

令和5年度

LC-MS 分析を指標にした真菌由来 21F121-A の発見と  
p53 野生型および欠失型の細胞を用いた細胞毒性物質の探索

熊本大学大学院 薬学教育部

医療薬学専攻

医療薬科学コース

天然薬物学分野

木村 一朗

# LC-MS-guided discovery of a new fungal metabolite, 21F121-A, and search for cytotoxic compounds using p53-wild type and p53-null HCT116 cells

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Department of Natural Medicines

Ichiro Kimura

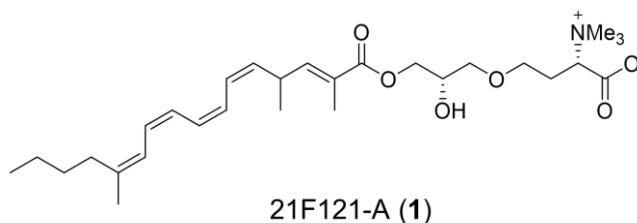
## Introduction

Microorganisms produce secondary metabolites that exhibit diverse biological activities, serving as biological defense substances and signal transducers. These compounds have long been used as valuable sources for drug discovery. More than half of the small molecule drugs are natural products or their derivatives. The development of new drug seeds from microorganisms requires the efficient strategy of new natural products, particularly those displaying unique biological activities.

In Chapter 1, LC-MS-guided discovery of a new secondary metabolite from the fungus collected in Kyushu was described. In Chapter 2, search for natural products that activate p53 and exhibit selective cytotoxicity against HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells was explained.

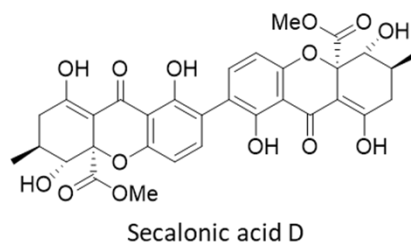
## Chapter 1. Isolation and structure determination of monoacylglyceryltrimethylhomoserine 21F121-A from *Penicillium glaucoroseum* (21F00121)

LC-MS measurement and data analysis led to the identification of a new secondary metabolites in the extract of the fungus *P. glaucoroseum* (21F00121) isolated from soil collected in Oguni, Kumamoto Prefecture. LC-MS-guided isolation afforded a new compound 21F121-A (**1**) with molecular formula of C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>6</sub>. The planar structure of **1** was determined by comprehensive analysis of NMR spectra, and **1** was revealed to be a new monoacylglyceryltrimethylhomoserine containing a 19-carbon branched pentaene chain. The absolute configurations of the chiral carbons of the betaine and glycerol units were determined by chemical reaction followed by ECD experiments. Compound **1** showed weak cytotoxicity with an IC<sub>50</sub> value of 40.3 μM against HCT116 cells<sup>1</sup>.



## Chapter 2. Search for fungal-derived cytotoxic compounds using p53-wild type and p53-null HCT116 cells.

The tumor suppressor protein p53 is often inactivated in certain cancer cells. Consequently, compounds capable of activating p53 in its inactivated state are promising as novel anticancer drug candidates, that selectively inhibiting the growth of p53 wild-type cancer cells. In this study, fungal extracts were evaluated for their cytotoxicity against HCT116 human colon cancer cells expressing wild-type p53 (HCT116 p53<sup>+/+</sup>) and p53 knockout HCT116 cells (HCT116 p53<sup>-/-</sup>) to identify natural products that activate p53 tumor suppressor function to inhibit the cancer growth. Of 1163 fungal rice culture extracts, 11 extracts showed selective cytotoxicity against HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells. Among the hits, a fungus 20F2002, isolated from tidal flat soil in Uto, Kumamoto Prefecture, was cultured, and cytotoxic compounds were purified from the extract. LC-MS analysis of the fractionated extract of the fungus indicated secalonic acid D as the bioactive substance. However, after purification, the compound inhibited the cell growth of both HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> to the same extent. The activity was thought to be indicated by secalonic acid D and several components in the extract.



### Summary

In Chapter 1, LC-MS-guided isolation of a novel fungal metabolite led to the identification of a new monoacylglyceryltrimethylhomoserine, 21F121-A, derived from the fungus *P. glaucoroseum*. The outcomes of this investigation affirm that employing LC-MS analysis is an effective strategy for the discovery of new natural products. In Chapter 2, a search for p53 activators was conducted using HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells. While the p53 activators that selectively inhibit HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells were not identified in this study, it is expected that the integration of the bioassay-guided and LC-MS-guided searches for natural products will lead to the discovery of new drug seeds in the future.

### Reference

1. [Kimura, I.](#); Hitora, Y.; Sadahiro, Y.; Kawahara, T.; Tsukamoto, S. *J. Nat. Med.* **2023**, *77*, 992-997.

## 略語

本文中において、以下の略語を使用した。

BzCl	benzoyl chloride
CDCl <sub>3</sub>	chloroform- <i>d</i>
COSY	correlation spectroscopy
d	doublet
dd	double doublet
D <sub>2</sub> O	deuterium oxide
DGCC	1,2-diacylglyceryl-3- <i>O</i> -carboxy-(hydroxymethyl)-choline
DGTA	1,2-diacylglyceryl-3- <i>O</i> -2'-(hydroxymethyl)-(N, N, N-trimethyl)- $\beta$ -alanine
DGTS	1,2-diacylglyceryl-3- <i>O</i> -4'-(N, N, N-trimethyl)-homoserine
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	dimethyl sulfoxide- <i>d</i> <sub>6</sub>
ECD	electronic circular dichroism
ESIMS	electronic ionization mass spectrometry
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
Fig.	figure
HCl	hydrochloric acid
HF	Hartree-Fock
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single bond correlation
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration
IR	infrared spectroscopy
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
m	multiplet
MMFF	Merck Molecular Force Field
MPLC	medium pressure liquid chromatography
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
<i>n</i> -BuOH	normal-butanol

<i>n</i> -hexane	normal-hexane
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
ODS	octadecyl silica gel
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine
RITA	2, 5-bis (5-hydroxymethyl-2-thienyl) furan
s	singlet
t	triplet
TDDFT	Time-dependent density functional theory
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolet spectroscopy

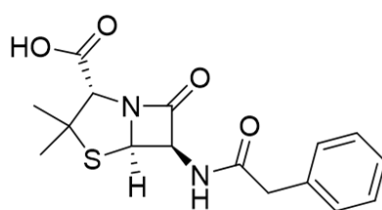
## 目次

	ページ
序論	1
本論	
第 1 章 真菌 <i>Penicillium glaucoroseum</i> (21F00121) から単離したモノアシルグリセリルトリメチルホモセリン 21F121-A の単離と構造決定	
1-1. 微生物エキストラライブラリの UPLC/TOF-MS 分析	6
1-2. <i>Penicillium glaucoroseum</i> (21F00121) の培養と分子ネットワーク分析	7
1-3. 化合物 1 の不安定性に関する検討	8
1-4. 化合物 1 の精製と構造解析	10
1-5. 化合物 1 の 2 次元 NMR スペクトルの解析	12
1-6. 化合物 1 の絶対立体配置の検討	18
1-7. 生物活性評価	22
1-8. 化合物 1 のリン制限下における産生量変化の検討と その他産生菌の探索	22
1-9. 小括	24
第 2 章 p53 野生型および欠失型の HCT116 細胞を用いた真菌由来細胞毒性物質の探索	
2-1. p53 活性化物質の発見を目指したスクリーニング構築の検討	26
2-2. HCT116 細胞を用いた微生物エキストラライブラリのスクリーニング	28
2-3. 真菌 20F2002 株の培養と目的化合物の精製	31
2-4. 化合物 4 の細胞増殖阻害試験	33
2-5. 小括	34
総括	36

実験の部	37
1. 使用機器	37
2. 使用試薬など	37
3. 第1章の実験項	40
3-1. 微生物エキスライブラリの UPLC/TOF-MS 分析	40
3-2. 菌の同定	40
3-3. 真菌の培養	40
3-4. 抽出と分離	40
3-5. 化合物 <b>1</b> の酸加水分解と加水分解物のベンゾイル化	41
3-6. モデル化合物 <b>2S</b> , <b>3''S-2</b> , <b>2R</b> , <b>3''S-2</b> の立体配座解析と ECD の計算	41
3-7. UPLC-HRMS/MS 分析と分子ネットワーク解析	42
3-8. 生物活性評価	42
3-8-1. 細胞増殖抑制活性試験	42
3-8-2. 抗菌活性試験	43
3-9. リン制限下における真菌の培養と抽出	43
3-10. 物理化学データ	43
4. 第2章の実験項	44
4-1. 1次スクリーニング	44
4-2. 2次スクリーニング	44
4-3. 3次スクリーニング	45
4-4. 活性画分の19分画	45
4-5. 真菌の培養	46
4-6. 抽出と分離	46
引用文献	47

## 序論

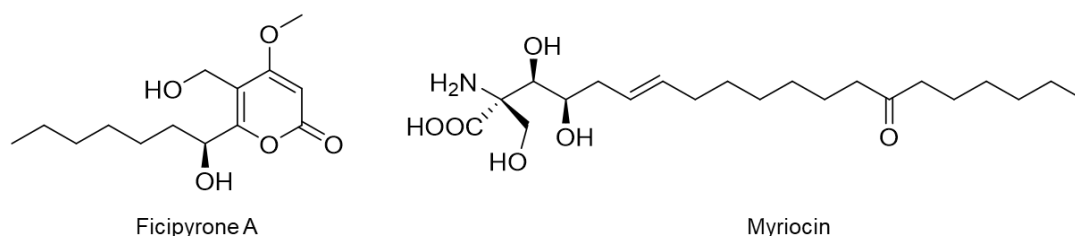
細菌や真菌などの微生物は、土壌や海洋をはじめとした様々な環境中に生息しており、地球上には  $10^{11}$ ~ $10^{12}$  種の微生物が生息すると推定されている<sup>1</sup>。微生物は、多様な二次代謝産物を産生することが知られており、アオカビの一種である真菌 *Penicillium notatum* からペニシリンが発見されて以降、今日に至るまで、微生物から数多くの生物活性物質が発見され、微生物由来の医薬品が開発されてきた (Fig. 1)。



Penicillin G

**Fig. 1.** Structure of penicillin G.

微生物は生体防御物質やシグナル伝達物質として二次代謝産物を産生すると考えられている。例えば、植物内生菌である *Pestalotiopsis fici* は、宿主である植物が病原菌等により損傷を受けた際に、抗菌物質である **ficipyron A** を産生し外敵を排除することで宿主ならびに自身の生育環境を維持している<sup>2</sup>。昆虫寄生菌である *Isaria sinclairii* は、免疫抑制物質である **myriocin** を産生しており、昆虫に寄生しやすくするために免疫抑制物質を産生することが考えられている<sup>3</sup> (Fig. 2)。



Ficipyron A

Myriocin

**Fig. 2.** Structures of ficipyron A and myriocin.

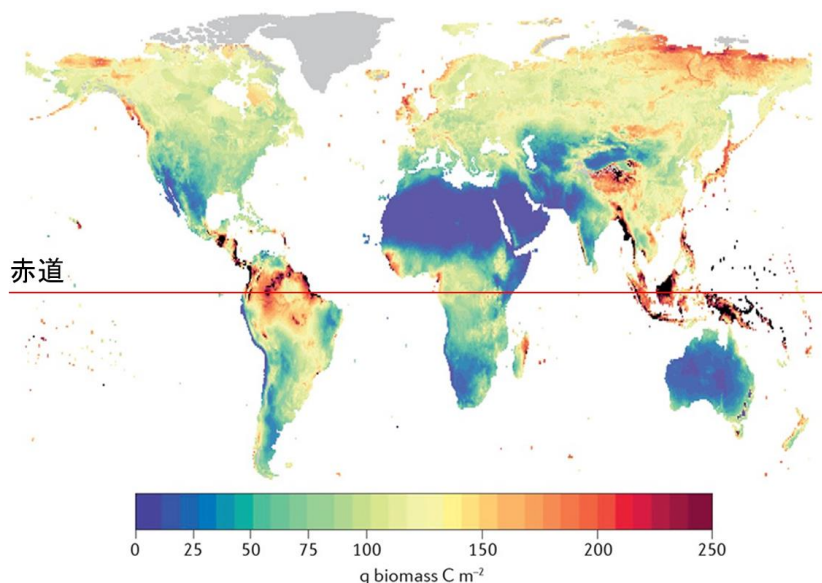
このように微生物は多様な生物活性を示す二次代謝産物を産生しており、それらは抗生物質をはじめ、抗がん剤や免疫抑制剤の開発において創薬シーズとして利用されている。実際に、現在使用されている低分子医薬品の 50% 以上が



天然物、または天然物に起源をもつ化合物であり<sup>4</sup>、微生物由来の天然物は創薬研究において重要な役割を果たしている<sup>5,6</sup>。天然物創薬において、天然物が占める独自のケミカルスペースを拡充することは新たな創薬シーズを供給するために重要であり、微生物由来の新規天然物の発見がもためられている。

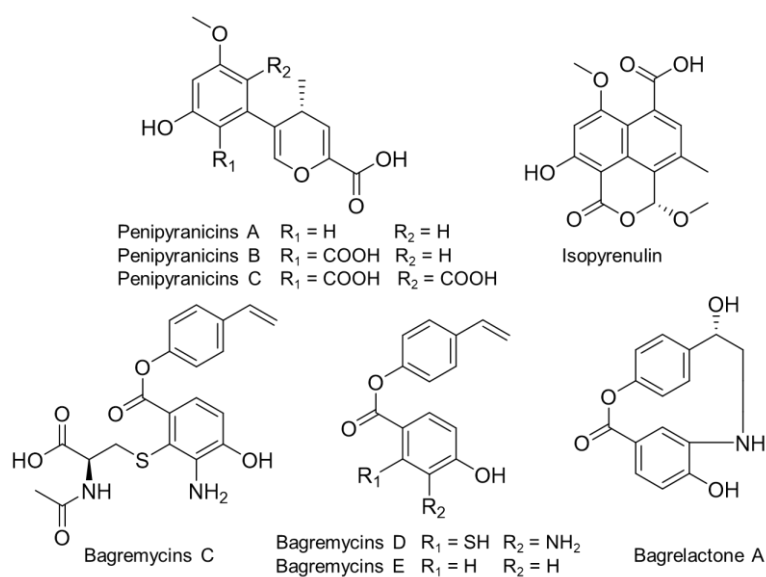
微生物の二次代謝産物の探索研究は、1950年代以降世界各地で盛んに行われてきたが、近年では新規化合物の発見は困難になってきている。その理由として、過去に培養や単離が容易な微生物からの成分探索が精力的に行われたため新規化合物の単離が難しくなっている点や、生物活性を指標としたスクリーニングでは既知の活性化合物にたどり着いてしまう点が挙げられる<sup>7</sup>。これらの問題を克服し、微生物から新規天然物を効率的に発見するためには、これまで成分探索が行われてこなかった微生物を対象にするとともに、過去に行われていない評価手法を用いる必要がある。

微生物由来の天然物の構造多様性は、生産者である微生物の種の多様性に比例する。そのため、これまで成分探索がされてこなかった未利用の微生物資源を活用することで、新規天然物の発見が期待される。これまでの研究で土壌微生物叢は、土壌のpHや気候、土壌中の利用可能な有機物の種類など土壌の場所や特性で変化しており、緯度が低いほど微生物の総量も多い傾向にあることが報告されている<sup>8</sup>(Fig. 3)。



**Fig. 3.** An estimation of how total soil microbial biomass varies across the globe.  
(文献 Fierer, N. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 579-590 から改変)

このように地理的あるいは環境的な要因により、土壌微生物の分布が異なることが知られている。また、特殊な環境下の土壌には、その他の土壌とは異なる種類の微生物が生息しているので、特殊環境に生息する微生物は二次代謝産物の成分探索がされていない微生物資源であると考えられる。実際にサウジアラビアの間欠泉の堆積物から採取した好熱性真菌 *Penicillium* sp. から新規化合物 penipyranicins A-C と isopyrenulin が単離されており<sup>9</sup>、中国のマングローブ林の土壌から採取した放線菌 *Streptomyces* sp. から新規化合物 bagremycins C-E と bagrelactone A が単離された<sup>10</sup> (Fig. 4)。

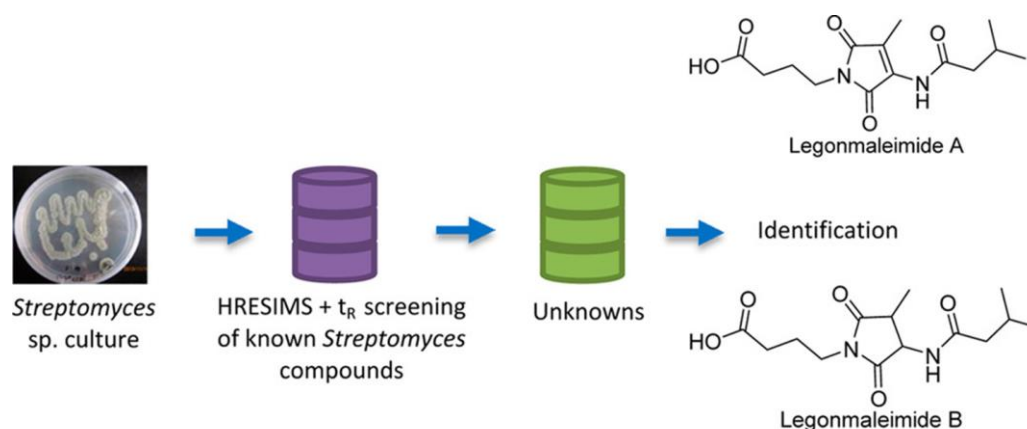


**Fig. 4.** Structures of new compounds isolated from unusual environments.

これらの背景から、当研究室では九州における特殊な自然環境に生息する微生物資源に着目した。九州には、世界でも珍しいカルデラ火山である阿蘇山や、火山噴出物で形成されたシラス台地、国内最大級の干潟である有明海や八代海など、多様な自然環境が存在する。そして、九州は本州よりも低緯度であるため年間を通して気温が高く降水量も多い傾向にある。このような自然環境のもと、九州各地で特殊な微生物叢が構築されていると考えられる。そこで当研究室では、『九州各地に生息する微生物は新規天然物の魅力的な探索源である』と考え、九州の多様な自然資源から単離した微生物エキスのライブラリを構築した。

また本研究では、独自に構築した微生物エキ斯拉イブラリから新規天然物を探索するために、LC-MS を用いた成分探索研究を実施した。従来の天然物探索研究では、エキスに含まれる成分を単離した後に構造を決定し、文献やデータベースを参照して新規化合物であるか判断する必要があった。しかし近年、LC-MS を用いた成分分析技術が発展したことで、LC-MS を用いた効率的かつ迅速な天

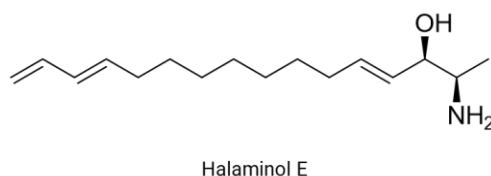
然物の探索研究が盛んに行われている<sup>11</sup>。Chervin らは放線菌 *Streptomyces* sp. のエキスを LC-MS によって分析し、得られた高分解能 MS データや HPLC の保持時間を指標としてデータベースと照合し既知化合物を同定した。さらに、データベースに情報が登録されていない新規化合物を効率的に検出することで、*Streptomyces albus* の変異株から新規化合物 legonmaleimide A, B を発見した<sup>12</sup> (Fig. 5)。



**Fig. 5.** Flow chart of the search for new compounds using LC-MS analysis.

(文献 Chervin, J. *et al. J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1370–1377 から引用)

Grkovic らは、天然物抽出エキスの自動分画システムを構築し、LC-MS をはじめとした各種スペクトル情報を統合した独自の天然物ライブラリを構築した。この自動分画システムでは、14 時間で 48 エキスを 1056 画分に分画し、ライブラリ化することができる。また、この研究では分画エキスライブラリの生物活性情報と LC-MS や NMR 等のスペクトル情報を集約することで網羅的かつ効率的な活性化合物の同定が可能となった。構築したシステムを用いることで、黒色腫や結腸がん細胞に対して細胞増殖阻害活性を示す新規化合物 halaminol E を発見した<sup>13</sup> (Fig. 6)。



**Fig. 6.** Structure of halaminol E.

このように LC-MS 分析を用いることにより、既知化合物を単離・構造決定することなく決定できるため、新規性の高い成分を効率的に探索することが可能となった。

そこで本研究では当研究室が構築した九州各地の土壌などから単離した微生物エキ斯拉イブラリを用いて、第 1 章においては、微生物エキスの LC-MS の測定データを解析することにより、エキスに含まれる新規化合物を見出し、化合物を単離・構造決定することで、効率的な新規天然物の発見を目指した。

第 2 章においては、がん抑制たんぱく質である p53 に着目し、p53 野生型の HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と p53 欠失型の HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いた細胞毒性試験を行ない、p53 の表現型の違いによる毒性評価を用いて、がん抑制活性を持つ天然物の発見を目指した。

## 本論

### 第1章 真菌 *Penicillium glaucoroseum* (21F00121) から単離したモノアシルグリセリルトリメチルホモセリン 21F121-A の単離と構造決定

#### 1-1. 微生物エキストラライブラリの UPLC/TOF-MS 分析

当研究室ではこれまで九州の各地で採取された微生物由来の新規二次代謝産物を探索するために、微生物エキストラライブラリを構築している<sup>14,15</sup>。それらのエキスを UPLC/TOF-MS で分析し、化合物の精密質量、UV 吸収、溶出時間などの情報を化合物データベースと照合することで、既知化合物の決定と新規化合物の予測を試みた。UPLC/TOF-MS 分析の結果、熊本県小国町の土壌から単離した真菌 21F00121 株 (*Penicillium glaucoroseum*, Fig. 7) を米培地で培養した際に、 $m/z$  506.3474  $[M+H]^+$  に、分子式が  $C_{29}H_{47}NO_6$  で 310 nm に特徴的な UV 吸収を示す化合物の産生が確認された (Fig. 8)。天然物辞典 (日本化学情報協会) の検索により物性情報が一致する化合物がなかったので、新規化合物の可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、この真菌が産生する二次代謝産物を探索した<sup>16</sup>。

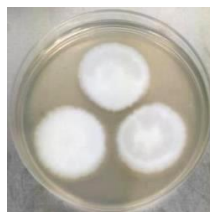


Fig. 7. *Penicillium glaucoroseum* (21F00121).

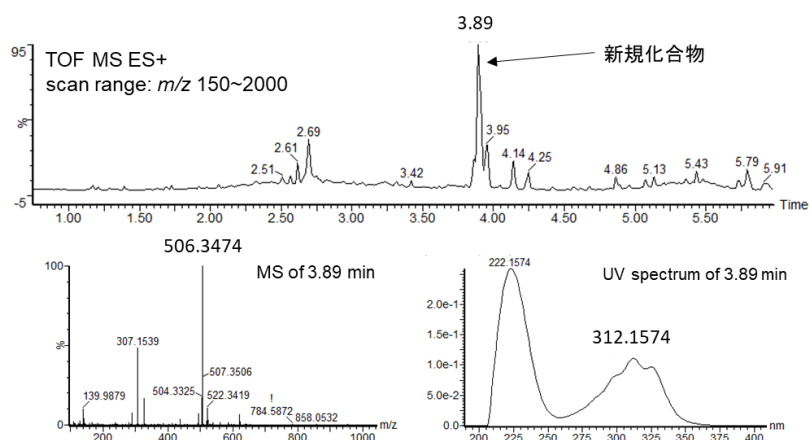


Fig. 8. UPLC/TOF-MS data of the extract of *Penicillium glaucoroseum* (21F00121).

## 1-2. *Penicillium glaucoroseum* (21F00121) の培養と分子ネットワーク分析

真菌 21F00121 株を米培地で培養したものを *n*-BuOH で抽出した。その抽出物を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O で液液分配し、*n*-BuOH 画分を減圧濃縮した後、*n*-hexane と 90% MeOH-H<sub>2</sub>O でさらに分配した。得られた 90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分を UPLC/TOF-MS を用いて分析し、MS/MS スペクトルを取得し、分子ネットワークを構築した (Fig. 9)。MS および MS/MS データは、ポジティブイオンモードを使用して取得した。図中の各ノードは LC-MS 測定によって検出された化合物を示しており、それぞれのノードの大きさは検出されたプリカーサーイオンのイオン強度に比例する。類似した MS/MS スペクトルのパターンを示した化合物同士は直線で繋がっており、クラスターを形成している。橙色のノードで示した化合物 **1** は、新規化合物と予想された化合物で、緑色のノードで示された各成分は化合物 **1** と類似した構造を有する類縁体であると考えられる。21F00121 株のエキス成分の分子ネットワークの解析により、21F00121 株は新規化合物 **1** ならびにその類縁体と予想される様々な化合物を産生することが明らかになった。

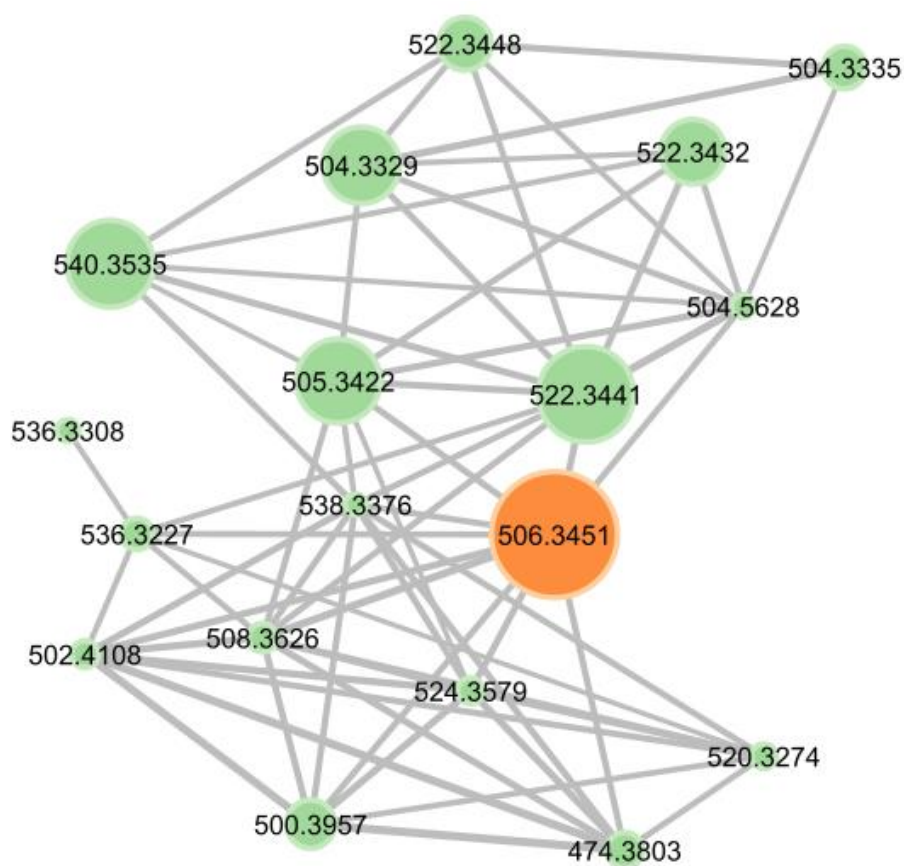


Fig. 9. Molecular cluster containing **1**.

### 1-3. 化合物 1 の安定性に関する検討

真菌 21F00121 株の米培養物を液液分配して得られた 90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分を逆相 MPLC 並びに逆相 HPLC で分画し、化合物 1 を単離したが、LC-MS や <sup>1</sup>H NMR スペクトルから、単離した翌日には化合物が分解していることが分かった (Fig. 10, 11)。化合物が不安定である原因を検討するために、精製直後に測定した <sup>1</sup>H NMR スペクトルと 1 日後に測定した <sup>1</sup>H NMR スペクトルを比較した。精製直後に測定したスペクトル中には、5-7 ppm 付近にポリエン由来と考えられるシグナルが確認できたが、翌日に測定したスペクトルでは該当部分のシグナルが消失していた (Fig. 11)。このことから化合物 1 はポリエン部分が光に対して不安定であると考え、化合物 1 の光に対する安定性を評価した。

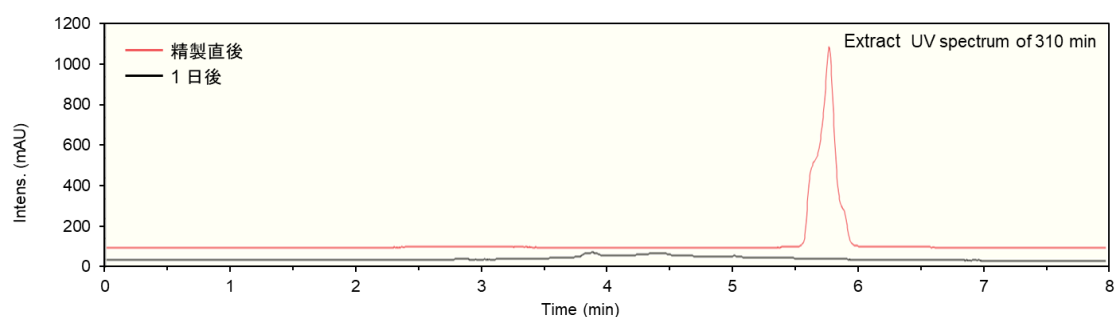


Fig. 10. LC-MS analysis of 1 measured immediately after purification and after 1 day.

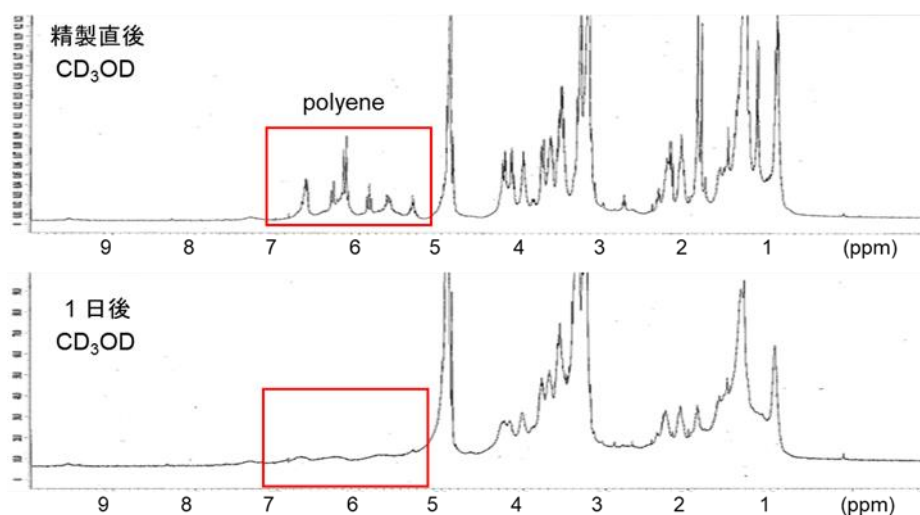
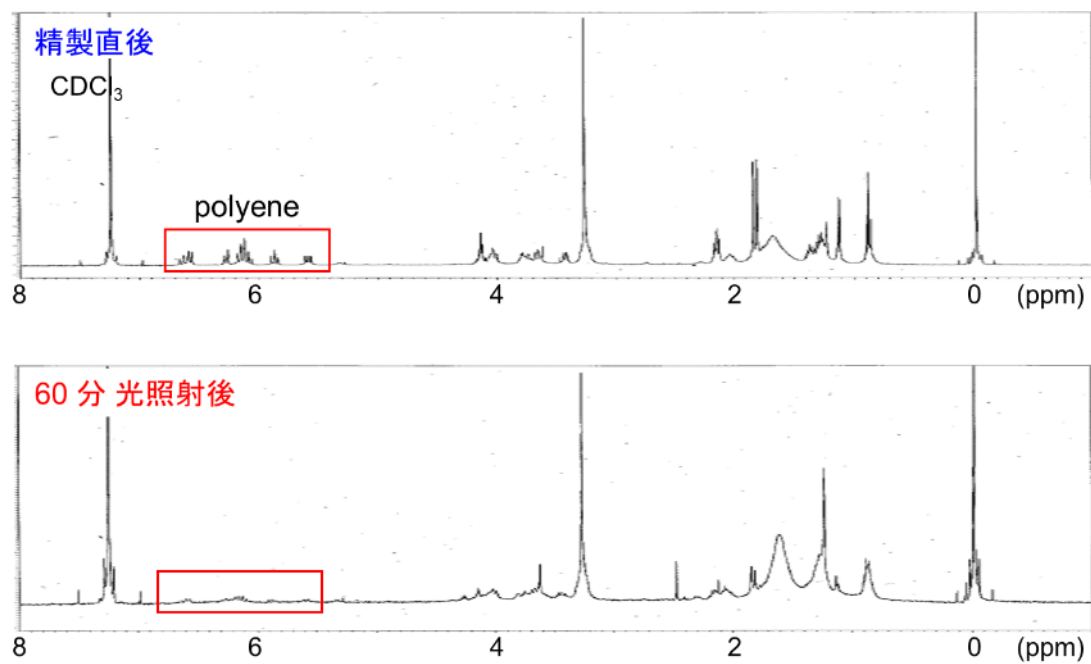


Fig. 11. <sup>1</sup>H NMR spectra of 1 measured immediately after purification and after 1 day.

化合物 **1** (1 mg) を乾固した状態で光を照射し、1 時間後に  $\text{CDCl}_3$  (400  $\mu\text{L}$ ) に溶解させ、 $^1\text{H}$ NMR スペクトルを測定した。その結果、化合物 **1** は光照射により 1 時間以内に分解することが分かった (Fig. 12)。このことから、化合物 **1** を遮光した状態で精製するとともに、単離後すぐにスペクトルを測定し構造決定した。



**Fig. 12.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of **1** measured immediately after purification and after exposure to light.



#### 1-4. 化合物 1 の精製と構造解析

真菌 21F00121 株を米培地で培養したものを *n*-BuOH で抽出し、液液分配することで *n*-hexane 画分と 90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分、H<sub>2</sub>O 画分を得た。LC-MS による分析により 90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分に化合物 **1** が検出されたので、この画分を ODS MPLC および ODS HPLC で精製し、化合物 **1** (3.7 mg) を得た。化合物 **1** は茶色の粉末として得られ、21F121-A (**1**) と命名した。高分解能質量分析により、*m/z* 506.3474 [M+H]<sup>+</sup> に水素付加体の分子イオンピークが観測されたので、分子式は C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>6</sub> であると決定した。UV スペクトルでは共役系を持つ化合物に特徴的な 310 nm および 324 nm に極大吸収を示した (Fig. 13)。25 °C で <sup>1</sup>H NMR スペクトルを測定したところ、 $\delta_{\text{H}}$  5.68 から  $\delta_{\text{H}}$  6.72 にかけて 8 つのオレフィンプロトンが観測された。また、 $\delta_{\text{H}}$  3.31 (m, H-4'), 3.34 (m, H-3), 3.41 (m, H-3), 3.45 (2H, m, H<sub>2</sub>-3''), 3.50 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H<sub>2</sub>-1''), 3.84 (2H, m H<sub>2</sub>-2), 3.98 (dd, *J* = 11.0 and 6.3 Hz, H-1), 4.07 (dd, *J* = 11.0 and 6.3 Hz, H-1) にメチレンあるいはメチンのシグナル、 $\delta_{\text{H}}$  3.08 (s, 9H) にヘテロ原子に結合したメチル基 3 つ分のシグナル、 $\delta_{\text{H}}$  0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, H<sub>3</sub>-16') および  $\delta_{\text{H}}$  1.10 (d, *J* = 6.7 Hz, H<sub>3</sub>-18') にメチル基のシグナル、 $\delta_{\text{H}}$  1.79 (s, H<sub>3</sub>-19'), 1.81 (d, *J* = 1.2 Hz, H<sub>3</sub>-17') に 2 種類の二重結合上のメチル基のシグナルが観測された。 $\delta_{\text{H}}$  3.08 (s, 9H) の化学シフトの値やシグナルの積分値はメチル基 3 つ分に相当していること、また <sup>13</sup>C NMR の化学シフトが  $\delta_{\text{C}}$  50.6 であったことから、トリメチルアンモニウム構造を有することが示唆された (Fig. 14, 15)。

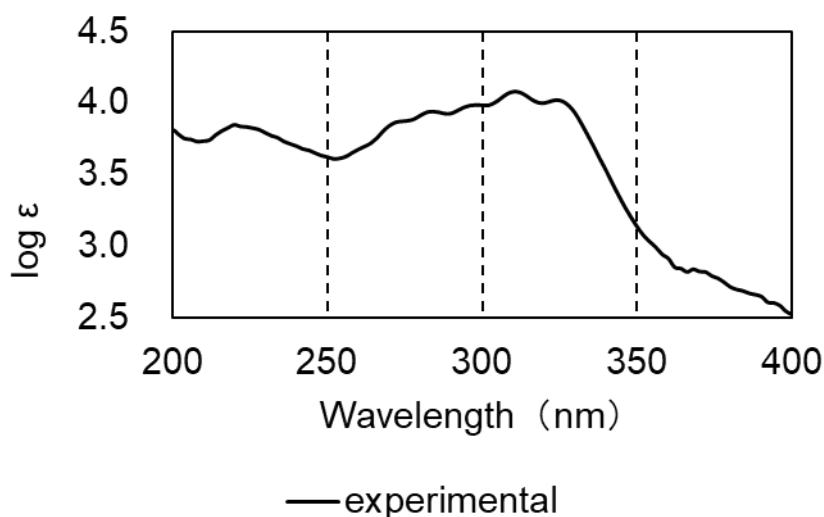


Fig. 13. UV spectrum of **1** in MeOH.

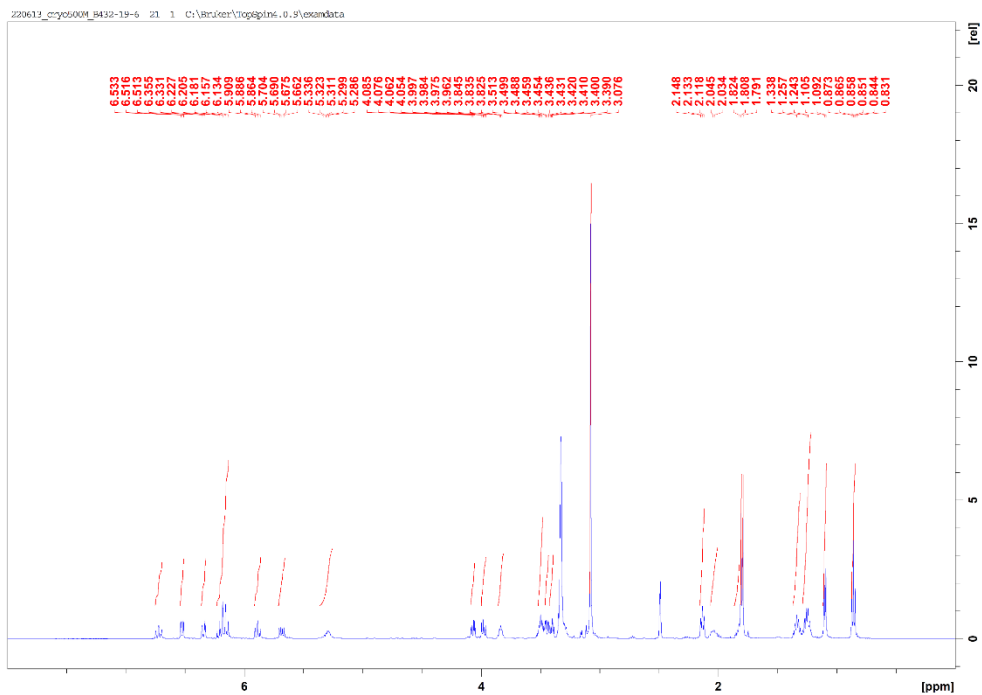


Fig. 14.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in  $\text{DMSO-}d_6$ .

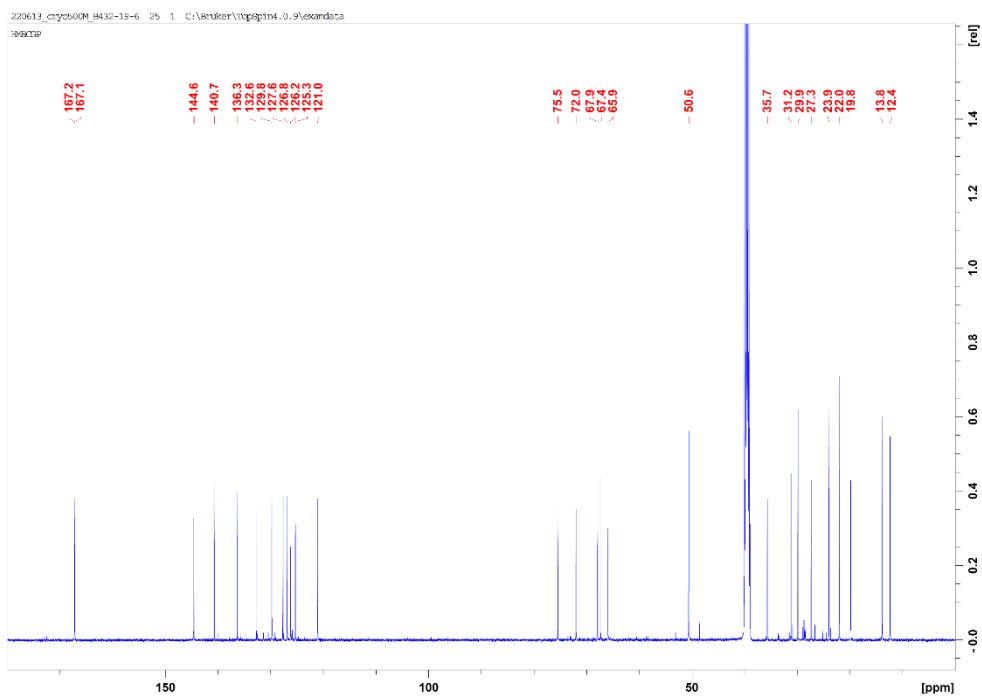


Fig. 15.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** in  $\text{DMSO-}d_6$ .

## 1-5. 化合物 1 の 2 次元 NMR スペクトルの解析

COSY スペクトルを解析したところ、H-3' ( $\delta_{\text{H}} 6.53$ ) から H-11' ( $\delta_{\text{H}} 6.34$ ) につながるスピンの存在が明らかになり、C-4'位にメチル基 (18'-Me) が存在することが分かった。また、H<sub>2</sub>-13' ( $\delta_{\text{H}} 2.13$ ) から H<sub>3</sub>-16' ( $\delta_{\text{H}} 0.86$ ) につながるブチル基の存在が明らかとなった。また H-17' ( $\delta_{\text{H}} 1.81$ ) から C-1' ( $\delta_{\text{C}} 167.2$ ), C-2' ( $\delta_{\text{C}} 126.2$ ), C-3' ( $\delta_{\text{C}} 144.6$ ) への HMBC 相関と H-19' ( $\delta_{\text{H}} 1.79$ ) から C-11' ( $\delta_{\text{C}} 121.0$ ), C-12' ( $\delta_{\text{C}} 140.7$ ), C-13' ( $\delta_{\text{C}} 31.2$ ) への HMBC 相関から部分構造 A の存在が示された。なお、二重結合の幾何異性は、結合定数の値が  $^3J_{\text{H-5}', \text{H-6}'} = 13.8 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H-7}', \text{H-8}'} = 13.5 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H-9}', \text{H-10}'} = 11.5 \text{ Hz}$  であったことから C-5', C-7', C-9' の二重結合はそれぞれ Z 配置と決定した。また、H-10' ( $\delta_{\text{H}} 6.16$ ) と H<sub>2</sub>-13' ( $\delta_{\text{H}} 2.13$ )、H-11' ( $\delta_{\text{H}} 6.34$ ) と H<sub>3</sub>-19' ( $\delta_{\text{H}} 1.79$ ) の NOESY 相関から C-11' の二重結合も Z 配置と決定した。二重結合上のメチル基の  $^{13}\text{C}$  NMR の化学シフトは二重結合の幾何異性によって異なる値を取ることが知られており、二重結合が Z 配置であれば 20 ppm 以上、E 配置であれば 20 ppm 以下となる<sup>17</sup>。C-2' の二重結合は、17' 位のメチル基の  $^{13}\text{C}$  NMR の化学シフトが  $\delta_{\text{C}} 12.4$  と高磁場であることから E 配置と決定した (Fig. 16)。

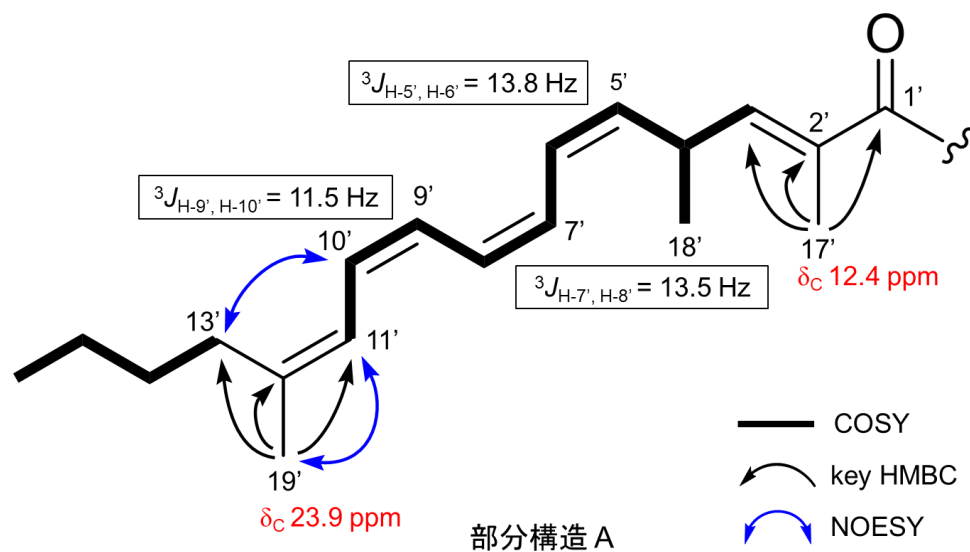


Fig. 16. COSY, HMBC, and NOESY correlations of substructure A in 1.

H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_{\text{H}}$  3.98, 4.07) から H<sub>2</sub>-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.34, 3.41) の COSY 相関と <sup>13</sup>C NMR の化学シフトの値が C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  65.9), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  67.4), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  72.0) を示したことから部分構造 B はグリセロール構造を持つことが分かった (Fig. 17)。

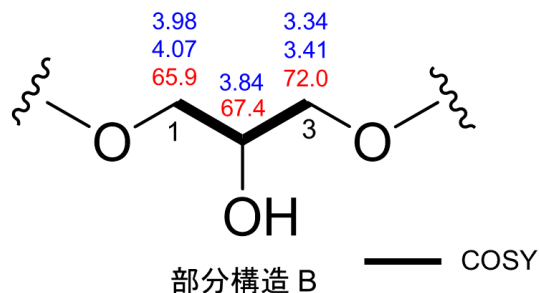


Fig. 17. COSY correlations of substructure B in 1.

COSY スペクトルから、H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.50)/H-2'' ( $\delta_{\text{H}}$  1.83, 2.04)/H<sub>3</sub>-3'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.45) の部分構造の存在が明らかとなった。さらに H-3'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.45) から N-CH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  50.6), C-4'' ( $\delta_{\text{C}}$  167.1) への HMBC 相関から部分構造 C はトリメチルアミン構造を有するホモセリンであると決定した (Fig. 18)。

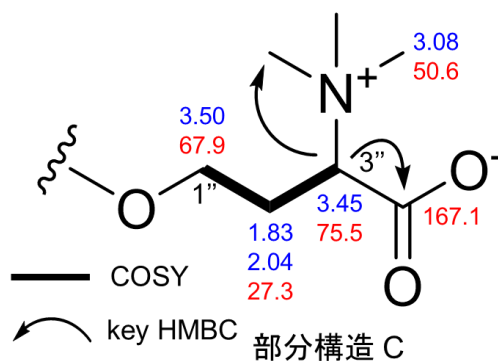


Fig. 18. COSY and HMBC correlations of substructure C in 1.

H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_{\text{H}}$  3.98, 4.07), H<sub>3</sub>-17' ( $\delta_{\text{H}}$  1.81) から C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  167.2) への HMBC 相関が観測されたことから、部分構造 A と部分構造 B がエステルを介して結合していることが分かった。また、H<sub>2</sub>-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.34, 3.41) から C-1'' ( $\delta_{\text{C}}$  67.9) への HMBC 相関から部分構造 B と部分構造 C がエーテルを介して結合していることが明らかとなった (Fig. 19)。以上の解析により、化合物 **1** はペンタエン構造を含む炭素数 19 の分枝鎖を有するモノアシルグリセリルトリメチルホモセリンであることが分かった。

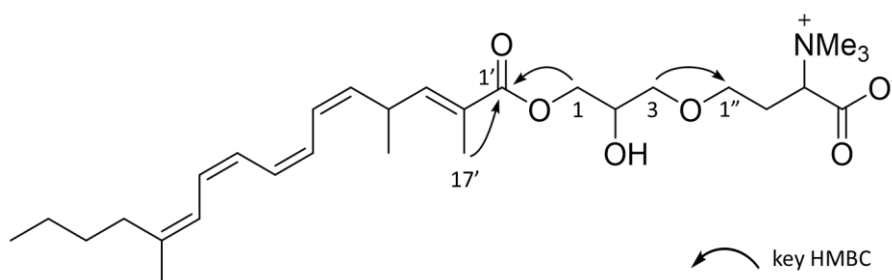
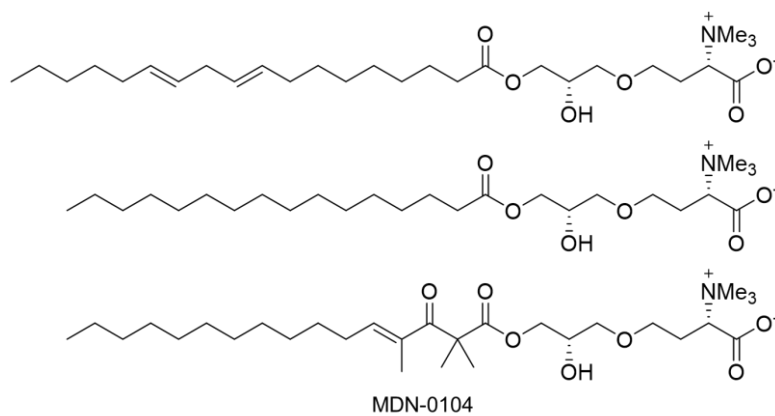
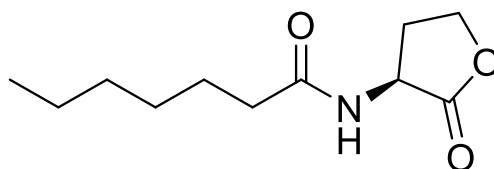


Fig. 19. HMBC correlations of **1**.

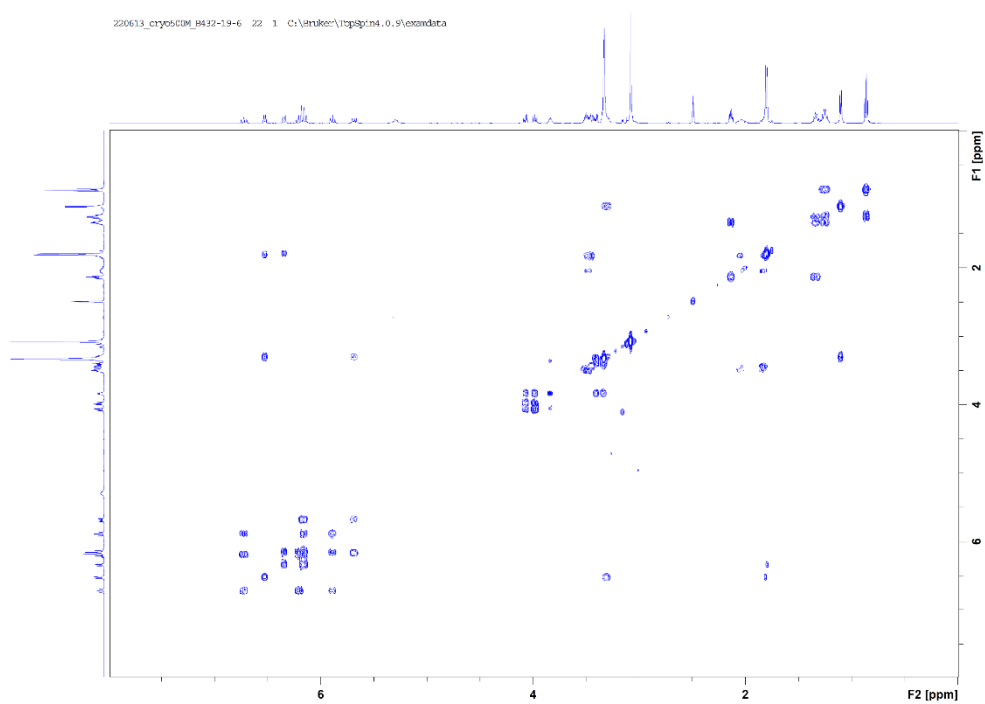
ベタイン構造を有するグリセロ脂質はベタイン脂質と呼ばれ、*Candida* 属や *Pichia* 属などの真菌において細胞膜構成脂質として知られている<sup>18</sup>が、本研究で見出したモノアシル構造を有するベタイン脂質は報告例が極めて少なく、初めての報告は緑藻 *Ulva fasciata* からの発見であった<sup>19</sup> (Fig. 20)。また、真菌 *Heterospora chenopodii* から初めて単離された MDN-0104 は、IC<sub>50</sub> 値 7.0  $\mu\text{M}$  で抗マラリア活性を示した<sup>19</sup>。本研究で見出した化合物 **1** は、真菌から発見されたモノアシルグリセリルトリメチルホモセリン構造を有する天然物としては MDN-0104 に次いで 2 例目の報告となる。これまでに細菌 *Pantoea ananatis* Serrano では炭素数が奇数のアシル鎖を持つ (*S*)-*N*-Heptanoylhomoserine lacton などの報告<sup>20</sup>があるが、化合物 **1** はアシル基として炭素数 19 の分枝鎖を有しており、真菌から同様の構造を有する化合物は報告例がなく、その点において化合物 **1** は珍しい構造である (Fig. 21)。



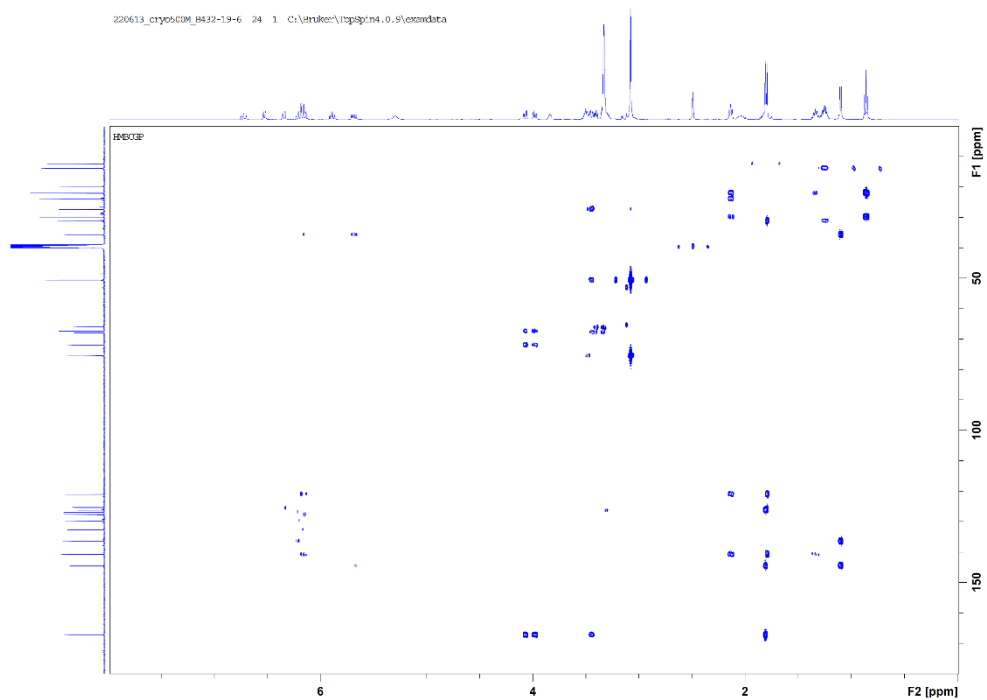
**Fig. 20.** Structure of two monoacylglyceryltrimethylhomoserines and MDN-0104.



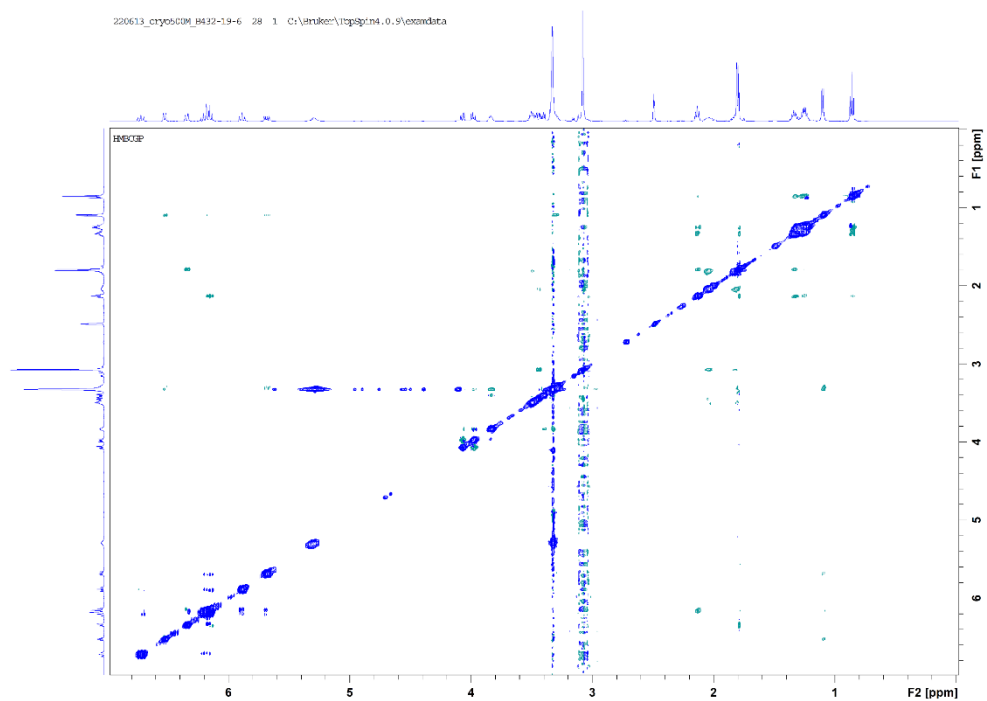
**Fig. 21.** Structure of (*S*)-*N*-heptanoylhomosericine lactone.



**Fig. 22.** COSY spectrum of **1** in DMSO- $d_6$ .



**Fig. 23.** HMBC spectrum of **1** in DMSO- $d_6$ .



**Fig. 24.** NOESY spectrum of **1** in DMSO- $d_6$ .

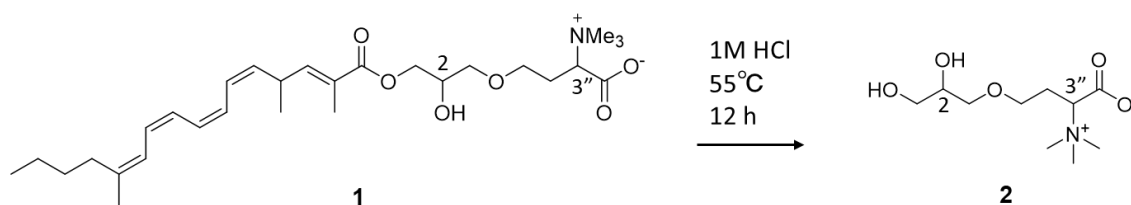
**Table 1.** NMR Data of **1** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Pos.	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)	HMBC
1	65.9, CH <sub>2</sub>	3.98, dd (11.0, 6.3) 4.07, dd (11.0, 4.7)	2, 3, 1' 2, 3, 1'
2	67.4, CH	3.84, m	1, 3
3	72.0, CH <sub>2</sub>	3.34, m 3.41, m	1, 2, 1'' 1, 2, 1''
1'	167.2, C		
2'	126.2, C		
3'	144.6, CH	6.53, dd (9.6, 1.2)	1', 2', 4', 5', 17', 18'
4'	35.7, CH	3.31, m	2', 3', 5', 18'
5'	136.3, CH	5.68, dd (13.8, 6.9)	3', 4', 18'
6'	129.8, CH	6.18, m	4', 7', 8'
7'	132.6, CH	6.21, m	5', 6', 9',
8'	127.6, CH	6.72, dd (13.5, 11.0)	9'
9'	126.8, CH	5.89, dd (11.5, 11.0)	7', 8', 11'
10'	125.3, CH	6.16, m	8', 9', 11', 12'
11'	121.0, CH	6.34, d (11.9)	9', 10', 12', 19'
12'	140.7, CH		
13'	31.2, CH <sub>2</sub>	2.13, t (7.5)	11', 12', 14', 15', 19'
14'	29.9, CH <sub>2</sub>	1.34, m	12', 13', 15', 16'
15'	22.0, CH <sub>2</sub>	1.25, m	13', 14', 16'
16'	13.8, CH <sub>3</sub>	0.86, t (6.7)	14', 15'
17'	12.4, CH <sub>3</sub>	1.81, d (1.2)	1', 2', 3'
18'	19.8, CH <sub>3</sub>	1.10, d (6.7)	3', 4', 5'
19'	23.9, CH <sub>3</sub>	1.79, s	11', 12', 13'
1''	67.9, CH <sub>2</sub>	3.50, t (6.2)	3, 2'', 3''
2''	27.3, CH <sub>2</sub>	1.83, m 2.04, m	1'', 3'', 4'' 3'', 4''
3''	75.5, CH	3.45, m	1'', 2'', 4'', <i>N</i> -CH <sub>3</sub>
4''	167.1, C		
2-OH	5.30		
<i>N</i> -CH <sub>3</sub>	50.6, CH <sub>3</sub>	3.08, s	3''



## 1-6. 化合物 1 の絶対立体配置の検討

C-3''の絶対立体配置を決定するために化合物 **1** を酸加水分解し、グリセリルトリメチルホモセリン **2** を得た (Scheme 1, Fig. 25)。化合物 **2** の ECD スペクトルを測定したところ、210 nm 付近に正のコットン効果を示した。グリセロール部分の不斉炭素に結合している官能基には発色団が存在せず、C-2 位のキラリティは ECD スペクトルに影響しないと考えられるので、C-3''位の絶対立体配置は *S* であることが予想された<sup>21</sup> (Fig. 26)。そこで、C-2 位の絶対立体配置が ECD スペクトルに影響するか否かを確認するため、Spartan'20 によりモデル化合物 2*S*,3''*S*-**2** と 2*R*,3''*S*-**2** の ECD スペクトルを計算したが、予想通り影響しないことがわかった。この結果は、C-3''の絶対立体配置が *S* であることを支持している。



Scheme 1. Acid hydrolysis of **1**.

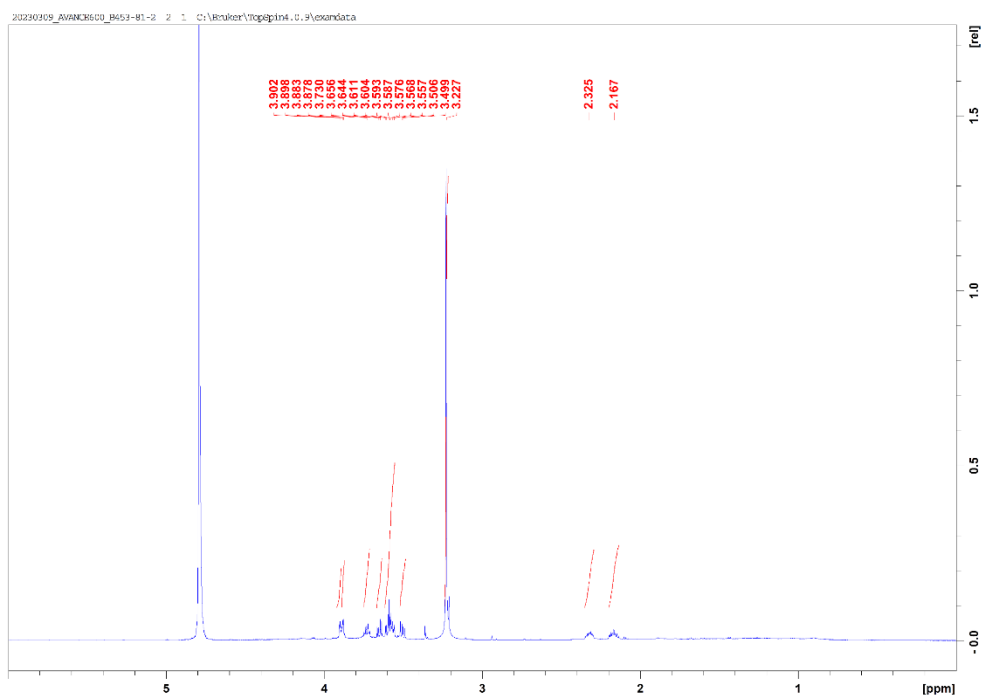
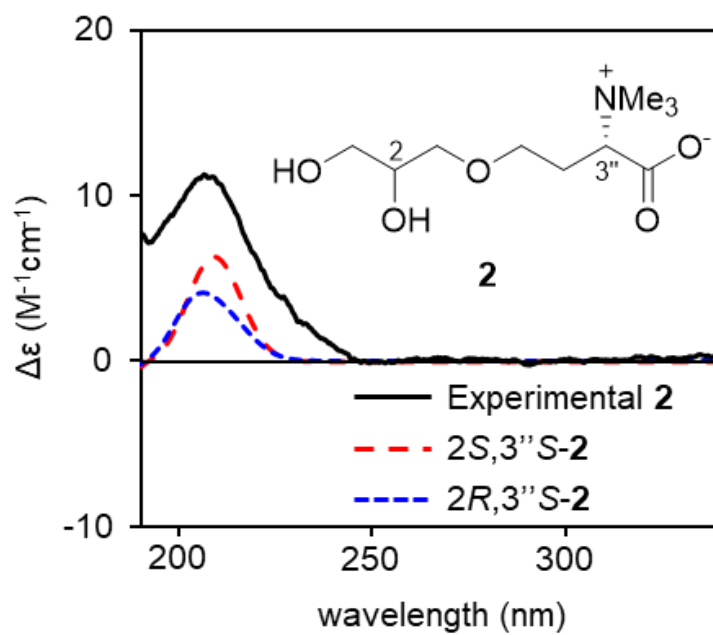
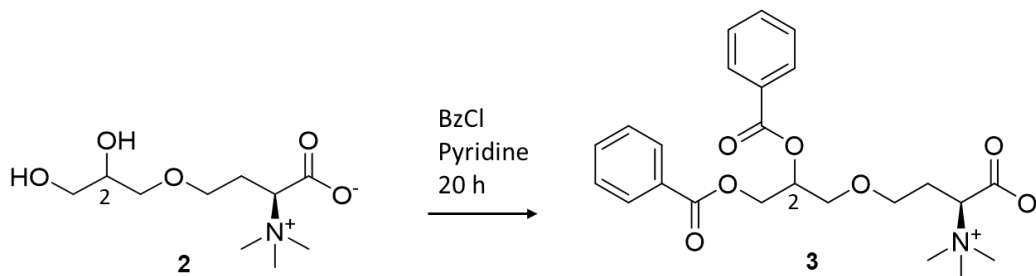


Fig. 25. <sup>1</sup>H NMR spectrum of **2** in D<sub>2</sub>O.

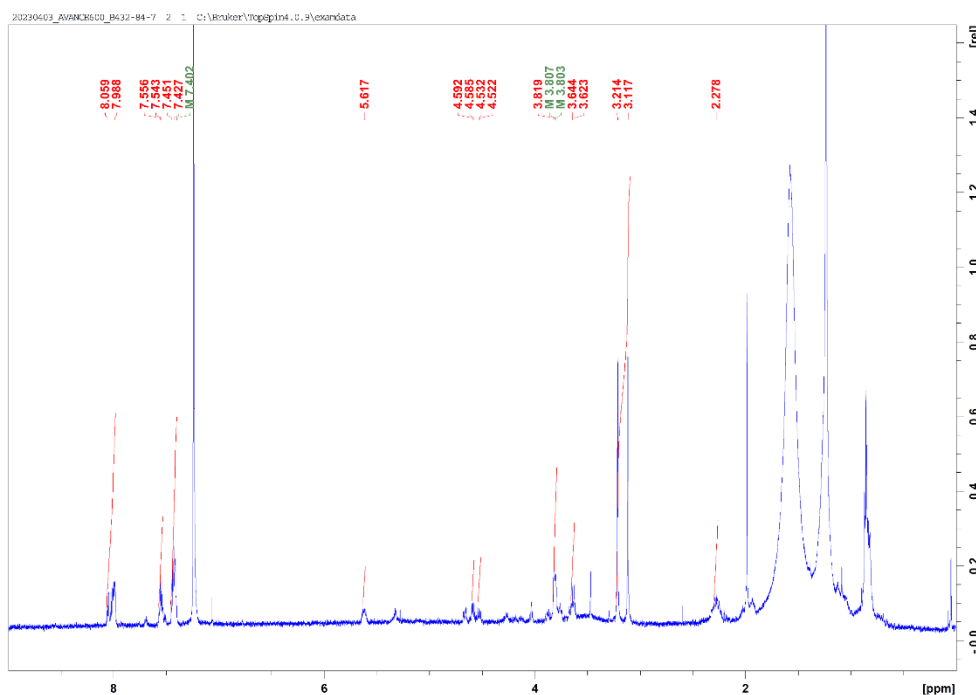


**Fig. 26.** ECD spectrum of **2** in H<sub>2</sub>O and calculated spectra of  $2S,3''S$ - and  $2R,3''S$ -**2**.

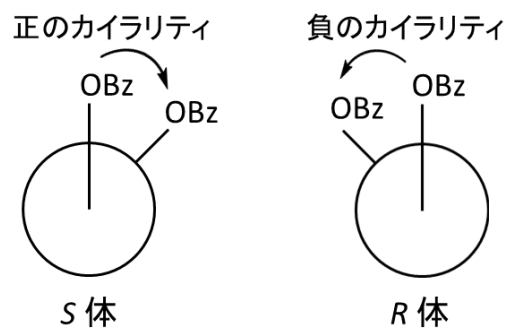
次にグリセロール部分の C-2 位の絶対立体配置を決定するため、化合物 **2** をベンゾイルエステル化し、化合物 **3** を得た (Scheme 2, Fig. 27)。ジオールのジベンゾエイトは、236 nm 付近 (第一コットン効果) と 220 nm 付近 (第二コットン効果) に符号の相反するコットン効果を示すことが知られている<sup>22</sup>。S 体であれば第一コットン効果は正の吸収を示し、R 体であれば第一コットン効果は負の吸収を示す (Fig. 28)。化合物 **3** の ECD スペクトルを測定した結果、第一コットン効果である 236 nm で正の吸収、220 nm で負の吸収を示したので、C-2 の絶対立体配置は S と決定した (Fig. 29)。また、Spartan'20 によりモデル化合物 2S-**3** と 2R-**3** の ECD スペクトルを計算し、実測値と計算値を比較したところ、実測値はモデル化合物 2S-**3** の計算値と同様の吸収パターンを示したため C-2 の絶対立体配置が S であることを更に支持した (Fig. 29)。



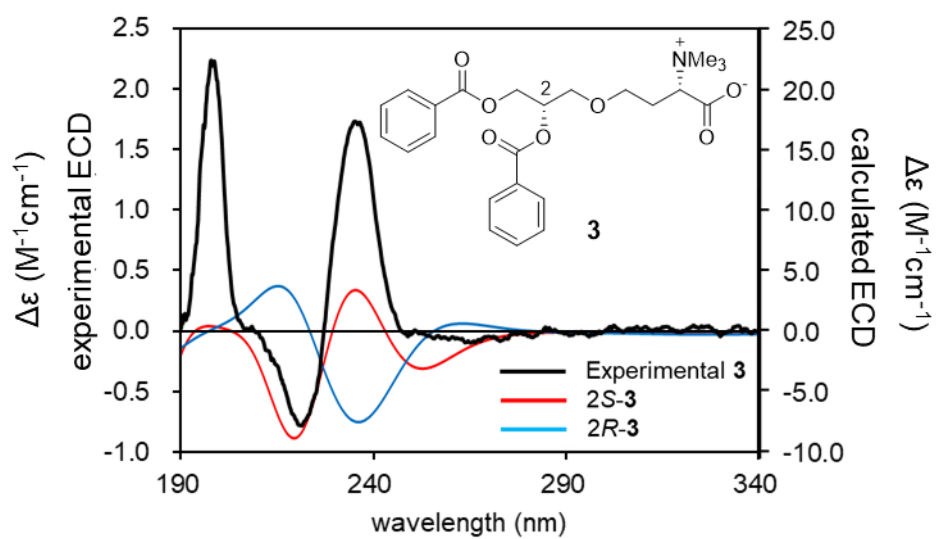
**Scheme 2.** Benzoylation of **2**.



**Fig. 27.** <sup>1</sup>H NMR spectrum of **3** in CDCl<sub>3</sub>.



**Fig. 28.** Cotton effects observed in dibenzoate.



**Fig. 29.** ECD spectrum of **3** in  $CH_3CN$  and calculated spectra of 2S- and 2R-**3**.

## 1-7. 生物活性評価

化合物 **1** の細胞毒性と抗菌活性を評価した。化合物 **1** は HCT116 細胞 (ヒト結腸がん細胞) に対して IC<sub>50</sub> 値 40.3 μM で弱い毒性を示した。*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* に対する抗菌活性を評価したが、50 μM で活性を示さなかった。

## 1-8. 化合物 **1** のリン制限下における産生量変化の検討とその他産生菌の探索

*P. glaucoroseum* (21F121) は LC-MS 分析の結果から化合物 **1** を主成分として産生していることが考えられたため、化合物 **1** は菌体において何らかの重要な機能を果たしていると予想した。一般的に、分子内にベタイン構造を有するグリセロ脂質はベタイン脂質と呼ばれ、1, 2-diacylglyceryl-3-*O*-4'-(*N,N,N*-trimethyl)-homoserine (DGTS)、1, 2-diacylglyceryl-3-*O*-2'-(hydroxymethyl)-(*N,N,N*-trimethyl)-β-alanine (DGTA)、および 1, 2-diacylglyceryl-3-*O*-carboxy-(hydroxymethyl)-choline (DGCC) と呼ばれる 3 つのグループに大別される<sup>23, 24</sup> (Fig. 30)。DGTS は藻類、地衣類、コケ類、シダ類、菌類に分布する膜脂質の一種で、低温、リン酸欠乏、窒素制限などの様々なストレスへの適応に重要な役割を果たしている<sup>18, 25-30</sup>。また、*Candida* 属や *Pichia* 属などの真菌ではリン制限化において、ホスファチジルコリン (PC) の産生量を減少させ、DGTS の産生量を増加させることで膜構成脂質をホスファチジルコリンから DGTS へと変換し、細胞内のリン酸量を調節することが報告されている<sup>18</sup>。化合物 **1** はジアシル構造ではなくモノアシル構造であるが、DGTS と同様にリン制限下において産生量が増加するか検討した。

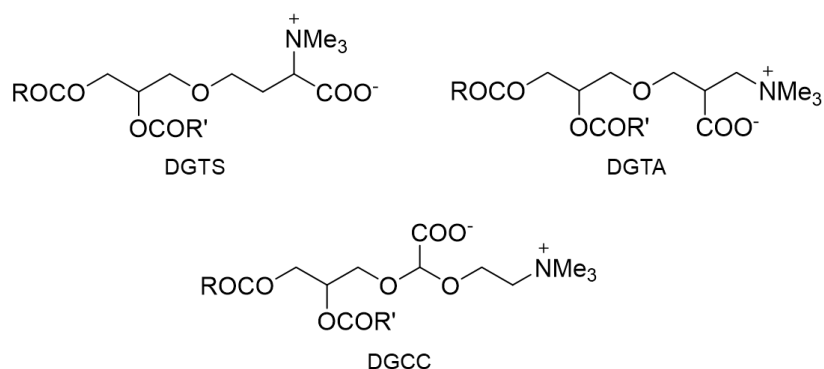
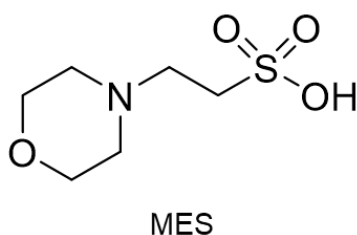


Fig. 30. Structures of DGTS, DGTA and DGCC.

リンが豊富に存在する培地としてフォーゲル・ジョンソン寒天培地を用いた。一方、リン欠乏条件としてフォーゲル・ジョンソン培地に含まれるリン酸をモルホリンエタンスルホン酸 (MES) (Fig. 31) で置換したフォーゲル・ジョンソン寒天培地を用いた。それぞれの培地を用いて *P. glaucoroseum* を 3 週間培養した後

に、菌体を MeOH で抽出し、エキスを LC-MS により分析した。分析結果を  $m/z$  506 の抽出イオンクロマトグラムで書き出したところ、リン存在下で培養した場合（赤線）とリン制限下で培養した場合（黒線）のどちらにおいても検出されるイオン強度に差は認められず、化合物 **1** の産生量に変化がないことが示された (Fig. 32)。このことから化合物 **1** はリン欠乏状態に適応するために産生された成分ではないことが示唆された。しかし、真菌の培養に用いる標準的な培地である麦芽エキス寒天培地に比べてフォーゲル・ジョンソン寒天培地では菌の生育が悪かったことから、*P. glaucoroseum* の培養実験には適さなかった可能性が考えられた。そのため、リンと化合物 **1** の産生量の関係を明確にするためには、別な培地を用いた検討が必要と考えられる。

また、化合物 **1** は *Candida* 属や *Pichia* 属などの真菌の膜構成脂質として知られているベタイン脂質<sup>18</sup> と共通した構造を有することから、化合物 **1** は様々な真菌において共通して産生される化合物であるか検討した。まず、微生物エキ斯拉イブラリの LC-MS 分析結果をもとに、化合物 **1** を産生することが示唆された 21F00121 株以外の菌株を選抜し、菌株を再度培養しエキスを調製した。そしてエキス成分を LC-MS を用いて分析したところ、熊本県小国町で採取した真菌 21F00103 株 (Fig. 33) も化合物 **1** を産生することが分かった。21F00103 株は 21F00121 株とは培養した際の形態的特徴が異なっていたことから、*P. glaucoroseum* とは異なる菌種であると考えられた。そこで 21F00103 株の遺伝子情報をもとに種同定を試みたところ、*P. glaucoroseum* またはその近縁種である *Penicillium* 属の真菌であることが示唆され、21F00121 株と同一種または近縁種であることが分かった。以上の結果から化合物 **1** は *P. glaucoroseum* またはその近縁種が特異的に産生する可能性が考えられた。



**Fig. 31.** Structure of MES.

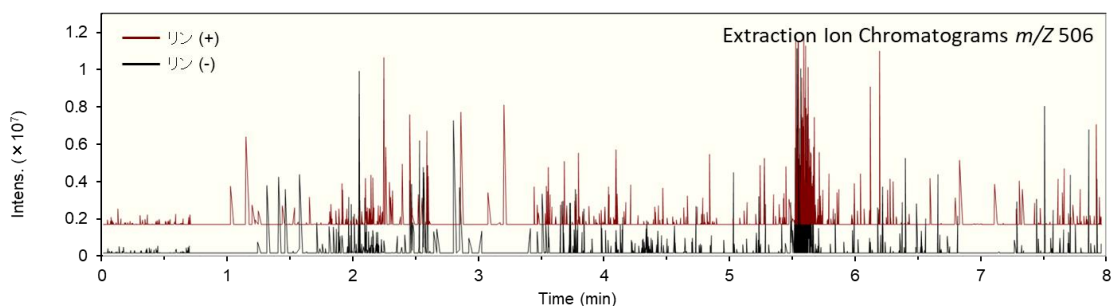


Fig. 32. 1 production under phosphorus limitation.



Fig. 33. *Penicillium* sp. (21F00103).

## 1-9. 小括

UPLC/TOF-MS を用いたスクリーニングによって、熊本県小国町の土壌から単離した真菌 *P. glaucoroseum* (21F00121) の米培養物から新規化合物 21F121-A (**1**) を見出した。化合物 **1** は光に不安定であり精製過程で分解することが分かったので、遮光条件において短工程で精製することで単離に成功した。NMR スペクトルにより化合物 **1** の構造を解析した結果、化合物 **1** はペンタエン構造を含む炭素数 19 の分枝脂肪鎖を有するモノアシルグリセリルトリメチルホモセリンであることが分かった。またベタインならびにグリセロール部分の不斉炭素の絶対立体配置は、化合物 **1** の酸加水分解物 **2** ならびに **2** のジベンゾエイト **3** の ECD スペクトルを解析することによって決定した。分子ネットワーク解析により *P. glaucoroseum* (21F00121) の米培養エキス中には化合物 **1** の類縁体が複数存在していることが示唆されたが、化合物 **1** と同様にいずれの化合物も不安定で、産生量も微量であったため単離には至らなかった。生物活性評価については、化合物 **1** は HCT1116 細胞に対して 40.3  $\mu\text{M}$  の IC<sub>50</sub> 値で弱い細胞毒性を示した。

これまでに報告されている真菌から単離されたモノアシルグリセリルトリメチルホモセリンは、Martín らが発見した MDN-0104 のみであり (Fig. 20)、本研究で見出した化合物 **1** は、2 例目の報告である。さらに 19 個の炭素からなる分枝脂肪鎖はこれまで真菌から発見されたことがなく、その点において化合物 **1** は珍しい構造である。

DGTS は *Candida* 属や *Pichia* 属などの真菌において膜構成成分として知られており、リン制限下において PC の代替成分として知られているが<sup>18</sup>、モノアシル構造である化合物 **1** はリン制限下においても産生量に変化はなかった。しかし、不等毛藻 *Nannochloropsis oceanica* においては、リン制限下のみではなく低温条件下でも DGTS の産生量が増加することが報告されている<sup>28</sup>。また、細胞膜脂質においてエステル化された多価不飽和脂肪酸は、低温下での膜の流動性の維持に重要であることが知られている<sup>31</sup>。本研究に使用した真菌は、比較的標高の高い熊本県小国町で採取した真菌であり、DGTS とは構造の異なったモノアシル構造ではあるが低温条件に適応するため産生された化合物である可能性が考えられた。

本研究では九州の多様な自然資源から単離した微生物の抽出エキスを LC-MS で分析することで、効率的に新規化合物を単離した。本研究結果は、微生物が新規天然物を発見するために有望であることに加えて、LC-MS の成分情報を指標とした探索は有効なアプローチであると考えられる。



## 第 2 章 p53 野生型および欠失型の HCT116 細胞を用いた真菌由来細胞毒性物質の探索

### 2-1. p53 活性化物質の発見を目指したスクリーニング構築の検討

がん抑制タンパク質である p53 は、DNA の損傷や細胞のがん化、細胞周辺環境の変化によるストレスに応答して細胞周期の停止やアポトーシスを引き起こすことが知られている。しかし、がん細胞の約半数では p53 が変異または欠失しており、p53 によるがん抑制作用を喪失している<sup>32,33</sup>。一方、p53 が野生型のがん細胞においては、p53 の発現量の減少や p53 関連のシグナル伝達の異常によって p53 を介したがん抑制作用が失われている。そのため、p53 の機能を活性化させる化合物は、野生型 p53 を発現するがん細胞選択的に増殖抑制作用を示すことが期待されるので、p53 野生型のがんに対する新規抗がん剤として注目されている。このように p53 は新規抗がん剤開発の創薬標的として注目されており、p53 を標的とする様々な化合物が世界中で研究開発されている<sup>34</sup>。

野生型 p53 活性化薬として、MDM2 阻害薬が注目されている。MDM2 は p53 の分解を担う E3 リガーゼである。正常細胞では、p53 に応じて MDM2 の発現量も増加し p53 を分解することで、p53 による転写調節機能を調整している<sup>35</sup>。しかし、多くの p53 野生型のがん細胞では、MDM2 が過剰発現しており<sup>36</sup>、p53 の発現量が低く抑えられている。そのため、MDM2 と p53 の結合を阻害する薬物は、MDM2 による p53 の分解を阻害することで p53 を活性化し、野生型 p53 を有するがん選択的に抗腫瘍作用を示す。

これまでに、nutlin-3<sup>37</sup> や RITA<sup>38</sup> などの野生型 p53 活性化薬が開発されている (Fig. 34)。Nutlin-3 は Vassilev らによって MDM2 の p53 結合ポケットにアンタゴニストとして作用することで p53 野生型のがん細胞選択的に増殖阻害作用を示すことが報告されている<sup>37</sup>。Nutlin-3 をリード化合物として開発された idasanutlin は急性骨髄性白血病に対する第三相の臨床試験が実施されており、新規抗がん剤としての上市が期待されている (Fig. 34)。

RITA は野生型 p53 を発現するヒト結腸がん由来の細胞株である HCT116 細胞 (HCT116 p53<sup>+/+</sup>) ならびに p53 をノックアウトした p53 欠失型の HCT116 細胞 (HCT116 p53<sup>-/-</sup>) を用いたスクリーニングで発見された<sup>38</sup>。Issaeva らは、National Cancer Institute が保有する化合物ライブラリの中から HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞よりも HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対して強い細胞毒性を示す化合物をスクリーニングすることで、RITA を同定した。作用機序解析の結果、RITA は p53 に結合し、MDM2 との複合体形成を阻害することで p53 を安定化し、抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった<sup>38</sup>。

このように nutlin-3 や RITA をはじめ、様々な野生型 p53 活性化薬が開発されてきたが、いずれも合成化合物を対象とした探索研究が中心で、天然物を対象とした探索研究は報告例が少ない。そこで本研究では、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対する細胞毒性の差を指標に、独自に構築した微生物エキスをスクリーニングし、野生型 p53 を発現する細胞選択的に毒性を示す天然物の探索を計画した。

スクリーニングを行うにあたり、当研究室の保有する HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いて nutlin-3 の作用を評価した。その結果、nutlin-3 は HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞と比較して HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞でより強い細胞増殖阻害作用を示したので (Fig. 35)、Issaeva らと同様のスクリーニングが可能であると考えた。

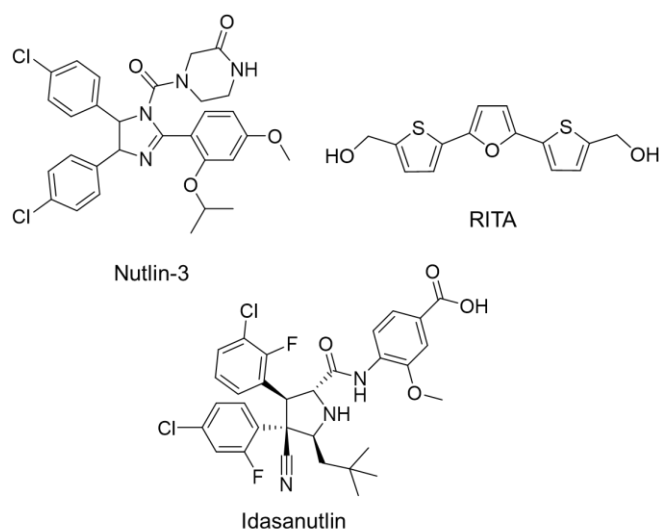


Fig. 34. Structures of nutlin-3, RITA and idasanutlin.

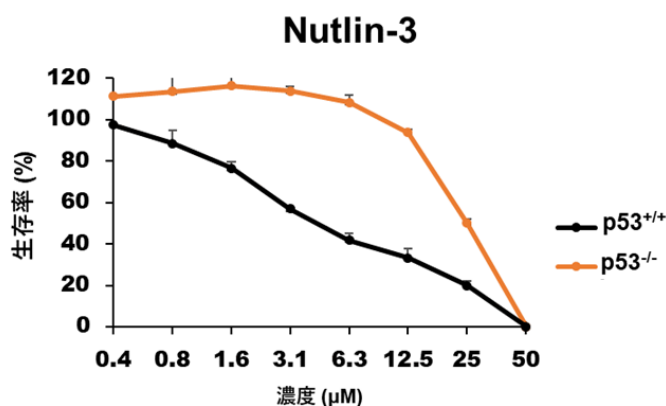
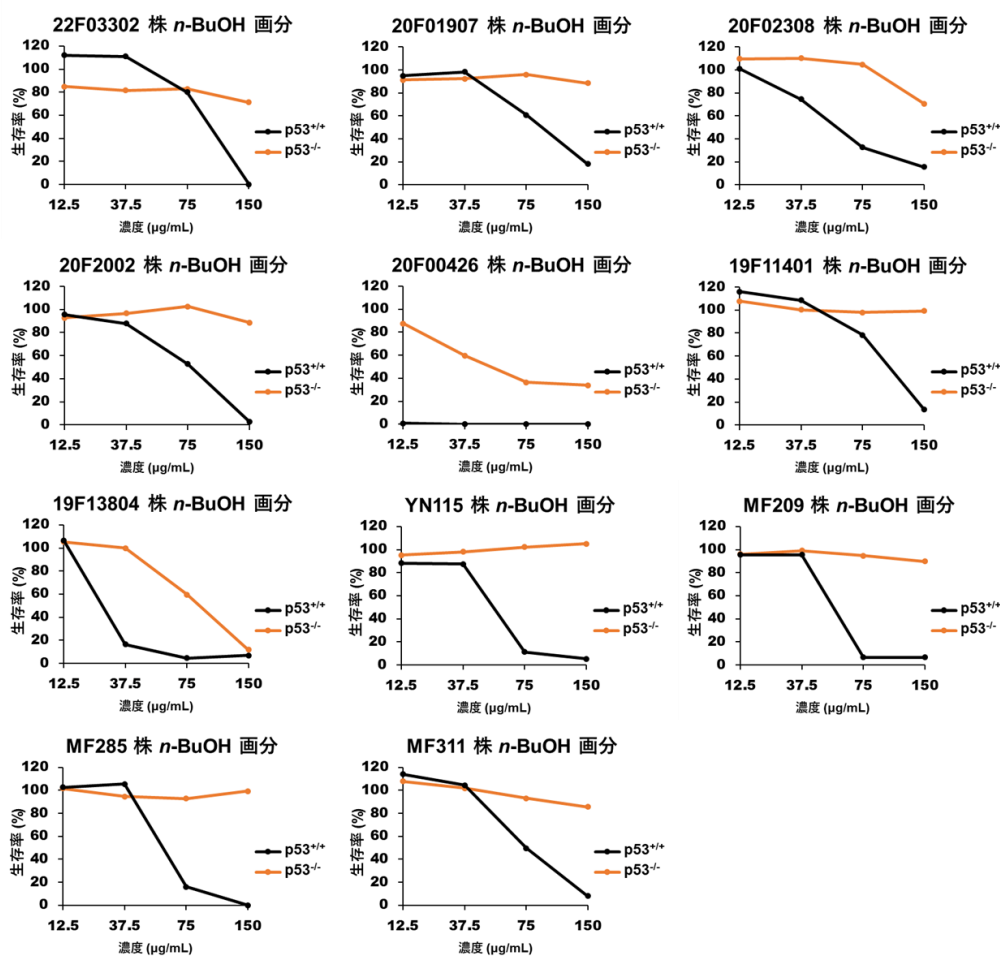


Fig. 35. Cell growth inhibitory effects of nutlin-3 against HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells.

## 2-2. HCT116 細胞を用いた微生物エキ斯拉イブラリのスクリーニング

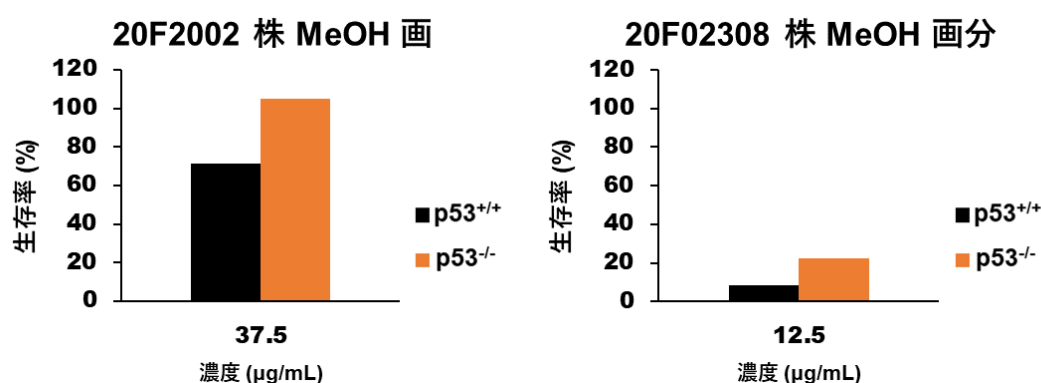
本研究で目的としている p53 活性化物質は、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対して細胞毒性を示すことが期待されるので、1 次スクリーニングでは HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対して細胞毒性を示すエキスを選抜した。真菌を米培地で培養したエキス 1163 サンプルについて、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対する細胞増殖阻害作用を調べ、細胞生存率が 20% 以下となった 103 サンプルを選抜した。

2 次スクリーニングでは、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いて HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞により強い細胞増殖阻害活性が認められたサンプルを選抜した。1 次スクリーニングで選抜した 103 サンプルについて、2 倍希釈系列で 4 段階の濃度のエキスを調製し、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対する細胞毒性試験を行い、ある濃度域において HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞の生存率が 20% 以下、HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞の生存率が 70% 以上を示した 11 サンプルを選抜した (Fig. 36)。



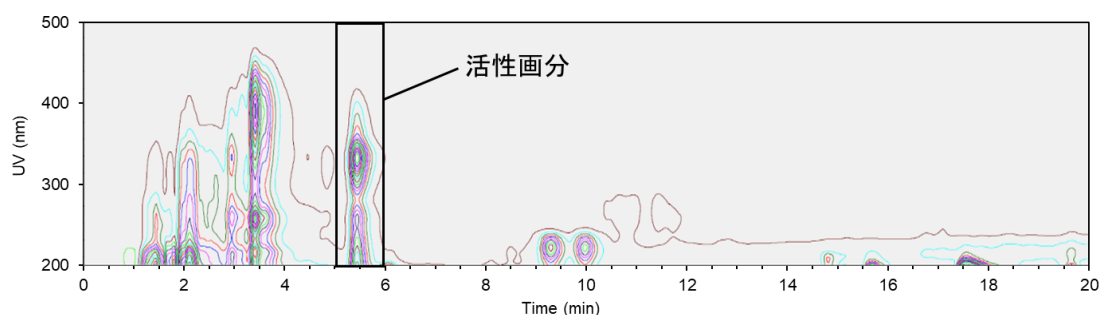
**Fig. 36.** Cell growth inhibitory effects of fungal extracts against HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells.

3次スクリーニングは、2次スクリーニングで選抜した11種類の真菌の米培養物エキスをさらに分画した。すなわち、*n*-BuOHエキスを*n*-BuOH-H<sub>2</sub>Oで液液分配した後、得られた*n*-BuOH画分を固層抽出法により7つの画分に分画し<sup>13, 39</sup>、2次スクリーニングと同様の試験を行った。その結果、熊本県宇土市の干潟土壌から単離した真菌20F2002株と20F01907株のエキスを分画した画分においてHCT116 p53<sup>+/+</sup>細胞に対してより強い毒性が示されたので、この2サンプルに含まれる活性成分について、さらに検討した (Fig. 37)。

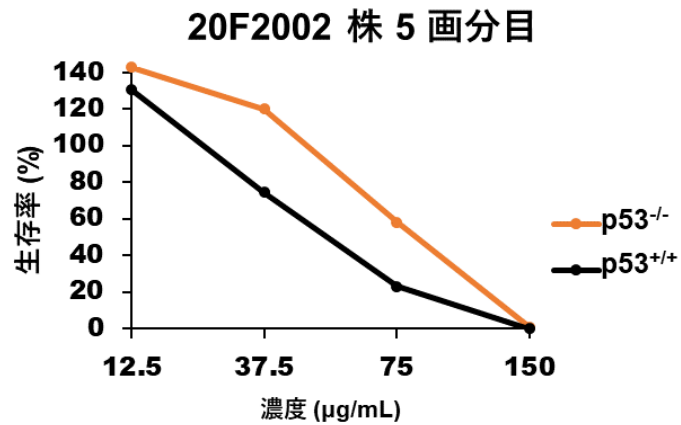


**Fig. 37.** Cell growth inhibitory effects of the fractions prepared from the extracts of the fungi 20F2002 and 20F01907 against HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells.

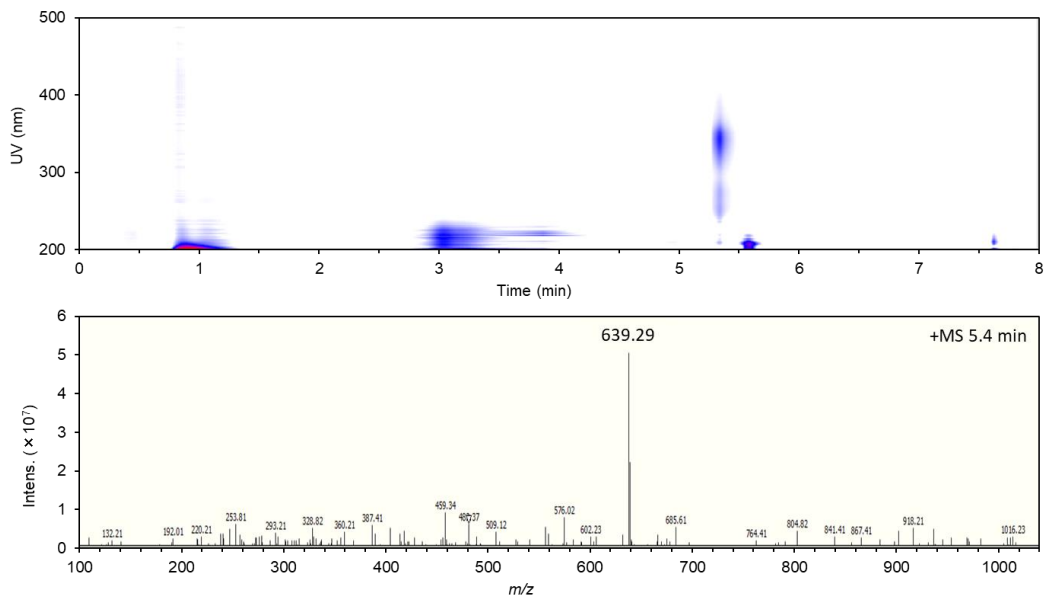
3次スクリーニングで選抜した2つの画分について、活性成分を同定するため、HPLCを用いて19画分に分画し、細胞生存率の差を測定した (Fig. 38)。その結果、真菌20F2002株のエキスから得られた5番目の画分がHCT116 p53<sup>+/+</sup>細胞に対して強い細胞毒性を示した (Fig. 39)。そこで、LC-MSを用いて分析した結果、活性を示した画分に分子量が638の化合物が検出されたが (Fig. 40)、LC-MSのデータからは化合物が同定できなかったため、20F2002株を培養し、精製することで成分を同定した (Fig. 41)。



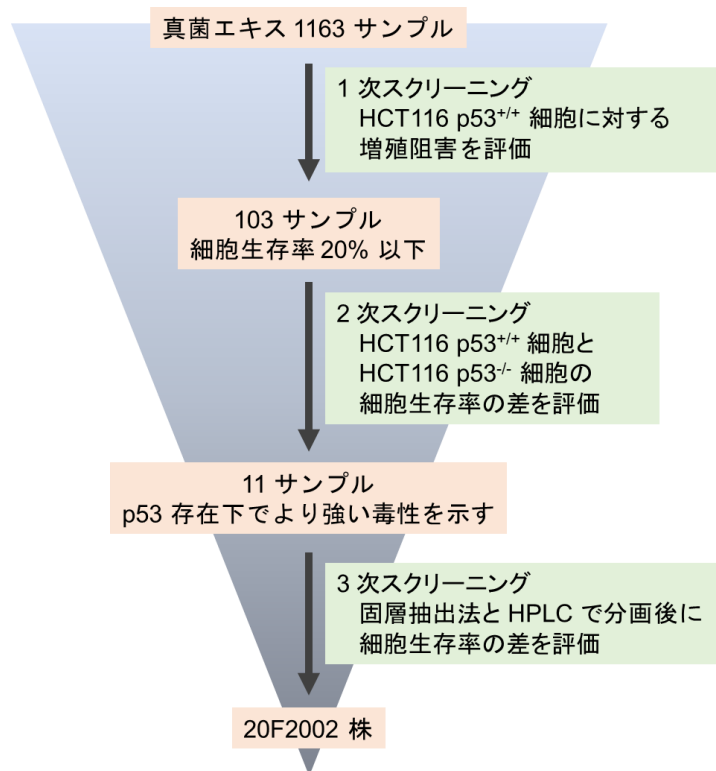
**Fig. 38.** HPLC chromatogram of the extract of the fungus 20F2002 using PDA.



**Fig. 39.** Cell growth inhibitory effect of the fifth fraction prepared from the extract of 20F2002 against HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells.



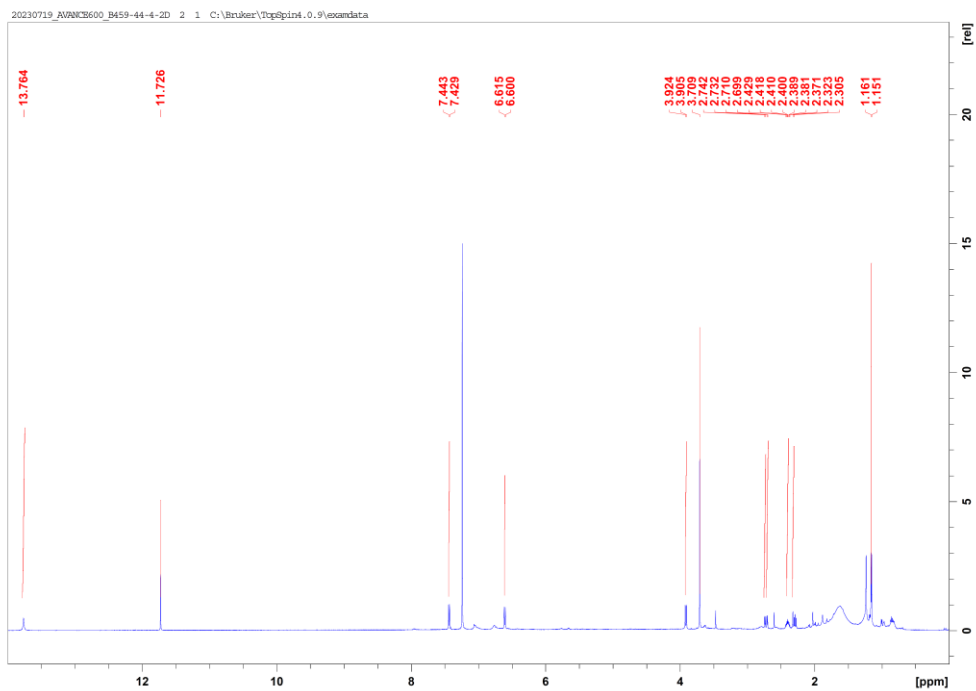
**Fig. 40.** LC-MS data of the fifth fraction prepared from the extract of the fungus 20F2002.



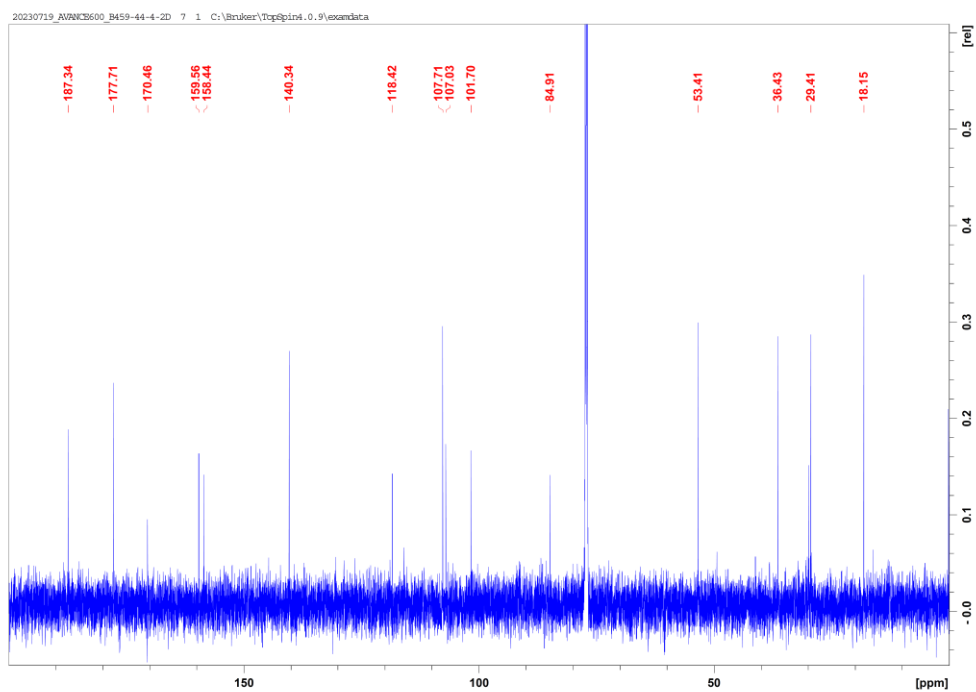
**Fig. 41.** Screening of fungal extract and fraction libraries that activate p53 in HCT116 cells.

### 2-3. 真菌 20F2002 株の培養と目的化合物の精製

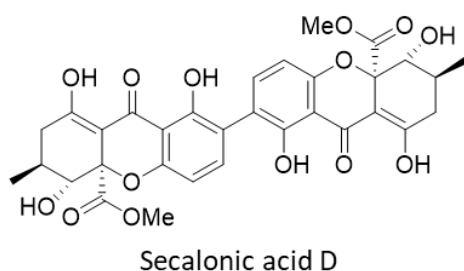
真菌 20F2002 株を米培地で培養し *n*-BuOH で抽出した。その抽出物を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O で液液分配し、*n*-BuOH 画分を減圧濃縮した後、*n*-hexane と 90% MeOH-H<sub>2</sub>O で分画した。LC-MS による分析の結果、分子量 638 の化合物は 90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分に含まれることが分かった。90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分を各種クロマトグラフィーにより精製したところ、目的化合物 **4** は分子量 638 の secalonic acid A または D であると考えられた (Fig. 42, 43)。Secalonic acid A と secalonic acid D はエナンチオマーであるため、真菌から単離した化合物 **4** がどちらであるかは NMR からは判断ができなかったが、比旋光度  $[\alpha]_{D}^{25} + 12.5$  ( $c = 0.02, \text{MeOH}$ ) であったことから 化合物 **4** は secalonic acid D であることが分かった<sup>40</sup>(Fig. 44)。Secalonic acid A, D はこれまでに抗腫瘍活性を持つことが報告されており<sup>41</sup>、特に secalonic acid D は HCT116 細胞に対して IC<sub>50</sub> 0.19  $\mu\text{M}$  の強い活性が報告されている<sup>42</sup>。HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対してより強い細胞増殖阻害作用を示すか確認するため、引き続き細胞増殖阻害試験を行った。



**Fig. 42.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **4** in  $\text{CDCl}_3$ .



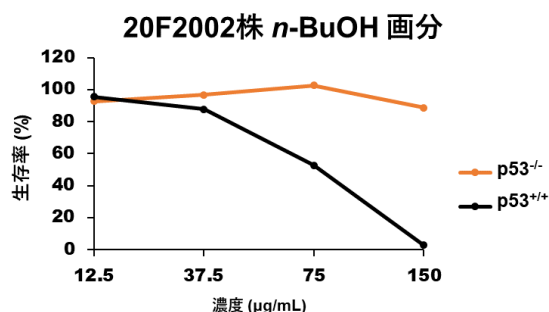
**Fig. 43.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **4** in  $\text{CDCl}_3$ .



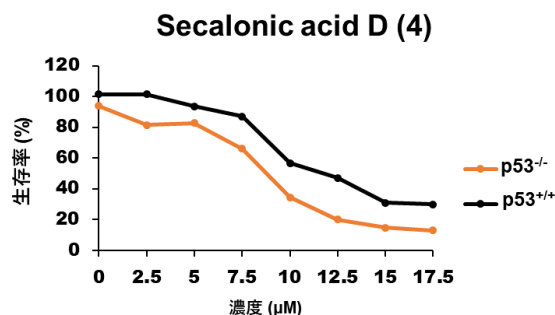
**Fig. 44.** Structures of secalonic acid D.

#### 2-4. 化合物 4 の細胞増殖阻害試験

化合物 4 の生物活性を評価するため HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対する増殖阻害試験を行った。スクリーニングでは、真菌 20F2002 株の *n*-BuOH 画分が HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対してより強い細胞増殖阻害作用を示していたが (Fig. 45)、単離した化合物 4 は HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対して同等の細胞増殖阻害作用を示したので、スクリーニングで *n*-BuOH 画分が示した活性は他の化合物によると考えられた (Fig. 46)。しかし、化合物 4 の精製過程で得られた他の画分にも期待するような活性は認められなかったため、*n*-BuOH 画分においては複数の成分が存在することで HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対してより強い細胞増殖阻害作用を示していた可能性が考えられた。



**Fig. 45.** Cell growth inhibitory effect of the extract of the fungus 20F2002.



**Fig. 46.** Cell growth inhibitory effect of 4.



## 2-5. 小括

HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いたスクリーニングにより、熊本県宇土市の干潟土壌から単離した真菌 20F2002 株の米培養エキスが HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対してより強い細胞毒性を示したので、目的化合物の単離を行った。そして、secaronic acid D と考えられる化合物 4 を単離したが、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞により強い細胞増殖阻害作用を示さなかったため、スクリーニング時には複数の成分が存在することで HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対してより強い細胞増殖阻害作用を示していた可能性が考えられた。

現在、スクリーニング時に HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対する増殖阻害活性よりも HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対して強い増殖阻害活性を示した真菌 20F01907 株の成分探索を行っている (Fig. 47, 48)。20F01907 株は熊本県宇土市の干潟土壌から単離した真菌 (Fig. 49) で、活性画分を LC-MS で分析した結果、*m/z* 418 に強いイオンピークが観測された (Fig. 50)。現在、活性を指標に目的化合物を精製している。

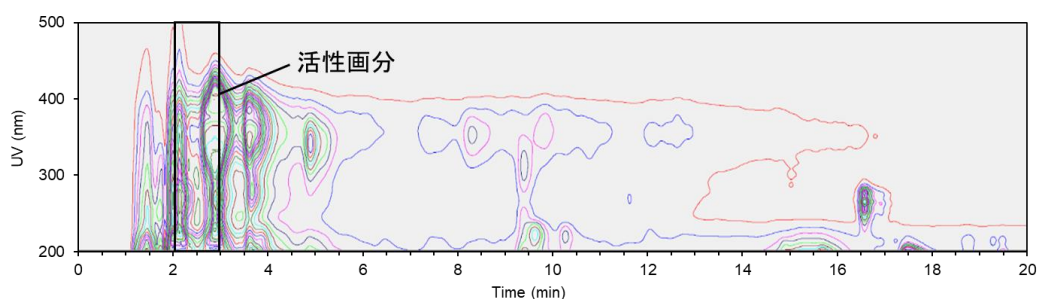


Fig. 47. HPLC chromatogram of the MeOH fraction of the fungus 20F01907 using PDA.

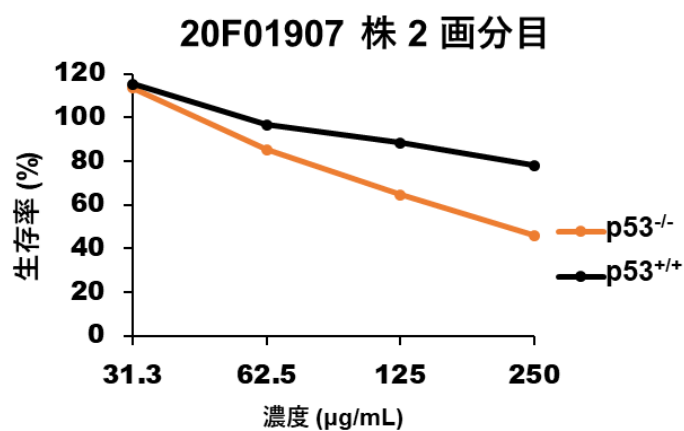
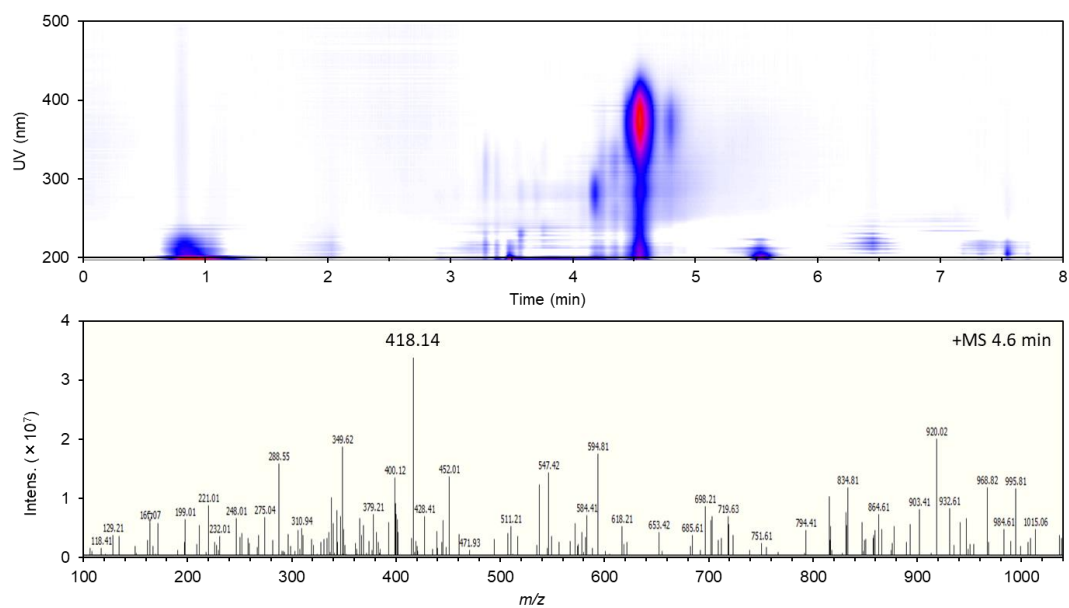


Fig. 48. Cell growth inhibitory effect of the second fraction prepared from the extract of the fungus 20F01907.



**Fig. 49.** A fungus (20F01907).



**Fig. 50.** LC-MS data of the second fraction prepared from the extract of the fungus 20F01907 that exhibited cytotoxicity.

## 総括

本研究では、LC-MS を用いて微生物エキスの含有成分を分析することで、効率的な新規化合物の探索を実施した。また、p53 野生型および p53 欠失型の HCT116 細胞に対する細胞毒性を指標に微生物エキスをスクリーニングすることで、p53 活性化作用を示す天然物の探索を実施した。

第 1 章では熊本県小国町の土壌から単離した真菌 *Penicillium glaucoroseum* (21F00121) が産生した新規モノアシルグリセリルトリメチルホモセリン 21F121-A (**1**) の特徴および単離・構造解析について記述した。本化合物は真菌由来で 2 例目の報告となるモノアシルグリセリルトリメチルホモセリンであり、アシル鎖として 19 個の炭素からなる分枝脂肪鎖を有している。本研究で用いた真菌は比較的標高の高い場所で採取された真菌であるため、モノアシル構造ではあるが、DGTS で報告されているような低温条件に適応するために産生された化合物である可能性が考えられた。本研究成果は、LC-MS を用いて得られた成分情報を指標に新規化合物を探索するという手法が、生物活性を指標としたスクリーニングでは見逃されていた不安定な化合物を検出することが出来るため網羅的な解析に有用であり、新規天然物を発見するために有効なアプローチであることを支持するものである。今後、九州の自然資源からサンプルを採取する方法や場所、培養方法を工夫することによって有用な新規天然物の更なる発見が期待される。

第 2 章では、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いた細胞毒性物質の探索を行い、熊本県宇土市の干潟土壌から単離した真菌 20F2002 株の米培養抽出物から secalonic acid D と考えられる化合物 **4** を単離した。化合物 **4** はスクリーニング時とは異なり、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対してより強い細胞増殖阻害作用を示さなかった。このことから、活性は secalonic acid D と *n*-BuOH 画分中に含まれていた複数成分によって示された可能性が考えられた。

本研究では、LC-MS 分析による成分情報を用いた新規天然物の探索と、細胞毒性を指標としたスクリーニングによる p53 活性化作用を持つ天然物の探索に取り組んだ。その結果、新規化合物 **1** を発見することができたが弱い細胞毒性しか認められず、化合物 **4** は細胞毒性を示す既知化合物であった。このことから、今後は生物活性を指標としたスクリーニングと LC-MS 分析を統合させることが必要であると考えられる。その結果、さらに効率的な新規生物活性化合物の探索が可能になるとともに、ケミカルスペースが拡充され、さらなる天然物創薬研究の発展が期待できる。

## 実験の部

### 1. 使用機器

MPLC	Isolera I (Biotage)
MPLC 用カラム	Purif-Pack <sup>®</sup> -EX SI-50 $\mu$ (SHOKO SCIENCE) Purif-Pack <sup>®</sup> -EX ODS-50 $\mu$ m
HPLC	2489 UV/Visible Detector (Waters) 515 HPLC Pump (Waters) 600 Controller (Waters)
HPLC 用カラム	COSMOSIL Cholester (nacalai tesque) Luna 5u Phenyl-Hexyl (Phenomenex) CAPCELL PAK C <sub>18</sub> -UG (OSAKA SODA)
固層抽出用カラム	InertSep HLB FF (GL sciences)
LC/MS	AmaZon speed (Bruker)
UPLC/MS	Xevo G2-XS QToF (Waters)
核磁気共鳴装置	JNM-ECX-400 (JEOL) Avance III 500 (Bruker) Avance 600 (Bruker) DIP-1000 (JASCO) V-550 (JASCO) J-820 (JASCO)
旋光計	
分光光度計	
円二色性分散計	
フーリエ変換近赤外/ 中赤外分光分析装置	Frontier FTIR (Perkin Elmer)
CO <sub>2</sub> インキュベーター	APC-50D (アステック)
プレートリーダー	CYTATION imaging reader (BioTek)

### 2. 使用試薬など

TLC	
Silica gel 60 F <sub>254</sub>	Merck
Silica gel RP-18 F <sub>254S</sub>	Merck
真菌の培養	
Malt extract	nacalai tesque
HIPOLYPEPTON	NIHON PHARMACEUTICAL
YEAST EXTRACT	nacalai tesque
D-Mannitol	Fujifilm Wako Pure Chemical

Dipotassium hydrogenphosphate	Fujifilm Wako Pure Chemical
2-Morpholinoethanesulfonic acid	Fujifilm Wako Pure Chemical
Lithium chloride	TCI Chemical
Glycine	Fujifilm Wako Pure Chemical
Phenol red	nacalai tesque
Agar	KISHIDA CHEMICAL

#### 分離・精製・構造解析

Methanol	Fujifilm Wako Pure Chemical
<i>n</i> -Butanol	Fujifilm Wako Pure Chemical
Acetonitrile	Fujifilm Wako Pure Chemical
Hexane	KANTO KAGAKU
Ethyl acetate	KANTO KAGAKU
Formic acid	nacalai tesque
Dimethyl sulfoxide- <i>d</i> <sub>6</sub>	Fujifilm Wako Pure Chemical
Chloroform- <i>d</i>	Fujifilm Wako Pure Chemical
Deuterium oxide	Fujifilm Wako Pure Chemical

#### 反応試薬

Hydrochloric acid	Fujifilm Wako Pure Chemical
Pyridine	nacalai tesque
Benzoyl chloride	Fujifilm Wako Pure Chemical

#### 細胞増殖抑制試験

D-MEM (High glucose)	Fujifilm Wako Pure Chemical
DMEM/Ham's F-12	Fujifilm Wako Pure Chemical
FBS (Fetal bovine serum)	Capricorn Scientific
Penicillin-streptomycin mixed solution (×100)	nacalai tesque
L-(+)-Glutamine	Fujifilm Wako Pure Chemical
0.25 w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA・4Na Solution (with Phenol red)	Fujifilm Wako Pure Chemical
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium Bromide	dojindo laboratories

Trypan blue  
Dimethyl sulfoxide

Fujifilm Wako Pure Chemical  
nacalai tesque

抗菌活性試験

普通ブイヨン

EIKEN CHEMICAL

Agar

KISHIDA CHEMICAL

Yeast extract

nacalai tesque

Peptone

Fujifilm Wako Pure Chemical

D-Glucose

KISHIDA CHEMICAL

Sodium dodecyl sulfate

Fujifilm Wako Pure Chemical

### 3. 第1章の実験項

#### 3-1. 微生物エキスをライブラリの UPLC/TOF-MS 分析

UPLC/TOF-MS 分析では、微生物エキスをライブラリについて Waters Xevo G2-XS QToF 質量分析計と Waters Acquity UPLC を用いて分析した。カラムは 55 °C の条件で Acquity UPLC BEH C18 2.1×100 mm を用いて、グラジエント溶出 [5-100% MeCN-H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid), 5 min; MeCN (0.1% formic acid), 1 min] により分離した。測定したデータをもとに検出ピークの分子量や保持時間、UV 吸収スペクトルから網羅的な成分探索と主成分分析をした。

#### 3-2. 菌の同定

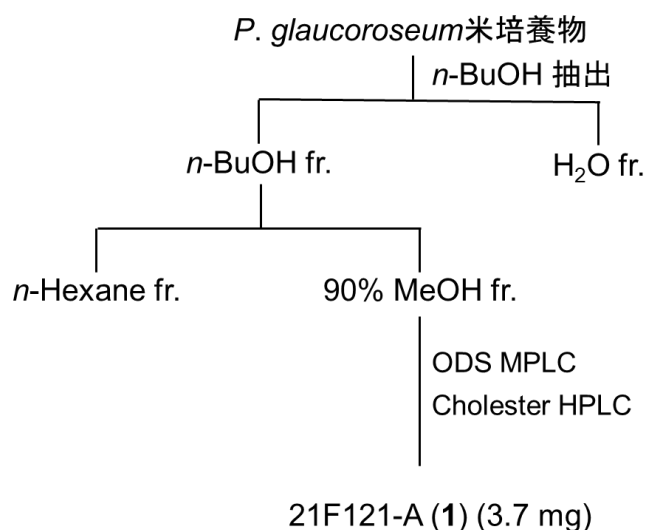
本研究で用いた真菌 (21F00121) を同定するため、シーケンス分析をテクノスルガ・ラボに依頼した。その結果、*Penicillium glaucoroseum* (MN431390) と 99.8% の相同性が認められた。菌株のシーケンスデータを、GenBank に登録した (accession number QQ834417)。

#### 3-3. 真菌の培養

本研究で用いた真菌 *P. glaucoroseum* (21F00121) は、2021 年に熊本県小国町 (北緯 33 度 07 分、東経 131 度 04 分) の土壌から単離した。継代用の培地は麦芽エキス寒天培地 (2.0% malt extract, 0.5% peptone, 1.5% agar) を用い、9 cm シャーレに 20 mL 分注して用いた。培養は 25 °C で行った。本培養は、米培地で行った。プラスチック容器 (φ 9 cm × 12 cm) に、米 100 g と精製水 100 mL を加えてオートクレーブした。シャーレ上の *P. glaucoroseum* (21F00121) を 1 cm 角に切り抜き滅菌水に懸濁した。懸濁液をディスポーザルピペットで米培地上に播種し、スパーテルで米をかき混ぜた。培養は 25 °C で 3 週間行った。

#### 3-4. 抽出と分離

米培地は *n*-BuOH で抽出し、抽出物を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O に分配した。*n*-BuOH 画分を減圧濃縮し *n*-hexane と 90% MeOH-H<sub>2</sub>O で分画した。90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分を減圧濃縮の後、この画分 (224.8 mg) の一部 (30 mg) を ODS MPLC [Purif-Pack-EX ODS-50 μm, size: 20; 50% MeOH-H<sub>2</sub>O (4.5 min), 50-100% MeOH-H<sub>2</sub>O (15 min), MeOH (7.5 min)] で分離した。21-22 分で溶出した画分 (10.4 mg) を ODS HPLC (COSMOSIL Cholester 21.2×250 mm, 85% MeOH-H<sub>2</sub>O) で精製し、化合物 **1** (3.7 mg) を得た。



**Chart 1.** Isolation scheme of **1**.

### 3-5. 化合物 **1** の酸加水分解と加水分解物のベンゾイル化

化合物 **1** (2.0 mg) を 0.1 mL の MeOH に溶解させた後、1 M HCl を 1 mL 添加し、その混合物を 55 °C で 12 時間加熱した。減圧濃縮後、反応生成物を EtOAc と H<sub>2</sub>O で分配し、H<sub>2</sub>O 画分から化合物 **2** (1.5 mg) を得た。化合物 **2** (1.3 mg) をピリジン (0.75 mL) に溶解させ、塩化ベンゾイル (0.15 mL) を添加した。混合物を室温で 20 時間攪拌した後、生成物を乾固させ、ODS HPLC [Luna 5u Phenyl-Hexyl 21.2×250 mm, 75% MeOH-H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid)] で精製し化合物 **3** (0.19 mg) を得た。化合物 **1** と化合物 **2** ではトリメチルアンモニウム基のシグナルは単一の一重線として確認されたが [**1**:  $\delta_{\text{H}}$  3.08 (9H, s), **2**:  $\delta_{\text{H}}$  3.23 (9H, s)], 化合物 **3** では  $\delta_{\text{H}}$  3.12 (4.5H, s) および  $\delta_{\text{H}}$  3.22 (4.5H, s) に 1:1 の割合で 2 本のシングレットとして確認された。化合物 **3** が 2 本の一重線として観測されたことについては、ベンゾイル基の遮蔽効果や配座異性体によって引き起こされた可能性が考えられる。

### 3-6. モデル化合物 2*S*,3''*S*-**2** および 2*R*,3''*S*-**2** の立体配座解析と ECD 計算

モデル化合物 2*S*,3''*S*-**2** および 2*R*,3''*S*-**2** の立体配座解析は PC (operating system、Windows 10 Education; CPU、Intel® Core™ i7-8700K 3.70 GHz; RAM、64 GB) を使用し、Spartan'20 (Wave function Inc.) ソフトウェアで行った<sup>43</sup>。それぞれについて 40 kcal/mol 以下の安定配座を Merck molecular force field (MMFF) で計算した。得られた安定配座は、Hartree-Fock (HF)/3-21G と B3LYP/6-31G\*により最適化した。ECD の計算は PC (operating system、CentOS Linux 7; CPU、Intel® Core™



i9-9900 3.10 GHz; RAM, 64 GB) を使用し、Gaussian 16 (Revision D.01 by Gaussian) ソフトウェアを用いた。ボルツマン分布の 99%を網羅する配座を選択し、それらの配座に対し BHandHLYP/TZVP レベルで Time-dependent density functional theory (TDDFT) 計算をした。計算 ECD のデータは Gaussian curves (bandwidth  $\sigma = 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) により変換した。そして、各配座の ECD スペクトルを合算し、計算 ECD スペクトルを得た。

### 3-7. UPLC-HRMS/MS 分析と分子ネットワーク解析

UPLC-HRMS 分析では、90% MeOH-H<sub>2</sub>O 可溶性画分を DMSO に溶解し、その画分 (1 mg/mL) の 1  $\mu$ L を Waters Xevo G2-XS QToF 質量分析計と Waters Acquity UPLC を使用した UPLC-HRMS によって分析した。カラムは 55 °C の条件で Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 2.1  $\times$  100 mm を用いて、グラジエント溶出 [5-100% MeCN-H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid), 5 min; MeCN (0.1% formic acid), 1 min] により分離した。MS および MS/MS データは、ポジティブイオンモードを使用して取得した。測定データは、Waters2mzML-1.2.0 (<https://github.com/AnP311/Waters2mzML>, 2023.6.16) を使用して mzML 形式に変換し、データは MZmine 3.10 を使用して処理した<sup>44</sup>。ピークリストは、Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) 形式に出力され、推奨設定を使用して GNPS プラットフォーム上に分子ネットワークを作成した<sup>45</sup>。作成された分子ネットワークは Cytoscape (バージョン 3.10.0) で解析した。

### 3-8. 生物活性評価

#### 3-8-1. 細胞増殖抑制活性試験

HCT116 細胞 (ヒト結腸がん細胞) を用いて毒性試験を行った。細胞は、DMEM/Ham's F-12 に penicillin-streptomycin solution を 5 mL 加えた 10% FBS 培地を用いて、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。細胞毒性試験は、初めに 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^3$  cell/well で細胞懸濁液 200  $\mu$ L を播種し、DMSO に溶解したサンプル溶液を 1  $\mu$ L 添加した。コントロールとして DMSO を、ポジティブコントロールとして nutlin-3 (30  $\mu$ M) を使用した。サンプル添加後、72 時間培養した。培養後に培養液を除去し、全てのウェルに培地で 10 倍希釈した MTT 試薬を加え、3 時間培養した。その後、DMSO を 150  $\mu$ L 加えてフォルマザン色素を溶解させ、570 nm で吸光度を測定した。下式を用いて細胞生存率を計算した<sup>46</sup>。

細胞生存率 =  $100 \times (ABS_s - ABS_0) / (ABS_{100} - ABS_0)$

ABS<sub>s</sub> : サンプルの平均吸光度

ABS<sub>0</sub> : ブランクの平均吸光度

ABS<sub>100</sub> : コントロールの平均吸光度

### 3-8-2. 抗菌活性試験

*B. cereus* および *E. coli* は、普通ブイヨン寒天培地 (Nutrient Broth) に播種し、37 °C で培養した。*C. albicans* は、glucose 0.2%、寒天 1.5%、yeast extract 0.1%、peptone 0.2% の組成の寒天培地に播種し、25 °C で培養した。抗菌試験は、*B. cereus* および *E. coli* は SDS (10 µg/mL) を含む普通ブイヨン液体培地、*C. albicans* は glucose 0.2%、yeast extract 0.1%、peptone 0.2%、SDS (10 µg/mL) から構成される液体培地を用いた。

抗菌試験は、濁度が 0.1 になるように調製した菌懸濁液を 96 ウェルプレートに播種し、サンプルの DMSO 溶液を 1 µL 添加した。*B. cereus* および *E. coli* は 37 °C で一晩静置培養し、*C. albicans* は 25 °C で一晩静置培養した。その後、ボルテックスで菌体を懸濁させ、プレートリーダーで 600 nm の吸光度を測定した。濁度から菌体量を算出し、サンプルの抗菌活性を評価した。

### 3-9. リン制限下における真菌の培養と抽出

真菌 *Penicillium glaucoroseum* (21F00121) はリン存在下においてフォーゲル・ジョンソン寒天培地 (1.0% hipolypton, 0.5% yeast extract, 1.0% D-mannitol, 0.5% dipotassium hydrogenphosphate, 0.5% lithium chloride, 1.0% glycine, 0.0025% phenol red, 1.6% agar) で 3 週間培養した。リン制限下においては、培地成分中の 0.5% dipotassium hydrogenphosphate を 0.5% 20 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid で置換した培地を用いて<sup>18</sup>、同様に 3 週間培養した。前培養は麦芽エキス寒天培地 (2.0% malt extract, 0.5% peptone, 1.5% agar) を用いて培養した。培養後はそれぞれ等量の MeOH で抽出し、LC-MS により成分分析した。

### 3-10. 物理化学データ

21F121-A (**1**): brown solid.  $[\alpha]_D^{25} + 26$  (c = 0.10, MeOH). UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 310 (4.08), 324 (4.03) nm. IR (film)  $\nu_{\max}$ : 3325, 2929, 2870, 1710, 1626, 1456, 1363, 1252, 1117, 998, 750  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (DMSO-*d*<sub>6</sub>), Table 1. HRESIMS *m/z* 506.3474 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>6</sub>, 506.3477).

Acid hydrolysis of **1** (**2**): ECD (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 206 (11.23) nm. <sup>1</sup>H NMR data (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta_H$  3.93 (1H, dd, *J* = 11.8, 2.9 Hz, H-3''), 3.89 (1H, m, H-2), 3.73 (1H, m, H-11''b),

3.65 (1H, dd,  $J = 11.8, 4.6$  Hz, H-1b), 3.56–3.59 (3H, H-1a, H-3b, and H-1''a), 3.50 (1H, dd,  $J = 10.6, 6.6$  Hz, H-3a), 3.23 (9H, s,  $N\text{-CH}_3$ ), 2.33 (1H, m, H-2''b), 2.17 (1H, m, H-2''a). LR-ESIMS  $m/z$  236  $[M + H]^+$ .

Benzoylated product of **2** (**3**): ECD ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 234 (+1.70), 221 (−0.74), 200 (+2.20) nm.  $^1\text{H}$  NMR data (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  8.05 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, aromatic proton), 7.99–8.02 (3H, aromatic protons), 7.55 (2H, m, aromatic protons), 7.40–7.45 (4H, aromatic protons), 5.62 (1H, m, H-2), 4.67 (1H, m, H-1b), 4.59 (1H, m, H-3b), 4.53 (1H, dd,  $J = 12.3, 6.0$  Hz, H-1a), 3.81–3.82 (2H, H-3a and H-3''), 3.64 (2H, m, H-3), 3.22 (4.5H, s,  $N\text{-CH}_3$ ), 3.12 (4.5H, s,  $N\text{-CH}_3$ ), 2.28 (1H, m, H-2''b), 1.93 (1H, m, H-2''a). LR-ESIMS  $m/z$  444  $[M + H]^+$ .

## 4. 第2章の実験項

### 4-1. 1次スクリーニング

HCT116 細胞 (ヒト結腸がん細胞) を用いて毒性試験を行った。細胞は、DMEM/Ham's F-12 に penicillin-streptomycin solution を 5 mL 加えた 10% FBS 培地を用いて、37 °C で 5%  $\text{CO}_2$  の条件で培養した。細胞毒性試験は、初めに 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^3$  cell/well で細胞懸濁液 200  $\mu\text{L}$  を播種し、DMSO に溶解したサンプル溶液を 1  $\mu\text{L}$  添加した。コントロールとして DMSO を、ポジティブコントロールとして nutlin-3 (30  $\mu\text{M}$ ) を使用した。サンプル添加後、72 時間培養した。培養後に培養液を除去し、全てのウェルに培地で 10 倍希釈した MTT 試薬を加え、3 時間培養した。その後、DMSO を 150  $\mu\text{L}$  加えてフォルマザン色素を溶解させ、570 nm で吸光度を測定した。下式を用いて細胞生存率を計算し<sup>46</sup>、細胞生存率が 20%以下のサンプルを選抜した。

$$\text{細胞生存率} = 100 \times (\text{ABS}_s - \text{ABS}_0) / (\text{ABS}_{100} - \text{ABS}_0)$$

$\text{ABS}_s$  : サンプルの平均吸光度

$\text{ABS}_0$  : ブランクの平均吸光度

$\text{ABS}_{100}$  : コントロールの平均吸光度

### 4-2. 2次スクリーニング

1 次スクリーニングでヒットしたサンプルについて、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いて毒性試験を行った。細胞は、DMEM/Ham's F-12 に penicillin-streptomycin solution を 5 mL 加えた 10% FBS 培地を用いて、37 °C で 5%  $\text{CO}_2$  の条件で培養した。細胞毒性試験は、初めに 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^3$  cell/well で細胞懸濁液 200  $\mu\text{L}$  を播種し、DMSO に溶解させたサンプル溶液を 1

μL 添加した。コントロールとして DMSO を、ポジティブコントロールとして nutlin-3 (30 μM) を使用した。サンプル添加後、72 時間培養した。培養後に培養液を除去し、全てのウェルに培地で 10 倍希釈した MTT 試薬を加え、3 時間培養した。その後、DMSO を 150 μL 加えてフォルマザン色素を溶解させ、570 nm で吸光度を測定した。下式を用いて細胞生存率を計算し<sup>46</sup>、HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞に対する細胞生存率が 20%以下で HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対する細胞生存率が 70% 以上を示したサンプルを選抜した。

$$\text{細胞生存率} = 100 \times (\text{ABS}_s - \text{ABS}_0) / (\text{ABS}_{100} - \text{ABS}_0)$$

ABS<sub>s</sub> : サンプルの平均吸光度

ABS<sub>0</sub> : ブランクの平均吸光度

ABS<sub>100</sub> : コントロールの平均吸光度

#### 4-3. 3 次スクリーニング

2 次スクリーニングでヒットした 11 サンプルの米培養物を *n*-BuOH で抽出し、抽出物を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O に分配した。*n*-BuOH 画分の約 250 mg をコットンロール (2.0×4.0 cm<sup>2</sup>) に吸着させ、凍結乾燥によって完全に乾燥させた。これらのサンプルを固層抽出法によりステップワイズグラジエント溶出 [InertSep HLB FF, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:19, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 1:0), MeCN-MeOH (1:1)] により分離した。分画で得られた 7 画分は 2 次スクリーニングと同様に HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対する細胞毒性試験を行った。

#### 4-4. 活性画分の 19 分画

固層抽出法で分画した画分のうち細胞生存率に差が認められた 2 画分 (1 mg) を ODS HPLC [CAPCELL PAK C<sub>18</sub> 4.6×150 mm, 60%MeOH-H<sub>2</sub>O (2.5 min), 60–100% MeOH-H<sub>2</sub>O (12.5 min), MeOH (5.0 min)] で分離し、精製開始 1 分後から 20 分後まで、1 分ごとに 19 の画分に分画した。分画した 19 画分は 2 次スクリーニングと同様に HCT116 p53<sup>+/+</sup> 細胞と HCT116 p53<sup>-/-</sup> 細胞に対する細胞毒性試験を行った。

#### 4-5. 真菌の培養

本研究で用いた真菌 20F2002 株は、2020 年に熊本県宇土市の干潟土壌から単離した。継代用の培地は麦芽エキス寒天培地 (2.0% malt extract, 0.5% peptone, 1.5% agar) を用い、9 cm シャーレに 20 mL 分注して用いた。培養は 25 °C で行った。本培養は、米培地で行った。プラスチック容器 (Φ9 cm × 12 cm) に、米 100 g と精製水 100 mL を加えてオートクレーブした。シャーレ上の 20F2002 株

を 1 cm 角に切り抜き滅菌水に懸濁させた。懸濁液をディスポーザルピペットで米培地上に播種し、スパーテルで米をかき混ぜた。培養は 25 °C で 3 週間行った。

#### 4-6. 抽出と分離

米培地は *n*-BuOH で抽出し、抽出物を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O に分配した。*n*-BuOH 画分を減圧濃縮し *n*-hexane と 90% MeOH-H<sub>2</sub>O で分画した。90% MeOH-H<sub>2</sub>O 画分を減圧濃縮の後、この画分 (849.4 mg) を SiO<sub>2</sub> MPLC [Purif-Pack-EX SI-50μm, size: 20; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:0, 49:1, 19:1, 23:2, 9:1, 7:0, 4:6, 0:1)] で分離した。次に、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) で溶出した画分 (83.5 mg) を ODS MPLC [Purif-Pack-EX ODS-50 μm, size: 20; 10% MeOH-H<sub>2</sub>O (1.5 min), 10-100% MeOH-H<sub>2</sub>O (15 min), MeOH (7.5 min)] で分離した。17-19 分で溶出した画分 (10.0 mg) は ODS HPLC (Luna 5u Phenyl-Hexyl 21.2×250 mm, 85% MeOH-H<sub>2</sub>O) で精製し、化合物 **4** (1.1 mg) を得た。

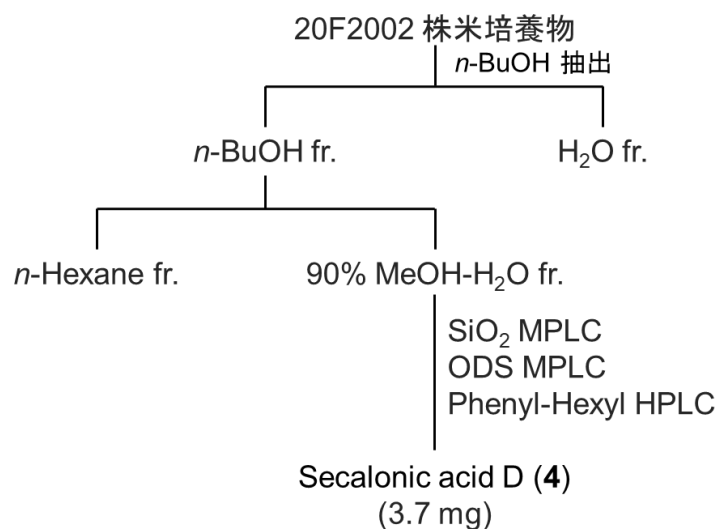


Chart 2. Isolation scheme of **4**.

## 引用文献

1. Locey, K. J.; Lennon, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 5970–5975.
2. Deshmukh, S. K.; Gupta, M. K.; Prakash, V.; Saxena, S. *J. Fungi* **2018**, *4*, 77–119.
3. Fujita, T.; Inoue, K.; Yamamoto, S.; Ikumoto, T.; Sasaki, S.; Toyama, R.; Chiba, K.; Hoshino, Y.; Okumoto, T. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 208–215.
4. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803.
5. Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012–3043.
6. Butler, M. S.; Cooper, M. A. *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 413–425.
7. Yang, J.; Liang, Q.; Wang, M.; Jeffries, C.; Smithson, D.; Tu, Y.; Boulos, N.; Jacob, M. R.; Shelat, A. A.; Wu, Y.; Ravu, R. R.; Gilbertson, R.; Avery, M. A.; Khan, I. A.; Walker, L. A.; Guy, R. K.; Li, X. C. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 902–909.
8. Fierer, N. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 579–590.
9. Orfali, R.; Perveen, S.; Al-Taweel, A.; Ahmed, A. F.; Majrashi, N.; Alluhay, K.; Khan, A.; Luciano, P.; Taglialatela-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 3591–3597.
10. Chen, L.; Chai, W.; Wang, W.; Song, T.; Lian, X. Y.; Zhang, Z. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1450–1456.
11. Sawa, R. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2016**, *64*, 101–104.
12. Chervin, J.; Stierhof, M.; Tong, M. H.; Peace, D.; Hansen, K. O.; Urgast, D. S.; Andersen, J. H.; Yu, Y.; Ebel, R.; Kyeremeh, K.; Paget, V.; Cimpan, G.; Wyk, A. V.; Deng, H.; Jaspars, M.; Tabudravu, J. N. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1370–1377.
13. Grkovic, T.; Akee, R. K.; Thornburg, C. C.; Trinh, S. K.; Britt, J. R.; Harris, M. J.; Evans, J. R.; Kang, U.; Ensel, S.; Henrich, C. J.; Gustafson, K. R.; Schneider, J. P.; O’Keefe, B. R. *Chem. Biol.* **2020**, *15*, 1104–1114.
14. Koyanagi, Y.; Kawahara, T.; Hitora, Y.; Tsukamoto, S. *Heterocycles* **2020**, *100*, 1686–1693.
15. Koyanagi, Y.; Hitora, Y.; Kawahara, T.; Tsukamoto, S. *Heterocycles* **2021**, *102*, 325–332.
16. Kimura, I.; Hitora, Y.; Sadahiro, Y.; Kawahara, T.; Tsukamoto, S. *J. Nat. Med.* **2023**, *77*, 992–997.
17. Afifi, A. H.; Kagiya, I.; El-Desoky, A. H.; Kato, H.; Mangindaan, R. E. P.; Voogd, N. J.; Ammar, N. M.; Hifnawy, M. S.; Tsukamoto, S. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2045–2050.
18. Riekhof, W. R.; Naik, S.; Bertrand, H.; Benning, C.; Voelker, D. R. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 749–757.
19. Martín, J.; Crespo, G.; González-Menéndez, V.; Pérez-Moreno, G.; Sánchez-Carrasco,

- P.; Pérez-Victoria, I.; Ruiz-Pérez, L. M.; González-Pacanowska, D.; Vicente, F.; Genilloud, O.; Bills, G. F.; Reyes, F. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2118–2123.
20. Pomini, A. P.; Marsaioli, A. J. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1032–1036.
21. Amdursky, N.; Stevens, M. M. *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 2768–2774.
22. Uzawa, H.; Nishida, Y.; Ohru, H.; Meguro, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 116–122.
23. Sato, N. *Bot. Mag. Tokyo* **1992**, *105*, 185–197.
24. Dembitsky, V. M. *Prog. Lipid Res.* **1996**, *35*, 1–51.
25. Huang, B.; Marchand, J.; Thiriet-Rupert, S.; Carrier, G.; Saint-Jean, B.; Lukomska, E.; Moreau, B.; Morant-Manceau, A.; Bougaran, G.; Mimouni, V. *Algal Res.* **2019**, *40*, 101506.
26. Canãvate, J. P.; Armada, I.; Riós, J. L.; Hachero-Cruzado, I. *Phytochemistry* **1992**, *124*, 68–78.
27. Vogel, G.; Eichenberger, W. *Plant Cell Physiol.* **1992**, *33*, 427–436.
28. Murakami, H.; Nobusawa, T.; Hori, K.; Shimojima, M.; Ohta, H. *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 181–193.
29. Künzler, K.; Eichenberger, W. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 883–892.
30. Senik, S. V.; Maloshenok, L. G.; Kotlova, E. R.; Shavarda, A. L.; Moiseenko, K. V.; Bruskin, S. A.; Koroleva, O. V.; Psurtseva, N. V. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 34–42.
31. Maruta, N.; Los, D. A. *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 875–879.
32. Bykov, V. J. N.; Eriksson, S. E.; Bianchi, J.; Wiman, K. G. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 89–102.
33. Bouaoun, L.; Sonkin, D.; Ardin, M.; Hollstein, M.; Byrnes, G.; Zavadil, J.; Olivier, M. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 865–876.
34. Levine, A. J.; Oren, M. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 749–758.
35. Chène, P. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 102–109.
36. Momand, J.; Jung, D.; Wilczynski, S.; Niland, J. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3453–3459.
37. Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukas, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A. *Science* **2004**, *303*, 844–848.
38. Issaeva, N.; Bozko, P.; Enge, M.; Protopopova, M.; Verhoef, L. G. G. C.; Masucci, M.; Pramanik, A.; Selivanova, G. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 1321–1328.
39. Thornburg, C. C.; Britt, J. R.; Evans, J. R.; Akee, R. K.; Whitt, J. A.; Trinh, S. K.; Harris, M. J.; Thompson, J. R.; Ewing, T. L.; Shipley, S. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J.; Schneider, J. P.; Grkovic, T.; O’Keefe, B. R. *Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2484–11.
40. Xiaoxuan, W.; Lin, C. C.; Yan, D.; Wang, W. G.; Matsuda, Y. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*,

1544–1549.

41. Shoeb, M.; Hoque, M. E.; Thoo-Lin, P. K.; Nahar, N. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *12*, 91-95.
42. Lv, H.; Su, H.; Xue, Y.; Jia, J.; Bi, H.; Wang, S.; Zhang, J.; Zhu, M.; Emam, M.; Wang, H.; Hong, K.; Li, X. N. *Mar. Life Sci. Technol.* **2023**, *5*, 232-241.
43. Sadahiro, Y.; Hitora, Y.; Tsukamoto, S. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 3131–3137.
44. Schmid, R.; Heuckeroth, S.; Korf, A.; Smirnov, A.; Myers, O.; Dyrlund, T. S.; Bushuiev, R.; Murray, K. J.; Hoffmann, N.; Lu, M.; Sarvepalli, A.; Zhang, Z.; Fleischauer, M.; Dührkop, K.; Wesner, M.; Hoogstra, S. J.; Rudt, E.; Mokshyna, O.; Brungs, C.; Ponomarov, K.; Mutabdzija, L.; Damiani, T.; Pudney, C. J.; Earll, M.; Helmer, P. O.; Fallon, T. R.; Schulze, T.; Rivas-Ubach, A.; Bilbao, A.; Richter, H.; Nothias, L. F.; Wang, M.; Orešič, M.; Weng, J. K.; Böcker, S.; Jeibmann, A.; Hayen, H.; Karst, U.; Dorrestein, P. C.; Petras, D.; Du, X.; Pluskal, T. *Nat. Biotechnol.* **2023**, *41*, 447–449.
45. Nothias, L. F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protsyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; Aicheler, F.; Aksenov, A. A.; Alka, O.; Allard, P. M.; Barsch, A.; Cachet, X.; Caraballo-Rodriguez, A. M.; Silva, R. R. D.; Dang, T.; Garg, N.; Gauglitz, J. M.; Gurevich, A.; Isaac, G.; Jarmusch, A.; Kameník, Z.; Kang, K. B.; Kessler, N.; Koester, I.; Korf, A.; Gouellec, A. L.; Ludwig, M.; Martin, H. C.; McCall, L. I.; McSayles, J.; Meyer, S. W.; Mohimani, H.; Morsy, M.; Moyne, O.; Neumann, S.; Neuweger, H.; Nguyen, N. H.; Nothias-Esposito, M.; Paolini, J.; Phelan, V. V.; Pluskal, T.; Quinn, R. A.; Rogers, S.; Shrestha, B.; Tripathi, A.; van der Hoof, J. J. J.; Vargas, F.; Weldon, K. C.; Witting, M.; Yang, H.; Zhang, Z.; Zubeil, F.; Kohlbacher, O.; Böcker, S.; Alexandrov, T.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 905–908.
46. Tsukamoto, S.; Yamanokuchi, R.; Yoshitomi, M.; Sato, K.; Ikeda, T.; Rotinsulu, H.; Mangindaan, R. E. P.; de Voogd, N. J.; van Soest, R. W. M.; Yokosawa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3341–3343.



## 謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、本稿の作製に多大なる御教示、御援助を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部天然薬物学分野 塚本 佐知子教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なる御指導、御助言を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部天然薬物学分野の人羅 勇氣 博士 並びに機器分析分野の 河原 哲平 博士に深く感謝いたします。

本研究に際し、御協力頂きました熊本大学大学院生命科学研究部天然薬物学分野の諸氏に厚く御礼申し上げます。

令和5年 12月