

創薬を指向した天然薬物学研究

塚本佐知子

Study on Natural Products for Drug Development

Sachiko TSUKAMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

(Received June 24, 2010)

The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays a major role in selective protein degradation and regulates various cellular events. Approval of bortezomib for the treatment of multiple myeloma validated the proteasome as an anticancer target. In order to find drug candidates targeting the ubiquitin-dependent protein degradation, we paid an attention to inhibitors against three enzymes, ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), and ubiquitin-protein ligase (E3), which are required for polyubiquitination of proteins and prerequisite to proteasome-mediated protein degradation. We succeeded in isolating various compounds with three distinct inhibitory activities against an E1 enzyme reaction, Ubc13 (E2)-Uev1A interaction, and p53-HDM2 (E3) interaction as well as the proteasome inhibitors. We also isolated new alkaloids, notoamides, from a marine-derived *Aspergillus* sp. Among them, notoamide B and stephacidin A contain a bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring in their structures. We proposed this ring is constructed from notoamide E by the intramolecular Diels-Alder (IMDA) reaction. Recently, the isolation of the antipodes of notoamides from the terrestrial *Aspergillus* has been reported. We propose that each enantiomer is generated by a distinct face-selective IMDA.

Key words—ubiquitin-proteasome system; natural product; drug development; indole alkaloid; enantiomer; fungus

1. はじめに

有用物質の宝庫である天然薬用資源から、人類の健康を増進する医薬品あるいは生体機能解明のための分子プローブとなる新規医薬シーズを探索するためには、充実した天然薬用資源ライブラリーの構築に加え、研究者独自の発想に基づいた生物活性試験システムの確立が極めて重要であると、筆者は今まで考えてきた。そして、国内やインドネシア熱帯サンゴ礁において自ら海洋無脊椎生物や微生物を採集し、独自に天然薬用資源ライブラリーを構築してきた。当研究室では、従来から、細胞増殖抑制作用、抗菌作用、神経突起阻害作用、いもち病菌を用いた微小管重合阻害試験、あるいは、酵母変異株に対する成長阻害作用などの生物活性試験を行っているが、最近は特に、他の研究者があまり調べていない

生物活性として、ユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害作用を重点的に調べている。本総説では、第一に、ユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害物質探索の成果について紹介する。

一方、筆者らが海洋由来 *Aspergillus* 属真菌から単離したインドールアルカロイド notoamide は、分子内に複雑なビシクロ構造として bicyclo [2.2.2] diazaoctane 環を有していることから、notoamide に関連する一連の化合物の生合成機構は大変興味深いと考え、notoamide の生合成機構を解明する研究を開始した。その研究の途上で、筆者らが単離した化合物の鏡像異性体が米国の研究者により近縁の真菌から発見された。ビシクロ構造の部分は分子内 Diels-Alder 反応により生合成されたと考えられることから、2種の真菌に存在する Diels-Alderase は異なるエナンチオ選択性を有していると推定される。この生合成研究は現在進行中であるが、本総説では、第二に、notoamide の発見から生合成機構に関する現在の到達点について紹介する。

熊本大学大学院生命科学研究所 (薬学系) (〒862-0973
熊本市大江本町 5-1)

e-mail: sachiko@kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会学術振興賞受賞を記念して記述したものである。

2. ユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) を阻害する天然低分子化合物の探索

生命活動は、遺伝子から転写・翻訳されたタンパク質の働きによって制御されている。そして、タンパク質が生合成されて機能することに加えて、不要になったタンパク質がタイムリーに分解されることも重要である。すなわち、生命活動はタンパク質の生合成と分解のバランスの上に成り立っていると言える。細胞内における選択的なタンパク質分解は、ユビキチン-プロテアソームシステム [ubiquitin-proteasome system (UPS), Fig. 1] によって行われており、このシステムによって細胞周期、シグナル伝達、ストレス応答、免疫応答、小胞体での品質管理などの多様な生命現象が制御されている。UPSにおいて、タンパク質を分解する酵素は、26Sプロテアソームである。26Sプロテアソームは多数のサブユニットから構築される分子量250万の巨大分子複合体で、トリプシン様、キモトリプシン様及びカスパーゼ様の3種類の触媒活性部位を合わせ持つことが、従来のプロテアーゼとは大きく異なる点である。26Sプロテアソームがタンパク質を分解する際に、まず、76アミノ酸からなるユビキチン (Ub) が標的タンパク質に複数個付加 (ユビキチン化) し、付加した複数個のユビキチン分子が分解の目印としてプロテアソームにより認識される。この標的タンパク質のユビキチン化には、ユビキチン化酵素 E1,

E2, E3 の働きが必要である。初めに、ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1) により活性化され、E1-ユビキチン複合体 (E1-Ub) が生成する (Fig. 1 中のステップ A)。次に、ユビキチンは、E1 酵素からユビキチン結合酵素 (E2) に渡され、E2-ユビキチン複合体 (E2-Ub) が生成する (ステップ B)。最後に、ユビキチンリガーゼ (E3) が標的タンパク質を認識し (ステップ C)、かつ、E2-ユビキチン複合体を結合することによって、ユビキチンは標的タンパク質にイソペプチド結合する (ステップ D)。この E1, E2, E3 が関与する系はユビキチンシステムと呼ばれる。そして、このユビキチン化反応が繰り返し起きることにより、複数個のユビキチン分子が鎖状に結合したポリユビキチン鎖が形成される。ポリユビキチン鎖が結合した標的タンパク質は26Sプロテアソームへと運搬され (ステップ E)、ATP 依存的に分解される (ステップ F)。この時、26Sプロテアソームの制御ユニットが、ポリユビキチン化タンパク質の認識、分解の目印であるポリユビキチン鎖の標的タンパク質からの遊離 (脱ユビキチン化) (ステップ G)、標的タンパク質のアンプオールディング (構造変化)、そして、触媒ユニット内部への標的タンパク質の送り込みを行うことにより、触媒ユニットに存在する活性部位で標的タンパク質が分解される。

2003年にアメリカにおいて、プロテアソーム阻

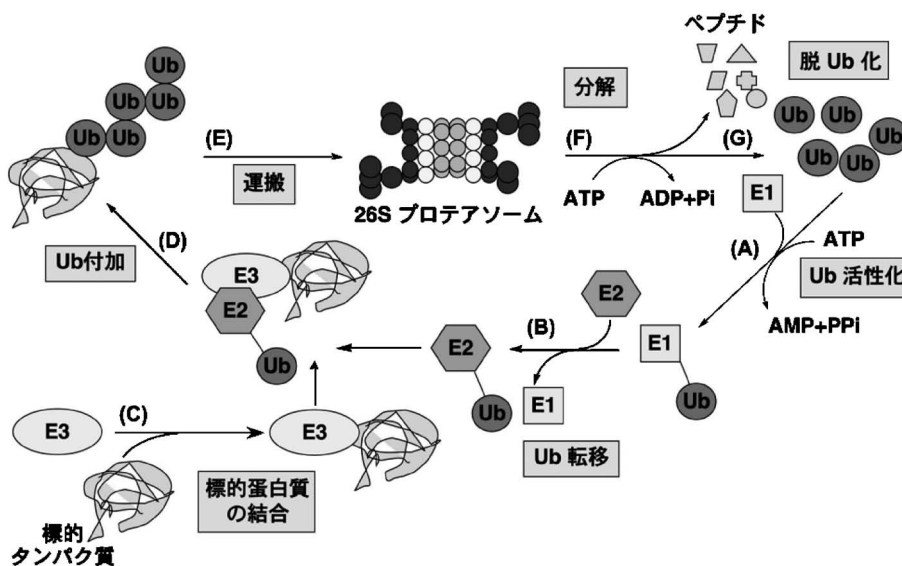


Fig. 1. The Ubiquitin-proteasome System (UPS)

Ub, ubiquitin; E1, Ub-activating enzyme; E2, Ub-conjugating enzyme; E3, Ub-protein ligase.

害剤 bortezomib (PS-341, Velcade®, **1**, Fig. 2) が多発性骨髄腫治療薬として認可され脚光を浴びた.¹⁾ その後、海洋由来放線菌から単離されたプロテアソーム阻害剤 salinosporamide A (NPI-0052, **2**, Fig. 2) の第 1 相臨床試験が行われるなど、プロテアソームは多発性骨髄腫治療薬の標的として注目されている。²⁾ 一方、ユビキチンシステムを構成する 3 つの酵素 (E1, E2, E3) のいずれかの働きを阻害した場合でも、標的タンパク質のユビキチン化が阻害されて、標的タンパク質の分解が阻害されることから、結果的にプロテアソームの働きを阻害する場合と同様の効果が期待できる。そして、3 つの酵素の中でも特に、標的タンパク質を識別しユビキチン化を触媒するユビキチンリガーゼ E3 は標的タンパク質に特異的であることから、E3 酵素を阻害する化合物が選択性の高い抗がん剤として期待され活発な開発が行われている。しかし、UPS を標的とした、天然資源からの阻害物質の網羅的探索は、あまり行われていないのが現状である。そこで筆者らは、創薬シーズの探索を目的として、海洋資源を含む天然資源からの UPS 阻害物質の探索を精力的に行っている。

2-1. プロテアソーム阻害物質 プロテアソーム阻害作用のアッセイは、ラット肝臓から調製したプロテアソーム標品を用いて行っている。初めに、

プロテアソーム標品にサンプルを加えてプレインキュベーションを行い、次に、MCA 基質を加えて加水分解反応を行い、最後に、10% SDS を加えて反応を停止させ、プロテアソームの作用により遊離したアミノメチルクマリンの量を蛍光光度計で測定している。スクリーニングの結果、天然資源からのいくつかの粗抽出物にプロテアソーム阻害活性を見出し、活性物質の精製と構造決定を行った。そして、*Acanthodendrilla* 属海綿のメタノール抽出液から、がん多剤耐性克服物質として以前に報告された agosterol の類縁化合物の 10 種類をプロテアソーム阻害剤として単離した。³⁾ それらの化合物は、同じステロール骨格を有しているにもかかわらず活性に差が認められ、キモトリプシン様活性に対する阻害活性については、agosterol C (**3**, Fig. 2) の IC₅₀ 値が 10 μg/ml と比較的強いことが明らかになった。さらに、*Mycale* 属海綿からは新規 secomycalolide A (**4**, IC₅₀ 11 μg/ml) が、⁴⁾ 海綿 *Aaptos suberitoides* からは isoaptamine (**5**, IC₅₀ 2 μg/ml)⁵⁾ がプロテアソーム阻害物質として得られた (Fig. 2)。現在、選択性が高く阻害活性の強い化合物の探索を続行中である。

2-2. ユビキチン活性化酵素 E1 の阻害物質 標的タンパク質がユビキチン化される際、ユビキチンがユビキチン活性化酵素 E1 によって活性化される

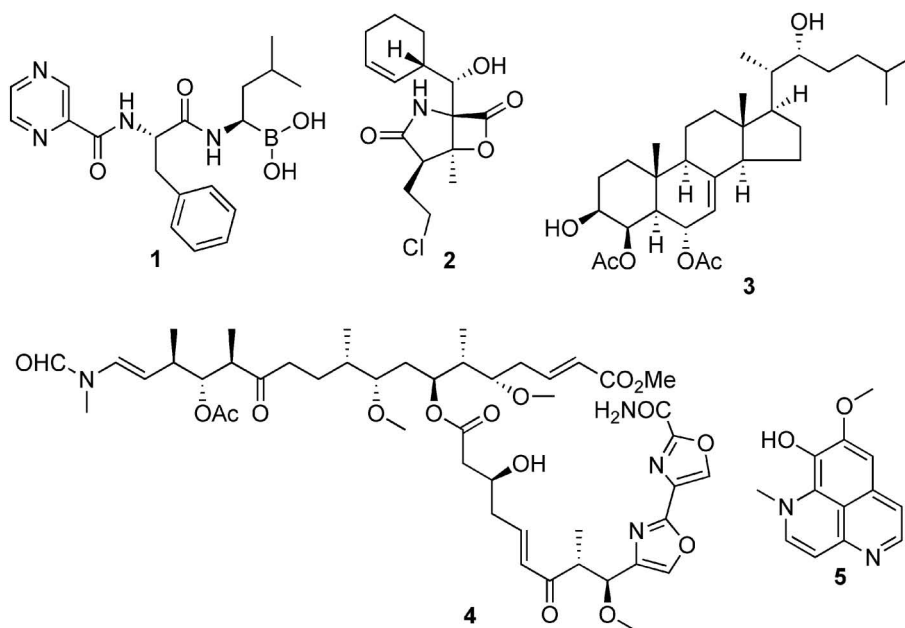


Fig. 2. Structures of Proteasome Inhibitors 1-5

必要がある。この時、E1 酵素の触媒部位に存在するシステイン残基のチオール基とユビキチンの C 末端グリシン残基のカルボキシル基との間でチオエステル結合が形成される。スクリーニングは、FLAG タグを付加した E1 酵素と GST-ユビキチン融合タンパク質を用い、非還元条件下でのウエスタンブロット解析法により、チオエステル結合を介する複合体形成を検出する方法を確立して行った。そして、海洋由来真菌 *Aspergillus* 属の培養液に阻害活性が認められたので、化合物の精製を行い、新規物質 himeic acid A (6), B (7), C (8) を得た (Fig. 3).⁶⁾ 6 は、ユビキチンと E1 酵素の複合体の形成を 50 μM の濃度で 65% 阻害したが、7 と 8 は 100 μM でも全く阻害しなかった。E1 酵素にユビキチンがチオエステル結合する過程では、初めに、E1 酵素の触媒部位にユビキチンと ATP が結合し、次に、ユビキチンがアデニル化され、最後に、ユビキチンが E1 酵素のシステイン残基にチオエステル結合するという 3 つのステップから構成されている。6 がどのステップを阻害しているのかを明らかにするために、免疫沈降実験により検討を行ったところ、6 はユビキチンが E1 酵素の触媒部位に結合する第一のステップを阻害することが明らかになった。また、6 は、ユビキチン様タンパク質である SUMO-1 や ISG15 に対する E1 酵素に対しては阻害活性を示さなかったので、ユビキチンに対する E1 酵素に特異的な化合物であると考えられる。天然資源から初めて単離された E1 酵素阻害物質はキノコ *Panus rudis* から単離された panepophenanthrin (9) (Fig. 3)⁷⁾ で、6 は 2 例目である。また最近、合成化合物ライブラリーから発見された E1 阻害物質である

PYR-41 (10) (Fig. 3)⁸⁾ は、転写因子 NF- κB の転写活性を阻害することにより、がん抑制因子 p53 を活性化させ抗腫瘍作用を示すと報告されている。今後、E1 阻害物質をリード化合物として用いて抗がん剤の開発が活発に行われると考えられる。

2-3. ユビキチン結合酵素 E2 の阻害物質 E2 酵素は十数種類存在するが、その中でも Ubc13 は、E2 様タンパク質である Uev1A とヘテロ複合体を形成して初めて、E2 酵素として機能する。リボソーム上で生合成されたがん抑制因子 p53 は四量体を形成し、細胞修復あるいはアポトーシスを誘導し細胞のがん化を防ぐ。しかし、生合成中の p53 に Ubc13-Uev1A 複合体が結合すると、K63-ユビキチン化が起こり、p53 のがん抑制作用が阻害され発がんに至る。したがって、このヘテロ二量体の形成を阻害する化合物は、がん抑制作用を示すと考えられる。そこで、Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害活性を ELISA 法により評価する方法を確立し、スクリーニングを行った。そして、インドネシアで採集した海綿から leucettamol A (11, IC₅₀ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Fig. 4) を単離することができた。⁹⁾ 11 は、E2 酵素阻害物質の発見例としては唯一の化合物である。なお、Ubc13 は別の E2 様タンパク質である Mms2 ともヘテロ複合体を形成して別の機能に関与するが、11 は、Ubc13-Mms2 複合体の形成を阻害しなかった

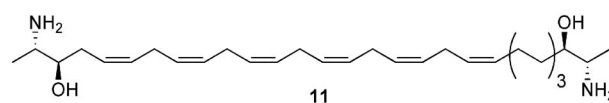


Fig. 4. Structure of an E2 Inhibitor 11

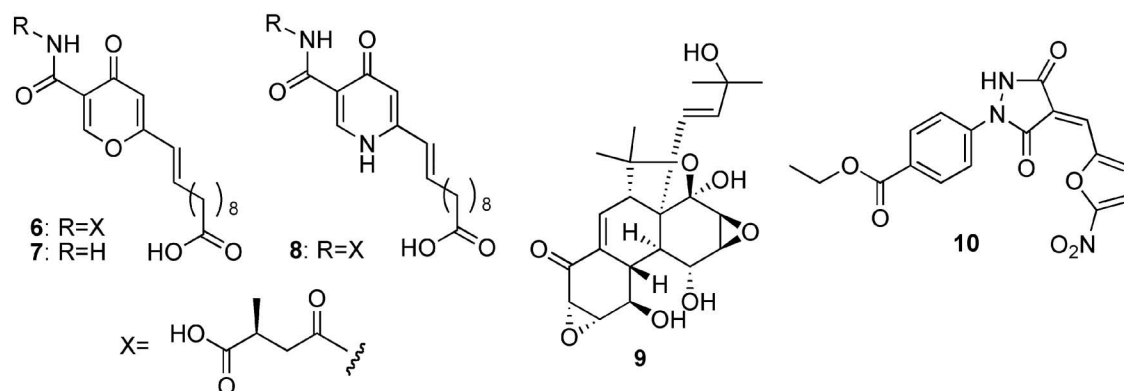


Fig. 3. Structures of E1 Inhibitors and Related Compounds 6-10

ので、Uev1A に特異的な阻害物質であると考えられる。今後、さらに強い Ubc13 阻害物質や他の E2 酵素に対する阻害物質の探索を行う予定である。

2-4. ユビキチンリガーゼ E3 の阻害物質 ユビキチンシステムを構成する酵素群の中で、ユビキチンリガーゼ E3 は分子多様性に富んでおり、各種疾患の責任遺伝子である例が多い。そして、広く研究が行われている E3 酵素として、Mdm2, VHL, E6-AP, Parkin などが知られている。また、ユビキチン依存的に分解される標的タンパク質には、がんなどの各種疾病において重要な働きをするものが多い。したがって、個々の標的タンパク質の分解を選択的に阻害する化合物は、従来の抗がん剤とは異なる作用機構で働く選択性の高い薬剤になると期待される。現在、がん抑制因子 p53 とその E3 酵素である Mdm2 との結合を阻害する化合物の開発が活発に行われている。Mdm2 が p53 に結合することにより、p53 の作用が阻害され、他方、Mdm2 が E3 酵素であるので、p53 の K48-ユビキチン化と分解も起こる。したがって、Mdm2 拮抗剤によって Mdm2-p53 複合体の形成が阻害されると、p53 は安定化し、そのがん抑制効果が促進される。また、がん細胞で Mdm2 の発現が上昇していることが知ら

れている。このような背景から、Mdm2 拮抗剤の開発が活発に行われ、それらの化合物の中で、合成化合物のライブラリーから見いだされた Mdm2 拮抗剤である nutlin-3 (**12**, Fig. 5) は、ヒトがん細胞を移植したヌードマウスでがんの増殖を抑制したことから、¹⁰ 臨床試験が行われている。一方、chlorofusin (**13**, Fig. 5) は天然資源から初めて単離された Mdm2 拮抗剤であるが、¹¹ 天然資源を用いた Mdm2 拮抗剤の網羅的な探索はほとんど行われていないのが現状である。

そこで筆者らは、天然資源から、p53 と Hdm2 (ヒト Mdm2 ホモログ) との複合体の形成を阻害する化合物の探索を行い、*Arthrinium* 属真菌の培養液から (-)-hexylitaconic acid (**14**, IC₅₀ 50 μg/ml, Fig. 5) を単離した。¹² 構造-活性相関を調べたところ、**14** は 100 μg/ml の濃度で 80% の阻害を示したのに対して、**14** から調製した **15-17** や itaconic acid (**18**) 及び succinic acid (**19**) は、100 μg/ml でもほとんど活性を示さなかった (Fig. 5)。筆者らは本研究において (-)-体の hexylitaconic acid を阻害剤として単離したが、(+)-体及び (-)-体とも、以前、海綿や菌の培養液から単離されている。**14** の絶対立体配置は決定されていなかったが、門出ら

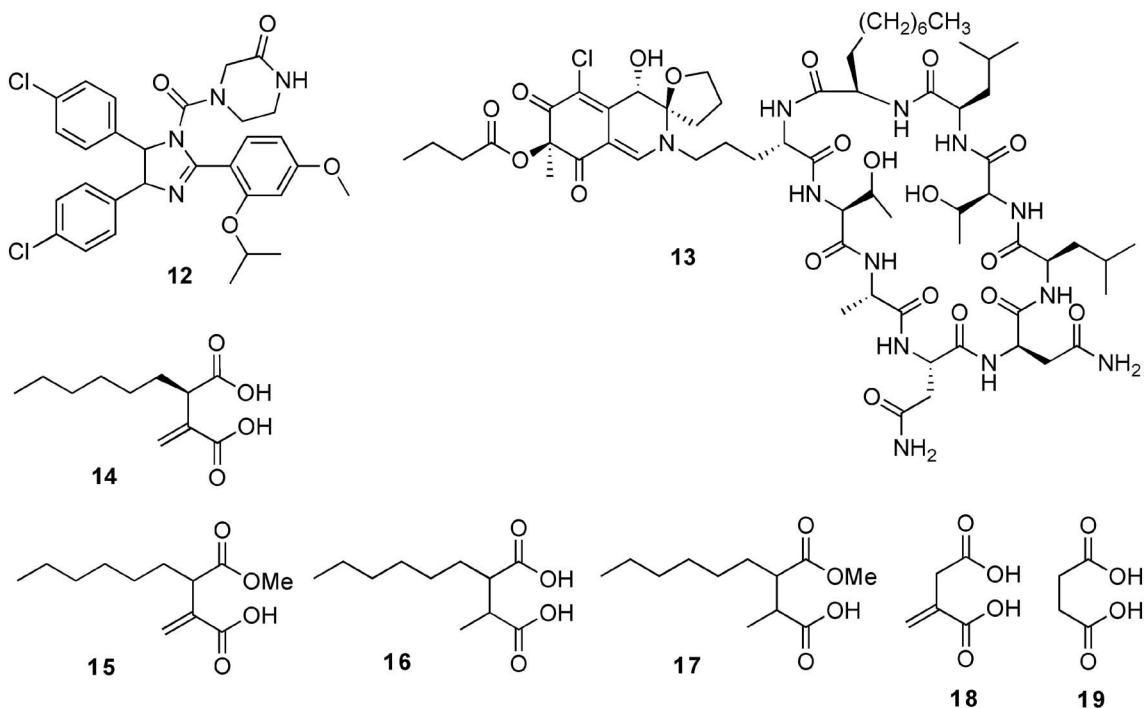


Fig. 5. Structures of E3 Inhibitors and Related Compounds 12-19

の VCD を用いた研究により, (–)-体は *R* 配置であることが明らかになった.¹³⁾ そして, 門出らにより合成された (+)-体を用いて阻害作用を調べ, (–)-体の阻害作用と比較したところ, いずれも同程度の阻害作用を示したので, 阻害剤の炭素の立体配置は阻害作用に影響を及ぼさないと考えられる. また, **14** は, p53 に対するもう 1 つの E3 酵素である COP1 と p53 との複合体の形成を阻害しなかったので, Hdm2 に結合して阻害していると考えられる. 天然資源からの p53-Hdm2 複合体形成阻害物質の単離例としては, **14** は 2 例目となる. 現在, さらに強い p53-Hdm2 複合体形成阻害物質の探索を続行中である.

2-5. 海綿由来抗腫瘍化合物 girolline の生体内における標的に関する解析 海綿 *Axinella brevistylla* のメタノール抽出物が p388 細胞に対して細胞毒性を示したので, 活性物質を精製したところ, 水溶性画分から girolline (**20**, Fig. 6) が得られた.

20 は, 以前にフランスにおいて抗がん剤としての臨床試験が行われたが, 生体内の標的に関する研究は行われていなかった. そこで筆者らは, **20** を単離したことを契機に, この化合物の生体内標的に関する解析を行った. そして **20** は, p53 の運搬 (ステップ E) に関与しているタンパク質の作用を阻害しているのではないかと推定するに至った.¹⁴⁾ これまでに, 運搬のステップを特異的に阻害する化合物はほかには発見されていないので, **20** の作用は大変興味深いと考えている. 現在, p53 の運搬を阻害する他の化合物の探索を進めている.

3. インドールアルカロイド notoamide について 能登半島で採集したイガイ (*Mytilus edulis galloprovincialis*) から単離した真菌から, 4 種類の新規インドールアルカロイド notoamides A–D (**21–24**) と既知の類縁化合物 sclerotiamide (**25**), stephacidin A (**26**), deoxybrevianamide E (**27**) を単離した (Fig.

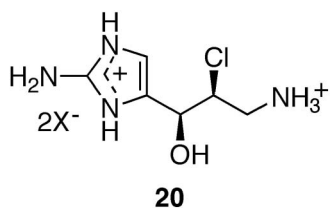


Fig. 6. Structure of a Recruit Inhibitor **20**

7).¹⁵⁾ **21–27** は, トリプトファン, プロリン, イソプレニンからなる基本構造をベースにして多様性が認められたので, それら化合物の生合成経路について推定した (Fig. 8). その際, 当時はまだ単離されていなかった化合物 **28** が一連の notoamides の生合成を考える上での重要な中間体になると考え, **28** を notoamides E と命名した. 当初, **28** は単離されていなかったが, 筆者らは **28** がかならず代謝産物中に存在すると考えた. そこで初めに, 合成された **28** を指標に用いて 20 日間培養した *Aspergillus* の代謝産物中に **28** が含まれているか否かを調べたが, **28** は検出されなかった. そこで, **28** が notoamide 類の前駆体であるならば, 培養の初期にのみ生産されるのではないかと考えた. そして, 菌を 20 枚の寒天プレート上で培養し, 毎日 2 枚ずつ抽出を行い, HPLC を用いて **28** と同じ溶出時間の画分を分取した. その画分の ¹H NMR スペクトルを測定したところ, 培養 5 日目の培養物中に **28** に由来するシグナルを確認できたが, 翌日には消失していた.¹⁶⁾ この結果から, **28** は培養初期に生合成されるがすぐに他の誘導体に変換する前駆体であると考えた. 次に, **28** がどのような化合物に変換するのかを調べるために, 共同研究者により合成された [¹²C,¹³C₂]-**28** を用いて取り込み実験を行った. その結果, ¹³C ラベルされた **23** と **24** は得られたが, 分子内 Diels-Alder (IMDA) 反応により生成すると推定した bicyclo [2.2.2] diazaoctane 環を有する化合物 (**21**, **22**, **26**) は全く検出されなかった.¹⁶⁾ しかし, その後, IMDA 反応の中間体と考えられる notoamide M (**29**) が単離されたことから,¹⁷⁾ 一連の notoamide の生合成にはやはり IMDA 反応が関与しているものと考えている.

一方, 筆者らが notoamide 類の生合成経路を解明するための取り込み実験を行っていた頃, Glore 教授 (University of Iowa) らが, ハワイのキノコから単離した *Aspergillus versicolor* から, 筆者らが単離した **22** や **26** の鏡像異性体に相当する (+)-notoamide B (**30**) や (–)-stephacidin A (**31**) とともに, 新規物質 (+)-versicolamide B (**32**) を単離した.¹⁸⁾ 続いて筆者らも, **32** の鏡像異性体である (–)-versicolamide B (**33**) を単離した.¹⁷⁾ すなわち, 2 種の近縁の *Aspergillus* から 3 組の鏡像異性体がそれぞれ単離されたことになる. Bicyclo [2.2.2] diazaoc-

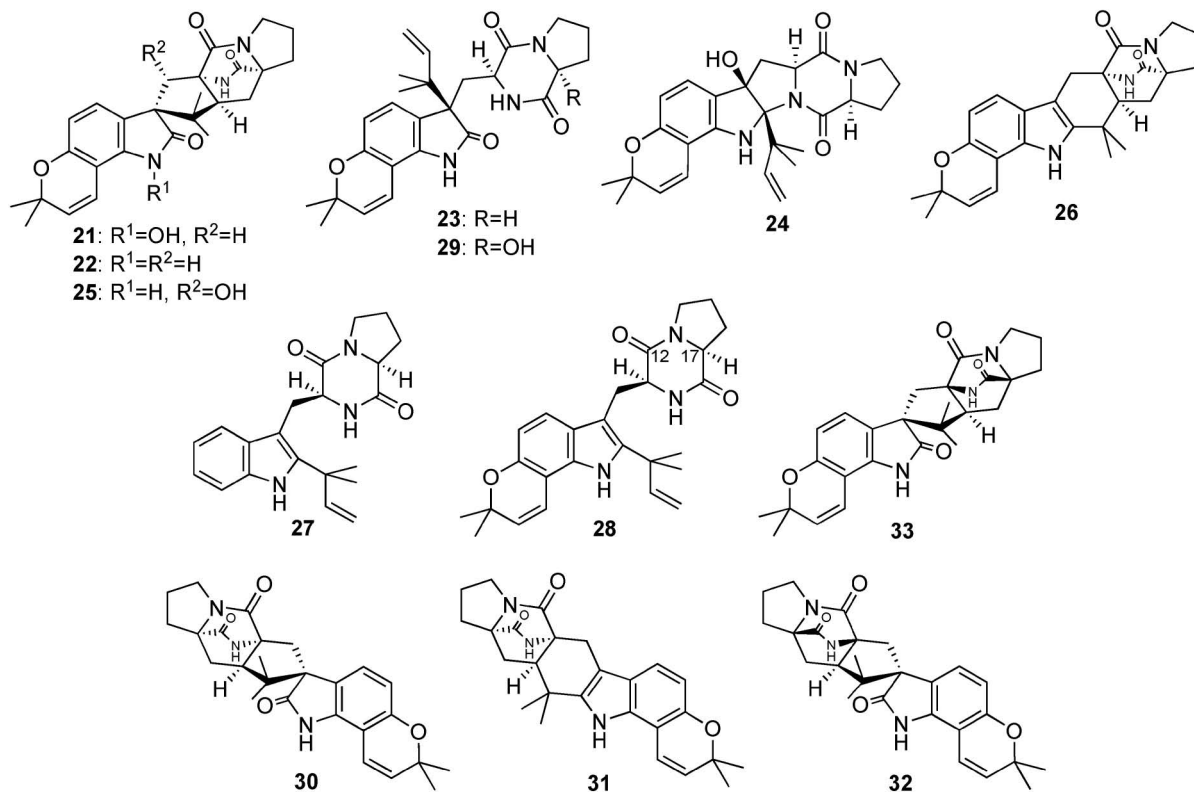


Fig. 7. Structures of Notoamides and Related Compounds 21–33

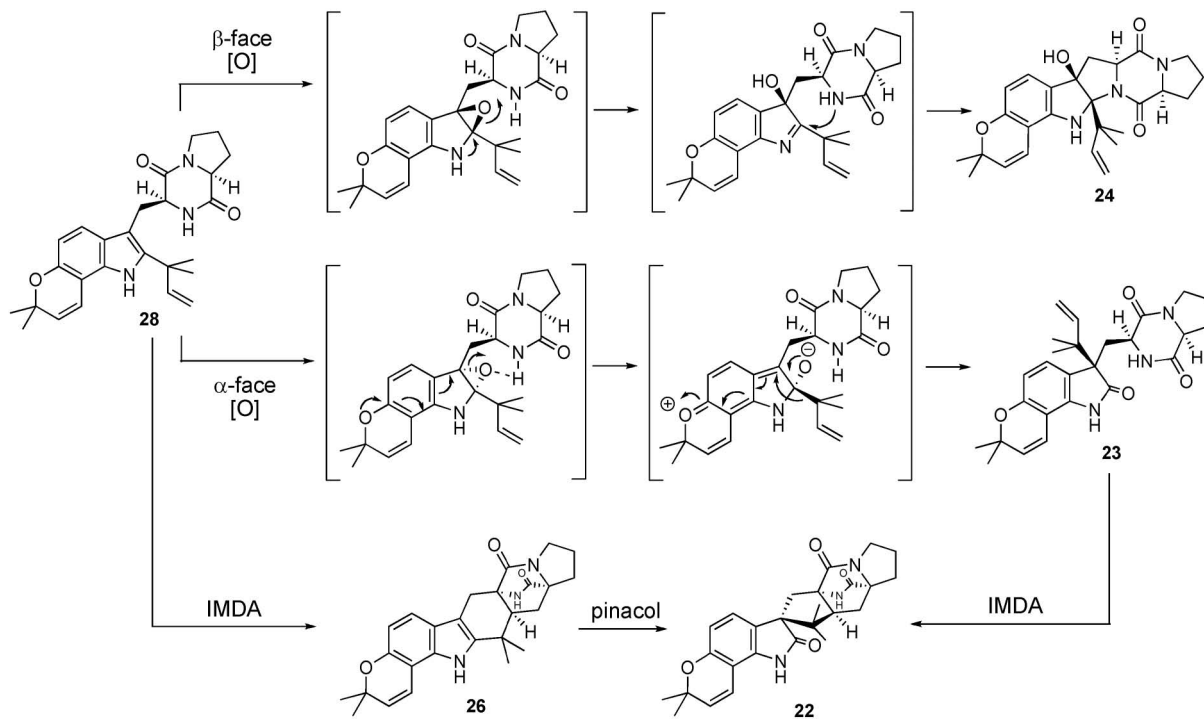


Fig. 8. Postulated Biosynthetic Relationships of Notoamides

tane 環の部分は IMDA 反応により生合成されたと考えられることから、2 種の真菌には異なるエナンチオ選択性を有する Diels-Alderase が存在すると推

定される。そして、これら 3 組の鏡像異性体がいずれも光学的に純粋であることは、Diels-Alderase のエナンチオ選択性が完全に制御されていることを示

唆している。¹⁹⁾天然資源から単離された有機化合物の中には、生合成的にIMDA反応で合成されたと考えられる化合物が多く認められるが、実際にその反応を触媒する酵素であるDiels-Alderaseについて研究が行われた例はあまり知られていない。現在、生合成研究を進行中であり、notoamide類の生合成に関与しているDiels-Alderaseの働きを解明することにより、天然物の生合成に関する重要な知見が得られると考えている。

4. おわりに

筆者は、創薬シーズとして有望な新規天然物を発見したいと考えている。そのためには、これまでにあまり行われていないような生物活性試験を積極的に活用することが重要ではないかと考えている。筆者は、以前、フジツボやホヤの幼生の着生機構を制御する天然物の探索を行っていたが、その際、細胞毒性試験などのスクリーニングでは見つからなかった化合物を多く発見することができた。その経験から、「切り口（すなわちスクリーニング方法）を変えることにより、自然は新しい顔を見せてくれるのではないか」という思いを強く抱くようになった。そして、本総説で記載したように、ユビキチン-プロテアソームシステムという新しい標的を選び、様々な天然物を阻害物質として単離することができた。また、notoamideの研究に関しては、化合物の構造にこだわって研究を続けたからこそ見出された成果であったと考えている。筆者らが天然資源から単離する化合物は、ハイスループットスクリーニングの場では膨大な数の化合物のうちの1つになってしまうかもしれないが、天然物化学の原点としての「化合物を大事にしてじっくり向き合う」という姿勢を通して発見できる成果もあるということをもtoamideの研究を通して実感している。今後の研究を通して、天然資源から人類の役に立つ医薬品あるいは生命現象の解明に役立つ分子ツールを発見したいと考えている。また、notoamideのように研究シーズとして興味深い天然物を発見して研究を大きく展開し、サイエンスの発展に貢献したいと考えている。

謝辞 ユビキチン-プロテアソームシステムに関するアッセイ系を構築するにあたり、ご指導頂きました愛知学院大学薬学部横沢英良教授（北海道大

学名誉教授）に深く感謝致します。Notoamideの生合成研究は、Robert M. Williams教授（コロラド州立大学）との共同研究で行いました。本研究は金沢大学大学院自然科学研究科（薬学系）天然物化学研究室（太田富久教授）、千葉大学大学院理学研究科天然物化学研究室、熊本大学大学院生命科学研究部天然薬物学分野において行ったものです。ご協力頂きました方々に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Sánchez-Serrano I., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 107–114 (2006).
- 2) Macherla V. R., Mitchell S. S., Manam R. R., Reed K. A., Chao T.-H., Nicholson B., Deyanat-Yazdi G., Mai B., Jensen P. R., Fenical W. F., Neuteboom S. T. C., Lam K. S., Palladino M. A., Potts B. C. M., *J. Med. Chem.*, **48**, 3684–3687 (2005).
- 3) Tsukamoto S., Tatsuno M., van Soest R. W. M., Yokosawa H., Ohta T., *J. Nat. Prod.*, **66**, 1181–1185 (2003).
- 4) Tsukamoto S., Koimaru K., Ohta T., *Mar. Drugs*, **3**, 29–36 (2005).
- 5) Tsukamoto S., Yamanokuchi R., Yoshitomi M., Sato K., Ikeda T., Rotinsulu H., Mangindaan R. E. P., de Voogd N. J., van Soest R. W. M., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 3341–3343 (2010).
- 6) Tsukamoto S., Hirota H., Imachi M., Fujimuro M., Onuki H., Ohta T., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 191–194 (2005).
- 7) Sekizawa R., Ikeno S., Nakamura H., Nagawawa H., Matsui S., Iinuma H., Takeuchi T., *J. Nat. Prod.*, **65**, 1491–1493 (2002).
- 8) Yang Y., Kitagaki J., Dai R. M., Tsai Y. C., Lorick K. L., Ludwig R. L., Pierre S. A., Jensen J. P., Davydov I. V., Oberoi P., Li C. C., Kenten J. H., Beutler J. A., Vousden K. H., Weissman A. M., *Cancer Res.*, **67**, 9472–9481 (2007).
- 9) Tsukamoto S., Takeuchi T., Rotinsulu H., Mangindaan R. E. P., van Soest R. W. M., Ukai K., Kobayashi H., Namikoshi M., Ohta T., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6319–6320 (2008).
- 10) Vassilev L. T., Vu B. T., Graves B., Carvajal

- D., Podlaski F., Filipovic Z., Kong N., Kammlott U., Lukacs C., Klein C., Fotouhi N., Liu E. A., *Science*, **303**, 844–848 (2004).
- 11) Duncan S. J., Grüşchow S., Williams D. H., McNicholas C., Purewal R., Hajek M., Gerlitz M., Martin S., Wrigley S. K., Moore M., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 554–560 (2001).
- 12) Tsukamoto S., Yoshida T., Hosono H., Ohta T., Yokosawa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 69–71 (2006).
- 13) Nakahashi A., Miura N., Monde K., Tsukamoto S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 3027–3030 (2009).
- 14) Tsukamoto S., Yamashita K., Tane K., Kizu R., Ohta T., Matsunaga S., Fusetani N., Kawahara H., Yokosawa H., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 699–701 (2004).
- 15) Kato H., Yoshida T., Tokue T., Nojiri Y., Hirota H., Ohta T., Williams R. M., Tsukamoto S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 2254–2256 (2007).
- 16) Tsukamoto S., Kato H., Greshock T. J., Hirota H., Ohta T., Williams R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3834–3835 (2009).
- 17) Tsukamoto S., Kawabata T., Kato H., Greshock T. J., Hirota H., Ohta T., Williams R. M., *Org. Lett.*, **11**, 1297–1300 (2009).
- 18) Greshock T. J., Grubbs A. W., Jiao P., Wicklow D. T., Gloer J. B., Williams R. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 3573–3577 (2008).
- 19) Miller K. A., Tsukamoto S., Williams R. M., *Nat. Chem.*, **1**, 63–68 (2009).