

学 位 論 文

血管形成を促進する微生物由来生理活性物質の探索研究  
Exploratory studies of microbe-derived compounds that promote blood vessel formation.

高畑（廣田）由紀

Yuki Hirota-Takahata

# 目次

## 第1章 序論

第1節 血管の役割.....	1
第2節 治療的血管新生.....	1
第3節 研究の目的.....	3
第4節 Hypoxia-inducible factor 活性化物質の探索.....	5
第5節 機能的血管形成促進物質の探索.....	8

## 第2章 Hypoxia-inducible factor 活性化物質の探索

第1節 スクリーニング系.....	10
第2節 A-503451 類の発見.....	12
第3節 考察.....	39
実験の部.....	41

## 第3章 機能的血管形成促進物質の探索

第1節 スクリーニング系.....	48
第2節 Vestaine 類の発見.....	50
第3節 F-36316 類の発見.....	71
第4節 生物活性.....	82
第5節 考察.....	89
実験の部.....	96

## 第4章 総括.....

謝辞.....	106
---------	-----

参考文献.....	107
-----------	-----

Supplementary information.....	115
--------------------------------	-----

## 略語表

Ang-1	Angiopoietin-1
APCI	Atomospheric pressure chemical ionization
br	broad
COSY	Correlated spectroscopy
d	doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DFX	Deferoxamine
DMSO	Dimethylsulfoxide
DQF-COSY	Double quantum filtered-COSY
EPO	Erythropoietin
ESI	Electrospray ionization
GFP	Green fluorescent protein
HIF	Hypoxia-inducible factor
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HRE	Hypoxia response element
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
INADEQUATE	Incredible natural abundance double quantum transfer experiment
IR	Infrared
MS	Mass spectrometry
NHDF	Normal human dermal fibroblasts
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
ODS	Octadecylsilyl
q	quartet
ROESY	Rotating frame overhauser effect spectroscopy
s	singlet
t	triplet
TMS	Tetramethylsilane
TOF-MS	Time of flight-MS
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 第1章 序論

## 第1節 血管の役割

血管は、全身に酸素と栄養を供給し、二酸化炭素と老廃物を回収する重要な器官である。正常な血管は血管内腔を覆う1層の血管内皮細胞と、その外側を被覆する周細胞等で構成され、内皮細胞同士の接着や透過に関わるタンパク質を調節することで血管内外への物質の運搬を行っている。

血管が動脈硬化や血栓等で狭窄、あるいは閉塞すると、血流が滞り、細胞は低酸素・低栄養状態、すなわち虚血状態に陥る。特に、酸素は、生命活動のエネルギーであるアデノシン三リン酸（ATP）の産生に必須であることから、低酸素状態は、細胞の機能障害や壊死を招く。細胞壊死に至るまでの時間は、中枢神経細胞で3～5分、心筋細胞で20～60分<sup>1</sup>と非常に短く、虚血状態の持続は、たとえ一過性であっても生命を危険にさらす。実際、2015年における全世界の死亡原因の第1位は虚血性心疾患、2位は脳卒中であり、総死亡者数5640万人のうち、1500万人が虚血が関係する疾患で亡くなっている<sup>2</sup>。

虚血による障害を軽減するには虚血部位への血流回復が必要であり、今までに血管形成術等の外科的手法や、血栓溶解薬等の開発がなされてきた。そして、現在、これらの治療法が適応できない症例を主な対象として、治療的血管新生と呼ばれる治療法が開発が行われている。

## 第2節 治療的血管新生

### 1-2-1 治療的血管新生

血管新生とは、生体が有する新しい血管を作り出すための仕組みであり、治療的血管新生とは、血管新生を促進したり、側副血行を発達させたりすることによって、虚血部位の血流を回復し、細胞の機能障害や壊死を回避・軽減させようとする取り組みである。今までに血管新生に関わる血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）や塩基性繊維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth

factor; bFGF) などの血管新生作用を有する因子の補充や、それらの遺伝子発現を利用した治療が試みられている<sup>3,4</sup>。

### 1-2-2 VEGF

VEGF は、1980 年代に、血管透過性因子、および血管内皮細胞増殖因子として単離・クローニングされた糖タンパク質である<sup>5,6</sup>。VEGF (VEGF-A) は、血管内皮細胞膜上に特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼ VEGFR2 を介して、血管内皮細胞の遊走、増殖、血管透過性の亢進を行う等、血管新生の開始から進行までに中心的な役割を果たしている。

VEGF を用いた治療的血管新生の研究は、その発見以降、精力的に行われ、下肢虚血や、心筋梗塞の動物モデルに VEGF タンパクを投与することで、毛細血管数の増加や側副血行の発達促進等が認められたという報告<sup>7,8</sup>や、下肢虚血患者に VEGF 遺伝子を含むプラスミドベクターを投与することで病態が改善されたという報告<sup>9</sup>等がなされている。

その一方で、虚血性心疾患患者に VEGF タンパクを投与した第 II 相試験 (VIVA trial)<sup>10</sup> や、VEGF プラスミドを投与した第 II 相試験 (Euroinject One Trial)<sup>11</sup> では、投与群とプラセボ群で有意差がないという報告がなされる等、すべての試験において十分な成果が得られているわけではない。

加えて、過剰な VEGF 作用は、周細胞等の剥離と透過性の亢進を誘導し、血管内容物が漏出しやすい脆弱な血管を誘導する。病態の改善が認められたとする上述の下肢虚血患者への投与においても、透過性の亢進に起因した浮腫が認められ、治療的血管新生を VEGF の単独利用で達成することの難しさを表しているといえる。

### 1-2-3 FGF

FGF は、1970 年代に繊維芽細胞の増殖を促進する因子として脳下垂体より発見されたポリペプチドである<sup>12,13</sup>。今までに aFGF や bFGF 等、20 種以上が発見され、血管新生因子として古くから研究されている。

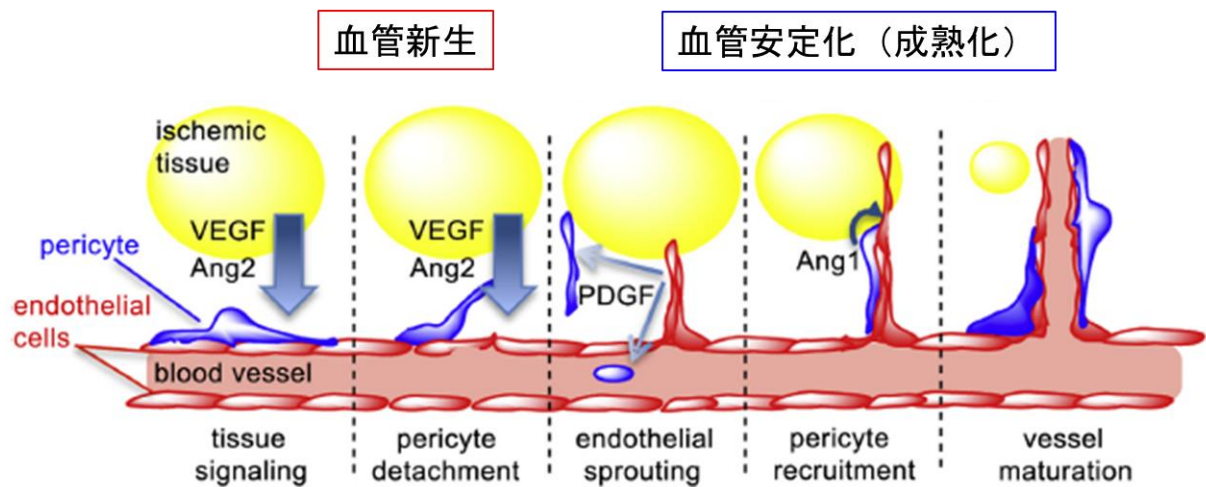
Masaki らが下肢虚血の動物モデルにおいて、VEGF 遺伝子を投与した群は、浮腫等により予後を悪

化させたが、bFGF 遺伝子を投与した群は、病態の改善が認められたと報告しているように<sup>14</sup>、過剰な bFGF は、VEGF や肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor の活性を抑制して、機能的な血管の形成を促進すると考えられている。一方で、FGF を単独で用いた臨床試験では、VEGF 同様、十分な成果は得られていない<sup>15,16</sup>。VEGF、および FGF の単独利用によって生じる課題は、両者の投与タイミングや投与濃度を調整してバランスよく併用することで解決できるのかもしれない。

### 第3節 研究の目的

第1節で述べたとおり、正常な血管は、血管内腔を覆う1層の血管内皮細胞とその外側を被覆する周細胞等で構成されている。

成体における代表的な血管新生の様式は発芽型といわれるもので、血管新生と血管安定化という2つの重要な過程により成されている（図 I-1）。発芽型血管新生では、まず既存の血管から周細胞の離脱と血管内皮細胞の細胞間接着の緩みが誘導され、血管が不安定化する。続いて、血管内皮細胞の遊走・増殖が促され、既存の血管から新たな血管が伸長される（血管新生）。その後、緊密な内皮細胞間接着の形成や、新生血管外側への周細胞の集積を経て、構造的に強固な機能血管が形成される（血管安定化）。



Brudno Y. *et al.* Biomaterials 34, 9201-9209 (2013)の Fig1を元に著者が手を加えて作成した

図 I-1 Process of sprouting angiogenesis.

Abbreviations: Ang-2, angiopoietin-2; PDGF, platelet-derived growth factor.

この血管新生、および血管安定化の過程には、従来の治療的血管新生で注目されてきた VEGF や bFGF 以外にも、多くの血管新生因子、抗血管新生因子や血管安定化因子が関与している<sup>3</sup>。そして、これらの因子の活性は、その量的バランスや、血管内皮細胞とそれを取り巻く周細胞間での物理的な相互作用等、様々な要因で制御され、はじめて機能的な血管が形成される。第2節で述べた VEGF や bFGF 等の血管新生因子の単独補充で十分な機能血管を誘導できなかったのは、複雑な血管形成の過程を十分に促進できなかったためと考えられる。そこで、血管新生、および血管安定化の2つの過程を、様々な因子が関与する生体本来の血管形成環境で促進させることができる物質は、機能的な血管の形成を促進し、治療的血管新生に有用であると考えた。そして、そのような物質を取得するために、以下に述べる2つのアプローチを考えた。1つは、生体が低酸素条件下で行う血管新生を模倣するアプローチで、もう1つは血管新生と同時に血管安定化も誘導するアプローチである。

低酸素条件下の血管新生を模倣するアプローチでは、この過程に重要な役割を果たすことが知られている hypoxia-inducible factor に着目したスクリーニングを実施することにした (hypoxia-inducible factor 活性化物質の探索)。

血管新生と血管安定化の両方を誘導するアプローチにおいては、安定化の機構が十分には解明されていないため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) とヒト皮膚繊維芽細胞 (normal human dermal fibroblasts; NHDF) との共培養系を用いたフェノタイプアッセイを用いたスクリーニングを実施することにした (機能的血管形成促進物質の探索)。

また、創薬シードの探索ソースには微生物培養液サンプルを用いることとし、低濃度で活性を示す物質の取得を目指した。

## 第4節 Hypoxia-inducible factor 活性化物質の探索

### 1-4-1 Hypoxia-inducible factor

細胞は低酸素にさらされると、低酸素応答遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群の発現を誘導して低酸素状態に順応する。その低酸素応答機構で中心的な役割を果たしているのが、転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) である。

HIF は、1992 年に Semenza と Wang によって低酸素依存的に造血因子 erythropoietin (EPO) の転写を誘導する因子として発見され<sup>17</sup>、それ以降、HIF が発現を制御する遺伝子が次々と同定された。これまでに 800 以上もの遺伝子を制御することが確認され<sup>18</sup>、その中には、血管新生に関与する VEGF、VEGFR2、bFGF をはじめ、血管新生の初期段階で血管を不安定化する angiopoietin-2 や、血管網の発達した結合組織の形成を誘導する血小板由来成長因子 platelet-derived growth factor beta polypeptide 等も含まれている。表 I-1 に HIF が発現誘導する因子の一例を示す。



表 I-1 **Factors induced by HIF.**

Blood/Blood vessel	
	adrenergic receptor
ADM	adrenomedullin
Ang-2	angiopoietin-2
	ceruloplasmin
EPO	erythropoietin
EPOR	erythropoietin receptor
ET-1	endothelin-1
HO-1	heme oxygenase 1
iNOS	inducible NO synthase
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PDGFb	platelet-derived growth factor beta polypeptide
Tf	transferrin
TfR	transferrin receptor
uPAR	urokinase plasminogen ativator receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR1, 2	VEGF receptor 1, 2

Glycolysis system / Cell proliferation	
ALDA	aldolase A
Glut-1	glucose transporter 1
Glut-3	glucose transporter 3
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HK-1, 2	hexokinase 1 and 2
IGF-2	insulin-like growth factor-2
IGFBP-1 ~ 3	IGF binding protein 1 ~ 3
PGK1	phosphoglycerate kinase 1
TGF-β3	transforming growth factor β3

etc.

#### 1-4-2 HIF の制御機構

HIF は、 $\alpha$ -サブユニットと  $\beta$ -サブユニットから成るヘテロ二量体の転写因子であり、 $\alpha$ -サブユニットが異なる 3 種類 (HIF-1、HIF-2、および HIF-3) が存在している。 $\beta$ -サブユニットは、これら 3 種で共通しており、異物代謝に必要な aryl hydrocarbon receptor (AhR) や、中枢神経系の発生に重要な single minded (SIM) 等のパートナー因子としても知られる、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) と同一物質である。これら HIF の転写誘導は、 $\alpha$ -サブユニットの安定化によって制御されている。最も良く研究されている HIF-1 の制御機構について、概要を以下に示す。

HIF-1 $\alpha$  は、細胞内で恒常的に生産されているが、常酸素状態では2か所のプロリン残基（Pro402とPro564）が3種のHIF prolyl hydroxylase isoforms (PHD1-3)によって、水酸化を受ける。水酸化されたHIF-1 $\alpha$ は、von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product (pVHL)によってユビキチン化され、ユビキチン-プロテアソーム経路で速やかに分解される。一方、低酸素状態では、PHDの活性が抑制され、HIF-1 $\alpha$ の分解が行われない。分解を受けなかったHIF-1 $\alpha$ は核へと移行し、HIF-1 $\beta$ とヘテロ二量体を形成する。そして、目的とする低酸素応答遺伝子上流に位置するhypoxia-responsive element (HRE)に結合し、その後、コアクチベータであるCBP/p300と複合体を形成し、転写を誘導する（図I-2）。

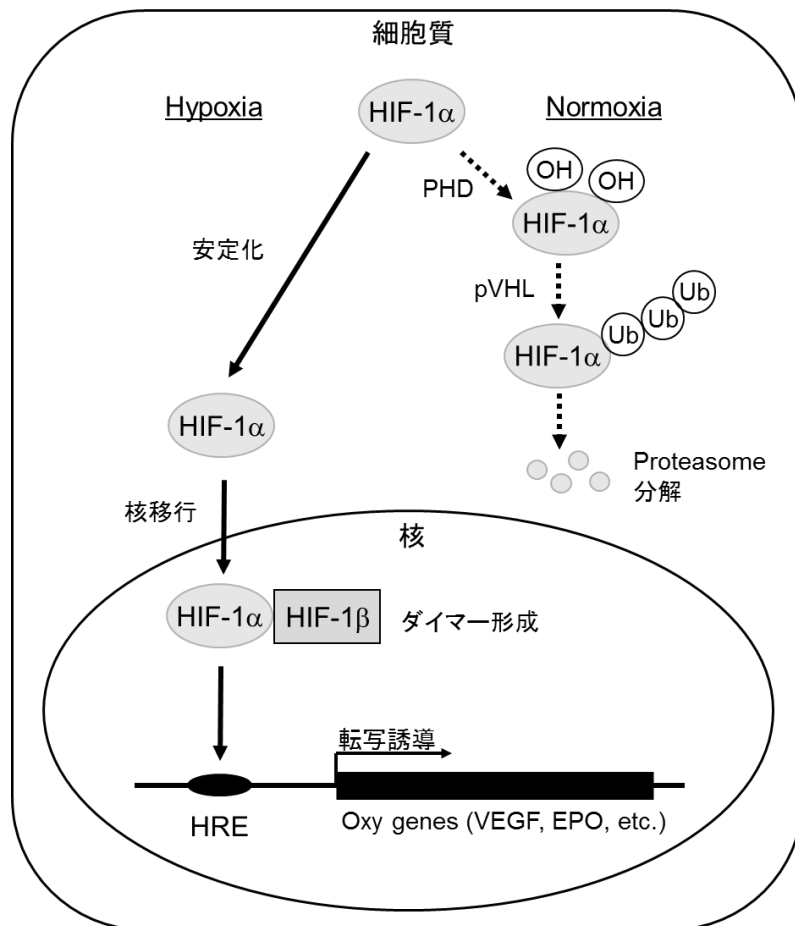


図 I-2 Regulation by HIF.

Abbreviations: pVHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product; Ub, ubiquitin.

### 1-4-3 HIF 活性化物質の探索

上述したとおり、HIF は低酸素条件下で活性化され、各種血管新生因子の発現を誘導する。そこで、常酸素状態で HIF を活性化させる物質には、生体が有している血管新生環境を模倣させることが可能と考えられた。しかしながら、本研究を開始した時点で、HIF を活性化させることができたのは、還元剤、コバルト、あるいは deferoxamine (DFX) のような鉄キレーターであり<sup>19</sup>、これらは選択性の観点からも創薬シードとして適していなかった。そこで、HIF は、天然物スクリーニングの魅力的なターゲットと考え、微生物培養液サンプルからの探索を実施した (第 2 章)。

なお、本論文の第 2 章は既報論文 2 報<sup>20,21</sup>に基づいて記述したものである。

## 第 5 節 機能的血管形成促進物質の探索

### 1-5-1 Angiopoietin-1

第 3 節で述べたとおり、機能的な血管の形成には、血管新生と血管安定化という 2 つの過程が存在しているが、近年、特に注目を集めているのが血管安定化の過程である。そして、この血管安定化の過程で重要な役割を果たしている因子が、angiopoietin-1 (Ang-1) である。

Ang-1 は、1996 年に血管内皮細胞膜上に特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼ Tie2 のリガンドとして発見された糖タンパク質である<sup>22,23</sup>。Ang-1 は、Tie2 を介して、血管内皮細胞同士の接着の増強や、周細胞のリクルートを誘導することで、血管の安定化に寄与している<sup>24</sup>。例えば、皮膚で Ang-1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいて、強固な血管構造を誘導し、血管透過性の抑制が認められたという報告<sup>25</sup>や、cartilage oligomeric matrices protein (COMP) と Ang-1 の融合タンパク質である COMP-Ang-1 が未熟な腫瘍血管を周細胞で覆われた安定化血管に変換したとの報告<sup>26</sup>等、Ang-1 存在下で太く漏れない血管が形成されるという報告が複数なされている。

### 1-5-2 機能的血管形成促進物質の探索

血管新生と同時に、Ang-1 のように血管安定化も促進する物質は、機能的な血管の形成を可能とし、

治療的血管新生に有用と考えられた。しかし、そのような活性を有する薬剤は、未だ開発されていない。

血管形成の過程は、第3節で述べたように、様々な因子が関与する複雑なものであるが、特に安定化の機構は十分には解明されていない。そこで、創薬シーズの探索には、より生体の血管形成環境に近づけられるように、単独の細胞から成るアッセイ系ではなく、HUVECs と NHDF の共培養系を用いたフェノタイプアッセイを構築し、その系を用いて Ang-1 様の形態変化を誘導する物質を探索することとした。そして、血管新生・血管安定化のような複雑な表現型を達成するには、微生物培養液サンプルからの探索が望ましいと考え、スクリーニングを実施した（第3章）。

なお、本論文の第3章は既報論文3報<sup>27~29</sup>に基づいて記述したものである。

## 第2章 Hypoxia-inducible factor 活性化物質の探索

### 第1節 スクリーニング系

Hypoxia-inducible factor (HIF) 活性化物質の探索は、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 に、HIF 応答性ルシフェラーゼレポータープラスミドである pHRE4-Luc プラスミドを導入して樹立した細胞株 (HRE4 細胞) を用いて実施した。pHRE4-Luc プラスミドは、プラスミド pGL3-Promoter (Promega 社製) の SV40 プロモーターの上流に hypoxia response element (HRE; TACGTG) の配列をタンデムに 4 回導入して作製した。概要を図 II-1 に示す。

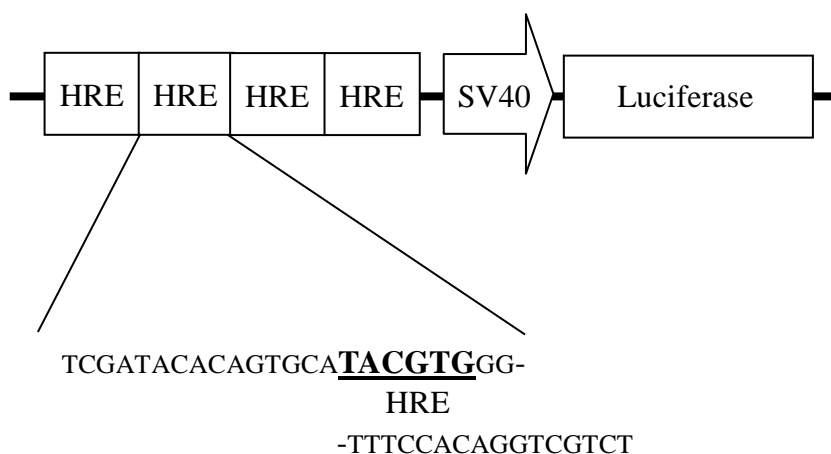


図 II-1 HIF-dependent reporter gene construct (pHRE4-Luc).

HRE4 細胞は、低酸素培養 (1% O<sub>2</sub>) や既知の HIF 活性化物質である、鉄キレーターの deferoxamine (DFX, 100 μM) 処理により、強力にルシフェラーゼ活性を誘導したことから (図 II-2)、HIF 活性化物質のスクリーニングに利用可能と判断した。

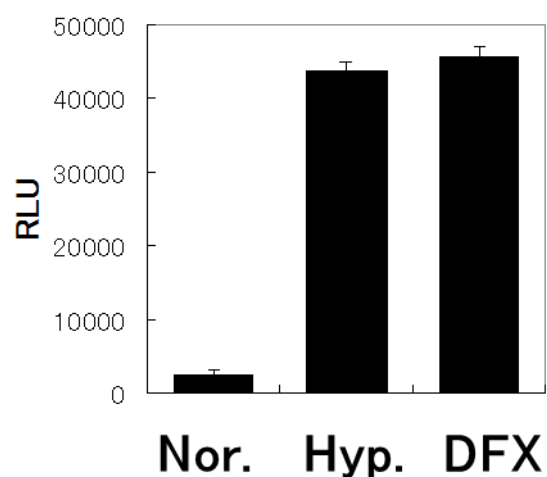
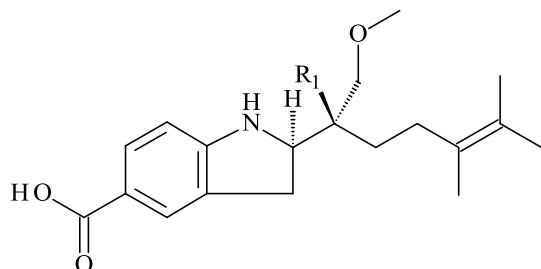


図 II-2 Validations of HRE4 cells.

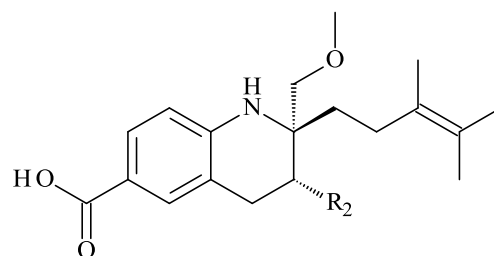
HRE4 cells were treated with normoxia (18% O<sub>2</sub>), hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or DFX (100 μM). Means ± SD of three independent experiments. Abbreviations: RLU, relative luminescent units; Nor., normoxia; Hyp., hypoxia.

本アッセイ系を用いて、微生物培養液サンプルをスクリーニングした結果、*Streptomyces* sp. SANK 60101 の培養液サンプルに強い活性を見出し、その培養液から新規 HIF 活性化物質 A-503451 類を見出した。発見した A-503451 類の生産菌、発酵生産、単離精製、物理化学的性質、構造解析、生物活性、および誘導体の作製とその生物活性について、以下の第 2 節で詳述する。

## 第2節 A-503451 類の発見



A-503451 A  $R_1 = \text{Cl}$   
A-503451 B  $R_1 = \text{OH}$



A-503451 C (virantmycin)  $R_2 = \text{Cl}$   
A-503451 D  $R_2 = \text{OH}$

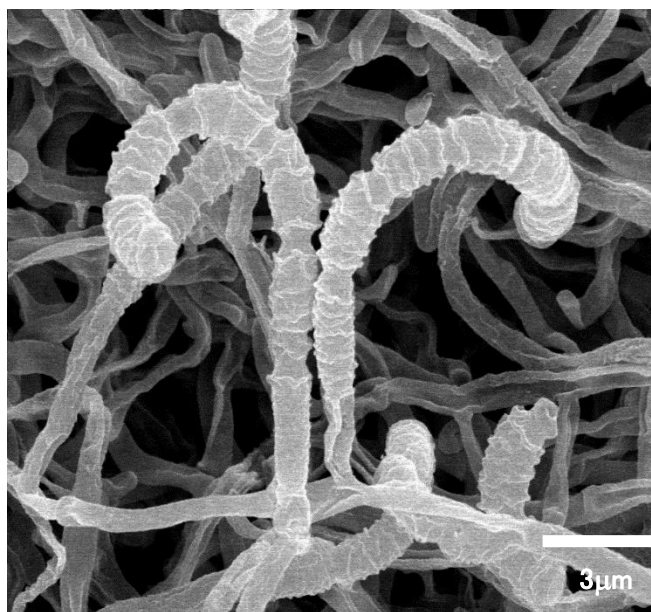
### A-503451 類

#### 2-2-1 生産菌

SANK 60101 株は、茨城県の土壌より分離された。

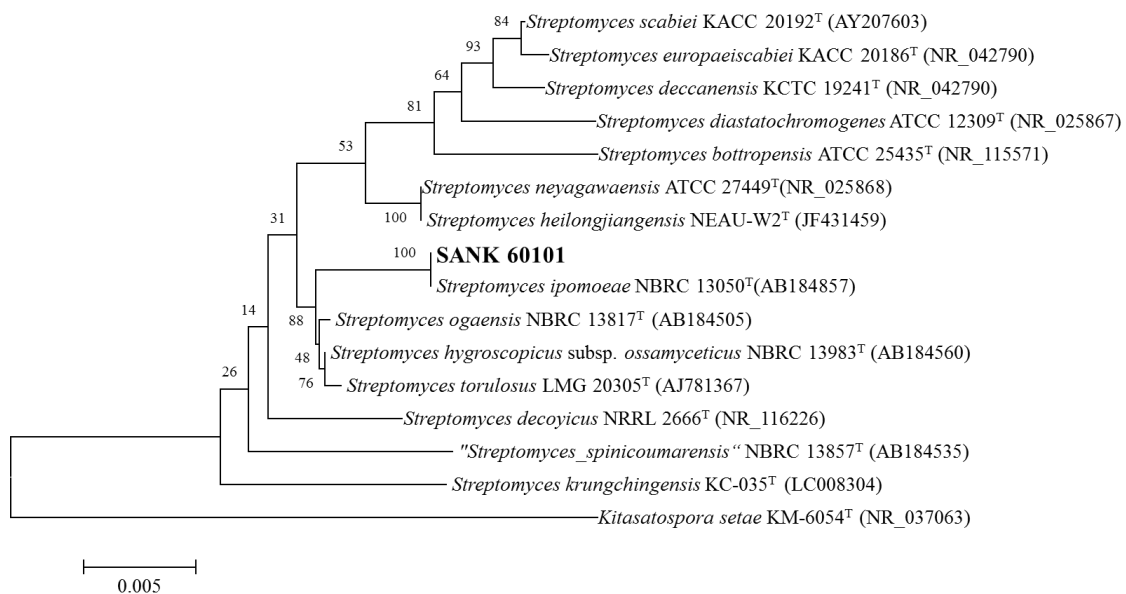
本株は、*Rectinaculiaperti* タイプの孢子連鎖を形成し、その孢子連鎖のほとんどは、1つの鎖あたり3~10個の孢子を有する短いもので、フック、もしくはループ状、すなわち、不完全な螺旋、もしくは1、2回転の螺旋状だった。孢子の形は、 $0.4\sim 0.6 \times 1.5\sim 2.0 \mu\text{m}$ の楕円状で、その表面は平滑、もしくは皺状だった(図 II-3)。基生菌糸の色は、薄黄、薄黄味茶から黄味灰であり、気菌糸の色は薄青から青味灰だった。メラニン色素は、ペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地 (ISP 培地 No. 6) においてもチロシン寒天培地 (IPS 培地 No. 7) においても生産されなかった。生育温度は $14\sim 45 \text{ }^\circ\text{C}$ だった。培地中の塩化ナトリウム量は、0~3%の範囲で生育可能だった。でんぷん、カゼイン、およびゼラチンは分解可能だった。D-グルコース、L-アラビノース、D-キシロース、イノシトール、D-マンニトール、D-フルクトース、L-ラムノース、スクロース、およびラフィノースは、すべて生育に利用可能だった。全細胞加水分解物からLL-ジアミノピメリン酸が検出されたことから、本株はtype Iの細胞壁を有していることが明らかとなった。全細胞中の糖成分に特徴的なパターンは認められなかった。そして、16S リボゾーム DNA 配列 (1462 塩基) を EzTaxon-e データベース<sup>30</sup>を用いて検索したところ、SANK

60101 株と *Streptomyces ipomoeae* NBRC 13050<sup>T</sup> (AB184857) が 100% の相同性を示した。以上のことから、本株を *Streptomyces* sp. SANK 60101 と命名した。MEGA program (version 6.05, <http://www.megasoftware.net/>) を用いて作成した系統樹を図 II-4 に示す。



☒ II-3 Scanned electron micrograph of strain SANK 60101 on potato extract-carrot extract agar, 28 °C for 2 weeks.





☒ II-4 The taxonomic position of the strain SANK 60101.

Bootstrap values (%) are indicated at the branches from 1000 replications. The scale bar below the phylogenetic tree indicates substitution per site.

#### 2-2-2 発酵生産

培地 2-1 450 ml を含む 2 L 容三角フラスコをオートクレーブ滅菌し、そこにスラントで生育させた *Streptomyces* sp. SANK 60101 株を一白金耳接種した。これを回転振盪培養機で、回転数 210 rpm、28 °C で 144 時間培養し、種培養液とした。

次に、培地 2-1 15 L を 30 L 容 Jar 培養機に入れ、121 °C で 30 分間加熱滅菌した。これを 28 °C に冷却した後、種培養液 450 ml を接種し、通気量 15 L/分 で溶存酸素量 5.0 ppm を保持させるように回転数を 100~280 rpm の範囲で調整しながら、28 °C で 24 時間通気攪拌培養し、前培養液とした。

次に、培地 2-2 300 L を 600 L 容 tank 培養機に入れ、121~127 °C で 35 分間加熱滅菌した。これを 26 °C に冷却した後、前培養液 9 L を接種し、通気量 300 L/分 で溶存酸素量 5.0 ppm を保持させるように回転数を 83~110 rpm の範囲で調整しながら、26 °C で 168 時間通気攪拌培養した。

なお、培地 2-1 および 2-2 の組成は、実験の部に記載した。

### 2-2-3 単離精製

精製は、第1節で述べたアッセイによる活性を指標に行った。そして、活性を有する A-503451 A、および C を見出した後、これらと同様の UV スペクトルを有する物質を同培養液から探索し、活性を有さない類縁体 A-503451 B、および D を見出した。

A-503451 類の代表的な精製方法を図 II-5 に示す。

培養液 310 L を塩酸で pH 5.0 に調整した後、アセトン 310 L を加えて抽出した。これにろ過助剤として Celite545 (Thermo Fisher Scientific 社製) 10 kg を加えてろ過し、アセトン抽出液 570 L を得た。このアセトン抽出液の pH を塩酸で 2.9 に調整した後、酢酸エチル 300 L を加えて分配し、酢酸エチル層 430 L を得た。これを飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。それをろ紙でろ過後、減圧下濃縮乾固して A-503451 A、B、C、および D を含む抽出物 282.4 g を得た。

次に、この抽出物を ODS オープンカラム (Cosmosil 140C18-OPN、ナカライテスク社製、14L) を用いて精製した。抽出物 282.4 g をメタノール 500 ml に溶解し、30% アセトニトリル水で平衡化したカラムにチャージした。このカラムを 40%、50%、および 60% アセトニトリル水、各 40 L で段階溶出し、溶出液を 10 L ずつ 12 分画した。

#### A-503451 A、および C の精製

60% アセトニトリル水で溶出した A および C 物質を含む ODS オープンカラムの分画フラクション No.9~11 を集め、それを減圧下濃縮してアセトニトリルを留去後、塩酸で pH 3.0 に調整した。そこに酢酸エチルを加えて抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。それをろ紙でろ過後、減圧下濃縮乾固して A、および C 物質を含む粗精製物 16.8 g を得た。この粗精製物を分取用 HPLC カラム (YMC Pack R-3105-20AM、100 i. d. × 500 mm、YMC 社製) で分離した。アセトニトリル : 0.5% トリエチルアミンリン酸バッファー pH 5.0 = 3 : 2 で平衡化した HPLC カラムに、粗精製物 16.8 g をメタノール 100 ml に溶解した試料溶液 50 ml を注入後、同じ溶媒で、流速 250 ml/分で溶出した。検出波長 300 nm で溶出液をモニターし、保持時間 52.8~60.8 分、および 62.4~66.6 分に溶出されるピークを分取した。残りの試料溶液 50 ml についても同様の操作を行い、ピーク

ごとに分取液をまとめた。それぞれの分取液について、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、保持時間 52.8～60.8 分のピークより C 物質を含む粗精製物 5.34 g を、保持時間 62.4～66.6 分に溶出されるピークより A 物質の白色粉末 960 mg を得た。

C 物質を含む粗精製物 5.34 g については、さらに上述の分取用 HPLC カラムを用いて、同じ溶媒、同じ流速にて精製を行った。検出波長は 210 nm を用い、保持時間 53.2～61.6 分に溶出されるピークを分取した。得られた分取液について、減圧下濃縮してアセトニトリルを留去し、リン酸で pH 3.0 に調整後、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、C 物質の白色粉末 4.88 g を得た。

#### A-503451 B および D の精製

50% アセトニトリル水で溶出した B および D 物質を含む ODS オープンカラムの分画フラクション No. 5～6 を集めた。それを減圧下濃縮してアセトニトリルを留去し、塩酸で pH 3.0 に調整後、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、B、および D 物質を含む粗精製物 20.1 g を得た。この粗精製物を上述の分取用 HPLC カラムで分離した。アセトニトリル：0.5% トリエチルアミンリン酸バッファー pH 5.0 = 9 : 11 で平衡化した HPLC カラムに、粗精製物 20.1 g をメタノール 100 ml に溶解した試料溶液 50 ml を注入後、同じ溶媒で、流速 240 ml/分で溶出した。検出波長 300 nm で溶出液をモニターし、保持時間 49.6～62.8 分、および 66.8～74.8 分に溶出されるピークをそれぞれ分取した。残りの試料溶液 50 ml についても同様の操作を行い、ピークごとに分取液をまとめた。それぞれの分取液について、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、保持時間 49.6～62.8 分のピークより D 物質を含む粗精製物 7.73 g を、保持時間 66.8～74.8 分に溶出されるピークより B 物質の白色粉末 1.55 g を得た。

D 物質を含む粗精製物 7.73 g については、さらに上述の分取用 HPLC カラムを用いて、同じ溶媒、同じ流速にて精製を行った。検出波長は 210 nm を用い、保持時間 52.6～64.6 分に溶出されるピークを分取した。得られた分取液について、減圧下濃縮してアセトニトリルを留去し、リン酸で pH 3.0 に調整後、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、D 物質の白色粉末 4.86 g を得た。

Cultured broth of *Streptomyces* sp. SANK 60101, 310 L

↓ pH 5

↓ Extracted with acetone 310 L

↓ Filtered with Celite 545

Acetone extract 570 L

↓ pH 2.9

↓ Extracted with ethyl acetate 300 L

Ethyl acetate extract

↓ Concentrated to dryness

Oily substance 282.4 g

↓ Cosmosil column chromatography  
eluted with 50-60% aq. Acetonitrile

16.8 g containing A-503451 A and C

↓ Preparative HPLC  
YMC Pack R-3105-20AM,  
100 i.d. x 500 mm  
eluted with  
acetonitrile : 0.5% TEAP buffer (pH 5.0) = 3 : 2

A-503451 A  
960 mg

5.34 g containing C

↓ HPLC  
same as  
above conditions

A-503451 C  
4.88 g

20.1 g containing A-503451 B and D

↓ Preparative HPLC  
YMC Pack R-3105-20AM,  
100 i.d. x 500 mm  
eluted with  
acetonitrile : 0.5% TEAP buffer (pH 5.0) = 9 : 11

A-503451 B  
1.55 g

7.73 g containing D

↓ HPLC  
same as  
above conditions

A-503451 D  
4.86 g

☒ II-5 Isolation of A-503451s.

#### 2 - 2 - 4 物理化学的性質

A-503451 類の物理化学的性質を表 II-1 に示す。

高分解能 TOF-MS データ (ESI positive) から、A-503451 A および C の分子式を  $C_{19}H_{26}ClNO_3$ 、A-503451 B および D の分子式を  $C_{19}H_{27}NO_4$  と決定した。

UV スペクトルでは、すべての A-503451 類で 205、227、および 308 nm 付近に極大吸収が観測された。

IR スペクトルでは、すべての A-503451 類で  $3400\text{ cm}^{-1}$  付近に NH 由来、 $1670\text{ cm}^{-1}$  付近に C=O 由来の吸収が観測された。

表 II-1 Physico-chemical properties of A-503451s.

	A-503451 A (1)	A-503451 B (2)
Appearance	White powder	White powder
Molecular formula	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>
HR-TOFMS ( <i>m/z</i> )		
Found:	352.1664 [M+H] <sup>+</sup>	334.2003 [M+H] <sup>+</sup>
Calcd.:	352.1679 (for C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> ClNO <sub>3</sub> )	334.2018 (for C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub> )
[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>	+71 ( <i>c</i> 0.5, MeOH)	+30 ( <i>c</i> 0.5, MeOH)
UV λ <sub>max</sub> <sup>MeOH</sup> nm (ε)	205 (33000), 227 (12000), 308 (24000)	204 (30000), 226 (11000), 307 (19000)
IR ν <sub>max</sub> cm <sup>-1</sup> (KBr pellet)	3402, 2983, 2924, 1672, 1610, 1503, 1455, 1431, 1271, 1120, 774	3411, 3353, 2983, 2924, 1671, 1610, 1503, 1455, 1433, 1270, 1113, 774
HPLC <sup>a</sup> R.T. (minute)	9.9	4.3

	A-503451 C (3)	A-503451 D (4)
Appearance	White powder	White powder
Molecular formula	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>
HR-TOFMS ( <i>m/z</i> )		
Found:	352.1685 [M+H] <sup>+</sup>	334.2003 [M+H] <sup>+</sup>
Calcd.:	352.1679 (for C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> ClNO <sub>3</sub> )	334.2018 (for C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub> )
[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>	-14 ( <i>c</i> 0.51, CHCl <sub>3</sub> )	-14 ( <i>c</i> 0.51, MeOH)
UV λ <sub>max</sub> <sup>MeOH</sup> nm (ε)	205 (36000), 227 (11000), 307 (27000)	205 (31000), 229 (10000), 309 (24000)
IR ν <sub>max</sub> cm <sup>-1</sup> (KBr pellet)	3411, 2983, 2924, 1673, 1609, 1517, 1432, 1289, 1254, 1131, 1110, 774	3404, 2981, 2926, 1672, 1607, 1517, 1433, 1288, 1254, 1132, 1108, 774
HPLC <sup>a</sup> R.T. (minute)	8.9	3.7

Abbreviation: R.T., retention time.

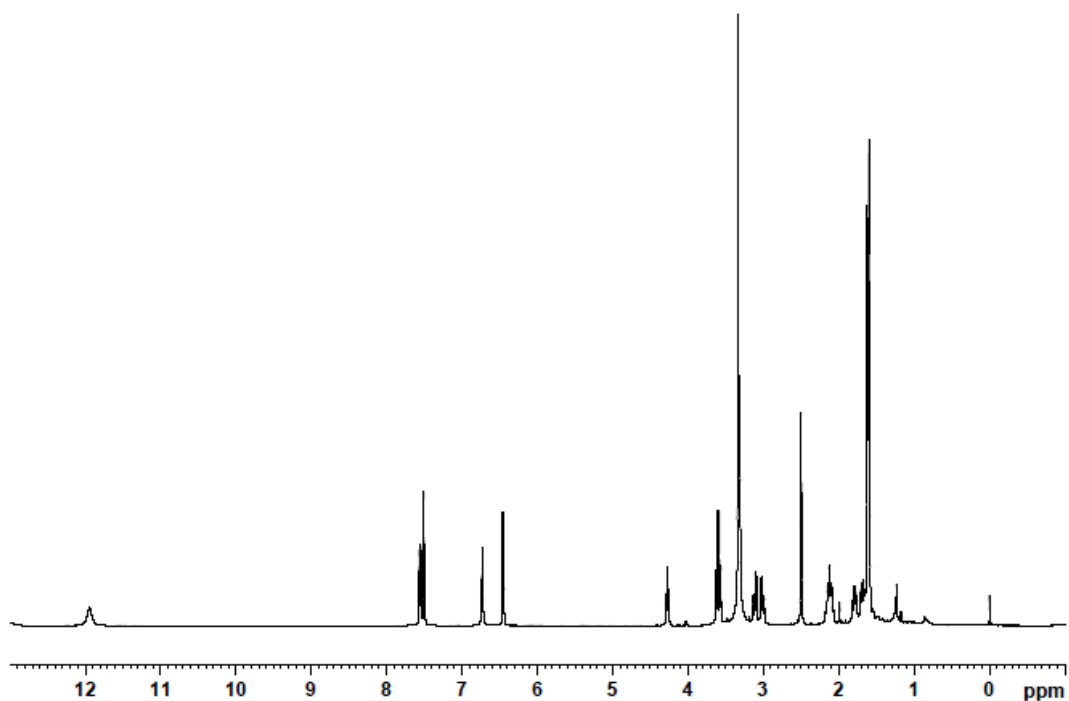
<sup>a</sup>YMC AM-312-3 (6 i.d. × 150 mm), MeCN : 0.3% TEAP buffer pH 5.0 = 3 : 2, 1.5 ml/minute

## 2-2-5 構造解析

### A-503451 A (1) の構造解析

表 II-1 に示すように A 物質の分子式は、高分解能 TOF-MS データより、 $C_{19}H_{26}ClNO_3$  と決定した。

重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^1H$  NMR スペクトルを図 II-6 に示す。本スペクトルにおいて、3 個のメチル基 ( $\delta$  1.60、1.61、および 1.62)、1 個のメトキシ基 ( $\delta$  3.34)、芳香族系 ( $\delta$  6.46～7.56)、および 2 個の交換性プロトン ( $\delta$  6.73、および 11.95) のシグナルが観測された。



☒ II-6  $^1H$  NMR spectrum of A-503451 A in  $DMSO-d_6$ .

重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを図 II-7 に示す。本スペクトルにおいて、帰属可能な 19 個のシグナルが観測され、それらは  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、HSQC スペクトルから 4 個のメチル炭素、4 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素、および 7 個の四級炭素に分類された。観測された 9 個の  $sp^2$  炭素は、6 個が芳香族、2 個がオレフィン、そして 1 個がカルボニル炭素であることが強く示唆された。

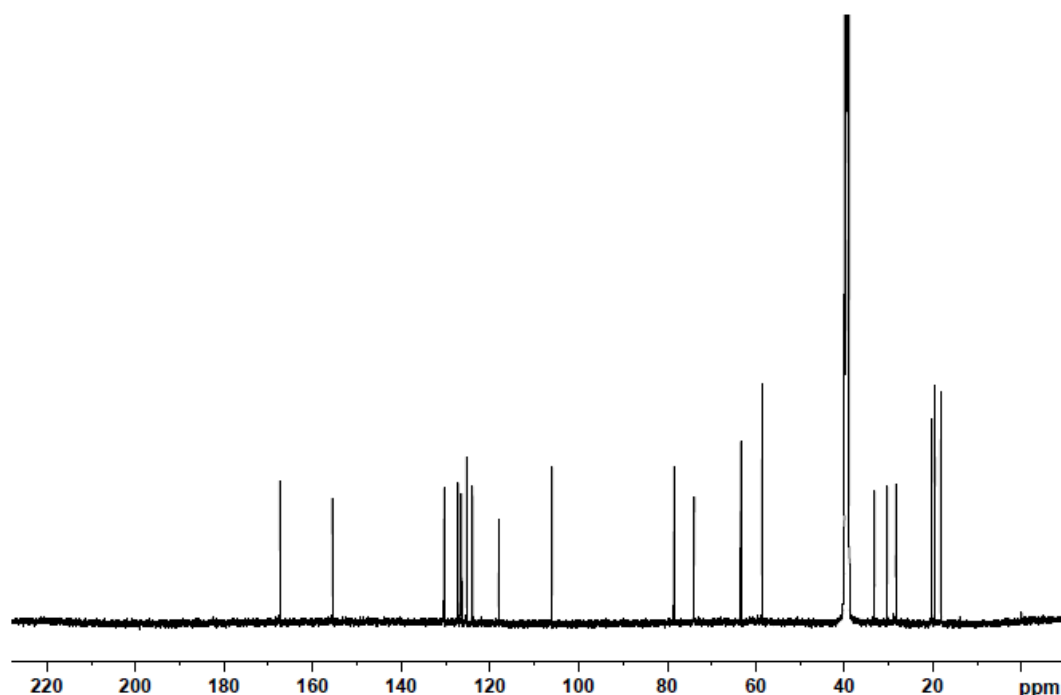


図 II-7  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of A-503451 A in  $\text{DMSO}-d_6$ .

2 個の交換性プロトンを除くすべてのプロトンは、HSQC スペクトルによってカーボンとの結合が明らかにされた。A 物質の  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータの帰属を表 II-2 に示す。加えて、上述した高分解能 MS データ、および、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータから得られた情報からは、観測された 2 個の交換性プロトンが 2 級アミンとカルボキシ基に由来するものであることが示唆された。

なお、表 II-2 には、後述する A 物質の構造に基づいたナンバリング、および B 物質の帰属についても記した。



表 II-2  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of A-503451 A and A-503451 B in DMSO- $d_6$ .

Position	A-503451 A (1)		A-503451 B (2)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
NH		6.73 (1H, d, 2.1 Hz)		6.34 (1H, d, 1.4 Hz)
1	118.1 (s)		117.5 (s)	
2	125.2 (d)	7.51 (1H, br. s)	125.2 (d)	7.48 (1H, br. s)
3	127.2 (s)		128.0 (s)	
4	155.6 (s)		156.3 (s)	
5	106.0 (d)	6.46 (1H, d, 8.0 Hz)	105.9 (d)	6.43 (1H, d, 8.3 Hz)
6	130.3 (d)	7.56 (1H, dd, 1.7, 8.0 Hz)	130.2 (d)	7.53 (1H, dd, 1.6, 8.3 Hz)
7	167.4 (s)		167.5 (s)	
8	30.4 (t)	H <sub>a</sub> 3.01 (1H, dd, 8.0, 16.7 Hz) H <sub>b</sub> 3.11 (1H, dd, 10.3, 16.7 Hz)	28.8 (t)	H <sub>a</sub> 2.89 (1H, dd, 9.7, 16.4 Hz) H <sub>b</sub> 2.97 (1H, dd, 9.0, 16.4 Hz)
9	63.4 (d)	4.28 (1H, ddd, 2.1, 8.0, 10.3 Hz)	64.2 (d)	3.97 (1H, dt, 1.9, 9.5 Hz)
10	78.5 (s)		73.2 (s)	
11	33.3 (t)	H <sub>a</sub> 1.68 (1H, ddd, 5.1, 12.0, 14.5 Hz) H <sub>b</sub> 1.79 (1H, ddd, 5.1, 11.5, 14.5 Hz)	31.8 (t)	1.37 (2H, m)
12	28.4 (t)	2.12 (2H, m)	27.6 (t)	H <sub>a</sub> 1.97 (1H, dt, 5.6, 12.2 Hz) H <sub>b</sub> 2.06 (1H, dt, 4.9, 12.2 Hz)
13	126.5 <sup>a</sup> (s)		127.7 (s)	
14	124.0 <sup>a</sup> (s)		122.8 (s)	
15	19.6 <sup>b</sup> (q)	1.62 (3H, s)	19.6 <sup>a</sup> (q)	1.60 (3H, s)
16	73.9 (t)	H <sub>a</sub> 3.58 (1H, d, 10.3 Hz) H <sub>b</sub> 3.62 (1H, d, 10.3 Hz)	75.0 (t)	3.30 (2H, m)
17	18.2 (q)	1.60 (3H, s)	18.2 (q)	1.57 (3H, s)
18	20.3 <sup>b</sup> (q)	1.61 (3H, s)	20.3 <sup>a</sup> (q)	1.57 (3H, s)
19	58.6 (q)	3.34 (3H, s)	58.6 (q)	3.29 (3H, s)
COOH		11.95 (1H, br. s)		11.87 (1H, br. s)
10-OH				4.26 (1H, br. s)

Chemical shifts are given in ppm referenced to TMS.

a,b) interchangeable.

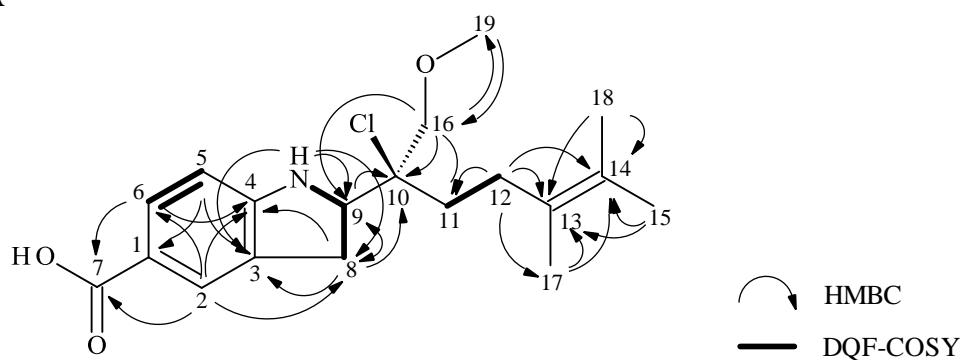
塩素原子の結合部位を除いた部分構造は、DQF-COSY、HSQC、およびHMBC等の各種NMRスペクトルによって解析された。DQF-COSYスペクトルにおいては、3個のスピンス、すなわちH-5~H-6、H-8~NH-9、およびH-11~H-12が観測された。HMBCスペクトルでは、図II-8Aに示すようなC-Hロングレンジ相関が観測され、主要となる骨格が明らかとなった。特に、NH-9とC-8、H-8とC-3、およびH-8とC-4との相関は、A-503451Aがインドリン骨格を有していることを示した。

塩素原子の結合部位については、直接的な証明はないが、唯一適した箇所が $sp^3$ の四級炭素であるC-10であった。そして、C-10の化学シフト値 $\delta$ 78.5もその結合を良く支持した。

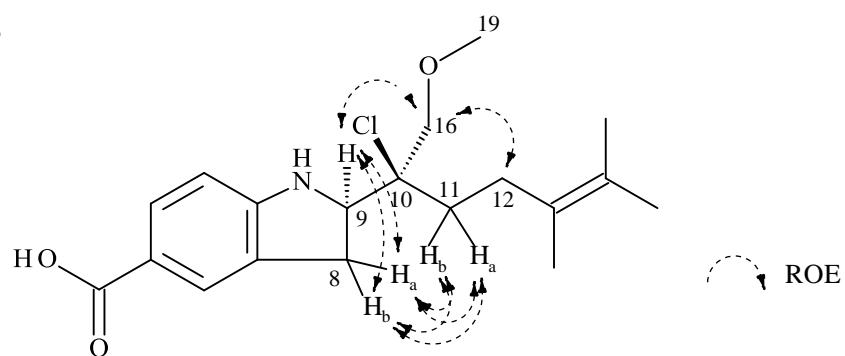
相対配置は、当初 *J*-HMBC スペクトル<sup>31, 32</sup>での決定を試みた。しかし、A-503451 A の  $^3J_{C-16, H-9}$  は、3.51 Hz (middle value) であり、かつ、C-11 と H-9 との相関が弱かったため、*J*-HMBC スペクトルを用いた解析は不可能だった。そのため、相対配置は ROESY スペクトルを用いて決定した<sup>33</sup>。ROESY スペクトルにおいて、H-9 と H-16<sub>a,b</sub>、H-8<sub>a,b</sub> と H-11<sub>a,b</sub> との間に鍵となる相関が観測された。H-9 が Pseudo-axial  $\alpha$ -oriented なプロトンと仮定したとき、すなわち 9 位を *R*\*と仮定したとき、観測された ROE 相関は、図 II-8B にあるように 10 位が *S*\*であることを示す。加えて、H-12 と H-16<sub>a,b</sub> の間に観測された相関がその結果を良く支持したことから、A 物質の相対配置を (*9R*\*, *10S*\*) と決定した。

以上のことから A 物質の構造を図 II-9 のように決定した。なお、図 II-9 には、後述する類縁体すべての構造を示した。

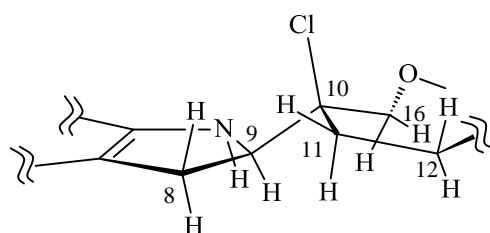
A



B

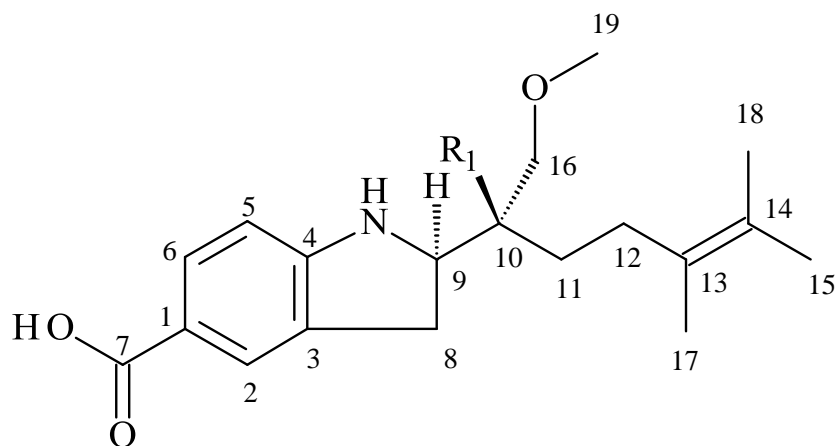


II

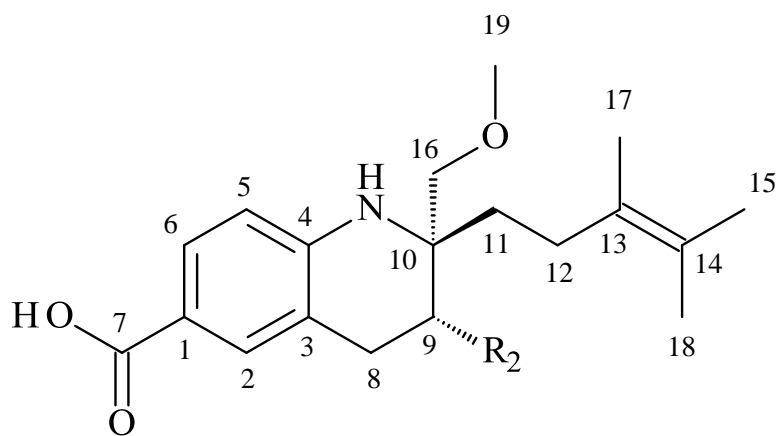


☒ II-8 NMR data of A-503451 A.

(A) HMBC and DQF-COSY data. (B) ROE data.



A-503451 A (**1**)  $R_1 = \text{Cl}$   
 A-503451 B (**2**)  $R_1 = \text{OH}$



A-503451 C (virantmycin, **3**)  $R_2 = \text{Cl}$   
 A-503451 D (**4**)  $R_2 = \text{OH}$

☒ II-9 Structures of A-503451s.

## A-503451 B (2) の構造解析

表 II-1 に示すように、高分解能 TOF-MS データより得られた B 物質の分子式は、A あるいは C 物質の分子式から塩素原子が除かれ、代わりに水素原子と酸素原子がそれぞれ 1 つずつ加わったものだった。重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータの帰属を表 II-2 に示す。

B 物質の IR、UV、重ジメチルスルホキシド溶液中にて測定した  $^1\text{H}$ 、および  $^{13}\text{C}$  NMR の各種スペクトル（交換性プロトンを除く）は、A 物質に類似していた。これらのデータは、A 物質における C-10 の塩素原子が、B 物質においては水酸基に置換されていることを示した。HMBC を含む各種 NMR スペクトルを用いて、さらに比較検討を進め、B 物質の平面構造を決定した。

B 物質の相対配置は A 物質と同様に ROESY スペクトルを用いて決定した。平面構造の決定の際に使用した重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^1\text{H}$  NMR スペクトルは、H-16<sub>a</sub> と H-16<sub>b</sub> のシグナルが重複し ( $\delta$  3.30, 2H, m)、相対配置の解析には不向きであった。そこで、使用溶媒を重クロロホルムに変更し、これらのシグナルを分離させた (H-16<sub>a</sub>;  $\delta$  3.44, 1H, d,  $J=9.2$  Hz, H-16<sub>b</sub>;  $\delta$  3.53, 1H, d,  $J=9.2$  Hz)。重クロロホルム溶液中で測定した ROESY スペクトルにおいて、H-8<sub>a,b</sub> と H-11<sub>a,b</sub>、H-9 と H-16<sub>b</sub>、および H-12 と H-16<sub>a</sub> との間に相関ピークが観測されたことから (図 II-10)、C-9 および C-10 の相対配置をそれぞれ  $R^*$ 、および  $S^*$  と決定した。

以上のことから、B 物質の構造を図 II-9 のように決定した。

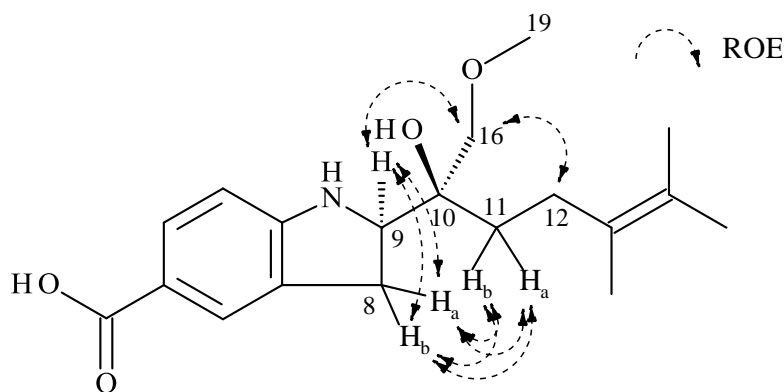


図 II-10 ROE data of A-503451 B.

### A-503451 C (3) の構造解析

高分解能 TOF-MS データより得られた分子式、UV スペクトル、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR データ、およびクロロホルム溶液中で測定した比旋光度により、C 物質を既知物質である virantmycin<sup>34, 35</sup> と同定した (図 II-9)。Virantmycin は A-503451 A と同じ分子式であるが、A-503451 A のようなインドリン骨格ではなく、テトラヒドロキノリン骨格を有している。重クロロホルム溶液中で測定した  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータの帰属を表 II-3 に示す。

なお、表 II-3 には、後述する D 物質の帰属についても記した。

表 II-3  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of A-503451 C and A-503451 D in  $\text{CDCl}_3$ .

Position	A-503451 C (3)		A-503451 D (4)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	117.5 (s)		117.8 (s)	
2	132.5 (d)	7.76 (1H, <sup>b</sup> )	133.2 (d)	7.78 (1H, d, 2.1 Hz)
3	116.1 (s)		117.0 (s)	
4	147.2 (s)		147.4 (s)	
5	113.6 (d)	6.53 (1H, d, 8.6 Hz)	113.4 (d)	6.50 (1H, d, 8.6 Hz)
6	130.4 (d)	7.76 (1H, <sup>b</sup> )	130.2 (d)	7.75 (1H, dd, 2.1, 8.6 Hz)
7	171.1 (s)		171.7 (s)	
8	33.5 (t)	H <sub>a</sub> 3.11 (1H, dd, 6.0, 17.0 Hz) H <sub>b</sub> 3.37 (1H, dd, 5.0, 17.0 Hz)	32.7 (t)	H <sub>a</sub> 2.86 (1H, dd, 6.0, 17.1 Hz) H <sub>b</sub> 3.11 (1H, dd, 4.3, 17.1 Hz)
9	56.2 (d)	4.36 (1H, dd, 5.0, 6.0 Hz)	67.4 (d)	3.99 (1H, dd, 4.3, 6.0 Hz)
10	58.1 (s)		57.6 (s)	
11	33.6 (t)	H <sub>a</sub> 1.61 (1H, ddd, 4.5, 12.1, 14.1 Hz) <sup>c</sup> H <sub>b</sub> 1.81 (1H, ddd, 5.0, 12.1, 14.1 Hz)	33.3 (t)	H <sub>a</sub> 1.54 (1H, ddd, 5.1, 12.0, 14.1 Hz) H <sub>b</sub> 1.82 (1H, ddd, 5.3, 11.8, 14.1 Hz)
12	27.8 (t)	H <sub>a</sub> 2.01 (1H, dt, 4.0, 12.1 Hz) H <sub>b</sub> 2.09 (1H, dt, 5.0, 12.1 Hz)	27.7 (t)	2.07 (2H, m)
13	126.5 (s)		126.8 (s)	
14	124.8 (s)		124.6 (s)	
15	19.9 <sup>a</sup> (q)	1.61 (3H, s)	20.0 <sup>a</sup> (q)	1.63 (3H, s)
16	74.0 (t)	H <sub>a</sub> 3.55 (1H, d, 9.0 Hz), H <sub>b</sub> 3.58 (1H, d, 9.0 Hz)	75.0 (t)	H <sub>a</sub> 3.49 (1H, d, 9.4 Hz) H <sub>b</sub> 3.67 (1H, d, 9.4 Hz)
17	18.5 (q)	1.63 (3H, s)	18.4 (q)	1.61 (3H, s)
18	20.6 <sup>a</sup> (q)	1.61 (3H, s)	20.6 <sup>a</sup> (q)	1.61 (3H, s)
19	59.4 (q)	3.39 (3H, s)	59.5 (q)	3.40 (3H, s)

Chemical shifts are given in ppm referenced to TMS.

a) interchangeable. b) Not clearly observed due to overlap. c) The signal was identified by the SELTOCSY experiment selecting H-12a signal.

#### A-503451 D (4) の構造解析

表 II-1 に示すように、高分解能 TOF-MS データより得られた D 物質の分子式は B 物質と同じだった。そして、A および C 物質の分子式から塩素原子が除かれ、代わりに水素原子と酸素原子がそれぞれ1つずつ加わったものだった。重クロロホルム溶液中で測定した  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータの帰属を表 II-3 に示す。

D 物質の IR、UV、重クロロホルム溶液中にて測定した  $^1\text{H}$ 、および  $^{13}\text{C}$  NMR の各種スペクトルは、C 物質 (virantmycin) に類似していた。他の類縁体と同様に各種 2D NMR スペクトルを用いて解析し、D 物質を C 物質の 9-デクロロ-9-ヒドロキシ体と決定した。

D 物質の相対配置は、*J*-HMBC、および NOESY スペクトルを用いて決定した。*J*-HMBC スペクトルにおいて、 $^2J_{\text{C-9, H-8a}}$  が 6.47 Hz (large value) であり、かつ  $^2J_{\text{C-9, H-8b}}$  が 3.04 Hz (small value) だったことから、C-9 の水酸基と H-8<sub>a</sub> はゴーシュであり、同水酸基と H-8<sub>b</sub> はアンチの関係にあることが示された。NOESY スペクトルにおいて、H-8<sub>b</sub> と H-11<sub>a,b</sub> の間に相関が観測されたため (図 II-11)、C-9、および C-10 の相対配置をそれぞれ *R*\*、および *R*\* と決定した。一方、NOESY スペクトルでは、H-8<sub>a</sub> と H-16<sub>b</sub> の間の相関も観測された (図 II-11)。これは、H-8<sub>a</sub> と C-16 が 1,3-diaxial に成り得ることを示し、virantmycin<sup>36</sup> や benzastatin D<sup>37, 38</sup> と同様に A-503451 D も 2つの配座を取り得ることが判明した。

以上のことから D 物質の構造を図 II-9 のように決定した。

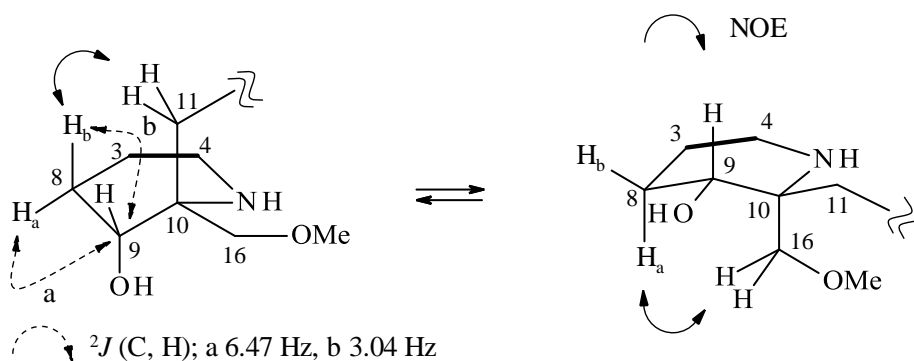


図 II-11 NOE data of A-503451 D.

## 2-2-6 生物活性

### pGVB2-EPO ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

取得した A-503451 類の HIF 活性化能を調べるために、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 に pGVB2-EPO プラスミドを一過的に導入し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ評価を実施した。pGVB2-EPO プラスミドとは、pGVB2 プラスミド（和光純薬工業社製）に HIF 応答遺伝子であるエリスロポエチン（EPO）のエンハンサーとプロモーターを導入したものである。概要を図 II-12 に示す。

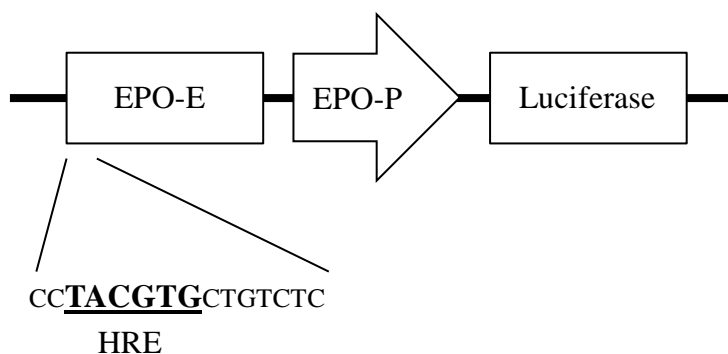


図 II-12 HIF-dependent reporter gene construct (pGVB2-EPO-Luc).

Abbreviations: EPO-E, EPO enhancer; EPO-P, EPO promoter.

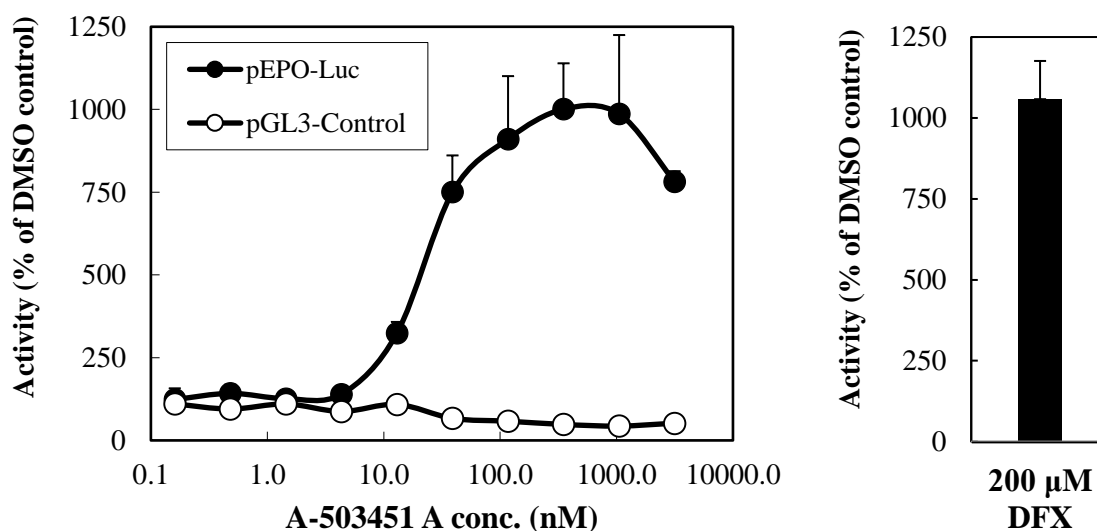
その結果、A-503451 A、および C はルシフェラーゼ活性を強く誘導し、それぞれの EC<sub>50</sub> 値は、A-503451 A が 23 nM、A-503451 C が 48 nM（表 II-4）。一方、A-503451 B、および D は、活性を示さなかった（EC<sub>50</sub> > 15000 nM）。A 物質の濃度依存性を表したグラフを図 II-13 に示す。最大活性は代表的な HIF 活性化物質として知られる、鉄キレーターの DFX と同程度であった。



表 II-4 Induction activities of A-503451s on pGVB2-EPO-Luc reporter gene assay.

Compounds	EC <sub>50</sub> (nM)
A	23
B	>15000
C	48
D	>15000

Each activity was shown using the value of DFX (200 μM) as a base of 100.



☒ II-13 Activation of HIF-dependent reporter gene expression by A-503451 A in HepG2 cells.

Luciferase activities in HepG2 cells following stimulation with indicated concentrations of A-503451 A or 200 μM DFX. Each activity was shown using the RLU value of treatment with DMSO as a base of 100. Means ± SD of three independent experiments.

### HIF-1 $\alpha$ タンパク量の確認

HIF-1 は HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  (ARNT) のヘテロ 2 量体で機能するが、その活性は主に HIF-1 $\alpha$ のタンパク質安定化によって制御されている。そこで、A-503451 A が HIF-1 $\alpha$  タンパク質の安定化に寄与するかを調べるため、ウェスタンブロッティングを用いて HIF-1 $\alpha$  タンパク量の確認を行った。その結果、HIF-1 $\alpha$  タンパク質の蓄積は、処理後 1~3 時間で開始され、A-503451 A が HIF-1 $\alpha$  を安定化することが判明した。この蓄積パターンは DFX とほぼ同様であったが、低酸素処理ではさらに早く、処理後 1 時間で蓄積されていた (図 II-14)。一方で、A-503451 A は HIF-1 $\beta$  のタンパク量には影響を与えなかった。

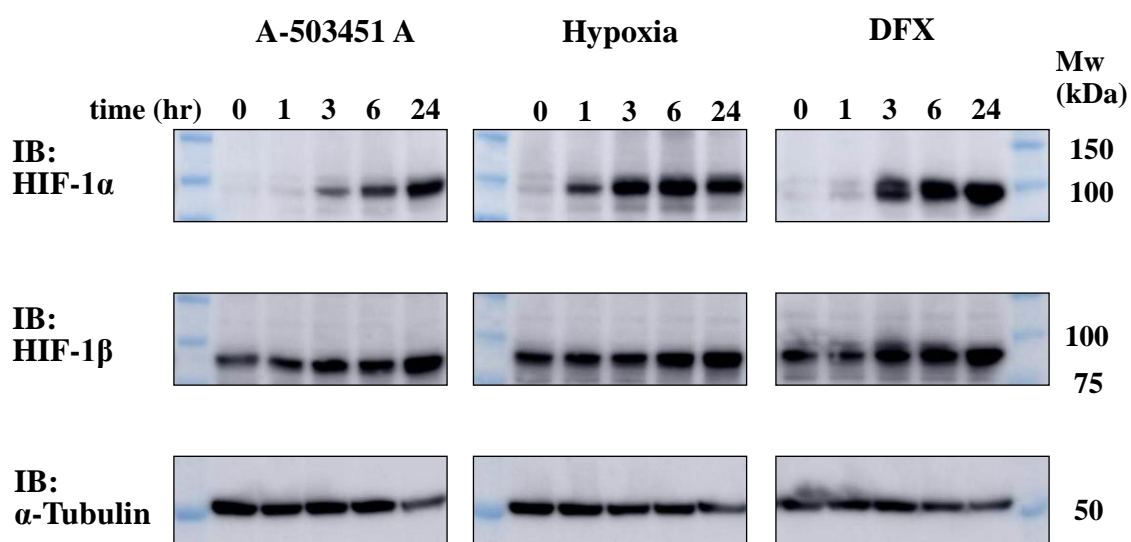


図 II-14 Time-dependent accumulation of HIF-1 $\alpha$  protein in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with A-503451 A (284 nM), hypoxia (1% O<sub>2</sub>), or DFX (100  $\mu$ M) for indicated time period. The HIF-1 $\alpha$  protein was detected using anti-HIF-1 $\alpha$  antibody. The blue bands are protein markers. Representative images of three independent experiments are shown.

Abbreviation: IB, immunoblot.

### VEGF と EPO の mRNA の発現量、およびタンパク量の確認

代表的な低酸素応答遺伝子である VEGF、および EPO の mRNA の発現に A-503451 A が与える影響を調べるため、定量 RT-PCR を実施した。その結果、A-503451 A を 1421 nM で 16 時間処理した場合、常酸素時の発現量を 1 とすると VEGF、および EPO の発現量をそれぞれ  $5.28 \pm 1.02$ 、および  $2.85 \pm 0.45$  にまで増加させた。この発現量は、低酸素処理 (1% O<sub>2</sub>) 時の約半分だった。一方、HIF によって影響を受けない HIF-1 $\alpha$ 、および HIF-1 $\beta$  の mRNA の発現量に変化は認められなかった (表 II-5)。

次に、VEGF、および EPO のタンパク量を ELISA にて確認した。その結果、A-503451 A を 1421 nM で 16 時間処理した場合、VEGF、および EPO タンパクをそれぞれ  $246 \pm 3\%$ 、および  $2040 \pm 100\%$  にまで増加させた (図 II-15)。

表 II-5 mRNA expression levels of HIF-dependent or -independent genes.

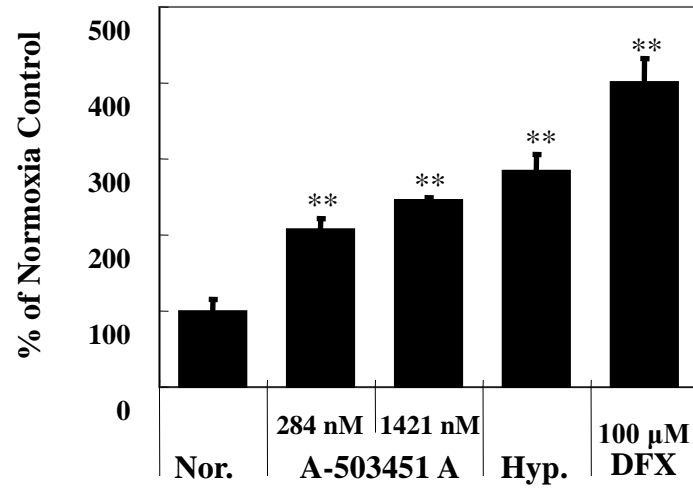
	VEGF	EPO	HIF-1 $\beta$	HIF-1 $\alpha$
Normoxia	1.00 $\pm$ 0.47	1.00 $\pm$ 0.30	1.00 $\pm$ 0.35	1.00 $\pm$ 0.24
A-503451 A, 284 nM	4.38 $\pm$ 0.91**	2.74 $\pm$ 1.32*	0.77 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.06
A-503451 A, 1421 nM	5.28 $\pm$ 1.02**	2.85 $\pm$ 0.45**	0.77 $\pm$ 0.21	0.70 $\pm$ 0.22
Hypoxia	11.92 $\pm$ 2.27**	6.33 $\pm$ 0.87**	1.04 $\pm$ 0.40	1.74 $\pm$ 0.58
DFX 100 $\mu$ M	6.73 $\pm$ 0.54**	2.66 $\pm$ 0.87*	0.53 $\pm$ 0.24	0.76 $\pm$ 0.21

(induction ratio)

Means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01.

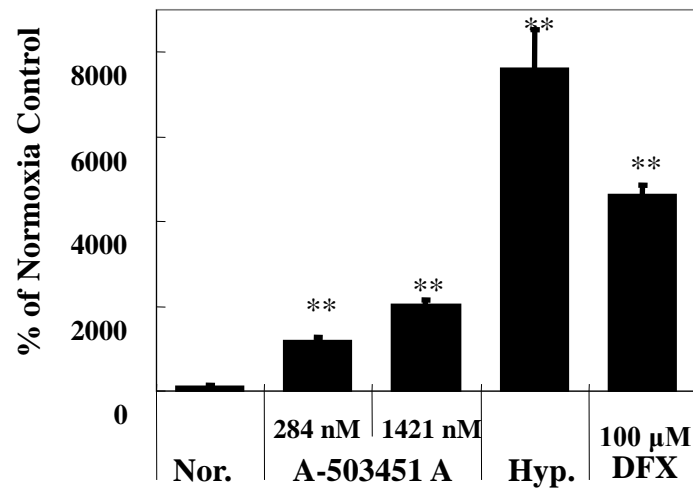
A

**VEGF**



B

**EPO**



☒ II-15 Induction of VEGF (A) and EPO (B) protein secretion by A-503451 A.

HepG2 cells were treated with A-503451 A (284 or 1421 nM), hypoxia (1% O<sub>2</sub>), or DFX (100 μM) for 16 hrs. The VEGF or EPO protein was detected using ELISA. Means ± SD of three or eight independent experiments, respectively. \*\**P* < 0.01. Abbreviations: Nor., normoxia; Hyp., hypoxia.

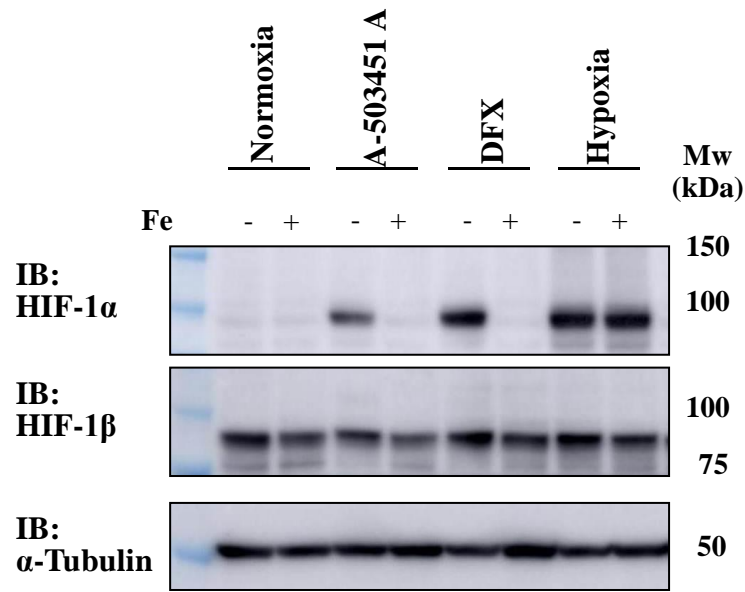
### 鉄イオン存在下での HIF 活性化能の評価

HIF-1 $\alpha$  の分解に関わる PHD は、その活性発現に鉄イオンと酸素の両方を必要とする<sup>39</sup>。そして、鉄キレーターが HIF を活性化することが知られているため、過剰な鉄存在下における A-503451 A の HIF 活性化能を評価した。

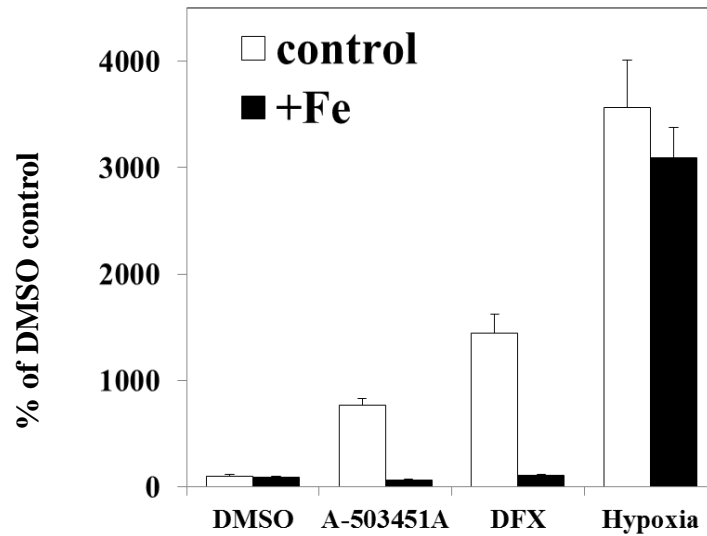
その結果、過剰な鉄の存在下では、DFX と同様、A-503451 A による HIF-1 $\alpha$  タンパク質の蓄積はキャンセルされた。一方、低酸素処理したものは、過剰な鉄の存在下でも HIF-1 $\alpha$  タンパク質の蓄積が認められた (図 II-16A)。

また、pGVB2-EPO ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおいても、過剰な鉄の存在によって、A-503451 A の HIF 活性化作用が消失することが明らかとなった (図 II-16B)。

A



B



☒ II-16 Excess iron ion inhibited the activity of A-503451 A.

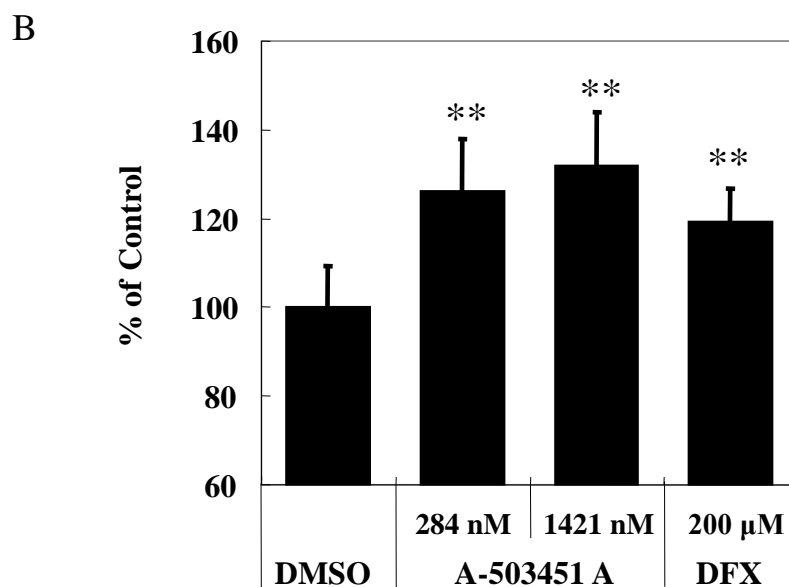
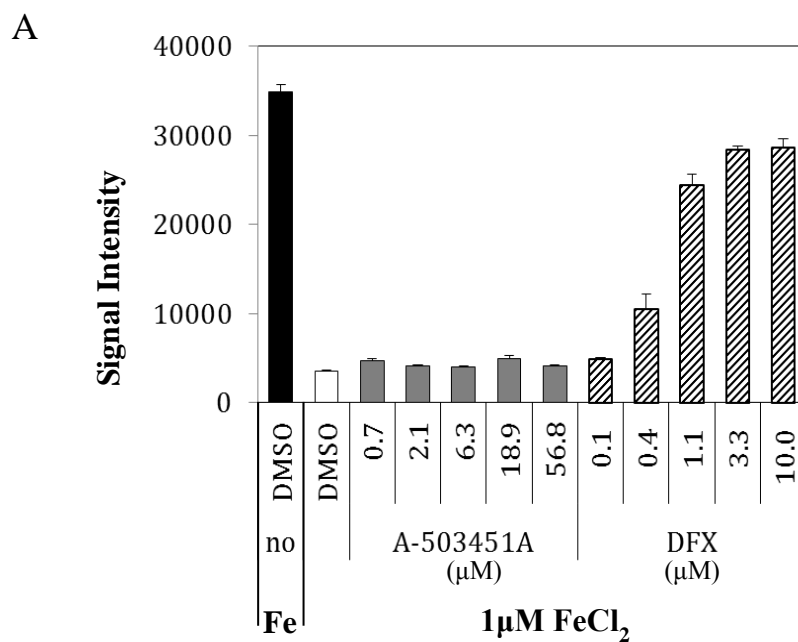
HepG2 cells were pretreated with 200  $\mu$ M ferrous chloride and then treated with A-503451 A (284 nM), hypoxia (1% O<sub>2</sub>), or DFX (100  $\mu$ M). (A) The HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  and  $\alpha$ -tubulin protein were detected by western blotting. Representative images of three independent experiments are shown. (B) pGVB2-EPO reporter gene activity. Means  $\pm$  SD of six independent experiments. Abbreviation: Fe, pretreatment of 200  $\mu$ M ferrous chloride.

### A-503451 A の鉄キレート活性

A-503451 A の鉄キレート活性について、鉄感受性蛍光プローブである calcein を用いて評価した。

Calcein は 2 価、および 3 価の鉄イオンをキレートし、その蛍光を失う<sup>40</sup>。そこで、A-503451 A と塩化鉄 (II) の混合溶液に calcein を添加して、calcein の蛍光強度を測定した。その結果、A-503451 A はいずれの濃度においても calcein の蛍光強度に影響を与えなかった。一方、DFX は、濃度依存的に calcein の蛍光強度を上昇させ、calcein と鉄イオンの結合を阻害した (図 II-17A)。このことから、A-503451 A には鉄キレート活性がないことが明らかとなった。

次に、A-503451 A が細胞内遊離鉄に与える影響を調べるため、calcein-AM テスト<sup>41</sup>を実施した。その結果、A-503451 A は、DFX と同様に calcein の蛍光を回復させ、細胞内遊離鉄を減少させていることが明らかとなった (図 II-17B)。



☒ II-17 **Iron chelating activities.**

(A) *In vitro* iron-chelating activity assay. Means  $\pm$  SD of four independent experiments.

(B) Cell-based calcein-AM test. Means  $\pm$  SD of twelve independent experiments. \*\* $P < 0.01$ .



## 2-2-7 誘導体の作製

pGVB2-EPO ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおいて、活性を有した A-503451 A、および C は分子内に塩素原子を有していたが、活性を示さなかった A-503451 B、および D は塩素原子の代わりに水酸基を有していた。そこで、活性発現における塩素原子の役割を調べるため、脱離基としての塩素原子に注目し、A-503451 D の C-9 の置換基が異なる 2 つの誘導体を合成した (図 II-18)。その結果、9-メシル体 (化合物 5) は A-503451 A と同等の強い活性を示した ( $EC_{50}=24$  nM)。一方、9-アセチル体 (化合物 6) は活性を示さなかった ( $EC_{50}>13000$  nM)。

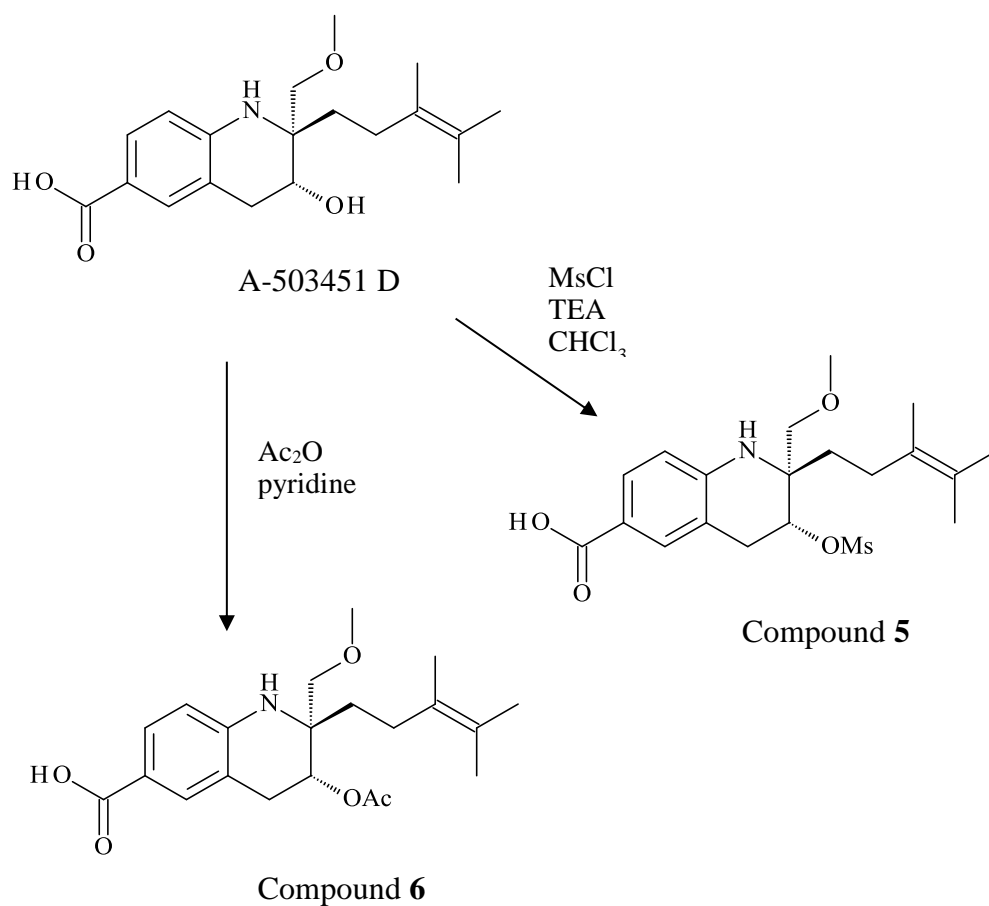


図 II-18 Structures of compounds 5 and 6.

### 第3節 考察

これまで述べてきた通り、HIF 活性化物質の探索スクリーニングにおいて、*Streptomyces* sp. SANK 60101 の培養液から2つの活性物質 A-503451 A、および C と、活性を有さない類縁体 B、および D を発見した。A、B、および D 物質は、その物理化学的、および分光学的データより新規物質であること、C 物質は HIV protease inhibitor としての報告がある virantmycin<sup>34</sup> であることが判明した。そして、A-503451 A を用いた各種評価では、常酸素状態で HIF-1 $\alpha$  タンパク質を安定化すること、代表的な低酸素応答遺伝子である VEGF や EPO の発現を誘導し、タンパク質レベルでも増加させることが明らかとなった。また、A-503451 A は、これまでに報告された天然由来の HIF 活性化物質<sup>42~48</sup> とは異なり、鉄キレーターではなかった。しかし、細胞内遊離鉄を減少させ、本物質はユニークな HIF 活性化メカニズムを有していると考えられた。

A-503451 類の構造的特徴としては、大きく2つのことが挙げられる。1つは、A および B 物質はインドリン骨格を有しているのに対して、C および D 物質はテトラヒドロキノリン骨格を有していることであり、もう1つは、活性を有する A および C 物質は窒素原子の  $\beta$  位に塩素原子を有しているが、活性を持たない B および D 物質は塩素原子が水酸基に置換されていることである。すなわち、活性を有する A、および C 物質は、骨格は異なるが、窒素原子の  $\beta$  位に塩素原子を有することが共通している。そして、A と B、および C と D 物質の相対配置は同じだった。これらのことから、A と B、および C と D 物質には、それぞれ共通する中間体、あるいは、これら4物質すべてに共通する中間体が存在し、その中間体に塩化物イオンや水酸化物イオンが同じ側面からアタックして生成したと考えられた。

そして、A-503451 類の HIF 活性化メカニズムに関しては、取得した類縁体、および合成的手法によって作製した誘導体の構造と活性から、以下に述べる2つの可能性が示唆された。

1つは、A-503451 類の HIF 活性化作用は、ラジカル捕捉活性によるものではないことである。A-503451 類の構造は、フリーラジカル捕捉剤として報告されている benzastatin C、D、および E<sup>33, 37, 38</sup> と類似していた。Benzastatin C は、A-503451 A や C と同様に分子内に塩素原子を有し、benzastatin D は

A-503451 B や D と同様に分子内に水酸基を有しているが、これらのフリーラジカル捕捉活性は同等と報告されている<sup>33,37</sup>。すなわち、benzastatin C の C-9 の塩素原子は、ラジカル捕捉活性に不可欠ではないが、A-503451 類における塩素原子は HIF の活性化に不可欠であり、このことからラジカル捕捉活性は関係していないと考えられた。

もう 1 つは、A-503451 類の活性発現には窒素原子の  $\beta$  位に良い脱離基が必要なことである。活性発現における塩素原子の役割を調べるために実施した誘導体の作製とその評価において、D 物質の 9 位の水酸基に、良い脱離基として知られるメシル基を導入したものは活性が認められるようになったが、アセチル基を導入したものは活性を示さないままであった。このことから、A-503451 A および C の塩素原子は、脱離基として機能していることが示唆された。A-503451 A や C 自身が、脱離基が関与する反応を介して標的タンパク質と反応しているのか、あるいは、脱離基が関係する反応を介して A-503451 A や C から共通する活性本体が生成されているのか等、脱離基の役割を解明することは今後の研究課題である。

本研究で見出した A-503451 類が、さらなる HIF の活性化メカニズムの解明に寄与し、本スクリーニングの最終目標である虚血に対する治療法の開発に役立てられることが期待される。

## 実験の部

### 細胞培養

HepG2 は、100 units/ml のペニシリンと、100 µg/ml のストレプトマイシン、10% のウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) を含む Dullbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen 社製) で培養した。細胞は、温度 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% にて培養した。低酸素条件下 (1% O<sub>2</sub>) の培養は、ACI-165D CO<sub>2</sub>/multi gas incubator (アステック社製) を用いて行った。

### pHRE4 ルシフェラーゼレポータープラスミド

pGL3-Promoter (Promega 社製) の Bgl II サイトに hypoxia response element (HRE) を含む配列 (TCGATACACAGTGCATTACGTGGGTTTCCACAGGTCGTCT;下線太字 HRE) の配列をタンデムに 4 回挿入し、pHRE4 ルシフェラーゼレポータープラスミド (pHRE4-Luc) を作製した。

### HRE4 細胞

HepG2 に上記 pHRE4-Luc プラスミドを Tfx-20 reagent (Promega 社製) を用いて導入し、2 日間培養した。その後、ジェネティシン (Sigma 社製) 600 µg/ml を添加して薬剤選択を開始した。4 日ごとに培地を交換し、生き残った個別クローンを選択した。そして、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>) で強い応答を示したクローンを HRE4 細胞と命名し、スクリーニングに用いた。

### スクリーニング (HRE4 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ)

HRE4 細胞を 96 穴ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $5.0 \times 10^3$  cells ずつ播種し、一晚培養した。翌日、そこに新鮮な培地に溶解したテストサンプルを添加し、常酸素で 16 時間培養した。その後、Steady Glo Luciferase Assay System (Promega 社製) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## 菌の分類

菌の形態、培養性状、炭素源の資化性、および菌の同定については、Waksman<sup>49</sup>、および International Streptomyces Project (ISP)<sup>50</sup> で示された方法で実施した。ジアミノピメリン酸や、全細胞中の糖成分の分析は、長谷川らの方法<sup>51</sup> で実施した。16S リボゾーム DNA は、PCR にて増幅し、増幅された断片をそのまま分析することでその配列を得た。本菌株は、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（住所：日本国茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6）に国際寄託され、寄託番号 FERM BP-8016 を付与された。

## 培地 2-1

グルコース 3.0%、生イースト 1.0%、大豆粉 3.0%、炭酸カルシウム 0.4%、硫酸マグネシウム・7水和物 0.2%、消泡剤 CB-442（日油社製）0.01%、滅菌前 pH 7.2

## 培地 2-2

スクロース 5.0%、生イースト 1.0%、大豆粉 3.0%、炭酸カルシウム 0.4%、硫酸マグネシウム・7水和物 0.2%、消泡剤 CB-442 0.01%、滅菌前 pH 7.2

## General

核磁気共鳴スペクトルは、C-H dual、および TXI プローブをそれぞれ装着した Bruker 社製 AVC500 スペクトロメーターを用いて測定した。内部標準として TMS を用い、化学シフト値は ppm で示した。

高分解能 TOF-MS データは、Waters 社製 Micromass LCT スペクトロメーターを用いて測定した。

APCI、および ESI MS データは、Agilent Technologies 社製 1100 シリーズ LC/MSD を用いて測定した。

IR スペクトルは、日本分光社製 FT/IR-610 スペクトロメーターを用いて、臭化カリウム錠剤法にて測定した。

UV スペクトルは、島津製作所社製 UV-265FW スペクトロメーターを用いて測定した。

比旋光度は、日本分光社製 DIP-370 型スペクトロメーターを用いて測定した。

#### 重クロロホルム溶液中で測定した A-503451 B の <sup>1</sup>H、および <sup>13</sup>C NMR

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS [internal standard]): δ 1.48 (1H, dt, *J* = 4.8, 13.6 Hz), 1.57 (1H, dt, *J* = 4.4, 13.6 Hz), 1.64 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.66 (3H, s), 2.01 (1H, dt, *J* = 4.8, 12.5 Hz), 2.16 (1H, dt, *J* = 4.4, 12.5 Hz), 2.98 (1H, dd, *J* = 9.2, 15.8 Hz), 3.08 (1H, dd, *J* = 10.6, 15.8 Hz), 3.13 (3H, s), 3.44 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 3.53 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 4.17 (1H, dd, *J* = 9.2, 9.9 Hz), 6.57 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.77 (1H, br. s), 7.83 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS [internal standard]): δ 18.3, 20.0, 20.6, 28.1, 29.9, 32.6, 59.6, 66.3, 73.0, 78.5, 107.5, 118.7, 124.6, 126.6, 127.1, 128.1, 131.6, 155.9, 171.7.

#### pGVB2-EPO ルシフェラーゼレポータープラスミド

pGVB2 プラスミド (和光純薬工業社製) のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に 126-bp 3' EPO (エリスロポエチン) エンハンサー (ポリ A 付加部位の 3'側のヌクレオチド 120~245 に相当する) と 144-bp minimal EPO プロモーター (転写開始部位に関するヌクレオチド -118~+26 に相当する) を挿入し、pGVB2-EPO ルシフェラーゼレポータープラスミドを作製した。

#### pGVB2-EPO ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

HepG2 を 96 穴ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^4$  cells ずつ播種し、一晩培養した。翌日、HepG2 に上記 pGVB2-EPO プラスミド、またはコントロールレポータープラスミド pGL3-Control (Promega 社製) を Tfx-20 reagent を用いてそれぞれ導入し、一晩培養した。翌日、新鮮な培地に溶解したテストサンプルを添加し、常酸素状態で 16 時間培養した。その後、Steady Glo Luciferase Assay System (Promega 社製) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性値は、DMSO 処理の RLU 値を 100% 活性とし、以下の計算式で算出した。

$$\text{Activity (\% of DMSO control)} = 100 \times \text{RLU (テストサンプル)} / \text{RLU (DMSO)}$$

A-503451 類の EC<sub>50</sub> 値は、200 μM DFX 処理での活性値を 100% 活性として算出した。

### ウェスタンブロッティング

HepG2 を 6 穴プレートに 1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^5$  cells ずつ播種し、一晩培養した後、新鮮な培地に交換した。細胞を A-503451 A (284 nM)、DFX (100 μM)、または低酸素 (1% O<sub>2</sub>) で刺激し、経時的に細胞を回収した。鉄添加実験においては、FeCl<sub>2</sub> (100 μM) で 30 分加温の後に、薬剤等で刺激し、経時的に細胞を回収した。細胞を lysis buffer (50 mM Tris、150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% NP-40、1 mM PMSF、ptotease inhibitor cocktail、pH 7.4) にて溶解し、超音波処理後、回転数 15,000 rpm にて 30 分間遠心して、上清を回収した。得られたタンパクを 4~12% グラジエント SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ニトロセルロース膜にブロッティングした。HIF-1α タンパク質は、抗 HIF-1α 抗体 (BD Transduction Laboratory 社製) で検出した。その後、同膜を用い、HIF-1β タンパク質、および α-チューブリンタンパク質を、それぞれ抗 HIF-1β 抗体 (Cell Signalling Technologies 社製)、および抗 α-チューブリン抗体 (Sigma 社製) で検出した。画像は、Amersham Imager 600 (GE 社製) を用いて測定した。

### 定量 RT-PCR

HepG2 を 6 穴プレートに 1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^5$  cells ずつ播種し、一晩培養した後、培地を交換した。そこに、A-503451 A (284 nM、1421 nM)、あるいは DFX (100 μM) を添加し、低酸素、もしくは常酸素にて 16 時間培養した。RNA は、Sapazol (ナカライテスク社製) を用いて精製した。逆転写は、RT-PCR kit および random hexamer primer を用いて実施した。Real-time PCR は、TaqMan Universal PCR Master kit (PE Applied Biosystems 社製) を用いて ABJ Prism 7700 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific 社製) にて測定した。発現レベルは、18S リボゾーム RNA でノーマライズした。使用したプライマーペアは以下のとおりである；

VEGF; 5'- CTTGCTGCTCTACCTCCACCAT-3' と

5'- ATGTCCACCAGGGTCTCGATT-3',  
EPO; 5'- GCATGTGGATAAAGCCGTCAGT -3' と  
5'- AGAGTTTGCGGAAAGTGTCAGC -3',  
HIF-1 $\alpha$ ; 5'- AACGCCAAAGCCACTTCGA -3' と  
5'- AGTGCTTCCATCGGAAGGACTAG -3',  
HIF-1 $\beta$ ; 5'- CATTGGCAGATTGCAGGTAAGTACTAG -3' と  
5'- ACAGCGGTGATCCACAAAAGT -3',

TaqMan probes は以下のとおりである ;

VEGF; 5'- CACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGAGATGA -3',  
EPO; 5'- TCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCAC -3',  
HIF-1 $\alpha$ ; 5'- ACCATGCCCCAGATTCAGGATCAGACA -3',  
HIF-1 $\beta$ ; 5'- CAACCAACAGAGTTCATCTCCCGACACAAC -3',

18S リボソーム RNA は、Pre-developed TaqMan assay reagent Eukaryotic 18S rRNA (Applied Biosystems 社製) を用いた。

## ELISA

HepG2 を 96 穴プレートに 1 ウェルあたり  $5.0 \times 10^3$  cells ずつ播種し、一晩培養した後、細胞を Dulbecco's modified Eagle's 培地で 2 度洗浄した。そこに、A-503451 A (284 nM、1421 nM)、あるいは DFX (100  $\mu$ M) を添加し、低酸素、もしくは常酸素にて 16 時間培養した。ELISA には培養上清を用いた。ELISA は、VEGF ELISA kit (R&D Systems 社製)、もしくは EPO ELISA kit (Stemcell Technologies 社製) にて実施した。

## 鉄キレートアッセイ *in vitro*

終濃度の 3 倍のテストサンプルと 3  $\mu$ M FeCl<sub>2</sub> を等量ずつ混合し、室温に 10 分間静置した。そこへ、等量の calcein (750 nM) を添加し、5 分後に calcein のシグナル強度を測定した (励起波長 485 nm、検



出波長 530 nm)。

#### 鉄キレートアッセイ cell-based

コンフルエントになった HepG2 細胞に A-503451 A (284 nM、1421 nM)、あるいは DFX (100  $\mu$ M) を添加し、6 時間培養した。そこへ、calcein-AM (0.4  $\mu$ M) を添加し、室温に 10 分間静置した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、calcein のシグナル強度を測定した (励起波長 485 nm、検出波長 530 nm)。

#### 2-(3,4-Dimethylpent-3-enyl)-2-(methoxymethyl)-3-[(methylsulfonyl)oxy]-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carboxylic acid (9-メシル体, 化合物 5)

A-503451 D (50 mg) をクロロホルム (4 ml) に溶解し、氷冷し、そこへトリエチルアミン (560  $\mu$ l) とメタンスルホニルクロリド (60  $\mu$ l) を添加した。それを室温に戻し、2 時間攪拌した。反応は水を添加することで終了させた。反応溶液の pH を 4.5 に調整し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。それをろ紙でろ過後、減圧下濃縮乾固して油状抽出物を得た。その抽出物を分取用 HPLC カラム (SYMMETRY C18、19 i.d.  $\times$  100 mm、Waters 社製) で分離した。移動相には、アセトニトリル : 酢酸アンモニウム - 酢酸 pH 4.5 = 2 : 1 を用いた。化合物 5 のピークを分取し、得られた分取液について減圧下濃縮してアセトニトリルを留去した後、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、化合物 5 の白色粉末 8.2 mg を得た。

APCI-MS ( $m/z$ ): 412 [M+H]<sup>+</sup>, 316 [M-CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS [internal standard]):  $\delta$  1.56 (1H, \*), 1.58 (3H, s), 1.60 (3H, s), 1.60 (3H, s), 1.71 (1H, ddd,  $J$  = 5.1, 12.1, 13.6 Hz), 2.04 (2H, m), 3.01 (3H, s), 3.15 (1H, dd,  $J$  = 3.5, 18.0 Hz), 3.22 (1H, dd,  $J$  = 3.5, 18.0 Hz), 3.43 (3H, s), 3.46 (1H, d,  $J$  = 8.8 Hz), 3.59 (1H, d,  $J$  = 8.8 Hz), 4.66 (1H, br. s), 5.07 (1H, t,  $J$  = 3.5 Hz), 6.52 (1H, d,  $J$  = 8.8 Hz), 7.77 (1H,  $J$  = 8.8 Hz), 7.78 (1H, s). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS [internal standard]):  $\delta$  18.4, 19.9, 20.6, 27.7, 30.0, 33.3, 39.1, 57.2, 59.3, 72.7, 74.5, 113.5, 114.7, 117.7, 125.0, 126.2, 130.5, 132.6, 146.8, 171.3.

\* Not clearly observed due to overlap.

3-(Acetyloxy)-2-(3,4-dimethylpent-3-enyl)-2-(methoxymethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carboxylic acid

(9-アセチル体、化合物 6)

A-503451 D (78 mg) をピリジン (5 ml) に溶解し、そこへ無水酢酸 (1.5 ml) を添加し、室温にて 14 時間攪拌した。反応溶液を減圧下濃縮し、反応物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。それをろ紙でろ過後、減圧下濃縮乾固して油状抽出物を得た。その抽出物を分取用 HPLC カラム (SYMMETRY C18、19 i.d. × 100 mm) で分離した。移動相には、アセトニトリル：トリエチルアミンリン酸バッファー pH 5.0=3 : 2 を用いた。化合物 6 のピークを分取し、得られた分取液について減圧下濃縮してアセトニトリルを留去した後、上記と同様に酢酸エチル抽出を行い、化合物 6 の白色粉末 67.5 mg を得た。

ESI-MS ( $m/z$ ): 414 [M+K]<sup>+</sup>, 398 [M+Na]<sup>+</sup>, 376 [M+H]<sup>+</sup>, 316 [M-CH<sub>3</sub>COOH+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS [internal standard]): δ 1.59 (3H, s), 1.60 (3H, s), 1.60 (3H, s), 1.60 (1H, m), 1.73 (1H, m), 2.04 (3H, s), 2.04 (2H, m), 2.86 (1H, dd,  $J = 4.4, 17.2$  Hz), 3.13 (1H, dd,  $J = 4.0, 17.2$  Hz), 3.39 (3H, s), 3.39 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 3.49 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 4.75 (1H, br. s), 5.24 (1H, t,  $J = 4.4$  Hz), 6.52 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.74 (1H, s), 7.76 (1H, dd,  $J = 2.2, 8.4$  Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS [internal standard]): δ 18.4, 19.9, 20.6, 21.2, 28.0, 29.1, 33.4, 56.9, 59.4, 67.6, 73.3, 113.3, 115.9, 117.2, 124.6, 126.6, 130.2, 132.6, 147.4, 170.5, 171.5.

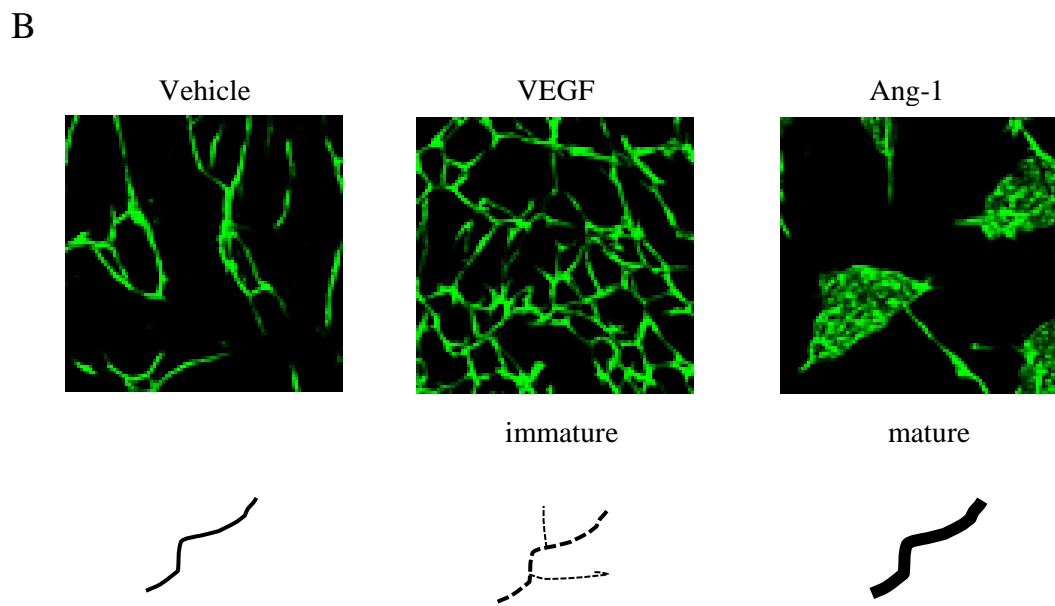
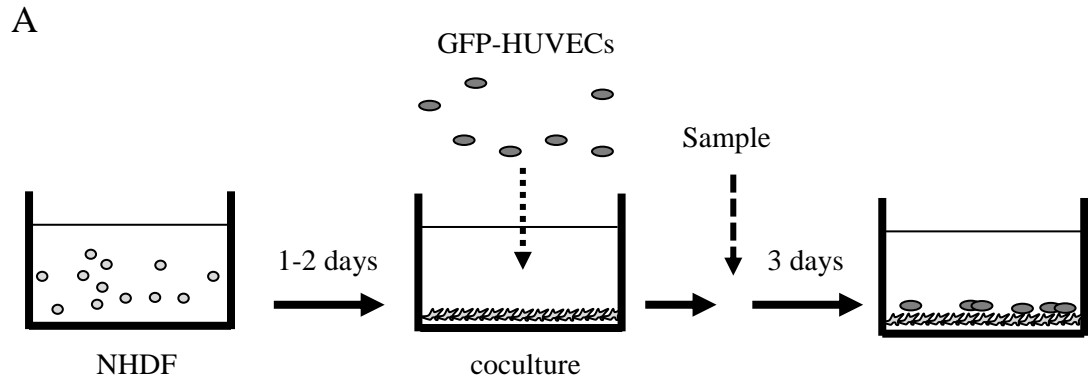
## 第3章 機能的血管形成促進物質の探索

### 第1節 スクリーニング系

機能的血管形成促進物質の探索は、フェノタイプアッセイである VS-G アッセイを用いて行った。VS-G アッセイは、ヒト皮膚繊維芽細胞 (normal human dermal fibroblasts; NHDF) と緑色蛍光タンパク (Green fluorescent protein; GFP) 標識したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) の共培養系であり、NHDF 上で HUVECs が管腔形成する様子を GFP シグナルで検出・観察するアッセイである。活性の有無を HUVECs の形態、およびその面積で評価した。アッセイの概要を図 III-1A に示す。本アッセイ系において、VEGF は HUVECs に対して管状形態を誘導するが、Ang-1 は島状形態を誘導する (図 III-1B)。そこで、VEGF と異なり、Ang-1 様の形態を誘導する物質は、機能的な血管形成を誘導すると仮定し、そのような物質を探索することにした。

微生物培養液サンプルをスクリーニングした結果、*Streptomyces* sp. SANK 63697、および *Incrucipulum* sp. SANK 10414 の培養液サンプル中に島状、および島状と管状の両方の形態を誘導する活性をそれぞれ見出した。そして、各培養液から新規機能的血管形成促進物質 vestaine 類と F-36316 類をそれぞれ発見した。

Vestaine 類の生産菌、発酵生産、単離精製、物理化学的性質、構造解析については以下の第2節に、F-36316 類のそれらについては以下の第3節に詳述する。また、vestaine 類、および F-36316 類の生物活性については第4節に記載する。

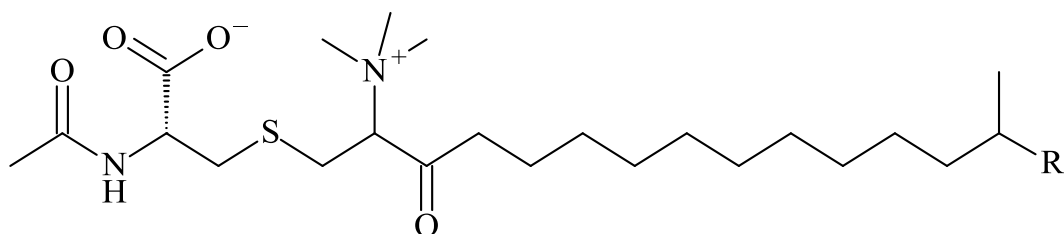


☒ III-1 VS-G assay.

(A) Outline of the assay system.

(B) Morphological changes observed in this assay system.

## 第2節 Vestaine 類の発見



Vestaine A<sub>1</sub>      R = CH<sub>3</sub>  
Vestaine B<sub>1</sub>      R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

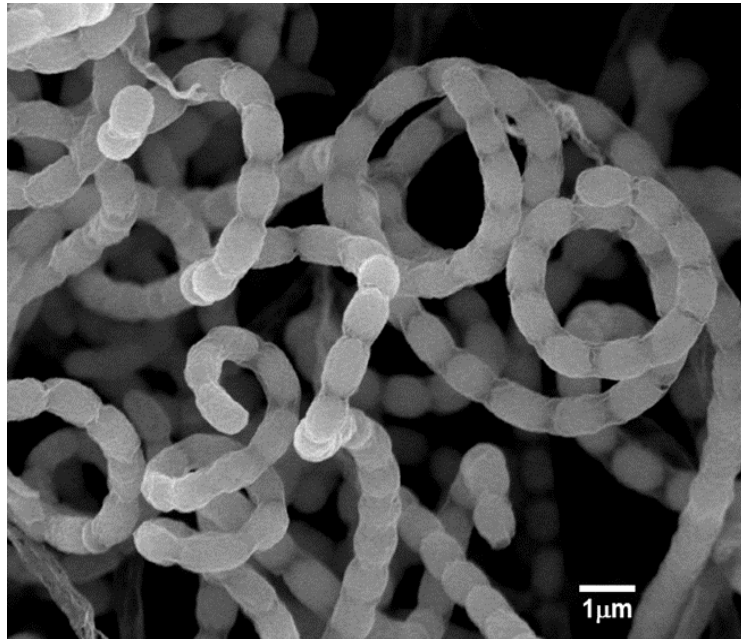
### Vestaine 類

#### 3-2-1 生産菌

SANK 63697 株は、東京都に自生するモモタマナ (*Terminalia catappa*) の葉より分離された。

本株は、*Rectinaculiaperti* タイプの孢子連鎖を形成し、1つの鎖あたり 20 以上の孢子を有した。孢子表面は、平滑だった (図 III-2)。本株は、イースト・麦芽寒天培地 (ISP 培地 No. 2) やスターチ・無機塩寒天培地 (ISP 培地 No. 4) で良く生育し、コロニーの色は、薄黄から茶色だった。IPS 培地 No. 2、オートミール寒天培地 (ISP 培地 No. 3)、ISP 培地 No. 4、グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP 培地 No. 5)、およびチロシン寒天培地 (ISP 培地 No. 7) 上で形成された気菌糸の集合体の色は、白から灰色だった。

16S リボソーム DNA 配列 (1472 塩基) を EzTaxon-e データベース<sup>30</sup> を用いて解析したところ、SANK 63697 株と *Streptomyces tendae* ATCC 19812<sup>T</sup> (D63873) が 100% の相同性を示した。以上のことから、本株を *Streptomyces* sp. SANK 63697 と命名した。MEGA program (version 6.05, <http://www.megasoftware.net/>) を用いて作成した系統樹を図 III-3 に示す。



☒ III-2 Scanned electron micrograph of strain SANK 63697 on ISP 4, 28 °C for 2 weeks.

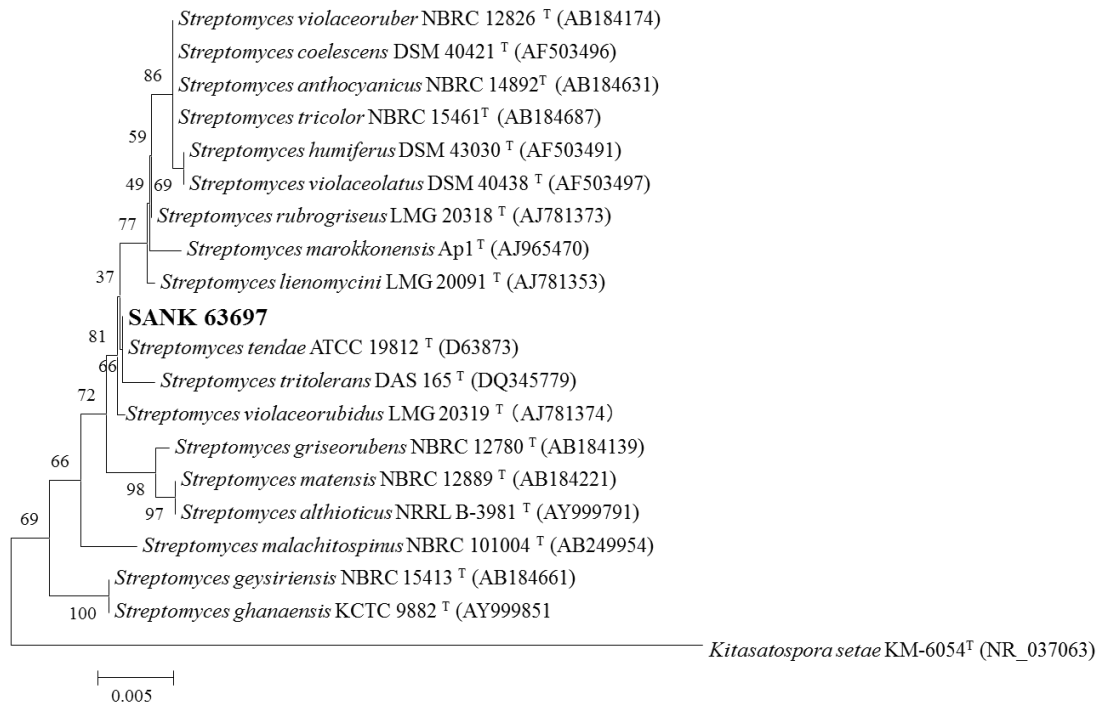


図 III-3 The taxonomic position of the strain SANK 63697.

Bootstrap values (%) are indicated at the branches from 1000 replications. The scale bar below the phylogenetic tree indicates substitution per site.

### 3-2-2 発酵生産

*Streptomyces* sp. SANK 63697 株を生育させたスラントを 10% グリセリン水 10 ml でホモジェナイズし、そのホモジェナイズ液をセルストレーナー (Thermo Fisher Scientific 社製、メッシュサイズ 100 μm) を用いてろ過した。このろ液 50 μl をオートクレーブ滅菌した培地 3-1 80 ml を含む 500 ml 容三角フラスコに接種した。これを回転振盪培養機にて、回転数 210 rpm、28 °C、48 時間培養し、前培養液とした。

次に、この前培養液 1 ml をオートクレーブ滅菌した培地 3-2 80 ml を含む 500 ml 容三角フラスコに接種した。これを回転振盪培養機にて、回転数 210 rpm、28 °C、96 時間培養した。

なお、培地 3-1 および 3-2 の組成は、実験の部に記載した。

### 3-2-3 単離精製

精製は、第 1 節で述べた VS-G アッセイによる活性を指標に行った。Vestaine 類の代表的な精製方法を図 III-4 に示す。

培養液 5 L をろ過助剤 Celite 545 を用いてろ過し、菌体と上清に分けた。その菌体に 80% アセトン水 1.2 L を加えて抽出後、上述と同様にろ過して、菌体アセトン抽出液を得た。菌体アセトン抽出液に消泡のための *n*-ブタノール 100 ml を添加した後、減圧下濃縮してアセトンを留去した。この濃縮液の pH を塩酸で 3.0 に調整した後、HP-20 カラム (Diaion HP-20、三菱ケミカル社製、200 ml) にチャージした。このカラムを 30% アセトン水 600 ml で洗浄後、80% アセトン水 600 ml で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固し、vestaine A<sub>1</sub>、および B<sub>1</sub> を含むオイル状抽出物 418 mg を得た。

次にこの抽出物を ODS オープンカラム (Cosmosil 140C18-OPN、40 ml) にて精製した。抽出物 418 mg を 50% メタノール水 20 ml に溶解し、30% アセトニトリル-0.1 M 過塩素酸ナトリウム水で平衡化した ODS オープンカラムにチャージした。このカラムを 40%、45%、および 50% アセトニトリル-0.1 M 過塩素酸ナトリウム水 (各 200 ml、800 ml、および 400 ml) で段階溶出し、溶出液を 15 ml ずつ分画した。

#### Vestaine A<sub>1</sub> の精製

45% アセトニトリル-0.1 M 過塩素酸ナトリウム水で溶出した A<sub>1</sub> 物質を含む ODS オープンカラムの分画フラクションを集め、それを減圧下濃縮してアセトニトリルを留去した。そして、脱塩のため、その濃縮液を HP-20 カラム (10 ml) にチャージした。このカラムを水 40 ml で洗浄後、80% アセトン水 40 ml で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固し、A<sub>1</sub> 物質を含む粗精製物 24.1 mg を得た。次に、この粗精製物を分取用 HPLC カラム (SYMMETRY C18 19 i.d. ×100 mm) で分離した。あらかじめアセトニトリル : 0.05 M 過塩素酸ナトリウム水 = 45 : 55 で平衡化した HPLC カラムに、粗精製物 24.1 mg を 50% エタノール水 240 μl に溶解した試料溶液 60 μl を注入後、同じ溶媒で、流速 9 ml/分で溶出



した。検出波長 210 nm で溶出液をモニターし、保持時間 20.1~25.4 分に溶出されるピークを分取した。残りの試料溶液 180 µl についても同様の操作を行い、分取液をまとめた。そして、その分取液を減圧下濃縮してアセトニトリルを留去後、上記と同様に HP-20 カラムで脱塩し、A<sub>1</sub> 物質の白色粉末 12.2 mg を得た。

得られた A<sub>1</sub> 物質について、HPLC 分析を行った結果、図 III-5A に示すようにピーク 1、および 2 の 2 つのピークが観測され、これらのピークは平衡関係にあることが判明した。また、ピーク 1、および 2 の UV スペクトルは、どちらも同じだった (図 III-5B)。

### Vestaine B<sub>1</sub> の精製

45~50% アセトニトリル-0.1 M 過塩素酸ナトリウム水で溶出した B<sub>1</sub> 物質を含む ODS オープンカラムの分画フラクションを集め、それを減圧下濃縮してアセトニトリルを留去した。そして、脱塩のため、その濃縮液を HP-20 カラム (20 ml) にチャージした。このカラムを水 80 ml で洗浄後、80% アセトン水 80 ml で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固し、B<sub>1</sub> 物質を含む粗精製物 50.6 mg を得た。この粗精製物を前述の分取用 HPLC カラムで分離した。あらかじめアセトニトリル : 0.05 M 過塩素酸ナトリウム水 = 50 : 50 で平衡化した HPLC カラムに、粗精製物 50.6 mg を 50% エタノール水 500 µl に溶解した試料溶液 60 µl を注入後、同じ溶媒で、流速 9 ml/分で溶出した。検出波長 210 nm で溶出液をモニターし、保持時間 16.5~20.0 分に溶出されるピークを分取した。残りの試料溶液 440 µl についても同様の操作を行い、分取液をまとめた。そして、その分取液を減圧下濃縮してアセトニトリルを留去後、上記と同様に HP-20 カラムで脱塩し、B<sub>1</sub> 物質をメインで含む精製物 23.7 mg を得た。この精製物を再度、前述の分取用 HPLC カラムで精製した。あらかじめアセトニトリル : 0.05 M 過塩素酸ナトリウム水 = 45 : 55 で平衡化した HPLC カラムに、精製物 23.7 mg を 240 µl の 50% エタノール水に溶解した試料溶液 60 µl を注入後、同じ溶媒で、流速 9 ml/分で溶出した。検出波長 210 nm で溶出液をモニターし、保持時間 32.5~39.0 分に溶出されるピークを分取した。残りの試料溶液 180 µl についても同様の操作を行い、分取液をまとめた。そして、その分取液を減圧下濃縮してアセトニトリルを留去後、上記と同様に HP-20 カラムで脱塩し、B<sub>1</sub> 物質の白色粉末 12.7 mg を得た。

HPLC 分析の結果、 $B_1$  物質も  $A_1$  物質と同様に、平衡関係にある 2 つのピーク（ピーク 3、および 4）が観測され、その UV スペクトルは、 $A_1$  物質と同様であった（図 III-5C、および 5D）。

なお、本株の培養液中には、 $A_1$  物質と同じ分子式を有する  $A_2$  物質、および  $B_1$  物質と同じ分子式を有する  $B_2$  物質も含まれていたが、これらの生産量は低かったため、取得しなかった。

Cultured broth of *Streptomyces* sp. SANK 63697, 5 L

↓ Filtered with Celite 545

Mycelium

↓ Extracted with 80% aq. acetone 1.2 L

↓ Filtered with Celite 545

Acetone extract

↓ concentrated to remove acetone

↓ pH 3.0

↓ HP-20 column chromatography  
eluted with 80% aq. acetone

418 mg containing vestaines

↓ Cosmosil column chromatography  
eluted with 45-50% acetonitrile - 0.1 M aq. NaClO<sub>4</sub>

24.1 mg containing vestaine A<sub>1</sub>

↓ Preparative HPLC  
SYMMETRY C18,  
19 i.d. x 100 mm  
eluted with  
acetonitrile : 0.05 M aq. NaClO<sub>4</sub> = 9 : 11

Vestaine A<sub>1</sub>

12.2 mg

50.6 mg containing vestaine B<sub>1</sub>

↓ Preparative HPLC  
SYMMETRY C18  
19 i.d. x 100 mm  
eluted with  
acetonitrile : 0.05 M aq. NaClO<sub>4</sub> = 1 : 1

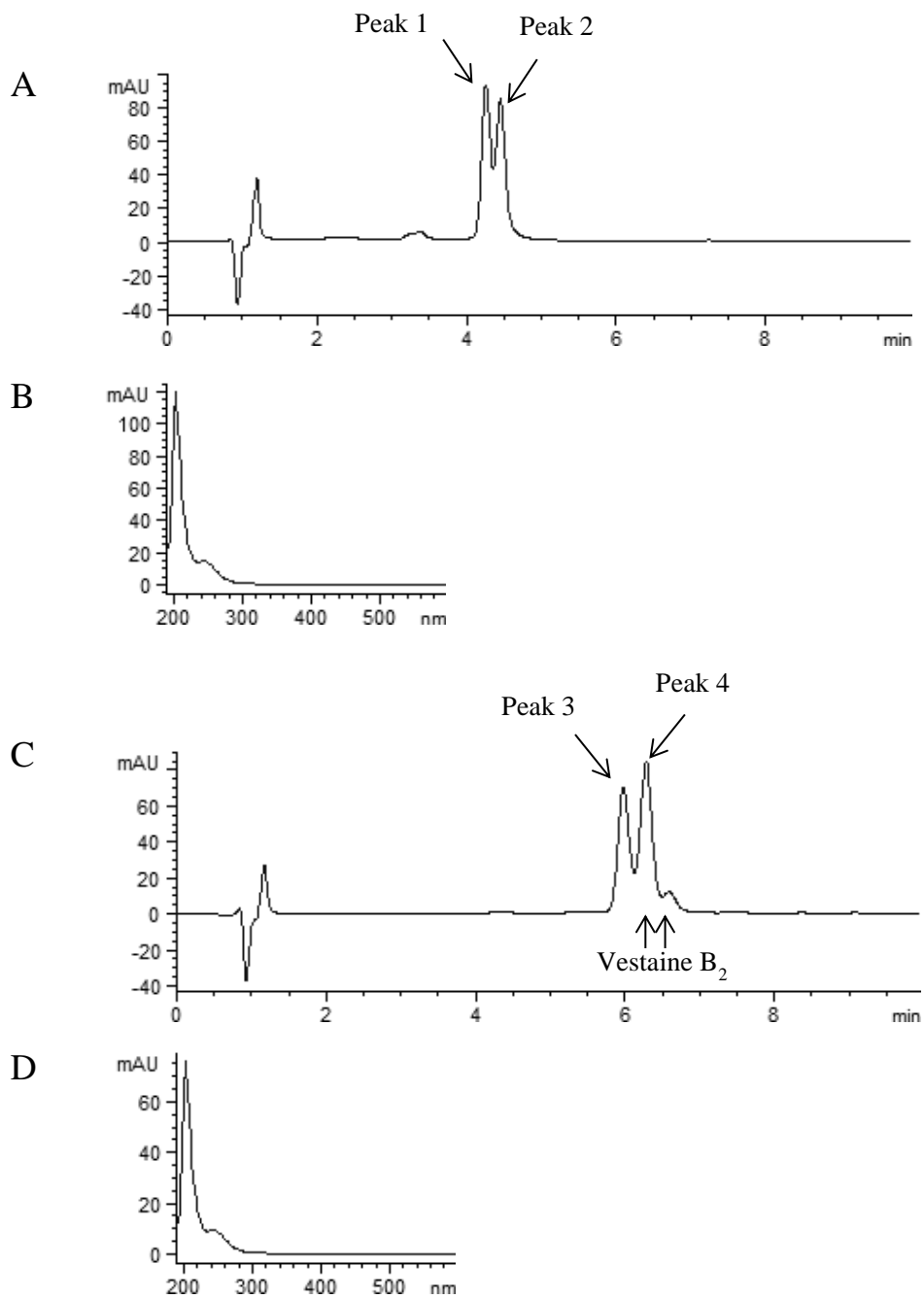
23.7 mg

↓ Preparative HPLC  
same column describe above  
eluted with  
acetonitrile : 0.05 M aq. NaClO<sub>4</sub> = 9 : 11

Vestaine B<sub>1</sub>

12.7 mg

☒ III-4 Isolation of vestaines.



☒ III-5 HPLC data of vestaine A<sub>1</sub> (1) and B<sub>1</sub> (2).

(A) HPLC chart of **1**. HPLC conditions: column, Unison UK-C18, 3  $\mu\text{m}$ , 4.6 i.d. x 75 mm; mobile phase, MeCN/20 mM aq. ammonium acetate (1/1); flow rate, 1 ml/min; sample, 2 mg/ml, 3  $\mu\text{l}$  injection. (B) UV spectrum of peak 1. Both peak 1 and peak 2 show the same UV spectrum. (C) HPLC chart of **2**. HPLC conditions are the same as (A). (D) UV spectrum of peak 3. Both peak 3 and peak 4 show the same UV spectrum.

### 3-2-4 物理化学的性質

Vestaine 類の物理化学的性質を表 III-1 に示す。

IR スペクトルでは、1720 cm<sup>-1</sup> 付近に C=O 由来の吸収が観測された。

高分解能 MS データ (ESI positive) から、vestaine A<sub>1</sub> 由来のピーク 1、および 2 の分子式を共に C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S と決定し、vestaine B<sub>1</sub> 由来のピーク 3、および 4 の分子式を共に C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S と決定した。硫黄原子の存在は、同位体イオンとして、vestaine A<sub>1</sub> においては、C<sub>24</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>34</sup>S 由来の *m/z* 461.3211 と C<sub>22</sub><sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 由来の *m/z* 461.3297 が観測されたこと (図 III-6A、および 6B)、vestaine B<sub>1</sub> においては、C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>34</sup>S 由来の *m/z* 475.3366 と C<sub>23</sub><sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 由来の *m/z* 475.3452 が観測されたことから、その存在が支持された (図 III-6C、および 6D)。

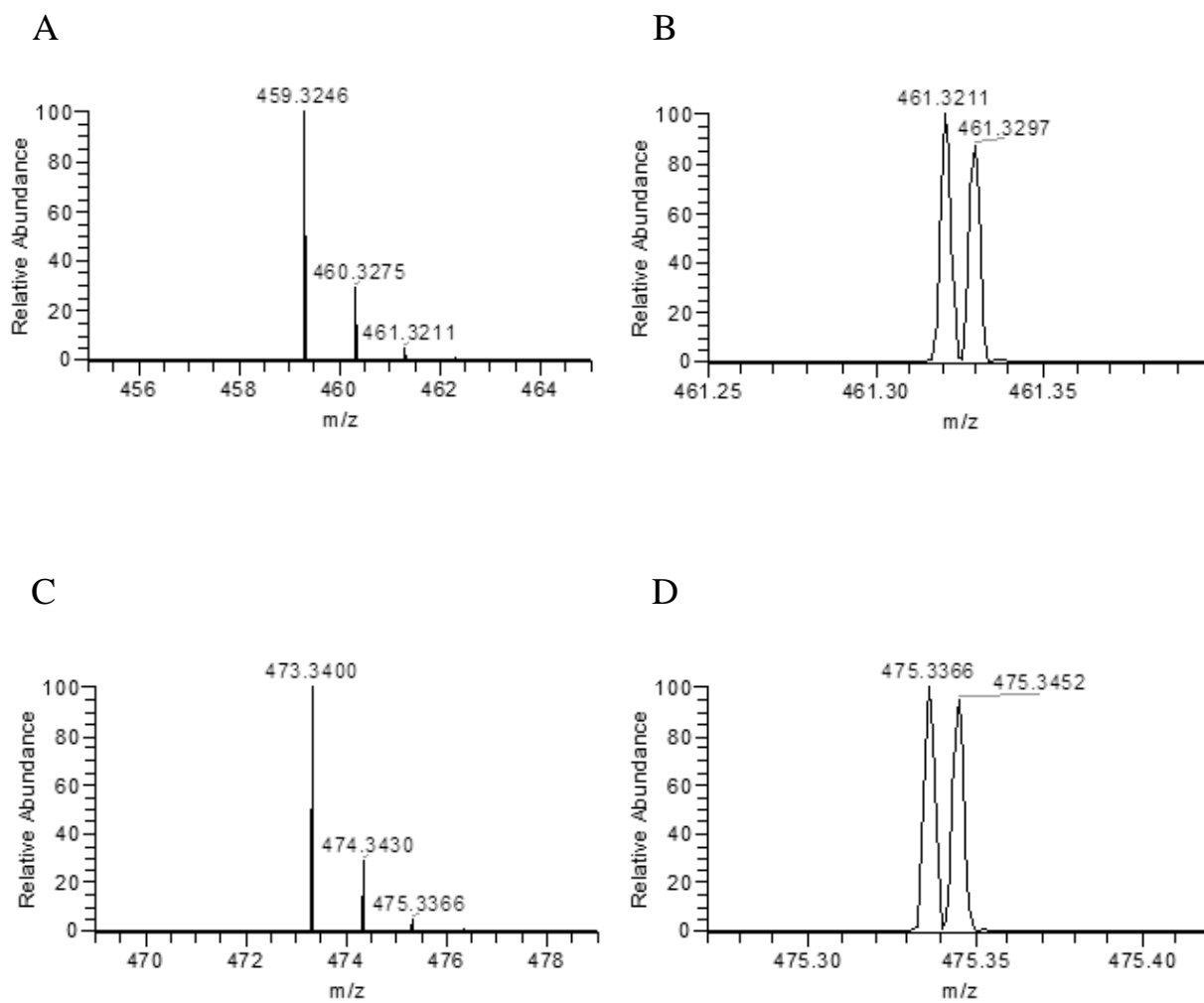
表 III-1 Physico-chemical properties of vestaines.

	Vestaine A <sub>1</sub> (1)	
	Peak 1	Peak 2
Appearance	White powder	
IR $\nu_{\max}$ cm <sup>-1</sup> (ATR)	3262, 2923, 2852, 1721, 1654, 1599, 1490, 1467, 1373	
Molecular formula	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
HR-MS ( <i>m/z</i> )		
Found:	459.3246 [M+H] <sup>+</sup>	459.3244 [M+H] <sup>+</sup>
Calcd.:	459.3251 (for C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	459.3251 (for C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)

	Vestaine B <sub>1</sub> (2)	
	Peak 3	Peak 4
Appearance	White powder	
IR $\nu_{\max}$ cm <sup>-1</sup> (ATR)	3258, 2924, 2853, 1721, 1655, 1601, 1491, 1464, 1375	
Molecular formula	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
HR-MS ( <i>m/z</i> )		
Found:	473.3400 [M+H] <sup>+</sup>	473.3400 [M+H] <sup>+</sup>
Calcd.:	473.3407 (for C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	473.3407 (for C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)

Abbreviation: ATR, attenuated total reflection.



☒ III-6 **HR-MS data (ESI) of vestaine A<sub>1</sub> and B<sub>1</sub>.**

(A) HR-MS data (ESI) of peak 1. (B) Enlarged view of figure 6A ranged from  $m/z$  461.25 to 461.40.

(C) HR-MS data (ESI) of peak 3. (D) Enlarged view of figure 6C ranged from  $m/z$  475.27 to 475.42.

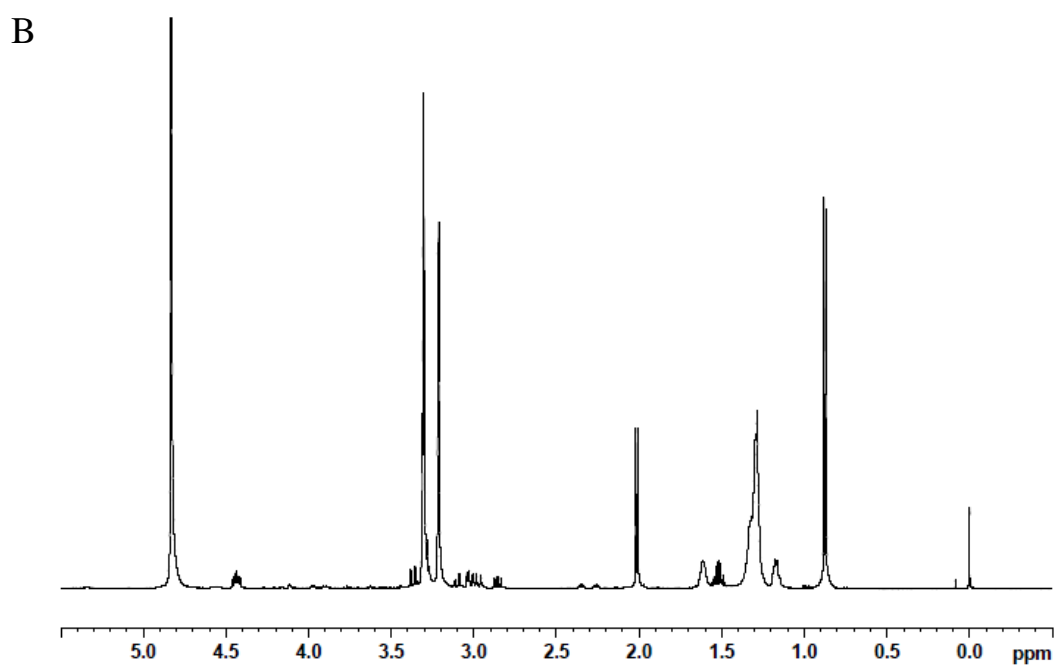
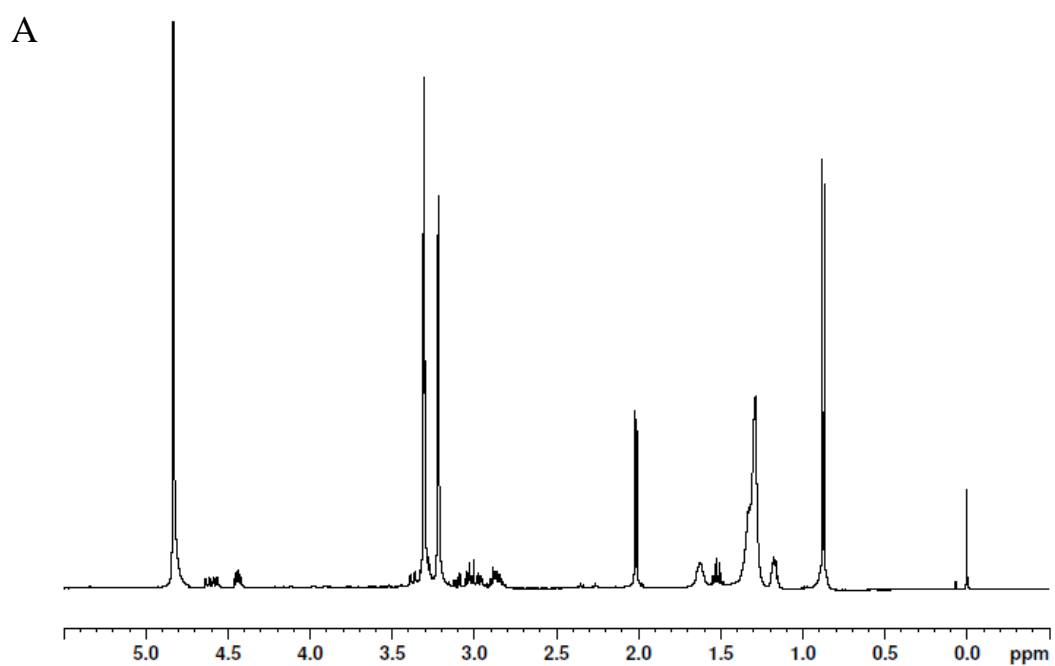
### 3-2-5 構造解析

#### Vestaine A<sub>1</sub> (1) の構造解析

表 III-1 に示すように A<sub>1</sub> 物質の分子式は、高分解能 MS データより、C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S と決定した。重メタノール溶液中で測定した <sup>1</sup>H NMR スペクトルを図 III-7 に示す。

時間の経過とともに、 $\delta$  2.8~2.9、および  $\delta$  4.6 付近のシグナルが消失した。HPLC パターンと同様に、<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいても、それぞれ対となる 2 つのシグナルが観測され、vestaine A<sub>1</sub> は 2 つの異性体 **1a** および **1b** で構成されていることが示唆された (HPLC 分析で認められた 2 つのピーク 1、および 2 のどちらが **1a**、および **1b** であるかは不明である)。そこで、観測された各々のシグナルを DQF-COSY、HSQC、HMBC、および <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC 等の各種 2 次元 NMR スペクトルの相関をもとに、**1a**、あるいは **1b** 由来に分類して解析を行った。

**1a** 由来の <sup>1</sup>H NMR シグナルにおいては、3 つのメチル基を含む、高度に重なったアルキル基 ( $\delta$  1.22 ~1.39) が観測された。加えて、時間の経過とともに 2 つのシグナル ( $\delta$  2.80~2.90、および 4.58) が消失した。これらのシグナルの消失は、互変異性により、**1a** から **1b**、あるいは **1b** から **1a** が生成することによって認められる現象と示唆された。



☒ III-7  $^1\text{H}$  NMR spectrum of vestaine  $\text{A}_1$  in methanol- $d_4$ .

(A) Before deuteration. (B) After deuteration.



重メタノール溶液中で測定した  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを図 III-8 に示す。

**1a** 由来の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいては、帰属可能な 16 個のシグナルと、いくつかの重複したシグナル ( $\delta$  53.2、および 30.6~30.8) が観測された。帰属可能な 16 個のシグナルは、DEPT スペクトルから 3 個のメチル炭素、7 個のメチレン炭素、3 個のメチン炭素、および 3 個の四級炭素に分類された。重複したシグナル  $\delta$  30.6~30.8 は、すべてメチレン炭素であり、このことから **1a** はアルキル鎖を有していることが示唆された。そして、プロトンシグナルと同様に、2 つのカーボンシグナルは観測することが困難だった (C-2', および C-4')。

重メタノール溶液中で測定した  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータの帰属を表 III-2 に示す。

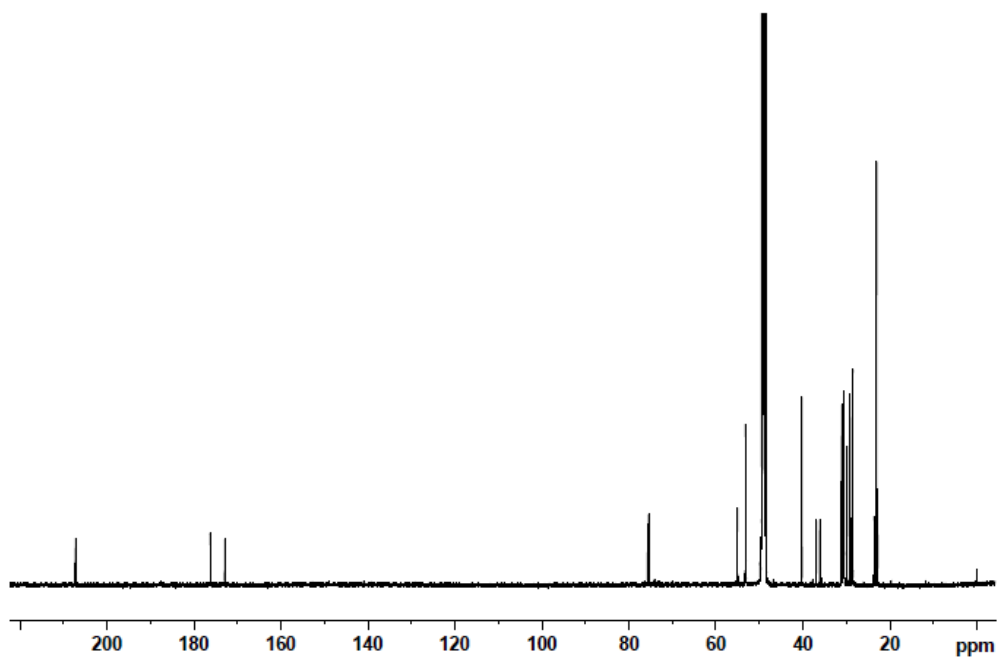


図 III-8  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of vestaine **A**<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.

表 III-2  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of vestaines in methanol- $d_4$ .

		Vestaine A <sub>1</sub> (1)					
		1a			1b		
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
		After deuteration	Before deuteration	After deuteration	After deuteration	Before deuteration	After deuteration
<i>N</i> -acetyl Cys	1	176.3 (s)			176.3 (s)		
	2	55.0 <sup>a</sup> (d)	4.43 (1H, dd, 4.7, 7.0 Hz)	4.43 (1H, dd, 4.7, 7.0 Hz)	55.1 <sup>a</sup> (d)	4.45 (1H, dd, 4.7, 6.0 Hz)	4.45 (1H, dd, 4.7, 6.0 Hz)
	3	36.9 (t)	2.80-2.90 (1H, *) 3.27 (1H, *)	2.86 (1H, dd, 7.0, 14.2 Hz) 3.28 (1H, *)	36.1 (t)	2.93-3.06 (1H, *) 3.10 (1H, dd, 4.7, 14.2 Hz)	3.02 (1H, dd, 6.0, 14.2 Hz) 3.10 (1H, dd, 4.7, 14.2 Hz)
	2-NHAc	172.8 <sup>b</sup> (s)			172.9 <sup>b</sup> (s)		
Alkyl chain		22.8 (q)	2.01 (3H, s)	2.01 (3H, s)	22.9 (q)	2.02 (3H, s)	2.02 (3H, s)
	1'	28.8 (t)	2.93-3.06 (1H, *) 3.31 (1H, *)	3.02 (1H, d, 13.5 Hz) 3.30 (1H, *)	28.5 (t)	2.93-3.06 (1H, *) 3.37 (1H, dd, 3.7, 13.5 Hz)	2.97 (1H, d, 13.5 Hz) 3.37 (1H, d, 13.5 Hz)
	2'	75.5 (d)	4.58 (*, dd, 3.6, 10.9 Hz) <sup>c</sup>	disappeared	75.7 (d)	4.60 (*, dd, 3.6, 10.9 Hz) <sup>c</sup>	disappeared
	3'	207.2 (s)			207.2 (s)		
	4' <sup>d</sup>		2.80-2.90 (*, *)	disappeared		2.80-2.90 (*, *)	disappeared
	5'	23.6 (t)	1.57-1.67 (2H, m)	1.57-1.65 (2H, m)	23.6 (t)	1.57-1.67 (2H, m)	1.57-1.65 (2H, m)
	6'	29.8 <sup>e</sup> (t)			29.8 <sup>f</sup> (t)		
	7'	30.57 <sup>e</sup> (t)			30.57 <sup>f</sup> (t)		
	8'	30.61 <sup>e</sup> (t)			30.61 <sup>f</sup> (t)		
	9'	30.75 <sup>e</sup> (t)	1.22-1.39 (14H, *)	1.22-1.39 (14H, *)	30.75 <sup>f</sup> (t)	1.22-1.39 (14H, *)	1.22-1.39 (14H, *)
	10'	30.83 <sup>e</sup> (t)			30.83 <sup>f</sup> (t)		
	11'	31.1 (t)			31.1 (t)		
	12'	28.5 (t)			28.5 (t)		
	13'	40.3 (t)	1.14-1.20 (2H, m)	1.14-1.20 (2H, m)	40.3 (t)	1.14-1.20 (2H, m)	1.14-1.20 (2H, m)
	14'	29.2 (d)	1.47-1.57 (1H, m)	1.47-1.57 (1H, m)	29.2 (d)	1.47-1.57 (1H, m)	1.47-1.57 (1H, m)
15'	23.1 (q)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	23.1 (q)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	
	2'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	53.2 (q)			53.2 (q)		
		53.2 (q)	3.216 (*, s) <sup>g</sup>	3.21 (*, s) <sup>h</sup>	53.2 (q)	3.220 (*, s) <sup>g</sup>	3.22 (*, s) <sup>h</sup>
		53.2 (q)			53.2 (q)		
	14'-CH <sub>3</sub>	23.1 (q)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	23.1 (q)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)	0.88 (3H, d, 6.7 Hz)

表 III-2 Continued.

		Vestaine B <sub>1</sub> (2)					
		2a			2b		
		$\delta_C$	$\delta_H$		$\delta_C$	$\delta_H$	
		After deuteration	Before deuteration	After deuteration	After deuteration	Before deuteration	After deuteration
<i>N</i> -acetyl Cys	1	176.4 (s)			176.4 (s)		
	2	55.1 (d)	4.42 (1H, dd, 4.4, 7.0 Hz)	4.42 (1H, dd, 4.4, 7.0 Hz)	55.2 (d)	4.45 (1H, dd, 5.0, 6.1 Hz)	4.45 (1H, dd, 5.0, 6.1 Hz)
	3	37.0 (t)	2.80-2.92 (1H, *) 3.28 (1H, *)	2.85 (1H, dd, 7.0, 14.1 Hz) 3.28 (1H, *)	36.1 (t)	2.94-3.06 (1H, *) 3.10 (1H, dd, 5.0, 14.3 Hz)	3.02 (1H, dd, 6.1, 14.3 Hz) 3.10 (1H, dd, 5.0, 14.3 Hz)
	2-NHAc	172.8 <sup>i</sup> (s)			172.9 <sup>i</sup> (s)		
Alkyl chain	1'	22.9 (q) 28.7 (t)	2.01 (3H, s) 2.94-3.06 (1H, *) 3.28 (1H, *)	2.01 (3H, s) 3.01 (1H, d, 12.3 Hz) 3.28 (1H, *)	22.9 (q) 28.5 (t)	2.02 (3H, s) 2.94-3.06 (1H, *) 3.37 (1H, d, 13.5 Hz)	2.02 (3H, s) 2.97 (1H, d, 13.4 Hz) 3.37 (1H, d, 13.4 Hz)
	2'	75.5 (d)	4.58 (*, dd, 3.6, 10.9 Hz) <sup>j</sup>	disappeared	75.7 (d)	4.62 (*, dd, 3.6, 10.9 Hz) <sup>j</sup>	disappeared
	3'	207.2 <sup>k</sup> (s)			207.3 <sup>k</sup> (s)		
	4' <sup>1</sup>		2.80-2.92 (*, *)	disappeared		2.80-2.92 (*, *)	disappeared
	5'	23.6 (t)	1.57-1.69 (2H, m)	1.57-1.69 (2H, m)	23.6 (t)	1.57-1.69 (2H, m)	1.57-1.69 (2H, m)
	6'	29.8 (t)			29.8 (t)		
	7'	28.2 <sup>m</sup> (t)			28.2 <sup>n</sup> (t)		
	8'	30.6 <sup>m</sup> (t)			30.6 <sup>n</sup> (t)		
	9'	30.6 <sup>m</sup> (t)	1.22-1.39 (14H, *)	1.22-1.39 (14H, *)	30.6 <sup>n</sup> (t)	1.22-1.39 (14H, *)	1.22-1.39 (14H, *)
	10'	30.8 <sup>m</sup> (t)			30.8 <sup>n</sup> (t)		
	11'	30.8 <sup>m</sup> (t)			30.8 <sup>n</sup> (t)		
	12'	31.1 <sup>m</sup> (t)			31.1 <sup>n</sup> (t)		
	13'	37.8 (t)	1.05-1.16 (1H, m) 1.31 (1H, *)	1.05-1.16 (1H, m) 1.31 (1H, *)	37.8 (t)	1.05-1.16 (1H, m) 1.31 (1H, *)	1.05-1.16 (1H, m) 1.31 (1H, m)
	14'	35.7 (d)	1.30 (1H, *)	1.30 (1H, *)	35.7 (d)	1.30 (1H, *)	1.30 (1H, *)
	15'	30.6 (t)	1.09-1.19 (1H, m) 1.35 (1H, *)	1.09-1.19 (1H, m) 1.35 (1H, *)	30.6 (t)	1.09-1.19 (1H, m) 1.35 (1H, *)	1.09-1.19 (1H, m) 1.35 (1H, *)
	16'	11.8 (q)	0.87 (3H, t, 7.2 Hz)	0.87 (3H, t, 7.2 Hz)	11.8 (q)	0.87 (3H, t, 7.2 Hz)	0.87 (3H, t, 7.2 Hz)
2'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	53.1 <sup>o</sup> (q)			53.2 <sup>o</sup> (q)			
	53.1 <sup>o</sup> (q)	3.21 (*, s) <sup>p</sup>	3.21 (*, s) <sup>q</sup>	53.2 <sup>o</sup> (q)	3.22 (*, s) <sup>p</sup>	3.22 (*, s) <sup>q</sup>	
	53.1 <sup>o</sup> (q)			53.2 <sup>o</sup> (q)			
14'-CH <sub>3</sub>	19.7 (q)	0.86 (3H, d, 6.6 Hz)	0.86 (3H, d, 6.4 Hz)	19.7 (q)	0.86 (3H, d, 6.6 Hz)	0.86 (3H, d, 6.4 Hz)	

Chemical shifts are given in ppm referenced to TMS.

\* Not clearly observed due to overlap.

a-c, g-k, o-q) changeable, d, l) Not clearly observed due to overlap and deuteration. e, f, m, n) interchangeable

図 III-9A に示す部分構造 (a)~(c) は、DQF-COSY、HSQC、HMBC、および  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC などの各種 NMR スペクトルによって解析された。そして、アルキル鎖の末端構造は、図 III-9A (c) に示すように分岐していることが分かった。硫黄原子の結合部位に関しては、直接的な証拠は得られなかったが、H-3 ( $\delta$  2.86 と 3.28) と H-1' ( $\delta$  3.02 と 3.30) の化学シフト値、H-3 と C-1'、H-1' と C-3 の間に  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ロングレンジ相関が観測されたこと、加えて H-3 と H-1' の間に  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  相関が認められなかったことから、C-3 と C-1' の間と決定した。このことは、**1a** の collision-induced dissociation (CID) スペクトルでプロダクトイオン  $m/z$  162 が観測されたことによっても支持された (図 III-9B)。これにより、部分構造 (a) は、*N*-アセチルシステインであることが明らかとなった。そして、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルで観測された重複した複数のメチレン炭素は、部分構造 (b) の C-3' と部分構造 (c) の C-11' の間に位置することが判明した。しかしながら、これらによって構成されるアルキル鎖の長さ、N-2' に結合するメチル基の数は、本検討では決定不可能だった。

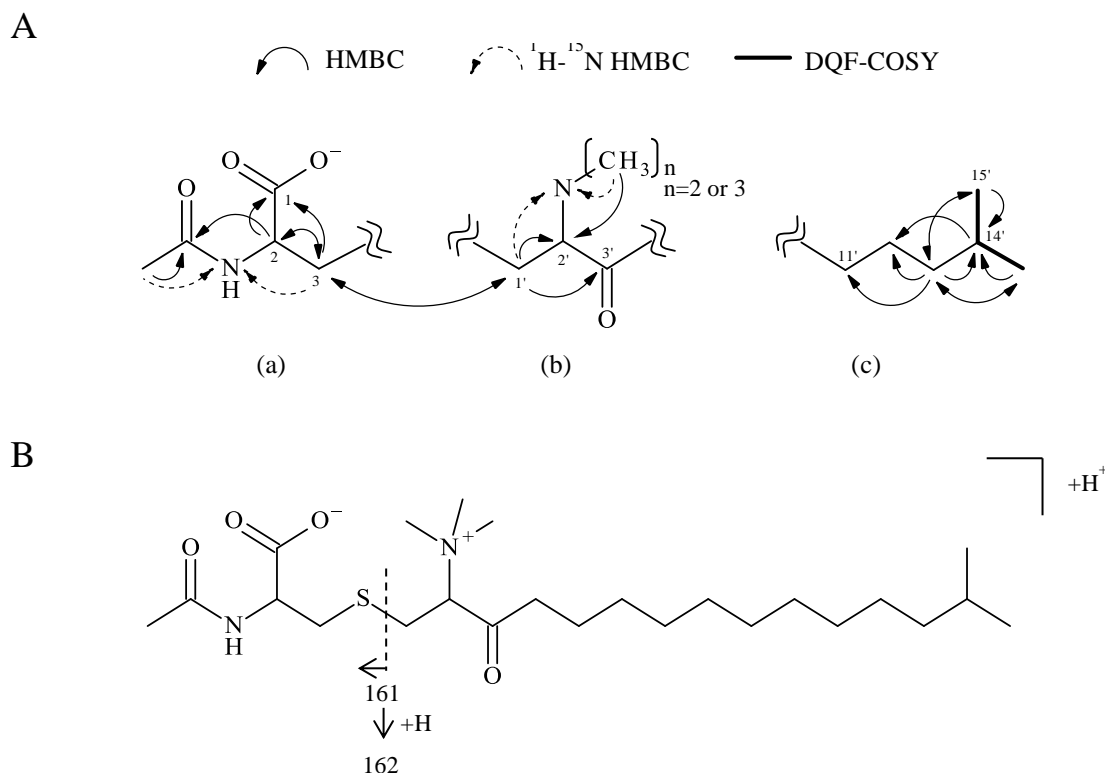


図 III-9 NMR and MS analyses of vestaine A<sub>1</sub> (**1**).

(A) Partial structures obtained from the NMR analyses of **1**. Both **1a** and **1b** had the same partial structures. (B) Product ion observed in collision-induced dissociation spectra of the protonated molecules of **1**. Both **1a** and **1b** gave the same product ion.

一方、**1b** 由来のシグナルを **1a** と同様に解析した結果、**1b** から **1a** と同じ部分構造が導かれ、**1b** は **1a** と同じ平面構造を有していることが判明した。

次に、アルキル鎖の長さ、N-2' に結合するメチル基の数を決定するために、A<sub>1</sub> 物質を重ジメチルスルホキシドに溶解し、各種 NMR スペクトルにて解析することにした。その結果、A<sub>1</sub> 物質は重ジメチルスルホキシド溶液中で化合物 **3** へと変化することが分かった。得られた化合物 **3** は、重メタノール溶液中で観測されていたような対となるシグナルは観測されず、互変異性は消失していた。

化合物 **3** について高分解能 MS を測定したところ、 $m/z$  400.2508 のイオンが観測されたことから、その分子式を  $C_{21}H_{37}NO_4S$  と決定した ( $C_{21}H_{38}NO_4 [M+H]^+$  の計算値 ; 400.2516)。次に、 $^1H$ 、および  $^{13}C$  NMR スペクトルを測定したところ、 $^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、アルキル鎖中のメチレンシグナルを含めたすべてのカーボンシグナルが明瞭に観測された。そして、各種 NMR スペクトルを測定して解析した結果、化合物 **3** は、N-2' が脱離し、そこに新たにオレフィンが形成された図 III-10 に示すような構造であることが明らかとなった。このことから、 $A_1$  物質の平面構造を、トリメチルアンモニウムを有する図 III-10 に示すような構造と決定した。そして、化合物 **3** は、このトリメチルアンモニウムがジメチルスルホキシド溶液中でホフマン脱離して生成したものであると考えられ、**1a** と **1b** は、ケト-エノール互変異性を介したジアステレオマー同士であり、C-2' 位の立体配置が異なると結論付けた。

なお、図 III-10 には、後述する  $B_1$  物質由来の分解物である化合物 **4** についても示した。

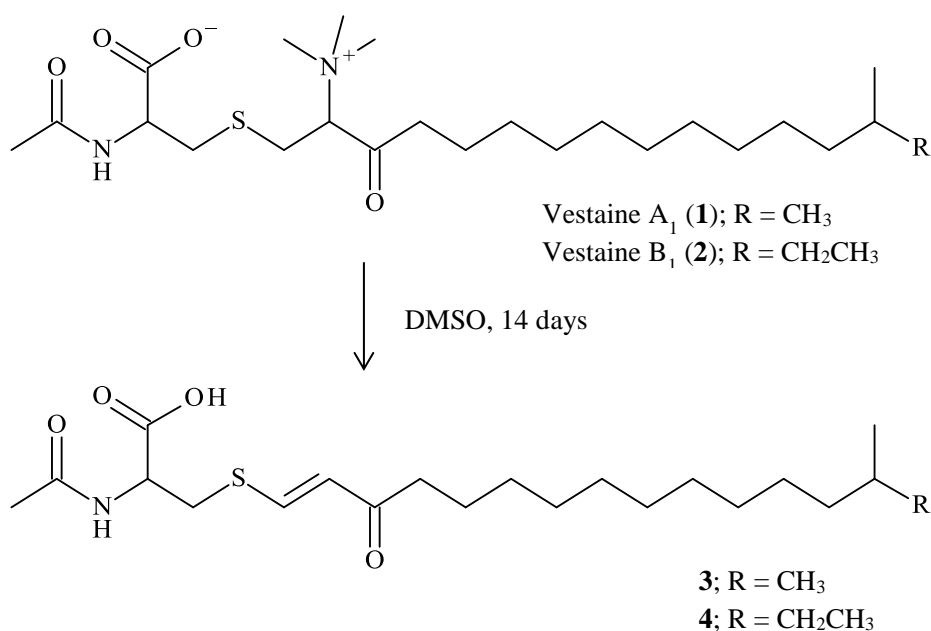
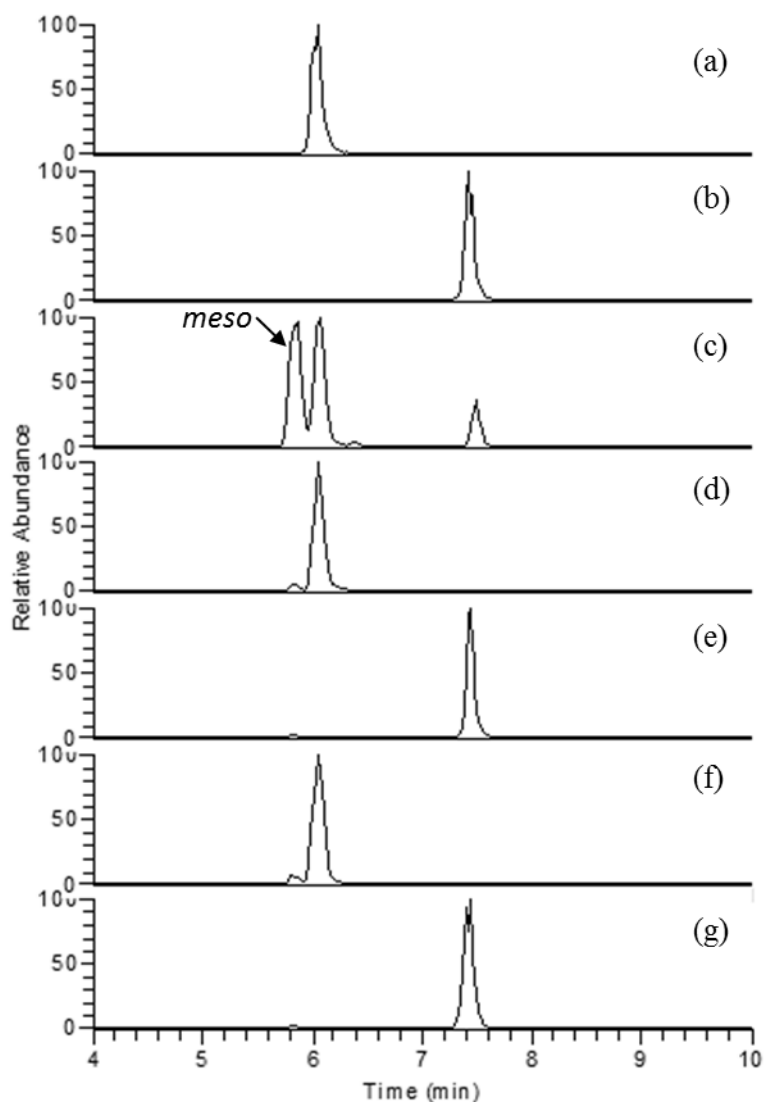


図 III-10 Hofmann elimination of vestaines.

A<sub>1</sub>物質のシステイン残基の立体配置は、改良 Marfey 法にて決定した<sup>52</sup>。システイン残基は酸加水分解において非常にラセミ化しやすいことで知られている<sup>53</sup>。しかし、vestaine 類においては、システインが *S*-アルキル化されているためにラセミ化が抑えられると考えた。この仮説は、Jacobson らによっても支持されたが<sup>54</sup>、さらにラセミ化を抑えるためにフラッシュ加水分解<sup>55</sup>を用いて、ラセミ化していないシステインを取得した。得られた酸加水分解物に L-1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucine amide (FDLA)、もしくは D-FDLA を縮合させて、DLA 化システインを作製した。これを LC-高分解能 MS にて分析したところ、ほとんどの DLA 化システインは、DLA 化シスチンとして検出された。これを標品と比較し、システイン残基の立体配置を L 体と決定した (図 III-11)。

なお、図 III-11 には、後述する B<sub>1</sub>物質の分析結果についても記した。

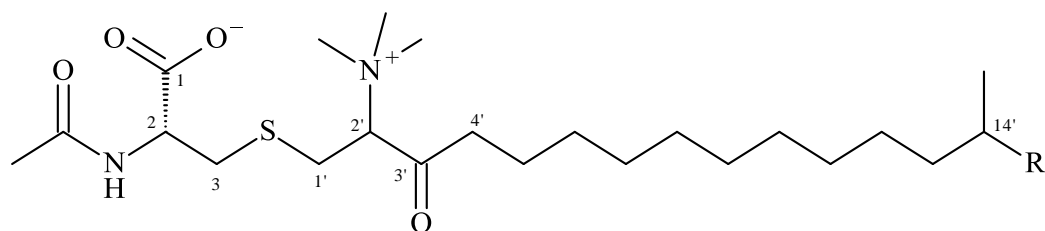


☒ III-11 LC-HR-MS analyses of DLA-derived cystine.

HPLC conditions: column, Unison UK-C18, 3  $\mu$ m, 3.0 i.d. x 50 mm; mobile phase, 5 mM aq. ammonium formate in 0.02% formic acid (A), MeCN in 0.02% formic acid (B); gradient rate, A:B (7:3)-A:B (3:7), 10 min; flow rate, 0.6 ml/min; detection, total ion count from  $m/z$  829.0000 to 831.0000. (a) LL-cystine-L-DLA, (b) LL-cystine-D-DLA, (c) racemic cysteine-derived cystine-L-DLA, (d) vestaine A<sub>1</sub>-derived cystine-L-DLA, (e) vestaine A<sub>1</sub>-derived cystine-D-DLA, (f) vestaine B<sub>1</sub>-derived cystine-L-DLA, (g) vestaine B<sub>1</sub>-derived cystine-D-DLA.



以上のことから A<sub>1</sub> 物質の構造を図 III-12 のように決定した。なお、図 III-12 には、後述する B<sub>1</sub> 物質の構造も示した。



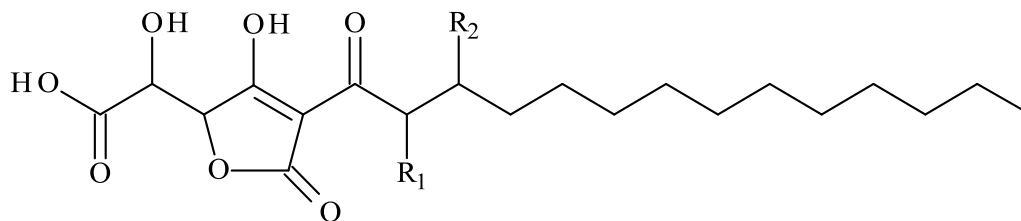
Vestaine A<sub>1</sub> (1)    R = CH<sub>3</sub>  
 Vestaine B<sub>1</sub> (2)    R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

図 III-12 Structures of vestaines.

#### Vestaine B<sub>1</sub> (2) の構造解析

B<sub>1</sub> 物質についても A<sub>1</sub> 物質と同様に 2 つの異性体 **2a** および **2b** で構成されていた (HPLC 分析で認められた 2 つのピーク 3、および 4 のどちらが **2a**、および **2b** であるかは不明である)。高分解能 MS データより求めた **2a** および **2b** の分子式は、**1a** および **1b** の分子式からメチレン 1 個分が増加していた。重メタノール溶液中で測定した B<sub>1</sub> 物質の <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR スペクトルデータの帰属を表 III-2 に示す。B<sub>1</sub> 物質の IR スペクトルデータ、<sup>1</sup>H、および <sup>13</sup>C NMR スペクトルデータは、A<sub>1</sub> 物質に酷似していた。そのため、B<sub>1</sub> 物質の構造解析は、ホフマン脱離による分解物の作製、および構造解析も含めて A<sub>1</sub> 物質と同様に行った。その結果、B<sub>1</sub> 物質をアルキル鎖の末端構造が異なる、図 III-12 に示す構造と決定した。

### 第3節 F-36316 類の発見



F-36316 A  $R_1 = R_2 = H$   
F-36316 B  $R_1 = OH, R_2 = H$   
F-36316 C  $R_1 = R_2 = OH$

#### F-36316 類

##### 3-3-1 生産菌

SANK 10404 株は、静岡県で採集された微小な子実体から分離された。ITS-5.8S リボゾーム DNA 配列を DDBJ データベース (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) を用いて解析したところ、*Incrucipulum* 属に属することが明らかとなった。そこで、本株を *Incrucipulum* sp. SANK 10404 と命名した。MEGA program (version 6.05, <http://www.megasoftware.net/>) を用いて作成した系統樹を図 III-13 に示す。

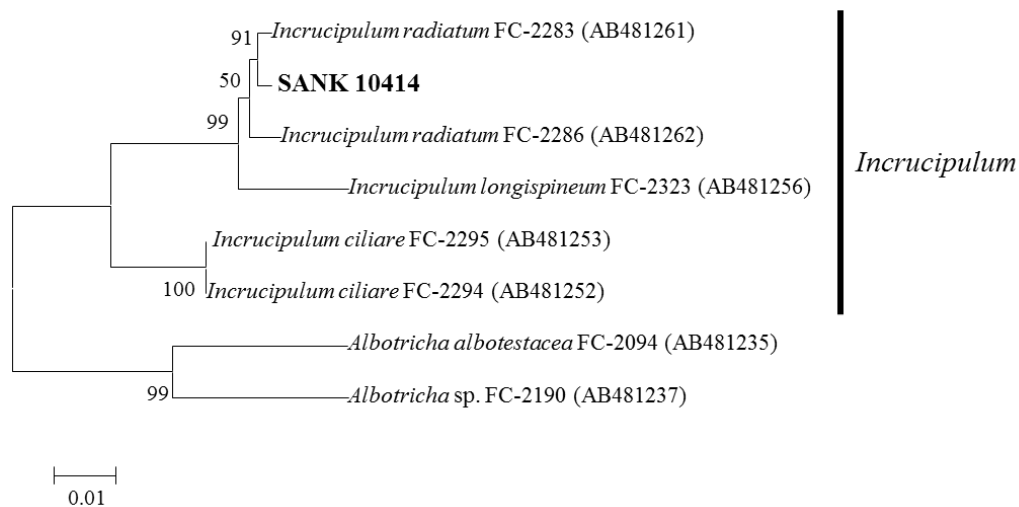


図 III-13 The taxonomic position of the strain SANK 10414.

Bootstrap values (%) are indicated at the branches from 1000 replications. The scale bar below the phylogenetic tree indicates substitution per site.

### 3-3-2 発酵生産

*Incrucipulum* sp. SANK 10414 株を生育させたスラントを滅菌水 5 ml でホモジェナイズし、そのホモジェナイズ液 1~2 ml をオートクレーブ滅菌した培地 3-3 30 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに接種した。これを、回転振盪培養機を用いて、210 rpm、23 °C で 7 日間培養し、前培養液とした。

次に、この前培養液 4~5 ml をオートクレーブ滅菌した培地 3-4 80 ml を含む 500 ml 容三角フラスコに接種した。これを、回転振盪培養機を用いて、210 rpm、23 °C で 14 日間培養した。

なお、培地 3-3 および 3-4 の組成は、実験の部に記載した。

### 3-3-3 単離精製

精製は、第 1 節で述べた VS-G アッセイによる活性を指標に行った。そして、活性を有する F-36316 A、および B を見出した後、これらと同様の UV スペクトルを有する物質を同培養液から探索し、活性を有さない類縁体 F-36316 C を見出した。

F-36316 類の代表的な精製方法を図 III-14 に示す。

培養液 1L を遠心分離し、菌体と上清に分けた。その菌体にアセトン 400 ml を添加し、それを遠心分離し、菌体アセトン抽出液を得た。これを減圧下、濃縮し、アセトンを留去した。この濃縮液の pH を塩酸で 3.0 に調整した後、酢酸エチル 125 ml を加えて分配し、酢酸エチル抽出液を得た。これを飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下濃縮乾固して F-36316 A、B、および C を含むオイル状の抽出物 96.8 mg を得た。

このオイル状の抽出物を分取用 HPLC カラムで精製した。あらかじめアセトニトリル：10 mM 硫酸ナトリウム水-0.03% リン酸=58：42 で平衡化した HPLC カラム (SYMMETRY C18 19 i.d.×100 mm) に、得られた抽出物 96.8 mg を 50% エタノール水 3 ml に溶解した試料溶液 100 μl を注入後、同じ溶媒で、流速 5 ml/分で溶出した。溶出液は検出波長 210 nm でモニターした。残りの試料溶液 2.9 ml についても同様の操作を行い、分取液をまとめた。

#### F-36316 A の精製

上記 HPLC にて、保持時間 14.2～17.0 分を分取した。この分取液を減圧下濃縮してアセトニトリルを留去した。そして、脱塩のため、その濃縮液を SP207 カラム (セパビーズ SP207、三菱ケミカル社製、5 ml) にチャージした。このカラムを水 20 ml で洗浄後、80% アセトン水 20 ml で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固し、A 物質の白色粉末 6.2 mg を得た。

#### F-36316 B の精製

上記 HPLC にて、保持時間 8.5～11.5 分を分取した。この分取液を A 物質と同様に脱塩し、B 物質の白色粉末 18.3 mg を得た。

#### F-36316 C の精製

上記 HPLC にて、保持時間 6.0～7.5 分を分取した。この分取液を A 物質と同様に脱塩し、C 物質の粗精製物 8.3 mg を得た。

この粗精製物を前述の分取用 HPLC カラムで精製した。あらかじめアセトニトリル : 0.1 M 過塩素酸ナトリウム水 = 51 : 49 で平衡化した HPLC カラムに、粗精製物 8.3 mg を水 2 ml に溶解した試料溶液 400  $\mu$ l を注入後、同じ溶媒で、流速 5 ml/分で溶出した。検出波長 210 nm で溶出液をモニターし、保持時間 4.1~6.8 分に溶出されるピークを分取した。残りの試料溶液 1.6 ml についても同様の操作を行い、分取液をまとめた。その分取液を減圧下濃縮してアセトニトリルを留去後、上記と同様に SP207 カラムで脱塩し、C 物質の白色粉末 5.0 mg を得た。

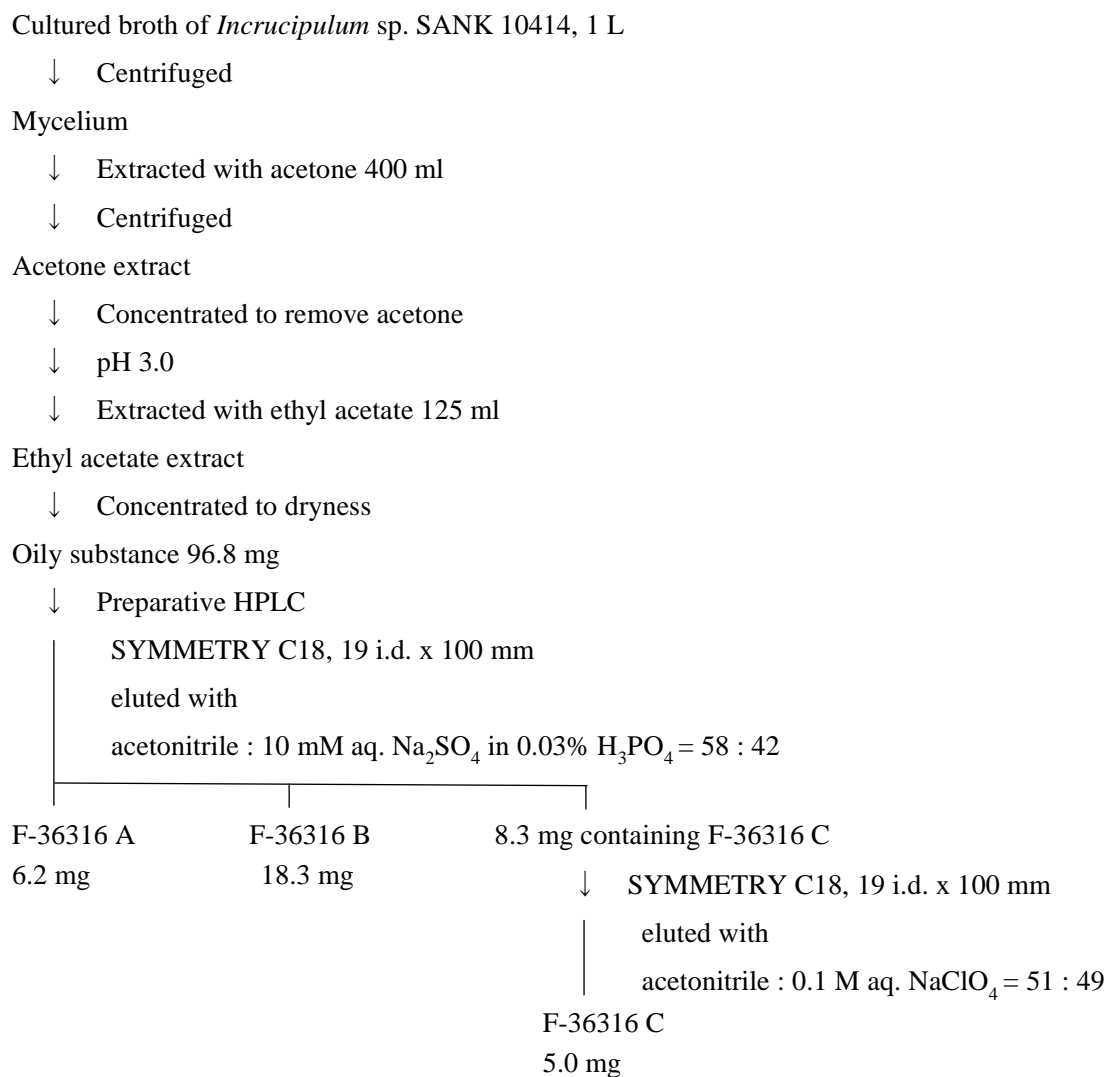


図 III-14 Isolation of F-36316s.

### 3-3-4 物理化学的性質

F-36316 類の物理化学的性質を表 III-3 に示す。

高分解能 MS データから、F-36316 A、B、および C の分子式をそれぞれ  $C_{20}H_{32}O_7$ 、 $C_{20}H_{32}O_8$ 、および  $C_{20}H_{32}O_9$  と決定した。

IR スペクトルでは、 $1700\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  に C=O 由来の吸収が観測された。

表 III-3 Physico-chemical properties of F-36316s.

	F-36316 A (1)	F-36316 B (2)	F-36316 C (3)
Appearance	White powder	White powder	White powder
HR-MS ( $m/z$ )			
Found:	383.2075 [M-H] <sup>-</sup>	399.2020 [M-H] <sup>-</sup>	415.1968 [M-H] <sup>-</sup>
Calcd.:	383.2064 (for $C_{20}H_{31}O_7$ )	399.2013 (for $C_{20}H_{31}O_8$ )	415.1962 (for $C_{20}H_{31}O_9$ )
$[\alpha]_D^{25}$ ( $c$ 0.50, 50% EtOH)	-75.8	-78.4	-84.4
UV $\lambda_{\max}^{50\% \text{ EtOH}}$ nm ( $\epsilon$ )	266 (16,000), 233 (14,000)	268 (16,000), 233 (14,000)	268 (15,000), 233 (14,000)
IR $\nu_{\max}$ $\text{cm}^{-1}$ (ATR)	3575, 3217, 2918, 2850, 1703, 1597, 1466	3388, 2920, 2852, 1722, 1622, 1566, 1460	3359, 2919, 2850, 1726, 1648, 1563, 1461

Abbreviation: ATR, attenuated total reflection.

### 3-3-5 構造解析

#### F-36316 A (1) の構造解析

表 III-3 に示すように A 物質の分子式は、高分解能 MS データより、 $C_{20}H_{32}O_7$  と決定した。この分子式から計算される不飽和度は 5 だった。

重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^1H$  NMR スペクトルは、溶解直後はそれぞれ対となる 2 つのシグナルが観測されたが、これらの対となるシグナルは時間の経過とともにその中央に収束した。それゆえ、F-36316 A は互変異性を有していることが示唆された。収束したスペクトルを図 III-15 に示す。本スペクトルにおいて、高度に重複したアルキル基 ( $\delta$  1.20~1.30)、1 つのメチル基 ( $\delta$  0.85)、2 つのメチレン基 ( $\delta$  1.42、および 2.58)、および 2 つのメチン基 ( $\delta$  4.20、および 4.38) が観測された。

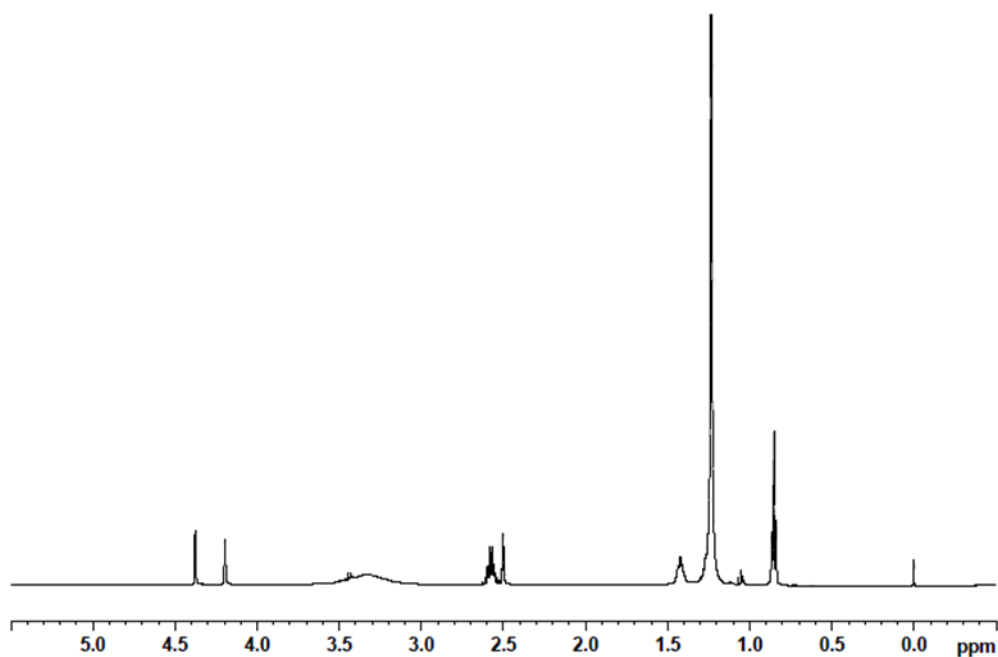


図 III-15  $^1H$  NMR spectrum of F-36316 A in  $DMSO-d_6$ .

重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^{13}C$  NMR スペクトル (収束後) を図 III-16 に示す。本スペクトルにおいて、帰属可能な 11 個のシグナルが観測され、それらは DEPT スペクトルから 1 個のメ

チル炭素、3個のメチレン炭素、2個のメチン炭素、および5個の四級炭素に分類された。そして、アルキル領域においては、高度に重複したメチレン炭素が観測された。加えて、DEPT スペクトルより、1つのメチレン炭素 (C-9) が溶媒シグナルと重なっていることが明らかとなった。

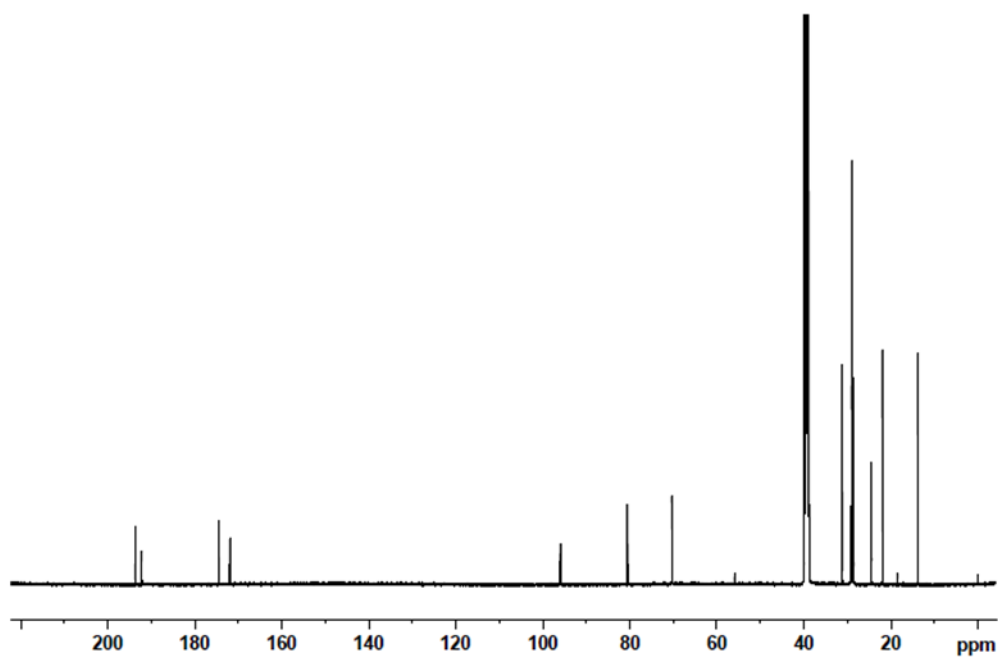


図 III-16  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of F-36316 A in  $\text{DMSO-}d_6$ .

重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータの帰属を表 III-4 に示す。なお、表 III-4 には、後述する A 物質の構造に基づいたナンバリング、および B、C 物質の帰属についても記した。



表 III-4  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignments of F-36316s in DMSO- $d_6$ .

Position	F-36316 A (1) <sup>a</sup>		F-36316 B (2)		F-36316 C (3)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	174.5 (s)		174.0 (s)		174.1 (s)	
3	96.0 (s)		94.0 (s)		94.2 (s)	
4	192.2 (s)		192.4 (s)		192.3 (s)	
5	80.5 (d)	4.38 (1H, d, 2.2 Hz)	81.1 (d)	4.44 (1H, d, 2.2 Hz)	81.0 (d)	4.44 (1H, d, 2.2 Hz)
6	70.4 (d)	4.20 (1H, d, 2.2 Hz)	70.2 (d)	4.26 (1H, d, 2.2 Hz)	70.0 (d)	4.29 (1H, d, 2.2 Hz)
7	172.0 (s)		171.8 (s)		171.7 (s)	
8	193.7 (s)		194.3 (s)		192.7 (s)	
9	39.4 <sup>b</sup> (t)	2.58 (2H, m)	73.3 (d)	4.38 (1H, m)	75.2 (d)	4.49 (1H, br.)
10	24.5 (t)	1.42 (2H, m)	34.2 (t)	1.21 (1H, <sup>c</sup> ) 1.58 (1H, m)	71.0 (d)	3.67 (1H, m)
11	(t)		25.3 (t)	1.32 (2H, m)	34.2 (t)	1.42 (2H, m)
12	(t)		(t)		25.4 (t)	
13	(t)		(t)		(t)	
14	(t)		(t)		(t)	
15	28.6-29.1 (t)		28.6-29.1 (t)		28.6-29.2 (t)	
16	(t)	1.20-1.30 (20H, <sup>c</sup> )	(t)	1.15-1.30 (18H, <sup>c</sup> )	(t)	1.20-1.30 (18H, <sup>c</sup> )
17	(t)		(t)		(t)	
18	(t)		(t)		(t)	
19	31.2 (t)		31.2 (t)		31.2 (t)	
20	22.0 (t)		22.0 (t)		22.0 (t)	
21	13.8 (q)	0.85 (3H, t, 7.0 Hz)	13.9 (q)	0.85 (3H, t, 7.2 Hz)	13.9 (q)	0.86 (3H, t, 7.0 Hz)

Chemical shifts are given in ppm referenced to TMS.

a) The signals were measured 10 days after dissolved.

b) The signal was measured by DEPT135 spectrum because it was not clearly observed due to overlap with DMSO signals in  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum.

c) Not clearly observed due to overlap.

部分構造は、DQF-COSY、HSQC、HMBC、およびINADEQUATEなどの各種NMRスペクトルによって解析された(図III-17)。

INADEQUATEスペクトルにおいては、C-4からC-7までの相関が観測された。

HMBCスペクトルにおいて、H-5とC-3の間の相関は観測されなかったが、H-6とC-3の相関は弱く観測された。そして、H-9からC-3、C-8への相関が観測されたことから、C-4はC-3と結合している、すなわち、C-3はC-4とC-8の間に位置していることが考えられた。この仮説は、ケミカルシフト値からも支持された。加えて、C-4( $\delta$  192.2)とC-8( $\delta$  193.7)のケミカルシフト値は、カルボニル炭素としては高磁場にあり、C-3( $\delta$  96.0)のケミカルシフト値もオレフィン炭素としては高磁場にあったことから、この箇所でエノール、もしくはエノンが形成されていることが示唆された。

C-2のケミカルシフト値 $\delta$  174.5に関しては、エステル基のカルボニル炭素と考えられた。H-5とC-2の間にC-Hロングレンジ相関が観測されたこと、C-5のケミカルシフト値が $\delta$  80.5であることから、2-フラノンの部分構造が導き出された。これにより、C-9にアルキル鎖が結合していることが判明した。

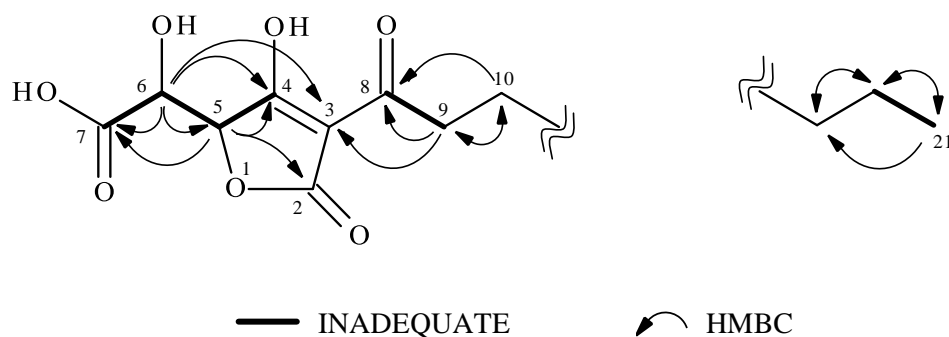
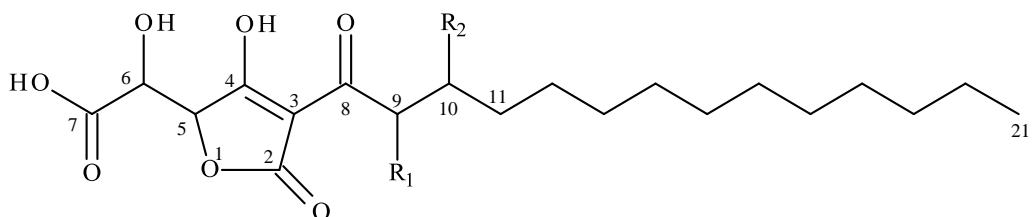


図 III-17 Partial structures obtained from the NMR analyses of F-36316 A.

このようにしてA物質の構造を図III-18に示すような新規3-アシル化テトロン酸であると決定した。そして、溶解直後に観測された互変異性は、テトロン酸部分で生じていたことが示唆された<sup>56</sup>。4つの想定される互変異性体を図III-19に示す。

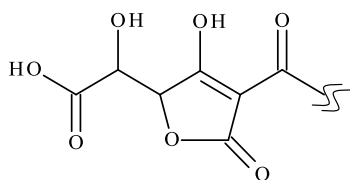
なお、図III-18には、後述する類縁体すべての構造を示した。



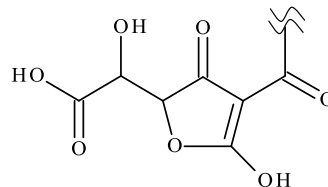
F-36316 A  $R_1 = R_2 = H$   
 F-36316 B  $R_1 = OH, R_2 = H$   
 F-36316 C  $R_1 = R_2 = OH$

☒ III-18 Structures of F-36316s.

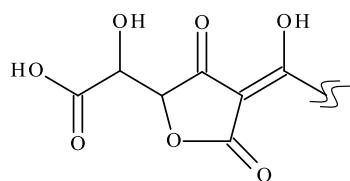
(a)



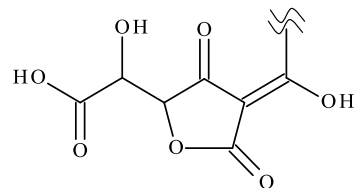
(b)



(c)



(d)



☒ III-19 Four assumed tautomers of F-36316 A.

Structures of (a) and (b) are endo-enol types, whereas those of (c) and (d) are exo-enol types.

### F-36316 B (2)、および C (3) の構造解析

表 III-3 に示すように、高分解能 MS データより B、および C 物質の分子式は、それぞれ  $C_{20}H_{32}O_8$ 、および  $C_{20}H_{32}O_9$  と決定した。重ジメチルスルホキシド溶液中で測定した  $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR スペクトルデータの帰属を表 III-4 に示す。B、および C 物質は、A 物質のように互変異性由来のシグナルは観測されなかったが、テトロン酸部分のシグナルはブロードニングしていた。

A 物質と比較した B、および C 物質の構造的違いは C-9、および C-10 の水酸基の置換パターンにあった。高分解能 MS、および各種 NMR スペクトルデータより、B 物質は A 物質の 9-ヒドロキシ体、C 物質は A 物質の 9, 10-ジヒドロキシ体であると決定した (図 III-18)。

## 第4節 生物活性

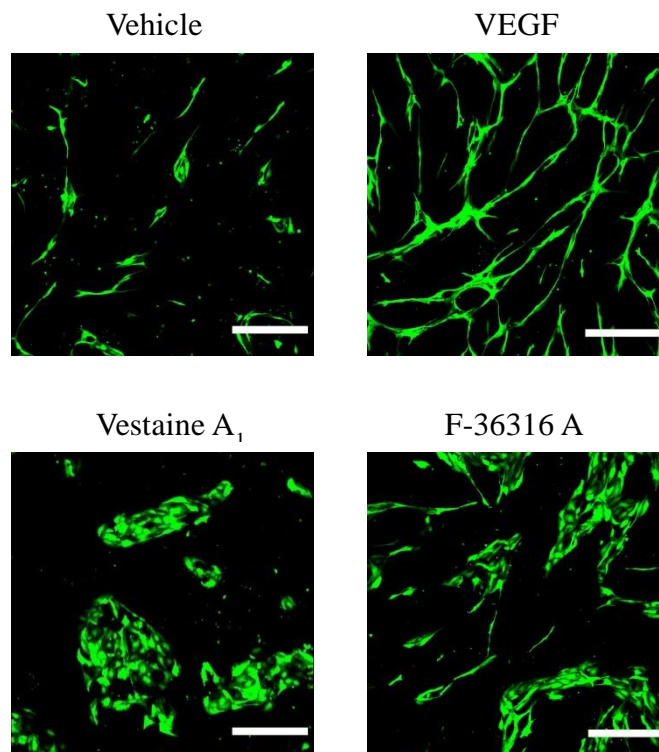
### 3-4-1 *in vitro* 試験

取得した vestaine 類、および F-36316 類が血管機能に与える作用を調べるために、スクリーニングで用いた VS-G アッセイにて評価を実施した。

前述したように、VS-G アッセイにおいて、VEGF は HUVECs に対して管状の形態を誘導し、Ang-1 は島状の形態を誘導する。

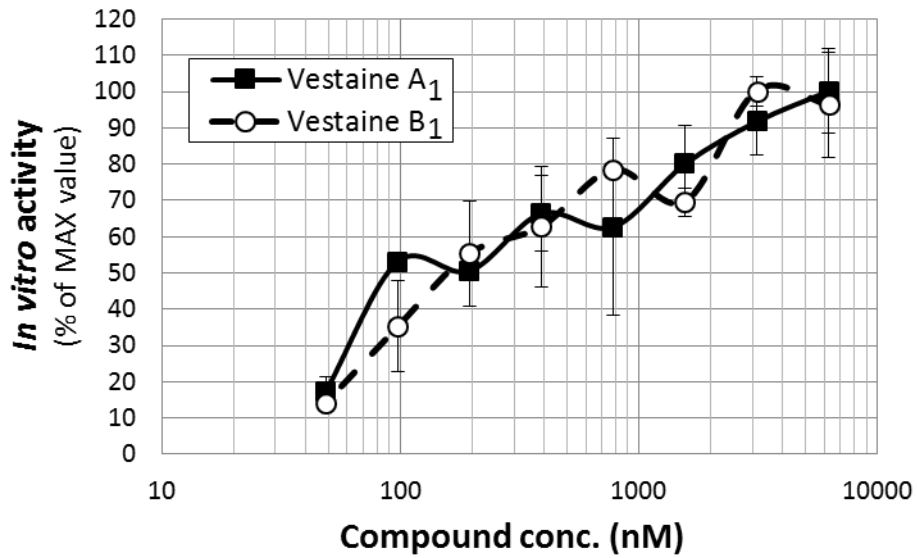
Vestaine 類は、島状の形態を誘導した (図 III-20)。Vestaine A<sub>1</sub>、および B<sub>1</sub> は濃度依存的に形態変化を誘導し、A<sub>1</sub> 物質が誘導する HUVECs の最大面積値を 100% 活性として算出した EC<sub>50</sub> 値は、A<sub>1</sub> 物質も、B<sub>1</sub> 物質もほぼ同等で、60~403 nM だった (図 III-21)。そのため、以降の評価は A<sub>1</sub> 物質のみで実施した。

一方、F-36316 A、および B が誘導した形態は、管状と島状、両方の形態を併せ持っており、VEGF とも、vestaine 類とも異なった (図 III-20)。F-36316 C は形態変化を誘導しなかった。F-36316 A、および B は濃度依存的に形態変化を誘導し、vestaine A<sub>1</sub> (5 μM) が誘導する HUVECs の面積値を 100% 活性として算出した EC<sub>50</sub> 値は、F-36316 A が 1.8 μM、F-36316 B が 11.7 μM だった (図 III-22)。



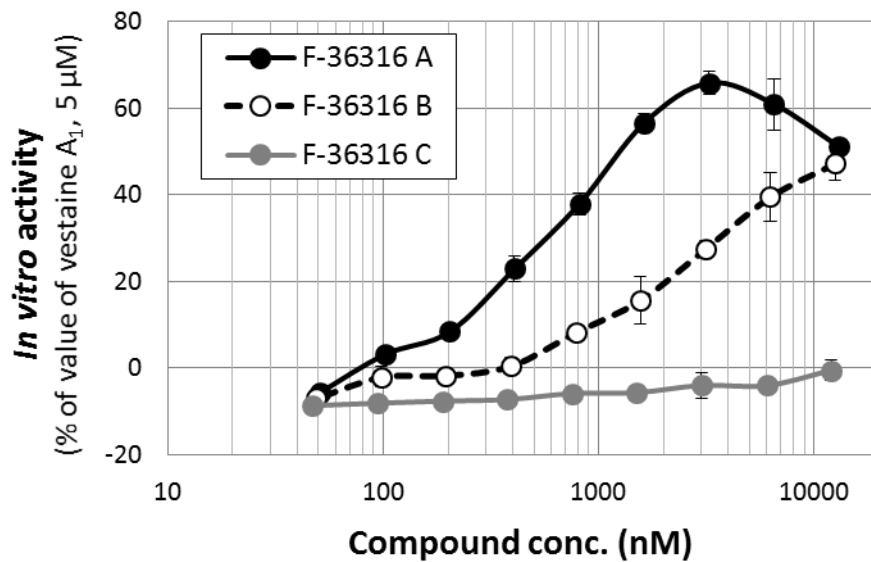
☒ III-20 **The morphologies of GFP-HUVECs in VS-G assay.**

GFP-HUVECs were treated with 0.25% DMSO, VEGF (50 ng/ml), vestaine A<sub>1</sub> (0.21 μM), or F-36316 A (3.0 μM). The data of vestaine A<sub>1</sub> is representative data obtained by another independent experiment. Each scale bar is 400 μm.



☒ III-21 Activities of vestaines in the VS-G assay.

GFP-HUVECs were treated at various concentrations of vestaine A<sub>1</sub> or vestaine B<sub>1</sub>. *In vitro* activity was shown using the number of maximum area value of treatment with vestaine A<sub>1</sub> as a base of 100. Each value is represented as the mean ± range (n = 2 wells per group).



☒ III-22 **Activities of F-36316s in the VS-G assay.**

GFP-HUVECs were treated at various concentrations of F-36316s. *In vitro* activity was shown using the number of area value of treatment with vestaine A<sub>1</sub> (5.0 μM) as a base of 100. Data is representative of three independent experiments. Each value is represented as the mean ± range (n = 2 wells per group).



### 3-4-2 *in vivo* 試験

Vestaine A<sub>1</sub>、F-36316 A、および B が *in vivo* において血管透過抑制作用を発揮するかを調べるために、血管の漏出性を評価する *in vivo* モデルであるマウス耳透過抑制試験を実施した。その概要を図 III-23 に示す。その結果、各試験物質を腹腔内投与したマウスでは、VEGF 処理により亢進する Evans Blue の漏出が抑制された。

Vestaine A<sub>1</sub> は、1 mg/kg にて VEGF による透過作用を 90% 程度抑制し、0.1 mg/kg においても 50% 程度抑制した (図 III-24)。

F-36316 A、および B は、ともに 10 mg/kg において、VEGF により亢進する Evans Blue の漏出を 50% 程度抑制し、VS-G アッセイで認められた活性値の差は、*in vivo* においてはほとんど認められなかった (図 III-25)。

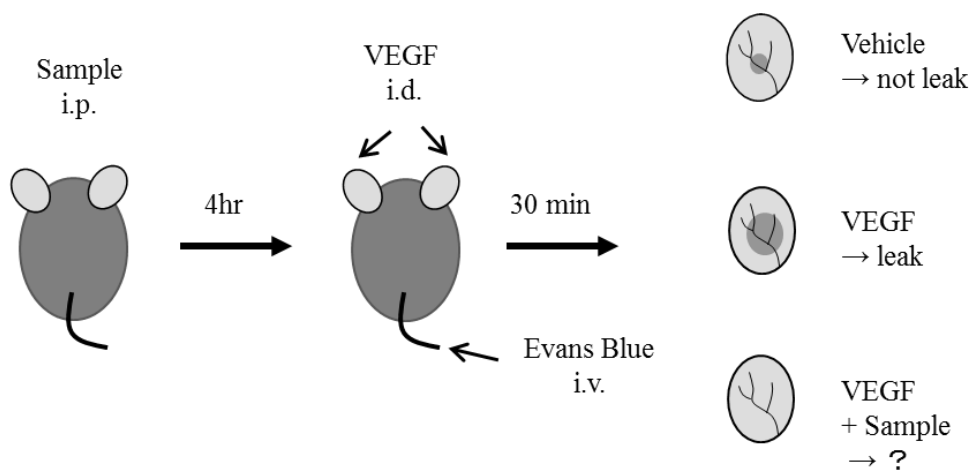
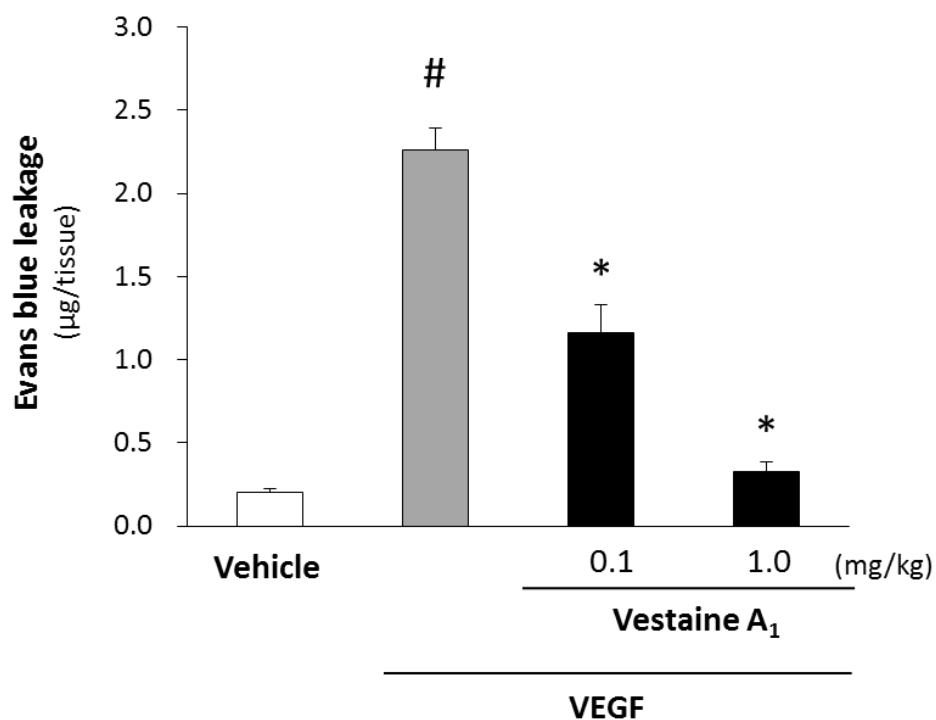


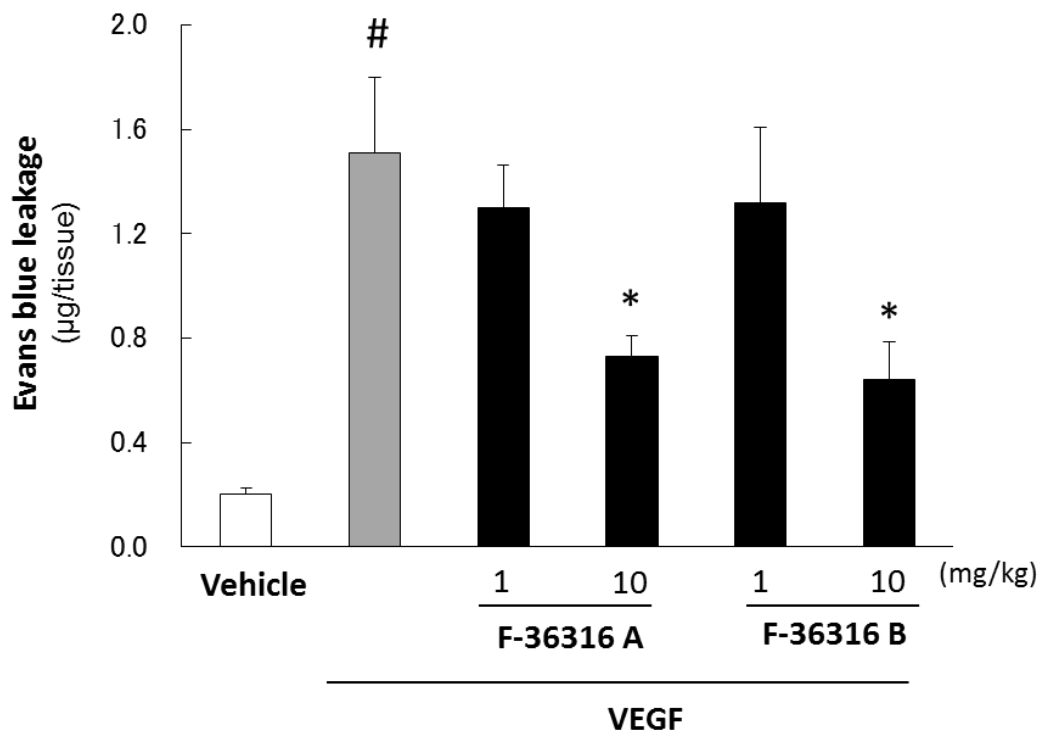
図 III-23 Vascular leakage assay.

Abbreviations: i.p., intraperitoneal; i.d., intradermal; i.v., intravenous.



☒ III-24 *In vivo* vascular leakage assays of vestaine A<sub>1</sub>.

The difference between vehicle and VEGF control was compared using a Student's t-test (#:  $P < 0.05$ ). Statistically significant differences were determined by a Dunnett's multiple comparison test vs. VEGF control (\*:  $P < 0.05$ ). Each value is represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$  per group).



☒ III-25 *In vivo* vascular leakage assays of F-36316 A and F-36316 B.

The difference between vehicle and VEGF control was compared using a Student's t-test (#:  $P < 0.05$ ). Statistically significant differences were determined by a Dunnett's multiple comparison test vs. VEGF control (\*:  $P < 0.05$ ). Each value is represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  per group).

## 第5節 考察

第4節までで述べてきた通り、機能的血管形成促進物質の探索スクリーニングにおいて、*Streptomyces* sp. SANK 63697 の培養液から、2つの活性物質 vestaine A<sub>1</sub>、および B<sub>1</sub> を、*Incrucipulum* sp. SANK 10414 の培養液から、2つの活性物質 F-36316 A、および B と、活性を有さない類縁体 C を発見した。これら2系統の物質群は、その物理化学的、および分光学的データよりいずれも新規物質であることが判明した。

Vestaine 類と F-36316 類には、同一分子内に親水性部分と疎水性部分を有する両親媒性物質であることや、ケト-エノール互変異性を有すること等の共通する構造的特徴が認められたが、これらによって誘導される HUVECs の形態は異なっていた。血管新生・血管安定化のメカニズムは、多くの因子が関与する複雑なものである。今回発見した2系統の物質群は、その解明に役立つことが期待される。

### Vestaine 類について

Vestaine 類は、*N*-アセチルシステインと脂肪鎖から成る両親媒性物質であり、かつ、同一分子内にトリメチルアンモニウムとカルボキシラートアニオンを有するベタイン物質でもあった。そして、ケト-エノール互変異性を介したジアステレオマーで構成され、塩基性条件下で不安定である等、非常にユニークな物質だった。そして、これらの性質によって、本物質の精製、構造解析は、共に工夫を要した。

精製においては、数々の検討を経て、ODS カラムに過塩素酸ナトリウムを添加した移動相を用いる方法を見出した。過塩素酸ナトリウムは、陰イオン界面活性剤を ODS カラムで分析する際によく用いられる試薬であるが、両性界面活性剤としての vestaine 類にも適応可能で、平衡関係にある2物質の分離も良好だった。一方で、過塩素酸ナトリウムは不揮発性のため、LC-MS 分析では使用できず、MS 分析時の移動相には酢酸アンモニウムを用いる等の使い分けが必要だった。

構造解析においては、観測された全ての NMR シグナルについて、ジアステレオマーごとに分類して解析を進めた。加えて、ケト-エノール互変異性に起因した重水素交換によるシグナル消失も認めら

れ、慎重に解析を進めた。Vestaine 類の構造は、最終的には、ジメチルスルホキシド溶液中で生成した分解物の構造によって明らかになったが、この分解反応が、本物質が塩基性条件下で不安定である理由だった。第4級アンモニウムは塩基性条件下でホフマン脱離する。本分解物は、トリメチルアンモニウムがホフマン脱離したことによって生成したと考えられ、ジメチルスルホキシド溶液中でホフマン脱離を生じさせたのは、vestaine 自身から脱離したトリメチルアミンによる塩基性と推察された。

Vestaine A<sub>1</sub> を用いた高次評価では、本物質は *in vitro* だけでなく、*in vivo* においても強く血管に作用することが明らかとなった。特に、*in vivo* 評価において、VEGF によって誘導される血管透過性を抑制したことは、本物質が過剰な VEGF によって形成される脆弱な血管に起因する疾患の治療薬になり得ることを示した。

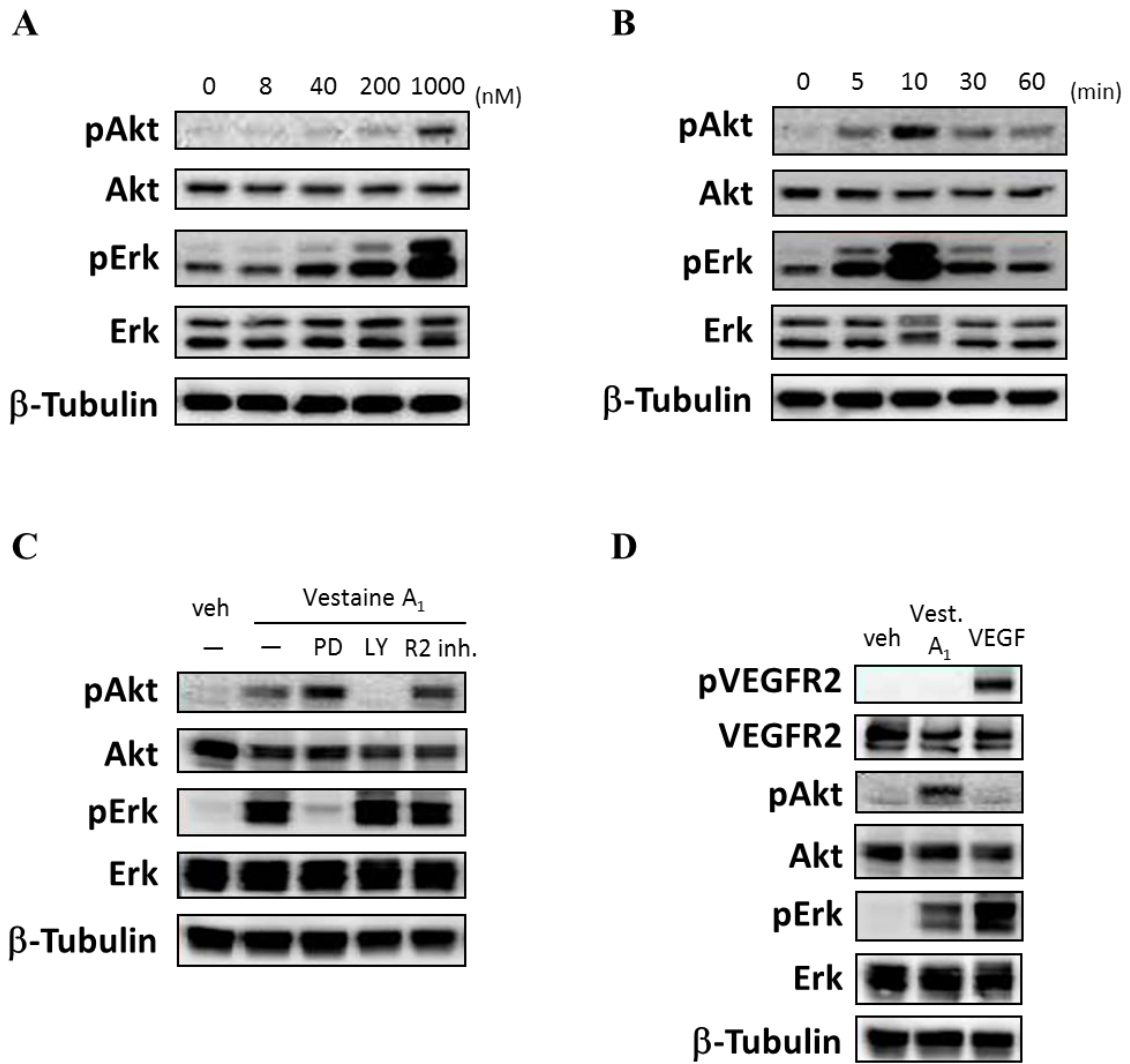
Vestaine 類の作用メカニズムに関しては、その後の研究から以下の2つが明らかとなっている。

まず1つ目は、本物質は VEGF 経路を介さずに血管内皮細胞に作用することである。VEGF、および Ang-1 は、共に受容体に結合後、extracellular signal-regulated kinase (ERK) と Akt のリン酸化を誘導することが知られている。また、増殖期にある血管内皮細胞では ERK の活性化が優位に、安定化している血管内皮細胞では Akt の活性化が優位となっているとの報告がある<sup>57</sup>。そこで本物質の ERK と Akt のリン酸化能を調べたところ、濃度依存的に ERK と Akt のリン酸化を誘導し (図 III-26A)、リン酸化のピークは処理 10 分後であることが明らかとなった (図 III-26B)。そして、MEK1/2 の阻害剤である PD98059、PI3-kinase の阻害剤である LY294002 で前処理した場合、vestaine A<sub>1</sub> による ERK と Akt のリン酸化は阻害され、vestaine A<sub>1</sub> が MEK1/2 を介して ERK を、PI3-kinase を介して Akt を活性化することが示された。一方、VEGFR2 kinase inhibitor で前処理した場合は、vestaine A<sub>1</sub> 処理による ERK と Akt のリン酸化は阻害されなかった (図 III-26C)。加えて、vestaine は VEGFR2 のリン酸化を誘導しないこと、VEGF と比べて Akt を強くリン酸化する一方、ERK のリン酸化は弱いとの結果も得られた (図 III-26D)。さらに、VS-G アッセイを用いて、VEGF との共処理による効果を調べた結果、強力な発がんプロモーターとして VEGF 経路など多くのシグナル伝達系を活性化することで知られる teleocidin B<sub>3</sub> との共処理は、VEGF の作用に影響を与えなかったが、vestaine A<sub>1</sub> との共処理は、VEGF の作用に相加的であった。(図 III-27)<sup>28</sup>。VS-G アッセイにおいて、VEGF の作用は 50 ng/ml において飽和してお

り、VEGF 経路を増強するような物質の場合、相加作用はみられないと考えられる。これらの結果より、vestaine A<sub>1</sub> が VEGF とは異なる経路にて血管内皮細胞に作用し得ることが示唆された。

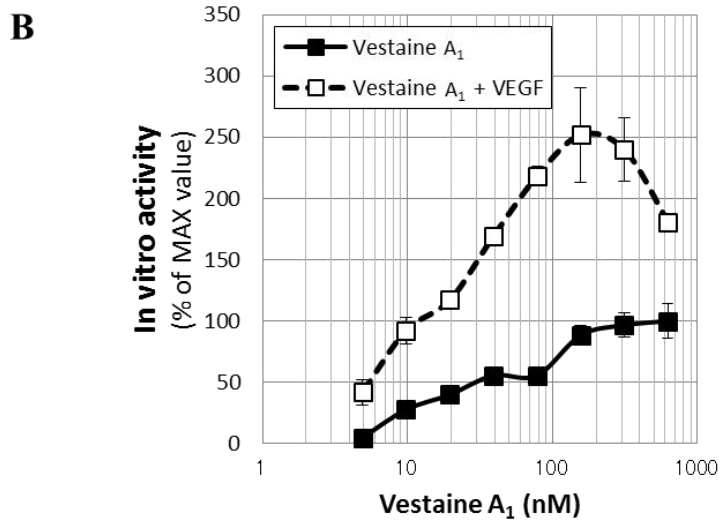
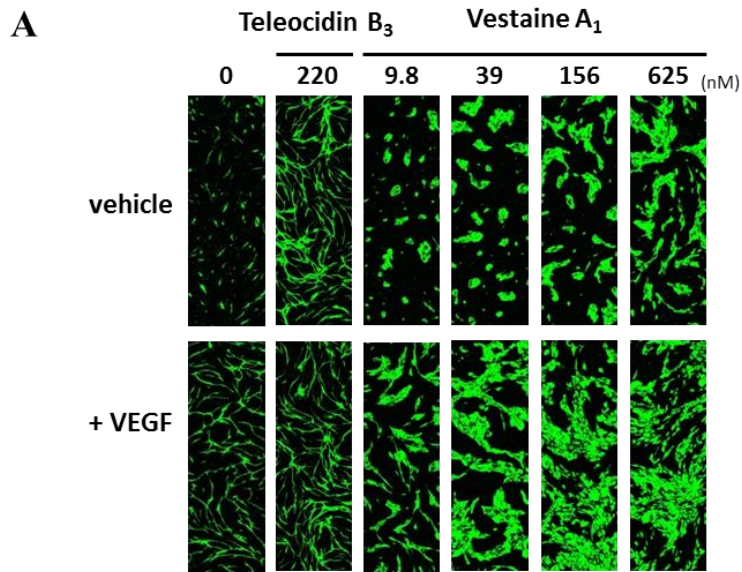
2つ目は、本物質のシグナル伝達に、sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P<sub>1</sub>) は関与していないことである。Vestaine A<sub>1</sub> は、スフィンゴ脂質の代謝物である sphingosine-1-phosphate (S1P) と同様に両親媒性物質である。S1P は、G タンパク質結合レセプターである S1P レセプターへの結合を介して、細胞増殖や細胞遊走などの血管新生促進作用と、透過性抑制作用をはじめとする血管安定化作用を発揮する<sup>58, 59</sup>。中でも、血管透過抑制作用に関しては、S1P レセプターの一つである S1P<sub>1</sub> 依存的事であることが報告されている<sup>60</sup>。そこで、S1P<sub>1</sub> 発現細胞を用いて vestaine A<sub>1</sub> の S1P<sub>1</sub> アゴニスト活性を評価したが、活性は検出されなかった (data not shown)。

Vestaine 類の作用機序の解明はまだ始まったばかりである。それらを解明することは、血管生物学の発展や、脆弱な血管新生に起因する疾患治療薬の開発につながるものと思われる。



☒ III-26 Vestaine A<sub>1</sub> induced both proliferation and survival signals in endothelial cells.

(A) HUVECs were treated with vestaine A<sub>1</sub> at various concentrations for 5 min and the level of the phosphorylated ERK of Akt were determined using Western blotting. (B) HUVECs were treated with 1  $\mu$ M of vestaine A<sub>1</sub> for various amounts of time. (C) After pre-treatment of inhibitors for 15 min, vestaine A<sub>1</sub> was treated at 1  $\mu$ M for 5 min. The treatment concentrations were below: PD98059 (PD, 5  $\mu$ M), LY294002 (LY, 5  $\mu$ M), and VEGFR2 inhibitor (R2 inh., 0.5  $\mu$ M). (D) HUVECs were treated with 1  $\mu$ M of vestaine A<sub>1</sub> or 50 ng/ml of VEGF for 5 min. Data is representative of three independent experiments.



☒ III-27 **Co-treatment with vestaine A<sub>1</sub> and VEGF.**

(A) Morphologies of GFP-HUVECs in VS-G assay treated at 220 nM of teleocidin B<sub>3</sub> or at various concentrations of vestaine A<sub>1</sub> alone, or with 50 ng/ml of VEGF. Magnification of the representative morphology was achieved by a 10-fold lens. (B) HUVECs were treated at various concentrations of vestaine A<sub>1</sub> alone, or with 50 ng/ml of VEGF. The value of treatment with vestaine A<sub>1</sub> is the black line and that of the co-treatment with vestaine A<sub>1</sub> and VEGF is the dotted line. *In vitro* activity was shown using the number of maximum area value of treatment with vestaine A<sub>1</sub> as a base of 100. Data is representative of three independent experiments. Each value is represented as the mean ± range (n = 2 wells per group).



## F-36316 類について

F-36316 類は、その物理化学的、および分光学的データより新規な 3-アシル化テトロン酸構造を有する物質であることが判明した。取得した 3 種の F-36316 類の構造的違いは、アルキル鎖中の水酸基数だった。

原核生物であるバクテリアも真核生物であるカビも、このような 3-アシル化テトロン酸構造を持つ物質を産生する<sup>61~64</sup>。そして、これらの化合物には、抗菌活性、酵素阻害活性、金属キレーターなど、様々な活性の報告がある<sup>61~67</sup>。本研究においては、3-アシル化テトロン酸構造を有する F-36316 類に、新たな活性として、血管透過抑制活性があることが示された。

第 2 節にて述べたとおり、同スクリーニング系では、新規物質 *vestaine* 類を発見している。上述したように、F-36316 類と *vestaine* 類には、共通する構造的特徴がある一方で、これらが誘導する HUVECs の形態は異なっていた。この形態の違いは、それぞれ独立した *in vitro* 評価において再現良く認められ、それぞれの作用メカニズムが異なることが示唆された。そして、F-36316 A のメカニズムに関しては、構造的特徴から以下に示す 2 つの可能性を見出した。

1 つ目は、F-36316 A がタンパク質チロシンフォスファターゼ (Protein tyrosine phosphatase; PTP) 阻害剤として働いている可能性である。F-36316 A は既知天然物の RK-682 に類似している。RK-682 は HIV-1 プロテアーゼ阻害剤として発見されたが<sup>61, 62</sup>、その後に PTP 阻害活性を有することが報告された<sup>66</sup>。血管形成に作用する PTPs としては、内皮細胞に特異的に発現している受容体型 PTP である vascular endothelial-PTPs (VE-PTP) がある。VE-PTP の阻害は、Tie2 レセプターを活性化し、血管安定化へと導く<sup>68, 69</sup>。RK-682 は、受容体型 PTP である cluster of differentiation 45 (CD45) を IC<sub>50</sub> 値 54 μM で阻害し、細胞質型 PTP である vaccinia virus VH1-related phosphatase を IC<sub>50</sub> 値 2 μM で阻害する<sup>66</sup>。RK-682 が VE-PTP を阻害するとの報告はないが、構造的特徴の類似から F-36316 A が VE-PTP を阻害する可能性はある。

2 つ目は、F-36316 A が S1P<sub>1</sub> アゴニストとして働いている可能性である。前述したように S1P の血管安定化作用は、S1P<sub>1</sub> レセプターへの結合を介して誘導される。一方、S1P の前駆体であるスフィンゴ

シンでは誘導されず、この反応の誘導にはリン酸基が不可欠であることが知られている。しかしながら、F-36316 A はリン酸基を有していない。

RK-682 と VH1-related phosphatase との結合モデルにおいて、アシル化されたテトロン酸アニオンが PTP の脱リン酸化の遷移状態を模倣することが報告されている<sup>70~72</sup>。すなわち、RK-682 のテトロン酸がリン酸基を模倣する。もし、F-36316 A のテトロン酸部分が、S1P のリン酸基のように振る舞うことができるなら、F-36316 A が S1P の代わりとなり、S1P<sub>1</sub> アゴニストとして作用することが可能と思われる。実際、F-36316 類のその後の研究において、F-36316 A は、弱いながら S1P<sub>1</sub> アゴニスト活性を有していることが明らかとなっている (data not shown)。

F-36316 類が血管安定化に対して、どのように作用しているのかを解明することも、vestaine 類と同様に複雑な血管新生や、血管安定化のメカニズムをより良く理解するのに役立つであろう。

## 実験の部

### 細胞培養

HUVECs は、HuMedia-EG2 培地 (クラボウ社製) を用いて collagen-I coated plate にて培養した。NHDF は、HuMedia-EG2 培地を用いて normal plate にて培養した。両細胞は、温度 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% にて培養した。

### GFP-HUVECs

HUVECs を VasuLife EnGS Comp Kit (クラボウ社製) 10 ml を含む collagen-I coated 10 cm dish に、約  $5 \times 10^5$  cells ずつ播種し、一晩培養した。翌日、培地を 10 ml の ice-cold HuMedia-EG2 に置換し、4 µg/ml の polybrene 溶液と 250 µl のウイルス液 (Cignal-Lenti Positive Control (EGFP)、キアゲン社製) を添加して感染させた。翌日、培地を除去し、10 ml の VasuLife EnGS Comp Kit (クラボウ社製) にて培養した。2 回目の継代からは HuMedia-EG2 にて培養し、計 4 回の継代培養を行った後、CELLBANKER-1 (タカラ社製) を用いて、約  $1 \times 10^6$  cells/vial、温度 -80 °C で保管した。作製した本細胞を GFP-HUVECs と命名した。

### VS-G アッセイ

NHDF をフィーダー細胞として 96 穴ウェルプレート (black clear bottom plate、Corning 社製) にて、HuMedia-EG2 培地で 1~2 日培養した後、1 ウェルあたり  $7.5 \times 10^3$  個の GFP-HUVECs を播種した。NHDF の層に GFP-HUVECs を接着させた後、HuMedia-EG2 培地を除去した。そこに 0.5% ウシ胎児血清 (HyClone 社製) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む Medium-199 培地 (M199、ThermoFisher Scientific 社製) に溶解したテストサンプルを添加し、37 °C で 3 日間培養した。そして、GFP-HUVECs の形態を In Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare 社製)、もしくは ImageXpress ULTRA (Molecular Devices 社製) を用いて観察した。GFP-HUVECs の面積値は、In Cell Investigator 1.6 (GE Healthcare 社製)、もしくは MetaXpress (Molecular Devices 社製) を用いて算出した。活性値は、VEGF (Peprotech 社製) 50

ng/ml の面積値を positive control (100% 活性)、0.25% DMSO の面積値を negative control (0% 活性) とし、以下の計算式で算出した。

*In vitro* Activity (%)

$$= 100 \times [(\text{テストサンプル}) - (\text{negative control})] / [(\text{positive control}) - (\text{negative control})]$$

Vestaine 類の EC<sub>50</sub> 値は、vestaine A<sub>1</sub> 処理での最大面積値を 100% 活性として算出した。F-36316 類の EC<sub>50</sub> 値は、5 μM vestaine A<sub>1</sub> 処理での面積値を 100% 活性として算出した。

#### SANK 63697 株の分類

菌の形態、培養性状、炭素源の資化性、および菌の同定については、Waksman<sup>49</sup>、および International Streptomyces Project (ISP)<sup>50</sup> で示された方法で実施した。16S リボゾーム DNA は PCR にて増幅し、増幅された断片をそのまま分析することでその配列を得た。

#### 培地 3-1

可溶性でんぷん 4.0%、グルコース 1.0%、大豆粉 1.0%、イーストエキス 0.45%、コーンステイプ  
リカー 0.25%、リン酸一カリウム 0.05%、リン酸マグネシウム・8 水和物 0.005%、硫酸亜鉛・7 水和  
物 0.001%、硫酸ニッケル・6 水和物 0.0001%、塩化コバルト・6 水和物 0.0001%、消泡剤 CB-442  
0.005%、滅菌前 pH 7.0

#### 培地 3-2

可溶性でんぷん 8.0%、グルコース 1.0%、大豆粉 1.0%、イーストエキス 0.45%、コーンステイプ  
リカー 0.25%、消泡剤 CB-442 0.005%、滅菌前 pH 7.0

## General

核磁気共鳴スペクトルは、DCH、および TCI クライオプローブをそれぞれ装着した Bruker 社製 AVC500 スペクトロメーターを用いて測定した。内部標準として TMS を用い、化学シフト値は ppm で示した。

高分解能 MS データは、Agilent Technologies 社製 1200 シリーズ HPLC システムに連結した Thermo Fisher Scientific 社製 LTQ Orbitrap XL スペクトロメーターを用いて測定した。

IR スペクトルは、日本分光社製 FT/IR-6100 typeA スペクトロメーターを用いて、ATR 法にて測定した。

UV スペクトルは、島津製作所社製 UV-265FW スペクトロメーターを用いて測定した。

比旋光度は、日本分光社製 DIP-370 型スペクトロメーターを用いて測定した。

### *N*-acetyl-*S*-[(1*E*)-14-methyl-3-oxopentadec-1-en-1-yl]-L-cysteine (化合物 3)

Vestaine A<sub>1</sub> (1.1 mg) を重ジメチルスルホキシドに溶解し、ホフマン脱離反応の進行を NMR にて定期的に観測した。反応は、14 日程度で完了し、ほとんどの A<sub>1</sub> 物質は化合物 3 へと変換された。NMR 分析の後、本溶液を凍結乾燥し、LC-高分解能 MS 分析を行った。

HR-MS (ESI): *m/z*: calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>4</sub>S, 400.2516; found, 400.2508 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS [internal standard]): δ 0.84 (6H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.10–1.15 (2H, m), 1.19–1.27 (14H, overlapped), 1.43–1.50 (2H, m), 1.47–1.54 (1H, m), 1.83 (3H, s), 2.47 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.13 (1H, dd, *J* = 7.1, 13.2 Hz), 3.31 (1H, dd, *J* = 4.7, 13.2 Hz), 4.23 (1H, dd, *J* = 6.7, 11.7 Hz), 6.17 (1H, d, *J* = 15.5 Hz), 7.75 (1H, d, *J* = 15.5 Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS [internal standard]): δ 22.4 (two carbons), 22.5, 23.9, 26.7, 27.3, 28.6, 28.7, 28.82, 28.88, 28.95, 29.2, 34.3, 38.4, 39.2\*, 52.5, 122.7, 147.0, 168.9, 171.1, 196.1.

\*The signal was detected by DEPT spectra owing to the overlap with the solvent signals.

#### N-acetyl-S-[(1E)-14-methyl-3-oxohexadec-1-en-1-yl]-L-cysteine (化合物 4)

Vestaine B<sub>1</sub> (1.2 mg) を重ジメチルスルホキシドに溶解し、ホフマン脱離反応の進行を NMR にて定期的に観測した。その後、A<sub>1</sub> 物質と同様に処理し、構造解析を行った。

HR-MS (ESI):  $m/z$ : calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>4</sub>S, 414.2672; found, 414.2670 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS [internal standard]): δ 0.82 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz), 0.83 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz), 1.03–1.10 (1H, m), 1.17–1.32 (18H, overlapped), 1.44–1.53 (2H, m), 1.84 (3H, s), 2.48 (2H, overlapped), 3.12 (1H, dd,  $J = 8.2, 13.5$  Hz), 3.31 (1H, overlapped), 4.38–4.44 (1H, m), 6.19 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz), 7.76 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS [internal standard]): δ 11.1, 19.0, 22.3, 23.8, 26.4, 28.6, 28.7, 28.8 (two carbons), 28.89, 28.94, 29.3, 33.3, 33.6, 35.9, 39.2\*, 51.6, 123.1, 146.0, 169.2, 171.3, 196.2.

\*The signal was detected by DEPT spectra owing to the overlap with the solvent signals.

#### DLA 化システイン

Vestaine A<sub>1</sub> (0.2 mg) を 5 N HCl (500 μl)、105 °C、1 時間で加水分解した。得られた加水分解物を濃縮乾固した後、水 (100 μl) と 1 M 重炭酸ナトリウム (50 μl) を加え、37 °C で 1 時間加温した。その溶液 (30 μl) に 1% D-、もしくは L-FDLA/アセトン溶液 (40 μl) を添加し、37 °C で 1.5 時間加温した。その後、反応を 1 N HCl (10 μl) で終了させた。この反応物を 50% メタノール水で希釈し、LC-高分解能 MS 分析を行った。

Vestaine B<sub>1</sub> (0.2 mg) についても上述のように DLA 誘導体を作製し、分析した。

ほとんどの DLS 化システインは DLA 化シスチンとして観測された。標品としては、LL-シスチン、および meso-シスチンを D-、もしくは L-FDLA にて誘導体化したものを作製した。meso-シスチンは、Kawasaki らの方法で作製した<sup>73</sup>。

#### SANK 10404 株の分類

ITS-5.8S リボゾーム DNA 配列は、細谷らの方法<sup>74</sup> にて決定した。得られた配列は、DDBJ/GenBank/EMBL に登録され、LC177543 を付与された。

### 培地 3-3

グルコース 3.0%、グリセロール 3.0%、可溶性でんぷん 2.0%、大豆粉 1.0%、イーストエキス 0.25%、ゼラチン 0.25%、硝酸アンモニウム 0.25%、寒天 0.3%、消泡剤 CB-442 0.005%、滅菌前 pH 無調整

### 培地 3-4

マルトース 2.0%、グルコース 1.0%、セルロースパウダー 0.5%、ポリペプトン(日本製薬社製) 0.2%、イーストエキス 0.08%、硫酸マグネシウム・7水和物 0.1%、リン酸一カリウム 0.05%、塩化カルシウム 0.0055%、塩化鉄(III)・6水和物 0.001%、硫酸亜鉛・7水和物 0.0002%、消泡剤 CB-442 0.005%、滅菌前 pH 無調整

### F-36316 A (just after dissolved in DMSO-*d*<sub>6</sub>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS [internal standard]): δ 0.85 (3H, t, 7.0 Hz), 1.20-1.30 (20 H, overlapped), 1.42 (2H, m), 2.58 (2H, m), 4.20 (1H, br.), 4.38 (1H, br.). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS [internal standard]): δ 13.8, 22.0, 24.5, 28.6, 28.9, 29.0-29.1 (6 carbons), 31.2, 39.37 and 39.40 (tautomers)\*, 70.37 and 70.41 (tautomers), 80.5 and 80.6 (tautomers), 96.0 and 96.1 (tautomers), 171.9 and 172.0 (tautomers), 174.5 and 174.6 (tautomers), 192.2 and 192.3 (tautomers), 193.6 and 193.8 (tautomers).

\*The signals were detected by DEPT spectra owing to the overlap with the solvent signals.

### マウス耳透過抑制試験

試験化合物は 100 % DMSO を用いて最終濃度の 10 倍濃度になるように溶解した後、生理食塩水を用いて最終濃度に調製した (最終組成 : 10% DMSO 含有生食)。試験化合物の腹腔内投与 4 時間後に血管透過性試験を実施した。1.5 % Evans Blue 色素溶液 (0.9% NaCl に溶解) 100 μl を尾静脈より投与し、その後、直ちにイソフルラン麻酔をかけ、マウスの両耳に 4 μg/ml VEGF 溶液 (PBS に溶解) 15 μl (最終濃度 : VEGF 60 ng/ear) をそれぞれ皮内投与した。30 分後、6 mm バイオプシーパンチにて漏れを誘導した領域の耳断片を回収した。回収した耳断片を 60 μl DMSO に浸して室温で 3~4 日間静置し、抽

出された Evans Blue を SpectraMax M5 (Molecular Devices 社製) を用いて 650 nm の吸光度で測定し、  
定量した。



## 第4章 総括

本研究では、虚血性疾患の治療法として研究されている治療的血管新生に焦点を当て、その研究で課題となっている機能的な血管の形成を目的に、そのような活性を有する物質を2つのアプローチから探索した。その結果、微生物培養液サンプルから、低濃度で活性を示す、3系統のいずれもユニークな物質を発見した。

第2章では、低酸素条件下の血管新生の過程を模倣するアプローチとして、その過程に重要な役割を果たすことが知られている転写因子 HIF に着目した探索スクリーニングと、そこから見出した A-503451 類の生産菌、発酵生産、単離精製、構造解析、および生物活性について記述した。

第3章では、血管新生と、それに続く血管安定化の両方の過程を誘導するアプローチとして、HUVECs と NHDF の共培養系によるフェノタイプアッセイを用いた探索スクリーニングと、そこから見出した vestaine 類、および F-36316 類の生産菌、発酵生産、単離精製、構造解析、および生物活性についてそれぞれ記述した。

### 第2章のまとめ

pHRE4-Luc レポーター遺伝子アッセイを構築して、常酸素状態で HIF を活性化する物質をスクリーニングした結果、放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 60101 株の培養液中に強い活性を見出した。そして、各種カラムクロマトグラフィーを行い、その培養液から2つの活性物質 A-503451 A および C と、活性を示さない類縁体 A-503451 B および D を単離した。これらについて、各種スペクトルデータを取得して、構造解析した結果、A-503451 A、B、および D は新規物質であること、A-503451 C は既知物質の virantmycin と一致することが判明した。

A-503451 A と virantmycin は、いずれも分子内に塩素原子を有し、活性を示さない A-503451 B および D は、塩素原子の代わりに水酸基を有していた。A-503451 A はインドリン骨格を、virantmycin はテトラヒドロキノリン骨格を有する物質であったが、塩素原子の結合部位は、いずれも窒素原子のβ位だった。

A-503451 A の HIF 活性化能を pGVB2-EPO-Luc レポーター遺伝子アッセイで評価したところ、EC<sub>50</sub> 値 23 nM でルシフェラーゼ活性を誘導した。そして、さらなる高次評価により、常酸素状態で HIF-1 $\alpha$  タンパクを安定化すること、VEGF、および EPO をタンパク質レベルでも誘導することが明らかとなった。

そして、HIF 活性化能を示す多くの天然由来化合物が鉄をキレートすることによって活性発現するのに対して、A-503451 A は鉄キレート活性を持たなかった。しかし、細胞内の遊離鉄濃度を低下させ、ユニークな HIF 活性化メカニズムを有していることが示唆された。

A-503451 類の HIF 活性化メカニズムに関しては、取得した類縁体と、合成的手法によって作製した誘導體から、窒素原子の  $\beta$  位に良い脱離基を有することが活性発現に必要であると示唆された。

HIF 活性化薬といえば、現在、HIF の  $\alpha$ -サブユニットの分解に関わる PHD をターゲットにしたいいくつかの薬剤が腎性貧血治療薬として臨床開発中である<sup>75</sup>。これらの薬剤により HIF による EPO の産生メカニズムの知見は非常に深まってきているが、HIF が関与するすべての制御機構が明らかになっているわけではない。本研究で得られた A-503451 類の知見が、さらなる HIF の活性化メカニズムの解明に寄与し、本探索の目標である虚血性疾患の治療法の開発に役立てられることを願う。

### 第3章のまとめ

HUVECs と NHDF の共培養系からなる VS-G アッセイを構築して、VEGF が誘導する管状形態とは異なり、Ang-1 が誘導するような島状形態を誘導する物質をスクリーニングした。その結果、放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 63697 と真菌 *Incrucipulum* sp. SANK 10414 の培養液中に目的とする活性を見出した。そして、単離精製・構造解析を行い、*Streptomyces* sp. SANK 63697 株の培養液からは島状形態を誘導する新規物質 vestaine 類を、*Incrucipulum* sp. SANK 10414 の培養液からは、島状と管状の両方の形態を誘導する新規物質 F-36316 類を発見した。

#### 1. Vestaine 類について

Vestaine 類は、構造解析の結果、*N*-アセチルシステインと脂肪鎖から構成される両親媒性物質であり、

かつ、同一分子内にトリメチルアンモニウムとカルボキシラートアニオンを有する新規なベタイン物質であることが判明した。加えて、ケト-エノール互変異性を介したジアステレオマーで構成される等、非常にユニークな物質だった。

Vestaine 類は、VS-G アッセイにおいて HUVECs の形態を Ang-1 様の島状に誘導し、その EC<sub>50</sub> 値は 60~403 nM だった (vestaine A<sub>1</sub> が誘導する HUVECs の最大面積値を 100% 活性として算出)。本物質は *in vitro* だけでなく、*in vivo* においても強い血管透過抑制活性を示し、マウス耳透過抑制試験において、VEGF 処理で亢進される血液の漏出を抑制した。このことは、本物質が、過剰な VEGF によって形成される異常な血管に起因する疾患の治療薬となり得る可能性を示した。

本物質の発見以降、その血管形成メカニズムについての研究が行われ、VEGF 経路を介さずに血管内皮細胞に作用すること、血管安定化作用を示すことが知られている S1P<sub>1</sub> は関与していないことが明らかとなっている。

## 2. F-36316 類について

F-36316 類は、3-アシル化テトロン酸構造を有する新規物質だった。VS-G アッセイにおける F-36316 類の EC<sub>50</sub> 値は F-36316 A が 1.8 μM、F-36316 B が 11.7 μM だった (5 μM vestaine A<sub>1</sub> が誘導する HUVECs の面積値を 100% 活性として算出)。そして、本物質群もマウス耳透過抑制試験で血管透過抑制活性を示し、血管安定化に作用することが明らかとなった。

F-36316 類は、前述の vestaine 類と両親媒性であることや、互変異性を有する点が共通していた。しかし、VS-G アッセイで誘導した HUVECs の形態は、管状と島状、両方の特徴を併せ持ち、島状形態を誘導する vestaine 類とは異なっていた。このことから、F-36316 類の血管形成メカニズムは、vestaine 類とは異なることが示唆された。

F-36316 類の作用メカニズムに関しては、その構造的特徴から以下に挙げる 2 つの可能性が考えられた。1 つは、その構造が PTP 阻害剤として報告されている RK-682 に類似していることから、血管安定化に関与する VE-PTP を阻害する可能性であり、もう 1 つは、RK-682 と VH1-related phosphatase との結合モデルにおいて、テトロン酸部分がリン酸基を模倣することから、S1P<sub>1</sub> に作用する可能性で

ある。そして、実際、その後の研究において F-36316 A は、弱いながら S1P<sub>1</sub> アゴニスト活性を有していることが明らかとなっている。

本スクリーニングでは、機能的血管の形成を促進する物質として、血管安定化の過程を促進する 2 系統の物質群を取得した。血管安定化に関しては、近年、その破綻が、糖尿病性網膜症や、脳梗塞急性期の脳出血、また、固形がんにおける抗がん剤の効果減弱など様々な疾患の原因となることが示唆されてきている。上述の患者では、周細胞に被覆されていない脆弱な血管が観察されており、これが血管内容物の漏出や低酸素状態を引き起こす一因であると考えられている<sup>76~78</sup>。本研究で見出した vestaine 類と、F-36316 類は、治療的血管新生のみならず、上述のような異常な血管新生に起因する疾患の創薬シーズにも成り得ると思われる。

今回見出した vestaine 類と、F-36316 類の知見が複雑に制御された血管形成メカニズムを解明する一助となり、血管生物学の発展や、未だ存在しない血管内皮細胞の透過性を抑制するという新薬の開発に貢献することを切に願う。

## 謝辞

本論文提出の機会をお与えいただき、ご多忙の中、ご指導を賜りました東京農工大学大学院 応用生命化学専攻 蓮見恵司 教授に深く感謝いたします。本論文の作成にあたりご助言を賜りました宇都宮大学 二瓶賢一 准教授、茨城大学 長谷川守文 教授、東京農工大学 北野克和 准教授、東京農工大学 鈴木絵里子 助教に心より感謝いたします。

本研究の薬理面を支えてくださり、多くの有益なご助言を賜りました第一三共株式会社 小林英毅博士、石本容子博士、安東治博士に心より感謝いたします。

本研究において、生理活性物質生産菌の分類にご協力いただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 木塚正明氏、田中一新博士、並びに、新規生理活性物質群の発見・精製にご協力いただきました中島睦男氏、鈴木康裕氏、藤原美恵氏、黒澤恵実氏、岩舘裕子氏に心より感謝いたします。また、これら物質群の生物活性の評価にご協力いただきました第一三共株式会社 大山高央博士、北村道子氏、小野澤佳子博士、化学面を支えていただきました第一三共 RD ノバーレ株式会社 千葉淳博士、長谷川徹博士、田村明弘氏に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、日頃よりご指導を賜りました第一三共 RD ノバーレ株式会社 大薄悟部長、田中勝弘博士、高津敏夫博士、古浜孝文博士、村松康範博士、並びに同社 天然物グループの皆様  
に心より感謝いたします。

最後に、研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

2018年 9月

高畑（廣田）由紀

## 参考文献

- 1 南山堂 医学大辞典 第 18 版
- 2 WHO 概況報告書 2017 年 1 月
- 3 Losordo, DW, Dimmeler S. Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Disease. *Circulation* **109**, 2487-2491 (2004).
- 4 新谷 理、室原 豊明 血管新生因子 VEGF *J Jpn Coll Angiol*, **46**, 289-295 (2006).
- 5 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985 (1983).
- 6 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309 (1989).
- 7 Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, **93**, 662-670 (1994).
- 8 Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, **189**, 2183-2189 (1994).
- 9 Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF<sub>165</sub> in patient with ischaemic limb. *Lancet*, **348**, 370-374 (1996).
- 10 Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER; VIVA Investigators. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia or vascular angiogenesis. *Circulation* **107**, 1359-1365 (2003).
- 11 Kastrup J, Jørgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, Bøtker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B,

- Thuesen L, Blomberg P, Gyöngyösi M, Sylvén C; Euroinject One Group. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris. A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* **45**, 982-988 (2005).
- 12 Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2702-2706 (1973).
- 13 Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**, 123-127 (1974).
- 14 Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* **90**, 966-973 (2002).
- 15 Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2; double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* **105**, 788-793 (2002).
- 16 Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, Van Belle E; TAMARIS Committees and Investigators. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischemia. *Lancet* **377**, 1929-1937 (2011).
- 17 Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-5454 (1992).
- 18 Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* **117** (23), e207-e217 (2011).
- 19 Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible

- factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* **82**, 3610-3615 (1993).
- 20 Hirota-Takahata Y, Kobayashi H, Kizuka M, Ohyama T, Kitamura-Miyazaki M, Suzuki Y, Fujiwara M, Nakajima M, Ando O. Studies on novel HIF activators, A-503451s. I. Producing organism, fermentation, isolation and structural elucidation. *J Antibiot* **69**, 747-753 (2016).
- 21 Kobayashi H, Ohyama T, Kitamura-Miyazaki M, Hirota-Takahata Y, Ando O. Studies on novel HIF activators, A-503451s. II: Biological activities of A-503451 A. *J Antibiot* **69**, 754-758 (2016).
- 22 Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169 (1996).
- 23 Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180 (1996).
- 24 Eklund L, Saharinen P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Exp Cell Res* **319**, 1271-1280 (2013).
- 25 Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286**, 2511-2514 (1999).
- 26 Hwang JA, Lee EH, Kim HW, Park JB, Jeon BH, Cho CH. COMP-Ang1 potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil by improving tissue perfusion in murine Lewis lung carcinoma. *Mol Cancer Res* **7**, 1920-1927 (2009).
- 27 Hirota-Takahata Y, Kurosawa E, Ishimoto Y, Iwadate Y, Kizuka M, Chiba J, Hasegawa T, Tanaka M, Kobayashi H. Vestaines, novel vasoactive compounds, isolated from *Streptomyces* sp. SANK 63697. *J Antibiot* **70**, 179-186 (2017).
- 28 Ishimoto Y, Hirota-Takahata Y, Kurosawa E, Chiba J, Iwadate Y, Onozawa Y, Hasegawa T, Tamura A, Tanaka M, Kobayashi H. A Novel Natural Product-Derived Compound, Vestaine A<sub>1</sub>, Exerts both Pro-



- Angiogenic and Anti-Permeability Activity via a Different Pathway from VEGF. *Cell Physiol Biochem* **39**, 1905-1918 (2016).
- 29 Hirota-Takahata Y, Ishimoto Y, Kurosawa E, Iwadate Y, Onozawa Y, Tanaka I, Tanaka M, Kobayashi H. F-36316 A and B, novel vasoactive compounds, isolated from *Incrucipulum* sp. SANK 10414. *J Antibiot* **70**, 981-986 (2017).
- 30 Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716-721 (2012).
- 31 Meissner A, Sørensen OW. Measurement of  $J$  (H,H) and long-range  $J$  (X,H) coupling constants in small molecules. Broadband XLOC and J-HMBC. *Magn Reson Chem* **39**, 49-52 (2001).
- 32 Matsumori N, Kaneno D, Murata M, Nakamura H, Tachibana K. Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin-coupling constants. A method of configuration analysis for natural products. *J Org Chem* **64**, 866-876 (1999).
- 33 Kim WG, Kim JP, Koshino H, Shin-Ya K, Seto H, Yoo ID. Benzastatins E, F and G: New indoline alkaloids with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporeus*. *Tetrahedron* **53**, 4309-4316 (1997).
- 34 Nakagawa A, Iwai Y, Hashimoto H, Miyazaki N, Ôiwa R, Takahashi Y, Hirano A, Shibukawa N, Kojima Y, Ômura S. Virantmycin, a new antiviral antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiot* **34**, 1408-1415 (1981).
- 35 Morimoto Y, Shirahama H. Synthetic studies on virantmycin. 2. Total synthesis of unnatural (+)-virantmycin and determination of its absolute stereochemistry. *Tetrahedron* **52**, 10631-10652 (1996).
- 36 Pearce CM, Sanders JK. Stereochemistry of (-)-virantmycin. *J Chem Soc PERKIN TRANS* **1**, 409-411 (1990).
- 37 Kim WG, Kim JP, Kim CJ, Lee KH, Yoo ID. Benzastatins A, B, C and D: New free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643 I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot* **49**, 20-25 (1996).
- 38 Kim WG, Kim JP, Yoo ID. Benzastatins A, B, C and D: New free radical scavengers from *Streptomyces*

- nitrosporeus* 30643 II. Structure determination. *J Antibiot* **49**, 26-30 (1996).
- 39 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472 (2001).
- 40 Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik IZ. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am J Physiol* **268**, C1354-1361 (1995).
- 41 Glickstein H, El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood* **106**, 3242-3250 (2005).
- 42 Nagle DG, Zhou YD. Natural product-derived small molecule activators of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Curr Pharm Des* **12**, 2673-2688 (2006).
- 43 Zhao S & Wu J. Hypoxia inducible factor stabilization as a novel strategy to treat anemia. *Curr Med Chem* **20**, 2697-2711 (2013).
- 44 Tsukiyama F, Nakai Y, Yoshida M, Tokuhara T, Hirota K, Sakai A, Hayashi H, Katsumata T. Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 234-239 (2006).
- 45 Lee MJ, Kim JW, Yang EG. Hinokitiol activates the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway through inhibition of HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 370-375 (2010).
- 46 Hattori H, Okuda K, Murase T, Shigetsura Y, Narise K, Semenza GL, Nagasawa H. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. *Bioorg Med Chem* **19**, 5392-5401 (2011).
- 47 Chung LC, Tsui KH, Feng TH, Lee SL, Chang PL, Juang HH. L-Mimosine blocks cell proliferation via upregulation of B-cell translocation gene 2 and N-myc downstream regulated gene 1 in prostate carcinoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C676-685 (2012).
- 48 Rafahi H, Ververis K, Balcerczyk A, Ziemann M, Ooi J, Hu S, Kwa FA, Loveridge SJ, Georgiadis GT, El-Osta A, Karagiannis TC. Investigation of the biological properties of Cinnulin PF in the context of diabetes:

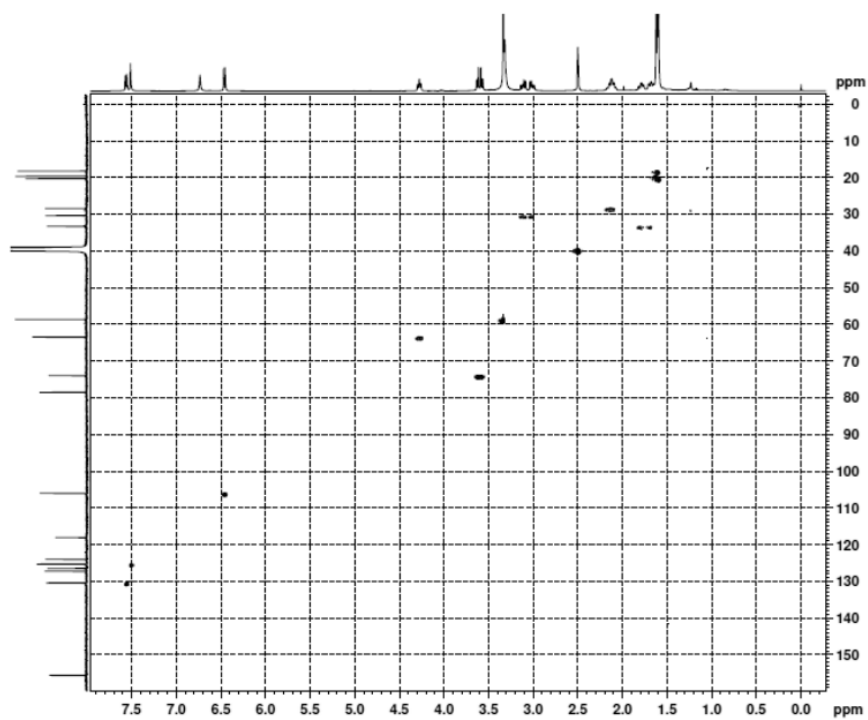
- mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* **2**(2012).
- 49 Waksman SA. Classification, Identification and Description of Genera and Species. The Actinomycetes. Vol. 2, ed. By Waksman SA, The Williams & Wilkins Company press, USA (1961).
- 50 Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313-340 (1966).
- 51 Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen Appl Microbiol* **29**, 319-322 (1983).
- 52 Fujii K, Shimoya T, Ikai Y, Oka H, Harada K. Further application of advanced Marfey's method for determination of absolute configuration of primary amino compound. *Tetrahedron Lett* **39**, 2579-2582 (1998).
- 53 Bhushan R, Brückner H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: A review. *Amino Acids* **27**, 231-247 (2004).
- 54 Jacobson PG, Sambandan TG, Morgan B. Determination of the chirality of cysteines in somatostatin analogs. *J Chromatogr A* **816**, 59-64 (1998).
- 55 Fujii K, Yahashi Y, Nakano T, Imanishi S, Baldia FS, Harada K. Simultaneous detection and determination of the absolute configuration of thiazole-containing amino acids in a peptide. *Tetrahedron* **58**, 6873-6879 (2002).
- 56 Yamaguchi T, Saito K, Tsujimoto T, Yuki H. Nmr spectroscopic studies on the tautomerism in tenuazonic acid analogs. *J Heterocyclic Chem* **13**, 533-537 (1976).
- 57 Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* **10**, 513-526 (2008).
- 58 An S, Zheng Y, Bleu T. Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* **275**, 288-296 (2000).

- 59 Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* **348**, 71-76 (2000).
- 60 Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapoiarzova T, Singleton PA, Chiang ET, Evenoski CL, Wang T, Mathew B, Husain A, Moitra J, Sun X, Nunez L, Jacobson JR, Dudek SM, Natarajan V, Garcia JG.. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**, 394-402 (2010).
- 61 Roggo BE, Petersen F, Delmendo R, Jenny HB, Peter HH, Roesel J. 3-Alkanoyl-5-hydroxymethyl tetronic acid homologues and resistomycin: new inhibitors of HIV-1 protease I. Fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* **47**, 136-142 (1994).
- 62 Roggo EB, Hug P, Moss S, Raschdorf F, Peter HH. 3-Alkanoyl-5-hydroxymethyl tetronic acid homologues: new inhibitors of HIV-1 protease II. Structure determination. *J Antibiot* **47**, 143-147 (1994).
- 63 Shoji J, Sakazaki R, Hattori T, Matsumoto K, Uotani N, Yoshida T. Isolation and characterization of agglomerins A, B, C and D. *J Antibiot* **42**, 1729-1733 (1989).
- 64 Terui Y, Sakazaki R, Shoji J. Structures of agglomerins. *J Antibiot* **43**, 1245-1253 (1990).
- 65 Angawi RF, Swenson DC, Gloer JB, Wicklow DT. Lowdenic acid: a new antifungal polyketide-derived metabolite from a new fungicolous *Verticillium* sp. *J Nat Prod* **66**, 1259-1262 (2003).
- 66 Hamaguchi T, Sudo T, Osada H. RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1 phase. *FEBS Letters* **372**, 54-58 (1995).
- 67 Sodeoka M, Sampe R, Kojima S, Baba Y, Morisaki N, Hashimoto Y. Asymmetric synthesis of a 3-acyltetronic acid derivative, RK-682, and formation of its calcium salt during silica gel column chromatography. *Chem Pharm Bull* **49**, 206-212 (2001).
- 68 Goel S, Gupta N, Walcott BP, Snuderl M, Kesler CT, Kirkpatrick ND, Heishi T, Huang Y, Martin JD, Ager E, Samuel R, Wang S, Yazbek J, Vakoc BJ, Peterson RT, Padera TP, Duda DG, Fukumura D, Jain RK.

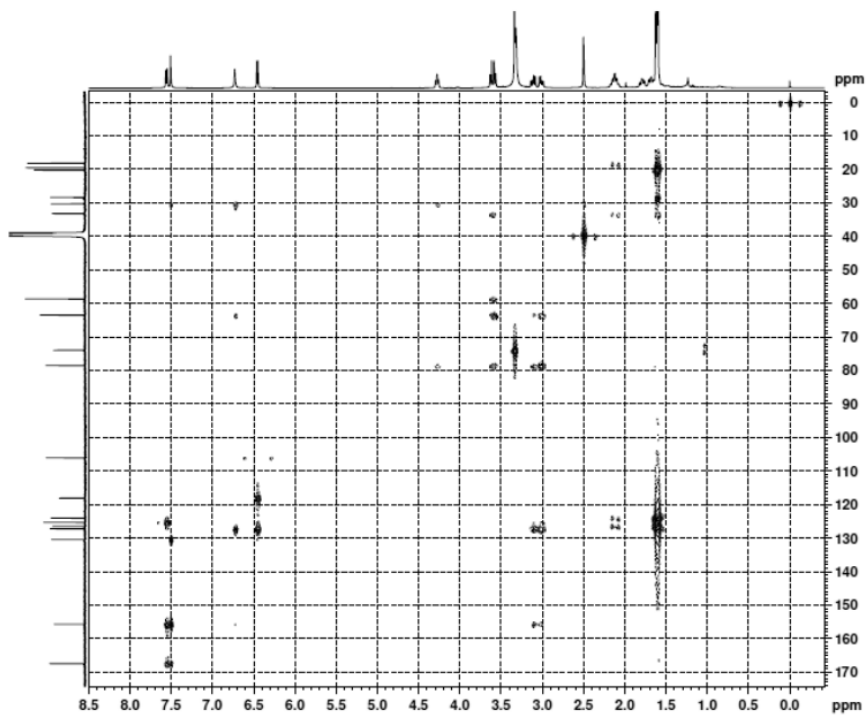
- Effects of vascular-endothelial protein tyrosine phosphate inhibition on breast cancer vasculature and metastatic progression. *J Natl Cancer Inst* **105**, 1188-1201 (2013).
- 69 Shen J, Frye M, Lee BL, Reinardy JL, McClung JM, Ding K, Kojima M, Xia H, Seidel C, Lima e Silva R, Dong A, Hackett SF, Wang J, Howard BW, Vestweber D, Kontos CD, Peters KG, Campochiaro PA. Targeting VE-PTP activates TIE2 and stabilizes the ocular vasculature. *J Clin Invest* **124**, 4564-4576 (2014).
- 70 Sodeoka M, Sampe R, Kojima S, Baba Y, Usui T, Ueda K, Osada H. Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition. *J Med Chem* **44**, 3216-3222 (2001).
- 71 Usui T, Kojima S, Kidokoro S, Ueda K, Osada H, Sodeoka M. Design and synthesis of a dimeric derivative of RK-682 with increased inhibitory activity against VHR, a dual-specificity ERK phosphatase: implications for the molecular mechanism of the inhibition. *Chem Biol* **8**, 1209-1220 (2001).
- 72 Hirai G, Sodeoka M. Focused library with a core structure extracted from natural products and modified: application to phosphatase inhibitors and several biochemical findings. *Acc Chem Res* **48**, 1464-1473 (2015).
- 73 Kawasaki Y, Nozawa Y, Harada K. Elution behavior of diaminopimelic acid and related diamino acids using the advanced Marfey's method. *J Chromatogr A* **1160**, 246-253 (2007).
- 74 Hosoya, T. *et al.* Molecular phylogenetic studies of *Lachnum* and its allies based on the Japanese material. *Mycosciense* **51**, 170-181 (2010).
- 75 Zhao S, Wu J. Hypoxia inducible factor stabilization as a novel strategy to treat anemia. *Curr Med Chem* **20**, 2697-2711 (2013).
- 76 Hendrick AM, Gibson MV, Kulshreshtha A. Diabetic Retinopathy. *Prim Care* **42**, 451-464 (2015).
- 77 Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M Shimohata T. Effects of angiopoietin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats. *PLoS One* **9**, e98639 (2014).
- 78 Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 417-427 (2011).

## Supplementary information

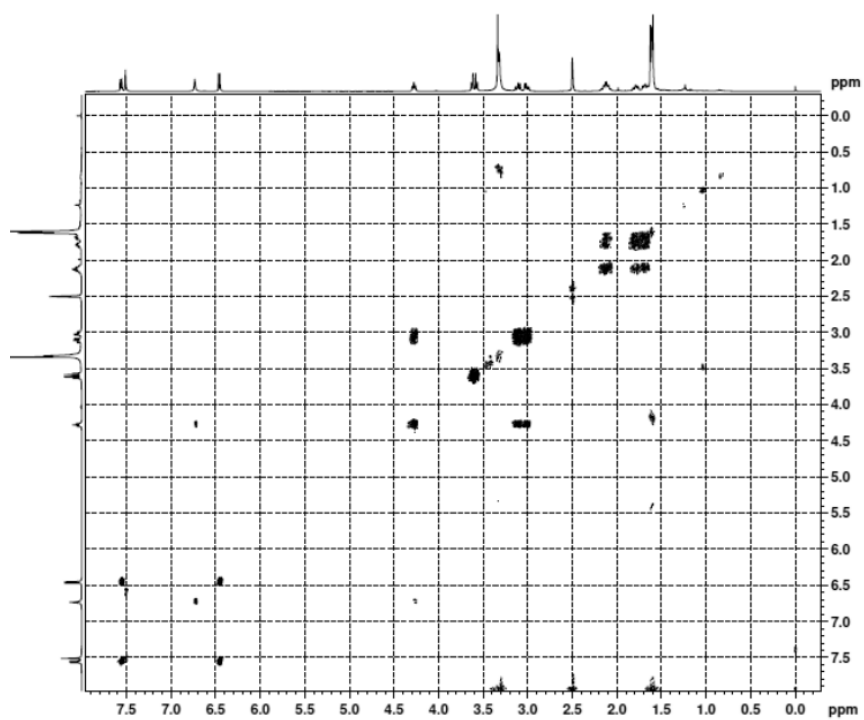
- ☒ SI-II-1 HSQC spectrum of A-503451 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-II-2 HMBC spectrum of A-503451 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-II-3 DQF-COSY spectrum of A-503451 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-II-4 ROESY spectrum of A-503451 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-II-5 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of A-503451 B in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-II-6 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of A-503451 C in CDCl<sub>3</sub>.
- ☒ SI-II-7 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of A-503451 D in CDCl<sub>3</sub>.
- ☒ SI-III-1 HSQC spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.
- ☒ SI-III-2 HMBC spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.
- ☒ SI-III-3 DQF-COSY spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.
- ☒ SI-III-4 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.
- ☒ SI-III-5 <sup>1</sup>H NMR spectrum of vestaine B<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.
- ☒ SI-III-6 <sup>13</sup>C NMR spectrum of vestaine B<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.
- ☒ SI-III-7 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of compound **3** (vestaine A<sub>1</sub>-derived) in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-III-8 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of compound **4** (vestaine B<sub>1</sub>-derived) in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-III-9 HSQC spectrum of F-36316 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-III-10 HMBC spectrum of F-36316 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-III-11 DQF-COSY spectrum of F-36316 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-III-12 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of F-36316 B in DMSO-*d*<sub>6</sub>.
- ☒ SI-III-13 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of F-36316 C in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



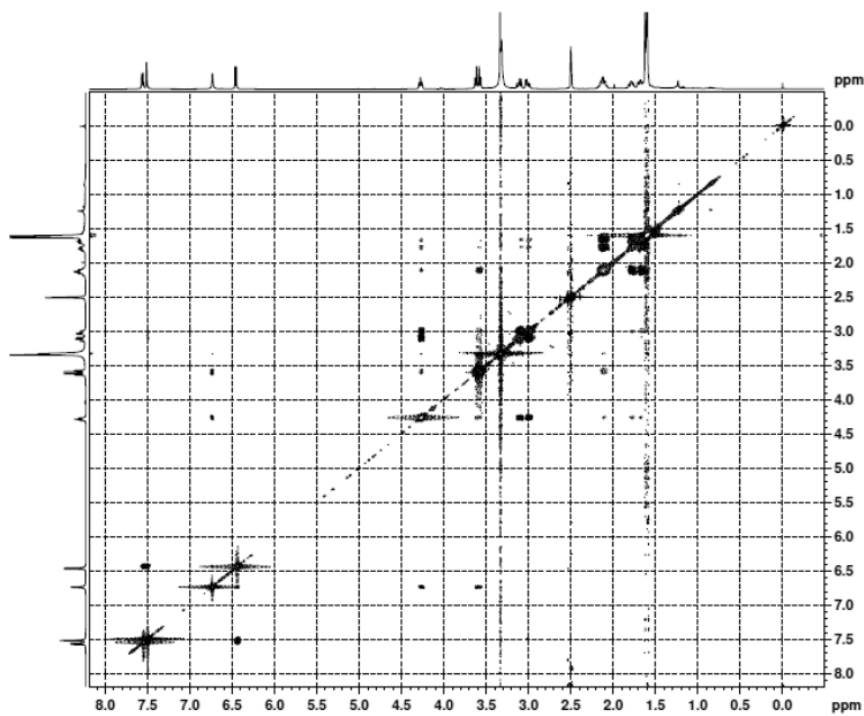
☒ SI-II-1 **HSQC spectrum of A-503451 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.**



☒ SI-II-2 **HMBC spectrum of A-503451 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.**



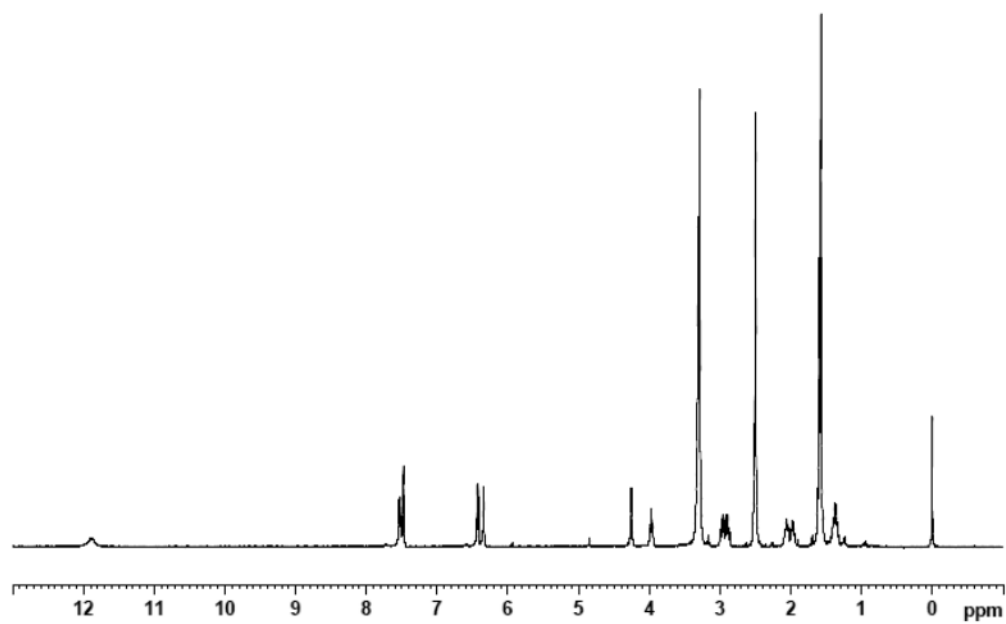
☒ SI-II-3      **DQF-COSY spectrum of A-503451 A in DMSO- $d_6$ .**



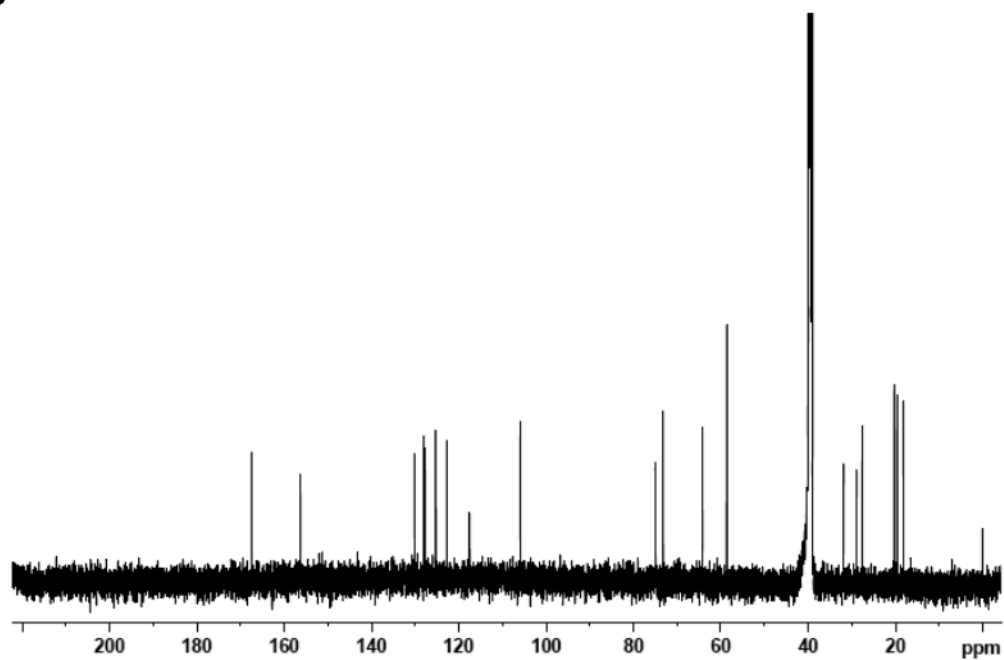
☒ SI-II-4      **ROESY spectrum of A-503451 A in DMSO- $d_6$ .**



**A**

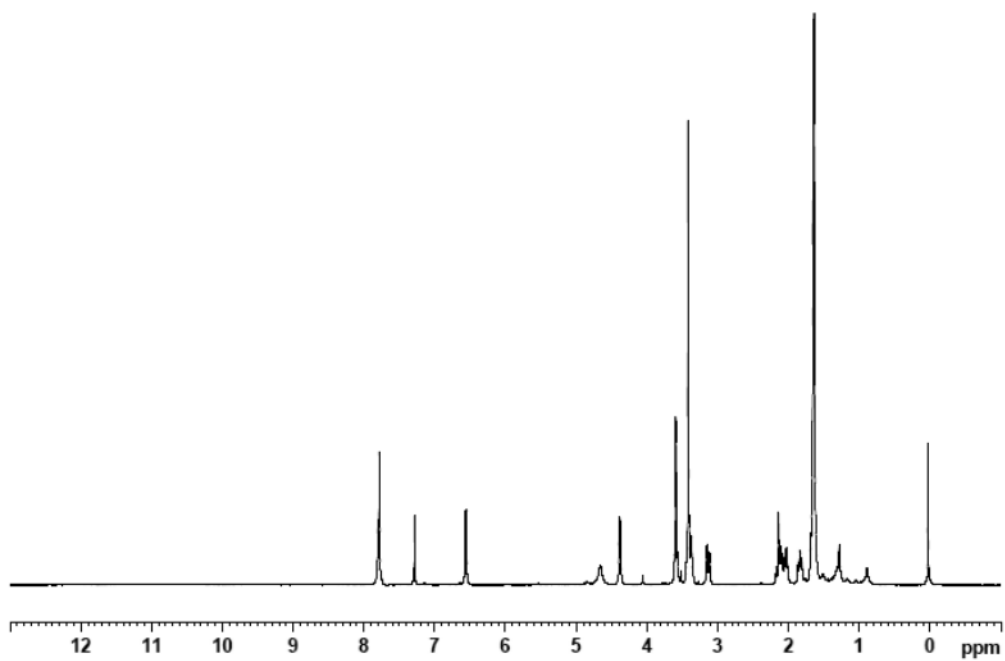


**B**

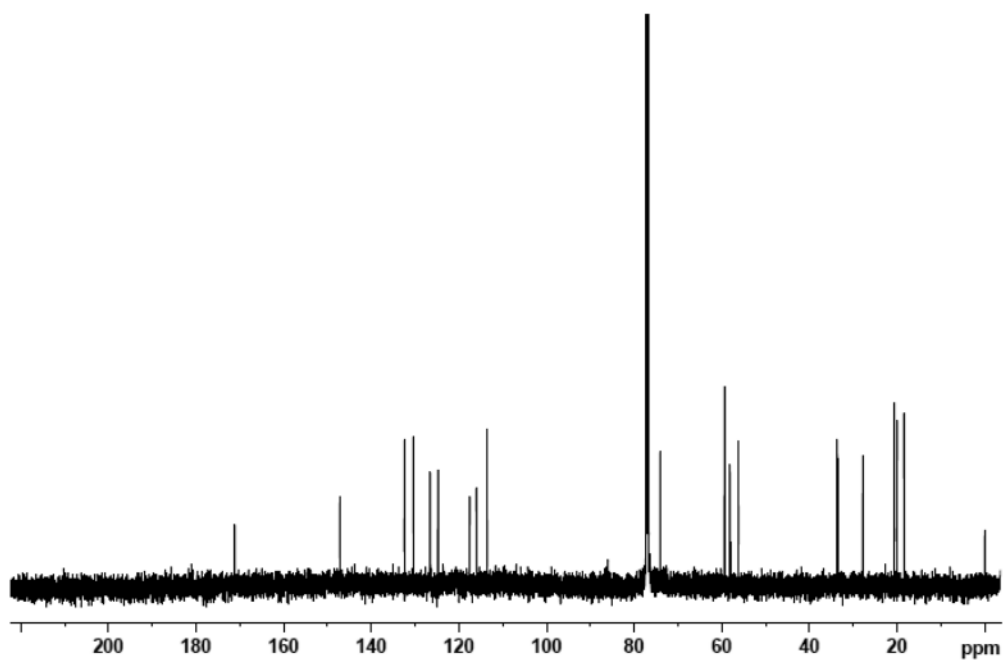


☒ SI-II-5  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) spectra of A-503451 B in  $\text{DMSO-}d_6$ .

**A**

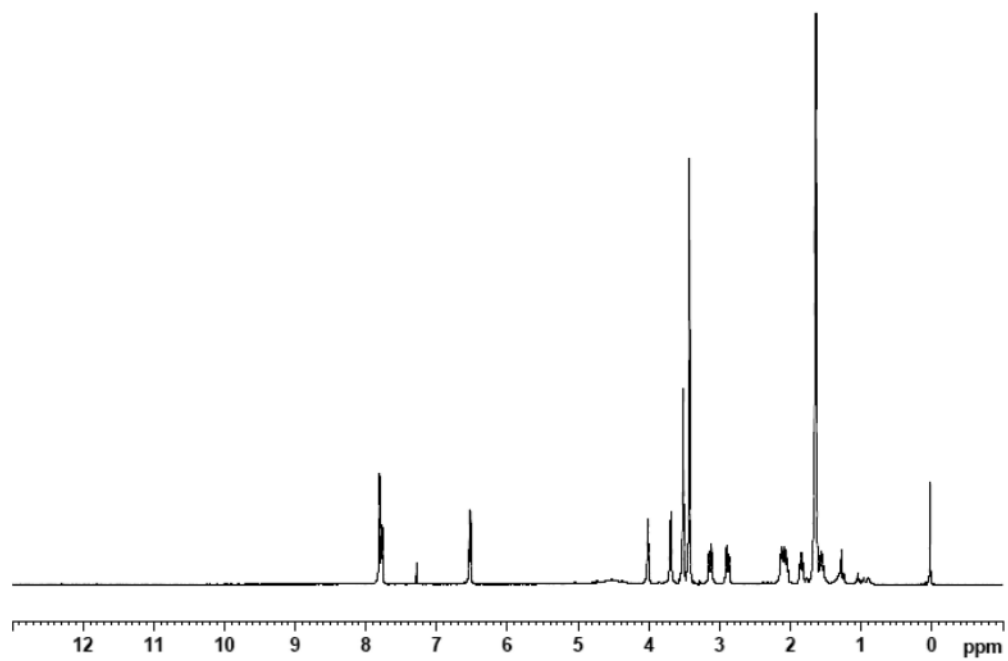


**B**

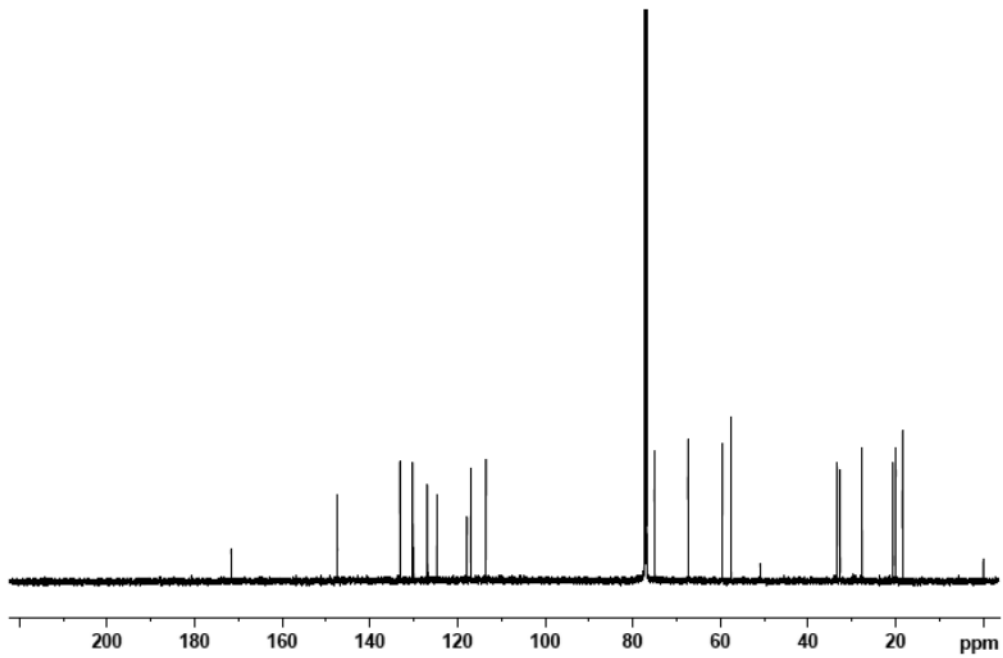


☒ SI-II-6  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) spectra of A-503451 C in  $\text{CDCl}_3$ .

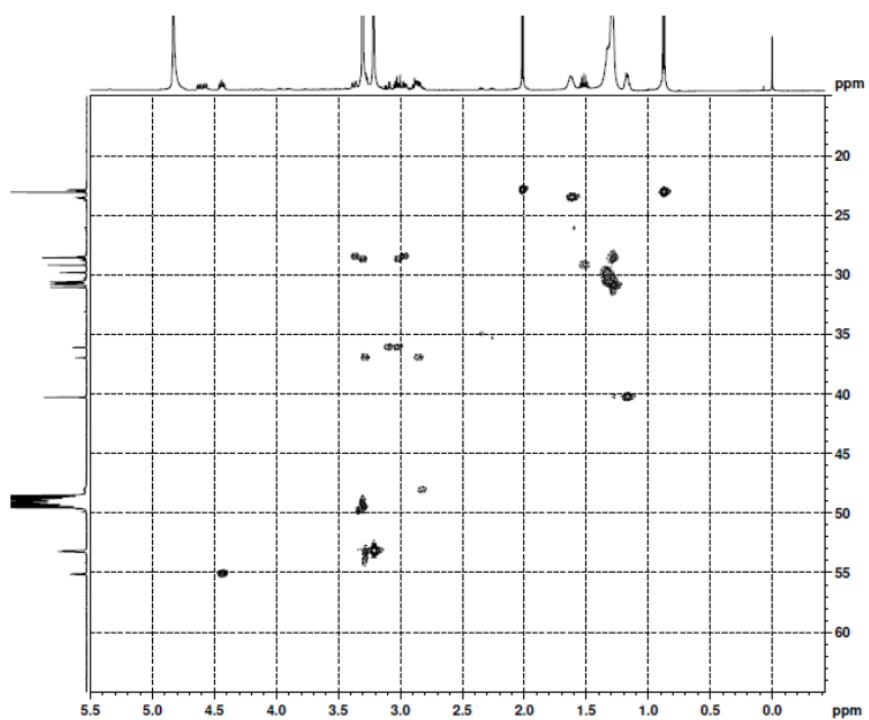
**A**



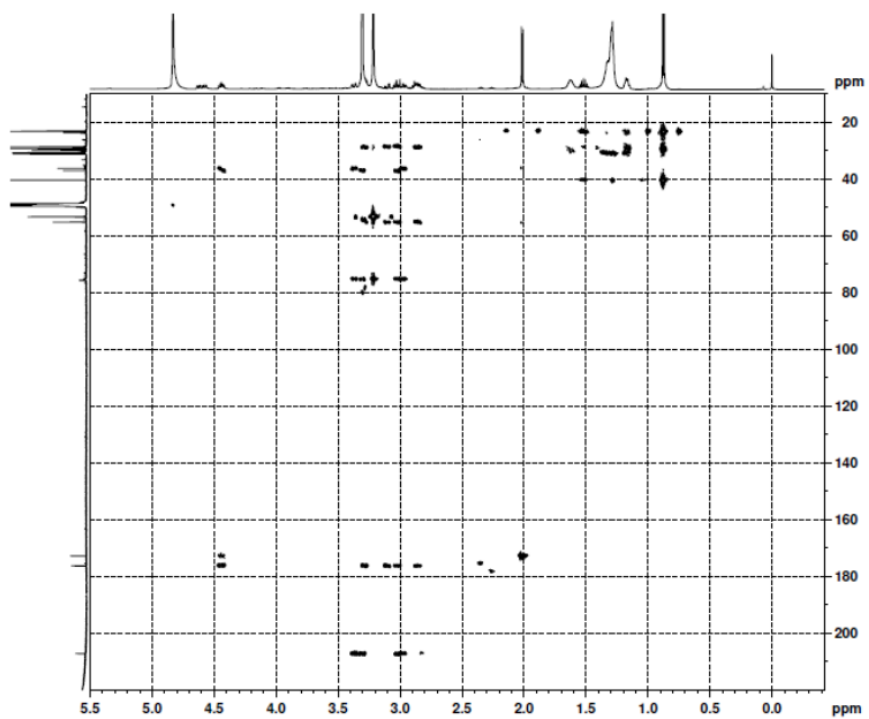
**B**



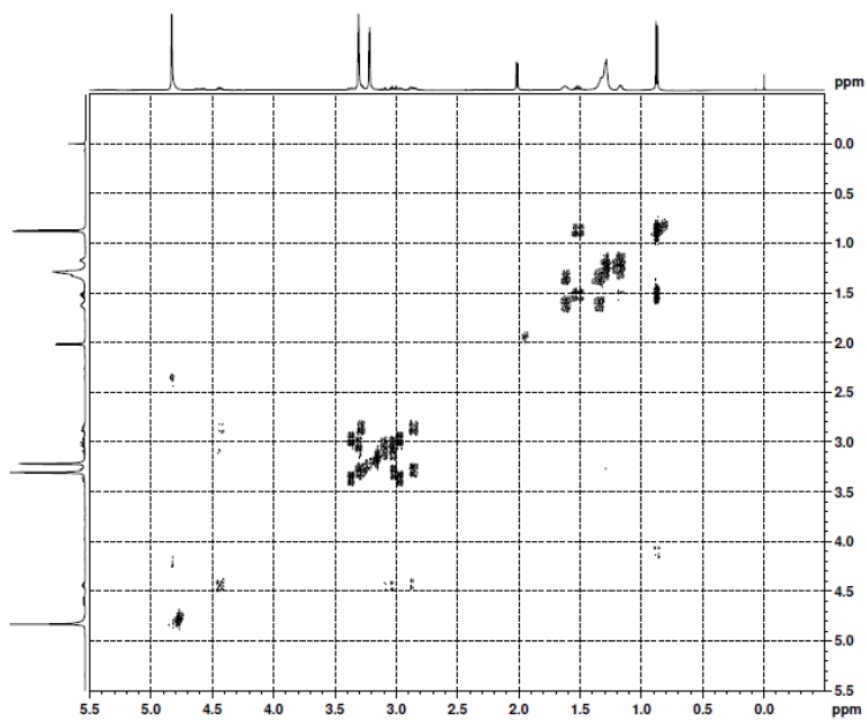
☒ SI-II-7  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) spectra of A-503451 D in  $\text{CDCl}_3$ .



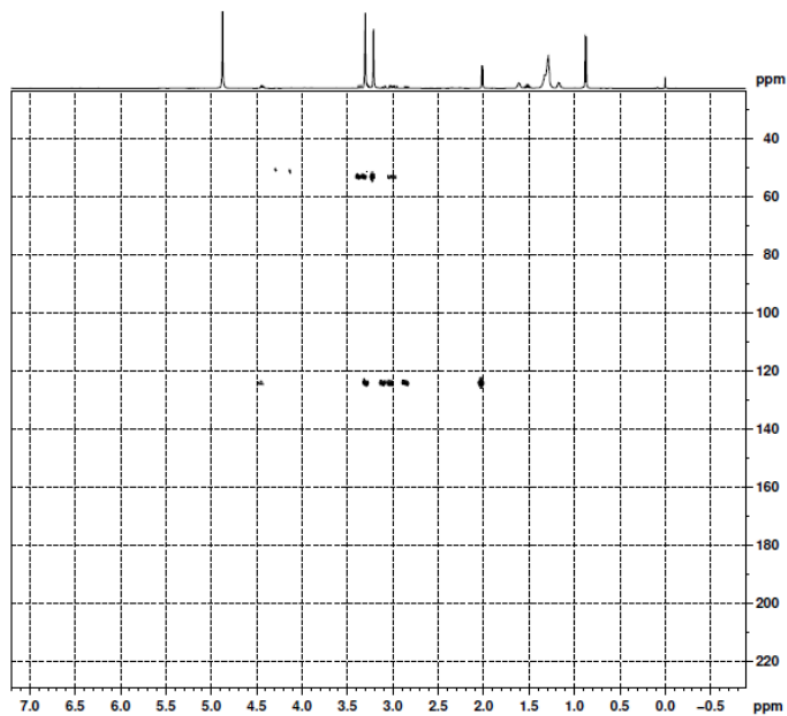
☒ SI-III-1 HSQC spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.



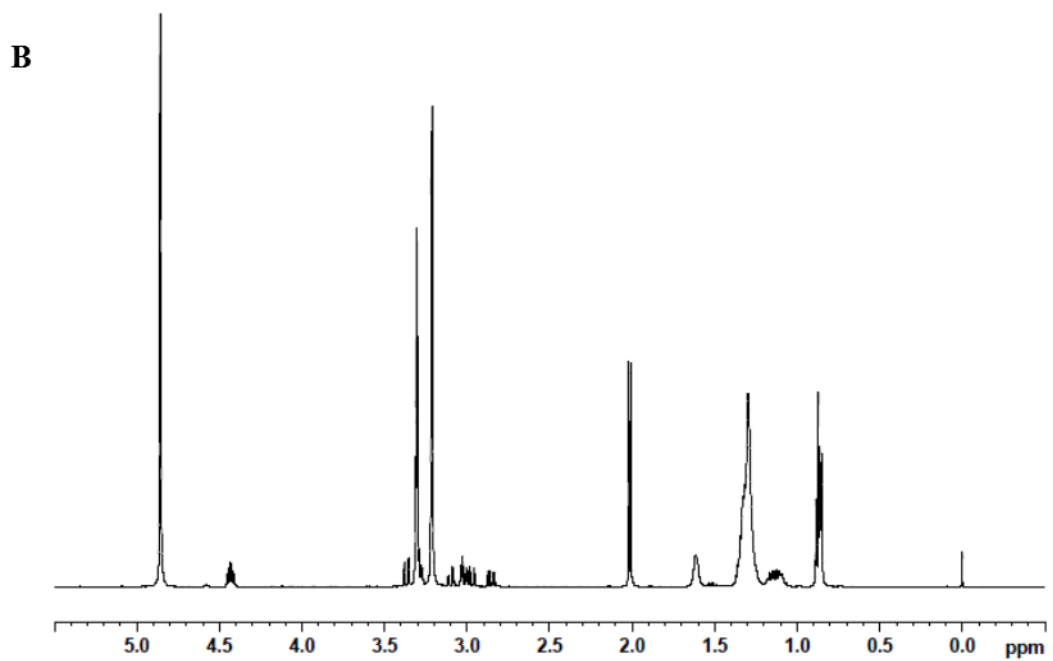
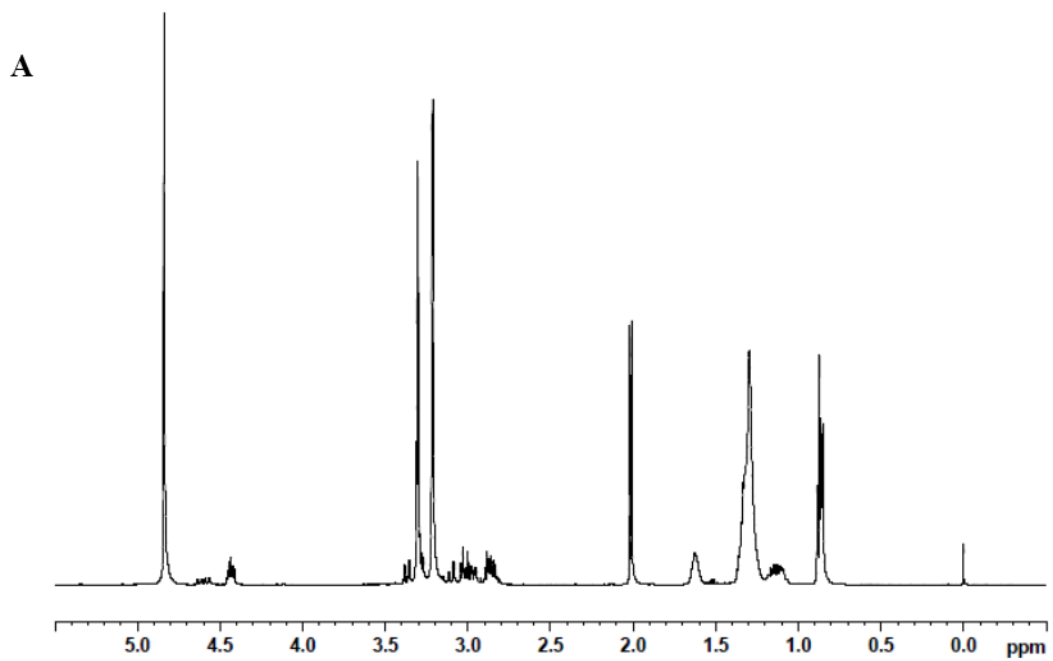
☒ SI-III-2 HMBC spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.



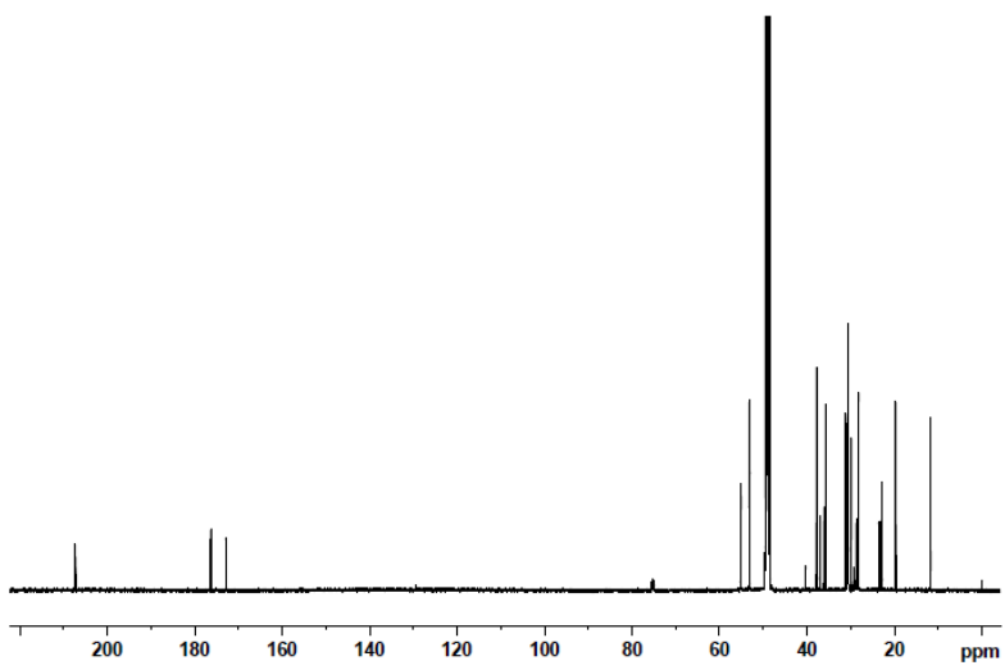
☒ SI-III-3 DQF-COSY spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.



☒ SI-III-4 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC spectrum of vestaine A<sub>1</sub> in methanol-*d*<sub>4</sub>.

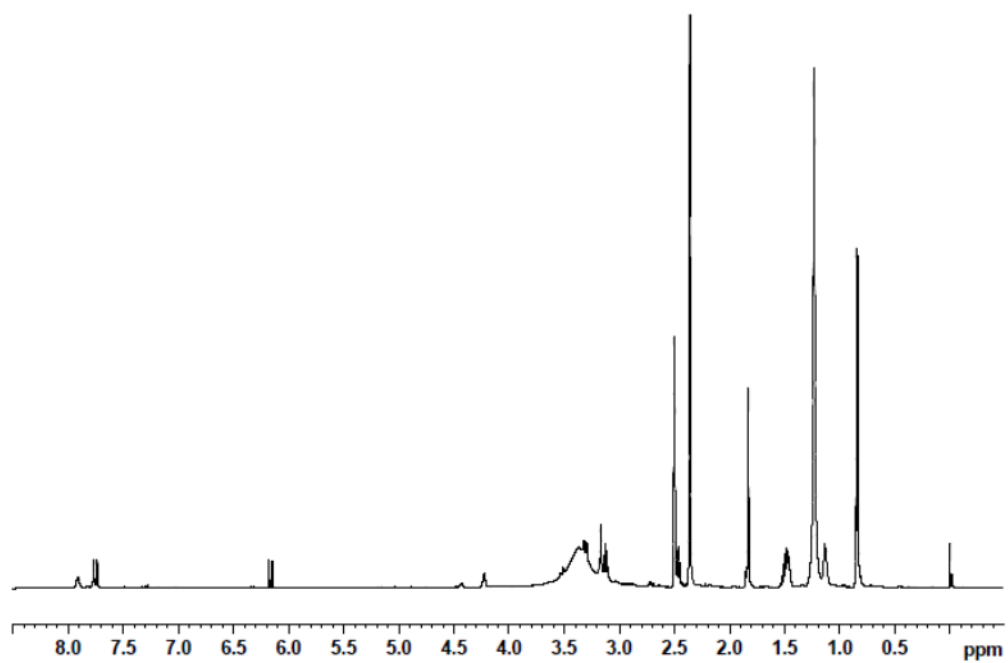


☒ SI-III-5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of vestaine  $\text{B}_1$  in methanol- $d_4$ .  
 (A) Before deuteration. (B) After deuteration.

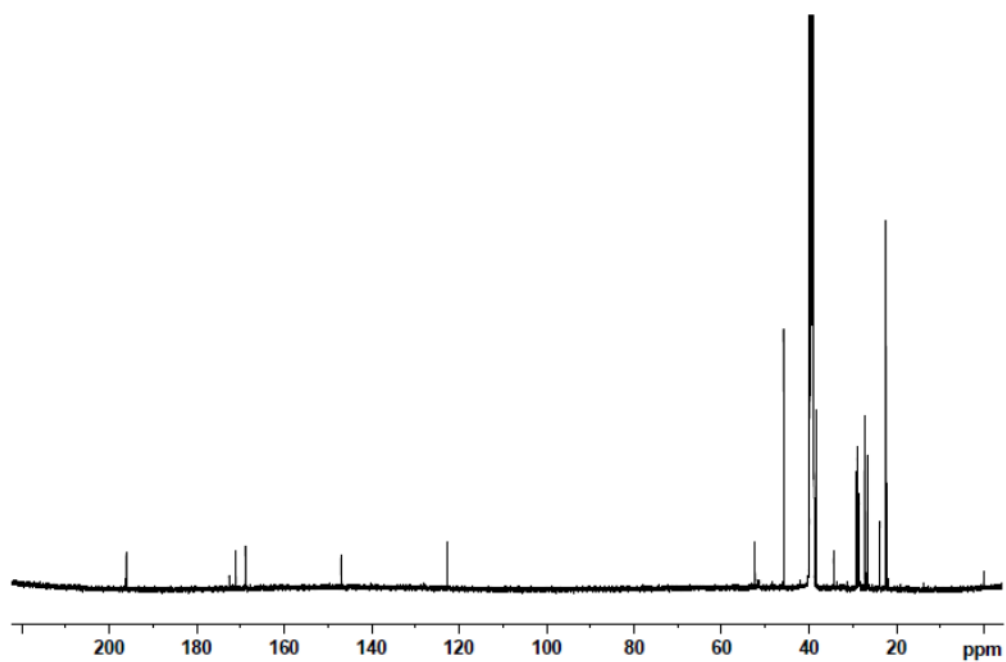


☒ SI-III-6  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of vestaine  $\text{B}_1$  in methanol- $d_4$ .

**A**



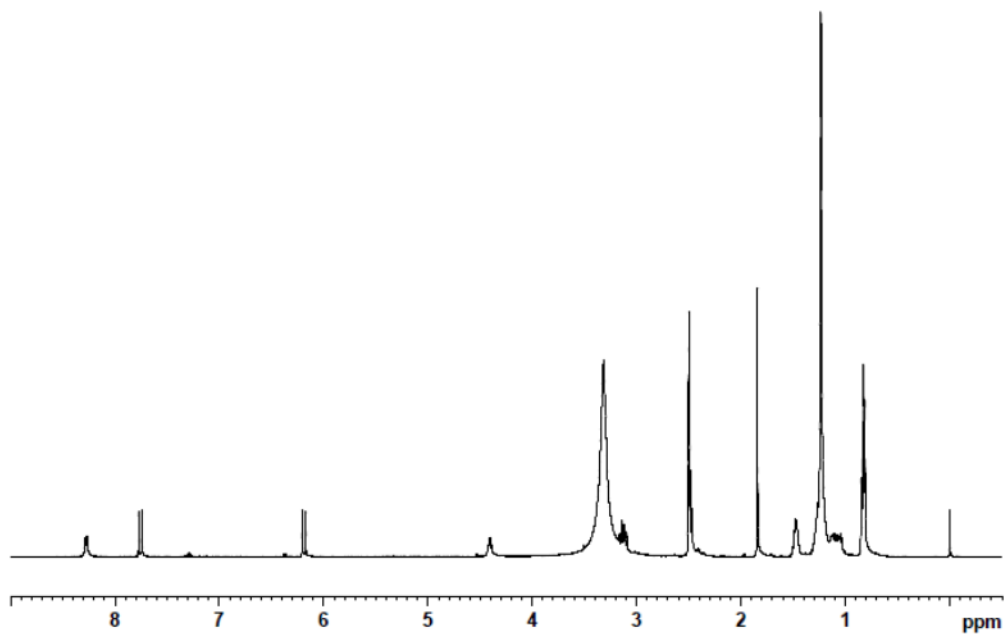
**B**



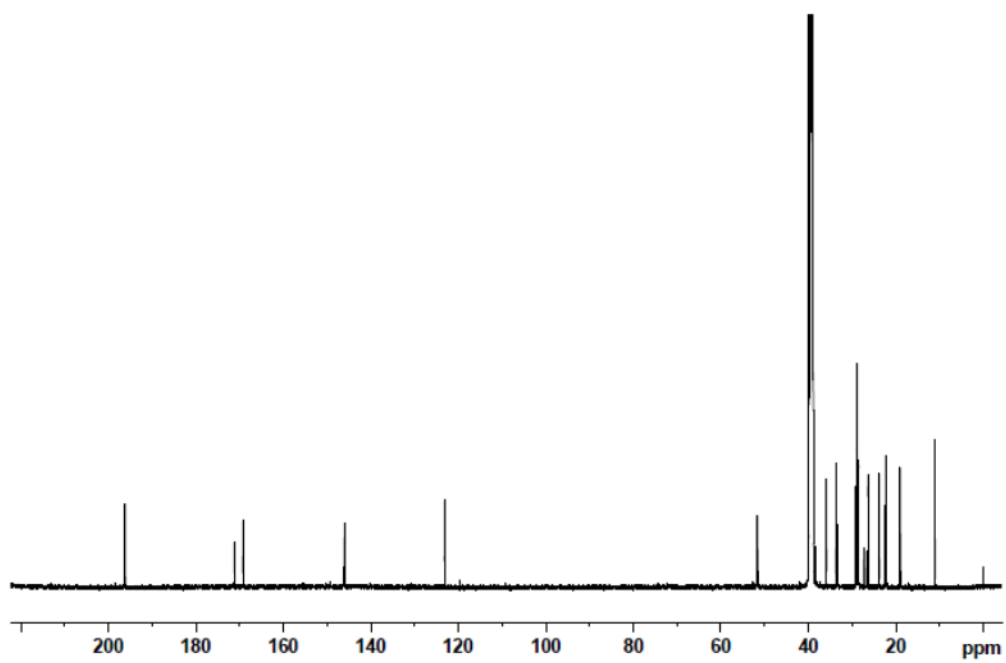
☒ SI-III-7 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of compound 3 (Vestaine A<sub>1</sub>-derived) in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



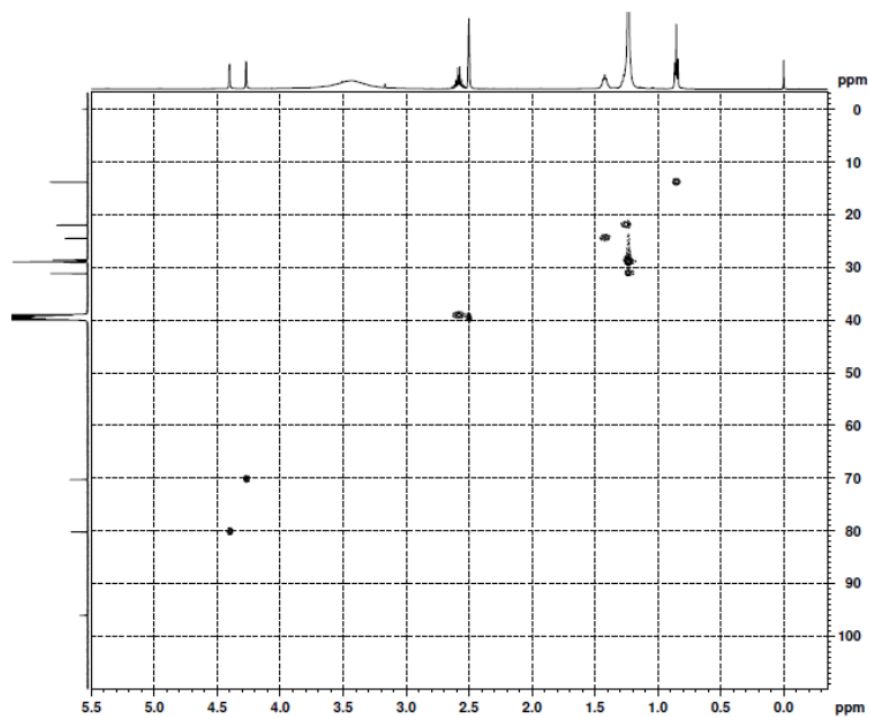
**A**



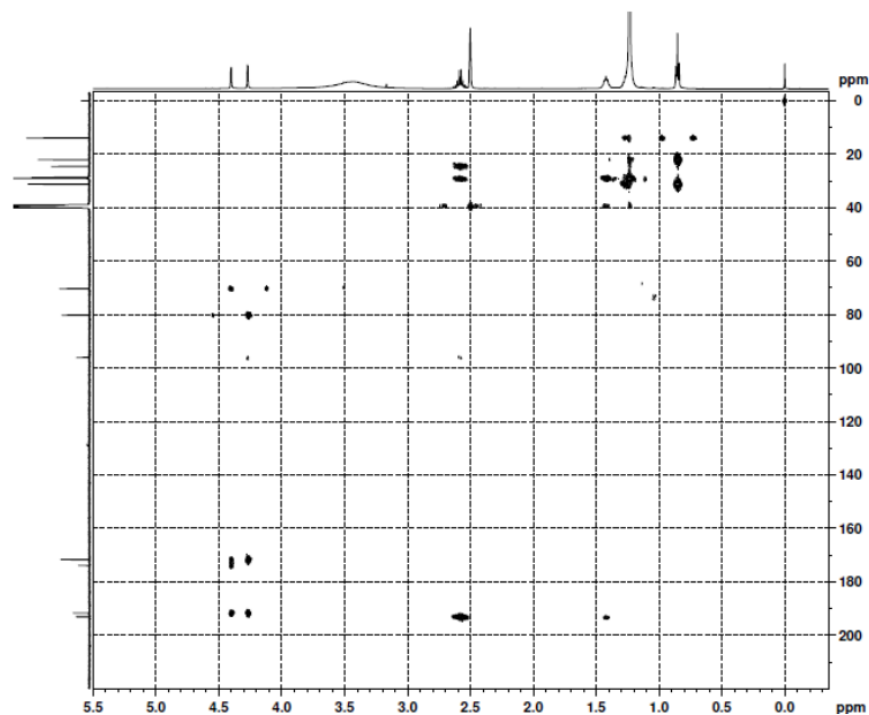
**B**



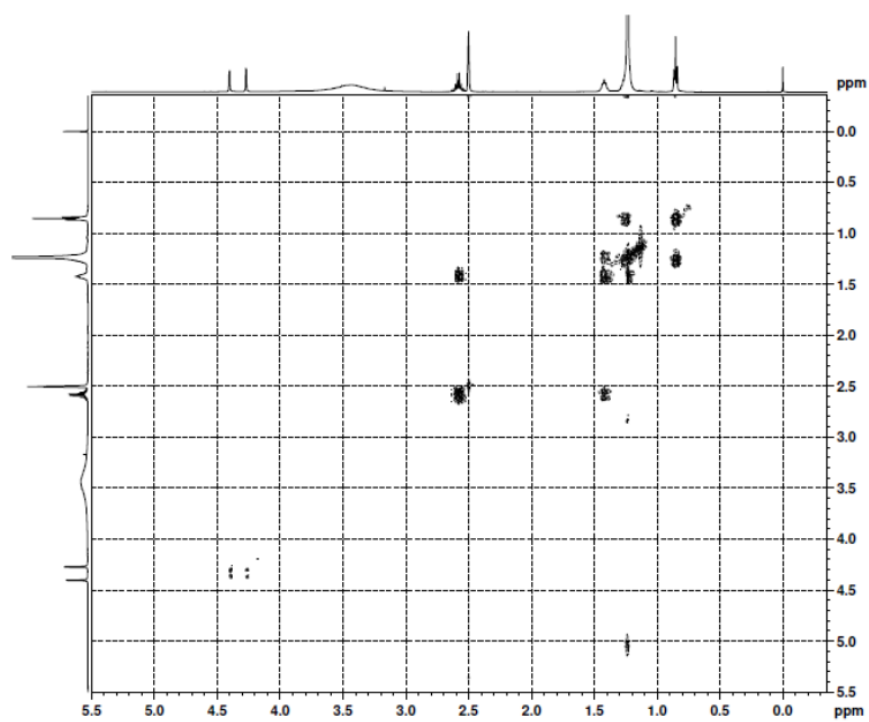
☒ SI-III-8  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) spectra of compound 4 (Vestaine B<sub>1</sub>-derived) in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



☒ SI-III-9 HSQC spectrum of F-36316 A in DMSO- $d_6$ .

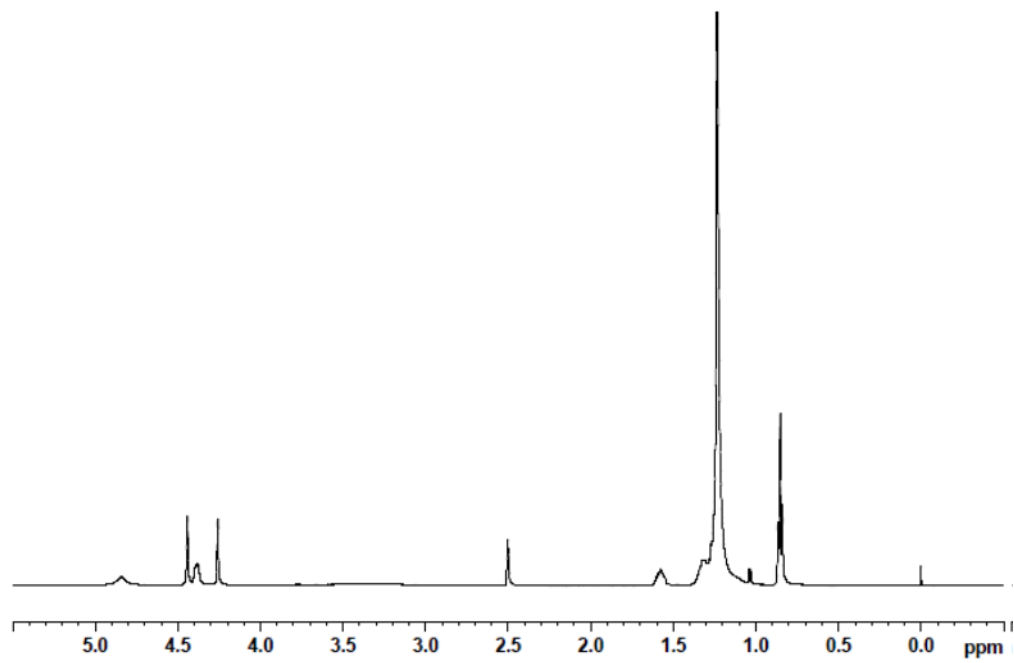


☒ SI-III-10 HMBC spectrum of F-36316 A in DMSO- $d_6$ .

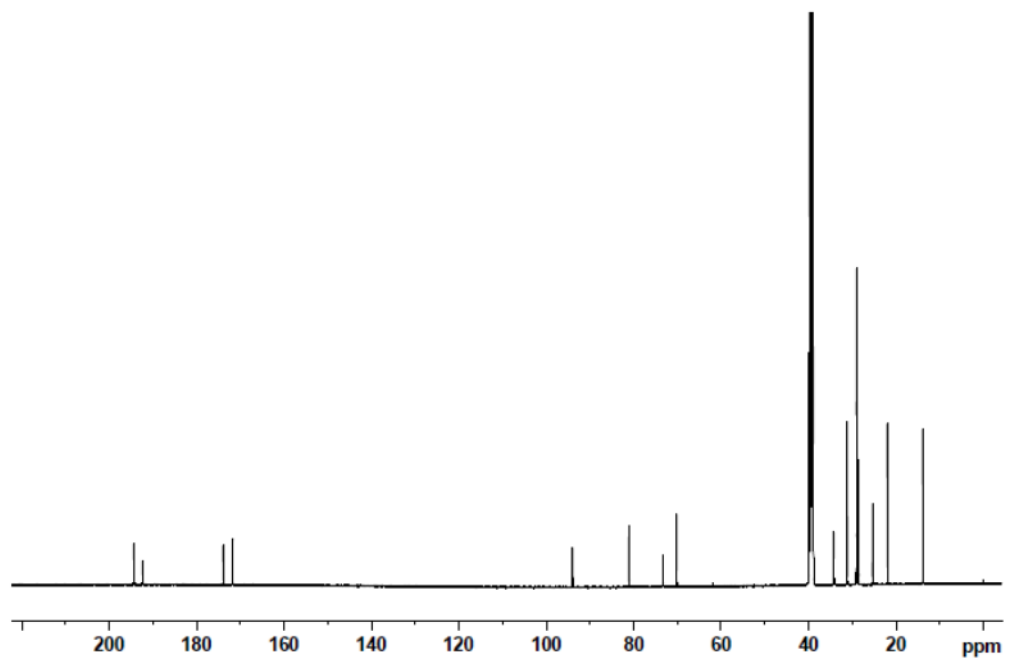


☒ SI-III-11     **DQF-COSY spectrum of F-36316 A in DMSO-*d*<sub>6</sub>.**

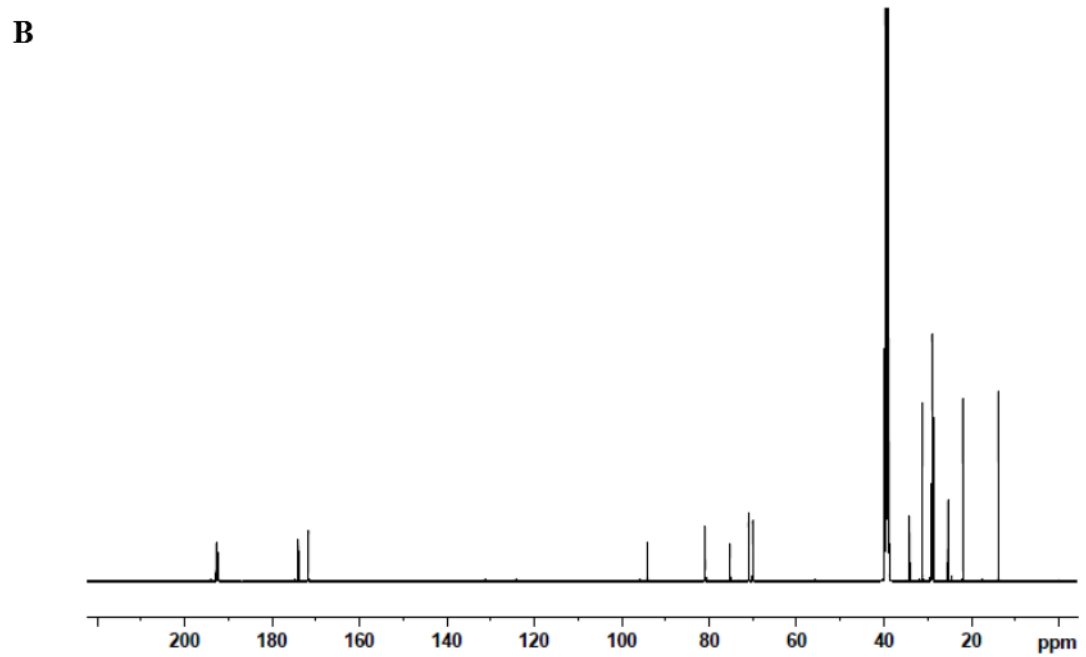
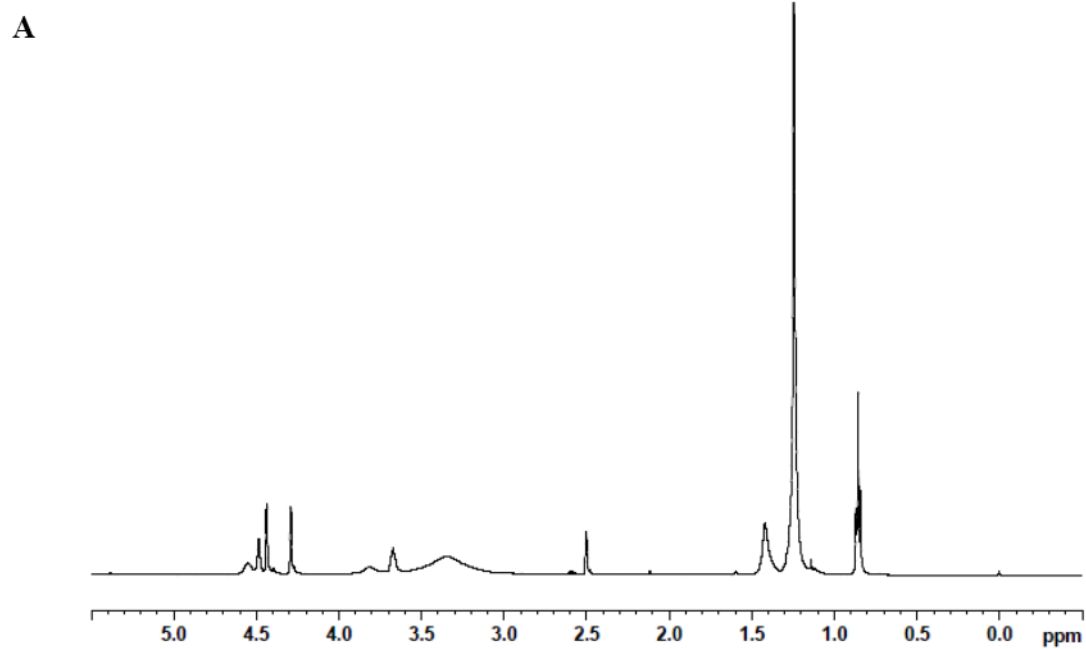
**A**



**B**



☒ SI-III-12 <sup>1</sup>H NMR (A) and <sup>13</sup>C NMR (B) spectra of F-36316 B in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



☒ SI-III-13  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) spectra of F-36316 C in  $\text{DMSO-}d_6$ .