

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, 謙太郎
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61693
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 謙太郎

目次

略語	1
緒論	2
本論	5
第一章 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 <i>Aspergillus</i> 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 <i>Viomellein</i> 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
第二章 <i>Nybomycin</i> 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
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
第五節 光アフィニティラベリング法による標的分子解析	26
結論	27
謝辞	28
実験の部	29
引用文献	58

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 ヶ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。

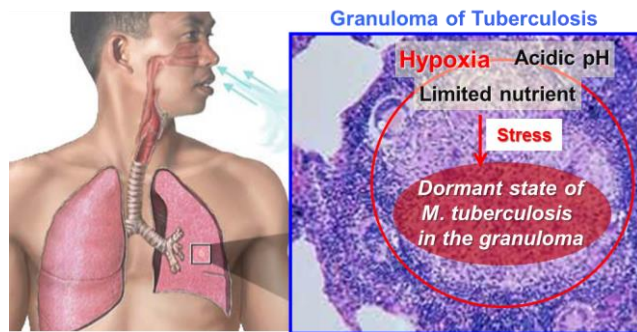


Figure 1 結核菌の潜在化と granuloma

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。

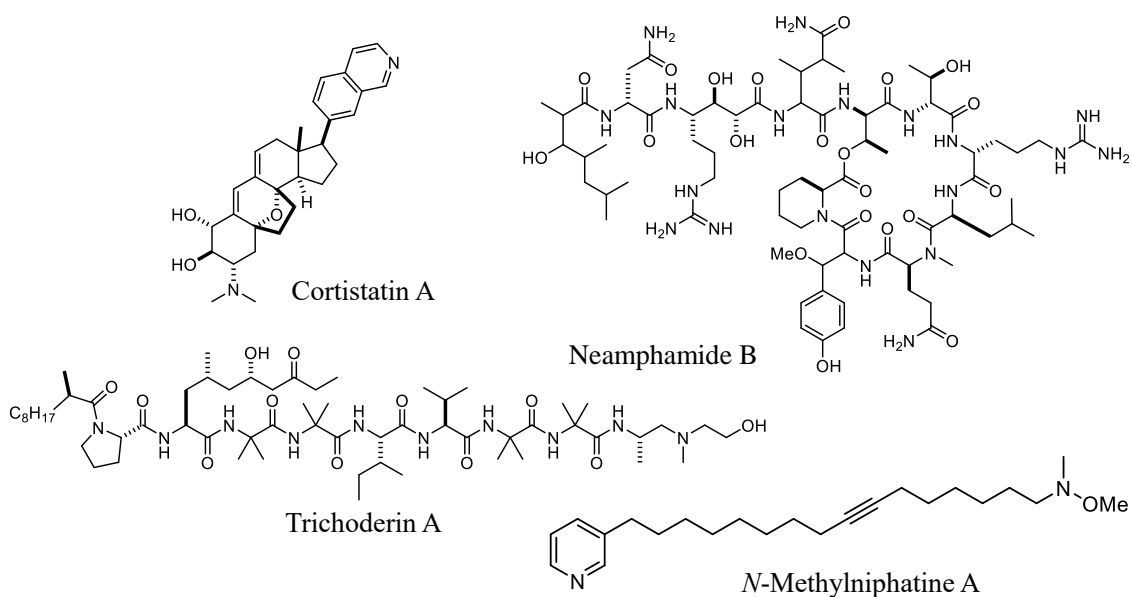


Figure 2 筆者の研究室で見出された海洋生物由来生理活性物質

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)。

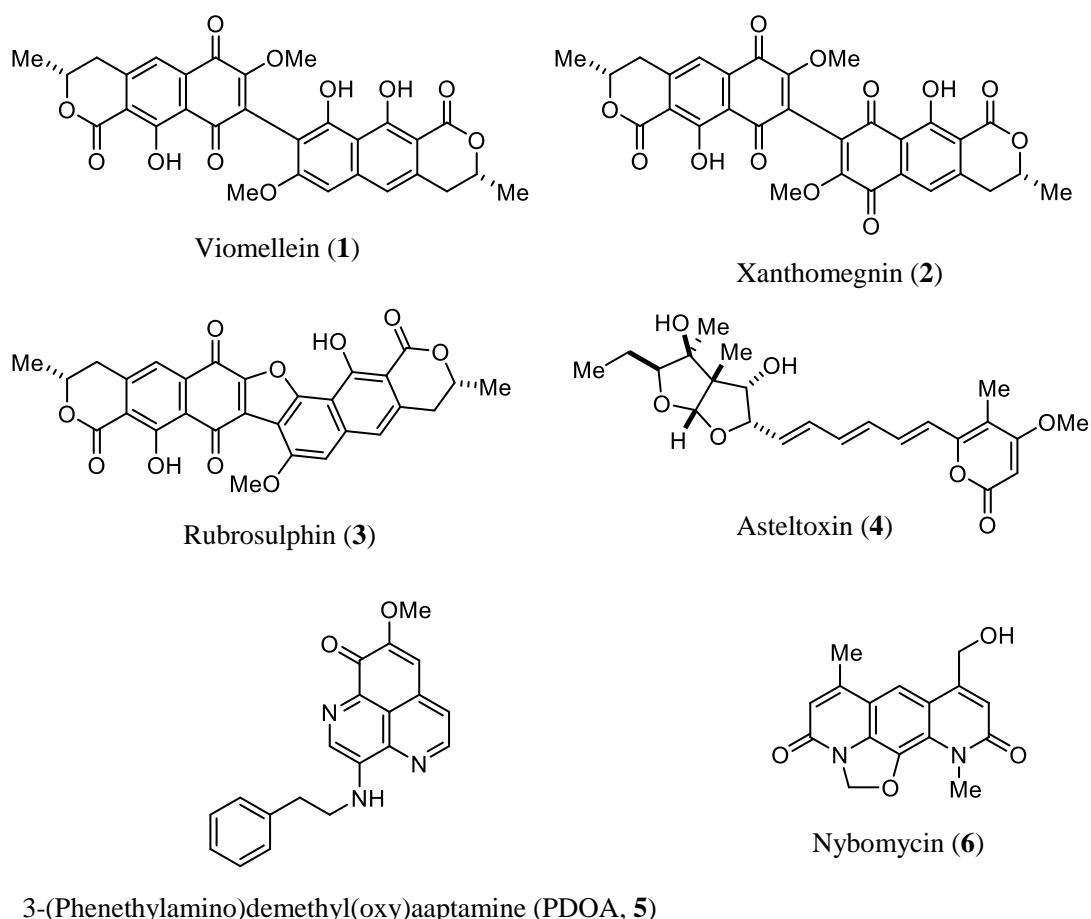


Figure 3 化合物 1-6 の化学構造

本論

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⁾。

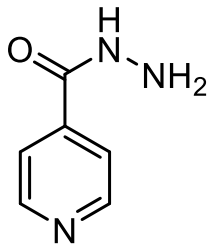


Figure 4 Isoniazid の化学構造

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

Strains	MIC of isoniazid ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Aerobic	Hypoxic
<i>M. smegmatis</i>	2.5	25
<i>M. bovis</i> BCG	0.03	>100

pre-cultured
M. smegmatis (1×10^4 CFU/0.1 mL) or
M. bovis BCG (1×10^5 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

Determination of MIC by MTT method



Picture of low O_2 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

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 6 海洋由来真菌 *Aspergillus* sp.

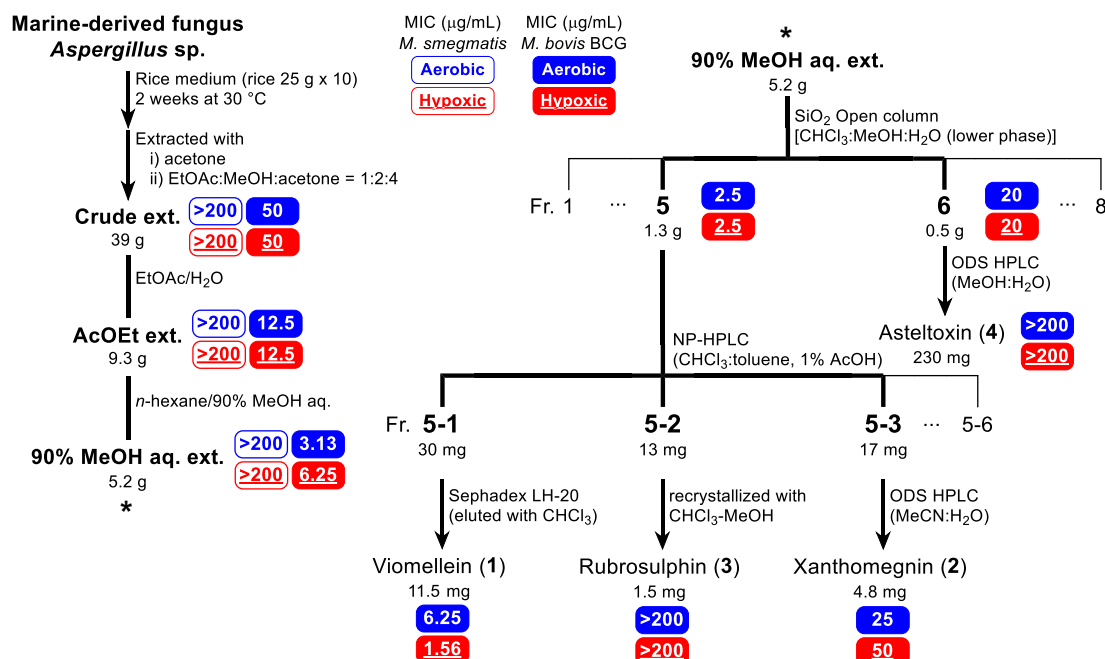


Figure 7 海洋由来真菌 *Aspergillus* sp.の培養抽出物からの活性物質の精製

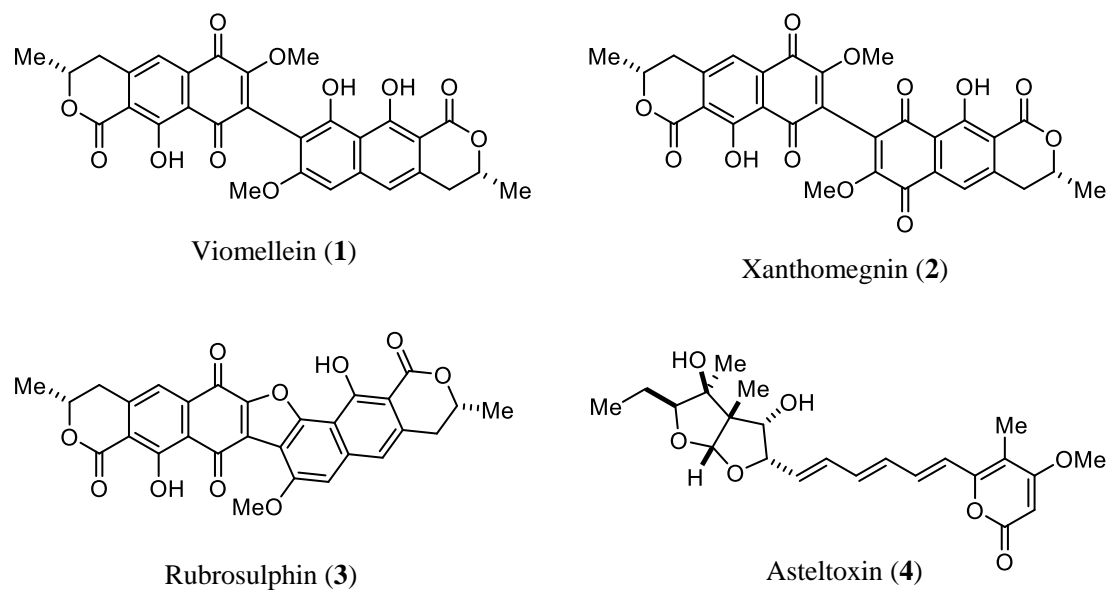


Figure 8 海洋由来真菌 *Aspergillus* sp. から単離した化合物 **1-4** の化学構造

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 vieidicatum*¹⁹⁾ 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。

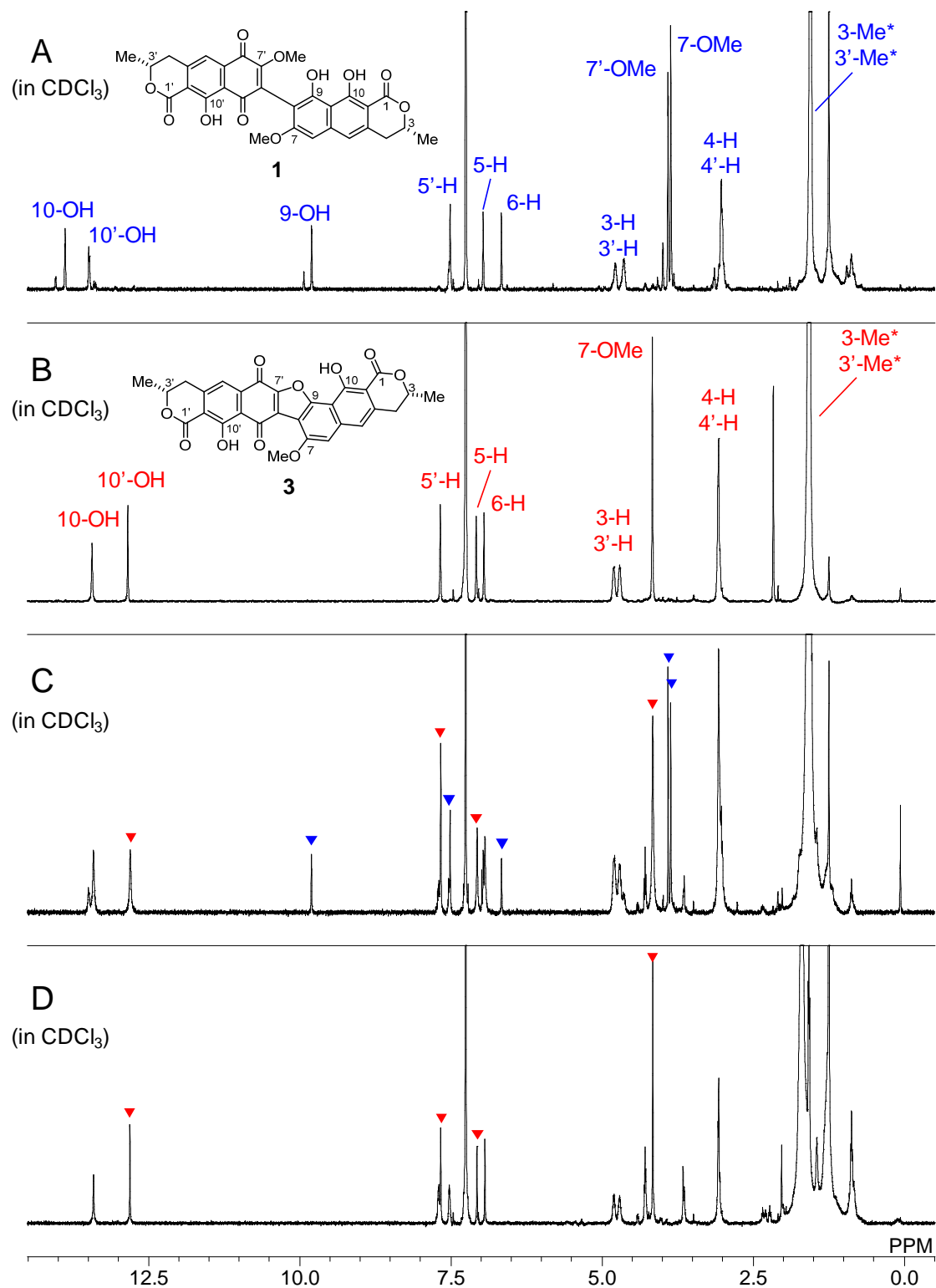


Figure 9 逆相 HPLC で精製した viomellein (**1**)の MeOH 中での変化

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 xanhomegnin (**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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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。

Table 2 単離した化合物 1-4 の各検定菌に対する MIC

Compounds	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>M. smegmatis</i>		<i>M. bovis</i> 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

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 $\mu\text{g/mL}$ で SOS induction factor が 1.43 (afatoxin B1 は 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 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

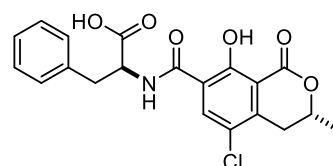


Figure 10 Ochratoxin A の化学構造

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と比較した。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。

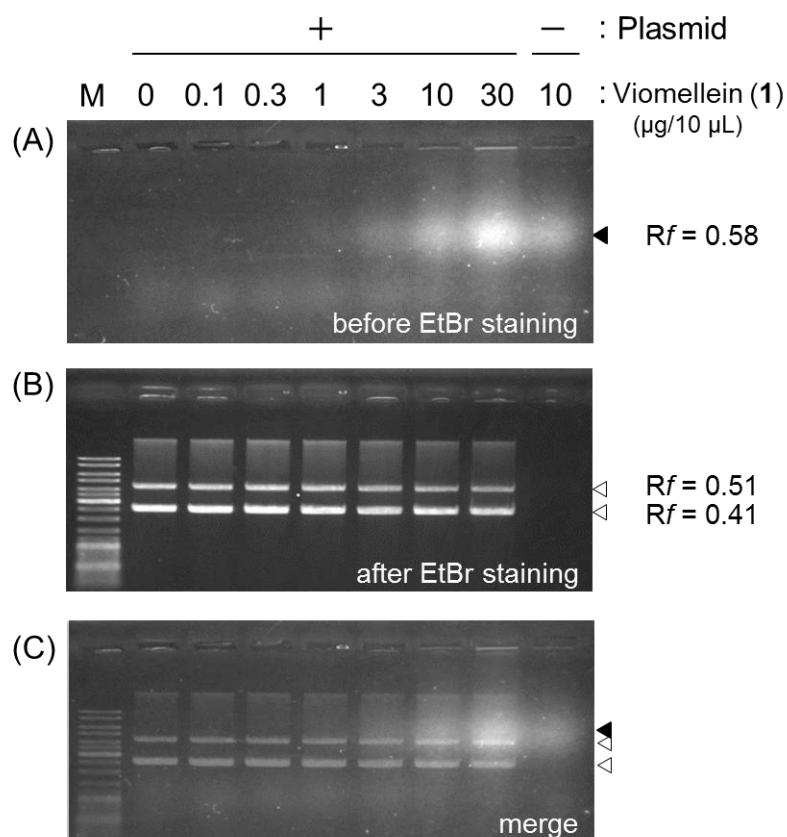


Figure 11 Viomellein (**1**)と pMV206 の結合実験

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 aptamine 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)demethyl(oxy)aptamine (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。

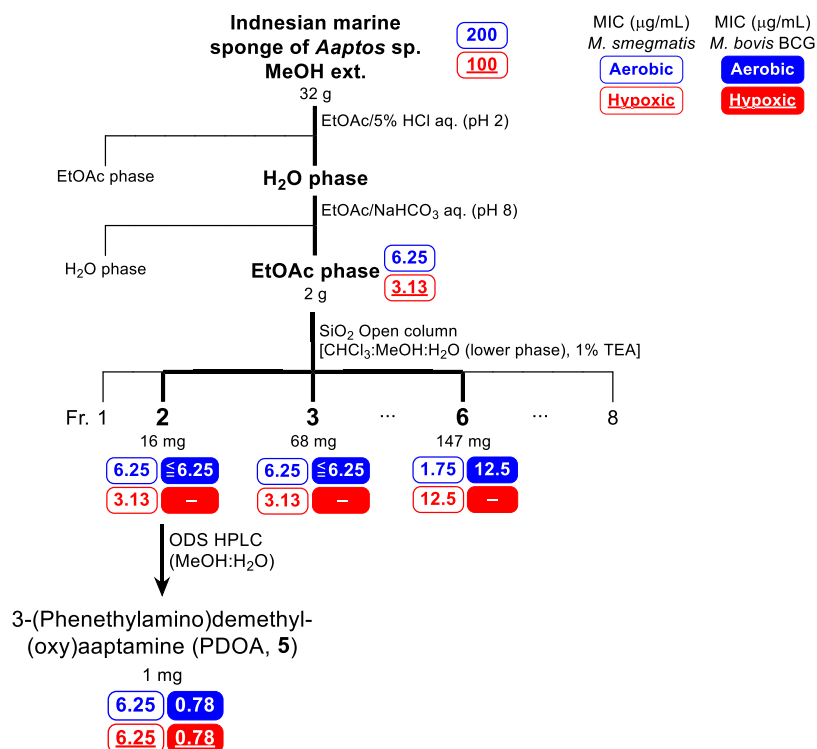


Figure 13 海綿 *Aaptos* sp. の MeOH 抽出物からの活性物質の精製

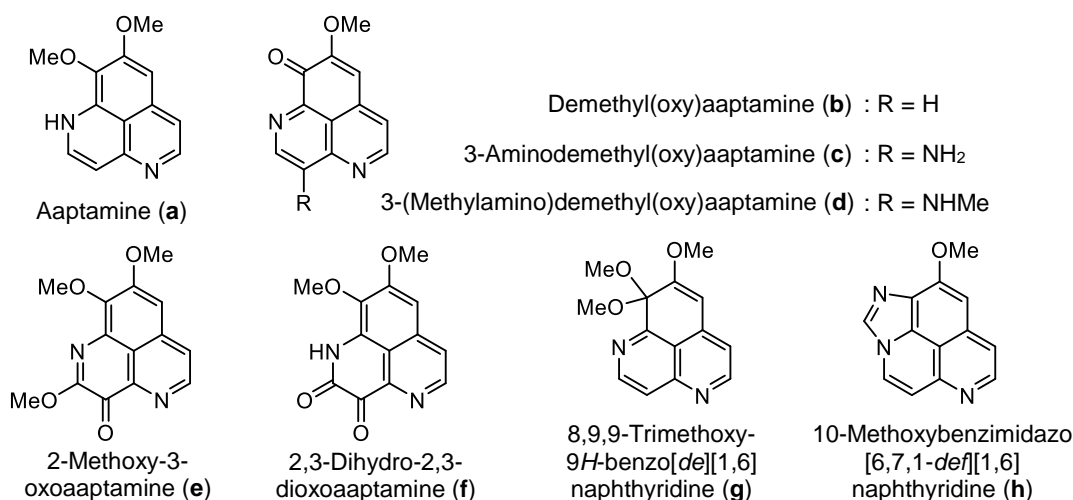


Figure 14 これまでに *Aaptos* 属海綿から単離されていた 8 種の aptamine 類の化学構造

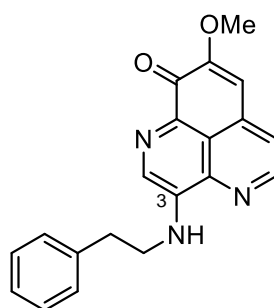


Figure 15 3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)aaptamine (PDOA, **5**)の化学構造

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 $\mu\text{g/mL}$ 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。

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

Compounds	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>M. smegmatis</i>		<i>M. bovis</i> BCG	
	Aerobic	Hypoxic	Aerobic	Hypoxic
PDOA (5)	6.25	6.25	0.78	0.78
a	100	200	200	200
b	25	6.25	200	200
c	6.25	1.56	50	25
d	6.25	1.56	200	100
e	6.25	6.25	25	25
f	25	6.25	25	25
g	200	100	>200	>200
h	25	12.5	100	100

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。

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

	Strains	Drug Resistance	MIC (µg/mL)
Wild-type	H37Rv	—	0.5-1.0
	Erdman	—	1.0
	Beijing	—	2.0
Drug-resistant TB	mc ² 4977	INH	1.0
	mc ² 4986	RIF	1.0
	mc ² 5886	OF	0.5
	mc ² 4914	INH, ETH	4.0
	CI5071*	INH, SM	1.0
	CI5483*	EMB, SM	2.0
MDR-TB	mc ² 5858	INH, RIF	0.5-1.0
	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

*: 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 (*ftsZ*²⁷⁾、*whmD*²⁸⁾) 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。

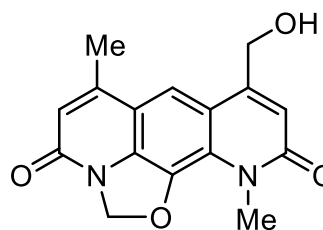


Figure 16 Nybomycin (**6**) の化学構造

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

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

*: Clinically isolated strains

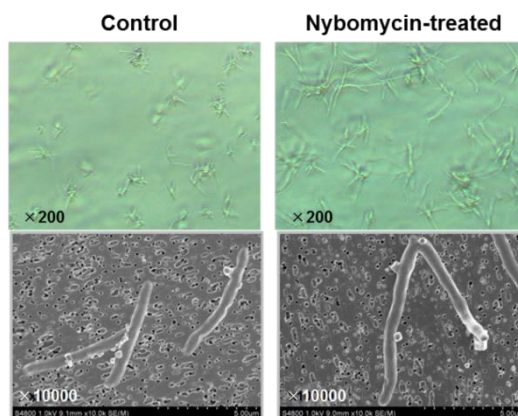


Figure 17 Nybomycin (**6**) で処理した *M. smegmatis* の形態変化

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)。

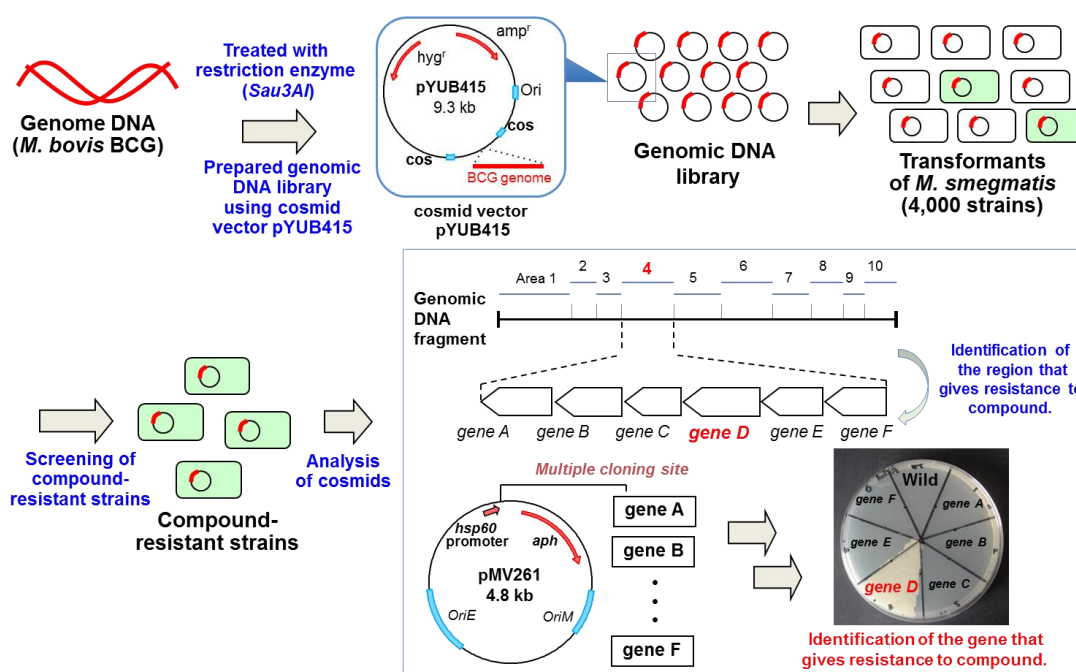


Figure 18 ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用した標的分子解析の概要

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)。

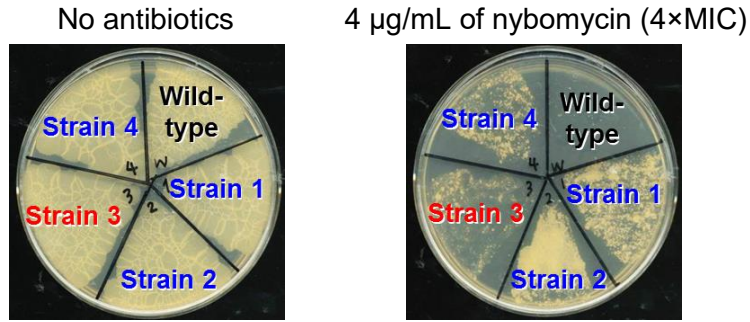


Figure 19 Nybomycin (6)に耐性を示した4株の形質転換株(strains 1-4)

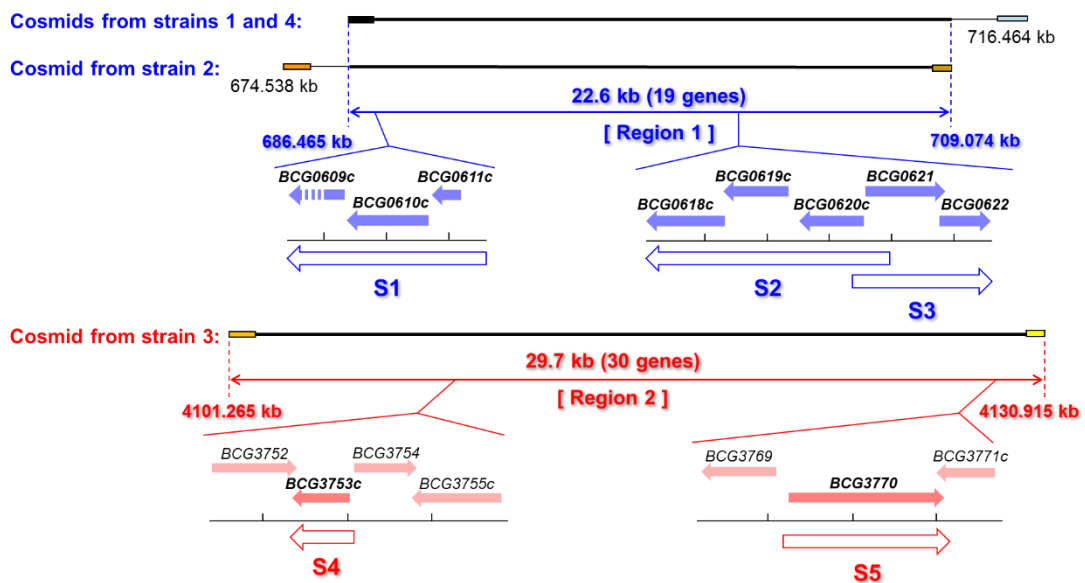


Figure 20 Nybomycin (6)に耐性を付与する2つの遺伝子領域

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)。

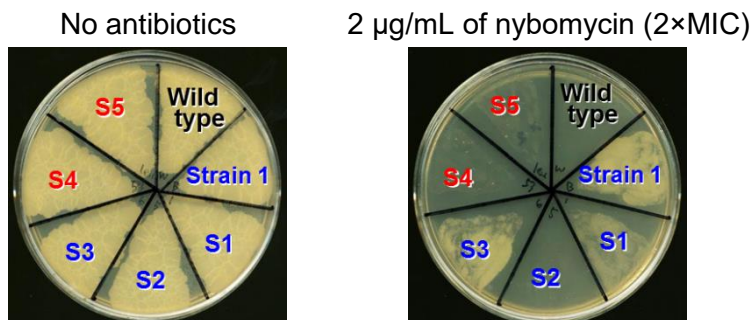


Figure 21 各形質転換株のnybomycin (6)に対する感受性

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。

Table 6 Nybomycin (**6**)に対して強い耐性を付与した S1 および S3 エリアに含まれる遺伝子と弱い耐性を付与した S4 および S5 の遺伝子

Area	Gene name	Description
S1	<i>BCG0609c</i>	Probable glycerol-3-phosphate dehydrogenase [nad(p)+] gpdA1
	<i>BCG0610c</i>	Probable monooxygenase
	<i>BCG0611c</i>	Conserved hypothetical protein
S3	<i>BCG0621</i>	Probable transcriptional regulatory protein (possibly arsR-family)
	<i>BCG0622</i>	Conserved hypothetical protein TB27.3
S4	<i>BCG3753c</i>	Possible conserved transmembrane protein
S5	<i>BCG3770</i>	2-isopropylmalate synthase leuA

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)。

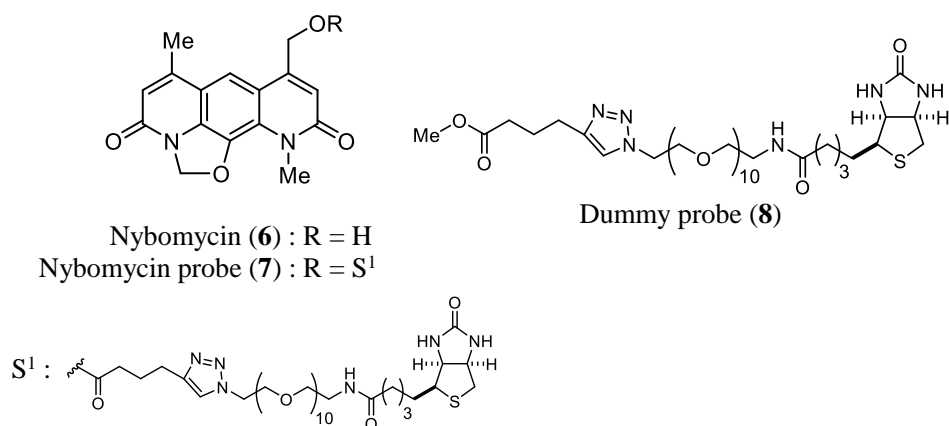


Figure 22 Nybomycin (**6**)とビオチン標識化プローブ **7** および **8** の化学構造

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)			
	<i>M. smegmatis</i>		<i>M. bovis</i> 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)。

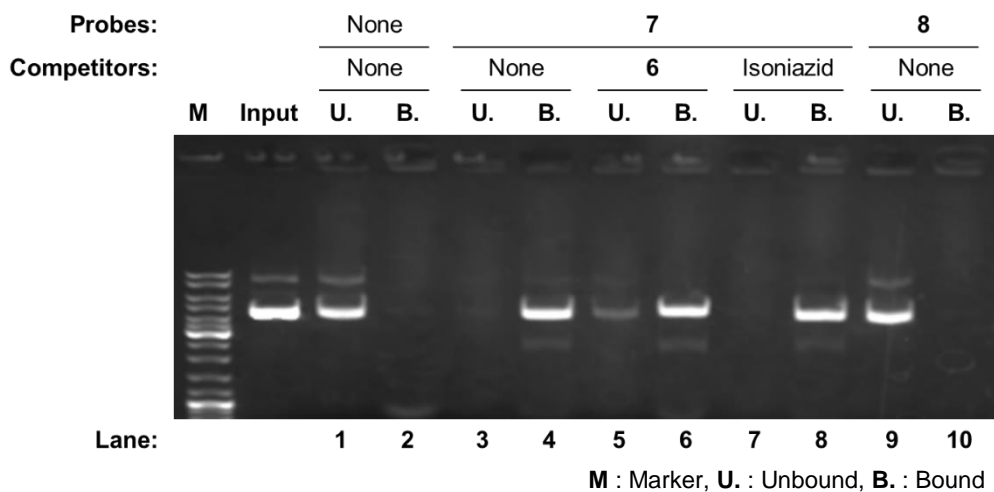


Figure 23 Nybomycin probe (7)および dummy probe (8)と S3 エリアを組み込んだプラスミドとの結合能解析

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)。

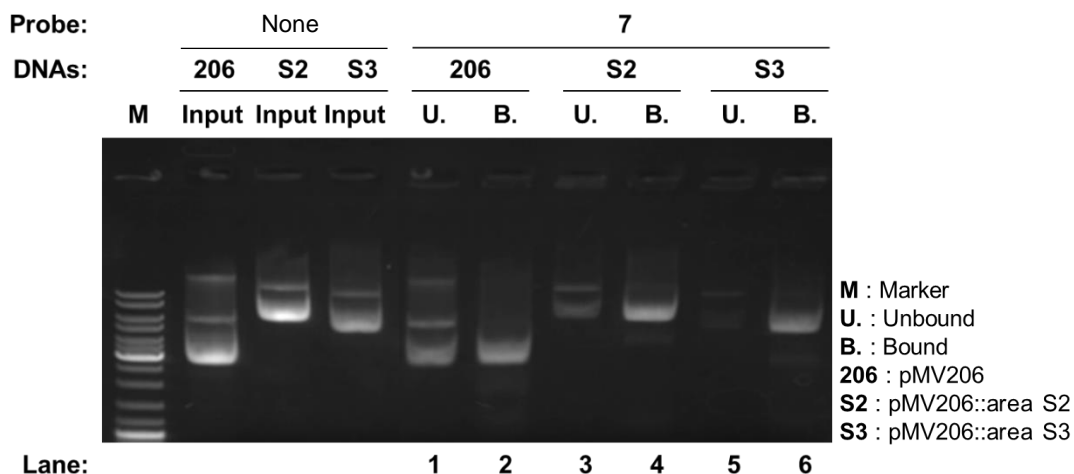


Figure 24 Nybomycin probe (7)と各プラスミドとの結合親和性の比較

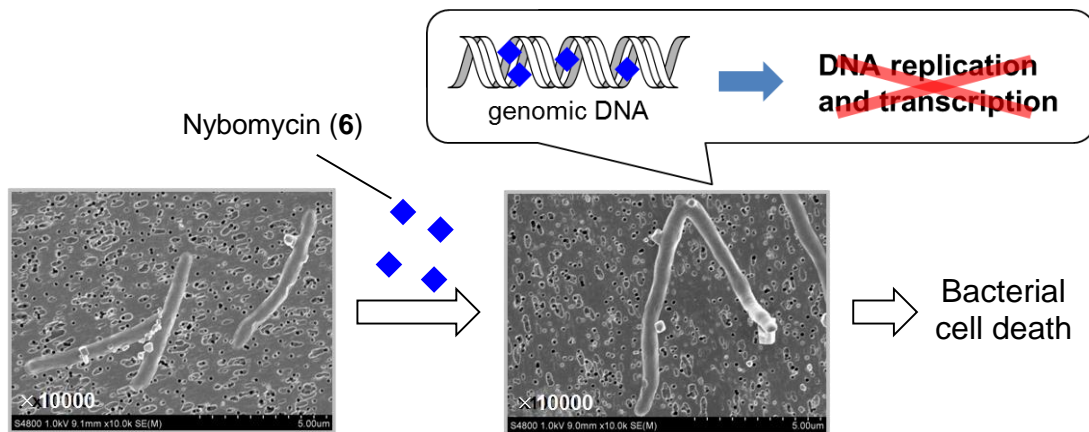


Figure 25 Nybomycin (6)の作用メカニズム

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)。

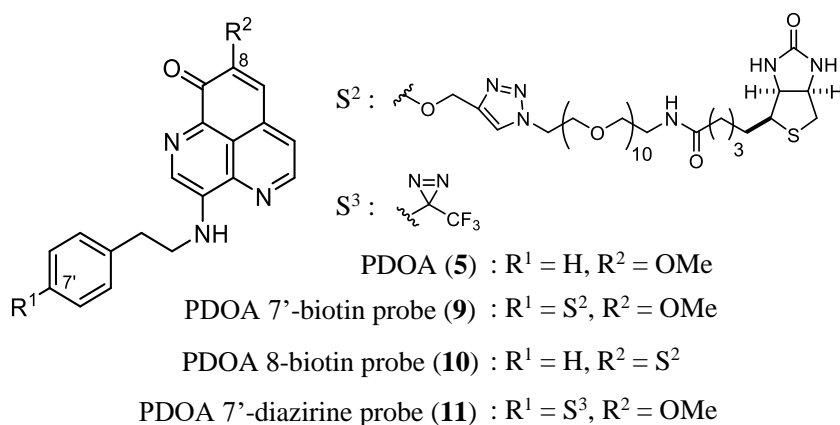


Figure 26 PDOA (**5**)および PDOA のプローブ分子 **9-11** の化学構造

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

Compounds	MIC (μM)			
	<i>M. smegmatis</i>		<i>M. bovis</i> 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

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。

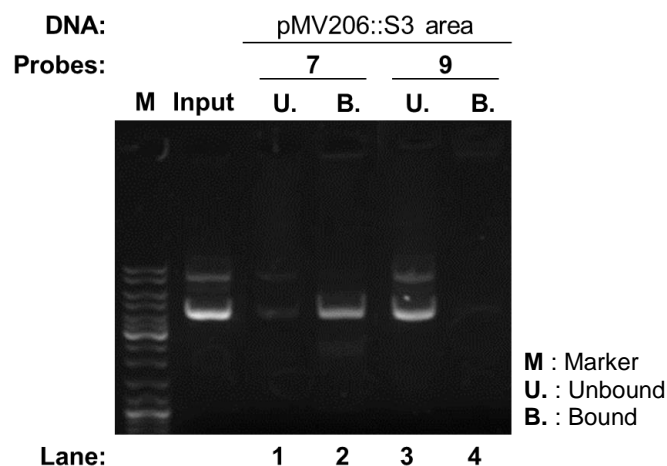


Figure 27 PDOA (5)のプラスミドに対する結合能の検証

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)。

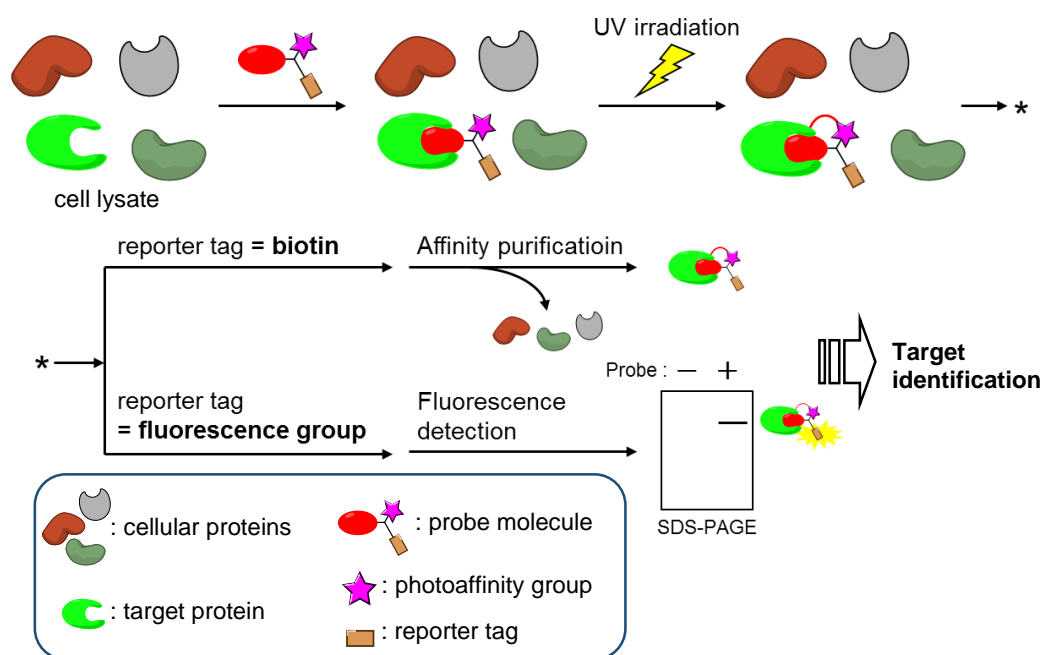


Figure 28 一般的な光アフィニティラベリング法による標的分子解析の概要

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)。

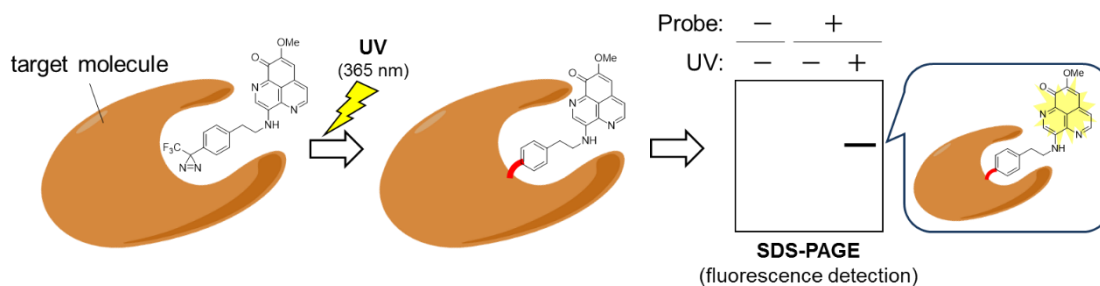


Figure 29 光アフィニティプローブ **11** を使用した光アフィニティラベリング法による標的分子解析の概略

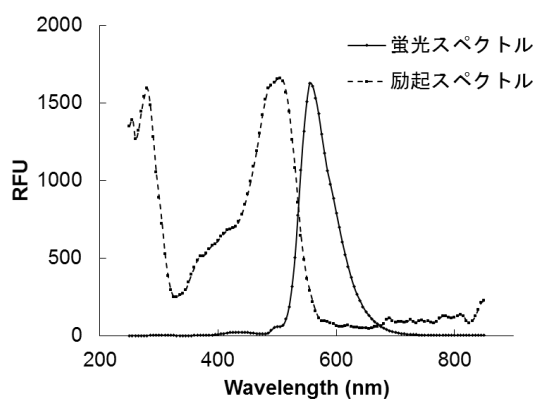


Figure 30 PDOA (**5**)の蛍光および励起スペクトル

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)。

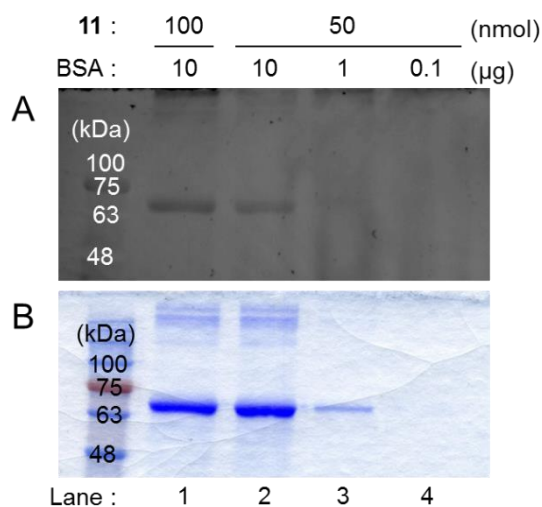


Figure 31 プローブ **11** の必要量と検出できる BSA 量の検討
A) 蛍光による検出、B) CBB 染色による検出

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 μ g 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。

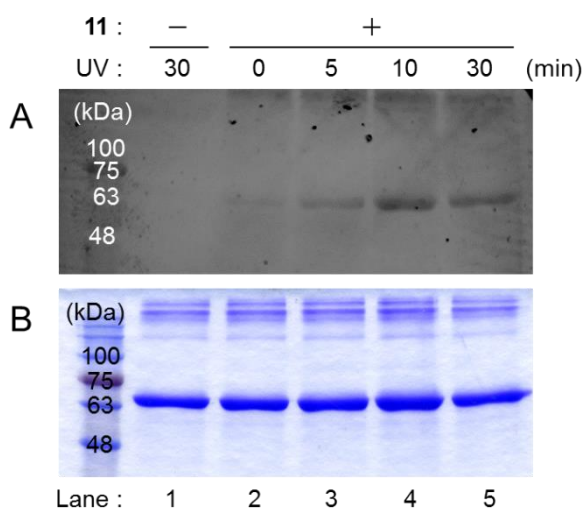


Figure 32 紫外線照射時間によるプローブ **11** の標識効率の検討
A) 蛍光による検出、B) CBB 染色による検出

第五節 光アフィニティラベリング法による標的分子解析

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碎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碎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、菌体破碎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。

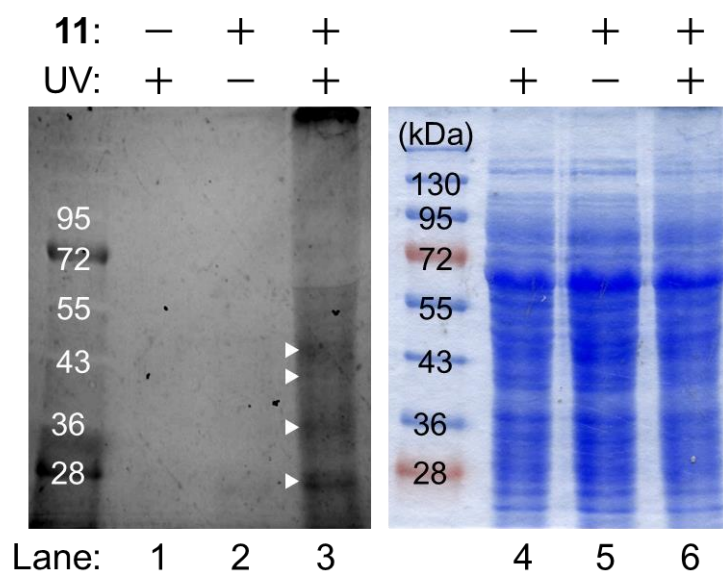


Figure 33 プローブ **11** で標識された PDOA (**5**) の標的候補タンパク質
A) 蛍光による検出、B) CBB 染色による検出

結論

- 1) 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。
- 2) 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 を分与していただきました 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へ感謝いたします。

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($^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$)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 ^{13}C : 150 MHz)または JEOL RESONANCE 製 ECA-500 (^1H : 500 MHz および ^{13}C : 125 MHz)を用いて測定し、 CDCl_3 を内部標準とし、chemical shift は δ (ppm)、結合定数は $J = (\text{Hz})$ で表示した。また、 $^1\text{H-NMR}$ 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. \times 250 mm)を使用し、逆相カラムは Nacalai tesque 製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm i.d. \times 250 mm)、Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10 mm i.d. \times 250 mm)、および資生堂製 Capcellpak MG-II (10 mm i.d. \times 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* 属細菌の破碎には 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槽は 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槽には、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。

Mycobacterium 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 °C、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™ 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を用いた。

1b) *M. bovis* BCG 用 Middlebrook 7H9 液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 900 mL に溶解させ、121 °C、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™ Middlebrook 7H9 Broth	4.7	g	BD
	Glycerol	2.0	mL	キシダ化学
B:	Difco™ 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) M. smegmatis 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 °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 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 µg/mL または 50 µg/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™ Middlebrook 7H10 Agar	19	g	BD
	Glycerol	5.0	mL	キシダ化学

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

試薬 A を高純度精製水 900 mL に溶解後 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、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™ Middlebrook 7H10 Agar	4.7	g	BD
	Glycerol	5.0	mL	キシダ化学
B:	Difco™ 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-Dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium 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) 細菌数の計測

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 1×10^8 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) *M. smegmatis* 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、 1×10^5 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(1×10^4 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) *M. smegmatis* 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 $^{\circ}\text{C}$ 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、 1×10^5 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 (1×10^4 CFU/100 μL /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 $^{\circ}\text{C}$ で 96 時間培養した。培養後、MTT solution 10 μL 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 Middlebrook 7H9 液体培地を含む square media bottle に、-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した *M. bovis* BCG 1 mL を植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ 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、 1×10^6 CFU/mL に希釈後、100 μL ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した (1×10^5 CFU/100 μL /well)。その後、被検薬物を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μL 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) *M. bovis* BCG に対する低酸素条件化での抗菌活性の評価法

M. bovis BCG 用 Middlebrook 7H9 液体培地により培養した菌液 1 mL を 9 mL の *M. bovis* BCG 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 $^{\circ}\text{C}$ 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、 1×10^6 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 (1×10^5 CFU/100 μL /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 $^{\circ}\text{C}$ で 2 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μL 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 °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。

A:	Malt extract	2.0	%	nacalai tesque
	Glucose	2.0	%	nacalai tesque
	Bacto™ 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) MG 液体培地の調製

試薬 A を人工海水(マリンアート SF-1)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。

A:	Malt extract	2.0	%	nacalai tesque
	Glucose	2.0	%	nacalai tesque
	Bacto™ 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 °C、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

1) 真菌保存溶液の調製

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。

A:	Bacto™ 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 $^{\circ}\text{C}$)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.からのナフトキノロン類(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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、低酸素条件で MIC = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ で 1 週間振盪培養した。これを米固体培地(25 g \times 10)に植菌し、さらに 30 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ で減圧濃縮した。得られた抽出物(39 g)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(5.2 g)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、低酸素条件で MIC = 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 \rightarrow 6:4:1 \rightarrow 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC、低酸素条件で 2.5 および 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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. \times 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. \times 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) TE buffer

	最終濃度	
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM	Wako
EDTA	1 mM	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 μ L 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 μ L 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 R_f 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 *Aptos* 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 *Aptos* sp. 09C21 の MeOH 抽出物に、*M. smegmatis* に対して好気条件で MIC 200 μ g/mL、低酸素条件で MIC 100 μ g/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(32 g) 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(2 g) 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-2,3-dioxoaaptamine (**f**)、8,9,9-trimethoxy-9*H*-benzo[*de*][1,6]naphthyridine (**g**) および 10-methoxy-benzimidazo[6,7,1-*def*][1,6]naphthyridine (**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 → 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) 10% Glycerol + Tween 80 溶液の調製

試薬 A に高純度精製水を加えて 1 L 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) *Mycobacterium* 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 µg/mL、40 µg/mL もしくは 100 µg/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 µg/mL、40 µg/mL もしくは 100 µg/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) *M. bovis* BCG ゲノム DNA ライブラリーによる *M. smegmatis* 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 Middlebrook 7H9 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ト (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) コスミド DNA のシーケンス解析

コスミド DNA のシーケンス解析は、primer として pYUB145_F (5'-GTACGCCACCGCCTGGTTC-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) *M. bovis* BCG ゲノム DNA の調製

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 proteinase 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) プライマーの設計

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 name	Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR Condition
S1 area	NyArea1_F2_KpnI	<u>GGTACCGTTCGGTGAACAGCCCAAG</u> KpnI	3.6 kb	A, B
	NyArea1_R_HindIII	<u>AAGCTTCGTTGTGCGGACATCACC</u> HindIII		
S2 area	NyArea5_F_KpnI	<u>GGTACCAACGGGTGACCGTGAAGT</u> KpnI	4.2 kb	A, C
	NyArea5_R_ClaI	<u>ATCGATTCGATGCGTCGGCAGTC</u> ClaI		
S3 area	NyArea6_F_XbaI	<u>TCTAGACGTTTGGCCACCTGGTAGC</u> XbaI	2.4 kb	A, B
	NyArea6_R_ClaI	<u>ATCGATCCGGGATGCTCCCTATTGC</u> ClaI		

Area name	Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR Condition
S4 area	B_3753c_F_HindIII	<u>AAGCTTT</u> GCGCAGGGTGGAC HindIII	1.0 kb	A, B
	B_3753c_R_HpaI	GTTAACGTCGTGTCGCGAGTTTC HpaI		
S5 area	B_leuA_F_HindIII	<u>AAGCTT</u> ACCATCCCGGAGCAAC HindIII	2.6 kb	D, E
	B_leuA_R_HpaI	GTTAACTCATGCCGCGGACC HpaI		

3) PCR

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:		Temperature	time	cycle
primer_forward	1.0 µL	B: 94 °C	5 min	1
primer_reverse	1.0 µL		94 °C	15 sec
Template	1.0 µL	57 °C	30 sec	30
5×buffer	10 µL	68 °C	2.5 min	
10 mM dNTPs	1.5 µL	68 °C	10 min	1
DMSO	1.0 µL	C: 94 °C	5 min	1
Polymerase	0.5 µL		94 °C	15 sec
H ₂ O	34 µL	55 °C	30 sec	30
total	50 µL	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:		Temperature	time	cycle
primer_forward	1.0 µL	E: 98 °C	1 min	1
primer_reverse	1.0 µL		98 °C	10 sec
Template	1.0 µL	63 °C	20 sec	30
5×buffer	10 µL	72 °C	80 sec	
10 mM dNTPs	1.0 µL	72 °C	2 min	1
GC Enhancer	10 µL			
Polymerase	0.5 µL			
H ₂ O	25.5 µL			
total	50 µL			

4) PCR 産物の精製

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 μ L を添加後、50 $^{\circ}$ 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 μ L を添加し転倒混和した後、QIAquick スピんカラムに共し、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。次にスピんカラムに Buffer QC 600 μ L を添加して 12000 rpm で 1 分間遠心分離した。さらにスピんカラムに Buffer PE 750 μ L 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 μ L の滅菌蒸留水を加えて 5 分間室温で放置し、12000 rpm で 1 分間遠心分離することにより目的の PCR 産物を精製した。

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 CloneTM-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。

5a) 3'末端の dA 付加 (S5 エリアのみ)

3'末端の dA 付加は A の組成で反応液を調製し、60 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。

A:	PCR 産物	10.8	μ L
	10 \times Buffer	1.8	μ L
	25 mM MgSO ₄	0.8	μ L
	2 mM dNTPs	1.8	μ L
	10 \times A-attachment	2.0	μ L
	H ₂ O	2.8	μ L

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

5b) ライゲーション

ライゲーションは A の組成でライゲーション液を調製し、室温で 30 分間反応させた。

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

5c) *E. coli* DH5 α の形質転換

ライゲーション反応液を *E. coli* DH5 α コンピテントセル 100 μ L に添加し、30 分間氷冷した。42 $^{\circ}$ C 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 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間震盪培養後、100 μ L の X-gal (20 mg/mL, Wako) を塗布した 100 μ g/mL の ampicillin を含む LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。生育した白色コロニーを、ampicillin を 100 μ g/mL 含む LB 液体培地 5 mL に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

5d) *E. coli* DH5 α からのプラスミドの抽出

培養した *E. coli* DH5 α 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 μ L に懸濁後、あらかじめ 250 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L の滅菌精製水を加えることでプラスミド溶液を得た。

6) シーケンシング

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) *Mycobacterium* 用発現ベクターへのサブクローニング

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	μ L
	制限酵素処理した pMV261 or pMV206	1.0	μ L
	T4 DNA ligase	1.0	μ L
	10 \times T4 ligase buffer	2.0	μ L
	total	20	μ L

次に、ライゲーション反応液 10 μ L を使用し、*E.coli* DH5 α 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 μ g/mL)、pMV206 とライゲーションしたサンプルは hygromycin B (150 μ g/mL)を含む LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ 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 μ g/mL)または hygromycin B (100 μ g/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、エレクトロ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 μ g/mL)または kanamycin (20 μ g/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 $^{\circ}$ C で振盪培養した。培養後、 1.0×10^7 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 μ L 塗布した(1.0×10^5 CFU/10 μ L)。そして、37 $^{\circ}$ 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

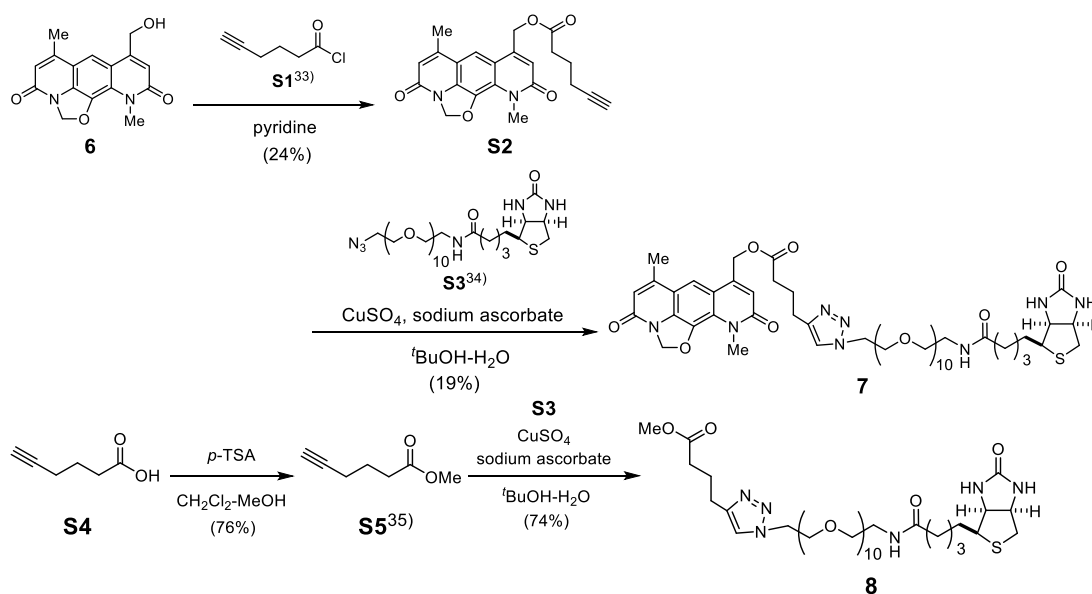
	最終濃度		
Tris-HCl (pH 7.5)	5	mM	Wako
EDTA	0.5	mM	同仁化学
NaCl	1	M	キシダ化学

2) DNA loading dye

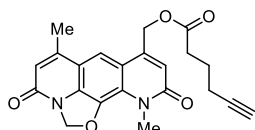
	最終濃度		
EDTA	5	mM	同仁化学
SDS	0.5	%	SERVA
Glycerol	30	%	キシダ化学
Bromophenol Blue	0.05	%	Wako

・ 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 **S1**³³⁾ 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 **S3**³⁴⁾ 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 **S5**³⁵⁾ と **S3** の Huisgen 反応により、dummy probe (**8**) を合成した。



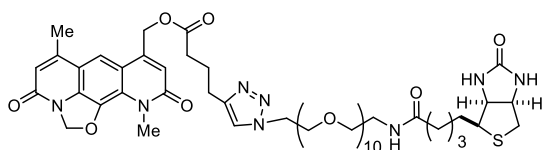
Scheme 1 Nybomycin probe (**7**) および dummy probe (**8**) の合成



Nybomycin 5-hexynoate 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-hexynoic acid chloride (**S1**, 43.6 mg, 0.335 mmol, 20 equiv.) を加え、室温で 24 時間攪拌した後、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 → CHCl₃ → CHCl₃:MeOH = 50:1 → 20:1) で精製し、**S2** (2.4 mg, 24%) を淡黄色固体として得た。

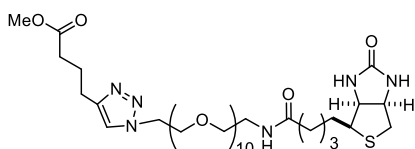
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.36 (1H, s), 6.75 (1H, s), 6.49 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 6.40 (2H, s), 5.38 (2H, d-like), 3.96 (3H, s), 2.62 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 2.51 (3H, d-like), 2.31 (2H, td, *J* = 6.9, 2.6 Hz), 2.00 (1H, t, *J* = 2.6 Hz), 1.96-1.87 (2H, m). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 172.5, 161.6, 158.4, 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 $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (1:1, 0.6 mL)に、 CuSO_4 (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 時間攪拌した。その後、減圧留去し、残渣をカラムクロマトグラフィ [SiO_2 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 40:3:1 \rightarrow 15:3:1$ (lower phase)]で精製し、**7** (1.0 mg, 19%)を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI-TOF) m/z : 1167.5260, calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 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 $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液(1:1, 2.0 mL)に、 CuSO_4 (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 時間攪拌した。その後、減圧留去し、残渣をカラムクロマトグラフィ [SiO_2 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 30:3:1$ (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, CDCl_3) 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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI-TOF) m/z : 901.4568, calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ で冷却した EtOH 250 μL を添加し、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 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。

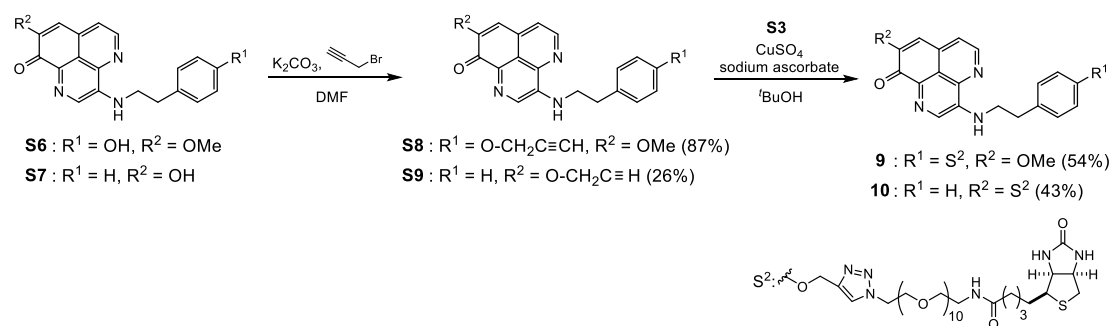
- 3) 電気泳動

Dynabeads は、10 μL の DNA loading dye で懸濁後、 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 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 μL 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。

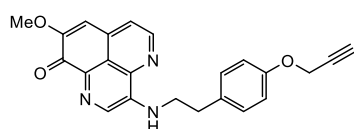
第三章 第一節に関する実験

- ・ **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。



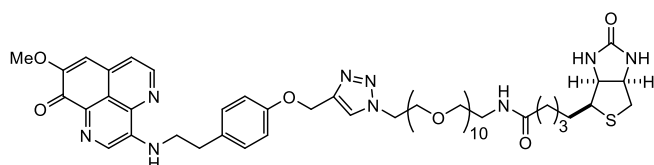
Scheme 2 PDOA のビオチン標識化プローブ **9**, **10** の合成



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 時間攪拌した後、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.

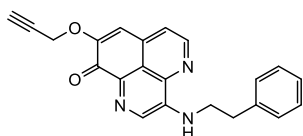


PDOA 7'-biotin probe (**9**)

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 ^tBuOH 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時間攪拌した。その後、減圧留去し、残渣を順相カラムクロマトグラフィ[SiO_2 , CHCl_3 : MeOH : H_2O = 30:3:1 (lower phase)]および逆相カラムクロマトグラフィ(ODS, MeOH : H_2O = 70:30)で精製し、**9** (3.7 mg, 54%)を赤色固体として得た。

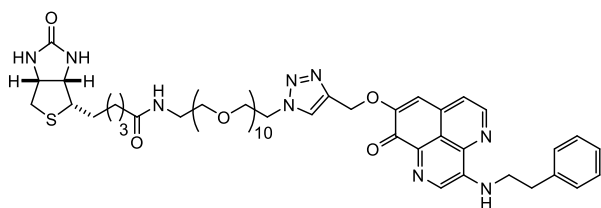
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.75 (1H, d, J = 4.6 Hz), 8.39 (1H, s), 7.85 (1H, s), 7.47 (1H, d, J = 4.6 Hz), 7.19 (2H, d, J = 8.6 Hz), 7.03 (1H, t, J = 6.2 Hz), 6.97 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.62 (1H, s), 5.59 (1H, s), 5.19 (2H, s), 4.87 (1H, s), 4.56 (2H, t, J = 5.0 Hz), 4.50 (1H, t, J = 6.4 Hz), 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 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{79}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{NaS}$ 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 K_2CO_3 (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時間攪拌した後、水を加え、 CHCl_3 で抽出した。有機層を無水 Na_2SO_4 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(SiO_2 , CHCl_3 : MeOH = 30:1 containing 1% Et_3N)および逆相カラムクロマトグラフィ(ODS, MeOH : H_2O = 70:30)にて精製し、**S8** (9.5 mg, 26%)を赤色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 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). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) 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 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ 378.1218; Found: 378.1236.



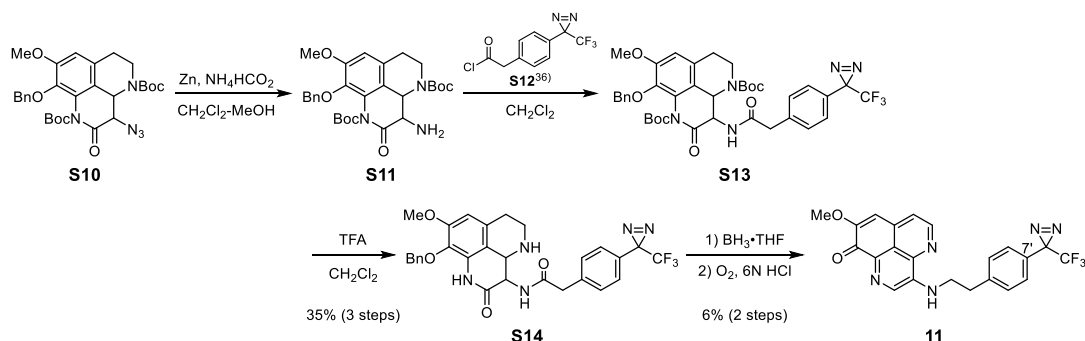
PDOA 8-biotin probe (10)

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 $t\text{BuOH-DMF}$ 溶液(2:5, 0.7 mL)に CuSO_4 (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 時間攪拌した後、さらに、 CuSO_4 (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 時間攪拌した。その後、減圧留去し、残渣を順相カラムクロマトグラフィ [SiO_2 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 30:3:1$ (lower phase)]および逆相カラムクロマトグラフィ (ODS, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 70:30$)で精製し、**9** (4.7 mg, 43%)を赤色固体として得た。

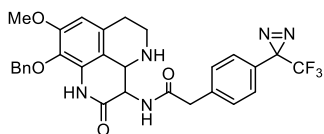
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.73 (1H, d, $J = 4.5$ Hz), 8.39 (1H, s), 7.99 (1H, s), 7.51 (1H, d, $J = 4.5$ Hz), 7.35-7.33 (2H, m), 7.28-7.27 (3H, m), 7.06 (1H, s), 7.02 (1H, t-like, $J = 5.9$ Hz), 6.64 (1H, br s), 5.85 (1H, br s), 5.41 (2H, s), 5.14 (1H, br s), 4.55 (2H, t, $J = 5.0$ Hz), 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 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. HRMS (ESI-TOF) m/z : [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{77}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{NaS}$ 1130.5208; Found: 1130.5222.

・ PDOA の光アフィニティブローブ **11** の合成

PDOA の光アフィニティブローブ **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 **S12**³⁶)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 の光アフィニティブローブ **11** の合成



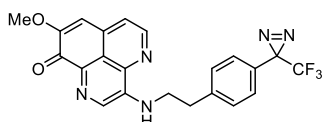
***N*-(9-(Benzyloxy)-8-methoxy-2-oxo-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1*H*-benzo[*de*][1,6]naphthyridin-3-yl)-2-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl)acetamide (S14)**

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時間攪拌した。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時間攪拌した。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時間攪拌した。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時間攪拌した。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時間攪拌した。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) 結合用 PBS 緩衝液

9.6 g の PBS (-)粉末(ニッスイ)を高純度精製水 1 L 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) 2×SDS-sample buffer

	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) SDS-PAGE 用 10×泳動 buffer

	最終濃度		
Tris	0.25	M	Wako
Glycine	1.92	M	Wako
SDS	1	%	SERVA

使用時には、高純度精製水により 10 倍希釈したものをを用いた。

4) SDS-PAGE 用ポリアクリルアミドゲル

	Separating gel			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 $^{\circ}\text{C}$ 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 \times SDS-sample buffer と 1:1 で混合し、100 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 \times SDS-sample buffer と 1:1 で混合し、100 $^{\circ}\text{C}$ 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) *Mycobacterium* 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	mM	Wako
Tween 80	0.05	%	nacalai tesque

必要に応じて、protease inhibitor cocktail (nacalai tesque)を最終濃度 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) *M. bovis* BCG の菌体破砕液の調製

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 °C 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で冷却した acetone 600 μL を添加し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 \times SDS-sample buffer 20 μL に溶解させ、 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.
- 6) 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.
- 8) 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.
- 9) Arai, M.; Kamiya, K.; Shin, D.; Matsumoto, H.; Hisa, T.; Setiawan, A.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 766.
- 10) (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.
- 11) (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.
- 18) 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.
- 27) 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.