	173
参考文献.....	177
謝辞.....	190

略語一覽表

3-NBA	: 3-nitrobenzyl alcohol
ac	: acetylation
AceCS2	: acetyl-CoA synthetase 2
ADP	: adenosine diphosphate
Amha	: 3-amino-2-methylhexanoic acid
AMP	: adenosine monophosphate
Arg	: arginine
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: adenosine triphosphate
BF	: bright field
BSA	: bovine serum albumin
calcd	: calculated
Ct	: control
CoA	: coenzyme A
COSY	: correlation spectroscopy
Cys	: cysteine
DMAP	: <i>N</i> -(4-Pyridyl)dimethylamine
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
DTT	: 1,4-dithiothreitol
ED ₅₀	: 50% effective dose
EDC	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
Em	: emission
ES	: embryonic stem
ESI	: electrospray ionization
EtOH	: ethanol
Ex	: excitation
FA	: ferulic acid
FDA	: Food and Drug Administration
FAEE	: ferulic acid ethyl ester
FAM	: carboxyfluorescein
FBS	: fetal bovine serum
FDA	: Food and Drug Administration
FDLA	: 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucineamide
FOXO	: forkhead box class O
GDH	: glutamate dehydrogenase

GFAP	: glial fibrillary acidic protein
Gly	: glycine
H3	: histone 3
H4	: histone 4
HAT	: histone acetyltransferase
HDAC	: histone deacetylase
His	: histidine
HMBC	: heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: heteronuclear multiple quantum correlation
HPA	: helix pomatia agglutinin
HPLC	: high-performance liquid chromatography
IC ₅₀	: half-maximal inhibitory concentration
ID ₅₀	: 50% inhibitory dose
IR	: infrared spectroscopy
K	: lysine
LC	: liquid chromatography
LCAD	: long-chain acyl-CoA dehydrogenase
mAb	: monoclonal antibody
Me	: methyl
me1	: mono-methylation
me2	: di-methylation
me3	: tri-methylation
MeCN	: acetonitrile
MEF	: mouse embryonic fibroblast
MeOH	: methanol
Met	: methionine
mmu	: milli mass unit
MS	: mass spectrometry
MTT	: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide
NAD ⁺	: nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form
NF-κB	: nuclear factor-kappa B
NMR	: nuclear magnetic resonance
<i>N,O</i> -diMeTyr-1, 2	: <i>N,O</i> -dimethyl-tyrosine
NP-40	: nonyl phenoxy polyethoxy ethanol
NSC	: Neural stem cell
ODS	: octadecylsilyl
p53	: protein 53
PBS	: phosphate-buffered saline
PEG	: polyethyleneglycol

PFA	: paraformaldehyde
PGC-1 α	: peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α
Phe	: phenylalanine
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
ppm	: parts per million
PS	: phosphatidylserine
PTSD	: post-traumatic stress disorder
PVDF	: polyvinylidene fluoride
RPMI	: roswell park memorial institute
rhEGF	: recombinant human epidermal growth factor
rhFGF-2	: recombinant human fibroblast growth factor-2
rt	: room temperature
RSR	: ribotoxic stress responses
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIRT	: sirtuin
TBTA	: tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl) methyl]amine
TFA	: trifluoroacetic acid
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tyr	: tyrosine
UV	: ultraviolet
Val	: valine
Val-thz-ca	: 2-(1-amino-2-methylpropyl) thiazole-4-carboxylic acid
Vat1	: vesicle amine transport -1

第1章 序論

生物は多種多様な有機化合物を生産しており、糖やアミノ酸、脂質、核酸など生命活動に必須な化合物は一次代謝産物、生命活動に必須ではない化合物は二次代謝物と呼ばれている。自然界において動植物や微生物は、生存競争を生き抜くための戦略として、他者を引き寄せるフェロモンや色素、また、身を守るための抗菌、抗原虫や抗ウイルス物質などの二次代謝物を産生していると解釈されているが、その多くは真の役割が理解されていない。このような二次代謝物の多くは多種多様な構造と生物活性を有しているため、抗がん剤や抗菌剤をはじめとする医薬品開発として応用されるとともに、ライフサイエンス研究のツールとしても様々な用途に利用されてきた。

近年、医薬品開発研究においても合成化合物の比重が増大しつつある。しかしながら、有機合成化学が高度に発達した現在でも、合成品を凌駕した多様な化学骨格を有する天然化合物は依然として重要な医薬品の探索ソースであり、morphine¹ や quinine², atropine³ といった1世紀以上前に同定された天然化合物は、いまだに医薬品として利用されている (Figure 1-1)。

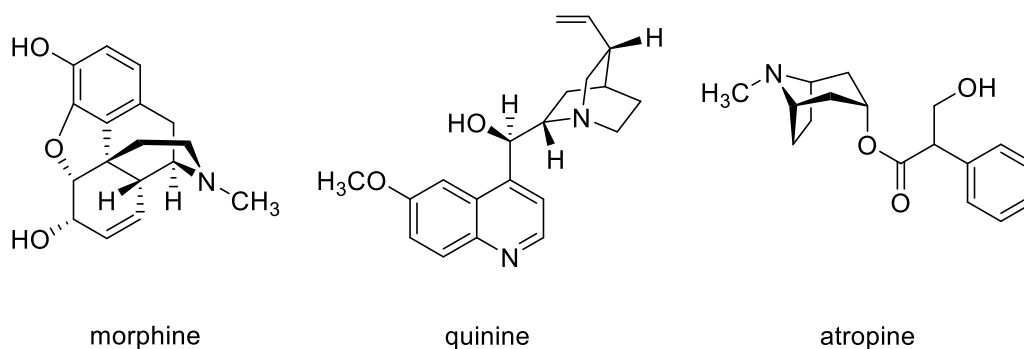


Figure 1-1. 天然化合物由来の医薬品.

また、カビ *Penicillium notatum* から抗菌性物質として penicillin^{4,5} が発見され (Figure 1-2), 感染症治療に革命がもたらされて以来、抗菌活性、抗がん活性などの様々な生物活性を指標とした天然化合物の探索が精力的に行われた結果、数多くの生物活性物質が見出されてきた。1980年から2010年までに承認された新薬1355個のうち約26%、特に抗がん剤に注目すると

約 44%を天然化合物やその誘導体が占めており、天然化合物は医薬品リード化合物の重要な供給源となってきた⁶。

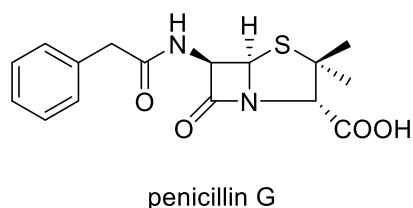


Figure 1-2. Penicillin G の構造.

多種多様な構造と生物活性を有する海洋天然化合物は、医薬品候補の探索源として注目され、1950年代に海綿 *Cryptotethia crypta* 由来の抗ウイルス活性ヌクレオチド⁷が発見されてから (Figure 1-3), 現在までに 35000 種を超える海洋天然化合物が報告されている⁸。これらのうち、15 種類の海洋生物由来の医薬品が承認され、現在 30 種類以上の候補物質が前臨床試験段階にある⁹⁻¹¹。

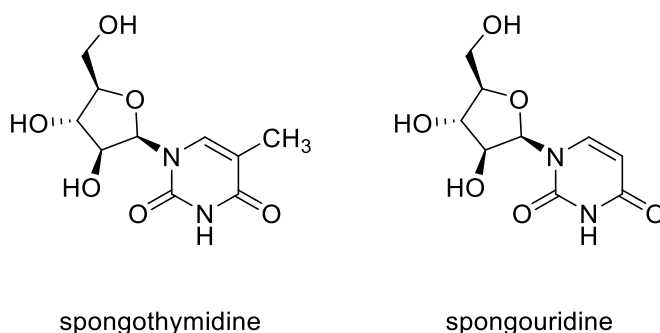


Figure 1-3. 海綿 *Cryptotethia crypta* 由来海洋ヌクレオチドの構造.

例えば、2010年に米国のFDAに承認された eribulin は海綿 *Halichondria okadai* から単離された halichondrin B をモチーフにエーザイ社が開発した転移性乳がん患者の第3選択薬であり、日本においても再発性乳がんの治療に用いられている (Figure 1-4)¹²。また、2020年には、2つの海洋天然化合物由来の抗がん剤がFDAによって承認された。シアノバクテリアから分離された海洋ペプチド dolastatin 10 の合成類縁体である BlenrepTMは、GlaxoSmithKline 社が開発した再発性・難治性の多発性骨髄腫治療薬である (Figure 1-5)¹³。また、ホヤ *Ecteinascidia*

turbinate から単離された海洋アルカロイド trabectedin の合成類縁体は, PharmaMar 社によって開発された lurbinectedin は転移性小細胞肺癌の治療薬として使用されている (Figure 1.6)¹⁴。

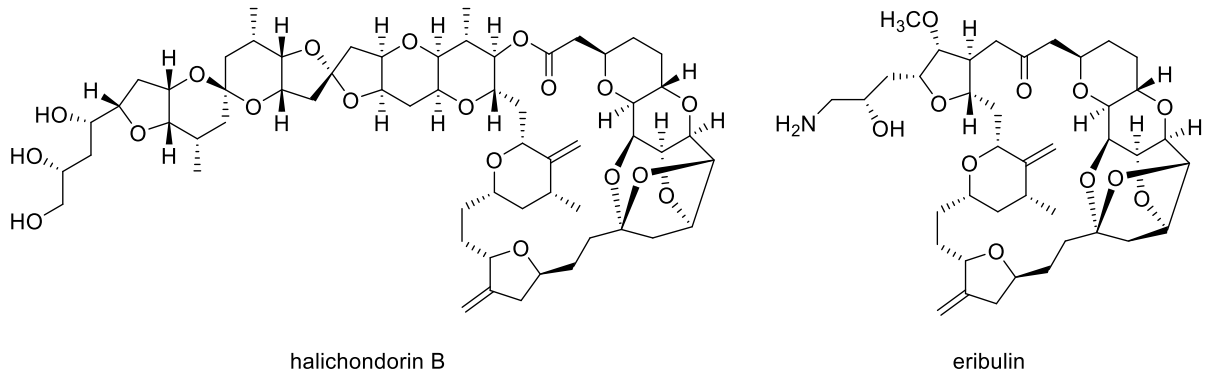
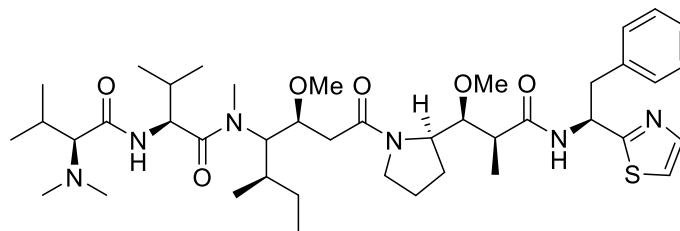


Figure 1-4. Halichondrin B および eribulin の構造.



dolastatin 10

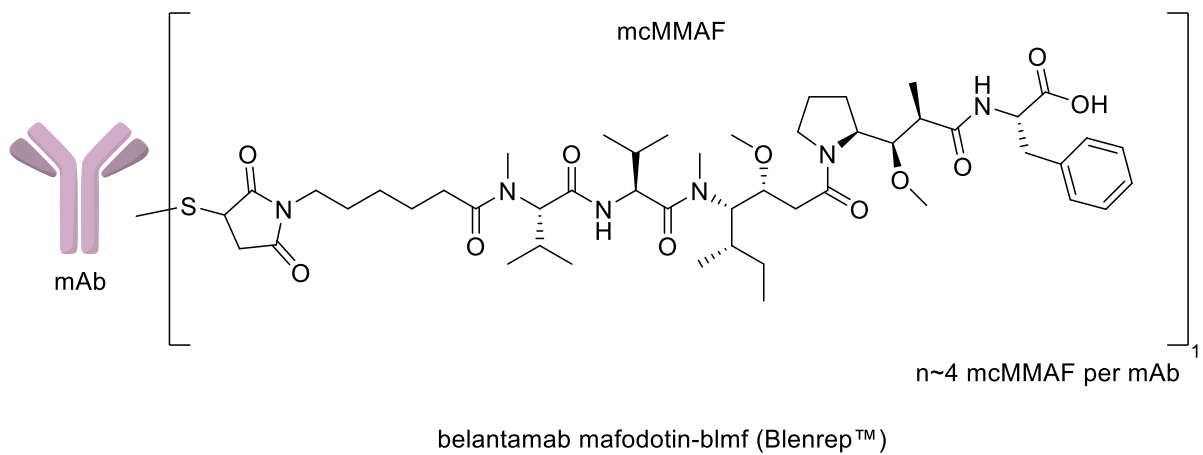


Figure 1-5. Dolastatin 10 および Blenrep™の構造.

第2章 Kakeromamide A に関する研究

2-1. 研究背景

海洋シアノバクテリアは抗がん作用をはじめとする様々な生物活性とユニークな構造を持つ二次代謝化合物を含んでいることから、天然物化学の分野における重要な探索源である¹⁴。最近では海綿の共生微生物やシアノバクテリアといった海洋微生物が海洋天然化合物の真の生産者として着目されており、中でも海洋シアノバクテリアからはペプチド性化合物が数多く見出されている^{15,16}。シアノバクテリアは、青緑色藻とも呼ばれ、他の細菌とは異なり、光合成において光を捕らえるための青色色素フィコシアニンを持っている。シアノバクテリアは二次代謝産物を大量に生産する能力があり、海洋から淡水、土壌など、さまざまな環境に適応している。その二次代謝産物の一部は、抗がんや、抗菌、抗ウイルス、免疫抑制作用等の生物活性物質として報告されている¹⁷。

アメフラシの仲間であるタツナミガイ *Dolabella auricularia* から低収率 (10^{-6} ~ 10^{-7} %) で単離された抗増殖活性化合物 dolastatin 類の真の生産者は海洋シアノバクテリア *Symploca* sp. であり、*Symploca* sp. が dolastatin 類縁体の食餌性起源であることが明らかになっている^{14,18}。

D. auricularia が海藻と一緒に海洋シアノバクテリアを摂食する結果、天敵から身を守るための手段として毒が蓄積されると考えられている¹⁹。海洋シアノバクテリア *Lyngbya majuscula* からマウス骨髄性白血病細胞株 P388 の増殖抑制活性成分として dolastatin 3^{20,21}, 12²², 13²³, 16²⁴ および G²⁵ と様々な dolastatin 類縁体が単離報告されている (Figure 2-1)。Dolastatin 類の中で最も活性の強い dolastatin 10 は、乾燥重量ベースで 10^{-2} % で *Symploca* sp. から単離され、P388 細胞に対して強い細胞毒性活性を有する (ID_{50} 0.046 ng/mL)²⁶。また、dolastatin 10 は、微小管の重合を阻害することが知られており、その誘導体である TZT-1027 はメラノーマの治療試験のフェーズ II まで進んだ^{27,28}。

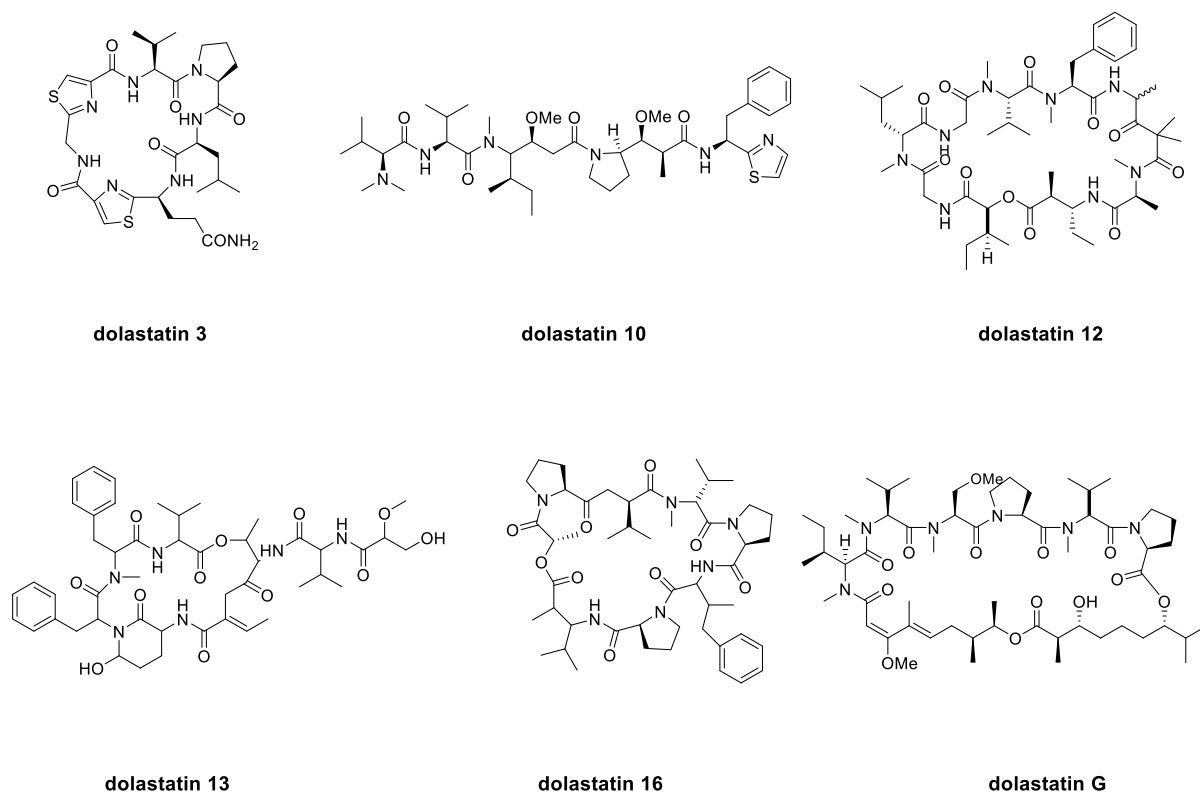


Figure 2-1. Dolastatin 類の構造.

また、dolastatin 類のほかにも apratoxin 類²⁹⁻³¹ や lyngbyabellin 類³²⁻³⁶ といった生物活性を有するペプチド性化合物が数多く報告されており、海洋天然化合物の真の生産者として、共生微生物や海洋シアノバクテリアが注目されている。非タンパク質構成アミノ酸を含む特異な構造を有するペプチド性化合物の豊富な供給源である海洋シアノバクテリアは創薬につながる生物活性二次代謝産物を多数生産していると考えられる。

そこで本研究では、海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* から MS 分析を適用した精製を行い、未知の微量成分について探索を行った。各精製段階で得られた画分について、取得した MS データをもとに海洋天然化合物データベースと照合して、未知のイオンピークを与える画分について精製を進め、新規環状ペプチド kakeromamide A を見出すことに成功した³⁷。

2-2. Kakeromamide A の単離と精製

鹿児島県加計呂麻島で採集した海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* (128 g, 湿重量) を MeOH で抽出して濃縮後, H₂O/CHCl₃ にて二層分配を行った。CHCl₃ 層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーによって 6 分画した。70%, 85% MeCN 溶出画分を合一後, 3 段階の HPLC を用いた 3 段階の精製を行うことで, 白色の粉末個体として kakeromamide A を 1.1 mg 単離した (9.4×10⁻⁶% yield based on the wet weight, Scheme 2-1)。

***Moorea bouillonii* 128 g wet wt.**

extraction and partition

MeOH

H₂O / CHCl₃

ODS flash CC (φ 2×6.5 cm)

50%, 70% MeOH, 70%, 85% MeCN,

100% MeOH, CHCl₃ / MeOH / H₂O 6:4:1

Reverse-phase HPLC

COSMOSIL 5C₁₈-AR-II,

Linear gradient from 20/80 to 0/100 of H₂O/MeOH, 220 nm (UV)

Reverse-phase HPLC

COSMOSIL 5C₁₈-MS-II,

70% MeCN, 220 nm (UV)

Reverse-phase HPLC

COSMOSIL 5C₁₈-MS-II,

50% MeCN, 220 nm (UV)

kakeromamide A 1.1 mg

Scheme 2-1. Kakeromamide A の単離スキーム.

2-3. Kakeromamide A の平面構造解析

Kakeromamide A は, HRFABMS において, m/z 791.4171 のプロトン付加イオンピーク [M+H]⁺ が認められたことにより分子式を C₄₂H₅₈N₆O₇S と決定した (calcd for C₄₂H₅₉N₆O₇S 791.4166, Δ +0.5 mDa)。また, 赤外分光スペクトルにおいて, アミド基の存在下で観測される 1647, 1612, 1541 cm⁻¹ 付近に極大吸収を示したことから, 本化合物はペプチド性化合物の可能性が示唆された。

Kakeromamide A の ¹H NMR スペクトル (Table 2-1) において, 3 つのアミドプロトン (δ_{H} 6.53, 8.51, 8.60), *N*-メチルプロトンの 2 つのシングル (δ_{H} 2.86, 3.05), および 4 つの α -プロトンのシグナル (δ_{H} 4.30, 5.25, 5.33, 5.53) が認められた。COSY スペクトルの解析により, 7 つのスピンの存在が明らかになり, 二つは Val タイプのアミノ酸由来のもので, 残りは Tyr タ

イプのアミノ酸由来のものと考えられた (Figure 2-2)。HMQC および HMBC スペクトルの解析により、2つの Tyr タイプのアミノ酸は *N, O*-diMeTyr-1,2 であることが明らかとなった。また、Val タイプのアミノ酸のうち一つは Val と考えられたが、もう一つは単純なタンパク質構成アミノ酸ではないことが明らかとなった。このアミノ酸由来の低磁場シフトしたシングレットのメチンプロトン H-26 (δ_H 8.01), および4つの sp^2 炭素 (δ_C 123.6, 150.8, 161.4, and 170.0) とともに、H-26 と C-26 の $^1J_{CH}$ 値がチアゾール環に特徴的な値 (194 Hz)³⁸ であることから、チアゾール環の存在が示唆された。H-26/C-27 および H-28/C-27 間の HMBC 相関から、チアゾール環と Val 様ユニットが結合した Val-thz-ca 残基の存在が明らかとなった。残る1つの残基はスピン系 (CH₃-37 to CH₃-38) および、H-38 から C-32 への HMBC クロスピークの解析により、 β -アミノ酸であることが示唆され、さらに文献値のデータ³⁹との比較により、最後のアミノ酸を Amha であると結論づけた。

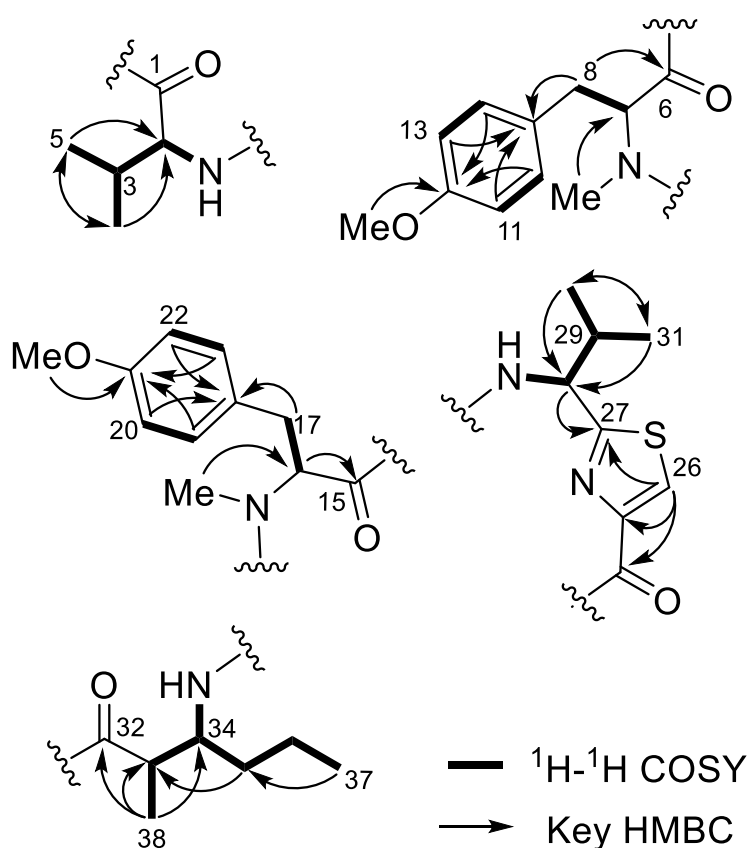


Figure 2-2. Kakeromamide A の各アミノ酸残基の COSY および key HMBC 相関。

これらのアミノ酸配列は、アミノ酸残基間の HMBC クロスピークに基づいて決定した。2-NH (δ_H 6.53) と C-32 (δ_C 173.3) の相関は、Val (NH) と Amha (CO) の間でアミド結合が形成さ

れていることを示しており、また、*N*-メチル δ_{H} 2.86 (*N,O*-diMeTyr-2) と δ_{C} 174.0 (C-26) の HMBC クロスピークから *N,O*-diMeTyr-1 と *N,O*-dimethyl-Tyr-2 が結合しており、また、*N*-メチル δ_{H} 3.05 (*N,O*-diMeTyr-1) から Val 中のカルボニル炭素と考えられる C-1 (δ_{C} 176.8) への HMBC 相関が認められ、2つの *N,O*-diMeTyr と Val が結合した Amha/Val/*N,O*-diMeTyr-1/*N,O*-diMeTyr-2 のペプチドが形成されていることが示唆された。Val-thz-ca と他の残基との間に残基間 HMBC クロスピークが認められなかったが、分子式から本化合物は環状構造であることが示されたため、kakeromamide A の平面構造は Val-thz-ca が Amha と *N,O*-diMeTyr-2 との間に結合した環状ペプチドであると決定した (Figure 2-3)。

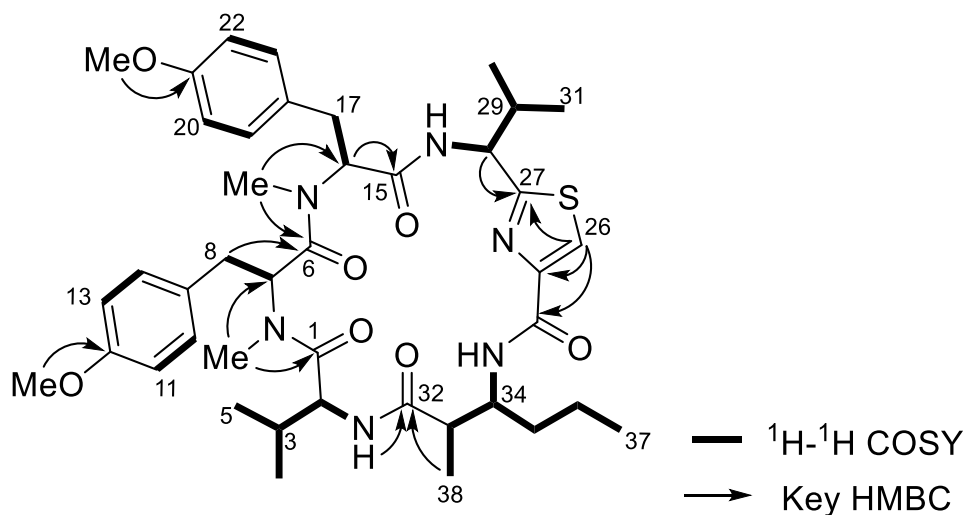


Figure 2-3. Kakeromamide A の平面構造とその COSY および key HMBC 相関.

Table 2-1. Kakeromamide A の NMR スペクトルデータ (CD₃CN, 400/100 MHz)

Unit	position	δ_C	δ_H mult. (J in Hz)	COSY	HMBC	
Val	1	176.8				
	2	57.2	4.30 dd (9.8, 7.3)	NH-2, H-3		
	3	32.0	1.80 dqq (9.8, 6.8, 6.7)	H-2, H-4, H-5		
	4	18.9	0.79 d (6.8)	H-3	C-2, 5	
	5	20.2	0.89 d (6.7)	H-3	C-2, 4	
	2-NH		6.53 d (7.3)	H-2	C-32 ^a	
	<i>N,O</i> -diimethyl-Tyr-1	6	174.0			
		7	52.3	5.53 dd (11.3, 4.6)	H-8	C-6 ^a , 8 ^a
		8	33.4	1.38 dd (16.4, 4.6) 2.70 dd (16.4, 11.3)	H-7 H-7	C-6, 7 ^a , 9
		9	130.1			
10/14		130.0	6.88 d (8.7)	H-11/13	C-8, 12	
11/13		114.9	6.77 d (8.7)	H-10/14	C-9	
12		159.2				
<i>N</i> -CH ₃		31.7	3.05 s		C-1, 7	
<i>O</i> -CH ₃		55.9	3.73 s		C-12	
<i>N,O</i> -dimethyl-Tyr-2		15	169.9			
	16	63.7	5.25 dd (9.7, 5.2)	H-17	C-15 ^a , 17 ^a	
	17	34.6	2.61 dd (14.4, 9.7) 2.97 dd (14.4, 5.2)	H-16 H-16	C-16 ^a , 18	
	18	131.0				
	19/23	131.3	6.99 d (8.6)	H-20/22	C-17, 21	
	20/22	115.2	6.56 d (8.6)	H-19/23	C-18	
	26	159.5				
	<i>N</i> -CH ₃	29.7	2.86 s		C-6, C-16	
	<i>O</i> -CH ₃	55.7	3.48 s		C-21	
	Val-thz-ca	24	161.4			
25		150.4				
26		123.6	8.01 s		C-24, 25 ^a , 27 ^a	
27		170.0				
28		57.2	5.33 dd (9.3, 5.5)	NH-28, H-29	C-27 ^a , 29	
29		36.8	2.01 dqq (5.5, 6.8, 6.8)	H-28, H-30, H-31		
30		17.8	0.78 d (6.8)	H-29	C-28, 31	
31		20.8	0.94 d (6.8)	H-29	C-28, 30	
28-NH			8.60 d (9.3)	H-28		
Amha		32	173.3			
	33	44.6	2.60 dq (3.4, 7.0)	H-34, H-38		
	34	52.8	4.09 dddd (12.0, 10.4, 3.4, 2.5)	H-33, H-35, NH-34		
	35	31.9	1.07 m, 1.70 dddd (14.1, 9.2, 7.0, 2.5)	H-34, H-36	C-33	
	36	20.2	1.27 m, 1.45 m	H-35, H-37		
	37	14.6	0.97 t (7.5)	H-36	C-35, 36	
	38	14.4	1.09 d (7.0)	H-33	C-32, 33, 34	
	34-NH		8.51 d (10.4)	H-34		

^a observed only in the spectrum recorded on the spectrometer (600 MHz).

2-4. Kakeromamide A の絶対配置

Kakeromamide A に含まれるアミノ酸の絶対配置を改良 Marfey 法^{40,41}によって決定した。Kakeromamide A (100 µg) の加水分解物を L-FDLA と反応させることによって、FDLA 体へと誘導後、LC-MS 分析に付した。5M HCl, 100°C の条件で処理した D-および L-標品アミノ酸の FDLA 誘導体と天然物由来の FDLA 誘導体との保持時間を比較することで、Val, 2つの *N,O*-dimethyl-Tyr および Val-thz-ca のアミノ残基はいずれも L 体であると決定でき、β-アミノ酸である Amha は (2*S*,3*R*)-Amha と決定した (Figure 2-4)。

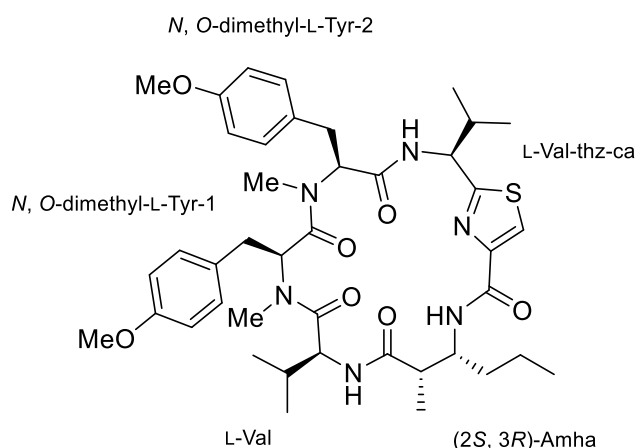


Figure 2-4. Kakeromamide A の構造.

2-5. Kakeromamide A の生物活性

Val を hydroxyisovaleric acid に置き換えた類似のアミノ酸配列を持つ環状デプシペプチド ulongamide D³⁹ (Figure 2-5) は、ヒト口腔がん細胞株 KB 細胞およびヒト大腸がん由来細胞株 LoVo に対して細胞毒性を示し、それぞれ 1 µM および 5 µM の低い IC₅₀ 値を示した。しかしながら、kakeromamide A は HeLa 細胞に対して 10 µM の IC₅₀ 値で毒性を示したが、P388 細胞に対しては 10 µM でも細胞毒性を示さなかった。

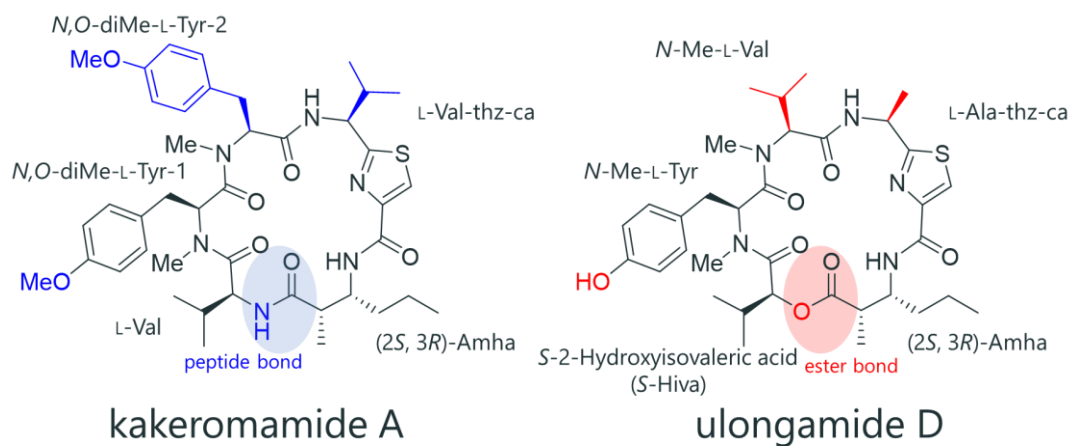


Figure 2-5. Kakeromamide A と ulongamide D の構造およびそれらの違い。

一方で、マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化モデル^{42,43}において、kakeromamide A は神経幹細胞 (NSCs) に対して細胞数に影響は与えず、10 μ M の濃度で NSCs に対してアストロサイト分化マーカーである GFAP の発現量を増加させる傾向にあることが明らかになった。一方、ニューロン選択染色試薬である NeuO⁴⁴ の蛍光強度が減少しており、神経幹細胞 (NSC) からアストロサイトへの分化を促進する活性が示唆された (Figure 2-6)。

また、共同研究者により、kakeromamide A の全合成が達成され、ここで提案した化学構造が確認されるとともに、合成化合物においても GFAP の発現量が増加する傾向にあることが確認された。以上により、kakeromamide A は神経幹細胞からアストロサイトへの分化促進に関与していることが明らかとなった (Figure. 2-7)⁴⁵。

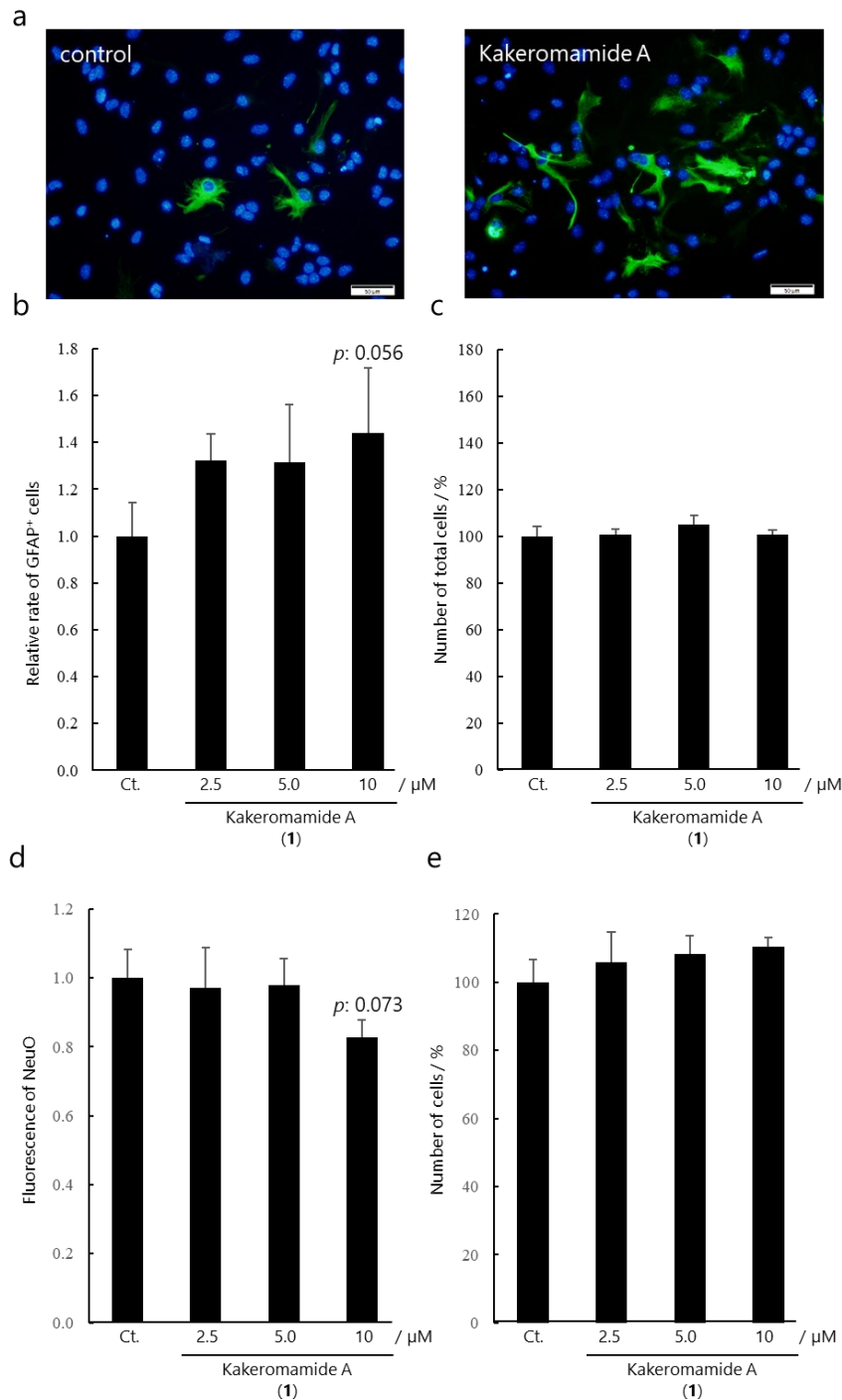


Figure 2-6. 神経分化調節活性試験. a: DMSO もしくは 10 μM kakeromamide A で処理した NSCs の蛍光写真 (right, 倍率 x20, 青: Hoechst 33342, 緑: anti-Glial Fibrillary Acidic Proteins (GFAP), スケールバー: 50 μm). b: 各サンプルで処理した細胞の GFAP 陽性細胞のコントロール比 ($n = 4$, means \pm S.D., Dunnett test). c: 各サンプルで処理した NSCs の細胞数のコントロールに対する細胞数の割合 ($n = 4$, mean \pm S.D.), d: 各濃度の kakeromamide A で処理した NSCs のニューロン (NeuO) への分化率 (Ct.=DMSO, コントロール比, $n = 4$, mean \pm S.D., Dunnett test). e: 各濃度の kakeromamide A で処理した NSCs の細胞数の割合 ($n = 4$, mean \pm S.D.).

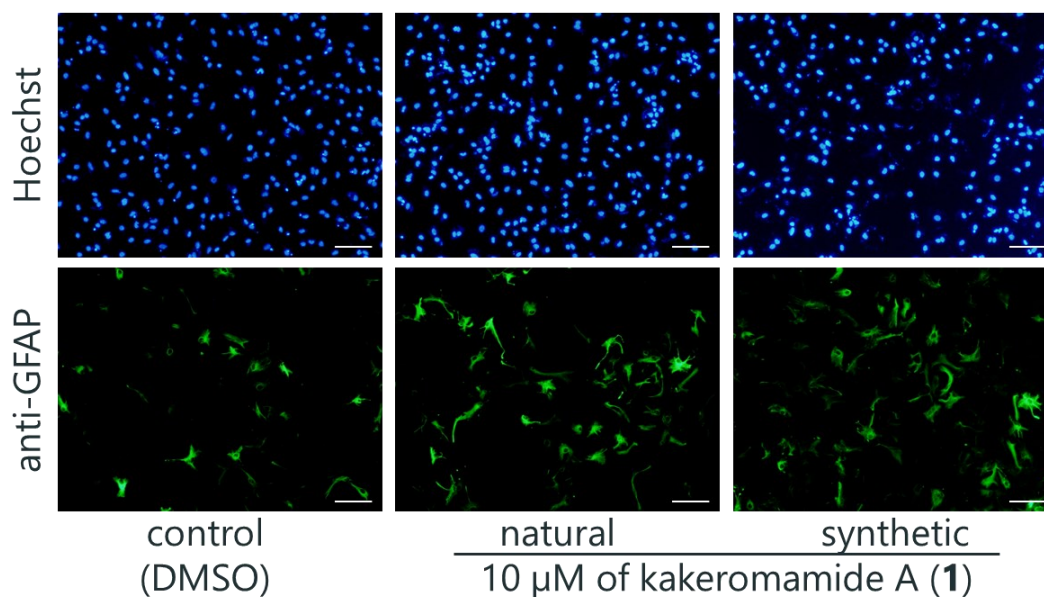


Figure 2-7. 天然由来および合成 kakeromamide A の神経分化調節活性試験結果 (蛍光写真, 青: Hoechst 33342, 緑: GFAP, スケールバー: 100 μ m).

脳細胞の大部分を占めるアストロサイトは、中枢神経系を構成するグリア細胞のひとつであり、互いに密接して存在し、シナプス伝達の調節やニューロンの保護、長期記憶形成のサポートなど多くの重要な機能を担うことが知られている^{46,47}。中枢神経系が何らかの傷害を受けた際には過剰に増殖し、病理学的な異常の目印として機能するということが明らかとなっており⁴⁸、ストレスによってアストロサイト数が減少する可能性やアストロサイト関連マーカーの減少とうつ症状の関連性が指摘されるほか、中枢神経系におけるアストロサイトの重要性が多数報告されている⁴⁸⁻⁵¹。

近年、成人脳内の海馬や側脳室といった一部の領域に存在する NSC が分裂を繰り返しながら、必要に応じてニューロンやアストロサイトなどを一生涯にわたり産生し続けているということが明らかになっている (Figure. 2-8)⁵²⁻⁵⁴。この発見により、中枢神経系損傷によって発症する各種疾患に対する治療や予防と、神経幹細胞の増殖・分化の調節との関連性に注目が集まっている。今回得られた kakeromamide A は、海洋性環状ペプチドが神経幹細胞の分化を誘導する初めての例であり、再生医療のリード化合物や神経分化系の研究用プローブとしての応用が期待される。

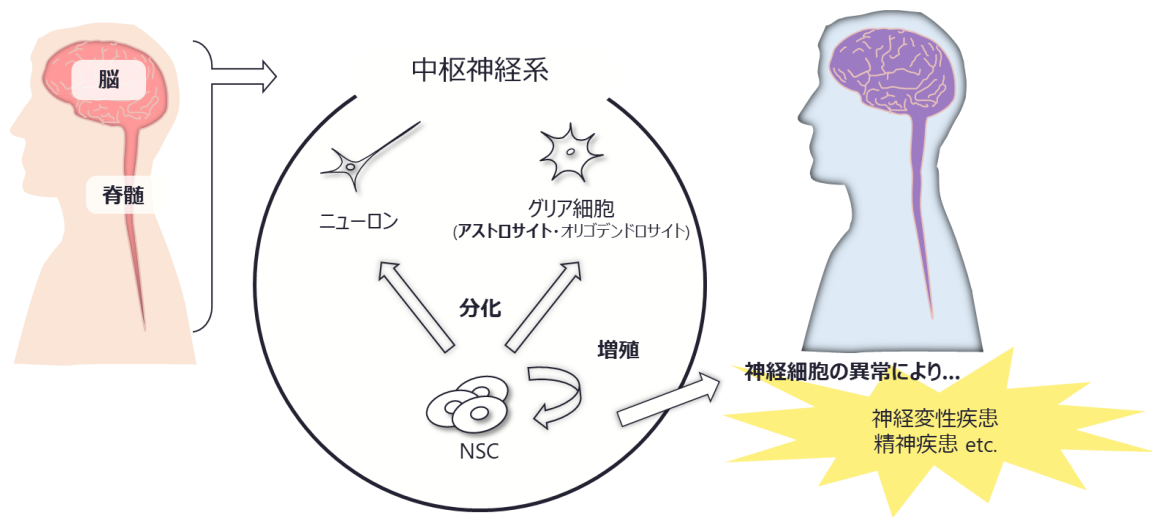


Figure 2-8. 中枢神経系における神経細胞の概略.

2-6. 結言

非タンパク質構成アミノ酸を含む特異な構造を有するペプチド性化合物の豊富な供給源である海洋シアノバクテリアに着目して、MS 分析を適用した精製を行い、未知の微量成分について探索を行った。各精製段階で得られた画分について、取得した MS データをもとに海洋天然化合物データベースと照合して、未知のイオンピークを与える画分について精製を進め、海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* から新規環状ペプチド kakeromamide A を見出すことに成功した。各種スペクトル解析の結果、本化合物は非タンパク質構成アミノ酸を含む環状ペプチドであると決定した。なお、各アミノ酸残基の絶対配置は改良 Marfey 法により決定した。本化合物は ESC を用いた神経分化誘導系において、NSC からアストロサイトへの分化を促進する初の海洋環状ペプチドであった。本化合物は NSC 分化調節のメカニズム解明に役立つ分子ツールとして、神経の再生医療への応用が期待される。

2-7. 第2章の実験項

2-7-1. 実験装置

各種 NMR スペクトルは Bruker Avance 400 MHz 型もしくは 600 MHz 型スペクトルメーター (Bruker Corporation, Billerica, MA, 米国) を用いて測定した。¹H および ¹³C NMR の化学シフト値は, δ_{H} 1.94, δ_{C} 1.32 および 118.26 の CHD₂CN の溶媒ピークを参照した。FABMS は, JMS-GCMateII, また, HRFABMS は, HRFABMS JMS-SX102A 質量分析計 (日本電子株式会社, 東京, 日本) を用いて, 3-NBA をマトリックスとして測定した。UV スペクトルは, Ultrospec 3000 分光光度計 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Sweden) を用いて測定した。IR スペクトルは, JIR-WINSPEC50 分光計 (日本電子株式会社) で測定した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 Olympus IX71 および DP72 digital camera (オリンパス株式会社, 東京, 日本) を用いて撮影した。

2-7-2. 生物材料

海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* は 2007 年 1 月に鹿児島県加計呂麻島 (N 28° 04.67', E 129° 18.42') で採集し, 実験で使用するまで -25°C で保存した。

2-7-3. 精製

Moorea bouillonii (128 g, 湿重量) を MeOH (300 mL×2) で抽出・濃縮後, H₂O と CHCl₃ を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, ODS フラッシュクロマトグラフィー (50%, 70% MeOH, 70%, 85% MeCN, 100% MeOH, CHCl₃/MeOH/H₂O=6/4/1) に付して, 6 つの画分を得た。これらのうち, 70% および 85% MeCN 溶出画分を合一して, 逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250×20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 80-100% MeOH] にて 11 画分を得た。さらに, 逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250×10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 50% MeCN] によって, 精製を進めることで, 無色非晶質固体の kakeromamide A (1.2 mg, 収率 9.4×10⁻⁶%) を得た。

Kakeromamide A: colorless amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{23.8} +6.2^{\circ}$ (*c* 0.065, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 203 (4.56), 226 (4.30) nm; IR (KBr card) ν_{max} 3300, 2959, 2931, 2872, 1733, 1647, 1612, 1541, 1514, 1469, 1248, 1179, 1087, 1034, 823 cm⁻¹; FABMS *m/z* 791 [M+H]⁺; HRFABMS *m/z* 791.4171 [M+H]⁺

(calcd for C₄₂H₅₉N₆O₇S, Δ +0.5 mDa); ¹H and ¹³C NMR data see Table 2-1.

2-7-4. 改良 Marfey 法

Kakeromamide A (100 μg) を 50 μL の 5M HCl 溶液, 100°C で酸加水分解に付し, 12 時間後に反応液を 60°C, 窒素気流下で乾固させた。乾固後のサンプルに 100 μL の 1% L-FDLA 溶液 (w/v, acetone) および 50 μL の 0.1M NaHCO₃ 水溶液に加え, 80°C で 3 分間反応させた。反応後, 25 μL の 0.2M HCl を加えて中和した。反応混合物を 100 μL の MeCN で溶解して LC-MS 分析用サンプルとした。同様に, 標品のアミノ酸についても各処理を行い, 標品アミノ酸 FDLA 誘導体 LC-MS 分析用サンプルを調製後, LC-MS 分析 [カラム; 3C₁₈-AR-II (50 x 2.0 mm), 移動相; 0.1%ギ酸 15-70% MeCN, MS; ポジティブモード] に付した。

2-7-5. 細胞毒性試験

HeLa 細胞の培養は, 37°C, 5% CO₂ の条件下で行い, DMEM (low glucose, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) に 10% FBS (Biowest, Nuaille, 仏国), 2 μg/mL の gentamicin, 1% antibiotic-antimycotic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 米国) を加えて調製した培地を用いた。P388 細胞の培養は, 37°C, 5% CO₂ の条件下で行い, RPMI (富士フイルム和光純薬株式会社) に 10% FBS (Biowest), 6.0 × 10⁻⁵ % HEDS 溶液 (2,2'-dithiobisethanol), 40 μg/mL の kanamycin sulfate を加えた培地を用いた。HeLa 細胞および P388 細胞が培養された培地を, 96 ウェルプレートに 10000 cells/well になるよう 200 μL ずつ加え, 24 時間インキュベートした後, サンプルを添加して, さらに 72 時間インキュベートした。1 mg/mL MTT 溶液を 50 μL ずつ添加し, 3 時間インキュベートした。その後, 培地とともに MTT 試薬を除去し, DMSO を各ウェルに 150 μL 添加し, 生細胞から生じるホルマザン色素量を 650 nm での吸光度を測定することで, IC₅₀ 値を決定した。

2-7-6. NSC の選択的誘導法

既報の NSC 誘導方法に改良を加えた手法^{42,43}を用いて, マウス ES 細胞より選択的に NSC を誘導した。マウス ES 細胞 J1 株 (ATCC) を 0.1%ゼラチンコート済のディッシュにてマイトマイシン C 処理済みのマウス胚性線維芽細胞 (MEF) と共培養した。まず MEF 細胞を除

去し, 20 μ L の ES 培地に 7500 個の ES 細胞が含まれる液滴を作製した。この液滴をハンギングドロップ法によって 72 時間培養することで, 胚様体 (embryoid body; EB) を形成させた。得られた EB を低接着プレートに移し, 20 ng/mL の組換えヒト上皮成長因子 (rhEGF, R&D Systems, MN, 米国) と, 20 ng/mL の組換えヒト繊維芽細胞成長因子 (rhFGF-2, R&D Systems) を添加した Neuron Culture Medium (住友ベークライト株式会社, 東京, 日本) を培養液として, さらに 96 時間浮遊培養した。その後, マトリゲル (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, 米国) でコートしたディッシュに EB を移し, NSC 維持用 Neurobasal medium [2% B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 米国), 1% P/S, 20 ng/mL rhEGF, 20 ng/mL rhFGF-2 を含む Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific)] で 20 日間培養した。最後に EB から遊走した NSC を回収し, 凍結保存した。

2-7-7. 神経分化調節活性試験

凍結保存した NSC を NSC 維持培地 [2% MACS NeuroBrew-21 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 独国), 1% P/S, 20 ng/mL rhEGF, 20 ng/mL rhFGF-2 を含む MACS Neuro Medium (Miltenyi Biotec)] で 10000 個/well ずつになるように調製してマトリゲルコートした 96 well プレートに播種し, 72 時間培養を行った。その後, 化合物を含む分化誘導培地 [DMEM と Ham's F-12 (富士フイルム和光純薬株式会社) の 1 : 1 混合培地, 2% B-27, 1% P/S, 1% FBS] を用いて, 72 時間培養した。

2-7-8. 細胞染色

ニューロン生細胞を選択的に染色できる蛍光プローブ NeuO を用いてニューロンを標識した。NeuO (2 μ M) を含む Opti-MEM I (1X, Thermo Fisher Scientific) および GlutaMAX Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) 溶液を用いて, 37°C で 1 時間反応させた。その後, Hoechst 33342 (1:1000, 株式会社同仁化学研究所, 熊本, 日本) で細胞核を染色後, 顕微鏡を用いて撮影した。取得した蛍光画像は Cell Profiler software⁵⁵ にて解析し, 全細胞数に対する NeuO 陽性細胞数の割合を, ニューロンへの分化誘導率として算出した。

2-7-9. 免疫蛍光染色法

アストロサイトの分化マーカーである GFAP に対する抗体を用いて免疫染色を行った。細胞を 4% PFA (富士フイルム和光純薬株式会社) 溶液を用いて、4°C で 30 分間インキュベートすることで、細胞を固定した。固定後、5% スキムミルク (富士フイルム和光純薬株式会社) と 0.2% TritonX-100 (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, US) を含む PBS でさらに 30 分間、4°C でインキュベートした。続いて、anti-GFAP 抗体 (マウスモノクローナル抗体, 1:500, Merck Millipore, Burlington, MA, 米国) 溶液で 4°C, 一晩反応させた。洗浄後、Alexa fluor 488 で蛍光標識された抗マウス IgG (1:1000, Thermo Fisher Scientific) 溶液を室温で 2 時間反応させた。洗浄後、Hoechst 33342 (1:1000, 株式会社同仁化学研究所) を含む 0.2% TritonX-100 溶液 (1:1000) で細胞核を染色した後に顕微鏡を用いて撮影した。取得した蛍光画像は CellProfiler software にて解析し、全細胞数に対する各マーカー陽性細胞数の割合を、アストロサイトへの分化誘導率として算出した。

2-7-10. 統計分析

統計解析ソフトウェア EZR⁵⁶ を用いて、一元配置分散分析後に、Dunnett の多重比較検定を使用してコントロール群と各サンプル処理群の 2 グループ間の差異を評価した。

2-2-11. Supporting Information

リスト

Figure S2-1. Kakeromamide A の HRFABMS (pos.).

Figure S2-2. Kakeromamide A の ^1H NMR スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

Figure S2-3. Kakeromamide A の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3CN , 100 MHz).

Figure S2-4. Kakeromamide A の COSY スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

Figure S2-5. Kakeromamide A の HMQC スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

Figure S2-6. Kakeromamide A の HMBC スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

Figure S2-7. Kakeromamide A の HMBC スペクトル (CD_3CN , 600 MHz).

Table S2-1. 標品アミノ酸の L-FDLA 誘導体と kakeromamide A 酸加水分解物の L-FDLA 誘導体の溶出時間

[Mass Spectrum]
Data : B0223-001 Date : 23-Feb-2010 15:33
Sample : -
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [EF-Linear]
RT : 1.47 min Scan# : 7
BP : m/z 791.4171 Int. : 2.64
Output m/z range : 674.0000 to 860.0000 Cut Level : 0.00 %

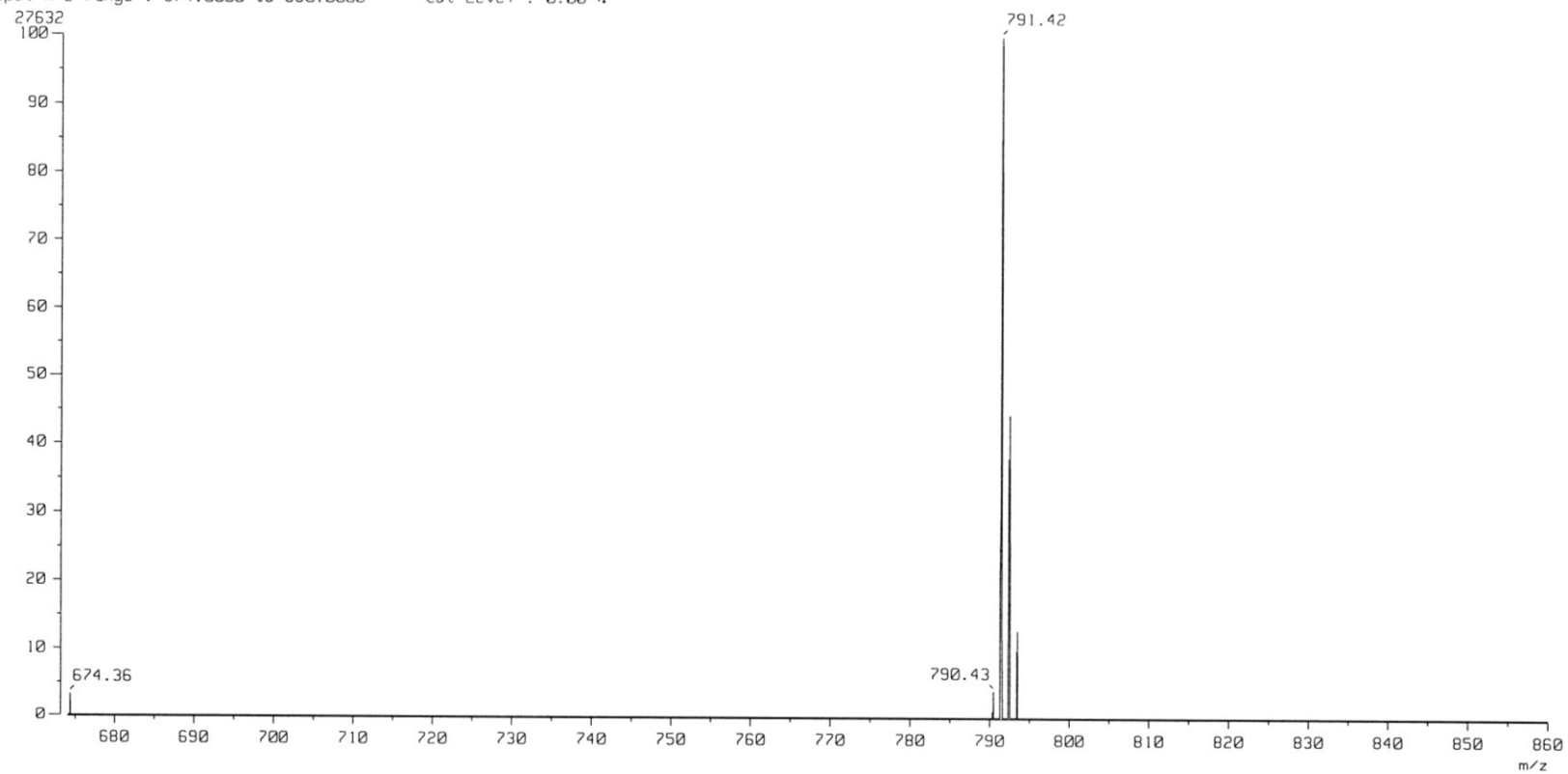


Figure S2-1. Kakeromamide A O HRFABMS (pos.).

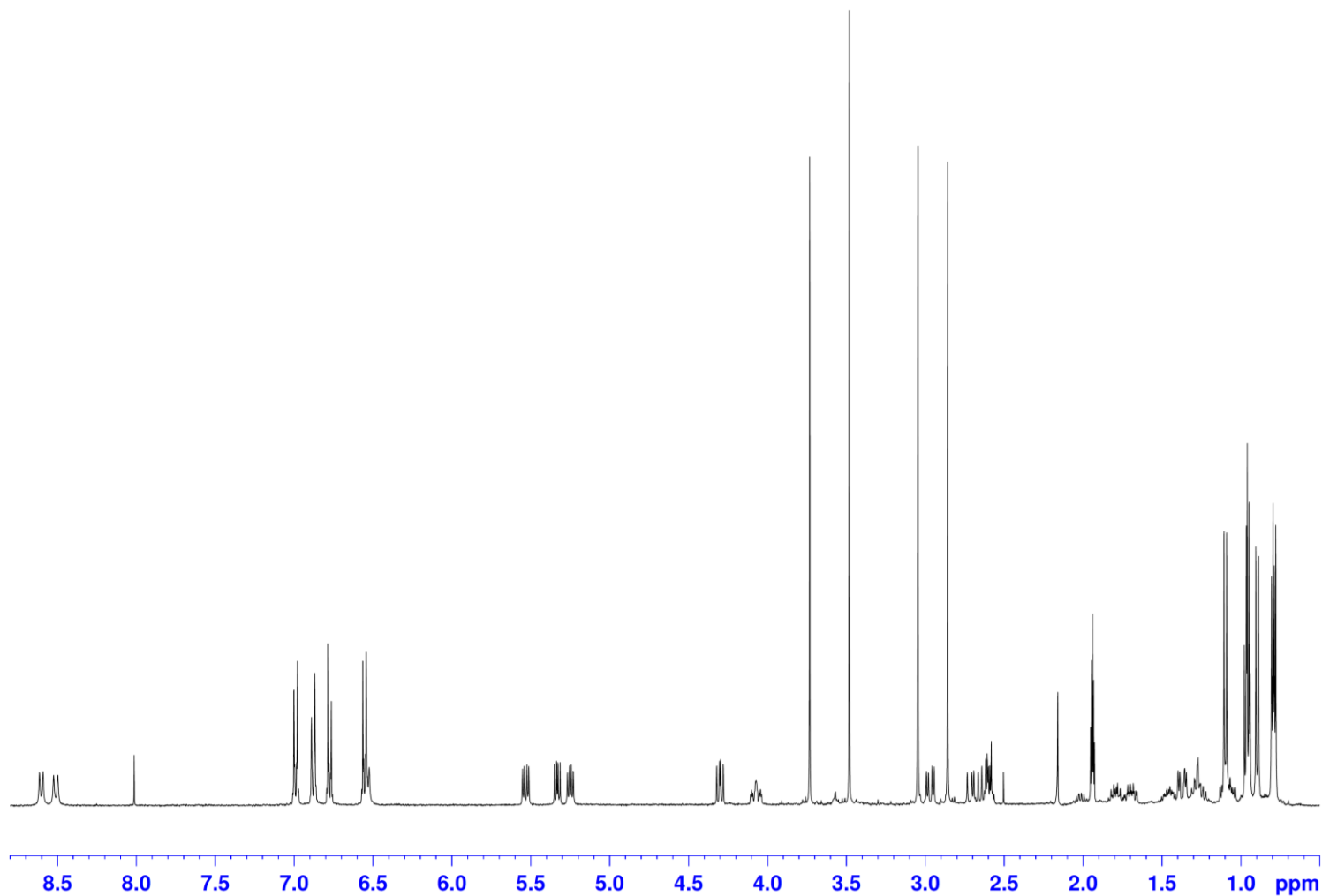


Figure S2-2. Kakeromamide A の ^1H NMR スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

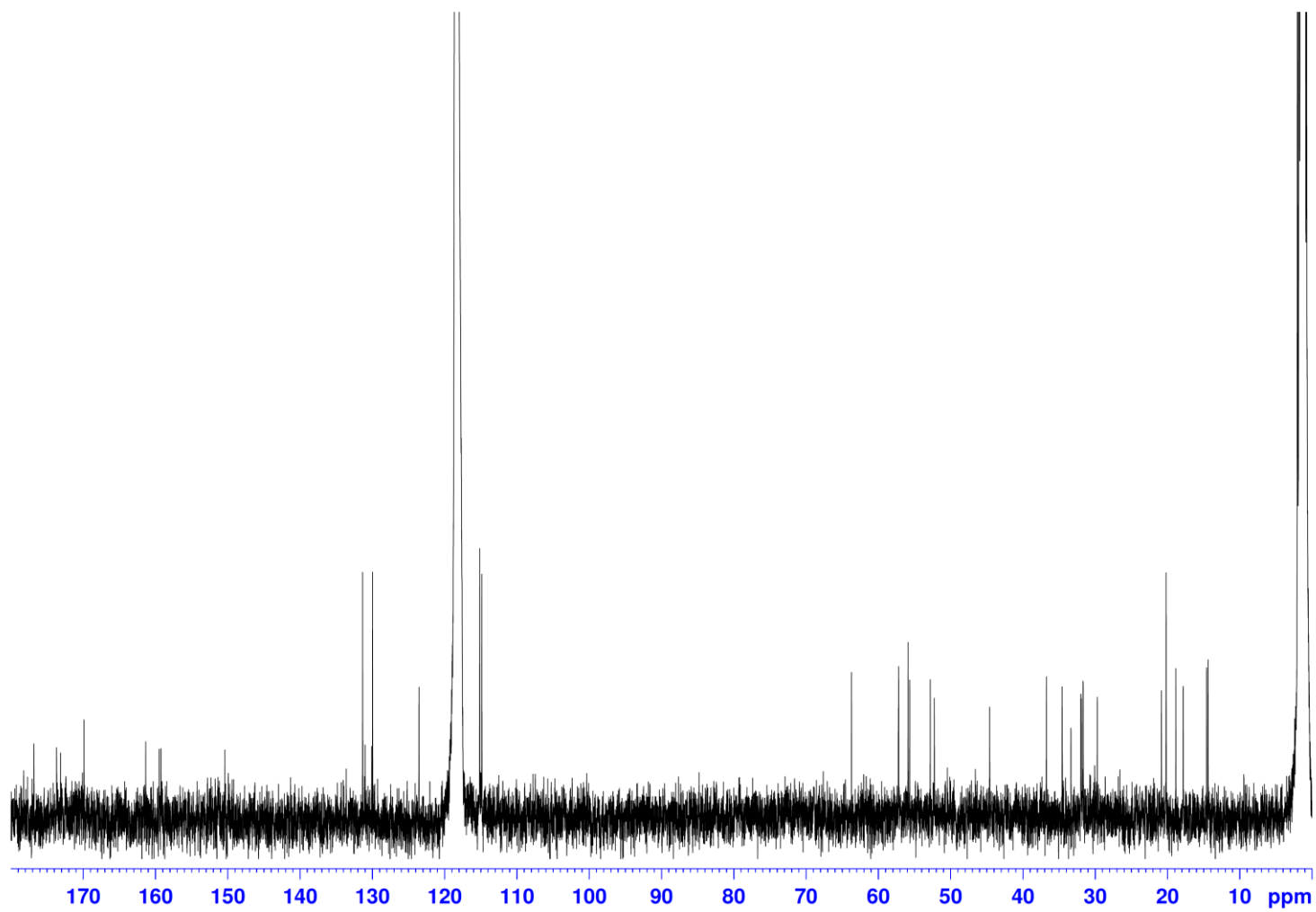


Figure S2-3. Kakeromamide A の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3CN , 100 MHz).

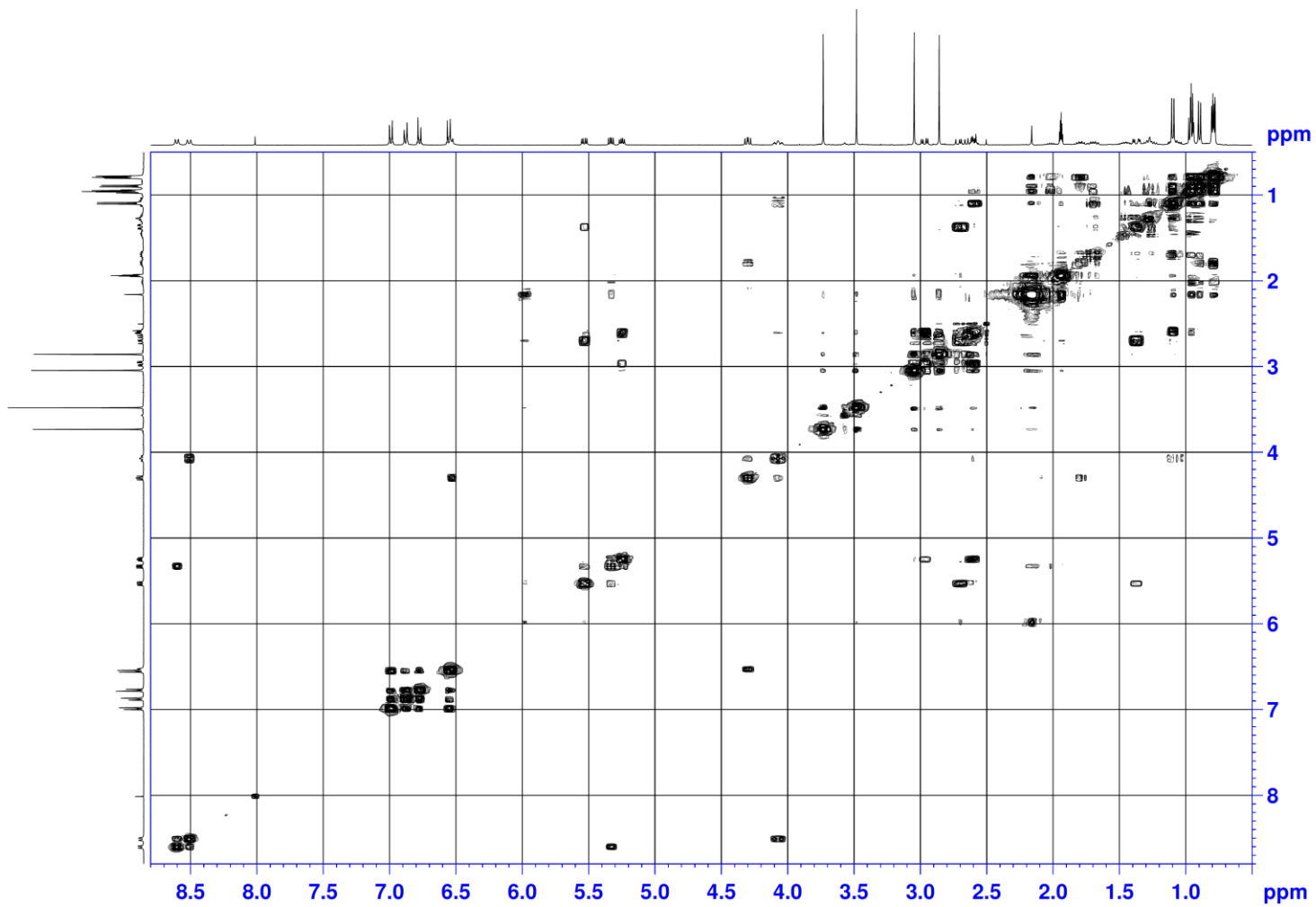


Figure S2-4. Kakeromamide A の COSY スペクトル (CD₃CN, 400 MHz).

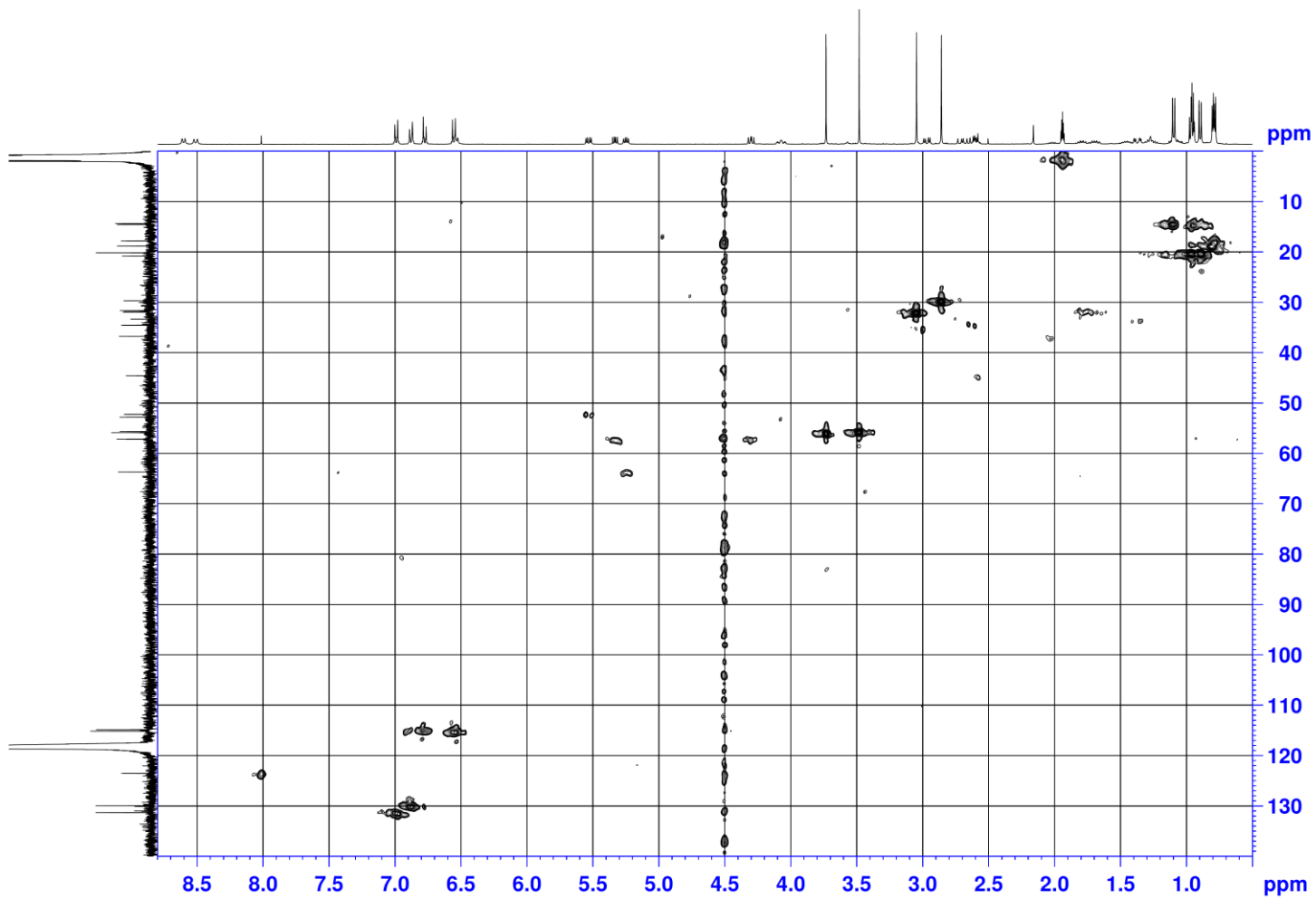


Figure S2-5. Kakeromamide A の HMQC スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

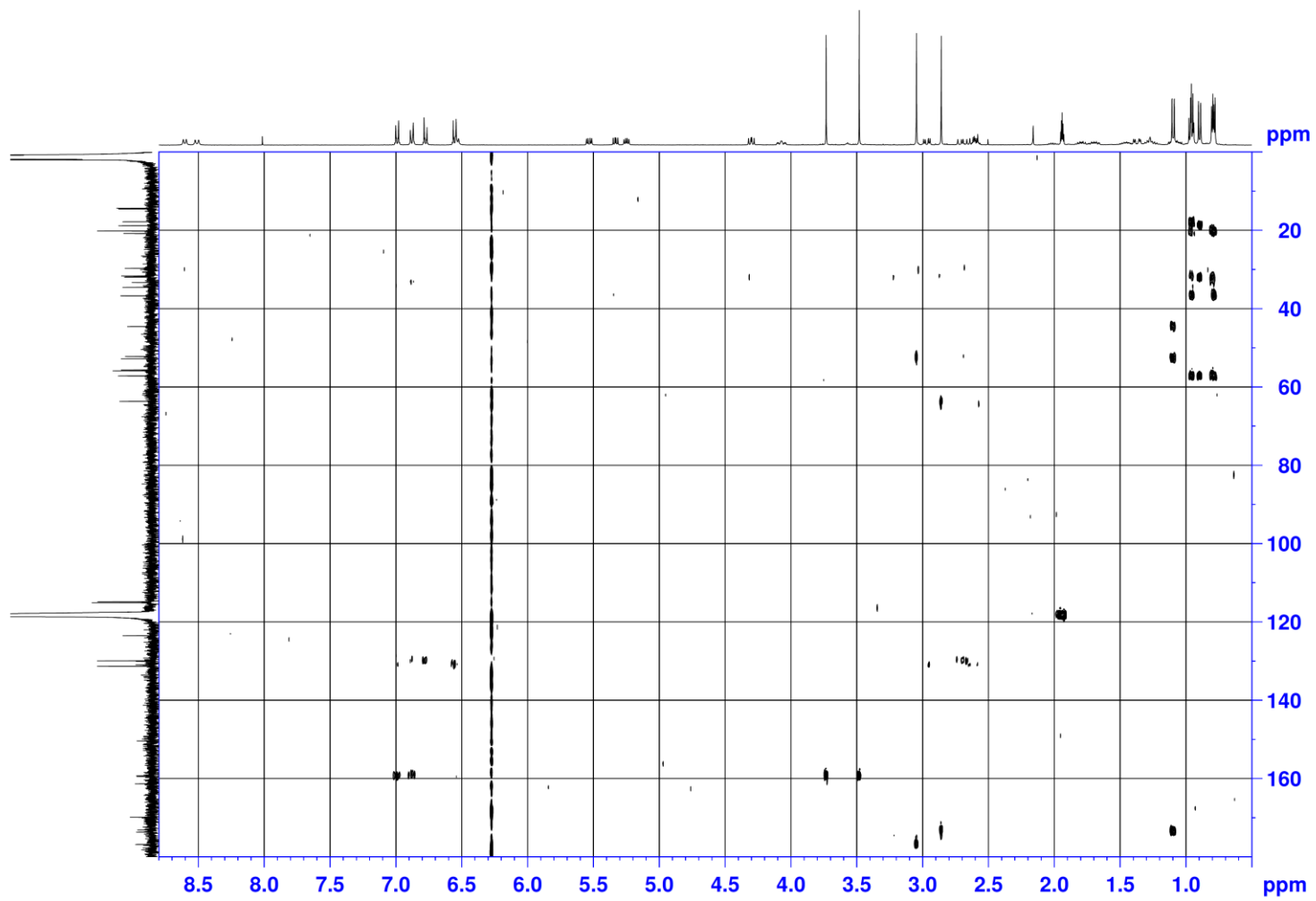


Figure S2-6. Kakeromamide A の HMBC スペクトル (CD_3CN , 400 MHz).

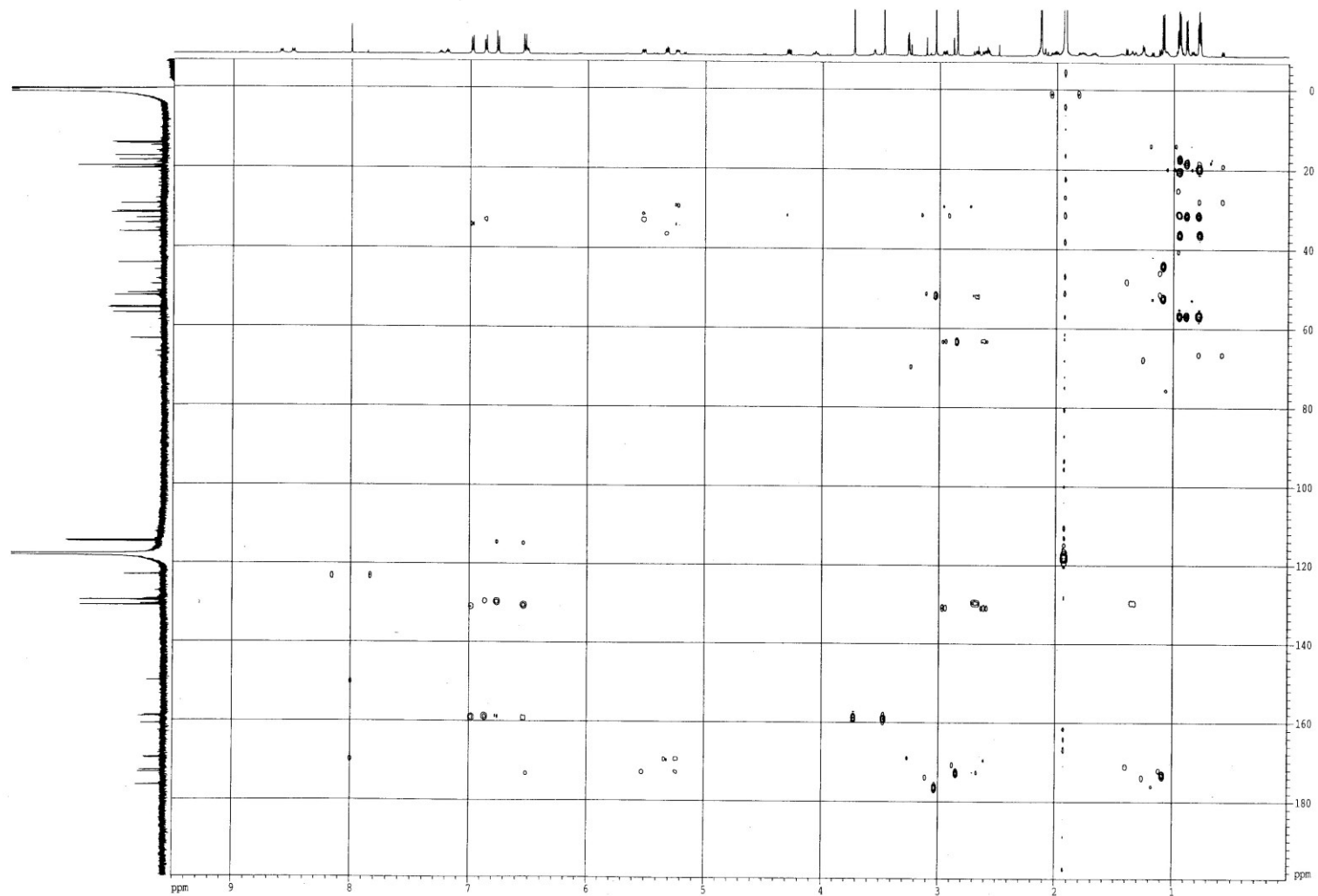


Figure S2-7. Kakeromamide A の HMBC スペクトル (CD₃CN, 600 MHz).

Table S2-1. 標品アミノ酸の L-FDLA 誘導体と kakeromamide A 酸加水分解物の L-FDLA 誘導体の溶出時間

アミノ酸残基	<i>N,O</i> -diMeTyr		Val		Val-thz-ca		Amha				
	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	
立体											
標品アミノ酸の L-FDLA 誘導体の溶出時間 (min)	15.09	15.69	12.67	16.34	15.60	16.86	15.00	15.41	17.35	18.13	
kakeromamide A 酸加水分解物の L-FDLA 誘導体の溶出時間 (min)	15.20		12.83		15.84		18.18				

第3章 Halistanol sulfate 類に関する研究

3-1. 研究背景

ヒストンは真核生物の核内で DNA を巻き付け、格納すると共にメチル化やアセチル化などの化学修飾を受けることで遺伝子の発現を制御している。ヒストンのアセチル化は HAT および HDAC によって制御されており、一般的にアセチル化は遺伝子の転写活性化、脱アセチル化は遺伝子の転写不活性化をされると考えられている^{57,58}。このような遺伝子のスイッチング機構は細胞のがん化や分化に大きく関係していることから、抗がん剤のターゲットとして注目されている。

ヒトには 18 種類の HDAC サブタイプが知られ、4 つのクラスに分類されている (Figure 3-1)。これらには、多様な基質特異性と生理的機能が知られ、中でもクラス III に属し、NAD⁺依存性リジン脱アセチル活性を有するタイプの HDACs は、サーチュインと総称されている。サーチュインは、ヒストン H3 や H4, PGC-1 α , p53, NF- κ B, FOXO など様々なタンパク質の脱アセチル化に関与することで、エネルギー代謝、ゲノム安定性、長寿、老化、加齢に伴う病態を調節している⁵⁹。ヒトには 7 種類のサーチュイン (SIRT1-7) が存在しており、それらは、5 つのサブクラスに分類されている。サブクラス I に分類される SIRT1-3 は強力な脱アセチル化活性を有している。

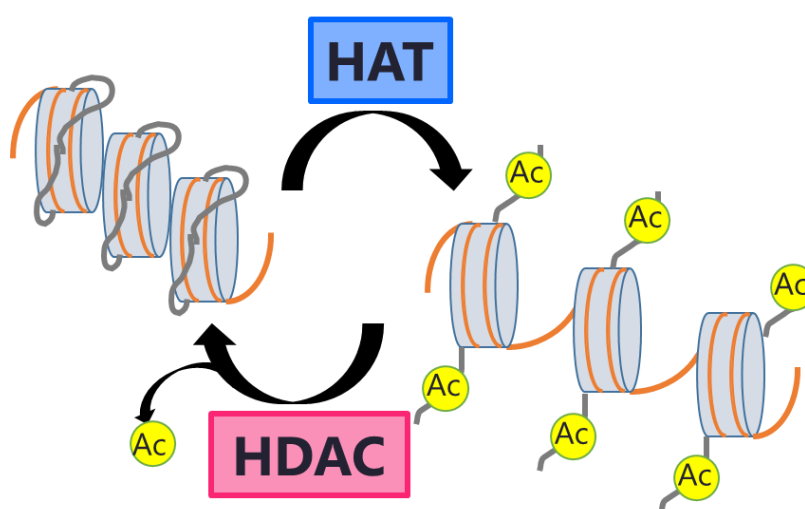


Figure 3-1. ヒストンテールのアセチル化による転写制御.

一方で、老化に関与する細胞内器官であるミトコンドリアには SIRT3-5 が存在しており、

中でも, SIRT3 は, クエン酸回路サイクル, 尿素サイクル, アミノ酸代謝, 脂肪酸酸化, 電子伝達鎖と酸化的リン酸化, 活性酸素解毒, ミトコンドリア動態, ミトコンドリア未知タンパク質応答など^{60,61} のミトコンドリア代謝を制御する上で重要な役割を果たすと考えられている。腎臓, 心臓, 脳, 肝臓組織など, 代謝の活発な細胞には特に多くのミトコンドリアが存在しており, それに合わせて SIRT3 はこれら組織で広く発現している⁶²。そのため, SIRT3 は老化, 神経変性, 肝臓疾患, 腎臓疾患, 心臓疾患, その他の代謝性疾患に加えて, がんの発生にも関与していることが報告されている^{63,64}。さらには, 核内において H4K16 および H3K9 の脱アセチル化に関与していることも明らかになっている⁶⁵。

このように, ミトコンドリアにおける主要な脱アセチル化酵素 SIRT3 は, ミトコンドリア内で幅広い役割を担っており, 現在までに SIRT3 が持つ生物学的機能が明らかにされつつあるため, 近年, SIRT3 はミトコンドリア代謝制御因子としての老化や寿命制御の役割だけでなく, 治療標的としても注目されている。しかしながら, 治療を目的とした有効な SIRT3 活性化剤や阻害剤は未だ明らかになっていない⁶⁶。

そこで本章では, 多様な SIRT3 の機能解明に役立つ分子ツールを求めて, 海洋無脊椎動物より SIRT3 阻害剤の探索研究を行った⁶⁷。

3-2. Halistanol sulfate 類の単離と精製

日本周辺および東南アジアで採集した海洋生物 908 検体の粗抽出物サンプル計 1816 サンプルについてスクリーニングを実施した結果, 46 サンプルに SIRT3 阻害活性が認められた。そのうち, 90%以上の高い阻害活性率を示したサンプル群から東京都八丈島で採集した海綿 *Halichondria* sp. に着目して活性成分の単離・精製を進めた。

海綿 *Halichondria* sp. (695 g, 湿重量) を MeOH で抽出して濃縮後, Kupchan 分画に付した。60% MeOH 層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーによって 6 分画し, その後, HPLC を用いた多段階の精製を行い, 6.6 mg の halistanol sulfates I (**2**) および 3.0 mg の halistanol sulfates J (**3**) をそれぞれ得た ($9.5 \times 10^{-3}\%$ and $5.5 \times 10^{-3}\%$ yield based on wet weights)。合わせて既知化合物である halistanol sulfate (**1**) も 301.4 mg 得た (Scheme 3-1, Figure 3-2)。

Halichondria sp. 695 g wet wt.		
extraction and partition MeOH H ₂ O / CHCl ₃ , <i>n</i> -BuOH <i>n</i> -hex / 90% MeOH CHCl ₃ / 60% MeOH ODS flash CC (φ 3.3×9.0 cm) 0, 20, 50, 70, 100% MeOH, CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O 6:4:1		
Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, 75% MeOH with 200 mM NaClO ₄ , RI		
halistanol sulfate (1) 301.4 mg (3.5 × 10 ⁻² %)	Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, 80% MeOH with 200 mM NaClO ₄ , RI	Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, 75% MeOH with 200 mM NaClO ₄ , RI
	halistanol sulfate I (2) 6.6 mg (9.5 × 10 ⁻³ %)	Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, 90% MeOH with 200 mM NaClO ₄ , RI
		Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, recycling, 90% MeOH with 200 mM NaClO ₄ , RI
		halistanol sulfate J (3) 3.0 mg (5.5 × 10 ⁻³ %)

Scheme 3-1. Halistanol sulfate 類の単離スキーム.

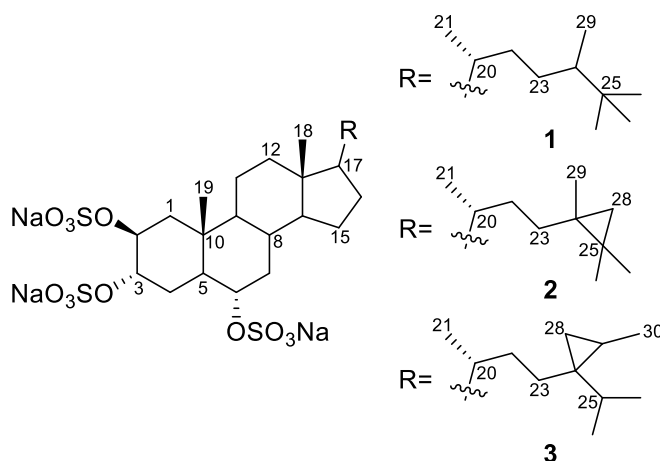


Figure 3-2. Halistanol sulfate 類 (1-3) の構造.

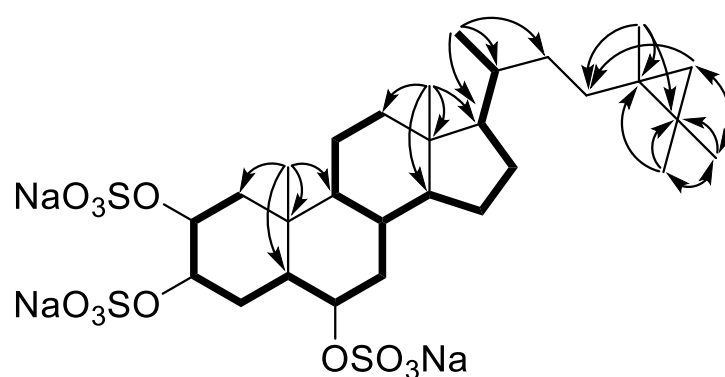
3-3. Halistanol sulfate 類の構造決定

主成分 (301.4 mg) の ESIMS 分析により, m/z 731.3 [M-Na]⁻, 611.3 [M-Na-NaSO₄H]⁻, 509.4 [M-Na-NaSO₄H-NaSO₃]⁻, 491.3 [M-Na-2 (NaSO₄H)]⁻, 354.1 [M-2Na]²⁻ が観測されたことから分子内に硫酸エステルが3つ含まれていることが示唆された。HRESIMS の測定において, m/z 731.2194 にナトリウム脱離イオンピーク [M-Na]⁻ が観測されたことにより, 分子式は C₂₉H₄₉Na₃O₁₂S₃ (calcd for C₂₉H₄₉Na₂O₁₂S₃ m/z 731.2187) と推定された。¹H および ¹³C NMR データを文献値と比較することによって, 主成分を halistanol sulfate (1) と同定した⁶⁸。

Halistanol sulfate I (2) の分子式は HRESIMS の測定において, m/z 729.2027 にナトリウム脱離イオンピーク [M-Na]⁻ が観測されたことにより, C₂₉H₄₇Na₃O₁₂S₃ と決定した (calcd for

C₂₉H₄₇Na₂O₁₂S₃ m/z 729.2031)。また、**1**と同様に ESIMS 分析において、 m/z 729.2 [M-Na]⁺, 609.3 [729.2-NaSO₄H]⁺, and 489.3 [609.3-NaSO₃H]⁺ が検出されたことから、分子内に硫酸エステルが 3 つ含まれていることが示唆された。また、赤外分光スペクトルにおいて、**2** は 1248 および 1220 cm⁻¹ 付近に極大吸収を有しており、分子内に硫酸エステル基が存在することが支持された。

2 の ¹H および ¹³C NMR スペクトル (Table 3-1) において、**1** と共通の構造、すなわち、2 つのシングレットメチルシグナル H-18, H-19 (δ_H 0.69, 1.06) と 3 つの低磁場シフトした oxymethine シグナル H-2, H-3, H-6 (δ_H 4.82, 4.74 および 4.19) が観測された。COSY および HMBC スペクトルをもとに、**2** に **1** と共通のステロイドコア構造 (C-1 から 22) の存在が示唆された (Figure 3.1)。**2** と **1** との構造の明確な違いは側鎖の末端、すなわち、**1** で観測された *t*-ブチル基由来の特徴的なシグナル (δ_H 0.86) の代わりに、**2** には、高磁場シフトした 2 つのダブルレットメチレンシグナル (δ_H 0.06 and 0.11) が観測され、シクロプロパン環が存在していることが示唆された。この末端構造の詳細は、H-29/C-23, 24, 25, および 28, および H-26 と 27/C-24, 25 および 28 の HMBC 相関から明らかとなった。残りの結合、つまり C-22 と C-23 はそれぞれ重なり合っているため、COSY および HMBC スペクトルにおいて、それらの確かな相関性は確認できなかったが、HRESIMS から推定した分子式を満たす唯一の構造は C-22 と C-23 が結合した構造であった (Figure 3-3)。



halistanol sulfate I (**2**)

Figure 3-3. Halistanol sulfate I (**2**) の構造とその COSY および HMBC 相関.

2 の ¹H (J 値含む) ならびに ¹³C NMR スペクトルを **1** と比較することによって、**2** のステロ

イド部分の硫酸エステル基の相対配置は **1** と同様に $2\beta, 3\alpha, 6\alpha$ (δ_c 75.7, 75.7 および 78.9) であることが明らかとなった。また, H-20 の相対配置は化学シフト値および J 値 (δ_c 0.92 d, $J_H = 6.5$ Hz) から $20R^*$ と推測された。一方で, *Pandanus boninensis* の葉から単離されたトリテルペン⁶⁹ は **2** と同じ側鎖構造を持つが, NMR データは $CDCl_3$ 中のものであった。化合物 **2** は, $CDCl_3$ に不溶であるため, $CDCl_3$ 中での NMR データが取得できず, C-24 の立体配置の決定には至らなかった。

Halistanol sulfate J (**3**) の分子式は HRESIMS の測定において, m/z 743.2200 にナトリウム脱離イオンピーク $[M-Na]^+$ が観測されたことにより, **2** と比較して CH_2 分増えた $C_{30}H_{49}Na_3O_{12}S_3$ と決定した (calcd for $C_{30}H_{49}Na_2O_{12}S_3$ m/z 729.2187)。また, ESIMS 分析において, **2** と同様に m/z 743.3 $[M-Na]^+$, 623.3 $[743.3-NaSO_4H]^-$, and 503.3 $[623.3-NaSO_3H]^-$ のイオンピークパターンが検出されたことから, 2 つの硫酸エステルの存在が示唆された。また, 赤外分光スペクトルにおいて, **3** は 1244 および 1220 cm^{-1} 付近に極大吸収を有しており, 分子内に硫酸基が存在することが支持された。

3 の 1H および ^{13}C NMR スペクトル (Table 3-1) において, **2** と類似したシグナルであったことから, 側鎖にシクロプロパン環を持つ **1** の類縁体であることが示唆された。COSY スペクトルの解析により, 3 つのスピンの存在が明らかとなり, HMQC および HMBC スペクトルの解析によって, **1** および **2** と共通のステロイドコア構造 (C-1 から 22) の存在が示唆された (Figure 3-2)。H-29 および H-30/C-24, および H-30/C-28 の HMBC 相関により, 側鎖のシクロプロパン環および **2** と比較して 1 つ多い炭素の配置を決定した。また, H-26 および 27/C-24 の HMBC 相関により, イソプロピル基 (C-25~C-27) が C-24 に結合していることを決定した (Figure 3-4)。

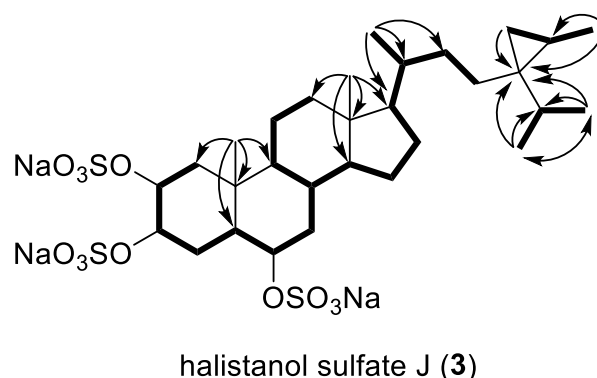


Figure 3-4. Halistanol sulfate J (**3**) の構造とその COSY および HMBC 相関.

3 の ^1H (J 値含む) ならびに ^{13}C NMR スペクトルを **1** と比較することによって, **3** のステロイド部分の硫酸エステル基および H-20 の相対配置も **1** と同様であると決定した。一方で, H-20 の化学シフト値および J 値 ($\delta_{\text{C}} 0.92 \text{ d}, J_{\text{H}} = 6.5 \text{ Hz}$) から $20R^*$ と推測された。一方で, **3** と同じ側鎖構造を持つ weinbersterol disulfate B^{70} および ibisterol sulfate⁷¹ のいずれにおいても共通する側鎖の立体配置は決定されておらず, **3** の C-24 および C-28 の立体配置の決定には至らなかった。

Table 3-1. Halistanol Sulfate (1), halistanol Sulfates I (2), および J (3) の NMR スペクトルデータ (CD₃OD, 400/100 MHz)

position	halistanol sulfate (1)		halistanol sulfate I (2)		halistanol sulfate J (3)	
	δ_C	δ_H mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H mult. (<i>J</i> in Hz)
1	39.4	2.09 brd (14.2) 1.46 dd (14.2, 3.5)	39.4	2.10 brd (14.3) 1.48 dd (14.3, 3.8)	39.3	2.10 brd (14.3) 1.47 dd (14.3, 3.5)
2	75.7	4.80 m	75.7	4.82 m	75.7	4.83 m
3	75.7	4.75 m	75.7	4.74 m	75.7	4.74 m
4	25.3	2.29 brd (14.7) 1.80 ddd (14.7, 12.8, 2.3)	25.3	2.29 brd (14.5) 1.80 dt (14.5, 2.5)	25.3	2.29 brd (14.7) 1.80 ddd (14.7, 12.8, 2.5)
5	45.5	1.65 ddd (12.8, 10.7, 2.4)	45.5	1.65 ddd (12.4, 10.4, 2.5)	45.5	1.65 ddd (12.8, 11.1, 2.5)
6	78.9	4.19 td (10.7, 4.5)	78.9	4.15 td (10.7, 4.5)	78.9	4.19 td (11.1, 4.5)
7	40.2	2.37 ddd (12.5, 4.5, 4.1) 1.03 m	40.2	2.37 dt (12.0, 3.9) 1.02 m	40.2	2.37 dt (12.4, 4.0) 1.03 m
8	35.3	1.54 m	35.3	1.53 m	35.3	1.53 m
9	56.0	0.75 m	56.0	0.76 m	56.0	0.76 m
10	37.8		37.8		37.8	
11	22.0	1.54 m, 1.34 m	22.0	1.56 m, 1.29 m	22.0	1.55 m, 1.31 m
12	41.3	2.01 dt (12.5, 3.0) 1.17 m	41.3	2.00 dt (12.4, 3.0) 1.16 m	41.3	1.99 dt (12.5, 3.0) 1.08 m
13	44.0		44.0		43.9	
14	57.5	1.15 m	57.8	1.11 m	57.5	1.10 m
15	25.3	1.10 m, 1.57 m	25.3	1.10 m, 1.60 m	25.3	1.11 m, 1.61 m
16	29.4	1.36 m, 1.80 m	29.4	1.28 m, 1.90 m	29.4	1.31 m ?, 1.84 m
17	57.8	1.15 m	57.7	1.11 m	57.8	1.10 m
18	12.6	0.69 s	12.6	0.69 s	12.6	0.68 s
19	15.5	1.06 s	15.5	1.06 s	15.5	1.06 s
20	37.9	1.35 m	37.8	1.35 m	38.0	1.28 m
21	19.7	0.95 d (6.7)	19.5	0.92 d (6.5)	19.4	0.90 d (6.5)
22	36.8	0.99 m, 1.86 m	34.6	1.06 m, 1.29 m	34.6	0.96 m, 1.38 m
23	29.3	0.85 m	34.5	1.35 m, 1.55 m	30.3	1.04 m, 1.49 m
24	45.5	1.03 m	24.9		29.0	
25	34.2		21.0		33.2	1.29 m
26	27.9	0.86 s	23.0	1.10 s	20.9	0.98 d (6.9)
27	27.9	0.86 s	23.3	1.07 s	20.9	1.01 d (6.9)
28	27.9	0.86 s	28.1	0.11 d (4.0) 0.06 d (4.0)	19.1	0.68 m
29	15.1	0.83 d (7.0)	20.1	1.05 s	20.4	-0.22 dd (5.5, 4.5) 0.44 dd (8.5, 4.5)
30	-	-	-	-	14.2	1.09 d (6.4)

3-4. Halistanol sulfate 類の生物活性

Halistanol sulfate (**1**), halistanol sulfate I (**2**) および J (**3**) は, HeLa 細胞および P388 細胞に対して 100 μM の濃度で細胞毒性を示さなかったが, SIRT 1-3 阻害活性は, IC_{50} 範囲がそれぞれ 45.9 ~67.9, 18.9~21.1 および 21.8~37.5 μM で認められた (Table 3-2)。しかしながら, ヒト結腸腺がん細胞株 HCT116 を用いた試験において, **1** は SIRT2 の生体内基質である eIF5A のアセチル化レベルの上昇は認められなかった (Figure 3-4)。細胞毒性が認められなかったことや細胞を用いた試験において, 生物活性が認められなかった原因として, 高極性の硫酸エステルを有することにより細胞膜を透過できないことが考えられた。化合物 **1** を含む硫酸化ステロイドは, 抗菌作用, 抗 HIV 作用, 防汚作用, プロテインキナーゼに対する酵素阻害作用, HIV 逆転写酵素, HIV インテグラーゼ, グリコシダーゼやプロテアーゼに対する阻害作用等, 多様な生物活性が注目されている⁷¹⁻⁸⁰。しかしながら, KDACs や SIRTs に対する阻害活性はまだ知られていない。今回, **1** が SIRTs に対して阻害活性を有することを初めて報告した。

Table 3-2. HeLa および P388 に対する細胞毒性および SIRT1-3 に対する阻害活性

Compounds	IC_{50} (μM)		IC_{50} (μM)		
	HeLa	P388	SIRT1 ($\pm\text{S.D.}$)	SIRT2 ($\pm\text{S.D.}$)	SIRT3 ($\pm\text{S.D.}$)
halistanol sulfate (1)	>100	>100	49.1 (1.7)	19.2 (0.68)	21.8 (0.36)
halistanol sulfate I (2)	>100	>100	45.9 (3.9)	18.9 (0.59)	32.6 (2.13)
halistanol sulfate J (3)	>100	>100	67.9 (4.7)	21.1 (0.82)	37.5 (3.70)
nicotineamide	n.d.	n.d.	n.d.	80.4 (4.3)	76.7 (13.9)

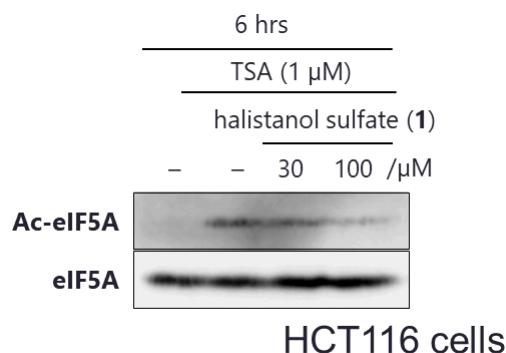


Figure 3-4. HCT116 細胞を用いた SIRT2 阻害活性試験.

3-5. 結晶構造解析

Halistanol sulfate 類を含む硫酸化ステロイドによる様々な酵素阻害活性は非特異的な作用として考えられてきた。本研究では、シッティングドロップ法により SIRT3 と halistanol sulfate (**1**) の複合体での結晶構造が得られたことから、**1** が SIRT3 に非特異的ではなく、特異的に結合していることが示唆された。複合体結晶構造解析から、その様式は SIRT3 の 243 番目の Lys, 224 番目の Arg, 301 番目の Arg, 300 番目の Gln と 2 分子の **1** の硫酸部位との間に水素結合による相互作用が形成され、300 番目の Gln から 311 番目の Met までの α -helix 上にステロイド部位が重なり合った形で 2 分子の **1** が特異的に SIRT3 と結合していた (Figure 3-5)。基質もしくは補酵素の結合部位と考えられる 248 番目の His から遠い位置のため、**1** は SIRT3 の活性中心以外のポケットに特異的に結合し、基質とは競合しない様式によって酵素活性の調節を行っている可能性が示唆された。

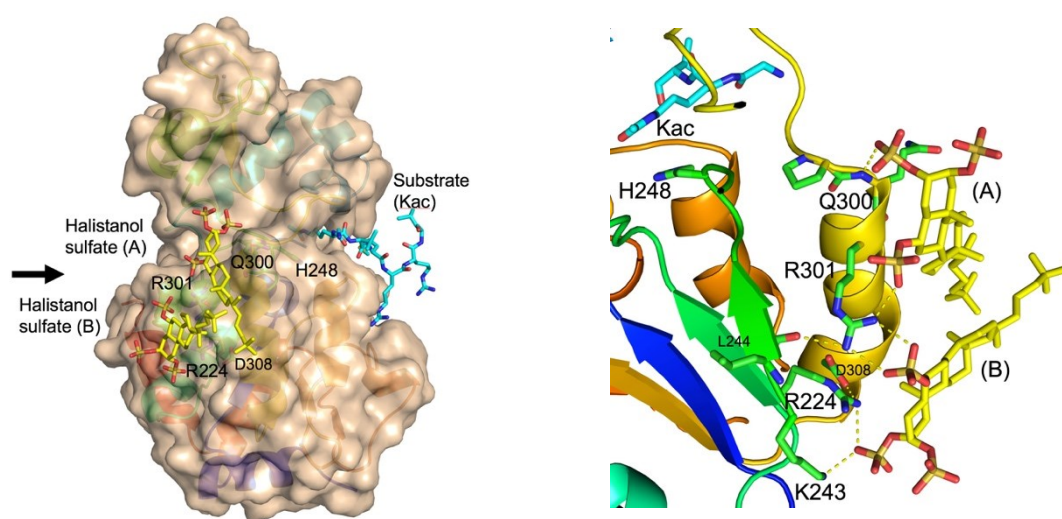


Figure 3-5. SIRT3- halistanol sulfate (**1**) 複合体の結晶構造 (左図). SIRT3 と 2 分子の **1** および基質であるアセチルリジンペプチドの複合体 (右図). 左図の矢印の視点における **1** 結合部位の拡大図 (黄色点線は水素結合相互作用を示す).

この結晶構造から、SIRT 阻害剤として知られる resveratrol の SIRT3 結合サイト⁸¹とは異なるアロステリックサイトが見出された。また、硫酸エステルを有する heparin がアンチトロンビンに対してアロステリック作用、つまり、heparin がアンチトロンビンのエキソサイトに結合すると、Xa 因子との複合体形成によりコンフォメーション変化が誘発される様式⁸²のように SIRT3 の酵素機能も何らかの生体分子によってアロステリックにコントロールされている

可能性を示すものである。

3-6. 結言

ヒストンのアセチル化修飾を調節するタンパク質に着目し、その機能解明に役立つ分子ツールを求めて、SIRT3 阻害剤の探索研究を行った結果、halistanol sulfate (**1**) を活性本体として同定するとともに、MS 分析を適用することによって、新規類縁体 halistanol sulfates I および J (**2, 3**) を単離・構造決定することに成功した。

硫酸化ステロイド類には様々な生物活性が報告されていたが、Halistanol sulfate 類の SIRTs 阻害活性は初めての報告となる。加えて、SIRT3 と halistanol sulfate との複合体結晶構造により、2 分子の **1** が一部分重なって SIRT3 の活性中心以外のポケットに特異的に結合し、基質とは競合しない様式によって酵素活性の調節を行っている可能性が示唆された。また、硫酸エステルを有する生体分子 heparin によってアロステリックに活性が阻害されるトロンビンと同様に、SIRT3 の酵素機能も何らかの生体分子によってアロステリックにコントロールされている可能性を示す新たな知見も得ることができた。

3-7. 第3章の実験項目

3-7-1. 実験装置

各種 NMR スペクトルは Bruker Avance 400 MHz 型スペクトルメーター (Bruker) を用いて測定した。¹H および ¹³C NMR の化学シフト値は、 δ_H 3.31 および δ_C 49.15 を CD₃OD の溶媒ピークとして参照した。ESIMS は、AccuTOF CS mass spectrometer 質量分析計 (日本電子株式会社) で測定した。HRESIMS は、SCIENTIFIC Exactive Plus mass spectrometers 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) で測定した。UV スペクトルは、UV-1800 分光光度計 (株式会社島津製作所, 京都, 日本) を用いて記録した。IR スペクトルは、JIR-WINSPEC50 分光計 (日本電子株式会社) で測定した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 Olympus IX71 および DP72 digital camera (オリンパス株式会社) を用いて撮影した。

3-7-2. 生物材料

海綿 *Halichondria* sp. は、1994 年 12 月に東京都八丈島 (N 33° 07.16', E 139° 49.07') で採集して実験で使用するまで -25°C で保存した。

3-7-3. 精製

海綿断片 (695 g, 湿重量) を解凍後、粉碎し、MeOH (2 L×7) で抽出・濃縮後、H₂O と CHCl₃ を用いた二層分配に付した。水層はさらに *n*-BuOH で抽出し、先の CHCl₃ 層と *n*-BuOH 層を合一して有機層とした。有機層を Kupchan 分画⁸³、詳細には、*n*-hexane と 90% MeOH を用いて二層分配し、*n*-hexane 可溶画分を得た。90% MeOH 層に H₂O を加えて 60% MeOH 層とした後、CHCl₃ で抽出し、CHCl₃ 可溶画分と 60% MeOH 可溶画分を得た。60% MeOH 可溶画分を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー (H₂O, 20%, 50%, 70%, 100% MeOH, CHCl₃/MeOH/H₂O=6/4/1) に付し、画分 A-F の 6 画分を得た。このうち、画分 C (50% MeOH 溶出画分) に SIRT3 に対する阻害活性が認められたため、画分 C の一部 (500 mg) を逆相 HPLC [カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 20 mm), 検出器; UV 220 nm and RI, 移動相: 200 mM NaClO₄ 75% MeOH] に付し、22 画分の分画した (画分 1-22)。これらのうち、画分 18 は halistanol sulfate (**1**, 301.4 mg, 収率 3.5 x 10⁻²%) であった。画分 9 はさらに逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 10 mm), 検出器; UV 220 nm および RI, 移動相; 200 mM NaClO₄ 80% MeOH] で精製を行い、halistanol sulfate I (**2**, 6.6 mg, 収率 9.5x10⁻³%) を得た。一方、画分

22 については 2 段階の逆相 HPLC [カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 20 mm), 検出器; UV 220 nm and RI, 移動相; 200 mM NaClO₄ 75% MeOH および 90% MeOH] で精製を行い, その後, リサイクル逆相 HPLC [カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 10 mm), 検出器; UV 220 nm および RI, 移動相; 200 mM NaClO₄ 90% MeOH] で精製することによって, 0.7 mg の halistanol sulfate J (**3**) を得た。さらに, 化合物 **3** をより多く得るために, 560 mg の画分 C (50% MeOH 溶出画分) を 2 段階の逆相 HPLC [カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 20 mm), 検出器; UV 220 nm and RI, 移動相: 200 mM NaClO₄ 90% MeOH および 85% MeOH] にて精製した。その後, 同じ条件にて 2 段階のリサイクル逆相 HPLC [カラム: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 x 10 mm), 検出器; UV 220 nm および RI, 移動相; 200 mM NaClO₄ 90% MeOH] で最終精製を行い, halistanol sulfate J (**3**, 3.0 mg, 収率 5.5x10⁻³%) を得た。

Halistanol sulfate (1). colorless amorphous solid; ESIMS m/z 731.3 [M-Na]⁻, 611.3 [M-Na-NaSO₄H]⁻, 509.4 [M-Na-NaSO₄H-NaSO₃]⁻, 491.3 [M-Na-2 (NaSO₄H)]⁻, 354.1 [M-2Na]²⁻; HRESIMS m/z 731.2194 [M-Na]⁻ (calcd for C₂₉H₄₉Na₂O₁₂S₃ m/z 731.2187); ¹H and ¹³C NMR data see Table 3-1.

Halistanol sulfate I (2). colorless amorphous solid; [α]_D^{25.4} +25.0° (c 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (logε) 279 (2.61) nm; IR (KBr) ν_{max} 2939, 2868, 1642, 1472, 1445, 1386, 1248, 1122, 1064, 968, 941, 930, 897, 826, 799, 754, 731, 628cm⁻¹; ESIMS m/z 729.2 [M-Na]⁻, 609.3 [M-Na-NaSO₄H]⁻, 507.3 [M-Na-NaSO₄H-NaSO₃]⁻, 489.3 [M-Na-2 (NaSO₄H)]⁻, 353.1 [M-2Na]²⁻; HRESIMS analysis (m/z 729.2027 [M-Na]⁻, calcd for C₂₉H₄₇Na₂O₁₂S₃ m/z 729.2031). ¹H and ¹³C NMR data see Table 3-1.

Halistanol sulfate J (3). colorless amorphous solid; [α]_D^{25.4} +32.0° (c 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (logε) 278 (2.67) nm; IR (KBr) ν_{max} 2934, 2870, 1633, 1472, 1454, 1382, 1244, 1126, 1972, 969, 930, 893, 844, 826, 799, 749, 732, 624 cm⁻¹; ESIMS m/z 743.3 [M-Na]⁻, 623.3 [M-Na-NaSO₄H]⁻, 521.4 [M-Na-NaSO₄H-NaSO₃]⁻, 503.3 [M-Na-2 (NaSO₄H)]⁻, 360.1 [M-2Na]²⁻; HRESIMS analysis (m/z 743.2200 [M-Na]⁻, calcd for C₃₀H₄₉Na₂O₁₂S₃ m/z 729.2187). ¹H and ¹³C NMR data see Table 3-1.

3-7-4. 細胞毒性試験

2-7-5.項と同様の方法で実施した。

3-7-5. SIRTs 阻害活性試験

In vitro での SIRT1-3 阻害活性試験は電気泳動移動度シフトアッセイを用いた⁸⁴。組み換え SIRT1-3 と FAM で蛍光標識したアセチル化リジンペプチド [SIRT1 および SIRT2: 1.5 μM FAM-RHKK (Ac) LM, SIRT3: 1.5 μM FAM-QPKK (Ac) KPL], SIRT1 と SIRT2 の阻害試験を行った。384 well plate に各サンプルを添加した 1 mM NAD 含有アッセイ buffer [25 mM Tris-HCl (pH 9.0), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA] を調製後, 37°Cで 60 分間インキュベートした。その後, 最終濃度が 10 mM になるように NAD を添加した反応停止 buffer [100 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.25% CR-3] を 50 μL を加えて反応を停止させ, LabChip EZ Reader II (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて, 蛍光標識したリジンアセチル化ペプチドとアセチル基が脱離したペプチドを定量することで評価した (SIRT1-3 阻害率は $100 \times P/(P+S)$ の計算式で算出した P: アセチル基が脱離したペプチドのピークの高さ, S: 蛍光標識したリジンアセチル化ペプチドのピークの高さ)。

3-7-6. SIRT3 と halistanol sulfate (1) 複合体の結晶構造解析

組換え SIRT3 (アミノ酸残基: 118-399, 5 mg/mL), アセチル化リジンペプチド [TRSGK (Ac) VMRLLR: AceCS2-K (Ac), 1 mM] および halistanol sulfate (1, 1 mM) の混合溶液を用いて, 20°C, 1.2 M リン酸ナトリウム一塩基およびリン酸カリウム二塩基緩衝液 (pH5.4) 中で SIRT3 と halistanol sulfate (1) 複合体の結晶を得た。本結晶は 18%グリセロールを低温保護剤として, 液体窒素で凍結した。高エネルギー加速器研究機構の「フォトンファクトリー」のビームライン PF-AR NW12A および PF-BL-17A を利用して取得して, HKL2000 program⁸⁵ でデータ処理した。結晶構造は SIRT3/AceCS2-K (Ac) complex (PDB id 3GLU)⁸⁶ の構造を参考にして MOLREP⁸⁷ による分子置換法によって決定した。モデル構築は REFMAC5⁸⁸ および Coot⁸⁹ を使用し, 構築した構造の妥当性を MolProbity⁹⁰ で評価した。データ収集と精密化の統計を Table 3-3 に示す。SIRT3 と halistanol sulfate (1) 複合体の結晶の構造図は PyMol (Schrödinger, New York, NY, 米国) を用いて作成した。

Table 3.3. SIRT3 と halistanol sulfate (1) 複合体の結晶データの収集と精密化統計

Data collection statistics			Refinement statistics	
X-ray source		PF BL17A	Resolution range (Å)	20.0 - 2.6
Space group		<i>P</i> 432	No. of reflections	10944
Unit cell	<i>a, b, c</i> (Å)	127.81	No. of non-hydrogen atoms	2166
	α, β, γ (°)	90.0	<i>R</i> _{work} (%)	22.5
Wavelength (Å)		0.980	<i>R</i> _{free} (%)	29.9
Resolution (Å)		50 - 2.6	R.m.s. deviations	
		(2.69 - 2.60)	Bond length (Å)	0.095
Unique reflections		11529	Bond angle (degree)	1.572
Completeness (%) ^a		99.9	<i>B</i> -factors (Å ²)	
<i>R</i> _{merge} (%) ^a		6.4 (75.7)	Ramachandran plot (%)	
<i>I</i> / σ (%) ^a		88.8 (7.7)	Favoured region	94.6
Wilson <i>B</i> (Å ²)		61.2	Allowed region	5.4
			Outlier region	0.0

a Values in parentheses are for the highest resolution shell

3-7-7. Supporting Information

リスト

Figure S3-1. Halistanol sulfate (1) の ESIMS (neg.).

Figure S3-2. Halistanol sulfate (1) の HRESIMS (neg.).

Figure S3-3. Halistanol sulfate (1) の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-4. Halistanol sulfate (1) の ¹³C NMR スペクトル (CD₃OD, 100 MHz).

Figure S3-5. Halistanol sulfate I (2) の ESIMS (neg.).

Figure S3-6. Halistanol sulfate I (2) の HRESIMS (neg.).

Figure S3-7. Halistanol sulfate I (2) の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-8. Halistanol sulfate I (2) の ¹³C NMR スペクトル (CD₃OD, 100 MHz).

Figure S3-9. Halistanol sulfate I (2) の COSY スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-10. Halistanol sulfate I (2) の HMQC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-11. Halistanol sulfate I (2) の HMBC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-12. Halistanol sulfate J (3) の ESIMS (neg.).

Figure S3-13. Halistanol sulfate J (3) の HRESIMS (neg.).

Figure S3-14. Halistanol sulfate J (3) の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-15. Halistanol sulfate J (3) の ¹³C NMR スペクトル (CD₃OD, 100 MHz).

Figure S3-16. Halistanol sulfate J (3) の COSY スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-17. Halistanol sulfate J (3) の HMQC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

Figure S3-18. Halistanol sulfate J (3) の HMBC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

測定データ名: S94311 20-5_2
試料名(内部):
イオン化モード: デュアルESI-
質量校正データ名: 140626yokudelna1kneg
処理履歴: ベース補正[5.0%];平均[MS[1] 0.08..0.13]
実験日時: 2017/06/09 15:41:18

オリフィス1電圧掃引: -88V
質量電荷比範囲: 100.0..1000.0

スペクトル記録間隔: 0.4[s]
リングレンズ電圧: -17[V]
代表測定経過時間: 0.100[min]

分析者名: Administrator

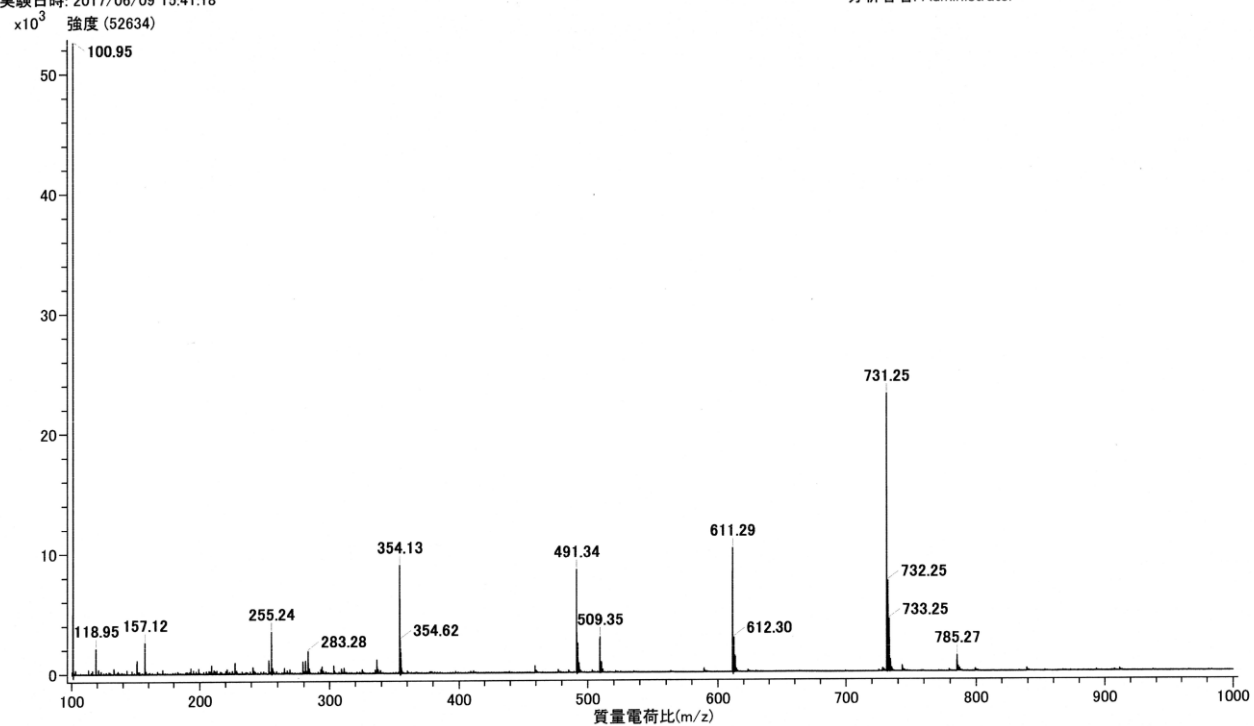


Figure S3-1. Halistanol sulfate (1) の ESIMS (neg.).

170605HS_neg2 #32 RT: 0.14 AV: 1 NL: 1.56E6
T: FTMS - p ESI Full ms [133.4000-2000.0000]

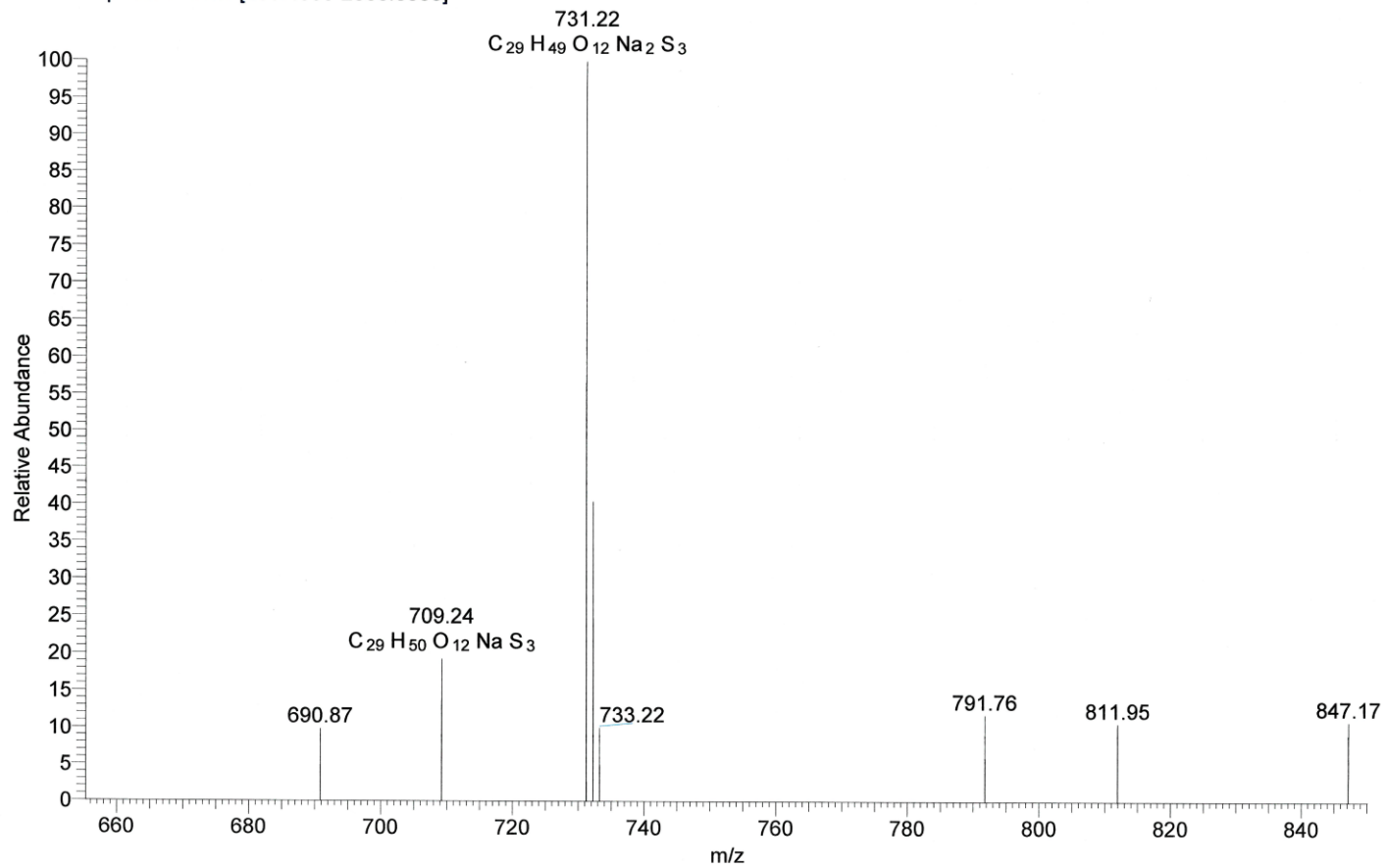


Figure S3-2. Halistanol sulfate (1) の HRESIMS (neg.).

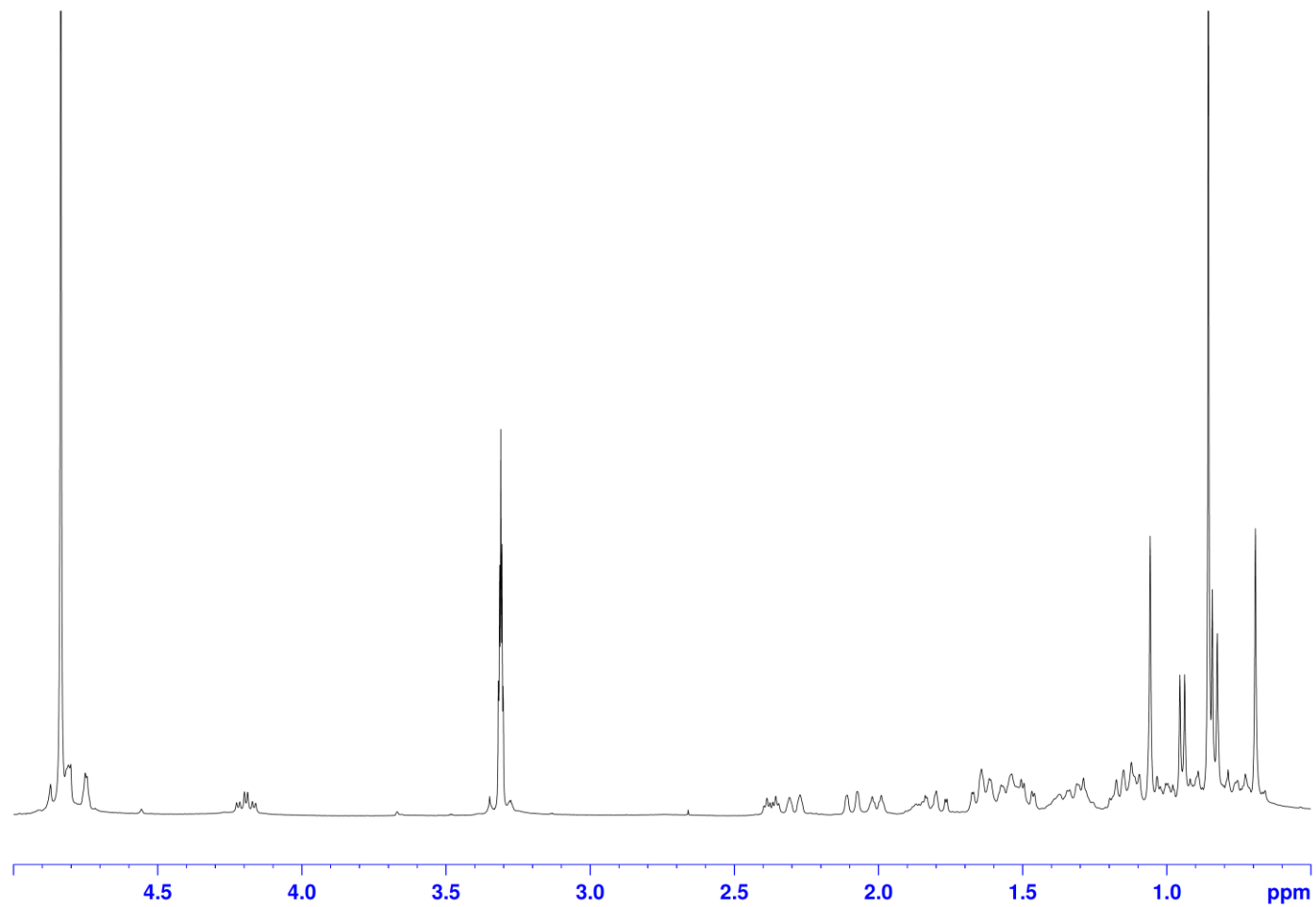


Figure S3-3. Halistanol sulfate (**1**) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

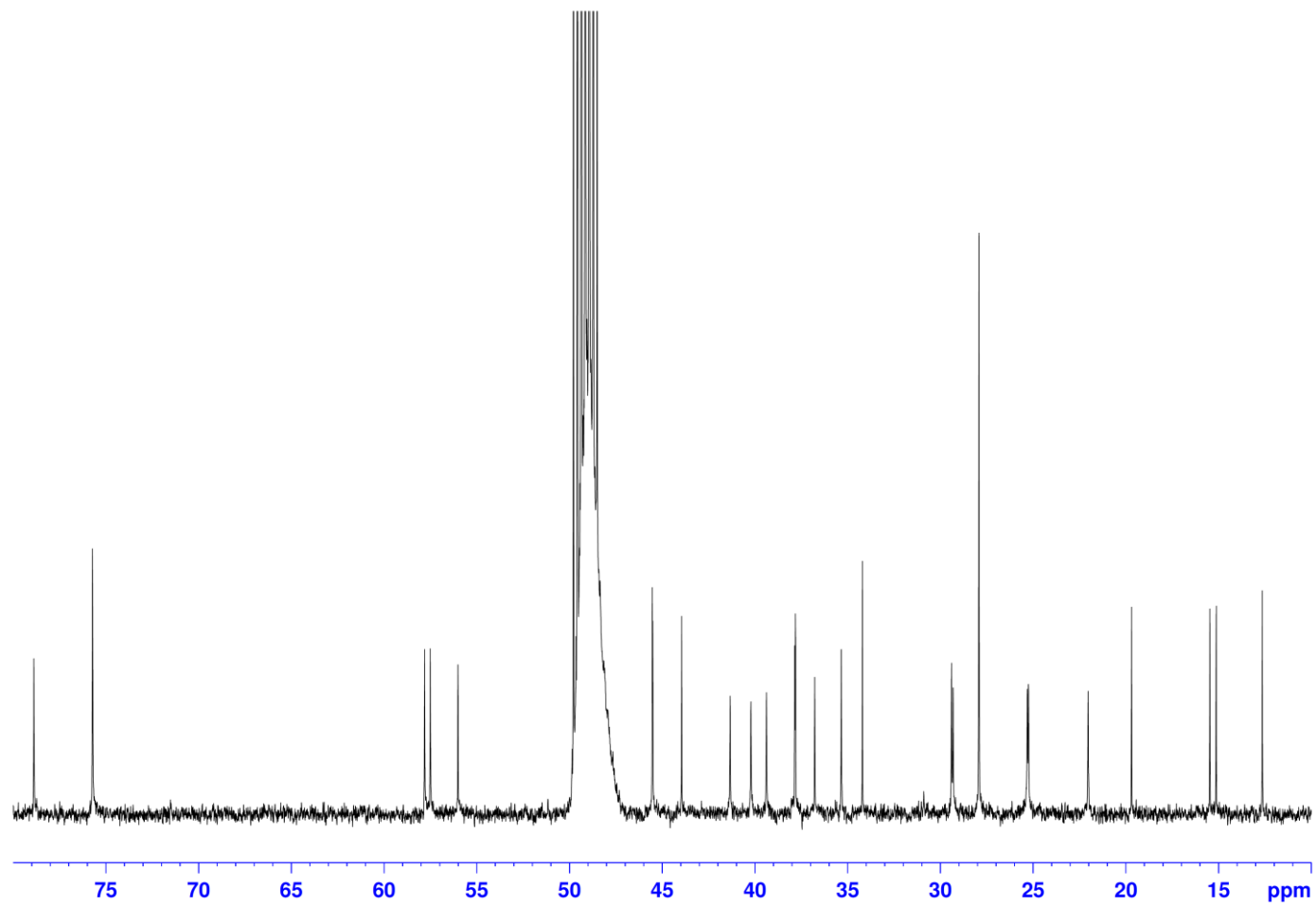


Figure S3-4. Halistanol sulfate (1) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 100 MHz).

測定データ名: S94311 23-2
試料名(内部):
イオン化モード: デュアルESI-
質量校正データ名: 140626yokudelna1kneg
処理履歴: ベース補正[5.0%],平均(MS[1] 0.08.0.12)
実験日時: 2017/06/09 15:44:53
x10³ 強度 (35809)

オリフィス1電圧掃引: -88V
質量電荷比範囲: 100.0.1000.0

スペクトル記録間隔: 0.4[s]
リングレンズ電圧: -17[V]
代表測定経過時間: 0.081[min]

分析者名: Administrator

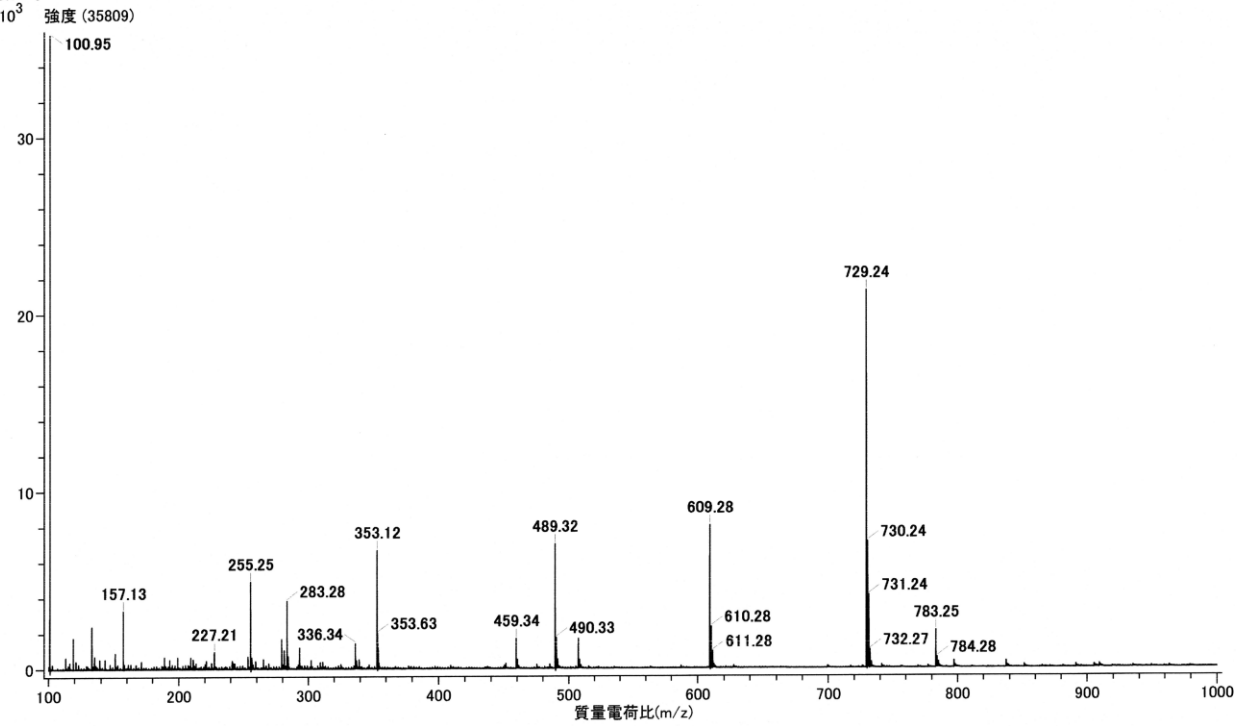


Figure S3-5. Halistanol sulfate I (2) の ESIMS (neg.).

170605HSI_neg2 #34 RT: 0.15 AV: 1 NL: 6.98E5
T: FTMS - p ESI Full ms [133.4000-2000.0000]

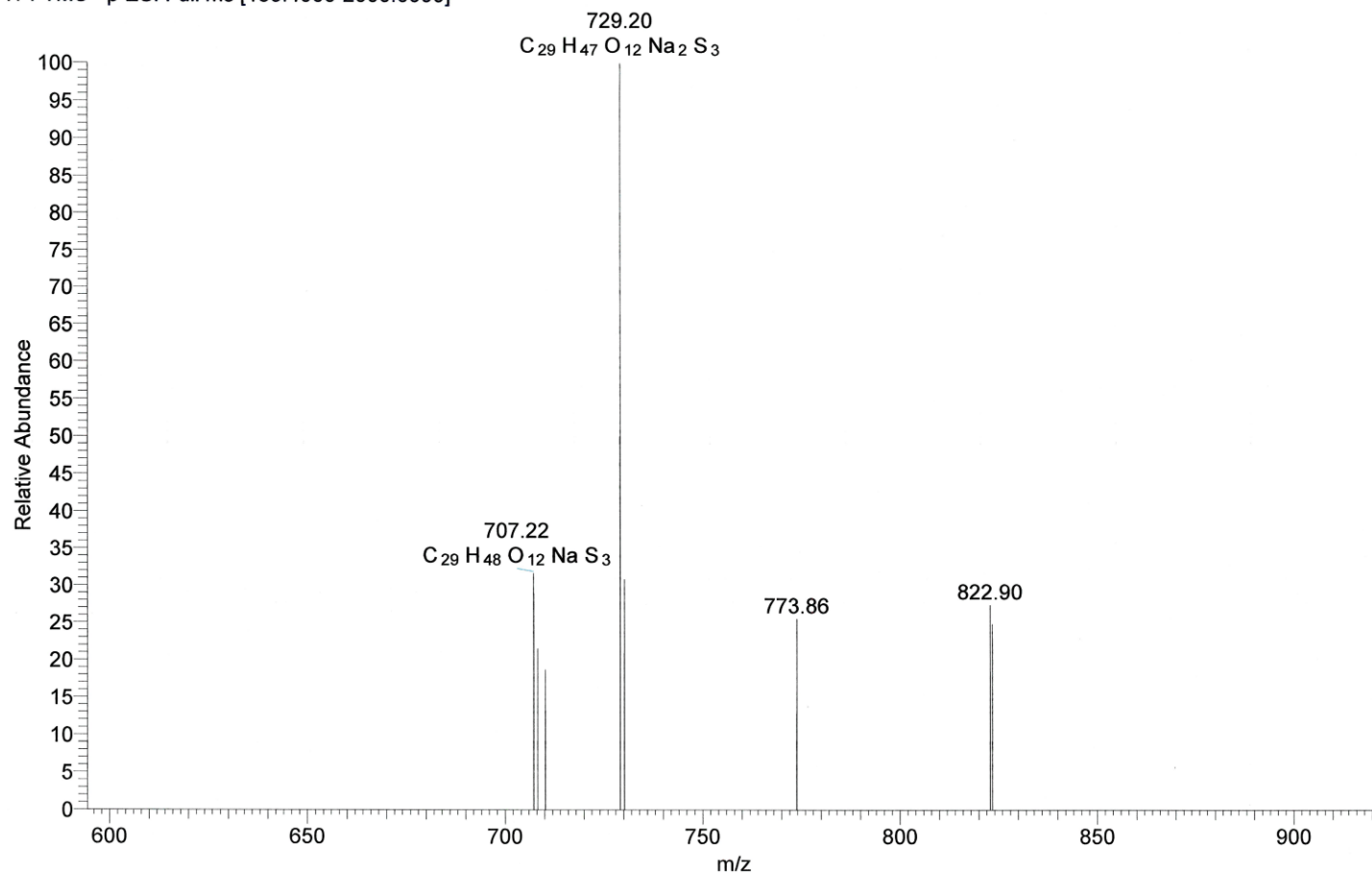


Figure S3-6. Halistanol sulfate I (2) の HRESIMS (neg.).

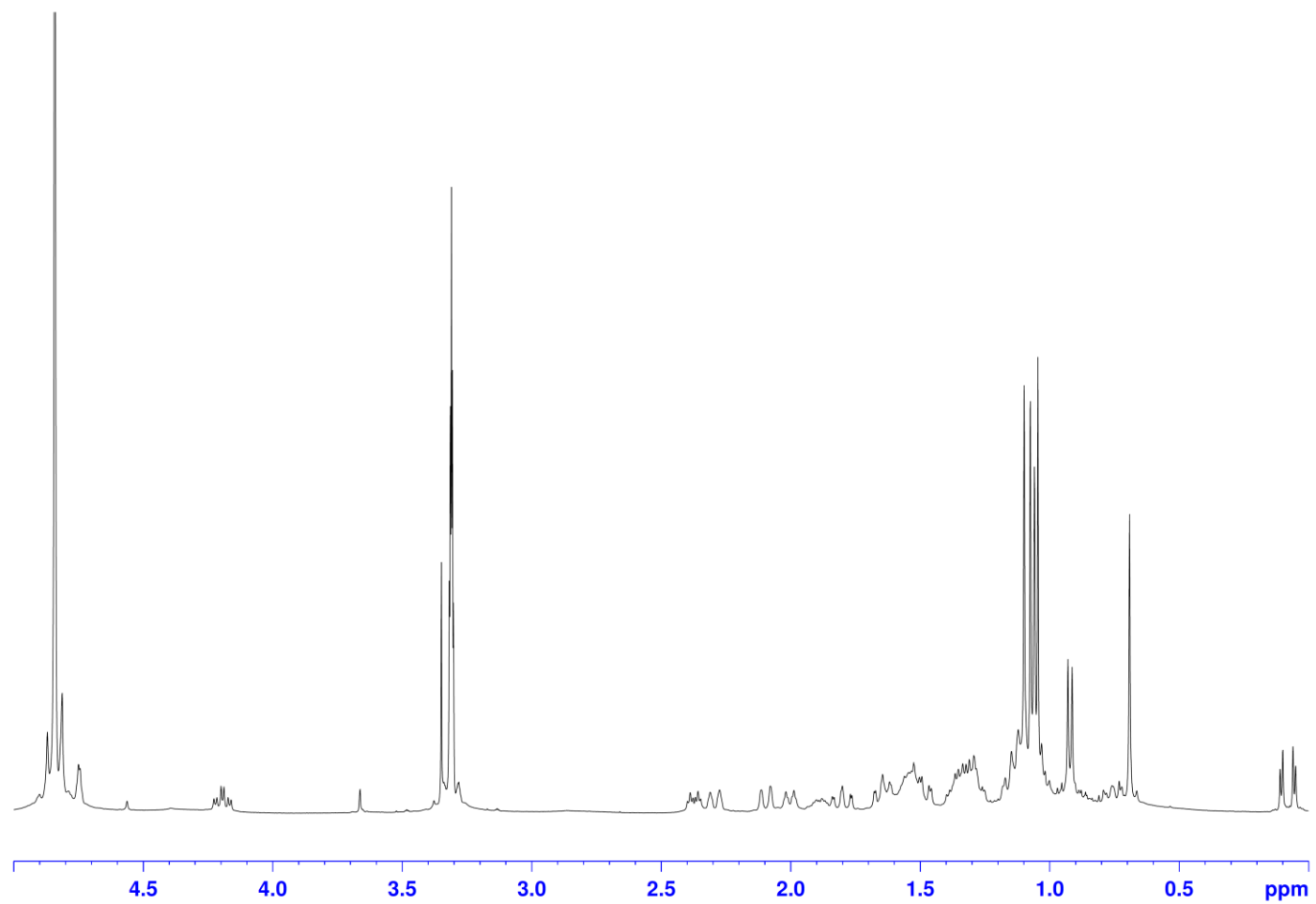


Figure S3-7. Halistanol sulfate I (2) の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

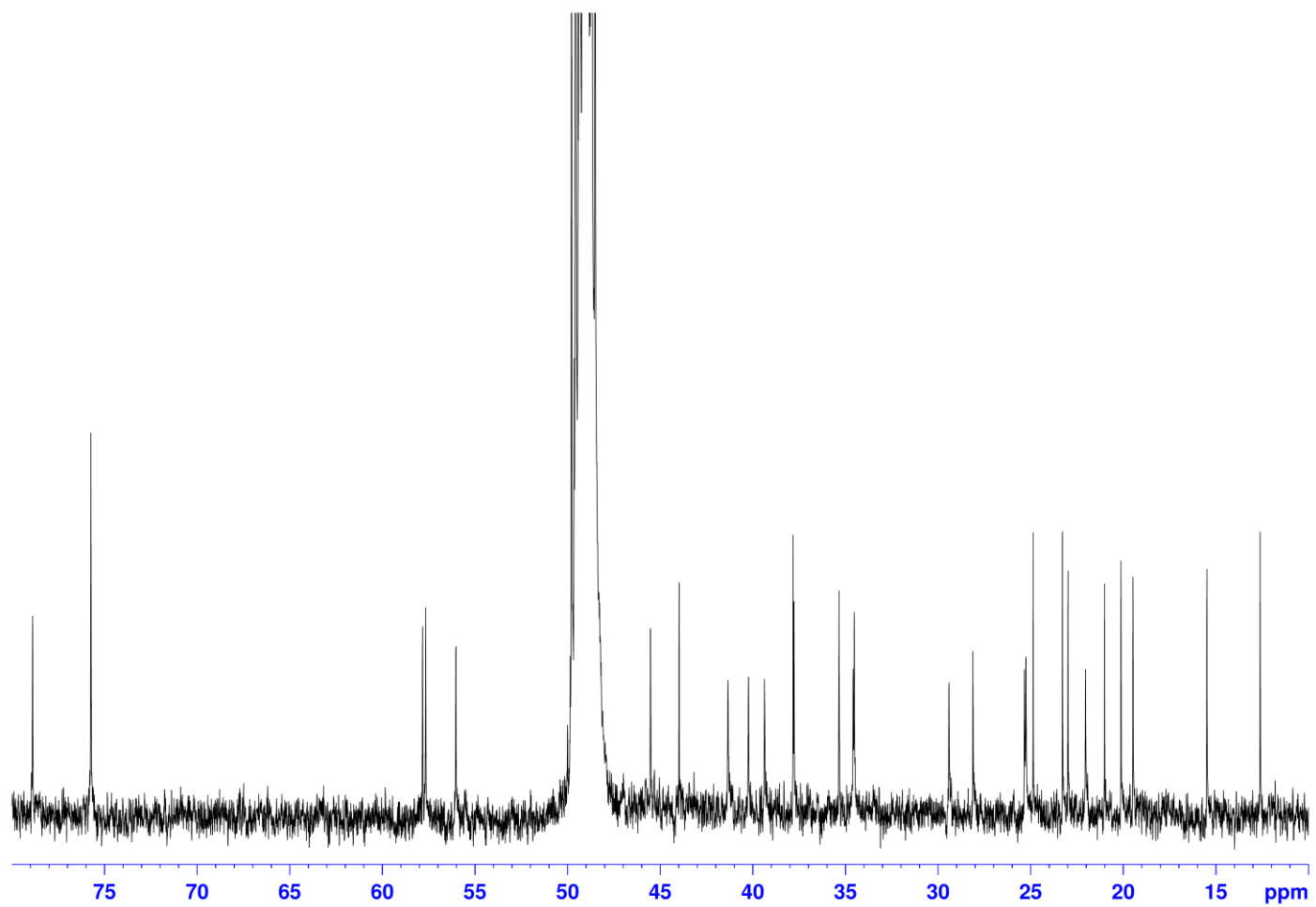


Figure S3-8. Halistanol sulfate I (2) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 100 MHz).

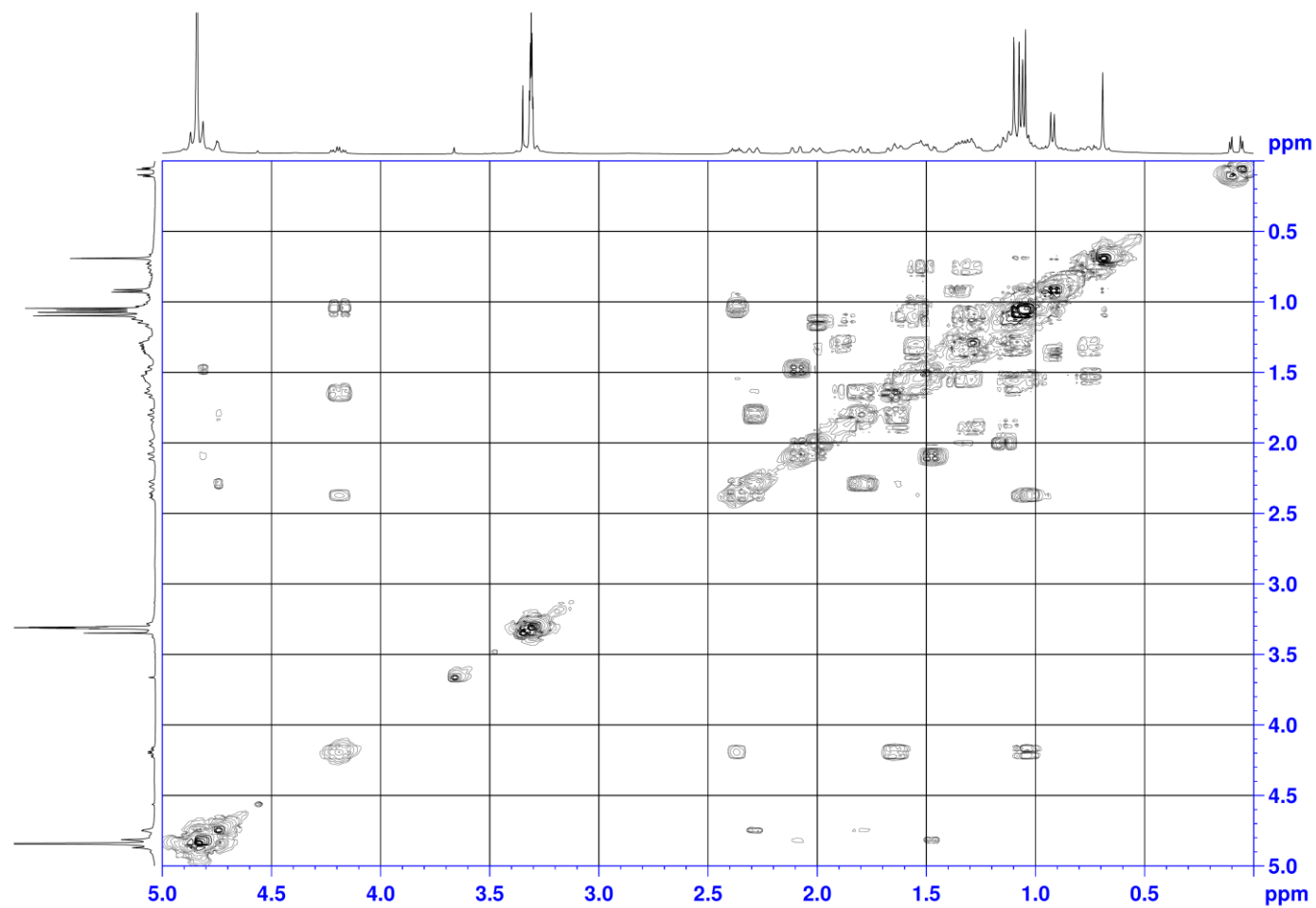


Figure S3-9. Halistanol sulfate I (2) の COSY スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

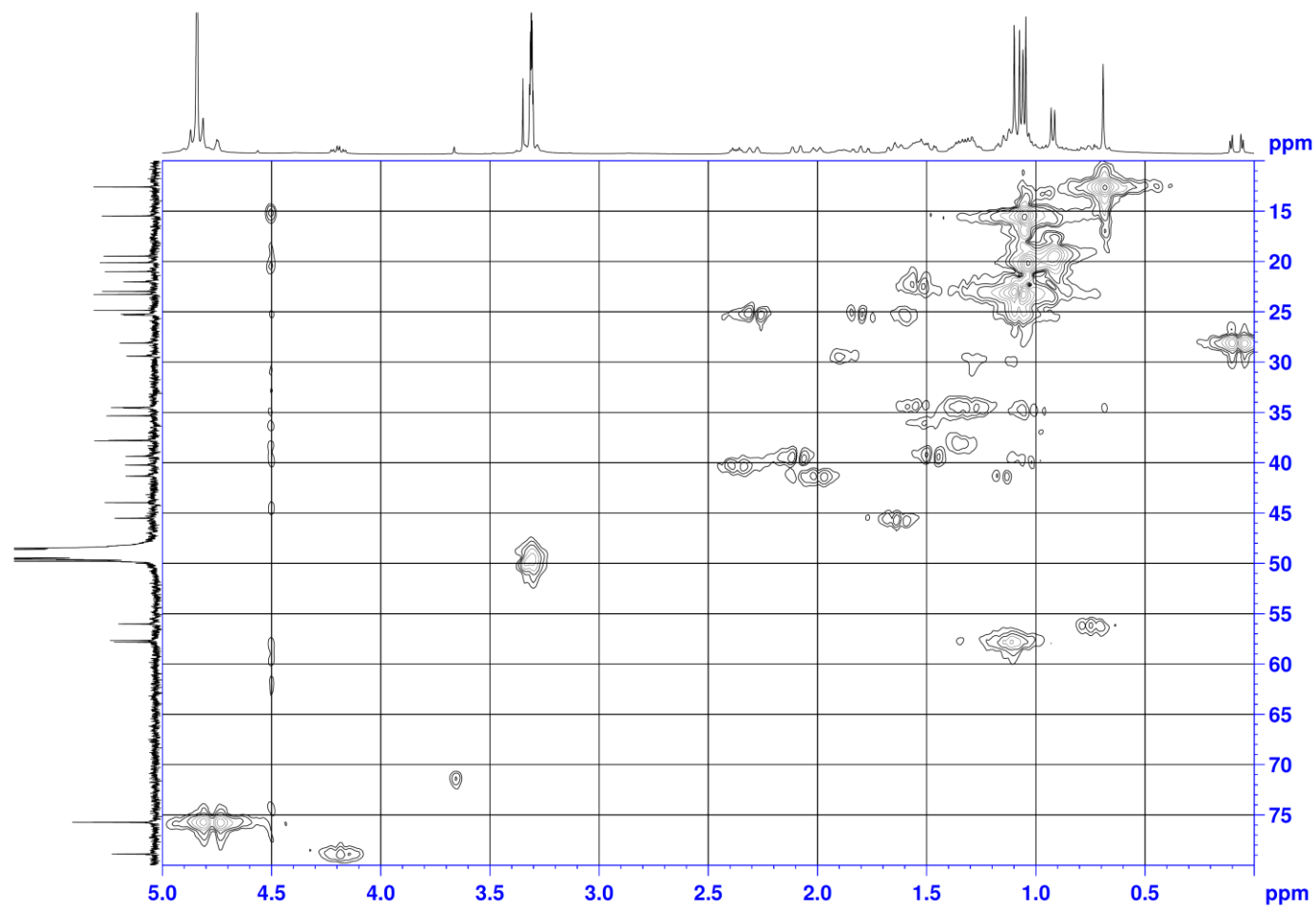


Figure S3-10. Halistanol sulfate I (2) の HMQC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

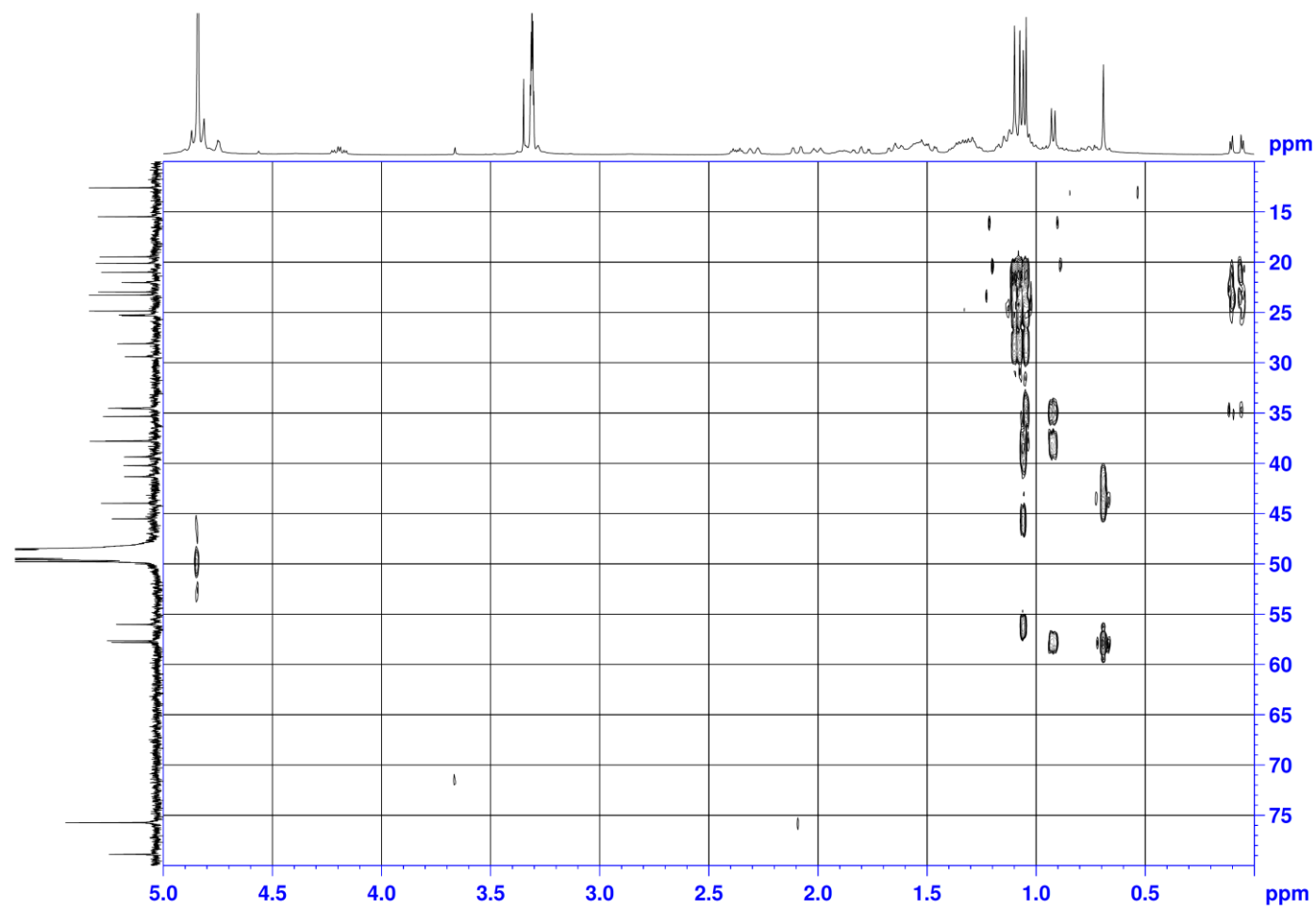


Figure S3-11. Halistanol sulfate I (2) の HMBC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

測定データ名: S94311 25-2
試料名 (内部):
イオン化モード: デュアルESI-
質量校正データ名: 140626yokudelna1kneg
処理履歴: ベース補正[5.0%];平均(MS[1] 0.06.0.11)
実験日時: 2017/06/09 15:47:27

オリフィス1電圧掃引: -88V
質量電荷比範囲: 100.0..1000.0

スペクトル記録間隔: 0.4[s]
リングレンズ電圧: -17[V]
代表測定経過時間: 0.077[min]

分析者名: Administrator

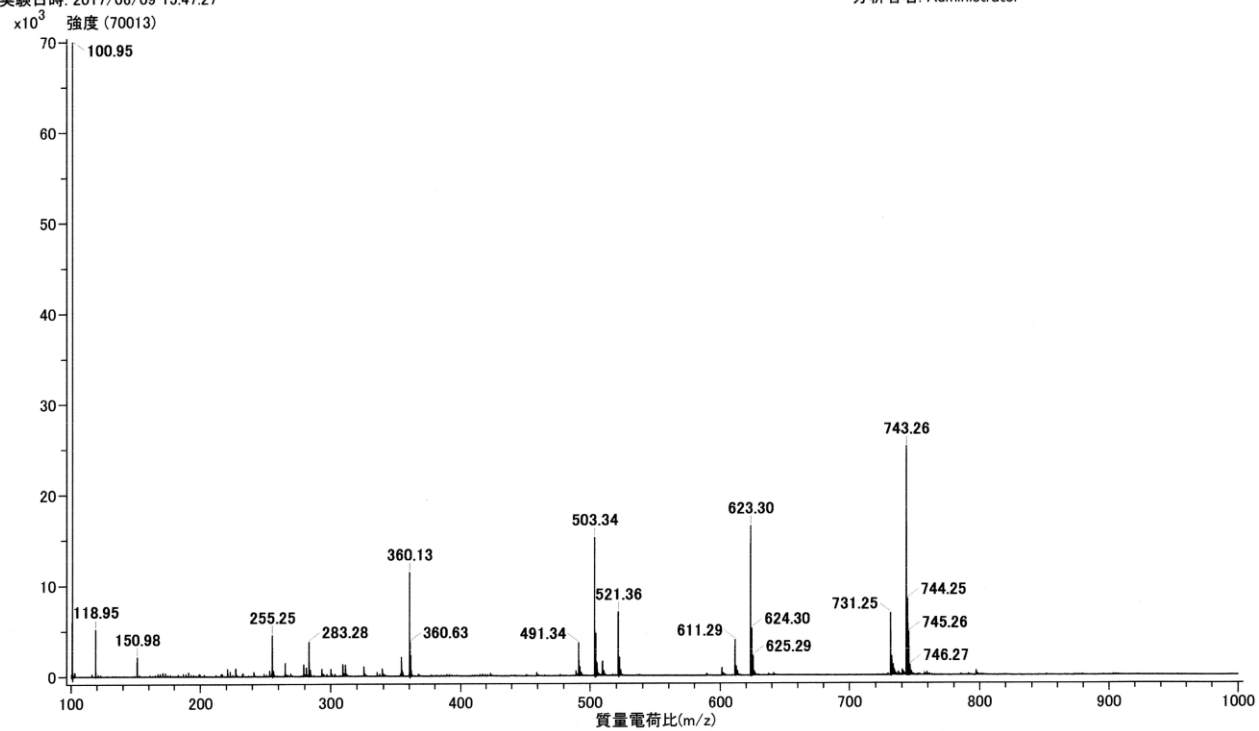


Figure S3-12. Halistanol sulfate J (3) の ESIMS (neg.).

170605HSJ_neg2 #36 RT: 0.16 AV: 1 NL: 1.42E6
T: FTMS - p ESI Full ms [133.4000-2000.0000]

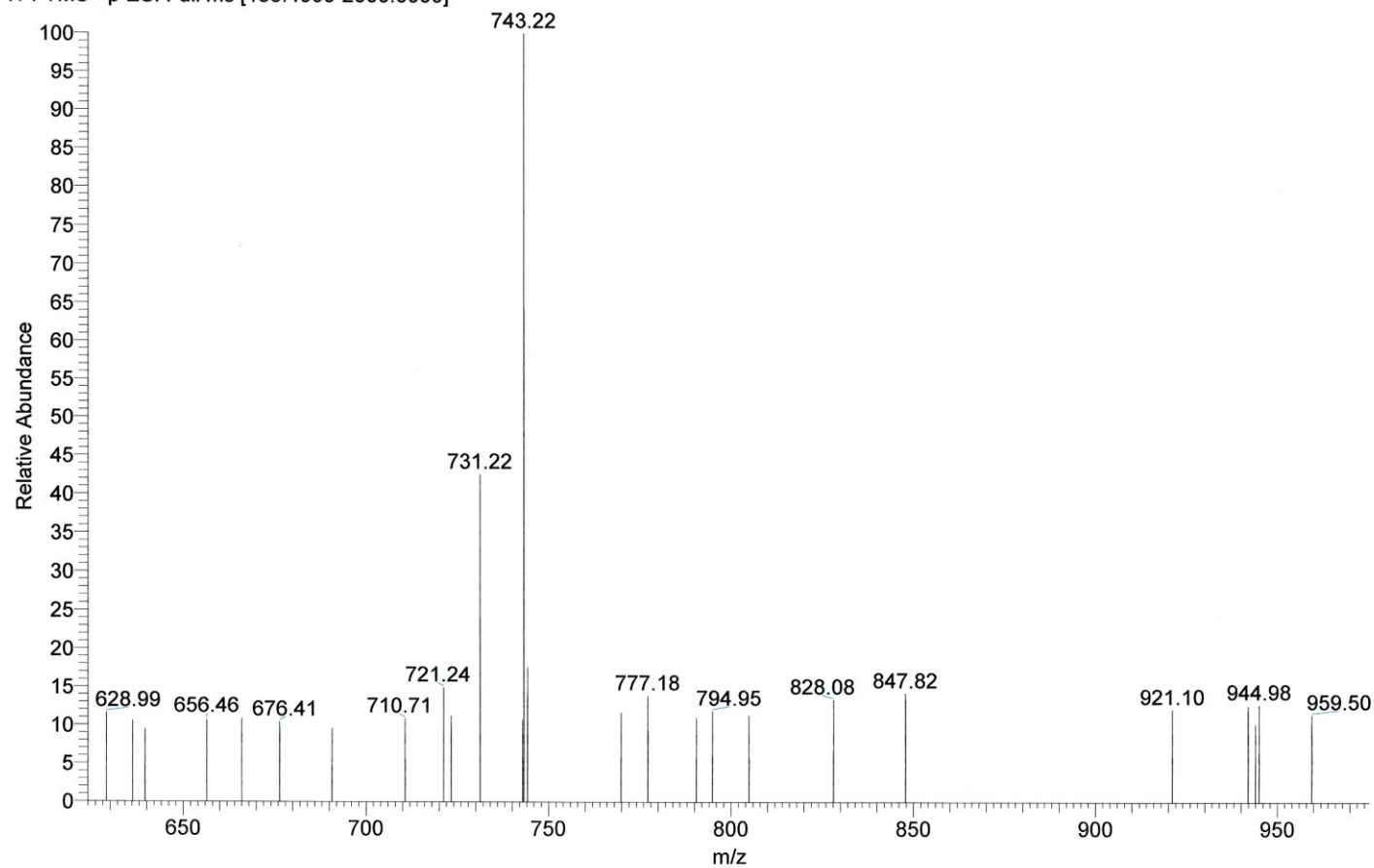


Figure S3-13. Halistanol sulfate J (3) の HRESIMS (neg.).

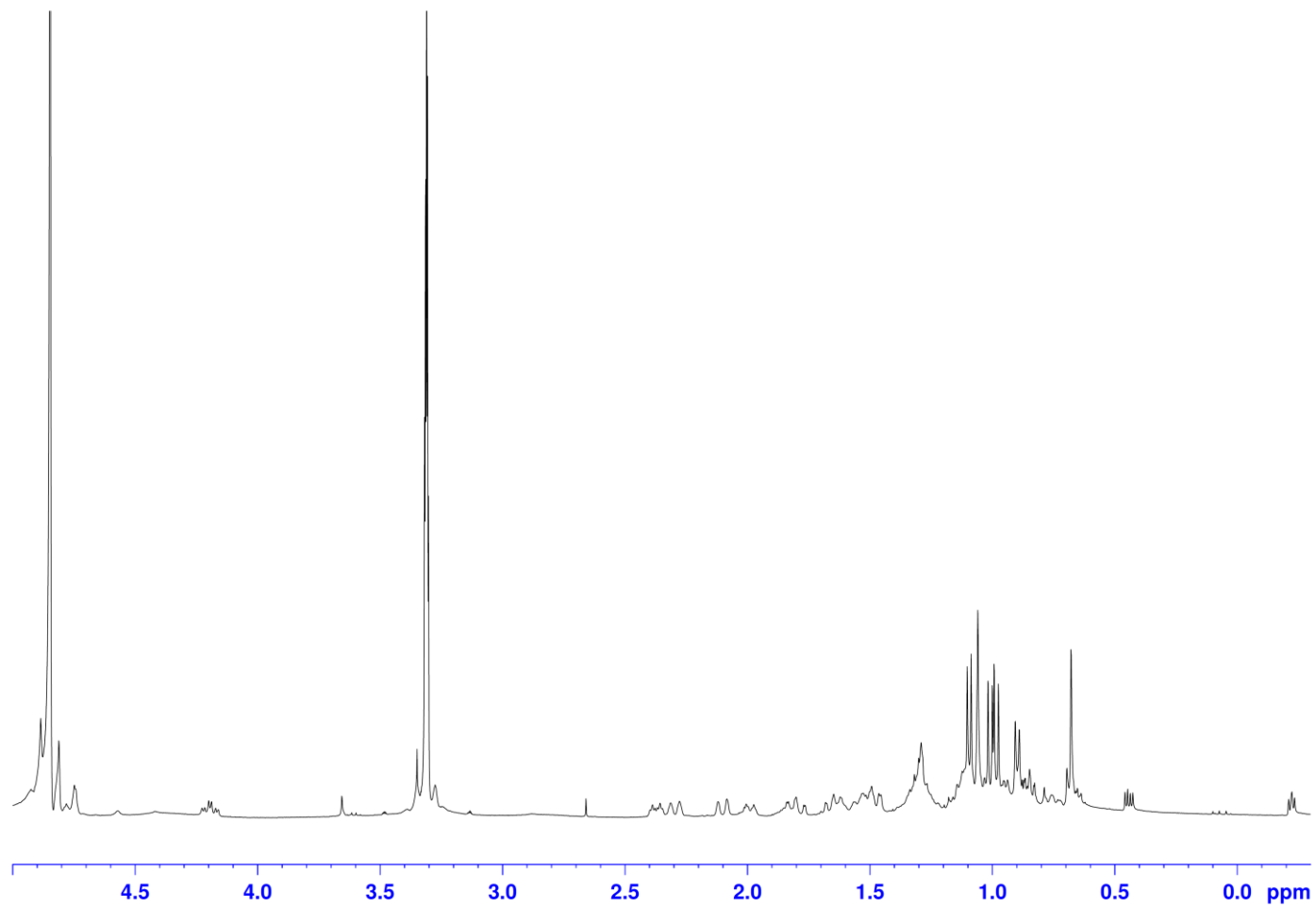


Figure S3-14. Halistanol sulfate J (3) の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

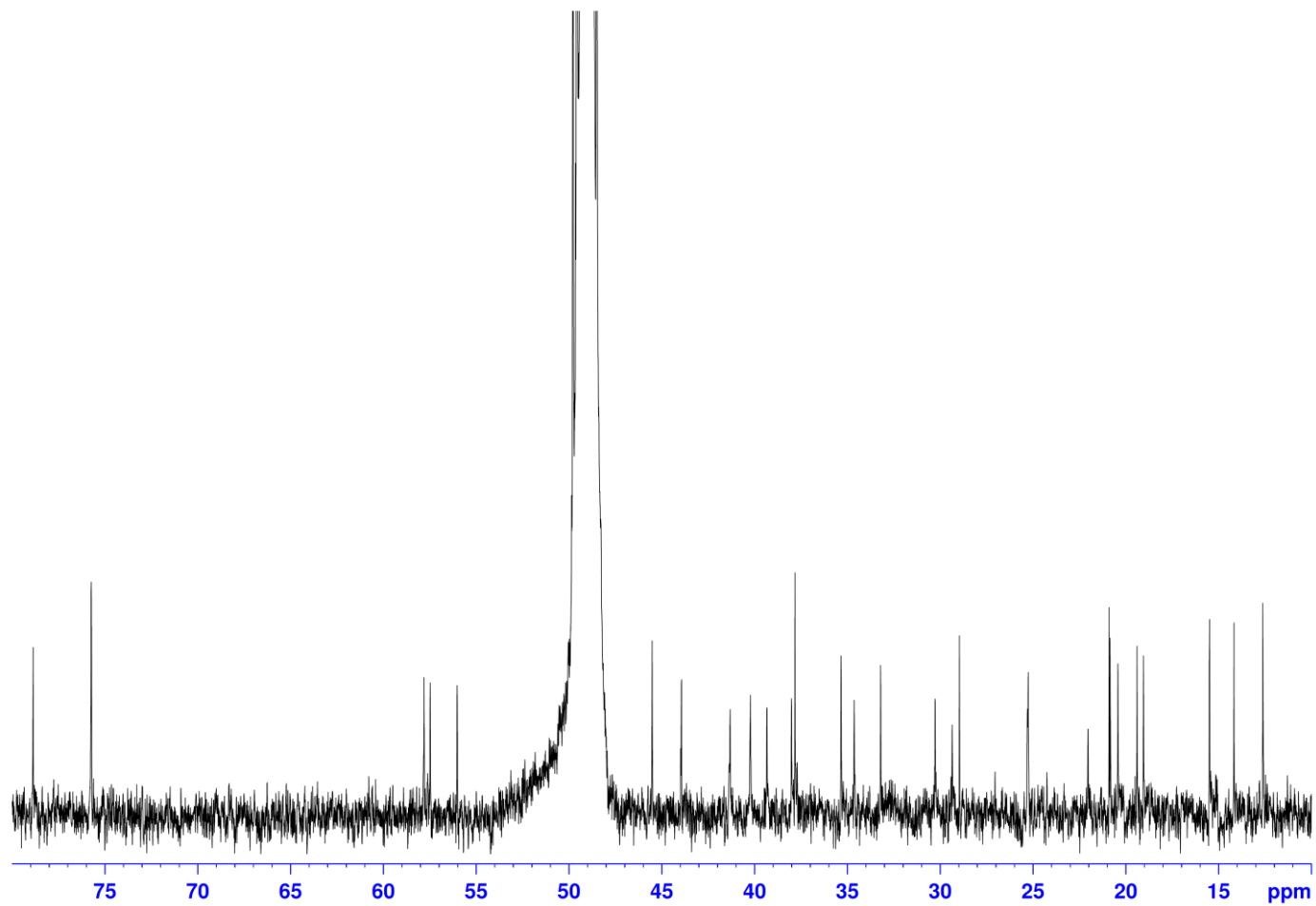


Figure S3-15. Halistanol sulfate J (3) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 100 MHz).

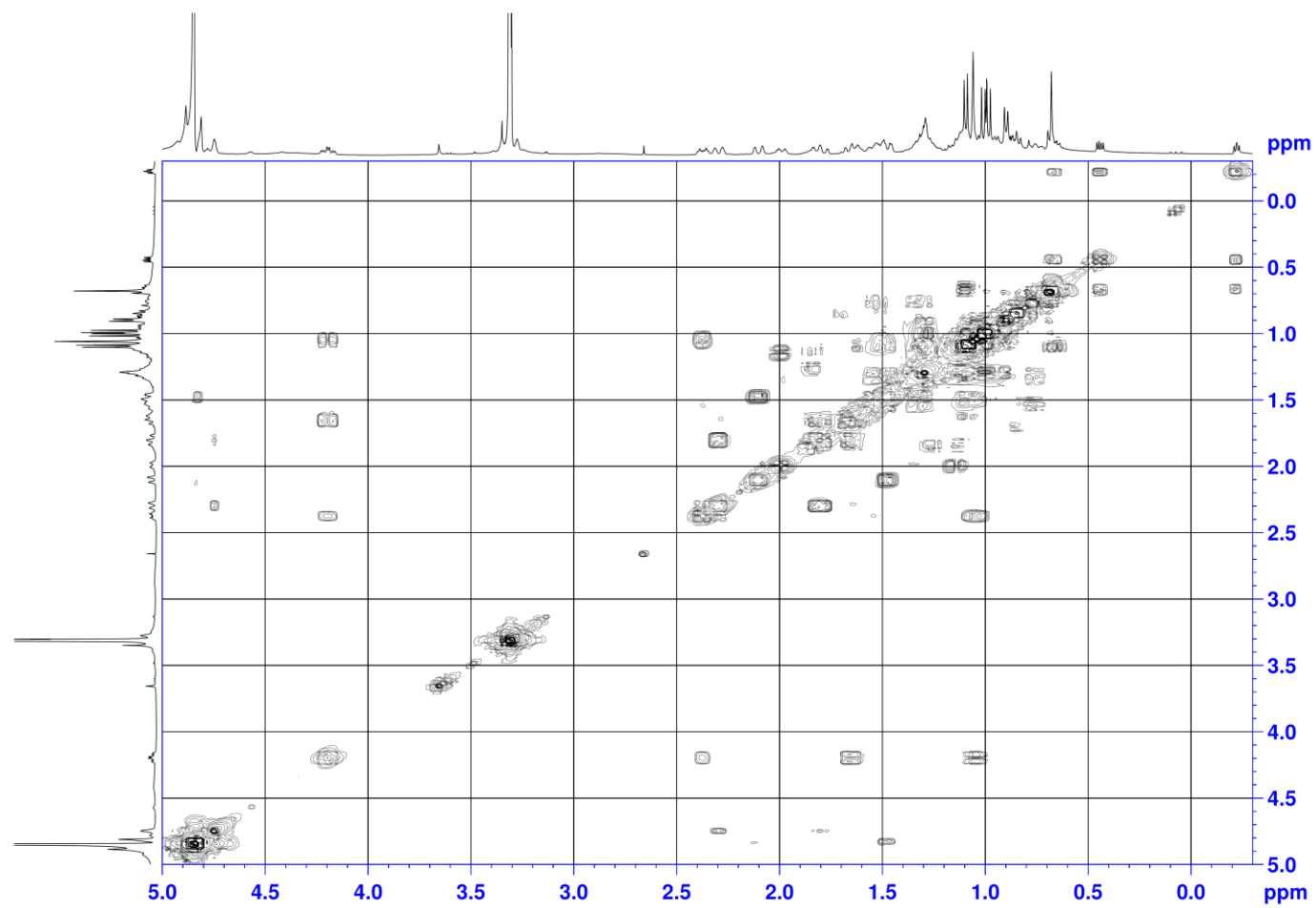


Figure S3-16. Halistanol sulfate J (3) の COSY スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

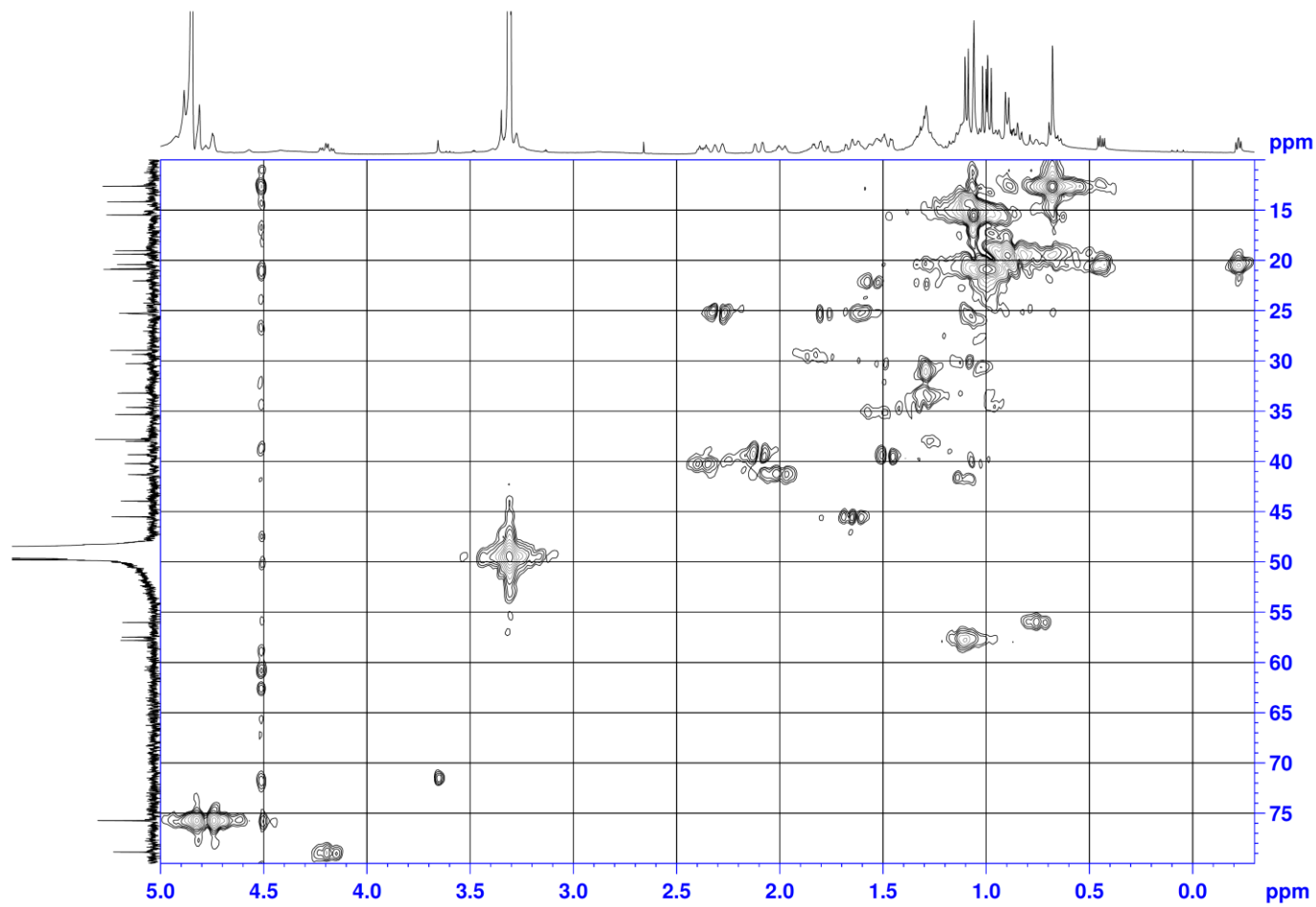


Figure S3-17. Halistanol sulfate J (3) の HMQC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

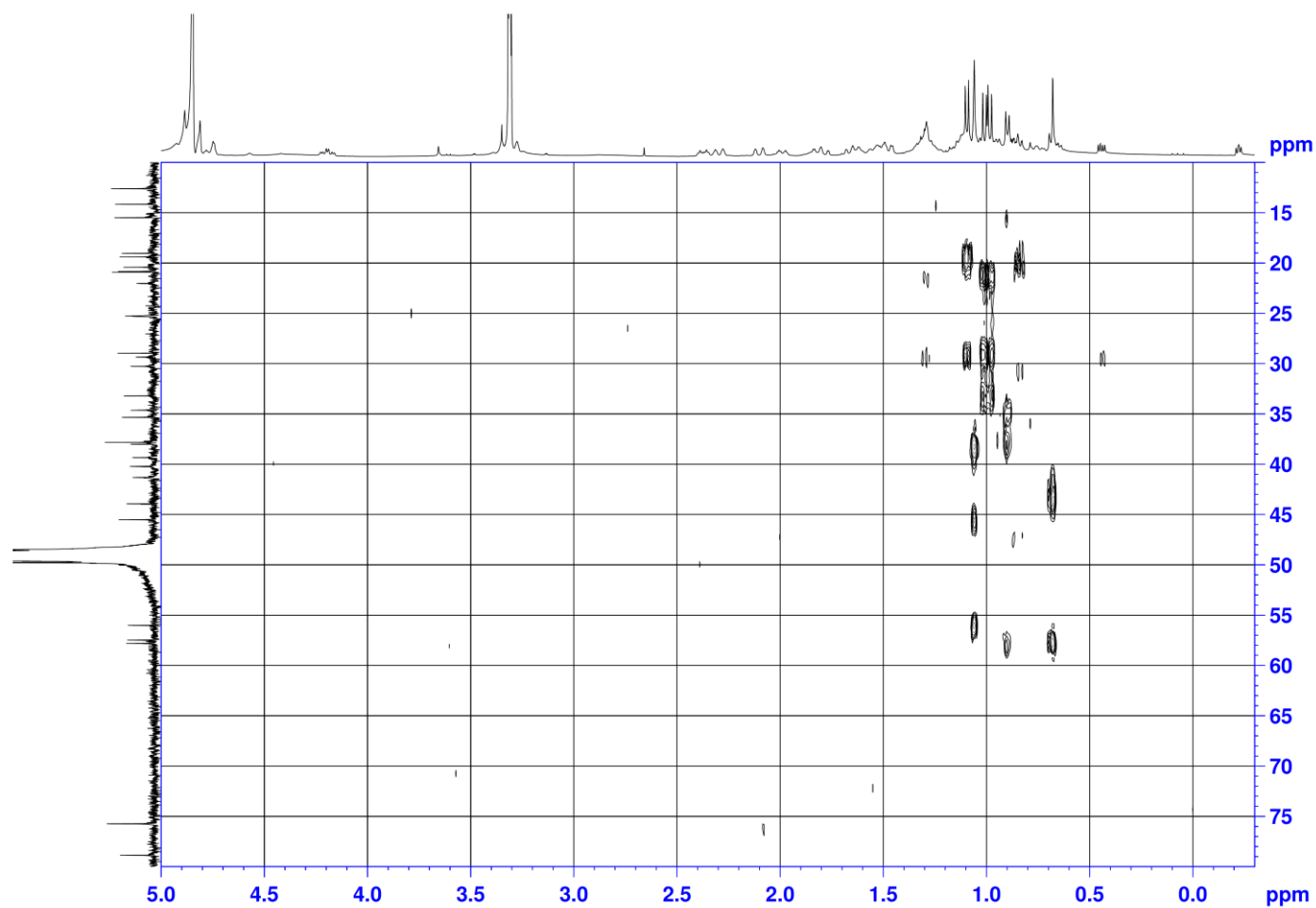


Figure S3-18. Halistanol sulfate J (3) の HMBC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

第4章 ヒストン修飾調節活性に注目した活性化合物の探索

4-1. 研究背景

エピジェネティックな遺伝子発現は DNA の塩基配列の変化を伴わずに後天的な修飾によって行われる安定的かつ可塑的な遺伝子発現調節機構である。エピジェネティックな遺伝子発現のひとつにヒストンの修飾がある⁹¹。真核生物の染色体はヌクレオソームを基本単位としたクロマチンとよばれる高次構造をとっている。ヌクレオソームはヒストンタンパク質 H2A, H2B, H3 および H4 の4種類で構成されているヒストン8量体に DNA が約2回転巻き付いた構造であり、ヒストンテールと呼ばれるヒストンのN末端尾部のアミノ酸残基はアセチル化、メチル化、リン酸化など様々な修飾を受ける。ヒストンのメチル化は Lys や Arg などの塩基性アミノ酸残基に対して化学修飾が起こり、Lys 残基のメチル化には mono-, di-および tri-メチル化が存在し、アルギニン残基のメチル化は mono-および di-メチル化が存在している。また、ヒストンのメチル化部位はヒストンタンパク質の Lys および Arg 残基に25か所以上存在することが確認されている。これらの修飾部位の違いやメチル化状態の違い、またはそれら組み合わせにより、転写調節に影響することが知られている⁹²。

ヒストンのメチル化が転写の抑制と活性化の両方に関連しているのに対し、ヒストンのアセチル化は主に転写の活性化に関連している。Lys 残基をアセチル化すると、Lys 中の $-NH_3^+$ の電荷が中和され、正に荷電しているヒストンと負に荷電している DNA の相互作用を減弱させ、転写を活性化させると考えられている。アセチル化にかかわる酵素は HAT や HDAC が知られており、HDAC 阻害剤には抗がん剤として用いられているものも存在する⁹³。

これらの修飾は、全ゲノムに渡って起きるものであり、クロマチンの高次構造を変化させることで遺伝子発現を制御し、細胞の発生・分化から恒常性の維持まで、多種多様な生命現象に関与するため (Figure 4-1)、新たな創薬ターゲットとして注目されている^{94,95}。

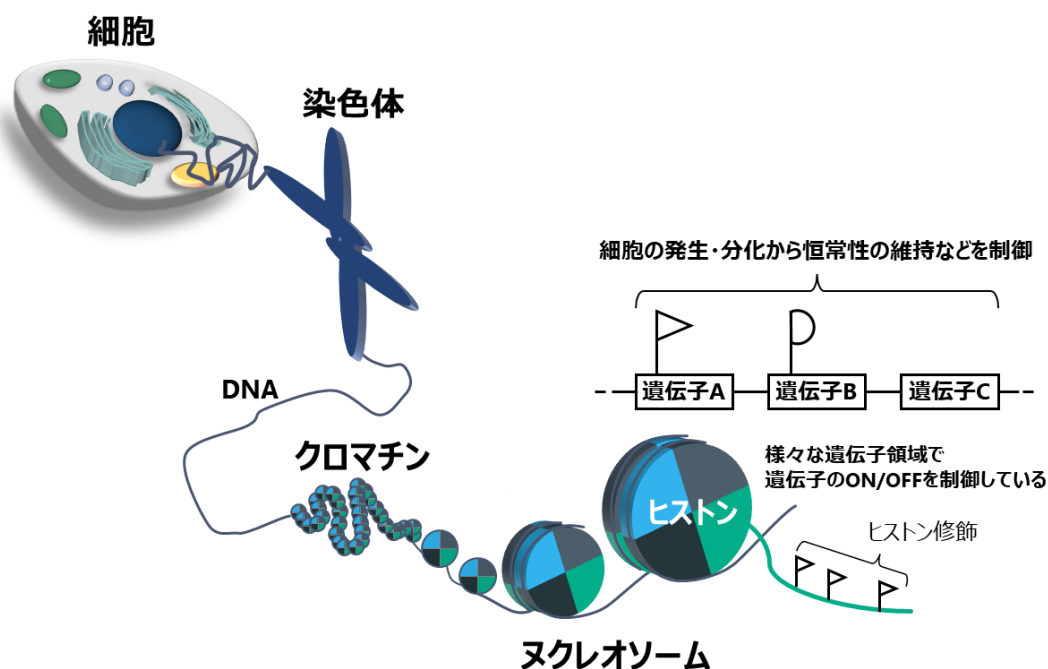


Figure 4-1. ヒストン修飾による遺伝子のスイッチ機構.

しかしながら、ヒストン修飾の複雑な組み合わせによる高度な遺伝子発現制御は、未解明な部分が多く残されており、いまだに全体の機構を理解するには至っていない。そのため、選択的にヒストン修飾を変化させる低分子化合物はエピジェネティックな遺伝子発現制御を理解するための重要なツールとなり得ると考えられる。加えて、ヒストン修飾調節活性を有する化合物の報告数は多くないことから、ヒストン修飾変化を指標とした天然化合物の探索研究には大きな余地が残されている。

そこで独自の構造と生物活性を持つ二次代謝産物のライブラリーである海洋無脊椎動物に着目して、海洋生物 1817 検体の抽出液 (有機層・水層) 計 3742 サンプルについて、複数のヒストン修飾の変化を同時に検出可能な細胞ベースのスクリーニング系を適用し、各サンプルのヒストン修飾調節活性を指標にしたスクリーニングを行った。その結果、372 サンプルにヒストン修飾レベルの変化が認められた。ヒットサンプルのうち、本章では、非リボソームペプチドやポリケチド、テルペノイドなどの多種多様な天然化合物⁹⁶⁻¹⁰¹が報告されている *Theonella* 属の海綿に着目して、活性本体の探索を行った。

4-2. Onnamide 類の単離と精製

鹿児島県奄美大島で採集した海綿 *T. conica* (1020 g, 湿重量) を MeOH で抽出・濃縮後, H₂O と CHCl₃ を用いた二層分配に付した。H₂O 層はさらに *n*-BuOH で抽出し, 先の CHCl₃ 層と *n*-BuOH 層を合一して有機層とした。有機層を Kupchan 分画⁸³により, *n*-hexane, CHCl₃ および 60% MeOH 可溶画分へと分画し, このうち, CHCl₃ 可溶画分を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーに付し, それぞれ 6 つの画分に分画した。活性画分について, SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー, 続けて, 逆相 HPLC を用いた精製に付し, 2*Z*-および 6*Z*-onnamide A (**1**) および **2**) の混合物, onnamide A (**3**)⁹⁷, 4*Z*-onnamide A (**4**)⁹⁹, dihydroonnamide A (**5**)⁹⁸ および onnamide B (**6**)⁹⁸ を得た。化合物 **1** と **2** の混合物は PHENYL-HEXYL カラムを用いたリサイクル逆相 HPLC で最終精製することで, **1** および **2** をそれぞれ 3.5 および 1.5 mg 得た (収率 3.4×10⁻³% および 1.5×10⁻³% yield based on the wet weight, Scheme 4-1., Figure 4-2)。

Theonella conica 1020 g wet wt.

extraction and partition MeOH H ₂ O / CHCl ₃ , <i>n</i> -BuOH <i>n</i> -hex / 90% MeOH CHCl ₃ / 60% MeOH ODS flash CC (φ 3.3×9.0 cm) 50% , 70% MeOH, 70% , 85% MeCN, 100% MeOH, CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O 6:4:1 SiO ₂ open CC (φ 2.0×10 cm) CHCl ₃ , CHCl ₃ / MeOH (19:1), CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O (8:2:0.1, 7:3:0.5, 6:4:1, 5:5:2) Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, 60% MeOH, 220 nm (UV)	Reverse-phase HPLC COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II, 32.5% MeCN, 220 nm (UV) Reverse-phase HPLC phenomex PHENIL-HEXYL, recycling, 40% MeCN, 220 nm (UV)	Reverse-phase HPLC phenomex PHENIL-HEXYL, recycling, 40% MeCN, 220 nm (UV)
onnamide A (3) 44.2 mg dihydroonnamide A (5) 4.3 mg onnamide B (6) 8.5 mg	2 <i>Z</i> -onnamide A (1) 3.5 mg (3.4×10 ⁻³ %) 6 <i>Z</i> -onnamide A (2) 1.7 mg (1.7×10 ⁻³ %)	4 <i>Z</i> -onnamide A (4) 2.5 mg

Scheme 4-1. Onnamide 類の単離スキーム.

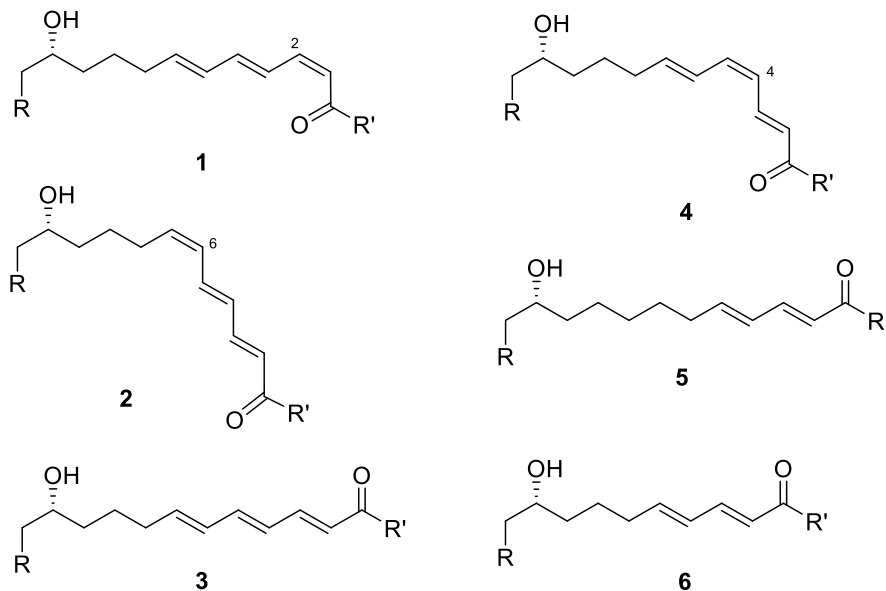
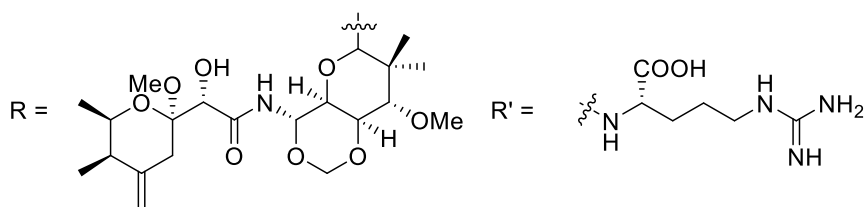


Figure 4-2. Onnamide 類 (1-6) の構造.

4-3. Onnamide 類の構造決定

2*Z*-onnamide A (**1**) は, HRESIMS において, m/z 794.4536 のプロトン付加イオンピーク $[M+H]^+$ を与え, 分子式は onnamide A (**3**) と同じ $C_{39}H_{63}N_5O_{12}$ と決定された (calcd for $C_{39}H_{64}N_5O_{12}$ 794.4546, Δ -1.3 ppm). 2*Z*-onnamide A (**1**) の 1H NMR スペクトル (Table 4-1) において, onnamide A (**3**) に含まれるものと類似したシグナル, すなわち, 低磁場シフトした 2 つの *O*-メチル基 CH_3 -30, CH_3 -32 (δ_H 3.23, 3.56) とともに CH_3 -27, CH_3 -38 (δ_H 1.18, 0.97) および 14 位に結合した 2 つのメチル基 CH_3 -33, CH_3 -34 (δ_H 0.86, 1.00), 特徴的なエキソメチレン CH_2 -29 (δ_H 4.80, 4.64), 16 位, 18 位に結合したアセタールメチレン ($O-CH_2-O$, δ_H 4.79, 5.21) および 18 位のヘミアミンールエーテル ($N-CH-O$, δ_H 5.80) の低磁場シフトしたプロトンシグナル観測された。また, 11, 13, 15, 16, 17, 21 および 26 位には oxymethine プロトン (それぞれ δ_H 3.88, 4.24, 3.99, 4.17, 3.66, 3.47 および 3.65) が認められたことから, **3** と共通の三環性のコア構造 (C-13~34) を有していることが示唆された。

1 と 3 の明確な違いは、ポリエンを含む側鎖，すなわち，H-2 から H-7 へのスピンの系に観察された。ウインドウ関数を変更したデータ解析¹⁰²により H-5 (δ_{H} 6.46) と H-3 (δ_{H} 6.43)の重複したシグナルの J 値を読み取ることによって， $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{6,7}$ の結合定数がそれぞれ 11.3, 15.0, 15.0 Hz と決定された (Figure 4-3)。したがって，H-2 と H-3 間の二重結合がシス型の 2*Z*-onnamideA (1) であると決定した。

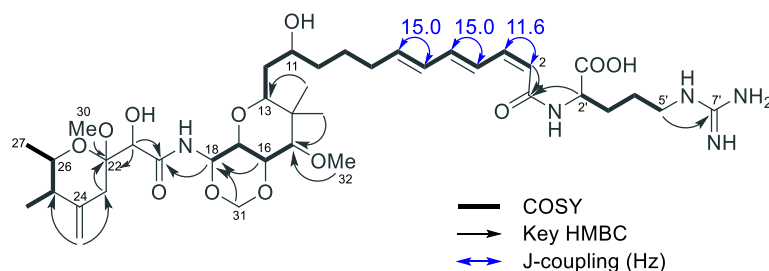


Figure 4-3. 2*Z*-onnamide (1) の構造とその COSY および HMBC 相関。

6*Z*-onnamide A (2) は，HRESIMSにおいて， m/z 794.4530のプロトン付加イオンピーク $[M+H]^+$ が認められたことにより，分子式を onnamide A (3) と同じ $C_{39}H_{63}N_5O_{12}$ と決定した (calcd for $C_{39}H_{64}N_5O_{12}$ 794.4546, Δ -2.0 ppm)。6*Z*-onnamide A (2) の ^1H NMR スペクトルも，多くのシグナルが 3 のものと一致しており (Table 4-2)，COSY および HMBC スペクトルの解析によって，3 と共通の三環性コア構造を含むことが明らかとなった。化合物 1 と同様にポリエン部位の H-2 (δ_{H} 6.11) と H-6 (δ_{H} 6.13) の重複したシグナルの解析によって， $\Delta^{2,3}$, $\Delta^{4,5}$, $\Delta^{6,7}$ の結合定数をそれぞれ 15.0, 14.7, 11.5 Hz と読み取り，6*Z*-onnamideA (2) の構造を決定した (2, Figure 4-4)。

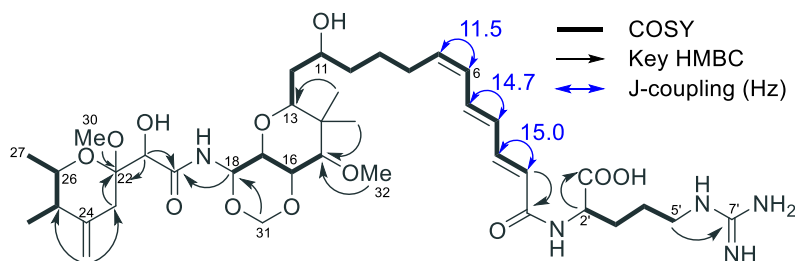


Figure 4-4. 6*Z*-onnamide の構造とその COSY および HMBC 相関。

また，化合物 3-6 は，NMR スペクトルおよび MS 解析によって，構造決定した (Table 4-3)。

Table 4-1. NMR spectral data for 2*Z*-onnamide (**1**) in CD₃OD (400 MHz)

position	δC	δH mult. (<i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC
1	168.5			
2	120.8	5.74 d (11.6)	H-3	C-1, 4
3	141.7	6.46 t (11.6)	H-2, 4	C-1, 5
4	128.4	7.45 dd (15.0, 11.6)	H-3, 5	
5	142.4	6.43 dd (15.0, 10.7)	H-4, 6	
6	131.9	6.24 dd (15.0, 10.7)	H-5, 7	
7	140.5	5.95 dt (15.0, 6.9)	H-6, 8	C-5
8	34.1	2.13 m, 2.23 m	H-7, 9	
9	31.6	1.30 m, 1.47 m	H-8, 10	
10	37	1.29 m, 1.43 m	H-11, 9	
11	71.2	3.65 m	H-10, 12	
12	37.5	1.54 m	H-11, 13	
13	78.8	3.47 dd (8.9, 3.4)	H-12	
14	42.5			
15	80.7	3.66 d (9.9)	H-16	C-32
16	75.8	4.17 dd (9.9, 6.6)	H-15, 17	C-15, 17, 18, 31
17	71	3.99 dd (9.4, 6.6)	H-16	
18	75	5.80 d (9.4)	H-17	C-20, 31
20	174.6			
21	74.1	4.24 s		C-20, 23, 24
22	101.5			
23	34.9	2.41 d (14.3), 2.32 d (14.3)		C-22, 24, 25, 29
24	148.4			
25	43.2	2.20 m	H-26, 28	C-24
26	71	3.88 qd (6.5, 2.5)	H-25, 27	C-25
27	18.3	1.18 d (6.5)	H-26, 28	C-25, 26
28	12.5	0.97 d (7.0)	H-25, 27	C-24, 25, 26
29	110.2	4.80 brs, 4.64 brs		C-23, 25
30	48.8	3.23 s		C-22
31	87.8	5.21d (6.8), 4.79 d (6.8)		C-18
32	62.1	3.56 s		C-15
33	14.3	0.86 s		C-13, 14, 15, 34
34	23.7	1.00 s		C-13, 14, 15, 33
1'	178.6			
2'	55.2	4.35 dd (7.3, 5.2)	H-3'	C-1, 1', 3'
3'	31.6	1.89 m, 1.74 m	H-2', 4'	C-1'
4'	26.3	1.65 m	H-3', 5'	C-3', 5'
5'	42.3	3.19 m, 3.26 m	H-4'	C-7'
7'	158.7			

Table 4-2. NMR spectral data for 6*Z*-onnamide (**2**) in CD₃OD (400 MHz)

position	δC	δH mult. (<i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC
1	168.5			
2	120.8	6.11 d (15.0)	H-3	C-1, 4
3	141.7	7.25 dd (15.0, 11.2)	H-2, 4	C-5
4	128.4	6.35 dd (14.7, 11.2)	H-3, 5	
5	142.4	6.94 dd (14.7, 11.5)	H-4, 6	
6	131.9	6.13 t (11.5)	H-5, 7	
7	140.5	5.67 dt (11.5, 7.7)	H-6, 8	
8	34.1	2.30 m	H-7, 9	
9	31.6	1.50 m, 1.58 m	H-8, 10	
10	37	1.32 m	H-11, 9	
11	71.2	3.65 m	H-10, 12	
12	37.5	1.54 m	H-11, 13	C-17
13	78.8	3.49 m	H-12	
14	42.5			
15	80.7	3.66 d (9.8)	H-16	C-32
16	75.8	4.17 dd (9.8, 6.6)	H-15, 17	C-15, 17, 18, 31
17	71	3.98 dd (9.1, 6.6)	H-16	
18	75	5.83 d (9.1)	H-17	C-20
20	174.6			
21	74.1	4.24 s		C-20, 23, 24
22	101.5			
23	34.9	2.41 d (14.3), 2.32 d (14.3)		C-22, 24, 25, 29
24	148.4			
25	43.2	2.20 m	H-26, 28	
26	71	3.87 qd (6.5, 2.6)	H-25, 27	
27	18.3	1.17 d (6.5)	H-26	C-25, 26
28	12.5	0.97 d (7.1)	H-25	C-24, 25, 26
29	110.2	4.79 s, 4.64 brs		C-23, 25
30	48.8	3.24 s		C-22
31	87.8	5.23d (6.9), 4.80 d (6.9)		C-18
32	62.1	3.56 s		C-15
33	14.3	0.86 s		C-13, 14, 15, 34
34	23.7	1.00 s		C-13, 14, 15, 33
1'	178.6			
2'	55.2	4.38 dd (7.3, 5.2)	H-3'	C-1'
3'	31.6	1.89 m, 1.75 m	H-2', 4'	
4'	26.3	1.64 m	H-3', 5'	C-2', 3'
5'	42.3	3.18 m, 3.22 m	H-4'	C-7'
7'	158.7			

Table 4-3. Onnamides (**1, 3, 5, 6**) の ¹H NMR スペクトルデータ

position	onnamide A (3)	4Z-onnamide A (4)	dyhidroonnamide A (5)	onnamide B (6)
1				
2	6.07 d (15.0)	6.08 d (14.9)	6.01 d (15.1)	6.02 d (15.1)
3	7.14 dd (15.0, 11.2)	7.67 dd (14.9, 12.0)	7.11 dd (15.1, 10.7)	7.12 dd (15.1, 10.8)
4	6.26 dd (14.9, 11.2)	6.00 dd (12.0, 11.2)	6.21 dd (15.1, 10.7)	6.26 dd (15.2, 10.8)
5	6.52 dd (14.9, 10.7)	6.28 t (11.2)	6.10 dt (15.1, 6.8)	6.12 dt (15.2, 6.9)
6	6.22 dd (15.1, 10.7)	6.72 dd (14.9, 11.2)	2.19 q (6.0)	-
7	5.95 dt (15.1, 6.9)	5.97 dt (14.9, 7.3)	1.46 m	-
8	2.22 m, 2.13 m	2.19 m	1.31 m, 1.35 m	2.22 m, 2.16 m
9	1.56 m, 1.42 m	1.63 m, 1.48 m	1.31 m, 1.46 m	1.54 m, 1.44 m
10	1.31 m, 1.50 m	1.30 m, 1.49 m	1.31 m, 1.46 m	1.27 m, 1.50 m
11	3.66 m	3.66 m	3.66 m	3.66 m
12	1.53 m	1.54 m	1.54 brt (6.1)	1.53 m
13	3.48 dd (8.4, 3.9)	3.48 dd (8.9, 3.0)	3.49 t (6.8)	3.48 dd (8.8, 3.6)
14				
15	3.64 d (9.8)	3.67 brd (9.9)	3.65 d (9.4)	3.65 d (9.9)
16	4.17 dd (9.8, 6.6)	4.17 dd (9.9, 6.5)	4.17 dd (9.8, 6.5)	4.17 dd (9.9, 6.5)
17	3.99 dd (9.3, 6.6)	4.00 dd (9.4, 6.5)	3.98 dd (9.3, 6.5)	3.98 dd (9.3, 6.5)
18	5.80 d (9.3)	5.81 d (9.4)	5.81 d (9.3)	5.81 d (9.3)
20				
21	4.24 s	4.24 s	4.24 s	4.24 s
22				
23	2.41 brd (14.3), 2.32 brd (14.3)	2.40 brd (14.0), 2.31 brd (14.0)	2.42 d (14.3), 2.33 d (14.3)	2.41 brd (14.3), 2.32 brd (14.3)
24				
25	2.19 m	2.19 m	2.20 m	2.19 m
26	3.88 qd (6.5, 2.6)	3.86 qd (6.5, 2.5)	3.88 qd (6.5, 2.6)	3.88 qd (6.5, 2.5)
27	1.18 d (6.5)	1.17 d (6.5)	1.18 d (6.5)	1.18 d (6.5)
28	0.97 d (7.0)	0.95 d (7.0)	0.97 d (7.0)	0.97 d (7.0)
29	4.79 brs, 4.65 brs	4.79 brs, 4.64 brs	4.79 brs, 4.65 brs	4.79 brs, 4.64 brs
30	3.24 s	3.21 s	3.25 s	3.24 s
31	5.20d (6.9), 4.80 d (6.9)	5.22 d (6.9), 4.79 d (6.9)	5.21 d (6.9), 4.80 d (6.9)	5.21d (6.9), 4.80 d (6.9)
32	3.56 s	3.56 s	3.56 s	3.56 s
33	0.86 s	0.86 s	0.87 s	0.86 s
34	1.01 s	1.01 s	1.01 s	1.00 s
1'				
2'	4.37 dd (7.9, 5.3)	4.40 dd (7.5, 5.0)	4.37 dd (7.4, 5.2)	4.37 dd (7.8, 5.3)
3'	1.90 m, 1.75 m	1.91 m, 1.75 m	1.90 m, 1.74 m	1.87 m, 1.73 m
4'	1.62 m	1.63 m	1.62 m	1.62 q (9.5)
5'	3.19 m	3.22 m	3.22 m, 3.17 m	3.22 m, 3.16 m
7'				

化合物 **1-6** の共通した $^1\text{H NMR}$ や onnamide A の生合成経路¹⁰³ から、2Z-および 6Z-onnamide A (**1, 2**) の立体構造は onnamide E を除いた onnamide 類縁体と共通した 11*R*, 13*R*, 15*S*, 16*R*, 17*S*, 18*S*, 21*S*, 22*R*, 25*R*, 26*R* および 2'*S* であると推測される。また、**3** を CD₃OD 中で光照射したところ、照射時間に応じて **1, 2** および 4Z-onnamide A (**4**) へと光異性化することが $^1\text{H NMR}$ の解析で明らかとなった (Table 4-4)。Calyculin 類はそれらのテトラエン部位が光によって異性化したことが報告されている¹⁰⁴。それと同様に **1, 2** は **3** のポリエン部位のみが光異性化したことが推察され、**1** および **2** は onnamide 類縁体と同じ立体構造を有することが示唆される。しかしながら、本海綿 *T. conica* は浅い水深 (10-15 m) に生息するために太陽光によって体内で **3** から幾何異性体が生じるのか、もしくは、精製途中で光に当たることで生じたのかは不明である。一方で、ヒストン修飾活性試験では 20 時間、細胞毒性評価の MTT 試験では 72 時間の化合物処理を行うが、その時間においては異性化が進んでいないことが確認された。

Table 4-4. Onnamide A (**3**) の蛍光灯下における $^1\text{H NMR}$ スペクトルの経時変化 [**3** に由来するシグナル (H-3) の積分値を 1 とした際の、**1, 2** および **4** に由来するプロトンシグナル (H-3 もしくは H-4) の積分値]

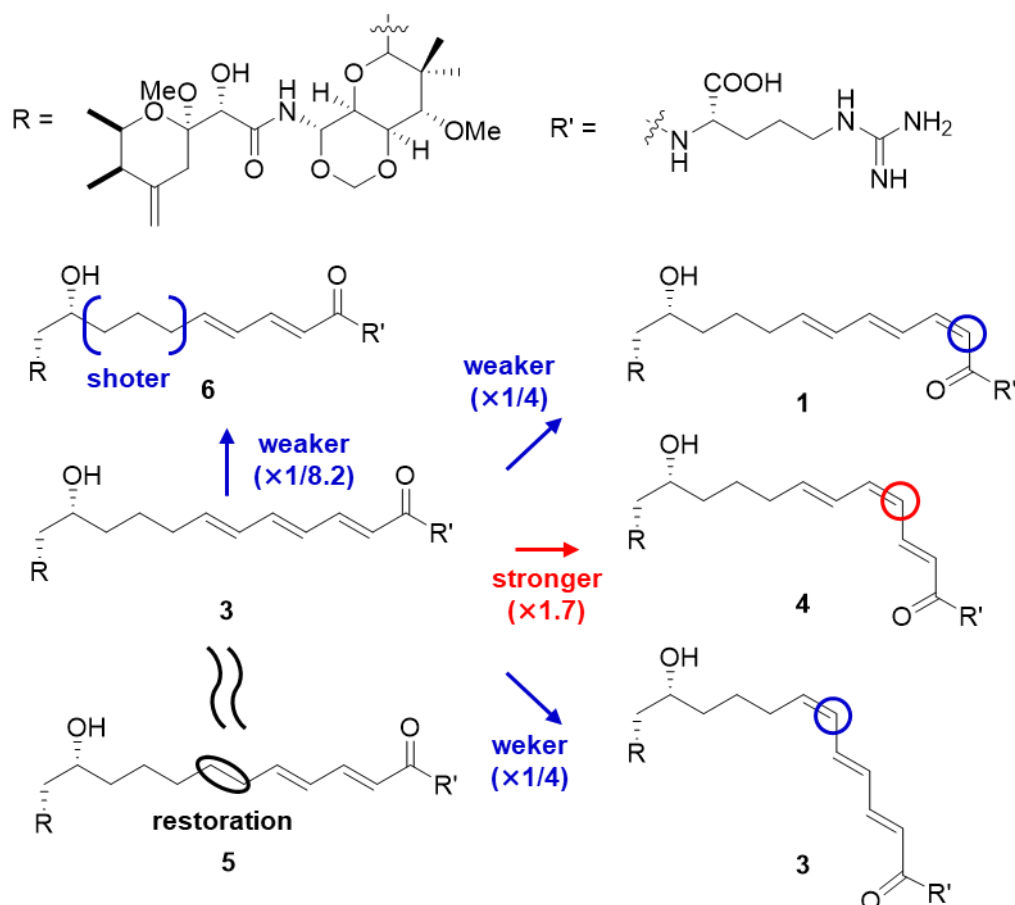
compound/position	time (hour)							
	0	24	48	72	96	168	672	840
onnamide A (3)/H-3	1	1	1	1	1	1	1	1
2Z-onnamide A (1)/H-4	0.03	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.09	0.12
4Z-onnamide A (2)/H-3	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.04	0.08	0.13
6Z-onnamide A (4)/H-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.02	0.05	0.08

4-4. Onnamide 類の生物活性

化合物 **1-6** は、HeLa 細胞および P388 細胞に対して、IC₅₀ 値 38-540 および 310-5200 μM で細胞毒性を示した (Table 4-5)。本研究で行った HeLa 細胞に対する細胞毒性に関する SAR 解析では、 $\Delta^{21,22}$ が還元された **5** は **3** と同程度の細胞毒性を示しており、炭素鎖が 2 つ短い **6** は **3** より弱い活性を示した (1/8.2)。また、4Z 体 (**4**) は **3** と比較して 1.7 倍強く、2Z 体 (**1**) および 6Z 体 (**2**) は約 2.5 倍弱い細胞毒性を示した。このように側鎖構造の細かな違いによって、活性への影響に差が認められた (Figure 4-5)。

Table 4-5. Cytotoxicity against HeLa and P388 by compounds 1–6

	cell line	1	2	3	4	5	6	
IC ₅₀	HeLa	0.066	0.17	0.038	0.15	0.057	0.54	
	μM	P388	0.62	1.8	0.31	4.8	0.57	5.2

**Figure 4-5.** Onnamide 類の細胞毒性に対する SAR.

次に、**3** によるヒストン修飾への影響を各ヒストン修飾特異的な蛍光標識モノクローナル抗体 16 種類を用いて検討した (Figure. 4-6)。その結果、化合物 **3** は細胞毒性の IC₅₀ 値 (66 nM) より高濃度 (70 nM および 140 nM) で、11 種類のヒストン修飾変化を誘導した。一方、より低濃度となる 35 nM では、H3K4me₃, H3K27me₃ および H3K36me₃ レベルを亢進し、H4K5ac レベルを抑制した。これら 4 種類のヒストン修飾は、細胞毒性との関連性が指摘されているものであるが¹⁰⁵⁻¹¹⁰、細胞毒性の IC₅₀ 値より低い濃度でもこれら修飾の変化が検出されたこと

は非常に興味深い。

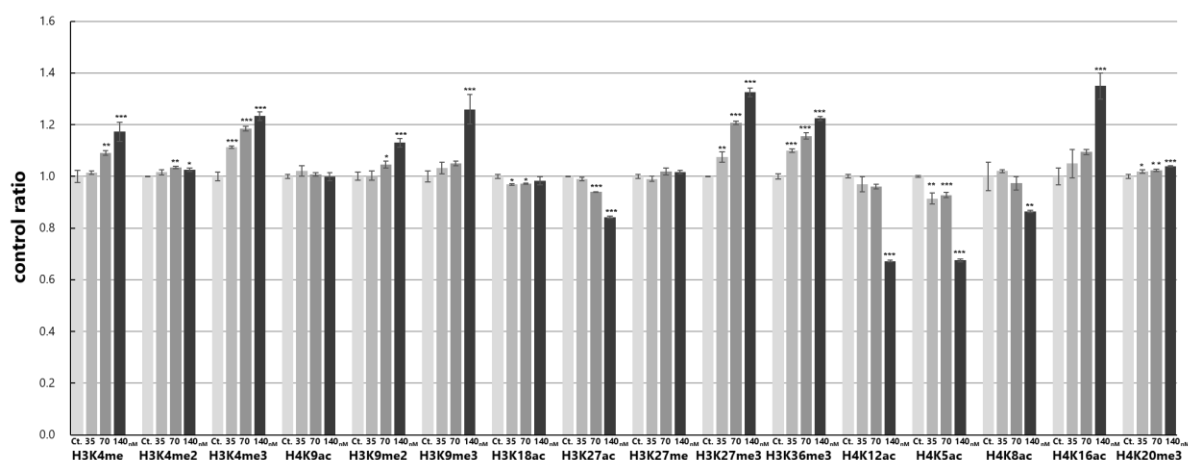


Figure 4-6. Onnamide A (1) のヒストン修飾調節活性試験結果. 各サンプルを含む培地で 20 時間培養した後の各ヒストン修飾レベルの定量化 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, $n = 3$, mean \pm S.D. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ vs control, Dunnett test).

そこで, 1 と同濃度において, onnamide 類縁体 (1, 2, 4-6) についても 3 と同じ濃度 (35, 70 および 140 nM)でのヒストン修飾 H3K4me3, H3K27me3, H3K36me3 および H4K5ac への影響を検討したところ (Figure 4-7), IC_{50} 値の約 1/8 の濃度 (70 nM) で投与した 6 が 4 種のヒストン修飾レベルの変化を誘導した。その一方で, 細胞毒性の IC_{50} 値よりも低い濃度 (35 nM) で 1, 2, 4, 5 に強い細胞毒性が観察された (Figure 4-8)。細胞毒性が細胞播種 1 日後に化合物投与, 3 日間培養後の評価であり, ヒストン修飾変化が細胞播種と同時に化合物投与, 20 時間培養後に評価することによる, サンプルの投与時期および培養期間の違いによる細胞感受性の変化を考慮すると, onnamide 類は細胞毒性に対応したヒストン修飾変化を引き起こしていた可能性が示唆された。

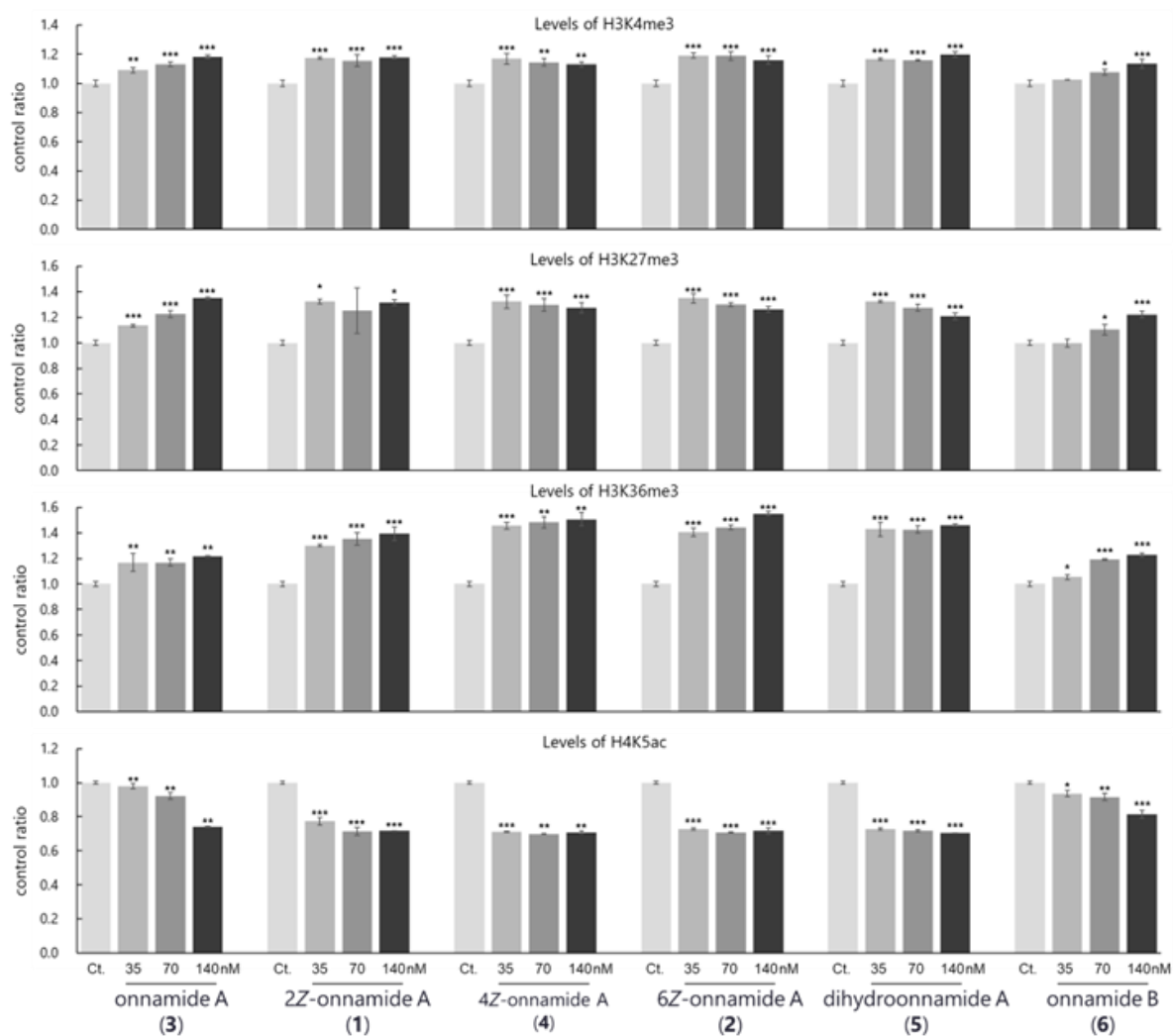


Figure 4-7. Onnamide 類 (1-6) による H3K4me3, H3K27me3, H3K36me3, および H4K5ac のレベルへの影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, n = 3, mean \pm S.D. ***: p < 0.001, **: p < 0.01, *: p < 0.05 vs control, Dunnett test).

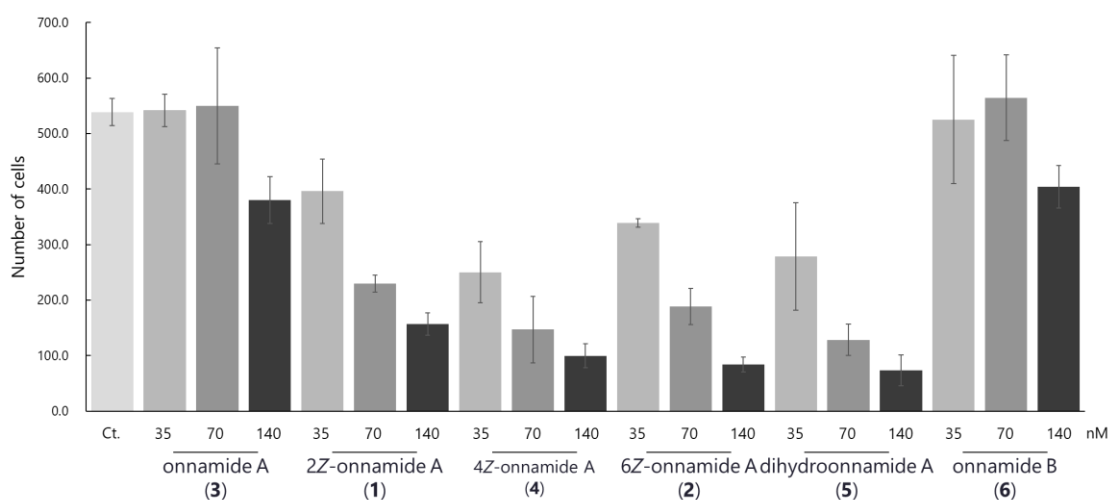


Figure 4-8. ヒストン修飾調節活性試験における onnamide 類 (1-6) による細胞数への影響 (縦軸: 細胞数, n = 3, mean ± S.D.).

Onnamide A (3) は, anisomycin と同様にリボトキシックストレス応答, RSR を誘発することによって p38 や JNK を活性化することが知られている¹¹¹。そこで, anisomycin についても 4 種のヒストン修飾を確認したところ, 3 と同じ挙動が観察された (Figure 4-9)。RSR はリボソームの 28S rRNA への障害に反応して, MAPK を介した炎症性シグナルカスケードを誘導することで最終的に細胞死を引き起こすと考えられているが, その伝達経路は明らかにされていない^{112,113}。また, RSR の生理的な関連性についてもほとんど分かっていない¹¹³。化合物 3 と anisomycin はそれぞれ, リボソームの E site および A site に結合することでリボソーム機能を阻害するが^{114,115}, そのリボソームの異常はいずれも MAPKKK である ZAK α によって検出され, MAP キナーゼを介した炎症性シグナルカスケードを誘導することで最終的にアポトーシスを引き起こすと報告されている¹¹⁶。そのため, 3 と anisomycin によって引き起こされるヒストン修飾変化は MAP キナーゼを介した炎症性シグナルカスケードによるものであると考えられる。

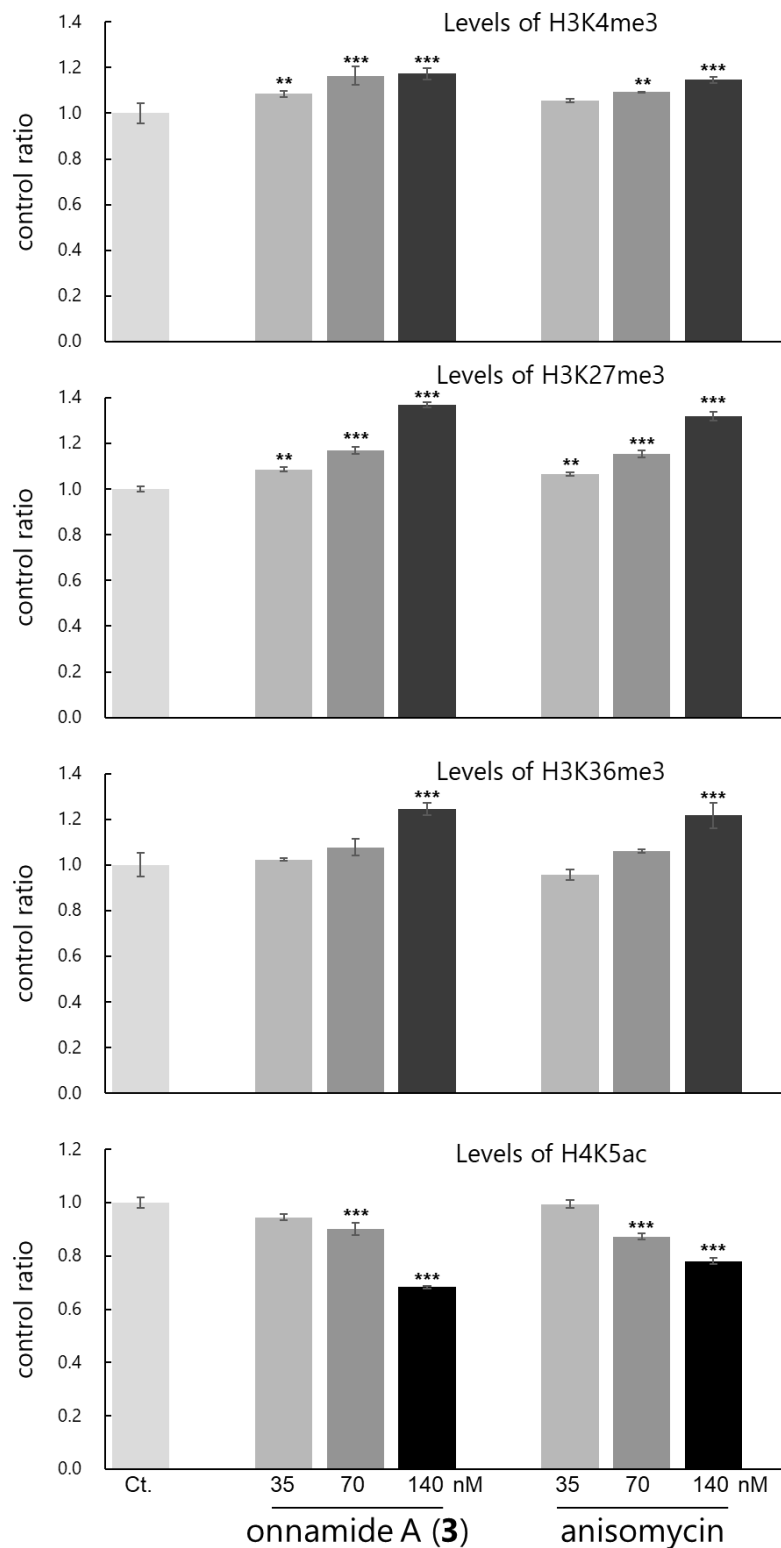


Figure 4-9. タンパク質合成阻害剤 anisomycin による H3K4me3, H3K27me3, H3K36me3, および H4K5ac のレベルへの影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, n = 3, mean ± S.D. ***: p < 0.001, **: p < 0.01 vs control, Dunnett test).

4-5. 結言

本研究では、海綿 *T. conica* から新たな類縁体 2Z-および 6Z-onnamides A (**1** および **2**) と 4 種類の onnamides (**3-6**) を単離し、それら構造を MS および NMR スペクトル解析によって解明した。化合物 **1-6** の SARs により、onnamide 類に共通する側鎖ポリエーテル部位の幾何異性が細胞毒性に影響することが明らかとなった。また、**3** は細胞毒性の IC₅₀ 値より低い濃度 35 nM でヒストン修飾 H3K4me3, H3K27me3 および H3K36me3 レベルを亢進し、H4K5ac レベルを抑制することが明らかとなった。今回、細胞内のヒストン修飾変化を追うことで、結果として細胞毒性化合物 onnamide 類を同定したが、ヒストン修飾変化を指標とすることで、細胞毒性よりも短時間・低濃度で活性が検出でき、高感度に活性化合物の探索が可能となることが示された。

4-6. 第4章の実験項目

4-6-1. 実験装置

各種 NMR スペクトルは Bruker Avance 400 MHz 型スペクトルメーター (Bruker) を用いて測定した。¹H および ¹³C NMR の化学シフト値は、 δ_{H} 3.31 および δ_{C} 49.15 を CD₃OD の溶媒ピークを参照した。ESIMS は、AB SCIEX TripleTOF™ 4600 型質量分析計 (株式会社エービー・サイエックス, 東京, 日本) を用いて測定した。UV スペクトルは、UV-1800 分光光度計 (株式会社島津製作所) を用いて記録した。IR スペクトルは、JIR-WINSPEC50 分光計 (日本電子株式会社) で測定した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 Olympus IX71 および DP72 digital camera (オリンパス株式会社) を用いて撮影した。

4-6-2. 生物材料

海綿 *T. conica* は、2007 年 6 月に鹿児島県奄美大島 (N 28° 06.82', E 129° 21.09') 採集して実験で使用するまで -25°C で保存した。

4-6-3. 精製

海綿断片 (1020 g, 湿重量) を解凍後、MeOH (300 mL × 5) 中で粉碎し、抽出・濃縮後、H₂O と CHCl₃ を用いた二層分配に付した。水層はさらに *n*-BuOH で抽出し、先の CHCl₃ 層と *n*-BuOH 層を合一して有機層とした。有機層を Kupchan 分画⁸³、詳細には、*n*-hexane と 90% MeOH を用いて二層分配し、*n*-hexane 可溶画分を得た。90% MeOH 層に H₂O を加えて 60% MeOH 層とした後、CHCl₃ で抽出し、CHCl₃ 可溶画分と 60% MeOH 可溶画分を得た。CHCl₃ 層を濃縮して、ODS フラッシュクロマトグラフィー (50%, 70% MeOH, 70%, 85% MeCN, 100% MeOH, CHCl₃/MeOH/H₂O=6/4/1) に付して、6つの画分を得た。これら画分について、ヒストン修飾調節活性試験を行い、活性が認められた 70% MeOH 溶出画分を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (CHCl₃, CHCl₃/MeOH = 19:1, 9:1, CHCl₃/MeOH/H₂O = 8:2:0.1, 7:3:0.5, 6:4:1, 5;5;2) を用いて画分 11 に分画した。画分 8 を逆相 HPLC [カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 20 mm), 検出器: UV 220 nm, 移動相: 60% MeOH] に付し、画分 8-1~8-12 に分画した。これらのうち、画分 8-4 は onnamide B (**6**, 8.5 mg), 画分 8-6 は onnamide A (**1**, 44.2 mg), 画分 8-11 は dihydroonnamide A (**5**, 4.3 mg) と同定した。また、画分 8-8 はさらに逆相 HPLC [カラム:

COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 x 10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相: 32.5% MeOH] に付し, その後, リサイクル HPLC [カラム: phenomenex PHENYL-HEXYL (250 x 10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相: 40% MeOH] で最終精製することによって 2Z-onnamide A (**2**, 3.4 mg, 収率 3.4x10⁻³%) および 6Z-onnamides A (**4**, 1.5 mg, 収率 1.5x10⁻³%) を得た。また, 画分 8-10 リサイクル HPLC [カラム: phenomenex PHENYL-HEXYL (250 x 10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相: 40% MeOH] で精製することによって 4Z-onnamide A (**3**, 2.5 mg) を得た。

2Z-onnamides A (1). yellow amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{22.8} +48.5^{\circ}$ (c 0.2, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) 299.4 (4.58) nm; IR (KBr film) ν_{max} 3363, 2936, 1652, 1635, 1576, 1558, 1531, 1397, 1093, 1032 cm⁻¹; ESIMS m/z 794.4539 [M+H]⁺ (calcd for C₃₉H₆₄N₅O₁₂ 794.4546, Δ -0.9 ppm); ¹H and ¹³C NMR data see Table 4-1.

6Z-onnamides A (2). yellow amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{23.0} +46.0^{\circ}$ (c 0.2, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) 300.4 (4.73) nm; IR (KBr film) ν_{max} 3417, 2925, 1644, 1583, 1537, 1403, 1316, 1092, 1032 cm⁻¹; ESIMS m/z 794.4530 [M+H]⁺ (calcd for C₃₉H₆₄N₅O₁₂ 794.4546, Δ -2.0 ppm); ¹H and ¹³C NMR data see Table 4-2.

Onnamide A (3). yellow amorphous solid; HRESIMS m/z 794.4542 [M+H]⁺ (calcd for C₃₉H₆₄N₅O₁₂ 794.4546, Δ -0.5 ppm); ¹H NMR data see Table S4-1.

4Z-onnamides A (4). yellow amorphous solid; HRESIMS m/z 794.4552 [M+H]⁺ (calcd for C₃₉H₆₄N₅O₁₂ 794.4546, Δ +0.8 ppm); ¹H NMR data see Table S4-1.

Dihydroonnamide A (5). yellow amorphous solid; HRESIMS m/z 796.4692 [M+H]⁺ (calcd for C₃₉H₆₆N₅O₁₂ 796.4702, Δ -1.3 ppm); ¹H NMR data see Table S4-1.

Onnamide B (6). yellow amorphous solid; HRESIMS m/z 768.4391 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₆₂N₅O₁₂ 768.4389, Δ +0.2 ppm); ¹H NMR data see Table S4-1.

4-6-4. 細胞毒性試験

2-7-5 項と同様の方法で実施した。

4-6-5. ヒストン修飾調節活性試験

ヒストン修飾調節活性は HeLa 細胞を用いて, 多重免疫染色法により評価した¹¹⁷。HeLa 細

胞を 96 well プレート各 well に 1×10^4 cells/well となるように播種すると同時に DMSO で調製したサンプル添加培地 (DMSO 終濃度 0.1%) を用いて 5% CO₂ 下, 37°Cにて 20 時間培養した。その後、培地を除去し、4% PFA(富士フイルム和光純薬工業) 溶液を 100 μ L 加えて 10 分間静置し、細胞を固定した。固定液を除去し、PBS で 2 回洗浄後、1% Triton X-100 in PBS (Alfa Aesar) 100 μ L に続き、Blocking One-P (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) 50 μ L でそれぞれ 20 分間透過およびブロッキング処理した。その後、Alexa Fluor488 もしくは Cy3 で蛍光標識したヒストン修飾特異的な蛍光標識モノクローナル抗体 (1:1000, 株式会社モノクローナル抗体研究所, 長野, 日本) および Hoechst33342 (1:2000, 同仁化学研究所) 50 μ L で 2 時間反応させた。染色した各細胞を蛍光顕微鏡で撮影し、得られた画像中の蛍光強度を CellProfiler software⁵⁵ で解析することで、それぞれのヒストン修飾レベルを算出した。これをコントロール群 (DMSO のみ添加) と比較することで各サンプルの活性を評価した。

4-6-6. 統計分析

2-7-10 項と同様の方法で実施した。

4-6-7. Supporting Information

リスト

Figure S4-1. 2Z-onnamide A (1) の ESIMS (pos.).

Figure S4-2-1. 2Z-onnamide A (1) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-2-2. 2Z-onnamide A (1) の 5.6-7.6 ppm の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-3. 2Z-onnamide A (1) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-4. 2Z-onnamide A (1) の COSY スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-5. 2Z-onnamide A (1) の HMQC スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-6. 2Z-onnamide A (1) の HMBC スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-7. 6Z-onnamide A (2) の ESIMS (pos.).

Figure S4-8-1. 6Z-onnamide A (2) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-8-2. 6Z-onnamide A (2) の 5.6-7.6 ppm の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-9. 6Z-onnamide A (2) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-10. 6Z-onnamide A (2) の COSY スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-11. 6Z-onnamide A (2) の HMQC スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-12. 6Z-onnamide A (2) の HMBC スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-13. onnamide A (3) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-14. 4Z-onnamide A (4) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-15. dihydroonnamide A (5) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-16. onnamide B (6) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S4-17. Onnamide A (3) の蛍光灯下における ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

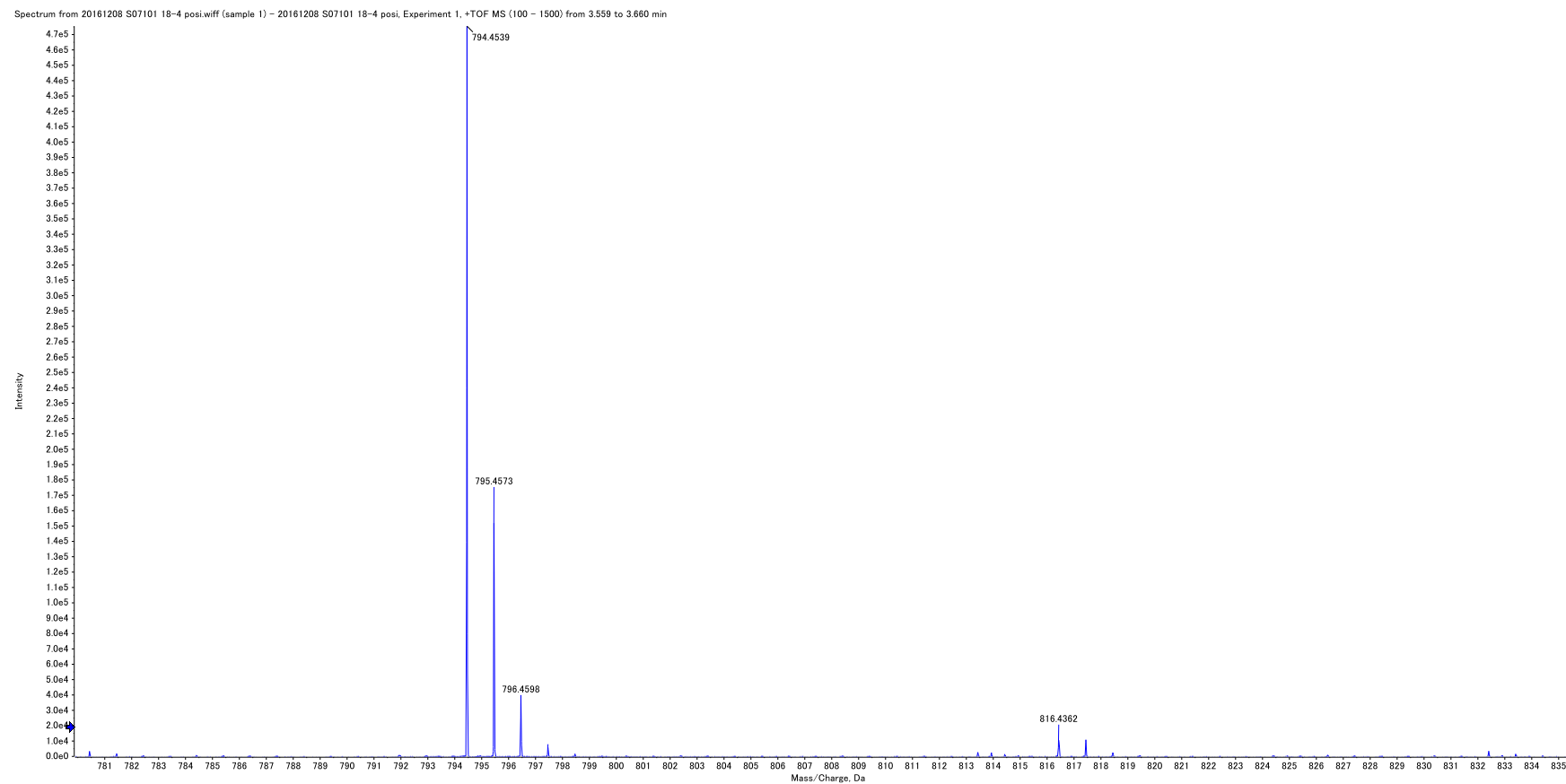


Figure S4-1. 2Z-onnamide A (2) の ESIMS (pos.).

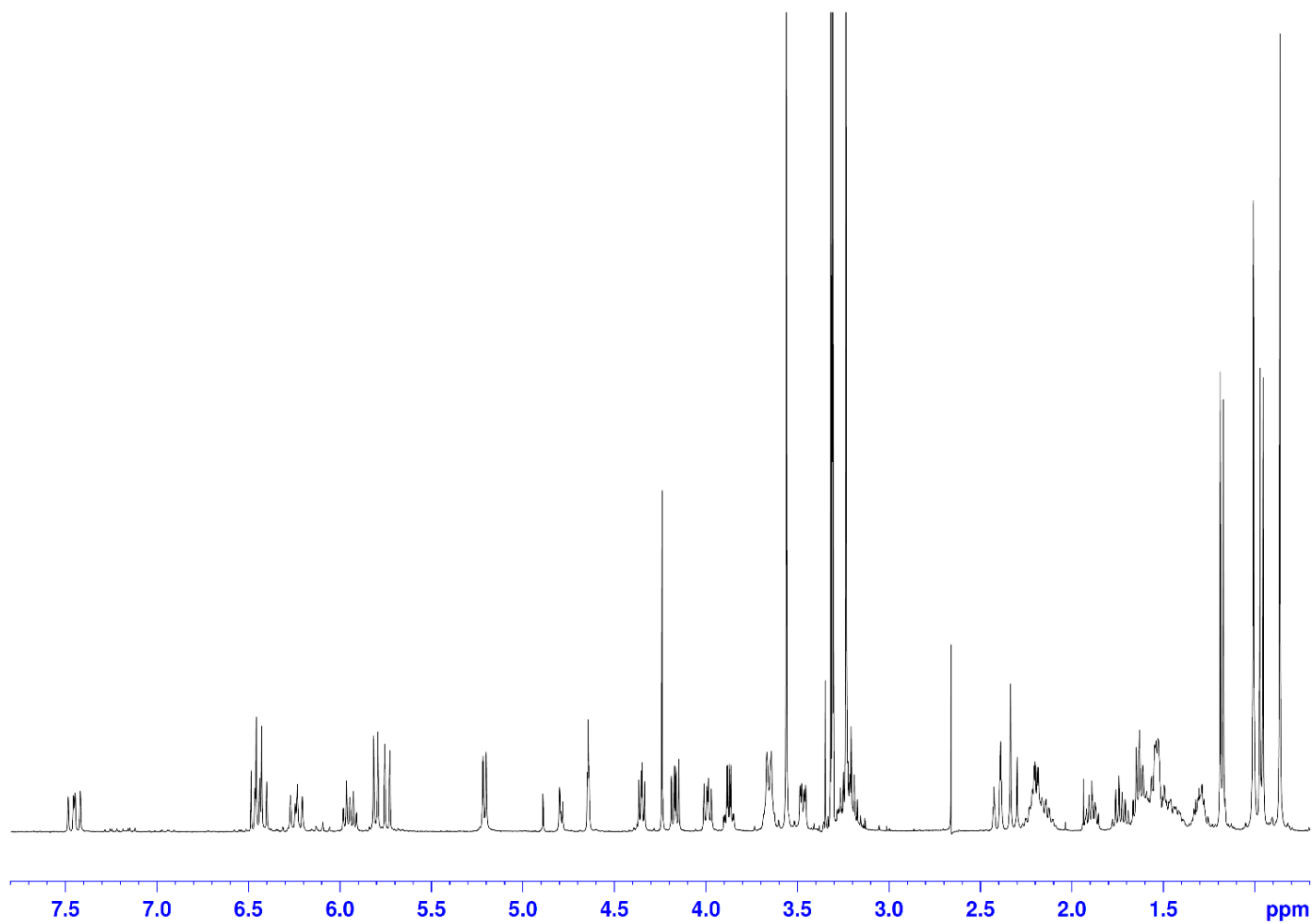


Figure S4-2-1. 2Z-onnamide A (2) の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

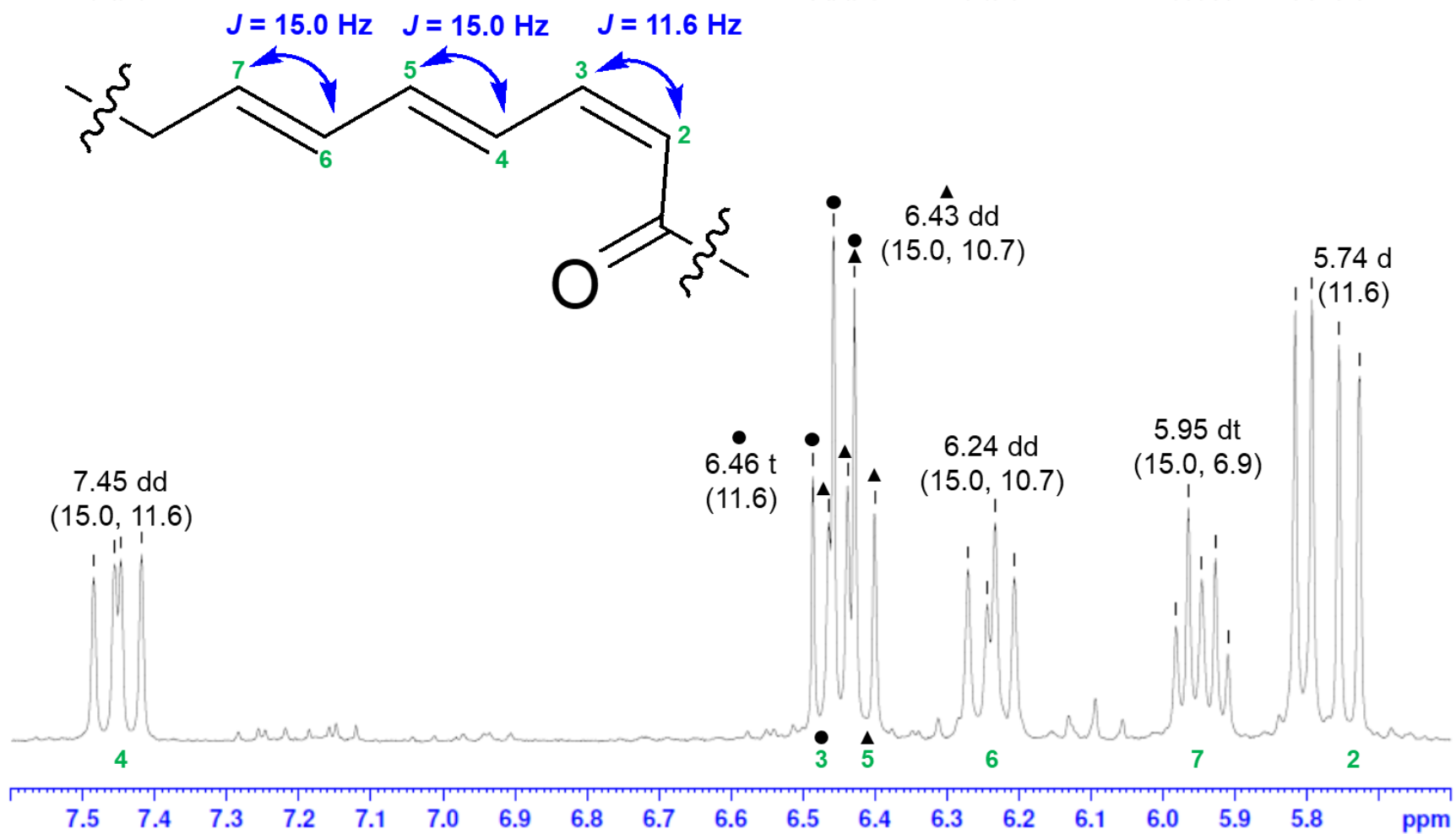


Figure S4-2-2. 2Z-onnamide A (2) の 5.6-7.6 ppm の $^1\text{H NMR}$ スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

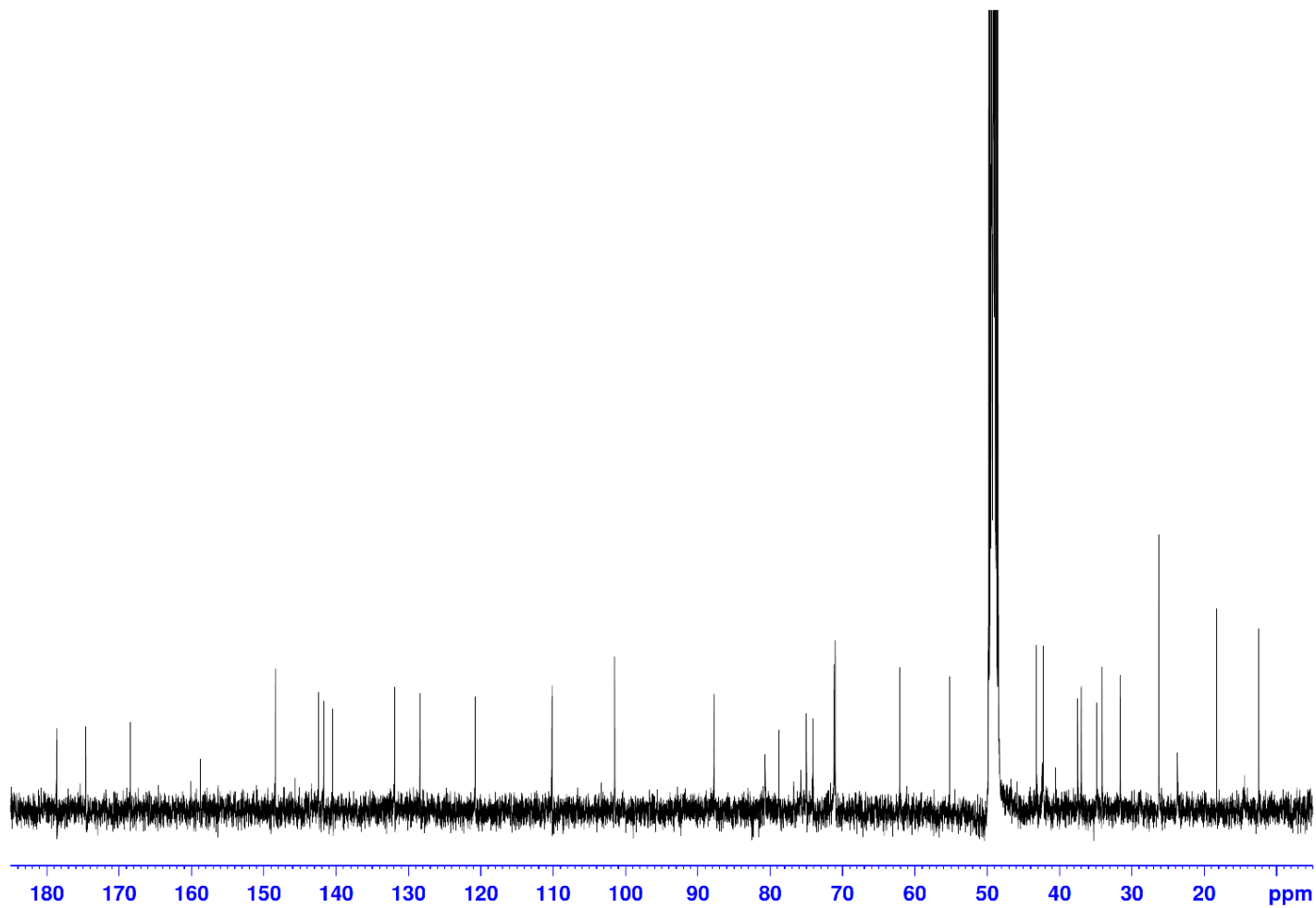


Figure S4-3. 2Z-onnamide A (2) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

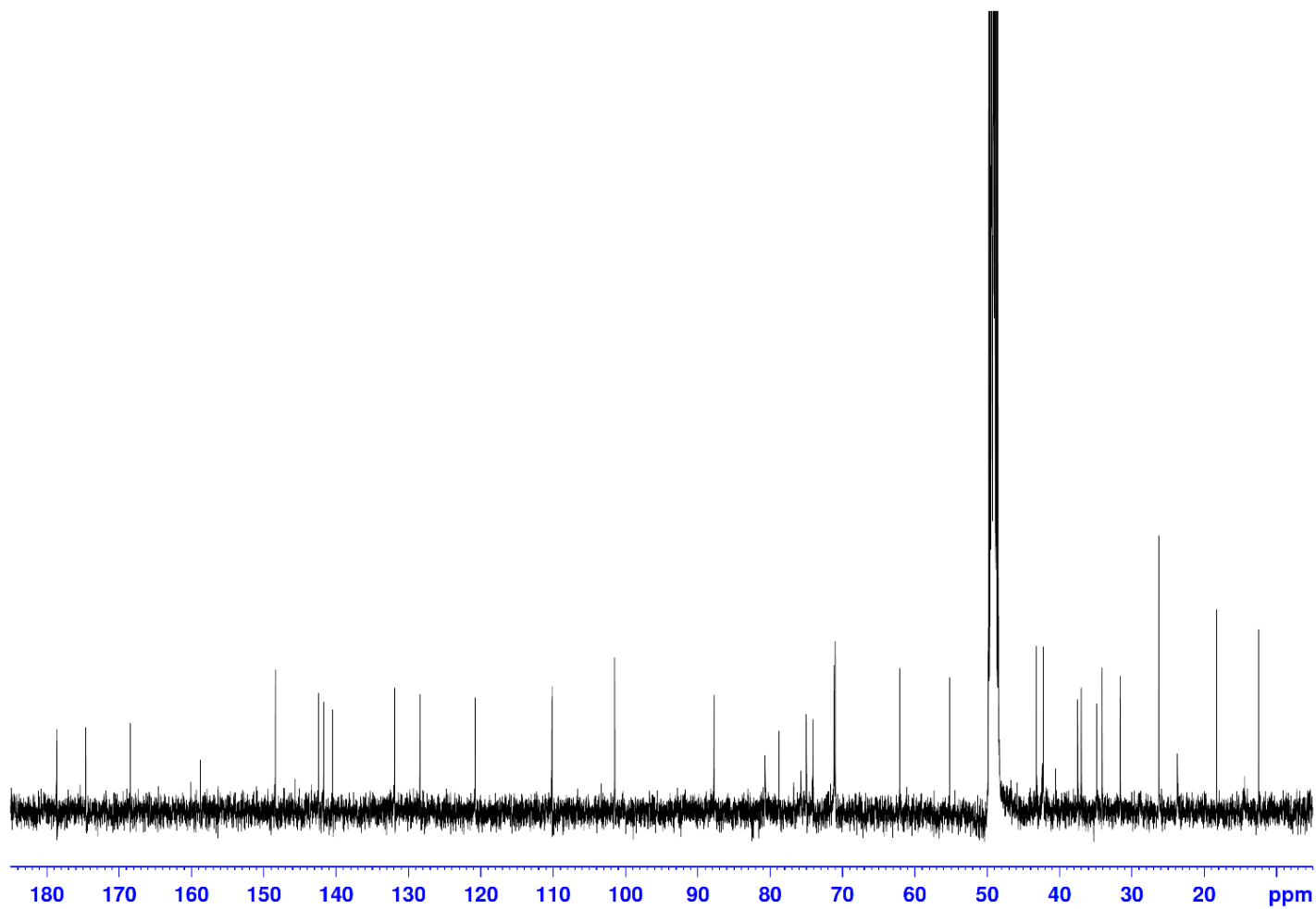


Figure S4-4. 2Z-onnamide A (2) の COSY スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

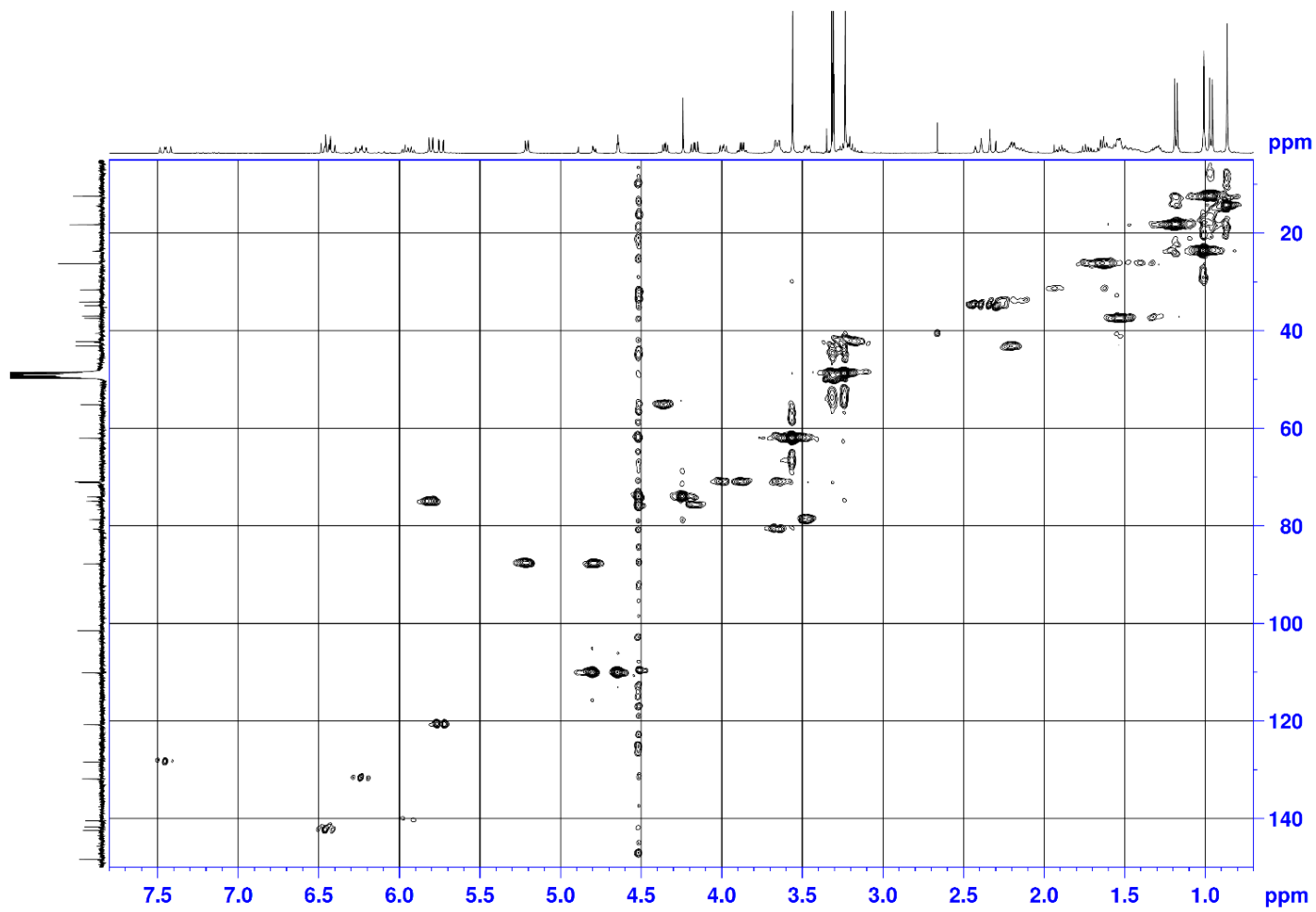


Figure S4-5. 2Z-onnamide A (2) の HMQC スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

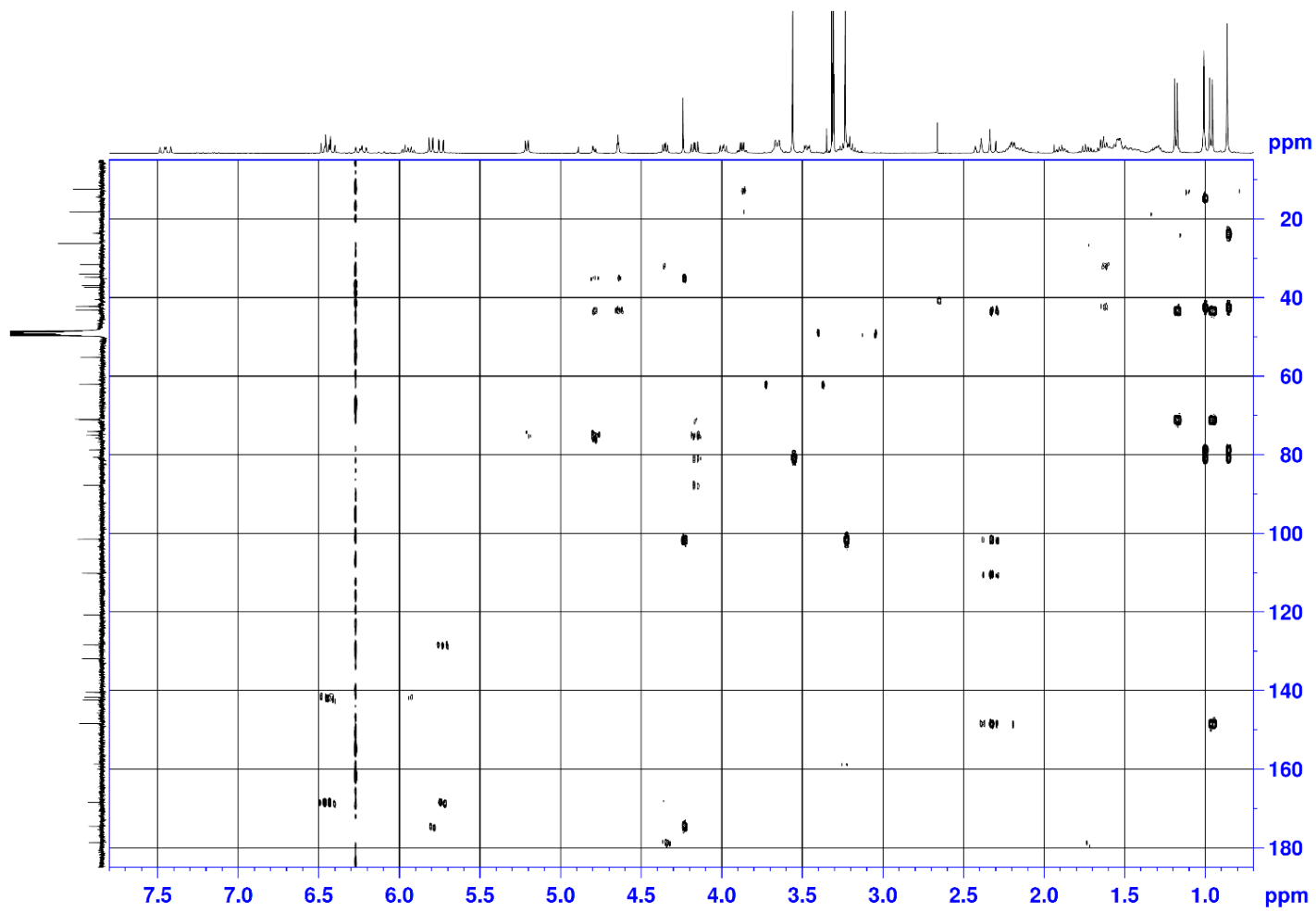


Figure S4-6. 2Z-onnamide A (2) の HMBC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

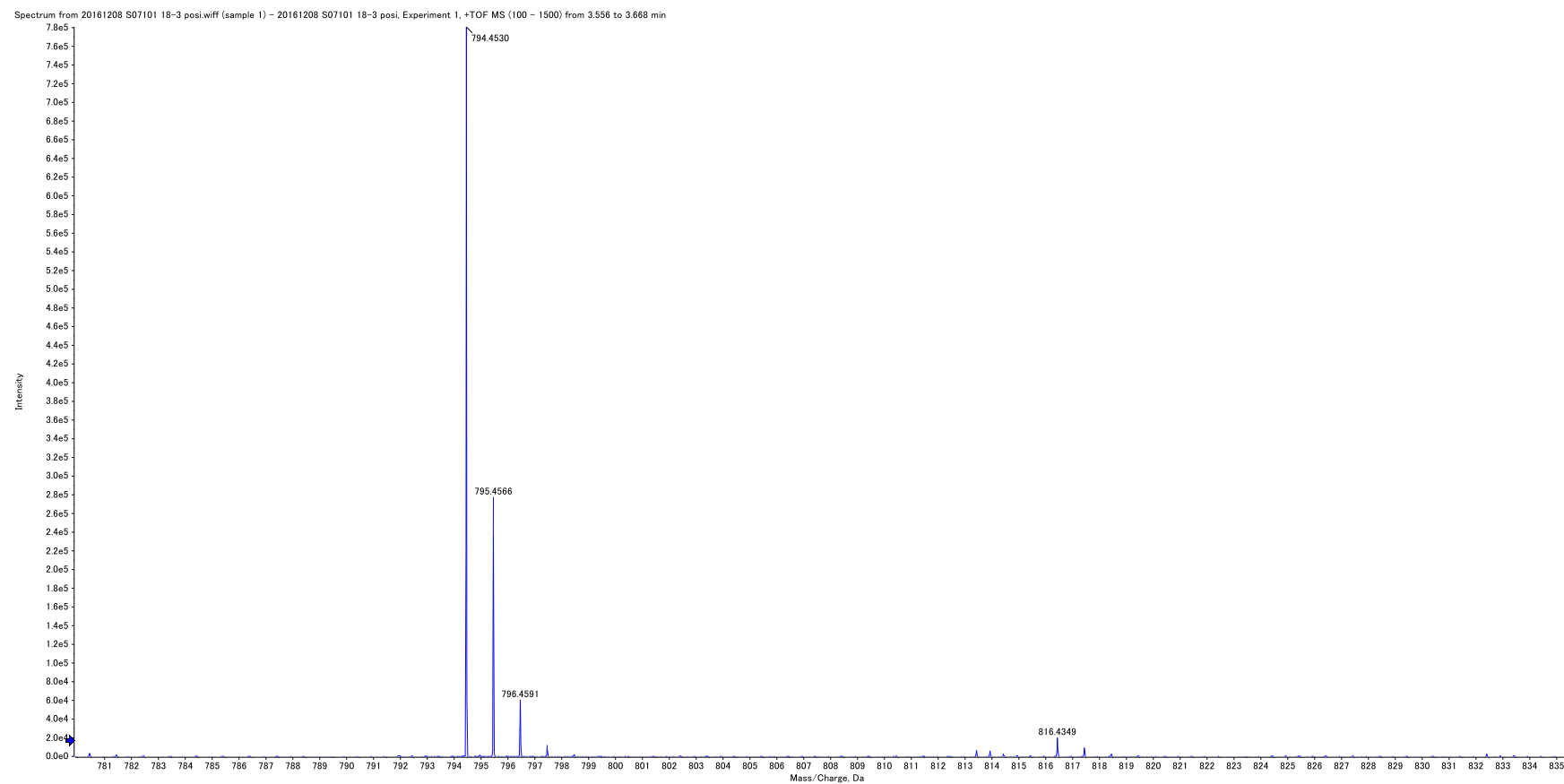


Figure S4-7. 6Z-onnamide A (4) の ESIMS (pos.).

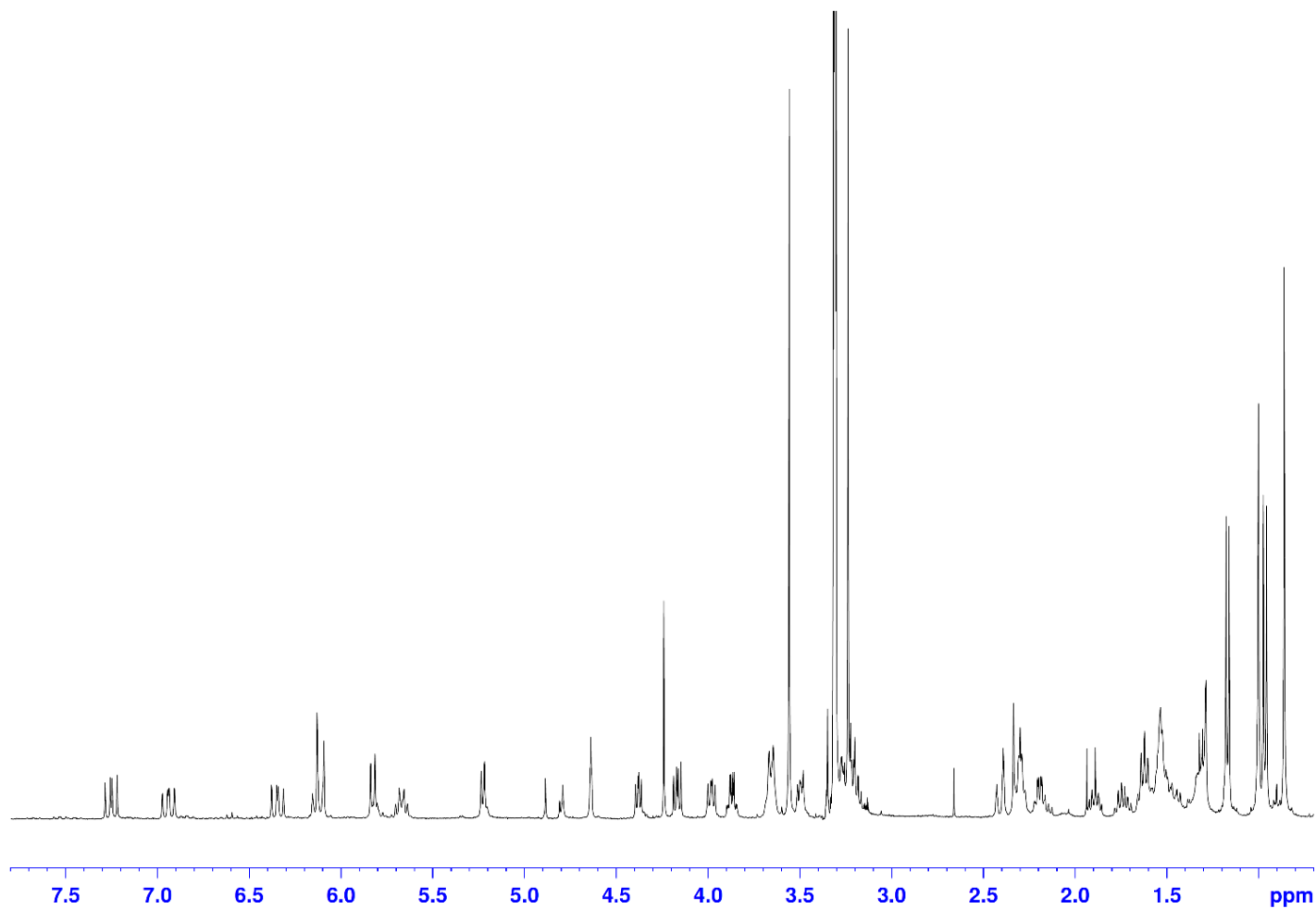


Figure S4-8-1. 6Z-onnamide A (4) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

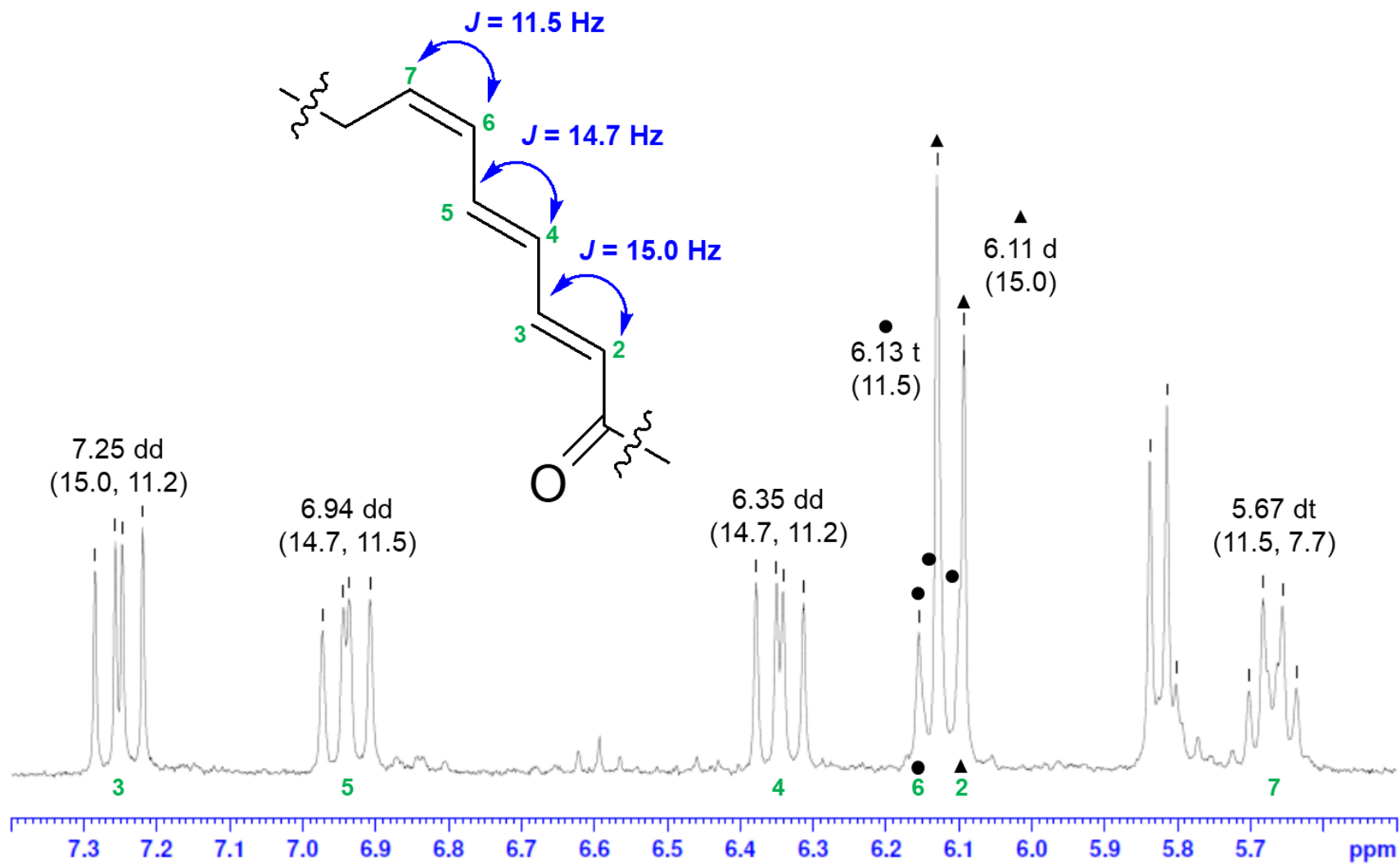


Figure S4-8-2. 6Z-onnamide A (4) の 5.6-7.6 ppm の ¹H NMR スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

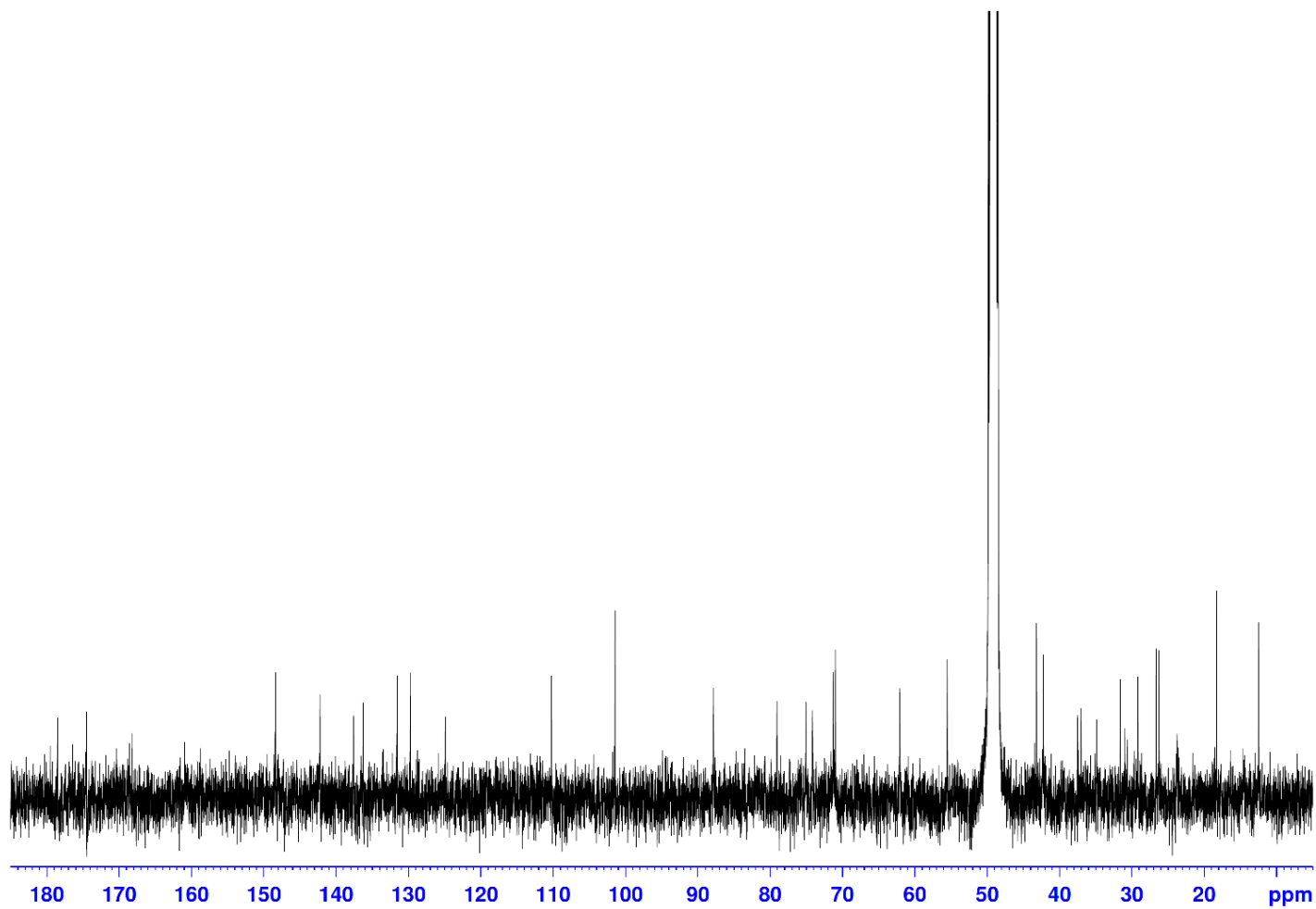


Figure S4-9. 6Z-onnamide A (4) の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

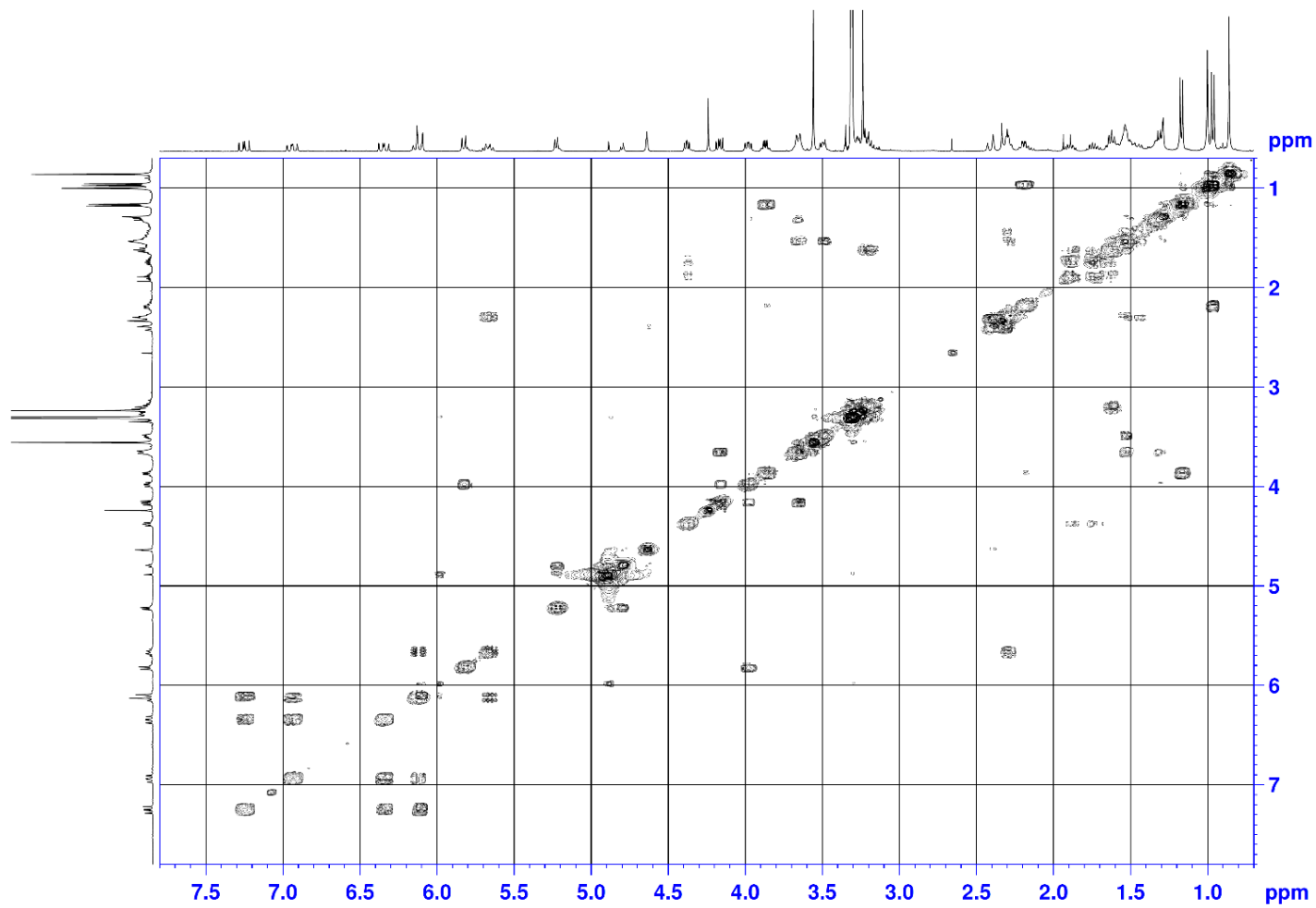


Figure S4-10. 6Z-onnamide A (4) の COSY スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

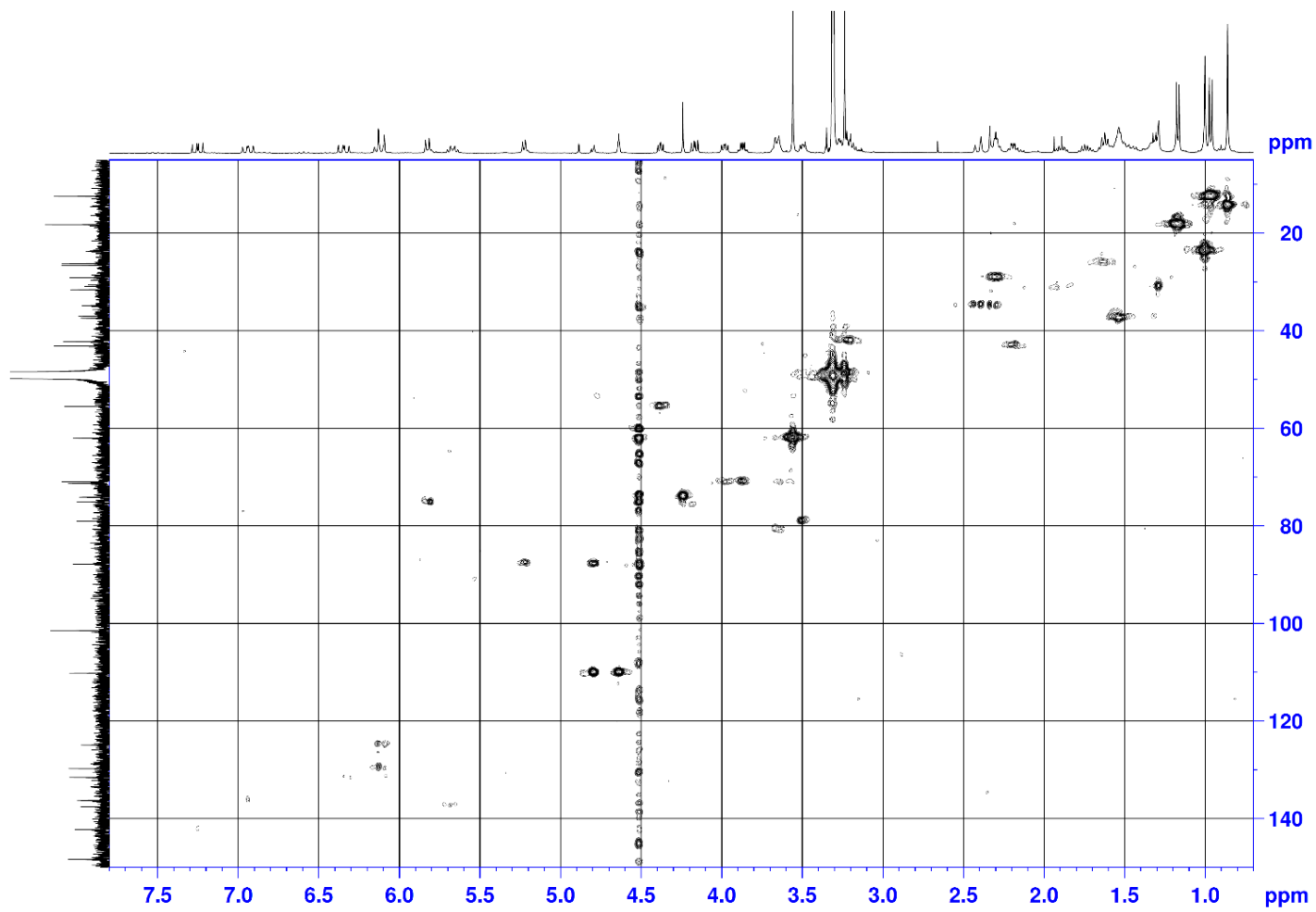


Figure S4-11. 6Z-onnamide A (4) の HMQC スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

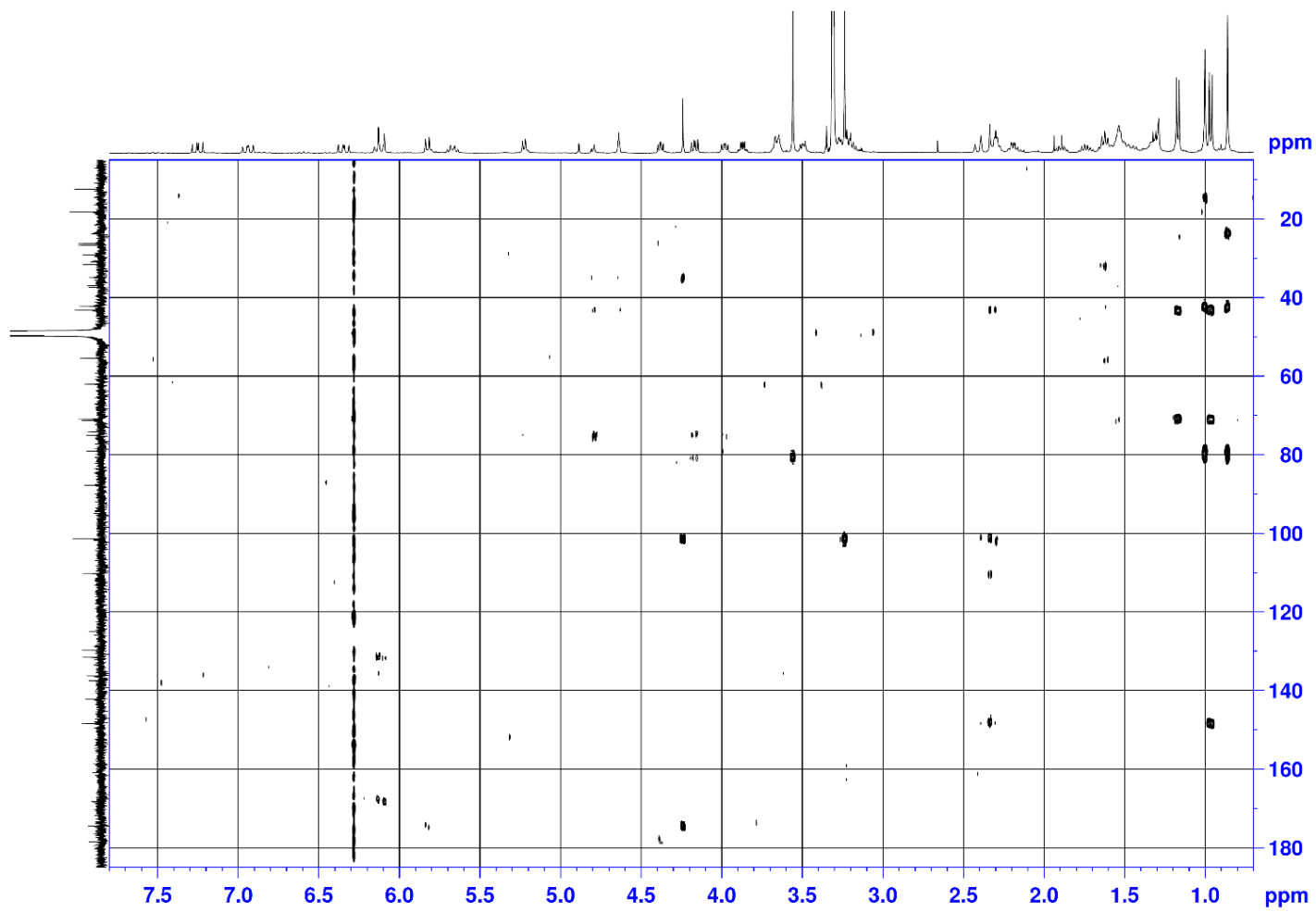


Figure S4-12. 6Z-onnamide A (4) の HMBC スペクトル (CD₃OD, 400 MHz).

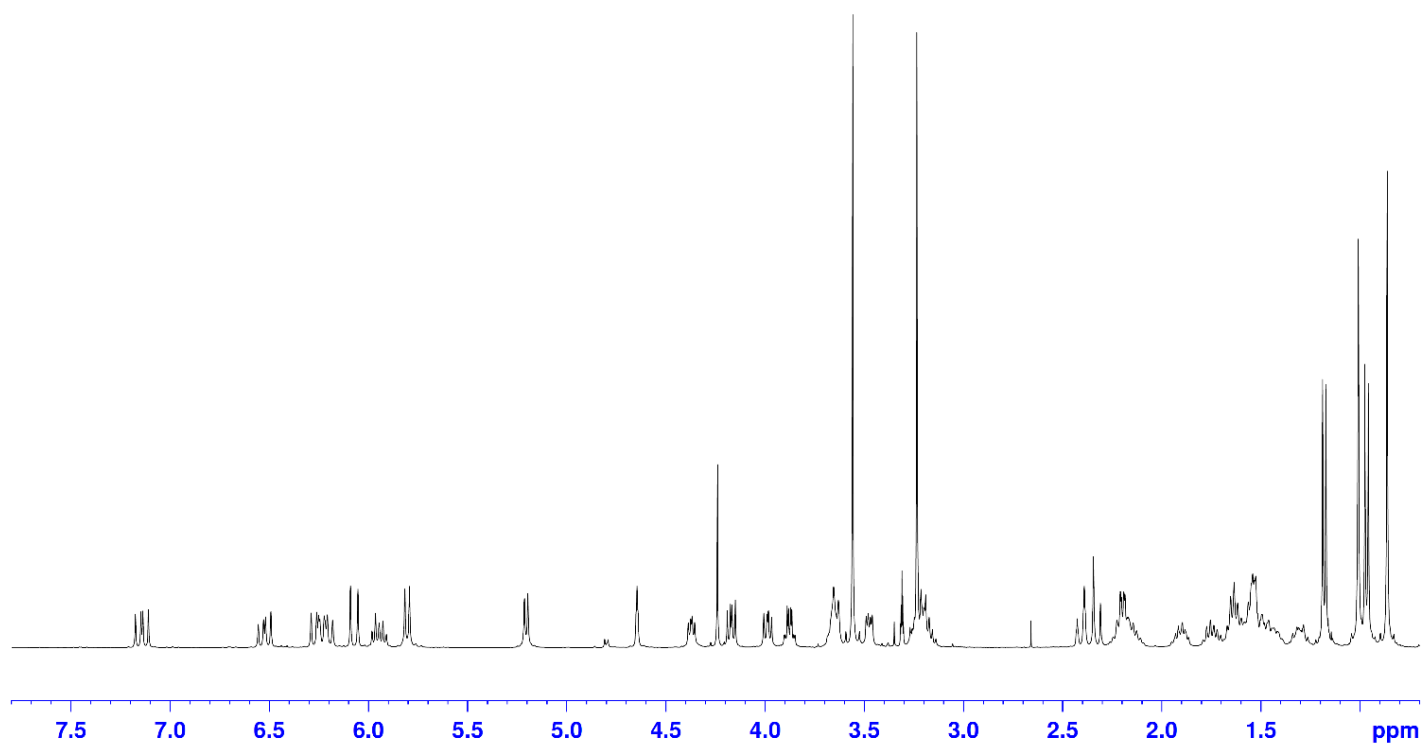


Figure S4-13. onnamide A (1) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

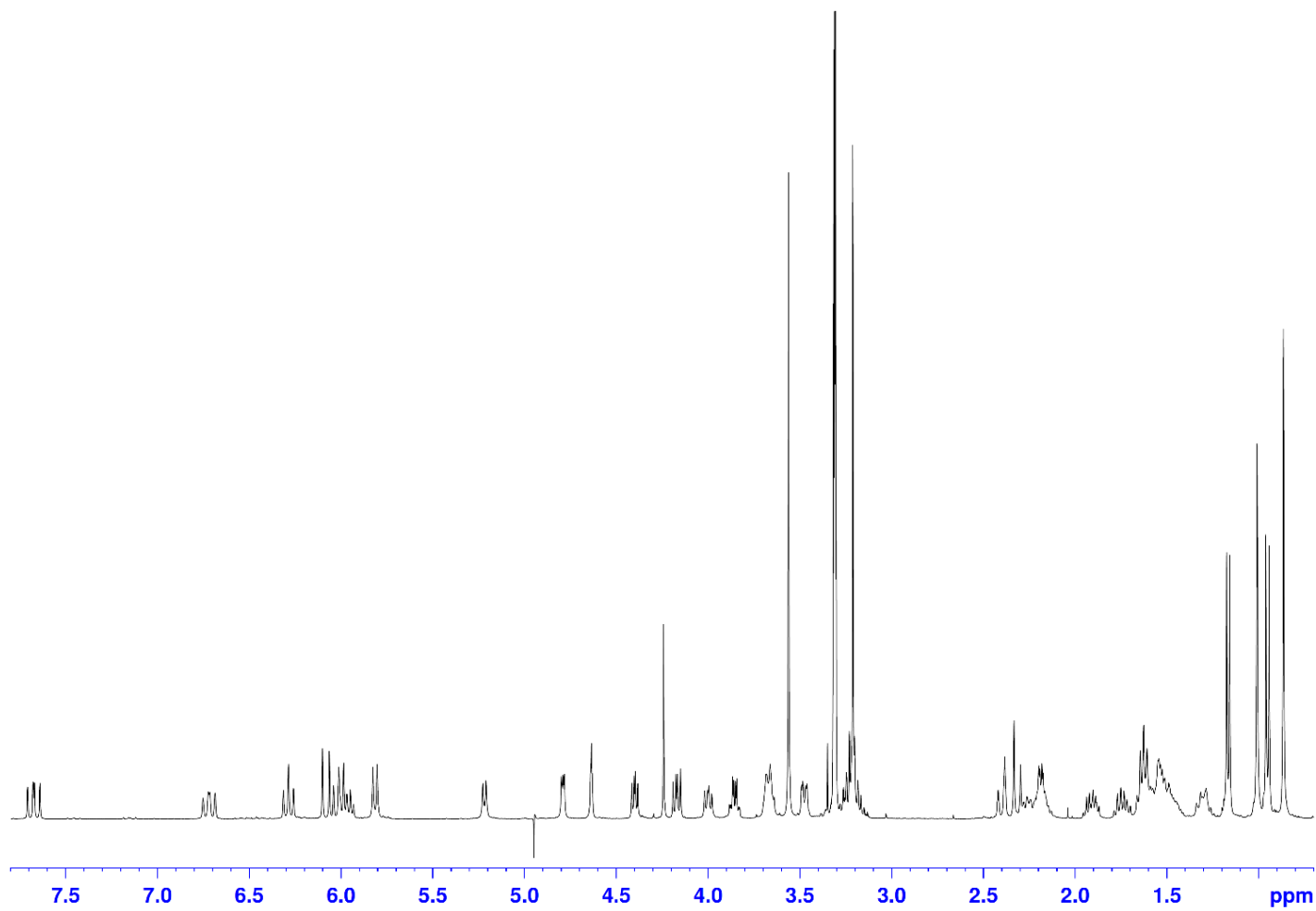


Figure S4-14. 4Z-onnamide A (3) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

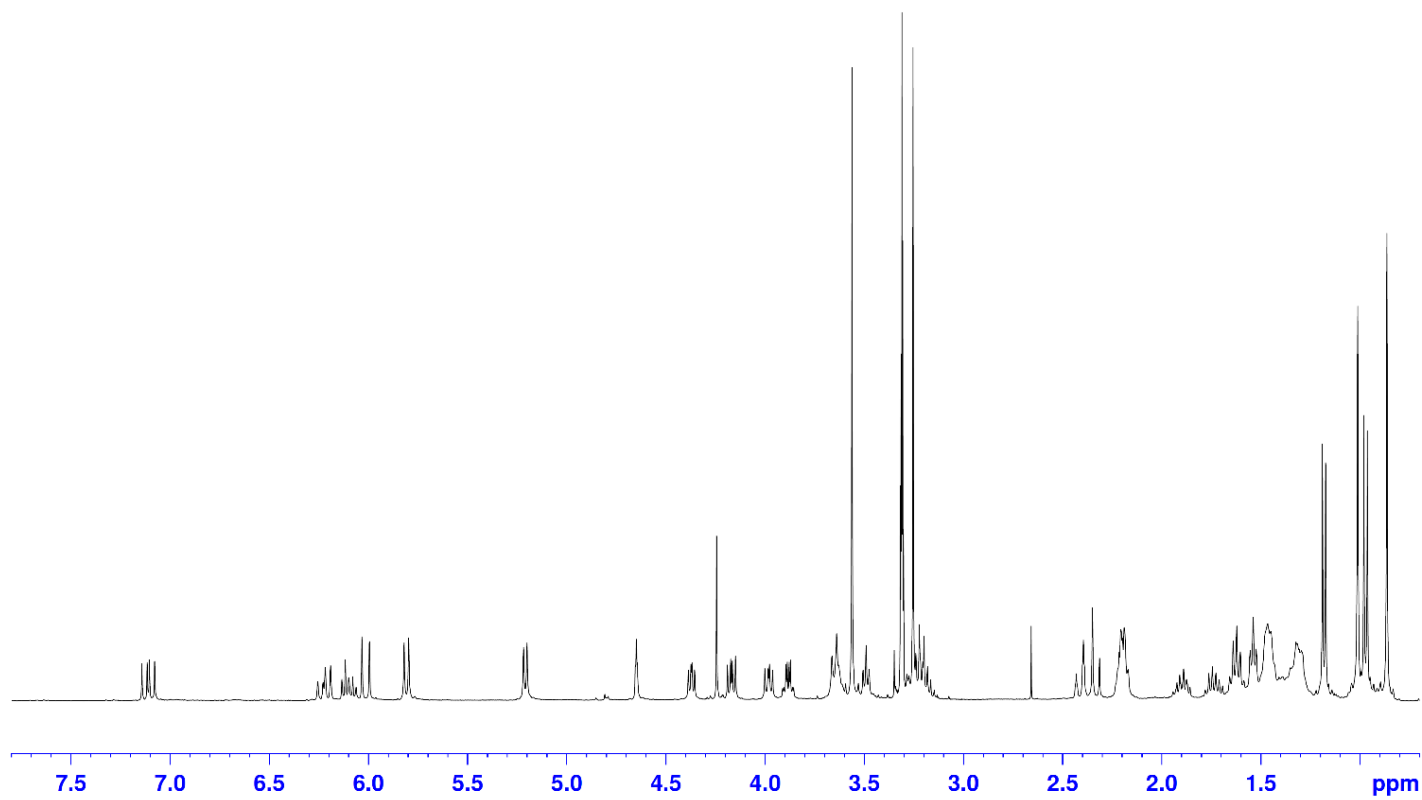


Figure S4-15. dihydroonnamide A (5) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

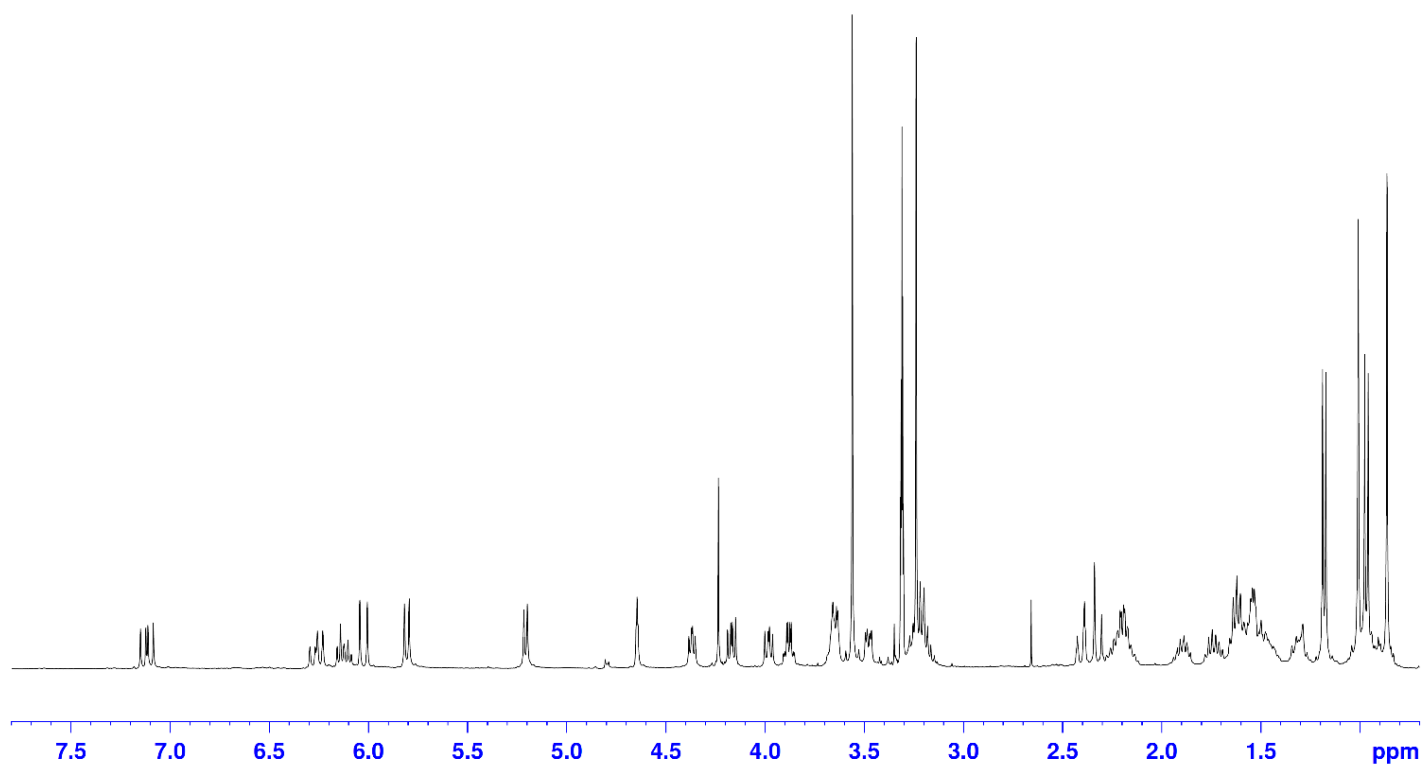


Figure S4-16. onnamide B (6) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

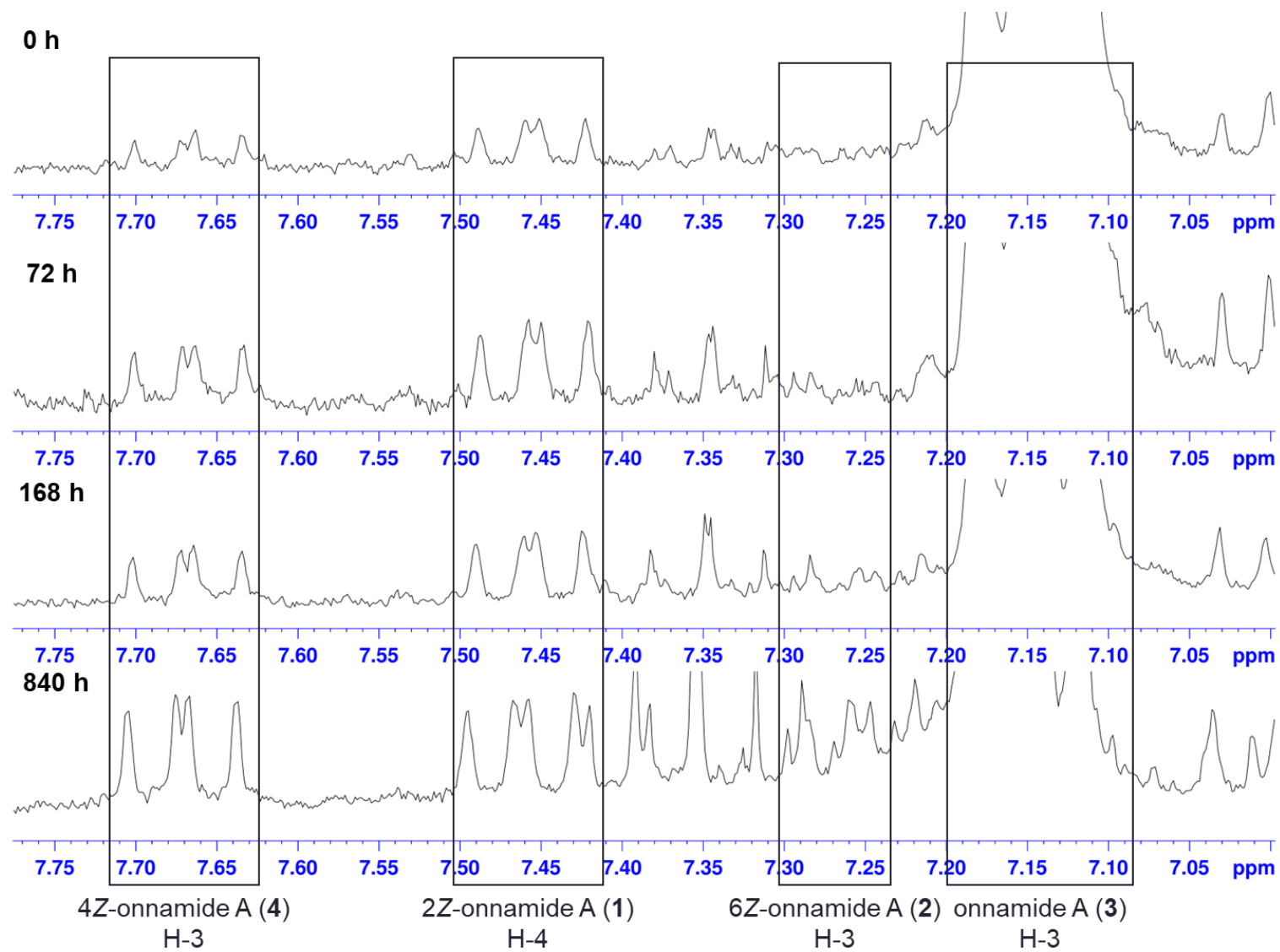


Figure S4-17. Onnamide A(1) の蛍光灯下における ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

第5章 食品に含まれる活性成分の探索研究

5-1. 研究背景

第2章から4章までは多種多様な生物活性化合物の宝庫である海洋生物に着目して研究を進めてきた。海洋生物から報告される天然化合物は、海洋生物自身が作り出す二次代謝産物だけでなく、海洋生物に共生する微生物の二次代謝産物に由来することが多く、海洋天然化合物の多様性には微生物が大きく貢献していると考えられる。一方で、発酵食品に目を向けてみると微生物の発酵によって原材料中の成分から新たに生じる多くの二次代謝産物が含まれており、発酵食品は天然物化学の視点において、ひとつの生物資源であり、海洋生物同様に非常に興味深い研究対象である。発酵食品では微生物による発酵過程で二次代謝産物が生じる。これらの二次代謝産物が有益な生物活性を示す場合、“体に良い”天然化合物の探索源として期待される。

そこで、日本食に特徴的な発酵食品のひとつである味噌に着目した。味噌は「味噌の医者殺し」などと諺になるほど、昔から健康に良いものとされてきた。また、1695年に刊行された「本朝食鑑」では、味噌は朝夕の食卓になくてはならないものと書かれている。つまり、我々日本人は長年に渡って味噌を日常食とし、その恩恵を受けてきたものと考えられる。味噌は豆味噌や米味噌、麦味噌、または、それらを組み合わせた合わせ味噌などの種類があり、地域や味噌職人の仕込み方によって様々な特徴を持っている。大豆や米、麦、そして、麹菌（豆麹、米麹もしくは麦麹）と食塩を混ぜ合わせて発酵させるため、味噌には発酵によって原材料中の成分から生じる多くの二次代謝産物が含まれている。

すでに味噌の有用性については検討されており、味噌を摂取させたマウスでは拘束ストレスから脳機能が保護されたこと、味噌を定期的に摂取する人の胃がん死亡率が低下することが報告されている^{118,119}。さらに、有効成分としては、大豆由来のタンパク質はコレステロールを低下させる作用、大豆由来のペプチドは体脂肪を燃焼させる作用、大豆由来のサポニンが抗がん作用を有することが報告されている¹²⁰⁻¹²²。また、ダイゼインやゲニステインといった大豆イソフラボンがエストロゲン活性や抗酸化作用が知られており、がんの予防作用や心血管疾患リスクの低下作用、骨粗鬆症の予防作用など様々な効果が報告されている¹²³⁻¹²⁶。このように味噌が日本人の健康維持に大きく貢献していることは、科学的にも検証されている。

しかしながら、これまでに報告された有効成分のほとんどは原料の大豆由来成分であり、微生物の発酵によって原材料中の成分から新たに生じる多くの二次代謝産物の報告例はごく僅かである。この原因のひとつとして、食品に含まれる成分の生物活性が微弱であることが挙げられる。有効成分探索を行うには、薬になるような強い生物活性が探索に適しているため、食品の微弱な生物活性成分の多くはこれまで見逃されてきたと考えられる。そのため、味噌特有の有効成分、特に微量成分が細胞レベルでどのように機能しているのかについてはほとんど明らかにされていない (Figure 5-1)。

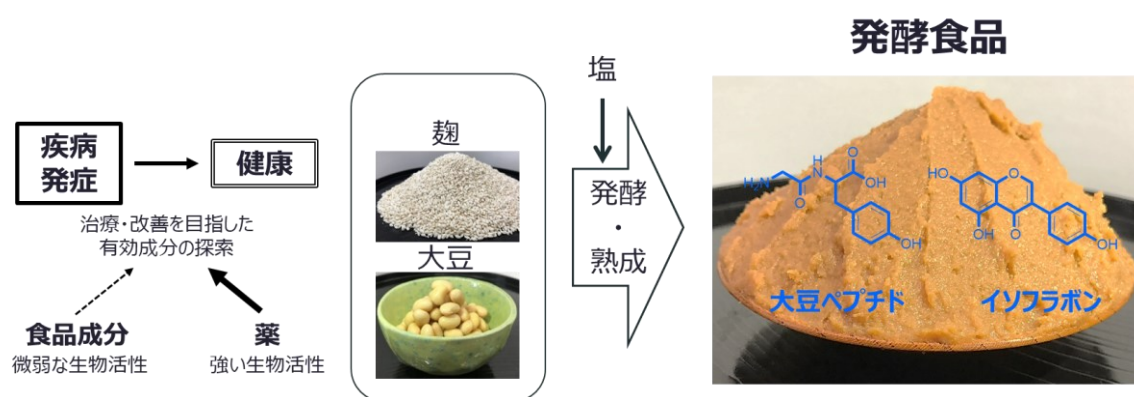


Figure 5-1. 食品からの生物活性成分の探索研究イメージ。

一方で、第 4 章で海洋天然化合物の探索に適用したヒストン修飾は、エピジェネティックな遺伝子発現の調節と促進に関与しており¹²⁷⁻¹²⁹、その異常はがんなどの慢性疾患に関連していることが報告されている¹³⁰。加えて、ストレスなど環境の影響を受けて容易に変化し、その異常な修飾の蓄積がうつ病などの疾病に関与しているのではないかと考えられている。そこで、日本人が日常的に味噌を摂取してきたことに着目し、味噌の摂取による日々のエピゲノム調節が日本人の健康維持に寄与してきたと仮定を立て (Figure 5-2)、ヒストン修飾変化を指標とし、食品成分の微弱な活性を感度よく検出するアッセイ系を用いることによって味噌特有の有効成分の同定を目指した。

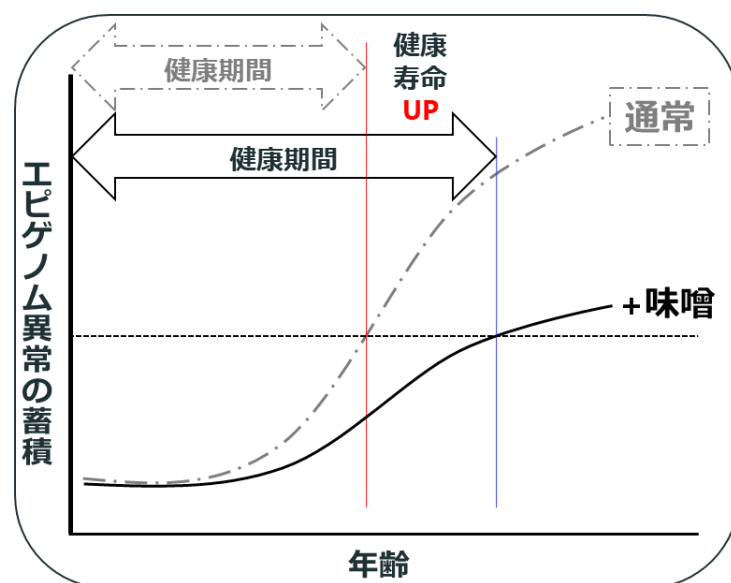
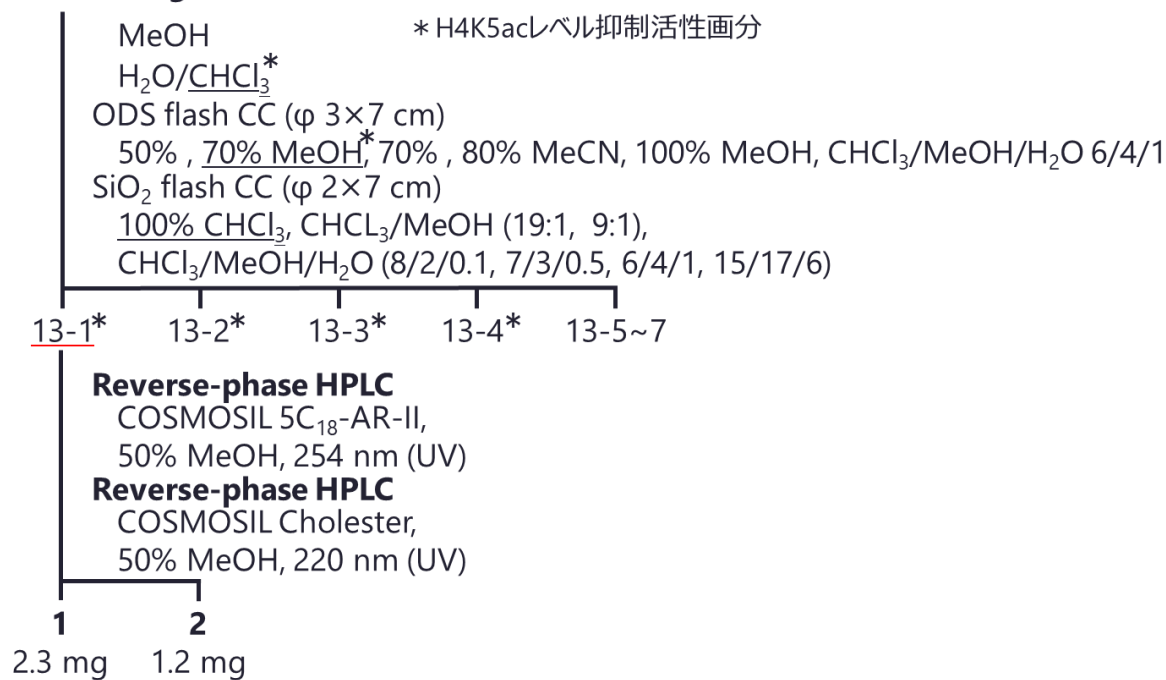


Figure 5-2. エピゲノム異常の低下と健康期間延長のイメージ図.

5-2. FAEE (1) の単離と精製

産地や原材料が異なる市販の味噌 117 種について、ヒストン修飾調節活性を指標にスクリーニングを行った。各味噌サンプルを MeOH で抽出し、濃縮後、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーで 6 画分に分画した。これら合計 702 サンプルについて、最終添加濃度が 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように HeLa 細胞に添加し、6 種類のヒストン修飾の変化を確認した。その結果、特定のヒストン修飾を選択的に変化させる画分が複数見出された。本研究では、他の味噌と比較して H4K5ac レベルを優位に抑制した味噌試料 MS63 に着目した。MS63 は米麴を用いて熟成させた辛口の赤色系米味噌である。MS63 (1 kg) を MeOH で抽出・濃縮後、 H_2O と CHCl_3 にて二層分配を行った。得られた CHCl_3 層 (9-1) を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーにて 6 つの画分に分画した。活性が認められた 70% MeOH 溶出画分 (10-2) を SiO_2 フラッシュカラムクロマトグラフィーで 7 つの画分に分画した。これらについて、ヒストン修飾調節活性試験を行った結果、4 つの画分 (13-1~13-4) に活性が認められた。そこで、この 4 画分について SiO_2 TLC で分析を行い、画分 13-1 はフラボノイド類を含まない活性画分であることを見出した (Figure 5-3)。画分 13-1 を 2 段階の逆相 HPLC (1. カラム; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, 検出器; UV220 nm, 移動相; 50% MeCN, 2. カラム; COSMOSIL Cholesterol, 検出器; UV 220 nm, 移動相; 50% MeCH) によって精製を行い、FAEE (1) を 2.3 mg, *p*-クマル酸エチルエステル (2) を 1.2 mg 得た (Scheme 5-1)。

MS63 1 kg



Scheme 5-1. 化合物 1 および 2 の単離スキーム.

SiO₂ TLC

展開相 : CHCl₃/MeOH (9:1)

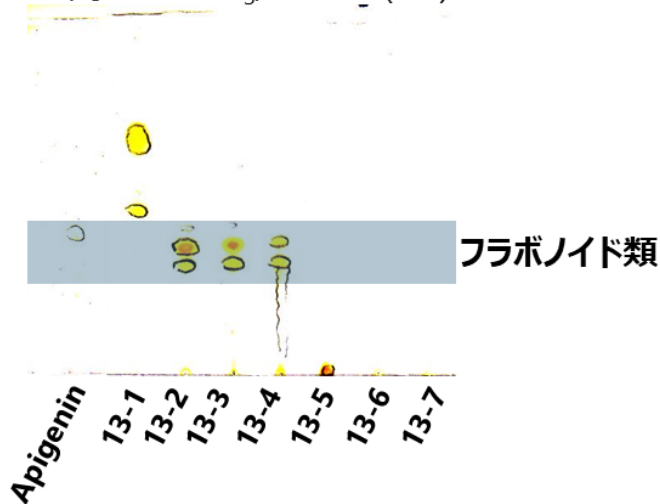


Figure 5-3. 画分 13-1 ~ 7 の SiO₂ TLC 分析.

5-3. FAEE (1) の構造決定およびその産生機構の検討

化合物 **1** は, LC-MS により m/z 221.0821 [M-H]⁻ のピークが観測され, 組成推定より分子式は C₁₂H₁₄O₄ (calcd. for C₁₂H₁₃O₄ 221.0808, Δ+ 1.3 mDa) であると決定した。本組成式を用いて, SciFinder[®]を用いたデータベース検索を行ったところ, 9999 種の候補化合物がヒットした。そのため, 各種 NMR を詳細に解析することで構造の同定を行った。

¹H NMR スペクトルから, メチル (δ_{H} 1.31), メトキシ (δ_{H} 3.88), エステルに結合したメチレン (δ_{H} 4.21), 3 置換芳香環 (δ_{H} 6.79, 7.06, 7.17) の存在が示唆された。¹³C NMR スペクトルから 12 本のシグナルが観測され, 共役エステル基 (δ_{C} 169.6) の存在が示唆された。¹H-¹H COSY より 3 つのスピンの系が確認された。H-12 のメチル (δ_{H} 1.31) と H-11 のオキシメチレン (δ_{H} 4.21) とのスピンの相関によりエチルエステルの存在が示された。また, 低磁場に観測された H-8 (δ_{H} 7.60) と H-9 (δ_{H} 6.32) とのスピンの相関 ($J_{\text{H}8-9} = 16.0$ Hz) より, *trans* 型の二重結合があることがわかった。HMBC において, H-11 (δ_{H} 4.22) から C-10 (δ_{C} 169.6) に相関が観測されたことからエチルエステル基の存在が確認された。また, H-8 (δ_{H} 7.60) および H-9 から C-10 (δ_{C} 169.6) に, H-8 から C-1 (δ_{C} 124.4), C-5 (δ_{C} 111.7), C-6 (δ_{C} 127.3) に, H-9 から C-6 にそれぞれ相関が観測されたことから, 芳香環にある C-6 から側鎖が伸びていることがわかった。H-1 (δ_{H} 7.06) からは, C-3 (δ_{C} 151.9) と C-5 に, H-2 (δ_{H} 6.79) からは C-3, C-4, C-6 に HMBC 相関がみられたこと, さらに, メトキシ基の H-7 (δ_{H} 3.88) から C-4 (δ_{C} 149.8) と, H-5 (δ_{H} 7.17) から C-4, C-6, への HMBC 相関がみられたことより, 側鎖に対してメタ位にメトキシ基が, パラ位に水酸基が結合している **1** であると決定した (Figure 5-4, Table 5-1)。

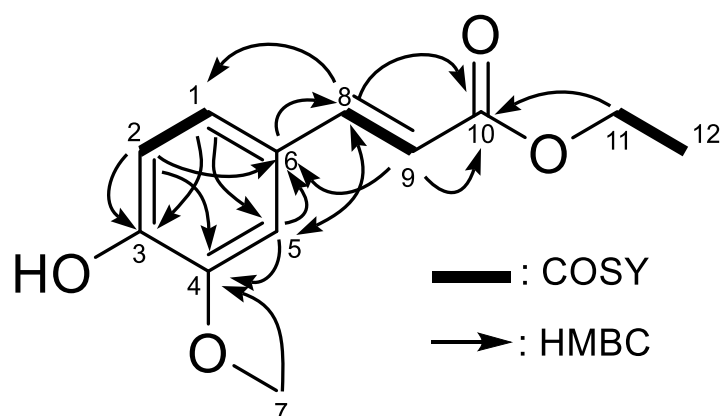
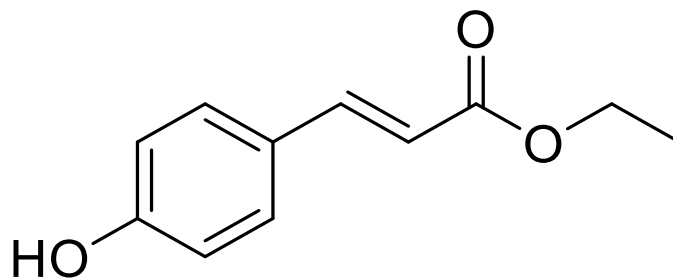


Figure 5-4. 化合物 **1** の構造とその COSY および HMBC 相関.

Table 5-1. FAEE の各種 NMR データ (CD₃OD)

atom	δ_c^a	δ_H , mult. (J in Hz) ^b	COSY	HMBC
1	124.4	7.06 dd (8.0, 2.0)	H-2, H-5	C-3, C-5
2	116.9	6.79 d (8.3)	H-1	C-3, C-4, C-6
3	151.9			
4	149.8			
5	111.7	7.17 d (2.0)	H-2	C-4, C-6, C-8
6	127.3			
7	56.5	3.88 s		C-4
8	147.0	7.60 d (16.0)	H-9	C-1, C-5, C-6, C-9, C-10
9	115.3	6.32 d (16.0)	H-8	C-6, C-10
10	169.6			
11	61.5	4.22 q (7.0)	H-12	C-10, C-12
12	14.8	1.31 t (7.0)	H-11	C-11

化合物 **2** は, LC-MS スペクトルにより m/z 191.0719 [M-H]⁻ のピークが観測され, 導かれた分子式 C₁₁H₁₂O₃ (calcd for C₁₁H₁₁O₃ 191.0703, Δ + 1.6 mDa) は **1** のものと CH₂O 分の違いがあった。そこで, 画分 19-3 と **1** との ¹HNMR スペクトルを比較したところ, **1** に存在するメトキシ基由来のシグナルがないことから画分 19-3 は *p*-クマル酸エチルエステル (**2**) であると決定した (Figure 5-5)。

**Figure 5-5.** 化合物 **2** の構造.

ここまで、ヒストン修飾調節活性を指標に、原料由来と考えられるフラボノイド類を外して活性成分 **1** を明らかにし、味噌に特徴的な成分であることが期待された。化合物 **1** は 1988 年にナス台木植物根から抗菌物質として単離されているが¹³¹、これは抽出操作において EtOH の使用によりフェルラ酸 (FA, **3**) から生じたアーティファクトであったことが推測されている。また、小麦粉をアルカリ性に寄せ、MeOH で抽出した際にはフェルラ酸メチルエステルが、EtOH で抽出した際には **1** が単離されており、抽出過程において、エステル交換が生じた結果アルコール付加体が生成されることが分かっている¹³²。一方、**3** は味噌成分として知られており、1866 年にオオウイキョウ属から初めて単離・構造決定され¹³³、その後、抗炎症活性¹³⁴、抗がん作用¹³⁵、血管拡張作用¹³⁶、アミロイド β ペプチド神経毒性の抑制¹³⁷をはじめ、多岐に渡る生理活性が報告されている^{138,139}。フェノール酸は様々な植物中に遍在しているが、それらのメチルエステル体やエチルエステル体はほとんど天然にはないとされ¹⁴⁰、単離報告されている各エステル体は抽出過程で化学修飾を受けたものが多い。

そこで、味噌に特徴的な成分であるかどうかを明らかにするため、熟成過程での産出機構を検討した。化合物 **3** は穀類に多く含まれており、米においては胚乳 (精米部分) よりも果皮、種皮、糊粉層 (糠部分, Figure 5-6.) の細胞壁に多糖類とエステル結合した状態で多く存在している。また、様々な麹菌由来のフェルラ酸エステラーゼの存在が報告されている¹⁴¹⁻¹⁴³。つまり、**3** は味噌の熟成において多糖類から切り出された、原料に由来する成分であることが考えられる。そのため、米糠を試作味噌の仕込みに添加することで **3** の量を増やすことができると期待された。

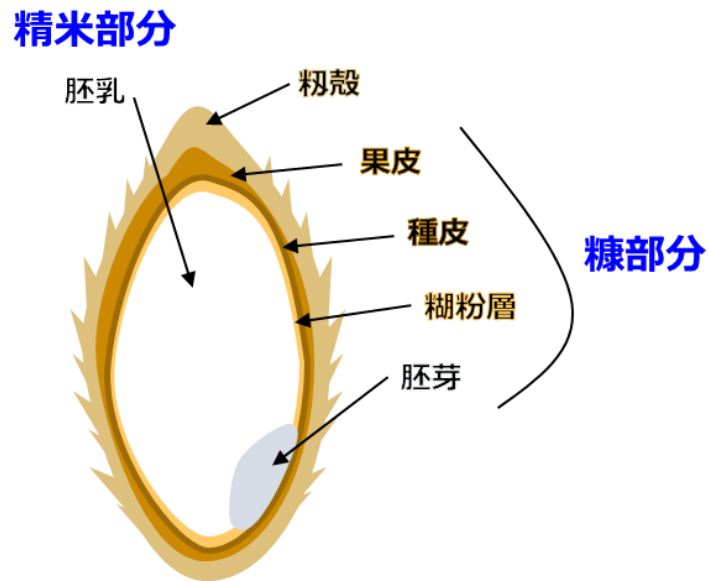


Figure 5-6. 粃の構造.

一方, EtOH は味噌中の酵母の発酵によって生じているものと考えられる。味噌の熟成過程では, 脂質から切り出された脂肪酸が, 酵母の発酵により生じた EtOH とエステル交換反応することにより脂肪酸エチルエステルになることが報告されている¹⁴⁴。つまり, **1** は味噌の熟成過程において, 糖結合型から切り出された **3** に, 酵母の発酵によって生じた EtOH が付加することで産出された味噌に特有な成分であることが推測される (Figure 5-7)。以上の生成機構から, 米糠を味噌の仕込みに添加して **3** の量を増やすことで **1** の量も増加させることができると予測された。

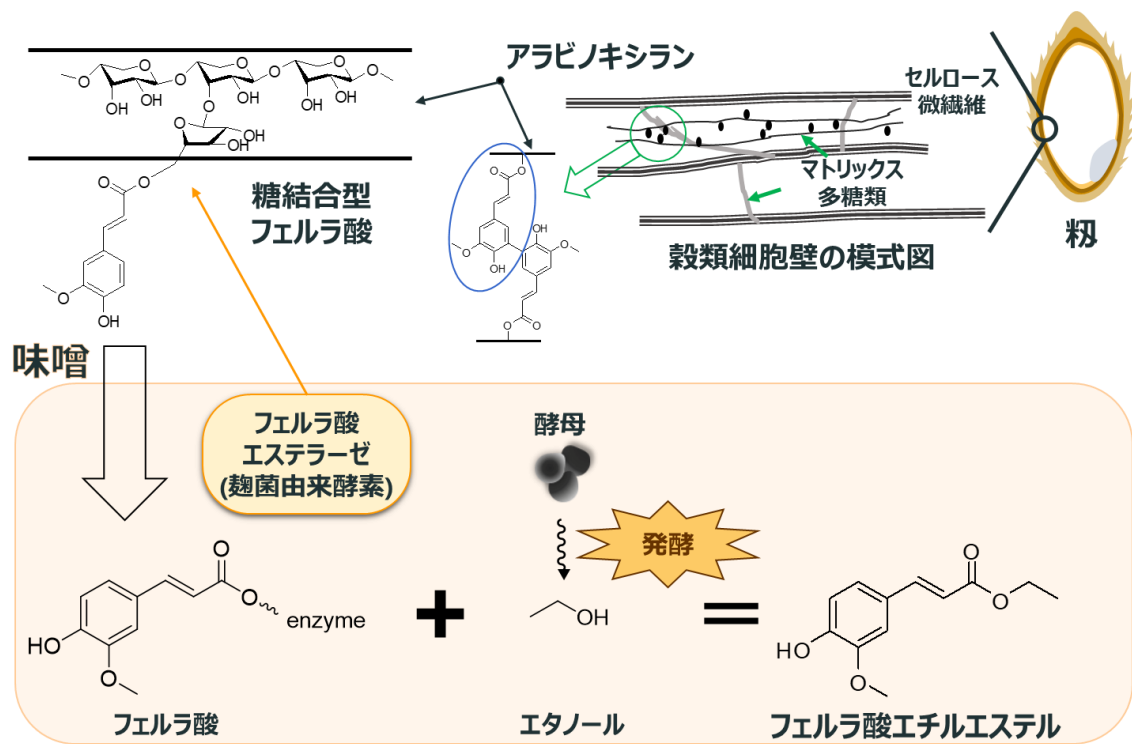


Figure 5-7. 推定される味噌中での **1** の生成機構.

そこで、中央味噌研究所の協力の下、独自の試作味噌の作製を行い、その試作味噌中の **3** および **1** の含有量、アルコール量の測定を行って生成機構を検討した。味噌の仕込みは **1** を単離・同定した MS63 の配合をベースに設計した。また、**1** が味噌に特徴的な成分であるか検討するため、味噌に用いられる原料およびそのほかの市販されている食品計 48 種に **1** が含まれているかを確認した。

その結果、試作味噌中の **3** および **1** の含有量は、米糠の添加により増加することが確認された。しかしながら、試作味噌中に含まれる **3** および **1** の線形相関を検討してみたが強い線形相関はみられなかった ($R^2 = 0.257$, Figure 5-8 A)。一方で、味噌のアルコール含有量については、線形相関の検討に加えるとよい相関を示すことがわかり ($R^2 = 0.814$, Figure 5-8 B)、**1** の産出には、味噌中の **1** およびアルコールが重要なことがわかった。

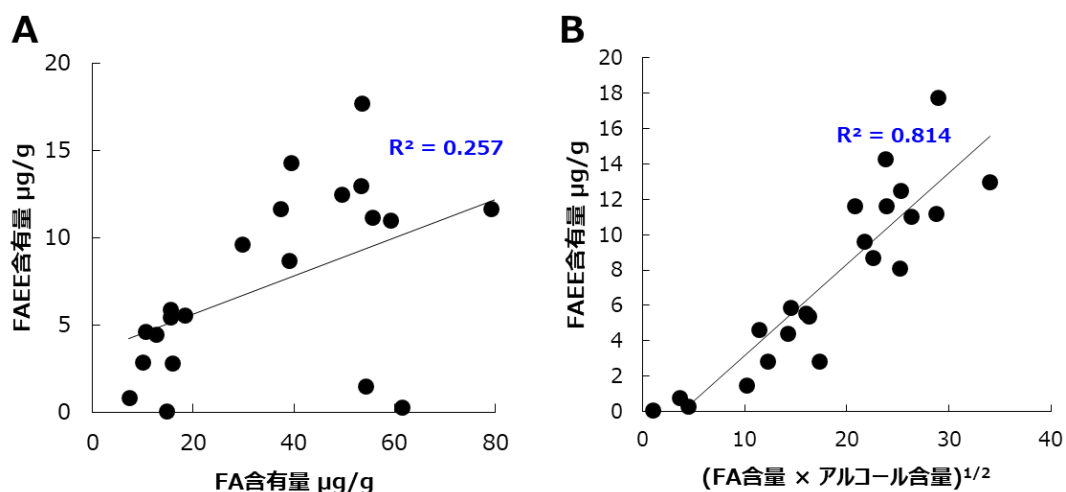


Figure 5-8. 試作味噌中に含まれる各成分の線形相関. A: 化合物 **3** および **1** の線形相関, 横軸 試作味噌中の **3** の含有量 ($\mu\text{g/g}$), 縦軸 試作味噌中の **1** の含有量 ($\mu\text{g/g}$), B: 化合物 **3** とアルコールおよび **1** の相関, 横軸 試作味噌中の **3** の含有量 ($\mu\text{g/g}$) とアルコール (mg/g) の相乗平均, 縦軸 試作味噌中の **1** の含有量 ($\mu\text{g/g}$).

その他の食品中の **1** の含有量を調べたところ, 味噌の原料中からはほとんど検出されなかった。化合物 **3** については, 原料のうち米だけでなく, 豆からも検出された。また, 長野県清酒鑑評会に出された 2016 年度酒造の日本酒についても **1** の含有量を調べてみたところ, 日本酒 100 mL 中に約 2.6 μg の **1** が含まれていることがわかった。一方, 味噌関連を除く食品では **1** は検出されなかった。

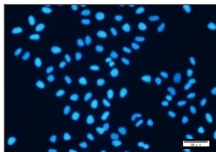
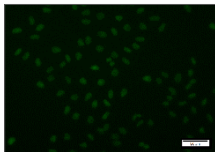
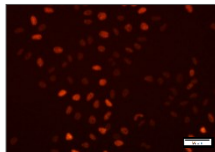
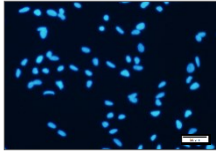
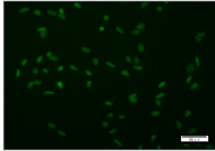
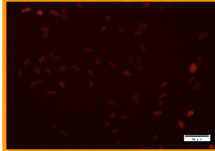
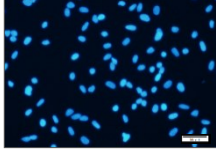
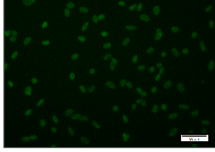
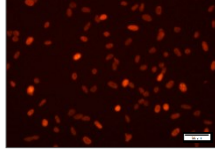
これらの結果から, 味噌中での **1** の生成は **3** およびアルコールの量に依存する傾向にあることがわかった。化合物 **3** およびアルコールは熟成過程においてそれぞれ, 原料から切り出された成分および酵母の発酵によって産生された成分であることが示唆されていることから, **1** は味噌の熟成によってはじめて生じる成分であることがわかった。また, 日本酒にも **1** は含まれていたが, 日本酒も味噌と同様に, 麹菌を用いて米を発酵させている食品のため, 味噌同様に **1** が含まれていたと考えられる。日本酒においては, **1** は香味成分である一方, **3** は日本酒に黄色みを帯びさせ, 苦味を与えるため, 日本酒の製造では好まれていない¹⁴⁵。そのため, **3** の混ざりを少なくする目的で評価の高い日本酒で使用される米は中心部しか使われておらず, 相対的に **1** の含有量が少なくなっていることが予測される。分析結果からも **1** の含有量は味噌よりも明らかに少ないことがわかる。

本研究で明らかにした活性成分 **1** の単離には EtOH を使用していないため、味噌にもともと存在していた天然由来の成分と言える。これまでに味噌成分として **3** が含まれていることは明らかにされていた一方、**1** が味噌に含まれているという報告はなく、本研究が味噌に含まれる活性成分としてはじめての報告となる。よって、**1** は日本食に特徴的な発酵食品に特有な成分であることがわかり、特に、味噌に特徴的な成分であることが明らかになった。

5-4. FAEE (**1**) の生物活性

単離した **1** および **2** について H4K5ac レベルの変化を確認したところ、**1** にのみ H4K5ac レベルを抑制する活性が認められた (Table 5-2)。化合物 **1** および **2** は非常によく似た構造を持っているが、芳香環のメタ位に結合しているメトキシ基の有無によって活性が大きく変化することから、メトキシ基が H4K5ac レベルの抑制に重要であることが示唆された (Figure 5-2)。

Table 5-2 単離した化合物の活性評価

Sample (30 µg/mL)	Hoechst	H3K27me3	H4K5ac
control			
1			
2			

(青; Hoechst 33342 で蛍光標識した核, 緑; Alexa Fluor488 標識した H3K27me3 抗体, 赤; Cy3 標識した H4K5ac 抗体, scale bar: 50 µm).

H4K5ac については、マウス海馬における複数の遺伝子領域での H4K5ac レベルの上昇が文脈的恐怖条件付けによる恐怖記憶と関連していることが報告されている¹⁴⁶。また、**1** は神経保護作用を有することが報告されていることから¹⁴⁷、**1** の機能性として、抗ストレス活性が期

待された。そこで、神経幹細胞の分化への影響を調べてみたところ、**1** は *in vitro* にて神経幹細胞からグリア細胞の一種であるアストロサイトへの分化を促進することがわかった (Figure 5-9)。

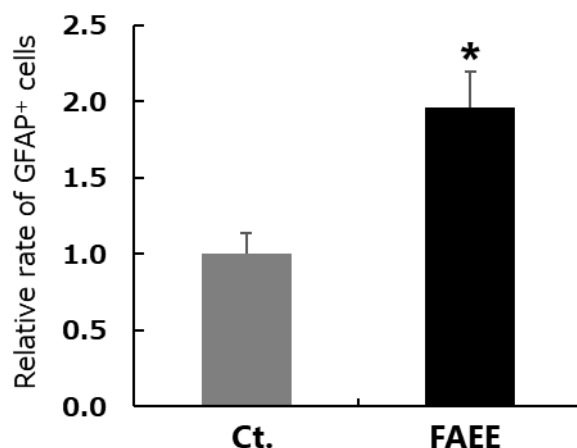


Figure 5-9. 神経分化調節活性試験. **1** で処理した細胞の GFAP 陽性細胞のコントロール比 (縦軸: コントロールの GFAP 陽性率を 1 とした際のコントロール比, n = 3, means \pm S.D., *: p < 0.05 vs control, Dunnett test).

うつ病患者やストレスを与えた動物の脳では海馬のアストロサイトの数が減少すること¹⁴⁸やアストロサイトを人為的に減少させたマウスではうつ様の症状を示すこと¹⁴⁹など、アストロサイトの数とストレスとの関係が指摘されている。そこで、**1** に抗ストレス作用があるのではないかと考え、社会心理的ストレスを再現可能な慢性うつ病モデル、マウス 2 個体間における社会行動を利用した抑うつ様症状を引き起こさせる社会的敗北モデルマウスにて **1** による影響を検討した。化合物 **1** を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.1% EtOH) に調製した水溶液を 1 週間、自由接種による経口投与を行い、披験マウスについて個体他個体に対する恐怖付けによるストレスを与えて、行動実験を実施した。その結果、コントロール群に対して **1** 投与群の披験マウスはストレス経験 7 日目の行動実験において、行動範囲が低下せず、PTSD 様症状が生じていない傾向が確認された (Figure 5-10 A, B)。また、行動観察中の他個体マウスに対する匂いかぎ時間およびその距離を解析したところ、コントロール群および **1** 投与群ともにストレス経験後には匂いかぎ行動に差が認められず、他個体マウスを恐怖対象として認識していたことがわかる (Figure 5-10 C)。一方で、ストレス経験 7 日目の行動実験において、**1** 投与群は対照

群と比較して他個体マウスとの他個体マウスとの距離が短くなる傾向にあり (Figure 5-9 D), 社会的回避行動の回復傾向が確認されて, 1 は *in vivo* の系においても抗ストレス作用の傾向を示した。

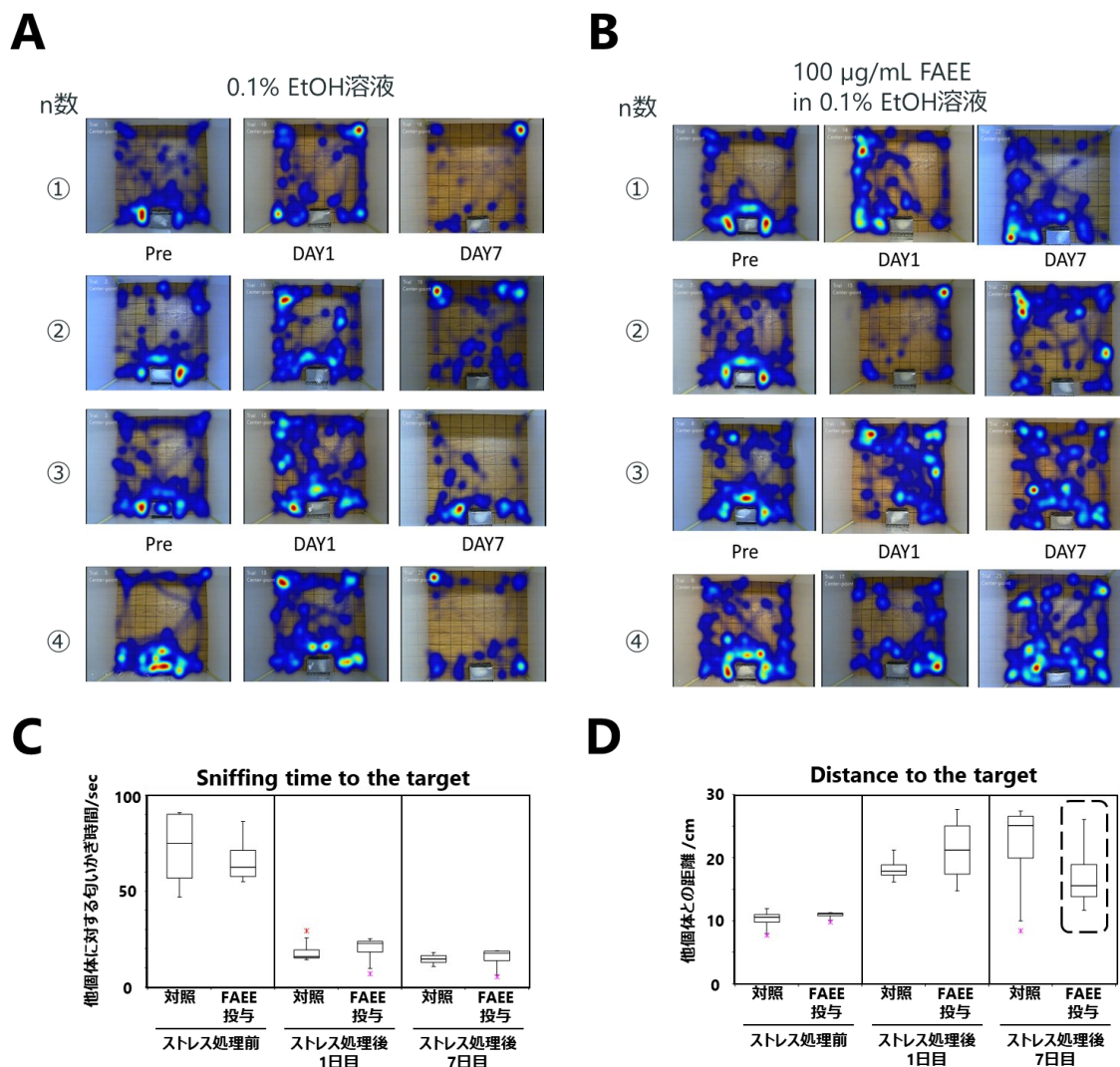


Figure 5-10. 社会的敗北モデルマウス行動実験. A 0.1%EtOH を事前投与したマウスの行動記録のヒートマップ分析 (n = 4), B 100 µg/mL (0.1% EtOH) を事前投与したマウスの行動記録のヒートマップ分析 (n = 4), C 被検マウス各群における他個体に対する匂いかぎ時間 (n = 4), D 被検マウス各群における他個体からの距離 (n = 4).

5-5. 構造-活性相関の検討

ここまでの研究で、味噌に含まれる **1** が H4K5ac レベルを抑制することを明らかにしてきたとともに、**1** は熟成によりはじめて生じる味噌に特徴的な成分であることがわかった。さらに興味深いことに、この FAEE が *in vitro* で NSC からアストロサイトへの分化を促進する、*in vivo* で抗ストレス作用の傾向を示す、2 つの重要な知見を得た。これら知見から、**1** は H4K5ac レベルの抑制やアストロサイトへの分化促進を介して、ストレスの緩和に関与していると考えられた。しかしながら、**1** の標的分子は見つかっておらず、これら一連の作用機序についてはほとんど知られていない。

一方で、**1** と同様に味噌に含まれる類縁体である **2** は、H4K5ac レベルに影響を与えなかった。これらの化合物の違いは芳香環のメタ位に結合しているメトキシ基の存在であり、この違いがセンシティブに H4K5ac レベルへ影響していることが考えられた。また、ヒストン修飾は酵素だけでなく、様々な補酵素や補因子など数多くの制御因子によって巧妙に制御されているため、**1** によるヒストン修飾調節に関わる直接の分子を同定することはメカニズムを理解する上で重要となる。そこで、**1** の類縁体を用いて構造-活性相関を検討することで、**1** の活性の強さと活性に関与する部分構造を明らかにすることとした。これによって、標的分子の探索ツールとして応用できるプローブ分子設計の手掛かりを得ることとした。

まず、芳香環の置換基が異なる **1** の構造類縁体 9 種について、H4K5ac レベルへの影響を調べた (Figure 5-11)。その結果、**1** は市販標品においても活性が確認され、構造類縁体と比較しても **1** が最も強い活性を示すことがわかった。

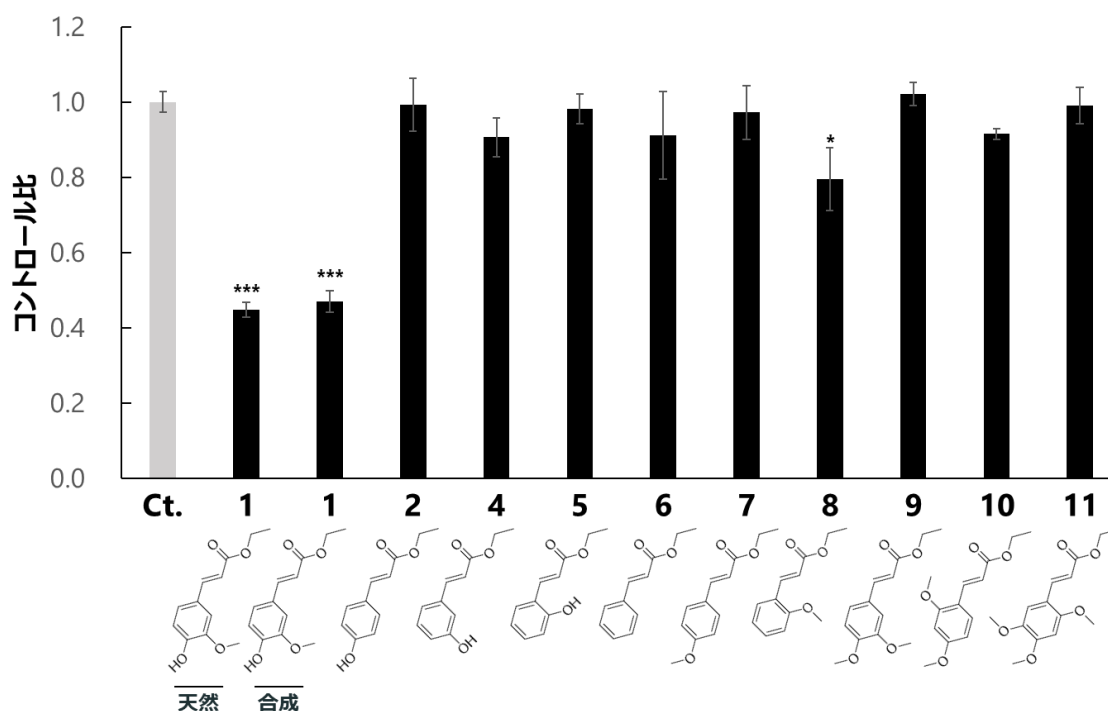


Figure 5-11. 芳香環の置換基の異なる構造類縁体による H4K5ac への影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, 各サンプル; 30 $\mu\text{g/mL}$, $n = 3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$,
***: $p < 0.001$, *: $p < 0.05$ vs control, Dunnett test).

次に、側鎖の違いが活性におよぼす影響を検討した (Figure 5-12)。側鎖の末端がメチル (12)、エチル (1) およびプロピルエステル (13) の時に強い活性を示し、末端がカルボン酸 (3) になると顕著に活性が低下した。また、末端がエチルエステル基よりも長くなるにつれて活性が弱まる傾向にあることがわかった。一方、ショウガに含まれるジングロン (15)、6-ジングロール (16) やトウガラシに含まれるカプサイシン (17) には活性が認められなかった。基本骨格の置換基だけでなく、側鎖も活性に影響を与える 1 つの要因であることが考えられる。

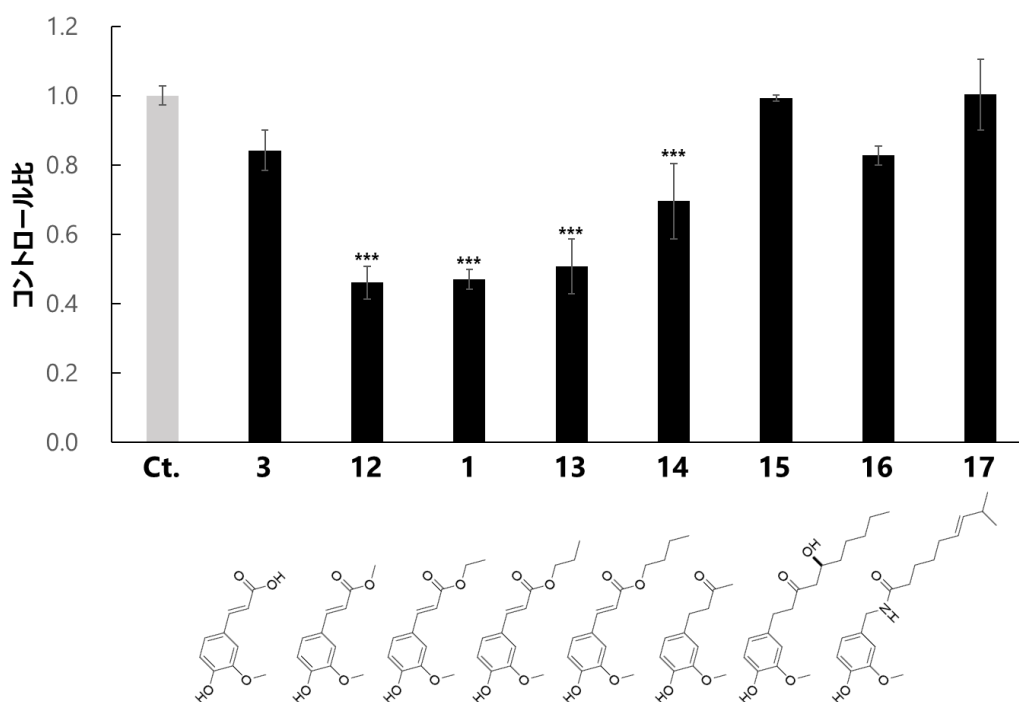


Figure 5-12. 側鎖の異なる構造類縁体による H4K5ac への影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, 各サンプル; 30 $\mu\text{g/mL}$, $n = 3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, ***: $p < 0.001$ vs control, Dunnett test).

次に, 3 位および 4 位の置換基の違いが活性におよぼす影響を検討した (Figure 5-13 および 5-14)。3 位の置換基を比較したところ, H4K5ac レベルの抑制には, ヒドロキシ基およびメトキシ基が重要であり, 3 位の側鎖が長くなると活性を失うことが分かった。一方で興味深いことに, **1** と比較してヒドロキシ基とメトキシ基が入れ替わった **21** については活性が認められず, 4 位に炭素鎖のある化合物 **21**, **22**, **9**, および **23** では活性を示さないことがわかった。つまり, 芳香環の 4 位にあるヒドロキシ基の水素が活性に重要であることが示唆され, 4 位のヒドロキシ基の水素が標的となるタンパク質との水素結合による相互作用に関与している可能性が考えられる。この結果より, H4K5ac レベルを抑制する活性を示す重要な部分構造は, 4 位のヒドロキシ基, そして, 3 位のヒドロキシ基, または, メトキシ基であることがわかった。

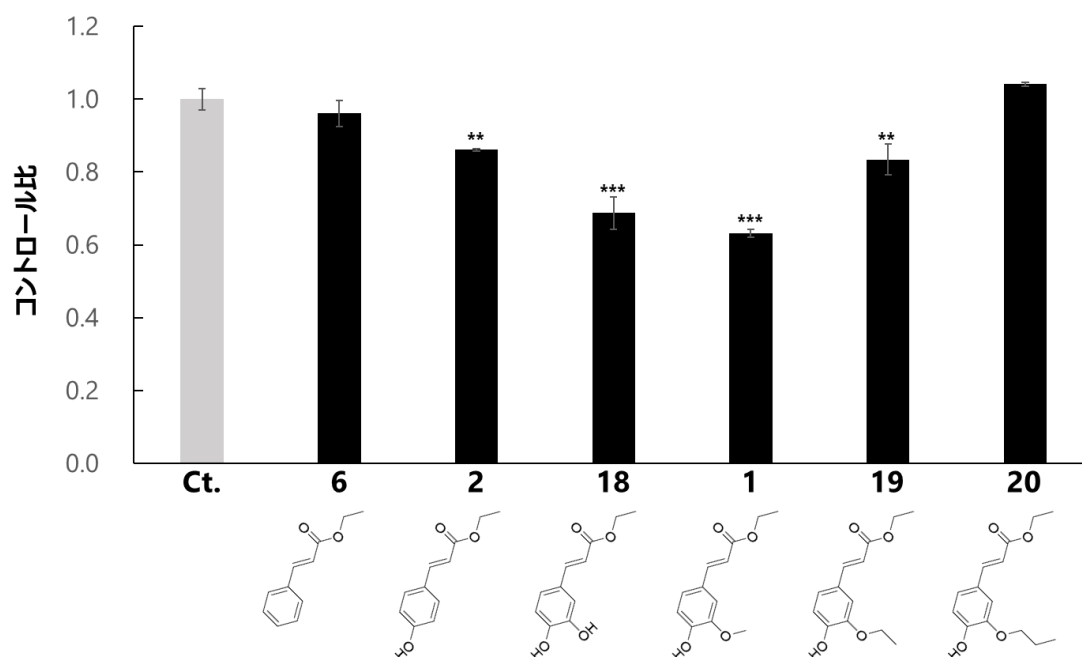


Figure 5-13. 3位の置換基の異なる構造類縁体による H4K5ac への影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, 各サンプル; 50 μ M, n = 3, mean \pm S.D., ***: p < 0.001, **: p < 0.01 vs control, Dunnett test).

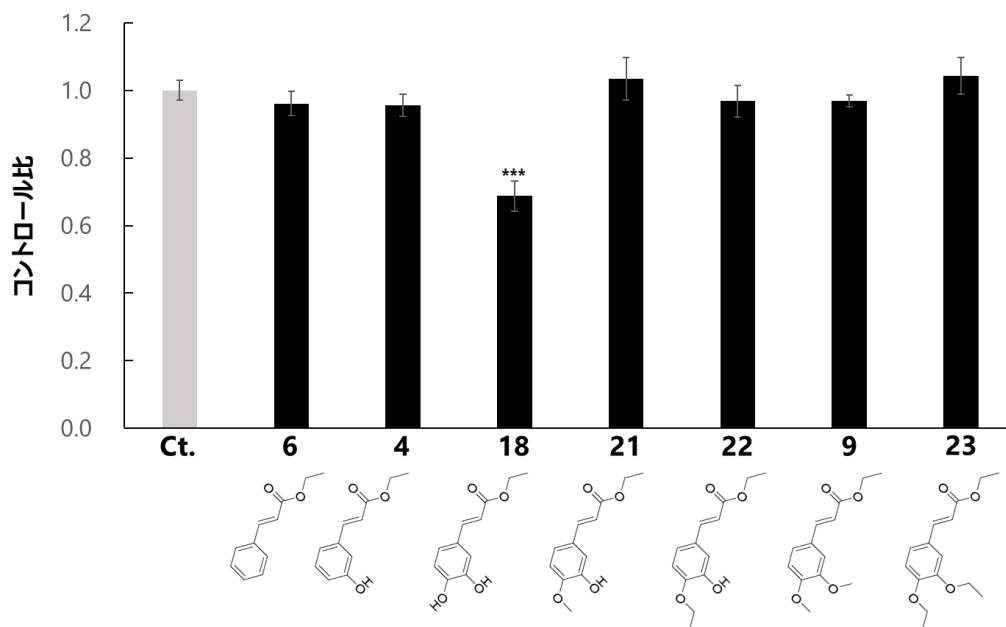


Figure 5-14. 4位の置換基の異なる構造類縁体による H4K5ac への影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, 各サンプル; 50 μ M, n = 3, mean \pm S.D., ***: p < 0.001 vs control, D Dunnett test).

構造-活性相関の検討により、H4K5ac レベルの抑制には、芳香環の 4 位にあるヒドロキシ基および 3 位にあるメトキシ基が重要な構造であり、エステルの側鎖長が活性を増幅させるひとつの要因であることを明らかにした (Figure 5-15)。また、構造類縁体と比較しても **1** が最も強い活性を示し、原料に含まれている **3** では活性が弱いことから、味噌は発酵によって H4K5ac レベルの抑制機能としての **1** を獲得していたことが明らかになった。

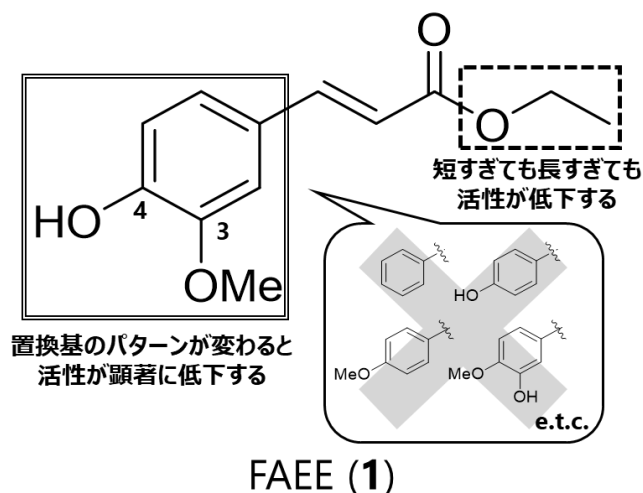


Figure 5-15. H4K5ac レベルの抑制に関わる部分構造.

5-6. FAEE (**1**) のプローブ化

生物活性化合物の作用機序を分子レベルで理解するためには、その化合物を基に設計したプローブ分子を利用する戦略が有効となる¹⁵⁰。蛍光ラベル化できれば、細胞内局在を可視化することができる一方、磁気ビーズに結合できれば、細胞内で活性本体が標的とする分子を同定することが可能となる。

細胞内局在解明に関わる蛍光プローブには、通常 coumarin 誘導体や fluorescein 等の蛍光色素を導入したプローブ分子が用いられるが¹⁵¹⁻¹⁵³、今回得られた活性分子 **1** の分子量は 221 と小さく、活性分子よりも大きい分子量の蛍光化合物を導入してしまうと、その影響が大きく、活性分子の活性が維持できない可能性が考えられた。そこで、比較的小さなアルキン基の導入を検討した。アルキンとアジドとのヒュスゲン環化付加反応¹⁵⁴はクリックケミストリーの代表的な反応として知られており、それら部分構造を持つ 2 分子は容易に結合することが可

能となる。

そこで、構造-活性相関研究をもとに、プロパルギルエステル基を導入したプローブ分子 6 種 (24-29) の設計および合成を行った。その結果、活性分子である **1** および **18** の側鎖をプロパルギルエステルに変えた分子 FAPG (**24**) およびカフェ酸プロパルギルエステル (**26**) において、H4K5ac レベルの抑制が **1** と同程度維持されていた。また、ネガティブプローブとして、4 位のヒドロキシ基と 3 位のメトキシ基が入れ替わった IFAPG (**25**) が得られた。さらに、3 位がプロキシ基の **28** はエチルエステル体 **20** と同様に活性が認められなかった。その一方で、3 位の置換基が末端アルキンで炭素鎖数が **28** と同じ **29** は 3 位がエトキシ基の **19** と同程度の活性が認められ、**29** の三重結合部位が直線形分子構造を取ることによって、**19** と似た活性を示す興味深い結果が得られた (Figure 5-16)。

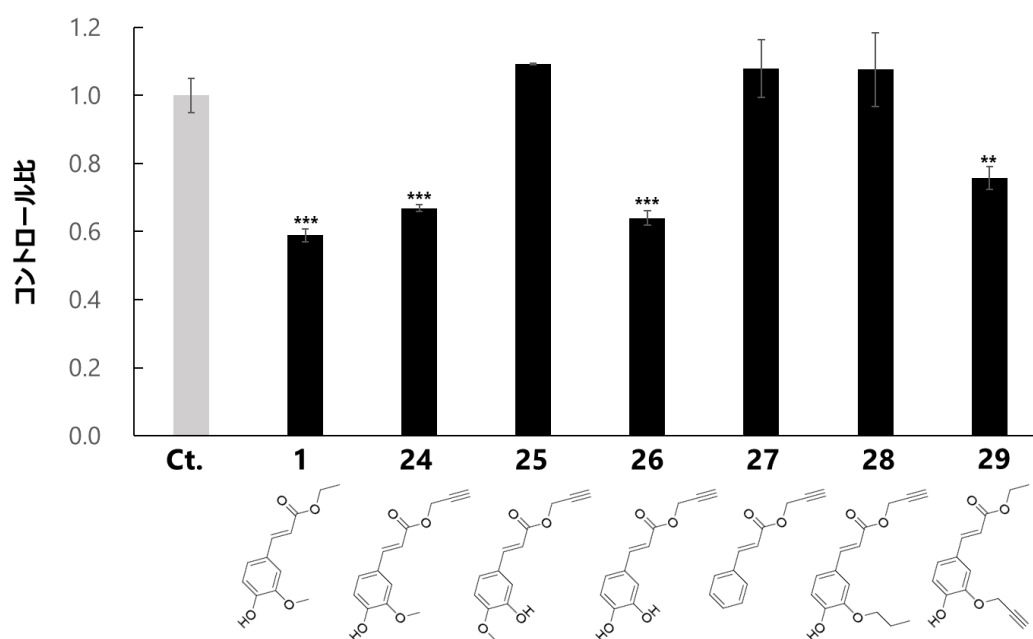


Figure 5-16. プローブ分子による H4K5ac への影響 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, 各サンプル; 50 μ M, n = 3, mean \pm S.D., ***: p < 0.001, **: p < 0.01, vs control, Dunnett test).

5-7. FAEE (1) の細胞内局在の解析

次に、各プローブ分子で処理した HeLa 細胞に対して、蛍光化合物 Carboxyrhodamine110-Azide (Azide 488) を細胞内クリック反応によってプローブ分子の細胞内局在イメージングを行った (Figure 5-17)。

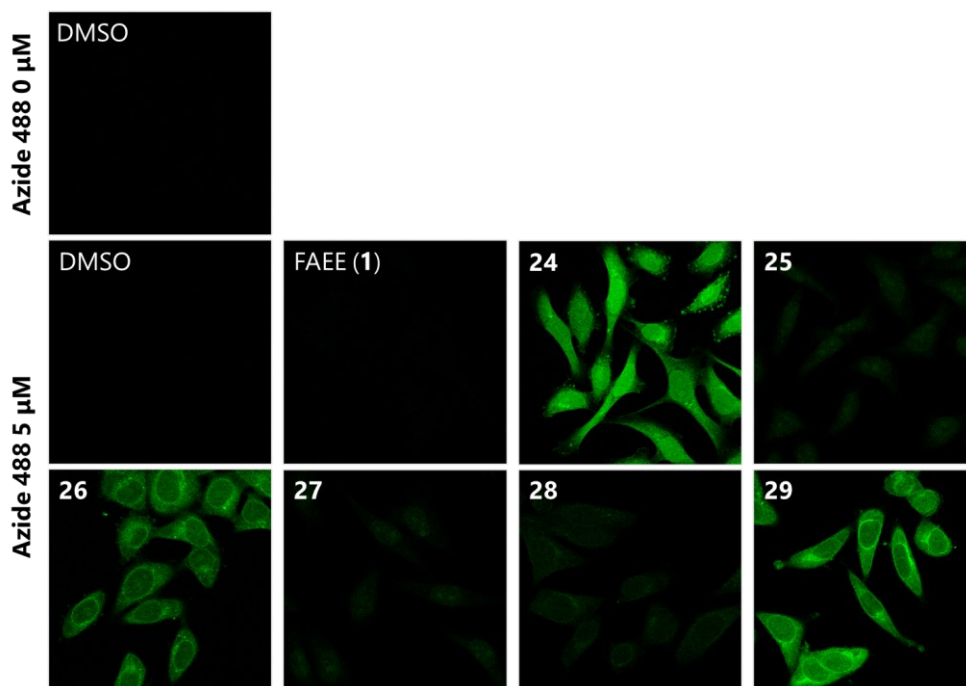


Figure 5-17. 細胞内クリック反応によるプローブ分子 (24-29) の細胞内局在イメージング. 上段; Azide 488 未処理の蛍光写真, 中段・下段; Azide 488 5 μ M を細胞内クリック反応させた蛍光写真 (各サンプル; 50 μ M, 共焦点顕微鏡対物レンズ; 100 倍).

その結果, H4K5ac レベルの抑制活性を有していたプローブ分子 (24, 26, 29) において, 緑色蛍光が細胞の細胞質全体から観察された。また, ゴルジ体染色試薬である HPA を用いて, プローブ分子 24 との共染色を行ったところ, 特に核の周りの緑色蛍光は共染色したゴルジ体 (HPA 染色) の一部と重なっている様子が観察された (Figure 5-18)。このことから, 活性成分 1 が HeLa 細胞の細胞質, またはゴルジ体の一部に局在しており, それらに 1 の標的分子が存在することが示唆された。一方, 活性が認められなかった 25 で処理した細胞は緑色蛍光が僅かにしか観察されなかったことから, ネガティブコントロールとして有用な化合物であると考えられた。

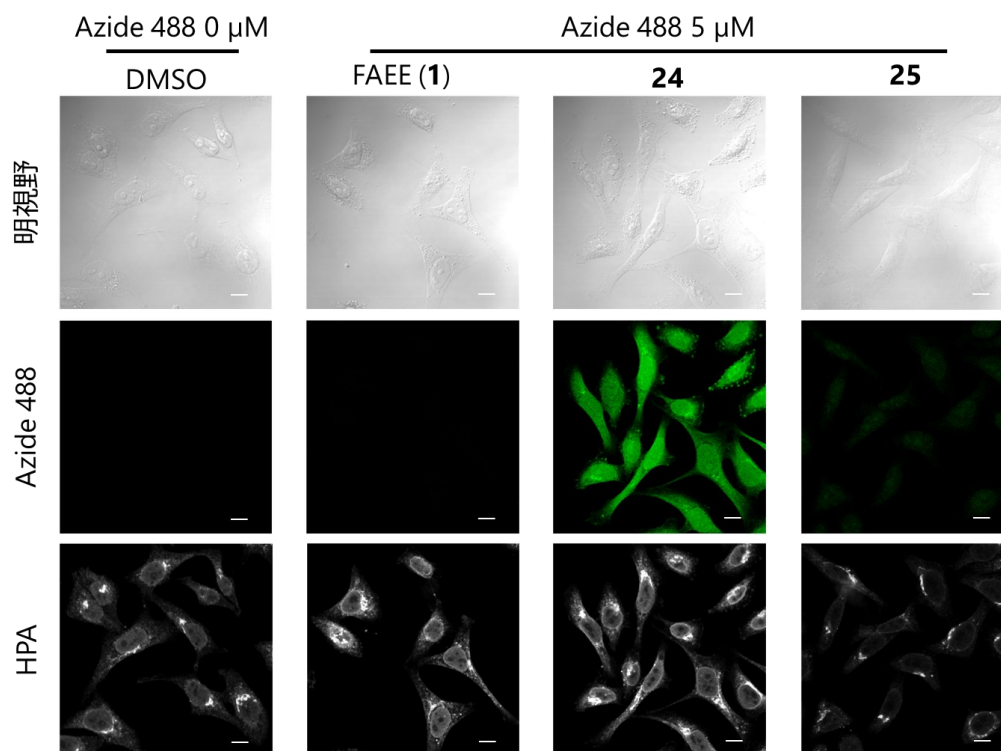


Figure 5-18. 細胞内クリック反応によるプローブ分子 (24-29) の細胞内局在イメージングと HPA との共染色. 上段; 明視野, 中段; Azide 488, 下段; HPA (各サンプル; 50 μ M, 共焦点顕微鏡対物レンズ; 100 倍).

5-8. FAEE (1) の標的分子探索

生物活性化合物の標的分子の同定によって得られる作用機序の知見は, 新たな標的ターゲット分子の発見の可能性を有する。標的分子探索ビーズによるアフィニティークロマトグラフィー法^{155,156}は, 標的分子の探索に用いられる手法であり, 中でも, FG ビーズ法¹⁵⁷は, ビーズに非特異的に吸着する生体内分子が低く抑えられている。また, ビーズ末端の官能基の種類が豊富なことやリガンド固定化率が高いことから天然化合物の標的分子の探索によく用いられている。そこで, Azide beads (FG beads) にプローブ分子 **24** および **25** をそれぞれ click 反応によって結合させた標的探索用プローブビーズを調製した。このビーズを HeLa 細胞の抽出液と 4°C で 4 時間反応させ, 磁気分離によってビーズを回収後, 1 M KCl によってビーズから結合タンパク質を塩溶出させた画分 (塩溶出画分, high salt) および塩溶出後に残ったビーズに結合する結合タンパク質を熱処理によって溶出させた画分 (加熱溶出画分, boil) をそれ

ぞれ得た。得られた各画分は SDS-PAGE によって分離して、銀染色によって検出した結果、活性リガンドと無活性リガンドとの間に差が認められたひとつのバンドが得られた (Figure 5-19)。

このバンドは、細胞質由来タンパク質溶液からプルダウンしたサンプル由来であり、前項で得られた細胞内局在箇所と矛盾しないものであった。そこで、このバンドを切り出し、LC/MS/MS に付してアミノ酸配列解析したところ、細胞質に広く存在するタンパク質 vesicle amine transport-1 (VAT-1) が検出された。

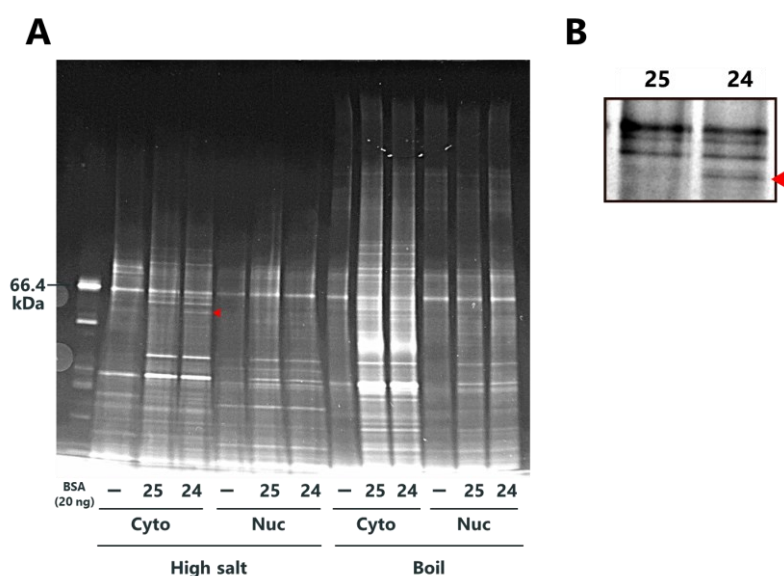


Figure 5-19. プローブ分子 **24** および **25** を結合したビーズを用いてプルダウンした各サンプルの SDS-PAGE 銀染色結果. A. SDS-PAGE を銀染色した像, (-; リガンドを結合させていないビーズ由来, **25**; **25** を結合したビーズ由来, **24**; **24** を結合したビーズ由来, Cyto; HeLa 細胞から調製した細胞質タンパク質溶液, Nuc; HeLa 細胞から調製した核タンパク質溶液), B. **24** を結合したビーズと **25** を結合したビーズからプルダウンしたサンプル間に差がみられたバンドの拡大図 (A における◀部分).

次に、**1** の標的タンパク質候補に挙げた VAT-1 を western blotting によっても確認した。HeLa 細胞から調製した細胞質タンパク質溶液に対して、プローブ分子 **24** および **25** を結合したビーズを用いて、プルダウンした塩溶出および加熱溶出画分に対して、VAT-1 の抗体を用いた western blotting によってバンドを検出した (Figure 5-20)。検出されたタンパク質バンドサ

イズは VAT-1 の分子量 (amino acids; 393, Mass; 41920 Da) と概ね一致しており、また、SDS-PAGE の結果と同様に、**24** を結合したビーズを用いてプルダウンしたサンプルに強いバンドが検出され、銀染色で検出されたバンドが VAT-1 であることを支持するものであった。

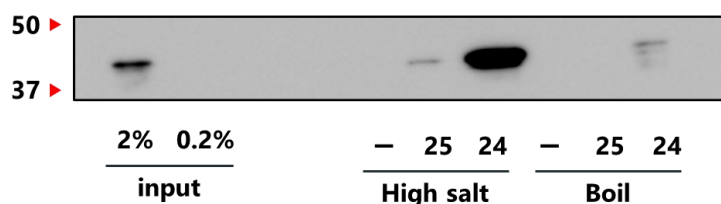


Figure 5-20. プローブ分子 **24** および **25** を結合したビーズを用いてプルダウンした各サンプルの western blotting の結果 (-; リガンドを結合させていないビーズ由来, **25**; **25** を結合したビーズ由来, **24**; **24** を結合したビーズ由来).

そこで、VAT-1 の機能を解析するために、RNA 干渉¹⁵⁸による VAT-1 のノックダウン実験を行った。HeLa 細胞に対して、VAT-1 の siRNA をトランスフェクションした細胞の VAT-1 の発現量を確認したところ、トランスフェクションの 18 時間後に VAT-1 の発現量の減少が確認された (Figure 5-21)。

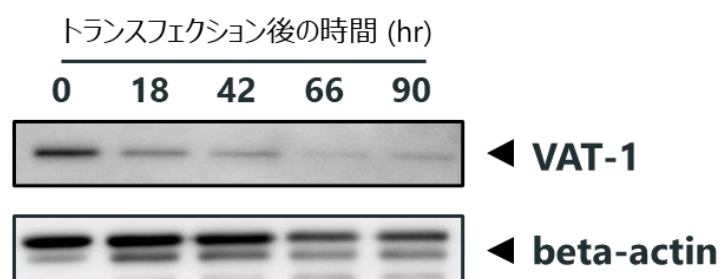


Figure 5-21. VAT-1 の siRNA を処理した HeLa 細胞抽出液の western blotting の結果 (各レーン; siRNA 処理後、0-90 時間後の HeLa 細胞)。

次に、標的分子候補のノックダウン時のフェノタイプを確認し、VAT-1 が **1** の機能を説明可能かどうか検討した。VAT-1 の発現量が減少していると予想されているトランスフェクションの 29 時間後の細胞を使用して (Figure 5-22 A), ヒストン修飾調節活性試験を行ったところ、

トランスフェクションしていない、もしくは、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞と比較しても 1 による H4K5ac レベルの抑制に変化は認められなかった (Figure 5-22 B)。

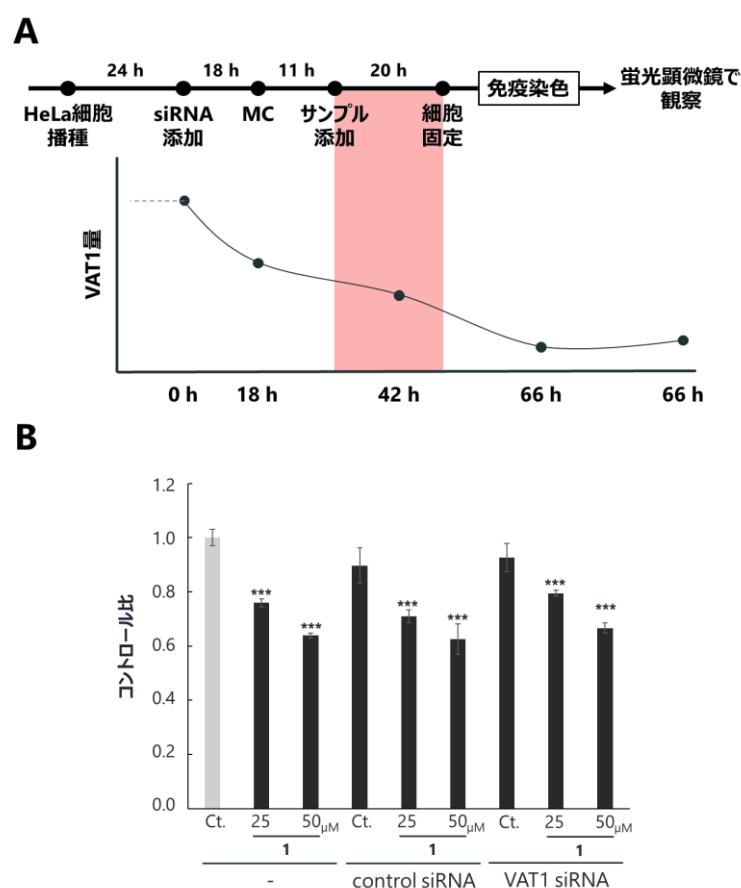


Figure 5-22. 化合物 1 による VAT-1 の siRNA を処理した HeLa 細胞への H4K5ac レベルへの影響. A. 実験スケジュールおよび RNA 干渉によってノックダウンした VAT1 の発現量のイメージ図, B. ヒストン修飾調節活性試験の結果 (縦軸: コントロールの蛍光強度を 1 とした際のコントロール比, Ct.; DMSO, 各サンプル; 25, 50 μ M, n = 3, mean \pm S.D., ***: p < 0.001 vs control, Dunnett test).

VAT-1 は、脊椎動物で保存されている細胞質可溶性タンパク質であり¹⁵⁹, VAT-1 のアミノ酸配列はアルコール脱水素酵素ファミリーに属し、ニコチンアミド補酵素結合モチーフを持つことが報告されている¹⁶⁰。また、ラット肝細胞抽出物の細胞分画により、VAT-1 のラット相同

体タンパク質 MIB は主に細胞質に局在し、その一部は小胞体およびミトコンドリアの両方に局在することが明らかとなっている¹⁶¹。VAT-1 を HeLa 細胞で過剰発現させるとミトコンドリアの断片化が起こる一方、VAT-1 をノックダウンするとミトコンドリアネットワーク構造が広範囲に増殖することから、VAT-1 のミトコンドリアに関する機能が示唆されている¹⁶¹。また、VAT-1 の機能として、アフリカツメガエル卵を用いた研究では、小胞体からミトコンドリアへのホスファチジルセリン (PS) の移層に関与することが報告されており¹⁶²、一方で、ヒト VAT-1 $\Delta N40$ の結晶構造解析では、これまで報告されている脂質転送タンパク質ファミリーに属さないにも関わらず、脂質移送機能を有することが明らかされた¹⁶³。

PS は生細胞の細胞内膜を構成するリン脂質であり、カスパーゼなどの活性化により、アポトーシス細胞または損傷細胞の細胞外膜に露出することによって^{164,165}、貪食細胞が死細胞を貪食するための eat me シグナルとしての機能を有する^{166,167}。中枢神経系においても、NSC から分化したニューロンの樹状突起スパインに局在している PS がシナプスの eat-me シグナルとして機能することも明らかになっている¹⁶⁸。

このような機能が知られている PS の移層に関与していることが報告されている VAT-1 は **1** の機能を考えるうえで非常に興味深い生体分子である。しかしながら、VAT-1 の機能は多くが未知であり、ヒストン修飾調節やアストロサイトとの関連は報告されていない。そのため、RNA 干渉のノックダウン実験だけでなく、引き続き VAT-1 に着目して機能性の検討を行い、VAT-1 が **1** の機能を示す標的であるかどうか明らかにする必要があると考えている。

5-9. 結言

発酵食品のひとつである味噌に注目し、味噌が日々のエピゲノム調節を通して健康に寄与していると仮定を立て、そこに含まれる保健機能性成分について、ヒストン修飾を指標として活性成分の探索を行った結果、H4K5ac レベルを抑制する味噌に特徴的な活性成分、FAEE (1) を同定することに成功した。また、1 は味噌の主な原料である大豆や米には含まれておらず、熟成によってはじめて生じる味噌に特徴的な成分であることがわかった。加えて、1 は *in vitro* にて NSC からアストロサイトへの分化を促進し、社会的敗北モデルマウスを用いた行動実験において、*in vivo* の抗ストレス作用の傾向があることを明らかにした。

また、23 種の構造類縁体を調製して構造-活性相関を検討した結果、H4K5ac レベルを抑制する活性に関わる重要な部分構造を明らかにするとともに、作用機序を明らかにする 6 種のプローブ分子を合成した。合成したプローブ分子のひとつである 24 を用いて、HeLa 細胞において細胞質に局在していることを明らかにするとともにプルダウンアッセイによって、ネガティブコントロールのプローブ分子 25 と比較して 24 が特異的に結合するタンパク質 VAT-1 の存在を明らかにした。

味噌からエピゲノムの変化を指標にして見出した新たな有効成分 1 は“日本食の保健効果”を解明することのできる成分であることが期待できる。今後、“日本食の保健効果”を解明するために、1 のヒストン修飾調節メカニズムをより詳細に明らかにする必要があると考えられる。

5-10. 第5章の実験項

5-10-1. 実験機器

^1H , ^{13}C , および各種二次元 NMR スペクトルは Bruker Avance 400 MHz 型 NMR スペクトロメータ (Bruker, 独国) を用いて測定した。LC-MS スペクトルの LC は SHIMADZU UFLC XR 型液体クロマトグラフ (株式会社島津製作所), MS は AB SCIEX TripleTOF™ 4600 (ESI-MS) 型マスマスペクトロメータ (株式会社エービー・サイエックス, 東京) を用いて測定した。

細胞画像は蛍光顕微鏡 Olympus IX71 および Olympus DP72 digital camera (オリンパス株式会社) もしくは、共焦点顕微鏡 Olympus FV1000 (オリンパス株式会社) システムを用いて撮影した。

5-10-2. ヒストン修飾調節活性試験

4-6-5 項と同様の方法で実施した。

5-10-3. 味噌サンプル

産地や原材料が異なる市販の味噌 117 種について、ヒストン修飾調節活性を指標にスクリーニングを行った。各味噌サンプルを MeOH で抽出し、濃縮後、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーで 6 画分に分画した。これら合計 702 サンプルについて、最終添加濃度が 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように HeLa 細胞に添加し、6 種類のヒストン修飾の変化を確認した。その結果、特定のヒストン修飾を選択的に変化させる画分が複数見出された。

本研究では、他の味噌と比較して H4K5ac レベルを優位に抑制した味噌試料 MS63 に着目した。MS63 は米麴を用いて熟成させた辛口の赤色系米味噌である。

5-10-4. 味噌成分の精製

MS63 (1 kg) を MeOH で抽出・濃縮後、 H_2O と CHCl_3 にて二層分配を行った。得られた CHCl_3 層 (9-1) を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーにて 6 つの画分に分画した。活性が認められた 70% MeOH 溶出画分 (10-2) を SiO_2 フラッシュカラムクロマトグラフィーで 7 つの画分に分画した。これらについて、ヒストン修飾調節活性試験を行った結果、4 つの画分 (13-1 ~ 13-4) に活性が認められた。そこで、この 4 画分について SiO_2 TLC で分析を行い、画分 13-1 はフラボノイド類を含まない活性画分であることを見出した。画分 13-1 を 2 段階の

逆相 HPLC (1. カラム; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, 検出器; UV220 nm, 移動相; 50% MeCN, 2. カラム; COSMOSIL Cholester, 検出器; UV 220 nm, 移動相; 50% MeCH) によって精製を行い, FAEE (**1**) を 2.3 mg, **2** を 1.0 mg 得た (Scheme 5-1)。

5-10-5. FA, FAEE, アルコール量の測定

LC-MS により, 各サンプル中の FAEE (**1**) および FA (**3**) の有無の確認と含有量の見積もりを行った。試作味噌サンプルについては, 試作味噌約 5 g を MeOH 30 mL で抽出し, その懸濁液の上清を回収・濃縮後, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーにて 6 画分に分画した。50%および 70% MeOH 溶出画分 (それぞれ **3** および **1** が含まれる) を 1 mg/mL となるように MeOH 溶液を調製し, LC-MS 分析に付した。一方, 食品サンプルは, MeOH で抽出し, 濃縮後, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーにて 6 画分に分画した。MS63 で **1** が含有されていた 70% MeOH 溶出画分を 1 mg/mL となるように MeOH で調製し, LC-MS 分析に付した。

LC-MS 分析の条件は, カラムは COSMOSIL 2.5C₁₈-MS-II (2.0×50mm) を用いて, 0.1%の濃度でギ酸を添加した H₂O と MeOH を移動相に使い, グラジエント条件にて分析し, ポジティブモードで **1** および **3** を検出した。さらに, それぞれの MS のピークエリアから含有量を概算した。検量線は市販標品 **1** および **3** を用いて作成した (Figure 5-23)。

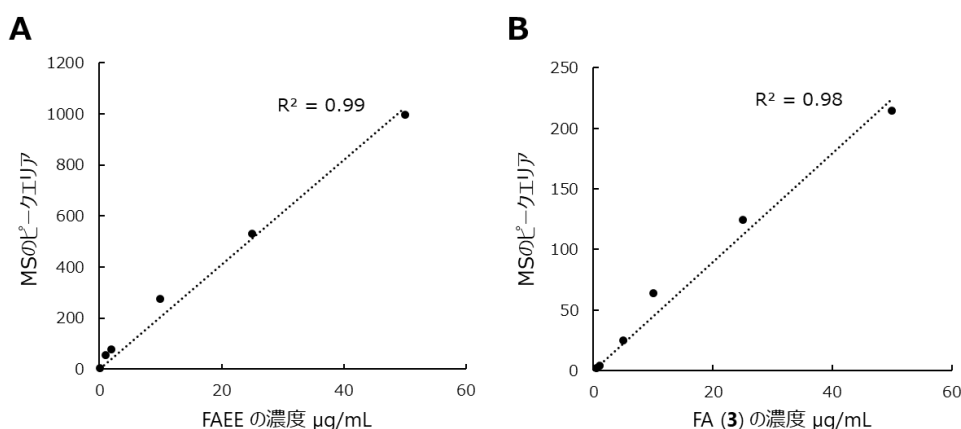


Figure 5-23. LC-MS 分析における FAEE (**1**, A) および FA (**3**, B) の検量線 (横軸; サンプル濃度, 縦軸; サンプルの MS のピークエリア).

味噌中のアルコール含有量の測定は中央味噌研究所で酸化還元滴定法によって行われた。味噌約 5 g と沈降炭酸カルシウム 1 g を H₂O 100 mL にて懸濁後, KieltecR 2200 Auto Distillation

Unit (FOSS, 丁国) を用いて水蒸気蒸留した。留液 10 mL に対して, 0.2 N $K_2Cr_2O_7$ 溶液 10 mL, H_2SO_4 溶液 10 mL を加えた後, 冷暗所にて反応させた。反応後 (1 時間), H_2O を加えて希釈し, 8% KI 溶液 6.5 mL を加えて, 0.1 N チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し, 終点に近くなったら 1% デンプン溶液を 1 mL 加え, 紫色が消失するまで滴定した¹⁶⁹。

5-10-6. 試作味噌サンプルおよび食品サンプル

試作味噌サンプルは, 日本で味噌を製造する企業 11 社に依頼して仕込みを行った。試作味噌の仕込み原料については, 大豆, 米糠は各社共通のものを, 麴, 塩, 発酵微生物は各社独自のものを用いた。コントロール (A) と, 米糠を原料に添加した味噌 (B) それぞれを 6~7 kg 仕込み, 30°C で 45 日間加温熟成した試作味噌をそれぞれサンプリングした (Table 5-3)。

Table 5-3. 各サンプルの仕込み配合

サンプル	麴歩合 (歩) ^a	塩分 (%)	水分 (%)	米糠 (%) ^b
A	12	12	46~48	0
B	12	12	46~48	20

^a; 大豆に対する麴の割合, ^b; 米重量に対する割合

また, 食品サンプルは, 味噌に用いられる原料 7 種および日本の食卓に並ぶ代表的な市販の食品 41 種の計 48 サンプルを準備した (Table 5-4)。

Table 5-4. 食品サンプルリスト (その 1)

味噌の原料 (7 種)	A 社 米こうじ A	
	A 社 米こうじ B	
	K 社 米こうじ A	
	K 社 米こうじ B	
	K 社 豆こうじ	
	K 社 蒸し米	
	K 社 蒸し豆	
海藻類 (6 種)	わかめ	乾燥
	ひじき	生
	昆布	
	もずく	
	海苔	

Table 5-4. 食品サンプルリスト (その2)

魚貝類 (10種)	イワシ	缶詰 (水煮)
		缶詰 (味噌煮)
	サンマ	缶詰 (水煮)
		缶詰 (味噌煮)
	サバ	缶詰 (水煮)
		缶詰 (味噌煮)
	アサリ	
	シジミ	
	明太子	
	イカの塩辛	
野菜類 (14種)	はくさい	生
		塩漬け
		キムチ
	きゅうり	生
		塩漬け
		ぬか漬け
	野沢菜	塩漬け
	ブロッコリー	
	ごぼう	
	アスパラガス	
	春菊	
	大根	
	人参	
	たけのこ	
きのこ類 (7種)	しいたけ	生
		干し
	えのき	生
		瓶詰
	しめじ	
	なめこ	
	きくらげ	
豆類 (3種)	大豆	生
		納豆
	枝豆	生
調味料 (1種)	シチューのルー	

5-10-7. 神経分化調節活性試験

2-7-6~2-7-9 項と同様の方法で実施した。

5-10-8. 社会的恐怖条件付け試験

温度 23°C, 湿度 50%, 明期 12 時間 (6 時点灯, 18 時消灯) に調節された動物室内で飼育されたマウス (C57BL/6, 日本クレア株式会社) の雄 8 匹 (12–15 週齢) を使用して, 社会的恐怖条件付け試験を行った。

100 µg/mL FAEE (1) を 0.1% エタノール含有水に溶解し, 給水ボトルに入れて自由摂取させた。また, 対照投与群は 0.1%エタノール含有水を自由摂取させ, それぞれ投与期間は 1 週間とし, その後行動実験を実施した。実験開始の 1 時間以上前に供試動物を行動観察室へ移し, 実験環境へ馴化した。試験は行動観察室 (温度 23±2°C) で, 明期に蛍光灯を点灯して行った。実験は不透明なプラスチックの囲い (45×45×45cm) のオープンフィールド中で行い, 実験 2 日目はフットショックボックス内で恐怖条件付けを行った。まず 1 日目は, 囲いの一边の壁に沿って, 給水ボトルをもとに作った穴のあいた透明な筒 (7×4×4cm) を置いた状態でマウスを導入し, 3 分間自由に探索させた。次に, 先の筒の中に性成熟した ICR 系統の雄マウスを入れて提示し, 5 分間の行動観察を行った。このデータを条件付け前の「Pre」とした。

翌日 (2 日目) は, C57BL/6 をフットショックボックス内で 3 分間馴化させた後, 提示 ICR マウスを筒に入れた状態でフットショックボックスに導入した。そして被験 C57BL/6 マウスが提示 ICR マウスのにおいを嗅いだ瞬間に, 0.3 mA の電気を 0.5 秒間流した。これを 7 回繰り返す, 提示マウスに対する恐怖条件付けを行った。提示したマウスは 1~2 日目において全て同じ個体を用いた。

条件付け後 1 日目および 7 日目に上記オープンフィールド実験を同様に実施し, それぞれ「Day1」ならびに「Day7」のデータとした。行動はビデオに録画記録し, Ethovision XT ver.10 を用いて, 行動観察中の移動距離, 提示 ICR マウスとの距離, 不動時間, 囲い内の各 corner の滞在時間を解析した。また, Excel イベントレコーダーを用いて, 他個体に対するにおい嗅ぎ時間を解析した。

5-10-9. 食品サンプルおよび構造類縁体の調製

FAEE (**1**, 4046-02-0), 桂皮酸エチルエステル (**6**, 103-36-6), 4-メトキシ桂皮酸エチルエステル (**7**, 24393-56-4), *o*-クマル酸 (614-60-8), *m*-クマル酸 (14755-02-3), *p*-クマル酸 (501-98-4), カフェ酸 (331-39-5), 2-メトキシ桂皮酸 (1011-54-7), 2,4-ジメトキシ桂皮酸 (6972-61-8), 3,4-ジメトキシ桂皮酸 (2316-26-9), 2,4,5-トリメトキシ桂皮酸 (24160-53-0), iso-FA (537-73-5), FA (537-98-4), ジンゲロン (**12**,122-48-5), 6-ジンゲロール (**16**, 23513-14-6) およびカプサイシン (**17**, 404-86-4) の市販標品は, 東京化成工業株式会社 (東京, 日本) よりそれぞれ入手した。

p-クマル酸エチルエステル (**2**)

p-クマル酸 10.0 mg (60.9 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °C で攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, solvent; 60% MeOH, detection; UV 220 nm) にて精製することで, **2** を 6.2 mg (収率; 53%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.60 (d, 16.0, 1H), 7.45 (d, 8.7, 2H), 6.80 (d, 8.7, 2H), 6.31 (d, 16.0, 1H), 4.22 (q, 7.0, 2H), 1.31 (t, 7.0, 3H) .

m-クマル酸エチルエステル (**4**)

m-クマル酸 10.0 mg (60.9 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °C で攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 60% MeOH] にて精製することで, **4** を 6.1 mg (収率; 52%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.60 (d, 16.0, 1H), 7.22 (t, 8.0, 1H), 7.05 (br d, 7.7, 1H), 6.99 (br t, 2.1, 1H), 6.83 (ddd, 8.0, 2.5, 1.0, 1H), 6.74 (d, 16.0, 1H), 4.24 (q, 7.0, 2H) ,1.32 (t, 7.0, 3H) .

o-クマル酸エチルエステル (**5**)

o-クマル酸 10.0 mg (60.9 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °C で攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィ

一および逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 60% MeOH] にて精製することで, **5** を 4.1 mg (収率; 35%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.96 (d, 15.9, 1H), 7.48 (dd, 7.9, 1.5, 1H), 7.21 (ddd, 8.5, 7.9, 1.5, 1H), 6.84 (ddd, 8.5, 7.9, 1.5, 1H), 6.83 (dd, 7.9, 1.5, 1H), 6.58 (d, 15.9, 1H), 4.23 (q, 7.0, 2H), 1.32 (t, 7.0, 3H).

2-メトキシ桂皮酸エチルエステル (**8**)

2-メトキシ桂皮酸 10.0 mg (56.1 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 60% MeOH] にて精製することで, **8** を 6.2 mg (収率; 53%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.98 (d, 16.4, 1H), 7.57 (d, 7.5, 1.5, 1H), 7.39 (ddd, 8.4, 7.5, 1.5, 1H), 7.05 (d, 7.8, 1H), 6.97 (t, 8.5, 1H), 6.54 (d, 16.4), 4.24 (q, 7.0, 2H), 3.91 (s, 3H), 1.32 (t, 7.0, 3H) .

3,4-ジメトキシ桂皮酸エチルエステル (**9**)

3,4-ジメトキシ桂皮酸 10.0 mg (48.0 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] にて精製することで, **9** を 6.2 mg (収率; 62%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.62 (d, 15.9, 1H), 7.21 (d, 2.0, 1H), 7.16 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.97 (d, 8.0, 2H), 6.40 (d, 15.9, 1H), 4.23 (q, 7.0, 2H), 3.86 (s, 6H), 1.32 (t, 7.0, 3H).

2,4-ジメトキシ桂皮酸エチルエステル (**10**)

2,4-ジメトキシ桂皮酸 10.0 mg (48.0 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] にて精製することで, **10** を 4.0 mg (収率; 35%) 得た。¹H NMR (400

MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.94 (d, 16.0, 1H), 7.13 (br t, 1.5, 1H), 6.97 (br d, 1.5, 2H), 6.53 (d, 16.0, 1H), 4.24 (q, 7.0, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 1.32 (t, 7.0, 3H).

2,4,5-トリメトキシ桂皮酸エチルエステル (**11**)

2,4,5-トリメトキシ桂皮酸 10.0 mg (42.0 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 60% MeOH] にて精製することで, **11** を 4.3 mg (収率; 38%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.94 (d, 16.0, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.41 (d, 16.0, 1H), 4.23 (q, 7.0, 2H), 3.90 (s, 6H), 3.90 (s, 6H), 1.32 (t, 7.0, 3H).

フェルラ酸メチルエステル (**12**)

FA (**3**) 10.0 mg (51.5 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), MeOH を過剰量加え, 80 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 50% MeOH] にて精製することで, **12** を 5.6 mg (収率; 52%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.60 (d, 16.0, 1H), 7.17 (d, 2.0, 1H), 7.06 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.80 (d, 8.0, 1H), 6.35 (d, 16.0, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.76 (s, 3H).

フェルラ酸プロピルエステル (**13**)

FA (**3**) 10.0 mg (51.5 μ mol) に H₂SO₄ 300 μ L (5.63 mmol), *n*-PrOH を過剰量加え, 100 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 60% MeOH] にて精製することで, **13** を 9.4 mg (収率; 77.3%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.60 (d, 15.9, 1H), 7.18 (d, 2.0, 1H), 7.07 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.81 (d, 8.0, 1H), 6.35 (d, 15.9, 1H), 4.13 (t, 6.5, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.72 (tq, 7.5, 6.5, 2H), 1.00 (t, 7.5, 3H).

フェルラ酸ブチルエステル (14)

FA (3) 10.0 mg (51.5 μmol) に H_2SO_4 300 μL (5.63 mmol), *n*-BuOH を過剰量加え, 130 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] にて精製することで, 14 を 11.1 mg (収率; 86%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.60 (d, 15.9, 1H), 7.18 (d, 2.0, 1H), 7.06 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.80 (d, 8.0, 1H), 6.35 (d, 15.9, 1H), 4.18 (t, 6.5, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.68 (tt, 9.4, 6.5, 2H), 1.45 (tq, 9.4, 7.5, 2H), 0.97 (t, 7.5, 3H).

カフェ酸エチルエステル (18)

カフェ酸 10.0 mg (55.5 μmol) に H_2SO_4 300 μL (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100 °Cで攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー flash CC および逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250x10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 50% MeOH] にて精製することで, 18 を 6.2 mg (収率; 54%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.53 (d, 16.0, 1H), 7.04 (d, 2.0, 1H), 6.93 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.78 (d, 8.0, 1H), 6.24 (d, 16.0, 1H), 4.20 (q, 7.0, 2H), 1.30 (t, 7.0, 3H).

4-ヒドロキシ, 3-エトキシ桂皮酸エチルエステル (19)

カフェ酸エチルエステル (18) 30.0 mg (144.1 μmol) に NaH 13.8 mg (576.4 μmol) および DMF 1.44 mL を加え, -30°Cで攪拌した。反応 (30 分) 後, 反応溶液に EtI 24.7 mg (158.5 μmol) を加え, rt で一晩攪拌した。反応溶液は冷 MeOH でクエンチし, MeOH を除去後, H₂O と *n*-hexane:EtOAc=1:10 を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane:EtOAc = 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 および CHCl₃/MeOH/H₂O = 6:4:1) を用いて分画した。このうち, *n*-hexane:EtOAc = 8:2 溶出画分について, 逆相 HPLC [カラム; Develosil C30 (250x20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] にて精製することで, 19 を 9.2 mg (収率 27.0%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.59 (d, 16.0, 1H), 7.16 (d, 2.0, 1H), 7.06 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.81 (d, 8.4, 1H), 6.33 (d, 16.0, 1H), 4.23 (q, 7.0, 2H), 4.13 (q, 7.0, 2H), 1.43 (t, 7.0, 3H), 1.31 (t, 7.0, 3H).

4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸エチルエステル (20)

カフェ酸エチルエステル (18) 50.0 mg (240.2 μmol) に NaH 28.7 mg (1200.8 μmol) および DMF 2.402 mL を加え, -30°C で攪拌した。反応 (30 分) 後, 反応溶液に PrI 44.79 mg (264.2 μmol) を加え, rt で一晩攪拌した。反応溶液は冷 MeOH でクエンチし, MeOH を除去後, H_2O と *n*-hexane:EtOAc=1:10 を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane:EtOAc = 10:0, 19:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 および $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 6:4:1$) を用いて分画した。このうち, *n*-hexane:EtOAc = 9:1 および 8:2 溶出画分について, recycle 逆相 HPLC [カラム; Develosil C30 (250 \times 20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 75% MeOH] にて精製することで, 20 を 14.7 mg (収率 24.5%) 得た。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.59 (d, 16.0, 1H), 7.15 (d, 2.0, 1H), 7.06 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.81 (d, 8.4, 1H), 6.32 (d, 16.0, 1H), 4.22 (q, 7.0, 2H), 4.02 (t, 7.0, 2H), 1.85 (qt, 7.5, 6.5, 2H), 1.31 (t, 7.0, 3H), 1.06 (t, 7.5, 3H).

Iso-FAEE (21)

Iso-FA 10.0 mg (51.5 μmol) に H_2SO_4 300 μL (5.63 mmol), EtOH を過剰量加え, 100°C で攪拌した。反応 (1 時間) 後, 反応溶液を濃縮して, ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 \times 10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 55% MeOH] にて精製することで, 21 を 3.0 mg (収率; 26%) 得た。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.53 (d, 16.0, 1H), 7.07 (d, 2.0), 7.05 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.94 (d, 8.0, 1H), 6.30 (d, 16.0, 1H), 6.24 (d, 16.0, 1H), 4.22 (q, 7.0, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.31 (t, 7.0, 3H).

3-ヒドロキシ, 4-プロキシ桂皮酸エチルエステル (22), 3,4-ジエトキシ桂皮酸エチルエステル (23)

カフェ酸エチルエステル (18) 30.0 mg (144.1 μmol) に K_2CO_3 79.7 mg (576.4 μmol) および DMF 1.44 mL を加え, -30°C で攪拌した。30 分後, 反応溶液に EtI 24.7 mg (158.5 μmol) を加え, 60°C で一晩攪拌した。反応溶液は冷 MeOH でクエンチし, MeOH を除去後, H_2O と *n*-hexane:EtOAc=1:10 を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, SiO_2 オープンカラムクロ

マトグラフィー (*n*-hexane:EtOAc = 10:0, 19:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 および CHCl₃/MeOH/H₂O = 6:4:1) を用いて分画した。このうち, *n*-hexane:EtOAc = 9:1 溶出画分について, 逆相 HPLC [カラム; Develosil C30 (250×20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 75% MeOH] にて精製することで, **23** を 4.5 mg (収率 11.8%) 得た。また, *n*-hexane:EtOAc = 8:2 溶出画分について, 逆相 HPLC [カラム; Develosil C30 (250×20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] にて精製することで, **22** を 10.9 mg (収率 32.0%) 得た。**22** の ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.55 (d, 16.0, 1H), 7.07 (d, 2.0, 1H), 7.02 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.91 (d, 8.4, 1H), 6.29 (d, 16.0, 1H), 4.22 (q, 7.0, 2H), 4.12 (q, 7.0, 2H), 1.43 (t, 7.0, 3H), 1.31 (t, 7.0, 3H). **23** の ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.60 (d, 16.0, 1H), 7.19 (d, 2.0, 1H), 7.14 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.96 (d, 8.4, 1H), 6.37 (d, 16.0, 1H), 4.23 (q, 7.0, 2H), 4.11 (q, 7.0, 2H), 4.10 (q, 7.0, 2H), 1.42 (t, 7.0, 6H), 1.32 (t, 7.0, 3H).

フェルラ酸プロパルギルエステル (**24**)

FA (**3**) 10.0 mg (51.5 μmol) にプロパルギルアルコール 577 μL (100 μmol), EDC 14.4mg (75 μmol) および DMAP 1.2 mg (10 μmol) を加え, 室温で一晩攪拌した。反応後, H₂O と CHCl₃ を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, 逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250×10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 40% MeCN] にて精製することで, **24** を 9.5 mg (収率 79.4%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.65 (d, 16.0, 1H), 7.20 (d, 2.0, 1H), 7.09 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.81 (d, 8.4, 1H), 6.38 (d, 16.0, 1H), 4.79 (d, 2.5, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.92 (t, 2.5, 1H).

イソフェルラ酸プロパルギルエステル (**25**)

FA (**3**) 10.0 mg (51.5 μmol) にプロパルギルアルコール 577 μL (100 μmol), EDC 14.4mg (75 μmol) および DMAP 1.2 mg (10 μmol) を加え, rt で一晩攪拌した。反応後, H₂O と CHCl₃ を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, 逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250×10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 40% MeCN] にて精製することで, **25** を 8.8 mg (収率 73.6%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.61 (d, 16.0, 1H), 7.09 (d, 2.0, 1H), 7.07 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.95 (d, 8.4, 1H), 6.33 (d, 16.0, 1H), 4.79 (d, 2.5, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.92

(t, 2.5, 1H).

カフェ酸プロパルギルエステル (26)

カフェ酸 10.0 mg (55.5 μmol) にプロパルギルアルコール 13.0 μL (227.6 μmol), EDC 11.7 mg (61.1 μmol), DMAP 1.4 mg (11.1 μmol) および CH_2Cl_2 555 μL を加え, rt で一晩攪拌した。反応後, H_2O と CHCl_3 を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (n -hexane:EtOAc = 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 9:1 および $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 6:4:1) を用いて分画した。このうち, n -hexane:EtOAc = 6:4 および $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 9:1 溶出画分について, 逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 \times 10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 50% MeCN] にて精製することで, **26** を 3.9 mg (収率 25.0%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., J in Hz), 7.57 (d, 16.0, 1H), 7.05 (d, 2.0, 1H), 6.76 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.78 (d, 8.0, 1H), 6.28 (d, 16.0, 1H), 4.78 (d, 2.5, 2H), 2.91 (t, 2.5, 1H).

桂皮酸プロパルギルエステル (27)

桂皮酸 50.0 mg (337.5 μmol) にプロパルギルアルコール 94.5 mg (1687.5 μmol), EDC 71.0 mg (371.3 μmol), DMAP 8.0 mg (67.5 μmol) および DMF 3375 μL を加え, rt で一晩攪拌した。反応後, H_2O と CHCl_3 を用いた二層分配に付した。反応溶液は H_2O と n -hexane:EtOAc = 1:10 を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (n -hexane:EtOAc = 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 および $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 6:4:1) を用いて分画し, **27** を 46.2 mg (収率 73.6%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., J in Hz), 7.71 (d, 16.0, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.39 (m, 3H), 6.51 (d, 16.0, 1H), 4.80 (d, 2.5, 2H), 2.94 (t, 2.5, 1H).

4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸プロパルギルエステル (28)

4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸エチルエステル (**20**) 15.0 mg (60.0 μmol) に 2M KOH 溶液 1.5 mL および H_2O 1.5 mL を加え, rt で 48 時間攪拌した。その後, 反応溶液に 2N HCL 溶液 1.5 mL 加えて中和してから H_2O と EtOAc を用いた二層分配に付し, 有機層 13.6 mg を **20** のカルボン酸として得た。**20** のカルボン酸 13.6 mg (61.2 μmol) にプロパルギルアルコール 17.1

mg (306.0 μmol), EDC 12.8 mg (67.3 μmol), DMAP 1.5 mg (12.2 μmol) および CH_2Cl_2 612 μL を加え, rt で一晩攪拌した。反応後, H_2O と EtOAc を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮後, 逆相 HPLC [カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (250 \times 10 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] および recycle 逆相 HPLC [カラム; Develosil C30 (250 \times 20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 75% MeOH] にて精製することで, **28** を 3.3 (収率 26.4%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.64 (d, 16.0, 1H), 7.18 (d, 2.0, 1H), 7.08 (dd, 8.4, 2.0, 1H), 6.83 (d, 8.4, 1H), 6.35 (d, 16.0, 1H), 4.79 (q, 2.5, 2H), 4.03 (t, 6.5, 2H), 2.90 (t, 2.5, 1H), 1.85 (qt, 7.5, 6.5 2H), 1.07 (t, 7.5, 3H).

4-ヒドロキシ, 3-(prop-2-yn-1-yloxy) 桂皮酸エチルエステル (**29**)

カフェ酸エチルエステル (**18**) 50.0 mg (240.2 μmol) に NaH 28.7 mg (1200.8 μmol) および DMF 2.402 mL を加え, -30 $^\circ\text{C}$ で攪拌した。30 分後, 反応溶液に PrBr (80% in toluene) 31.3 mg (288.2 μmol) を加え, rt で一晩攪拌した。反応溶液は冷 MeOH でクエンチし, MeOH を除去後, H_2O と *n*-hexane:EtOAc=1:10 を用いた二層分配に付した。有機層を濃縮して, SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane:EtOAc = 10:0, 19:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 および $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 6:4:1) を用いて分画した。このうち, *n*-hexane:EtOAc = 8:2 および 7:3 溶出画分について, recycle 逆相 HPLC [カラム; Develosil C30 (250 \times 20 mm), 検出器; UV 220 nm, 移動相; 70% MeOH] にて精製することで, **29** を 15.6 mg (収率 26.4%) 得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD); δ (mult., *J* in Hz), 7.59 (d, 16.0, 1H), 7.30 (d, 2.0, 1H), 7.12 (dd, 8.0, 2.0, 1H), 6.84 (d, 8.0, 1H), 6.32 (d, 16.0, 1H), 4.83 (q, 2.5, 2H), 4.22 (q, 7.0, 2H), 2.98 (t, 2.5, 1H), 1.31 (t, 7.0, 3H).

5-10-10. 細胞内クリック反応およびゴルジ体のオルガネラ染色

HeLa 細胞を 24 well プレーートの各 well に丸型カバーガラスを入れた各 well に 60000 cells/well となるように播種すると同時に DMSO で調製したサンプル添加培地 (DMSO 終濃度 0.1%) を用いて 5% CO₂ 下, 37 $^\circ\text{C}$ にて 20 時間培養した。その後, 培地を除去し, 4% PFA (富士フイルム和光純薬工業) 溶液を 500 μL 加えて 10 分間静置し, 細胞を固定した。固定液を除去し, PBS で 2 回洗浄後, 0.2% Triton X-100 in PBS (Alfa Aesar) 500 μL に続き, Blocking One-

P(ナカライテスク株式会社) 250 μ L でそれぞれ 20 分間透過およびブロッキング処理した。その後、共焦点顕微鏡を用いて撮影した。ゴルジ体を染色する場合は Blocking One-P を除去し、PBS で 2 回洗浄後、15 μ g/mL HPA Alexa Fluor 647 conjugate (Thermo Fisher Scientific) in PBS 溶液 250 μ L をクリック反応溶液 100 μ L に添加後、暗所にて 1 時間振とうした。PBS で洗浄後、クリック反応溶液 (5 μ M Azide 488, 250 μ M CuSO₄, 2 mM アスコルビン酸, 250 μ M THPTA) 250 μ L を加え、室温、暗所で 30 分振とうした。反応溶液を除去し、PBS で洗浄後、カバーガラスを回収してプレパラートを作製して、共焦点顕微鏡を用いて撮影した。

5-10-11. HeLa 細胞の細胞質および核タンパク質分画

HeLa 細胞 ($\sim 2.0 \times 10^7$) に冷 PBS を加えて 2 回洗浄後に細胞を回収した。180 \times g, 15 min の遠心により上清及び沈殿に分離した。沈殿物を冷 PBS で洗浄し、再び遠心分離 180 \times g, 15 min した。この PBS 洗浄を 2 回繰り返す、200 μ L の冷却した buffer I [10 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF および $\times 1$ PI] を加えて、氷上で 15 分間静置した。冷 NP-40 を終濃度が 1% になるように添加した後、215 \times g で 5 分間遠心分離をした。その後、上清を buffer II [20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF および $\times 1$ PI] を用いて 10 倍希釈して、細胞質タンパク質抽出液を調製した。一方、沈殿物に対しては buffer III [20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, $\times 1$ PI] を 100 μ L 加えてソニケーションを行った (1 サイクル: 30 秒 ON, 30 秒 OFF を 10 サイクル)。その後、遠心分離を行い、上清を回収後、buffer II への透析を行った。透析後、回収した溶液を最速で遠心分離したのち上清を回収して核画分とした。

5-10-12. HeLa 細胞由来タンパク質画分とリガンド結合 FG ビーズとのプルダウンアッセイ

HeLa 細胞から調製した細胞質画分 200 μ g と 0.5 mg のリガンド結合 Azide beads (多摩川精機株式会社, 長野, 日本) とを 4 $^{\circ}$ C, 4 時間反応した。その後、磁気分離によってビーズを回収し、結合 buffer を用いて、3 回洗浄後、ビーズに塩溶出 buffer (1 M KCl, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF および $\times 1$ PI) 30 μ L を添加して、4 $^{\circ}$ C, 5 分間静置した。その後、上清を磁気分離によって回収し

て、そこに×4 loading buffer (0.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.02% bromophenol blue, 8% SDS および 40% glycerol) 8 μ L および 2-mercaptoethanol 2 μ L を添加し、98°C, 5 分間加熱したサンプルを塩溶出結合タンパク質画分として得た。一方、磁気分離したビーズには×1 loading buffer (0.0625 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.005% bromophenol blue, 2% SDS および 10% glycerol) 38 μ L および 2-mercaptoethanol 2 μ L を添加後、98°C, 5 分間加熱したサンプルを加熱溶出結合タンパク質画分として得た。

5-10-13. SDS-PAGE および銀染色

5-10-12 項で得られた塩溶出および加熱溶出結合タンパク質画分をスーパーセップエース™ 5-20% 13 ウェル (富士フイルム和光純薬株式会社) の各ウェルに添加して、泳動 buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine および 0.1% SDS) を用いて、定電流 18 mA, 90 分間で電気泳動した。BSA または Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Inc., CA, 米国) を分子量マーカーとして使用した。電気泳動した泳動ゲルは、銀染色 MS キット (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて、銀染色した。

5-10-14. Western blotting

5-10-13 項で電気泳動した泳動ゲルを転写 buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine および 20% MeOH) に浸し、60 min, 定電流 180 mA で PVDF メンブレンへの転写を行った。その後、10% スキムミルク in PBS-T を用いて、室温、60 分間ブロッキングを行い、次に anti-VAT1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, US, 1% スキムミルク in PBS-T) を 4°C, 一晩反応させた。PBS-T で洗浄後に、anti-mouse の 2 次抗体と室温で 3 時間反応させた。再び PBS-T で洗浄後に、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Bio-Rad Inc.) によってタンパク質の検出をした。メンブレンの撮影は LAS-3000 (富士フイルム株式会社) を使用した。

5-10-15. LC/MS/MS を用いたタンパク質バンドの解析

5-10-13 項で調製した銀染色したゲルから目的のタンパク質バンドを回収して、そのバンドについて、理化学研究所 生命機能科学研究センター 無細胞タンパク質合成研究チームのプロテオミクス研究技術支援・質量分析受託解析に依頼して解析を行った。

5-10-16. RNA 干渉

HeLa 細胞を 6 well プレート の各 well に 100000 cells/well となるように播種して 24 時間インキュベートした後、培地を除去して、VAT-1 の siRNA (#sc-93355, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) もしくは control siRNA (#sc-37007, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を含んだトランスフェクション溶液 [siRNA 4 μ L (0.50 μ g), Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 287 μ L, Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) 9 μ L] を添加してトランスフェクションした。添加後 18 時間後にトランスフェクション溶液を除去して、通常の HeLa 培養培地に戻して、その後、サンプリングもしくは活性試験で使用するまで培養した。細胞はトリプシンを用いて回収して、10000 cells/10 μ L となるように 1 \times loading buffer を加えて、100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱したものを細胞抽出サンプルとした。5-10-13 および 5-10-14 項と同様の方法により、SDS-PAGE および western blotting を行い、VAT-1 および beta actin (Anti-beta Actin, Abcam, Cambridge, UK) の発現量を調べた。また、RNA 干渉した細胞のヒストン修飾調節活性試験は 4-6-5.項と同様の方法で実施した。

5-10-17. 統計分析

2-7-10 項と同様の方法で実施した。

5-10-18. Supporting Information

リスト

Figure S5-1. 天然 FAEE (1) の ESI-MS (neg.).

Figure S5-2. 天然 FAEE (1) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-3. 天然 FAEE (1) の ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz).

Figure S5-4. 天然 FAEE (1) の COSY (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-5. 天然 FAEE (1) の HMQC (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-6. 天然 FAEE (1) の HMBC (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-7. 天然 *p*-クマル酸エチルエステル (2) の ESI-MS (neg.).

Figure S5-8. 天然 *p*-クマル酸エチルエステル (2) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-9. 合成 *p*-クマル酸エチルエステル (2) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-10. *m*-クマル酸エチルエステル (4) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-11. *o*-クマル酸エチルエステル (5) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-12. 2-メトキシ桂皮酸エチルエステル (8) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-13. 3,4-ジメトキシ桂皮酸エチルエステル (9) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-14. 2,4-ジメトキシ桂皮酸エチルエステル (10) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-15. 2,4,5-トリメトキシ桂皮酸エチルエステル (11) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-16. フェルラ酸メチルエステル (12) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-17. フェルラ酸プロピルエステル (13) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-18. フェルラ酸ブチルエステル (14) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-19. カフェ酸エチルエステル (18) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-20. 4-ヒドロキシ, 3-エトキシ桂皮酸エチルエステル (19) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-21. 4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸エチルエステル (20) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-22. iso-FAEE (21) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-23. 3-ヒドロキシ, 4-プロキシ桂皮酸エチルエステル (22) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-24. 3,4-ジエトキシ桂皮酸エチルエステル (23) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-25. フェルラ酸プロパルギルエステル (24) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-26. iso-フェルラ酸プロパルギルエステル (25) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-27. カフェ酸プロパルギルエステル (26) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-28. 桂皮酸プロパルギルエステル (27) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-29. 4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸プロパルギルエステル (28) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Figure S5-30. 4-ヒドロキシ, 3-(prop-2-yn-1-yloxy) 桂皮酸エチルエステル (29) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

Spectrum from 20151124 ms63 19-2 nega.wiff (sample 1) - 20151124 ms63 19-2 nega, Experiment 1, -TOF MS (100 - 1500) from 7.714 to 7.764 min

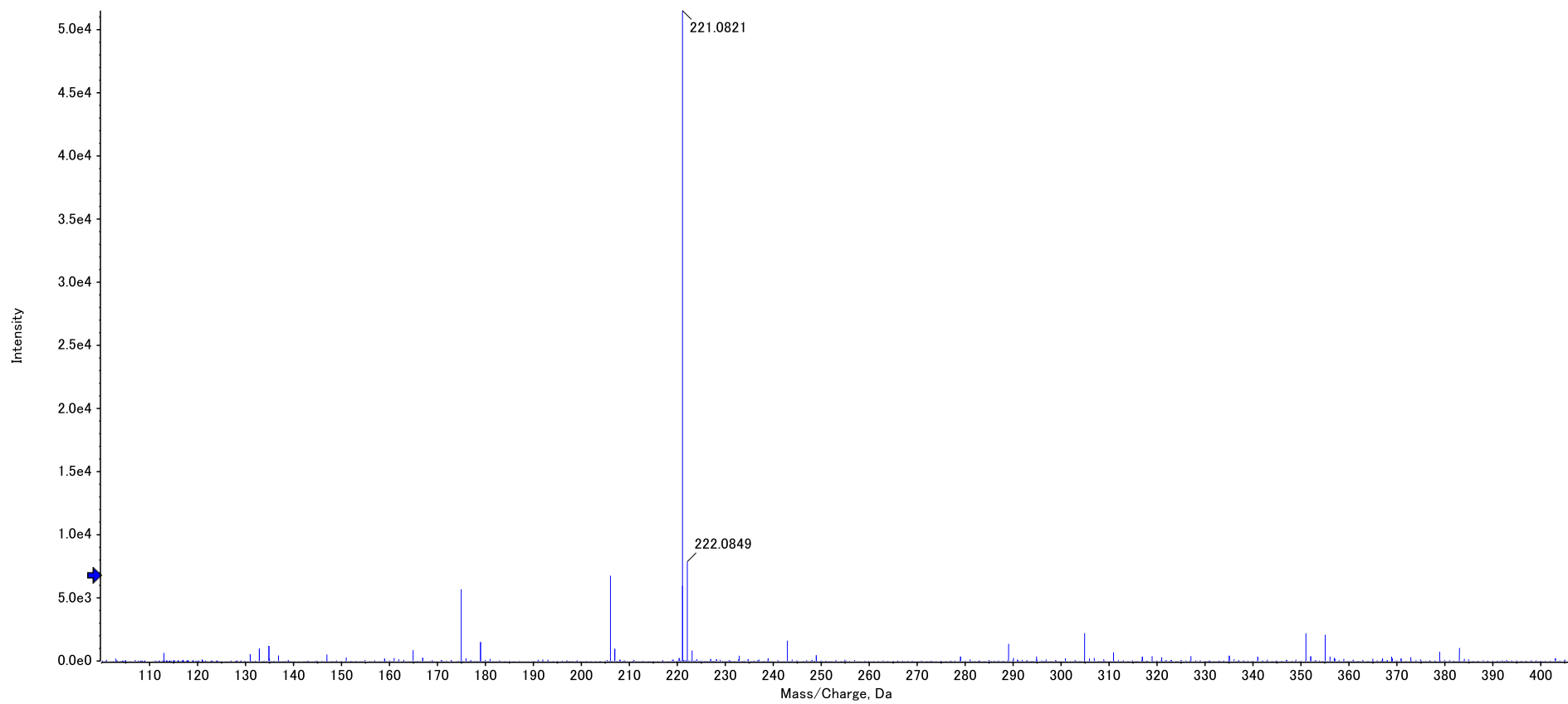


Figure S5-1. 天然 FAEE (1) の ESI-MS (neg.).

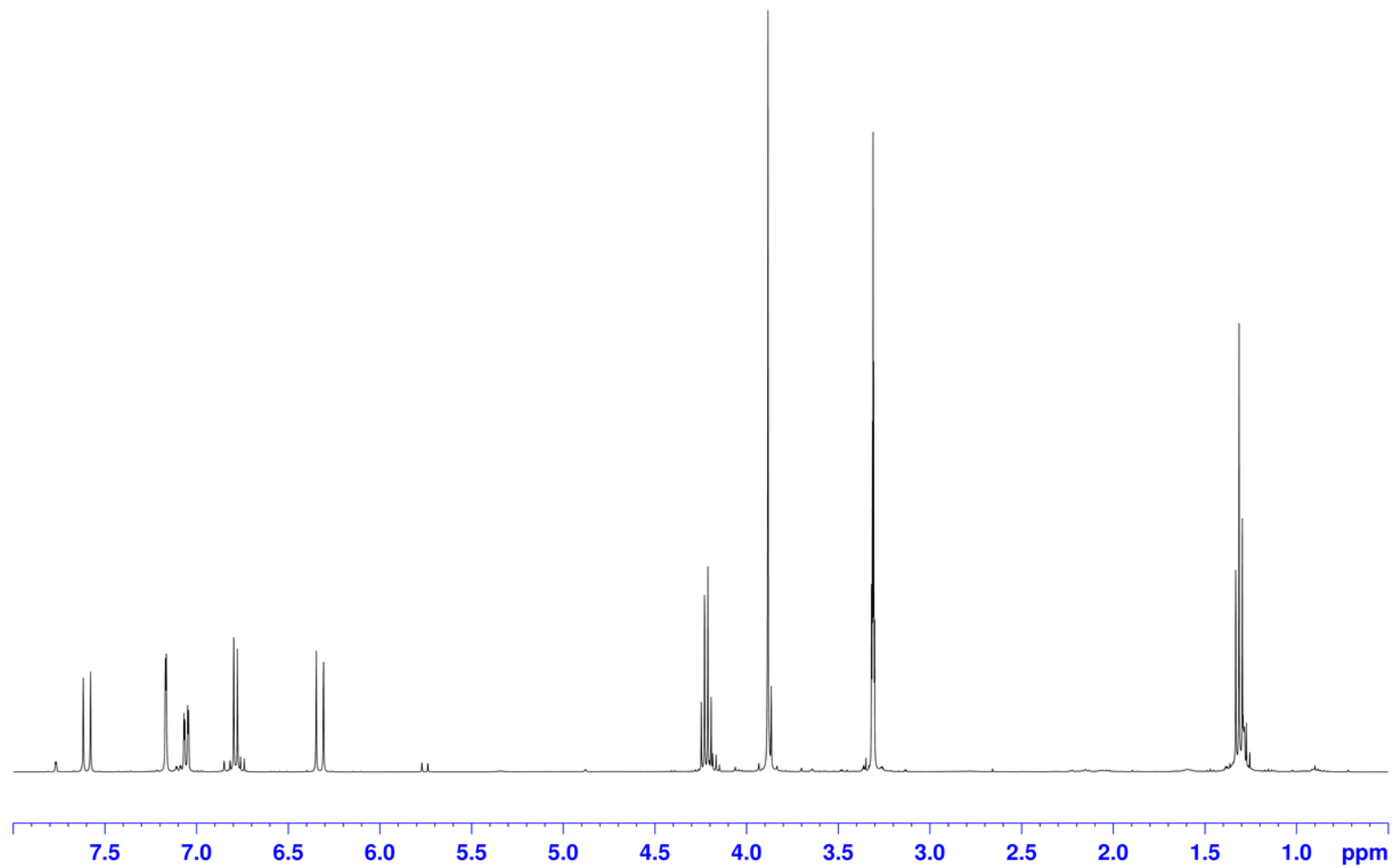


Figure S5-2. 天然 FAEE (1) の ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400 MHz).

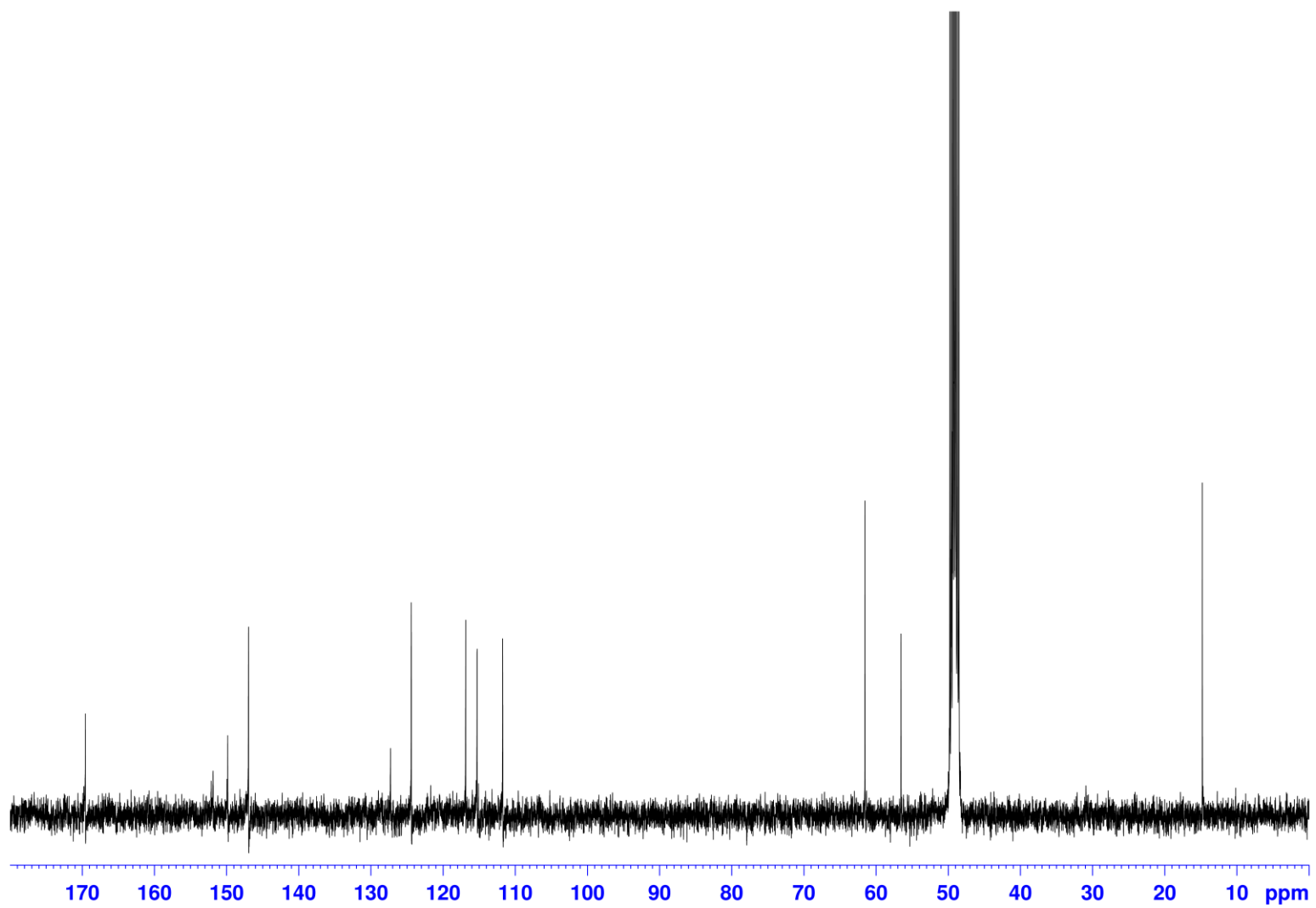


Figure S5-3. 天然 FAEE (1) の ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz).

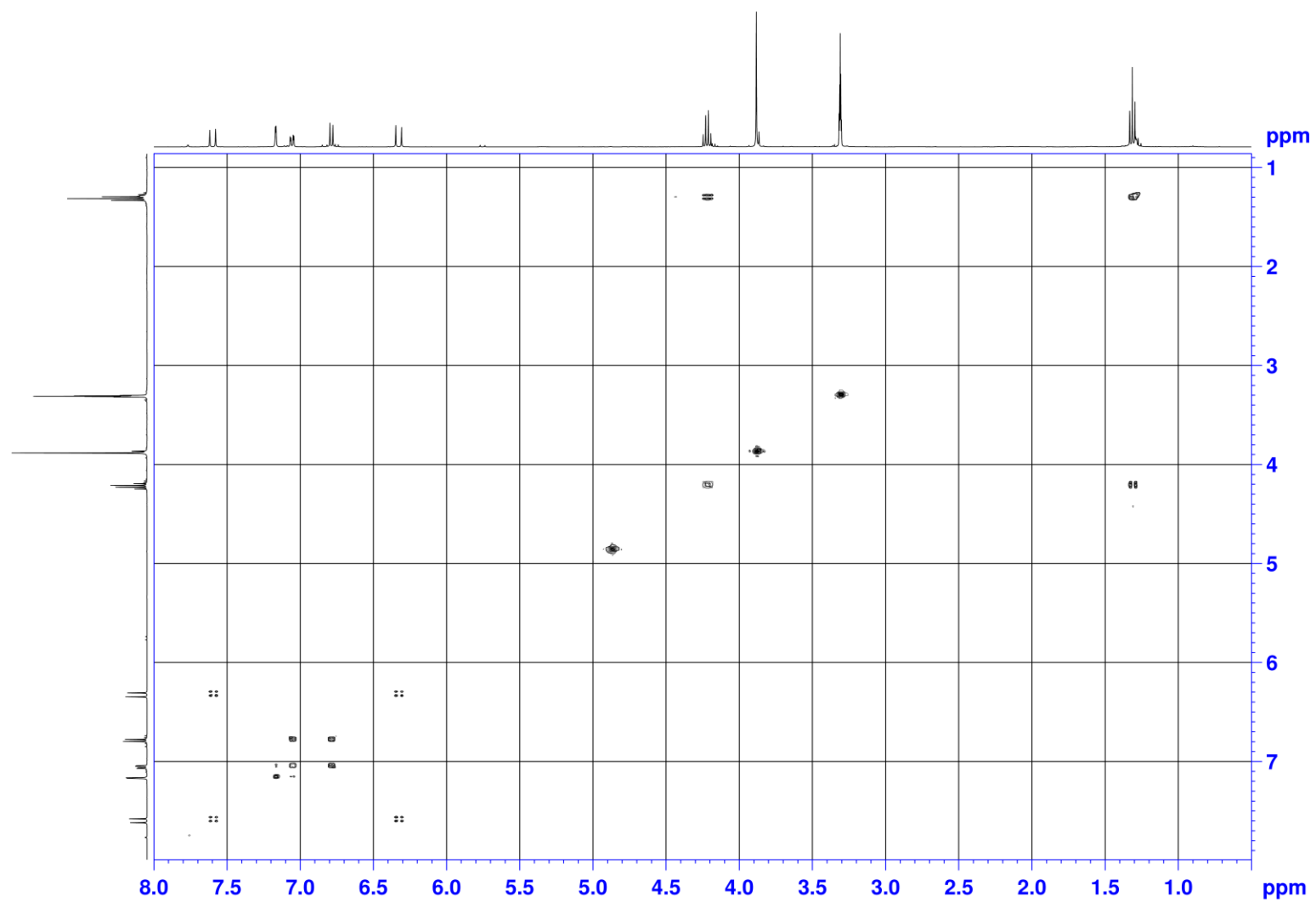


Figure S5-4. 天然 FAEE (1) の COSY (CD₃OD, 400 MHz).

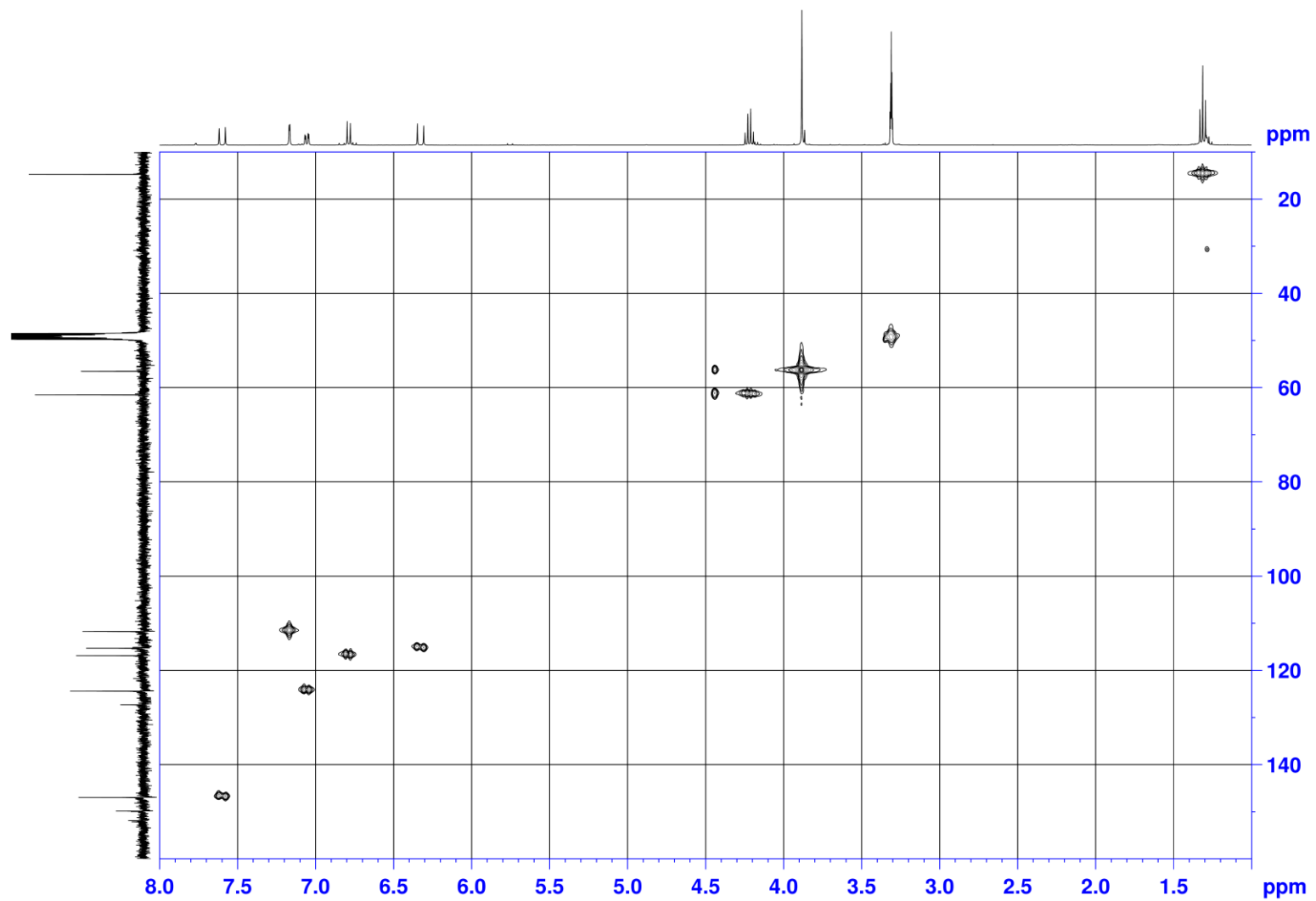


Figure S5-5. 天然 FAEE (1) の HMQC (CD₃OD, 400 MHz).

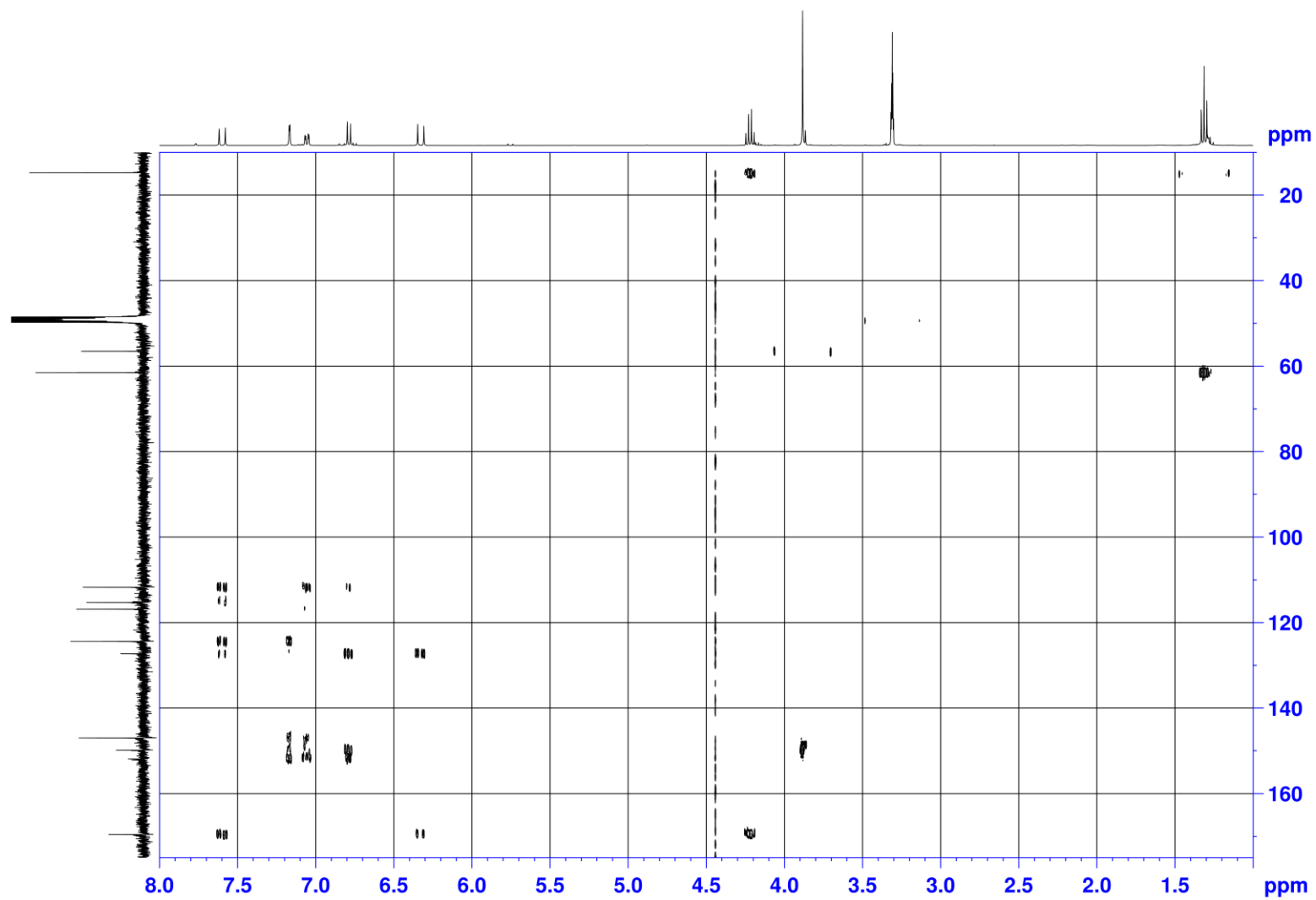


Figure S5-6. 天然 FAEE (1) の HMBC (CD₃OD, 400 MHz).

Spectrum from 20151124 ms63 19-3 nega.wiff (sample 1) - 20151124 ms63 19-3 nega, Experiment 1, -TOF MS (100 - 1500) from 7.639 to 7.699 min

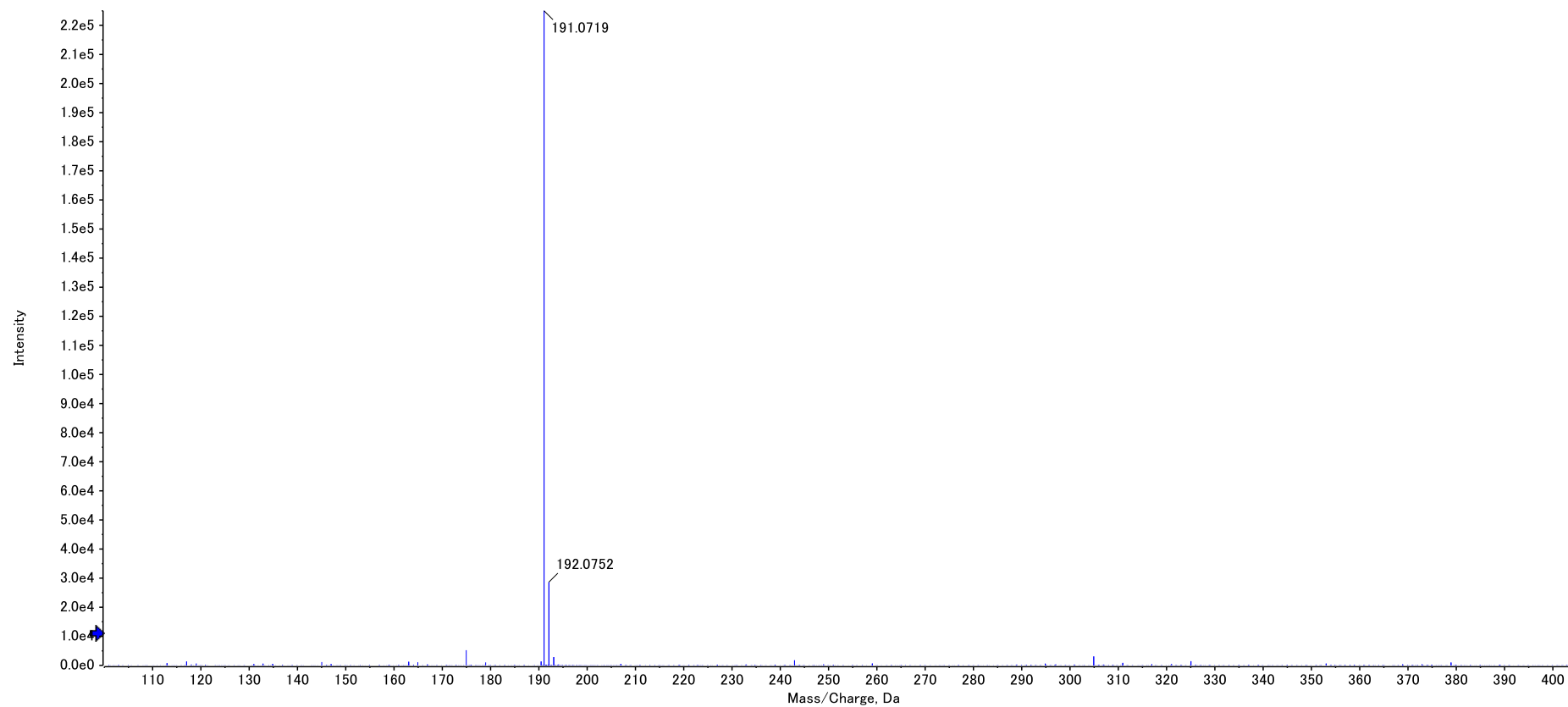


Figure S5-7. 天然 *p*-クマル酸エチルエステル (2) の ESI-MS (neg.).

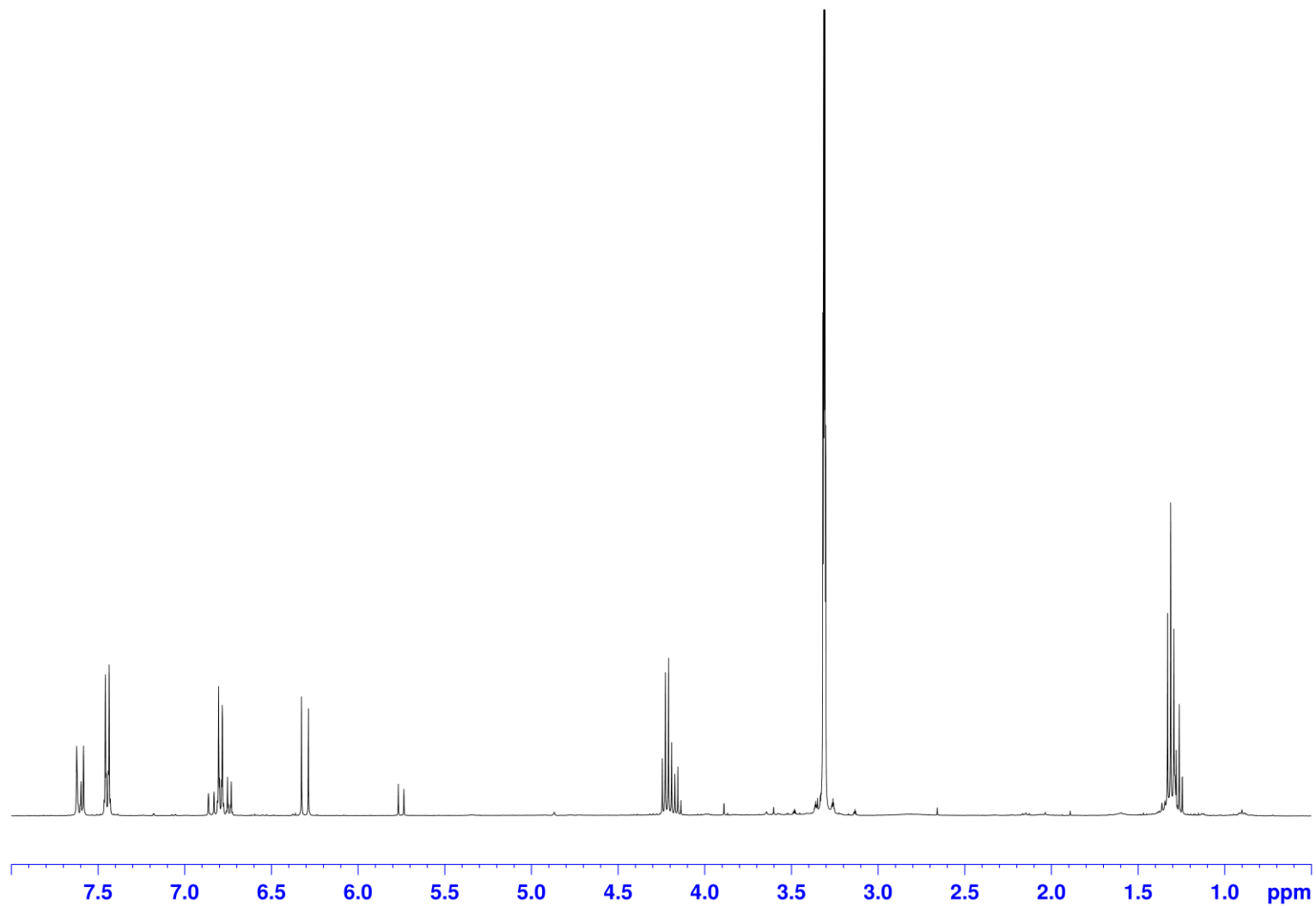


Figure S5-8. 天然 *p*-クマル酸エチルエステル (2) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

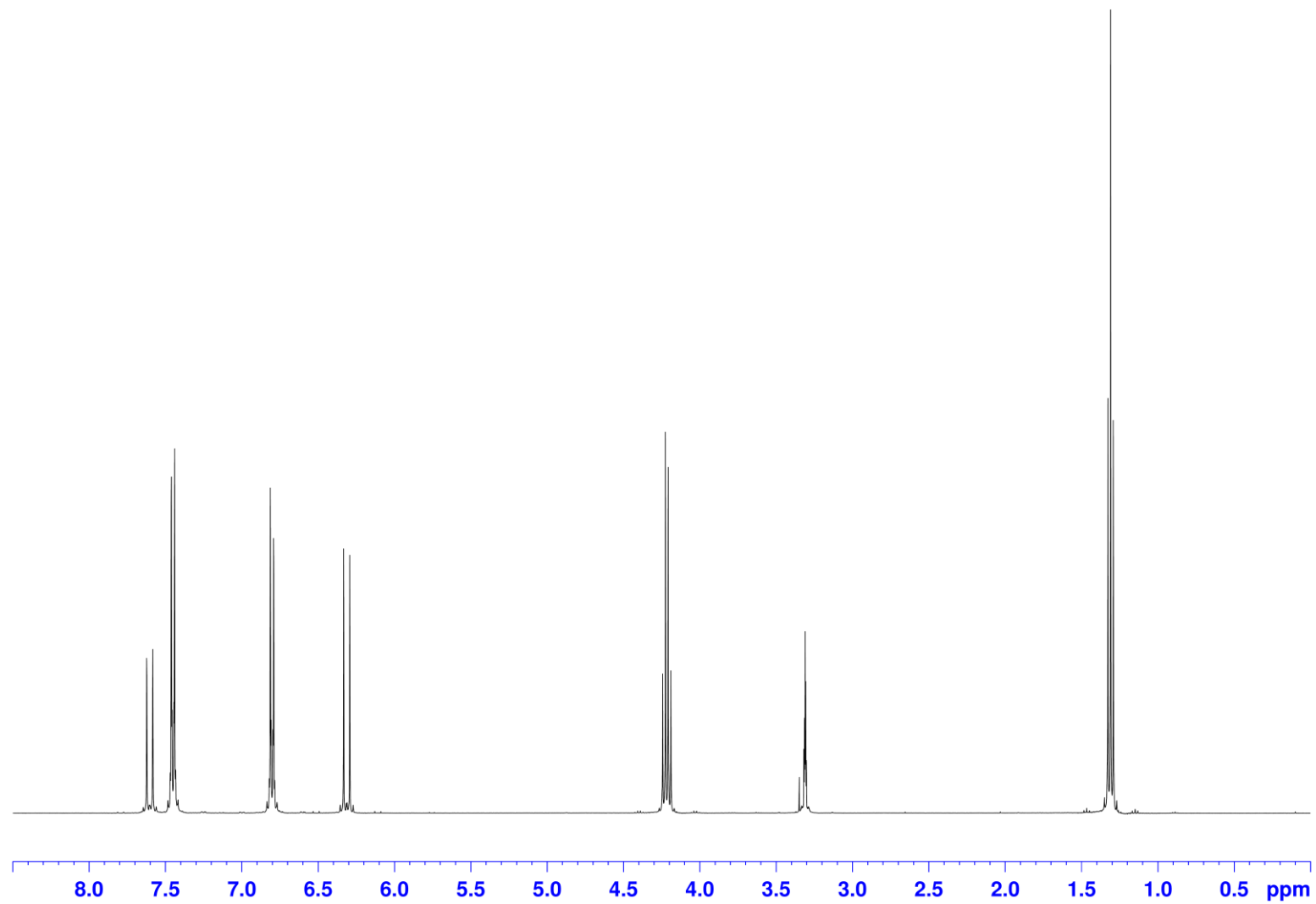


Figure S5-9. 合成 *p*-クマル酸エチルエステル (2) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

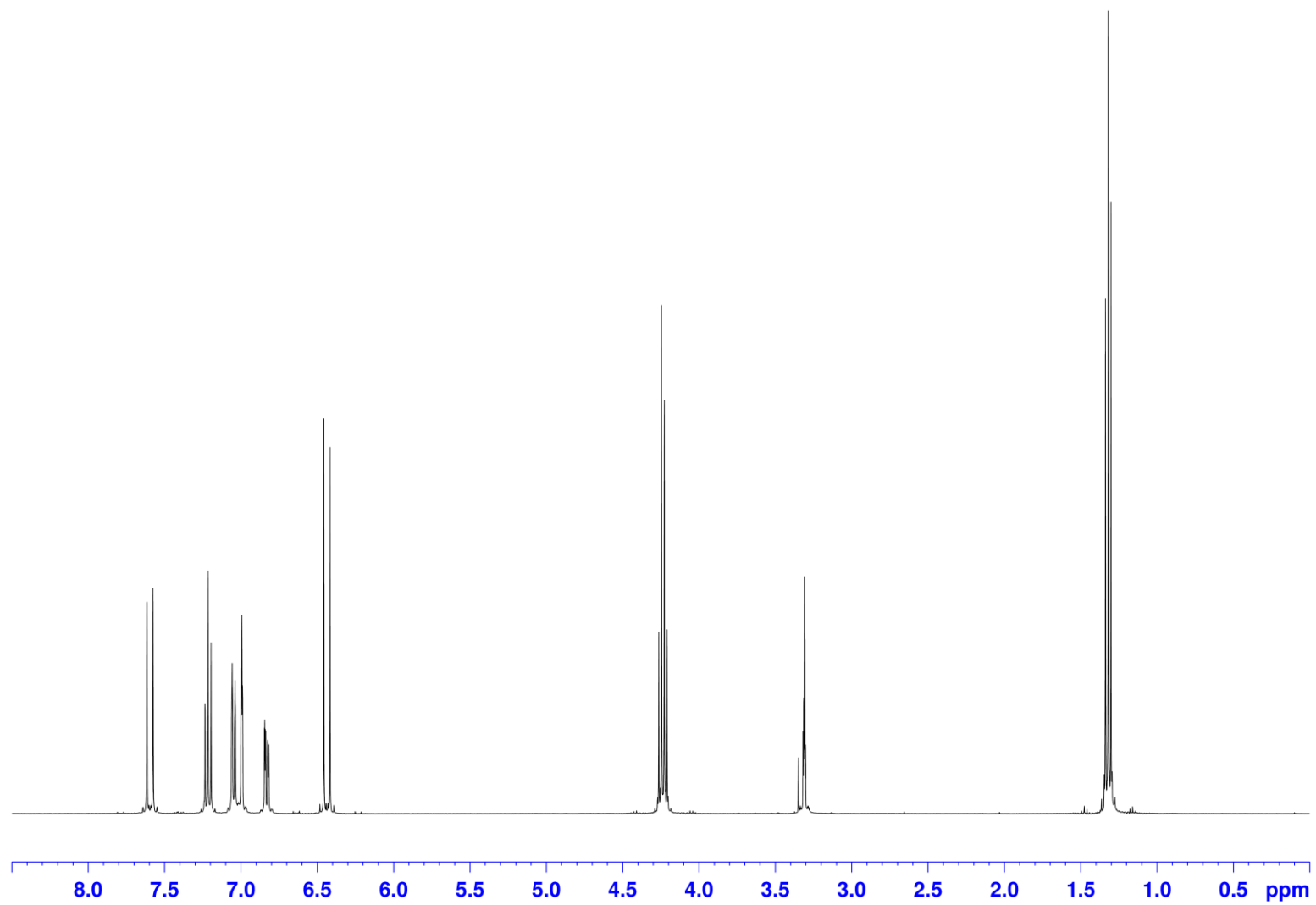


Figure S5-10. *m*-クマール酸エチルエステル (4) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

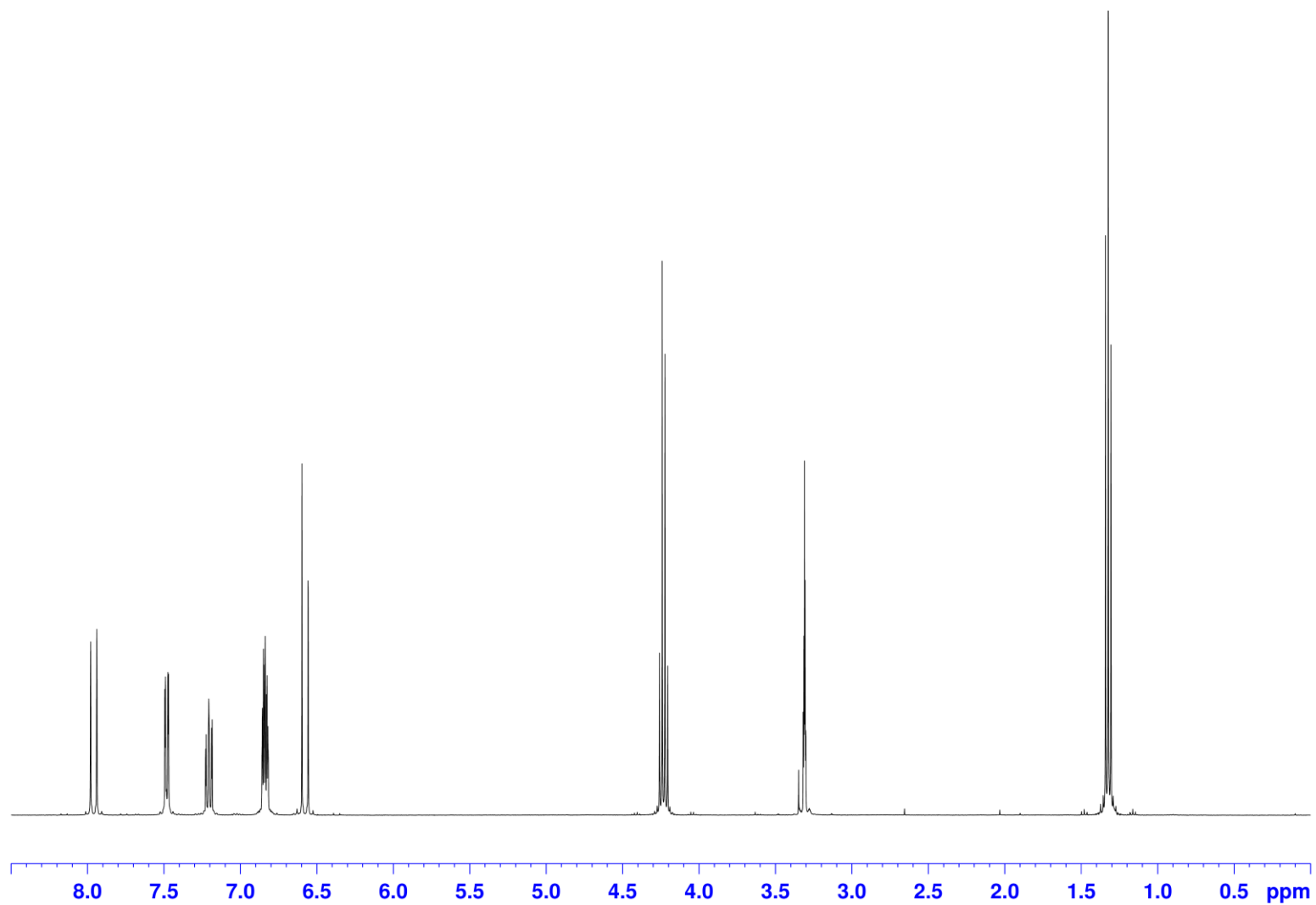


Figure S5-11. *o*-クマル酸エチルエステル (5) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

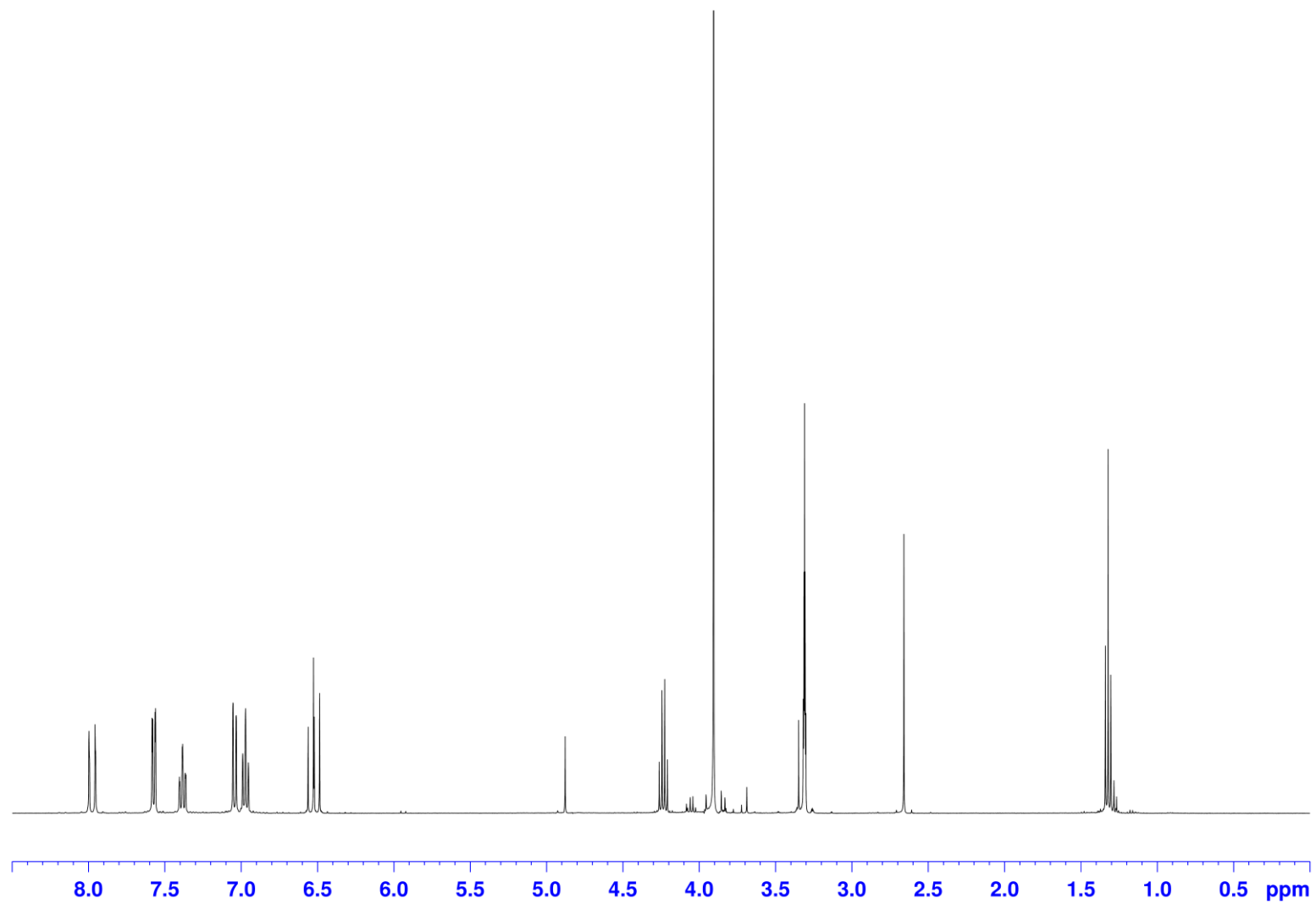


Figure S5-12. 2-メトキシ桂皮酸エチルエステル (8) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

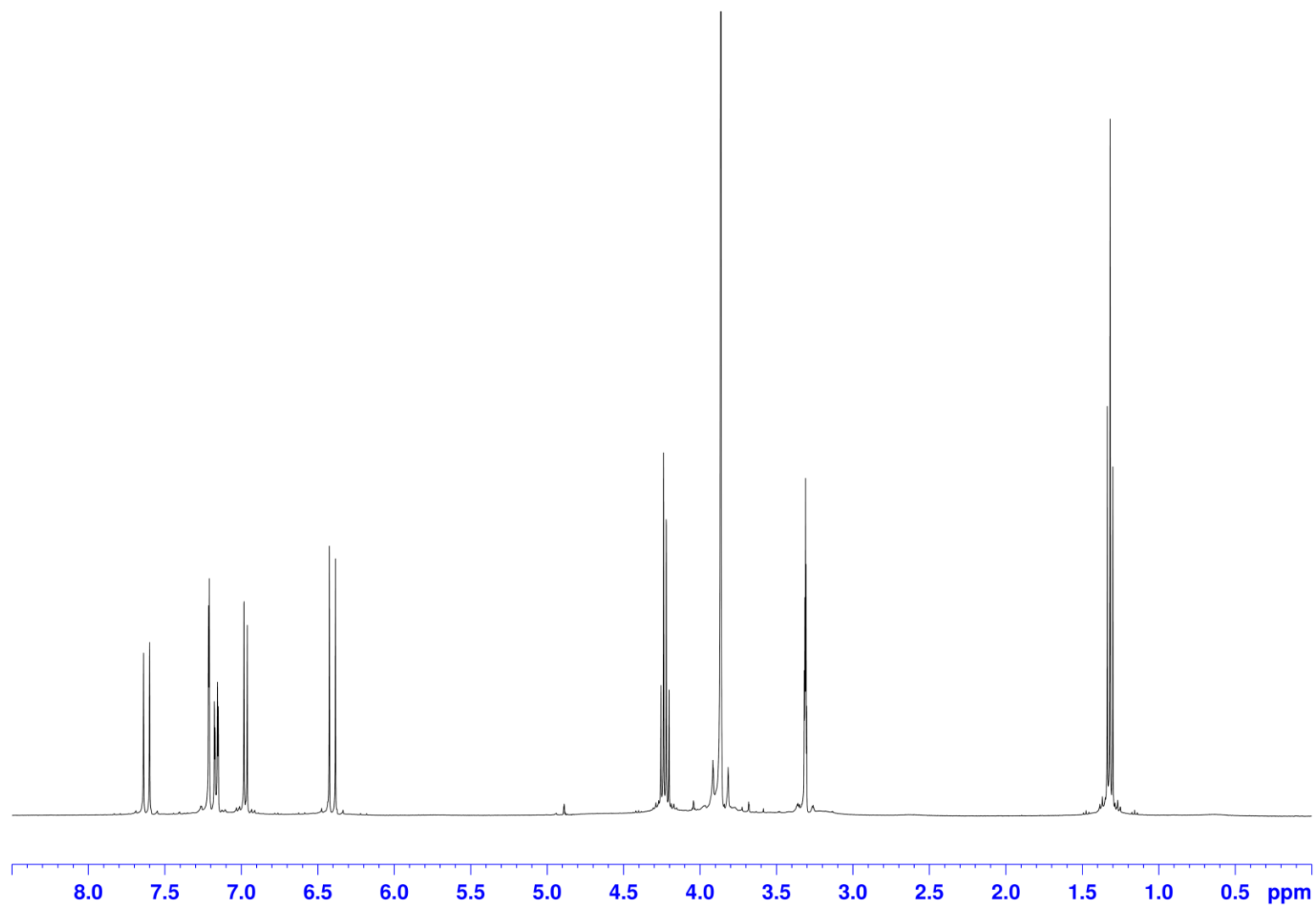


Figure S5-13. 3,4-ジメトキシ桂皮酸エチルエステル (9) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

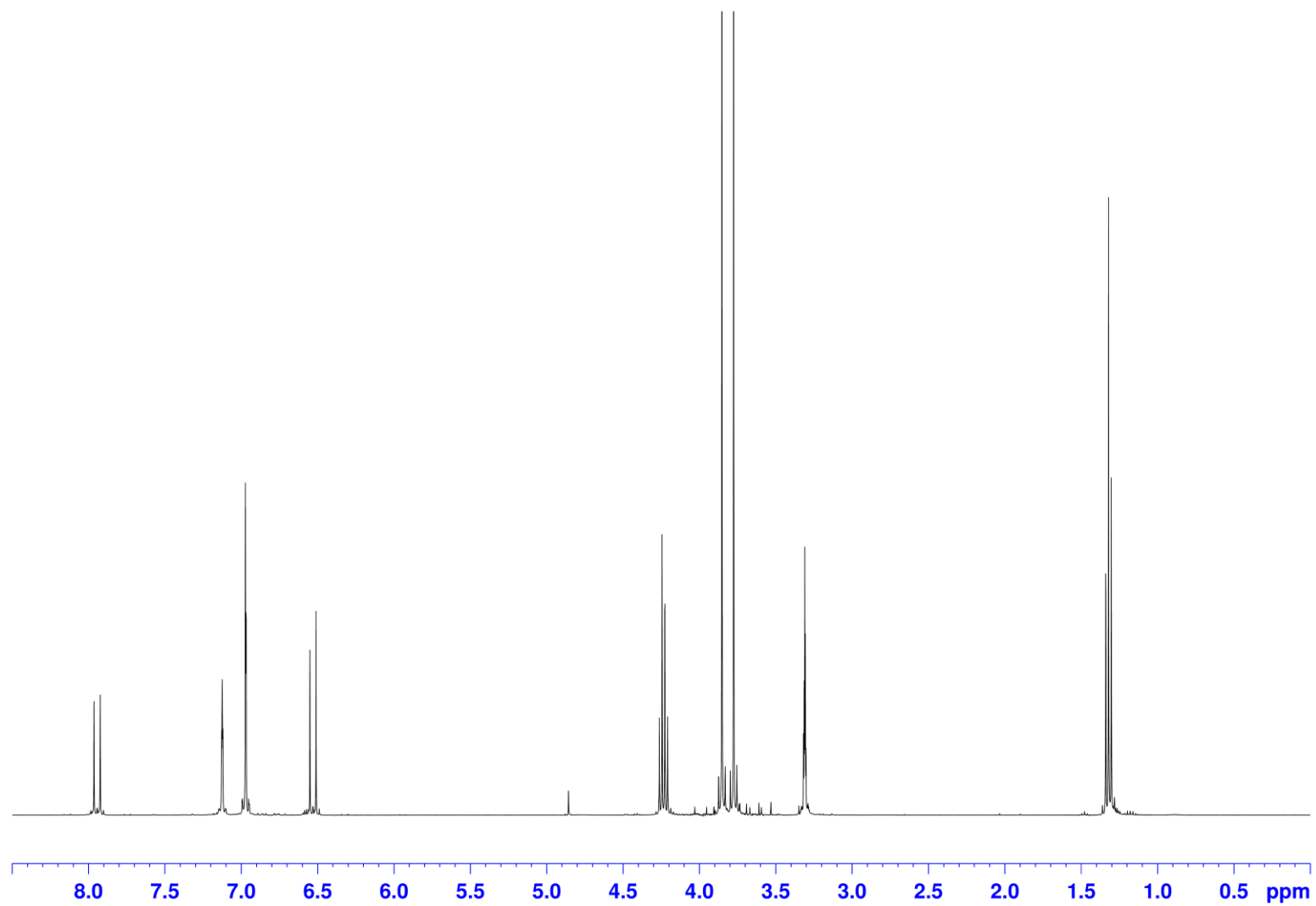


Figure S5-14. 2,4-ジメトキシ桂皮酸エチルエステル (10) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

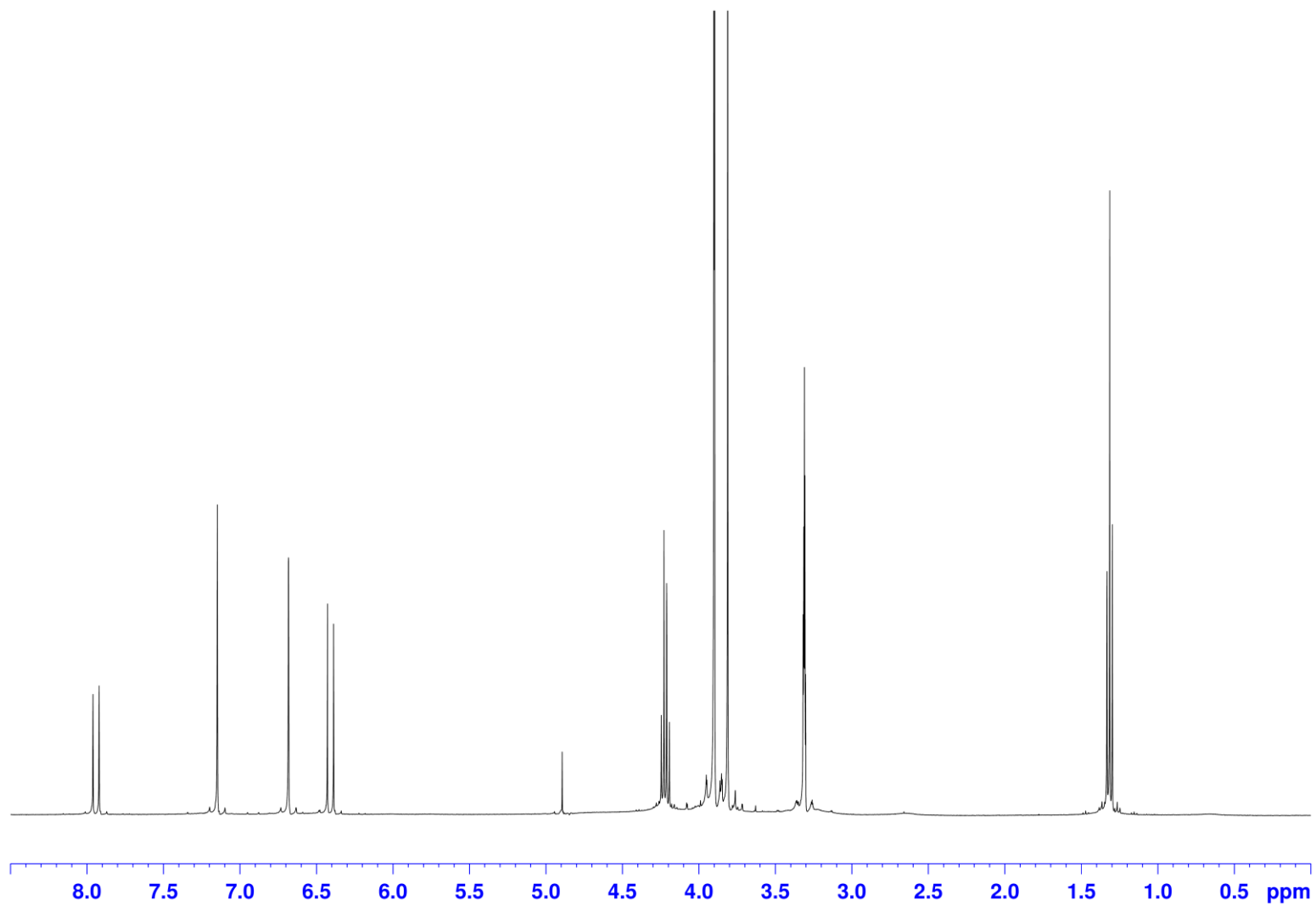


Figure S5-15. 2,4,5-トリメトキシ桂皮酸エチルエステル (11) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

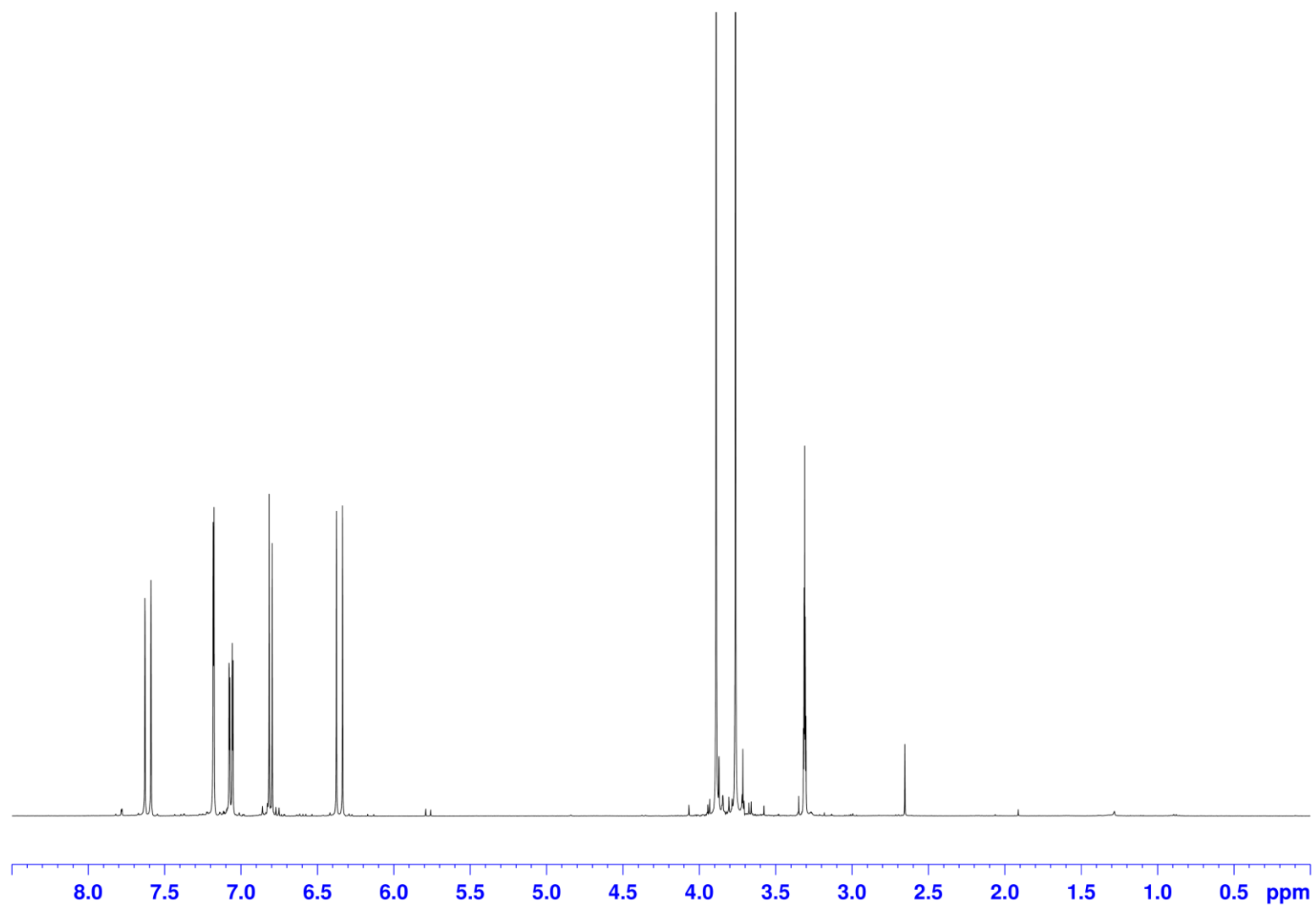


Figure S5-16. フェルラ酸メチルエステル (12) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

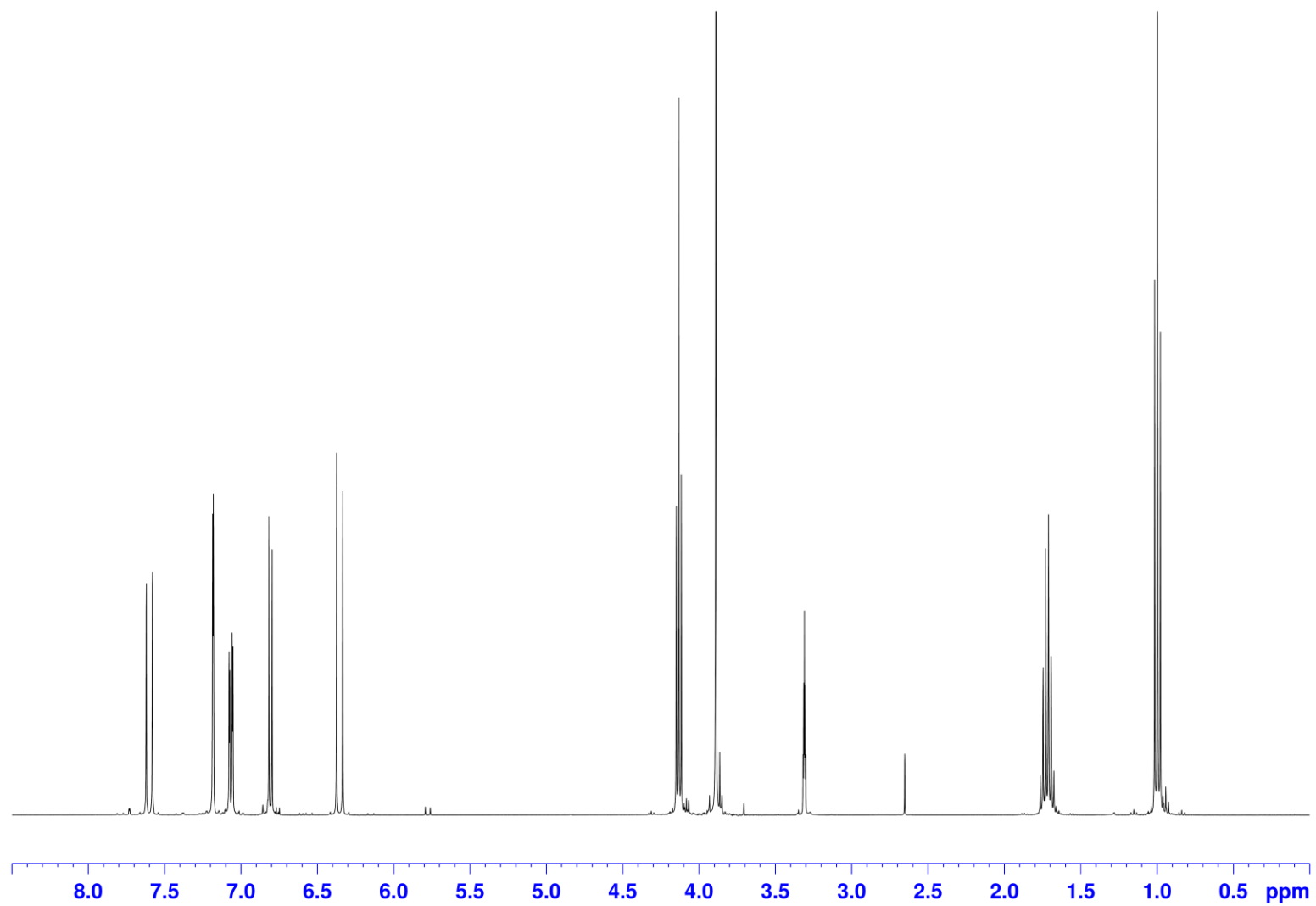


Figure S5-17. フェルラ酸プロピルエステル (13) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

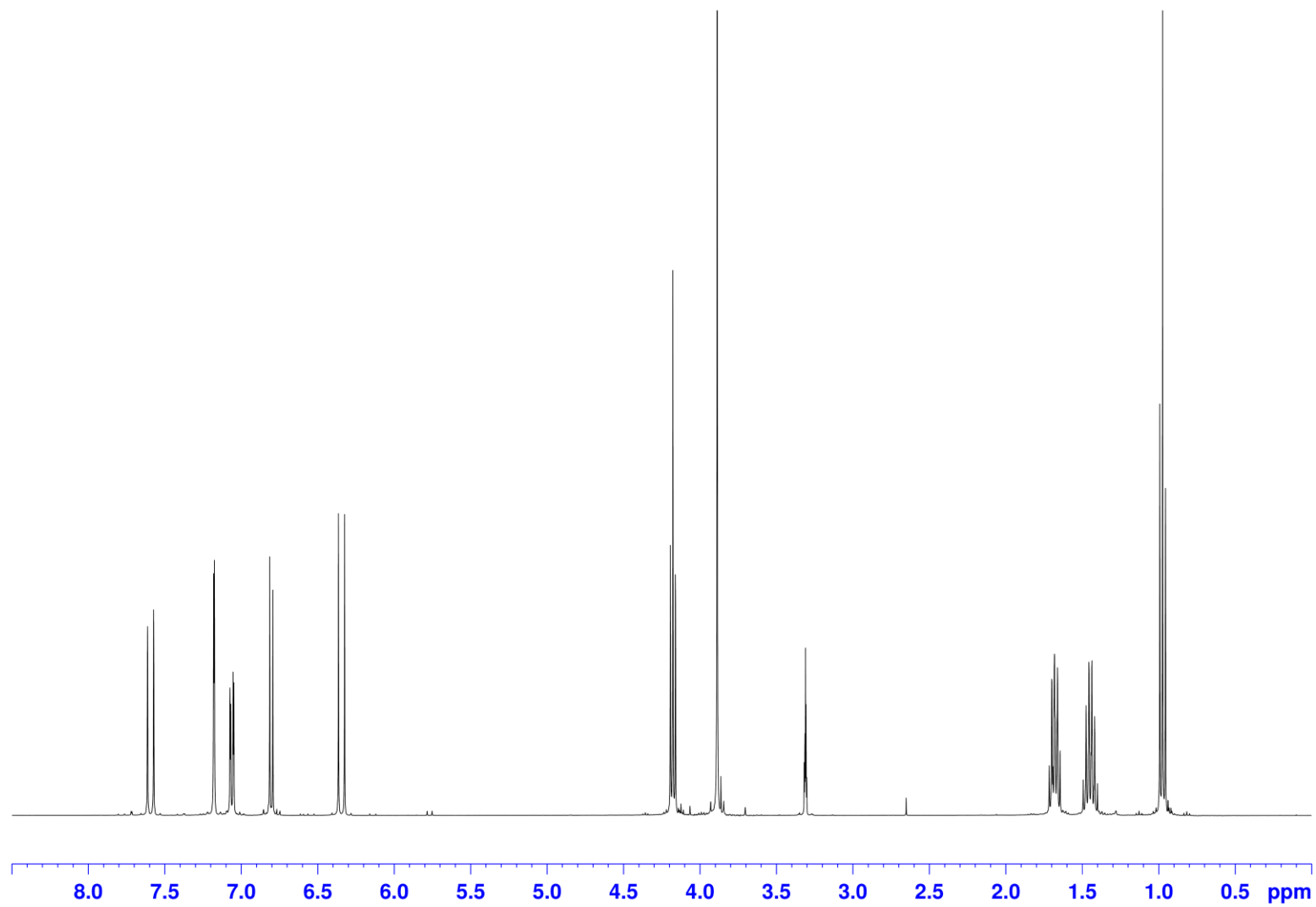


Figure S5-18. フェルラ酸ブチルエステル (14) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

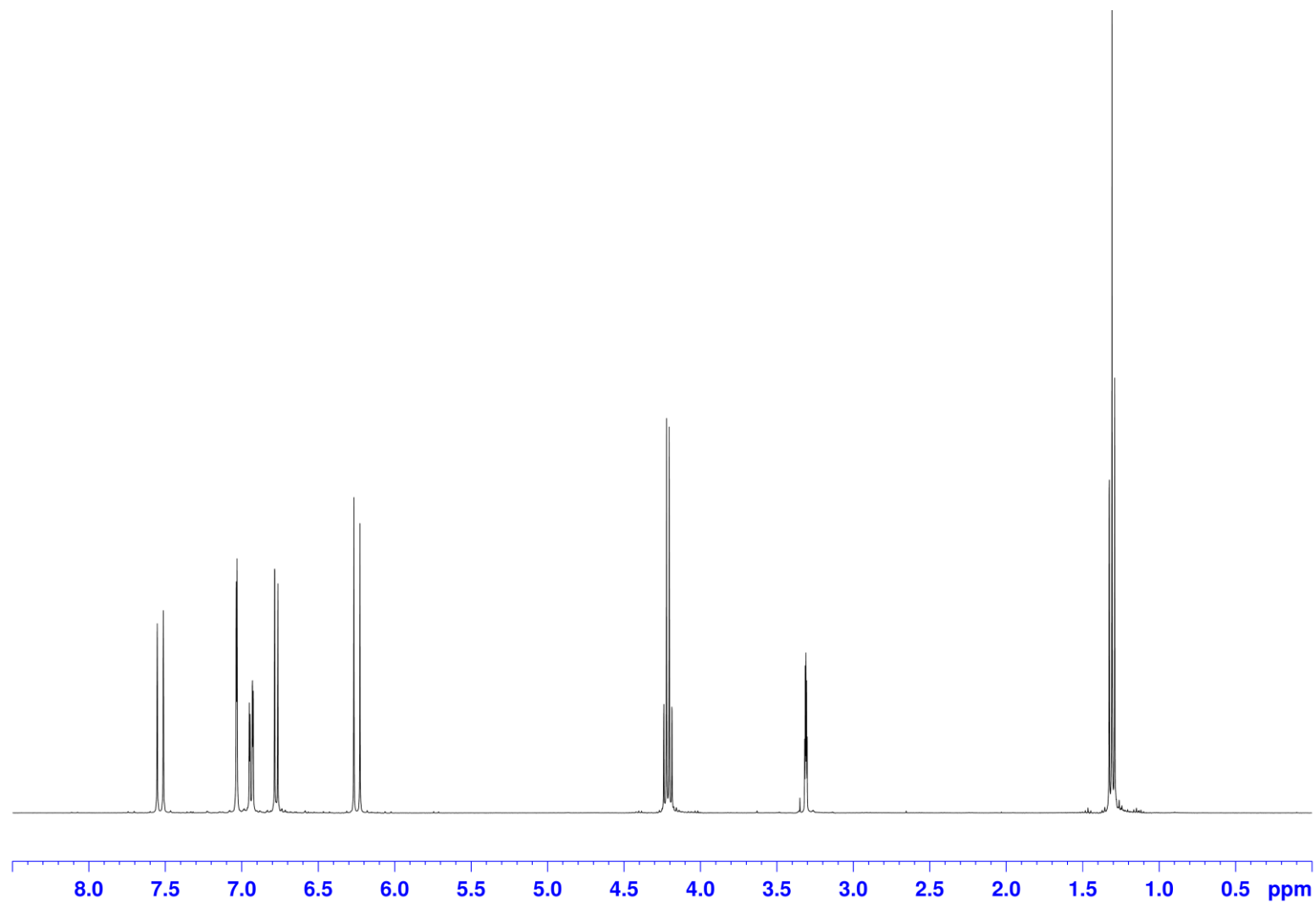


Figure S5-19. カフェ酸エチルエステル (18) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

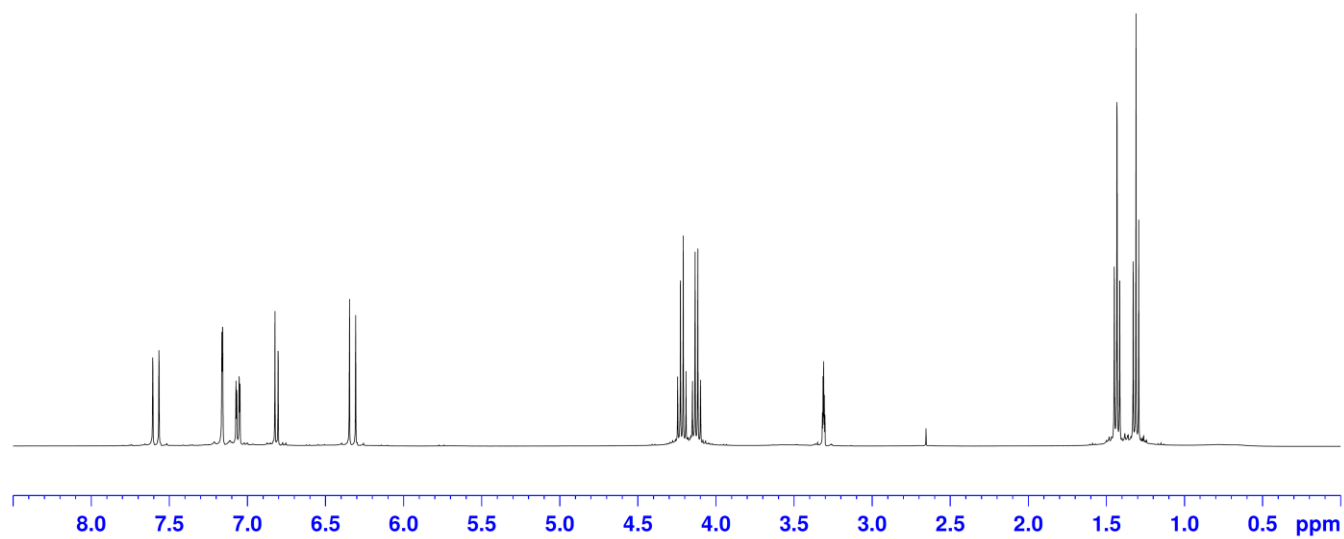


Figure S5-20. 4-ヒドロキシ, 3-エトキシ桂皮酸エチルエステル (19) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

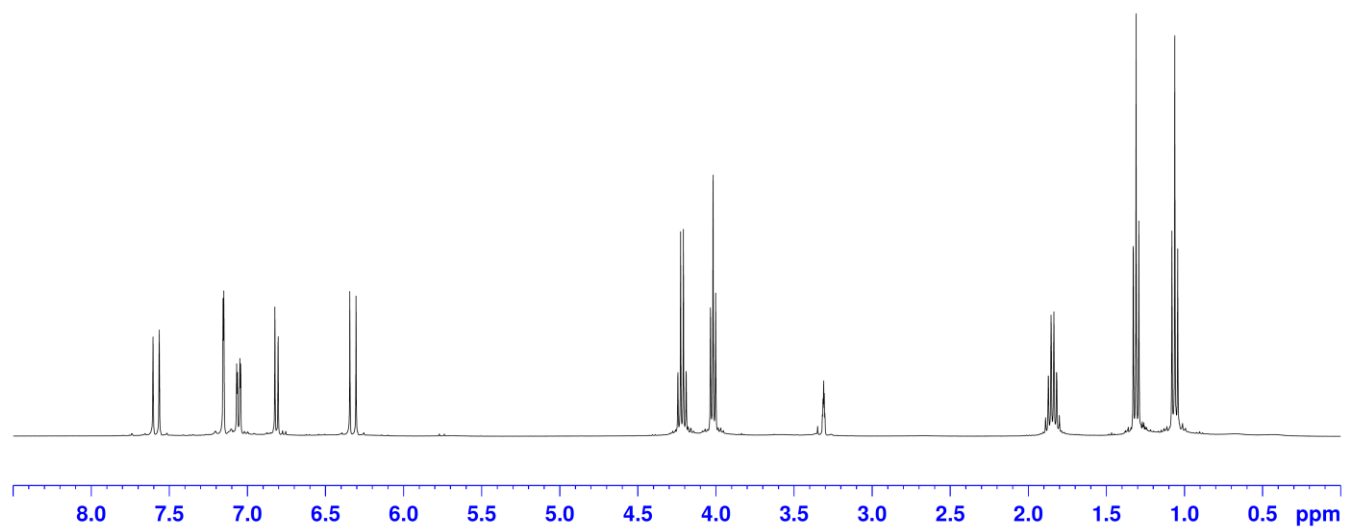


Figure S5-21. 4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸エチルエステル (20) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

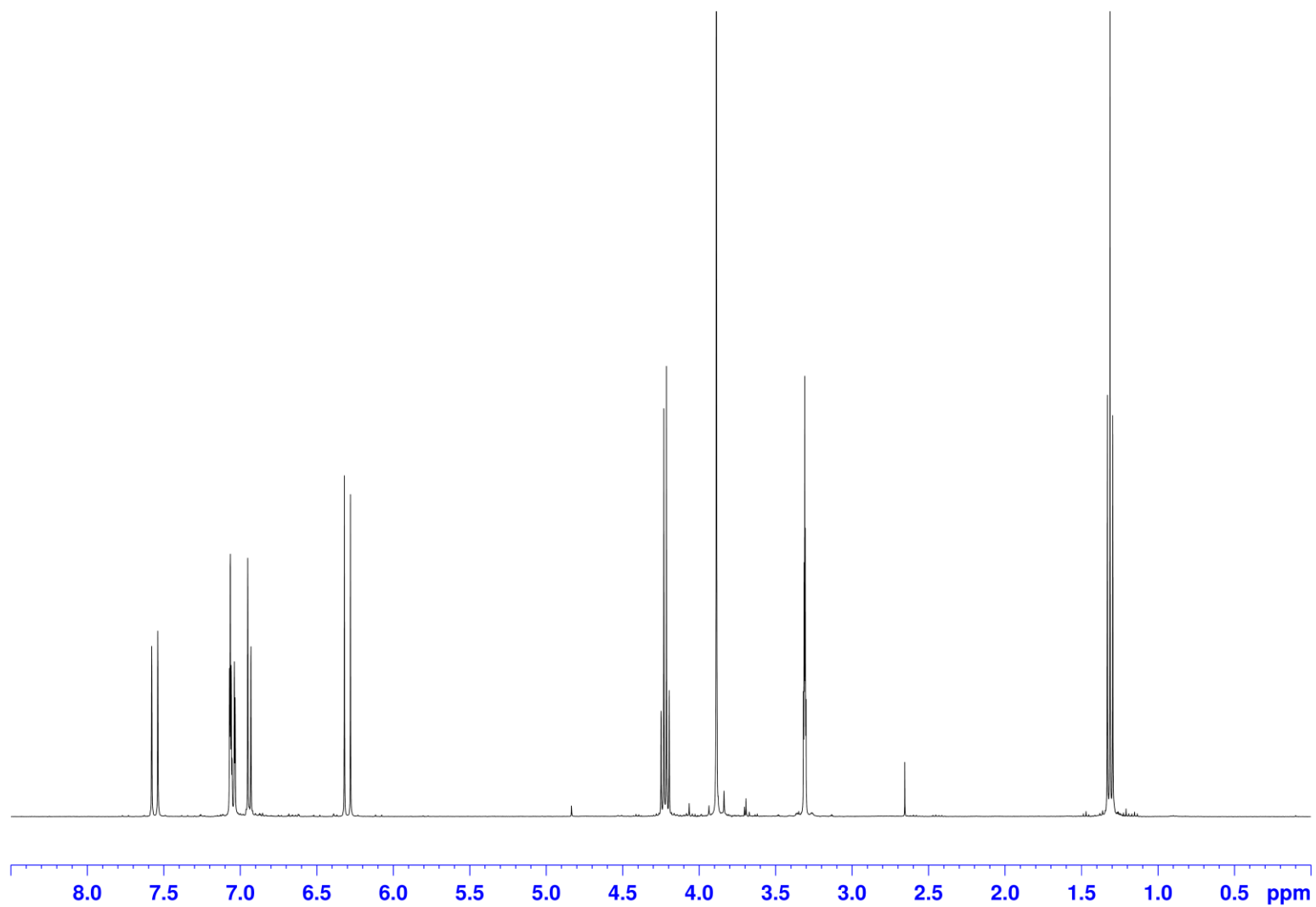


Figure S5-22. iso-FAEE (21) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

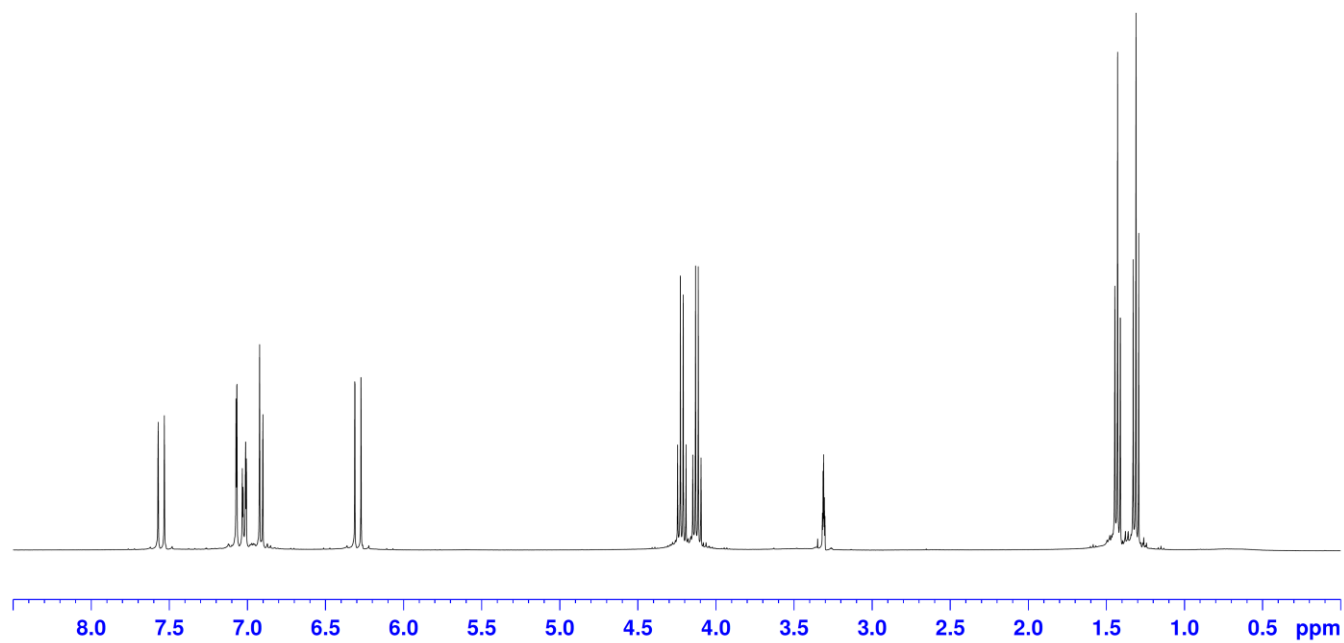


Figure S5-23. 3-ヒドロキシ, 4-プロキシ桂皮酸エチルエステル (**22**) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

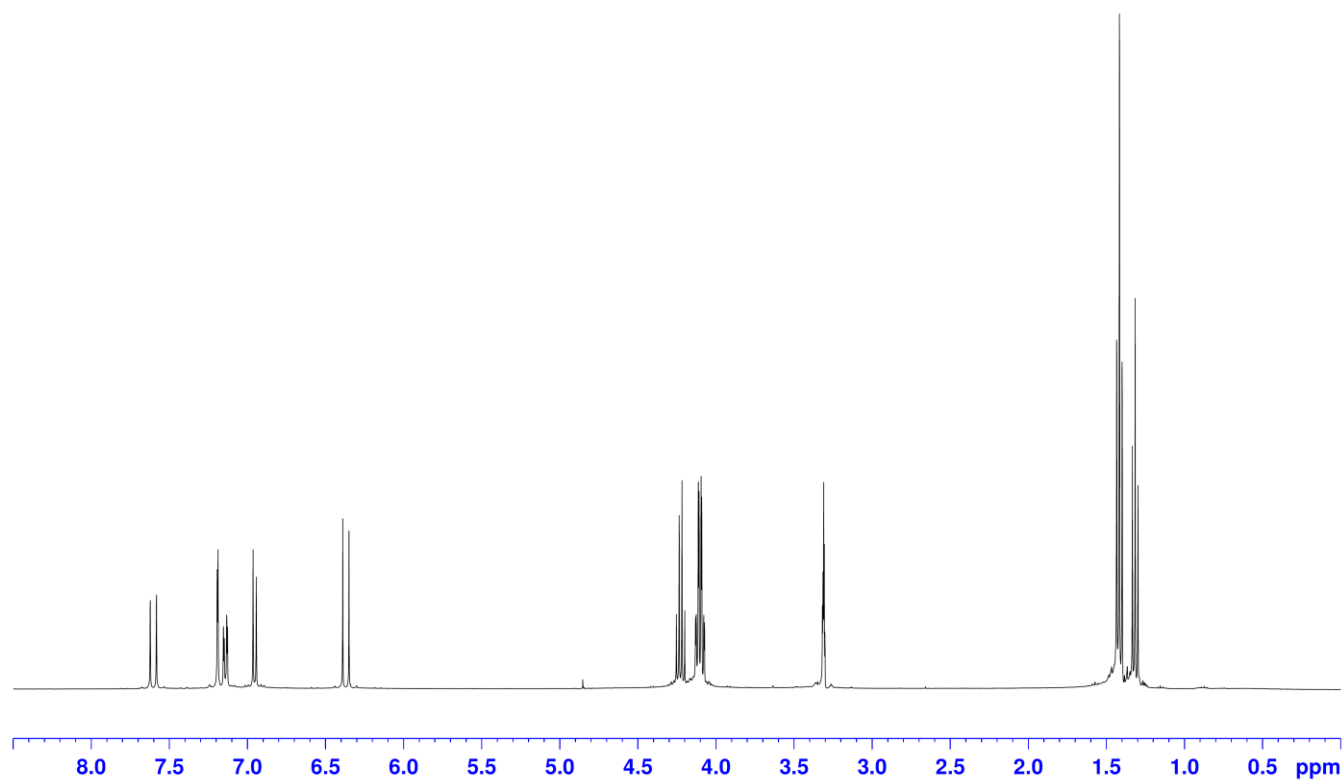


Figure S5-24. 3,4-ジエトキシ桂皮酸エチルエステル (23) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

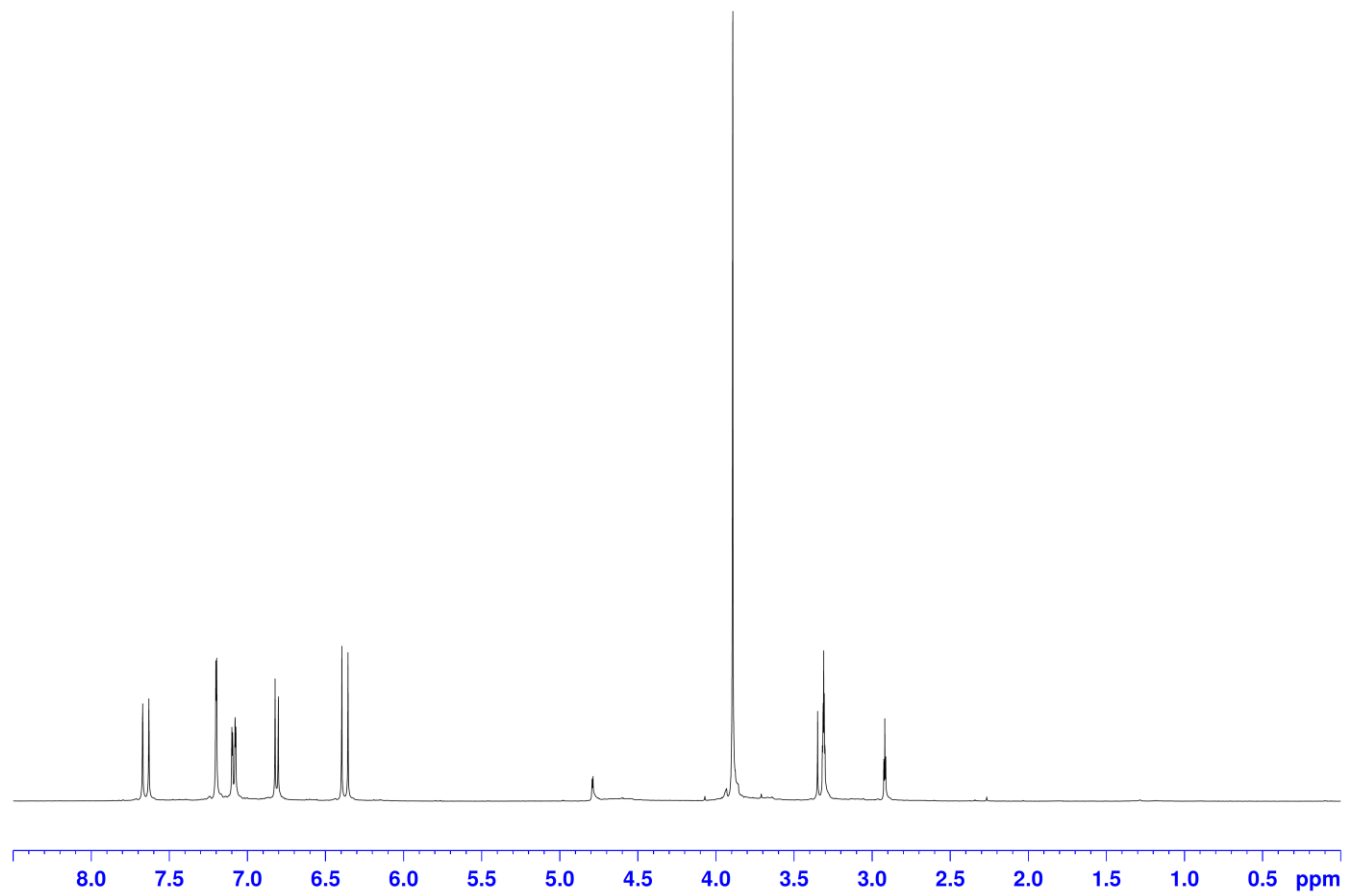


Figure S5-25. フェルラ酸プロパルギルエステル (24) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

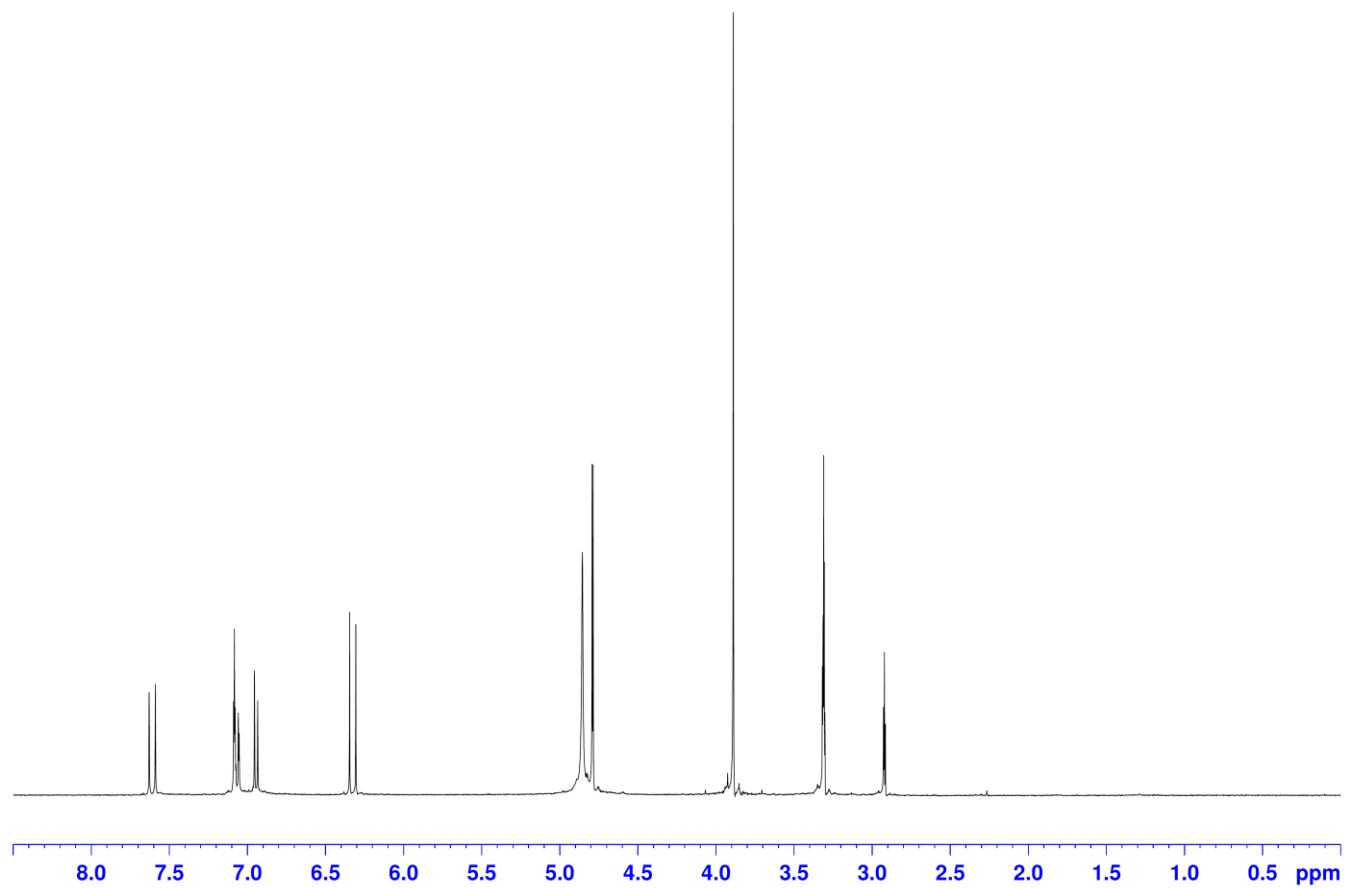


Figure S5-26. iso-フェルラ酸プロパルギルエステル (25) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

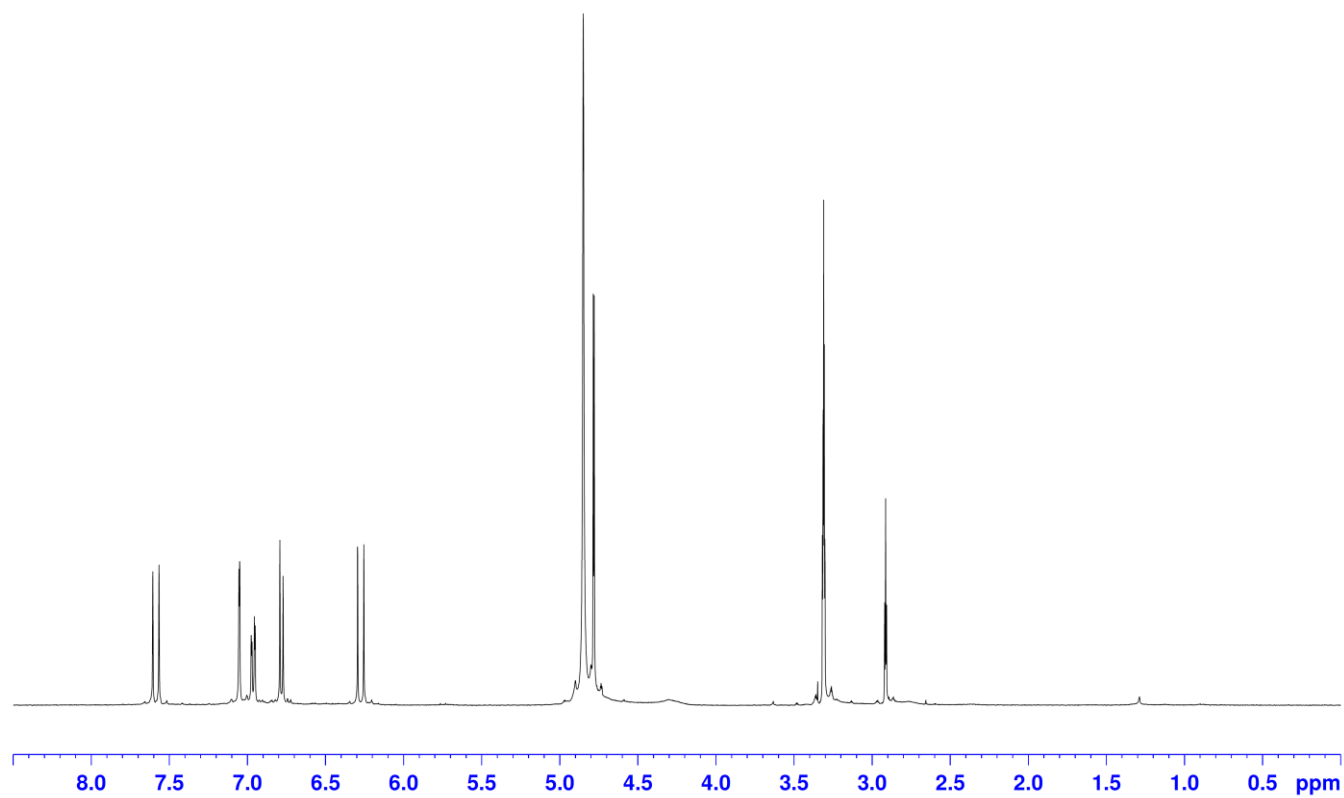


Figure S5-27. カフェ酸プロパルギルエステル (26) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

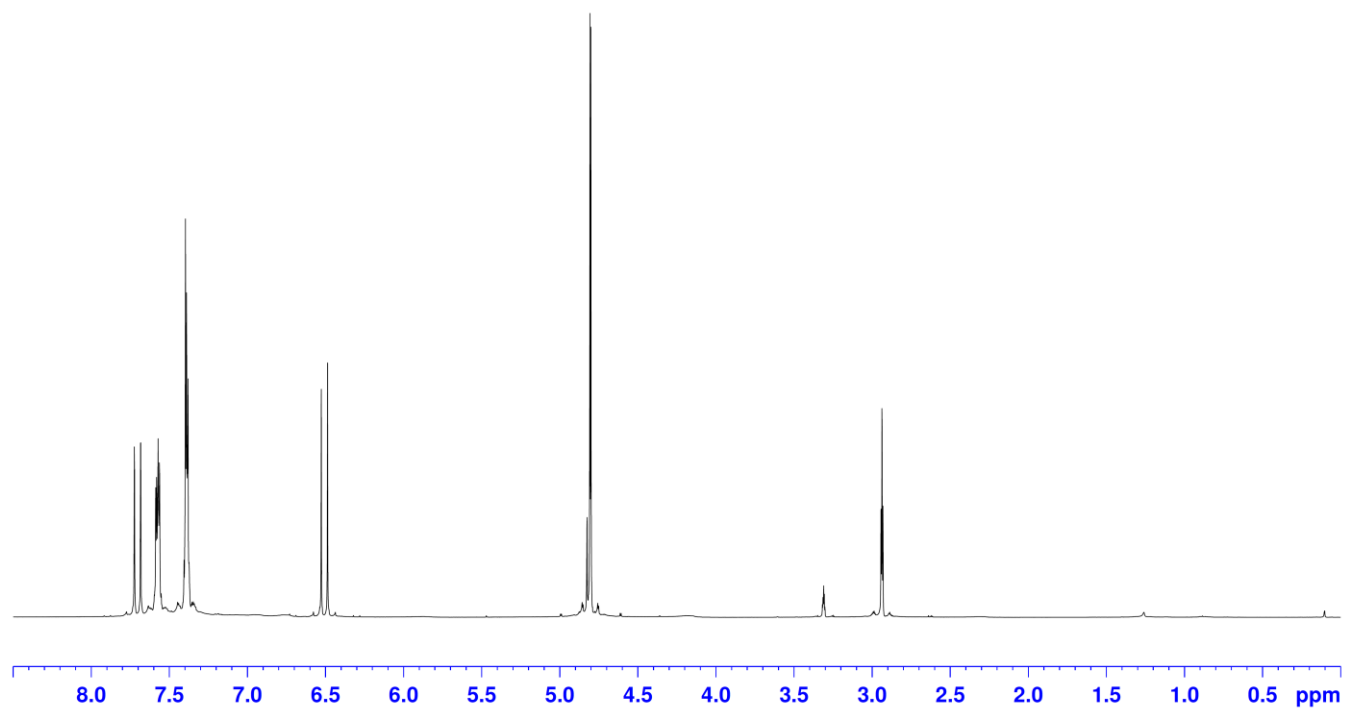


Figure S5-28. 桂皮酸プロパルギルエステル (27) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

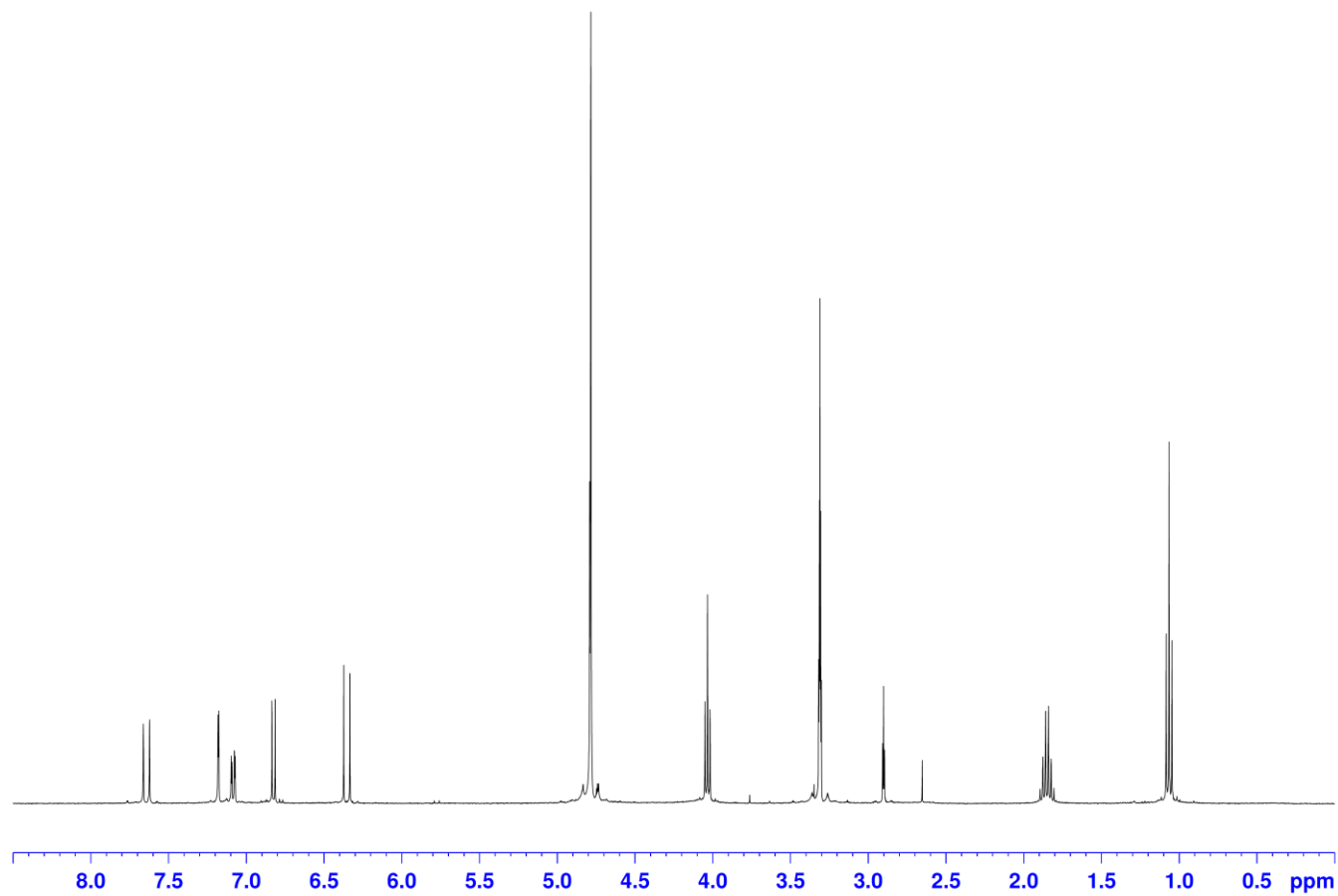


Figure S5-29. 4-ヒドロキシ, 3-プロキシ桂皮酸プロパルギルエステル (**28**) の ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz).

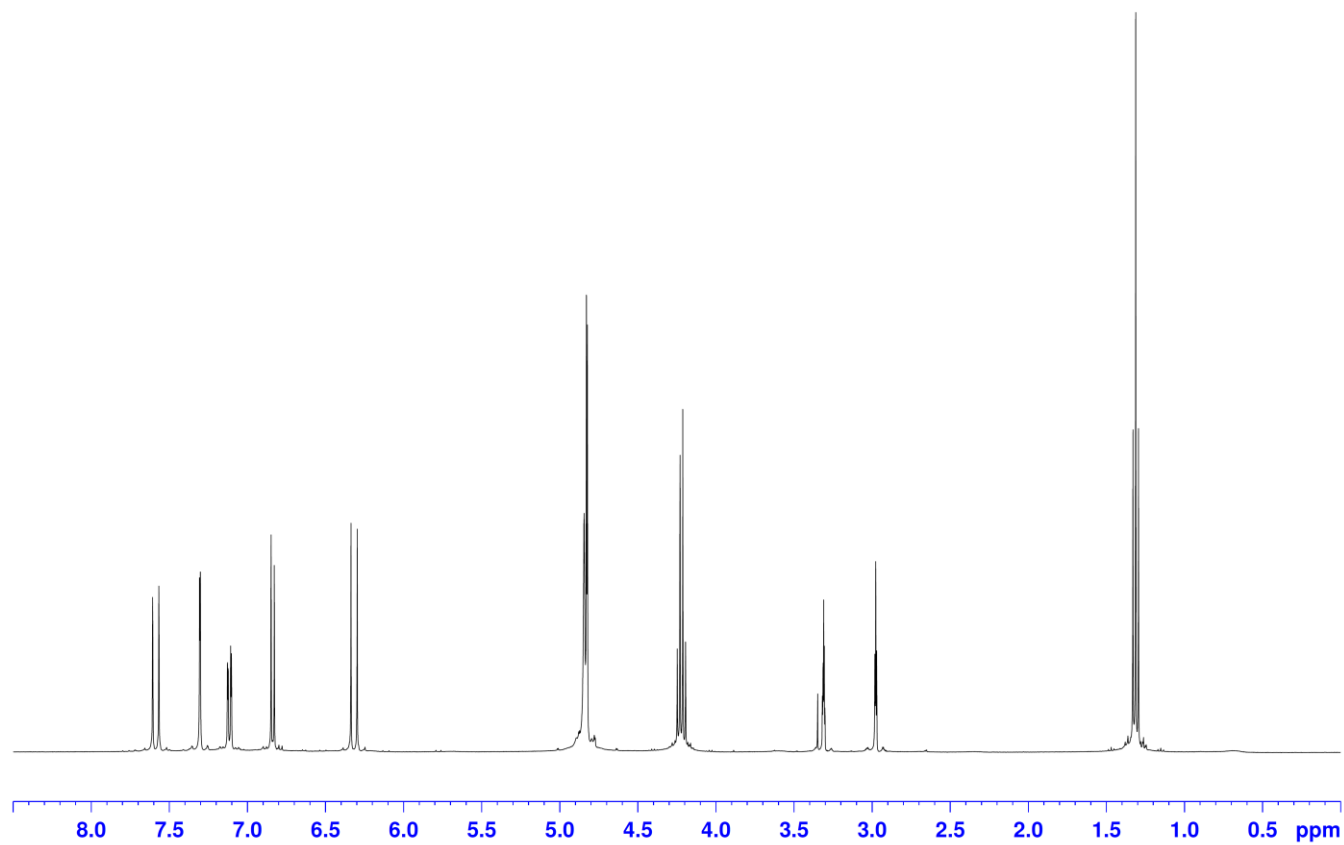


Figure S5-30. 4-ヒドロキシ, 3-(prop-2-yn-1-yloxy) 桂皮酸エチルエステル (**29**) の ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz).

第6章 総括

本研究では、さらなる天然化合物の活用を目指して、これまで見逃されてきた低含量・低活性の化合物にフォーカスすることで、新たな有用生物活性化合物の探索を行った。そこで、低含量・低活性の化合物についても見逃がさないよう、①精製過程での MS 分析を適用した新規成分の検出、および②エピゲノム変化を指標とする新たな生物活性の検出、のふたつの手法をもとに探索研究することとした。この結果、天然の探索源である海洋生物および発酵食品の味噌から、生物活性を持つ天然化合物を新たに見出すことができた。

第1章は、本論文の序論として研究背景および目的について述べる。

第2章ではMS分析を適用することで明らかにした海洋シアノバクテリア *Moorea bouillonii* 由来の新規環状ペプチド **kakeromamide A** について述べる。海洋天然化合物の真の生産者として、近年共生微生物や海洋シアノバクテリアが注目されている。海洋シアノバクテリアは、非タンパク質構成アミノ酸を含む特異な構造を有するペプチド性化合物の豊富な供給源であるため、MS分析を適用した精製を行い、未知の微量成分について探索を行った。

各精製段階で得られた画分について、取得した MS データをもとに海洋天然化合物データベースと照合して、未知のイオンピークを与える画分について精製を進め、新規環状ペプチド **kakeromamide A** を見出すことに成功した。各種スペクトル解析の結果、本化合物は非タンパク質構成アミノ酸を含む環状ペプチドであると決定した。なお、各アミノ酸残基の絶対配置は、改良 Marfey 法により決定した。

本化合物は ESC を用いた神経分化誘導系において、NSC からアストロサイトへの分化を促進する初の海洋環状ペプチドであった。本化合物は NSC 分化調節のメカニズム解明に役立つ分子ツールとして、神経の再生医療への応用が期待される。

第3章では海綿 *Halichondria* sp. より SIRT 阻害剤として単離した **halistanol sulfate** 類について述べる。クラス III の HDAC であるサーチュインは、NAD⁺ 依存的にタンパク質の脱アセチル化を行う酵素群であり、老化や寿命の制御にも関与していることが知られる。老化に関与する細胞内器官であるミトコンドリアには SIRT3-5 が存在しており、ミトコンドリアタンパク質のアセチル化レベルを調節することで、エネルギー代謝を制御している。このうち、SIRT3 はミトコンドリアタンパク質以外の脱アセチル化にも関与しており、細胞全体で幅広

い役割を担っていると考えられる。そこで多様な SIRT3 の機能解明に役立つ分子ツールを求めて、SIRT3 阻害剤の探索研究を行った。その結果、halistanol sulfate を活性本体として同定するとともに、MS 分析を適用することによって、新規類縁体 halistanol sulfates I および J を単離・構造決定することができた。

明らかとなった SIRT3 と halistanol sulfate との複合体結晶構造により、2 分子の halistanol sulfate が一部分重なって SIRT3 の活性中心以外のポケットに特異的に結合し、基質とは競合しない様式によって酵素活性の調節を行っている可能性が示唆された。このことは、硫酸エステルを有する生体分子 heparin 類によってアロステリックに活性が阻害されるトロンビンと同様に、SIRT3 の酵素機能も何らかの生体分子によってアロステリックにコントロールされている可能性を示すものである。

第 4 章ではヒストン修飾調節活性に注目した活性化化合物の探索について述べる。ヒストンタンパク質はヒストンコアと呼ばれる八量体を形成し、その周囲に DNA の二重らせんが巻き付くことでクロマチンの単位構造であるヌクレオソームを形成している。ヒストンタンパク質に含まれる Lys や Arg, Ser, Thr などのアミノ酸残基の側鎖末端が、アセチル化・メチル化・リン酸化などの修飾を受けると、クロマチンの高次構造が変化する結果、転写因子複合体と DNA との相互作用が変化し、結果として遺伝子発現が影響を受ける。ヒストンタンパク質の修飾は、エピジェネティックな遺伝子発現調節の基本的な機構のひとつであり、細胞の分化やがん化、発生から恒常性の維持など、あらゆる生命現象に関与するため、新たな創薬ターゲットとして注目されている。

本章では、多様な生物活性化化合物が含まれていることが知られている *Theonella* 属の海綿を対象として、セルベースでのヒストン修飾調節活性を指標に活性化化合物を探索した。その結果、活性本体として onnamide 類を単離した。得られた化合物は、これまで報告のない onnamide A の 2Z および 6Z 体であったが、これら化合物は抽出・精製過程で光によって onnamide A から生じた人工物である可能性が示唆された。Onnamide 類は細胞毒性化合物として知られるが、ヒストン修飾変化を指標とすることで、細胞毒性よりも短時間・低濃度で活性が検出でき、高感度な活性化化合物の探索が可能となることが示された。

第 5 章では発酵食品の機能性成分に注目し、第 2~4 章において海洋活性化化合物の探索に用

いた手法を、食品に含まれる活性成分の探索に適用した結果について述べる。発酵食品では微生物による発酵過程で二次代謝産物が生じる。これらの二次代謝産物が有益な生物活性を示す場合、“体に良い”天然化合物の探索源として期待される。しかしながら、薬と異なり、一般に強い作用を示さない食品成分の生物活性を検出するのは、医薬品の探索に用いる活性試験法のみでは困難であった。そこで食品成分の微弱な活性を感度よく検出するため、海洋天然化合物の探索に適用したヒストン修飾変化を指標としたアッセイ系を用いて活性成分を探索することとした。発酵食品のひとつである味噌に注目し、ヒストン修飾に対する影響を調べ、H4K5ac レベルを選択的に抑制する活性を見出した。本活性を指標として味噌エキスの精製を進め、活性本体として FAEE を同定した。本化合物は、これまでに報告されている味噌中の有効成分である脂質やポリフェノール類と異なり、味噌の原料である米や麦から生じるフェルラ酸が、発酵の過程で生じるエタノールと反応することではじめて生成される、味噌に特徴的な成分であった。

一方、恐怖ストレスを受けたマウスの海馬では、H4K5ac 修飾が上昇するため、FAEE の機能性として、抗ストレス活性が期待された。そこで FAEE の神経分化系への影響を調べたところ、本化合物は *in vitro* の系において NSC からアストロサイトへの分化を促進することが明らかになった。さらに、社会的敗北モデルマウスを用いた行動実験において、本成分は *in vivo* の系においても抗ストレス作用の傾向を示した。

これまで FAEE の神経分化促進活性については報告されていないことから、作用メカニズムについても解明されていない。そこで、H4K5ac レベルの抑制作用に対する構造-活性相関を検討し、FAEE のプローブ分子をデザイン・合成した。まず、合成した蛍光標識プローブ分子を用いて、FAEE プローブ分子が HeLa 細胞の細胞質に広く局在することを確認した。また、標的タンパク質を釣り上げるためのプローブ分子を結合させたビーズと、細胞質由来タンパク質溶液を用いてプルダウン実験を行った。この結果、FAEE の標的候補タンパク質として、細胞質に広く存在するタンパク質 VAT-1 を同定した。

以上のようにヒストン修飾変化を指標にして、味噌に含まれる活性化合物の探索を行い、FAEE を味噌に含まれる抗ストレス機能性成分として新たに見出すとともに、その作用メカニズムについても知見を得ることができた。

このように本研究では、新規の化合物やその生物活性を見出すために、新たな指標を軸に生物活性成分を探索戦略によって、4種の新たな生物活性分子を見出すことに成功した。天然物化学の単離・構造決定分野「モノトリ」では、昔のように何か抽出すれば新規骨格の化合物が取れる時代ではなく、報告される新規化合物の多くは既知の類縁体である。このようなモノトリの限界を極め、新規骨格・新規構造を単に追い求めるのではなく、新規の生物活性に着目して、未知の機能成分が眠る生物資源からのモノトリに取り組むことで、天然物化学の発展に貢献していきたい。

参考文献

1. Schmitz, R. Friedrich Wilhelm Sertürner and the Discovery of Morphine. *Pharm. Hist.* **1985**, *27* (2), 61–74.
2. Wongsrichanalai, C.; Pickard, A. L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R. Epidemiology of Drug-Resistant Malaria. *Lancet* **2002**, *2* (4), 209–218. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00239-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00239-6).
3. Aldossary, S. A. Review on Pharmacology of Atropine, Clinical Use and Toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, *15* (2), 691–697.
4. Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzæ. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10* (3), 226–236.
5. Henderson, J. W. The Yellow Brick Road to Penicillin: A Story of Serendipity. *Mayo Clin. Proc.* **1997**, *72* (7), 683–687. <https://doi.org/10.4065/72.7.683>.
6. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
7. Bergmann, W.; Feeney, R. Contributions to the Study of Marine Products. XXXIX. The Nucleosides of Sponges. III. Spongothymidine and Spongouridine. *J. Org. Chem.* **1955**, *20* (11), 1501–1507. <https://doi.org/10.1021/jo01128a007>.
8. Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39* (6), 1122–1171. <https://doi.org/10.1039/D1NP00076D>.
9. Mayer, A. M. S.; Glaser, K. B.; Cuevas, C.; Jacobs, R. S.; Kem, W.; Little, R. D.; McIntosh, J. M.; Newman, D. J.; Potts, B. C.; Shuster, D. E. The Odyssey of Marine Pharmaceuticals: A Current Pipeline Perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31* (6), 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.005>.
10. Montaser, R.; Luesch, H. Marine Natural Products: A New Wave of Drugs? *Future. Med. Chem.* **2011**, *3* (12), 1475–1489. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.118>.
11. Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (2), 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>.
12. Swami, U.; Shah, U.; Goel, S. Eribulin in Cancer Treatment. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (8), 5016. <https://doi.org/10.3390/md13085016>.
13. Al Musaimi, O.; Al Shaer, D.; Albericio, F.; de la Torre, B. G. 2020 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (2), 145. <https://doi.org/10.3390/ph14020145>.
14. Vijayakumar, S.; Menakha, M. Pharmaceutical Applications of Cyanobacteria—A Review. *J. Acute Med.* **2015**, *5* (1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.
15. Piel, J. Metabolites from Symbiotic Bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21* (4), 519–538. <https://doi.org/10.1039/B310175B>.
16. Luesch, H.; Harrigan, G. G.; Goetz, G.; Horgen, F. D. The Cyanobacterial Origin of Potent Anticancer Agents Originally Isolated from Sea Hares. *Curr. Med. Chem.* **9** (20), 1791–1806.
17. Tan, L. T. Bioactive Natural Products from Marine Cyanobacteria for Drug Discovery. *Phytochemistry* **2007**, *68* (7), 954–979. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.012>.
18. Kobayashi, M.; Natsume, T.; Tamaoki, S.; Watanabe, J.; Asano, H.; Mikami, T.; Miyasaka, K.; Miyazaki,

- K.; Gondo, M.; Sakakibara, K.; Tsukagoshi, S. Antitumor Activity of TZT-1027, a Novel Doiastatin 10 Derivative. *Jpn. J. Cancer. Res.* **1997**, *88* (3), 316–327. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1997.tb00383.x>.
19. Harrigan, G. G.; Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Nagle, D. G.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A. Symplostatin 1: A Dolastatin 10 Analogue from the Marine Cyanobacterium *Symploca Hydnoides*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (9), 1075–1077. <https://doi.org/10.1021/np980321c>.
 20. Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Holzapfel, C. W.; Van Zyl, W. J.; Tuinman, A. A.; Herald, C. L.; Baczynskyj, L.; Schmidt, J. M. Antineoplastic Agents. 150. The Structure and Synthesis of Dolastatin 3. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (24), 7581–7582. <https://doi.org/10.1021/ja00258a081>.
 21. Mitchell, S. S.; Faulkner, D. J.; Rubins, K.; Bushman, F. D. Dolastatin 3 and Two Novel Cyclic Peptides from a Palauan Collection of *Lyngbya Majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (2), 279–282. <https://doi.org/10.1021/np990353f>.
 22. Williams, P. G.; Moore, R. E.; Paul, V. J. Isolation and Structure Determination of Lyngbyastatin 3, a Lyngbyastatin 1 Homologue from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya m Ajuscula*. Determination of the Configuration of the 4-Amino-2,2-Dimethyl-3-Oxopentanoic Acid Unit in Majusculamide C, Dolastatin 12, Lyngbyastatin 1, and Lyngbyastatin 3 from Cyanobacteria. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (10), 1356–1363. <https://doi.org/10.1021/np0302145>.
 23. Nogle, L. M.; Williamson, R. T.; Gerwick, W. H. Somamides A and B, Two New Depsipeptide Analogues of Dolastatin 13 from a Fijian Cyanobacterial Assemblage of *Lyngbya Majuscula* and *Schizothrix* Species. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (6), 716–719. <https://doi.org/10.1021/np000634j>.
 24. Nogle, L. M.; Gerwick, W. H. Isolation of Four New Cyclic Depsipeptides, Antanapeptins A–D, and Dolastatin 16 from a Madagascan Collection of *Lyngbya Majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (1), 21–24. <https://doi.org/10.1021/np010348n>.
 25. Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. Lyngbyastatin 2 and Norlyngbyastatin 2, Analogues of Dolastatin G and Nordolastatin G from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62* (12), 1702–1706. <https://doi.org/10.1021/np990310z>.
 26. Luesch, H.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H. Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue Symplostatin 1. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (7), 907–910. <https://doi.org/10.1021/np010049y>.
 27. Kavallaris, M.; Verrills, N. M.; Hill, B. T. Anticancer Therapy with Novel Tubulin-Interacting Drugs. *Drug Resist. Updat.* **2001**, *4* (6), 392–401. <https://doi.org/10.1054/drup.2002.0230>.
 28. Riely, G. J.; Gadgeel, S.; Rothman, I.; Saidman, B.; Sabbath, K.; Feit, K.; Kris, M. G.; Rizvi, N. A. A Phase 2 Study of TZT-1027, Administered Weekly to Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Following Treatment with Platinum-Based Chemotherapy. *Lung Cancer* **2007**, *55* (2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.10.002>.
 29. Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H. Total Structure Determination of Apratoxin A, a Potent Novel Cytotoxin from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (23), 5418–5423. <https://doi.org/10.1021/ja010453j>.

30. Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. New Apratoxins of Marine Cyanobacterial Origin from Guam and Palau. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10* (6), 1973–1978. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00014-7).
31. Gutiérrez, M.; Suyama, T. L.; Engene, N.; Wingerd, J. S.; Matainaho, T.; Gerwick, W. H. Apratoxin D, a Potent Cytotoxic Cyclodepsipeptide from Papua New Guinea Collections of the Marine Cyanobacteria *Lyngbya Majuscula* and *Lyngbya Sordida*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (6), 1099–1103. <https://doi.org/10.1021/np800121a>.
32. Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L. Isolation, Structure Determination, and Biological Activity of Lyngbyabellin A from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (5), 611–615. <https://doi.org/10.1021/np990543q>.
33. Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. Isolation and Structure of the Cytotoxin Lyngbyabellin B and Absolute Configuration of Lyngbyapeptin A from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (10), 1437–1439. <https://doi.org/10.1021/np000104n>.
34. Milligan, K. E.; Marquez, B. L.; Williamson, R. T.; Gerwick, W. H. Lyngbyabellin B, a Toxic and Antifungal Secondary Metabolite from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (10), 1440–1443. <https://doi.org/10.1021/np000133y>.
35. Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. Structurally Diverse New Alkaloids from Palauan Collections of the Apratoxin-Producing Marine Cyanobacterium *Lyngbya* Sp. *Tetrahedron* **2002**, *58* (39), 7959–7966. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00895-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00895-5).
36. Williams, P. G.; Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. Continuing Studies on the Cyanobacterium *Lyngbya* Sp.: Isolation and Structure Determination of 15-Norlyngbyapeptin A and Lyngbyabellin D. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (5), 595–598. <https://doi.org/10.1021/np030011g>.
37. Nakamura, F.; Maejima, H.; Kawamura, M.; Arai, D.; Okino, T.; Zhao, M.; Ye, T.; Lee, J.; Chang, Y.-T.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Kakeromamide A, a New Cyclic Pentapeptide Inducing Astrocyte Differentiation Isolated from the Marine Cyanobacterium *Moorea Bouillonii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (12), 2206–2209. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.067>.
38. Crews, Phillip.; Kakou, Yao.; Quinoa, Emilio. Mycothiazole, a Polyketide Heterocycle from a Marine Sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (13), 4365–4368. <https://doi.org/10.1021/ja00221a042>.
39. Luesch, H.; Williams, P. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. Ulongamides A–F, New β -Amino Acid-Containing Cyclodepsipeptides from Palauan Collections of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* Sp. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (7), 996–1000. <https://doi.org/10.1021/np0200461>.
40. Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Elucidation of Limitations of Marfey's Method and of Its Separation Mechanism. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (16), 3346–3352. <https://doi.org/10.1021/ac9701795>.
41. Fujii, K.; Ikai, Y.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Combination of Marfey's Method with Mass Spectrometry and Its Practical Application. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (24), 5146–5151. <https://doi.org/10.1021/ac970289b>.
42. Nakayama, T.; Inoue, N. Neural Stem Sphere Method. In *Embryonic Stem Cell Protocols: Volume 2:*

- Differentiation Models*; Turksen, K., Ed.; Methods in Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2006; pp 1–13. <https://doi.org/10.1385/1-59745-036-7:001>.
43. Iwata, T.; Otsuka, S.; Tsubokura, K.; Kurbangalieva, A.; Arai, D.; Fukase, K.; Nakao, Y.; Tanaka, K. One-Pot Evolution of Ageladine A through a Bio-Inspired Cascade towards Selective Modulators of Neuronal Differentiation. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (41), 14707–14716. <https://doi.org/10.1002/chem.201602651>.
 44. Er, J. C.; Leong, C.; Teoh, C. L.; Yuan, Q.; Merchant, P.; Dunn, M.; Sulzer, D.; Sames, D.; Bhinge, A.; Kim, D.; Kim, S.-M.; Yoon, M.-H.; Stanton, L. W.; Je, S. H.; Yun, S.-W.; Chang, Y.-T. NeuO: A Fluorescent Chemical Probe for Live Neuron Labeling. *Angew. Chem.* **2015**, *54* (8), 2442–2446. <https://doi.org/10.1002/anie.201408614>.
 45. Zhao, M.; Xiao, Y.; Otsuka, S.; Nakao, Y.; Guo, Y.; Ye, T. Total Synthesis and Biological Evaluation of Kakeromamide A and Its Analogues. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 410. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00410>
 46. Dallérac, G.; Rouach, N. Astrocytes as New Targets to Improve Cognitive Functions. *Prog. Neurobiol.* **2016**, *144*, 48–67. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.003>.
 47. Kimelberg, H. K.; Nedergaard, M. Functions of Astrocytes and Their Potential as Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics* **2010**, *7* (4), 338–353. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.006>.
 48. Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol.* **2010**, *119* (1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
 49. Müller, M. B.; Lucassen, P. J.; Yassouridis, A.; Hoogendijk, W. J. G.; Holsboer, F.; Swaab, D. F. Neither Major Depression nor Glucocorticoid Treatment Affects the Cellular Integrity of the Human Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **2001**, *14* (10), 1603–1612. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01784.x>.
 50. Leventopoulos, M.; Rüedi-Bettschen, D.; Knuesel, I.; Feldon, J.; Pryce, C. R.; Opacka-Juffry, J. Long-Term Effects of Early Life Deprivation on Brain Glia in Fischer Rats. *Brain Res.* **2007**, *1142*, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.039>.
 51. Rajkowska, G.; Stockmeier, C. A. Astrocyte Pathology in Major Depressive Disorder: Insights from Human Postmortem Brain Tissue. *Curr. Drug Targets* **2013**, *14* (11), 1225–1236. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990156>.
 52. Gage, F. H. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* **2000**, *287* (5457), 1433–1438. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>.
 53. Reynolds, B. A.; Weiss, S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science* **1992**, *255* (5052), 1707–1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>.
 54. Ming, G.; Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* **2011**, *70* (4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>.
 55. Carpenter, A. E.; Jones, T. R.; Lamprecht, M. R.; Clarke, C.; Kang, I. H.; Friman, O.; Guertin, D. A.; Chang, J. H.; Lindquist, R. A.; Moffat, J.; Golland, P.; Sabatini, D. M. CellProfiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes. *Genome Biol.* **2006**, *7* (10), R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>.

56. Kanda, Y. Investigation of the Freely Available Easy-to-Use Software ‘EZR’ for Medical Statistics. *Bone Marrow Transplant.* **2013**, *48* (3), 452–458. <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.244>.
57. Grunstein, M. Histone Acetylation in Chromatin Structure and Transcription. *Nature* **1997**, *389* (6649), 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664>.
58. Bayle, J. H.; Crabtree, G. R. Protein Acetylation: More than Chromatin Modification to Regulate Transcription. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (12), 885–888. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90296-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90296-9).
59. Hall, J. A.; Dominy, J. E.; Lee, Y.; Puigserver, P. The Sirtuin Family’s Role in Aging and Age-Associated Pathologies. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123* (3), 973–979. <https://doi.org/10.1172/JCI64094>.
60. Samant, S. A.; Zhang, H. J.; Hong, Z.; Pillai, V. B.; Sundaresan, N. R.; Wolfgeher, D.; Archer, S. L.; Chan, D. C.; Gupta, M. P. SIRT3 Deacetylates and Activates OPA1 To Regulate Mitochondrial Dynamics during Stress. *Mol. Cell Biol.* **2014**, *34* (5), 807–819. <https://doi.org/10.1128/MCB.01483-13>.
61. Papa, L.; Germain, D. Correction for Papa and Germain, “SirT3 Regulates a Novel Arm of the Mitochondrial Unfolded Protein Response”. *Mol. Cell Biol.* **2017**, *37* (13), e00191-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00191-17>.
62. Jin, L.; Galonek, H.; Israelian, K.; Choy, W.; Morrison, M.; Xia, Y.; Wang, X.; Xu, Y.; Yang, Y.; Smith, J. J.; Hoffmann, E.; Carney, D. P.; Perni, R. B.; Jirousek, M. R.; Bemis, J. E.; Milne, J. C.; Sinclair, D. A.; Westphal, C. H. Biochemical Characterization, Localization, and Tissue Distribution of the Longer Form of Mouse SIRT3. *Protein Sci.* **2009**, *18* (3), 514–525. <https://doi.org/10.1002/pro.50>.
63. Marcus, J. M.; Andrabi, S. A. SIRT3 Regulation Under Cellular Stress: Making Sense of the Ups and Downs. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 799. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00799>
64. Chen, Y.; Fu, L. L.; Wen, X.; Wang, X. Y.; Liu, J.; Cheng, Y.; Huang, J. Sirtuin-3 (SIRT3), a Therapeutic Target with Oncogenic and Tumor-Suppressive Function in Cancer. *Cell Death Dis.* **2014**, *5* (2), e1047. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.14>.
65. Scher, M. B.; Vaquero, A.; Reinberg, D. SirT3 Is a Nuclear NAD⁺-Dependent Histone Deacetylase That Translocates to the Mitochondria upon Cellular Stress. *Genes Dev.* **2007**, *21* (8), 920–928. <https://doi.org/10.1101/gad.1527307>.
66. Zhang, J.; Xiang, H.; Liu, J.; Chen, Y.; He, R.-R.; Liu, B. Mitochondrial Sirtuin 3: New Emerging Biological Function and Therapeutic Target. *Theranostics* **2020**, *10* (18), 8315–8342. <https://doi.org/10.7150/thno.45922>.
67. Nakamura, F.; Kudo, N.; Tomachi, Y.; Nakata, A.; Takemoto, M.; Ito, A.; Tabei, H.; Arai, D.; de Voogd, N.; Yoshida, M.; Nakao, Y.; Fusetani, N. Halistanol Sulfates I and J, New SIRT1–3 Inhibitory Steroid Sulfates from a Marine Sponge of the Genus *Halichondria*. *J. Antibiot.* **2018**, *71* (2), 273–278. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.145>.
68. Sperry, S.; Crews, P. Haliclostanoone Sulfate and Halistanol Sulfate from an Indo-Pacific *Haliclona* Sponge. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60* (1), 29–32. <https://doi.org/10.1021/np960592s>.
69. Inada, A.; Ikeda, Y.; Murata, H.; Inatomi, Y.; Nakanishi, T.; Bhattacharyya, K.; Kar, T.; Bocelli, G.; Cantoni, A. Unusual Cyclolanostanes from Leaves of *Pandanus Boninensis*. *Phytochemistry* **2005**, *66* (23), 2729–2733. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.019>.
70. Sun, H. H.; Gross, S. S.; Gunasekera, M.; Koehn, F. E. Weinbersterol Disulfates A and B, Antiviral

- Steroid Sulfates from the Sponge *Petrosia Weinbergi*. *Tetrahedron* **1991**, *47* (7), 1185–1190. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86375-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86375-4).
71. McKee, T. C.; Cardellina, J. H.; Tischler, M.; Snader, K. M.; Boyd, M. R. Ibisterol Sulfate, a Novel HIV-Inhibitory Sulfated Sterol from the Deep Water Sponge *Topsentia* Sp. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (3), 389–392. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)85083-9](https://doi.org/10.1016/0040-4039(93)85083-9).
 72. Slate, D. L.; Lee, R. H.; Rodriguez, J.; Crews, P. The Marine Natural Product, Halistanol Trisulfate, Inhibits Pp60v-Src Protein Tyrosine Kinase Activity. *Biochem. Biophys. Rep.* **1994**, *203* (1), 260–264. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2176>.
 73. Lima, B. de A.; de Lira, S. P.; Kossuga, M. H.; Gonçalves, R. B.; Berlinck, R. G. S.; Kamiya, R. U. Halistanol Sulfate A and Rodriguesines A and B Are Antimicrobial and Antibiofilm Agents against the Cariogenic Bacterium *Streptococcus Mutans*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, *24* (6), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.002>.
 74. Cardellina, J. H. II.; Munro, M. H. G.; Fuller, R. W.; Manfredi, K. P.; McKee, T. C.; Tischler, M.; Bokesch, H. R.; Gustafson, K. R.; Beutler, J. A.; Boyd, M. R. A Chemical Screening Strategy for the Dereplication and Prioritization of HIV-Inhibitory Aqueous Natural Products Extracts. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56* (7), 1123–1129. <https://doi.org/10.1021/np50097a016>.
 75. McKee, T. C.; Cardellina, J. H. I.; Riccio, R.; D’Auria, M. V.; Iorizzi, M.; Minale, L.; Moran, R. A.; Gulakowski, R. J.; McMahon, J. B. HIV-Inhibitory Natural Products. 11. Comparative Studies of Sulfated Sterols from Marine Invertebrates. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (6), 793–797. <https://doi.org/10.1021/jm00032a012>.
 76. Nakao, Y.; Fusetani, N. Enzyme Inhibitors from Marine Invertebrates. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (4), 689–710. <https://doi.org/10.1021/np060600x>.
 77. Bifulco, G.; Bruno, I.; Minale, L.; Riccio, R. Novel HIV-Inhibitory Halistanol Sulfates F-H from a Marine Sponge, *Pseudoaxinissa Digitata*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (1), 164–167. <https://doi.org/10.1021/np50103a026>.
 78. Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. Antifouling Terpenes and Steroids against Barnacle Larvae from Marine Sponges. *Biofouling* **1997**, *11* (4), 283–291. <https://doi.org/10.1080/08927019709378337>.
 79. Rudi, A.; Yosief, T.; Loya, S.; Hizi, A.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Clathsterol, a Novel Anti-HIV-1 RT Sulfated Sterol from the Sponge *Clathria* Species. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (11), 1451–1453. <https://doi.org/10.1021/np010121s>.
 80. Qureshi, A.; Faulkner, D. J. Haplosamates A and B: New Steroidal Sulfamate Esters from Two *Haplosclerid* Sponges. *Tetrahedron* **1999**, *55* (28), 8323–8330. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00465-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00465-2).
 81. Nguyen, G. T. T.; Gertz, M.; Steegborn, C. Crystal Structures of Sirt3 Complexes with 4’-Bromo-Resveratrol Reveal Binding Sites and Inhibition Mechanism. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (11), 1375–1385. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.019>.
 82. Jin, L.; Abrahams, J. P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R. N.; Carrell, R. W. The Anticoagulant Activation of Antithrombin by Heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94* (26), 14683–14688. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14683>.

83. Kupchan, S. M.; Britton, R. W.; Ziegler, M. F.; Sigel, C. W. Bruceantin, a New Potent Antileukemic Simaroubolide from *Brucea Antidysenterica*. *J. Org. Chem.* **1973**, *38* (1), 178–179. <https://doi.org/10.1021/jo00941a049>.
84. Shah, A. A.; Ito, A.; Nakata, A.; Yoshida, M. Identification of a Selective SIRT2 Inhibitor and Its Anti-Breast Cancer Activity. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39* (10), 1739–1742. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00520>.
85. Otwinowski, Z.; Minor, W. [20] Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In *Meth. Enzymol.* 1997; Vol. 276, pp 307–326. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76066-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76066-X).
86. Jin, L.; Wei, W.; Jiang, Y.; Peng, H.; Cai, J.; Mao, C.; Dai, H.; Choy, W.; Bemis, J. E.; Jirousek, M. R.; Milne, J. C.; Westphal, C. H.; Perni, R. B. Crystal Structures of Human SIRT3 Displaying Substrate-Induced Conformational Changes. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (36), 24394–24405. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014928>.
87. Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.* **1997**, *30* (6), 1022–1025. <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>.
88. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta. Cryst.* **1997**, *53* (3), 240–255. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>.
89. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
90. Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
91. Kimura, H. Histone Modifications for Human Epigenome Analysis. *J. Hum. Genet.* **2013**, *58* (7), 439–445. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66>.
92. Lee, D. Y.; Teyssier, C.; Strahl, B. D.; Stallcup, M. R. Role of Protein Methylation in Regulation of Transcription. *Endocr. Rev.* **2005**, *26* (2), 147–170. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0008>.
93. Baylin, S. B.; Jones, P. A. A Decade of Exploring the Cancer Epigenome — Biological and Translational Implications. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (10), 726–734. <https://doi.org/10.1038/nrc3130>.
94. Chen, T.; Dent, S. Y. R. Chromatin Modifiers: Regulators of Cellular Differentiation. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15* (2), 93–106. <https://doi.org/10.1038/nrg3607>.
95. Portela, A.; Esteller, M. Epigenetic Modifications and Human Disease. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>.
96. Bewley, C. A.; Faulkner, D. J. Lithistid Sponges: Star Performers or Hosts to the Stars. *Angew. Chem.* **1998**, *37* (16), 2162–2178. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980904\)37:16<2162::AID-ANIE2162>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980904)37:16<2162::AID-ANIE2162>3.0.CO;2-2).
97. Sakemi, Shinichi.; Ichiba, Toshio.; Kohmoto, Shigeo.; Saucy, Gabriel.; Higa, Tatsuo. Isolation and Structure Elucidation of Onnamide A, a New Bioactive Metabolite of a Marine Sponge, *Theonella* Sp. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (14), 4851–4853. <https://doi.org/10.1021/ja00222a068>.
98. Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Eight New Cytotoxic Metabolites Closely Related to Onnamide

- A from Two Marine Sponges of the Genus *Theonella*. *Tetrahedron* **1992**, *48* (39), 8369–8376. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86585-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86585-6).
99. Kobayashi, J.; Itagaki, F.; Shigemori, H.; Sasaki, T. Three New Onnamide Congeners from the Okinawan Marine Sponge *Theonella* Sp. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56* (6), 976–981. <https://doi.org/10.1021/np50096a030>.
 100. Fusetani, N.; Sugawara, T.; Matsunaga, S. Bioactive Marine Metabolites. 41. Theopederins A-E, Potent Antitumor Metabolites from a Marine Sponge, *Theonella* Sp. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (14), 3828–3832. <https://doi.org/10.1021/jo00040a021>.
 101. Tsukamoto, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Toh-e, A. Theopederins F-J: Five New Antifungal and Cytotoxic Metabolites from the Marine Sponge, *Theonella Swinhoei* 11 Bioactive Marine Metabolites 97. Part 96: Oku, N.; Matsunaga, S.; Wada, S.; Fusetani, N.; Watabe, S., Submitted. *Tetrahedron* **1999**, *55* (48), 13697–13702. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00841-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00841-8).
 102. Lindon, J. C.; Ferrige, A. G. Digitisation and Data Processing in Fourier Transform NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1980**, *14* (1), 27–66. [https://doi.org/10.1016/0079-6565\(80\)80002-1](https://doi.org/10.1016/0079-6565(80)80002-1).
 103. Piel, J.; Hui, D.; Wen, G.; Butzke, D.; Platzer, M.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. Antitumor Polyketide Biosynthesis by an Uncultivated Bacterial Symbiont of the Marine Sponge *Theonella Swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101* (46), 16222–16227. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405976101>.
 104. Matsunaga, S.; Fujiki, H.; Sakata, D.; Fusetani, N. Calyculins E, F, G, and H, Additional Inhibitors of Protein Phosphatases 1 and 2a, from the Marine Sponge *Discodermia Calyx*. *Tetrahedron* **1991**, *47* (18), 2999–3006. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96031-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96031-4).
 105. Cao, R.; Wang, L.; Wang, H.; Xia, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Jones, R. S.; Zhang, Y. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science* **2002**, *298* (5595), 1039–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>.
 106. Kim, K. H.; Roberts, C. W. M. Targeting EZH2 in Cancer. *Nat. Med.* **2016**, *22* (2), 128–134. <https://doi.org/10.1038/nm.4036>.
 107. Sobel, R. E.; Cook, R. G.; Perry, C. A.; Annunziato, A. T.; Allis, C. D. Conservation of Deposition-Related Acetylation Sites in Newly Synthesized Histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92* (4), 1237–1241. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1237>.
 108. Kaneko, S.; Li, G.; Son, J.; Xu, C.-F.; Margueron, R.; Neubert, T. A.; Reinberg, D. Phosphorylation of the PRC2 Component Ezh2 Is Cell Cycle-Regulated and up-Regulates Its Binding to NcRNA. *Genes Dev.* **2010**, *24* (23), 2615–2620. <https://doi.org/10.1101/gad.1983810>.
 109. Xie, P.; Tian, C.; An, L.; Nie, J.; Lu, K.; Xing, G.; Zhang, L.; He, F. Histone Methyltransferase Protein SETD2 Interacts with P53 and Selectively Regulates Its Downstream Genes. *Cell Signal.* **2008**, *20* (9), 1671–1678. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.05.012>.
 110. Guerra-Calderas, L.; González-Barríos, R.; Herrera, L. A.; Cantú de León, D.; Soto-Reyes, E. The Role of the Histone Demethylase KDM4A in Cancer. *Cancer Genet.* **2015**, *208* (5), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.11.001>.
 111. Lee, K.-H.; Nishimura, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Horinouchi, S.; Yoshida, M. Inhibition of Protein Synthesis and Activation of Stress-Activated Protein Kinases by Onnamide A and Theopederin B, Antitumor Marine Natural Products. *Cancer Sci.* **2005**, *96* (6), 357–364.

- <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00055.x>.
112. Jordanov, M. S.; Pribnow, D.; Magun, J. L.; Dinh, T. H.; Pearson, J. A.; Chen, S. L.; Magun, B. E. Ribotoxic Stress Response: Activation of the Stress-Activated Protein Kinase JNK1 by Inhibitors of the Peptidyl Transferase Reaction and by Sequence-Specific RNA Damage to the Alpha-Sarcin/Ricin Loop in the 28S RRNA. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17* (6), 3373–3381.
 113. Vind, A. C.; Genzor, A. V.; Bekker-Jensen, S. Ribosomal Stress-Surveillance: Three Pathways Is a Magic Number. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (19), 10648–10661. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa757>.
 114. Garreau de Loubresse, N.; Prokhorova, I.; Holtkamp, W.; Rodnina, M. V.; Yusupova, G.; Yusupov, M. Structural Basis for the Inhibition of the Eukaryotic Ribosome. *Nature* **2014**, *513* (7519), 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature13737>.
 115. Dang, Y.; Schneider-Poetsch, T.; Eyler, D. E.; Jewett, J. C.; Bhat, S.; Rawal, V. H.; Green, R.; Liu, J. O. Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by the Antitumor Natural Product Mycalamide B. *RNA* **2011**, *17* (8), 1578–1588. <https://doi.org/10.1261/rna.2624511>.
 116. Wu, C. C.-C.; Peterson, A.; Zinshteyn, B.; Regot, S.; Green, R. Ribosome Collisions Trigger General Stress Responses to Regulate Cell Fate. *Cell* **2020**, *182* (2), 404–416.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.006>.
 117. Hayashi-Takanaka, Y.; Kina, Y.; Nakamura, F.; Becking, L. E.; Nakao, Y.; Nagase, T.; Nozaki, N.; Kimura, H. Histone Modification Dynamics as Revealed by a Multicolor Immunofluorescence-Based Single-Cell Analysis. *J. Cell. Sci.* **2020**, jcs.243444. <https://doi.org/10.1242/jcs.243444>.
 118. 瀬尾誠; 村越隆之. 慢性拘束ストレス負荷による海馬機能低下に対する味噌摂取による改善効果. *中央味噌研究所研究報告* **2014**, *35*, 119–128.
 119. Hirayama, T. Relationship of Soybean Paste Soup Intake to Gastric Cancer Risk. *Nutr. Cancer* **1981**, *3* (4), 223–233. <https://doi.org/10.1080/01635588109513726>.
 120. Sirtori, C. R.; Agradi, E.; Conti, F.; Mantero, O.; Gatti, E. Soybean-protein Diet in the Treatment of Type-II Hyperlipoproteinaemia. *Lancet* **1977**, *309* (8006), 275–277. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)91823-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91823-2).
 121. Aoyama, T.; Fukui, K.; Takamatsu, K.; Hashimoto, Y.; Yamamoto, T. Soy Protein Isolate and Its Hydrolysate Reduce Body Fat of Dietary Obese Rats and Genetically Obese Mice (Yellow KK). *Nutrition* **2000**, *16* (5), 349–354. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00230-6](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00230-6).
 122. Zowail, M. E. M.; Khater A, E. H. S.; Waer, A. F. M.; El-mancy, H. A. The Evidence for Soybean Products as Cancer Preventive Agents. *Egypt. J. Hosp. Med.* **2012**, *48* (1), 394–406. <https://doi.org/10.21608/ejhm.2012.16243>.
 123. Hirota, A.; Taki, S.; Kawai, S.; Yano, M.; Abe, N. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radical-Scavenging Compounds from Soybean Miso and Antiproliferative Activity of Isoflavones from Soybean Miso toward the Cancer Cell Lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64* (5), 1038–1040. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1038>.
 124. Messina, M.; Barnes, S. The Role of Soy Products in Reducing Risk of Cancer 1. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83* (8), 541–546. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.8.541>.
 125. Anderson, J. W.; Johnstone, B. M.; Cook-Newell, M. E. Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333* (5), 276–282.

- <https://doi.org/10.1056/NEJM199508033330502>.
126. Tsuchida, K.; Mizushima, S.; Toba, M.; Soda, K. Dietary Soybeans Intake and Bone Mineral Density among 995 Middle-Aged Women in Yokohama. *J. Epidemiol.* **1999**, *9* (1), 14–19. <https://doi.org/10.2188/jea.9.14>.
127. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **2007**, *128* (4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
128. Bannister, A. J.; Kouzarides, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Res.* **2011**, *21* (3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
129. Pokholok, D. K.; Harbison, C. T.; Levine, S.; Cole, M.; Hannett, N. M.; Lee, T. I.; Bell, G. W.; Walker, K.; Rolfe, P. A.; Herbolsheimer, E.; Zeitlinger, J.; Lewitter, F.; Gifford, D. K.; Young, R. A. Genome-Wide Map of Nucleosome Acetylation and Methylation in Yeast. *Cell* **2005**, *122* (4), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.026>.
130. Portela, A.; Esteller, M. Epigenetic Modifications and Human Disease. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>.
131. Teruhiko, Y.; Yoshimasa, H.; Toshinori, N.; Saiko, C.; Sadao, S. Fungitoxic Compounds from the Roots of the Eggplant Stock. *Jpn. J. Phytopathol.* **1988**, *54* (4), 453–459. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.54.453>.
132. 裕康小山; 徹米山; 秀明府川; 徹清水. 小麦粉のアルカリ呈色に関する研究(第 2 報). *日本農芸化学会誌* **1969**, *43* (12), 826–830. <https://doi.org/10.1271/nogeikagaku1924.43.826>.
133. Malin, G. Mittheilungen Aus Dem Chemischen Laboratorium in Innsbruck. II. Ueber Ein Derivat Der Rufigallussäure; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1867**, *141* (3), 345–349. <https://doi.org/10.1002/jlac.18671410306>.
134. Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Hirose, K.; Akiyama, K.; Taniguchi, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (7), 2161–2168. <https://doi.org/10.1021/jf011348w>.
135. Barone, E.; Calabrese, V.; Mancuso, C. Ferulic Acid and Its Therapeutic Potential as a Hormetin for Age-Related Diseases. *Biogerontology* **2009**, *10* (2), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9160-8>.
136. Ardiansyah; Ohsaki, Y.; Shirakawa, H.; Koseki, T.; Komai, M. Novel Effects of a Single Administration of Ferulic Acid on the Regulation of Blood Pressure and the Hepatic Lipid Metabolic Profile in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (8), 2825–2830. <https://doi.org/10.1021/jf072896y>.
137. Yan, J.-J.; Cho, J.-Y.; Kim, H.-S.; Kim, K.-L.; Jung, J.-S.; Huh, S.-O.; Suh, H.-W.; Kim, Y.-H.; Song, D.-K. Protection against β -Amyloid Peptide Toxicity in Vivo with Long-Term Administration of Ferulic Acid. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *133* (1), 89–96. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704047>.
138. Kumar, N.; Pruthi, V. Potential Applications of Ferulic Acid from Natural Sources. *Biotechnol. Rep.* **2014**, *4*, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>.
139. Li, D.; Rui, Y.; Guo, S.; Luan, F.; Liu, R.; Zeng, N. Ferulic Acid: A Review of Its Pharmacology, Pharmacokinetics and Derivatives. *Life Sci.* **2021**, *284*, 119921. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119921>.

140. Schäfers, F. I.; Herrmann, K. Analysis of Methyl and Ethyl Esters of Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acids in Plant Material. *J. Chromatogr. A* **1982**, *240* (2), 387–396. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)99618-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)99618-3).
141. Tenkanen, M.; Schuseil, J.; Puls, J.; Poutanen, K. Production, Purification and Characterization of an Esterase Liberating Phenolic Acids from Lignocellulosics. *J. Biotechnol.* **1991**, *18* (1), 69–83. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90236-O](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90236-O).
142. Koseki, T.; Takahashi, K.; Fushinobu, S.; Iefuji, H.; Iwano, K.; Hashizume, K.; Matsuzawa, H. Mutational Analysis of a Feruloyl Esterase from *Aspergillus Awamori* Involved in Substrate Discrimination and PH Dependence. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2005**, *1722* (2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.12.016>.
143. Koseki, T.; Hori, A.; Seki, S.; Murayama, T.; Shiono, Y. Characterization of Two Distinct Feruloyl Esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus Oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83* (4), 689–696. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1913-z>.
144. Yamabe, S.; Kaneko, K.; Inoue, H.; Takita, T. Maturation of Fermented Rice-Koji Miso Can Be Monitored by an Increase in Fatty Acid Ethyl Ester. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68* (1), 250–252. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.250>.
145. Suzuki, N.; Ito, T.; Hiroshima, K.; Tokiwano, T.; Hashizume, K. Formation of Ethyl Ferulate from Feruloylated Oligosaccharide by Transesterification of Rice Koji Enzyme under Sake Mash Conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *121* (3), 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.06.015>.
146. Park, C. S.; Rehrauer, H.; Mansuy, I. M. Genome-Wide Analysis of H4K5 Acetylation Associated with Fear Memory in Mice. *BMC Genom.* **2013**, *14* (1), 539. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-539>.
147. Sultana, R.; Ravagna, A.; Mohmmad-Abdul, H.; Calabrese, V.; Butterfield, D. A. Ferulic Acid Ethyl Ester Protects Neurons against Amyloid β -Peptide(1–42)-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Relationship to Antioxidant Activity. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (4), 749–758. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02899.x>.
148. Müller, M. B.; Lucassen, P. J.; Yassouridis, A.; Hoogendijk, W. J. G.; Holsboer, F.; Swaab, D. F. Neither Major Depression nor Glucocorticoid Treatment Affects the Cellular Integrity of the Human Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **2001**, *14* (10), 1603–1612. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01784.x>.
149. Rajkowska, G.; Stockmeier, C. A. Astrocyte Pathology in Major Depressive Disorder: Insights from Human Postmortem Brain Tissue *Curr. Drug Targets* **2013**, *14* (11), 1225–1236.
150. McGivern, J. G. Ziconotide: A Review of Its Pharmacology and Use in the Treatment of Pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2007**, *3* (1), 69–85.
151. Wulf, E.; Deboen, A.; Bautz, F. A.; Faulstich, H.; Wieland, T. Fluorescent Phallotoxin, a Tool for the Visualization of Cellular Actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76* (9), 4498–4502.
152. Arita, Y.; Nishimura, S.; Ishitsuka, R.; Kishimoto, T.; Ikenouchi, J.; Ishii, K.; Umeda, M.; Matsunaga, S.; Kobayashi, T.; Yoshida, M. Targeting Cholesterol in a Liquid-Disordered Environment by Theonellamides Modulates Cell Membrane Order and Cell Shape. *Chem. Biol.* **2015**, *22* (5), 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.04.011>.
153. Yanagi, S.; Sugai, T.; Noguchi, T.; Kawakami, M.; Sasaki, M.; Niwa, S.; Sugimoto, A.; Fuwa, H.

- Fluorescence-Labeled Neopeltolide Derivatives for Subcellular Localization Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (28), 6771–6776. <https://doi.org/10.1039/C9OB01276A>.
154. Proceedings of the Chemical Society. October 1961. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, No. October, 357–396. <https://doi.org/10.1039/PS9610000357>.
155. Sato, S.; Murata, A.; Shirakawa, T.; Uesugi, M. Biochemical Target Isolation for Novices: Affinity-Based Strategies. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (6), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.015>.
156. Lee, H.; Lee, J. W. Target Identification for Biologically Active Small Molecules Using Chemical Biology Approaches. *Arch. Pharm. Res.* **2016**, *39* (9), 1193–1201. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0791-z>.
157. Sakamoto, S.; Kabe, Y.; Hatakeyama, M.; Yamaguchi, Y.; Handa, H. Development and Application of High-Performance Affinity Beads: Toward Chemical Biology and Drug Discovery. *Chem. Rec.* **2009**, *9* (1), 66–85. <https://doi.org/10.1002/tcr.20170>.
158. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>.
159. Linial, M.; Miller, K.; Scheller, R. H. VAT 1: An Abundant Membrane Protein from Torpedo Cholinergic Synaptic Vesicles. *Neuron* **1989**, *2* (3), 1265–1273. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90311-5).
160. Linial, M.; Levius, O. VAT-1 from Torpedo Is a Membranous Homologue of Zeta Crystallin. *FEBS Lett.* **1993**, *315* (1), 91–94. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81140-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81140-U).
161. Eura, Y.; Ishihara, N.; Oka, T.; Mihara, K. Identification of a Novel Protein That Regulates Mitochondrial Fusion by Modulating Mitofusin (Mfn) Protein Function. *J. Cell. Sci.* **2006**, *119* (23), 4913–4925. <https://doi.org/10.1242/jcs.03253>.
162. Junker, M.; Rapoport, T. A. Involvement of VAT-1 in Phosphatidylserine Transfer from the Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Traffic* **2015**, *16* (12), 1306–1317. <https://doi.org/10.1111/tra.12336>.
163. Watanabe, Y.; Tamura, Y.; Kakuta, C.; Watanabe, S.; Endo, T. Structural Basis for Interorganelle Phospholipid Transport Mediated by VAT-1. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (10), 3257–3268. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011019>.
164. Segawa, K.; Kurata, S.; Yanagihashi, Y.; Brummelkamp, T. R.; Matsuda, F.; Nagata, S. Caspase-Mediated Cleavage of Phospholipid Flippase for Apoptotic Phosphatidylserine Exposure. *Science* **2014**, *344* (6188), 1164–1168. <https://doi.org/10.1126/science.1252809>.
165. Segawa, K.; Kurata, S.; Nagata, S. Human Type IV P-Type ATPases That Work as Plasma Membrane Phospholipid Flippases and Their Regulation by Caspase and Calcium*. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (2), 762–772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.690727>.
166. Segawa, K.; Nagata, S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25* (11), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>.
167. Nagata, S.; Segawa, K. Sensing and Clearance of Apoptotic Cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2021**, *68*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.07.007>.
168. Kurematsu, C.; Sawada, M.; Ohmuraya, M.; Tanaka, M.; Kuboyama, K.; Ogino, T.; Matsumoto, M.; Oishi, H.; Inada, H.; Ishido, Y.; Sakakibara, Y.; Nguyen, H. B.; Thai, T. Q.; Kohsaka, S.; Ohno, N.;

Yamada, M. K.; Asai, M.; Sokabe, M.; Nabekura, J.; Asano, K.; Tanaka, M.; Sawamoto, K. Synaptic Pruning of Murine Adult-Born Neurons by Microglia Depends on Phosphatidylserine. *J. Exp. Med.* **2022**, *219* (4), e20202304. <https://doi.org/10.1084/jem.20202304>.

169. 英祐松原; 芳孝本多; 淳嶋川; 大祐新井; 文彬中村; 妙子加藤; 京子中野; 昶威大池; 洋一中尾. 味噌に含有する抗ストレス物質の探索及び FAEE 高含有みその製法について. *中央味噌研究所研究報告* **2017**, *38*, 34–48.

謝辞

早稲田大学理工学術院教授 中尾洋一先生には8年間に渡り、研究のすべてを、ご指導ご鞭撻を受け賜りました。心より深く感謝申し上げます。

本学位論文の作成にあたり、学位申請の過程でご指導いただいた同学科教授、寺田泰比古先生、同学科准教授、山本佳奈准教授に深く感謝いたします。

海洋生物のサンプリングでは、広島大学名誉教授 堀貫治先生、講師 平山真先生、豊潮丸の乗組員の皆様にご協力いただきました。ありがとうございました。

SIRT 阻害活性試験は、理化学研究所 環境資源科学研究センター，兼，東京大学大学院農学生命科学研究科 吉田稔先生および工藤紀雄博士に行っていただきました。ありがとうございました。

味噌サンプルは一般社団法人 中央味噌研究所 中野京子氏および加藤妙子氏にご提供していただきました。社会的敗北モデルマウスを用いた実験は、学校法人麻布獣医学園 伴侶動物学研究室 菊水健史先生および上杉愛海氏に行っていただきました。ありがとうございました。

最後に、私の研究生生活を陰ながら支えてくれた家族に感謝いたします。

研究業績書

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者(申請者含む)
論文	<p>○ “Two onnamide analogs from the marine sponge <i>Theonella conica</i>: evaluation of geometric effects in the polyene systems on biological activity” <i>Molecules</i> 2023, <i>28</i>, accepted manuscript (molecules-2279444) on 07 March 2023. <u>Fumiaki Nakamura</u>, Hiroshi Kimura, Nobuhiro Fusetani, and Yoichi Nakao</p> <p>○ “Kakeromamide A, a new cyclic pentapeptide inducing astrocyte differentiation isolated from the marine cyanobacterium <i>Moorea bouillonii</i>” <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 2018, <i>28</i>, 2206-2209. <u>Fumiaki Nakamura</u>, Hiroshi Maejima, Midori Kawamura, Daisuke Arai, Tatsufumi Okino, Meng Zhao, Tao Ye, Jungyeol Lee, Young Tae Chang, Nobuhiro Fusetani, and Yoichi Nakao</p> <p>○ “Halistanol sulfates I and J, new SIRT1-3 inhibitory steroid sulfates from a marine sponge of the genus <i>Halichondria</i>” <i>J. Antibiot.</i> 2018, <i>71</i>, 273-278. <u>Fumiaki Nakamura</u>, Norio Kudo, Yuki Tomachi, Akiko Nakata, Misao Takemoto, Akihiro Ito, Hodaka Tabei, Daisuke Arai, Nicole De Voogd, Minoru Yoshida, Yoichi Nakao, and Nobuhiro Fusetani</p>
講演	<p>“味噌に特徴的なエピゲノム調節成分の研究”, 中村文彬, 中尾洋一, 第7回みそ技術研究発表会, 東京, 2019年3月</p> <p>“Kakeromamide A, a new cyclic pentapeptide from the marine cyanobacterium <i>Moorea bouillonii</i>”, <u>Fumiaki Nakamura</u>, Hiroshi Maejima, Midori Kawamura, Daisuke Arai, Meng Zhao, Tao Ye, Nobuhiro Fusetani, and Yoichi Nakao, 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP30 & ICOB10), Athens, Greece, 2018年11月</p> <p>“Fermented ingredients from “Miso” that affect histone modifications”, <u>Fumiaki Nakamura</u> and Yoichi Nakao, Symposium; Health Promotion through Food Science, Chrono-nutrition and Sports Science-From basic to applied research-, Singapore, 2018年10月</p> <p>“ヒストン修飾調節活性を有する海洋天然化合物の探索”, <u>中村文彬</u>, 田中万結, 新井大祐, 木村宏, 中尾洋一, 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会, 東京, 2018年6月</p> <p>“奄美大島産海綿 <i>Theonella conica</i> に含まれる新規オンナミド類の単離と構造決定”, <u>中村文彬</u>, 菊池恒太, 中尾洋一, 第12回 化学生態学研究会, 函館, 2017年6月</p>

研究業績書

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者(申請者含む)
講演 (続き)	<p>“奄美大島産海綿からのヒストン修飾制御活性化合物の探索”, <u>中村文彬</u>, 中尾洋一, 第 31 回 海洋生物活性談話会, 秋田, 2017 年 5 月</p> <p>“味噌特有のヒストン修飾制御活性成分の研究”, <u>中村文彬</u>, 川村緑, 新井大祐, 塩田邦夫, 中尾洋一, 農芸化学会 2017 年度大会, 京都, 2017 年 3 月</p> <p>“加計呂麻島産シアノバクテリアに含まれる環状ペプチド性化合物の研究”, <u>中村文彬</u>, 前島寛, 川村緑, 沖野龍文, 中尾洋一, 第 51 回 天然物化学談話会, 新潟, 2016 年 7 月</p> <p>“加計呂麻島産シアノバクテリアに含まれる環状ペプチドの構造と活性”, <u>中村文彬</u>, 前島寛, 川村緑, 沖野龍文, 中尾洋一, 第 11 回 化学生態学研究会, 函館, 2016 年 7 月</p> <p>“奄美大島産シアノバクテリアに含まれる環状ペプチドの構造と活性”, <u>中村文彬</u>, 中尾洋一, 第 30 回 海洋生物活性談話会, 鳥取, 2016 年 5 月</p> <p>“海洋シアノバクテリアからの新規環状ペプチドの単離と構造決定”, <u>中村文彬</u>, 前島寛, 中尾洋一, 日本化学会第 96 春季年会, 京都, 2016 年 3 月</p>
その他 (特許)	<p>発明の名称:フェルラ酸誘導体含有組成物およびその製造方法, 出願日:2016 年 10 月 31 日, 発明者:中尾洋一, 新井大祐, <u>中村文彬</u>, 松原英祐, 本多芳孝, 菊水健史, 出願番号:特願 2016-213183, 出願人:学校法人早稲田大学, 一般社団法人中央味噌研究所, 学校法人麻布獣医学園</p>

