

新規海洋天然化合物の探索と起源  
に関する研究

Studies on New Marine Natural Products and  
Their Origins

2018年7月

町田 光史  
Koshi MACHIDA

新規海洋天然化合物の探索と起源  
に関する研究

Studies on New Marine Natural Products and  
Their Origins

2018年7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

町田 光史  
Koshi MACHIDA

## 略語表

2D	: 2-dimensions
ADP	: adenosine diphosphate
Ala	: alanine
aq.	: aqueous
calcd	: calculated
Comp	: compound
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
COSY	: correlation spectroscopy
DC	: Diffusion chamber
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
Dha	: dehydroalanine
DMAP	: 4-dimethylaminopyridine
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
em	: emission
ES	: embryonic stem
ESI	: electrospray ionization
ex	: excitation
FDA	: Food and Drug Administration
FDLA	: 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucineamide
<i>FgF5</i>	: fibroblast growth factor 5 gene
<i>Gapdh</i>	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
GTP	: guanosine triphosphate
Hleu	: hydroxyleucine
HMBC	: heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	: high performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	: half-maximal inhibitory concentration
IR	: infrared spectroscopy

LIF	: leukemia inhibitory factor
LC	: liquid chromatography
<i>Klf4</i>	: Kruppel-like factor 4 gene
MDR1	: multiple drug resistance 1
Me	: methyl
MEF	: mouse embryonic fibroblasts
mmu	: milli mass unit
MS	: mass spectrometry
MTPA	: $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)phenylacetyl
NMR	: nuclear magnetic resonance
NOESY	: nuclear Overhauser effect spectroscopy
OD	: optical density
ODS	: octadecylsilyl
ORTEP	: Oak Ridge thermal ellipsoid plot
Pla	: phenyllactic acid
Pra	: propionic acid
rRNA	: ribosomal ribonucleic acid
<i>Sox17</i>	: (sex determining region Y)-box 17 gene
sp.	: species
<i>T</i>	: Brachyury gene
Thr	: threonine
TLC	: thin-layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>Zfp42</i>	: zinc finger protein 42 gene



## 目次

### 第 1 章 序論

1.1.	研究背景	
1.1.1.	天然物化学.....	1
1.1.2.	海洋天然化合物.....	4
1.1.3.	新規天然化合物の探索研究における課題.....	8
1.2.	研究目的.....	9

### 第 2 章 Cinanthrenol A に関する研究

2.1.	研究背景.....	10
2.2.	実験	
2.2.1.	深海生物のドレッジ採集.....	11
2.2.2.	Cinanthrenol A の単離と精製.....	11
2.2.3.	Cinanthrenol A の構造解析.....	13
2.2.4.	Cinanthrenol A の相対配置.....	16
2.2.5.	Cinanthrenol A の絶対配置.....	17
2.2.6.	Cinanthrenol A を含む海洋生物の同定.....	18
2.2.7.	Cinanthrenol A の毒性試験結果.....	19
2.3.	結言.....	20

### 第 3 章 Dolabellol A に関する研究

3.1.	研究背景.....	21
3.2.	実験	
3.2.1.	タツナミガイ <i>Dolabella auricuraria</i> の採集.....	22
3.2.2.	Dolabellol A の単離と精製.....	23
3.2.3.	Dolabellol A の構造解析.....	24
3.2.4.	重水素置換実験によるヒドロキシ基の置換位置の決定.....	27
3.2.5.	エポキシ化反応によるハロゲン原子の置換位置決定.....	27
3.2.6.	Dolabellol A の相対配置.....	28
3.2.7.	Dolabellol A の X 線結晶構造解析.....	29
3.2.8.	Dolabellol A の毒性試験結果.....	29
3.3.	考察.....	30

3.4.	結言.....	30
<b>第4章 Sameuramide A に関する研究</b>		
4.1.	研究背景.....	31
4.2.	実験	
4.2.1.	スクリーニング.....	32
4.2.2.	ウスボヤ(Didemnid)科ホヤの採集.....	32
4.2.3.	Sameuramide A の単離と精製.....	33
4.2.4.	Sameuramide A の構造解析.....	34
4.2.5.	Sameuramide A の絶対配置.....	40
4.2.6.	Sameuramide A の生物活性.....	42
4.2.7.	YM-254890 のコロニー維持活性評価.....	49
4.2.8.	ホヤサンプルからの微生物培養実験.....	50
4.3.	考察.....	50
4.4.	結言.....	51
<b>第5章 海綿内未培養微生物培養法の確立</b>		
5.1.	研究背景.....	52
5.2.	研究目的.....	55
5.3.	実験	
5.3.1.	モデル海綿の選択と採集.....	56
5.3.2.	Diffusion chamber を用いた海綿内微生物の培養方法.....	58
5.3.3.	16S rRNA 系統解析.....	62
5.3.4.	分離株に含まれる化合物プロファイル分析.....	65
5.4.	考察.....	69
5.5.	結言.....	71
<b>第6章 総括.....</b>		
<b>第7章 実験項</b>		
7.1.	第2章における実験項.....	75
7.2.	第3章における実験項.....	88
7.3.	第4章における実験項.....	102

7.4	第5章における実験項.....	114
-----	-----------------	-----

参考文献

謝辞

# 第1章 序論

## 1.1. 研究背景

### 1.1.1. 天然物化学

天然物化学の歴史は植物から始まり、植物や微生物から抽出された天然化合物は、医薬品の開発において重要な役割を担ってきた。現在ではがん治療での鎮痛剤として用いられるmorphineは、1805年にケシ科植物*Papaver somniferum*より単離され、1926年に天然化合物として初めて臨床応用が認められた<sup>1</sup>。さらに、抗マラリア薬のquinine<sup>2</sup>、強心剤のdigitoxin<sup>3</sup>、抗がん剤のvinblastine<sup>4</sup>、paclitaxel<sup>5</sup>などが天然由来の医薬品として利用されている (Figure 1.1)。

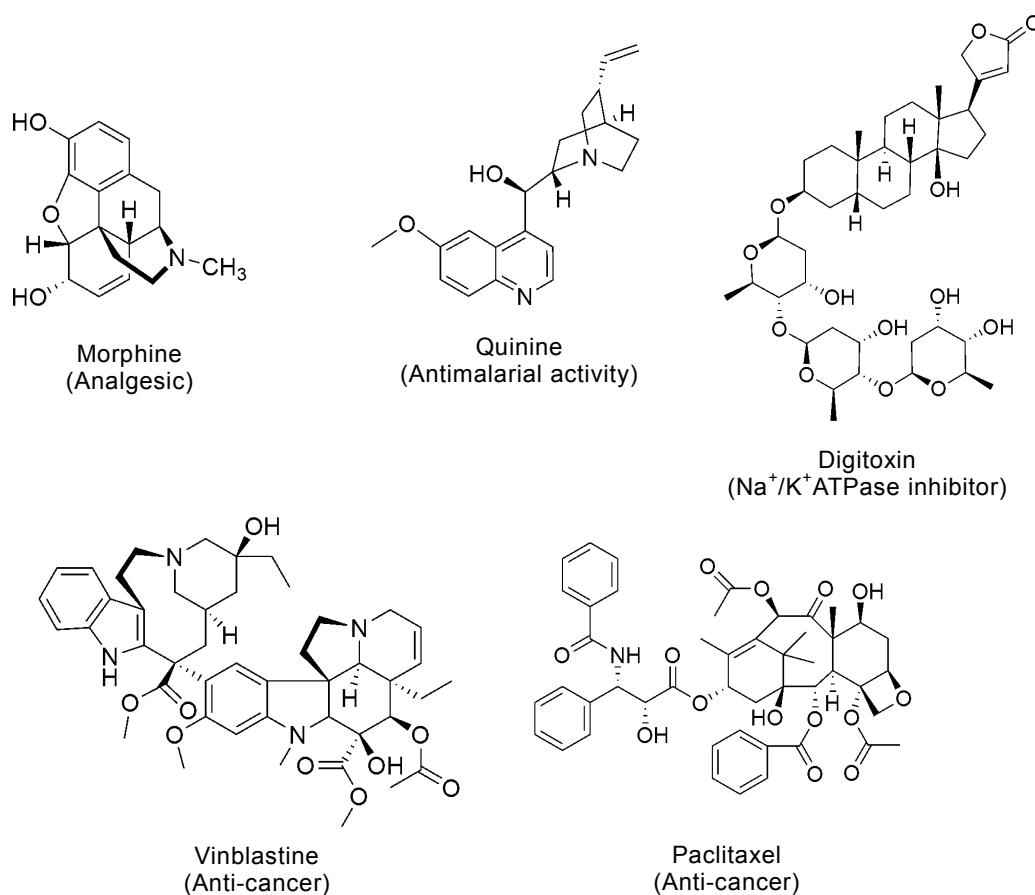


Figure 1.1. 植物由来天然化合物

1819年にセイヨウシロヤナギ *Salix alba* より発見された salicin は、解熱鎮痛作用を有していることから創薬開発がすすめられ、1899年に解熱鎮痛剤の Aspirin が世界で初めて合成医薬品として販売された (Figure 1.2)<sup>1</sup>。

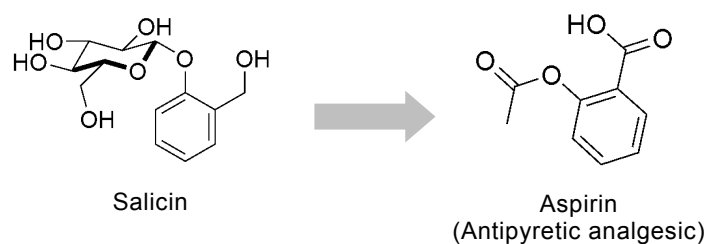


Figure 1.2. 植物由来天然化合物をもとに合成された医薬品

1928年、感染症治療に革命をもたらした penicillin は、A. Fleming によってアオカビ *Penicillium notatum* から発見された<sup>6</sup>。これをきっかけに微生物から様々な抗生物質が見出されることになり、現在では、抗がん剤 (epothilone A)、コレステロール合成阻害剤 (mevastatin)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (romidepin)、免疫抑制剤 (tacrolimus) などが放線菌や糸状菌などから単離されている (Figure 1.3)<sup>7-11</sup>。また、放線菌 *Streptomyces avermectinius* が産生する avermectin を基に、合成された Ivermectin が駆虫薬として開発された (Figure 1.4)<sup>12</sup>。自然界において生存競争を生き抜くため、生物が生産する二次代謝産物は特異的な生物活性を有し、立体化学が厳密に制御された分子構造は多様であることから天然有機化合物はこれからも医薬品のリード化合物として重要な資源である。

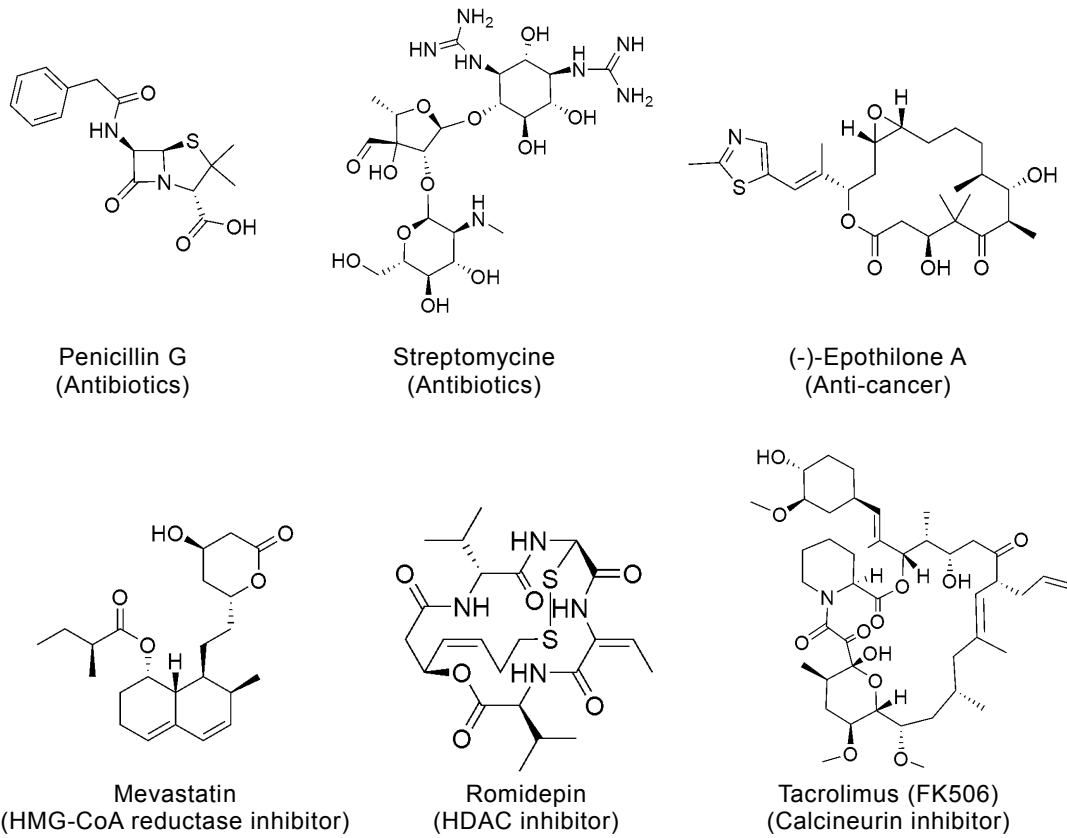


Figure 1.3. 微生物由来天然有機化合物

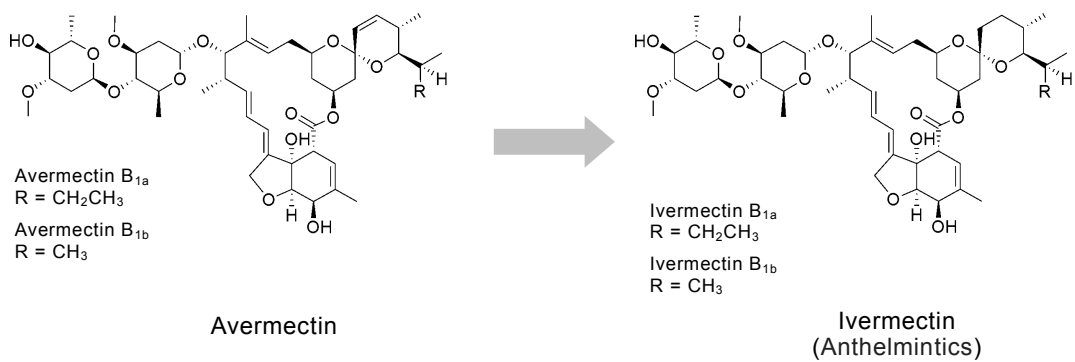
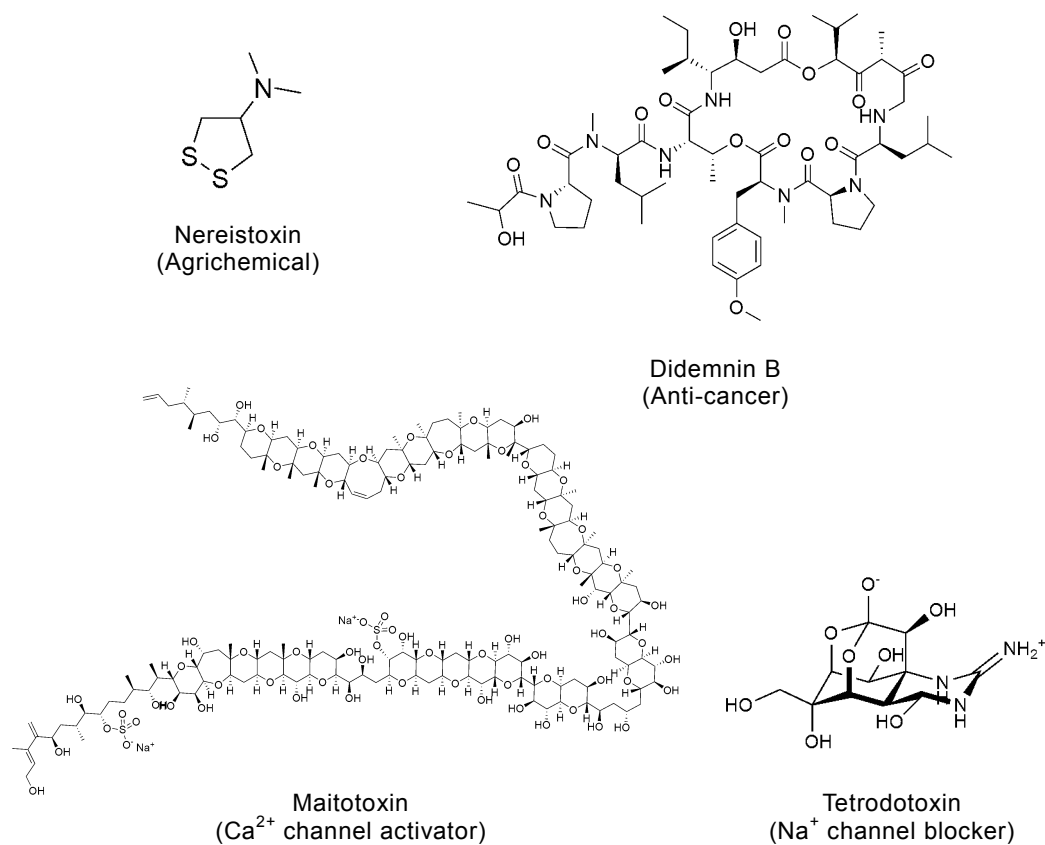


Figure 1.4. 微生物由来天然化合物をもとに合成された医薬品

### 1.1.2. 海洋天然化合物

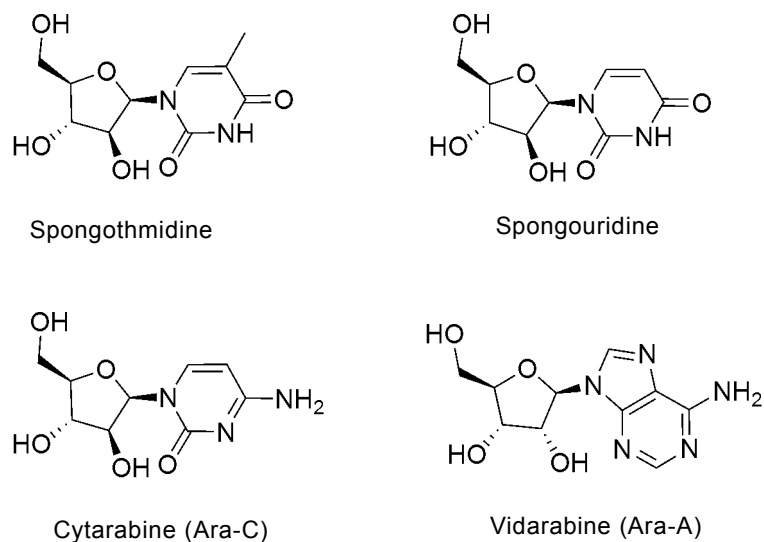
生命誕生の起源とされる海は、地球表面積の約7割を占め、これまでに多くの恵みを人類に与えてきた。陸上とは異なる環境である海には、約221万種もの多様な生物種が生息していると予想され、その91%は未だ発見されてないと予測されている<sup>13</sup>。一方、海洋生物に由来する二次代謝産物はこれまで数多く報告されており、1960年から50年の間にその数は24,000以上になる<sup>14</sup>。これらの分子構造は陸上生物のそれとは異なるものが多いため、陸生生物由来の天然化合物とは異なった生物活性物質を求め、多くの探索研究がなされてきた<sup>15</sup>。1967年に発売されたCartapは、海産環形動物の一種*Lumbrineris brevicirra*から単離されたnereistoxin<sup>16</sup>をもとに開発され、動物由来の化合物をもとに創製された最初の農薬である。1981年、カリブ海産ホヤから単離された環状デプシペプチドdidemnin Bは、免疫抑制作用や抗がん活性、抗菌活性を有しており、抗がん剤として臨床開発研究にすすんだ初めての海洋天然化合物である<sup>17</sup>。また、1996年に構造決定がなされた渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus*由来の海産毒素maitotoxinは、分子量3422のポリケタイド化合物であり、構造式が判明している最大の非ポリマー天然化合物である<sup>18,19</sup>。ポリ環状エーテルの特徴的な梯子状骨格を有し、細胞膜上のカルシウムチャンネルを活性化することで、ふぐ毒として有名なtetrodotoxin<sup>20</sup>の約200倍強い毒性を示す (Figure 1.5)。



**Figure 1.5.** 海洋生物由来の天然化合物

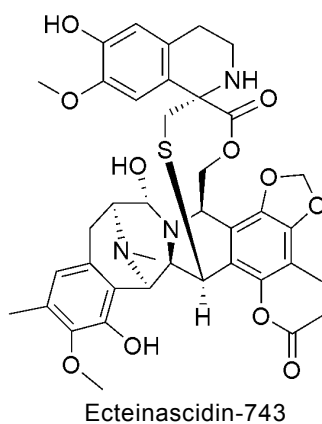
このように海洋生物からは、アルカロイドやペプチド、ポリケタイドなど多様な化合物群が単離されてきた。それら特徴的な分子構造から、特異的な生物活性を有するものが多く、研究用試薬や薬物のリード化合物として利用されている。例えば、海綿 *Tethya crypta* より単離された spongothymidine および spongouridine の構造をもとにして開発された cytarabin (Ara-C) は、1969年に抗がん剤として臨床応用が承認されている<sup>21, 22, 23</sup>。これは海洋天然物の類縁体が医薬品として初めて承認された事例である。また、類縁体の vidarabine (Ara-A) が、1976年に抗ウイルス剤として認証された。これらはいずれも細胞内ヌクレオチドと競合し、DNAポリメラーゼを阻害することでDNA合成を抑制し、抗がん・抗ウイルス活性を示すことが知られている (Figure 1.6)<sup>24</sup>。





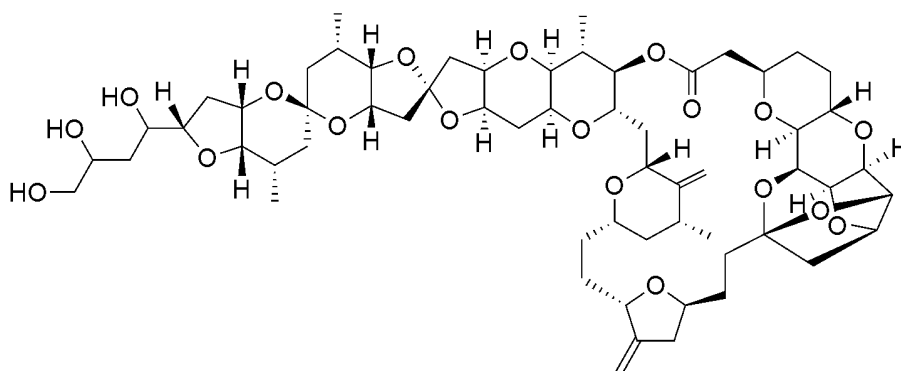
**Figure 1.6.** Spongothymidine およびその類縁体の構造

Ecteinascidin-743, 別名をtrabectedin, はカリブ海産ホヤ *Ecteinascidia turbinata* より単離されたテトラヒドロイソキノリンアルカロイドである<sup>25</sup>。また, 広範囲の腫瘍タイプに強力な細胞毒性を示し, その作用機序はいまだ明らかになっていないが, DNAと共有結合を形成し,ヌクレオチド除去修復機構を阻害することが知られている<sup>26</sup>。Ecteinascidin-743はMDR1遺伝子の発現を阻害し, P糖たんぱく質の合成を抑制することでがん細胞の薬物感受性を維持する<sup>27</sup>。現在, 卵巣がん治療薬として承認されている。

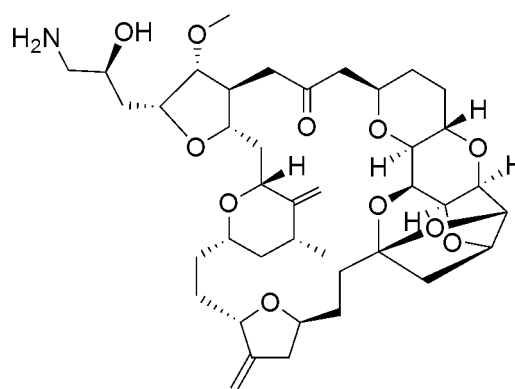


**Figure 1.7.** Ecteinascidin-743 の構造

Halichondrin Bは、ポリエーテルマクロライドとして海綿*Halichondria okadai*より1986年に単離された<sup>28</sup>。L1210マウス白血病細胞に対してIC<sub>50</sub>値が0.3 nMと強力な細胞毒性を示し、チューブリン重合を阻害することによってSACチェックポイントで細胞周期を停止し、細胞分裂を阻害する。エーザイにより開発された抗がん剤Eribulinは、このhalichondrin Bの部分構造を有しており<sup>29</sup>、日本では手術不能または再発性乳がんの治療に利用されている。



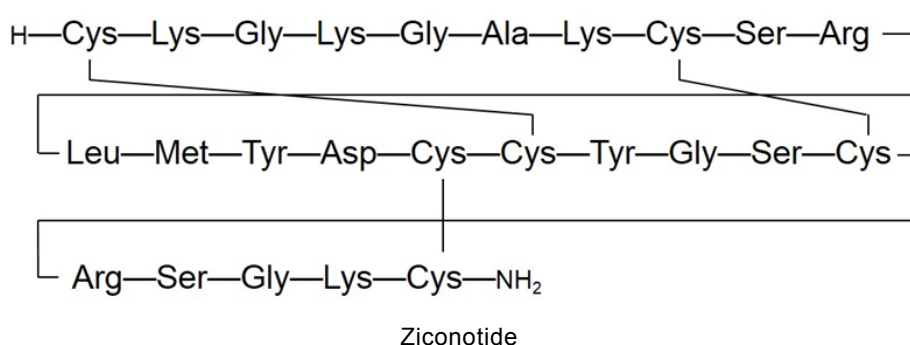
Halichondrin B



Eribulin

**Figure 1.8.** Halichondrin B および Eribulin の構造

食魚性のイモ貝 *Conus magus* より単離された ziconotide ( $\omega$ -conotoxin) は、世界で初めて天然化合物そのままの構造で承認された海洋天然化合物である<sup>30</sup>。モルヒネの1000倍も強い鎮痛作用を有していることから、他の治療法が効かない重度疼痛に用いられている。イモ貝はこの conotoxin を魚に注入することで麻痺させ、動けなくなったところを丸のみにする。Ziconotide による神経系のシグナル伝達が阻害されるのは、N 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを遮蔽することに起因している<sup>31</sup>。



**Figure 1.9.** Ziconotide の構造

現在、世界中で少なくとも13種類の海洋天然物由来の化合物が臨床試験段階にあり、9種類の化合物が薬物として使用されている<sup>32</sup>。これら化合物のうち約80%は、海綿動物やホヤなど海洋無脊椎動物を起源とする。一方、これらの二次代謝産物の80%以上が無脊椎動物に共生する微生物によって生産されると考えられている<sup>33</sup>。

### 1.1.3. 新規天然化合物の探索研究における課題

以上のように、海洋生物を由来とする二次代謝産物の中には、医薬品として臨床現場で実際に応用されている化合物がある。これらの事実は、薬物資源として天然化合物の高いポテンシャルを示しているものの、その数はこれまでに報告された海洋天然化合物の総数のうちごく僅かにとどまっている。その理由の1つとして、長年の精力的な探索研

究の結果、生物資源から新規骨格を含む生理活性分子を発見することが困難になっている問題があげられる。薬物資源の多様性を求めたコンビナトリアル合成による資源創製は、薬物資源の量的な類縁体拡大には効果的であったが、質的拡大、すなわち骨格新規な化合物を創出する面では課題を残している<sup>34</sup>。もう1つの理由は、天然化合物の量的供給が安定しない問題があげられる。一般に、薬物の臨床試験には最低kg単位の化合物が必要とされ、臨床応用には化合物の安定的な供給が必須となる。これまでに臨床応用あるいは臨床開発に至った海洋天然物は、合成もしくは生産生物の培養によって供給されてきた<sup>35,36</sup>。しかしながら、海洋天然化合物の構造は複雑なものが多く全合成が困難なことや、生産微生物のほとんどは難培養性であることから、合成や培養による大量供給は依然として容易ではない。また、海洋天然資源にも限りがあるため、海洋生物から化合物を安定供給する方法は確立されていないのが現状である。そこで、海綿に含まれる二次代謝産物の真の生産者である難培養性の共生微生物を培養して化合物を取り出すことができれば、医薬品探索源としての可能性は大きく広がるため、共生微生物の培養法確立が急務である。

## 1.2. 研究目的

本研究では、これまで述べた背景をもとに、海洋無脊椎動物から新規天然化合物の探索を行うとともに、海綿内共生微生物の培養法を開発することを目的とした。

## 第2章 Cinanthrenol A に関する研究

### 2.1. 研究背景

天然化合物の探索研究において、既知化合物に行きついてしまうことを回避するには、従来にはない新しい生物活性を指標とするか、未開拓な生物資源から探索する戦略が有効と考えられる。本研究では、後者の戦略に注目し、アクセスが難しく未開拓な深海生物を探索源とした。これまで単離報告された海洋天然化合物のうち、深海 (50 m以深) から発見されたものは2%にとどまる<sup>37</sup>。これら深海性の生物は極限環境に適応していることから、ユニークな構造を有する二次代謝産物を生産していると期待される<sup>38</sup>。実際、抗がん剤として期待された discodermolide<sup>39</sup>は水深147 mで採集された海綿 *Discodermia* sp. から見出されており、calyculins<sup>40</sup>やhalichondrins<sup>41</sup>などの生物活性物質についても80 m以深で採集された海綿からの単離報告例がある。通常、深海性生物を採集するには、鉄製の枠を備えたドレッジやトローリング<sup>42</sup>が用いられる。この採集過程において、生物サンプルが破砕された小断片や、分類が困難なほど小さいサイズの生物個体が大量に獲れる。従来行っていた研究では、ドレッジによる破砕を免れ分類可能なサイズを保った海洋生物を探索源として有用物質の探索を行い、採集サンプル全体の多くを占める分類不可能なサンプル群は廃棄してきた。そこで、深海生物から新規の天然化合物を発見することを目的として、従来は廃棄対象であった分類不可能なサンプル小断片の混合物に着目し、有効利用することで、これまで試されなかった探索方法を試みることにした。

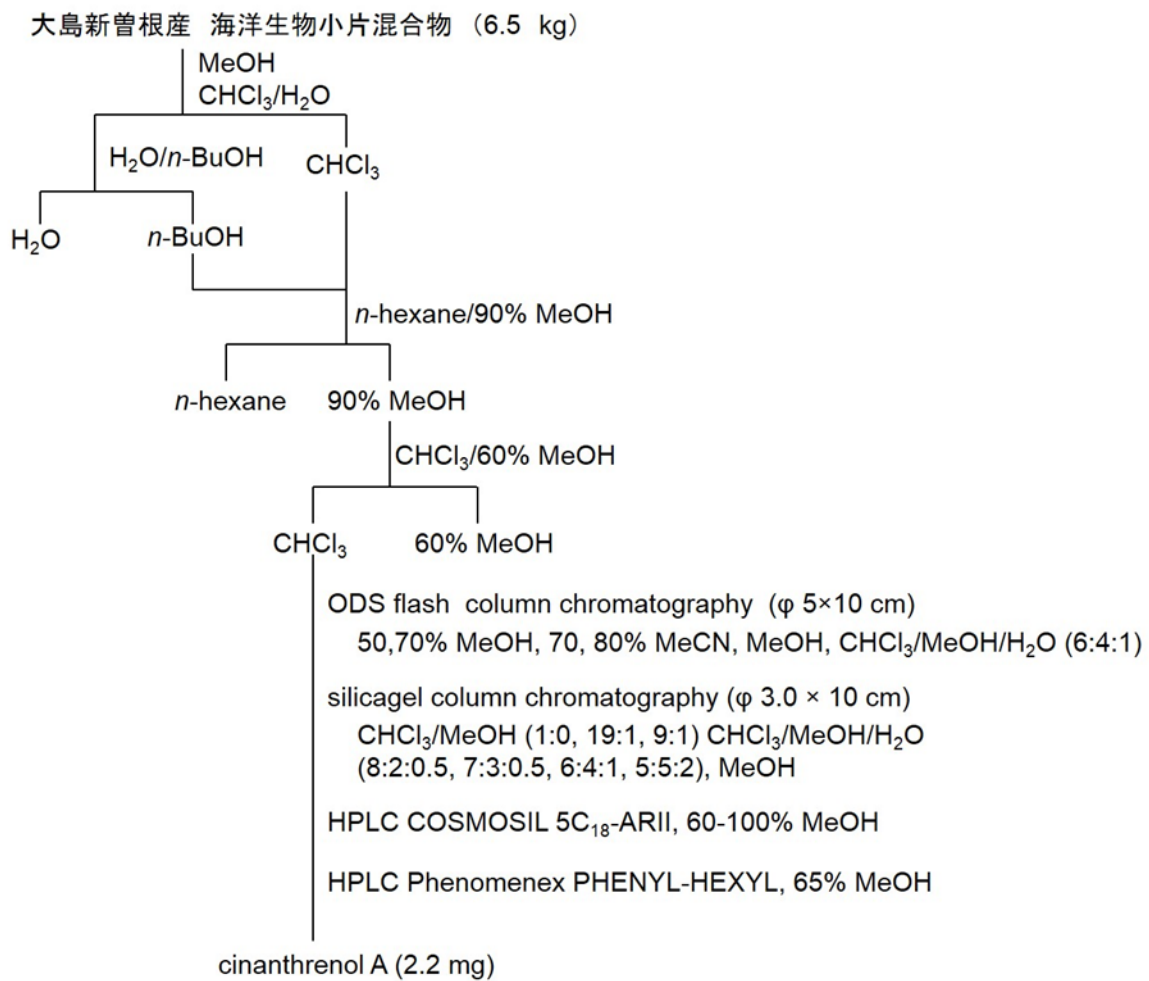
## 2.2. 実験

### 2.2.1. 深海生物のドレッジ採集

鹿児島県沖海底火山大島新曾根で、ドレッジにより深海生物の採集を行った (水深 140-160 m, 28.52.99N;129.33.05E)。分類された 39 種類の海洋生物と、分類不可能なサンプル小片混合物 6.5 kg を得た。

### 2.2.2. Cinanthrenol A の単離と精製

Cinanthrenol A の精製法を Figure 2.1 に示す。細胞毒性を指標にして、採集したドレッジサンプル小片混合物 (6.5 kg) のメタノール抽出物を、クロロホルムと水を用いて液液分配し、さらに有機層をブタノールと水で分画した。ブタノール層とクロロホルム層を合一した後、Kupchan 分画<sup>43</sup> にふし、ヘキサン層、クロロホルム層、60%メタノール層を得た。クロロホルム層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、最終的に 2 回の分取 HPLC (カラム 1; COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII, 溶出液 ; 60%メタノール, カラム 2 ; Phenomenex PHENYL-HEXYL, 溶出液 ; 65%メタノール) により精製し, cinanthrenol A を 2.2 mg 得た (収率  $3.4 \times 10^{-5}\%$ , yield based on wet weight)。



**Figure 2.1.** cinanthrenol A の単離スキーム

### 2.2.3. Cinanthrenol A の構造解析

Cinanthrenol A は、旋光度 $[\alpha]_D -11.6$  ( $c$  0.16, MeOH)を示す茶色粉末として得られた。その分子式は、高分解能 ESIMS 測定値 ( $[M-H]^-$   $m/z$  289.1235, calcd for  $C_{20}H_{17}O_2$  289.1229,  $\Delta +0.6$  mmu)により、不飽和度が 12 ある  $C_{20}H_{18}O_2$  と決定された。赤外分光スペクトルにおいて、cinanthrenol A は  $3392\text{ cm}^{-1}$  付近に極大吸収を有しており、分子内にヒドロキシ基が存在することが示唆された。紫外吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルにおいては、最大吸収波長が 270 nm, 最大蛍光波長が 380 nm 付近に観測されたことから、フェナントレン骨格の存在が示唆された<sup>44</sup>。

Cinanthrenol A の重ピリジン中における各種 NMR スペクトルを Table 1 に示す。<sup>1</sup>H NMR スペクトルでは、16 のシグナルが観測された。HMQC スペクトルデータと合わせて解析したところ、これらは  $-CH_3 \times 1$  ( $\delta_H$  1.33),  $\text{>CH-O-} \times 1$  ( $\delta_H$  4.92),  $-CH=$   $\times 7$  ( $\delta_H$  7.01, 7.55, 7.68, 7.87, 7.97, 8.59, 8.68),  $\text{>CH-} \times 1$  ( $\delta_H$  1.40), ジェミナル非等価な 2 組の  $CH_2$  プロトン ( $\delta_H$  1.19, 1.50, 3.65, 3.91), および 2H 分の交換性プロトンシグナル ( $\delta_H$  6.49, 12.04)に分類できた。また、本化合物の重ピリジン中における <sup>13</sup>C NMR スペクトルでは、高分解能 MS で推定された分子式と矛盾しない全部で 20 本のシグナルが観測された。これらのシグナルは、HMQC スペクトルの解析によって  $-CH_3 \times 1$  ( $\delta_C$  14.4),  $-CH_2-$   $\times 2$  ( $\delta_C$  19.6, 41.3),  $\text{>CH-} \times 1$  ( $\delta_C$  22.0),  $\text{>CH-O-} \times 1$  ( $\delta_C$  71.8),  $\text{>C<} \times 1$  ( $\delta_C$  38.5),  $-CH=$   $\times 7$  ( $\delta_C$  107.5, 117.8, 117.9, 120.4, 122.8, 127.6, 130.8),  $\text{>C=}$   $\times 6$  ( $\delta_C$  120.8, 128.6, 129.3, 133.5, 137.1, 146.0),  $=C-O-$   $\times 1$  ( $\delta_C$  158.2)と帰属した。ここまでで分子式から求められる不飽和度 12 のうち 7 つを消化することから、本化合物は 5 つの環構造を有していると示唆された。



**Table 1.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of cinanthrenol A in pyridine- $d_5$ 

position	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY	HMBC	NOESY
1	8.59 d (2.25)	107.5	H-3	C-2, C-3, C-5, C-9	H-11
2		158.2			
2-OH	12.04 s				
3	7.55 dd (8.5, 2.25)	117.8	H-4, H-1	C-1, C-5	H-4
4	7.97 d (8.6)	130.8	H-3	C-1, C-2, C-6, C-10	H-3, H-6
5		125.8			
6	7.87 d (8.85)	127.6	H-7	C-5, C-7, C-8, C-10	H-4, H-7
7	7.68 d (8.85)	120.4	H-6	C-5, C-6, C-8, C-9, C-14	H-6, H-15 $\alpha$
8		129.3			
9		128.6			
10		133.5			
11	8.68 d (8.6)	122.8	H-12	C-8, C-10, C-13	H-1, H-12
12	7.01 d (8.6)	117.9	H-11	C-9, C-11, C-14, C-17	H-11, H-18b, H-19
13		146.0			
14		137.1			
15 $\alpha$	3.91 dd (16.6, 7.6)	41.3	H-15 $\beta$ , H-16	C-13, C-14, C-16, C-17	H-7, H-15 $\beta$ , H-16
15 $\beta$	3.65 dd (16.6, 4.2)		H-15 $\alpha$ , H-16	C-13, C-14, C-16, C-17	H-15 $\alpha$
16	4.92 dd (7.6, 4.2)	71.8	H-15 $\alpha$ , H-15 $\beta$		
16-OH	6.49 d (5.8)				
17		38.5			
18a	1.50 dd (5.9, 5.0)	19.6	H-18b, H-20	C-13, C-16, C-17, C-19, C-20	H-18b, H-19
18b	1.19 dd (9.0, 5.0)		H-18a, H-19	C-13, C-17, C-20	H-12, H-18a, H-19
19	1.40 dd (9.0, 5.9)	22.0	H-18b		H-12, H-18b
20	1.33 s	14.4	H-18a, H-18b	C-17, C-18, C-19	H-16, H-18a, H-18b

つづいて, cinanthrenol A の COSY スペクトルを解析したところ, 5つのスピンの系 A~E が導きだされた。これらのスピンの系は, 以下のように HMBC 相関をもとにつなぎ合わせた。

平面構造を Figure 2.2 に示す HMBC 相関が, H-1 から C-5 と C-9, H-3 から C-5, H-4 から C-6 と C-10, H-6 から C-8 と C-10, H-7 から C-5, H-11 から C-8, C-10, C-13, そして H-12 から C-9 と C-14 で観測されたことから, スピンの系 A, B, C は4つの4級炭素 C-5, C-8, C-9, C-10 を介して繋がったフェナントレン骨格の部分由来であると明らかになった。このことは, UV 吸収波長が  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 230.2, 263.2, 271.4, 311.2, 328.4, 344.2 nm であることから支持された<sup>45</sup>。一方, 残りの不飽和度は2となることから, さらに2つの環構造が存在すると考えられた。H-15, H-18, H-20 から C-17 への HMBC 相関より, スピンの系 D と E が C-17 を介して結合しており, メチルシクロプロピルの存在が明らかとなった。また, H-18 から C-13, H-12 から C-17 への HMBC 相関より, C-13 と C-17 は結合していることを明らかにし, H-15 から C-13, C-14 への HMBC 相関より五員環の存在が判明したことで, 全体の不飽和度を満たすことができた。以上の結果より, cinanthrenol A の平面構造を明らかにした (Figure 2.2)。

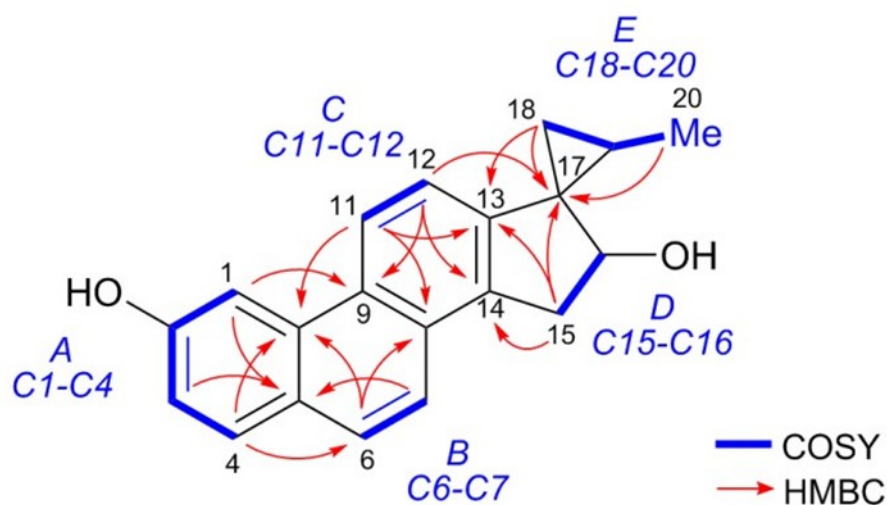


Figure 2.2. Cinanthrenol A の COSY および HMBC 相関

#### 2.2.4. Cinanthrenol A の相対配置

Cinanthrenol A に含まれる 3 つの不斉中心の相対配置は、NOESY スペクトル解析により帰属した。H-12 が H-18b と H-19 の双方に NOESY 相関を示したことから、これら 3 つのプロトンはシクロプロパン系の同じ平面側に位置していることを示唆した。反対に、H-16 と H-20 の間の NMR 相関から、それらの 4 つのプロトンはシクロプロパン環の反対側に位置していた。H-12 と H-20 の NOESY 相関が認められないことを併せて考えると、cinanthrenol A の相対配置は  $16S^*, 17S^*, 19S^*$  と帰属した (Figure 2.3)。

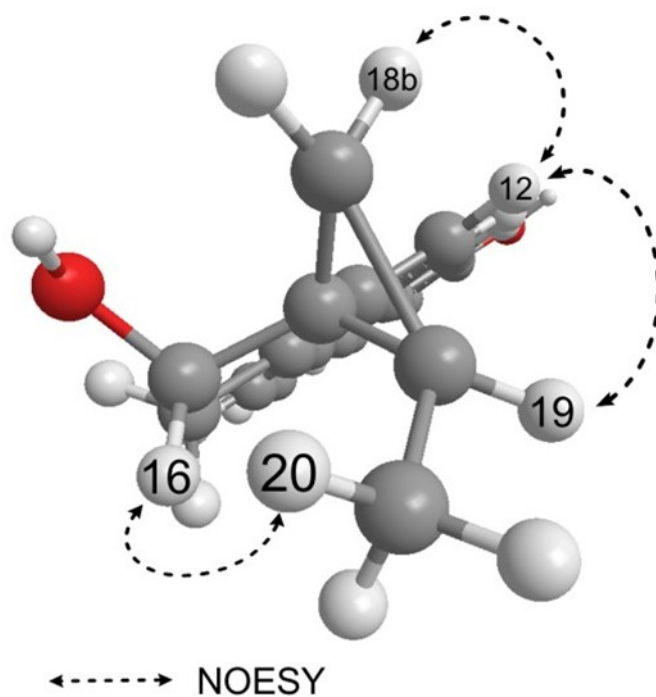
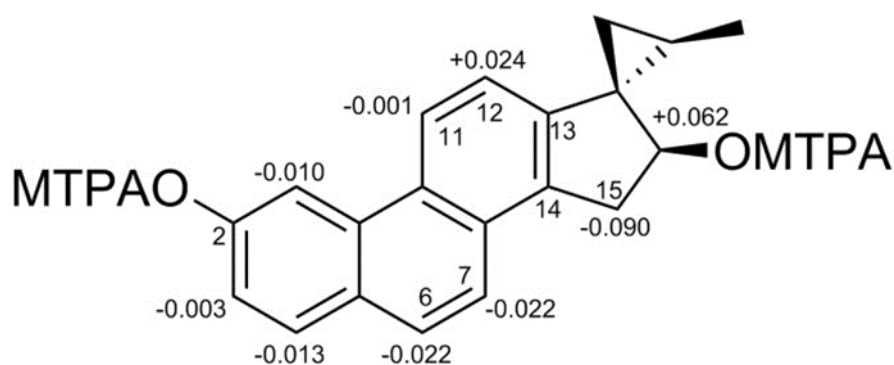


Figure 2.3. Cinanthrenol A の NOESY 相関

## 2.2.5. Cinanthrenol A の絶対配置

本化合物の絶対配置は改良 Mosher 法<sup>46, 47</sup>により決定することができた。*R*-(-)- および *S*-(+)-MTPA chlorides を用いた cinanthrenol A のエステル化反応により, cinanthrenol A の *S*- および *R*-MTPA をそれぞれ誘導した。これらエステル体から得られるプロトンシグナルのシフト値差を分析することで, C-16 の絶対配置は *S* 体と決定した。よって, 本化合物の絶対配置は 16*S*,17*S*,19*S* と決定した (Figure 2.4)。



**Figure 2.4.** Cinanthrenol A の *S*/*R*-MTPA エステル体のプロトンシフト値差

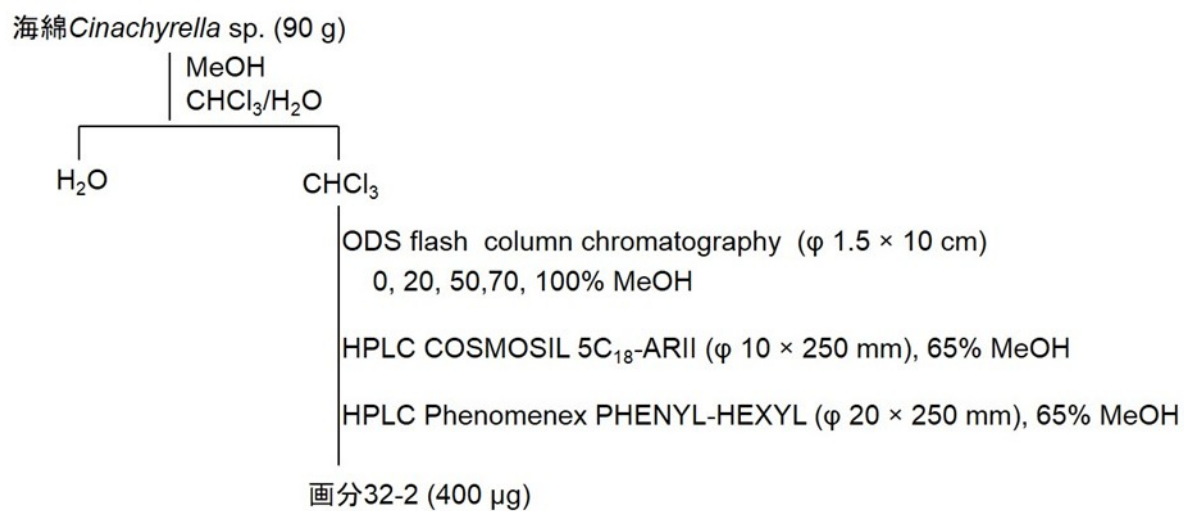
## 2.2.6. Cinanthrenol A を含む海洋生物の同定

本化合物を含む海洋生物を同定するため、シナントレン骨格に特徴的な蛍光波長 (ex 270, em 380 nm)を用いることとした。同じドレッジ採集で分類された 39 種のサンプルの抽出物について、蛍光検出による HPLC 分析を行ったところ、海綿 *Cinachyrella* sp. (Figure 2.5)の抽出物についてのみ、本化合物と同じ保持時間を有するピークが確認された。



**Figure 2.5.** 海綿 *Cinachyrella* sp.

そこで、海綿 *Cinachyrella* sp. (90 g, wet weight)から cinanthrenol A の探索を試みることにした。精製スキームを Figure 2.6 に示す。本海綿のメタノール抽出物を、クロロホルムと水により液液分配し、得られたクロロホルム画分を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーに付した。最終的に 2 回の分取 HPLC (カラム 1; COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII, 溶出液; 65%メタノール, カラム 2; Phenomenex PHENYL-HEXYL, 溶出液; 65%メタノール)により精製し、画分 32-2 を 400 μg 得た。得られた画分 32-2 と cinanthrenol A の MS および NMR スペクトルを比較したところ、本化合物を含有する海洋生物は海綿 *Cinachyrella* sp. と判明した。



**Figure 2.6.** 海綿 *Cinachyrella* sp.からの精製スキーム

### 2.2.7 Cinanthrenol A の毒性試験結果

Cinanthrenol A は、ヒト子宮頸部腫瘍細胞株 HeLa 細胞に対し 4.5 µg/m, マウス白血病細胞株 P-388 細胞に対し 0.4 µg/mL の毒性を示した。

### 2.3. 結言

Cinanthrenol A は芳香環化されたステロイド構造をとり、フェナントレン骨格と spiro[2,4]heptane を含む。ウミヤツメから 2013 年に単離報告された hexahydro-phenanthrene sulfate である petromyzonin<sup>48</sup> は天然由来のフェナントレン誘導体としては植物成分として報告例があるのみであり<sup>49-51</sup>、本化合物は、フェナントレン骨格を有するはじめての海洋天然化合物である。Cinanthrenol A の生合成経路は、parathiosteroid A<sup>52</sup>、もしくは sokodoside B<sup>53</sup> に似た経路をとると考えられた。Cinanthrenol A はマウス白血病細胞株 P-388 およびヒト子宮頸部腫瘍細胞株 HeLa 細胞に対し、それぞれ IC<sub>50</sub> 4.5 および 0.4 μg/mL の毒性を示した。

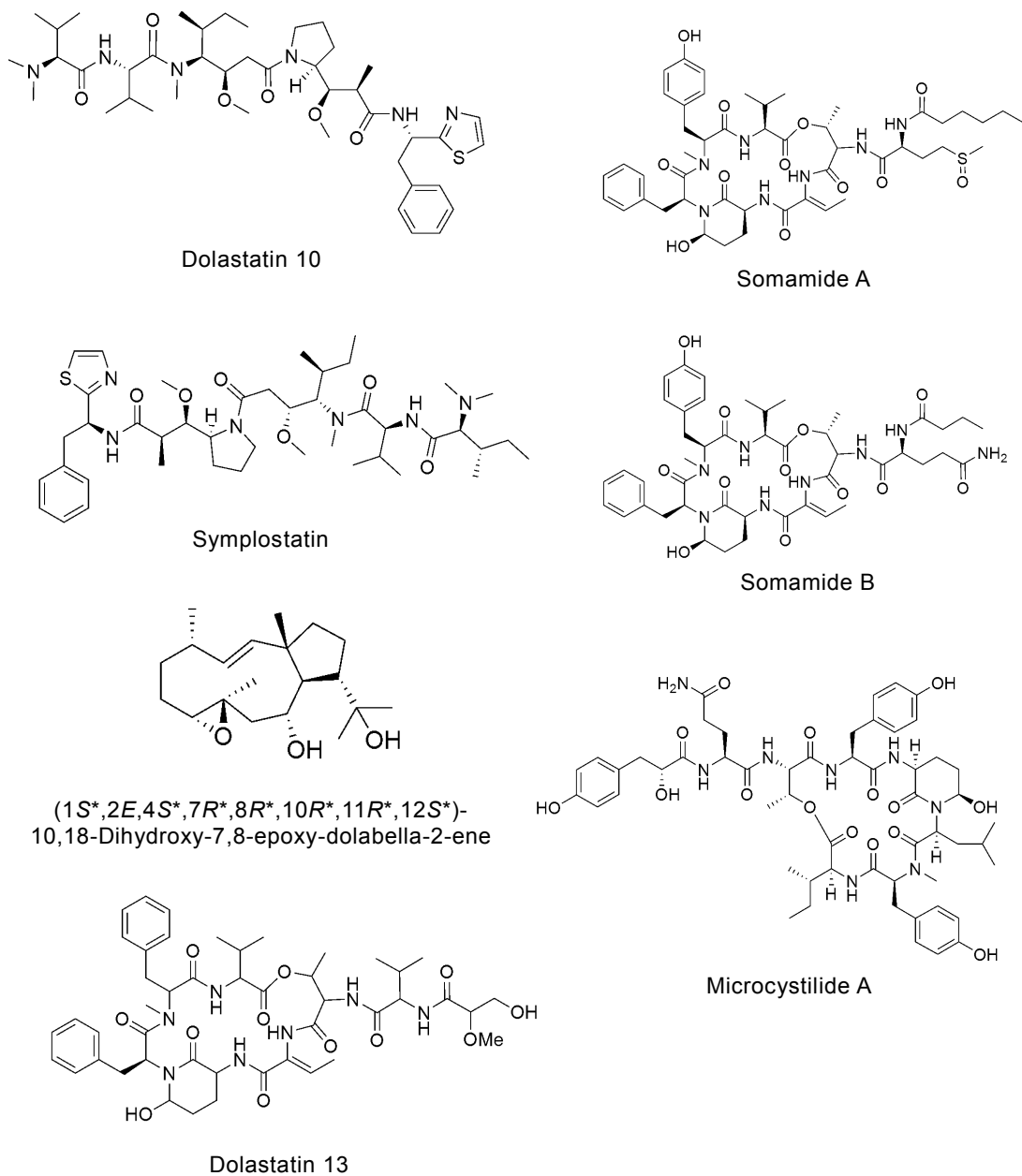
本研究では、通常の探索方法とは異なり、化合物を精製してから含有生物を同定する逆探索的ともいえる手法をとった。もし、通常の方法で分類した海綿から cinanthrenol A を探索していたら、本化合物は 400 μg しか単離できていないことから、構造決定は不可能であったと考えられることから、新規化合物探索における本手法の有効性を実証できたと考える。

## 第3章 Dolabellol A に関する研究

### 3.1. 研究背景

大型海洋軟体動物タツナミガイ *Dolabella auricularia* には, dolastatin 類と総称される細胞毒性ペプチド群が含まれていることが知られている。このうち 1987 年に単離された Dolastatin 10<sup>54</sup> のアナログ化合物は, 抗 CD30 モノクローナル抗体を結合させることによって, ホジキンリンパ腫および未分化大細胞型リンパ種の分子標的治療薬 brentuximab vedotin として FDA によって 2011 年に承認されている<sup>55</sup>。その後, 2001 年に海洋シアノバクテリア *Symploca* sp. から Dolastatin 10 が単離され, 食物に付着したシアノバクテリアを *D. auricularia* が摂取することで Dolastatin 10 を蓄積することが示唆されている<sup>56</sup>。*D. auricularia* から単離された二次代謝産物の例としては, その他 somamides<sup>57</sup>, symplostatin<sup>58</sup>, dolabellanes<sup>59-64</sup>, microcystilide A<sup>65</sup>, dolastatin 13<sup>57</sup>などがあげられ, これらのなかでもハロゲン化ジテルペンの化学骨格は *D. auricularia* が摂食する大型紅藻に含まれる化合物に特徴的であることから, その起源が注目されている。通常, ジテルペンの構造決定は比較的容易であるが, ハロゲンやヒドロキシ基で複数置換された場合はそれらの置換基の化学シフトが似かよってくるため, MS および NMR 分析のみによる構造決定は困難となる。今回, 新しく単離したハロゲン化ジテルペン dolabellol A は, obtusadiol<sup>66</sup> と共通の化学骨格を有しており, 塩素, 臭素, ヒドロキシ基によって連続的に置換された部位を含んでいるため, その置換基パターンと立体配置の決定には, 重水素置換実験と, エポキシ化反応による化学変換を必要とした。さらに X 線結晶解析により絶対配置を含めた全構造の決定を行った。





**Figure 3.1.** *Dolabella auricularia* から単離された天然化合物

## 3.2. 実験

### 3.2.1. タツナミガイ *Dolabella auricularia* の採集

熊本県天草諸島の沿岸 (32°8'38"N, 129°58'34"E) で *Dolabella auricularia* (855g, wet weight)を採集し、すぐに冷凍した。

### 3.2.2. Dolabellol A の単離と精製

Dolabellol A の精製方法を Figure 3.2 に示す。細胞毒性を指標として、冷凍された *D. auricularia* (855 g) をメタノールおよび  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (70/30/5) で抽出し、クロロホルムと水を用いて液液分配し、さらに有機層を Kupchan 分画<sup>43</sup> に付し、*n*-ヘキサン層、クロロホルム層、60%メタノール層を得た。細胞毒性を示したクロロホルム層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィーで分画した。最終的に4回の分取 HPLC により精製したところ、毒性はないものの、きれいな単離ピークを示した画分から白色粉末の dolabellol A を 4.9 mg (収率  $5.7 \times 10^{-4}$  %, yield based on the wet weight) 得た。

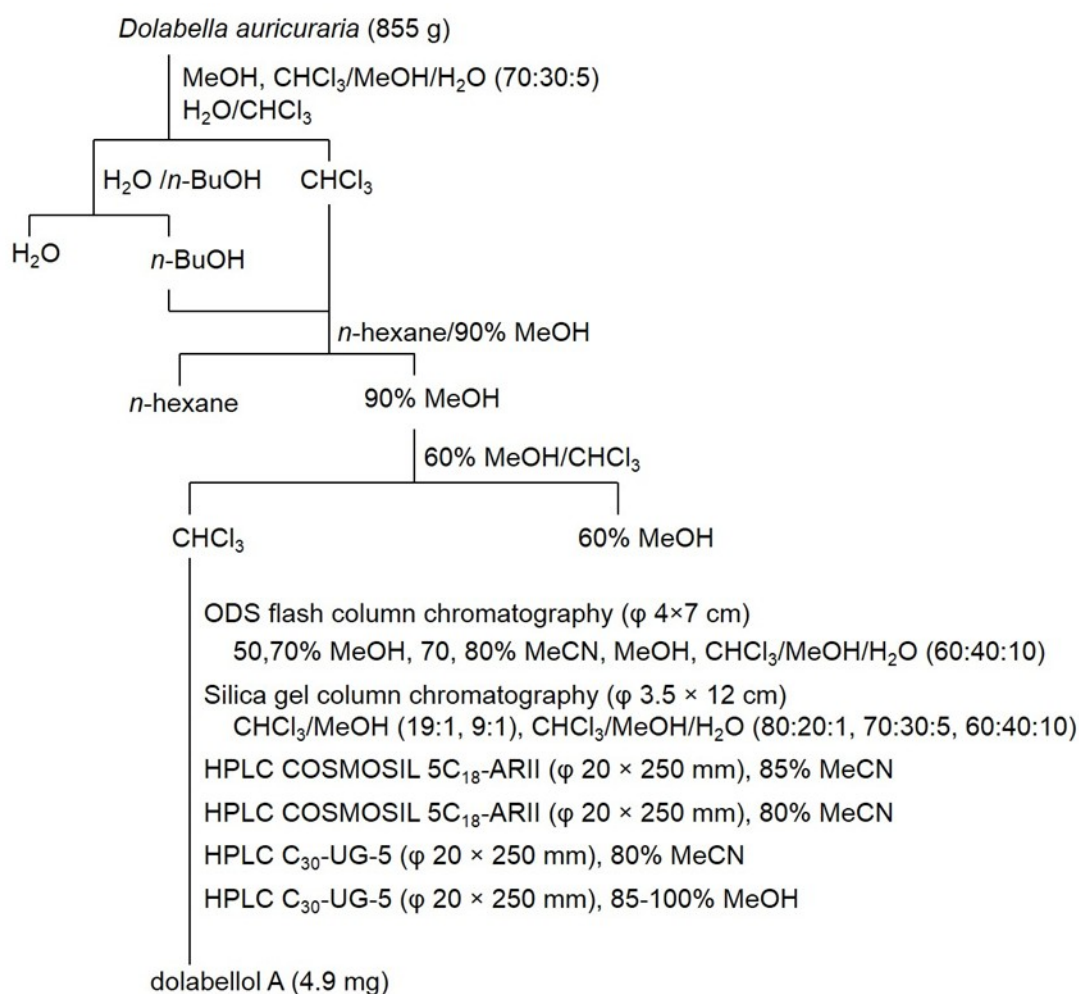


Figure 3.2. Dolabellol A の単離スキーム

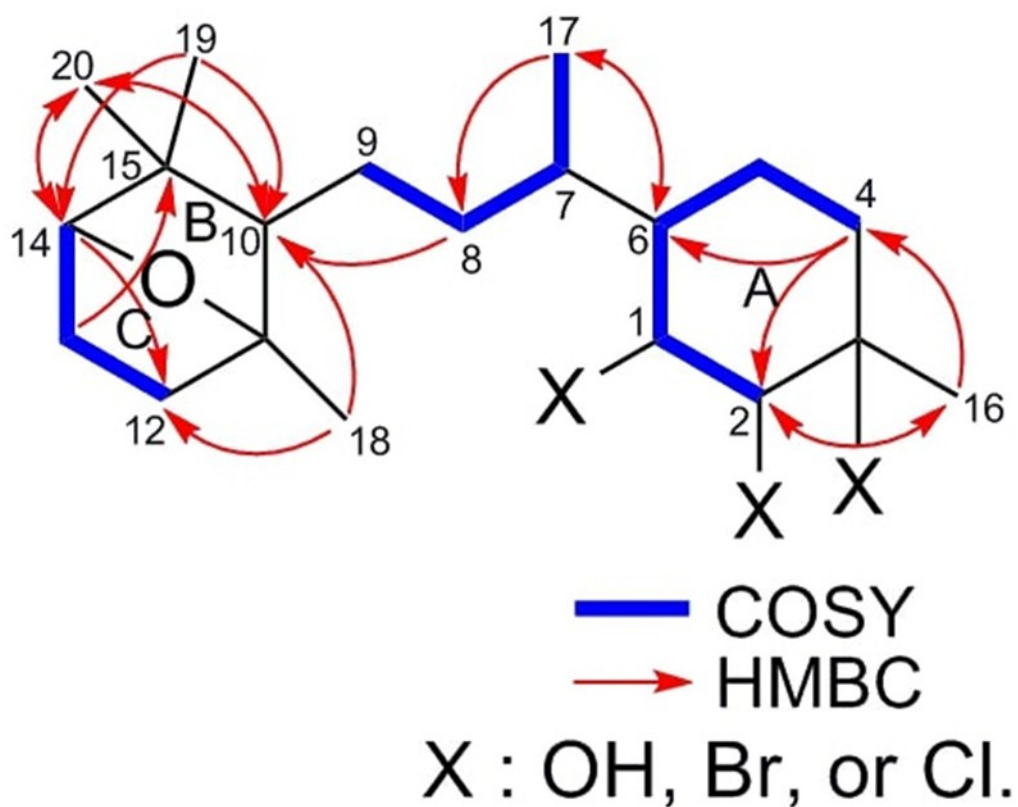
### 3.2.3. Dolabellol A の構造解析

Dolabellol A は、旋光度 $[\alpha]_D +22.9$  ( $c$  0.02, MeOH)を示す白色粉末として得られた。その分子式は、高分解能 ESIMS 測定 ( $[M + H - H_2O]^+$   $m/z$  403.1399, calcd for  $C_{20}H_{33}BrClO$  403.1398,  $\Delta$  +0.1 mmu)により、 $C_{20}H_{34}BrClO_2$ と推定された。LC-ESIMS 分析では、相対イオン強度が 3 : 4 : 1 ( $[M + H - H_2O]^+$  at  $m/z$  403/405/407)が認められたことから、塩素原子と臭素原子が 1 つずつ含まれていることがわかった。また、赤外分光スペクトルにおいて、dolabellol A は、 $3316\text{ cm}^{-1}$  付近に極大吸収を有しており、分子内にヒドロキシ基が存在することが示唆された。

Dolabellol A の重クロロホルム中における NMR スペクトルを Tabel 3 に示す。本スペクトルでは、20 本の炭素シグナルが観測された。DEPT スペクトルデータと合わせて解析し、その内訳は  $\text{>C<} \times 3$ ,  $\text{—CH—} \times 6$ ,  $\text{—CH}_2\text{—} \times 6$ ,  $\text{—CH}_3 \times 5$ であることがわかった。低磁場シフトした 5 つの  $sp^3$  炭素原子 ( $\delta_C$  88.3, 86.3, 75.1, 73.0, 70.3)は、酸素原子もしくは臭素原子、塩素原子のいずれかのヘテロ原子に結合した  $\text{>C<}$  が 2 つと  $\text{—CH—}$  が 3 つ存在することを示唆した。

$^1\text{H}$  NMR スペクトルには、4 つのシングレットメチルシグナル ( $\delta_H$  0.82, 1.02, 1.66, 1.34)と 3 つの低磁場シフトしたメチンシグナル ( $\delta_H$  3.50, 3.75, 4.25)が観測された。Dolabellol A の分子式からは不飽和度が 3 であることがわかるが、 $sp^2$  炭素および  $sp$  炭素が存在しないことから、分子内に 3 つの環構造を有していると推測された。分子に含まれるハロゲン原子は 2 つで、酸素原子は 2 つであり、低磁場シフトして炭素原子は 5 つであることから、分子内にエーテル結合の存在が示唆された。これは、波長  $1021\text{ cm}^{-1}$  の赤外分光スペクトル吸収が観測されたことから、その存在が支持された。COSY および HMQC スペクトルをもとに、3 つのスピンの系が帰属できた (Figure 3.3)。シクロヘキサン環の 1 つ (ring A; C1-C6)は、H-4b/C-2, H-4b/C-6, H-16/C-2 および H-16/C-4 間の HMBC 相関から導

いた。一方、二環性の 7-oxabicyclo[2.2.1]heptanes 部分 (ring B and C)は、H-13a/C-15, H-18/C-10,12, H-19/C-10,14, および H-20/C-10,14 間の HMBC 相関をもとに帰属できた。この環構造は 3',6'-epoxycycloaurapten<sup>67</sup> の <sup>13</sup>C NMR データと比較することでも確認できた。H-6/C-17 と H-8a/C-10 の HMBC 相関から、これら 2 つの部分構造は C7—C9 の結合部位を介して繋がられた。



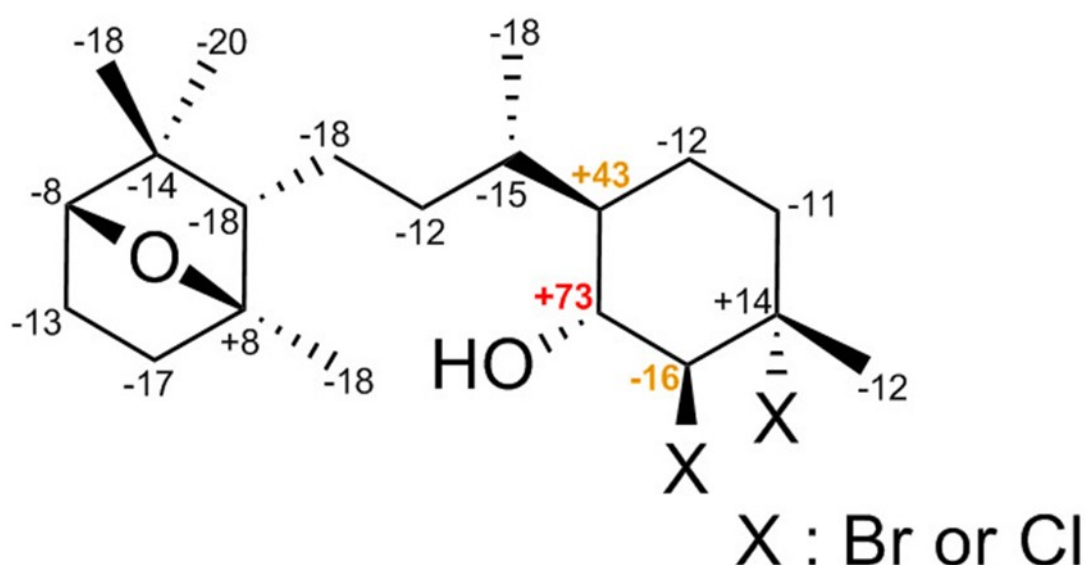
**Figure 3.3.** dolabellol A の COSY および HMBC 相関

**Table 3.**  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR data of dolabellol A in  $\text{CDCl}_3$ 

position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( $J$ in Hz)	HMBC
1	73.0	3.50 dd (10.0, 10.0)	C-2, C-6
2	75.1	4.25 d (9.8)	C-1, C-3, C-16
3	70.3		
4a	42.6	2.04 m	
4b		2.36 ddd (13.6, 3.1, 3.1)	C-2, C-3, C-6
5a	20.1	1.20 m	
5b		1.49 m	C-3
6	47.8	1.51 m	C-17
7	32.4	2.05 m	
8a	35.5	1.12 m	C-10
8b		1.23 m	
9a	25.6	1.56 m	C-15
9b		1.75 m	
10	57.5	1.16 m	C-11, C-15
11	88.3		
12a	28.9	1.22 m	
12b		1.56 m	C-14
13a	26.9	1.56 m	C-12, C-14, C-15
13b		1.75 m	
14	86.3	3.75 d (4.9)	C-10, C-11, C-12, C-20
15	41.9		
16	25.9	1.66 s	C-2, C-3, C-4
17	14.0	0.77 d (6.8)	C-6, C-7, C-8
18	21.7	1.34 s	C-10, C-11, C-12
19	20.1	0.82 s	C-10, C-14, C-15, C-20
20	32.7	1.02 s	C-10, C-14, C-15, C-19

### 3.2.4. 重水素置換実験によるヒドロキシ基の置換位置の決定

Ring A の C-1, C-2, C-3 に結合するヒドロキシ基, 臭素原子, 塩素原子の置換パターンは, H—D 交換による同位体効果<sup>68</sup> およびエポキシ化反応<sup>69</sup> により決定した。Dolabellol A を  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$  または  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  の溶媒に溶かし,  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを測定して  $^{13}\text{C}$  のケミカルシフトを比較したところ, C-1 の炭素原子に大きな差が認められたことから, C-1 にヒドロキシ基が結合しているとわかった (Figure 3.4)。



**Figure 3.4.** 重水素置換実験による Dolabellol A の  $^{13}\text{C}$  NMR のケミカルシフト値の変化 [in ppb,  $\Delta C = \delta_{\text{C}}(\text{H}) - \delta_{\text{C}}(\text{D})$ ].

### 3.2.5. エポキシ化反応によるハロゲン原子の置換位置決定

臭素原子と塩素原子の置換位置は, エポキシ化反応を用いることで決定した。ハロヒドリンはジエチルエーテル中 KOH 存在下で, ヒドロキシ基の酸素原子がハロゲン化炭素に求核攻撃する結果, 脱ハロゲンを伴ってエポキシを生じる。得られたエポキシ体について ESI-MS 分析したところ, 同位体強度が 3 : 1,  $m/z$  379/381 [ $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{ClO}_2 + \text{K}$ ]<sup>+</sup> のイオ

ンピークが認められたことから、臭素原子が水酸基のついた C-1 の隣の C-2 炭素原子に結合していたことが明らかになった。以上の結果から、dolabellol A の平面構造を、Figure 3.5 のように決定できた。

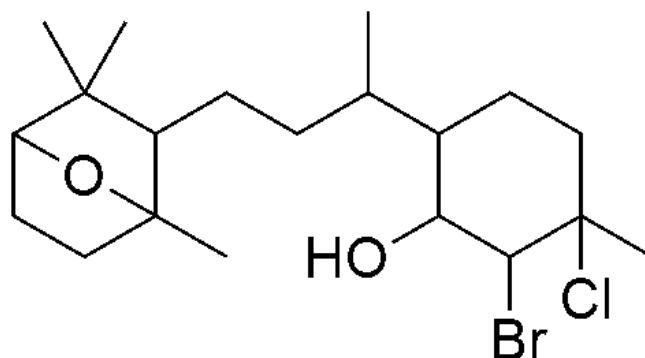


Figure 3.5. Dolabellol A の平面構造

### 3.2.6. Dolabellol A の相対配置

Dolabellol A の NOESY 相関を分析することで、各環状部分の相対配置については決定できた。しかしながら、2つの環状部分の相対配置を関連付けることができないため、化合物全体の相対配置を決定するには至らなかった (Figure 3.6)。

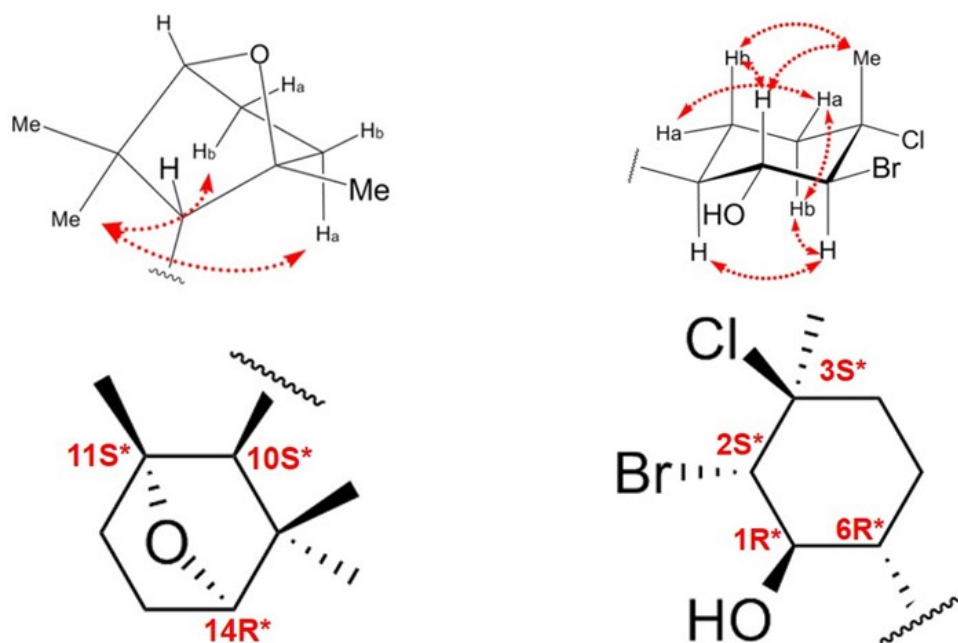


Figure 3.6. Dolabellol A の NOESY 相関および相対配置

### 3.2.7. Dolabellol A の X 線結晶構造解析

Dolabellol A の絶対配置を含めた全体構造を明らかにするため、本化合物の結晶化を試みた。まず本化合物を MeOH に溶解して $-30^{\circ}\text{C}$  まで冷却し、直後に減圧濃縮したところ、dolabellol A の結晶が析出した。この結晶について、X 線結晶構造解析を行ったところ、本化合物の置換基パターンを確認できたとともに、絶対配置も決定できた<sup>70, 71</sup>。すなわち、X 線結晶構造解析は Cu K $\alpha$  放射線を用いて行われ、臭素と塩素の異常散乱<sup>72</sup>によって、本化合物の絶対配置を  $1R,2R,3S,6R,7S,10S,11S,14R$  と決定することができた (Flack parameter of  $0.08 \pm 0.02$ , Figure 3.7)。

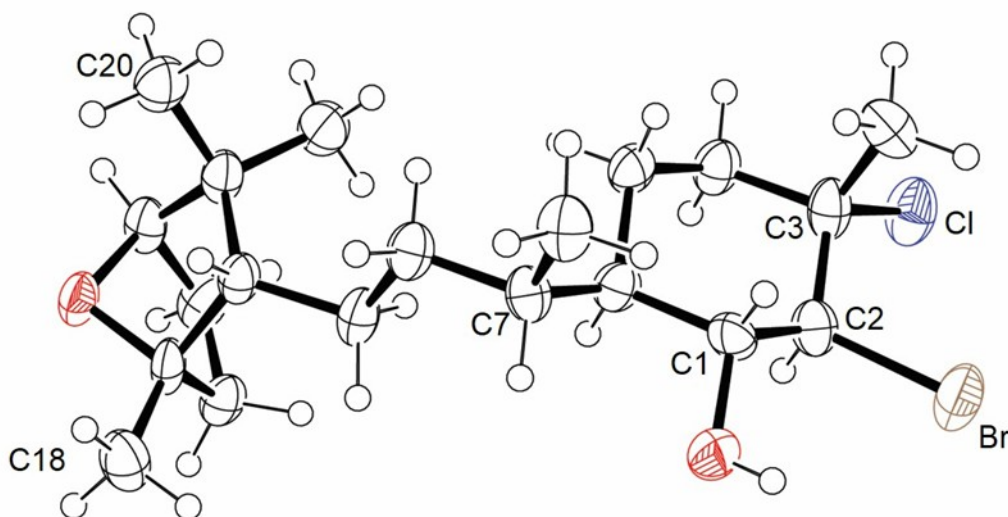


Figure 3.7. Dolabellol A の結晶構造の ORTEP 図

### 3.2.8. Dolabellol A の毒性試験結果

Dolabellol A は、ヒト子宮頸部腫瘍細胞株 HeLa 細胞およびマウス白血病細胞株 P-388 細胞に対し、 $10 \mu\text{g/mL}$  以下で毒性を示さなかった。



### 3.3. 考察

Dolabellol A は, obtusadiol, rogioldiol A<sup>73</sup>, laurenditerpenol<sup>74</sup> および 14-bromoobtus-1-ene-3,11-diol<sup>75</sup> らと構造的類似性があることから, その起源は *D. auricularia* が摂食している紅藻に由来すると考えられた。

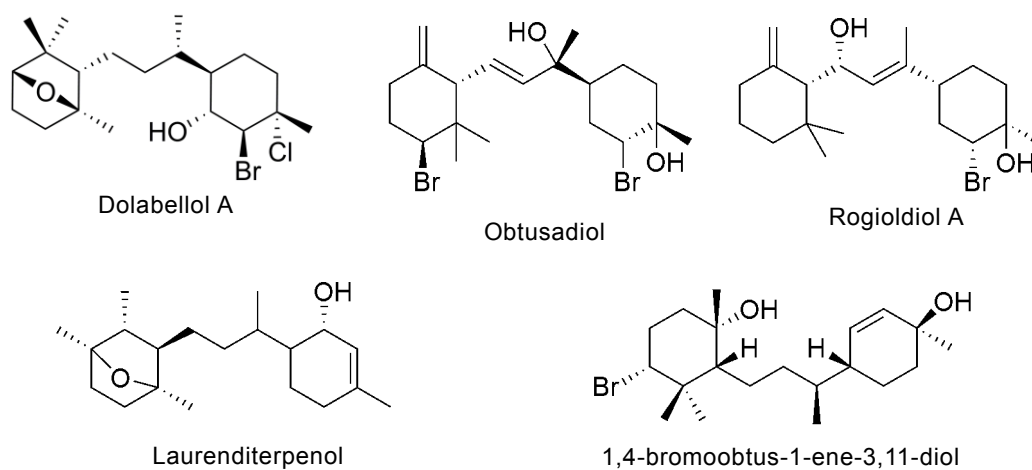


Figure 3.8. Dolabellol A の構造と類似性のある化合物

### 3.4. 結言

以上本章についてまとめる。新規ハロゲン化ジテルペン dolabellol A を単離し, その構造を分光学的手法, ハロヒドリンのエポキシ化反応および X 線結晶構造解析により決定した(Figure 3.9)。

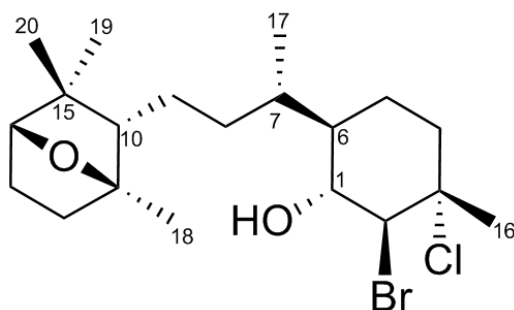


Figure 3.9. Dolabellol A の構造

## 第 4 章 Sameuramide A に関する研究

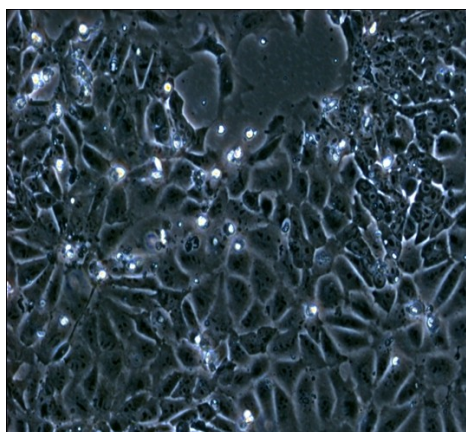
### 4.1. 研究背景

哺乳類の受精卵は、細胞分裂を始めて 4~5 日後に胚盤胞へと成長する。胚盤胞は、内部細胞塊とトロホブラスト (栄養外胚葉) と呼ばれる 2 つの細胞集団で構成されている。1981 年, Evans および Kaufmann と Martin によって, マウスの内部細胞塊から多能性を持つ細胞がはじめて *in vitro* で培養され, マウス ES 細胞 (胚性幹細胞) が樹立された<sup>76,77</sup>。1998 年には, 人工授精の余剰胚からヒト ES 細胞を培養し, 未分化の状態で維持することが可能となった<sup>78</sup>。ES 細胞の大きな特徴は, 未分化のまま増殖できる自己複製能と成体の全ての細胞に分化可能な幅広い分化能である<sup>79</sup>。通常, この幹細胞性を維持するためには, 白血病抑制因子 leukemia inhibitory factor (LIF)<sup>80,81</sup> を添加し, マウス胎仔線維芽細胞 mouse embryonic fibroblast (MEF)<sup>82</sup> をフィーダー細胞として培養することが望ましい。ES 細胞の形態的特徴としては, ドーム状のコロニーを形成することがよく知られているが, その意義については未だよくわかっていない。もし, ES 細胞のコロニー形成能を維持する低分子化合物を見つけることができれば, ES 細胞をより深く理解するためのバイオプローブとなりうる。そこで本研究では, ES 細胞のコロニーを維持する低分子化合物を探索することを目的とした。

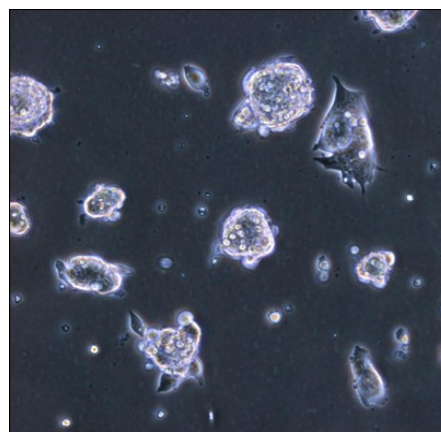
## 4.2. 実験結果

### 4.2.1. スクリーニング

マウス ES (mES)細胞のコロニー形成を評価するスクリーニングについて説明する。ゼラチンコートデッシュ上, LIF 存在下で培養した ES 細胞から LIF を除き, サンプル溶液を添加した。さらに 4 日間培養した後, 顕微鏡で ES 細胞がコロニーを維持しているかどうかを評価した (Figure 4.1)。海洋生物 750 サンプルをメタノールで抽出し, 水とクロロホルムにより液液分配し調製したスクリーニングサンプル 1500 検体についてコロニー形態を評価したところ, ウスボヤ(Didemnid)科ホヤ T07403 の抽出物に活性が認められた。



分化細胞



コロニー形成

**Figure 4.1.** 分化細胞とマウス ES 細胞のコロニー形成の顕微鏡写真

### 4.2.2. ウスボヤ (Didemnid)科ホヤの採集

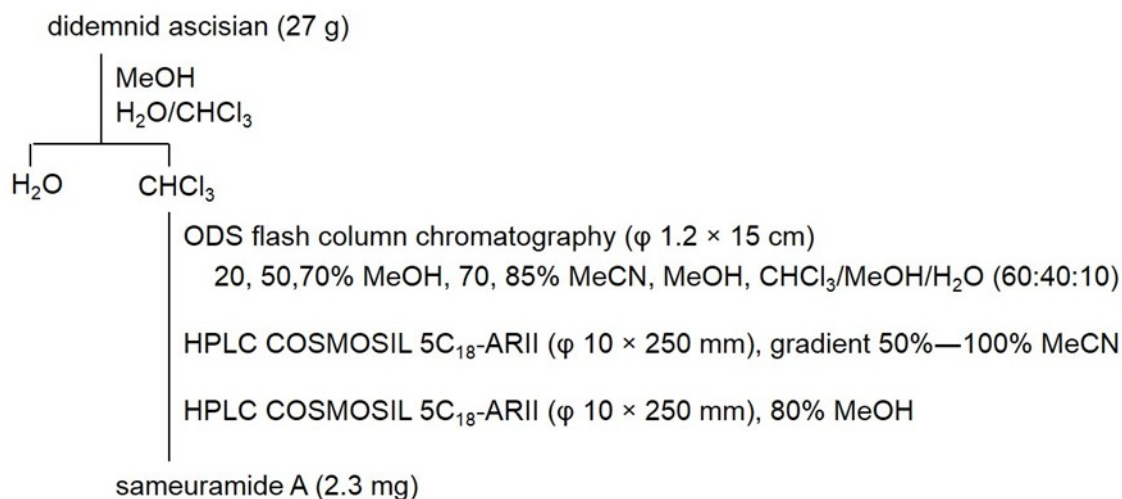
宮城県牡鹿半島の鮫浦湾 (38.37.14 N 141.50.63 E)で, スキューバダイビングにより手でウスボヤ (Didemnid)科ホヤを 27 g 採集した。



**Figure 4.2.** 鯨浦湾で採集したウスボヤ(Didemnid)科ホヤ

#### 4.2.3. Sameuramide A の単離と精製

Sameuramide A の精製法を Figure 4.3 に示す。ウスボヤ(Didemnid)科ホヤ 27 g のメタノール抽出物を水とクロロホルムで二層分配した。活性が認められた水溶性画分を、ODS カラム( $\phi$  1.2  $\times$  15 cm)を用いて、20, 50, 70%メタノール, 70, 85%アセトニトリル, メタノール,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (60:40:10)を溶出溶媒として分画した。さらに、70%アセトニトリル画分を、2 回の分取 HPLC (カラム 1 ; COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII, 溶出液 ; グラジエント 50-100% MeCN, カラム 2 ; COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII, 80% MeOH)に付し、黄色の粉末固体として, sameuramide A を 2.3 mg 単離した (収率  $8.5 \times 10^{-3}\%$  yield based on the wet weight)。



**Figure 4.3.** Sameuramide A の単離スキーム

#### 4.2.4. Sameuramide A の構造解析

Sameuramide A の分子式は、高分解能 ESIMS 測定値 ( $[M + H]^+$   $m/z$  1016.5558, calcd for  $C_{50}H_{77}N_7O_{15}$  1016.5550,  $\Delta +0.8$  mmu)により、 $C_{50}H_{77}N_7O_{15}$  と決定された。sameuramide A について赤外分光スペクトル分析したところ、1640, 1749, 3326, 3640  $cm^{-1}$  付近に極大吸収を有しており、分子内にアミド、エステル、アミン、ヒドロキシ基の存在が示唆された。

Sameuramide A の重アセトニトリル中における NMR スペクトルを Table 4 に示す。プロトン NMR スペクトルでは、以下のようにペプチドに特徴的なシグナルが観測された：4つの NH ダブルット ( $\delta_H$  6.75, 7.27, 7.41, 8.34), 3つの *N*-メチルシングレット ( $\delta_H$  2.63, 2.82, 3.20), 7つの  $\alpha$ -プロトンマルチプレット ( $\delta_H$  4.06 – 5.35), およびオーバーラップしたメチルダブルットとメチルトリプレット ( $\delta_H$  0.74 – 1.63)。 $^{13}C$  NMR スペクトルを分析したところ、特徴的な 10 個のエステル/アミドタイプのカルボニル炭素 ( $\delta_C$  167.5 – 175.9), 5つの酸素原子に結合した  $sp^3$  炭素 ( $\delta_C$  72.2, 73.2, 78.1, 78.6, 79.0), 1つの  $sp^3$  炭素 ( $\delta_C$  57.4)および末端の 1 置換ベンゼン環に特徴的な 4つの炭素シグナル ( $\delta_C$  127.7, 129.2  $\times$  2, 130.7  $\times$  2, 137.5)が認められた。次に HMBC 相関を分析したところ、*N*-メチルプロ

トン H<sub>3</sub>-22, H<sub>3</sub>-29, H<sub>3</sub>-40 からそれぞれ  $\alpha$ -炭素 C-20, C-27, C-37 への 3 結合を介した HMBC 相関が認められた。これら 3 つの *N*-メチルアミノ酸は, HMQC および COSY, HMBC スペクトルの解析から, *N*-methyl alanine (*N*-Me-Ala) 1 残基, *N*-methyl dehydroalanine (*N*-Me-Dha) 1 残基, および *N,O*-dimethyl threonine (*N,O*-Me<sub>2</sub>-Thr) 1 残基と決定できた。さらに, HMQC および COSY, HMBC スペクトルを詳細に解析した結果, alanine (Ala) 1 残基,  $\beta$ -hydroxyleucines ( $\beta$ -Hleu-1,  $\beta$ -Hleu-2,  $\beta$ -Hleu-3) 3 残基, および 2 つのプロピオニル基 (Pra-1, Pra-2) を同定できた。

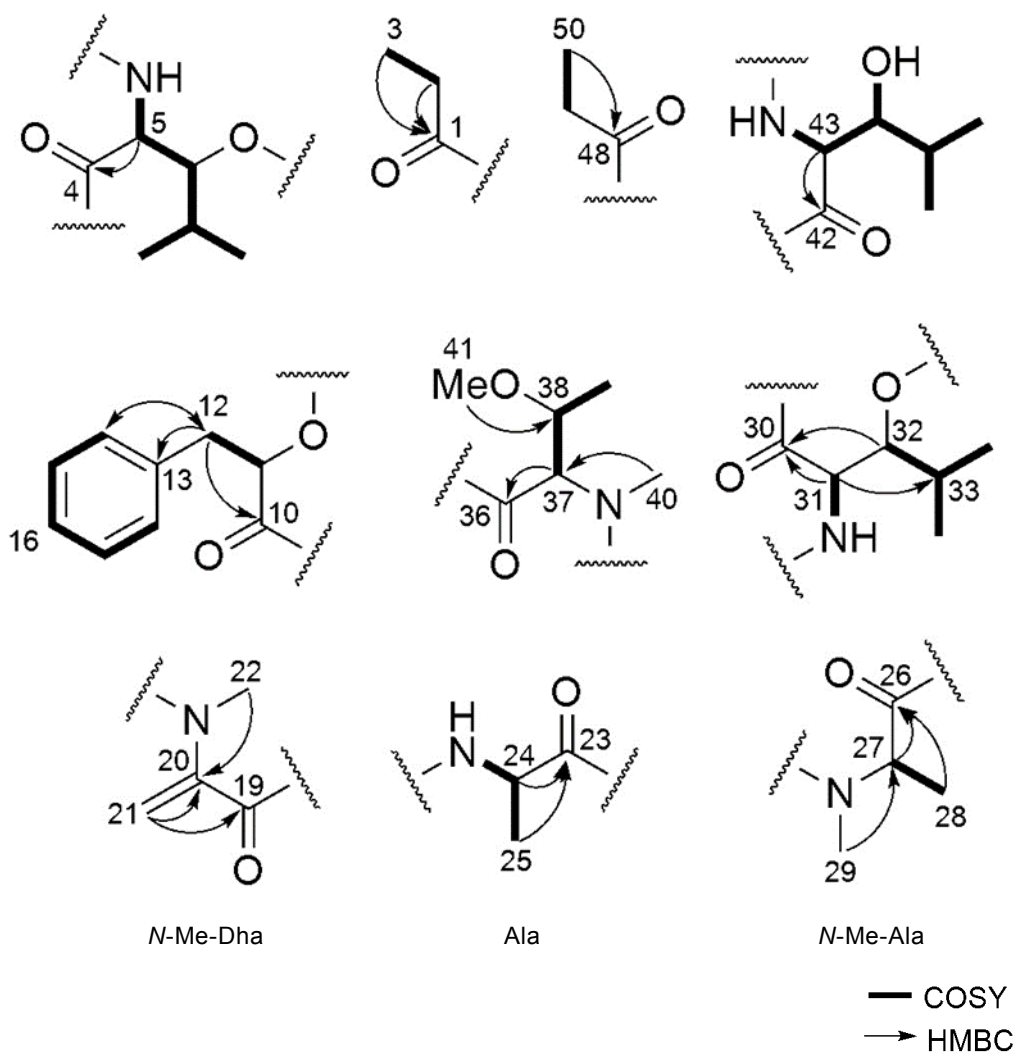
**Table 4.** NMR Spectral Data for Sameuramide A in CDCl<sub>3</sub> (600 MHz)

unit	position	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY	HMBC
Pra-1	1, CO		175.9		
	2	2.48, q (7.6)	29.4	H-3	C-1, C-3
	3	1.15, t (7.6)	10.8	H-2	C-1
$\beta$ -HLeu-1	4, CO		170.1		
	5, $\alpha$	5.14, dd (1.9, 10.0)	51.3	NH-5, H-6	C-1, C-4
	6, $\beta$	5.08, dd (1.9, 9.9)	78.6	H-5, H-7	C-36
	7, $\gamma$	1.82, m	29.9	H-6, H-9, H-8	C-6
	8, $\delta$	0.81, d (6.8)	19.4	H-7	C-6, C-7, C-9
	9, $\delta$	0.93, d (6.7)	19.1	H-7	C-6, C-7, C-8
	NH	7.41, d (10.1)		H-5	C-1
Pla	10, CO		169.0		
	11, $\alpha$	5.30, dd (3.5, 9.3)	72.2	H-12	C-13
	12, $\beta$	2.81, dd (9.3, 14.9)	37.3	H-11	C-10, C-11, C-13, C-14, C-18
		3.10, dd (3.5, 14.9)			
	13		137.5		
	14/18	7.28, m	130.7	H-15/17	C-12, C-15/17, C-16
	15/17	7.26, m	129.2	H-14/18, H-16, H-17/15	C-17/15
16	7.21, m	127.7	H-15, H-17	C-14, C-18	
<i>N</i> -Me-Dha	19, CO		164.7		
	20, $\alpha$		146.7		
	21, $\beta$	5.17, d (2.2)	107.5		C-19, C-20
		5.26, d (2.2)		C-19, C-20	
	22, NMe	3.20, s	37.0		C-10, C-20
Ala	23, CO		173.5		
	24, $\alpha$	4.83, m	46.1	NH-24, H-25	C-19, C-23, C-25
	25, $\beta$	1.28, d (6.5)	18.4	H-24	C-23, C-24
	NH	8.34, d (9.2)		H-24	C-19
<i>N</i> -Me-Ala	26, CO		171.2		
	27, $\alpha$	4.65, q (6.9)	57.4	H-28	C-23, C-26, C-28, C-29
	28, $\beta$	1.37, d (6.9)	14.1	H-27	C-26, C-27
	29, NMe	2.82, s	32.2		C-23, C-27
$\beta$ -HLeu-2	30, CO		172.6		

	31, $\alpha$	5.36, d (9.9)	47.7	NH-31	C-26, C-30, C-33
	32, $\beta$	5.25, d (9.8)	78.1	H-33	C-30, C-34, C-35, C-42
	33, $\gamma$	1.74, m	31.4	H-32, H-35, H-34	
	34, $\delta$	0.74, d (6.6)	18.5	H-33	C-32, C-33, C-35
	35, $\delta$	1.03, d (6.7)	19.6	H-33	C-32, C-33, C-34
	NH	6.75, d (9.9)		H-31	C-26
<i>N,O</i> -Me <sub>2</sub> -Thr	36, CO		167.5		
	37, $\alpha$	4.06, d (9.9)	65.5	H-38	C-30, C-36, C-38, C-39, C-40
	38, $\beta$	3.75, m	73.2	H-37, H-39	C-37, C-41
	39, $\gamma$	1.14, d (6.0)	16.7	H-38	C-37, C-38
	40, NMe	2.63, s	29.5		C-30, C-37
	41, OMe	3.35, s	57.4		C-38
$\beta$ -HLeu-3	42, CO		171.4		
	43, $\alpha$	4.36, dd (2.0, 7.8)	57.9	NH-43, H-44	C-42
	44, $\beta$	3.57, m	79.0	H-43, OH-44, H-45	
	45, $\gamma$	1.93, m	31.0	H-44, H-46, H-47	
	46, $\delta$	0.84, d (6.8)	18.7	H-45	C-44, C-45, C-47
	47, $\delta$	1.16, d (6.6)	20.8	H-45	C-44, C-45, C-46
	NH	7.27, d (7.8)		H-43	C-48
	OH	6.91, d (4.4)		H-44	C-45
Pra-2	48, CO		175.6		
	49	2.47, q (7.6)	29.2	H-50	C-48, C-50
	50	1.10, t (7.6)	10.3	H-49	C-48

HMBC スペクトルでは、*N*-Me-Dha のメチリデンプロトン ( $\delta_{\text{H}}$  5.17, 5.26)から  $\alpha$ -炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  146.7), カルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  164.7)への相関が認められた。また、*N,O*-Me<sub>2</sub>-Thr の *N,O*-ジメチル部位は、HMBC 相関 ( $\alpha$ -CH/NMe および  $\beta$ -CH/OMe)と  $\beta$ -C ( $\delta_{\text{C}}$  73.2)および OMe ( $\delta_{\text{C}}$  57.4)のケミカルシフトによって明らかになった。3 残基の  $\beta$ -hydroxyleucine のなかで、 $\beta$ -Hleu-3 のみヒドロキシ基 —OH を含むことが、ヒドロキシプロトン ( $\delta_{\text{H}}$  6.91)の存在によって確認され、他の 2 残基の  $\beta$ -Hleu についてはヒドロキシ基のプロトンシグナルが見られなかったため、これらはいずれもエステル結合を形成していると考えられた。なお、 $\beta$ -Hleu-2 においては、 $\alpha$ -炭素と  $\beta$ -炭素のつながりは HMBC 相関 ( $\alpha$ -H/ $\gamma$ -C,  $\beta$ -H/CO)により決定できたが、COSY スペクトルにおいては、 $\alpha$ -プロトンと  $\beta$ -プロトン間の相関は認められず、 $\alpha$ -CH 結合と  $\beta$ -CH 結合の二面角が 90°であることを示唆した。HMQC および COSY スペクトルからは、酸素原子が結合したメチンダブルレット (H-11,  $\delta_{\text{H}}$  5.30)がメチンダブルレット (H<sub>2</sub>-12,  $\delta_{\text{H}}$  2.81, 3.10)と相関したスピンの系が明らかとなった。また、メチレンプロトンシグナル (H<sub>2</sub>-12,  $\delta_{\text{H}}$  2.81, 3.10)から、非プロトン sp<sup>2</sup>-炭素 (C-13,  $\delta_{\text{C}}$  137.5)および sp<sup>2</sup>-メチン炭素 (C-14/18,  $\delta_{\text{C}}$  130.7)への HMBC 相関が認められたことから、末端にベンゼン環が結合した炭化水素鎖であることが判明した。最終的に、H<sub>2</sub>-12 ダブルダブルレットから C-10 カルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  169.0)への HMBC 相関から、ヒドロキシ酸である phenyllactic acid (Pla)と決定した (Figure 4.4)。





**Figure 4.4.** Sameuramide A のそれぞれの塩基構造

HMBC 相関を解析することで、7つのアミノ酸、1つのヒドロキシ酸、2つのプロピオン酸は、3つの大きなフラグメント；Pra-1- $\beta$ -Hleu-1 (fragment 1), Pla-Dha-Ala- $N$ -Me-Ala- $\beta$ -HLeu-2- $N,O$ -Me<sub>2</sub>-Thr (fragment 2), および Pra-2- $\beta$ -Hleu-3 (fragment 3) に集約できた。これら3つ fragments は  $N$ -メチル、アミド、 $\alpha$ -プロトンのいずれかから隣接した塩基のカルボニル炭素への HMBC 相関により構築した (Figure 4.5)。

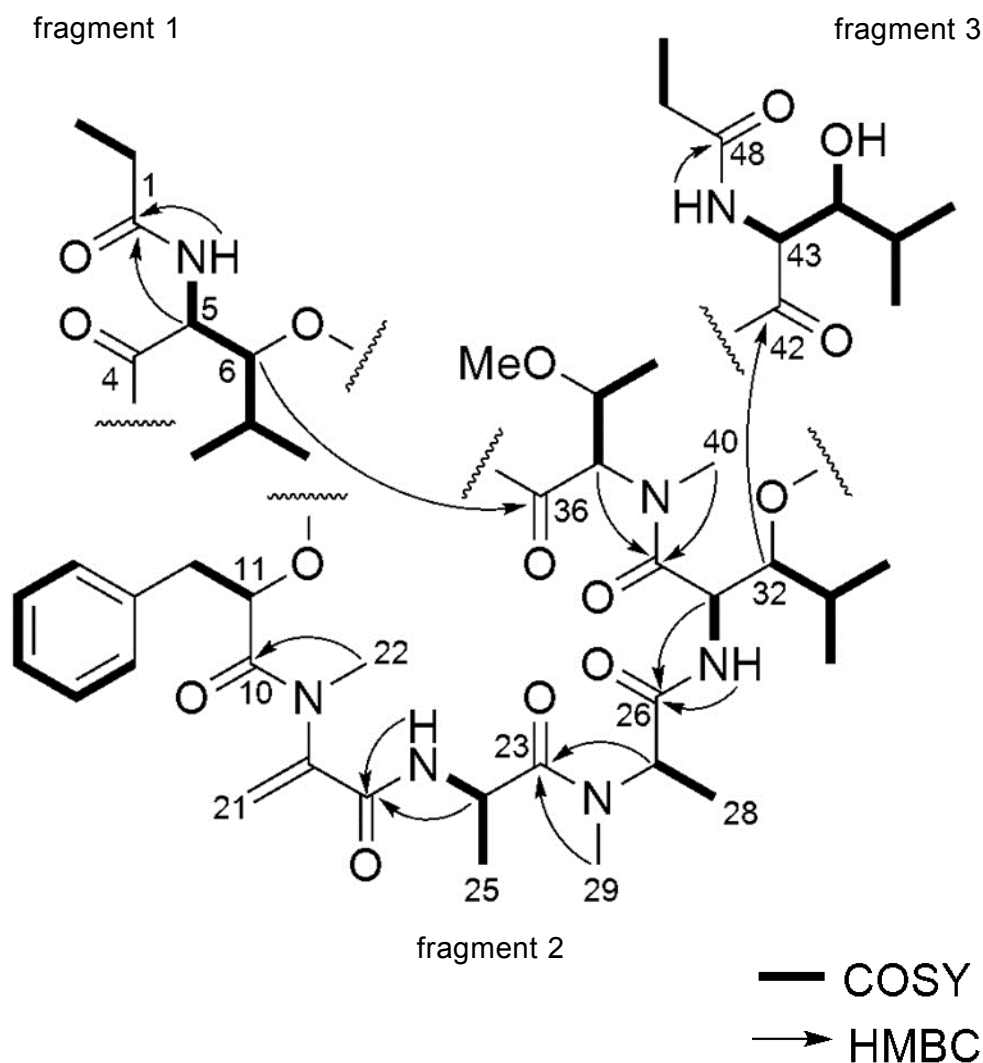
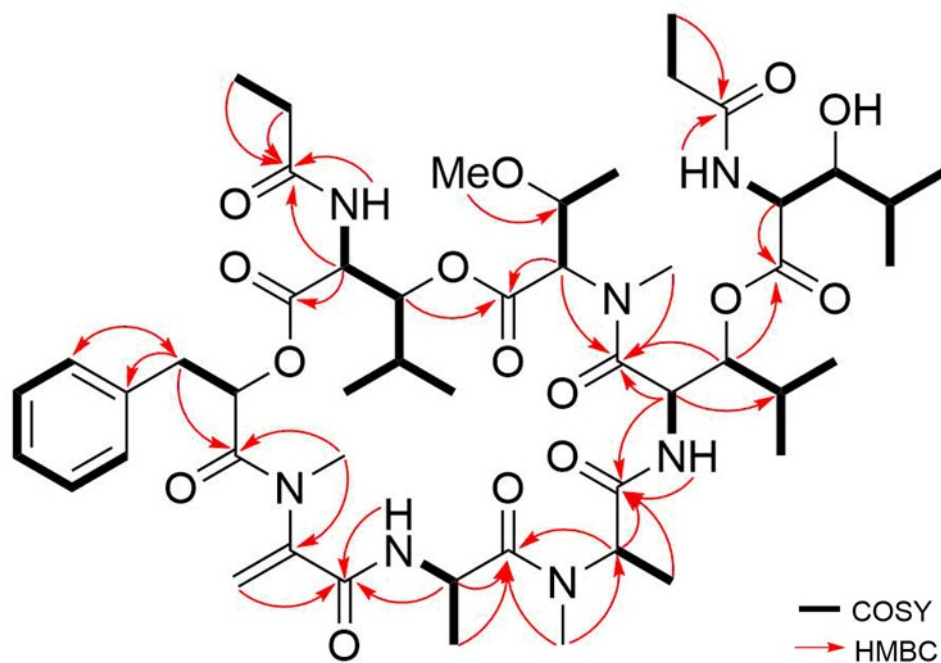


Figure 4.5. Sameuramide A の Key 2D NMR 相関

$\beta$ -Hleu-2/ $\beta$ -Hleu-3 と  $\beta$ -Hleu-1/*N,O*-Me<sub>2</sub>-Thr の間のエステル結合は、それぞれ  $\beta$ -Hleu-2 の  $\beta$ -H (H-32,  $\delta_{\text{H}}$  5.25) から  $\beta$ -Hleu-3 のカルボニル炭素 (C-42,  $\delta_{\text{C}}$  171.4), および  $\beta$ -Hleu-1 の  $\beta$ -H (H-6,  $\delta_{\text{H}}$  5.08) から *N,O*-Me<sub>2</sub>-Thr のカルボニル炭素 (C-36,  $\delta_{\text{C}}$  168.5) への HMBC 相関より決定した。最終的に残った fragment 1 と fragment 2 との結合は、分子式より考慮して, Pla のヒドロキシ基と  $\beta$ -Hleu-1 のカルボニル基でエステル結合によりつなげた。以上より, sameuramide A の平面構造を明らかにした (Figure 4.6)。

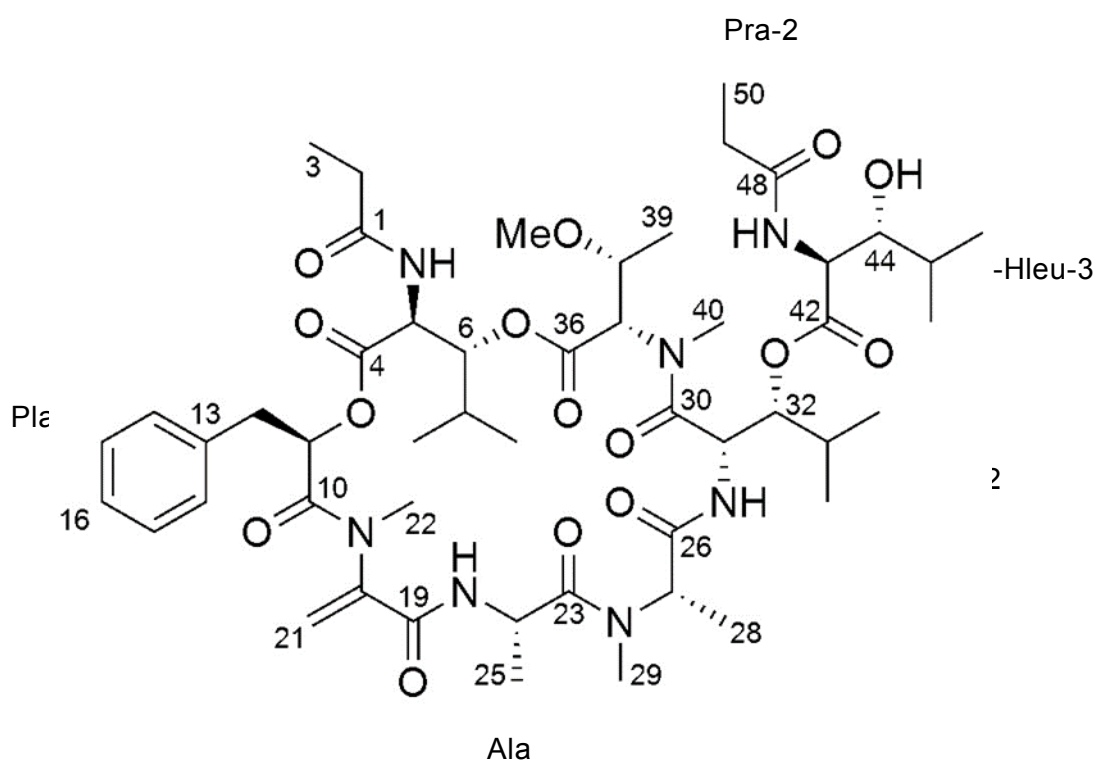


**Figure 4.6.** Sameuramide A の平面構造とその COSY および HMBC 相関

#### 4.2.5. Sameuramide A の絶対配置

Sameuramide A に含まれるアミノ酸の絶対配置については改良 Marfey 法<sup>83, 84</sup>を用いて決定した。本化合物 (0.4 mg) を 5M HCl, 100°C の条件下で酸加水分解した。得られた加水分解物に対して、L-および D-1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucineamide (L/D-FDLA, advanced Marfey's reagent) を用いて FDLA 体へと誘導し、RP18 HPLC 分析によって、標品のアミノ酸の D- および L-FDLA 誘導体と保持時間を比べることで絶対配置の決定を行った。Ala, N-Me-Ala, N,O-Me<sub>2</sub>threonine residue は L 体であると決定でき、3 つの  $\beta$ -Hleu は (2*S*,3*R*)- $\beta$ -Hleu と決定できた。

次に, phenyllactic acid (Pla)の絶対配置を決めることとした。Sameuramide A の酸加水分解物 0.3 mg から, Pla を逆相液体クロマトグラフィーにより精製し, *p*-bromobenzoyl chloride によって *p*-bromobenzoate 体へと誘導した。この *p*-bromobenzoate 体と標品である L-および D-Pla の *p*-bromobenzoate 誘導体を chiral-phase HPLC により分析し, それぞれの保持時間を比較した。その結果, sameuramide A の Pla は D 体であると決定できた。以上により, sameuramide A の絶対配置を決定できた (Figure 4.7)。

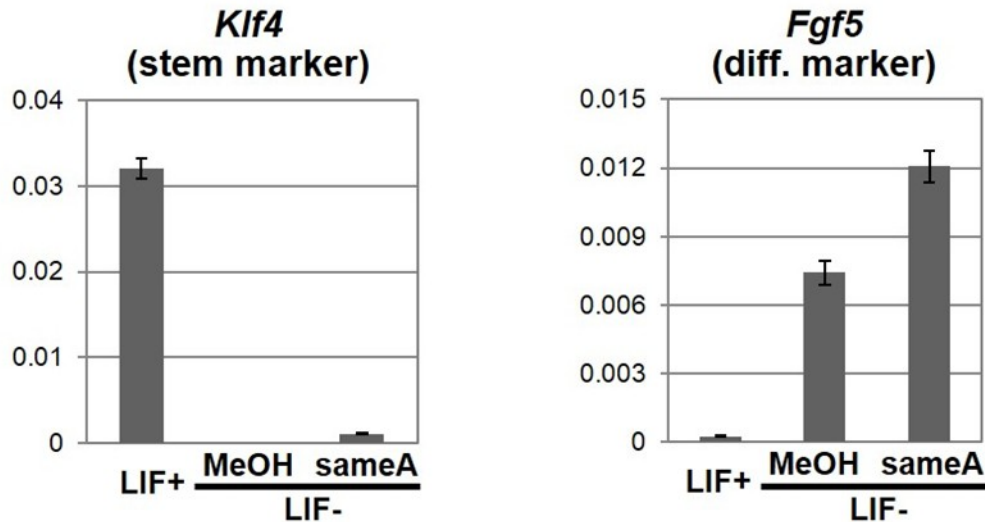
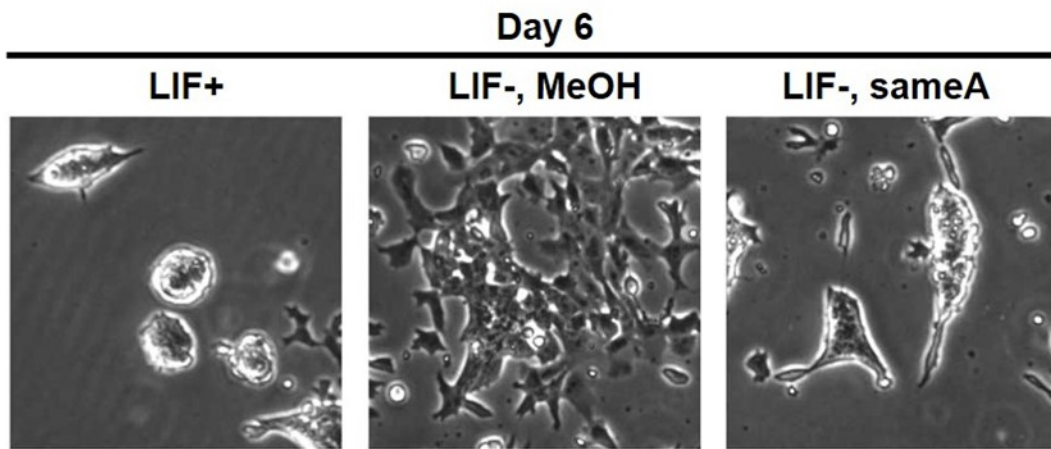
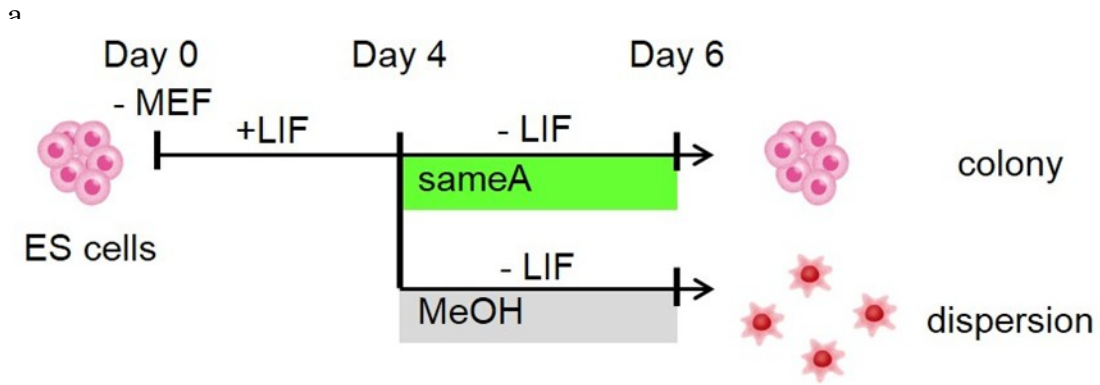


**Figure 4.7.** Sameuramide A 絶対配置

#### 4.2.6. Sameuramide A の生物活性

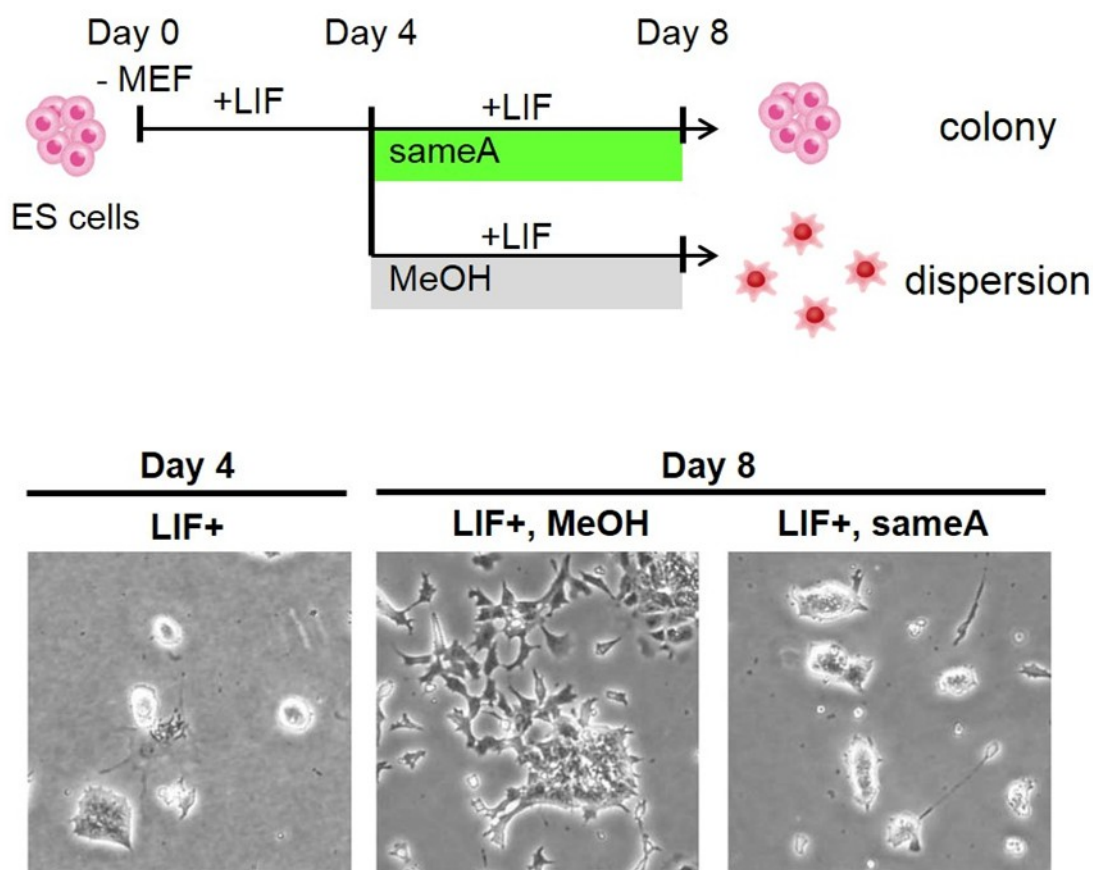
Sameuramide A (sameA)はマウス ES 細胞のコロニーを維持したが、幹細胞のもう一つの特徴である未分化状態を維持したかどうかは明らかになっていなかった。そこで、フィーダー細胞と LIF を除去し, sameuramide A 存在下で, マウス ES 細胞のコロニーが維持されるか否かを確認し, その未分化状態を検証した (Figure 4.8a)。

MEF 細胞を取り除いて 4 日間培養した後, LIF 無添加の培地で 2 日間培養するとマウス ES 細胞はコロニー形成を維持できなくなる (Figure 4.8b 真中)。MEF 細胞を取り除いて 4 日間培養した後, LIF 無添加の培地に sameuramide A を添加して 2 日間培養したところ, マウス ES 細胞様のコロニーが確認された (Figure 4.8b 右)。そこで, Sameuramide A によってマウス ES 細胞が未分化状態を維持しているのかを調べた。胚性マーカーの 1 つである *Klf4* の遺伝子発現レベルを分析したところ, 著しく減少していることが明らかになった。また, 分化マーカーの 1 つ, 原始外胚葉マーカー *Fgf5* については, LIF 存在下で培養したマウス ES 細胞と比較して顕著な発現が認められた。すなわち, LIF 非存在下, sameuramide A 存在下で 2 日間培養したマウス ES 細胞は, コロニーは維持するものの, 未分化状態を維持するわけではないことがわかった (Figure 4.8c)。



**Figure 4.8.** LIF 非存在下における、マウス ES 細胞に対する sameuramide A の影響  
a: アッセイスキーム図 b: マウス ES 細胞の顕微鏡写真 (6 日目) c: 6 日目の遺伝子発現解析 (*Klf4* and *Fgf5*), *Gapdh* の発現量を基に各遺伝子の発現量の比率を求めて縦軸とした,  $n = 3$ , mean  $\pm$  SD。

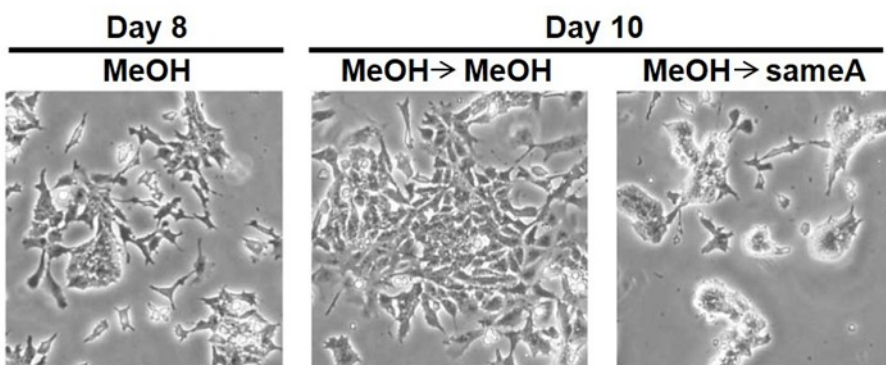
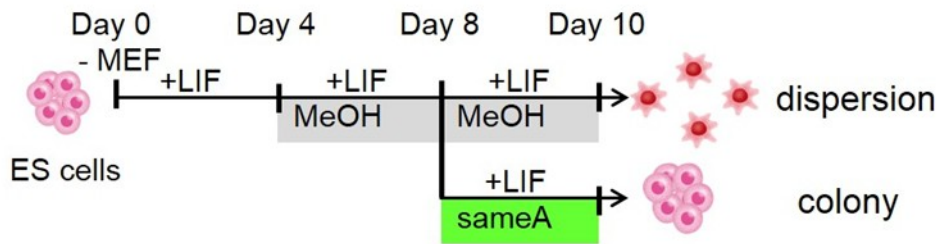
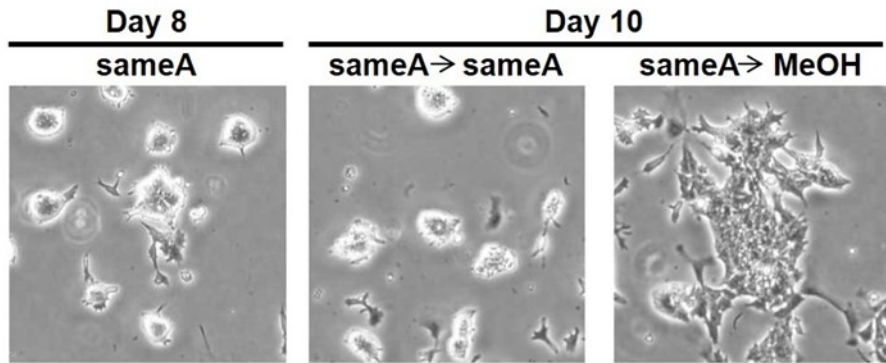
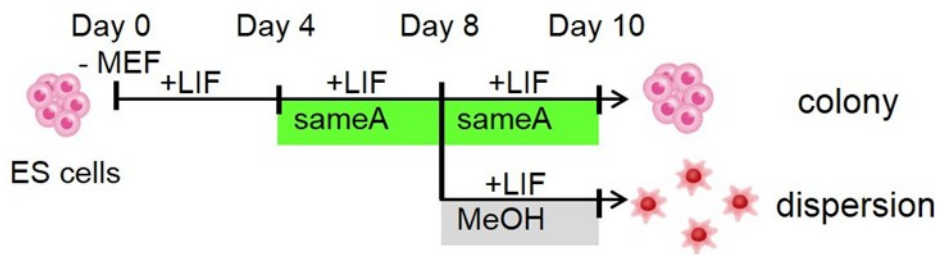
本研究で使用したマウス ES 細胞は、フィーダー細胞を除去して培養すると、LIF 存在下であっても 8 日後にはコロニーを維持できなくなり、分散してしまう (Figure 4.9b 真中)。そこで、この形態的特徴を生かし、sameuramide A のコロニー維持活性を詳細に調べることにした。フィーダー細胞を除去後、4 日目に sameuramide A を添加して 4 日間培養したところ、マウス ES 細胞はきれいなドーム状のコロニーを維持した (Figure 4.9b 右)。



**Figure 4.9.** LIF 存在下での, sameuramide A のコロニー形成への影響 a: アッセイスキーム図 b: マウス ES 細胞の顕微鏡写真 (4 日目と 8 日目)。

さらに, sameuramide A について, マウス ES 細胞のコロニー形成能に及ぼす影響を調べた。前述の, フィーダー細胞を除去後, 4 日目に sameuramide A を添加して 4 日間培養した。さらに続けて, sameuramide A を除いた条件で 2 日間培養した。コントロールとして sameuramide A を除去せず 2 日間培養したものを使用した。その結果, sameuramide A を除去せず培養を続けたマウス ES 細胞はコロニーを維持し続けた (Figure 4.10b 真中) のに対し, 8 日目で sameuramide A を除去したマウス ES 細胞は, 10 日目にコロニーを維持しなくなかった (Figure 4.10b 右)。次に, フィーダー細胞を除去後 8 日目に sameuramide A を添加し, 2 日間培養した。コントロールとして, フィーダー細胞を除去後, sameuramide A 非存在下マウス ES 細胞を 10 日間培養したものをを用いた。その結果, コントロールではマウス ES 細胞のコロニーは崩壊していた (Figure 4.10d 真中) のに対し, 8 日目にコロニーが完全に崩壊したマウス ES 細胞に sameuramide A を添加すると, 10 日目にマウス ES 細胞がコロニーを形成しているのが認められた。つまり, マウス ES 細胞に対して sameuramide A は可逆的なコロニー形成能を有することが明らかとなった。

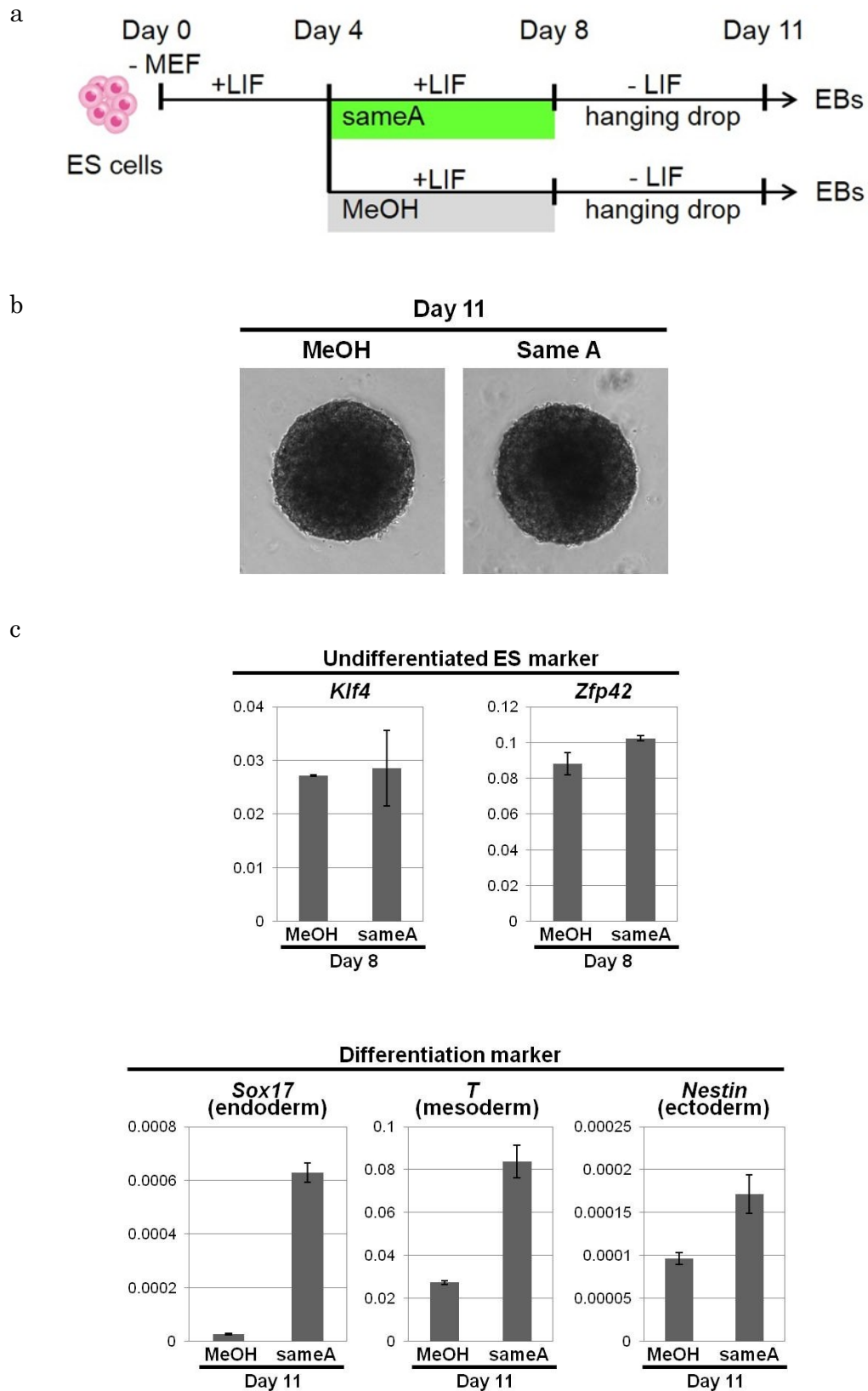




**Figure 4.10.** 可逆的な sameuramide A によるコロニー形成能 a, c: アッセイスキーム図 b,d: マウス ES 細胞の顕微鏡写真。

最後に、sameuramide A で形成されたコロニーが、マウス ES 細胞の幹細胞性へどのような影響を及ぼすかについて調べた。まず、幹細胞性のひとつである未分化状態について調べるために、フィーダー細胞を除去し、LIF 存在下で培養したマウス ES 細胞のコロニーが崩壊する 8 日目に、未分化マーカー (*Klf4*, *Zfp42*) の発現レベルを調べた。その結果、sameuramide A を 4 日目に添加してコロニーを形成したマウス ES 細胞では、未分化マーカーの発現レベルは sameuramide A 非存在下でコロニーが崩壊したマウス ES 細胞と同程度であった (Figure 4.11c 上段)。これらの結果より、sameuramide A はマウス ES 細胞の未分化状態には影響しないことがわかった。

次に、sameuramide A が分化能へどのような影響を与えるかを詳細に調べるために、sameuramide A で処理したマウス ES 細胞を胚様体 (embryoid bodys, EBs) へと分化させ、三胚葉 (内胚葉・中胚葉・外胚葉) の分化マーカーの発現量を測定した。すなわち上記 8 日目までの培養に加え、LIF および sameuramide A を除去後に 3 日間ハンギングドロップ法による培養を行って胚様体へと分化させた (Figure 4.11a)。この胚様体について、内胚葉、中胚葉、外胚葉それぞれの遺伝子マーカー (*Sox17*, *T*, *Nestin*) の遺伝子発現量を調べたところ、3 つ全てのマーカー遺伝子の発現量が顕著に増加していた (Figure 4.11c 下段)。この結果から、マウス ES 細胞は sameuramide A で処理されることで、胚様体での分化能が向上することが明らかとなった。



**Figure 4.11.** Sameuramide A の分化能への影響 a: 胚様体への分化スキーム図 b: 胚様体の顕微鏡写真 c: 遺伝子解析 [stem marker (*Klf4*, *Zfp42*, 8 日目), differentiation marker (*Nestin*, *T*, *Sox17*, 11 日目)], *Gapdh* の発現量を基に各遺伝子の発現量の比率を求めて縦軸とした,  $n = 3$ , mean  $\pm$  SD。

#### 4.2.7. YM-254890 のコロニー維持活性評価

Sameuramide A は *Chromobacterium* 属の桿菌が生産する YM-254890<sup>85</sup> に化学構造が類似していた (Figure 4.12)。血小板凝集阻害物質として発見された YM-254890 は、三量体 G タンパク質 (GTP 結合タンパク質) の  $G_q$  シグナルを選択的に阻害することが知られている。

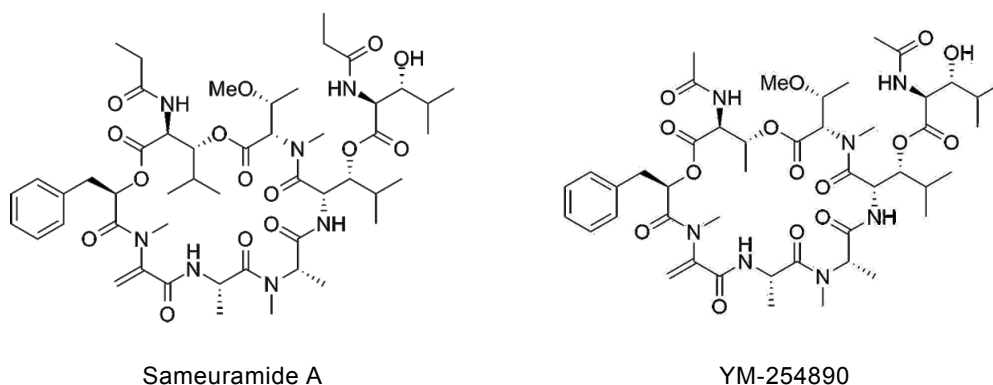


Figure 4.12. Sameuramide A と YM-354890 の構造

そこで、YM-254890 が、sameuramide A と同じように、マウス ES 細胞のコロニーを維持する活性があるかどうかを調べた。その結果、YM-254890 は、sameuramide A と同様に、マウス ES 細胞のコロニーを維持することがわかった (Figure 4.13)。

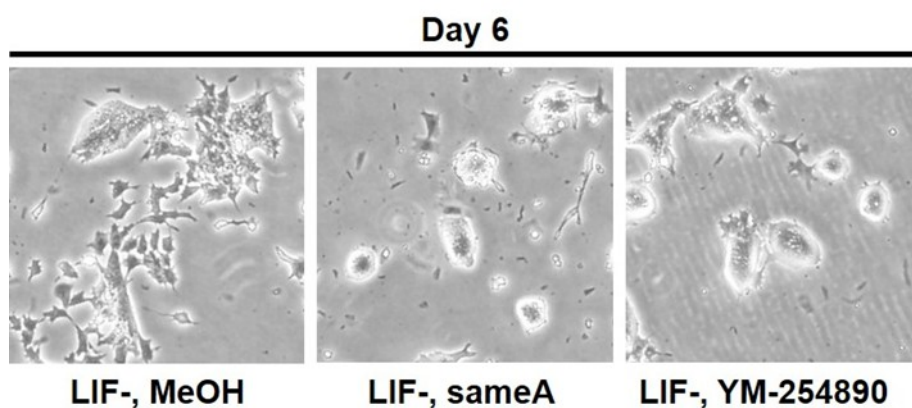


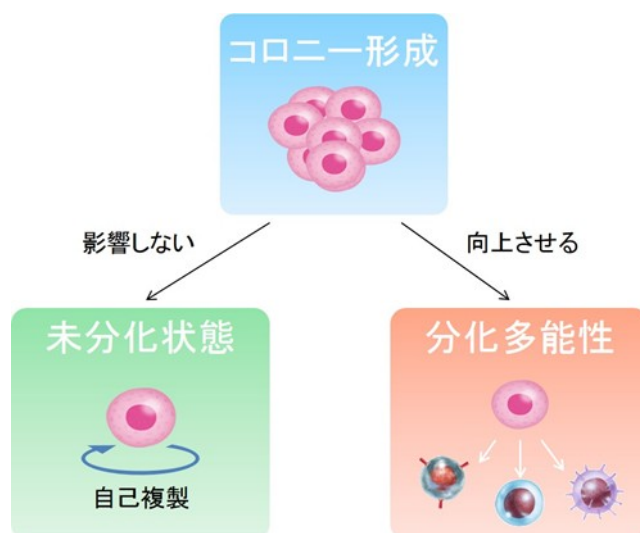
Figure 4.13. YM-254890 のコロニー維持活性 (マウス ES 細胞の顕微鏡写真, MEF 除去後, LIF 非存在下, 4 日目に化合物を添加)

#### 4.2.8. ホヤサンプルからの微生物培養実験

Sameuramide A は YM-254890 と化学構造が類似していることから、共生微生物由来と考えられたため、寒天培地を用いて生産菌の培養を試みたものの、目的とする微生物を得ることはできなかった。

#### 4.3. 考察

本研究の結果から、マウス ES 細胞がコロニー形成する意義について考察した。ES 細胞のコロニー形成は未分化状態の維持には影響しないものの、胚様体での分化能に影響することを示唆した (Figure 4.14)。



**Figure 4.14.** マウス ES 細胞がコロニーを形成する意義についての考察図

また、フィーダー細胞非存在下では、LIF 存在下であっても、8 日目にはコロニーが維持されなくなるが、sameuramide A では、コロニーが維持されること、LIF と sameuramide A 共存下では、分化能が向上したことを考えると、sameuramide A はフィーダー細胞と同様の働きをしている可能性が考えられる。このことから、sameuramide A はフィーダー細胞の代替となりえる可能性が示唆された。

本化合物に構造が類似した YM-254890 が、マウス ES 細胞に対してコロニー維持活性を示したことを考えると、sameuramide A は YM-254890 と同じ作用点である可能性が高い。コロニー維持には E カドヘリンが関係していると考えられるが、E カドヘリンが  $G_q$  シグナルとどのような関わりがあるかは調べられていない。もし  $G_q$  シグナルとマウス ES 細胞の間に何かしらのメカニズムが存在するならば、本化合物はその生理機能を明らかにする有用なバイオプローブとなりうると期待される。

#### 4.4. 結言

宮城県石巻鮫浦湾で採集したウスボヤ(*Didemnid*)科ホヤより sameuramide A 単離し、構造決定を行った。絶対配置は、改良 Marfey 法およびキラルカラムトグラフィーによって、L-Ala, *N*-Me-L-Ala, *N,O*-Me<sub>2</sub>-L-threonine, 3 つの(2*S*,3*R*)- $\beta$ -Hleu, D-Pla と決定した。つぎに、sameuramide A の詳細な生物活性について検討を行ったところ、LIF 非存在下では ES 細胞の未分化状態を維持しないもののコロニーは維持する。一方、LIF 存在下では本化合物によって ES 細胞の分化能が高まるという極めてユニークな生物活性を見出した。

## 第 5 章 海綿内未培養微生物培養法の確立

### 5.1. 研究背景

第 1 章でも述べたように、海綿からは様々な二次代謝産物が報告されてきた。一方、これらの真の生産者の多くは海綿に共生する微生物であることが示唆されている<sup>86</sup>。海綿内に共生する多様な微生物は、宿主である海綿の 3~5 割の体積を占めているが<sup>87</sup>、それら微生物の 99%以上が分離培養不可能と言われており、微生物が二次代謝産物の真の生産者であることを実証できた報告例はごく限られている<sup>88</sup>。実際に、自然状態で生きている海綿内において顕微鏡で直接計数された微生物数に対して、従来の培養法で用いられる寒天培地上でのコロニー数は極めて少ないことはよく知られており、この現象は“Great Plate Count Anomaly”と呼ばれている<sup>89</sup>。これらの共生微生物が培養できない理由は、有機物、無機物、濃度、酸性度、温度、酸素濃度、ゲル化剤などの特定の培養条件のうち、適合するものを用いなかったためと考えられる。したがって、未培養微生物もしくは難培養性微生物が生存する環境中を模倣した培養手法を与えることで、これらの微生物を培養できる可能性がある。このアイデアに基づいて、実環境を模倣する培養手法 (*in situ* 培養法)のひとつである diffusion chamber<sup>90-93</sup>法が開発された (Figure 5.1)。最初に提案された微生物培養用の diffusion chamber は、金属製ワッシャーまたはプラスチック製リングと、小孔径が 0.1  $\mu\text{m}$  以下のポリカーボネート膜 2 枚で構成されている。ポリカーボネート膜は、シリコン接着剤によってワッシャーに接着される。水生土壌微生物を段階希釈し、寒天 (0.7~1.5%, 40~45°C)と混合し、懸濁液 3 mL を膜に注ぐ。寒天が凝固した後、もう 1 枚の膜をワッシャーの反対側に接着し、内部に封入した微生物を含む寒天を密封して、diffusion chamber を形成する。形成した diffusion chamber を、海底などの細胞の生息環境や、自然環境を模倣した水槽内に設置して、培養後に回収し、片方

の膜を剥がし、内部の微生物コロニーをシリンジで採集し、寒天培地に播種する。

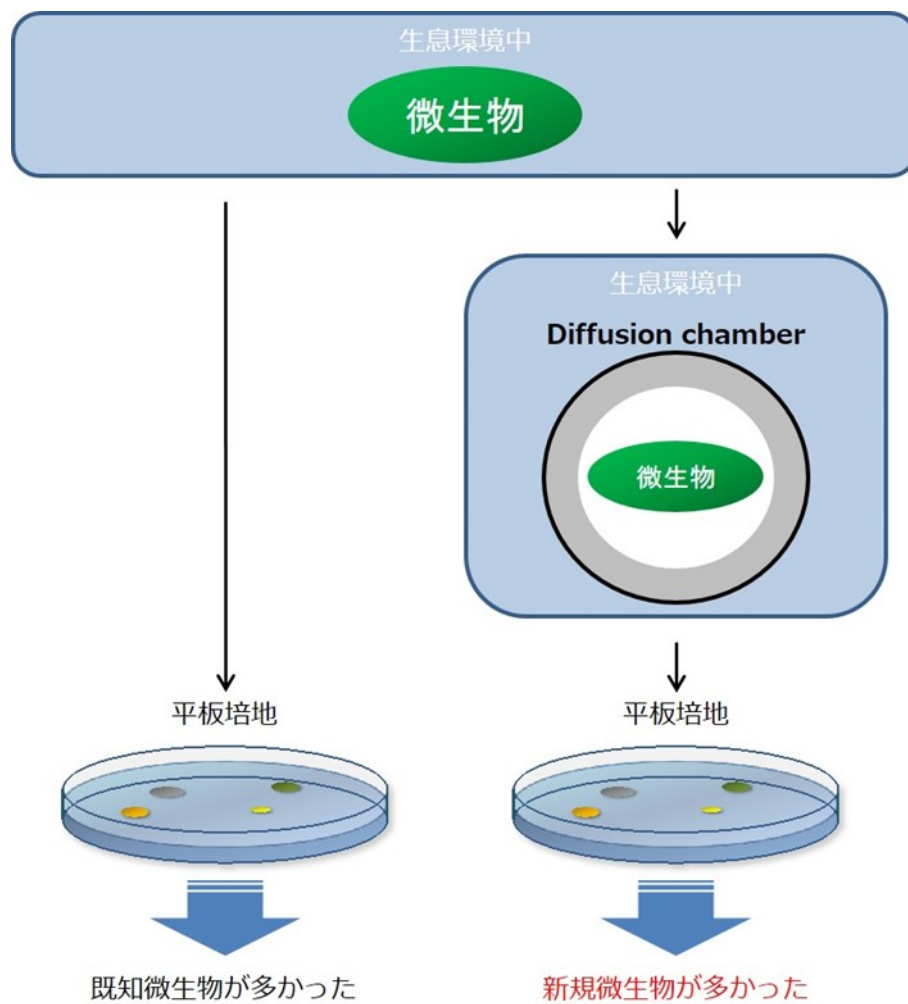
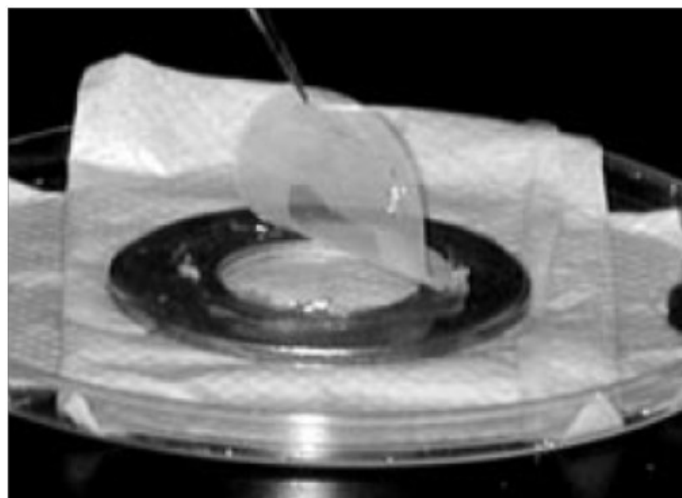


Figure 5.1. Diffusion chamber<sup>90</sup> と diffusion chamber 法の概略図



この手法によって、従来の培養方法では未培養・難培養であった微生物、および系統的に新しい種の微生物の分離株数が著しく増加した (Figure 5.1)。このことから、従来の培養法（平板培地培養）では獲得しにくい難培養性微生物の有効な分離培養法になりうる。また、diffusion chamber 法によって得られたある種の難培養性微生物群は従来培養法（平板培地上）でも増殖可能ではあるが、易培養性な他の微生物(既知微生物)に淘汰されてしまうことから、それらの性質は増殖速度が遅い、増殖阻害因子に特異的な感受性がある、または休眠しやすいものであり、これまで分離株を得にくかった<sup>94</sup>。一方、diffusion chamber では、培地に加えて自然環境中における増殖促進因子の供給や増殖阻害因子の拡散も期待できるため、それらを必要とする難培養性微生物であっても培養が可能となる<sup>94</sup>。また、次のステップである 2 次培養を行う際には難培養性微生物（平板でも増殖は可能）の割合を高めた状態で植菌することが可能になるため、結果的に新規性の高い微生物が獲得可能になる可能性が高まる<sup>94</sup>(Figure 5.2)。

例えば Figure 5.2 では、環境中に生息する微生物 A, B は、どちらも平板培地上で増殖する能力を有しているが微生物 A は従来培養法において易培養性の微生物で、B は難培養性とする。これらの微生物 A, B を直接平板培地に播種する従来の培養方法に付した場合、平板培地上では増殖速度の速い微生物 A のコロニーが平板培地を占有し、微生物 B が増殖できる可能性は著しく減少する。このため、従来培養法で得られる微生物のほとんどが既知の微生物 A であり、新規性の高い微生物はほとんど獲得できない。そこで、微生物 A, B を diffusion chamber 内に封入し、生息環境中に戻すことで、環境中にある増殖促進因子が供給されるか、増殖阻害因子が拡散されることで、微生物 B が微生物 A に比べて優位に増殖できる環境になる。微生物 B が微生物 A に対して十分に高い割合になった状態で平板培地に播種できるため、微生物 B のコロニーが出現する可能性が高まると考えられている<sup>95</sup>。

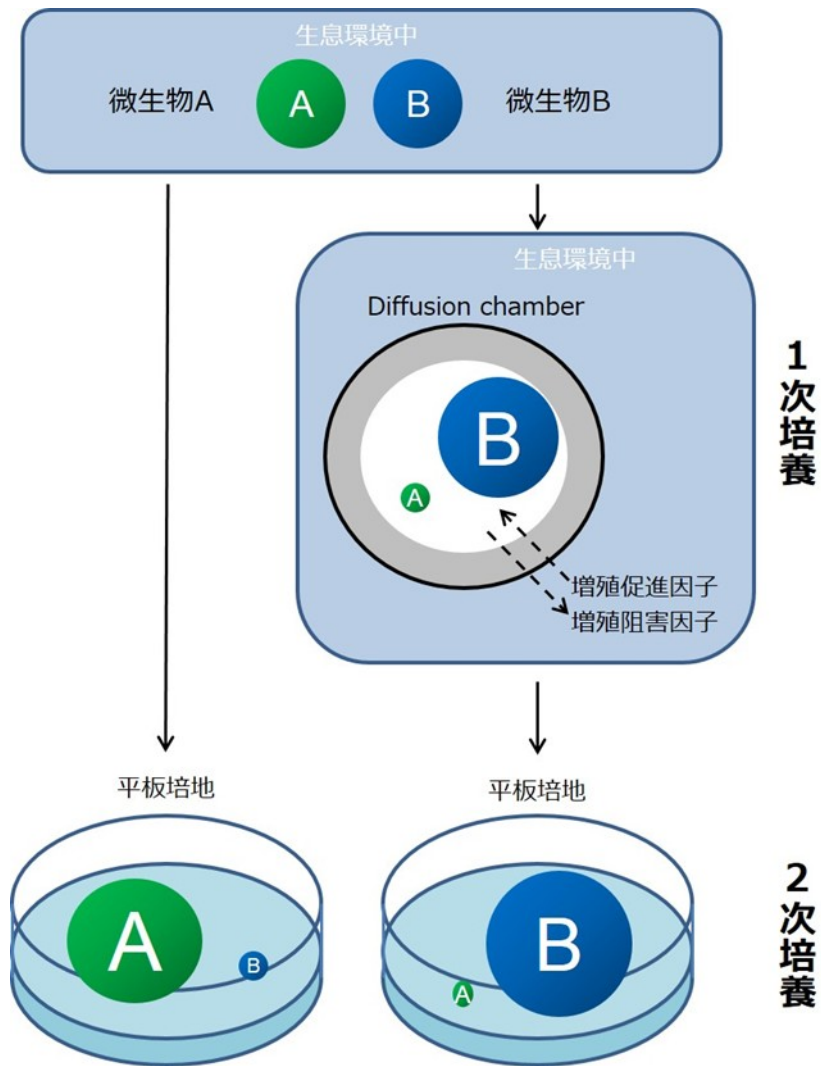


Figure 5.2. Diffusion Chamber の培養効果のモデル図

## 5.2. 研究目的

このような背景のもと、diffusion chamber を用いることで従来の培養方法では獲得されにくい微生物を獲得・培養するための分離培養法を確立することを目的とした。本培養法より得られる分離株から新たな化合物を得ることで、海綿内の二次代謝産物の真の生産者を明らかにできると考えた。

### 5.3. 実験

#### 5.3.1. モデル海綿の選択と採集

海綿 *Theonella swinhoei* をモデル海綿とした3つの理由は以下1)~3)に述べるとおりである。1) 本海綿からは swinholides<sup>96</sup>, theonellamides<sup>97</sup>, cyclotheonamides<sup>98</sup> など数多くのユニークな構造を有する生物活性物質が単離報告されている (Figure 5.3)。2) 本海綿の長期飼育に成功している。3) 生息地を把握していることから、本海綿のサンプリングが容易である。

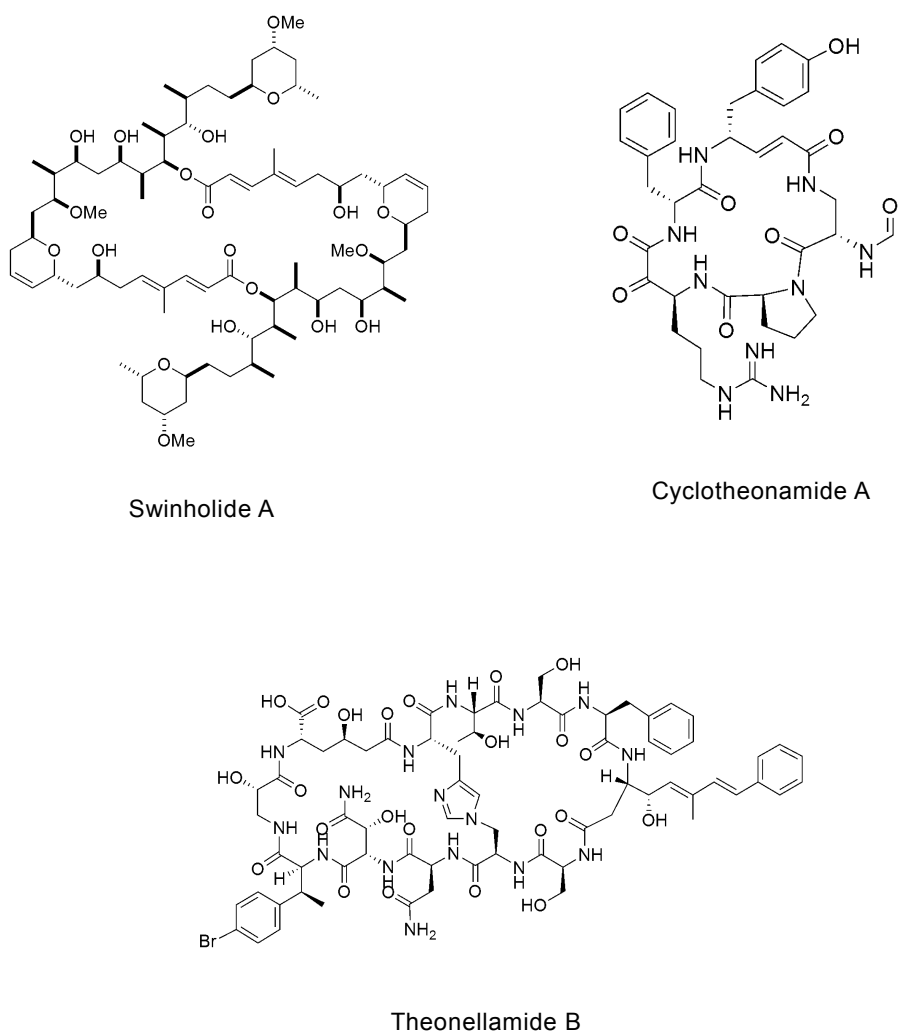


Figure 5.3. *Theonella swinhoei* から単離された天然化合物の例

スキューバダイビングにより、高知県の宿毛市の沿岸、水深 10-15 m の海底で海綿 *Theonella swinhoei* を採集した (Figure 5.4)。



**Figure 5.4.** 飼育中の海綿 *Theonella swinhoei*

### 5.3.2. Diffusion chamber を用いた海綿内微生物の培養方法

海綿内微生物に diffusion chamber (DC) を適用した概要図を Figure 5.5 に示す。Diffusion chamber 法は先行研究 (Bollmann et al., 2010) を参考にした。採集した海綿 *Theonella swinhoei* の一部を切り取り、すり鉢を用いてホモジナイズし、微生物密度が  $10^4$  cells/20  $\mu\text{L}$  となるように希釈したものを微生物サンプルとした。シリコン枠 (外幅 14 mm 内幅 7 mm 長さ 38 mm 厚さ 2 mm) の片面に孔径 0.1  $\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブレンを接着させ、微生物サンプル 20  $\mu\text{L}$  と 40°C の 1.5% 低融点アガロース 400  $\mu\text{L}$ , 18% 人工海水 58  $\mu\text{L}$ , 4  $\times$  R2A 培地 12  $\mu\text{L}$  を混合したものをシリコン枠内に充填させた。アガロースが凝固した後、シリコン枠のもう片面にもう 1 枚のポリカーボネートメンブレンを接着させ、微生物サンプルを封入することで DC を作成した。微生物サンプルを採集した海綿にこの DC を戻すことで、DC 内の微生物は生息環境中の化合物の受け渡しが可能になり、自然環境が模倣された条件 (*in situ*) となる。

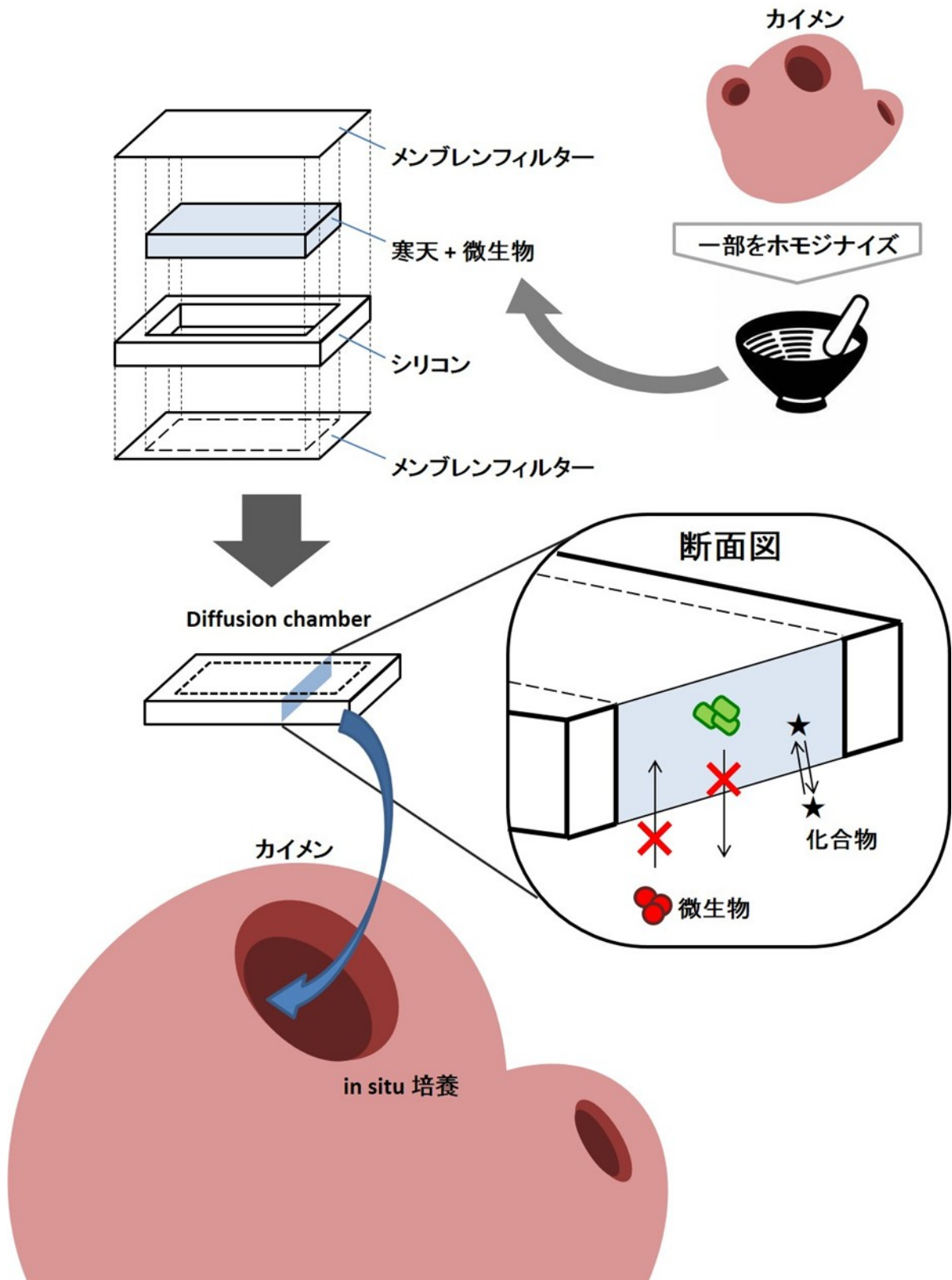
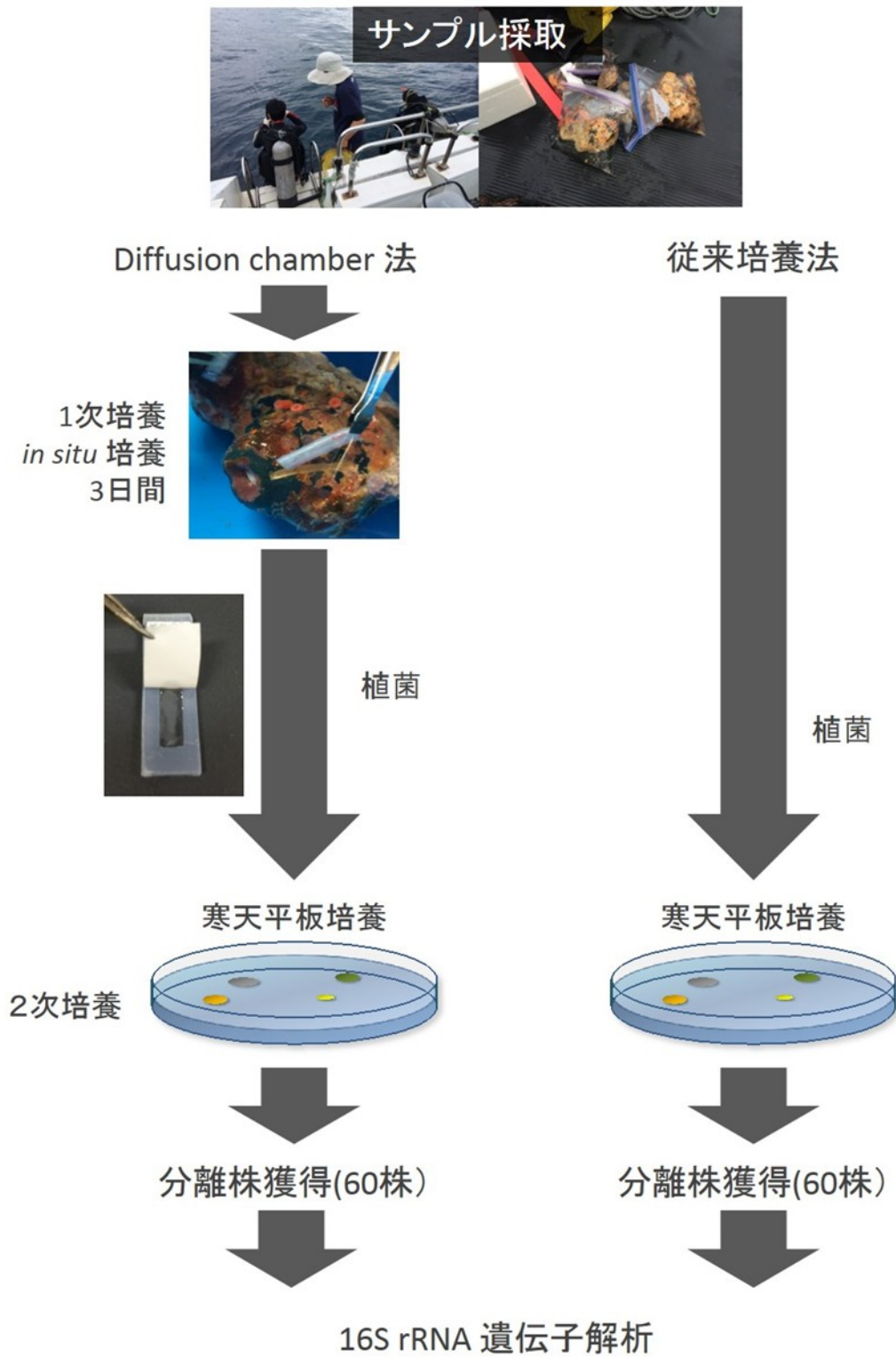


Figure 5.5. Diffusion chamber を用いた培養法(*in situ* 培養)の概要図

次に、この diffusion chamber を用いた微生物の培養方法を述べる。海綿内微生物を封入した DC を海綿内に挿入し、3 日間 *in situ* 培養することで一次培養に付した。一次培養後、DC を海綿から回収し、ポリカーボネートメンブレンを 1 枚はがし、微生物サンプルをアガロースごと 1.5 mL エッペンチューブに移した。3.5%の滅菌人工海水を 1 mL 加えて、滅菌したスパチュラやボルテックスによりホモジナイズにした。上澄みに含まれる微生物を DAPI 染色し、顕微鏡を用いて菌密度を測定した。この上澄みに滅菌人工海水を加え、100 cells/100  $\mu$ L に希釈し、R2A 寒天培地 (1.5%Agar, 3%人工海水, 1/10 R2A)に播種することで、二次培養をとした (20 $^{\circ}$ C, 大気下)。二次培養後、コロニーをピックアップし、R2A 寒天培地 (1.5%Agar, 3%人工海水, 1/10 R2A)に播種することで分離株を 60 株獲得した。得られた分離株について 16S rRNA 系統解析を行い、各分離株の微生物種を調べた。また、コントロールとして同一海綿から得た微生物サンプルを、直接 R2A 寒天培地 (1.5%Agar, 3%人工海水, 1/10 R2A)に播種し、得られたコロニーから 60 株の分離株を得た (Figure 5.6)。

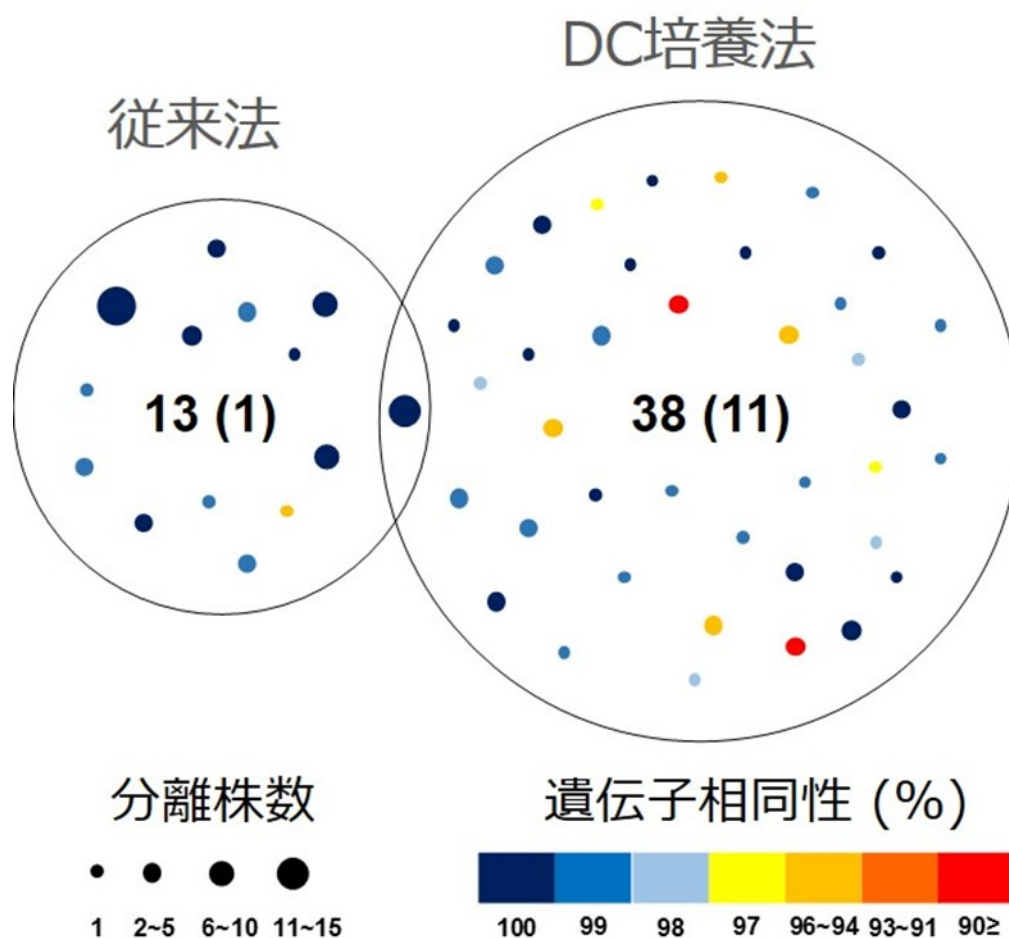


**Figure 5.6.** Diffusion chamber 法 (*in situ* 培養法)と従来培養法の実験方法



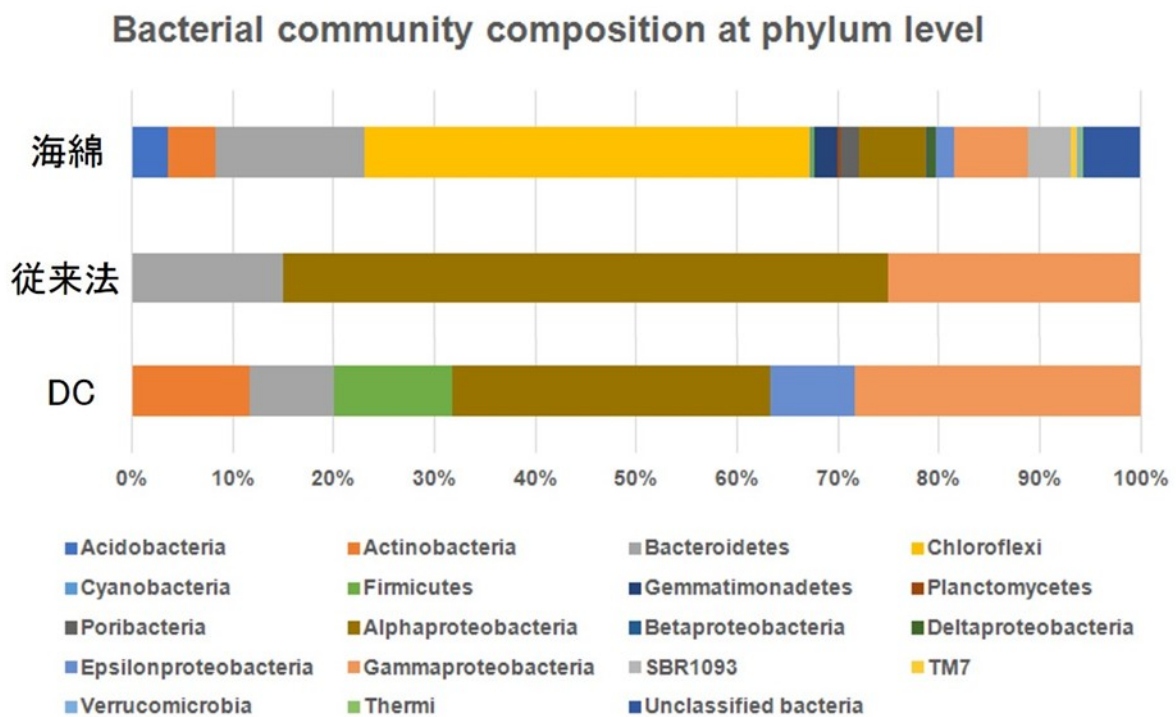
### 5.3.3. 16S rRNA 系統解析

*In situ* 培養と従来法による二次培養によって純化させたコロニー60株に対して、ユニバーサルプライマー (27F-1492R)を用いて直接 PCR を行い、16S rRNA 遺伝子を増幅、DNA シーケンス解析を行った。得られた塩基配列は、既存種データベースのものと比較することで、得られた分離株について近縁種を決定した。その結果、それぞれの培養法で得られた分離株の種類は大きく異なり、共通する分離株は1種類のみであった。従来法で得られた分離株は13種であるのに対し、*in situ* 培養法で得られた分離株は38種と従来法に比べて3倍近い種類を獲得できた (Figure 5.7)。



**Figure 5.7.** Diffusion chamber (DC)培養法と従来培養法で得られた分離株の多様性。各ドットが各微生物種を表している。円内の数字は、微生物の種類数 (既存の微生物に対して 16S rRNA の相同性が 97%以下の種類数)を表している。

また、得られたそれぞれの分離株について門レベルの微生物種を調べたところ、従来法で得られた分離株は Bacteroidetes 門, Alphaproteobacteria 門, Gammaproteobacteria 門の 3 門だったのに対し, *in situ* 培養法で得られた分離株は上記の 3 門に加え, Actinobacteria 門, Firmicutes 門, Epsilonproteobacteria 門の 3 門が新しく獲得されていた (Figure 5.8)。



**Figure 5.8.** *in situ* 培養法と従来培養法で得られた分離株の菌門

次に、それぞれの分離株に対して、新規性の高い菌株（既存株に対する 16S rRNA 遺伝子の相同性が 97%以下)の割合を比較した。その結果、従来法で獲得した分離株では 1 つだけ新規性の高い菌株が得られたのに対して、*in situ* 培養より獲得した分離株では 18 株もの新規性の高い分離株が得られた。得られた 18 株の中には、既存株との相同性が 92%以下と非常に新規性の高い株が認められた (Figure 5.9)。

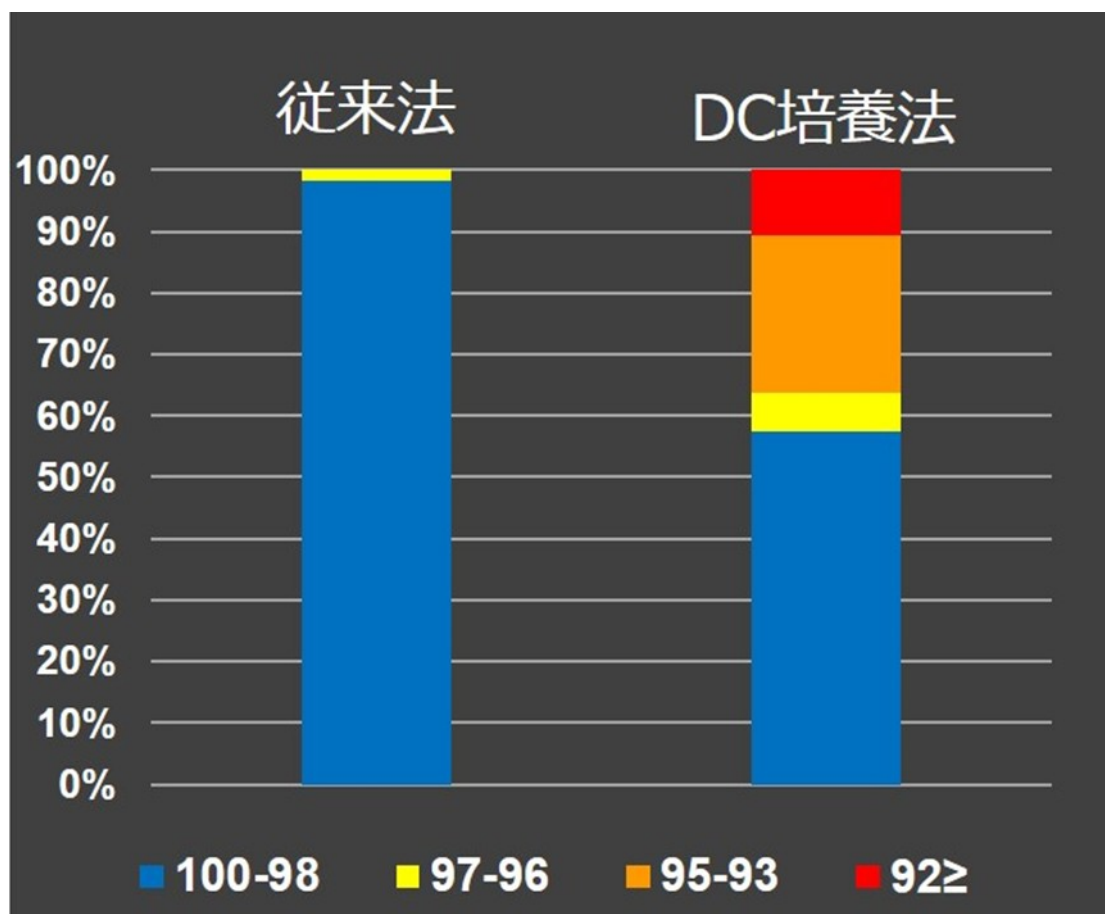
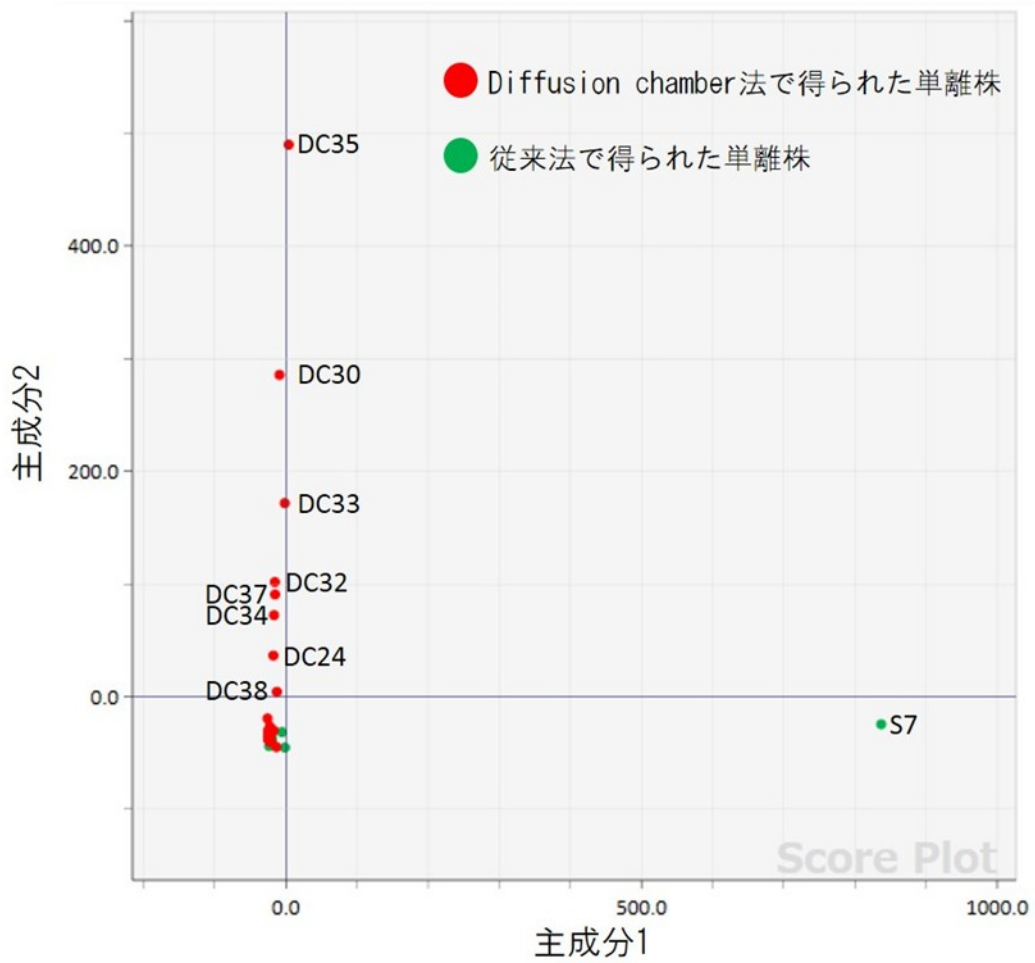


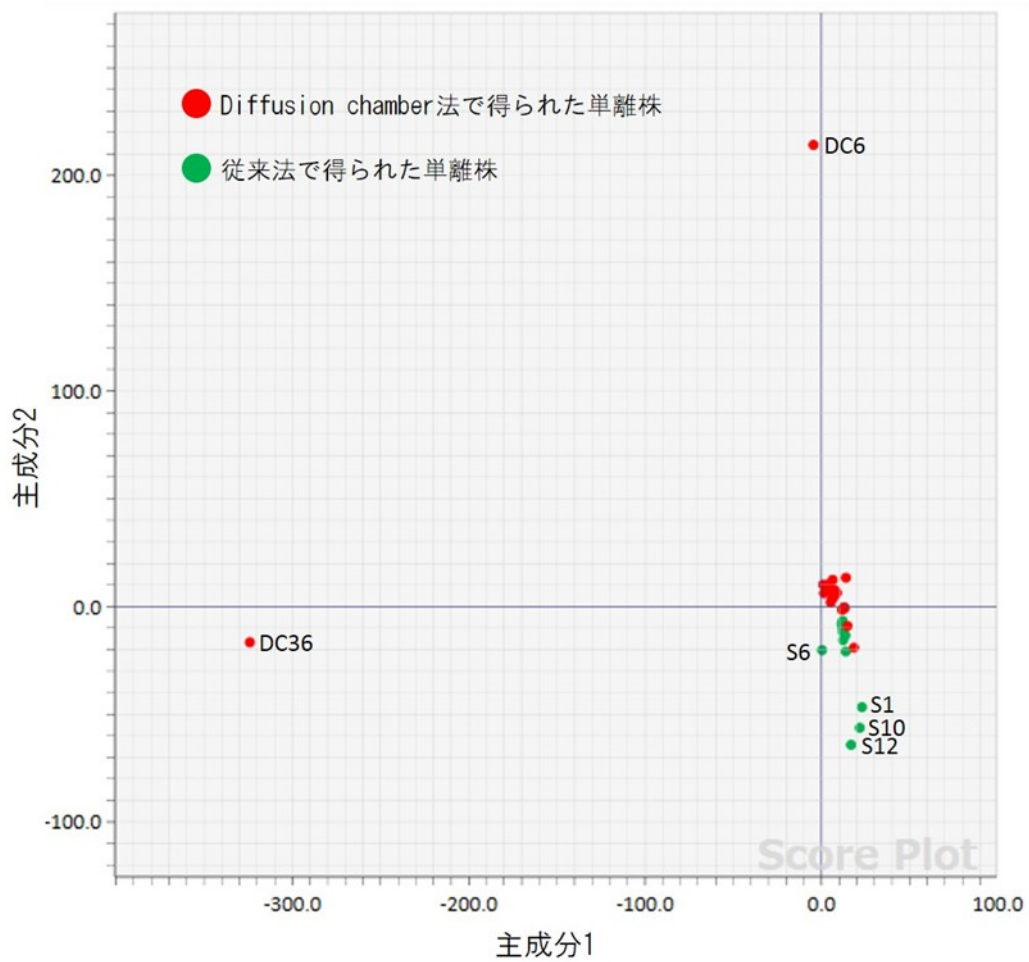
Figure 5.9. DC 培養法と従来培養法で得られた分離株の新規性

#### 5.3.4. 分離株に含まれる化合物プロファイル分析

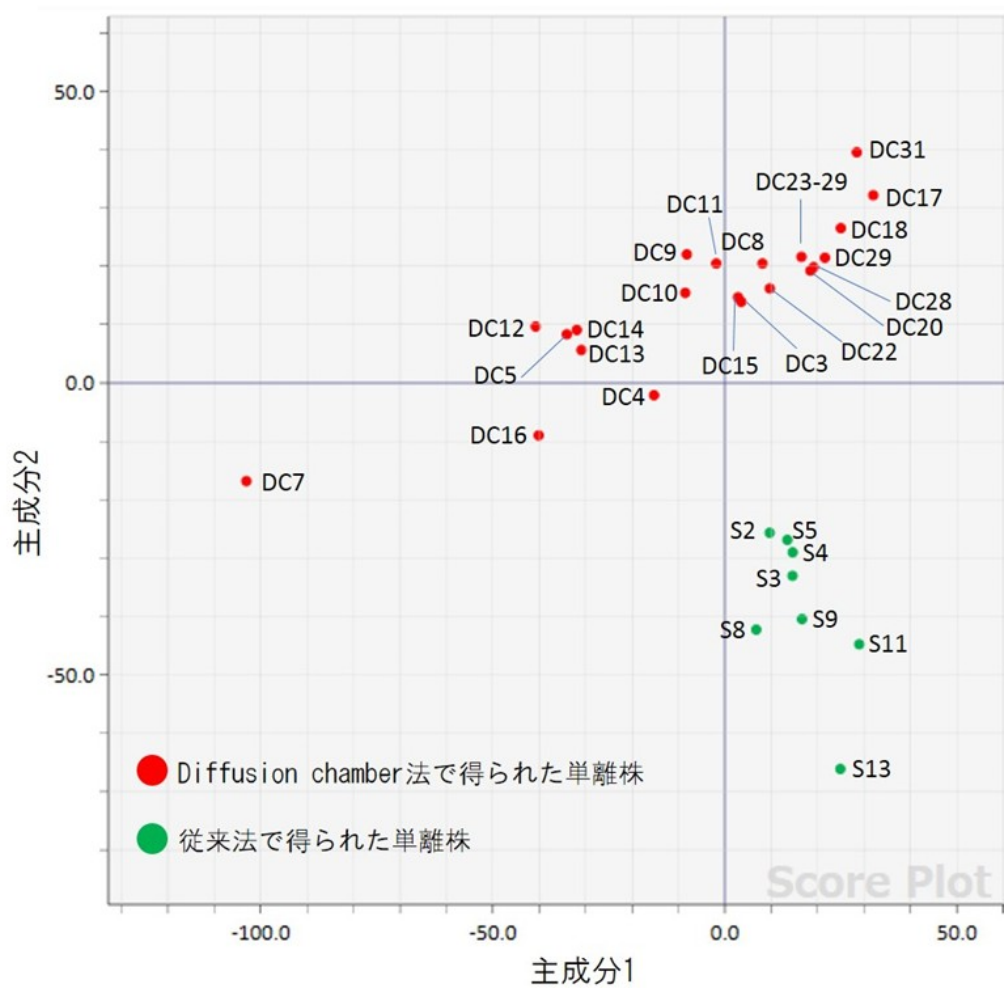
従来法で得られた分離株 (S1~S13)および diffusion chamber 法で得られた分離株 (DC1~DC38)のメタノール抽出液を、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーに付し、純水で脱塩後、メタノールで溶出させた。それぞれの分離株のメタノール溶出画分について LC-MS を用いて分析し、得られた LC-MS データを多変量解析ソフト Signpost MS を用いて主成分分析を行った。主成分分析では、高次元の LC-MS データ (分離株種、化合物の  $m/z$ , 保持時間, イオン強度)を 2次元のデータ (主成分 1, 主成分 2)で出力する。その結果を Figure 5.10 に示した。Figure 5.10 内に示したドットは、各分離株を表している (赤点:diffusion chamber で得られた分離株, 緑点:従来の培養法法で得られた分離株)。ドット間の距離が近ければ、そのドットの示す分離株らが類似した化合物群を有していることを示しており、ドット間の距離が遠ければ、その分離株らは異なる化合物群を有していることを示している。また、Figure 5.10 のドットが重なっている狭い範囲を見るために、離れたドットを除外した主成分分析を、Figure 5.11 および Figure 5.12 に示した。分析の結果、従来法より得られた分離株は 1 株を除いて全て類似した化合物プロファイルであることがわかった。一方、diffusion chamber 法で得られた分離株の化合物プロファイルは、従来法で得られた分離株のそれとは大きく異なっており、また、分離株ごとの化合物プロファイルも違っていることが判明した。



**Figure 5.10.** *in situ* 培養法で得られた分離株(赤)と従来法で得られた分離株(緑)の主成分分析結果 継代培養できた全ての分離株。



**Figure 5.11.** *in situ* 培養法で得られた分離株(赤)と従来法で得られた分離株(緑)の主成分分析結果 分離株 (S7, DC24, DC30, DC32, DC33, DC34, DC35, DC37, DC38 を除いた)を用いて解析した。



**Figure 5.12.** *in situ* 培養法で得られた分離株(赤)と従来法で得られた分離株(緑)の主成分分析結果 分離株 (S1, S6, S7, S10, S12, DC6, DC24, DC30, DC32~DC38 を除いた)を用いて解析した。

## 5.4 考察

本研究では、diffusion chamber を用いた海綿内微生物の一次培養と、寒天培地を用いた従来の方法による二次培養を組み合わせることで、新規性の高い微生物を高率で獲得できた。一方、従来の培養法のみでは、既知の微生物と相同性の高い微生物が分離株の大部分であり、大きな違いを見せた。

以上のように、結果に大きな違いが生じた理由について考察を行った。まず、従来培養法で得られた分離株のほとんどが既知の微生物であったことについては、易培養性微生物が難培養性微生物を淘汰してしまうことが原因と考えられる。平板培地における淘汰の様式として 1) 他の微生物に捕食される、2) 他の微生物が生産する増殖阻害因子によって生育が阻害される、3) 増殖速度の遅い難培養性微生物がコロニーを作る前に、増殖速度の速い易培養性微生物のコロニーによって平板培地が占拠される、の 3 つの場合を考えた。

このうち、1)については、平板培地上では微生物はコロニー形成のようにじわじわと広がるような動きはできても、長距離をすみやかに移動はできないため、他の微生物を捕食する可能性は低いと考えられた。また、従来培養法では、菌密度を限界まで希釈して植菌するため、コロニーを形成する微生物のほとんどは他の微生物と接触する可能性も低い。一方、微生物の中には生存戦略のひとつとして競合微生物を排除するために抗生物質を生産するものもいるため、2)については十分に可能性があると考えられる。また、3)については、実際のケースで易培養性微生物のコロニーで埋め尽くされた平板培地から、成長が遅く十分な大きさのコロニーをつくらせていない難培養性微生物をピックアップして分離単離株をつくることは難しいと考えられる。

次に、diffusion chamber を用いた培養法によって新規性の高い分離株が高率で獲得できたことについては、本法によって、生存する微生物全体を占める難培養性微生物の割合



が増加したことが、二次培養における微生物コロニー層に違いをもたらしたと考える。実際、diffusion chamber 内においてある種の難培養性微生物がマイクロコロニーをつくることが観察されている<sup>90</sup>ことから、本仮説は支持される。Diffusion chamber を元の環境中 (海綿中)に戻して一次培養することによる効果については、a) 増殖促進因子が周囲環境から供給され、難培養性微生物がマイクロコロニーをつくる割合を向上させる、b) 逆に、易培養性微生物によって生産される増殖阻害因子は環境中へ拡散される、c) 易培養性微生物は高栄養条件下の平板培地上では短期間で素早く増殖できるが、低栄養の環境中では増殖速度が低下する結果、微生物数が減少し、相対的に難培養性微生物の割合が増加する、d) 環境中にある休眠・覚醒因子<sup>99</sup>によって難培養性微生物の増殖が可能となることの4つが考えられる。このうち a)については、従来培養法で植菌する際に増殖促進因子が平板培地に添加されるとしても、環境中に比べ  $10^6 \sim 10^8$  倍程度の希釈率となるためにその影響は大きくないと考えられ、その濃度は diffusion chamber 法の二次培養でも理論上変わらない。すなわち、diffusion chamber が海綿環境中にあるときにだけ、増殖促進因子が機能した可能性がありうる。次に、b)については、2)でも考察した通り、diffusion chamber が周囲環境と物質のやりとりできることで増殖阻害因子が拡散し、難培養性微生物がマイクロコロニーをつくることで微生物数を増加させることができたと考えられる。また、c)については、本研究で得られた従来培養法分離株は、DC 法で得られる分離株に比べてコロニーの出現が早いものが多かったことから、従来の高栄養条件下での培養で獲得される易培養性微生物は、低栄養条件下では増殖がしづらい可能性がある。d)について、微生物が覚醒することは、微生物が休眠するという Epstein の仮説<sup>99</sup>に基づくものであり、もともと増殖する状態である微生物がなんらかの影響によってその増殖速度が向上する現象を指すのではなく、増殖が可能な栄養と条件があるのにも関わらず微生物が増殖をしない状態 (休眠状態)から増殖を開始することを意味する。この覚

醒因子が、周囲に仲間がいることを知らせるシグナルとして働いているのであれば、diffusion chamber によってつくられるマイクロコロニーから覚醒因子が放出され、二次培養において難培養性微生物が増殖できるようになったと考えられる。

以上のように本手法を用いることで、上記に示した考察の事象を初めて検証できる生物サンプルを獲得できたことは、これまで未解明であった微生物の覚醒増殖機構の解明にとってひとつのヒントになりうる知見であり、難培養性微生物の培養法開発という今後の微生物学の発展にも寄与しうると期待される。

## 5.5. 結言

本章において、1) diffusion chamber を用いた *in situ* 培養法では、従来の培養法に比べて得られた分離株の新規性・多様性がともに高いこと、2) diffusion chamber 法で得られた分離株の化合物プロファイルは従来法で得られた分離株のそれとは大きく異なっていることを明らかにした。これらの結果を踏まえると、本手法を用いれば、将来的には海綿に含まれる化合物の真の生産者を培養し、その化合物を生産しうる有力なツールとなりうる。

## 第 6 章 総括

本論文では、3 種類の海洋無脊椎動物から新規天然化合物の単離精製を行い、それぞれの化合物について絶対配置を含めた構造決定を行うことに成功した。また、海綿に含まれる二次代謝産物の真の生産者を探索するためのツールとして、海綿内共生微生物培養法を確立した。

第 2 章では、鹿児島県の海底火山大島新曾根でのドレッジ採集時に生じた分類不能な混獲物から単離精製した cinanthrenol A について述べた。従来は廃棄されていたこの分類不能混獲物をまとめて抽出し、液液分配および各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、新規天然化合物 cinanthrenol A の単離に成功した。MS および NMR 分析した結果、cinanthrenol A は、海洋生物からは初の報告例となるフェナントレン骨格を有しており、spiro [2,4] heptane を含んだきわめてユニークな化学骨格を有する化合物であることが判明した。改良 Mosher 法を用いて、cinanthrenol A の絶対配置を 16*S*,17*S*,19*S* と決定した。一方、同じドレッジ採集時に採集され分類可能であった生物サンプルから、cinanthrenol A を含む海洋生物を探索したところ、cinanthrenol A の由来生物は海綿 *Cinachyrella* sp. であると同定できた。以上のように本章では、従来は廃棄していた生物サンプル小片混合物から構造決定に必要な化合物量を確保することができた結果、本探索手法は深海生物を対象とした探索研究において有効であると示せた。

第 3 章では、熊本県天草で採集した軟体動物タツナミガイ *Dolabella auricularia* より単離した dolabellol A について述べた。*D. auricularia* の抽出物から、溶媒分画および各種クロマトグラフィーによって新規天然化合物 dolabellol A を単離した。MS および NMR スペクトルを解析した結果、本化合物は 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane 環と cyclohexane 環を有するジテルペン構造であることが明らかになった。また、詳細な NMR スペクトル解析

の結果、ヒドロキシ基、塩素基、臭素基によって置換された炭素が 3 つ連続している部分構造が得られた。この連続する置換配列を決定するため、ヒドロキシ基の重水素置換実験とハロヒドリンのエポキシ化反応を行った。その結果、dolabellool A は 1 位がヒドロキシ基、2 位が臭素基、3 位に塩素基によって置換された平面構造であると決定できた。また、NOESY 相関を解析することで二つの環状部分構造について相対配置を明らかにし、絶対配置は X 線結晶構造解析を行って決定することができた。以上の結果、本化合物は新規の obtusane ジテルペンであることが明らかとなった。類縁の obtusadiol が紅藻ソゾ (*Laurencia obtusa*) から単離されていることと *D. auricularia* が藻食性であることから、本化合物は餌である紅藻由来であることが示唆された。

第 4 章では、宮城県石巻産のウスボヤ科ホヤより単離・精製した sameuramide A について述べた。mES 細胞のコロニー形成維持活性を指標として、ウスボヤ科ホヤ抽出物から溶媒分画および各種クロマトグラフィーによって新規天然化合物 sameuramide A を単離した。Sameuramide A の平面構造については、MS および NMR スペクトルを解析することで決定し、絶対配置については、改良 Marfey 法およびキラルカラム分析より決定した。Sameuramide A は *Chromobacterium* 属の桿菌が生産する YM-254890 と化学構造が類似していることから、共生微生物由来と考えられた、従来の培養法による生産微生物の単離を試みたものの、目的の微生物を得ることはできなかった。つぎに、sameuramide A の詳細な生物活性について検討を行ったところ、本化合物投与下、LIF 非存在下では ES 細胞の未分化状態を維持しないもののコロニー形成能は維持されることが分かった。一方、LIF 存在下では本化合物によって ES 細胞の分化能が高まるという生物活性を見出した。本化合物は、幹細胞を用いた再生医療分野において、新たな知見を与える生化学ツールになりうると期待される。

第 5 章では、diffusion chamber 法 (*in situ* 培養方法) を適用した海綿内微生物の培養方法

の確立について述べた。土壌中の新規微生物を可培養化した diffusion chamber 法(*in situ* 培養法)を、モデル海綿として選んだ *Theonella swinhoei* 内の微生物に応用して分離株を得た。得られた分離株について 16S rRNA 系統解析を行って微生物種を分析した結果、直接平板培地に播種する従来の培養方法に比べて、得られる分離株の新規性・多様性がともに高いことが判明した。それぞれの分離株のメタノール抽出物について LC-MS を用いて分析し、そのデータを多変量解析したところ、本培養法で得られた単離株の化合物プロファイルは従来法で得られた単離株のそれと大きく異なっており、従来の培養法では得られなかった化合物群を含んでいることが示唆された。以上より、diffusion chamber 法を海綿の共生微生物に適用することで、新規な海綿内微生物の獲得を可能とする培養法を確立することができた。本培養法は、微生物学における培養に関する新たな知見を与え、医薬品の探索研究における新たな探索資源を提供する有用な方法となりうる。

以上のように、本論文は新規天然化合物とその起源生物について述べてきた。

- Cinanthrenol A の研究では、これまで研究対象外であった分類不能の小サンプル群から新規天然化合物を発見し、化合物の有無を調べることで起源生物の同定に成功した。
- Dolabellol A の研究では、軟体動物から単離した新規天然化合物の構造を明らかにし、類似した化合物を含む紅藻を、軟体動物が摂食することから、起源生物と推察した。
- Sameuramide A の研究では、群体ボヤから新規生物活性物質を単離・構造決定し、その構造類似性から、起源生物は共生微生物であると推察した。
- 培養法確立の研究では、新規性の高い海綿内共生微生物を培養することに成功した。また、その分離株に含まれる化合物プロファイルは、従来培養法で得られる微生物のものとは大きく異なっていたことから、新規天然化合物の新たな探索源としての難培養性微生物の培養法確立に向けた重要な知見となりうる。

## 第7章 実験項

### 7.1. 第2章における実験項

#### 一般機器

旋光度( $[\alpha]_D$ )は 10 cm セルを用いて JASCO P-2200 polarimeter によって測定した。UV スペクトルはサンプルの MeOH 溶液を用いて Pharmacia Ultrospec 3000 spectrophotomer により測定し, IR スペクトルは Thermo Nicolet FT-IR spectrometer を用いて測定した。CD スペクトルはサンプルの MeOH 溶液を用いて JASCO J-820 spectropolarimeter で測定した。Cinanthrenol A の NMR スペクトルは, pyridine- $d_5$  に溶かし Bruker UltraShield 400 magnet によって測定した。Cinanthrenol A の MTPA エステル体の NMR スペクトルは  $CDCl_3$  中, Bruker Ultra Shield 400 spectrometer で測定した。NMR スペクトル測定時の濃度は, cinanthrenol A が 3 mg/650  $\mu$ L, MTPA エステル体が 0.3 mg/650  $\mu$ L になるように調製した。HPLC には JASCO PU-1580 solvent delivery system に検出器 JASCO UV-975 とポンプ JASCO PU-1580 を付けて使用した。高分解能質量分析機 JEOL JMS-T100CS spectrometer を用いて質量分析を行った。

#### 実験動物

*Cinachyrella* sp. (Sample No. S07150)は, 2007 年 6 月 23 日に鹿児島県海底火山大島新曾根の水深 140-160 m からドレッジにより採集した。海綿の大きさは縦 10 cm  $\times$  横 10 cm  $\times$  高さ 10 cm あり, 表面はガラス質の細かい棘で覆われ, 色は曇った白色であった。標本 (RMNH POR 7347)はオランダライデン市の National Museum of Natural History (Naturalis) に保管されている。

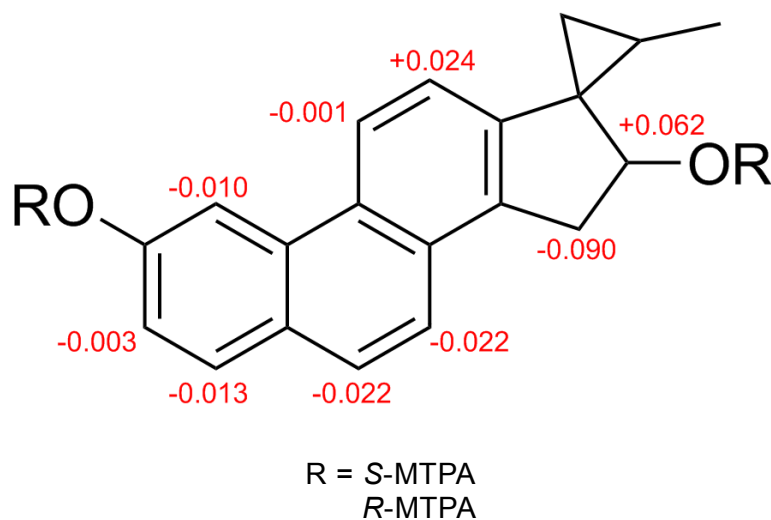
## 抽出・単離方法

採集した海洋生物サンプルはすぐに冷凍し、冷凍した状態のまま研究室に運び、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。ドレッジ混獲物 (6.5 kg, 湿重量)は解凍後, MeOH ( $2 \times 2000$  mL)で抽出し, 濃縮したエキスを,  $\text{H}_2\text{O}$  と  $\text{CHCl}_3$  で尼僧分配を行い(2回), 残った水槽をさらに, *n*-BuOHで抽出した。 $\text{CHCl}_3$  層と *n*-BuOH 層を合一して濃縮した後, Kupchan 分画に付し, *n*-hexane 層,  $\text{CHCl}_3$  層, 60%MeOH 層を得た。 $\text{CHCl}_3$  層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  = 50/50, 70/30; MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  = 70/30, 80/20, 100% MeOH;  $\text{CHCl}_3$ /MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  = 60/40/10 で溶出)に付した。得られた 6 つの画分のうち 70%MeOH 溶出画分に, P388 と HeLa 細胞に対する細胞毒性が認められた。そこで, 70%MeOH 画分(1.7 g)をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ /MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  = 1/0/0, 19/1/0, 9/1/0, 80/20/1, 70/30/5, 6/4/1, 5/5/2, 0/0/1)に付し, 14 つの画分を得た。一番強い細胞毒性を示した画分(281.4 mg)を ODS カラムクロマトグラフィー (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  = 7/3, 8/2, 1/0;  $\text{CHCl}_3$ /MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  = 6/4/1)を用いて分画し, 10 画分を得た。細胞毒性を示した画分について, 逆相 HPLC [COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR II; 250 × 20 mm, gradient 60 – 100% MeOH]を用いて分画し, 6 つの画分を得た。細胞毒性を示した画分を逆相 HPLC [COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR II; 250 × 10 mm, 70% MeOH]を用いて精製し, cinanthrenol A を 2.2 mg 単離した。

**Cinanthrenol A** : brown amorphous solid,  $[\alpha]_{\text{D}} -11.6$  (*c* 0.16, MeOH); IR  $\nu_{\text{max}}$  3392, 2932, 2866, 1707, 1464, 1376, 1503  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  271 nm; HRESIMS (neg.) *m/z* 289.12354 [ $\text{M} - \text{H}$ ]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub> 289.1229,  $\Delta + 0.6$  mmu);

## Cinanthrenol A の MTPA エステル化反応

室温で cinanthrenol A (250  $\mu\text{g}$ )と DMAP (9 mg)を dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (90  $\mu\text{L}$ )に溶解させ、*R*-MTPA-Cl (2  $\mu\text{L}$ )を加えた。ODS TLC と展開溶媒 ( $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$  = 90 : 10)を用いて反応の進行具合を確認して、10 分後に反応溶液に 1 M  $\text{NaHCO}_3$  (400  $\mu\text{L}$ )を加えて反応を止め、 $\text{CHCl}_3$  (400  $\mu\text{L} \times 3$ )で抽出した。合一した有機層に 0.2 M  $\text{HCl}$  (400  $\mu\text{L}$ )を加えて  $\text{NaHCO}_3$  を取り除き、残った有機層に  $\text{H}_2\text{O}$  (400  $\mu\text{L} \times 3$ )を加えてさらに洗浄した。有機層を濃縮した後、逆相 HPLC [COSMOSIL, 5C<sub>18</sub>-ARII, 250  $\times$  10 mm, stepwise 85, 95, 100%  $\text{MeOH}$ ]により精製し、bis-(*S*)-MTPA-エステル体 [ $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.372 (H-11), 8.278 (H-1), 7.876 (H-4), 7.732 (H-6), 7.623 (H-7), 7.312 (H-3), 6.930 (H-12), 5.813 (H-16), and 3.890 (H-15 $\alpha$ )]を得た。同様の操作と *S*-MTPA-Cl を用いることで、bis-(*R*)-MTPA-エステル体 [ $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.373 (H-11), 8.288 (H-1), 7.889 (H-4), 7.754 (H-6), 7.655 (H-7), 7.315 (H-3), 6.906 (H-12), 5.751 (H-16), 3.980 (H-15 $\alpha$ )]を得た。

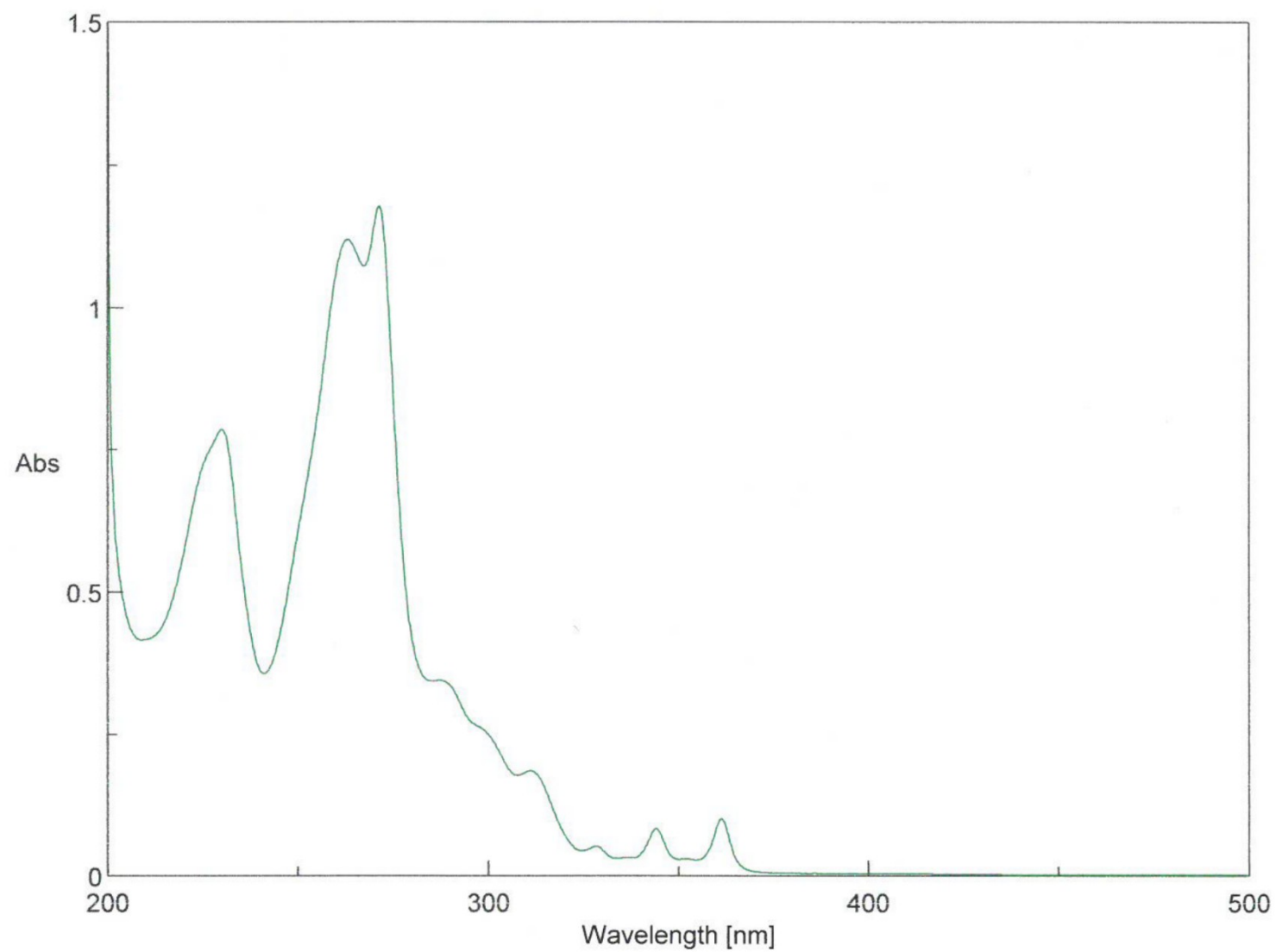


**Figure 7.1.** Cinanthrenol A の *S/R*-MTPA-bis-エステル体の  $^1\text{H}$  NMR ケミカルシフト値の差( $\Delta\delta^{S-R}$  ppm)



## 細胞毒性試験

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells / well)の培養は、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で行い、D-MEM 培地 (low glucose, No. 041-29775, Wako)に 10%ウシ胎児血清 (Lot No. S1820, BioWest), gentamicin1 を  $8 \mu\text{g/mL}$ , 1% antibiotic-antimicotic を加えて調製した培地を用いた。96-well プレーートの各ウェルに cinanthrenol A のメタノール溶液 (終濃度  $10-0.08 \mu\text{g/mL}$ )を加えて、で 72 時間培養した。マウス白血病細胞株 P388 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) は、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で培養した。RPMI 培地 (No. 189-02025, Wako)に 10%ウシ胎児血清 (Lot No. S1820, BioWest),  $6.0 \times 10^{-5} \%$  HEDS solution (2,2'-dithiodiethanol), kanamycin sulfate を  $40 \mu\text{g/mL}$  加えて調製した培地を用いた。上記と同様に、cinanthrenol A (**1**)のメタノール溶液 (終濃度  $10-0.08 \mu\text{g/mL}$ )を加えて 72 時間培養した。それぞれの細胞を培養後各ウェルに 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl- 2H-tetrazolium bromide (MTT,  $1 \text{mg/mL}$ )の生理食塩溶液 ( $50 \mu\text{L}$ )を加え、さらに 4 時間倍世用を続けた。培養終了後、培地を取り除き、各ウェルに DMSO を  $150 \mu\text{L}$  を加えて細胞を溶解し、溶出したホルマザン (MTT 還元体)の濃度を吸光度計 (吸収波長  $550 \text{nm}$ )を用いて測定し、 $\text{IC}_{50}$  値を算出した。



**Figure 7.2.** Cinanthrenol A の UV スペクトル (MeOH)

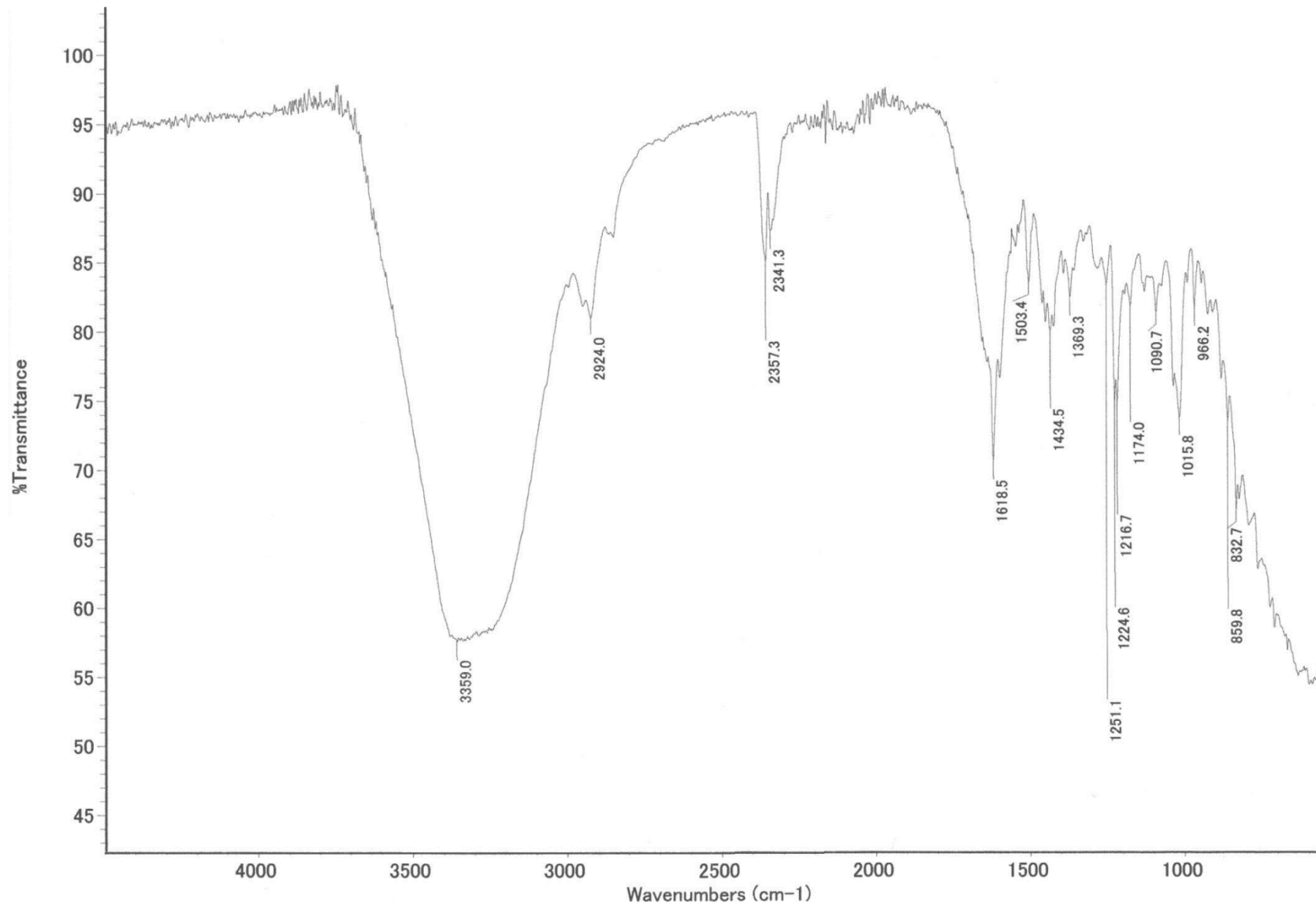
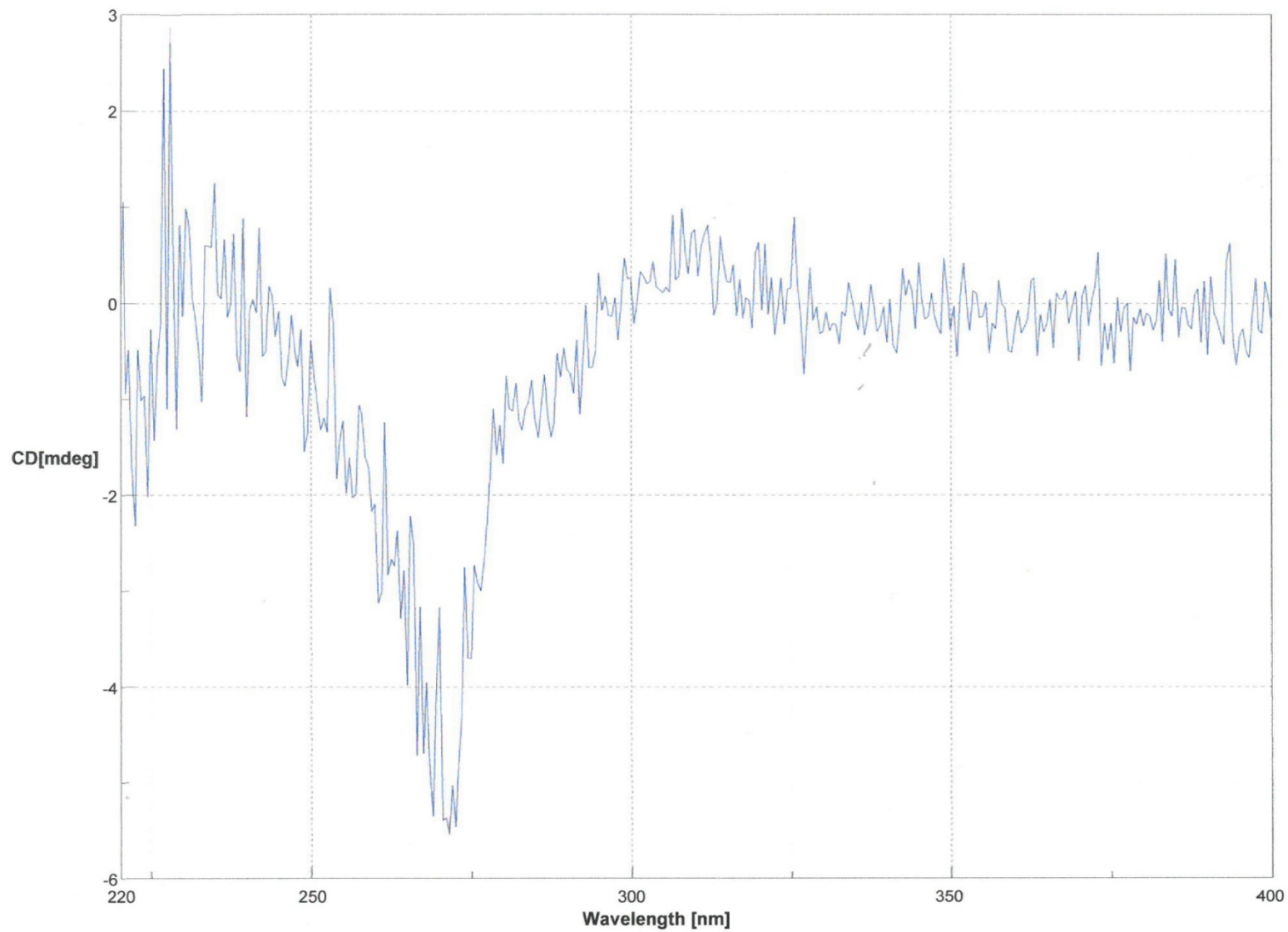
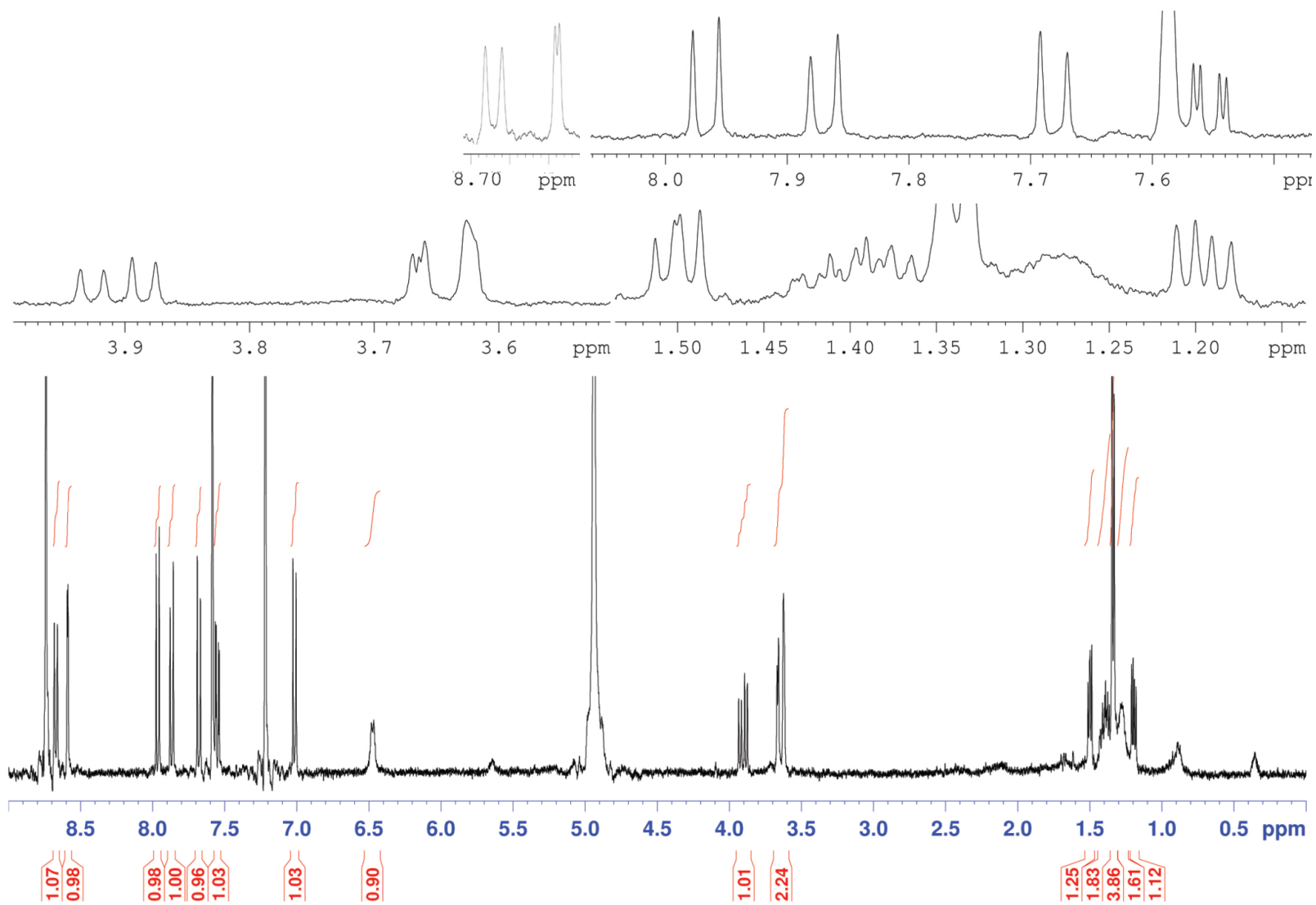


Figure 7.3. Cinanthrenol A の IR スペクトル



**Figure 7.4.** Cinanthrenol A の CD スペクトル



**Figure 7.5.** Cinanthrenol A の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル(400 MHz, pyridine- $d_5$ )

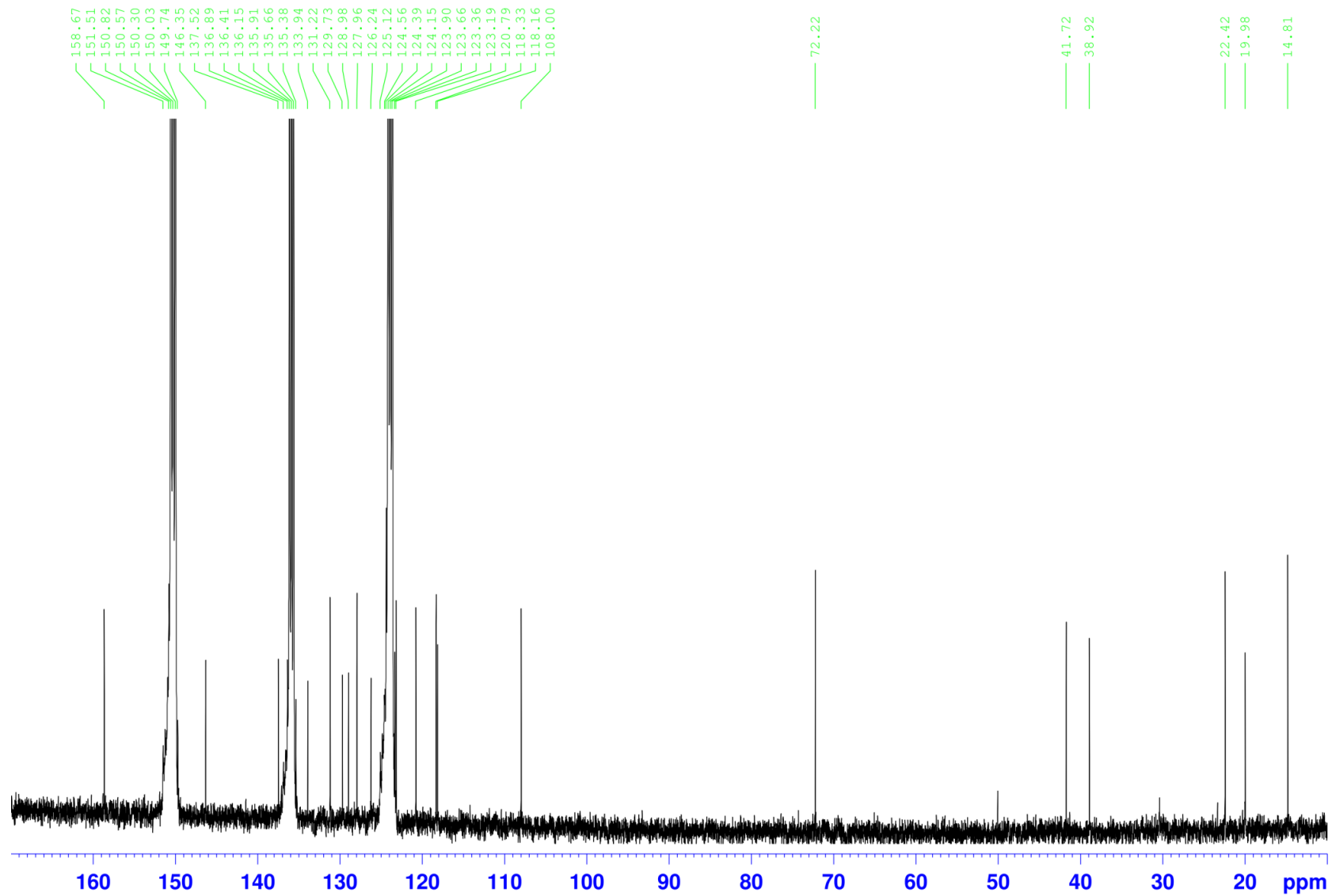
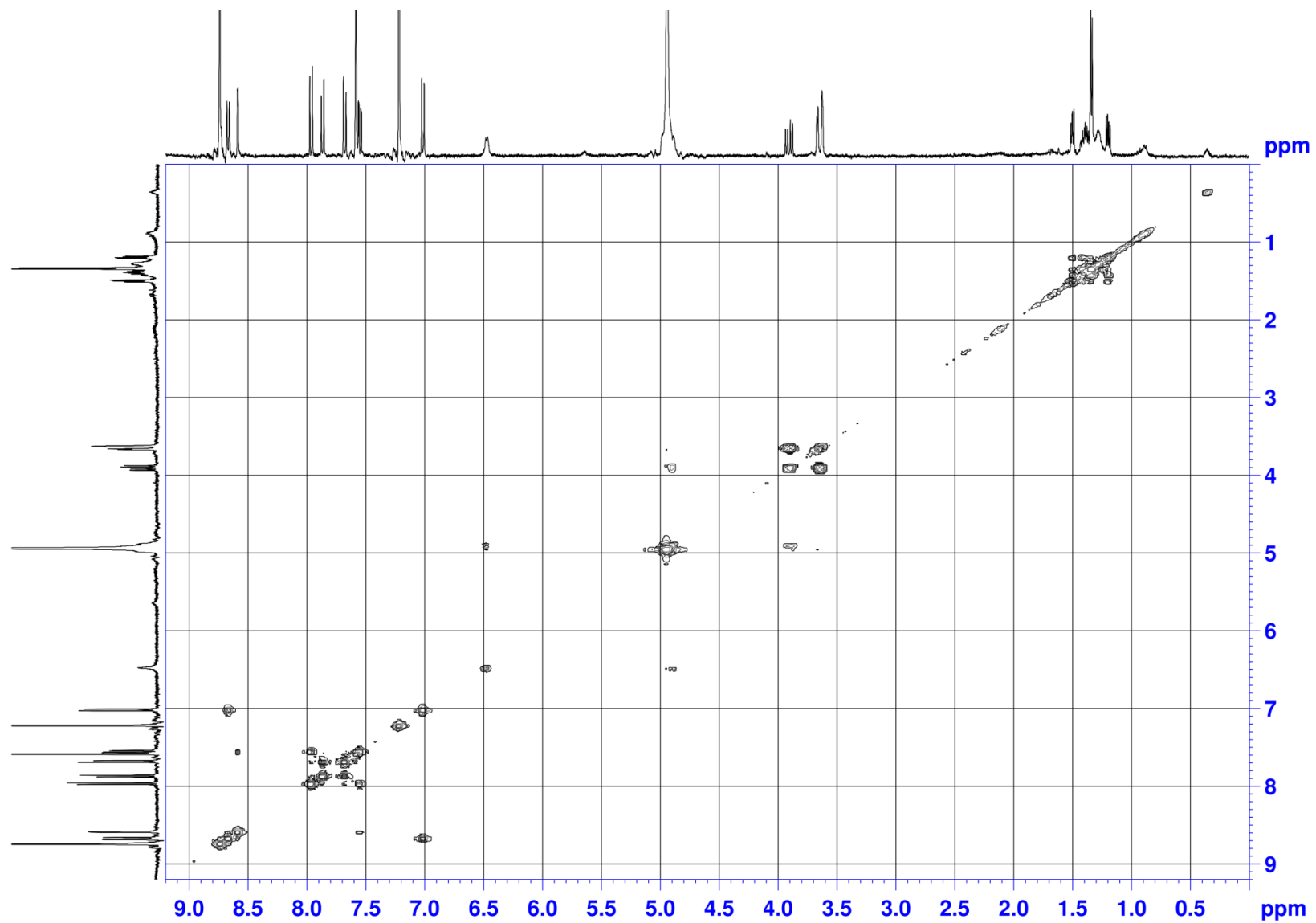


Figure 7.6. Cinanthrenol A の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル(400 MHz, pyridine- $d_5$ )



**Figure 7.7.** Cinanthrenol A の COSY スペクトル(400 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

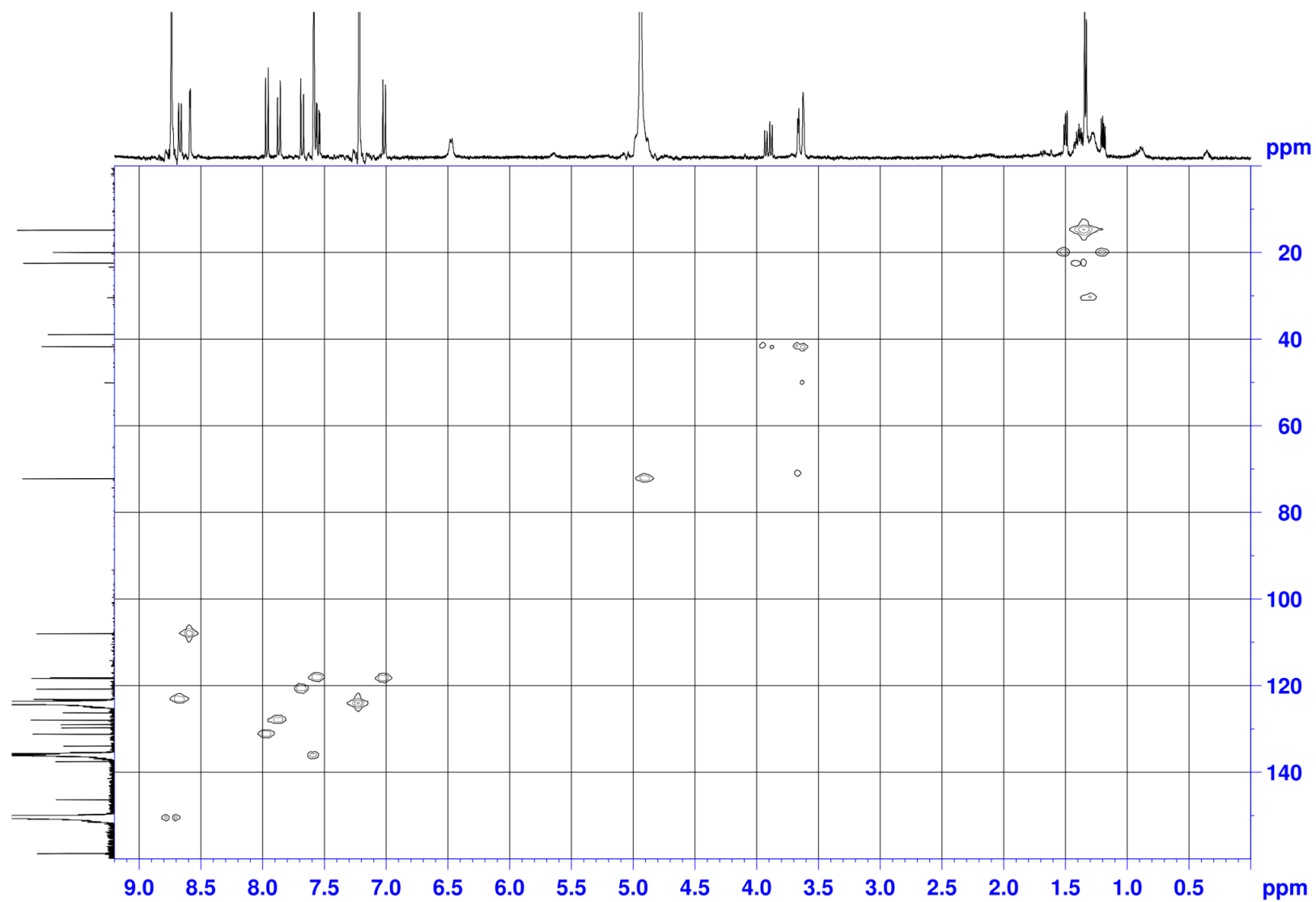
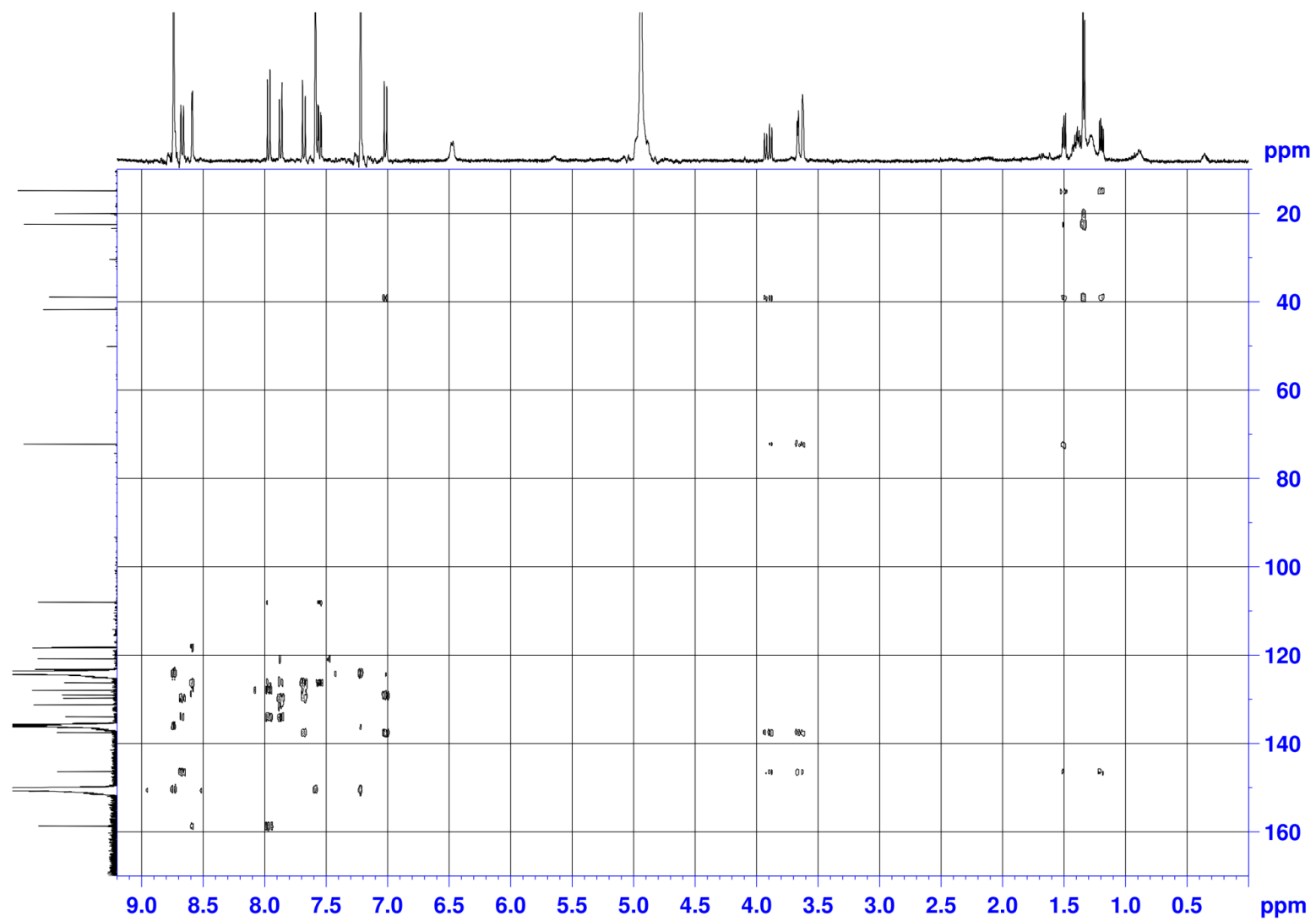
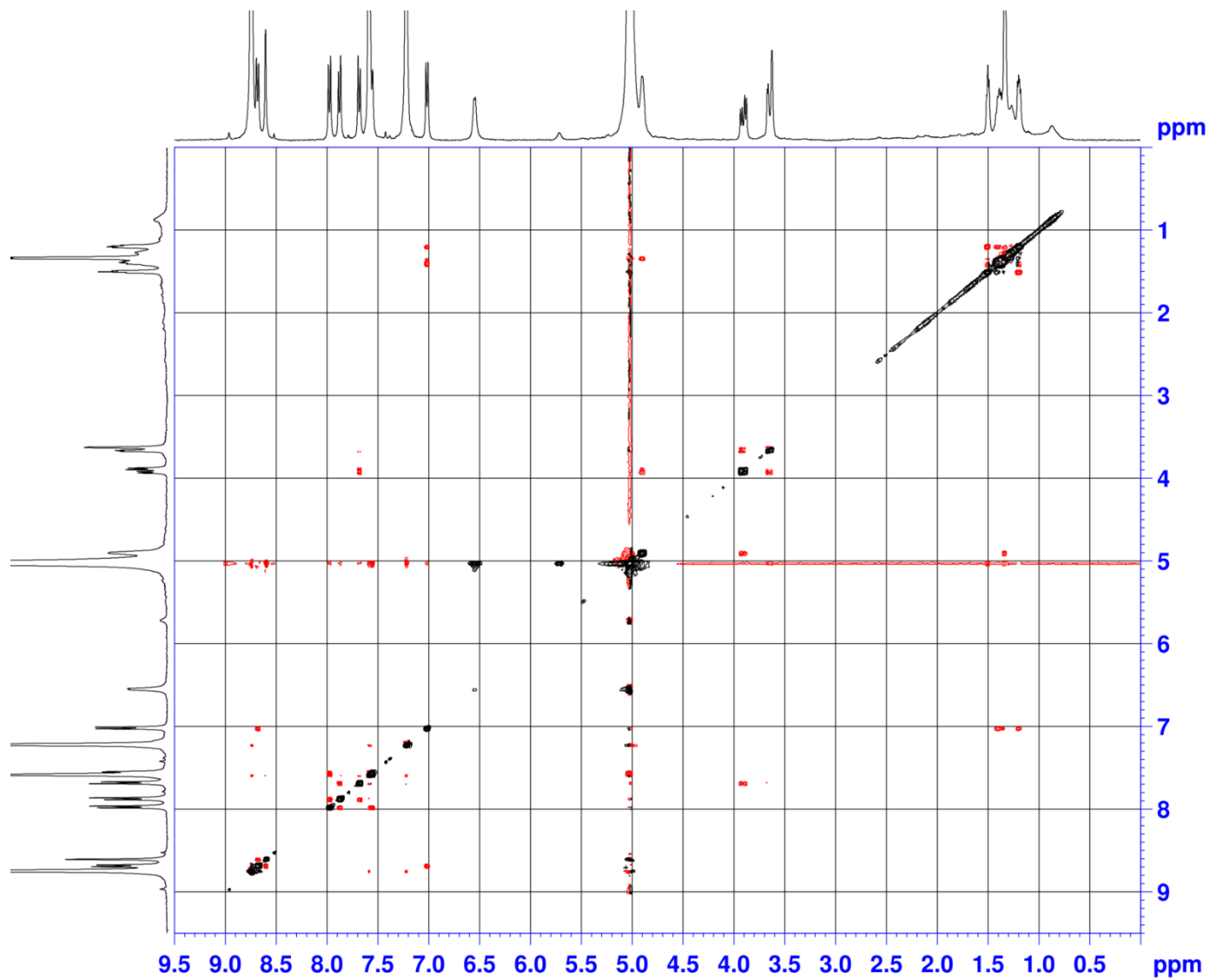


Figure 7.8. Cinanthrenol A の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル(400 MHz, pyridine- $d_5$ )





**Figure 7.9.** Cinanthrenol A の HMBC スペクトル(400 MHz, pyridine- $d_5$ )



**Figure 7.10.** Cinanthrenol A  $\mathcal{O}$  NOESY (400 MHz, pyridine- $d_5$ )

## 7.2. 第3章における実験項

### 一般機器

旋光度 ( $[\alpha]_D$ )は 10 cm セルを用いて JASCO P-2200 polarimeter によって測定した。UV スペクトルはサンプルの MeOH 溶液を用いて Pharmacia Ultrospec 3000 spectrophotometer により測定し、IR スペクトルは Thermo Nicolet FT-IR spectrometer を用いて測定した。Dolabellol A の NMR スペクトルは、 $\text{CDCl}_3$  に溶かし Bruker UltraShield 400 magnet によって測定した。Dolabellol A の同位体効果によるプロトンシグナルのシフト値は dolabellol A を  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$  もしくは  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  に溶かし Bruker Ultra Shield 400 spectrometer で測定した。HPLC には JASCO PU-1580 solvent delivery system に検出器 JASCO UV-975 とポンプ JASCO PU-1580 を付けて使用した。高分解能質量分析機 JEOL JMS-T100CS spectrometer を用いて質量分析を行った。X 線結晶構造解析には Rigaku R-AXIS RAPID-II を用いた。

### 実験動物

*Dolabella auricularia* (Sample No. M08201)は、2008年24日に熊本県天草沖の深さ 10 m の海底で採集した。

### 抽出・単離方法

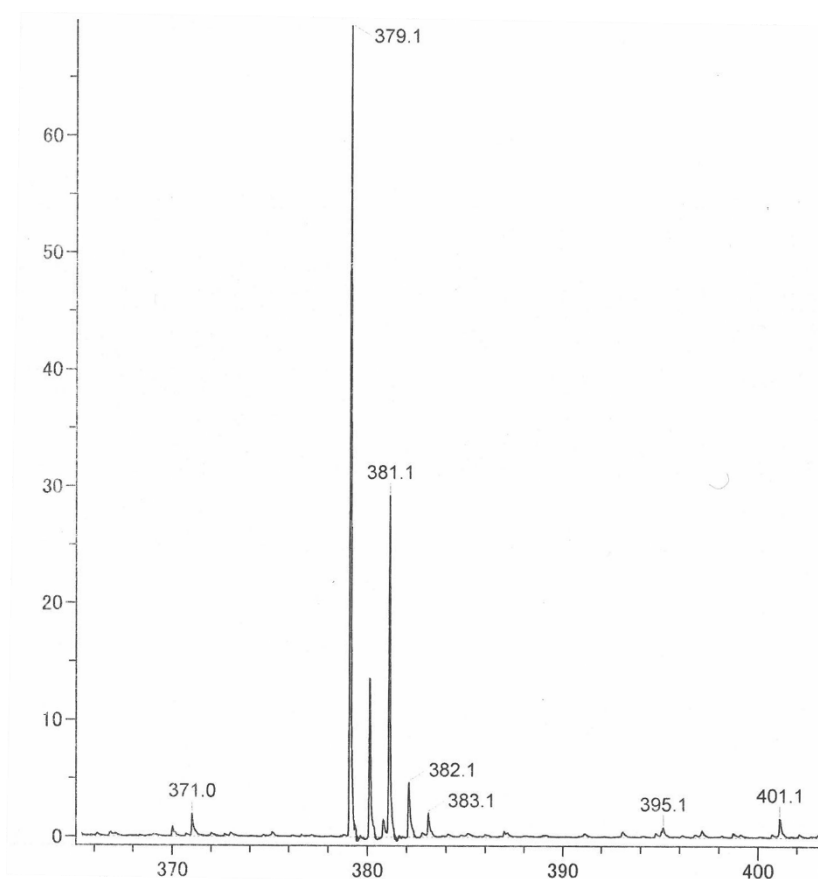
採集したタツナミガイは速やかに冷凍し、冷凍した状態のまま研究室に運んで、 $-25^\circ\text{C}$  で保管した。解凍した *D. auricularia* (855 g, 湿重量)を半分に切り、MeOH ( $4 \times 300$  mL)と  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (70/30/5;  $1 \times 100$  mL)により抽出した。それぞれの抽出液を合一し、エバポレーターで濃縮後、次いで、水層を *n*-BuOH により抽出した。 $\text{CHCl}_3$  層と *n*-BuOH 層を合一して濃縮した後、Kupchan 分画に付し、*n*-hexane 層、 $\text{CHCl}_3$  層、60%MeOH

層を得た。CHCl<sub>3</sub>層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー (MeOH/H<sub>2</sub>O = 1/1, 7/3; MeCN/H<sub>2</sub>O = 7/3, 8/2; 100% MeOH; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 6/4/1 で溶出) に付した。得られた 6 つの画分のうち 70%MeCN で溶出してきた画分を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 20/0/0, 19/1/0, 9/1/0, 80/20/1, 70/30/5, 6/4/1 で溶出)に付したところ、13 画分を得た。4 番目の画分 (116.1 mg)について、4 回の逆相 HPLC 分取 [1st: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII; 250 × 20 mm, 85% MeOH, 2nd: 80% MeOH, 3rd: Develosil C30-UG; 250 × 20 mm, 80% MeCN, 4th : gradient 80 – 100% MeOH]を用いて精製し、dolabellol A を 4.9 mg 単離した。 .

**Dolabellol A** : white amorphous solid, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +22.9 (c 0.02, MeOH); IR  $\nu_{\max}$  3317, 2943, 2831, 1449, 1114, 1022, 627 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  260 nm (log  $\epsilon$  0.284); HRESI(+)MS  $m/z$  403.1399 [M + H - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>BrClO 403.1398,  $\Delta$  +0.1 mmu);

#### **Dolabellol A のエポキシ化反応**

Dolabellol A (300  $\mu$ g)の Et<sub>2</sub>O (1 mL)溶液に KOH (100 mg)を加えて室温で反応を行った。反応の進行具合は、シリカゲル TLC と展開溶媒 (*n*-hexane : EtOAc = 8 : 2)を用いて確認した。一晚反応を行った後、反応溶液をエバポレーターで濃縮し、*n*-hexane で抽出した。得られた生成物を ESIMS 分析に付したところ、 $m/z$  379/381 に同位体比率が 3 : 1 のイオンピーク [C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>ClO<sub>2</sub> + K]<sup>+</sup>が認められたことから、dolabellol A のエポキシ体には臭素原子が含まれず、ハロゲン原子は塩素原子のみが含まれていることが明らかとなった。



**Figure 7.11.** Dolabellol A の ESI-MS スペクトル

### 細胞毒性試験

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells / well)の培養は、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  の条件下で行い、D-MEM 培地 (low glucose, No. 041-29775, Wako)に 10%ウシ胎児血清 (Lot No. S1820, BioWest), gentamicin1 を  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 1% antibiotic-antimicotic を加えて調製した培地を用いた。96-well プレート各ウェルに dolabellol A のメタノール溶液 (終濃度  $10-0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$ )を加えて、72 時間培養した。マウス白血病細胞株 P388 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells)は、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。RPMI 培地 (No. 189-02025, Wako)に 10%ウシ胎児血清 (Lot No. S1820, BioWest),  $6.0 \times 10^{-5}$  % HEDS solution (2,2'-dithiodiethanol), kanamycin

sulfate を 40  $\mu\text{g/mL}$  加えて調製した培地を用いた。上記と同様に, dolabellol A のメタノール溶液 (終濃度 10–0.08  $\mu\text{g/mL}$ )を加えて 72 時間培養した。それぞれの細胞を培養後各ウェルに 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl- 2*H*-tetrazolium bromide (MTT, 1 mg/mL) の生理食塩溶液 (50  $\mu\text{L}$ )を加え, さらに 4 時間倍世用を続けた。培養終了後, 培地を取り除き, 各ウェルに DMSO を 150  $\mu\text{L}$  を加えて細胞を溶解し, 溶出したホルマザン (MTT 還元体)の濃度を吸光度計 (吸収波長 550 nm)を用いて測定し,  $\text{IC}_{50}$  値を算出した。

### Dolabellol A の X 線結晶構造解析

以下の条件を用いて測定を行った。

検出器から結晶までの距離 127.40 mm

温度  $-150 \pm 1^\circ\text{C}$

最大  $2\theta$  値  $136.3^\circ$

撮影枚数 90 枚

$\omega$  scans from  $80.0^\circ$  to  $260.0^\circ$  in  $10.00^\circ$  step, at  $\chi = 54.0^\circ$  and  $\varphi = 0.0^\circ$ , 75.0 [sec./ $^\circ$ ].

$\omega$  scans from  $80.0^\circ$  to  $260.0^\circ$  in  $10.00^\circ$  step, at  $\chi = 54.0^\circ$  and  $\varphi = 90.0^\circ$ , 75.0 [sec./ $^\circ$ ].

$\omega$  scans from  $80.0^\circ$  to  $260.0^\circ$  in  $10.00^\circ$  step, at  $\chi = 54.0^\circ$  and  $\varphi = 180.0^\circ$ , 75.0 [sec./ $^\circ$ ].

$\omega$  scans from  $80.0^\circ$  to  $260.0^\circ$  in  $10.00^\circ$  step, at  $\chi = 54.0^\circ$  and  $\varphi = 270.0^\circ$ , 75.0 [sec./ $^\circ$ ].

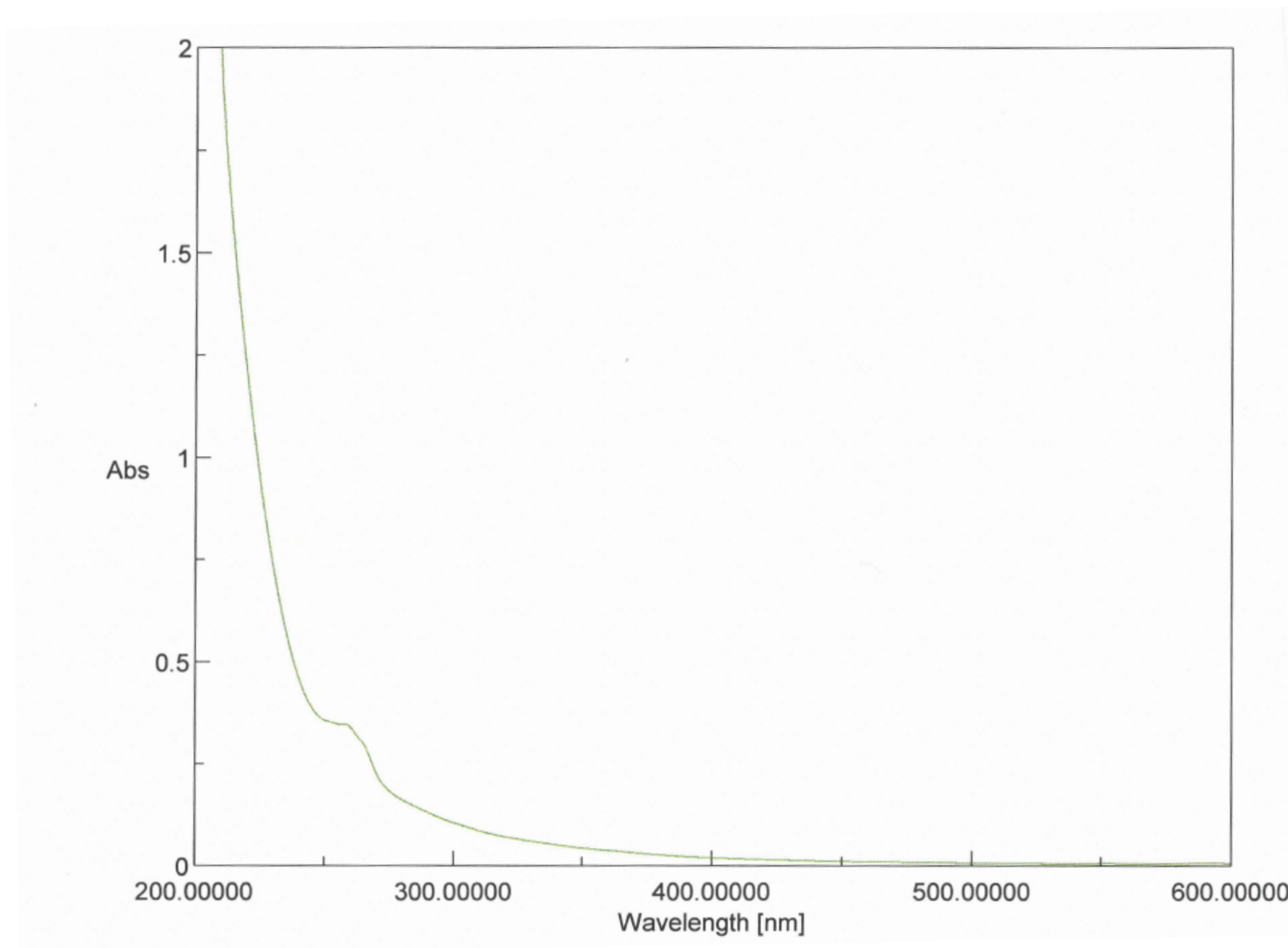
$\omega$  scans from  $80.0^\circ$  to  $260.0^\circ$  in  $10.00^\circ$  step, at  $\chi = 0.0^\circ$  and  $\varphi = 0.0^\circ$ , 75.0 [sec./ $^\circ$ ].

0.100 mm pixel mode.

Dolabellol A の結晶の X 線解析データは direct methods (SIR2008)<sup>92</sup> とフーリエ法を用いて処理した。また, 非水素原子構造イメージは full-matrix least square

(SHELXL2014/6)<sup>100</sup>を用いて作成した。結晶構造の測定情報を以下に示す

結晶寸法	0.800 × 0.050 × 0.050 mm
結晶の格子定数	a = 7.2470(6) Å
	b = 16.4428(13) Å
	c = 17.4010(13) Å
	V = 2073.5(3) Å <sup>3</sup>
空間群	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (#19)
Z value	4
Dcalc	1.351 g/cm <sup>3</sup>
<i>F</i> <sub>000</sub>	888.00
μ(CuKα)	39.508 cm <sup>-1</sup>
Flack parameter <sup>101</sup> (Parsons' quotients = 630)	0.08(2)



**Figure 7.12.** Dolabellol A の UV スペクトル (MeOH)



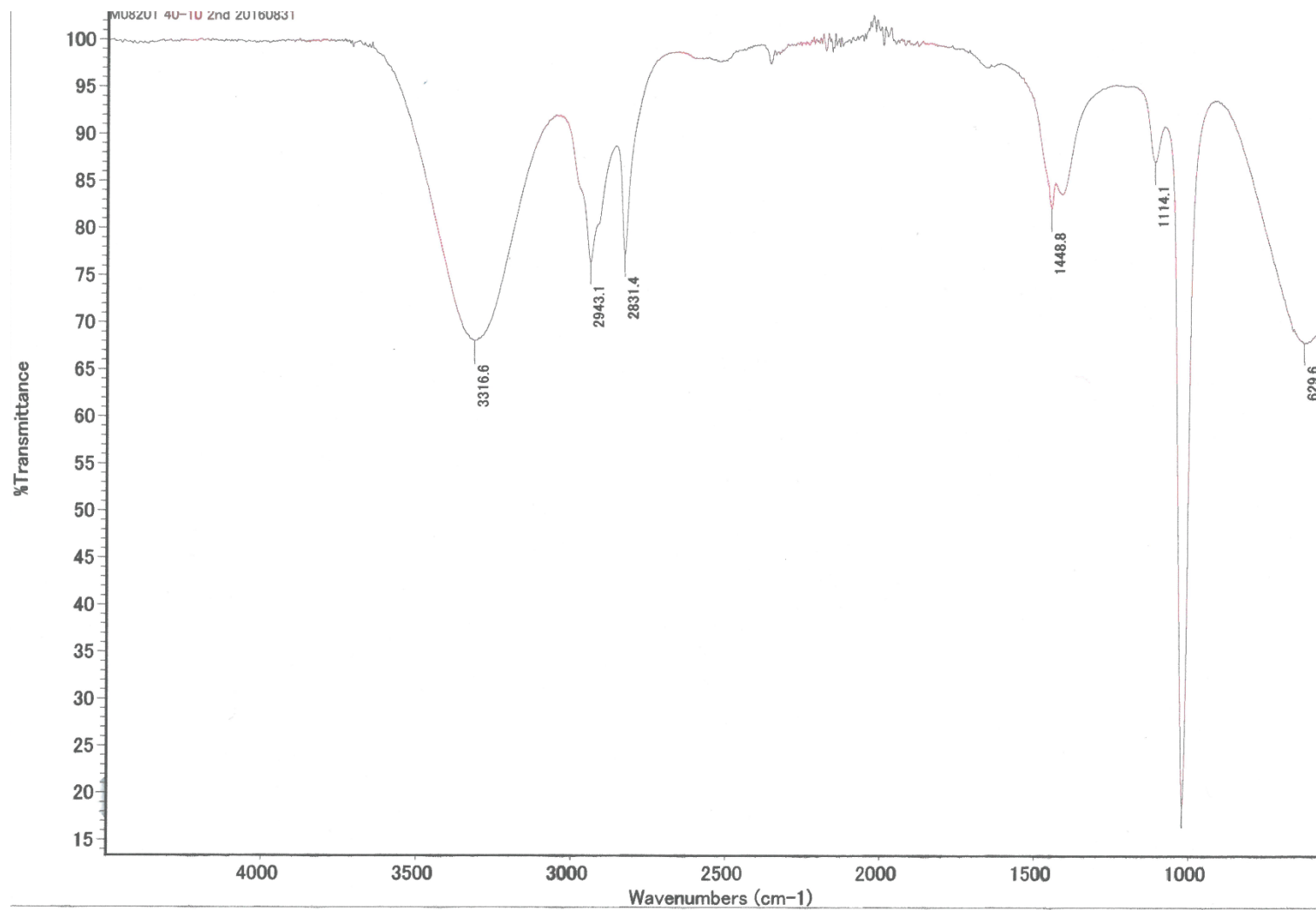
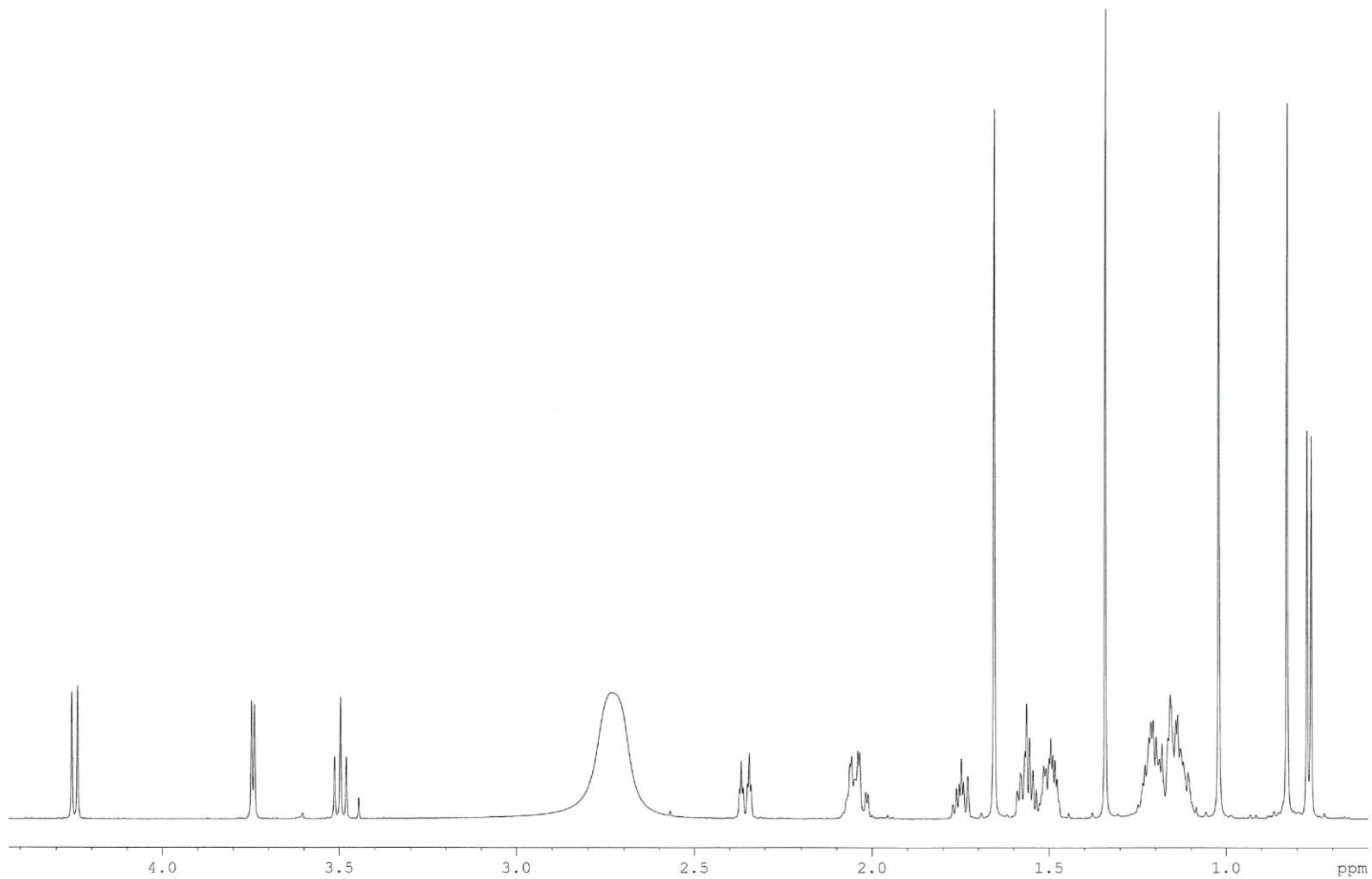


Figure 7.13. Dolabellol A の IR スペクトル



**Figure 7.14.** Dolabellol A の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

FCFDZ

60  
15

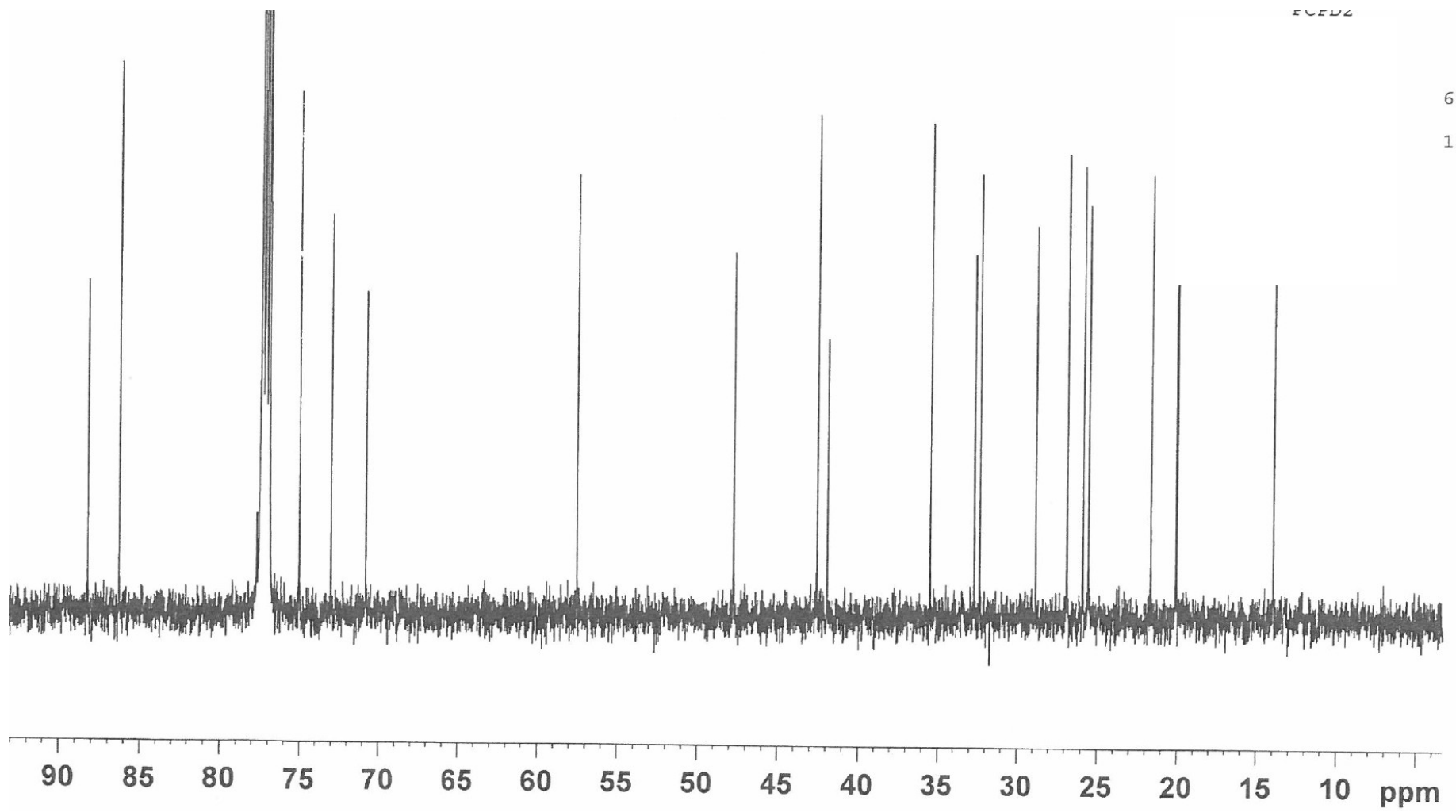
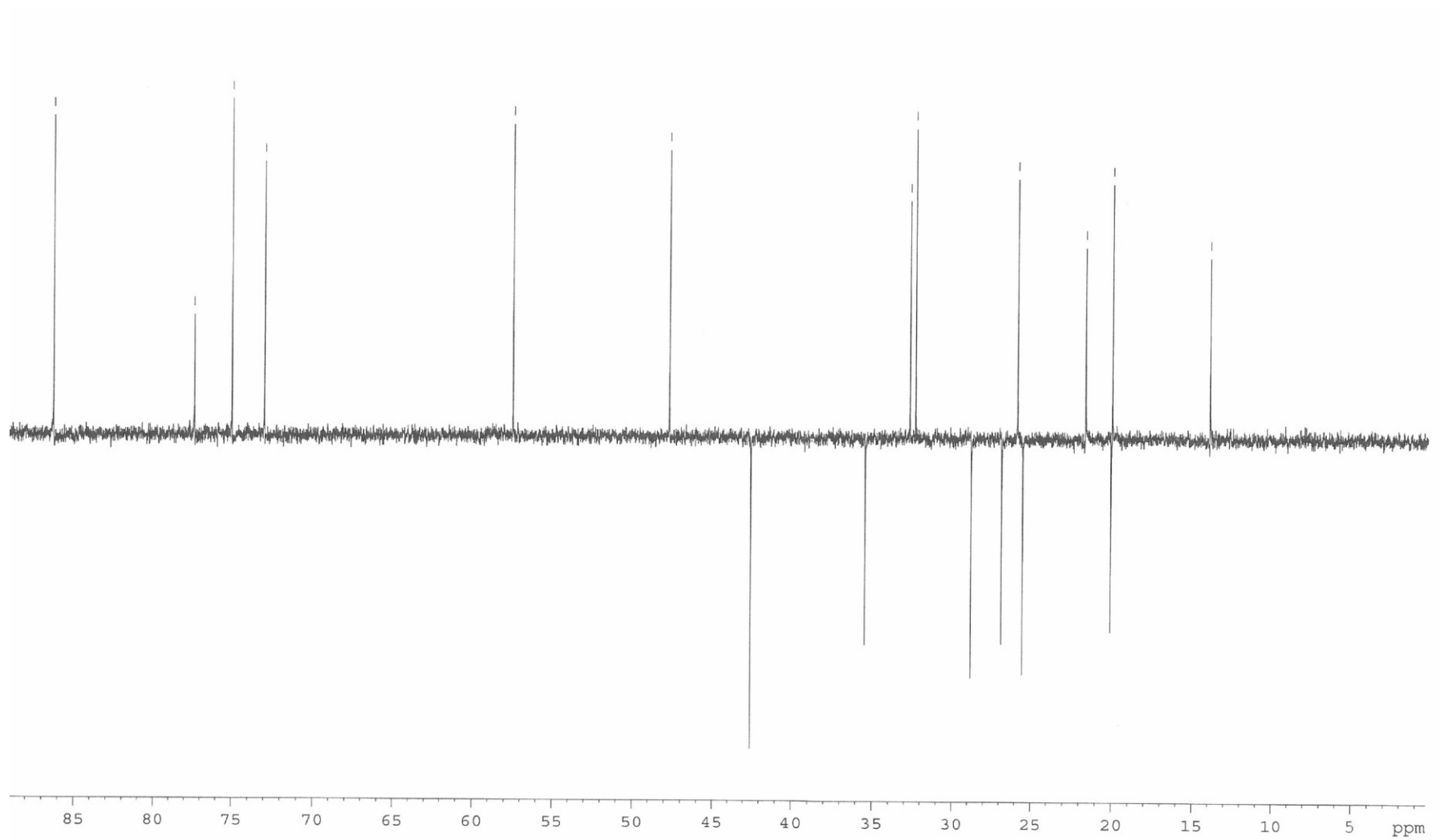


Figure 7.15. Dolabellol A の <sup>13</sup>C NMR スペクトル(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Figure 7.16.** Dolabellol A の DEPT スペクトル(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

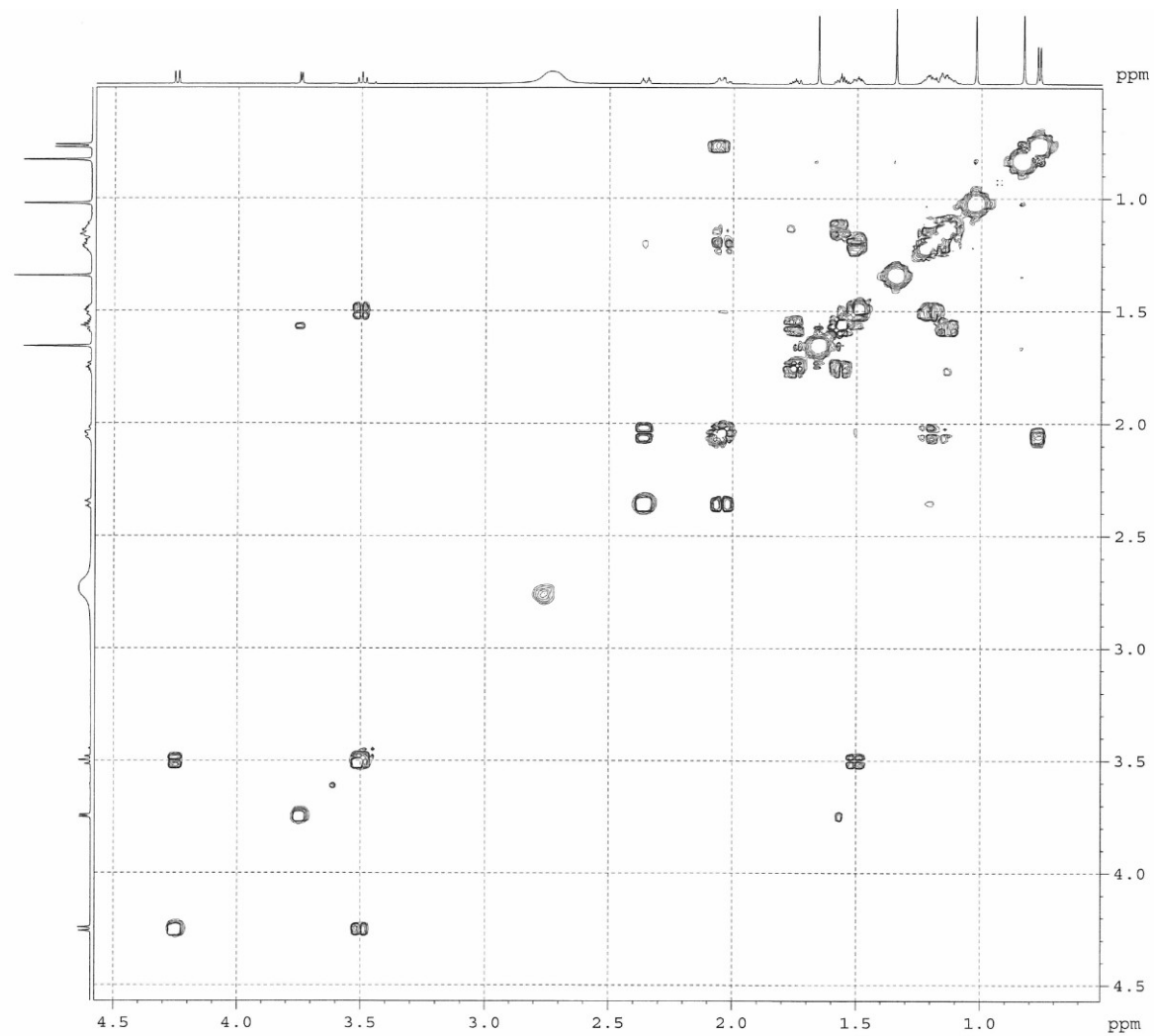


Figure 7.17. Dolabellol A の COSY スペクトル(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

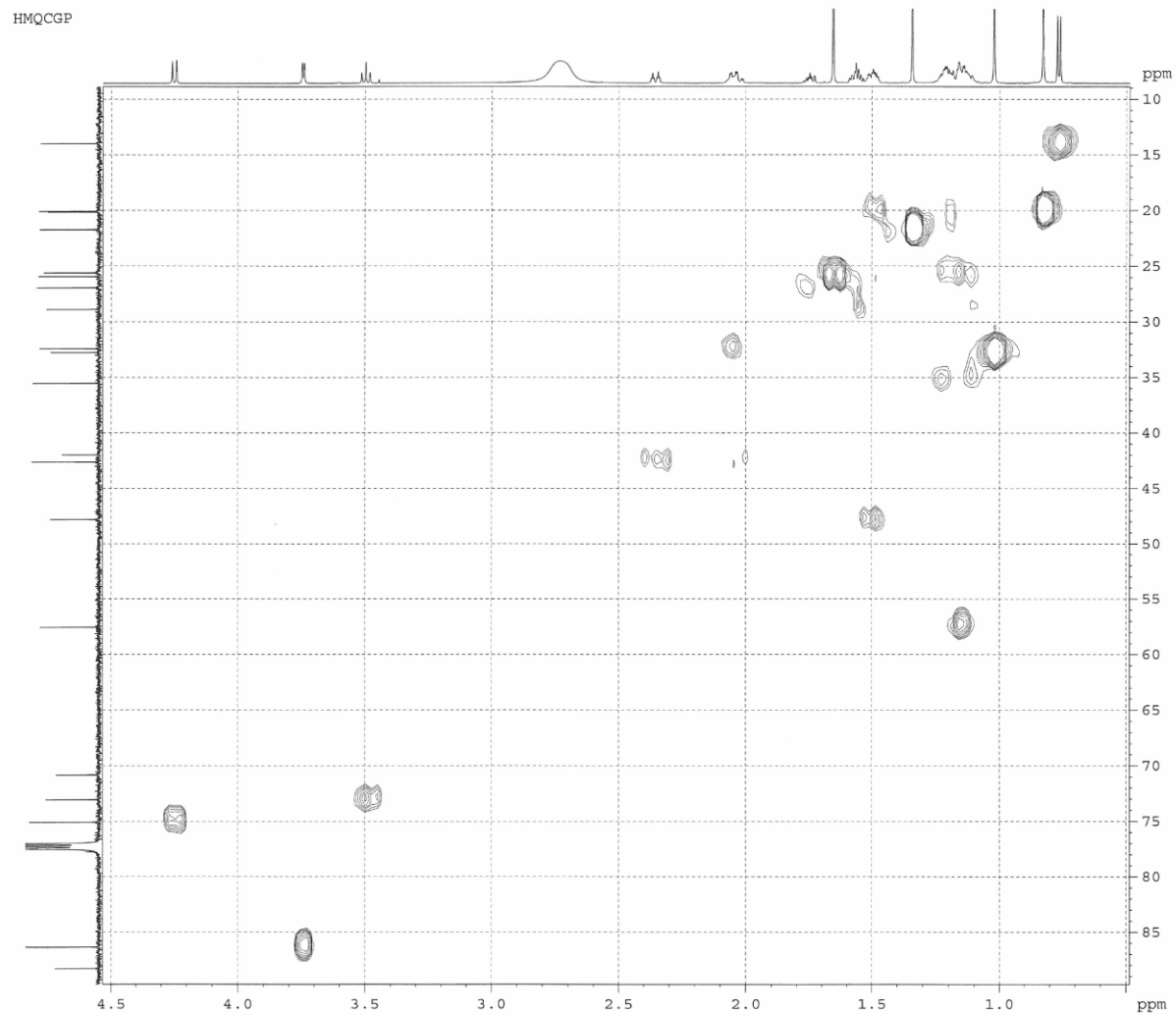


Figure 7.18. Dolabellol A の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトル(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

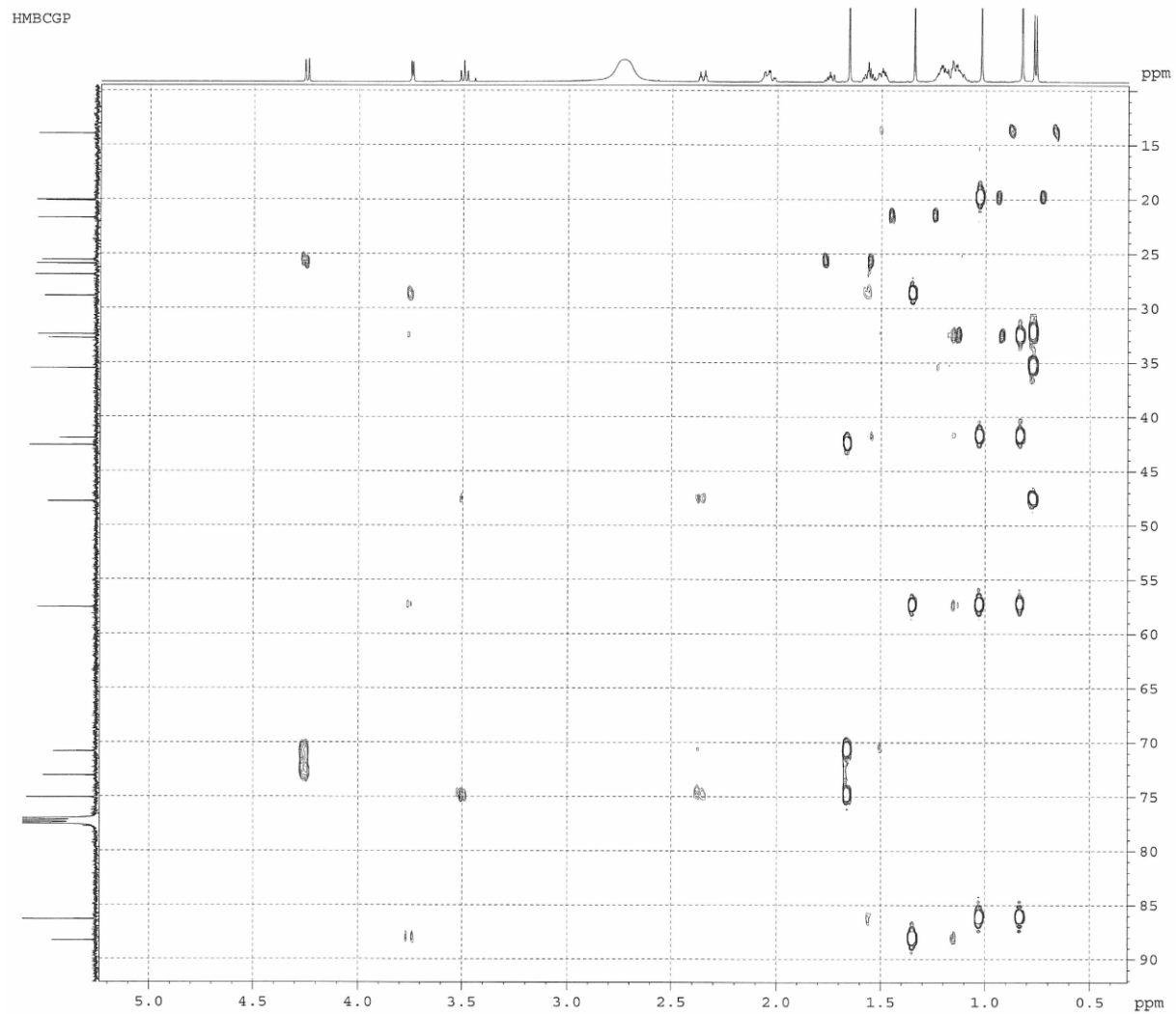


Figure 7.19. Dolabellol A の HMBC スペクトル(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

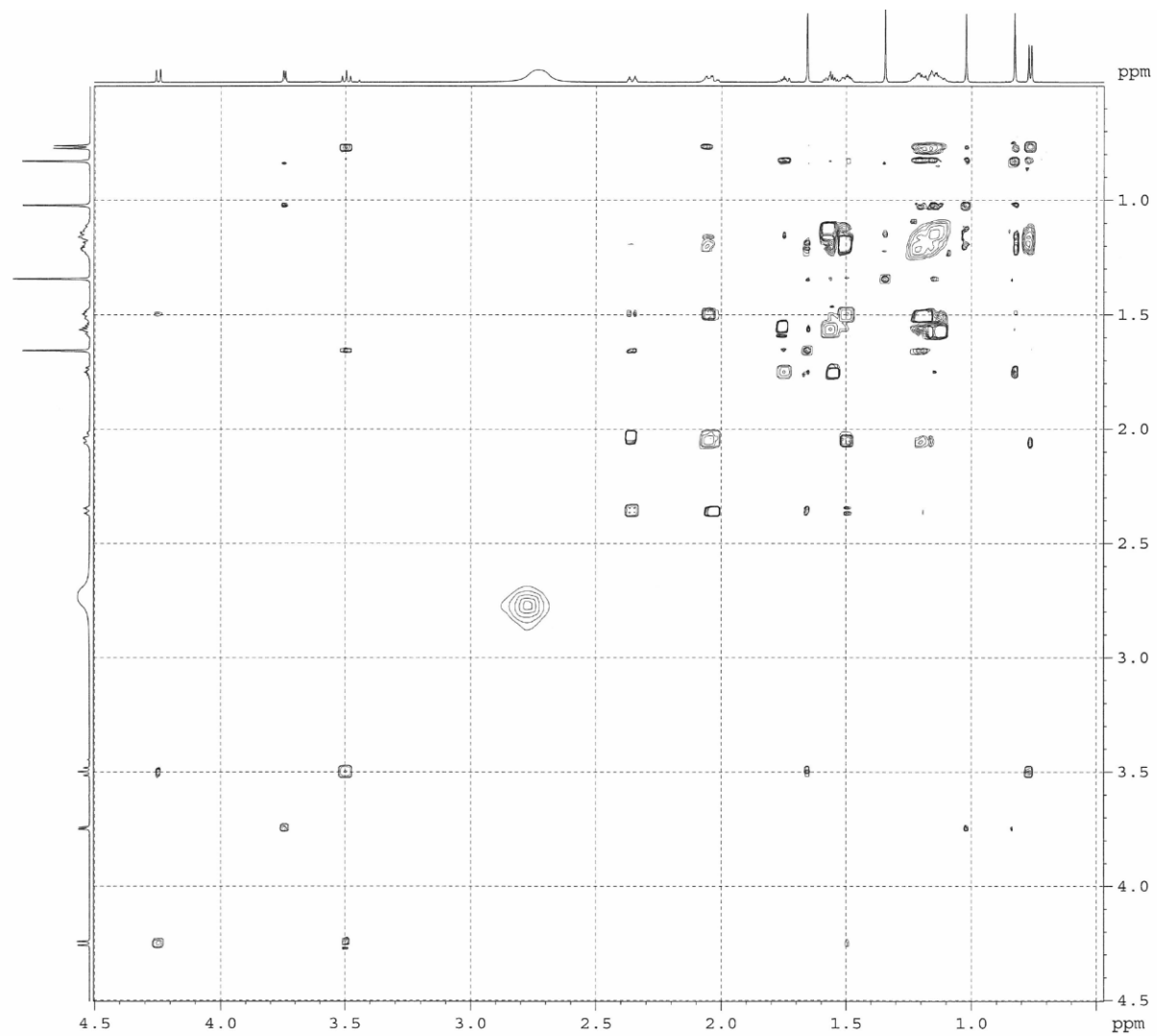


Figure 7.20. Dolabellol A の NOESY スペクトル(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



### 7.3 第4章における実験項

#### 一般機器

IR スペクトルは Thermo Nicolet FT-IR spectrometer を用いて測定した。Sameuramide A の NMR スペクトルは、CD<sub>3</sub>CN に溶かし Bruker UltraShield 400 or 600 magnet によって測定した。HPLC には JASCO PU-1580 solvent delivery system に検出器 JASCO UV-975 とポンプ JASCO PU-1580 を付けて使用した。高分解能質量分析機 JEOL JMS-T100CS spectrometer を用いて質量分析を行った。

#### 試薬

alanine (Wako)

$\beta$ -hydroxyleucine (Santa Cruz Biotechnology)

allothreonine (TCI America)

*N*-Me-Alanine (BACHEM)

phenyllactic acid (SIGMA)

*N*-methyl dehydroalanine (Tao Ye 教授より提供, 北京大学)

#### 実験動物

ウスボヤ科ホヤ (Sample No. T07403)は、2007年に鮫浦湾 (38.37.14N 141.50.63E)の水深 5-10 m の海底で採集した。

#### 抽出・単離方法

採集したホヤは冷蔵した状態のまま研究室に運び、-30°C で保管した。解凍したウスボヤ

科ホヤ (27 g, wet weight)は半分に切り MeOH (2×100 mL)に浸漬することで抽出した。合一した抽出液を濃縮し、H<sub>2</sub>O と CHCl<sub>3</sub> で二層分配した。CHCl<sub>3</sub>層を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー (MeOH/H<sub>2</sub>O = 50/50, 70/30; MeCN/H<sub>2</sub>O = 70/30, 85/15; MeOH; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 60/40/10 で溶出)に付した。得られた 6 つの画分のうち 70%MeCN 溶出画分にコロニー維持活性が認められた。そこで 70%MeCN 画分をさらに逆相 HPLC [COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII; 250 × 20 mm, gradient 50 – 100% MeCN]を用いて分画し、マウス ES 細胞のコロニー維持活性を示した画分を逆相 HPLC [COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-ARII; 250 × 20 mm, 80% MeCN]を用いて精製し、sameuramide A を 2.3 mg 単離した。

**Sameuramide A** : pale yellow amorphous solid,  $[\alpha]_D -75.9$  ( $c$  0.02); IR  $\nu_{\max}$  3640, 3326, 2967, 2930, 2360, 2343, 1749, 1640, 1518, 1449, 1402, 1210, 1160, 1073  $\text{cm}^{-1}$ ; HRESIMS (pos.)  $m/z$  1016.5558  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for C<sub>50</sub>H<sub>78</sub>N<sub>7</sub>O<sub>15</sub> 1016.5550,  $\Delta$  +0.8 mmu);

### ***N,O*-Me<sub>2</sub>-allo-threonine の合成**

D-*allo*-threonine (16.0 mg)と di-*tert*-butyl dicarbonate (40 mg)を NEt<sub>3</sub> 2 mL と H<sub>2</sub>O 1 mL の混合溶液に加え、室温・オーバーナイトで反応させた。反応溶液を濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 80/20/1, 70/30/5, 6/4/1)に付し、CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20/1)溶出画分に 1M NaOH aq.を加えて、Et<sub>2</sub>O で洗浄した。水層の pH が 3 になるよう 1M HCl を加えて調製後、EtOAc で抽出した。EtOAc 層を NaCl 水溶液で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水後に濃縮した。濃縮物 (9.8 mg)と sodium hydride (13 mg. 60% in mineral oil)を、-30°C に冷却した dry THF (1 mL)に加え、さらに MeI (30  $\mu$ L)を加えて、攪拌しながらゆっくりと室温に戻してさらに 1 時間反応させた。反応溶液に飽和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液を加え、減圧濃縮したものに 1M HCl を加えて pH 3 に調製し、EtOAc (3 × 1 mL)で抽出した。得られた有機層を

NaCl 水溶液で洗浄し、無水 MgSO<sub>4</sub>により脱水した。得られた有機層を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [φ 1.0 cm × 5.0 cm, *n*-hexane:EtOAc (1:1)]を用いて精製を行った。

### 酸加水分解と改良 Marfey 法

Sameuramide A (100 μg)を酸加水分解 (5M HCl, 100°C, 12 h)に付し、反応液を 60°C に保温しながら窒素気流下で乾固させた。1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamide 溶液 (L-FDLA, 0.5% w/v in acetone) もしくは 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-D-leucinamide 溶液 (D-FDLA, 0.5% w/v in acetone) 100 μL と 1M NaHCO<sub>3</sub> (20 μL)を乾固させたサンプルに加え、37°C で 1 時間反応させた。反応後、1M HCl (20 μL)を加えて反応液を酸性にしたものを窒素気流下で乾燥させ、MeCN-H<sub>2</sub>O (1:1, 100μL)を加えて、LC-MS 分析用サンプルとした。標品のアミノ酸も同様に調製し、調製した各 FDLA 誘導体について逆相の HPLC-MS 分析に付した。

逆相 HPLC-MS 分析条件を以下に示す。

Curtain Gass	25
Collision Energy	10.0
Ion Spray Vortage Heating	5500
Temperature	550
Ion Source Gass1	50
Ion Source Gass2	70

### ***p*-bromobenzate 誘導体の合成**

標品の DL- または L-phenyllactic acid (それぞれ, 10.5 または 5.6 mg)と, pyridine (それぞれ, 39.1 または or 20.6 mg), 4-dimethylaminopyridine (DMAP, それぞれ 2.0 または 1.0 mg)を乾燥した CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に加えた。ここに, 2-bromo-benzoyl chloride (それぞれ, 19.7 または 9.9 mg)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液をゆっくり加え, 室温で 2 時間攪拌しながら反応させた。この反応液を 1M HCl 溶液, 15% NaHCO<sub>3</sub> 溶液の順で洗浄し, 得られた有機層を濃縮後に逆相 HPLC で精製し, DL- または L-phenyllactic acid の *p*-bromobenzate 誘導体を得た。Sameuramide A の加水分解物についても, 同様の操作を行い, phenyllactic acid の *p*-bromobenzoate 誘導体を得た。

### ***p*-bromobenzate 誘導体のキラルカラム分析**

上記で得られたそれぞれの *p*-bromobenzate 誘導体について, キラル HPLC [column, CHIRAL ART Cellulose-SB (4.6 × 250 mm); solvent, 40% MeCN + 0.05% trifluoroacetic acid; flow rate, 0.42 mL/min; detection by UV absorption at 254 nm]を用いて分析を行った。ESIMS (positive ion mode)により, 誘導体ピークの確認を行った。

### **マウス ES 細胞の維持培養**

マウス ES 細胞 (CiRa 京都大学より提供, CCE strain)は, ゼラチンコートしたディッシュ上もしくは, mitomycin C 処理した mouse embryonic fibroblasts (MEFs, Kitayama Labs, nagano, Japan)上で, 以下の培地条件により培養した。

### **培地条件**

KnockOut Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific)

15% FBS (Biowest)

1 × non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific)

0.1mM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific)

2mM L-glutamine (Wako Pure Chemical Co.)

1mM sodium pyruvate (Wako Pure Chemical Co.)

1% penicillin-streptomycin (Wako Pure Chemical Co.)

1,000 U/mL LIF (ESGRO, Merck Millipore).

### コロニー形成スクリーニング

各ウェルには、上記の維持培養条件から LIF を除いた培地 200  $\mu$ L を 0.1% ゼラチンコートした 96-well plate のそれぞれのウェルに加え、各ウェルに mES 細胞 (400 cells/well) を播種し、ここにサンプル(終濃度 5000, 500, 50, 5 ng/mL)を加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。培養 4 日目に、顕微鏡 IX71 microscope (Olympus)によって細胞形態を観察した。

### 細胞の多能性評価分析 (*in vitro*)

MEF 細胞を除去して 4 日間培養したマウス ES 細胞に sameuramide A を加え、さらに 4 日間培養した。培養したマウス ES 細胞 (750 cells per well, 20  $\mu$ L)は、LIF を除去した培地を用いて、ハンギングドロップ法によって 3 日間培養し、胚様体へと分化させた。内胚葉、中胚葉、外胚葉に特徴的な遺伝子マーカーに対するプライマーを用いて、遺伝子発現解析を行った。

### リアルタイム定量 PCR 法 (RT-qPCR)

全ての RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて単離し、PrimeScript II 1st stand cDNA

Synthesis Kit (TAKARA BIO)を用いて逆転写を行った。リアルタイム定量 PCR (qPCR)は、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いた。ハウスキーピング遺伝子には、*Gapdh* を用いた。使用したプライマーを以下に示す。

*Klf4* Forward 5'-CTCTTCCCCCAGGATTCCAT-3'  
Reverse 5'-TTGCCACACCCTGCATAGT-3'

*Fgf5* Forward 5'-GCGATCCACAGAACTGAAAA-3'  
Reverse 5'-ACTGCTTGAACCTGGGTAGG-3'

*Sox17* Forward 5'-GCTTCTCTGCCAAGGTCAAC-3'  
Reverse 5'-CTCGGGGATGTAAAGGTGAA-3'

*T* Forward 5'-CTGGGAGCTCAGTTCTTTTCG-3'  
Reverse 5'-CCCCTTCATACATCGGAGAA-3'

*Gapdh* Forward 5'-TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3'  
Reverse 5'-AATGAAGGGGTCGTTGATGG-3'

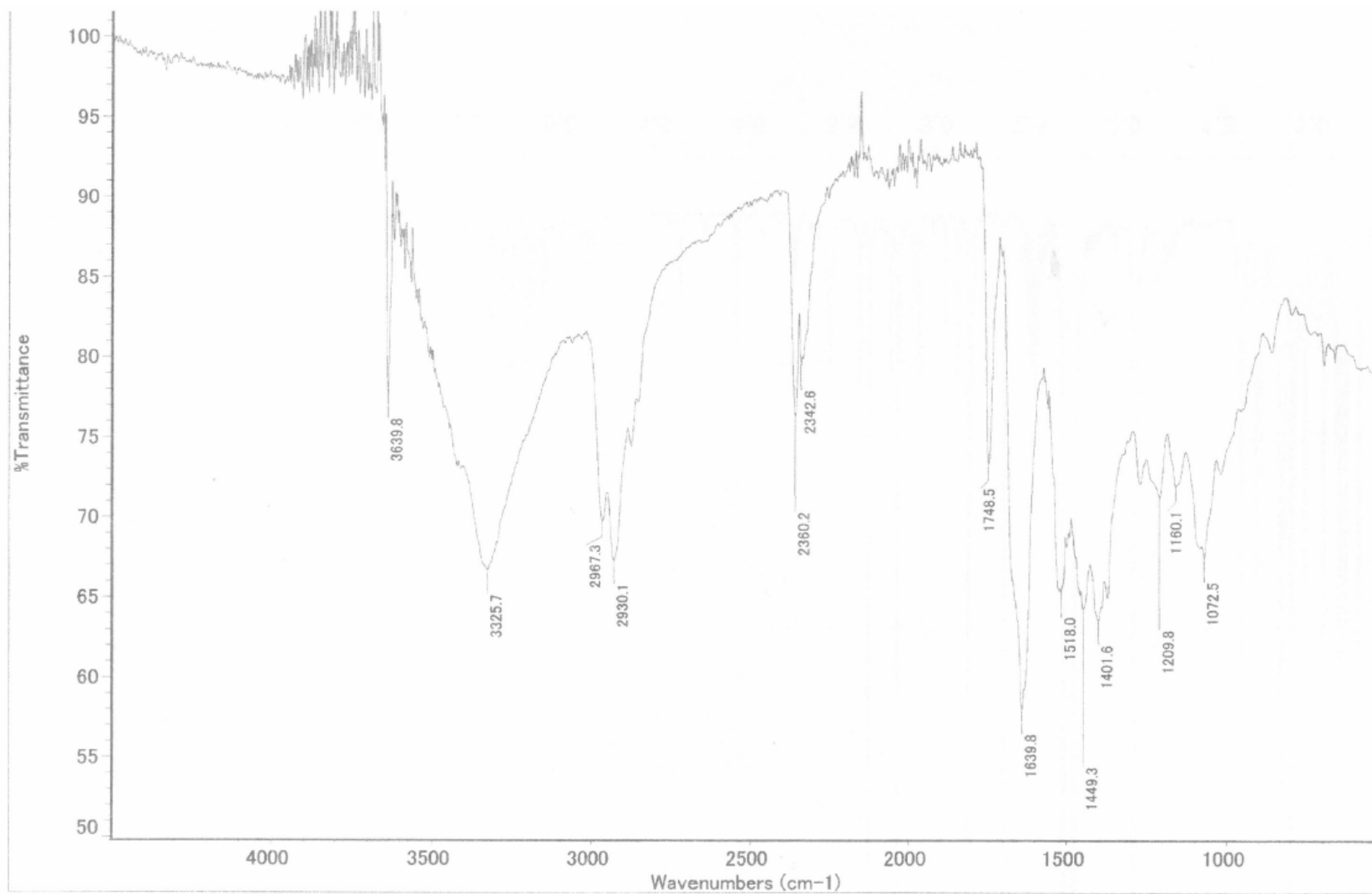
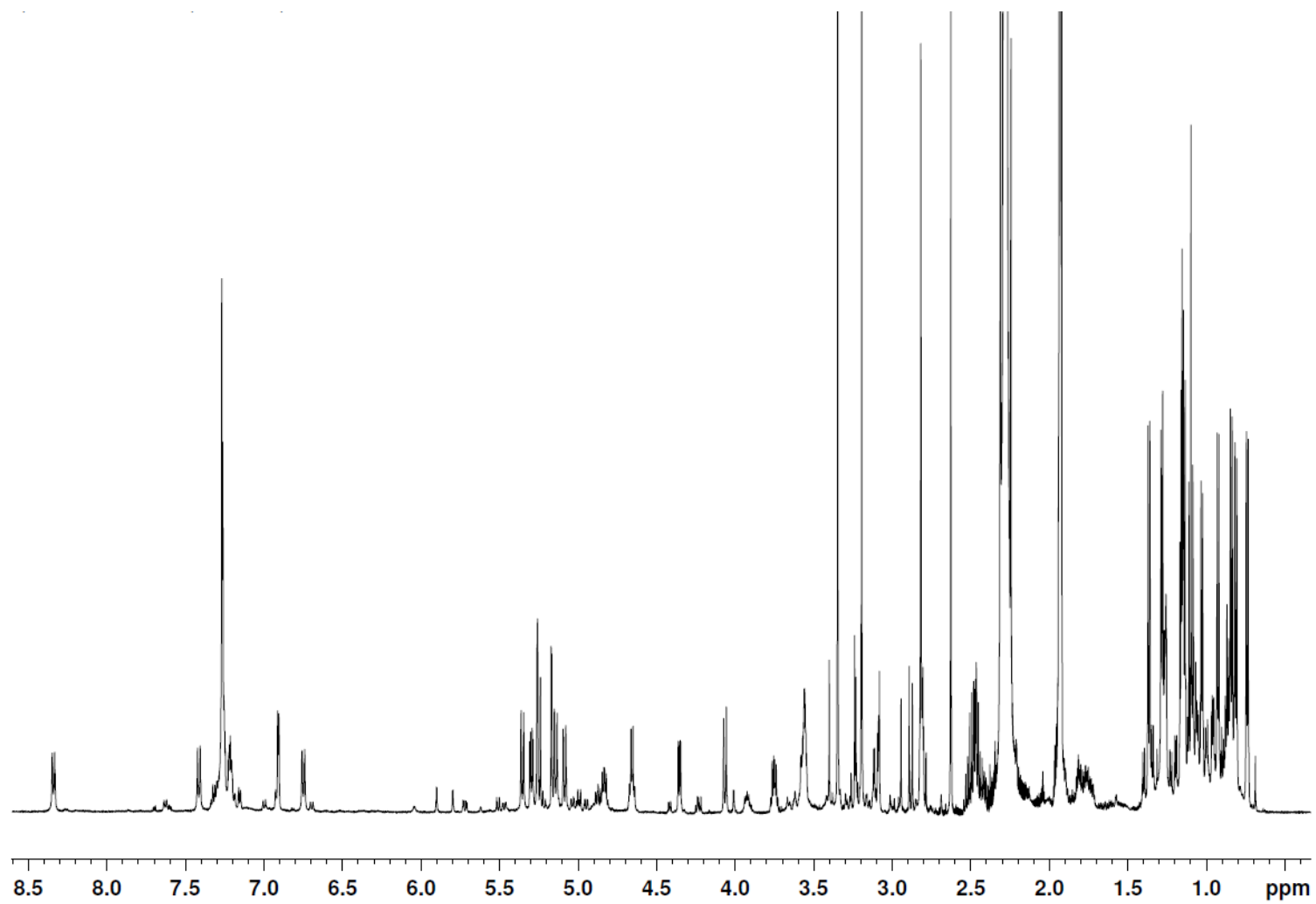


Figure 7.21. Sameuramide A の IR スペクトル



**Figure 7.22.** Sameuramide A の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



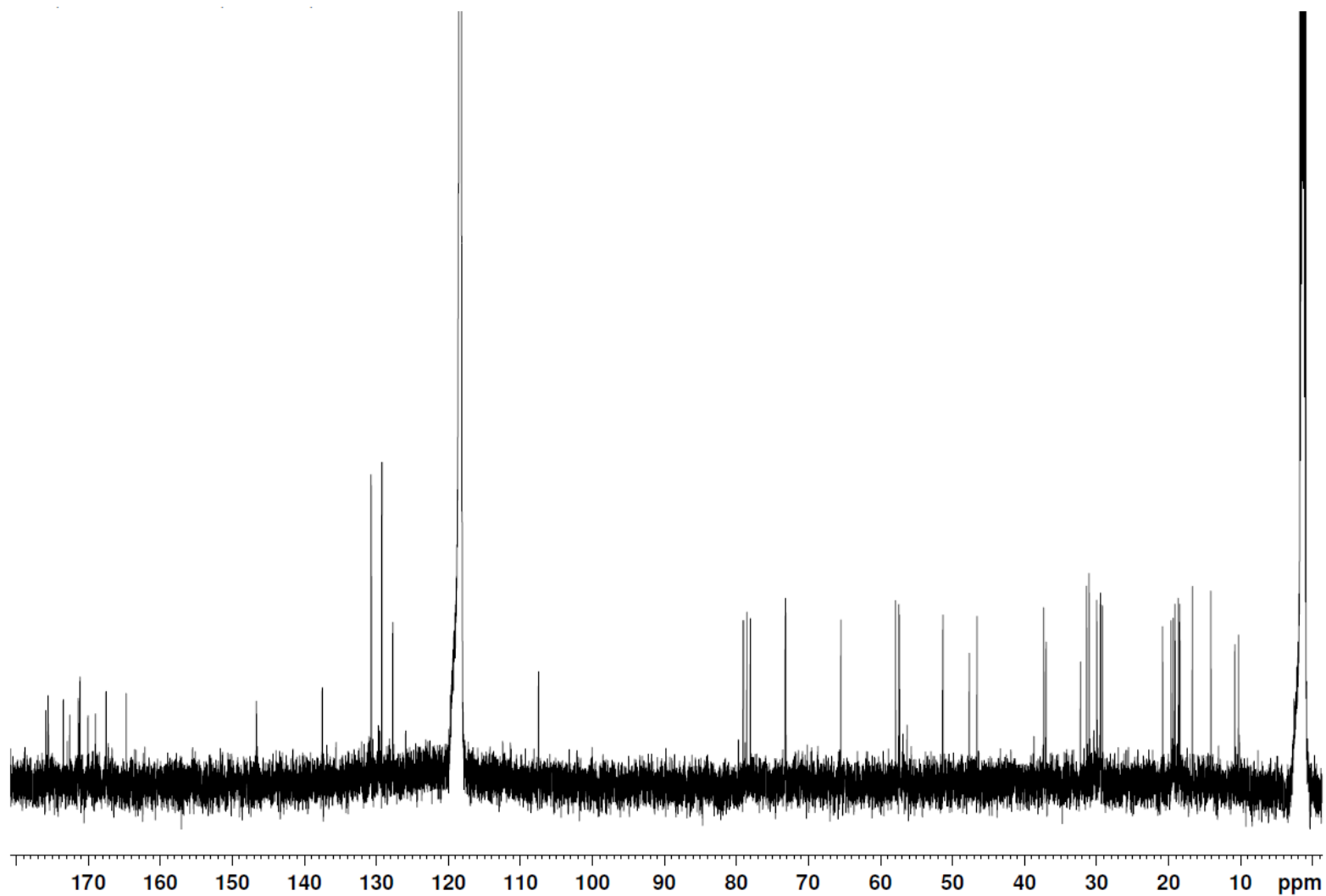


Figure 7.23. Sameuramide A の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル(600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

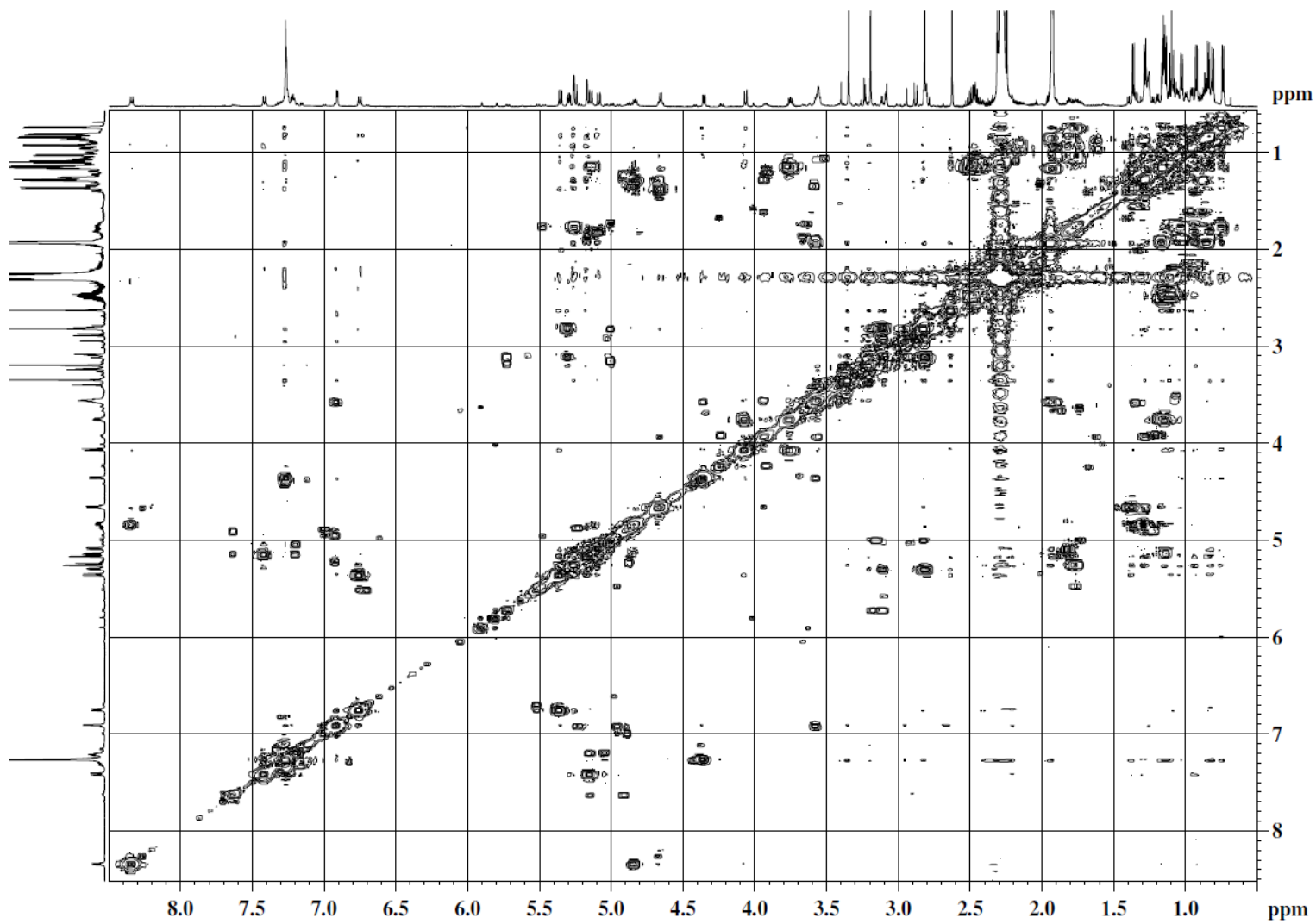


Figure 7.24. Sameuramide A の COSY スペクトル(600 MHz, CD<sub>3</sub>CN)

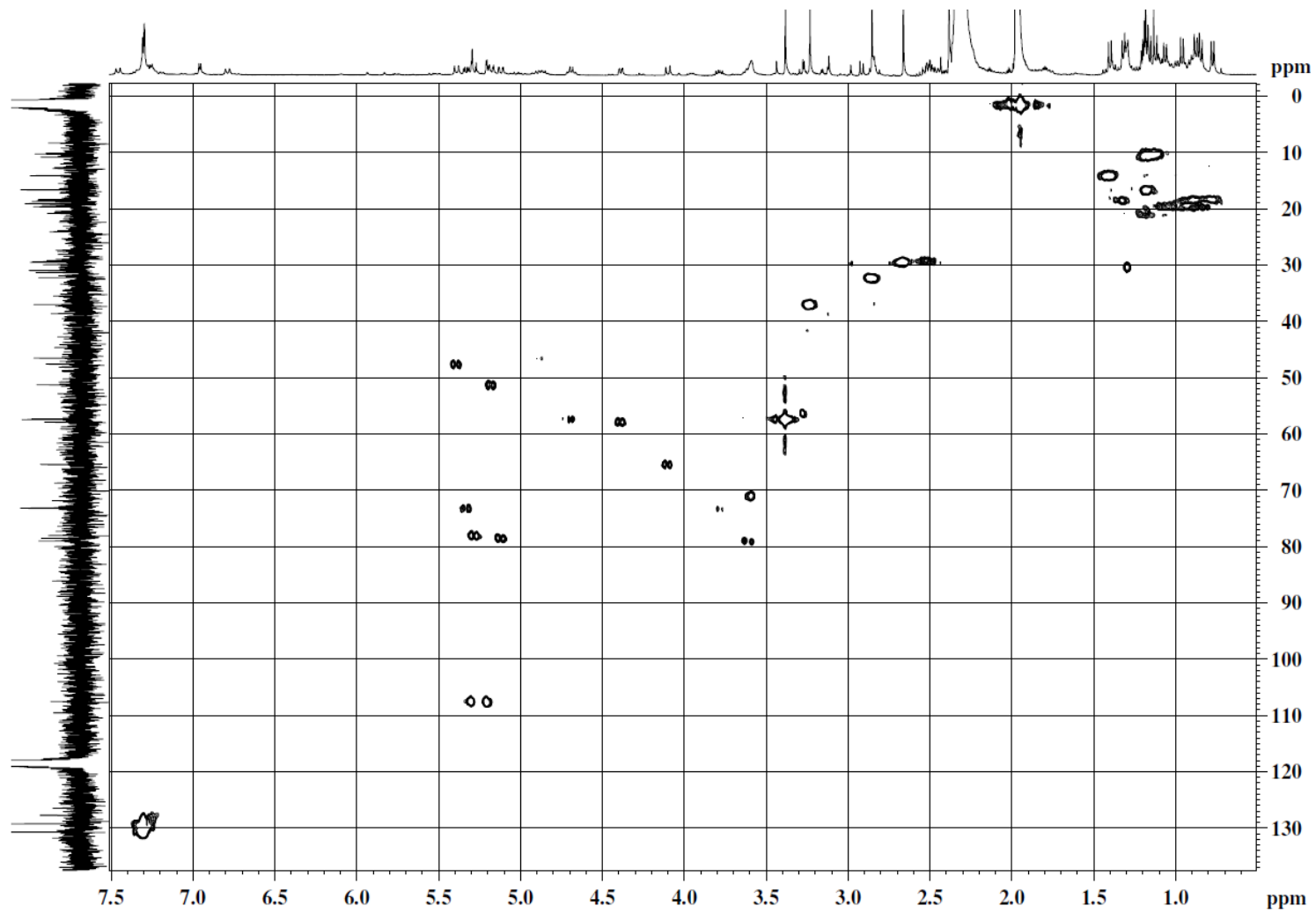


Figure 7.25. Sameuramide A の HMQC スペクトル(400 MHz, CD<sub>3</sub>CN)

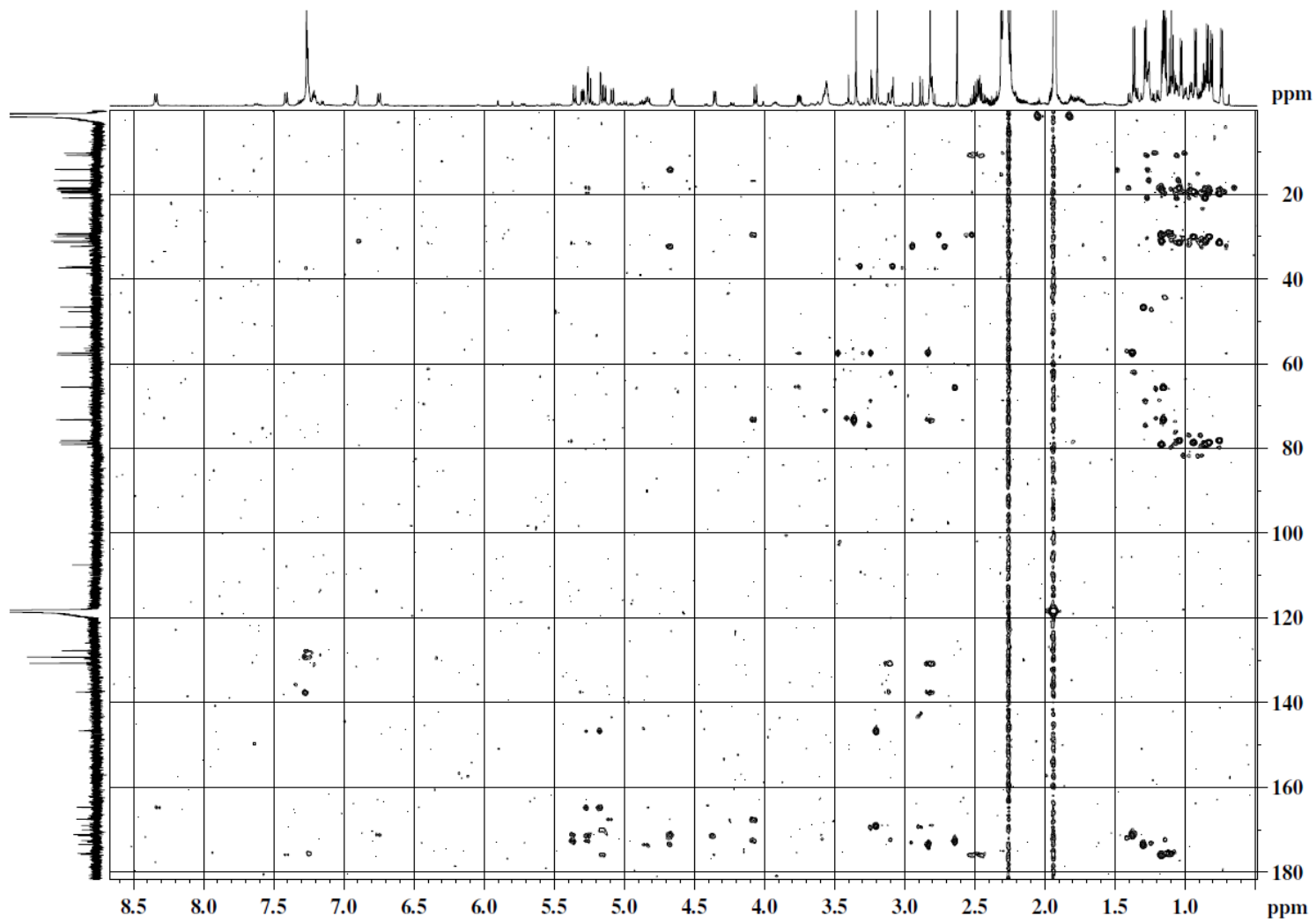


Figure 7.26. Sameuramide A の HMBC スペクトル(600 MHz, CD<sub>3</sub>CN)

## 7.4. 第5章における実験項

### 試薬

R2A 培地 (Nihon Pharmaceutical Co., Japan)

Agar (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

低融点アガロース (LONZA)

人工海水 (Marine Tech, Japan)

ポリカーボネートメンブレン (Millipore, Ireland)

防水接着剤 (Chemedain, Japan)

### 実験動物

海綿 *Theonella swinhoei* は、2015年8月26日に高知県宿毛の水深10-15 mの海底で採集し、水層で飼育した。

### 分離株の微生物種同定

分類学的識別は、16S rRNA遺伝子長が610 bpから712 bpのシーケンス配列を用いて解析を行った。コロニーの一部を鋳型としてPCR増幅産物を作成した。16S rRNA遺伝子はユニバーサルプライマー (27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', Toyobo, Japan) と KOD FX Neo system を用いて行った。PCR産物は、fast gene purification kit (Nippon Genetics, Japan) を用いて精製した。精製PCR産物の塩基配列は蛍光ダイターミネーター法を用いて微生物同定サービス (Takara bio, Japan) で決定した。得られた塩基配列は、GenBankデータベースのものと比較し、MEGAプログラム (MEGA software, Tempe, USA) を用いて近縁種を決定した。

これらの結果を, Table 7.1および7.2に示す。

### **DNA抽出とIlluminaシーケンシング**

宿主海綿中の微生物指標分子を用いて, 培養された微生物の多様性を比較するために, 16S rRNA遺伝子に基づいた16Sアンプリコンシーケンシングを行った。海綿を実験室に移した後, 海綿をDNAが含まれない純水で3回洗浄し, ホモジナイズした。ホモジナイズした組織由来のゲノムDNAを, DNAキットを用いてガイドラインに従って抽出した。抽出したゲノムDNAを以下のようにプライマーを用いて増幅した。アンプリコンフォワードプライマーおよびアンプリコンリバースプライマーをHifi hot start ready mix PCR (Kapa Biosystems, USA)を用いて増幅し, そしてfast gene purification kit (Nippon genetics, Japan)を用いて精製した。DNAシーケンシングは, Illumina Miseq System (Illumina, USA)を用いて北海道システム・サイエンス株式会社により実施した。それぞれのシーケンスデータをQIIME software<sup>102</sup>を用いて系統解析を行った。

Table 7.1. 従来培養法分離株の系統解析結果

Taxonomic group	Isolate #	Closest species	Similarity	Number of isolates
Bacteroidetes	S1	<i>Aquimarina atlantica</i>	99	1
	S2	<i>Maribacter dokdonensis</i>	99	1
	S3	<i>Mesoflavibacter sabulilitoris</i>	100	6
	S4	<i>Tenacibaculum amylolyticum</i>	96	1
Alphaproteobacteria	S5	<i>Loktanella maritima</i>	99	4
	S6	<i>Phaeobacter arcticus</i>	100	5
	S7	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99, 100	9
	S8	<i>Ruegeria atlantica</i>	99, 100	9
	S9	<i>Shimia marina</i>	99, 100	6
	S10	<i>Sphingopyxis marina</i>	99	3
Gammaproteobacteria	S11	<i>Algicola bacteriolytica</i>	100	5
	S12	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	100	7
	S13	<i>Vibrio panuliri</i>	100	3

Table 7.2. Diffusion chamber 法分離株の系統解析結果

Actinobacteria	DC1	<i>Streptomyces angustmyceticus</i>	100	1	
	DC2	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	99	2	
	DC3	<i>Streptomyces galbus</i>	100	1	
	DC4	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	100	1	
	DC5	<i>Streptomyces sanglieri</i>	100	2	
Bacteroidetes	DC6	<i>Marinifilum flexuosum</i>	94	5	
Firmicutes	DC7	<i>Bacillus cereus</i>	100	2	
	DC8	<i>Bacillus hunanensis</i>	100	1	
	DC9	<i>Bacillus lehensis</i>	100	1	
	DC10	<i>Bacillus thermophilus</i>	99	1	
	DC11	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	1	
	DC12	<i>Paenibacillus harenae</i>	98	1	
	Alphaproteobacteria	DC13	<i>Leisingera aquimarina</i>	98	1
		DC14	<i>Pelagicola litoralis</i>	98	1
		DC15	<i>Pelagimonas varians</i>	99	3
DC16		<i>Phaeobacter arcticus</i>	99	1	
DC17		<i>Phaeobacter daeponensis</i>	99	1	
DC18		<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	97	1	
DC19		<i>Roseovarius aestuarii</i>	99	1	



	DC20	<i>Roseovarius sediminilitoris</i>	99	1
	DC21	<i>Ruegeria atlantica</i>	99	2
	DC22	<i>Ruegeria conchae</i>	99	1
	DC23	<i>Shimia marina</i>	97	1
	DC24	<i>Sphingomonas melonis</i>	98	1
	DC25	<i>Sulfitobacter pacificus</i>	100	1
	DC26	<i>Thalassobius aestuarii</i>	97	1
	DC27	<i>Tropicibacter phthalicicus</i>	96	1
	DC28	<i>Vadicella arenosi</i>	97	1
Epsilonproteobacteria	DC29	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	95	5
Gammaproteobacteria	DC30	<i>Agarivorans albus</i>	99, 100	4
	DC31	<i>Amphritea atlantica</i>	89, 90	3
	DC32	<i>Amphritea japonica</i>	96	1
	DC33	<i>Kangiella spongicola</i>	90	2
	DC34	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	99	1
	DC35	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	99	1
	DC36	<i>Vibrio brasiliensis</i>	100	2
	DC37	<i>Vibrio mediterranei</i>	100	1
	DC38	<i>Vibrio ponticus</i>	95	2

---

## 参考文献

- 1) McCurdy, C. R., Scully, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sci.* **2005**, 78, 476-484.
- 2) Wongsrichanalai, C. Pickard, A. L., Wernsdorfer, W. H., Meshnick, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet. Infect. Dis.* **2002**, 2, 209-218.
- 3) Haux, J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med. Hypotheses* **1999**, 53, 543– 548.
- 4) Marvin, G., Norbert, N., Gordon, S. H. Vinca alkaloids. IV. Structural features of leurosine and vincalkebostine, representatives of a new type of indole-indoline alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4745-4746.
- 5) Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2325-2327.
- 6) Falconer, S. B., Czarny, T. L., Brown, E. D. Antibiotics as probes of biological complexity. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 415-423.
- 7) Victory, S. F., Vander Velde, D. G., Jalluri, R. K., Grunewald, G. L., Georg, G. I. Relative stereochemistry and solution conformation of the novel paclitaxel-like antimitotic agent epothilone A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 893-898.
- 8) Comroe, J. H. Jr. Pay dirt: the story of streptomycin. Part I. From Waksman to Waksman. *Am Rev Respir Dis.* **1978**, 117, 773-781.
- 9) Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* **1976**, 29, 1346-1348.

- 10) Ueda, H., Nakajima, H., Hori, Y., Fujita, T., Nishimura, M., Goto, T., Okuhara, M. FR901228, A Novel Antitumor Bicyclic Depsipeptide Produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 301-310.
- 11) Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, H., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1249-1255.
- 12) Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schonberg, G., Jacob, T. A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, **1983**, *221*, 823-828.
- 13) Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B., Worm, B. How Many Species Are there on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol.* **2011**, *9*, 1–8.
- 14) Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 116–211.
- 15) Gerwick, W. H., Fenner, A. M. Drug discovery from marine microbes. *Microb. Ecol.* **2013**, *65*, 800-806.
- 16) Okaichi, T., Hashimoto, Y. The Structure of Nereistoxin. *Agr. Biol. Chem.* **1962**, *26*, 224-227.
- 17) Rinehart, K. L., Gloer, J. B., Cook, J. C., Mizesak, S. A., Scabil, T. A. Structures of the didemmins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1857-1859.
- 18) Sakai, R., Higa, T., Jefford, C. W., Bernardinelli, G. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6404-6405.
- 19) Sasaki, M., Matsumori, N., Maruyama, T., Nonomura, T., Murata, M., Tachibana, K., Yasumoto, T. The complete structure of maitotoxin, part I: configuration of the C1-C14 side chain. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1672-1675.
- 20) Tahara, Y. Studies on globefish poison. *J. Pharm. Soc. Japan.* **1909**, *29*, 587-625.

- 21) Bergmann, W., Feeney, R. J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2809-2810.
- 22) Bergmann, W., Feeney, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.
- 23) 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*, 1501-1507.
- 24) Rustum, Y. M., Raymakers, R. A. *Pharmacol. Ther.* **1992**, *56*, 307-321.
- 25) Rinehart, K. L., Holt, T. G., Fregeau, N. L., Stroh, J. G., Keifer, P. A., Sun, F., Li, L. H., Martin, D. G. Ecteinasidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteina scidia turbinata*. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512-4515.
- 26) Erba, E., Bergaaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G. T., D'Incalici, M. Ecteinasidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 97-105.
- 27) Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., and Scotto, K. W. Ecteinasidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6775-6779.
- 28) Hirata, Y., Uemura, D. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-710.
- 29) Uemura, D., Takahashi, K., Yamamoto, T., Katayama, C., Tanaka, J., Okumura, Y., Hirata, Y. Norhalichondrin A: an antitumor polyether macrolide from a marine sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4796-4798.
- 30) Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Luque, F. A., Gray, W. R. Purification and Sequence of a Presynaptic Peptide Toxin from *Conus geographus* Venom. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5087-5090.

- 31) Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A. F., Veliçelebi, G., Ellis, S. B., Harpold, M. M. Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science*, **1992**, *257*, 389-395.
- 32) Rangel, M., Falkenberg M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *J. Coast. Life Med.* **2015**, *3*, 421-428.
- 33) Gerwick, H. W., Fenner, A. M. Drug discovery from marine microbe. *Microb. Ecol.* **2013**, *65*, 800-806.
- 34) Feher, M., Schmidt, J. M. Property Distributions: Differences Between Drugs, Natural Products, and Molecules From Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218-227.
- 35) Hunt, B., Vincent, A. C. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio.* **2006**, *35*, 57-64.
- 36) Montaser, R., Luesch, H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1475-1489.
- 37) Skropeta, D. Deep-sea natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 1131–1166.
- 38) Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today.* **2003**, *8*, 536–544.
- 39) Gunasekera, S. P., Paul, G. K., Longley, R. E., Isbrucker, R. A., Pomponi, S. A. Five New Discodermolide Analogues from the Marine Sponge *Discodermia* Species. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1643–1648.
- 40) Dumdei, E. J., Blunt, J. W., Munro, M. H. G., Pannell, L. K. Isolation of Calyculins, Calyculinamides, and Swinholide H from the New Zealand Deep-Water Marine Sponge *Lamellomorpha strongylata*. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2636–2639.
- 41) Litaudon, M., Hickford, S. J. H., Lill, R. E., Lake, R. J., Blunt, J. W., Munro, M. H. G. Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge

*Lissodendoryx* sp. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1868–1871.

- 42) Capon, R. Marine Bioprospecting – Trawling for Treasure and Pleasure. *J. Eur. Org. Chem.* **2001**, *690*, 633–645.
- 43) Kupchan, S. M., Briton, R. W., Ziegler, M. F., Sigel, C. W. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 178–179.
- 44) Chug, Y. M., Chang, F. R., Tseng, T. F., Hwang, T. L., Chen, L. C., Wu, S. F., Lee, C. L., Lin, Z. Y., Chung, L. Y., Su, J. H., Wu, Y. C. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1792–1794.
- 45) Ute, S., Thomas, M. H., Joanna, D., Carl, E. C., Maria, C. C., Wolfgang, F. Novel Metabolites in Phenanthrene and Pyrene Transformation by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2906–2909.
- 46) Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096.
- 47) Tsuda, M., Toriyabe, Y., Endo, T., Kobayashi, J. Application of Modified Mosher's Method for Primary Alcohols with a Methyl Group at C2 Position. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 448–451.
- 48) Li, K., Brant, C. O., Huertas, M., Hur, S. K., Li, W. Petromyzonin, a Hexahydrophenanthrene Sulfate Isolated from the Larval Sea Lamprey (*Petromyzon marinus* L.). *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5924–5927.
- 49) Ross, S. A., Minard, R. D., Shamma, M., Fagbule, M. O., Olatunji, G., Gbile, Z. Thaliporphinemethine: A New Phenanthrene Alkaloid from *Illigera pentaphylla*. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 835–836.
- 50) Hegde, R. V., Borges, S., Patel, M., Das, R. P., Wu, B., Gullo, P. V., Chan, T. M. New potential antitumor compounds from the plant *Aristolochia manshuriensis* as inhibitors of the CDK2 enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1344–1346.

- 51) Behery, F. A. A., Naeem, Z. E. M., Maatooq, G. T., Amer, M. M. A., Wen, Z. H., Sheu, J. H., Ahmed, A. F. Phenanthrenoids from *Juncus acutus* L., New Natural Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1264–1266.
- 52) Poza, J. J., Fernandez, R., Reyes, F., Rodriguez, J., Jimenez, C. Isolation, Biological Significance, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of New Natural Parathiosteroids A–C and Analogues from the Soft Coral *Paragorgia* sp. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7978–7984.
- 53) Okada, Y., Matsunaga, S., van Soest, R. W. M., Fusetani, N. Sokodosides, Steroid Glycosides with an Isopropyl Side Chain, from the Marine Sponge *Erylus placenta*. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4884–4888.
- 54) Pettit, G. R., Kamano, Y., Herald, C. L., Tuinman, A. A., Boettner, F. E., Kizu, H., Schmidt, J. M., Baczynskyj, L., Tomer, K. B., Bontems, R. J. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885.
- 55) Senter, P. D., Sievers, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 631-637.
- 56) 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*, 907-910.
- 57) Nogle, L. M., Williamson, T. R., 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*, 716-719.
- 58) Harrigan, G. G., Luesch, H., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., Nagle, D. G., Paul, V. J. Symplostatin 2: A Dolastatin 13 Analogue from the Marine Cyanobacterium *Symploca hydnoides*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 655-658.

- 59) Look, S. A., Fenical, W. New Bicyclic Diterpenoids from the Caribbean Gorgonian Octocoral *Eunicea calyculata*. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4129–4134.
- 60) Gonza'lez, A. G., Marti'n, J. D., Norte, M., Pe'rez, R., Weyler, V., Rafii, S., Clardy, J. A New Diterpene from *Aplysia dactylomela*. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1075–1076.
- 61) Huneck, S., Baxter, G. A., Cameron, A. F., Connolly, J. D., Harrison, L. J., Phillips, W. R., Rycroft, D. S., Sim, G. A. Dolabellane diterpenoids from the liverworts *Barbilophozia floerkei*, *B. lycopodioides*, and *B. attenuata*: spectroscopic and *X*-ray studies of structure, stereochemistry, and conformation. *X*-Ray molecular structure of 3*S*,4*S*;7*S*,8*S*-diepoxy-10*R*,18-dihydroxydolabellane, 18-acetoxy-3*S*,4*S*;7*S*,8*S*-diepoxydolabellane, and 10*R*,18-diacetoxy-3*S*,4*S*-epoxydolabell-7*E*-ene. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, *5*, 809–814.
- 62) Mori, K., Iguchi, K., Yamada, N., Yamada, Y., Inouye, Y. Bioactive Marine Diterpenoids from Japanese Soft Coral of *Clavularia* sp. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2840–2852.
- 63) Su, J., Zhong, Y., Shi, K., Cheng, Q., Snyder, J. K., Hu, S., Huang, Y. J. Clavudiol A and Clavirolide A, Two Marine Dolabellane Diterpenes from the Soft Coral *Clavularia viridis*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2337–2344.
- 64) Shin, J., Fenical, W. Structures and Reactivities of New Dolabellane Diterpenoids from the Caribbean Gorgonian *Eunicea laciniata*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3392–3398.
- 65) Tsukamoto, S., Painuly, P., Young, K. A., Yang, X., Shimizu, Y., Cornell, L. Microcystilide A: A Novel Cell-Differentiation-Promoting Depsipeptide from *Microcystis aeruginosa* NO-15-1840. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11046-11047.
- 66) Howard, B. N., Fenical, W. Obtusadiol, A Unique Bromoditerpenoid from the Marine Red Alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 2453-2456.



- 67) DiFazio, M. P., Sneden, A. T. A Short Synthesis of ( $\pm$ )-3',6'-Epoxybicycloaurapten. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1357-1361.
- 68) Hansen, P. E., Kamounah, F. S., D. T. Gryko, Deuterium Isotope Effects on  $^{13}\text{C}$ -NMR Chemical Shifts of 10-Hydroxybenzo[*h*]quinolines. *Molecules* **2013**, *18*, 4544-4560.
- 69) Alimardanov, K. M., Sadygov, O. A., Garibov, N. I., Abdullaeva, M. Y. Liquid-phase synthesis of cyclic diene diepoxides using metal halides and hydrogen peroxide. *Russ. J. Org. Chem.* **2012**, *48*, 1302-1308.
- 70) Crystal data for dolabellol A:  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{BrClO}_2$ , formula weight: 421.84, orthorhombic,  $P2_12_12_1$ ,  $a = 7.2470(6)\text{\AA}$ ,  $b = 16.4428(13)\text{\AA}$ ,  $c = 17.4010(13)\text{\AA}$ ,  $V = 2073.5(3)\text{\AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $D_{\text{calc}} = 1.351\text{ g cm}^{-3}$ ,  $T = 123\text{ K}$ , 19992 reflections measured, 3784 observed ( $I > 2\sigma(I)$ ),  $R_1 = 0.0721$ ,  $wR_2 = 0.1574$ .
- 71) CCDC 1450137 (dolabellol A) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [http://www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).
- 72) Flack, H. D., Bernardinelli, G., Reporting and evaluating absolute-structure and absolute-configuration determinations. *J. Appl. Cryst.* **2000**, *33*, 1143-1148.
- 73) Guella, G., Pietra, F. A New Skeleton Diterpenoid, New Prenylbisabolanes, and Their Putative Biogenetic Precursor, from the Red Seaweed *Laurencia microcladia* from Il Rogiolo: Assigning the Absolute Configuration when Two Chiral Halves are Connected By Single Bonds. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2946-2952.
- 74) Mohammed, K. A., Hossain, C. F., Zhang, L., Bruick, R. K., Zhou, Y.-D., Nagle, D. G. Laurenditerpenol, a New Diterpene from the Tropical Marine Alga *Laurencia intricata* that Potently Inhibits HIF-1 Mediated Hypoxic Signaling in Breast Tumor Cells. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2002-2007.
- 75) Schmitz, F. J., Hollenbeak, K. H., Carter, D. C., Hossain, M. B., Helm, D. van der Marine Natural Products:

- 14-Bromoobtus-1-ene-3,11-diol, A New Diterpenoid from the Sea Hare *Aplysia dactylomela*. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2445-2447.
- 76) Evans, M. J., Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **1981**, *292*, 154-156.
- 77) Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 7634-7638.
- 78) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145-1147.
- 79) Eckfeldt, C. E., Mendenhall, E. M., Verfaillie, C. M. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 726-737.
- 80) Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **1988**, *336*, 688-690.
- 81) Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **1988**, *336*, 684-687.
- 82) Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. Embryonic Stem Cells: Isolation, Characterization and Culture. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2009**, *114*, 173-184.
- 83) Harada, K., Fujii, K., Hayashi, K., Suzuki, M. Application of <sub>D,L</sub>-FDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3001-3004.
- 84) 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*, 5146–5151.
- 85) Taniguchi, M., Nagai, K., Arao, N., Kawasaki, T., Saito, T., Moritani, Y., Takasaki, J., Hayashi, K., Fujita, S., Suzuki, K., Tsukamoto, S. YM-254890, a Novel Platelet Aggregation Inhibitor Produced by *Chromobacterium* sp. QS3666. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 358-363.
- 86) 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.* **2004**, *101*, 16222-16227.
- 87) Brantley, E. S., Molinski, T. F., Preston, C. M. Delong, E. F. Brominated acetylenic fatty acids from *Xestospongia* sp., a marine spongebacteria association. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7667-7672.
- 88) Tsukimoto, M., Nagaoka, M., Shishido, Y., Fujimoto, J., Nishisaka, F., Matsumoto, S. Harunari, E., Imada, C., Matsuzaki, T. Bacterial Production of the Tunicate-Derived Antitumor Cyclic Depsipeptide Didemnin B. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2329-2331.
- 89) Staley, J. T., Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **1985**, *39*, 321-346.
- 90) Kaeberlein, T., Lewis, K., Epstein, S. S., Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **2002**, *296*, 1127–1129.
- 91) Boomann, A., Palumbo, A. V., Lewis, K., Epstein, S. S., Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7413-7419.
- 92) Bollmann, A., Lewis, K., Epstein, S. S. Incubation of Environmental Samples in a Diffusion Chamber Increases the Diversity of Recovered Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6386-6390.
- 93) Lewis, K., Epstein, S., D’Onofrio, A., Ling, L. L. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 468-476.

- 94) Sizova, M. V., Hohmann, T., Hazen, A., Paster, B. J., Halem, S. R., Murphy, C. M., Panikov, N. S., Epstein, S. S. New Approaches for Isolation of Previously Uncultivated Oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 14-203.
- 95) Aoi, Y., Kinoshita, T., Hata, T., Ohtta, H., Obokata, H., Tsuneda, S. Hollow-Fiber Membrane Chamber as a Device for In Situ Environmental Cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 3826-3833.
- 96) Carmely, S., Kashman, Y. Structure of Swinholide-A, A New Macrolide from the Marine Sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 511-514.
- 97) Matsunaga, S., Fusetani, N. Theonellamides A-E, Cytotoxic Bicyclic Peptides, from a Marine Sponge *Theonella* sp. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1177-1181.
- 98) Burla, M. C., Caliendo, R., Camalli, M., Carrozzini, B., Cascarano, G. L., De Caro, L., Giacovazzo, C., Polidori, G., Siliqi, D., Spagna, R. *IL MILIONE*: a suite of computer programs for crystal structure solution of proteins. *J. Appl. Cryst.* **2007**, *40*, 609-613.
- 99) Epstein, S. S. Microbial awakenings. *Nature* **2009**, *457*, 1083.
- 100) Sheldrick, G. M. A short history of *SHELX*. *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112-122.
- 101) Flack, H.D., Bernardinelli G. Reporting and evaluating absolute-structure and absolute-configuration determinations. *J. Appl. Cryst.* **2000**, *33*, 1143-1148.
- 102) Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., Gonzalez, A., Caporaso, J. G., Knight, R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* **2011**, Ed. Board Andreas Baxevanis A1 CHAPTER, Unit10.7.

## 謝辞

本研究は、早稲田大学中尾研究室で7年半に渡り行われたものです。研究全般において、早稲田大学理工学術院教授 中尾洋一先生にご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

本学位論文の作成にあたり、多くのご助言とご指導いただいた同学科教授 小出隆規先生、寺田 泰比古先生、応用化学科 准教授 細川 誠二郎先生、広島大学 大学院先端物質科学研究科 准教授 青井 議輝先生に感謝いたします。

Sameuramide Aの遺伝子解析では、丁寧なご指導・ご協力をいただきました早稲田大学理工学術院次席研究員 新井大祐博士に深く御礼申し上げます。

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。深く御礼申し上げます。

スキューバダイビング面では、須賀次郎様、久保彰良様、鈴木敏久様、石川総一郎様にご指導と安全管理をして頂きました。厚く御礼申し上げます。

海綿内共生微生物の*in situ*培養法の開発において、ご指導いただいた広島大学准教授 青井議輝先生、に心よりお礼申し上げます。

最後に、研究生活を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>○“Cinanthrenol A, an Estrogenic Steroid Containing Phenanthrene Nucleus, from a Marine Sponge <i>Cinachyrella</i> sp.”, <i>Organic Letters</i> 誌, 2014 年 3 月 発行, 16, pp 1539–1541  <u>Koshi Machida</u>, Takahiro Abe, Daisuke Arai, Mayumi Okamoto, Isao Shimizu, Nicole J. de Voogd, Nobuhiro Fusetani, and Yoichi Nakao</p> <p>○“Dolabellol A, a New Halogenated Diterpene Isolated from the Opisthobranch <i>Dolabella auricularia</i>”, <i>Chemistry Letters</i> 誌, 2017 年 9 月 発行, 46, pp 1676–1678  <u>Koshi Machida</u>, Takuro Matsumoto, Nobuhiro Fusetani, and Yoichi Nakao</p> <p>○“Sameuramide A, a new cyclic depsipeptide isolated from an ascidian of the family Didemnidae”, <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry</i> 誌, 2018 年 7 月 発行, 26, pp3852–3857  <u>Koshi Machida</u>, Daisuke Arai, Ryosuke Katsumata, Satoshi Otsuka, Jun K. Yamashita, Tao Ye, Shoubin Tang, Nobuhiro Fusetani, and Yoichi Nakao</p>
講演	<p>「多重免疫染色法を利用したヒストン修飾制御剤の探索」, 第 9 回エピジェネティクス研究会, 2015 年 5 月, 東京  町田 光史, 菊地 恒太, 片岡 亮佑, 新井 大祐, 林 陽子, 木村 宏, 中尾 洋一</p> <p>「味噌に含まれるヒストン修飾および神経分化制御活性を示す生理活性成分の研究」, 第 9 回エピジェネティクス研究会, 2015 年 5 月, 東京  大塚 悟史, 杉江 啓太, 町田 光史, 新井 大祐, 林 陽子, 木村 宏, 中尾 洋一</p> <p>“Cinanthrenol A and its estrogenic activity”, 3D Lab Exchange Symposium, 2015 年 9 月, Singapore  Koshi Machida, Mayumi Okamoto, Isao Shimizu, Daisuke Arai, Nobuhiro Fusetani, Yoichi Nakao</p> <p>「熊本県産海洋無脊椎動物からの新規天然化合物の探索」, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015, 2015 年 10 月, 東京  町田光史, 松本拓郎, 中尾洋一</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)
	<p>“Isolation and structure elucidation of an active compound affecting histone modification from the marine sponge”, Pacificchem, 2015 年 12 月, Honolulu Koshi Machida, Nobuhiro Ishibashi, Ryosuke Kataoka, Daisuke Arai, Yoko Hayashi-Takanaka, Hiroshi Kimura, Nobuhiro Fusetani, Yoichi Nakao</p> <p>“Search for active components of Japanese “miso” affecting histone modification and neural differentiation”, Pacificchem, 2015 年 12 月, Honolulu Satoshi Otsuka, Keita Sugie, Koshi Machdia, Daisuke Arai, Yoko Hayashi-Takanaka, Hiroshi Kimura, Yoichi Nakao</p> <p>「タツナミガイから単離した新規ジテルペノイドの構造」, 第 30 回海洋生物活性 談話会, 2016 年 5 月, 鳥取 町田光史, 松本拓郎, 中尾洋一</p> <p>「新規分離培養手法を用いた海綿由来の有用化合物産出菌の探索」, 第 68 回日本 生物工学会大会, 2016 年 9 月, 富山 町田光史, Dawoon Jung, 青井議輝, 中尾洋一</p> <p>“Search for metabolites in Japanese "miso" regulation histone modifications”, 3D Lab Exchange Symposium, 2018 年 1 月, Singapore Koshi Machida, Yoichi Nakao</p>