

# 博士論文

論文題目 テルペン合成酵素に関する研究

氏名 三橋 隆章

# 目次

序論	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p1
第一章	テルペノイドとテルペン合成酵素	・・・・・・・・・・ p2-p3
第二章	テルペノイドの生合成	・・・・・・・・・・ p4
第三章	プレニル基転移酵素について	・・・・・・・・・・ p5
第四章	テルペン環化酵素について	・・・・・・・・・・ p6
第五章	キメラ型テルペン合成酵素について	・・・・・・・・ p7-p9
本論	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p10
第六章	テルペン合成酵素の機能解析手法の概要	・・・・・・・・・・ p11
第七章	<i>Penicillium chrysogenum</i> 由来テルペン合成酵素	・・・・・・・・・・ p12-p25
第八章	<i>Emericella varicolor</i> 由来テルペン合成酵素	・・・・・・・・・・ p26-p36
結論	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p37-p42
実験項	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p43-p102
参考文献	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p103-p105
謝辞	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p106

# 序論

## 第一章 テルペノイドとテルペン合成酵素

テルペノイドとは、5炭素からなるイソプレン単位（図1）を基本的な単位とし、その組み合わせによって構成されている化合物群を指す。ごく単純な構成単位から成り立っているにも関わらず、テルペノイドは天然において最も構造多様性に富む化合物群の一つとして知られている<sup>1</sup>。実際、これまでに8万種を超えるテルペノイドが天然から単離・報告されている。



図1. イソプレン単位とイソプレン

イソプレン単位を有する最も単純な化合物の一つとして、イソプレンがある（図1）。イソプレンもテルペノイドの一種であり天然に存在する化合物であるが、本化合物がテルペノイド生合成の前駆体となるわけではない。実際には、生化学的に活性なイソペンテニル二リン酸 (isopentenyl diphosphate: IPP) 及び、ジメチルアリル二リン酸 (dimethylallyl diphosphate: DMAPP) と呼ばれる化合物を前駆体として、テルペノイドは生体内において合成される（図2）。

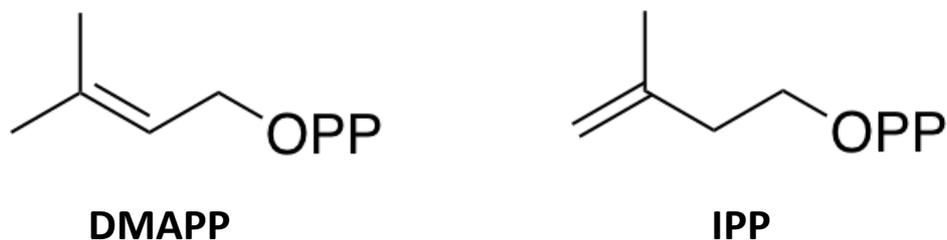


図2. 生化学的に活性なイソプレン単位

生合成の過程では、DMAPP 及び IPP が縮合反応、環化反応、酸化反応などの修飾反応といった様々な反応を経ることで、複雑かつ多様性に富んだ化合物へと導かれる。また、テルペノイドの構造多様性は、テルペノイドの示す生物活性の多様性の基盤ともなっている。例として、抗マラリア活性を示すアルテミシニン<sup>2</sup>、抗腫瘍活性を示すパクリタキセル<sup>3</sup>、 $\kappa$ -オピオイド選択的アゴニストであるサルビノリンA<sup>4</sup>など薬学的に重要な化合物もテルペノイドの一種である（図3）。

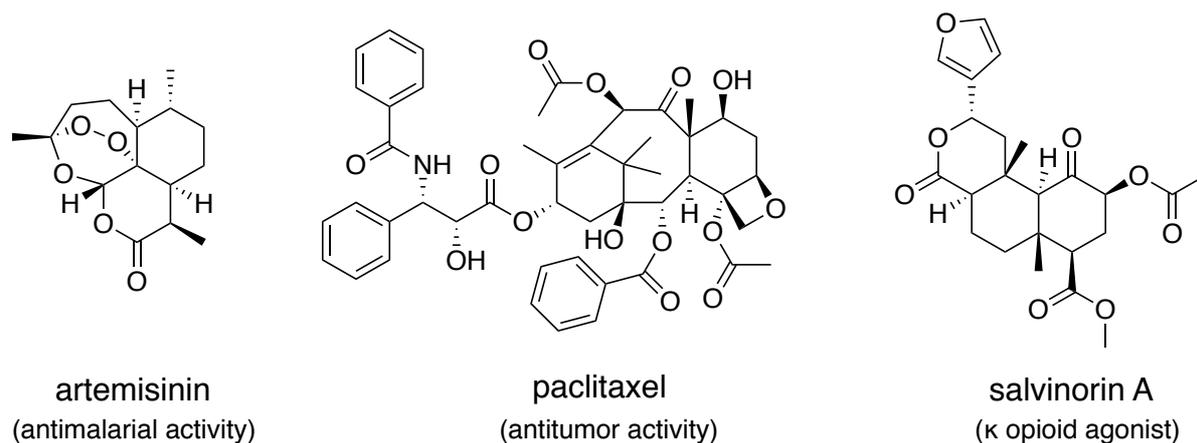


図3. 生物活性を示すテルペノイドの例

テルペノイドは、しばしば複雑な炭素骨格と多数の不斉中心を有する構造を持つ為、有機化学合成による供給は時として挑戦的である。こうした複雑化合物の合成を生体内という温和な条件下で達成する酵素の機能や仕組みを解明していくことは、意義深いと考えられる。本研究では、テルペノイドの基本的な炭素骨格の形成に関わる酵素である「テルペン合成酵素」を対象に、新規酵素の同定と機能解析を行った。

## 第二章 テルペノイドの生合成

テルペノイドは、イソプレン単位である IPP および DMAPP が縮合反応によって直鎖状のポリプレニル二リン酸に導かれた後に、環化することによって基本骨格が形成され、場合により更なる修飾を受けることによって、生体内で合成される (図 4)。イソプレン単位が縮合することで形成されるポリプレニル二リン酸はそれぞれ、geranyl diphosphate (GPP, C10)、farnesyl diphosphate (FPP, C15)、geranylgeranyl diphosphate (GGPP, C20)、geranylfarnesyl diphosphate (GFPP, C25) と呼ばれる。

また、テルペノイドは、その構造中に取り込まれたイソプレン単位 (C5 : 炭素原子5つの意) の数によって分類される。それぞれ、モノテルペン (C10)、セスキテルペン (C15)、ジテルペン (C20)、セスタテルペン (C25) と呼ばれ、例としてモノテルペン (C10) の場合、イソプレン単位2つから成っている。これらの中でもイソプレン単位5つから成るセスタテルペン (C25) は、天然からの単離報告例が少ない比較的稀なテルペノイドであることが知られている。

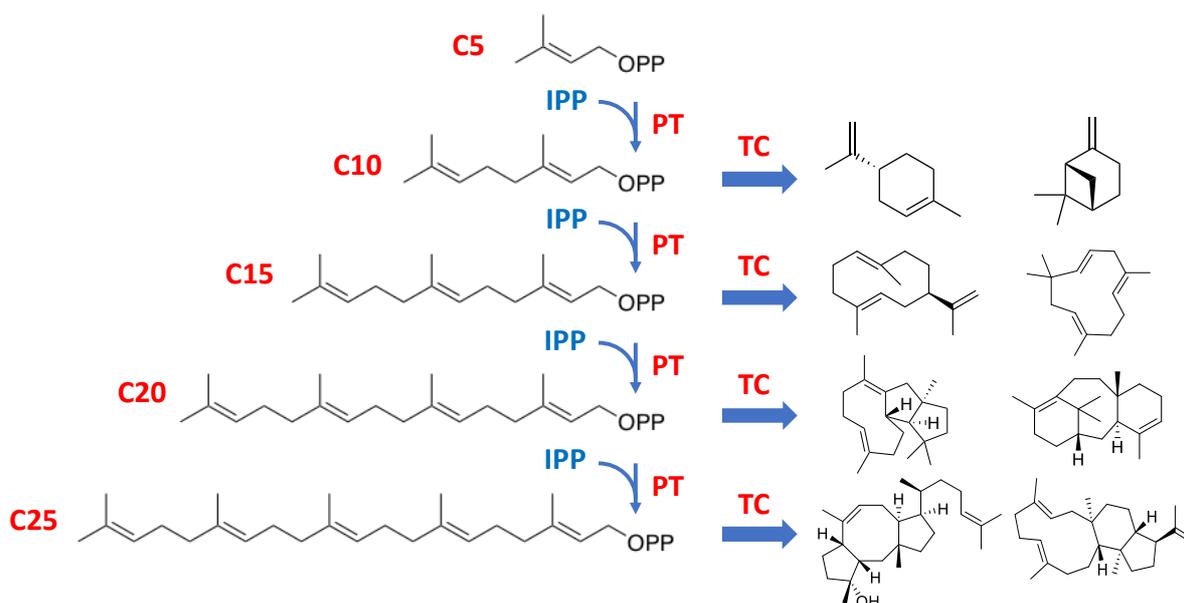


図 4. テルペノイドの生合成

また、IPP と DMAPP の縮合反応を触媒する酵素はプレニル基転移酵素 (prenyltransferase: PT) と呼ばれ、このプレニル基転移酵素の産物であるポリプレニル二リン酸の環化を触媒する酵素はテルペン環化酵素 (terpene cyclase: TC) と呼ばれる。

### 第三章 プレニル基転移酵素について

プレニル基転移酵素は、ポリプレニル二リン酸の伸長反応を触媒する酵素である。本酵素反応においては、基質となる（ポリ）プレニル二リン酸が二リン酸の脱離を伴い IPP の二重結合部分と反応し、最後に立体特異的にプロトンが脱離する（図 5）。こうした縮合反応を繰り返すことで、より長い鎖長のポリプレニル二リン酸が生合成される。

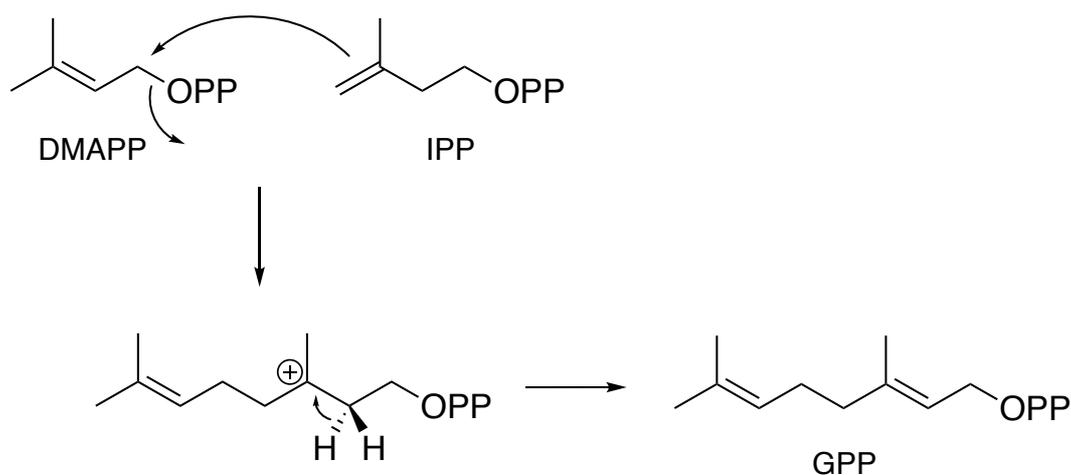


図 5. GPP を生成する反応機構。同様の反応を繰り返すことで、更に長い直鎖状ポリプレニル二リン酸が生合成される。

また、プレニル基転移酵素は、 $\alpha$ -ヘリックスを多く有する構造を持つことが知られており（図 6）、更に、そのアミノ酸配列中には、特徴的なモチーフとして、アスパラギン酸を多く含む DDXXD モチーフを持つ<sup>6</sup>。また、このモチーフは、酵素内において  $Mg^{2+}$  を介し、基質の二リン酸部位と相互作用することが知られており、酵素活性に重要な役割を担っている。

## 第四章 テルペン環化酵素について

テルペン環化酵素は、ポリプレニル二リン酸を環化する反応を触媒する。本反応はポリプレニル二リン酸がヘテロリシスを起こし、二リン酸が脱離してカルボカチオンが生じることによって開始される。生じたカチオン中間体は、その後、環化やWagner-Meerwein転移、水の付加もしくはプロトンの脱離によるカチオンの消去などを経て環化産物へと導かれる（図6）<sup>6,7</sup>。

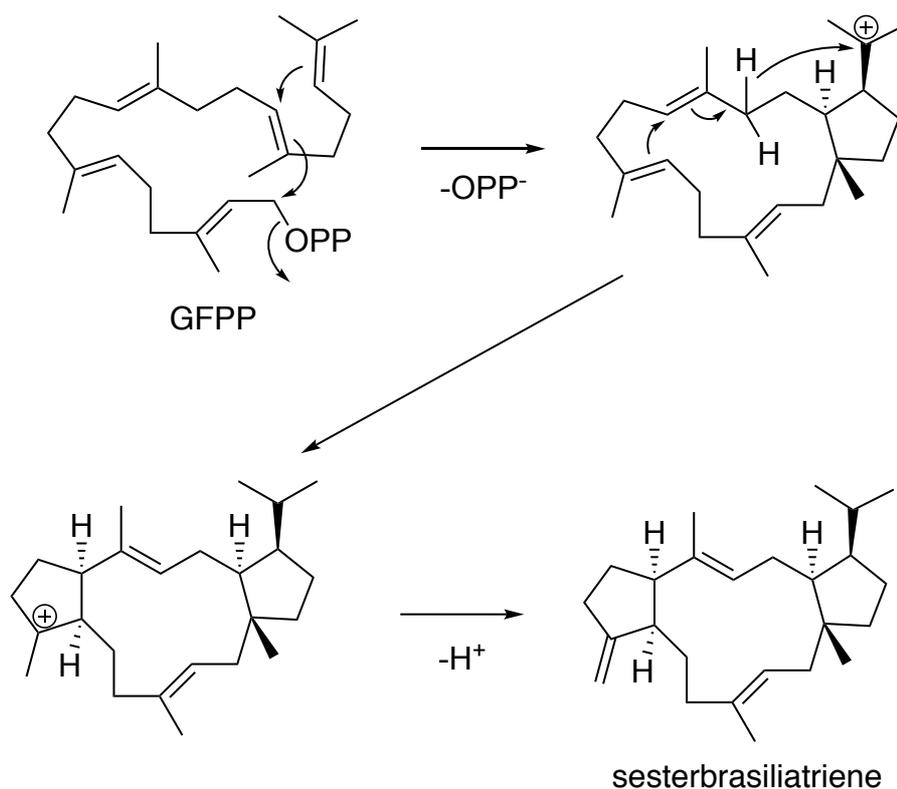


図6. テルペノイドの環化メカニズムの例

また、テルペン環化酵素は、プレニル基転移酵素と同様に、 $\alpha$ -ヘリックスを多く有する構造を持つことが知られており、また、 $Mg^{2+}$ を介して基質の二リン酸部位と相互作用する点も同様である。酵素のアミノ酸配列中には  $Mg^{2+}$ の結合に関わる DDXXD モチーフ<sup>8</sup>も保存されている。そのほかにも、同じく  $Mg^{2+}$ の保持に関わることで知られる NSE/DTE モチーフ<sup>8</sup>も保存されている。また、ポリプレニル二リン酸のヘテロリシスに重要な役割を果たすアルギニン・アスパラギン酸・グリシンからなる effector triad<sup>9</sup>が保存されていることも近年になって報告された。

## 第五章 キメラ型セスタテルペン合成酵素について

これまで、プレニル基転移酵素とテルペン環化酵素は、独立した別個の酵素として知られていた。しかし、2007年に糸状菌由来の初のジテルペン合成酵素として PaFS と呼ばれる酵素が同定され<sup>10</sup>、こうした例に当てはまらない酵素も存在することが明らかとなった。即ち、PaFS はプレニル基転移酵素とテルペン環化酵素が結合し、一つの酵素として存在するキメラ型の酵素であった。また、本酵素は N 末側にテルペン環化部位を持ち、C 末側にプレニル基転移部位を持つことが知られている。

また、2013年にはセスタテルペン合成酵素として糸状菌 *Aspergillus clavatus* 由来 ophiobolin F synthase (AcOS) が報告されたが<sup>11</sup>、AcOS も一つの酵素の中にプレニル基転移酵素部位とテルペン環化酵素部位を併せ持つ特異なキメラ型の酵素であった (図 7)。また、炭素数 25 のテルペノイドであるセスタテルペノイドの炭素骨格形成に関わる酵素 (セスタテルペン合成酵素) は、近年になるまで報告例の無い未知の存在であったが、このキメラ型テルペン合成酵素 AcOS が初の例となった。

このキメラ型テルペン合成酵素の利点として、効率よく酵素産物を与えることができる点が挙げられる。即ち、プレニル基転移酵素部位とテルペン環化酵素部位が結合して存在している故に、プレニル基転移酵素が産生したポリプレニル二リン酸を、近傍に存在するテルペン環化酵素が効率良く取り込むことができる。また、これまでの研究から、キメラ型テルペン合成酵素の最初の例である PaFS の場合、6 個の PaFS 同士で複合体を形成し、6 量体として存在していることが示唆されている。つまり、一对のプレニル基転移酵素ならびにテルペン合成酵素が近傍にいるのみならず、複合体を形成することで、それぞれのドメイン 6 個ずつがお互いに隣接して存在することとなり、酵素が単量体として存在する場合よりも効率的に反応を行うことができるものと推察される<sup>12</sup>。

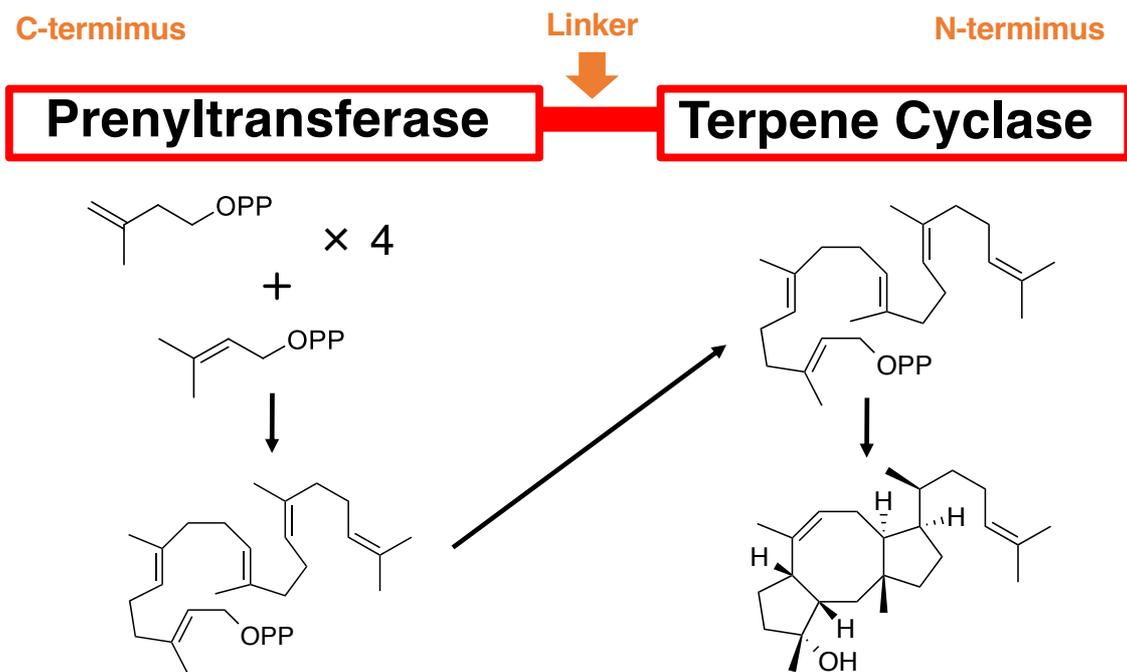


図7. *Aspergillus clavatus* 由来 ophiobalin synthase (AcOS) が触媒する反応と酵素の構成

更に、公開されている糸状菌の遺伝子情報中には、キメラ型のテルペン合成酵素が多数存在している。このことから、キメラ型テルペン合成酵素は近年になって存在が認知されるようになったものの、ごく限られた特殊な例というわけではないことが推察される<sup>10</sup>。しかし、キメラ型テルペン合成酵素をコードする遺伝子は、データベース上にその候補が多数見出だされる一方、実際にその機能が解析されている例は少ない。テルペン合成酵素は、酵素ごとに酵素産物の構造が大きく異なり、かつ、しばしば複雑な構造を持つ為、機能解析にあたっては、酵素産物の構造決定に大きな労力を要する。このことが、キメラ型テルペン合成酵素の機能解析を遅らせている一因と推察される。一方、未解析の推定テルペン合成酵素を解析することで、有機合成的手法では容易に合成し得ないような複雑な構造を持った新規化合物を得ることができる可能性も存在する。また、数多くの酵素を同定する過程において、酵素産物の構造を酵素がどのように制御しているのかについて、知見が蓄積することが期待される。このような観点から本研究では、新規キメラ型テルペン合成酵素の同定と機能解析を行った。

# 本論

## 第六章 キメラ型テルペン合成酵素の機能解析手法の概要

キメラ型テルペン合成酵素を探索するにあたっては、既知のキメラ型テルペン合成酵素である PaFS や AcOS と相同性を示す酵素遺伝子を検索することで、候補となる遺伝子を見出だすこととした。こうした手法は、ゲノムマイニングと呼ばれ<sup>13</sup>、遺伝子解析技術の急速な発展を背景にゲノム情報が容易に手に入るようになった現在、注目を集めている手法の一つである。

更に、見出だした酵素遺伝子の機能解析には、異種発現の手法を用いた。即ち、解析対象遺伝子を宿主となる生物に導入し、強制発現させることとした。異種発現の宿主には糸状菌の一種である *Aspergillus oryzae* NSAR1 株<sup>14</sup>を用いた。本菌は *A. oryzae* の栄養要求性四重変異株であり、これまでに糸状菌由来の天然物に関する生合成研究において使用されてきた実績がある<sup>15</sup>。本研究にて解析した遺伝子は全て糸状菌由来であった為、同じく糸状菌を異種発現の宿主として使用することが適当であると考えた。*A. oryzae* NSAR1 株への目的遺伝子の導入には、糸状菌形質転換用シャトルベクターの一種である pTAex3<sup>16</sup>を用いた。*A. oryzae* 形質転換体は、導入遺伝子が強制発現する条件にて培養後、その代謝物中から、導入した遺伝子がコードする酵素の産物を単離し、構造決定を行った。

また必要に応じて、安定同位体によって標識した前駆体を用い、同位体取り込み実験を行った。この実験では、安定同位体の酵素産物への取り込み様式を観察することで、キメラ型テルペン合成酵素の触媒するテルペン環化反応のメカニズムに関する知見を得ることができた。

## 第七章 *Penicillium chrysogenum* 由来テルペン合成酵素

### ・キメラ型テルペン合成酵素の探索

糸状菌の一種である *Penicillium chrysogenum* MT-12 の遺伝子情報中を検索したところ、既知キメラ型テルペン合成酵素に対して相同性を示す酵素をコードすると推定される遺伝子を見出だした。また、そのアミノ酸配列中には、酵素活性に重要なモチーフが保存されていたことから、本酵素がテルペン合成酵素として機能する可能性が高いと考えた。具体的には、N 末側のテルペン環化部位に、DDXXD モチーフ (<sup>97</sup>DDETD<sup>101</sup>)。NSE/DTE モチーフ (<sup>234</sup>NDLFSWDKE<sup>242</sup>) が保存されていた。本酵素のプレニル基転移部位に関しても DDXXD モチーフが保存されていた (<sup>462</sup>DDIQD<sup>466</sup>) (図 8)。また、本酵素に類似のアミノ酸配列を持った酵素をコードすると推察される遺伝子が多数の *Penicillium* 属菌に含まれることが判明した (表 1)。

### ・異種発現の方法を用いた *in vivo* における機能解析

糸状菌形質転換用シャトルベクター pTAex3 を用い、見出した推定キメラ型テルペン合成酵素遺伝子を異種糸状菌である *A. oryzae* NSAR1 に導入した。得られた形質転換体の代謝物を GC-MS によって分析したところ、この遺伝子を導入した形質転換体に特異的に現れるピークを観測することができた (図 9, 10)。更に、そのマススペクトル中において分子イオンピークと推察される  $m/z$  290 が観測された為、本化合物はジテルペンアルコールであると考えた。そこで、本形質転換体を大量培養し、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて、特異的なピークに対応する化合物 **1** を単離した。

### ・NMR を用いた酵素産物の構造決定の試み

単離した **1** を NMR による解析に供したところ、室温 (25 °C) にて NMR シグナルがブロードニングを起こすことが判明した (図 11)。また、この傾向は種々の NMR 溶媒 (benzene-*d*<sub>6</sub>, chloroform-*d*, and methanol-*d*<sub>4</sub>) を検討したものの改善することは無かった。このことから、本化合物は複数の配座を取り、配座間を行き来しているものと推察された。従って、NMR 解析のみによる構造決定は困難と考え、別の方法による構造決定を模索することとした。また、温度 50 °C にて NMR 測定を行ったところ (in benzene-*d*<sub>6</sub>)、25 °C に置ける測定と比較し、シグナルが多少シャープに変化した。この結果は **1** の配座変換を支持するものであった。

```

                20                40                60
MADK I TDEYAVG I DPE I YANNPAYSSLFNPIHKQT I IADHVSQCH I DLNG I DAVGSKF
                80                100 DDXXD motif                120
GNLNAHAGNFTSLCAPNCLPERFALVAYTVEYAF L H D D E T D NAADQEALLLENKMLHQAL
                140                160                180
NQSGMTSVSTRVSDKAQRKSEVQAK IAAEYLRLDPVFGWFLNKWQFTTACVKDVRSLF
                200                220 NSE/DTE motif                240
PSLDDYLEFRIVDAAADWTLYNFRWGSGITLTPEEEKLADPMSYVAYAELCLV NDLFSWD
                260                280                300
KEYASH I K SNGDVPLVNAVH I VAVTQGLTHCAAKAVVQAEVRAHEERFCQLKEQYEATDK
                320                340                360
PSHEVLRWLRLLEHSMAGNWWSLCVPRYCKVDRNPYKDHLKYGSDAVRVLTPLDRLCW
                380                400                420
SKQE I KEMKRNQLKEPSSSTYKTHFSPLEPNPGPEQTRLT I SQTQQRPV LNPYTY I NSL
                440                460 DDXXD motif                480
PSKNVRQTL I AALNSWYKVPVKSLLI I EGAVNFLHNSSL L L DDIQD GSVLRRGRPVAHQI
                500                520                540
FGVGQTI NTATYLMNEALYL I QMLSPSAVSAYTDEMRLQLGQGRDLYWSYHTHVPTPAQ
                560                580                600
YI SMVDGKTGGLFRL I SRLMRSEATKN SLD I SQFATLLGRHFQ I RDDYQNLQSEDVTNP
                620                640                660
H I V SLYAPRANMLLQYTKNKGFCDDLDEGKVSFPV I L SMQSPGF SNTALSSVFKGSRKGE
                680                700                720
T L SLEMKQYMLEE I TARGAFSETKAVLRKLHTELLSLLMET EKKAGGVENWALRLL I MKL
                740                760
D I V E E K K V A P P K S D S H W G V N Q R R A W K G G Q K N G R P I D K A C F L R A M E E A L Q K

```

図8. *P. chrysogenum* MT-12 由来テルペン合成酵素のアミノ酸配列  
DDXXD モチーフを赤枠、NSE/DTE モチーフを青枠で示した。

表 1. *Penicillium chrysogenum* MT-12 由来テルペン合成酵素に類似の酵素。  
 多くの *Penicillium* 属糸状菌のゲノム中に類似酵素をコードすると推定される遺伝子が存在している。identities 並びに similarities は、*Penicillium chrysogenum* MT-12 由来テルペン合成酵素との値。

Organism	Accession	Identities (%)	similarities (%)
<i>Penicillium rubens</i> Wisconsin 54-1255	XP_002563575.1	92	93
<i>Penicillium nalgiovense</i>	OQE91319.1	91	93
<i>Penicillium chrysogenum</i>	KZN86668.1	90	91
<i>Penicillium expansum</i>	KGO45916.1	84	88
<i>Penicillium camemberti</i>	CRL20985.1	83	88
<i>Penicillium roqueforti</i> FM164	CDM32996.1	84	88
<i>Penicillium solitum</i>	OQD94167.1	83	88
<i>Penicillium italicum</i>	KGO78266.1	84	88
<i>Penicillium nordicum</i>	KOS48568.1	82	87
<i>Penicillium expansum</i>	XP_016596824.1	77	81
<i>Penicillium expansum</i>	KGO37245.1	77	81
<i>Penicillium antarcticum</i>	OQD88776.1	71	81
<i>Penicillium arizonense</i>	XP_022486475.1	71	82
<i>Penicillium digitatum</i> Pd1	XP_014539152.1	78	85

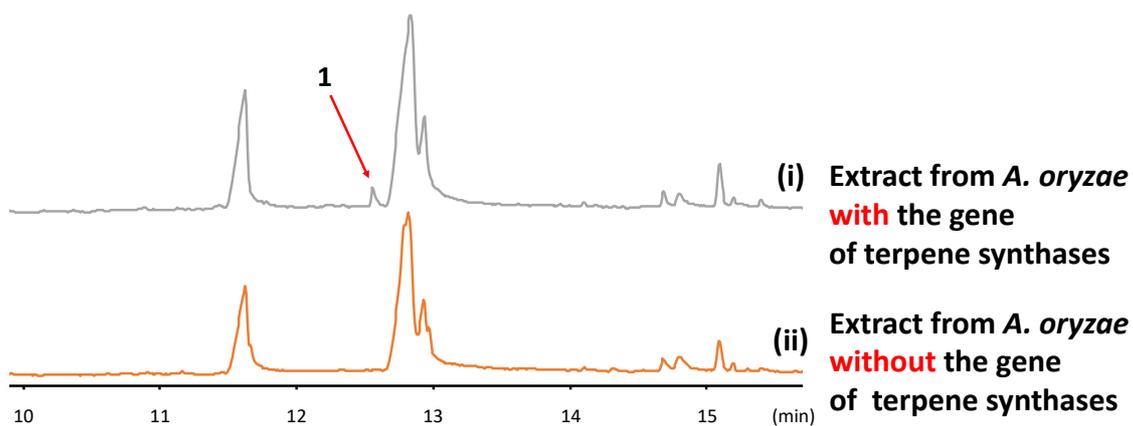


図9. キメラ型テルペン合成酵素を導入した株と導入していない株における代謝物の比較 (GC-MS 解析)。

(i) キメラ型テルペン合成酵素の導入株、(ii) ネガティブコントロール。

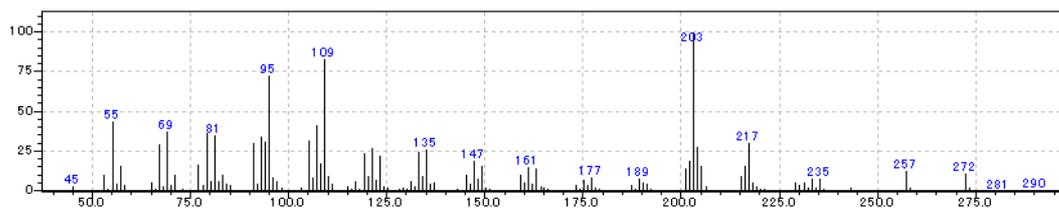


図10. キメラ型テルペン合成酵素を導入した株に特異的な産物(1)のマススペクトル

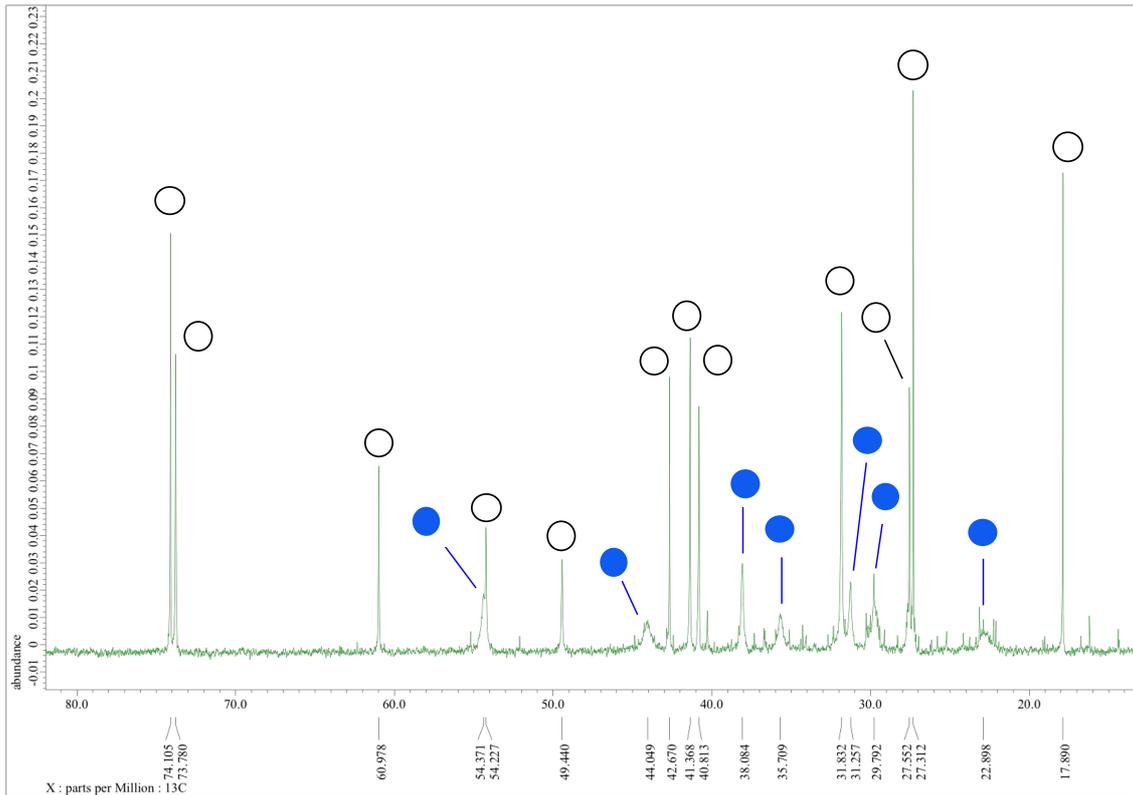


図 11. 酵素産物の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル benzene- $d_6$  (125 MHz)。特にブロードニングの程度が大きいシグナルを青丸にて示した。

## ・結晶スポンジ法を用いた酵素産物の構造決定

化合物の構造決定の手法の内、最も信頼できる技術の一つとして X 線回折法があげられる。この手法では、解析対象化合物の結晶に X 線を照射した際の回折を利用し、化合物の構造決定を行う。しかし、本法の問題点として、解析対象化合物の結晶が必要である点が挙げられる。化合物の結晶化は、現状、試行錯誤の末に達成されるものであり、あらゆる化合物を結晶化できるプロトコールが存在する訳ではない。従って、解析対象化合物の結晶化には、しばしば長い年月がかかり、時には達成されない場合もある。

特に、今回解析対象としている酵素産物は油状物質であり、結晶の作成は困難であると考えられた。そこで、「結晶スポンジ法」と呼ばれる方法にて、構造決定を試みることにした。本法は、解析対象化合物の結晶化を経ずに、X 線回折法による構造決定を可能にする手法である<sup>17</sup>。具体的には、あらかじめ作成した多孔性のネットワーク錯体の結晶内の空間に解析対象化合物を導入し、X 線回折法による解析に供する。ネットワーク錯体内に導入された化合物は、錯体の内部にて 3 次元的に規則正しく整列する為、X 線回折法によって構造決定を行うことができる。

1 の解析では、多孔性ネットワーク錯体の結晶として  $[(ZnCl_2)_3(tpt)_2 \cdot x(n\text{-hexane})]_n$  [tpt = tris(4-pyridyl)-1,3,5-triazine] を用い、結晶スポンジ法による解析を行った。その結果、酵素産物の構造を明瞭に捉えることができ(図 12-14)、6-5-5-5 員環構造を持つジテルペン化合物 (1) であると明らかになった(図 15)。更に、1 の絶対配置についても、Flack parameter [0.072(6)] に基づき、1*R*, 4*S*, 5*S*, 6*S*, 9*R*, 11*R*, 15*R* と決定した。また、本化合物が GGPP から形成されるメカニズムについて、図 16 のように考察した。

また 1 は、cyclopiane-type ジテルペノイドとして知られている化合物群(図 17)<sup>18</sup> と類似の炭素骨格を有していたことから、この種の化合物群の共通の前駆体であると予測された。このことから本酵素を PcCS (*Penicillium chrysogenum* Cyclopiane-type diterpene Synthase) と名付けた。

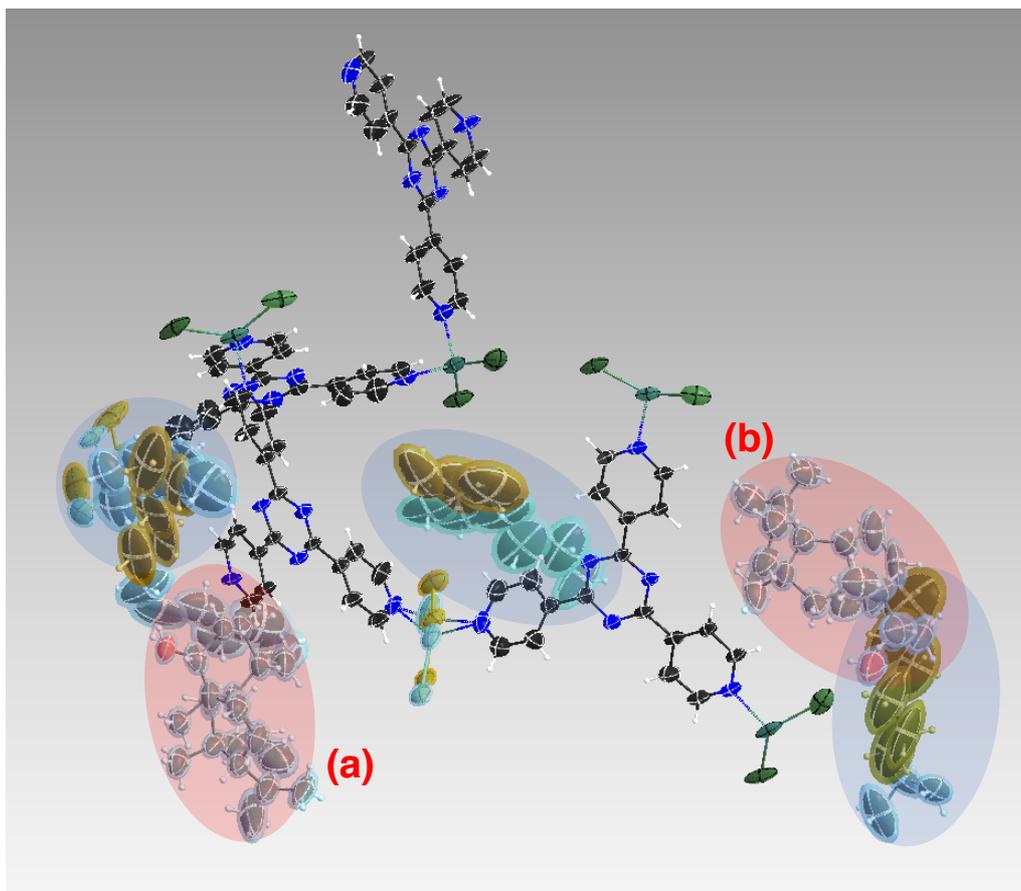


図 12 結晶スポンジ法による解析結果  
ORTEP 図 (50% probability) として表示したもの。赤丸にてハイライトした解析対象化合物の他に青丸にてハイライトした溶媒 (*n*-hexane) が観測された。  
非対称単位中に 2 分子の **1** が観測された (a および b)。

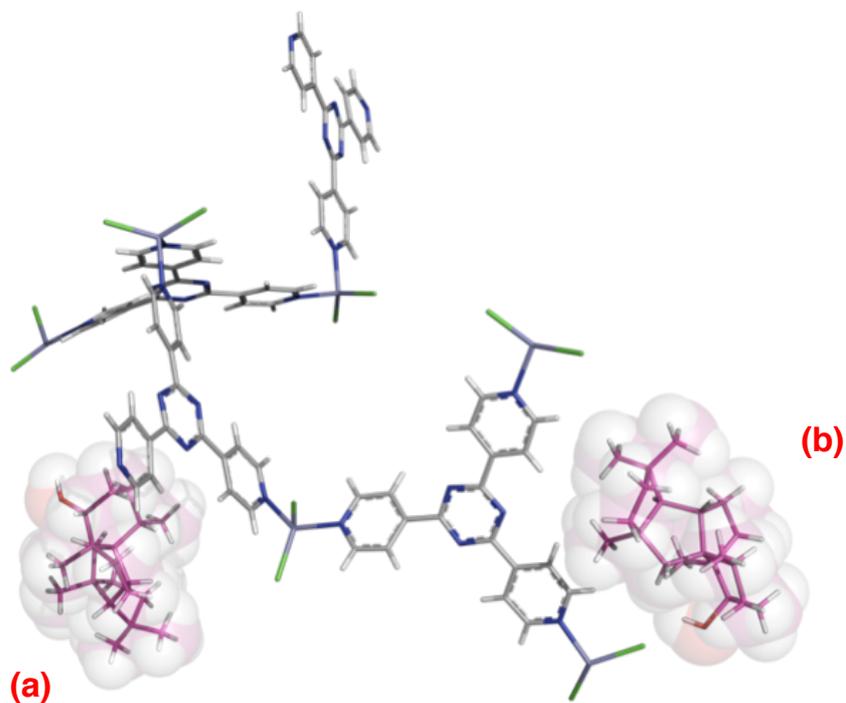


図 13 結晶スポンジ法による解析結果。(図 12 の表示形式を変更したもの。)  
 結晶スポンジのフレームワークは Stick モデルにて表示した。  
 1 は Stick モデル及び Space-filling モデルの両方にて表示した。  
 簡単の為、溶媒分子を除いて表示した。

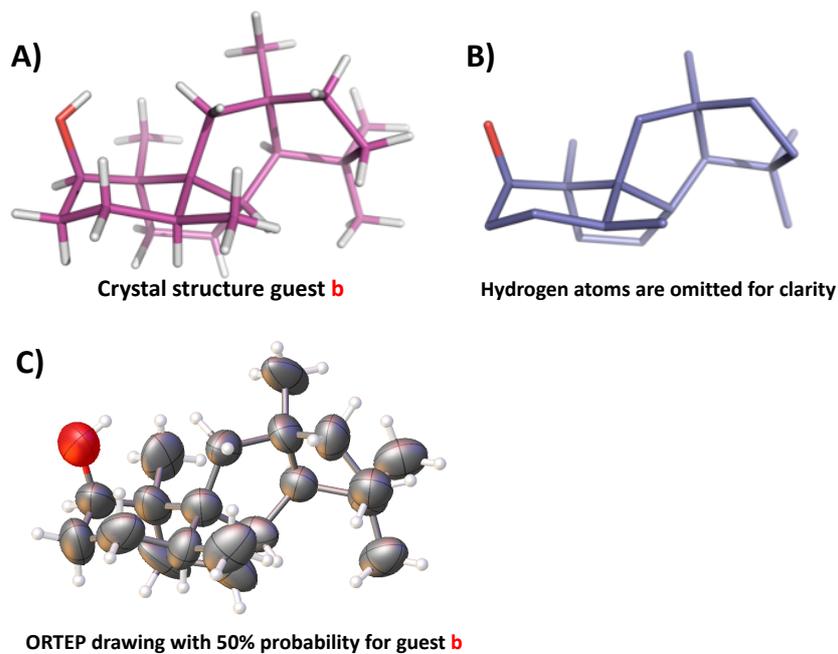


図 14 結晶スポンジ法による解析結果。  
 (図 12,13 中の **b** を抜き出し、表示したもの。)

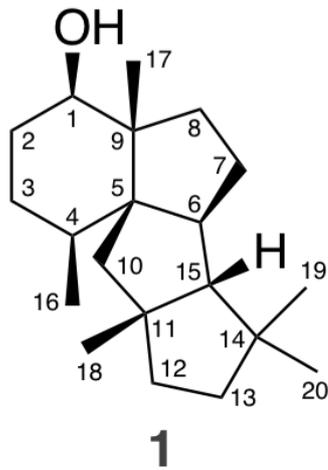


図 15 結晶スポンジ法によって明らかとなった酵素産物 **1** の構造。

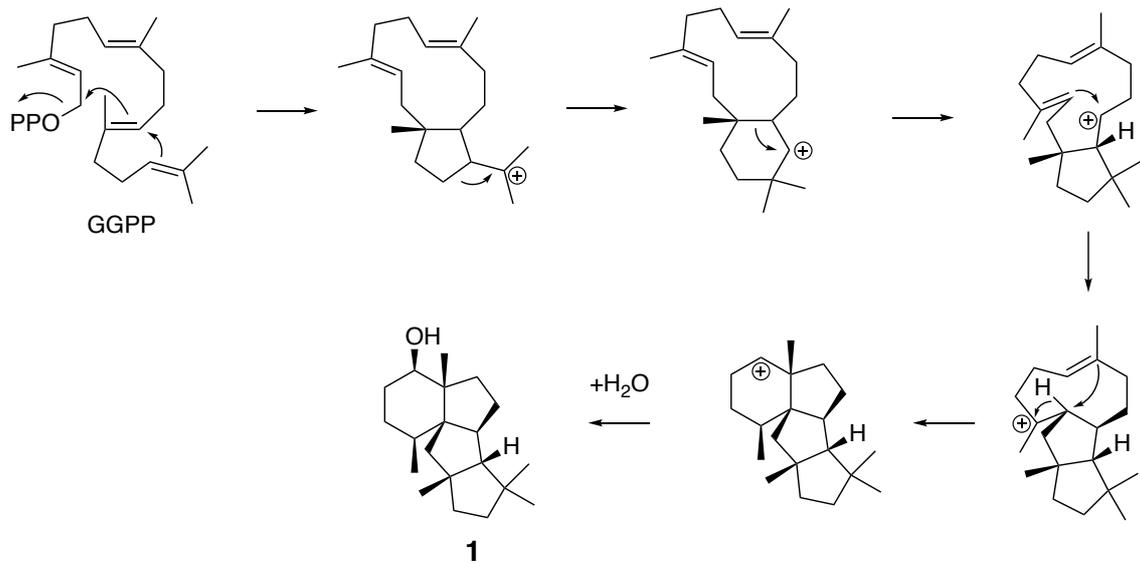


図 16 GGPP から **1** が形成される際の推定反応メカニズム。キメラ型テルペン合成酵素 PcCS のテルペン環化酵素部位にて触媒されると考えられる。

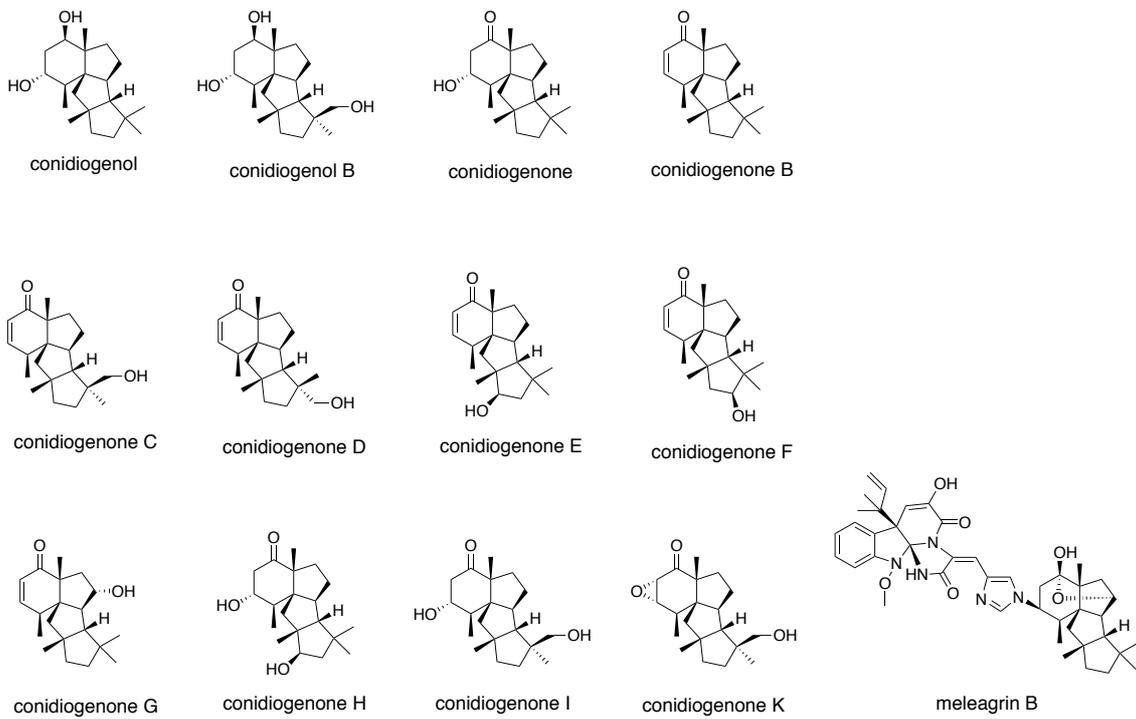


図 17. 既知の cyclopiane-type ジテルペノイド。cyclopiane-type ジテルペノイドは、主に *Penicillium* 属糸状菌から単離報告されている。

## ・ NMR スペクトルの再解析

結晶スポンジ法によって、**1**の構造が明らかになったことから、この構造を元に NMR の再解析を行うこととした (in benzene-*d*<sub>6</sub>)。各種 1 次元および 2 次元 NMR の解析の結果、やはり NMR 解析のみによっては 6-5-5-5 員環構造を導くことはできなかったものの、既に **1** の構造が判明していることから、アサインを行うことができた (図 18)。また、特にブロードニングが顕著な <sup>13</sup>C NMR のシグナルは、2、4、6、7、8、10、17 位に由来するものと判明した (図 19)。

## ・ 化合物 **1** の配座解析

NMR シグナルのブロードニングは、**1** が複数配座間を行き来している為と推察される。そこで、6-5-5-5 員環構造を持つ **1** が複数の配座を取り得るか否かについて、計算化学の観点から検証することとした。配座解析ソフト MacroModel<sup>19</sup> を用い配座を発生させた後、Gaussian 09<sup>20</sup> によって DFT 計算 (B3LYP/6-31G(d) level with Polarizable Continuum Model (PCM) in benzene) を行い、構造最適化と自由エネルギーの算出を試みた。その結果、**1** の A 環部分についてコンホメーション変化が起きうるということが推察された (図 20)。

また、**1** と類似の炭素骨格を持つ既知の cyclopiane-type ジテルペノイドはいずれも NMR シグナルのブロードニングを起こさないことが知られている。これら既知の cyclopiane-type ジテルペノイドの構造を確認するといずれも **1** の A 環に当たる部分に何らかの修飾が見られた<sup>18</sup>。即ち、既知 cyclopiane-type ジテルペノイドは A 環部分への修飾によって、コンホメーション変化が起きにくい構造となっていると推察される (図 21)。

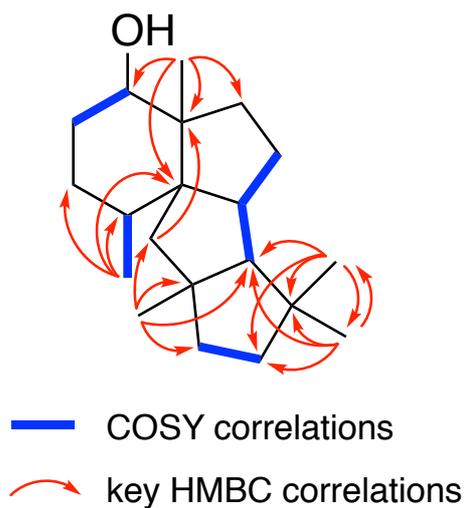


図 18. 1 の NMR 解析において観測された重要な相関

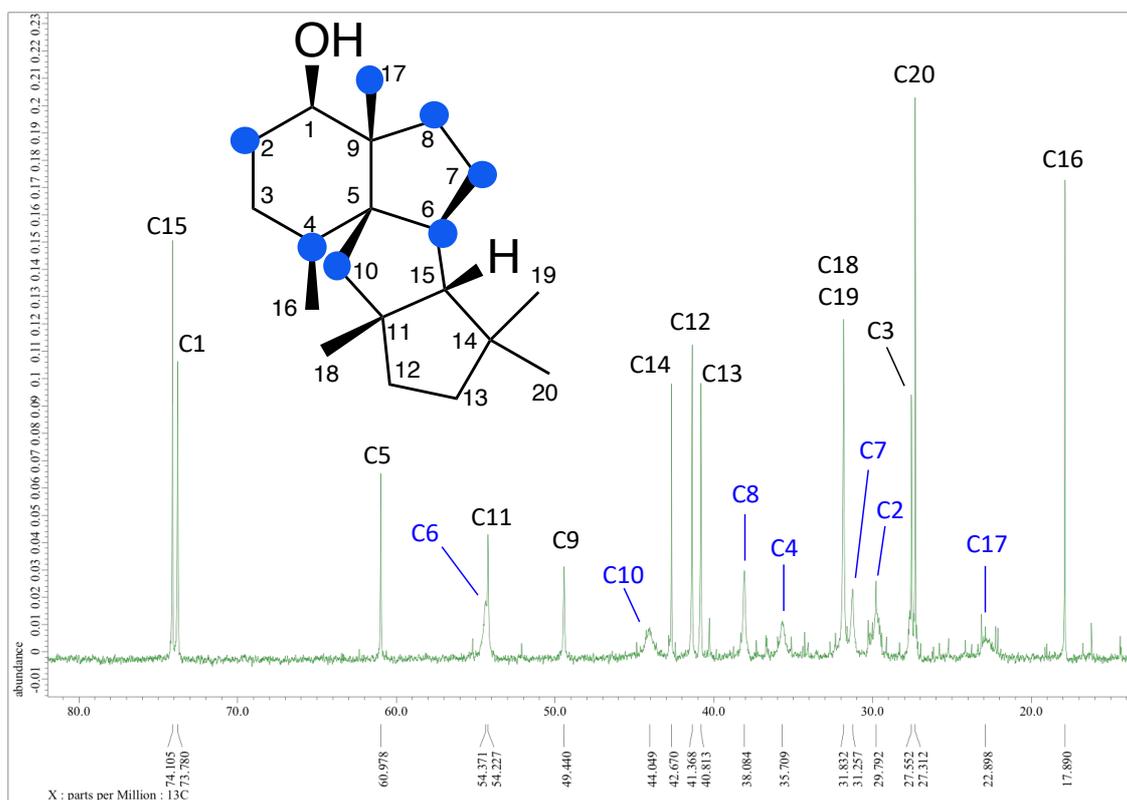


図 19.  $^{13}\text{C}$  NMR のシグナルのアサインメント。特にブロードニングが顕著な  $^{13}\text{C}$  NMR のシグナルは、2、4、6、7、8、10、17 位に由来する。C18 と C19 はオーバーラップしていた。

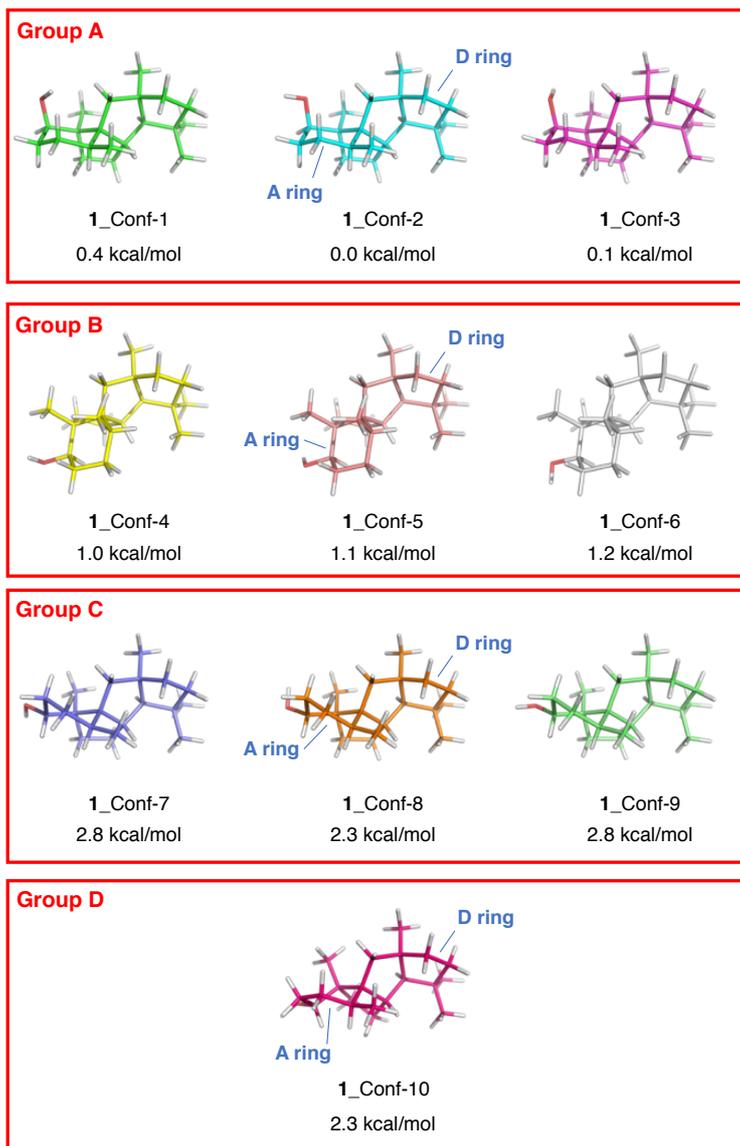
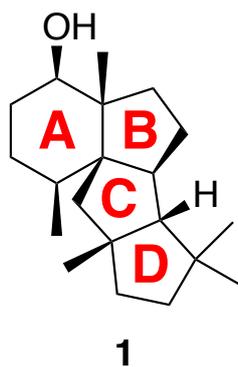


図 20. 1 の配座解析の結果。

特に A 環部分についてコンホメーション変化を起こしうることが推察された。同じグループの配座同士は炭素骨格の配座は類似し、水酸基の向きが異なる。

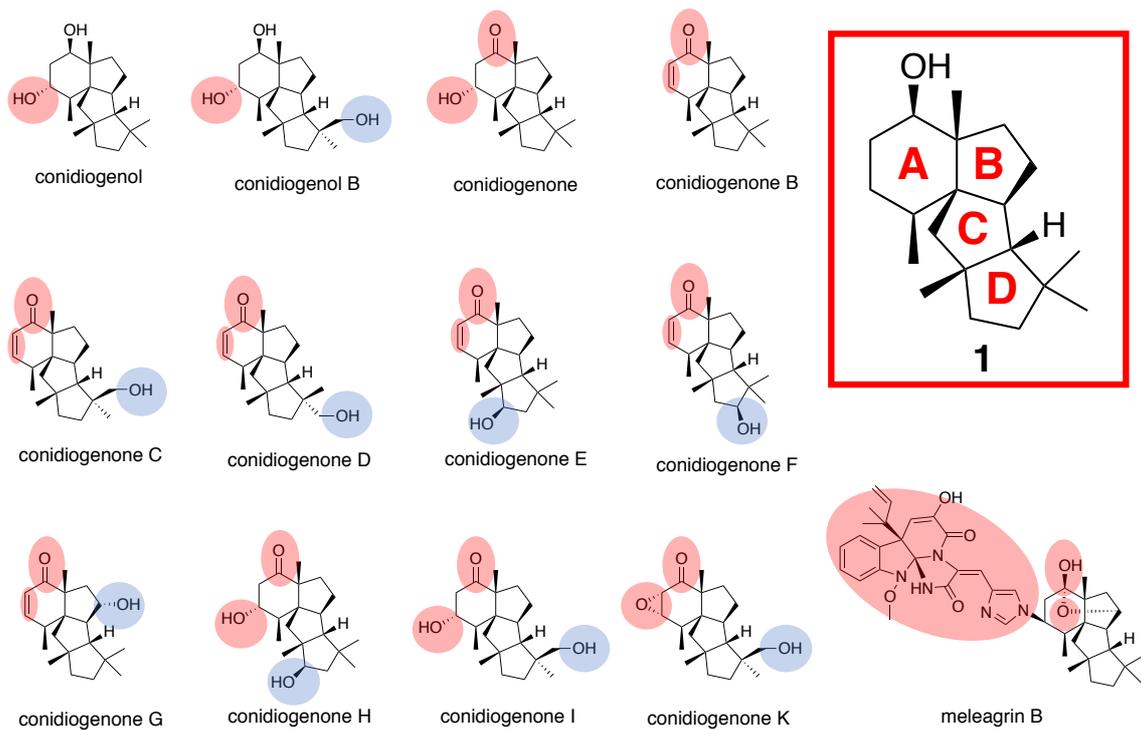


図 21. 既知の cyclopiane-type ジテルペノイドの構造。いずれも 1 の A 環に当たる部分に何らかの修飾が見られる（赤色にてハイライト）。A 環以外の部分に対する修飾は青色にてハイライトした。

## 第七章 *Emericella varicolor* 由来テルペン合成酵素

### ・キメラ型テルペン合成酵素の探索

糸状菌の一種である *Emericella varicolor* NBRC 32302 の遺伝子情報から検索したところ、キメラ型テルペン合成酵素をコードすると推定される遺伝子を見出した為、PcCS と同様に機能解析を行うこととした。また、PcCS の場合と同様、そのアミノ酸配列中には、酵素活性に重要と思われるモチーフが保存されていた。具体的には、N 末側のテルペン環化部位においては、DDXXD モチーフ (<sup>92</sup>DDVID<sup>96</sup>)。NSE/DTE モチーフ (<sup>223</sup>NDLVSWEKE<sup>231</sup>) が見られた。本酵素のプレニル基転移部位に関しても DDXXD モチーフが保存されていた (<sup>475</sup>DDVED<sup>479</sup>) (図 22)。このことから、本酵素がキメラ型テルペン合成酵素である可能性が高いと考えた。

### ・異種発現の方法を用いた *in vivo* における機能解析

PcCS の場合と同様に、糸状菌形質転換用シャトルベクター pTAex3 を用い、見出したセスタテルペン合成酵素遺伝子を異種糸状菌である *A. oryzae* NSAR1 株に導入した。得られた形質転換体の代謝物を GC-MS によって分析したところ、この遺伝子を導入した形質転換体に特異的に現れるピーク(2)を観測することができた (図 23)。そこで、本形質転換体を大量培養し、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて、2 を単離した。

MEFKYSTLIDPEMYETEGLCDGIPVRYHNNPELEEIDCLRCHEHWRENVGPLGV  
 YKGGGLADQWNGISIAIPEALPDR LGVVSYASEFAFVHDDVIDIAQHGNEQNDDL  
 RVGF EQMIDAGAIKYSTSGKRALQSYIAKRMLSIDRERAAIISLRAWLEFIEKTG  
 RQEERRFNNEKEFLKYRIYDVGMLFWYGLLTF A QK I T I P E N E L T T C H E L A I P A Y  
 RHMAL LNDLV SWEKE RASSIALGKDYCINFI FVAMEESGISEDEAKERCREEIK  
 LATVDYLRVFDEAKDRIDL SHDTMLYLESLLYSMSGNVWVWGLQSPRYYTDAKFS  
 QRQLDWIKNGLPLEVRL EDRV FGLSPSEDRVTHQAVIENGLPESGLGKNGNSSN  
 GVDVNKALLSAVLHEHLKGHAVFKMSDHEVKVKA SNGRSLDTKVLQAPYEYITG  
 LPSKRLREQAIDAMNVWFRVPAEKLDLIK SITTILHNASLMLDDVEDGSELRRG  
 NPSTHTIFGLSQTINSANYQLVRALERVQKLEDSESLLVFTEELRNLYIGQSMD  
 LYWTGNLICPTMNEYFHMVECKTGGLFRLFTRLMSLHSTS AVKVDPTTLSTRLG  
 IYFQTRDDYKNLVSTEYTKQKGYCEDLEEGKFS LPLIHLIQAMPDNHVLRNILT  
 QWRVTRKVT LAQKQVVLGLMEKSGSLKFTRET LASLYSGLEKSFT ELEEKFGTE  
 NFQLKLI LQFLRTE

図 22. *E. varicolor* 由来テルペン合成酵素のアミノ酸配列。  
 DDXXD モチーフを赤枠、NSE/DTE モチーフを青枠で示した。

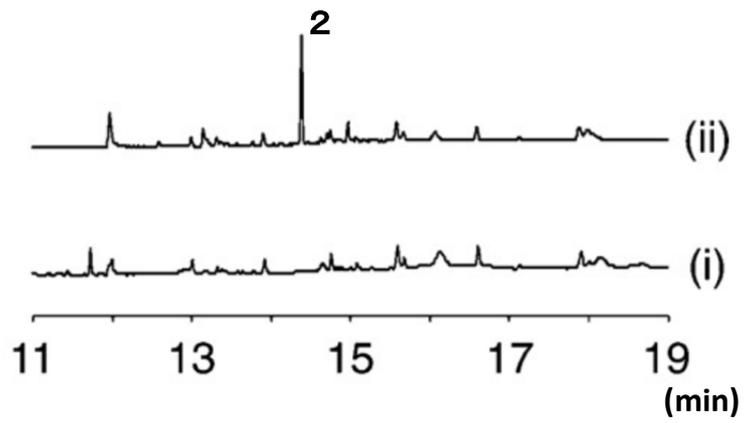


図 23 *E. varicolor* 由来キメラ型テルペン合成酵素を導入した株と導入していない株における代謝物の比較(GC-MS 解析)。

(i) はネガティブコントロール、(ii) はキメラ型テルペン合成酵素の導入株。

## ・ NMR と MS による 2 の構造の構造決定

HR-MS 解析の結果、**2** の分子式は  $C_{25}H_{40}$  と推定された。従って、**2** はセステテルペンであると考えた。また、**2** を NMR 解析に供したところ、**1** の場合とは異なり、明瞭な NMR シグナルを与えた為、NMR 解析による構造解析を行った (図 24)。

先ず、 $^{13}C$  NMR 解析 (in chloroform-*d*) では、25 本のシグナルが観測された。内訳は、4 本の singlet methyls、1 本の doublet methyl、10 本の methylenes (exomethylene (C-24) を含む) 1 本の olefinic methine (C-9)、4 本の aliphatic methines、2 本の  $sp^2$  quaternary carbons (C-10 and C-19)、3 本の  $sp^3$  quaternary carbons であった。従って、**2** は 4 環性の化合物であると考えられた。

$^1H$ - $^1H$  COSY 解析の結果から、以下の spin systems が明らかとなった；H-1/H-2/H-6, H-8/H-9, H-12/H-13, H-14/H-18/H-17。更に HMBC 解析の結果、methyl からの相関として下記が観測された；H<sub>3</sub>-20 ( $\delta$  0.85) から C-2, C-3, 及び C-4; H<sub>3</sub>-21 ( $\delta$  0.74) から C-6, C-7, 及び C-8; H<sub>3</sub>-22 ( $\delta$  1.18) から C-10, C-11, 及び C-12; H<sub>3</sub>-23 ( $\delta$  0.82) から C-13, C-14, 及び C-15; H<sub>3</sub>-25 ( $\delta$  1.66) から C-18, C-19, 及び C-24。これらの相関からは、下記の結合が明らかになった；C-3 から C-2, C-4, 及び C-20; C-7 から C-6, C-8, 及び C-21; C-11 から C-10, C-12, 及び C-22; C-15 から C-13, C-14, 及び C-23; C-19 から C-18, C-24, 及び C-25。また、そのほかの HMBC 相関として下記のものが観測された；H-1 ( $\delta$  1.14) から C-22; H-5 ( $\delta$  1.26) から C-21; H-8 ( $\delta$  2.76) から C-10; H-14 ( $\delta$  2.34) から C-9 及び C-10。その結果、以下の結合を確認することができた；C-1 と C-11; C-5 と C-7; C-9 と C-10; C-10 と C-14。更には、H-17 ( $\delta$  2.01) から C-15 の HMBC 相関から C-15 と C-17 が C-16 を間に挟んで存在していると考えた。また最後に、H-5 ( $\delta$  1.26) から C-4 への HMBC 相関から C-4 と C-5 の結合が存在すると考え、6-8-6-5 員環構造を有する **2** の平面構造を推定した。

**2** の C 環及び D 間の相対立体配置 ( $11R^*$ ,  $14R^*$ ,  $15S^*$ ,  $18S^*$ ) については、下記の NOESY 相関から導いた；H-12 $\beta$  ( $\delta$  0.95) と H-13 $\beta$ /H-22; H-14 ( $\delta$  2.34) と H-13 $\beta$ /H-22/H-25; H-18 ( $\delta$  2.60) と H-23。また、C-5 に結合している水素原子の内の片方 ( $\delta$  1.26) は triple doublet (td,  $J = 12.5, 4.0$  Hz) として観測された為、A 環はイス型配座であり、この水素原子はアキシアル方向を向いていると判断した。更に、 $\delta$  2.11 (H-1) と  $\delta$  2.76 (H-8) 並びに  $\delta$  1.26 (H-5) と H-21 の NOESY 相関から、C-1 及び C-8 がアキシアル方向を向いている推察した。加えて、 $\delta$  1.14 (H-1) と H-20 の間に NOESY 相関を見出だしたことから、A 環、B 環の相対立体配置について ( $2S^*$ ,  $3S^*$ ,  $7R^*$ ) と導いた。最後に、H-2 と H-12 $\alpha$  の間の NOESY 相関 (in benzene-*d*<sub>6</sub>) から、全体の相対立体配置を、( $2S^*$ ,  $3S^*$ ,  $7R^*$ ,  $11R^*$ ,  $14R^*$ ,  $15S^*$ ,  $18S^*$ ) とした。

## ・ 2 の結晶スポンジ法による絶対配置の決定

MS と NMR による解析により、**2** の相対立体配置までは推定することが出来たものの、更に絶対配置を決定する必要がある。また通常、NMR 解析では絶対配置を求めることが出来ない為、別の方法によって決定する必要がある。本研究では、結晶スポンジ法を用いて、絶対配置の決定を試みた。結晶スポンジ法の利点の一つとして、解析対象化合物に重原子が含まれていない場合でも、X 線結晶構造解析によって、比較的容易に絶対配置の決定を行うことができる点が挙げられる。これは、多孔性のネットワーク錯体自体に重原子が含まれている為である。**2** の解析にあたっては、多孔性のネットワーク錯体として  $[(\text{ZnI}_2)_3(\text{tpt})_2 \cdot x(\text{solvent})]_n$  [tpt = tris(4-pyridyl)-1,3,5-triazine] を用い、結晶スポンジ法による解析を行った。その結果、酵素産物 **2** の構造を明瞭に捉えることができ、**2** の平面構造及び相対立体配置を改めて確認することができたと同時に、絶対立体配置についても、Flack parameter [0.071 (6)] に基づき、(2*S*, 3*S*, 7*R*, 11*R*, 14*R*, 15*S*, 18*S*) と決定することができた (図 25)。

結果、**2** は新規化合物であることが判明した為、本化合物を *astellifadiene* と名付けた。また、本化合物の炭素骨格は、新規の炭素骨格であった。本化合物を生産する酵素については、EvAS (*Emericella varicolor* Astellifadiene Synthase) と名付けた。

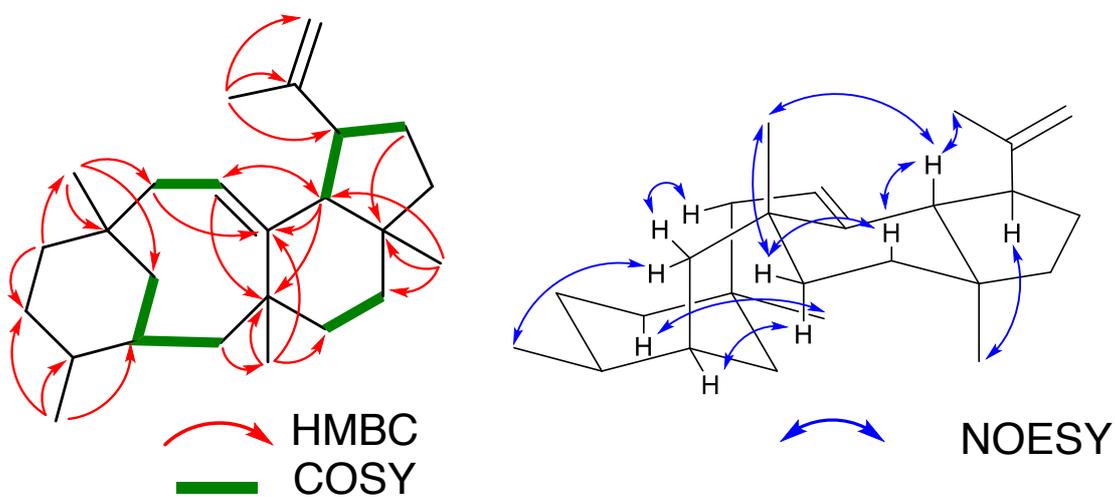
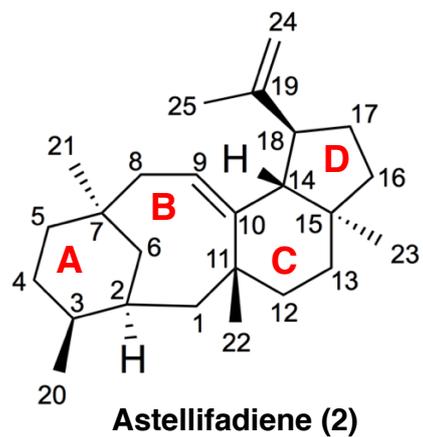


図 24. NMR による酵素産物 **2** の構造決定

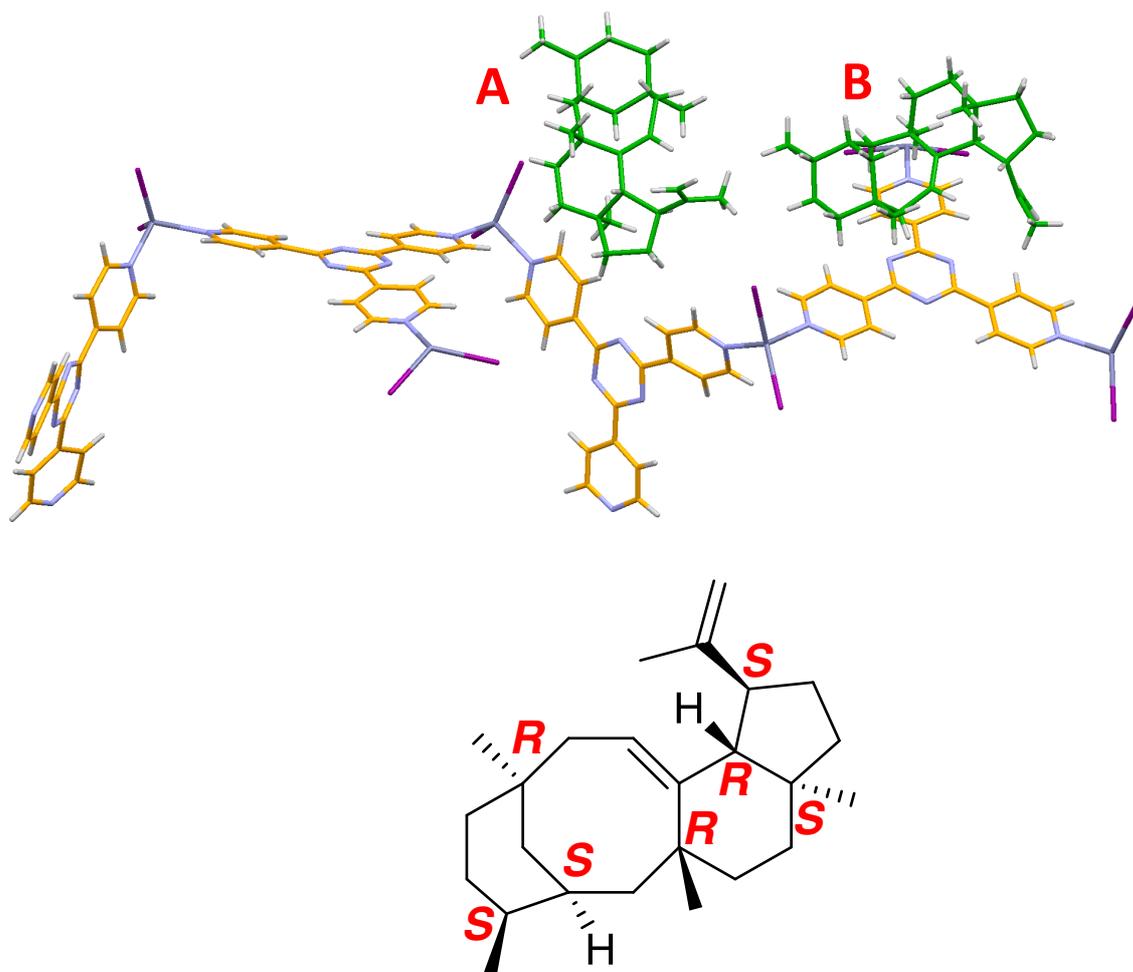


図 25. 結晶スポンジ法による **2** の解析結果。非対称単位中に 2 分子の **2** (A および B) が観測された。Stick モデルにて表示した。  
**2** は緑色にて表示した。また、簡単の為、溶媒分子を除いて表示した。

## ・安定同位体標識した酢酸ナトリウムを用いた *in vivo* 標識実験

テルペノイドは DMAPP 並びに IPP から生合成される。この生合成経路を更に上流に遡ると、糸状菌では多くの場合、DMAPP、IPP は酢酸から生合成されることが知られている。即ち、安定同位体標識した酢酸ナトリウムを培地に添加した状態にて、**2** を生産する *A. oryzae* 形質転換体を培養することで、**2** に安定同位体標識した酢酸ナトリウムを取り込ませることができる。この安定同位体の取り込みパターンから GFPP を **2** へ導く環化反応のメカニズムを類推することができる。本研究では、安定同位体標識体として、[1-<sup>13</sup>C]-sodium acetate, [1-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-sodium acetate, 並びに [2-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-sodium acetate を用い、培地に添加した。二重標識酢酸ナトリウムの取り込みパターンについて、図 26 に示した。

## ・精製酵素を用いた *in vitro* 実験

キメラ型テルペン合成酵素 EvAS のより詳細な機能解析に向けて、精製酵素を用いた *in vitro* 酵素反応による解析にも着手した。大腸菌 *Escherichia coli* BLR (DE3) においてコールドショック発現ベクター pColdTF を用いて発現した EvAS を精製し、*in vitro* の反応に供した。

本実験では、反応液中に D<sub>2</sub>O を添加した場合と、そうでない場合を比較した。酵素反応終了後、酵素反応液からの抽出物を GC-MS 解析に供したところ、どちらの条件においても **2** の生産が確認された(図 27)。しかし、**2** のマススペクトルを確認したところ、D<sub>2</sub>O を酵素反応液に添加した条件では、質量数が 1 だけ増加した **2** が生成していることが示唆された。このことは GFPP から **2** へ変換される際に外部からプロトンが取り込まれることを示唆している(図 28)。この *in vitro* 酵素反応の結果と先の *in vivo* における安定同位体標識酢酸ナトリウムの取り込み実験の両者の結果に矛盾しない環化メカニズムとして図 29 に示す経路を提案した。

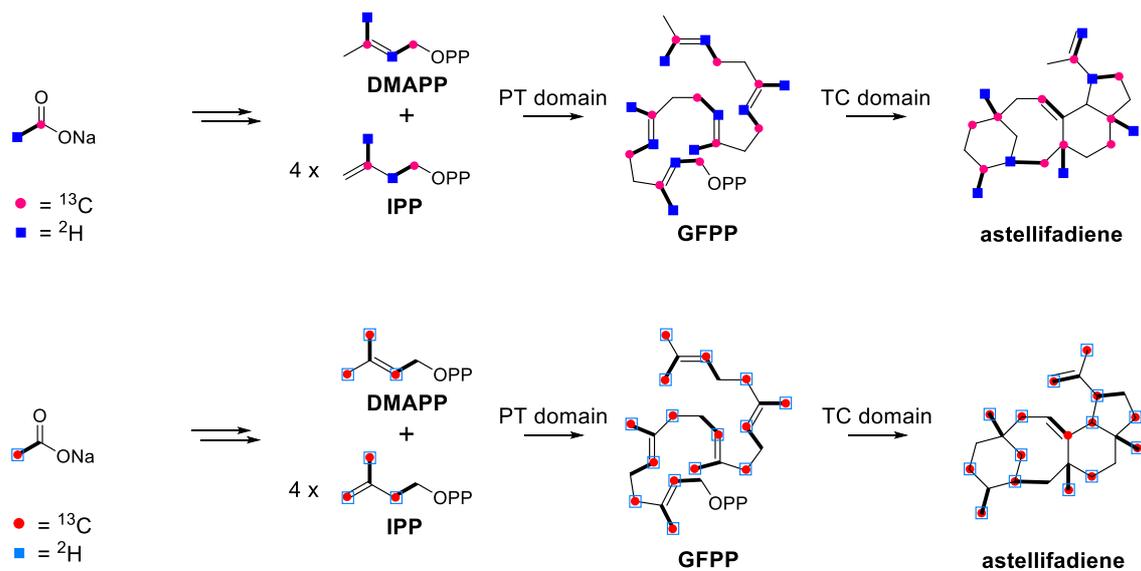


図 26. 二重標識酢酸ナトリウム ( $[1\text{-}^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]\text{-sodium acetate}$ , 並びに  $[2\text{-}^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]\text{-sodium acetate}$ ) の 2 への取り込みパターン。

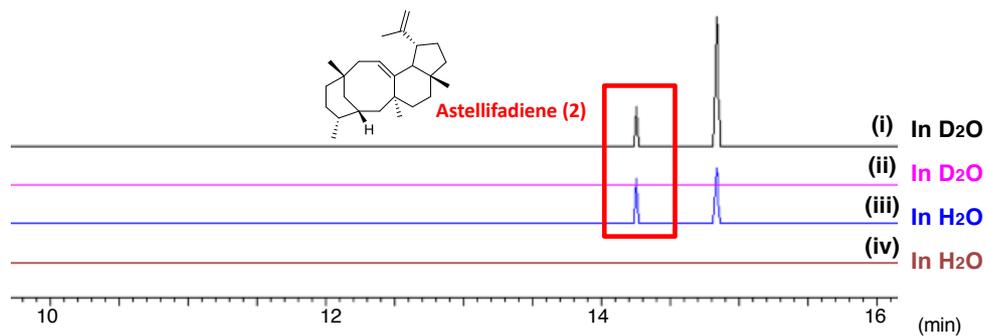
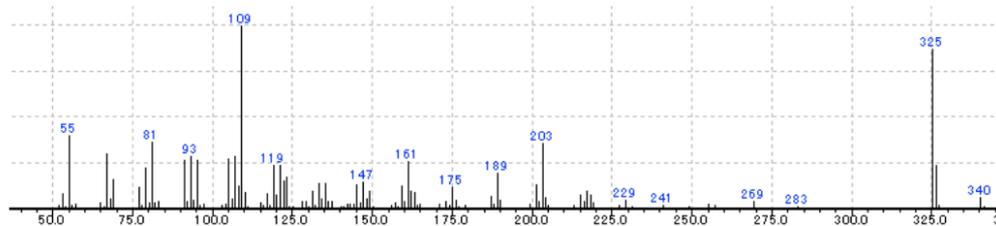


図 27. キメラ型テルペン合成酵素 EvAS の *in vitro* における機能解析(GC-MS 解析)。

(ii) (iv)、はネガティブコントロール。

(i) 及び(ii)の条件においては、100  $\mu$ l の反応液中に D<sub>2</sub>O が 71  $\mu$ l 含まれている。  
 (iii) 及び(iv)の条件においては、D<sub>2</sub>O の代わりに同量の H<sub>2</sub>O が加えられている。

(A)



(B)

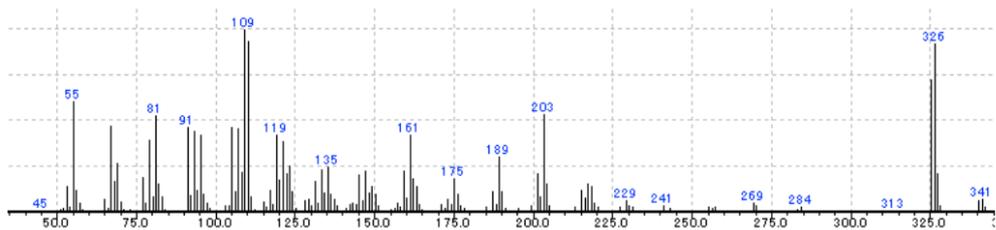


図 28. 2 のマスペクトル

(A) は無標識の 2。 (B) 図 27 の(i)の酵素反応によって得られた 2。  
 (B)では(A)と比較し、質量数が 1 増加した分子の割合が増加している。

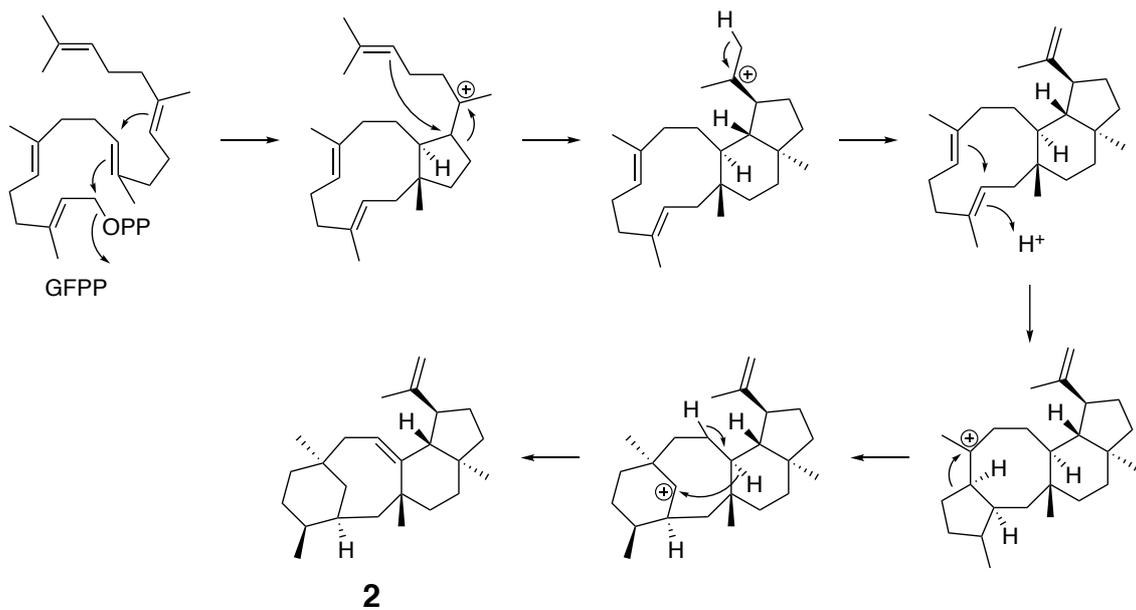


図 29. GGPP から 2 が形成される際の推定反応メカニズム

一度環化反応が脱プロトンによって終結した後に、プロトネーションが起こり、環化反応が再開する。*in vitro* 酵素反応において反応液に  $D_2O$  を添加した際には、このプロトネーションの際に取り込まれる水素原子が重水素原子となり、質量数が 1 増加したと考えられる。

# 結論

## 結論

本研究では、プレニル基転移酵素としての活性並びにテルペン環化酵素としての活性を併せ持つキメラ型テルペン合成酵素に特に注目し、新規キメラ型テルペン合成酵素の探索とその機能解析を行った。その結果、6-5-5-5 員環構造を有する cyclopiane-type ジテルペン(1) 並びに新規炭素骨格を有するセスタテルペン astellifadiene (2) を取得するに至った<sup>21</sup>。即ち、未解析酵素の機能解析を通して、新規化合物の取得も同時に達成した。

今後、更に多くのテルペン合成酵素の解析が進むことで、これら酵素が触媒する複雑な環化反応を制御するためのメカニズムが詳細に明らかになることが期待される。実際、本研究において機能解析を行ったキメラ型テルペン合成酵素や筆者が同定に関わった他のキメラ型テルペン合成酵素、他の研究グループから報告されたものなど<sup>10, 11, 22</sup> を用いた系統樹解析などによって、本酵素群のテルペン環化ドメインが触媒する環化メカニズムについて、大まかな傾向も明らかになりつつある(図 30-32)<sup>23</sup>。また近年では、計算化学の手法を用い、テルペン環化のメカニズムを明らかにする試みもなされており、大変大きな注目を集めている。将来的に、これらの研究が進展することで、酵素のアミノ酸配列に基づく酵素産物の予測や、酵素の改変による新規の酵素産物の自由自在なデザインが可能になることを期待している。

また本研究では、ゲノムマイニング法と結晶スポンジ法の相性の良さをも実証することとなった。遺伝子解析技術が急速に発展している現代において、本研究の様に、未解析遺伝子の機能解析を行う機会は益々増えていくものと考えられる。しかし、遺伝子の機能解析を進めて行く為には、特に遺伝子が二次代謝に関わるものである場合、遺伝子がコードする酵素の産物に対する構造解析が必須となる。遺伝子解析に多くの時間とコストが掛かっていた時代とは異なり、膨大な遺伝子情報が次々と供給される現代において、寧ろ、この酵素産物の構造決定こそが研究の律速段階となっており大きな問題となっている。そこで、迅速な構造決定を可能とする結晶スポンジ法を積極的に利用することで、研究全体の高速化が達成されることは想像に易い。今後、ゲノムマイニング法と結晶スポンジ法を組み合わせた研究が益々増えていくと期待している。

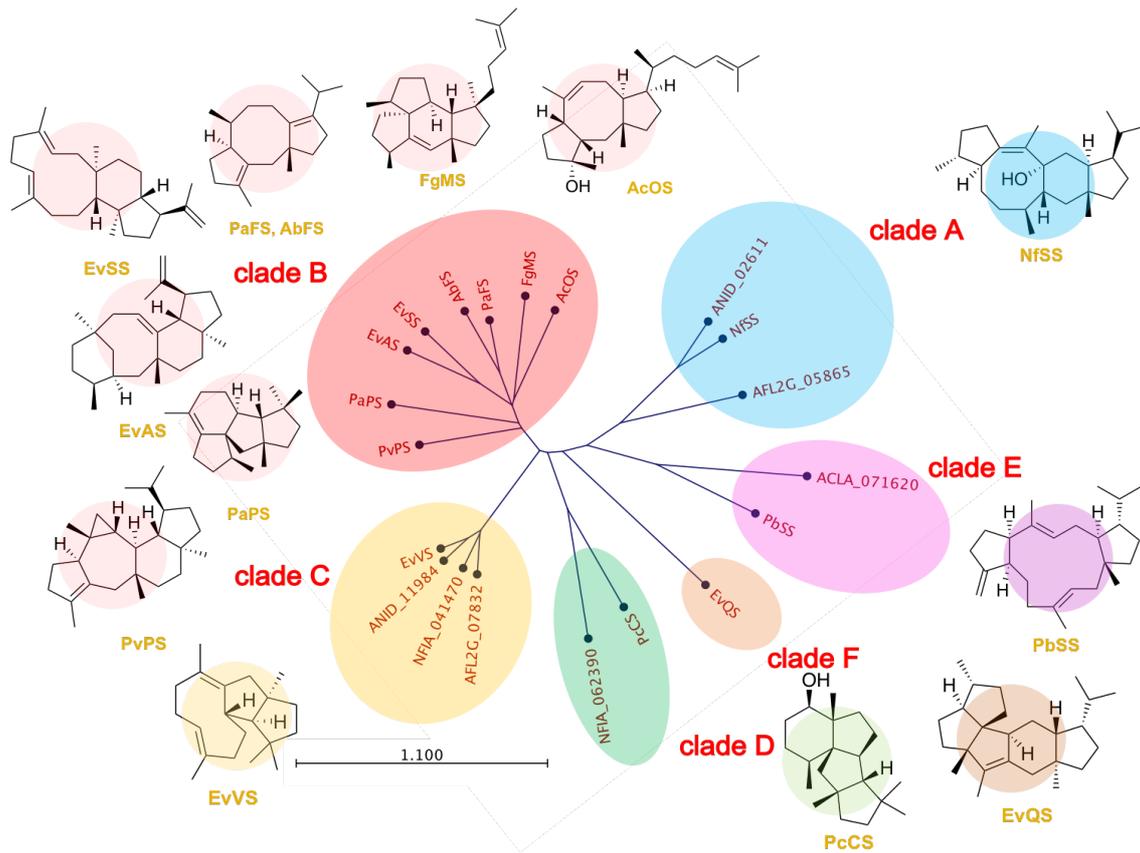


図 30. キメラ型テルペン合成酵素のテルペン環化ドメインの系統樹解析。  
A-F のクレードに分かれる。それぞれの酵素の酵素産物を示した。

**11-5 membered ring system**

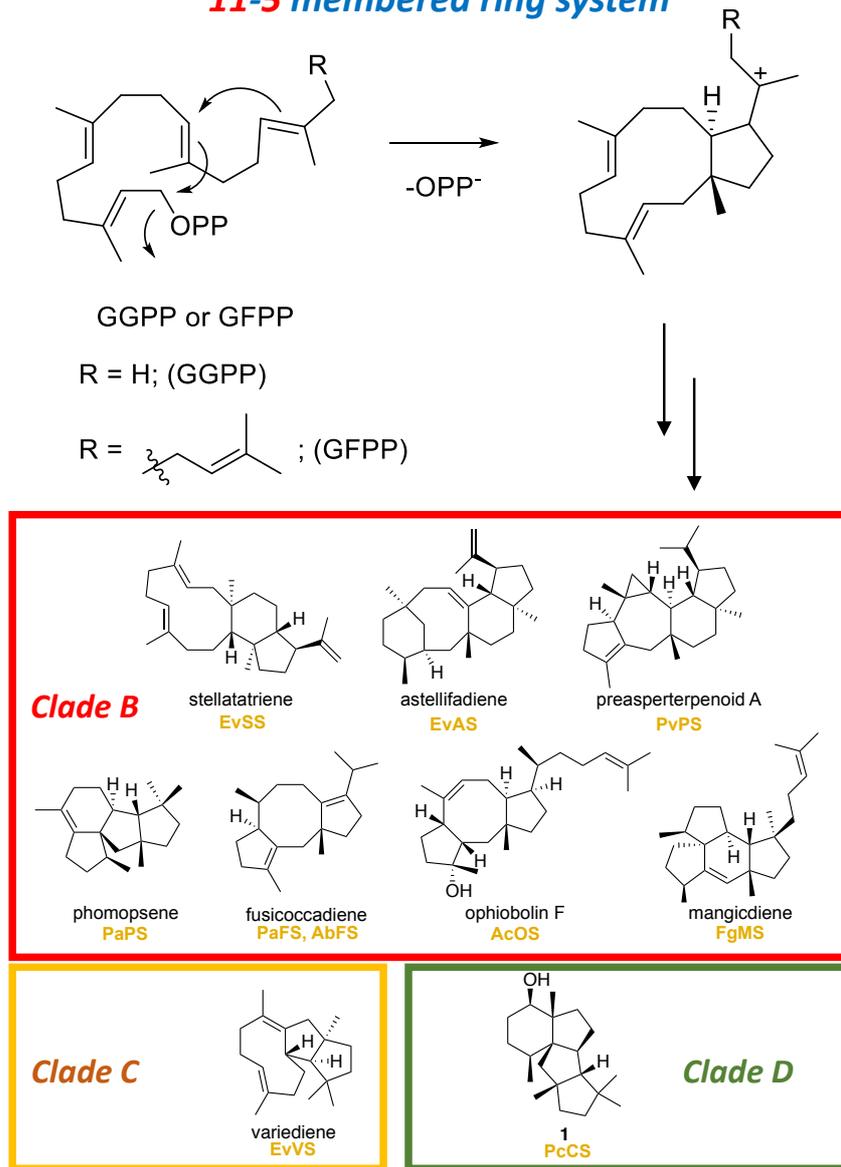


図 31. クレード B,C,D に属する酵素が触媒する環化反応は、全て 11-5 員環の形成から開始される。

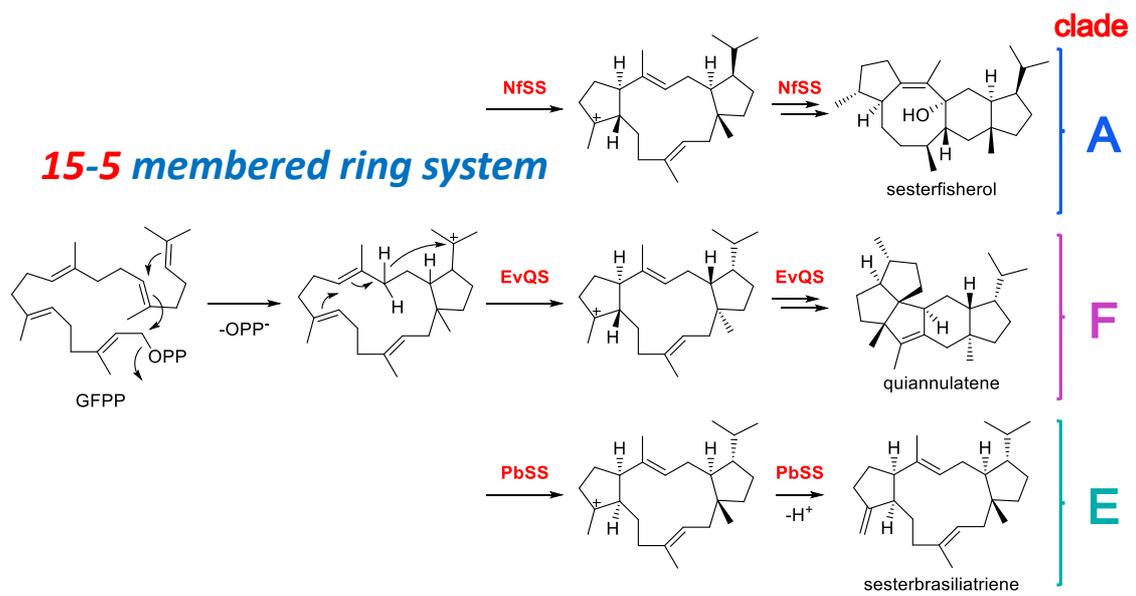


図 32. クレード A,E,F に属する酵素が触媒する環化反応は、全て 15-5 員環の形成から開始される。

最後に、本博士論文は下記にて発表した内容を、許可を得て掲載したものである。

(Mitsubishi, T.; Kikuchi, T.; Hoshino, S.; Ozeki, M.; Awakawa, T.; Shi, S.-P.; Fujita, M.; Abe, I. “Crystalline Sponge Method Enabled the Investigation of a Prenyltransferase-terpene Synthase Chimeric Enzyme, Whose Product Exhibits Broadened NMR Signals”, *Org. Lett.* 20, 5606-5609, (2018)).

Copyright (2018) American Chemical Society.

(Matsuda, Y.\*; Mitsuhashi, T.\*; Lee, S.\*; Hoshino, M.; Mori, T.; Okada, M.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Fujita, M.; Abe, I. “Astellifadiene: Structure Determination by NMR Spectroscopy and Crystalline Sponge Method, and Elucidation of its Biosynthesis”, *Angew. Chem., Int. Ed.* 55, 5785-5788, (2016) (\* co-first author)).

Copyright (2016) John Wiley and Sons.

# 実験項

## 使用機器および試薬等一覧

### 機器

PCR 装置 : TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TaKaRa)

GC-MS 装置 : GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu)

GC-MS 用カラム : Restek Rtx®-5MS glass capillary column (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm film thickness)

NMR 装置 : JEOL ECX-500 or ECA-500 spectrometer (500 MHz (<sup>1</sup>H), 125MHz (<sup>13</sup>C))。Bruker Avance III HD 900 MHz NMR spectrometer (900 MHz (<sup>1</sup>H)/225 MHz (<sup>13</sup>C))。Bruker AVANCE III HD 600MHz NMR spectrometer (600 MHz (<sup>1</sup>H)/150 MHz (<sup>13</sup>C))。

ケミカルシフトに関しては溶媒のピーク (<sup>1</sup>H NMR: CDCl<sub>3</sub> 7.26 ppm, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> 7.16 ppm; <sup>13</sup>C NMR: CDCl<sub>3</sub> 77.0 ppm, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> 128.0 ppm) を基準とした。

高分解能質量分析装置 :

HR-ESI-MS : Bruker Compact QqTOF mass spectrometer (Bruker): **1** の測定に使用

HR-FAB-MS : JEOL JMS-700V spectrometer (JEOL): **2** の測定に使用

X 線装置 :

SuperNova diffractometer (Rigaku Oxford Diffraction) (micro-focus Cu Kα radiation source, high-sensitive CCD detector, low temperature system using cold nitrogen stream (100 K)): **1**/結晶スポンジ複合体の測定に使用

XtaLAB P200(Rigaku) (rotating anode Mo Kα radiation source, hybrid photon counting detector (DECTRIS Pilatus 200K), low temperature system using cold nitrogen stream (93 K)): **2**/結晶スポンジ複合体の測定に使用

### 化成品

silica Gel 60N (KANTO CHEMICAL CO.,INC.)

hipolypepton (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.)

yeast extract (Difco)

tryptone (Difco)

potato dextrose broth (Difco)

polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

dextrin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

LB 培地 (造粒タイプ) (KANTO CHEMICAL CO.,INC.)

ポテトデキストロース寒天培地(Nissui)

MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

starch (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

ampicillin sodium salt (Nacalai Tesque)

maleic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

tris(hydroxymethyl)aminomethane (Nacalai Tesque)

NaOH (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
Yatalase (TaKaRa)  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
sorbitol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
PEG4000 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Nacalai Tesque)  
その他の試薬・有機溶媒等は特に記載のない限り、KANTO CHEMICAL CO.,INC  
もしくは Wako Pure Chemical Industries, Ltd.から購入した。

### 遺伝子工学用試薬

In-Fusion® HD Cloning Kit (TaKaRa)  
iProof DNA polymerase (BIO-RAD)  
ISOGEN (Nippon gene)  
DNaseI (TaKaRa)  
RNase (invitrogen)  
Super scriptIII (invitrogen)  
各種制限酵素は TaKaRa から購入した。  
各種キットは付属のプロトコルに従い使用した。

### 生物種

*Penicillium chrysogenum* MT-12 : Potato dextrose broth (Difco) 中、30 °C、160 rpm、2 日間の条件にて培養することで得た菌体から抽出したゲノムをテンプレートとし、PcCS の遺伝子をクローニングした。

*Emericella varicolor* NBRC 32302 (Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation から入手した。) : DPY medium 中、30 °C、160 rpm、3 日間の条件にて培養することで得た菌体から抽出したゲノムをテンプレートとし、EvAS の遺伝子をクローニングした。

*Aspergillus oryzae* NSAR1 (niaD-, sC-, ΔargB, adeA-) : *Aspergillus oryzae* の栄養要求性 4 重変異株。異種発現宿主として使用。

*Escherichia coli* DH5 α (Clontech) : 各種プラスミドの構築・増幅に使用。

*Escherichia coli* BLR (DE3) (Merck) : EvAS の *in vitro* 酵素反応に用いる精製酵素を調製するために使用。

### ベクター

pTAex3 vector : 糸状菌異種発現用シャトルベクター

pColdTF vector (TaKaRa) : 大腸菌用コールドショック発現ベクター

## 結晶スポンジ法関連

screw-top microvial (Osaka Chemical, cat. no. 11090620)

screw cap with a septum seal (Osaka Chemical, cat. no. 53951-09FB)

syringe needle (TERUMO, cat. no. NN-2116R)

結晶スポンジ $[(ZnI_2)_3(tpt)_2 \cdot (cyclohexane)_x]$ 並びに $[(ZnCl_2)_3(tpt)_2 \cdot (n-hexane)_x]$ は、文献に従い、調製した<sup>17,24</sup>。

## プライマー

これらは Eurofins Genetics (Tokyo, Japan)から購入した。

PcCS-F: AGCAAGCTCCGAATTCATGGCAGACAAAATAACTGACGAGTATG  
PcCS-R: ACTACAGATCCCCGGGTACCTCATTTCTGAAGCGCCTCTTCCATC  
EvAS-F: AGCAAGCTCCGAATTCATGGAATTCAAGTACTCAACCC  
EvAS-R: ACTACAGATCCCCGGGTACCCTACTCCGTGCGCAAAA  
HindIII-EvAS-F: AGTACAAGCTTATGGAATTCAAGTACTCAACCCTC  
XbaI-EvAS-R: TATATTCTAGACTACTCCGTGCGCAAAA  
ACTGC

## 一般操作

### 培地調製法

#### DPY medium

2% dextrin, 1% hipolypepton, 0.5% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.05%  $\text{MgSO}_4$  水溶液を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。

#### CD-starch medium

0.3%  $\text{NaNO}_3$ , 0.2%  $\text{KCl}$ , 1% hipolypepton, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.002%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2% starch 水溶液 (HCl を用いて pH を 5.5 に調製) を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。

#### LB medium

LB 培地 (造粒タイプ) 25 g あたり 1 L の蒸留水に溶かし、これを高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。

#### SOB medium

Tryptone 20g, yeast extract 5g,  $\text{NaCl}$  0.5g, 1M  $\text{KCl}$  2.5 mL を 1L の蒸留水に溶かした。(NaOH を用いて pH を 7.0 に調製) これを高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供したのちに、1M  $\text{MgCl}_2$  を 10 mL 加えた。

#### PDA plate

ポテトデキストロース寒天培地 3.9 g あたり 100 ml の蒸留水に溶かし、高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。さらにこれをシャーレに 20 ml ずつ分注した。

#### M 培地 (+Ade+Met+sorbitol) plate

本培地は TOP 培地並びに BOTTOM 培地からなる。

TOP 培地 : 0.2%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05%  $\text{KCl}$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0% glucose, 0.8% agar, 0.15% methionine, 0.01% adenine 水溶液 (NaOH を用いて pH を 5.5 に調製) を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。使用前に 50 °C に保温した。

BOTTOM 培地 : 0.2%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05%  $\text{KCl}$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0% glucose, 1.5% agar, 0.15% methionine, 0.01% adenine 水溶液 (NaOH を用いて pH を 5.5 に調製) を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。さらにこれをシャーレに 20 ml ずつ分注した。M 培地 (+Ade+Met+sorbitol) plate に植菌する際には、BOTTOM 培地に植菌した後に TOP 培地を 5 ml 上層し、TOP 培地が固まるまで室温して静置する。

M 培地 (+Ade+Met) plate

0.2% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% KCl, 0.05% NaCl, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.002% FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 2.0% glucose, 1.5% agar, 0.15% methionine, 0.01% adenine 水溶液 (NaOH を用いて pH を 5.5 に調製) を高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 min) に供した。

## 試薬調整法

### 80%グリセロール溶液

グリセロールを蒸留水にて80%まで希釈し、これを高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 min）に供した。

### 20%グリセロール溶液

グリセロールを蒸留水にて80%まで希釈し、これを高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 min）に供した。

### 0.1 % Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate 溶液

Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate を蒸留水にて0.1%まで希釈し、これを高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 min）に供した。

### 1M Tris-HCl

tris(hydroxymethyl)aminomethane を1 M になるように蒸留水に溶解した。塩酸を用いて目的の pH に調製した。

### TF solution 0（糸状菌形質転換用試薬）

Maleic acid を終濃度が 50 mM になるように蒸留水に溶解した。pH は NaOH を用いて 5.5 に調製し、これを高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 min）に供した。

### TF solution 1（糸状菌形質転換用試薬）

Yatalase の終濃度が 1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の終濃度が 0.6 M になるように TF solution 0 に溶解した。TF solution 1 の調製は、形質転換を行う直前に行なった。

### TF solution 2（糸状菌形質転換用試薬）

Sorbitol の終濃度が 1.2 M、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の終濃度が 50 mM、NaCl の終濃度が 35 mM、また 1M Tris-HCl (pH 7.5) を終濃度 10 mM になるように蒸留水に溶解し、高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 min）に供した。

### TF solution 3（糸状菌形質転換用試薬）

PEG4000 の終濃度が 60%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の終濃度が 50 mM、また 1M Tris-HCl (pH 7.5) を終濃度 10 mM になるように蒸留水に溶解し、高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 min）に供した。

### Inoue transformation buffer

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (5.44 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.10 g), KCl (9.34 g), 0.5M PIPES (pH6.7, 10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (up to 500 ml) の水溶液を 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて滅菌した。

#### 大腸菌グリセロールストック調製法

作成した大腸菌の形質転換体は、30 °C 、160 rpm、LB medium 中にて一晩培養後、培養液 250  $\mu$ L と 80%グリセロール溶液 750  $\mu$ L を混合し、-20 °C にて保存した。

#### 糸状菌グリセロールストック調製法

PDA plate 上で培養した糸状菌形質転換体を 0.1% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate 溶液を用いて培地から剥がし取り、これによって得た懸濁液を綿栓シリンジによってろ過した。ろ液を 2500 rpm にて 10 分間遠心し、上清を捨てた後に 20%グリセロール溶液を加え、混和した後に分注し、-80 °C にて保存した。

#### 大腸菌のコンピテントセル作成法

大腸菌を 37 °C、130 rpm にて 100 ml の SOB medium を用い培養した。OD<sub>600</sub> が 0.55 に達したところで、培養液を 2500 g、4 °C にて 10 分間遠心し、上清を捨てた。40 ml の Inoue transformation buffer を加え、大腸菌ペレットを懸濁した。再び、2500 g、4 °C にて 10 分間遠心し、上清を捨て、10 ml の Inoue transformation buffer を加え、大腸菌ペレットを懸濁した。これに 750  $\mu$ L の DMSO を混合し、10 分間氷冷した。これを 100  $\mu$ L ずつ分注し、液体窒素で急速凍結し、-80 °C にて保存した。

#### 大腸菌形質転換法

大腸菌コンピテントセルに作成したプラスミド溶液 5  $\mu$ L を混合し、1 時間氷冷した。これを 42 °C にて 1 分間加熱し、再び 2 分間以上氷冷した。次に、1 ml の LB medium を加え、37 °C、130 rpm にて 45 分間培養した。これを、適切な抗生物質を含む寒天培地に塗布し、37 °C にて一晩培養後、増殖してきたものを形質転換体として用いた。

## 実験操作

### 糸状菌発現用プラスミドの構築

*P. chrysogenum* MT-12 もしくは *E. varicolor* NBRC32302 のゲノム DNA をテンプレートとして目的遺伝子の全長を PCR にて増幅した。この際、プライマーとして PcCS-F/PcCS-R もしくは、EvAS-F/EcAS-R を用い、プログラムは PcCS : 98 °C, 30 s; (98 °C, 10 s; 61 °C, 10 s; 72 °C, 90 s) × 30 cycles; 72 °C, 5 min; EvAS : 98 °C, 30 s; (98 °C, 10 s; 63 °C, 10 s; 72 °C, 90 s) × 30 cycles; 72 °C, 5 min とした。増幅した遺伝子を精製後、In-Fusion® HD Cloning Kit を用いて pTAex3 vector に組み込んだ。

### 糸状菌形質転換体 *Aspergillus oryzae* 形質転換体の作成

DPY medium にて培養した *A. oryzae* NSAR1 株の菌体を TF solution 1 に加え、液が濁るまで 30 °C にて振とうした。この溶液を綿詰めシリンジを用いてろ過し、ろ液を 1500 rpm、室温にて 10 分間遠心した。その後、上清を捨て、TF solution 2 を加え、懸濁した。そして再び、1500 rpm、室温にて 10 分間遠心し、上清を捨て、TF solution 2 を加えた。この溶液 200  $\mu$ l に 20  $\mu$ l の糸状菌発現用プラスミド溶液を混合し、室温にて 30 分間静置した。1350  $\mu$ l の TF solution 3 を加え、室温にて 20 分間静置した。その後、5 ml の TF solution 2 を加え、1500 rpm、室温にて 10 分間遠心した。上清を捨て、500  $\mu$ l の TF solution 2 を加え、懸濁後、M 培地 (+Ade+Met+sorbitol) plate に植菌した。これを 30 °C にて培養した。増殖してきた菌糸を、M 培地 (+Ade+Met) plate に植えつぎ、これを形質転換体として用いた。

### *Aspergillus oryzae* 形質転換体の代謝物に関する GC-MS 解析 (化合物 1)

*A. oryzae* 形質転換体を培養後、菌体からのアセトン抽出物を GCMS 解析に供することで、代謝物の解析を行なった。このとき、気化室の温度は 260 °C, EI 法によるイオン化は 70 eV にておこなった。また、キャリアガスとしてはヘリウムを用い、線速度は 44.9 cm/min とした。また、プログラムは、100 °C にて 3 分間保持した後 14 °C/min の割合にて 330 °C まで温度を上昇させ、330 °C にて 15 分間保持した。

### *Aspergillus oryzae* 形質転換体の代謝物に関する GC-MS 解析 (化合物 2)

*A. oryzae* 形質転換体を培養後、菌体からのアセトン抽出物を GCMS 解析に供することで、代謝物の解析を行なった。このとき、気化室の温度は 260 °C, EI 法によるイオン化は 70 eV にておこなった。また、キャリアガスとしてはヘリウムを用い、線速度は 44.9 cm/min とした。また、プログラムは、100 °C にて 3 分間保持した後 14 °C/min の割合にて 268 °C まで温度を上昇させ、268 °C にて 4 分間保持した。

## 1 および同位体標識していない 2 を単離した際の糸状菌形質転換体の培養法

作成した *A. oryzae* の形質転換体は 30 °C、160 rpm にて DPY medium 中にて前培養後、DPY medium にて更に 3 日間培養 (PcCS の場合) もしくは CD-starch medium にて 4 日間 (EvAS の場合) 培養した。

### 1 の単離

*A. oryzae* /pTAex3-PcCS の 8 L 培養分の菌体からアセトンを用いて、代謝物を抽出した。この抽出物を濃縮し、ヘキサンにて抽出した後に、再び濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒 hexane:ethyl acetate (100:0 to 80:20)) に供した。結果、15.4 mg の yellowish oil として **1** を得た。

旋光度並びに質量分析結果は下記の通りであった。

$[\alpha]^{32.5}_{\text{D}} +7.1$  (c 0.75,  $\text{CHCl}_3$ )

HR-ESI-MS found m/z 313.2508  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. 313.2502 for  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NaO}^+$ ).

### 2 の単離

*A. oryzae* /pTAex3-EvAS の 6 L 培養分の菌体からアセトンを用いて、代謝物を抽出した。この抽出物を濃縮し、ヘキサンにて抽出した後に、再び濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒 hexane:ethyl acetate (99:1)) に供した。結果、22.7 mg の colorless oil として **2** を得た。

旋光度並びに質量分析結果は下記の通りであった。

$[\alpha]^{21}_{\text{D}} +29.1$  (c 1.13,  $\text{CHCl}_3$ )

HR-FAB-MS found m/z 341.3205  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd 341.3208 for  $\text{C}_{25}\text{H}_{41}$ ).

## 2 への安定同位体標識酢酸ナトリウムの取り込み実験

200 mL DPY culture にて *A. oryzae* 形質転換体を培養した際、100 mg の安定同位体標識した (sodium acetate ( $[1-^{13}\text{C}]$ -sodium acetate,  $[1-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -sodium acetate, もしくは  $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -sodium acetate) を加えた。30 °C、160 rpm にて 2 日間培養した後に、菌体からアセトンを用い、代謝物を抽出した。この抽出物を濃縮し、ヘキサンにて抽出した後に、再び濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒 hexane) に供した。結果、それぞれ 2.62 mg, 1.99 mg, 2.48 mg の **2** を得た (それぞれ、sodium acetate ( $[1-^{13}\text{C}]$ -sodium acetate,  $[1-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -sodium acetate,  $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -sodium acetate を用いた場合の収率)。その後、これら同位体標識された **2** を  $^{13}\text{C}$  NMR の解析に供した。

### 1 の結晶スポンジ法による解析 (測定試料の調製)

**1** の 5  $\mu\text{L}$  の n-hexane 溶液 (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) を結晶スポンジ 1 つと 50  $\mu\text{L}$  の n-hexane が入ったバイアルに入れ、セプタム付きキャップにて蓋をした後に、セプタムにニードルを突き刺した。その状態にて 50 °C、1 日放置することで、ゆっくりと溶媒を蒸発させた<sup>25</sup>。その後、**1** が導入された結晶スポンジを X 線回折法に供した。

## 2 の結晶スポンジ法による解析(測定試料の調製)

2 の 10  $\mu\text{L}$  の cyclohexane 溶液 (1 mg mL<sup>-1</sup>) を結晶スポンジ 1 つと 45  $\mu\text{L}$  の cyclohexane が入ったバイアルに入れ、セプタム付きキャップにて蓋をした後に、セプタムにニードルを突き刺した。その状態にて 50 °C、2 日間放置した後に 4 °C、9 日間更に放置することで、ゆっくりと溶媒を蒸発させた<sup>25</sup>。その後、2 が導入された結晶スポンジを X 線回折法に供した。

## X 線回折法によって得られたデータの解析

X 線回折法によって収集したデータは、単結晶構造解析・統合プラットフォーム CrysAlis(Pro)によって処理 (integration, correction, 及び scales) した。更に結晶構造に関しては、SHELXT ver. 2014/5 にて解き、SHELXL ver. 2014/7 を用いて精密化を行った。また、全ての非水素原子は異方性にし、精密化を行った。一方、水素原子は、騎乗モデルを用いることで、等方性にて導入した。ディスオーダーや熱運動が大きい部分については各種の束縛 (e.g. DFIX, DANG, RIGU, SAME SIMU, ISOR) を使用した。

### 1/結晶スポンジ複合体のデータ

Crystal size: 499 × 328 × 246  $\mu\text{m}^3$

Refined formula: C<sub>106.70</sub> H<sub>116.30</sub> Cl<sub>12</sub> N<sub>24</sub> O Zn<sub>6</sub>

Formula weight (*M<sub>r</sub>*) = 2568.55

Crystal looks: colorless block

Crystal system: Monoclinic

space group *C*2

*Z* = 4

29883 unique reflections merged from recorded 83494 ones (3.355° <  $\theta$  < 74.983° ) were used for structural analysis (*R*<sub>int</sub> = 0.0215).

Lattice parameters, *R*-factor on *F*<sup>2</sup> > 2  $\sigma$ (*F*<sup>2</sup>), weighted *R*-factor, and goodness-of-fit: *a* = 33.0800(6) Å, *b* = 14.4181(2) Å, *c* = 31.4827(6) Å,  $\beta$  = 101.532(2)°, *V* = 14712.6(4) Å<sup>3</sup>, *R* = 0.0595, *wR* = 0.1837, *S* = 1.062

Calculated density: 1.160

The Flack parameter (calculated from 12604 Parsons' quotients): 0.072(6)

Linear absorption coefficient ( $\mu$ ): 3.446

Residual electron density (max/min): 0.730/ -0.762 eÅ<sup>-3</sup>

CCDC number: 1855333

2 分子の 1 が非対称単位中に観測され、占有率はそれぞれ 50%であった。

### 2/結晶スポンジ複合体のデータ

Crystal size: 150 × 100 × 50  $\mu\text{m}^3$

Refined formula: C<sub>133</sub>H<sub>160</sub>N<sub>24</sub>I<sub>12</sub>Zn<sub>6.01</sub>

Formula weight (Mr): 4010.68

Crystal system: monoclinic

space group: C2

Z = 4.

For structural analysis 33648 unique reflections merged from 301447 recorded ones ( $1.586^\circ < \theta < 27.270^\circ$ ) were used ( $R_{int} = 0.0237$ ).

Lattice parameters, R-factor on  $F_2 > 2\sigma(F_2)$ , weighted R-factor, and goodness-of-fit:  $a = 34.7734(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 14.87160(12) \text{ \AA}$ ,  $c = 31.2793(2) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 101.6434(8)^\circ$ ,  $V = 15842.8(2) \text{ \AA}^3$ ,  $R = 0.0341$ ,  $wR = 0.1028$ ,  $S = 1.099$

Calculated density: 1.681

Linear absorption coefficient ( $\mu$ ): 3.285

Residual electron density (max/min): 1.003/−0.898  $e\text{\AA}^{-3}$

The Flack parameter (calculated from 13169 Parsons' quotients): 0.071(6)

CCDC number: 1446744

2分子の **2** が非対称単位中に観測され、占有率はそれぞれ 50%であった。

#### Aspergillus oryzae /pTAex3-EvAS からの EvAS の cDNA の調製

RNA の抽出には ISOGEN を用いた。更に、これを DNaseI で処理し、混入したゲノム DNA を取り除いた。これを Super scriptIII にて逆転写し、cDNA を得た。また、これを RNase にて処理することで混入している RNA を除去した。

#### 大腸菌発現用プラスミド pColdTF-EvAS の構築

*A. oryzae* /pTAex3-EvAS の cDNA をテンプレートとして EvAS 遺伝子の全長を PCR にて増幅した。この際、プライマーとして *Hind*III-EvAS-F と *Xba*I-EcAS-R を用い、プログラムは  $98^\circ\text{C}$ , 30 s;  $98^\circ\text{C}$ , 10 s;  $63^\circ\text{C}$ , 10 s;  $72^\circ\text{C}$ , 40 s)  $\times$  30 cycles;  $72^\circ\text{C}$ , 5 min とした。増幅した遺伝子を精製後、制限酵素である *Hind*III ならびに *Xba*I にて処理し、Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて、pColdTF vector に組み込み、これを pColdTF-EvAS とした。

#### 精製酵素 EvAS の取得

*E. coli* BLR (DE3)/pColdTF-EvAS を  $37^\circ\text{C}$ 、130 rpm にて 100 mg/L のアンピシリンナトリウム塩を添加した LB medium を用い培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 に達したところで、終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を加え、 $15^\circ\text{C}$ 、130 rpm にて 24 時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を回収し、この菌体を lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 250 mM NaCl, 5 mM imidazole, 10% glycerol) 中において超音波によって破碎した。遠心分離によって沈殿を取り除き Ni-NTA affinity column へと試料をロードした。このカラムを 100 column volumes 分の wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 250 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol) にて洗浄し、目的酵素を 5 column volumes 分の elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 250 mM NaCl, 300 mM imidazole, 10% glycerol) にて溶出した。溶出した酵素は

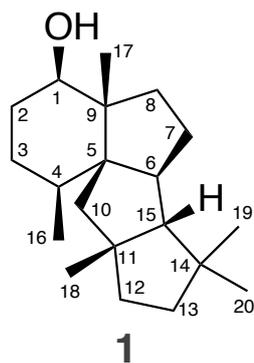
Superdex™200 10/300 GL column (GE Healthcare) にて更に精製した。その際のバッファの組成は (20 mM CHES-NaOH, pH 9.0, 200 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) を用いた。SDS-PAGE にて純度を確認し、酵素の濃度は UV-1700 PharmaSpec Spectrophotometer (Shimadzu) を用いた。

#### EvAS の *in vitro* 酵素反応

典型的な酵素反応条件は下記の通りである。溶液 (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10  $\mu$ g dimethylallyl pyrophosphate, 10  $\mu$ g isopentenyl pyrophosphate, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothreitol, 71  $\mu$ l D<sub>2</sub>O or H<sub>2</sub>O and 200  $\mu$ g EvAS, final volume of 100  $\mu$ L) を調製し 30 °C にて overnight で酵素反応を行った。反応終了後、200  $\mu$ L の酢酸エチルにて 3 回抽出し、抽出物を GC-MS によって解析した。また、酵素を系中に加えないネガティブコントロール反応も行った。GC-MS 解析の条件は、*A. oryzae* 形質転換体の代謝物を解析した際と同様とした。

#### 化合物 1 の配座解析

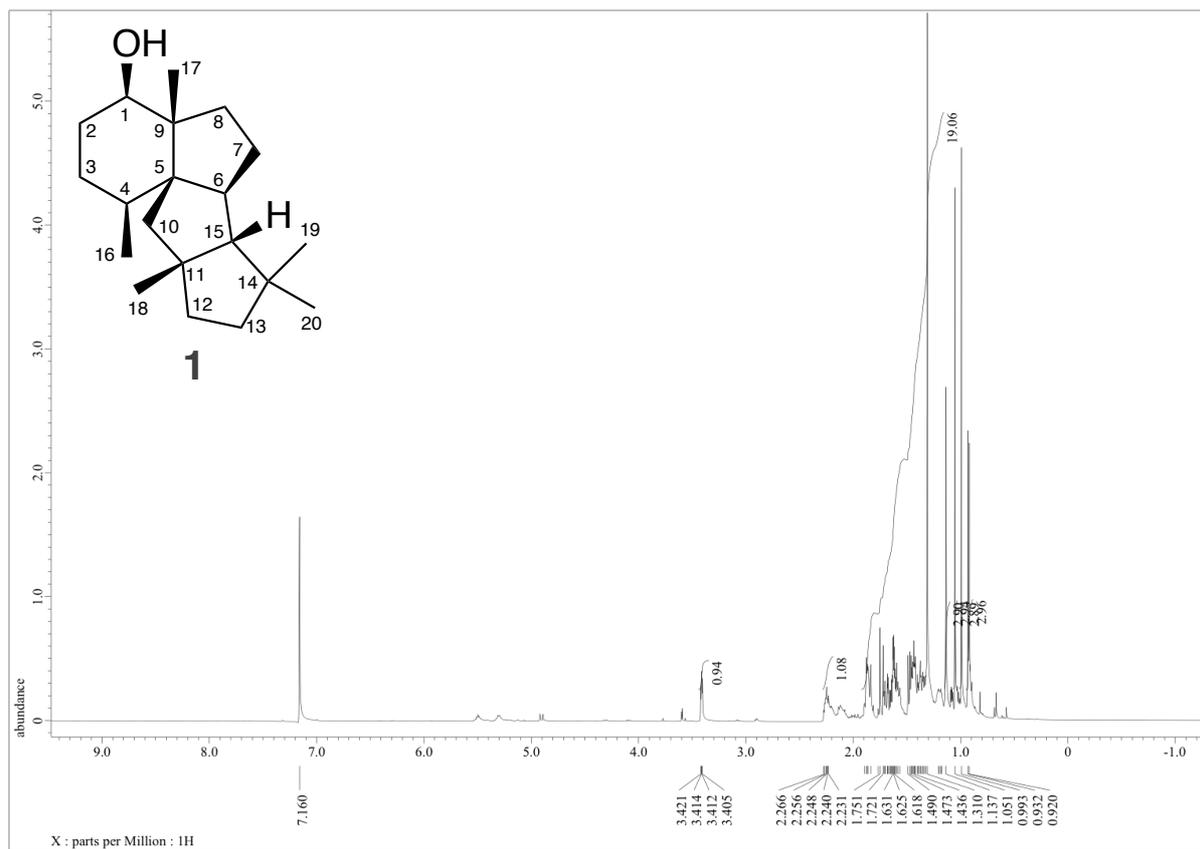
配座の探索は MacroModel software (Schrödinger) を用いて行った。まず 1 の構造を、OPLS3 (Optimized Potentials for Liquid Simulations 3) force field (maximum iterations: 2500, convergence threshold: 0.05) によって最適化した。その後、Monte-Carlo Multiple Minimum (MCMM) algorithm with OPLS3 force field (maximum number of step: 2000, maximum atom deviation cut-off: 2.0 Å, energy window for saving structures: 40 kJ/mol) にて、配座を探索した。その後、上位 40 kJ/mol 以内の安定配座を DFT 計算 (B3LYP/6-31G(d) level with Polarizable Continuum Model (PCM) in benzene) に供した。DFT 計算には *Gaussian 09* を用いた。それぞれの配座に対して、構造最適化と振動計算を行い、それぞれの配座とその Gibbs エネルギーを比較した。



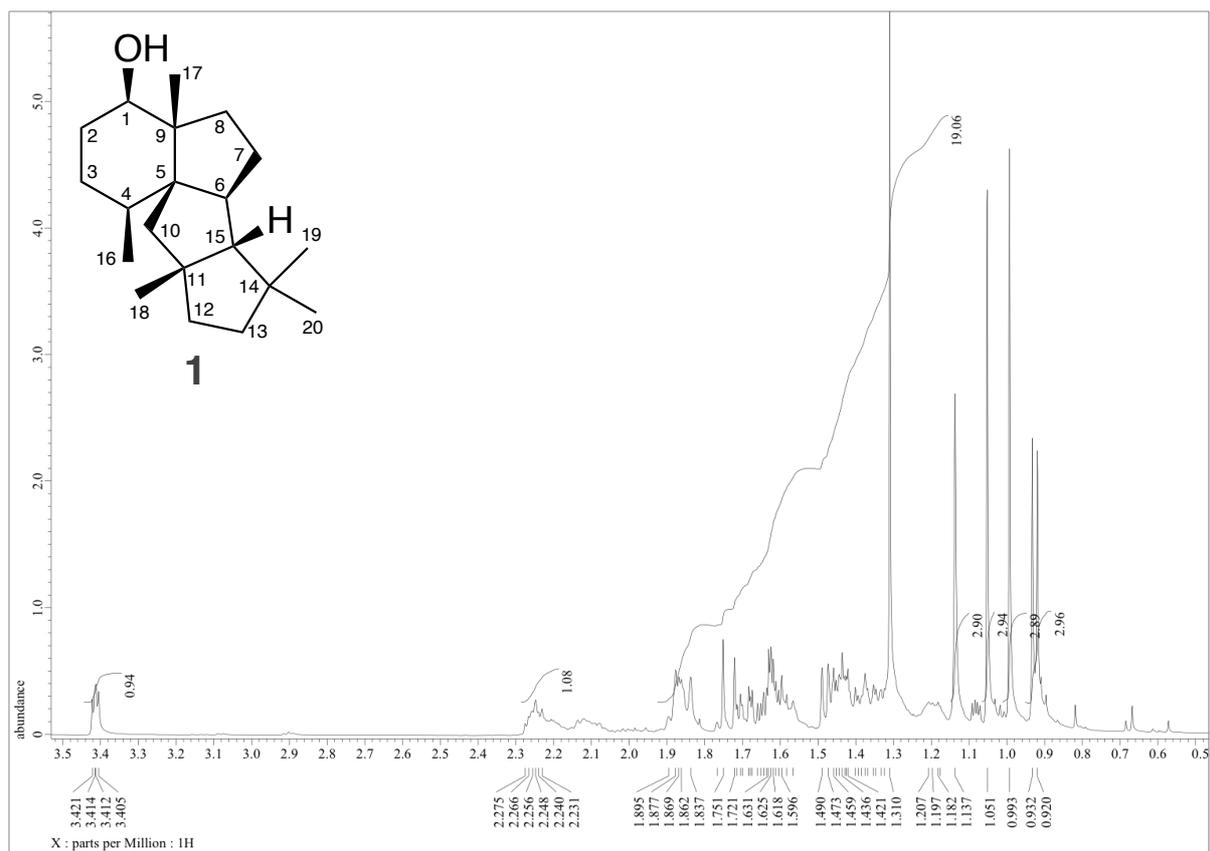
NMR data for **1** in benzene- $d_6$ .

position	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$		
	$\delta(\text{ppm})$	broadenig	$\delta(\text{ppm})$	intensity	multiplicity
1	73.8		3.41	1H	dd ( $J = 4.53, 3.40$ Hz)
2	29.8	•	1.44	1H	m
3	27.6		1.61	1H	m
			1.19	1H	m
4	35.7	•	1.37	1H	m
			1.42	1H	m
5	61.0				
6	54.4	•	2.25	1H	m
7	31.3	•	1.37	1H	m
			1.86	1H	m
8	38.1	•	1.31	1H	m
			1.86	1H	m
9	49.4				
10	44.0	•	1.72	1H	m
			1.84	1H	m
11	54.2				
12	41.4		1.70	1H	m
			1.56	1H	m
13	40.8		1.41	1H	m
			1.61	1H	m
14	42.7				
15	74.1		1.46	1H	m
16	17.9		0.93	3H	d ( $J = 6.24$ Hz)
17	22.9	•	1.14	3H	s
18	31.8		1.31	3H	s
19	31.8		1.05	3H	s
20	27.3		0.99	3H	s

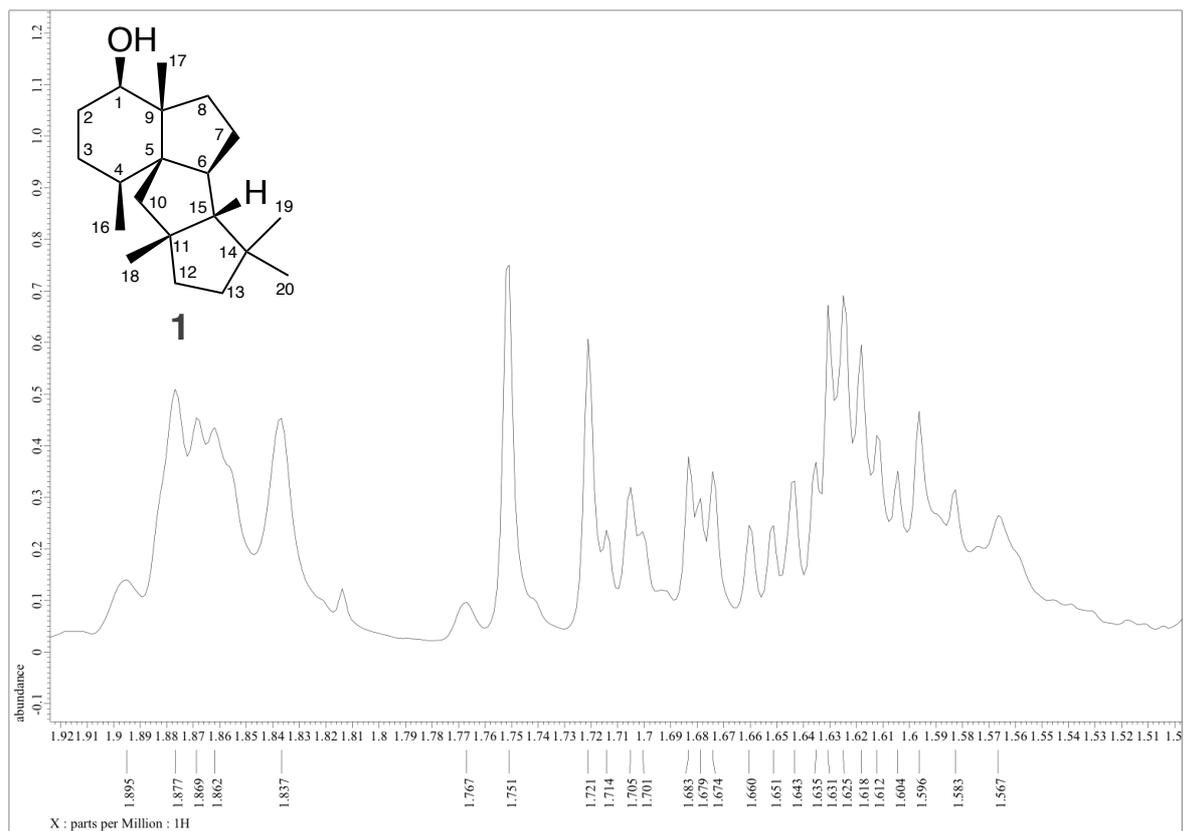
$^1\text{H}$  NMR: 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz (in benzene- $d_6$ , 25 °C)



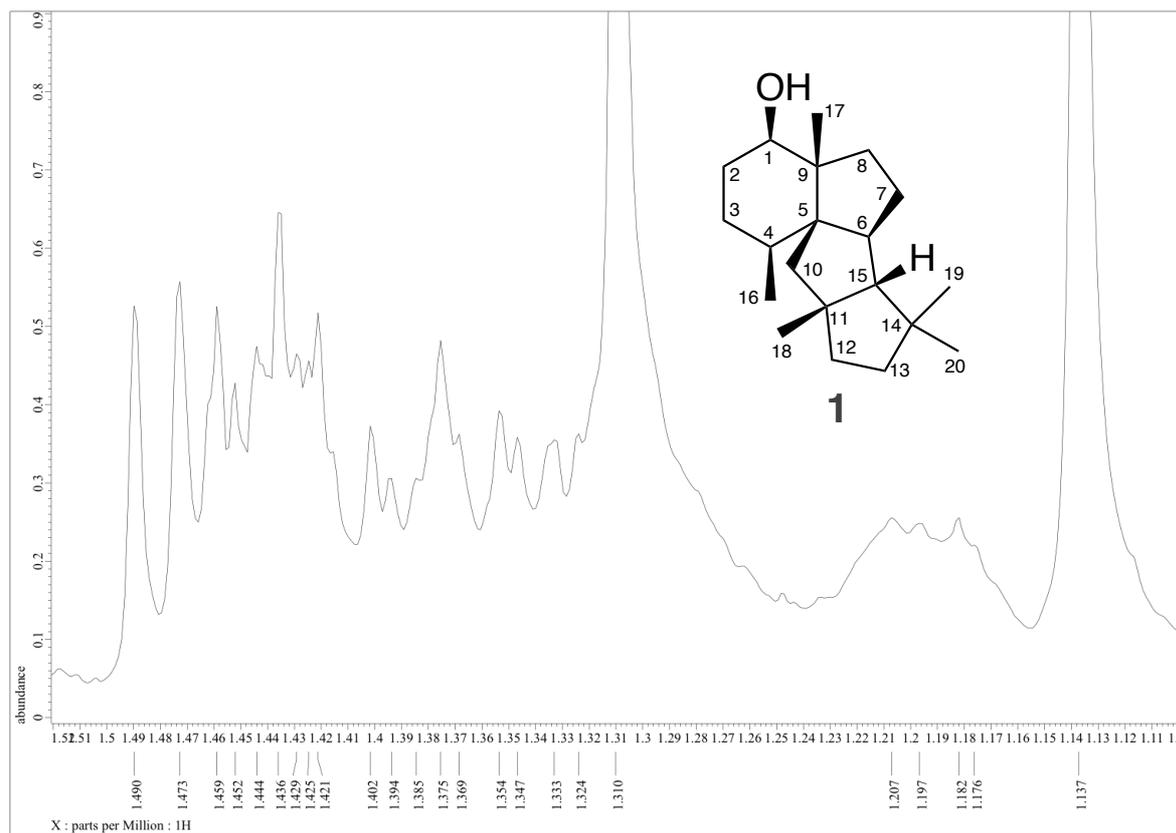
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (500 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 7.16 ppm.



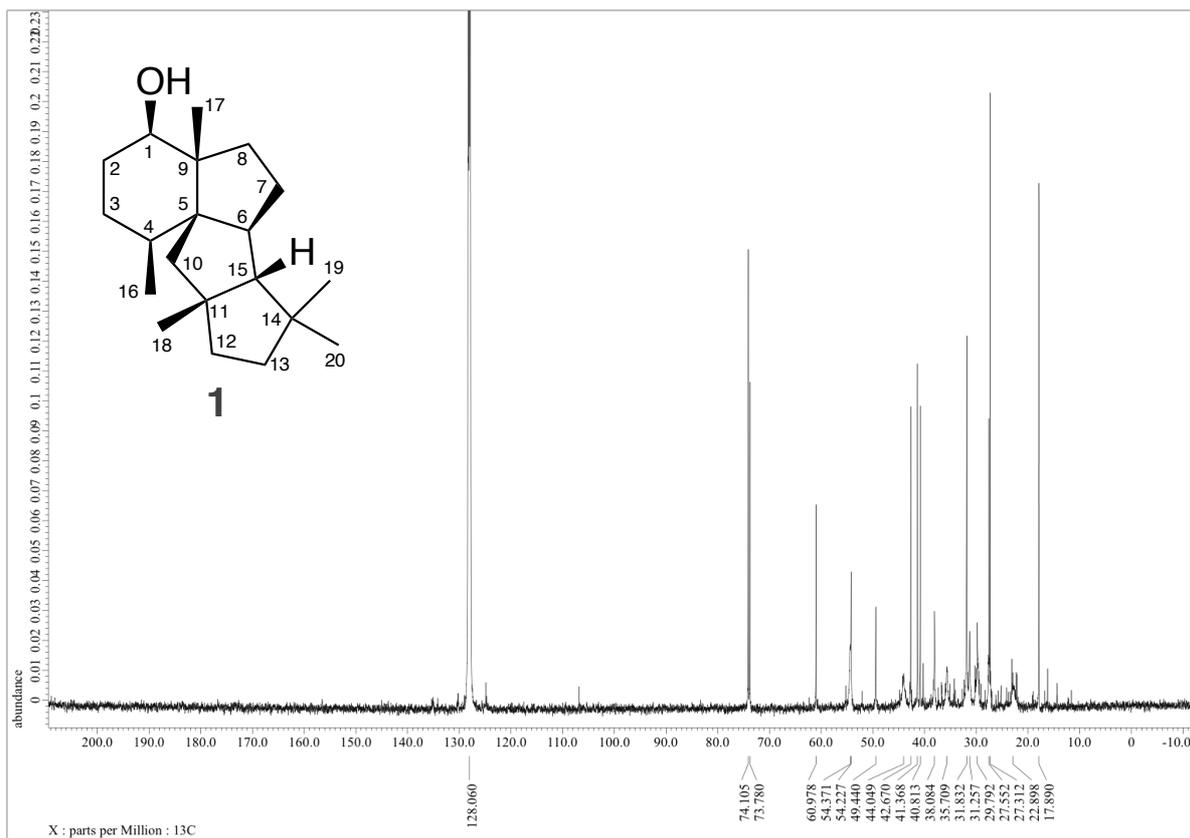
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (0.5-3.5 ppm, 500 MHz, 25 °C).



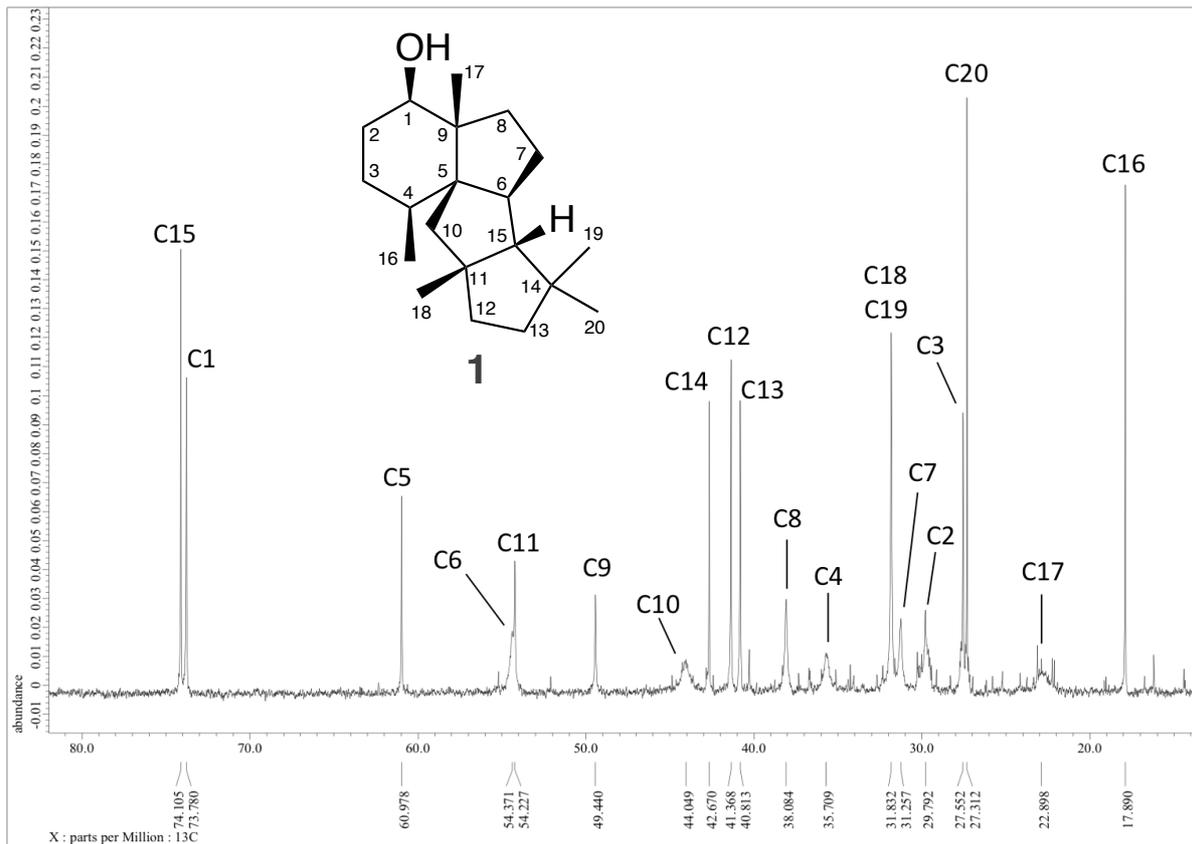
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (1.5-1.9 ppm, 500 MHz, 25 °C).



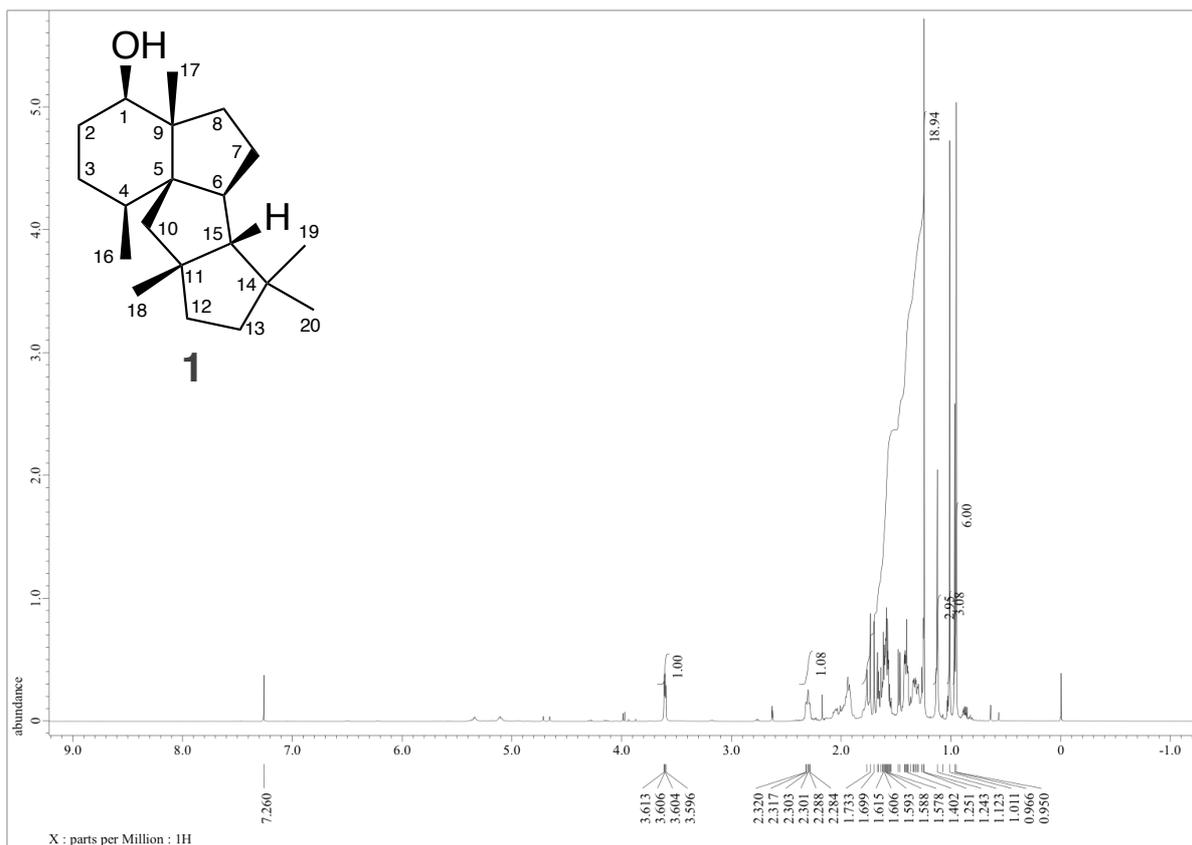
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (1.1-1.5 ppm, 500 MHz, 25 °C).



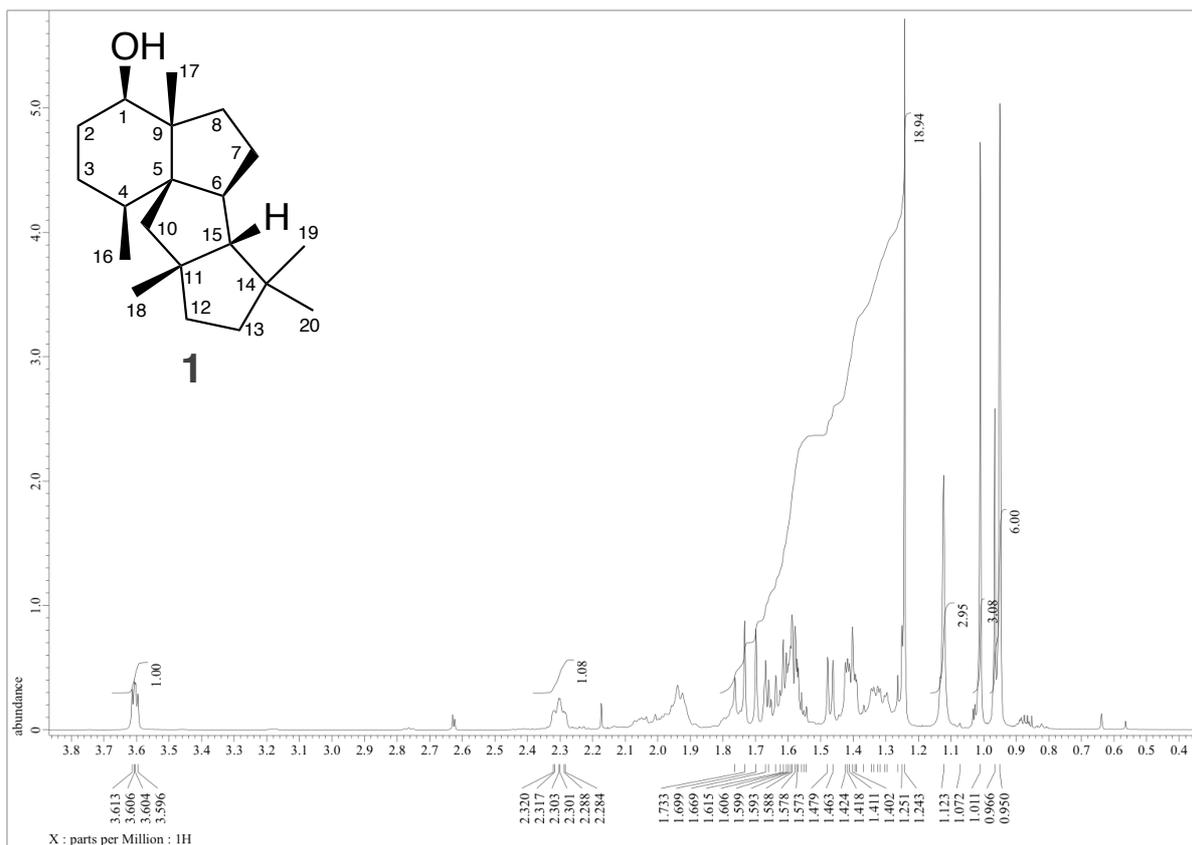
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (125 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 128.06 ppm.



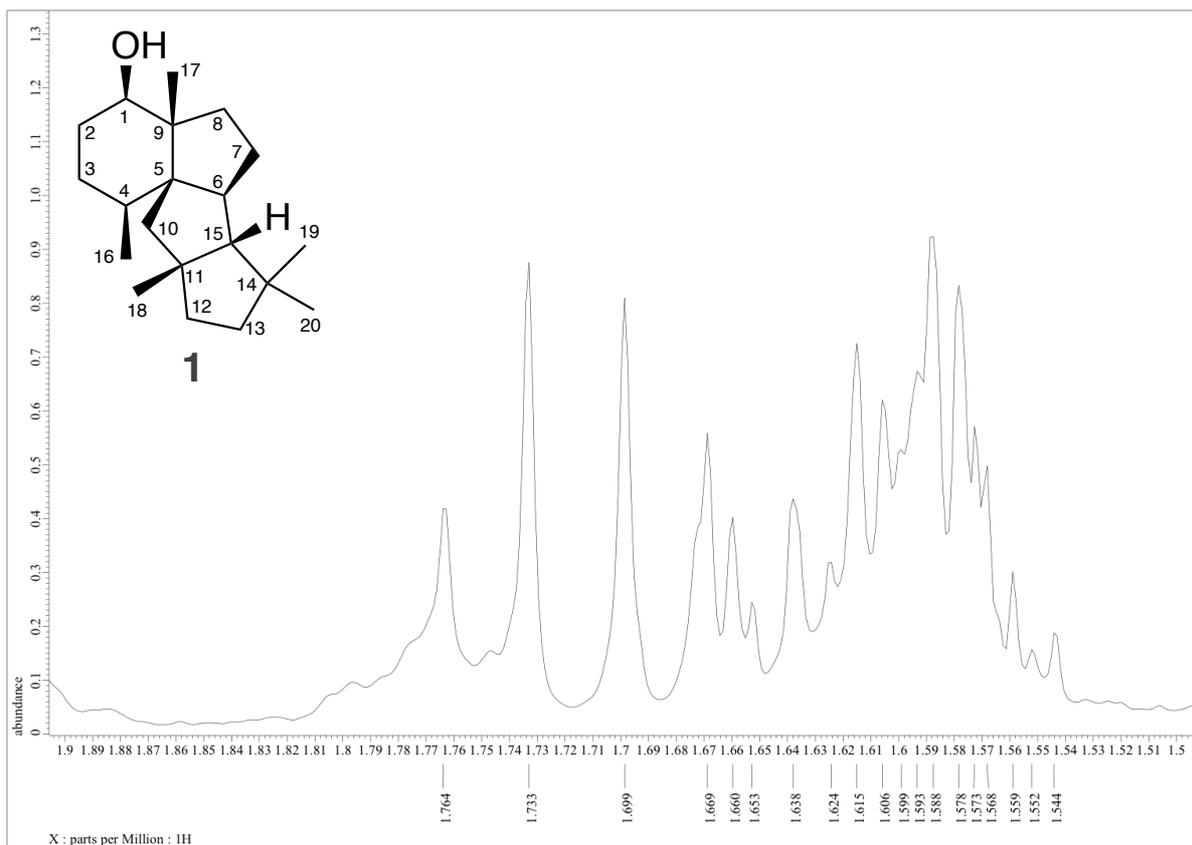
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (15-80 ppm, 125 MHz, 25 °C). C2,C4,C6,C7,C8,C10,C17 に対応するシグナルにおいて特にブロードニングの程度が大きい。



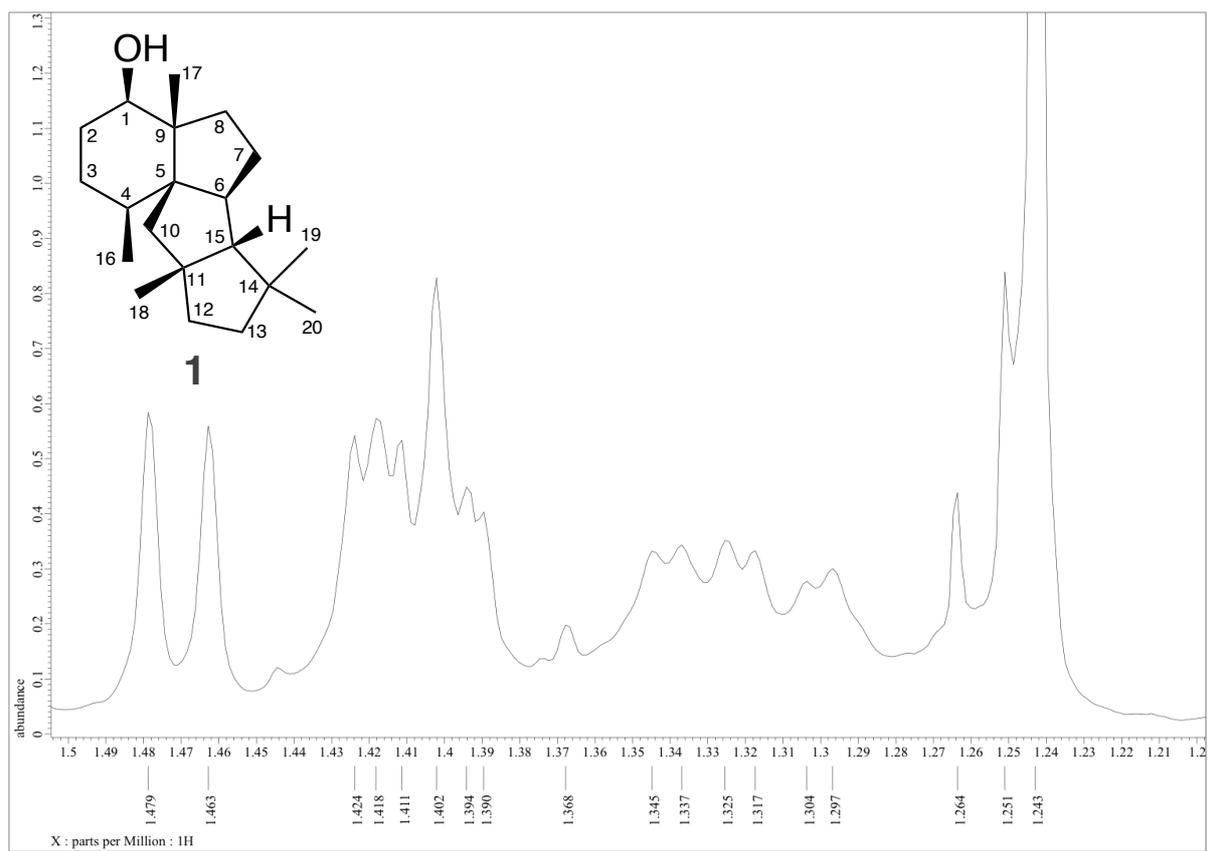
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in chloroform-*d* (500 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 7.26 ppm.



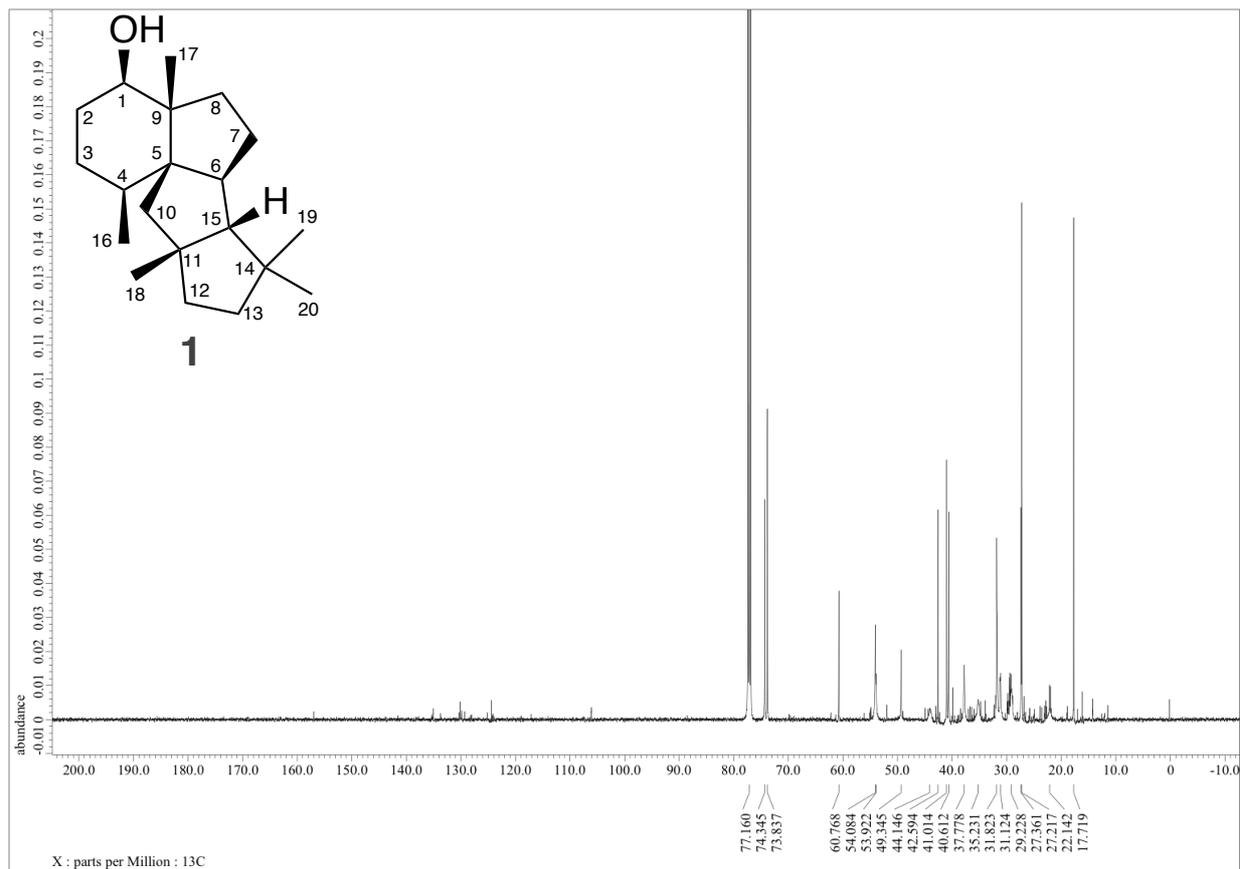
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** in chloroform-*d* (0.4-3.8 ppm, 500 MHz, 25 °C).



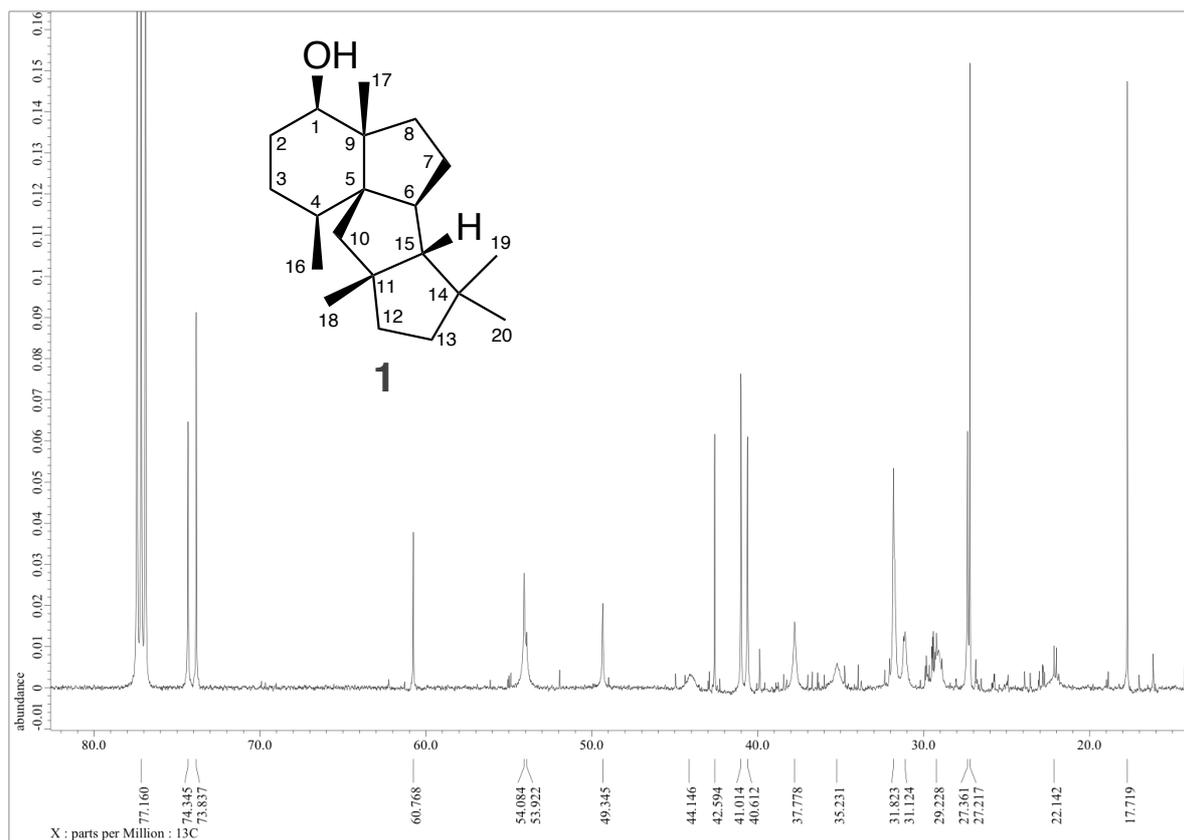
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in chloroform-*d* (1.5-1.9 ppm, 500 MHz, 25 °C).



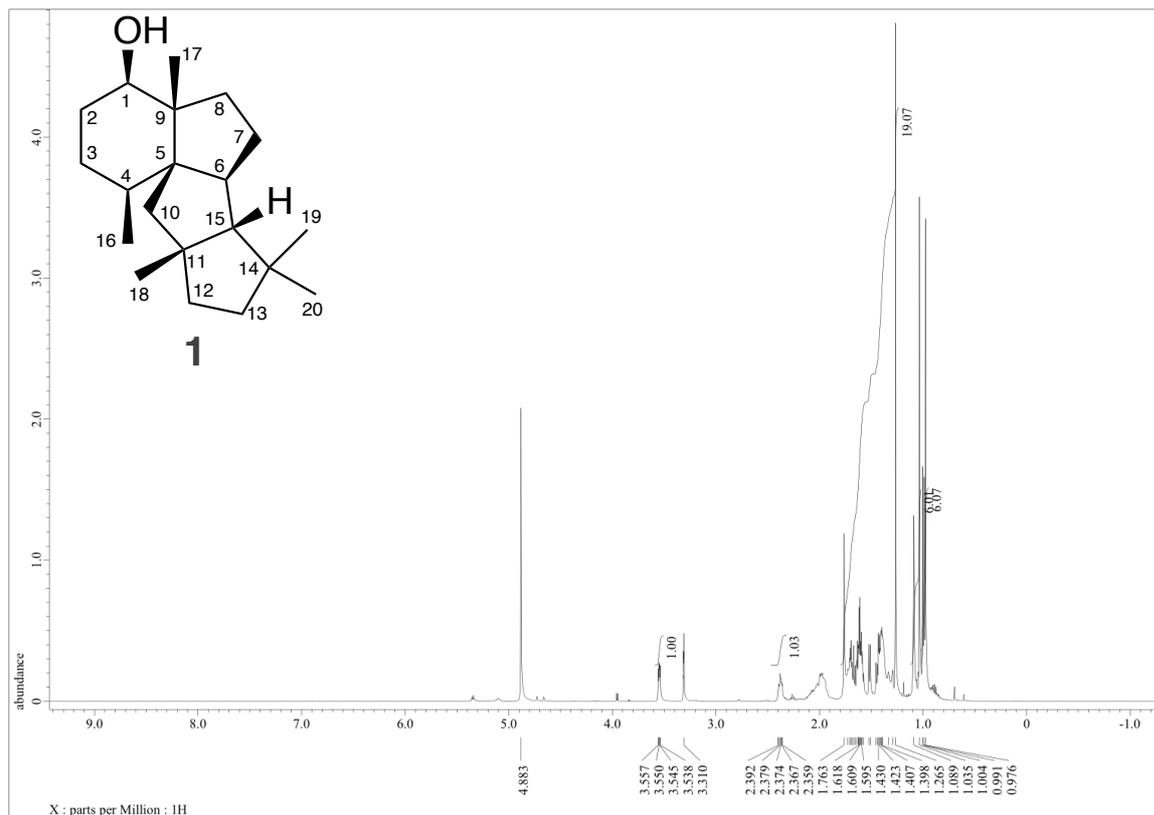
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in chloroform-*d* (1.2-1.5 ppm, 500 MHz, 25 °C).



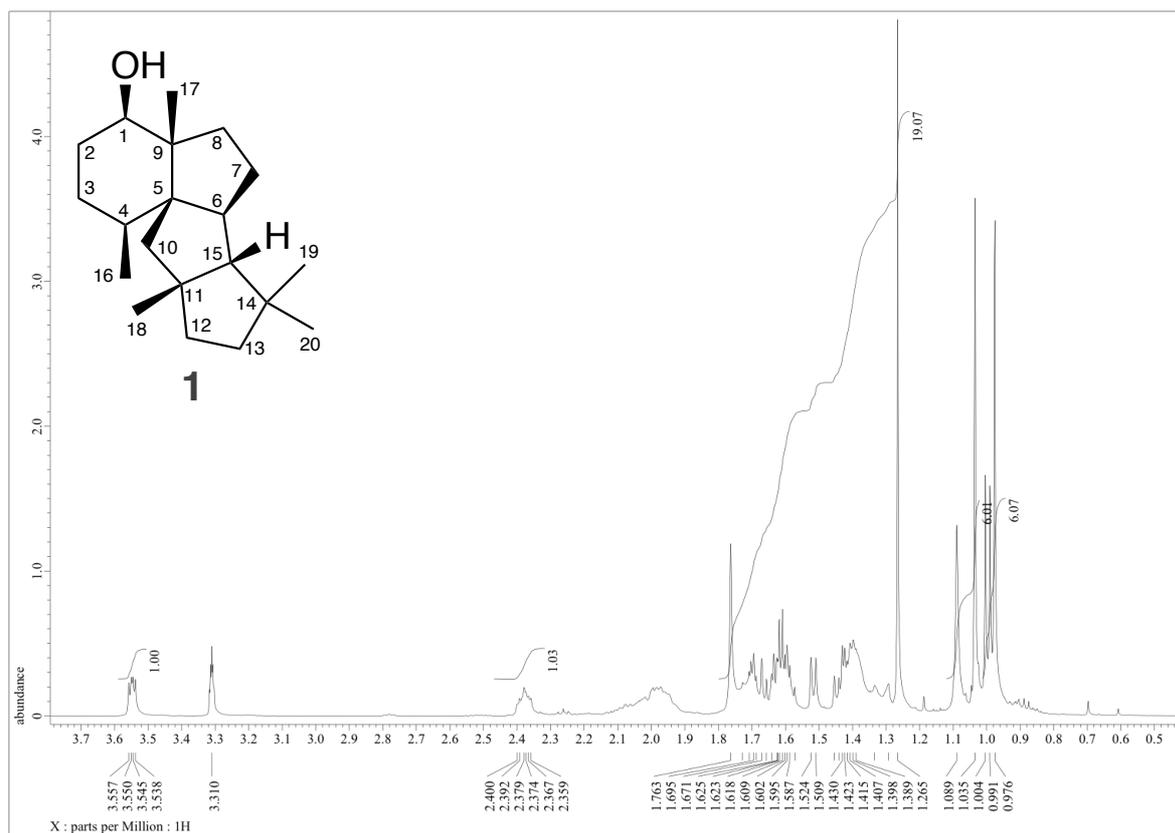
<sup>13</sup>C NMR spectrum of **1** in chloroform-*d* (125 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 77.16 ppm.



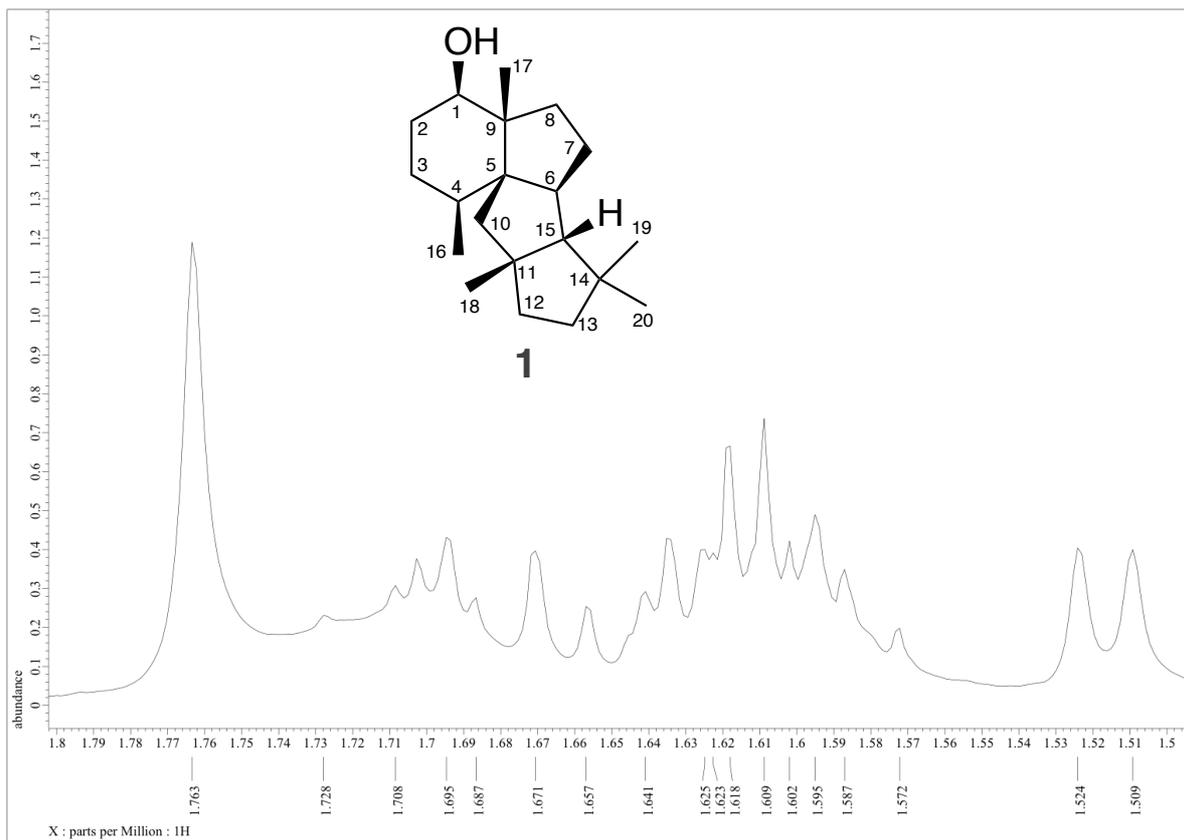
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** in chloroform-*d* (15-80 ppm, 125 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 77.16 ppm.



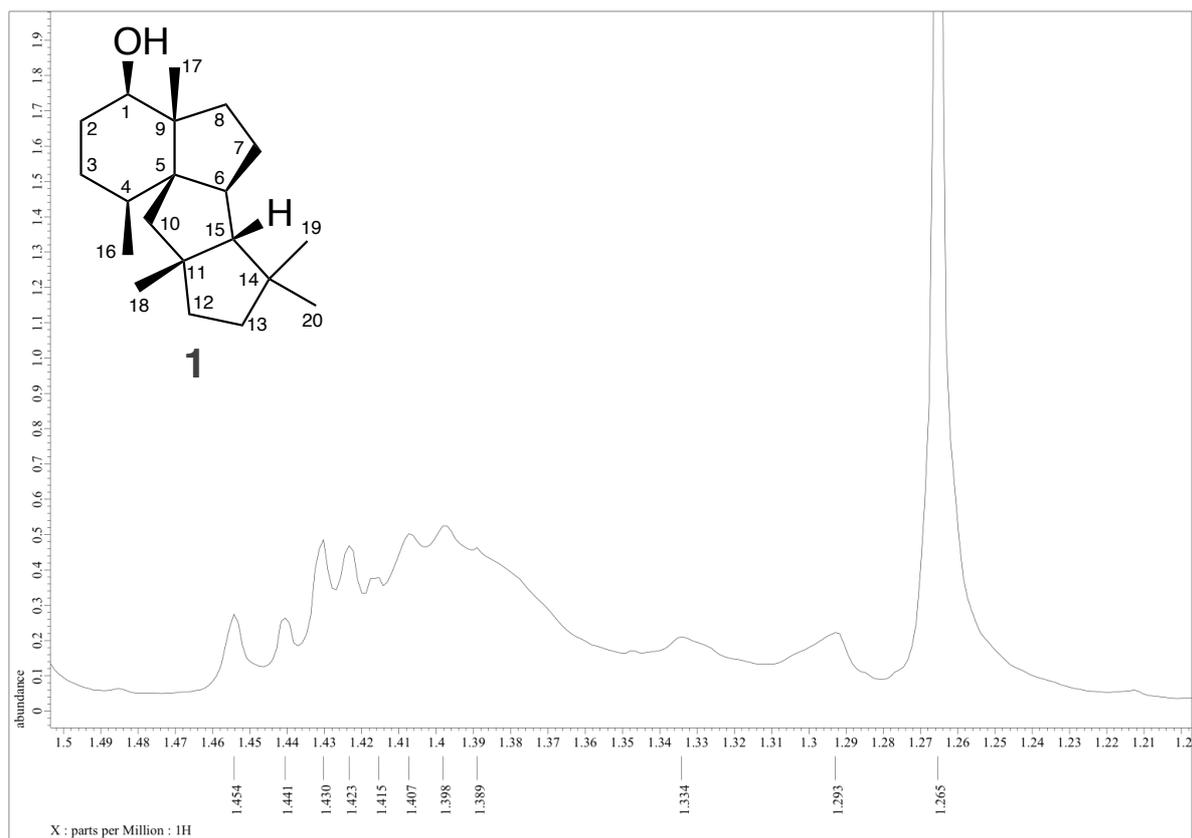
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in methanol- $d_4$  (500 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 3.31 ppm.



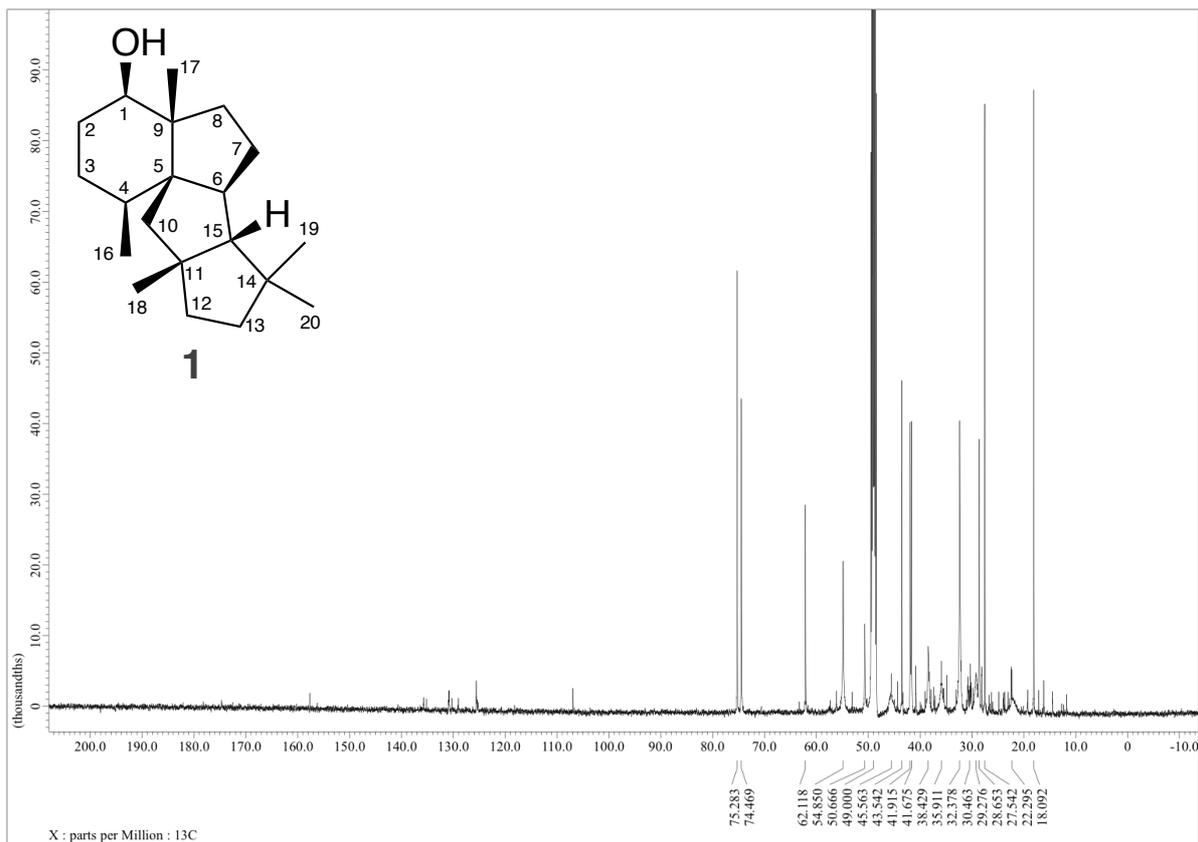
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** in methanol-*d*<sub>4</sub> (0.5-3.7 ppm, 500 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 3.31 ppm.



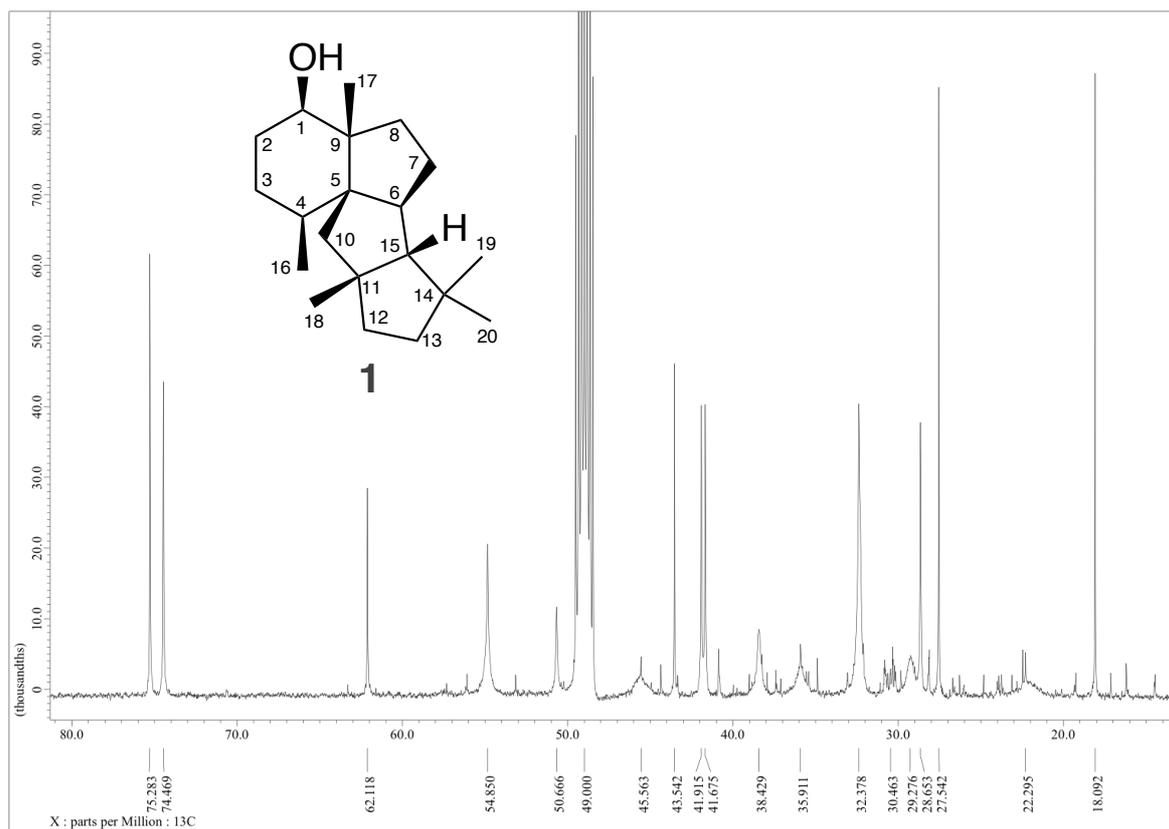
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (1.5-1.8 ppm, 500 MHz, 25 °C).



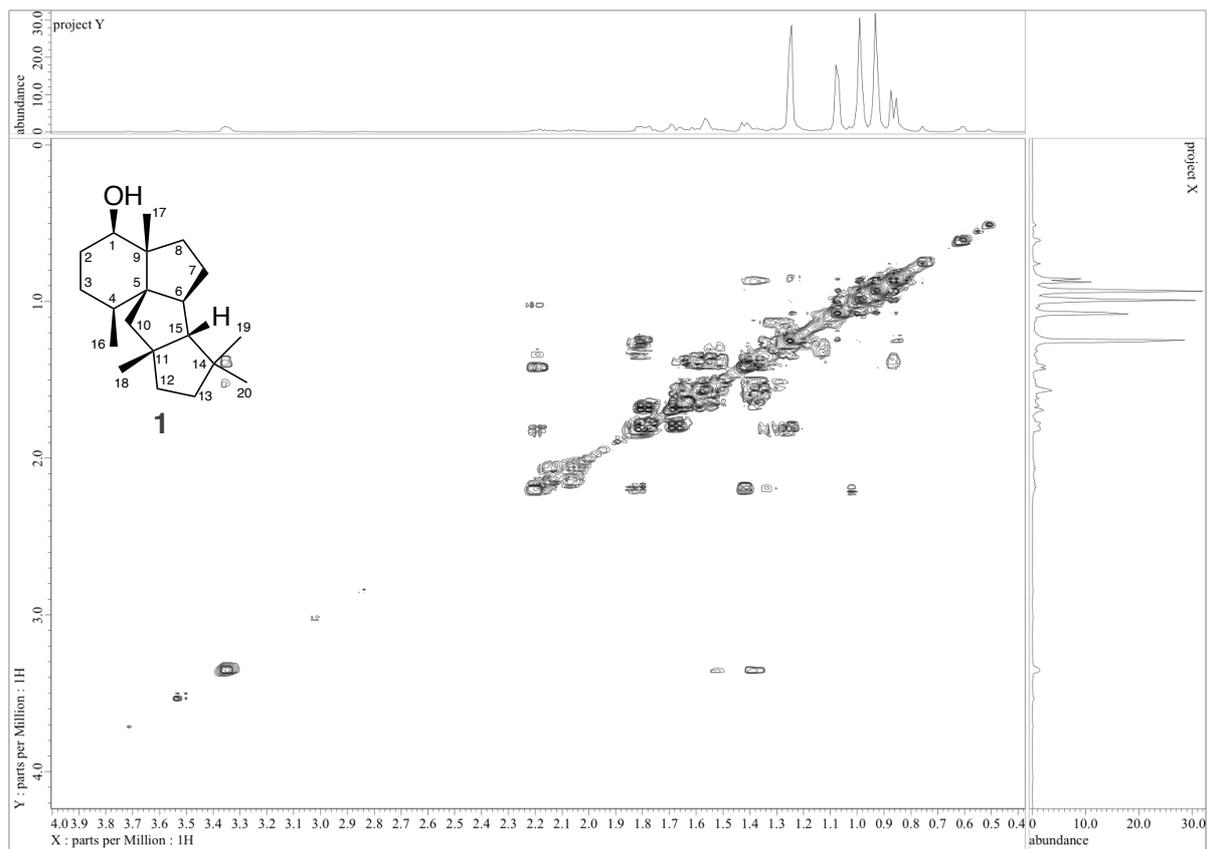
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in methanol- $d_4$  (1.2-1.5 ppm, 500 MHz, 25 °C).



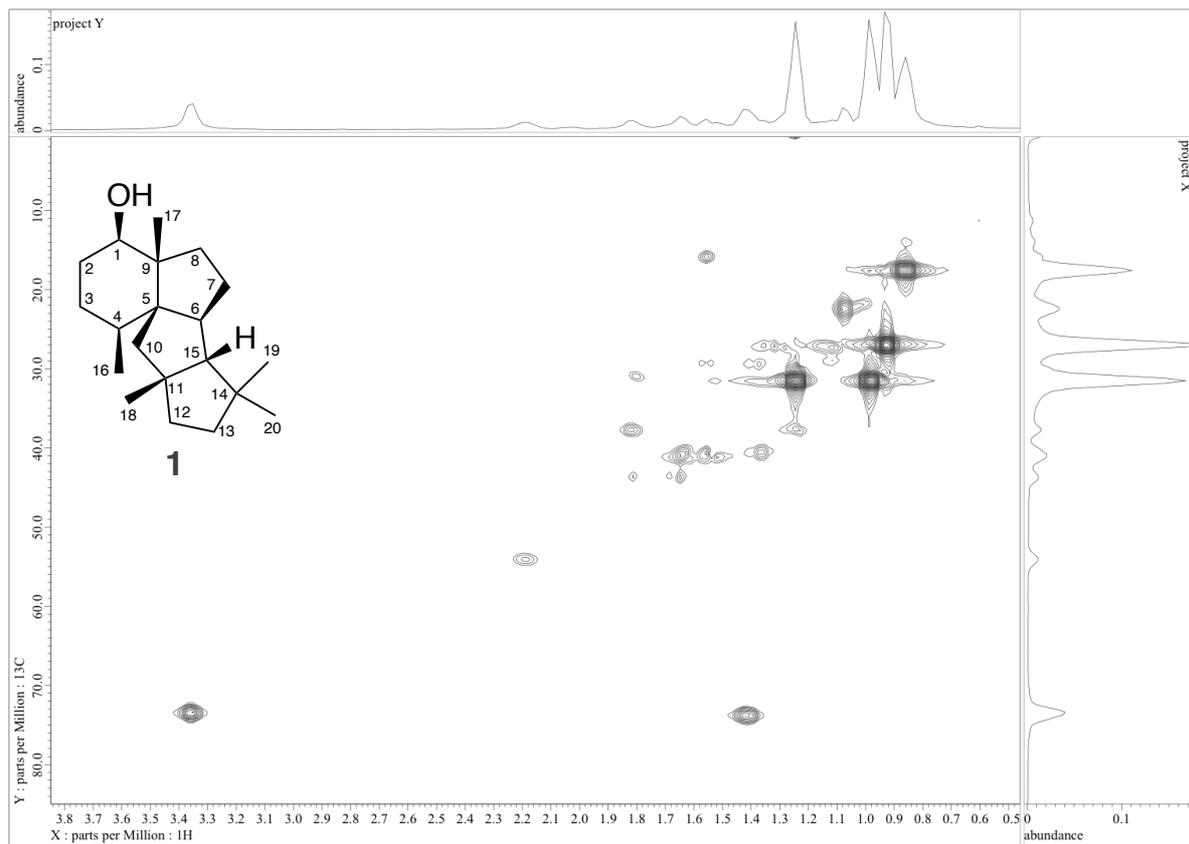
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** in methanol- $d_4$  (125 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 49.00 ppm.



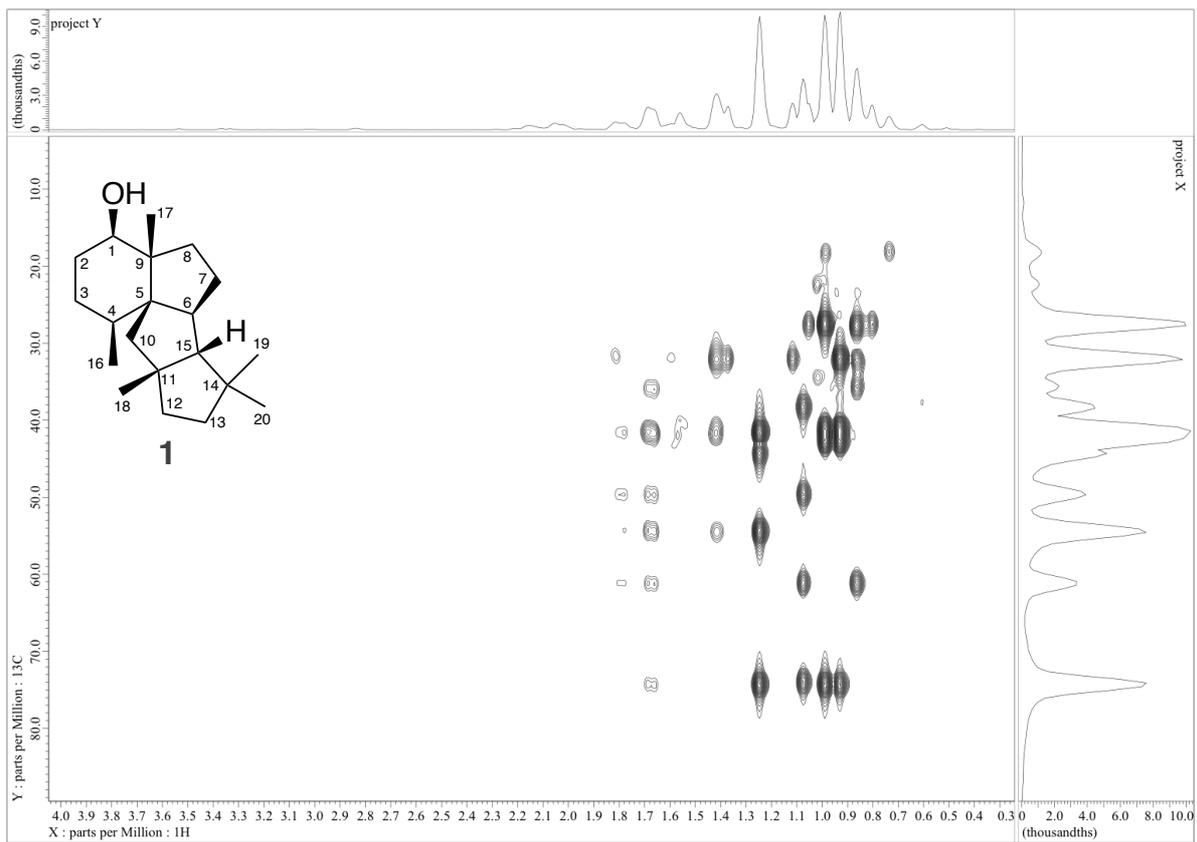
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** in methanol- $d_4$  (15-80 ppm, 125 MHz, 25 °C). The peak of the solvent is at 49.00 ppm.



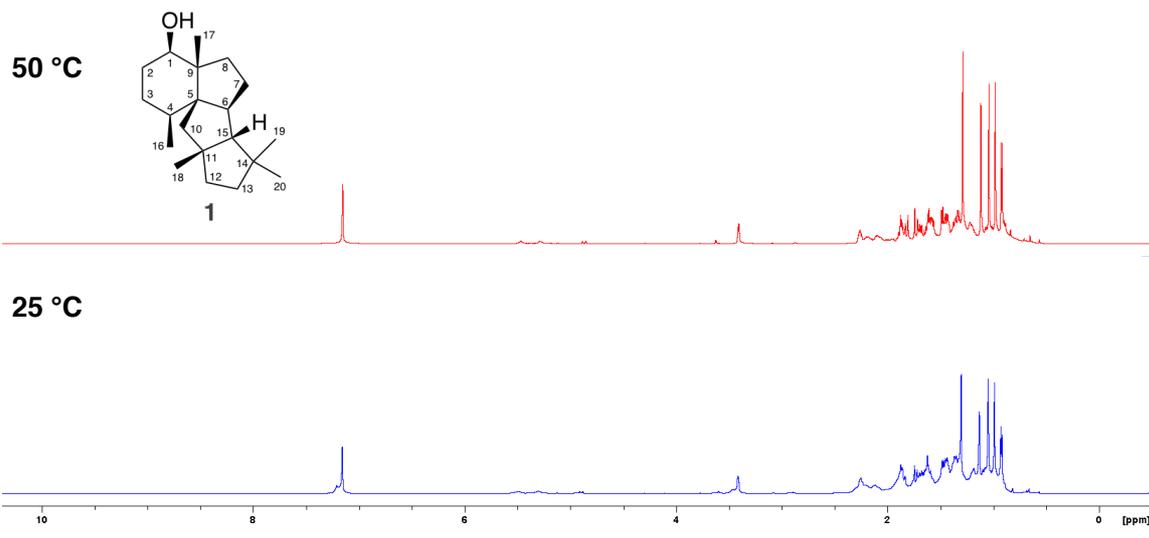
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (500 MHz, 25 °C).



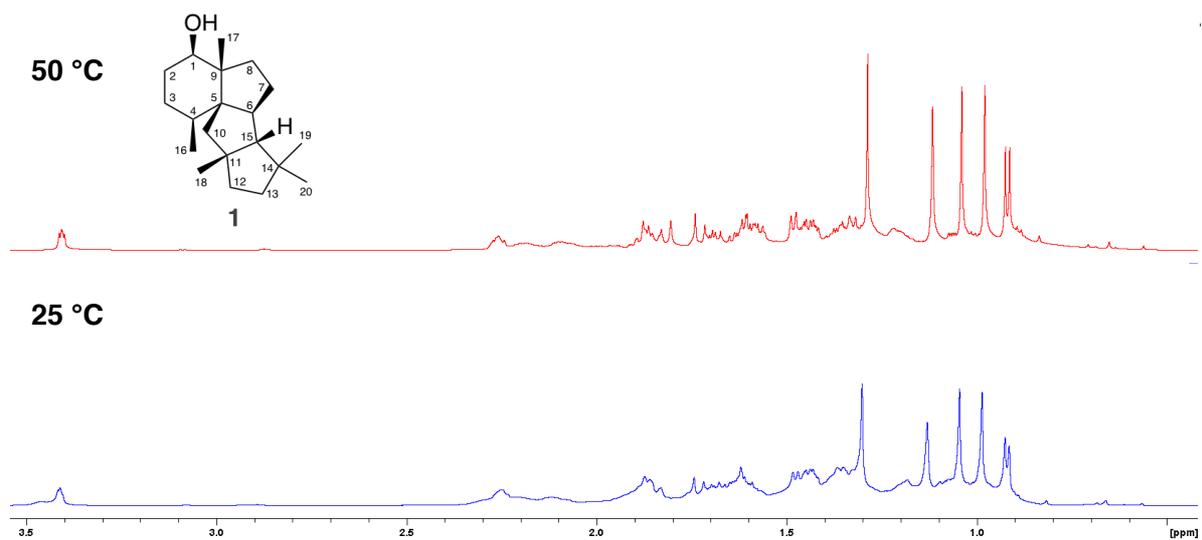
HMQC spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (500 MHz, 25 °C).



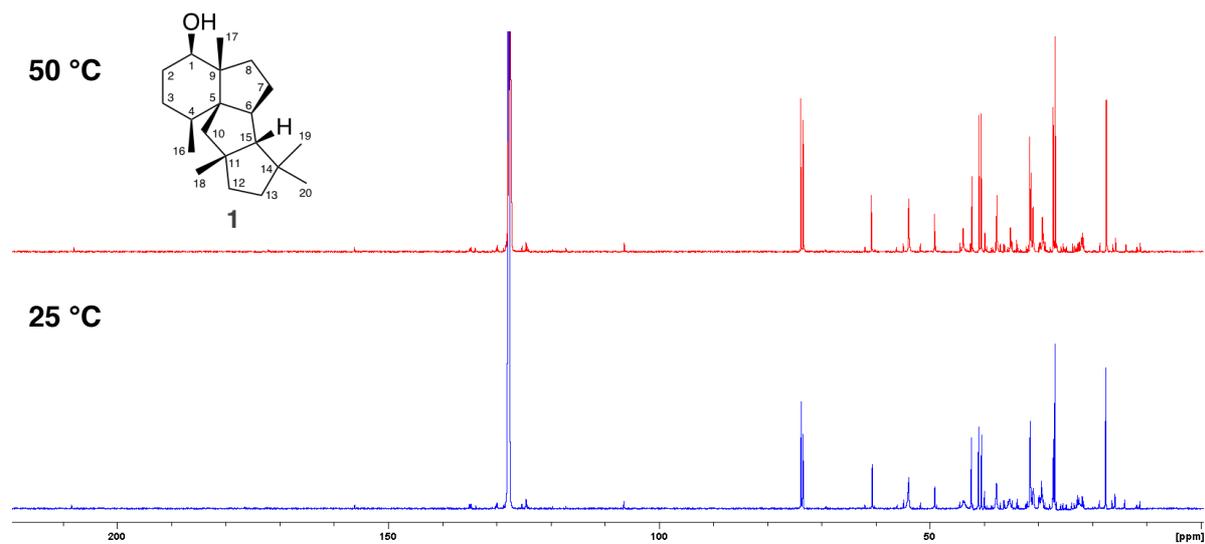
HMBC spectrum of **1** in benzene- $d_6$  (500 MHz, 25 °C).



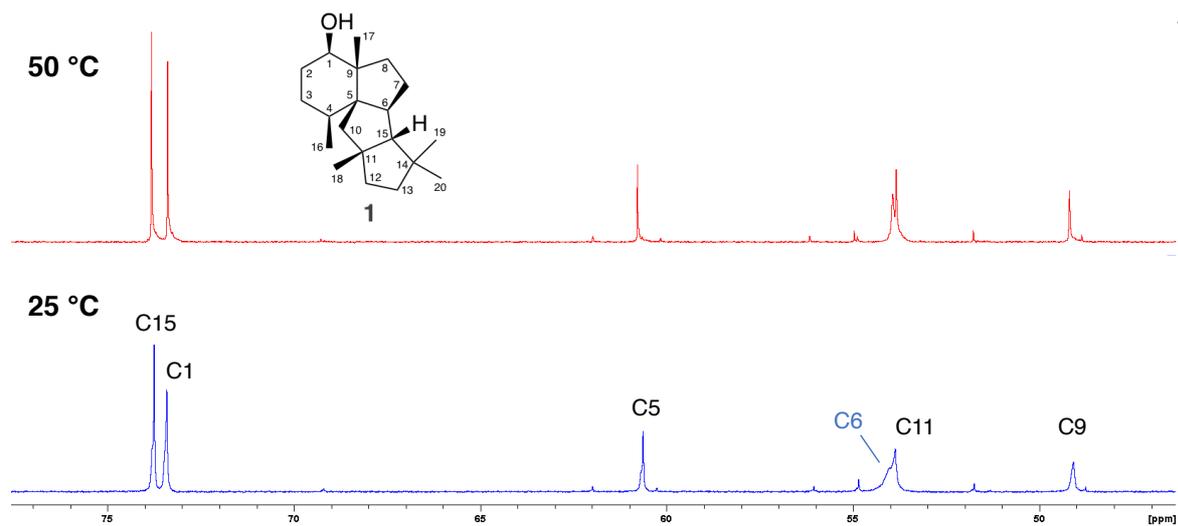
Comparison of  $^1\text{H}$  NMR spectra of **1**, which is measured at different temperature (600 MHz, in benzene- $d_6$ ).



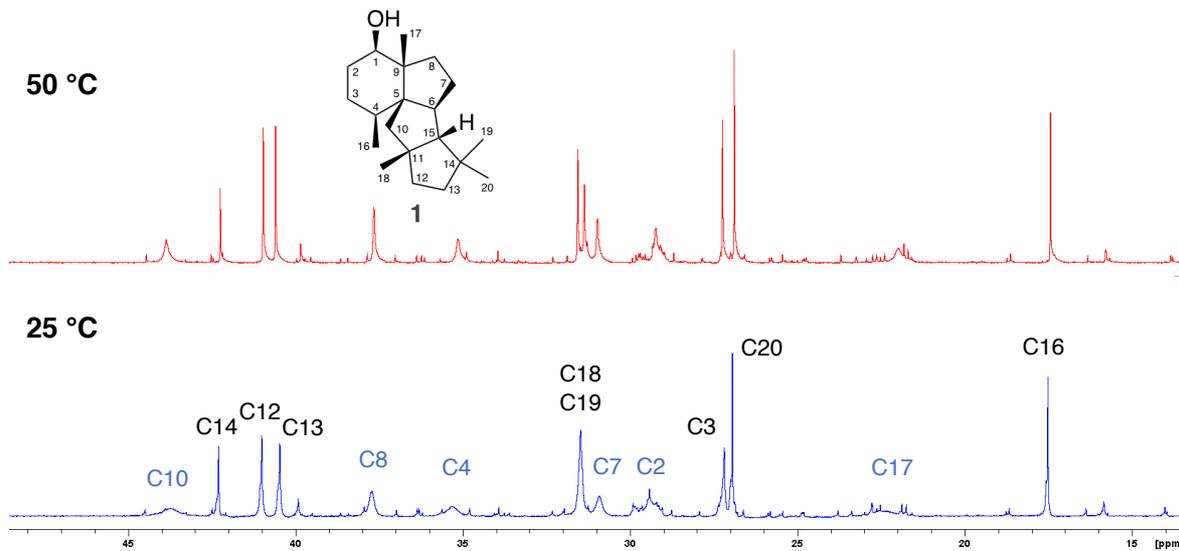
Comparison of <sup>1</sup>H NMR spectra of **1**, which is measured at different temperature (0.5-3.5 ppm, 600 MHz, in benzene-*d*<sub>6</sub>).



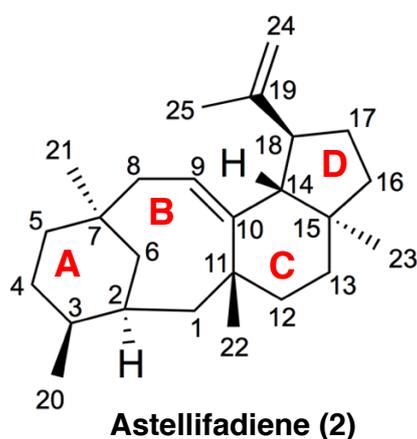
Comparison of <sup>13</sup>C NMR spectra of **1**, which is measured at different temperature (150 MHz, in benzene-*d*<sub>6</sub>).



Comparison of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **1**, which is measured at different temperature (47-77 ppm, 150 MHz, in benzene- $d_6$ ). The significantly broadened peaks are shown with blue letters.



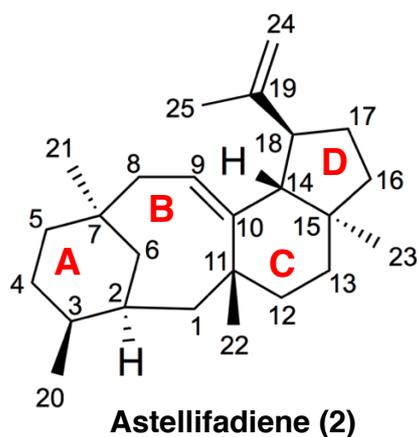
Comparison of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **1**, which is measured at different temperature (14-48 ppm, 150 MHz, in benzene- $d_6$ ). The significantly broadened peaks are shown with blue letter



NMR data for **2** in CDCl<sub>3</sub>

position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	39.3	1.14 (α) 2.11 (β)	1H 1H	dd ( <i>J</i> = 14.7, 6.8 Hz) dd ( <i>J</i> = 14.7, 12.5 Hz)	2, 6, 10, 11, 22 3, 11, 12	H-2	H-2, H-12β, H-20 H-2
2	34.8	1.89	1H	m	7	H-1α, H-1β, H-6α	H-1α, H-6β
3	36.3	1.59	1H	m			H-5α
4	26.2	1.32 (α) 1.50 (β)	1H 1H	m m			H-1β, H-8β
5	39.3	1.26 (α) 1.37 (β)	1H 1H	td ( <i>J</i> = 12.5, 4.0 Hz) m	4, 6, 7, 21		H-3, H-6α, H-21
6	38.4	0.84 (α) 2.04 (β)	1H 1H	m m		H-2	H-6α
7	33.3						
8	36.0	1.34 (α) 2.76 (β)	1H 1H	m dd ( <i>J</i> = 14.2, 8.5 Hz)	6, 7, 9, 10, 21 7, 9, 10, 21	H-9 H-9	H-1β, H-4β
9	117.8	5.07	1H	td ( <i>J</i> = 8.8, 1.7 Hz)	7, 8, 11, 14	H-8α, H-8β, H-14	H-8α, H-18, H-21
10	144.7						
11	41.7						
12	34.1	2.03 (α) 0.95 (β)	1H 1H	m ddd ( <i>J</i> = 13.6, 4.0, 2.8 Hz)	10, 11, 15	H-13α, H-13β	H-1α, H-13β, H-22
13	36.4	1.59 (α) 1.63 (β)	1H 1H	m td ( <i>J</i> = 13.0, 4.0 Hz)	11, 12, 14, 15, 23	H-12β H-12β	H-12β, H-14, H-22
14	52.7	2.34	1H	d ( <i>J</i> = 11.3 Hz)	9, 10, 11, 18, 23	H-9, H-18	H-13β, H-22, H-25
15	44.6						
16	39.5	1.35 1.50	1H 1H	m m			
17	28.9	1.44 2.01	1H 1H	m m	15, 19 14, 15	H-18 H-18	
18	45.2	2.60	1H	td ( <i>J</i> = 10.8, 6.8 Hz)	14, 17, 19, 24, 25	H-14, H-17α, H-17β	H-9, H-23, H-24, H-25
19	148.6						
20	19.6	0.85	3H	d ( <i>J</i> = 6.8 Hz)	2, 4		H-1α
21	30.6	0.74	3H	s	6, 7, 8		H-5α, H-9
22	30.1	1.18	3H	s	10, 11, 12		H-12β, H-14
23	19.1	0.82	3H	s	13, 14, 15		H-18
24	109.4	4.67	2H	brs	18, 19, 25	H-25	H-18, H-25
25	19.8	1.66	3H	s	18, 19, 24	H-24	H-14, H-18, H-24

<sup>1</sup>H NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 125 MHz (in CDCl<sub>3</sub>)

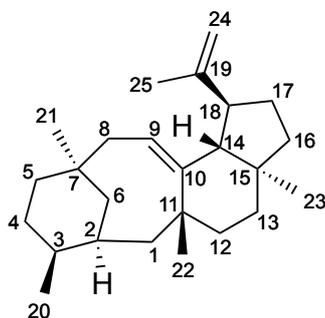


NMR data for **2** in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	39.7	1.18 (α) 2.17 (β)	1H 1H	dd ( <i>J</i> = 15.1, 6.7 Hz) dd ( <i>J</i> = 15.1, 12.9 Hz)	2, 6, 10, 11, 12, 22 2, 11, 12	H-2 H-2	H-2, H-20 H-4β, H-8β
2	35.2	1.88	1H	m		H-1α, H-1β, H-6α	H-1α, H-6β, H-12α
3	36.5	1.51	1H	m			H-2
4	26.4	1.29 (α) 1.53 (β)	1H 1H	m m			H-1β, H-8β
5	39.7	1.28	1H	m			
		1.36	1H	m			
6	38.8	0.90 (α) 2.19 (β)	1H 1H	m brd ( <i>J</i> = 13.9 Hz)		H-2	H-1α, H-2, H-12α
7	33.5						
8	36.4	1.43 (α) 2.83 (β)	1H 1H	m dd ( <i>J</i> = 13.5, 8.4 Hz)	7, 9, 10, 21 7, 9, 10, 21	H-9 H-9	H-1β, H-4β
9	118.4	5.37	1H	brt ( <i>J</i> = 8.4 Hz)	7, 8, 10, 11, 14	H-8α, H-8β	H-8α, H-18, H-21
10	145.0						
11	42.0						
12	34.5	2.06 (α) 0.88 (β)	1H 1H	td ( <i>J</i> = 13.9, 5.1 Hz) m	11, 22	H-13β	H-2, H-6α, H-13α
13	36.7	1.58 (α) 1.63 (β)	1H 1H	m td ( <i>J</i> = 12.9, 3.9 Hz)	11, 12, 14, 15, 23 12, 14, 15, 23	H-12α	H-12α H-12β, H-14, H-22
14	53.1	2.42	1H	d ( <i>J</i> = 11.2 Hz)	9, 10, 11, 15, 18, 19, 23	H-18	H-13β, H-15β, H-22, H-24b, H-25
15	44.8						
16	39.7	1.32	1H	m	15, 17, 23		H-14
		1.49	1H	m			
17	29.2	1.49	1H	m		H-18	
		2.01	1H	m	14, 18	H-16β, H-18	H-18
18	45.7	2.72	1H	td ( <i>J</i> = 10.7, 7.6 Hz)	14, 17, 19, 24, 25	H-14, H-17α, H-17β	H-9, H-17α, H-23, H-24b, H-25
19	148.3						
20	19.7	0.88	3H	d ( <i>J</i> = 6.7 Hz)	2, 3, 4		H-1α
21	30.9	0.88	3H	s	6, 7		H-9
22	30.2	1.20	3H	s	10, 11, 12		H-13β, H-14, H-24b
23	19.4	0.91	3H	s	14, 15		H-18
24	110.2	4.85 (a) 4.88 (b)	1H 1H	brs brs	18, 19, 25	H-25	H-25 H-14, H-18, H-22
25	19.9	1.67	3H	s	18, 19, 24	H-24	H-14, H-18, H-24a

<sup>1</sup>H NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 125 MHz (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)

NMR data for **2** in CDCl<sub>3</sub> (125 MHz)  
 (obtained from [1-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-sodium acetate-feeding experiment)

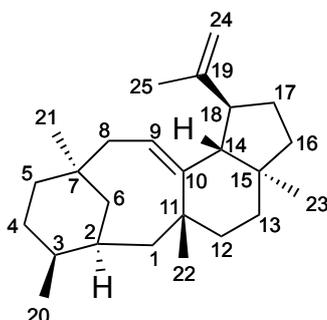


position	<sup>13</sup> C		β-deuterium isotope shift ( <sup>2</sup> Δ <sub>β</sub> , ppm)		
	δ (ppm)	enrichment	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>
1	39.3	●	-0.09	—	—
2	34.8				
3	36.3	●	-0.11	-0.24	-0.33
4	26.2				
5	39.3	●	—	—	—
6	38.4				
7	33.3	●	-0.09	-0.16	-0.24
8	36.0				
9	117.8	●	—	—	—
10	144.7				
11	41.7	●	-0.08	-0.14	-0.22
12	34.1				
13	36.4	●	—	—	—
14	52.7				
15	44.6	●	-0.08	-0.15	-0.23
16	39.5				
17	28.9	●	-0.11	—	—
18	45.2				
19	148.7	●	-0.06 -0.08	-0.19	—
20	19.6				
21	30.6				
22	30.1				
23	19.1				
24	109.4				
25	19.8				

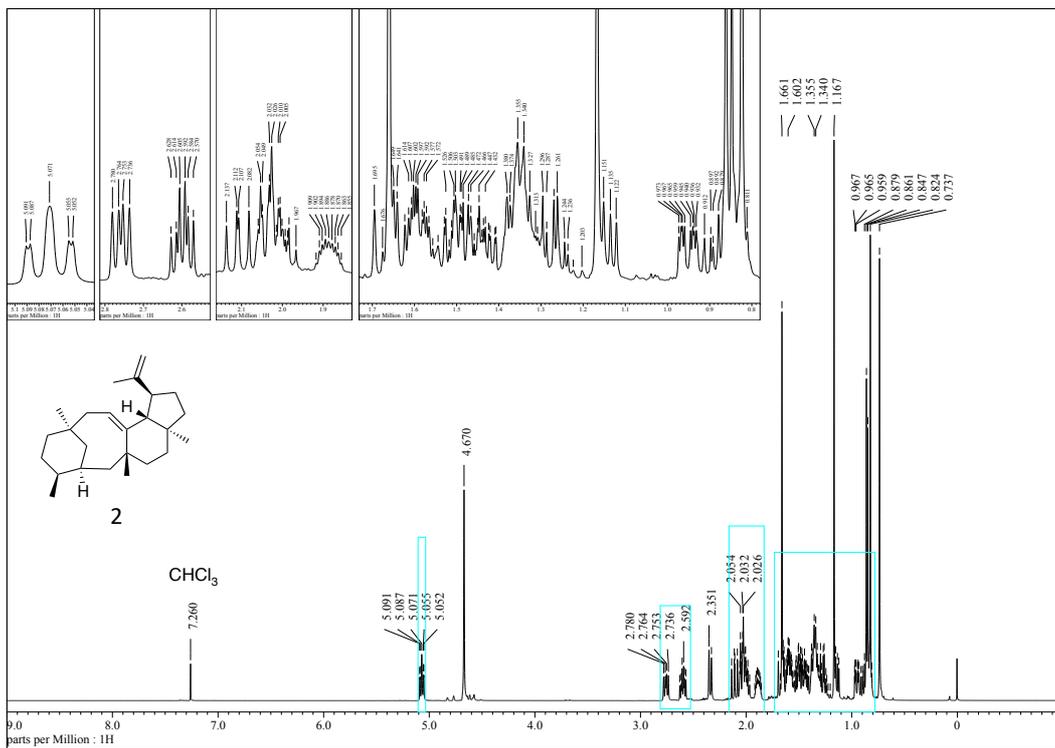
NMR data for **2** in CDCl<sub>3</sub>(225 MHz)

(obtained from [2-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-sodium acetate-feeding experiment)

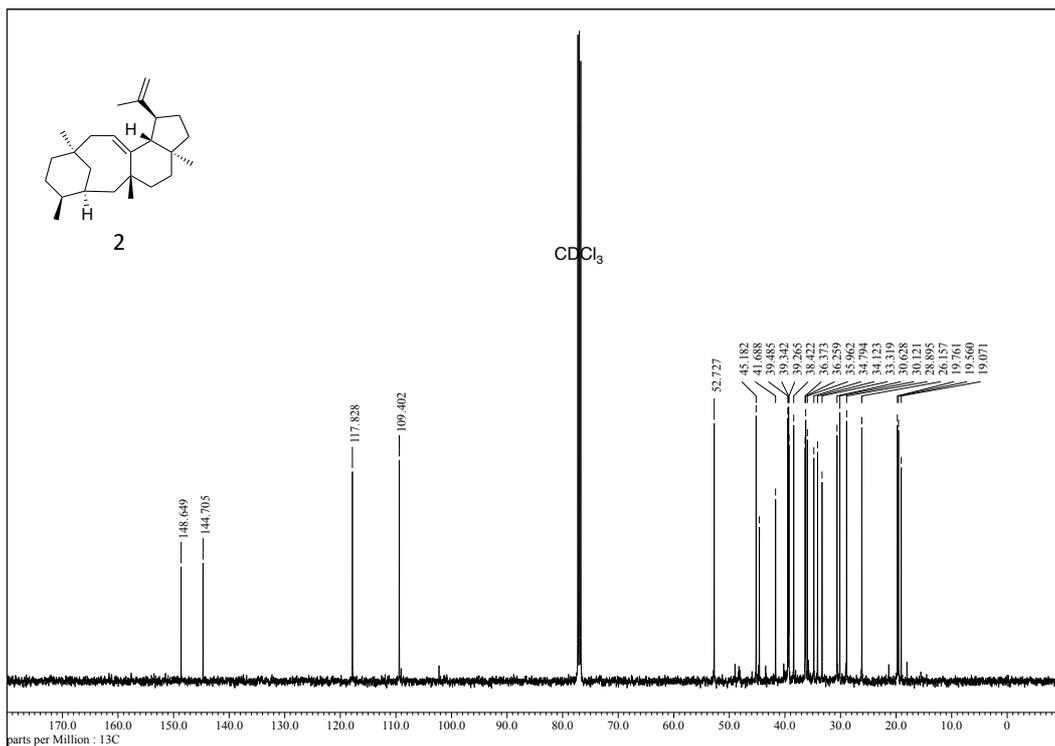
\*: interchangeable



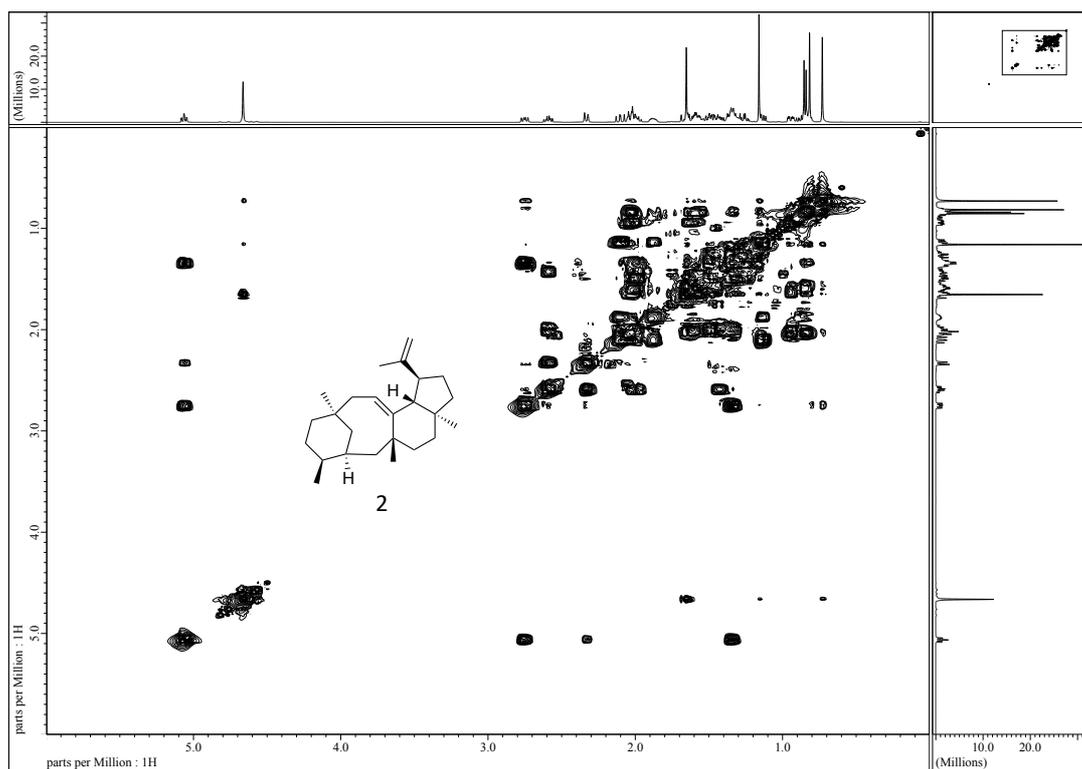
position	<sup>13</sup> C		α-deuterium isotope shift ( <sup>1</sup> Δ <sub>δ</sub> , ppm)		
	δ (ppm)	enrichment	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>
1	39.4*				
2	34.8	●	-0.51	-	-
3	36.3				
4	26.2	●	-0.38	-0.80	-
			-0.42		
5	39.3*				
6	38.4	●	-0.46	-	-
7	33.3				
8	36.0	●	-0.32	-0.71	-
			-0.40		
9	117.8				
10	144.7	●	-	-	-
11	41.7				
12	34.1	●	-0.32	-0.76	-
			-0.43		
13	36.4				
14	52.8	●	-0.47	-	-
15	44.6				
16	39.5	●	-0.39	-0.80	-
			-0.41		
17	28.9				
18	45.2	●	-0.42	-	-
19	148.7				
20	19.5	●	-0.31	-0.61	-0.92
21	30.6	●	-0.32	-0.64	-0.96
22	30.1	●	-0.31	-0.61	-0.92
23	19.1	●	-0.30	-0.60	-0.90
24	109.4	●	-0.28	-0.56	-
25	19.7	●	-0.28	-0.56	(overlapped)



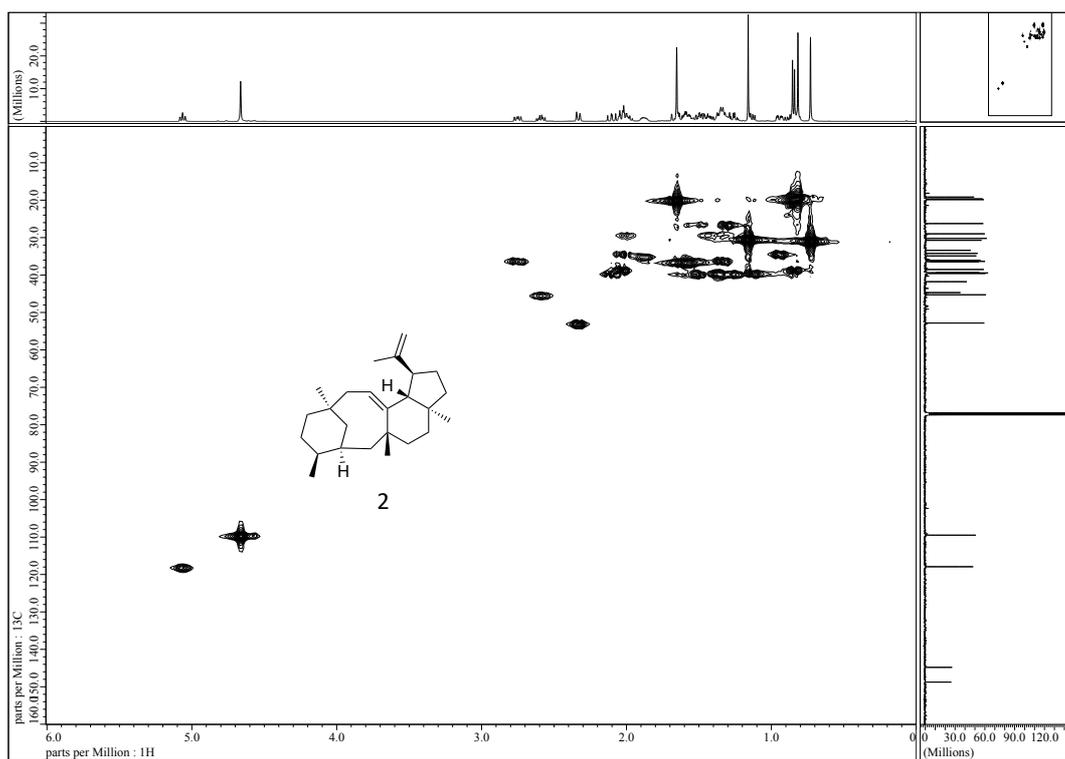
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2** in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)



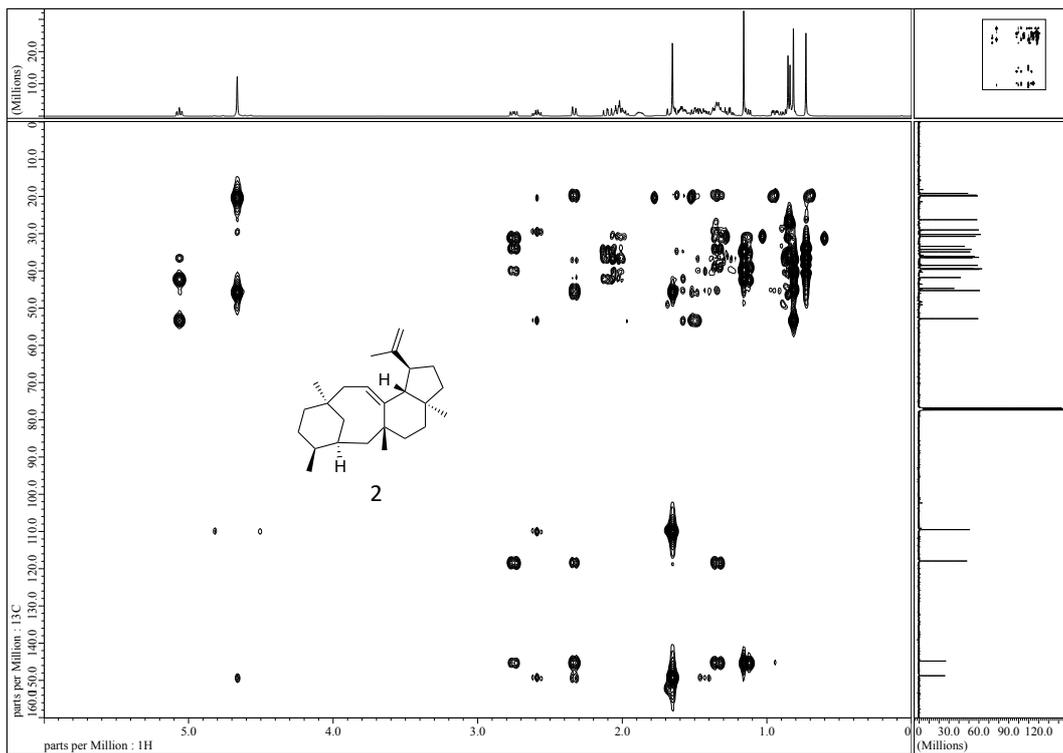
<sup>13</sup>C NMR spectrum of **2** in CDCl<sub>3</sub>(125 MHz)



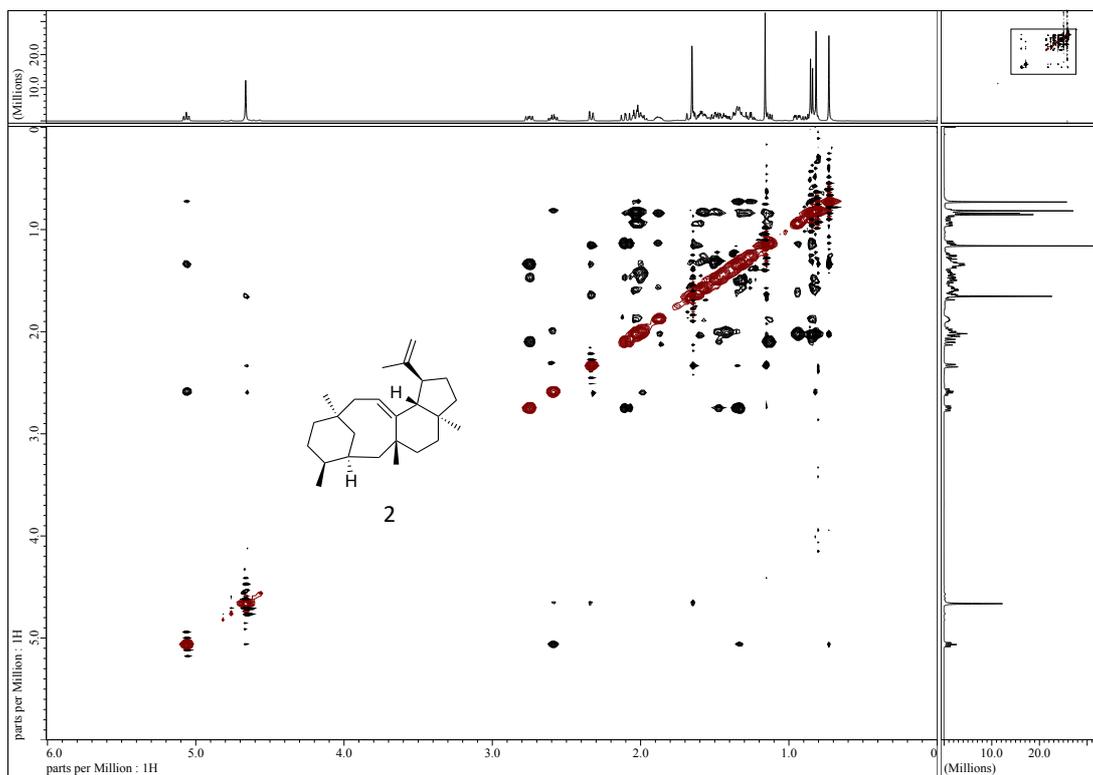
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of **2** in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

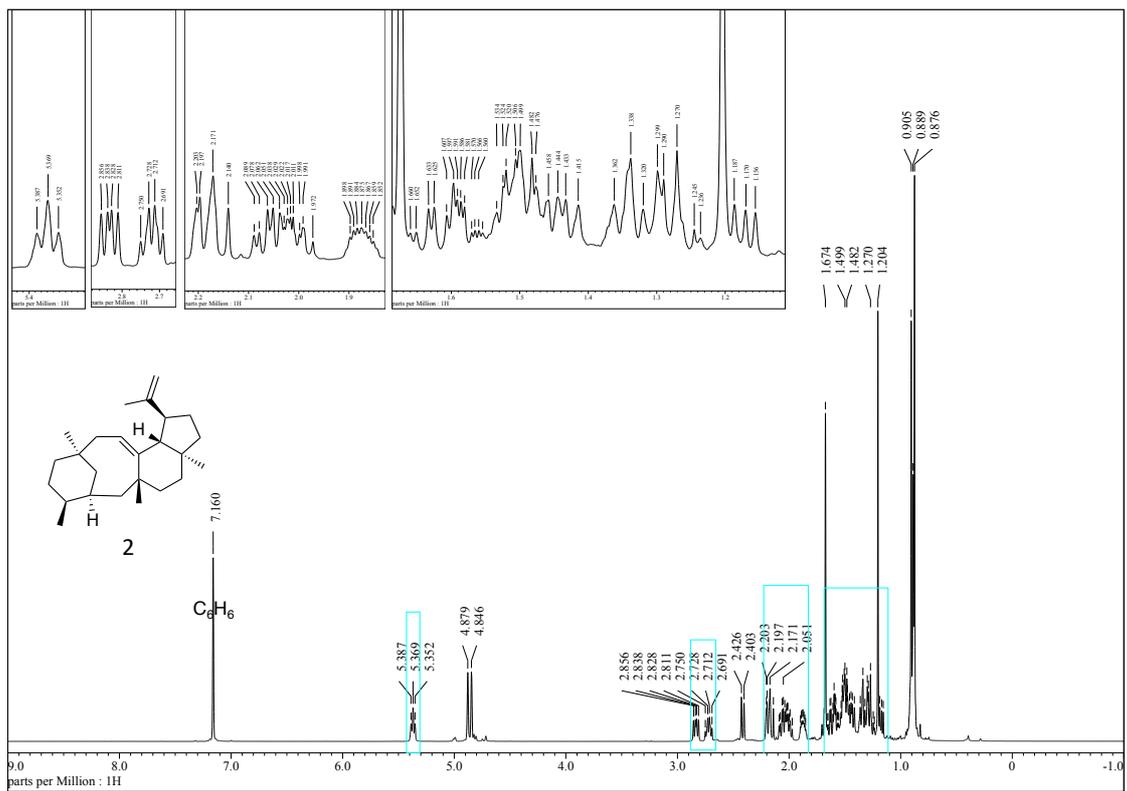


HMQC spectrum of **2** in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

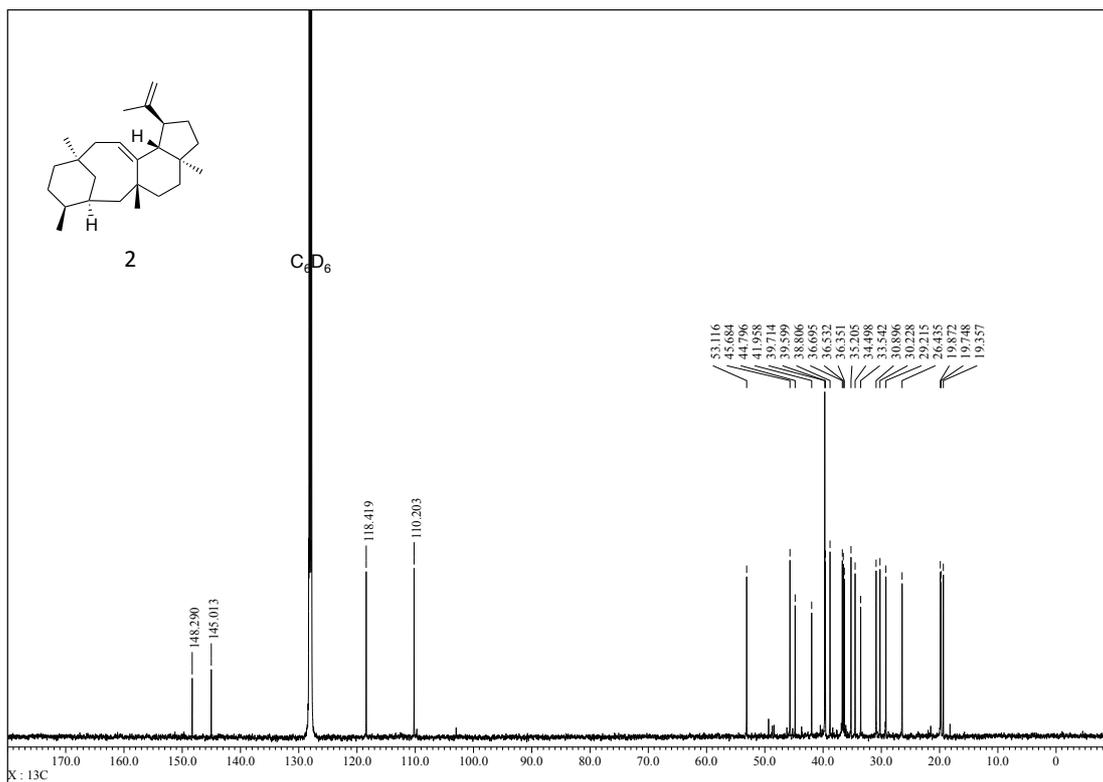


HMBC spectrum of **2** in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

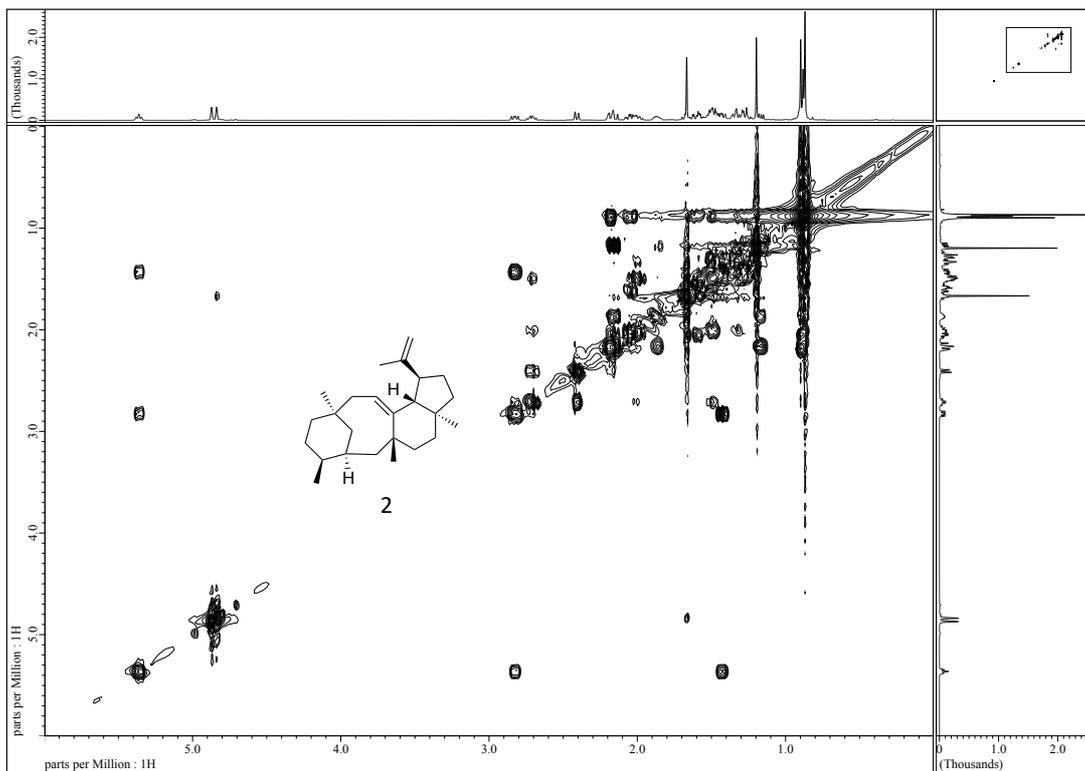




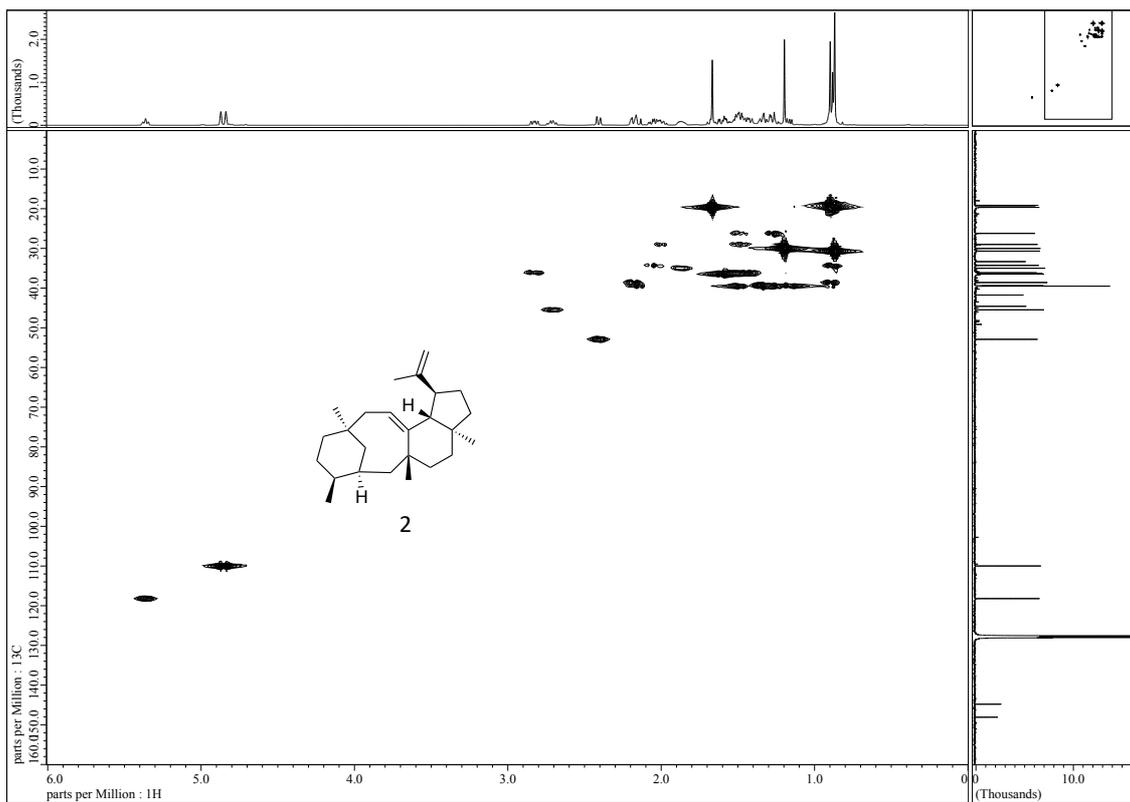
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2** in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (500 MHz)



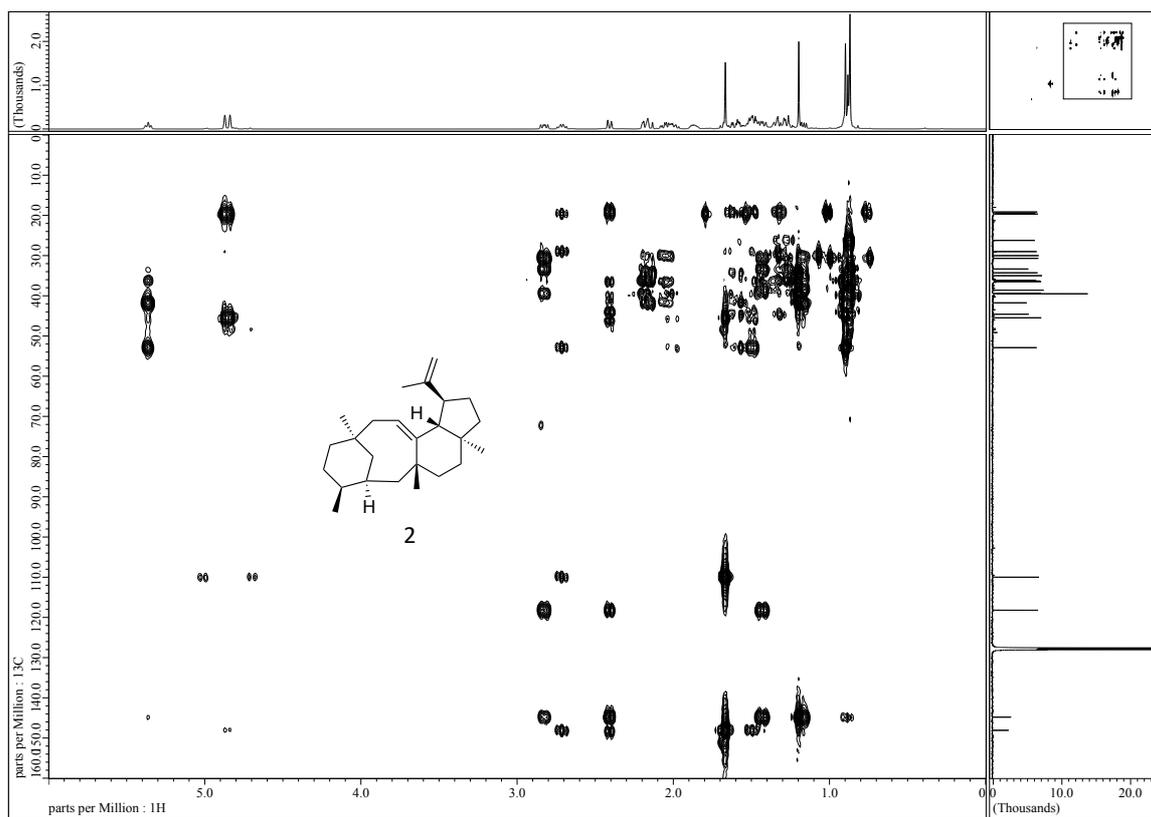
<sup>13</sup>C NMR spectrum of **2** in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (125 MHz)



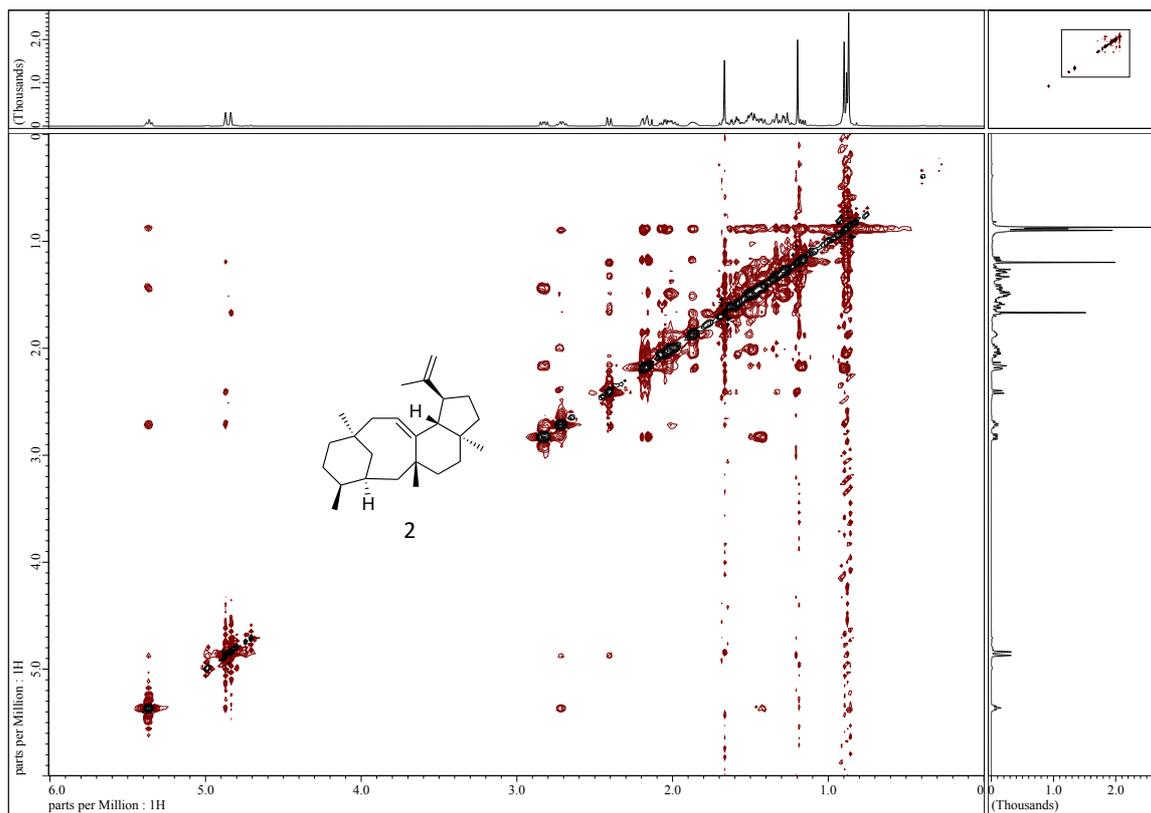
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of **2** in  $\text{C}_6\text{D}_6$  (500 MHz)



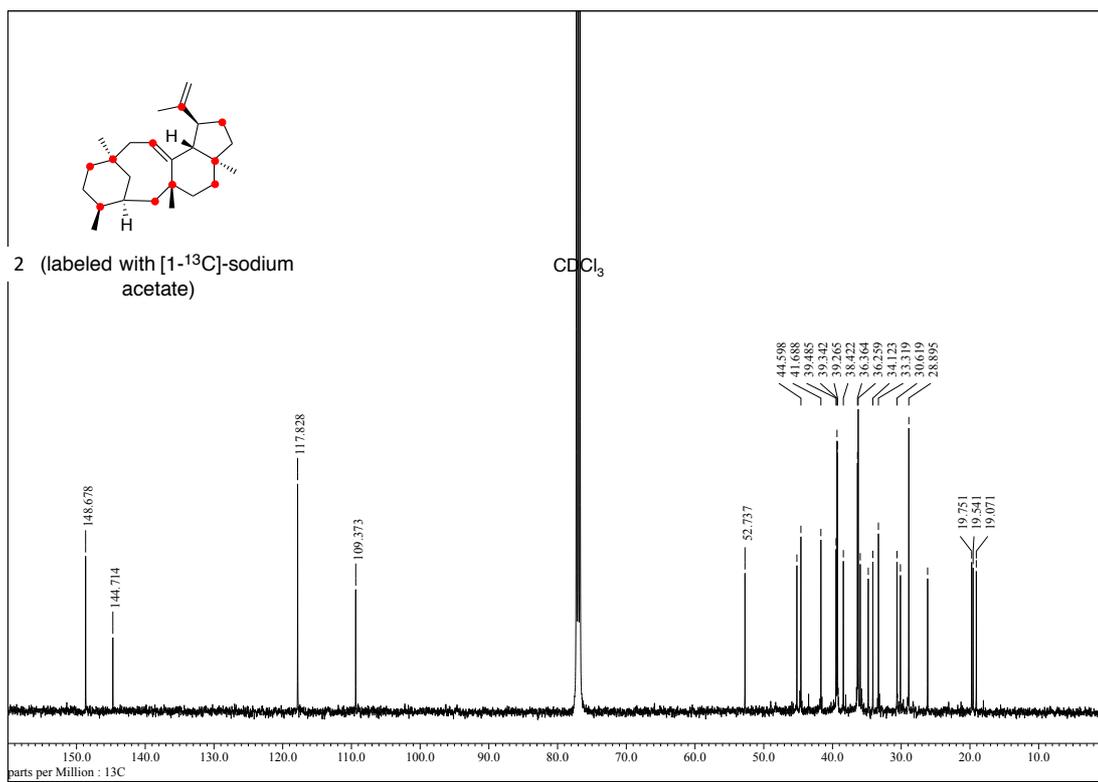
HMQC spectrum of **2** in  $C_6D_6$  (500 MHz)



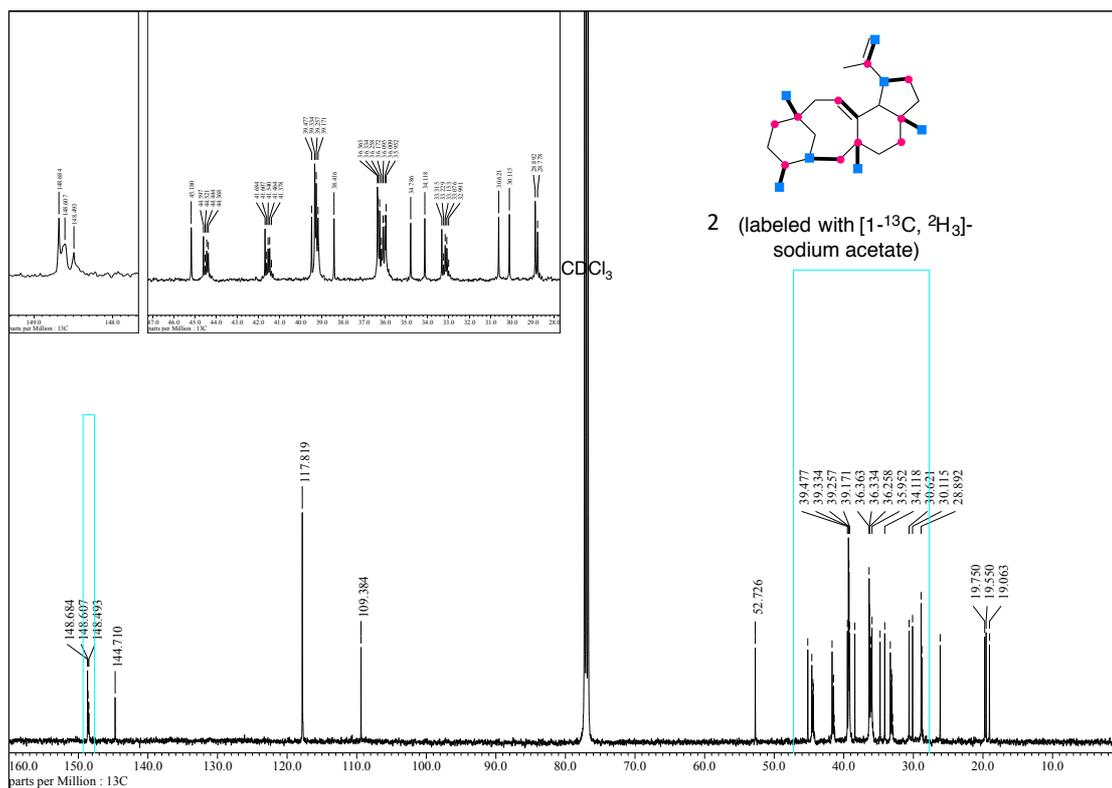
HMBC spectrum of **2** in  $\text{C}_6\text{D}_6$  (500 MHz)



NOESY spectrum of **2** in  $C_6D_6$  (500 MHz)

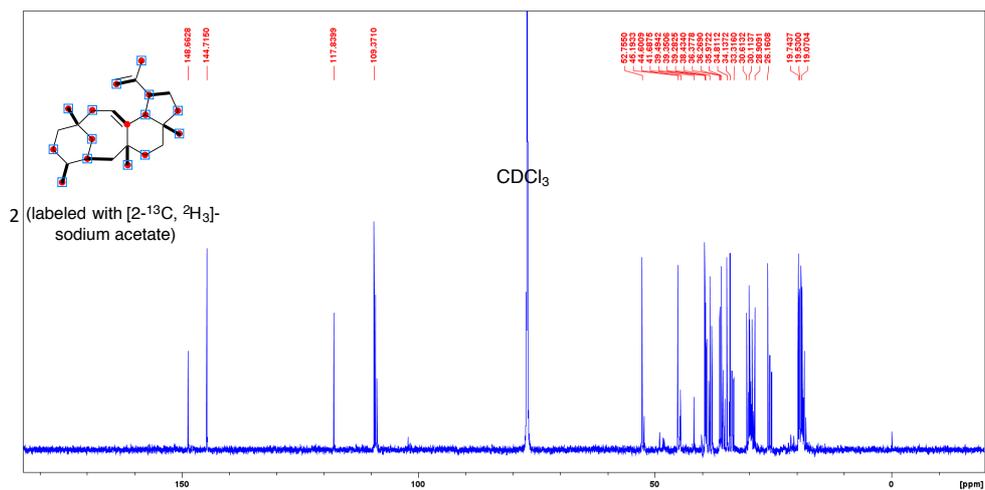


<sup>13</sup>C NMR spectrum of <sup>13</sup>C-labeled **2**, obtained from [1-<sup>13</sup>C]-sodium acetate-feeding experiment, in CDCl<sub>3</sub>(125 MHz)

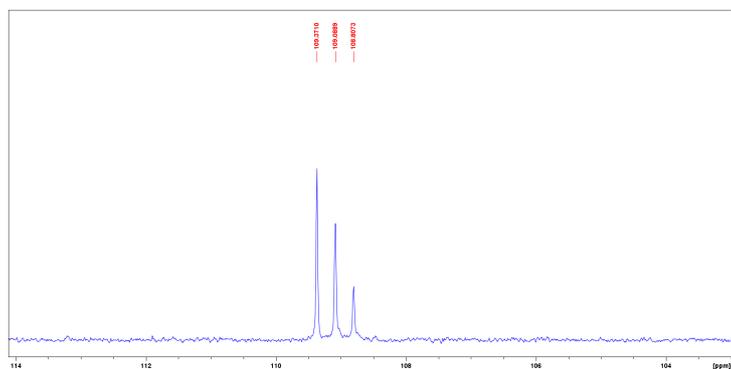


<sup>13</sup>C NMR spectrum of <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H-labeled **2**, obtained from [1-<sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-sodium acetate-feeding experiment, in CDCl<sub>3</sub>(125 MHz)

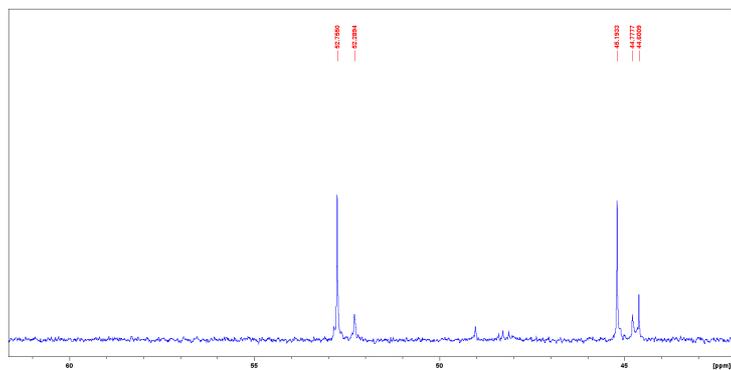
(A)



(B)



(C)



(次ページへ続く)



## 参考文献

- (1) (a) *Dictionary of Natural Products, Vol. 7* (Ed.: J. Buckingham), Chapman & Hall, London, **1994**. (b) Buckingham, J.; Cooper, C. M.; Purchase, R. *Natural Products Desk Reference*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2016**, pp. 235.
- (2) Meshnick, S. R. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1655–1660.
- (3) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *9*, 2325-2327.
- (4) Roth, B. L.; Baner, K.; Westkaemper, R.; Siebert, D.; Rice, K. C.; Steinberg, S.; Ernsberger, P.; Rothman, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *18*, 11934-11939.
- (5) Popjak, G.; Cornforth, J. W. *Biochem. J.* **1966**, *101*, 553–568.
- (6) Christianson, D. W. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412.
- (7) Gao, Y.; Honzatko, R. B.; Peters, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1153–1175.
- (8) Shishova, E. Y.; Di Costanzo, L.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1941–1951.
- (9) Baer, P.; Rabe, P.; Fischer, K.; Citron, C. A.; Klapschinski, T. A.; Groll, M.; Dickschat, J. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 7652–7656.
- (10) Toyomasu, T.; Tsukahara, M.; Kaneko, A.; Niida, R.; Mitsunashi, W.; Dairi, T.; Kato, N.; Sassa, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 3084–3088.
- (11) Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594–597.
- (12) (a) Chen, M.; Harris, G. G.; Pemberton, T. A.; Christianson, D. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *41*, 27-37. (b) Chen, M.; Chou, W. K. W.; Toyomasu, T.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 889-899.
- (13) Ziemert, N.; Alanjary, M.; Weber, T. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 988–1005.
- (14) Jin, F. J.; Maruyama, J.; Juvvadi, P. R.; Arioka, M.; Kitamoto, K. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *239*, 79–85.
- (15) (a) Matsuda, Y.; Wakimoto, T.; Mori, T.; Awakawa, T.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15326–15336. (b) Matsuda, Y.; Iwabuchi, T.; Wakimoto, T.; Awakawa, T.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3393–3401. (c) Liu, C.; Tagami, K.; Minami, A.; Matsumoto, T.; Frisvad, J. C.; Suzuki, H.; Ishikawa, J.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 5748–5752.
- (16) Fujii, T.; Yamaoka, H.; Gomi, K.; Kitamoto, K.; Kumagai, C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1869-1874.
- (17) (a) Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Hitora, Y.; Takada, K.; Matsunaga, S.; Rissanen, K.; Fujita, M. *Nature* **2013**, *495*, 461–466. (b) Hoshino, M.; Khutia, A.; Xing, H.; Inokuma, Y.; Fujita, M. *IUCrJ* **2016**, *3*, 139-151. (c) Urban, S.; Brkljača, R.; Hoshino, M.; Lee, S.; Fujita, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 2678-2682. (d) Kersten, R. D.; Lee, S.; Fujita, D.; Pluskal, T.; Kram, S.; Smith, J. E.; Iwai,

T.; Noel, J. P.; Fujita, M.; Weng, J. -K. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16838–16844. (e) Wada, N.; Kersten, R.; Iwai, T.; Lee, S.; Sakurai, F.; Kikuchi, T.; Fujita, D.; Fujita, M.; Weng, J.-K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 3671–3675.

(18) (a) Roncal, T.; Cordobés, S.; Ugalde, U.; He, Y.; Sterner, O. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6799–6802. (b) Du, L.; Li, D.; Zhu, T.; Cai, S.; Wang, F.; Xiao, X.; Gu, Q. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1033–1039. (c) Niu, S.; Fan, Z.; Tang, X.; Liu, Q.; Shao, Z.; Liu, G.; Yang, X. -W. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 375–378. (d) Gao, S. -S.; Li, X. -M.; Zhang, Y.; Li C. -S.; Wang, B. -G. *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 1748–1753. (e) Hou, S. -H.; Tu, Y. -Q.; Wang, S. -H.; Xi, C. -C.; Zhang, F. -M.; Wang, S. -H.; Li, Y. -T.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 4456–4460.

(19) (a) Schrödinger Release 2017-4: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017. (b) Harder E.; Damm W.; Maple J.; Wu C.; Reboul M.; Xiang J. Y.; Wang L.; Lupyan D.; Dahlgren M. K.; Knight J. L.; Kaus J. W.; Cerutti D. S.; Krilov G.; Jorgensen W. L.; Abel R.; Friesner R. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 281–296.

(20) Gaussian 09, Revision A02, Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J. A. Jr., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas Ö., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J., Fox D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

(21) (a) Mitsunashi, T.; Kikuchi, T.; Hoshino, S.; Ozeki, M.; Awakawa, T.; Shi, S.-P.; Fujita, M.; Abe, I. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5606–5609. (b) Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Lee, S.; Hoshino, M.; Mori, T.; Okada, M.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Fujita, M.; Abe, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 5785–5788.

(22) (a) Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Quan, Z.; Abe, I. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4644–4647. (b) Qin, B.; Matsuda, Y.; Mori, T.; Okada, M.; Quan, Z.; Mitsunashi, T.; Wakimoto, T.; Abe, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 1658–1661. (c) Okada, M.; Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Hoshino, S.; Mori, T.; Nakagawa, K.; Quan, Z.; Qin, B.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Kawaide, H.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10011–10018. (d) Mitsunashi, T.; Rinkel, J.; Okada, M.; Abe, I.; Dickschat, J. S. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10053–10057. (e) Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846–11853. (f) Narita, K.; Sato, H.; Minami, A.; Kudo, K.; Gao, L.; Liu, C.; Ozaki, T.; Kodama, M.;

Lei, X.; Taniguchi, T.; Monde, K.; Yamazaki, M.; Uchiyama, M.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6696-6699. (g) Toyomasu, T.; Kaneko, A.; Tokiwano, T.; Kanno, Y.; Kanno, Y.; Niida, R.; Miura, S.; Nishioka, T.; Ikeda, C.; Mitsunashi, W.; Dairi, T.; Kawano, T.; Oikawa, H.; Kato, N.; Sassa, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1541-1548. (h) Bian, G.; Han, Y.; Hou, A.; Yuan, Y.; Liu, X.; Deng, Z.; Liu, T. *Metab. Eng.* **2017**, *42*, 1-8. (i) Minami, A.; Tajima, N.; Higuchi, Y.; Toyomasu, T.; Sassa, T.; Kato, N.; Dairi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 870-874. (j) Chai, H.; Yin, R.; Liu, Y.; Meng, H.; Zhou, X.; Zhou, G.; Bi, X.; Yang, X.; Zhu, T.; Zhu, W.; Deng, Z.; Hong, K. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, Article number: 27181.

(23) (a) Mitsunashi, T.; Abe, I. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1106–1114. (b) Minami, A.; Ozaki, T.; Liu, C.; Oikawa, H. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 1330-1346.

(24) (a) Batten, S. R.; Robson, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1460–1494. (b) Martí-Rujas, J.; Matsushita, Y.; Izumi, F.; Fujita, M.; Kawano, M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6515–6517. (c) Martí-Rujas, J.; Islam, N.; Hashizume, D.; Izumi, F.; Fujita, M.; Kawano, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5853–5860. (d) Ramadhar, T. R.; Zheng, S. -L.; Chen, Y. -S.; Clardy, J. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11252–11255.

(25) Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Fujita, M. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 246–252.

## 謝辞

本研究の遂行にあたりご指導を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室教授 阿部郁朗 先生に心より感謝申し上げます。

本研究に関する多数のご助言とご指導をいただきました、脇本敏幸 先生、淡川孝義 先生、岡田正弘 先生、松田侑大 先生、森貴裕 先生をはじめとした東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室の関係者の方々に感謝致します。

また、東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室の皆様ばかりでなく、共同研究者の皆様にも大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

結晶スポンジ法による化合物の構造解析におきましては、藤田誠 先生（東京大学大学院工学系研究科）、菊池貴 博士（株式会社リガク）、李鐘光博士（大日本住友製薬）、星野学 博士（理研）をはじめ、藤田研究室並びに関係者の皆様に大変お世話になりました。

計算化学による解析におきまして、内山真伸 先生（東京大学大学院薬学系研究科 基礎有機化学教室）、佐藤玄 先生（千葉大学大学院薬学研究院）に大変丁寧にご指導いただきました。厚く御礼申し上げます。

化合物の NMR 測定におきましては、林文晶 先生（理研）並びに、張恵平先生（理研）に大変お世話になりました。

Prof. Jeroen S. Dickschat 先生（University of Bonn）並びに、川出洋 先生（東京農工大学大学院）には、共同研究を通じ、化合物の同位体標識法について学ばせていただきました。

Prof. Shepo Shi 先生（Beijing University of Chinese Medicine）には糸状菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 を提供していただきました。

五味勝也 先生（東北大学大学院農学研究科）並びに、北本勝ひこ 先生（東京大学大学院農学生命科学研究科）には糸状菌形質転換用シャトルベクター並びに *A. oryzae* NSAR1 をご提供いただきました。大変感謝申し上げます。

葛山智久 先生（東京大学院農学生命科学研究科）並びに、及川英秋 先生（北海道大学大学院理学研究院化学部門）には、二重標識酢酸ナトリウムをご提供いただきました。厚く御礼申し上げます。

令和元年7月8日  
三橋 隆章