

学位論文

微生物二次代謝産物からの 抗真菌薬シード化合物の探索

指導教授

北里大学北里生命科学研究所 微生物応用化学研究室

塩見 和朗

北里大学大学院感染制御科学府

創薬科学履修コース 細胞機能制御科学

DI-17002 坂井 克行

2019 年度

目次

略語集	5
序論	6
本論	
第1章 背景	11
第2章 微生物培養液からの抗真菌物質のスクリーニング方法	
2-1 スクリーニング方法	12
2-2 スクリーニング結果	13
第3章 微生物培養物からの抗真菌活性物質の単離・構造解析および活性評価	
3-1 糸状菌 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株培養物 (lot.1) からの活性物質の 単離・精製および構造解析	14
3-1-1 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株の培養 (lot. 1)	14
3-1-2 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株培養物 (lot. 1) からの活性物質の精製	15
3-1-3 新規化合物 pestiocandin の構造解析	16
3-2 糸状菌 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株培養物 (lot.2) からの活性物質の 単離・精製および構造解析	20
3-2-1 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株の培養 (lot.2)	20
3-2-2 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株培養物 (lot. 2) からの活性物質の精製	21
3-2-3 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株培養物 (lot.2) から取得した化合物の 構造解析	22
3-2-3-1 既知化合物 pestalotic acid A の構造解析	22
3-2-3-2 新規化合物 pestynol の構造解析	23
3-2-3-3 Pestynol の絶対立体配置の決定	26
3-3 糸状菌 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物からの活性物質の 単離・精製および構造解析	28
3-3-1 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株の培養	28
3-3-2 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物からの活性物質の精製	29
3-3-3 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物から取得した化合物の構造解析	30

3-3-3-1 4,6'-anhydrooxysporidinone の構造解析	30
3-3-3-2 新規化合物 FKI-7550-1 の構造解析	32
3-4 取得化合物の活性評価の結果	34
3-4-1 <i>Pestalotiopsis humus</i> FKI-7473 株培養物より取得した化合物の 活性評価の結果	34
3-4-2 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物から取得した化合物の 活性評価の結果	36
3-5 3 章のまとめと考察	36
第 4 章 糸状菌 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物からのミトコンドリア阻害剤の 単離・構造解析および活性評価の結果	
4-1 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株の培養	38
4-2 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物からの活性物質の精製	39
4-3 <i>Fusarium</i> sp. FKI-7550 株培養物から取得したミトコンドリア阻害剤の 構造解析	40
4-3-1 既知化合物 sambutoxin の構造解析	40
4-3-2 既知化合物 <i>N</i> -demethylsambutoxin の構造解析	40
4-3-3 既知化合物(-)-6-deoxyoxysporidinone の構造解析	41
4-3-4 新規化合物 fusaramin の構造解析	42
4-3-5 新規化合物 FKI-7550A および B の構造解析	45
4-4 取得化合物の活性評価の結果	49
4-5 4 章のまとめと考察	51
第 5 章 総括	53
実験の部	
第 1 章 培地組成、使用器具および試薬	54
第 2 章 薬剤超感受性出芽酵母を用いたスクリーニング方法	56
第 3 章 第 3 章の実験手法	57
第 4 章 第 4 章の実験手法	60

5 章 取得化合物の各種機器分析のデータ	62
謝辞	129
参考文献	130

略語

ADP	Adenosine diphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
$[\alpha]_D$	Optical rotation
CDCl_3	Chloroform- <i>d</i>
CHCl_3	Chloroform
COSY	Correlation spectroscopy
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethyl alcohol
FBS	Fatal bovine serum
Fig.	Figure
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IC_{50}	Half maximal (50%) inhibitory concentration
IR	Infrared
MeOH	Methyl alcohol
MIC	Minimal inhibitory concentration
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
ODS	octadecyl silica
ROESY	rotating Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
Ppm	parts per million
rpm	revolutions per minute
sp.	Species
UV	ultraviolet

序論

1. 微生物の多様性と微生物二次代謝産物の有用性

微生物は地球上に存在する全ての生物のルーツとして 35 億年前の誕生から進化を繰り返して今日に至っている。個体数においても微生物が地球上で最も多く、すべての生物および環境に多大な影響を及ぼし、微生物なしではすべての高等生物は生存することができない。微生物は広範囲に生息しており、南極、北極、深海、酸性温泉、鉱山、塩湖および砂漠などの極限環境下で生存する微生物も存在する。微生物は天然に存在するほぼすべての化学物質を変換する能力を有していることから、自然界において地球科学的な物質循環を担っている。現在までに分離されている微生物は約 190 万種余りだが、ほとんどの微生物は分離が困難であり全体の 1%しか解明されておらず、未知なる微生物がこの地球上には数多く存在していると考えられている¹⁾。

微生物からは penicillin の発見以来、多くの抗菌物質が発見されてきた。近年では抗菌物質に限らず治療薬として用いられている抗腫瘍剤、免疫抑制剤、酵素阻害剤などの抗生物質が微生物より見出されている。また、薬剤だけでなく特異的な生物活性を有する化合物は細胞機能メカニズムの解明に使用され、生命科学の分野でも活用されている²⁾。このように微生物は今後も未知の可能性を秘めた物質を人類に与え続けることが期待される。

1980 年から 2010 年までに開発された低分子新薬のうち、天然物およびその誘導体を集計すると全体の約三分の一に相当する³⁾。さらに、何らかの形で天然物と関係がある新薬を足し合わせていくと全体のおよそ三分の二 (64%) に達し、新薬のリード化合物の多くは天然物であった³⁾。しかし近年、微生物によるランダムスクリーニングの煩雑さやコストパフォーマンスの悪さを理由に微生物由来の新たな化合物の探索による創薬研究は縮小傾向にあり、既存の天然化合物や合成化合物をリード化合物として創薬研究を効率的かつ迅速に進める傾向にある。ただここ数年間で開発された新薬の数は減少傾向にある。これは合成品の構造の多様性に限界があるためと考えられ、天然物が再度見直されるようになってきた。しかし、既存のスクリーニング系では発見できる化合物の多様性に限界があるのも事実であり、スクリーニング系への工夫は非常に大切であると考えられる。

2. 病原微生物との戦い

微生物は人の体内で健康向上の手助けをすることもあるが、人体に対する影響で最も先に思い浮かぶのは感染症である。人類は長らく感染症と戦ってきた。近年、医療技術および衛生環境の整備に伴い、ウイルス、細菌、真菌そして寄生虫などの病原体による感染症は克服されたように見える。しかし、現在においても感染症そのものは決して減少していない。世界中の年間推定死亡者数約 5,600 万人のうち、約 1,470 万人は感染症により命を落としている⁴⁾。これは全世界のおよそ 4 人に 1 人が何らかの感染症により死亡していることになる。

特に、真菌類による感染症（真菌症）は、現在も臨床現場での大きな脅威であり、抗ガン剤治療や HIV 感染などで免疫力の低下した患者の血液や肺、脳など、体の深部に真菌が侵入し感染を引き起こす**深在性真菌症**は、多くの場合重篤で急速に症状が悪化する⁵⁾。現在、深在性真菌症に対して全身投与可能な抗真菌薬は限られており⁶⁾、既に既存の抗真菌薬に耐性を示す病原体が出現している⁷⁾。従って、現在臨床現場で用いられている薬剤とは異なる化学構造あるいは作用機構を有する抗真菌化合物の継続的な探索と開発は急務である。

3. これまでの出芽酵母を利用した微生物二次代謝産物からの活性物質の単離

出芽酵母は真核生物のモデルであり、薬剤評価や薬剤の標的分子の同定そして活性物質の探索に頻繁に用いられている。筆者が所属する北里大学北里生命科学研究所微生物応用化学研究室では、病害虫ミトコンドリアの ATP/ADP carrier protein (AAC) と出芽酵母のミトコンドリアの AAC を組み換えた、病害虫の AAC が発現する遺伝子組み換え出芽酵母を用いて病害虫の AAC を標的とした農薬のシード化合物を探索してきた⁸⁻¹⁰⁾。この探索系で新規化合物の ascosteroside C⁸⁾, ascosteroside D⁹⁾および trichopolyn¹⁰⁾を農薬のシード化合物として取得した (図 1)。

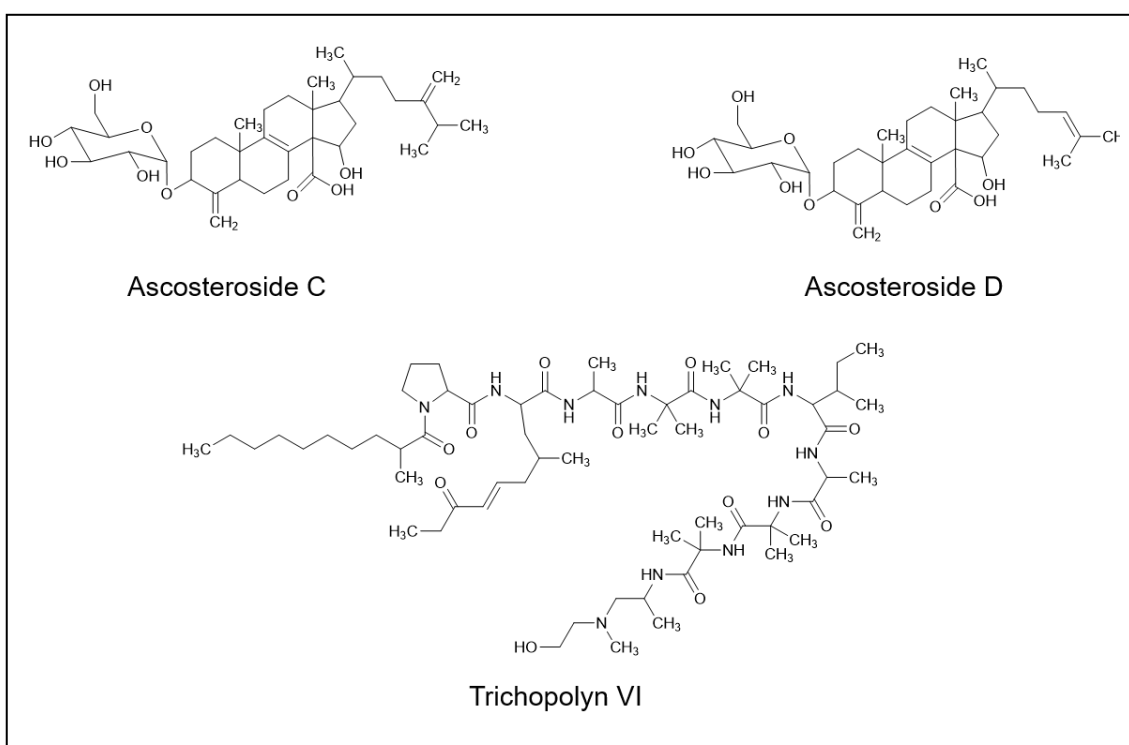


図 1. AAC 組み換え酵母により得られた新規化合物の化学構造

しかしながら、この探索系でのスクリーニングのヒット率 (表 1) は 0.04% と非常に悪く効率的に微生物培養液から農薬のシード化合物を取得していくのは困難であった。そこで、スクリーニングのヒット率の向上そして新規ミトコンドリア阻害剤の取得のため、スクリーニング系の改善を行った。出芽酵母を利用した活性物質の探索を困難にする原因の一つ

に ATP binding cassette トランスポーター (ABC トランスポーター) の発現による高い薬剤耐性が挙げられる¹¹⁾。ABC トランスポーターは、分子内に高度に保存された ATP 結合領域を持ち、ATP の加水分解を利用して機能するタンパク質である。また、細菌から人に至るまで様々な生物種に普遍的に存在し、あるものは細胞膜に局在し薬剤を細胞外へ汲み出す排出ポンプとして働く¹²⁾。細胞膜に局在する 4 つの ABC トランスポーターに関わる遺伝子を破壊した薬剤高感受性出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* BY25929 株 ($\Delta yrr1$, $\Delta yor1$, $\Delta pdr1$, $\Delta pdr3$) を利用することで、今までに見出されていない新たなミトコンドリア阻害剤が取得できることを期待し研究を行ってきた。その結果、スクリーニングのヒット率は 0.8% と改善され (表 1)、ミトコンドリア阻害剤として新規化合物 decatamariic acid¹³⁾ (図 2) が取得された。しかしながら、問題点として venturicidin A および B¹⁴⁾ や DC 1149B¹⁵⁾、simaomicin α ¹⁶⁾、IKD-8344¹⁷⁾、nonactin¹⁸⁾、1-phenazinecarboxylic acid¹⁹⁾ といった既知化合物も活性物質として多く取得されてきた。したがって、さらにスクリーニング系を改善する必要性が考えられた。

表 1 スクリーニング結果の比較

通常の出芽酵母を利用したスクリーニング結果		
	サンプル数	ヒット数 (率)
糸状菌	1,040	0
放線菌	3,499	2
合計	4,539	2 (0.04%)
薬剤高感受性出芽酵母を利用したスクリーニング結果		
	サンプル数	ヒット数 (率)
糸状菌	1,040	22
放線菌	3,499	16
合計	4,539	38 (0.8%)

※サンプルは微生物機能研究室および微生物資源研究センターより供給された。

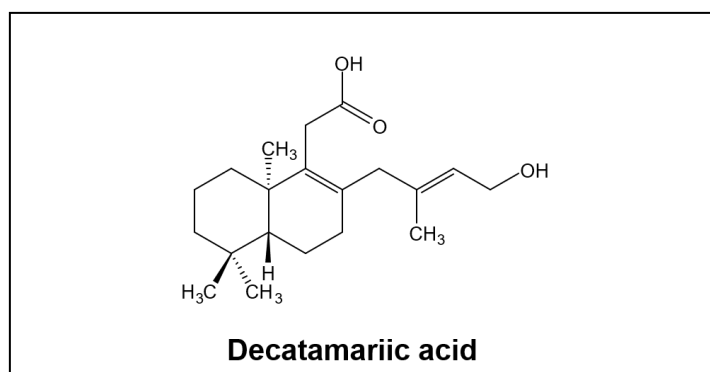


図 2. Decatamariic acid の化学構造

4. 薬剤超感受性出芽酵母 *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株を利用する意義

ABC トランスポーターに関わる遺伝子を 4 つ破壊した薬剤高感受性出芽酵母 (BY25929 株) を用いることで、既存の出芽酵母では取得できなかった化合物を取得することができた。しかしながら多くの既知化合物が活性物質として取得されてくることが問題であった。したがって、より薬剤感受性の高い出芽酵母を用いることで出芽酵母に活性を持つ既存のスクリーニング系では見出されてこなかった新たな化合物が見つかると考えられた。そこで、ABC トランスポーターに関わる遺伝子が 12 個破壊され ($\Delta yrr1$, $\Delta yor1$, $\Delta pdr1$, $\Delta pdr3$, $\Delta pdr8$, $\Delta aus1$, $\Delta pdr5$, $\Delta pdr10$, $\Delta pdr11$, $\Delta pdr12$, $\Delta pdr15$, $\Delta snq2$)、細胞膜の薬剤膜透過性に関わるエルゴステロール²⁰⁾の生合成遺伝子 (*erg 6*) が発現誘導型 (ガラクトース存在下でのみ発現する) になっている薬剤超感受性出芽酵母 *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株²¹⁾を用いて研究を進めることにした。

本研究ではスクリーニングにおいて、これまで使用してきた出芽酵母で取得できる化合物を除くため BY25929 株と 12geneΔ0HSR-iERG6 株で 12geneΔ0HSR-iERG6 株のみ生育阻害を示す菌株を選択することにした。このスクリーニング系の工夫により、新規抗真菌剤創製に有用なシード化合物を探しだせると考えた。

本論

第1章 背景

出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は薬剤のスクリーニングや薬剤ターゲットの推定、同定、生物活性物質の評価を含むケミカルバイオロジー研究で広く使用されている。しかしながら、*S. cerevisiae* の細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの亢進による高い薬剤耐性は化合物の探索や解析を困難にしている^{11, 21)}。特に薬剤排出ポンプである ATP binding cassette (ABC) transporter は広範囲の物質を基質とするため種々の薬剤を細胞外に排出する。したがって、薬剤感受性を有した *S. cerevisiae* を利用すればこれまで ABC transporter により排出されたためスクリーニングで選択されてこなかった化合物を探索することが可能になると考えられる。そこで、細胞膜に局在する ABC transporter の発現に関わる 12 個の遺伝子を破壊し、さらに外界からの薬剤に対して透過障害となっているエルゴステロール²⁰⁾の生合成に関与する Erg6 の遺伝子の発現を抑制した薬剤超感受性の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株を利用して微生物培養液から新しい抗真菌薬シード化合物を探索することを目的に研究を行った。

第2章 微生物培養液からの抗真菌物質のスクリーニング方法

本章では薬剤排出機構破壊株を用いた抗真菌活性の評価方法について述べる。

2-1 スクリーニング方法

本研究におけるスクリーニングでは薬剤感受性出芽酵母である *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株と *S. cerevisiae* BY25929 株を使用した。12geneΔ0HSR-iERG6 株は筑波大学生命環境科学研究科臼井研究室から提供して頂いた。スクリーニングで使用した検定菌の BY25929 株は 1 つの ABC トランスポーター (*yor1*) と ABC トランスポーターの発現に関わる 3 つの転写因子 (*yrr1*, *pdr1*, *pdr3*)、計 4 個の遺伝子を破壊した薬剤高感受性出芽酵母であり、12geneΔ0HSR-iERG6 株は 8 つの ABC トランスポーター (*yor1*, *aus1*, *pdr5*, *pdr10*, *pdr11*, *pdr12*, *pdr15*, *snq2*) と ABC トランスポーターの発現に関わる 4 つの転写因子 (*yrr1*, *pdr1*, *pdr3*, *pdr8*)、計 12 個の遺伝子を破壊し、外界からの薬剤の透過障壁となっているエルゴステロールの生合成に関与する *erg6* の発現がガラクトース培地以外では抑制された薬剤超感受性出芽酵母である。スクリーニング方法は簡便かつ効率的に多数のサンプルを検討することが可能なペーパーディスク法により評価した (図 2-1)。

まず、1 次スクリーニングは 6 mm ペーパーディスクに 10 μ L のサンプルを染み込ませ、BY25929 株と 12geneΔ0HSR-iERG6 株での抗真菌活性を比較し、12geneΔ0HSR-iERG6 株にのみ抗真菌活性を示すサンプルを選択した。続いて、2 次スクリーニングでは、再培養を行い活性の再現性およびサンプルの濃度を振ることにより選択性の有無を確認した。再現性は 8 mm ペーパーディスクに 50 μ L のサンプルを染み込ませ 12geneΔ0HSR-iERG6 株に活性を示すかを確認した。選択性は 8 mm ペーパーディスクに 50 μ L および 30 μ L、10 μ L のサンプルを染み込ませ BY25929 株と 12geneΔ0HSR-iERG6 株での抗真菌活性を比較することにより評価した。

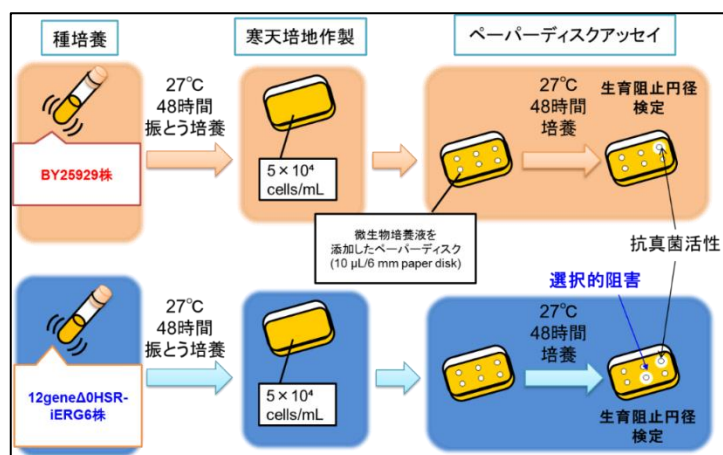


図 2-1 スクリーニング方法

2-2 スクリーニング結果

北里生命科学研究所微生物機能研究室および微生物資源研究センターから供給された放線菌および糸状菌培養液を用いてスクリーニングを行った。

BY25929 株および 12geneΔ0HSR-iERG6 株を検定菌としスクリーニングを行った。放線菌 2,080 サンプル、糸状菌 2,576 サンプル、計 4,656 サンプルから、1 次スクリーニングでは 46 サンプル、2 次スクリーニングでは糸状菌 2 サンプルを精製候補サンプルとして見出した(表 2-1)。

表 2-1 スクリーニング結果

	サンプル数	1 次スクリーニング 通過株数	2 次スクリーニング 通過株数
糸状菌	2,576	16	2
放線菌	2,080	30	0
合計	4,656	46	2

※サンプルは微生物機能研究室および微生物資源研究センターより供給された。

2 次スクリーニングを通過した 2 サンプルを以下に示した。

Pestalotiopsis humus FKI-7473 株 (F36 培地)

Fusarium sp. FKI-7550 株 (F36 培地)

また、スクリーニングを通過した 2 サンプルに対してペーパーディスク法で 12geneΔ0HSR-iERG6 株を植菌したグリセロール含有寒天培地でもアッセイを行った。

アッセイを行った結果、12geneΔ0HSR-iERG6 株を植菌したグルコース含有寒天培地とグリセロール含有寒天培地での阻害活性を比較し、FKI-7473 株は両培地で同程度の活性を示した。一方で、FKI-7550 株はグリセロール含有寒天培地で顕著な阻害活性が確認された。

出芽酵母をグルコース含有培地で生育させると ATP は解糖系とミトコンドリアで生産される。一方グリセロール含有培地では酵母の ATP 産生はミトコンドリアでのみ行われる。したがって、FKI-7550 株培養液中には出芽酵母のミトコンドリアに作用する化合物も含まれていることが示唆された。

FKI-7473 株および FKI-7550 株培養物からの抗真菌活性を有する化合物の取得は第 3 章で、FKI-7550 株培養物からの出芽酵母のミトコンドリアを標的とする化合物の取得は第 4 章で述べた。

第3章 微生物培養物からの抗真菌活性物質の単離・構造解析および活性評価

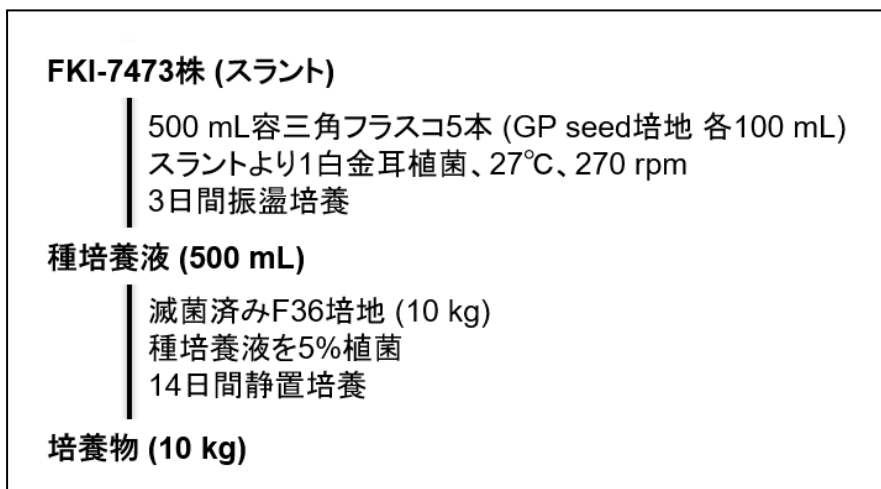
微生物培養液からのスクリーニングにより選択された糸状菌 2 株の培養液から第 2 章で示した活性を指標に抗真菌活性を有する化合物 (新規化合物 3 種、既知化合物 2 種) を単離した。本章では、各化合物生産菌の培養、微生物培養液からの活性物質の単離、構造解析および活性評価について示した。

3-1 糸状菌 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物 (lot. 1) からの活性物質の単離・精製および構造解析

3-1-1 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株の培養 (lot. 1)

糸状菌 FKI-7473 株培養物より活性物質を単離するために種培養した後、生産培養を行った。種培養では GP seed 培地を使用し、生産培養では F36 培地を使用した。

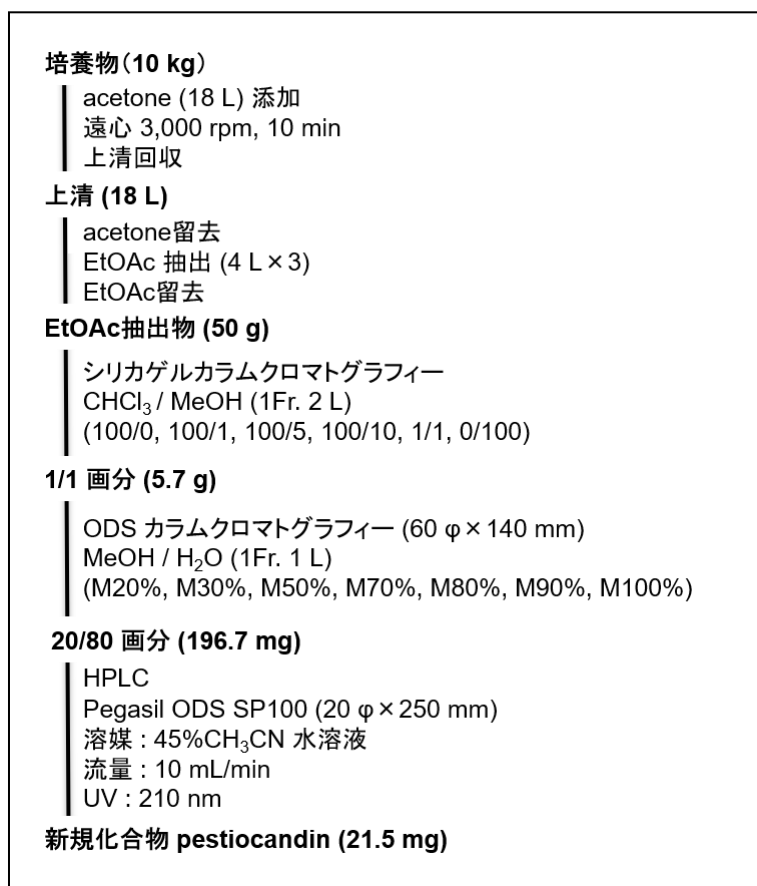
FKI-7473 株を GP seed 培地 100 ml 分注した 500 ml 容三角フラスコ 5 本に 1 白金耳植菌し、27 °C、270 rpm で 3 日間振盪培養した。得られた種培養液を 2 kg の F36 培地に 5%植菌し 14 日間、室温で静置培養することで生産培養を行った (Scheme 3-1)。



Scheme 3-1 FKI-7473 株の培養方法 (lot. 1)

3-1-2 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物 (lot. 1) からの活性物質の精製

FKI-7473 株培養物 (10 kg) に 18 L の acetone を添加し、遠心分離を行った後、上清を回収することで acetone 抽出液 18 L を得た。Acetone 抽出液 18 L から acetone を減圧留去し、4 L の酢酸エチルで 3 回抽出した。続いて、有機層を減圧乾固し酢酸エチル抽出物を 50 g 得た。酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、活性が確認できたクロロホルム/メタノール=1/1 溶出画分を乾固後、水/メタノール系の ODS カラムクロマトグラフィーに供した。水/メタノール=20/80 溶出画分を HPLC (溶媒、45% CH₃CN; 流量、10 mL/min) で分取し、R.T. 80-84 min 溶出画分を回収することで新規化合物 pestiocandin¹⁷⁾を 21.5 mg 単離した (Scheme 3-2)。



Scheme 3-2 FKI-7473 株培養物の精製方法 (lot. 1)

3-1-3 新規化合物 pestiocandin の構造解析

黄色油状物質として得られた新規化合物 pestiocandin について構造解析を行った。Pesticandin の物理化学的特性は表 3-1 に示した。

表 3-1 Pesticandin の物理化学的特性

分子式	$C_{43}H_{62}O_{16}$
分子量	834 (found m/z 857.3962 $[M+Na]^+$, calculated m/z 857.3936 $[M+Na]^+$)
$[\alpha]_D^{27}$	+21 (c 0.1, MeOH)
UV (MeOH) λ_{max} (ϵ)	206 (65,600), 223 (43,200), 263 (30,500)
IR ν_{max} (ATR) cm^{-1}	3362, 2925, 2850, 2359, 2335, 1716, 1699, 1653, 1558, 1541, 1457, 1264, 1150, 1043

高分解能 ESI-MS 解析により分子量 834、分子式 $C_{43}H_{62}O_{16}$ および不飽和度 13 と決定した。重メタノール中で測定した 1H -NMR (400 MHz)、 ^{13}C -NMR (100 MHz)、HSQC スペクトル (Fig. S1、S2 および S4) から 2 個のメチル炭素、12 個の sp^3 メチレン炭素、11 個の sp^3 メチン炭素、12 個の sp^2 メチン炭素、4 個の 4 級炭素、2 個のカルボニル炭素の存在が明らかになった。ケミカルシフト値およびカップリング定数については表 3-2 に示した。

COSY 相関 (図 3-1 の太線、Fig. S3) が H-2'' (δ_H 5.87) から H₃-12'' (δ_H 1.74) まで観測されたため C-2'' (δ_C 121.6) から C-12'' (δ_C 18.2) までの部分構造を決定した。HMBC 解析 (図 3-1 の矢印、Fig. S5) より、H-2'' および H-3'' (δ_H 7.25) から C-1'' (δ_C 168.9) のカルボニル炭素に相関が見られたため、1'' 位から 12'' 位までの部分構造を決定した。

COSY 相関が H-1 (δ_H 4.80) から H-6 (δ_H 3.89 and 4.04) まで観測されたため 1 位から 6 位の糖構造が決定した。また、7 位から 13 位までの構造は HMBC 相関 (Fig. S5) より決定した。さらに、HMBC 相関が H-1 および H-9 (δ_H 6.28)、H-11 (δ_H 6.41)、H₂-13 (δ_H 4.55 and 4.64) から C-7 (δ_C 114.4) へ見られたため、1 位と 7 位の炭素が結合していることを明らかにした。また、H-3 (δ_H 5.18) から C-1'' へ相関が見られ、3 位と 1'' 位間にはエステル結合していることが明らかになった。

COSY 相関が H-1' (δ_H 4.35) と H-2' (δ_H 3.48)、H-3' (δ_H 3.46) と H-4' (δ_H 3.75)、H-5' (δ_H 3.67) と H₂-6' (δ_H 4.13 and 4.20) のそれぞれで見られ、さらに HMBC 相関が H-2' および H-5' から C-1' (δ_C 105.4)、H-3' および H-4' から C-2' (δ_C 72.6)、H-2' および H-4' から C-3' (δ_C 74.7)、H-5' から C-4' (δ_C 70.2)、H₂-6' から C-5' (δ_C 73.9) そして H-5' から C-6' (δ_C 64.5) へ見られたため、1' 位から 6' 位までの糖構造を決定した。さらに、1' 位と 4 位がお互いに HMBC 相関が見られることから 2 つの糖骨格は 1' 位と 4 位間で *O*-グリコシド結合することが明らかになった。

COSY 相関が H-2''' (δ_H 5.91) から H₂-5''' (δ_H 1.49) まで見られたため、2''' 位から 5''' 位まで

の構造を決定した。HMBC 相関が H-2''' および H-3''' (δ_H 7.05) からカルボニル炭素である C-1''' (δ_C 168.0) に見られ、H₂-6' から C-1''' へも HMBC 相関が見られるため、6' 位と 1''' 位間にはエステル結合していることがわかった。また、H₃-12''' (δ_H 0.90) から C-11''' (δ_C 23.7) および C-10''' (δ_C 33.0) へ HNBC 相関が確認できたことから、11''' 位と 10''' 位の炭素のケミカルシフトを決定した。最後に、HSQC-TOCSY 相関 (Fig. S14) が H₂-4''' (δ_H 2.25) から C-6''' (δ_C 30.4) と C-8''' (δ_C 30.7) に、H-5''' から C-7''' (δ_C 30.5) と C-9''' (δ_C 30.4) に、H₃-12''' から C-10''' に確認できたため、C-5''' から C-10''' の部分構造を決定した。また、C-2'' と C-3'', C-4'' と C-5'', C-8'' と C-9'', C-10'' と C-11'' および C-2''' と C-3''' 間のそれぞれの *cis-trans* 異性体は ¹H-NMR のカップリング定数より全て *trans* 型であると決定した。上記の NMR 解析の結果より新規化合物 pestiocandin の構造を決定した²²⁾ (図 3-1)。

また、ROESY 相関 (Fig. S6) が H-1 と H-3 および H-3 と H-5 に観測されたこと、HOHAHA スペクトル (Fig. S7) および ¹H-NMR の H-1 と H-2、H-2 と H-3、H-3 と H-4 および H-4 と H-5 間のカップリング定数がそれぞれ 10.0、9.4、9.4 および 10.0 Hz を示したことより、C-グリコシド結合している糖ユニットはグルコース型であると決定した。さらに、 $J_{H1,2}$ 値が 10 Hz であることから、 β -glucoside であると明らかにした (図 3-2)。

残りの糖ユニットは ROESY 相関 (Fig. S6) が H-1' と H-5' に観測されたこと、HOHAHA スペクトル (Fig. S8) および ¹H-NMR の H-1' と H-2', H-2' と H-3' および H-3' と H-4' 間のカップリング定数がそれぞれ 7.1、10.0 および 1.0 Hz を示したことよりガラクトース型であると決定した。さらに、 $J_{H1,2'}$ 値が 7.1 Hz であることから、 β -galactoside であると明らかにした (図 3-2)。

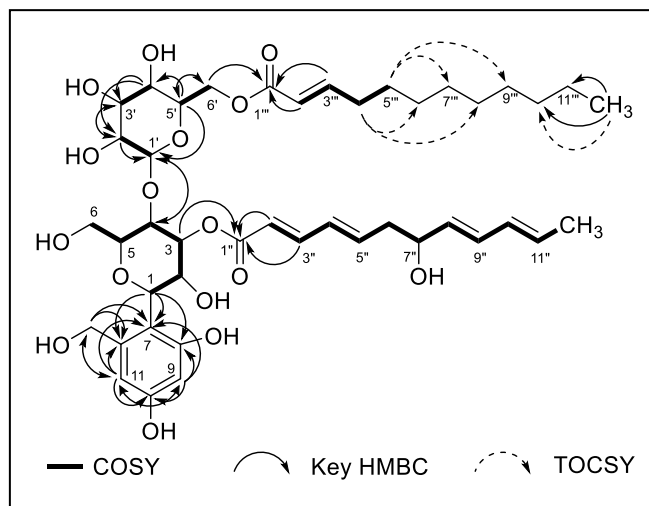


図 3-1 Pestiocandin の化学構造および 2D-NMR 解析

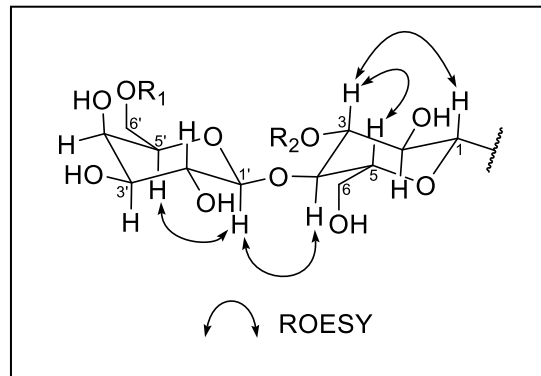


図 3-2 Pesticandin の糖ユニットの ROESY 解析

表 3-2 Pestiocandin の ^1H -および ^{13}C -NMR データ (重メタノール)

<i>Position</i>	δ_{C}	<i>mult.</i>	δ_{H} (<i>int., mult., J in Hz</i>)
1	78.6	CH	4.80 (1H, d, $J = 10.0$ Hz)
2	71.9	CH	3.99 (1H, dd, $J = 10.0, 9.4$ Hz)
3	79.0	CH	5.18 (1H, dd, $J = 9.4, 9.4$ Hz)
4	77.4	CH	3.97 (1H, dd, $J = 10.0, 9.4$ Hz)
5	81.3	CH	3.63 (1H, ddd, $J = 10.0, 3.0, 2.0$ Hz)
6	61.0	CH ₂	3.89 (1H, dd, $J = 12.5, 2.0$ Hz) 4.04 (1H, dd, $J = 12.5, 3.0$ Hz)
7	114.4	C	
8	158.7	C	
9	104.5	CH	6.28 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
10	159.3	C	
11	109.4	CH	6.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
12	143.1	C	
13	63.7	CH ₂	4.55 (1H, d, $J = 12.4$ Hz) 4.64 (1H, d, $J = 12.4$ Hz)
1'	105.4	CH	4.35 (1H, d, $J = 7.1$ Hz)
2'	72.6	CH	3.48 (1H, dd, $J = 10.0, 7.1$ Hz)
3'	74.7	CH	3.46 (1H, dd, $J = 10.0, 1.0$ Hz)
4'	70.2	CH	3.75 (1H, d, $J = 1.0$ Hz)
5'	73.9	CH	3.67 (1H, dd, $J = 7.0, 6.0$ Hz)
6'	64.5	CH ₂	4.13 (1H, dd, $J = 11.2, 7.0$ Hz) 4.20 (1H, dd, $J = 11.2, 6.0$ Hz)
1''	168.9	C	
2''	121.6	CH	5.87 (1H, d, $J = 15.5$ Hz)
3''	146.1	CH	7.25 (1H, dd, $J = 15.5, 10.1$ Hz)
4''	131.9	CH	6.27 (1H, dd, $J = 16.0, 10.1$ Hz)
5''	141.3	CH	6.13 (1H, dt, $J = 16.0, 7.2$ Hz)
6''	42.2	CH ₂	2.38 (2H, m)
7''	72.6	CH	4.14 (1H, dt, $J = 7.1, 5.6$ Hz)
8''	133.9	CH	5.53 (1H, dd, $J = 14.9, 7.1$ Hz)
9''	132.0	CH	6.17 (1H, dd, $J = 14.9, 10.6$ Hz)
10''	132.3	CH	6.04 (1H, dd, $J = 14.9, 10.6$ Hz)
11''	130.4	CH	5.69 (1H, dq, $J = 14.9, 6.9$ Hz)
12''	18.2	CH ₃	1.74 (3H, d, $J = 6.9$ Hz)
1'''	168.0	C	
2'''	121.9	CH	5.91 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)
3'''	151.9	CH	7.05 (1H, dt, $J = 15.6, 6.7$ Hz)
4'''	33.3	CH ₂	2.25 (2H, dt, $J = 7.5, 6.7$ Hz)
5'''	29.2	CH ₂	1.49 (2H, m)
6'''	30.4	CH ₂	^a 1.34 (2H, m)
7'''	30.5	CH ₂	^a 1.32 (2H, m)
8'''	30.7	CH ₂	^a 1.30 (2H, m)
9'''	30.4	CH ₂	^a 1.36 (2H, m)
10'''	33.0	CH ₂	^a 1.29 (2H, m)
11'''	23.7	CH ₂	^a 1.30 (2H, m)
12'''	14.5	CH ₃	0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz)

Data were collected at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C .

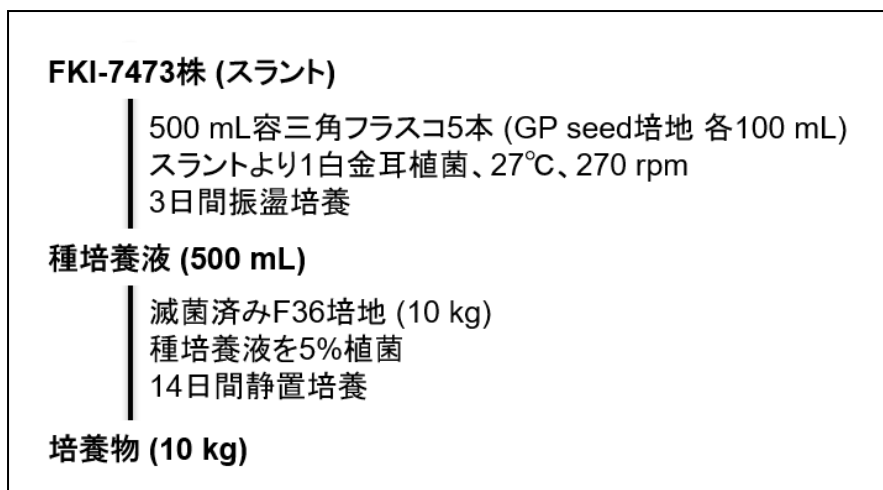
^aOverlapped.

3-2 糸状菌 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物 (lot. 2) からの活性物質の単離・精製および構造解析

Lot. 1 では最も活性の強い化合物を HPLC 分取でピークを特定出来ず、取得することができなかったため、FKI-7473 株の再培養を行った。

3-2-1 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株の培養 (lot.2)

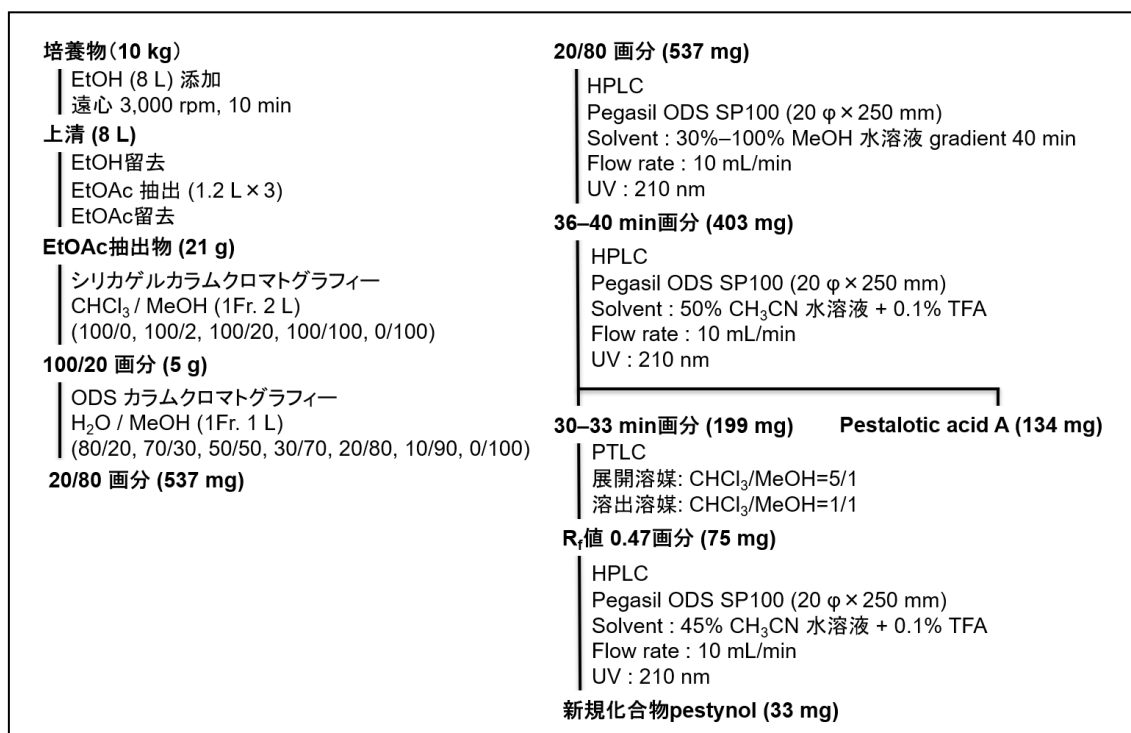
Lot. 1 と同様に培養を行った。種培養は FKI-7473 株を GP seed 培地 100 ml 分注した 500 ml 容三角フラスコ 5 本に 1 白金耳植菌し、27 °C、270 rpm で 3 日間振盪培養した。得られた種培養液を 10 kg の F36 培地に 5%植菌し 14 日間、室温で静置培養することで生産培養を行った (Scheme 3-3)。



Scheme 3-3 FKI-7473 株の培養方法 (lot. 2)

3-2-2 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物 (lot. 2) からの活性物質の精製

FKI-7473 株培養物 10 kg に 8 L の EtOH を加え、遠心分離を行った後、上清を回収することで EtOH 抽出液 8 L を得た。EtOH 抽出液 8 L から EtOH を減圧留去し、等量の酢酸エチルで 3 回抽出した。続いて、有機層を減圧乾固し酢酸エチル抽出物を 21 g 得た。酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、活性が確認できたクロロホルム/メタノール=100/20 溶出画分を減圧乾固後、水/メタノール系の ODS カラムクロマトグラフィーに供した。水/メタノール=20/80 溶出画分を HPLC で 2 段階の精製を行い、2 回目の HPLC 分取で R.T. 21-26 min の画分として既知化合物である *pestalotic acid A*²³⁾ を取得した。さらに、2 回目の HPLC 分取で R.T. が 30-33 min の画分を PTLC で分画後、HPLC 分取を行い、R.T. 50-60 min のピークを回収することで新規化合物 *pestynol*²⁴⁾ を 33 mg 単離した (Scheme 3-4)。また、lot. 1 で取得した *pestiocandin* は lot. 2 の精製過程では観測されなかった。



Scheme 3-4 FKI-7473 株培養物の精製方法 (lot.2)

3-2-3 Pestalotiopsis humus FKI-7473 株培養物 (lot.2) から取得した化合物の構造解析

3-2-3-1 既知化合物 Pestalotic acid A の構造解析

本物質は低分解能 ESI-MS による質量分析から分子量は 378 であった。また、重クロロホルム中での ^1H -NMR (400 MHz、Fig. S15) および ^{13}C -NMR (100 MHz、Fig. S16) のデータから pestalotic acid A と推定された。文献値²³⁾と実測値を比較した結果 *E/Z* の混合物として良い一致を示した (表 3-3) ことから構造を pestalotic acid A (図 3-3) と同定した。

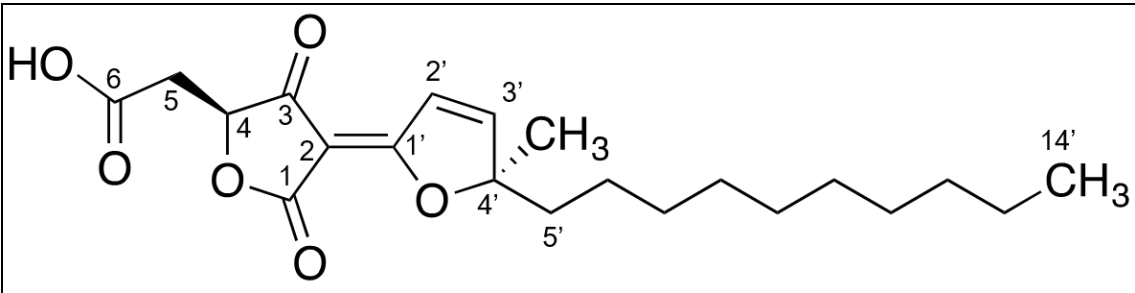


図 3-3 Pestalotic acid A の化学構造

表 3-3 Pestalotic acid A の文献値²³⁾と実測値の ^1H -NMR および ^{13}C -NMR ケミカルシフト値の比較 (重クロロホルム)

No.		文献値				実測値			
		^{13}C		^1H		^{13}C		^1H	
		<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>
1	C	170.0	167.5			170.2	167.7		
2	C	93.6	93.3			93.6	93.2		
3	C	194.1	196.3			194.3	196.3		
4	CH	78.1	78.4	4.87	4.91	78.2	78.5	4.86	4.90
5	CH ₂	35.8	35.8	3.05	3.02	35.9	36.0	3.03	3.01
				2.81	2.85			2.78	2.82
6	C	173.0	173.0			174.1	174.1		
1'	C	179.4	180.2			179.4	180.2		
2'	CH	123.3	123.1	7.50	7.55	123.2	123.0	7.53	7.53
3'	CH	160.3	160.3	7.43	7.45	160.5	160.5	7.45	7.46
4'	C	102.5	102.0			102.5	102.0		
5'	CH ₂	38.1	38.0	1.92	1.98	38.0	37.9	1.85-2.01	1.85-2.01
6'	CH ₂	24.0	24.1	1.20-1.33	1.20-1.33	23.9	24.0	1.22	1.22
7'-11'	CH ₂	29.2-29.5	29.2-29.5	1.20-1.33	1.20-1.33	29.2-29.4	29.2-29.4	1.22	1.22
12'	CH ₂	31.9	31.9	1.20-1.33	1.20-1.33	31.8	31.8	1.22	1.22
13'	CH ₂	22.6	22.6	1.20-1.33	1.20-1.33	22.6	22.6	1.22	1.22
14'	CH ₃	14.1	14.1	0.87	0.87	14.0	14.0	0.85	0.85
15'	CH ₃	23.3	23.2	1.61	1.62	23.2	23.1	1.59	1.60

3-2-3-2 新規化合物 pestynol の構造解析

白色粉末として得られた新規化合物 pestynol について構造解析を行った。Pestynol の物理化学的特性は表 3-4 に示した。

表 3-4 Pestynol の物理化学的特性

分子式	$C_{21}H_{30}O_4$
分子量	346 (found m/z 369.2049 $[M+Na]^+$, calculated m/z 369.2042 $[M+Na]^+$)
$[\alpha]_D^{27}$	-49.4 (c 0.1, MeOH)
UV (MeOH) λ_{max} (ϵ)	202 (20,500), 261 (13,200), 274 (10,500)
IR ν_{max} (ATR) cm^{-1}	3375, 2358, 1398

高分解能 ESI-MS 解析により分子量 346、分子式 $C_{21}H_{30}O_4$ 、不飽和度 7 と決定した。重メタノール中で測定した 1H -NMR (400 MHz)、 ^{13}C -NMR (100 MHz)、HSQC スペクトル (Fig. S17, S18 および S20) から 3 個のメチル炭素、4 個の sp^3 メチレン炭素、1 個の sp^2 メチレン、4 個の sp^3 メチン炭素、3 個の sp^2 メチン炭素、6 個の 4 級炭素の存在が明らかになった。ケミカルシフト値およびカップリング定数については表 3-5 に示した。

COSY 相関 (図 3-4 (a) の太線、Fig. S19) が H-1 (δ_H 4.21) と H-2 (δ_H 3.91)、H-3 (δ_H 3.91) と H-4 (δ_H 4.31)、H-4 と H-5 (δ_H 6.04) の間でそれぞれ見られた。HMBC 相関 (図 3-4 (a) の矢印、Fig. S21) が H-1 から C-3 (δ_C 70.4)、C-5 (δ_C 136.2) および C-6 (δ_C 126.1) へ、H-2 から C-3、C-4 (δ_C 67.5) および C-6 へ、H-3 から C-2 (δ_C 70.8)、C-4 および C-5 へ、H-4 から C-2、C-3、C-5 および C-6 へ、H-5 から C-1 (δ_C 70.2)、C-3、C-4 および C-6 へ相関がそれぞれ見られた。以上の結果から 1,2,3,4-tetrahydroxy-5-cyclohexene ring の存在が明らかになった。H-2 と H-3 のケミカルシフト値はオーバーラップしていたが、H-5 から C-3 への HMBC 相関が見られるため C-2 と C-3 のケミカルシフト値の区別が可能であった。

COSY 相関が H₂-4' (δ_H 2.21) から H-6' (δ_H 5.12) へ、H₂-8' (δ_H 1.98) から H-10' (δ_H 5.08) へそれぞれ見られた。HMBC 相関が H₂-12' (δ_H 5.25, 5.31) から C-3' (δ_C 132.8) および C-4' (δ_C 38.5) へ、H₂-4' から C-3'、C-5' (δ_C 27.7)、C-6' (δ_C 124.5) および C-12' (δ_C 121.8) へ、H₂-5' から C-3'、C-4'、C-6' および C-7' (δ_C 136.8) へ、H-6' から C-4'、C-5'、C-8' (δ_C 40.8) および C-13' (δ_C 16.2) へ、H₃-13' (δ_H 1.63) から C-6'、C-7' および C-8' へ、H₂-8' から C-6'、C-7'、C-9' (δ_C 27.7)、C-10' (δ_C 125.4) および C-13' へ、H₂-9' から C-7'、C-8'、C-10' および C-11' (δ_C 132.1) へ、H-10' から C-8' および C-9' へ、H₃-14' (δ_H 1.67) から C-10'、C-11' および C-15' (δ_C 17.8) へ、H-15' (δ_H 1.60) から C-10' および C-14' (δ_C 25.9) へそれぞれ観測された。以上の結果から 3'位から 15'位までの部分構造を決定した。

残る炭素は2つの4級炭素であり不飽和度2を満たさなければならない。さらに2個の4級炭素の ^{13}C -NMRのケミカルシフト値は89.9および90.9 ppmであることからアルキンが存在することが明らかになった。加えて、HMBC相関がH-1およびH-5からC-1' (δ_{C} 89.9) へ、H-4'およびH-12'からC-2' (δ_{C} 90.9) へ相関が見られた。したがって、アルキンは1,2,3,4-tetrahydroxy-5-cyclohexene ringと側鎖を繋ぐ部分に存在することが導き出され、pestynolの平面構造を図3-4 (a) に示すように決定した。

また、6'位と7'位間の立体配置はNOESY相関 (図3-4 (b) の矢印、Fig. S22) がH-6'とH-8'間に観測されたことより*E*体であると決定した。Pestynolの絶対立体配置の決定は3-2-3-3で述べる。

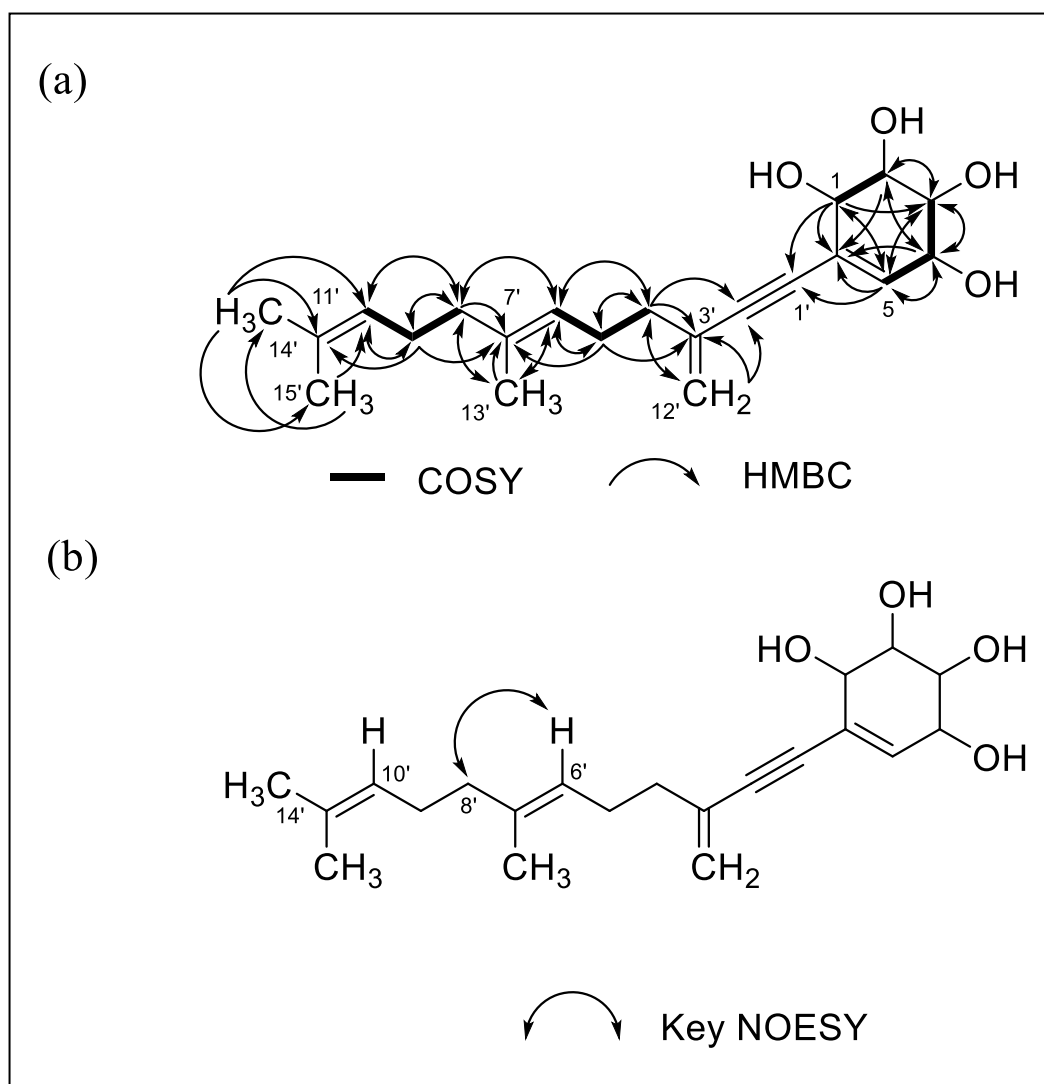


図 3-4 (a) Pestynol の化学構造および 2D-NMR 解析 (b) Pestynol の NOESY 相関

表 3-5 Pestynol の ^1H -および ^{13}C -NMR データ (重メタノール)

<i>Position</i>	δ_{C}	<i>mult.</i>	δ_{H} (<i>int., mult., J in Hz</i>)
1	70.2	CH	4.21 (1H, d, $J = 2.8$ Hz)
2	70.8	CH	3.91 ^a (1H, m)
3	70.4	CH	3.91 ^a (1H, m)
4	67.5	CH	4.31 (1H, dd, $J = 2.2, 4.1$ Hz)
5	136.2	CH	6.04 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)
6	126.1	C	
1'	89.9	C	
2'	90.9	C	
3'	132.8	C	
4'	38.5	CH ₂	2.21 (2H, m)
5'	27.7	CH ₂	2.24 (2H, m)
6'	124.5	CH	5.12 (1H, dt, $J = 1.3, 6.8$ Hz)
7'	136.8	C	
8'	40.8	CH ₂	1.98 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)
9'	27.7	CH ₂	2.08 (2H, dt, $J = 7.4, 7.1$ Hz)
10'	125.4	CH	5.08 (1H, dt, $J = 1.3, 7.1$ Hz)
11'	132.1	C	
12'	121.8	CH ₂	5.25 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 5.31 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
13'	16.2	CH ₃	1.63 (3H, d, $J = 1.3$ Hz)
14'	25.9	CH ₃	1.67 (3H, d, $J = 1.3$ Hz)
15'	17.8	CH ₃	1.60 (3H, s)

Data were collected at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C .
^aOverlapped.

3-2-3-3 Pestynol の絶対立体配置の決定

Pestynol は 1,2,3,4-tetrahydroxy-5-cyclohexene ring の 1、2、3、4 位に不斉炭素原子を持つ化合物であった。4 つの不斉炭素原子の絶対立体配置を決定するために、まず初めに相対立体配置の決定を試みた。Pestynol は 2 位および 3 位の $^1\text{H-NMR}$ のケミカルシフト値がオーバーラップしていたため、カップリング定数による相対立体配置の決定は困難であった。そこで、誘導体を合成し $^1\text{H-NMR}$ のケミカルシフト値を変化させることにより、カップリング定数での相対立体配置の決定を目指した。

Pestynol と *R*-(+)-および *S*-(-)-MTPA 酸を反応させ MTPA エステル体を合成した (図 3-5)。メインの生成物を精製した結果、ESI-MS の値 (Fig. S29 および S30, *R* 体; $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{O}_6$ (found m/z 580.2882, calcd m/z 580.2886 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$), *S* 体; $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{O}_6$ (found m/z 580.28858, calcd m/z 580.28860 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$)) より mono-MTPA エステル体が得られた。また、メインの生成物は 4 位の $^1\text{H-NMR}$ のケミカルシフト (Fig. S23 および S27) のみが低磁場シフトしたことより、4 位の水酸基と MTPA が反応した mono-MTPA エステル体であった。

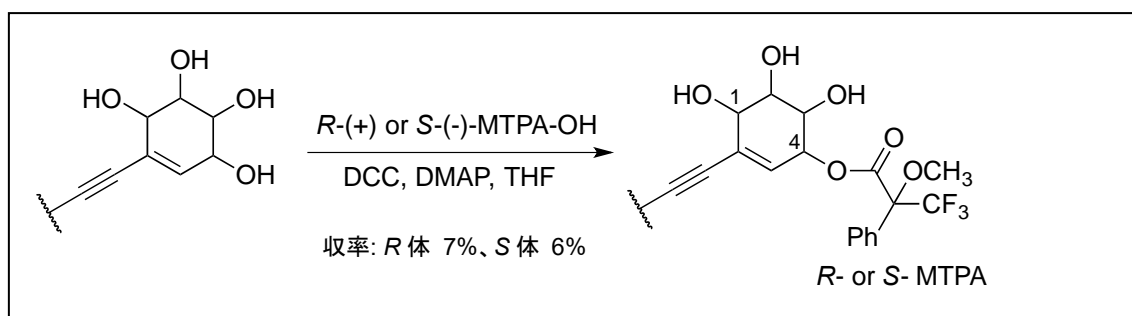


図 3-5 Pestynol のシクロヘキセン環の拡大図および MTPA エステル体の合成

さらに、mono-(*R*)-MTPA エステル体の $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数より、H-2 と H-3 間は 9.7 Hz でカップリングしていることから 2 位と 3 位のプロトンは 2,3-diaxial と決定した。H-1 と H-2 および H-3 と H-4、H-4 と H-5 の $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数はそれぞれ 4.3、4.5、4.9 Hz と小さかったため、1 位および 4 位のプロトンは equatorial であることが明らかになり pestynol の相対立体配置は 1*R**, 2*R**, 3*R**, 4*R** と決定した (図 3-6)。

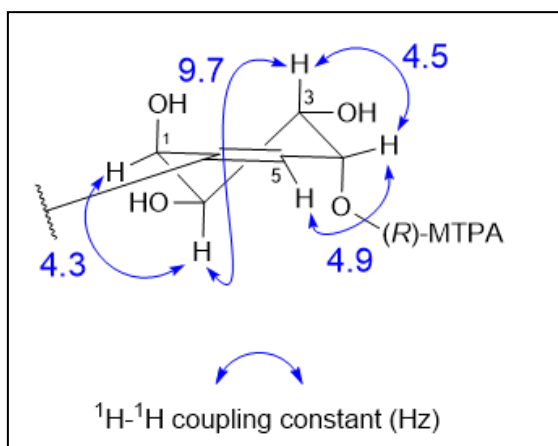


図 3-6 Pestynol の mono-(*R*)-MTPA エステル体のシクロヘキセン環の拡大図および $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数

相対立体配置が決定したので絶対立体配置を改良モッシャー法により決定することにした。Mono-MTPA エステル体の *S* 体から *R* 体の $^1\text{H-NMR}$ のケミカルシフト値を引いた $\Delta\delta$ 値を算出した結果 (図 3-7)、MTPA が結合した 4 位を中心に左右に $\Delta\delta$ 値が正と負で別れていることおよび MTPA が結合した位置から離れるほど $\Delta\delta$ 値が小さくなっていることより、pestynol は改良モッシャー法が適応できる化合物であると明らかになった。したがって、改良モッシャー法²⁵⁾により 4 位の絶対立体配置を *R* 体であると決定した。Pestynol の相対立体配置は $1R^*, 2R^*, 3R^*, 4R^*$ であるので、絶対立体配置は $1R, 2R, 3R, 4R$ であると決定した (図 3-8)。

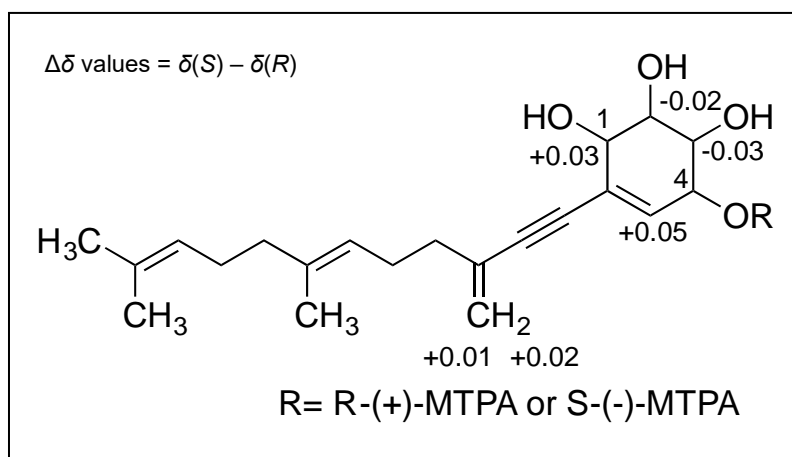


図 3-7 改良モッシャー法による絶対立体配置の決定

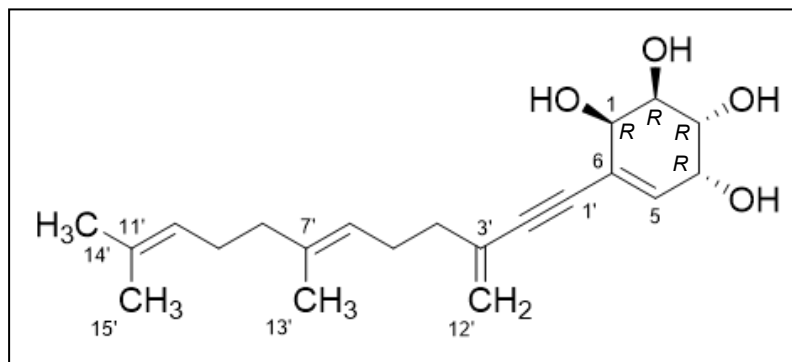


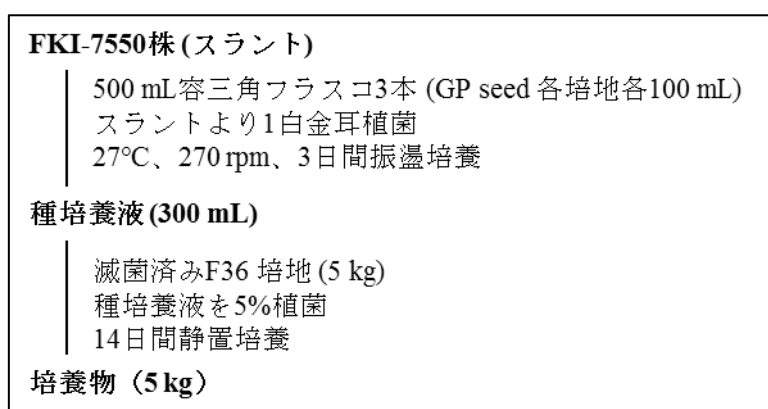
図 3-8 Pestynol の絶対立体配置

3-3 糸状菌 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物からの活性物質の単離・精製および構造解析

3-3-1 *Fusarium* sp. FKI-7550 株の培養

糸状菌 FKI-7550 株より活性物質を単離するために種培養した後、生産培養を行った。
種培養では GP seed 培地を使用し、生産培養では F36 培地を使用した。

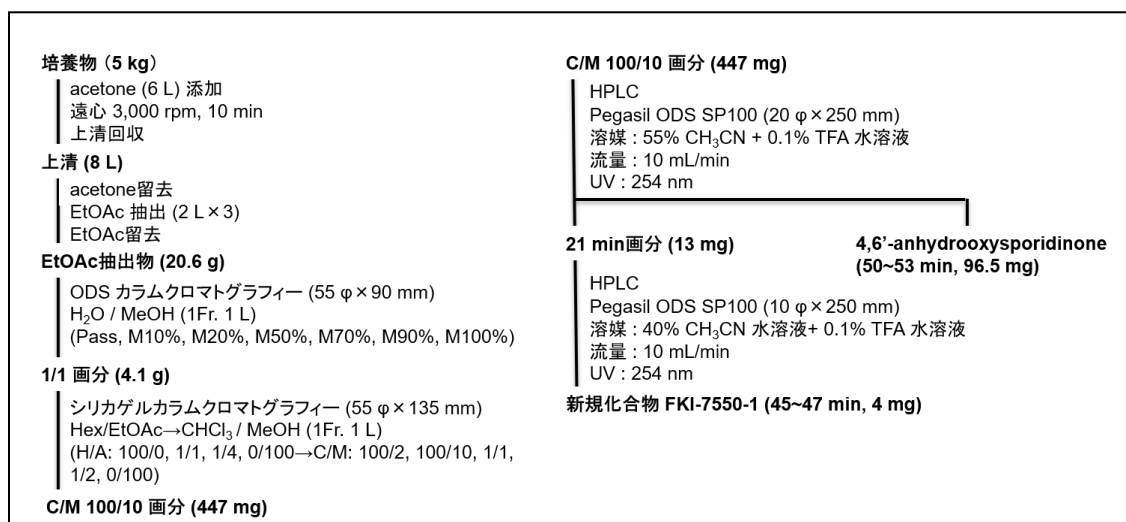
FKI-7550 株を GP seed 培地 100 ml 分注した 500 ml 容三角フラスコ 3 本に 1 白金耳植菌し、27℃、270 rpm で 3 日間振盪培養した。得られた種培養液を 5 kg の F36 培地に 5%植菌し 14 日間、室温で静置培養することで生産培養を行った (Scheme 3-5)。



Scheme 3-5 FKI-7550 株の培養方法

3-3-2 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物からの活性物質の精製

FKI-7550 株培養物 5 kg に acetone を 6 L 添加後、遠心分離し上清を回収することで、acetone 抽出液 8 L を得た。Acetone を減圧留去した後、2 L の酢酸エチルで 3 回抽出し、酢酸エチルを減圧留去することで、酢酸エチルを抽出物 20.6 g 取得した。得られた酢酸エチル抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーに供し、活性の確認できた水/メタノール=10/90 溶出画分を減圧乾固した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。活性の確認できたクロロホルム/メタノール=100/10 溶出画分を減圧乾固し、HPLC で分取を行うことにより R.T. 50-53 min の溶出画分として既知化合物の 4,6'-anhydrooxysporidinone²⁶⁾ を 97 mg 単離した。また、HPLC 分取により得られた 21 min 溶出画分を再度別の分離条件下で HPLC による分取を行うことで新規化合物 FKI-7550-1 物質を 4 mg 単離した (Scheme 3-6)。



Scheme 3-6 FKI-7550 株培養物の精製方法

3-3-3 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物から取得した化合物の構造解析

3-3-3-1 4,6'-anhydrooxysporidinone の構造解析

本物質は MS 解析より分子量 471 であり 4,6'-anhydrooxysporidinone と推定された (図 3-11)。重メタノール中での ^1H -NMR (Fig. S31) および ^{13}C -NMR (Fig. S32) のケミカルシフト値を文献値と実測値で比較した (表 3-6)。その結果、既知化合物の 4,6'-anhydrooxysporidinone²⁶⁾と同一した。

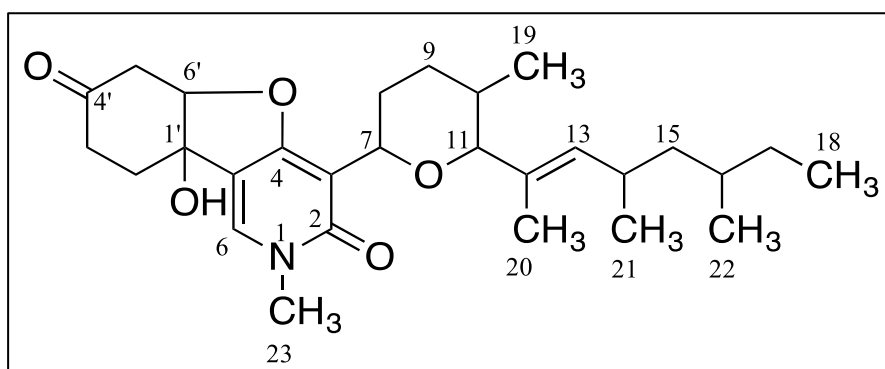


図 3-9 4,6'-anhydrooxysporidinone の化学構造

表 3-6 4,6'-anhydrooxysporidinone の文献値 ²⁶⁾と実測値のケミカルシフト値の比較 (重メタノール)

No.		文献値		実測値	
		¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
2	C	165.3		165.0	
3	C	109.5		109.2	
4	C	168.5		168.3	
5	C	119.1		118.9	
6	CH	135.8	7.68	135.7	7.67
7	CH	73.7	4.76	73.4	4.76
8	CH ₂	30.3	2.18, 1.53	30.1	2.18, 1.53
9	CH ₂	34.1	1.90, 1.31	33.9	1.90, 1.30
10	CH	33.1	1.65	32.8	1.63
11	CH	93.2	3.37	92.9	3.37
12	C	133.9		133.8	
13	CH	137.4	5.11	137.2	5.12
14	CH	30.9	2.51	30.6	2.52
15	CH ₂	46.4	1.22, 1.08	46.2	1.22, 1.07
16	CH	33.4	1.36	33.2	1.34
17	CH ₂	30.1	1.43, 1.08	29.9	1.42, 1.07
18	CH ₃	11.7	0.85	11.6	0.87
19	CH ₃	18.4	0.73	18.3	0.74
20	CH ₃	11.7	1.57	11.6	1.59
21	CH ₃	21.3	0.90	21.2	0.9
22	CH ₃	20.2	0.85	20.1	0.87
23	CH ₃	38.6	3.51	38.5	3.49
1'	C	77.2		77.0	
2'	CH ₂	34.4	2.33, 2.25	34.2	2.35, 2.25
3'	CH ₂	36.0	2.38, 2.03	35.8	2.35, 2.02
4'	C	210.3		210.0	
5'	CH ₂	49.4	3.37, 3.48	42.7	2.78, 3.03
6'	CH	92.0	4.92	91.9	4.94

3-3-3-2 新規化合物 FKI-7550-1 の構造解析

黄色油状物質として得られた FKI-7550-1 について構造解析を行った。高分解能 ESI-MS 解析により分子量 290、分子式 $C_{17}H_{22}O_4$ ($[M+H]^+$ (m/z) found ; 291.1591, calcd ; 291.1596)、および不飽和度 7 と決定した。重クロロホルム中で測定した 1H -NMR (400 MHz、Fig. S33)、 ^{13}C -NMR (100MHz、Fig. S34)、HSQC (Fig. S36) スペクトルから 5 個のメチル炭素、6 個のオレフィンメチン炭素、2 個のカルボニル炭素、4 個の 4 級炭素の存在が明らかになった。ケミカルシフト値およびカップリング定数については表 3-7 に示した。

COSY 解析 (Fig.35) より、H-3 (δ 7.40) と H-4 (δ 6.52) 、H-4 と H-5 (δ 6.66) および H-11 (δ 6.98) と H-12 (δ 1.78) の相関がそれぞれ見られた。HMBC 解析 (Fig. 37) より、H-13 (δ 2.01) から C-1 (δ 173.1) 、C-2 (δ 125.2) および C-3 (δ 141.0) へ、H-3 から C-1、C-2、C-5 (δ 146.2) および C-13 (δ 12.5) へ、H-4 から C-2 へ、H-5 から C-3、C-4 (δ 123.2)、C-6 (δ 134.8)、C-7 (δ 139.1) および C-14 (δ 14.1) へ、H-14 (δ 2.07) から C-5、C-6 および C-7 へ、H-7 (δ 6.21) から C-5、C-6、C-8 (δ 137.4)、C-9 (δ 125.4)、C-14 および C-15 (δ 18.9) へ、H-15 (δ 1.72) から C-7、C-8 および C-9 へ、H-9 (δ 6.04) から C-7、C-8、C-11 (δ 140.0) および C-15 へ、H-11 から C-9、C-10 (δ 130.4)、C-12 (δ 16.0) および C-16 (δ 167.7) へ相関がそれぞれ見られたことから、図 3-12 に示したペンタエンジカルボン酸構造を決定した。さらに、H-17 (δ 3.75) から C-16 へ HMBC 相関が見られたことより、16 位のカルボニル炭素の先に酸素を介してメチル基が存在することがわかった。以上の結果から FKI-7550-1 の平面構造を図 3-10 のように決定した。

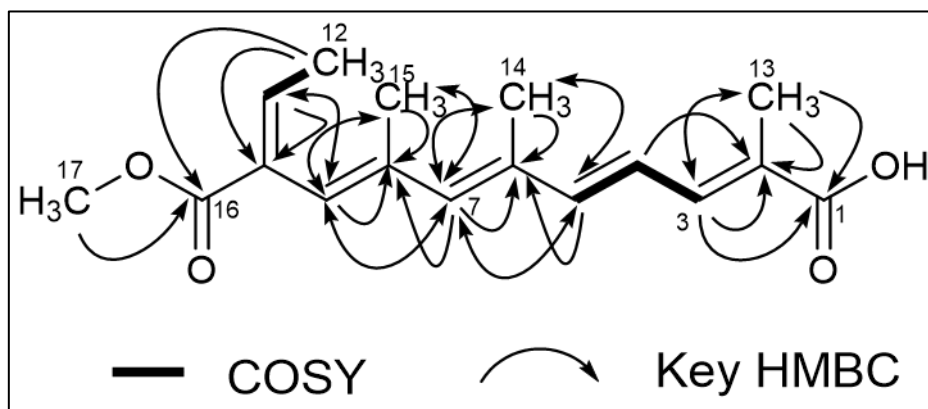


図 3-10 FKI-7550-1 物質の構造

表 3-7 FKI-7550-1 のケミカルシフト値 (重クロロホルム中)

<i>Position</i>	δ_C	<i>mult.</i>	δ_H (<i>int.</i> , <i>mult.</i> , <i>J in Hz</i>)
1	173.1	C	
2	125.2	C	
3	141.0	CH	7.40 (1H, dd, $J = 1.2, 11.1$ Hz)
4	123.2	CH	6.52 (1H, dd, $J = 11.1, 15.1$ Hz)
5	146.2	CH	6.66 (1H, d, $J = 15.1$ Hz)
6	134.8	C	
7	139.1	CH	6.21 (1H, s)
8	137.4	C	
9	125.4	CH	6.04 (1H, s)
10	130.4	C	
11	140.0	CH	6.98 (1H, dq, $J = 1.0, 7.2$ Hz)
12	16.0	CH ₃	1.78 (3H, dd, $J = 1.4, 7.2$ Hz)
13	12.5	CH ₃	2.01 (3H, d, $J = 1.2$ Hz)
14	14.1	CH ₃	2.07 (3H, d, $J = 0.8$ Hz)
15	18.9	CH ₃	1.72 (3H, d, $J = 1.2$ Hz)
16	167.7	C	
17	51.9	CH ₃	3.75 (3H, s)
Data were collected at 400 MHz for ¹ H and 100 MHz for ¹³ C.			

3-4 取得化合物の活性評価の結果

3-4-1 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物より取得した化合物の活性評価の結果

FKI-7473 株培養物より活性物質として既知化合物の *pestalotic acid A* および新規化合物の *pestiocandin* および *pestynol* を取得した。ペーパーディスク法でのアッセイは全て 6 mm ペーパーディスクを用いて行った。

Pestalotic acid A はペーパーディスク法で *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対してアッセイを行い、0.3 µg/disc で活性を示した (表 3-8)。

表 3-8 *Pestalotic acid A* の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対する活性評価の結果

化合物名	濃度 (µg/disc)			
	10	3	1	0.3
Pestalotic acid A	22.8	18.3	10.5	8.6

新規化合物の *pestiocandin* はペーパーディスク法での活性評価および微量液体希釈法により MIC 値の測定をグラム陽性菌 4 種、グラム陰性菌 5 種、酵母 5 種、糸状菌 1 種に対して行った。*Pestiocandin* は微量液体希釈法では各菌株に対して顕著な阻害活性は見られなかった。ペーパーディスク法では病原真菌である *C. albicans* に対して 1 µg/disc で生育阻害活性がみられた (表 3-9)。

表 3-9 *Pestiocandin* の活性評価の結果

Organism	MIC values (µg/mL)	Paper disc method (µg/disc)				
		100	30	10	3	1
Gram positive bacteria						
<i>Staphylococcus aureus</i> KB210 (ATCC6538p)	128	11.8	8.1	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> KB211 (ATCC6633)	8	14.6	9.2	8.3	—	—
<i>Micrococcus luteus</i> KB212 (ATCC9341)	128	21.6	12.1	9.6	—	—
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KB42 (ATCC607)	256	—	—	—	—	—
Gram negative bacteria						
<i>Escherichia coli</i> KB213 (NIHJ)	>256	13.0	9.9	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KB214 (ATCC10031)	>256	8.9	—	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KB115 (IFO3080)	>256	—	—	—	—	—
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KB88	16	20.6	11.3	10.4	—	—
<i>Proteus vulgaris</i> KB127 (NBRC 3167)	64	14.3	12.6	—	—	—
Yeast						
<i>Candida albicans</i> KF1 (ATCC 64548)	>256	12.1	9.4	9.9	9.3	8.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KF237 (ATCC9763)	>256	7.3	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	>256	7.6	7.0	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY25929	128	13.4	7.4	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 12geneΔ0HSR-iERG6	64	14.6	8.6	—	—	—
Filamentous fungus						
<i>Mucor racemosus</i> KF223 (IFO4581)	256	8.5	—	—	—	—

新規化合物の pestynol はペーパーディスク法でグラム陽性菌 4 種、グラム陰性菌 5 種、mycoplasma1 種、酵母 5 種、糸状菌 2 種に対して活性評価を行った。活性評価の結果、グラム陽性菌に対して弱いながらも活性を示した。また、スクリーニングで使用した *S. cerevisiae* BY25929 株と *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株で 10 倍の選択性があり、スクリーニングで狙った通りの化合物を取得することが出来た。また、真菌 *Mucor racemosus* に対しても *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株と同程度の生育阻害活性を示した (表 3-10)。

表 3-10 Pestynol の活性評価の結果

Organism	Pestynol (μg/disc)			
	100	30	10	3
Gram positive bacteria				
<i>Staphylococcus aureus</i> KB210 (ATCC6538p)	8.2	6.6	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> KB211 (ATCC6633)	16.2	—	—	—
<i>Kocuria rhizophila</i> KB212 (ATCC 9341)	14.7	7.5	—	—
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KB42	9.4	7.3	—	—
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> KB213 (NIHJ)	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KB214 (ATCC10031)	7.9	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KB359 (NBRC12582)	—	—	—	—
<i>Xanthomonas canpestris</i> pv. <i>oryzae</i> KB88	—	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i> KB127 (NBRC 3167)	—	—	—	—
Mycoplasma				
<i>Acholeplasma laidlawii</i> KB174 (PG8)	—	—	—	—
Yeast				
<i>Candida albicans</i> KF1 (ATCC 64548)	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KF237 (ATCC9763)	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY25929	8.0	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 12geneΔ0HSR-iERG6	12.1	10.6	7.9	—
Filamentous fungi				
<i>Aspergillus niger</i> KF103 (ATCC6275)	—	—	—	—
<i>Mucor racemosus</i> KF223	31.2	28.1	15.6	—
Inhibition zone (mm)、—; No inhibition				

3-4-2 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物から取得した化合物の活性評価の結果

FKI-7550 株培養物より活性物質として既知化合物の 4,6'-anhydrooxysporidinone および新規化合物の FKI-7550-1 を取得した。

両化合物をペーパーディスク法で *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対してアッセイを行った。どちらの化合物も *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対して 1 µg/disc で生育阻害活性を示した (表 3-11)。

表 3-11 4,6'-Anhydrooxysporidinone と FKI-7550-1 の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対する活性評価の結果

化合物名	濃度 (µg/disc)			
	10	3	1	0.3
4, 6' - Anhydrooxysporidinone	11.3	8.4	7.6	-
FKI-7550-1	36.5	28.2	13.1	-

3-5 3 章のまとめと考察

S. cerevisiae 12geneΔ0HSR-iERG6 株を用いたスクリーニング系で抗真菌活性を有する既知化合物を 2 つ (pestalotic acid A と 4,6'-anhydrooxysporidinone)、新規化合物を 3 つ (pestiocandin、pestynol および FKI-7550-1) を取得した。

得られた既知化合物は出芽酵母に対する生育阻害活性の報告はなく、今回が初の知見であった。

新規化合物の pestiocandin は 2 つの糖ユニットおよびベンジルアルコールを持つ化合物であり、本化合物は papulacandin 系 (図 3-11) の化合物^{27, 28)}であった。Papulacandin 系化合物の中には真菌の細胞壁合成酵素である β(1,3)-D-glucan synthase を標的とし抗真菌活性を示す化合物が存在する²⁹⁾。本化合物はペーパーディスクアッセイにて *C. albicans* に対して活性を有したことより、β(1,3)-D-glucan synthase を標的として抗真菌活性を示す可能性がある。

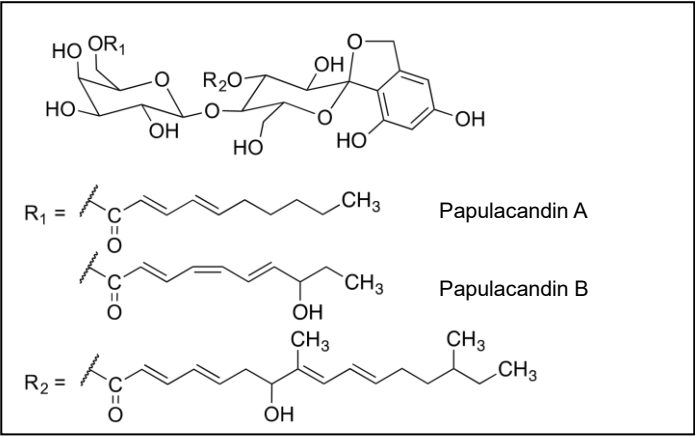


図 3-11 Papulacandin 系化合物の化学構造

新規化合物 pestynol は分子内にアルキンを持つ非常にユニークな構造の化合物であった。Pestynol の絶対立体配置は類縁体を合成し、¹H-NMR スペクトルのカップリング定数から相対立体配置を決定した後、絶対立体配置を全て *R* 体であると決定した。また、2019 年に Borra ら³⁰⁾により全合成が報告され、pestynol の絶対立体配置は正しいことが示された。

また、pestynol の類縁体として phomentrioloxins (図 3-12)³¹⁻³⁴⁾ が存在する。Phomentrioloxins は phytotoxic 活性のみ持ち、pestynol で観測されたグラム陽性菌、グラム陰性菌、酵母および糸状菌に対する活性報告はなかった。Pestynol は *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株と *S. cerevisiae* BY25929 株で 10 倍の選択性が観察され、スクリーニングで狙った通りのユニークな化合物を取得することが出来た。また、出芽酵母だけでなく *Mucor racemosus* に対しても活性を有した。

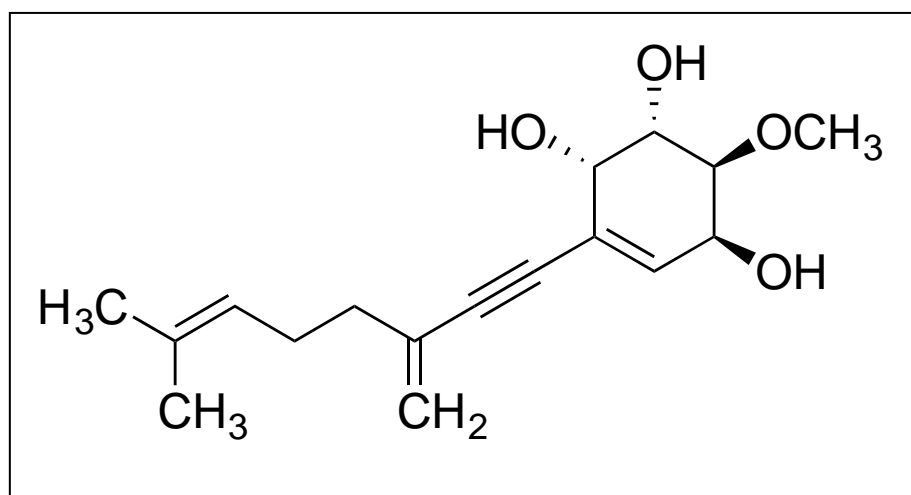


図 3-12 Phomentrioloxin の化学構造

Pestiocandin および pestynol は薬剤超感受性出芽酵母だけでなく、他の真菌にも活性を有することから、本スクリーニング系はユニークな構造を持つ抗真菌薬シード化合物を取得するために非常に有用であると考えられた。

新規化合物 FKI-7550-1 は非常に強く *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株の生育を阻害した。しかしながら、非常に不安定な化合物であり物理化学データを測定する前に壊れてしまった。安定的に保存できる条件を探しだすことが非常に重要であると考えられた。また、幾何異性は NOESY を測定することにより決定できると考えられた。今後、新たに FKI-7550-1 を取得し、立体配置の決定を行っていきたい。

4 章 糸状菌 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物からのミトコンドリア阻害剤の単離・構造解析 および活性評価の結果

Fusarium sp. FKI-7550 株培養液をペーパーディスク法で 12geneΔ0HSR-iERG6 株を植菌したグリセロール含有寒天培地でアッセイを行った結果、同菌株を植菌したグルコース含有寒天培地と比較し、顕著な阻害活性が確認された。

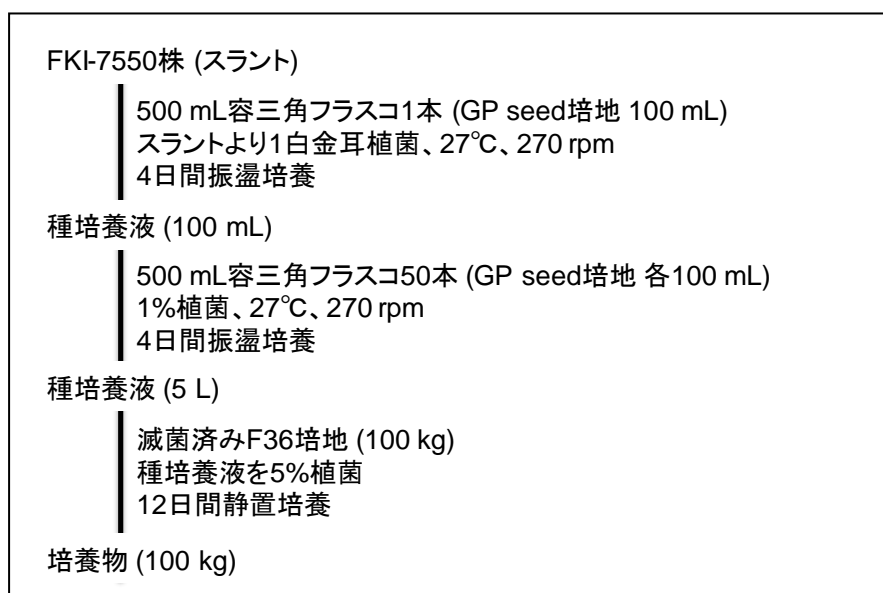
出芽酵母をグルコース含有培地で生育させると ATP は解糖系とミトコンドリアで生産される。一方グリセロール含有培地では酵母の ATP 産生はミトコンドリアでのみ行われる。

したがって、FKI-7550 株培養液中には出芽酵母のミトコンドリアに作用する化合物も含まれていることが示唆された。よって、FKI-7550 株培養液からミトコンドリアに作用する化合物の取得を目指した。

4-1 *Fusarium* sp. FKI-7550 株の培養

糸状菌 FKI-7550 株培養物より活性物質を単離するために種培養した後、生産培養を行った。種培養では GP seed 培地を使用し、生産培養では F36 培地を使用した。

FKI-7550 株を GP seed 培地 100 mL 分注した 500 mL 容三角フラスコ 1 本に 1 白金耳植菌し、27 °C、270 rpm で 4 日間振盪培養した。得られた種培養液を GP seed 培地 100 mL 分注した 500 mL 容三角フラスコ 50 本に 1%植菌し 27 °C、270 rpm で 4 日間振盪培養した。最後に 100 kg の F36 培地に種培養液を 5%植菌し 12 日間、室温で静置培養することで生産培養を行った (Scheme 4-1)

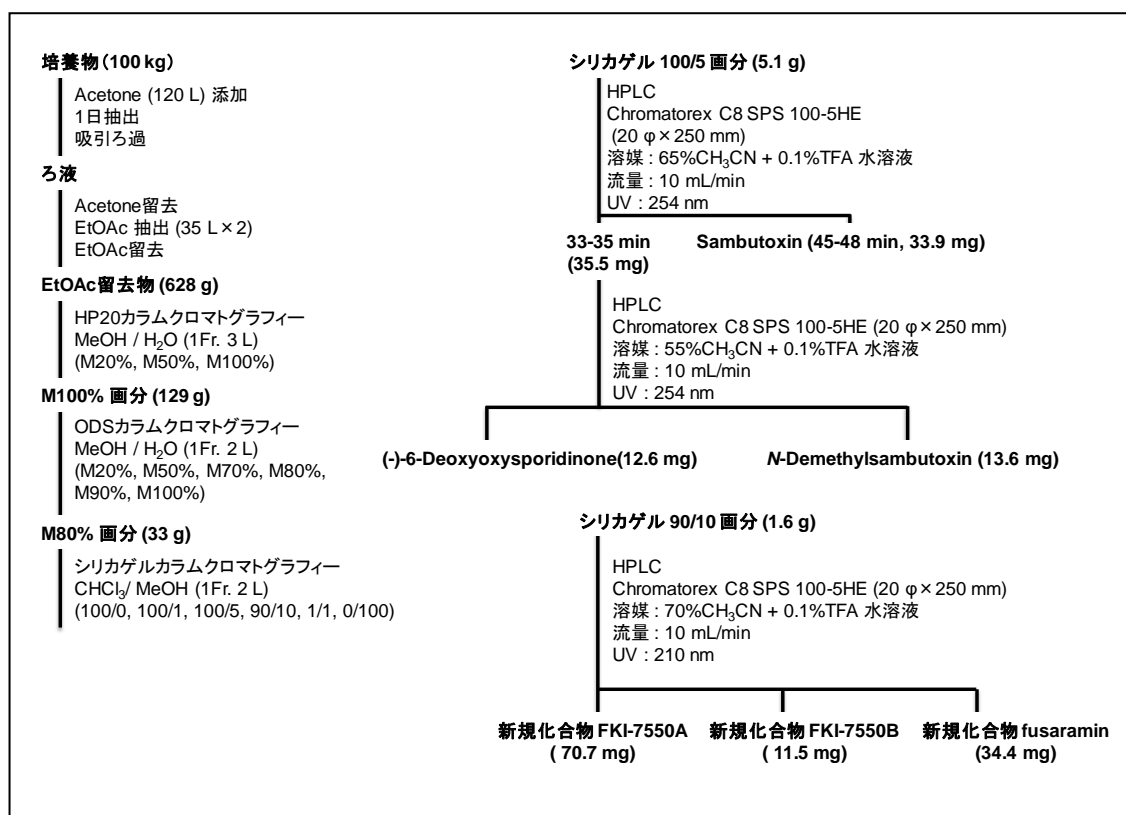


Scheme 4-1 FKI-7550 株の培養方法

4-2 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物からの活性物質の精製

FKI-7550 株培養物 100 kg に acetone を 120 L 添加後、1 日置いておくことにより、菌体から活性化合物を抽出、吸引ろ過を行い、多量のろ液を得た。ろ液中の Acetone を減圧留去した後、酢酸エチル (35 L) で 2 回抽出し、酢酸エチルを減圧留去することで、酢酸エチル抽出物 628 g 得た。得られた酢酸エチル抽出物を HP20 カラムクロマトグラフィーに供した後、ODS カラムクロマトグラフィーに供した。ODS カラムクロマトグラフィーにて活性の確認できたメタノール 80% 溶出画分を減圧乾固した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。活性の確認できたクロロホルム/メタノール=100/5 溶出画分を減圧乾固し、HPLC で分取を行うことにより R.T. 45-48 min の溶出画分から既知化合物の sambutoxin²⁸⁾ を 13.6 mg 単離した。また、HPLC 分取により得られた R.T. 33-35 min 画分を再度 HPLC で精製を行った結果、R.T. 72-79 min のピークより既知化合物の(-)-6-deoxyoxysporidinone²⁰⁾ を 12.6 mg、R.T. 81-91 min のピークより既知化合物 *N*-demethylsambutoxin²⁹⁾ を 13.6 mg 取得した (Scheme 4-2)。

また、シリカゲルカラムクロマトグラフィー後の活性画分であるクロロホルム/メタノール=90/10 画分を HPLC にて精製した結果、R.T 39-42 min のピークより新規化合物 FKI-7550A を R.T. 48-52 min のピークより新規化合物 FKI-7550B を R.T. 64-68 min のピークより新規化合物 fusaramin³⁰⁾ をそれぞれ 70.7 mg、11.5 mg、34.4 mg 取得した (Scheme 4-2)。



Scheme 4-2 FKI-7550 株培養物の精製方法

4-3 *Fusarium* sp. FKI-7550 株培養物から取得したミトコンドリア阻害剤の構造解析

Fusarium sp. FKI-7550 株培養物からミトコンドリア阻害剤として既知化合物を 3 つ、新規化合物を 3 つ取得した。それぞれの化合物の構造解析について下記する。

4-3-1 既知化合物 sambutoxin の構造解析

R.T. 45-48 min のピークは薄黄色油状物質として得られた。分子量は ESI-MS 測定より 453 (ESI-MS (+) mode m/z 454 $[M+H]^+$ and ESI-MS (-) mode m/z 452 $[M-H]^-$) であると決定した。重メタノール中で測定した 1H -NMR スペクトル (Fig. S38) は δ 10.08 (–OH, br s), 7.24 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.12 (1H, s), 6.29 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 5.18 (1H, d, $J=9.2$ Hz), 5.04 (1H, dd, $J=11.0, 1.8$ Hz), 3.51 (1H, m), 3.51 (3H, s), 2.46 (1H, m), 2.07 (1H, d, $J=13.6$ Hz), 1.89 (1H, m), 1.71–1.58 (2H, overlapped), 1.61 (3H, s), 1.45–1.16 (4H, overlapped), 1.03 (2H, m), 0.89 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.82 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 0.82 (3H, d, $J=6.4$ Hz) and 0.73 (3H, d, $J=6.8$ Hz) を示し、 ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. S39) は δ 162.7, 161.3, 156.5, 138.0, 135.9, 130.2, 130.2, 130.0, 124.8, 116.0, 115.4, 115.4, 110.4, 92.5, 77.6, 44.6, 37.4, 32.2, 32.0, 31.9, 30.6, 29.5, 28.8, 20.6, 19.5, 17.5, 11.5 and 11.1 を示した。得られた分子量および NMR のケミカルシフト値が sambutoxin の文献値³⁵⁾と良い一致を示したため、取得した化合物を sambutoxin³⁵⁾と同定した (図 4-1)。

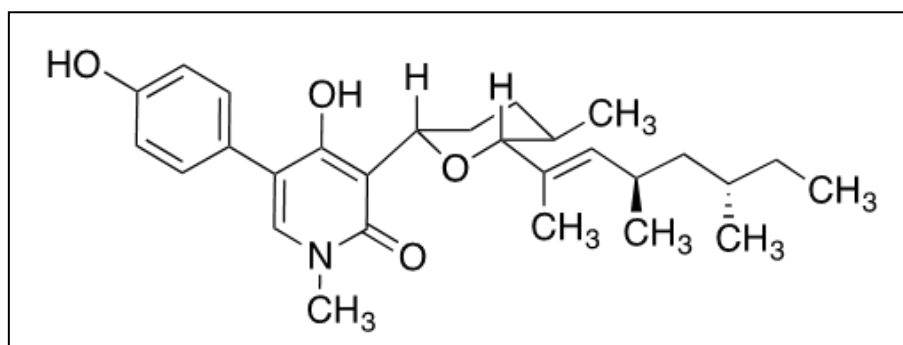


図 4-1 Sambutoxin の化学構造

4-3-2 既知化合物 *N*-demethylsambutoxin の構造解析

R.T. 81-91 min のピークは黄色油状物質として得られた。分子量は ESI-MS 測定より 439 (ESI-MS (+) mode m/z 440 $[M+H]^+$ and ESI-MS (-) mode m/z 438 $[M-H]^-$) であると決定した。重クロロホルム中で測定した 1H -NMR スペクトル (Fig. S40) は δ 10.25 (–OH, s), 7.16 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 6.95 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 6.64 (1H, s), 5.21 (1H, d, $J=13.2$ Hz), 5.05 (1H, d, $J=12.0$ Hz), 3.55 (1H, d, $J=9.6$ Hz), 2.46 (1H, m), 2.07 (1H, m), 1.91 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 1.68 (1H, m), 1.62 (3H, s), 1.62 (1 H, m), 1.46–1.17 (4H, overlapped), 1.04 (2H, m), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.83 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 0.82 (3H, d, $J=6.0$ Hz) and 0.74 (3H, d, $J=6.4$ Hz)を示し、 ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. S41) は δ 164.4, 163.4, 156.6, 138.2, 132.8, 130.5, 130.5, 130.0, 125.2, 116.6, 115.6, 115.6, 110.1, 92.7, 77.2 44.7, 32.3, 31.9, 31.9, 31.0, 29.6, 28.8, 20.6, 19.6, 17.5, 11.6 and 11.2 を示した。得られた分

子量および NMR のケミカルシフト値が *N*-demethylsambutoxin の文献値³⁶⁾と良い一致を示したため、取得した化合物を *N*-demethylsambutoxin³⁶⁾と同定した (図 4-2)。

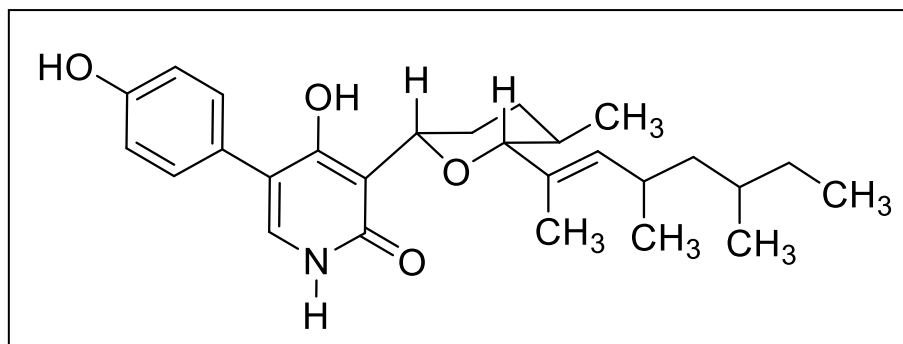


図 4-2 *N*-Demethylsambutoxin の化学構造

4-3-3 既知化合物(-)-6-deoxyoxysporidinone の構造解析

R.T. 72-79 min のピークは薄黄色油状物質として得られた。分子量は ESI-MS 測定より 473 (ESI-MS (+) mode m/z 496 $[M+Na]^+$ and ESI-MS (-) mode m/z 472 $[M-H]^-$.) であると決定した。重クロロホルム中で測定した 1H -NMR スペクトル (Fig. S42) は δ 10.49 (–OH, br s), 7.14 (1H, s), 5.20 (1H, d, $J=9.2$ Hz), 4.94 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.50 (1H, d, $J=10.0$ Hz), 3.44 (3H, s), 2.89 (2H, m), 2.48 (1H, m), 2.36–2.03 (8H, overlapped), 1.89 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.65 (3H, s), 1.44–1.17 (4H, overlapped), 1.04 (2H, m), 0.91 (3H, d, $J=6.8$ Hz), 0.83 (6H, overlapped), 0.74 (3H, d, $J=6.4$ Hz) を示し、 ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. S43) は δ 211.7, 162.1, 161.1, 138.1, 133.2, 129.9, 117.5, 111.1, 92.4, 78.0, 70.2, 44.6, 37.2, 36.8, 36.8, 36.1, 36.0, 32.4, 31.9, 31.9, 30.6, 29.6, 28.8, 20.6, 19.5, 17.5, 11.8 and 11.1 を示した。また、 $[\alpha]_D^{23} = -100.5$ ($c = 0.1$, MeOH) であった。したがって、得られた分子量および NMR のケミカルシフト値、比旋光度が(-)-6-deoxyoxysporidinone の文献値²⁶⁾と良い一致を示したため、取得した化合物を(-)-6-deoxyoxysporidinone²⁶⁾と同定した (図 4-3)。

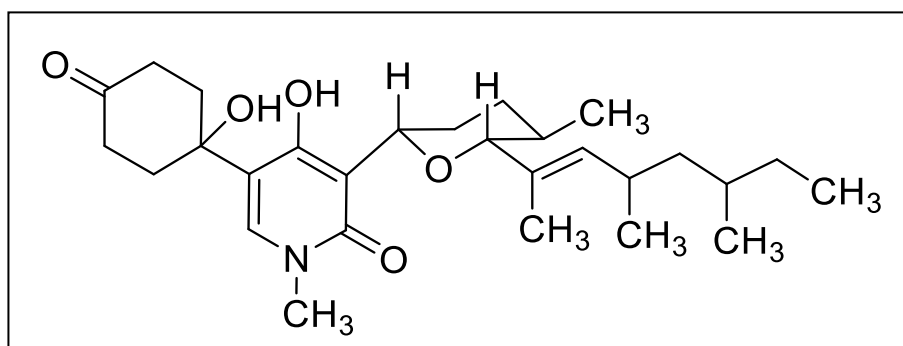


図 4-3 (-)-6-Deoxyoxysporidinone の化学構造

4-3-4 新規化合物 fusaramin の構造解析

黄色油状物質として得られた新規化合物 fusaramin について構造解析を行った。

fusaramin の物理化学的特性は表 4-1 に示した。

表 4-1 Fusaramin の物理化学的特性

分子式	$C_{27}H_{39}NO_4$
分子量	441 (found m/z 442.2946 $[M+H]^+$, calculated m/z 442.2957 $[M+H]^+$)
$[\alpha]_D^{27}$	-127.2 (c 0.1, MeOH)
UV (MeOH) λ_{max} (ϵ)	203 (20,100), 242 (8,500), 281 (13,100)
IR ν_{max} (ATR) cm^{-1}	3332, 2954, 2919, 1650, 1596, 1450, 1342, 1106, 1041
CD λ_{max} ($\Delta\epsilon$)	226 (-18,412), 242 (-10,585), 262 (-9,472), 285 (-9,759)

高分解能 ESI-MS 解析により分子量 441、分子式 $C_{27}H_{39}NO_4$ (found m/z 442.2946 $[M+H]^+$, calculated m/z 442.2957 $[M+H]^+$)、不飽和度 9 と決定した。重 DMSO 中で測定した 1H -NMR (600 MHz、Fig. S44)、 ^{13}C -NMR (150 MHz、Fig. S45)、HSQC (Fig. S47) スペクトルから 5 個のメチル炭素、5 個の sp^3 メチレン炭素、5 個の sp^3 メチン炭素、6 個の sp^2 メチン炭素、6 個の sp^2 4 級炭素の存在が明らかになった。ケミカルシフト値およびカップリング定数については表 4-2 に示した。

COSY 相関 (図 4-4 の太線、Fig. S46) が H_2-7 (δ_H 2.54 and 2.63) から H_2-10 (δ_H 1.65 and 1.90)、 $H-12$ (δ_H 4.83) から H_3-17 (δ_H 0.79) に確認できた。さらに、 $H-9$ (δ_H 1.50) と H_3-18 (δ_H 0.73)、 $H-13$ (δ_H 2.39) と H_3-20 (δ_H 0.83)、 $H-15$ (δ_H 1.29) と H_3-21 (δ_H 0.79)、 $H-5$ (δ_H 4.17) と $H-22$ (δ_H 4.94) の間に観測された。また、HMBC 相関 (図 4-4 の太線の矢印、Fig. S48) が H_2-10 から $C-11$ (δ_C 131.1)、 $C-12$ (δ_C 133.1) と $C-19$ (δ_C 15.7) へ、 $H-12$ から $C-10$ (δ_C 47.0) と $C-19$ へ、 H_3-19 (δ_H 1.49) から $C-10$ 、 $C-11$ と $C-12$ へ観測されたことより、 $C-7$ から $C-21$ の部分構造を決定した。

1H -および ^{13}C -NMR、2D-NMR 解析よりフェニル基の存在が明らかになった。HMBC 相関がフェニル基の水素 (δ_H 7.16-7.22) から $C-22$ (δ_C 72.8) へ、 $H-22$ からフェニル基の炭素 (δ_C 139.5 と 127.0) へ確認できたことより、フェニル基と $C-22$ の炭素が結合していることが明らかになった。残りの 6 つの炭素原子は ^{13}C -NMR 測定でブロードシグナルとして観測された。それぞれのケミカルシフト値は δ_C 175.1 ($C-2$)、101.3 ($C-3$)、192.9 ($C-4$)、67.4 ($C-5$) そして 188.7 ($C-6$) であった。残りの不飽和度が 4 であること、 ^{13}C -NMR のシグナルがブロードしていることおよびこのケミカルシフト値はテトラミン酸骨格を持つ化合物のシグナルと酷似しているため、得られた化合物もテトラミン酸骨格を有することが示唆された。

HMBC 相関が H_2-7 から $C-3$ と $C-6$ へ、 H_2-8 (δ_H 1.15 and 1.39) から $C-6$ へ観測されたこと

より、テトラミン酸骨格と C-7 から C-21 の部分構造が結合していることを明らかにした。

最後に、HMBC 相関が H-5 から C-2、C-4 そして C-23 へ、H-22 から C-4 へ確認できたことより、fusaramin³⁷⁾の平面構造を決定した (図 4-5)。また、NOESY 相関 (図 4-4 の点線の矢印、Fig. S49) が H₂-10 と H-12 間に観測されたことより、C-11 と C-12 間の立体配置は *E* 体であると明らかにした (図 4-4)。

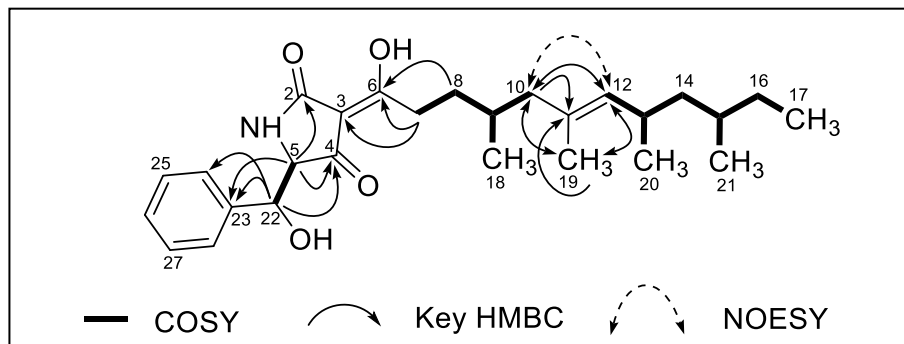


図 4-4 Fusaramin の化学構造および各種 NMR による構造解析

C-5 と C-22 の相対立体配置は Shang らの文献³⁸⁾を参考にし、H-5 と H-22 のカップリング定数が 7.2 Hz と大きかったことおよび H-5 と H-22 のケミカルシフト値を文献と比較することにより 5*S**, 22*S**であると決定した。C-5 の絶対立体配置は ECD スペクトル (Fig. S55) にて負のコットン効果が 226 および 285 nm に観測され、類縁化合物の文献値³⁸⁾との比較により 5*S*であると決定した。したがって、fusaramin の 5 位および 22 位の絶対立体配置は *S* 体であると決定した (図 4-5)。

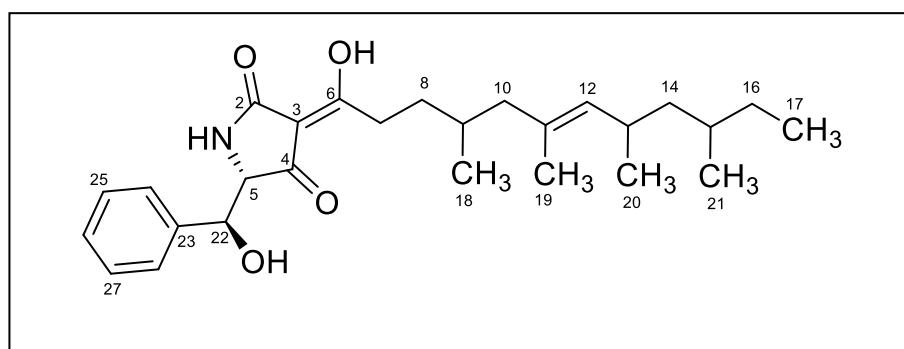


図 4-5 Fusaramin の 5 位および 22 位の絶対立体配置を含む化学構造

表 4-2 Fusaramin の ^1H -および ^{13}C -NMR データ (重 DMSO)

<i>Position</i>	δ_{C}	<i>mult.</i>	δ_{H} (<i>int., mult., J in Hz</i>)
2	175.1	C	
3	101.3	C	
4	192.9	C	
5	67.4	CH	4.17 (1H, brs)
6	188.7	C	
7	30.7	CH ₂	2.54 (1H, m) 2.63 (1H, m)
8	32.3	CH ₂	1.15 ^a (1H, m) 1.39 (1H, m)
9	30.0	CH	1.50 (1H, m)
10	47.0	CH ₂	1.65 (1H, dd, $J = 7.2, 12.9$ Hz) 1.90 (1H, dd, $J = 7.2, 12.9$ Hz)
11	131.1	C	
12	133.1	CH	4.83 (1H, d, $J = 9.6$ Hz)
13	29.4	CH ₂	2.39 (1H, m)
14	44.6	CH ₂	0.99 ^b (1H, m) 1.15 ^a (1H, m)
15	31.5	CH	1.29 ^c (1H, m)
16	28.4	CH ₂	1.00 ^b (1H, m) 1.32 ^c (1H, m)
17	11.1	CH ₃	0.79 (3H, t, $J = 7.5$ Hz)
18	18.7	CH ₃	0.73 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
19	15.7	CH ₃	1.49 (3H, brs)
20	21.2	CH ₃	0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
21	19.5	CH ₃	0.79 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
22	72.8	CH	4.94 (1H, brs)
23	139.5	C	
24/28	127.0	CH	7.16-7.22 (2H, m)
25/27	127.3	CH	7.16-7.22 (2H, m)
26	127.2	CH	7.16-7.22 (1H, m)
1		NH	8.88 ^d (1H, brs)
6		OH	5.96 ^d (1H, brs)
22		OH	5.96 ^d (1H, brs)

Data were collected at 600 MHz for ^1H and 150 MHz for ^{13}C .

4-3-5 新規化合物 FKI-7550A および B の構造解析

黄色油状物質として得られた新規化合物 FKI-7550A および B について構造解析を行った。FKI-7550A および B の物理化学的特性は表 4-3 に示した。

表 4-3 FKI-7550A および FKI-7550B の物理化学的特性

	FKI-7550A	FKI-7550B
分子式	$C_{27}H_{37}NO_5$	$C_{28}H_{41}NO_6$
分子量	455 (found m/z 456.2728 $[M+H]^+$, calculated m/z 456.2750 $[M+H]^+$)	487 (found m/z 488.2991 $[M+H]^+$, calculated m/z 488.3012 $[M+H]^+$)
$[\alpha]_D^{27}$	-15 (c 0.1, MeOH)	-140 (c 0.1, MeOH)
UV (MeOH) λ_{max} (ε)	243 (32,760), 275 (14,970)	243 (52,790), 281 (15,633)
IR ν_{max} (ATR) cm^{-1}	3394, 2958, 2925, 2870, 1770, 1715, 1601, 1438, 1318, 1238, 1074, 1040, 963	3324, 2958, 2927, 1721, 1655, 1608, 1440, 1375, 1340, 1208, 1084, 963

FKI-7550A は高分解能 ESI-MS 解析により分子量 455、分子式 $C_{27}H_{37}NO_5$ 、不飽和度 10 と決定した。重 DMSO 中で測定した 1H -NMR (600 MHz、Fig. S56))、 ^{13}C -NMR (125 MHz、Fig. S57)、HSQC (Fig. S59) スペクトルから 5 個のメチル炭素、5 個の sp^3 メチレン炭素、4 個の sp^3 メチン炭素、6 個の sp^2 メチン炭素、7 個の sp^2 級炭素の存在が明らかになった。ケミカルシフト値については表 4-4 に示した。

COSY 相関 (Fig. S58) が H-2 (δ_H 3.51) から H-5 (δ_H 5.98)、H-7 (δ_H 5.13) から H₂-9 (δ_H 1.94) および H-12 (δ_H 6.17) から H₃-16 (δ_H 0.83) に確認できた。さらに、COSY 相関が H-2 と H₃-17 (δ_H 0.95)、H-8 (δ_H 2.63) と H₃-19 (δ_H 0.85) 間に観測された。また、HMBC 相関 (Fig. S60) が H-2 および H₂-3 (δ_H 2.01 and 2.36) から C-1 (δ_C 197.0) に観測された。さらに、HMBC 相関が H-5 から C-6 (δ_C 131.4)、C-7 (δ_C 136.9) および C-18 (δ_C 12.4) へ、H-7 から C-5 (δ_C 136.3) および C-18 へ、H₃-18 (δ_H 1.63) から C-5、C-6 および C-7 へ観測された。最後に HMBC 相関が H₂-9 から C-10 (δ_C 134.1)、C-11 (δ_C 126.1) および C-20 (δ_C 16.3) へ、H-11 (δ_H 5.71) から C-9 (δ_C 47.2)、C-13 (δ_C 132.0) および C-20 へ、H₃-20 (δ_H 1.63) から C-9、C-10 および C-11 へ観測されたことより、C-1 から C-20 までの部分構造を決定した (図 4-6)。

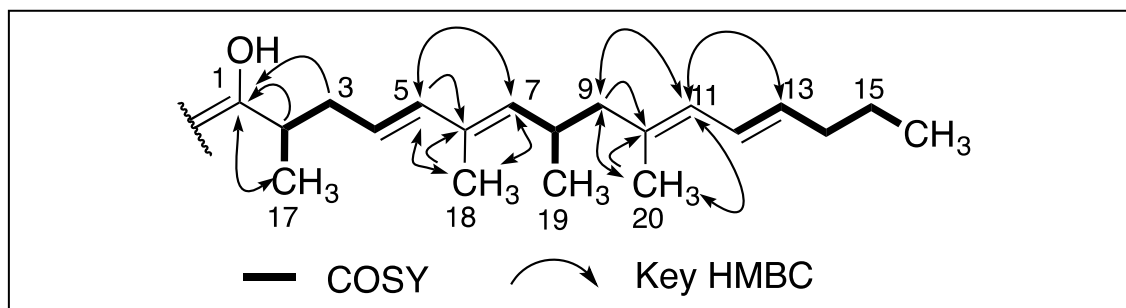


図 4-6 FKI-7550A および FKI-7550B の部分構造

C-1 から C20 までの部分構造の決定から、残りの部分構造は $C_7H_5NO_4$ で不飽和度 5 を満たすことが示唆された。COSY 相関より H-5' (δ_H 4.56) から H₂-7' (δ_H 2.27 and 2.95) までの繋がりが明らかになった。また、HMBC 相関が H-5' から C-2' (δ_C 167.0) および C-3' (δ_C 105.1)、C-4' (δ_C 188.6) へ、H-6' から C-7' (δ_C 46.0) および C-8' (δ_C 172.0) へ、H₂-7' から C-5' (δ_C 67.7) および C-6' (δ_C 67.0)、C-8' へ観測された。最後に 1H - ^{15}N HMBC 相関 (Fig. S61) が 7' 位のプロトンから 1' 位の窒素原子 (-221.7 ppm) へ観測されたことより N-1' から C-8' までの部分構造を決定した (図 4-7)。

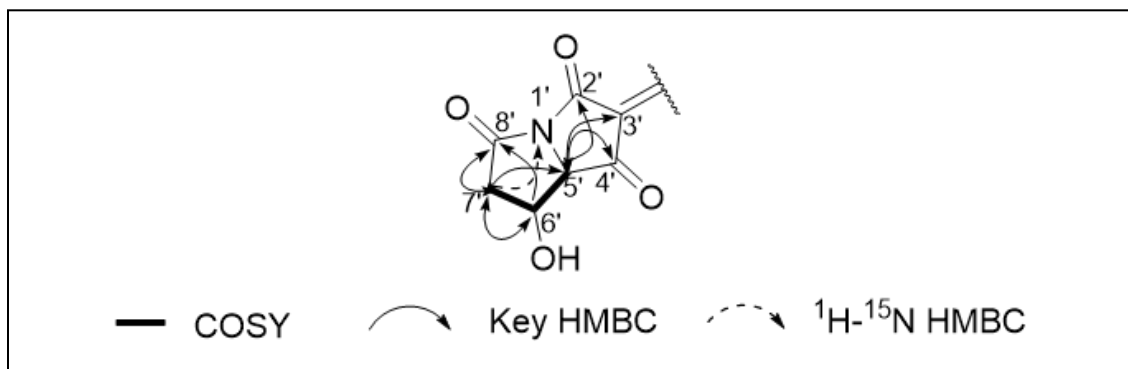


図 4-7 FKI-7550A の部分構造

したがって、FKI-7550A の平面構造を図 4-8 のように決定した。

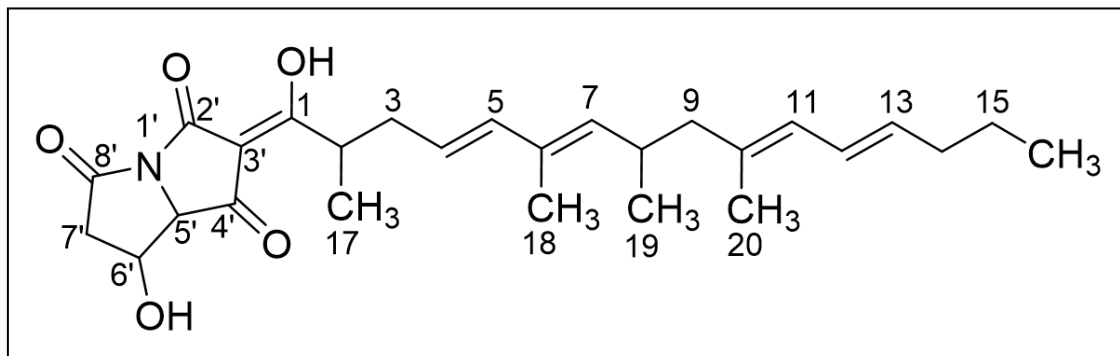


図 4-8 FKI-7550A の化学構造

続いて、FKI-7550B は高分解能 ESI-MS 解析により分子量 487、分子式 $C_{28}H_{41}NO_6$ 、不飽和度 9 と決定した。重 DMSO 中で測定した 1H -NMR (400 MHz、Fig. S62)、 ^{13}C -NMR (100 MHz、Fig. S63)、HSQC (Fig. S65) スペクトルから 6 個のメチル炭素、5 個の sp^3 メチレン炭素、4 個の sp^3 メチン炭素、6 個の sp^2 メチン炭素、7 個の sp^2 級炭素の存在が明らかになった。ケミカルシフト値およびカップリング定数については表 4-4 に示した。

FKI-7550B の 1 位から 20 位までの 1H -および ^{13}C -NMR のケミカルシフト値は FKI-7550A の各ケミカルシフト値と良い一致を示した (表 4-2)。FKI-7550B と A の分子量の差より、FKI-7550B の化学構造は FKI-7550A の持つピロリリジン環が MeOH により開環した構造で

あると示唆された。COSY 相関 (Fig. S64) より H-5' (δ_{H} 3.79) から H₂-7' (δ_{H} 2.52 and 2.63) までの繋がりが明らかになった。HMBC 相関 (Fig. S66) が H-5' から C-2' (δ_{C} 177.9) および C-4' (δ_{C} 194.0)、C-6' (δ_{C} 66.2)、C-7' (δ_{C} 39.0) へ、H-6' (δ_{H} 4.20) から C-7' へ、H₂-7' および H₃-9' (δ_{H} 3.58) から C-8' (δ_{C} 171.1) へ観測されたことから、N-1' から C-9' までの部分構造を決定した (図 4-9)。

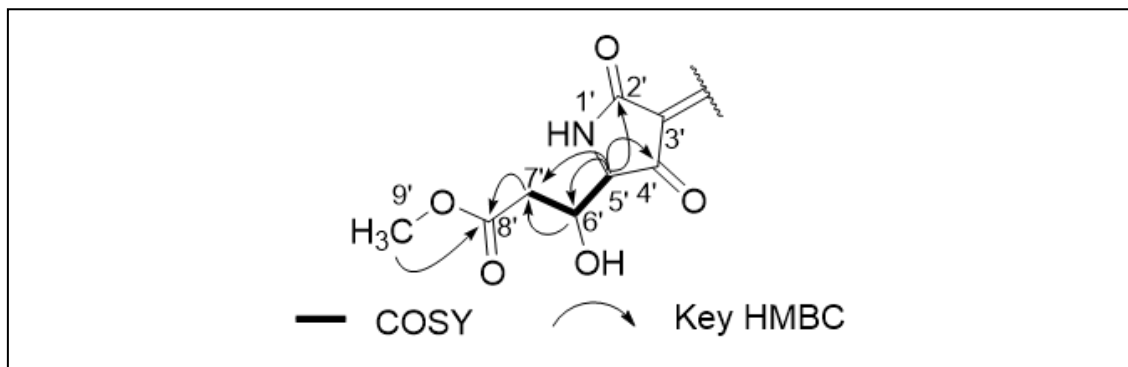


図 4-9 FK1-7550B の部分構造

したがって、FK1-7550B の平面構造を図 4-10 のように決定した。

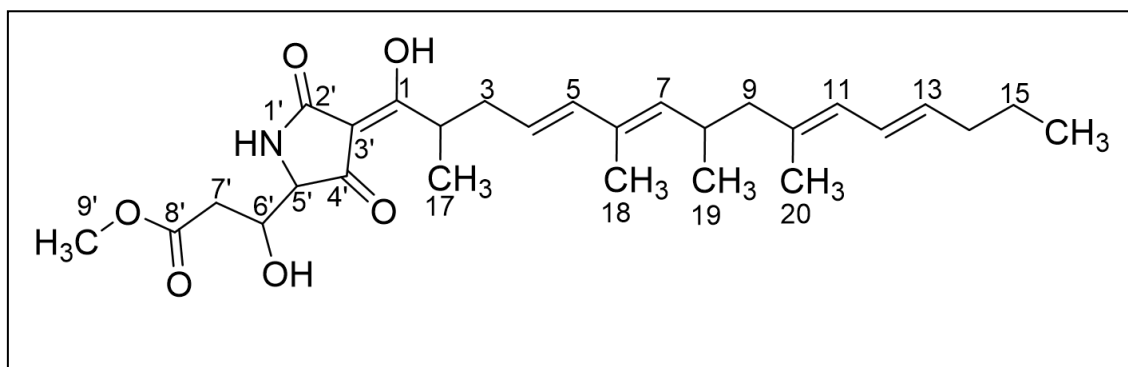


図 4-10 FK1-7550B の化学構造

表 4-4 FKI-7550A および FKI-7550B の ^1H -および ^{13}C -NMR データ (重 DMSO)

FKI-7550A				FKI-7550B		
<i>position</i>	δ_{C}	<i>mult.</i>	δ_{H}	δ_{C}	<i>mult.</i>	δ_{H}
1	197.0	C		192.0	C	
2	39.5	CH	3.51	36.2	CH	3.50
3	35.7	CH ₂	2.01	36.1	CH ₂	2.17
			2.36			2.33
4	124.7	CH	5.43	123.9	CH	5.41
5	136.3	CH	5.98	136.6	CH	6.00
6	131.4	C		131.3	C	
7	136.9	CH	5.13	137.2	CH	5.14
8	30.4	CH	2.63	30.4	CH	2.63
9	47.2	CH ₂	1.94	47.2	CH ₂	1.93
10	134.1	C		134.1	C	
11	126.1	CH	5.71	126.1	CH	5.71
12	126.9	CH	6.17	126.8	CH	6.17
13	132.0	CH	5.51	131.9	CH	5.52
14	34.4	CH ₂	2.01	34.3	CH ₂	2.01
15	22.2	CH ₂	1.33	22.2	CH ₂	1.34
16	13.6	CH ₃	0.83	13.6	CH ₃	0.84
17	16.1	CH ₃	0.95	16.0	CH ₃	0.97
18	12.4	CH ₃	1.63	12.4	CH ₃	1.62
19	20.4	CH ₃	0.85	20.4	CH ₃	0.84
20	16.3	CH ₃	1.63	16.3	CH ₃	1.63
2'	167.0	C		177.9	C	
3'	105.1	C		103.1	C	
4'	188.6	C		194.0	C	
5'	67.7	CH	4.56	65.8	CH	3.79
6'	67.0	CH	4.51	66.2	CH	4.20
7'	46.0	CH ₂	2.27	39.0	CH ₂	2.52
			2.95			2.63
8'	172.0	C		171.1	C	
9'				51.3	CH ₃	3.58

Data were collected at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C .

4-4 取得化合物の活性評価の結果

Fusarium sp. FKI-7550 株培養物から酵母のミトコンドリアを阻害する化合物として既知化合物の sambutoxin、*N*-demethylsambutoxin および (-)-6-deoxyoxysporidinone と新規化合物 fusaramin、FKI-7550A および FKI-7550B を取得した。

取得した 6 つの化合物に関して微量液体希釈法にて親株の *S. cerevisiae* BY4741 株および薬剤超感受性株の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対してグルコース含有培地 (YPD 培地) およびグリセロール含有培地 (YPG 培地) で活性評価を行い、MIC 値を出した (表 4-5)。活性評価の結果、各化合物とも YPD 培地と YPG 培地で顕著な選択性を持ち、酵母のミトコンドリアの ATP 産生を阻害していることが示唆された (表 4-5)。

表 4-5 単離した化合物の活性評価の結果

Compound	MIC value (μg/mL)			
	BY4741		12遺伝子破壊株	
	YPD	YPG	YPD	YPG
FKI-7550A	>128	32	>128	1
FKI-7550B	>128	>128	>128	2
Fusaramin	>128	>128	>128	0.64
Sambutoxin	>128	4	>128	0.064
<i>N</i> -Demethylsambutoxin	>128	>128	>128	0.32
(-)-6-Deoxyoxysporidinone	>128	>128	32	2

新規化合物 fusaramin および既知化合物の 3 つに関して出芽酵母の単離ミトコンドリアを用いた ATP の排出阻害活性を評価した。詳細な評価方法は実験の部 (p59) に記載した。本アッセイ系は単離ミトコンドリアに ADP を添加した後、ミトコンドリアのマトリックスにて産出され、ミトコンドリア外部に排出された ATP を各酵素 (hexokinase と glucose-6phosphate dehydrogenase) により変換され、最終的に NADPH を UV (340 nm) で観察することで ATP 排出阻害を評価した。

Fusaramin、sambutoxin、*N*-demethylsambutoxin および (-)-6-deoxyoxysporidinone はそれぞれ IC₅₀ 値が 1.2、0.042、0.44、5.9 μM で出芽酵母の単離ミトコンドリアの ATP 排出を阻害した (表 4-6)。

表 4-6 単離ミトコンドリアを用いた ATP 排出阻害活性評価の結果

compound	IC ₅₀ (μM)*
Fusaramin	1.2 ± 0.25
Sambutoxin	0.042 ± 0.0046
<i>N</i> -Demethylsambutoxin	0.44 ± 0.070
(-)-6-Deoxyoxysporidinone	5.9 ± 1.7

*Values are means ± standard error.

Sambutoxin は出芽酵母のミトコンドリアの電子伝達系酵素の complex III に作用することが既に報告されていた³⁹⁾。したがって、その他の化合物 (fusaramin、*N*-demethylsambutoxin および (-)-6-deoxyoxysporidinone) に関しても標的が出芽酵母の complex III であると考え、出芽酵母の complex III のアッセイ系である NADH-cytochrome *c* oxidoreductase 活性を評価した (図 4-11)。Sambutoxin、*N*-demethylsambutoxin および (-)-6-deoxyoxysporidinone は活性が確認できたため、標的は complex III であると示唆された。新規化合物 fusaramin は活性が見られなかったため、標的は complex III 以外であると示唆された。

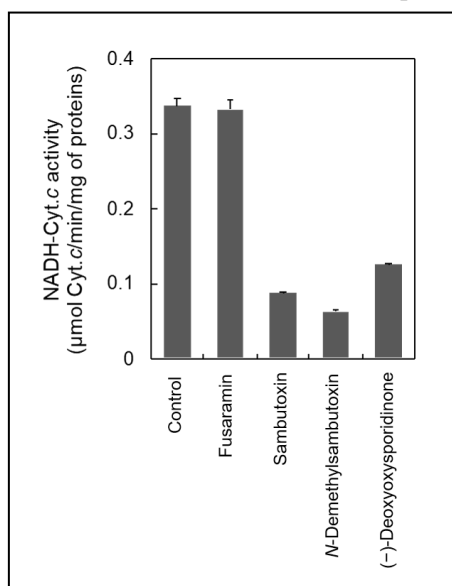


図 4-11 Complex III に対する各化合物の評価の結果

最後に、得られた化合物のヒト癌細胞に対する細胞毒性試験を行った。癌細胞は浮遊系癌細胞 3 種 (HL-60, Jurkat, THP-1) と接着系癌細胞 5 種 (HeLa S3, HT29, A549, H1299, Panc1) の計 8 種を用いた。(-)-6-deoxyoxysporidinone を除いて各化合物は浮遊系癌細胞に対して接着系癌細胞と比較し、顕著に細胞毒性を示した (表 4-7)。

表 4-7 ヒト癌細胞に対する各化合物の評価の結果

Compounds	IC ₅₀ (μM) values in various cell lines							
	HL-60	Jurkat	THP-1	HeLa S3	HT29	A549	H1299	Panc1
Fusaramin	1.9	5.8	3.0	57.1	34.4	38.4	64.4	>100
FKI-7550A	<1.0	<1.0	<1.0	95.2	>100	>100	>100	>100
FKI-7550B	5.4	6.4	1.4	>100	94.6	>100	>100	>100
Sambutoxin	<1.0	<1.0	<1.0	5.1	14.6	15.8	10.7	>100
N-Demethylsambutoxin	1.1	1.5	<1.0	15.0	18.2	16.8	17.7	16.8
(-)-6-Deoxyoxysporidinone	7.8	16.4	13.0	15.7	18.3	60.9	19.9	16.6

4-5 4 章のまとめと考察

ミトコンドリアをターゲットにした化合物探索は抗真菌薬のシードのみならず、抗がん剤⁴⁰⁾、農薬⁸⁻¹³⁾のシードまたは生化学的な新たな知見の取得⁴¹⁾に非常に重要であると考えられる。

Fusarium sp. FKI-7550 株培養物から酵母のミトコンドリアを阻害する化合物として既知化合物を 3 つ (sambutoxin, N-demethylsambutoxin および (-)-6-deoxyoxysporidinone)、新規化合物を 3 つ (fusaramin, FKI-7550A および FKI-7550B) 取得した。

既知化合物は ESI-MS、¹H-および ¹³C-NMR の比較により化学構造を同定した。新規化合物は ESI-MS, ¹H-と ¹³C-NMR および 2D-NMR により化学構造を決定した。Fusaramin の 5 位および 22 位の絶対立体配置は過去の文献との NMR および ECD スペクトルの比較で決定した。また、9 位、13 位、15 位のメチンの絶対立体配置は fusaramin が油状物質のため結晶化が困難であり決定することが出来なかった。

取得した化合物はそれぞれグリセロール含有培地で生育させた *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対してグルコース含有培地と比較し、強く生育阻害活性を示した。この結果は各化合物が出芽酵母の ATP 産生に何かしらの影響を与えていると考えられた。Sambutoxin のみミトコンドリアの呼吸鎖複合体である complex III に対する活性が報告されていた³⁹⁾。新規化合物 fusaramin および既知化合物の 3 つに関して単離ミトコンドリアを用いた ATP 排出阻害活性試験を行った (表 4-6)。試験した全ての化合物で出芽酵母の ATP 排出を抑制したため、ミトコンドリア阻害剤であることが明らかになった (表 4-6)。既知化合物の N-demethylsambutoxin および(-)-6-deoxyoxysporidinone はミトコンドリアに対する活性の報告はなく初の知見であった。ミトコンドリアを標的とする tetramic acid 骨格を持つ化合物に equisetin⁴²⁾ やその類縁体である TA-289⁴³⁾ (図 4-12) が存在する。これらの化合物は

tetramic acid 骨格とデカリン骨格を有する化合物である。一方で、fusaramin は tetramic acid 骨格のみを有しミトコンドリアの ATP 産生を阻害する。このことは、tetramic acid の骨格がミトコンドリア阻害剤として有用である可能性を示唆した。

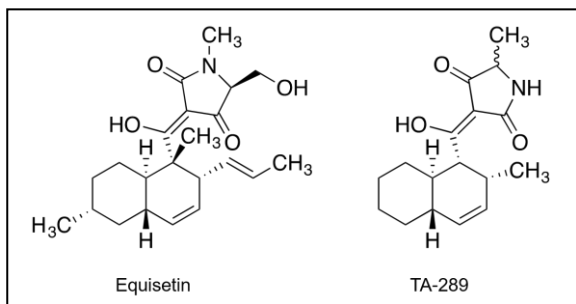


図 4-12 Equisetin および TA-289 の化学構造

また、sambutoxin が complex III の阻害剤であることは報告されており³⁹⁾、その他の化合物の標的も complex III であると考え、酵素ベースでの活性 (NADH-cytochrome *c* oxidoreductase activity) を評価した (図 4-11)。その結果、*N*-demethylsambutoxin および (-)-6-deoxyoxysporidinone は complex III が標的であると明らかにした。Fusaramin は complex III とは別の場所を標的とし、ミトコンドリアの ATP 合成を阻害していると考えられた。今後、標的のタンパクが発見されることを期待したい。

取得した全ての化合物についてヒト癌細胞に対する細胞毒性試験を行った。全ての化合物が浮遊系癌細胞に対して強い細胞毒性を示した (表 4-7)。これらの化合物が抗がん剤のシード化合物として有用か確かめるため、今後通常のヒト細胞に対して細胞毒性試験を行いたい。また、FKI-7550A および FKI-7550B は接着系癌細胞に対して細胞毒性がなく、浮遊系癌細胞に対して非常に強く細胞毒性を示した。この現象を明らかにするため、標的タンパク質を見つける研究を行うことが重要であると考えられた。

取得した新規の化合物は顕著にグリセロール含有培地で薬剤超感受性出芽酵母である 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対して生育阻害活性を示し、親株の BY4741 ではほとんど活性を示さなかった。今回通常の出芽酵母で取得できないミトコンドリア阻害剤を 12geneΔ0HSR-iERG6 株を利用することで取得することが出来た。12geneΔ0HSR-iERG6 株は新規な活性物質探索のための有用なツールであることが明らかになった。

第 5 章 総括

新たな抗真菌薬開発のためのリード化合物の取得を目的とした研究において、微生物培養液 4,656 サンプルのスクリーニングを行い、候補株を 2 株見出した。この 2 株から抗真菌薬シード化合物となり得る新規化合物を 3 つ、既知化合物を 2 つ単離し、構造解析を行った。2 つの既知化合物に関してはいずれも抗真菌活性は報告されておらず、薬剤感受性の出芽酵母を利用することにより取得することが出来たと考えられた。

新規化合物の *pestiocandin* と *pestynol* はそれぞれペーパーディスクアッセイにて 12geneΔ0HSR-iERG6 株だけでなく *Candida. albicans* と *Mucor racemosus* に対して抗真菌活性を示した。12geneΔ0HSR-iERG6 株を利用してスクリーニングを行うことで効率よく新規化合物を取得できるだけでなく、他の真菌に対して活性を持つ化合物を取得できることを明らかにした。

以上の結果より、12geneΔ0HSR-iERG6 株を使用することにより、新規化合物や生物活性が報告されていない既知化合物を取得することができた。したがって、12geneΔ0HSR-iERG6 株が化合物探索において非常に有用なツールであることが示された。今後スクリーニングを継続して行い、精製候補株を増やし化合物単離していくことでさらに 12geneΔ0HSR-iERG6 株が化合物探索に役立つことが示されることが考えられる。

また、12geneΔ0HSR-iERG6 株を利用することで FKI-7550 株培養物より非常に有用なミトコンドリア阻害剤を新規化合物 3 つ、既知化合物 3 つ取得した。これらの化合物は通常の出芽酵母では活性が弱く取得するのは困難であると考えられた。新規なミトコンドリア阻害剤の探索を行う際も 12geneΔ0HSR-iERG6 株は非常に有用であることが明らかになった。

実験の部

第1章 培地組成、使用機器および試薬

ペーパーディスク法を行うにあたり、次の実験材料を用いた。接種菌液に用いる液体培地として YPD 液体培地 (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 3%) を使用し、検定に用いる寒天培地として YPD 寒天培地 (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 3%, agar 1.5%) を使用した。ペーパーディスク (6 mm, 8mm) は Advantec より購入し、検定プレートは 2 号角形滅菌シャーレを栄研化学より購入した。

菌液を培養するにあたり、次の実験材料を用いた。菌株保存用スラントには LcA 培地を使用した。種培養培地として GP seed 培地を用いた。生産培養には F36 培地を用いた。各培地の組成は表 S-1 に示した。振盪培養はロータリーシェイカー (高崎科学機器、TC-500RV: 大試験管、TB-C-60R: 三角フラスコ) を用いた。静置培養は Ulpack 47 を北研から購入し使用した。遠心機 (Kubota8100) を用いた。

化合物の単離精製を行うにあたり、次の実験材料を用いた。有機溶媒 (メタノール、酢酸エチル、アセトニトリル、クロロホルム) は関東化学より、エタノールは日本アルコール販売より購入した。シリカゲル樹脂はシリカゲル 60 (particle size 230-400 mesh) を Merck より、ODS 樹脂を YMC より購入した。また、HPLC 装置は送液ユニット (島津製作所、LC-6AD) 、システムコントローラー (島津製作所、CBM-20A) 、検出器 (島津製作所、SPD-M20A) 、カラム (分析用 : センシュー科学、Pegasil ODS SP100 4.6Φ×250 mm ; 富士シリシア、Chromatorex C8 SPS100-5HE 4.6Φ×250 mm、分取用 : センシュー科学、Pegasil ODS SP100 20Φ×250 mm ; 富士シリシア、Chromatorex C8 SPS100-5HE 20Φ×250 mm) を使用した。ロータリーエバポレーター装置はエバポレーター (Eyela, Rotary Vacuum Evaporator N-N Series) 、湯浴 (Eyela, Water Bath SB-35) 、冷却器 (Eyela, CA1112) 、コントローラー (Buchi, Vacuum Controller B721) を使用した。また、水の除去に凍結乾燥機 (Eyela, FD-81) を使用した。

質量分析は高分解能 ESI-MS (日本電子製 JMS-T100LP もしくは AB SCIEX 製 QSTAR Elite) を用いて測定した。UV スペクトルは分光光度計 (日本分光、DIP-1000) で測定した。赤外吸収スペクトルは ATR 法により、フーリエ変換赤外分光光度計 (Horiba, FT-210) にて測定した。比旋光度は旋光度計 (日本分光、P-2200) で測定した。各種 NMR は 400 MHz NMR (Agilent Technologies, Varian XL-400) 、500MHz NMR (JEOL, Jastec)、600MHz NMR (Bruker 、Bruker Avance III HD600) を用いて測定した。重クロロホルム (^1H : 7.26 ppm、 ^{13}C : 77.0 ppm) 、重メタノール (^1H : 3.31 ppm、 ^{13}C : 49.0 ppm)、重 DMSO (^1H : 2.48 ppm、 ^{13}C : 39.5 ppm) を内部標準とした。

細胞培養には以下の機器を用いた。CO₂ インキュベーターは三洋電機株式会社製 MCO-175 を用いた。クリーンベンチは三洋電機株式会社製 MCV-131BNF を用いた。

表 S1 培地組成

LcA培地		
Glycerol	和光純薬工業	0.10%
KH ₂ PO ₄	関東化学	0.08%
K ₂ HPO ₄	関東化学	0.02%
MgSO ₄ · 7HO	関東化学	0.02%
KCl	関東化学	0.02%
NaNO ₃	和光純薬工業	0.02%
Agar	SSKセールス	1.50%
pH 6.0		

YPD培地		
Yeast extract	オリエンタル酵母工業	1.00%
Peptone	和光純薬工業	2.00%
Glucose	和光純薬工業	2.00%

F36培地		
米	肉のハナマサ	10 g
こぶ茶	伊藤園	100 mg

GP seed培地		
Glucose	和光純薬工業	2.00%
Polypepton	和光純薬工業	0.50%
Yeast extract	オリエンタル酵母工業	0.20%
MgSO ₄ · 7HO	関東化学	0.05%
KH ₂ PO ₄	関東化学	0.10%
Agar	SSKセールス	0.10%
pH 6.0		

YPD寒天培地		
Yeast extract	オリエンタル酵母工業	1.00%
Peptone	和光純薬工業	2.00%
Glucose	和光純薬工業	2.00%
Agar	SSKセールス	1.50%

第2章 薬剤超感受性出芽酵母を用いたスクリーニング方法

本研究におけるスクリーニングでは薬剤感受性出芽酵母である *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 株と *S. cerevisiae* BY25929 株を使用した。12geneΔ0HSR-iERG6 株は筑波大学生命環境科学研究科臼井研究室から提供して頂いた。2種の菌株は YPD 寒天培地上にコロニーを形成させ 4℃で保存した。

保存してある菌株を 5 mL の YPD 液体培地に 1 白金耳植菌し 27℃にて 2 日間振盪培養した。この培養液を湯煎で溶かした後 50℃まで下げた YPD 寒天培地に 1%混釈し、2 号角型シャーレに 30 mL ずつ分注したものを検定プレートとした。この検定プレート上に各サンプルを染み込ませたペーパーディスク (6 mm もしくは 8 mm) を置き、27℃で 2 日間静置培養後、阻止円径を測定することで活性を評価した。

1 次スクリーニングでは 12geneΔ0HSR-iERG6 株と BY25929 株に対する活性を比較し、12geneΔ0HSR-iERG6 株にのみ阻止円を形成するサンプルをスクリーニング通過サンプルとした。2 次スクリーニングでは再培養を行い 12geneΔ0HSR-iERG6 株に対する活性の再現が確認でき、12geneΔ0HSR-iERG6 株と BY25929 株を比較し 12geneΔ0HSR-iERG6 株に優先的に阻止円を形成したサンプルを選択した。

第3章 第3章の実験手法

3-1 糸状菌 FKI-7473 株の taxonomic studies

糸状菌 FKI-7473 株は徳島の土壌より単離した。Oatmeal agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 上で生育させた FKI-7473 株のコロニーの形態学的な解析より *Pestalotiopsis* 属であると決定した。また、internal transcribed spacer (ITS) 領域の DNA 配列は BLASTN2.5.0 解析⁴⁴⁾により、GenBank database にある配列と比較した。その結果、FKI-7473 株は *Pestalotiopsis humus* CBS 336.97 (ex-type, GenBank accession number KM199317) と 100%の類似性を持つため、FKI-7473 株は *Pestalotiopsis humus* と同定した。

3-2 糸状菌 FKI-7550 株の taxonomic studies

糸状菌 FKI-7550 株は徳島の *Cerasus × yedoensis* の根本の土壌より単離した。ITS 領域の DNA 配列は BLASTN2.7.1 解析⁴⁴⁾により、GenBank database にある配列と比較した。その結果、FKI-7550 株は NRRL 25181 (ex-type of *Fusarium concentricum*, GenBank accession number NR_111886) と 99.6%の類似性を示したため、FKI-7550 株は *Fusarium* sp. と同定した。

3-3 (R)-(+)-MTPA pestynol の合成および精製、構造解析

室温で pestynol (3.2 mg, 9.24 μ mol) を乾燥溶媒のテトラヒドロフラン 0.9 mL に溶かした後、(R)-(+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid (2.6 mg, 11.1 μ mol) および dicyclohexylcarbodiimide (3.8 mg, 18.5 μ mol)、触媒量の 4-dimethylaminopyridine を添加した。60°C で 19 時間攪拌後、室温に戻し H₂O を 3 mL 添加し、10 分攪拌することで反応を止めた。反応停止後の溶液をジクロロメタン 5 mL で三回抽出を行い、ジクロロメタン層を回収し溶媒を減圧留去した。得られた粗抽出物を TLC (250 μ m 20×20 cm; CHCl₃-MeOH, 10:1) で精製を行い目的物の (R)-(+)-MTPA pestynol を 0.3 mg (収率 6%) 取得した。

(R)-(+)-MTPA pestynol は無色油状物質として得られ、高分解能 ESI-MS 解析により分子量 562、分子式 C₃₁H₃₇F₃O₆ (found m/z 580.2882、calcd m/z 580.2886 [M + NH₄]⁺) と決定した。重クロロホルム中で測定した ¹H-NMR (500 MHz) 解析より以下のケミカルシフト値を決定した。 δ_H 6.10 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-5), 5.76 (1H, dd, J = 4.5, 4.9 Hz, H-4), 5.40 (1H, brs, H-12'), 5.33 (1H, brs, H-12'), 5.11 (1H, m, H-6'), 5.09 (1H, m, H-10'), 4.35 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-1), 4.19 (1H, dd, J = 4.5, 9.7 Hz, H-3), 3.94 (1H, dd, J = 4.3, 9.7 Hz, H-2), 2.23 (2H, m, H-4'), 2.23 (2H, m, H-5'), 2.06 (2H, m, H-9'), 1.98 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8'), 1.68 (3H, brs, H-14'), 1.61 (3H, brs, H-13'), 1.60 (3H, brs, H-15')。

3-4 (S)-(-)-MTPA pestynol の合成および精製、構造解析

室温で pestynol (2.8 mg, 8.08 μ mol) を乾燥溶媒のテトラヒドロフラン 0.9 mL に溶かした後、(S)-(-)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid (2.3 mg, 9.7 μ mol) および

dicyclohexylcarbodiimide (3.8 mg, 18.5 μ mol)、触媒量の 4-dimethylaminopyridine を添加した。その後 3-3 で述べた (R)-(+)-MTPA pestynol と同様の操作を行い、(S)-(-)-MTPA pestynol を 0.3 mg (収率 7%) 取得した。

(S)-(-)-MTPA pestynol は無色油状物質として得られ、高分解能 ESI-MS 解析により分子量 562、分子式 $C_{31}H_{37}F_3O_6$ (found m/z 580.288858、calcd m/z 580.28860 $[M + NH_4]^+$) と決定した。重クロロホルム中で測定した 1H -NMR (500 MHz) 解析より以下のケミカルシフト値を決定した。 δ_H 6.15 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, H-5), 5.77 (1H, dd, $J = 4.5, 4.6$ Hz, H-4), 5.42 (1H, brs, H-12'), 5.34 (1H, brs, H-12'), 5.10 (1H, m, H-6'), 5.08 (1H, m, H-10'), 4.38 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-1), 4.16 (1H, dd, $J = 4.5, 9.2$ Hz, H-3), 3.92 (1H, dd, $J = 4.0, 9.2$ Hz, H-2), 2.23 (2H, m, H-4'), 2.23 (2H, m, H-5'), 2.06 (2H, m, H-9'), 1.98 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8'), 1.68 (3H, brs, H-14'), 1.61 (3H, brs, H-13'), 1.60 (3H, brs, H-15').

3-5 抗菌試験

ペーパーディスク法による抗菌試験はペーパーディスクに 10 μ L の化合物溶液を染み込ませた後、各菌株を植菌した寒天培地上に置き、27 $^{\circ}$ C もしくは 37 $^{\circ}$ C で培養し、24 h もしくは 48 h 後の阻止円径の大きさを測ることで評価した。各菌株の培養条件および培養温度は以下に示した。

Bacillus subtilis ATCC 6633 [nutrient agar (0.5% peptone, 0.5% meat extract, and 0.8% agar adjusted to pH 7.0), 0.5% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Escherichia coli* NIHJ [nutrient agar, 0.5% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 [nutrient agar, 0.5% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 [nutrient agar, 0.2% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Proteus vulgaris* NBRC 3167 [nutrient agar, 0.5% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12582 [nutrient agar, 1.0% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p [nutrient agar, 0.2% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 24 h], *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* KB 88 [nutrient agar, 1.0% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 24 h], *Mycobacterium smegmatis* KB 42 [Waksman agar (0.5% peptone, 0.5% meat extract, 0.3% NaCl, 1.0% glucose, and 0.8% agar adjusted to pH 7.0), 1.0% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 48 h], *Acoleplasma laidlawii* PG 8 [PPLO agar (3% PPLO broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), 0.2% phenol red (5 mg/mL), 0.1% glucose, 1.5% agar, 1% penicillin G, and 15% horse serum), 7.5% inoculation, 37 $^{\circ}$ C, 48 h], *Aspergillus niger* ATCC 6275 [GY agar (1.0% glucose, 0.5% yeast extract, and 0.8% agar adjusted to pH 6.0), 0.5% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 48 h], *Candida albicans* ATCC 64548 [GY agar, 0.2% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 48 h], *Mucor racemosus* IFO 4581 [GY agar, 0.3% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 48 h], *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 [GY agar, 0.3% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 24 h], *S. cerevisiae* BY4741 [YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 1.5% agar), 1% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 48 h], *S. cerevisiae* BY25929 [YPD agar, 1% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 48 h], *S. cerevisiae* 12gene Δ 0HSR-iERG6 [YPD agar, 1% inoculation, 27 $^{\circ}$ C, 48 h].

次に微量液体希釈法による抗菌試験方法を述べる。

使用した細菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* NIHJ, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12582, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* KB 88, *Proteus vulgaris* KB127, *Mycobacterium smegmatis* KB 42, *Micrococcus luteus* KB212) は全て MHB で前培養を行った後、McFarland No. 0.5 に調整し 200 倍希釈になるように 96 穴プレートに前培養液を植菌した。使用した真菌 (酵母; *C. albicans* KF1, *S. cerevisiae* KF237, *S. cerevisiae* BY4741, *S. cerevisiae* BY25929, *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6: 糸状菌; *Mucor racemosus* KF223) は全て YPD 培地で前培養を行い、96 穴プレートに菌数 1.0×10^4 cells/100 μ L (酵母)、 2.5×10 CFU/100 μ L (糸状菌) になるように前培養液を植菌した。

植菌した培地入りの 96 穴プレートに化合物を 256 μ g/mL から二倍希釈系列で添加し、細菌は 24 h、真菌は 48 h 後の菌の増殖を目視で確認し MIC 値を出した。

第 4 章 第 4 章の実験手法

4-1 抗菌試験

微量液体希釈法は 3 章と同様に行った。YPG 培地は 1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol で作成し使用した。

4-2 単離ミトコンドリアを用いた ATP 排出阻害試験

出芽酵母より単離したミトコンドリアを用いて ATP の排出阻害試験を Lousa らの方法⁴⁵⁾に従って行った。単離ミトコンドリア (50 μ g of proteins/ml) は 30°C で ATP detecting system (2.5mM glucose, hexokinase (1.7 E.U.), glucose-6phosphate dehydrogenase (0.85 E.U.), 0.20mM NADP⁺ and 10 μ M Ap5A) 存在下の 2.5mL の reaction buffer (0.60M mannitol, 0.10mM EGTA, 2.0mM MgCl₂, 10mM KPi, 5.0mM α -ketoglutarate, and 10mM Tris-HCl, pH 7.4) に懸濁した。最後に、ADP (25mM) を加えることでミトコンドリアのマトリックスにて ATP が産出される。産出された ATP が ATP detecting system 中に存在する各酵素により変換され、NADPH を Shimadzu UV3000 (340nm; ϵ = 6.2mM⁻¹ cm⁻¹) で測定することにより阻害活性を評価した。

4-2 NADH-cytochrome *c* oxidoreductase 活性評価

単離ミトコンドリアは基質 (NADH と cytochrome *c*) の透過性を上げるため凍結融解を 50mM KPi buffer (pH 7.4) 中で 3 回行った。NADH-cytochrome *c* oxidoreductase 活性の評価は 30°C で 4.0 mM KCN と 50 μ M cytochrome *c* (from horse heart, Sigma-Aldrich) 、終濃度 10 μ M NADH 含有の 50 mM KPi (pH 7.4) buffer 中で cytochrome *c* (550–540nm; ϵ = 21mM⁻¹ cm⁻¹) の還元を Shimadzu UV3000 で測定することにより行った。

4-3 ヒト癌細胞に対する毒性試験

細胞毒性試験は 8 種のヒト癌細胞を用いて行った。浮遊系癌細胞として HL-60 (human promyelocytic leukaemia cell line), Jurkat (human acute lymphocytic leukaemia cell line) と THP-1 (human acute monocytic leukaemia cell line) および接着系癌細胞として HeLa S3 (human cervical cancer cell line), HT29 (human colorectal adenocarcinoma cell line), A549 (human adenocarcinoma cell line derived from lung cancer), H1299 (human non-small cell lung carcinoma cell line derived from lymph nodes) and Panc1 (human cell line derived from pancreatic cancer) を使用した。

培養条件は以下に示した。

浮遊系癌細胞 [RPMI medium (Nacalai Tesque) added to 10%FBS, 1% sodium pyruvate and 1% penicillin streptomycin, 37°C, under 5%CO₂].

接着系癌細胞 [DMEM medium (Wako Pure Chemical Industries) added to 10% FBS and 1% penicillin streptomycin, 37°C, under 5%CO₂].

活性評価の方法は以下に示した。

浮遊系癌細胞と接着系癌細胞をそれぞれ 3×10^5 cells/well と 5×10^3 cells/well になるよう 96 穴プレートに接種した後、MeOH に溶解させた化合物を 10 μ L ずつ各 well に添加した。2 日間 37°C で培養し、WST-8 溶液を各 well に添加し、4 時間 37°C で培養した。最後に各 well の吸収波長をマイクロプレートリーダーで 460 nm の波長を測定することにより評価した。

5 章 取得化合物の各種機器分析のデータ

5-1 Pesticandin の各種機器分析データ

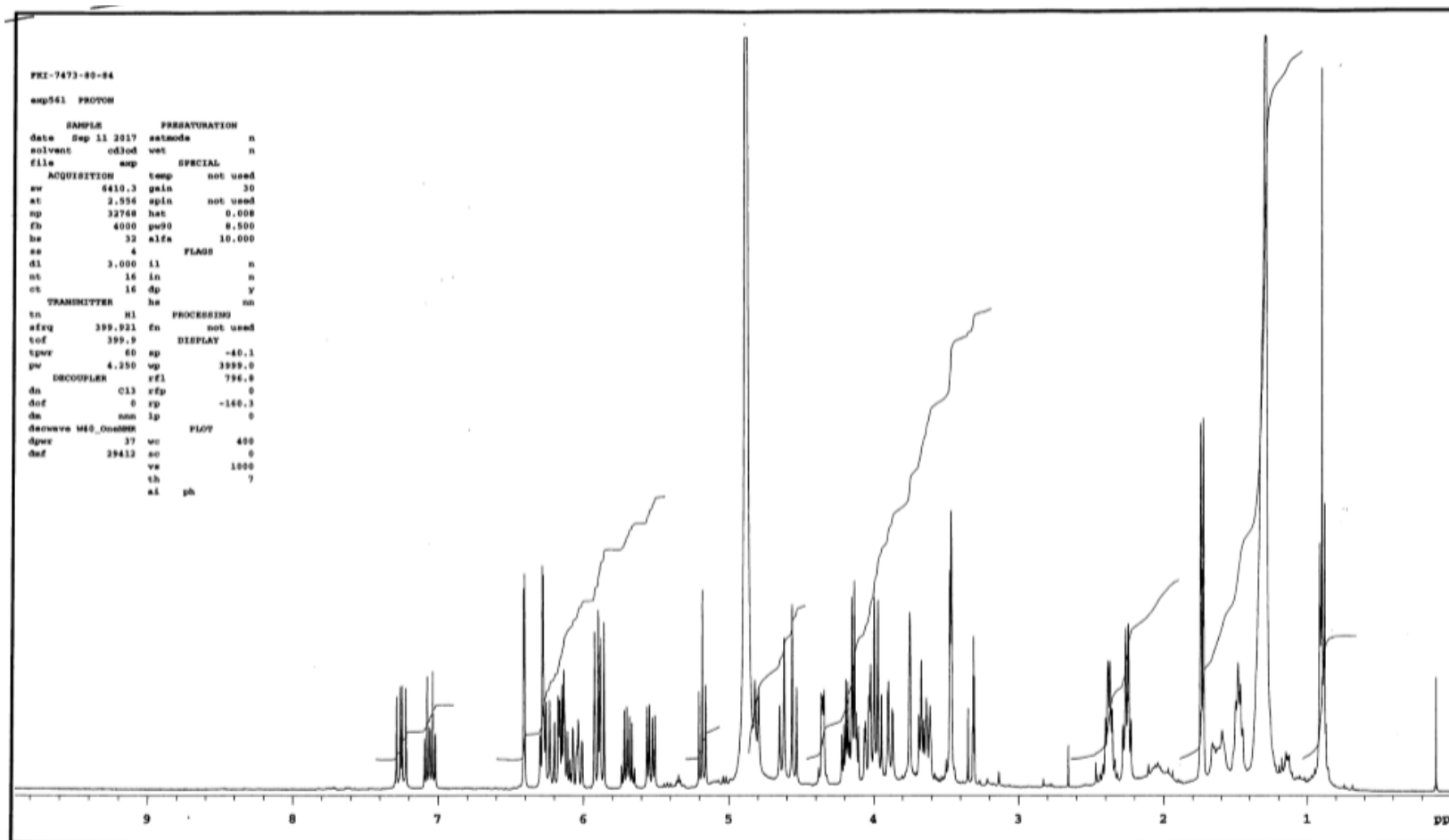


Fig. S1 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of pesticides

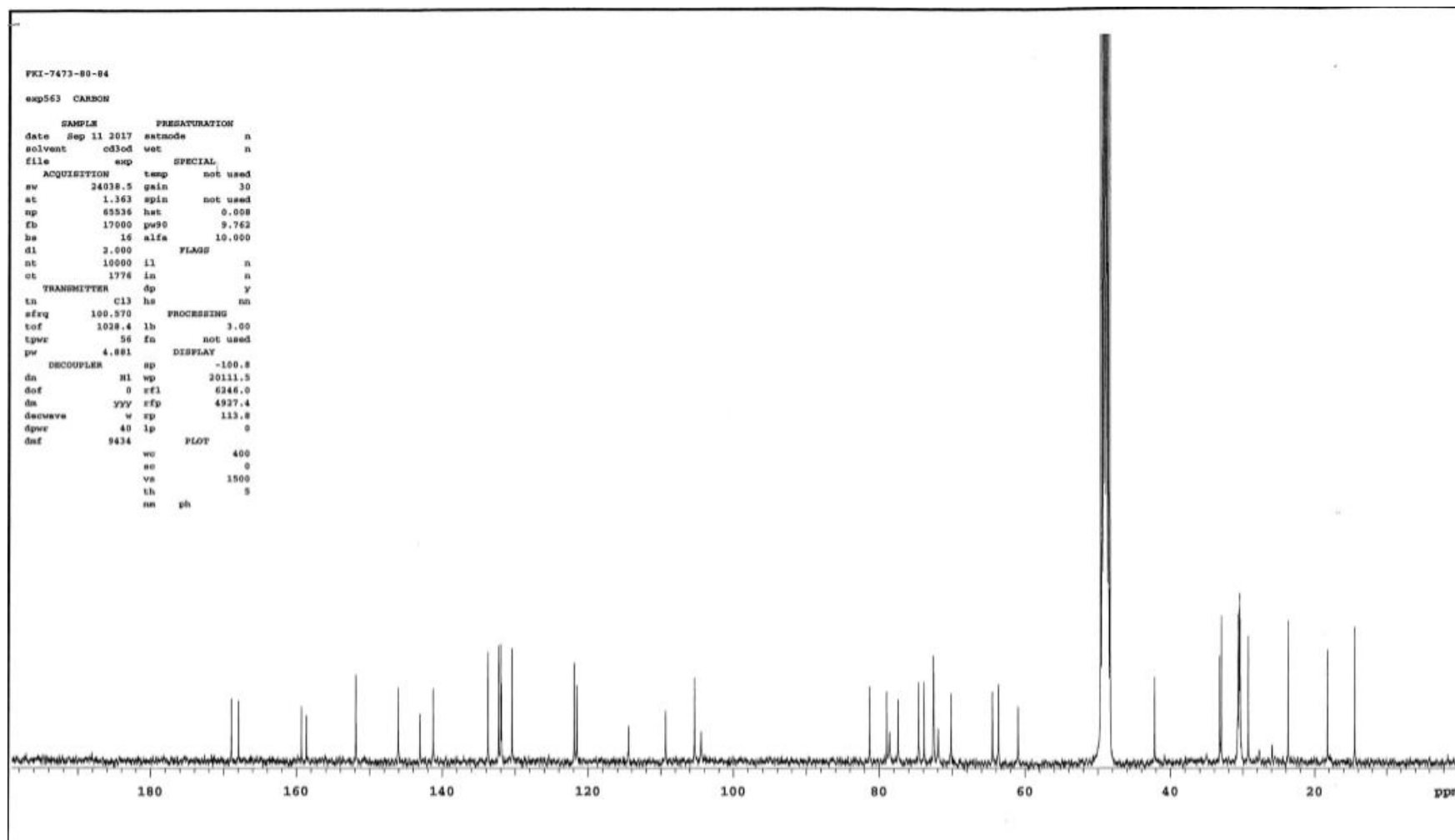


Fig. S2 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of pestiocandin

lot3FKI-7473-1-1M90-2-80-84-all

exp9 gCOSY

SAMPLE		FLAGS	
date	Aug 6 2017	hs	nn
solvent	cd3od	aspul	y
sample	lot3FKI-7473	hsglv1	1212
3-1-1M90-2-80-84-a-		SPECIAL	
11_20170806_01	temp	25.0	
ACQUISITION		gain	30
sw	6377.6	spin	0
at	0.150	F2 PROCESSING	
np	1914	sb	-0.075
fb	4000	sbs	not used
ss	32	fn	2048
d1	1.000	F1 PROCESSING	
nt	16	sb1	-0.040
2D ACQUISITION		sbu1	not used
sw1	6377.6	proc1	1p
ni	256	fn1	2048
d2	0	DISPLAY	
PRESATURATION		sp	113.8
satmode	n	vp	2914.7
wet	n	sp1	-73.7
TRANSMITTER		wp1	3537.5
tn	H1	rf1	2105.3
sfrq	399.451	rfp	1322.2
tof	399.4	rf11	2112.1
tpwr	57	rfp1	1322.2
pw	14.300	PLOT	
GRADIENTS		wc	140.0
gslv1E	1011	sc	10.0
gtE	0.001000	wc2	140.0
EDratio	1.000	sc2	5.0
gstab	0.000500	vs	1172
DECOUPLER		th	5
dn	C13	ai	cdc av
dm	nan		

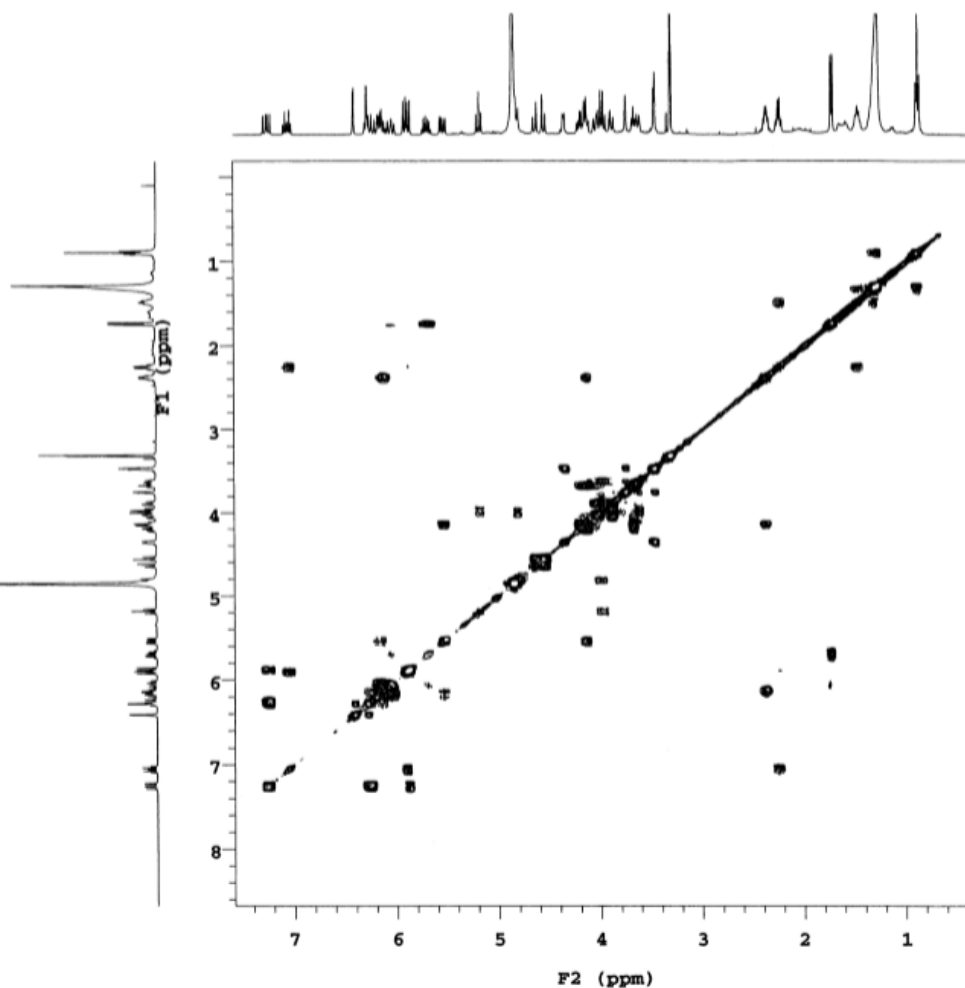


Fig. S3 COSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestiocandin

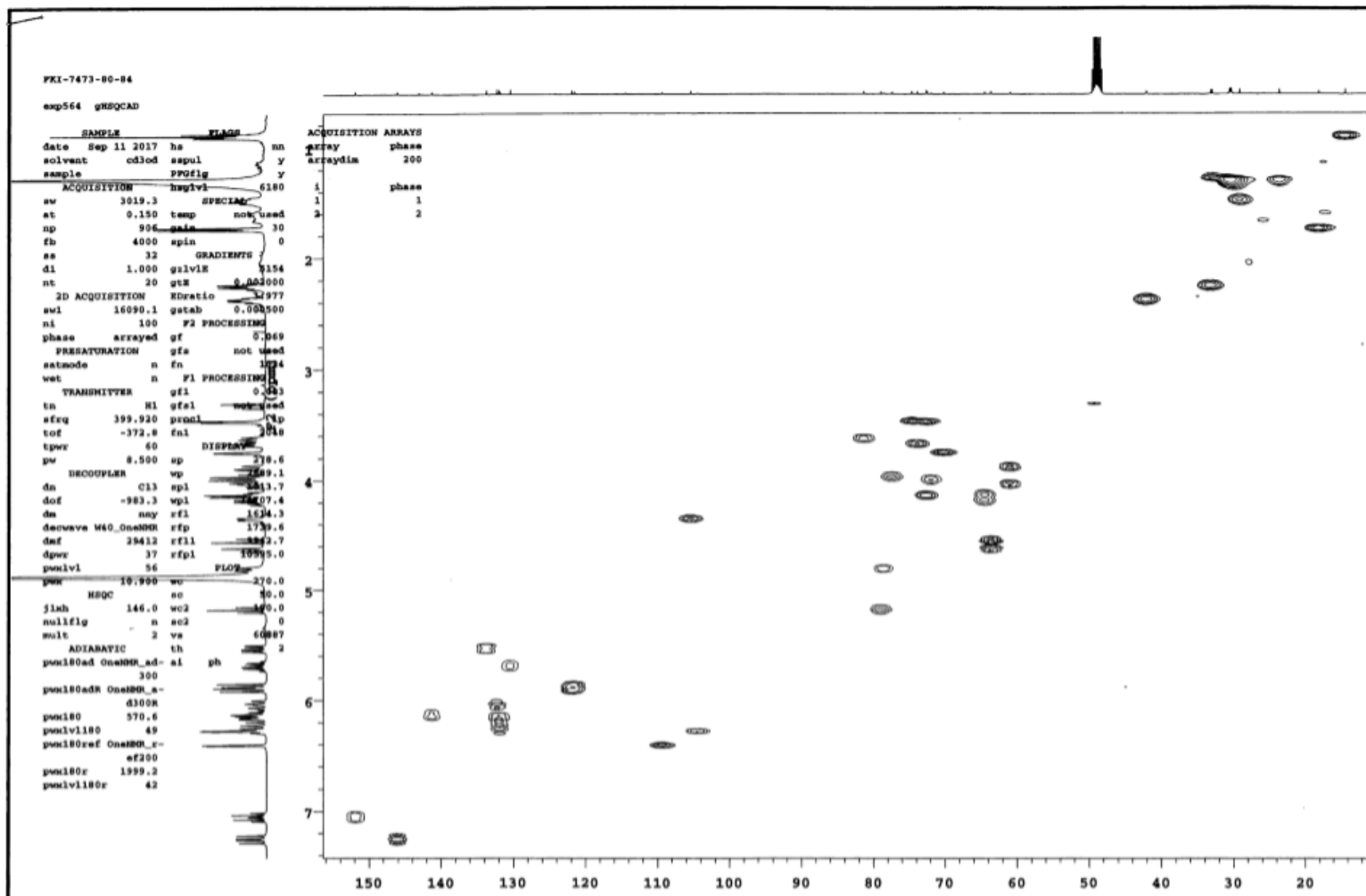


Fig. S4 HSQC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestiocandin

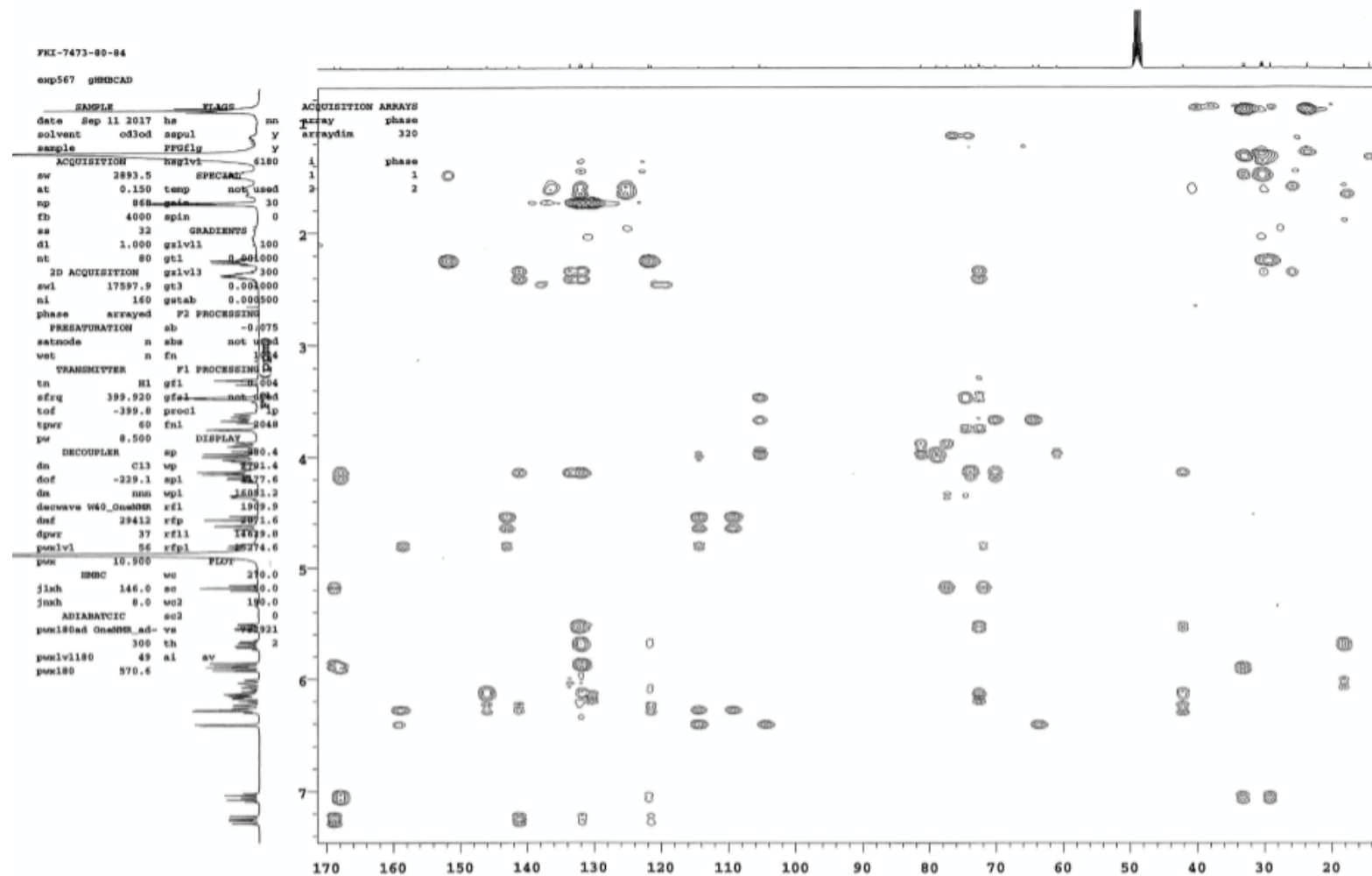


Fig. S5 HMBC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestiocandin

lot3FXI-7473-1-1M80-2-80-84ROESY

exp32 ROESY

SAMPLE		FLAGS	
date	Aug 12 2017	hs	nn
solvent	cd3od	aspl	y
sample	lot3FXI-747- PPGflg		
3-1-1M80-2-80-84RO-	hagiv1		1212
ESY_20170812_01		SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	6377.6	gain	30
at	0.150	spin	0
np	1914	F2 PROCESSING	
fb	4000	gf	0.069
ss	32	gfs	not used
d1	1.000	fn	2048
nt	16	F1 PROCESSING	
2D ACQUISITION		gfl	0.029
sw1	6377.6	gfl1	not used
nl	200	psoc1	lp
TRANSMITTER		fn1	2048
tn	H1	DISPLAY	
sfrq	399.451	sp	176.2
tof	399.4	wp	2802.6
tpwr	57	sp1	45.4
pw	14.300	wp1	3139.0
TOCXY		xf1	2105.1
nidR	0.200	xfp	1322.2
slpwr	45	xf11	2105.1
slpwr	65.775	xfp1	1322.2
trm	0.0020	PLOT	
PULSATORATION		wo	180.0
astmode	n	so	10.0
wet	n	wo2	180.0
DECOUPLER		so2	0
ds	C13	vs	3077
ds	nm	ch	1
	sl	ph	

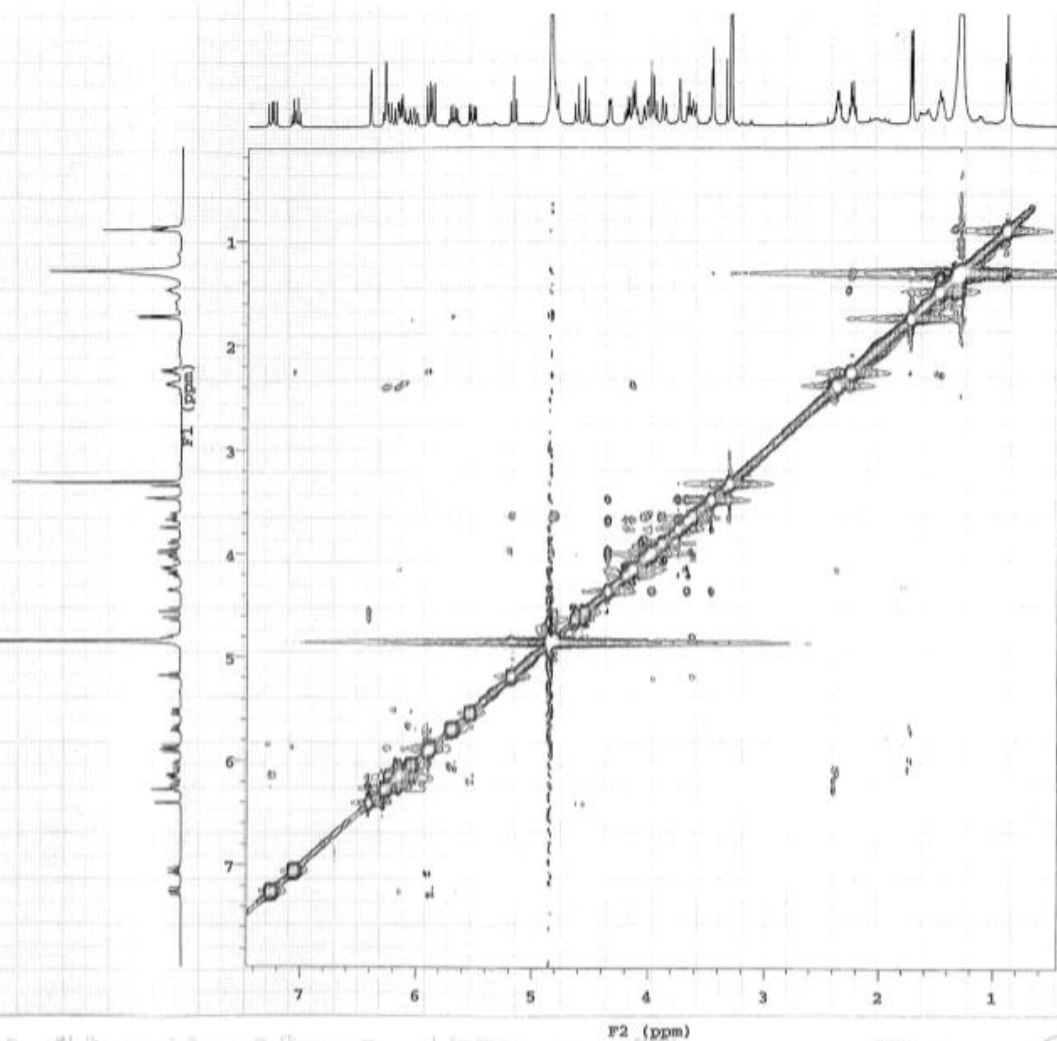


Fig. S6 ROESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestiocandin

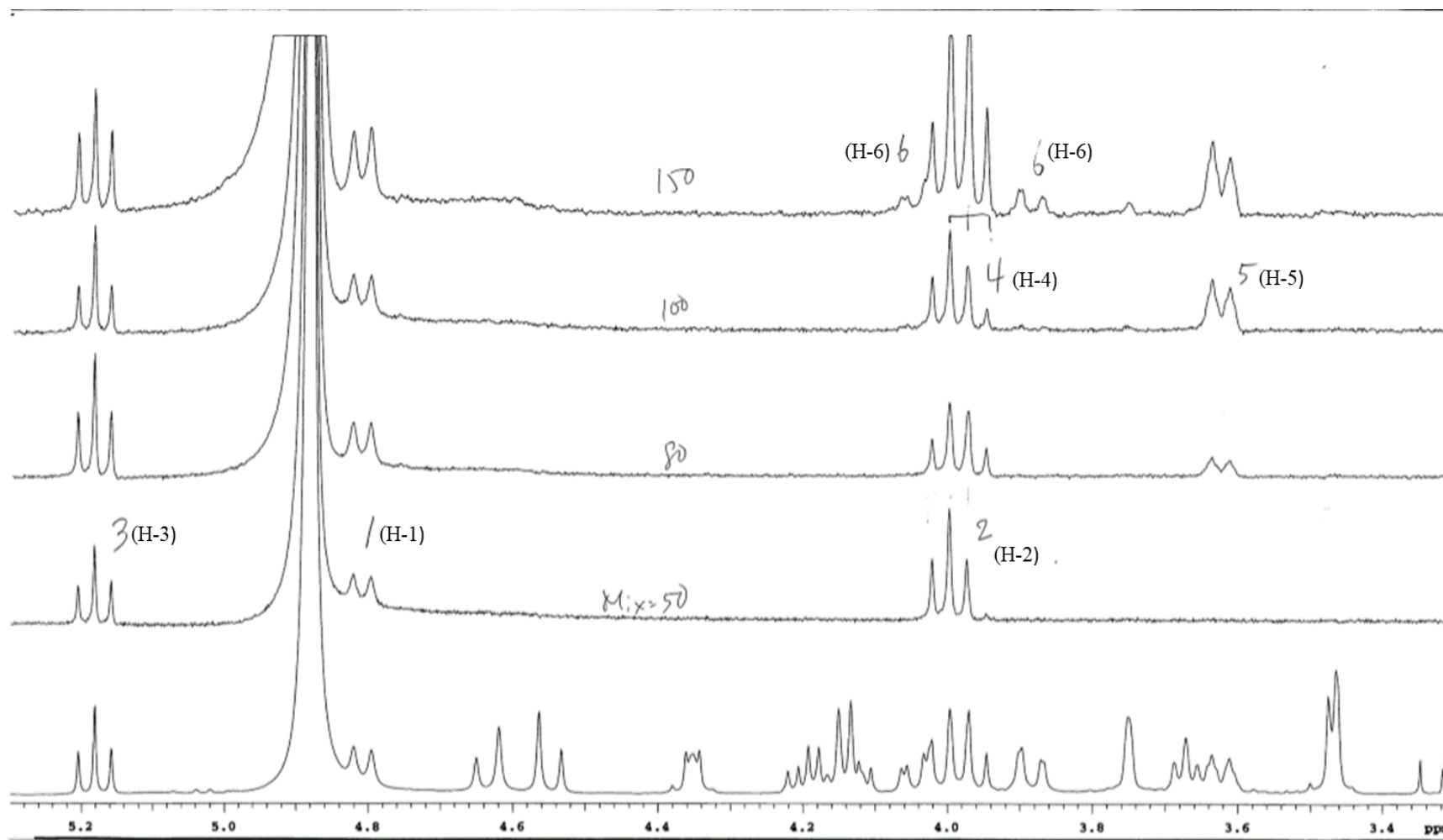


Fig. S7 HOHAHA spectra of glucose unit

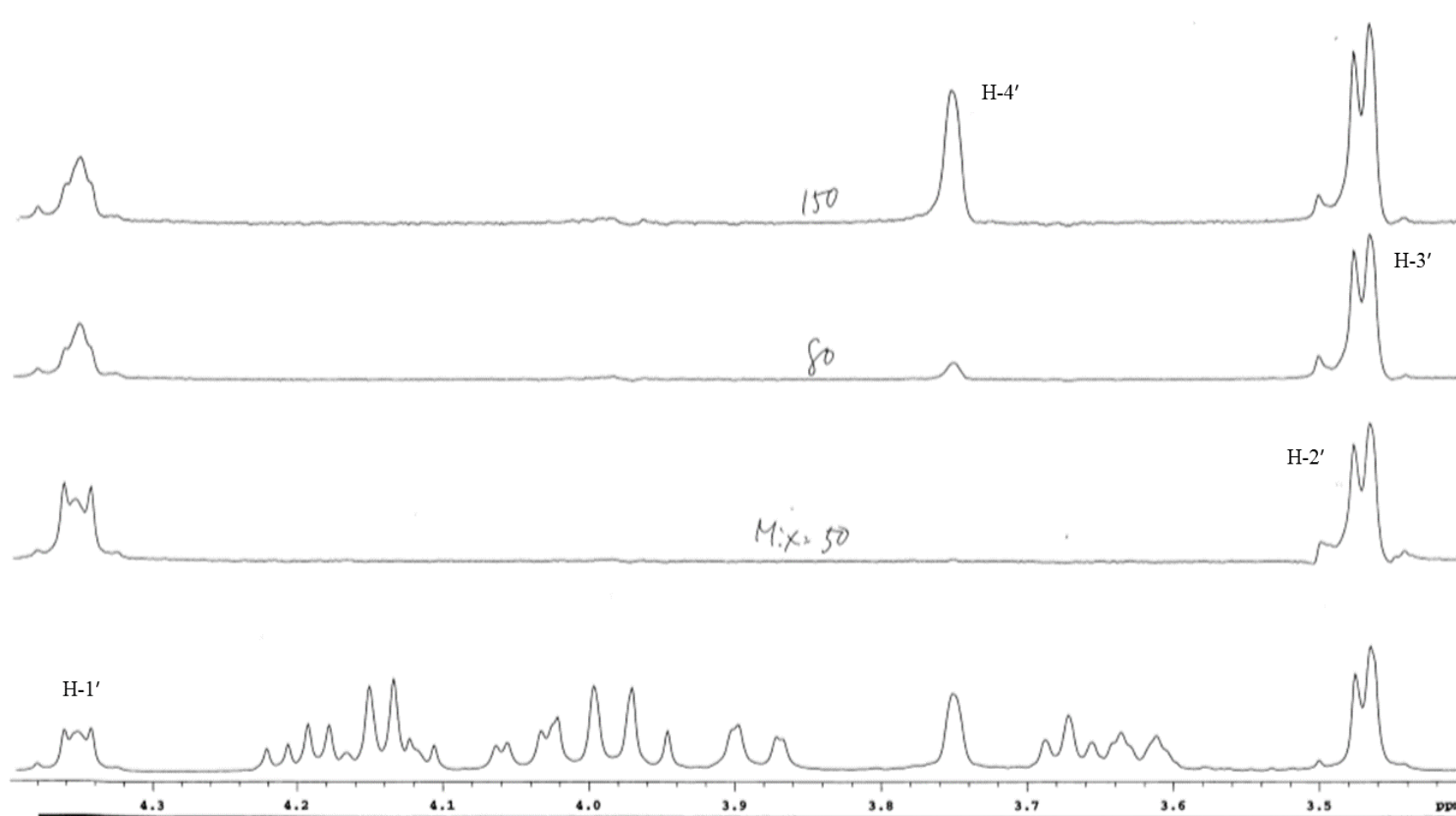


Fig. S8 HOHAHA spectra of galactose unit

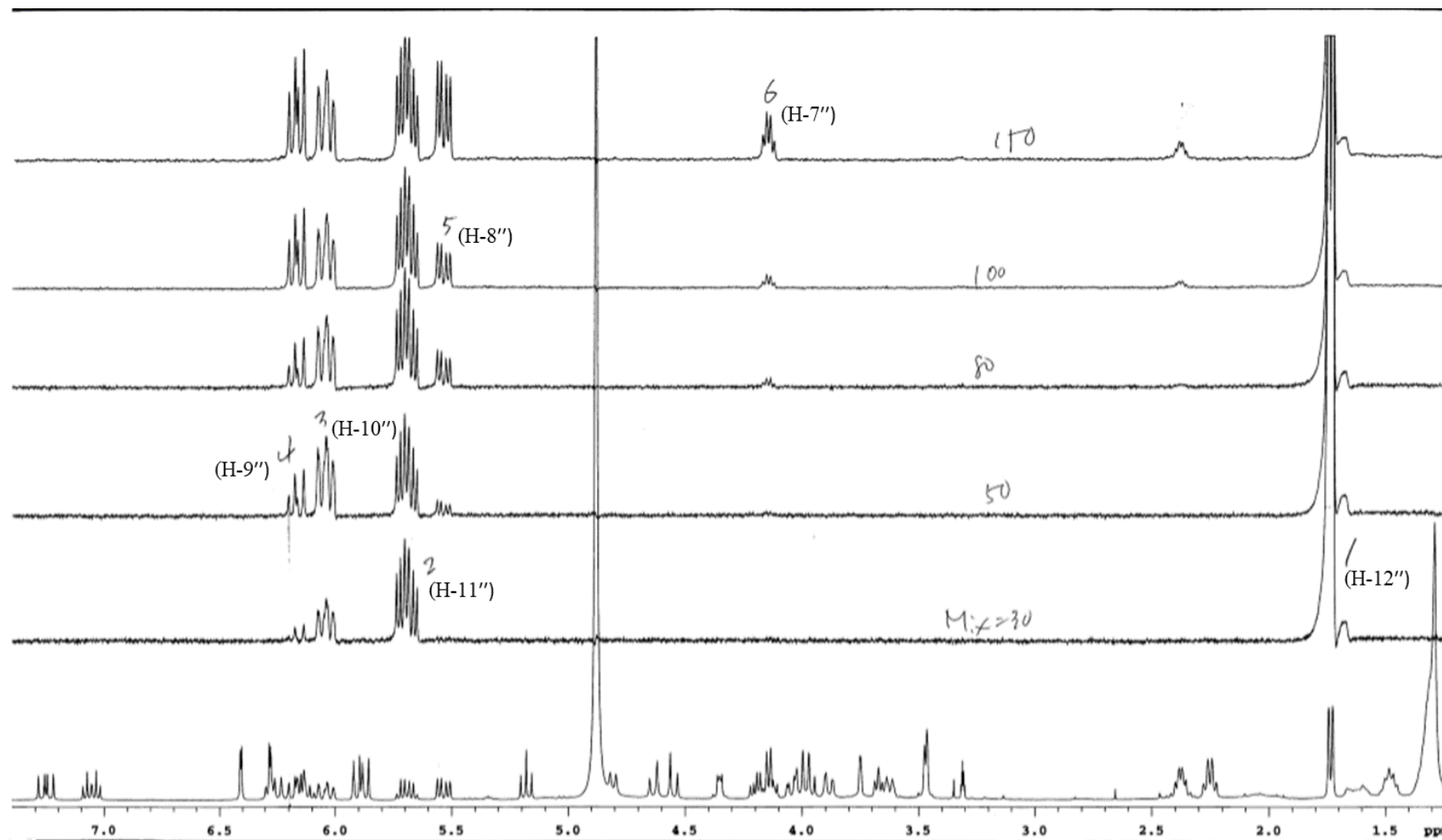


Fig. S9 HOHAHA spectra of oxygenated hydrocarbon unit from H-12'' to H-7''

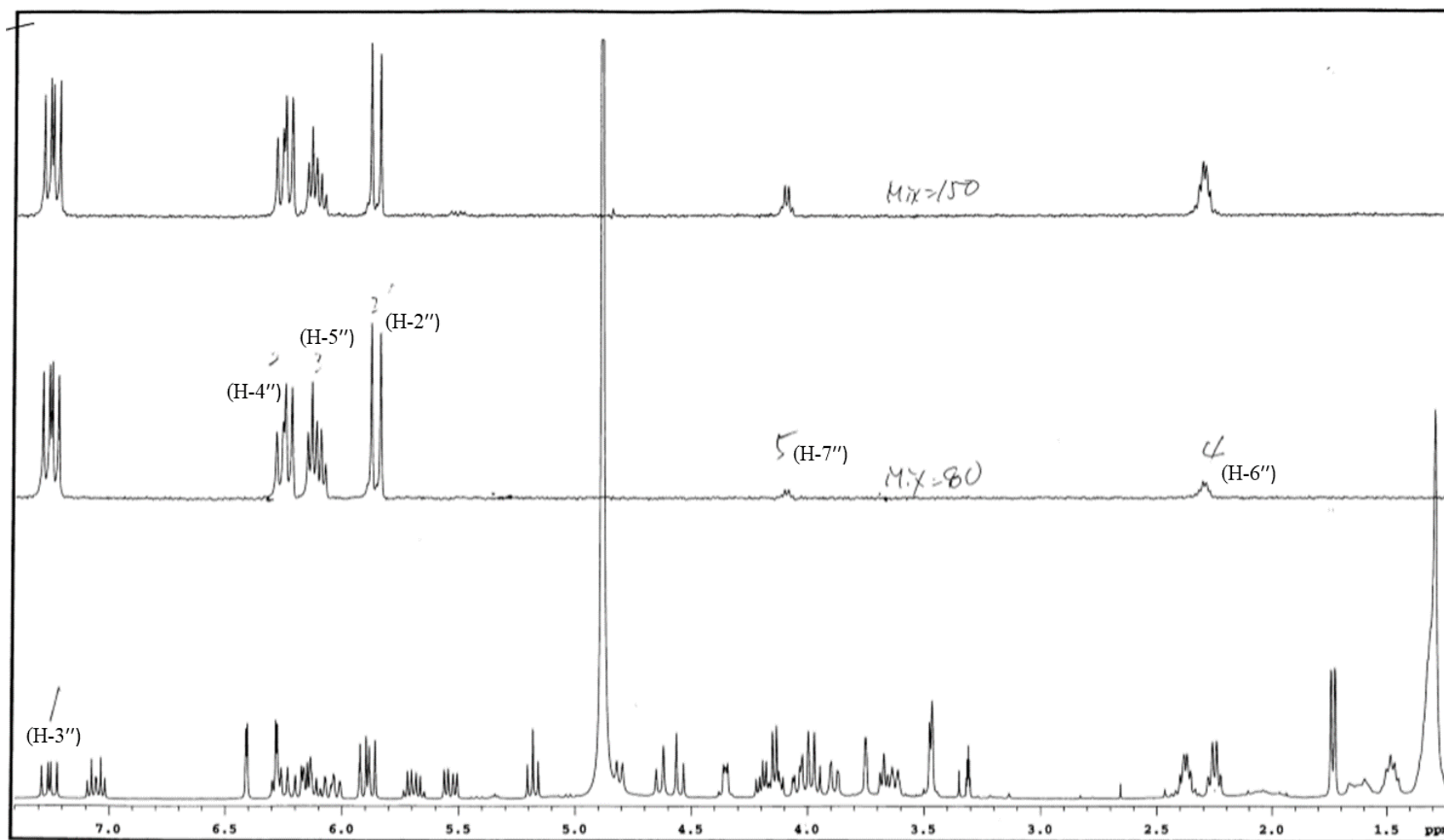


Fig. S10 HOHAHA spectra of oxygenated hydrocarbon unit from H-3'' to H-7''

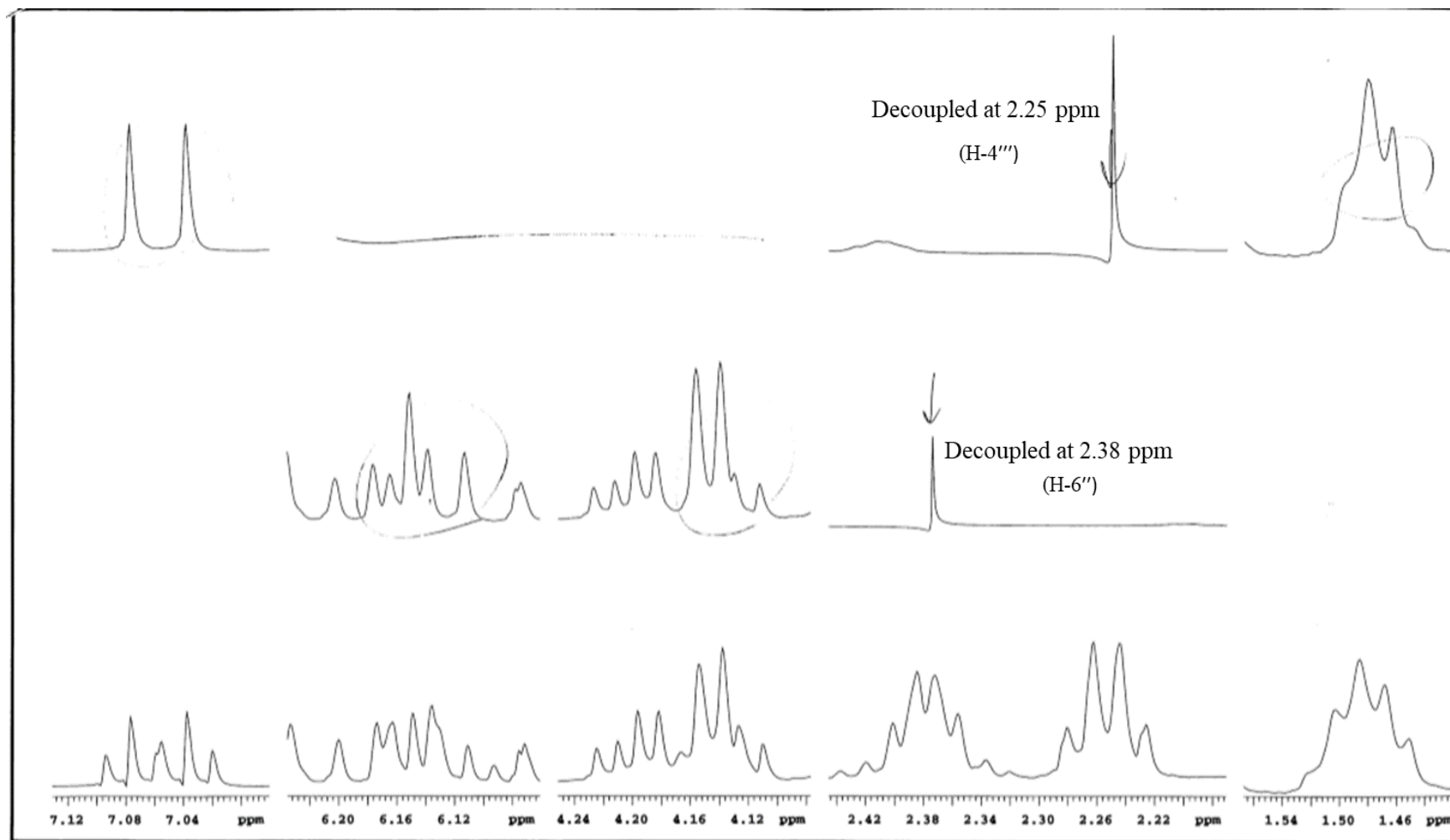


Fig. S11 Decoupling of proton signals (2.25 ppm and 2.38 ppm) of pestiocandin

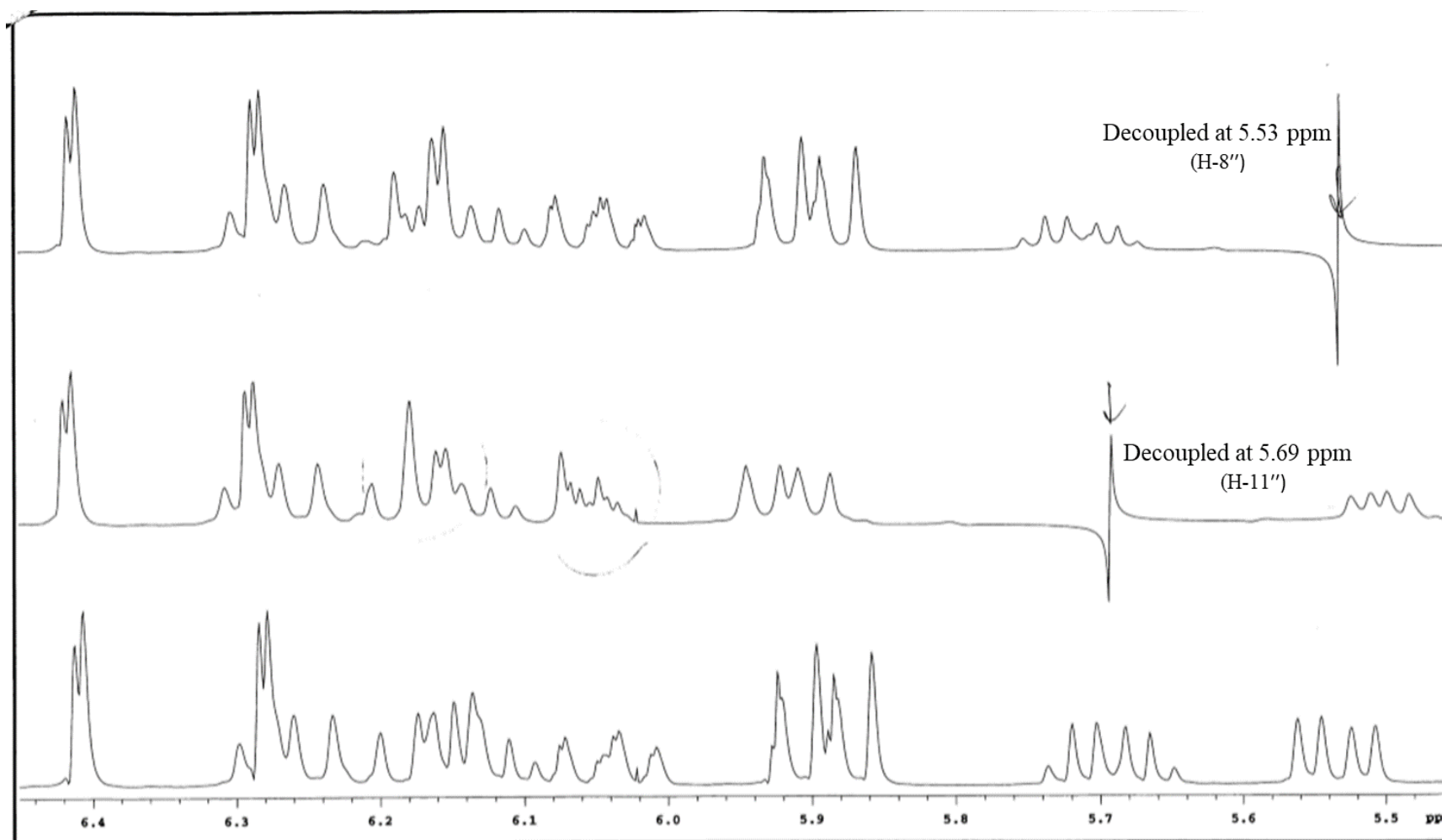


Fig. S12 Decoupling of proton signals (5.53 ppm and 5.69 ppm) of pestiocandin

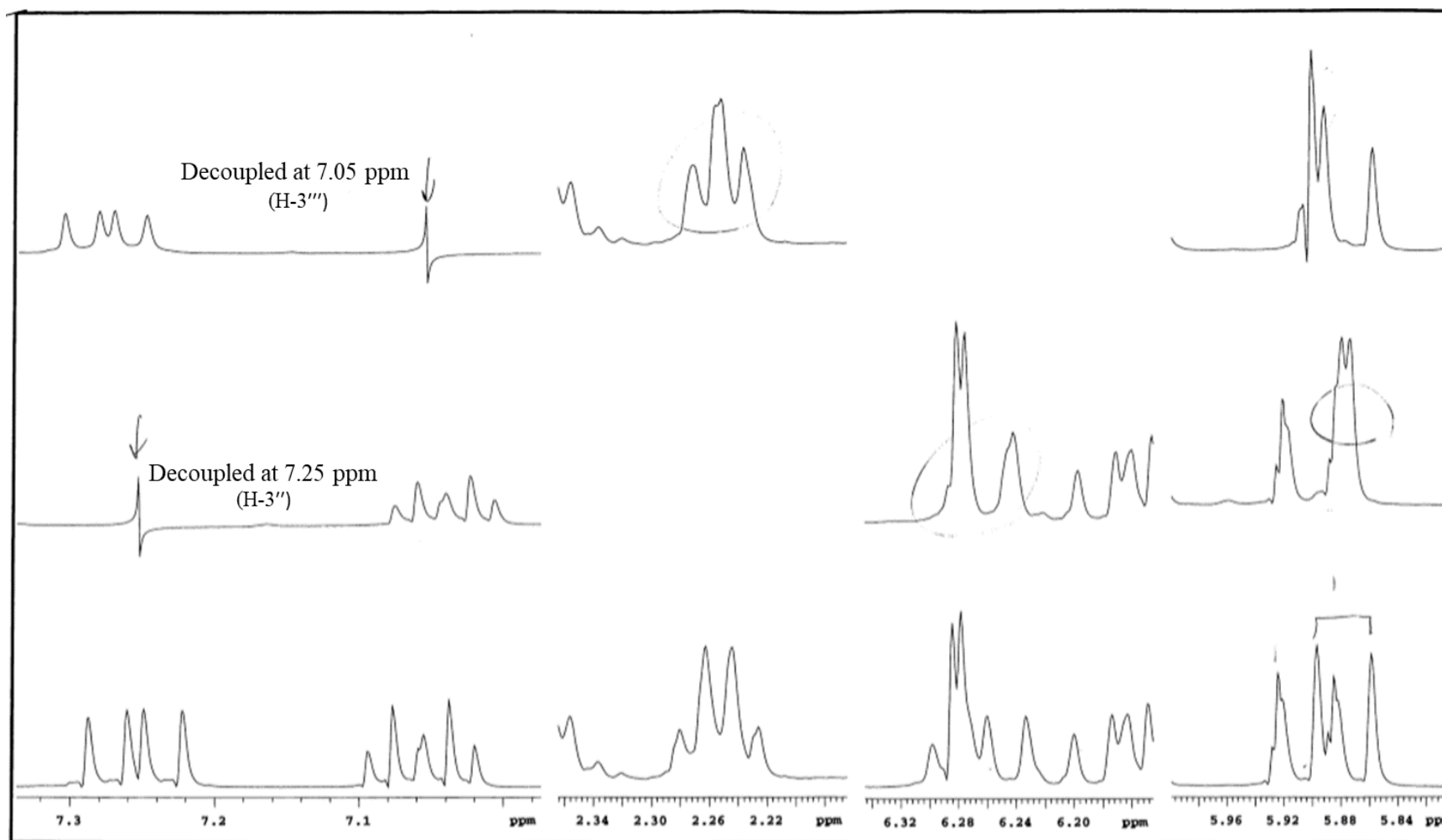


Fig. S13 Decoupling of proton signals (7.05 ppm and 7.25 ppm) of pestiocandin

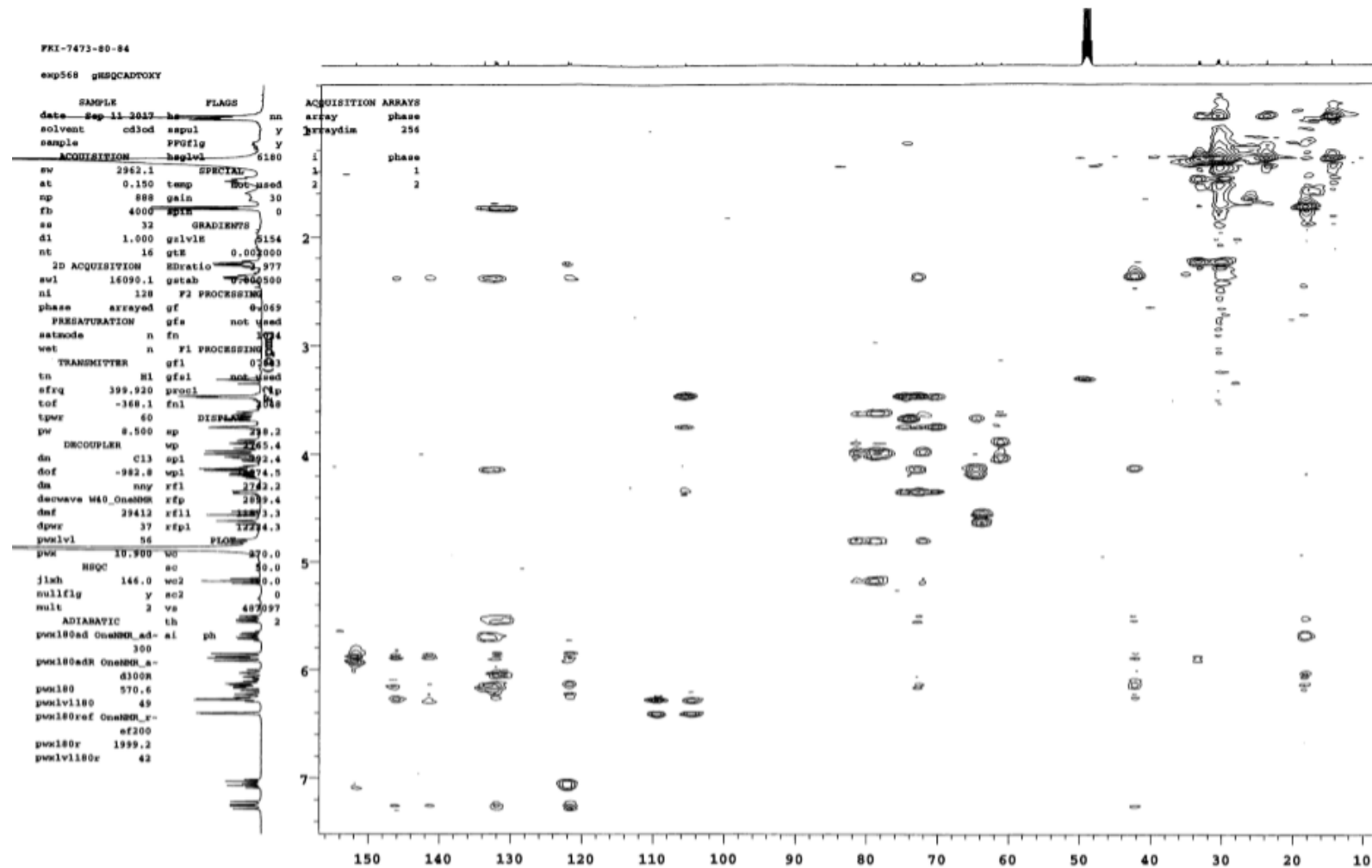


Fig. S14 HSQC-TOCSY spectra of pestiocandin

5-2 Pestalotic acid A の各種機器分析データ

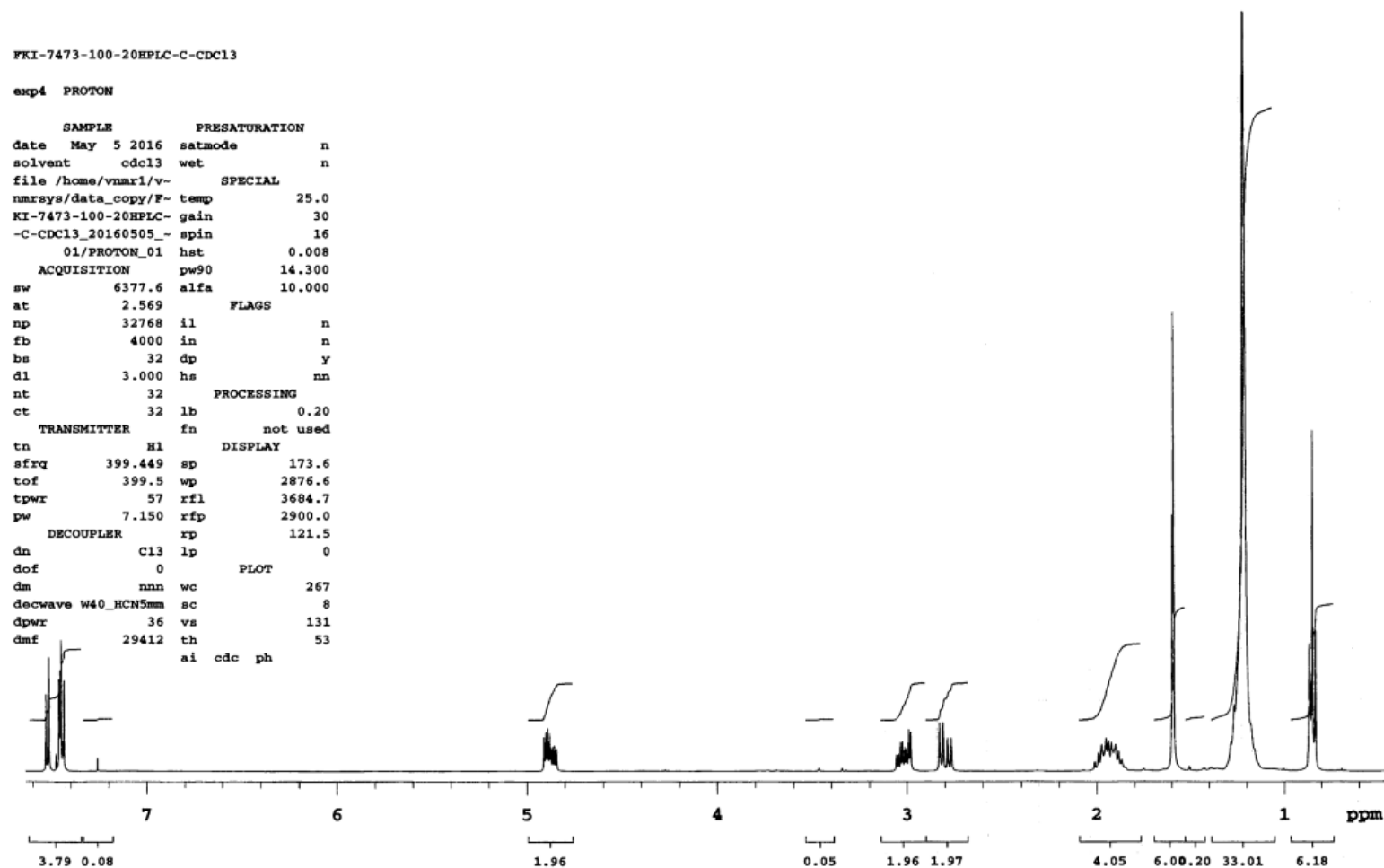


Fig. S15 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of pestalotic acid A

FKI-7473-100-20HPLC-C-CDCl3

Sample: FKI-7473-100-20HPLC-C-CDCl3

File: /home/vnmr1/vnmrsws/data_copy/FKI-7473-100-20HPLC-C-CDCl3_20160505_01/CARBON_01

Pulse Sequence: s2pul

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.363 sec

Width 24038.5 Hz

1024 repetitions

OBSERVE C13, 100.6410495 MHz

DECOUPLE H1, 399.4490707 MHz

Power 39 dB

continuously on

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

FT size 65536

Total time 57 min

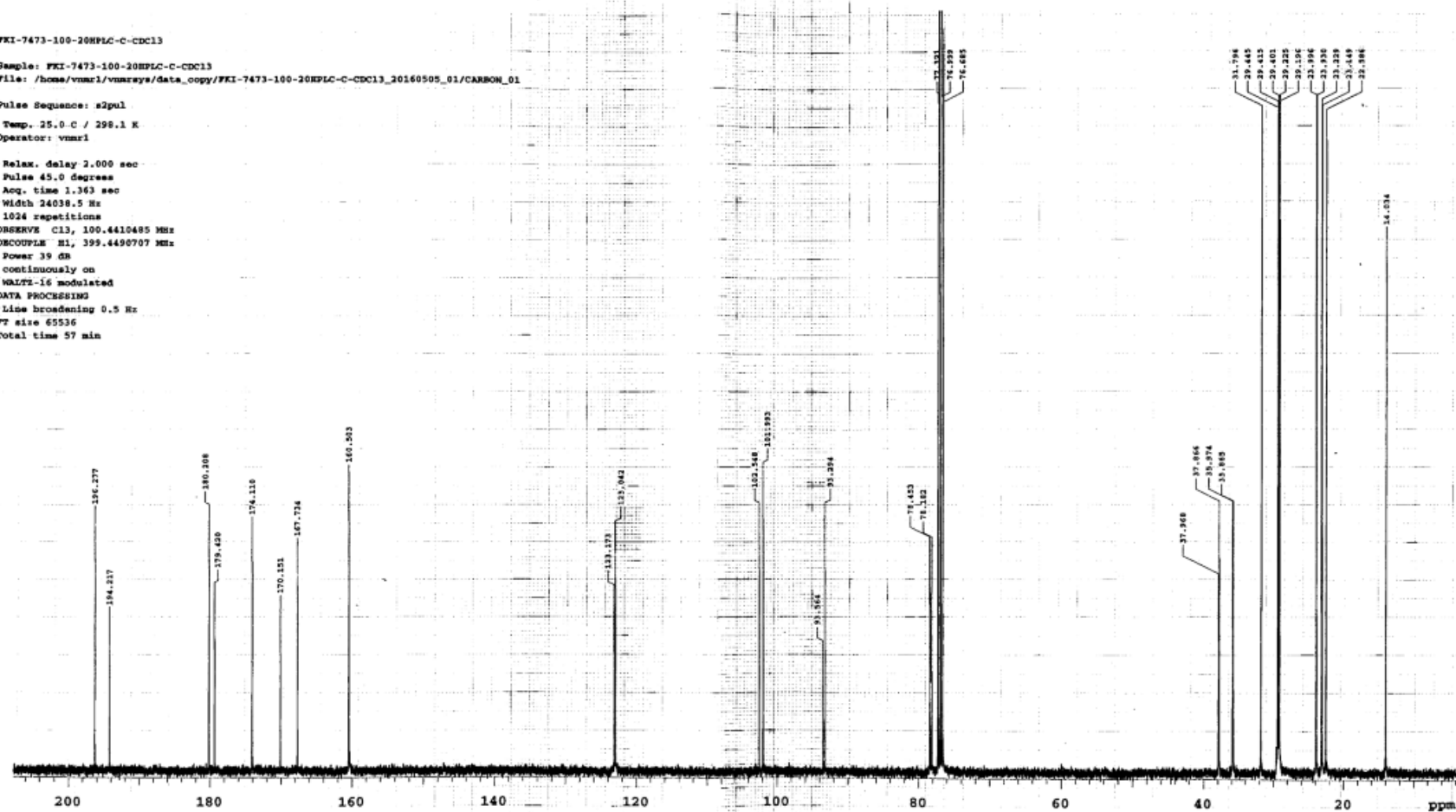


Fig. S16 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of pestalotic acid A

5-3 Pestynol の各種機器分析データ

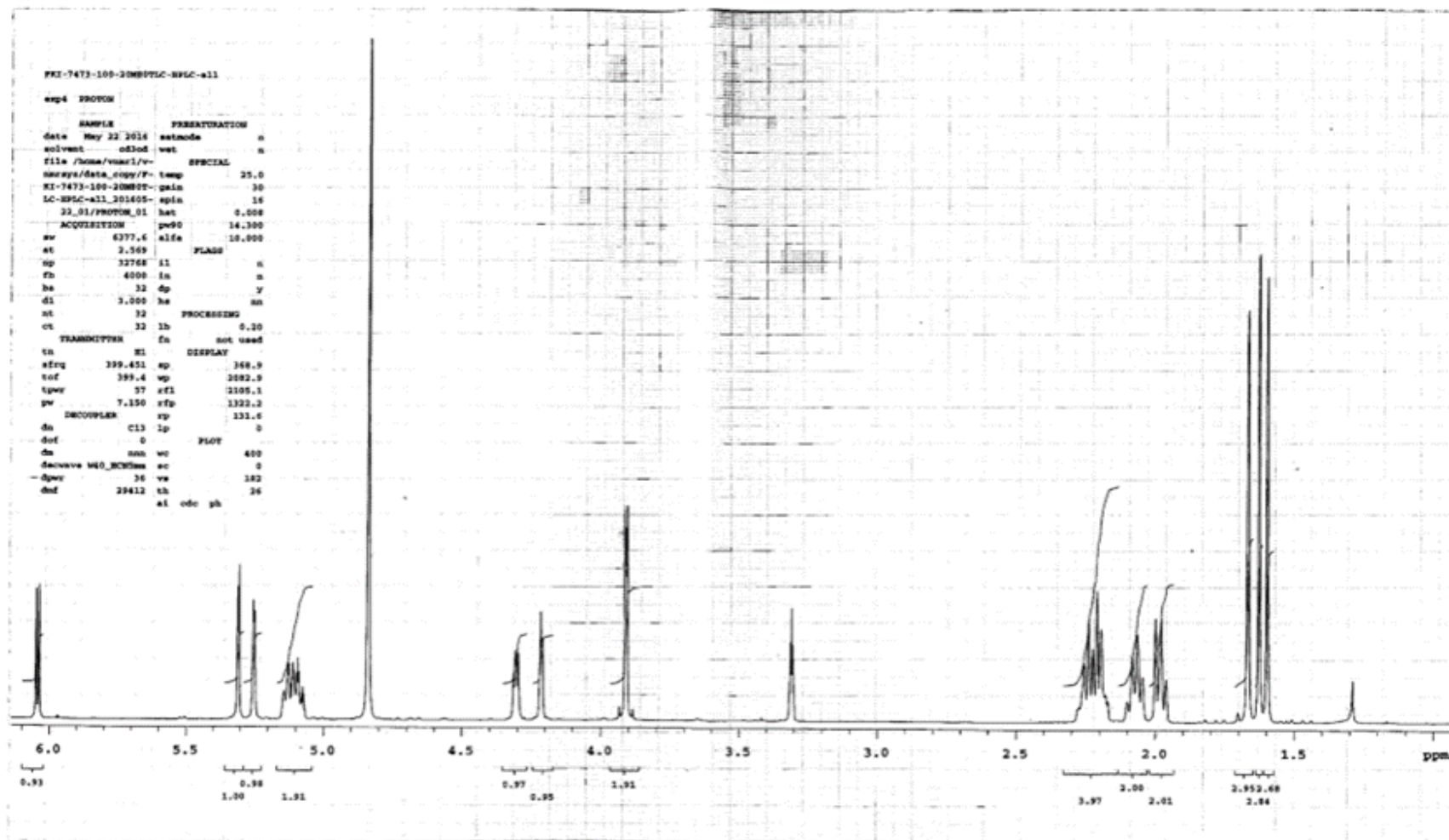


Fig. S17 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) spectrum of pestynol

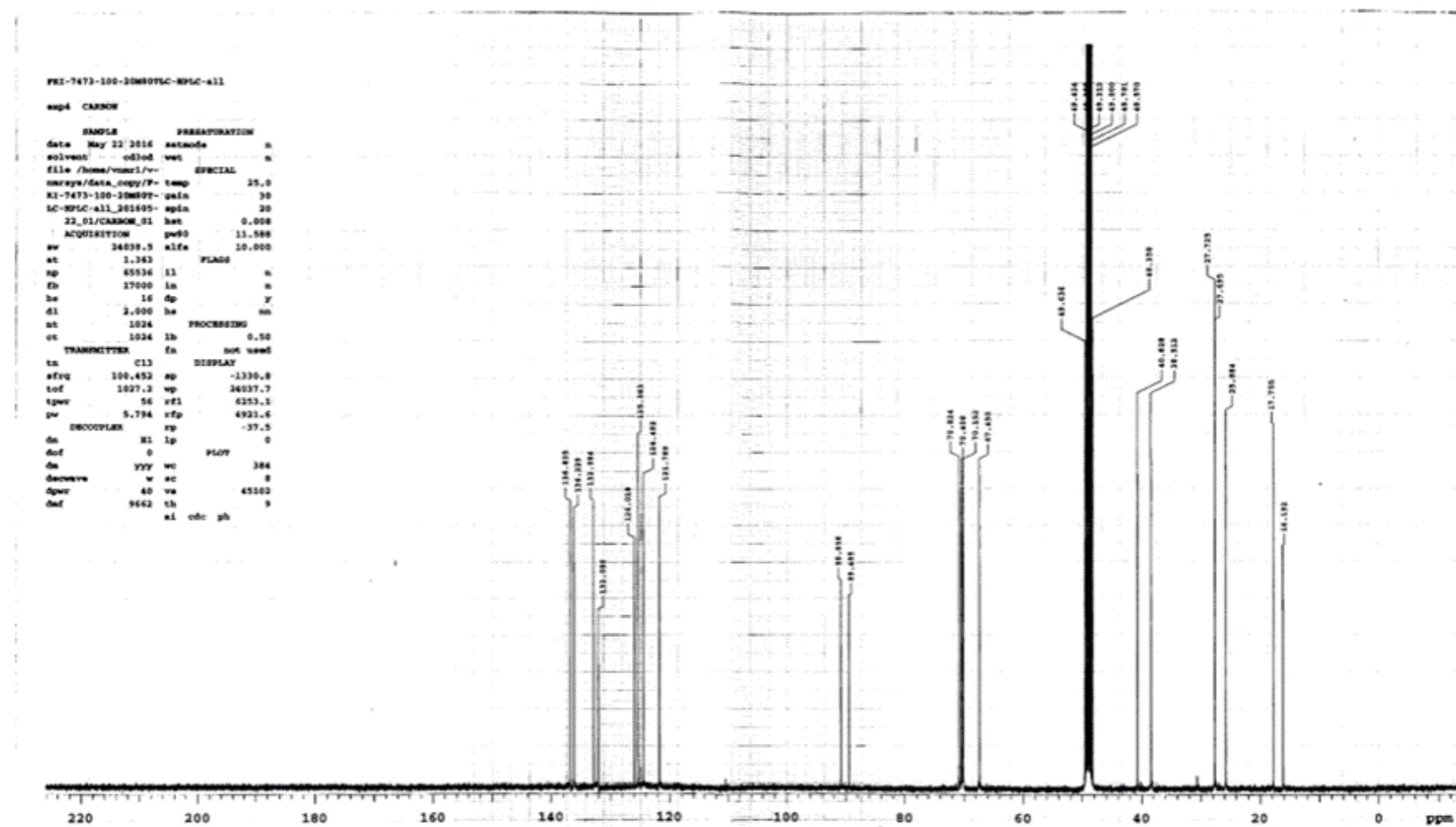


Fig. S18 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of pestynol

PKI-7473-100-10M00PLC-NPLC-all

exp32 gCOSY

SAMPLE		PLATE	
date	May 22 2016	ha	na
solvent	cd3od	sepul	y
sample	PKI-7473-10- heglv		1212
0-10M00PLC-NPLC-all		SPECIAL	
1_20160522_01		temp	25.0
ACQUISITION		gain	30
av	6377.6	spin	0
at	0.150	F2 PROCESSING	
ap	1914	ab	-0.975
fb	4000	abs	not used
as	32	fs	2048
dl	1.000	F1 PROCESSING	
at	16	ab1	-0.031
2D ACQUISITION		ab1	not used
av1	6377.6	procl	lp
nl	200	fo1	2048
dl	0	DISPLAY	
PREDATUNATION		ap	555.8
astmode	n	vp	1901.8
wet	n	sp1	451.6
TRANSMITTER		wp1	2105.1
tn	K1	rf1	3195.9
afreq	399.451	rfp	2412.7
tof	399.4	rf11	3200.5
tpwr	57	rfp1	2412.7
pw	14.300	PLOW	
GRADIENTS		wc	180.0
gvlv1	1011	ec	10.0
gtR	0.001000	wc2	180.0
ldratio	1.000	ac2	0
getab	0.000500	vs	100
DECOUPLER		th	3
da	C13	al	cdc
da	nan		

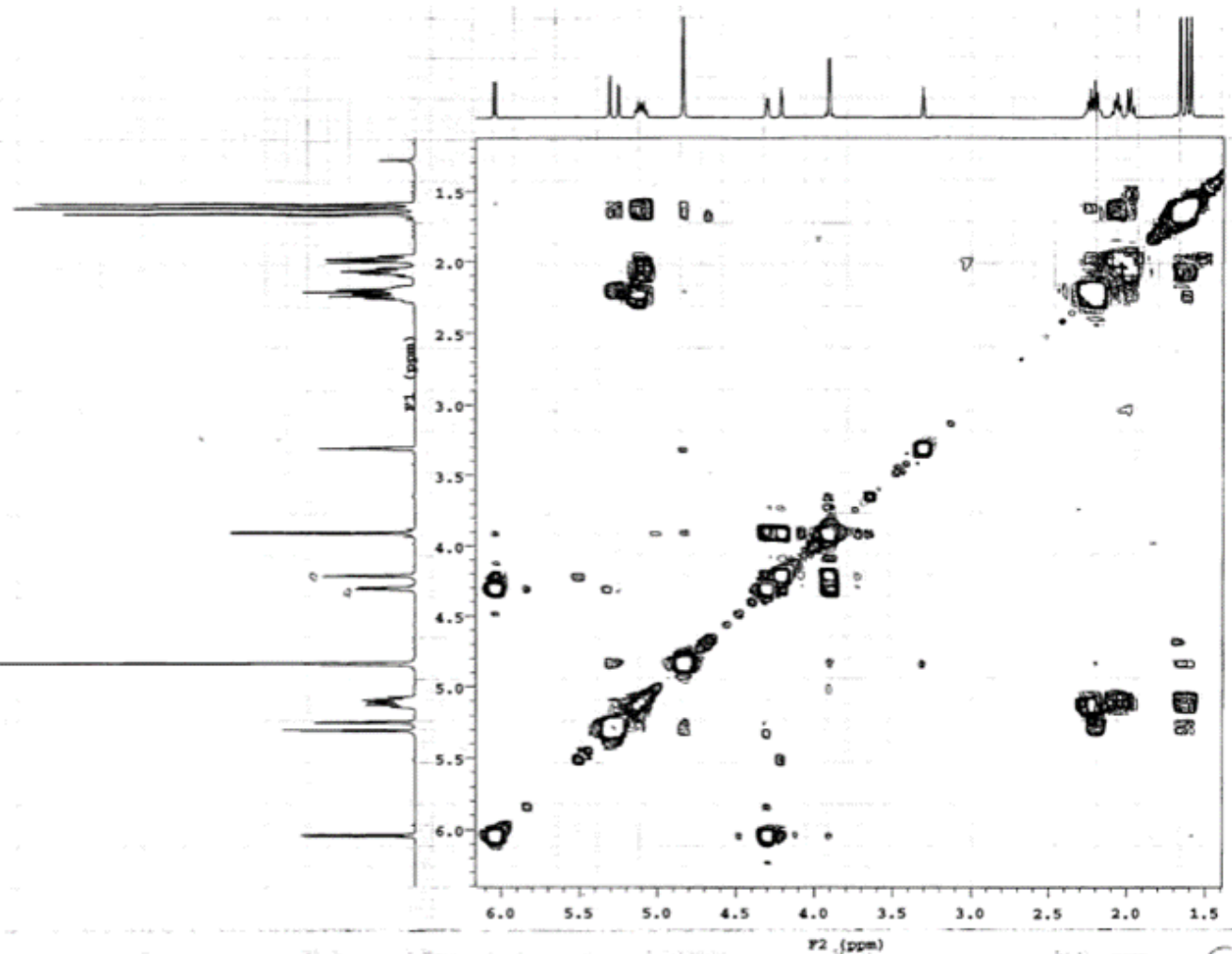


Fig. S19 COSY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestynol

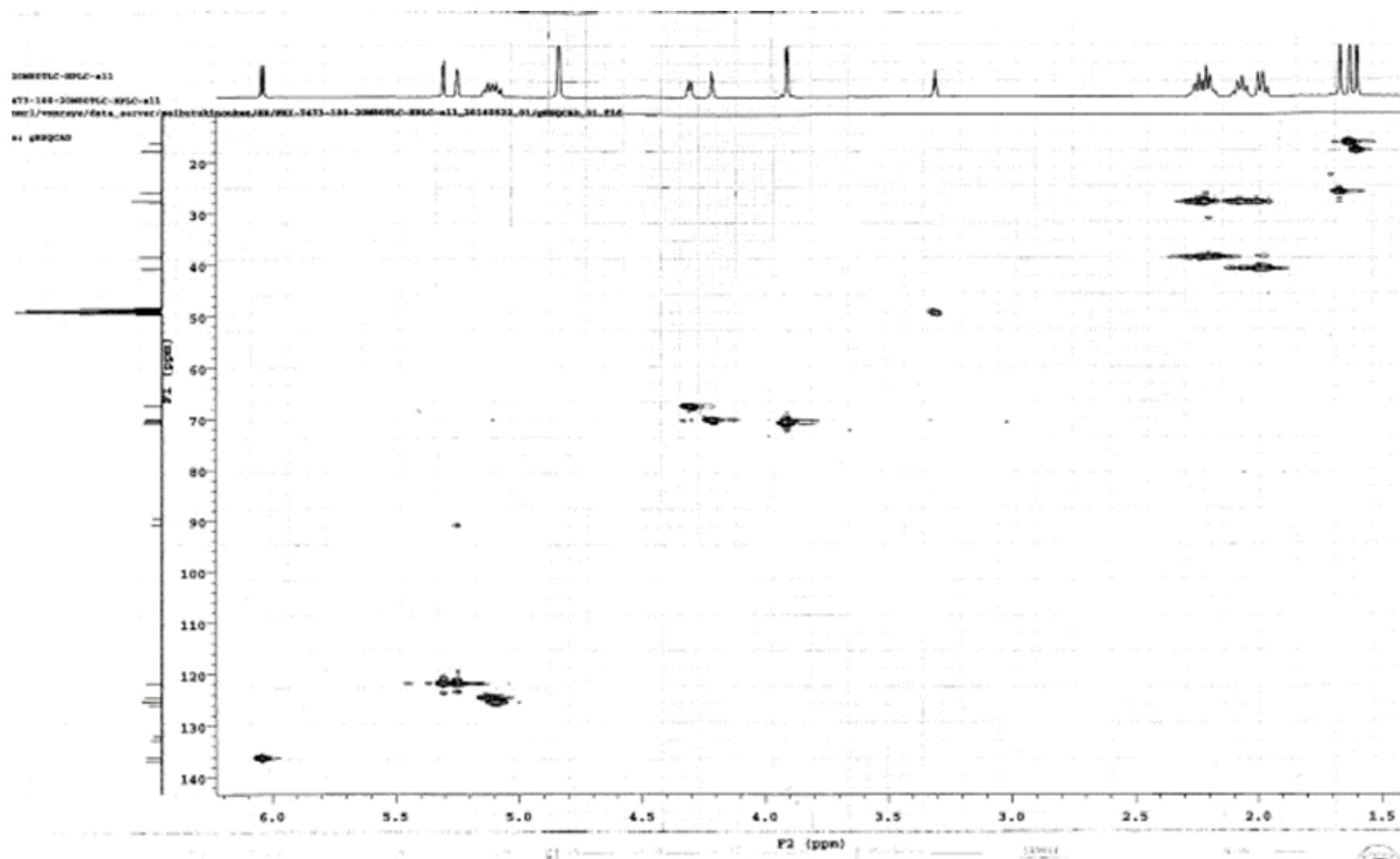


Fig. S20 HSQC (400 MHz, CD_3OD) spectrum of pestynol

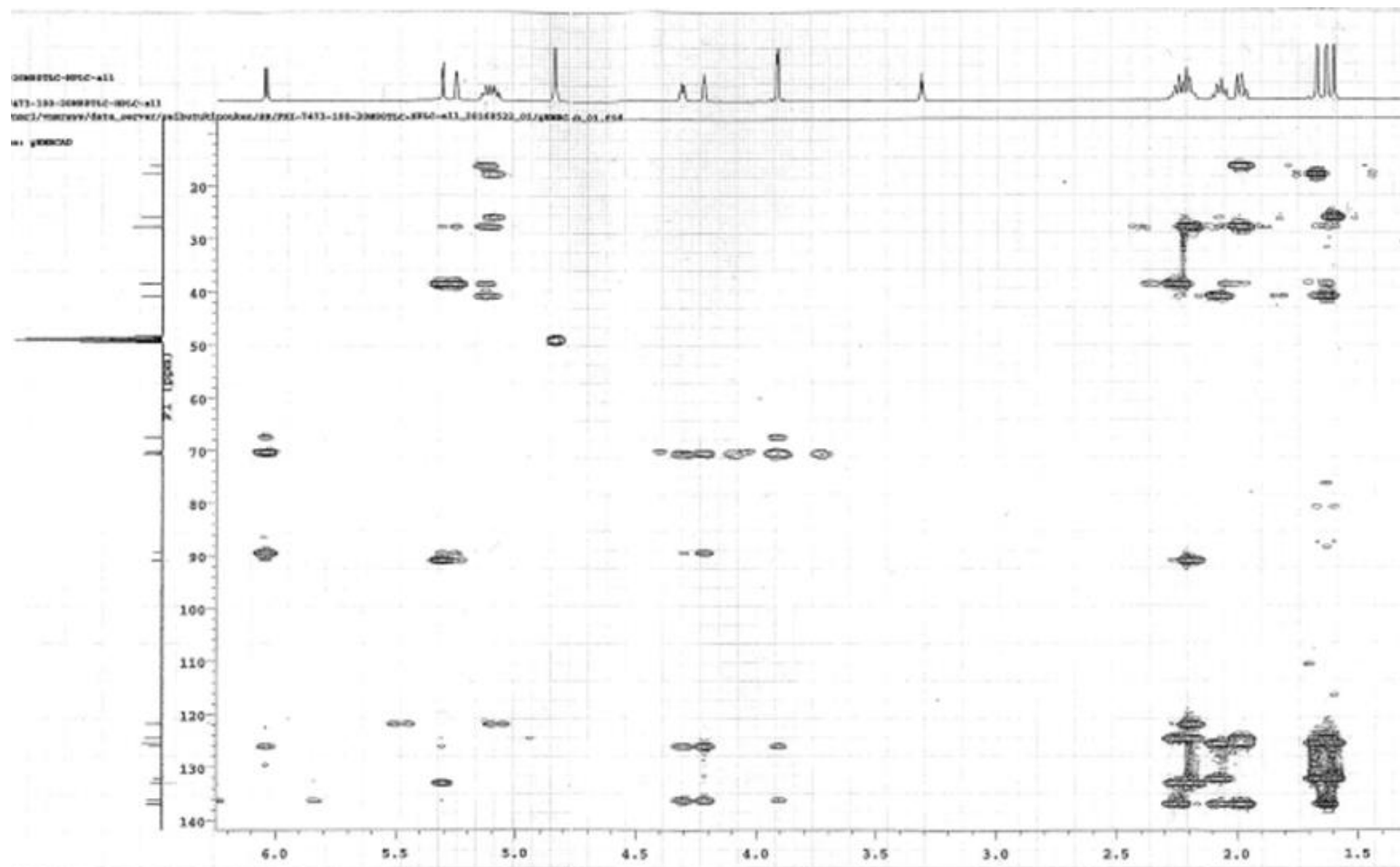


Fig. S21 HMBC (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestynol

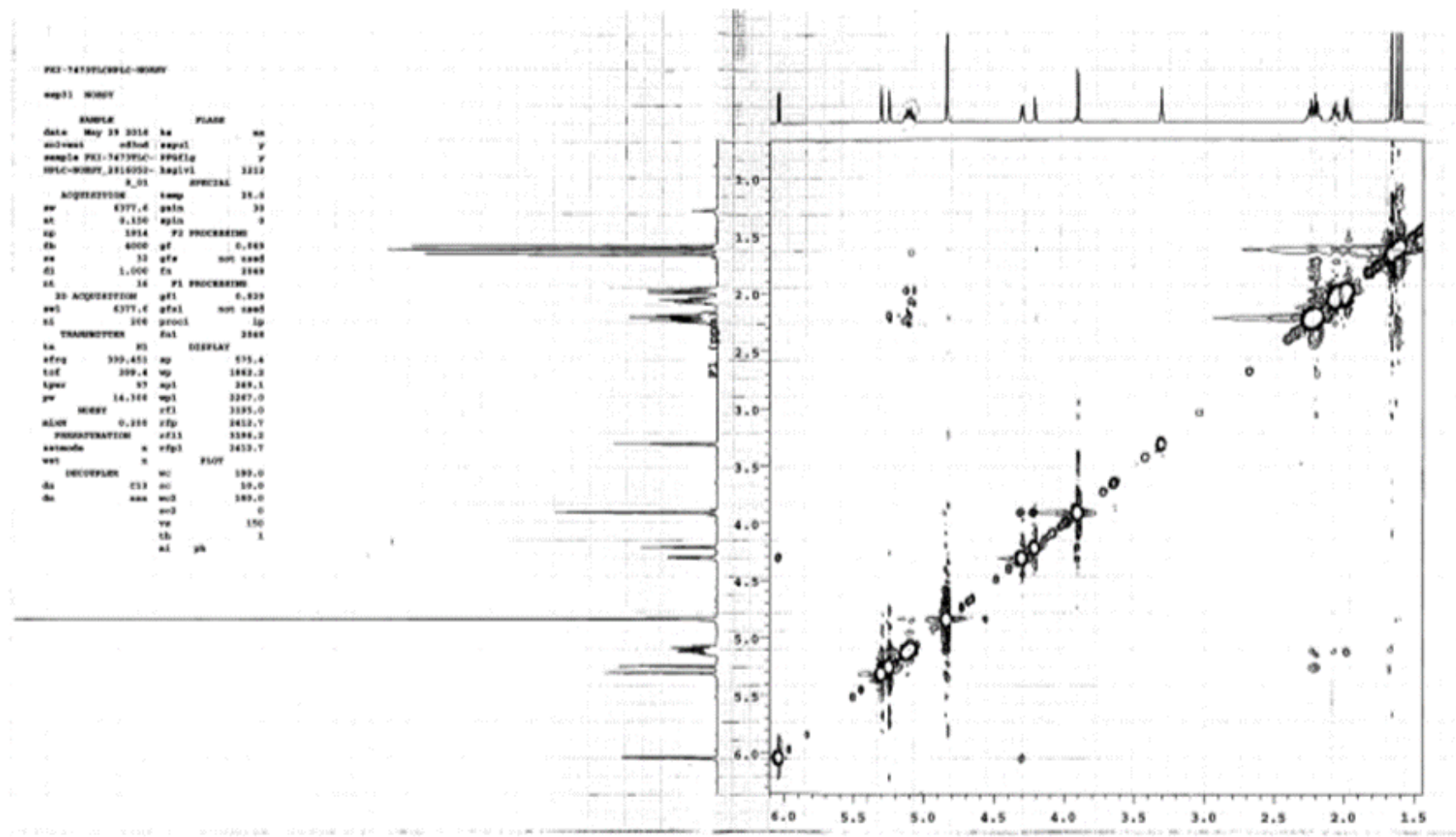


Fig. S22 NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of pestynol

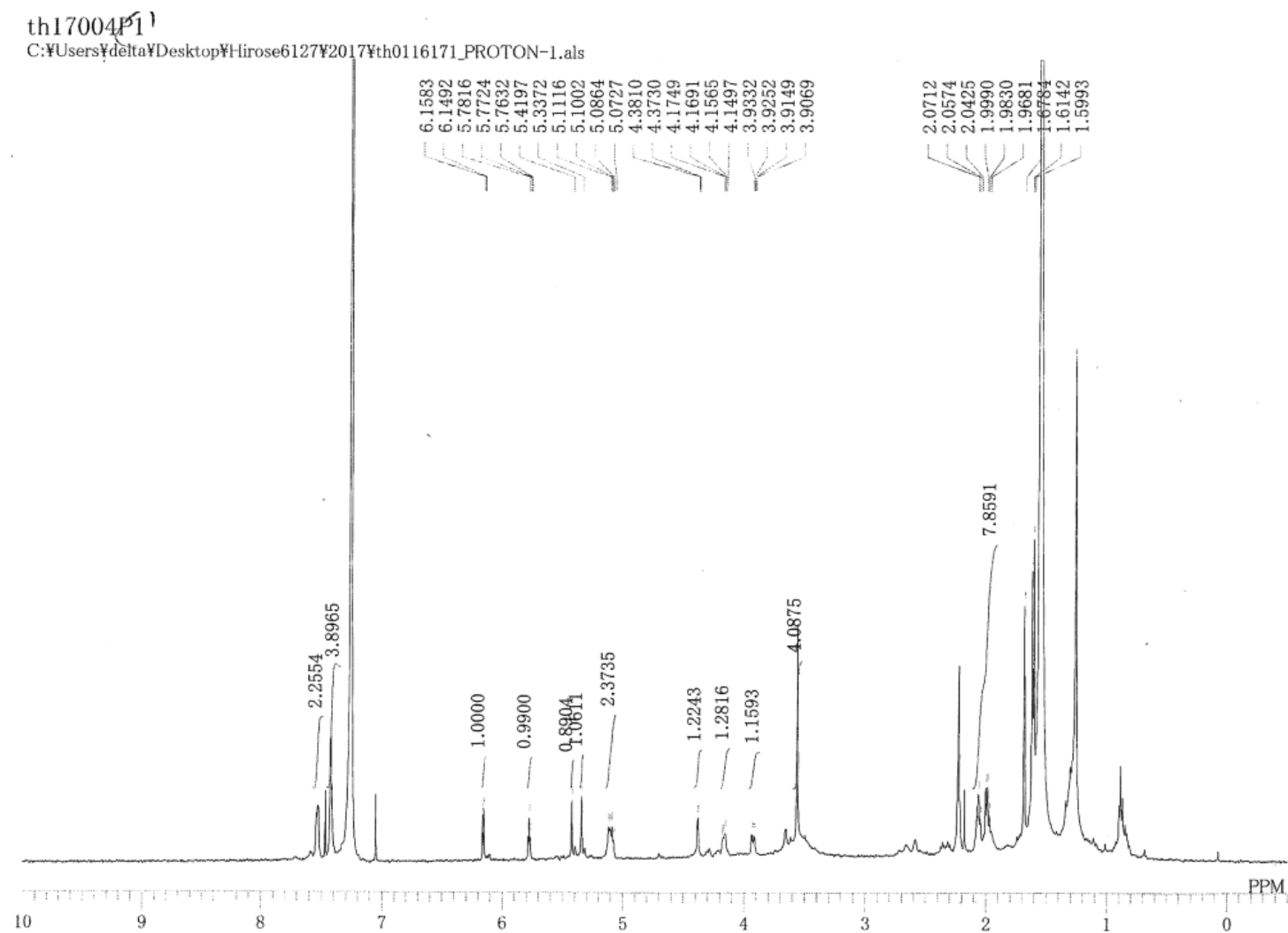


Fig. S23 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of (*R*)-(+)-MTPA pestynol

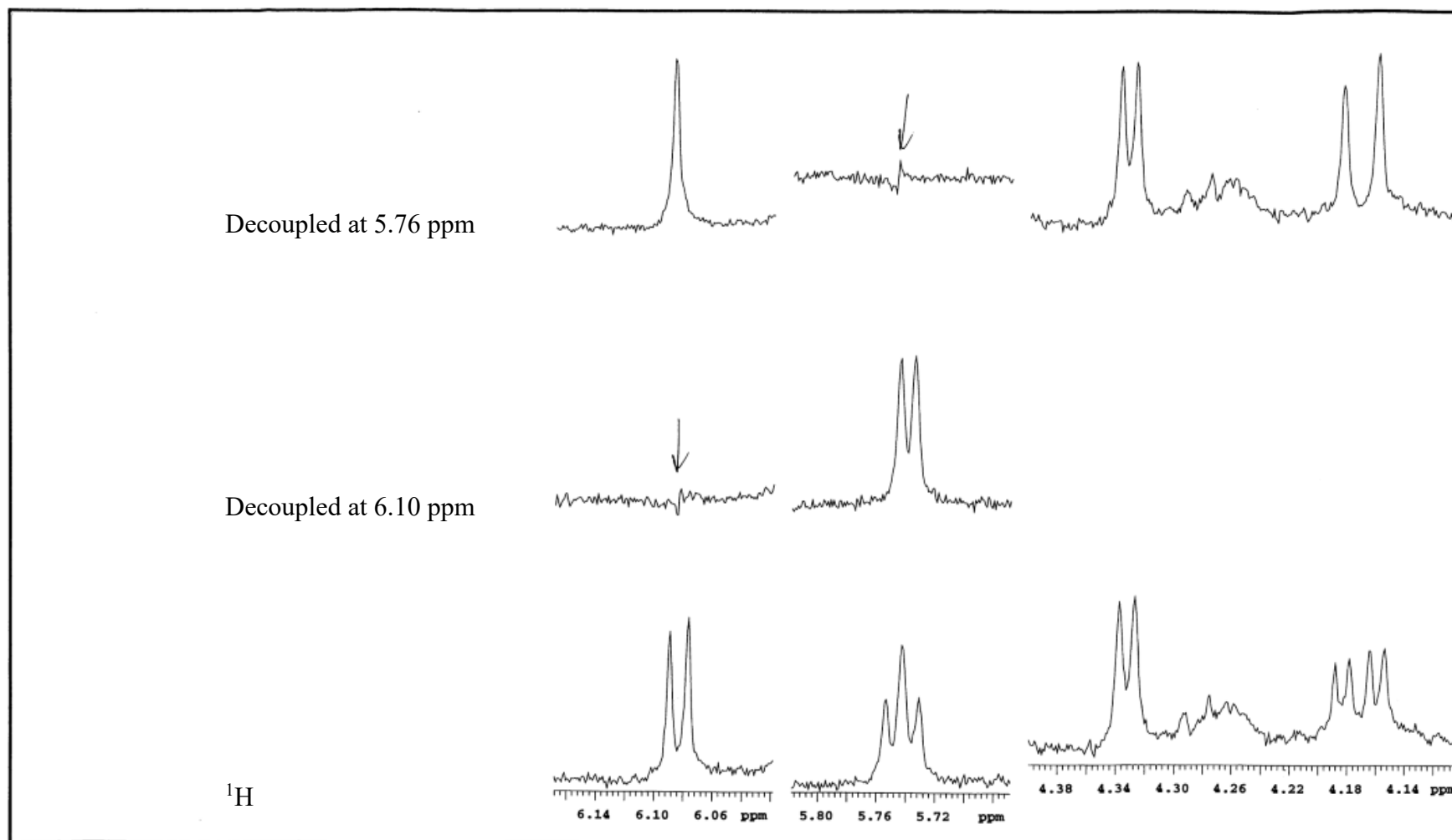


Fig. S24 Decoupling of proton signals (5.76 ppm. and 6.10 ppm) of (R)-(+)-MTPA pestynol

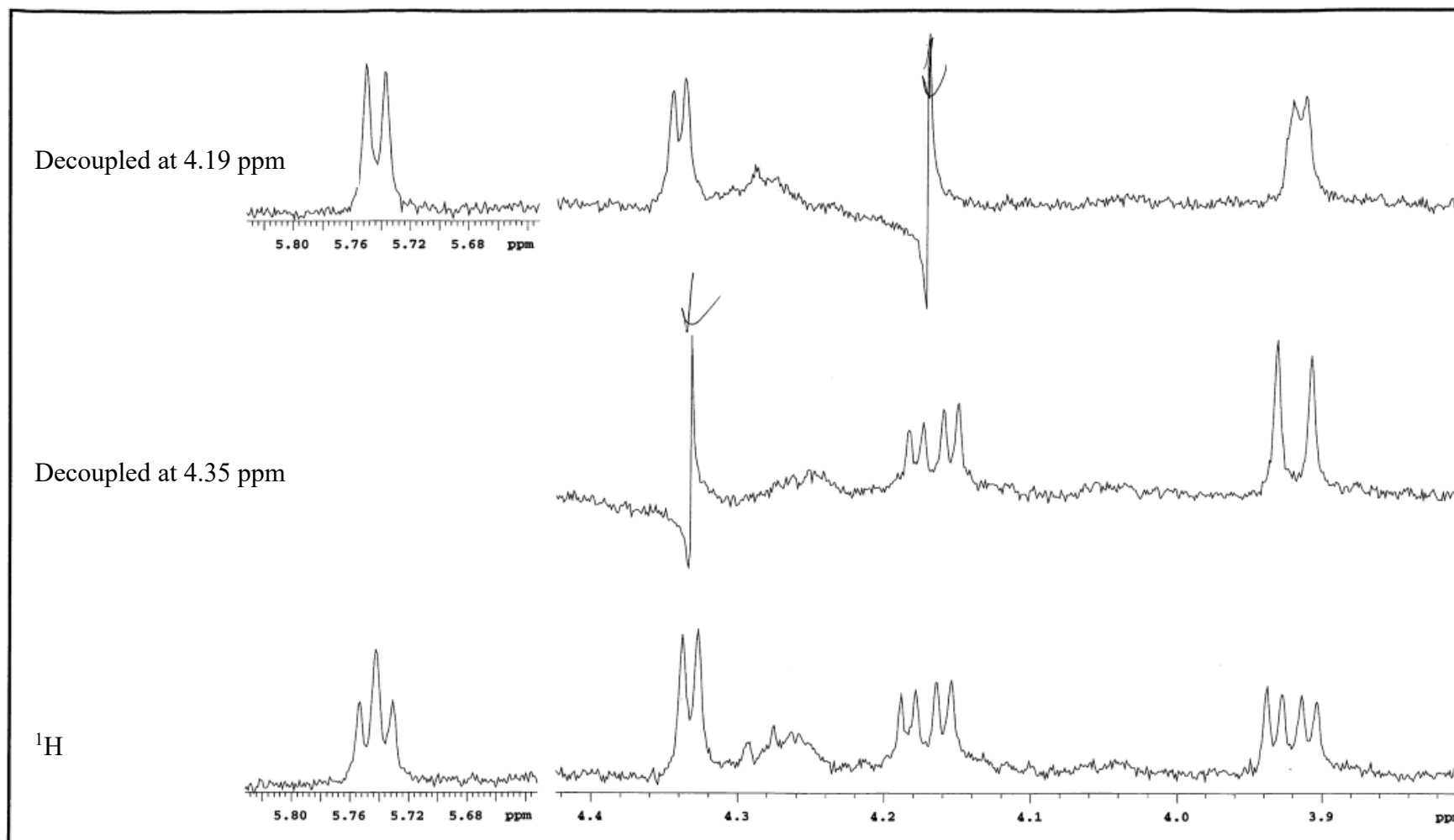


Fig. S25 Decoupling of proton signals (4.19 ppm and 4.35 ppm) of $(R)\text{-}(+)\text{-MTPA pestynol}$

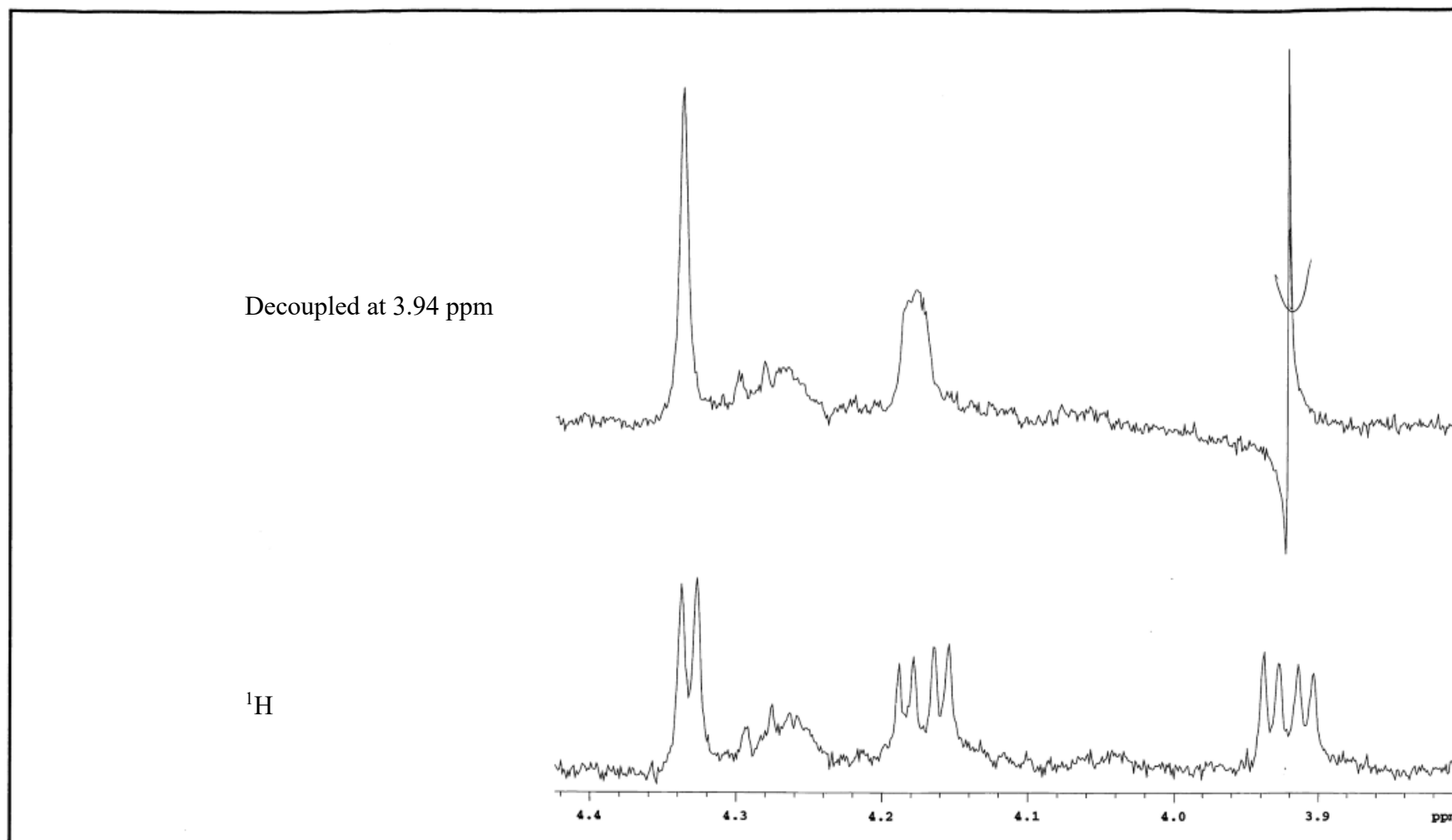


Fig. S26 Decoupling of proton signal (3.94 ppm) of *R*-(+)-MTPA pestynol

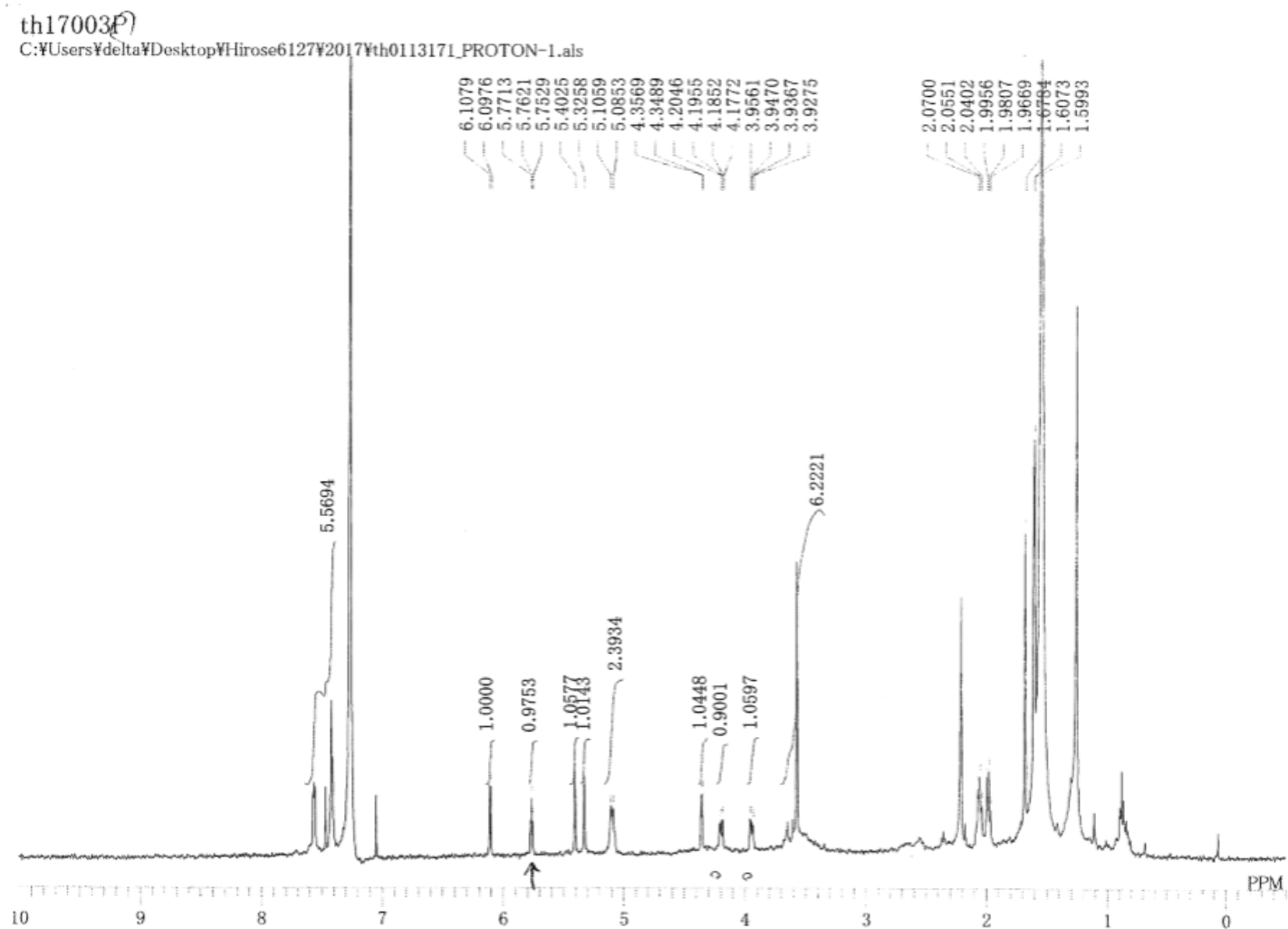


Fig. S27 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of (*S*)-(-)-MTPA pestynol

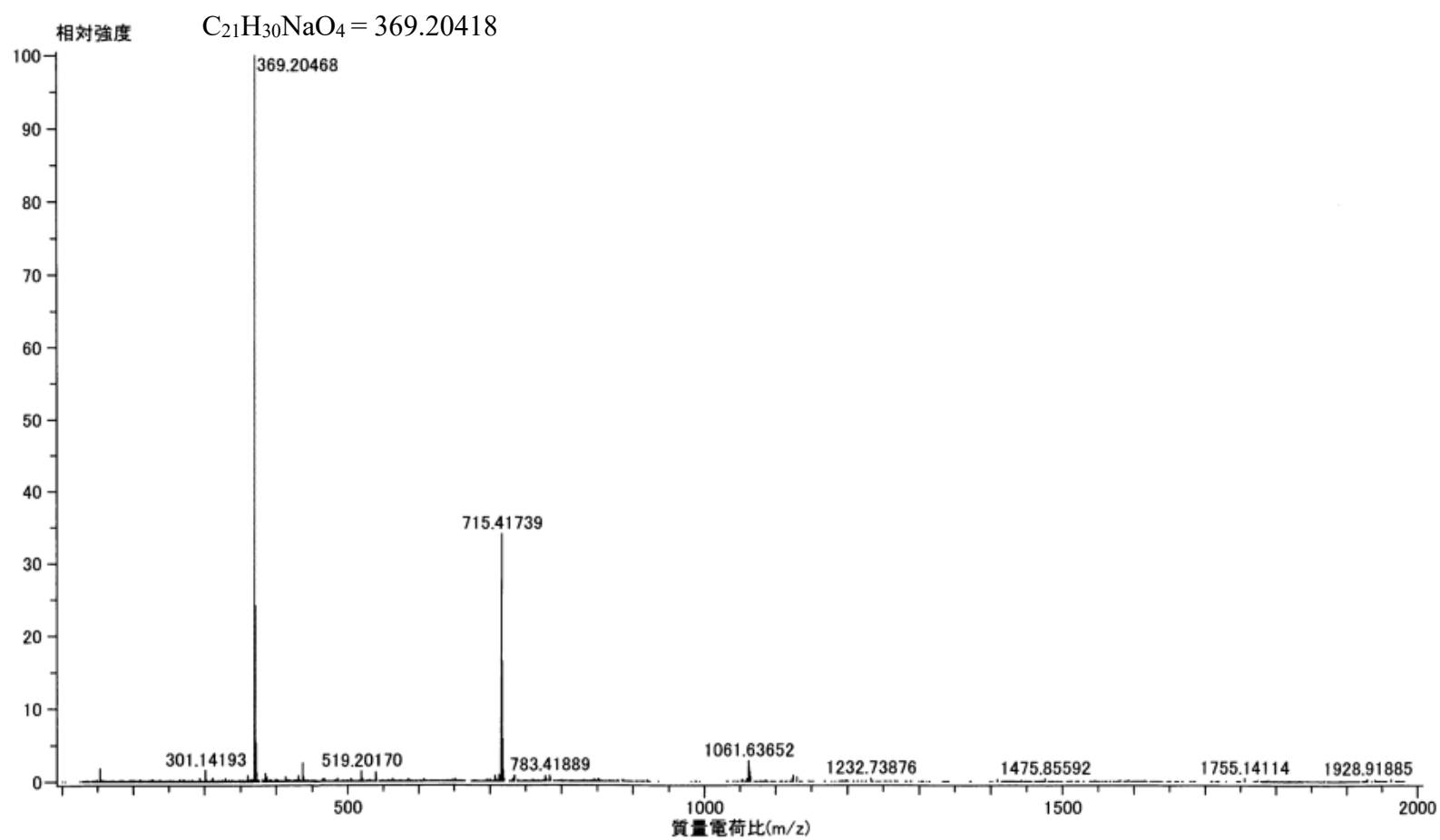


Fig. S28 HRESIMS spectrum of pestynol

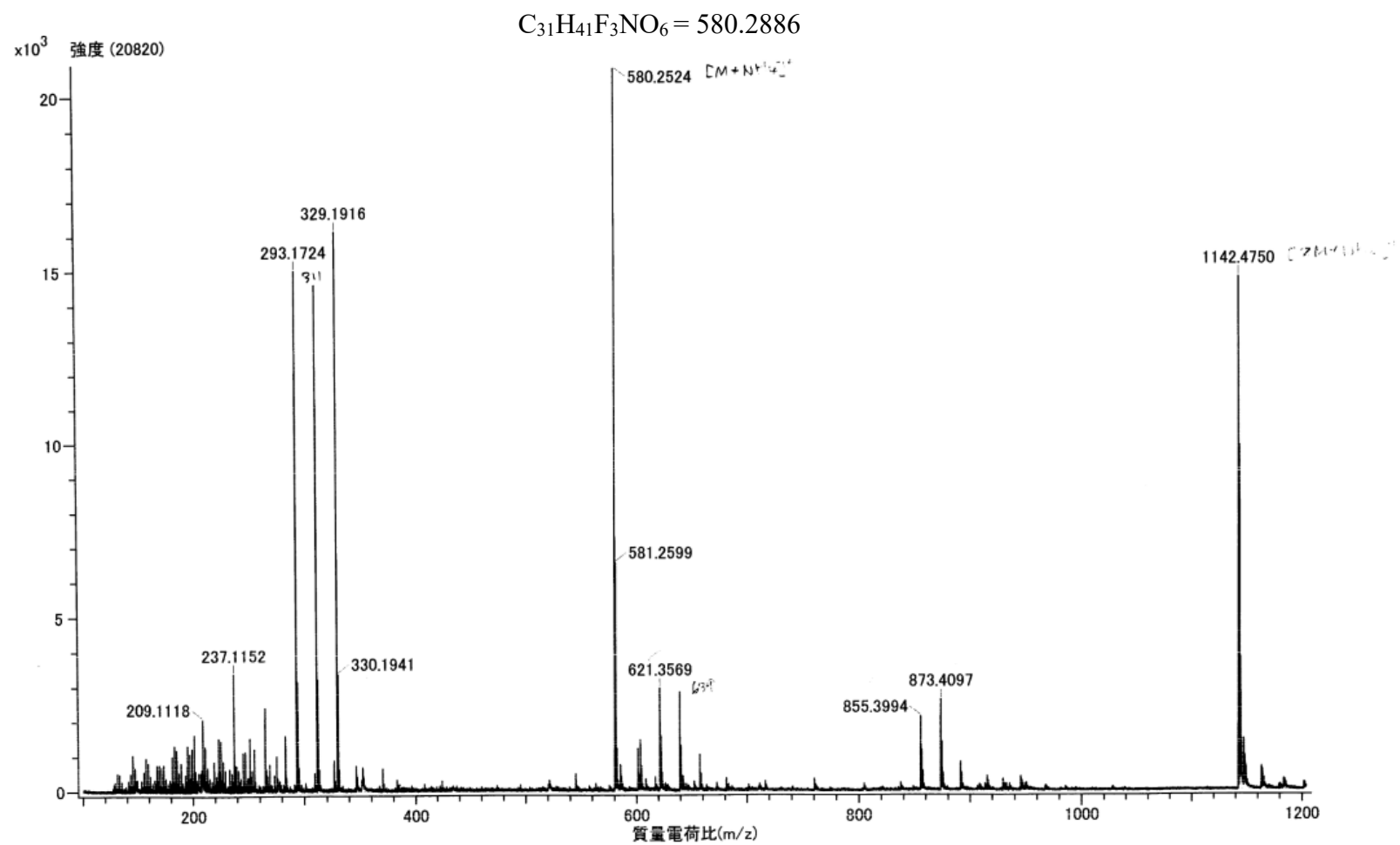


Fig. S29 HRESIMS spectrum of (*R*)-(+)-MTPA pestynol

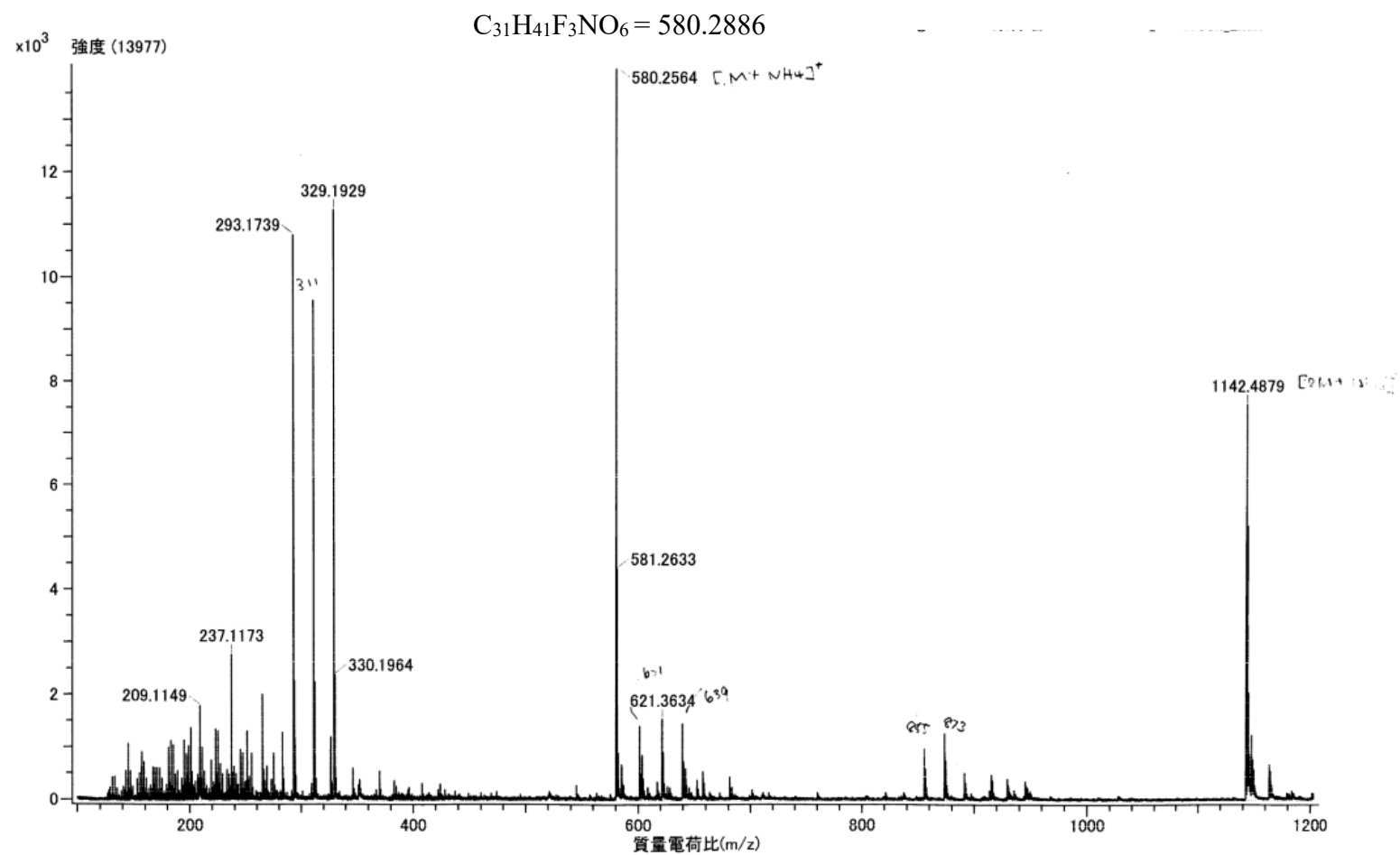


Fig. S30 HRESIMS spectrum of (*S*)-(-)-MTPA pestynol

5-4 4,6'-Anhydrooxysporidinoneの各種機器分析データ

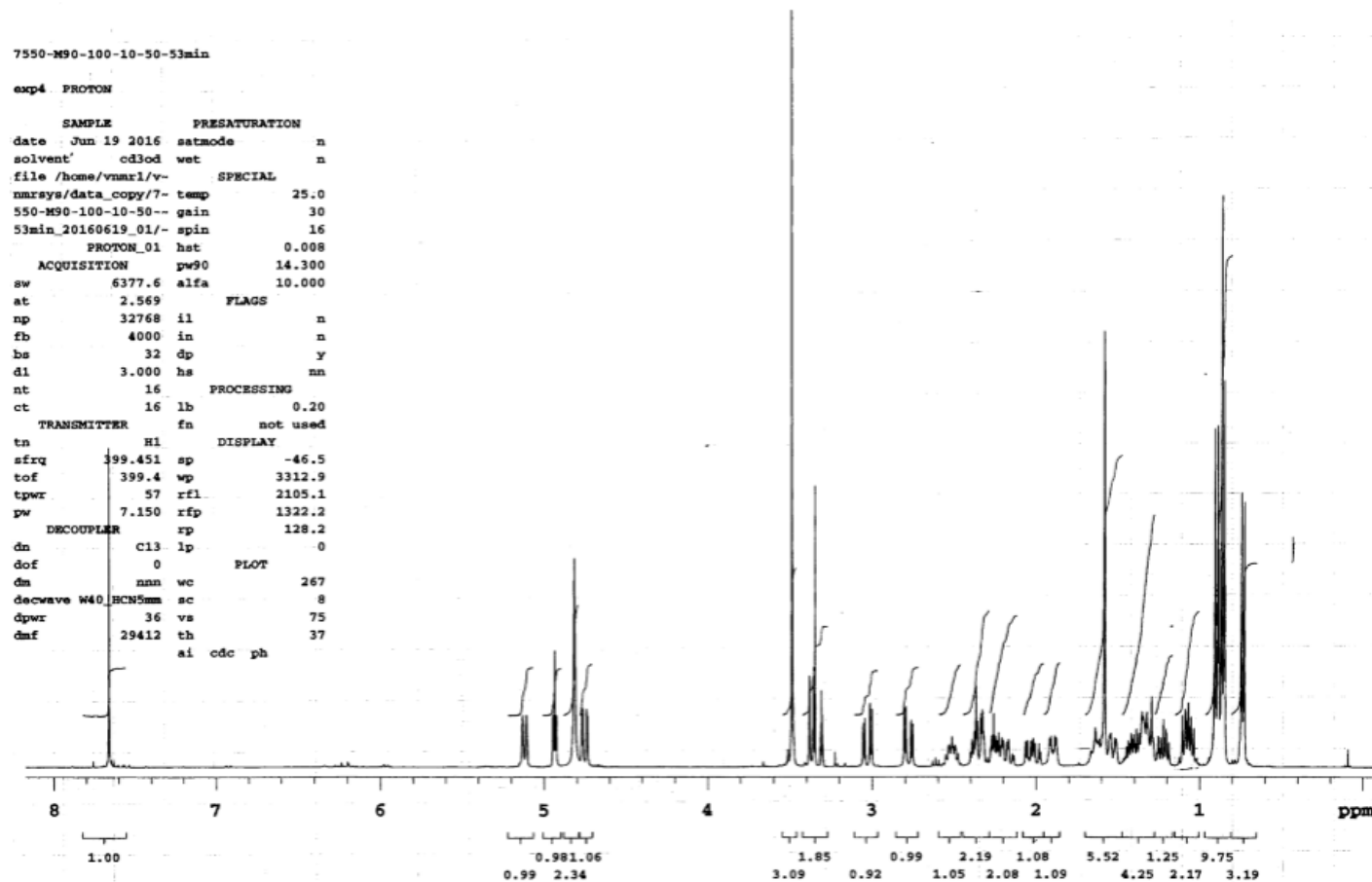


Fig. S31 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of 4,6'-anhydrooxysporidinone

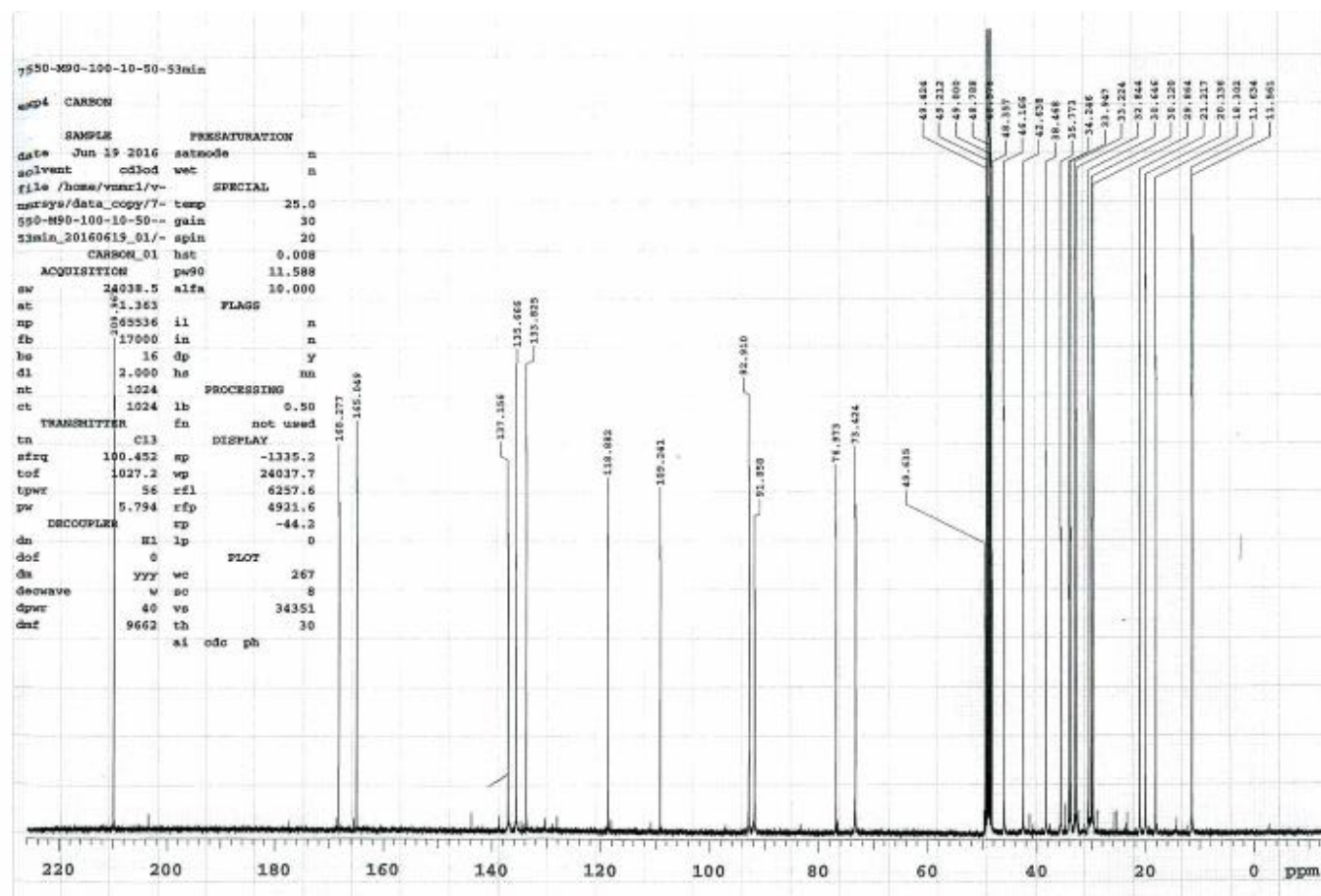


Fig. S32 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum of 4,6'-anhydrooxysporidinone

5-5 FKI-7550-1の各種機器分析データ

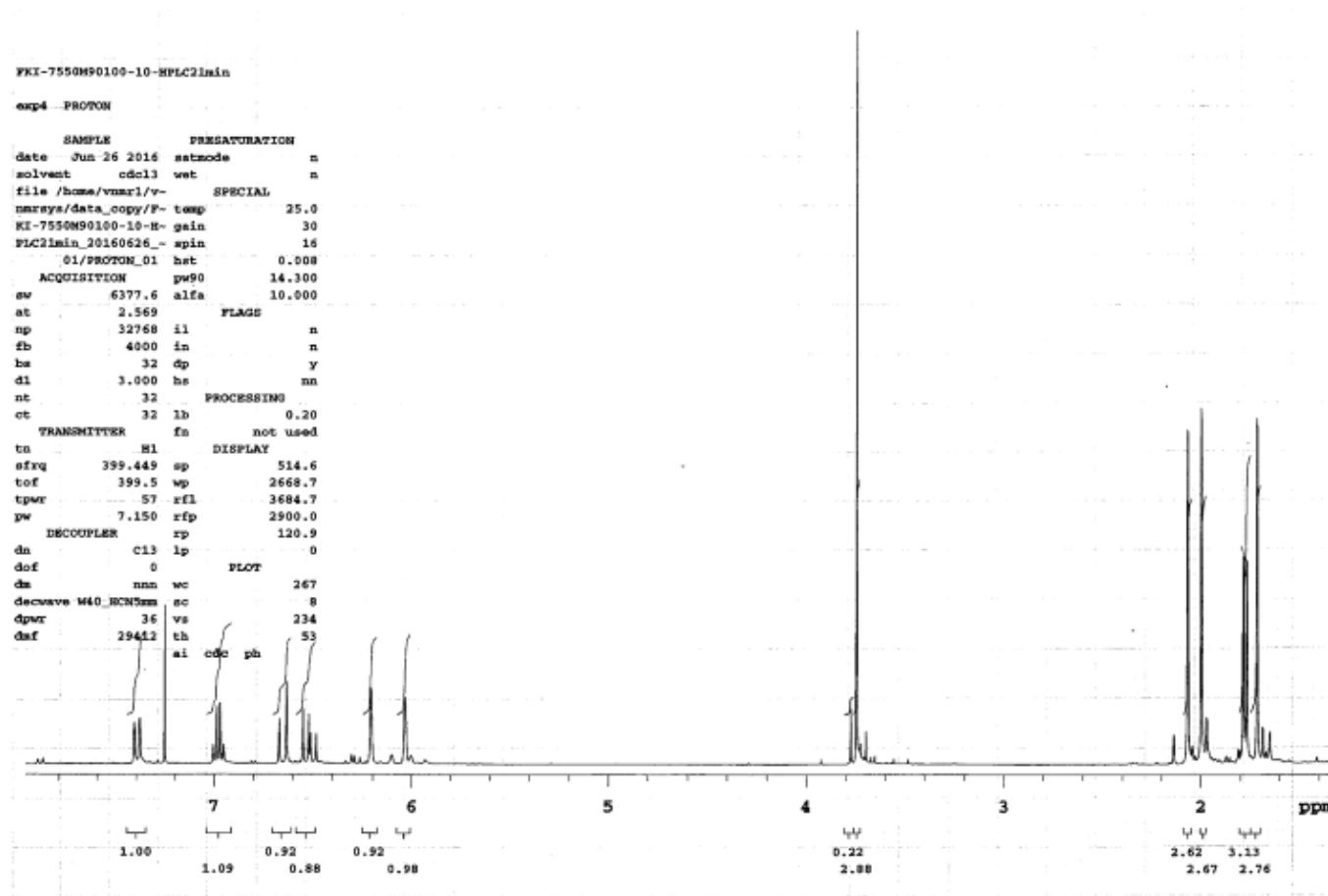


Fig. S33 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of FKI-7550-1

7550-100-10-HPIC21HPIC45min
 Sample: 7550-100-10-HPIC21HPIC45min
 File: /home/vmr1/vmrays/data_copy/7550-100-10-HPIC21HPIC45min_20160710_01/CARBON_01
 Pulse Sequence: s2pul
 Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: vmr1
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.363 sec
 Width 24038.5 Hz
 1024 repetitions
 OBSERVE C13, 100.6410442 MHz
 DECOUPLE H1, 399.4490707 MHz
 Power 19 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.5 Hz
 FT size 65536
 Total time 57 min

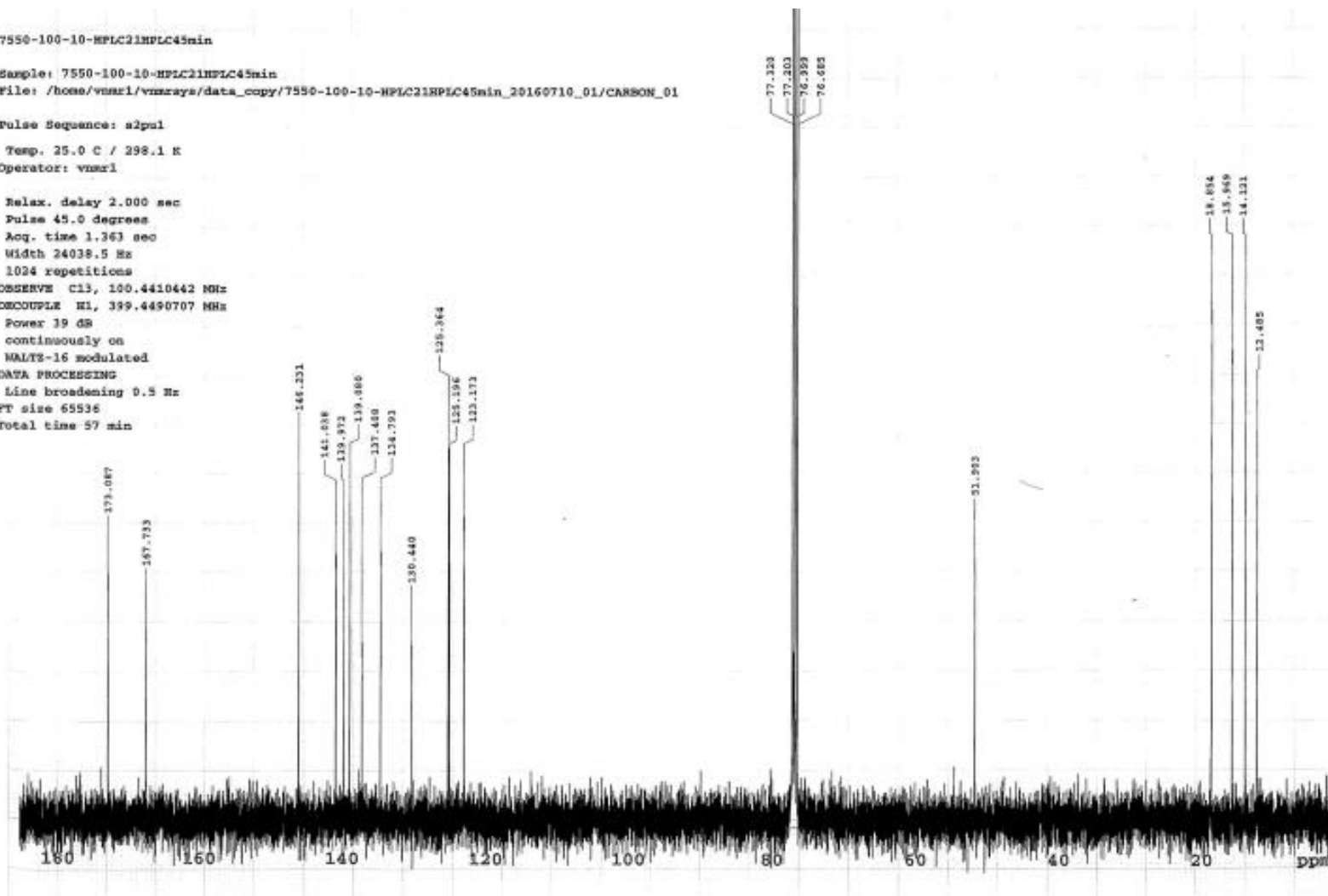


Fig. S34 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of FK1-7550-1

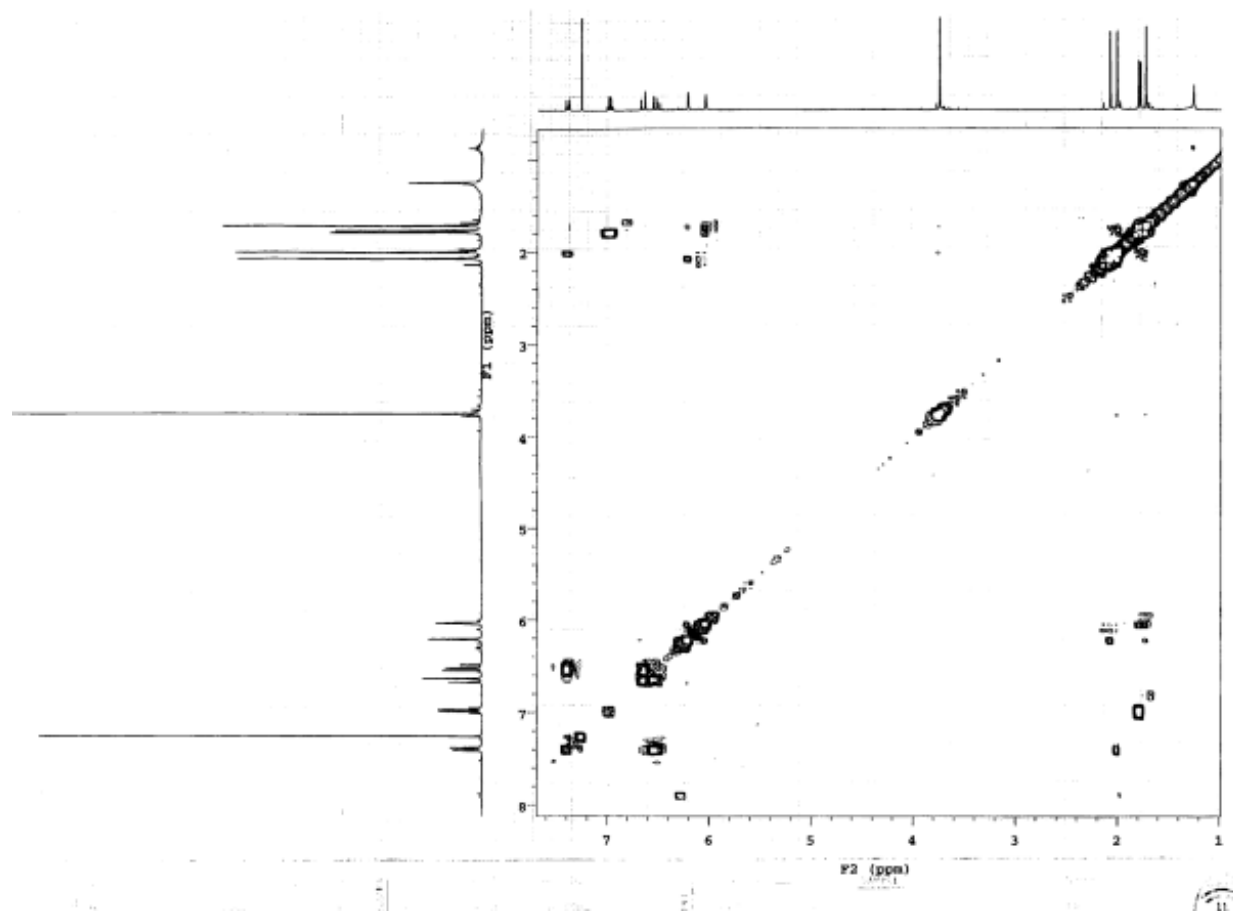


Fig. S35 COSY (400 MHz, CDCl₃) spectrum of FK1-7550-1

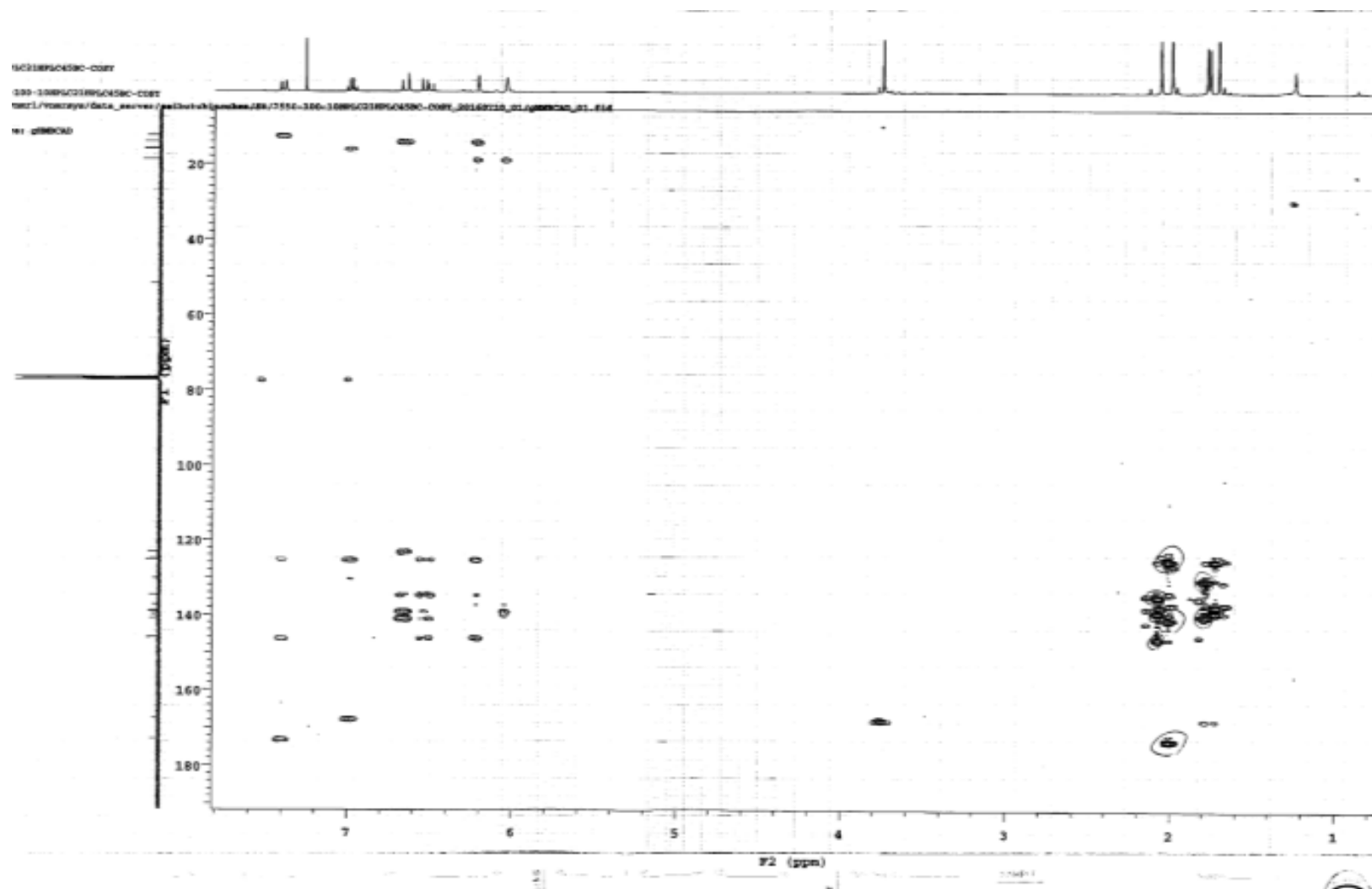


Fig. S37 HMBC (400 MHz, CDCl₃) spectrum of FK1-7550-1

5-6 Sambutoxin の各種機器分析データ

FKI-7550-M80-100-5-45-48

exp3 PROTON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Dec 13 2017	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsys/data_server-	temp	25.0	
/seibutukinouken/s-	gain	30	
R/FKI-7550-M80-100-	spin	16	
-5-45-48_20171213_-	hst	0.008	
01/PROTON_01.fid	pw90	14.300	
ACQUISITION	alfa	10.000	
sw	6377.6	FLAGS	
at	2.569	il	n
np	32768	in	n
fb	4000	dp	y
bs	32	hs	nn
dl	3.000	PROCESSING	
nt	16	lb	0.20
ct	16	fn	not used
TRANSMITTER		DISPLAY	
tn	H1	sp	122.3
sfrq	399.449	wp	4100.0
tof	399.5	rfl	3685.1
tpwr	57	rfp	2900.0
pw	7.150	rp	25.0
DECOUPLER	lp		0
dn	C13	PLOT	
dof	0	wc	267
dm	nnn	sc	8
decwave	W40_HCN5mm	vs	353
dpwr	36	th	56
daf	29412	ai	cdc ph

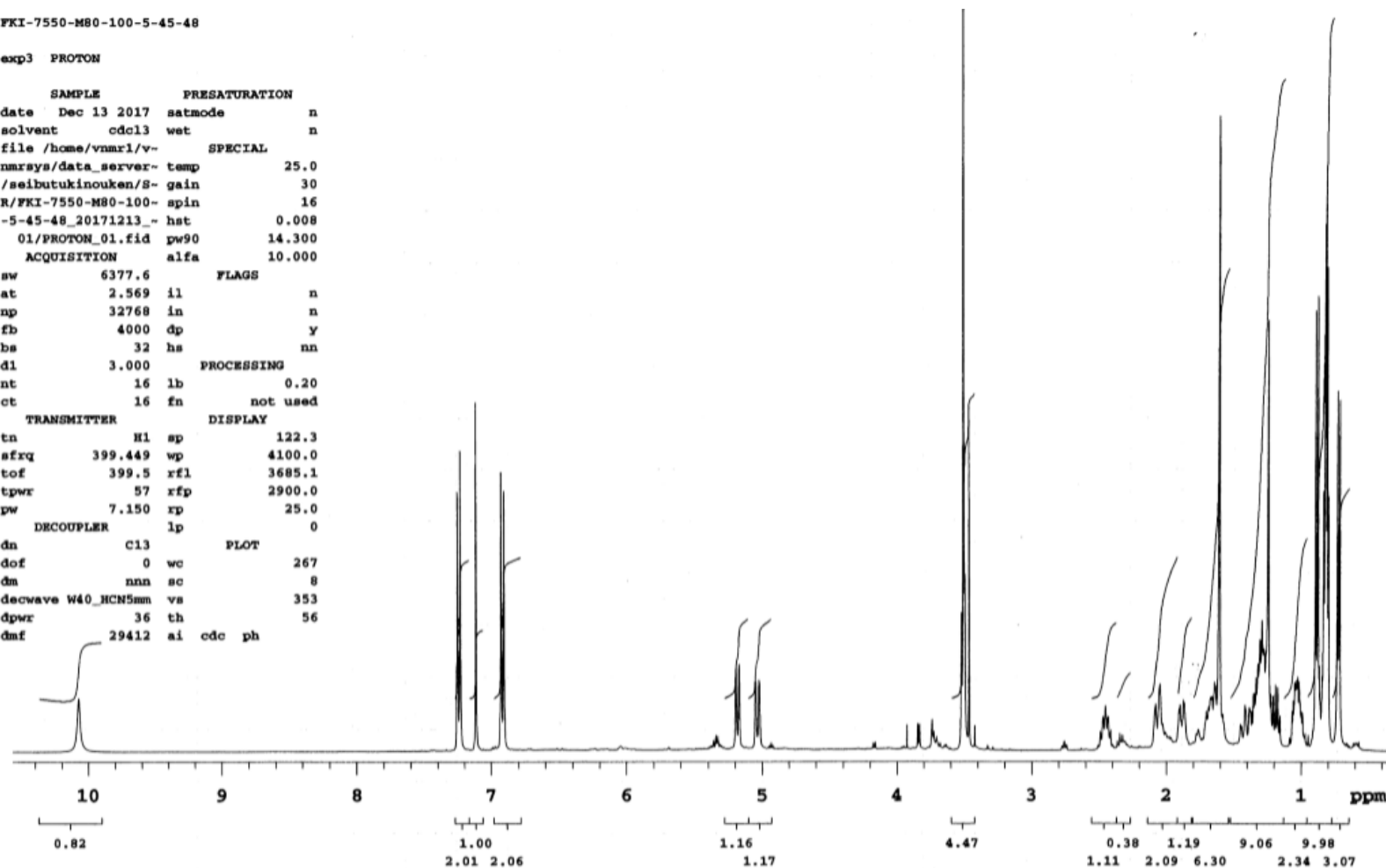


Fig. S38 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of sambutoxin

FKI-7550M80-100-5-45-48-C

exp8 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Dec 17 2017	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsgs/data_copy/F-	temp	25.0	
KI-7550M80-100-5-4-	gain	30	
5-48-C_20171217_01-	spin	20	
/CARBON_01	hst	0.008	
ACQUISITION	pw90	11.588	
sw	24038.5	alfa	10.000
at	1.363	FLAGS	
np	65536	il	n
fb	17000	in	n
bs	16	dp	y
dl	2.000	hs	nn
nt	1024	PROCESSING	
ct	1024	lb	0.50
TRANSMITTER	fn	not used	
tn	C13	DISPLAY	
sfrq	100.452	sp	-329.0
tof	1027.2	wp	22576.4
tpwr	56	rfl	9212.5
pw	5.794	rfl	7734.0
DECOUPLER	rp	-85.4	
dn	H1	lp	0
dof	0	PLOT	
dm	YYY	wc	267
decwave	w	sc	8
dpwr	40	vs	168155
dmf	9662	th	15
	ai	cdc	ph

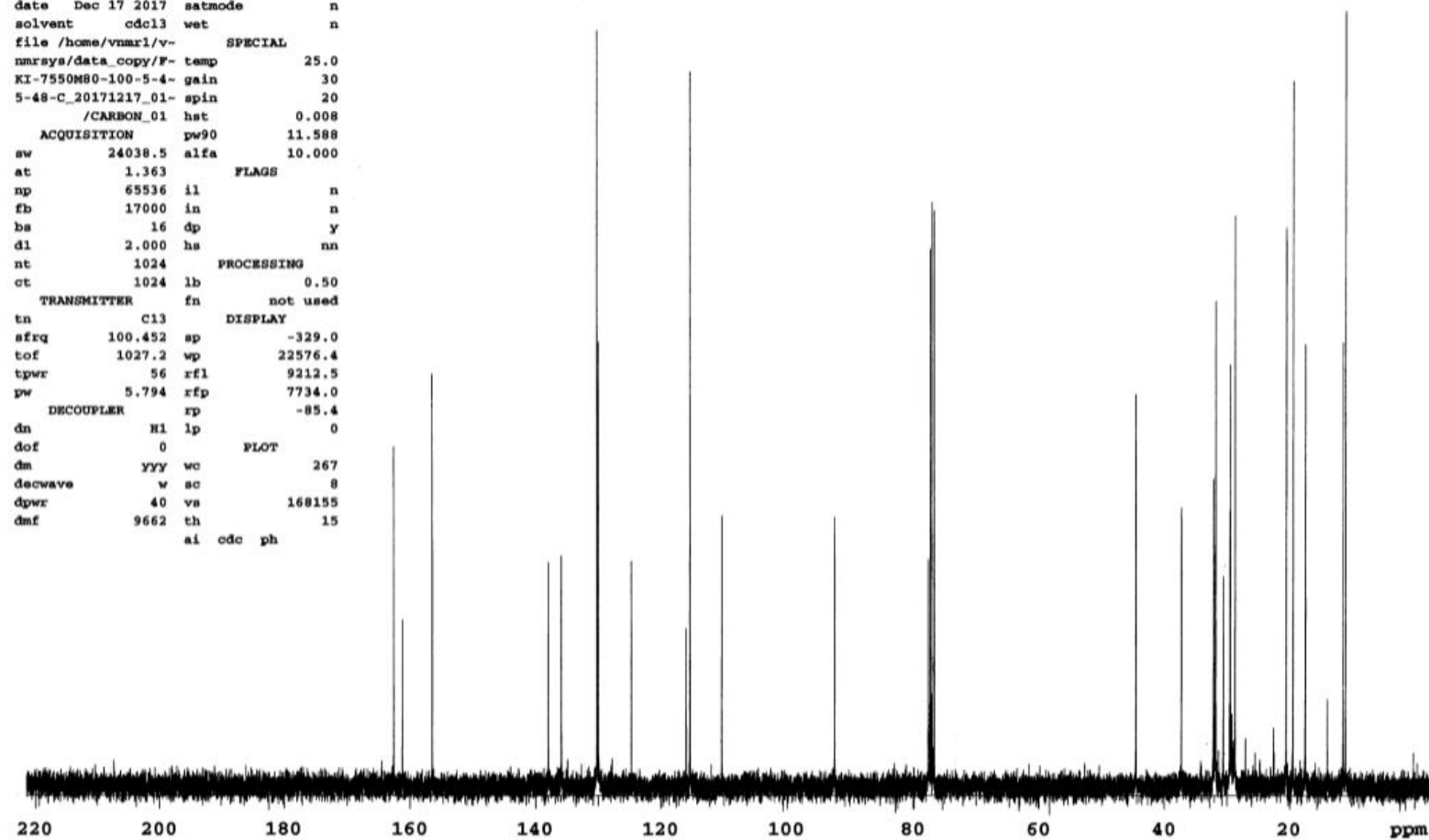


Fig. S39 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of sambutoxin

5-7 *N*-Demethylsambutoxin の各種機器分析データ

N-demethylsambutoxin

Sample: *N*-demethylsambutoxin

File: /home/vnmr1/vnmrsys/data_copy/*N*-demethylsambutoxin_20180204_01/PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 3.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.569 sec

Width 6377.6 Hz

16 repetitions

OBSERVE H1, 399.4470665 MHz

DATA PROCESSING

Line broadening 0.2 Hz

FT size 32768

Total time 1 min 29 sec

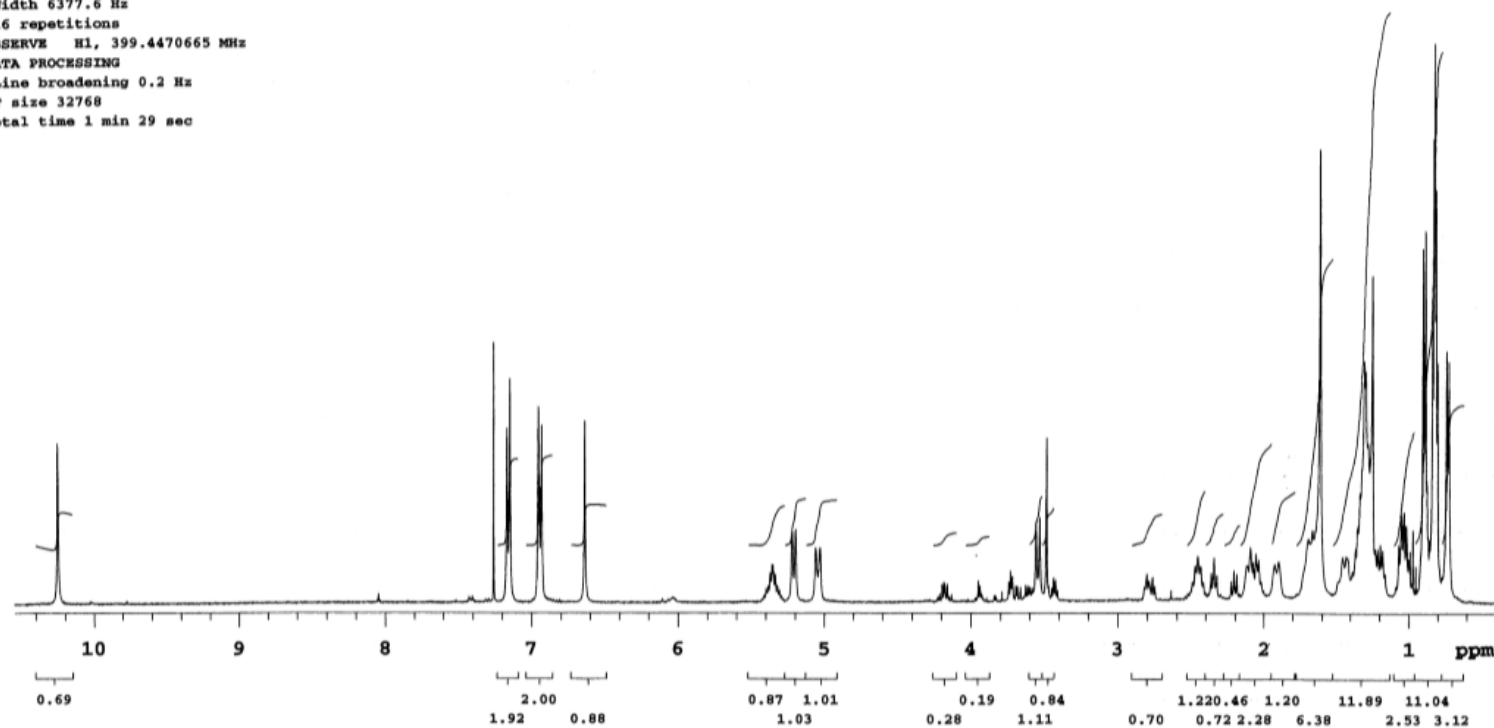


Fig. S40 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of *N*-demethylsambutoxin

N-demethylsambutoxin

exp35 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Feb 4 2018	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsys/data_server-	temp	25.0	
/seibutukinouken/S-	gain	30	
R/N-demethylsambut-	spin	20	
okin_20180204_01/C-	hst	0.008	
ARBON_01.fid	pw90	11.588	
ACQUISITION	alfa	10.000	
sw	24038.5	FLAGS	
at	1.363	il	n
np	65536	in	n
fb	17000	dp	y
bs	16	hs	nn
d1	2.000	PROCESSING	
nt	1024	lb	0.50
ct	1024	fn	not used
TRANSMITTER		DISPLAY	
tn	C13	sp	-250.5
sfrq	100.452	wp	17491.1
tof	1027.2	rfl	9206.6
tpwr	56	rflp	7734.0
pw	5.794	rp	-81.0
DECOUPLER		lp	0
dn	H1	PLOT	
dof	0	wc	267
dm	yyy	sc	8
decwave	w	vs	480945
dpwr	40	th	65
dmf	9462	ai	cdc ph

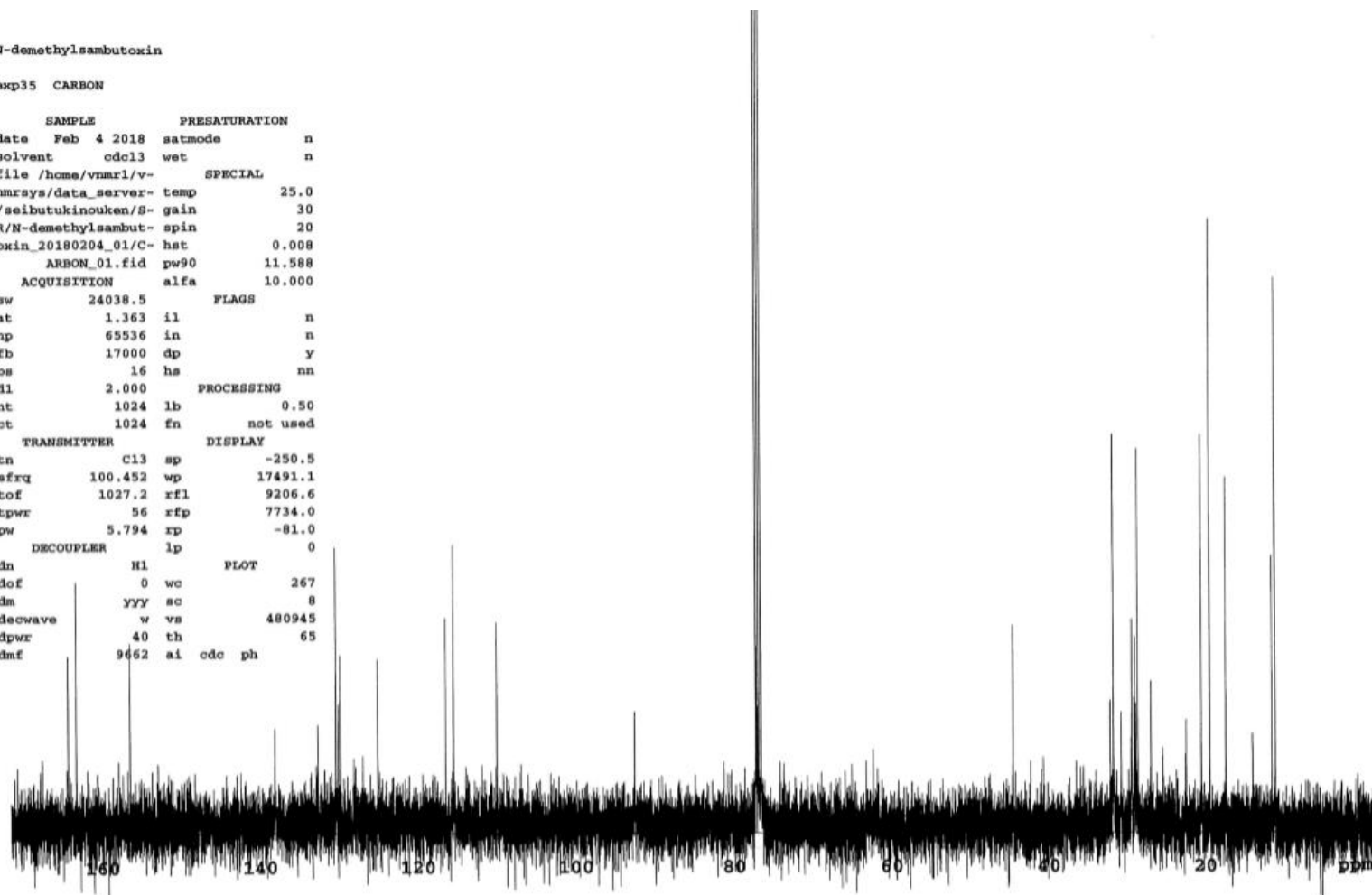


Fig. S41 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of *N*-demethylsambutoxin

5-8 (-)-6-Deoxyoxysporidinone の各種機器分析データ

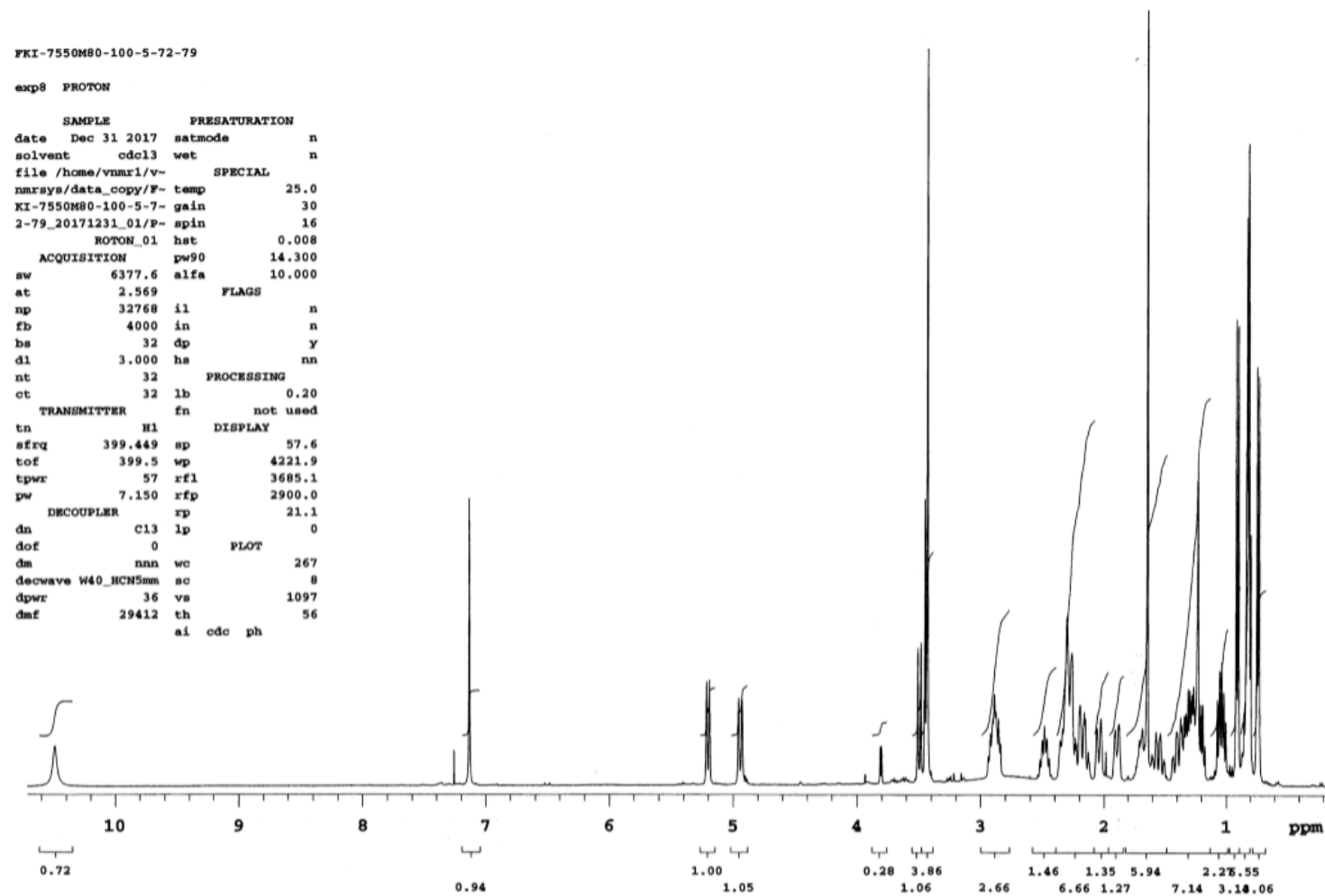


Fig. S42 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of (-)-6-deoxyoxysporidinone (4)

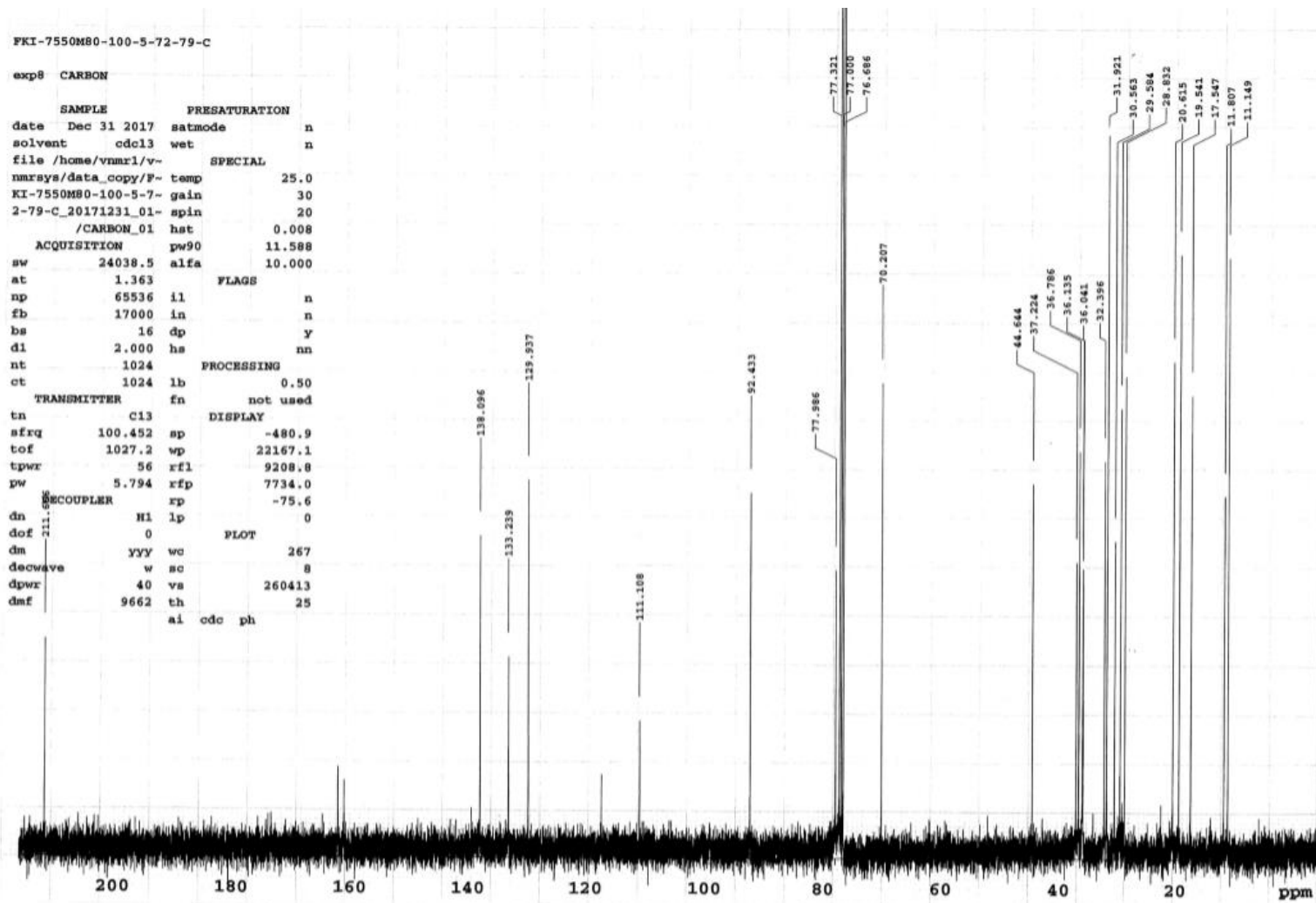


Fig. S43 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of (-)-6-deoxyoxysporidinone (**4**)

5-9 Fusaramin の各種機器分析データ

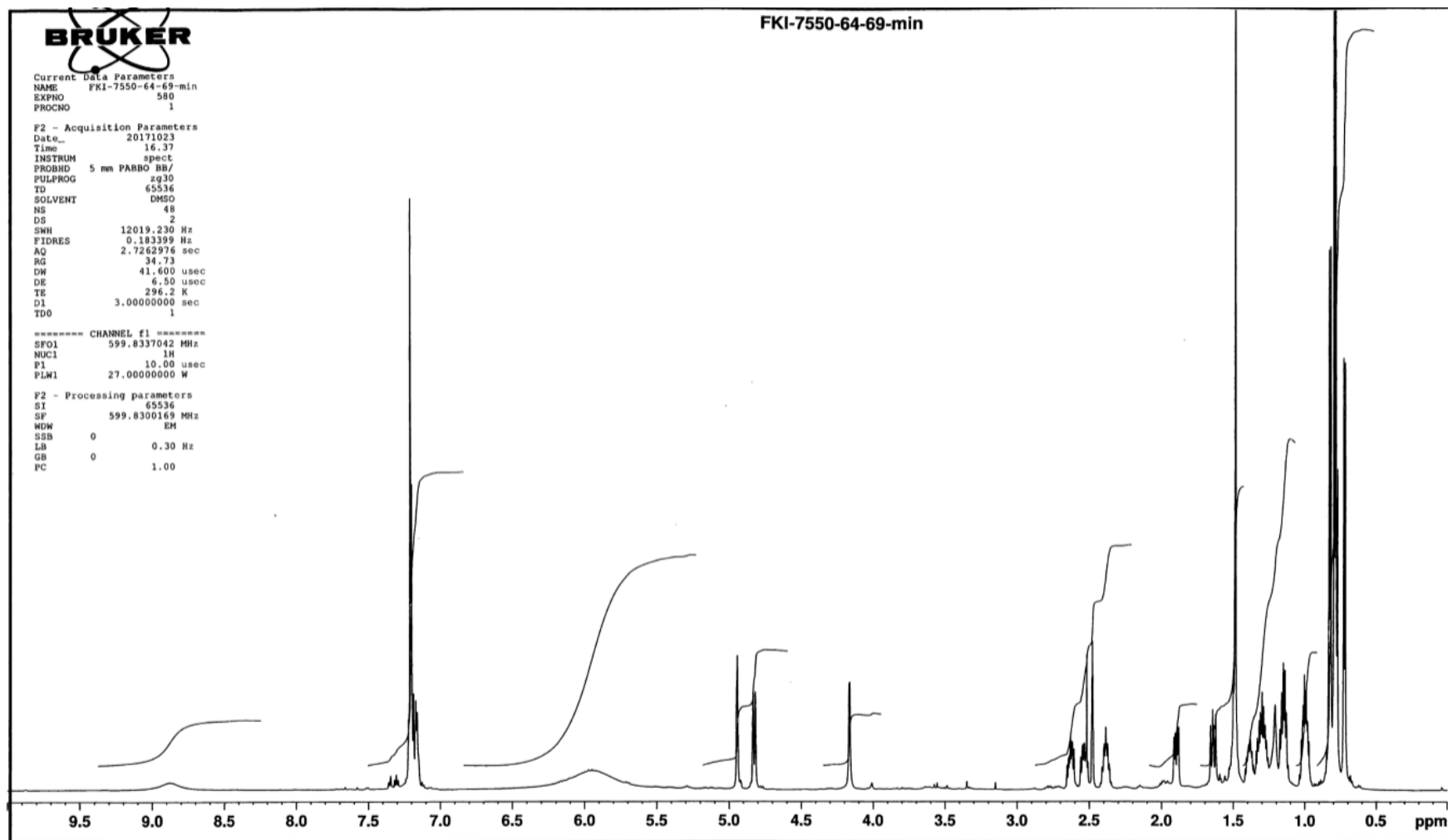


Fig. S44 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spectrum of fusaramin

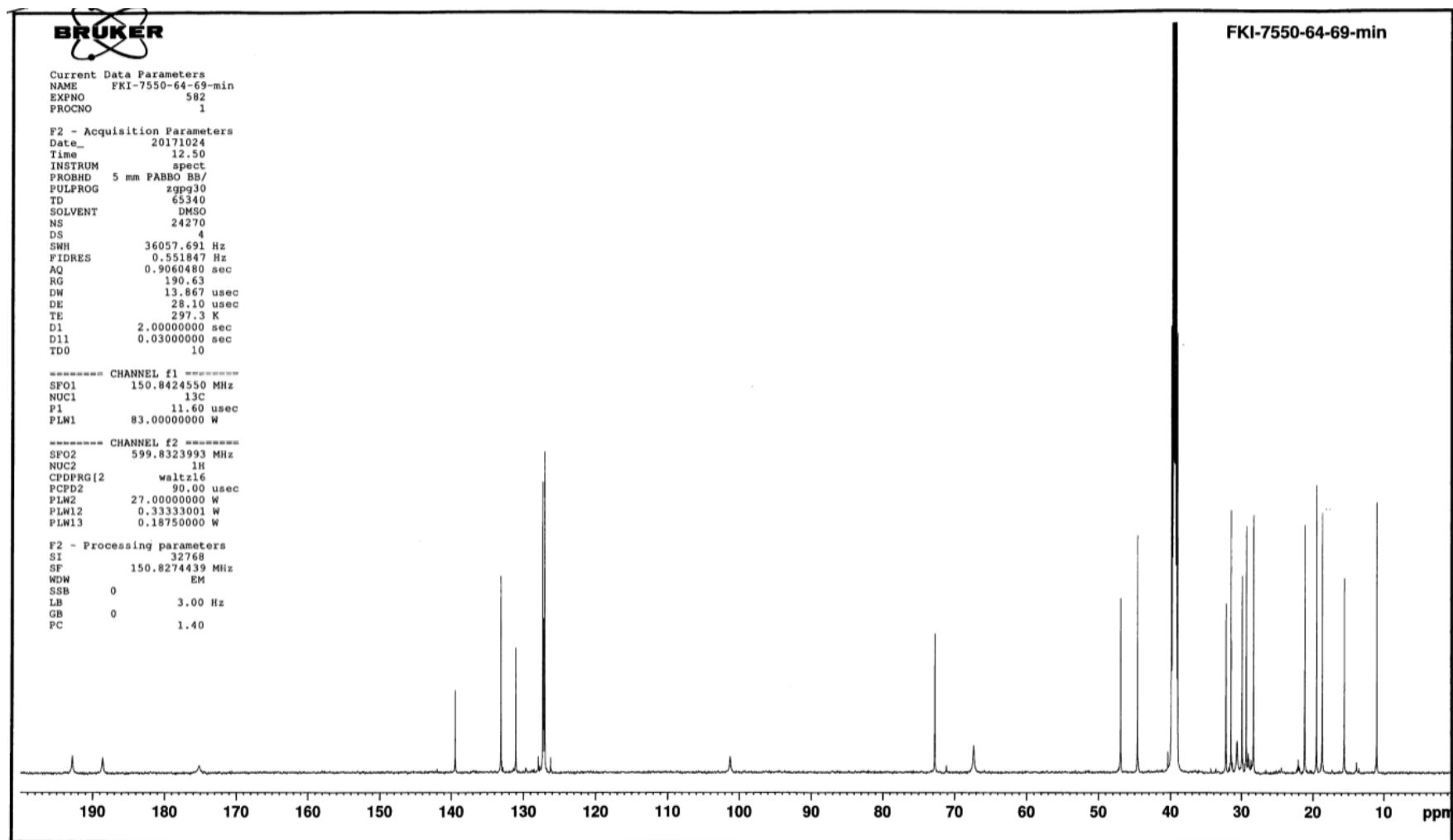


Fig. S45 ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum of fusaramin

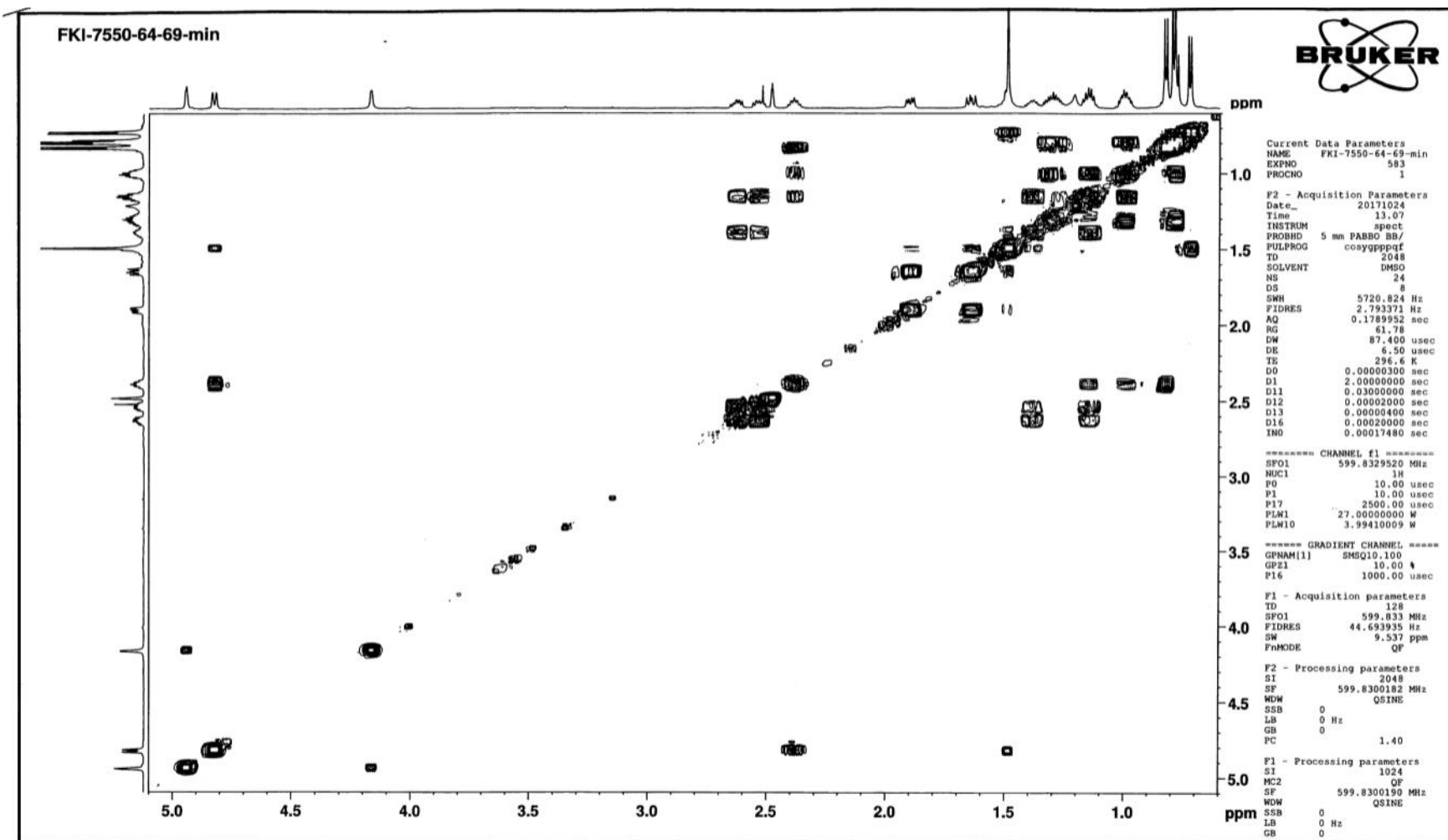


Fig. S46 COSY (600 MHz, DMSO- d_6) spectrum of fusaramin

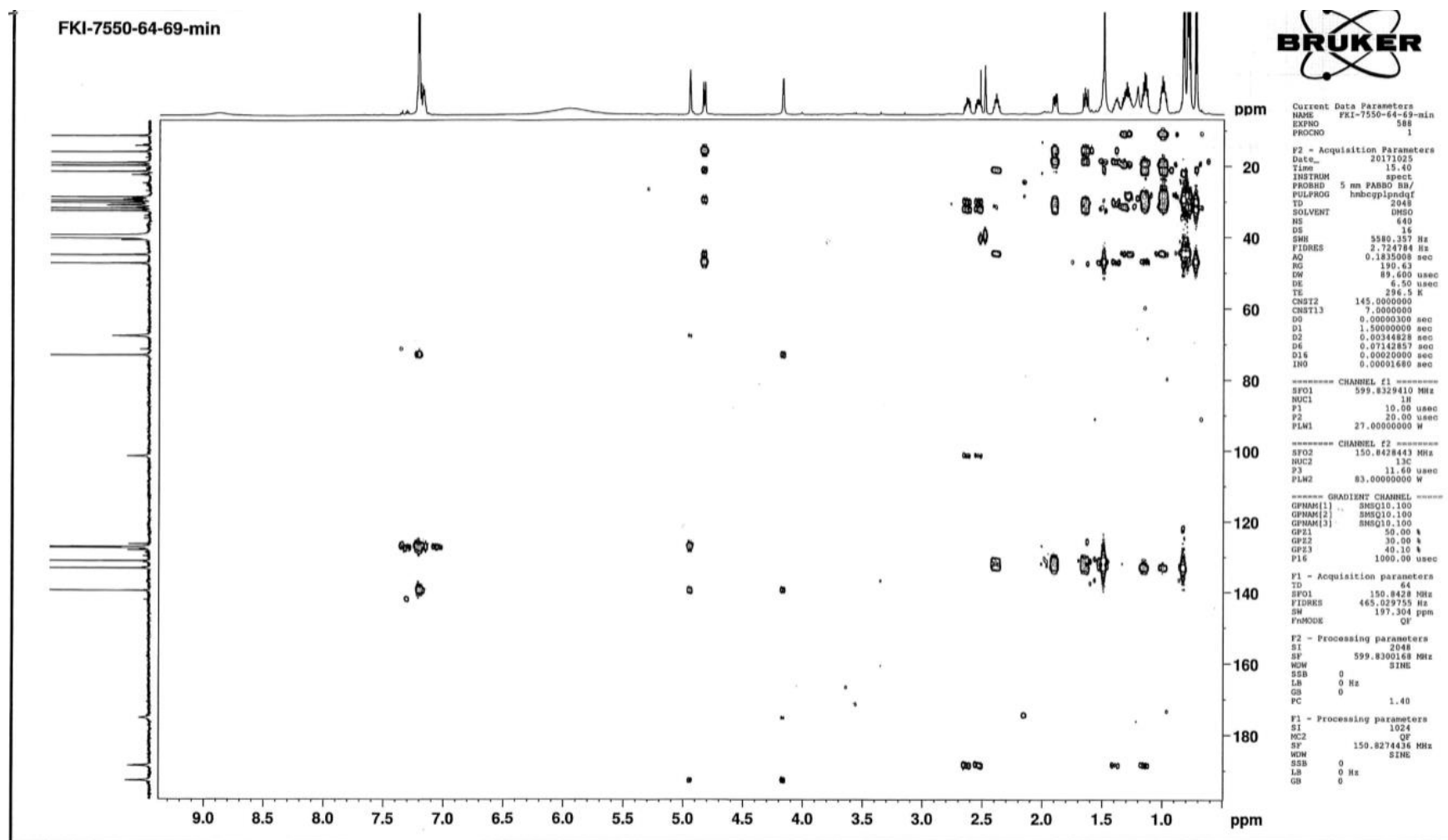


Fig. S48 HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) spectrum of fusaramin

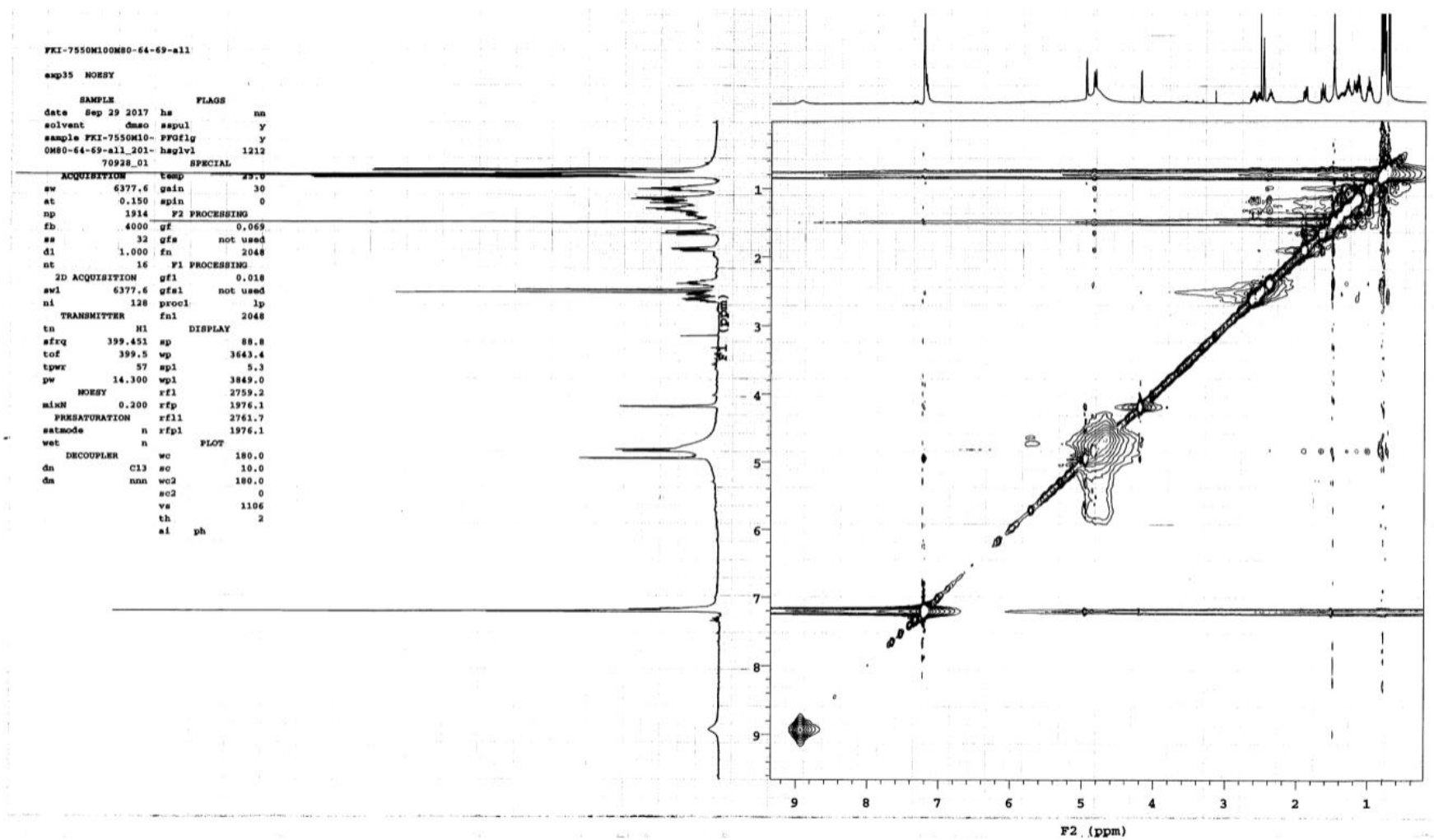


Fig. S49 NOESY (400 MHz, DMSO- d_6) spectrum of fusaramin

FKI-7550M80-90-10-64-69-CDCl₃

exp8 PROTON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Oct 7 2017	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsvs/data_copy/V-		temp	25.0
KI-7550M80-90-10-6-		gain	30
4-69-CDCl ₃ _2017100-		spin	16
7_01/PROTON_01		hst	0.008
ACQUISITION		pw90	14.300
sw	6377.6	alfa	10.000
at	2.569	FLAGS	
np	32768	il	n
fb	4000	in	n
bs	32	dp	y
d1	3.000	hs	nn
nt	16	PROCESSING	
ct	16	lb	0.20
TRANSMITTER		fn	not used
tn	H1	DISPLAY	
sfrq	399.449	sp	86.8
tof	399.5	wp	3097.7
tpwr	57	rfl	3684.7
pw	7.150	rfl	2900.0
DECOUPLER		rp	28.3
dn	013	lp	0
dof	0	FLOT	
dn	ann	wc	267
decwave	W40_HCN5mm	sc	8
dpwr	36	vs	1622
daf	29412	th	56
	ai	cdc	ph

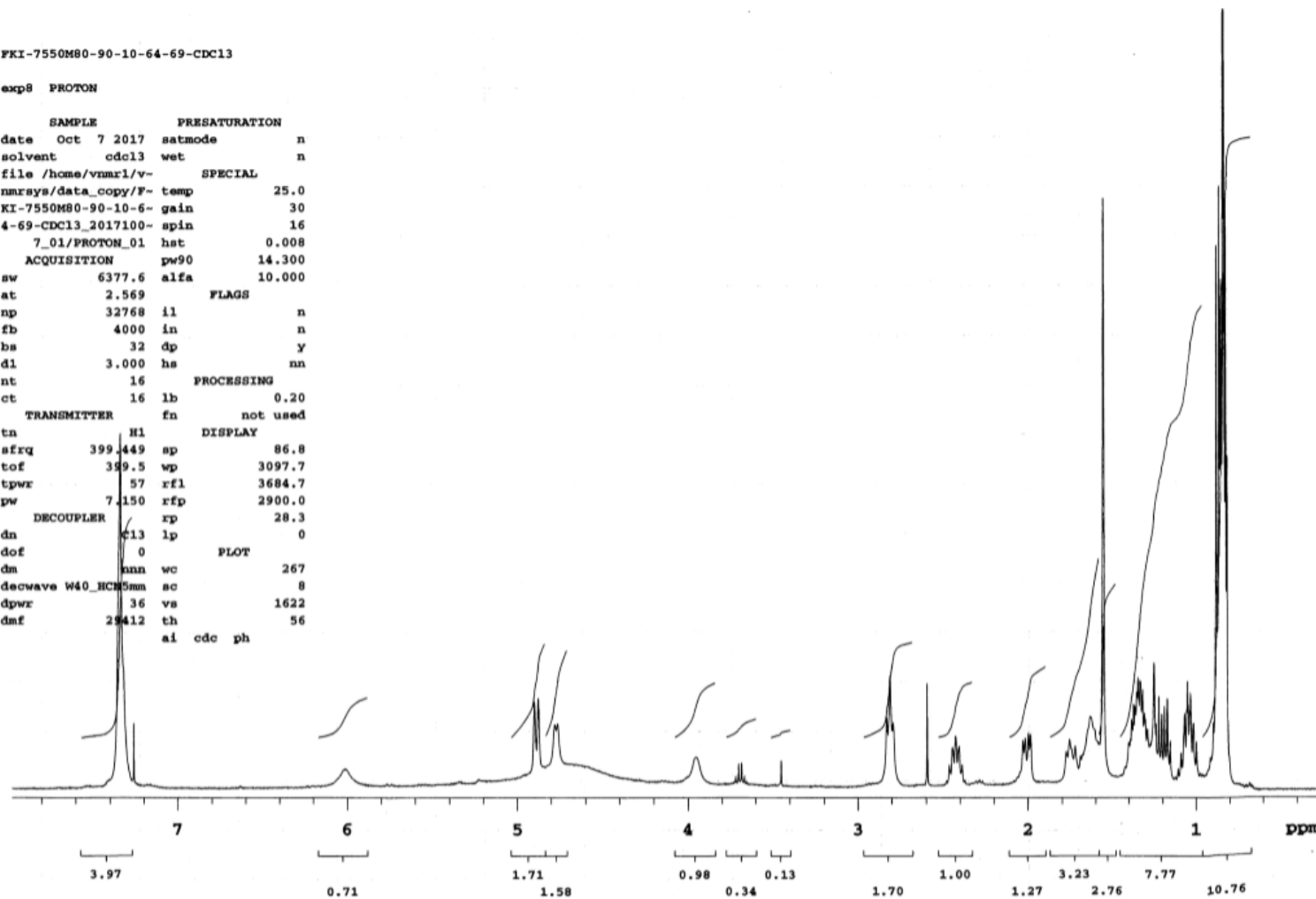


Fig. S50 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of fusaramin

FKI-7550M80-90-10-64-69-CDCl3-Clong

exp7 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Oct 18 2017	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsys/data_copy/F-	temp	25.0	
KI-7550M80-90-10-6-	gain	30	
4-69-CDCl3-Clong_2-	spin	20	
0171018_01/CARBON_-	hst	0.008	
	01	pw90	11.588
ACQUISITION	alfa		10.000
sw	24038.5	FLAGS	
at	1.363	il	n
np	65536	in	n
fb	17000	dp	y
bs	16	hs	nn
d1	2.000	PROCESSING	
nt	10000	lb	0.50
ct	10000	fn	not used
TRANSMITTER		DISPLAY	
tn	C13	sp	139.0
sfrq	100.452	wp	20182.7
tof	1027.2	rfl	9209.6
tpwr	56	rfp	7734.0
pw	5.794	rp	-83.0
DECOUPLER		lp	0
dn	H1	PLOT	
dof	0	wc	267
dm	YYY	sc	8
decwave	w	vs	151102
dpwr	40	th	6
dmf	9662	ai	cdc ph

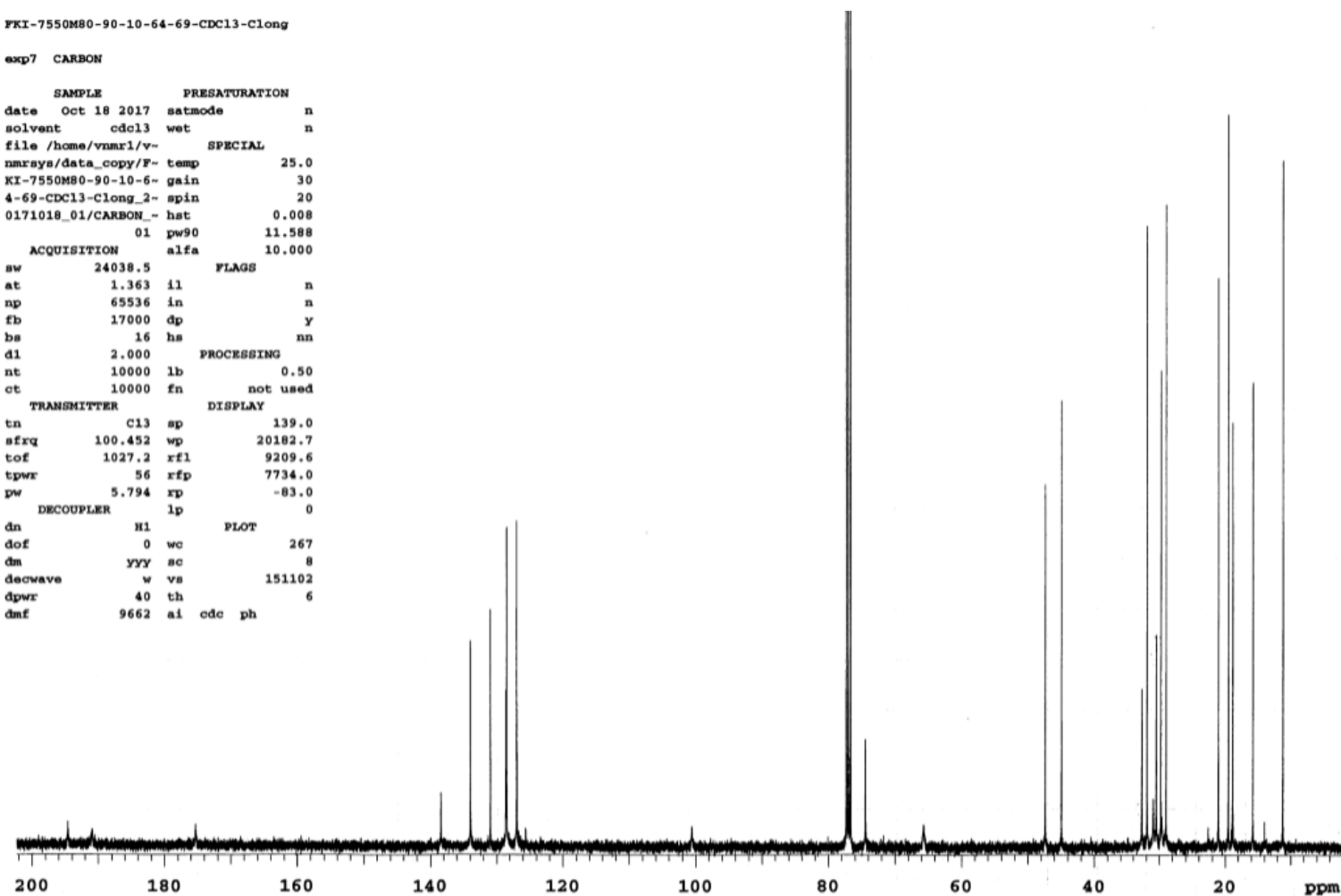


Fig. S51 ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of fusaramin

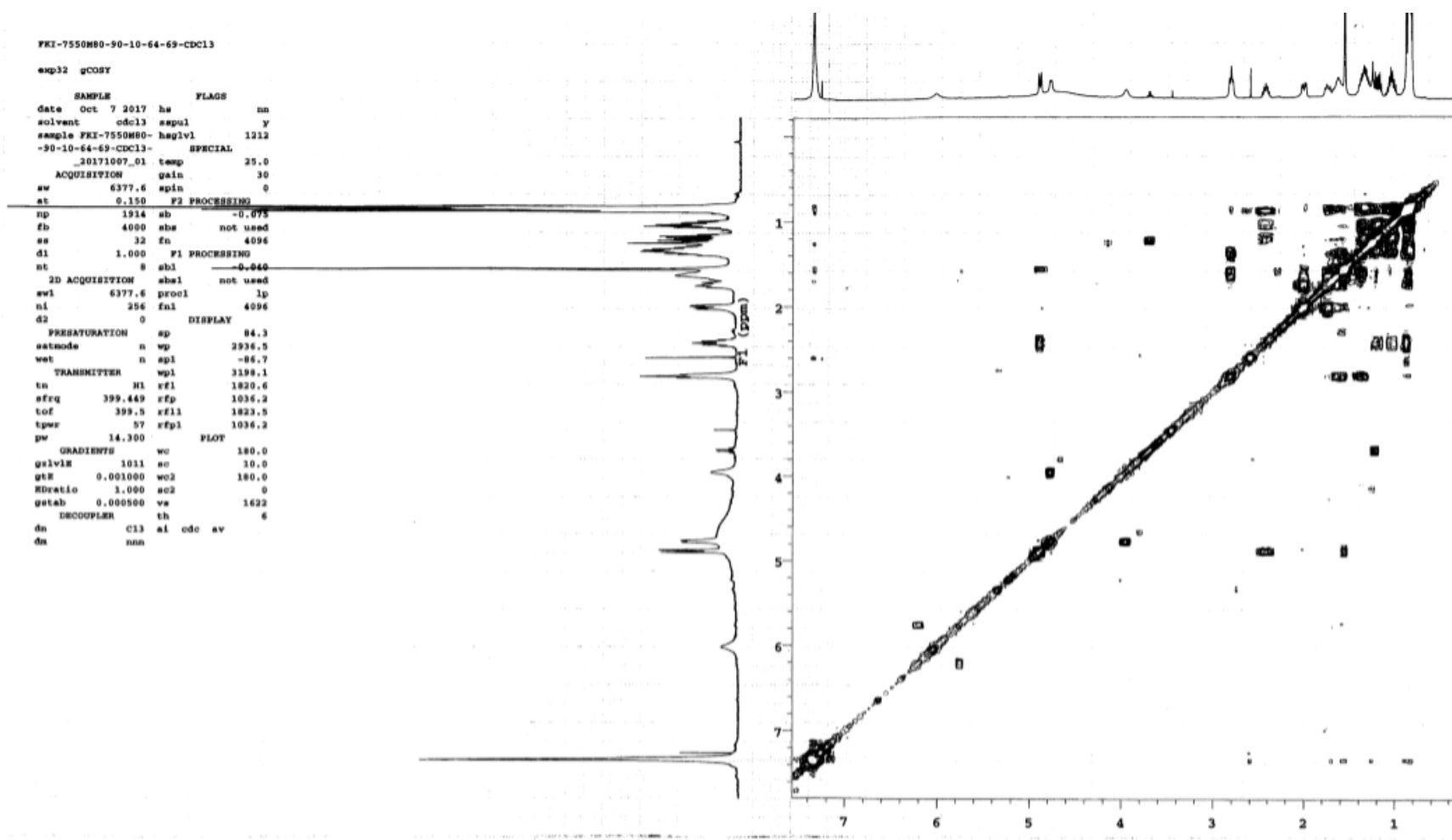


Fig. S52 COSY (400 MHz, CDCl₃) spectrum of fusaramin

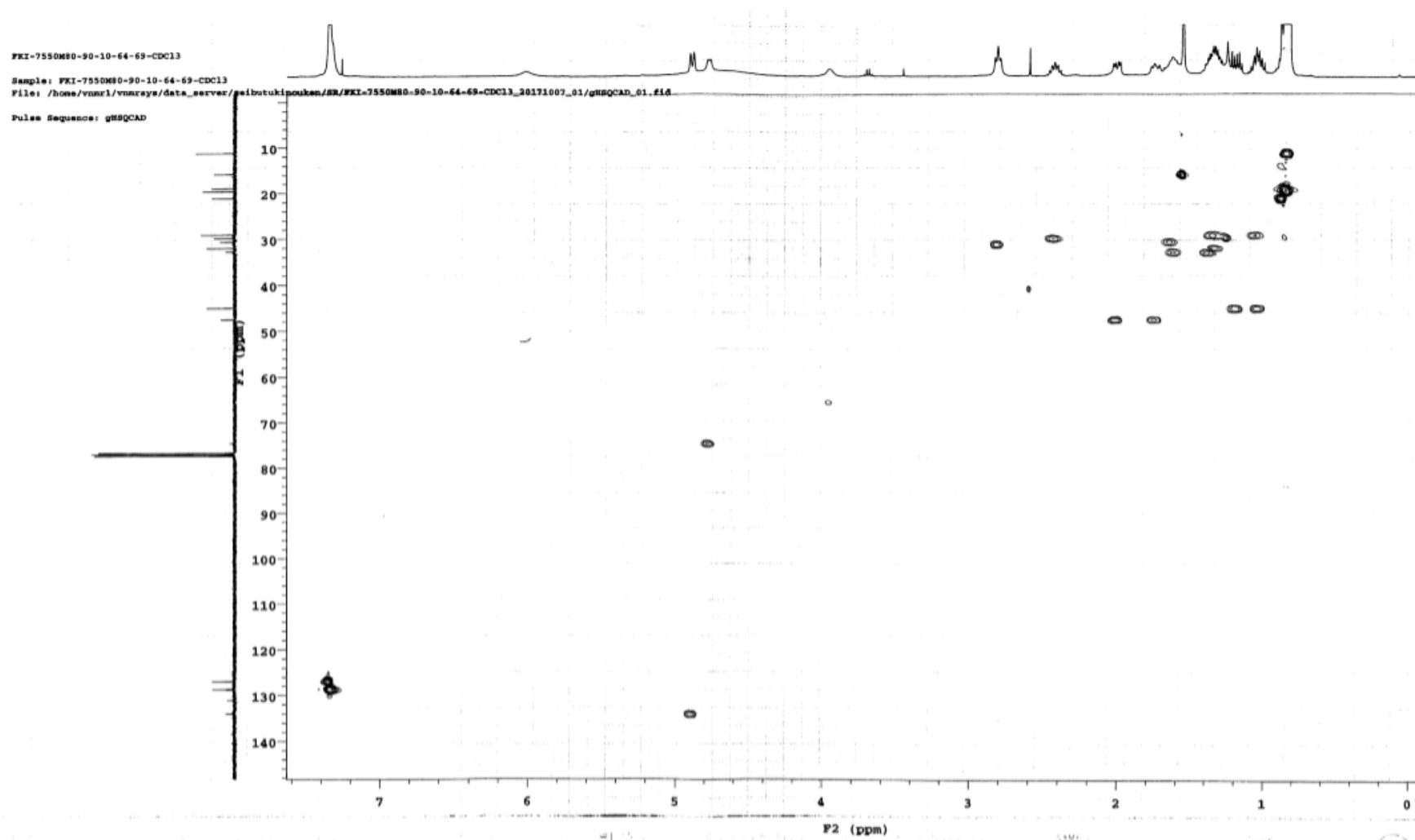


Fig. S53 HSQC (400 MHz, CDCl₃) spectrum of fusarmin

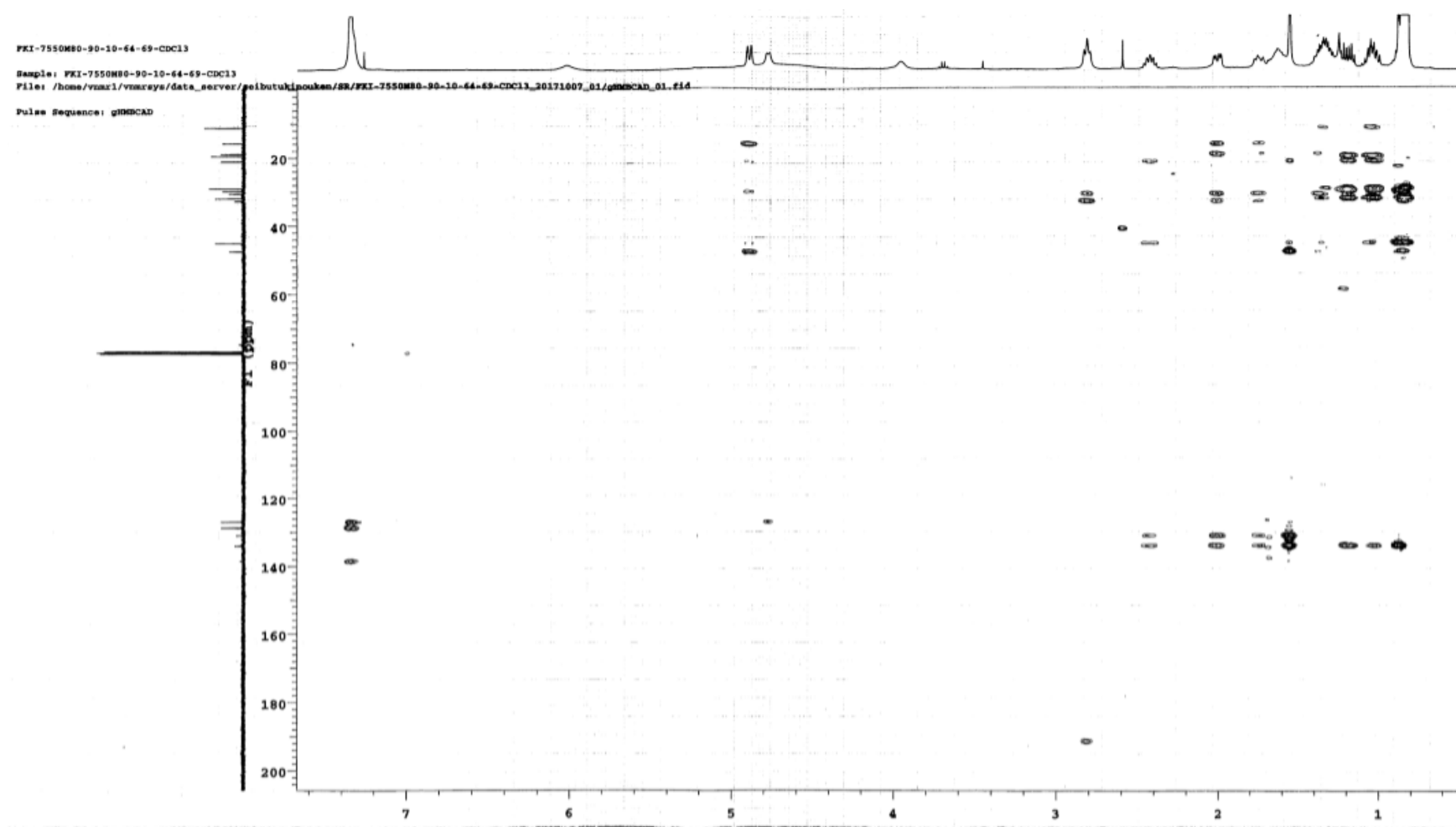


Fig. S54 HMBC (400 MHz, CDCl₃) spectrum of fusarimin

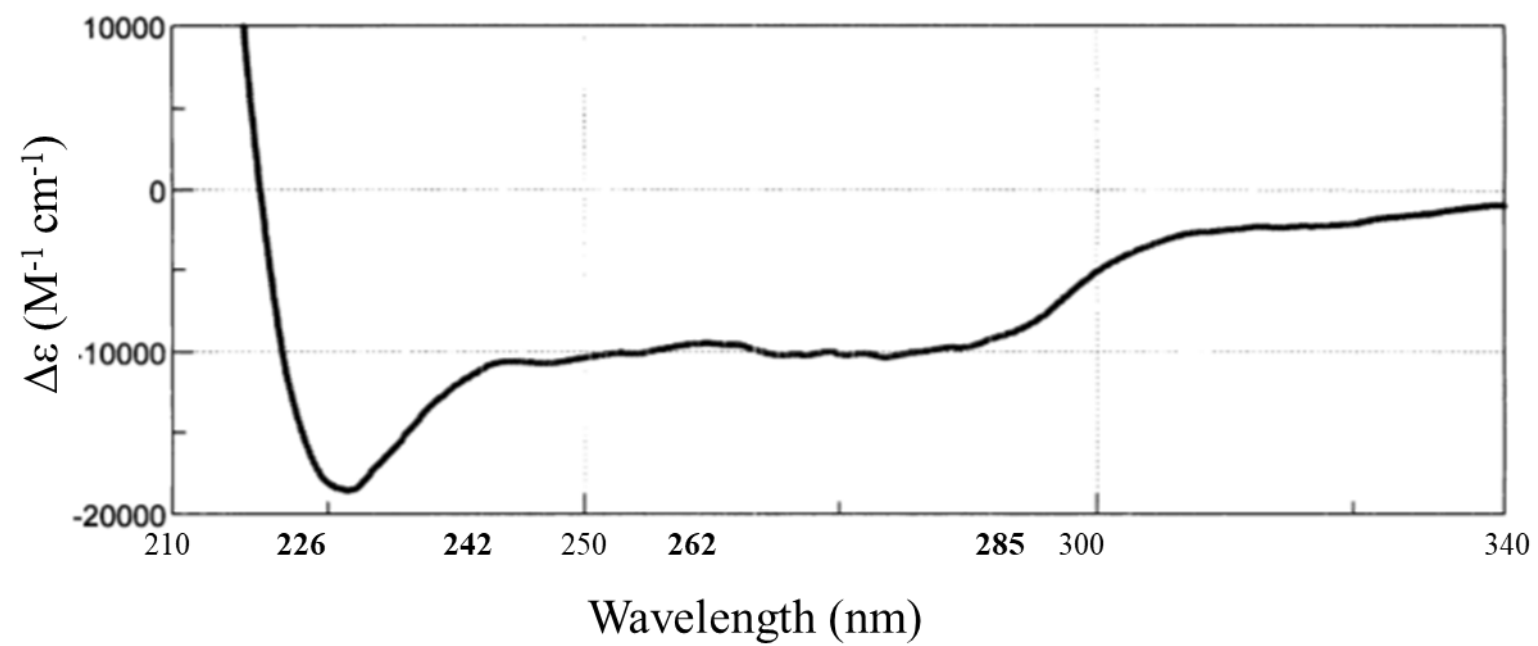


Fig. S55 Experimental ECD spectra of fusaramin

5-10 FK1-7550A の各種機器分析データ

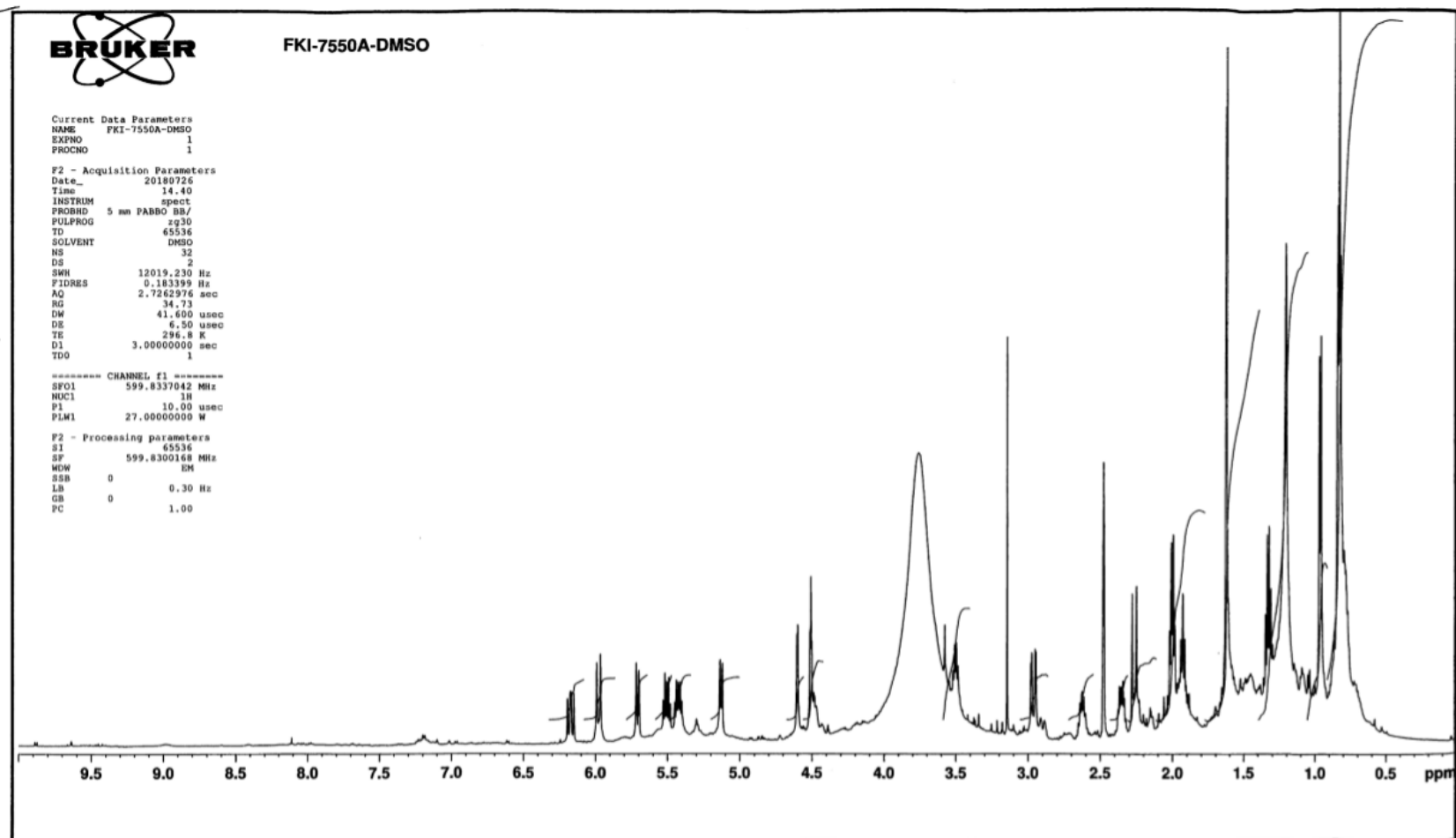


Fig. S56 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum of FK1-7550A

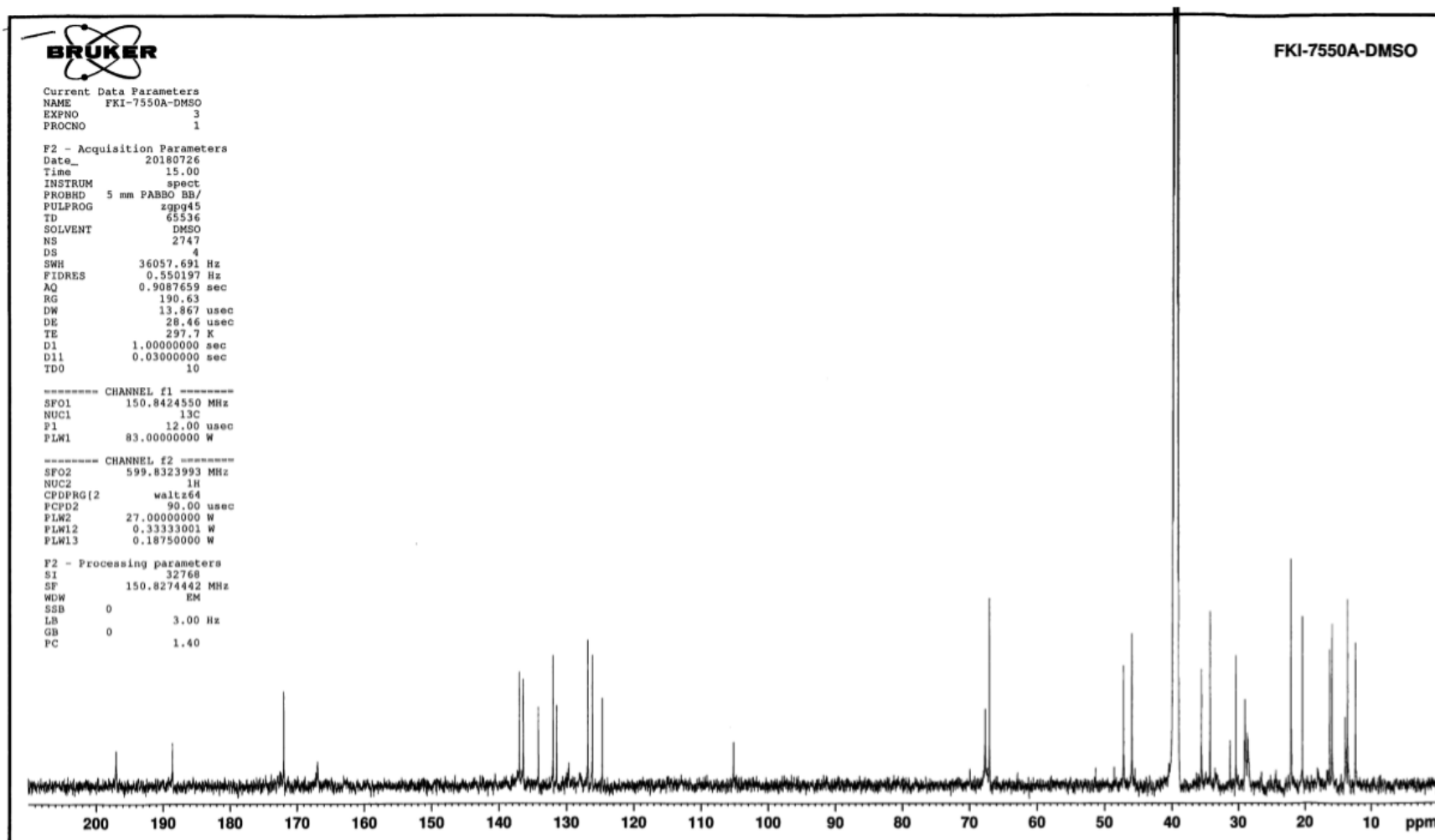


Fig. S57 ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spectrum of FKI-7550A

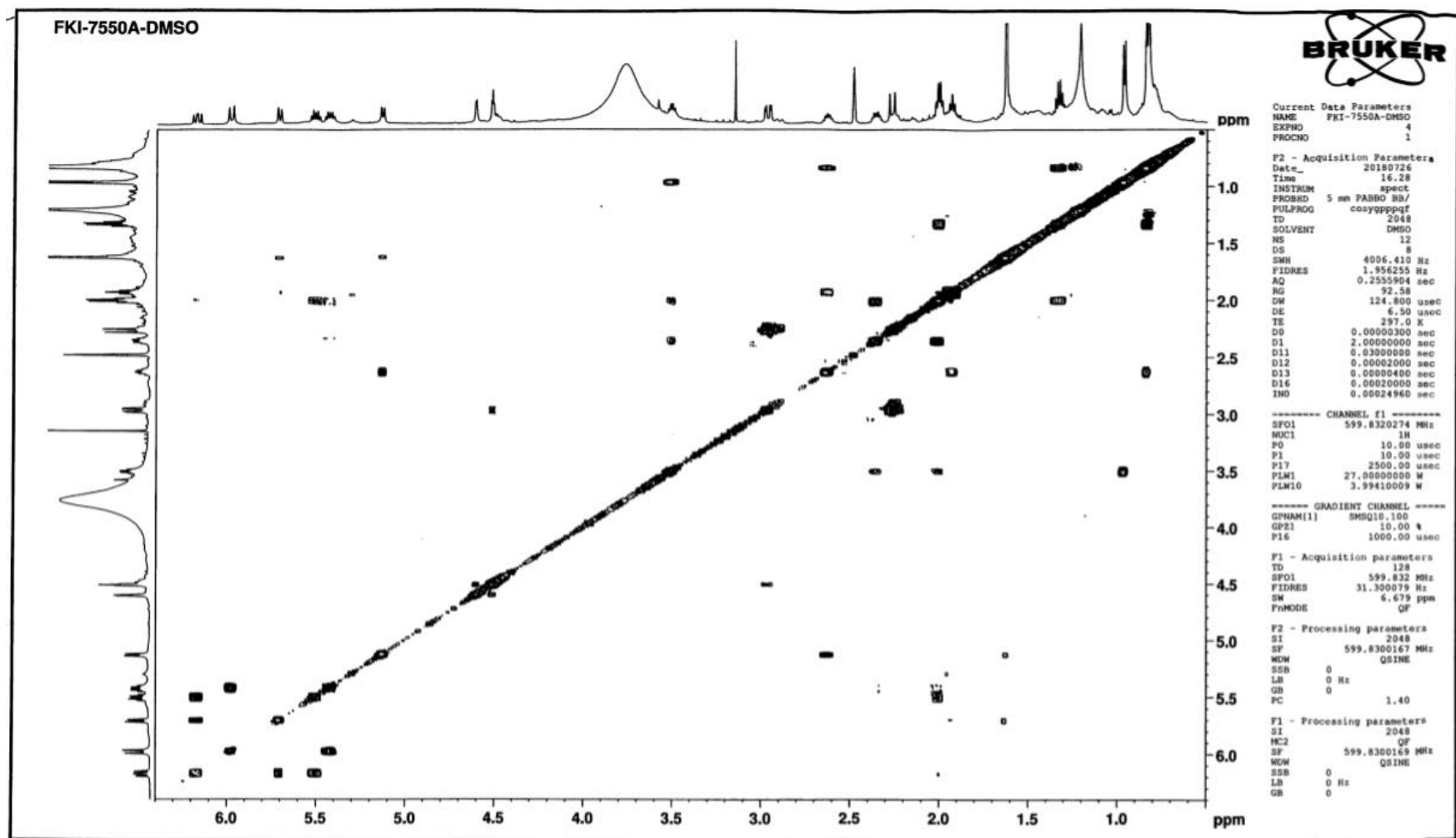


Fig. S58 COSY (600 MHz, DMSO- d_6) spectrum of FKI-7550A

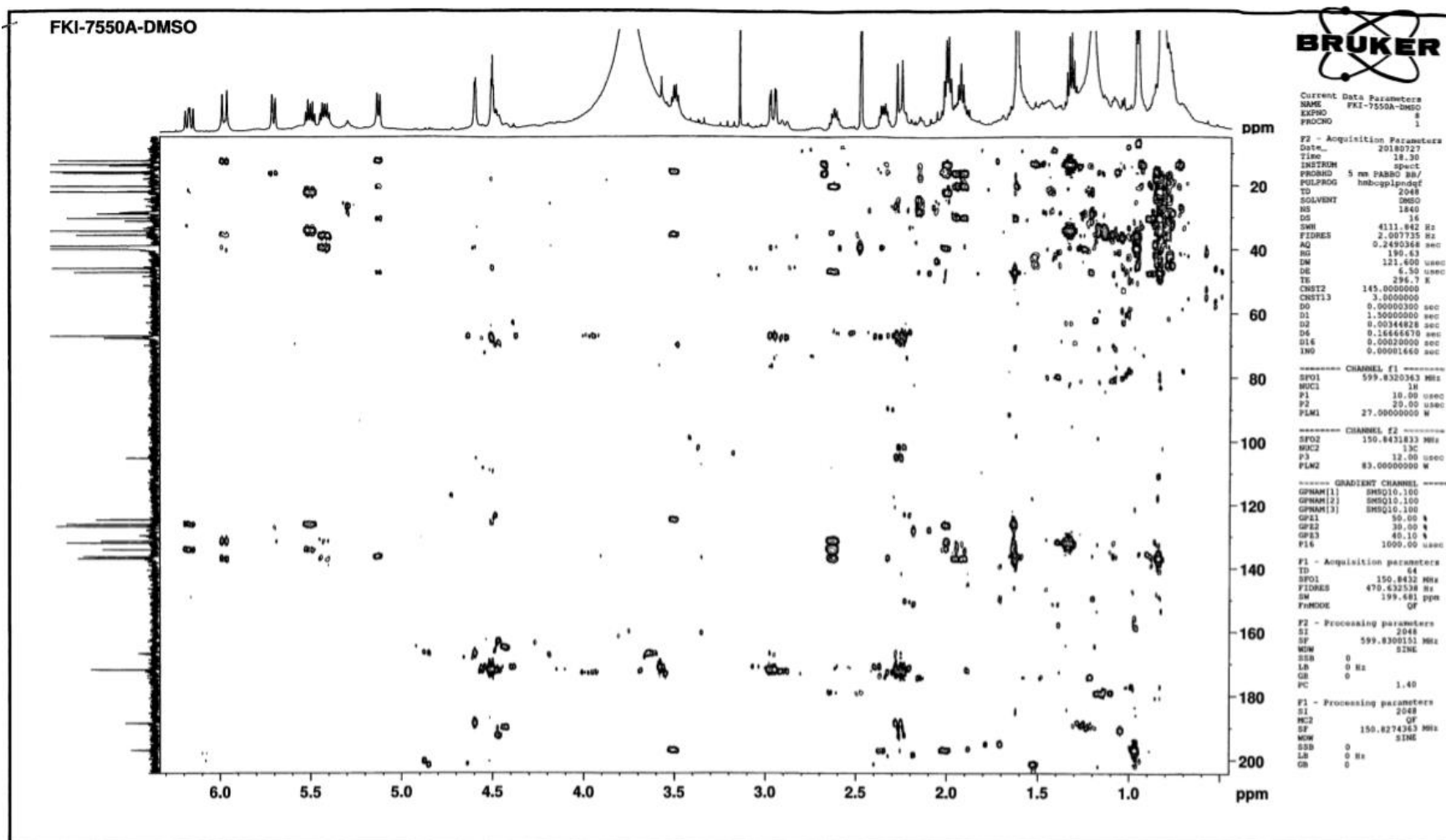


Fig. S60 HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) spectrum of FKI-7550A

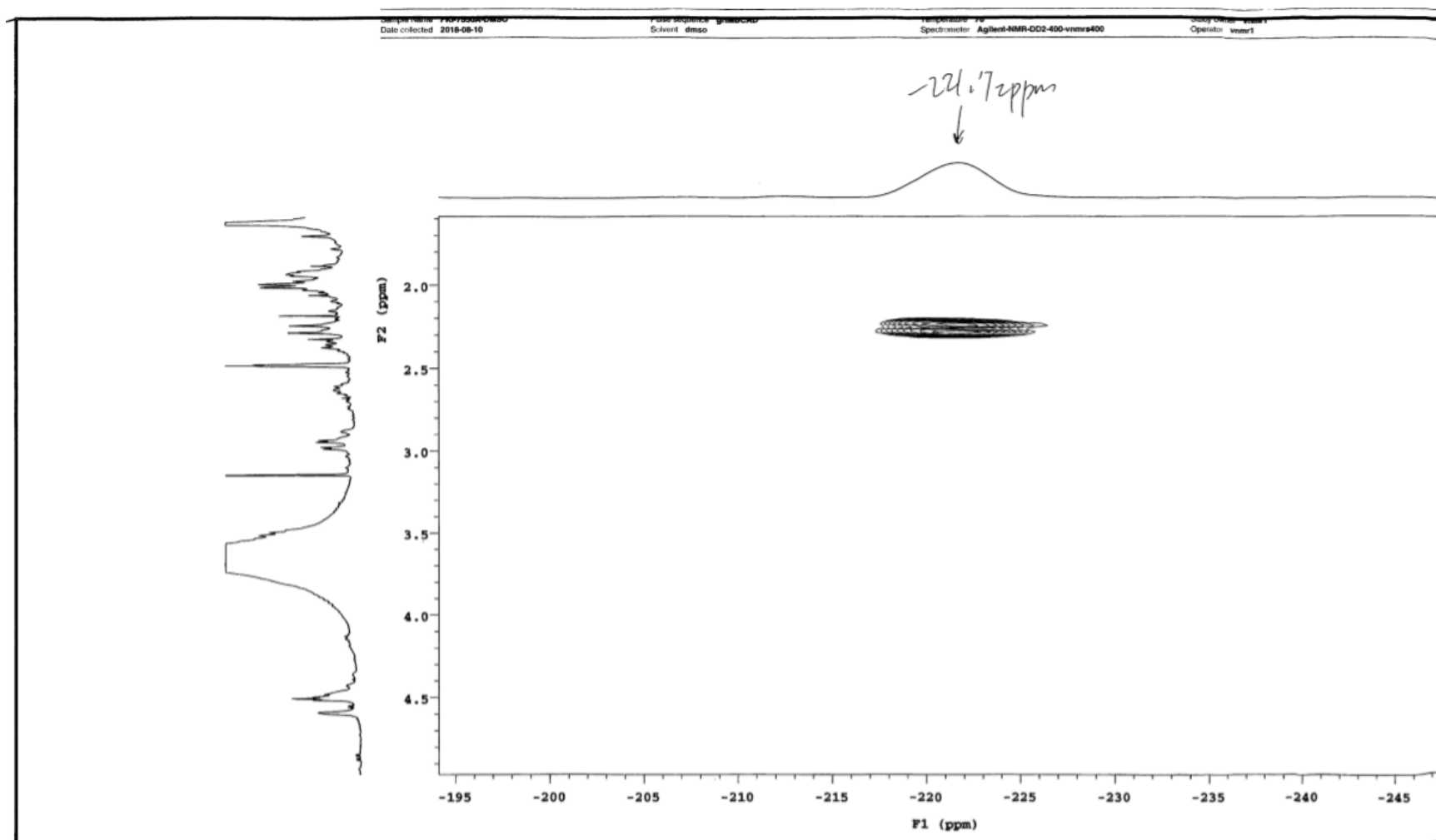


Fig. S61 ^1H - ^{15}N HMBC (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum of FK7550A

5-11 FKI-7550B の各種機器分析データ

FKI-7550-M80-1-1-27-28DMSO

exp3 PROTON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 21 2017	satmode	n
solvent	dmsc	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nrmrsvs/data_server~	temp	25.0	
/seibutukinouken/S-	gain	30	
R/FKI-7550-M80-1-1-	spin	16	
-27-28DMSO_2017052-	hat	0.008	
1_01/PROTON_01.fid	pw90	14.300	
ACQUISITION		alfa	10.000
sw	6377.6	FLAGS	
at	2.569	il	n
np	32768	in	n
fb	4000	dp	y
bs	32	hs	nn
d1	3.000	PROCESSING	
nt	32	lb	0.20
ct	32	fn	not used
TRANSMITTER		DISPLAY	
tn	H1	sp	14.4
sfrq	399.451	wp	2622.8
tof	399.5	rfl	1777.3
tpwr	57	rfp	990.6
pw	7.150	rp	40.9
DECOUPLER		lp	0
dn	C13	PLOT	
dof	0	wc	267
dm	nnn	sc	8
decwave	W40_HCN5mm	vs	336
dpwr	36	th	10
dmf	29412	ai	cdc ph

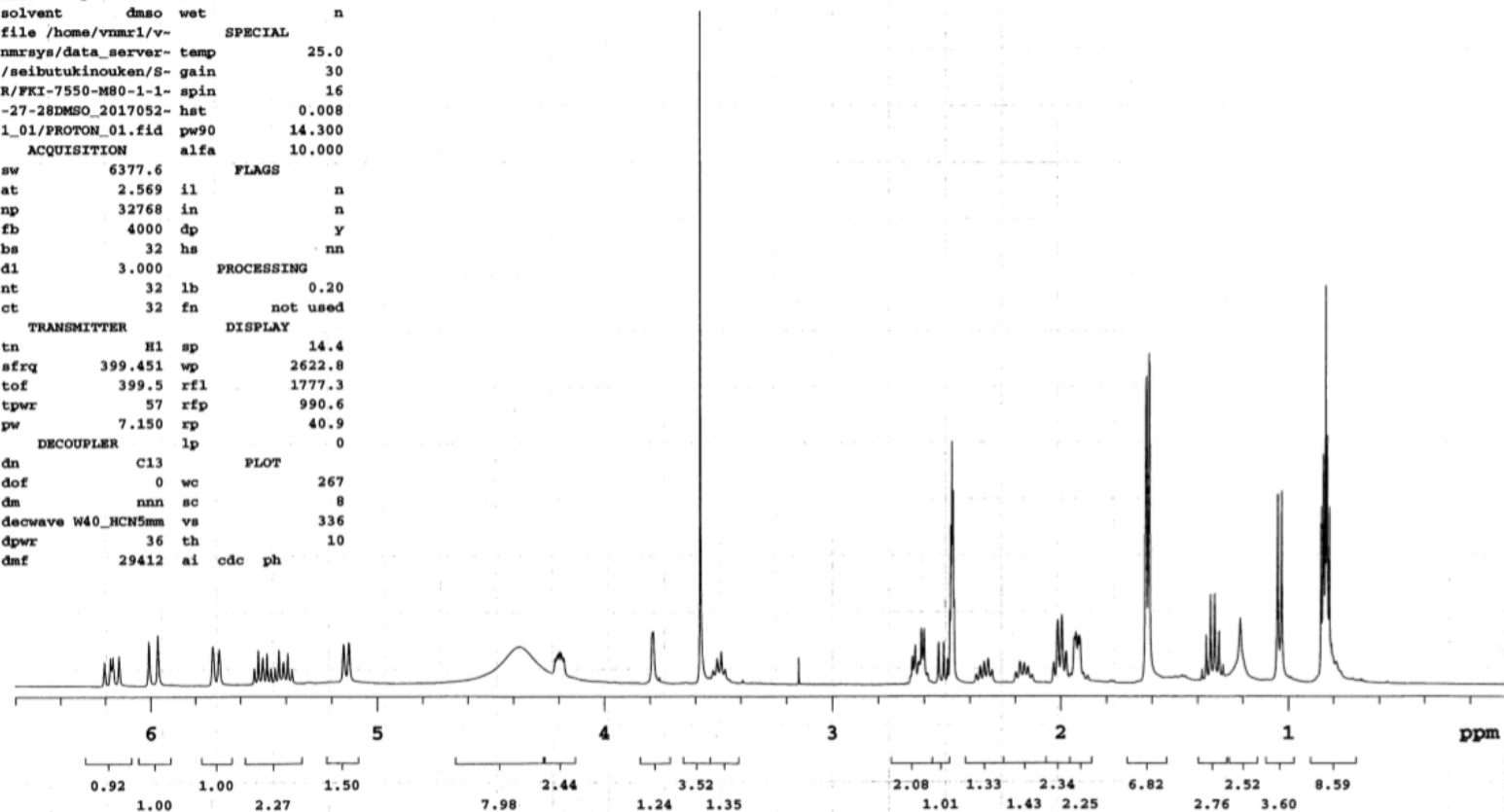


Fig. S62 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum of FKI-7550B

FKI-7550-M80-1-1-27-28DMSO

exp10 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 21 2017	satmode	n
solvent	dmsc	wet	n
file	/home/vnmr1/v-	SPECIAL	
nmrsys/data_copy/F~	temp	25.0	
KI-7550-M80-1-1-27~	gain	30	
-28DMSO_20170521_0~	spin	20	
1/CARBON_01	hst	0.008	
ACQUISITION	pw90	11.588	
sw	24038.5	alfa	10.000
at	1.363	FLAGS	
np	65536	il	n
fb	17000	in	n
bs	16	dp	y
dl	2.000	hs	nn
nt	1024	PROCESSING	
ct	1024	lb	0.50
TRANSMITTER	fn	not used	
tn	C13	DISPLAY	
sfrq	100.452	sp	-279.1
tof	1027.2	wp	21446.7
tpwr	56	rf1	5486.3
pw	5.794	rfp	3967.4
DECOUPLER	rp	-39.0	
dn	H1	lp	0
dof	0	PLOT	
dm	yyy	wc	267
decwave	w	sc	8
dpwr	40	vs	275835
dmf	9662	th	25
	ai	cdc	ph

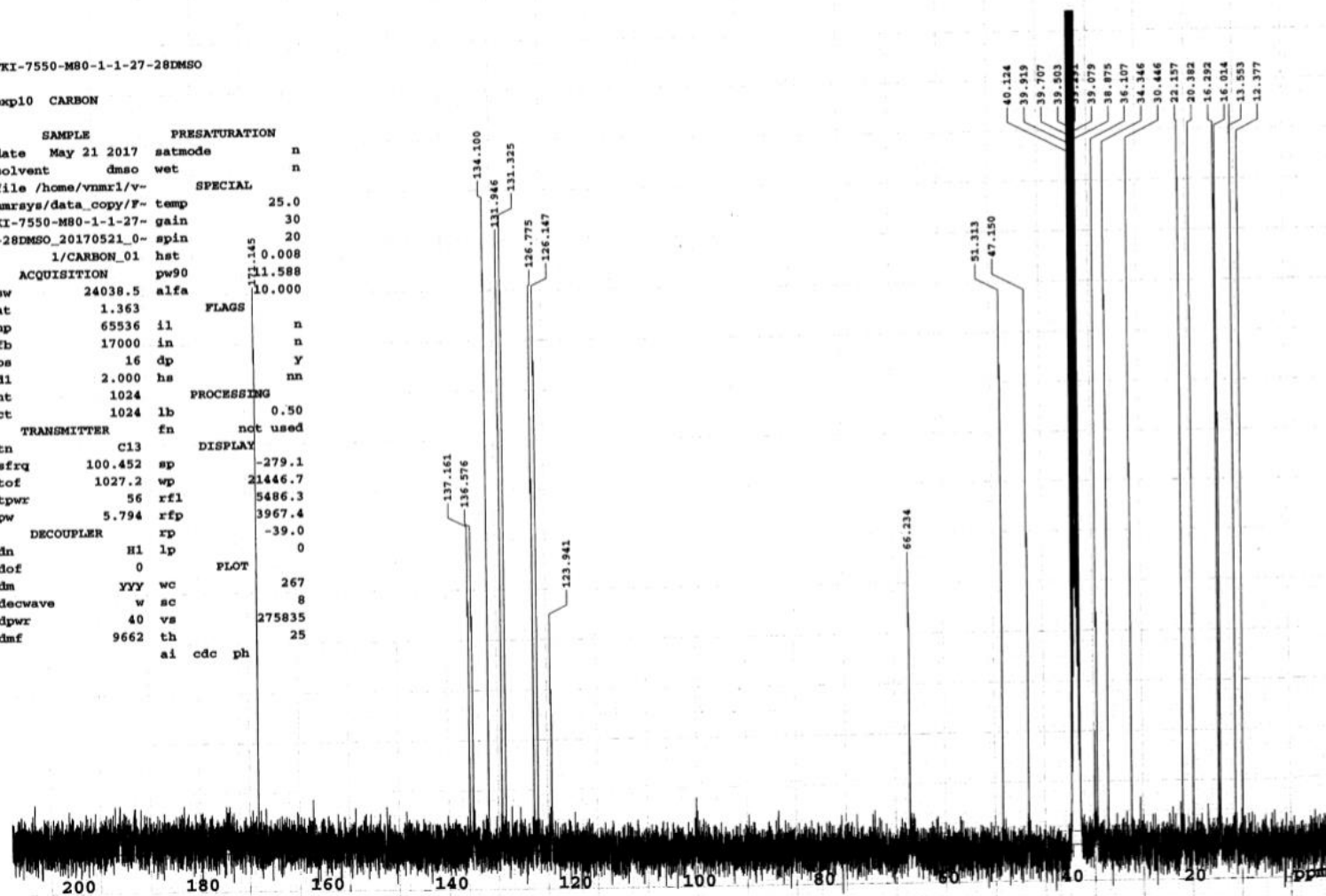


Fig. S63 ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum of FKI-7550B

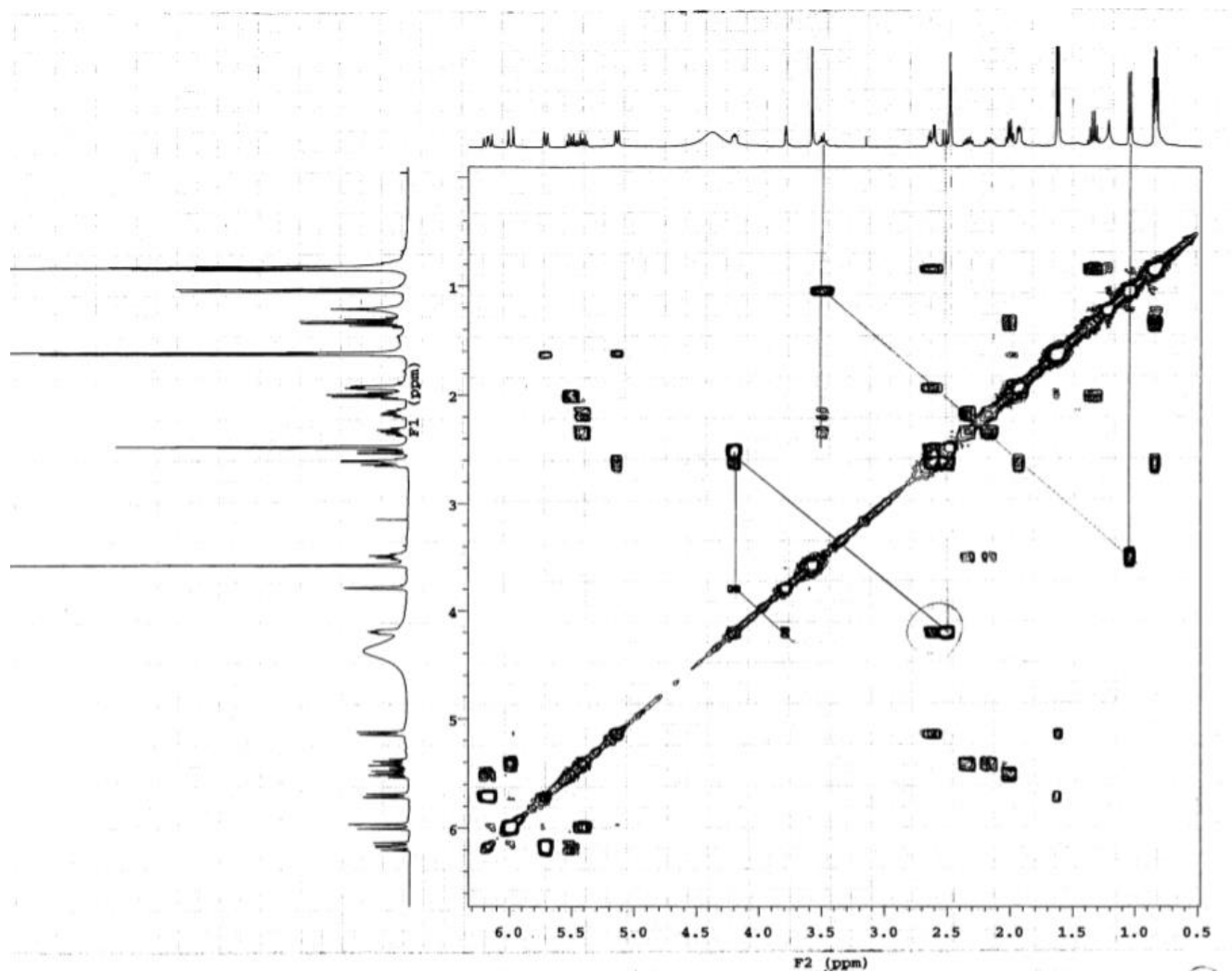


Fig. S64 COSY (400 MHz, DMSO- d_6) spectrum of FKI-7550B

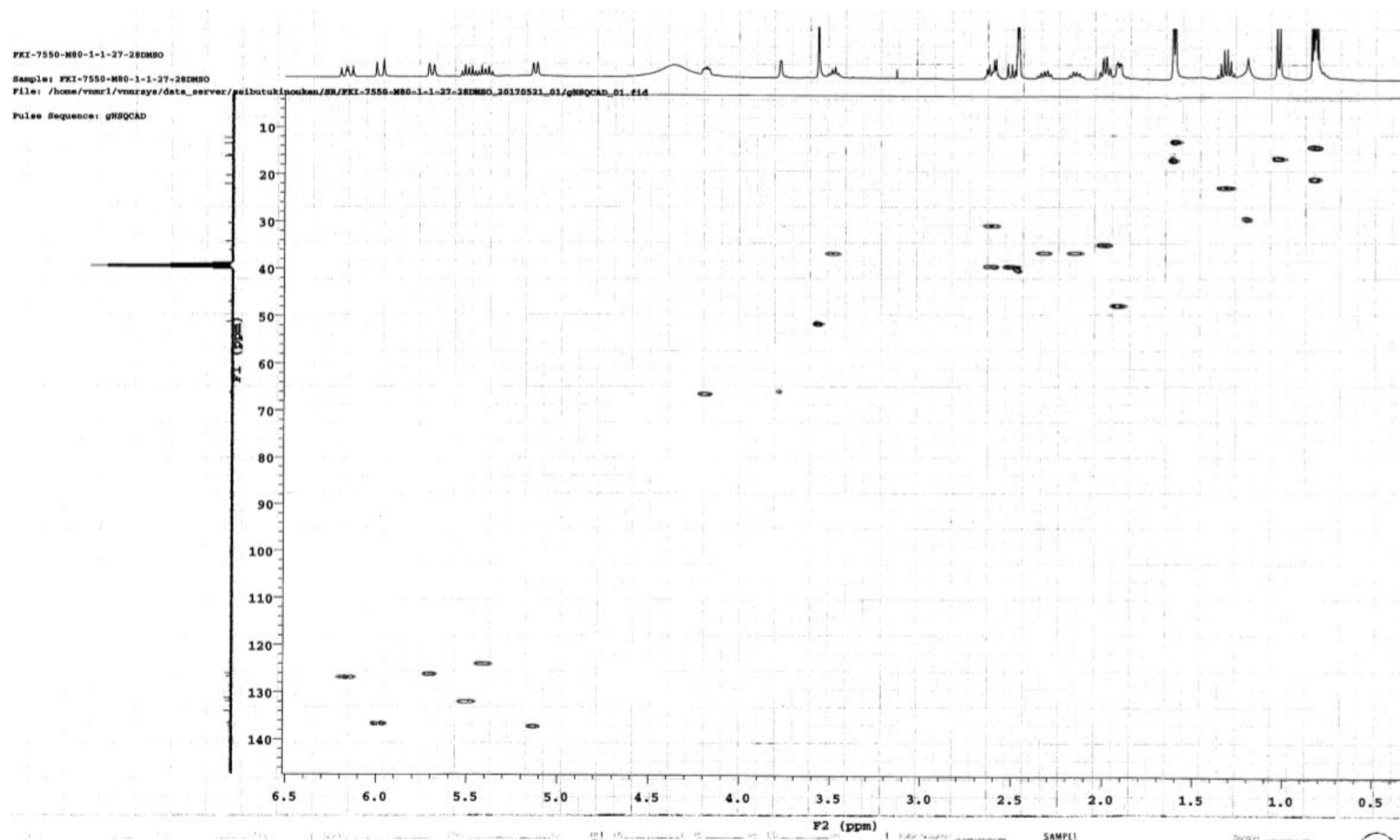


Fig. S65 HSQC (400 MHz, DMSO- d_6) spectrum of FKI-7550B

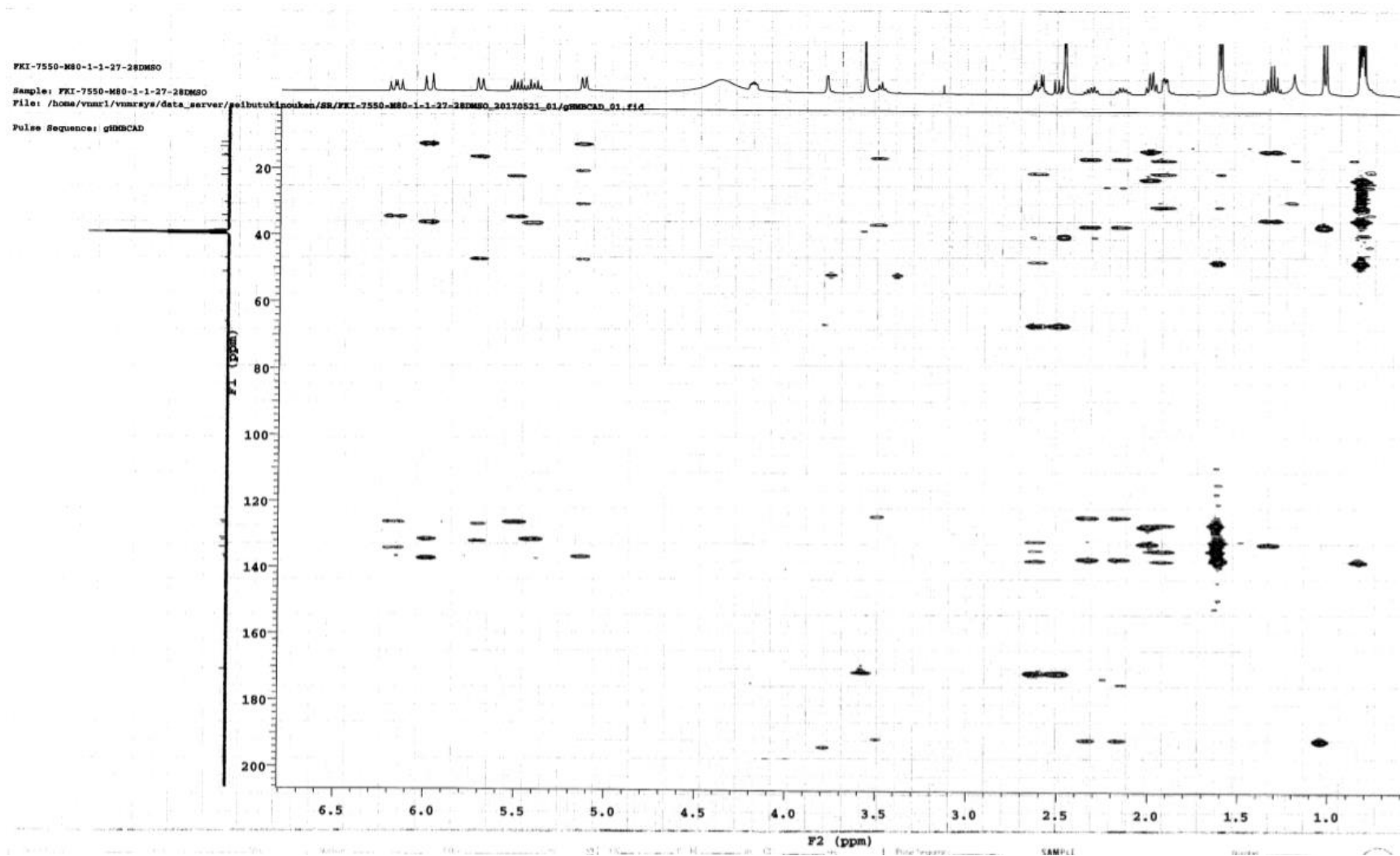


Fig. S66 HMBC (400 MHz, DMSO- d_6) spectrum of FKI-7550B

謝辞

本研究を行うにあたり、終始多大なご指導、ご鞭撻を賜りました北里大学北里生命科学研究所微生物応用化学研究室教授、塩見和朗博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、研究の場を与えて頂いた北里大学特別荣誉教授、大村智博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、直接貴重なるご指導、ご鞭撻を頂きました北里大学北里生命科学研究所特別研究部門 天然物創薬推進プロジェクト、浅見行弘特任准教授、北里大学北里生命科学研究所熱帯病研究センター、岩月正人准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、菌学を担当し、培養のご指導をして頂きました北里大学北里生命科学研究所微生物機能研究室、松本厚子准教授、北里大学北里生命科学研究所微生物資源研究センター、野中健一講師に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、各種 NMR および質量分析を行って頂き、貴重な御助言を頂きました北里大学薬学部共有機器室、佐藤倫子助教、長井賢一郎助教に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、立体構造の決定のための誘導体を合成して頂いた北里大学北里生命科学研究所生物有機化学研究室、廣瀬友靖准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、薬剤感受性出芽酵母の分与して頂いた筑波大学生命環境科学研究科臼井研究室、臼井健郎准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 生物機能制御化学研究室、三芳秀人教授、村井正俊准教授、運天優歩氏に心より御礼申し上げます。

本研究への助言、御協力頂いた北里大学生命科学研究所創薬グループの皆様ならびに京都大学大学院農学研究科生物機能制御化学研究室内の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. 植田芳夫ら、微生物機能の開発、京都大学学術出版会 (2008)
2. 大村智、上野芳夫、微生物薬品化学 改訂第4版、南江堂 (2005)
3. Newman DJ & Cragg GM, *J Nat Prod.*, **75**, 311–335 (2012).
4. World Health Organization (2010) The world health report 2008, Primary health care-Now more than ever, Chapter 1, p8.
5. Mitsuyama *et al.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **52** (2008).
6. 宮崎ら、深在性真菌症の診断・治療ガイドライン、協和企画 (2014).
7. 山口英世 モダンメディア 56巻6号 (2010).
8. Suga T, *et al.*, *J. Antibiot.* **68**, 649-652 (2015).
9. Watanabe Y, *et al.*, *J. Antibiot.* **71**, 146-148 (2018).
10. Suga T, *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **61**, 82-87 (2015).
11. Prasad R & Goffeau A, *Annu Rev Microbiol.*, **66**, 39–63 (2012).
12. 新見昌一 日本医真菌学会雑誌 51巻2号 79–86 (2010).
13. Watanabe Y, *et al.*, *J. Antibiot.* **70**, 395-399 (2017).
14. Rhodes A, *et al.*, *Nature* **192**, 952-954 (1961).
15. Yamaski H, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **78**, 2319–2321 (2015).
16. Maiese WM, *et al.*, *J. Antibiot.* **43**, 1059-1063 (1990).
17. Minami Y, *et al.*, *Tetrahedron lett.* **33**, 7373-7376 (1992).
18. Wallhaeusser KH, *et al.*, *Arzneimittelforschung* **14**, 356-360 (1964).
19. Levitch ME & Stadtman ER, *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 194-199 (1964).
20. Shimon JA & Bedalov A, *Nat Rev Cancer.*, **4**, 481–492 (2004).
21. Chinen T, Nagumo Y & Usui, T, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **60**, 160–162 (2014).
22. Sakai K, *et al.*, *J. Antibiot.*, **71**, 1031-1035 (2018).
23. Zhang F, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 5307–5314 (2012).
24. Sakai K, *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **81**, 1604–1609 (2018).
25. Ohtani I, Kusumi T, Kashman Y & Kakisawa H, *J Am Chem Soc.*, **113**, 4092–4096 (1991).
26. Zhan J, *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **70**, 227-232 (2007).
27. Traxler P, Gruner J & Auden JA, *J Antibiot.*, **30**, 289–296 (1977).
28. Traxler P, Fritz H & Richter WJ, *J Antibiot.*, **33**, 967–978 (1980).
29. Dávila T, San-Blas G & San-Blas F, *J Med Vet Mycol.*, **24**, 193–202 (1986).
30. Borra S, Kumar M, McNulty J, Baidilov D & Hudilicky T, *Eur. J. Org. Chem.*, 77–79 (2019).
31. Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J & Crous PW, *Stud. Mycol.*, **79**, 121–186 (2014).
32. Evidente A, Lanzetta R, Abouzeid MA, Corsaro MM, Mugnai L & Surico G, *Tetrahedron*, **50**,

- 10371–10378 (1994).
33. Cimmino A, et al., *J. Nat. Prod.*, **75**, 1130–1137 (2012).
 34. Andolfi A, *J. Nat. Prod.*, **78**, 623–629 (2015).
 35. Kim JC, Lee YW, Tamura H & Yoshizawa T, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1047–1050(1995).
 36. Jayasinghe L, Abbas HK, Jacob MR, Herath WH & Nanayakkara NP, *J Nat Prod.*, **69**, 439–442(2006).
 37. Sakai K, et al., *J. Antibiot.* **72**, 645-652 (2019).
 38. Shang Z, et al. *Org Biomol Chem.*, **13**, 7795–802 (2015).
 39. Kawai K, Suzuki T, Kitagawa A, Kim JC & Lee YW, *Cereal Res Commun.*, **25**, 325–326(1997).
 40. Molina JR, et al., *Nat Med.*, **24**, 1036–1046 (2018).
 41. Akaike T, et al., *Nat Commun.*, **8**, 1177 (2017).
 42. Köning T, Kapus A & Sarkadi B, *J Bioenerg Biomembr.*, **25**, 537–545 (1993).
 43. Quek NC, et al. *Mol Biosyst.*, **9**, 2125–2133 (2013).
 44. Altschul SF, et al., *Nucleic Acids, Res.*, **25**, 3389–3402 (1997).
 45. De Marcos Lousa C, Trézéguet V, Dianoux AC, Brandolin G & Lauquin GJ, *Biochemistry*, **41**, 14412–20 (2002).