

Title	潜在性結核菌に有効な海洋天然物の探索とその標的分 子解析
Author(s)	神谷, 謙太朗
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61693
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

潜在性結核菌に有効な

海洋天然物の探索とその標的分子解析

2017年

神谷 謙太朗

目次

联	各語…		1
紂	皆論…		2
才	≿論…		5
第	了一章	海洋薬用資源からの抗潜在性結核物質の探索	· 5
	第一節	低酸素培養法を用いた抗潜在性結核物質のスクリーニング方法・・・・・・・・・	5
	第二節	海洋由来真菌 Aspergillus sp.からの抗潜在性結核物質の単離・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	6
	第三節	単離した化合物 1-4 の抗菌活性	9
	第四節	Viomellein の作用メカニズムの検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	9
	第五節	海綿 <i>Aaptos</i> sp.からの抗潜在性結核物質の単離	10
	第六節	3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamineの抗菌活性・・・・・	12
第	三章	Nybomycin の標的分子解析 ····································	14
	第一節	ゲノム DNA ライブラリーを利用した標的分子解析・・・・・・・・・・・・・・・・・	15
	第二節	ビオチン標識化プローブを利用した標的分子解析・・・・・・・・・・・・・・・・	17
第	三章	3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA)の標的分子解析	21
	第一節	PDOA の各種プローブ分子の抗菌活性	21
	第二節	PDOA の DNA に対する結合能の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	22
	第三節	光アフィニティプローブ 11 を用いた標的分子の解析法	23
	6-6- 1777 6-6-		
	第四節	光アフィニティプローブ 11 を用いるタンパク質標識条件の検討	24
	第四節 第五節	光アフィニティプローブ 11 を用いるタンパク質標識条件の検討	24 26
新	第四節 第五節 吉論 …	光アフィニティプローブ 11 を用いるタンパク質標識条件の検討	24 26 27
新 割	第四節 第五節 吉論	光アフィニティプローブ 11 を用いるタンパク質標識条件の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	24 26 27 28
新説は実	第四節 第五節 古論 村辞 長験の	光アフィニティプローブ 11 を用いるタンパク質標識条件の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	24 26 27 28 29

略語

BCG	Bacilli de Calmette et Guérin
CFU	colony forming unit
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI-TOF-MS	electrospray ionization time of flight mass spectrometry
HPLC	high performance liquid chromatography
IR	infrared absorption
LB	Luria-Bertani
MDR-TB	multi drug resistant tuberculosis
MHz	megahertz
MIC	minimum inhibitory concentration
MTT	methylthiazolyltetrazolium bromide
NMR	nuclear magnetic resonance
OADC	oleic acid, albumin, dextrose, catalase
OD	optical density
ODS	octa decyl silyl
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RFU	relative fluorescence unit
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate poly-acrylamide gel electrophoresis
TEA	triethylamine
TLC	thin layer chromatography
UV	ultraviolet

緒論

結核の主な原因菌である結核菌(Mycobacterium tuberculosis)には、世界人口の 1/3 が感染していると言われ、現在も年間 150 万人が結核により亡くなっている¹⁾。また、結核菌は宿主に感染後、その一部が感染部位で形成される granuloma 内の環境刺激により潜在化し、長期に渡り生存し続ける特徴をもつ(Figure 1)^{2,3)}。さらに、潜在化した結核菌は isoniazid など

の既存の抗結核薬に抵抗性を示すこと が知られており⁴⁾、このことが最低 6 ヵ月の長期にわたる化学療法、それに 伴う副作用の発生、不完全な治療によ る再発や薬剤耐性菌出現の原因と考え られている。したがって、潜在性結核 菌にも有効な新しい医薬シーズの探索 と、結核に対する新規薬剤標的の開拓 は重要な課題である。



Figure 1 結核菌の潜在化と granuloma

一方、海綿などの海洋生物や海洋微生物が産生する活性天然物は、多様な化学構造を有し ており、医薬シーズの探索源として注目されている⁵⁾。またすでに、Prialt (Ziconotide、疼痛 治療薬)、Yondelis (Trabectedin、抗がん剤)や Halaven (Eribulin、抗がん剤)といった海洋生物 由来の活性天然物が基となった化合物が臨床応用されている。また、筆者の研究室でもこれ までに、海綿由来の新規ステロイドアルカロイド cortistatin 類⁶⁾ (血管新生阻害物質)、海綿 由来の新規デプシペプチド neamphamide B⁷⁾ (抗潜在性結核物質)、海洋性真菌由来の新規ア ミノリポペプチド trichoderin 類⁸⁾ (抗潜在性結核物質)、海綿由来の新規アルキルピリジンア ルカロイド *N*-methylniphatyne A⁹⁾ (低栄養環境選択的がん細胞増殖阻害物質)をはじめ数多く の生理活性物質を見出している(Figure 2)。これら単離された化合物に見られるように、海洋 生物由来の二次代謝産物の化学構造は多岐にわたり、それらを探索源としたスクリーニン グから見出される化合物は、新規の骨格と作用メカニズムを有する可能性が高い。



Figure 2 筆者の研究室で見出された海洋生物由来生理活性物質

このような背景のもと、筆者は潜在性結核菌にも有効な新規医薬シーズの創製を目的に、 granuloma内の低酸素環境に着目した評価系を用いて、海綿を中心とする底生海洋生物の抽 出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象に探索研究を行った。その結 果、海洋由来真菌 Aspergillus sp.の培養抽出物からナフトキノン誘導体 viomellein (1)¹⁰、 xanthomegnin (2)¹¹、rubrosulphin (3)¹⁰ならびに α-ピロン誘導体 asteltoxin (4)¹²)を単離した。ま た、インドネシア産海綿 Aaptos sp.の MeOH 抽出物からは、3-(phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA, 5)¹³)を単離した。これらの化合物のうち、1 および5は、好気培養条件お よび潜在状態を誘導した低酸素培養条件の両培養条件下で*M. smegmatis*よりも*M. bovis* BCG に対して強い抗菌活性を示した。また、5 は多剤耐性結核菌(MDR-TB)を含む各種 *M. tuberculosis* に対しても良好な抗菌活性を示すことが明らかとなった(Figure 3) (第一章)。さ らに、筆者の研究室ではこれまでに、潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として海洋由来放線 菌の二次代謝産物 nybomycin (6)¹⁴⁾を見出しており、6 は臨床分離株を含む各種 *M. tuberculosis* に対して良好な抗菌活性を示す¹⁵⁾。そこで筆者は、5 および 6 の詳細な作用メカニズムおよ び結核に対する新しい薬剤標的分子の開拓を目的として、その標的分子の解析を行った(第 二章、第三章)。

筆者の研究室では、「抗菌物質の標的分子の高発現株は、その抗菌物質に対して耐性を示す」という考えの基、ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用する標的分子解析法を構築している¹⁶。そして、nybomycin (6)の標的分子解析に本手法を適応した結果、*M. bovis* BCG ゲノムの 686.465 kb~709.074 kb (22.6 kb)または 4101.265 kb~4130.915 kb (29.7 kb)の領域を高発現した形質転換株が 6 に対して耐性を示すことを見出した。すなわち、両領域内にコードされているいずれかのタンパク質が 6 の標的分子であることが示唆された。次に筆者は、見出した遺伝子領域を基にして、さらに6 に対して耐性を付与する遺伝子の解析を進

めた。しかし、耐性を付与する遺伝子または遺伝子領域は複数存在し、その遺伝子の種類や 機能に類似性が確認できなかった。このことから筆者は、6 は特定のタンパク質と結合する 化合物ではなく、結核菌ゲノム DNA に直接結合するものと予想した。そこで、設計・合成 した 6 のビオチン標識化プローブを用いて、*M. bovis* BCG のゲノム断片を含むプラスミド との結合能の有無を検証した。その結果、6 はゲノム DNA と直接結合することにより抗菌 活性を示すことが強く示唆された(第二章)。

PDOA(5)の標的分子解析は、5 が蛍光を有することを利用した光アフィニティラベリング 法により解析を行った。すなわち、5 のアナログ化合物による構造活性相関の検討結果を基 にして、トリフルオロメチルジアジリン基を構造中に含む PDOA プローブを設計・合成し た。次に、これと M. bovis BCG から調製した菌体破砕液を混和後、紫外線照射により標的 分子をプローブ分子で標識した。そして5 が有する蛍光を検出することにより、プローブ分 子で標識された複数のタンパク質の検出に成功した(第三章)。



3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA, 5)

Figure 3 化合物 1-6 の化学構造

第一章 海洋薬用資源からの抗潜在性結核物質の探索

第一節 低酸素培養法を用いた抗潜在性結核物質のスクリーニング方法

潜在性結核菌が存在する granuloma 内と同じ低酸素環境下で培養した結核菌は、感染部位の結核菌と同様に isoniazid に対して抵抗性を示すことが知られている¹⁷⁾。筆者の研究室では、本知見を基にして、抗潜在性結核物質を探索するスクリーニング系を構築している¹⁸⁾。 すなわち、早生育型で非病原性の Mycobacterium 属細菌である M. smegmatis および遅生育型のワクチン株で M. tuberculosis と相同性の高い M. bovis BCG を検定菌として、これらを 0.2%の低酸素条件で培養することにより潜在状態を誘導した。実際に本法で潜在状態を誘導した検定菌は、好気培養条件下と比較して、isoniazid に対して 10 倍以上の抵抗性を示す(Figure 4, Table 1)。そして、実際のスクリーニングでは、このような低酸素培養条件下においても抗菌活性を示す化合物の探索を行った。また、試料の最小生育阻止濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)は、MTT 試薬による比色定量法で算出した(Figure 5)¹⁸⁾。





pre-cultured *M. smegmatis* $(1 \times 10^4 \text{ CFU/0.1 mL})$ or *M. bovis* BCG $(1 \times 10^5 \text{ CFU/0.1 mL})$ under aerobic or hypoxic $(0.2 \% O_2)$ conditions.

1) added serial diluted sample

2) incubated for 96 hr (for *M. smegmatis*) or 14 days (for *M. bovis* BCG) **under hypoxic condition** or incubated for 36 hr (for *M. smegmatis*) or 7 days (for *M. bovis* BCG) **under aerobic condition**
 Table 1
 好気および低酸素培養条件下

 での各検定菌に対する isoniazid の MIC

MIC of isoniazid (µg/mL)				
Strains	Aerobic	Hypoxic		
M. smegmatis	2.5	25		
<i>M. bovis</i> BCG	0.03	>100		



Picture of low O₂ chamber

Figure 5 低酸素培養法を利用する抗潜在性結核物質のスクリーニング法

Determination of MIC by MTT method

第二節 海洋由来真菌 Aspergillus sp.からの抗潜在性結核物質の単離

2014年にインドネシアのアチェで採集した海 綿14E28から分離した真菌 Aspergillus sp. (Figure 6)の培養抽出物に、好気および低酸素の両培養 条件下で M. bovis BCG に対する選択的な抗菌活 性を見出した。そこで、本菌の培養抽出物につ いて、活性試験の結果を指標に溶媒間分配、各 種カラムクロマトグラフィおよび再結晶により 順次精製を行い、3 種のナフトキノン誘導体 viomellein (1)¹⁰、xanthomegnin (2)¹¹、rubrosulphin (3)¹⁰ならびにα-ピロン誘導体 asteltoxin (4)¹²を



Figure 6 海洋由来真菌 Aspergillus sp.

単離した(Figure 7,8)。各化合物は、各種 NMR および MS スペクトルデータを解析し、それ らを文献値と比較することにより同定した。



Figure 7 海洋由来真菌 Aspergillus sp.の培養抽出物からの活性物質の精製



Figure 8 海洋由来真菌 Aspergillus sp.から単離した化合物 1-4 の化学構造

また、viomellein (1)を精製するための予試験において、逆相のカラムと MeOH-H₂O 系溶 媒を用いる HPLC で精製を行った。1 のピークを分取後、その¹H-NMR のスペクトルデータ を解析したところ、1 および rubrosulphin (3)の混合物になっていることが明らかとなった (Figure 9C)。さらに、この混合物を MeOH 中、室温で放置したところ、1 由来のシグナルが 消失し、3 由来のシグナルのみが観測された(Figure 9D)。このことから、1 は MeOH 中で容 易に3 に変化することが明らかとなった。また、3 はこれまで A. sulphureus^{10a)}や Penicillium vieidicatum¹⁹⁾の培養抽出物から1 とともに単離されており、さらに、1 を塩基性条件下で加 熱還流すると3 へ変化することも報告されている¹⁹⁾。以上の知見と今回の検討の結果から、 3 は1 から生じた二次生成物であることが示唆された。





精製した viomellein (1) (A)および rubrosulphin (3) (B)の ¹H-NMR スペクトル。 逆相 HPLC で分取した 1 (C)およびそれを MeOH 中で放置後(D)の ¹H-NMR スペクトル。 *: Overlapping with other signals

第三節 単離した化合物 1-4 の抗菌活性

次に、単離した化合物 1-4 について、好気および低酸素培養条件における *M. smegmatis* お よび *M. bovis* BCG に対する抗菌活性を測定した(Table 2)。その結果、viomellein (1)および xanthomegnin (2)は、好気条件および潜在状態を誘導した低酸素培養条件で *M. smegmatis* に対 する MIC が 12.5-50 µg/mL と中程度から弱い活性を示した。また、*M. bovis* BCG に対する抗 菌活性をみると、2 は好気および低酸素の両培養条件において MIC が 25-50 µg/mL と *M. smegmatis* に対する抗菌活性よりも弱い活性を示した。一方、1 は *M. bovis* BCG に対する MIC が 1.56-6.25 µg/mL と *M. smegmatis* よりも強い活性を示し、好気条件と比較して潜在化した *M. bovis* BCG に対して強い活性を示す傾向が見られた。また、これまでに 1 は、*Mycobacterium* 属細菌を除く、数種類のグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して 0.3-10 µg/mL の MIC を示すことが報告されている^{11c}。しかし、好気条件および潜在状態を誘導した *Mycobacterium* 属細菌に対して抗菌活性を示すことは初めての知見となる。また、rubrosulphin (3)および asteltoxin (4)は両検定菌に対して抗菌活性を示さなかった。

Compounds	MIC (µg/mL)			
	M. smegmatis		M. bovi	is BCG
	Aerobic	Hypoxic	Aerobic	Hypoxic
1	25	50	6.25	1.56
2	12.5	12.5	25	50
3	>200	>200	>200	>200
4	>200	>200	>200	>200

Table 2 単離した化合物 1-4 の各検定菌に対する MIC

第四節 Viomellein の作用メカニズムの検討

M. bovis BCG に対して良好な抗菌活性を示した viomellein (1)は、マイコトキシンとして知られており、1 と類似構造を有し、非常に強力な毒性を示す ochratoxin A (Figure 10)と比較すると低毒性ではあるが、456 mg/kg の1 を含む餌を 10 日間マウスに与えた際に肝毒性および腎毒性を示すことが報告されている²⁰⁾。また、これまでに1 は、大腸菌を使用した、DNA 損

傷に対する SOS 応答を検出する試験である SOS ク ロモテストに 0.2 μg/mL で SOS induction factor が 1.43 (aflatoxin B1 は 0.05 μg/mL で 11.2)と弱いながら陽性 であり、遺伝毒性が示唆されている²¹⁾。以上の知見 から、1 の抗菌活性は結核菌の DNA に直接作用する



Figure 10 Ochratoxin A の化学構造

ことによると考えた。そこで筆者は、プラスミド DNA を用いて1が DNA に直接結合するか 否かを検証した。すなわち、アガロースゲル上で検出されるプラスミドのバンドパターンを、 1の添加時と非添加時で比較した。プラスミド pMV206 と1を混和後、アガロースゲル電気 泳動で展開し、紫外線照射により1を検出した結果、1はアガロースゲル上で Rf 値が 0.58 の 位置に検出された(Figure 11A)。また、プラスミドは Rf 値 0.51 および 0.41 の位置に検出され た(Figure 11B)。この時、プラスミドに1を添加しても Rf 値に変化はなかった(Figure 11C)。こ のことから、1の抗菌活性は結核菌の DNA に直接作用するものではないことが示唆された。



Figure 11 Viomellein (1)と pMV206 の結合実験

第五節 海綿 Aaptos sp.からの抗潜在性結核物質の単離

2009 年にインドネシアのクパンで採集し た海綿 Aaptos sp. (Figure 12)の MeOH 抽出物 に、M. smegmatis に対する低酸素培養条件選 択的な抗菌活性を見出した。また、これまで の探索研究により、本抽出物のアルカロイド 分配後のアルカロイド画分を M. smegmatis に対する抗菌活性を指標にして、シリカゲル



Figure 12 インドネシア産海綿 Aaptos sp.

オープンカラムクロマトグラフィで精製し、活性を示した Fr. 2、3 および 6 から新規化合物 を含む 8 種の aaptamine 類を単離していた(Figure 13, 14)²²⁾。筆者は、予試験として精製画分 について *M. bovis* BCG に対する抗菌活性を評価したところ、Fr. 2 および 3 が少なくとも好 気条件で強い抗菌活性を示すことを見出した(Figure 13)。そこで、さらに精製を進めたとこ ろ、Fr. 2 から 3-(phenethylamino)demethy(oxy)aaptamine (PDOA と略す, **5**)¹³⁾を単離した。(Figure 13, 15)。本化合物は各種 NMR および MS スペクトルデータを解析し、それらを文献値と比 較することにより同定した。



Figure 13 海綿 Aaptos sp.の MeOH 抽出物からの活性物質の精製



Figure 14 これまでに Aaptos 属海綿から単離されていた 8 種の aaptamine 類の化学構造



Figure 15 3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA, 5)の化学構造

第六節 3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine の抗菌活性

次に、*Aaptos* 属海綿から単離した PDOA (5)の抗菌活性を測定した。これまでに単離していた 8 種の aaptamine 類は、*M. bovis* BCG よりも *M. smegmatis* に対して比較的良好な抗菌活性を示していたが^{22,23}、5 は好気および低酸素の両培養条件下で *M. smegmatis* よりも *M. bovis* BCG に対して MIC が 0.78 μg/mL と強い抗菌活性を示した(Table 3)。また、5 の 3 位の置換基の異なる構造を有する b-d は、*M. bovis* BCG に対する抗菌活性が減弱していることから、3 位 phenethylamino 基が活性発現に重要であることが示唆された。

Compounds	MIC (µg/mL)			
	M. sme	gmatis	M. bov	is BCG
	Aerobic	Aerobic Hypoxic		Hypoxic
PDOA (5)	6.25	6.25	0.78	0.78
а	100	200	200	200
b	25	256.256.251.56		200
С	6.25			25
d	6.25	1.56	200	100
е	6.25	6.25	25	25
f	25	6.25	25	25
g	200	100	>200	>200
h	25	12.5	100	100

Table 3 PDOA (5)および 8 種の aaptamine 類 a-h の各検定菌に対する抗菌活性

次に、*M. bovis* BCG に対して強い抗菌活性を示した PDOA (5)について、多剤耐性結核菌 (MDR-TB)を含む各種 *M. tuberculosis* に対する抗菌活性を測定した。その結果、5 は臨床分離株を含む各種 *M. tuberculosis* にも良好な抗菌活性を示すことが明らかとなった(Table 4)。 また、既存の抗結核薬に対する交叉耐性を示さなかったことから、5 は既存の薬剤とは異な る作用機序により抗菌活性を示すことが示唆された。5 の生物活性については、これまでに、 がん細胞に対する増殖阻害活性^{13,24)}や、抗真菌活性²⁵⁾、抗ウイルス活性²⁵⁾が報告されてい るが、抗菌活性については報告されておらず、*M. tuberculosis* を含む各種 *Mycobacterium* 属 細菌に対する抗菌活性については今回が初めての知見となる。

	Strains	Drug Resistance	MIC (µg/mL)
pe	H37Rv	—	0.5-1.0
ld-ty	Erdman	—	1.0
Ň	Beijing	_	2.0
	mc ² 4977	INH	1.0
It TB	mc ² 4986	RIF	1.0
istar	mc ² 5886	OF	0.5
Drug-resi	mc ² 4914	INH, ETH	4.0
	CI5071*	INH, SM	1.0
	CI5483*	EMB, SM	2.0
	mc ² 5858	INH, RIF	0.5-1.0
MDR-TB	CK12081*	INH, RIF, SM, EMB, ETH	0.5
	KZN11*	INH, RIF, SM, EMB	0.5
_	TF275*	INH, RIF, SM, EMB, ETH, KM, PZA	0.5

Table 4 PDOA (5)の各種 M. tuberculosis に対する MIC

*: Clinically isolated strains

INH: isoniazid, RIF: rifampicin, OF: ofloxacin, ETH: ethionamide SM: streptomycin, EMB: ethambutol, KM: kanamycin, PZA: pyrazinamide

第二章 Nybomycin の標的分子解析

筆者の研究室において、海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp.の培養抽出物から、潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として見出した nybomycin (6) (Figure 16)¹⁴⁾は、*M. smegmatis* および*M. bovis* BCG に対して好気および低酸素の両培養条件下で MIC が 1.0 µg/mL と良好な抗菌活性

を示す(Table 5)¹⁵⁾。また、臨床分離株を含む各種 *M. tuberculosis* にも良好な抗菌活性を示すことが明 らかとなっていた(Table 5)。さらに、6 で処理した *M. smegmatis* の菌体が伸長するという特異な形態 変化を示すことも見出していた(Figure 17)¹⁵⁾。同様 の形態変化は、*Mycobacterium* 属細菌の Ser/Thr キ ナーゼ(*pknA、pknB*)²⁶⁾や細胞分裂に関わる遺伝子



Figure 16 Nybomycin (6)の化学構造

(ftsZ²⁷⁾、whmD²⁸⁾)を低下させた M. smegmatis 形質転換株で報告があり、また、DNA の複製 および転写阻害剤である ciprofloxacin や novobiocin で処理した大腸菌においても同様の形 態変化が報告されている²⁹⁾。これらの知見から、6の標的分子は Ser/Thr キナーゼや細胞分 裂、DNA 複製および転写に関わる分子であると予想されていた。

	MIC of nybomycin (6) (µg/mL)				
			M. tuberculosis		
_	M. smegmatis	M. bovis BCG	H37Rv	T1413*	T1538*
Aerobic	1.0	1.0	4.2	6.3	5.2
Hypoxic	1.0	1.0		—	—

Table 5 Nybomycin (6)の各種 Mycobacterium 属細菌に対する MIC

*: Clinically isolated strains



Figure 17 Nybomycin (6)で処理した M. smegmatis の形態変化

第一節 ゲノム DNA ライブラリーを利用した標的分子解析

一方、筆者の研究室では、「抗菌物質の標的分子の高発現株は、その抗菌物質に対して耐性を示す」という考えの基、ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用する標的分子解析法を構築している¹⁶⁾。すなわち、*M. bovis* BCG 由来のゲノム DNA ライブラリーで*M. smegmatis* を形質転換することにより、*M. bovis* BCG のゲノム DNA 断片をランダムに高発現する形質転換株を作成する。そして、化合物に耐性を示す形質転換株をスクリーニングし、そこに含まれる *M. bovis* BCG 由来のゲノム DNA 断片を解析することにより、化合物に耐性を付与する遺伝子領域を見出し、最終的にどの遺伝子を高発現した場合に化合物に耐性を示すかを確認することで標的分子を明らかにする方法を確立している(Figure 18)。



Figure 18 ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用した標的分子解析の概要

本法に従って、*M. bovis* BCG のゲノム DNA 断片をランダムに高発現する約 4000 株の*M. smegmatis* 形質転換株から nybomycin (6)に耐性を示す形質転換株をスクリーニングした結果、6 に耐性を示す4 株の形質転換株の取得に成功した(Strains 1-4, Figure 19)。そこで次に、 strains 1-4 からコスミドを抽出し、それらに含まれる *M. bovis* BCG 由来の遺伝子配列を解析 した。その結果、strain 1 および4 には、*M. bovis* BCG ゲノムの 686.465~716.464 kb の領域が 含まれており、strain 2 には 674.538~709.074 kb の領域が含まれていた。一方、strain 3 には、 strain 1、2 および4 とは異なる 4101.265~4130.915 kb の領域が含まれていた(Figure 20)。以上の結果から、6 に対して耐性を付与する遺伝子は、strain 1、2 および4 由来の遺伝子配列 の重複領域である 686.465 kb~709.074 kb (22.6 kb、region 1)および strain 3 由来の遺伝子配列 である 4101.265~4130.915 kb (29.7 kb、region 2)内に存在することが示唆された(Figure 20)。



Figure 19 Nybomycin (6)に耐性を示した 4 株の形質転換株(strains 1-4)



Figure 20 Nybomycin (6)に耐性を付与する 2 つの遺伝子領域

そこで筆者は、見出した 2 つの領域から無作為に選択した遺伝子領域(S1-S3)および遺伝 子(S4, S5)をクローニングし、各遺伝子領域または遺伝子を高発現する *M. smegmatis* 形質転 換株を作成した。そして、作成した各形質転換株の 6 に対する感受性を確認した結果、S1 および S3 を高発現した形質転換株が 6 に対して強い耐性を示しただけでなく、S4 および S5 を高発現した形質転換株も6に弱い耐性を示した(Figure 21)。



Figure 21 各形質転換株の nybomycin (6)に対する感受性

次に筆者は、6 に対して強い耐性を付与した遺伝子領域 S1 および S3 に含まれる遺伝子、 および 6 に対して弱い耐性を付与した遺伝子 S4 および S5 がコードするタンパク質を比較 した。しかし、いずれのタンパク質にも種類や機能に類似性が確認できなかった(Table 6)。 また、排出ポンプなどの多剤耐性に関わるタンパク質も存在していなかった。

		に含まれる遺伝子と物い間性を行与した 54 ねよい 55 の遺伝子	
Area	Gene name	Description	
S1	BCG0609c	Probable glycerol-3-phosphate dehydrogenase [nad(p)+] gpdA1	
	BCG0610c	Probable monooxygenase	
	BCG0611c	Conserved hypothetical protein	
62	BCG0621	Probable transcriptional regulatory protein (possibly arsR-family)	
33	BCG0622	Conserved hypothetical protein TB27.3	
S4	BCG3753c	Possible conserved transmembrane protein	
S5	BCG3770	2-isopropylmalate synthase leuA	

Table 6 Nybomycin (6)に対して強い耐性を付与した S1 および S3 エリア

一方で、Hiramatsu らは、6 が DNA ジャイレースの A サブユニット(gyrA)に S84L の変異 をもつ黄色ブドウ球菌に有効であるのに対し、gyrA に変異をもたない野生株には弱い抗菌 活性を示すことを明らかにしており、黄色ブドウ球菌における 6 の標的分子は、S84L の変 異をもつ gyrA としていた³⁰⁾。また、筆者の研究室では、6 の自然耐性株を利用した標的分 子解析により、6 に対する耐性に関わる遺伝子を明らかにしている¹⁵⁾。すなわち、6 に対し て 10 倍以上の耐性を示す自然耐性となった *M. smegmatis* 株を取得し、その全ゲノム配列を 解析した結果、自然耐性株には *MSMEG_6223* および *MSMEG_6471* の 2 つの遺伝子にアミ ノ酸レベルでの変異を含むことを明らかにしている。しかし、自然耐性株には、*M. smegmatis* の 2 つの gyrA (*MSMEG_0006*、*MSMEG_0456*)や菌体の形態変化に関わる pknA (*MSMEG_0030*)、 pknB (*MSMEG_5437*)、ftsZ (*MSMEG_4222*)および whmD (*MSMEG_1831*)のいずれの遺伝子に も変異は検出されていなかった。以上の結果から、6 は特定のタンパク質と結合し、その機 能を阻害することによって抗菌活性を示す化合物ではないことが示唆された。

第二節 ビオチン標識化プローブを利用した標的分子解析

そこで筆者は、nybomycin (6)はタンパク質ではなく、結核菌のゲノム DNA と結合すると 予想し、6 から調製したビオチン標識化プローブ 7 を用いて、プラスミド DNA との結合親 和性を解析することとした(Figure 22)。また、比較検討のため、ダミープローブ 8 も別途調 製した(Figure 22)。調製したプローブ分子の抗菌活性を測定した結果、7 は好気および低酸 素の両培養条件下で各検定菌に対する抗菌活性を保持していたのに対し、8 は抗菌活性を示 さなかった(Table 7)。



Figure 22 Nybomycin (6)とビオチン標識化プローブ 7 および 8 の化学構造

Table 7 Nybomycin (6)とビオチン標識化プローブ 7 および 8 の各検定菌に対する MIC

Compounds MIC (µM)				
	M. smegmatis		M. bov	is BCG
	Aerobic Hypoxic		Aerobic	Hypoxic
6	3.5	3.5	3.5	3.5
7	24	6.0	12	6.0
8	>200	>200	>200	>200

そして筆者は、調製したプローブ分子を用いてプラスミド DNA との結合能の有無を解析 した。解析に用いたプラスミドは、ゲノム DNA ライブラリーを利用した標的分子解析にお いて、6 に対して強い耐性を付与した S3 エリアを組み込んだ pMV206、耐性を付与しなか った S2 エリアを組み込んだ pMV206、およびベクターpMV206 自身を選択した。そしてプ ローブ分子とプラスミド DNA との結合能の有無を検証した結果、プローブ 7 と S3 エリア を含むプラスミドを反応させた場合、添加したプラスミドは全てプローブ 7 と結合した (Figure 23, lane 3 および 4)。また、この結合は、競合物質として isoniazid を添加した場合に は阻害されずに(Figure 23, lane 7 および 8)、6 を添加した場合には、部分的ではあるが阻害 された(Figure 23, lane 5 および 6)。一方で、ビーズ自身およびダミープローブ 8 にプラスミ ドは結合しなかった(Figure 23, lane 1 および 2、9 および 10)。





次に、S2 エリアを含むプラスミドおよびベクター自身(pMV206)を用いて、各プラスミド に対する結合親和性の比較を行った。その結果、S3 エリアを含むプラスミドでの結果とは 異なり(Figure 24, lane 5 および 6)、S2 エリアを含むプラスミドまたはベクターの場合には、 その一部がプローブ 7 と結合した(Figure 24 lane 1-4)。以上の結果から、nybomycin (6)は DNA と直接結合し、その結合には一定の DNA 配列選択性を持つことが強く示唆された。また、 6 が DNA と直接結合することで DNA の複製および転写が阻害され、ciprofloxacin や novobiocin で処理した大腸菌のように、*M. smegmatis*の菌体が伸長したと考えられる。以上 のことから、6 が結核菌のゲノムに直接結合して、DNA の複製または転写を阻害すること により抗菌活性を示すというモデルを提案した(Figure 25)。



Figure 24 Nybomycin probe (7)と各プラスミドとの結合親和性の比較



Figure 25 Nybomycin (6)の作用メカニズム

第三章 3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA)の標的

分子解析

第一節 PDOA の各種プローブ分子の抗菌活性

筆者の研究室では、第一章 第六節において、*M. bovis* BCG に対して強力な抗菌活性を示 した PDOA (5)の量的供給および標的分子解析に向けたプローブ化を目的として、5 を合成 する手法を確立しており、さらに、5 の合成中間体から側鎖部分の構造を変換した種々のア ナログ化合物の合成に成功している。そこで筆者は、合成したアナログ化合物の構造活性相 関の結果を基にして、5 の各種プローブ分子を設計・合成し、5 の標的分子解析を行うこと とした(Figure 26)。

まず、作成したプローブ分子の抗菌活性を測定した結果、標的分子をプルダウンによりア フィニティ精製することのできる 5 のビオチン標識化プローブは、7 位または 8 位からリン カーを伸ばした 9 および 10 のいずれも、好気および低酸素の両培養条件下で各検定菌に対 する抗菌活性が大きく減弱する結果となった(Table 8)。一方で、360 nm 付近の紫外線照射に より、カルベンを発生させ、標的分子を共有結合で捕捉することのできる光反応性基である トリフルオロメチルジアジリン基を 7 位に導入した光アフィニティプローブ 11 は、*M. bovis* BCG に対して、好気および低酸素の両培養条件下で MIC が 3.13-12.5 μM と抗菌活性を保持 していた(Table 8)。



Compounds	MIC (µM)				
	M. smegmatis		M. bovi	s BCG	
	Aerobic Hypoxic		Aerobic	Hypoxic	
5	25	12.5	1.56	1.56	
9	>200	>200	>200	>200	
10	>200	>200	100	100	
11	>200	>200	12.5	3.13	

Table 8 PDOA (5)および PDOA のプローブ分子 9-11 の各検定菌に対する抗菌活性

第二節 PDOAのDNAに対する結合能の検証

次に筆者は、PDOA (5)の化学構造の平面性から、5 は前述の nybomycin (6)と同様に、DNA に直接結合して抗菌活性を示していると予想した。そこで、第二章 第三節と同様にして PDOA のビオチン標識化プローブ9を用いて、5 が DNA と直接結合するか否かを検証した。 また、使用したプラスミドは nybomycin probe (7)に結合した S3 エリアを組み込んだ pMV206 を用いた。その結果、プラスミドは7 と結合したのに対し(Figure 27, Lane 1 および 2)、9 と は結合しなかった(Figure 27, Lane 3 および 4)。このことから、5 は DNA に直接結合する化 合物ではないことが強く示唆された。



Figure 27 PDOA (5)のプラスミドに対する結合能の検証

第三節 光アフィニティプローブ 11 を用いた標的分子の解析法

次に筆者は、*M. bovis* BCG に対する抗菌活性を保持していた光アフィニティプローブ PDOA 7'-diazirine probe (11)を使用して PDOA (5)の標的分子解析を行うこととした。低分子 化合物の標的分子解析法の一つに光アフィニティラベリング法による標的分子解析が知ら れている³¹⁾。本手法では、通常、対象とする低分子化合物にジアジリンや芳香族アジドなど の光反応性官能基(photoaffinity group)と、フルオレセインやローダミンなどの蛍光性官能基、 あるいはビオチンなどの標識タンパクを検出するための検出用官能基(reporter tag)を導入し たプローブ分子を調製する。そして、このプローブ分子を細胞やその破砕液に添加し、紫外 線照射により標的タンパク質を共有結合で捕捉し、さらに検出用官能基を足がかりにして 標的タンパク質を検出することができる(Figure 28)。



Figure 28 一般的な光アフィニティラベリング法による標的分子解析の概要

一方で、aaptamine は、複素環を含む3つの芳香環が縮環した特徴的な母核構造を有して おり(Figure 14)、その構造の特徴から、これまでに単離されているいくつかの aaptamine 類 は、蛍光を有することが報告されている³²⁾。そこで筆者は、5も蛍光を有していれば、光反 応性基のみをもつプローブ 11 に蛍光性官能基を導入することなく、光アフィニティラベリ ング法による標的分子解析を行うことができると考えた。すなわち、*M. bovis* BCG の菌体破 砕液に含まれる標的分子を、紫外線照射によりプローブ 11 で標識し、11 由来の蛍光を検出 することで、5 の標的分子を検出することができると考えた(Figure 29)。そこでまず、5 が蛍 光を有するか否かを検討した。その結果、5は、極大励起波長 505 nm、極大蛍光波長 555 nm の蛍光を有することが明らかとなった(Figure 30)。



Figure 29 光アフィニティプローブ 11 を使用した光アフィニティラベリング法による標的分子解析の概略



Figure 30 PDOA (5)の蛍光および励起スペクトル

第四節 光アフィニティプローブ 11 を用いるタンパク質標識条件の検討

次に、光アフィニティプローブ 11 でのタンパク質標識条件をモデルタンパク質として BSA を使用して検討した。まず、11 の必要量および検出できる BSA 量の検討を行った。 BSA を 0.1、1、または 10 μg を含む反応液(1 mL)に 11 を 50 または 100 nmol 添加し、紫外 線照射を 30 分間行った。そしてこれを SDS-PAGE で分離し、11 の蛍光を検出した。その結 果、10 μg の BSA を用いたとき、11 で標識された BSA を検出することができた(Figure 31, Lane 1, 2)。



Figure 31 プローブ 11 の必要量と検出できる BSA 量の検討
 A) 蛍光による検出、B) CBB 染色による検出

次に、紫外線の照射時間とタンパク質の標識効率の検討を行った。上述の検討をもとに 10 µg の BSA を含む反応液(1 mL)に 11 を 50 nmol 添加し、紫外線照射を 5、10、または 30 分間行った。そして 11 の蛍光を検出した結果、紫外線照射を 10 分間行った場合にプローブ 分子で標識された BSA を最も効率よく検出できることが明らかとなった(Figure 32, Lane 4)。 以上の結果から、検出に必要なプローブ分子量は 50 nmol、紫外線照射時間は 10 分間が最 適条件であると判断した。



 Figure 32
 紫外線照射時間によるプローブ 11 の標識効率の検討

 A)
 蛍光による検出、B) CBB 染色による検出

上述の検討で最も効率よく標的分子を標識できると判断した条件にて、*M. bovis* BCG から調製した菌体破砕液に対して光アフィニティラベリングを行った。その結果、*M. bovis* BCG から調製した菌体破砕液に光アフィニティプローブ 11 を添加し、紫外線照射を行った場合、約 45、40、35 および 25 kDa のタンパク質が標識された(Figure 33, Lane 3、6)。これらのタンパク質は、菌体破砕液に紫外線照射のみを行った場合(Figure 33, Lane 1、4)、および 11 を添加して、紫外線照射を行わなかった場合(Figure 33, Lane 2、5)には検出されなかった。以上の結果から、5 の標的分子はこれら4 つのタンパク質のいずれかであることが示唆された。今後は、プローブ 11 の蛍光を指標にして各種クロマトグラフィにより、標識タンパク質を精製していく予定である。



 Figure 33
 プローブ 11 で標識された PDOA (5)の標的候補タンパク質

 A) 蛍光による検出、B) CBB 染色による検出

結論

- 海洋由来真菌 Aspergillus sp.の培養抽出物から viomellein (1)および xanthomegnin (2)を 潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として見出した。特に1は、M. smegmatis よりもM. bovis BCG に対して強い抗菌活性を示すことを明らかにした。また、1の抗菌活性は、 結核菌のゲノムに直接作用するものではないことを示唆する知見を得た。
- インドネシア産海綿 Aaptos sp.の MeOH 抽出物から 3-(phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA, 5)を潜在性結核菌にも有効な抗菌物質として見出した。また、5 は、 *M. smegmatis*よりも *M. bovis* BCG に対して強い抗菌活性を示し、さらに、多剤耐性結 核菌を含む各種 *M. tuberculosis* にも良好な抗菌活性を示すことを明らかにした。
- 3) ゲノム DNA ライブラリーを利用した標的分子解析および nybomycin のビオチン標識 化プローブ 7 を用いたプルダウン実験から、nybomycin (6)は、特定のタンパク質では なく、結核菌のゲノム DNA に直接結合することにより、抗菌活性を示すことを示唆 する知見を得た。
- 4) PDOA (5)が蛍光をもつという特性を利用して、5から調製した光アフィニティプローブ11を用いて、光アフィニティラベリング法による標的分子解析を行った結果、5の標的分子候補と考えられるタンパク質の標識に成功した。

謝辞

本研究の機会を与えてくださり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研 究科天然物化学分野 恩師 小林 資正 教授に心から感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接の指導者として終始一貫して多くの有意義な御討論と 御鞭撻を賜りました 荒井 雅吉 准教授に心から感謝致します。また、実験をはじめとする 研究室での様々な場面で有益な御助言を賜りました 古徳 直之 助教に深く感謝いたしま す。

本研究を遂行するにあたり、実験の一部を担当いただきました本薬学研究科天然物化学分 野 住井 裕司 博士、韓 智秀 修士、申 多英 修士、松澤 有希 学士に深く感謝いたします。

海綿の採取にご協力いただきました Lampung University の Andi Setiawan 教授に感謝の意 を表します。また、*M. smegmatis* mc²155、*M. bovis* BCG Pasteur および *Mycobacterium* 用発現 ベクターpMV206、pMV261 を分与してくださいました Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr. 博士に感謝いたします。また、各種 *M. tuberculosis* に対する抗菌活性 を評価していただきました Albert Einstein College of Medicine の Catherine Vilchéze 博士に 感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ご助力、ご助言いただきました本薬学研究科天然物化学分野 河内 崇志 博士、伊藤 葵 修士、石田 良典 修士、戸田 和成 修士、伊藤 みなみ 学士、中 村 健彦 学士、城森 啓宏 学士、田中 駿 学士の他、大阪大学大学院薬学研究科天然物化学 分野の皆様に感謝いたします。

最後に、いかなるときも私を励まし支え、長い学生生活を温かく見守って下さいました家 族と、共に過ごした友人たちに深く感謝いたします。

実験の部

エレクトロスプレーイオン化法飛行時間型質量分析(ESI-TOF-MS)は、Waters 製 Q-Tof Ultima を用いて測定し、溶媒として MeOH を用いた。核磁気共鳴スペクトル(¹H-NMR およ び¹³C-NMR)は、バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド製 Varian unity inova 600 (¹H: 600 MHz および¹³C: 150 MHz)または JEOL RESONANCE 製 ECA-500 (¹H: 500 MHz および ¹³C: 125 MHz)を用いて測定し、CDCl₃を内部標準とし、chemical shift は δ (ppm)、結合定数 は J = (Hz)で表示した。また、¹H-NMR における分裂様式は、singlet、doublet、triplet、 doubledoublet、doubletriplet、および multiplet をそれぞれ s、d、t、dd、dt、および m に、broad は br と略して記載した。

赤外吸収スペクトル(IR spectrum)は日本分光製フーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-4600 を用いて測定した。

薄相クロマトグラフィ(TLC)は、Merck 製 TLC Silica gel 60 F₂₅₄および HPTLC Silica gel 60 RP-18 WF₂₅₄S を使用し、スポットの検出は UV 照射下(254 nm および 365 nm)における発色の 有無を確認した後、5% 12-molybdo(VI)phosphoric acid, n-hydrate EtOH reagent または *p*-methoxybenzaldehyde (anisaldehyde)・sulfuric acid reagent を噴霧し、加熱により発色を確認した。

カラムクロマトグラフィの担体は、関東化学株式会社製 Silica Gel 60N (63-210 µm)、Nacalai tesque 製 Cosmosil 75C₁₈-OPN および GE Healthcare 製 Sephadex LH-20 を使用した。また、高 速液体クロマトグラフィ(HPLC)には、日立製作所製 L-2130 (UV-detector: L-2400H)または L-6000 (UV-detector: L-4000H)を使用した。順相カラムは Nacalai tesque 製 Cosmosil 5SL-II (10 mm i.d. × 250 mm)を使用し、逆相カラムは Nacalai tesque 製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm i.d. × 250 mm)、Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10 mm i.d. × 250 mm)、および資生堂製 Capcellpak MG-II (10 mm i.d. × 250 mm)を使用した。

ロータリーエバポレーターには、BÜCHI 製 R-210 (vacuum controller: V-850)または R-200 (vacuum controller: V-800)を使用し、遠心エバポレーターには、EYELA 製 CVE-200D を使用した。凍結乾燥機には IWAKI 製 FRD-50P を使用し、真空ポンプは ULVAC 製 GCD-136X を 使用した。

高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)はトミー精工製 BS-325 およびヤマト化学株式会社製 SN500を使用した。多本架冷却遠心機はトミー精工製 LX-120、高速遠心機はトミー精工製 RX-200を使用した。超低温フリーザーは三洋電機株式会社製 MDF-U537、MDF-U33V また はパナソニックヘルスケア株式会社製 MDF-C8V1 を使用した。高純度精製水は Milipore 製 Direct-Q UV を使用した。実験における pH の調製には堀場製作所製 D-12 を使用した。

P2 実験室の安全キャビネットは日本医化器機製作所製 VH-1300 BH-2A および三洋電機株式会社製 MHE-130A を使用した。液体培養は TAITEC 製 BR-23FP、寒天培養には三洋電機株式会社製 MIR-262 を使用した。低酸素実験用培養チャンバーには三菱社製アネロパッ

ク角型ジャーを使用した。Mycobacterium 属細菌の破砕には SONICS 製 VC750 にテーパー マイクロチップ 1/4 インチ(6 mm)を接続したものを使用した。海洋由来微生物用のクリーン ベンチは、三洋電機株式会社製 MCV-B131F を使用し、振盪培養には TAITEC 製 BR-40LF を使用し、静置培養には New Brunswick Scientific 製 G-25R を使用した。

吸光マイクロプレートリーダーは、Molecular Devices 製 SpectraMax 190 または SpectraMax M5e を使用し、オペレーションソフトウェアは Soft Max Pro を用いた。PCR には PERKIN ELMER 製 Gene Amp PCR System 2400 を使用した。エレクトロポーレーションには BIO-RAD 製 Gene Pulser X cell total system を使用した。アガロースゲル電気泳動用の泳動漕は ADVANCE 製 Mupid-2plus を使用した。DNA の濃度測定用の分光光度計には、GE Healthcare 製 GeneQuant 100 を使用した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の泳動漕には、日本 エイドー社の NA-1011 を使用し、また、パワーサプライには、BIO CRAFT 製 BP-9 または BP-T5 を使用した。蛍光の検出および EtBr で染色したプラスミド DNA の検出には、GE Healthcare 製 LAS4010 を使用した。光アフィニティプローブのクロスリンク用 UV 照射ラ ンプには、UVP 製 BLAK-RAY B-100A を使用した。

第一章 第一節に関する実験

• 使用菌株

Mycobacterium smegmatis mc²155 および Mycobacterium bovis Bacille de Calmette et Guérin (BCG) Pasteur は Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr.博士より分与して 頂いた。また、M. smegmatis および M. bovis BCG は Cryo Tube™ Vials (nunc)中で最終濃度が 25% となるように glycerol と混和し、超低温フリーザー(-80 °C)で保存した。

<u>Mycobacterium</u> 属細菌保存用培地 50% glycerol aq.の調製

Glycerol (キシダ化学)の最終濃度が50%となるように高純度精製水に溶解させ、polystyrene sterile filter (Corning)を用いて濾過滅菌を行った。

・ 菌株培養用培地の調製

1) Mycobacterium 属細菌培養用液体培地

1a) M. smegmatis 用 Middlebrook 7H9 液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 1 L に溶解させ 121 ℃、2 気圧の条件下で 20 分間高圧蒸気滅菌を 行った。室温に冷却後、B を添加し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Difco TM Middlebrook 7H9 Broth	4.7	g	BD
	Glycerol	2.0	mL	キシダ化学
B:	20% NaCl aq.	2.0	mL	キシダ化学
	20% Glucose aq.	10.0	mL	nacalai tesque
	20% Tween 80 aq.	2.5	mL	nacalai tesque

試薬 B で使用した 20% NaCl aq.、20% glucose aq.および 20% Tween 80 aq.は各試薬を高純 度精製水に溶解し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌することにより調製した。以下、 これらの試薬を使用する場合には、同様に調製したものを用いた。

1b) <u>M. bovis BCG 用 Middlebrook 7H9 液体培地の調製</u>

試薬 A を高純度精製水 900 mL に溶解させ、121 ℃、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気 滅菌を行った。室温に冷却後 B を添加し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行っ た。

A:	Difco TM Middlebrook 7H9 Broth	4.7	g	BD
	Glycerol	2.0	mL	キシダ化学
B:	Difco TM Middlebrook OADC Enrichment	100	mL	BD
	20% Tween 80 aq.	2.5	mL	nacalai tesque

2) Mycobacterium 属細菌培養用寒天培地

2a) <u>M. smegmatis</u>用 Middlebrook 7H10 寒天培地の調製

試薬 A を高純度精製水 1 L に溶解後 121 ℃、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。約 50 ℃ に冷却後、シャーレに 35 mL 流し入れ、室温で放置することにより固化させた。また、必要に応じて 50 mg/mL に高純度精製水で溶解し、濾過滅菌した kanamycin (Wako) または hygromycin B (invitrogen)をそれぞれ終濃度 20 μ g/mL または 50 μ g/mL になるように シャーレに流し入れる前に添加し、使用した。

A:	Difco TM Middlebrook 7H10 Agar	19	g	BD
	Glycerol	5.0	mL	キシダ化学

2b) <u>M. bovis BCG 用 Middlebrook 7H10 寒天培地の調製</u>

試薬 A を高純度精製水 900 mL に溶解後 121 ℃、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅 菌した。約 50 ℃ に冷却後、B を添加し、シャーレに 35 mL 流し入れ、室温で放置すること により固化させた。

A:	Difco TM Middlebrook 7H10 Agar	4.7	g	BD
	Glycerol	5.0	mL	キシダ化学
B:	Difco TM Middlebrook OADC Enrichment	100	mL	BD

抗菌活性測定用試薬と細菌数の計測数

1) MTT solution の調製

3-(4,5-Di<u>m</u>ethyl-2-<u>t</u>hiazoyl)-2,5,-diphenyl<u>t</u>etrazolium bromide (MTT) (TCI)を高純度精製水に5 mg/mL になるように溶解した後、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

2) <u>細菌数の計測</u>

M. smegmatis および *M. bovis* BCG の菌数の計測は、分光光度計用石英セル(三和理研株式 会社)を用いて、UV-2425 (株式会社島津製作所)により 600 nm での吸光度を測定することに より行った。そして、吸光度 1.0 を 1×10⁸ CFU/mL とみなして菌数を算出した。

・ M. smegmatis および M. bovis BCG に対する抗菌活性の評価法

1) <u>M. smegmatis</u> に対する抗菌活性の評価法

9 mL の *M. smegmatis* 用 Middlebrook 7H9 液体培地を含む square media bottle (NALGENE) に、-80 °C で凍結保存した *M. smegmatis* 1 mL を植菌し、37 °C で 24 時間振盪培養(95 rpm)を行った。次に菌液を 7H9 液体培地で 10 倍希釈し、UV 検出器を用いて菌数を算出した後、1×10⁵ CFU/mL に希釈し、これを 100 μL ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した(1×10⁴ CFU/100 μL/well)。その後、被検薬物を添加し、37 °C で 36 時間培養した。培養後、MTT

solution 10 μL を加え、さらに 12 時間培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸 光度を測定することで生存菌数を算出し、MIC を求めた。

2) <u>M. smegmatis</u> に対する低酸素条件下での抗菌活性の評価法

M. smegmatis 用 Middlebrook 7H9 液体培地で培養した菌液 1 mL を 9 mL の *M. smegmatis* 用 Middlebrook 7H9 液体培地を含む square media bottle に植菌した後、蓋を緩めた状態で低酸素 培養チャンバーに入れ、チャンバー内を窒素で 15 分間置換後、0.2%濃度になるよう酸素を 注入し、37 °C で 72 時間振盪培養した。こうして低酸素条件下で前培養した菌液を 7H9 液体培地で 10 倍希釈し、UV 検出器を用いて菌数を算出した後、1×10⁵ CFU/mL に希釈し、これを 100 μ L ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した(1×10⁴ CFU/100 μ L/well)。その後、 被検薬物を添加し、マルチウェルプレートを低酸素培養チャンバーに入れ、低酸素条件下、 37 °C で 96 時間培養した。培養後、MTT solution 10 μ L を加え、さらに 12 時間低酸素条件 下で培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌数を 算出し、MIC を求めた。

3) M. bovis BCG に対する抗菌活性の評価法

9 mL の *M. bovis* BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地を含む square media bottle に、-80 °C で 凍結保存した *M. bovis* BCG 1 mL を植菌し、37 °C で 1 週間振盪培養(95 rpm)を行った。次に 菌液を 7H9 液体培地で 10 倍希釈した後、UV 検出器で 600 nm の吸光度を測定し、菌数を算 出し、1×10⁶ CFU/mL に希釈後、100 μ L ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した(1×10⁵ CFU/100 μ L/well)。その後、被検薬物を添加し、37 °C で 1 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μ L を加え、さらに 24 時間培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度から 生存菌数を算出し、MIC を求めた。

4) <u>M. bovis BCG に対する低酸素条件化での抗菌活性の評価法</u>

M. bovis BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地により培養した菌液 1 mL を 9 mL の *M. bovis* BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地を含む square media bottle に植菌した後、蓋を緩めた状態 で低酸素培養チャンバーに入れ、チャンバー内を窒素で 15 分間置換後、0.2%濃度になるよ う酸素を注入し、37 °C で 1 週間振盪培養した。こうして低酸素条件下で前培養した菌液を 7H9 液体培地で 10 倍希釈し、UV 検出器を用いて菌数を算出した後、1×10⁶ CFU/mL に希釈 し、これを 100 μ L ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した(1×10⁵ CFU/100 μ L/well)。 その後、被検薬物を添加し、マルチウェルプレートを低酸素培養チャンバーに入れ、低酸素 条件下、37 °C で 2 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μ L を加え、さらに 24 時間低酸素 条件下で培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌 数を算出し、MIC を求めた。

• 海洋由来真菌用培地

1) MG 寒天培地の調製

試薬 A を人工海水(マリンアート SF-1, 富田製薬)に溶解させ 121 ℃、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。約 50 ℃ に冷却後、シャーレに 35 mL 流し入れ、室温で放置 することにより固化させた。

A:	Malt extract	2.0	%	nacalai tesque
	Glucose	2.0	%	nacalai tesque
	Bacto TM peptone	0.1	%	BD
	Agar	2.0	%	nacalai tesque
	人工海水(マリンアート SF-1)			富田製薬

2) <u>MG 液体培地の調製</u>

試薬 A を人工海水(マリンアート SF-1)に溶解させ 121 ℃、2 気圧の条件下で 20 分間高圧 蒸気滅菌した。

A:	Malt extract	2.0	%	nacalai tesque
	Glucose	2.0	%	nacalai tesque
	Bacto TM peptone	0.1	%	BD
	人工海水(マリンアート SF-1)			富田製薬

3) 米固体培地の調製

試薬 A を 500 mL マイヤーに入れ、121 ℃、2 ∮	気圧の条件下で 20 分間高圧蒸気滅菌した
---------------------------------	-----------------------

A:	玄米	25	g	
	人工海水(マリンアート SF-1)	50	mL	富田製薬

・ 海洋由来真菌の保存

<u>真菌保存溶液の調製</u>

試到	集 A を高純度精製水に溶解させ 121 ℃	、2 気圧の条件	下でご	20 分間高圧蒸気滅菌した。
A:	Bacto TM soytone	0.2	%	BD
	Yeast extract dried	0.2	%	nacalai tesque
	Soluble Starch	0.5	%	nacalai tesque
	Glucose	1.0	%	nacalai tesque
	Glycerol	20	%	キシダ化学

2) 海洋由来真菌の保存方法

MG 寒天培地に生育したコロニーを滅菌ループで寒天培地ごとくり抜き、500 μL の真菌 保存溶液を含むクライオチューブ(nunc)へ入れた。これを液体窒素チャンバーに入れ、凍結 後、超低温フリーザー(-80 °C)で保存した。

第一章 第二節に関する実験

海洋由来真菌 Aspergillus sp.からのナフトキノン類(1-3)および asteltoxin (4)の単離

2014 年にインドネシアのアチェで採集した海綿 14E28 より分離した Aspergillus 属真菌 14E28_2-2 株の培養抽出物に、*M. bovis* BCG に対して、好気条件で MIC=50 μg/mL、低酸素 条件で MIC=50 μg/mL の抗菌活性を見出した。

そこで、凍結保存した菌株を MG 寒天培地に塗布し、コロニーを形成するまで 30 ℃ で静 置培養した。そして MG 寒天培地上にコロニーを形成した真菌を、10 mL の MG 液体培地 を含む試験管に植菌し、30 ℃で1週間振盪培養した。これを米固体培地(25g×10)に植菌 し、さらに 30 ℃ で 2 週間静置培養した。得られた培養物を acetone で 2 回抽出し、残渣を さらに混合溶媒(EtOAc:MeOH:acetone = 1:2:4)で抽出し、acetone 抽出物と合わせ、37 ℃で減 圧濃縮した。得られた抽出物(39g)に H2O および EtOAc を加えて溶媒間分配を行い、得られ た EtOAc 抽出物(9.3 g)をさらに n-hexane と 90% MeOH aq. で溶媒間分配し、 90% MeOH aq. 抽出物(5.2g)を得た。本抽出物の M. bovis BCG に対する抗菌活性は、好気条件で MIC = 3.13 µg/mL、低酸素条件で MIC = 6.25 µg/mL であった。活性の認められた 90% MeOH aq.抽出物 をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(CHCl₃:MeOH:H₂O = 100:3:1 → 6:4:1 → MeOH)で分 画し、Fr. 1~Fr. 8 を得た。また、各画分の M. bovis BCG に対する抗菌活性を測定した結果、 Fr. 5 および 6 がそれぞれ、好気条件で 2.5 および 20 µg/mL の MIC、低酸素条件で 2.5 およ び 20 μg/mL の MIC を示した。次に活性が認められた Fr. 5 (1.3 g)を順相 HPLC (Cosmosil 5SL-II, 10 mm i.d. \times 250 mm, CHCl₃:toluene:AcOH = 70:30:1, flow rate = 2.35 mL/min, detection UV = 280 nm)により精製し、Fr. 5-1~Fr. 5-6 を得た。得られた各画分について ¹H NMR スペクト ルを解析した結果、Fr. 5-1、5-2 およびには、それぞれ viomellein (1)¹⁰、rubrosulphin (3)¹⁰お よび xanthomegnin (2)¹¹⁾が主成分として含まれていることが明らかとなった。そこで、Fr. 5-1 (30.3 mg)を Sephadex LH-20 (CHCl₃)で精製を行い、viomellein (1) (11.5 mg)を得た。また、 Fr. 5-3 (17.4 mg) を逆相 HPLC (Cosmosil 5C18-AR-II, 10 mm i.d. × 250 mm, MeCN:H2O = 60:40, flow rate = 2.5 mL/min, detection UV = 220 nm)で精製し、xanthomegnin (2) (4.8 mg)を得た。さ らに、Fr. 5-2 (13.0 mg)を MeOH-CHCl3 (= 2:1)で再結晶することにより、rubrosulphin (3) (1.5 mg)を得た。一方、Fr. 6 (0.5 g)は、逆相 HPLC (Cosmosil 5C18-MS-II, 10 mm i.d. × 250 mm, MeOH:H₂O = 60:40, flow rate = 1.7 mL/min, detection UV = 220 nm)で精製した。その結果、 asteltoxin (4)¹²⁾ (230 mg)および微量の viomellein (1)を単離した。各化合物は、各種 NMR およ

び MS スペクトルデータを解析し、それらを文献値と比較することにより同定した。

Viomellein (1): Red solid. ESI-TOF-MS m/z: 583 [M+Na]⁺.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 13.90 (1H, s), 13.50 (1H, s), 9.81, (1H, s), 7.52 (1H, s), 6.97 (1H, s), 6.67 (1H, s), 4.79 (1H, m), 4.64 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.01-3.04 (4H, m), 1.58^a a) Overlapping with other signals

Xanthomegnin (2): Brown solid. ESI-TOF-MS *m*/*z*: 597 [M+Na]⁺.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 13.18 (1H, s), 7.50 (1H, s), 4.68 (1H, m), 4.16 (3H, s), 3.06-3.03 (2H, m), 1.56^a

a) Overlapping with other signals

Rubrosulphin (**3**): Red crystal. ESI-TOF-MS *m*/*z*: 551 [M+Na]⁺. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 13.44 (1H, s), 12.85 (1H, s), 7.68 (1H, s), 7.09 (1H, s), 6.96 (1H, s), 4.81 (1H, m), 4.71 (1H, m), 4.17 (3H, s), 3.07 (4H, m), 1.58^a a) Overlapping with other signals

Asteltoxin (**4**): Yellow solid. ESI-TOF-MS *m*/*z*: 441 [M+Na]⁺, 859 [2M+Na]⁺. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.18 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.9 Hz), 6.64 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.8 Hz), 6.51 (1H, dd, *J* = 14.5, 10.8 Hz), 6.41 (1H, dd, *J* = 14.5, 10.9 Hz), 6.38 (1H, d, *J* = 15.2 Hz), 5.51 (1H, s), 5.29 (1H, s), 4.75 (1H, m), 4.31 (dd, *J* = 7.7, 4.9 Hz), 3.83 (3H, s), 3.73 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 1.97 (3H, s), 1.80 (1H, br s), 1.57 (2H, m), 1.39 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.06 (3H, t, *J* = 7.4 Hz)

第一章 第三節に関する実験

・ 単離した化合物の抗菌活性評価

第一章 第二節で単離した4種の化合物の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する活 性評価は第一章 第一節と同様にして行った。

第一章 第四節に関する実験

試薬等

Mycobacterium 用発現ベクターpMV206 は Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr.博士より分与して頂いたものを使用し、GeneQuant 100 (GE Healthcare)を使用して DNA 濃度を測定した。

1) <u>TE buffer</u>

	最終濃度				
Tris-HCl (pH 8.0)	10	mМ	Wako		
EDTA	1	mМ	同仁化学		

• アガロースゲル電気泳動

ゲルの作成には agarose (cambrex)を用い、0.8% (w/v)となるように泳動液と混合後溶解して用いた。泳動液には 50×TAE buffer (nacalai tesque)を高純度精製水により 50 倍希釈したものを用いた。

Viomellein (1)とプラスミド DNA の結合実験

300 ng の pMV206 を含む TE buffer 10 µL に viomellein (1)を添加し、室温で 30 分間転倒混 和した。混和後、ここに 6×loading dye (NEB) 2 µL 添加し、アガロースゲル電気泳動で展開 した。展開後のゲルについて、まず、LAS4010 を使用して 1 を検出した。つぎに、プラスミ ド DNA を EtBr (nacalai tesque)により染色し、LAS4010 を使用して検出した。1 およびプラ スミド DNA の Rf 値は画像編集ソフト Adobe Photoshop を使用して算出した。

第一章 第五節に関する実験

インドネシア産海綿 Aaptos sp.からの 3-(phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (5)の単離
 2009 年にインドネシアのクパンで採取した海綿 Aaptos sp. 09C21 の MeOH 抽出物に、M.
 smegmatis に対して好気条件で MIC 200 µg/mL、低酸素条件で MIC 100 µg/mL の抗菌活性を
 見出した。

これまで、当研究室における本抽出物からの抗潜在性結核物質の探索研究により、1種の新 規化合物を含む8種の aaptamine 類を単離・構造決定していた²²⁾。すなわち、本抽出物(32g) を出発材料として、塩酸酸性(pH 2)条件下で EtOAc と H₂O 画分に分配し、得られた水層を中 和後、これに EtOAc を加え分配を行い、得られた EtOAc 画分をアルカロイド集約画分とし た。そして、得られたアルカロイド集約画分(2g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1% TEA を含む CHCl₃:MeOH:H₂O = 100:3:1 → 65:3:1 → 30:3:1 → 15:3:1 → 6:4:1 → MeOH)で Fr. 1~8 に分画した。このうち、活性を示した Fr. 2 [MIC (µg/mL) = aerobic: 6.25, hypoxic: 3.13] から、demethyl(oxy)aaptamine (b)および 2-methoxy-3-oxoaaptamine (e)を、Fr. 3 [MIC (µg/mL) = aerobic: 6.25, hypoxic: 3.13]から、3-(methylamino)demethyl(oxy)aaptamine (d)、2,3-dihydro-2,3dioxoaaptamine (f)、 8,9,9-trimethoxy-9*H*-benzo[*de*][1,6]naphtyridine (g) および 10-methoxybenzimidazo[6,7,1-*def*][1,6]naphtyridine (h)を、さらに Fr. 6 [MIC (µg/mL) = aerobic: 1.75, hypoxic: 12.5]から、aaptamine (a)および 3-aminodemethyl(oxy)aaptamine (c)を単離していた。

筆者は、本精製画分に *M. bovis* BCG に対して強い抗菌活性を示す物質が含まれているこ とを見出し、活性の見られた Fr. 2 を、逆相 HPLC (Capcellpak MG-II, 10 mm i.d. × 250 mm, 40% MeOH \rightarrow 100% MeOH for 30 min, flow rate = 3.0 mL/min, detection UV 220 nm)で精製し、 3-(phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (5)¹³ (1 mg)を単離した。本化合物は各種 NMR お よび MS スペクトルデータを解析し、それらを文献値と比較することにより同定した。

3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (5) : Orange solid.

ESI-TOF-MS m/z: 354 [M+Na]⁺, 685 [2M+Na]⁺.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8.74 (1H, d, *J* = 4.4 Hz), 8.39 (1H, s), 7.45 (1H, d, *J* = 4.4 Hz), 7.34 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.28^a, 7.02 (1H, m), 6.61 (1H, s), 3.96 (3H, s), 3.80 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.11 (2H, *t*, J = 7.0 Hz)

a) Overlapping with other signals

第一章 第六節に関する実験

・ 単離した化合物の抗菌活性評価

Aaptos 属海綿より単離した PDOA (5)の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する活性評価は、第一章 第一節と同様にして行った。また、5 の各種 *M. tuberculosis* に対する活性評価は、Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr.博士および Catherine Vilchéze 博士に評価していただいた。

第二章 第一節に関する実験

試薬、菌株等

Mycobacterium 用発現ベクターpMV206、pMV261 は Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr.博士より分与して頂いたものを使用した。*Escherichia coli* DH5α のコン ピテントセルは、TOYOBO より購入したものを使用した。

1) <u>10% Glycerol + Tween 80 溶液の調製</u>

試薬 A に高純度精製水を加えて 1L になるよう混和し、polystyrene sterile filter を用いて濾 過滅菌を行った。

A:	Glycerol	100	mL	キシダ化学
	20% Tween 80 aq.	2.5	mL	nacalai tesque

· 菌株培養用培地

1) <u>Mycobacterium</u> 属細菌培養用培地

M. smegmatis および *M. bovis* BCG の培養に用いた培地および培養条件は、第一章と同様 に行った。

2) Luria-Bertani (LB)液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水に溶解させ、121 °C、2 気圧の条件下で 20 分高圧蒸気滅菌して用 いた。また、*M. smegmatis* の形質転換を行う場合には、これに Tween 80 を終濃度 0.2%にな るよう添加し、濾過滅菌したものを使用した。さらに、必要に応じて高純度精製水で溶解し、 濾過滅菌した hygromycin B、kanamycin もしくは ampicillin (nacalai tesque)を、それぞれ終濃 度 100 μ g/mL、40 μ g/mL もしくは 100 μ g/mL になるよう添加し、使用した。

A:	Tryptone	1.0	%	nacalai tesque
	Yeast extract dried	0.5	%	nacalai tesque
	NaCl	1.0	%	キシダ化学

3) Luria-Bertani (LB) 寒天培地の調製

試薬 A を高純度精製水に溶解させ、121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。約 50 °C に冷却後、シャーレに 35 mL 流し入れ、室温で放置することにより固化させた。また、必要に応じて高純度精製水で溶解し、濾過滅菌した hygromycin B、kanamycin もしくは ampicillin を、それぞれ終濃度 150 μ g/mL、40 μ g/mL もしくは 100 μ g/mL になるようにシャーレに流し入れる前に添加し、使用した。

A:	Tryptone	1.0	%	nacalai tesque
	Yeast extract dried	0.5	%	nacalai tesque
	NaCl	1.0	%	キシダ化学
	Agar	2.0	%	nacalai tesque

・ ゲノム DNA ライブラリーを利用した nybomycin (6)の標的遺伝子候補領域の解析

1) <u>M. bovis BCG ゲノム DNA ライブラリーによる M. smegmatis</u>の形質転換

野生型の*M. smegmatis*を*M. smegmatis*用Middlebrook 7H9液体培地でOD₆₀₀が0.8~1.0程度に なるまで振盪培養した。続いてその菌液10 mLを100 mLの0.2% Tween 80を含むLB液体培地 に添加し、37 °Cで24時間振盪培養した。培養後、菌体を3000 rpmで20分間遠心処理し、得ら れたペレットを10% glycerol + Tween 80溶液で3回洗浄した後、全菌体を5 mLの10% glycerol + Tween 80溶液に懸濁した。こうして得られた菌液を350 μLとり、氷上で冷やしておいた Gene Pulser[®] Cuvette (0.2 cm electrode gap, BIO-RAD)に移した。そして1.5 μLの*M. bovis* BCG ゲノムDNAライブラリーを添加し、2500 V, 25 μF, 1000 Ωの条件でエレクトロポレーション 後、ただちに氷中で3分間冷却した。続いて、850 μLの7H9液体培地を加え、37 °Cで4時間振 盪培養した。培養後、hygromycin Bを50 μg/mL含む*M. smegmatis*用Middlebrook 7H10培地で5 日間培養することで、約4000株の形質転換株を得た。

2) ゲノム DNA ライブラリー形質転換株からの nybomycin 耐性株の選択

前述の方法により得られた約 4000 株の形質転換株を、1 株ずつ hygromycin B を 50 µg/mL 含む寒天培地および nybomycin (6)を 2.4 µg/mL 含む寒天培地に分離、塗布し、両プレート上 で生育する形質転換株をスクリーニングした。選択した形質転換株については、再度 hygromycin B プレートより 4 µg/mL の 6 を含むプレートに塗布し、耐性を示すことを確認 した。また、得られた耐性株は hygromycin B を含む Middlebrook 7H9 培地で培養後、-80 °C で保存した。

3) Nybomycin 耐性形質転換株からのコスミド DNA の分離

前述した nybomycin 耐性株を hygromycin B を含む LB 培地 10 mL 中で OD₆₀₀ が 0.8~1.0 程 度になるまで 37 °C で震盪培養した後、それらを 190 mL の *M. smegmatis* 用 Middlebrook7H9 培地に添加し、さらに 48 時間振盪培養を行うことでコスミド抽出用の菌液とした。コスミ ド DNA の分離には QIAGEN プラスミド抽出キッド(QIAfilter Plasmid Maxi kit 10)を使用し、 そのプロトコールに従いコスミドを抽出した。最終的にカラムより溶出させたコスミド DNA を含む溶出液 15 mL を 10.5 mL の 2-propanol で沈殿させ、70% EtOH 25 mL で洗浄し、 風乾させた後、250 µL の 0.5×TE buffer (Wako)に溶解した。

4) <u>コスミド DNA のシーケンス解析</u>

コスミド DNA のシーケンス解析は、primer として pYUB145_F (5'-GTACGCCACCGCCT GGTTC-3')および pYUB145_R (5'-GTGCCACCTGACGTCTAAG-3')を使用し、コスミドベク ターpYUB145 に含まれるゲノム DNA の両末端の配列解析を行った。またシーケンシング は Mcrogen Inc. (korea)に委託した。得られたシーケンス結果は、GenoList Genome Browser の ゲノムデータベース(http://genolist.pasteur.fr/BCGList/)上で blast 検索を行い導入されていた *M. bovis* BCG ゲノムの領域を決定した。

・ 各遺伝子領域または遺伝子高発現 M. smegmatis 形質転換株の作成

1) <u>M. bovis BCG ゲノム DNA の調製</u>

M. bovis BCG の培養液(10 mL)を、3000 rpm で 15 分間遠心分離後、ペレットを buffer P1 (QIAGEN) 1 mL で 1 回洗浄した。洗浄後、10 mg/mL の lysozyme (SIGMA)を含む buffer P1 500 µL に懸濁し、37 °C で一晩加温した。翌日 10% SDS 100 µL および 10 mg/mL の protainase K (QIAGEN)を含む 5% SDS 25 µL を加え、55 °C で 40 分間加温した。次に 65 °C に温めた 5M NaCl 200 µL および 65 °C に温めた cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB, SIGMA) 160 µL を添加し、さらに 65 °C で 10 分間加温した。次に CHCl₃:isoamylalcohol = 24:1 に調製し た溶液 1 mL を加え、転倒混和した後、3000 rpm で 15 分間遠心分離した。水相を分取し、 その水相に、2-propanol 1 mL を加えて転倒混和後、析出したゲノム DNA を先を丸めたパス ツールピペットですくい取り、70% EtOH で洗浄した。得られたゲノム DNA を滅菌精製水 50 µL に溶解し、4 °C で一晩放置し、その後、-20 °C で保存した。PCR にはこれを滅菌精製 水で 100 倍希釈したものを Template として用いた。

2) <u>プライマーの設計</u>

PCR Gene Area Primer name Sequences (5'-3') length Condition name NyArea1_F2_KpnI GGTACCGTTCGGTGAACAGCCCAAG **S**1 KpnI 3.6 kb A, B AAGCTTCGTTGTGCGGACATCACC NyArea1_R_HindIII area HindIII NyArea5_F_KpnI GGTACCAACGGGTGACCGTGAACTG **S**2 KpnI 4.2 kb A, C ATCGAT TCGATGCGTCGGCAGTC NyArea5_R_ClaI area ClaI NyArea6_F_XbaI TCTAGACGTTTGGCCACCTGGTAGC **S**3 XbaI 2.4 kb A, B ATCGATCCGGGATGCTCCCTATTGC NyArea6_R_ClaI area ClaI

PCRには、以下のプライマーを用いた。また、プライマーの合成は北海道システム・サイ エンス社に委託した。

Area	Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR Condition
nume	B 3753c F HindIII	AAGCTTTGCGCAGGGTGGAC	length	Condition
S4 area		HindIII	1.0.1-1-	A D
54 area	B_3753c_R_HpaI	GTTAACGTCGTGTCGCGAGTTTC	1.0 KD	А, Б
		HpaI		
	B_leuA_F_HindIII	AAGCTTACCATCCCGGAGCAAC		
S5 area		HindIII	2.6 lsh	DE
S5 alea	B_leuA_R_HpaI	GTTAACTCATGCCGCGGACC	2.0 KU	D, E
		HpaI		

3) <u>PCR</u>

PCR には、Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System, dNTPack (Roche)を主に用いた。また PCR のテンプレートには *M. bovis* BCG より調製したゲノム DNA を用いた。PCR は A の条件で 試薬を分注し、B または C の温度設定で行った

A:	primer_forward	1.0 µL		Temperature	time	cycle
	primer_reverse	1.0 µL	B:	94 °C	5 min	1
	Template	1.0 μL	-	94 °C	15 sec	
	5×buffer	10 µL		57 °C	30 sec	30
	10 mM dNTPs	1.5 μL		68 °C	2.5 min	
	DMSO	1.0 μL		68 °C	10 min	1
	Polymerase	0.5 μL	C:	94 °C	5 min	1
	H ₂ O	34 µL	-	94 °C	15 sec	
	total	50 µL		55 °C	30 sec	30
				68 °C	3 min	
			-	68 °C	10 min	1

S5 エリアの PCR には Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase (NEB)を用いた。D の条件で試薬 を分注し、E の温度設定で行った。

-				
D:	primer_forward	1.0 μL		Tem
	primer_reverse	1.0 μL	E:	9
	Template	1.0 μL		9
	5×buffer	10 µL		6
	10 mM dNTPs	1.0 μL		7
	GC Enhancer	10 µL		7
	Polymerase	0.5 μL		
	H ₂ O	25.5 μL		
	total	50 μL		

	Temperature	time	cycle
E:	98 °C	1 min	1
	98 °C	10 sec	
	63 °C	20 sec	30
	72 °C	80 sec	
	72 °C	2 min	1

4) <u>PCR 産物の精製</u>

PCR の反応液をそれぞれ電気泳動し、各 PCR 産物を agarose ゲルより切り出した。切り 出したゲルブロックは、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)により、以下の手順でゲルか ら溶出し、精製した。まずゲルブロックを 15 mL の遠沈管に移し、Buffer QC 600 µL を添加 後、50 °C で 10 分間加温することによりゲルブロックを溶解した。次に 2-propanol 200 µL を 添加し転倒混和した後、QIAquick スピンカラムに共し、12000 rpm で 1 分間遠心することに よりカラムに PCR 産物を吸着させた。次にスピンカラムに Buffer QC 600 µL を添加して 12000 rpm で 1 分間遠心分離した。さらにスピンカラムに Buffer PE 750 µL を添加後 3~4 分 間室温で放置し、12000 rpm で 1 分間の遠心分離を 2 回行うことにより PCR 産物を洗浄し た。最後に 20~50 µL の滅菌蒸留水を加えて 5 分間室温で放置し、12000 rpm で 1 分間遠心

5) PCR 産物のシーケンシングベクターへのクローニング

得られた PCR 産物は、TArget Clone[™]-Plus- (TOYOBO)を使用して TA クローニングを行った。S5 エリアの PCR 産物については、PCR 産物が平滑末端であるため、ライゲーション を行う前に 3'末端に dA を付加した。

A:	PCR 産物	10.8	μL
	10×Buffer	1.8	μL
	25 mM MgSO ₄	0.8	μL
	2 mM dNTPs	1.8	μL
	10×A-attachment	2.0	μL
	H_2O	2.8	μL

5a) <u>3'末端の dA 付加 (S5 エリアのみ)</u>

3'末端の dA 付加は A の組成で反応液を調製し、60 ℃ で 10 分間反応させた。

上記試薬のうち、10×Buffer、25 mM MgSO4 および 2 mM dNTPs は、KOD -Plus- (TOYOBO) のものを使用した。

5b) <u>ライゲーション</u>

A:	PCR 産物または dA 付加反応液	3.0	μL
	2×Ligation Buffer	5.0	μL
	pTA2 Vector (50 ng/µL)	1.0	μL
	T4 DNA Ligase	1.0	μL

5c) <u>E. coli DH5a の形質転換</u>

ライゲーション反応液を *E. coli* DH5α コンピテントセル 100 μL に添加し、30 分間氷冷し た。42 ℃ で 45 秒間加温することで形質転換後、直ちに 3 分間氷冷した。次に LB 液体培地 800 μL を加え、37 ℃ で 1 時間震盪培養後、100 μL の X-gal (20 mg/mL, Wako)を塗布した 100 μg/mL の ampicillin を含む LB 寒天培地に塗布し、37 ℃ で一晩培養した。生育した白色コロ ニーを、ampicillin を 100 μg/mL 含む LB 液体培地 5 mL に植菌し、37 ℃ で一晩培養した。

5d) <u>E. coli DH5a からのプラスミドの抽出</u>

培養した *E. coli* DH5α の形質転換株 5 mL を、3000 rpm で 15 分間遠心分離した。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)のプロトコルに従い、菌体を buffer P1 250 μL に懸濁後、あらか じめ 250 μL の buffer P2 を分注しておいたエッペンドルフチューブに移し入れ、5 分間室温 放置することによりアルカリ溶菌させた。次に buffer P3 350 μL を加え中和し、15000 rpm で 10 分間遠心分離することによりたんぱく質画分およびゲノム DNA を沈殿させた。得られ た上清に 2-propanol 600 μL を加え、12000 rpm で 30 分間遠心分離した。得られたペレット を 70% EtOH aq.で洗浄し、10 分間風乾させたのち、50 μL の滅菌精製水を加えることでプ ラスミド溶液を得た。

6) <u>シーケンシング</u>

シーケンス解析は北海道システム・サイエンスに委託した。

シーケンス Primer には M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')および M13R (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3')を用いた。シーケンス結果は、GenoList Genome Browser の ゲノムデータベース(http://genolist.pasteur.fr/BCGList/)により、変異の有無を確認した。

7) <u>Mycobacterium 用発現ベクターへのサブクローニング</u>

前述 6)において変異が認められなかったプラスミドを、プライマー内に設計した制限酵素(NEB)で処理した。次に、反応液を前述 4)と同様に電気泳動し、遺伝子断片を抽出、精製した。また *Mycobacterium* 用発現ベクターpMV261 または pMV206 についても同様に制限酵素処理後、抽出、精製した。

ライゲーションには T4 DNA ligase (TaKaRa)を用いた。A の組成でライゲーション飯能駅 を調製し、室温で 30 分間反応させた。尚、S1~S3 は pMV206 へ、S4 および S5 は pMV261 へ導入した。

A:	制限酵素処理した DNA 断片	16	μL	
	制限酵素処理した pMV261 or pMV206	1.0	μL	
	T4 DNA ligase	1.0	μL	
	10×T4 ligase buffer	2.0	μL	
	total	20	μL	

次に、ライゲーション反応液 10 μL を使用し、*E.coli* DH5α を形質転換した。pMV261 と ライゲーションしたサンプルは kanamycin (40 μg/mL)、pMV206 とライゲーションしたサン プルは hygromycin B (150 μg/mL)を含む LB 寒天培地に塗布し、37 °C、24 時間培養すること により形質転換株を得た。次に各形質転換株を kanamycin (40 μg/mL)または hygromycin B (100 μg/mL)を含む LB 液体培地 5 mL で培養し、前述 5d)と同様にしてプラスミドを抽出し た。また、このプラスミドを用いて、エレクロトポレーション法により *M. smegmatis* を形質 転換することで、各エリアを高発現する形質転換株を作成した。

・ Nybomycin (6)に対する各形質転換株の感受性の確認

作成した各形質転換株を、hygromycin B (50 μg/mL)または kanamycin (20 μg/mL)を含む *M. smegmatis* 用 Middlebrook 7H9 液体培地で OD₆₀₀ が 0.8~1.0 程度になるまで 37 °C で振盪培養した。培養後、1.0×10⁷ CFU/mL の菌液を作成し、nybomycin (6)を含む *M. smegmatis* 用 Middlebrook 7H10 寒天培地に 10 μL 塗布した(1.0×10⁵ CFU/10 μL)。そして、37 °C で 3 日間 培養し、生育の有無を確認した。

第二章 第二節に関する実験

試薬等

Mycobacterium 用発現ベクターpMV206、pMV206::S2 area および pMV206::S3 area は第二 章 第一節と同様のものを使用し、GeneQuant 100 を使用して DNA 濃度を測定した。

1) 結合用緩衝液

	最終	§濃度	
Tris-HCl (pH 7.5)	5	mM	Wako
EDTA	0.5	mM	同仁化学
NaCl	1	М	キシダ化学

2) DNA loading dye

	最終	※濃度	
EDTA	5	mМ	同仁化学
SDS	0.5	%	SERVA
Glycerol	30	%	キシダ化学
Bromophenol Blue	0.05	%	Wako

・ ビオチン標識化プローブ 7,8 の合成

ビオチン標識化プローブ**7** および**8** は Scheme 1 に示す方法で合成した。すなわち、6 を 文献既知の方法で合成した S1³³と縮合することにより、5-ヘキシノイルエステル体 S2 とし た。次に S2 と S3³⁴⁾の Huisgen 反応により、nybomycin probe (7)を合成した。また、文献既知 の化合物 S5³⁵⁾と S3 の Huisgen 反応により、dummy probe (8)を合成した。



Scheme 1 Nybomycin probe (7)および dummy probe (8)の合成



Nybomycin 5-hexynoyl ester (S2)

窒素雰囲気下、nybomycin (6, 5.0 mg, 0.0168 mmol)のピリジン溶液(1.7 mL)に、5-hexynoyl chloride (S1, 43.6 mg, 0.335 mmol, 20 equiv.)を加え、室温で 24 時間撹拌した後、飽和 NaHCO3 水溶液を加え、CHCl₃ で抽出した。有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥後、減圧留去し、残渣をカ ラムクロマトグラフィ(SiO₂, EtOAc \rightarrow CHCl₃ \rightarrow CHCl₃:MeOH=50:1 \rightarrow 20:1)で精製し、S2 (2.4 mg, 24%)を淡黄色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.36 (1H, s), 6.75 (1H, s), 6.49 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 6.40 (2H, s), 5.38 (2H, d-like), 3.96 (3H, s), 2.62 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 2.51 (3H, d-like), 2.31 (2H, td, *J* = 6.9, 2.6 Hz), 2.00 (1H, t, *J* = 2.6 Hz), 1.96-1.87 (2H, m). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 172.5, 161.6, 158.4. 147.4, 143.7, 135.8, 132.4, 125.7, 121.6, 118.8, 117.6, 113.7, 112.1, 86.0, 82.8, 69.5, 62.2, 32.7, 29.7, 23.4, 17.9, 17.8. IR (KBr): 2922, 1740, 1659, 1638, 1427, 1350 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m/z*: 415 [M+Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 415.1270, calcd for C₂₂H₂₀N₂O₅Na [M+Na]⁺; Found: 415.1280.



Nybomycin probe (7)

窒素雰囲気下、S2 (1.8 mg, 4.59 µmol)とS3 (4.1 mg, 5.51 µmol, 1.2 equiv.)の 'BuOH/H₂O 溶液 (1:1, 0.6 mL)に、CuSO₄ (0.05 M solution in water, 18.3 µL, 0.2 equiv.)と sodium ascorbate (0.05 M solution in water, 45.9 µL, 0.5 equiv.)を加え、室温で 16 時間撹拌した。その後、減圧留去し、 残渣をカラムクロマトグラフィ [SiO₂, CHCl₃:MeOH:H₂O = 40:3:1 → 15:3:1 (lower phase)]で精 製し、7 (1.0 mg, 19%)を自色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.55 (1H, s), 7.38 (1H, s), 6.82 (1H, s), 6.71 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.40 (2H, s), 5.88 (1H, s), 5.37 (2H, s), 5.18 (1H, s), 4.51 (3H, t-like), 4.35 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.95 (3H, s), 3.86 (2H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.66-3.62 (36H, m), 3.55 (2H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.44 (2H, t, *J* = 4.3 Hz), 3.17-3.13 (1H, m), 2.92 (1H, dd, *J* = 13.5, 5.4 Hz), 2.80-2.73 (3H, m), 2.54 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 2.50 (3H, s), 2.26-2.22 (2H, m), 2.10-2.04 (2H, m), 1.76-1.63 (4H, m), 1.44 (2H, t, *J* = 7.4 Hz). IR (KBr): 3266, 2922, 1798, 1740, 1669, 1634, 1456, 1352, 1248, 1101 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m*/*z*: 1167 [M+Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m*/*z*: 1167.5260, calcd for C₅₄H₈₀N₈O₁₇SNa [M+Na]⁺; Found: 1167.5293.



Dummy probe (8)

S5 (10.0 mg, 0.079 mmol, 4.9 equiv.)と **S3** (12.2 mg, 0.0162 mmol)の 'BuOH/H₂O 溶液(1:1, 2.0 mL)に、CuSO₄ (0.05 M solution in water, 65.0 µL, 0.2 equiv.)と sodium ascorbate (0.05 M solution in water, 162 µL, 0.5 equiv.)を加え、室温で 16 時間撹拌した。その後、減圧留去し、残渣をカラムクロマトグラフィ[SiO₂, CHCl₃:MeOH:H₂O = 30:3:1 (lower phase)]で精製し、**8** (10.6 mg, 74%)を白色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.49 (1H, s), 6.79 (1H, s), 6.27 (1H, s), 5.39 (1H, s), 4.50 (3H, t, *J* = 5.2 Hz), 4.31 (1H, t, *J* = 6.1 Hz), 3.84 (2H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.66 (3H, s), 3.66-3.63 (32H, m), 3.60 (4H, s), 3.55 (2H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.47-3.38 (3H, m), 3.15-3.12 (1H, m), 2.89 (1H, dd, *J* = 12.8, 4.9 Hz), 2.75-2.74 (3H, m), 2.38 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 2.22 (2H, td, *J* = 7.3, 3.1 Hz), 2.00 (2H, quint, *J* = 7.4 Hz), 1.76-1.63 (4H, m), 1.46-1.41 (2H, m). IR (KBr): 3285, 2922, 2872, 1701, 1452, 1352, 1246, 1111 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m*/*z*: 901 [M+Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m*/*z*: 901.4568, calcd for C₃₉H₇₀N₆O₁₄SNa [M+Na]⁺; Found: 901.4604.

・ ビオチン標識化プローブの抗菌活性評価

合成したビオチン標識化プローブ**7**および**8**の*M. smegmatis*および*M. bovis* BCG に対する活性評価は、第一章第一節と同様にして行った。

・ ビオチン標識化プローブとプラスミドとの結合能解析

1) ビオチン標識化プローブを用いたプルダウン

15 μL の Streptavidin Dynabeads (M-280, invitrogen)をエッペンドルフチューブに分注し、 100 μL の結合用緩衝液で 2 回洗浄後、100 μL の結合用緩衝液に懸濁した。ここにビオチン 標識化プローブ(260 pmol)を添加し、室温で 30 分間転倒混和することでビオチン標識化プ ローブを結合させた Dynabeads を調製した。この Dynabeads を結合用緩衝液で 3 回洗浄後、 100 μL の結合用緩衝液で懸濁した。懸濁後、プラスミド(300 ng)を添加し、室温で 1 時間転 倒混和することでプローブにプラスミドを結合させた。競合実験では、プラスミド添加時に nybomycin (6)または isoniazid を終濃度が 60 μM となるように添加した。そして、Dynabeads と上清を分離した。

2) エタノール沈殿によるプラスミドの濃縮

前述の上清 100 μL に-20 °C で冷却した EtOH 250 μL 添加し、-20 °C で 1 時間放置することで、プラスミドを析出させた。冷却後 12000 rpm で 30 分間遠心分離し、得られたペレットを 70% EtOH aq. 500 μL で洗浄し、室温で風乾させた。

3) <u>電気泳動</u>

Dynabeads は、10 μ L の DNA loading dye で懸濁後、100 °C で 3 分間煮沸し、室温で放冷 したものを電気泳動に使用した。一方、エタノール沈殿により濃縮した上清は、DNA loading dye 5 μ L で溶解させたものを電気泳動に使用した。電気泳動は第二章 第一節と同様に行い、 プラスミドを EtBr により染色し、LAS4010 を使用して検出した。

第三章 第一節に関する実験

・ PDOA のビオチン標識化プローブ 9,10 の合成

PDOA のビオチン標識化プローブ 9 および 10 は、Scheme 2 に示す方法で合成した。すな わち、共同研究者が合成した S6 または S7 に対して、プロパルギルブロミドと縮合するこ とにより、プロパルギルエーテル体 S8 または S9 とした。そして、第二章 第二節と同様に、 S3 との Huisgen 反応により、PDOA 7'-biotin probe (9)または PDOA 8-biotin probe (10)を合成 した。



Scheme 2 PDOA のビオチン標識化プローブ 9,10 の合成

MeO O N N N N

8-Methoxy-3-((4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenethyl)amino)-9H-benzo[de][1,6]naphthyridin-9-one (S8)

窒素雰囲気下、S6 (12.1 mg, 0.0348 mmol)の無水 DMF 溶液(0.4 mL)に K₂CO₃ (24.1 mg, 0.174 mmol, 5.0 equiv)と propargyl bromide (5.2 μL, 0.070 mmol, 2.0 equiv)を加え、室温で 12 時間撹 拌した後、水を加え、CHCl₃-MeOH (10:1)で抽出した。有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥後、減圧 濃縮して得られた残渣を順相カラムクロマトグラフィ (SiO₂, CHCl₃:MeOH = 30:1 containing 1% Et₃N)および逆相カラムクロマトグラフィ (ODS, MeOH:H₂O = 70:30)にて精製し、S8 (11.7 mg, 87%)を赤色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.74 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 8.39 (1H, s), 7.45 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 7.21 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.99 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 6.96 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.61 (1H, s), 4.69 (2H, d, *J* = 2.9 Hz), 3.97 (3H, s), 3.77 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.06 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.52 (1H, t, *J* = 2.3 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 175.9, 157.7, 156.5, 150.6, 143.8, 136.2, 134.62, 134.55, 130.8, 129.7 (2C), 129.5, 121.6, 117.8, 115.3, 106.2, 78.5, 75.6, 56.0, 55.8, 44.2, 34.5. IR (KBr): 1615, 1563, 1542, 1519, 1272 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m*/*z*: 408 [M + Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m*/*z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₃H₁₉N₃O₃Na 408.1324; Found: 408.1339.



PDOA 7'-biotin probe (9)

窒素雰囲気下、S8 (2.3 mg, 5.97 µmol)とS3 (4.9 mg, 6.56 µmol, 0.4 equiv.)の 'BuOH 溶液(0.3 mL)に CuSO₄ (0.05 M solution in water, 24.0 µL, 0.2 equiv.)と sodium ascorbate (0.05 M solution in

water, 48.0 µL, 0.4 equiv.)を加え、室温で 16 時間撹拌した。その後、減圧留去し、残渣を順相 カラムクロマトグラフィ [SiO₂, CHCl₃:MeOH:H₂O = 30:3:1 (lower phase)]および逆相カラムクロ マトグラフィ (ODS, MeOH:H₂O = 70:30)で精製し、**9** (3.7 mg, 54%)を赤色固体として得た。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.75 (1H, d, J = 4.6 Hz), 8.39 (1H, s), 7.85 (1H, s), 7.47 (1H, d, J =4.6 Hz), 7.19 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.03 (1H, t, J = 6.2 Hz), 6.97 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.62 (1H, s), 5.59 (1H, s), 5.19 (2H, s), 4.87 (1H, s), 4.56 (2H, t, J = 5.0 Hz), 4.50 (1H, t, J = 6.4 Hz), 4.32 (1H, t, J =6.0 Hz), 3.97 (3H, s), 3.88 (2H, t, J = 5.0 Hz), 3.77 (2H, q, J = 6.8 Hz), 3.64-3.60 (40H, m), 3.56 (3H, t, J = 5.0 Hz), 3.43 (2H, dd, J = 10.2, 5.3 Hz), 3.15 (1H, td, J = 7.2, 4.7 Hz), 3.05 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.91 (1H, dd, J = 12.9, 4.9 Hz), 2.72 (1H, d, J = 12.6 Hz), 2.22 (2H, td, J = 7.3, 2.9 Hz), 1.45 (2H, q, J = 7.4 Hz). IR (KBr): 3367, 2916, 2870, 1695, 1640, 1564, 1511, 1272 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m/z*: 1160 [M + Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₅₅H₇₉N₉O₁₅NaS 1160.5314; Found: 1160.5356.



3-(Phenethylamino)-8-(prop-2-yn-1-yloxy)-9H-benzo[de][1,6]naphthyridin-9-one (S9)

窒素雰囲気下、S7 (24.5 mg, 0.0772 mmol)の無水 DMF (0.5 mL)溶液に K₂CO₃ (32.2 mg, 0.233 mmol, 3.0 equiv)と propargyl bromide (5.2 µL, 0.085 mmol, 1.1 equiv)を加え、室温で 8 時間撹拌 した後、水を加え、CHCl₃ で抽出した。有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥後、減圧濃縮して得ら れた残渣を順相カラムクロマトグラフィ(SiO₂, CHCl₃:MeOH = 30:1 containing 1% Et₃N)および 逆相カラムクロマトグラフィ(ODS, MeOH:H₂O = 70:30)にて精製し、S8 (9.5 mg, 26%)を赤色 固体として得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.76 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 8.40 (1H, s), 7.50 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 7.36-7.34 (2H, m), 7.29-7.27 (3H, m), 7.02 (1H, t-like, *J* = 6.4 Hz), 6.83 (1H, s), 4.89 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 3.81 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.11 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.60 (1H, t, *J* = 2.3 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 175.7, 155.4, 150.7, 143.8, 137.8, 136.2, 135.8, 134.6, 129.6, 128.9 (2C), 128.7 (2C), 127.0, 122.1, 117.9, 108.7, 77.3, 76.7, 56.3, 44.2, 35.4. IR (KBr): 3361, 1639, 1617, 1562, 1543, 1269, 1194 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m/z*: 378 [M + Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₂H₁₇N₃O₂Na 378.1218; Found: 378.1236.



PDOA 8-biotin probe (10)

窒素雰囲気下、**S9** (3.5 mg, 9.85 µmol)と**S3** (7.8 mg, 10.3 µmol, 1.05 equiv.)の 'BuOH-DMF 溶 液(2:5, 0.7 mL)に CuSO₄ (0.05 M solution in water, 40.0 µL, 0.2 equiv.)と sodium ascorbate (0.05 M solution in water, 79.0 µL, 0.4 equiv.)を加え、室温で 16 時間撹拌した後、さらに、CuSO₄ (0.05 M solution in water, 40.0 µL, 0.2 equiv.)と sodium ascorbate (0.8 mg, 0.4 equiv.)を加え、室 温で 6 時間撹拌した。その後、減圧留去し、残渣を順相カラムクロマトグラフィ [SiO₂, CHCl₃:MeOH:H₂O = 30:3:1 (lower phase)] および逆相カラムクロマトグラフィ (ODS, MeOH:H₂O = 70:30)で精製し、**9** (4.7 mg, 43%)を赤色固体として得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.73 (1H, d, *J* = 4.5 Hz), 8.39 (1H, s), 7.99 (1H, s), 7.51 (1H, d, *J* = 4.5 Hz), 7.35-7.33 (2H, m), 7.28-7.27 (3H, m), 7.06 (1H, s), 7.02 (1H, t-like, *J* = 5.9 Hz), 6.64 (1H, br s), 5.85 (1H, br s), 5.41 (2H, s), 5.14 (1H, br s), 4.55 (2H, t, *J* = 5.0 Hz), 4.51 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 4.32 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.87 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.79 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.64-3.55 (38H, m), 3.44-3.42 (2H, m), 3.15-3.14 (1H, m), 3.10 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.90 (1H, dd, *J* = 12.7, 4.7 Hz), 2.74 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 2.23-2.20 (2H, m), 1.83 (1H, br s), 1.76-1.63 (3H, m), 1.46-1.40 (2H, m). IR (KBr): 3361, 2917, 2871, 1696, 1642, 1564, 1460, 1270, 1111 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m*/*z*: 1130 [M + Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m*/*z*: [M + Na]⁺ calcd for C₅₄H₇₇N₉O₁₄NaS 1130.5208; Found: 1130.5222.

・ PDOA の光アフィニティプローブ 11 の合成

PDOA の光アフィニティプローブ 11 は、文献既知のトリフルオロメチルジアジリン基を 有するフェニル酢酸から調製した S12³⁶⁾を用いて、S11 と縮合することで PDOA 7'-diazirine probe (11)を合成した(Scheme 3)。



Scheme 3 PDOA の光アフィニティプローブ 11 の合成



N-(9-(Benzyloxy)-8-methoxy-2-oxo-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1*H*-benzo[*de*][1,6]naphthyridin-3-yl)-2-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)acetamide (S14)

窒素雰囲気下、**S10** (1.29 g, 2.29 mmol)のCH₂Cl₂/MeOH溶液(2:1, 45 mL)に、NH₄HCO₂ (865 mg, 13.7 mmol, 6.0 equiv)と亜鉛末(299 mg, 4.57 mmol, 2.0 equiv)を加え、6時間撹拌した。反応 液をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣を水に溶解し、濃NH₃水を加えた後、CHCl₃ で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥後、減圧濃縮して得られたアミン体**S11**はそのまま 次の反応に用いた。

上記のアミン体S11のCH₂Cl₂溶液(35 mL)にピリジン(1.85 mL, 22.9 mmol, 10.0 equiv.)と2-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)acetyl chloride (S12) (2-(4-(3-(trifluoromethyl)- 3*H*diazirin-3-yl)phenyl)acetic acid³⁶⁾より調製、2.53 mmol, 1.1 equiv.)のCH₂Cl₂ (10 mL)溶液を0 °C で加え、室温まで徐々に昇温しながら20時間撹拌した。反応液に飽和NaHCO₃水を加え、 CH₂Cl₂で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥後、減圧濃縮して得られたアミド体S13はそ のまま次の反応に用いた。

上記アミド体**S13**のCH₂Cl₂溶液(30 mL)にTFA (10 mL)を加え、3時間撹拌した。反応液を減 圧濃縮し、残渣にNH₃水を加えて塩基性にした後、CHCl₃で抽出した。有機層を無水Na₂SO₄ で乾燥後、減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィ(SiO₂, CHCl₃/MeOH = 40:1 containing 1% Et₃N)にて精製し、**S14** (458 mg, 35% in three steps)を白色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.48 (1H, s), 7.34-7.32 (4H, m), 7.19-7.17 (3H, m), 7.04 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.39 (1H, s), 5.38 (1H, br s), 5.25 (1H, d, J = 8.0 Hz), 4.99 (2H, s), 4.63 (1H, dd, J = 8.0, 4.0 Hz), 4.16 (1H, d, J = 4.0 Hz), 3.93 (3H, s), 3.52 (1H, d, J = 15.5 Hz), 3.46 (1H, d, J = 15.5 Hz), 3.20 (1H, ddd, J = 11.9, 5.9, 1.6 Hz), 2.97 (1H, td, J = 11.7, 4.4 Hz), 2.63 (1H, dt, J = 18.3, 4.7 Hz), 2.54 (1H, dd, J = 16.0, 2.9 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.2, 166.1, 151.9, 136.7, 136.5, 131.8, 131.5, 129.7 (2C), 128.6 (2C), 128.5 (2C), 127.9, 127.8, 126.9, 126.6 (2C), 122.0 (1C, q, J = 275 Hz), 111.1, 106.8, 75.0, 55.8, 53.6, 52.2, 42.88, 42.86, 28.26, 28.19 (1C, q, J = 40.4 Hz). IR (KBr): 3282, 3033, 2939, 1687, 1517, 1348, 1232, 1186, 1154 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m/z*: 566 [M+H]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₂₂H₁₆F₃N₅O₂Na 566.2015; Found: 566.2006.



PDOA 7'-diazirne probe (11)

窒素雰囲気下、S14 (156 mg, 0.275 mmol)のTHF溶液(2.8 mL)に、BH₃•THF錯体(2.75 mL, of a 1.0 M solution in THF, 2.75 mmol, 10.0 equiv.)を加え、45 °Cで2時間撹拌した。反応液にMeOH

を加えた後、減圧濃縮した。残渣を6N HCl (5 mL)に溶解した後、酸素雰囲気下、85 °Cで1時 間撹拌した。放冷後、4N NaOH水溶液を加えて塩基性にし、CHCl₃-MeOH (10:1)で抽出した。 有機層を無水Na₂SO₄で乾燥後、減圧濃縮して得られた残渣を5% HClに溶解し、Et₂Oで抽出 した。水層を4N NaOH水溶液で塩基性にした後にCHCl₃-MeOH (10:1)で抽出した。有機層を 無水Na₂SO₄で乾燥後、減圧濃縮して得られた残渣を順相カラムクロマトグラフィ (SiO₂, CHCl₃:MeOH = 30:1 containing 1% Et₃N)および逆相カラムクロマトグラフィ (ODS, MeOH:H₂O = 70:30 → 80:20)で精製し、11 (7.2 mg, 6%)を赤色固体として得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.74 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 8.39 (1H, s), 7.46 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 7.31 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.17 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.93 (1H, t-like, *J* = 6.3 Hz), 6.61 (1H, s), 3.97 (3H, s), 3.79 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.12 (2H, t, *J* = 7.0 Hz). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 176.0, 157.8, 150.9, 143.6, 139.7, 136.4, 136.3, 134.9, 129.4, 129.2 (2C), 127.8, 127.0 (2C), 122.1 (CF₃, 1C, q, *J* = 275 Hz), 121.7, 117.9, 106.3, 56.1, 43.8, 34.9, 28.3 (CN=N, 1C, q, *J* = 40.8 Hz). IR (KBr): 2917, 1614, 1565, 1345, 1274, 1182, 1154 cm⁻¹. MS (ESI-TOF) *m/z*: 462 [M+Na]⁺. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M+Na]⁺ calcd for C₂₂H₁₆F₃N₅O₂Na 462.1154; Found: 462.1167.

PDOA の各種プローブ分子 9-11 の抗菌活性評価

合成した PDOA の各種プローブ分子 **9-11** の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する 活性評価は、第一章 第一節と同様にして行った。

第三章 第二節に関する実験

・ PDOA のビオチン標識化プローブとプラスミドとの結合能解析

PDOA のビオチン標識化プローブ9とプラスミド pMV206::S3 area との結合能解析は第二 章 第二節と同様にして行った。

第三章 第三節に関する実験

・ PDOA (5)の蛍光および励起スペクトルの測定

PDOA (5)の蛍光および励起スペクトルは、分光光度計用石英セルを使用して SpectraMax M5e により測定した。蛍光スペクトルは励起波長 (λ_{ex})を 505 nm に固定して測定し、また、励起スペクトルは検出波長(λ_{em})を 555 nm に固定して測定した。

第三章 第四節に関する実験

試薬等

1) <u>結合用 PBS 緩衝液</u>

9.6 gの PBS (-)粉末(ニッスイ)を高純度精製水1Lに溶解させ、Tween 80 を終濃度 0.05% となるように添加したものを使用した。

2) <u>2×SDS-sample buffer</u>

	最終濃度					
Tris-HCl (pH 6.8)	50	mM	Wako			
SDS	1	%	SERVA			
Glycerol	20	%	キシダ化学			
2-Mercaptoethanol	1	%	Wako			
BPB	0.01	%	Wako			

3) <u>SDS-PAGE 用 10×泳動 buffer</u>

	最終演	農度	
Tris	0.25	М	Wako
Glycine	1.92	М	Wako
SDS	1	%	SERVA

使用時には、高純度精製水により10倍希釈したものを用いた。

4) <u>SDS-PAGE 用ポリアクリルアミドゲル</u>

	<u> </u>	Stacking gel		
	7.5%	10%	12.5%	
高純度精製水	5.425 mL	4.8 mL	4.175 mL	1920 μL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)				735 μL
40% Acrylamide (nacalai tesque)	1.875 mL	2.5 mL	3.125 mL	220 μL
10% SDS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	29 µL
10% APS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	84 μL
TEMED (nacalai tesque)	6 µL	6 µL	6 µL	2.9 μL

ガラスプレートに separating gel を注ぎ込み、直ちに高純度精製水を重層した。ゲルが十分 に固まっていることを確認した後、重層した高純度精製水を除去し、stacking gel を重層した。

4) CBB 染色液

CBB R-250	1	g	Wako
MeOH	20	mL	nacalai tesque
AcOH	30	mL	nacalai tesque
高純度精製水	350	mL	
5) 脱色液			
MeOH	150	mL	nacalai tesque
AcOH	50	mL	nacalai tesque
高純度精製水	300	mL	

・ 光アフィニティプローブ 11 の検出実験

1) 検出に要するタンパク量の検討

サンプル瓶に BSA 0.1、1 または 10 µg を含む結合用 PBS 緩衝液 1 mL を調製した。ここ に光アフィニティプローブ 11 (50 nmol または 100 nmol)を添加し、4 ℃ で 1 時間、遮光下で 転倒混和した。次に、UV ランプ(BLAK-RAY B-100A, UVP)を用いて氷上で 30 分間、10 cm の距離で 365 nm の紫外線を照射した。反応液を限外ろ過(Amicon Ultra 10 kDa, Millipore)で 濃縮した後、2×SDS-sample buffer と 1:1 で混合し、100 ℃ で 3 分間煮沸したものを電気泳動 に使用した。

2) 紫外線照射時間による標識効率の検討

前述 1)と同様に調製した BSA 10 µg を含む結合用 PBS 緩衝液 1 mL に 50 nmol の光アフィニ ティプローブ 11 を添加し、4 ℃ で 1 時間、遮光下で転倒混和した。次に、UV ランプを用 いて氷上で 5、10 または 30 分間、10 cm の距離で 365 nm の紫外線を照射した。反応液を限 外ろ過で濃縮した後、2×SDS-sample buffer と 1:1 で混合し、100 ℃ で 3 分間煮沸したものを 電気泳動に使用した。

3) 電気泳動と標識タンパク質の検出

ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルをラップで気泡が入ら ないように包み、光アフィニティプローブ 11 由来の蛍光を、LAS4010 (落射光源: 520 nm, 検出フィルター: 575 nm)を使用して検出した。次に、CBB 染色液で全タンパク質を検出し た。

第三章 第五節に関する実験

• 菌株培養用培地

1) <u>Mycobacterium</u> 属細菌培養用培地

M. bovis BCG の培養に用いた培地および培養条件は、第一章と同様に行った。

試薬等

結合用緩衝液

	最終濃度			
Tris-HCl (pH 7.4)	50	mМ	Wako	
Tween 80	0.05	%	nacalai tesque	

必要に応じて、protease inhibitor cocktail (nacalai tesque)を終濃度 1% となるように添加した。

・光アフィニティラベリング法による標的分子解析

1) <u>M. bovis BCG の菌体破砕液の調製</u>

9 mL の *M. bovis* BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地を含む square media bottle に、-80 °C で 凍結保存した *M. bovis* BCG 1 mL を植菌し、37 °C で 1 週間振盪培養した。続いてこの菌液 全量を 50 mL の Middlebrook7H9 液体培地を含む 200 mL マイヤーに移し、37 °C で 1 週間振 盪培養した。そして、この菌液全量を 500 mL の Middlebrook7H9 液体培地を含む 2L マイヤ ーに移し、37 °C でさらに 1 週間振盪培養した。培養後、3000 rpm で 20 分間遠心分離し、 ペレットを結合用緩衝液で 3 回洗浄した。洗浄後、protease inhibitor cocktail (nacalai tesque)を 含む結合用緩衝液 10 mL に懸濁させ、SONICS 製 VC-750 にテーパーマイクロチップ 1/4 イ ンチ(6 mm)を接続し、40%の出力で 5 秒×10 回の超音波処理を 5 回繰り返すことで菌体を破 砕した。続いて 12000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を菌体破砕液として回収した。この 菌体破砕液のタンパク質濃度は、Bradford 法(Protein Assay reagent, BIO-RAD)により測定し た。

2) 光アフィニティプローブ 11 を用いた光アフィニティラベリング

サンプル瓶に、*M. bovis* BCG から調製した菌体破砕液(1 mg protein)を含む結合用緩衝液 1 mL を調製した。ここに光アフィニティプローブ 11 (50 nmol)を添加し、4 ℃ で 1 時間、遮 光下で転倒混和した。次に、UV ランプを用いて氷上で 10 分間、10 cm の距離で 365 nm の 紫外線を照射した。反応液を 15000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。

3) アセトン沈殿によるタンパク質の濃縮

前述の上清 150 µL に-20 ℃ で冷却した acetone 600 µL を添加し、-80 ℃ で 1 時間放置す ることで、タンパク質を析出させた。その後、13000 rpm で 30 分間遠心分離し、得られたペ レットを 70% EtOH aq. 500 µL で洗浄後、室温で風乾させた。乾燥させたペレットは、2×SDSsample buffer 20 µL に溶解させ、100 ℃ で 3 分間煮沸したものを電気泳動に使用した。

4) 電気泳動と標識タンパク質の検出

第三章 第四節と同様にしてポリアクリルアミドゲルでタンパク質を分離し、光アフィニ ティプローブ 11 由来の蛍光を、LAS4010 を使用して検出し、CBB 染色液で全タンパク質を 検出した。

引用文献

- 1) World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2016.
- 2) Saunders, B. M.; Britton, W. J.; Immunol. Cell. Biol. 2007, 85, 103.
- 3) Manabe, Y. C.; Bishai, W. R. Nat. Med. 2000, 6, 1327.
- 4) Wayne, L. G.; Sohaskey, C. D. Annu. Rev. Microbiol. 2001, 55, 139.
- 5) Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saudes, J. P. Nat. Rev. Drug Discov. 2009, 8, 69.
- Aoki, S.; Watanabe, Y.; Sanagawa, M.; Setiawan, A.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 3148.
- 7) Yamano, Y.; Arai, M.; Kobayashi, M. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22, 1877.
- Pruksakorn, P.; Arai, M.; Kotoku, N.; Vilchéze, C.; Baughn, A. D.; Moodley, P.; Jacobs, W. R., Jr.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 3658.
- Arai, M.; Kamiya, K.; Shin, D.; Matsumoto, H.; Hisa, T.; Setiawan, A.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* 2016, 64, 766.
- (a) Durley, R. C.; MacMillan, J.; Simpson, T. J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1975, 163. (b)
 Stack, M. E.; Mazzola, E. P.; Eppley, R. M. Tetrahedron Lett. 1979, 20, 4989.
- (a) Blank, F.; Day, W. C.; Just, G. J. Invest. Dermatol. 1963, 40, 133. (b) Höfle, G.; Röser, K. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978, 611. (c) Zeeck, A.; Ruß, P.; Laatsch, H.; Loeffler, W.; Wehrle, H.; Zähner, H.; Holst, H. Chem. Ber. 1979, 112, 957.
- 12) Kruger, G. J.; Steyn, P. S.; Vleggaar, R.; Rabie, C. J. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 441.
- 13) Shaari, K.; Ling, K. C.; Rashid, Z. M.; Jean, T. P.; Abas, F.; Raof, S. M.; Zainal, Z.; Lajis, N. H.; Mohamad, H.; Ali, A. M. Mar. Drugs 2009, 7, 1.
- 14) Strelitz, F.; Flon, H.; Asheshov, I.N. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1955, 41, 620.
- 15) Patamaporn Pruksakorn *博士論文*, **2010**.
- 16) Arai, M.; Liu, L.; Fujimoto, T.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. Mar. Drugs 2011, 9, 984
- 17) Wayne, L. G.; Hayes, L. G. Infect. Immun. 1996, 64, 2062.
- Arai, M.; Sobou, M.; Vilchéze, C.; Baughn, A.; Hashizume, H.; Pruksakorn, P.; Ishida, S.; Matsumoto, M.; Jacobs, W. R., Jr.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, *16*, 6732.
- 19) Stack, M. E.; Eppley, R. M.; Dreifuss, P. A.; Pohland, A. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *33*, 351.
- 20) Carlton, W. W.; Stack, M. E.; Eppley, R. M. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1976, 38, 455.
- 21) Auffray, Y.; Boutibonnes, P. Mycopathologia 1987, 100, 49.
- 22) Arai, M.: Han, C.; Yamano, Y.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. J. Nat. Med. 2014, 68, 372.
- 23) 韓智秀 修士論文, 2013.
- 24) Zalilawati, M. R.; Andriani, Y.; Shaari, K.; Bourgougnon, N.; Ali, A. M.; Muhammad, T. S. T.;

Mohamad, H.; J. Chem. Pharm. Res. 2015, 7, 330.

- 25) Yu, H. B.; Yang, F.; Sun, F.; Li, J.; Jiao, W. H.; Gan, J. H.; Hu, W. Z.; Lin, H. W. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 6003.
- 26) Kang, C. M.; Abbott, D. W.; Park, S. T.; Dascher, C. C.; Cantley, L. C.; Husson, R. N. Genes Dev. 2005, 19, 1692.
- Dziadek, J.; Rutherford, S. A.; Madiraju, M. V.; Atkinson, M. A. L.; Rajagopalan, M. Microbiology 2003, 149, 1593.
- 28) Gomez, J. E.; Bishai, W. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 8554.
- 29) Nonejuie, P.; Burkart, M.; Pogliano, K.; Pogliano, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 16169.
- 30) Hiramatsu, K.; Igarashi, M.; Morimoto, Y.; Baba, T.; Umekita, M.; Akamatsu, Y. Int. J. Antimicrob. Agents 2012, 39, 478.
- 31) (a) Hibert, F. K.; Kapfer, I.; Goeldner, M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34, 1296. (b) Leslie,
 B. J.; Hergenrother, P. J. Chem. Soc. Rev. 2008, 37, 1347.
- 32) (a) Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y. *Tetrahedron Lett.* 1982, 23, 5555. (b) Fedoreev,
 S. A.; Prokof'eva, N. G.; Denisenko, V. A.; Rebachuk, N. M. *Pharm. chem. J.* 1988, 22, 615.
- 33) Graf, K. M.; Tabor, M. G.; Brown, M. L.; Paige, M. Org. Lett. 2009, 11, 5382.
- 34) Tantama, M.; Lin, W. C.; Licht, S. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 15766.
- 35) Qi, L.; Meijler, M. M.; Lee, S. H.; Sun, C.; Janda, K. D. Org. Lett. 2004, 6, 1673.
- 36) Chen, F. Q.; Hirano, T.; Ohashi, M.; Nakayama, H.; Oda, K.; Machida, M. Chem. Lett. 1993, 287.