

細胞応答を修飾する微生物由来
バイオプローブの探索研究

平成十九年度

二村友史

目次

緒言	1
第1章 Bcl-xL 機能阻害物質の探索、incednine の生産及び単離精製	10
第1節 スクリーニング	10
第2節 Incednine 生産菌の同定	15
第3節 Incednine の発酵生産	18
第4節 Incednine の単離精製	20
第2章 Incednine の構造解析	22
第1節 Incednine の理化学的性状	22
第2節 Incednine の平面構造の決定	25
第3節 Incednine アグリコンの相対立体構造の決定	36
第4節 Incednine アグリコンの絶対立体構造の決定	42
§1 Incednine アグリコンの単離精製、構造解析	42
§2 Incednine アグリコンへの改良型 Mosher 法の適用	43
第5節 糖の立体構造決定	52
§1 アミノ糖 (A) の立体化学	52
§2 アミノ糖 (B) の立体化学	52
小括	60
第3章 Incednine の生理活性	62
第1節 Incednine の Bcl-xL 機能阻害活性	62
§1 Bcl-xL の抗腫瘍剤に対するアポトーシス抑制機能に incednine が与える影響	62
§2 Bcl-xL の Bax/Bak 誘導性細胞死に対するアポトーシス抑制機能に incednine が与える影響	63
第2節 Incednine による細胞死誘導機構の解明	71
§1 ミトコンドリア膜電位の検出	71
§2 Caspase 依存的経路の検討	72
§3 AIF の関与	73

第3節	Incednine の Bcl-2 ファミリー間の結合に与える影響	77
	小括	79
第4章	新規 triene-ansamycin 系化合物、trierixin の構造解析	81
第1節	Trierixin の理化学的性状	83
第2節	Trierixin の構造決定	83
第5章	総括	89
第6章	実験の部	92
	Chemistry	
	諸事項	92
第1節	新規 Bcl-xL 機能阻害剤の探索及び incednine の生産	94
第1項	スクリーニングサンプルの調整	94
第2項	Incednine 生産菌の同定	94
第3項	Incednine の発酵生産	94
第2節	Incednine の単離精製	95
第3節	Incednine アグリコンに関する実験	102
第1項	LC-MS 解析	102
第2項	Incednine アグリコンの単離精製	102
第4節	Incednine アグリコンの 11- <i>O</i> -MTPA エステル体の合成	109
第5節	メチル- <i>N</i> -(4-ブロモベンゾイル)-2,3,4,6-テトラデオキシ-4- メチルアミノ- β -D- <i>erythro</i> -ヘキソピラノシドの合成	123
第6節	コンピュータモデリング	129
第7節	X線構造解析	129
第8節	Trierixin に関する実験	130
	Biology	
第1節	Materials	136
第2節	細胞培養、トランスフェクション	136
第3節	トリパンプルー細胞外排出法による細胞生存率の測定	137
第4節	GST-Bcl-xL 融合タンパク質の精製、Bax との結合評価	137

第5節	Western Blotによるタンパク質の検出	138
第6節	フローサイトメーターによるミトコンドリア膜電位の解析	139
第7節	細胞分画	139
第8節	siRNA	139
参考文献		140
謝辞		144

緒言

1. がんの化学療法

「歯痛には柳楊枝」-古代ギリシャの時代から柳の木には解熱、鎮痛作用をもった成分が含まれていることが知られていた。19世紀初頭、この薬効成分は salicin と呼ばれる小分子化合物であることが明らかになり、また salicin はその後 aspirin へと合成展開され現在でも幅広く用いられているのは有名な話である。また抗マラリア薬 quinine はペルーのインディアンがマラリア治療に利用していたキナ樹皮から発見された。このように天然には病を治し、QOL (Quality Of Life) を向上させる小分子化合物が数多く眠っており、Ehrlich が化学薬品を用いて治療を行う“化学療法”を提唱したことや Fleming らが微生物代謝産物から penicillin を発見したことを契機に、様々な薬理活性を有する小分子化合物が天然から系統的に探索されるようになった。Penicillin や streptomycin などの抗生物質は人類が長い間苦しめられてきた結核、ペスト、チフスといった感染症の脅威を払いのけた。がん治療においては bleomycin や mitomycin、daunomycin など現在でも臨床上非常に有用な物質が発見され、数多くのがん患者の延命に効果を発揮してきた。しかし、これらの薬剤は白血病や悪性リンパ腫といった血球系腫瘍に対する効果と比べ、固形がんに対する効果は十分とはいえ、また重篤な副作用が問題となることもあった。細菌感染症の化学療法が病原性細菌とヒトという異なる種の細胞成分や代謝機構などの相違点に着目し優れた選択性を有する薬剤を開発できたのに対し、がんの化学療法は単純な増殖抑制作用の強さを指標としたものであり、がん細胞と正常細胞という実質的にはほとんど変わらない細胞を染め分けできなかったことが如実に現れた結果になった。正常細胞とがん細胞をうまく差別化できなかったのは、種としての違いの少なさ以外にも、がん発症の原因に関し、不明な点多すぎたことが理由に挙げられる。ところが20世紀後半、ゲノミクスを基にした生物学の爆発的な進展により、がん原因遺伝子が続々と発見され、さらにその遺伝子産物の多くが細胞増殖シグナル伝達分子のホモログやアポトーシス関連分子であることが明らかになっていくに従い、がんの進展には正常な細胞増殖機構を制御しているタンパク質や細胞の生死を司るタンパク質の発現量や構造の異常が密接に関連していることが示された。その結果、これらのがん原因分子を標的とす

る薬剤“分子標的薬”は、従来の細胞傷害性の抗がん剤とは異なり優れた選択性が期待されるようになった。実際、慢性骨髄性白血病治療薬 Gleevec の成功も相まって、いよいよ分子標的志向の創薬の機運が高まってきた。

2. ケミカルバイオロジー

がん治療において有効な分子標的を見出すためには、我々の体内でおこるあらゆる生命現象の理解が重要である。生命現象の解明には、体の基本要素である細胞をその構成要素であるタンパク質を中心とした分子間ネットワークとして理解することが必要であると考えられ、2003年のヒトゲノム解読完了と共に時代の趨勢は確実に全タンパク質機能の網羅的解析へと向かっている。しかし、たかだか約 25,000 程度といわれるヒト遺伝子から翻訳されるタンパク質は数十万個と言われており、従来用いられてきたジェネティクス的手法だけではこれらすべてのタンパク質機能を解析することは困難であった。1980年代 Schreiber らは、免疫抑制剤 FK506 の作用機序を明らかにするため、FK506 を担持したアフィニティーゲルを合成し FK506 の標的タンパク質としてイムノフィリン FKBP12 を同定した¹。さらに Schreiber らは FK506-FKBP12 複合体に結合する Ca^{2+} 依存的ホスファターゼ Calcineurin² を解析することにより、「Calcineurin→転写因子 NF-AT の活性化→IL-2 産生」という T 細胞の活性化に重要なシグナル伝達を解明した。また Schreiber はこのような小分子化合物（バイオプローブ）を用いてタンパク質の機能を解析する方法をケミカルジェネティクスとして提唱した。小分子化合物は遺伝子変異とは異なり、①添加や除去が容易であり、濃度によって変異の強度を制御できる、②小分子化合物をプローブとして用いることによりある表現型を誘起する原因分子の同定を容易に行える、③タンパク質が複数の機能を有している場合、ある特定の機能のみを制御することができるといった利点を有していることからケミカルジェネティクスは従来のジェネティクスを補完するタンパク質機能解析法として注目された。ポストゲノム時代に突入した今、ケミカルジェネティクスはその解析対象がすべてのタンパク質へと変化し、ケミカルゲノミクスへと拡張された。小分子化合物は理論上無限の構造多様性を持つため全タンパク質機能の解明を達成し新たな分子標的を見出せうること、また疾患原因因子に対応する小分子化合物はすぐさま創薬へと発展させうることから、ケミカルゲノミクスを中核と

するケミカルバイオロジー研究はがん化学療法において“魔法の弾丸”の創製を実現させる一番の近道として期待されている。

ケミカルバイオロジー研究の推進には多種多様な化合物が不可欠である。現在、化合物の供給には従来の天然由来化合物ではなく、コンビナトリアル合成化合物が広く用いられている。しかし Ortholand らは化合物のケミカルスペース（化合物の物理化学定数などに基づいた統計学的解析によって評価される多様性空間）を比較し、天然物の多様性こそが医薬品に通ずると指摘する³。また、Koehn らは、微生物代謝産物の特性として、構造中に多数のキラル中心や環構造の多様性からくる複雑な立体を有していること、また構造中に含まれるヘテロ原子数を比較すると、ハロゲンや硫黄原子の大差がないものの微生物代謝産物には酸素原子が多く含まれていることを挙げている⁴。このことは、天然物がタンパク質との相互作用に重要な水素結合の donor/acceptor になりうる官能基を多数有していることと関連しており、従ってタンパク質と相互作用しうる化合物の探索源として再び微生物代謝産物が見直されてきた。

そこで筆者は様々な細胞応答を修飾する生理活性物質を微生物代謝産物から探索し、ケミカルバイオロジー研究への応用を試みた。その結果、アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-xL の機能阻害剤として incednine を、また小胞体ストレス応答転写因子 XBP1 の活性化阻害物質として trierixn を発見した。

3. アポトーシスと Bcl-2 ファミリー

アポトーシスとは 1972 年、Kerr らによって提唱された細胞死の形態であり、外的素因による細胞膜の損傷、細胞の膨潤、破裂を伴うネクローシスとは違い、核や細胞の断片化・マクロファージによる貪食を伴う細胞の自殺機構である⁵。またその生理的な意義は、一義的には、不要になった細胞や有害な細胞を死に至らしめることで、生命の発生や形態変化、新陳代謝といった生体の恒常性の維持の一助をなすことであるといえる。アポトーシスの研究は当初、線虫をモデルとし、アポトーシスの実行に関わる遺伝子・分子レベルでの解析が行われた。その結果、アポトーシスのシグナル伝達は Ced-3、Ced-4、Ced-9、EGL-1 といった様々なタンパク質が関与した厳密な細胞応答により制御されていることが明らかになった⁶。その後、アポトーシスの制御機構はヒトを含む高等生物においても高度に保存されていることもわかってきた。

アポトーシス誘導機構には数多くの経路が知られているが、その多くはミトコンドリアへと集約される。さらにミトコンドリア下流では主に Ced-3 のヒトホモログである Caspase と呼ばれるプロテアーゼ群の活性化を介し、最終的に DNase の活性化により細胞死が実行されることが知られている⁷。この Caspase ファミリーはアポトーシス刺激に応じて自身のアミノ酸配列内に存在する Asp-X 配列の限定分解により活性化し、基質のアスパラギン酸の C 末端側を切断するシステインプロテアーゼである⁸。Caspase 3 は基質の DEVD 配列を特異的に認識して切断するプロテアーゼであり⁹、Caspase ファミリー中では effector Caspase としてアポトーシスの実行に最も重要な役割を果たしていると考えられている。Caspase 3 の基質としては、細胞骨格の一つであるアクチン¹⁰や DNase である CAD の抑制因子 ICAD¹¹、核 DNA を保護する PARP¹² などが知られている。

アポトーシス刺激を受けたミトコンドリアは膜透過性が亢進し、内部から Cytochrome *c* などのアポトーシス誘導因子の放出を促す。Cytochrome *c* は通常エネルギー産出に関与しているミトコンドリアタンパク質であるがアポトーシスシグナルに応答してミトコンドリアから放出されると、Ced-4 のヒトホモログ Apaf-1¹³ と Caspase 9 の複合体を形成し、Caspase 9、Caspase 3 を順次活性化する¹⁴。また Fas などの Death Receptor は Caspase 8 を活性化し、ミトコンドリアを介さずに直接 Caspase 3 を活性化できる¹⁵。これらのアポトーシス伝達経路は Caspase ファミリーによって引き起こされるアポトーシスであり、Caspase 依存的経路と呼ばれている。これに対して、近年 Caspase の活性化には依存しないアポトーシス誘導経路の存在が明らかになり、その実行因子として AIF が注目を浴びている¹⁶。AIF は Cytochrome *c* 同様、ミトコンドリアタンパク質であり、通常は膜間腔に存在しミトコンドリア電子伝達系の維持に関与するといわれている。しかし細胞が一度アポトーシス刺激を受けると AIF はミトコンドリアから細胞質を経て核へと移行し DNase を活性化、DNA のラージフラグメンテーション・クロマチンの凝集を伴った細胞死を誘導することが明らかになってきた^{17,18}。

ところでこれら一連のアポトーシスシグナル伝達において Bcl-2 ファミリーと呼ばれるタンパク質群が重要な役割を果たしている¹⁹。Bcl-2 は 1985 年、Tsujiimoto らが濾胞性 B リンパ腫の多くに認められる染色体転座 t(14;18):(q32;q21) の切断点から 14 番染色体上の免疫グロブリン重鎖遺伝子と

融合している18番染色体上の未知の遺伝子産物として発見したがん遺伝子産物である²⁰。1988年 Vaux、続いて Tsujimoto らが Bcl-2 のアポトーシス抑制機能を報告して以来、様々なアポトーシス刺激に対する Bcl-2 の抑制効果が報告されてきた²¹。その後1993年に Bcl-2 と構造的に類似した Bcl-xL (Ced-9 のヒトホモログ)²² と Bax (EGL-1 のヒトホモログ)²³ という二つの分子が報告されると、これを皮切りに Bak²⁴ と Bad²⁵、Bid²⁶、Hrk²⁷、Bim²⁸、最近では Noxa²⁹ というように次々と Bcl-2 ホモログがクローニングされ、現在までに約30ものファミリータンパク質の存在が報告されている。この分子群は BH ドメイン (Bcl-2 Homology domain) と呼ばれるファミリー間での相同性の高いアミノ酸配列 (BH1~4) を複数有しているのが特徴的であり、その機能と構造によって大きく3つに分類される。すなわち、①BH1~4 を有する Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 に代表されるアポトーシス抑制タンパク質群、②BH4 を除く3つのドメインを有する Bax、Bak に代表されるアポトーシス促進タンパク質群、③BH3 のみを有する Bid、Bad に代表されるアポトーシス促進タンパク質群 (BH3-only タンパク質) である。これらのタンパク質の機能の違いは BH ドメインに端を発すると考えられ、ドメイン解析が行われた。その結果、アポトーシス抑制タンパク質のみに存在する BH4 ドメインが抑制作用に関わるドメインであること、またアポトーシス促進タンパク質が共有する BH3 ドメインがアポトーシス誘導に必須なドメインであることが示唆された¹⁹。これら Bcl-2 ファミリータンパク質はアポトーシスのシグナル伝達のうち主にミトコンドリア上流で不可逆的なチェックポイントを担っている³⁰。多くのアポトーシス刺激は p53 を介して促進型タンパク質の発現量を増加させ³¹、さらに BH3-only タンパク質を介して Bax や Bak を活性化する。活性化した Bax や Bak はミトコンドリア膜上に存在する VDAC や ANT、cyclophilin D といったチャンネルタンパク質に働きかけ、ミトコンドリアからの細胞死誘導因子の放出を促す³²。Bcl-2 や Bcl-xL は、主にミトコンドリア膜に局在し、活性化した Bax らとヘテロ二量体を形成することによりその機能を不活性化することにより Cytochrome c や AIF の放出を抑制し、Caspase 依存、非依存経路の両方を抑制することが知られている³³。

がんをはじめとする様々な難治疾患では、多くの場合アポトーシスに関わるタンパク質の発現や機能に異常をきたしており、そのことが様々な疾患の発症・悪性化と密に関連していることがわかってきた³⁴。中でも Bcl-xL や Bcl-2 は細胞の種類によってその発現パターンが異なるものの、予後の悪い乳がんや

前立腺がんなど実に半数以上のヒトがん細胞でその過剰発現が観察されている³⁵。Bcl-2 や Bcl-xL の過剰発現は内因性的のアポトーシスを異常に阻害するため、細胞の正常なターンオーバーを妨げ、がんの発症の一因になりうるものが容易に類推される。実際、個体レベルの解析では、Bcl-2 を過剰発現させたトランスジェニックマウスが一定頻度で悪性腫瘍を発症することが報告されている³⁶。またこれらのタンパク質の過剰発現は抗がん剤などの外因性的のアポトーシスに対しても抑制効果を発揮し、がん悪性化や抗がん剤耐性に寄与していることが報告されている³⁷。以上の知見から、Bcl-2、Bcl-xL はがん治療薬の開発において有効な分子標的と考えられている³⁸。実際、Bcl-2 や Bcl-xL をターゲットにした薬剤の開発は様々な研究チームが行っており、その取り組みを分類すると、大きく二つに分けられる。一つはアンチセンスや一本鎖抗体、リボザイム³⁹を用い、Bcl-2 の発現を遺伝子、メッセンジャーレベルで下げる方法であり、*bcl-2* 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド Oblimersen は第 3 相試験で臨床有用性を示している⁴⁰。小分子化合物についての取り組みは、Bcl-2 と Bax との結合を阻害するような物質がコンピュータモデリングや NMR 解析をもとに設計・合成され、HA14-1⁴¹ や BH3I⁴²、gossypol⁴³、ABT-737⁴⁴ などが相次いで発見され、臨床に向けた知見も徐々に蓄積されつつある⁴⁵。

Bcl-2 や Bcl-xL は発見以来、ジェネティクス的手法により二量体形成がその機能の本質と考えられてきた。しかし二量体形成能を欠いた Bcl-2 変異体にもアポトーシス抑制活性があること⁴⁶ やプロテインキナーゼやホスファターゼ、シヤペロン、Caspases、Apaf-1 など様々なタンパク質が Bcl-2 と結合することがわかってきたことにより、Bcl-2/Bcl-xL の作用機序の本態は Bax との結合だけが主たるものではないと考えられるようになった。しかし、Bcl-2 ファミリーとは別のタンパク質との相互作用によるアポトーシス抑制機構については未だ不明な点が多い。そこで筆者は、Bcl-xL 過剰発現細胞を用いた cell-based スクリーニングにより Bcl-xL の機能阻害物質を探索し、得られた小分子化合物をバイオプローブとしたケミカルジェネティクス研究により Bcl-2/Bcl-xL の新たな作用機序の解明を試みた。

4. 小胞体ストレス応答と XBP1

小胞体には多種多様な分子シヤペロンやフォールディング酵素（ジスルフィ

ド結合や糖鎖付加)が存在し、これら小胞体シャペロンの作用により新生タンパク質は正しく折りたたまれ、固有の立体構造が形成される。一方で小胞体にはタンパク質の分解機構も存在し、何かしらの原因で発生した構造異常によるタンパク質毒性が発揮されるのを未然に防ぐことができる。すなわち小胞体は折りたたみと分解という相反する作用によりタンパク質の品質を管理している。

細胞は外的ストレスが負荷されたり、処理能力を超えた多量のタンパク質が産生されたりすると折りたたみと分解のバランスに変化が生じ、小胞体内で **unfolded** なタンパク質が増加する。これを小胞体ストレスと呼ぶ。細胞は小胞体ストレス状態になると、以下の3つの細胞応答(小胞体ストレス応答、**UPR**; **unfolded protein response**)を示す⁴⁷。①小胞体にそれ以上新生タンパク質が送り込まれないようにするための翻訳抑制、②小胞体内での折りたたみ能力を増強するための小胞体シャペロン転写誘導、③分解能力を増強するための分解経路因子の転写誘導である。またこれらの応答で状況が改善しない場合はアポトーシスにより細胞は死滅する。**UPR**の分子機構は出芽酵母を用いた解析により進展し、ヒトでは3つの小胞体ストレスセンサー(**PERK**、**ATF6**、**IRE1**)が小胞体内のタンパク質の構造に変化があるかどうかを鋭敏に監視していること、**unfolded** なタンパク質が蓄積するとセンサーが活性化し、それぞれに固有のシグナル伝達を誘導することが明らかになってきた⁴⁸。**UPR**はそもそも、糖鎖修飾阻害剤 **tunicamycin** や Ca^{2+} -ATPase 阻害剤 **thapsigargin**、還元剤 **DTT** などの薬剤を用いたある意味人工的なシステムとして一般には受け入れられないことが多かったものの、近年 **UPR**の分子機構が明らかにされていくにつれてがん悪性化への関与や神経変性疾患への関与、糖尿病発症への関与などその生理的な意義も明らかになってきた^{49,50}。

固形がん内部の細胞は通常、低酸素・低栄養・低 pH 下にさらされ小胞体ストレス状態にあるものの、この小胞体ストレスによって活性化される **UPR**により劣悪な環境下でも生存し、悪性化しうることが報告されている⁵⁰。また固形がんの増殖や悪性化には **UPR** 下流因子の中でも特に多機能性転写因子 **X-box binding protein 1 (XBP1)**の活性化が必須であることが知られている^{51,52}。**XBP1**は通常、転写活性ドメインを持たない不活性型のタンパク質 **XBP1(U)**として翻訳されるが、小胞体ストレスにより活性化した **IRE1**のスプライソソーム非依存的なフレームスイッチ型スプライシング反応により **XBP1**の前駆体型 mRNA から 26 塩基が切り取られ、フレームシフトを起こして活性化型転写因

子 XBP1(S) として翻訳され小胞体シャペロンや分解経路因子の発現を誘導する⁵³。XBP1 をノックアウトしたがん細胞と野性型を SCID マウスに移植すると、野性型は腫瘍が増大したのに対し XBP1 をノックアウトしたがんは腫瘍形成が見られなかった⁵²。このことから XBP1 を標的とする薬剤は固形がん治療薬への応用が期待されている。一方で XBP1 の標的遺伝子をマイクロアレイ解析によって検索すると小胞体ストレス因子以外にもタンパク質の分泌などに関わる遺伝子が数多く同定される⁵⁴。XBP1 はそもそも細胞から抗体産生細胞への最終分化に必須な転写因子として報告された因子であり⁵⁵、その後の研究から膜脂質合成やウイルス感染、肝細胞の発生との関わりも示唆されている⁵⁶。さらに転写活性を持たないバリエーションである XBP1(U) の翻訳が XBP1(S) と同程度に見られることから XBP1(U) も何らかの機能を有することが予想される⁵⁷。従って XBP1 の活性化や機能を制御するような化合物は、固形がん治療薬への応用はもちろん、XBP1 の未知機能の解明にも貢献することが考えられる。そこで筆者は XBP1 のフレームスイッチ型スプライシング機構に着目したスクリーニングにより小胞体ストレス誘導性 XBP1 活性化阻害物質の探索を行った。

本論文は、Bcl-xL 過剰発現細胞を用いた cell-based スクリーニングによる Bcl-xL の機能阻害剤の探索、及び *incednine* の単離精製、構造決定、生物活性、さらに新規 ER ストレス誘導性 XBP1 活性化阻害物質 *trierixin* の構造決定について述べたものであり、その骨子を以下に示す。

第 1 章では新規 Bcl-xL 機能阻害物質 *incednine* の発見、発酵生産、単離精製について述べる。Bcl-xL の機能を阻害する物質を微生物代謝産物より探索する方法を確立し、約 2000 株の被検菌から *Streptomyces* sp. ML694-90F3 株が目的の物質を生産していることを発見した。また同菌株の培養液より遠心液々分配クロマトグラフィーを用いた精製を行い、*incednine* の単離に成功した。

第 2 章では *incednine* の構造決定について述べる。*Incednine* の構造は理化学的性状、各種 NMR スペクトル解析により平面構造を決定し、天然には珍しい骨格を有する新規 24 員環マクロラクタム系化合物であることを明らかにした。相対立体配置は ¹H スピン結合定数や NOE スペクトルの詳細な解析をもとに決定した。さらにアグリコンに対する改良型 Mosher 法の適用、並びに *p*-ブロモベンゾイル誘導体を用いた X 線構造解析により絶対立体配置を決定した。

第 3 章では *incednine* の生物活性について述べる。*Incednine* は Bcl-xL 及び

Bcl-2 の抗アポトーシス効果をキャンセルし、抗腫瘍剤や Bax との併用により Bcl-2/Bcl-xL 過剰発現細胞に Caspase 非依存的な細胞死を誘導した。またこのとき incednine は Bcl-xL と Bax との結合は阻害しなかった。

第 4 章では trierixin の構造決定について述べる。Trierixin は小胞体ストレスによって誘導される XBP1 の活性化を阻害する物質として見出された新規 triene-ansamycin 系化合物であり、構造中に硫黄原子を含むユニークな構造を有している。Trierixin の構造は各種 NMR 法により決定した。

第1章 Bcl-xL機能阻害物質の探索、incednineの生産及び単離精製

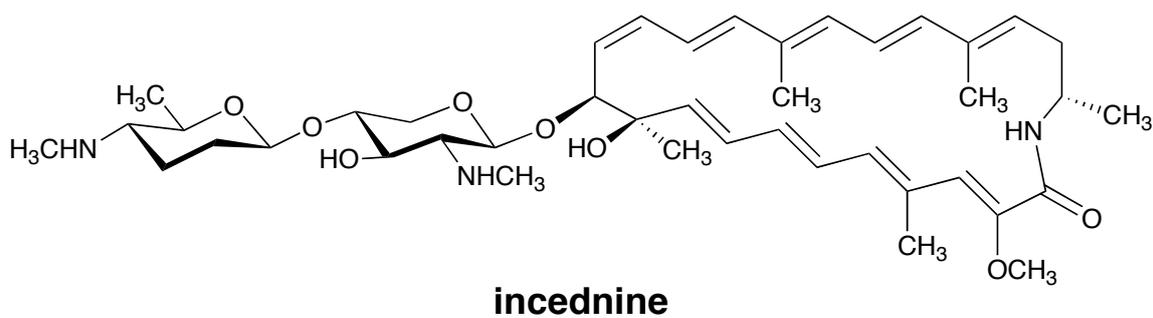
アポトーシス抑制蛋白質 Bcl-2 や Bcl-xL は様々なヒト癌細胞で高発現が観察され、癌細胞の悪性化や薬剤耐性獲得への関与が強く示唆される³⁵。これらのタンパク質機能を阻害する物質は抗がん治療薬への応用が期待されるばかりでなく、未だ不明な点の多い Bcl-2/Bcl-xL のアポトーシス抑制機構をケミカルジェネティクスの手法で解明するバイオプローブとしても有効と考えられる。そこで Bcl-xL の機能を阻害する物質を微生物代謝産物より探索した。筆者は、Bcl-xL を過剰発現させたヒト小細胞肺癌 Ms-1 細胞を用いた cell-based のスクリーニング系を確立し、微生物代謝産物より Bcl-xL の機能を阻害する物質を探索した。その結果、ML694-90F3 の培養上清に目的の活性物質を見出し、incednine を発見した (Figure 1-1 (a))。Incednine 生産菌は菌学的性状から *Streptomyces* sp. ML694-90F3 と同定した。また incednine は光や酸素、酸に対し非常に不安定であり、担体を用いた精製では単離には至らなかったが、遠心液々分配クロマトグラフィー (CPC) を駆使した精製法により塩酸塩として単離に成功した。

第1節 スクリーニング

スクリーニングには Bcl-xL を強制的に発現させたヒト小細胞肺癌 Ms-1 細胞 (Ms-1/Bcl-xL #24 細胞) を用いた。この細胞は、ベクターコントロール細胞である Ms-1/Neo #13 細胞とは異なり adriamycin (ADM) などの抗癌剤に抵抗性を示すことから、この細胞に微生物の二次代謝産物を加え、さらに ADM を加えたときにのみ選択的に細胞死を起こさせるような薬剤を Bcl-xL の機能阻害剤と考えた。系の構築に際し、添加する ADM の添加濃度を検討した。96-well plate に 1.2×10^4 cells/well で撒いた Ms-1/Neo #13 細胞と Ms-1/Bcl-xL #24 細胞に、それぞれ 0.03、0.1、0.3、1、3 $\mu\text{g/ml}$ と ADM の濃度を変化させて添加し、48 時間後の細胞生存率をトリパンプルー排出外試験法にて評価した。その結果、3 $\mu\text{g/ml}$ の ADM を 48 時間処理により Ms-1/Neo #13 細胞では 90% 以上の細胞が死んでいたのに対し、Ms-1/Bcl-xL #24 細胞では Bcl-xL によって ADM 誘導性の細胞死が抑制され、両者の生死に顕著な差が現れることが分かった (Figure 1-2 (a))。以上の検討から Figure 1-2 (b) に示すスクリーニング系を構築した。すなわち Ms-1/Bcl-xL #24 細胞を 96-well plate に 1.2×10^4 cells/well で撒き、

翌日スクリーニングサンプル（スクリーニングサンプルの調整法は実験の部に記した）を1%添加した。30分間前処理した後、3 $\mu\text{g/ml}$ のADMを加え、さらに48時間インキュベートした。このときADMを添加していない細胞を対照に置き、ADMを加えたものにのみ選択的に細胞死を誘導する菌株を探索した。約2000株の微生物培養上清より探索を行った結果、放線菌ML694-90F3株が目的の活性物質を生産していることを見出した（Figure 1-3 (a)）。また筆者は以前、V-ATPase 阻害剤である destruxin E が camptothecin との併用により Ms-1/Bcl-xL #24 細胞に細胞死を誘導することを見出していたが、Acridine Orange 染色によりこの菌株の生産する活性物質は V-ATPase 阻害剤でないことを確認した（Figure 1-3 (b)）。そこで種々精製法を工夫し、得られた活性本体の構造解析を行ったところ本化合物は新規化合物であったことから、incednine と命名した。

(a)



(b)

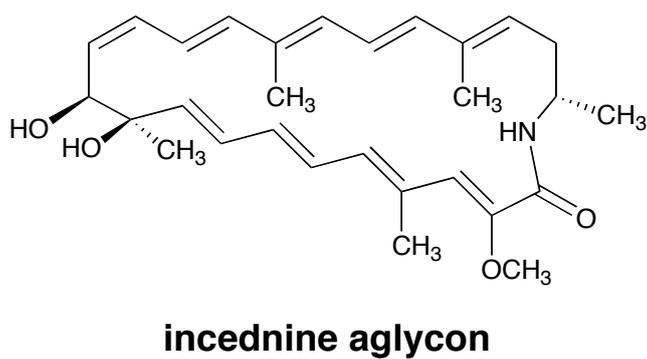


Figure 1-1 Structures of incednine (a) and its aglycon (b)

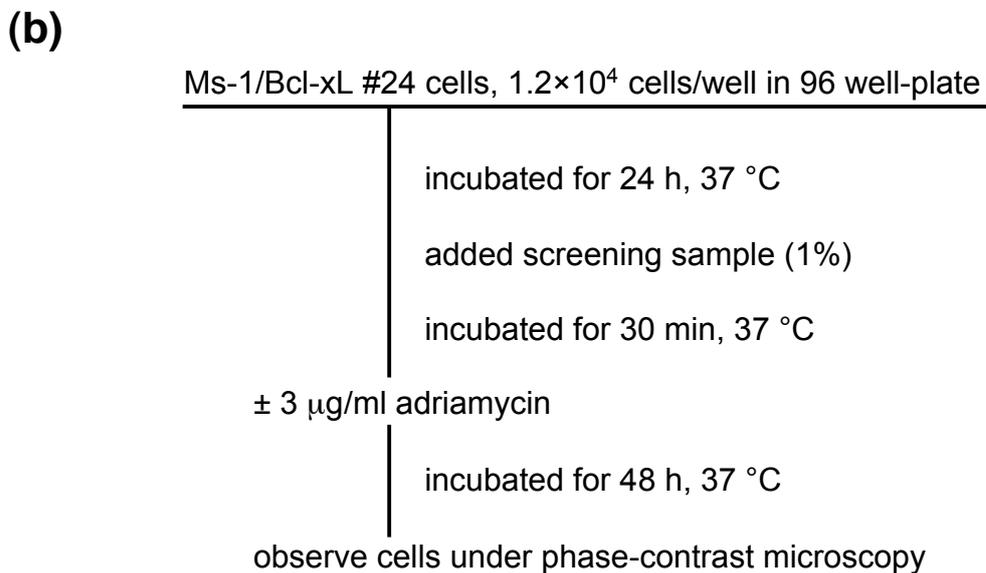
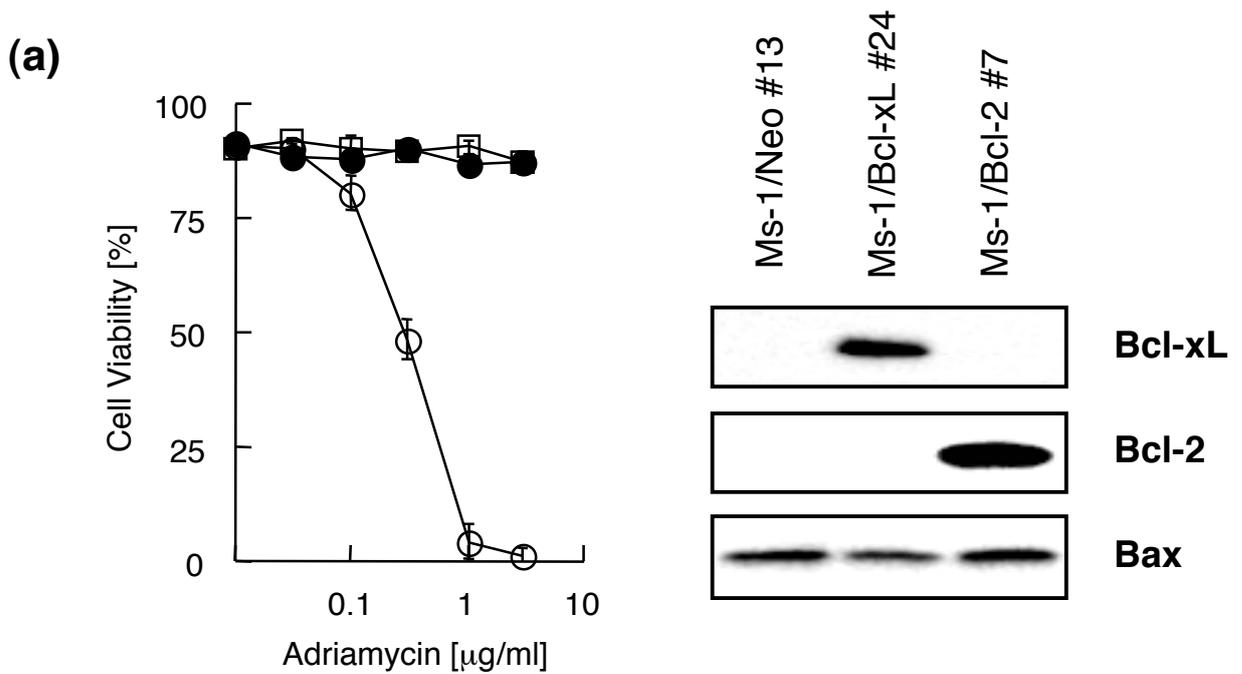
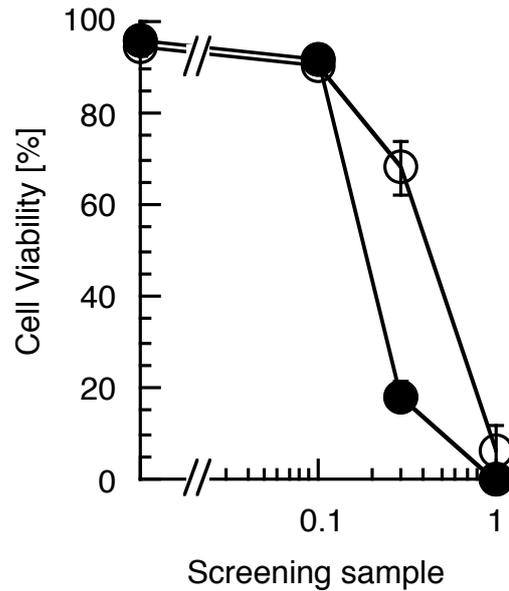


Figure 1-2 Assay method for discovery of a Bcl-xL functional inhibitor

(a) Cells were treated with adriamycin as indicated for 48 h (Ms-1/Neo #13 cells; open circle, Ms-1/Bcl-2 #7 cells; closed circle, Ms-1/Bcl-xL #24 cells; closed square). Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples: bars, SD. Right panel; Expression patterns of Bcl-2, Bcl-xL, and Bax in Ms-1 cell lines. (b) Assay system for inhibitory activity of Bcl-xL.

(a)



(b)

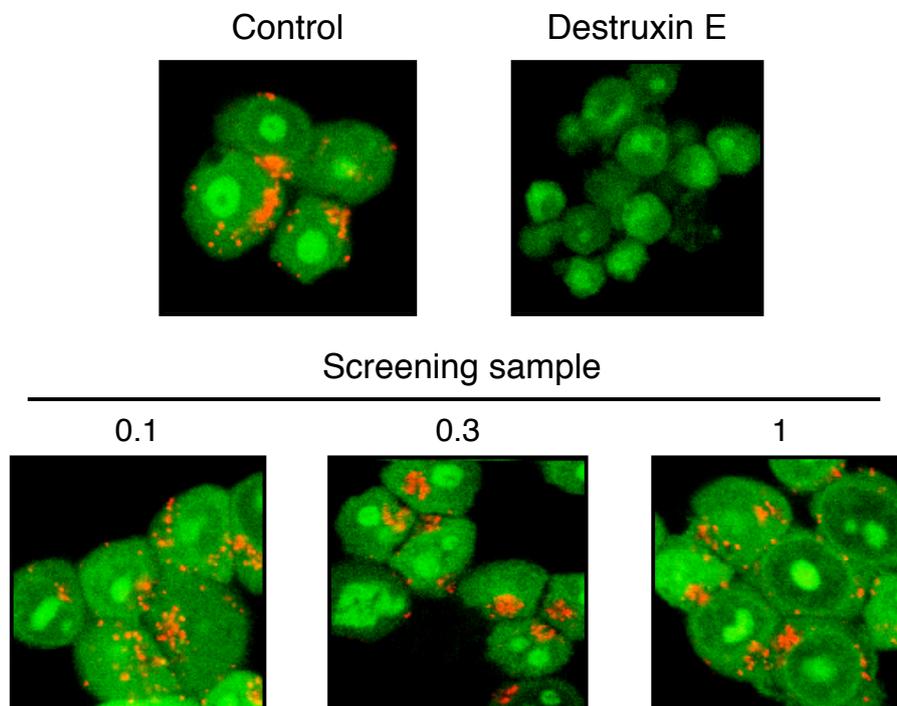


Figure 1-3 ML694-90F3 strain produces a modulator of the anti-apoptotic function of Bcl-xL

(a) Cells were treated with the indicated concentrations of screening sample in the presence (closed circle) or absence (open circle) of 3 $\mu\text{g/ml}$ Adriamycin for 48 h. The cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples; bars, SD. (b) Ms-1/Bcl-XL cells were treated with screening sample or 1 $\mu\text{g/ml}$ Destruxin E, V-ATPase inhibitor for 4 h, and then stained with 1 μM acridine orange for 30 min. After washed, the cells were observed under a laser-scanning confocal microscope.

第2節 Incednine 生産菌の同定

Incednine を生産する菌株、ML694-90F3 株は *Streptomyces* 属に属する放線菌であり、伊東市の土壌より分離された。本菌株の電子顕微鏡写真は Figure 1-4 に示す。ML694-90F3 株は、下記に記載する菌学的性状を有する。

1. 形態

ML694-90F3 株は、分枝した基生菌糸より、比較的長い気菌糸を伸長し、その先端はかぎ状、ループ状あるいは緩く巻いたらせんを形成する。成熟した孢子鎖は 10~50 個の卵円形~円筒形の孢子を連鎖する。孢子の大きさは約 0.5~0.6×0.8~0.9 ミクロンで、孢子の表面は平滑である。輪生枝、菌束糸、孢子のうおよび運動性孢子は認められない。

2. 各種培地における生育状態

(1) イースト・麦芽寒天培地 (ISP-培地 2、27°C 培養)

にぶ黄~明るい茶の発育上に、黄味白~うす黄の気菌糸を着生する。可溶性色素は認められない。

(2) オートミール寒天培地 (ISP-培地 3、27°C 培養)

うす黄~にぶ黄の発育上に、明るい灰の気菌糸を着生し、可溶性色素はかすかに黄色味を帯びる。

(3) スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-培地 4、27°C 培養)

うす黄の発育上に、黄味白~明るい灰の気菌糸を着生し、可溶性色素は認められない。

(4) グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-培地 5、27°C 培養)

にぶ黄~明るい茶の発育上に、黄味白の気菌糸をわずかに着生し、可溶性色素は黄色味を帯びる。

(5) シュクロース・硝酸塩寒天培地 (27°C 培養)

うす黄の発育上に、明るい灰の気菌糸をうっすらと着生し、可溶性色素は認められない。

3. 生理的性質

(1) 生育温度範囲

イースト・スターチ寒天培地（溶性デンプン 1.0%、イーストエキス 0.2%、ひも寒天 2.4%、pH7.0）を用い、10°C、20°C、24°C、27°C、30°C、37°C 及び 45°C の各温度で試験した結果、10°C、37°C、45°C での生育は認められず、20°C~30°C の範囲で生育した。生育至適温度は 27°C 付近である。

- (2) スターチの加水分解（スターチ・無機塩寒天培地、ISP-培地 4、27°C 培養）培養後 18 日目頃よりわずかにスターチの加水分解が認められたが、その作用は弱い。

4. 菌体成分

細胞壁中の 2,6-ジアミノピメリン酸は LL-型である。

5. 16S rRNA 遺伝子解析

16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（458 bp）を決定し、DNA データベースに登録された公知菌株のデータと比較した。その結果、ML694-90F3 株の塩基配列は *Streptomyces* 属放線菌の 16S rRNA 遺伝子と高い相同性を示した。

以上の性状を要約すると、ML694-90F3 株は、その形態上、よく分枝した基生菌糸より、比較的長い気菌糸を伸長する。その先端は、かぎ状、ループ状あるいは、緩く巻いたらせんを形成し、卵円形〜円筒形の胞子を連鎖する。種々の培地で、うす黄〜にぶ黄の発育上に黄味白〜明るい灰の気菌糸を着生する。可溶性色素は認められないか、又は黄色味を帯びる。この菌株の細胞壁中の 2,6-ジアミノピメリン酸は LL-型である。ML694-90F3 株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を公知菌株のデータと比較したところ、*Streptomyces* 属放線菌と高い相同性を示した。

以上の結果より、ML694-90F3 株は *Streptomyces* 属に属するものと考えられる。そこで、ML694-90F3 株を *Streptomyces* sp. ML694-90F3 とした。なお、ML694-90F3 株は独立行政法人産業技術総合研究所に寄託申請し、FERM P-19631 として受託された。

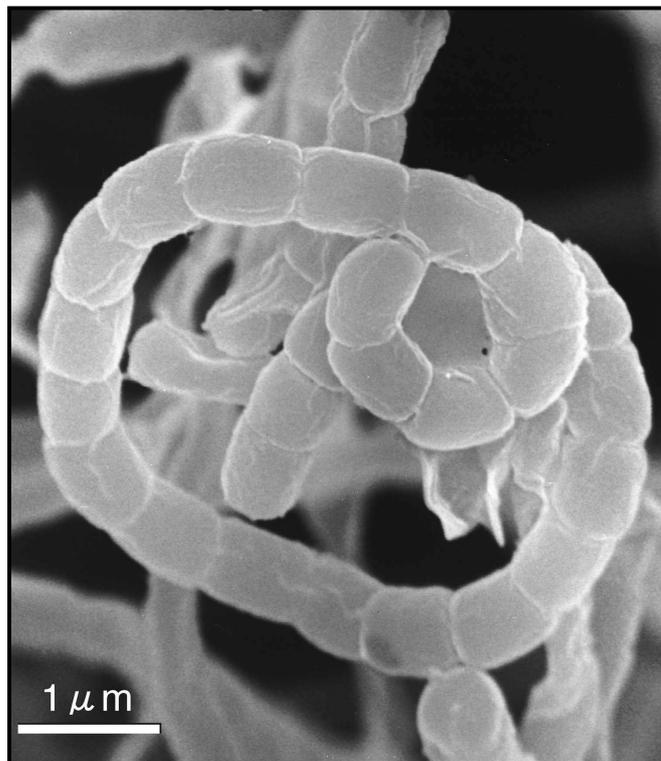


Figure 1-4 Scanning electron micrograph of *Streptomyces* sp. ML694-90F3

第3節 Incednine の発酵生産

55種類の培地を用い、HPLCで incednine の生産量を定量することにより至適生産培地を検討した。その結果、“は培地”（グルコース 1.0%、グリセロール 1.0%、L-グルタミン酸ナトリウム 0.3%、アジプロン 1%、炭酸カルシウム 0.1%、pH7.4）4日間培養において最大の発酵生産を得られた（Figure 1-5）。また、“は培地”を段階希釈した培地を用いたところ、2倍希釈培地では incednine 生産性が約2倍向上したため、この培地を生産培地に選択した。

Incednine の発酵生産は最終的に 200 L 容ジャーファーメンターを用いて行った。すなわち、*Streptomyces* sp. ML694-90F3 株の寒天斜面培地培養物の菌体一白菌耳を、種母培地（デキストリン 2.0%、ガラクトース 2.0%、バクトソイトン 1.0%、コーンステープリカー 0.5%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%、pH 7.4）を 110 ml ずつ分注した 500 ml 容 Erlenmeyer フラスコ 1 本に接種し、27°C で 3 日間振盪培養した。さらにその培養物を再度、種母培地を 110ml ずつ分注した 500 ml 容 Erlenmeyer フラスコ 18 本に 2 ml ずつ接種し、27°C で 3 日間振盪培養した。これを種培養液として、生産培地（グルコース 0.5%、グリセロール 0.5%、L-グルタミン酸ナトリウム 0.15%、アジプロン 0.5%、炭酸カルシウム 0.1%、pH7.4）に消泡剤としてプロナールを加えた培地 100 L に全量接種し、27°C、等量通気、200 rpm/min の攪拌条件で 3 日間培養した。

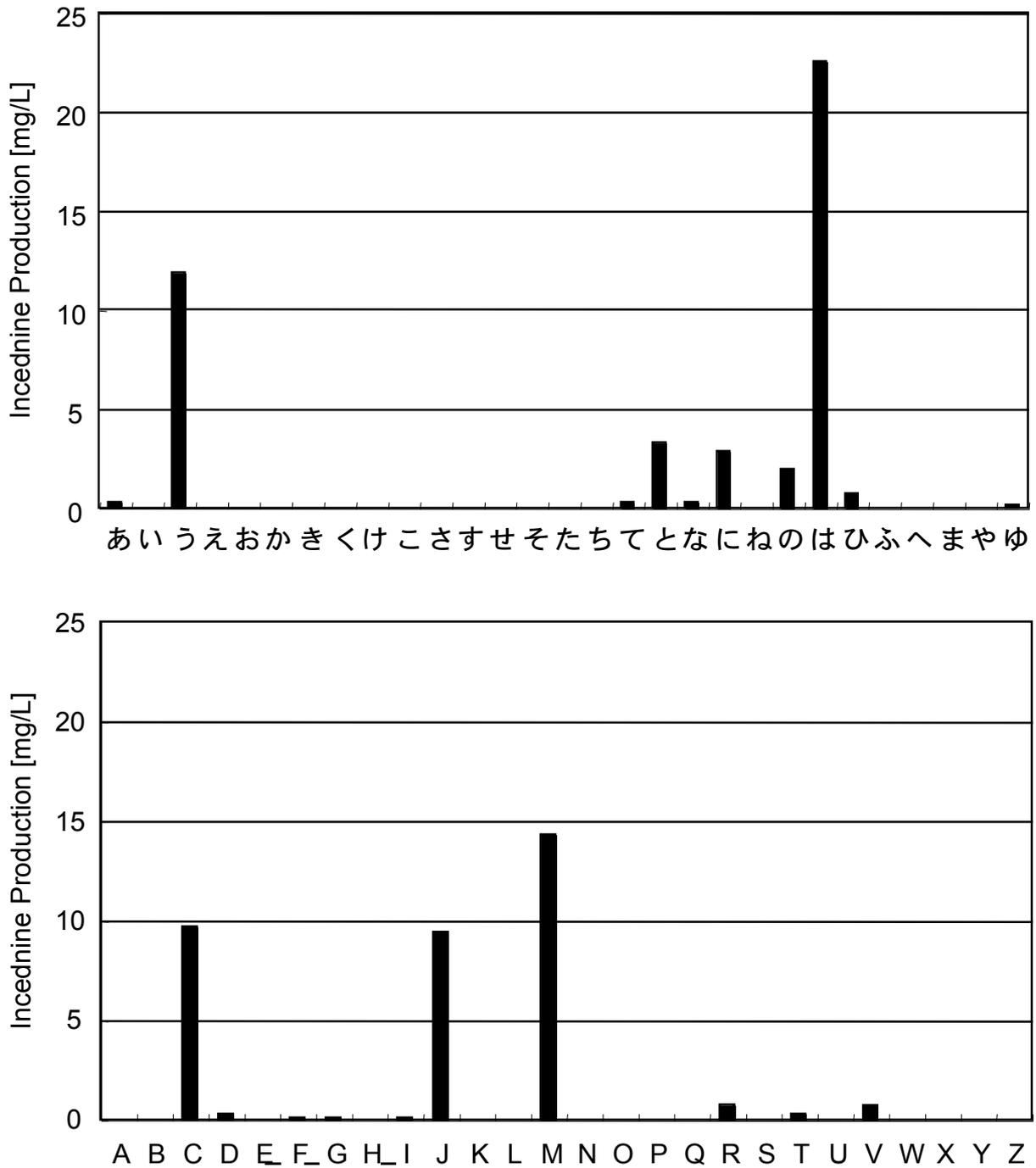


Figure 1-5 Detection of metabolites of ML694-90F3 in various producing Media

Seed culture of ML694-90F3 strain was inoculated into 55 kinds of producing media as indicated, and incubated on a rotary shaker at 27°C for 4 days. These cultures were extracted with CHCl_3 and analyzed by HPLC. Production yields of incednine was determined by its peak intensity in HPLC chromatogram using authentic sample.

第4節 Incednine の単離精製

Incednine はその化学的な性質上、培養液を塩基性・高塩濃度下におくと析出してくること、また光あるいは酸性条件下で容易に活性が低下すること、またシリカゲルやゲル濾過などの担体を用いた精製はいずれも回収率が極端に低かったことから、遠心液々分配クロマトグラフィーを駆使した Figure 1-6 に示す方法により精製した。すなわち培養液を pH9 に調整後、硫酸ナトリウムを加え 10°C で静置した。濾過により菌体を含む沈殿物を回収し、この沈殿物をクロロホルム:メタノール=1:1 で抽出、濃縮乾固した。得られた抽出物はクロロホルム:メタノール:水=5:6:4 の二層系に溶解し、分配した。この有機層をクロロホルム:メタノール:水=5:6:4 系の下降法にて遠心液々分配クロマトグラフィー (CPC) を行い、正溶出の脂溶性画分に得られた活性画分を濃縮乾固し黄色粗粉末を得た。一方、incednine は構造中に塩基性官能基を有することがわかったので、次にこの粗粉末を希薄な酸性条件下、クロロホルム:メタノール:1 mM 塩酸水=5:6:4 系の上昇法にて CPC を行った。その結果、incednine は正溶出である水溶性画分に塩酸塩の形で溶出された。またこの際、溶出画分について 1 本ずつ MS クロマトグラフィーを行うことにより incednine 分解物を含む不純物を除くことができ、純粋な incednine を薄黄色粉末として得た。

Cultured broth of *Streptomyces* sp.ML694-90F3 (3 days, 100 L)

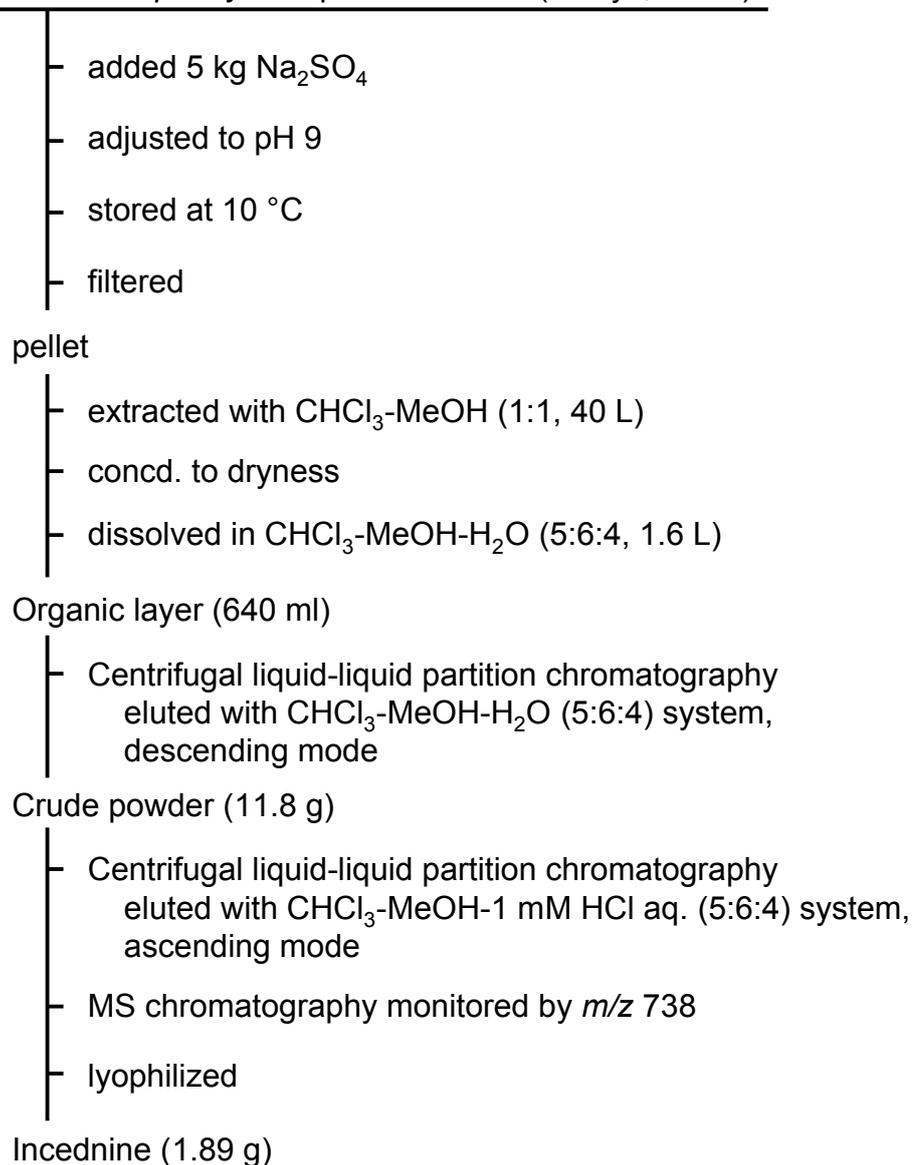


Figure 1-6 Purification procedure of incednine

第2章 Incednine の構造解析

第1章で *Streptomyces* sp. ML694-90F3 株の培養液より単離した incednine の構造は各種スペクトル解析、コンピュータモデリング、X線構造解析により決定した。本章ではまず各種 NMR スペクトル解析やコンピュータモデリングによる incednine の平面構造、及び相対構造の決定について述べる。また incednine 生産菌の培養液中存在した incednine アグリコン部分への改良型 Mosher 法の適用、及び糖の X線構造解析による incednine の絶対構造の決定について述べる。

第1節 Incednine の理化学的性状

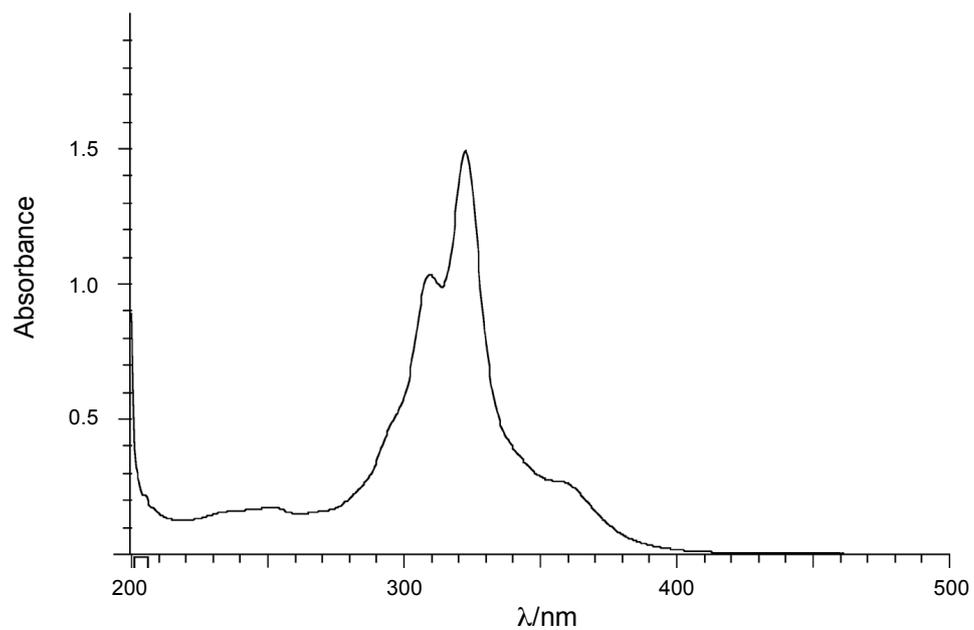
Incednine の理化学的性状は Table 2-1 に示した。Incednine は融点が 121-122°C の薄黄色粉末であり、高分解能 ESI-MS スペクトルからその分子式を $C_{42}H_{63}N_3O_8$ と決定した (m/z : 738.4691 [(M+H)⁺ calcd. for $C_{42}H_{64}N_3O_8$, 738.4688])。Incednine は塩酸塩としてはメタノール、水に可溶であり、クロロホルムやアセトンには難溶である。一方、フリーの状態ではクロロホルムやピリジンに可溶である。なお、incednine は塩基性下では比較的安定であるが、酸性条件下あるいは光には非常に不安定である。Incednine のシリカゲルによる薄層クロマトグラフィーは展開溶媒クロロホルム:メタノール:水=4:1:0.1 (v/v) で $R_f=0.26$ を示す。呈色反応はリンモリブテン硫酸試薬、GL 試薬に陽性である。Incednine の UV スペクトル及び IR スペクトルをそれぞれ Figure 2-1 (a)及び (b)に示した。UV スペクトルは 294.5、309.5、322.5、356.0 nm に極大吸収を示したことから、incednine がポリエン様化合物であることが示唆された。さらに IR スペクトルは 1650、1510 cm^{-1} に強い吸収を示したこと、GL 試薬による呈色反応が陽性であったことからアミドの存在が示唆された。

Table 2-1 Physico-chemical properties of incednine as a HCl salt

Appearance	pale yellow powder
Melting point (°C)	122-124
HRESI-MS (<i>m/z</i>)	
found	738.4691 (M+H) ⁺
calcd.	738.4688 (for C ₄₂ H ₆₄ N ₃ O ₈)
Molecular formula	C ₄₂ H ₆₃ N ₃ O ₈ · 2HCl
Molecular weight	810.98
Optical Rotation [α] _D ²⁰	-702.3° (c 0.2, MeOH)
UV λ_{\max} nm (log ϵ) in MeOH	294.5 (4.88), 309.5 (5.23), 322.5 (5.38), 356.0 (4.64)
IR ν_{\max} (KBr) cm ⁻¹	3440, 2980, 2930, 1650, 1620, 1580, 1510, 1460, 1160, 1080, 990, 960
TLC ^a (Rf)	0.26
Color Reaction	
positive	phosphomolybdate-H ₂ SO ₄ , GL
negative	ninhydrin, dragendorff

^a Silica gel TLC (Merck Art. 105715): CHCl₃:MeOH:H₂O=4:1:0.1

(a)



(b)

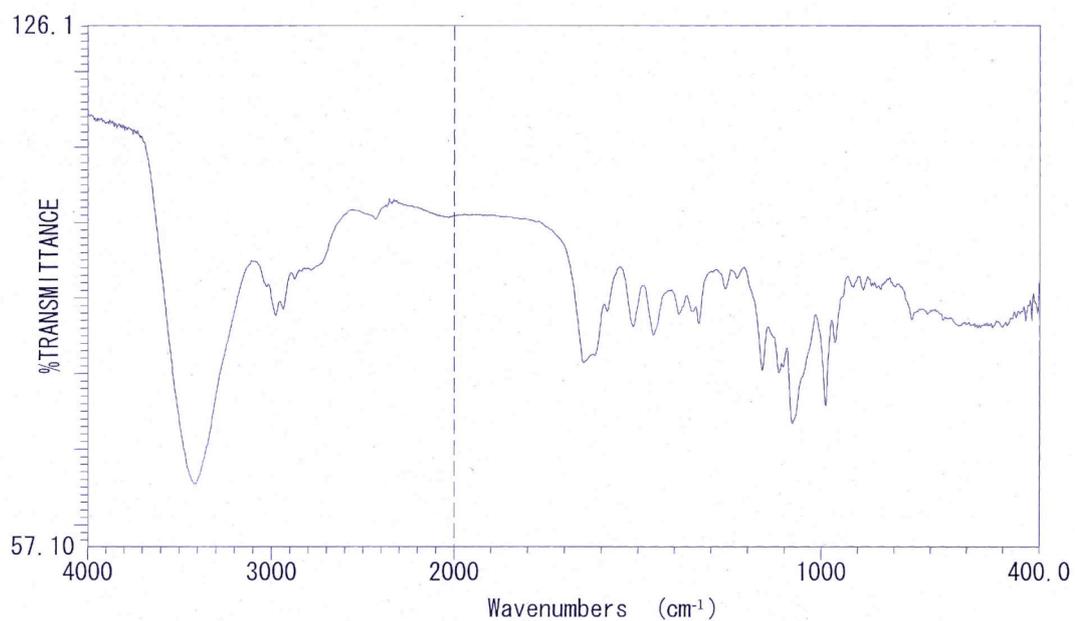


Figure 2-1 UV spectrum and IR spectrum of incednine

(a) UV spectrum of incednine was measured at RT in MeOH : incednine·2HCl (5 μ g/ml), (b) IR spectrum of incednine was taken in a KBr disc.

第2節 Incedinine の平面構造の決定

Incednine はその安定性や溶解性の問題からフリーの状態においても塩酸塩の状態においても単一溶媒では解析可能な NMR スペクトルを得られなかった。測定溶媒や温度の条件検討を行ったところ、メタノール- d_3 :水=3:1 混液、 -5°C の条件下で比較的良好な NMR スペクトルを得ることができた。 ^1H と ^{13}C -NMR スペクトルとそのデータをそれぞれ Figure 2-2、2-3、Table 2-2 に示した。 ^1H -NMR スペクトルより、6つのメチル、1つのメトキシ、及び2つの *N*-メチルの存在と、1つのアミドプロトン (δ 7.62)、さらに 14H 分のオレフィンメチンのシグナルを確認した。また ^{13}C -NMR は分子式から予測された 42 のシグナルを示し、その多重度については DEPT スペクトル (Figure 2-4) により、9つのメチル、4つのメチレン、14の sp^2 メチン、9つの sp^3 メチン、5つの sp^2 級炭素、1つの sp^3 級炭素であることを明らかにした。また ^{13}C のケミカルシフト、及び HMQC スペクトルの解析から1つのアミド/エステルカルボニル (δ 167.7)、及び9つのオレフィンが含まれることを帰属した。このことと分子式から計算される不飽和度より、incednine の構造中には3つの環構造が含まれることがわかった。

Incednine の ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析により、Figure 2-5 に示す5つの部分構造の存在を明らかにした。部分構造 (a) については 4- CH_3 より遠隔相関が見られる H-5 から H-9 までスピン結合ネットワークが見られ、4- CH_3 ~C-9 までのつながりを決定した。部分構造 (b) は H-11 から二重結合由来の H-13 まで観測されるスピン結合により決定した。また C-11 (δ 84.1) には酸素原子が結合していることがケミカルシフトより判明した。部分構造 (c) については 20- CH_3 より遠隔相関が見られる二重結合由来 H-20 から 23- CH_3 までのスピン結合ネットワークが観測され、20- CH_3 ~C-23 及び 23- CH_3 のつながりを決定した。スピン結合ネットワークの末端に存在する H-23 は、 δ_{H} 7.62 にダブルットとして観測されるシグナルともスピン結合していた。この δ_{H} 7.62 のシグナルに対応する炭素シグナルは HMQC スペクトルでは観測されなかったことから、C-23 はアミドの窒素原子と結合していることが示唆された。部分結合 (A) は H-1' から H-5' までのスピン結合ネットワークが観察され C-1'~C-5' のつながりを明らかにした。また対応する炭素の ^{13}C ケミカルシフトから C-3' (δ 69.2)、C-4' (δ 77.1)、C-5' (δ 63.0) には酸素原子が結合していることがわかった。1'位は

その ^1H 、 ^{13}C ケミカルシフト (δ_{H} 4.89、 δ_{C} 99.9) から容易に糖のアノマー位を類推させた。さらに C-2'にはその ^1H 、 ^{13}C ケミカルシフト (δ_{H} 3.02、 δ_{C} 62.7) から窒素原子が結合していることが示唆された。部分構造 (B) については H-1'' から H-6''までに観測されるスピン結合ネットワークより C-1''~C-6''のつながりを明らかになった。また ^{13}C ケミカルシフトから C-5'' (δ 73.7) には炭素原子が、C-4''にはその ^1H 、 ^{13}C ケミカルシフト (δ_{H} 2.86、 δ_{C} 59.7) から窒素原子が結合していることが示唆された。1''位もその ^1H 、 ^{13}C ケミカルシフト (δ_{H} 4.69、 δ_{C} 101.1) から容易に糖のアノマー位を類推させた。

以上で明らかになった 5 つの部分構造の他に、incednine を構成する炭素として、Figure 2-5 に示す 2 つのシングレットメチル [10- CH_3 (δ_{H} 1.51、 δ_{C} 23.3)、16- CH_3 (δ_{H} 1.61、 δ_{C} 12.8)]、2 つの NCH_3 [2'- NCH_3 (δ_{H} 2.82、 δ_{C} 32.3)、4''- NCH_3 (δ_{H} 2.66、 δ_{C} 31.0)]、1 つの OCH_3 [2- OCH_3 (δ_{H} 3.52、 δ_{C} 61.4)]、 sp^2 4 級炭素が 2 つ [C-2 (δ 147.9)、C-16 (δ 135.8)]、酸素が結合した sp^3 4 級炭素が 1 つ [C-10 (δ 76.5)]、アミド/エステルカルボニルが 1 つ [C-1 (δ 167.7)] 及び、 ^1H - ^1H COSY では帰属が困難なものを含むオレフィンメチンが 6 つ [C-3 (δ 127.5)、C-14 (δ 125.6)、C-15 (δ 138.5)、C-17 (δ 132.9)、C-18 (δ 124.8)、C-19 (δ 138.5)] 存在することを明らかにした。

これらの各炭素及び部分構造間のつながりは HMBC スペクトルなどにより検討した (Figure 2-6)。部分構造 (a) 及び (b) のつながりは 10- CH_3 から部分構造 (a) 末端にある C-9、酸素原子が結合した sp^3 4 級炭素 C-10 及び部分構造 (b) の末端にある C-11 への相関が観測されたことにより決定した。さらに部分構造 (c) に存在する 1-NH から 1 位のカルボニル炭素 (δ 167.7) への相関、部分構造 (a) 中の 4- CH_3 から 3 位のオレフィン炭素への相関、H-3 から 1 位カルボニル炭素及び C-2 への相関、2- OCH_3 から C-2 への相関がそれぞれ観測されたことから部分構造 (a) 及び (c) はエノールエーテルアミドという天然物には珍しい構造でつながっていることを明らかにし、C-13~C-20 を除く炭素、窒素間のつながりを明らかにした。部分構造 (b) と (c) のつながりはオレフィン領域 (δ 6.1~6.3) に 8 つの水素が極めて接近して現れるため ^1H - ^1H COSY では推定できなかった。そこで ^1H - ^1H COSY の遠隔相関と HMBC、1D,2D-TOCSY スペクトルとを併せて解析した。その結果、 ^1H - ^1H COSY の遠隔相関と HMBC スペクトル解析より C-15~C-17 及び 16- CH_3 、C-19~C-21 及び 20- CH_3 の部分構造が明らかになった。また Figure 2-7 に示すように 1D-TOCSY において H-13

から H-15、H-17 から H-19 までの相関が観察されたことから部分構造 (b) 及び (c) はペンタエンを介してつながっていることを決定した。以上より **incednine** のアグリコン部分の構造が判明し、**incednine** が 24 員環マクロラクタム環を有することを明らかにした。

残りの部分構造 (A) 及び (B) については HMBC スペクトルにおいて、H-1' から C-5'、H-1'' から C-5'' へのロングレンジ C-H カップリングが観測されたことから部分構造 (A) 及び (B) がそれぞれペントピラノース環、ヘキソピラノース環を形成していることがわかった。また δ 2.82 と δ 2.66 に観測される N-CH₃ からそれぞれペントピラノース環の C-2'、ヘキソピラノース環の C-4'' への相関が見られたことに加え、LC-MS/MS でのフラグメントパターン (m/z : 128、146 [M+H]⁺、Figure 2-8) が奇数であったことからいずれの糖も 1 つの窒素原子を含むアミノ糖であることがわかった。さらに HMBC スペクトルより H-1' から C-11、H-1'' から C-4' への相関が観測されたことからアミノ糖 (A) はアグリコンの 11 位に結合していること、並びにアミノ糖 (A) 及び (B) はそれぞれ 4' 位と 1'' 位でグリコシド結合していることがわかった。以上より Figure 1-1 (a) に示す **incednine** の平面構造が明らかになった。**Incednine** はそのアグリコン中に天然物には珍しい骨格 (エノールエーテル-アミド) を有する新規 24 員環マクロラクタム配糖体であった。

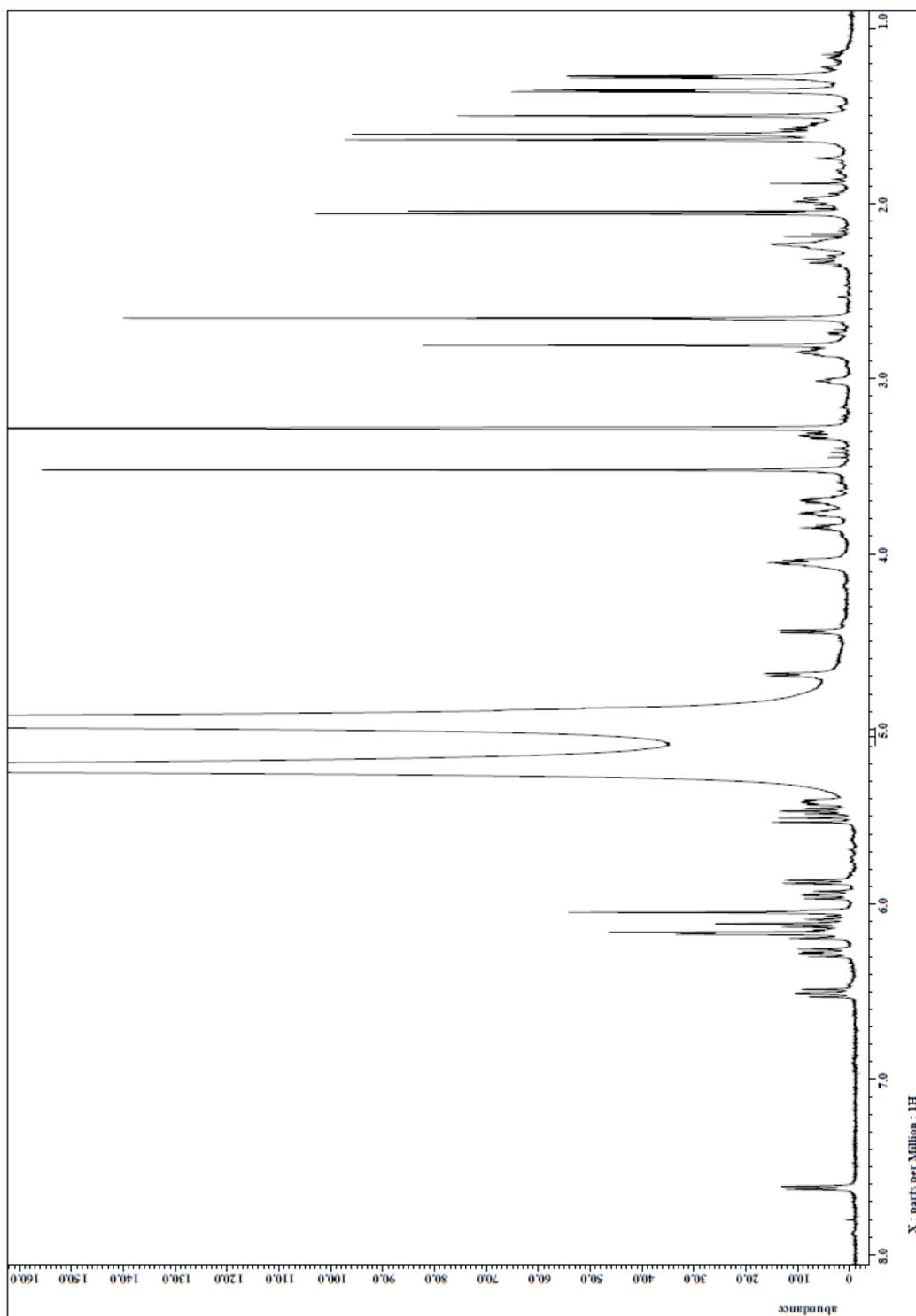


Figure 2-2 ¹H NMR spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1) (600 MHz)

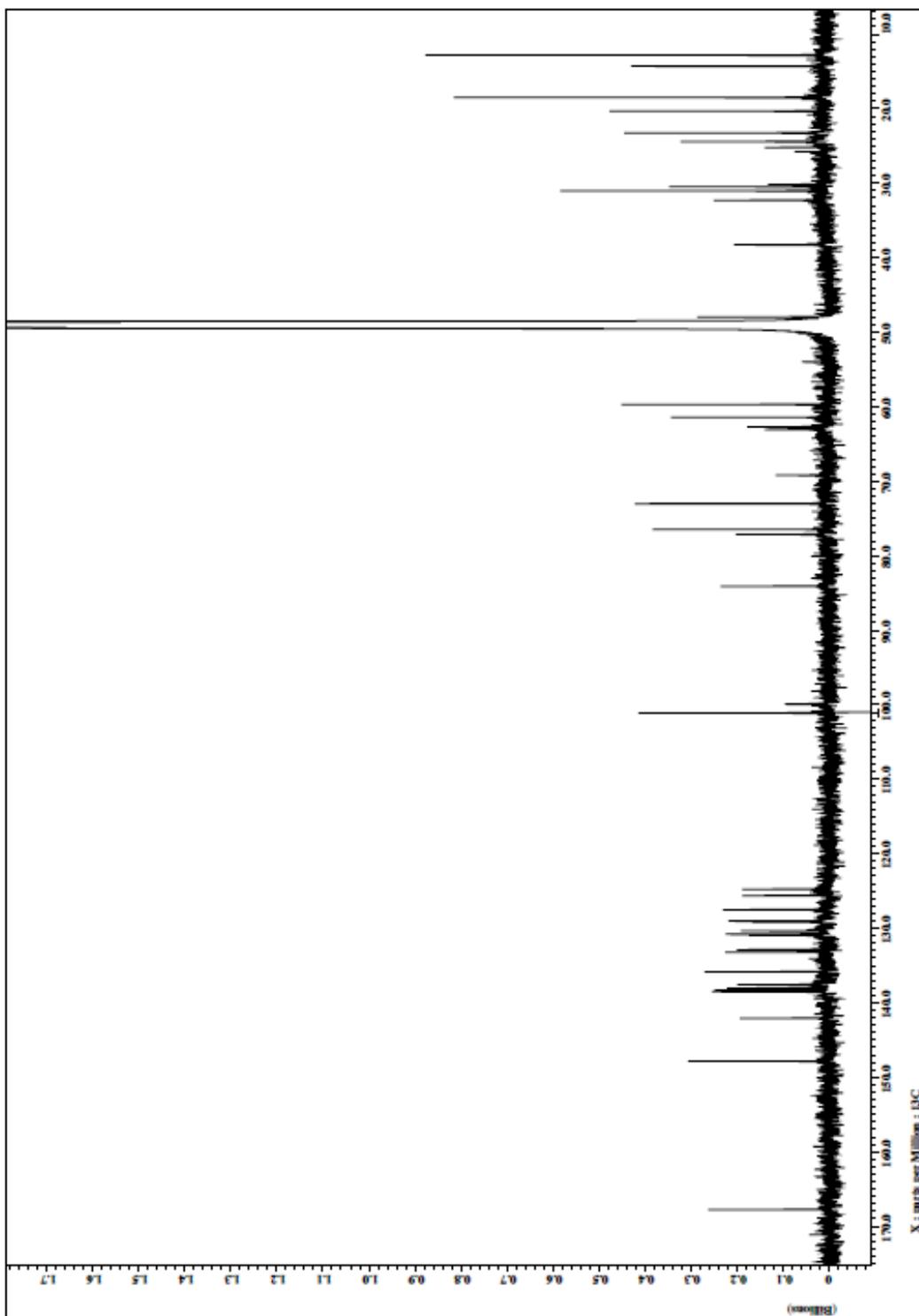


Figure 2-3 ¹³C NMR spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1) (150 MHz)

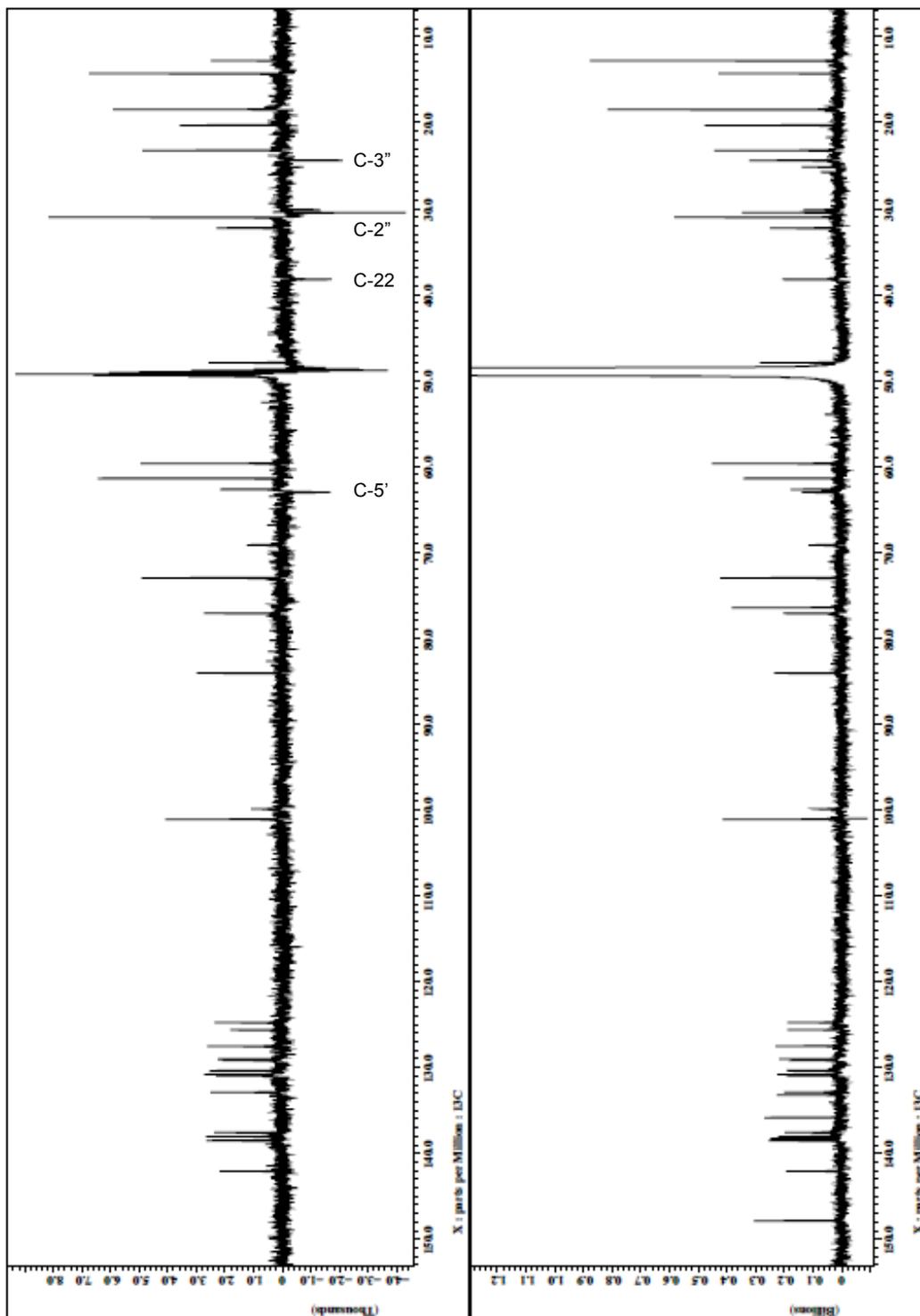


Figure 2-4 DEPT spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1) (150 MHz) (left panel) DEPT spectra of incednine, (right panel) ¹³C-NMR spectra of incednine.

Table 2-2 ¹H and ¹³C NMR data of incednine·2HCl (CD₃OH:H₂O=3:1, -5°C)

No.	δ _C	δ _H (multiplicity, J [Hz])	No.	δ _C	δ _H (multiplicity, J [Hz])
1	167.7 (s)		23	48.0 (d)	4.06 (1H, m)
2	147.9 (s)		24	14.3 (q)	2.06 (3H, s)
3	127.5 (d)	6.05 (1H, brs)	25	23.3 (q)	1.51 (3H, s)
4	133.2 (s)		26	12.8 (q)	1.61 (3H, s)
5	138.0 (d)	5.87 (1H, d, 11.6)	27	12.8 (q)	1.64 (3H, s)
6	129.0 (d)	6.51 (1H, dd, 11.6, 14.4)	28	20.3 (q)	1.28 (3H, d, 6.7)
7	137.6 (d)	5.95 (1H, dd, 10.8, 14.4)	29	61.4 (q)	3.52 (3H, s)
8	130.4 (d)	6.28 (1H, dd, 10.8, 15.8)	1-NH		7.62 (1H, d, 10.4)
9	142.1 (d)	5.52 (1H, d, 15.8)	1'	99.9 (d)	4.89 (1H, d, 7.0)
10	76.5 (s)		2'	62.7 (d)	3.02 (1H, t, 7.0)
11	84.1 (d)	4.44 (1H, d, 9.0)	3'	69.2 (d)	3.85 (1H, dd, 7.0, 8.0)
12	129.2 (d)	5.47 (1H, t, 9.0)	4'	77.1 (d)	3.77 (1H, ddd, 4.2, 8.0, 8.0)
13	130.1 (d)	6.13 (1H, m)	5'	63.0 (t)	3.33 (1H, dd, 8.0, 12.0),
14	125.6 (d)	6.09 (1H, dd, 11.0, 14.0)	6'	32.3 (q)	2.82 (3H, s)
15	138.5 (d)	6.19 (1H, d, 14.0)	1"	101.1 (d)	4.69 (1H, dd, 1.5, 9.1)
16	135.8 (s)		2"	30.5 (t)	1.56 (1H, m),
17	132.9 (d)	6.05 (1H, m)	3"	24.4 (t)	1.60 (1H, m),
18	124.8 (d)	6.17 (1H, m)	4"	59.7 (d)	2.86 (1H, m)
19	138.5 (d)	6.17 (1H, m)	5"	73.0 (d)	3.70 (1H, dq, 6.1, 9.2)
20	138.3 (s)		6"	18.5 (q)	1.36 (3H, d, 6.1)
21	130.8 (d)	5.42 (1H, dd, 6.0, 10.4)	7"	31.0 (q)	2.66 (3H, s)
22	38.3 (t)	2.23 (1H, m),			

Chemical shifts in ppm from TMS as an internal standard.

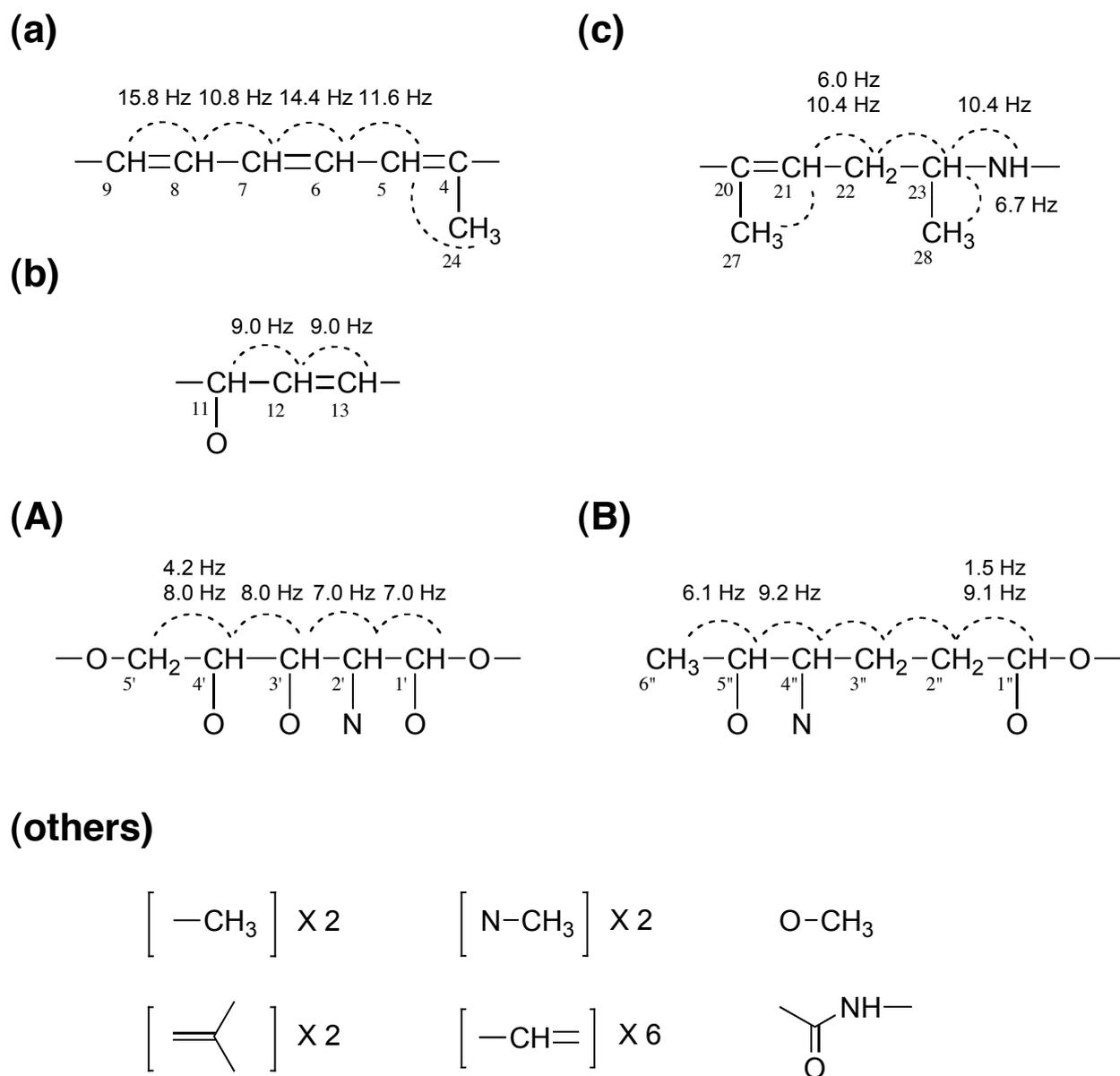


Figure 2-5 Partial structures of incednine determined by $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum

Five partial structures were determined by $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum (dashed curve, observable ^1H spin-spin coupling; values, spin coupling constant).

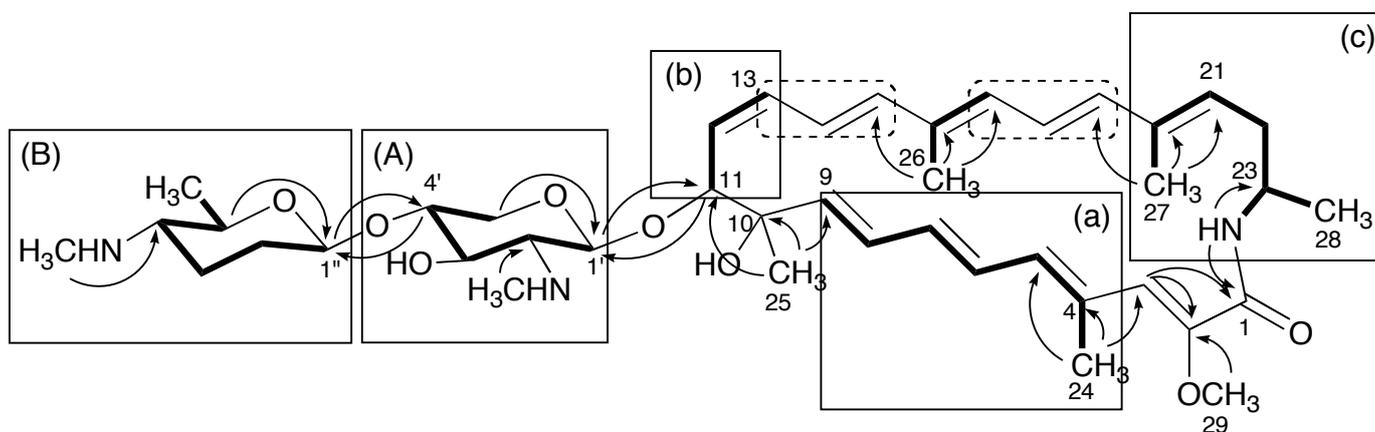


Figure 2-6 Gross structure of incednine determined by 2D-NMR spectroscopy

Connectivity of partial structures were elucidated by 2D-NMR spectra (bold line, COSY; arrows, selected HMBC correlations; dashed squares, selected TOCSY connectivity; single squares, partial structures determined by ^1H - ^1H COSY spectrum).

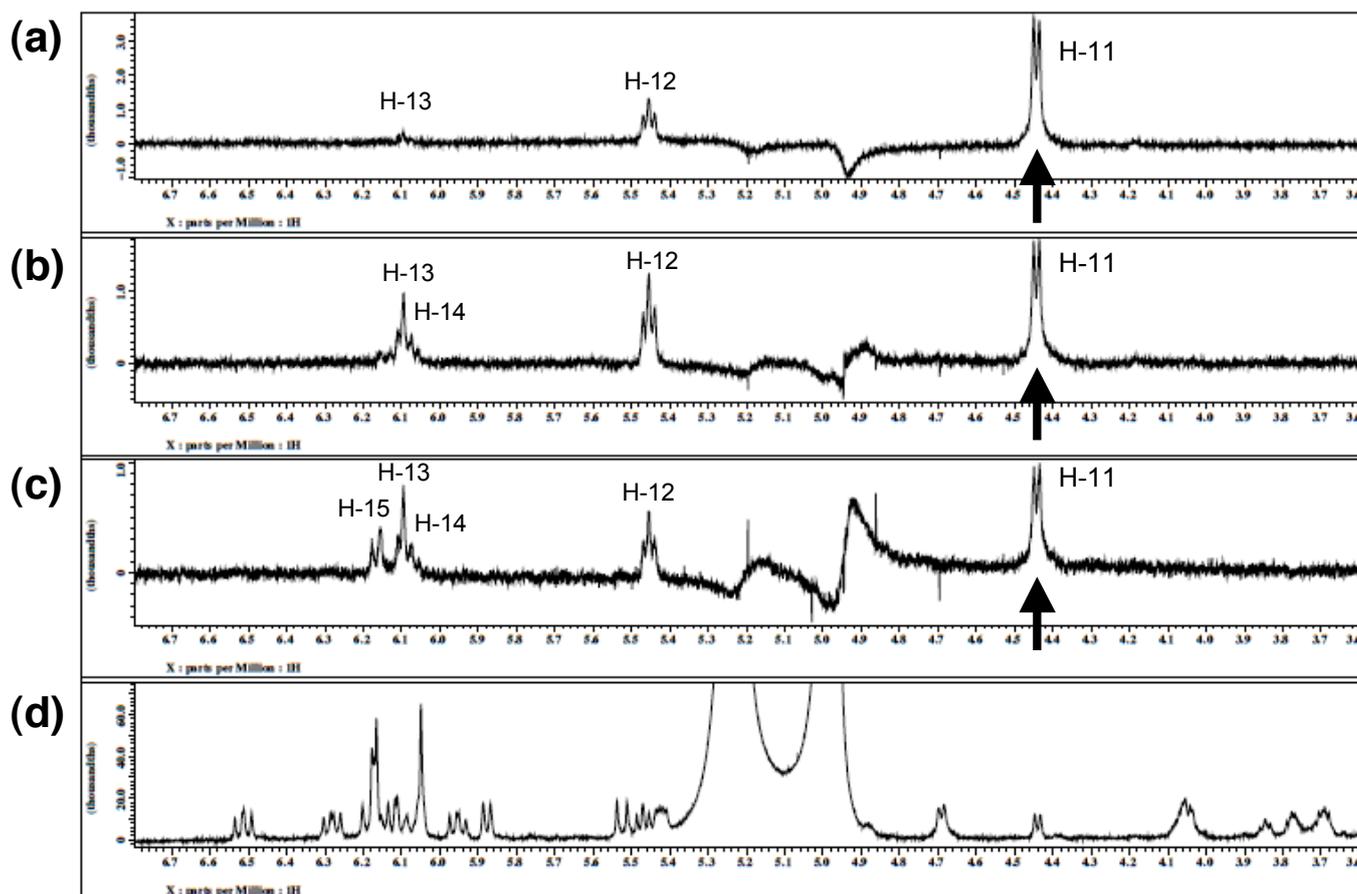


Figure 2-7 1D TOCSY spectrum of incednine · 2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1)

Bold arrows indicated the irradiation position of H-11. (a) mixing time 20 msec, (b) mixing time 40 msec, (c) mixing time 80 msec, (d) ¹H-NMR spectrum of incednine · 2HCl

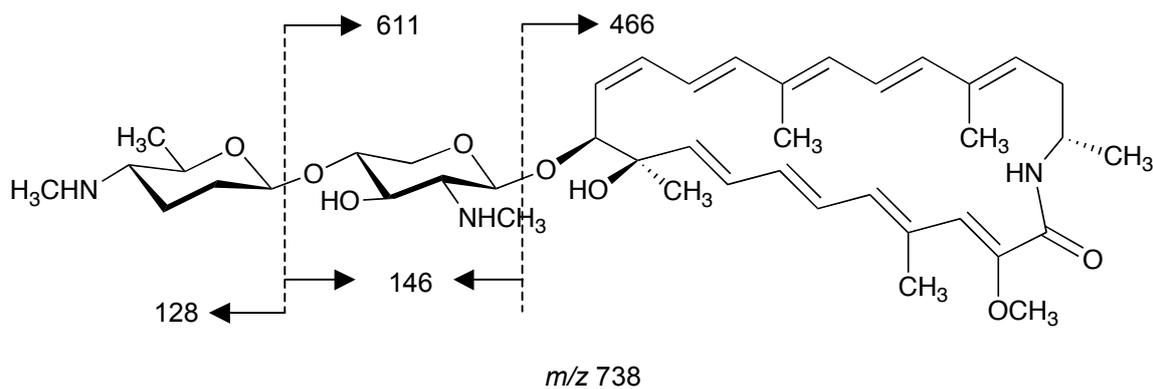
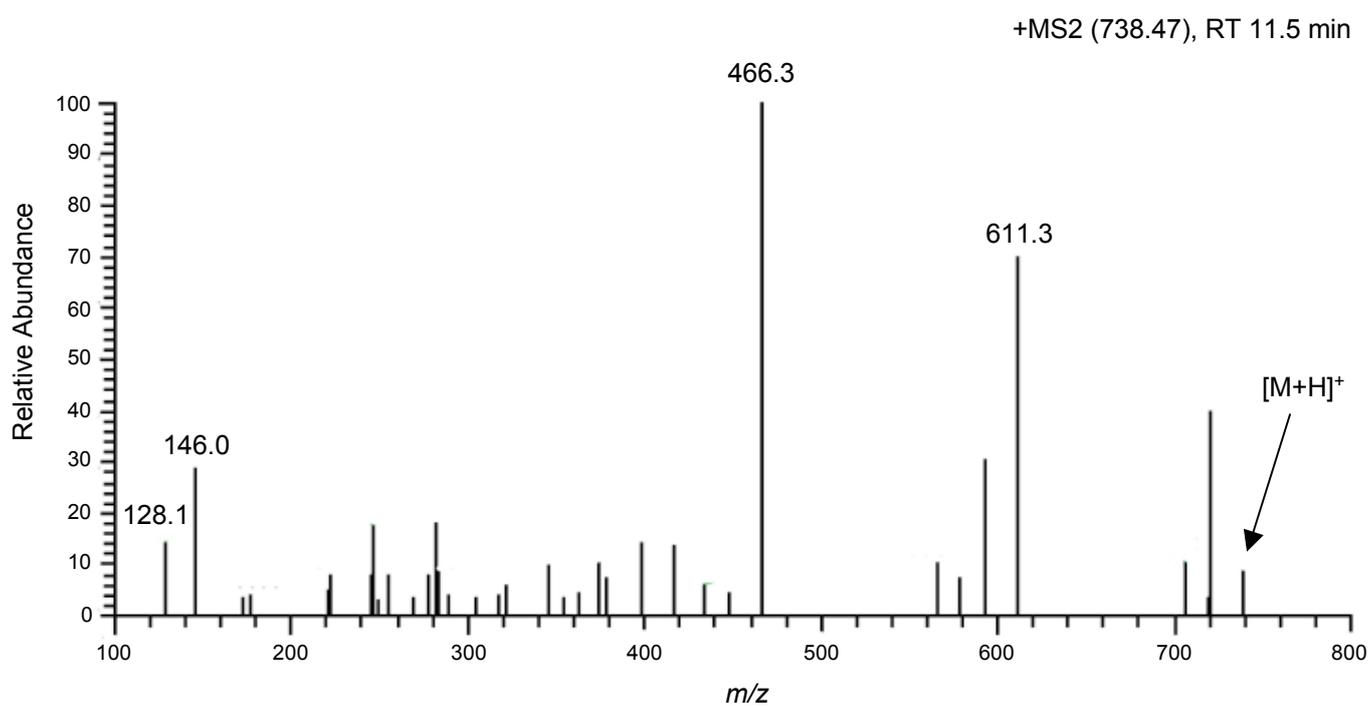


Figure 2-8 MS/MS analysis of incednine

Incednine was analyzed by LC-MS/MS using a Orbitrap mass spectrometer equipped with an electron spray in positive ion-mode (LC, 70% MeOH-5 mM (NH₄)₂CO₃ aq.; MS/MS, pqd mode).

第3節 Incednine アグリコンの相対立体配置の決定

Incednine アグリコン中には9つのオレフィンと3つの不斉炭素が存在する。そこでまずオレフィンの幾何異性について検討した。6位、8位、12位についてはその¹Hのスピ結合定数がそれぞれ $J_{6,7}=14.4$ Hz、 $J_{8,9}=15.8$ Hz、 $J_{12,13}=9.0$ Hzであったことより **6E**、**8E**、**12Z** と決定した。残りのオレフィンのうち14位以外の立体化学はNOEで検討した。Figure 2-9に示すように2-OCH₃と4-CH₃間、H-3とH-5間、4-CH₃とH-6間にNOEが観測されたことから2位は**Z**配向、4位は**E**配向と決定した。また16位、18位、20位については16-CH₃とH-18間、H-17とH-19間、H-18と20-CH₃間、H-19とH-21間にそれぞれNOE相関が見られたことから全て**E**配向と決定した。14位の幾何異性については¹H-NMRスペクトルからはスピ結合定数の解析が困難だったことから¹H-¹H *J*分解スペクトル解析を行った。その結果、Figure 2-10に示すようにH-15のスピ結合定数が14.0 Hzであったことから14位は**E**配向であることが判明した。

次にC-10、C-11の相対立体配置について検討した。H-11とH-12間のスピ結合定数が $J_{11,12}=9.0$ Hzであることから11位、12位のプロトンは**anti**に配置されることがわかった。C-10とC-11間でラクタム環構造が**gauche**配置である場合、相対立体配置はFigure 2-11 (a)-(d)に示す4通りが可能である。このうち、(c)は10-CH₃とH-11間のNOEを、(d)は10-CH₃とH-1'及び2'-NCH₃間のNOEを、(b)はH-8と10-CH₃間、H-11とH-14間、H-11とH-1'間のNOEを満足できず、Figure 2-11 (a)のみが観測されるNOEを合理的に説明できた。一方、ラクタム構造が**anti**配置の場合、Figure 2-11 (e)、(f)が可能であるが、これらの構造はいずれも上記NOEに矛盾した。従って、10位、11位の相対立体配置は**10R***、**11S***であることが示唆された。さらにIncednine アグリコンは二重結合の幾何異性と4位、16位、20位のメチル基周辺に観測されるNOEから4種類の環構造形成が可能である(Figure 2-12)。そこでそれぞれのモデルについてDiscovery IIIプログラムによる最適化を行ったところ、Figure 2-12 (a)に示すconformer-1/**10R***、**11S***モデルはコンピュータ上で計算される原子間距離が、実験的にNOEが観測できるとされる3.4 Å内に配置された。一方、Figure 2-12 (b)~(d)のモデルはNOEを矛盾なく説明できなかった。C-23についてはconformer-1において**10R***、**11S***、**23S***のモデルが23位周辺に観測される

2-OCH₃及び20-CH₃と1-NH間、H-21とH-23間のNOE相関を満足するのに
対し、23*R**のモデルはNOEに矛盾することから*S**であることが示唆された
(Figure 2-12 (B))。以上より、アグリコンに存在する相対立体配置は10*R**、
11*S**、23*S**と決定した。

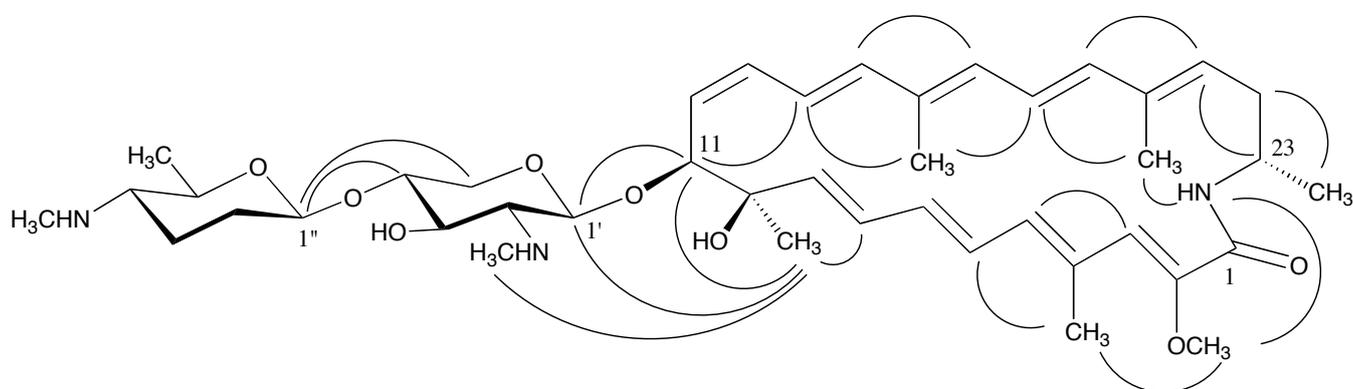


Figure 2-9 Selected NOE correlations of incednine·2HCl

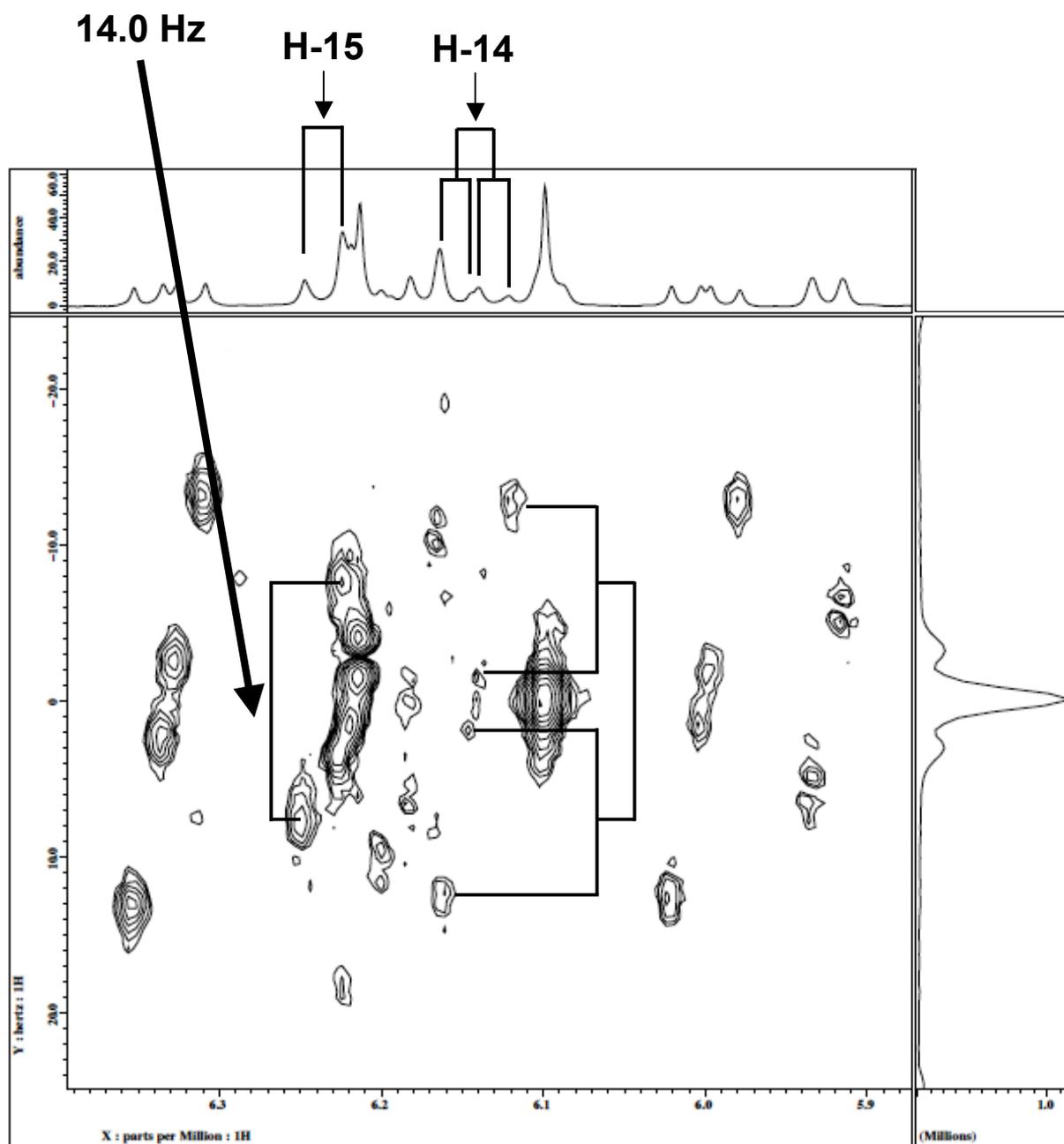
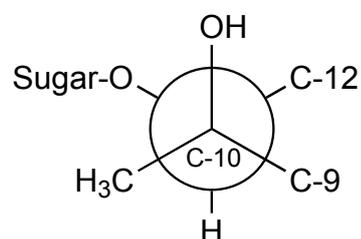


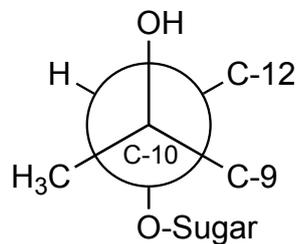
Figure 2-10 ^1H - ^1H J-resolve spectrum of incednine·2HCl in $\text{CD}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1)

Gauche

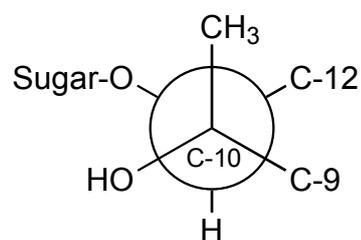
(a)



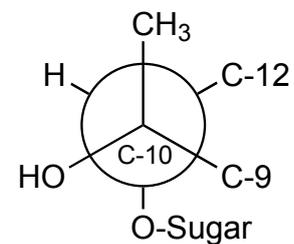
(b)



(c)

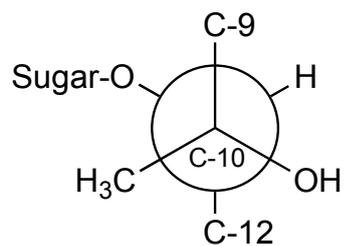


(d)



Anti

(e)



(f)

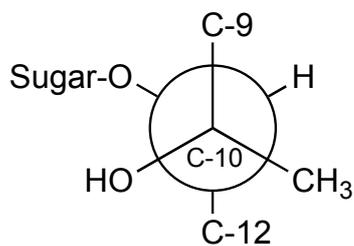


Figure 2-11 Stereochemistry of C-10 and C-11

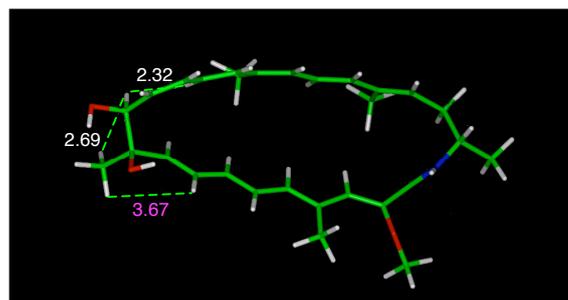
Six considerable chemical conformations of C-10 and C-11 were visualized by Newman projection. C-9 and C-12 were in a gauche relationship (a-d) and in an anti one (e,f)

(A)

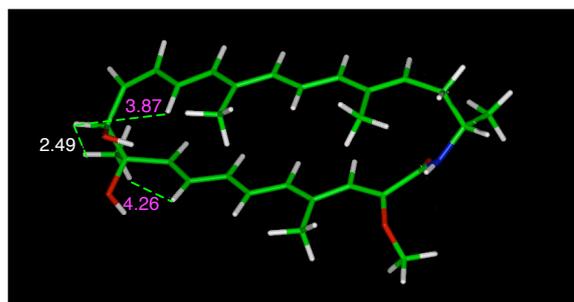
(a) Conformer-1 / $10R^*$, $11S^*$



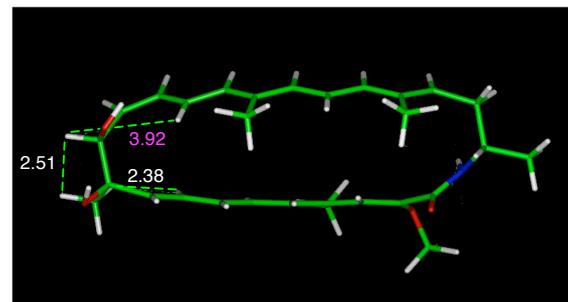
(c) Conformer-2 / $10R^*$, $11S^*$



(b) Conformer-3 / $10R^*$, $11S^*$

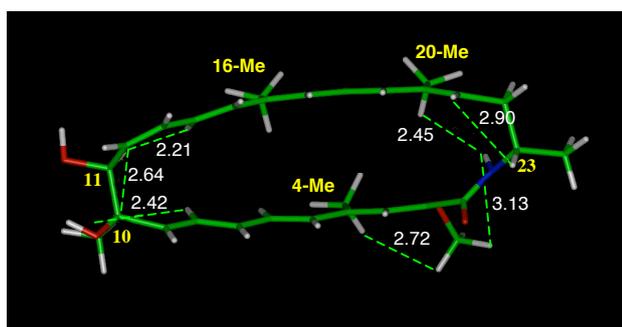


(d) Conformer-4 / $10R^*$, $11S^*$



(B)

Conformer-1 / $10R^*$, $11S^*$, $23S^*$



Conformer-1 / $10R^*$, $11S^*$, $23R^*$

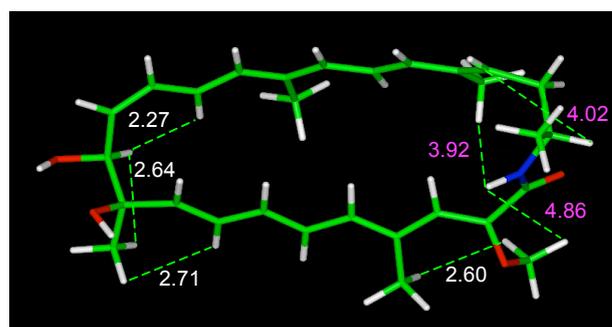


Figure 2-12 Optimized structure of incednine aglycon calculated by computations.

The relative stereochemistry of incednine aglycon was simulated with Discovery III programs. (A) The geometries of double bonds in aglycon and NOEs observed surrounding 4,16, and 20-Me allowed four types of conformers (1-4). Based on the NOEs and the coupling constant of $J_{11,12}$, the conformation of aglycon were suggested to be conformer-1 with ($10R^*$, $11S^*$). (B) The structures of $23S^*$ or $23R^*$ in conformer-1 were modeled. The conformer-1 with ($10R^*$, $11S^*$, $23S^*$) was in excellent agreement with the results of NOEs, while the other not. The data indicated showed the calculated-atomic distances (Å). The distance in white (< 3.4 Å) shows the observable NOE, pink (> 3.4 Å) not.

第4節 Incednine アグリコンの絶対立体配置の決定

Incednine の絶対立体配置を決定するにあたり、当初 incednine の *p*-ブromoベンゾイル化誘導体による結晶化を検討した。フリーの incednine を無水ピリジン中 *p*-ブromoベンゾイルクロリドと反応させ、選択的にアミノ糖 (B) の窒素に導入した誘導体へと導いた。しかしこの誘導体は本体と同様、溶液中で不安定であったことから結晶化には至らなかった。そこで incednine のアグリコン部分とアミノ糖についてそれぞれ絶対立体配置を検討した。

§1 Incednine アグリコンの単離精製、構造解析

Incednine 生産菌 ML693-90F3 株の培養物を LC-ESIMS を用いて詳細に分析した。Incednine に特徴的な極大吸収である UV 322 nm でのモニターの結果、Rt 5.5min、11.5 min にそれぞれ大きなピークが観測され、このうち Rt 11.5 min の化合物は標品の溶出パターンから incednine であることがわかった。また photodiode array での分析結果から Rt 5.5min に溶出される物質は incednine と同じ UV の極大吸収をもつことが明らかとなり、incednine の類縁体であることが示唆された。さらに MS 解析から本物質が incednine アグリコンに相当する物質であることが明らかになった (Figure 2-13)。化合物の性質上、本物質は incednine 精製過程であるクロロホルム:メタノール:1 mM 塩酸水=5:6:4 系の CPC で正溶出画分に含まれていることが予想され、はたしてこの画分からシリカゲルカラムクロマトグラフィー、溶媒操作を用いた精製により薄黄色粉末として目的の物質を得た。

本物質は高分解能 ESI-MS スペクトルからその分子式が incednine アグリコン部分と同じ $C_{29}H_{39}NO_4$ と決定した (m/z : 488.2762 [(M+Na)⁺ calcd. for $C_{29}H_{39}NO_4Na$, 488.2771])。また UV スペクトルは 294.5、309.0、322.0、358.0 nm に極大吸収を示し、モル吸光度定数も完全に一致したことより incednine とよく似た構造を有していることが示唆された。

本物質の構造解析は各種 NMR スペクトルより行った (Table 2-3)。Incednine の NMR スペクトルと比較して、スペクトル上の大きな変化は incednine に存在する 2 つのアミノ糖に相当するシグナルが消失した点であり、残りシグナルは incednine のアグリコン部分とよく一致した。以上の結果、本物質は incednine

から二つのアミノ糖が外れたアグリコンであることがわかった。またこの天然より得られたアグリコンが *incednine* と同じ立体配置を有しているか CD スペクトルを比較検討した。その結果、Figure 2-14 に示すように両者の CD はパターンが完全に一致したことから、両物質は絶対立体配置を含めた構造が共通であることが示唆された。

§2 *Incednine* アグリコンへの改良型 Mosher 法の適用

Kakisawa らのグループが 1991 年に発表した改良型 Mosher 法⁵⁸は、1973 年に Mosher らによって報告された Mosher 法⁵⁹を改良し、キラル二級アルコール、一級アミンに加え二級カルボン酸にまで適応幅が広がった絶対立体配置の決定法である。立体を決定したい化合物をキラル補助剤の(±)- α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル)フェニルアセテート (MTPA) を用いてジアステレオマーへと導き、それらの NMR スペクトルの磁気異方性効果によるケミカルシフトの変化から絶対構造を決定する。筆者は前節で得られた *incednine* アグリコンの 11 位キラル二級アルコールへの改良型 Mosher 法の適用を検討した。アグリコンを無水ピリジン中、室温で(+)-MTPA クロリドと作用させると反応は速やかに進行し、11 位水酸基に選択的に MTPA 基を導入した *R*-MTPA-*O*-アグリコン誘導体が薄黄色粉末として得られた。*S*-MTPA-*O*-アグリコン誘導体は(-)-MTPA クロリドを用いて合成した。*(R/S)*-MTPA-*O*-アグリコン誘導体の構造は高分解能 ESI-MS スペクトルよりその分子式が $C_{39}H_{46}NO_6F_3$ であること、各種 NMR スペクトルよりアグリコン部分が保存されていること、HMBC スペクトルにおいてアグリコン H-11 から MTPA エステルアミドに相関が観測されたことから確認した (Table 2-4, Figure 2-15)。そこで *S* 体、*R* 体のケミカルシフトの変化 [$\Delta\delta$ (ppm) = $\delta S - \delta R$] を検討した (Figure 2-16)。その結果、Figure 2-17 に示すように 12 位、13 位は $\Delta\delta$ 値が -0.14、-0.02 と負の値をとり、10-CH₃、9 位、8 位は $\Delta\delta$ 値が +0.18、+0.01、+0.02 と正の値をとった。MTPA 面に対し $\Delta\delta < 0$ の官能団を左側に、 $\Delta\delta > 0$ の官能団を右側に配することにより、11 位の絶対立体配置は *S* と決定できた。従って、*incednine* アグリコンの絶対立体配置は 10*R*、11*S*、23*S* であることが判明し、CPK モデルで描いたアグリコンは極めて合理的な環構造を示した (Figure 2-18)。

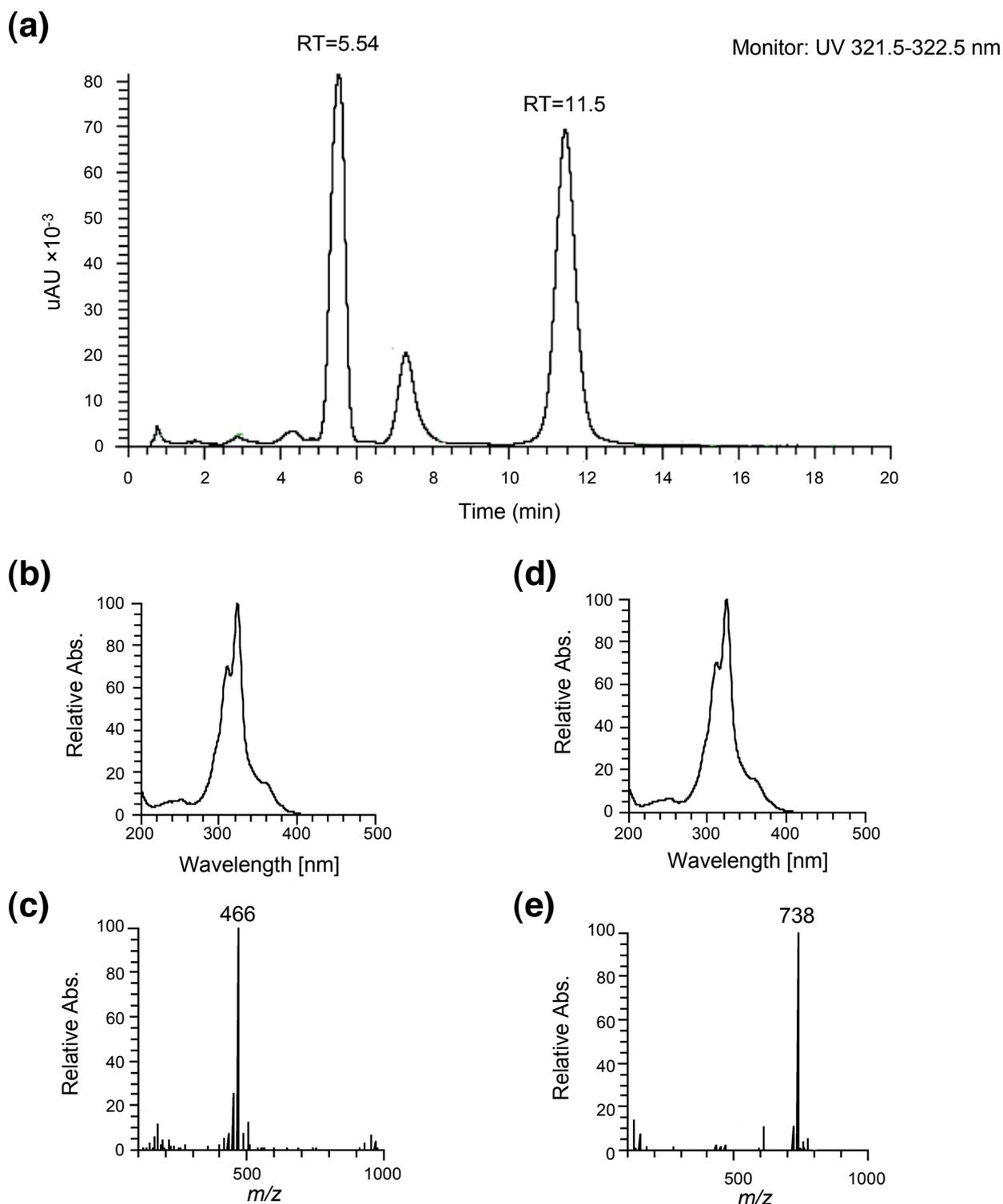


Figure 2-13 Detection of metabolites of ML694-90F3 by LC-MS

Cultured Broth of ML694-90F3 was extracted with CHCl_3 -MeOH and extract was analyzed by LC-MS. (a) Elution pattern of incednine and its derivatives (LC; 70% MeOH-5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ aq.; UV, monitoring at 321.5-322.5 nm). (b, d) PDA and MS spectra of the compound eluted at RT 5.54 min. (c, e) PDA and MS spectra of the compound eluted at RT 11.5 min, which is corresponded to incednine.

Table 2-3 ^1H and ^{13}C NMR data of incednine aglycon ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}=1:1$, 25°C)

No.	δ_{C}	δ_{H} (multiplicity, J [Hz])
1	167.0 (s)	
2	147.4 (s)	
3	126.9 (d)	6.15 (1H, brs)
4	132.3 (s)	
5	137.7 (d)	5.95 (1H, d, 11.4)
6	128.0 (d)	6.43 (1H, dd, 11.4, 14.8)
7	137.3 (d)	6.02 (1H, dd, 10.9, 14.8)
8	129.0 (d)	6.19 (1H, dd, 10.9, 15.6)
9	143.3 (d)	5.65 (1H, d, 15.6)
10	76.1 (s)	
11	75.9 (d)	4.22 (1H, d, 9.0)
12	130.7 (d)	5.45 (1H, t, 9.0)
13	125.4 (d)	6.10 (1H, m)
14	130.5 (d)	6.15 (1H, m)
15	137.7 (d)	6.18 (1H, d, 15.4)
16	135.5 (s)	
17	132.3 (d)	6.05 (1H, d, 10.6)
18	124.5 (d)	6.21 (1H, m)
19	137.9 (d)	6.21 (1H, m)
20	137.7 (s)	
21	130.0 (d)	5.45 (1H, m)
22	38.5 (t)	2.28 (1H, m), 2.32 (1H, m)
23	47.2 (d)	4.16 (1H, m)
24	14.2 (q)	2.09 (3H, s)
25	22.8 (q)	1.49 (3H, s)
26	12.9 (q)	1.66 (3H, s)
27	12.7 (q)	1.70 (3H, s)
28	20.7 (q)	1.32 (3H, d, 6.8)
29	61.1 (q)	3.58 (3H, s)

Chemical shifts in ppm from TMS as an internal standard.

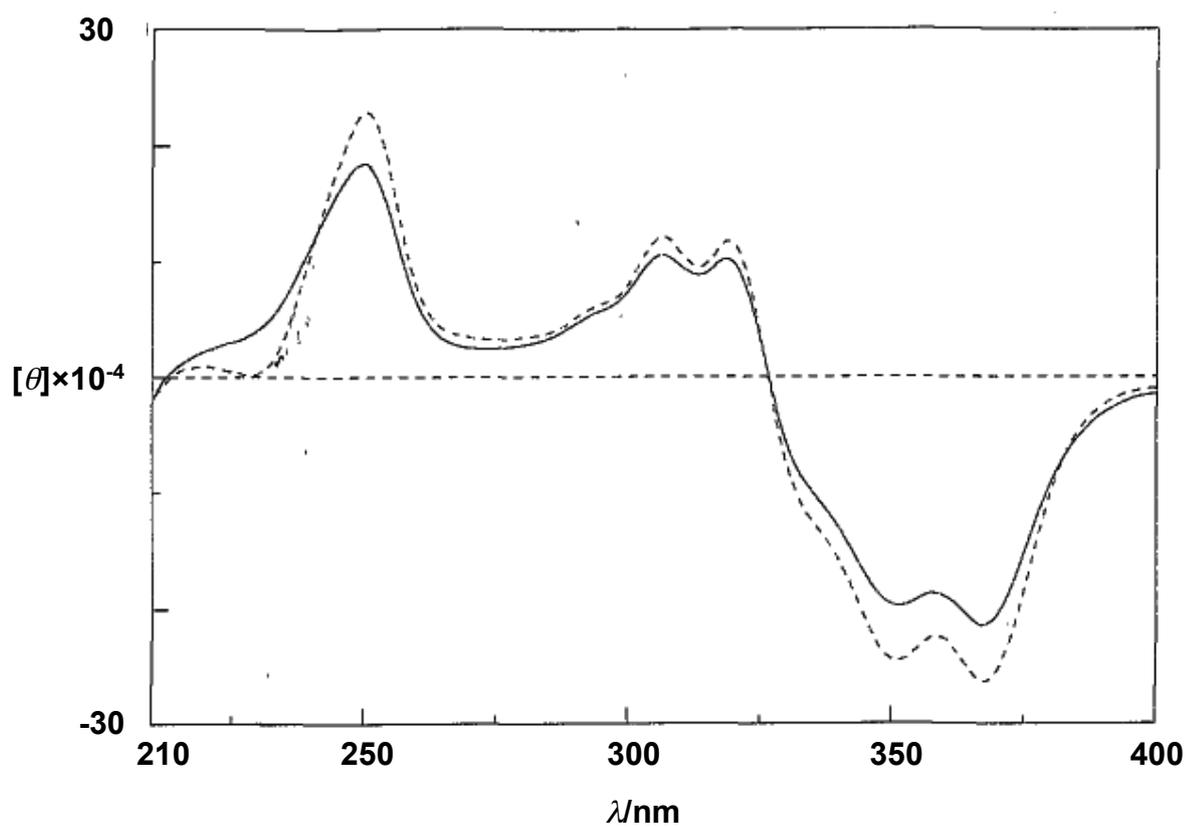


Figure 2-14 CD spectra of incednine-2HCl and its aglycon.

Each CD spectrum was measured at RT in MeOH : incednine-2HCl (c 10 [μ g/ml], dashed line) ; Aglycon (c 6 [μ g/ml], solid line)

Table 2-4 ¹H and ¹³C NMR data of *R*-MTPA and *S*-MTPA ester of aglycon

No.	<i>R</i> -MTPA ester (CDCl ₃ , 25°C)		<i>S</i> -MTPA ester (CDCl ₃ , 25°C)	
	δ _C	δ _H (multiplicity, <i>J</i> [Hz])	δ _C	δ _H (multiplicity, <i>J</i> [Hz])
1	166.0 (s)		166.0 (s)	
2	146.5 (s)		146.6 (s)	
3	126.7 (d)	6.27 (1H, brs)	126.6 (d)	6.25 (1H, brs)
4	132.2 (s)		132.2 (s)	
5	137.1 (d)	5.98 (1H, d, 11.1)	137.1 (d)	5.96 (1H, d, 11.6)
6	128.5 (d)	6.43 (1H, dd, 11.1, 14.3)	128.4 (d)	6.43 (1H, dd, 11.6, 15.0)
7	135.9 (d)	6.00 (1H, dd, 11.1, 14.3)	135.8 (d)	5.99 (1H, dd, 11.1, 15.0)
8	129.8 (d)	6.18 (1H, m)	129.8 (d)	6.20 (1H, m)
9	139.6 (d)	5.60 (1H, d, 16.3)	139.7 (d)	5.61 (1H, d, 16.2)
10	75.2 (s)		75.0 (s)	
11	79.4 (d)	5.63 (1H, d, 9.8)	79.8 (d)	5.58 (1H, d, 10.0)
12	122.9 (d)	5.43 (1H, t, 9.8)	123.0 (d)	5.29 (1H, t, 10.0)
13	133.4 (d)	6.30 (1H, dd, 9.8, 11.4)	133.2 (d)	6.28 (1H, dd, 10.0, 11.0)
14	123.5 (d)	6.15 (1H, m)	123.6 (d)	6.16 (1H, m)
15	139.1 (d)	6.23 (1H, d, 15.0)	138.9 (d)	6.22 (1H, d, 14.8)
16	134.5 (s)		134.5 (s)	
17	132.9 (d)	6.06 (1H, d, 10.4)	132.8 (d)	6.06 (1H, d, 10.4)
18	123.8 (d)	6.19 (1H, m)	123.8 (d)	6.19 (1H, m)
19	137.9 (d)	6.22 (1H, m)	137.8 (d)	6.23 (1H, m)
20	136.9 (s)		136.9 (s)	
21	129.7 (d)	5.50 (1H, dd, 5.2, 11.5)	129.7 (d)	5.50 (1H, dd, 5.3, 11.0)
22	38.4 (t)	2.20 (1H, q, 11.5), 2.31 (1H, m)	38.4 (t)	2.20 (1H, q, 11.0), 2.31 (1H, m)
23	46.5 (d)	4.27 (1H, m)	46.5 (d)	4.26 (1H, m)
24	13.9 (q)	2.06 (3H, s)	14.0 (q)	2.07 (3H, s)
25	23.1 (q)	1.30 (3H, s)	23.4 (q)	1.48 (3H, s)
26	12.7 (q)	1.67 (3H, s)	12.5 (q)	1.67 (3H, s)
27	12.5 (q)	1.67 (3H, s)	12.7 (q)	1.67 (3H, s)
28	21.1 (q)	1.30 (3H, d, 6.0)	21.1 (q)	1.30 (3H, d, 6.6)
29	61.2 (q)	3.56 (3H, s)	61.2 (q)	3.57 (3H, s)
1-NH		5.90 (1H, d, 11.0)		5.88 (1H, d, 10.6)
MTPA, C=O	165.7 (s)		165.8 (s)	
MTPA, C	84.5 (s)		85.0 (s)	
MTPA, OMe	55.4 (q)	3.57 (3H, s)	55.5 (q)	3.57 (3H, s)
MTPA, ph	132.4 (s)		131.8 (s)	
MTPA, ph	129.5 (d)	7.42 (1H, m)	129.8 (d)	7.42 (1H, m)
MTPA, ph	128.4 (d)	7.42 (1H, m)	128.5 (d)	7.42 (1H, m)
MTPA, ph	127.7 (d)	7.42 (1H, m)	127.7 (d)	7.42 (1H, m)
MTPA, ph	127.3 (d)	7.55 (2H, m)	127.6 (d)	7.53 (2H, m)

Chemical shifts in ppm from TMS as an internal standard.

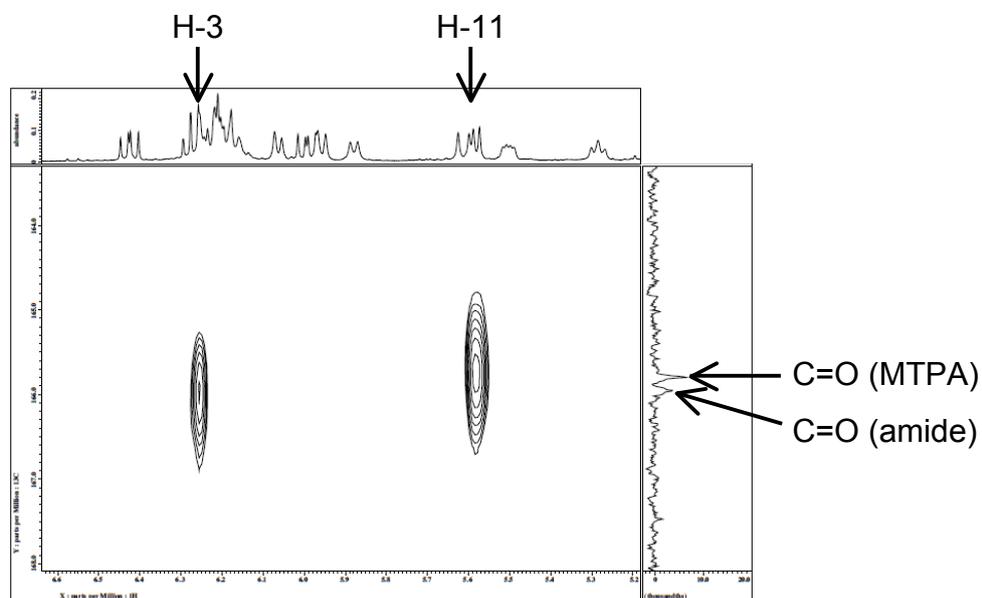
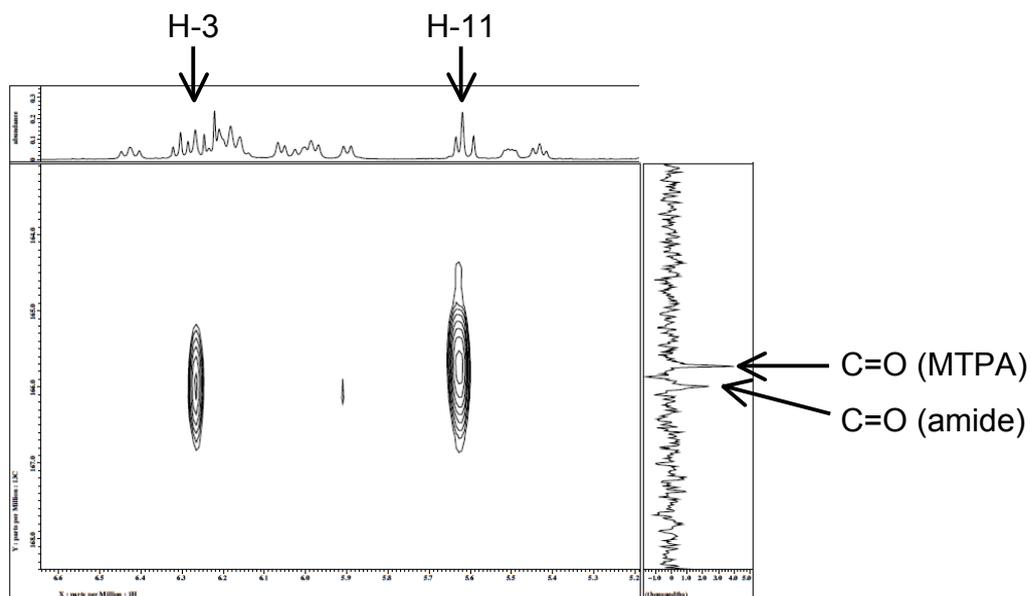


Figure 2-15 HMBC correlation of H-11 and MTPA carbonyl in *R* and *S*-MTPA ester of aglycon

(upper panel) HMBC spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon, (lower panel) HMBC spectrum of *S*-MTPA ester of aglycon.

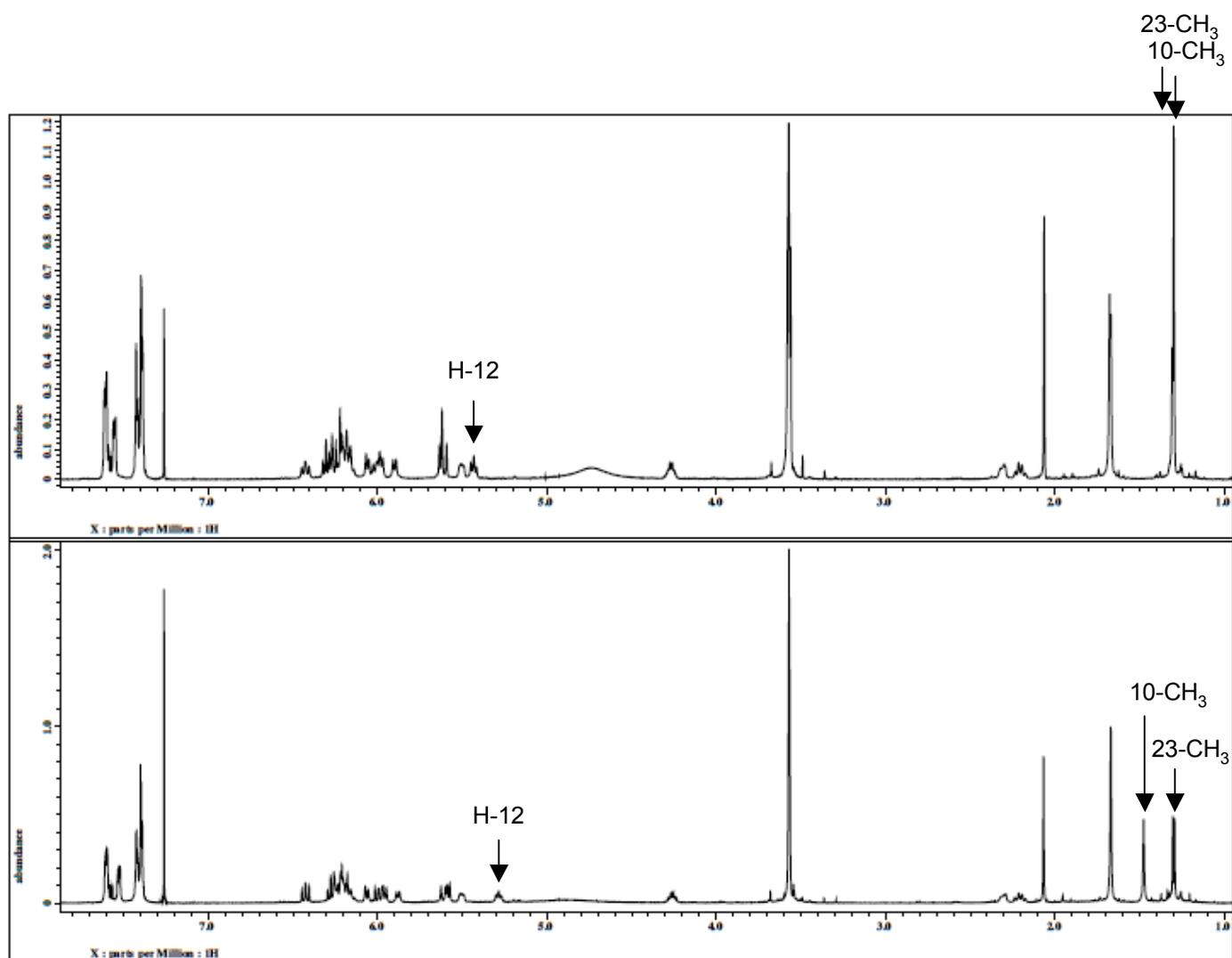


Figure 2-16 Comparison of $^1\text{H-NMR}$ spectra for *R* and *S*-MTPA ester of aglycon (upper panel) $^1\text{H-NMR}$ spectra of *R*-MTPA ester of aglycon, (lower panel) $^1\text{H-NMR}$ spectra of *S*-MTPA ester of aglycon.

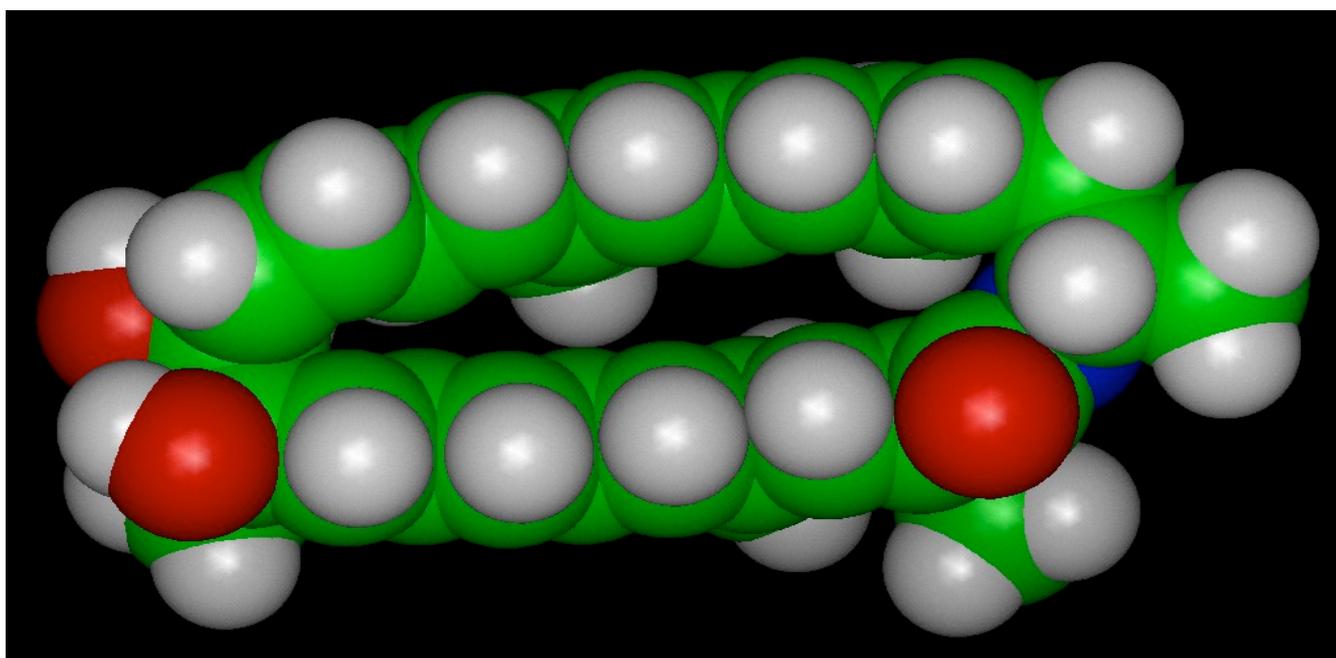


Figure 2-18 CPK model of incednine aglycon

第5章 糖の立体構造決定

Incednine に存在する二つのアミノ糖のうち、アミノ糖 (A) は前節にて絶対立体配置を決定したアグリコンからの NOE 相関によりその立体配置が判明した。またアミノ糖 (B) は NOE 実験からはアミノ糖 (A) との位置関係が把握できなかったことから、アミノ糖 (B) の *p*-ブロモベンゾイル誘導体を合成・単離し、その X 線構造解析により立体構造を決定した。

§1 アミノ糖 (A) の立体化学

アミノ糖 (A) の H-1' から H-5' までのそれぞれのビシナル水素のスピ結合定数がそれぞれ $J_{1',2'ax}=7.0$ Hz、 $J_{2',3'}=7.0$ Hz、 $J_{3',4'}=8.0$ Hz、 $J_{4',5'ax}=8.0$ Hz であったことから、アミノ糖 (A) は置換する炭素、窒素、酸素原子が全てエクアトリアルに配位した β -ザイロース型であることが明らかになった。糖の絶対立体配置については NOE 実験により決定した。Figure 2-9 に示すように H-1' と H-11 間、H-1' と 10-CH₃ 間、及び 2'-NCH₃ と 10-CH₃ 間にそれぞれ NOE 相関が認められたことよりアグリコンとアミノ糖 (A) の位置関係は一義的に決定され、1' 位の絶対立体配置が *S* であることがわかった。またこのことは D 型もしくは L 型の糖を配した構造をコンピュータ上でシミュレーションし、実験的に観測される NOE との整合性を検討した結果、D 型のみが適合したこととよく一致した (Figure 2-19)。以上より、アミノ糖 (A) は 2-デオキシ-2-メチルアミノ- β -D-ザイロピラノースと決定した。

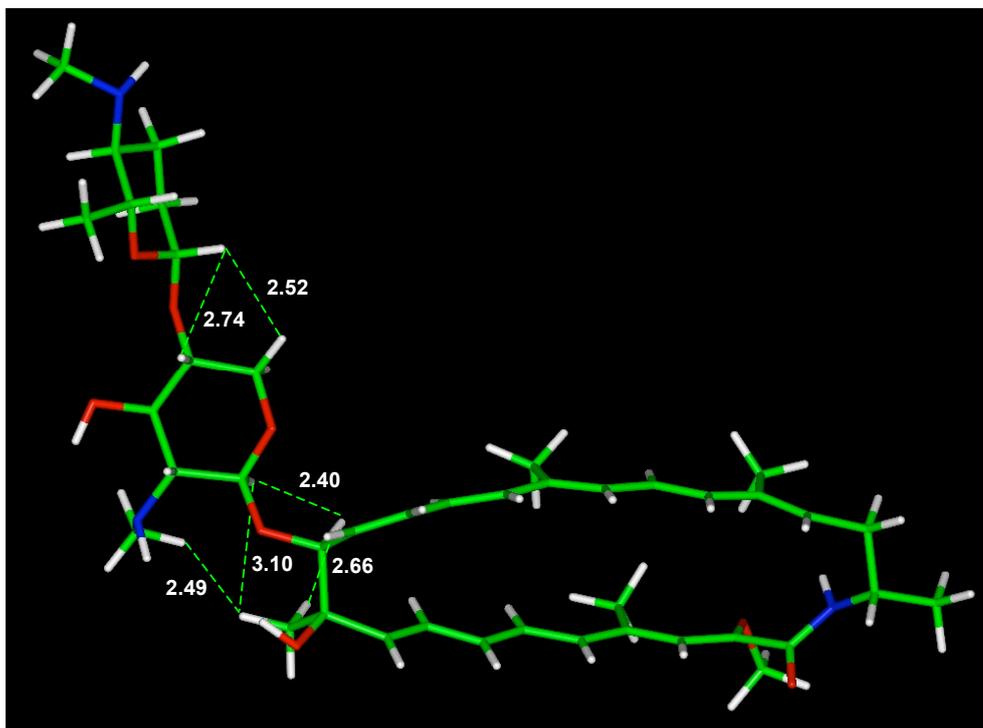
§2 アミノ糖 (B) の立体化学

アミノ糖 (B) は H-1'', H-2'', H-4'' 及び H-5'' のビシナル水素のスピ結合定数がそれぞれ $J_{1'',2''ax}=9.1$ Hz、 $J_{4'',5''}=9.2$ Hz と大きな値を示したことから H-1'', H-4'', H-5'' がアキシアル配向した 2,3,4,6-テトラデオキシ-4-メチルアミノ- β -*erythro*-ヘキソピラノースであることが判明した。NOESY スペクトル解析の結果、アミノ糖 (A) の H-5' 及び H-4' とアミノ糖 (B) の H-1'' 間でのみ NOE 相関が観測され、これらアミノ糖の位置関係についてはこれ以上 NOE 解析から決定できなかった。そこでアミノ糖 (B) についてはブロムを導入した誘導体へ

と導き、結晶化による絶対立体配置を検討した。フリーの incednine をピリジン中、*p*-ブロモベンゾイルクロリドと反応させた後、*p*-ブロモベンゾイル化したアミノ糖 (B) のメチルグリコシドを単離する目的で、この反応物をそのままジクロロメタン-10%塩酸メタノール水中でメタノリシスを行った。反応物をクロロホルム-メタノール-水系で抽出し、得られた有機層を濃縮乾固後、HPLC による分取、TLC 上での分取を行うことにより本アミノ糖の α 型、 β 型メチルグリコシドをそれぞれ得た。これらのアノマーをヘキサン-アセトン系での再結晶化を行ったところ、 β 型アノマーで X 線構造解析に適する無色板状結晶を得た。この結晶は高分解能 ESI-MS スペクトルによりその分子式が $C_{15}H_{20}NO_3Br$ であることが判明した (m/z 364.0507 [(M+Na)⁺ calcd. for $C_{15}H_{20}NO_3BrNa$, 364.0519])。NMR スペクトルはアミドの幾何異性によって生ずると考えられる積分比 2:1 のスペクトルが得られたが、主成分の ¹H-NMR スペクトルよりアミノ糖 (B) に由来する 1 つのダブルットメチル、1 つの NCH₃ に加え、1 つの OCH₃、4H 分のアロマティックプロトンのシグナルを確認した (Table 2-5)。¹H-¹H COSY スペクトル解析からアミノ糖 (B) に相当する H-1~H-6 のスピン結合ネットワークを確認した。また HMBC スペクトルにおいて、H-1 から C-5 へのロングレンジ C-H カップリングが観測されたこと、1-OCH₃ から C-1、4-NCH₃ より C-4 及びアミドカルボニルへの相関が観測されたこと (Figure 2-20)、さらに H-1、H-2、H-4 及び H-5 のビシナル水素のスピン結合定数がそれぞれ $J_{1',2'ax}=9.5$ Hz、 $J_{4',5'}=9.3$ Hz と大きな値を示したことより、本物質がメチル-*N*-(4-ブロモベンゾイル)-2,3,4,6-テトラデオキシ-4-メチルアミノ- β -*eythro*-ヘキソピラノシドであることを確認し、0.23×0.23×0.06 mm の結晶を X 線結晶解析の試料として供した。本試料の結晶データを Table 2-6 に、ORTEP 図及び水素を除いた各原子間の結合距離を Figure 2-21 に示す。X 線結晶構造解析により得られた ORTEP 図よりアミノ糖 (B) の絶対立体配置は D であることがわかった。なお、本結晶は The Cambridge Crystallographic Data Centre に寄託申請し、CCDC-661551 として受託された。

以上の結果より、incednine の構造は平面、立体配置ともに明らかにし、Figure 2-22 のように決定した。

D-Form



L-Form

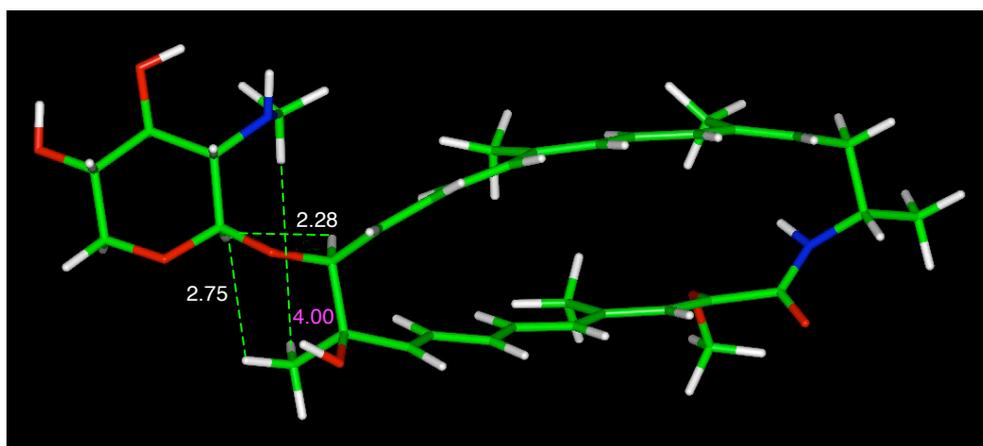


Figure 2-19 D-Form of aminosugar (A) met the experimentally-observed NOEs.

The stereochemistry of H-1' in aminosugar (A) was confirmed by computations. Two types of structures were modeled and the atomic distances (Å) were calculated as indicated. The distance in white (< 3.4 Å) shows the observable NOE, pink (> 3.4 Å) not.

Table 2-5 ^1H and ^{13}C NMR data of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6,-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside (CDCl_3 , 25°C)

No.	δ_{C}	δ_{H} (multiplicity, J [Hz])
1	102.4 (d)	4.30 (1H, d, 9.5)
2	26.0 (t)	1.42 (1H, m), 1.91 (1H, m)
3	30.9 (t)	1.81 (1H, m)
4	60.0 (d)	3.33 (1H, m, 9.3)
5	72.1 (d)	3.65 (1H, dq, 6.2, 9.3)
6	17.9 (q)	1.13 (3H, d, 6.2)
7	27.7 (q)	2.92 (3H, s)
1-OCH ₃	56.2(q)	3.43 (3H, s)
C=O	171.8 (s)	
Ph	135.5 (s)	
Ph	132.0 (d)	7.54 (2H, d, 7.8)
Ph	128.0 (d)	7.19 (2H, d, 8.1)
Ph	123.8 (s)	

* Chemical shifts in ppm from TMS as an internal standard.

* This compound existed in two types of isomers (2:1) in the solution, likely due to the geometry of amide. The spectral data of major isomer were presented in this column.

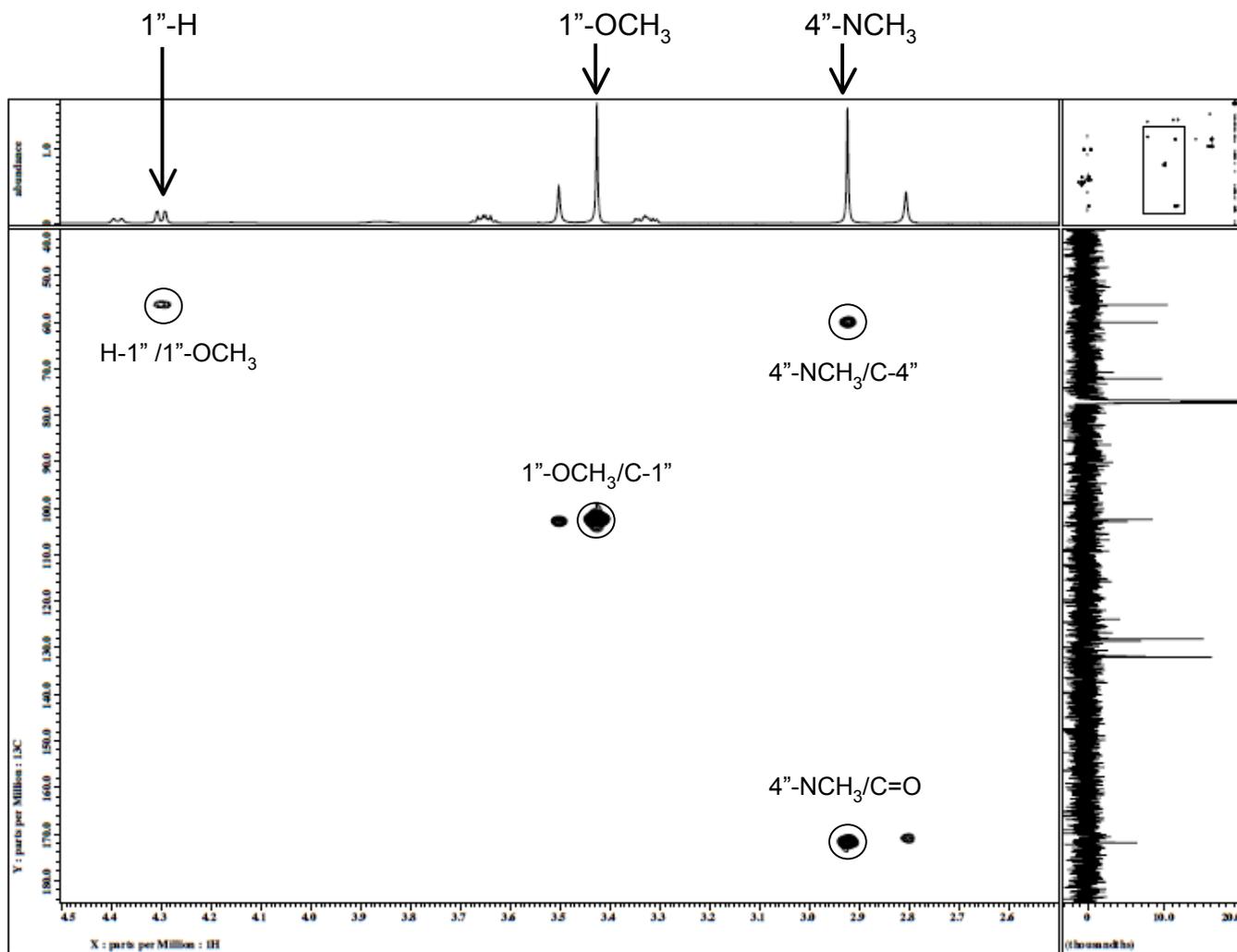


Figure 2-20 Key HMBC correlation of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-erythro-hexopyranoside

Table 2-6 Crystal data of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6,-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside

Empirical Formula	C ₁₅ H ₂₀ NO ₃ Br
Formula Weight	342.23
Crystal Color, Habit	Colorless, Platelet
Crystal Dimension	0.23x0.23x0.06 mm
Crystal System	monoclinic
Lattice Type	Primitive
Lattice Parameter	a=8.41004 (15) Å b=10.48964 (19) Å c=9.317450 (17) Å β =107.8149 (8)° V=781.31 (2) Å ³
Space Group	P2 ₁
Z Value	2
D _{calc}	1.453 g/cm ³
F ₀₀₀	352.00
μ (CuK α)	36.456 cm ⁻¹

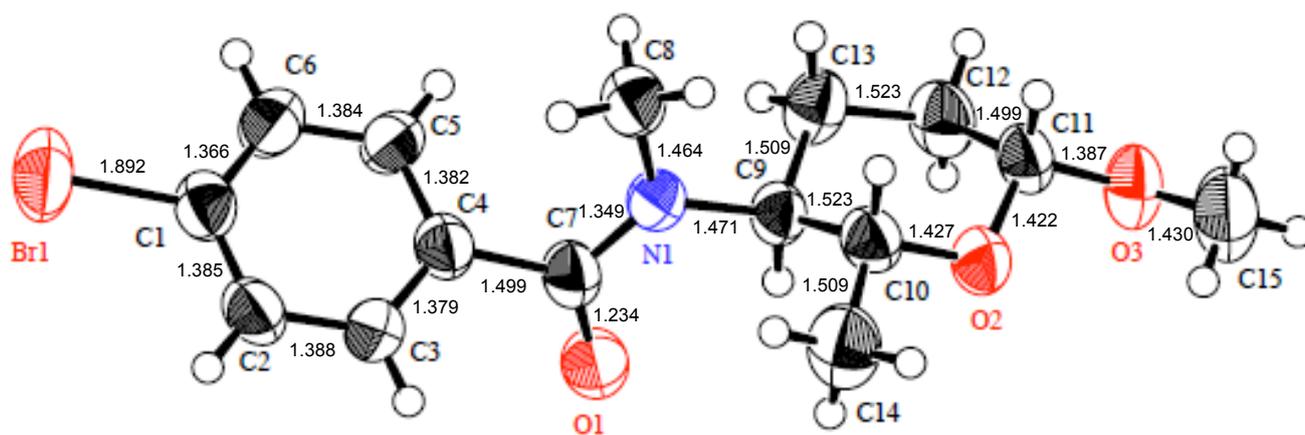


Figure 2-21 ORTEP drawing of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-erythro-hexopyranoside

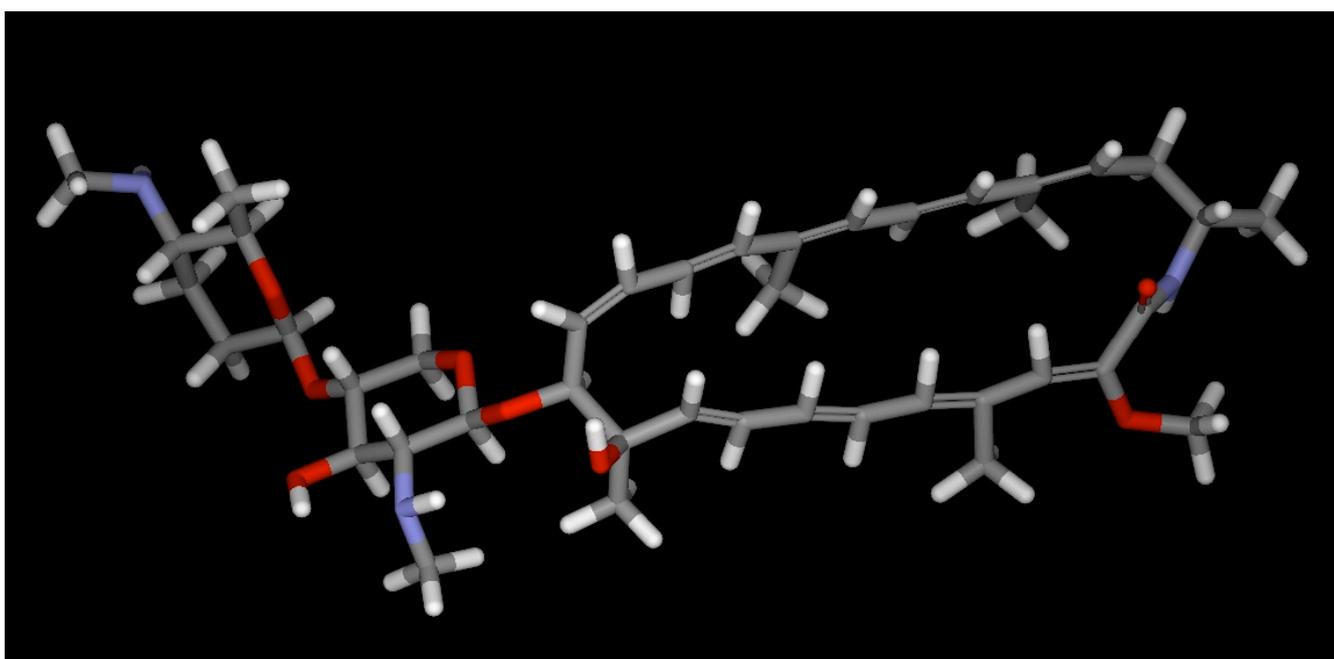
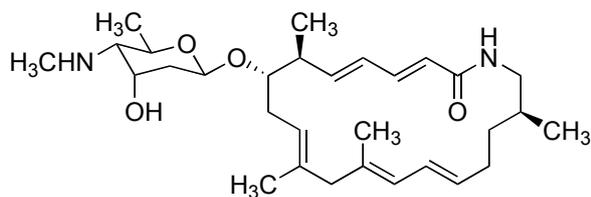


Figure 2-22 Gross structure of incednine

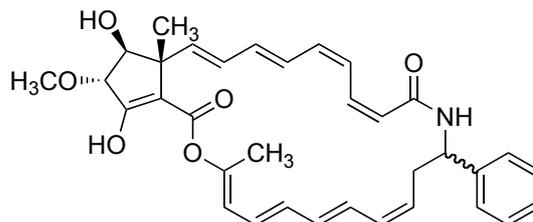
小括

本章では第 1 章において Bcl-xL 機能阻害物質として見出した新規物質 *incednine* の構造決定について述べた。*Incednine* の理化学的性状は MS スペクトル、UV スペクトル、IR スペクトル、CD スペクトル、比旋光度、融点などより明らかにした。また各種 NMR スペクトル解析やコンピュータモデリングにより *incednine* の平面構造、相対立体配置を決定した。*Incednine* はエノールエーテルアミドという新規骨格をアグリコン中にもち、アグリコン 11 位に二つのアミノ糖が配位していた。*Incednine* の絶対立体配置は、*incednine* アグリコンに対する改良型 Mosher 法の適用によりアグリコン中に含まれる不斉が 10*R*、11*S* 及び 23*S*、またアミノ糖 (A) は D 型と決定した。また重原子を導入したアミノ糖 (B) の X 線構造解析によりアミノ糖 (B) も D 型と決定した。

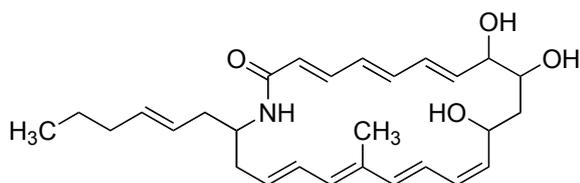
これまで放線菌生産物から興味深い生理活性を有するマクロラクタム系化合物が数多く発見されており、抗腫瘍剤 *vicenistatin* (20 員環)⁶⁰、*aureoverticillactam* (22 員環)⁶¹、*hitachimycin* (19 員環)⁶²、抗生物質 *viridenomycin* (27 員環)⁶³、BE14106 (20 員環)⁶⁴、内皮接着阻害物質 *cyclamenol* (20 員環)⁶⁵ などが報告されている。*Incednine* はそのアグリコン中にエノールエーテルアミドにペンタエンが連なる新規骨格を有した 24 員環マクロラクタムであることから既存のマクロラクタム系化合物とは構造を異にするものと言える。さらに *incednine* に配位する二単糖は、アミノグリコシドを除けば天然物ではほとんど報告例のない二つのアミノ糖で構成されており、このことから *incednine* は類縁化合物のない新規骨格を有する化合物と言える。従って、*incednine* はケミカルバイオロジー研究を展開する上でオリジナリティーあるバイオプローブになりうることを期待されるとともに、生合成や全合成研究の絶好のターゲットとなることが予想される。



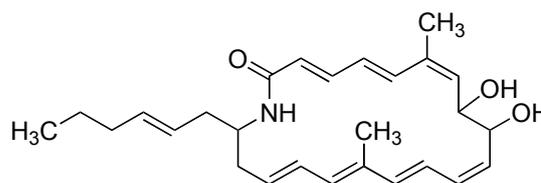
vicanistatin



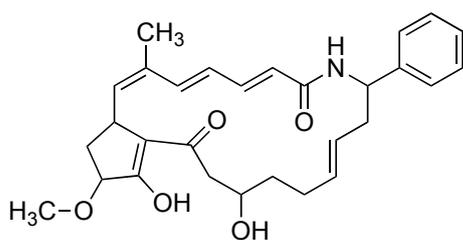
viridenomycin



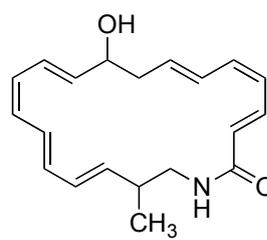
aureovercillactam



BE14106



hitachimycin



cyclamenol

Figure 2-23 Structures of other macrocyclic lactams

第3章 Incednine の生理活性

Bcl-xL の機能を阻害する物質を探索した結果、*Streptomyces* sp. ML694-90F3 株の培養液より新規物質 incednine を同定した。本章では、incednine の Bcl-xL 及びそのホモログである Bcl-2 に対する機能阻害活性などについてまとめた。Incednine は抗腫瘍剤やアポトーシス促進タンパク質である Bax により誘導されるアポトーシスに対する Bcl-2 及び Bcl-xL の抑制効果をキャンセルした。一方で incednine は Bcl-xL と Bax との結合を阻害することはなかった。また incednine 存在下で抗腫瘍剤によって誘導される細胞死誘導機構の解析について述べる。

第1節 Incednine の Bcl-xL 機能阻害活性

§1 Bcl-xL の抗腫瘍剤に対するアポトーシス抑制機能に incednine が与える影響

Incednine による Bcl-xL の機能阻害活性を検討した。Ms-1/Bcl-xL #24 細胞を 48-well plate に 4×10^4 cells/well で撒き、翌日 100 nM incednine と 3 μ g/ml adriamycin (ADM) を添加した。このとき ADM を加えていないものを対照においた。48 時間後、細胞の様子を顕微鏡下で観察した。Bcl-xL を過剰発現した細胞はベクターコントロールの Ms-1/Neo #13 細胞とは異なり ADM に耐性を示したが、100 nM incednine の共処理により Bcl-xL のアポトーシス抑制効果がキャンセルされ、ADM 誘導性の細胞死が観察された (Figure 3-1 (b))。また同様の活性は Bcl-2 を過剰発現した Ms-1/Bcl-2 #7 細胞を用いたときにも観察された (Figure 3-1 (c))。このことから incednine は ADM に対する Bcl-2/Bcl-xL のアポトーシス抑制機能を阻害していることが示唆された。

次にこの効果が incednine による ADM の細胞死増強効果でないことを示すことを目的とし、①作用機序の異なる抗腫瘍剤と incednine の併用による細胞死誘導活性、②Bcl-xL を過剰発現していないベクターコントロール細胞に対する incednine の効果を評価した。

種々の抗腫瘍剤に対する Bcl-2/Bcl-xL のアポトーシス抑制機能に incednine が与える影響を検討した。Bcl-2 や Bcl-xL を過剰発現した Ms-1 細胞は、ベク

ターコントロール細胞である Ms-1/Neo #13 細胞と比較し、DNA 作用薬 cisplatin (CDDP ; 100 $\mu\text{g/ml}$)、Topoisomerase I 阻害剤 camptothecin (CPT ; 3 $\mu\text{g/ml}$)、PI 代謝阻害剤 inostamycin (INM ; 0.3 $\mu\text{g/ml}$)、微小管作用薬 taxol (TXL ; 100 ng/ml) 及び vinblastin (VBL ; 10 ng/ml) に対して抑制効果を発揮した (Figure 3-2)。Ms-1/Bcl-xL #24 細胞、Ms-1/Bcl-2 #7 細胞に incednine と種々抗腫瘍剤を上記の濃度でそれぞれ添加し、48 時間後の細胞生存率をトリパンプルー細胞外排出試験法により評価した。その結果、いずれの抗腫瘍剤を用いたときにおいても、incednine 100 nM の添加により Bcl-xL による抗腫瘍剤耐性を克服し、細胞死が誘導された (Figure 3-3)。同様の活性は Ms-1/Bcl-2 #7 細胞を用いたときにも観察された (Figure 3-4)。従って、incednine は各種抗腫瘍剤に対する Bcl-2/Bcl-xL のアポトーシス抑制機能を阻害することがわかった。

次に Ms-1/Neo #13 細胞に 12.5、25、50、100、200 nM の incednine 及び adriamycin の濃度を変化させて添加した。このとき ADM を加えていないものを対照においた。48 時間後、細胞の生存率をトリパンプルー細胞外排出試験法により評価した (Figure 3-5)。その結果、Ms-1/Neo #13 細胞に対して単独で細胞死を誘導しない濃度の ADM を併用しても incednine 単独処理とよく似たプロファイルをとり、細胞死が増強される効果は観察されなかった。

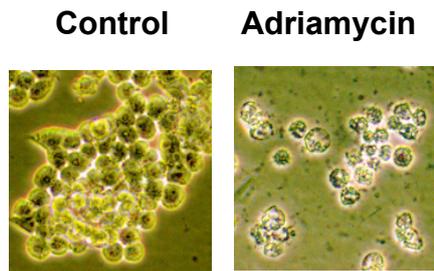
以上より、incednine は、adriamycin の効果を増強する作用ではなく、Bcl-2 や Bcl-xL のアポトーシス抑制機能を阻害し、抗腫瘍剤との併用により細胞死を誘導することが示唆された。

§ 2 Bcl-xL の Bax/Bak 誘導性細胞死に対するアポトーシス抑制機能に incednine が与える影響

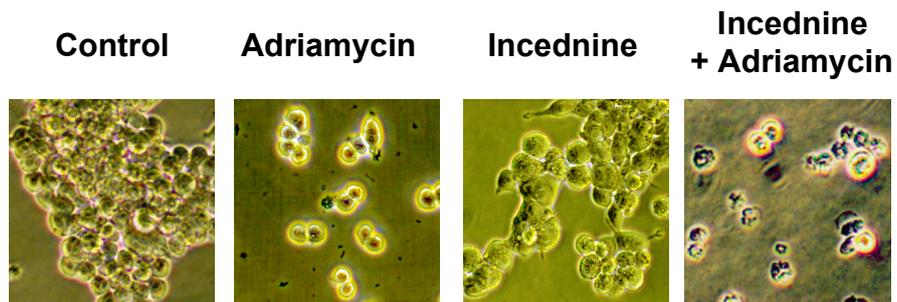
多くの抗腫瘍剤は Bax や Bak といったアポトーシス促進型 Bcl-2 ファミリータンパク質の活性化を介して細胞死を誘導することが報告されている⁶⁶。そこで筆者は Bax、Bak の過剰発現によって誘導される細胞死に対する Bcl-xL のアポトーシス抑制能に incednine が与える影響を検討した。Bax もしくは Bak と Bcl-xL を一過的に過剰発現させたヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293T 細胞に単独では細胞死を誘導しない濃度の incednine (60 nM) を添加し、48 時間後の細胞生存率をトリパンプルー細胞外排出試験法にて評価した (Figure 3-6)。その結

果、Bax もしくは Bak の過剰発現により 50%以上の細胞が死ぬことがわかった。またこの細胞死は Bcl-xL の共発現により完全に抑制された。Incednine を添加すると、Bax もしくは Bak、Bcl-xL をそれぞれ過剰発現させた細胞の生存率には影響を与えなかった。一方、Bax/Bak と Bcl-xL を共発現させた細胞に対しては顕著な細胞死を誘導した。従って、incednine は Bcl-xL の機能を抑制し、Bcl-xL によって阻害される Bax、Bak の細胞死誘導活性を回復させることが明らかになった。

(a) Ms-1/Neo #13 cells



(b) Ms-1/Bcl-xL #24 cells



(c) Ms-1/Bcl-2 #7 cells

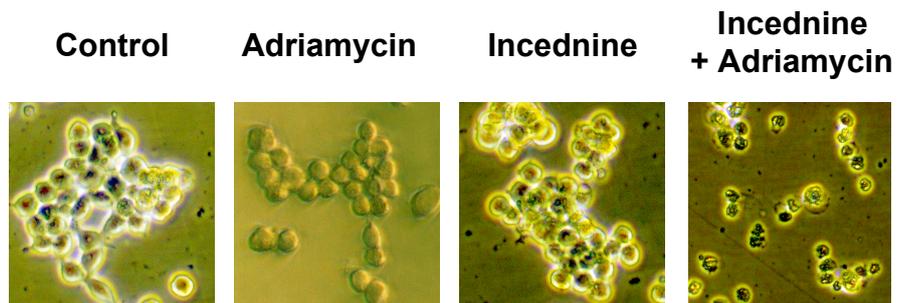


Figure 3-1 Incednine overcome the anti-apoptotic function of Bcl-xL/Bcl-2 against adriamycin-induced cell death in Ms-1/Bcl-xL cells.

Cells were treated with adriamycin or incednine as indicated (adriamycin; 3 μ g/ml, incednine; 100 nM). After 48 h, cells were observed under a phase-contrast microscope and photographed.

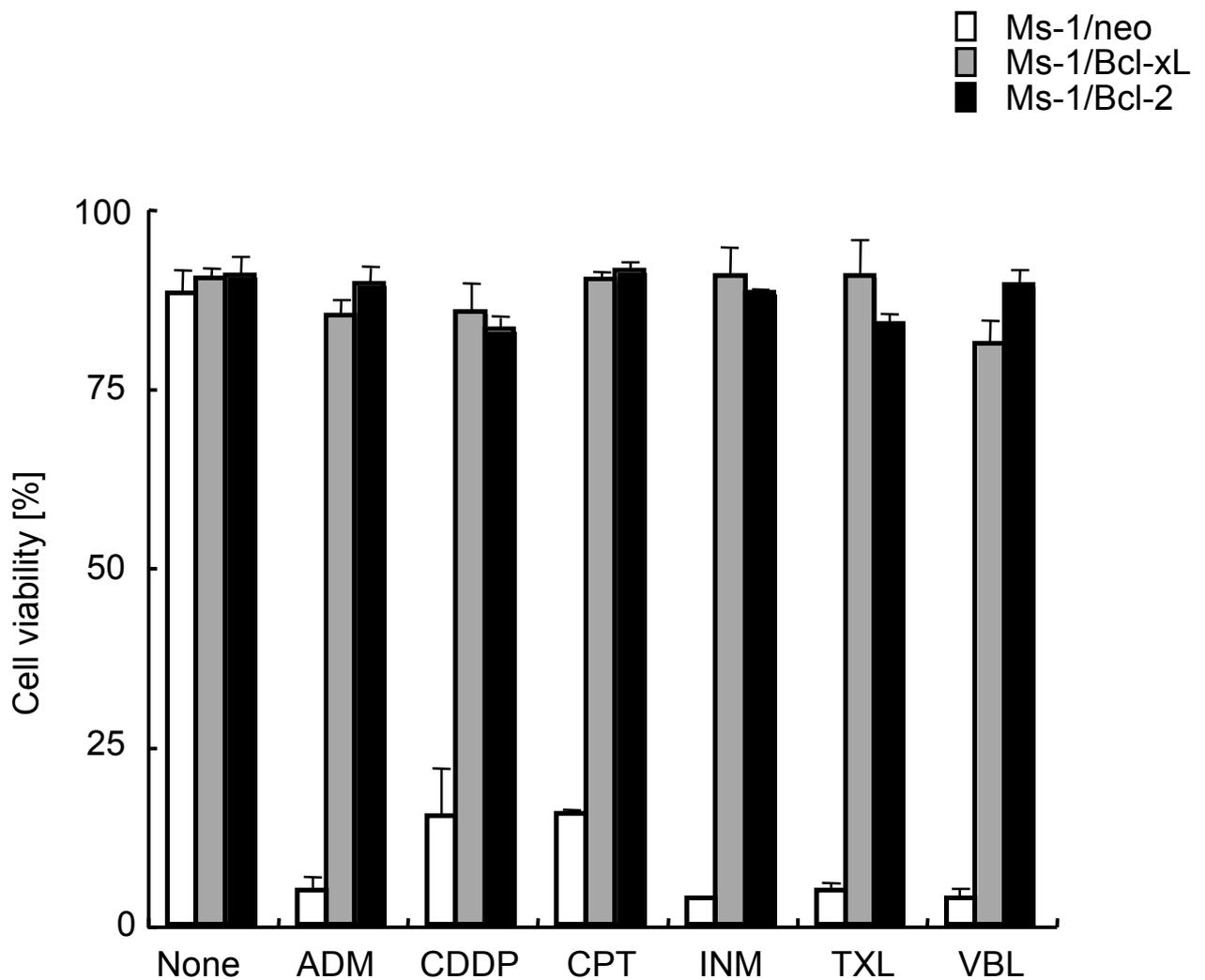


Figure 3-2 Overexpression of Bcl-2/Bcl-xL protected Ms-1 cells from anti-tumor drug-induced apoptosis.

Cells were treated with compounds indicated for 48 h. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples: bars, SD. (adriamycin; ADM, 3 μ g/ml, cisplatin; CDDP, 100 μ g/ml, camptothecin; CPT, 3 μ g/ml, inostamycin; INM, 0.3 μ g/ml, taxol; TXL, 100 ng/ml, vinblastine; VBL, 10 ng/ml.)

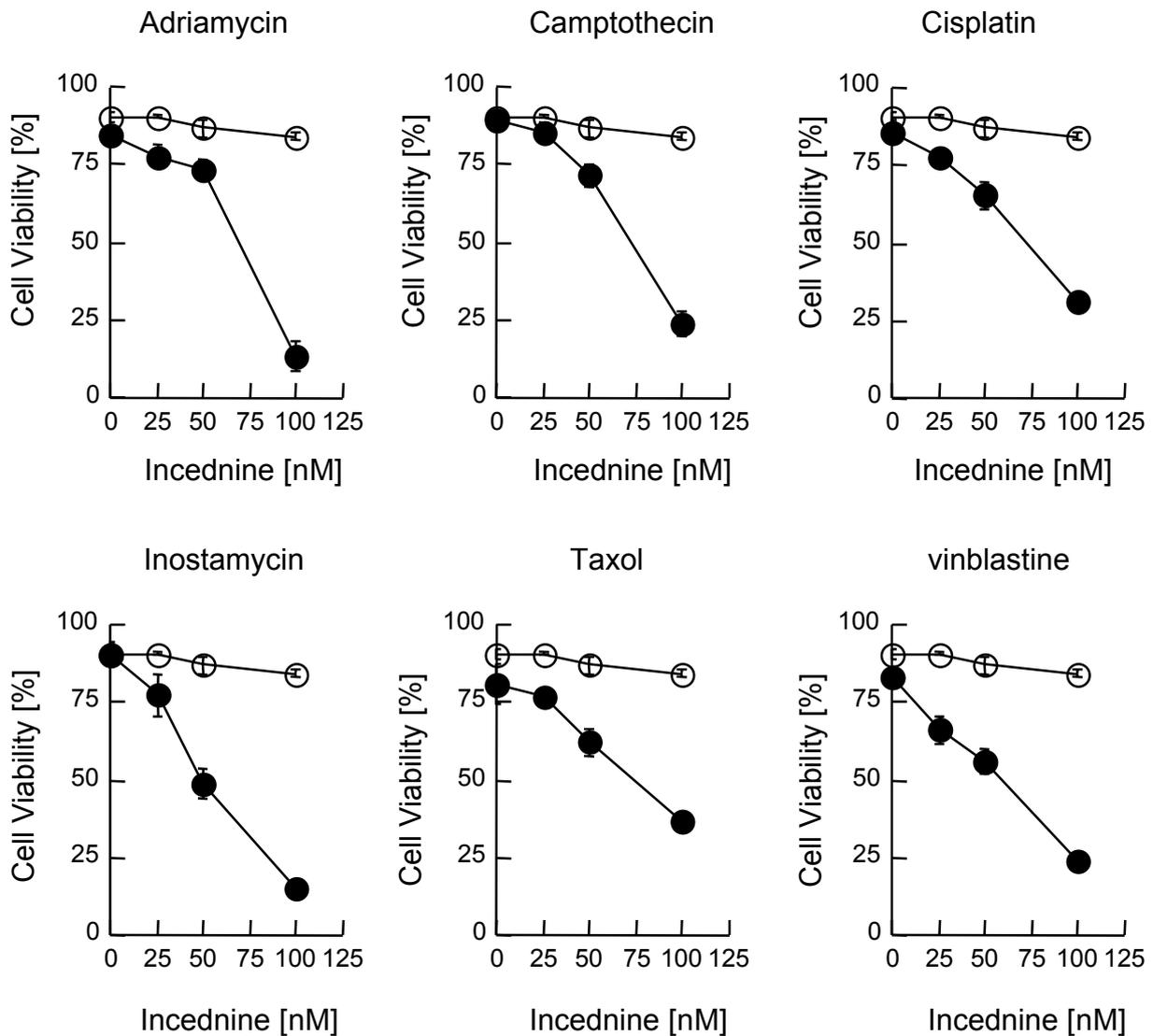


Figure 3-3 Incednine overcomes the anti-apoptotic function of Bcl-xL against anti-tumor drug-induced apoptosis in Ms-1/Bcl-xL cells.

Cells were treated with incednine in combination with several types of anti-tumor drugs as indicated for 48 h (incednine alone; open circle, combination; closed circle). Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples; bars, SD. (adriamycin; 3 $\mu\text{g/ml}$, cisplatin; 100 $\mu\text{g/ml}$, camptothecin; 3 $\mu\text{g/ml}$, inostamycin; 0.3 $\mu\text{g/ml}$, taxol; 100 ng/ml, vinblastine; 10 ng/ml.)

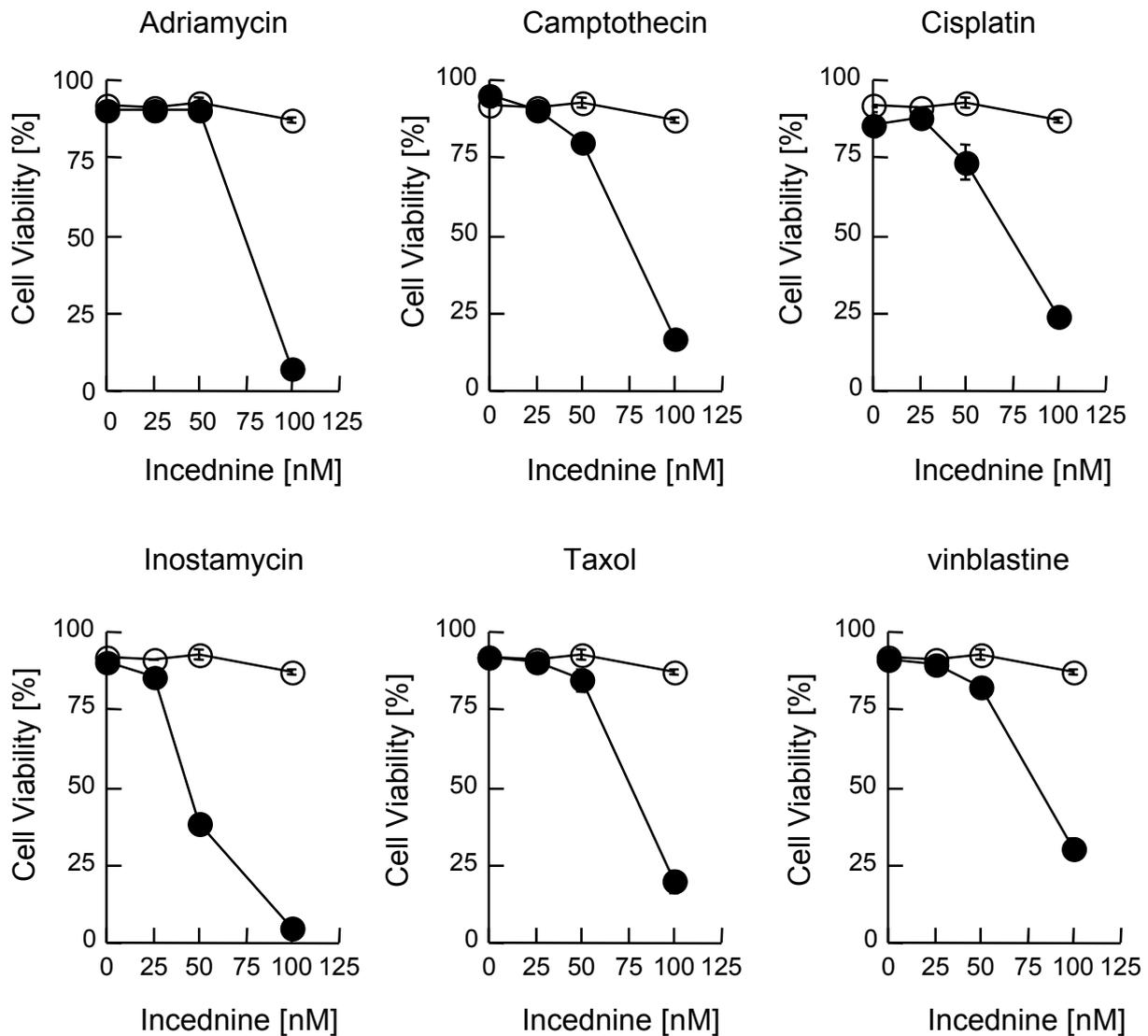


Figure 3-4 Incednine overcomes the anti-apoptotic function of Bcl-2 against anti-tumor drug-induced apoptosis in Ms-1/Bcl-2 cells.

Cells were treated with incednine in combination with several types of anti-tumor drugs as indicated for 48 h (incednine alone; open circle, combination; closed circle). Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples; bars, SD. (adriamycin; 3 $\mu\text{g/ml}$, cisplatin; 100 $\mu\text{g/ml}$, camptothecin; 3 $\mu\text{g/ml}$, inostamycin; 0.3 $\mu\text{g/ml}$, taxol; 100 ng/ml, vinblastine; 10 ng/ml.)

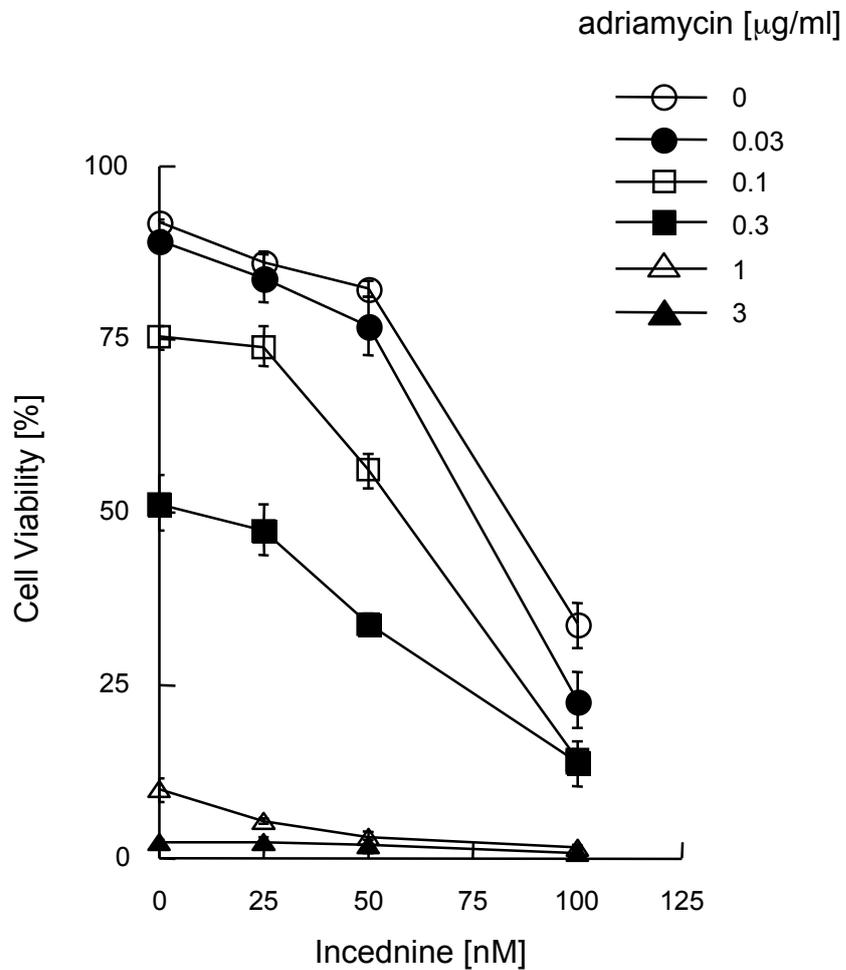


Figure 3-5 Incenine did not enhance adriamycin-induced apoptosis in Ms-1/Neo cells.

Cells were treated with incednine in combination with adriamycin as indicated for 48 h . Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples: bars, SD.

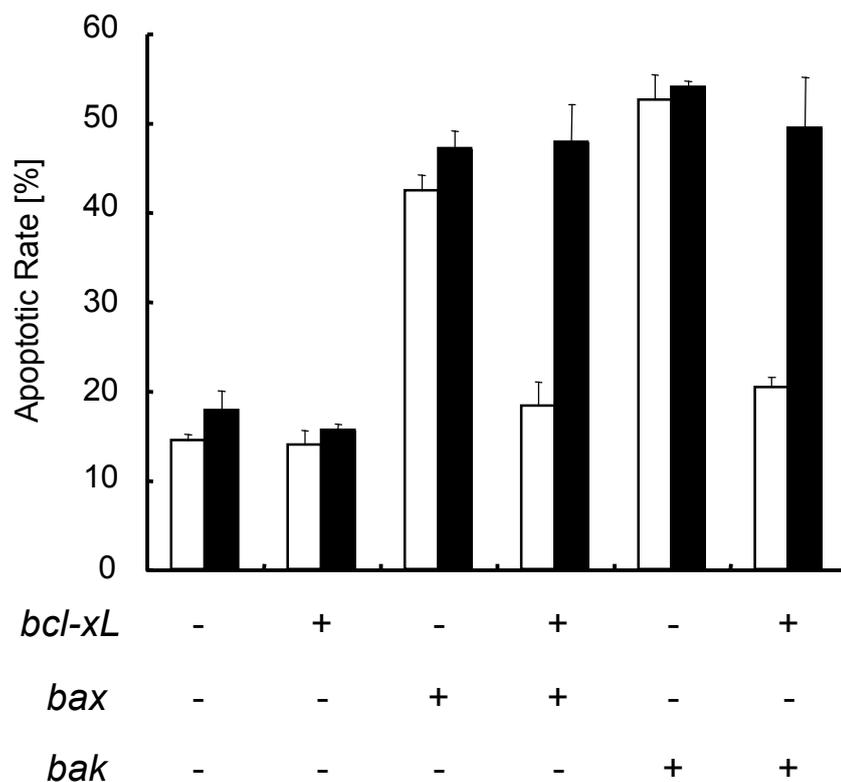


Figure 3-6 Effect of incednine on anti-apoptotic function of Bcl-xL in Bax- or Bak-induced apoptosis in HEK293T cells.

HEK293T cells were transiently co-transfected with pCI-neo plasmids encoding Bax or Bak and Bcl-xL. The total amounts of DNA were normalized with pCI-neo empty vector. After 5 h incubation, cells were treated with (closed squares) or without (open squares) 60 nM incednine for 48 h. Apoptotic rate was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples: bars, SD.

第2節 Incednineによる細胞死誘導機構の解明

前節までに、incednineは Bcl-xLや Bcl-2のアポトーシス抑制機能を阻害し、種々抗腫瘍剤との共処理により Bcl-2/Bcl-xL 過剰発現細胞に顕著な細胞死を誘導することが明らかになった。本節では incednine と特に顕著な細胞死誘導活性を発揮した inostamycin (INM) との併用による細胞死誘導機構について解析した。Incednineは INM との併用によりミトコンドリア膜電位の低下、続くミトコンドリアからの細胞死誘導因子の放出を誘導した。Caspase 依存性について評価した結果、この細胞死は AIF を介した Caspase 非依存的経路で誘導されることが示唆された。

§1 ミトコンドリア膜電位の検出

アポトーシス刺激はその種類により活性化されるシグナル伝達が異なるものの、それらの多くはミトコンドリアへと集約される⁶⁷。アポトーシス刺激を受けたミトコンドリアでは電子伝達系が変化し、内膜と外膜間に存在する電位差（ミトコンドリア膜電位；MMP）の消失が起こり膜透過性の亢進が起こる。これにより、ミトコンドリアに内在する細胞死誘導因子が放出され下流へとシグナルを伝達する。筆者は INM と incednine を共処理したときに誘導されるアポトーシスがミトコンドリアを介したシグナル伝達であるかを評価する目的で JC-1 染色を行った。JC-1 はカチオン性蛍光試薬であり、MMP が正常な生細胞に取り込まれると負に帯電した内膜上で凝集し、Ar レーザーによる励起で赤色蛍光を発する。一方で MMP が低下した細胞に取り込まれた場合、JC-1 は凝集せず単量体として存在し、緑色蛍光を発する。INM 0.3 µg/mL と incednine 100 nM を 9 時間、単独もしくは共処理した Ms-1/Bcl-xL #24 細胞をそれぞれ JC-1 染色し、ミトコンドリア膜電位をフローサイトメーターにより解析した。その結果、incednine、INM それぞれの単独処理では無処理の細胞と同様、MMP の低下は検出されなかった。一方、incednine と INM を共処理した細胞では、MMP の顕著な低下が観察された (Figure 3-7)。従って、incednine、INM を共処理したときに誘導されるアポトーシスはミトコンドリアを介して誘導されることが明らかになった。

§ 2 Caspase 依存的経路の検討

MMP が低下したミトコンドリアは膜透過性が亢進し、内部から細胞死誘導因子を放出する⁶⁷。また一般に、アポトーシス刺激によりミトコンドリアから Cytochrome *c* が放出され、続く Caspase の活性化を伴った細胞死伝達経路が広く確立されている。そこで筆者は incednine と INM の共処理による細胞死が Cytochrome *c* の放出を伴う Caspase 依存的経路で誘導されるかを評価した。INM 0.3 µg/ml を 8 時間処理した Ms-1/neo #13 細胞と、incednine 100 nM と 0.3 µg/ml の INM とを 12 時間単独もしくは共処理した Ms-1/Bcl-xL #24 細胞の細胞質画分を分画し、抗 Cytochrome *c* 抗体による western blot を行った。その結果、Ms-1/neo #13 細胞では INM 添加によって Cytochrome *c* の放出が観察された。Ms-1/Bcl-xL #24 細胞では、incednine、INM それぞれの単独処理では Cytochrome *c* の放出が検出されなかったのに対し、incednine と INM の共処理では、Ms-1/neo #13 細胞に INM を添加したときと同様、Cytochrome *c* の細胞質への放出が観察された (Figure 3-8 (a))。

次に effector Caspase である Caspase 3 の活性化をその基質である PARP の切断を指標に検討した。Cytochrome *c* の放出を観察した条件を用い、薬剤処理した細胞の可溶画分を抗 PARP 抗体で検出した。その結果、Ms-1/neo #13 細胞では INM 処理によって 82 kDa に PARP の切断バンドが検出された。一方 Ms-1/Bcl-xL #24 細胞では、細胞死が誘導される条件においても PARP の切断バンドは検出されなかった (Figure 3-8 (a))。

さらに Caspase 全般を阻害する z-VAD-fmk を用い、Ms-1/Bcl-xL #24 細胞において incednine と INM の共処理によって誘導されるアポトーシスがキャンセルされるか評価した。Ms-1/Bcl-xL 細胞に 100 µM の z-VAD を添加し、1 時間前処理した。その後、incednine 100 nM、INM 0.3 µg/mL を添加し 48 時間後の細胞生存率をトリパンプルー細胞外排出試験法で測定した。z-VAD-fmk の効果は、Ms-1/neo #13 細胞に対する INM の細胞死誘導活性に与える影響により確認した。INM が Ms-1/neo #13 細胞に誘導するアポトーシスは z-VAD-fmk の添加により阻害された。しかしながら、incednine と INM との共処理によって低下した Ms-1/Bcl-xL #24 細胞の生存率は z-VAD-fmk の添加によっても回復しなかった (Figure 3-8 (b))。従って、incednine 存在下で INM が Ms-1/Bcl-xL #24 細胞に誘導するアポトーシスのシグナル伝達は、INM が Ms-1/neo #13 細胞に

誘導するアポトーシス誘導シグナルとは異なり Caspase 非依存的であることが示唆された。

§3 AIF の関与

Caspase 非依存的なアポトーシス誘導因子として、近年研究が進んでいるのがミトコンドリアから放出されるフラビンタンパク質 AIF (Apoptosis inducing factor) である。AIF は通常、ミトコンドリアの膜間腔に存在し電子伝達系 Complex I の調整を行っているものの⁶⁸、アポトーシス刺激によって一度ミトコンドリアから放出されると、細胞質を経て核へと移行し、DNase の活性化、クロマチンの凝集・DNA のラージフラグメンテーションを誘導することが知られている¹⁷。そこで *incednine* と INM の共処理による AIF の細胞内局在に与える影響を検討した。Cytochrome *c* の放出が検出された条件で細胞を薬剤処理し、細胞分画によって得られた細胞質画分を抗 AIF 抗体により western blot を行った。その結果、Figure 3-9 (a)に示すように、Ms-1/Bcl-xL #24 細胞では、*incednine*、INM それぞれの単独処理では AIF の放出が検出されなかったのに対し、*incednine* と INM の共処理では、顕著な AIF の放出が観察された。さらに AIF の関与を支持するため、AIF のノックダウンが *incednine* と INM の共処理による細胞死に与える影響を検討した。AIF の siRNA により AIF の発現量は 90%以上抑制された。このとき *incednine* 及び INM を処理すると、AIF をノックダウンした細胞では *incednine* と INM の共処理によって誘導される細胞死が顕著に抑制された (Figure 3-9 (b))。従って、*incednine* 存在下で INM が誘導するアポトーシスは AIF を介した Caspase 非依存的経路で誘導されることが示唆された。

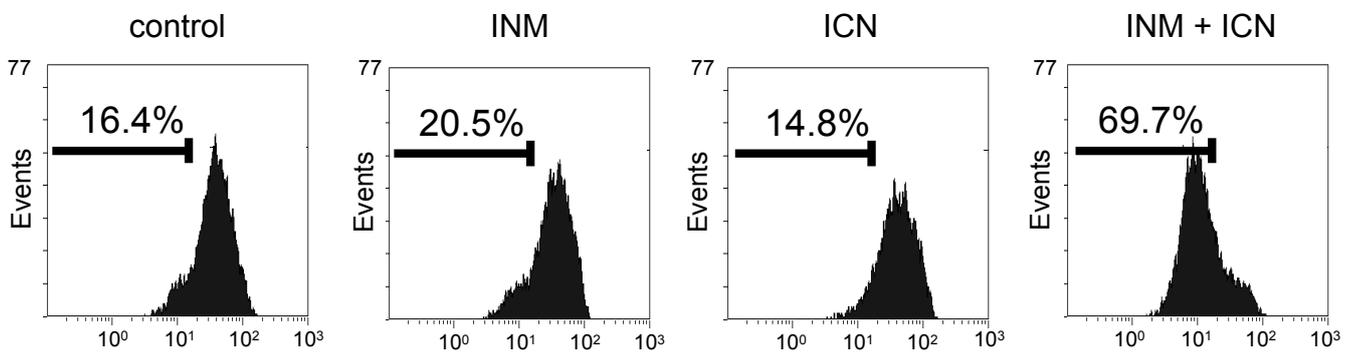


Figure 3-7 Incednine led to dissipation of the mitochondrial membrane potential in inostamycin-treated Ms-1/Bcl-xL cells.

Cells were treated with incednine in combination with inostamycin for 9 h. Collected cells were stained with JC-1 and analyzed by flow cytometer. (inostamycin, INM; 0.3 $\mu\text{g/ml}$, incednine, ICN; 100 nM.) The indicated values in each panel show the percentage of MMP-dissipated cells.

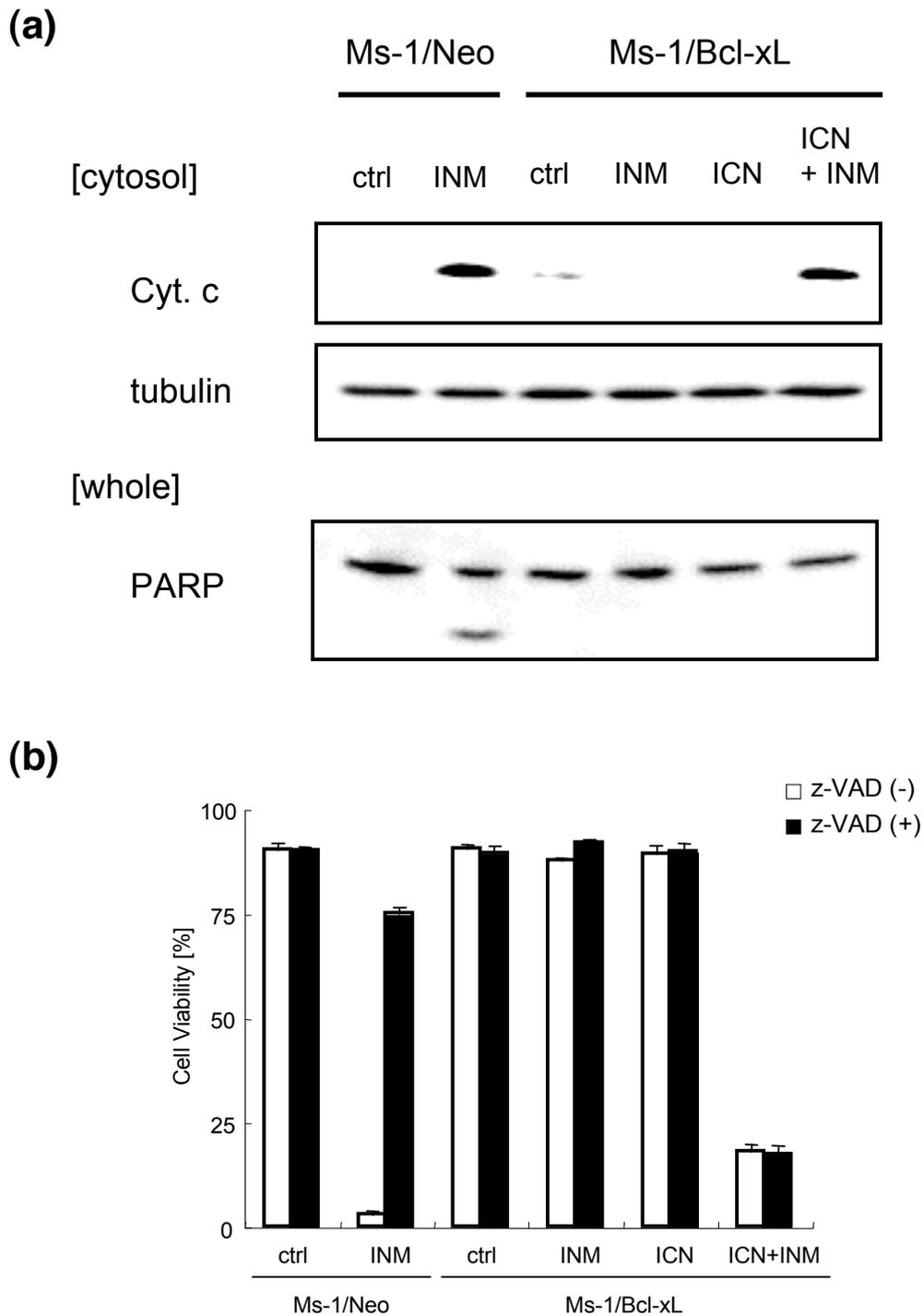


Figure 3-8 Caspase activation was not observed in incednine plus inostamycin-treated Ms-1/Bcl-xL cells.

(a) Cells were treated with incednine in combination with inostamycin for 12 h. Cell fractionation was performed with digitonin technique. Cyt.c in cytosolic fraction and PARP in whole lysate were immunoblotted with each antibody. (INM; 0.3 μ g/ml, incednine, ICN; 100 nM.) (b) Cells were pretreated with 100 μ M of z-VAD-fmk, and then treated with drugs indicated for 48 h. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion assay. Values are means of three samples: bars, SD.

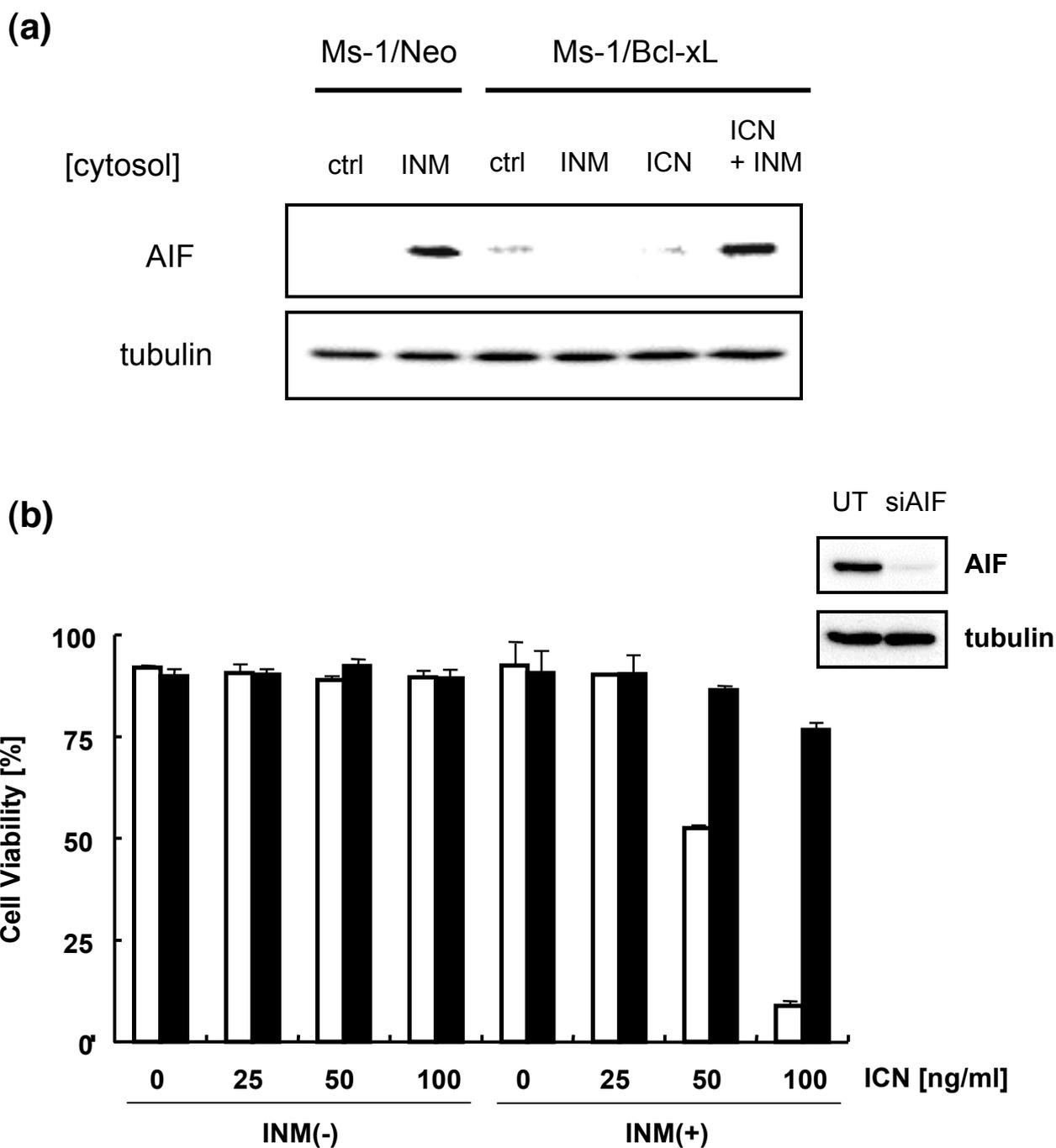


Figure 3-9 Involvement of AIF-mediated pathway in incednine and inostamycin--induced Ms-1/Bcl-xL cells apoptosis.

(a) Cells were treated with drug indicated for 12 h. AIF and tubulin in cytosolic fraction were immunoblotted with each antibody. (INM; 0.3 μ g/ml; ICN; 100 nM.) (b) Immunoblots of AIF expression in Ms-1/Bcl-xL cells 6 days after transfected with 25 nM siRNA. Equal loading was confirmed by probing with a tubulin-specific antibody. The siRNA-transfected (closed squares) or untransfected (UT, open squares) cells were left untreated or treated with INM in the presence or absence incednine for 24 h. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay. Values are means of three samples: bars, SD.

第3節 Incednine の Bcl-2 ファミリー間の結合に与える影響

Bcl-2 や Bcl-xL はその作用機序の一つとして、ミトコンドリア上で促進型である Bax や Bak とヘテロ二量体を形成し、ミトコンドリアからの cytochrome c や AIF の放出を抑制する³³。前節にて incednine は INM との併用により AIF の放出を促し、細胞死を誘導することを見出したことから、incednine は Bcl-xL と Bax との二量体形成を阻害するのではないかと考えた。大腸菌より精製したリコンビナント Bcl-xL タンパク質と Bax を過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液を用い、*in vitro* で Bcl-xL と Bax との結合を評価した。既に Bcl-2 と Bax との結合阻害活性が報告されている HA14-1⁴¹を用いたところ、HA14-1 は 1 μ M から Bcl-xL と Bax の結合を完全に阻害し、評価系が機能することを確認した。そこでこの評価系において incednine の活性を検討した。その結果、incednine は細胞評価系で十分に効果を発揮する濃度 (100 nM) よりはるかに高い濃度においても Bcl-xL と Bax の結合を阻害しなかった (Figure 3-10)。従って、incednine は Bcl-xL と Bax の結合を阻害しないことが示唆された。以上より、incednine による Bcl-2、Bcl-xL の機能阻害活性は Bcl-2/Bcl-xL と Bax との結合を阻害する既存の Bcl-2 阻害剤とは異なり、Bcl-2/Bcl-xL が結合する別のタンパク質に作用することにより発揮される可能性が示唆された。

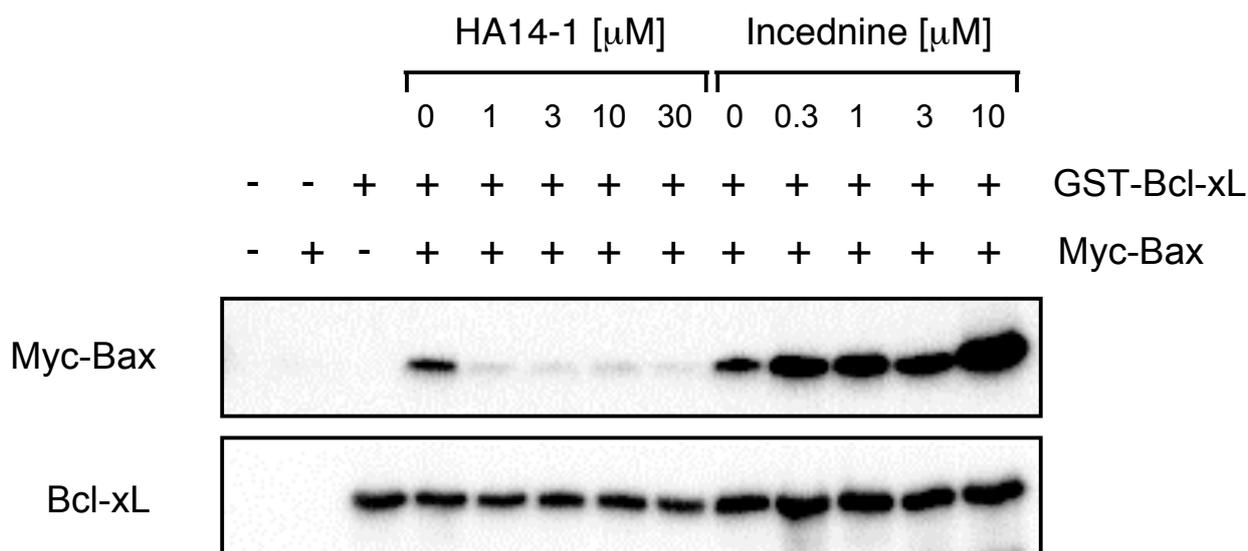


Figure 3-10 Effect of incednine on heterodimerization of Bcl-xL and Bax *in vitro*.

The lysate from HEK293T cells transiently transfected with pCI-myc-bax (50 μ g) was incubated with recombinant GST-Bcl-xL (1 μ g) and glutathione-sepharose 4B beads in the presence or absence of indicated concentrations of incednine or HA14-1 for 2 h at 4°C. The amount of Bax bound to Bcl-xL was determined by immunoblot analysis with anti-Myc antibody.

小括

本章では *incednine* による *Bcl-xL/Bcl-2* の機能阻害活性及び *incednine* と抗腫瘍剤との併用によって誘導される細胞死メカニズムについて検討した。*Bcl-2* や *Bcl-xL* を過剰発現した細胞は種々抗腫瘍剤に耐性を示したが、*incednine* はこの耐性を克服した。またベクターコントロール細胞では同様の活性がみられなかったことから *incednine* は *Bcl-2/Bcl-xL* の抗アポトーシス活性を抑制することが示唆された。多くのアポトーシス刺激はミトコンドリアからの *cytochrome c* の放出、続く *Caspase* の活性化を介した *Caspase* 依存的経路で細胞死を誘導する。*Incednine* と *INM* を共処理するとミトコンドリアからの *Cytochrome c* の放出が促されたが、興味深いことにその下流の *Caspase 3* の活性化は見られなかった。さらにこの細胞死は *Caspase* ファミリー全般を阻害する *z-VAD* の前処理によっても阻害されなかった。このことからこの細胞死は *Caspase* 非依存的に誘導されることが考えられたため、近年 *Caspase* 非依存的な細胞死誘導因子として注目を浴びている *AIF* の関与を検討した。*AIF* はミトコンドリア膜間腔に存在するフラビンタンパク質であり、*staurosporin* や As_2O_3 刺激などによって核へと移行しクロマチン凝集・DNA ラージフラグメンテーションを誘導することが知られている¹⁷。*Ms-1/Bcl-xL* 細胞に *incednine* と *INM* を共処理するとミトコンドリアからの顕著な *AIF* の放出が観察された。さらに、*siRNA* を用いた *AIF* の発現抑制によりその細胞死は抑制されたことから *incednine* と *INM* は *AIF* を介した *Caspase* 非依存的経路で細胞死を誘導することが示唆された。興味深いことに *Ms-1/Neo* 細胞に *INM* を処理しても *AIF* の放出が観察された。*INM* が *Ms-1/Neo* 細胞に誘導する細胞死は *z-VAD* で回復することからこの細胞死は *Caspase* 依存的であることが考えられ、*AIF* は細胞質に放出されるだけでは機能しないことが示唆される。つまり、*AIF* は細胞質に放出されるステップ、核に移行するステップそれぞれに制御機構が存在し、*incednine* は *AIF* の核移行に関わる制御メカニズムへも影響を与える可能性が考えられる。*AIF* の核移行に関わる因子としては *HSP70* の関与が報告されている⁶⁹が未だ不明な点も多く、今後更なる検討が必要である。さらに一つの疑問が残る。-*Cytochrome c* の放出が促されているにも関わらず、なぜ下流の *Caspase* が活性化しないのか？- *Cytochrome c* は通常ミトコンドリアから放出されると *Apaf-1*、*pro-Caspase 9*、*ATP/dATP* と複合体 *Apoptosome* を形成し *Capase 9*

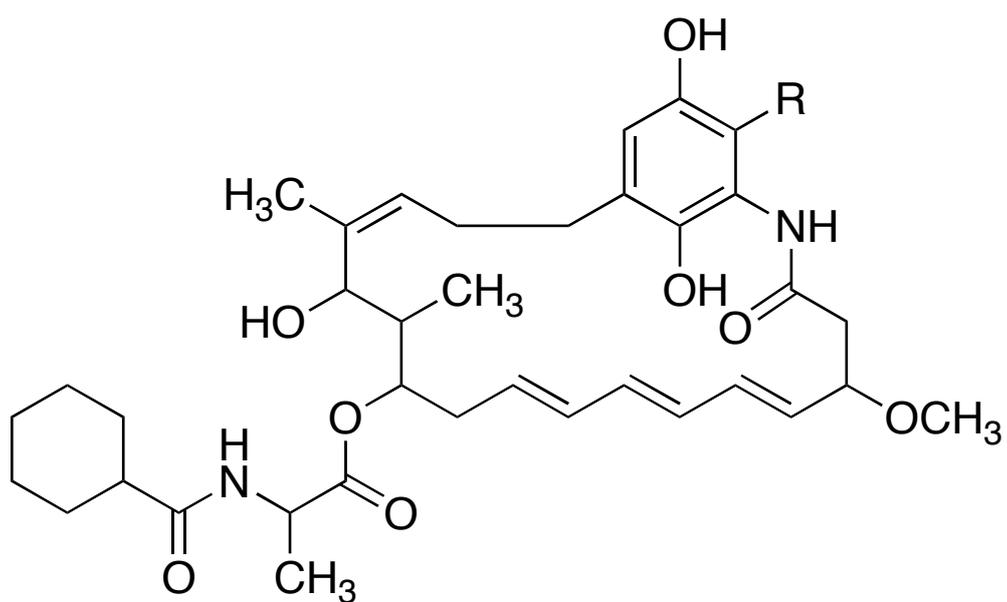
の活性化、Caspase 3 の活性化を誘導する¹⁴。筆者はここで細胞内 ATP 量に着目した。はたして incednine と INM を処理した細胞では細胞内 ATP 量の低下が観察され、このことが Apoptosome 形成阻害を誘導し Caspase 不活性化の一因になっていると考えられた。しかし、予備的な試験の結果ではあるものの ATP の供給源となるグルコースの添加によってもこの細胞死は回復しなかったことから、Caspase 不活性化における細胞内 ATP 量低下の関与は現在のところ推測の域を脱し得ない。なお、Bcl-xL の結合タンパク質の一つとして Apaf-1 が知られている⁷⁰。このことから「Incednine は Bcl-xL の機能は阻害するものの、Bcl-xL と Apaf-1 との結合阻害能を有しておらず Apoptosome が形成されない」という仮説も十分検討の余地が残る。

著者は最後に incednine がどのようなメカニズムで Bcl-xL の機能を抑制し Caspase 非依存的な細胞死を誘導するのかについて検討した。アポトーシス促進タンパク質である Bax や Bak は多くのアポトーシス刺激によって活性化され、ミトコンドリア機能不全、細胞死誘導因子 (cytochrome c、AIF など) の放出を誘導する⁷¹。Bcl-2 や Bcl-xL は主な作用機序として、ミトコンドリア上で Bax や Bak と二量体を形成し、ミトコンドリアからの細胞死誘導因子の放出を抑制することから incednine はこれらの二量体形成を阻害し、Bcl-xL の機能を抑制している可能性が容易に想像された。しかし予想に反して、incednine は Bcl-xL と Bax の結合に影響を与えなかった。近年、Bcl-2 や Bcl-xL は yeast two hybrid 法や免疫沈降法などにより Bcl-2 ファミリー以外にも数多くのタンパク質と結合することが明らかとなり、またそれらのタンパク質との結合によっても細胞死抑制機能を発揮する可能性が報告されている⁷²。しかしながらその詳細は未だ明らかではない。Incednine は Bax と Bcl-xL の二量体形成を阻害する既存の Bcl-2 阻害剤とは異なるメカニズムで Bcl-2/Bcl-xL の機能を抑制することから、今後 incednine をバイオプローブとしたケミカルジェネティクス研究によりその標的タンパク質が明らかになれば、Bcl-2/Bcl-xL の新たな作用機序の解明につながることを期待される。

第4章 新規 triene-ansamycin 系化合物、trierixin の構造解析

固形がん内部の細胞は通常、低酸素・低栄養・低 pH 下にさらされ小胞体ストレス状態にあるものの、小胞体ストレスによって活性化される **unfolded protein response (UPR)**により劣悪な環境下でも生存し、悪性化しうるということが報告されている⁵⁰。実際、多くのがん細胞では **UPR** 下流因子の過剰発現が観察されており、結果、既存の放射線治療や化学療法に耐性を示すことが知られている。さらに固形がんの悪性化には **UPR** 下流因子の中でも転写因子 **X-box binding protein 1 (XBP1)**の活性化が必須であることが知られており、**XBP1** を標的とする薬剤は有効な固形がん治療薬への応用が期待されている⁵²。**XBP1** は通常、転写活性ドメインを持たない不活性型のタンパク質として翻訳されるが、小胞体ストレス下ではセンサータンパク質の **IRE1** によって **XBP1 mRNA** の 26 塩基が切り取られ、フレームシフトを起こして転写活性ドメインを有する活性型として翻訳される⁵³。このようなフレームシフトによって活性化するタンパク質は **XBP1** とその酵母ホモログである **HAC1** のみであることから当研究室では、このユニークな活性化メカニズムに着目し、**XBP1** の下流にフレームシフトが起こったときのみルシフェラーゼタンパク質を発現するプラスミドの安定発現株を用いた **cell-based** のスクリーニング系により、小胞体ストレス誘導性 **XBP1** 活性化阻害剤の探索が行われてきた。微生物二次代謝産物よりスクリーニングが行われた結果、*Streptomyces* sp. **AC654** 株が目的の活性物質を生産していることが明らかとなった。**Tashiro** らは生産菌培養液のブタノール、酢酸エチル抽出物をクロロホルム-メタノール系、及びトルエン-アセトン系でのシリカゲルカラムにより分画し、さらに得られた活性画分を **HPLC** で分取することにより新規物質 **trierixin** を活性物質として同定した (**Figure 4-1**)⁷³。

本章では **trierixin** の高分解能 **MS** スペクトル、**UV** 吸収スペクトル、**IR** 吸収スペクトル、比旋光度、融点などからその理化学的性状を明らかにした。また各種 **NMR** スペクトル解析より、**trierixin** がメチルチオベンゼネジオール構造を有する新規 triene-ansamycin 系化合物であることを明らかにした。



Trierixin R = SCH₃
Mycotrienin II R = H

Figure 4-1 Structures of trierixin and mycotrienin II

第1節 Trierixin の理化学的性状

Trierixin の理化学的性状は Table 4-1 にまとめた。Trierixin は薄桃色粉末であり、融点は 121～122℃である。高分解能 ESI-MS スペクトルにおいて $m/z=683.3372$ [(M-H)⁻, Δ +0.06 mmu] にピークを示したことから、その分子式を C₃₇H₅₂N₂O₈S と決定した。UV スペクトルは 261、271、281 nm に極大吸収を示し、トリエン構造を有することが示唆された。また 315 nm の吸収が塩基性下では 335 nm にシフトしたことからフェノール性水酸基の存在が示された。さらに IR スペクトルより trierixin が NH/OH (3420 cm⁻¹)、エステル (1740 cm⁻¹)、アミド (1650、1540 cm⁻¹) の官能基を有することが示唆された。

第2節 Trierixin の構造決定

当研究室 Tashiro らは trierixin の単離過程において、同生産菌培養液中より別の triene-ansamycin 系化合物 mycotrienin II を同定した⁷³。Trierixin の UV スペクトル及び ¹H-NMR スペクトルは mycotrienin II と極めて類似していたことから、構造解析は mycotrienin II と比較しながら検討した。

Trierixin のクロロホルム-*d*₁ 中の ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹H COSY、HMQC、HMBC スペクトルより帰属した各シグナルを Table 4-2 に示す。また Sugita らによる mycotrienin II の帰属も Table 4-2 に示す⁷⁴。

Trierixin は ¹³C-NMR スペクトルより 37 個のシグナルが観測され、HMQC などの詳細な解析により、それぞれ 4 個のメチル、1 個のメトキシ、9 個のメチレン、3 個のメチン、3 個の酸素原子に結合したメチレン、8 個のオレフィン、6 個の 4 級オレフィン、3 個のカルボニル炭素と帰属した。¹H-¹H COSY より (a) C-2~C-13 及び C-24、(b) C-15~C-17、(c) 28-NH~C-29 の 3 つの部分構造を明らかにした (Figure 4-2)。またこれらの部分構造と HMBC の解析及び mycotrienin II の構造とを比較した結果、(1) trierixin の C-1~C-17 及び C-27~C-36 (シクロヘキサンカルボニルアラニル基) は mycotrienin II と共通していたこと、(2) mycotrienin II には存在しない δ_H 2.17 のシングレットメチルが存在したこと、(3) mycotrienin II では 2 個存在したオレフィンメチンが trierixin では 1 個に減っていたことが明らかになった。これらの知見に加え、trierixin と mycotrienin II の分子式の違い (CH₂S) を考慮すると、trierixin

は mycotrienin II の 21 位もしくは 23 位に SCH₃ 基が導入した類縁体であることが推測された。HMBC スペクトルを詳細に検討した結果、Figure 4-3 に示すように 21 位のオレフィン炭素には SCH₃ 及び 1-NH より相関が観測された。さらにこのとき H-23 から C-17 への相関が観測されたことから SCH₃ 基は確かに 21 位に結合していることが明らかとなった。ところで多くの triene-ansamycin 系化合物では 11 位に側鎖が結合しているが、trienomycin G は 13 位に側鎖が結合した構造を有している。Trierixin の HMBC スペクトルにおいては H-11、H-13 のいずれからも C-27 へのロングレンジ C-H カップリングは観察されなかったが、11 位のプロトン (δ 4.88) の低磁場側へのアシレーションシフトが観測されたことから、シクロヘキサンカルボニルアラニル基が 11 位に結合していることが示唆された。

なお、trierixin に含まれるオレフィンの幾何異性については H-4、H-6、H-8 のスピン結合定数 ($J_{4,5}=15.4$ Hz、 $J_{6,7}=15.0$ Hz、 $J_{8,9}=15.0$ Hz) より 4 位、6 位、8 位は全て *E* 配向であることがわかった。また 14 位の幾何異性は NOE スペクトルにおいて H-15 と 14-CH₃ 間の相関が観測されたことから *Z* 型と決定した (Figure 4-2)。

以上より、trierixin の平面構造を Figure 4-1 のように決定した。

Table 4-1 Physico-chemical properties of trierixin

Appearance	pale pink powder
Melting point (°C)	121-122
HRESI-MS (negative)	
found	683.3372 (M-H) ⁻
calcd	683.3366 (for C ₃₇ H ₅₁ N ₂ O ₈ S)
Molecular formula	C ₃₇ H ₅₂ N ₂ O ₈ S
Molecular weight	684
Specific rotation [α] _D ²⁰	+ 306.2° (c 0.2, CHCl ₃)
UV λ_{\max} nm (log ϵ)	
in MeOH	261.5 (4.54), 271.0 (4.66), 281.0 (4.56), 315.0 (3.65)
in 0.1 N HCl-MeOH	261.5 (4.56), 271.0 (4.67), 281.0 (4.57), 315.0 (3.67)
in 0.1 N NaOH-MeOH	261.5 (4.43), 271.0 (4.50), 281.0 (4.40), 335.0 (3.75)
IR ν_{\max} (KBr) cm ⁻¹	3420, 2930, 2860, 1740, 1650, 1540, 1470, 1380, 1290, 1210, 1160, 1090, 1000, 960, 730
HPLC Rt (min.) ^a	7.9

a: column; UG120 (4.6 mm x 250 mm, shiseido), 80% MeOH, 0.7 ml/min

Table 4-2 ^1H - and ^{13}C -NMR data for trierixin and mycotrienin II

trierixin			mycotrienin II *	
No.	δ_{C} ppm (multiplicity)	δ_{H} ppm (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	No.	δ_{C} ppm (multiplicity)
1	170.8 (s)		1	169.7 (s)
2	43.5 (t)	2.66 (1H, dd, 8.6, 13.6)	2	43.1 (t)
	–	2.97 (1H, dd, 4.5, 13.7)		–
3	80.0 (d)	4.23 (1H, m)	3	79.6 (d)
4	129.8 (d)	5.50 (1H, dd, 7.3, 15.4)	4	129.1 (d)
5	135.8 (d)	6.28 (1H, dd, 10.4, 15.4)	5	134.4 (d)
6	130.3 (d)	6.04 (1H, dd, 10.4, 15.0)	6	129.5 (d)
7	135.5 (d)	6.23 (1H, dd, 10.4, 15.0)	7	134.9 (d)
8	134.7 (d)	6.04 (1H, dd, 10.4, 15.0)	8	133.9 (d)
9	130.4 (d)	5.63 (1H, m)	9	129.6 (d)
10	34.9 (t)	2.31, 2.48 (2H, m)	10	33.7 (t)
11	76.3 (d)	4.88 (1H, m)	11	75.8 (d)
12	39.8 (d)	1.85 (1H, m)	12	39.0 (d)
13	69.4 (d)	4.64 (1H, m)	13	68.7 (d)
14	139.0 (s)		14	137.8 (s)
15	124.8 (d)	5.11 (1H, d, 8.8)	15	124.3 (d)
16	27.1 (t)	2.02, 2.39 (2H, m)	16	26.6 (t)
17	33.2 (t)	2.17, 3.07 (2H, m)	17	31.7 (t)
18	136.9 (s)		18	132.7 (s)
19	143.5 (s)		19	141.1 (s)
20	127.1 (s)		20	125.5 (s)
21	110.9 (s)		21	107.5 (d)
22	150.9 (s)		22	149.2 (s)
23	116.1 (d)	6.78 (1H, s)	23	115.8 (d)
24	10.5 (q)	0.79 (3H, d, 6.8)	24	9.6 (q)
25	21.2 (q)	1.70 (3H, s)	25	20.3 (q)
26	57.6 (q)	3.36 (3H, s)	26	56.6 (q)
27	174.1 (s)		27	173.3 (s)
28	49.5 (d)	4.43 (1H, m)	28	48.7 (d)
29	18.8 (q)	1.42 (3H, d, 7.1)	29	17.7 (q)
30	177.4 (s)		30	176.9 (s)
31	46.0 (d)	2.10 (1H, m)	31	45.1 (d)
32	30.4 (t)	1.23, 1.85 (2H, m)	32	29.4 (t)
33	26.6 (t)	1.23–1.75 (6H, m)	33	25.6 (t)
34	26.6 (t)		34	25.6 (t)
35	26.7 (t)		35	25.7 (t)
36	30.5 (t)	1.23, 1.85 (2H, m)	36	29.4 (t)
1-NH		8.53 (1H, s)		
19-OH		7.68 (1H, s)		
21-SCH ₃	19.4 (q)	2.17 (3H, s)		
29-NH		5.94 (1H, d, 6.6)		

Recorded at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C in CDCl_3 * M. Sugita et al., *J. Antibiotics* (1982) 35, 1460

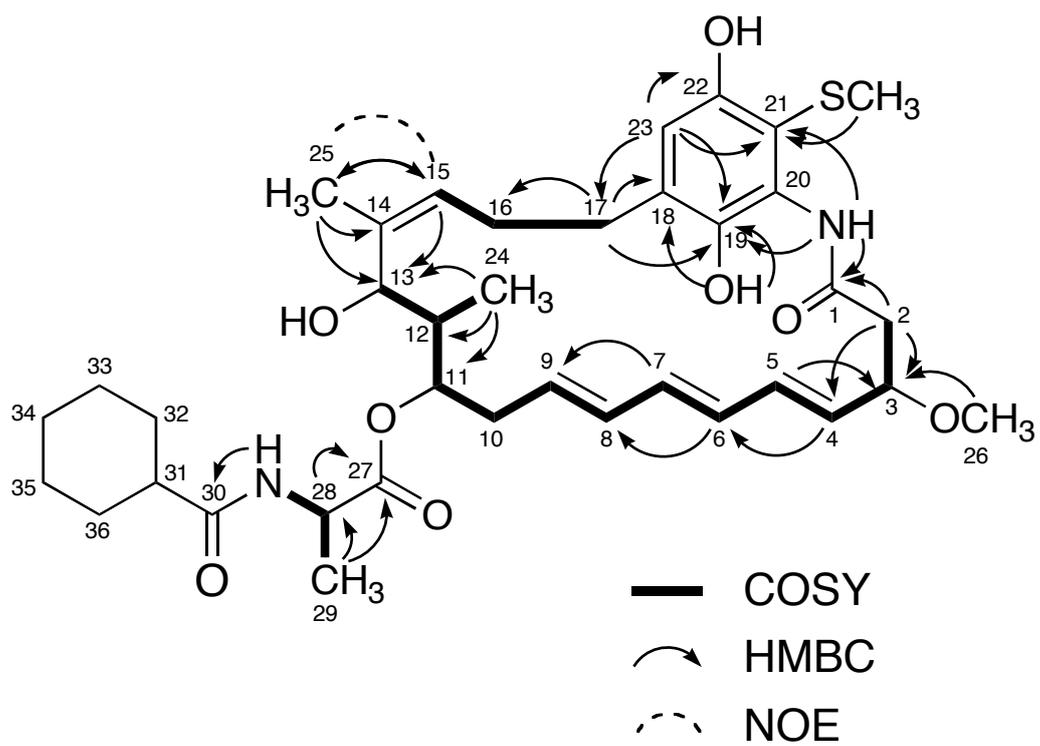


Figure 4-2 Selected 2D correlations for trierixin

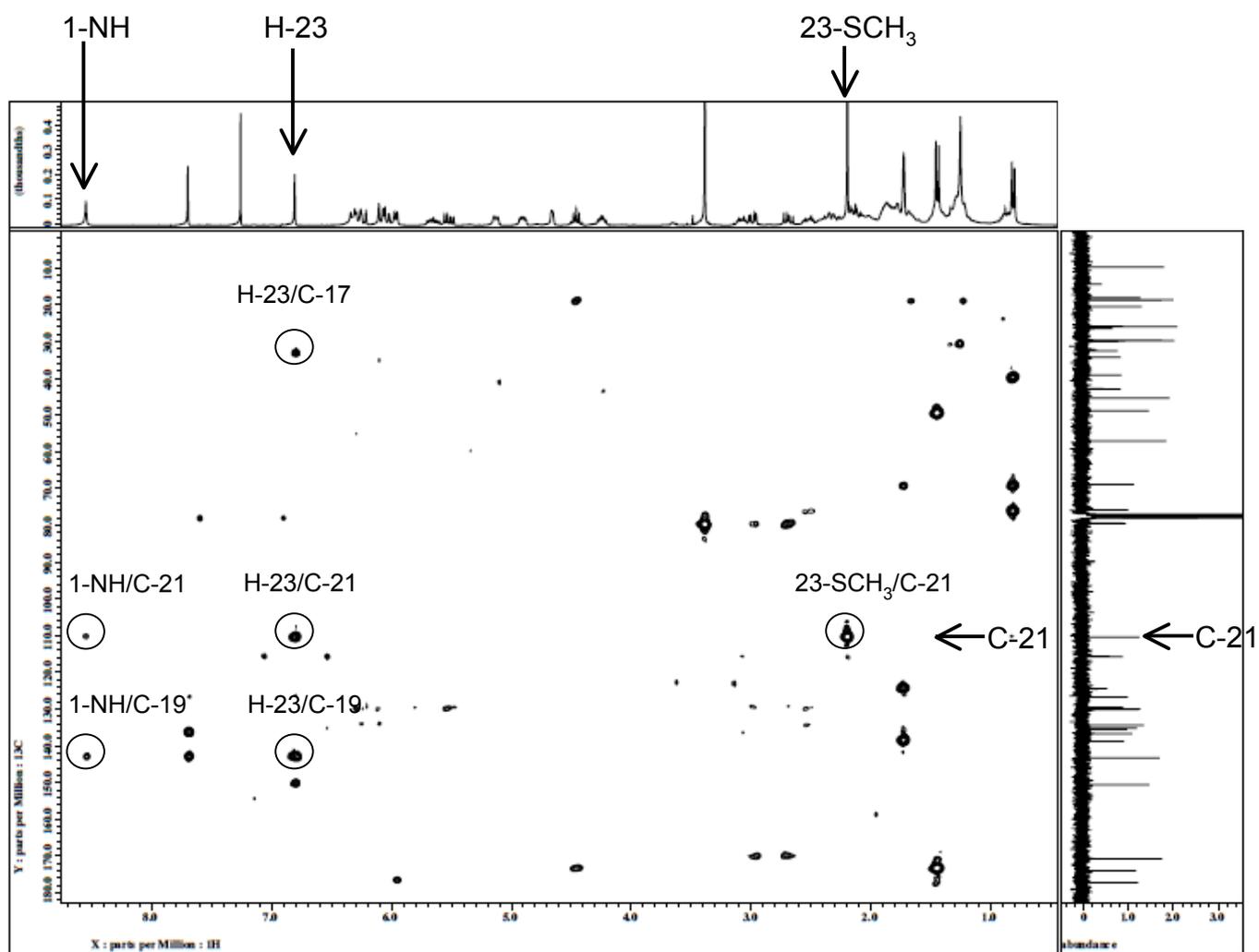


Figure 4-3 Observed HMBC correlations surrounding C-21

第5章 総括

1990年代、Schreiberらは免疫抑制剤FK506を用い、免疫学上非常に重要なT細胞活性化に関わる新しいメカニズムの解明⁷⁵、小分子化合物によるタンパク質機能解析研究“ケミカルジェネティクス”の有効性を広く世に知らしめた。その後、ヒトゲノムの解読も相まって様々な疾患関連因子が同定され、例えばチロシンキナーゼやプロテアソームに対する阻害剤を用いたケミカルゲノミクス研究はある種の生命現象の理解、創薬研究に貢献してきた。しかし、解明が必要とされる難治性疾患のメカニズム解析はまだ果てることを知らない。そこで筆者はアポトーシス制御機構、小胞体ストレス応答という二つの細胞応答において、特にがん化との密接な関連が示唆されるBcl-xL、XBP1という分子に着目し、それらの機能阻害剤の取得によりケミカルバイオロジー研究を展開することを試みた。その結果、天然より新規物質incednine及びtrierixinを細胞応答修飾物質として見出した。結果を要約すると次のようになる。

- 1) Adriamycinに対するBcl-xLのアポトーシス抑制機能を阻害する物質を微生物代謝産物より探索し、*Streptomyces* sp. ML694-90F3株が生産する新規物質incednineを発見した。
- 2) Incednineはその物性をうまく利用し、塩析やcentrifugal liquid-liquid partition chromatographyを用いた精製法により塩酸塩として単離した。
- 3) Incednineの平面構造は各種NMRスペクトルより決定し、新規骨格エノールエーテルアミドを有する24員環マクロラクタムに二つのアミノ糖が配位していることを明らかにした。
- 4) Incednineの相対立体配置は、NOEスペクトルや¹Hスピン結合定数、コンピュータモデリングをもとに末端のアミノ糖を除く構造を決定した。
- 5) Incednineの絶対立体配置は、incednine生産菌培養液より同定したアグリコンに対する改良型Mosher法の適用、及び相対構造が明らかでなかった末端糖の結晶化・X線構造解析により決定した。
- 6) Incednineは100 nMでBcl-xL及びBcl-2の様々なアポトーシス刺激に対する抑制活性を阻害した。Incednineの作用機序を明らかにする目的で、抗腫瘍剤とincednineの誘導する細胞死誘導機構を解析した。その結果、AIFを介したCaspase非依存的な経路で細胞死が誘導されることを明らかにし

た。またこのとき *incednine* は *Bcl-xL* と *Bax* の結合に影響を与えることはなかった。従って、*incednine* は既存の *Bcl-2* 阻害剤とは異なるメカニズムで *Bcl-2/Bcl-xL* の機能を阻害している可能性が示唆され、これらのタンパク質に関わる新たな制御機構を解析する上で有用なツールとなることを示している。

- 7) 小胞体ストレスによって誘導される *XBP1* の活性化阻害物質を微生物培養液中に探索し、*Streptomyces sp. AC654* 株培養上清より目的の活性を有する化合物を単離した。各種 NMR スペクトル解析及び理化学的性状から構造決定を行ったところ、本化合物はメチルチオベンゼネジオール構造を有する新規 *triene-ansamycin* 系化合物であることが判明し、*trierixin* と命名した。

本研究により見出された新規物質 *incednine* 及び *trierixin* は構造や生物活性が非常にユニークな化合物である。*Incednine* は、既存の *Bcl-2* 阻害剤とは異なるメカニズムで *Bcl-2/Bcl-xL* の機能を抑制することから、その標的タンパク質の同定が未だ不明な点の多い *Bcl-xL* のアポトーシス抑制機能の解析において有用であることは疑う余地はない。さらに *Bcl-xL* が過剰発現していない細胞では *Caspase* 依存的な細胞死を誘導する抗腫瘍剤が、*incednine* との併用では *Bcl-xL* 過剰発現細胞に対して *Caspase* 非依存的経路でアポトーシスを導いた点も非常に興味深い。がんでは *Bcl-2* 以外に *Caspase* や *Apaf-1* の発現異常などにより *Caspase* 依存経路に支障をきたしているケースが多々あり、この種のがん細胞に対しては *Apaf-1* や *Capase* を過剰発現させること⁷⁶、*Caspase* 阻害分子 *IAP* ファミリータンパク質の機能を阻害することによって抗腫瘍剤への感受性を増加させる検討が行われている⁷⁷。またこれらに加え、近年明らかになりつつあるミトコンドリアタンパク質の *AIF* や *EndoG*⁷⁸、リソソームプロテアーゼの *Cathepsin*⁷⁹ 等を介した *Caspase* 非依存的アポトーシスががん治療の新たな分子標的として注目されていることから、*incednine* 自身はもちろん、*incednine* を用いた *Caspase* 非依存経路の解析は創薬研究のニーズに応えうることが期待される。一方 *trierixin* は *XBP1* 阻害活性を阻害する初の小分子化合物である。既存の *triene-ansamycin* 系化合物は *pp60^{src}* のチロシンキナーゼ阻害活性 (*mycotrienin I & II*)⁸⁰ や *Ftase* 阻害活性 (*UCF116*)⁸¹、*NO* 産生阻害 (*trienomycin G*)⁸² や *EGFR* シグナル阻害活性 (*thiazinotrienomycin B*)⁸³ が報告されていたが、*triene-ansamycin* 系化合物の抗腫瘍活性との関連は不明

であった。また多くのがんでは小胞体ストレス応答が亢進し XBP1 が高度に活性化していること⁸⁴、trierixin の *in vitro* 抗腫瘍活性は XBP1 阻害活性と関連すること、さらに trienomycin A や mycotrienine II にも XBP1 阻害活性があること⁷³より triene-ansamycin 系化合物の抗腫瘍活性は XBP1 阻害に起因していることが推測される。今後 trierixin をバイオプローブとしたケミカルジェネティクス研究は不明な点の多い XBP1 の機能を明らかにするのみならず、triene-ansamycin 系化合物の抗腫瘍活性の詳細を明らかにすることが期待され、治療が困難な固形がん治療への応用が期待される。

Incednine については既にビオチン標識体の合成を完了しており、その標的タンパク質の同定を始めている。Trierixin は他の triene-ansamycin 系化合物を用いた構造活性相関や小胞体ストレス応答に与える影響の検討が進められている。今後、これらの化合物を用いたケミカルバイオロジー研究が新たな生命現象の解明に寄与するだけでなく、ポスト Greevec たる夢の新薬開発へとつながることを願ってやまない。

第6章 実験の部

Chemistry

諸事項

第2章で取り上げた *incednine* を含む関連化合物の機器分析には、断りのない限り以下の装置を用いた。

- ・融点 (m.p.)

Yanagimoto micromelting point apparatus を用いて測定した。但し、融点の補正は行っていない。

- ・比旋光度 ($[\alpha]_D^{20}$)

ナトリウム D 線を光源とし、JASCO P-1030 polarimeter を使用した。マイクロセル (光路長 10 cm)、20°C で測定した。

- ・IR スペクトル

Horiba FT-210 spectrometer を用い、臭化カリ錠剤法にて測定した。

- ・UV スペクトル

Hitachi U-2800 spectrophotometer を用い、メタノール中で測定した。

- ・CD スペクトル

JASCO J-720 CD spectropolarimeter を用い、メタノール中で測定した。

- ・ESI-MS スペクトル、高分解能 ESI-MS スペクトル (HRESI-MS)

Thermo Fisher SCIENTIFIC LTQ Orbitrap mass spectrometer を用いた。

- ・NMR スペクトル

各種 NMR スペクトルは内部標準にはテトラメチルシラン (TMS) を用い、JEOL JMN-ECA600 spectrometer を用いて測定した。

- ・X 線構造解析

Rigaku R-Axis RAPID II imaging plate area detector を用いて測定した。

- ・シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

Silica gel 60 F254 プレート (Merck) を用いた。検出には UV ランプ (254 nm, 366 nm) あるいはリンモリブテン酸 (モリブデン酸ナトリウム 12 g、 H_3PO_4 1.5 ml、 H_2SO_4 25ml、 H_2O 500ml)、GL 試薬による発色を用いた。

- ・遠心液々分配クロマトグラフィー (CPC)

CPC は Sanki engineering CPC-B29 を用いた。必要に応じてカートリッジを 1000E × 6 (440 ml 容) もしくは 250W × 6 (125 ml 容) に交換した。

なお、第 4 章で取り上げた trierixin の機器分析のうち、融点、比旋光度、IR、UV は上記の装置を用いて測定した。各種 NMR 及び MS スペクトルの測定は以下の装置を用いた。

- ・ MS スペクトル

JEOL JMS-T100LC mass spectrometer を用いた。

- ・ NMR スペクトル

各種 NMR は内部標準にはテトラメチルシラン (TMS) を用い、クロロホルム- d_1 中で JEOL JMN-AL-300 spectrometer を用いて測定した。

また、合成反応は特に記載のない限りアルゴン雰囲気下で行った。

第1節 新規 Bcl-xL 機能阻害剤の探索及び incednine の生産

第1項 スクリーニングサンプルの調整

微生物化学研究センターより供与された微生物培養液 1.5 ml を 100°C で 5 分煮沸処理し、そのうち 500 μ l を 1.5 ml マイクロテストチューブにとり、等量のブタノールを加えて 30 秒間激しく攪拌した。13000 rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、有機層 400 μ l をとり、減圧乾固した。これを 200 μ l のメタノールに溶解し（この濃度を×1 とする）、スクリーニングサンプルとして用いた。

第2項 incednine 生産菌の同定

ML694-90F3 株の形態は走査型電子顕微鏡 S-570 (Hitachi) を用いて観察した。各種培地上での生育状態及び生理的性質は、Shirling と Gottlieb⁸⁵、あるいは Waksman⁸⁶ の方法で行った。細胞壁に含まれる 2,6-ジアミノピメリン酸の光学異性の判定には Becker らの方法⁸⁷により実施した。

第3項 incednine の発酵生産

種母培地としてデキストリン 2.0%、ガラクトース 2.0%、バクトソイトン (DIFCO) 1.0%、コーンステープリカー (Iwaki) 0.5%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%を含む培地 (pH 7.4) を 110 ml ずつ分注した 500 ml 容 Erlenmeyer フラスコを用意し、120°C で 20 分間高压滅菌した。この培地に寒天斜面培地で培養した *Streptomyces* sp. ML694-90F3 株を一白菌耳接種し、27°C で 180 rpm/min で 3 日間振盪培養した。このようにして得られた種母培養液を 55 種の培地にそれぞれ 2 ml ずつ接種し、27°C、180 rpm/min で振盪培養した。Incednine の生産量は HPLC を用いて測定した。生産菌 4 日間培養液 500 μ l を pH3 で等量のクロロホルムで抽出した後、水層を pH9 に調整し、クロロホルム:メタノール=5:1 混液で転溶した。得られた有機層 10 μ l はメタノール:40mM リン酸二水素カリウム水溶液=60:40 を移動層とした HPLC (PEGASIL ODS カラム 4.6 ϕ ×150 mm, Senshu) で分析を行い、Rt=9.3 min のピークの 322 nm での吸光度をもとに incednine の生産量を検量した。

第2節 incednine の単離精製

生産菌培養液 (100 L) を pH9 に調整後、5 kg の硫酸ナトリウムを加え 10°C で数日静置した。培養液 25 L につきハイフロスーパーセル 1 kg を用いた濾過により菌体を含む沈殿物を回収した。この沈殿物をクロロホルム:メタノール =1:1 (40 L) で抽出、濾過により得られた濾液 (40 L) を濃縮乾固した。得られた抽出物はクロロホルム:メタノール:水=5:6:4 (1.6 L) の二層系に溶解し、分配した。この有機層 (640 ml) のうち 1/8 量にあたる 80 ml 分をクロロホルム:メタノール:水=5:6:4 系の下降法にて CPC (1st CPC、カートリッジ 1000E×6、流速 10 ml/min、回転数 500 rpm) を行い、正溶出の脂溶性画分として得られた活性画分を濃縮乾固し黄色粗粉末 (1.47 g) を得た。次にこの粗粉末をクロロホルム:メタノール:1 mM 塩酸水=5:6:4 系の上昇法にて CPC (2nd CPC、カートリッジ 1000E×6、流速 10 ml/min、回転数 500 rpm) を行った。溶出液を 15 ml ずつ 40 本分画後、incednine の分子量 (m/z 738) でモニターした MS クロマトグラフィーを行い、incednine を高純度を含む画分を集め、236.2 mg の薄黄色粉末を得た。残りの 7/8 量の有機層についても同様の操作を行い、合計 1.89 g の incednine を得た。

外観 ;	薄黄色粉末
m.p. ;	121-122 °C
$[\alpha]_D^{20}$;	-702.3° (c 0.2, MeOH)
molecular formula ;	$C_{42}H_{63}N_3O_8 \cdot 2HCl$
HRESI-MS m/z ;	found: 738.4691 (M+H) ⁺ calcd for $C_{42}H_{64}N_3O_8$: 738.4688
UV スペクトル ;	本文 Figure 2-1(a)に示す
UV/VIS (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) ;	356.0 (4.64), 322.5 (5.38), 309.5 (5.23), 294.5 (4.88)
IR スペクトル ;	本文 Figure 2-1(b)に示す。
IR (KBr) ν cm^{-1} ;	3440, 2980, 2930, 1650, 1620, 1580, 1510, 1460, 1160, 1080, 990, 960
CD スペクトル ;	本文 Figure 2-14 に示す。
NMR 帰属 ;	本文 Table 2-2 に示す。

^1H -NMR スペクトル ;	本文 Figure 2-2 に示す。
^{13}C -NMR スペクトル ;	本文 Figure 2-3 に示す。
DEPT スペクトル ;	本文 Figure 2-4 に示す。
HMQC スペクトル ;	Figure 6-1 に示す。
^1H - ^1H COSY スペクトル ;	Figure 6-2 に示す。
HMBC スペクトル ;	Figure 6-3 に示す。
TOCSY スペクトル ;	Figure 6-4 に示す。
^1H - ^1H <i>J</i> resolved スペクトル ;	本文 Figure 2-10 に示す。
NOESY スペクトル ;	Figure 6-5 に示す。

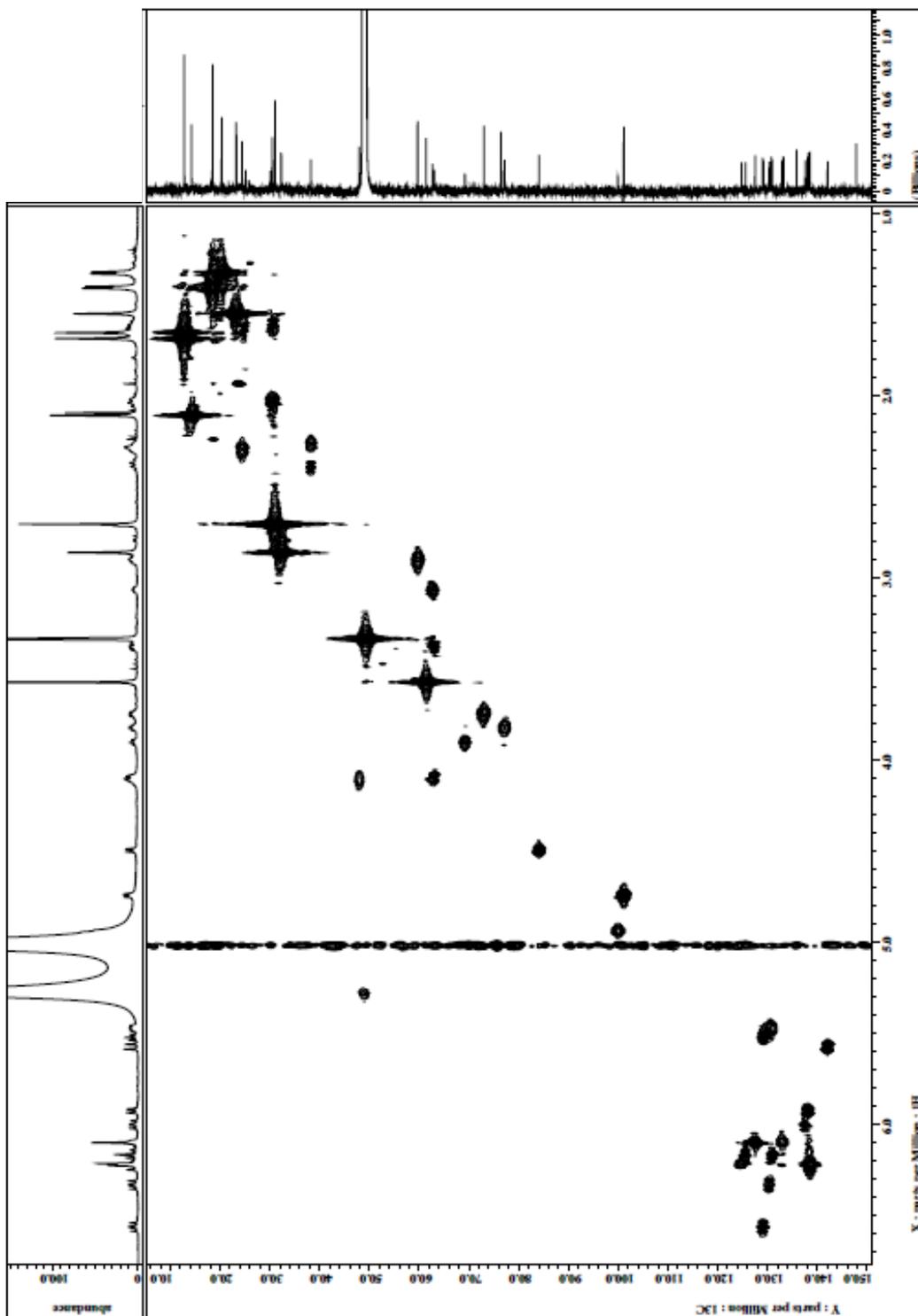


Figure 6-1 HMQC spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1)

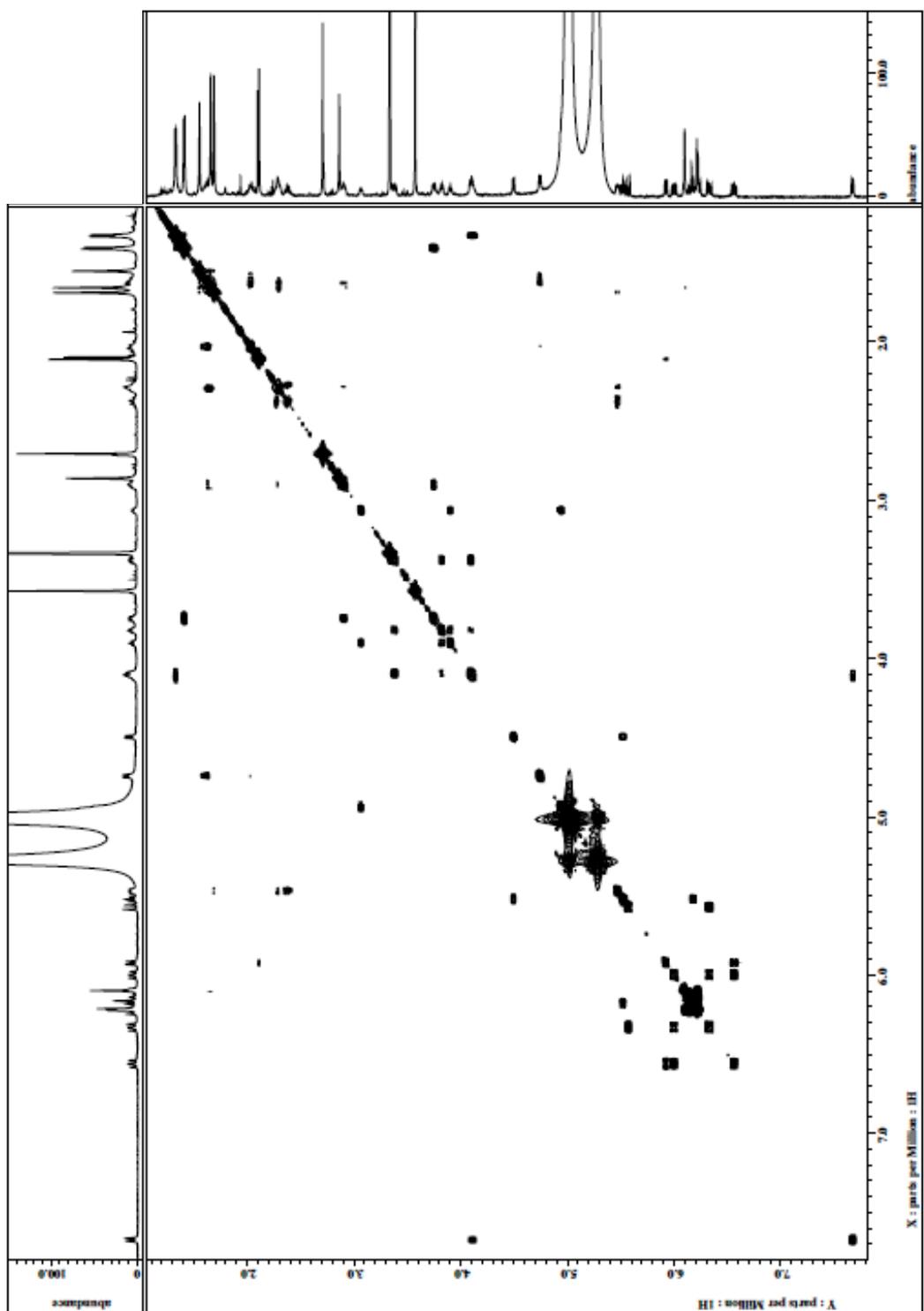


Figure 6-2 ^1H - ^1H COSY spectrum of incednine·2HCl in $\text{CD}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1)

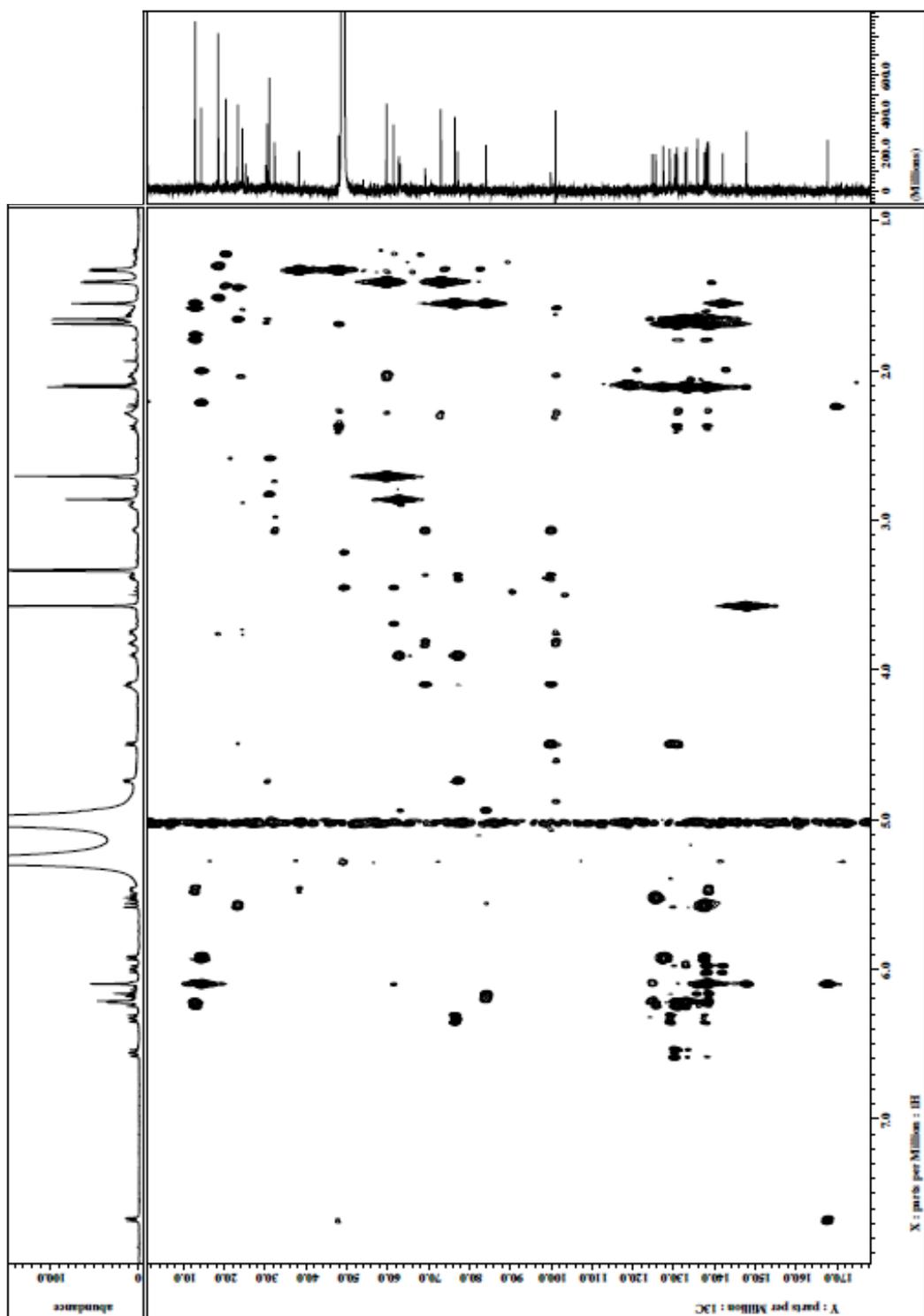


Figure 6-3 HMBC spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1)

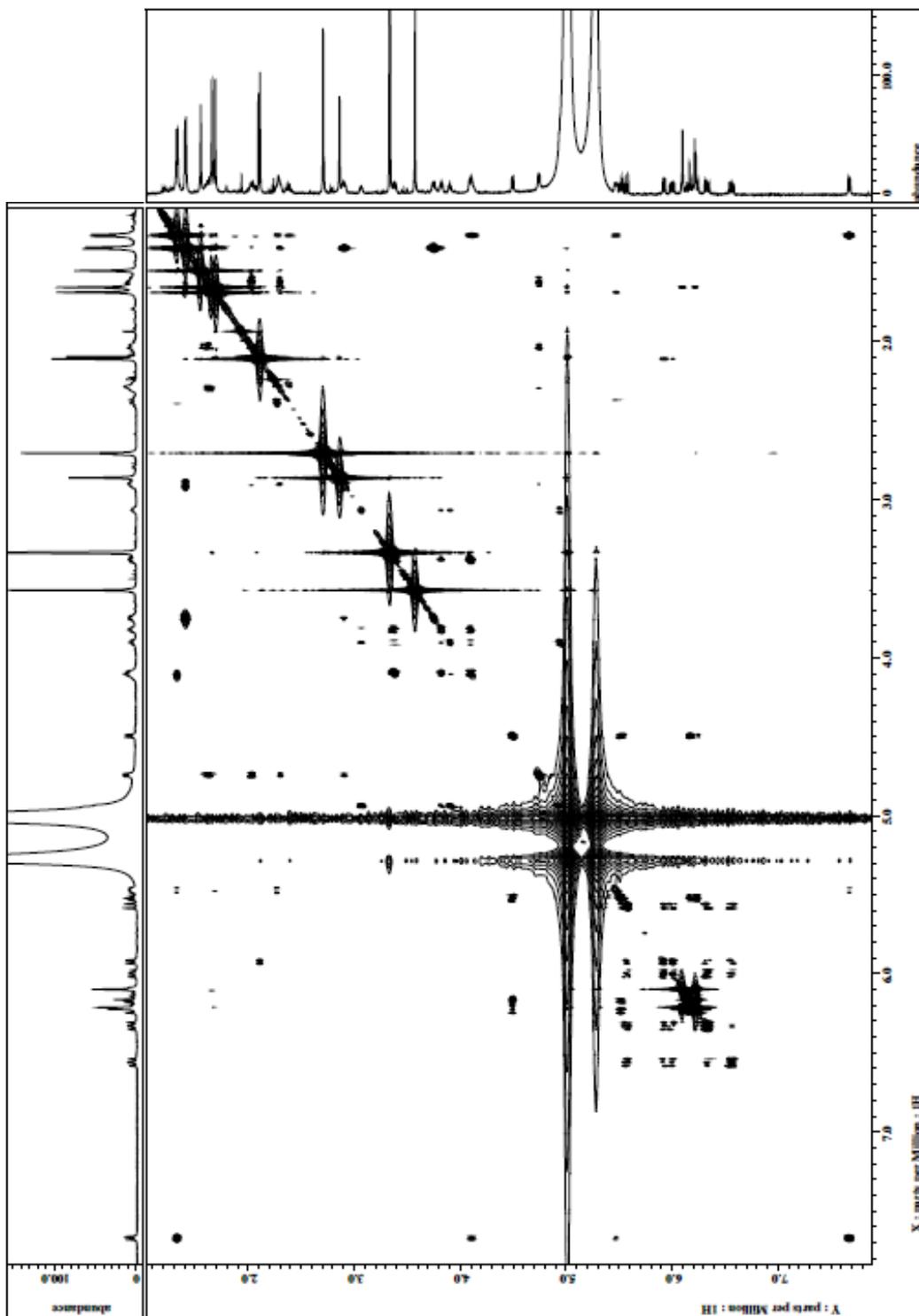


Figure 6-4 2D TOCSY spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1)

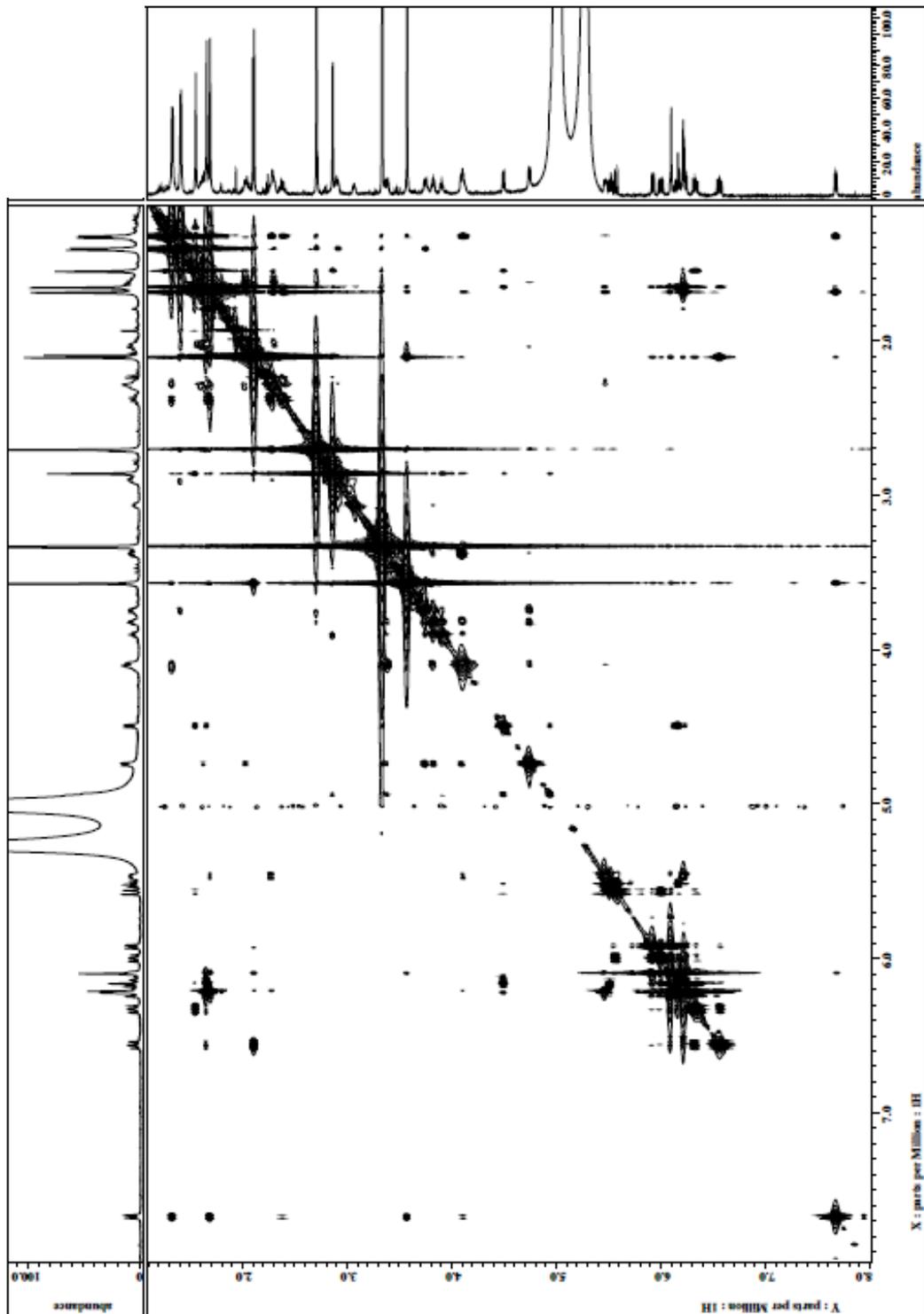


Figure 6-5 NOESY spectrum of incednine·2HCl in CD₃OH:H₂O (3:1)

第3節 incednine アグリコンに関する実験

第1項 LC-MS 解析

Incednine 生産菌培養液中に incednine のアグリコンが存在しているかを調べる目的で、培養液より得られたクロロホルム-メタノール抽出物の 10 倍希釈液 10 μ l について LC-MS 解析を行った。メタノール : 5 mM 炭酸アンモニア水溶液 = 70:30 を移動層とした LC (MG カラム 2.1 ϕ \times 75 mm, Shiseido) で、検出は MS と PhotoDiodeArray (PDA) で行った。Rt 11.5 min に incednine、Rt 5.54 min に incednine アグリコンの分子量に一致するピークをそれぞれ得た。

第2項 incednine アグリコンの単離精製

Incednine の単離精製過程である 2nd CPC の反転溶出画分 (脂溶性画分) を飽和重曹水で中和した。有機層を水洗した後、減圧下濃縮した。得られた残渣 (1.16 g) を少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルム-メタノール系でのシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。クロロホルムで洗浄後、クロロホルム-メタノール (100:1) で溶出された画分を減圧下乾固し、黄色粉末を得た。この粉末をトルエン-アセトン (10:1) 混液で洗浄し、不溶画分に incednine アグリコン 18.1 mg を純粋な薄黄色粉末として得た。この操作を 7 回繰り返し、合計 156.0 mg の incednine アグリコンを得た。

外観 ;	薄黄色粉末
$[\alpha]_D^{20}$;	-1616.7° (c0.1, CHCl ₃)
molecular formula ;	C ₂₉ H ₃₉ NO ₄
HRESI-MS <i>m/z</i> ;	found: 488.2762 (M+Na) ⁺ calcd for C ₂₉ H ₃₉ NO ₄ Na: 488.2771
UV/VIS (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) ;	358.0 (4.66), 322.0 (5.43), 309.0 (5.28), 294.5 (4.94)
CD スペクトル ;	本文 Figure 2-14 に示す。
NMR 帰属 ;	本文 Table 2-4 に示す。
¹ H-NMR スペクトル ;	Figure 6-6 に示す。

^{13}C -NMR スペクトル ;	Figure 6-7 に示す。
HSQC スペクトル ;	Figure 6-8 に示す。
^1H - ^1H COSY スペクトル ;	Figure 6-9 に示す。
HMBC スペクトル ;	Figure 6-10 に示す。

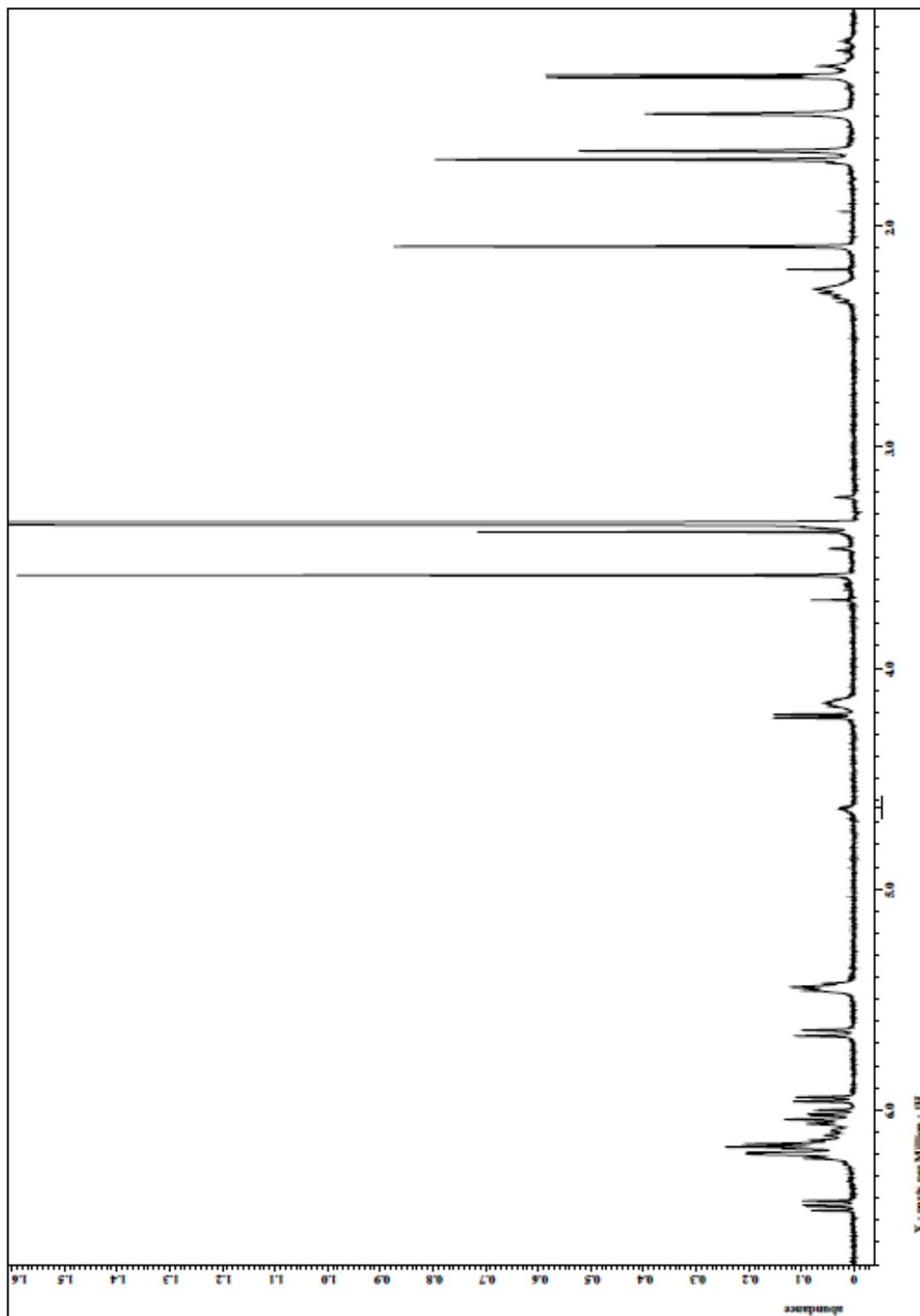


Figure 6-6 ^1H NMR spectrum of incednine aglycon in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1)

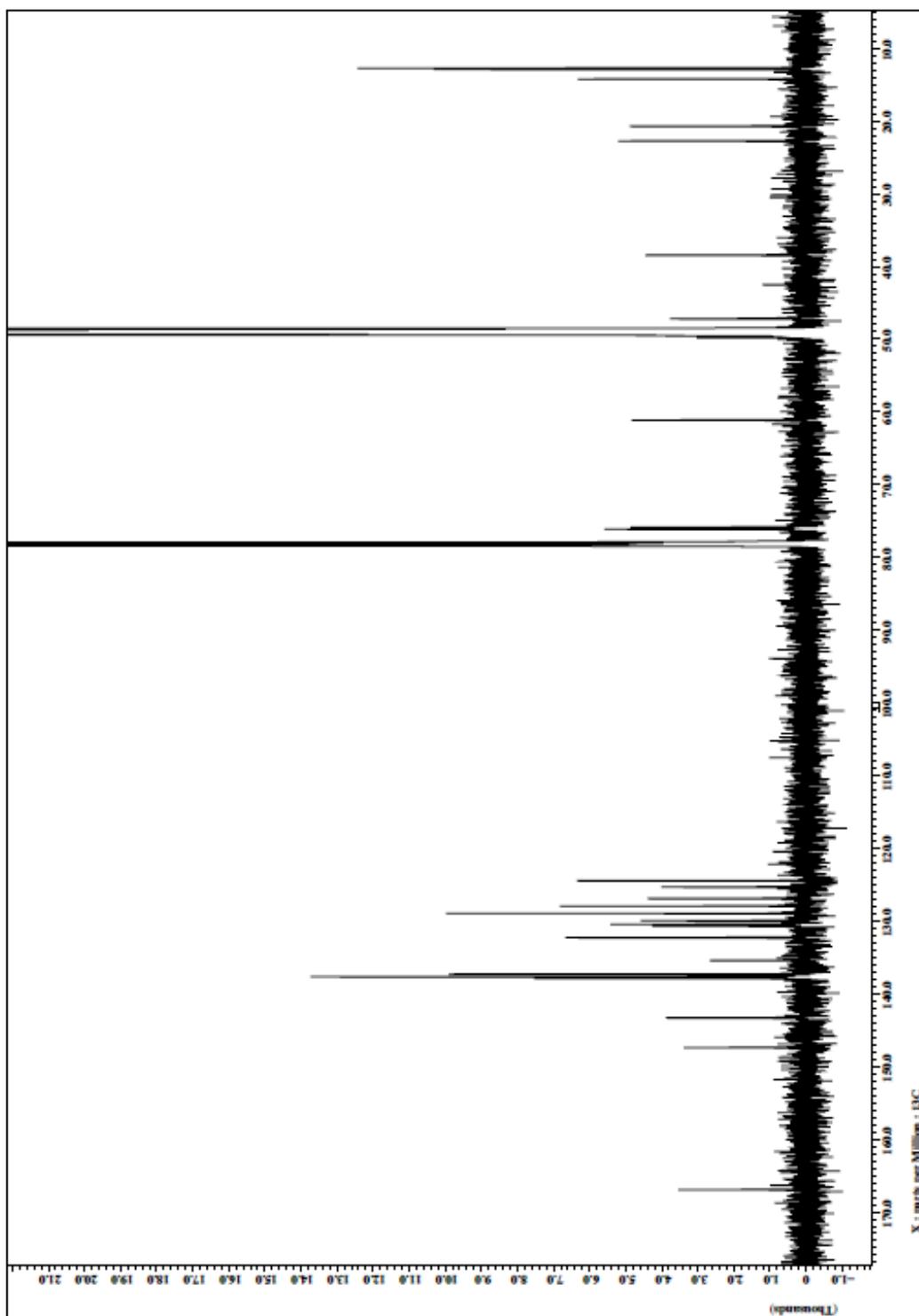


Figure 6-7 ^{13}C NMR spectrum of incednine aglycon in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1)

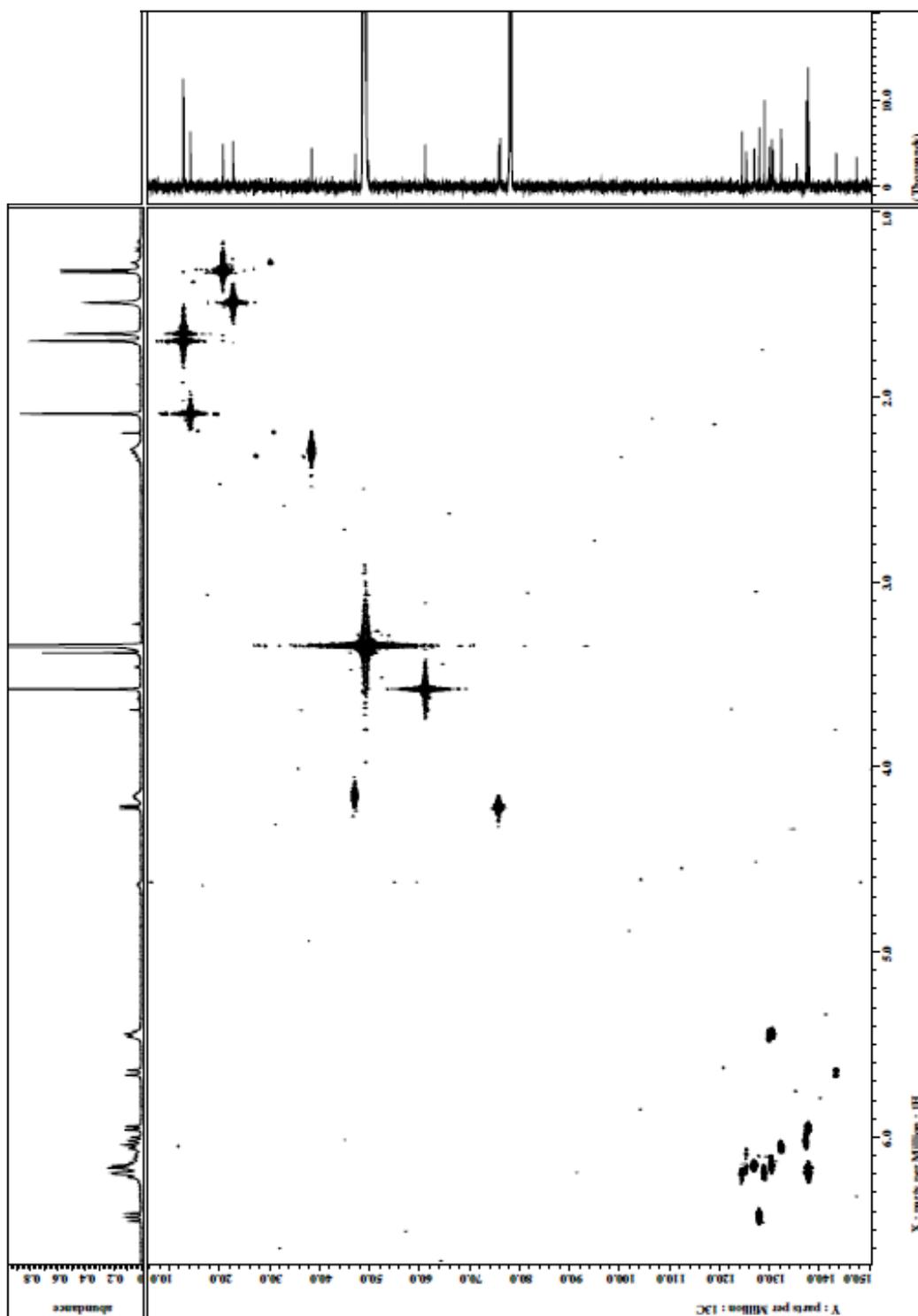


Figure 6-8 ^1H - ^1H COSY spectrum of incednine aglycon in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1)

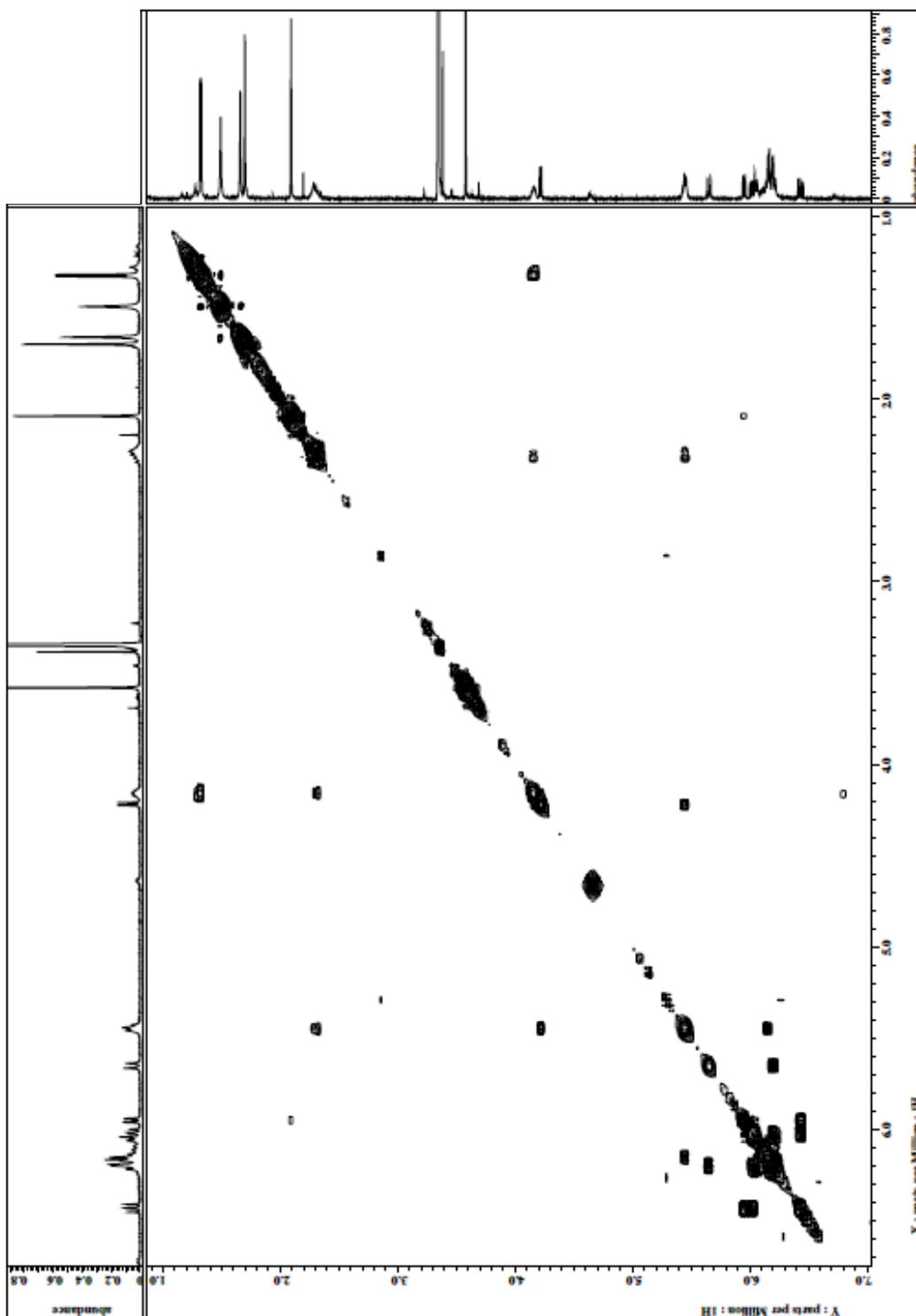


Figure 6-9 HSQC spectrum of incednine aglycon in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1)

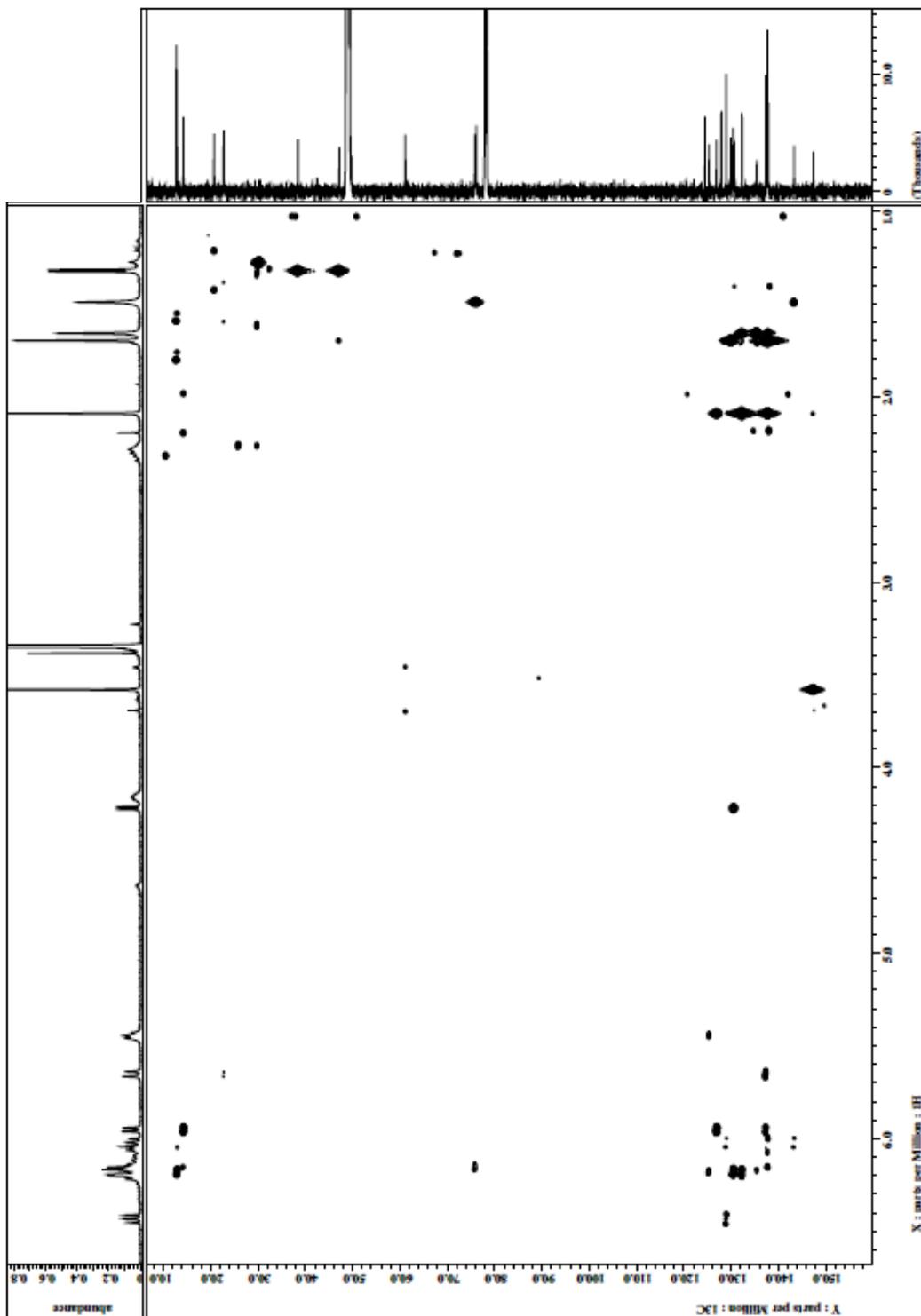


Figure 6-10 HMBC spectrum of incednine aglycon in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1)

第4節 incednine アグリコンの 11-*O*-MTPA エステル体の合成

インセドニンアグリコン (10.0 mg, 0.02 mmol) を無水ピリジン 1 ml に溶解し、(+)-MTPA-Cl (40 μ l, 0.24 mmol) を加え室温で 4 時間静置した。氷冷下 10 μ l の水を滴下し反応を止めた。この反応液を減圧下濃縮した。得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン:アセトン=10:1) で精製し、13.7 mg のアグリコン *R*-MTPA エステル体を得た (収率 92.4%)。 *S*-MTPA エステル体はアグリコン 10.0 mg と(-)-MTPA-Cl 40 μ l を用いて上記と同様の方法にて合成、精製し 12.9 mg を薄黄色粉末として得た (収率 86.9%)。

R-MTPA エステル体

外観 ;	薄黄色粉末
$[\alpha]_D^{20}$;	-719.5° (c 0.2, CHCl ₃)
molecular formula ;	C ₃₉ H ₄₆ NO ₆ F ₃
HRESI-MS m/z ;	found: 704.3169 (M+Na) ⁺ calcd for C ₃₉ H ₄₆ NO ₆ F ₃ Na: 704.3169
NMR 帰属 ;	本文 Table 2-4 に示す。
¹ H-NMR スペクトル ;	Figure 6-11 に示す。
¹³ C-NMR スペクトル ;	Figure 6-12 に示す。
DEPT スペクトル ;	Figure 6-13 に示す。
HSQC スペクトル ;	Figure 6-14 に示す。
¹ H- ¹ H COSY スペクトル ;	Figure 6-15 に示す。
HMBC スペクトル ;	Figure 6-16 に示す。

S-MTPA エステル体

外観 ;	薄黄色粉末
$[\alpha]_D^{20}$;	-886.9° (c 0.2, CHCl ₃)
molecular formula ;	C ₃₉ H ₄₆ NO ₆ F ₃
HRESI-MS m/z ;	found: 704.3162 (M+Na) ⁺ Calcd for C ₃₉ H ₄₆ NO ₆ F ₃ Na: 704.3169

NMR 帰属 ;	本文 Table 2-4 に示す。
^1H -NMR スペクトル ;	Figure 6-17 に示す。
^{13}C -NMR スペクトル ;	Figure 6-18 に示す。
DEPT スペクトル ;	Figure 6-19 に示す。
HSQC スペクトル ;	Figure 6-20 に示す。
^1H - ^1H COSY スペクトル ;	Figure 6-21 に示す。
HMBC スペクトル ;	Figure 6-22 に示す。

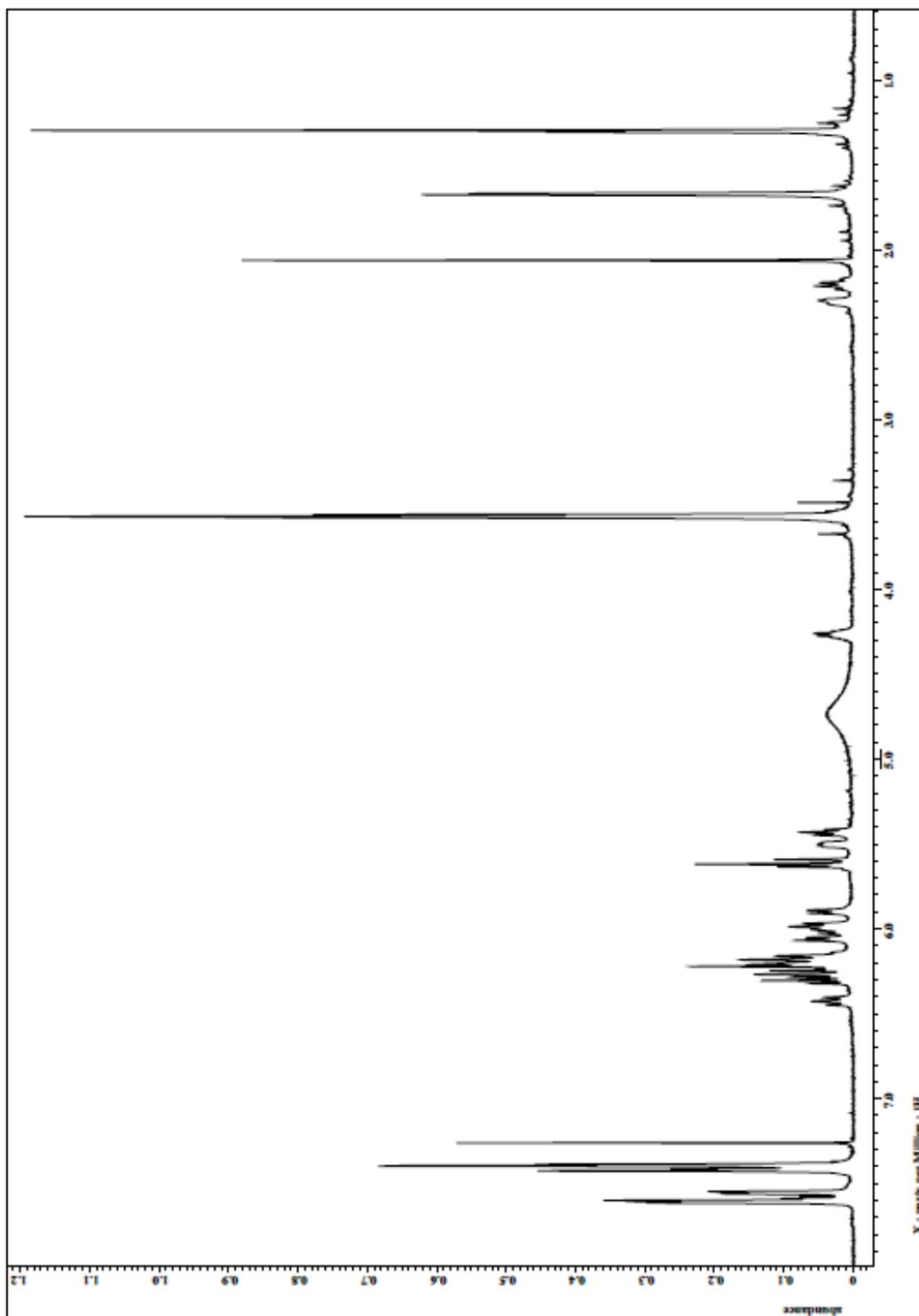


Figure 6-11 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

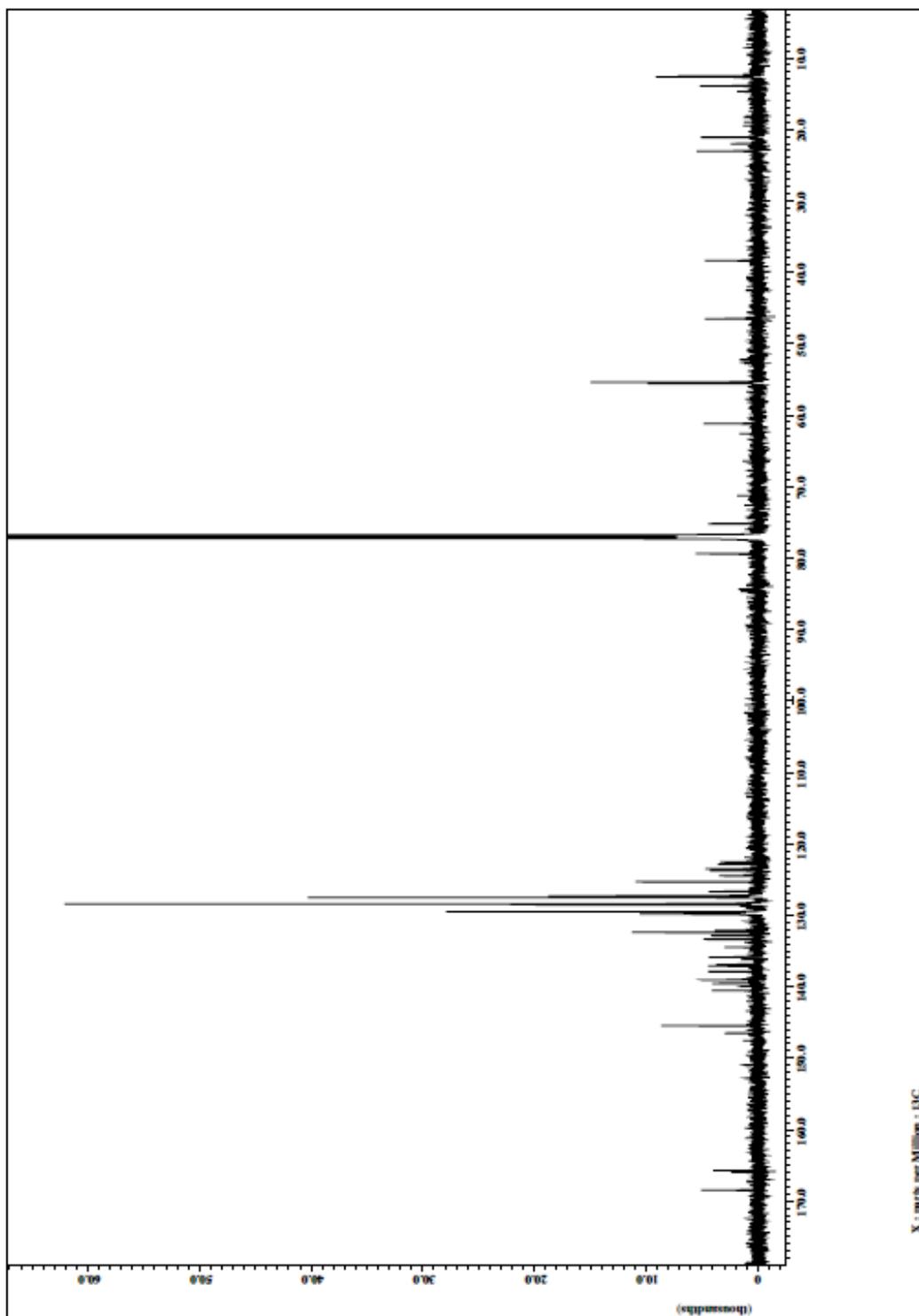


Figure 6-12 ^{13}C -NMR spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

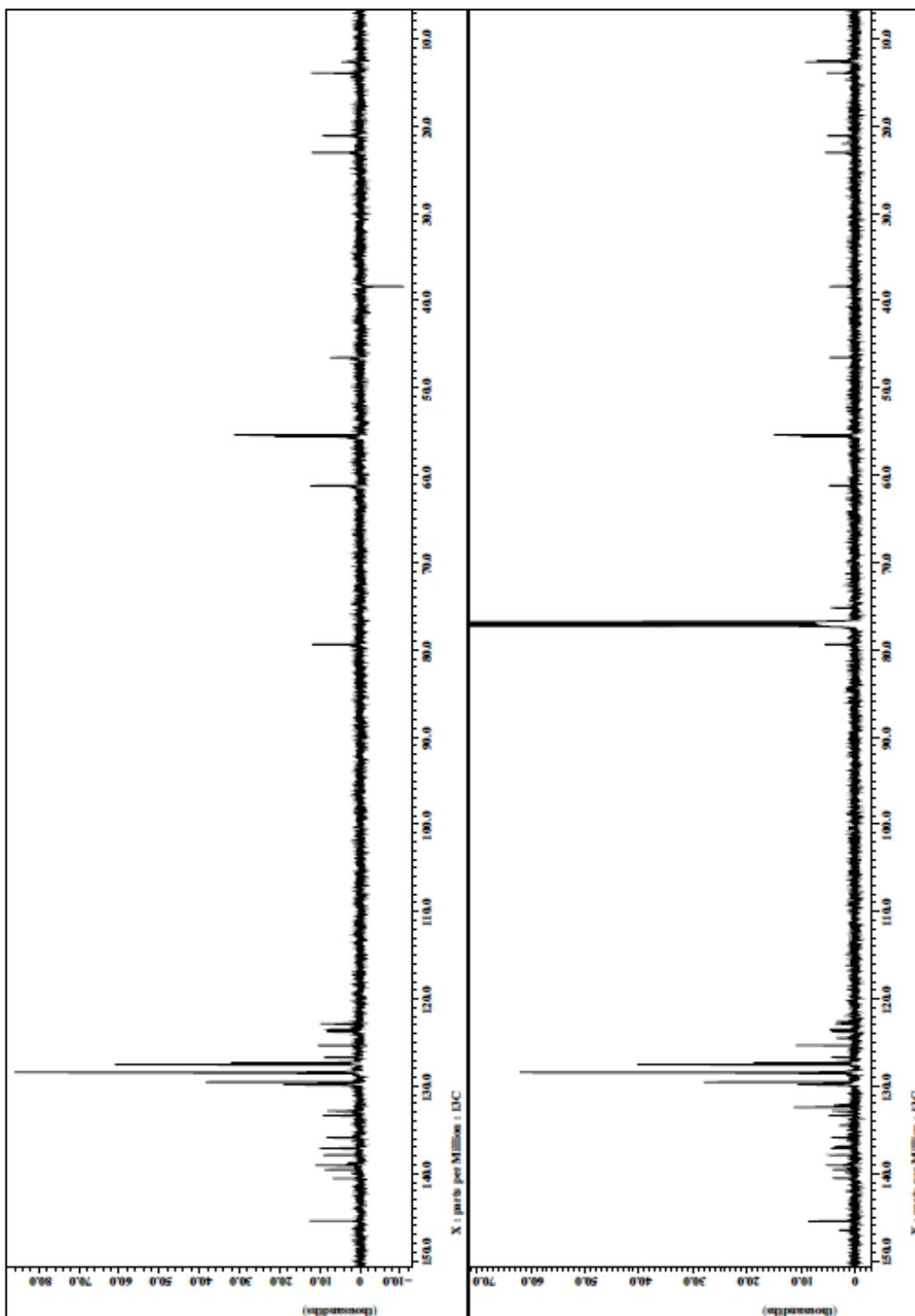


Figure 6-13 DEPT spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

(Left panel) DEPT spectra of *R*-MTPA ester of aglycon, (right panel) ^{13}C -NMR spectra of *R*-MTPA ester of aglycon

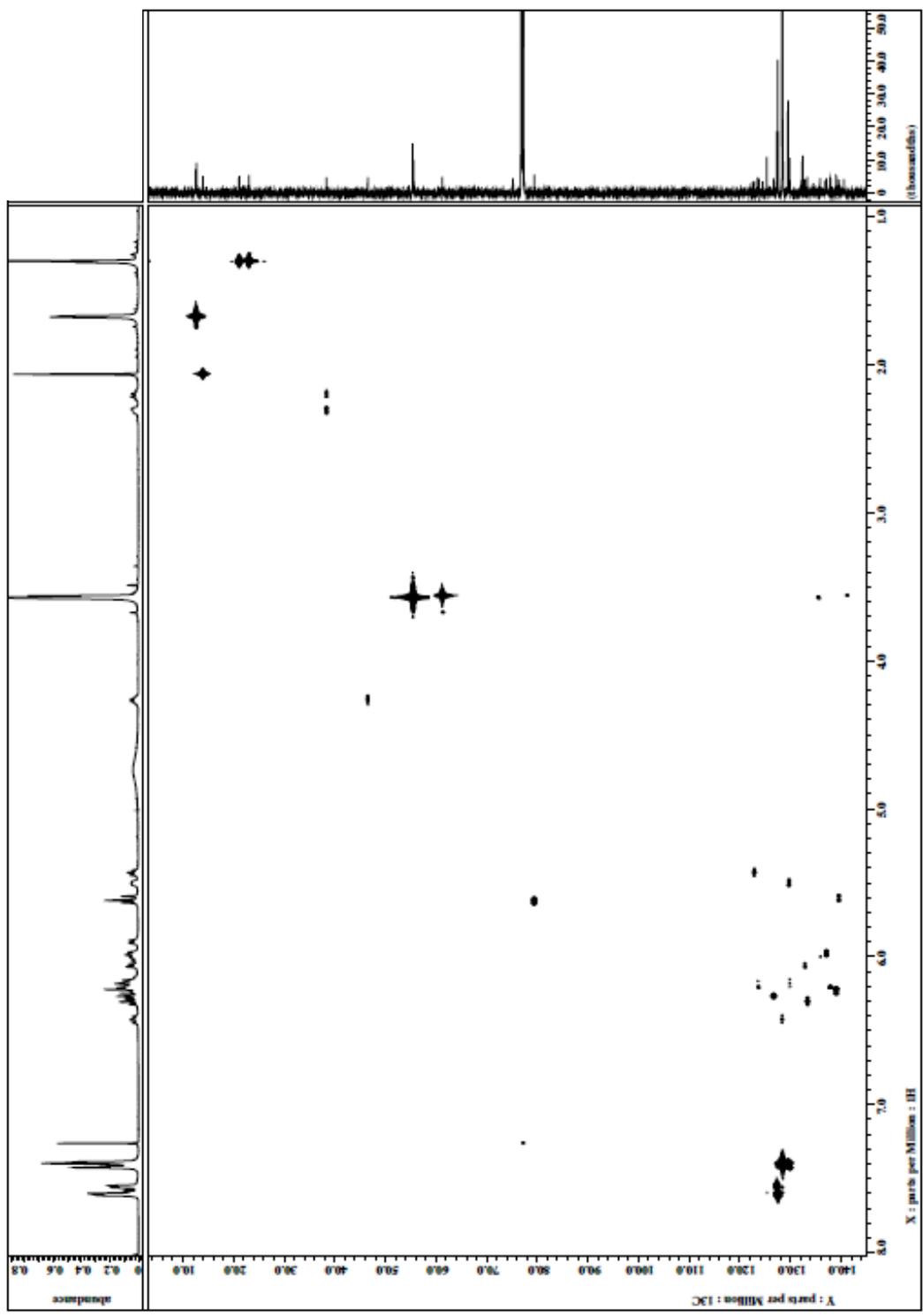


Figure 6-14 HSQC spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon in CDCl₃

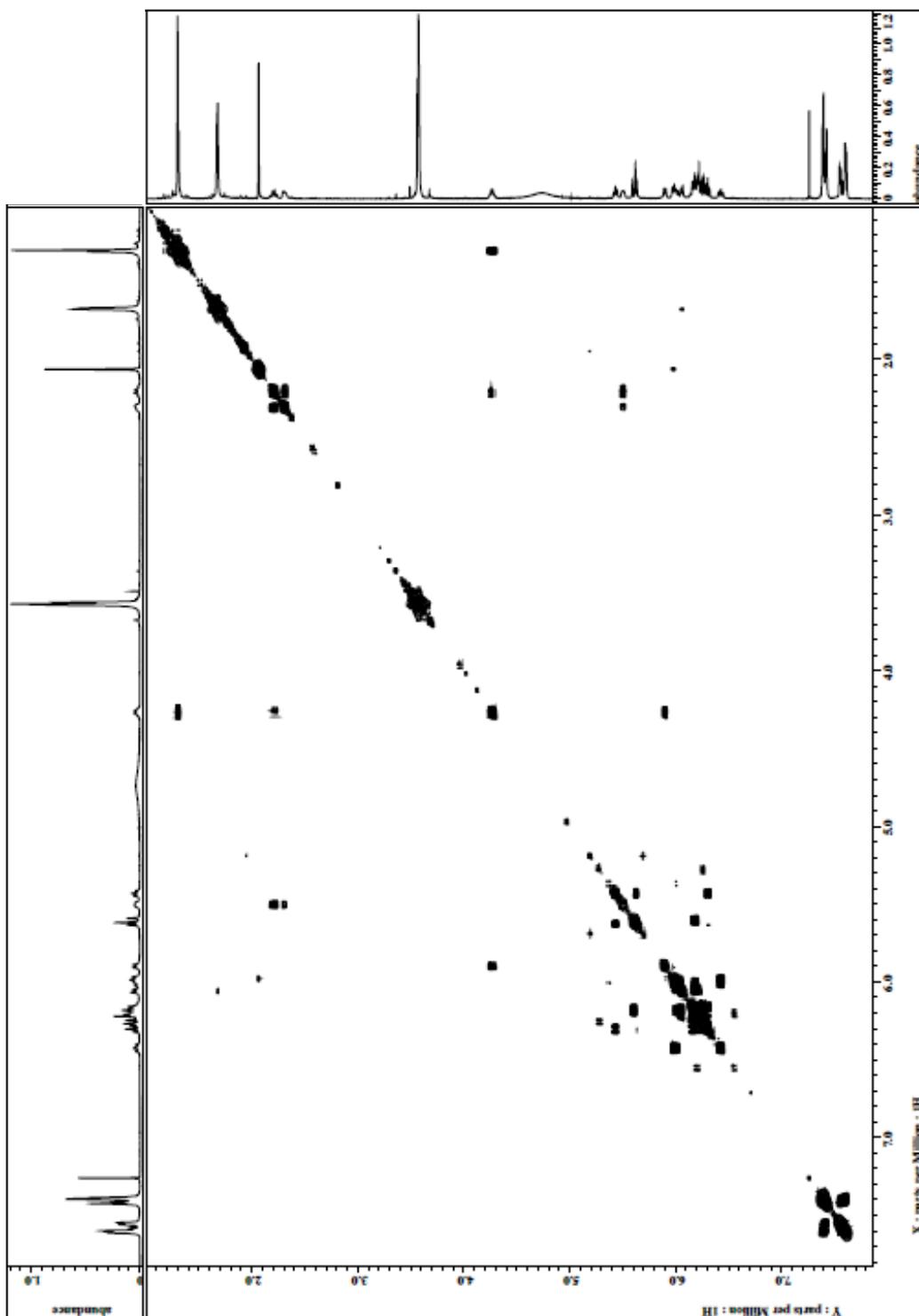


Figure 6-15 ^1H - ^1H COSY spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

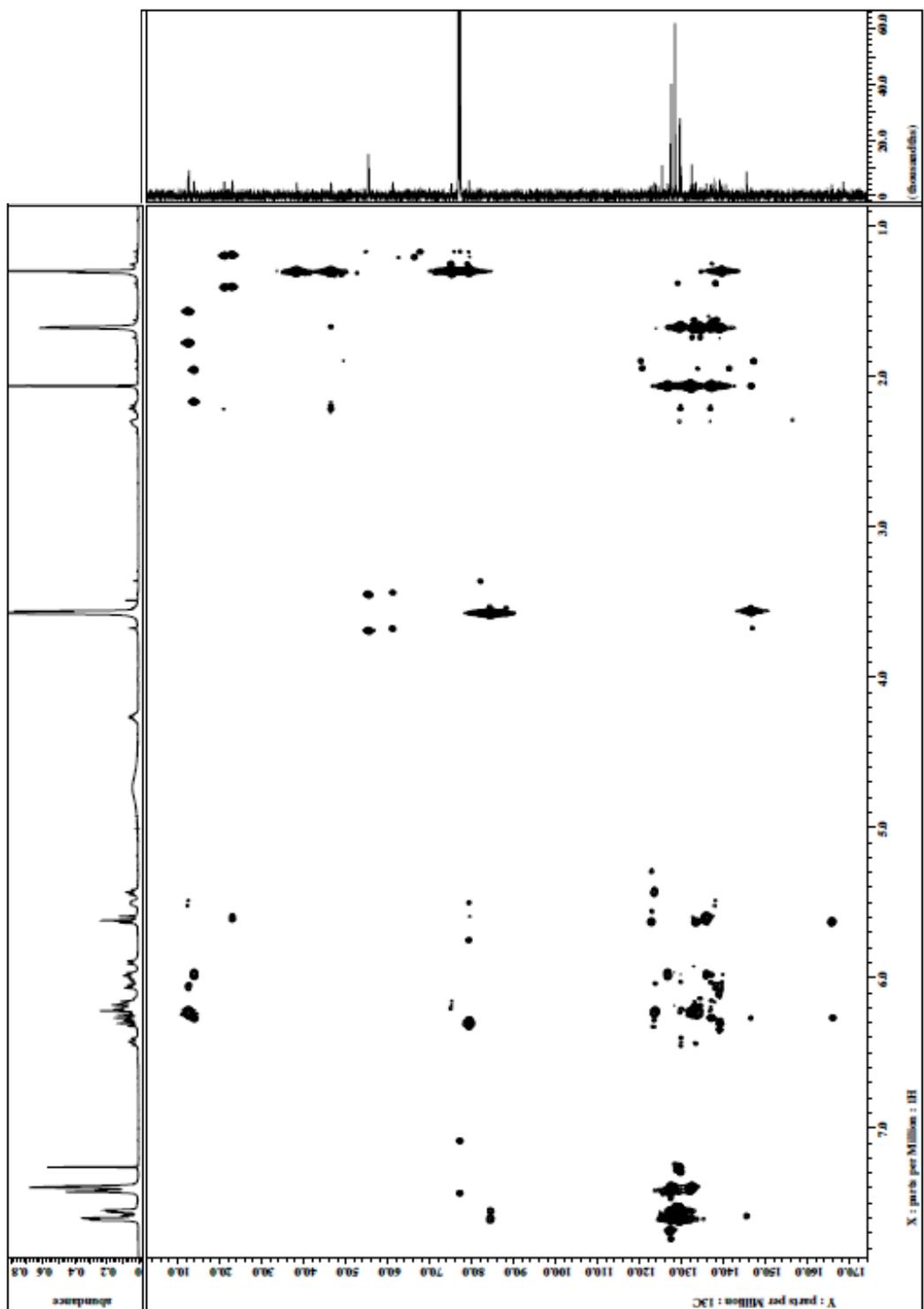


Figure 6-16 HMBC spectrum of *R*-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

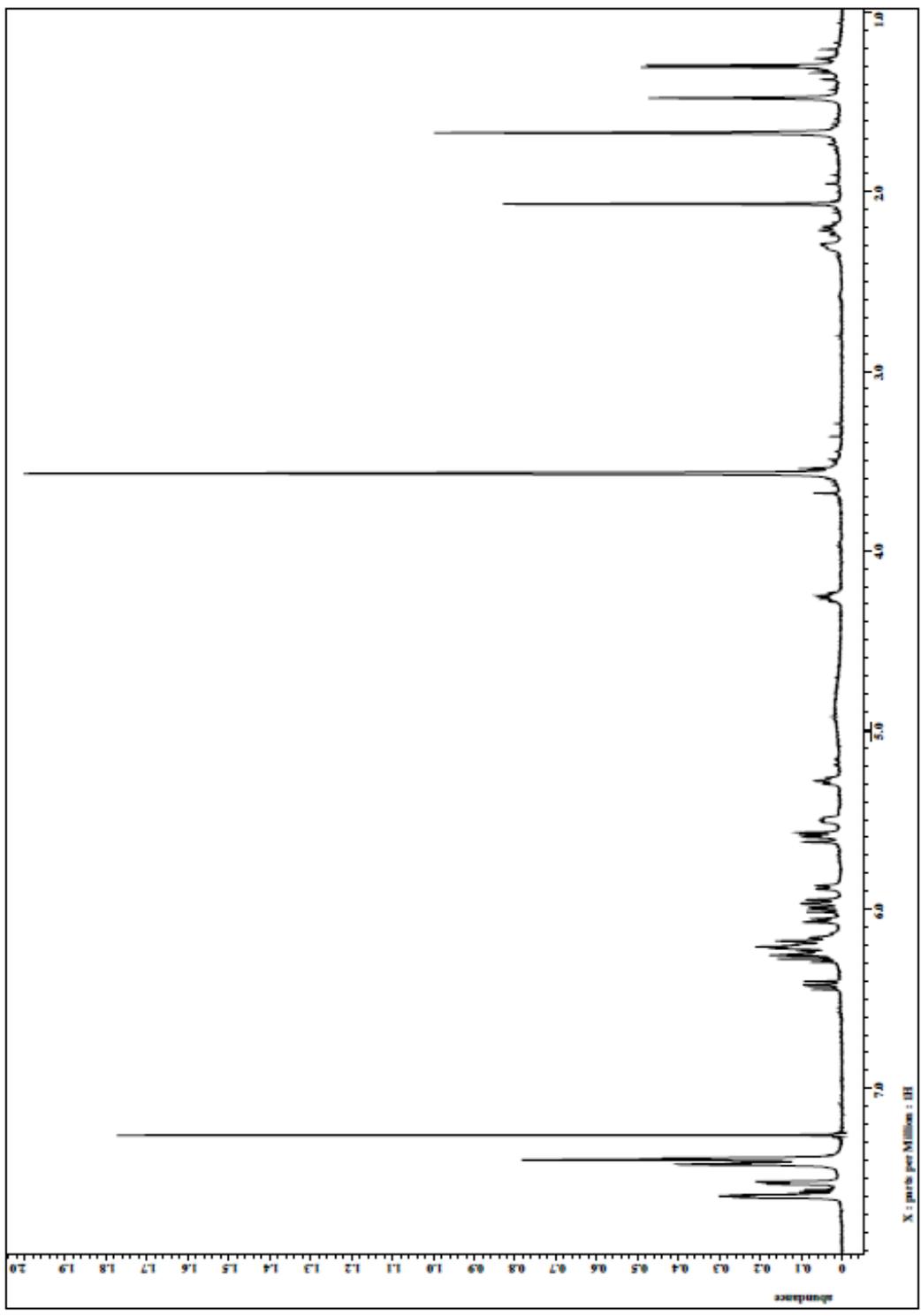


Figure 6-17 ¹H-NMR spectrum of S-MTPA ester of aglycon in CDCl₃

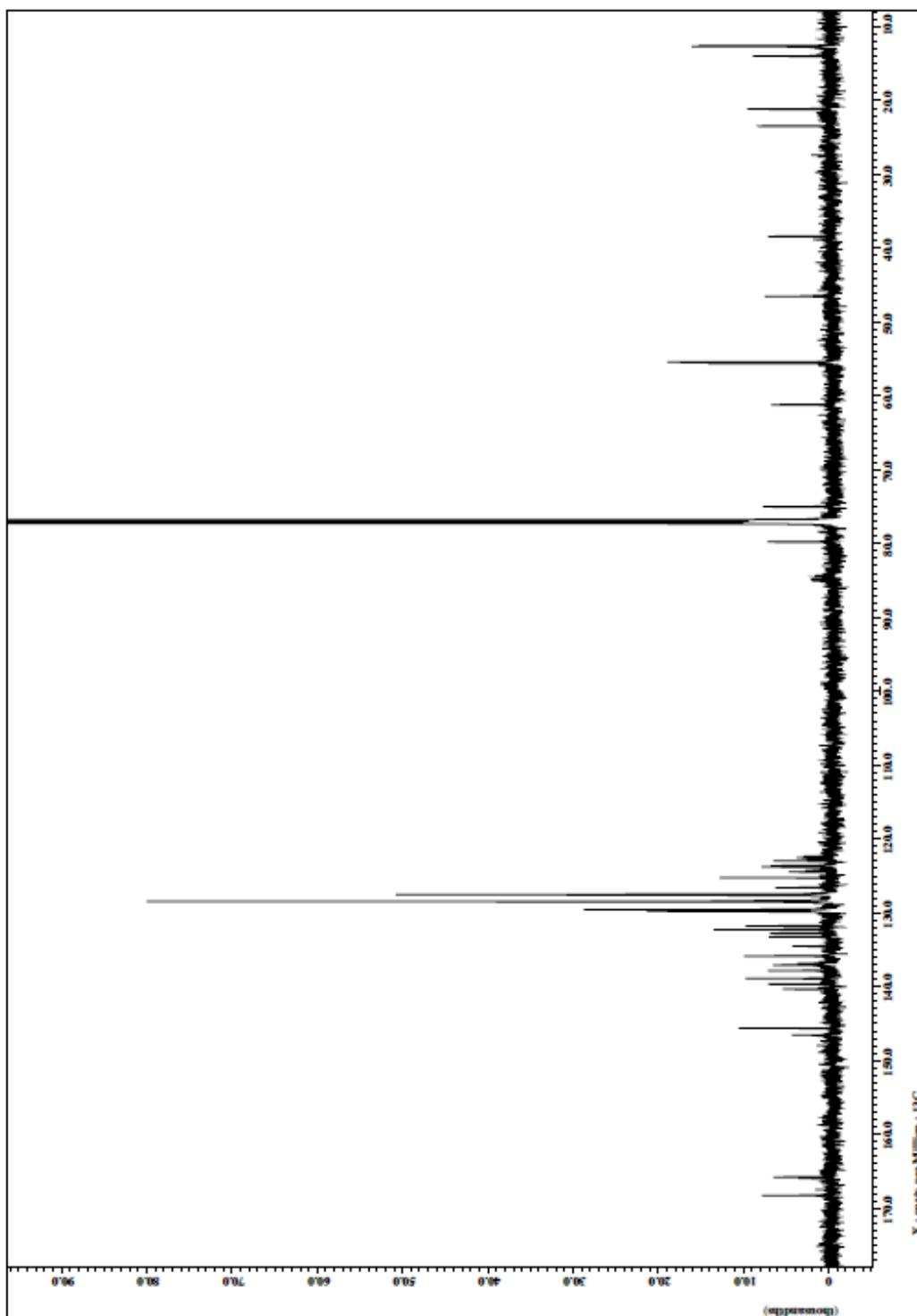


Figure 6-18 ^{13}C -NMR spectrum of S-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

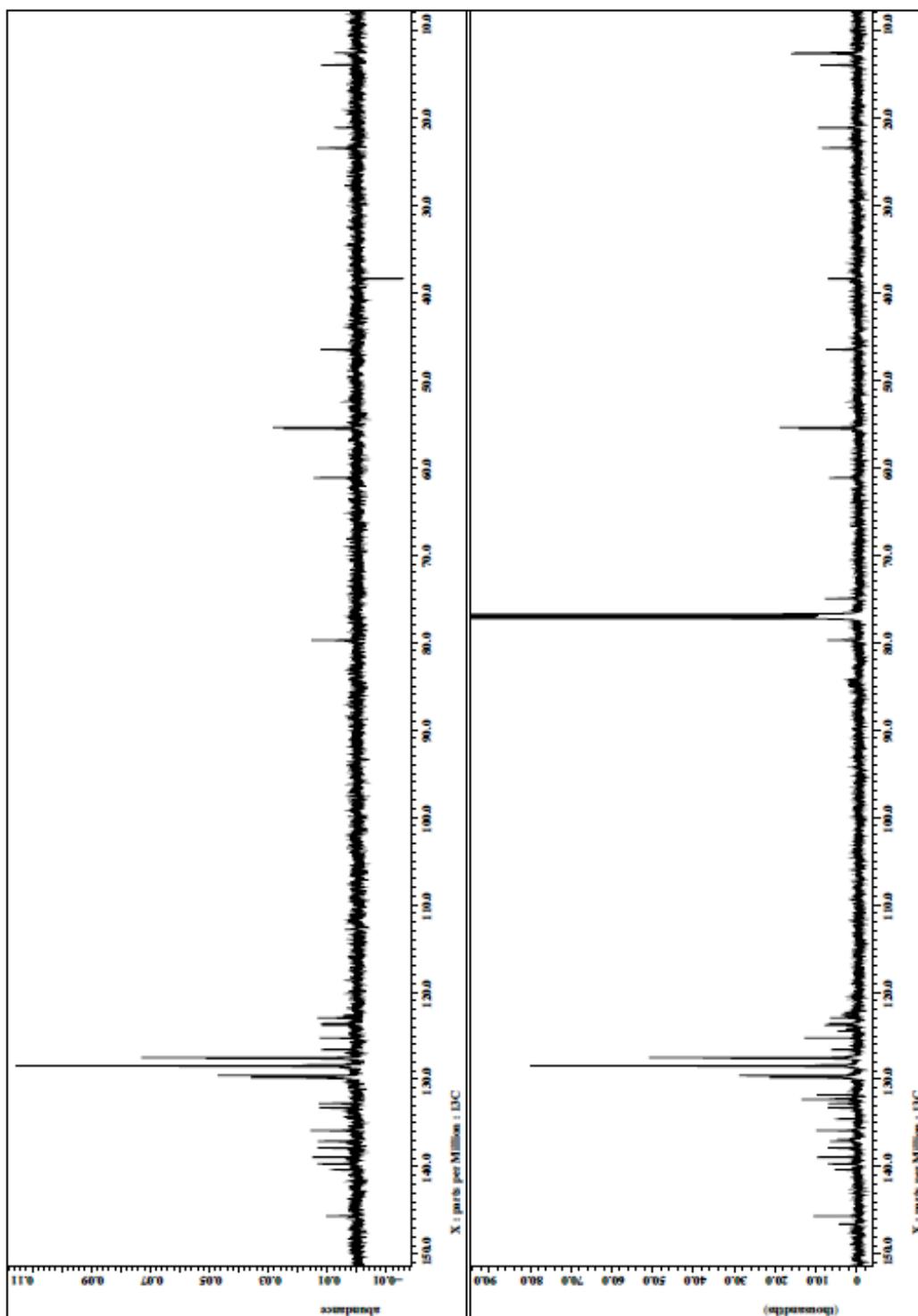


Figure 6-19 DEPT spectrum of S-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

(Left panel) DEPT spectra of S-MTPA ester of aglycon, (right panel) ^{13}C -NMR spectra of S-MTPA ester of aglycon

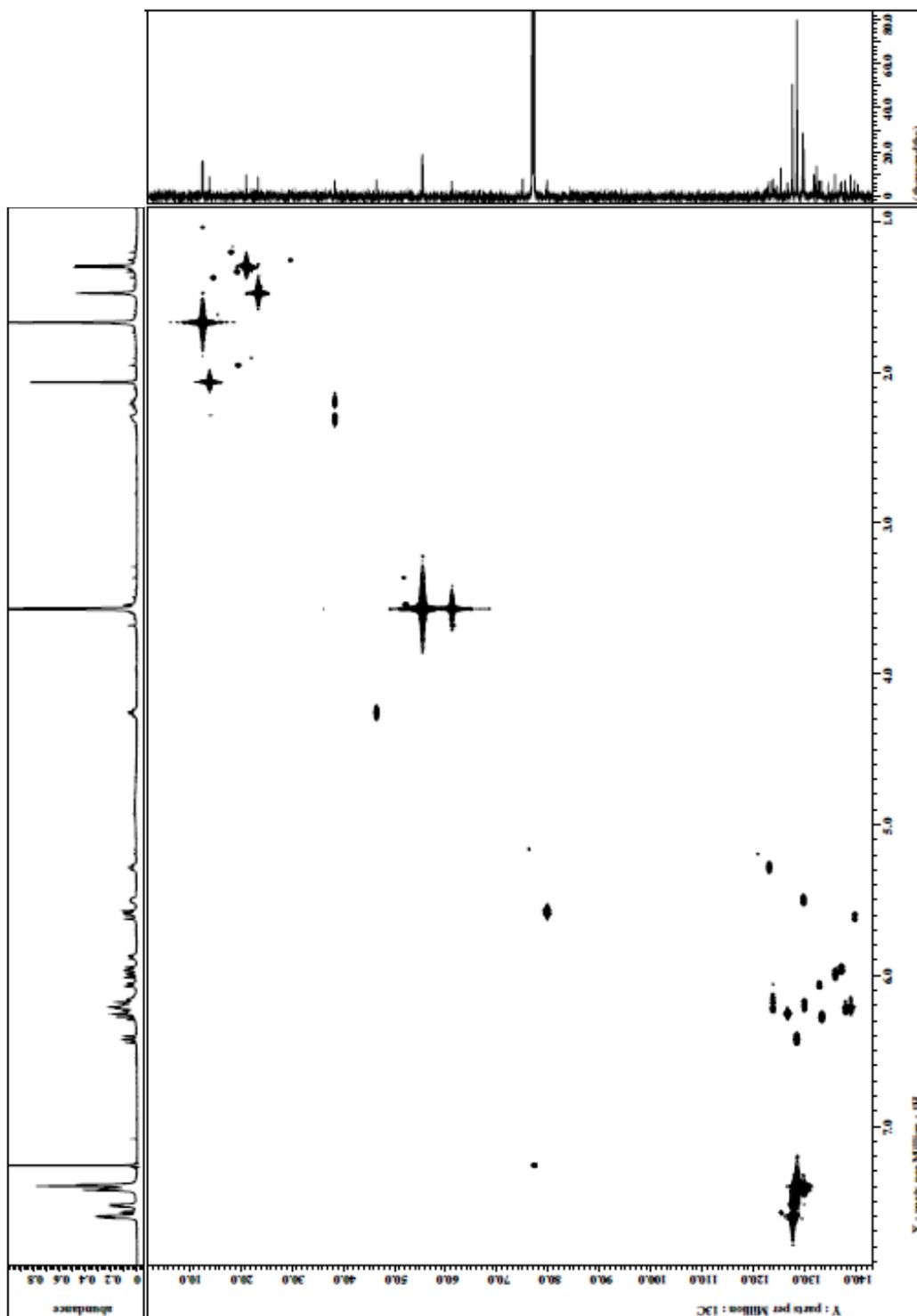


Figure 6-20 HSQC spectrum of S-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

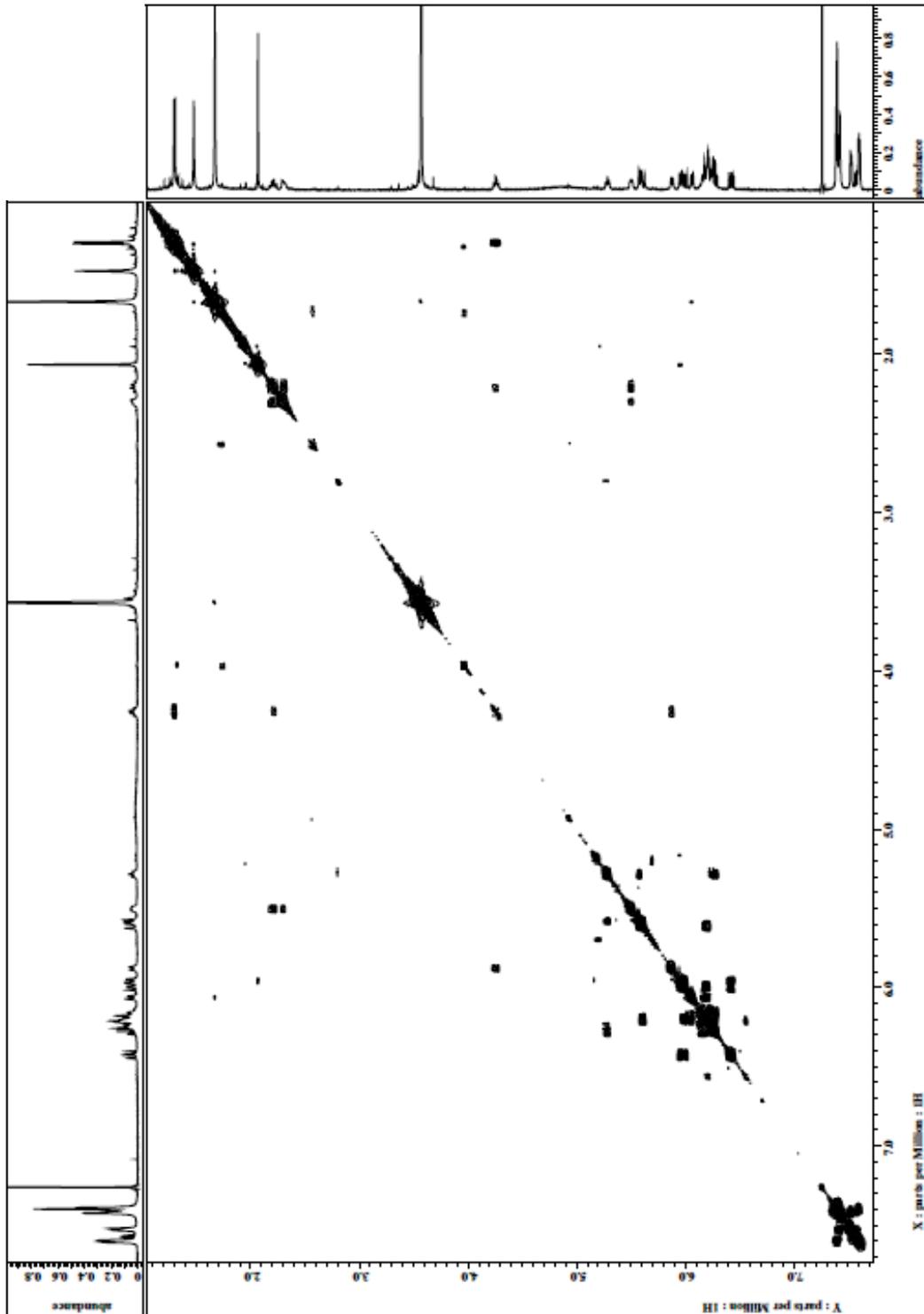


Figure 6-21 ^1H - ^1H COSY spectrum of S-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

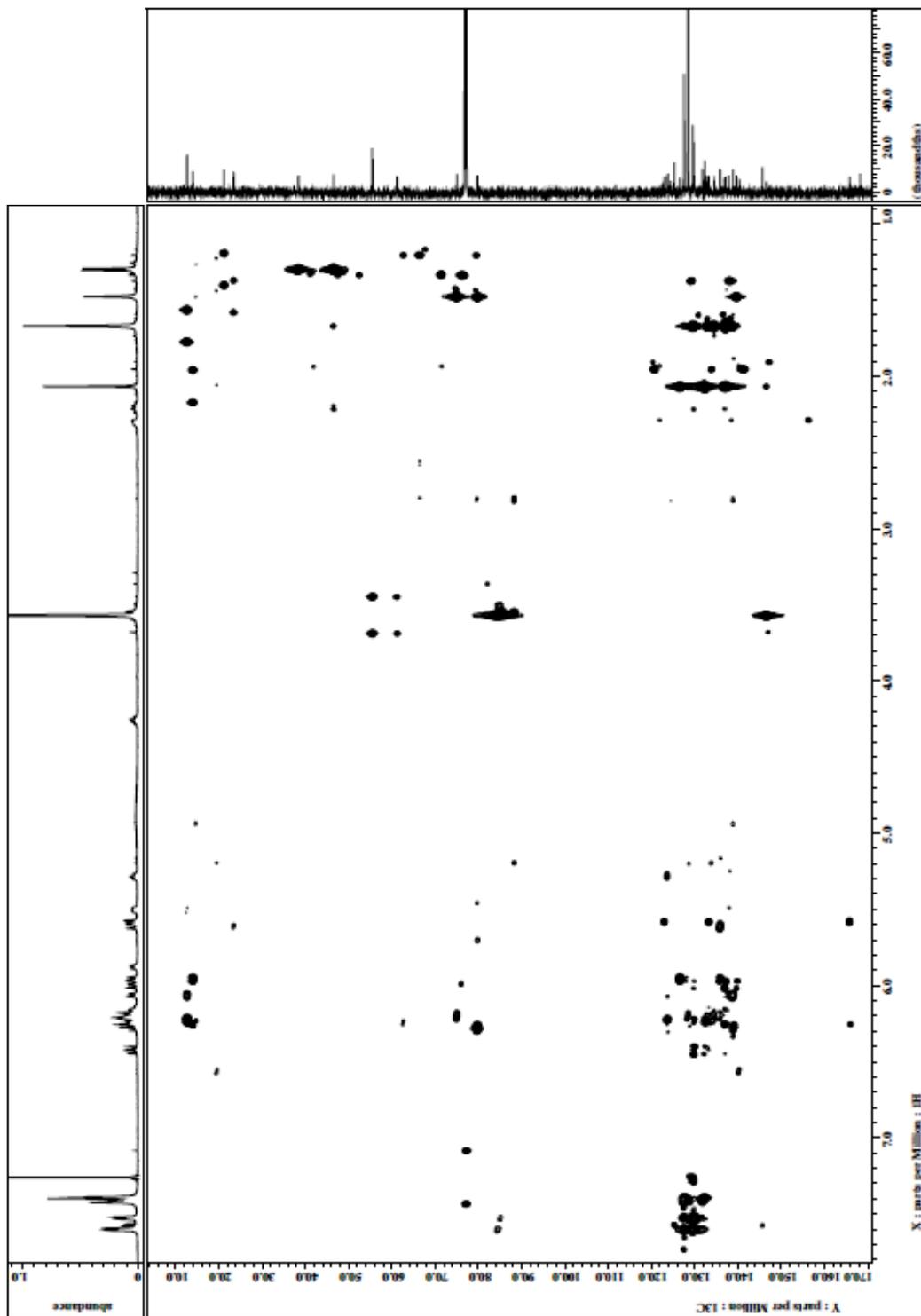


Figure 6-22 HMBC spectrum of S-MTPA ester of aglycon in CDCl_3

第 5 節 メチル-*N*-(4-ブロモベンゾイル)-2,3,4,6-テトラデオキシ-4-メチルアミノ- β -D-*erythro*-ヘキソピラノシドの合成

Incednine (52.0 mg, 0.07 mmol) を無水ピリジン 5 ml に溶解し、*p*-ブロモベンゾイルクロライド (29.0 mg, 0.13 mmol) を加え室温で 16 時間攪拌した。氷冷下 10 μ l の水を滴下し反応を止め、反応液を減圧下濃縮した。得られた残渣はクロロホルム:メタノール:重曹水=5:6:4 の二層系 (200 ml) に溶解し、分配した。有機層をクロロホルム:メタノール:水=5:6:4 二層系の上層で洗浄し、4''-*N*-4-ブロモベンゾイル化 incednine の黄色粗精製物を得た (72.3 mg)。この粗精製物を無水ジクロロメタン 5 ml に溶解し、10%塩酸メタノール水 6 ml を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応液をクロロホルム:メタノール:重曹水=5:6:4 の二層系 (400 ml) に加え、分配した。有機層をクロロホルム:メタノール:水=5:6:4 の上層で洗浄し、減圧下濃縮した。得られた茶褐色残渣 (67.8 mg) をメタノール:40mM リン酸二水素カリウム水溶液=70:30 を移動層とした HPLC (PEGASIL ODS カラム 30 ϕ \times 250 mm, Senshu) により精製し、 α/β -メチルグリコシドの混合物を得た。この混合物を TLC 上での分取 (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) で精製し、 α 型と β 型をそれぞれ 13.8 mg (収率 52.7%)、3.8 mg (収率 14.3%) ずつ得た。これらの糖をそれぞれヘキサン-アセトン系での再結晶化を行い、メチル-*N*-(4-ブロモベンゾイル)-2,3,4,6-テトラデオキシ-4-メチルアミノ- β -D-*erythro*-ヘキソピラノシドの無色板状結晶を得た。

外観 ;	無色板状結晶
融点 ;	132°C
$[\alpha]_D^{20}$;	-35.7° (c 0.2, MeOH)
molecular formula ;	C ₁₅ H ₂₀ NO ₃ Br
HRESI-MS m/z ;	found: 364.0507 (M+Na) ⁺ calcd for C ₁₅ H ₂₀ NO ₃ BrNa: 364.0519
¹ H-NMR スペクトル ;	Figure 6-23 に示す。
¹³ C-NMR スペクトル ;	Figure 6-24 に示す。
HSQC スペクトル ;	Figure 6-25 に示す。
¹ H- ¹ H COSY スペクトル ;	Figure 6-26 に示す。
HMBC スペクトル ;	Figure 6-27 に示す。

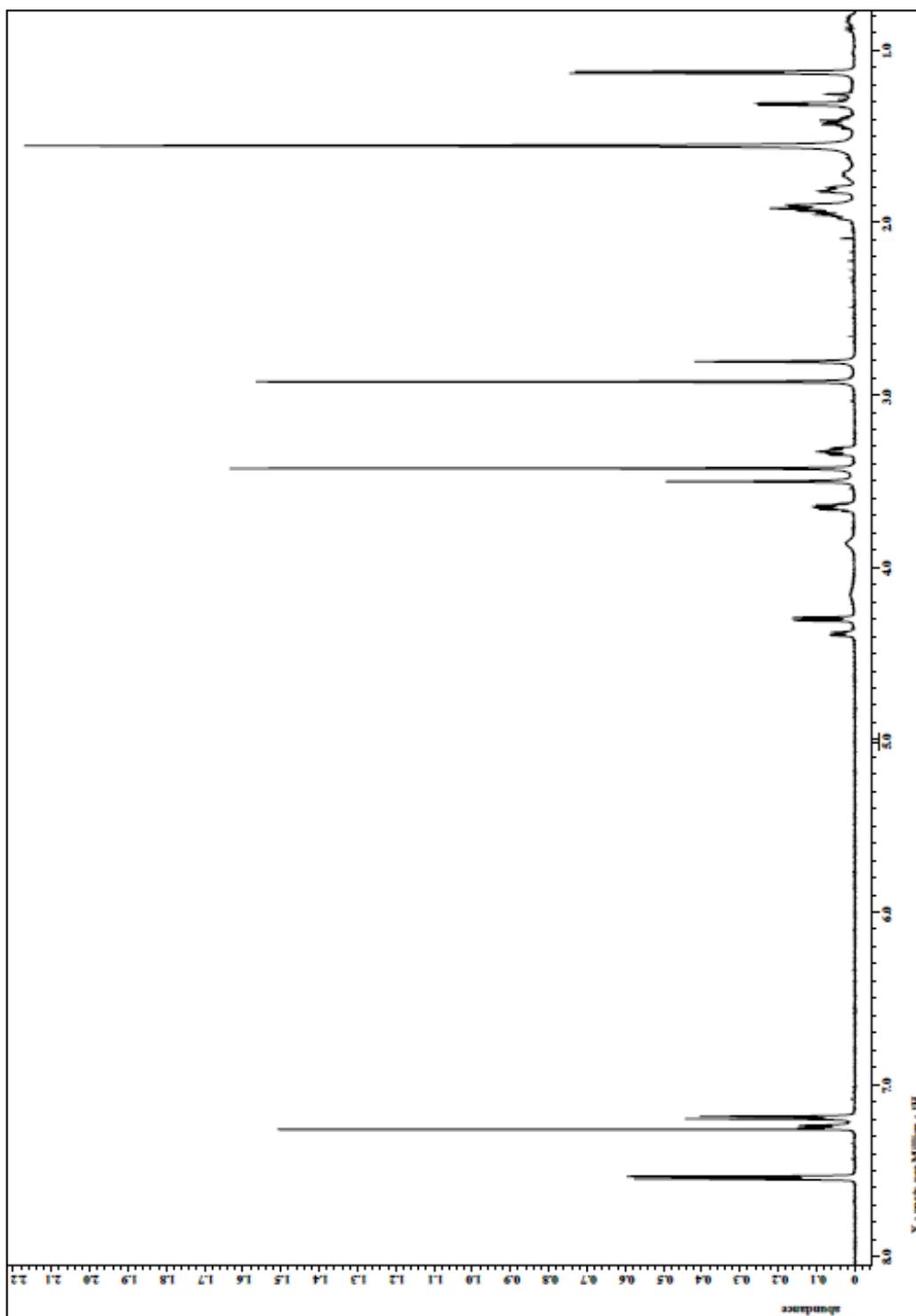


Figure 6-23 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside in CDCl_3

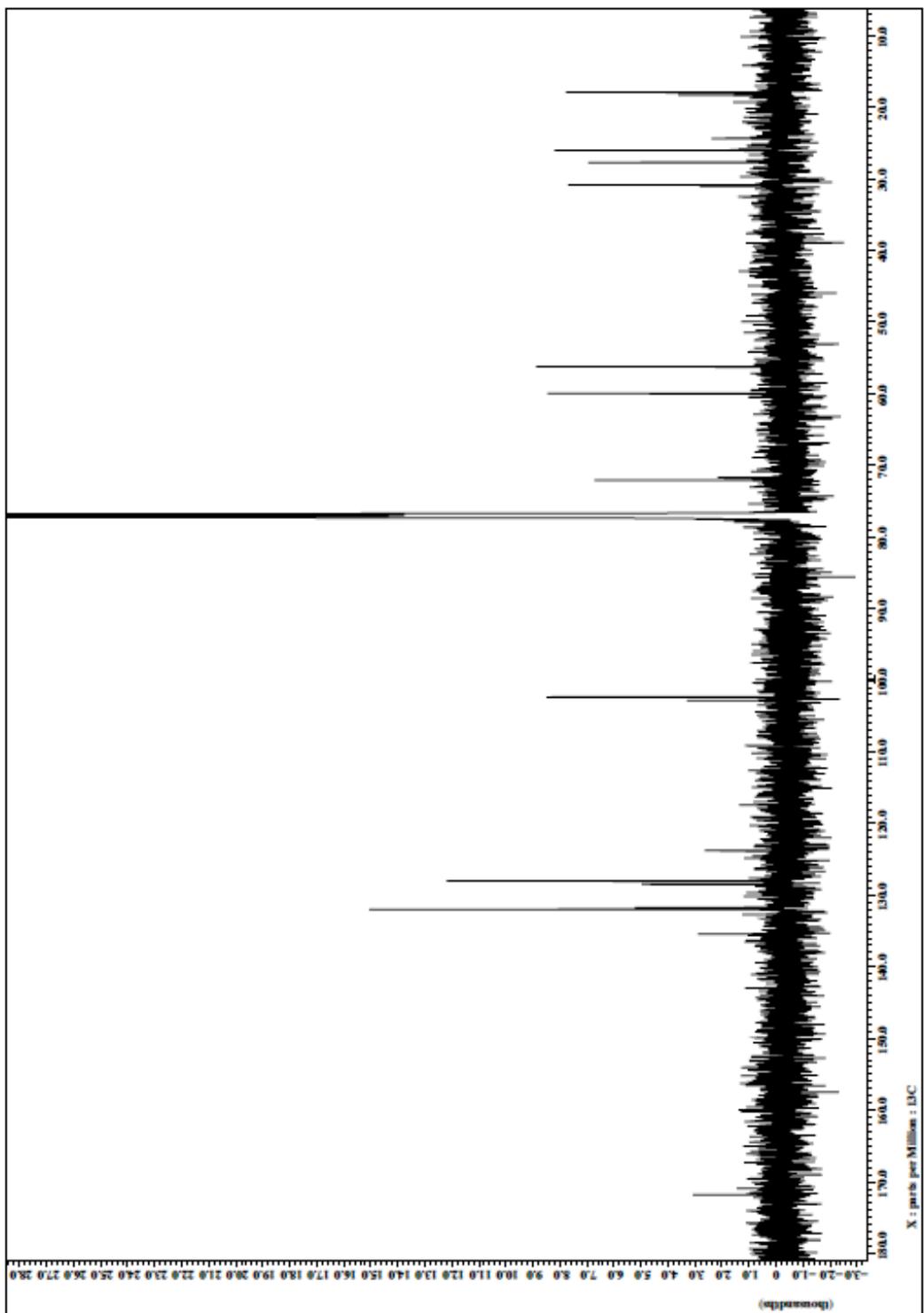


Figure 6-24 ^{13}C -NMR spectrum of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside in CDCl_3

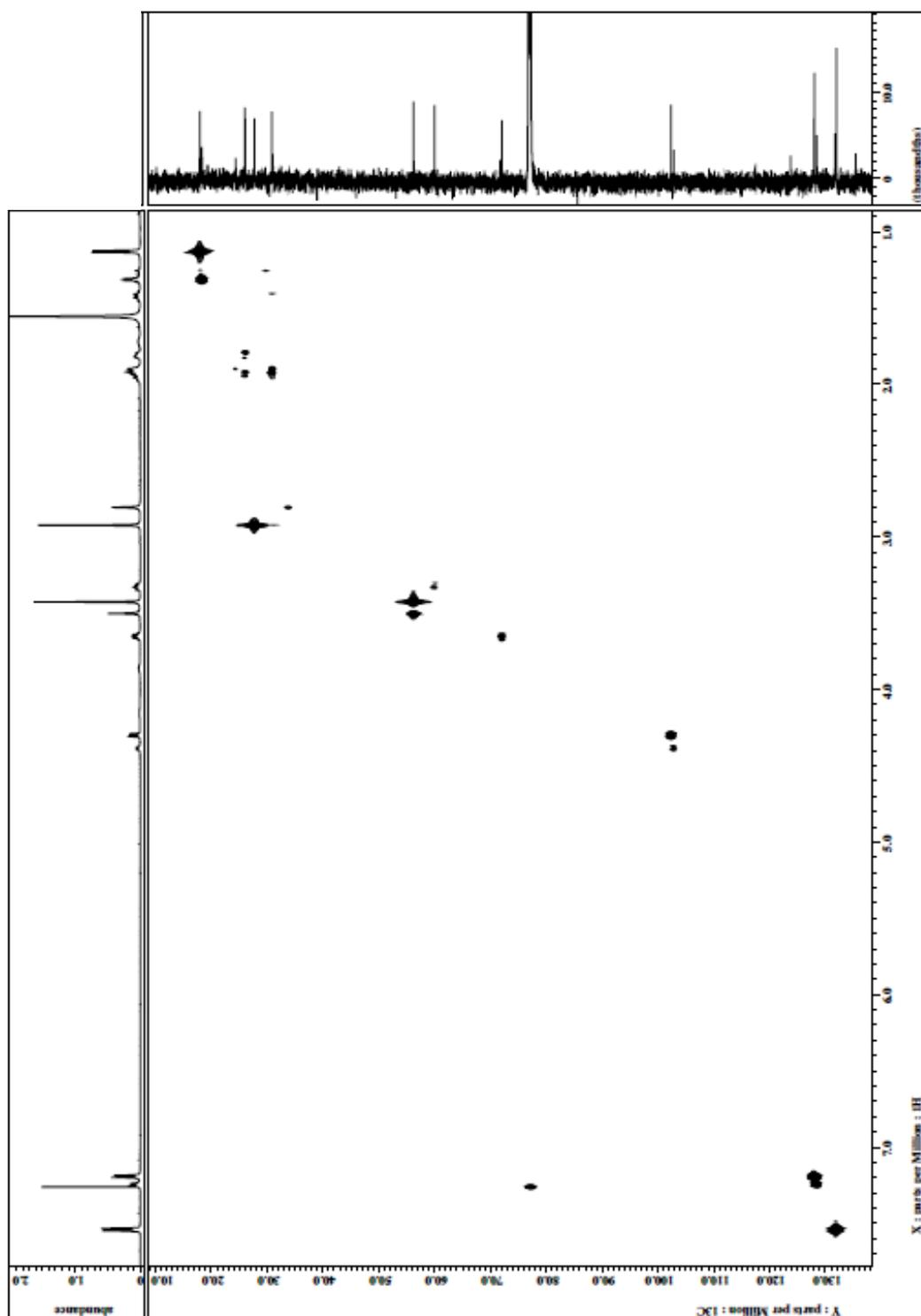


Figure 6-25 HSQC spectrum of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6,-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside in CDCl_3

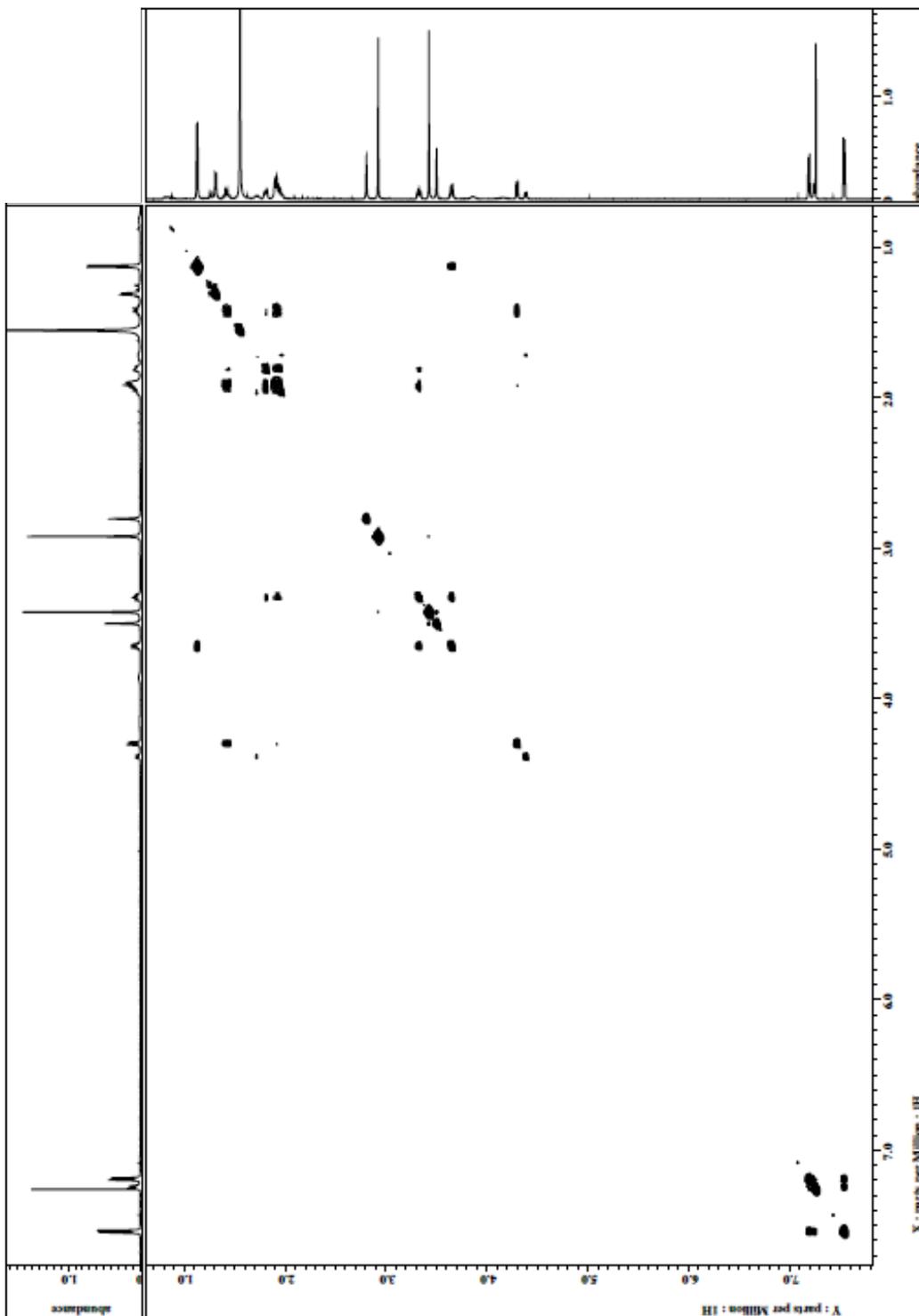


Figure 6-26 ^1H - ^1H COSY spectrum of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside in CDCl_3

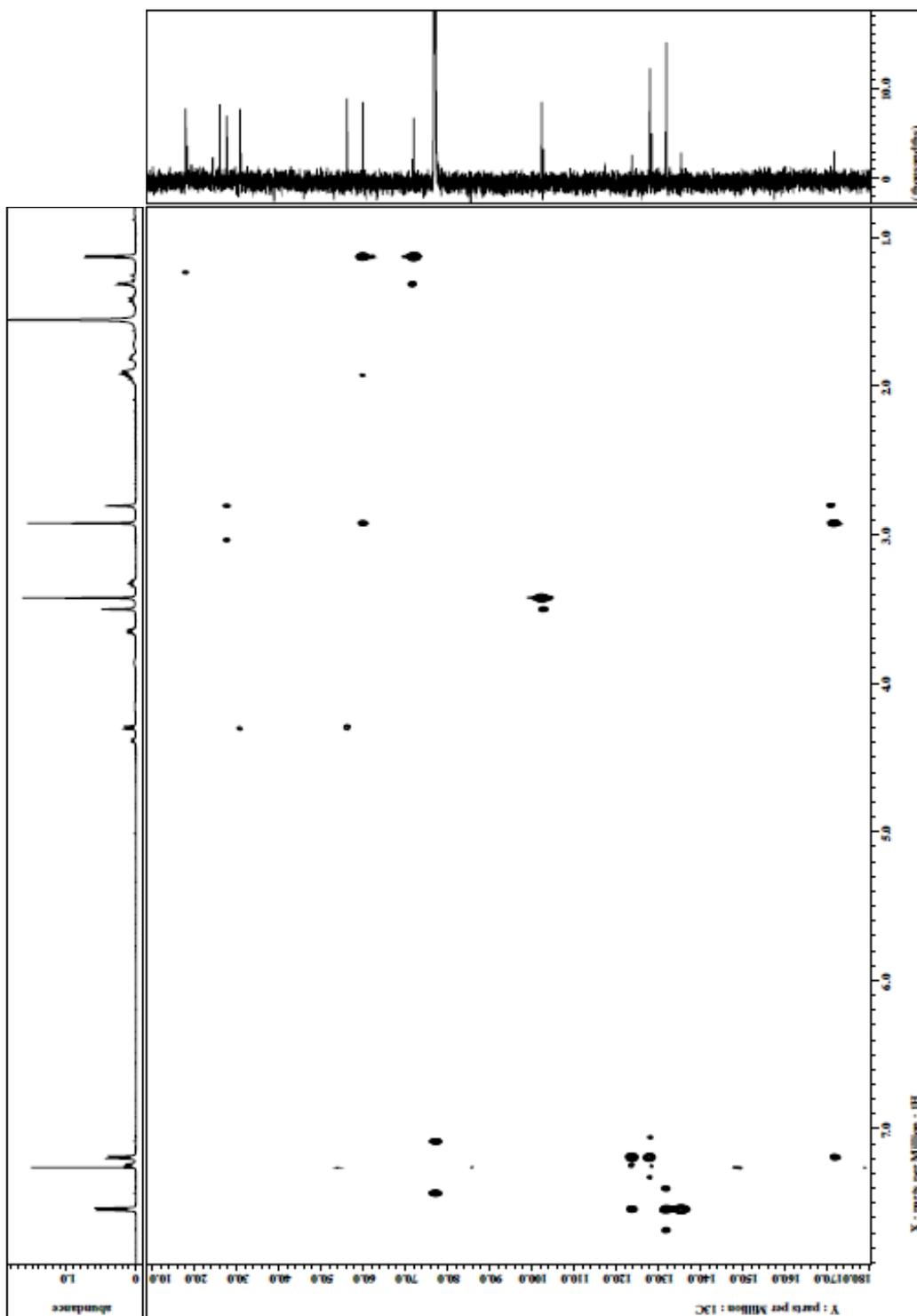


Figure 6-27 HMBC spectrum of methyl *N*-(4-bromobenzoyl)-2,3,4,6,-tetra-deoxy-4-methylamino- β -D-*erythro*-hexopyranoside in CDCl_3

第6節 コンピュータモデリング

分子モデリングにはパッケージソフト **Insight II (Accelrys)** を使用した。最適化は各種 NMR スペクトルの情報を基に、このパッケージにバンドルされている **Discovery III** プログラムを利用して実施した。分子動力学計算と構造最適化計算に際し、分子力場パラメータは **cvff** 力場を使用した。

第7節 X線構造解析

X線解析強度データは $0.23 \times 0.23 \times 0.06$ mm の結晶を用い、**Rigaku R-AXIS RAPID II imaging plate area detector** で **CuK α** 線を用いて測定した。 $2\theta < 136.1^\circ$ 、 ω - 2θ スキャン法を用いて ω が 10.0 sec° の速度で独立した **2505** 反射を収集した。収集したデータは吸収補正、ローレンツ因子及び偏光因子の補正を行った。また2次消滅効果の補正も行った⁸⁸。結晶学的データは空間群 **P2₁**、 $a=8.41004(15) \text{ \AA}$ 、 $b=10.48964(19) \text{ \AA}$ 、 $c=9.31450(17) \text{ \AA}$ 、 $\beta=107.8149(8)^\circ$ 、 $V=782.31(2) \text{ \AA}^3$ であった。構造解析はパッケージソフト **CrystalStructure 3.8**⁸⁹ にバンドルされている **SHELXL-97**⁹⁰ 上で直接法 **SIR2004**⁹¹ と **DIRDIF99**⁹² を用いた。フルマトリックス最小二乗法によって **186** 反射 ($I > 2.00\sigma(I)$) の最終 R 値は **3.6%** であった。最終差フーリエ図上の最大及び最小のピークはそれぞれ **0.44 and -0.37 e⁻/\AA³** であった。

第 8 節 trierixin に関する実験

外観 ;	薄桃色粉末
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$;	-306.2° (c 0.2, CHCl_3)
molecular formula ;	$\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$
HRESI-MS m/z ;	found: 683.3372 (M-H) calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$: 683.3366
NMR 帰属 ;	本文 Table 4-2 に示す。
^1H -NMR スペクトル ;	Figure 6-28 に示す。
^{13}C -NMR スペクトル ;	Figure 6-29 に示す。
HMQC スペクトル ;	Figure 6-30 に示す。
^1H - ^1H COSY スペクトル ;	Figure 6-31 に示す。
HMBC スペクトル ;	Figure 6-32 に示す。

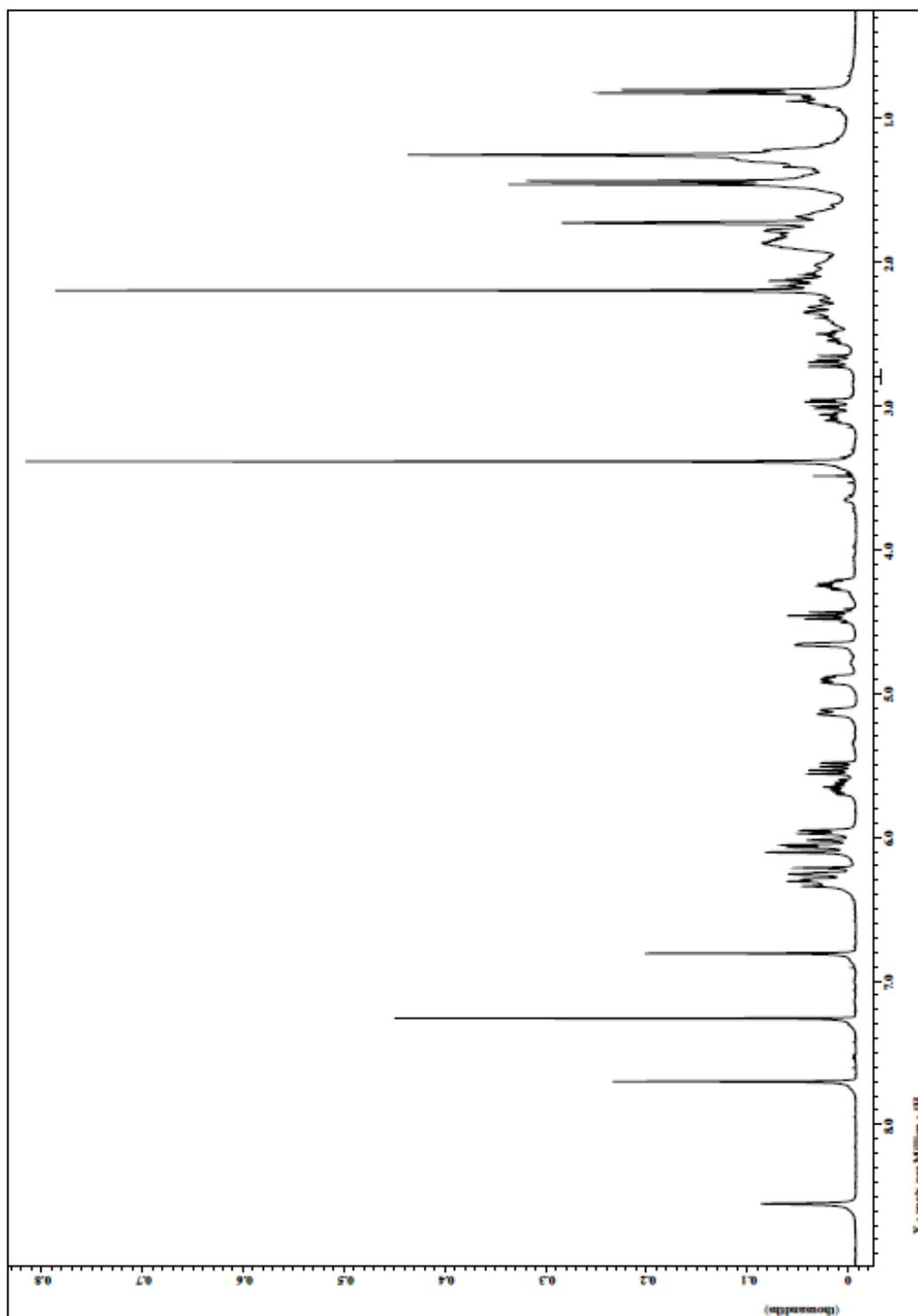


Figure 6-28 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of trierixin in CDCl_3

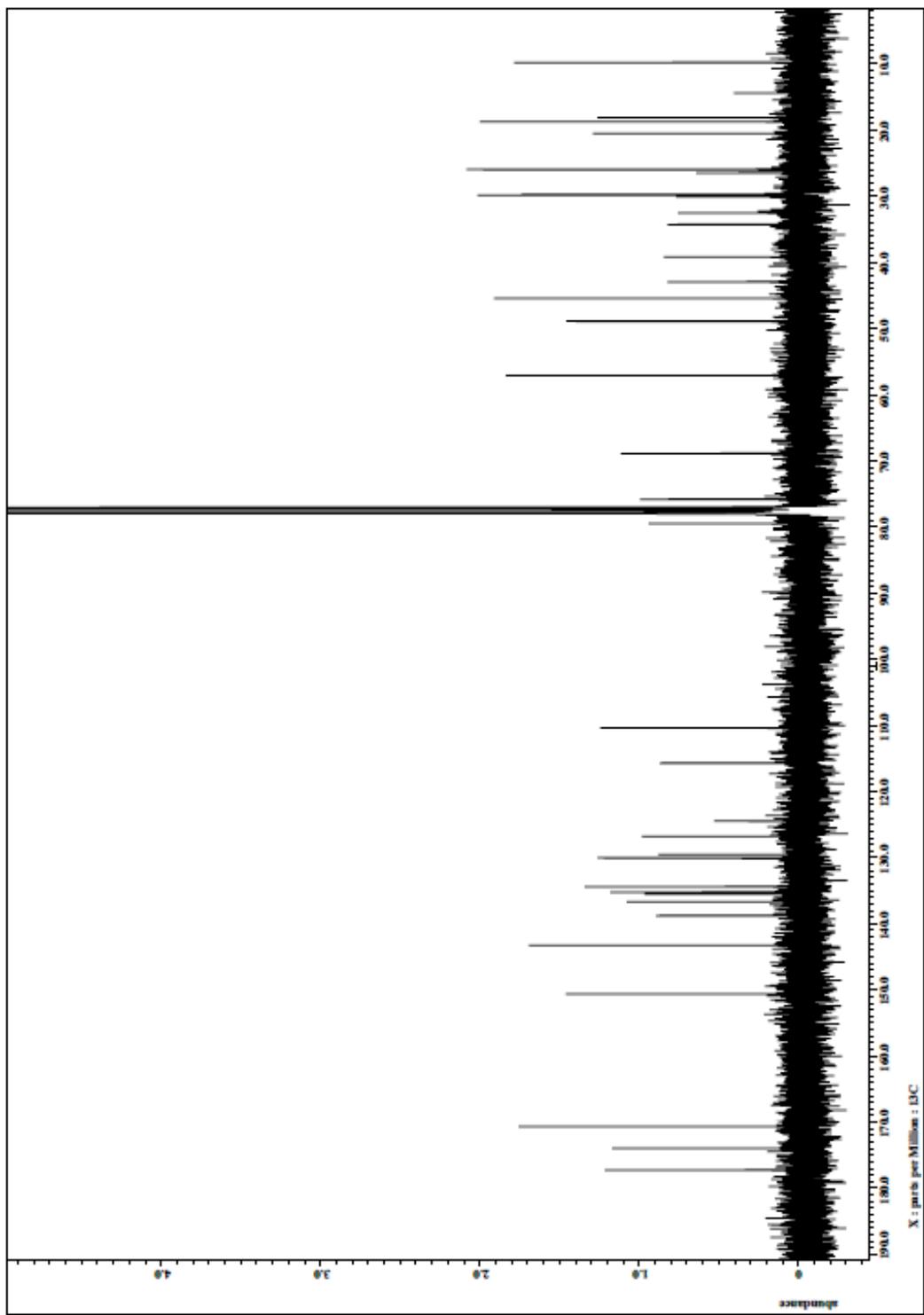


Figure 6-29 ^{13}C -NMR spectrum of trierixin in CDCl_3

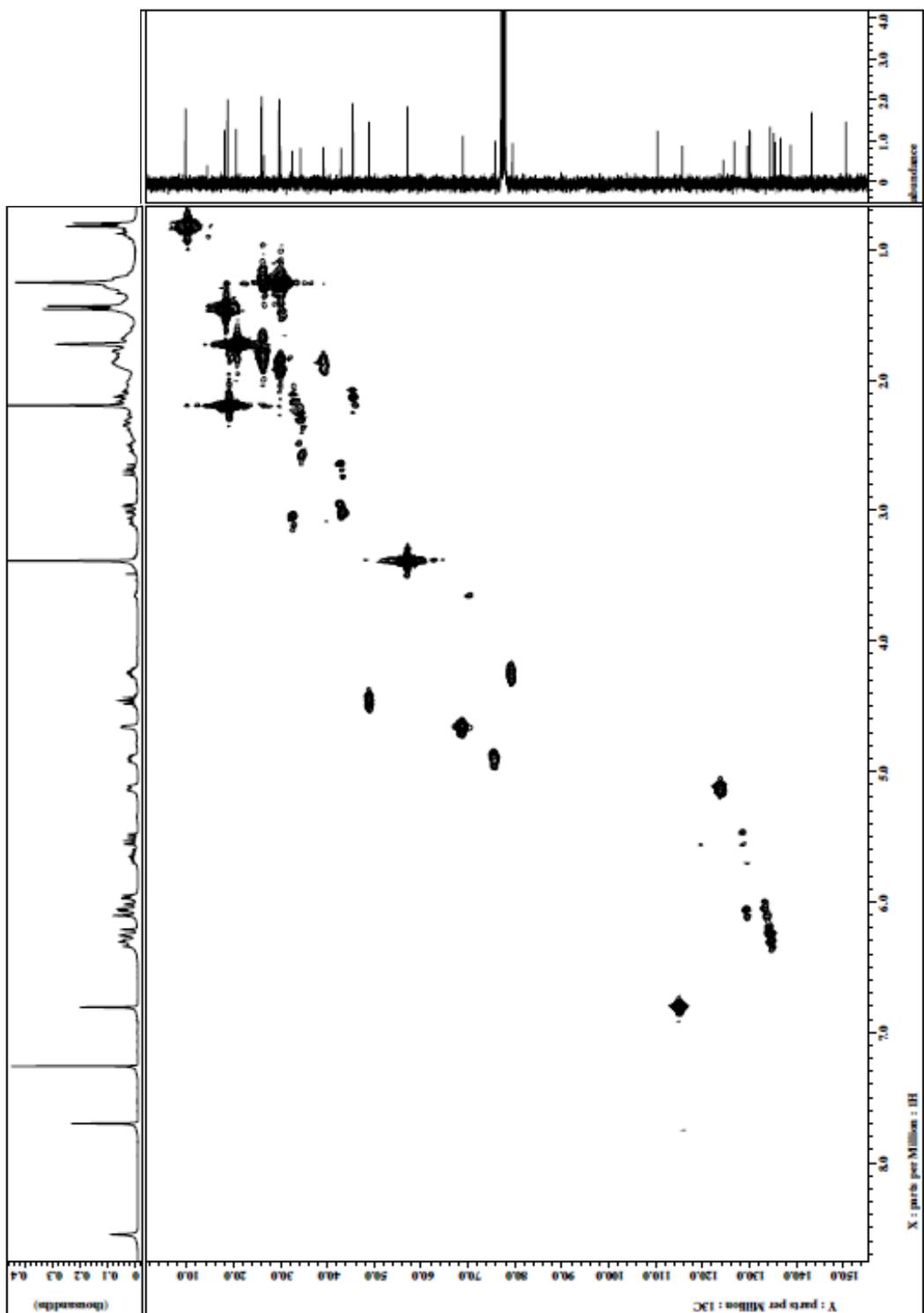


Figure 6-30 HMQC spectrum of trierixin in CDCl₃

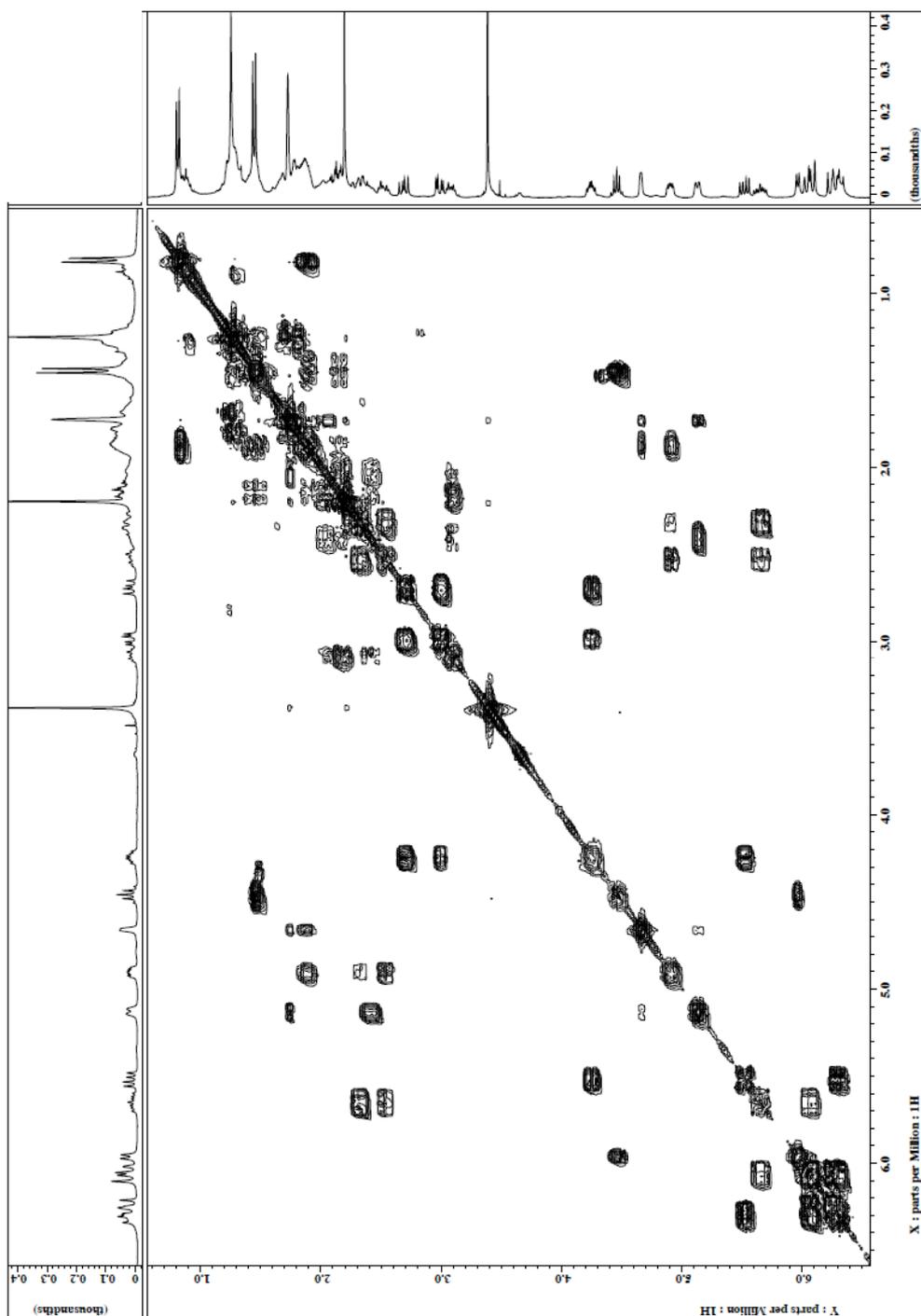


Figure 6-31 ^1H - ^1H COSY spectrum of trierixin in CDCl_3

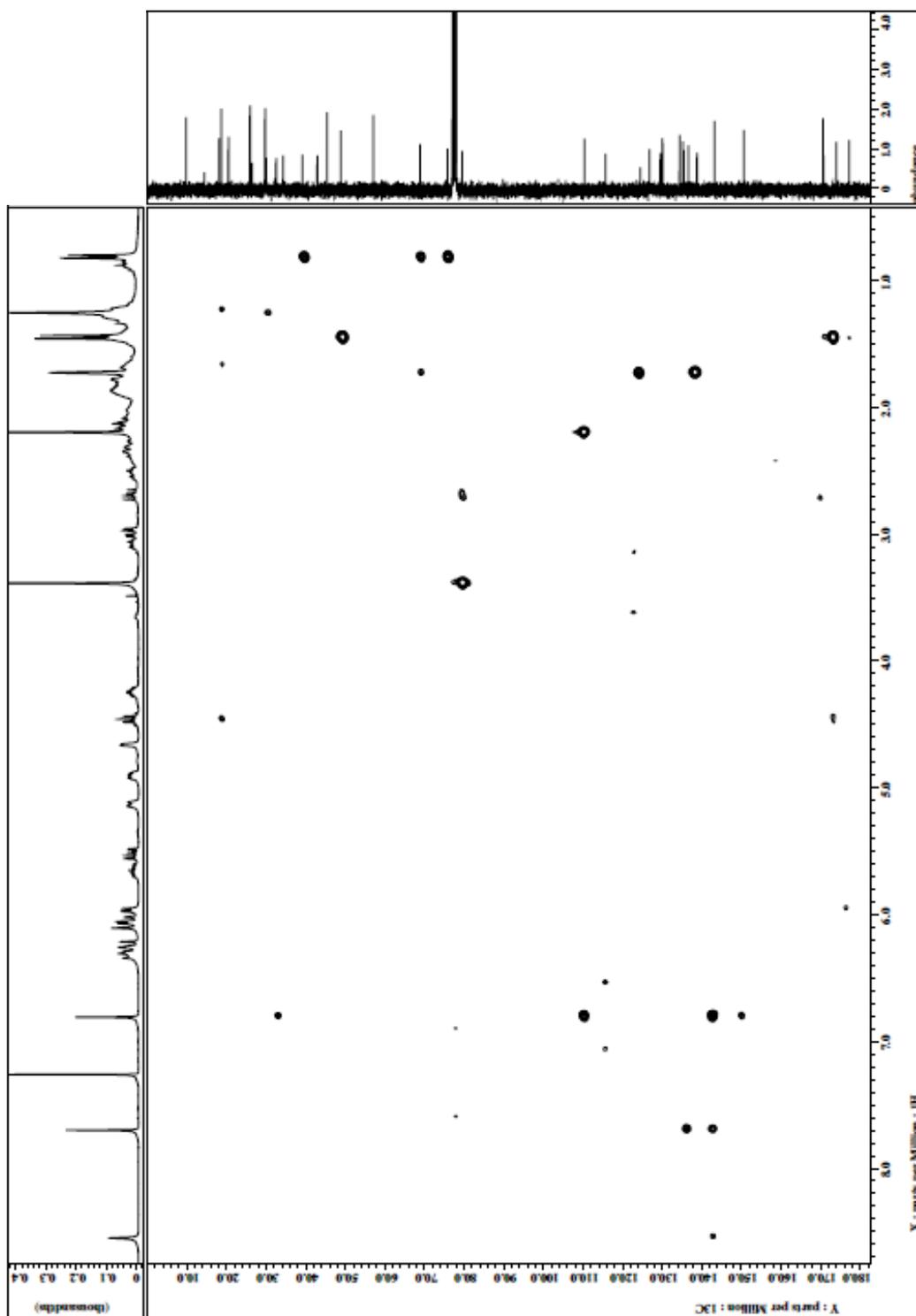


Figure 6-32 HMBC spectrum of trierixin in CDCl₃

Biology

第1節 Materials

ヒト小細胞肺癌 Ms-1 細胞はりんくう総合医療センターの高田実博士らより頂いた。Human *bcl-2*、*bcl-xL*、*bax* 遺伝子は理化学研究所の長田裕之博士、清水史郎博士より頂いた。Human *bak* 遺伝子は大阪大学の辻本賀英博士より頂いた。ベクターコントロール細胞である Ms-1/Neo 細胞、Bcl-2 過剰発現細胞である Ms-1/Bcl-2 細胞、Bcl-xL 過剰発現細胞である Ms-1/Bcl-xL 細胞はそれぞれ pCI vector (Promega)、pCI-*bcl-2* 及び pCI-*bcl-xL* の安定発現株として取得した。また薬剤は acridine orange (Merck)、adriamycin (Sigma)、cisplatin (sigma)、camptothcin (Sigma)、inostamycin (*Streptomyces* sp. MH816-AF15 株より当研究室で単離精製されたもの)、taxol (Sigma)、vinblastine (Wako)、HA14-1 (Merck)、JC-1 (Wako)、z-VAD-fmk (Sigma) を用いた。

第2節 細胞培養、トランスフェクション

Ms-1 細胞は Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Nissui) を高圧蒸気滅菌したものに、5%ウシ胎児血清 (FBS) (JRH)、濾過滅菌した kanamycin (Sigma) 100 µg/ml、penicillin G (Sigma) 100 units/ml、L-(+)-Glutamine (Kanto) 300 µg/ml を加えたものを培地とし、37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で培養した。HEK293T 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Nissui) を高圧蒸気滅菌したものに、10%ウシ胎児血清 (FBS) (JRH)、濾過滅菌した kanamycin (Sigma) 100 µg/ml、penicillin G (Sigma) 100 units/ml、L-(+)-Glutamine (Kanto) 300 µg/ml を加えたものを培地とし、37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で培養した。またこれら細胞は細胞の集密状態によって引き起こされる形質転換を防ぐため、3日に一度培養液を除去した後に Ca²⁺、Mg²⁺ 不含リン酸緩衝液 PBS⁻ (NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 0.916 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L) で細胞を洗浄し、トリプシン-EDTA 溶液 (trypsin 0.75 g/L, NaCl 8.0 g/L, KCl 0.4 g/L, Na₂HPO₄ 0.0475 g/L, KH₂PO₄ 0.06 g/L, glucose 1.0 g/L, phenol red 0.02 g/L, NaHCO₃ 0.35 g/L、

EDTA 0.2 g/L) で細胞を剥がし、継代を行った。なお、細胞の観察には培養顕微鏡 CK40 (Olympus) を用い、適時顕微鏡デジタルカメラ DP12 (Olympus) を用いた写真撮影を行った。

また HEK293T 細胞へのトランスフェクションは製造元の手引きに従い、Lipofect Amine™ (Invitrogen) を用いたリポフェクション法で行った。

第 3 節 トリパンプルー細胞外排出法による細胞生存率の測定

薬剤処理を行った細胞をピペッティングにより剥がし、細胞懸濁液に 5 倍濃縮の trypan blue 溶液 (9 g/L NaCl, 4 g/L trypan blue) を加え、血球計算板 (エルマ) 上で染色された細胞数を測定した。細胞の生存率は以下の式により求めた。

$$(\text{細胞の生存率} [\%]) = (\text{生細胞数}) / (\text{全細胞数}) \times 100$$

第 4 節 GST-Bcl-xL 融合タンパク質の精製、Bax との結合評価

GST 融合 Bcl-xL を発現するように形質転換した大腸菌を一晩培養し、0.1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (Stratagene) を添加しさらに 3 時間培養した。その後 3500rpm で 15 分遠心分離を行い、大腸菌を回収した。回収した大腸菌を MT-PBS⁻ (8.8g/l NaCl, 2.3g/l Na₂HPO₄, 0.48g/l NaH₂PO₄; pH 7.3) 1ml に懸濁し、超音波破碎器 ultrasonic homogenizer UH-50 (エムエステー) で破碎後、13000rpm で 15 分遠心分離した。得られた上清を glutathione-sepharose 4B ビーズ (GE healthcare) のカラムで精製し、リコンビナント GST-Bcl-xL 融合タンパク質を得た。Bax と Bcl-xL の結合実験は、トランスフェクションにより Myc 融合 Bax を過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液 (50 μ g) を調整し、この細胞抽出液と GST-Bcl-xL (1 μ g)、glutathione-sepharose 4B ビーズを薬剤存在下、4°C で混和した。2 時間後、遠心操作により沈降するビーズを 3×SDS sample Buffer (150 mM Tris, 30% Glycerol, 3% SDS, 1.5 mg/100 mL bromophenol blue, 100 mM DTT; pH 6.8) に懸濁し、10 分間煮沸した。Bcl-xL に結合した Bax の量は抗 Myc 抗体による western blot にて評価した。

第5節 Western Blot によるタンパク質の検出

回収した細胞を Extraction Buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Tween20, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF ; pH 7.4) に懸濁し、氷上にて Ultrasonic homogenizer UH-50 (エムエステー) により細胞を破碎した。この操作を2回行い、細胞を可溶化した。これを 13000 rpm×15 min で遠心分離し、得られた上清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液に半分量の 3×SDS sample Buffer (150 mM Tris, 30% Glycerol, 3% SDS, 1.5 mg/100 mL bromophenol blue, 100 mM DTT ; pH 6.8) を加え、3分間煮沸した。これを SDS-PAGE 用サンプルとした。

ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、PVDF 膜 (Hybond P, Millipore) に転写、BSA もしくは milk を含む TBS-Tween 溶液 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20 ; pH 7.6) にてブロッキングを行った。一次抗体 (1:1000) はブロッキング液とともに 4°C で一晩振とうした。TBS-Tween 溶液で適宜洗浄後、二次抗体希釈液 (1:5000) に浸し室温で1時間振とうした。TBS-Tween 溶液で適宜洗浄し、化学発光剤 (ECL reagent, Millipore) によりメンブレンを発光させ、las1000 (富士フィルム) に感光した。またそれぞれのタンパク質の検出には以下の抗体を用いた。

・ 一次抗体

- 抗 AIF 抗体 (E-1; Santa Cruz, mouse monoclonal IgG)
- 抗 Bax 抗体 (N-20; Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG)
- 抗 Bcl-2 抗体 (clone 124; DAKO, mouse monoclonal IgG)
- 抗 Bcl-xL 抗体 (#2762; Cell Signaling, rabbit polyclonal IgG)
- 抗 cytochrome *c* 抗体 (7H8.2C12; PharMingen, mouse monoclonal IgG)
- 抗 Myc 抗体 (9E10; Santa Cruz, mouse monoclonal IgG)
- 抗 PARP 抗体 (H-250; Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG)
- 抗 tubulin 抗体 (T9026; sigma, mouse monoclonal IgG)

・ 二次抗体

- 抗 rabbit-horseradish peroxidase 抗体 (Amersham)
- 抗 mouse-horseradish peroxidase 抗体 (Amersham)

第6節 フローサイトメーターによるミトコンドリア膜電位の解析

回収した細胞は 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の JC-1 を含む培地 1 mL に懸濁し、37°C で 20 min インキュベーションを行った。1000 rpm \times 5 min の遠心分離後、上清を取り除いた。得られた pellet を PBS で 1 回洗浄した後、PBS 0.5 mL に懸濁し、ナイロンメッシュ ($\phi=42 \mu\text{m}$) に通したものをサンプルとした。JC-1 はミトコンドリア膜電位が正常な場合、ミトコンドリア膜上にて凝集し Ar レーザーによる励起で赤色の光を発光する。ミトコンドリア膜電位は Flow Cytometer (Epics Elite ; Coulter) の PMT3 検出器に検出される光の強度から解析した。

第7節 細胞分画

細胞分画は用いる濃度に応じて選択的に膜透過性を亢進させることが可能な digitonin を用いて行った⁹³。回収した細胞を Lysis Buffer (70 mM Tris-HCl、250 mM sucrose、digitonin 0.05 mg/mL; pH 7.0) に懸濁し氷上にて 10 分間静置した。13000 rpm \times 10 min の遠心分離で得られた上清を細胞質画分抽出液とした。この細胞抽出液に分量の 3 \times SDS sample Buffer を加え、5 分間煮沸した。これを SDS-PAGE 用サンプルとした。

第8節 siRNA

ヒト AIF の発現を抑制するように設計された二本鎖 siRNA (sense anti-human AIF 5'-AUAGCAUUGGGCAUCACCUUAACCC-3', Invitrogen) を用い、リバーストランスフェクション法により siRNA を導入した。トリプシン処理により剥がした 70×10^4 個の Ms-1 細胞を抗生物質不含 RPMI 培地 500 μl に懸濁した。siRNA (終濃度 25 nM) と 3 μl の lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 500 μl の OPTI-MEM (Gibco) に加えた溶液に細胞懸濁液を添加し、室温で静置した。20 分間後、細胞液を 60 mm シャーレに播き 72 時間 37°C でインキュベーションした。この細胞は上記と同条件で再度 siRNA をトランスフェクションした。AIF のノックダウン効率は 1st トランスフェクション後 144 時間後 AIF 発現量を western blot で検出することにより評価した。

参考文献

1. M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling et al., *Nature* (1989) *341*, 758.
2. J. Liu, J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane et al., *Cell* (1991) *66*, 807.
3. J. Y. Ortholand and A. Ganesan, *Curr Opin Chem Biol* (2004) *8*, 271.
4. F. E. Koehn and G. T. Carter, *Nat Rev Drug Discov* (2005) *4*, 206.
5. J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, *Br J Cancer* (1972) *26*, 239; A. H. Wyllie, *J Pathol* (1987) *153*, 313.
6. A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, B. R. Lane et al., *Science* (1997) *275*, 1122; M. O. Hengartner and H. R. Horvitz, *Nature* (1994) *369*, 318; B. Conradt and H. R. Horvitz, *Cell* (1998) *93*, 519.
7. E. S. Alnemri, *J Cell Biochem* (1997) *64*, 33.
8. N. P. Walker, R. V. Talanian, K. D. Brady et al., *Cell* (1994) *78*, 343; K. P. Wilson, J. A. Black, J. A. Thomson et al., *Nature* (1994) *370*, 270.
9. T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, and E. S. Alnemri, *J Biol Chem* (1994) *269*, 30761.
10. T. Mashima, M. Naito, K. Noguchi et al., *Oncogene* (1997) *14*, 1007.
11. M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama et al., *Nature* (1998) *391*, 43.
12. Y. A. Lazebnik, S. H. Kaufmann, S. Desnoyers et al., *Nature* (1994) *371*, 346; D. W. Nicholson, A. Ali, N. A. Thornberry et al., *Nature* (1995) *376*, 37.
13. H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu et al., *Cell* (1997) *90*, 405.
14. P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo et al., *Cell* (1997) *91*, 479.
15. S. Nagata and P. Golstein, *Science* (1995) *267*, 1449.
16. S. A. Susin, E. Daugas, L. Ravagnan et al., *J Exp Med* (2000) *192*, 571; M. C. Abraham and S. Shaham, *Trends Cell Biol* (2004) *14*, 184.
17. C. Cande, I. Cohen, E. Daugas et al., *Biochimie* (2002) *84*, 215.
18. S. A. Susin, H. K. Lorenzo, N. Zamzami et al., *Nature* (1999) *397*, 441.
19. A. Gross, J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer, *Genes Dev* (1999) *13*, 1899.
20. Y. Tsujimoto, J. Gorham, J. Cossman et al., *Science* (1985) *229*, 1390.
21. D. L. Vaux, S. Cory, and J. M. Adams, *Nature* (1988) *335*, 440; Y.

- Tsujimoto, *Oncogene* (1989) 4, 1331.
22. L. H. Boise, M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema et al., *Cell* (1993) 74, 597.
 23. Z. N. Oltvai, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer, *Cell* (1993) 74, 609.
 24. S. N. Farrow, J. H. White, I. Martinou et al., *Nature* (1995) 374, 731.
 25. E. Yang, J. Zha, J. Jockel et al., *Cell* (1995) 80, 285.
 26. K. Wang, X. M. Yin, D. T. Chao et al., *Genes Dev* (1996) 10, 2859.
 27. N. Inohara, L. Ding, S. Chen et al., *EMBO* (1997) 16, 1686.
 28. L. O'Connor, A. Strasser, L. A. O'Reilly et al., *EMBO* (1998) 17, 384.
 29. E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa et al., *Science* (2000) 288, 1053.
 30. S. J. Korsmeyer, *Cancer Res* (1999) 59, 1693s.
 31. T. Miyashita and J. C. Reed, *Cell* (1995) 80, 293.
 32. J. E. Belizario, J. Alves, J. M. Occhiucci et al., *Braz J Med Biol Res* (2007) 40, 1011.
 33. J. Yang, X. Liu, K. Bhalla et al., *Science* (1997) 275, 1129; S. A. Susin, N. Zamzami, M. Castedo et al., *J Exp Med* (1996) 184, 1331.
 34. M. V. Kumar, R. Shirley, Y. Ma et al., *Curr Pharm Biotechnol* (2004) 5, 471.
 35. S. Wang, D. Yang, and M. E. Lippman, *Semin Oncol* (2003) 30, 133.
 36. T. J. McDonnell, G. Nunez, F. M. Platt et al., *Mol Cell Biol* (1990) 10, 1901; Y. Shinto, M. Morimoto, M. Katsumata et al., *Oncogene* (1995) 11, 1729.
 37. Z. Huang, *Oncogene* (2000) 19, 6627.
 38. K. Papadopoulos, *Semin Oncol* (2006) 33, 449.
 39. T. Dorai, C. A. Olsson, A. E. Katz et al., *Prostate* (1997) 32, 246.
 40. A. A. Tarhini and J. M. Kirkwood, *Future Oncol* (2007) 3, 263.
 41. J. L. Wang, D. Liu, Z. J. Zhang et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 7124.
 42. A. Degterev, A. Lugovskoy, M. Cardone et al., *Nat Cell Biol* (2001) 3, 173.
 43. S. Kitada, M. Leone, S. Sareth et al., *J Med Chem* (2003) 46, 4259.
 44. T. Oltersdorf, S. W. Elmore, A. R. Shoemaker et al., *Nature* (2005) 435,

- 677.
45. M. K. Manion, J. Fry, P. S. Schwartz et al., *Curr Opin Investig Drugs* (2006) 7, 1077.
 46. M. Kawatani, M. Uchi, S. Simizu, et al., *Exp. Cell Res.* (2003) 286, 57.
 47. K. Mori, *Cell* (2000) 101, 451.
 48. C. Patil and P. Walter, *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13, 349.
 49. R. J. Kaufman, *J Clin Invest* (2002) 110, 1389.
 50. L. Zhao and S. L. Ackerman, *Curr Opin Cell Biol* (2006) 18, 444.
 51. A. C. Koong, V. Chauhan, and L. Romero-Ramirez, *Cancer Biol Ther* (2006) 5, 756.
 52. L. Romero-Ramirez, H. Cao, D. Nelson et al., *Cancer Res* (2004) 64, 5943.
 53. H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto et al., *Cell* (2001) 107, 881.
 54. D. Acosta-Alvear, Y. Zhou, A. Blais et al., *Mol Cell* (2007) 27, 53.
 55. H. C. Liou, M. R. Boothby, P. W. Finn et al., *Science* (1990) 247, 1581.
 56. R. Sriburi, S. Jackowski, K. Mori et al., *J Cell Biol* (2004) 167, 35.
 57. H. Yoshida, *Antioxid Redox Signal* (2007) 9, 2323.
 58. I Ohtani, T Kusumi, Y Kashman et al., *J Am Chem Soc* (1991) 113, 4092.
 59. James A. Dale and Harry S. Masher, *J Am Chem Soc* (1973) 95, 512.
 60. K. Shindo, M. Kamishohara, A. Odagawa et al., *J Antibiot* (1993) 46, 1076.
 61. S. S. Mitchell, B. Nicholson, S. Teisan et al., *J Nat Prod* (2004) 67, 1400.
 62. I. Umezawa, H. Takeshima, K. Komiyama et al., *J Antibiot* (1981) 34, 259.
 63. T. Hasegawa, T. Kamiya, T. Henmi et al., *J Antibiot* (1975) 28, 167.
 64. K. Kojiri, S. Nakajima, H. Suzuki et al., *J Antibiot* (1992) 45, 868.
 65. H Muller, E Bischoff, V Fiedler et al., *US Patent 5565561* (1996).
 66. M. C. Wei, W. X. Zong, E. H. Cheng et al., *Science* (2001) 292, 727.
 67. R. Kim, M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer Chemother Pharmacol* (2006) 57, 545.
 68. N. Vahsen, C. Cande, J. J. Briere et al., *EMBO* (2004) 23, 4679.
 69. L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S. A. Susin et al., *Nat Cell Biol* (2001) 3,

- 839.
70. Y. Hu, M. A. Benedict, D. Wu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) *95*, 4386.
 71. B. Antonsson, *Mol Cell Biochem* (2004) *256-257*, 141.
 72. J. C. Reed, *Nature* (1997) *387*, 773.
 73. E. Tashiro, N. Hironiwa, M. Kitagawa et al., *J Antibiot* (2007) *60*, 547.
 74. M. Sugita, Y. Natori, T. Sasaki et al., *J Antibiot* (1982) *35*, 1460.
 75. S. L. Schreiber and G. R. Crabtree, *Immunol Today* (1992) *13*, 136.
 76. C. Perkins, C. N. Kim, G. Fang et al., *Cancer Res* (1998) *58*, 4561; D. A. Fennell, *Clin Cancer Res* (2005) *11*, 2097.
 77. L. Yang, T. Mashima, S. Sato et al., *Cancer Res* (2003) *63*, 831.
 78. L. Y. Li, X. Luo, and X. Wang, *Nature* (2001) *412*, 95.
 79. K. F. Ferri and G. Kroemer, *Nat Cell Biol* (2001) *3*, E255.
 80. D. Feuerbach, R. Waelchli, T. Fehr et al., *J Biol Chem* (1995) *270*, 25949.
 81. M. Hara, S. Soga, M. Itoh et al., *J Antibiot* (2000) *53*, 720.
 82. W. G. Kim, N. K. Song, and I. D. Yoo, *J Antibiot* (2002) *55*, 204.
 83. N. Hosokawa, S. Yamamoto, Y. Uehara et al., *J Antibiot* (1999) *52*, 485.
 84. D. E. Feldman, V. Chauhan, and A. C. Koong, *Mol Cancer Res* (2005) *3*, 597.
 85. E.B. Shirling and D. Gottlieb, *Int J Syst Bacteriol* (1966) *16*, 313.
 86. S. A. Waksman and A. T. Henrici, *J Bacteriol* (1943) *46*, 337.
 87. B. Becker, M. P. Lechevalier, R. E. Gordon et al., *Appl Microbiol* (1964) *12*, 421.
 88. A.C. Larson in *Crystallographic Computing* (Ed. F. R. Ahmed) *Munksgaard, Copenhagen* (1970), 291.
 89. CrystalStructure 3.8, Crystal Structure Analysis Package, Rigaku and Rigaku Americas (2000-2007).
 90. SHELX97: G. M. Sheldricks (1997).
 91. SIR2004: M. C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli et al., (2005).
 92. DIRDIF99: P. T. Beurskens, G. Admiraal, G. Beurskens et al., (1999).
 93. H. Otera, S. Ohsakaya, Z. Nagaura et al., *EMBO* (2005) *24*, 1375.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、慶應義塾大学理工学部教授 井本正哉博士に謹んで感謝の意を表します。

また本研究に際し、常々御懇篤なる御教授、御鞭撻を賜りました微生物化学研究センター副センター長 高橋良和博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり、多大なる御指導、御助言頂きました慶應義塾大学理工学部助教 田代悦博士に深謝致します。

本論文の執筆にあたり、御教示、御高配頂きました慶應義塾大学理工学部教授 太田博道博士、慶應義塾大学理工学部教授 戸嶋一敦博士、慶應義塾大学理工学部准教授 松本緑博士に厚く感謝致します。

Incednine の生産菌同定、発酵生産、及び構造解析に際し、御指導、御助言賜りました微生物化学研究センター 浜田雅博士、梅沢洋二博士、澤竜一博士、五十嵐雅之博士、中村ひかる氏、久保田由美子氏、木下直子氏に心より感謝致します。また本研究に際し、微生物化学研究センターよりスクリーニングサンプルを御供与頂きました。重ねて御礼申し上げます。

X線構造解析を行うにあたり、御指導、ご協力頂きました **Rigaku** (株) 山崎幹緒博士、長谷川君子博士に深く感謝致します。

Trierixin の発酵生産、構造解析に際し、御指導、御助言賜りました田辺三菱製薬 西尾真樹博士、鈴木伸一博士、河野順博士、日本女子大学家政学部准教授 新藤一敏博士に厚く感謝致します。

本研究を行うにあたり、御指導、御激励頂きました理化学研究所 川谷誠博士、土屋綾子博士、竹本靖博士をはじめ、慶應義塾大学理工学部応用細胞生物学研究室の諸先輩方ならびに卒業生の皆様に厚く御礼申し上げます。また 7 年間、切磋琢磨し励ましあってきた同期の湊雄介氏に心より御礼申し上げます。

様々な面で研究をサポートして頂きました応用細胞生物学研究室秘書 梅崎秀香さん、並びに御協力頂きました北川光洋君、河村達郎君、馬場悠史君、笹澤有紀子さん、高野圭君をはじめとする応用細胞生物学研究室の後輩たちに深く感謝の意を表します。

最後に本研究を遂行する機会を与えて下さり、陰ながら暖かく私を支えてくれた、家族に心より謝意を表します。