

細胞性粘菌の創薬資源としての活用：  
DIF-1 を基盤とした誘導体合成及び  
亜鉛イオン添加培養による新規化合物の取得

東北大学大学院薬学研究科  
分子薬科学専攻  
NGUYEN VAN HAI

本論文中において以下の略記を用いた.

Ac : acetyl

Bn : benzyl

Bu : butyl

calcd. : calculated

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CC<sub>50</sub> : 50% cytotoxicity concentration

CD : circular dichroism

DIF : differentiation inducing factor

DIPEA : *N,N*-diisopropylethylamine

DMAP : *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine

DMF : *N,N*-dimethylformamide

DMSO : dimethyl sulfoxide

EC<sub>50</sub> : 50% effective concentration

EDCI : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

EIMS : electron ionization mass spectrometry

Et : ethyl

FABMS : fast atom bombardment mass spectrometry

FBS : fetal bovine serum

HPLC : high performance liquid chromatography

HR : high resolution

HUVEC : normal human umbilical vein endothelial cell

IC<sub>50</sub> : 50% inhibitory concentration

IL-2 : interleukin 2

IL-6 : interleukin 6

IL-8 : interleukin 8

LPS : lipopolysaccharide

LR : low resolution

Me : methyl

MOM : methoxymethyl

MTT : methyl thiazolyl tetrazolium

NMR : nuclear magnetic resonance

PCC : pyridinium chlorochromate

PGN : peptidoglycan

PKS : polyketide synthase

rt : room temperature

SI : selectivity index

SDM : Schwarz differential medium

THF : tetrahydrofuran

TLC : thin layer chromatography

TMS : tetramethylsilane

Ts : toluenesulfonyl

UV : ultraviolet

# 目次

序論	1
本論	
第 1 章 DIF-1 を基盤とした合成展開による自然免疫抑制誘導体の創製	
第 1 節 DIF-1 の「創薬テンプレート」としての活用	12
第 2 節 自然免疫	14
第 3 節 自然免疫に対する活性の検出法	16
第 4 節 DIF-1 の自然免疫に対する作用	19
第 5 節 DIF-1 誘導体の合成及びその自然免疫に対する作用	20
第 6 節 TM-DIF-1 および TH-DIF-1 の構造活性相関の検討	24
第 7 節 誘導体 <b>82</b> 及び <b>58</b> のヒトの獲得免疫に対する作用	29
第 8 節 考察	31
第 2 章 亜鉛イオン添加培養による新規化合物の取得	
第 1 節 金属イオンによる細胞性粘菌の代謝活性化	34
第 2 節 スクリーニング	36
第 3 節 化合物の単離	40
第 4 節 Dictyobispyrone B 及び E の化学構造の推定	42
第 5 節 Dictyobispyrone B 及び E の合成	45
第 6 節 Dictyobispyrone B 及び E の化学構造の決定	48
第 7 節 Dictyopyrone E の合成による化学構造の決定	52
第 8 節 Dictyobispyrone 類の生物活性評価	55
第 9 節 考察	56

結論	61
実験の部	63
第 1 章の実験	64
第 2 章の実験	78
参考文献	89
発表論文リスト	95
謝辞	96

# 序論

天然化合物はこれまでに創薬研究において極めて重要な役割を果たしてきた。ケシ科ケシ属の *Papaver somniferum* より単離された morphine (1)<sup>1</sup> やタイヘイヨウイチイ *Taxus brevifolia* から得られた paclitaxel (2)<sup>2</sup> はそれぞれ鎮痛薬及び抗癌剤として実際に利用されてきた。放線菌 *Streptomyces roseosporus* 及び *Streptomyces tsukubaensis* より単離された抗生物質 daptomycin (3) 及び免疫抑制剤 tacrolimus (FK506) (4) はそれぞれ、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による感染症の治療及び臓器移植における拒絶反応の抑制に用いられている (Figure 1)<sup>3,4</sup>。このように、多くの天然化合物そのものが薬として利用されている。

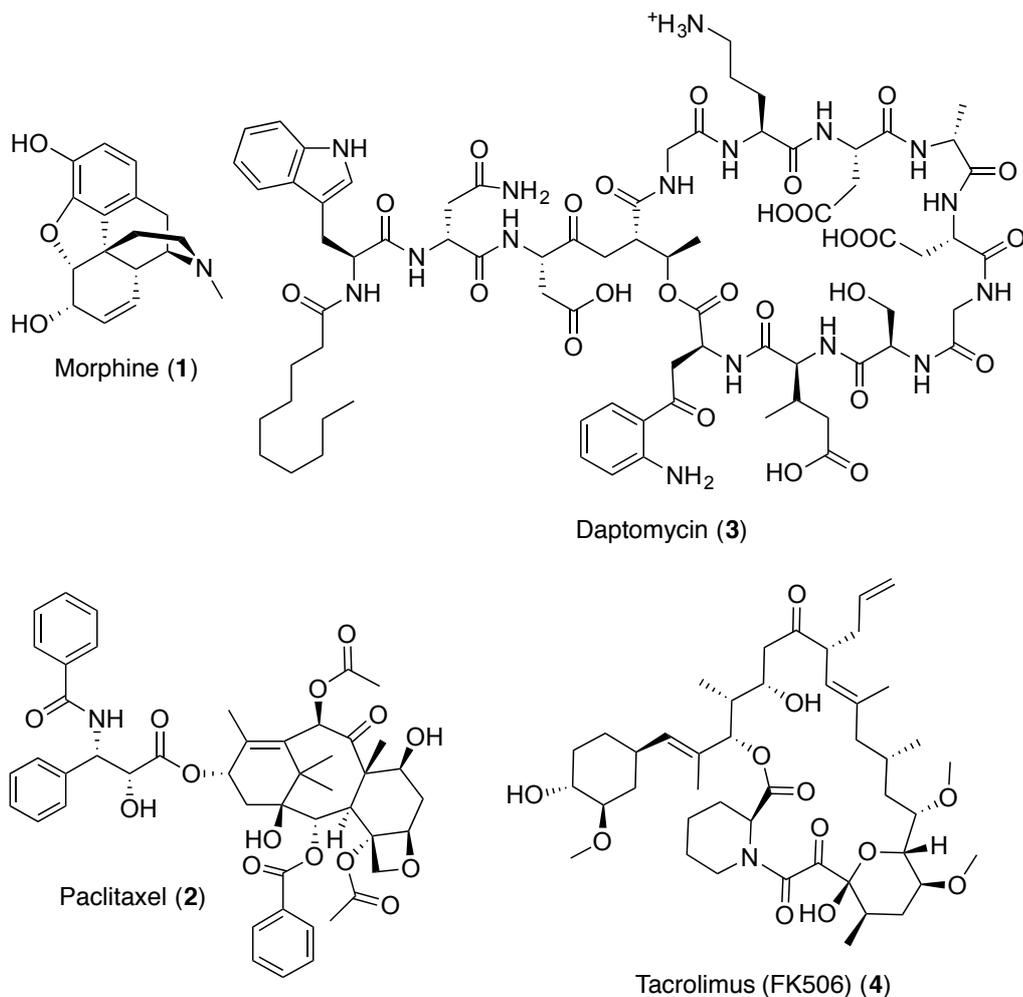
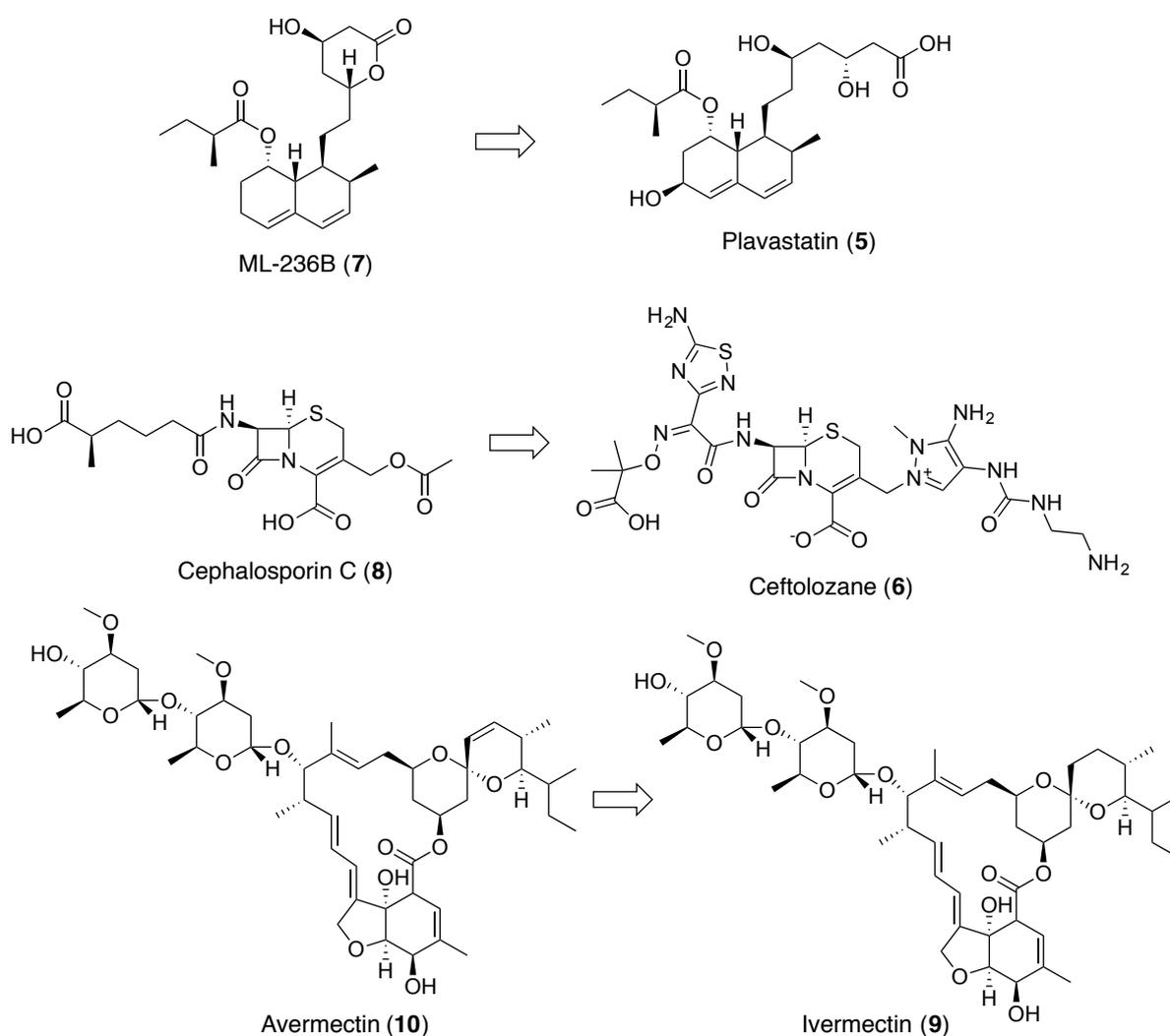


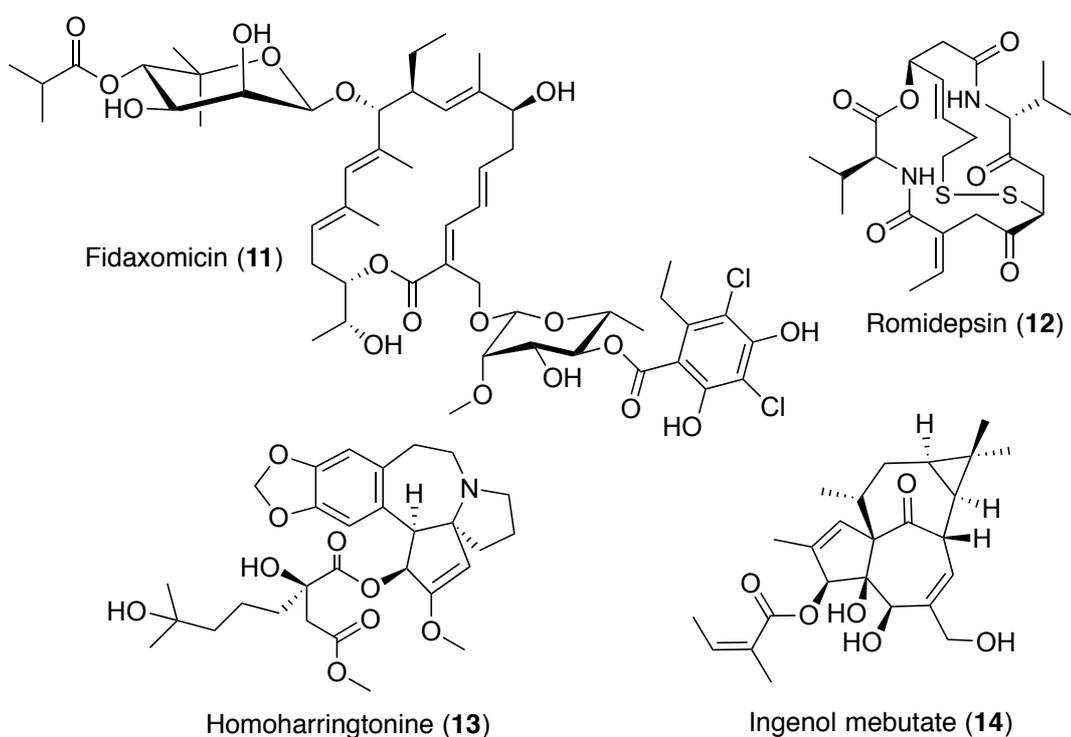
Figure 1. 医薬品として用いられている天然化合物

一方、天然化合物の化学構造を改変することでこれまで多くの医薬品が開発されてきた。コレステロール合成阻害剤である plavastatin (5)<sup>5</sup> または近年承認された抗菌薬 ceftolozane (6)<sup>6</sup> はそれぞれ子囊菌 *Penicillium citrinum* 及び *Cephalosporium acremonium* から単離された ML-236B (7) 及び cephalosporin の化学誘導体である。また、世界中で熱帯感染症の特効薬として用いられており、2015 年のノーベル賞で脚光を浴びた ivermectin (9) も放線菌 *Streptomyces avermectinius* (*S. avermitilis*) より単離された avermectin (10) を元に開発された医薬品である (Figure 2).<sup>7</sup>



**Figure 2.** 天然化合物の化学構造改変により開発された医薬品

近年承認された天然化合物由来の医薬品としては細菌由来の抗菌薬 fidaxomicin (11)<sup>8</sup> 及び抗癌剤 romidepsin (12),<sup>9</sup> または植物由来の抗癌剤 homoharringtonine (13)<sup>10</sup> や日光角化症の治療薬 ingenol mebutate (14)<sup>11</sup> が知られている (Figure 3). このように天然化合物の創薬研究における役割は極めて重要であり, 1981 年から 2014 年までの間, 承認された医薬品の約 25% が天然化合物由来であり, 構造を模倣する等, 天然化合物からヒントを得て開発された医薬品も含めるとその割合は 4 割にも上る.<sup>10</sup>



**Figure 3.** 近年承認された天然化合物由来医薬品

ところが, 現在ではすでに入手が容易な多くの天然資源の探索研究がなされてきたため, 創薬に有用な天然化合物の発見がより困難になっている. 新規天然化合物を得るには様々な工夫が必要な状況になった. 近年のゲノム解読の結果により, 多くの微生物には通常, 発現しない休眠遺伝子が多く存在することが明らかになった.<sup>12</sup> そのため, すでに成分探索研究がなされた微生物でも, これらの休眠遺伝子を強制的に発現させることで, 新たな代謝物を取得することができる. この考えを元に, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や DNA メチル化酵素阻害剤のエピジェネテ

イクス制御化合物の添加培養<sup>13</sup>や生合成遺伝子の異種発現等<sup>14</sup>の手法による新規化合物取得の試みが行われている。

一方、ジャングルや深海のような僻地に生育する生物等、これまで入手や大量培養が困難であるため研究がなされてこなかった生物を利用することも新規化合物の取得につながる。例えば、近年シロアリと相利共生する真菌 *Pseudoxylaria* sp. X802 からは allenyl 基を有する独特な環状 tetrapeptide 型化合物 pseudoxylallenmycin 類<sup>15</sup>が単離されており、海洋由来の各種真菌からは pseudellone 類,<sup>16</sup> versicamide 類,<sup>17</sup> や diasteltoxin 類<sup>18</sup>等のユニークな構造を有する多くの化合物群が報告されている (Figure 4)。

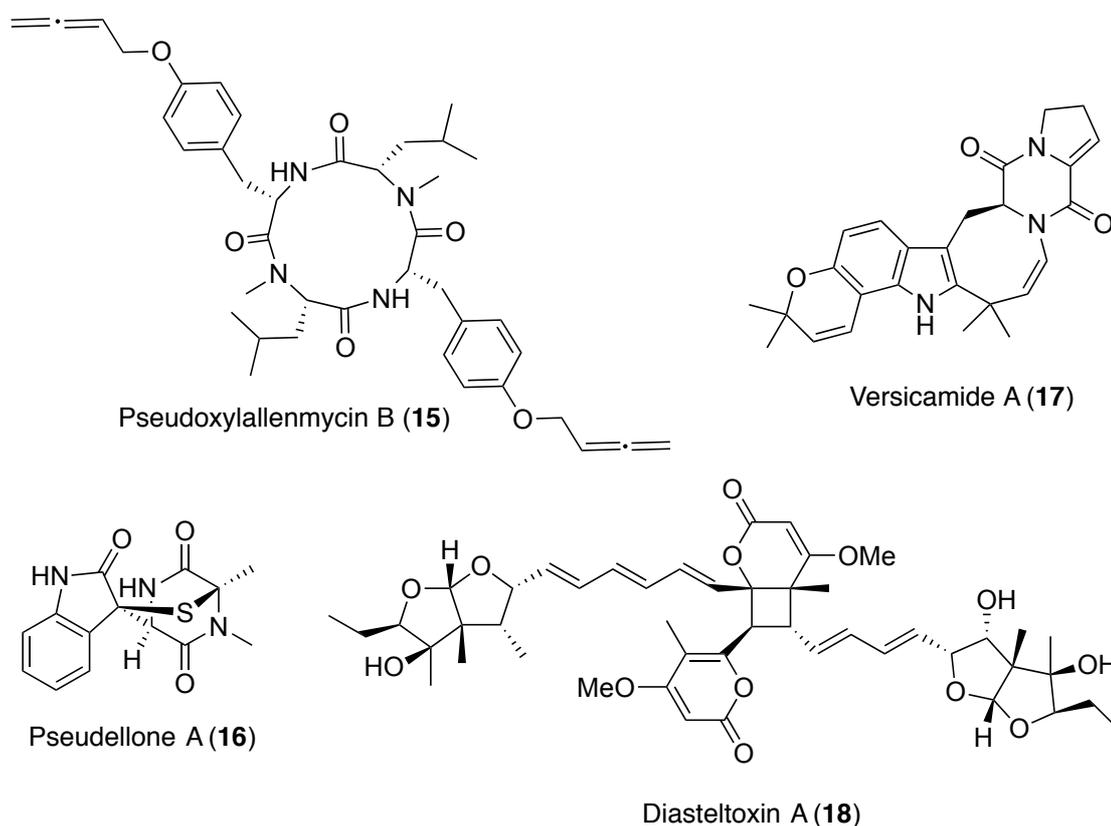


Figure 4. 近年単離された天然化合物の例

そこで、当研究室が未利用天然資源として着目したのは細胞性粘菌である。細胞性粘菌は土壌表層に広く分布し、他の生物にない独特な生活環を有する (Figure 5)。胞子から発芽すると、単細胞の粘菌アメーバとなり、大腸菌等のバクテリアを貪食

しながら分裂により増殖する。そして、周囲に餌がなくなり飢餓状態に陥った細胞は走化性物質である cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を分泌し、約 10 万個程度の粘菌アメーバが集合し、多細胞の集合体を形成する。やがて集合体は横に伸び、ナメクジ状の移動体となり、予定柄細胞・予定孢子細胞という 2 種類の細胞へとそれぞれ分化し、柄細胞・孢子細胞を形成する。最終的には飢餓状態に陥ってから約 24 時間で多細胞性の柄に孢子塊を頂生した子実体を形成する。このように細胞性粘菌は単純で時間的に短い生活環の中で、単細胞と多細胞、植物的性質と動物的性質といった二つの異なる性質を併せ待っており、生物学の分野においては発生・分化・細胞運動に関するモデル生物として広く用いられている。<sup>19</sup>

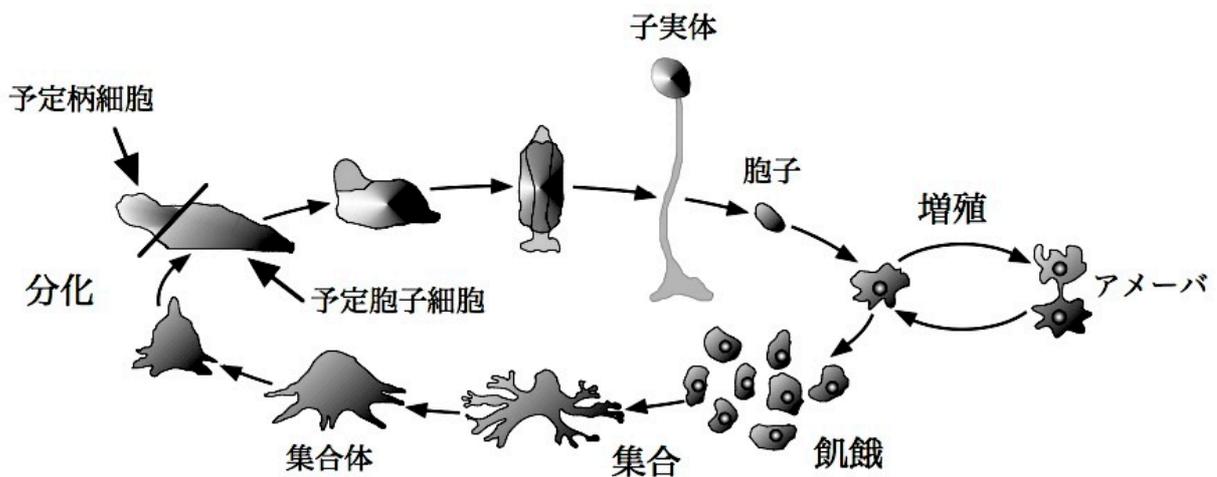


Figure 5. 細胞性粘菌の独特な生活環

分類学において、五界説はすでに古い考え方であるものの、その理解しやすさ故、中等教育においてまだ用いられている。この五界説における細胞性粘菌の位置づけは原生生物であり、これまで成分探索研究が盛んに行われてきたモレラ界の放線菌や菌界の子囊菌等とは分類的に大きく異なっている (Figure 6).<sup>20</sup>

また、2005 年に細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* のゲノム解読が終了し、ゲノムサイズは約 34 Mbp であることが明らかとなった。その中に 12500 個の遺伝子が存在すると想定された。この塩基配列データを用いて分子系統学的解析がなされ、

細胞性粘菌は菌類とは系統的に大きく異なることが示唆された (Figure 7).<sup>21</sup> これらの知見から細胞性粘菌が菌類とは違う系統の生合成遺伝子を有する可能性が高いと考えられる。すなわち、細胞性粘菌が未知の二次代謝物を産生する可能性は十分に期待できる。

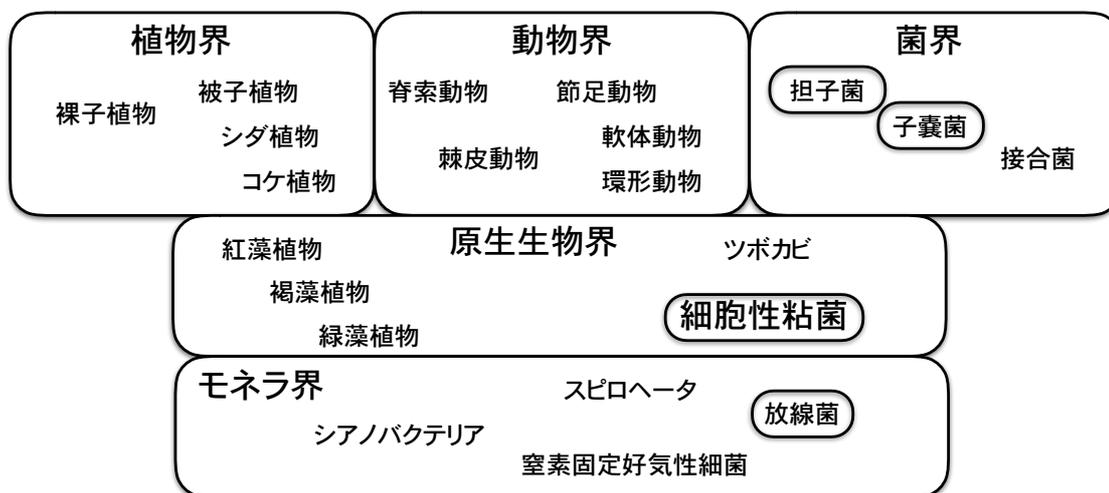


Figure 6. 五界説

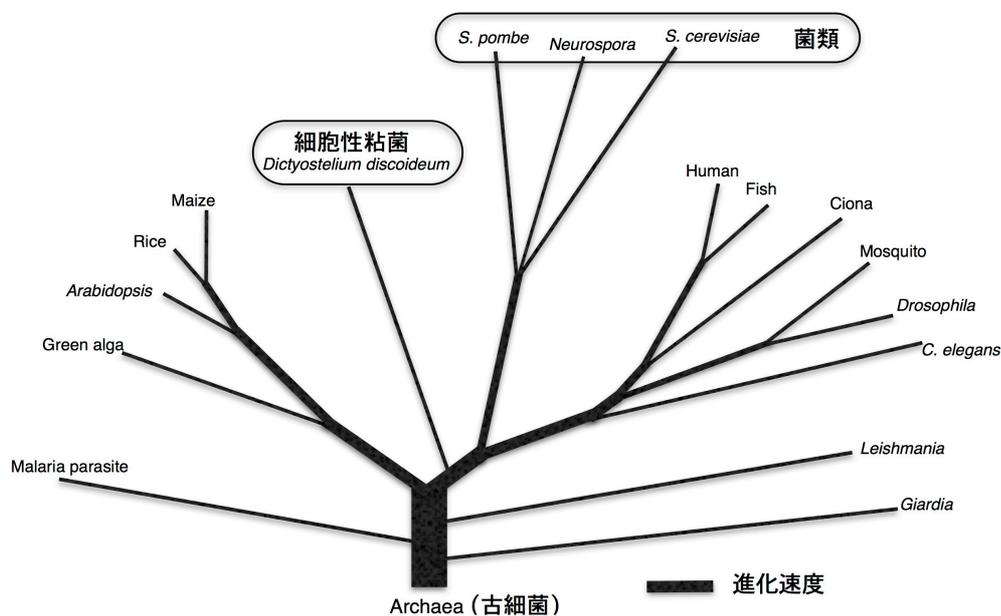
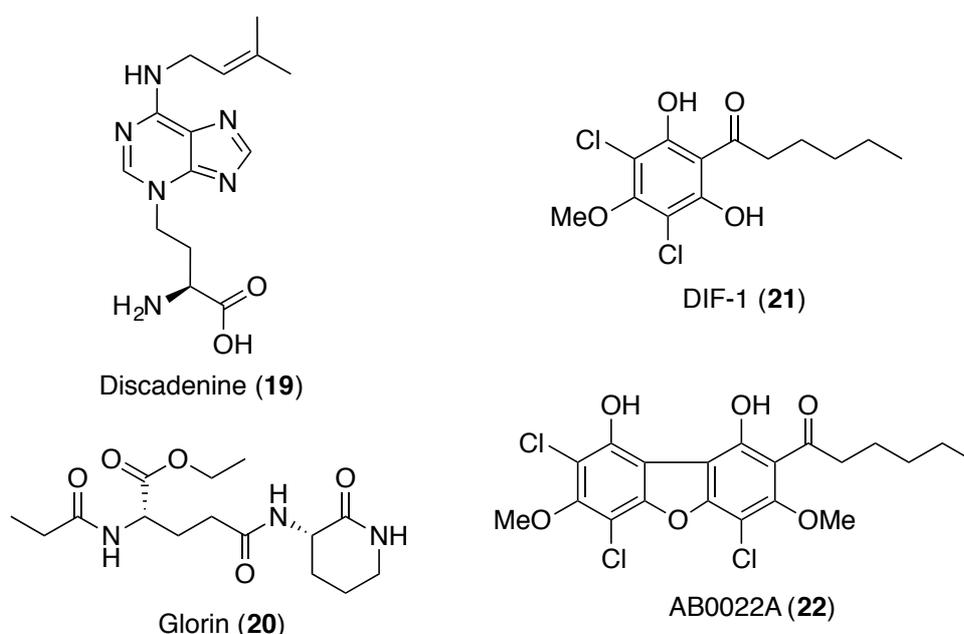


Figure 7. 細胞性粘菌と他の生物との系統関係

*Dictyostelium discoideum* と 17 種の真核生物の 5279 種類のタンパク質のアミノ酸配列を比較することにより、構築された系統樹である。祖先系として古細菌を用いた。(Eichinger, L. et al. *Nature* 2005, 435, 43-57 Figure 5 を参考し、作成した)

しかし、これまで細胞性粘菌を対象とした二次代謝物の探索研究はほとんど行われておらず、数個の低分子化合物しか単離されていない (Figure 8). Discadenine (19)<sup>22</sup> は、胞子の分散を均一にするためにその濃度の高い条件下で胞子の発芽を抑制する物質である. Glorin (20)<sup>23</sup> は、細胞性粘菌 *Polysphondylium violaceum* が飢餓状態に陥った際、粘菌アメーバを集合させる走化性物質である. DIF-1 (21)<sup>24</sup> は分化の過程において単一細胞から柄細胞への分化を誘導する因子として知られている。また、DIF-1 (21) が縮合してできたと考えられる AB0022A (22) は抗菌物質として単離されている。<sup>25</sup> このように、細胞性粘菌由来化合物は主に生活環の制御に用いられている化合物がわずかに知られているに過ぎなかった。

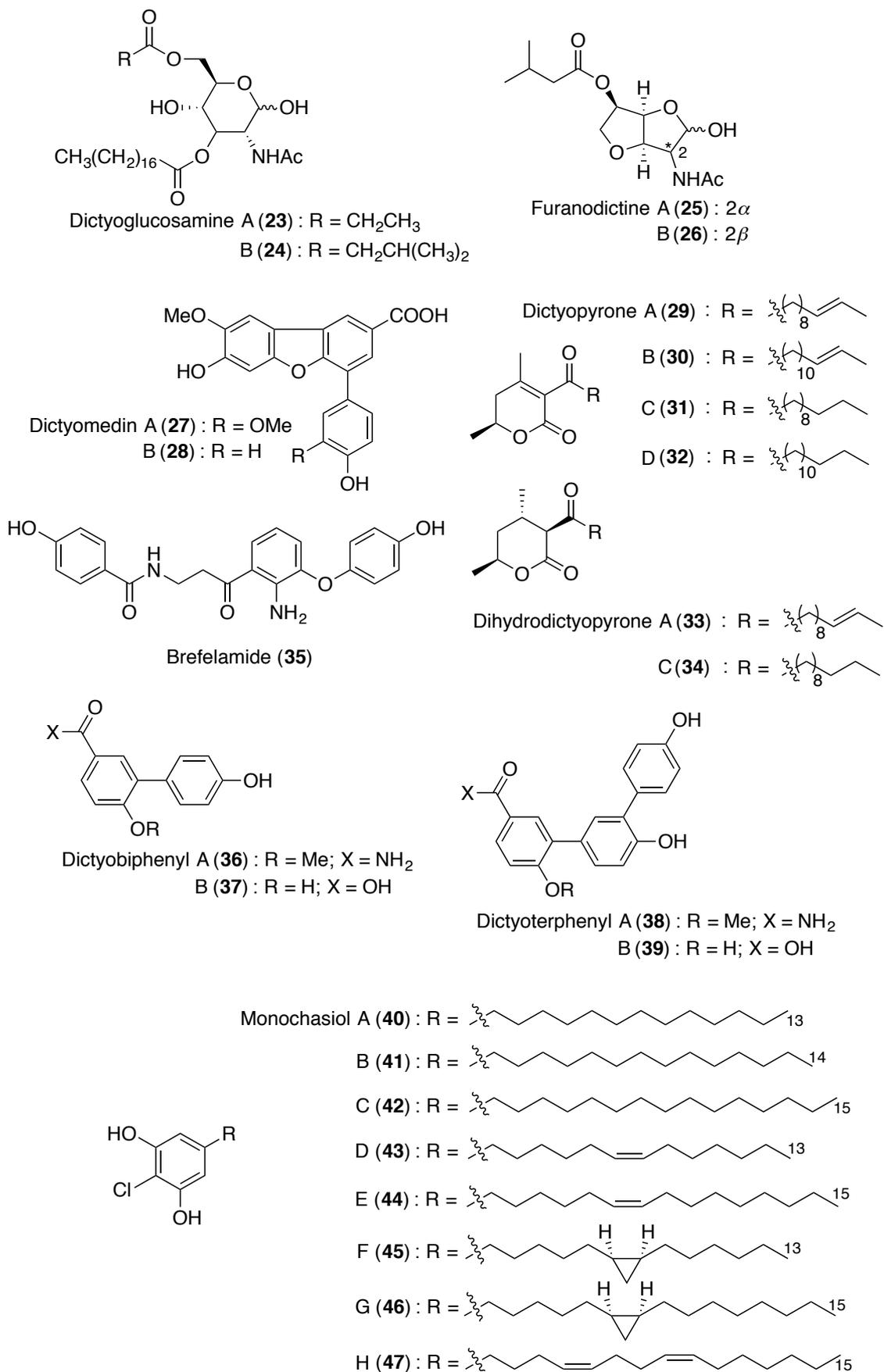


**Figure 8.** Discadenine, glorin, DIF-1 及び AB0022A の化学構造

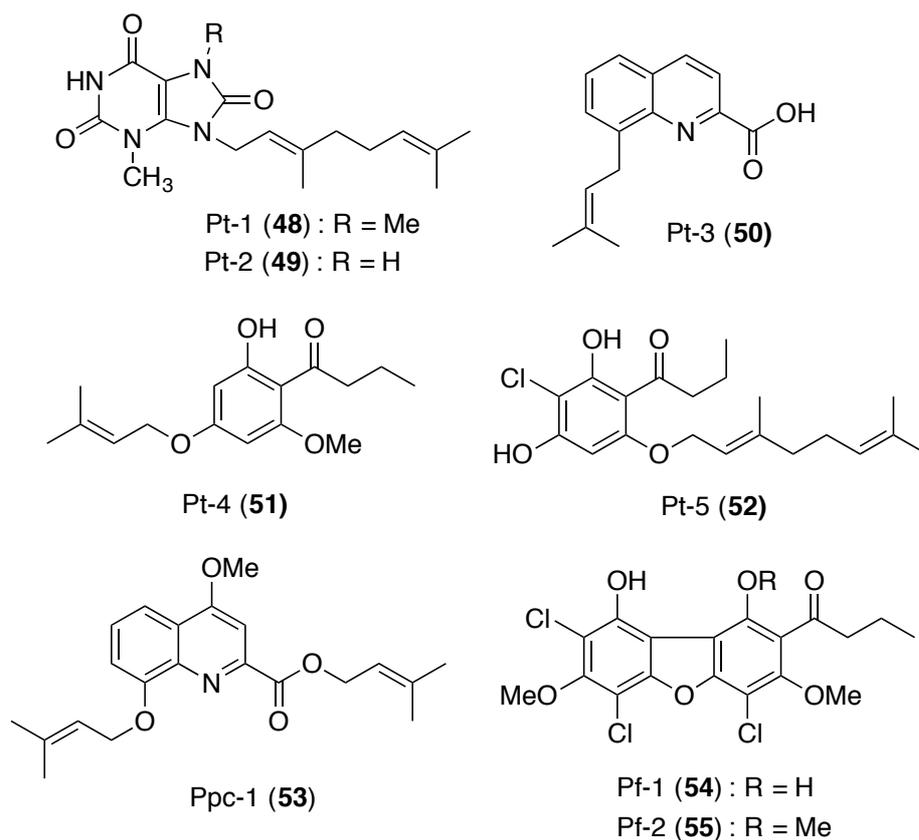
そこで、当研究室では細胞性粘菌を未利用天然資源として捉え、成分探索の研究を進めることにした。その結果、*Dictyostelium* 属の細胞性粘菌からは dictyoglucosamine 類 (23, 24),<sup>26</sup> furanodictine 類 (25, 26),<sup>27</sup> dictyomedin 類 (27, 28),<sup>28</sup> dictyopyrone 類 (29, 30, 31, 32),<sup>29</sup> dihydrodictyopyrone 類 (33, 34),<sup>30</sup> brefelamide (35),<sup>31</sup>

dictyobiphenyl 類 (36, 37), dictyoterphenyl 類 (38, 39),<sup>32</sup> monochasiol 類 (40-47),<sup>33,34</sup> *Polysphondylium* 属の細胞性粘菌からは Pt-1 (48), Pt-2 (49), Pt-3 (50), Pt-4 (51), Pt-5 (52), Ppc-1 (53),<sup>35</sup> Pf-1 (54), Pf-2 (55)<sup>36</sup> といった数多くの新規化合物を単離・構造決定してきた (Figure 9, 10). Dictyopyrone 類のような  $\alpha$ -pyrone 環の 4 位がメチル化された化合物が天然から見出された例はほとんどない. また, dictyoterphenyl 類は窒素原子を含む初めての *m*-terphenyl 型化合物である. このことから, 細胞性粘菌が多様かつ独特な化合物群を産生することが示唆された. また, 細胞性粘菌由来化合物の多くは哺乳類細胞に対して様々な生物活性を示すことも明らかになった. 例えば, brefelamide は癌の転移に関わるタンパク質 osteopontin を阻害することが明らかにされ, 現在新規抗癌剤の開発に利用されている.<sup>37</sup> 一方, ppc-1 は抗肥満作用や *in vitro*, *in vivo* での IL-2 産生阻害作用が報告されている.<sup>35,38</sup>

これまでの結果により, 著者は細胞性粘菌を新たな創薬資源として活用することができると考えた. ところが, 細胞性粘菌は放線菌や子囊菌等と比較すれば, まだ単離化合物の数が少ない. そのため, 創薬資源として活用するには, 未検討菌種の利用は勿論, 培養条件の改良により代謝物産生を活性化させ, さらなる化合物を取得することも必要である. また, 細胞性粘菌よりすでに単離された活性物質を基盤とした誘導体合成展開を行い, 化合物ライブラリーを拡大することで, 活性が増強した誘導体や新たな生物活性を有する誘導体等, 創薬に有用な化合物を得ることも十分に期待できる. そこで, 著者は本研究において, この 2 つのアプローチより, 細胞性粘菌の創薬資源としての活用法を検討した.

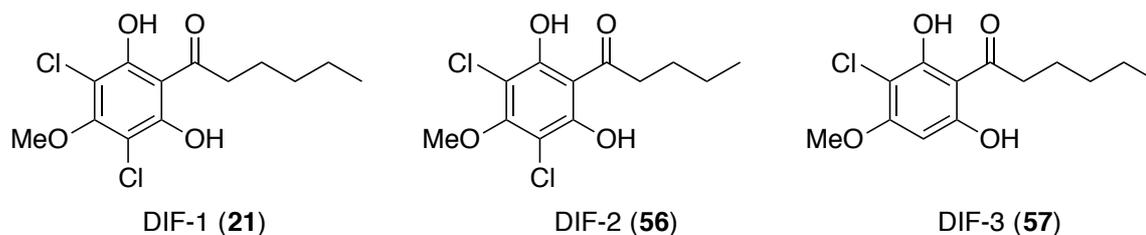


**Figure 9.** *Dictyostelium* 属より単離された各種二次代謝物

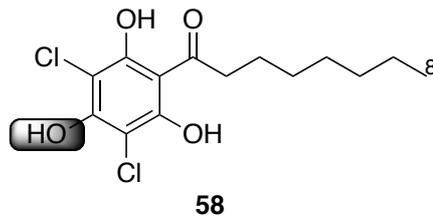


**Figure 10.** *Polyspondilium* 属より単離された各種二次代謝物

第 1 章では、細胞性粘菌由来化合物 DIF-1 を基盤とした誘導體合成展開を行った。DIF-1 (21) は DIF-2 (56) 及び DIF-3 (57) と共に、細胞性粘菌の予定柄細胞への分化を誘導する因子 (Differentiation Inducing Factors) (DIFs) として報告された化合物である。<sup>39</sup> これらの化合物はベンゼン環の水素が全て置換されており、そのうちの 2 つが塩素原子である独特な化学構造を有する (Figure 11)。DIF-1 (21) の構造に基づき、各種誘導體を合成し、その自然免疫に対する作用を評価した結果、自然免疫抑制誘導體 58 を得ることができた。第 1 章では、この詳細について述べる。



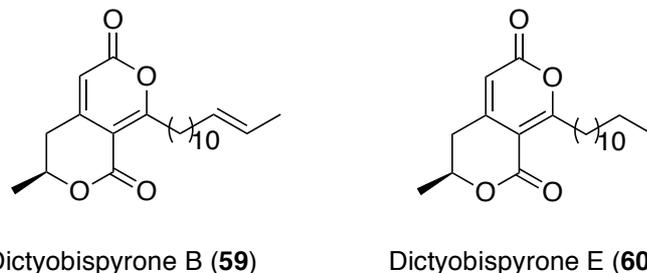
**Figure 11.** DIFs の化学構造



**Figure 12.** 誘導体 **58** の化学構造

ところで、2005 年のゲノム解析研究の結果により、細胞性粘菌の一種である *Dictyostelium discoideum* はそのゲノム 34 Mb の中に 45 個ものポリケチド合成酵素 (pks) 遺伝子を持っていることが明らかになった。<sup>21</sup> さらにその後の研究で、近縁種の *D. purpureum* が 50 個の pks 候補遺伝子を有すると報告された。<sup>40</sup> この pks 遺伝子の数は今まで知られているどの生物より多く、細胞性粘菌には代謝物産生の大きなポテンシャルが秘められていると言える。しかし、現在各種細胞性粘菌から実際に単離された化合物の数はそれほど多くない。その一つの理由として、微生物には通常の培養環境では発現しない多くの休眠遺伝子が存在するからだと考えられる。<sup>14</sup> したがって、培養方法の改善等により、これらの休眠遺伝子を活性化させることができれば、新たな代謝物を得ることは十分に期待できる。

そこで、本研究では、細胞性粘菌よりさらに新規化合物を取得すべく、各種細胞性粘菌について  $Zn^{2+}$  の添加培養を行うことにした。その結果、*Dictyostelium giganteum* を  $Zn^{2+}$  の存在下で培養した際、新規化合物 dictyobispyrone B (**59**) および E (**60**) を得ることができた (**Figure 13**)。第 2 章では、dictyobispyrone 類の単離、構造決定及び生物活性評価について詳細を述べる。



**Figure 13.** Dictyobispyrone B (**59**) 及び E (**60**) の化学構造

# 本論

## 第 1 章

### DIF-1 を基盤とした合成展開による自然免疫抑制誘導体の創製

#### 第 1 節 DIF-1 の「創薬テンプレート」としての活用

序論でも述べたように, DIF-1 (**21**) は DIF-2 (**56**) 及び DIF-3 (**57**) と共に, 細胞性粘菌の予定柄細胞への分化を誘導する因子 (Differentiation Inducing Factors) (DIFs) として報告された化合物である.<sup>39</sup> DIFs の中で DIF-1 は  $EC_{50}$  が 0.58 nM と柄細胞分化誘導活性が最も高い.<sup>41</sup> DIF-2 (**56**) はアシル基の炭素鎖が DIF-1 (**21**) より 1 個だけ少なく, 柄細胞分化誘導作用も DIF-1 (**21**) より少し低下している ( $EC_{50}$  1.8 nM).<sup>42</sup> 一方, ベンゼン環に塩素原子が 1 個だけ置換した DIF-3 (**57**) は柄細胞分化誘導作用が DIF-1 (**21**) と比較して約 25 倍弱い ( $EC_{50}$  14.5 nM).<sup>41</sup>

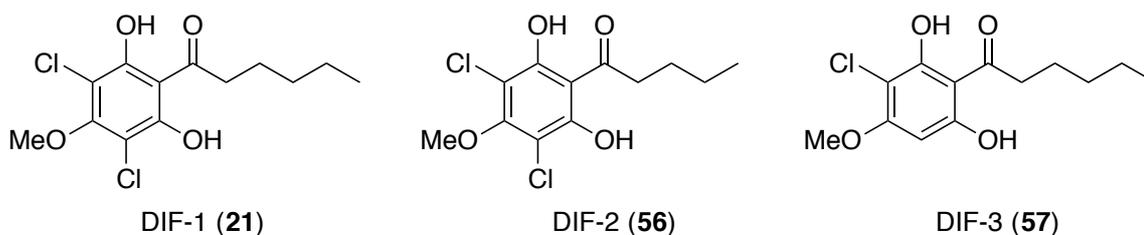
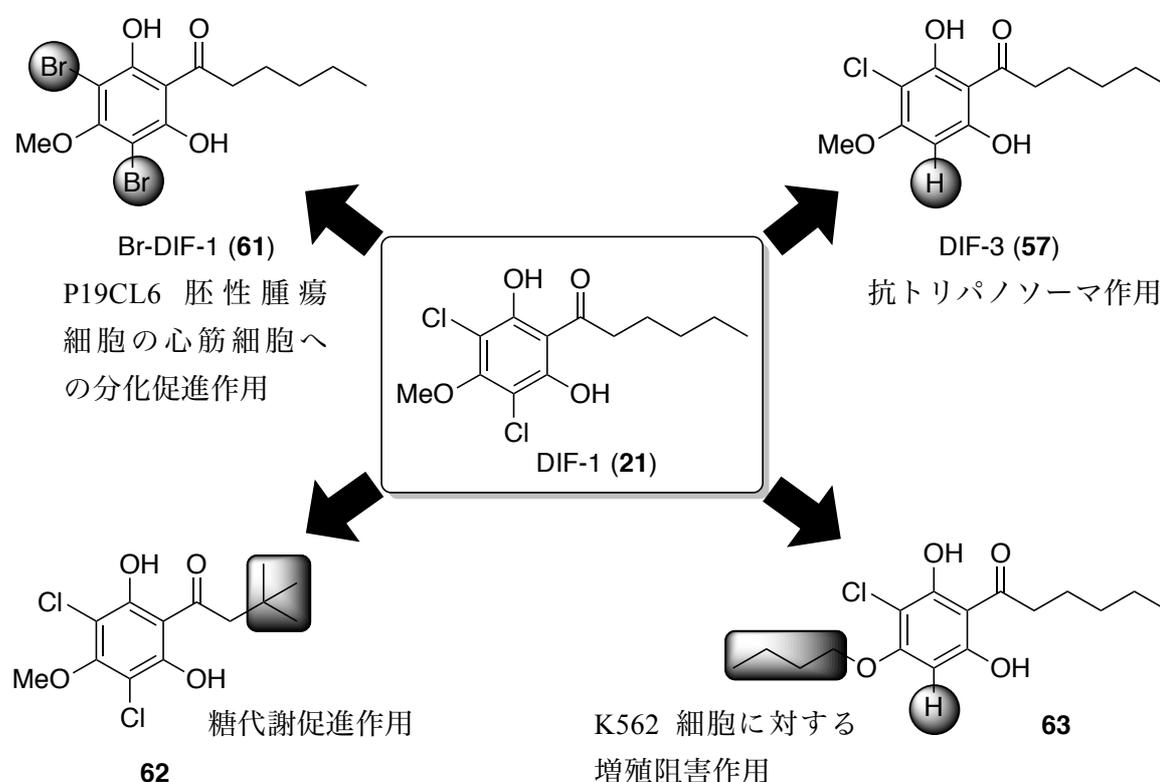


Figure 11. DIFs の化学構造

これまでの研究により, DIF-1 (**21**) は細胞性粘菌に対してだけではなく, 哺乳類に対しても様々な薬理活性を示すことが明らかになった.<sup>43,44</sup> また, DIF-1 (**21**) の構造を改変することでさらに活性が増強した誘導体や新たな活性を有する誘導体を得ることができた. 例えば, DIF-1 (**21**) の 2 つの塩素原子を臭素原子に置き換えた化合物 Br-DIF-1 (**61**) や塩素原子が 1 個だけ置換した DIF-3 (**57**) はそれぞれ P19CL6

胚性腫瘍細胞の心筋細胞への分化促進作用<sup>45</sup> や抗トリパノソーマ作用<sup>46</sup> と新たな生物活性を示した。また, DIF-1 の hexanoyl 基を 3,3-dimethylbutyryl 基に変換した化合物 **62** や DIF-3 (**57**) の methoxy 基を butoxy 基に変換した化合物 **63** はそれぞれ DIF-1 より糖代謝促進作用<sup>47</sup> 及びヒト白血病 K562 細胞に対する細胞増殖阻害作用<sup>48</sup> が増強した (**Figure 14**)。このように, DIF-1 誘導体の様々な薬理活性における構造活性相関研究の結果から, ベンゼン環の置換基は各々の薬理活性の選択性に関わると考えられる。一方, アシル基の長さの変化はその薬理活性の強さを変化させる傾向が見られた。<sup>45-48</sup>

以上の知見から DIF-1 (**21**) は様々な生物活性のリード化合物となりうる「創薬テンプレート」として利用できると考えられる。そこで, 本研究では DIF-1 (**21**) の「創薬テンプレート」としての活用を広げるべく, 本化合物の自然免疫に対する作用を検討することにした。



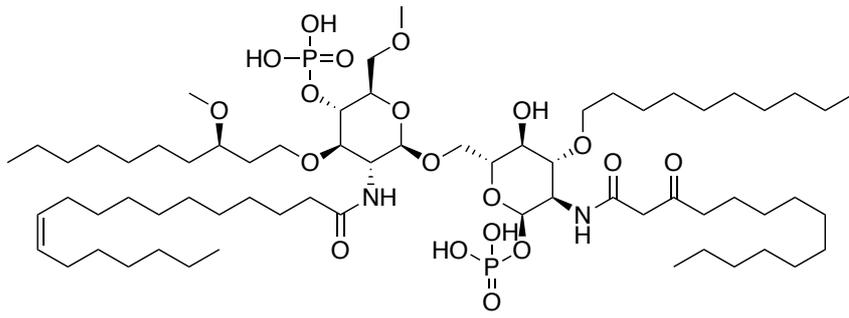
**Figure 14.** DIF-1 誘導体の様々な生物活性

## 第 2 節 自然免疫

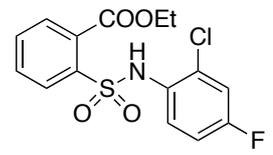
ヒトを含む脊椎動物の免疫は獲得免疫と自然免疫という 2 つの経路で成立している。獲得免疫とは T 細胞, B 細胞の遺伝子再編成により, 特異的に異物を認識して排除し, さらに侵入した異物を記憶することで後天的に獲得される免疫機構である。<sup>49</sup> これに対し, 自然免疫とは生まれつき全ての多細胞生物が有している免疫機構であり, 初めて体内に侵入した感染異物に対する一次防御反応としてはたらく。グラム陽性菌やグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカン (PGN) やリポ多糖 (LPS) など, 微生物の表面に共通する分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識することで幅広い免疫応答を示す。<sup>50</sup>

自然免疫が衰弱すると病原微生物の易感染性を生じ, 日和見感染症などを引き起こす。日和見感染症とは通常の状態では感染症を引き起こさない病原体 (弱毒微生物, 非病原微生物) が原因で発症する感染症である。しかし, これらの疾病に対する対策は衛生面の改善による予防と感染後の抗生物質の投与などに限られ, 抜本的な治療法は現在のところ確立されていない。一方, 自然免疫の異常な活性化が起こった場合, 敗血症を引き起こす。敗血症では, 体内に侵入した異物を局所的な免疫応答では排除しきれなくなり, 異物が血流により全身に運ばれ, 全身で炎症性サイトカイン産生などの免疫応答が誘導される。その結果, 多臓器不全やエンドトキシンショックを引き起こし, 死に至ることもある重篤な疾患である。<sup>51</sup>

このように自然免疫の破綻は人体に対して様々な疾病を引き起こす。そのため自然免疫を効果的に制御する方法の開発は極めて重要であり, 自然免疫を制御する化合物はこれらの疾病に対する治療薬になりうる。このような観点から開発されている敗血症の治療薬候補として, 現在治験の段階にある eritoran (**64**)<sup>52,53</sup> や, 開発が中止されたものの臨床段階まで進んだ TAK242 (**65**)<sup>54,55</sup> が知られている (**Figure 15**)。本研究では, このような化合物を探索すべく, DIF-1 (**21**) 及びその各種合成誘導体についても, 自然免疫に対する作用を検討することにした。



Eritoran (64)



TAK242 (65)

Figure 15. 臨床段階まで進んだ自然免疫抑制物質

### 第 3 節 自然免疫に対する活性の検出法

自然免疫のモデル生物としてショウジョウバエが広く利用されている。ショウジョウバエの自然免疫の反応経路である Toll 及び IMD 経路はヒトの自然免疫における TLR 及び TNF 経路と高い相同性を示す (Figure 16).<sup>56</sup> そのため、ショウジョウバエの自然免疫に作用する化合物はヒトの自然免疫にも効果を示すと言われている。

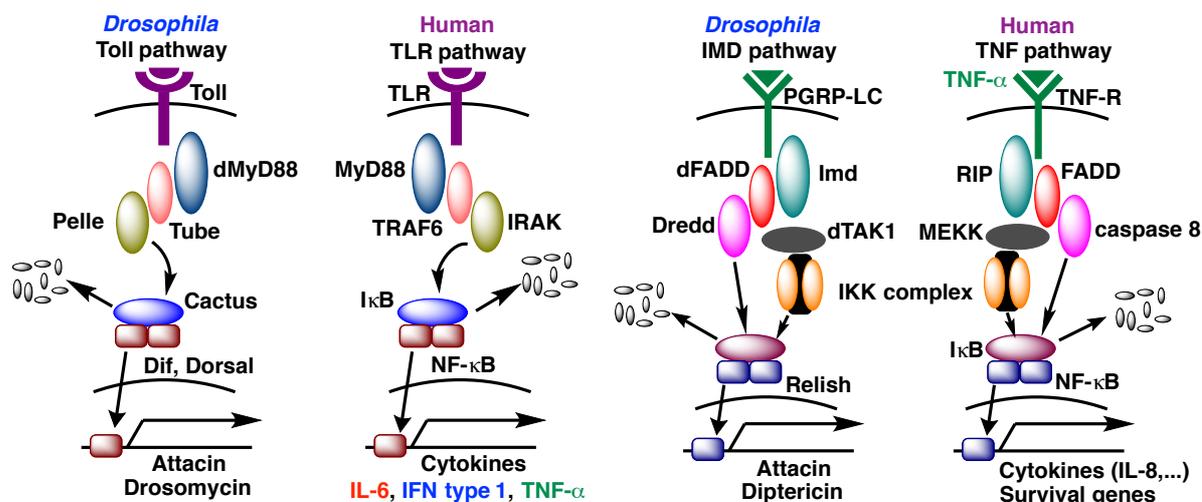


Figure 16. ショウジョウバエとヒトの自然免疫の高い相同性

(Hoffmann, J.A. & Reichhart, J. M. *Nat. Immunol.* 2002, 3, 121-126 Figure 1 & 2 を参考に作成した)

当研究室では自然免疫の活性検出系としてショウジョウバエの S2 細胞を利用した *att-luc* 系を用いている。<sup>57</sup> *Att-luc* 系では、抗菌ペプチドである attacin の転写制御領域に luciferase の産生を誘導する遺伝子 *luc* をつないだプラスミドを導入したショウジョウバエ S2 細胞を用いた。この細胞に細菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカン (PGN) により刺激を与、自然免疫を活性化<sup>58</sup> させると luciferase が産生される。そして、試料を添加した時の luciferase の産生量の変化は試料の自然免疫に対する作用として検出することができる (Figure 17)。また、同時に試料の S2 細胞に対する細胞増殖阻害作用は MTT 法を用いて評価することで、試料の自然免疫に対する選択性を評価することができる (Figure 18)。

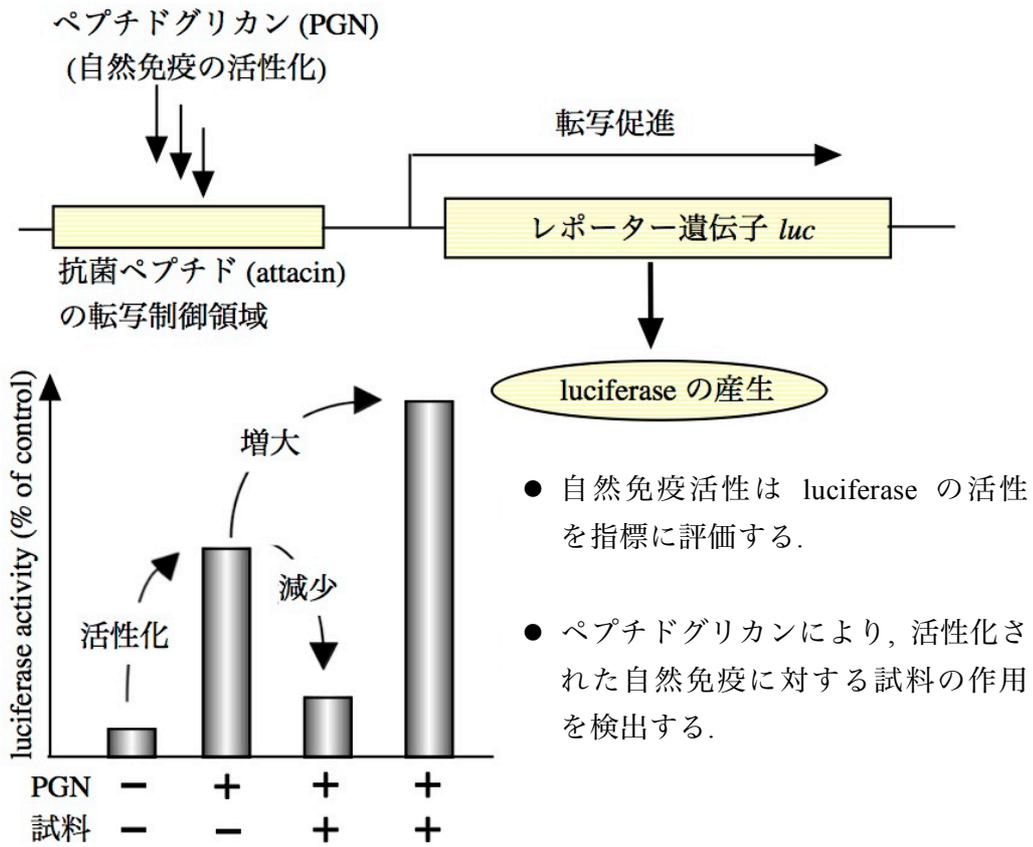


Figure 17. 自然免疫応答の活性評価

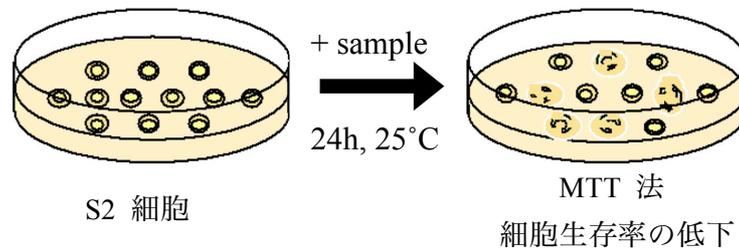


Figure 18. MTT 法による細胞増殖阻害作用の評価

当研究室では、現在までにショウジョウバエ細胞を利用したアッセイ系を用いたスクリーニングによって、およそ 20000 種の糸状菌および放線菌抽出物などから自然免疫制御物質の探索が行われてきた。その結果、自然免疫抑制物質として TP-1 (66)<sup>59</sup> 及び celastramycin A (67),<sup>60</sup> 自然免疫増強物質として gonytolide A (68)<sup>61</sup> や terresterol (69)<sup>62</sup> を得ることができた (Figure 19)。これらの化合物はヒト HUVEC 細胞における自然免疫サイトカイン IL-8 の産生に対しても作用を示した。また、

celastramycin A (67) のプローブ誘導体 70 を合成し、その作用機構を解析したところ、ジンクフィンガータンパク質である ZFC3H1 と結合し、IL-8 の産生を抑制することが明らかになった。<sup>63</sup> 一方, gonytolide A は軸不斉を有することも含めその構造は複雑であり、合成が困難であるため *in vivo* での活性評価には適さなかった。そこで、自然免疫増強作用を保持しながら、より合成やその後の構造変換が簡便な誘導体 71 を開発した。<sup>64</sup> このようにショウジョウバエ細胞を利用したアッセイ系により得られた自然免疫制御物質はヒトの免疫機構にも作用し、自然免疫のメカニズム解明や新薬の開発に利用することができる。そこで、本研究では *att-luc* 系を用いて、DIF-1 (21) およびその各種合成誘導体の自然免疫に対する作用を評価することにした。

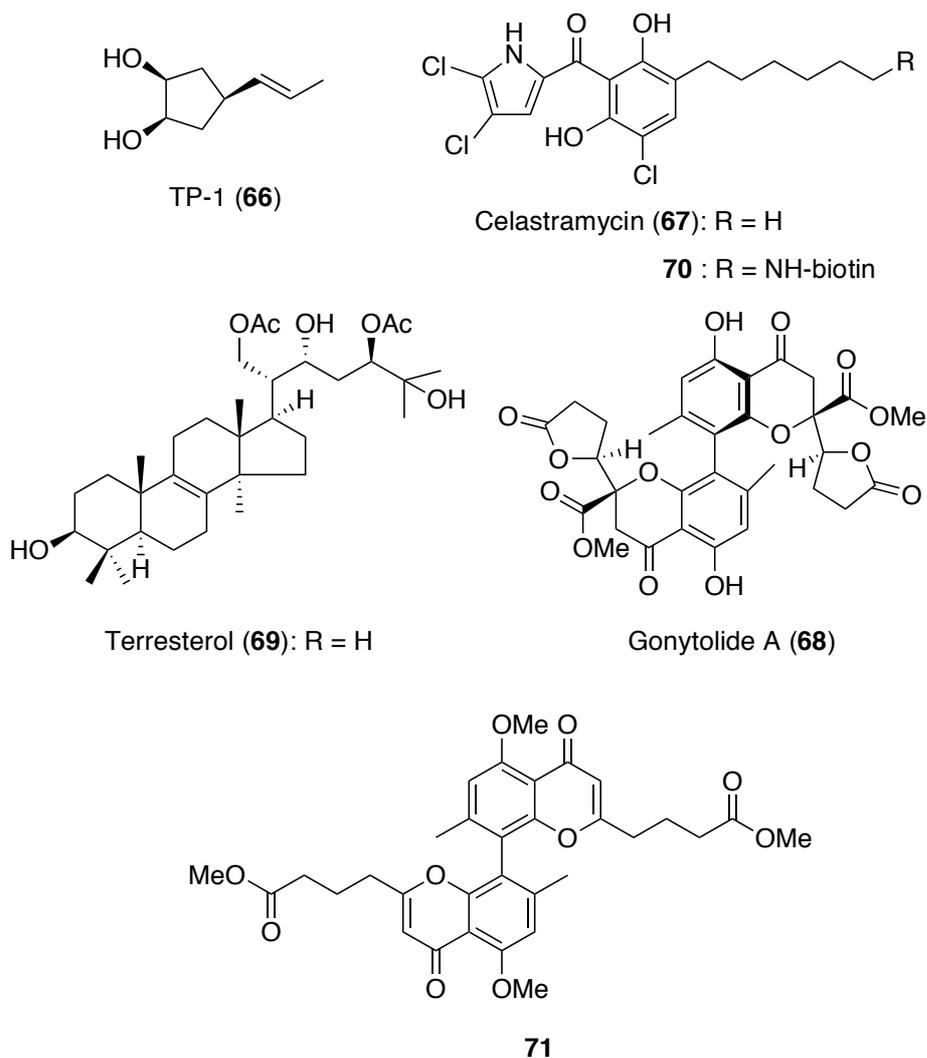


Figure 19. 当研究室で、得られた自然免疫制御物質及びその誘導体

## 第 4 節 DIF-1 (21) の自然免疫に対する作用

まず DIF-1 (21) の自然免疫に対する作用を評価した. 本化合物は *att-luc* 系における luciferase の産生を 3  $\mu\text{M}$  で阻害し始め, 10  $\mu\text{M}$  で完全に抑え, 強力な濃度依存的な抑制作用を示した ( $\text{IC}_{50}$  4.6  $\mu\text{M}$ ). しかし, DIF-1 (21) はショウジョウバエ S2 細胞の増殖に対しても同様に強い阻害作用を示した ( $\text{CC}_{50}$  22.5  $\mu\text{M}$ ). そのため, 自然免疫に対する選択指数 SI は 4.9 と中程度であった (Figure 20). そこで, より選択性の高い自然免疫抑制化合物を得るべく, DIF-1 の各種誘導体を合成しその自然免疫に対する作用を評価することにした.

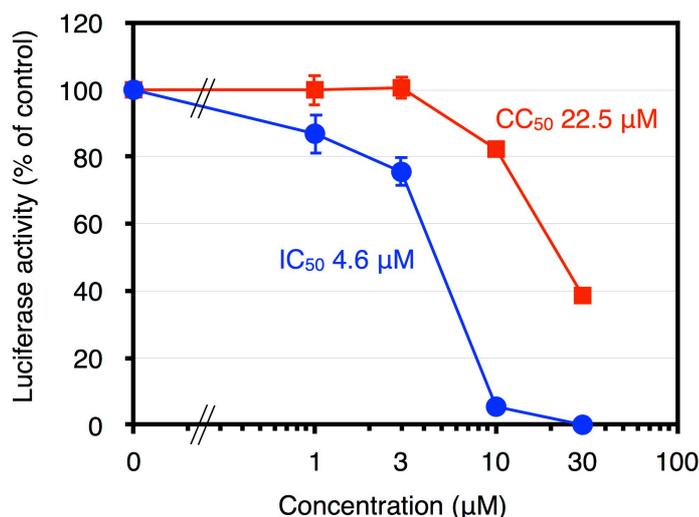


Figure 20. DIF-1 (21) の自然免疫に対する作用

化合物の自然免疫に対する作用 (*att-luc* 系,  $n = 4$ , ●) 及び細胞増殖阻害作用 ( $n = 4$ , ■) を測定した. 縦軸は化合物非処理時における値に対する相対値である.

横軸は化合物の濃度である.

$\text{IC}_{50}$  は *att-luc* 系における luciferase の産生を 50% まで下げた化合物の濃度である.

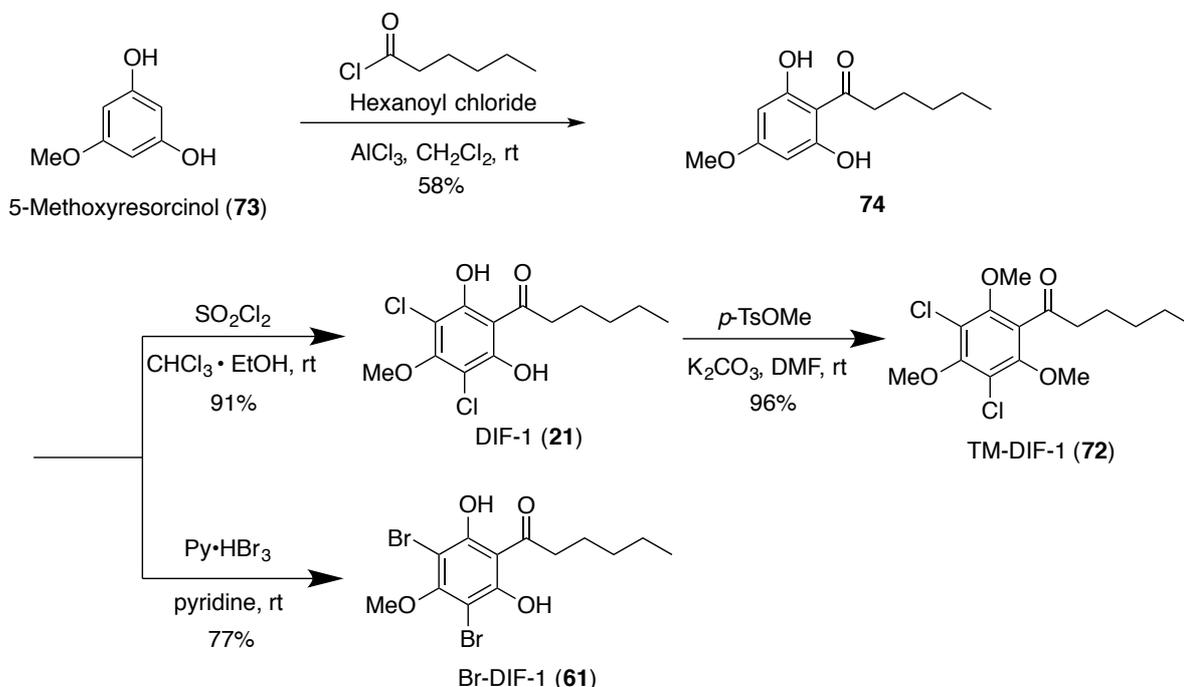
$\text{CC}_{50}$  は化合物処理 24 時間後の S2 細胞の細胞生存率を 50% まで下げた化合物の濃度である.

SI は自然免疫に対する選択指数 ( $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ ) である.

## 第 5 節 DIF-1 誘導体の合成及びその自然免疫に対する作用

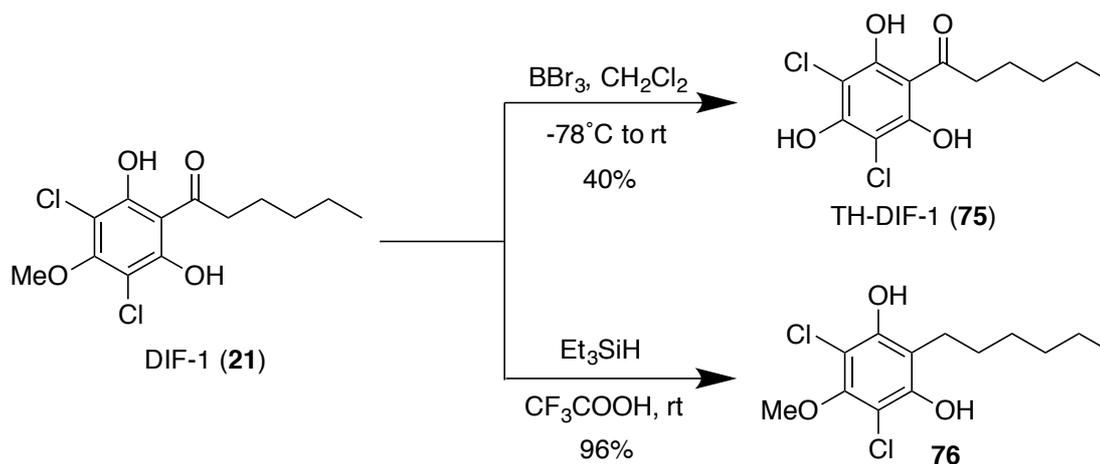
第 1 節で述べたように DIF-1 誘導体は様々な薬理活性を示し、ベンゼン環の置換基は各々の薬理活性の選択性に関わる一方、アシルの長さの変化はその薬理活性の強さを変化させる傾向が見られた。<sup>45-48</sup> そこで、DIF-1 (21) のベンゼン環の置換基を変えた各種誘導体を合成し、自然免疫に対する選択性がより高い誘導体の創製を目指した。

DIF-1 (21) の 2 つのフェノール性水酸基をメチル化した誘導体 TM-DIF-1 (72) 及び塩素原子を臭素原子に置き換えた誘導体 Br-DIF-1 (61) は、以前当研究室において確立された **Scheme 1** の経路を用いて合成した。<sup>48</sup> すなわち原料の 5-methoxyresorcinol (73) に対して hexanoyl chloride との Friedel-Crafts 反応を行い化合物 74 を得た。次に 74 を塩素化し DIF-1 (21) を得た後、フェノール性水酸基をメチル化することで TM-DIF-1 (72) を合成した。一方、74 を pyridinium bromide perbromide により臭素化することで Br-DIF-1 (61) を得た。



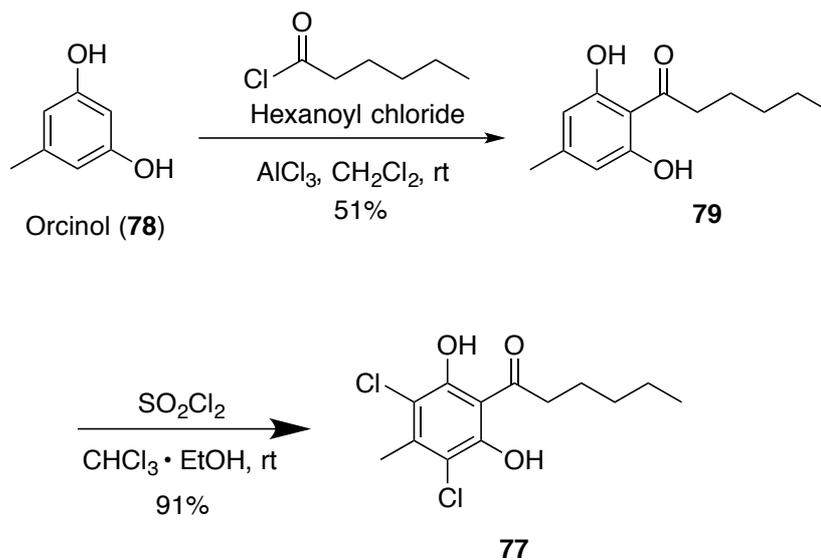
**Scheme 1.** 誘導体 TM-DIF-1 (72) 及び Br-DIF-1 (61) の合成

続いて、DIF-1 (**21**) に対し三臭化ホウ素で処理し 4 位のメトキシ基の脱メチル化を行い、3 個のフェノール性水酸基を有する誘導体 TH-DIF-1 (**75**) を得た。一方、trifluoroacetic acid の存在下で triethylsilane を用いて DIF-1 (**21**) のカルボニル基を還元することで側鎖をアルキル基に変換した誘導体 **76** を得た (Scheme 2)。



**Scheme 2.** 誘導体 TH-DIF-1 (**75**) 及び **76** の合成

またベンゼン環の 4 位のメトキシ基をメチル基に変換した誘導体 **77** は出発原料の 5-methoxyresorcinol (**73**) を orcinol (**78**) に変更することで、DIF-1 (**21**) と同様の経路で合成することができた (Scheme 3)。

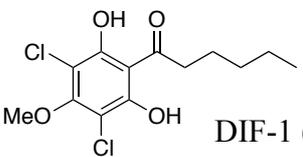
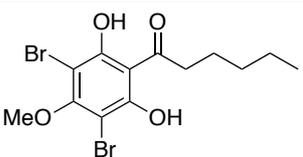
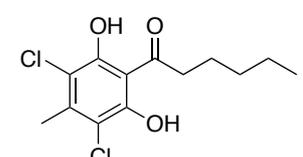
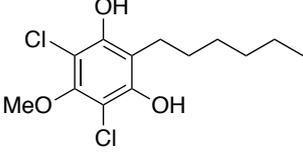
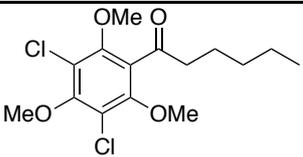
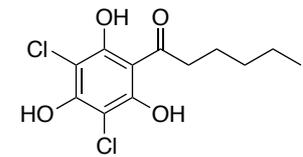


**Scheme 3.** 誘導体 **77** の合成

合成した各種誘導体について、自然免疫に対する作用を評価した。その結果、Br-DIF-1 (**61**) ( $IC_{50}$  3.7  $\mu$ M) および誘導体 **77** ( $IC_{50}$  3.8  $\mu$ M) は DIF-1 (**21**) よりも強い自然免疫抑制作用を示したが、その細胞増殖阻害作用も強力であったため (それぞれ  $CC_{50}$  12.9  $\mu$ M 及び 13.8  $\mu$ M)、自然免疫に対する選択性は DIF-1 (**21**) より低下していた (それぞれ SI 3.5 及び 3.8)。側鎖をアルキル基に変換した誘導体 **76** に関しては自然免疫抑制作用が DIF-1 (**21**) より大幅に減弱した ( $IC_{50}$  58.6  $\mu$ M) (**Table 1**)。

一方、TM-DIF-1 (**72**) および TH-DIF-1 (**75**) は自然免疫抑制作用が DIF-1 (**21**) より多少低下したものの (それぞれ  $IC_{50}$  18.9  $\mu$ M 及び 9.9  $\mu$ M)、ほとんど細胞増殖阻害作用を示さなくなったため ( $CC_{50} > 100$   $\mu$ M)、DIF-1 (**21**) より高い自然免疫選択性を示した (それぞれ SI 7.8 及び 10.3)。

そこで TM-DIF-1 (**72**) および TH-DIF-1 (**75**) について更なる構造活性相関の検討を行うことにした。

化合物	IC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	SI
 DIF-1 (21)	4.6	22.5	4.9
 Br-DIF-1 (61)	3.7	12.9	3.5
 77	3.8	13.8	3.8
 76	58.6	>100	>1.7
 TM-DIF-1 (72)	18.9	148.3	<b>7.8</b>
 TH-DIF-1 (75)	9.9	102.0	<b>10.3</b>

**Table 1.** DIF-1 (21) および各種合成誘導体の自然免疫抑制作用

化合物の自然免疫に対する作用 (*att-luc* 系,  $n=4$ ) 及び細胞増殖阻害作用 ( $n=4$ ) を測定した.

IC<sub>50</sub> は *att-luc* 系における luciferase の産生を 50% まで下げた化合物の濃度である.

CC<sub>50</sub> は化合物処理 24 時間後の S2 細胞の細胞生存率を 50% まで下げた化合物の濃度である.

SI は自然免疫に対する選択指数 ( $SI=CC_{50}/IC_{50}$ ) である.

## 第 6 節 TM-DIF-1 および TH-DIF-1 の構造活性相関の検討

第 5 節の活性評価において、最も良好な結果を示したトリメトキシ体 TM-DIF-1 (72) およびトリヒドロキシ体 TH-DIF-1 (75) について、アシル基の長さとの相関を検討することにした。Scheme 1 の hexanoyl chloride の代わりに、対応する酸クロライドを用いることで、アシル基の炭素数が 4, 5, 7, 8 の誘導体 80, 81, 82, 83 を TM-DIF-1 (72) と同様に合成した。TH-DIF-1 (75) の場合も scheme 1 及び scheme 2 における経路と同様にアシル基の炭素数が 4, 8, 9 の誘導体 84, 58, 85 をそれぞれ合成した (Figure 21)。

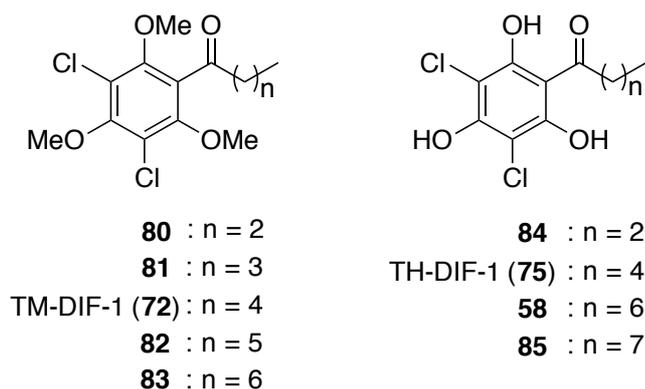
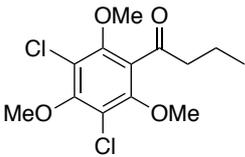
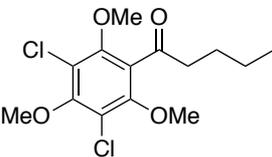
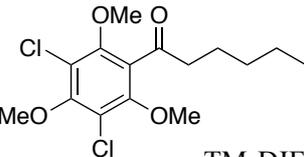
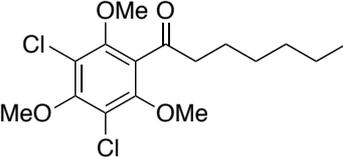
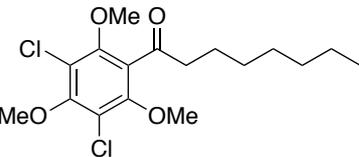


Figure 21. 合成した TM-DIF-1 (72) 及び TH-DIF-1 (75) の各種誘導体

得られた化合物についてその自然免疫に対する作用を評価した。まず、TM-DIF-1 (72) の各種誘導体について、アシル基の炭素数の長さの伸長は若干自然免疫抑制作用を増強させたが、炭素数が 8 まで長くなると、細胞増殖阻害作用の増強により自然免疫に対する選択性が大幅に低下したことが明らかになった (Table 2)。

一方、TH-DIF-1 (75) の各種誘導体の場合、アシル基の炭素数の 8 までの伸長は細胞増殖阻害作用にほとんど影響せず、自然免疫抑制作用を増強させた。しかし、こちらにおいても、さらにアシル基が長くなると自然免疫抑制活性が低下し始めた

(Table 3).

化合物	IC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	SI
 <b>80</b>	20.8	144	6.9
 <b>81</b>	23.5	149	6.3
 TM-DIF-1 ( <b>72</b> )	18.9	148	7.8
 <b>82</b>	<b>16.8</b>	140	<b>8.3</b>
 <b>83</b>	15.3	51.4	3.4

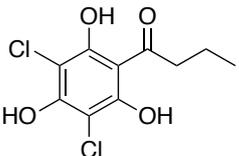
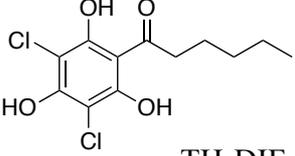
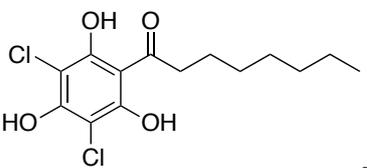
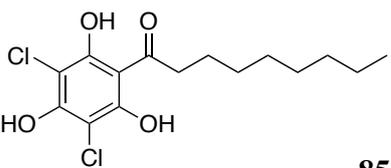
**Table 2.** TM-DIF-1 (**72**) 各種誘導体の自然免疫抑制作用

化合物の自然免疫に対する作用 (*att-luc* 系,  $n=4$ ) 及び細胞増殖阻害作用 ( $n=4$ ) を測定した.

IC<sub>50</sub> は *att-luc* 系における luciferase の産生を 50% まで下げた化合物の濃度である.

CC<sub>50</sub> は化合物処理 24 時間後の S2 細胞の細胞生存率を 50% まで下げた化合物の濃度である.

SI は自然免疫に対する選択指数 ( $SI=CC_{50}/IC_{50}$ ) である.

化合物	IC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	SI
 <b>84</b>	58.6	>100	>1.7
 <b>TH-DIF-1 (75)</b>	9.9	102	10.3
 <b>58</b>	<b>3.7</b>	88.5	<b>23.9</b>
 <b>85</b>	6.5	82.8	12.7

**Table 3.** TH-DIF-1 (75) 各種誘導体の自然免疫抑制作用

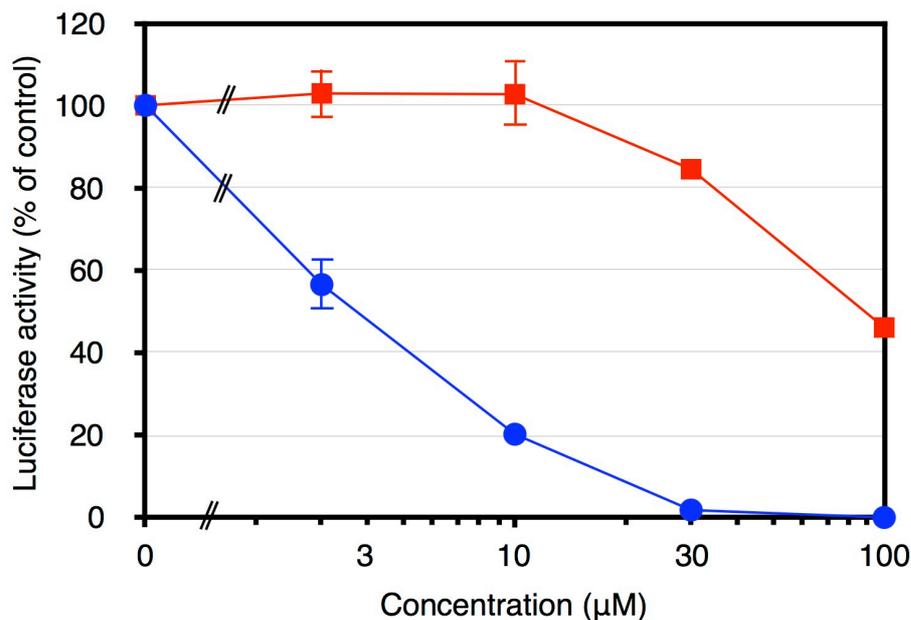
化合物の自然免疫に対する作用 (*att-luc* 系,  $n=4$ ) 及び細胞増殖阻害作用 ( $n=4$ ) を測定した.

IC<sub>50</sub> は *att-luc* 系における luciferase の産生を 50% まで下げた化合物の濃度である.

CC<sub>50</sub> は化合物処理 24 時間後の S2 細胞の細胞生存率を 50% まで下げた化合物の濃度である.

SI は自然免疫に対する選択指数 ( $SI=CC_{50}/IC_{50}$ ) である.

これまで検討してきた全ての DIF-1 誘導体のうち, TH-DIF-1 (75) のアシル基の炭素数を 8 まで伸長させた誘導体 **58** が最も有力な自然免疫抑制誘導体である (IC<sub>50</sub> 3.7 μM, SI 23.9). 本化合物は全く毒性を示さない 3 μM 及び 10 μM の濃度で, 自然免疫活性をそれぞれ約 50% と 80% 抑え, 強力かつ選択的な自然免疫抑制作用を示した (Figure 22).



**Figure 22.** 誘導体 **58** の自然免疫に対する作用

化合物の自然免疫に対する作用 (*att-luc* 系,  $n = 4$ , ●) 及び細胞増殖阻害作用 ( $n = 4$ , ■) を測定した。縦軸は化合物非処理時における値に対する相対値, 横軸は化合物の濃度である。

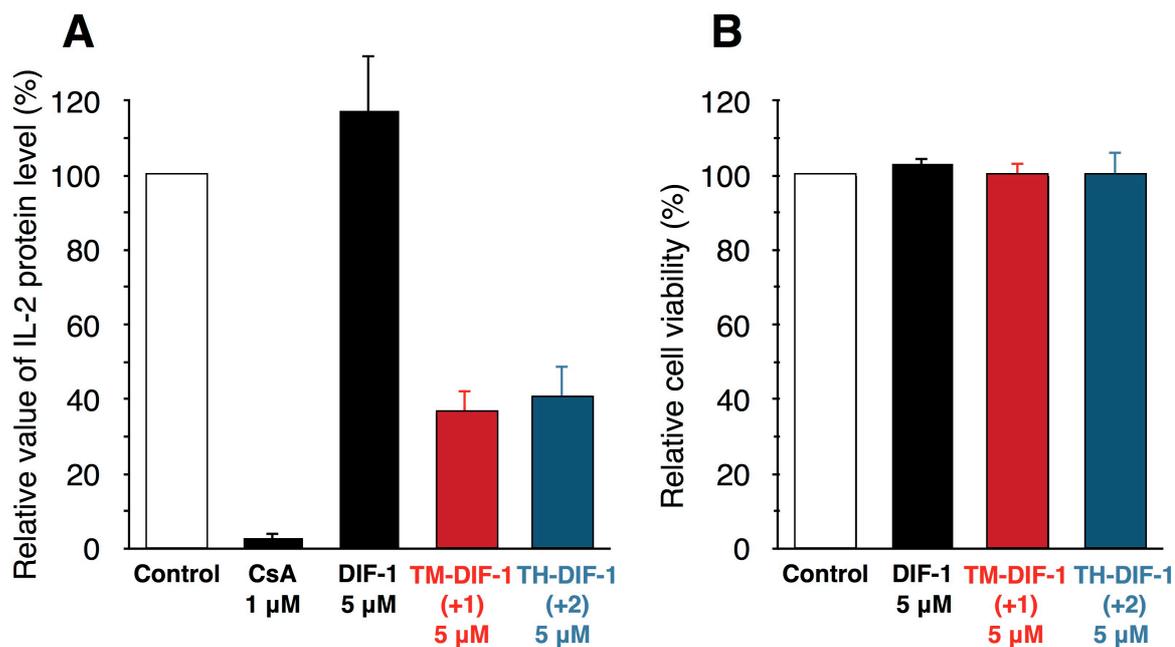
アシル基と活性との相関を検討した結果, TM-DIF-1 (**72**) 及び TH-DIF-1 (**75**) 誘導体は両方ともアシル基が長ければ長いほど自然免疫抑制作用が増強した。しかし, ある程度の長さを超えると逆に選択性が低くなることが明らかになった。TM-DIF-1 (**72**) 及び TH-DIF-1 (**75**) の誘導体のうち, それぞれ最も強い自然免疫抑制活性を示したのは誘導体 **82** と **58** である。これらの化合物のアシル基の炭素数はそれぞれ 7 及び 8 であり, その脂溶性を表す ClogP の値がそれぞれ 5.18 及び 5.13 である。一般的に, 化合物が細胞膜を透過し細胞内に入るためには適切な脂溶性 ( $-1 < \log P < 5$ ) が必要であると言われている。<sup>55</sup> このことから, 誘導体 **82** 及び **58** は細胞膜の通過が可能な最も高い脂溶性を有することが伺える。すなわち, TM-DIF-1 (**72**) 及び TH-DIF-1 (**75**) の誘導体はアシル基を伸ばすことで自然免疫活性を増強させることができるが, アシル基が長すぎると脂溶性が大幅に増大し, 細胞膜を透過することができなくなり, 結果として活性が発現不可能になることが本節の結果から推察できる。また, 脂溶性が高すぎると, 化合物の溶解度が悪くな

り、毒性が強くなることも自然免疫に対する選択性を低下させる要素の一つだと考えられる。なお、TM-DIF-1 誘導体及び TH-DIF-1 誘導体、それぞれにおいて、アシル基の最適な長さが違うのは、3つのメトキシ基を有する TM-DIF-1 (**72**) (ClogP 4.65) が3つの水酸基を有する TH-DIF-1 (**75**) (ClogP 3.54) より元々の脂溶性が高いからだと推測した。

## 第 7 節 誘導体 82 及び 58 のヒトの獲得免疫に対する作用

以前, TM-DIF-1 (72) 及び TH-DIF-1 (75) がヒト T 細胞の一種である Jurkat 細胞における免疫サイトカイン IL-2 の産生を阻害することが報告された.<sup>65</sup> そこで, TM-DIF-1 誘導体及び TH-DIF-1 誘導体のうち, 最も自然免疫抑制活性が強かった誘導体 82 及び 58 についても IL-2 産生に対する作用を検討した.

その結果, 82 及び 58 は両方とも Jurkat 細胞に対して, 5  $\mu$ M の濃度で全く毒性を示さずに IL-2 の産生を約 60 % 阻害した. すなわち, これらの化合物はヒトの獲得免疫に対しても抑制作用を示すことが明らかになった. なお, ショウジョウバエ細胞を用いた自然免疫に対する作用を評価する *att-luc* 系では, 82 は 58 より抑制作用が弱かったが, ヒト細胞においては両方が同程度の IL-2 産生阻害活性を示した (Figure 23).



**Figure 23.** DIF-1 (21), 誘導体 82 及び 58 の Jurkat 細胞における IL-2 の産生に対する作用

(A) Concanavalin A (conA) により誘導された IL-2 の産生に対する作用を評価した。細胞はそれぞれ 0.1% DMSO (control), cyclosporine A (CsA) (positive control) もしくは 5  $\mu$ M DIF-1 誘導体 (DIF-1, 82 または 58) の存在下で予め 30 分間培養した後, conA を添加しさらに 12 時間培養し, IL-2 の産生量を測定した。データは実験複数回 ( $n=3$ ) の平均値である。

(B) Jurkat 細胞に対する細胞増殖阻害作用を評価した。細胞はそれぞれ 0.1% DMSO (control), cyclosporine A (CsA) (positive control) もしくは 5  $\mu$ M DIF-1 誘導体 (DIF-1, 82 または 58) の存在下で 30 分間培養し, 細胞生存率を測定した。データは実験複数回 ( $n=3$ ) の平均値である。

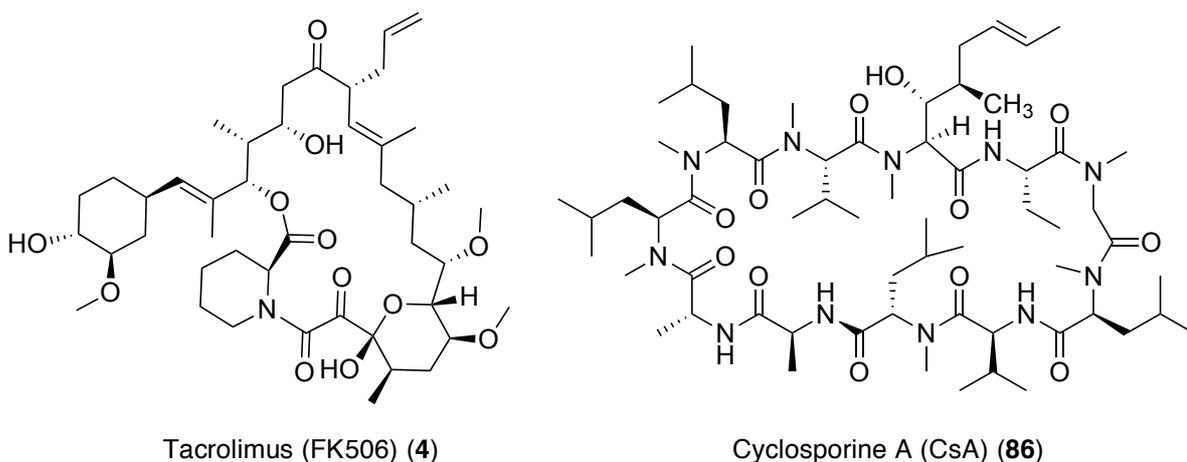
## 第 8 節 考察

本章では、DIF-1 (21) を基盤とした誘導体合成展開を行うことで、自然免疫抑制誘導体 58 を得ることができた。DIF-1 誘導体は様々な薬理活性を有し、これまで各々の薬理活性における構造活性相関が行われてきた。<sup>45-48</sup> その結果から、活性の発現にはベンゼン環の 3, 5 位に少なくとも 1 個のハロゲン原子, 2, 4, 6 位にメトキシ基または水酸基, そして 1 位にアシル基が必須であることが明らかになった。メトキシ基, 水酸基やアシル基の酸素は水素結合を形成することで、化合物とタンパク質との相互作用を増強させる。<sup>66</sup> 一方、ハロゲン含有低分子化合物とタンパク質間のハロゲン結合の形成は十分に有力な相互作用であり、ドラッグデザインにおいて、重要な要素の一つだと報告されている。<sup>67</sup> このように、DIF-1 (21) の化学構造はタンパク質との相互作用を補助する部位が多く存在し、本化合物が様々な薬理活性を示すことを裏付ける。今後、DIF-1 (21) の各種誘導体を対象とした様々な薬理活性のスクリーニングや DIF-1 (21) をベースにしたドラッグデザインを行うことで、さらに多くの活性物質を見出すことは十分に期待できる。

本章において、得られた誘導体 58 は IC<sub>50</sub> 3.7 μM とショウジョウバエの自然免疫を強く抑制した。第 3 節にも示したように、ショウジョウバエの自然免疫とヒトの自然免疫は高い相同性が見られ、<sup>56</sup> ショウジョウバエの自然免疫に作用する化合物はヒトの自然免疫にも効果を示す。<sup>60,61</sup> すなわち、誘導体 58 もヒトの自然免疫を抑制すると考えられ、自然免疫を制御する新規免疫抑制剤の開発に利用できる。

一方、誘導体 82 及び 58 はヒト Jurkat 細胞における IL-2 の産生も抑制することが明らかになった。IL-2 は主に獲得免疫機構において、T ヘルパー細胞の T-cell Receptor (TCR) 経路により産生され、T キラー細胞や B 細胞へと伝達され、T キラー細胞増殖や B 細胞による抗体の産生を促進するサイトカインである。<sup>68</sup> すで

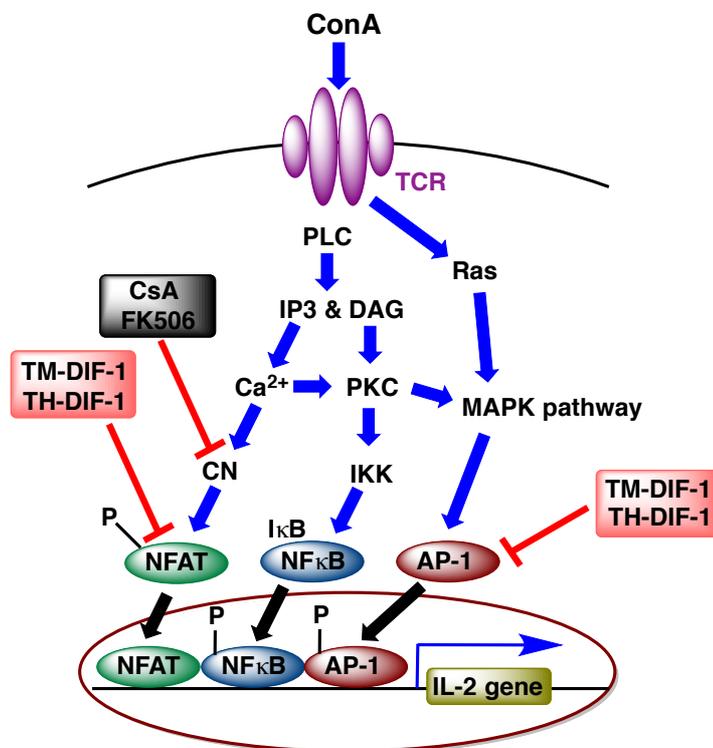
に免疫抑制剤として用いられている tacrolimus (FK506) (4) や cyclosporine A (86) も IL-2 の産生を阻害することで、免疫抑制作用を示す。これらの化合物は細胞内の FK506 結合タンパク質及びシクロスポリン結合タンパク質に結合した後、薬物-タンパク質の複合体がカルシニューリンに結合することで IL-2 の遺伝子発現を抑制することが知られている。<sup>69</sup> 一方、TM-DIF-1 (72) 及び TH-DIF-1 (75) は tacrolimus (4) や cyclosporine A (86) とは違い、カルシニューリンの下流にある転写因子 AP-1 と NFAT の活性を抑制することで IL-2 の産生を阻害することが以前の研究により、明らかにされた (Figure 25)。<sup>65</sup> 今回、得られた誘導体 82 及び 58 も TM-DIF-1 (72) 及び TH-DIF-1 (75) と同様に tacrolimus (4) や cyclosporine A (86) とは異なる作用機構で IL-2 の産生を阻害すると考えられる。



**Figure 24.** Tacrolimus (4) 及び cyclosporine A (86) の化学構造

本章の結果から、誘導体 58 が自然免疫及び獲得免疫、両方とも強く抑制することが明らかになった。上でも述べたように、獲得免疫において、T キラー細胞の増殖や B 細胞による抗体産生は T ヘルパー細胞により促進される。しかし、その過程の引き金は自然免疫の樹状細胞から T ヘルパー細胞への抗原情報伝達であることが知られている。<sup>68</sup> すなわち、自然免疫の活性化は獲得免疫の活性化を引き起こす。誘導体 58 が自然免疫及び獲得免疫両方とも抑制することから、本化合物は獲得

免疫のみを抑制する既存薬よりも、効果的に免疫を抑制することができる新タイプの免疫抑制剤の開発に有用である。このことから DIF-1 (21) の「創薬テンプレート」としての有用性が改めて示唆された。



**Figure 25.** TCR 経路による IL-2 の産生

(Takahashi, K. et. al *Life Sci.* 2011, 88, 480-485 Figure 1B を参考し, 作成した)

## 第 2 章 亜鉛イオン添加培養による新規化合物の取得

### 第 1 節 金属イオンによる細胞性粘菌の代謝活性化

序論で述べたように、本章では細胞性粘菌からさらに新規化合物を取得するために、各種細胞性粘菌について  $Zn^{2+}$  の存在下で培養を行うことにした。細胞性粘菌は全ゲノムの解読の結果から、どの生物よりも多くのポリケチド合成酵素 (pks) 遺伝子を有する<sup>21,40</sup>にもかかわらず、実際に単離された化合物の数はそれほど多くない。その理由は通常の培養環境では発現しない多くの休眠遺伝子が存在するからだと考えられる。<sup>14</sup> したがって、これらの休眠遺伝子を活性化させることで新たな代謝物を得ることが期待できる。微生物の代謝を活性化させる方法の一つとして金属イオンの添加培養が報告されている。黄色麹菌 *Aspergillus flavus* において  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  や  $Fe^{2+}$  のミネラルイオンが mRNA 転写と共に aflatoxin (87) 及びその前駆体の生合成を誘導することが Cuero らにより見出された。<sup>70</sup> 同様に、内生真菌 *Berkleasmium* sp. Dzf12 を  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  や  $Al^{3+}$  の存在下で培養を行った結果、代謝物である palmarumycins  $C_{12}$  (88) 及び  $C_{13}$  (89) の産生量が増大した報告もある。<sup>71</sup>

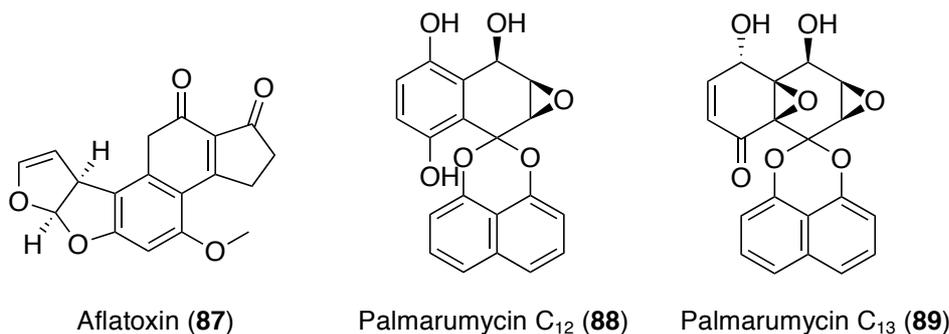


Figure 26. Aflatoxin, palmarumycin  $C_{12}$  及び  $C_{13}$  の化学構造

また、細胞性粘菌については、以前  $Zn^{2+}$  が *D. discoideum* において柄細胞への分化を誘導することが明らかにされた。<sup>72</sup> その後の Serafimidis らの研究では、*D. discoideum* を  $Zn^{2+}$  や  $Cd^{2+}$  の存在下で培養した際、通常の培養条件では得ることが

できない柄細胞分化誘導活性を有する数個の化合物の存在が検出された。<sup>73</sup> この際、化合物の単離及び詳細な構造決定には至らなかったが、これらの知見は細胞性粘菌の代謝を活性化させるために  $\text{Cd}^{2+}$  や  $\text{Zn}^{2+}$  が有力なファクターである可能性を示唆した。

## 第 2 節 スクリーニング

第 1 節で述べたように、細胞性粘菌の代謝を活性化させるために  $\text{Cd}^{2+}$  や  $\text{Zn}^{2+}$  が有力なファクターである可能性が示唆された。 $\text{Cd}^{2+}$  は  $\text{Zn}^{2+}$  より毒性が強く、規制等による取り扱いが難しいため、 $\text{Zn}^{2+}$  の存在下で各種細胞性粘菌について、培養を行うことにした。最初に、少スケールでのスクリーニングを行った (Figure 27)。

各種細胞性粘菌について、通常細胞性粘菌の培養に用いられている A 培地 (control) 及び  $\text{Zn}^{2+}$  源として塩化亜鉛を添加した A 培地をそれぞれ用いて 15 cm シャーレ 50 枚ずつ培養した。塩化亜鉛の濃度については 0.5 mM, 2.0 mM 及び 8.0 mM をそれぞれ検討したが、2.0 mM 以上の濃度では毒性により、細胞性粘菌が増殖できなかつたため、0.5 mM の塩化亜鉛を用いてスクリーニングを行うことにした。培養開始から 4 日後、子実体を回収し、凍結乾燥後メタノールで 3 回抽出を行った。得られたメタノール抽出物を酢酸エチル対水で分液操作を行い、酢酸エチル可溶画分を得た。この酢酸エチル可溶画分について、逆相 HPLC を用いて代謝物の組成を分析し、control と比較した。この際、 $\text{Zn}^{2+}$  の添加により、HPLC のチャートにおいて control には見られなかつたピークが出現した場合、新しい化合物の産生が誘導されたと見なした。

本スクリーニング法を用いて、*Dictyostelium* 属からは 15 株、*Polyspondilium* 属からは 4 株、計 19 種類の細胞性粘菌について検討を行った。その結果、7 つの菌種において、 $\text{Zn}^{2+}$  添加による代謝物の産生誘導が見られた (Table 4)。

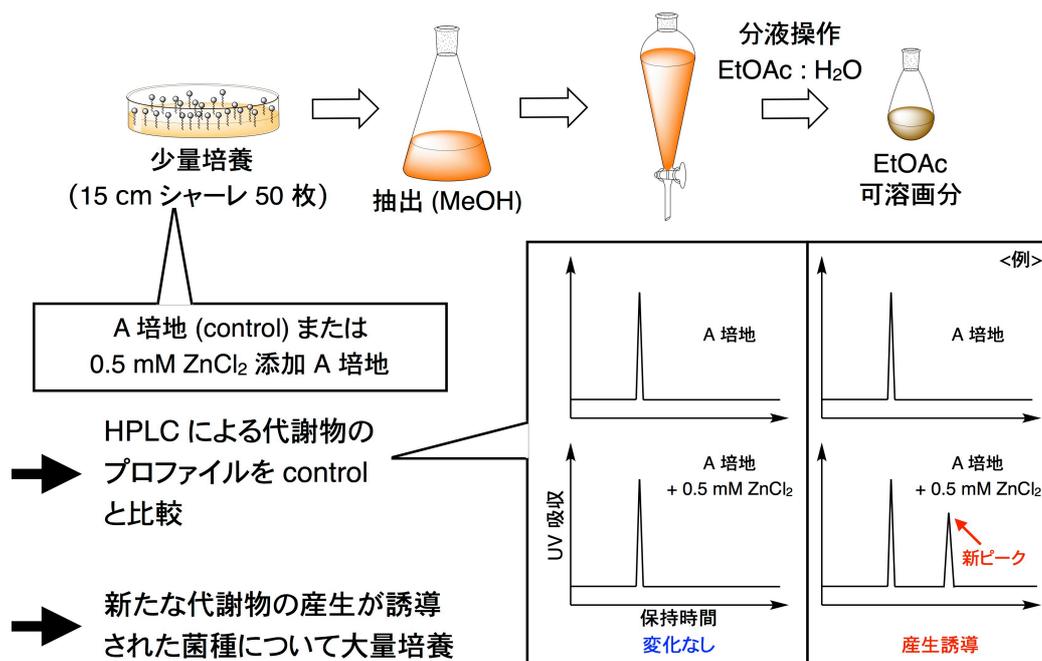


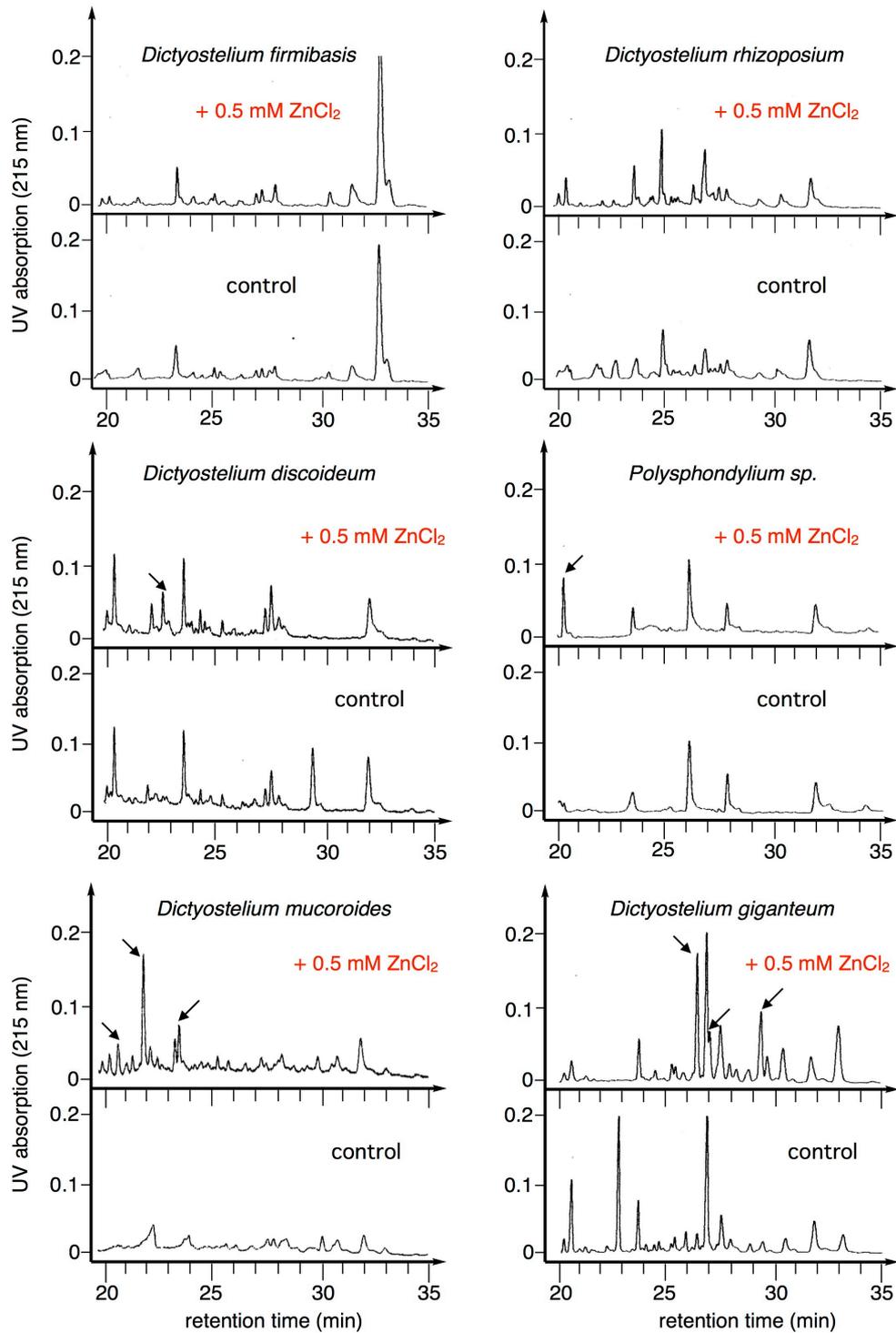
Figure 27. スクリーニングの方法

菌名	結果	菌名	結果
<i>Dictyostelium discoideum</i>	●	<i>Dictyostelium magnum</i>	×
<i>Dictyostelium mucoroides</i>	●	<i>Dictyostelium elegans</i>	×
<i>Dictyostelium purpureum</i>	●	<i>Dictyostelium aureum</i>	×
<i>Dictyostelium longosporum</i>	●	<i>Dictyostelium rhizoposium</i>	×
<i>Dictyostelium giganteum</i>	●	<i>Dictyostelium robustum</i>	×
<i>Dictyostelium clavatum</i>	●	<i>Polysphondylium sp.</i>	●
<i>Dictyostelium monochasiodes</i>	×	<i>Polysphondylium filamentous</i>	×
<i>Dictyostelium firmibasis</i>	×	<i>Polysphondylium pallidum</i>	×
<i>Dictyostelium implicatan</i>	×	<i>Polysphondylium violaceum</i>	×
<i>Dictyostelium rosarium</i>	×		

Table 4. スクリーニングに用いた各種細胞性粘菌

- : Zn<sup>2+</sup> 添加による代謝物の産生誘導が見られた菌種
- × : Zn<sup>2+</sup> を添加しても代謝物の産生誘導が見られなかった菌種

**Figure 28** にスクリーニング時の HPLC チャートの結果の一部を示した。 *D. firmibasis* や *D. rhizoposium* については  $Zn^{2+}$  を添加しても代謝物の組成は control と比較して、ほとんど違いが見られなかった。一方、*D. discoideum*, *D. mucoroides*, *D. giganteum* や *Polysphondylium sp.* の場合、 $Zn^{2+}$  の添加による新しい代謝物の産生が確認できた。特に、*D. giganteum* については、0.5 mM  $Zn^{2+}$  の存在下で培養することで、複数の代謝物の産生が大幅に誘導され、 $Zn^{2+}$  による代謝活性化は非常に顕著なものであった。そこで、*D. giganteum* について、大量培養を行い実際に化合物の取得を目指した。



**Figure 28.** 主な菌株のスクリーニングの結果

図は酢酸エチル可溶画分に含まれる代謝物の組成を HPLC により分析したチャートである。

下段：通常 A 培地で培養した場合；上段：0.5 mM Zn<sup>2+</sup> 存在下で培養した場合

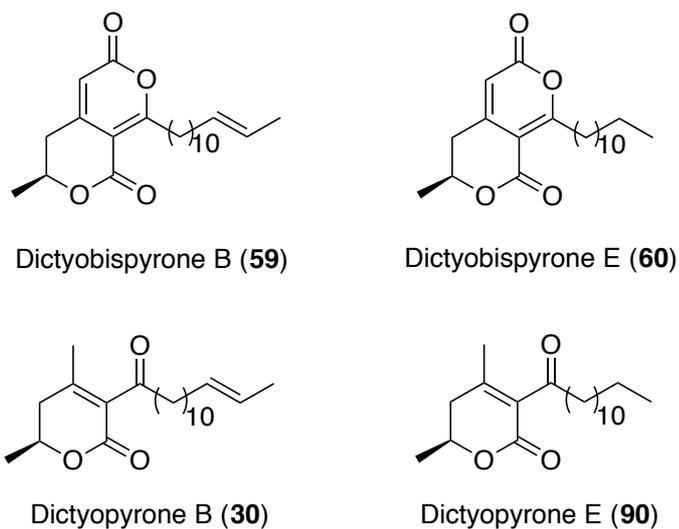
縦軸：215 nm の波長における吸光度；横軸：HPLC における保持時間

酢酸エチル可溶画分の注入量：300 μg

Column：Mightysil RP-18; Eluent：CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O (20 / 80 → 100 / 0); Flow：1 mL/min

### 第 3 節 化合物の単離

大量培養した *D. giganteum* (15 cm シャーレ 400 枚分) は少量培養時と同様に回収 (凍結乾燥後 43.74 g), メタノール抽出 (5.7 g), 酢酸エチル対水での分液操作を行い, 酢酸エチル可溶画分 (686.4 mg) を得た. これを各種カラムクロマトグラフィーにより分画した結果, dictyobispyrone B (**59**) と E (**60**) の混合物 (dictyobispyrone B : E = 3 : 1) (1.5 mg), 及び dictyopyrone B (**30**) と E (**90**) の混合物 (dictyopyrone B : E = 3 : 1) (2.4 mg) がそれぞれ得られた (**Figure 29**). このうち, dictyopyrone B<sup>29</sup> 以外は新規化合物である. それぞれの混合物は各種カラムクロマトグラフィー及び順相 HPLC では分離することができなかった. しかし, それぞれの混合物の <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR を測定したところ, 共通のピークが多く見られ, 混合物の状態でも構造を推定することができると考えられたため, 混合物の状態でも化学構造を推定することにした.



**Figure 29.** *Dictyostelium giganteum* より単離した化合物

また、逆相 HPLC を用いて分析した結果 dictyobispyrone B (59) と E (60) が少量培養時、 $Zn^{2+}$  の添加により産生が誘導されていたピークに相当する化合物等であることが明らかになった (Figure 30).

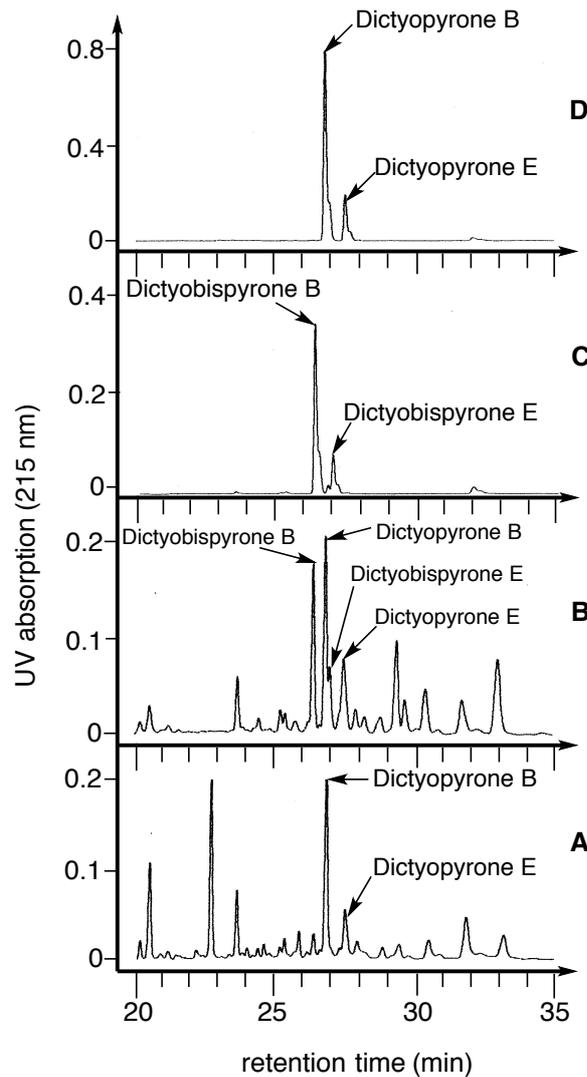


Figure 30. 逆相 HPLC による分析

A : *D. giganteum* 通常培養時の酢酸エチル可溶画分, 注入量 : 300  $\mu$ g; B :  $Zn^{2+}$  添加培養時の酢酸エチル可溶画分, 注入量 : 300  $\mu$ g; C : dictyobispyrone B (59) と E (60) の混合物 (B : E = 3 : 1), 注入量 : 5  $\mu$ g; D : dictyopyrone B (30) と E (90) の混合物 (B : E = 3 : 1), 注入量 : 5  $\mu$ g.

Column : Mightysil RP-18; Eluent :  $CH_3CN / H_2O$  (20 / 80  $\rightarrow$  100 / 0); Flow : 1 mL/min.

縦軸 : 215 nm の波長における吸光度; 横軸 : HPLC における保持時間

## 第 4 節 Dictyobispyrone B 及び E の化学構造の推定

Dictyobispyrone B (59) 及び E (60) の混合物の  $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR のスペクトルには、共通のピークが多く見られたことから、これらの化合物が共通の構造を有すると推測した。また、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR のスペクトルよりその共通の構造には 2 個のエステルカルボニル炭素、4 つのオレフィン炭素の他、オキシメチン炭素、メチレン炭素、メチル炭素それぞれ 1 個ずつが存在することが確認できた。さらに、これらの  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 及び HMBC スペクトルにおける相関から、共通の部分構造が Figure 31 の I であることが明らかになった。C-10 の化学シフト値が  $\delta_{\text{C}}$  177.9 とかなり低磁場側にシフトしたことから、C-10 は O-9 と結合すると推測した。結果的に、残りの C-2 と C-3 は互いに繋がり、dictyobispyrone B (59) 及び E (60) の共通部分構造が Figure 31 の bispyrone 環構造 II であることが明らかになった。

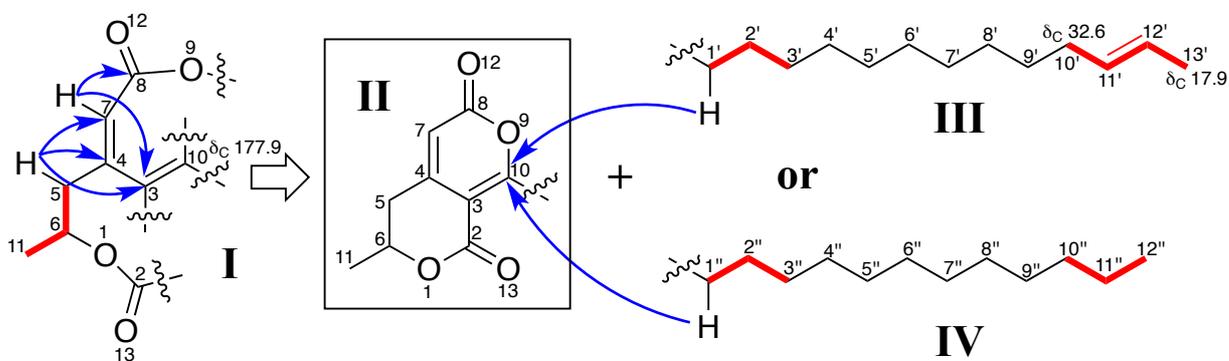


Figure 31. Dictyobispyrone B (59) 及び E (60) の主な  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (太い線), HMBC (矢印) における相関

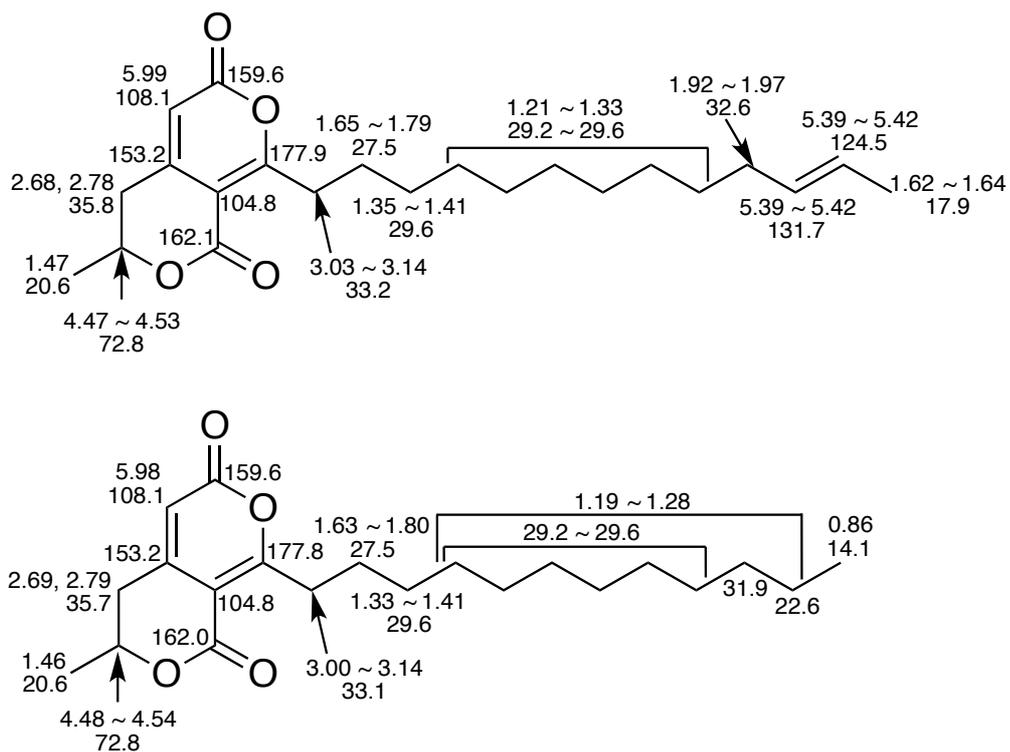
$^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおける、共通の部分構造を除いた残りのピークがほとんど高磁場側に位置することから dictyobispyrone B (59) 及び E (60) の残りの部分構造がそれぞれ異なる炭化水素鎖であると推測した。Dictyobispyrone B (59) の炭化水素鎖には 1 個の C-C 二重結合の存在が確認できた ( $\delta_{\text{C}}$  124.5 ppm, 131.7

ppm;  $\delta_{\text{H}}$  5.39-5.42 ppm). また, HREIMS において, 分子イオンピーク  $m/z$  360.2301  $[\text{M}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$  360.2299) が観測されたことから, bispyrone 環 ( $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$ ) を除いた dictyobispyrone B (**59**) の炭化水素鎖の組成式が  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}$  であることが明らかになった. したがって, dictyobispyrone B (**59**) の炭化水素鎖が **Figure 31** の **III** であると推測した. また, C-11'-C-12' の二重結合の *E* 配置は隣接の炭素の化学シフト値の測定値を加成的なシフトパラメーターを用いて計算した値<sup>29</sup> と比較することで、決定することができた (**Table 5**).

	$\delta_{\text{C}}$ (測定値)	$\delta_{\text{C}}$ ( <i>E</i> 配置時の計算値)	$\delta_{\text{C}}$ ( <i>Z</i> 配置時の計算値)
C-10'	32.6	33.0	27.0
C-13'	17.9	17.0	11.0

**Table 5.** 化学シフト値の比較による dictyobispyrone B (**59**) の C-11'-C-12' の二重結合の配置の決定

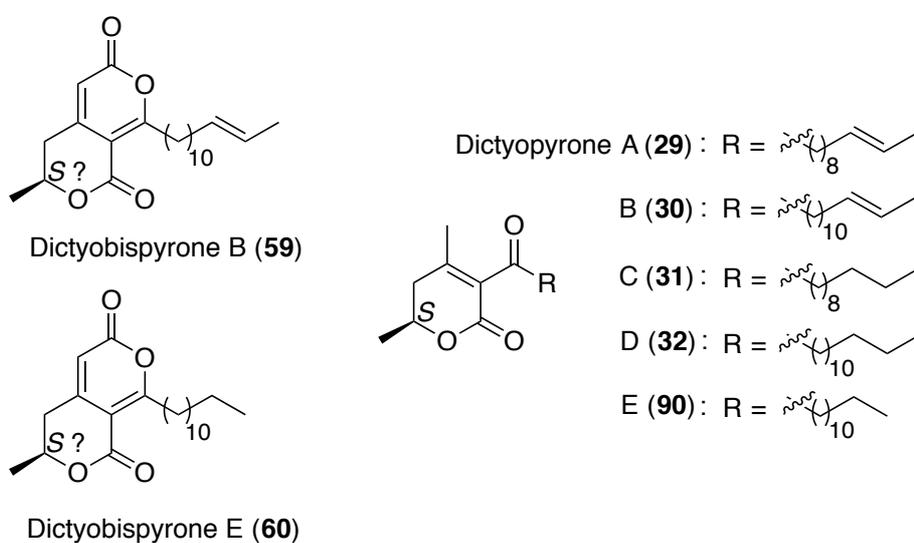
Dictyobispyrone E (**60**) ついても同様に, HREIMS における分子イオンピーク 348.2293  $[\text{M}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$  348.2299) から, 炭化水素鎖の組成式が  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$  であることが明らかになった. したがって, その構造が **Figure 28** の **IV** であると推測した. 最後に, **II** と **III** または **IV** との繋がりには C-10 と H-1' または H-1'' との HMBC における相関により確認できた. したがって, dictyobispyrone B (**59**) 及び E (**60**) の化学構造が **Figure 32** に示した構造であると推定した.



**Figure 32.** Dictyobispyrone B (**59**) 及び E (**60**) の化学構造及び  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR における化学シフト値 (上段 :  $\delta_{\text{H}}$ ; 下段 :  $\delta_{\text{C}}$ )

## 第 5 節 Dictyobispyrone B 及び E の合成

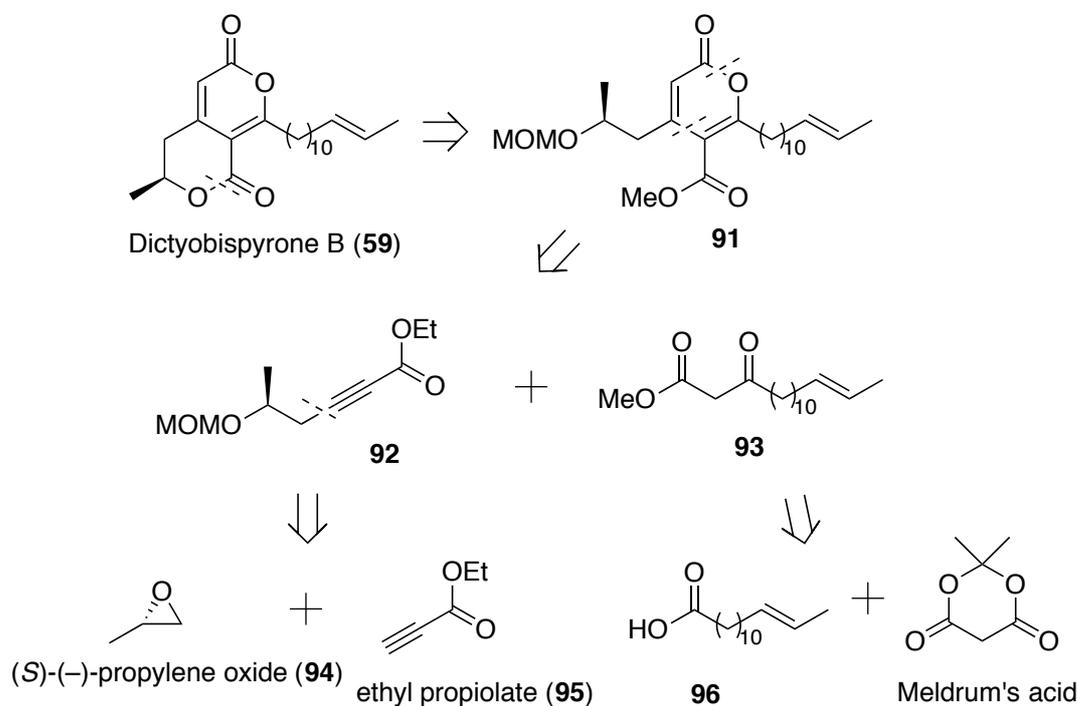
Dictyobispyrone B (59) 及び E (60) の構造には 6 位に不斉炭素があり, その絶対配置が決定できていない. ところで, dictyobispyrone B (59) 及び E (60) と一緒に dictyopyrone B (30) 及び E (90) も単離された. Dictyopyrone 類は以前すでに細胞性粘菌から単離された化合物群であり, その 6 位の絶対配置は *S* であると決定されている.<sup>29</sup> Dictyobispyrone 類及び dictyopyrone 類の化学構造における  $\alpha$ -pyrone 環や炭化水素鎖の飽和度, 長さの類似性から, これらの化合物は同じ生合成経路により産生されると推測した. すなわち, dictyobispyrone 類の 6 位の絶対配置も dictyopyrone 類と同じである可能性が高い. そこで, dictyobispyrone 類の 6 位における絶対配置が *S* であると推測し, dictyobispyrone B (59) 及び E (60) の合成をそれぞれ行い, 化学構造を確認することにした.



**Figure 33.** Dictyobispyrone 類及び dictyopyrone 類の化学構造

Dictyobispyrone B (59) は中間体 91 を環化させることで得ることができると考えた. 中間体 91 は以前報告された acetylenic ester 及び  $\beta$ -ketoester による  $\alpha$ -pyrone 環の構築法を参考に, 中間体 92 及び 93 から得ることができると考えた.<sup>74</sup> また,

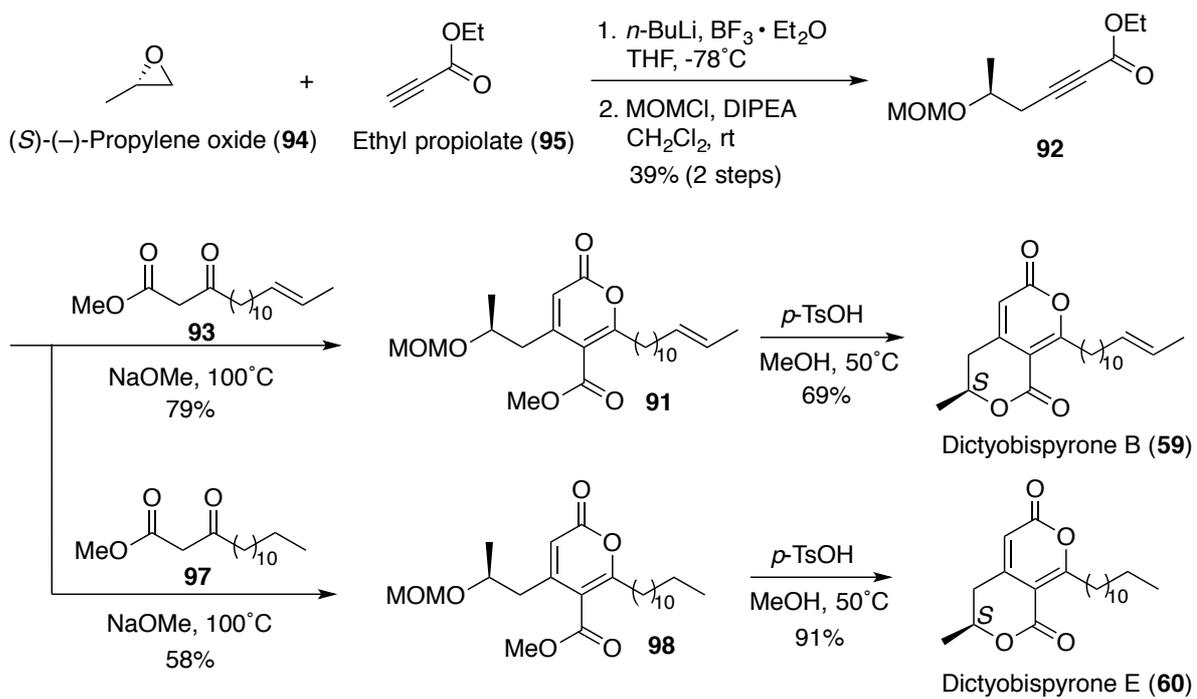
92 及び 93 はそれぞれ 94 と 95 及び 96 と Meldrum's acid より合成することができる (Scheme 4).



Scheme 4. Dictyobispyrone B (43) の逆合成解析

この方針に基づき、実際に dictyobispyrone B (59) の合成を行った。まず、boron trifluoride diethyl etherate の存在下で、ethyl propiolate (95) を *n*-butyllithium で処理し得られたアセチリドを用いて、(S)-(-)-propylene oxide (94) への求核付加反応を行った。<sup>75</sup> 続いて、得られた二級アルコールの methoxymethyl 基による保護を行うことで化合物 92 を得た。化合物 92 を以前当研究室においてすでに合成が達成された  $\beta$ -ketoester 93<sup>76</sup> と反応させることで 1 個目の pyrone 環を有する化合物 91 を合成した。<sup>74</sup> 化合物 91 に対して、*p*-toluensulfonic acid の存在下、50°C で攪拌することにより 2 個目の pyrone 環を環化させ、目的の dictyobispyrone B (59) を得ることができた (Scheme 5).

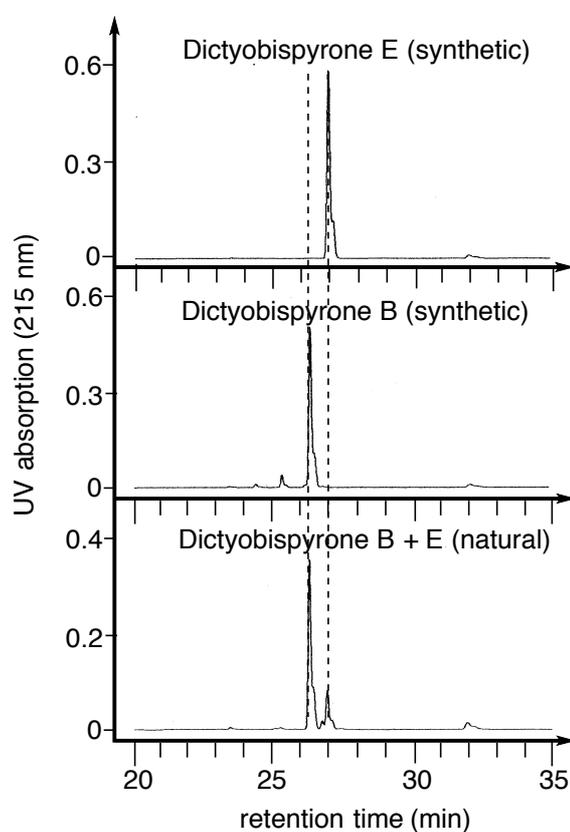
Dictyobispyrone E についても、相応する  $\beta$ -ketoester 97<sup>76</sup> を用いることで、dictyobispyrone B と同様の経路で合成できた。



**Scheme 5.** Dictyobispyrone B (**59**) 及び E (**60**) の合成

## 第 6 節 Dictyobispyrone B 及び E の化学構造の決定

合成した dictyobispyrone B (59) 及び E (60) を用いて、HPLC での分析を行ったところ、天然の混合物の 2 つのピークとそれぞれ保持時間が一致した (Figure 34). また、合成品の  $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルをそれぞれ合わせたものも天然の混合物のスペクトルと一致したことから、推定していた化学構造が正しいことが示唆された (Table 6).



**Figure 34.** 合成した dictyobispyrone B, E 及び天然混合物の逆相 HPLC による分析

Column : Mightysil RP-18; Eluent :  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  (20 / 80  $\rightarrow$  100 / 0); Flow : 1 mL/min; 注入量 : 5  $\mu\text{g}$

縦軸 : 215 nm の波長における吸光度; 横軸 : HPLC における保持時間

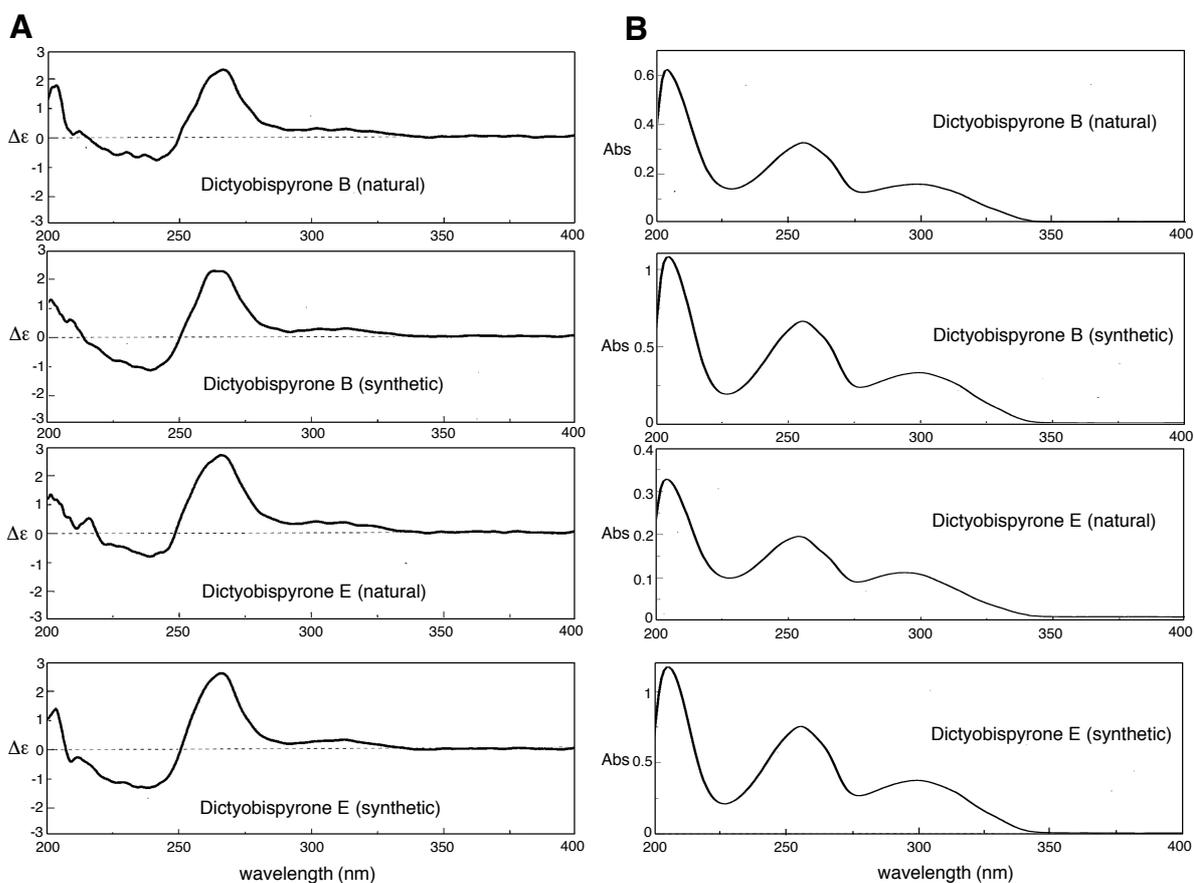
Position	Natural mixture of dictyobispyrone B and E <sup>a</sup>		Dictyobispyrone B (synthetic) <sup>b</sup>		Dictyobispyrone E (synthetic) <sup>b</sup>	
	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)
<b>10</b>	177.8, C		177.9, C		177.8, C	
<b>2</b>	162.1, C		162.1, C		162.0, C	
<b>8</b>	159.6, C		159.6, C		159.6, C	
<b>4</b>	153.2, C		153.2, C		153.2, C	
<b>11'</b>	131.7, CH	5.37-5.42, m	131.7, CH	5.39-5.42, m		
<b>12'</b>	124.5, CH		124.5, CH			
<b>7</b>	108.1, CH	5.98, s	108.1, CH	5.99, s	108.1, CH	5.98, s
<b>3</b>	104.8, C		104.8, C		104.8, C	
<b>6</b>	72.8, CH	4.45-4.54, m	72.8, CH	4.47-4.53, m	72.8, CH	4.48-4.54, m
<b>5</b>	35.8, CH <sub>2</sub>	2.79, dd (3.2, 16.4)	35.8, CH <sub>2</sub>	2.78, dd (2.4, 16.2)	35.7, CH <sub>2</sub>	2.79, dd (2.9, 16.5)
		2.68, ddd (1.6, 10.4, 16.4)		2.68, ddd (1.8, 10.2, 16.2)		2.69, ddd (1.7, 10.7, 16.3)
<b>1' (1'')</b>	33.2, CH <sub>2</sub>	3.00-3.15, m	33.2, CH <sub>2</sub>	3.03-3.14, m	33.1, CH <sub>2</sub>	3.00-3.14, m
<b>10'</b>	32.6, CH <sub>2</sub>	1.90-1.97, m	32.6, CH <sub>2</sub>	1.92-1.97, m		
<b>3' (3'')</b>	29.6, CH <sub>2</sub>	1.33-1.41, m	29.6, CH <sub>2</sub>	1.35-1.41, m	29.6, CH <sub>2</sub>	1.33-1.41, m
<b>10''</b>	31.9, CH <sub>2</sub>				31.9, CH <sub>2</sub>	
<b>4'~9' (4''~9'')</b>	29.5, CH <sub>2</sub>	1.21-1.33, m	29.5, CH <sub>2</sub>	1.21-1.33, m	29.6, CH <sub>2</sub>	1.19-1.28, m
	29.5, CH <sub>2</sub>		29.5, CH <sub>2</sub>		29.5, CH <sub>2</sub>	
	29.4, CH <sub>2</sub>		29.4, CH <sub>2</sub>		29.4, CH <sub>2</sub>	
	29.4, CH <sub>2</sub>		29.4, CH <sub>2</sub>		29.4, CH <sub>2</sub>	
	29.2, CH <sub>2</sub>		29.2, CH <sub>2</sub>		29.3, CH <sub>2</sub>	
	29.2, CH <sub>2</sub>		29.1, CH <sub>2</sub>		29.2, CH <sub>2</sub>	
<b>11''</b>	22.7, CH <sub>2</sub>				22.6, CH <sub>2</sub>	
<b>2' (2'')</b>	27.5, CH <sub>2</sub>	1.65-1.81, m	27.5, CH <sub>2</sub>	1.65-1.79, m	27.5, CH <sub>2</sub>	1.63-1.80, m
<b>11</b>	20.6, CH <sub>3</sub>	1.47, d (6.4)	20.6, CH <sub>3</sub>	1.47, d (6.3)	20.6, CH <sub>3</sub>	1.46, d (6.3)
<b>13'</b>	17.9, CH <sub>3</sub>	1.61-1.64, m	17.9, CH <sub>3</sub>	1.62-1.64, m		
<b>12''</b>	14.1, CH <sub>3</sub>	0.87, d (6.9)			14.1, CH <sub>3</sub>	0.86, d (6.7)

**Table 6.** Dictyobispyrone B, E 及び天然物の <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR のデータの比較

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR 測定周波数 : 600 / 150 MHz

<sup>b</sup> <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR 測定周波数 : 400 / 150 MHz

続いて、逆相 HPLC を用いて天然混合物の分離を試みたところ、得られた各々の化合物の量は少なく、各種 1 次元及び 2 次元 NMR の測定には不十分であったが、CD スペクトルの測定には十分な量が得られた。そこで、天然物及び合成品の dictyobispyrone B (**59**) 及び E (**60**), それぞれについて CD スペクトルを測定した。その結果、4 つの化合物は共に 260 nm 付近において同じ正のコットン効果を示した (**Figure 35**)。このことから天然物と合成品が同じ絶対構造を有することが確認でき、dictyobispyrone 類の 6 位の絶対配置が *S* であると決定した。



**Figure 35.** Dictyobispyrone B (天然物, 合成品) 及び dictyobispyrone E (天然物, 合成品) の CD スペクトル (A) 及び UV 吸収スペクトル (B) の比較

A 縦軸：モル円二色性; 横軸：波長

B 縦軸：吸光度; 横軸：波長

サンプルの濃度 dictyobispyrone B (synthetic) : 83.3  $\mu\text{M}$ ; dictyobispyrone B (natural) : 58.1  $\mu\text{M}$ ;  
dictyobispyrone E (synthetic) : 86.2  $\mu\text{M}$ ; dictyobispyrone E (natural) : 57.2  $\mu\text{M}$

また, dictyobispyrone B (**59**), dictyobispyrone E (**60**) 及び天然の混合物 (dictyobispyrone B : E = 3 : 1) の比旋光度を測定したところ, それぞれの結果が  $[\alpha]_D^{25} + 38.7$ ,  $[\alpha]_D^{25} + 38.0$  及び  $[\alpha]_D^{25} + 40.7$  と一致が見られた (**Table 7**). このことも天然物の 6 位における絶対配置が合成品と同じ *S* であることを裏付けた.

Dictyobispyrone B ( <b>59</b> ) (synthetic)	Dictyobispyrone E ( <b>60</b> ) (synthetic)	Mixture of dictyobispyrone B and E (natural) (B : E = 3 : 1)
$[\alpha]_D^{25} + 38.7$ ( <i>c</i> 0.90, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D^{25} + 38.0$ ( <i>c</i> 1.16, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D^{25} + 40.7$ ( <i>c</i> 0.18, CHCl <sub>3</sub> )

**Table 7.** Dictyobispyrone B (**59**), dictyobispyrone E (**60**) 及び天然混合物の比旋光度

## 第 7 節 Dictyopyrone E の合成による化学構造の決定

Dictyopyrone E (90) は既知化合物 dictyopyrone B (30) との混合物として得られた。各種スペクトルのデータより, dictyobispyrone 類と同様に dictyopyrone E (90) と dictyopyrone B (30) との違いは炭化水素鎖の飽和度及び長さのみであることが明らかになった (Figure 36)。

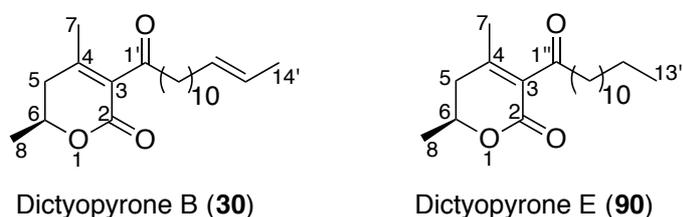
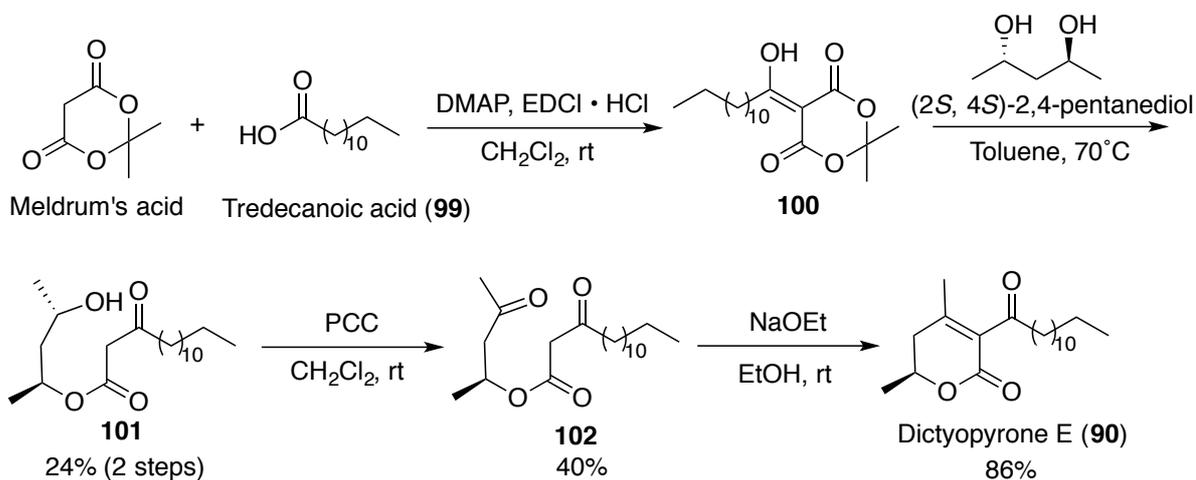


Figure 36. Dictyopyrone B (30) 及び E (90) の化学構造

Dictyopyrone 類の合成は以前すでに達成されている。<sup>76</sup> Dictyopyrone E (90) についても原料に tredecanoic acid (99) 及び Meldrum's acid を用いることで, 同様の経路により合成することができた (Scheme 6)。



Scheme 6. Dictyopyrone E (90) の合成

得られた dictyopyrone E (90) 及び以前報告された dictyopyrone B (30)<sup>29</sup> の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR データをそれぞれ合わせたものが天然の混合物と一致した。(Table 8)

Position	Natural mixture of dictyopyrone B and E <sup>a</sup>		Dictyopyrone B (natural) <sup>b</sup>		Dictyopyrone E (synthetic) <sup>c</sup>		
	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)	$\delta_C$ , mult.	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> , Hz)	
<b>1' (1'')</b>	203.5, C		203.7, C		203.5 C		
<b>2</b>	163.2, C		163.6, C		163.2, C		
<b>4</b>	156.1, C		156.4, C		156.1, C		
<b>12'</b>	131.7, CH	5.36-5.45, m	131.9, CH	5.39-5.42, m			
<b>13'</b>	124.5, CH		124.8, CH				
<b>3</b>	130.1, C		130.3, C		130.0, C		
<b>6</b>	73.1, CH	4.51-4.57, m	73.3, CH	4.47-4.53, ddq (11.6, 6.1, 3.7)	73.1, CH	4.53-4.57, ddq (11.6, 6.0, 3.6)	
<b>2' (2'')</b>	43.5, CH <sub>2</sub>	2.73, td (7.2, 2.9)	43.7, CH <sub>2</sub>	2.73, td (7.3, 2.4)	43.5, CH <sub>2</sub>	2.73, td (7.6, 1.6)	
<b>5</b>	37.8, CH <sub>2</sub>	2.44, dd (18.0, 11.8)	38.0, CH <sub>2</sub>	2.44, dd (18.3, 11.6)	37.7, CH <sub>2</sub>	2.44, dd (18.4, 11.6)	
		2.30, dd (18.0, 3.6)		2.30, dd (18.3, 3.7)		2.30, dd (18.0, 4.0)	
<b>11'</b>	32.6, CH <sub>2</sub>	1.19-1.38, m	32.8, CH <sub>2</sub>	1.2-1.4, m		1.21-1.36, m	
<b>11''</b>	31.9, CH <sub>2</sub>						31.9, CH <sub>2</sub>
<b>4'~10' (4''~10'')</b>	29.6, CH <sub>2</sub>		29.8, CH <sub>2</sub>				29.6, CH <sub>2</sub>
	29.6, CH <sub>2</sub>		29.6, CH <sub>2</sub>				29.6, CH <sub>2</sub>
	29.5, CH <sub>2</sub>		29.6, CH <sub>2</sub>				29.6, CH <sub>2</sub>
	29.5, CH <sub>2</sub>		29.4, CH <sub>2</sub>				29.5, CH <sub>2</sub>
	29.4, CH <sub>2</sub>		29.4, CH <sub>2</sub>				29.4, CH <sub>2</sub>
	29.3, CH <sub>2</sub>		29.3, CH <sub>2</sub>				29.3, CH <sub>2</sub>
	29.2, CH <sub>2</sub>		29.2, CH <sub>2</sub>				29.2, CH <sub>2</sub>
<b>12''</b>	22.7, CH <sub>2</sub>						22.7, CH <sub>2</sub>
<b>3' (3'')</b>	23.8, CH <sub>2</sub>	1.56-1.62, m	24.0, CH <sub>2</sub>	1.61, m	23.8, CH <sub>2</sub>	1.57-1.62, m	
<b>7</b>	20.9, CH <sub>3</sub>	2.00, s	21.1, CH <sub>3</sub>	2.01, s	20.9, CH <sub>3</sub>	2.01, s	
<b>8</b>	20.5, CH <sub>3</sub>	1.43, d (6.4)	20.7, CH <sub>3</sub>	1.44, d (6.1)	20.4, CH <sub>3</sub>	1.44, d (6.4)	
<b>14'</b>	17.9, CH <sub>3</sub>	1.63, dd (4.0,	18.2, CH <sub>3</sub>	1.64, dd (3.7,			
<b>13''</b>	14.1, CH <sub>3</sub>	0.88, t (6.8)			14.1, CH <sub>3</sub>	0.88, t (6.8)	

**Table 8.** Dictyopyrone B, E 及び混合物の <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR のデータの比較

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR 測定周波数 : 600 / 150 MHz <sup>b</sup> 以前報告されたデータ (Ref. 29)

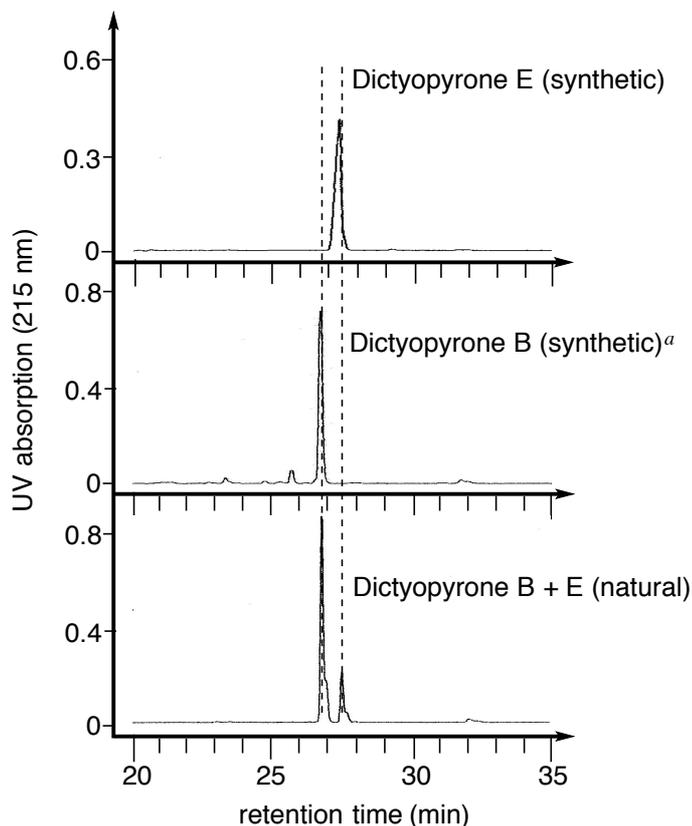
<sup>c</sup> <sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR 測定周波数 : 400 / 150 MHz

また、合成した dictyopyrone B (**30**), dictyopyrone E (**90**) 及び天然の混合物の比旋光度 (Table 9) や HPLC における保持時間 (Figure 37) の一致が見られたため、推定していた dictyopyrone E (**90**) の化学構造が正しいであると決定した。

Dictyopyrone B ( <b>30</b> ) <sup>a</sup> (synthetic)	Dictyopyrone E ( <b>90</b> ) (synthetic)	Mixture of dictyopyrone B and E (natural) (B : E = 3 : 1)
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 50.8$ ( <i>c</i> 0.79, CHCl <sub>3</sub> ) <sup>a</sup>	$[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 56.1$ ( <i>c</i> 0.83, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 51.3$ ( <i>c</i> 0.26, CHCl <sub>3</sub> )

<sup>a</sup> 以前報告されたデータ (Ref. 29) :  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 36.6$  (*c* 0.16, CHCl<sub>3</sub>)

**Table 9.** Dictyopyrone B (**30**), dictyopyrone E (**90**) 及び天然混合物の比旋光度



**Figure 37.** 合成した dictyopyrone B, E 及び天然混合物の逆相 HPLC による分析

<sup>a</sup> 以前合成したものを使用 (Ref. 76)

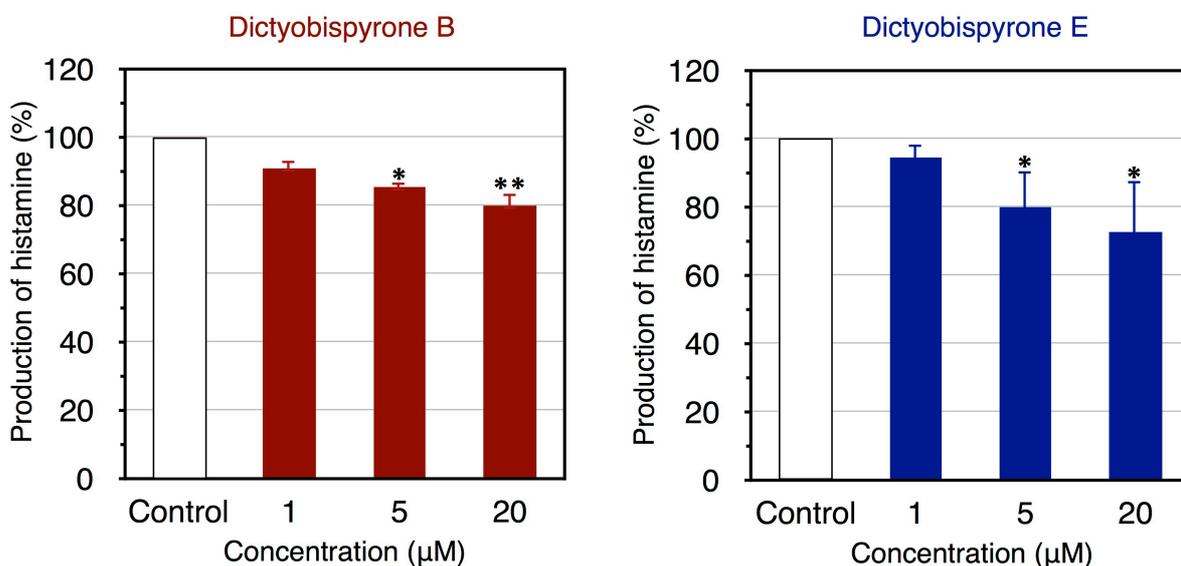
Column : Mightysil RP-18; Eluent : CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O ( 20 / 80 → 100 / 0); Flow : 1 mL/min; 注入量 : 5 μg

縦軸 : 215 nm の波長における吸光度; 横軸 : HPLC における保持時間

## 第 8 節 Dictyobispyrone 類の生物活性評価

合成した dictyobispyrone 類を用いて細胞性粘菌及び各種哺乳類細胞に対する作用を評価した。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の DIF-1 欠損株 HM44 細胞を用いて、柄細胞への分化誘導活性を評価したところ、活性は見られなかった。また、dictyobispyrone 類はヒト白血病 K562 細胞及びマウス線維芽 3T3-L1 細胞の増殖に対しても影響を与えなかった。

一方、dictyobispyrone 類は 20  $\mu\text{M}$  の濃度から、マウスのマクロファージ様 RAW 264.7 細胞において、細胞増殖阻害作用を示さずに、ヒスタミンの産生を阻害した (Figure 38)。ヒスタミンは炎症やアレルギー反応における介在物質であり、過剰に分泌されるとアレルギーの疾患の原因となる。したがって、dictyobispyrone 類は抗アレルギー薬の開発に利用できる。



**Figure 38.** Dictyobispyrone B 及び E のヒスタミン産生阻害作用

細胞を予め 0.1% DMSO (control), dictyobispyrone B 及び E それぞれ 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  または 20  $\mu\text{M}$  の存在下で培養した後、LPS (最終濃度 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え、16 時間培養し、ヒスタミンの産生量を測定した。データは実験複数回 ( $n = 3$ ) の平均値である。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  versus Control (by Welch's t-test).

## 第 9 節 考察

本章では、代謝活性化による新規化合物の取得を目的に、各種細胞性粘菌について  $Zn^{2+}$  の存在下での培養を試みた結果、*Dictyostelium giganteum* より天然では初めての  $\alpha,\alpha$ -bispyrone 型化合物 dictyobispyrone B (59) 及び E (60) を得ることができた。すなわち、細胞性粘菌からさらに新規化合物を取得するのに  $Zn^{2+}$  添加培養が有用な方法であることを示した。

Dictyobispyrone 類と一緒に既知の dictyopyrone 類も単離することができた。Dictyopyrone 類は以前すでに各種の細胞性粘菌より単離された化合物群であり、<sup>29</sup> 天然化合物ではほとんど見られない  $\alpha$ -pyrone 環の 4 位がメチル化された独特な構造を有し、その生合成機構が全く不明であった。

細胞性粘菌由来化合物の生合成経路については、DIF-1 (21) や 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol (MPBD) (103) の生合成が報告されている。DIF-1 (21) の生合成には Steely2 というポリケチド合成酵素が関与していることが確認されている。<sup>77</sup> Hexanoyl CoA を出発物質として 3 分子の malonyl CoA が縮合し、テトラケチドを経て acylphloroglucinol 骨格を形成する。Acylphloroglucinol が halogenase によって塩素化され、その後 O-メチル化されることで DIF-1 (21) が生合成される (Figure 39)。一方、細胞性粘菌 *Dictyostelium mucoroides* より単離された MPBD (103) は細胞集合や孢子細胞への分化を誘導する因子である。本化合物は Steely1 というポリケチド合成酵素によって生合成される。<sup>78</sup> こちらも出発物質は hexanoyl CoA であり、テトラケチドを経るが、DIF-1 (21) とは環化の様式が異なり 5-alkylresorcinol 骨格が構築される。このように、どちらにおいても化合物は 1 本のポリケチド鎖より生合成される。

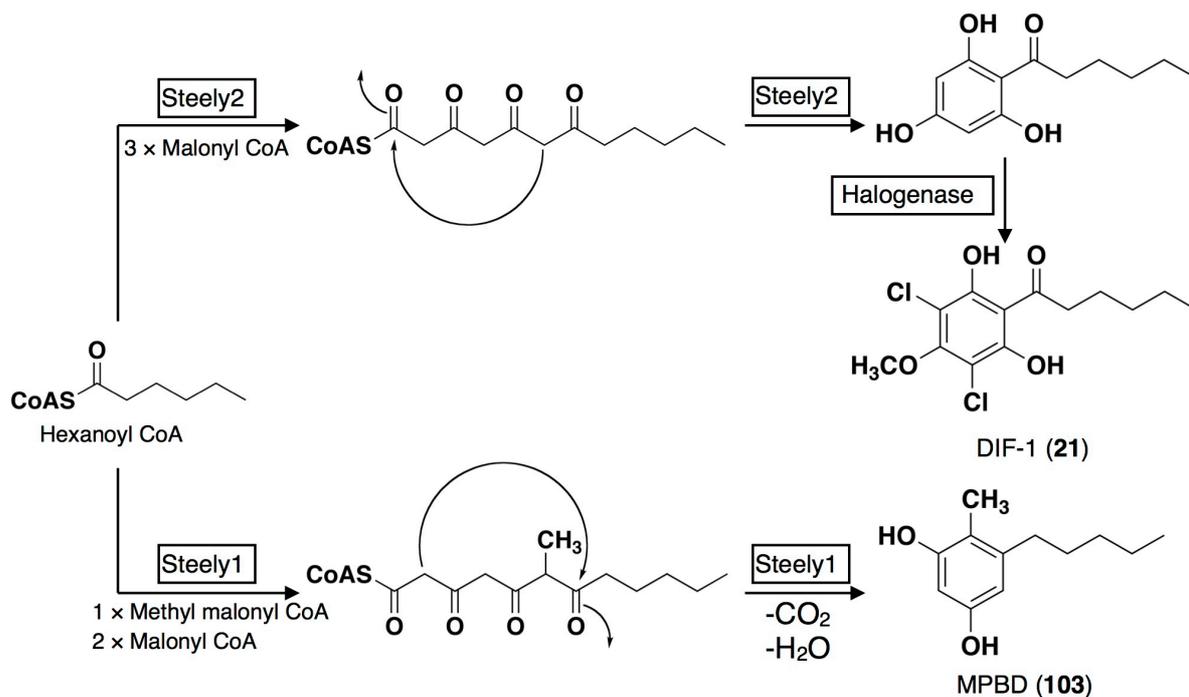


Figure 39. DIF-1 (21) 及び MPBD (103) の推定生合成経路

Dictyopyrone 類の生合成を考察する際、Figure 40 に示したように、1 本のポリケチド鎖からではその生合成を説明することができず、2 本のポリケチド鎖が必要だと考えられる。本研究において、dictyopyrone 類と一緒に dictyobispyrone 類も単離され、その構造の類似性からこれらが同じ生合成経路上にある産生物であると推測した。

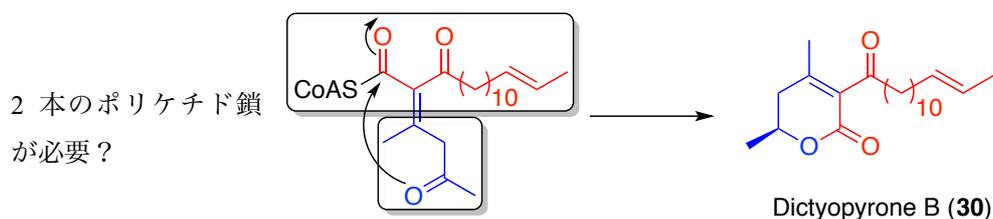


Figure 40. Dictyopyrone B (30) の生合成の考察

Dictyobispyrone 類はその化学構造から明らかに 2 本のポリケチド鎖より生合成されると考えられる。Figure 41 に示したように 2 本のポリケチド鎖はエステル縮合や Claisen 縮合を経て、dictyobispyrone 類を生成する。それに水が付加し、その

後脱炭酸を経て, dictyopyrone 類が生合成されると推測した.

本章では, 細胞性粘菌を  $Zn^{2+}$  の存在下で培養することにより, 通常の培養条件では得ることができない dictyobispyrone 類が得られた.  $Zn^{2+}$  は哺乳類の生体内において二酸化炭素と水を炭酸水素イオンと水素イオンに変換する炭酸脱水酵素や, タンパク質の C 末端のアミノ酸を切断するカルボキシペプチダーゼ等, 様々な酵素の活性発現に必須であることが知られている.<sup>79</sup> 細胞性粘菌においても  $Zn^{2+}$  を活性中心とした加水分解酵素や他の活性酵素を分解するスーパーオキシドディスムターゼの存在がゲノム解析の結果により確認されている.<sup>80,81</sup> したがって, 本章において  $Zn^{2+}$  が dictyobispyrone 類から dictyopyrone 類への変換に関わる酵素の働きを阻害することにより, dictyobispyrone 類の蓄積量を増大させたという可能性も考えられる.

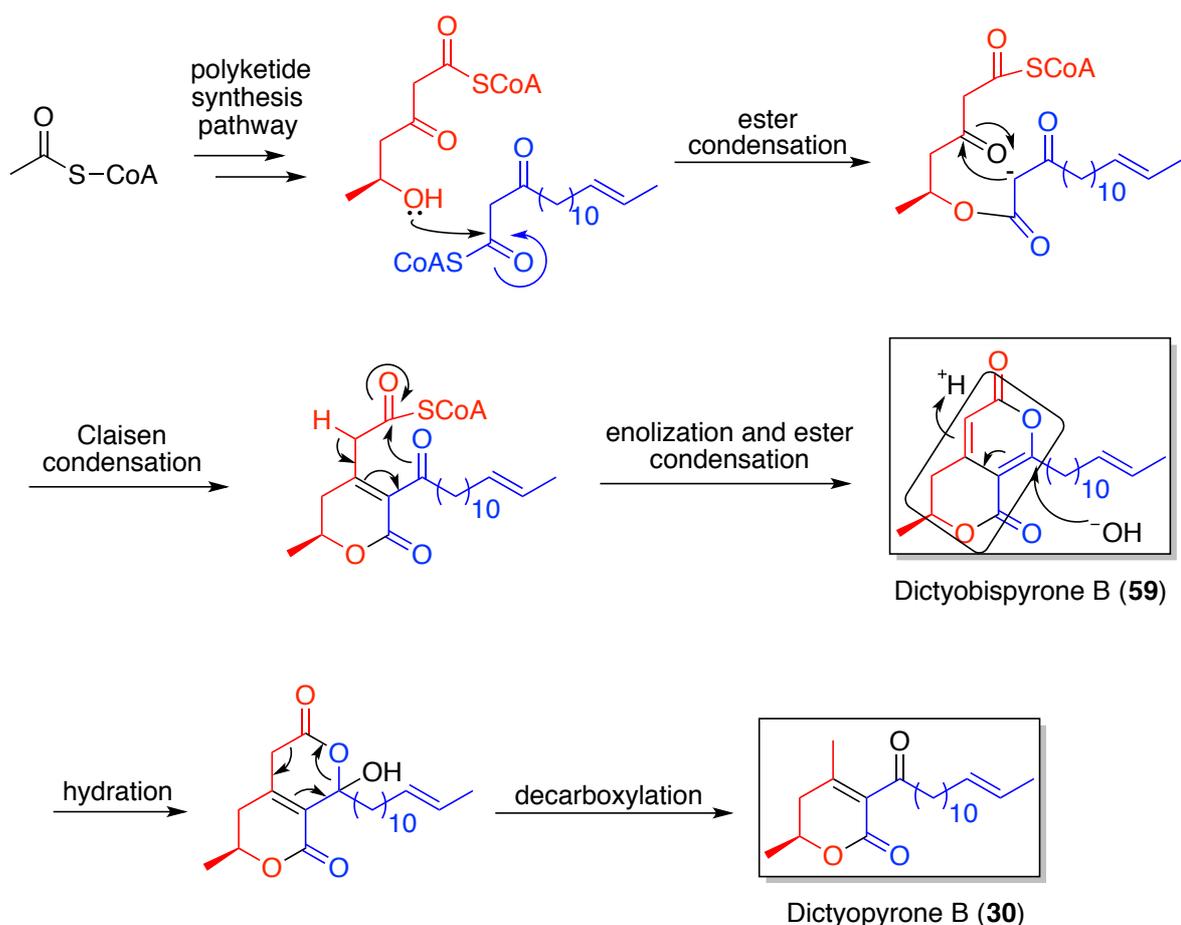


Figure 41. Dictyobispyrone B (59) 及び dictyopyrone B (30) の推定生合成経路

2本のポリケチド鎖より生合成される化合物は少なく、これまで報告されたのは数例に過ぎない。<sup>82,83</sup> ケタマカビ *Chaetomium globosum* より単離された chaetoviridin A (104)<sup>84</sup> は Figure 42 に示したように、2本のポリケチド鎖より生合成されると近年明らかにされた。<sup>82</sup> Chaetoviridin A (104) の生合成において、2本のポリケチドは2回の縮合反応を経て、furan環を構築するが、dictyobispyroneの生合成では2本のポリケチド鎖が3回の縮合反応を経て、bispyrone環構造を構築する。このことから、細胞性粘菌が独特な生合成経路を有することが示唆された。

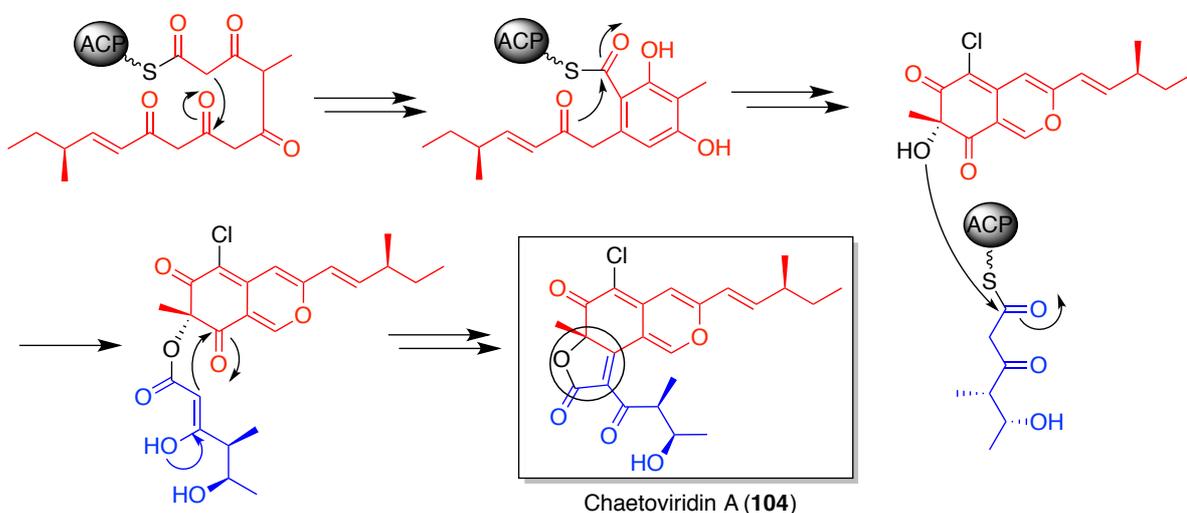
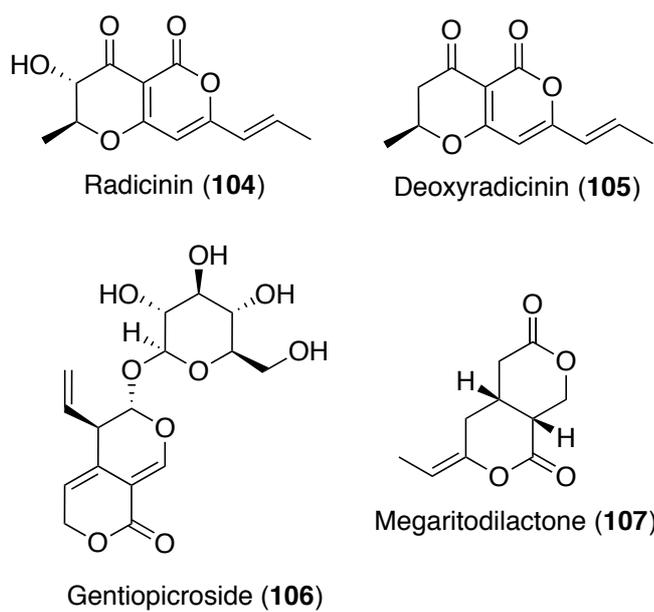


Figure 42. Chaetoviridin A (104) 生合成経路

(Winter, J. M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17900-17903 Figure 3 を参考し、作成した.)

また、bispyrone型化合物は天然において珍しい化合物群である。 $\alpha,\gamma$ -bispyrone型化合物は植物病原菌である *Stemphylium radicinum* から radicinin (104)<sup>85</sup> 及びその類縁体である deoxyradicinin (105)<sup>86</sup> が単離されている。その他、構造的に dictyobispyrone 類と似ているものとしては、植物由来のセコイリドイドである gentiopicroside (106)<sup>87</sup> や megaritodilactone (107)<sup>88</sup> が知られている。本章において、*D. giganteum* から得られた dictyobispyrone 類は天然では初めての  $\alpha,\alpha$ -bispyrone 型のポリケチドである。また、長い脂肪鎖を有することも dictyobispyrone 類の構造的特徴である。このことから細胞性粘菌が独特な化合物群を産生することが改めて

示された.



**Figure 43.** Radicinin, deoxyradicinin, gentiopicroside 及び megaritodilactone の構造

## 結論

天然化合物はこれまでの創薬研究において、重要な役割を果たしてきた。しかし、近年多くの天然資源が研究なされてきたため、創薬に有用な新規化合物の発見が困難な状況になっている。当研究室はこれまで細胞性粘菌を未利用天然資源として捉え、多くの化合物を単離してきた。<sup>26-36</sup> しかし、細胞性粘菌を創薬資源として活用するには、さらなる新規化合物の取得はもちろん、それらに基づいた誘導体合成展開を行うことで創薬に有用な誘導体を創製することも必要である。そこで、本研究では、誘導体合成及び新規化合物の取得という 2 つのアプローチより、細胞性粘菌の創薬資源として活用法を検討した。

第 1 章では、細胞性粘菌の分化誘導因子である DIF-1 (**21**) を基盤として、自然免疫に対する作用を指標に、誘導体合成展開を行った。その結果、自然免疫抑制作用を有する誘導体 **58** を得ることができた。本化合物は自然免疫を制御する新規免疫抑制剤の開発において有望な候補化合物である。このように、細胞性粘菌由来化合物を基盤とした誘導体合成展開を行うことで、創薬に有用な化合物を得ることができる。特に、DIF-1 (**21**) の場合、以前の研究でも、その構造を改変することで、新たな薬理活性を有する誘導体を得ることができた。本研究の結果により、DIF-1 (**21**) の「創薬テンプレート」としての有用性が示された。今後、DIF-1 の各種誘導体を対象とした他の薬理活性のスクリーニングや DIF-1 をベースとしたドラッグデザインを行うことで、本化合物の創薬における活用はまだ拡大することができる。

一方、第 2 章では代謝活性化による新規化合物の取得を目的に、各種細胞性粘菌について  $\text{Zn}^{2+}$  の存在下での培養を試みた。その結果、*Dictyostelium giganteum* より、天然では初めての  $\alpha,\alpha$ -bispyrone 型化合物 dictyobispyrone B (**59**) 及び E (**60**) を得ることができた。Dictyobispyrone 類はヒスタミンの産生を阻害し、抗アレルギー薬の開発に利用できる。また、これらの化合物は通常の培養条件では得られなかった

化合物群である。すなわち、細胞性粘菌より新規化合物を取得する為に、 $Zn^{2+}$  添加培養が有用な方法であることが示唆された。本研究の結果により、培養条件を変えることで、細胞性粘菌から通常の培養条件では得られない二次代謝物が取得できることを明らかにした。本研究をきっかけに今後、他の金属イオンの添加培養等、様々な培養条件を組み合わせることで、細胞性粘菌よりさらに多くの新規化合物を得ることは十分に期待できる。

このように、本研究では培養条件の改良による新規化合物の取得及びそれらに基づく誘導体合成展開が創薬において有望な生物活性物質に繋がることを明らかにし、これらの手法で、細胞性粘菌が有用な創薬資源であることを示した。

## 実験の部

マススペクトルの測定は日本電子 JEOL JMS-DX 303 型質量分析計, JMS-700 型質量分析計および JMS-T 100 GC 型質量分析計を使用した. NMR スペクトルの測定は日本電子 JEOL ECA-600 型核磁気共鳴装置および JEOL AL-400 型核磁気共鳴装置を使用し, 内部標準物質として TMS を用いた. 化学シフト値は ppm で表し, 結合様式は, 一重線 : s, 二重線 : d, 三重線 : t, 四重線 : q, 五重線 : quint, 六重線 : sext, 多重線 : m, 幅広いシグナル : br. で表した. 比旋光度の測定は JASCO P-1030 polarimeter の旋光計を使用した. IR スペクトルの測定は JASCO-FT/IR-4200 のフーリエ変換赤外分光光度計を使用した. CD スペクトルの測定は日本分光 J-720 の分散計を使用した. 順相のカラムクロマトグラフィーの担体には silica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck) を用いた. 逆相カラムクロマトグラフィーの担体には cosmosil 140C<sub>18</sub>-OPN (nacalai tesque) を用いた. HPLC は LC-9201 (Japan Analytical Industry Co. Ltd.) を用いた. そのカラムとして YMC-GPC-T2000 (φ 20 mm x 600 mm) (YMC Co. Ltd.) を用いた. TLC は TLC aluminium sheets Silica gel 60F<sub>254</sub> (0.25 mm, Merck) を用い, 検出は UV (254, 365 nm) 照射下における蛍光およびアニスアルデヒド硫酸溶液噴霧後の加熱発色およびリンモリブデン酸溶液噴霧による加熱発色により行った. 試薬は市販のものを精製せずにそのまま用いた.

## 第 1 章の実験

### 自然免疫応答制御物質の検出系 (*Att-luc* 系)

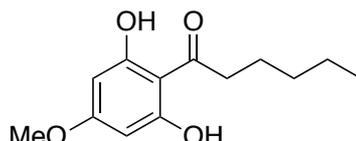
*Attacin* プロモーター下流に luciferase 遺伝子を持つプラスミドを導入したショウジョウバエ S2 細胞 (*S2 att-luc*) を, 10% FBS を含む SDM で  $6 \times 10^4$  cells/mL に調製し, 96-well plate (FALCON) の各 well に 85  $\mu$ L 分注した. 25°C で 12 時間培養した後, SDM で 20 倍に希釈した試料を 10  $\mu$ L 加え, 25°C で 1.5 時間培養した. 続いて PGN を最終濃度 100 ng/mL になるように 5  $\mu$ L ずつ加え, 25°C で 8 時間培養した. 培養後の細胞に Glo Lysis Buffer (Promega) を加えて溶解し, luciferase 測定用のサンプルとした. Luciferase 活性の測定は One-Glo (Promega) を用いて行い, ルミノメーター (Microplate Luminometer LB 96V; Berthold) で化学発光を測定した. 検量線用として luciferase を 1 ng/mL から 1 pg/mL まで 10 倍ずつ希釈し, 同様に測定した. Luciferase 産生量を算出し, DMSO と PGN のみを添加した場合の値を 100%, DMSO のみを添加した場合の値を 0% とした時の各試料の値を自然免疫活性とした.

### S2 細胞に対する細胞増殖阻害活性の評価 (MTT 法)

S2 細胞を 20% FBS, 1% Antibiotics-Antimycotic (GIBCO) を含んだ SDM で  $2 \times 10^5$  cells/mL に調製し, 96-well plate (FALCON) の各 well に 100  $\mu$ L ずつ分注した. 培地には試料を最終濃度 0.5% (v/v) になるように添加した. 25°C で 24 時間培養した後, MTT 試薬 (生細胞数測定試薬 SF : nacalai tesque) を各 well に 10  $\mu$ L ずつ分注した. 分注直後および 4 時間後に MICRO PLATE READER MODEL 680 (BIO-RAD) を使用して 450 nm の吸光度を測定した. 4 時間後の吸光度から 0 時

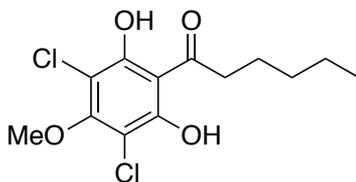
間後の吸光度を引き、培地に DMSO のみを添加した well を 100% とし、培地のみで細胞を蒔いていない well を 0% とし、細胞生存率を算出した。

### 1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)hexan-1-one (74) の合成



5-Methoxyresorcinol (2.87 g, 20.5 mmol) を dichloromethane (40 mL) に懸濁し、aluminium chloride (5.46 g, 41.0 mmol), hexanoyl chloride (4.30 mL, 30.7 mmol) を加え、室温にて 3 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ ethyl acetate で 3 回抽出した。有機層を集め、水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate (9:1) で溶出した画分より 74 (2.82 g, 11.8 mmol, 58 %) を得た。得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した。

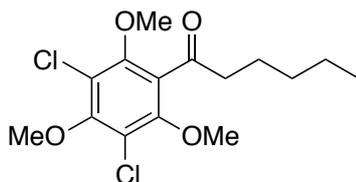
### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)hexan-1-one (DIF-1 (21)) の合成



化合物 74 (51.4 mg, 0.22 mmol) を chloroform (2.5 mL) に懸濁し、ethanol (20  $\mu\text{L}$ ), sulfuryl chloride (64.0 mg, 0.47 mmol) を順次加え、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate

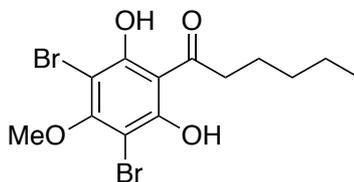
(19:1-9:1) で溶出した画分より DIF-1 (**21**) (61.1 mg, 0.20 mmol, 91 %) を得た。得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, EIMS は文献値<sup>48</sup> と一致した。

### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trimethoxyphenyl)hexan-1-one (TM-DIF-1 (**72**)) の合成



DIF-1 (**21**) (70.5 mg, 0.23 mmol) を acetone (10 mL) に溶かし, potassium carbonate (208.0 mg, 1.51 mmol), methyl *p*-toluenesulfonate (85.7 mg, 0.46 mmol) を順次加え, 室温で 16 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ ethyl acetate で 3 回抽出した。有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (19:1) で溶出した画分より TM-DIF-1 (**72**) (73.2 mg, 0.22 mmol, 96 %) を得た。得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した。

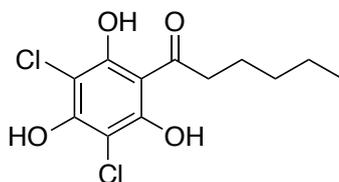
### 1-(3,5-Dibromo-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)hexan-1-one (Br-DIF-1 (**61**)) の合成



化合物 **74** (55.1 mg, 0.23 mmol) を pyridine (4 mL) に溶かし, pyridinium tribromide (351.8 mg, 1.10 mmol) を加え, 室温で 1 時間攪拌した後, 反応液を水に注ぎ, ethyl acetate で 3 回抽出した。有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫

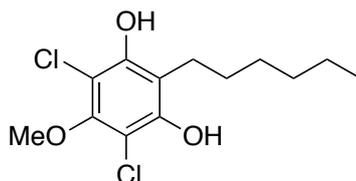
酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate (19:1) で溶出した画分より Br-DIF-1 (**61**) (70.9 mg, 0.18 mmol, 77 %) を得た。得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した。

#### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trihydroxyphenyl)hexan-1-one (**TH-DIF-1 (75)**) の合成



DIF-1 (**21**) (20.0 mg, 0.065 mmol) を dichloromethane (2 mL) に溶かし、boron tribromide (1M in dichloromethane) (520  $\mu\text{L}$ , 0.52 mmol) を加え、0  $^\circ\text{C}$  にて 8 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ、ethyl acetate で 3 回抽出した。有機層を集め、水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate (9:1) で溶出した画分より TH-DIF-1 (**75**) (7.6 mg, 0.026 mmol, 40 %) を得た。得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した。

#### 4,6-Dichloro-2-hexyl-5-methoxybenzene-1,3-diol (**76**) の合成

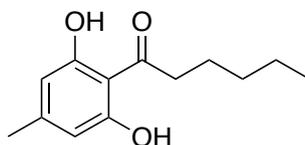


DIF-1 (**21**) (19.7 mg, 0.065 mmol) を trifluoroacetic acid (1 mL) に溶かし、

triethylsilane (41  $\mu$ L, 0.260 mmol) を加え、室温にて 8 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ ethyl acetate で 3 回抽出した。有機層を集め、水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣を HPLC (column : T2000, eluent : ethyl acetate, detector : UV 254 nm, flow : 8 mL/min) を用いて分離し、**76** (18.2 mg, 0.062 mmol, 96 %) を得た。

Colorless amorphous solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.60 (2H, s), 3.87 (3H, s), 2.67 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 1.48-1.58 (2H, m), 1.27-1.38 (6H, m), 0.89 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.1, 149.3 (2C), 107.6 (2C), 104.3, 63.5, 31.8, 31.4, 28.5, 24.5, 22.3, 14.0; EIMS:  $m/z$  292  $[\text{M}]^+$ , 294  $[\text{M}+2]^+$ , 296  $[\text{M}+4]^+$ , 221 (base); HREIMS:  $m/z$  292.0617  $[\text{M}]^+$  (292.0633 calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3^{35}\text{Cl}_2$ ).

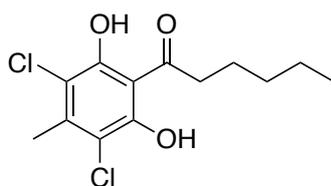
### 1-(2,6-Dihydroxy-4-methylphenyl)hexan-1-one (**79**) の合成



Orcinol (50.0 mg, 0.40 mmol) および hexanoyl chloride (84  $\mu$ L, 0.60 mmol) を用い、**74** の合成と同様にして、**79** (45.4 mg, 0.205 mmol, 51%) を得た。

Colorless amorphous solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  11.84 (2H, br. s), 6.61 (2H, s), 3.06 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 2.34 (3H, s), 1.40-1.45 (2H, m), 1.30-1.35 (4H, m), 0.91 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  205.5, 164.9 (2C), 147.3, 105.5, 91.1 (2C), 44.4, 32.4, 25.1, 23.2, 21.9, 14.3; EIMS:  $m/z$  222  $[\text{M}]^+$ , 204, 151 (base), 71; HREIMS:  $m/z$  222.1245  $[\text{M}]^+$  (222.1256 calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ ).

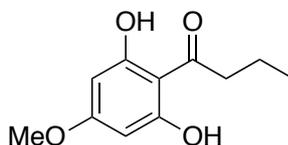
### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)hexan-1-one (**77**) の合成



化合物 **79** (25.0 mg, 0.11 mmol) を用い、DIF-1 (**21**) の合成と同様にして、**77** (29.1 mg, 0.10 mmol, 91 %) を得た.

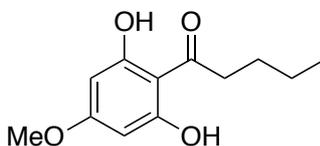
Colorless amorphous solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.39 (2H, br. s), 3.12 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz), 2.35 (3H, s), 1.68-1.73 (2H, m), 1.34-1.37 (4H, m), 0.91 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  205.3, 158.8 (2C), 141.3, 117.4 (2C), 111.5, 44.4, 31.4, 25.2, 23.9, 22.5, 14.1; EIMS:  $m/z$  290  $[\text{M}]^+$ , 292  $[\text{M}+2]^+$ , 294  $[\text{M}+4]^+$ , 272, 219 (base), 149; HREIMS:  $m/z$  290.0556  $[\text{M}]^+$  (290.0476 calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}^{35}\text{Cl}_2$ ).

#### 1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)butan-1-one (**108**) の合成



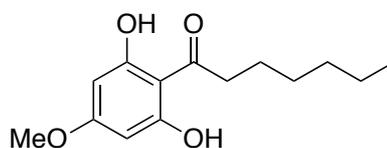
5-Methoxyresorcinol (100.2 mg, 0.71 mmol) および butyryl chloride (111  $\mu\text{L}$ , 1.07 mmol) を用い、**74** の合成と同様にして、**108** (65.5 mg, 0.31 mmol, 44%) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

#### 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)pentan-1-one (**109**) の合成



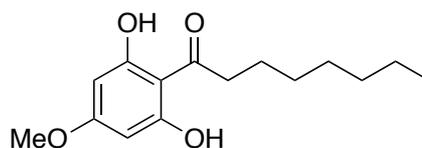
5-Methoxyresorcinol (350.3 mg, 2.50 mmol) および valeroyl chloride (445  $\mu$ L, 3.75 mmol) を用い, **74** の合成と同様にして, **109** (223.4 mg, 0.10 mmol, 40 %) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

#### 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)heptan-1-one (**110**) の合成



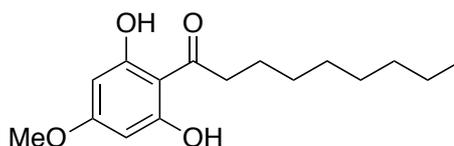
5-Methoxyresorcinol (100.1 mg, 0.71 mmol) および heptanoyl chloride (166  $\mu$ L, 1.07 mmol) を用い, **74** の合成と同様にして, **110** (83.2 mg, 0.33 mmol, 46 %) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

#### 1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)octan-1-one (**111**) の合成



5-Methoxyresorcinol (420.1 mg, 3.00 mmol) および octanoyl chloride (770  $\mu$ L, 4.50 mmol) を用い, **74** の合成と同様にして, **111** (660.0 mg, 2.48 mmol, 83%) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

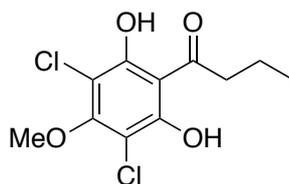
#### 1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)nonan-1-one (**112**) の合成



5-Methoxyresorcinol (99.5 mg, 0.71 mmol) および nonanoyl chloride (193  $\mu$ L, 1.07 mmol) を用い, **74** の合成と同様にして, **112** (114.9 mg, 0.41 mmol, 57%) を得た.

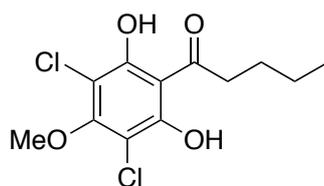
Yellow amorphous solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.74 (2H, br. s), 5.85 (2H, s), 3.77 (3H, s), 3.02 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 1.54 (2H, quint,  $J = 7.2$  Hz), 1.26-1.33 (10H, m), 0.85 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.4, 166.5, 164.9 (2C), 105.5, 94.3 (2C), 55.4, 44.1, 31.8, 29.5, 29.2, 29.0, 24.9, 22.7, 14.3; EIMS:  $m/z$  280  $[\text{M}]^+$ , 212, 140 (base), 80; HREIMS:  $m/z$  280.1640  $[\text{M}]^+$  (280.1675 calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ ).

### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)butan-1-one (**113**) の合成



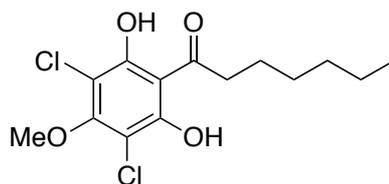
化合物 **108** (39.8 mg, 0.19 mmol) を用い, DIF-1 (**21**) の合成と同様にして, **113** (47.3 mg, 0.17 mmol, 87%) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)pentan-1-one (**114**) の合成



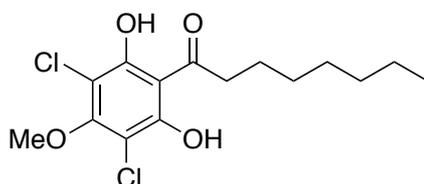
化合物 **109** (30.1 mg, 0.13 mmol) を用い, DIF-1 (**21**) の合成と同様にして, **114** (29.3 mg, 0.10 mmol, 77%) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

#### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)heptan-1-one (**115**) の合成



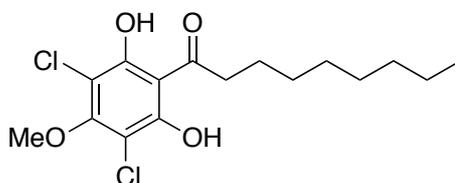
化合物 **110** (35.2 mg, 0.14 mmol) を用い, DIF-1 (**21**) の合成と同様にして, **115** (31.5 mg, 0.098 mmol, 70%) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

#### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)octan-1-one (**116**) の合成



化合物 **111** (139.8 mg, 0.52 mmol) を用い, DIF-1 (**21**) の合成と同様にして, **116** (140.8 mg, 0.42 mmol, 81%) を得た. 得られた化合物の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 及び EIMS のデータは文献値<sup>48</sup> と一致した.

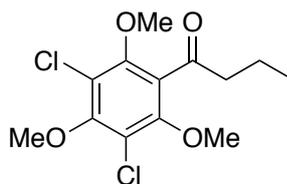
### 1-(3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)nonan-1-one (117) の合成



化合物 **112** (99.7 mg, 0.36 mmol) を用い, DIF-1 (**21**) の合成と同様にして, **117** (101.3 mg, 0.29 mmol, 81%) を得た.

Yellow amorphous solid;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.74 (2H, br. s), 3.75 (3H, s), 3.01 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 1.68-1.73 (2H, m), 1.28-1.37 (10H, m), 0.89 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.4, 166.5, 163.9 (2C), 105.2, 94.3 (2C), 61.4, 44.1, 31.8, 29.2, 29.0, 25.2, 24.9, 22.7, 14.3; EIMS:  $m/z$  348  $[\text{M}]^+$ , 350  $[\text{M}+2]^+$ , 352  $[\text{M}+4]^+$ , 265, 235 (base), 149, 122; HREIMS:  $m/z$  348.0886  $[\text{M}]^+$  (348.0895 calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4^{35}\text{Cl}_2$ ).

### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trimethoxyphenyl)butan-1-one (80) の合成

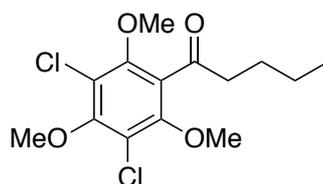


化合物 **113** (19.8 mg, 0.071 mmol) を用い, TM-DIF-1 (**72**) の合成と同様にして, **80** (11.6 mg, 0.038 mmol, 54%) を得た.

Colorless oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.82 (3H, s), 3.72 (6H, s), 2.69 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz), 1.54 (2H, sext,  $J = 7.2$  Hz), 0.82 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  202.3, 154.2, 151.7 (2C), 129.1, 119.5 (2C), 62.6 (2C), 60.8, 44.9, 31.2, 13.9; EIMS:  $m/z$  306  $[\text{M}]^+$ , 308  $[\text{M}+2]^+$ , 310  $[\text{M}+4]^+$ , 235 (base), 165, 71; HREIMS:  $m/z$  306.0420  $[\text{M}]^+$

(306.0426 calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>).

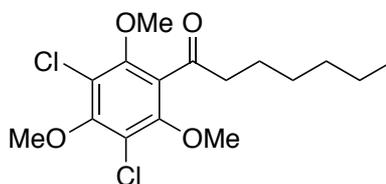
### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trimethoxyphenyl)pentan-1-one (81) の合成



化合物 **114** (14.9 mg, 0.051 mmol) を用い, TM-DIF-1 (**72**) の合成と同様にして, **81** (11.9 mg, 0.037 mmol, 73%) を得た.

Colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.92 (3H, s), 3.83 (6H, s), 2.77 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.66 (2H, quint, *J* = 7.8 Hz), 1.38 (2H, sext, *J* = 7.4 Hz), 0.93 (3H, t, *J* = 7.7 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.6, 154.4, 151.9 (2C), 129.2, 119.7 (2C), 62.7 (2C), 60.9, 44.7, 25.4, 22.1, 13.8; EIMS: *m/z* 320 [M]<sup>+</sup>, 322 [M+2]<sup>+</sup>, 324 [M+4]<sup>+</sup>, 263 (base); HREIMS: *m/z* 320.0570 [M]<sup>+</sup> (320.0582 calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>).

### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trimethoxyphenyl)heptan-1-one (82) の合成

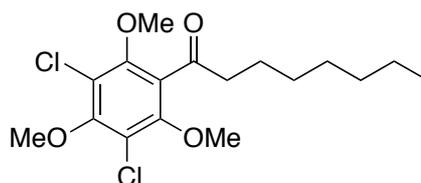


化合物 **115** (10.1 mg, 0.031 mmol) を用い, TM-DIF-1 (**72**) の合成と同様にして, **82** (9.8 mg, 0.028 mmol, 91%) を得た.

Colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.92 (3H, s), 3.82 (6H, s), 2.76 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.67 (2H, quint, *J* = 7.0 Hz), 1.25–1.39 (6H, m), 0.89 (3H, t, *J* = 6.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR

(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.6, 154.4, 151.9 (2C), 129.2, 119.7 (2C), 62.7 (2C), 60.9, 45.0, 31.5, 28.7, 23.3, 22.5, 14.0; EIMS: *m/z* 348 [M]<sup>+</sup>, 350 [M+2]<sup>+</sup>, 352 [M+4]<sup>+</sup>, 263 (base), 165; HREIMS: *m/z* 348.0912 [M]<sup>+</sup> (348.0896 calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>).

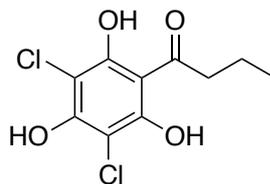
### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trimethoxyphenyl)octan-1-one (83) の合成



化合物 **116** (15.0 mg, 0.045 mmol) を用い, TM-DIF-1 (**72**) の合成と同様にして, **83** (9.0 mg, 0.025 mmol, 56%) を得た.

Colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.92 (3H, s), 3.82 (6H, s), 2.76 (2H, t, *J* = 7.7 Hz), 1.67 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz), 1.24-1.37 (8H, m), 0.88 (3H, t, *J* = 7.2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.6, 154.4, 151.9 (2C), 129.2, 119.7 (2C), 62.7 (2C), 60.9, 45.0, 31.7, 29.0 (2C), 23.3, 22.6, 14.0; EIMS: *m/z* 362 [M]<sup>+</sup>, 364 [M+2]<sup>+</sup>, 366 [M+4]<sup>+</sup>, 291 (base), 221, 83; HREIMS: *m/z* 362.1040 [M]<sup>+</sup> (362.1050 calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub><sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>).

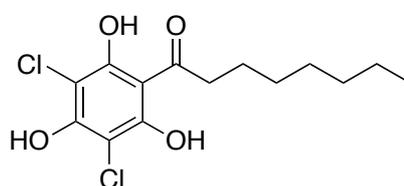
### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trihydroxyphenyl)butan-1-one (84) の合成



化合物 **113** (10.0 mg, 0.036 mmol) を用い, TH-DIF-1 (**75**) の合成と同様にして, **84** (6.2 mg, 0.023 mmol, 64%) を得た.

Colorless oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.46 (2H, br.s), 6.75 (1H, br.s), 3.14 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.59 (2H, sext,  $J = 7.1$  Hz), 0.90 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.0, 156.3, 153.1 (2C), 104.6 (2C), 99.8, 44.2, 31.5, 14.0; EIMS:  $m/z$  264  $[\text{M}]^+$ , 266  $[\text{M}+2]^+$ , 268  $[\text{M}+4]^+$ , 221 (base), 149; HREIMS:  $m/z$  263.9956  $[\text{M}]^+$  (263.9956 calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4^{35}\text{Cl}_2$ ).

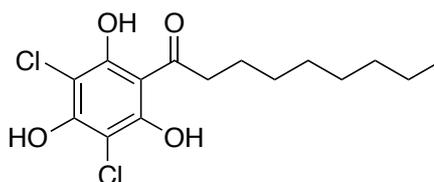
### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trihydroxyphenyl)octan-1-one (58) の合成



化合物 **116** (30.0 mg, 0.089 mmol) を用い、TH-DIF-1 (**75**) の合成と同様にして、**58** (19.2 mg, 0.060 mmol, 67%) を得た。

Colorless oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.56 (2H, br.s), 6.75 (1H, br.s), 3.10 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 1.68-1.72 (2H, m), 1.33-1.37 (8H, m), 0.91 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.1, 156.2, 153.0 (2C), 104.6 (2C), 99.7, 44.1, 31.6, 24.1, 22.6, 21.8, 21.0, 13.9; EIMS:  $m/z$  320  $[\text{M}]^+$ , 322  $[\text{M}+2]^+$ , 324  $[\text{M}+4]^+$ , 302, 249, 221 (base), 149, 108; HREIMS:  $m/z$  320.0570  $[\text{M}]^+$  (320.0582 calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4^{35}\text{Cl}_2$ ).

### 1-(3,5-Dichloro-2,4,6-trihydroxyphenyl)nonan-1-one (85) の合成



化合物 **117** (9.5 mg, 0.027 mmol) を用い、TH-DIF-1 (**75**) の合成と同様にして、**85**

(5.8 mg, 0.017 mmol, 63 %) を得た.

Colorless oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.56 (2H, br.s), 6.80 (1H, br.s), 3.20 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 1.68-1.72 (2H, m), 1.33-1.37 (10H, m), 0.91 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  206.0, 156.3, 153.1 (2C), 104.6 (2C), 99.8, 44.2, 31.5, 24.1, 22.6, 21.9, 21.4, 20.8, 14.0; EIMS:  $m/z$  334  $[\text{M}]^+$ , 336  $[\text{M}+2]^+$ , 338  $[\text{M}+4]^+$ , 249, 221 (base), 149, 122; HREIMS:  $m/z$  334.0750  $[\text{M}]^+$  (334.0739 calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4^{35}\text{Cl}_2$ ).

### Jurkat 細胞における IL-2 産生量の測定及び細胞生存率の測定

Jurkat 細胞 を 90 mm シャーレにて、予め DMSO (vehicle) または化合物 (5  $\mu\text{M}$ ) の存在下で 30 分間培養した。培地は 10 mL Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium を用いた (細胞濃度 :  $1 \times 10^6$  cells/mL). Concanavalin A を加え (最終濃度 : 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), さらに 12 時間培養した後, 各シャーレから培養液の一部を取り, immunoassay キット (ENDOGEN, Rockford, IL) により, IL-2 の産生量を測定した。すなわち, 培養液またはキットの標準液 (それぞれ 50  $\mu\text{L}$ ) をビオチン化された IL-2 の抗体でプレコートした 96 wells プレートにて培養した後, streptavidin-horseradish peroxidase の存在下で培養することにより発色させた。サンプルの 450 nm における吸光度から 550 nm における吸光度を引いた値より, IL-2 の産生量を算出した。なお, 細胞生存率については MTT 法により測定した。

## 第 2 章の実験

### 細胞性粘菌の子実体の培養

滅菌した 50 mL 遠沈管に分取した A 液体培地 (D-(+)-glucose 0.5%, polypepton 0.5%, yeast extract 0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.225%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.137%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%) 約 20 mL に寒天培地上の *Klebsiella aerogenes* を白金耳でとり、懸濁させた。これを 37 °C で 12 時間振盪培養したものを菌液とした。A 寒天培地 (agar 1.5%, 直径 15 cm ペトリシャーレ, 約 60 mL) に *Klebsiella aerogenes* の菌液をマイクロピペットで 550  $\mu\text{L}$  とり、コンラージ棒で均一に塗布した。そこに滅菌した爪楊枝で細胞性粘菌の子実体を接種し、コンラージ棒と同様に塗布した。光照射下 22 °C で 4 日間培養した後、形成した子実体を回収した。培地はオートクレーブ (121 °C, 20 分) で滅菌したものをを用いた。塩化亜鉛を添加する場合は A 寒天培地作成時、塩化亜鉛を添加し、培地の成分と混合させた。

### 逆相 HPLC による代謝物の分析

回収された子実体は凍結乾燥後、室温でメタノールによる抽出を 3 回行った。得られたメタノール抽出物は酢酸エチル対水で分液操作を行い、酢酸エチル可溶画分を得た。これを逆相 HPLC (Hitachi LaChrom system, column : Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5  $\mu\text{m}$ ) (Kanto Chemical Co. Inc.); flow : 1 mL/min; eluent : acetonitrile-water (20:80) to acetonitrile-water (100:0) in 35 minutes; detection : UV 215 nm) にて、化合物の組成を分析した。注入サンプルはメタノールに溶かした溶液を用いた。

### Dictyobispyrone B 及び E の単離

0.5 mM ZnCl<sub>2</sub> を添加した A 培地を用いて培養した *D. giganteum* の子実体 (乾燥後 43.74 g) は室温でメタノールによる抽出を 3 回行い、メタノール抽出物 (5.7 g) を得た。メタノール抽出物を酢酸エチル対水で分液操作を行い、酢酸エチル可溶画分 (686.4 mg) を得た。酢酸エチル可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate (1:1) で溶出した画分よりフラクション A (49.4 mg), hexane-ethyl acetate (3:1) で溶出した画分よりフラクション B (196.1 mg) を得た。

フラクション A を HPLC (column : T2000, eluent : ethyl acetate, detection : UV 254 nm, flow : 8 mL/min) にて精製し、フラクション C を得た。フラクション C は逆相カラムクロマトグラフィーに付し、acetonitrile-water (7:3) で溶出した画分より dictyobispyrone B 及び E の混合物を得た (1.5 mg; B : E = 3 : 1)。

Colorless amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25} +40.7$  (c 0.18, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of the mixture, see **Table 6**; HREIMS *m/z* 360.2293 [M]<sup>+</sup> (360.2299 calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>) and *m/z* 348.2293 [M]<sup>+</sup> (348.2299 calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>); FABMS *m/z* 361.3 [M+H]<sup>+</sup> and *m/z* 349.3 [M+H]<sup>+</sup>.

Dictyobispyrone B 及び E の混合物を逆相 HPLC (Hitachi LaChrom system, column : Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μm) (Kanto Chemical Co., Inc.); flow : 1 mL/min; eluent : acetonitrile-water (90:10) in 15 minutes; detection : UV 215 nm) により分離した。保持時間 : 11.6 min (dictyobispyrone B); 12.3 min (dictyobispyrone E); 単離量 : 0.90 mg (dictyobispyrone B); 0.28 mg (dictyobispyrone E)。

### **Dictyopyrone B 及び E の単離**

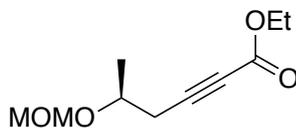
フラクション B を HPLC (column : T2000, eluent : ethyl acetate, detection : UV 254 nm, flow : 8 mL/min) にて精製し、フラクション D を得た。フラクション D について、順次にシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出 : hexane-ethyl acetate (9:1))

及び逆相カラムクロマトグラフィー (溶出 : acetonitrile-water (7:3)) にて精製し, dictyopyrone B 及び E の混合物を得た (2.4 mg; B : E = 3 : 1).

Colorless amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25} +51.3$  ( $c$  0.26,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see **Table 8**; HREIMS  $m/z$  334.2490  $[\text{M}]^+$  (334.2506 calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$ ) and  $m/z$  322.2505  $[\text{M}]^+$  (322.2506 calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$ ); FABMS  $m/z$  335.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and  $m/z$  323.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Dictyopyrone B 及び E の混合物を逆相 HPLC (Hitachi LaChrom system, column : Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5  $\mu\text{m}$ ) (Kanto Chemical Co., Inc.); flow : 1 mL/min; eluent : acetonitrile-water (90:10) in 15 minutes; detection : UV 215 nm) により分離した. 保持時間 : 11.7 min (dictyopyrone B); 13.3 min (dictyopyrone E); 単離量 : 1.4 mg (dictyopyrone B); 0.6 mg (dictyopyrone E).

#### Ethyl (*S*)-5-(methoxymethoxy)hex-2-ynoate (92) の合成

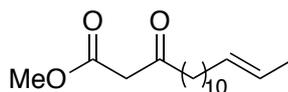


Ethyl propiolate (292  $\mu\text{L}$ , 2.88 mmol) を boron trifluoride ethyl etherate (800  $\mu\text{L}$ , 1.44 mmol) に溶かし,  $-78^\circ\text{C}$  にて *n*-butyllithium in hexane (1.6 M) (1.8 mL, 2.88 mmol) を加えた.  $-78^\circ\text{C}$  で 1 時間攪拌した後, 反応液に (*S*)-(-)-propylene oxide (100  $\mu\text{L}$ , 1.44 mmol) を加え, さらに 3 時間攪拌した. 反応液を飽和食塩水に注ぎ dichloromethane で 3 回抽出した. 有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (4:1) で溶出した画分の溶媒を留去し, 残渣 (110.6 mg) を得た. これに dichloromethane (5 mL), chlorodimethyl ether (77  $\mu\text{L}$ , 1.03 mmol) 及び *N,N*-diisopropylethylamine (265  $\mu\text{L}$ , 1.54 mmol) を加え, 室温にて 16 時間攪拌した後, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,

hexane-ethyl acetate (9:1) で溶出した画分より ethyl (*S*)-5-(methoxymethoxy)-hex-2-ynoate (**92**) (112.4 mg, 39%, 2 steps) を得た.

Colorless oil; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2236, 1712, 1254, 1035  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.68 (1H, d,  $J = 12.8$  Hz), 4.66 (1H, d,  $J = 12.8$  Hz), 4.21 (2H, q,  $J = 7.2$  Hz), 3.92 (1H, m), 3.39 (3H, s), 2.60 (1H, dd,  $J = 5.6, 16.8$  Hz), 2.52 (1H, dd,  $J = 6.4, 16.8$  Hz), 1.31 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz), 1.30 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.6, 95.1, 85.7, 74.6, 70.8, 61.8, 55.4, 26.9, 20.1, 14.0; EIMS:  $m/z$  156, 141, 128, 111, 89 (base); FABMS :  $m/z$  201  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRFABMS :  $m/z$  201.1128  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (201.1126 calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_4$ ).

### Methyl (*E*)-3-oxohexadec-14-enoate (**93**) の合成

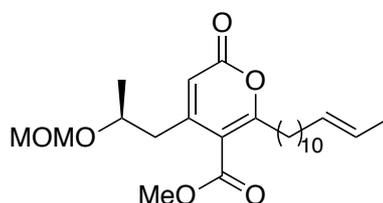


(*E*)-Tetradec-12-enoic acid<sup>76</sup> (41.8 mg, 0.19 mmol) を dichloromethane に溶かし, 室温にて Meldrum's acid (26.7 mg, 0.19 mmol), *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (34.0 mg, 0.28 mmol) 及び 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (53.3 mg, 0.28 mmol) を加えた. 12 時間攪拌した後, 1 M hydrochloric acid 溶液 (1 mL) を加え, 反応液を水 (50 mL) に注ぎ, ethyl acetate (50 mL) で 3 回抽出した. 有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣に methanol (10 mL) を加え, 3 時間攪拌しながら加熱還流した後, 溶媒を留去した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (19:1) で溶出した画分より methyl (*E*)-3-oxohexadec-14-enoate (**93**) (37.8 mg, 72%) を得た.

Colorless amorphous solid; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2920, 2849, 1747, 1711, 1470  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.39-5.42 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.45 (2H, s), 2.53 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz),

1.92-1.99 (2H, m), 1.63 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz), 1.54-1.62 (2H, m), 1.21-1.37 (14H, m);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  202.8, 167.7, 131.6, 124.5, 52.3, 49.0, 43.0, 32.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.1, 28.9, 23.4, 17.9; EIMS:  $m/z$  282  $[\text{M}]^+$ , 190, 129, 116 (base); HREIMS:  $m/z$  282.2180  $[\text{M}]^+$  (282.2193 calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_3$ ).

**(*S,E*)-4-(2-(methoxymethoxy)propyl)-2-oxo-6-(tridec-11-en-1-yl)-2H-pyran-5-carboxylate (91) の合成**

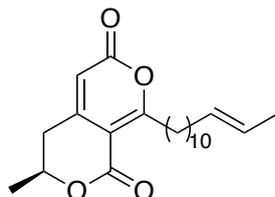


化合物 **93** (26.0 mg, 0.13 mmol), sodium methoxide (2.7 mg, 0.05 mmol) 及び化合物 **92** (37.0 mg, 0.13 mmol) の混合物を  $100^\circ\text{C}$  にて, 3 時間攪拌した後, 室温にて acetyl acetate (0.5 mL) を加えた. 反応液をセライト濾過した後, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (9:1) で溶出した画分より methyl (*S,E*)-4-(2-(methoxymethoxy)propyl)-2-oxo-6-(tridec-11-en-1-yl)-2H-pyran-5-carboxylate (**91**) (44.6 mg, 79%) を得た.

Colorless amorphous solid; IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 2928, 2854, 1731, 1033  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.08 (1H, s), 5.39-5.43 (2H, m), 4.61 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 4.49 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 3.78-3.88 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.27 (3H, s), 2.82 (1H, dd,  $J = 8.0, 13.6$  Hz), 2.64 (1H, dd,  $J = 7.5, 13.6$  Hz), 2.58-2.66 (2H, m), 1.92-1.99 (2H, m), 1.65-1.72 (2H, m), 1.64 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz), 1.22-1.34 (14H, m), 1.20 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.6, 166.2, 160.8, 154.6, 131.6, 124.5, 113.0, 112.8, 94.7, 71.7, 55.3, 52.3, 41.1,

32.9, 32.5, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.1, 29.1, 27.6, 20.4, 17.9; FABMS:  $m/z$  437.3 [M+H]<sup>+</sup>; HRFABMS:  $m/z$  437.2903 [M+H]<sup>+</sup> (437.2901 calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>O<sub>6</sub>).

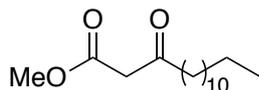
### Dictyobispyrone B の合成



化合物 **91** (35.0 mg, 0.080 mmol) を methanol (2 mL) に溶かした溶液に *p*-toluensulfonic acid (6.1 mg, 0.032 mmol) を加え, 50°C にて 6 時間攪拌した後, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (4:1) で溶出した画分より dictyobispyrone B (20.0 mg, 69%) を得た.

Colorless amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25}$  +38.7 (*c* 0.90, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2924, 2853, 1755, 1719, 1631, 1552, 1260, 1068 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see **Table 6**; EIMS:  $m/z$  360 [M]<sup>+</sup>, 315, 207 (base), 194; HREIMS:  $m/z$  360.2287 [M]<sup>+</sup> (360.2299 calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>).

### Methyl 3-oxopentadecanoate (97) の合成

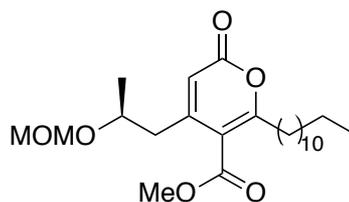


Tridecanoic acid (428.7 mg, 2.0 mmol) を dichloromethane に溶かし, 室温にて Meldrum's acid (288.3 mg, 2.0 mmol), *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (390.9 mg, 3.2

mmol) 及び 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (575.1 mg, 3.0 mmol) を加えた。18 時間攪拌した後, 1 M hydrochloric acid 溶液 (4 mL) を加え, 反応液を水 (100 mL) に注ぎ, ethyl acetate (50 mL) で 3 回抽出した。有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した。残渣に methanol (10 mL) を加え, 3 時間攪拌しながら加熱還流した後, 溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (19:1) で 溶出した画分より methyl 3-oxopentadecanoate (**97**) (270.2 mg, 50%) を得た。

Colorless amorphous solid; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2919, 2849, 1749, 1708  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.74 (3H, s), 3.45 (2H, s), 2.53 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 1.59 (2H, m), 1.22-1.32 (18H, m), 0.88 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  202.8, 167.6, 52.3, 49.0, 43.0, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 23.4, 22.6, 14.1; EIMS:  $m/z$  270  $[\text{M}]^+$ , 197, 129, 116 (base); HREIMS:  $m/z$  270.2184  $[\text{M}]^+$  (270.2193 calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_3$ ).

### Methyl (*S*)-6-dodecyl-4-(2-(methoxymethoxy)propyl)-2-oxo-2H-pyran-5-carboxylate (**98**) の合成

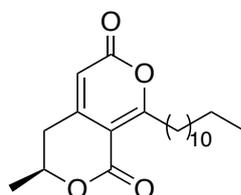


化合物 **97** (60.0 mg, 0.3 mmol), sodium methoxide (5.4 mg, 0.1 mmol) 及び化合物 **92** (82.0 mg, 0.3 mmol) の混合物を 100°C にて, 3 時間攪拌した後, 室温にて acetyl acetate (0.5 mL) を加えた。反応液をセライト濾過した後, 溶媒を留去した。残渣を

シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (9:1) で溶出した画分より methyl (*S*)-6-dodecyl-4-(2-(methoxymethoxy)propyl)-2-oxo-2H-pyran-5-carboxylate (**98**) (73.7. mg, 58%) を得た.

Colorless oil; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2925, 2854, 1731, 1541, 1076, 1034  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.08 (1H, s), 4.61 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz), 4.49 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz), 3.86 (3H, s), 3.79-3.89 (1H, m), 3.27 (3H, s), 2.82 (1H, dd,  $J = 7.6, 13.6$  Hz), 2.60 (1H, dd,  $J = 7.6, 13.6$  Hz), 2.58-2.66 (2H, m), 1.65-1.73 (2H, m), 1.22-1.35 (18H, m), 1.20 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz), 0.88 (3H, t,  $J = 6.4$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.6, 166.2, 160.9, 154.7, 113.0, 112.8, 94.7, 71.7, 55.4, 52.4, 41.1, 33.0, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 27.7, 22.7, 20.5, 14.1; FABMS:  $m/z$  425.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRFABMS:  $m/z$  425.2903  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (425.2901 calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{O}_6$ ).

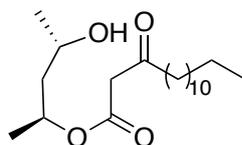
### Dictyobispyrone E の合成



化合物 **98** (44.3 mg, 0.104 mmol) を methanol (2 mL) に溶かした溶液に *p*-toluensulfonic acid (4.0 mg, 0.021 mmol) を加え,  $50^\circ\text{C}$  にて 6 時間攪拌した後, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-ethyl acetate (4:1) で溶出した画分より dictyobispyrone E (33.1 mg, 91%) を得た.

Colorless amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25} +38.0$  ( $c$  1.16,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2918, 2843, 1748, 1731, 1712, 1551  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see **Table 6**; EIMS:  $m/z$  348  $[\text{M}]^+$ , 207, 194 (base); HREIMS:  $m/z$  348.2286  $[\text{M}]^+$  (348.2299 calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$ ).

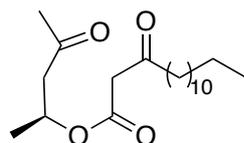
### (2*S*,4*S*)-4-Hydroxypentan-2-yl 3-oxopentadecanoate (**101**) の合成



Tridecanoic acid (428.7 mg, 2.0 mmol) を dichloromethane に溶かし、室温にて Meldrum's acid (288.3 mg, 2.0 mmol), *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (390.9 mg, 3.2 mmol) 及び 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (575.1 mg, 3.0 mmol) を加えた。18 時間攪拌した後、反応液を水 (100 mL) に注ぎ、ethyl acetate (100 mL) で 3 回抽出した。有機層を集め、水および飽和食塩水で洗浄した後無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣に toluene (13 mL) 及び (2*S*,4*S*)-2,4-pentanediol (312.5 mg, 3.0 mmol) を加え、5 時間攪拌しながら加熱還流した後、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate (4:1) で溶出した画分より methyl (2*S*,4*S*)-4-hydroxypentan-2-yl-3-oxopentadecanoate (**101**) (164.3 mg, 24%) を得た。

Colorless oil; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 3524 (br), 2925, 2854, 1735, 1715, 1313, 1151  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.17-5.27 (1H, m), 3.79-3.88 (1H, m), 3.46 (2H, s), 2.52 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 1.67 (1H, ddd,  $J = 14.9, 9.9, 3.2$  Hz), 1.57 (1H, ddd,  $J = 14.9, 9.8, 3.2$  Hz), 1.55-1.69 (2H, m), 1.28 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz), 1.24-1.30 (18H, m), 1.18 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz), 0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203.2, 167.7, 69.6, 63.5, 49.5, 45.7, 43.2, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.0, 23.5, 23.2, 22.6, 20.6, 14.0; EIMS:  $m/z$  342  $[\text{M}]^+$ , 324, 257, 197, 170, 102 (base); HREIMS:  $m/z$  342.2810  $[\text{M}]^+$  (342.2768 calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_4$ ).

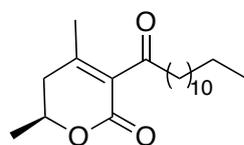
### (*S*)-4-Oxopentan-2-yl 3-oxopentadecanoate (**102**) の合成



化合物 **101** (68.0 mg, 0.2 mmol) を dichloromethane (2 mL) に溶かした溶液に pyridium chlorochromate (172.4 mg, 0.8 mmol) を加え、室温で 11 時間攪拌した。反応液をセライト濾過し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl acetate (9:1) で溶出した画分より methyl (*S*)-4-oxopentan-2-yl 3-oxododecanoate (**102**) (27.2 mg, 40%) を得た。

Colorless oil; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 2925, 2854, 1743, 1716, 1457, 1375, 1362, 1313, 1240, 1169, 1069  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.34 (1H, m), 3.39 (2H, s), 2.83 (1H, dd,  $J = 16.0, 6.5$  Hz), 2.59 (1H, dd,  $J = 16.0, 6.7$  Hz), 2.51 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.16 (3H, s), 1.58 (2H, m), 1.30 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz), 1.24-1.30 (18H, m), 0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  205.1, 202.9, 166.5, 68.1, 49.4, 49.1, 43.0, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 29.3, 29.0, 23.4, 22.6, 19.8, 19.8, 14.1; EIMS:  $m/z$  340  $[\text{M}]^+$ , 197, 186, 102, 85 (base); HREIMS:  $m/z$  340.2657  $[\text{M}]^+$  (340.2612 calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ).

### Dictyopyrone E の合成



化合物 **102** (20.0 mg, 0.059 mmol) を ethanol (1 mL) に溶かした溶液に sodium ethoxide (4.8 mg, 0.071 mmol) を加え、室温で 14 時間攪拌した。反応液を 0.5 M hydrochloric acid 溶液 (50 mL) に注ぎ、ethyl acetate (40 mL) で 3 回抽出した。有機層を集め、水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-ethyl

acetate (4:1) で溶出した画分より dictyopyrone E (16.3 mg, 86%) を得た.

Colorless amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25} +56.1$  ( $c$  0.83,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 2925, 2853, 1704, 1457, 1389, 1286, 1192, 1139  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see **Table 8**; EIMS:  $m/z$  322  $[\text{M}]^+$ , 307, 262, 168 (base), 153; HREIMS:  $m/z$  322.2502  $[\text{M}]^+$  (322.2506 calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$ ).

#### **RAW 264.7 細胞におけるヒスタミン産生量の測定**

マウスマクロファージ様細胞 RAW 264.7 を予め DMSO (vehicle) または化合物の存在下で 20 分間培養した. 培地は 100  $\mu\text{L}$  MEM medium (Sigma, St. Louis, MO) を用いた. LPS を加え, さらに 16 時間培養した後, 各 well の上澄み 50  $\mu\text{L}$  を用いて, Histamine Test System (Kikkoman Biochemifa Company, Tokyo, Japan) により, ヒスタミンの濃度を測定した.

## 参考文献

1. Blakemore, P. R.; White, J. D. *Chem. Commun.* **2002**, 1159-1168.
2. Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325-2327.
3. Tally, F. P.; DeBruin, M. F.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 523-526.
4. Tanaka, H.; Kuroda, A.; Marusawa, H.; Hatanaka, H.; Kino, T.; Goto, T.; Hashimoto, M.; Taga, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031-5033.
5. Kishida, Y.; Naito, A.; Iwado, S.; Terahara A.; Tsujita Y. *Yakugaku Zasshi* **1991**, *111*, 469-480.
6. Hong, M. -C.; Hsu, D. I.; Bounthavong, M. *Infect. Drug Resist.* **2013**, *6*, 215-223.
7. Crump, A.; Ōmura, S. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2011**, *8*, 713-28.
8. Theriault, R. J.; Karwowski, J. P.; Jackson, M.; Girolami, R. L.; Sunga, G. N.; Vojtko, C. M.; Coen, Lyle J. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 567-574.
9. Ueda, H.; Nakajima, H.; Hori, J.; Fujita, T.; Nishimura, M.; Goto, T.; Okuhara, M. *J. Antibiot.* **1993**, *47*, 301-309.
10. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
11. Samorano, L. P.; Torezan, L. A.; Sanches, J. A. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2015**, *29*, 1822-1827.
12. Scherlach, K.; Hertweck, C. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1753-1760.
13. Asai, T. Yamamoto, T.; Oshima, Y. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2006-2009.
14. Ikeda, H.; Shin-ya, K.; Omura, S. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 233-250.
15. Guo, H.; Kreuzenbeck, N. B.; Otani, S.; Garcia-Altare, M.; Dahse, H. -M.; Weigel, C.; Aanen, D. K.; Hertweck, C.; Poulsen, M.; Beemelmans, C. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3338-3341.

16. Liu, W.; Li, H. -J.; Xu, M. -Y.; Ju, Y. -C.; Wang, L. -Y.; Xu, J.; Yang, D. -P.; Lan, W. *J. Org. Lett.* **2015**, *17*, 5156-5159.
17. Peng, J.; Gao, H.; Li, J.; Ai, J.; Geng, M.; Zhang, G.; Zhu, T.; Gu, Q.; Li, D. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7895-7904
18. Long, H.; Cheng, Z.; Huang, W.; Wu, Q.; Li, X.; Cui, J.; Proksch, P.; Lin, W. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4678-4681.
19. Maeda, Y.; Inoue, K.; Takeuchi, I.; Eds. *Dictyostelium. A Model System for Cell and Developmental Biology*, Universal Academy : Tokyo, **1997**.
20. 生物学辞典第4版, 岩波書店, **1996**, 1560-1574.
21. Eichinger, L.; Pachebat, J. A.; Glöckner, G.; Rajandream, M. A.; Sucgang, R.; Berriman, M.; Song, J.; Olsen, R.; Szafranski, K.; Xu, Q.; Tunggal, B.; Kummerfeld, S. et al. *Nature* **2005**, *435*, 43-57.
22. Abe, H.; Uchiyama, M.; Tanaka, Y.; Saito, H. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *42*, 3807-3810.
23. Shimomura, O.; Suthers, H. L. B.; Bonner, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 7376-7379.
24. Morris, H. R.; Taylor, G. W.; Masento, M. S.; Jermyn, K. A.; Kay, R. R. *Nature* **1987**, *328*, 811-814.
25. Sawada, T.; Aono, M.; Asakawa, S.; Ito, A.; Awano, K. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 959-966.
26. Kikuchi, H.; Komiya, J.; Saito, Y.; Sekiya, J.; Honma, S.; Nakahata, N.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1477-1480.
27. Kikuchi, H.; Saito, Y.; Komiya, J.; Takaya, Y.; Honma, S.; Nakahata, N.; Ito, A.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6982-6987.
28. Takaya, Y.; Kikuchi, H.; Terui, Y.; Komiya, J.; Maeda, Y.; Ito, A.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 61-63.
29. Takaya, Y.; Kikuchi, H.; Terui, Y.; Komiya, J.; Furukawa, K.; Seya, K.; Motomura, S.; Ito, A.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 985-989.

30. Kikuchi, H.; Nakamura, K.; Kubohara, Y.; Gokan, N.; Hosaka, K.; Maeda Y.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5905-5909.
31. Kikuchi, H.; Saito, Y.; Sekiya, J.; Okano, Y.; Saito, M.; Nakahata, N.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8854-8858.
32. Kikuchi, H.; Matsuo, Y.; Kato, Y.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8884-8889.
33. 松尾祐介, 修士論文, 東北大学大学院薬学研究科, **2014**.
34. 伊藤育子, 修士論文, 東北大学大学院薬学研究科, **2016**.
35. Kikuchi, H.; Ishiko, S.; Nakamura, K.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6000-6007.
36. Kikuchi, H.; Kubohara, Y.; Nguyen, V. H.; Katou, Y.; Oshima, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4628-4633.
37. Zhang, J.; Yamada, O.; Kida, S.; Matsushita, Y.; Murase, S.; Hattori, T.; Kubohara Y.; Kikuchi, H.; Oshima, Y. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 2357-2364.
38. Ogura, M.; Kikuchi, H.; Suzuki, T.; Yamaki, J.; Homma, M. K.; Oshima, Y.; Homma, Y. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *105*, 55-65.
39. Town, C. D.; Gross, J. D.; Kay, R. R. *Nature* **1976**, *262*, 717-719.
40. Sugang, R., Kuo, A.; Tian, X.; Salerno, W.; Parikh, A.; Feasley, C. L.; Dalin, E.; Tu, H.; Huang, E.; Barry, K.; Lindquist, E.; Shapiro, H.; Bruce, D.; Schmutz, J.; Salamov, A. et al. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R20.
41. Masemto, M. S.; Morris, H. R.; Taylor, G. W.; Johnson, S. J.; Skapski, A. C.; Kay, R. R. *Biochem. J.* **1988**, *256*, 23-28.
42. Wurster, B.; Kay, R. R. *Dev. Biol.* **1990**, *140*, 189-195.
43. Kubohara Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 418-422.
44. Omata, W.; Shibata, H.; Nagasawa, M.; Kojima, I.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Hosaka, K.; Kubohara, Y. *FEBS J.* **2007**, *274*, 3392-3404.

45. Seya, K.; Kanemaru, K.; Matsuki, M.; Hongo, K.; Kitahara, H.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Kubohara, Y.; Okumura, K.; Motomura, S.; Furukawa, K-I. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *70*, 676-685.
46. Nakajima-Shimada, J.; Hatabu, T.; Hosoi, Y.; Onizuka, Y.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Kubohara, Y. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1603-1610.
47. Kubohara, Y.; Kikuchi, H.; Oshima, Y. *Life Sci.* **2008**, *83*, 608-612.
48. Gokan, N.; Kikuchi, H.; Nakamura, K.; Oshima, Y.; Hosaka, K.; Kubohara, Y. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 676-685.
49. Beverler, P. *Curr. Opin. Immunol.* **1991**, *3*, 355-360.
50. Teixeira, M. M.; Almeida, C. I.; Gazzinelli, T. R. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 883-886.
51. Fukushima, K.; Arai, T. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1480-1494.
52. Czeslick, E.; Struppert, A.; Simm, A.; Sablotzki, A. *Inflamm. Res.* **2006**, *55*, 511-515.
53. Kim, H. M.; Park, B. S.; Kim, J. -I.; Kim, S. E.; Lee, J.; Oh, S. C.; Enkhbayar, P.; Matsushima, N.; Lee, H.; Yoo, O. J.; Lee, J. -O. *Cell* **2007**, *130*, 906-917.
54. Yamada, M.; Ichikawa, T.; Ii, M.; Sunamoto, M.; Itoh, K.; Tamura, N.; Kitazaki, T. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7457-7467.
55. Kawamoto, T.; Ii, M.; Kitazaki, T.; Iizawa, Y.; Kimura, H. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *584*, 40-48.
56. Hoffmann, J. A. *Nature* **2003**, *426*, 33-38.
57. Goto, A.; Matsushita, K.; Gesellchen, V.; Chamy, L. E.; Kutteneuler, D.; Takeuchi, O.; Hoffmann, J. A.; Akira, S.; Boutros, M.; Reichhart, J. M. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 97-104.
58. Leulier, F.; Parquet, C.; Pili-Floury, S.; Ryu, J. H.; Caroff, M.; Lee, W. J.; Mengin-Lecreulx, D.; Lemaitre, B. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 478-484.
59. Sekiya, M.; Ueda, K.; Okazaki, K.; Kikuchi, H.; Kurata, S.; Oshima, Y. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 2165-2174.

60. Kikuchi, H.; Sekiya, M.; Katou, Y.; Ueda, K.; Kabeya, T.; Kurata, S.; Oshima, Y. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1693-1695.
61. Kikuchi, H.; Isobe, M.; Sekiya, M.; Hoshikawa, T.; Ueda, K.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4624-4627.
62. Kikuchi, H.; Sato, Y.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3536-3542.
63. Tomita, T.; Ieguchi, K.; Coin, F.; Kato, Y.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Kurata, S.; Maru, Y. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108957.
64. Kikuchi, H.; Hoshikawa, T.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1259-1266.
65. Takahashi, K.; Murakami, K.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Kubohara, Y. *Life Sci.* **2011**, *88*, 480-485.
66. Wade R. C.; Goodford P. J.; *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *289*, 433-444.
67. Lu, Y.; Shi, T.; Wang, Y.; Yang, H.; Yan, X.; Luo, X.; Jiang, H.; Zhu, W. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2854-2862.
68. 笹月健彦 免疫生物学 -免疫系の正常と病理- 原書第 3 版, **1998**, 344-364.
69. Ho, S.; Clipstone, N.; Timmermann, L.; Northrop, J.; Graef, I.; Fiorentino, D.; Nourse, J.; Crabtree, G. R. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *80*, S44-S45.
70. Cuero, R.; Ouellet, T.; Yu, J.; Mogongwa, N. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 953-961.
71. Mou, Y.; Luo, H.; Mao, Z.; Shan, T.; Sun, W.; Zhou, K.; Zhou, L. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 979-998.
72. Kubohara, Y.; Okamoto, K. *Exp. Cell. Res.* **1994**, *214*, 367-372.
73. Serafimidis, I.; Kay, R. R. *Dev. Biol.* **2005**, *282*, 432-441.
74. Jung, M. E.; Hagenah, J. A. *Heterocycles* **1987**, *25*, 117-121.
75. Yamaguchi, M.; Hirao, I. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 391-394.

76. Kikuchi, H.; Sasaki, K.; Sekiya, J.; Maeda, Y.; Amagai, A.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3203-3214.
77. Austin, M. B.; Saito, T.; Bowman, M. E.; Haydock, S.; Kato, A.; Moore, B. S.; Kay, R. R.; Noel, J. P. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 494-502.
78. Ghosh, R.; Chhabra, A.; Phatale, P. A.; Samrat, S. K.; Sharma, J.; Gosain, A.; Mohanty, D.; Saran, S.; Gokhale, R. S. *J. Biol Chem.* **2008**, *283*, 11348-11354.
79. Maret, W. *Am. Soc. Nut. Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 82-91.
80. Fan, D.; Hou, L. S. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 16332-16342.
81. Akaza, Y.; Tsuji, A.; Yasukawa, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1528-1532.
82. Winter, J. M.; Sato, M.; Sugimoto, S.; Chiou, G.; Garg, N. K.; Tang, Y.; Watanabe, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17900-17903.
83. Shizuri, Y.; Kosemura, S.; Yamamura, S.; Furukawa, H.; Kawai, K.; Okada, N. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1583-1584.
84. Gao, J. M.; Yang, S. X.; Qin, J. C. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4755-4811.
85. Clarke, D. D.; Nord, F. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1953**, *45*, 469-470.
86. Robeson, D. J.; Strobel, G. A. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 767-768.
87. Chang-Liao, W. -L.; Chien, C. -F.; Lin, L. -C.; Tsai, T. -H. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 668-673.
88. Mousouri, E.; Melliou, E.; Magiatis, P. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 660-667.

## 発表論文リスト

1. Development of novel DIF-1 derivatives that selectively suppress innate immune responses.

Van Hai Nguyen, Haruhisa Kikuchi, Yuzuru Kubohara, Katsunori Takahashi, Yasuhiro Katou, Yoshiteru Oshima *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 4311-4315.

2. Production of Novel Bispyrone Metabolites in the Cellular Slime Mold *Dictyostelium giganteum* Induced by Zinc(II) Ion.

Van Hai Nguyen, Haruhisa Kikuchi, Hiraku Sasaki, Kyoichi Iizumi, Yuzuru Kubohara, Yoshiteru Oshima *Tetrahedron* **2017**, *73*, 583-588.

## 謝辞

本研究に際し、始終御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 大島 吉輝先生に謹んで御礼申し上げます。

主査として本論文の審査にあたり、有益なるご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 土井 隆行先生に厚く御礼申し上げます。

副査として本論文の審査にあたり、有益なるご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科准教授 叶 直樹先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、細部に至る御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科准教授 菊地 晴久先生に謹んで御礼申し上げます。

細胞性粘菌および哺乳類細胞を用いた生物活性試験に関して多大なるお力添えをいただきました順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科教授 久保原 禅先生に厚く御礼申し上げます。

ショウジョウバエ細胞を用いた生物活性試験をはじめ、様々な面でお力添えをいただきました東北大学大学院薬学研究科元助教 加藤 泰弘先生に厚く御礼申し上げます。

生物活性試験に関して多大なるお力添えをいただきました群馬パース大学保健科学部講師 高橋 克典先生に厚く御礼申し上げます。

生物活性試験に関して多大なるお力添えをいただきました順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科准教授 佐々木 啓先生、助手 飯泉 恭一先生に厚く御礼申し上げます。

細胞性粘菌の貴重な試料を御提供いただきました元国立科学博物館植物研究部名誉研究員 萩原 博光博士に深く感謝いたします。

研究室生活全般において様々な御力添えをいただきました東京大学大学院総合文化研究科准教授 浅井 禎吾先生に厚く御礼申し上げます。

NMR スペクトル, 質量スペクトル測定の労をとられました東北大学大学院薬学研究科中央分析室の諸氏に厚く御礼申し上げます.

本研究を続けるにあたり公私共に御支援頂いた東北大学大学院薬学研究科医薬資源化学分野の先生方, 職員の皆様, および先輩, 同輩, 後輩の諸氏に心より感謝致します.

本研究を続けるにあたり多大なるご支援をいただきました小林奨学金財団の小林一雅 理事長, 小林 博子副理事長をはじめ財団関係者の皆様に心より感謝致します.

最後に, これまで様々な面においてあたたかく見守っていただいた私の家族に心より感謝いたします.