

平成 26 年度 博士論文

原核細胞生物由来テルペン合成酵素の包括的解析

微生物創薬科学

平成 24 年度博士課程入学

氏名 山田 佑樹

指導教員 池田 治生

目次

略語一覧	5
序論	6
第一章 細菌由来データベースからのテルペン合成酵素の探索	
1-1 序論	12
1-2 3 rd -HMM を用いた細菌由来テルペン合成酵素の探索	13
1-3 ゲノム解析が行なわれた放線菌が生産するテルペン化合物の解析	19
1-4 考察	21
第二章 原核細胞生物由来テルペン合成酵素遺伝子の解析	
2-1 序論	28
2-2 テルペン合成酵素遺伝子発現カセットの構築	29
2-3 放線菌由来のテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの構築	34
2-4 <i>Mycobacterium</i> 属、 <i>Rubrobacter</i> 属およびグラム陰性菌由来の テルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの構築	37
2-5 SUKA22 へのテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの導入	38
2-6 テルペン合成酵素遺伝子発現プラスミド形質転換体の解析	41
2-7 考察	52
第三章 テルペン化合物の構造解析	
3-1 テルペン化合物の構造解析	127
3-2 実験結果	
3-2-1 <i>sclav_p0765</i> 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析	129
3-2-2 <i>sclav_p0985</i> 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析	132

3-2-3	<i>sclav_p1169</i> 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析	133
3-2-4	<i>sclav_p1407</i> 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析	138
3-2-5	<i>sclav_p0067-sclav_p0068</i> 形質転換株が生産するセスキテルペン化合物の解析	139
3-2-6	<i>sven_0552</i> 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析	140
3-2-7	<i>slt18_1078</i> 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析	141
3-2-8	<i>slt18_1880</i> 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析	142
3-2-9	<i>stsu_20912</i> 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析	143
3-2-10	<i>nd90_0354</i> 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析	144
3-2-11	<i>mmar_3220</i> 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析	146
3-2-12	<i>rxyl_0493</i> 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析	147
3-2-13	<i>haur_2987</i> 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析	148
3-3	化合物 1 (hydropyrene) の X 線結晶解析	150
3-4	考察	152

第四章 安定同位体取り込みによる環化反応機構の推定

4-1	実験方法	241
4-2	実験結果	242
4-3	考察	243

第五章 Labdane 型ジテルペン合成酵素の交換による新規なジテルペン骨格の

創製

5-1	序論	259
5-2	酵素タンパク質の精製	260
5-3	テルペン合成酵素の機能解析	265
5-4	Labdane 型ジテルペン化合物の生産	266
5-5	<i>scla_lds</i> の強制発現株の構築	269
5-6	Labdane 型ジテルペン化合物の構造解析	
5-6-1	<i>scla_lds-scla_lts</i> 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析	273
5-6-2	<i>cldB-scla_lts</i> 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析	274
5-6-3	<i>scla_lds-cldD</i> 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析	275
5-7	考察	277

総括	299
培地	309
参考文献	311
謝辞	318

略語一覧

試薬

APM	Apramycin
CP	Chloramphenicol
KM	Kanamycin
NM	Neomycin
DTT	Dithiothreitol
PEG	Polyethylene glycol
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

菌属名略称

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>

その他

GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometer
MS	Mass spectrometer
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
COSY	Correlate spectroscopy
HMBC	¹ H-Detected heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	¹ H-Detected heteronuclear multiple quantum correlation
HR-MS	High resolution mass spectrum
IR	Infrared
BLAST	Basic local alignment search tool
HMM	hidden markov models
PCR	Polymerase chain reaction

序論

テルペン化合物は、メントールや樟脳などの精油成分やステロイド、カロテノイド等に代表される代謝産物であり、これまで 40,000 種以上の化合物の単離が報告されている¹⁻⁴⁾。また、これらの化合物の構造多様性によって、様々な生物活性を有する化合物が存在する。例えば、抗マラリア活性を有するアルテミシニンや抗腫瘍活性を有するタキソール等が医薬品として使用されている。テルペン化合物のほとんどは植物や糸状菌等の真核細胞生物により生産されることから、これまでこれらの生物種の代表的な二次代謝産物として認識されていた。一方、細菌などの原核細胞生物からの代謝産物の多くは、抗菌、抗カビ活性などを有する抗生物質や免疫抑制薬(アミノグリコシド、ポリケタイド、ペプチド)など医薬品として利用されてきたが、細菌によるテルペン化合物は稀であると理解されていた。原核細胞生物が生産する代表的なテルペン化合物は geosmin や 2-methylisoborneol などの揮発性異臭物質が知られており、これらは放線菌、藍藻および粘液細菌の代謝産物として見出されている(図 1)。また、これらの揮発性異臭物質は 1891 年に Berthelot と André によって土壌の異臭成分として報告され⁵⁾、さらに 75 年後、Gerber および Lechevalier によって化学構造が明らかにされた⁶⁻¹¹⁾。

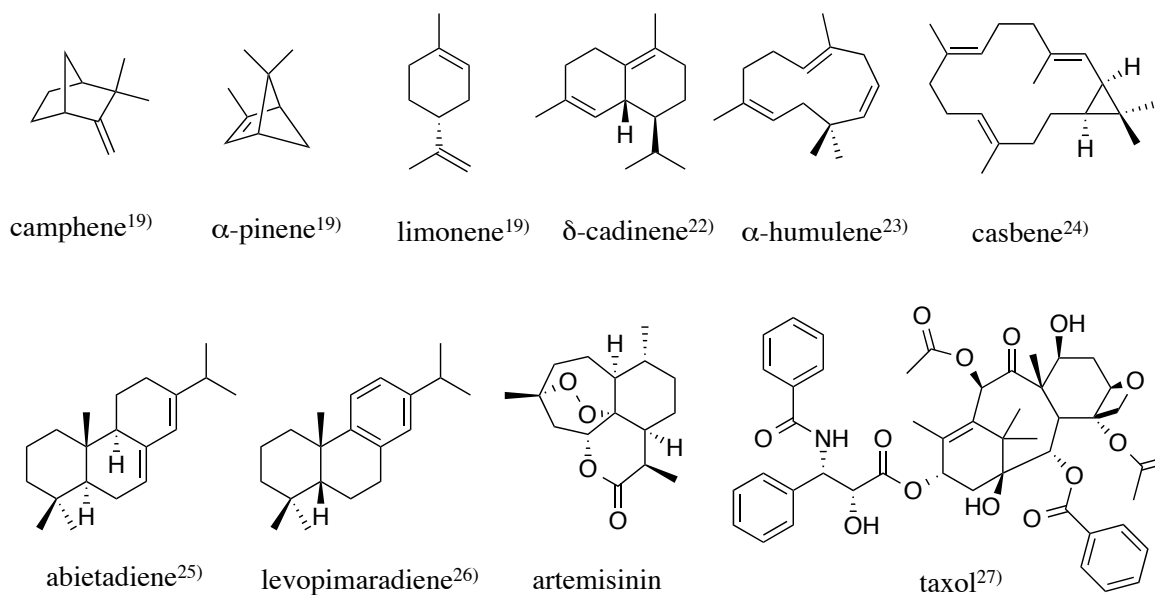
環状テルペン化合物の母核構造の形成はテルペン合成酵素によって行われる。その反応は、前駆体である鎖状のプレニル 2 リン酸が脱二リン酸化によってイオン化し、生じたカルボカチオンを介して閉環反応が生じる。さらにカルボカチオンの転移等が生じる場合もあり、最終段階でこれらのカルボカチオンは脱プロトン化あるいは水分子の捕捉によって環状テルペン炭化水素あるいはアルコールを生成する。利用される前駆体の種類 (C10;ゲラニルニリン酸, C15;ファルネシルニリン酸, C20;ゲラニルゲラニルニリン酸)によって生成される化合物はモノテルペン、セスキテルペンそしてジテルペン化合物に分類される。

テルペン化合物の生合成に関してはテルペン骨格形成の初発に関与するテルペン合成酵素(環化酵素)およびその遺伝子が植物から単離され精力的に研究が行われている。これは、植物が多くのテルペン化合物を生成することや、これらのテルペン合成酵素のアミノ酸配列の相同性が互いに高いことから、BLAST 等の相同性を利用した方法により、容易にクローン化することができたからである。一方、細菌等の原核細胞生物由来のテルペン合成酵素の単離は、*Streptomyces exfoliates* UC5319 の生産するセスキテルペン抗生物質 pentalenolactone の母格構造の pentalenene を生成する pentalenene 合成酵素^{12, 13)}が初めてであり、その後 21 世紀初頭に *Streptomyces* ゲノム解析が完了し、geosmin/germacradienol 合成酵素¹⁴⁾、*epi*-isozizaene 合成酵素¹⁵⁾

および 2-methylisoborneol 合成酵素¹⁶⁾が明らかにされた。テルペン合成酵素の一次配列には生物種また生成する骨格に関わらず、特徴的な金属イオン結合に関与するモチーフ配列が見出される。テルペン合成酵素の N 末端側から 80~120 アミノ酸残基（細菌および糸状菌由来）あるいは 230~270 アミノ酸残基（植物由来）には酸性アミノ酸に富む領域[D/N]Dxx[D/E]あるいは DDxxxE と、さらに 140 アミノ酸残基程度 C 末側に NSE triad (NxxxSxxxE)が配置している(PF03936: Terpene synthase family, metal binding domain)。また、植物由来のテルペン合成酵素では N 末端側に α -barrel 構造に関与すると推定される 252 アミノ酸残基のモチーフ(PF01397: Terpene synthase, N-terminal domain)が存在する (図 2)¹⁷⁾。植物由来のテルペン合成酵素で見出される、特徴的な後者のモチーフ(PF01397)は他の植物由来のテルペン合成酵素とアミノ酸配列に高い相同性が見出されるため、この領域を基に BLAST 検索で検出することができる。一方、糸状菌や細菌由来のテルペン合成酵素には植物で見出される PF01397 のモチーフ配列は存在せず、PF03936 モチーフのみが存在する。さらに細菌由来のテルペン合成酵素ではこの領域のアミノ酸配列の相同性が互いに低いことが特徴的である (図 3)。このことは、植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列を利用して、BLAST 解析による細菌のタンパク質データベースからテルペン合成酵素を探索することが極めて困難であり、細菌のテルペン合成酵素の研究が進展しなかった理由でもある。

筆者が所属する研究室では、2008 年に相同性解析ではなく、PF03936 の統計モデル(hidden Markov models; HMM)を使用したモチーフ解析を行ない、放線菌から 2-methylisoborneol 合成酵素遺伝子の存在を明らかにした¹⁶⁾(図 4)。しかしながら、PF03936 は植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から作成したモデル配列であるため、細菌全般からテルペン合成酵素の探索が可能であるか不明であった。そこで本研究は、原核細胞生物におけるテルペン合成酵素遺伝子の分布（第一章）、ならびにそれらの遺伝子産物の機能および反応生成物の包括的な解析（第二および三章）を目的として行なった。さらに新奇なテルペン骨格を有する化合物の予想される環化反応を推定するため、安定同位体の取り込みによる解析を行なった（第四章）。またさらにテルペン合成酵素遺伝子を組み合わせることで人工的に構造を変換させ、構造多様性に富む化合物を創出する解析を行なった（第五章）。

plant



bacteria

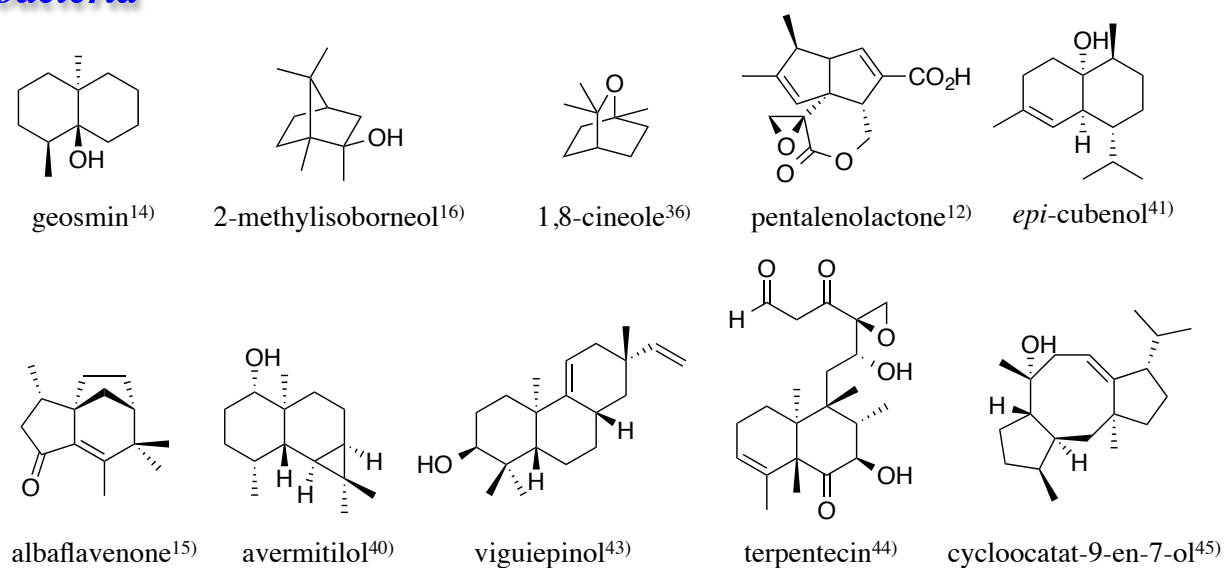


図1. 植物および細菌由来のテルペン化合物

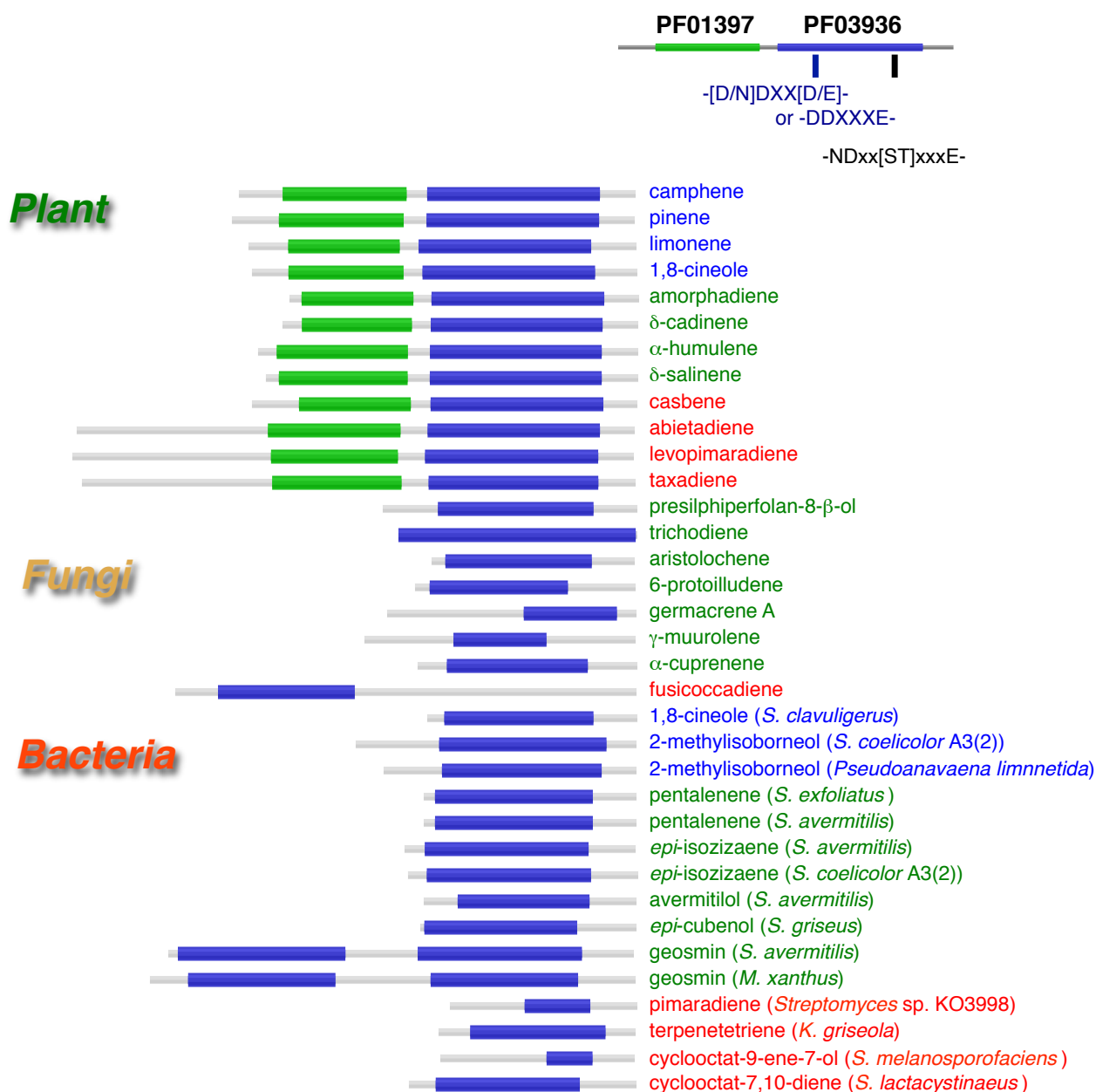


図2. 各生物種由来テルペン合成酵素の模式図

PF01397およびPF03936を示す。モノテルペン合成酵素、セスキテルペン合成酵素およびジテルペン合成酵素はそれぞれ緑、青および赤色で表記する。緑色および青色で表されているドメインは、それぞれPF01397およびPF03936を示す。camphene, AAB70707¹⁹⁾; pinene, AAB71085¹⁹⁾; limonene, AAB70907¹⁹⁾; 1,8-cineole, AAU01970²⁰⁾; amorphadiene, ABB51572²¹⁾; δ-cadinene, AAD51718²²⁾; α-humulene, ; ADZ45513²³⁾; casbene, RCOM_1574350²⁴⁾; abietadiene, AAS47691²⁵⁾; levopimaradiene, AAL09965²⁶⁾; taxadiene, 2211347A²⁷⁾; presilphiperofolan-8-β-ol, BOT2_BOTFU²⁸⁾; trichodiene, TRI5_FUSCE²⁹⁾; aristolochene, AAF13264³⁰⁾; 6-protoilludene, PRO1_ARMGA³¹⁾; germacrene A, A8NE23³²⁾; γ-murolene, STPS1_SANAL³³⁾; α-cuprenene, COP6³⁴⁾; fusicoccadiene, FUSS_PH0AM³⁵⁾; 1,8-cineole, SCLAV_p0982³⁶⁾; 2-methylisoborneol, SCO6073¹⁶⁾, ADU79150³⁷⁾; pentalenene, PTL5_STRS3¹³⁾, SAV_2998³⁸⁾; epi-isozizaene, SAV_3032³⁹⁾, SCO5222¹⁵⁾; avermitilol, SAV_76⁴⁰⁾; epi-cubenol, SGR_6065⁴¹⁾; geosmin, SAV_2163⁴²⁾, MXAN_6247; pimaradiene, BAD86798⁴³⁾; terpenetetriene, BAB39207⁴⁴⁾; cyclooctat-9-en-7-ol, BA144338⁴⁵⁾; cyclooctat-7,10-diene, SLT18_1078.


```

*->tlLeLArKLdFNflQalhqqELkeltrWwkeldlaskLpfyaRdRlv
+ ++ +++++ l+ + W +e +l++ +++ ++
28 IETDFP-RQLHPYWPRLQ----EKTRSWLLEKRLMPADKV--EEYAD 67

EcYFwalavyfEPgaySdaRialaKtaalltiiDDtyDaygtleEea.Le
++ l+++++ a +++++a+a+++a+++++DD D+ + ++
68 GLCYTDL MAGYYIGAPDEV LQAIADYSAWFFVWDDRHDRDVIHRRATaWR 117

lftdaveRWlslrDilnsaid.LPdymkivfkalldtfeeieeelskeqG
++ +++ ++ ++ ++ +++ ++ ++ d + ++ l k +
118 QLRFQLH-----TALDSPRDHLHHRDPLVAGFADSMVRLYSFLGKKWN 160

rslshGyivpylkeawkdldvkayleEAkWakeghvPsfeEYlengrvsig
+ ++ ++ ++ay +E +++ +g vP++eEYle +r +++
161 AR-----FACHFHAVIEAYDREFHNRTRGIVPTVEEYLELRRLTFA 201

apl1111sflmgGgdiat.eeafewlksrpk.alvqlsslilRLlNDia
+++++l + +a++e ++ +++++ +++ ls+ ++ ++ND++
202 HRIWTDLL-----EPSARhEIPAGVREHPGYrRAALLSQEFAAWYNDLC 245

syekEmarGevassieCYMkeypgvteEeAlehvqkmiedawkeln<-*
s +kE+a +ev +++ + +++g+t EeA+ +v++++e+++ e+
246 SLPKEIAGDEV-HNLGISLIHHEGLTLEEAVTEVRRRVEECIAEFL 290

```

図3. *epi*-isozizaene合成酵素 (SAV_3032)とPF03936モデル配列のアライメント解析

DDXXD: Mg²⁺結合モチーフ、NXXXDXXXE: ポリプレニル2リン酸結合モチーフを示す。

第一章 細菌由来データベースからのテルペン合成酵素の探索

1-1 序論

筆者が所属する研究室では、2008 年に PF03936 のモチーフ配列を使用して HMM 解析を行なった結果、細菌由来タンパク質 (1,922,990 個)から 41 種のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質を見出し、さらに実験科学的に放線菌から 2-methylisoborneol 合成酵素遺伝子の存在を明らかにした¹⁶⁾。しかしながら、PF03936 は植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から作成したモデル配列であるため、細菌全般からテルペン合成酵素の探索が可能であるか不明であった。その後、これら 41 種の細菌由来のテルペン合成酵素から作製した HMM (2nd-HMM)を用いて公的データベースの細菌タンパク質から 140 種のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質を見出した¹⁸⁾(図 1-1)。抽出された候補の解析によって、藍藻類である *Pseudonabaena limnetica* str. Castaic Lake から 2-methylisoborneol 合成酵素遺伝子を見出すことに成功し、細菌由来のテルペン合成酵素の探索に対して効果的であることを明らかにした³⁷⁾。今世紀のヒトゲノム解析以降、ゲノム配列解析技術は革新的に進展し、今日膨大なゲノムデータが蓄積されている。最新の公的データベース (2014.6)および筆者が所属する研究室で解析したゲノムデータから得た細菌のタンパク質を 2nd-HMM で得た 140 種のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から新たに作製した 3rd-HMM を用いて検索を行なった。

1-2 3rd-HMM を用いた細菌由来テルペン合成酵素の探索

【実験方法】

細菌由来のゲノムデータ(総数 8,759,463 タンパク質、5152 菌種)は、National Center for Biotechnology and Information (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria/>; 8,617,057 タンパク質、5,132 菌種), Broad Institute (https://olive.broadinstitute.org/collections/actinomycetales_group.1/strains; 104,911 タンパク質、15 菌種)および筆者が所属する研究室で解析したゲノムデータ (37,495 タンパク質、5 菌種)から取得した。HMM は生物学配列解析用 HMM の hmmer-3.1b1 (<ftp://selab.janelia.org/pub/software/hmmer3/3.1b1>)のソースコードをダウンロードし、C 言語コンパイラでコンパイルして生成したバイナリープログラムをUNIXワークステーションで使用した。見出されたアミノ酸配列を MAFFT version 7.182 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/source.html>)を用いて alignment を行い⁴⁶⁾、その結果について CLUSTLAW version 2.1(<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2/2.1>)のbootstrap 法 (bootstrap number, 1,000 ; seed number, 111)による系統的解析を行った⁴⁷⁾。系統樹の描画は MEGA version 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>)を用いて行った。本解析は2nd-HMMで得た140種のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から新たに3rd-HMMを作成した。見出されたテルペン合成酵素の特徴的な領域 (金属イオン結合モチーフおよび NxxxSxxxE triad モチーフ)は筆者が所属する研究室で開発された Perl スクリプトプログラムで抽出した。抽出した配列を再び alignment を行ない、alignment された配列を hmmer3.1b1 パッケージの hmmbuild プログラムを用いて HMM を作成した。3rd-HMM を利用した hmmer-3.1b1 パッケージの hmmsearch プログラム (E-value <10⁻³)を用いて上記のデータベースに含まれる細菌由来のタンパク質配列について解析を行なった。

【実験結果】

3rd-HMM を用いて解析を行なった結果、262 個のテルペン合成酵素を得ることができた (E-value $5.3 \times 10^{-7} \sim 6.9 \times 10^{-207}$)。推定されたテルペン合成酵素の多くは *Actinomycetales* の菌株から見出された (表 1)。一方、グラム陰性菌に属する *Myxococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Burkholderiales*, *Herpetosiphonales*, *Rhizobiales*, *Chlamydiales*, *Flavobacteriales*, *Chromatiales*, *Ktedonobacterales*, *Sphingobacteriales* や *Pseudomonadales* から候補の合成酵素が見出された。なお、グラム陽性菌の Firmicutes 門および Archaea ドメインからはテルペン合成酵素と推定されるタンパク質は見出されなかった。また、推定された 262 のテルペン合成酵素のアミノ酸配列の alignment 及び、その結果の bootstrap 法による系統的な解析から、これらの合成酵素には主に 3 つの分岐群が存在することが明らかになった (図 1-2)。系統樹の上部には geosmin/germacradienol 合成酵素 (SAV_2163 および SCO6073) の分岐群が^{14, 48, 49)}、左側には 2-methylisoborneol/2-methylenebornane 合成酵素 (ADU79148, ADU79149, ADU79150, BAK26793, BAI77523, Pfl01_1841, SACE_3722, SAML_0357 および SCO7700) の分岐群^{16, 37)}が、また右側の比較的小さな分岐群には *epi*-isozizaene 合成酵素 (SAV_3032 および SCO5222)^{15, 39)}が、さらにその分岐群の下側には pentalenene 合成酵素 (ADO85594 および SAV_2988)^{12, 38)}が見出された。

表 1. 3rd-HMM により見出された細菌由来テルペン合成酵素の候補

Microorganism	Class or Phylum	Order	Type of synthase	Locus tag or protein ID	Accession #	E-value
<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Amir_0977	YP_003098781	3.70 x 10 ⁻¹⁷⁷
				Amir_3801	YP_003101527	9.60 x 10 ⁻²⁴
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	AMED_1325	YP_003763541	1.20 x 10 ⁻¹⁸⁶
			2-MIB/2MB synthase	AMED_3240	YP_003765432	1.70 x 10 ⁻⁵⁵
<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Caci_6200	YP_003116895	9.20 x 10 ⁻¹⁶⁶
			2-MIB/2MB synthase	Caci_4612	YP_003115314	1.70 x 10 ⁻⁵⁶
				Caci_3530	YP_003114277	4.10 x 10 ⁻²⁹
<i>Frankia alni</i> ACN14a	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	FRAAL6507	YP_716636	2.40 x 10 ⁻¹⁹²
				FRAAL1336	YP_711586	8.40 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Frankia</i> sp. Cc13	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Franci3_4231	YP_483306	4.10 x 10 ⁻¹⁹²
				Franci3_4335	YP_483410	2.10 x 10 ⁻³⁵
<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Franci1_5559	YP_001509819	3.80 x 10 ⁻¹⁹³
<i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		Acix8_3254	YP_005058585	6.20 x 10 ⁻⁴⁵
<i>Kitasatospora setae</i> KM-6054	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	KSE_46080	YP_004906345	5.70 x 10 ⁻¹⁹²
			2-MIB/2MB synthase	KSE_70210	YP_004908735	2.60 x 10 ⁻⁶⁶
				KSE_12950	YP_004903082	2.70 x 10 ⁻⁵⁴
				KSE_00200t	YP_004901829	8.90 x 10 ⁻⁵⁷
				KSE_62070	YP_004907928	2.20 x 10 ⁻³⁵
<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Kfla_4247	YP_003382082	2.40 x 10 ⁻¹⁹³
<i>Kutzneria</i> sp. 744	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	KUTG_04531	-	1.40 x 10 ⁻¹⁷⁷
			2-MIB/2MB synthase	KUTG_08607	-	4.50 x 10 ⁻⁵²
				KUTG_08053	-	3.60 x 10 ⁻⁴¹
<i>Micromonospora carbonacea</i> ATCC 39149	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		MCAG_03139	ZP_04606882	6.60 x 10 ⁻⁶¹
			2-MIB/2MB synthase	MCAG_05469	ZP_04609212	3.80 x 10 ⁻⁵⁴
				MCAG_01060	ZP_04604803	4.50 x 10 ⁻²⁷
<i>Micromonospora</i> sp. M42	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		MCBG_03612	-	7.10 x 10 ⁻⁶⁴
				MCBG_05692	-	2.40 x 10 ⁻²⁹
<i>Mycobacterium marinum</i> M	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		MMAR_3220	YP_001851501	2.70 x 10 ⁻⁶⁰
				MMAR_0280	YP_001848602	1.00 x 10 ⁻⁴³
<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	O3I_014240	YP_006807783	5.90 x 10 ⁻¹⁷⁰
			2-MIB/2MB synthase	O3I_008535	YP_006806644	9.00 x 10 ⁻⁵³
				O3I_014430	YP_006807821	3.60 x 10 ⁻⁴¹
				O3I_023980	YP_006809725	6.00 x 10 ⁻²⁸
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	2-MIB/2MB synthase	Ndas_2620	YP_003680543	2.10 x 10 ⁻⁵⁴
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rubrobacterales</i>		Rxyl_0493	YP_643279	1.70 x 10 ⁻⁷⁰
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SACE_3187	YP_001105388	2.00 x 10 ⁻¹⁸⁸
			germacradienol/geosmin synthase	SACE_4907	YP_001107098	4.20 x 10 ⁻¹⁹³
			germacradienol/geosmin synthase	SACE_3977	YP_001106173	2.40 x 10 ⁻¹⁶²
			2-MIB synthase	SACE_3722	YP_001105919	3.50 x 10 ⁻⁴⁹
<i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	BN6_11180	YP_007035317	1.00 x 10 ⁻¹⁷¹
				BN6_54650	YP_007039597	2.80 x 10 ⁻⁶⁴
<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		Sare_1287	YP_001536181	7.10 x 10 ⁻²⁹
<i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Snas_1127	YP_003509930	1.50 x 10 ⁻¹⁸⁶
				Snas_1991	YP_003510780	1.10 x 10 ⁻⁵⁷
<i>Streptomyces albus</i> J1074	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSHG_04630	ZP_06593727	2.10 x 10 ⁻¹⁹⁰
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSHG_04343	ZP_06593440	5.50 x 10 ⁻⁷¹
<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		SAMR0831	CAJ88540	3.10 x 10 ⁻⁶⁵
			2-MIB/2MB synthase	SAML0357	CAJ89344	2.80 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SAV_2163	NP_823339	5.30 x 10 ⁻²⁰⁰
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SAV_3032	NP_824208	4.90 x 10 ⁻⁷⁵
			pentalenene synthase	SAV_2998	NP_824174	1.30 x 10 ⁻⁶⁷
			avermitilol synthase	SAV_76	NP_821250	9.20 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SBI_02068	ADI05189	2.40 x 10 ⁻¹⁸⁶
			2-MIB/2MB synthase	SBI_08957	ADI12075	8.90 x 10 ⁻⁷²
			pentalenene synthase	SBI_09679	ADI12797	3.30 x 10 ⁻⁶⁵
				SBI_01080	ADI04201	7.80 x 10 ⁻⁶⁴
<i>Streptomyces bottropensis</i> ATCC 25435	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SBD_5038	EMF53494	5.80 x 10 ⁻¹⁹⁸
				SBD_7148	EMF51443	6.40 x 10 ⁻⁵⁷
<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8005	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SCAT_2953	YP_004912463	9.60 x 10 ⁻¹⁹⁸
				SCAT_p0091	YP_004919385	2.40 x 10 ⁻⁴⁴
				SCAT_0463	YP_004910008	2.60 x 10 ⁻³⁵
<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SCLAV_0159	ZP_06913794	4.10 x 10 ⁻¹⁹¹
				SCLAV_p0635	ZP_05005402	1.80 x 10 ⁻⁷⁴
			1,8-cineole synthase	SCLAV_p0982	ZP_05003209	9.80 x 10 ⁻⁷⁰
				SCLAV_p1407	ZP_06776581	2.90 x 10 ⁻⁶⁵
			(-)- δ -cadinene synthase	SCLAV_p0328	ZP_05004823	4.90 x 10 ⁻⁶⁷
			(+)-T-muurolool synthase	SCLAV_p0068	ZP_05006242	1.70 x 10 ⁻⁵⁷
			linalool synthase	SCLAV_p1185	ZP_06776363	5.00 x 10 ⁻⁶⁴
				SCLAV_p0985	ZP_06776164	6.90 x 10 ⁻⁶⁰
				SCLAV_p0574	ZP_06775755	8.90 x 10 ⁻⁵⁵
				SCLAV_p0571	ZP_06775752	8.80 x 10 ⁻⁵⁷
				SCLAV_p1173	ZP_06776351	5.50 x 10 ⁻⁵²
				SCLAV_p0491	ZP_05004575	2.50 x 10 ⁻⁴⁶
				SCLAV_p0765	ZP_06775944	5.90 x 10 ⁻⁴⁵
				SCLAV_p1429	ZP_05002948	2.70 x 10 ⁻³⁵
				SCLAV_p1169	ZP_05007982	4.70 x 10 ⁻²⁶

<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SCLAV_5601	ZP_06775069	6.30 x 10 ⁻¹⁷
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SCLAV_5671	ZP_06775139	1.40 x 10 ⁻⁸
			2-MIB synthase	SCO6073	NP_630182	6.70 x 10 ⁻¹⁹⁸
<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SCO5222	NP_629369	1.10 x 10 ⁻⁷⁵
			2-MIB/2MB synthase	SCO7700	NP_733742	3.00 x 10 ⁻⁶⁸
			pentalenene synthase	B446_28510	YP_008389319	4.10 x 10 ⁻¹⁹⁸
<i>Streptomyces cyaneogriseus</i> subsp. noncyanogenus NRRL 15773	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -isozizaene synthase	B446_04425	YP_008384524	6.30 x 10 ⁻⁵⁵
			germacradienol/geosmin synthase	B446_29695	YP_008389556	2.40 x 10 ⁻⁶³
			2-MIB/2MB synthase	B446_24610	YP_008388544	9.30 x 10 ⁻⁷⁵
<i>Streptomyces davawensis</i> JCM 4913	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -isozizaene synthase	SCYA_02397	BAP82218	1.30 x 10 ⁻¹⁹⁷
			germacradienol/geosmin synthase	SCYA_00859	BAP82219	3.10 x 10 ⁻⁷⁴
			pentalenene synthase	SCYA_02107	-	6.50 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Streptomyces flabogriseus</i> ATCC 33331	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SCYA_02852	BAP82220	1.40 x 10 ⁻⁶⁴
			2-MIB/2MB synthase	BN159_2274	YP_007520780	4.10 x 10 ⁻¹⁹⁶
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	BN159_8264	YP_007526769	4.70 x 10 ⁻⁵⁴
<i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	BN159_3155	YP_007521661	5.30 x 10 ⁻⁷⁵
			<i>epi</i> -cubenol synthase	BN159_1440	YP_007519946	4.80 x 10 ⁻⁵⁷
			2-MIB/2MB synthase	Sfl_6028	YP_004926931	3.90 x 10 ⁻¹⁹⁸
<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -cubenol synthase	Sfla_5399	YP_004926313	3.20 x 10 ⁻⁷³
			germacradienol/geosmin synthase	Sfla_4535	YP_004925455	5.30 x 10 ⁻⁶³
			2-MIB/2MB synthase	Sfla_5668	YP_004926578	1.30 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu4000	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Sfla_1617	YP_004922572	2.30 x 10 ⁻⁵⁹
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SFUL_319	YP_007929188	1.50 x 10 ⁻²⁰²
			2-MIB/2MB synthase	SFUL_5260	YP_007934038	4.10 x 10 ⁻⁶⁶
<i>Streptomyces griseus</i> IFO 13350	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -cubenol synthase	SFUL_978	YP_007929843	1.10 x 10 ⁻⁷⁵
			germacradienol/geosmin synthase	SSFG_01626	ZP_06575915	5.70 x 10 ⁻¹⁹⁷
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSFG_02456	ZP_06576746	2.40 x 10 ⁻⁷⁴
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> ATCC 53653	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSRG_01130	ZP_07309957	7.40 x 10 ⁻²⁰⁰
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSRG_02017	ZP_07310844	8.00 x 10 ⁻⁷⁸
			germacradienol/geosmin synthase	SGR_6839	YP_001828351	1.40 x 10 ⁻²⁰²
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. jinggangensis 5008	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -cubenol synthase	SGR_6065	YP_001827577	2.60 x 10 ⁻⁷⁵
			2-MIB synthase	SGR_1269	YP_001822781	1.20 x 10 ⁻⁷⁰
			(+)-caryolan-1-ol synthase	SGR_2079	YP_001823591	2.40 x 10 ⁻⁶⁵
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSOG_01998	ZP_07293917	6.60 x 10 ⁻²⁰⁷
			germacradienol/geosmin synthase	SSOG_04571	ZP_07296488	7.70 x 10 ⁻²⁰⁸
			2-MIB/2MB synthase	SSOG_08875	ZP_07300792	1.40 x 10 ⁻⁷¹
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSOG_01163	ZP_07293082	9.50 x 10 ⁻⁶²
			2-MIB/2MB synthase	SHUG_7148	YP_006248288	1.10 x 10 ⁻¹⁹⁵
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SHUG_6335	YP_006247475	3.40 x 10 ⁻⁷⁵
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSPG_01553	ZP_05522837	7.90 x 10 ⁻¹⁹⁸
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSPG_02461	ZP_06528571	3.60 x 10 ⁻⁷³
			germacradienol/geosmin synthase	SSPG_07524	ZP_06533634	9.90 x 10 ⁻⁶¹
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. rimosus ATCC 10970	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSPG_00143	ZP_06526253	1.80 x 10 ⁻⁶⁷
			2-MIB/2MB synthase	SSDG_03228	ZP_06913794	4.80 x 10 ⁻¹⁹⁹
			<i>epi</i> -cubenol synthase	SSDG_01120	ZP_06913376	2.20 x 10 ⁻⁷⁵
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSDG_02809	ZP_06911744	1.20 x 10 ⁻⁵³
			<i>epi</i> -cubenol synthase	M271_26075	YP_008791624	7.40 x 10 ⁻²⁰¹
			2-MIB/2MB synthase	M271_41390	YP_008794613	3.60 x 10 ⁻⁷¹
<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	M271_43390	YP_008795010	1.10 x 10 ⁻⁵⁸
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SRIM_23596	ELQ80777	2.60 x 10 ⁻¹⁹⁷
			germacradienol/geosmin synthase	SRIM_15025	ELQ82439	2.90 x 10 ⁻⁴⁶
<i>Streptomyces sviceus</i> ATCC 29083	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SRIM_16420	ELQ82161	2.20 x 10 ⁻⁵³
			<i>epi</i> -cubenol synthase	SRIM_16380	ELQ82238	2.70 x 10 ⁻⁴²
			caryolan-1-ol synthase	SSGG_00557	ZP_06582730	5.20 x 10 ⁻⁷⁷
<i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL18488	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSGG_05086	ZP_06587258	1.00 x 10 ⁻⁶²
			2-MIB/2MB synthase	SCAB20121	YP_003487693	4.70 x 10 ⁻¹⁹⁷
			<i>epi</i> -cubenol synthase	SCAB5041	YP_003486275	3.50 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SCAB82161	YP_003493696	9.30 x 10 ⁻⁵³
			2-MIB/2MB synthase	SCAB73741	YP_003492893	1.80 x 10 ⁻⁵⁹
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSEG_08185	ZP_06920565	1.00 x 10 ⁻¹⁹⁹
<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu4113	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SSEG_08483	ZP_06919672	5.20 x 10 ⁻⁷⁵
			2-MIB/2MB synthase	STSU_00780	EIF94408	4.20 x 10 ⁻¹⁸⁷
			cycloocat-9-en-7-ol synthase	STSU_03594	EIF93850	1.50 x 10 ⁻⁶⁴
<i>Streptomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	STSU_05708	EIF93423	2.70 x 10 ⁻⁵⁵
			2-MIB/2MB synthase	STSU_16977	EIF91174	2.30 x 10 ⁻⁵⁹
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	STSU_20912	EIF90392	6.40 x 10 ⁻³³
<i>Streptomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	STSU_24926	EIF89600	2.50 x 10 ⁻³²
			2-MIB/2MB synthase	STSU_19230	EIF90739	2.60 x 10 ⁻⁵⁵
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	STSU_29841	EIF88623	2.60 x 10 ⁻³⁸
<i>Streptomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SVEN_0269	CCA53556	9.20 x 10 ⁻¹⁸⁸
			2-MIB/2MB synthase	SVEN_7111	CCA60397	7.50 x 10 ⁻⁶⁹
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	SVEN_0552	CCA53839	1.80 x 10 ⁻⁵⁸
<i>Streptomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Strvi_9069	YP_004818644	5.30 x 10 ⁻¹⁹⁸
			2-MIB/2MB synthase	Strvi_5648	YP_004815441	3.50 x 10 ⁻⁷⁰
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	Strvi_5748	YP_004815539	7.40 x 10 ⁻⁶⁰
<i>Streptomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Strvi_5779	YP_004815569	1.30 x 10 ⁻⁷
			2-MIB/2MB synthase			
			<i>epi</i> -isozizaene synthase			

<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase <i>epi</i> -isozizaene synthase	SSQG_06187 SSQG_05270	ZP_07307300 ZP_07306383	5.10 x 10 ⁻¹⁹⁷ 5.30 x 10 ⁻⁷⁴
			2-MIB/2MB synthase	SSQG_07226 SSQG_00350 SSQG_00965	ZP_07308339 ZP_07301463 ZP_07302078	3.00 x 10 ⁻⁶⁴ 3.20 x 10 ⁻⁵⁴ 4.20 x 10 ⁻³⁹
<i>Streptomyces</i> sp. AA4	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase 2-MIB/2MB synthase	SSMG_01007 SSMG_03159	ZP_07276967 ZP_07279199	1.00 x 10 ⁻¹⁷⁴ 1.20 x 10 ⁻⁵⁷
<i>Streptomyces</i> sp. C	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase 2-MIB/2MB synthase	SSNG_05608 SSNG_06212 SSNG_07281	ZP_07289987 ZP_07290591 ZP_07291660	3.80 x 10 ⁻¹⁷⁹ 1.30 x 10 ⁻⁶⁷ 1.80 x 10 ⁻³⁷
<i>Streptomyces</i> sp. E14	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSTG_03324 SSTG_04057	ZP_06709883 ZP_06710616	1.60 x 10 ⁻⁷⁵ 6.60 x 10 ⁻⁷²
<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase avermilol synthase 2-MIB/2MB synthase	SSAG_06177 SSAG_00457 SSAG_06488 SSAG_05118 SSAG_06899 SSAG_00644	ZP_05001875 ZP_04996155 ZP_05002186 ZP_05000816 ZP_05002597 ZP_04996342	2.50 x 10 ⁻¹⁸² 2.10 x 10 ⁻⁶⁷ 9.50 x 10 ⁻⁶⁹ 8.00 x 10 ⁻⁶¹ 1.20 x 10 ⁻⁵² 4.20 x 10 ⁻⁹⁰
<i>Streptomyces</i> sp. Sirex AA-E	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase <i>epi</i> -cubenol synthase caryolan-1-ol synthase	SACTE_0245 SACTE_0873 SACTE_4655 SACTE_5791	ZP_06273105 ZP_06275238 ZP_06270281 ZP_06273747	2.30 x 10 ⁻³⁰¹ 1.20 x 10 ⁻⁷⁵ 1.50 x 10 ⁻⁶¹ 3.00 x 10 ⁻⁴⁰
<i>Streptomyces</i> sp. SPB74	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>epi</i> -isozizaene synthase	SSBG_02327	ZP_06823519	2.10 x 10 ⁻⁷¹
<i>Streptomyces</i> sp. SPB78	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase <i>epi</i> -isozizaene synthase	SSLG_03862 SSLG_04610	ZP_07273435 ZP_07274183	4.00 x 10 ⁻¹⁹⁶ 6.10 x 10 ⁻⁷⁴
<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Sros_0075 Sros_6866 Sros_2608 Sros_3191 Sros_2610	YP_00333587 YP_003342315 YP_003338321 YP_003338879 YP_003338323	3.40 x 10 ⁻¹⁹⁰ 1.60 x 10 ⁻⁵⁷ 7.70 x 10 ⁻⁶¹ 3.30 x 10 ⁻²⁸ 7.60 x 10 ⁻²⁷
<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		Tcur_3107 Tcur_3806	YP_003300687 YP_003301375	6.50 x 10 ⁻⁶⁰ 2.20 x 10 ⁻¹⁹
<i>Verrucosipora maris</i> AB-18-032	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		VAB18032_26646 VAB18032_05920	YP_004407004 YP_004402910	8.40 x 10 ⁻⁶¹ 6.20 x 10 ⁻⁵⁸
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>		Ava_1982	YP_322499	5.50 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>		BURPS668_A0947 BURPS668_A1721	YP_001061946 YP_001062716	1.80 x 10 ⁻⁶² 1.20 x 10 ⁻⁴⁹
<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>		Cpin_4730 Cpin_3949 Cpin_1797 Cpin_4100	YP_003124367 YP_003123612 YP_003121494 YP_003123761	3.90 x 10 ⁻⁶⁶ 2.20 x 10 ⁻⁶⁰ 4.00 x 10 ⁻⁵² 1.30 x 10 ⁻⁵⁰
<i>Chryseobacterium</i> sp. CF314	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>		PMI13_01091 PMI13_02384 PMI13_02385 PMI13_02386	EJL74352 EJL71436 EJL71437 EJL71438	2.10 x 10 ⁻⁴⁴ 5.30 x 10 ⁻³⁴ 3.80 x 10 ⁻²¹ 3.00 x 10 ⁻³³
<i>Corallococcus coralloides</i> DSM 2259	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase	COCOR_07379	YP_005373330	7.30 x 10 ⁻¹⁸⁸
<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>	germacradienol/geosmin synthase	Cylst_4391 Cylst_2635	YP_007149161 YP_007147519	3.50 x 10 ⁻¹⁹² 7.90 x 10 ⁻⁶⁰
<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Hoch_1257 Haur_2988 Haur_2987 Haur_4149	YP_003265710 YP_001545754 YP_001545753 YP_001546909	8.50 x 10 ⁻¹⁷⁵ 6.20 x 10 ⁻⁶⁴ 5.50 x 10 ⁻⁶³ 2.10 x 10 ⁻³⁸
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> DSM 785	<i>Chloroflexi</i>	<i>Herpetosiphonales</i>		Krac_10082	EFH88606	5.80 x 10 ⁻⁶⁵
<i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM 44963	<i>Ktedonobacteria</i>	<i>Ktedonobacterales</i>		alr4685	NP_488725	1.10 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>	germacrene A synthase	Npun_R2756 Npun_R3832	YP_001866236 YP_001867159	9.80 x 10 ⁻¹⁸⁹ 1.40 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Nostoc punctiforme</i> OCC 73102	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>	germacradienol/geosmin synthase 8a- <i>epi</i> - α -selinene synthase	LILAB_15255 MYSTI_06763 MYSTI_05862 MYSTI_05305	YP_004666032 YP_007363720 YP_007362822 YP_007362269	5.40 x 10 ⁻¹⁸⁸ 2.30 x 10 ⁻¹⁸² 1.80 x 10 ⁻⁵⁷ 1.50 x 10 ⁻⁵⁴
<i>Myxococcus fulvus</i> HW-1	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase	MXAN_6247	YP_634376	4.40 x 10 ⁻¹⁸⁶
<i>Myxococcus stipitatus</i> DSM 14675	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase	OSCI_4110022 PPSIR1_01859 PPSIR1_04093 PPSIR1_04673	ZP_07114089 EDM77925 EDM79289 EDM81731	8.40 x 10 ⁻¹⁹³ 1.40 x 10 ⁻⁵⁰ 6.20 x 10 ⁻⁵⁵ 1.50 x 10 ⁻³³
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase	Pf01_1841	YP_347573	1.20 x 10 ⁻⁵⁷
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	germacradienol/geosmin synthase	BN77_p2150044	CCM80010	1.80 x 10 ⁻³⁷
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>		Rcas_0622 Rcas_2716 RoseRS_3509 RoseRS_2648	YP_001430766 YP_001432805 YP_001277817 YP_001276972	2.60 x 10 ⁻⁷⁶ 1.10 x 10 ⁻⁴³ 2.90 x 10 ⁻⁷³ 9.90 x 10 ⁻⁴⁴
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	2-MB synthase	Sce1440 Sce6369 Sce8552	YP_001612078 YP_001617016 YP_001619202	1.10 x 10 ⁻¹⁸⁶ 3.80 x 10 ⁻⁶⁷ 3.70 x 10 ⁻⁶⁶
<i>Rhizobium mesoamericanum</i> STM3625	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>		STAUR_1114	YP_003950745	9.80 x 10 ⁻¹⁸⁷
<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexales</i>		Thimo_2203 Wcw_0522	YP_007244580 YP_003708899	9.90 x 10 ⁻³⁷ 7.70 x 10 ⁻⁴⁵
<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexales</i>				
<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56'	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase			
<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	germacradienol/geosmin synthase			
<i>Thioflavococcus mobilis</i> 8321	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Chromatiales</i>				
<i>Waddlia chondrophila</i> WSU 86-1044	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydiales</i>				

<i>Kitasatospora griseola</i> MF730-N6	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	terpentetriene synthase	BAB39207	AB048795	3.00 x 10 ⁻⁴¹
<i>Micromonospora olivasterospora</i> NRRL 8178	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	2-MB synthase	BAK26793	AB634561	1.90 x 10 ⁻⁵³
<i>Streptomyces citricolor</i> NBRC 13005	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	(-)-germacradiene-4-ol synthase	BAL14866	AB621338	2.00 x 10 ⁻⁵⁸
			(-)-epi- α -bisabolol synthase	BAL14867	AB621339	2.30 x 10 ⁻⁵¹
<i>Streptomyces exfoliatus</i> UC5319	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	pentalenene synthase	PTLS_STRS3	Q55012	9.60 x 10 ⁻⁶⁸
<i>Streptomyces lasaliensis</i> NRRL 3382	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	2-MIB synthase	BAI77523	AB547324	1.60 x 10 ⁻⁶⁶
<i>Streptomyces melanosporefaciens</i> MI614-43-F2	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	cycloocat-9-ene-7-ol synthase	BAI44338	AB183750	1.60 x 10 ⁻⁷
<i>Streptomyces platensis</i> MA7327	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>ent</i> -kaurene synthase	ACO31279	FJ655920	1.60 x 10 ⁻⁷
			<i>ent</i> -atiserene synthase	ACO31274	FJ655920	1.60 x 10 ⁻⁷
<i>Streptomyces platensis</i> MA 7339	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>ent</i> -atiserene synthase	ADD83014	GQ398492	1.60 x 10 ⁻⁷
<i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	pimaradiene synthase	BAD86798	BAD86798	5.10 x 10 ⁻⁷
<i>Anabaena ucrainica</i> CHAB1432	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>	germacradienol/geosmin synthase	AEA03338	AEA03338	2.50 x 10 ⁻¹⁸⁸
<i>Anabaena ucrainica</i> CHAB2155	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostocaceae</i>	germacradienol/geosmin synthase	AEA03341	AEA03341	3.50 x 10 ⁻¹⁸⁸
<i>Oscillatoria limosa</i> LBD 305b	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	2-MIB/2MB synthase	ADU79150	ADU79150	2.20 x 10 ⁻⁵⁹
<i>Phormidium</i> so. P2r	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	germacradienol/geosmin synthase	ABU93239	ABU93239	7.00 x 10 ⁻¹⁸⁹
<i>Planktothricoides raciborskii</i> CHAB3331	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	2-MIB/2MB synthase	AEK21537	AEK21537	3.40 x 10 ⁻⁵⁷
<i>Pseudanabaena limnetica</i> str. Castaic Lake	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	2-MIB synthase	ADU79148	ADU79148	2.60 x 10 ⁻⁵⁹
<i>Pseudanabaena</i> sp. dph15	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	2-MIB/2MB synthase	AEK21533	AEK21533	4.10 x 10 ⁻⁵⁷
<i>Pseudanabaena</i> sp. NIVA-CYA 111	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriales</i>	2-MIB/2MB synthase	ADU79149	ADU79149	2.30 x 10 ⁻⁵⁸
<i>Streptomyces lactacystinaeus</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SLT19_593	-	1.60 x 10 ⁻⁴⁶
			2-MIB/2MB synthase	SLT11_214	-	1.70 x 10 ⁻⁶⁷
				SLT18_1246	BAP82213	1.60 x 10 ⁻⁶⁰
				SLT18_1078	BAP82203	4.60 x 10 ⁻⁴⁴
				SLT18_1718	BAP82214	3.50 x 10 ⁻⁶⁴
				SLT18_1880	BAP82216	2.90 x 10 ⁻⁵⁵
<i>Streptomyces</i> sp. SK1894	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	SspSK6539	BAP82222	1.20 x 10 ⁻¹⁹⁰
			2-MIB/2MB synthase	SspSK6215	BAP82224	3.40 x 10 ⁻²³
				SspSK5794	BAP82221	5.10 x 10 ⁻⁵⁷
				SspSK3051	BAP82223	2.30 x 10 ⁻⁵⁵
<i>Streptomyces</i> sp. ND90	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	germacradienol/geosmin synthase	ND90_2698	BAP82225	2.90 x 10 ⁻¹⁹⁵
			<i>epi</i> -isozizaene synthase	ND90_4926	BAP82226	9.00 x 10 ⁻⁷³
			2-MIB/2MB synthase	ND90_4247	BAP82227	4.70 x 10 ⁻⁷²
				ND90_2413	BAP82228	6.60 x 10 ⁻⁶⁴
				ND90_0354	BAP82229	1.80 x 10 ⁻⁴³
				ND90_0246	BAP82230	5.20 x 10 ⁻³⁰

1-3 ゲノム解析が行なわれた放線菌が生産するテルペン化合物の解析

これまでに放線菌は多くの二次代謝産物を生産することを明らかにされてきた。しかしながら、テルペン化合物については極めて少ないことが認識されていた。放線菌が生成するテルペン化合物とゲノム上にコードされていると予想されるテルペン合成酵素との関係を明らかにする目的として、実際にゲノム解析が行なわれた放線菌の培養を行ない、テルペン化合物の生産の確認を行った。

【実験材料】

・ 使用菌株

S. albus J1074

S. avermitilis ATCC 31267

S. coelicolor A3(2)

S. clavuligerus ATCC 27064

S. cyaneogriseus subsp. *noncyanogenus* NRRL 15773

S. ghanaensis ATCC 14672

S. griseus IFO13350

S. lactacystinaeus OM-6519

S. pristinaespiralis ATCC 25486

S. roseosporus NRRL 11379

S. sviceps ATCC 29083

S. venezuelae ATCC 10712

S. viridochromogenes DSM 40736

Streptomyces sp. SirexAA-E

Kitasatospora setae KM-6054

【実験方法】

2-1). 放線菌が生産するテルペン化合物の分析

ISP #2 あるいは SFM 寒天培地 (直径 90 mm プレート) に各菌株の孢子懸濁液を塗布し、30℃で孢子が形成するまで(およそ 5 日間)培養した。培養終了後、寒天平板 1 枚あたり 10 ml のメタノールを加え 30 分間静置した。メタノール抽出液を分取し、1 ml の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ないヘキサン抽出物を得た。これらヘキサン抽出物を脱水後 GC-MS により解析を行った。

[分析条件]

・GC-MS 島津製作所製 GCMS-QP5050A

カラム：Neutral Bond-5 capillary column (30 m x 0.25 mm) (GL サイエンス社製)

温度：開始温度 50°C、昇温 50-250°C (25°C/min)、測定時間：12 分

【実験結果】

これまでに放線菌が生産するテルペン化合物として、geosmin や 2-methylisoborneol が見出されていた。今回、³rd-HMM の解析により細菌、特に放線菌由来のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質が多数見出された。したがって、本属は多様なテルペン化合物を生産する能力を有していることが示唆される。そこで実際にゲノム解析が行なわれた放線菌が生産しているテルペン化合物を GC-MS 解析を行なった。その結果、ほとんどの菌種が geosmin やその中間体である germacradienol や germacrene D といった揮発性のテルペン化合物を生産していることが明らかになった。また生産物のパターンによって、少なくとも 3 つのグループに分けることができた。すなわち、(A) *S. albus* J1074, *S. avermitilis* ATCC 31267, *S. coelicolor* A3(2), *S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* NRRL 15773, *S. ghanaensis* ATCC 14672, *S. pristinaespiralis* ATCC 25486, *S. sviceus* ATCC 29083, *S. venezuelae* ATCC 10712, *S. viridochromogenes* DSM 40736, および *K. setae* KM-6054 は主として geosmin (2)、2-methylisoborneol (1) あるいは germacradienol (9) を生産し、*S. albus* J1074 および *S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* NRRL 15773 では albaflavenone (5) も生産した(図 1-3)。(B) *S. griseus*, *S. roseosporus* NRRL 11379 および *Streptomyces* sp. SirexAA-E は geosmin, 2-methylisoborneol あるいは germacradienol は全く生産しないか、あるいは極少量もしくは他の培養条件で少量生産するが、セスキテルペンである(+)-caryolan-1-ol (10) および *epi*-cubenol (11) を主代謝産物として生産した (図 1-4)。(C) *S. clavuligerus* ATCC 27064 および *S. lactacystinaeus* OM-6519 はあらゆる培養方法によってもテルペン化合物を生産しない (図 1-5)、に分類された。

1-4 考察

2014 年の公的データベースおよび筆者が所属する研究室で解析したゲノムデータから得た細菌のタンパク質(総数 8,759,463 タンパク質、5152 菌種)を 1st、2nd および 3rd-HMM を用いて解析を行った。3rd-HMM を用いて検索したところ E-value $5.3 \times 10^{-7} \sim 6.9 \times 10^{-207}$ で 262 個のテルペン合成酵素を推定することができた。一方、1st-HMM を用いた場合では、245 個のテルペン合成酵素を推定することができた。また 2nd-HMM で検索した場合では、262 個と 3rd-HMM と同数のタンパク質を推定することができたが、E-value は $1.1 \times 10^{-1} \sim 2.9 \times 10^{-258}$ であった。3rd-HMM を用いた解析結果の E-value は 2nd-HMM を用いた解析結果に比べて E-value の幅が収束していることから、3rd-HMM は統計モデルとして前世代のモデルと比べて改善していることが確認されたものと判断できる。推定されたテルペン合成酵素の多くは *Actinomycetales* の菌群から見出されたが、これは公的データベースに、これらの菌種が多数登録されているものと思われる。テルペン合成酵素と推定されたタンパク質が見出された菌群は、グラム陽性、陰性を問わず、ほとんどが土壌細菌であった。土壌生育環境では多くの生物種と共存している状況である。特に植物や糸状菌などとの共生環境であることから、テルペン化合物がこれらの菌群で糸状菌、あるいは植物との情報伝達のシグナル物質として利用されていたのかもしれない。

HMM 解析の結果、多くの細菌、特に放線菌由来のテルペン合成酵素が見出されたため、実際にこれらの菌種がテルペン化合物を生産するのか解析を行なった。Geosmin や 2-methylisoborneol の蓄積が確認されなかったグループ(B)および(C)の菌株のゲノムからは geosmin 合成酵素および 2-methylisoborneol 合成酵素と推定される遺伝子が見出される。しかしながら *S. roseosporus* NRRL 11379 は唯一、geosmin 合成酵素遺伝子が見出されなかった。グループ(B)に属する *S. griseus* も geosmin 合成酵素および 2-methylisoborneol 合成酵素と推定されるテルペン合成酵素遺伝子を保持しているが、液体培養において微量の geosmin および 2-methylisoborneol の蓄積が観察された。その理由として、geosmin 合成酵素遺伝子の転写に問題があるのか、もしくは (+)-caryolan-1-ol 合成酵素、*epi*-cubenol 合成酵素および geosmin 合成酵素が前駆体としてのファルネシル二リン酸の利用を競合していることが示唆された。また、グループ(A)の菌株のゲノムにおいても geosmin 合成酵素、2-methylisoborneol 合成酵素以外に、さらに(B)および(C)の菌株からも多数のテルペン合成酵素と推定される合成酵素遺伝子が見出される。このことは少なくとも *Streptomycetaceae* の放線菌では多くのテルペン合成酵素遺伝子は休眠状態であることが推定された。

推定されたテルペン合成酵素のアミノ酸配列に基づく系統解析から作成された系統樹において、*epi*-isozizaene の分岐群の下側に ADO85594, SAV_2988, SBI_09679,

B446_29695 および SCYA_02107 からなる分岐群が配置している($K_{aa} < 0.1$)。ADO85594 は *S. exfoliatus* UC5319 のセスキテルペン抗生物質 pentalenolactone 生合成遺伝子群 (*pen*)の pentalenene 合成酵素である^{12, 13})。 *S. bingchenggensis*, *S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* および *S. collinus* のオルソログのゲノム上での配置は、*S. exfoliatus* や *S. avermitilis* の *pen* あるいは *ptl* 生合成遺伝子群とほぼ同一であった (図 1-5)。したがってこれらのオルソログを保有する菌株は pentalenolactone 類を生産する能力を有すると推察された。 *S. exfoliatus* の *pen* 遺伝子群には cytochrome P450 をコードする 2 つの遺伝子 *penI* および *penM* が存在する⁵⁰)。他方、*S. avermitilis* の neopentalenolactone 生合成遺伝子群(*ptl*)には cytochrome P450 遺伝子(*ptlI*)が一つのみ配置している³⁸)。 *S. bingchenggensis*, *S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* の生合成遺伝子群には *penI* および *penM* に相当するオルソログが存在するが、*S. collinus* の生合成遺伝子群は *S. avermitilis* と同様に *ptlI* のオルソログのみが存在する。また、前者の Baeyer-Villiger monooxygenase と推定される遺伝子は *pen* 遺伝子群内の *penE* との相同性が高いが、*S. collinus* の生合成遺伝子群内の Baeyer-Villiger monooxygenase と推定される遺伝子は *S. avermitilis* の *ptlE* と相同性が高い。これらのことから、*S. bingchenggensis* および *S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* は pentalenolactone を、一方、*S. collinus* は neopentalenolactone を生産する能力を有しているものと推察される。系統樹の左上部に位置する geosmin/germacradienol 合成酵素分岐群と *epi*-isozizaene 合成酵素分岐群の間には SGR_2079 (*S. griseus* IFO 13350 由来の (+)-caryolan-1-ol 合成酵素⁵¹)、SACTE_4655 (*Streptomyces* sp. SirexAA-E), SSGG_05086 (*S. roseosporus* NRRL 11379) および SFUL_5260 (*S. fulvissimus* DSM 40593)の分岐群が、また系統樹の下部には SGR_6065 (*epi*-cubenol 合成酵素⁴¹)、SACTE_0873, SSGG_00557, SFUL_978 および Sfla_5339 の分岐群が見出された。(+)caryolan-1-ol 合成酵素と *epi*-cubenol 合成酵素のオルソログを保有する *Streptomyces* sp. SirexAA-E は (+)-caryolan-1-ol および *epi*-cubenol を生産した。さらに *S. roseosporus* NRRL 11379 も同様な生産物のパターンを示した (図 1-4)。この結果は、系統樹の K_{aa} 0.1 以下からなる分岐群のテルペン合成酵素では生成物の推定が可能であることが示唆された。

また、2008 年の解析では、モノ、セスキおよびジテルペン合成酵素、それぞれに系統群を生成したが、2nd HMM による解析では炭素鎖数での分類ができなくなってきた。これは植物の合成酵素でも同じようなことが見出されることから、細菌由来の合成酵素も植物などと同様に多様性が高いことが強く示唆された。

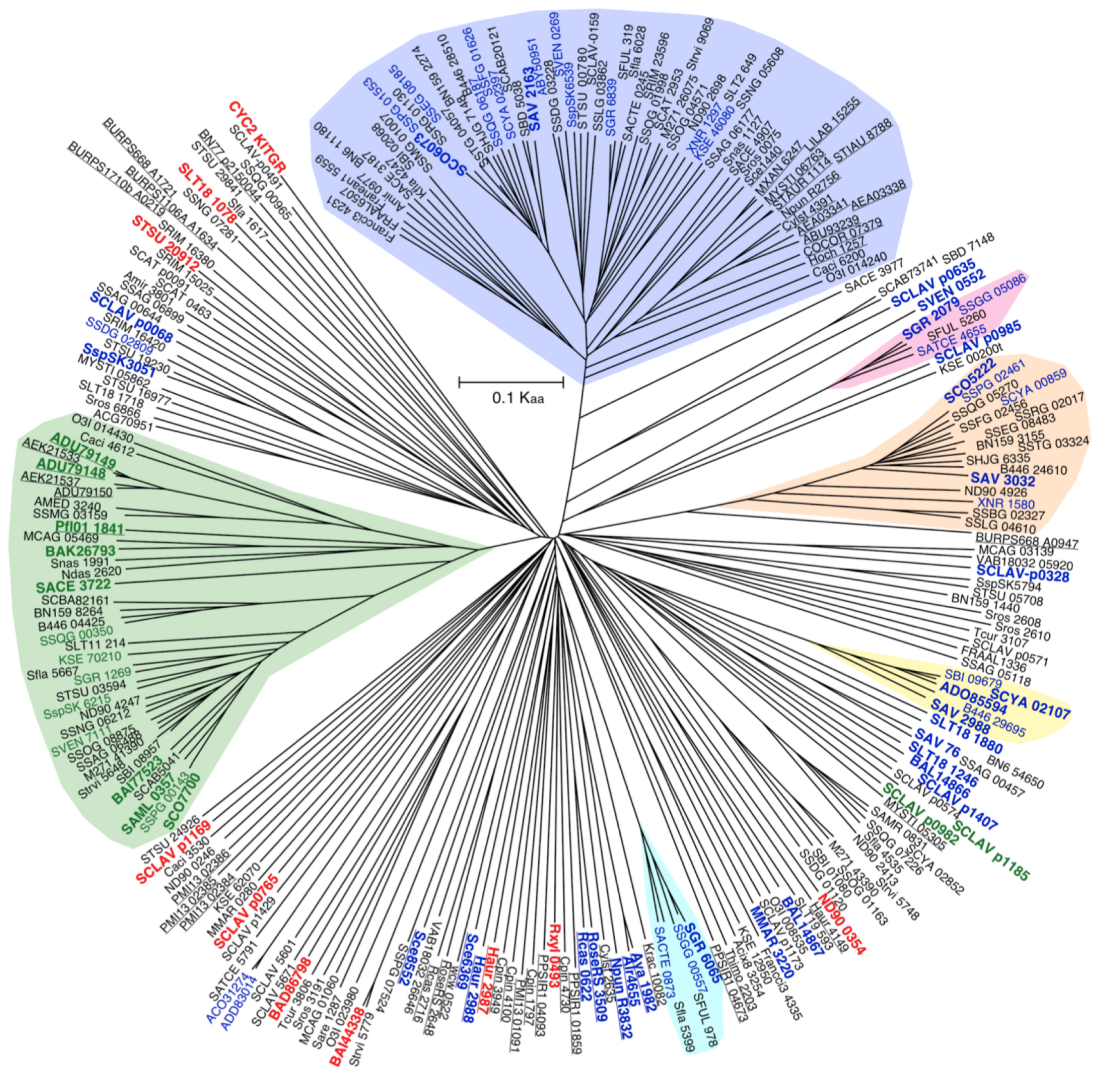


図1-2. 3rd-HMMにより見出されたテルペン合成酵素の系統解析 (2014)

細菌由来データベース(8,759,463 タンパク質)から見出された262個のテルペン合成酵素の系統解析。**モノテルペン合成酵素**、**セスキテルペン合成酵素**および**ジテルペン合成酵素**はそれぞれ緑、青および赤色で表記する。太字および下線で記されているテルペン合成酵素は既に解析が報告されているものを示す。青色、橙色および緑色で囲われている分岐群は、それぞれgeosmin合成酵素、epi-isozizaene合成酵素および2-methylisoborneol合成酵素を示す。

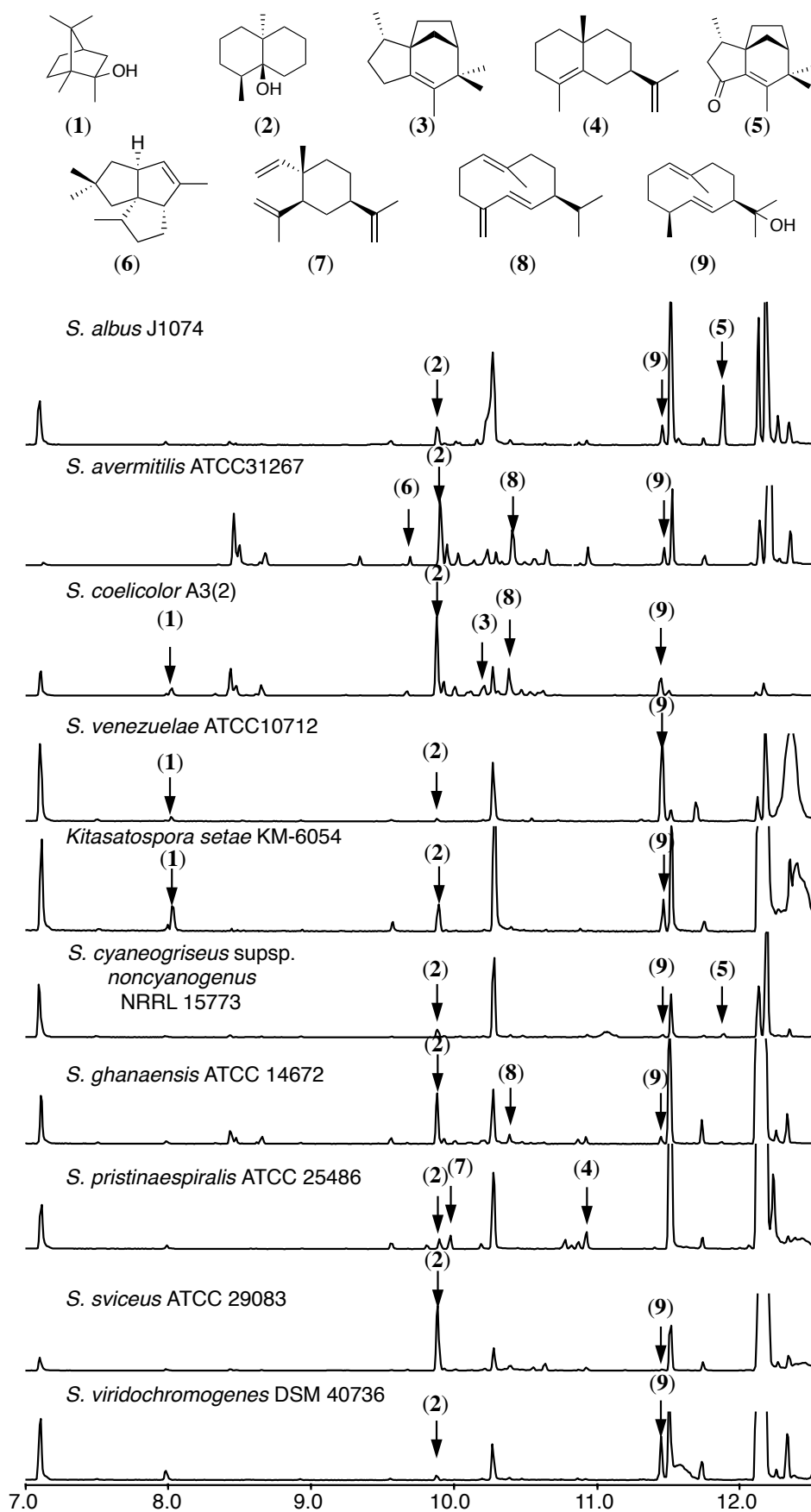


図1-3. グループAに属する放線菌のヘキサン抽出物のGC解析
2-methylisoborneol (1), geosmin (2), epi-isozizaene (3), selina-4(15),7(11)-diene (4), albaflavenone (5), pentalenene (6), β -elemene (7), germacrene D (8), germacradienol (9)を示す。

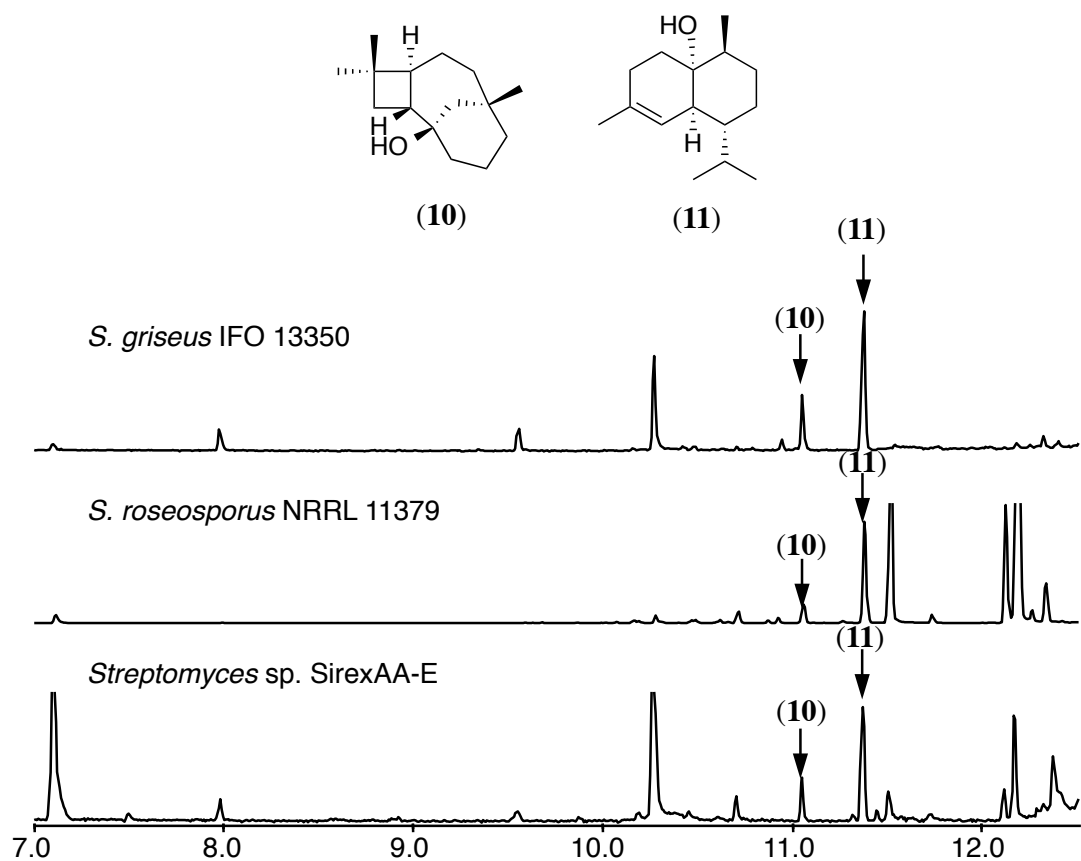


図1-4. グループBに属する放線菌のヘキサン抽出物のGC解析
Caryolan-1-ol (10)および*epi*-cubenol (11)を示す。

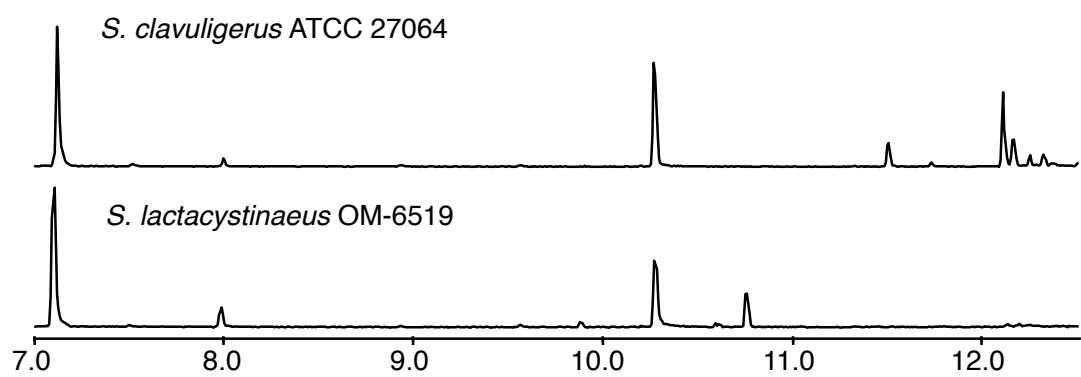


図1-5. グループCに属する放線菌のヘキサン抽出物のGC解析

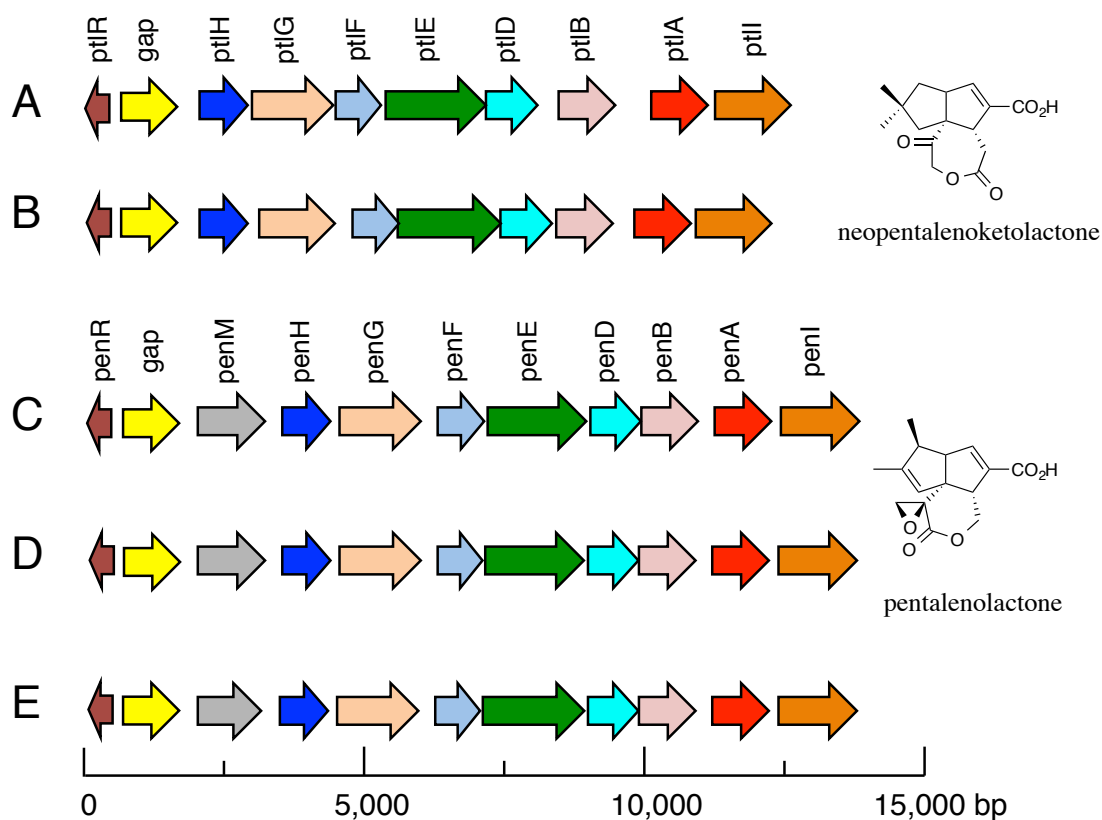


図1-6. pentalenolactone類生合成遺伝子群

S. avermitilis ATCC31267 (A)および*S. collinus* Tu 365 (B)由来のneopentalenoketolactone生合成遺伝子群と*S. exfoliatus* UC5319 (C), *S. bingchenggensis* BCW-1 (D)および*S. cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* NRRL 15773 (E)由来のpentalenolactone生合成遺伝子群を示す。

第二章 原核細胞生物由来テルペン合成酵素遺伝子の解析

2-1 序論

2012 年に 2nd-HMM を用いて公的データベースの細菌タンパク質遺伝子情報から 140 種のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質遺伝子を見出した¹⁸⁾。さらに 2014 年の公的データベースおよび筆者が所属する研究室で解析されたゲノムデータから得た細菌のタンパク質 (総数 8,759,463 タンパク質) を 2nd-HMM で得た 140 種のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から新たに作製した 3rd-HMM を用いて検索したところ、262 個ものテルペン合成酵素を得ることができた。推定された 262 のテルペン合成酵素のアミノ酸配列の alignment およびその結果の bootstrap 法による系統解析を行なった。その結果、既知のテルペン合成酵素と異なる独立した分岐群を見出し、その中で 30 種 (SGR_2029, SGR6065, SCLAV_p0068, SCLAV_p0328, SCLAV_p0635, SCLAV_p0765, SCLAV_p0982, SCLAV_p0985, SCLAV_p1169, SCLAV_p1185, SCLAV_p1407, SVEN_0552, SspSK_3051, SLT17_1246, SLT18_1078, SLT_1880, STSU_20912, ND90_0354, MMAR_3220, AVA_1982, Haur_2987, Haur_2988, Npun_R3832, NP_488725, Rcas_0622, RoseRS_3509, Rxyl_0493, Sce6369, Sce8552, Wcw_0522) を選択した (図 1-2)。そこで、筆者が所属する研究室で開発された *S. avermitilis* SUKA 株を宿主とした異種遺伝子発現系を用いることにより、これらのテルペン合成酵素遺伝子の発現ならびに生産される化合物の解析を行なった^{42, 52, 53)}。各テルペン合成酵素遺伝子を構成的発現プロモーターである *rpsJp* ならびにポリプレニルニリン酸合成酵素遺伝子とオペロンを形成するように連結し、SUKA22 を宿主とした異種発現系に供することによって、生成するテルペン化合物の解析を行なった。

2-2 テルペン合成酵素遺伝子発現カセットの構築

【実験材料】

・ 使用菌株

Escherichia coli DH5α

・ プラスミド

pKU1021 (pKU460::aac(3)I-rpsJp) (図 2-1)

・ 試薬および酵素

Expand High Fidelity PCR system : Roche 社より購入

電気泳動用高純度アガロース(アガロース ME) : 岩井化学薬品株式会社より購入

カナマイシン(KM) : 和光純薬株式会社より購入

制限酵素 : NEW ENGLAND Biolabs 社より購入

T4 DNA ligase : NEW ENGLAND Biolabs 社より購入

GENECLEAN Kit (6 M ヨウ化ナトリウムおよびガラスミルク) : フナコシ株式会社より購入

・ 培地

巻末に記載

【実験方法】

2-2-1 PCR による各ポリプレニルニリン酸合成酵素遺伝子の増幅

それぞれの鎖長のプレニルニリン酸を基質とするテルペン合成酵素に対応するため、炭素数 10 のモノテルペン合成酵素遺伝子の発現にはゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子(*gps*)、炭素数 15 のセスキテルペン合成酵素遺伝子の発現にはファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子 (*fps*)、さらに炭素数 20 のジテルペン合成酵素遺伝子の発現にはゲラニルゲラニル ニリン酸合成酵素遺伝子(*ggs*)との共発現プラスミドの構築を行なった。上流および下流領域の増幅では、以下に示すプラスミドおよび *S. avermitilis* のコスミドクローンを鋳型として用いた。

gps : pGPS (*gps* : *Streptomyces* sp. CL190 由来のゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子)

fps : CL_216_D06 (*ptlB* : *S. avermitilis* 由来のファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子)

(sav2997))

ggs : pKU1021::*cldABCD* (*cldA* : *Streptomyces* sp. K04-0144 由来のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子)

以下の反応液を調製し、PCR (Biometra 社製) を行った。

鋳型 DNA (0.5 µg/ml を 50 倍希釈)	1 µl
Expand High Fidelity Taq Buffer (10x)	2 µl
DMSO (ジメチルスルホキシド)	1 µl
dNTP mixture (2.5 mM each)	1 µl
Forward primer (10 mM)	1 µl
Reverse primer (10 mM)	1 µl
Expand High Fidelity Taq DNA polymerase	0.7 U
滅菌水 (D.W.)	up to 20 µl

増幅条件

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min return to 2, 24 cycles
5. 72°C 5 min
6. 4°C ∞

プライマーの塩基配列 (下線は制限酵素サイト、太字は開始コドンおよび終止コドンを示す)

ggs_fwd_NdeI : 5'-gtggttcccat**ATG**ACTCCGGACGTGACCAACGAC-3'

ggs_rev_XbaI : 5'-ctcgaattctctagaCTACGCATCGCGGTAGGCGAC-3'

ptlB_fwd_NdeI : 5'-cgggaggtcat**ATG**ACCGTGACCCCGGAAAGTCTG-3'

ptlB_rev_XbaI : 5'-tcgagtctagaactagt**TCAC**ACCTCCCGGTGACGACGAAG-3'

cldA_fwd_NdeI : 5'-catgcggtaccggccat**atg**TACTCAGTAGTCCTTCGT-3'

cldA_rev_XbaI : 5'-gctctagac**TCATG**ACTGCCTTTCGGTGGCCATCC-3'

試料溶液の半量 (10 µl) のフェノール/クロロホルム溶液 (0.1% 8-ヒドロキシキノリンを含むフェノールおよび 4.17% イソアミノアルコールを含むクロロホルムを等量混合し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で飽和させた溶液) を加えてよく攪拌し、

13,200 rpm で 5 分間遠心分離を行なった(以下フェノール/クロロホルム処理とする)。上層を回収し、2 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (サンプル溶液の 1/10 量) および 20 ml のイソプロパノール (試料溶液と等量) を加え、攪拌後、室温で 5 分間静置して DNA を沈殿させた。5 分間の遠心分離 (13,200 rpm) 後、上清を除去し(以下イソプロパノール沈殿とする)、50 μ l の 70%エタノールを加えて DNA を洗浄した(以下 70%エタノール洗浄とする)。5 分間の遠心分離 (13,200 rpm) を行ない、上清を除去した。しばらく風乾した後、20 μ l の 0.1x TE 緩衝液 (1 mM Tris-HCl、0.1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA), pH 8.0) に溶解した。

2-2-2 アガロース電気泳動

アガロース ME を 1% となるように TAE バッファー (40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTA、pH 8.0) に加え、加温処理して溶解した。ガラス平板に注ぎ室温で固化した。得られた DNA 溶液に 2 \times 泳動用色素 (0.1% ブロモフェノールブルー、5% スクロース、0.02% SDS) を加え、70 V で電気泳動を行い、増幅産物の確認を行なった。

2-2-3 増幅断片の制限酵素消化

得られた DNA 溶液に 3.0 μ l の 10 x NEBuffer 4 を加え、滅菌水で全量 30 μ l とした。0.25 μ l の *DpnI* を加え、37°C で一晩保温し、鋳型 DNA を完全に消化 (分解) した。反応終了後、65°C で 5 分間加温し、氷水中で急冷した。その後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行なった。次いで、プライマーに導入した制限酵素を用いて以下のように反応を行なった。

gps, *fps*, *ggs* (インサート) および pKU1021 (ベクター) の DNA 溶液 5 μ l に 2 μ l の 10 x NEBuffer 4 および牛血清アルブミン (BSA) を加え、滅菌水で全量 20 μ l とした。0.25 μ l の *NdeI* および *XbaI* を加え、37°C で 2 時間の制限酵素反応を行なった。反応終了後、65°C で 5 分間加温し、氷水中で急冷した。フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行ない、しばらく風乾させた後、10 μ l の TE 緩衝液に溶解した。

2-2-4 アガロース電気泳動による DNA 断片の精製

得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動し、臭化エチジウム溶液 (0.5 μ g/ml) 中で 30 分間染色した。染色したアガロースゲルをダークリーダー (クレアケミカルリサーチ社製) で観察し、目的断片約 1.0 kb および約 6.2 kb (ベクター断片) を切り出した。1.5 ml エッペンドルフチューブに入れゲル重量から換算したゲル容量の 3 倍量の 5 M ヨウ化ナトリウムを加え 45°C で 5 分間加温して溶解させた。その後、4 μ l のガラスミルクを加えて懸濁し、氷上で 10 分間放置 (1 分毎に攪拌) し DNA を吸

着させた。13,200 rpm で 10 秒程度遠心しガラスミルクを沈殿させ、上清を除去した後、1 ml の NEW buffer (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、100 mM 塩化ナトリウム、50 v/v % エタノール、pH 8.0) で 2 回洗浄した。洗浄液を完全に除去した後、ガラスミルクに 10 μ l の 0.1 x TE 緩衝液を加え混合し、45°C で 4 分間加温した。これを 13,200 rpm で 10 秒程度の遠心分離を行い、DNA を含む上清を回収した。この作業を 2 回繰り返し、ガラスミルクに吸着した DNA を溶出した。(以下アガロースゲルからの抽出操作とする)。

2-2-5 DNA の連結および形質転換

得られた PCR 断片および pKU1021 の DNA 溶液のモル比が 2 : 1 となるように調製し、1.5 μ l の 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) および 0.1 M MgCl₂ を加え、滅菌水で 13.5 μ l とした。65°C で 2 分間加温し、室温で放冷した後、1.5 μ l の ATP/DTT 混合液 (0.1M ジチオスレイトール (DTT)、1 mM ATP) を加えた。十分に攪拌し、0.2 μ l (400 U) の T4 DNA ligase を加え、12°C で一晩反応を行った。反応終了後、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、5 μ l の 0.1 x TE 緩衝液に溶解した。溶解した DNA と 50 ml のエレクトロポレーション用大腸菌コンピテントセル (DH5 α) を氷中で混和させ、氷冷したキュベット(1 mm 幅)に移した。200 Ω 、25 μ F、1.5 kV の条件でエレクトロポレーション (バイオラッド社製) を行った。直ちに 1 ml の SOC 培地を加え、30°C で 90 分間の振とう培養を行った。その後、一部を 50 μ g/ml の KM を含む LA 培地に塗布し、30°C で一晩培養した。

2-2-6 プラスミド抽出

得られたコロニーを、50 μ g/ml の KM を含む 2 ml の LB 培地で一晩培養した。遠心分離(3,000 rpm, 10 分間)により菌体を回収した後、0.3 M スクロール溶液で菌体を洗浄した。再度遠心分離(13,200 rpm, 1 分)を行い、上清を除去した。2 mg/ml の卵白リゾチームを含む 200 μ l の STE 緩衝液 (10%スクロース、25 mM Tris-HCl、25 mM EDTA pH8.0) を添加し、菌体を懸濁した後、室温で 5 分間放置した (1 分おきに転倒混和した)。120 μ l の 0.3M NaOH / 2 v/w % SDS を加えてよく攪拌した後、65°C で 20 分間加温した (5 分おきに転倒混和した)。室温に放置し、室温まで冷却した後、60 μ l のフェノール/クロロホルム溶液を加えてよく攪拌し、遠心分離を行った (13,000 rpm、5 分間)。上層を回収し、28 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムおよび 280 μ l のイソプロパノールを加えてよく攪拌し、5 分間室温で静置して DNA を沈殿させた。遠心分離によって上清を除去し、200 μ l の TE 緩衝液に溶解した。100 μ l のポリエチレングリコール(#6,000) / 1.5 M 塩化ナトリウム溶液を添加し、よく攪拌した後、30 分間室温で静置した。遠心分離によって上清を除去し、1 ml の 70%エタノールを加

えて DNA を洗浄した。再度、遠心分離によって上清を除去し、しばらく風乾した後、20 μ l の TE バッファーに溶解した。その後、1%アガロース電気泳動を行ない、目的とするプラスミドが抽出されたことを確認し、pKU1021::*gps* (AB982124), pKU1021::*fps* (AB982125)および pKU1021::*ggs* (AB982126)を構築した(図 2-2)。

2-3 放線菌由来のテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの構築

【実験材料】

・使用菌株

S. clavuligerus ATCC 27064

S. griseus IFO 13350

S. tsukubaensis NRRL18488

S. venezuelae ATCC 10712

S. lactacystinaeus OM-6519

Streptomyces sp. SK1894

Streptomyces sp. ND90

・プラスミド

pKU1021::*gps*, pKU1021::*fps*, pKU1021::*ggs*

【実験方法】

2-3-1 PCR による各候補テルペン合成酵素遺伝子の増幅

以下の反応液を調製し、PCR を行った。上流および下流領域の増幅では、各菌株の染色体を鋳型として用いた。

鋳型 DNA (0.5 µg/ml を 50 倍希釈)	1 µl
Expand High Fidelity Taq Buffer (10x)	2 µl
DMSO	1 µl
dNTP mixture (2.5 mM each)	1 µl
Forward primer (10 mM)	1 µl
Reverse primer (10 mM)	1 µl
Expand High Fidelity DNA Taq polymerase	0.7 U
滅菌水 (D.W.)	up to 20 µl

増幅条件

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min 15 sec return to 2, 24 cycles
5. 72°C 5 min
6. 4°C ∞

プライマーの塩基配列（下線は制限酵素サイト、太字は開始コドンおよび終止コドンを示す）

sgr2079_fwd_XbaI : 5'-gctctagacgaggggcagca**ATG**AGCCAGATC-3'
sgr2079_rev_HindIII : 5'-ggtgagaagcttaaacattcgatgggcgcggtagcc-3'
sgr6065_fwd_XbaI : 5'-cggctctagactggggcacaccgt**TTG**ACCGGAG-3'
sgr6065_rev_HindIII : 5'-accggaagcttcgagggcccccgatccgttcc-3'
sclav_p0068_fwd_XbaI : 5'-cggctctagatgcgaggtcgac**ATG**TCCCTGAAC-3'
sclav_p0068_rev_HindIII : 5'-ggtcacaagcttcgggcagctcccggatgaagt-3'
sclav_p0328_fwd_XbaI : 5'-gctctagagggaacggagcg**GTG**TGACC-3'
sclav_p0328_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttaccgcgtggcccaggaagggaaga-3'
sclav_p0635_fwd_XbaI : 5'-ccgggctctagaacataggctccggac**ATG**AATCCC-3'
sclav_p0635_rev_HindIII : 5'-gtggagaagcttcgaccgccgtcctctacg-3'
sclav_p0765_fwd_XbaI : 5'-ccttctagaggaggaccat**ATG**ACCATCTCCGTTCCCCAGCTC-3'
sclav_p0765_rev_HindIII : 5'-cgcccaagcttggccgagcgcgttctctgac-3'
sclav_p0982_fwd_XbaI : 5'-cggcctctagaccacaggagcagcgcac**ATG**CCCG-3'
sclav_p0982_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttcggaggacgggcggg**TCACCA**AG-3'
sclav_p0985_fwd_XbaI : 5'-cgctctagacgcggtcgtgagga**GTG**AACCTG-3'
sclav_p0985_rev_HindIII : 5'-gagcacaagctttatcccgccgggcaggtcacg-3'
sclav_p1169_fwd_XbaI : 5'-cggtctagaggaggaccat**ATG**CGCGGAGCCGGTCCCGGGAGC-3'
sclav_p1169_rev_HindIII : 5'-cgccgtgaagcttgggccgggggtcg**CTACC**AGGGGGTGAACAC-3'
sclav_p1185_fwd_XbaI : 5'-gccgtctagacgagagttggggtcattg**ATG**CAG-3'
sclav_p1185_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttcagctcgaaccggcgtgaga-3'
sclav_p1407_fwd_XbaI : 5'-cctctagacgggaggggctggg**ATG**CCGCAGG-3'
sclav_p1407_rev_HindIII : 5'-gtcagaagcttcaccggcgggggcggtccgga**TCAT**-3'
sven_0552_fwd_XbaI : 5'-cggctctagacgaggaagaaggaggctgggtcccg-3'

sven_0552_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttcacctggcgtagcagggTCATGC-3'
sspSK_3051_fwd_XbaI : 5'-gctctgcgacggaggcccgcgATGACCACCACTTC-3'
sspSK_3051_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttcggccccggctccgttccggtggat-3'
slt17_1246_fwd_XbaI : 5'-gctctagacgggagtcgATGTCTGACGACACC-3'
slt17_1246_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttcgctcggtgggctgttc-3'
slt18_1078_fwd_XbaI :
 5'-ccctccgtctagaggaggacatATGTCTGACGACACCTCACTTCAG-3'
slt18_1078_rev_HindIII : 5'-gggtccaagcttcacgcccgcTCAGACCGCGTGGTAC-3'
slt18_1880_fwd_XbaI : 5'-ccctctagaggaggacatATGACAACCACGGCAGAGATCCTC-3'
slt18_1880_rev_HindIII : 5'-ggggcaagcttgtagcacgggaggcggaag-3'

反応終了後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、20 μ l の 0.1xTE 緩衝液に溶解した。1%アガロース電気泳動を用いて増幅産物の確認を行なった後、*DpnI* により鋳型 DNA を完全に消化（分解）した。さらに PCR 断片、pKU1021::*gps*、pKU1021::*fps* および pKU1021::*ggs* を *XbaI* および *HindIII* で消化した。反応後、65℃で 5 分間加温し、氷水中で急冷した。フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行ない、しばらく風乾させた後、10 μ l の TE バッファーに溶解した。アガロース電気泳動後、DNA 断片をゲル中から精製し、PCR 断片(インサート)およびベクターのモル比が 2 : 1 となるように調製し連結した。その後、*E. coli* DH5 α へ導入した後、50 μ g/ml の KM を含む LB 培地で培養した。プラスミド抽出を行い、pKU1021::*fps-sgr2079*, pKU1021::*fps-sgr6065*, pKU1021::*fps-sclav_p0068*, pKU1021::*fps-sclav_p0328* , pKU1021::*fps-sclav_p0635*, pKU1021::*ggs-sclav_p0765*, pKU1021::*gps-sclav_p0982*, pKU1021::*fps-sclav_p0985*, pKU1021::*ggs-sclav_p1169*, pKU1021::*gps-sclav_p1185*, pKU1021::*fps-sclav_p1407*, pKU1021::*fps-sven_0552*, pKU1021::*fps-sspSK_3051*, pKU1021::*fps-slt17_1246*, pKU1021::*ggs-slt18_1078*, pKU1021::*fps-slt18_1880*, pKU1021::*ggs-stsu_20912*, pKU1021::*ggs-nd90_0354* を得た。その後、目的とするプラスミドを 1%アガロース電気泳動で確認した。

2-4 *Mycobacterium* 属、*Rubrobacter* 属およびグラム陰性菌由来のテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの構築

【実験方法】

2-4-1 放線菌発現用人工遺伝子の設計

Mycobacterium 属、*Rubrobacter* 属やグラム陰性菌は菌株を取得せず、かつ *Streptomyces* での発現を効率に行わせるため、*S. avermitilis* のコドン使用頻度に従った、人工遺伝子を設計した。設計した人工遺伝子の合成はオペロン株式会社に依頼した (図 2-3, 4, 5)。

2-4-2 テルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの構築

pBluescript II SK(+):*mmar_3220* (AB983210), pCR2.1::*ava_1982* (AB983201), pBluescript II SK(+):*haur_2987* (AB983202), pBluescript II SK(+):*haur_2988* (AB983203), pCR2.1::*npun_R3832* (AB983205), pCR2.1::*alr_4655* (AB983204), pBluescript II SK(+):*rcas_0622* (AB983206), pBluescript II SK(+):*roseRS_3509* (AB983207), pCR2.1::*rxyl_0493* (AB983211), pCR2.1::*sce6369* (AB983208), pBluescript II SK(+):*sce8552* (AB983209), pCR2.1::*wcw_0522* および pKU1021::*fps* と pKU1021::*ggs* を *Xba*I および *Hind*III で消化した。反応終了後、65℃で5分間加温し、氷水中で急冷した。フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および70%エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、10 µl の TE 緩衝液に溶解した。アガロース電気泳動後、DNA 断片をゲル中から精製し、目的テルペン合成酵素遺伝子断片およびベクターの断片のモル比が 2:1 となるように調製し連結した。その後、*E. coli* DH5 αへ導入した後、50 µg/ml の KM を含む LB 培地で培養した。プラスミド抽出を行ない、pKU1021::*fps-mmar_3220*, pKU1021::*fps-ava_1982*, pKU1021::*ggs-haur_2987*, pKU1021::*ggs-haur_2988*, pKU1021::*fps-npun_R3832*, pKU1021::*fps-alr_4655*, pKU1021::*fps-rcas_0622*, pKU1021::*fps-roseRS_3509*, pKU1021::*ggs-rxyl_0493*, pKU1021::*ggs-sce6369*, pKU1021::*fps-sce8552*, pKU1021::*fps-wcw_0522* を得た。

2-5 SUKA22 へのテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの導入

【実験材料】

・ 使用菌株

E. coli GM2929 (F- *dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 recF143 mcrA0 mcrB9999 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 supE44 leuB6 rfbD fhuA13 hsdS::Tn10*)

SUKA22 (*Δsav71-1287 Δolm-cluster Δptl-cluster::ermE ΔgeoA Δsav7456-7491*)

・ プラスミド

pKU1021::*fps-sgr2079*

pKU1021::*fps-sgr6065*

pKU1021::*fps-sclav_p0068*

pKU1021::*sclav_p0067-sclav_p0068*

pKU1021::*fps-sclav_p0328*

pKU1021::*ggs-sclav_p0765*

pKU1021::*gps-sclav_p0982*

pKU1021::*fps-sclav_p0985*

pKU1021::*ggs-sclav_p1169*

pKU1021::*gps-sclav_p1185*

pKU1021::*fps-sclav_p1407*

pKU1021::*fps-sven_0552*

pKU1021::*fps-sspSK_3051*

pKU1021::*fps-slt17_1246*

pKU1021::*ggs-slt18_1078*

pKU1021::*fps-slt18_1880*

pKU1021::*ggs-stsu_20912*

pKU1021::*ggs-nd90_0354*

pKU1021::*fps-mmara_3220*

pKU1021::*fps-ava_1982*

pKU1021::*ggs-haur_2987*

pKU1021::*fps-haur_2988*

pKU1021::*fps-npun_R3832*

pKU1021::*fps-alr_4655*

pKU1021::*fps-rcas_0622*
pKU1021::*fps-roseRS_3509*
pKU1021::*ggs-rxyl_0493*
pKU1021::*fps-sce6369*
pKU1021::*fps-sce8552*
pKU1021::*fps-wcw_0522*

・ 試薬および酵素

カナマイシン (KM)
クロラムフェニコール (CP)
ネオマイシン (NM)

・ 培地

巻末に記載

【実験方法】

2-5-1 形質転換用 DNA の調製

S. avermitilis は大腸菌細胞内で複製された DNA 中のメチル化されたアデニン (G^mATC) 及びシトシン ($C^mC[A/T]GG$) 配列を認識して切断する制限系の存在が確認されている。通常、大腸菌から調製した DNA は *dam* (アデニンメチラーゼ遺伝子)、*dcm* (シトシンメチラーゼ遺伝子) の遺伝子産物によってメチル化されているため、直接 *S. avermitilis* に導入することはできない。従って、このような DNA メチル化能を失った変異型の大腸菌を用いて DNA を調製する必要がある。DH5 α より調製したプラスミドをエレクトロポレーション法により *E. coli* GM2929 *hsdS::Tn10* へ導入した。得られた形質転換体を、30 $\mu\text{g/ml}$ の CP および 50 $\mu\text{g/ml}$ の KM を含む LB 培地で一晩培養した。その後、プラスミド抽出を行い、*E. coli* GM2929 *hsdS::Tn10* 由来の DNA を調製した。

2-5-2 プロトプラストの調製

終濃度 0.5 v/w % のグリシンと 5 mM 塩化マグネシウムを含む 50 ml の 15 v/w % スクロースを含む YEME 培地に SUKA22 の孢子懸濁液を 50 μl 植菌し、30°C で 40 時間培養した。培養終了後、3,000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した後、20 ml の P10 培地で洗浄した。回収した菌体に 1 mg/ml の卵白リゾチームを含む 20 ml の P10 培地を加え、時折穏やかに振とうしながら 30°C で 30 分間加温しプロトプラス

トを形成させた。さらに、20 ml の P20 培地を加えて懸濁した後、棉栓ろ過器に通過させ菌糸を除去した。この通過液を 3,000 rpm で 10 分間遠心し、プロトプラストを回収した。10 ml の P20 培地で穏やかに懸濁した後、再度遠心しプロトプラストを沈殿させた。この操作を 2 回繰り返した後、得られたプロトプラストに終濃度 7% の DMSO を含む 1 ml の P20 培地を加えて穏やかに懸濁し、50 μ l ずつ分注し、-80°C で凍結保存した。

2-5-3 形質転換およびプロトプラストの再生

4-1). で調製した DNA 5 μ l と作製したプロトプラスト懸濁液 50 μ l を混和し、500 μ l の 25%PEG 溶液（スクロース 2.5 g、ポリエチレングリコール（#1000）25 g を水 100 ml に溶解し、2 N 水酸化カリウムで pH 9.0 に調整し、フィルター濾過をした後 121°C で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。使用時に、別滅菌した 0.5 v/w %リン酸二カリウム 10 μ l/ml、5 M 塩化カルシウム 20 μ l/ml、1M Tris-マレイン酸(pH 8.0) 50 μ l/ml を添加した）を加え混合した。1 分間静置した後、450 μ l の P20 培地を加え懸濁した。その後、一部を 2.5 ml の RM14 軟寒天培地とともに RM14 培地に広げた。30°C で 16~20 時間培養した後、100 μ g/ml の NM を含む 2.5 ml の RM14 軟寒天培地を重ねし、30°C で 4 日間培養した。得られたコロニーを 1 μ g/ml の NM を含む YMS⁺⁺培地にパッチ状に移植し培養した。耐性を示すコロニーの胞子を YMS⁺⁺培地に塗布し、30°C で培養後、胞子を 20 v/w %グリセロールに懸濁し保存した。

2-6 テルペン合成酵素遺伝子発現プラスミド形質転換体の解析

【実験材料】

・ 使用菌株

SUKA22/pKU460

SUKA22/pKU1021::*fps-sgr2079*

SUKA22/pKU1021::*fps-sgr6065*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p0068*

SUKA22/pKU1021::*sclav_p0067-sclav_p0068*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p0328*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p0635*

SUKA22/pKU1021::*ggs-sclav_p0765*

SUKA22/pKU1021::*gps-sclav_p0982*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p0985*

SUKA22/pKU1021::*ggs-sclav_p1169*

SUKA22/pKU1021::*gps-sclav_p1185*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p1407*

SUKA22/pKU1021::*fps-sven_0552*

SUKA22/pKU1021::*fps-sspSK_3051*

SUKA22/pKU1021::*fps-slt17_1246*

SUKA22/pKU1021::*ggs-slt18_1078*

SUKA22/pKU1021::*fps-slt18_1880*

SUKA22/pKU1021::*ggs-stsu_20912*

SUKA22/pKU1021::*ggs-nd90_0354*

SUKA22/pKU1021::*fps-mmara_3220*

SUKA22/pKU1021::*fps-ava_1982*

SUKA22/pKU1021::*ggs-haur_2987*

SUKA22/pKU1021::*fps-haur_2988*

SUKA22/pKU1021::*fps-npun_R3832*

SUKA22/pKU1021::*fps-alr_4655*

SUKA22/pKU1021::*fps-rcas_0622*

SUKA22/pKU1021::*fps-roseRS_3509*

SUKA22/pKU1021::*ggs-rxyl_0493*

SUKA22/pKU1021::*fps-sce6369*

SUKA22/pKU1021::*fps-sce8552*

【実験方法】

2-6-1 テルペン合成酵素遺伝子発現プラスミド形質転換体の小スケール培養
および生産物の分析

10 ml の種培地をスプリングコイル入り大試験管に分注し、ネガティブコントロール株(SUKA22/pKU460)および各形質転換体の孢子懸濁液を接種し、30°Cで2日間振とう培養したものを種培養液とした。10 ml の生産用半合成培地を125 ml 容量のポリカーボネート三角フラスコに分注し、種培養液を0.1 mL (1%)植菌し、28°C、200 rpm で5日間振とう培養した。培養終了後、培養液を3,000 rpm で10分間遠心分離を行ない、培養上清と菌体を分離した。培養上清に1 ml の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ない、ヘキサン抽出物を得た。また菌体は10 ml のメタノールを加え30分間攪拌し、3,000 rpm で10分間遠心分離を行ない、上清を得た。上清に1 ml の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ない、ヘキサン抽出物を得た。それぞれのヘキサン抽出物を直接 GC-MS で解析した。

[分析条件]

・ GC-MS 島津製作所製 GCMS-QP5050A

カラム：Neutral Bond-5 capillary column (30 m x 0.25 mm) (GL サイエンス社製)

(1) 温度：開始温度 50°C、昇温 50-250°C (25°C/min)

測定時間：12 分

(2) 温度：開始温度 50°C、昇温 50-280°C (20°C/min)

測定時間：20 分

【実験結果】

推定された 262 個のテルペン合成酵素のアミノ酸配列に基づく系統的解析から、系統樹において独立して分岐した候補は新規なテルペン骨格を形成する反応を触媒することが期待される。これらの内、30 種のテルペン合成酵素が新規のテルペン骨格を有する化合物を生成することが強く示唆された。そこで、*S. avermitilis* 大規模染色体欠失株 SUKA22 による異種遺伝子発現系を用いて、各形質転換株の代謝産物の包括的な解析を行なった。構成的発現プロモーターである *rpsJp* の直下に前駆体を供給するためにポリプレニルニリン酸合成酵素遺伝子(*gps*, *fps* および *ggs*)を連結したプラスミドを作製した。さらに同一転写単位として発現させるため、その下流に各テルペン合成酵素遺伝子を配置した。それぞれの組換えプラスミドは筆者が所属する研究室で開発された異種発現系の宿主 *S. avermitilis* SUKA22 へ導入した。

1. *sgr2079*

sgr2079 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、保持時間 7.88 分に特異的なピークが検出された。 m/z 204 [M^+]のイオンピークを示す化合物が観測され、セスキテルペン化合物であることが推測された。マスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、この化合物が caryolan-1-ol であると推定した (図 2-6)。

2. *sgr6065*

sgr6065 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、7 種類の特異的ピークが検出された (図 2-7)。それぞれ m/z 204 [M^+]と m/z 222 [M^+]の分子イオンピークを示す生産物が観測され、セスキテルペンの炭化水素ならびにアルコール体であると推測された。マスフラグメンテーションパターンの解析から、保持時間 6.70 分の化合物は α -copaene、保持時間 7.10 分の化合物は calarene、保持時間 7.41 分の化合物は α -muurolene、保持時間 7.53 分の化合物は cadina-1(10),4-diene、保持時間 7.62 分の化合物は cadina-1,4-diene、そして保持時間 8.18 分の化合物は *epi*-cubenol とそれぞれ推

定した。また保持時間 7.04 分の化合物はマスデータベースや文献と一致しないマスフラグメンテーションパターンを示した (図 2-8)。

3. *sclav_p0068*

sclav_p0068 形質転換体を培養した後、菌体由来のヘキサン抽出液の GC-MS 解析を行なった結果、保持時間 11.38 分に陰性対照として用いた SUKA22/pKU460 では検出されない特異的なピークが検出された。この化合物は m/z 222 $[M^+]$ を示すことから、セスキテルペンアルコールであることが示唆された。マスフラグメンテーションパターンを詳細に解析した結果、この化合物が T-muurolool であることが示唆された (図 2-9)。また *sclav_p0068* の上流に位置する cytochrome P450 をコードする *sclav_p0067* と共発現させた形質転換体では、T-muurolool の生産の他にさらに保持時間 12.29 分に新たに m/z 222 $[M^+]$ を示すセスキテルペンアルコールの蓄積が確認された(図 2-10)。

4. *sclav_p0328*

sclav_p0328 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析の結果、保持時間 7.52 分に m/z 204 $[M^+]$ を示す特異的なピークが検出されたことから、セスキテルペンの炭化水素であることが推測された。マスフラグメンテーションパターンの解析から、この化合物は δ -cadinene であることが示唆された (図 2-11)。

5. *sclav_p0635*

sclav_p0635 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析の結果、5 種類の特異的なピークが検出された (図 2-12)。それらは m/z 204 $[M^+]$ あるいは m/z 222 $[M^+]$ の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素あるいはアルコールであることが推測された。さらにマスフラグメンテーションパターンの解析から、保持時間 6.72 分の化合物が β -elemene、保持時間 7.28 分の化合物は selina-4,11-diene、保持時間 8.42 分の化合物は selina-11-ene-4a-ol であることが示唆された。一方で、他の化合物について同様に調べた結果、マスデータベースや文献値と一致しないマスフラグメンテーションパターンを有していた (図 2-13)。

6. *sclav_p0765*

sclav_p0765 形質転換体においては、10 種類の特異的なピークが検出された。これらは m/z 272 $[M^+]$ あるいは m/z 290 $[M^+]$ の分子イオンピークを示したことから、ジテルペンの炭化水素あるいはアルコール体であることが推測された。マスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、これらの化合物が新規のジテルペン化合

物であることが強く示唆された (図 2-14, 15)。

7. *sclav_p0982*

fps と共発現させた *sclav_p0982* 形質転換体の培養抽出液の GC-MS 解析を行なったが、形質転換体抽出物にも特異的なピークは検出されなかった。しかしながら、*gps* と共発現させた形質転換体の培養抽出液の GC-MS 解析の結果、培養上清由来ヘキササン抽出液において 1 種類、菌体由来抽出液では 3 種類の特異的なピークが検出された (図 2-16)。これらは m/z 136 [M^+]あるいは m/z 154 [M^+]のイオンピークを示し、モノテルペン化合物であることが推測された。マスフラグメンテーションパターンの解析から、培養上清とともに菌体由来抽出液においても検出された保持時間 6.57 分は 1,8-cineol であることが示唆された。一方、保持時間 5.71 分の化合物は camphene、保持時間 6.02 分の化合物は β -pinene であることが示唆された。標品との比較により、これらの化合物が 1,8-cineol、camphene および β -pinene であると同定された (図 2-17)。

8. *sclav_p0985*

sclav_p0985 形質転換体の菌体由来のヘキササン抽出液の GC-MS 解析を行なった結果、8 種類の特異的な成分が検出された (図 2-18)。それらは m/z 204 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素であることが示唆された。マスフラグメンテーションパターンの解析により、保持時間 7.02 分の化合物は α -gurjunene、保持時間 7.21 分の化合物は α -humulene、保持時間 7.28 分の化合物は 9-*epi*-caryophyllene であることが示唆された。一方、その他の化合物は、マスデータベースや文献と一致しないマスフラグメンテーションパターンを示したことから、新規セスキテルペン化合物であることが示唆された (図 2-18, 19)。

9. *sclav_p1169*

sclav_p1169 形質転換体の培養抽出液の解析の結果、7 種類の特異的なピークが検出された (図 2-20)。これらは m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、ジテルペン炭化水素であることが推測された。マスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、これらの化合物が新規のジテルペン化合物であることが強く示唆された (図 2-20, 21)。

10. *sclav_p1185*

fps と共発現させた *sclav_p1185* 形質転換体の GC-MS 解析の結果、特異的なピークは検出されなかった。しかしながら、*gps* と共発現した形質転換体においては、保持時間 7.16 分に m/z 136 [M^+]の分子イオンピークを示す特異的なピークが検出さ

れたことから、*sclav_p1185* がモノテルペン化合物の生成に関与することが推測された。さらにマスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、この化合物は linalool であることが示唆された。市販の標品試料と比較した結果、保持時間ならびにマスフラグメンテーションパターンが一致した(図 2-22)。

11. *sclav_p1407*

sclav_p1407 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、8 種類の m/z 204 $[M^+]$ を示す特異的なピークが検出された (図 2-23)。これらはセスキテルペン炭化水素であることが示唆された。マスフラグメンテーションパターンより、最も蓄積量が高い保持時間 5.93 分の化合物は既知のセスキテルペン化合物とは異なることから新規のテルペン化合物であることが強く示唆された。またマイナー成分である保持時間 6.76 分の化合物は *cis*- β -elemene、保持時間 7.00 分の化合物は β -caryophyllene であることが示唆された (図 2-24)。

12. *sven_0552*

sven_0552 形質転換体では、保持時間 7.03 分と 7.48 分の位置にセスキテルペンの炭化水素であると推測される m/z 204 $[M^+]$ の分子イオンピークを示す、2 種類の特異的なピークが検出された。保持時間 7.48 分に検出された化合物が最も生産量が高く、マスフラグメンテーションパターンからデータベースとは一致しないセスキテルペン化合物であることが明らかになった。また、保持時間 7.03 分の化合物のマスフラグメンテーションパターンは α -chamigrene のものと一致した (図 2-25)。

13. *sspSK_3051*

sspSK_3051 形質転換体の菌体由来のヘキサン抽出液の GC-MS 解析を行った結果、4 種類の特異的な成分が検出された (図 2-26)。それらは m/z 204 $[M^+]$ あるいは m/z 222 $[M^+]$ の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素あるいはアルコール体であると推測された。マスフラグメンテーションパターンを解析した結果、保持時間 9.91 分の化合物は γ -elemene であると推定した。同様にして保持時間 10.68 分の化合物は β -maaliene と、保持時間 10.76 分の化合物は selina-3,7(11)-diene と、保持時間 11.80 分の化合物は selina-7(11)-ene-4-ol であることが示唆された (図 2-27)。

14. *slt17_1246*

slt17_1246 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、18 種類の特異的成分が検出された (図 2-28)。それらは m/z 204 $[M^+]$ あるいは m/z 222 $[M^+]$ の分子イオンピー

クを示したことから、セスキテルペンの炭化水素あるいはアルコール体であると推測された。詳細にマスフラグメンテーションパターンを解析した結果、最も蓄積量が高い、保持時間 10.98 分の化合物は germacredien-4-ol であることが示唆された。同様に保持時間 9.52 分の化合物は copaene と、保持時間 9.61 分の化合物は β -elemene と、保持時間 10.07 分の化合物は α -cubebene と、10.21 分の化合物は β -cubebene と、保持時間 10.26 分の化合物は β -aromadendrene と、保持時間 10.42 分の化合物は viridiflorene と、保持時間 10.52 分の化合物は γ -cadinene と、保持時間 10.55 分の化合物は β -cadinene と、保持時間 10.69 分の化合物は α -cadinene と、保持時間 11.40 分の化合物は T-cadinol であることが示唆された。その一方で、他の化合物について同様に調べた結果、マスデータベースならびに文献に記載されている既知化合物のマスフラグメンテーションパターンと一致しなかったことから、それら新規のセスキテルペン化合物であることが示唆された (図 2-29)。

15. *slt18_1078*

slt18_1078 形質転換体においては、 m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示すピークが検出されたことから、ジテルペンの炭化水素であると示唆された。マスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、新規のジテルペン化合物であることが強く示唆された (図 2-30)。

16. *slt18_1880*

slt18_1880 形質転換体の菌体由来のヘキサン抽出液の GC-MS 解析を行った結果、4 種類の特異的なピークが検出された。 m/z 204 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素であると推測された。これら化合物は、マスデータベースや文献と一致しないマスフラグメンテーションパターンを示したことから、新規セスキテルペン化合物であることが示唆された (図 2-31)。

17. *stsu_20912*

stsu_20912 形質転換体の菌体由来のヘキサン抽出液の GC-MS 解析を行った結果、 m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示す 8 種類の特異的な成分が検出され、特に保持時間 12.74 分の化合物が最も蓄積量が高かった (図 2-32)。いずれの化合物も m/z 272 を示したことから、ジテルペン炭化水素であると推測された。マスフラグメンテーションを解析した結果、これら化合物はデータベースや文献と一致しないマスフラグメンテーションパターンを示したことから、新規ジテルペン化合物であることが示唆された (図 2-33)。

18. *nd90_0354*

nd90_0354 形質転換体においては、 m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示すピークが3種類検出されたことから、これら化合物はジテルペンの炭化水素であると示唆された。マスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、新規のジテルペン化合物であることが強く示唆された (図 2-34)。

20. *mmar_3220*

mmar_3220 形質転換体の菌体由来のヘキサン抽出液の GC-MS 解析を行った結果、11 種類の特異的な成分が検出された (図 2-35)。それらは m/z 204 [M^+]あるいは m/z 222 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素ならびにアルコール体であると推測された。詳細にマスフラグメンテーションパターンを解析した結果、最も蓄積量が高い、保持時間 11.07 分の化合物は germacradien-11-ol であることが示唆された。また、マイナー成分である保持時間 9.18 分の化合物は γ -elemene、保持時間 9.59 分の化合物は β -elemene、保持時間 11.22 分の化合物は β -eudesmol であることが示唆された。一方、他の化合物について同様に調べた結果、マスデータベースならびに文献に記載されている既知化合物のマスフラグメンテーションパターンと一致しなかったことから、それら新規のセスキテルペン化合物であることが示唆された (図 2-36)。

21. *ava_1982*

ava_1982 形質転換体の菌体由来のヘキサン抽出液の GC-MS 解析を行った結果、3 種類の特異的なピークが検出された (図 2-37)。それらは全て m/z 204 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素であると推測された。マスフラグメンテーションパターンの解析から、保持時間 17.7 分に主生産物として検出された化合物は β -elemene であることが推測された。また、保持時間 28.9 分のマイナーピークの化合物は germacrene A であることが示唆された。ガスクロマトグラフィー装置のインジェクション部分の温度を 200°C および 160°C に下げて解析した場合、 β -elemene のピークが減少すると共に germacrene A のピークが増大した。一方、保持時間 17.1 分の化合物においては、マスデータベースや文献値と一致しないマスフラグメンテーションパターンを有していた (図 2-38)。

22. *haur_2987*

haur_2987 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、4 種類の特異的なピークが検出された (図 2-39)。それらは全て m/z 272 [M^+]のイオンピークを示したことから、ジテルペンの炭化水素であると推測された。そこで、目的化合物の生産性の向

上を目的として、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子(*ggs*)との共発現プラスミドを構築し、SUKA22 へ導入した。*ggs* と共発現した *haur_2987* 形質転換体は、*fps* と強発現した場合と比較して、各ジテルペン化合物の生産性が 50 倍以上に増加した。各化合物のマスフラグメンテーションパターンは、マスデータベースや文献値と一致しなかった (図 2-40)。

23. *haur_2988*

haur_2988 では、保持時間 6.73 分と 7.43 分の位置にセスキテルペンの炭化水素であると推測される m/z 204 [M^+] の分子イオンピークを示す、2 種類の特異的なピークが検出された。保持時間 7.43 分に検出された化合物が最も生産量が高く、マスフラグメンテーションパターンから、 α -selinene であることが示唆された。また、保持時間 6.73 分の化合物のマスフラグメンテーションパターンは β -elemene のものと一致した (図 2-41)。

24. *npun_R3832*

npun_R3832 形質転換体では、保持時間 7.33 分に検出された主生産物を含めて 3 つの特異的なピークが検出された (図 2-42)。それぞれ m/z 204 [M^+] の分子イオンピークを示す生産物が観測されたことから、セスキテルペンの炭化水素であると推測された。さらにマスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、保持時間 7.43 分の主生産物の化合物は 8a-*epi*- α -selinene であると推測された。また保持時間 7.29 分の化合物は selina-4,11-diene と推測された (図 2-43)。

25. *alr_4655*

alr_4655 形質転換体からは、1 種類の特異的なピークが検出された。 m/z 204 [M^+] の分子イオンピークを示し、セスキテルペンの炭化水素であると推測された。さらにマスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、保持時間 17.7 分の化合物は β -elemene であると示唆された。*ava_1982* を分析した場合と同様にガスクロマトグラフィー装置のインジェクション部分の温度を下げた結果、 β -elemene のピークが減少し、それに相反して保持時間 29.0 分に germacrene A を示すピークが検出された (図 2-44)。

23. *rcas_0622*

rcas_0622 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析の結果、保持時間 11.38 分に m/z 204 [M^+] を示す特異的なピークが検出されたことから、セスキテルペンの炭化水素であると推測された。マスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、この

化合物は T-muurolol であることが示唆された。標品との比較より、この化合物が T-muurolol であると同定された。T-muurolol の標準試料と比較した結果、保持時間ならびにマスフラグメントパターンが一致したことから、*Rcas_0622* は T-muurolol 合成酵素遺伝子であることが明らかとなった (図 2-45)。

26. *roseRS_3509*

roseRS_3509 形質転換体においては、 m/z 204 $[M^+]$ を示す特異的なピークが検出されたことから、この化合物はセスキテルペンの炭化水素であると推測された。さらにマスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、この化合物は T-muurolol であることが示唆された。標準試料と比較した結果、保持時間ならびにマスフラグメントパターンが一致したことから、*rcas_0622* は T-muurolol 合成酵素遺伝子であることが明らかとなった (図 2-46)。

27. *rxyl_0493*

rxyl_0493 形質転換体においては、 m/z 272 $[M^+]$ を示す特異的なピークが検出されたことから、ジテルペンの炭化水素であると推測された。そこで、*haur_2987* の場合と同様に、*ggs* と共発現した結果、*fps* と共発現した場合と比較して、生産量が 10 倍以上に増加した。この化合物は、マスデータベースや文献と一致しないマスフラグメンテーションパターンを示したことから、新規ジテルペン化合物であることが示唆された (図 2-47)。

28. *sce6369*

sce6369 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、6 種類の特異的なピークが検出された (図 2-48)。それらは m/z 204 $[M^+]$ あるいは m/z 222 $[M^+]$ の分子イオンピークを示し、セスキテルペンの炭化水素あるいはそのアルコール体であると推測された。さらにマスフラグメンテーションパターンの詳細の解析から、保持時間 9.64 分の化合物が α -cubebene、保持時間 10.18 分の化合物は β -cubebene であることが示唆された (図 2-48, 49)。

29. *sce8552*

sce8552 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、 m/z 204 $[M^+]$ を示す特異的なピークが検出されたことから、本化合物はセスキテルペンの炭化水素であると推測された。マスフラグメンテーションパターンより eremophilene であることが示唆された (図 2-50)。

30. *wcw_0522*

wcw_0522 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、9 種類の特異的成分が検出された (図 2-51)。それらは m/z 204 $[M^+]$ あるいは m/z 222 $[M^+]$ の分子イオンピークを示したことから、セスキテルペンの炭化水素あるいはアルコール体であると推測された。詳細にマスフラグメンテーションパターンを解析した結果、保持時間 9.49 分の化合物は α -ylangene であることが示唆された。同様にして保持時間 9.61 分の化合物は β -elemene と、保持時間 10.28 分の化合物は α -amorphene と、10.47 分の化合物は δ -amorphene と、保持時間 10.52 分の化合物は germacrene D と、保持時間 10.60 分の化合物は epizonarene と、保持時間 10.97 分の化合物は germacradienol であることが示唆された。その一方で、他の化合物について同様に調べた結果、マスデータベースならびに文献に記載されている既知化合物のマスフラグメンテーションパターンと一致しなかったことから、それら新規のセスキテルペン化合物であることが示唆された (図 2-52)。

2-7 考察

仲野らは *sgr_2079* を大腸菌で発現させた組換え酵素を Mg^{2+} 存在下でファルネシルニリン酸を基質として反応させたところ (+)-caryolan-1-ol の生成を確認している⁵¹⁾。*S. avermitilis* SUKA22 株での異種発現でも同様に caryolan-1-ol の同様のマスフラグメンテーションパターンを示すセスキテルペン化合物を生産したことが明らかになった。SGR_6065 はこれまでに *in vitro* の解析により *epi*-cubenol 合成酵素であることが報告されている⁴¹⁾。*S. avermitilis* SUKA22 の *sgr6065* 形質転換体の解析によって *epi*-cubenol 以外にも calarene, α -copaene, α -muurolene, cadinal(10),4-diene および cadina-1,4-diene も生産したことが明らかになった。生成が確認された化合物の環化反応は以下のような反応機構であると推察される。Calarene は、SGR6065 によるファルネシルニリン酸のニリン酸部分の脱離により、カチオンの形成ならびにメチル基転位反応によって生成されることが推定された。一方、 α -copaene、 α -muurolene、cadina-1(10),4-diene および cadina-1,4-diene は、ファルネシルニリン酸の異性体であるネロリジルニリン酸のニリン酸の脱離によりカルボカチオンを生成し、その後 1,3-hydride シフトによってそれぞれ生成することが推測された (図 2-53)。

SCLAV_p0068 は、組換え酵素を利用した酵素反応および大腸菌を宿主とした *in vivo* で発現させた解析により (+)-T-muurolol 合成酵素であることが明らかにされている⁵⁴⁾。*S. avermitilis* SUKA22 における *sclav_p0068* と *fps* の共発現発は、上記と同様にセスキテルペン化合物である T-muurolol を生成したことから異種発現系での評価は *in vitro* の反応を反映していることが確認された。

SCLAV_p0328 は、組換え酵素を利用した酵素反応および大腸菌を宿主とした *in vivo* で発現させた解析により (-)- δ -cadinene 合成酵素であることが報告されている⁵⁴⁾。*sclav_p0328* 形質転換体の菌体抽出液を GC-MS によって分析したところ、同様に δ -cadinene と推定されるセスキテルペン化合物が検出された。 δ -cadinene は多くの植物によって生産される事が報告されている。また、その合成酵素も既に単離されている。その環化反応以下のように推測した。まず T-muurolol と同様に、ネロリジルニリン酸の脱ニリン酸に伴い、カルボカチオンを生成する。1,3-hydride シフトにより cadinane 骨格を形成した後、脱プロトン化により δ -cadinene が生成すると推測された (図 2-54)。

sclav_p0635 菌体抽出液の GC-MS 解析の結果、セスキテルペン化合物である β -elemene, selina-4,11-diene および selina-11-en-4 α -ol が検出された。それら化合物の構造から推測される環化反応は、ファルネシルニリン酸の脱リン酸化により germacryl カチオンを生成し、さらに脱プロトン化によって germacrene A を生成する。Germacrene A は GC のサンプル注入口での高温下で cope 転位を生じ β -elemene

を生成するものと思われる。さらに germacrene A の C-2 位の脱プロトン化によって反応が開始し、1 位と 6 位の間に C-C 結合が形成され、カルボカチオンが生成する。最終的に脱プロトン化あるいは水分子付加によって selina-4,11-diene ならびに selina-11-ene-4 α -ol が生成するものと思われる (図 2-55)。

SCLAV_p0982 は、ゲラニルニリン酸から 1,8-cineole への環化反応を触媒することが組換え酵素を用いた *in vitro* の系で解析されている³⁶⁾。sclav_p0982 は、gps と共発現させた形質転換体の GC-MS 解析より、モノテルペン化合物の主生産物として 1,8-cineole、またマイナー成分として camphene および β -pinene が生産することが明らかになった。しかしながら、fps との共発現させた形質転換株では全くテルペン化合物の生産が確認されなかった。ゲラニルニリン酸はゲラニルニリン酸合成酵素によって特異的に生成し、ファルネシルニリン酸合成酵素やゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素では反応中間体であるゲラニルニリン酸が殆ど生成されないことが示唆された。

gps と共発現した sclav_p1185 形質転換体の培養抽出液の GC-MS による解析によって、直鎖状のモノテルペン化合物である linalool が検出された。直鎖状テルペン合成酵素は植物では既に報告されているが、細菌ではほとんど知られていない。したがって sclav_p1185 が細菌で初めての直鎖状モノテルペン合成酵素遺伝子であることが示唆された。一方、仲野らが、大腸菌で発現した SCLAV_p1185 組換え酵素を Mg²⁺ 存在下でゲラニルニリン酸を加えて反応した結果 linalool を生成し、またファルネシルニリン酸存在下では nerolidol を生成したことを報告している⁵⁵⁾しかしながら、fps を共発現させた形質転換株において GC-MS 解析では nerolidol をはじめとした特異的なピークは検出されなかったことから、大腸菌で生成した組換え酵素では擬陽性反応を確認してしまっていることが推察される。*S. avermitilis* SUKA22 での異種発現系はより、自然な状態での反応を解析することが達成できるものと思われる。

sspSK_3051 の機能解析をするために、fps と共発現する強制発現プラスミドを構築し解析を行なった。sspSK_3051 形質転換体の菌体抽出液を GC-MS によって分析したところ、セスキテルペン化合物である γ -elemene、 β -maaliene、selina-3,7(11)-diene、selina-7(11)-ene-4-ol が生産されることが示唆された。複数のテルペン化合物が生成されたことから、生成したカルボカチオンへの求核反応が多様な状況の活性中心空洞があることが推測された。また推定された構造より sspSK_3051 が触媒する環化反応を図 2-56 のように推定した。

SLT17_1246 は BAL14866 と系統樹解析において約 0.1 K_{aa} で分岐していた。BAL14866 は、仲野らにより *S. citricolor* から germacredien-4-ol 合成酵素(BAL14866)として単離された⁵⁶⁾。slt17_1246 形質転換体の菌体抽出液を GC-MS によって分析し

たところ、germacredien-4-ol と推定されるセスキテルペン化合物を生成した。これらのことから SLT17_1246 は、BAL14866 とアミノ酸配列での相同性が高く (identity 61%, similarity 71%)、環化反応は同一であると結論された(図 2-57)。

mmar_3220 は *fps* と共発現させることにより、GC-MS 解析によって検出されたテルペン化合物由来のピーク総面積の 98%以上を germacranediol と推定される化合物で占められていた。Germacradiol は、geosmin の生合成中間体として多くの放線菌から見出されている¹⁴⁾。しかしながら、第一章で解析を行なった *S. avermitilis* ATCC 31267 や *S. coelicolor* A3(2)らが生産する germacradiol と GC-MS での保持時間が異なることから germacranediol と類似の構造を有するセスキテルペンアルコールであることが示唆された。

系統樹の解析から AVA_1982 と Alr_4655 は 0.1 Kaa 以下で分岐していることが明らかになっており、同一の化合物を生成することが予想された。発現解析の結果、*fps* との共発現によりいずれの形質転換株で主生産物として β -elemene が、副生産物で germacrene A が生産された。Germacrene A は熱力学的に不安定な化合物であり、ガスクロマトグラフィー装置の注入口部分の高温下に曝されることにより、cope 転位反応が進行し β -elemene が生成することが知られている^{57,58)}(図 2-58)。試料注入口部分の温度を 200°Cおよび 160°Cに下げて解析した結果、 β -elemene のピークが減少し、それに相反して germacrene A のピークが増大した。したがって AVA_1982 ならび Alr_4655 は germacrene A を生成する酵素であることが示唆された。

haur_2988 形質転換体の菌体由来のヘキサノ粗抽出物を GC-MS によって分析した結果、主生産物として α -selinene と推定される化合物が検出された。また *npun_R3832* 形質転換体が、8a-epi- α -selinene を生産することが示唆された。これら 2 つのテルペン合成酵素間の相同性は 31%の identity, 49%の similarity であったが、平面構造が同じテルペン化合物の生成を触媒することは興味深い。

系統樹の解析から Rcas_0622 と RoseRS_3509 は 0.1 Kaa 以下で分岐していることが明らかになっており、同一の化合物を生成することが予想された。両者とも T-muurolool を生産していることが明らかになり、T-muurolool 合成酵素であることが明らかになった。SCLAV_p0068 もまた T-muurolool 合成酵素であったが、Rcas_0622 ならびに RoseRS_3509 と系統的に非常に離れており、また各テルペン合成酵素の相同性はそれぞれ 32%の identity, 46%の similarity および 33%の identity, 47%の similarity と低いながら同一の化合物を生成することが明らかになった。おそらくアミノ酸配列の相同性は低いものの活性中心の空間構造や活性に与るアミノ酸残基の空間的な距離が極めて相同であるものと思われる。

sce6369 形質転換体の菌体由来のヘキサノ抽出液の GC-MS 解析の結果、 α -cubebene、 β -cubebene、cadina-3,5-diene および bicyclosesquiphellandrene と推定され

る化合物が検出された。これらの化合物は植物から単離された報告がされているが、細菌から単離された例は本研究が初めてである。また SCE6369 によって触媒される環化反応を図 2-59 のように推測した。前駆体のファルネシル 2 リン酸の 2 リン酸基の脱離からのカチオン生成と、それに続く 1,3-hydride シフトで生成する 10 員環カチオンを経て cadinyl カチオンを生成する。さらに 1,2-hydride シフトによってカルボカチオン 1 が生成し、 α -cubebene および β -cubebene が生成する。また 1 は 1,2-hydride シフトによって生成されるカルボカチオン 2 を経て、cadin-3,5-diene および bicyclosquisphellandrene が形成されると推測した。

sce8552 形質転換体は eremophilene と推定されるセスキテルペン化合物を生産した。Eremophilene は植物から単離されたているが⁵⁹⁾、細菌から見出された例は本研究がはじめてである。また SCE8552 によって触媒される環化反応を図 2-60 のように推測した。ファルネシル 2 リン酸の 2 リン酸基の脱離、脱プロトン化によって中間体である germacrene A が生成した後、6 位の二重結合のプロトン化によってカルボカチオン 1 が生成し、1,2 メチル基転位と 8 位の脱プロトンによる hydride シフトによって生成すると推測した。

wcw_0522 形質転換株は菌体抽出液の GC-MS 解析の結果、セスキテルペン化合物である β -elemene, α -ylangene, α -amorphene, δ -amorphene, epizonarene および germacradien-4-ol が検出された。それら化合物の構造から推測される環化反応は、ファルネシル 2 リン酸の脱二リン酸化により germacryl カチオンを生成し、脱プロトン化によって germacrene A が生成する。ここで cope 転位により β -elemene が生成する。さらに germacrene カチオンが 1,3-hydride シフトによって 10 員環にカチオンを保持するカルボカチオンを生成する。さらに閉環反応が進行し、cadinane 骨格を有するカルボカチオンが生成し、脱プロトン化によって α -amorphene および δ -amorphene が生成する。また cadinane 骨格を有するカルボカチオンが 1,3-hydride shift を経て脱プロトン化されると epi-zonarene が、また 4 位と 9 位で閉環されることにより α -ylangene が生成すると推測した。

また sclav_p0985, sclav_p1407, sven_0552 および slt18_1880 をそれぞれ発現させた形質転換株が生産するセスキテルペン化合物はマスフラグメンテーションパターンがデータベースと一致しなかったことから、新規なセスキテルペン化合物であることが示唆された。さらに sclav_p0765, sclav_p1169, slt18_1078, stsu_20912, nd90_0354, haur_2987 および rxyl_0493 は、同様な理由で新規なジテルペン化合物であることが示唆された。

第一章において 3rd-HMM を用いて見出された細菌由来のテルペン合成酵素遺伝子を *S. avermitilis* 大規模染色体欠失株 SUKA22 を用いて解析した結果、新規のテルペン化合物の生成に関与する多種多様なテルペン合成酵素(遺伝子)が見出された。

第一章で *S. clavuligerus* ATCC 27064 や *S. lactacystinaeus* は、通常の培養においてテルペン化合物の生産が全く確認されなかったが、本手法を用いる事によって多くのテルペン化合物を見出すことができ、多くのテルペン合成酵素遺伝子が休眠状態であることが再確認された。またグラム陰性菌由来のテルペン合成酵素の候補は、系統樹下部に集中して位置していたが、それぞれ分岐群は独立していた。グラム陰性菌由来のテルペン合成酵素遺伝子の解析からも、多様なセスキテルペン化合物が見出された。一方で、Haur_2987 は Haur_2988 とアミノ酸配列の相同性が高い(38%の identity, 51%の similarity)ことと、遺伝子の配置が隣同士である。大変興味深いことにこれらは相同性が高いにも関わらず、一方はセスキテルペン化合物を、他方はジテルペン化合物を生成することを明らかにした。また系統的に非常に離れているにも関わらず、*sclav_p0068*, *rcas_0622* および *roseRS_3509* を発現させた形質転換株は T-muurolol を生成することが確認された。このことからグラム陽性菌とグラム陰性菌では、同一の化合物を生成するにも関わらずテルペン合成酵素のアミノ酸配列が異なり、それぞれの菌種で独立の進化を経たものと推察される。このように、本結果は細菌においてもテルペン合成酵素の多様な進化が行われてきたことを示唆するものである。これまで、グラム陰性菌由来のテルペン合成酵素が単離同定された例は極めて少ないが、本研究により、グラム陰性菌においても放線菌と同様に多様なテルペン合成酵素遺伝子が存在していることが示された。グラム陰性菌もまた、新たなテルペン合成酵素(遺伝子)ならびに新規テルペン化合物の探索源として有用である。

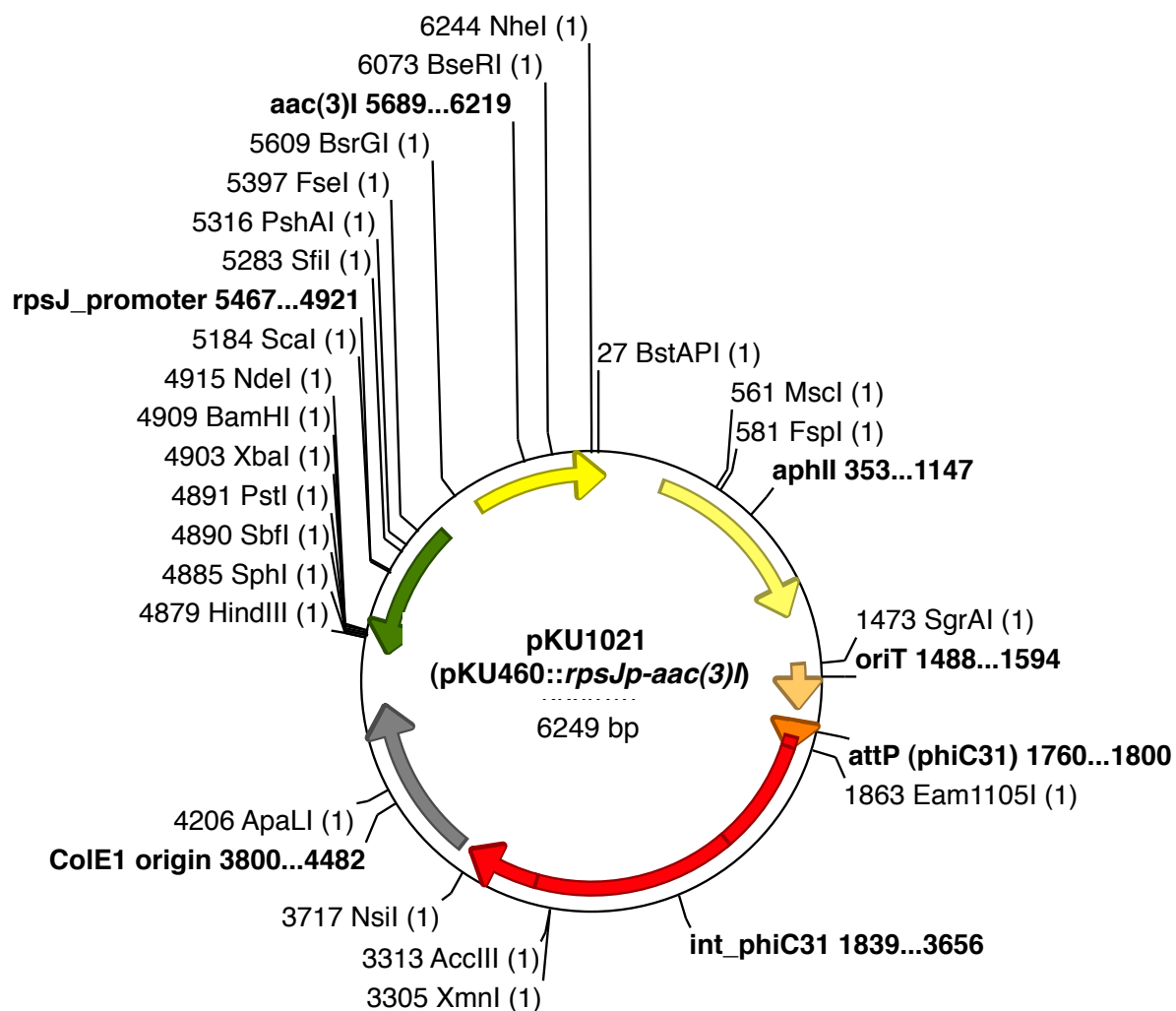
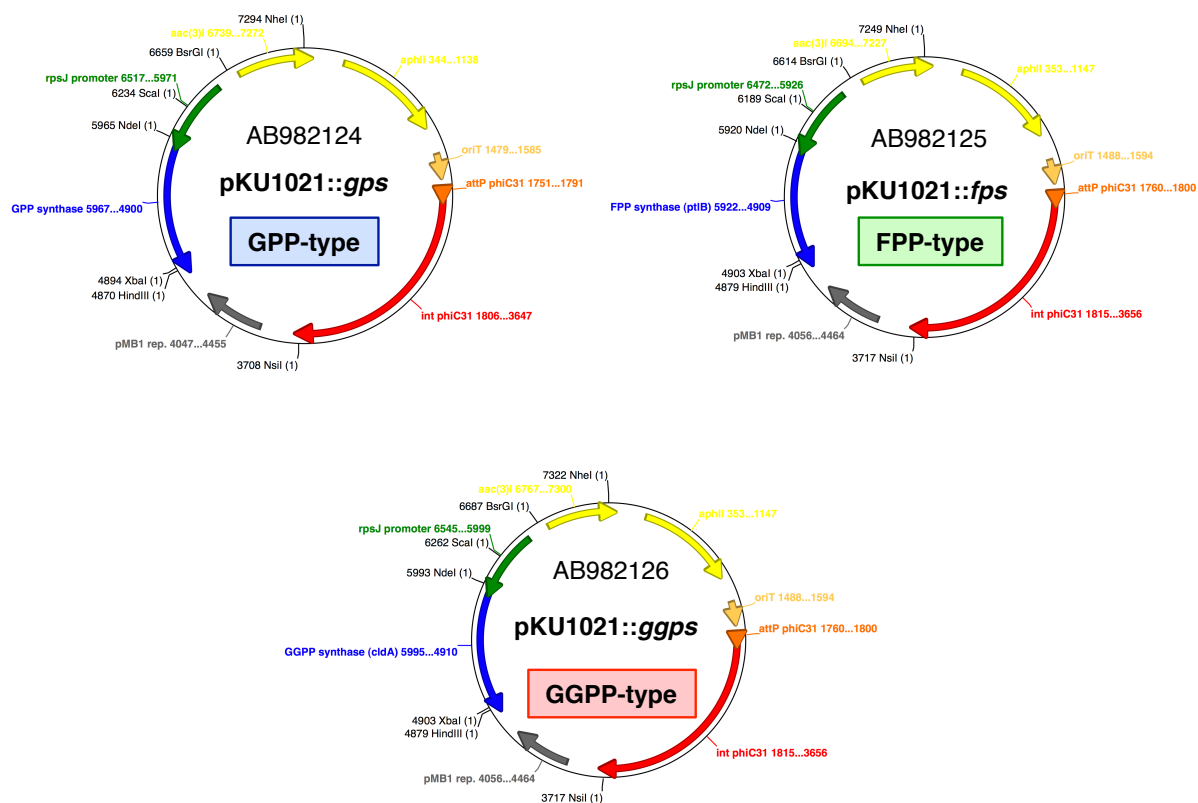


図2-1. pKU1021の制限酵素地図

rpsJ_promoter, リボソームタンパク質S10をコードする遺伝子のプロモーター領域; *int_phiC31*, アクチノファージphiC31インテグラーゼ; *attP (phiC31)*, phiC31のアタッチメント部位; *oriT*, 接合開始起点; *aphII*, カナマイシン耐性遺伝子; *aac(3)I*, ゲンタマイシン耐性遺伝子; *ColE1 origin*, 複製起点。



rpsJ promoter ••GAAGGActactgagtacCATATG•••[GPP, FPP or GGPP synthase]•••
R.B.S. NdeI

TAGTCTAGAgctcgacctgcaggcatgcAAGCTTggcgta••••••••
XbaI HindIII

図2-2. テルペン合成酵素遺伝子発現プラスミド

GPP synthase, ゲラニル2リン酸合成酵素遺伝子; FPP synthase, ファルネシル2リン酸合成酵素遺伝子; GGPP, ゲラニルゲラニル2リン酸合成酵素遺伝子; *rpsJ* promoter, リボソームタンパク質S10をコードする遺伝子のプロモーター領域; *int* *phiC31*, アクチノファージphiC31インテグラーゼ; *attP* (*phiC31*), phiC31のアタッチメント部位; *oriT*, 接合開始起点; *aphII*, カナマイシン耐性遺伝子; *aac(3)*I, ゲンタマイシン耐性遺伝子; *ColEI* origin, 複製起点。

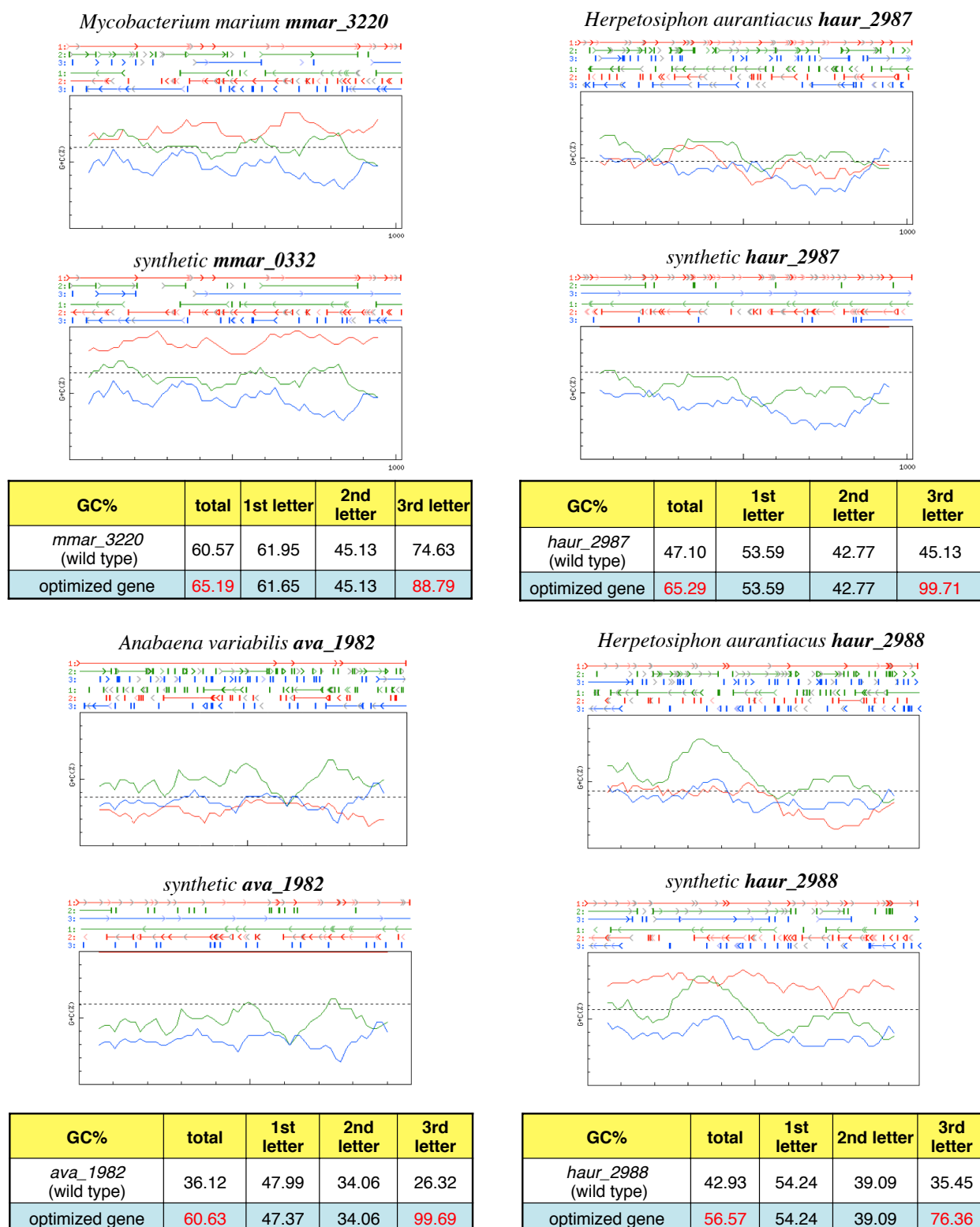
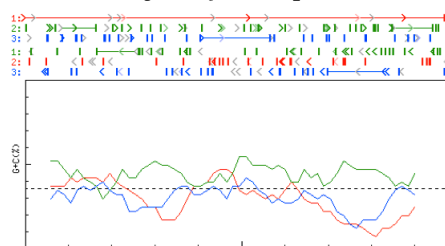
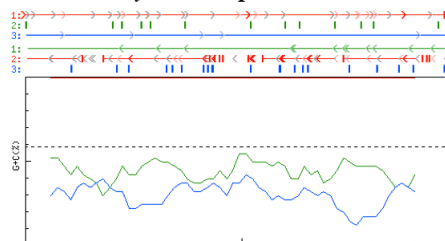


図2-3. mmar_3220, ava_1982, haur_2987およびhaur_2988の人工遺伝子の設計

Nostoc punctiforme npun_R3832

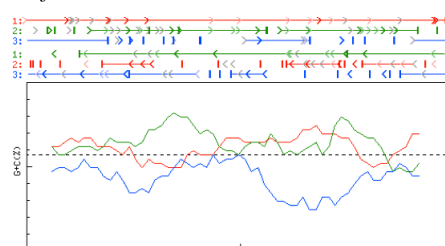


synthetic npun_R3832

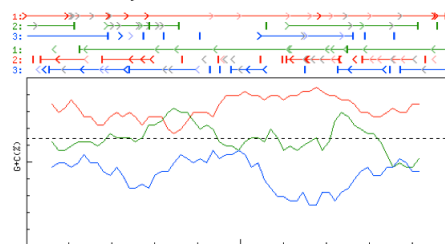


GC%	total	1st letter	2nd letter	3rd letter
<i>npun_R3832</i> (wild type)	35.08	44.44	30.56	30.25
optimized gene	58.23	44.14	30.56	100.00

Roseiflexus castenholzii DSM 13941 rcas_06223

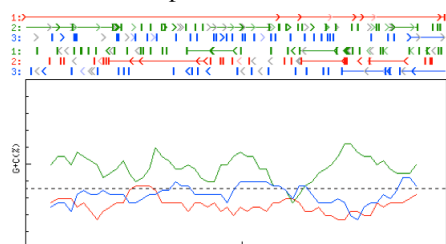


synthetic rcas_06223

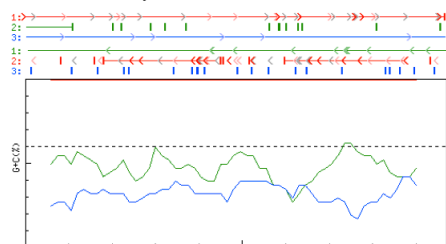


GC%	total	1st letter	2nd letter	3rd letter
<i>rcas_06223</i> (wild type)	56.78	64.83	43.43	62.08
optimized gene	63.61	64.53	43.43	82.87

Nostoc sp. PCC7120 alr_4655

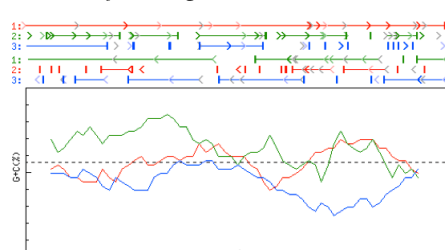


synthetic alr_4655

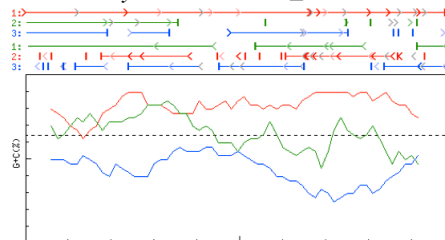


GC%	total	1st letter	2nd letter	3rd letter
<i>alr_4655</i> (wild type)	35.50	47.68	32.82	26.01
optimized gene	59.96	47.37	32.82	99.69

Roseiflexus sp. RS-1 roseRS_3509



synthetic roesRS_3509



GC%	total	1st letter	2nd letter	3rd letter
<i>roseRS_3509</i> (wild type)	55.56	65.14	44.95	56.57
optimized gene	63.91	64.83	44.95	81.96

図2-4. *npun_R3832*, *alr_4655*, *rcas_06223*および*roseRS_3509*の人工遺伝子の設計

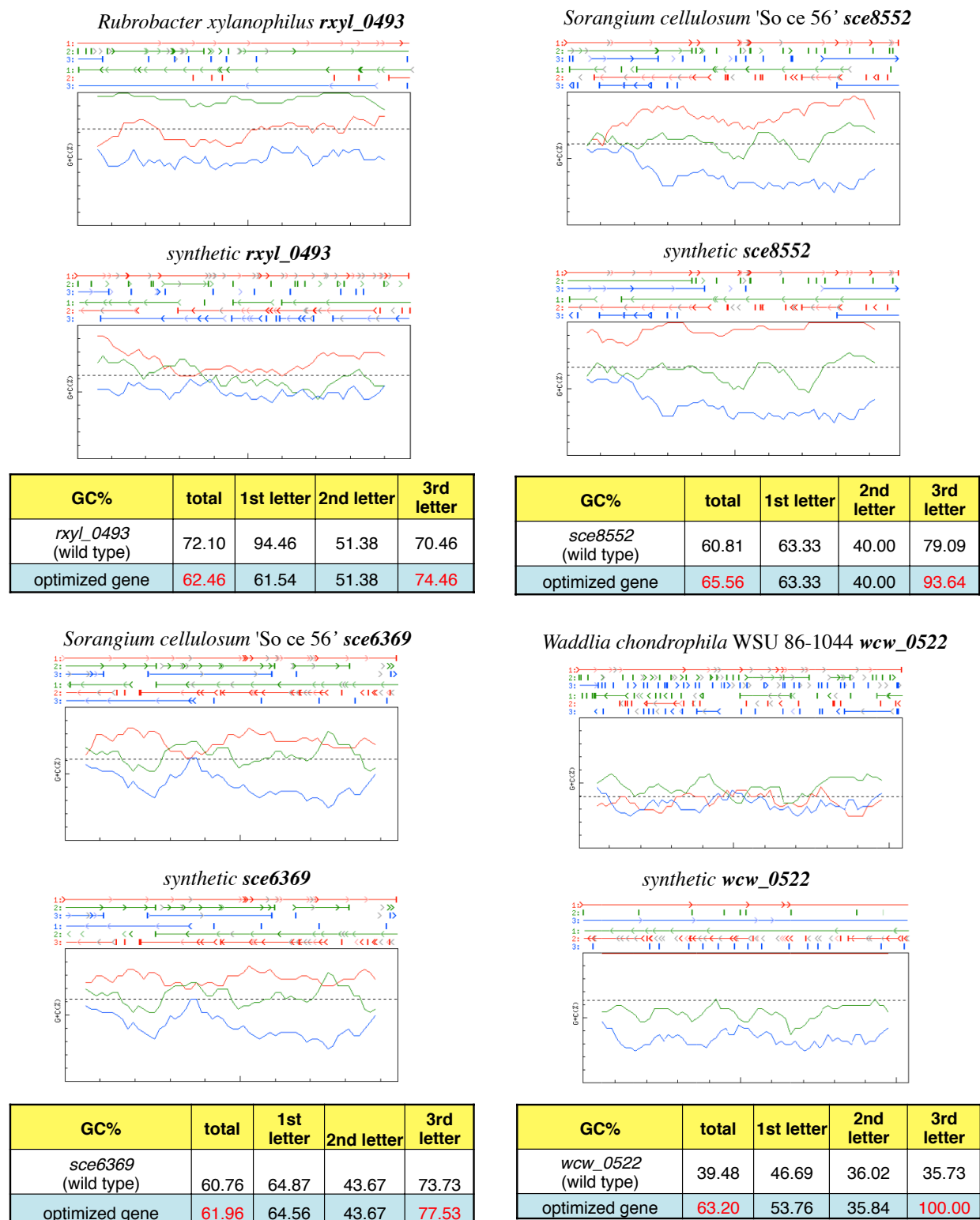
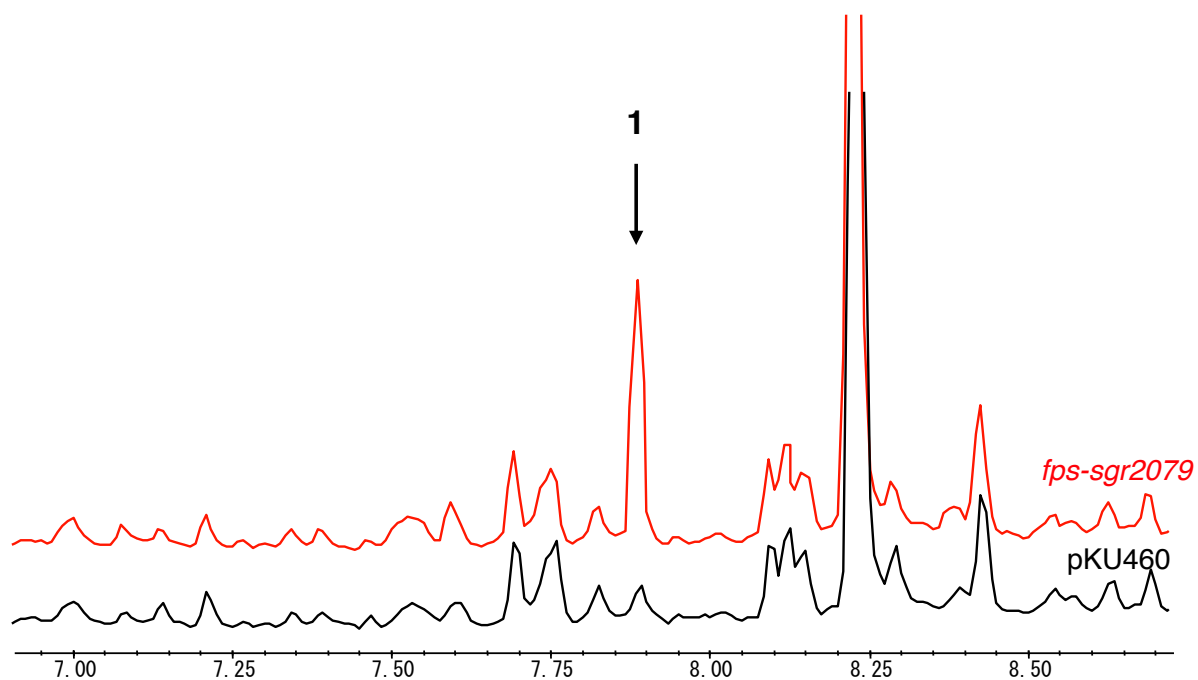


図2-5. *rxyl_0493*, *sce6369*, *sce8552*および*wcw_0522*の人工遺伝子の設計



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

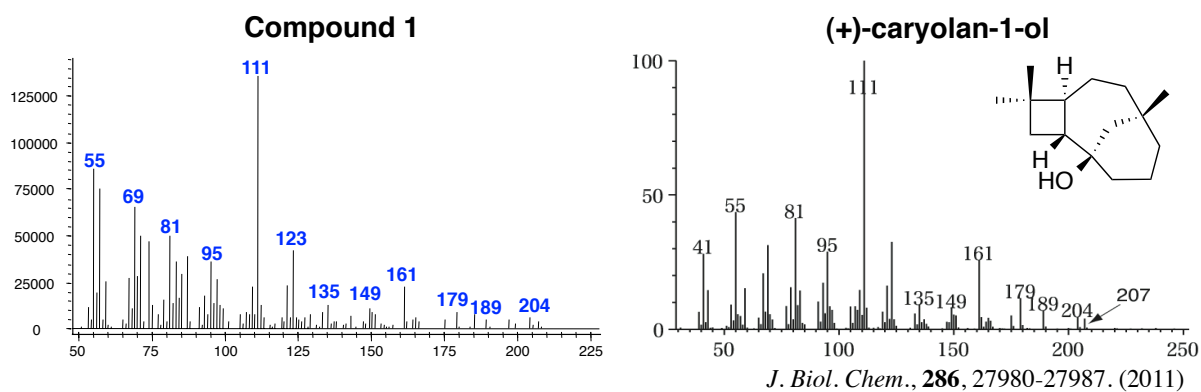
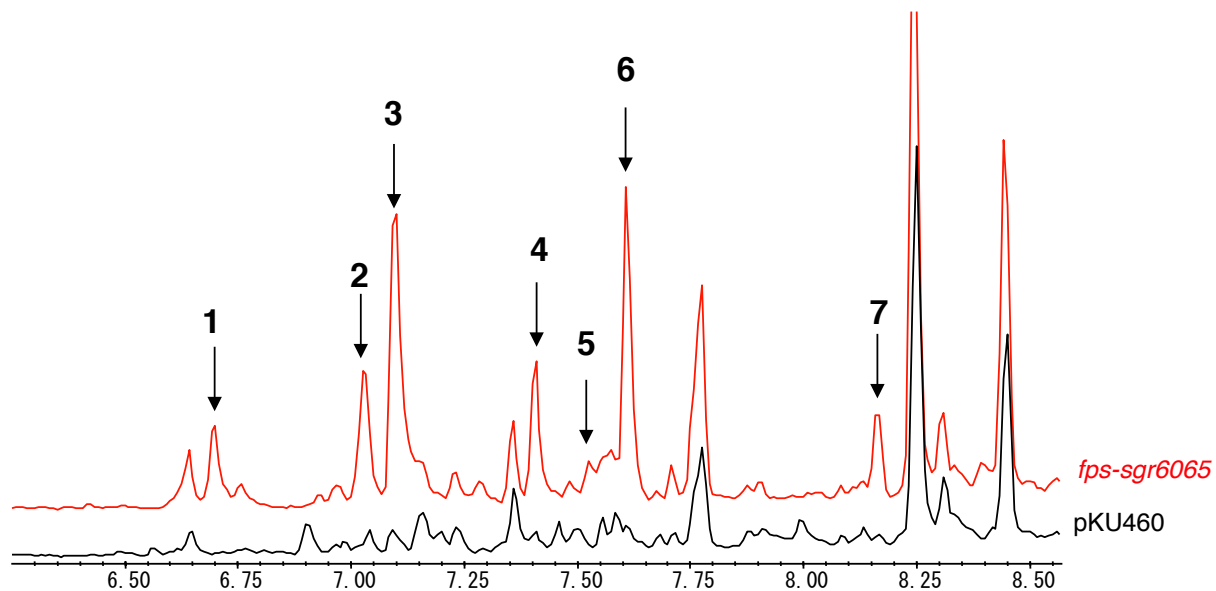


図2-6. SUKA22株および*sgr2079*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図2-7. SUKA22株および*sgr6065*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

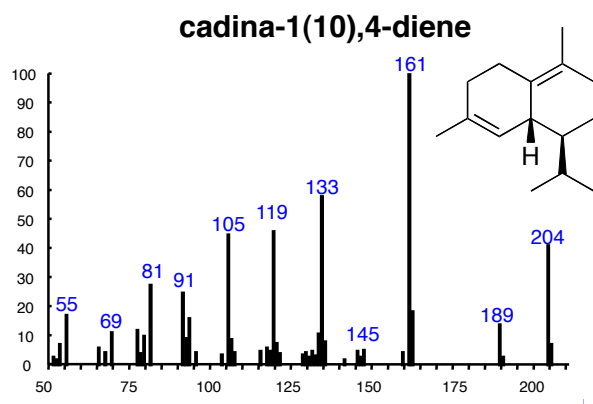
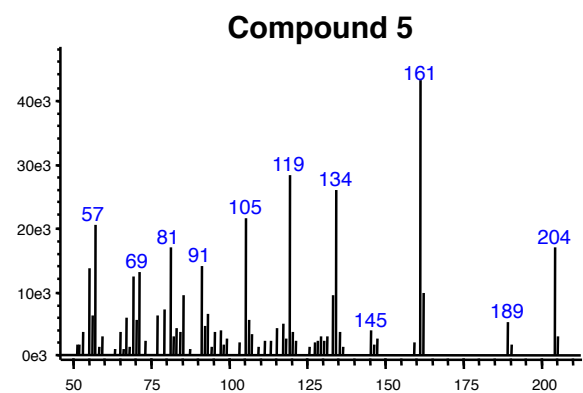
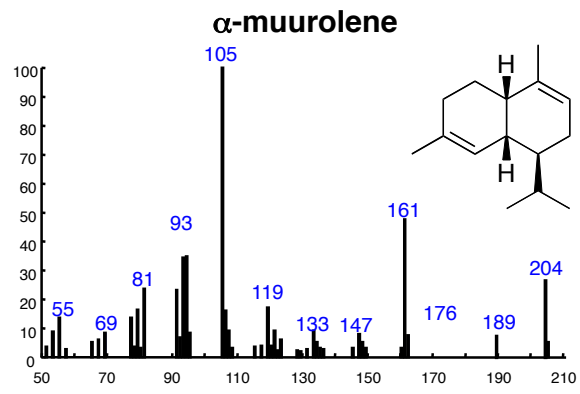
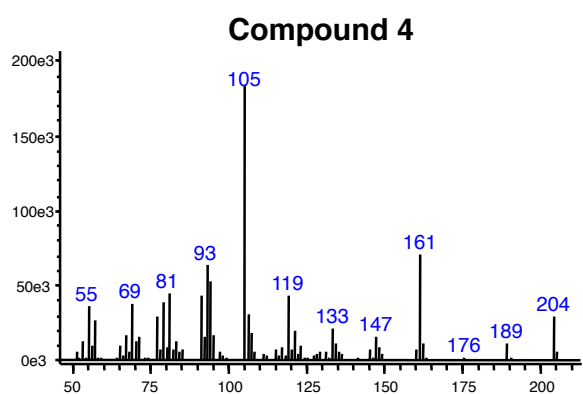
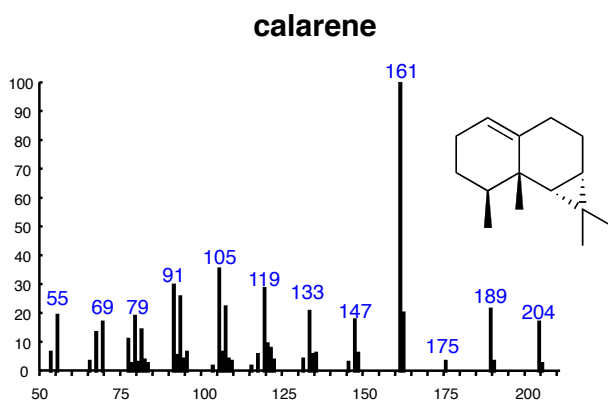
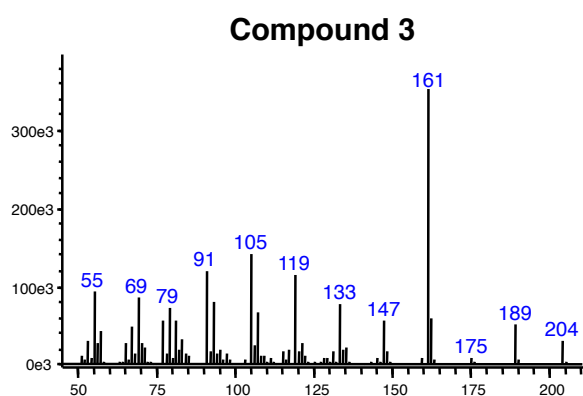
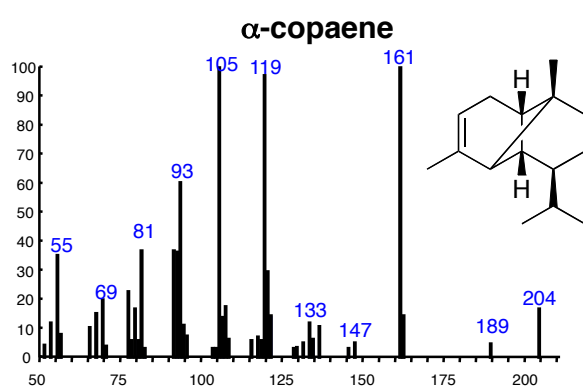
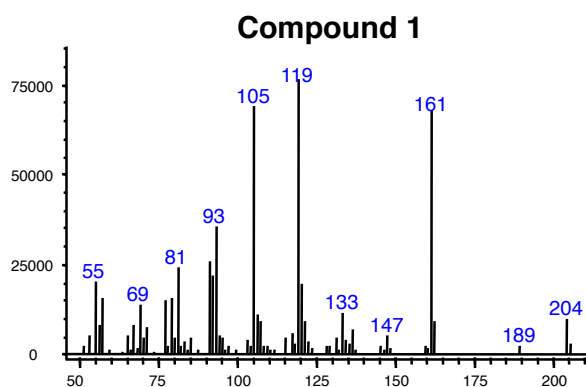


図2-8. *sgr6065*形質転換体が生産する化合物および既知化合物のマスペクトル

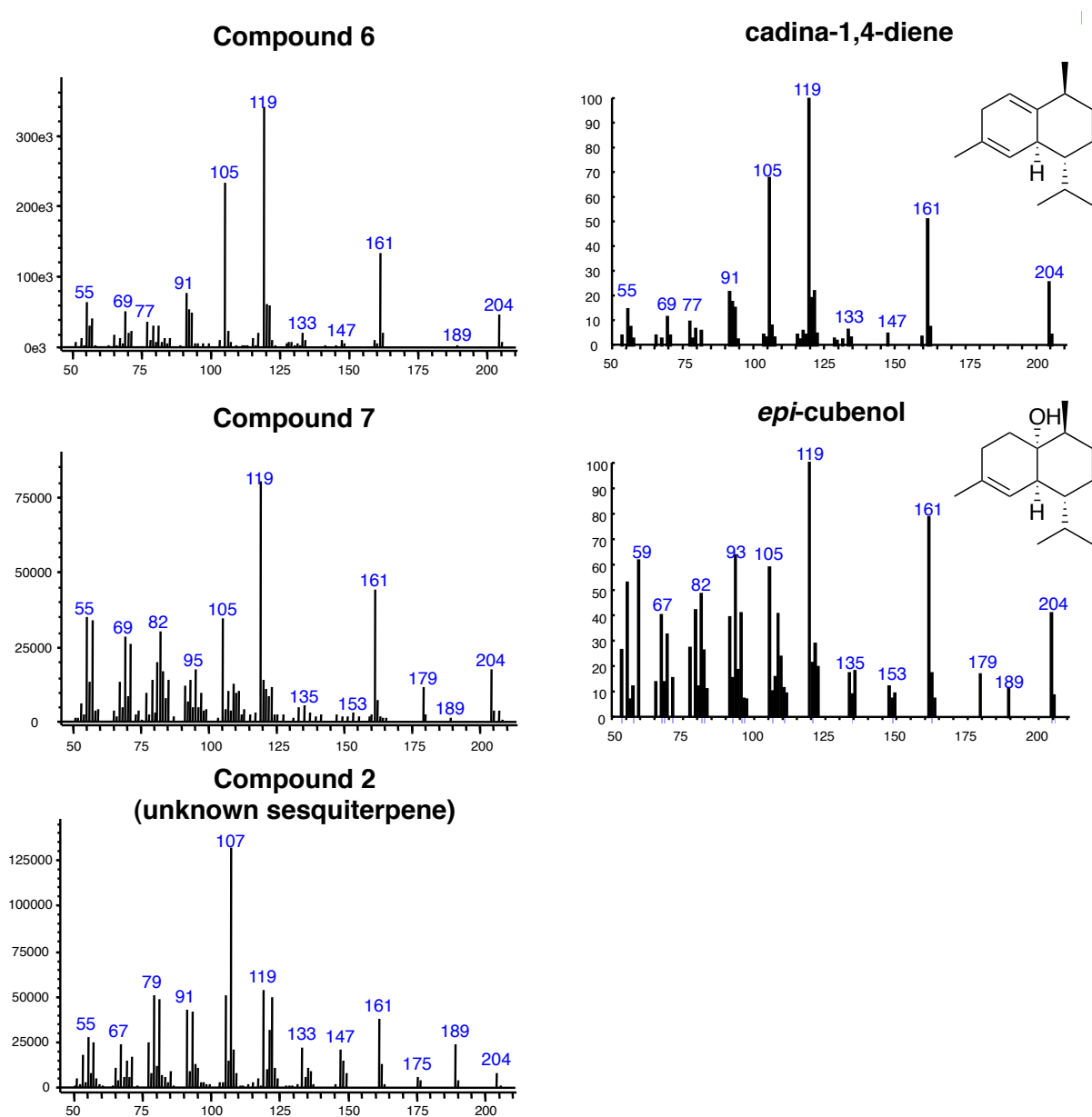
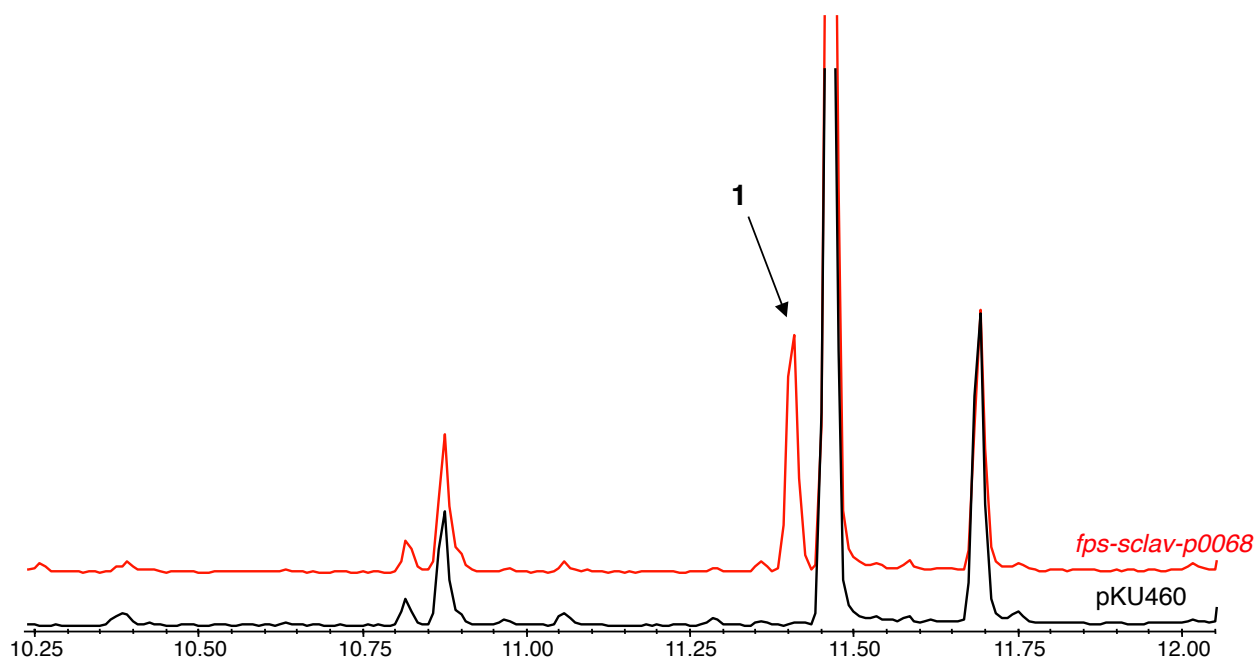


図2-8. *sgr6065*形質転換体が生産する化合物および既知化合物のマスペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

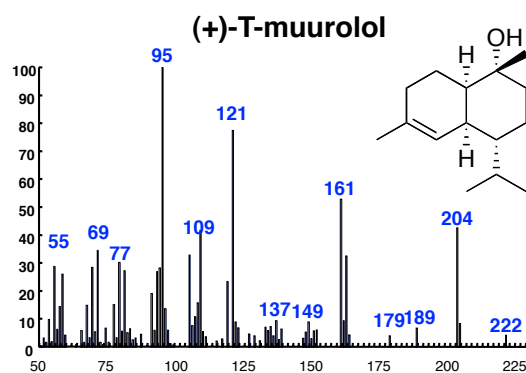
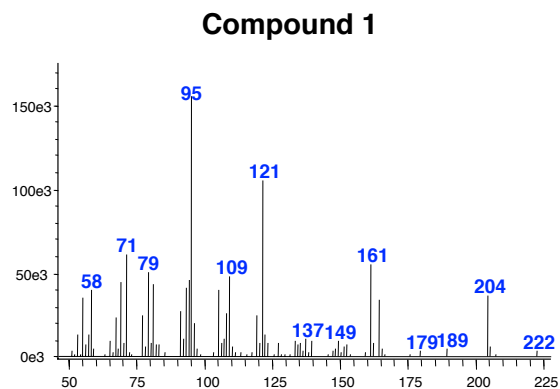
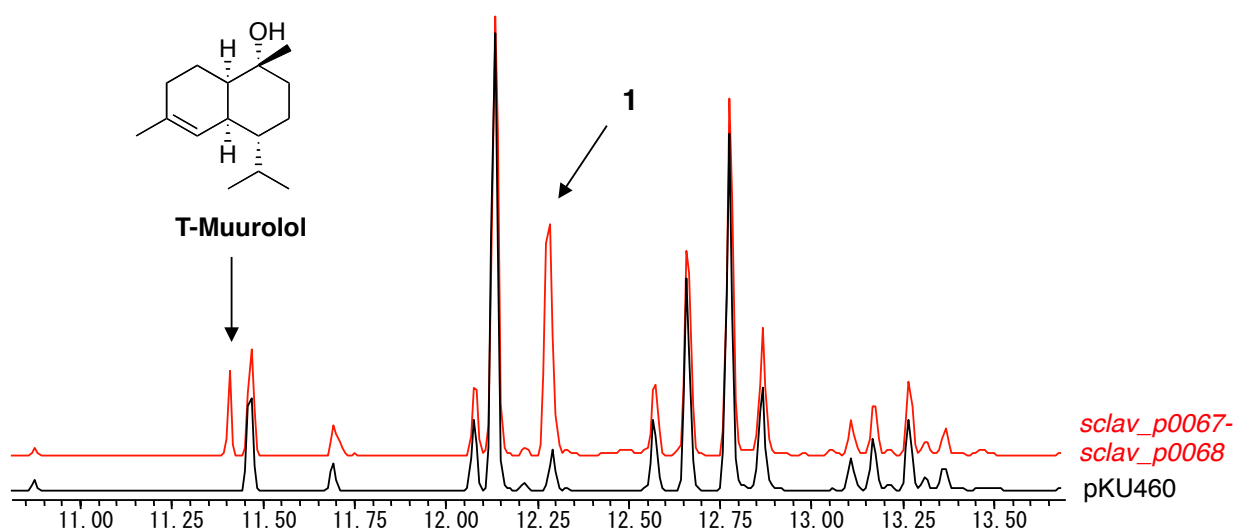


図2-9. SUKA22株および*sclav_p0068*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

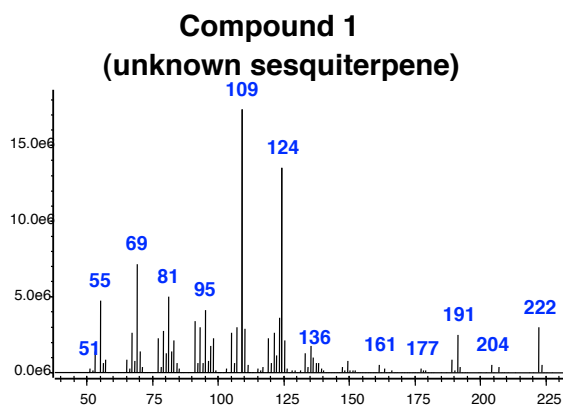
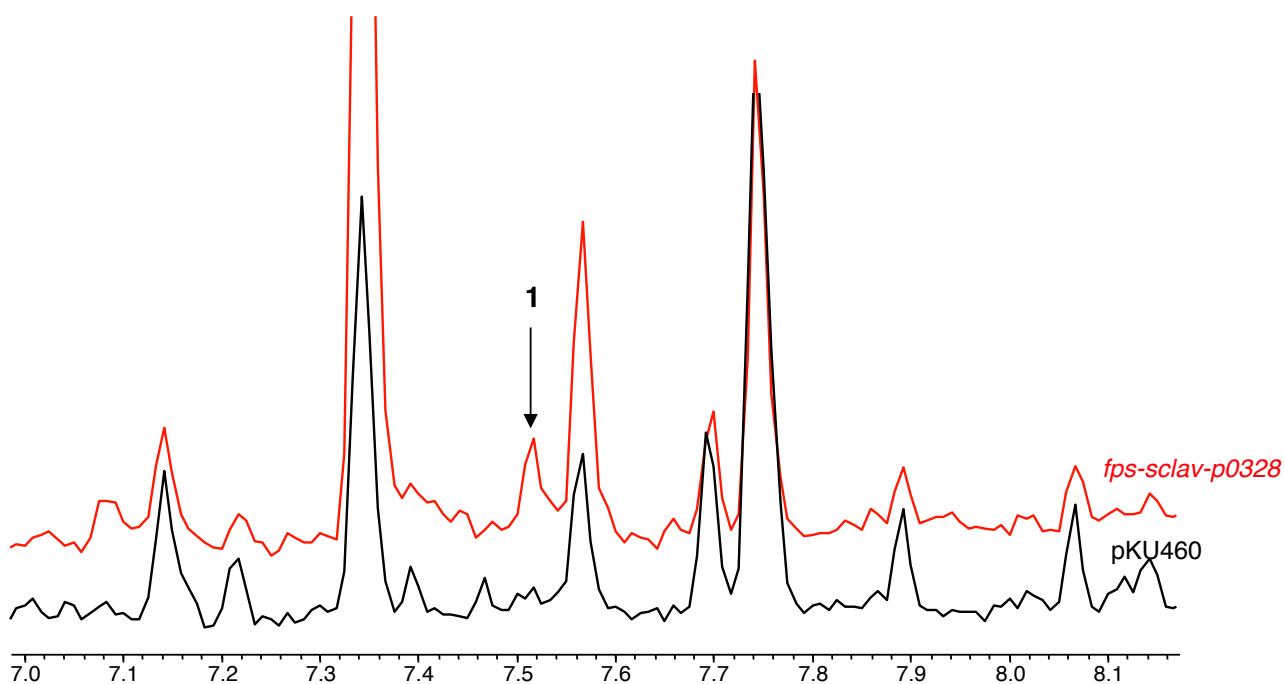


図2-10. SUKA22株および*sclav_p0067-sclav_p0068*導入株のヘキササン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

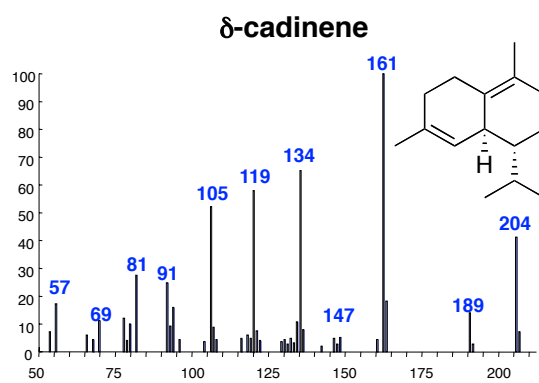
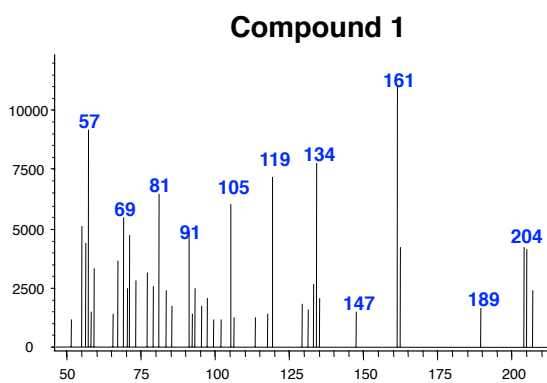
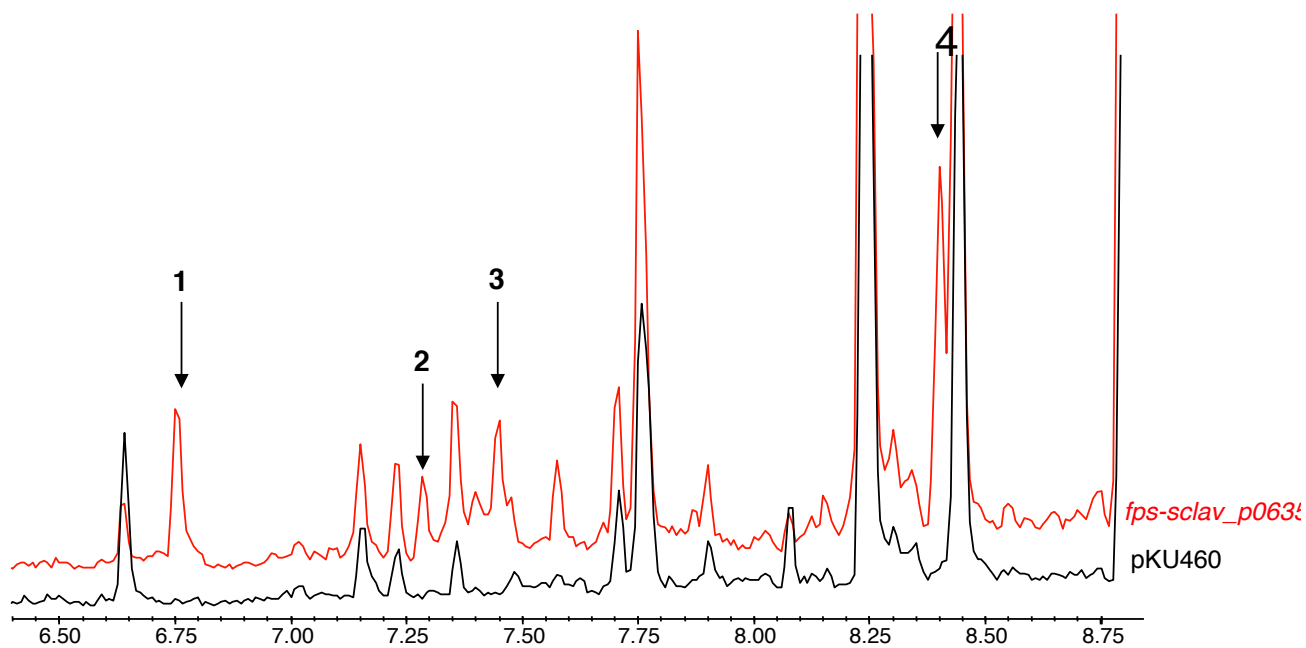
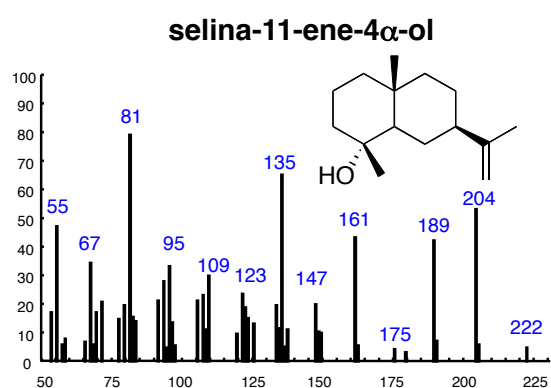
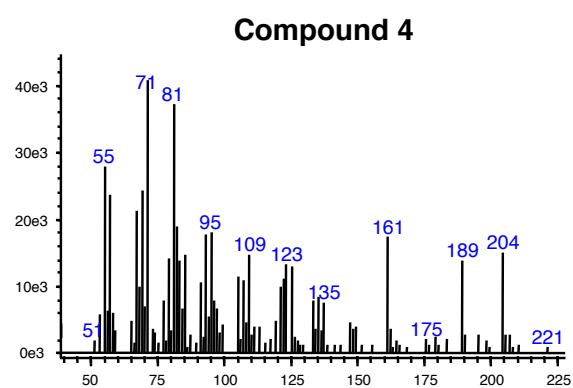
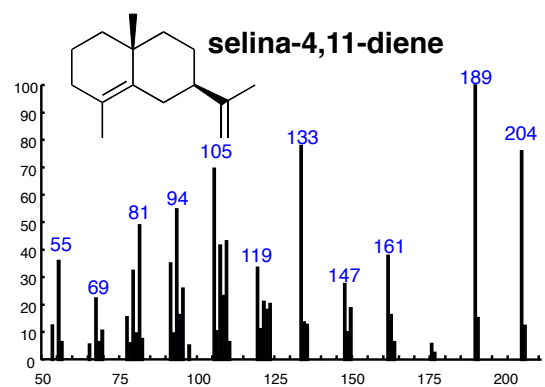
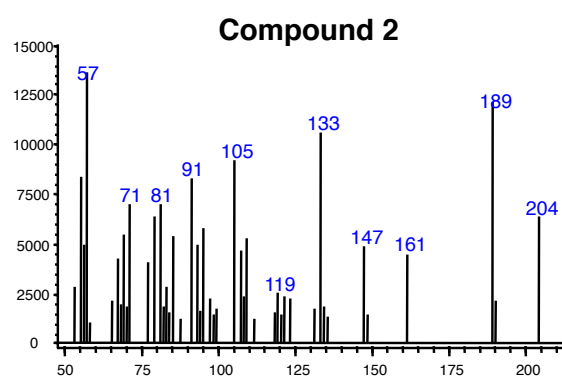
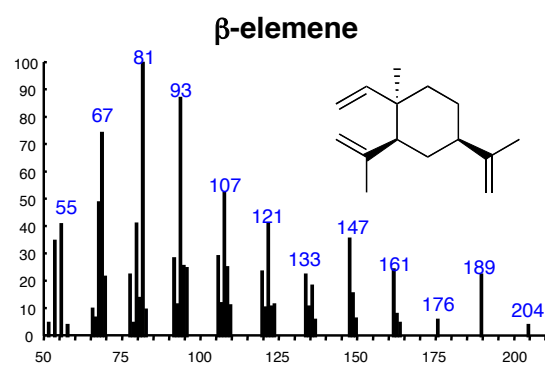
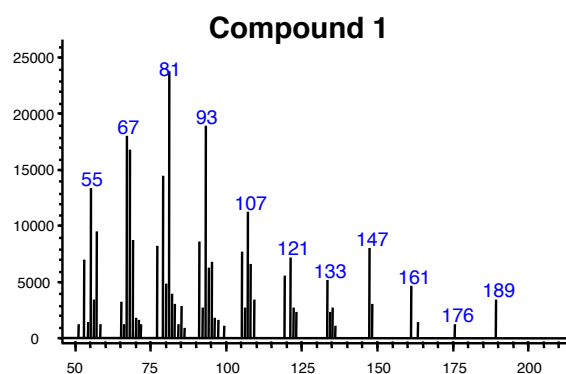


図2-11. SUKA22株および*sclav_p0328*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図2-12. SUKA22株および*sclav_p0635*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



Compound 3
(unknown sesquiterpene)

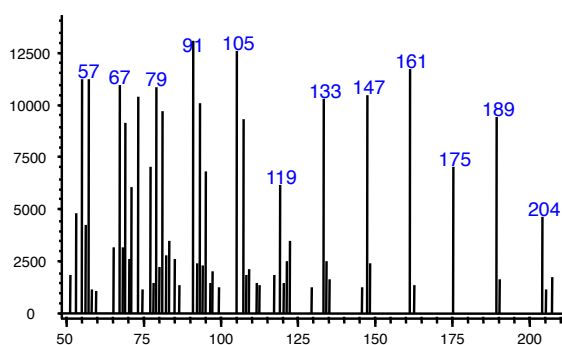
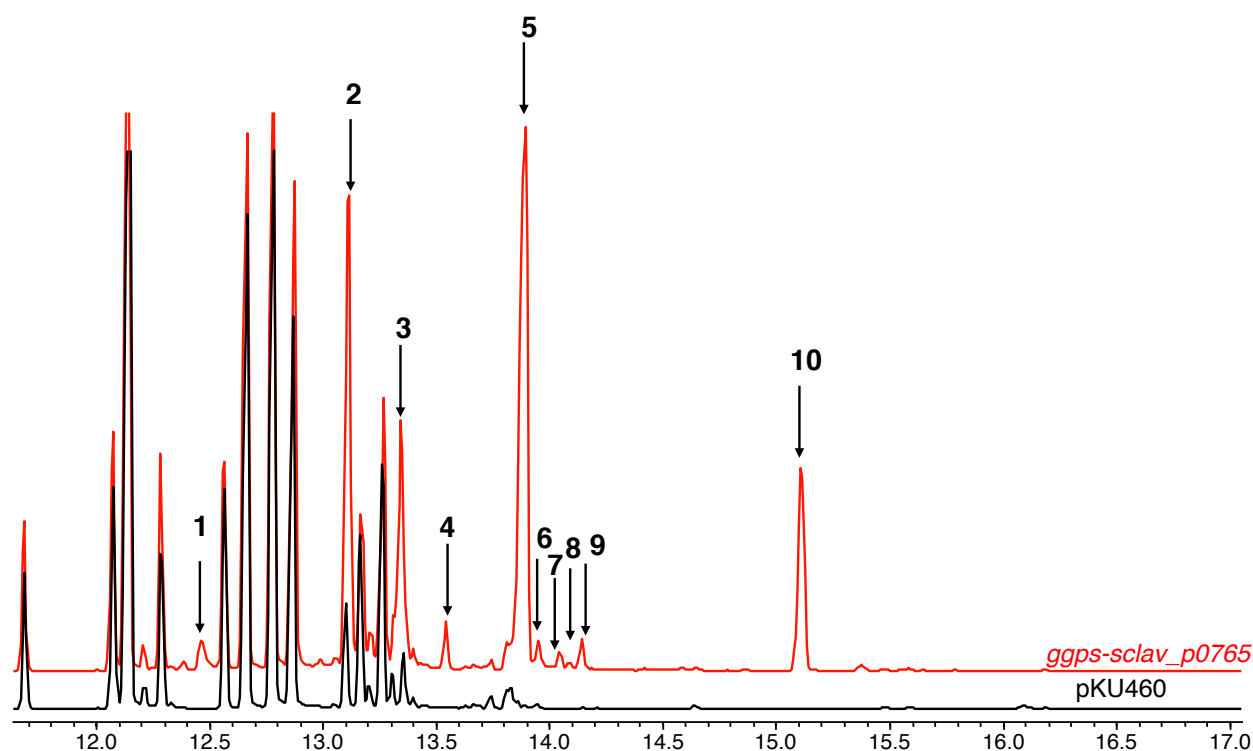
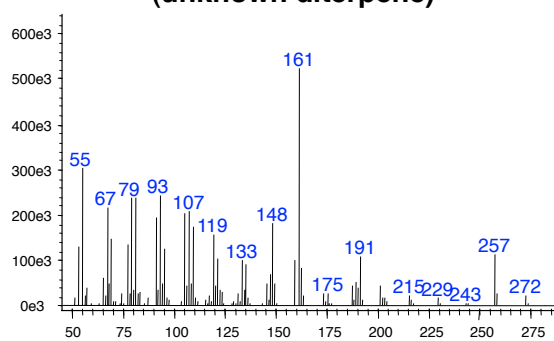


図2-13. *sclav_p0635*形質転換体が生産する化合物および既知化合物のマスペクトル

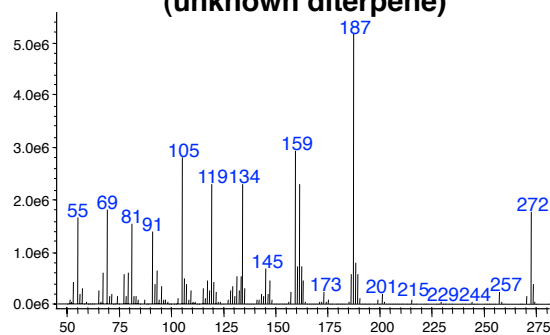


A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

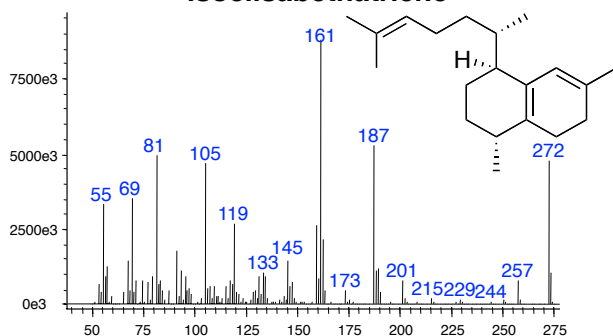
Compound 1
(unknown diterpene)



Compound 3
(unknown diterpene)



Compound 2
isoelisabethatriene



Compound 4
(unknown diterpene)

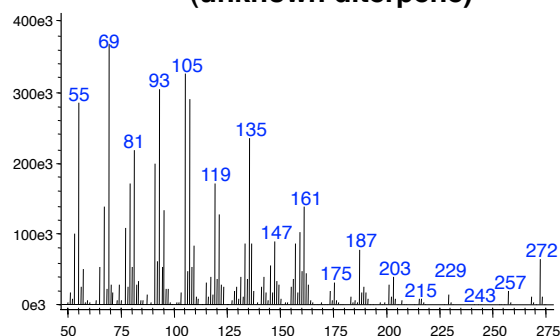


図2-14. SUKA22株およびsclav_p0765導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

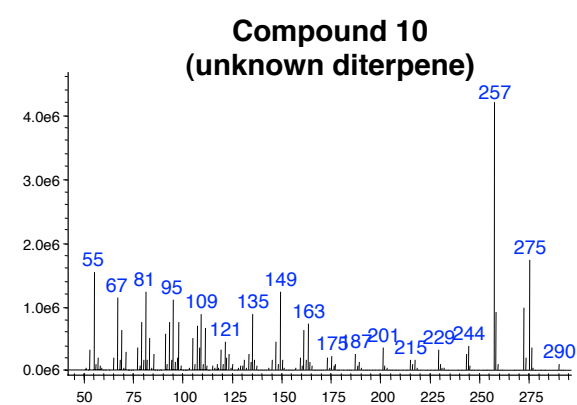
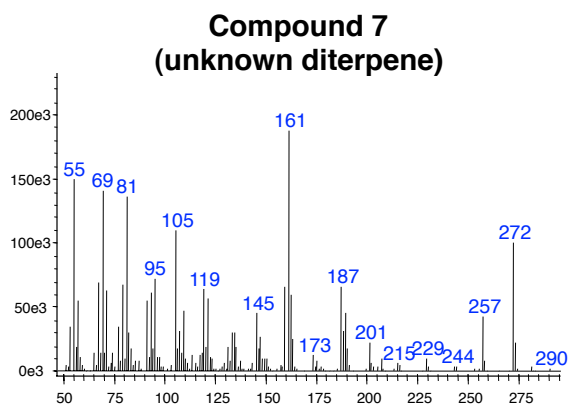
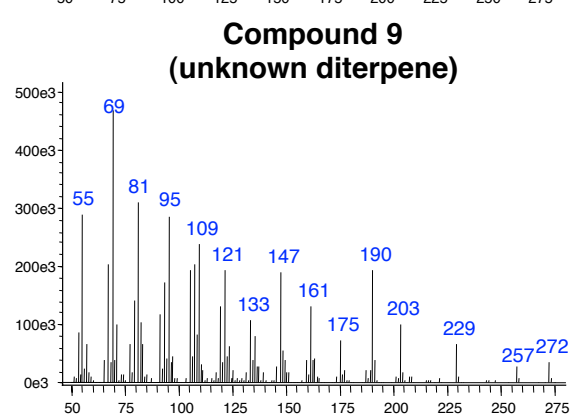
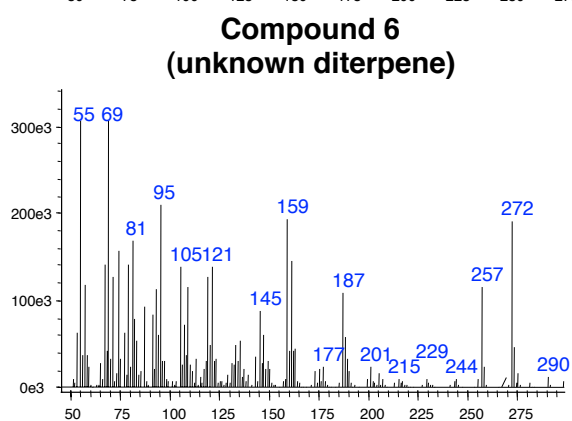
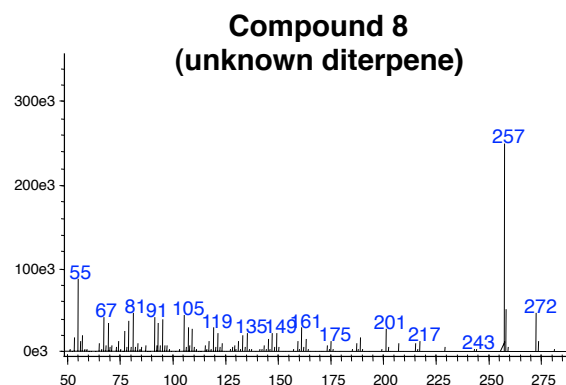
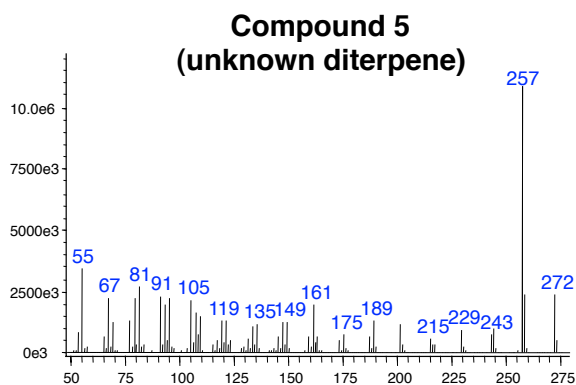
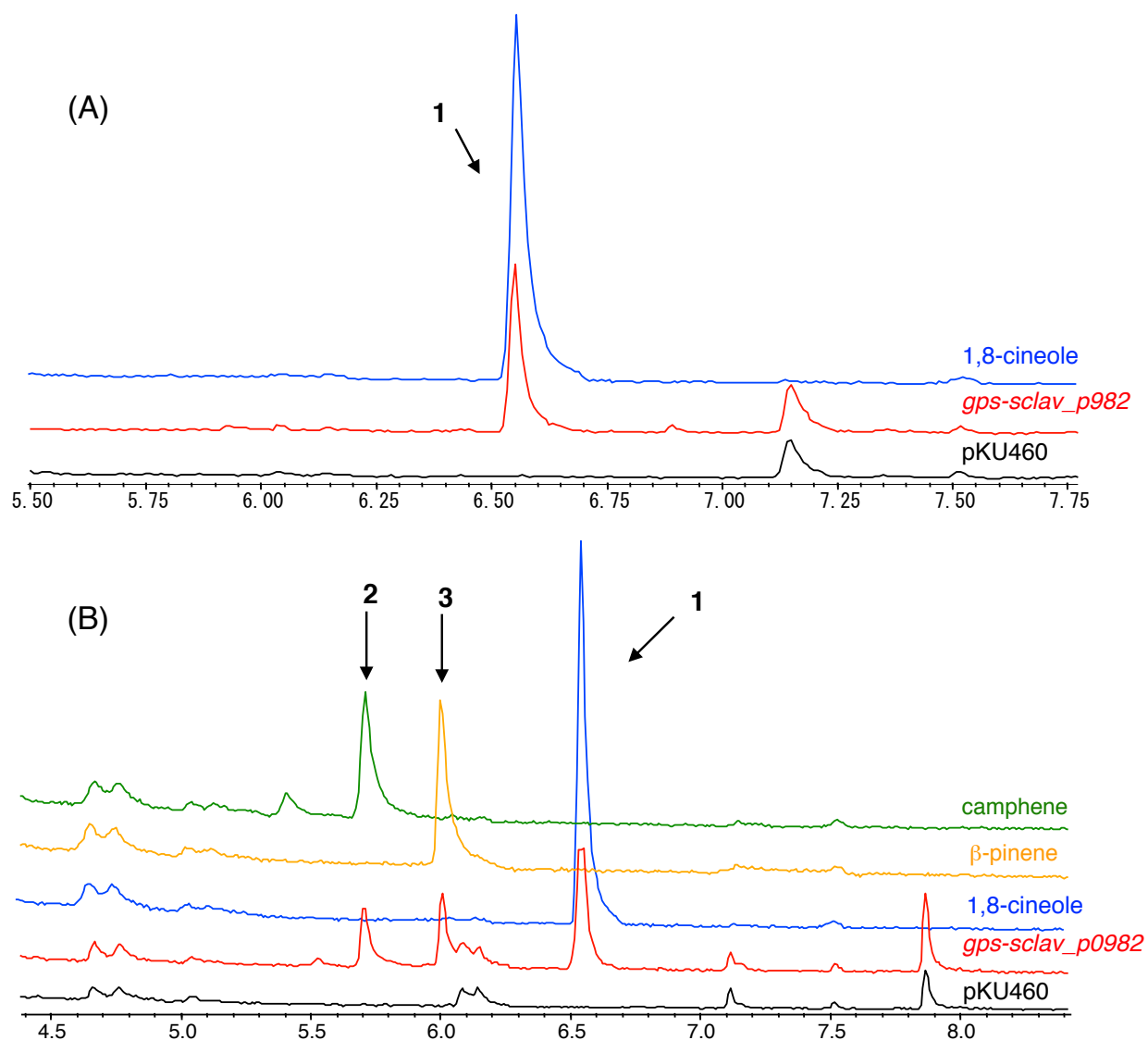


図2-15. sclav_p0765形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

図2-16. SUKA22株および*sclav_p0982*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析 (A) 上清, (B) 菌体

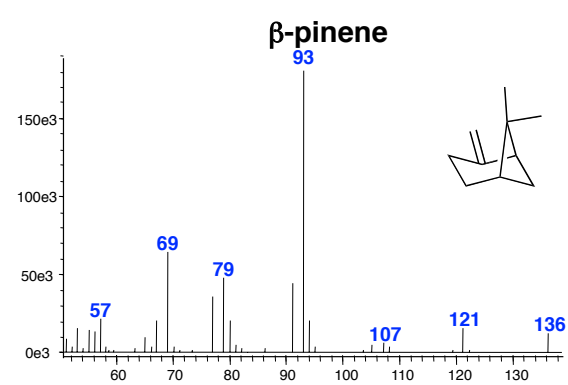
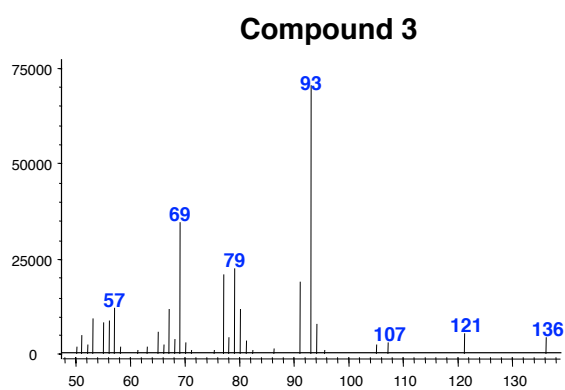
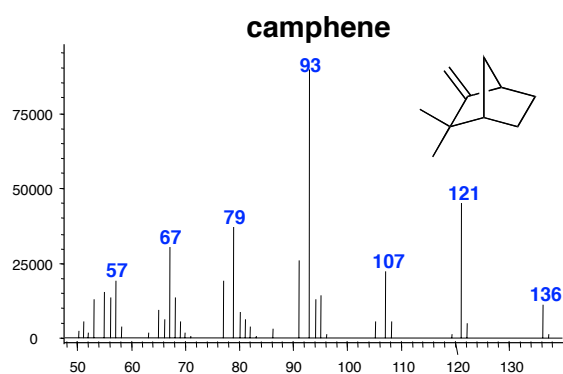
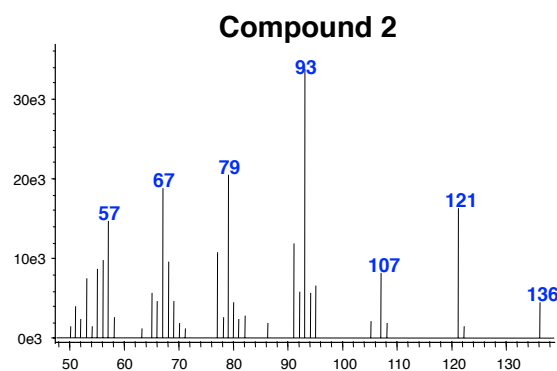
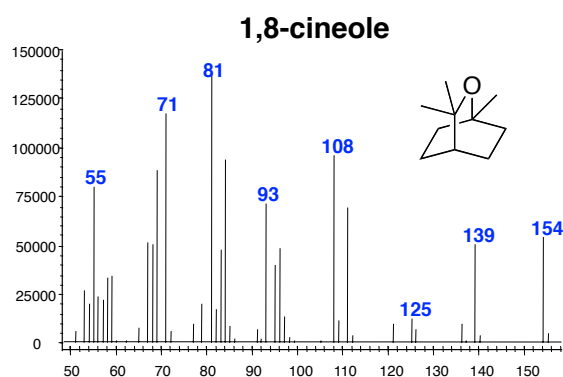
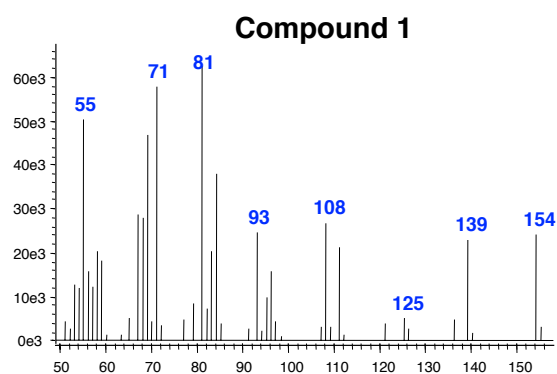
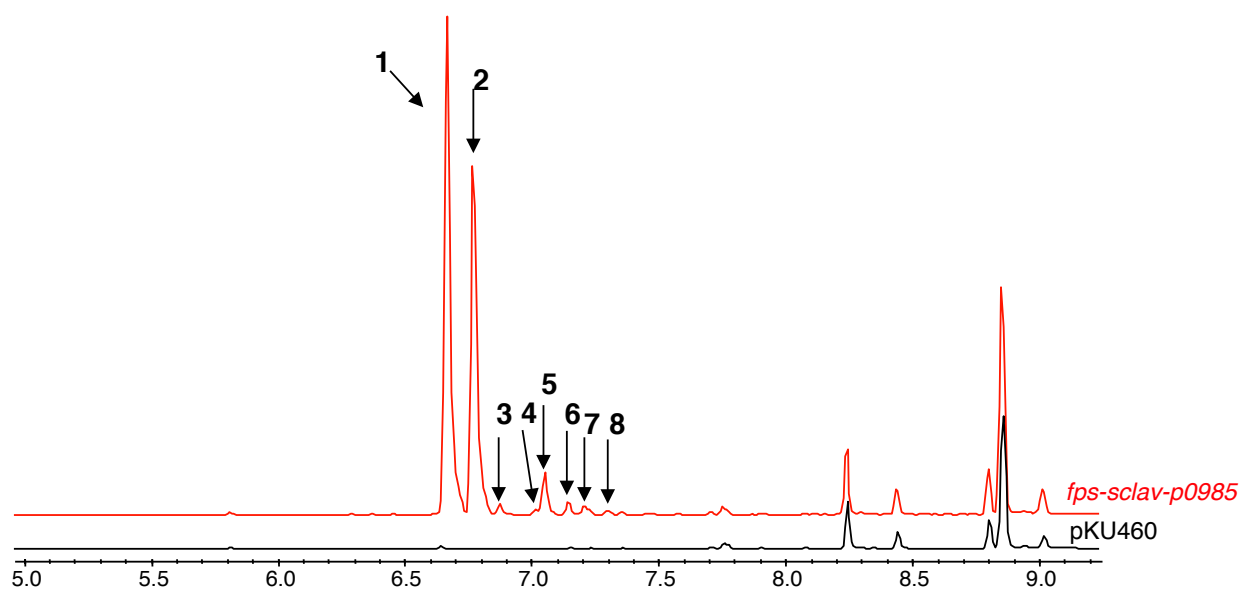
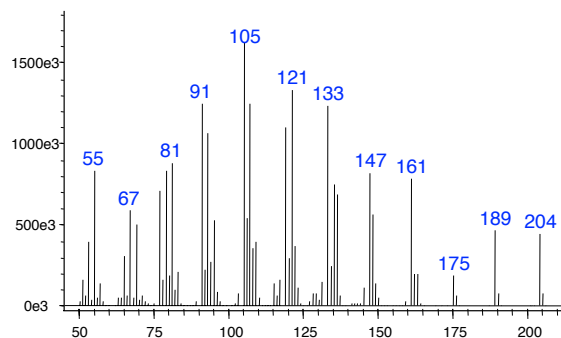


図2-17. sclav_p0982形質転換体が生産する化合物のマスペクトル

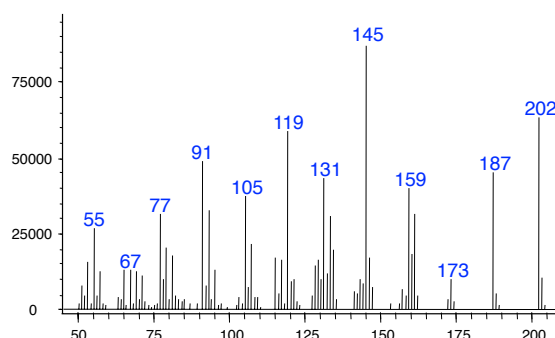


A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

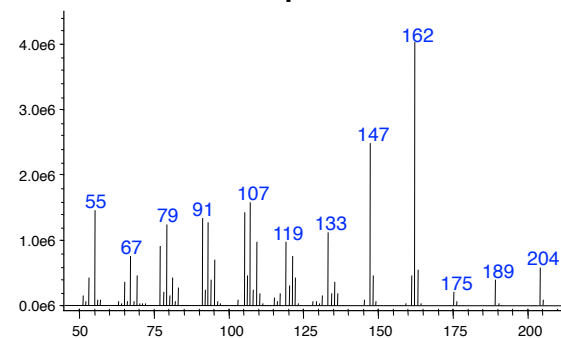
Compound 1



Compound 3
(unknown sesquiterpene)



Compound 2



Compound 5
(unknown sesquiterpene)

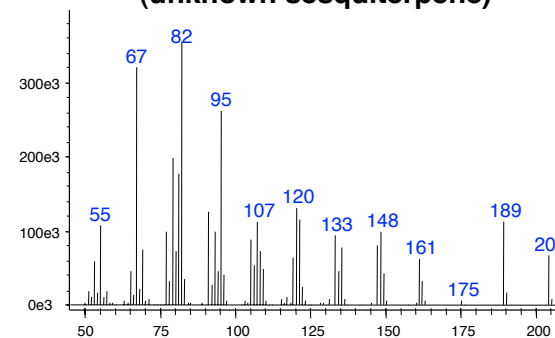


図2-18. SUKA22株およびsclav_p0985導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

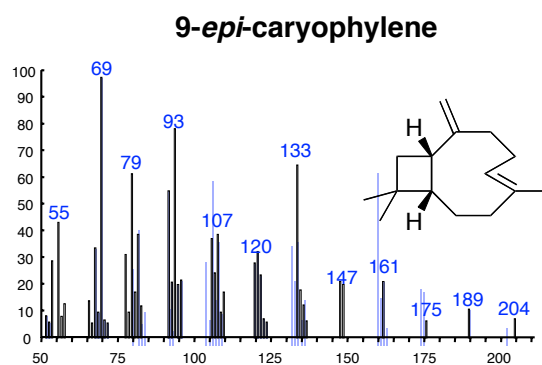
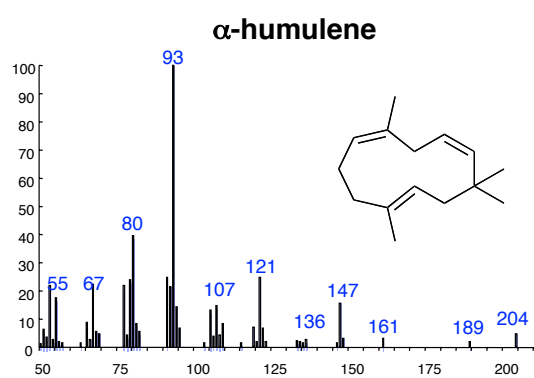
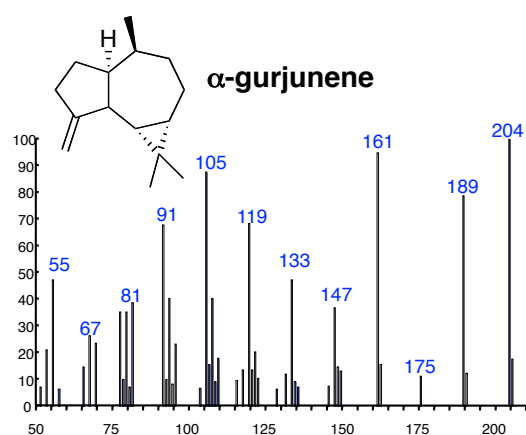
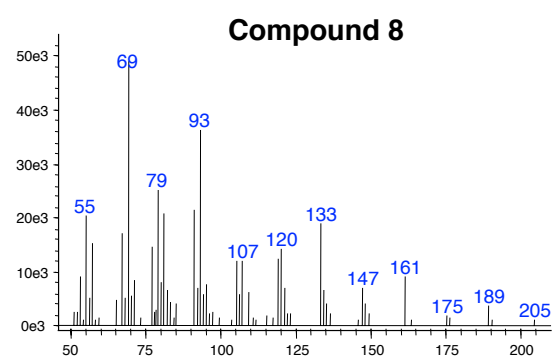
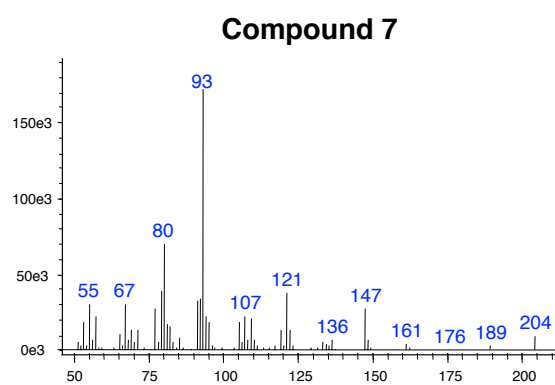
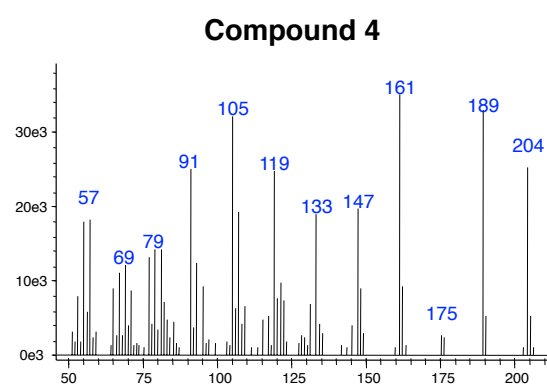
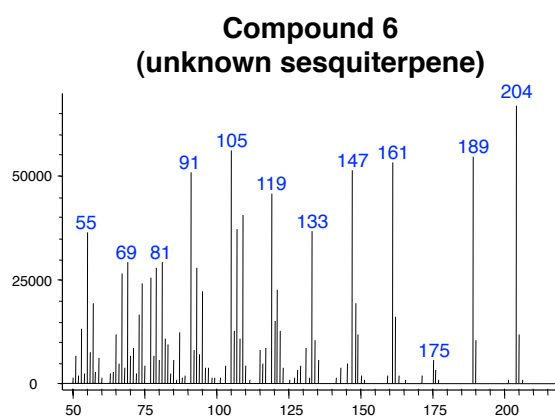
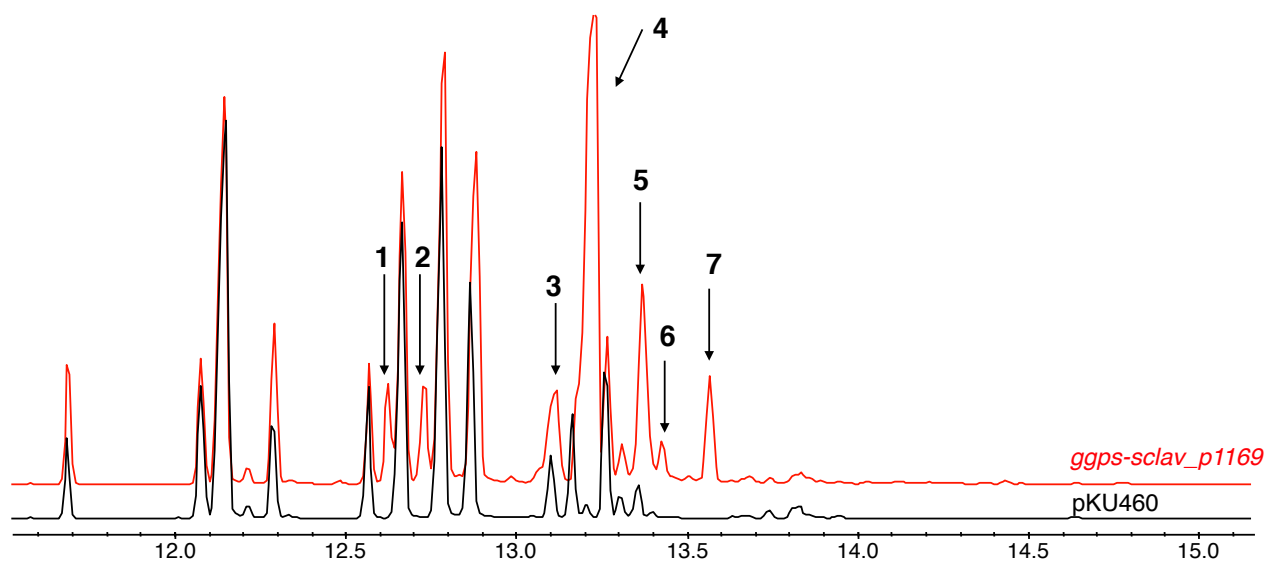


図2-19. *sclav_p0985*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

図2-20. SUKA22株および*sclav_p1169*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

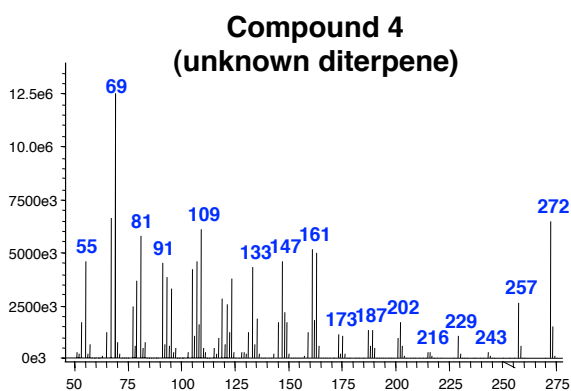
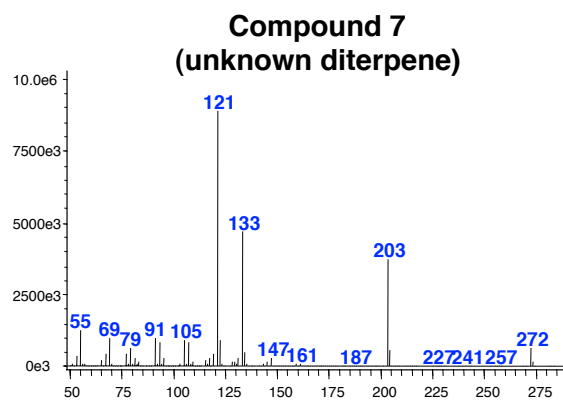
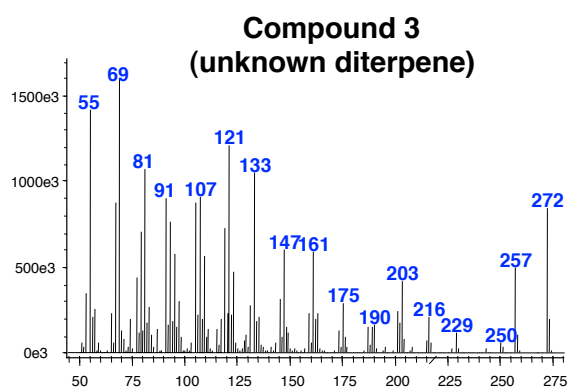
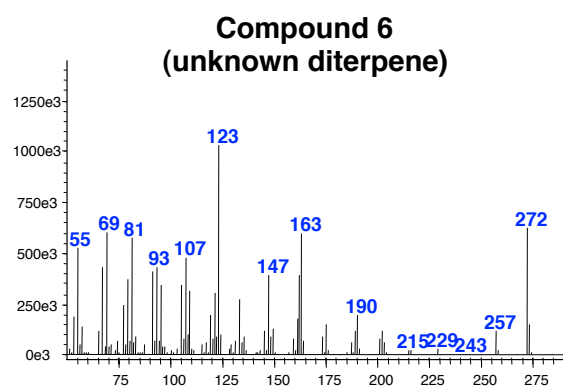
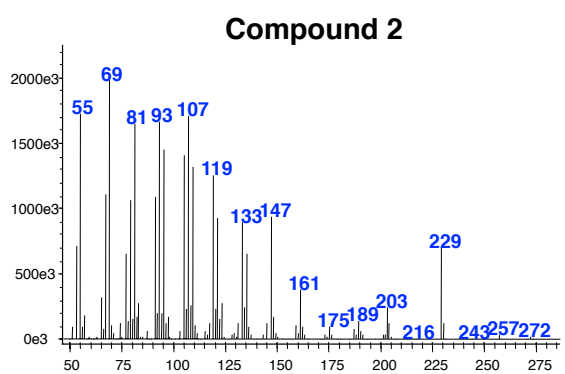
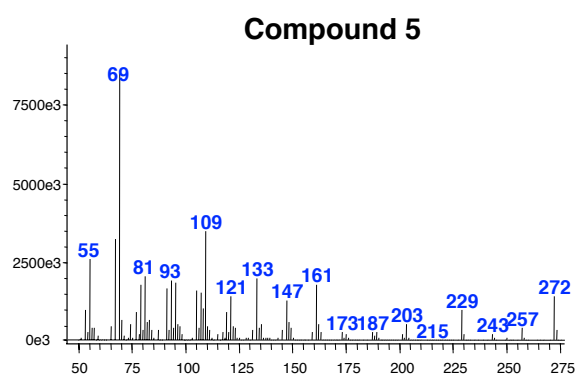
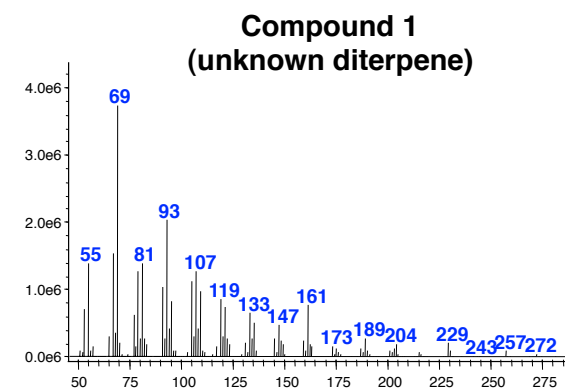
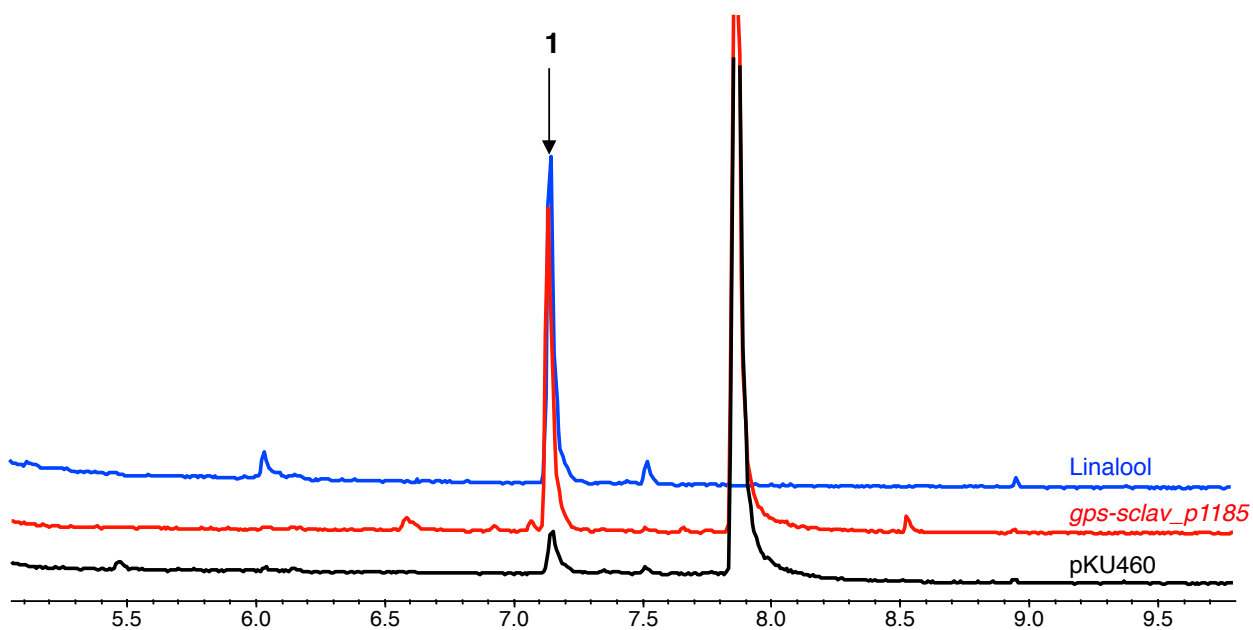


図2-21. *sclav_p1169*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

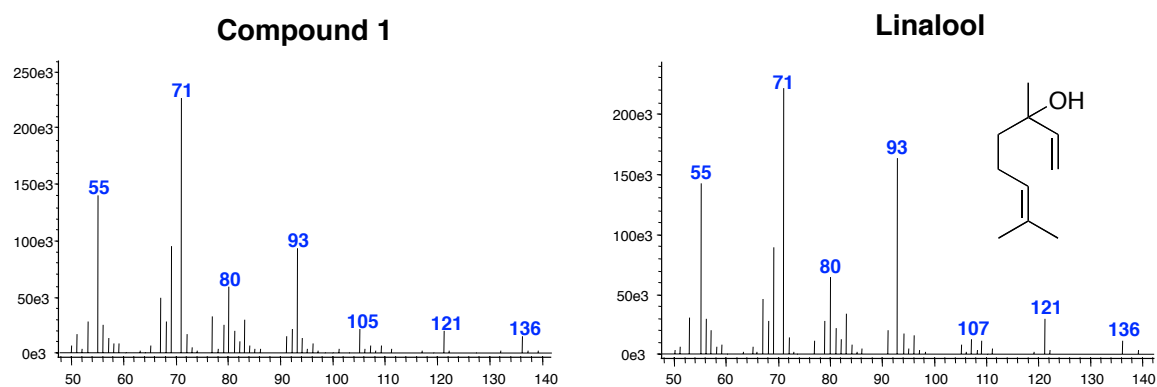
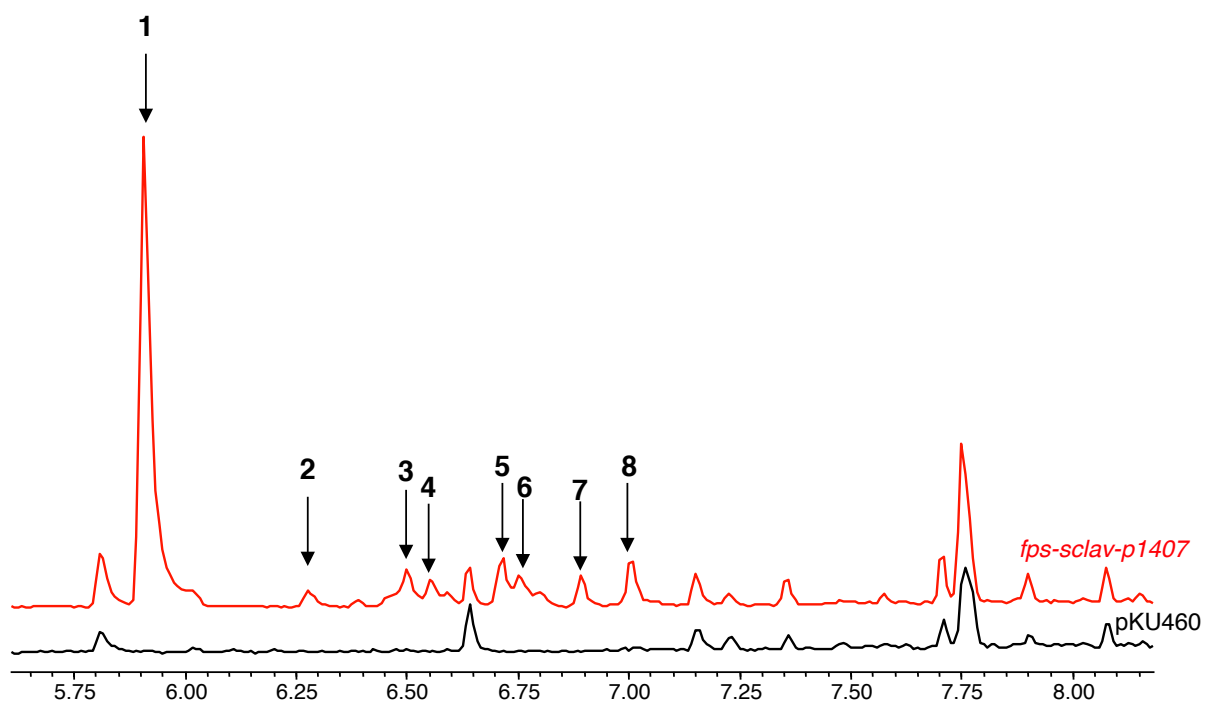


図2-22. SUKA22株および*sclav_p1185*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図2-23. SUKA22株および*sclav_p1407*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

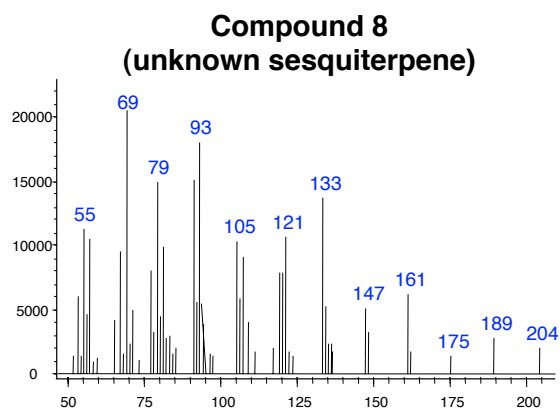
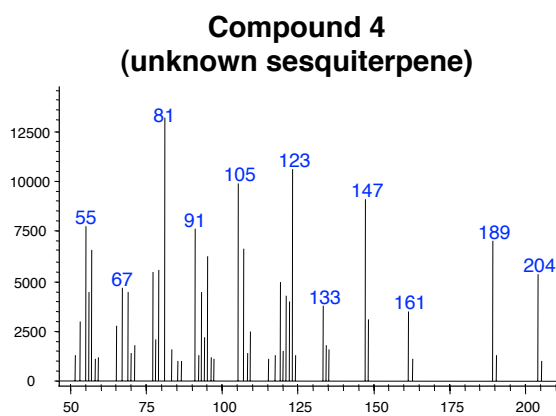
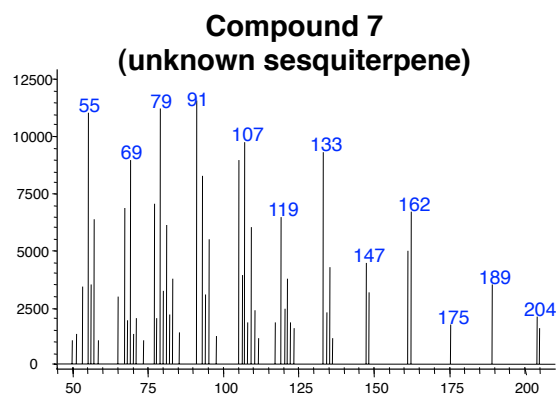
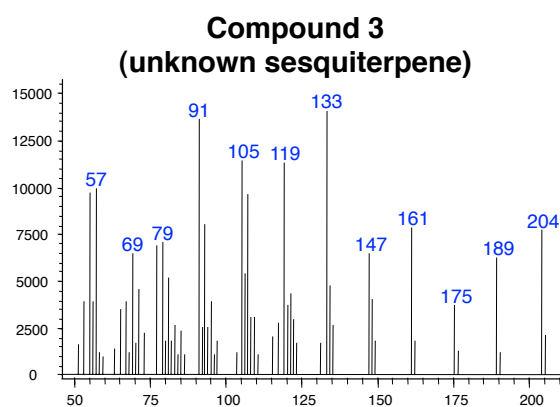
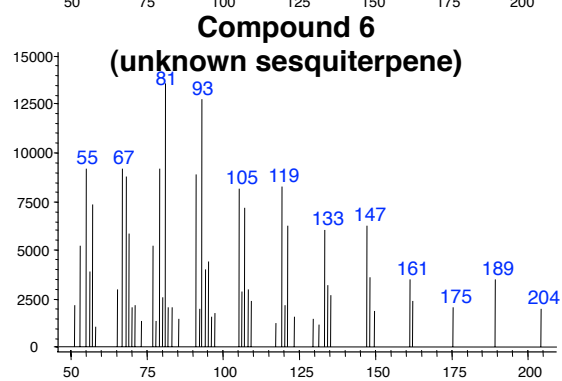
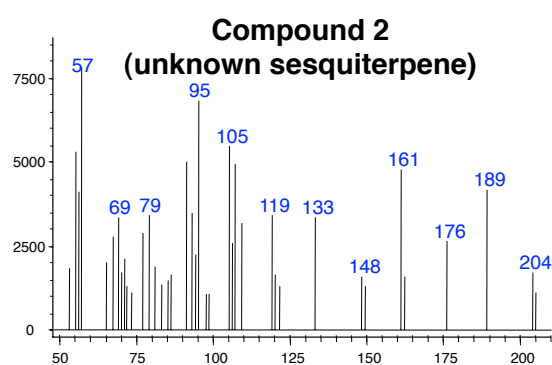
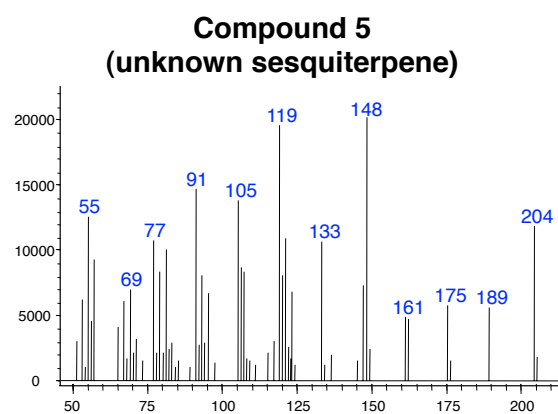
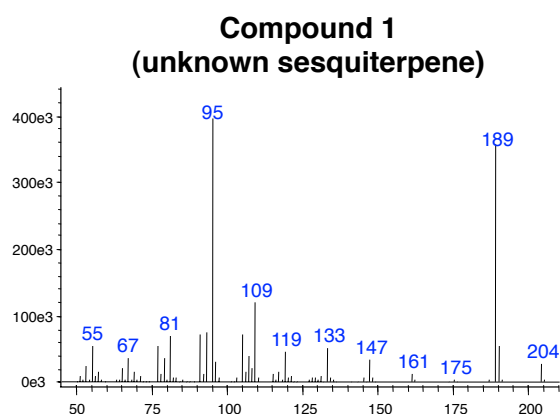
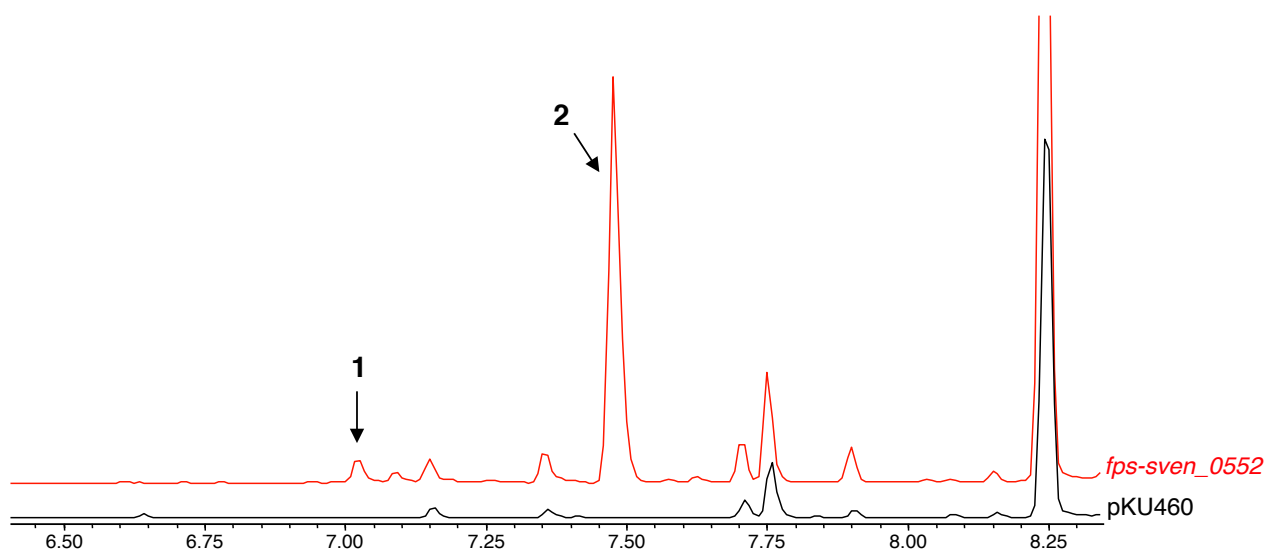


図2-24. *sclav_p1407*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

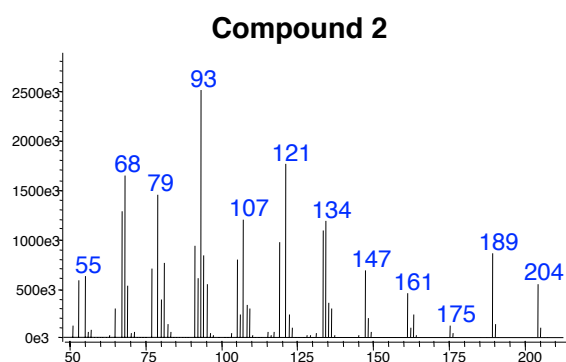
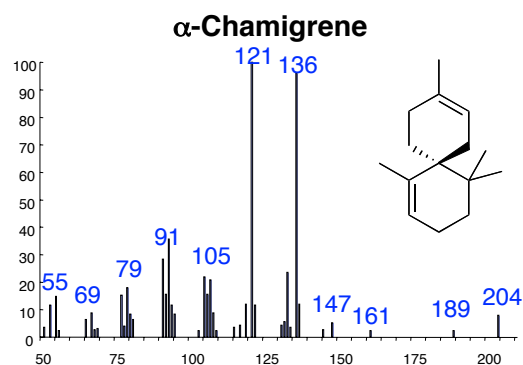
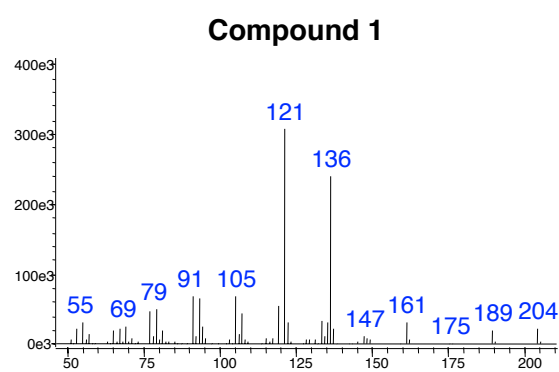
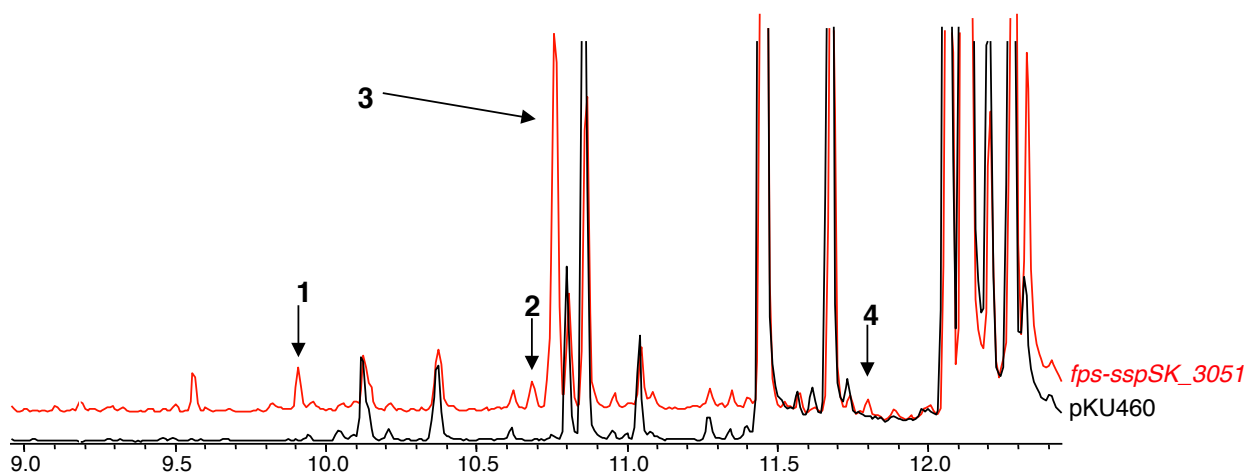


図2-25. SUKA22株およびsven_0552導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図2-26. SUKA22株および*sspSK_3051*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

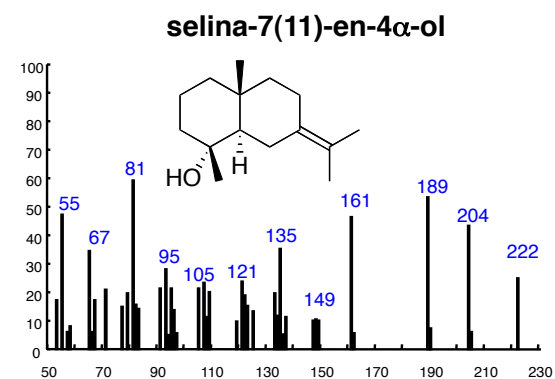
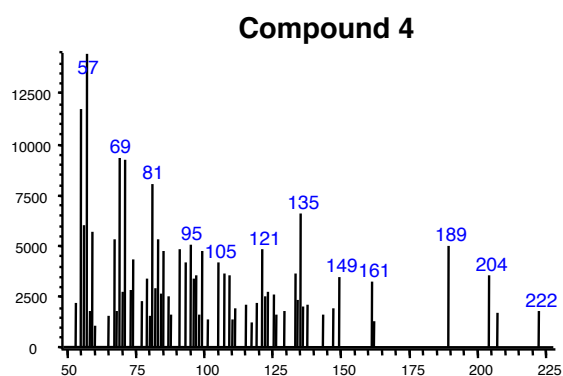
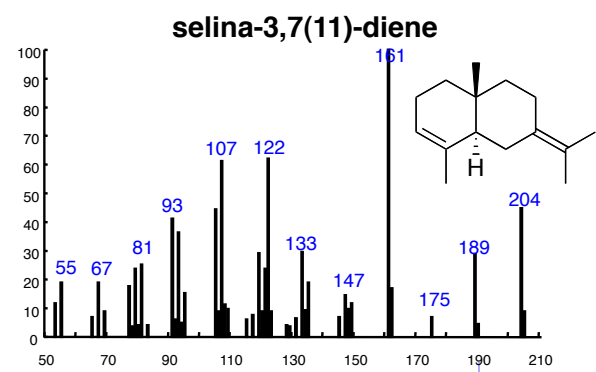
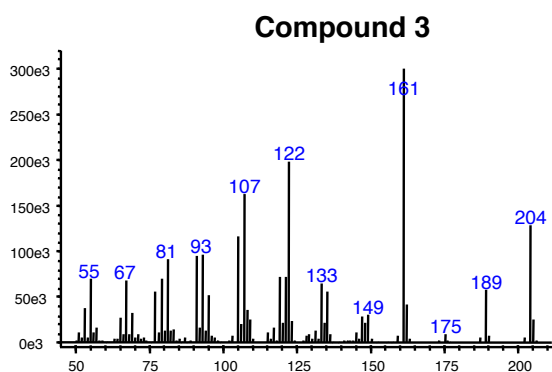
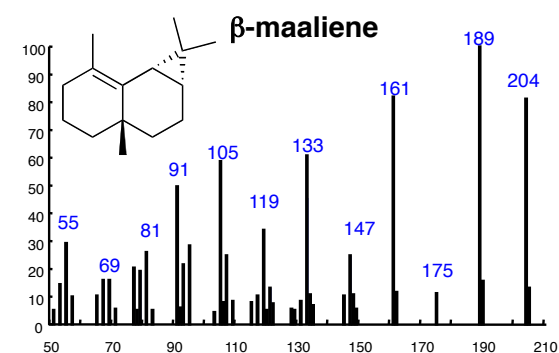
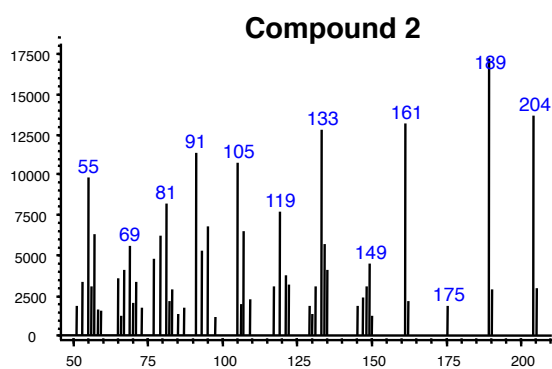
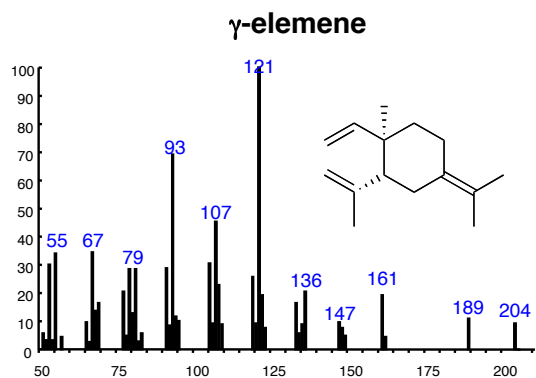
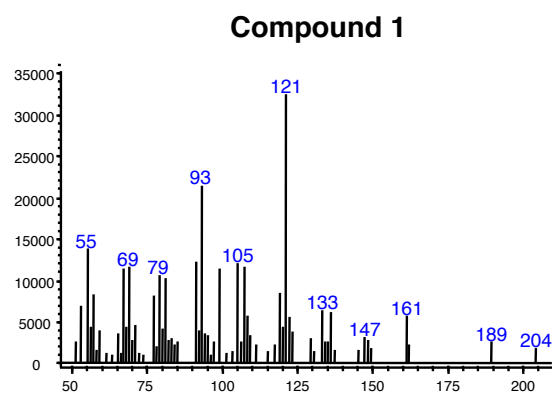
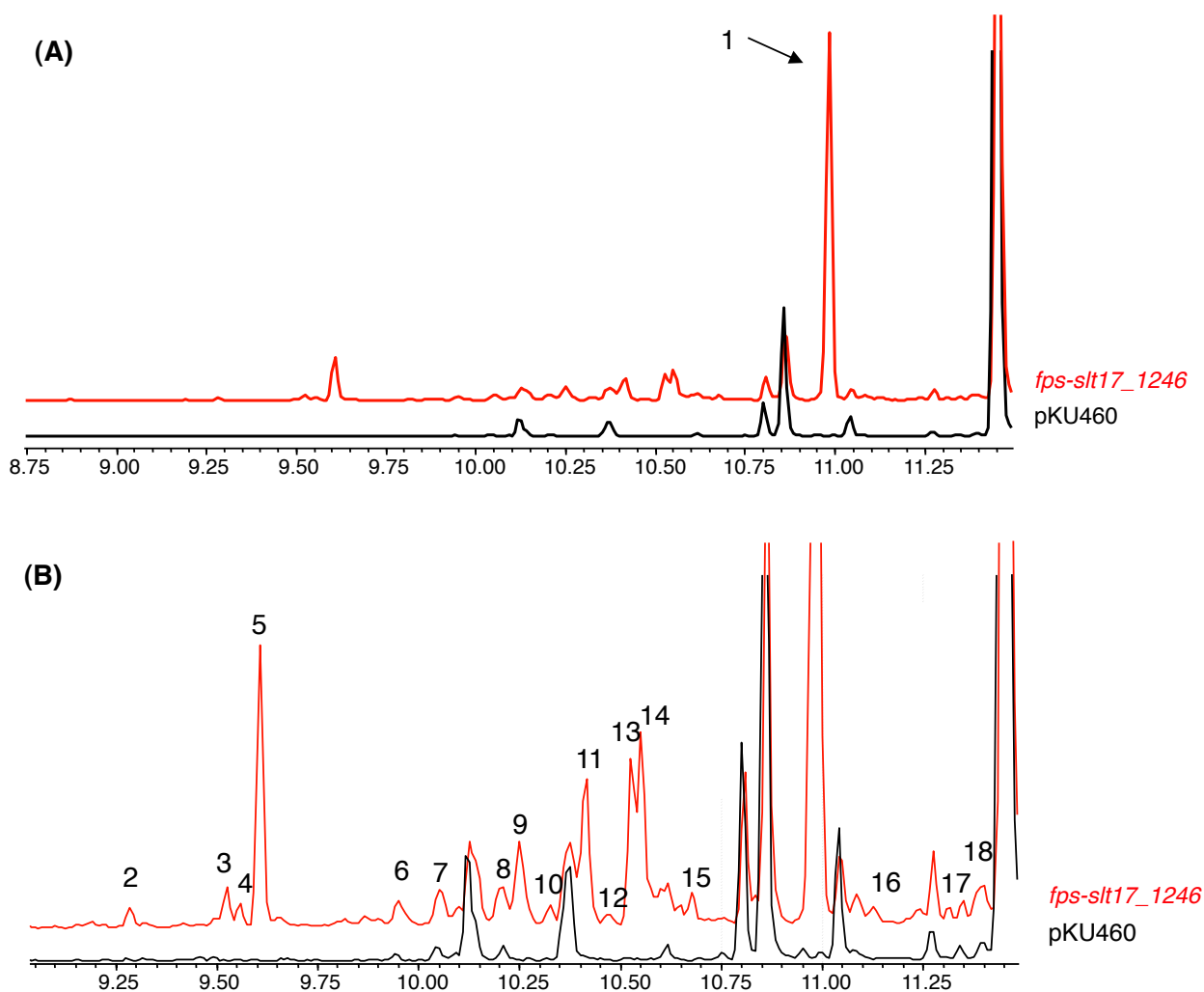


図2-27. *sspSK_3051*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図2-28. SUKA22株および*slt17_1246*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析
(A)保持時間8.75-11.30分、(B)保持時間9.20-11.30分

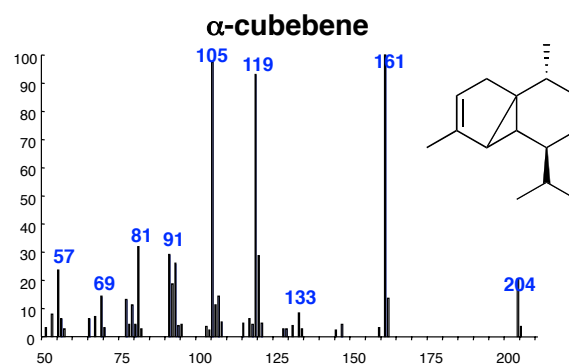
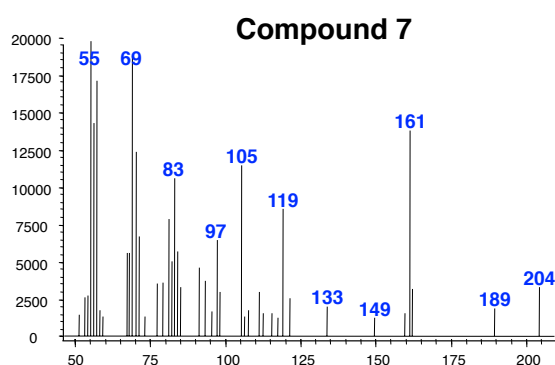
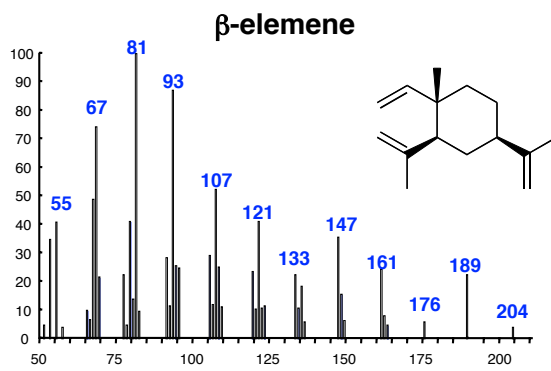
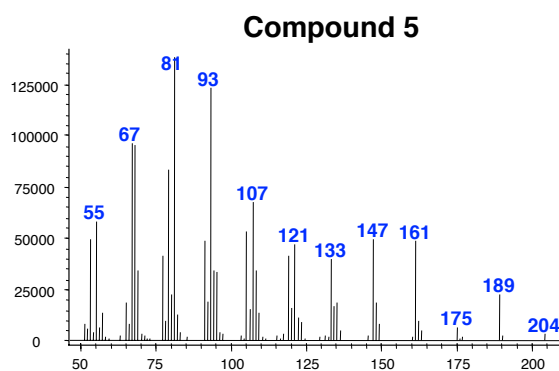
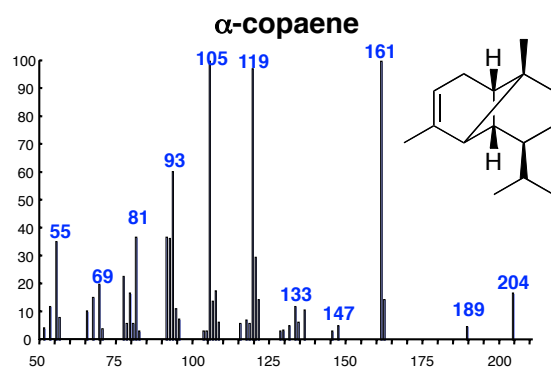
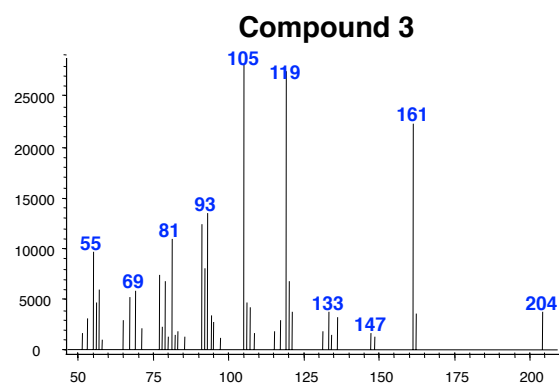
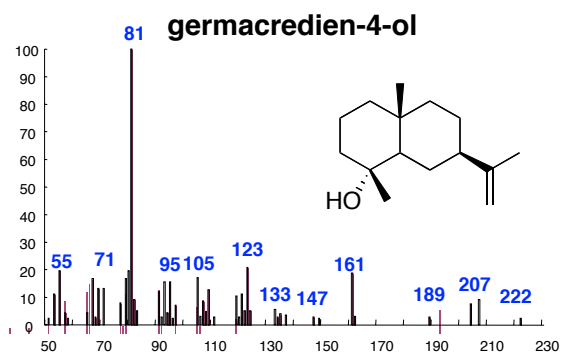
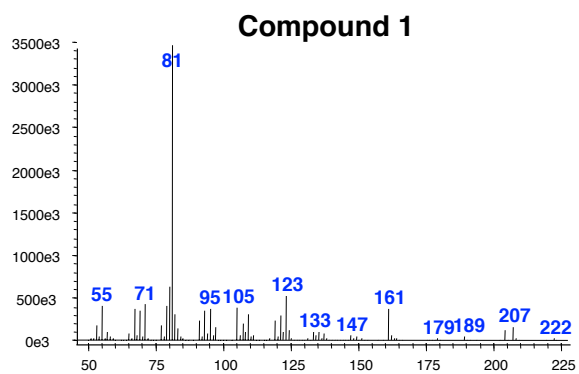


図2-29. *slt17_1246*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル

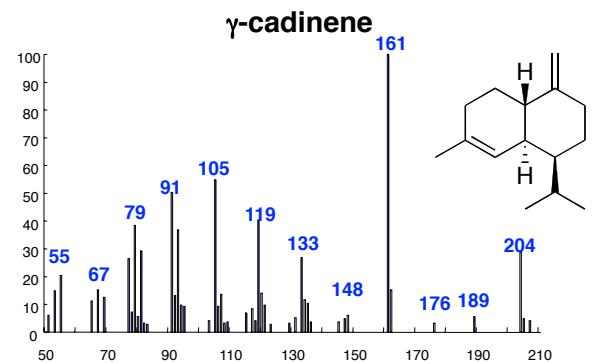
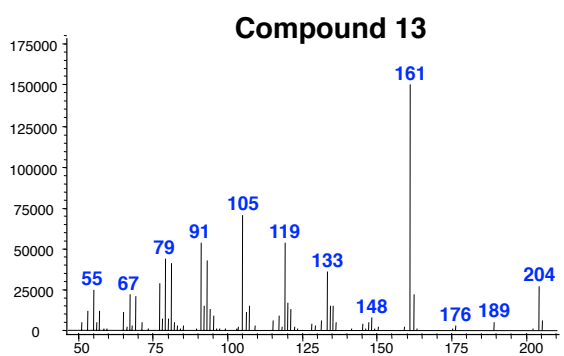
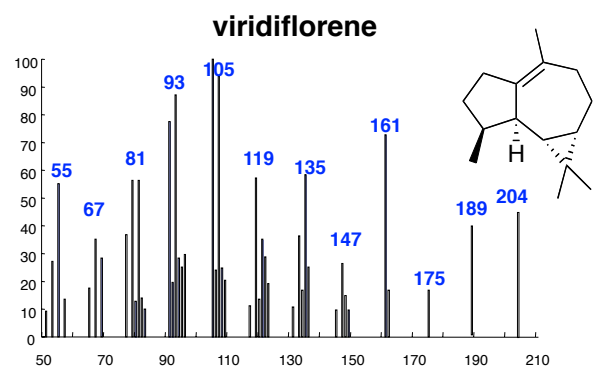
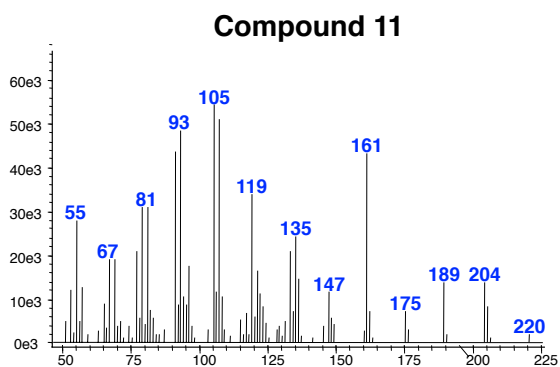
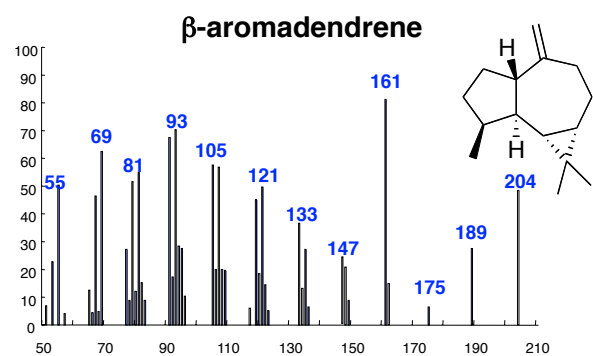
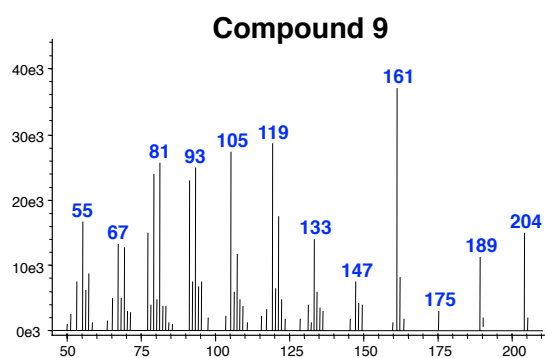
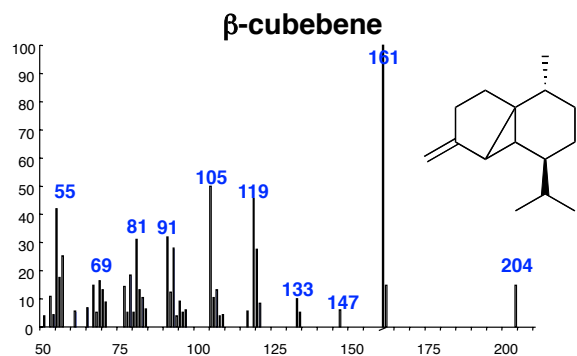
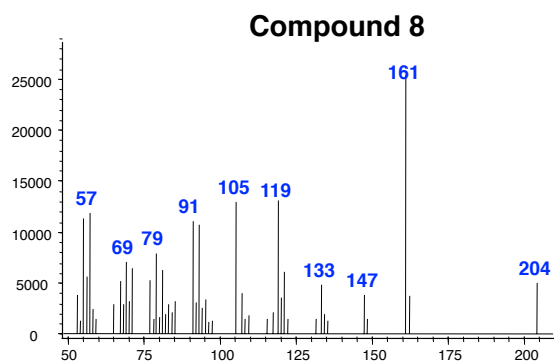


図2-29. *slt17_1246*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル

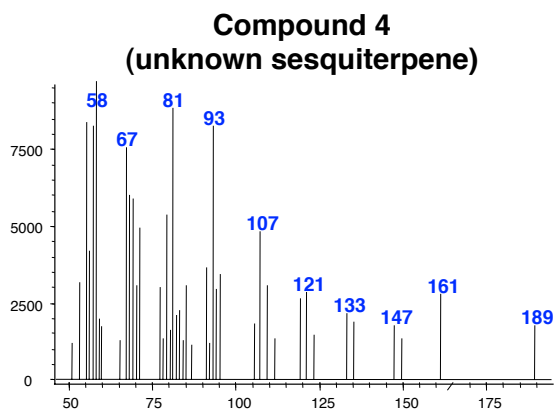
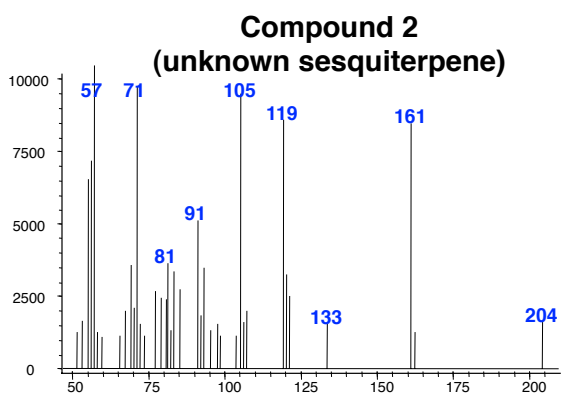
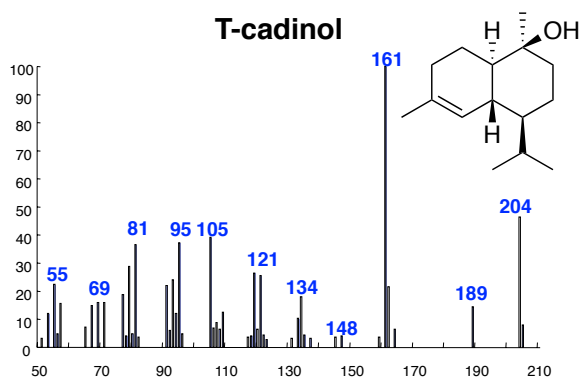
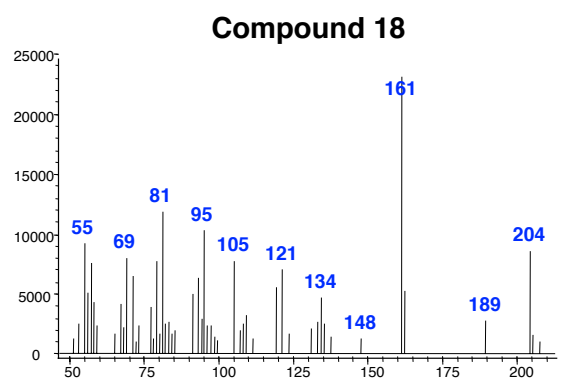
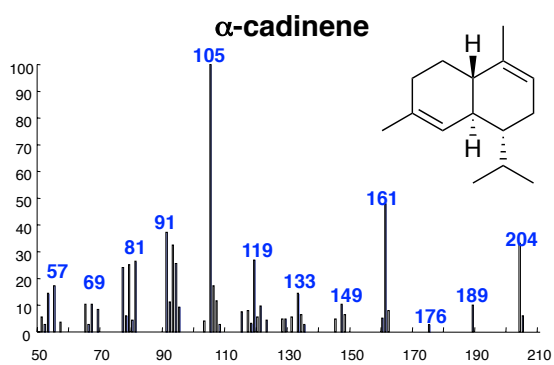
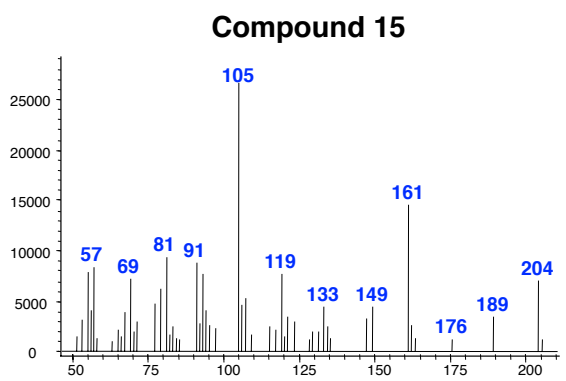
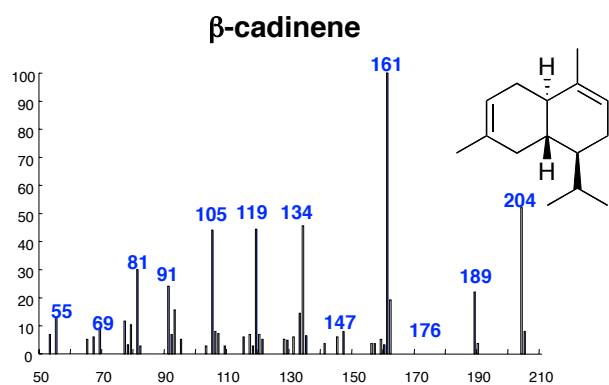
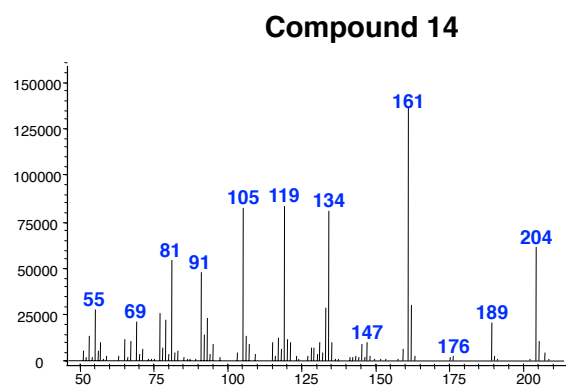


図2-29. *slt17_1246*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル

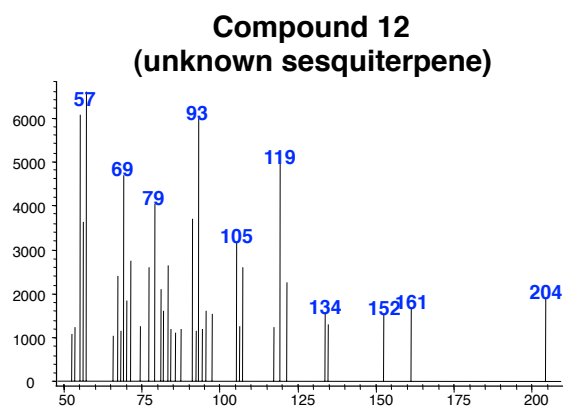
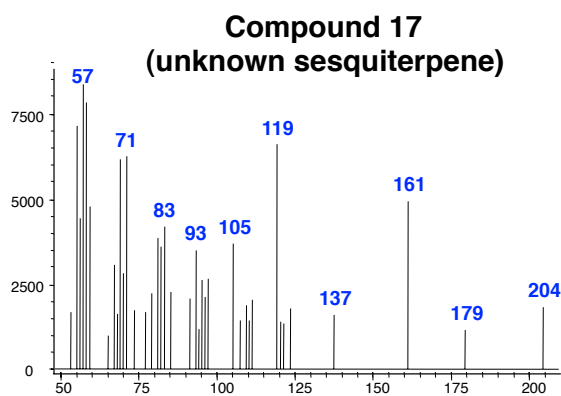
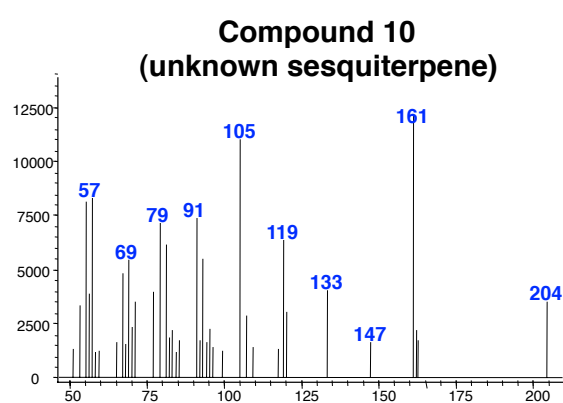
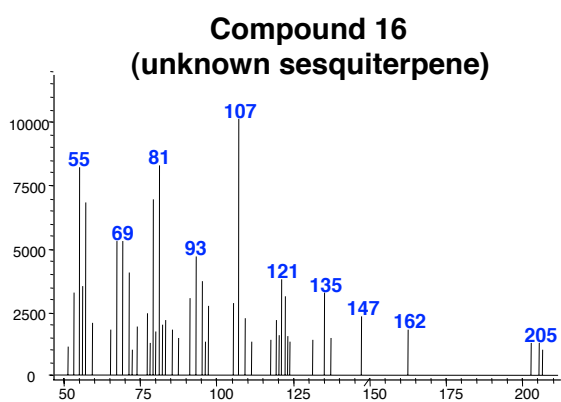
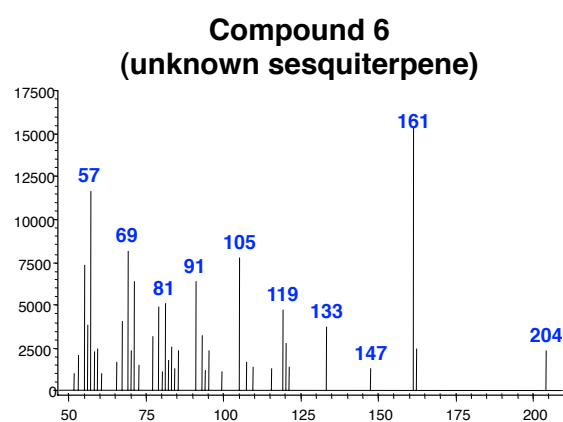
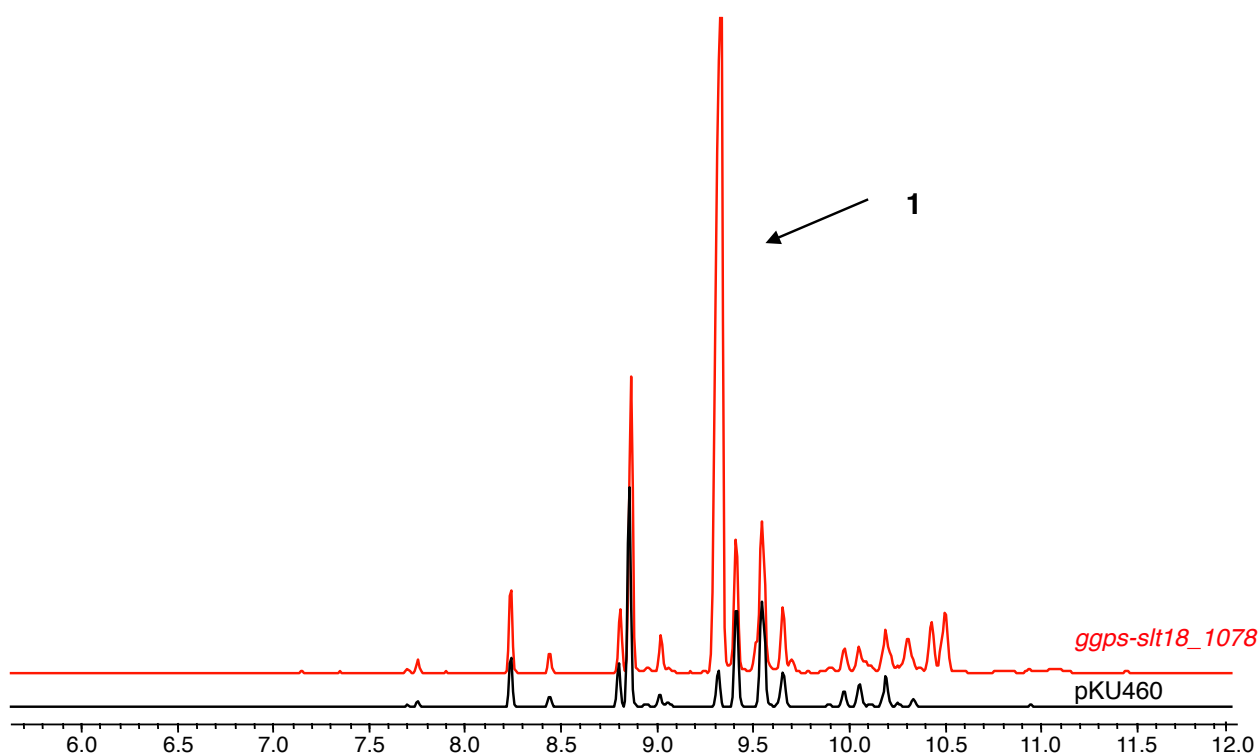


図2-29. *slt17_1246*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

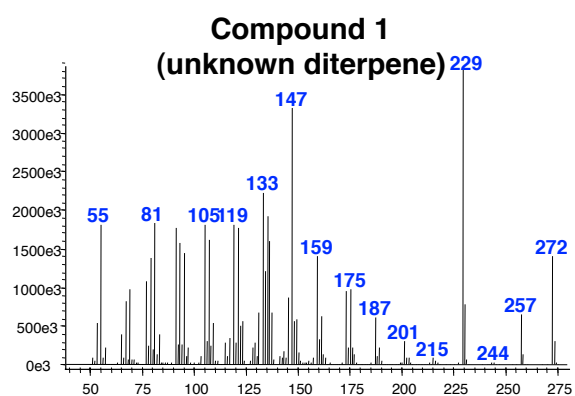
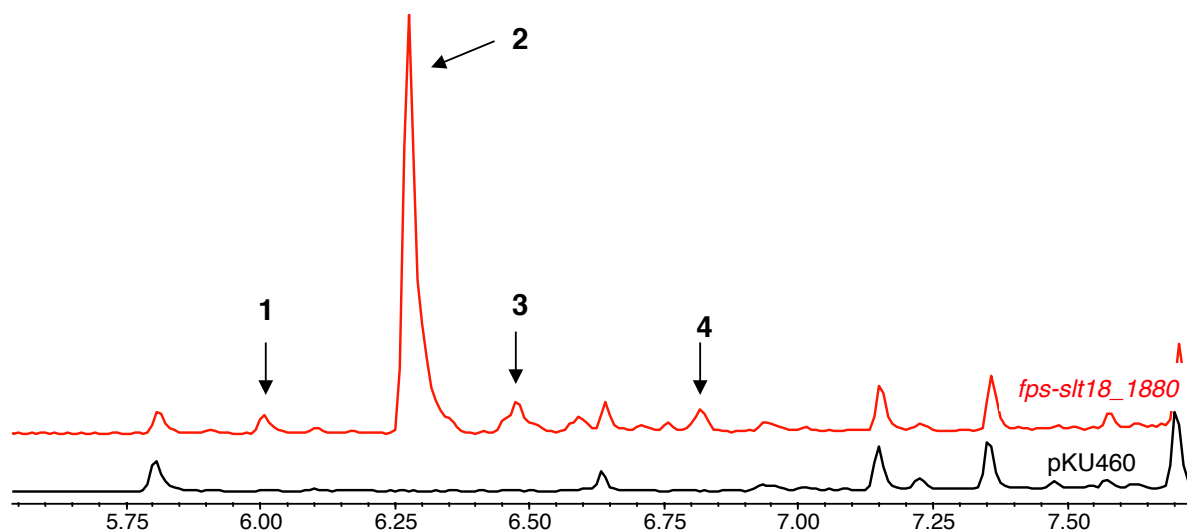


図2-30. SUKA22株および*slt18_1078*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

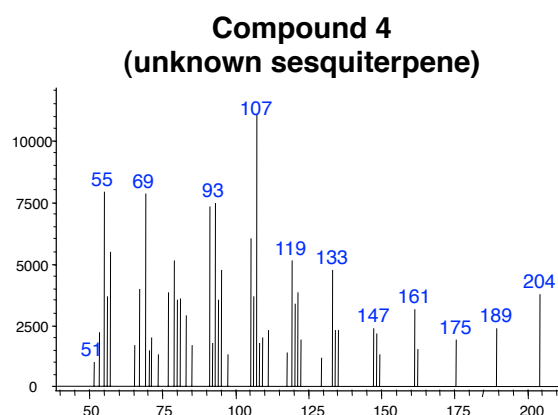
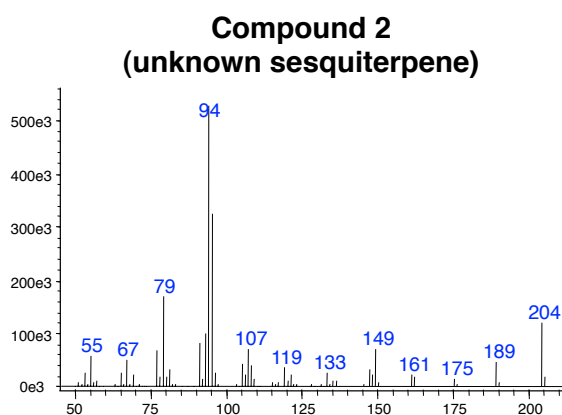
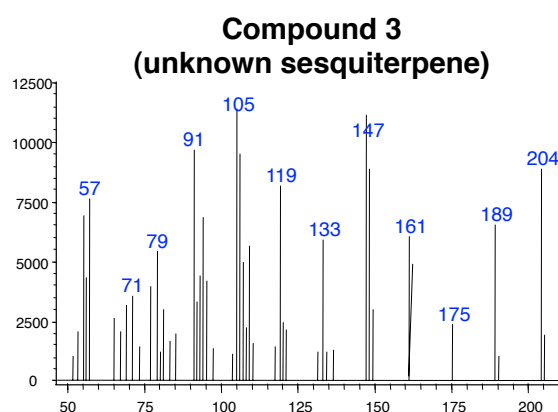
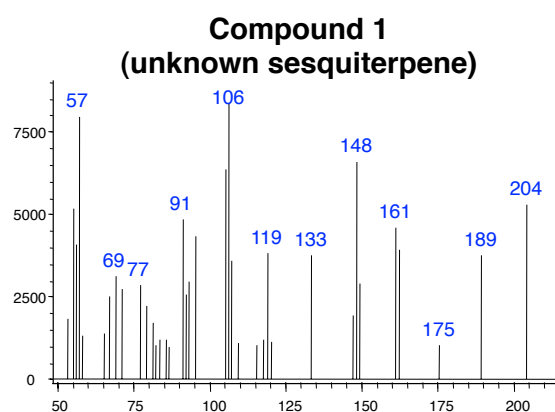
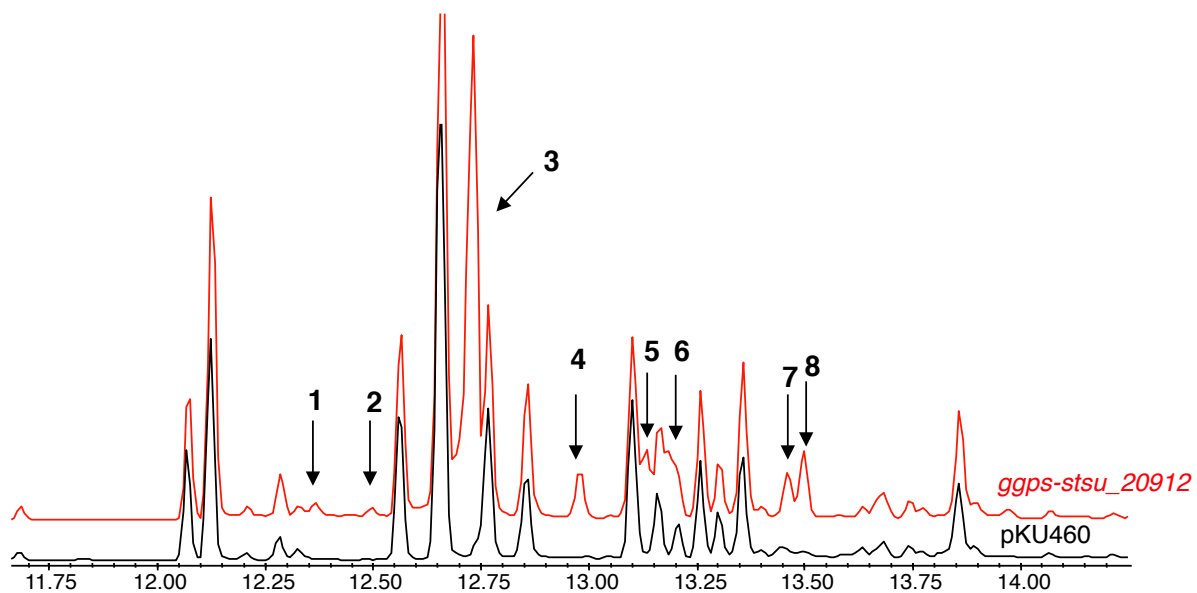


図2-31. SUKA22株および $slt18_1880$ 導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

図2-32. SUKA22株および $stsu_20912$ 導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

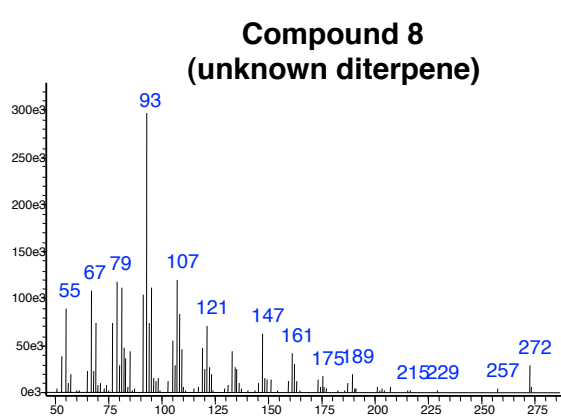
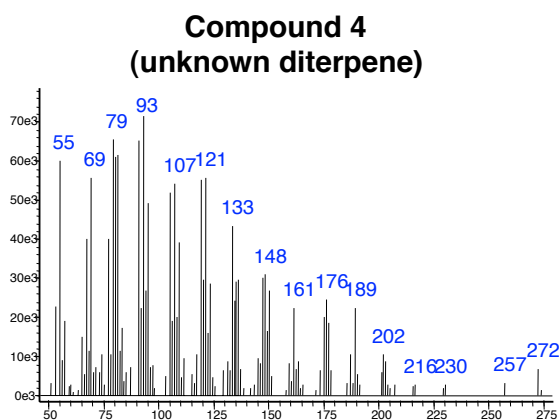
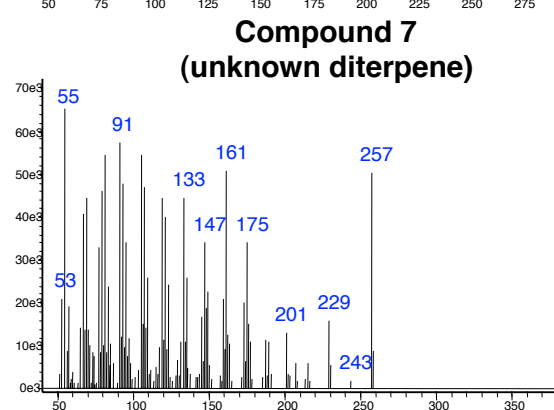
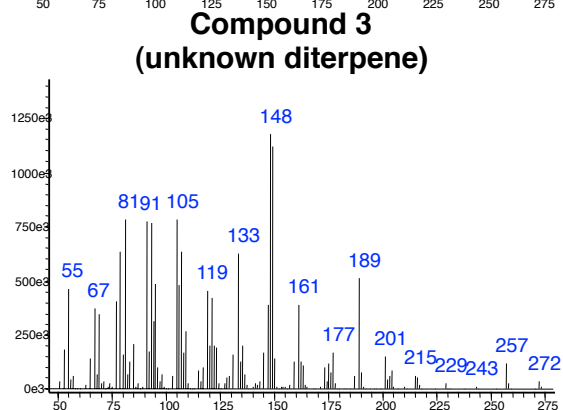
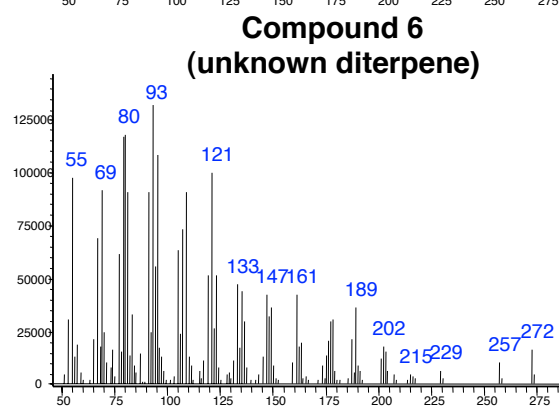
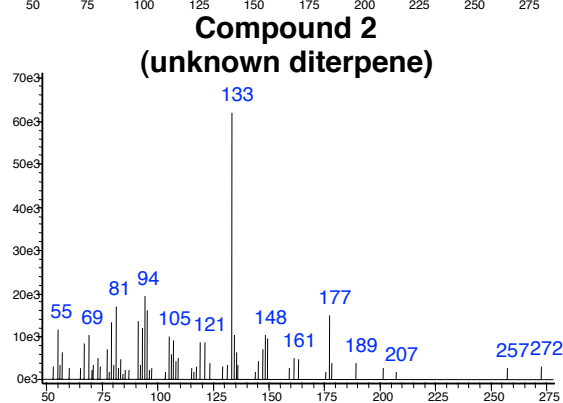
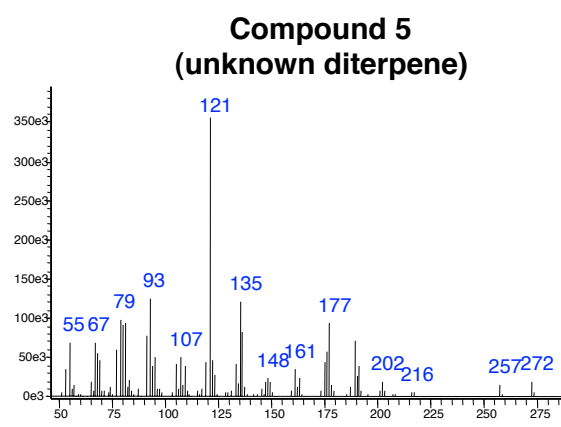
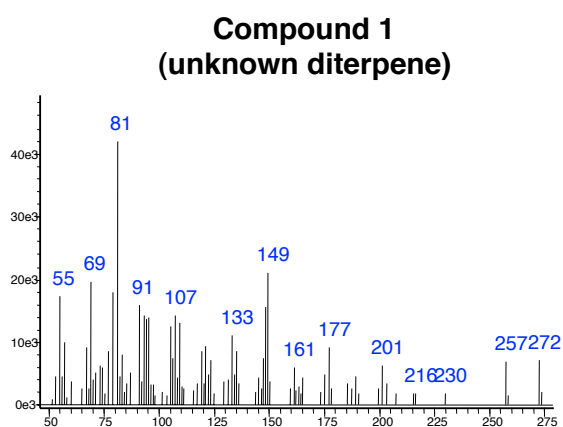
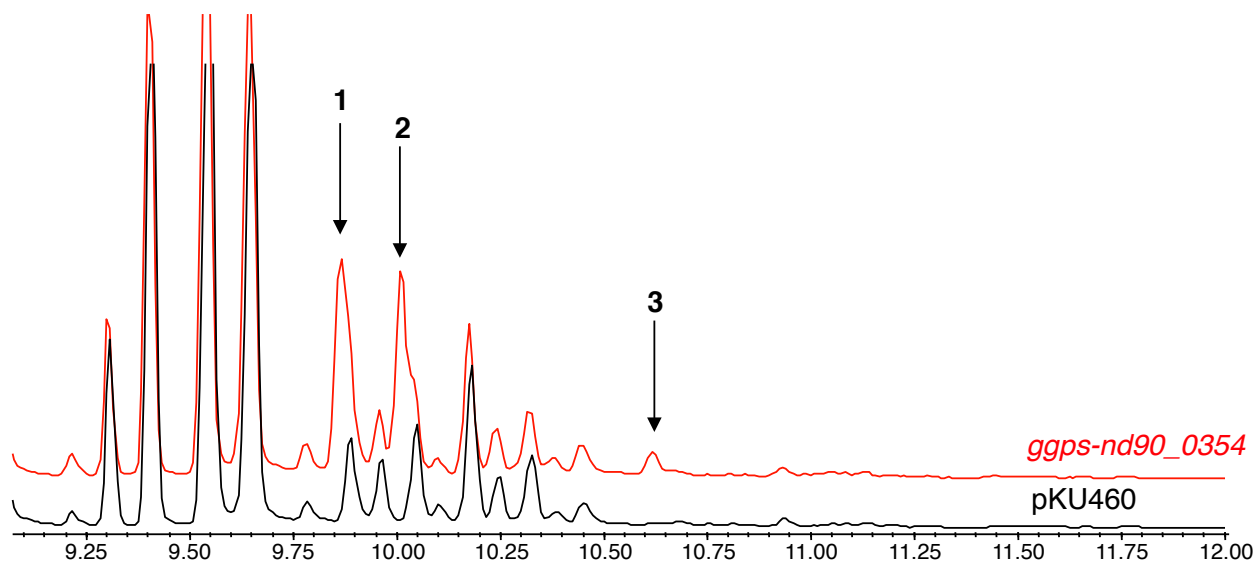
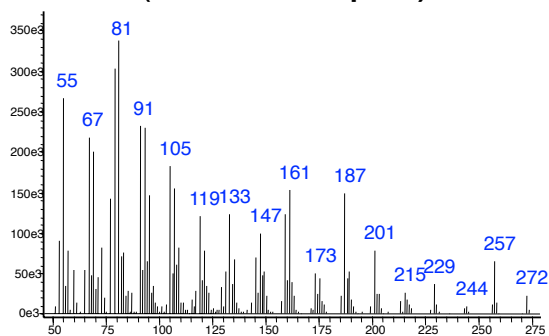


図2-33. *stsu_20912*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル

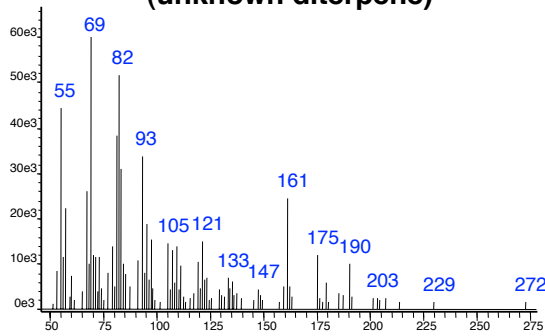


A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

Compound 1
(unknown diterpene)



Compound 3
(unknown diterpene)



Compound 2
(unknown diterpene)

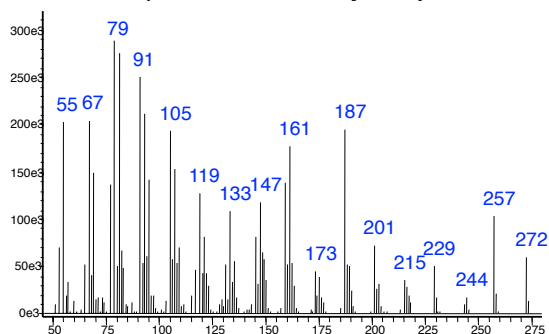
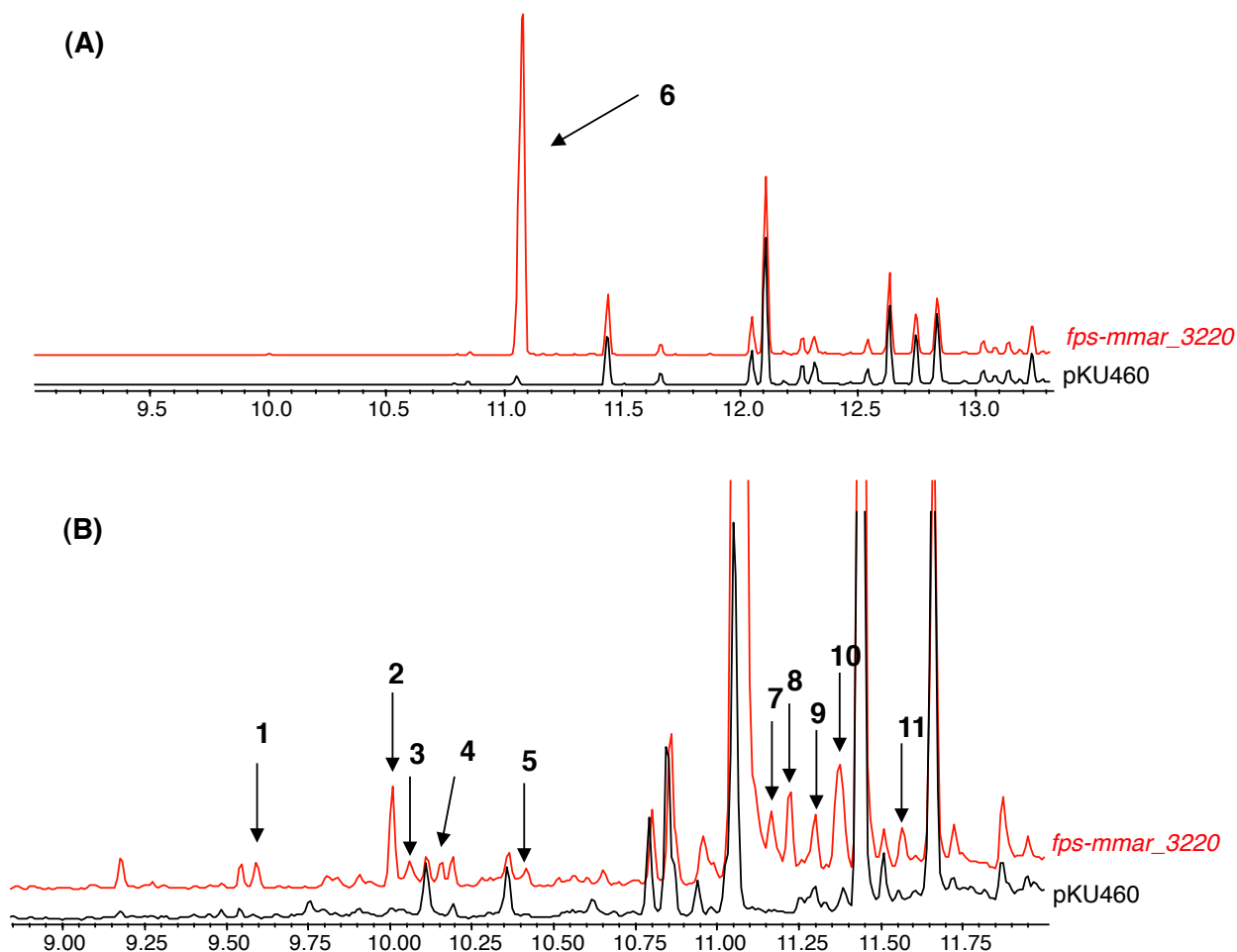


図2-34. SUKA22株およびnd90_0354導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

図2-35. SUKA22株および*mmar_3220*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析
(A)保持時間9.0-13.5分および(B)保持時間9.0-12.0分

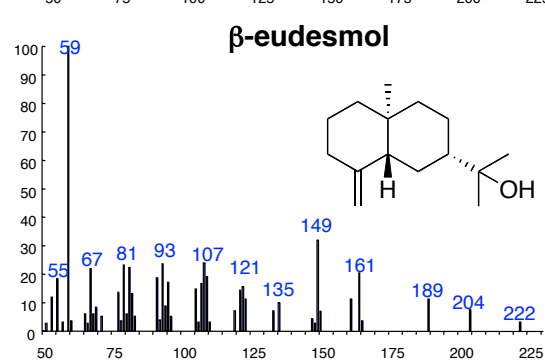
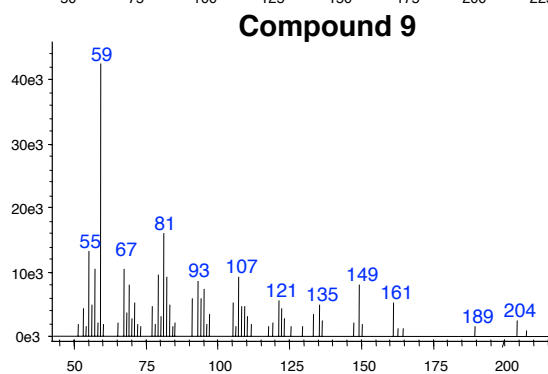
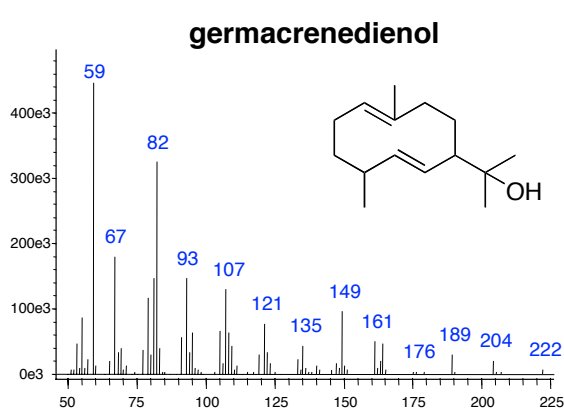
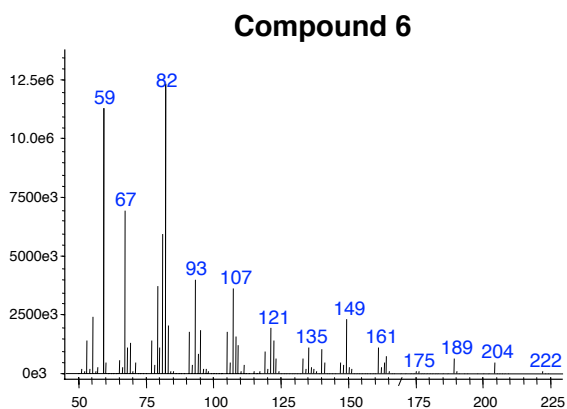
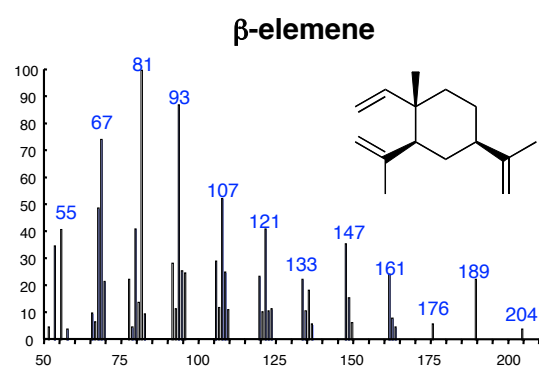
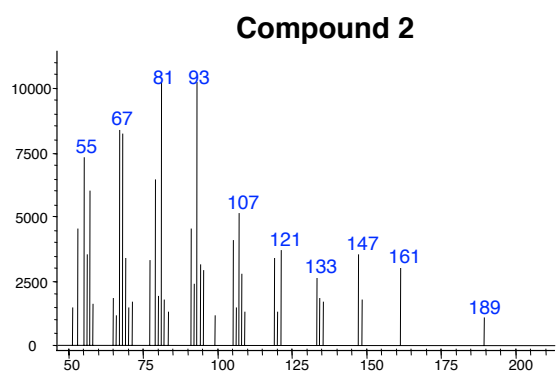
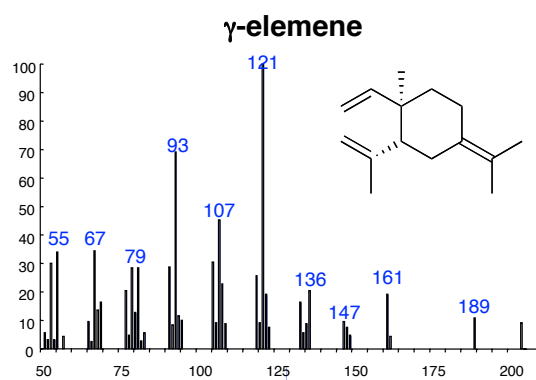
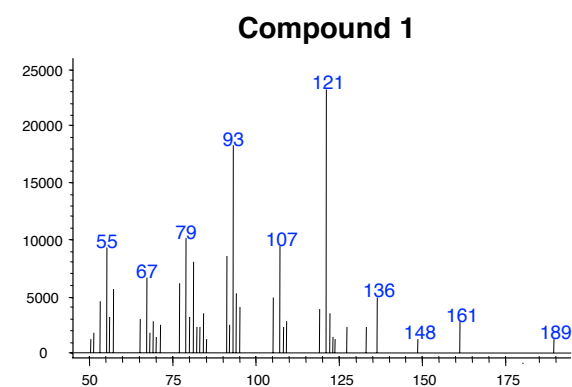


図2-36. *mmar_3220*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル

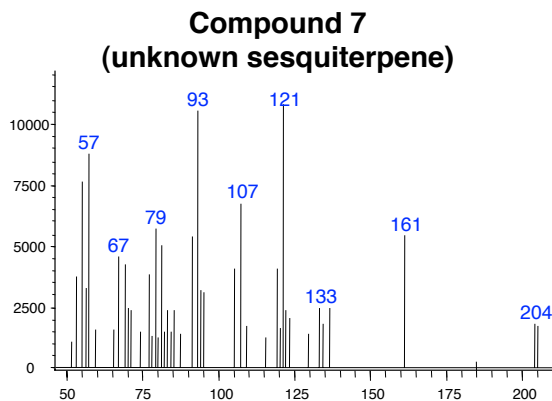
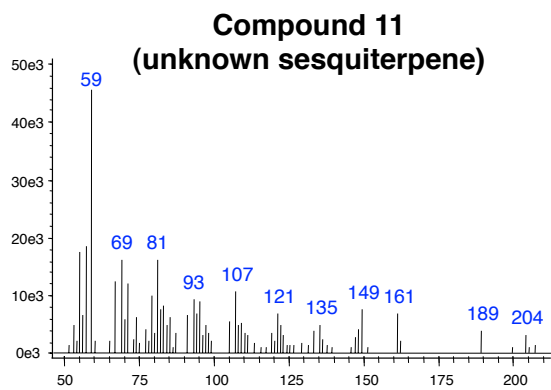
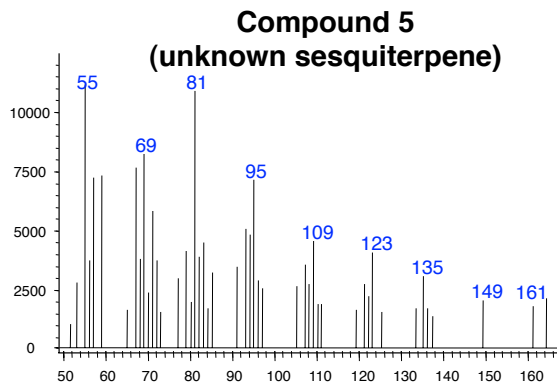
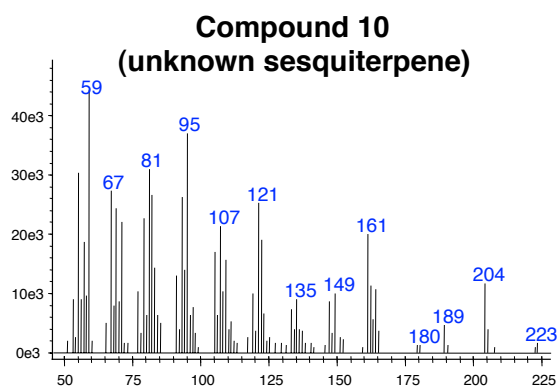
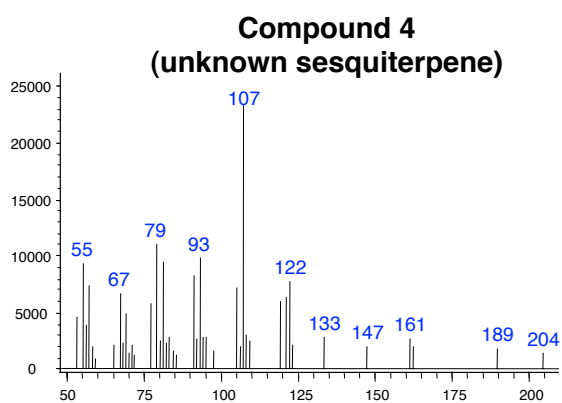
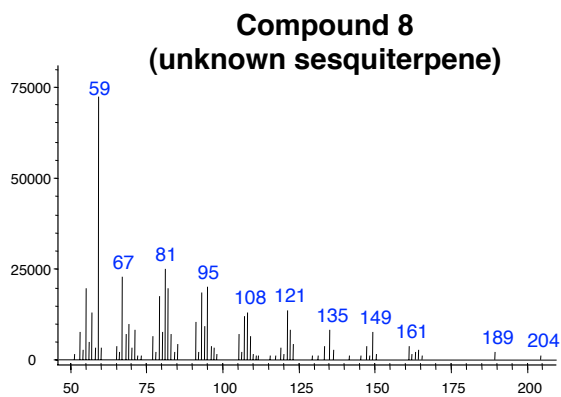
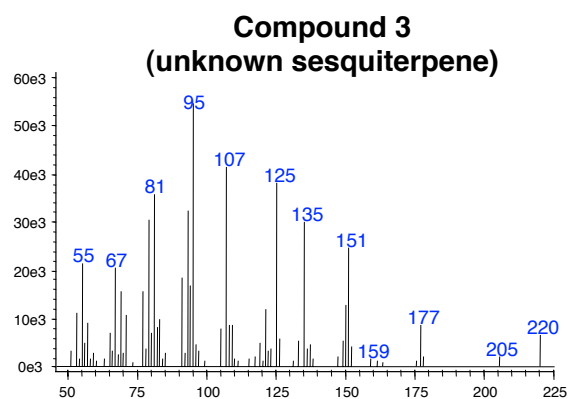


図2-36. *mmar_3220*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル

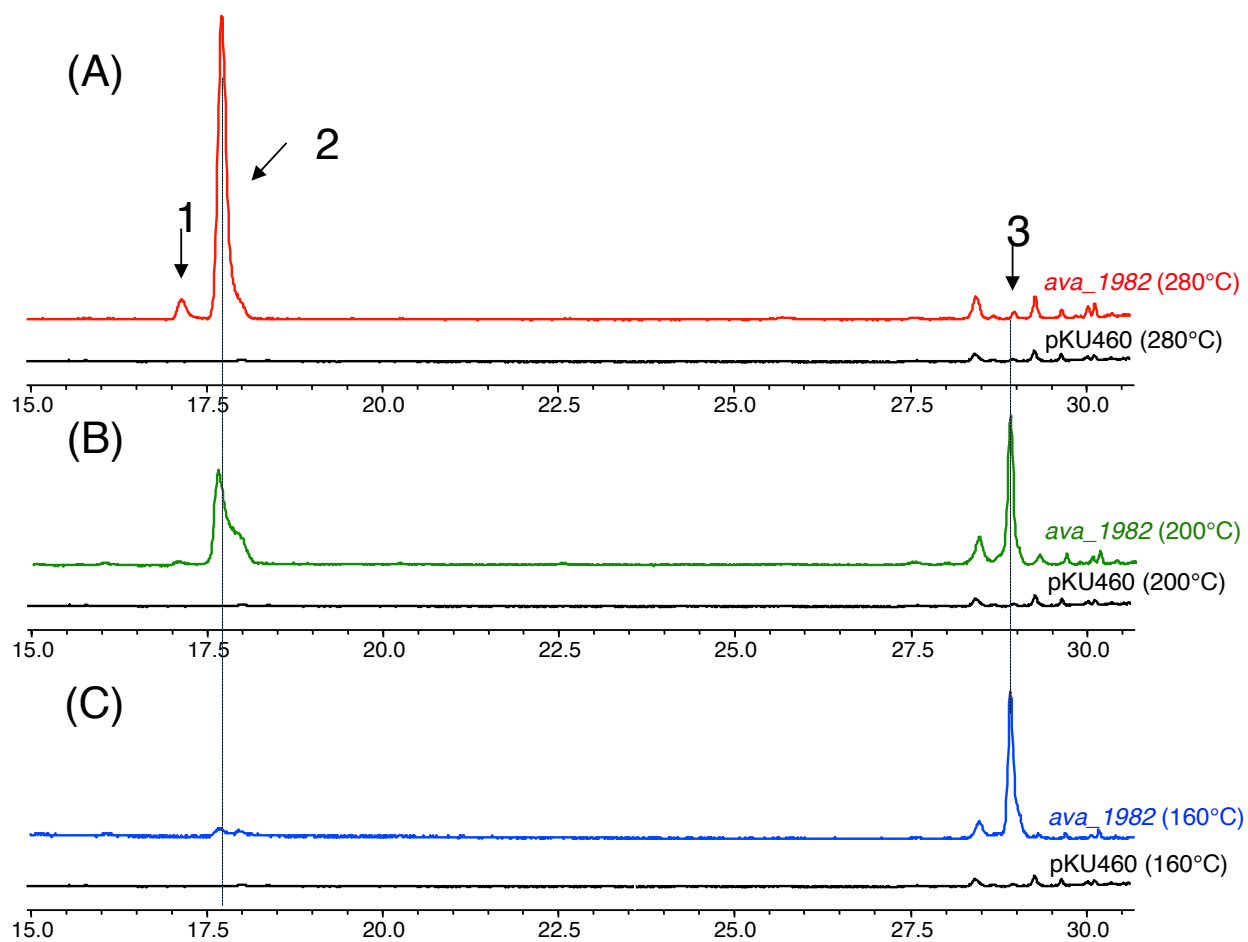


図2-37. *ava_1982*導入株のヘキサン抽出液のGC-MS解析
(A):インジェクション部分280°C, (B)200°C, (C)160°C

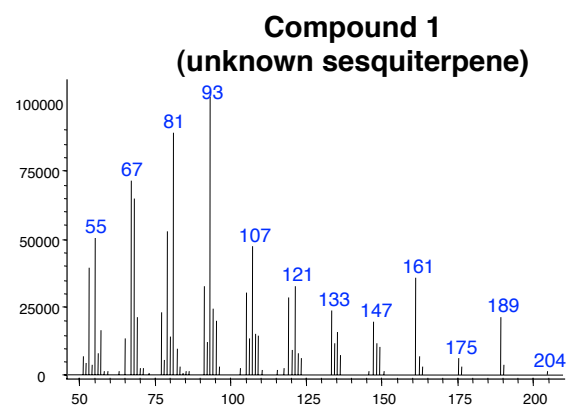
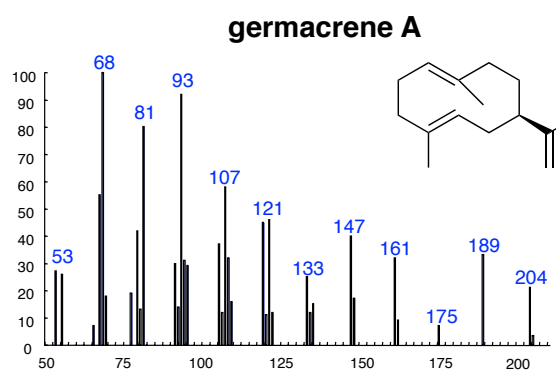
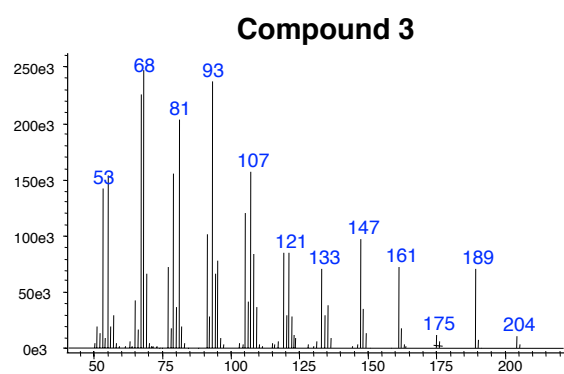
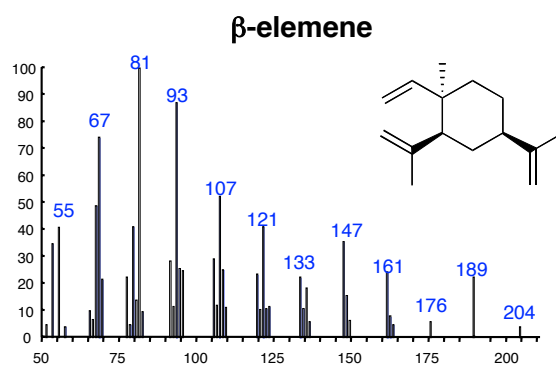
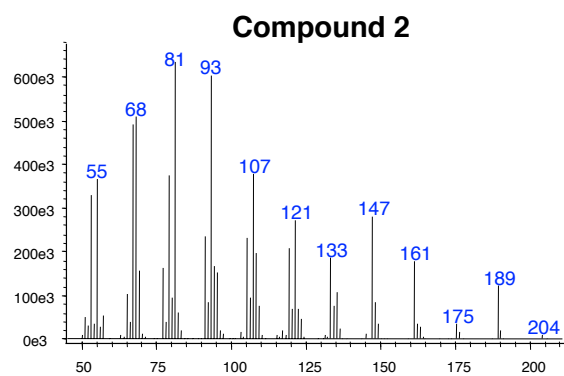
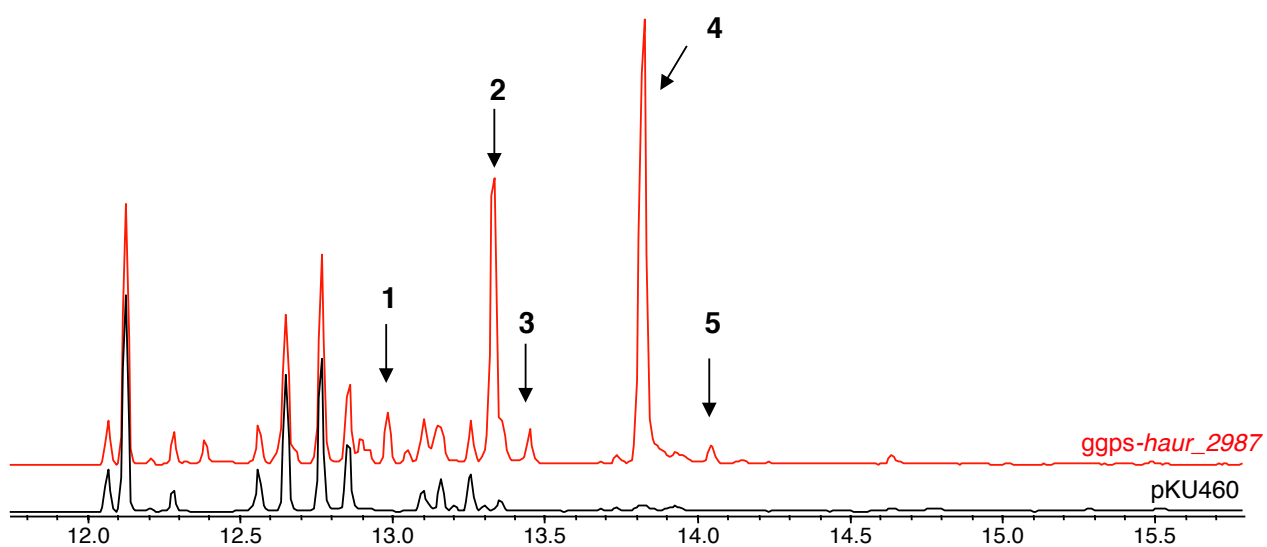


図2-38. *ava_1982*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

図2-39. SUKA22株および*haur_2987*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

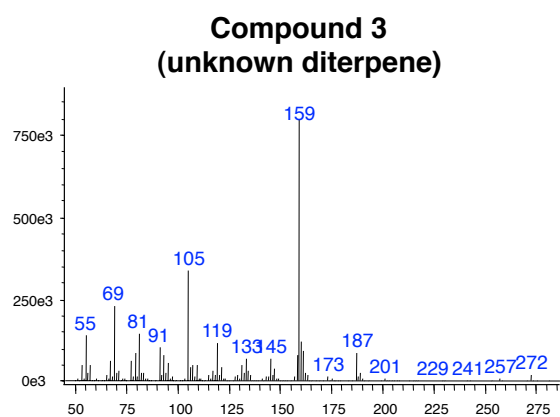
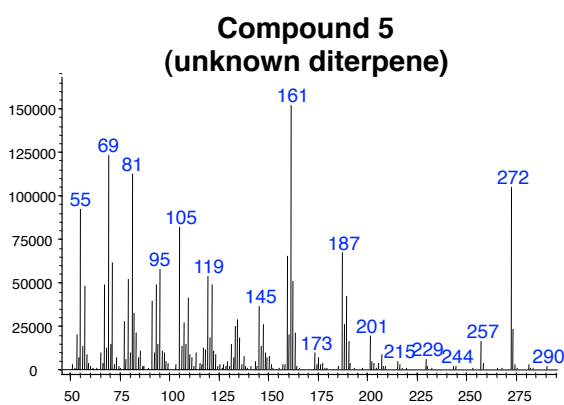
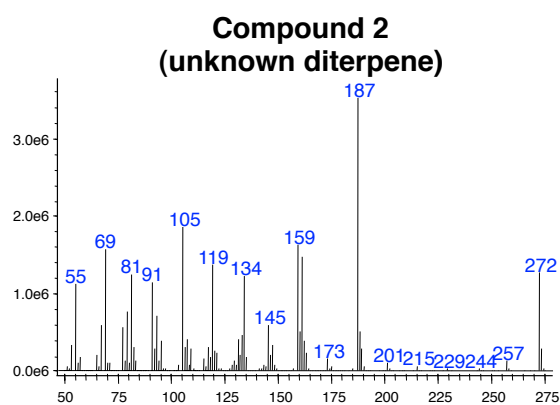
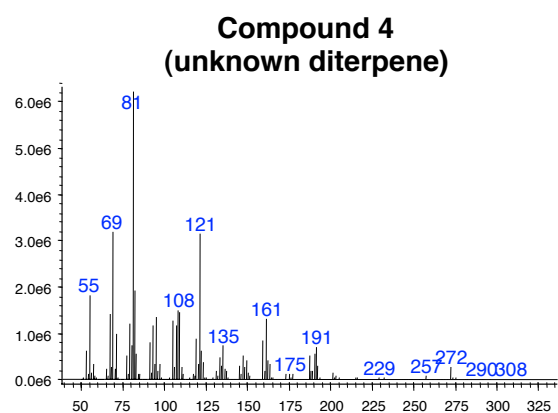
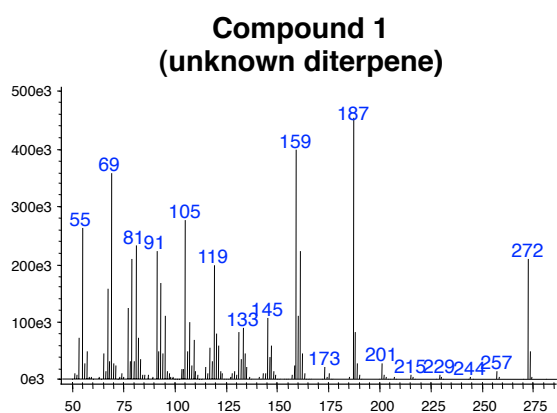
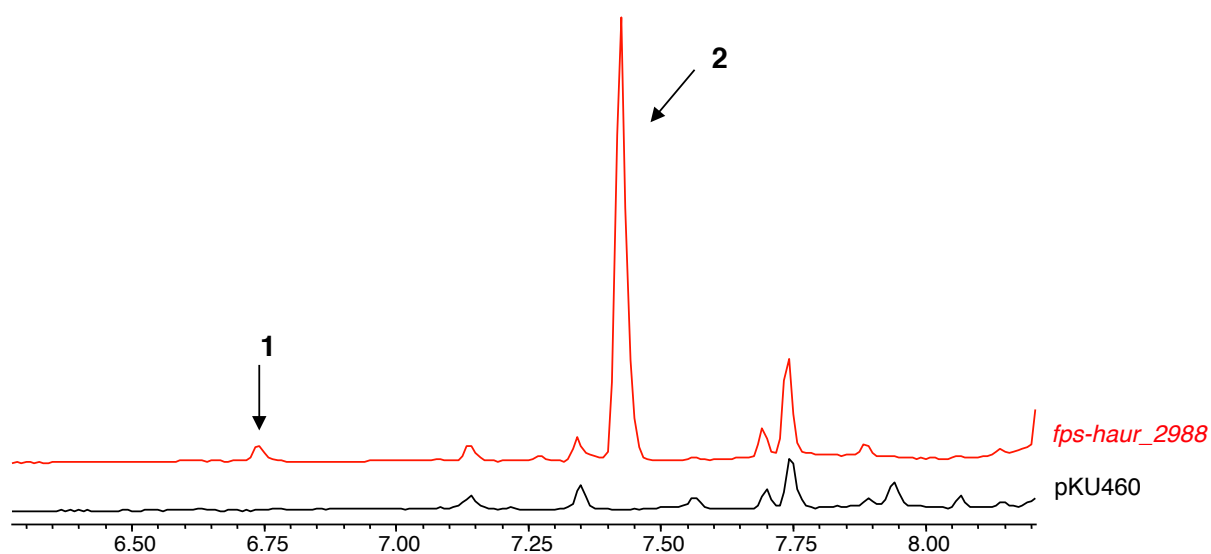


図2-40. *haur_2987*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

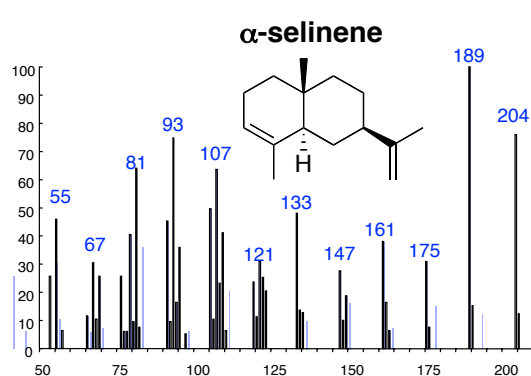
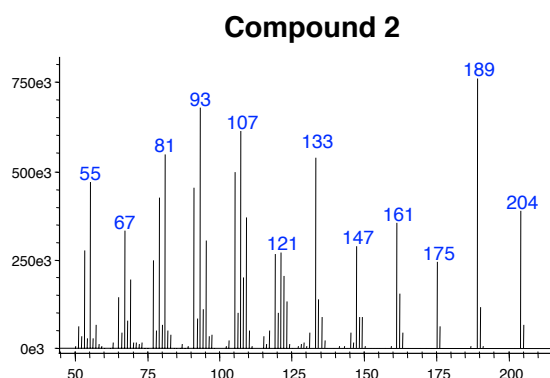
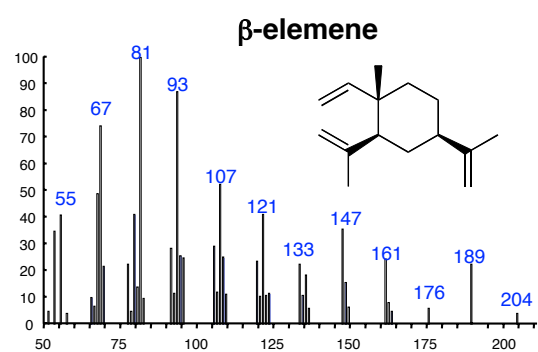
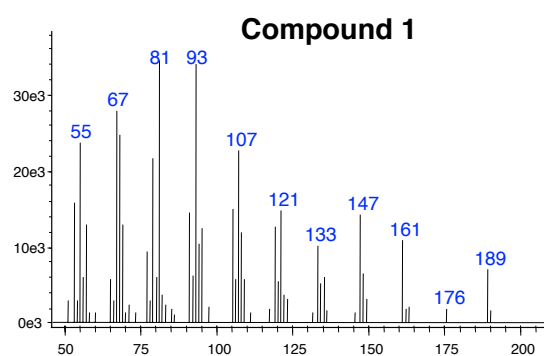
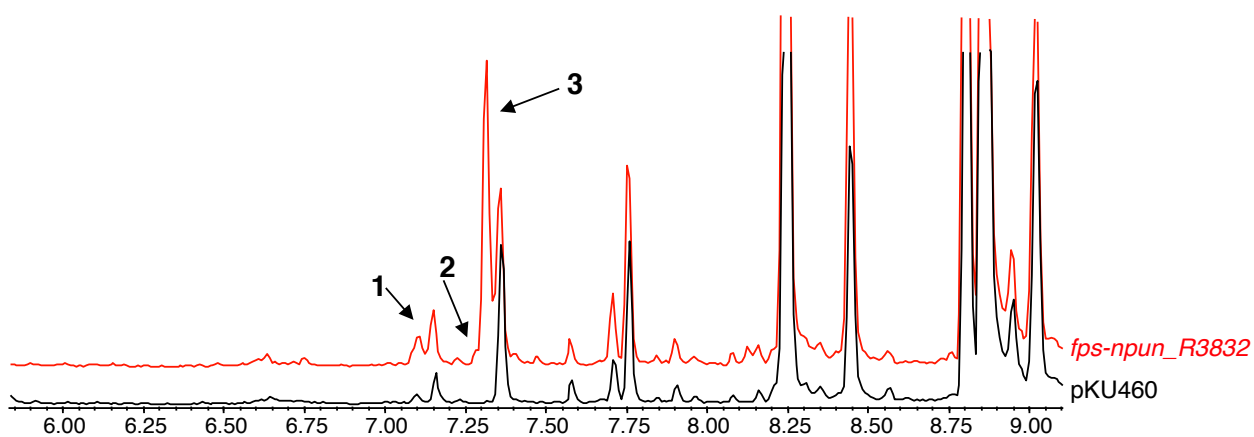


図2-41. SUKA22株および*haur_2988*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図2-42. SUKA22株および*npun_R3832*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

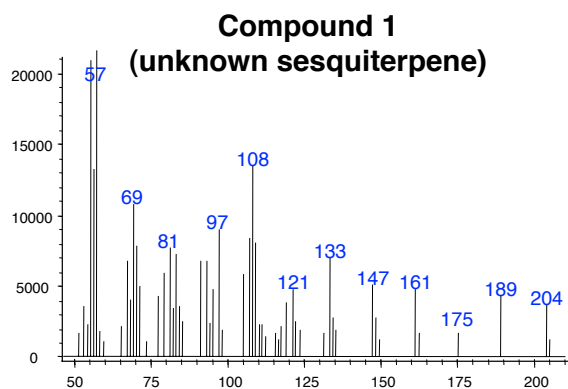
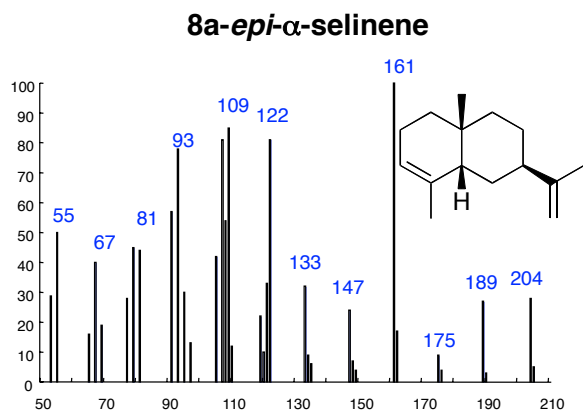
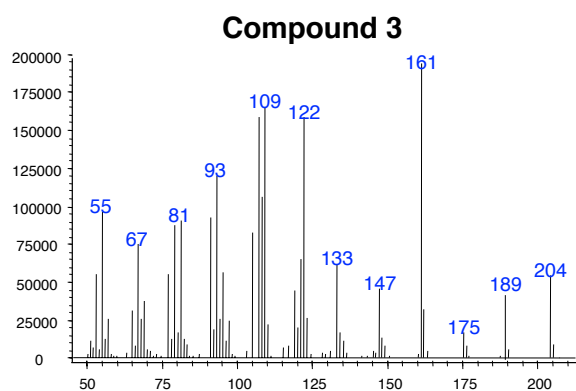
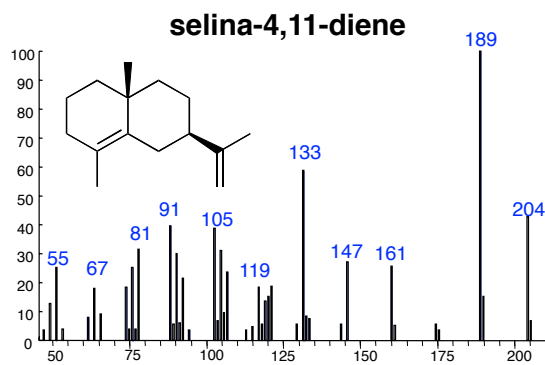
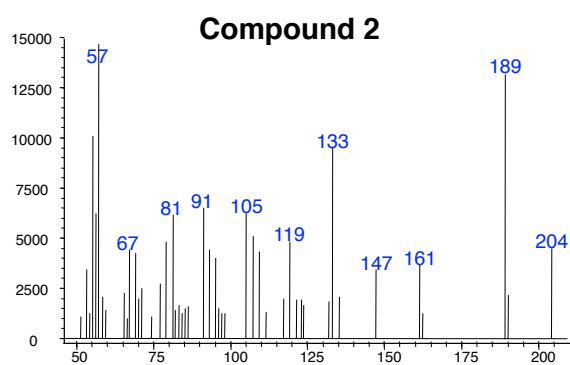


図2-43. *npun_R3832*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル

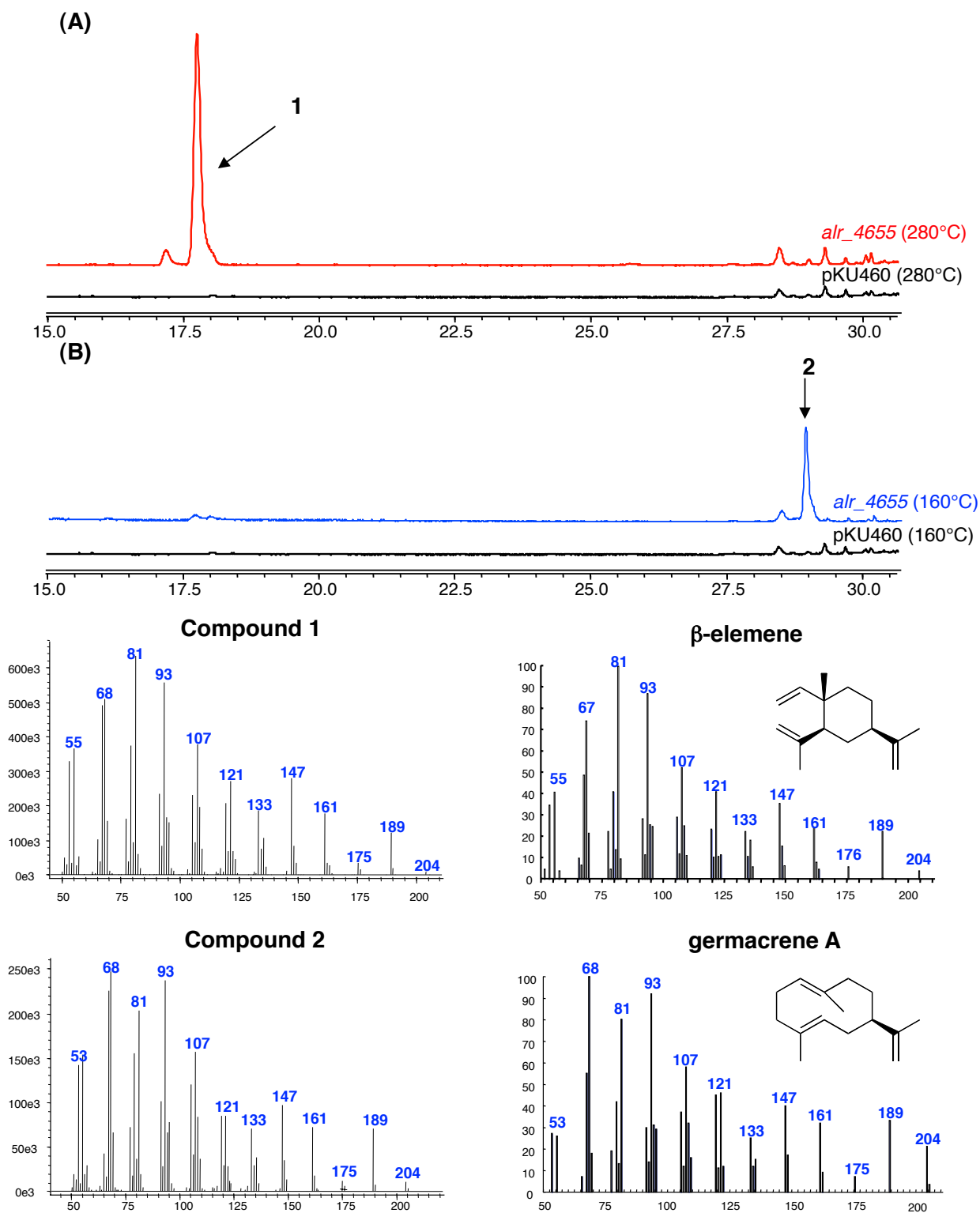
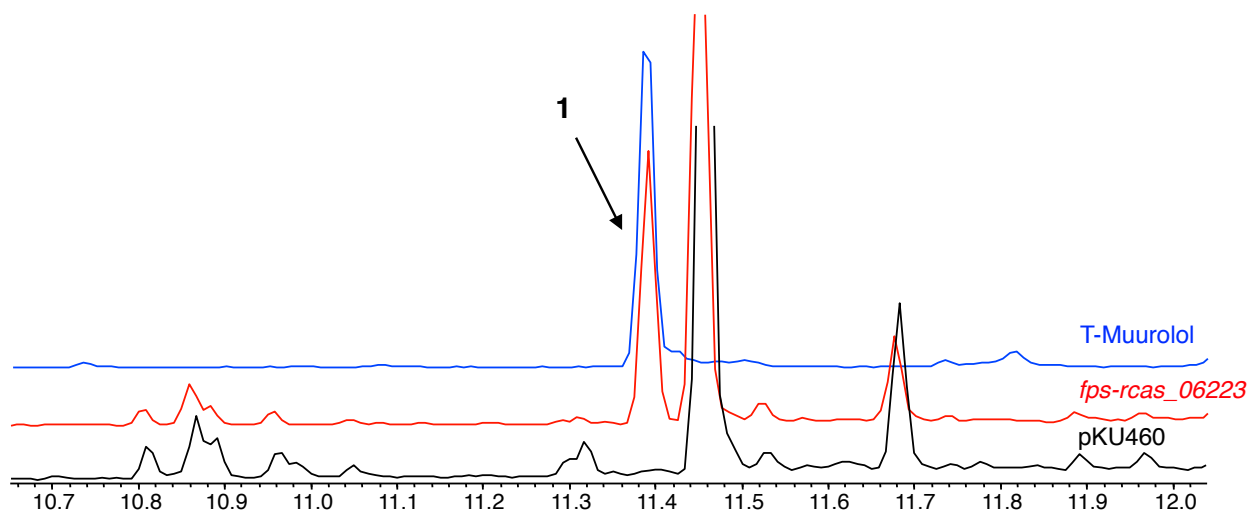


図2-44. *alr_4655*導入株のヘキサン抽出液のGC-MS解析
(A):インジェクション部分280°C, (B)160°C



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

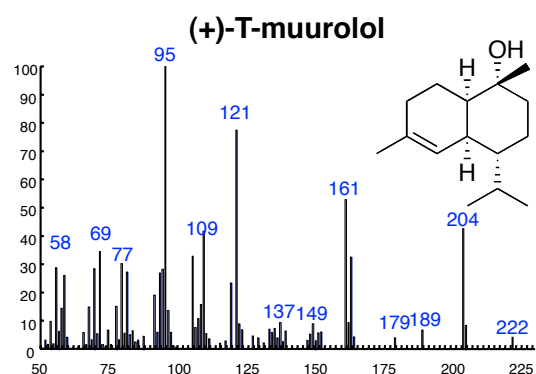
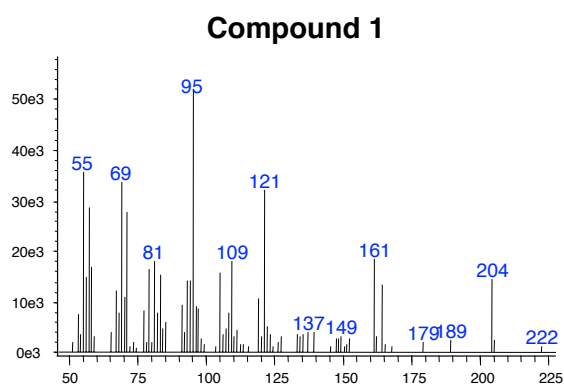
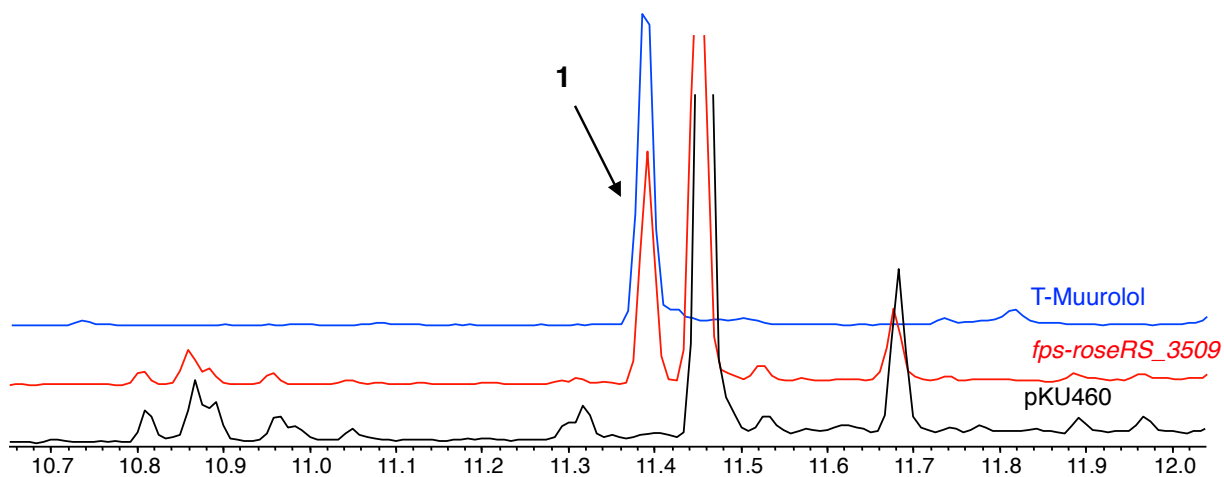


図2-45. SUKA22株および $rcas_06223$ 導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

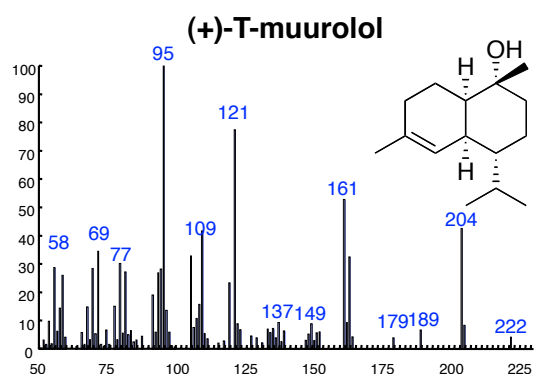
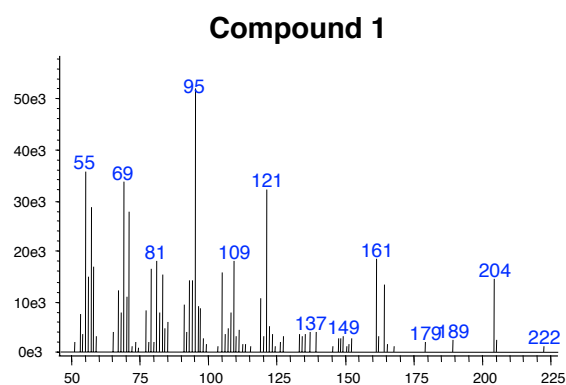
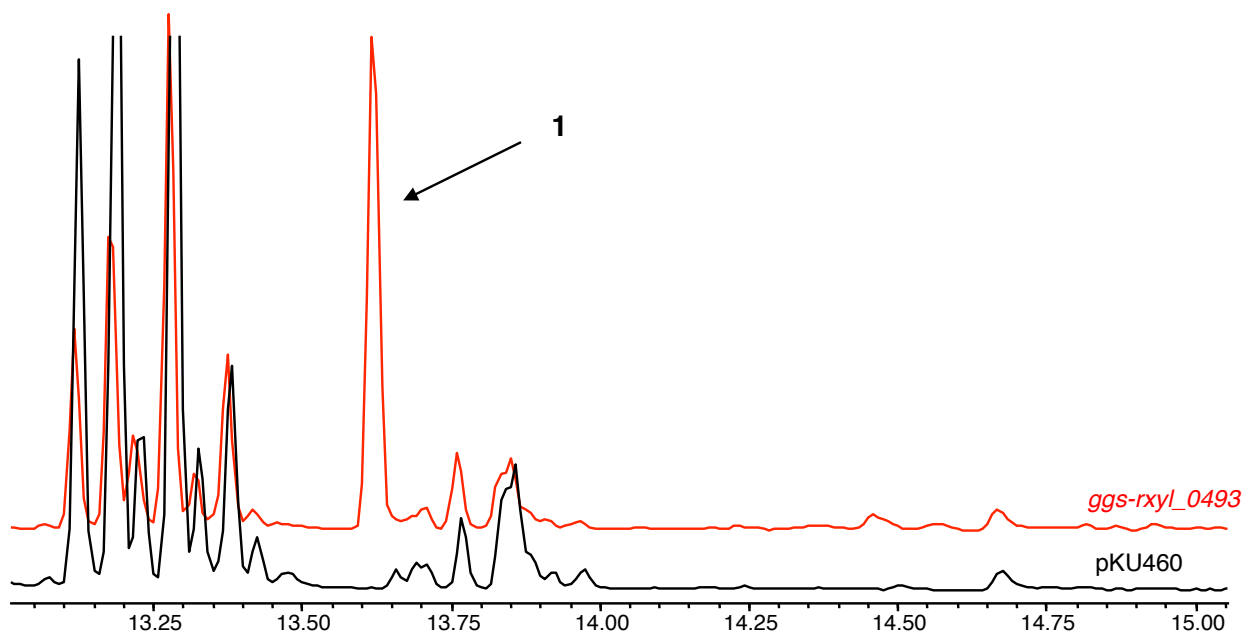


図2-46. SUKA22株および*roseRS_3509*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

Compound 1

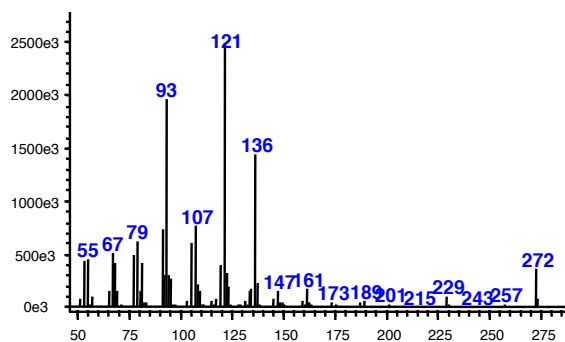
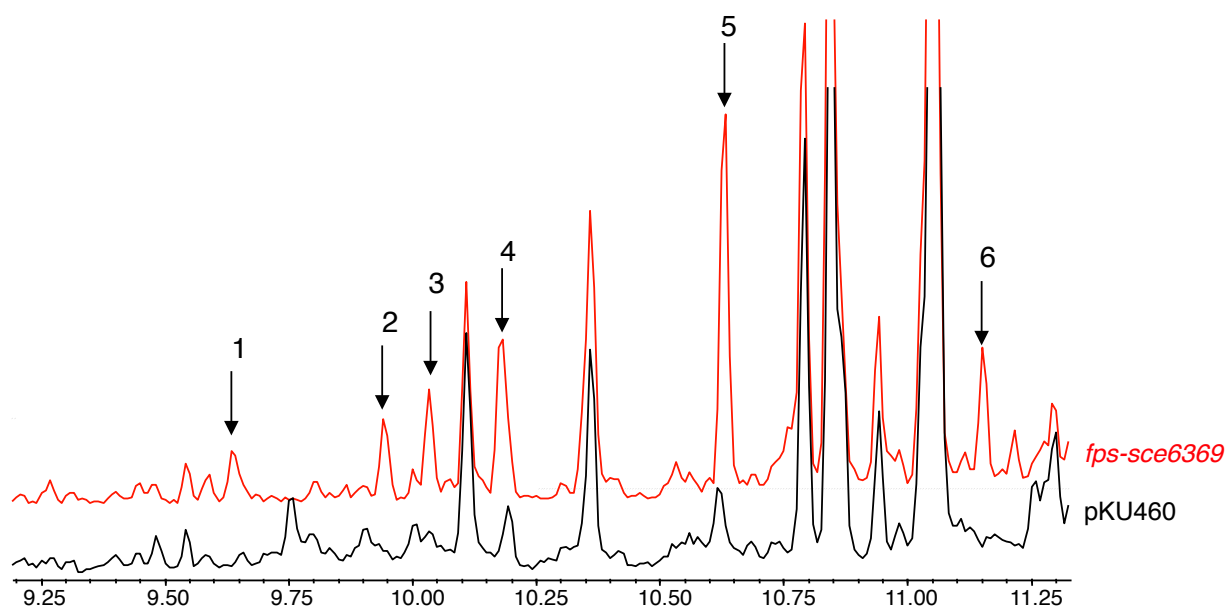


図2-47. SUKA22株および $rxyl_0493$ 導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

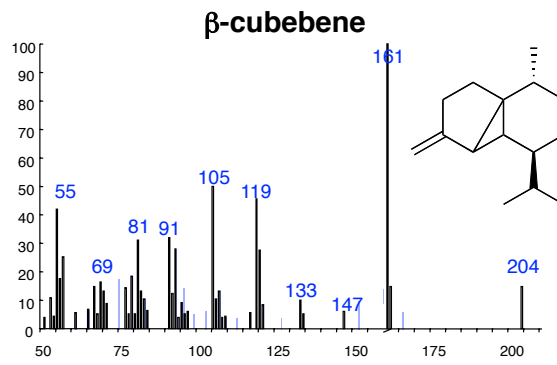
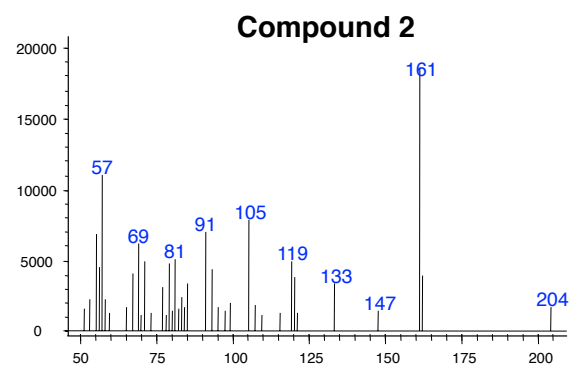
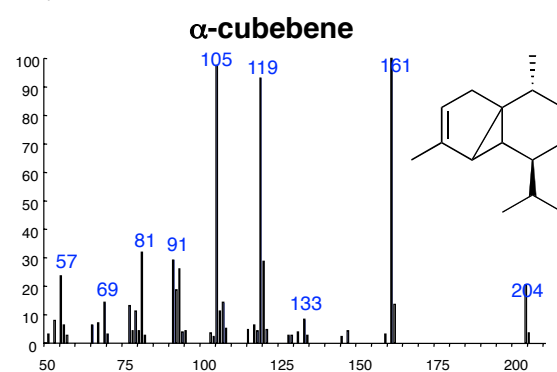
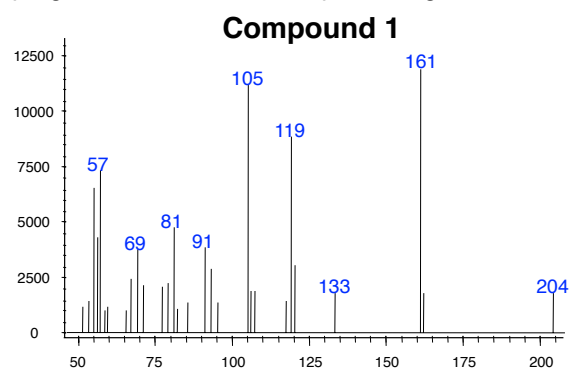


図2-48. SUKA22株および*sce6369*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

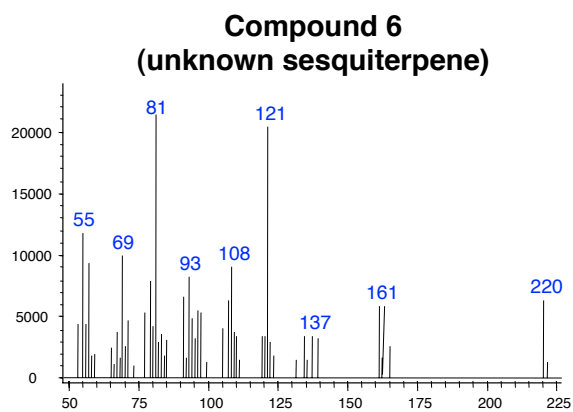
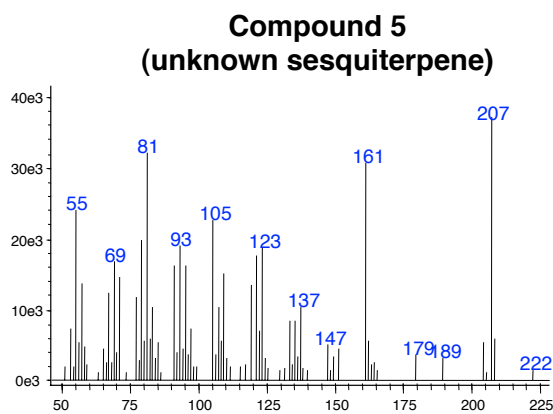
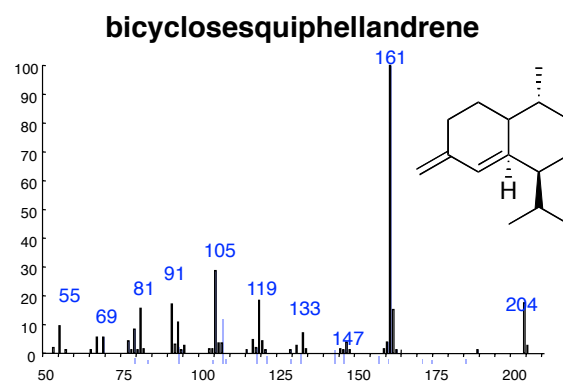
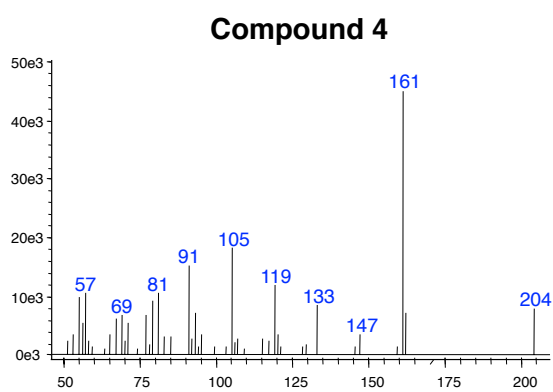
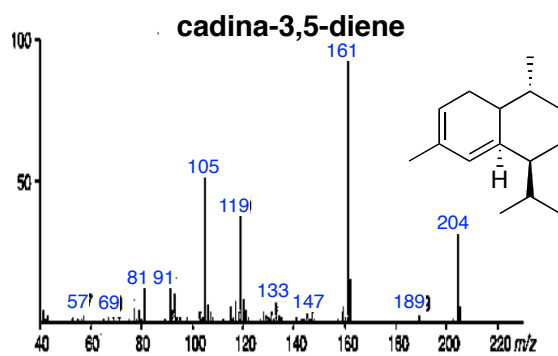
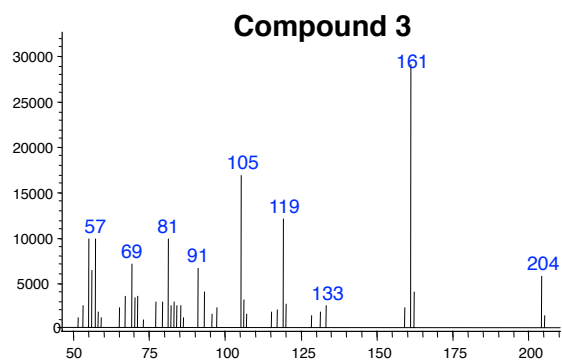
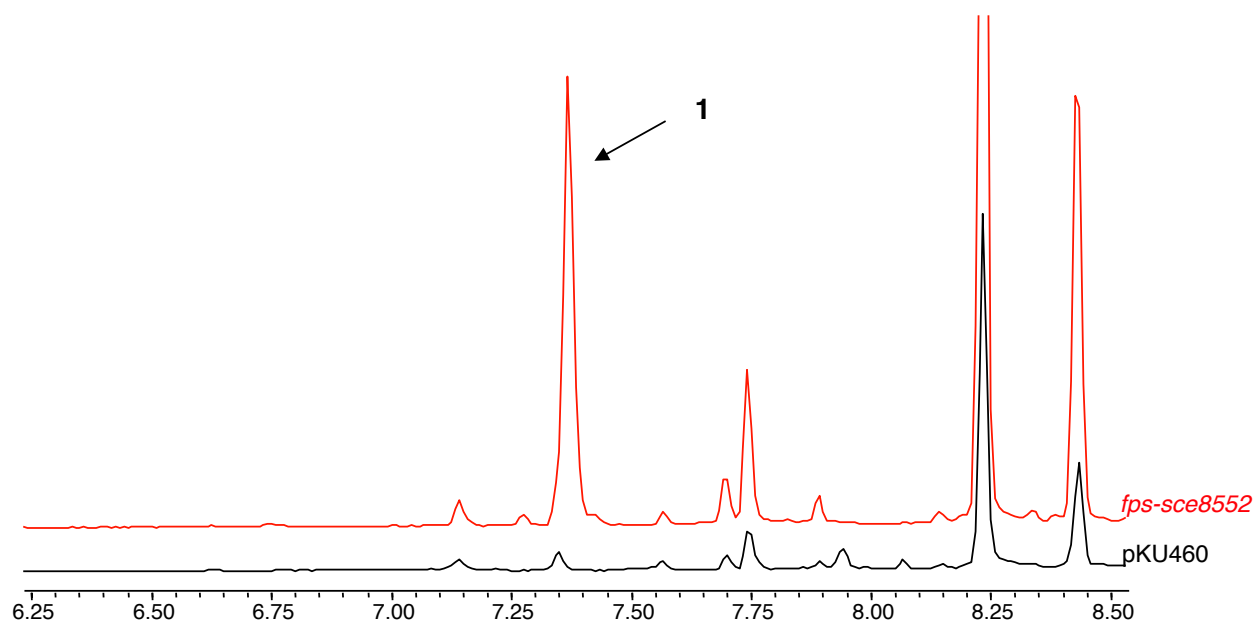


図2-49. *sce6369*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

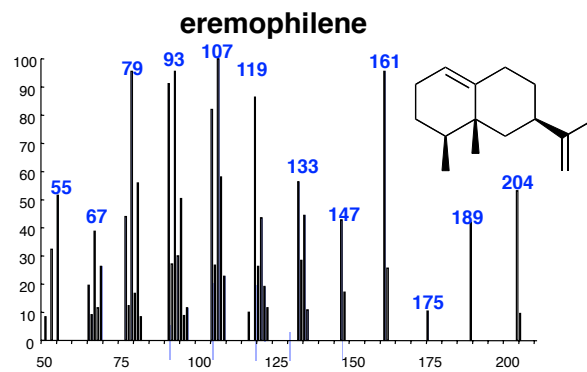
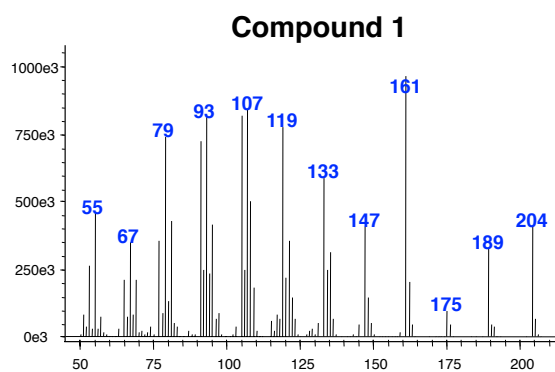
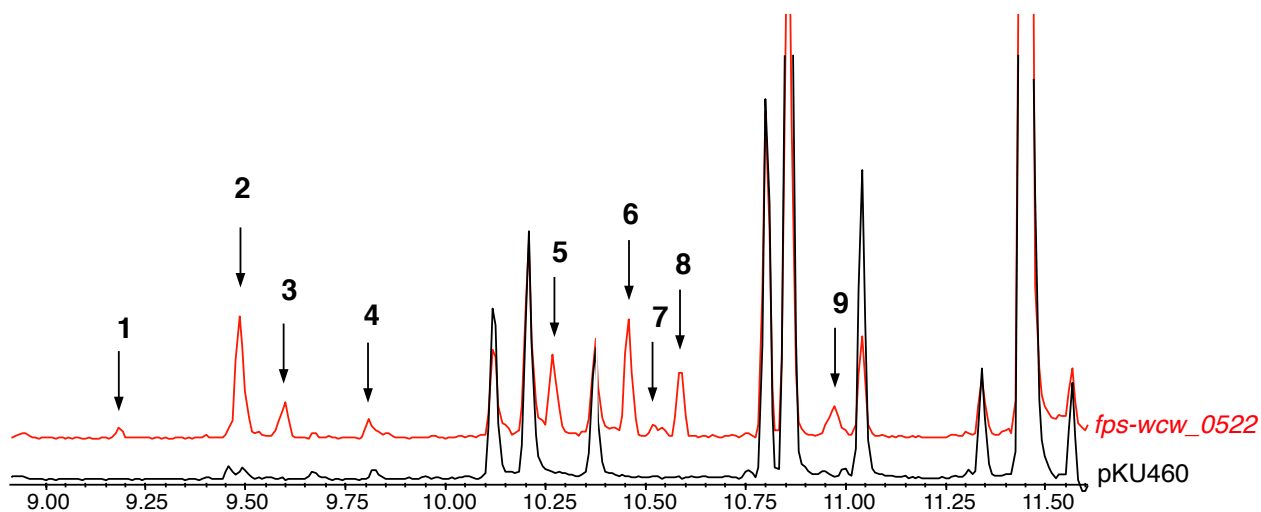


図2-50. SUKA22株および*sce8552*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 280°C, temperature gradient of 20°C/minute)

図2-51. SUKA22株および wcw_0522 導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析

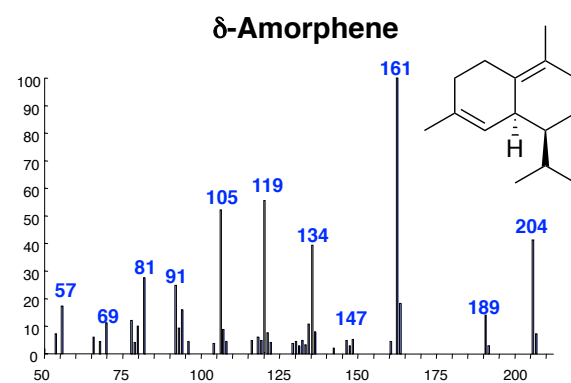
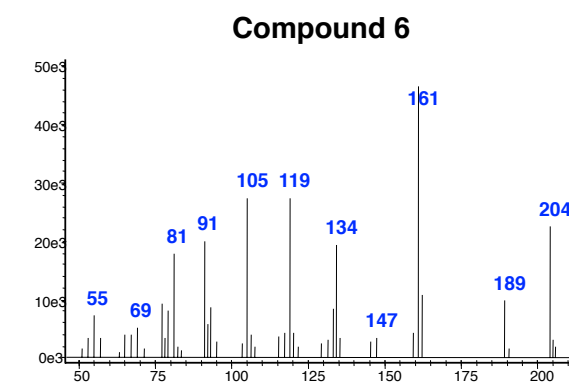
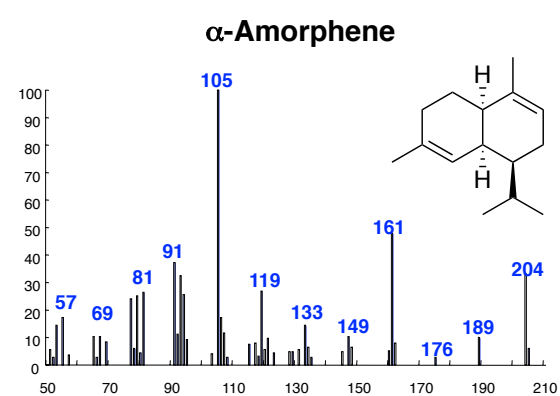
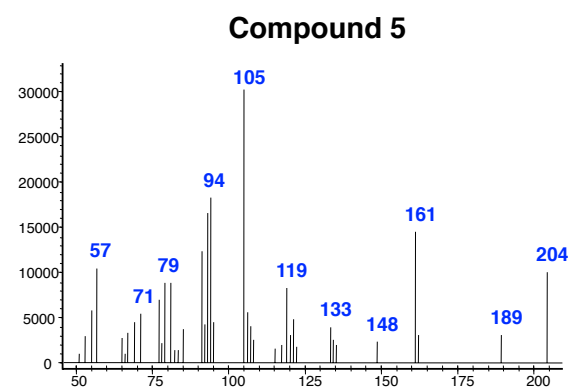
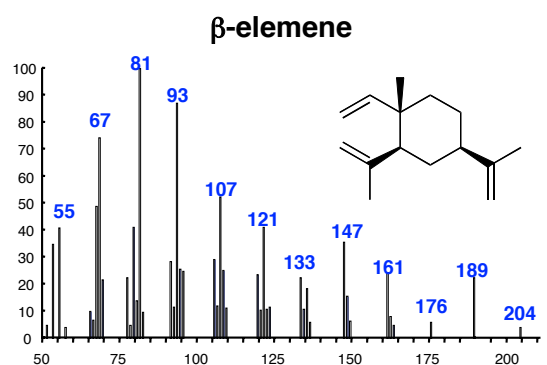
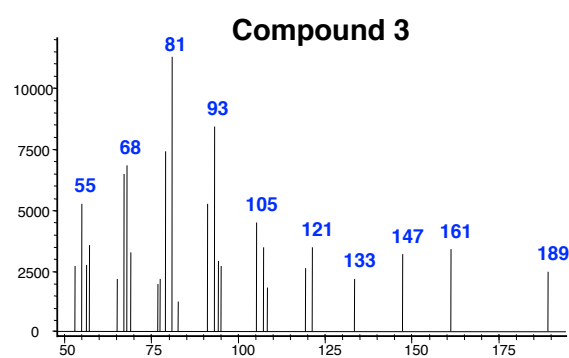
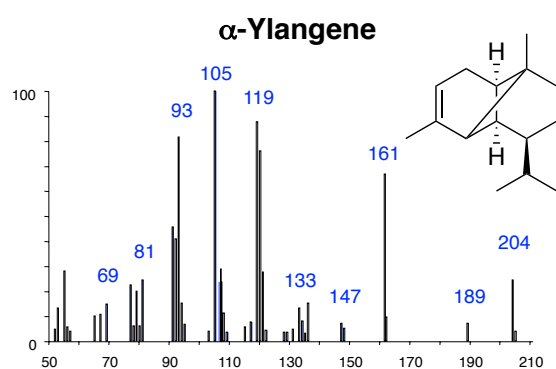
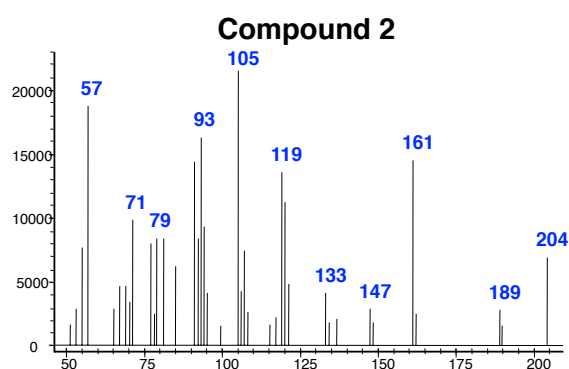


図2-52. *wcw_0522*形質転換体が生産する化合物のマスペクトル

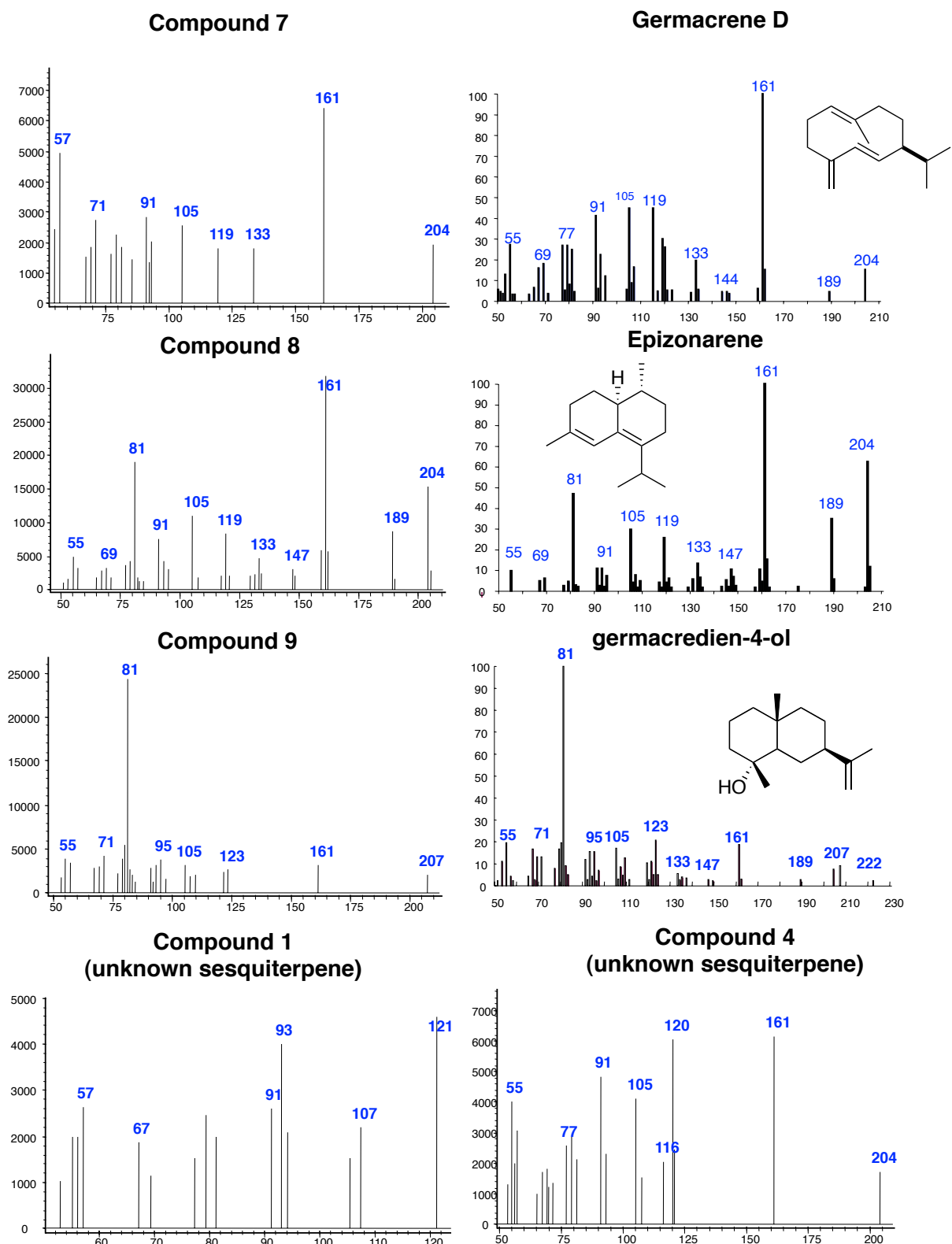


図2-52. *wcw_0522*形質転換体が生産する化合物のマススペクトル

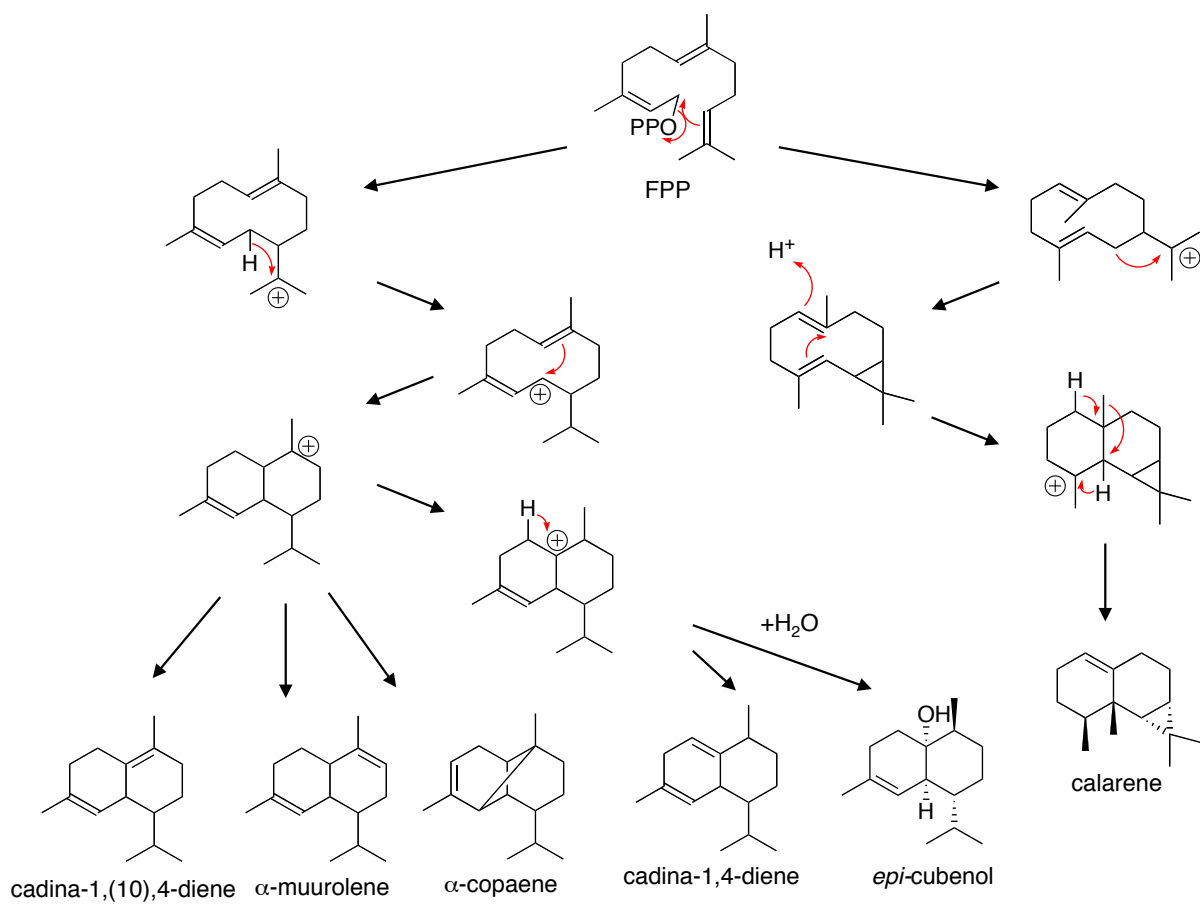


図2-53. SGR6065が触媒する推定環化反応

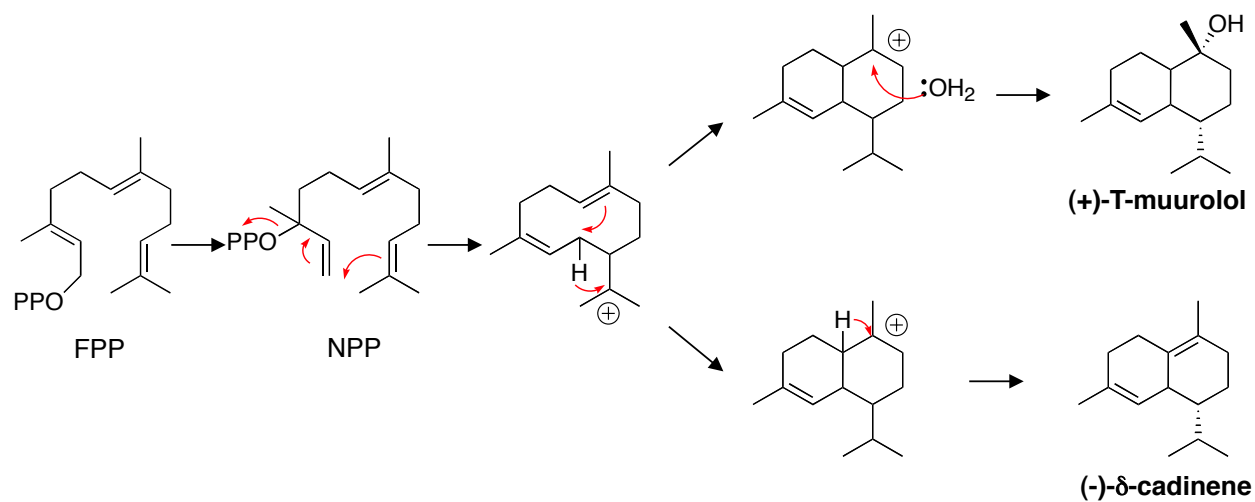


図2-54. SCLAV-p0068およびSCLAV-p0328が触媒する推定環化反応

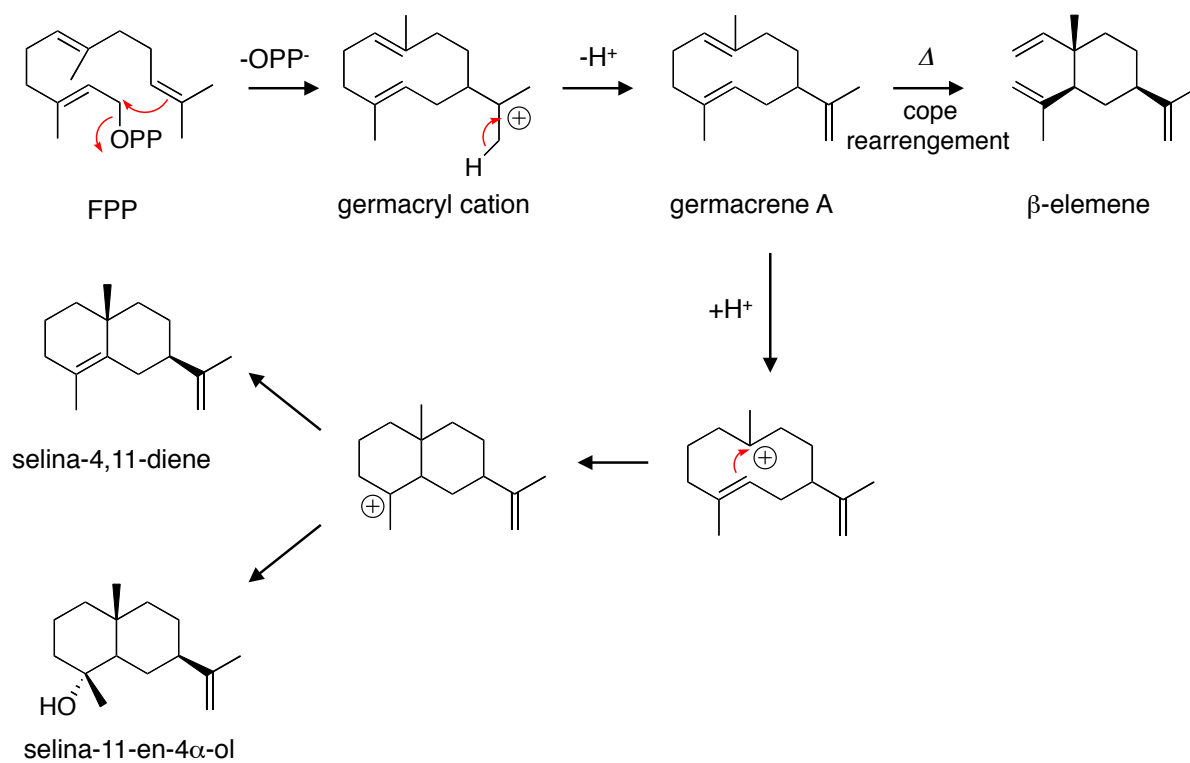


図2-55. SCLAV_p0635が触媒する推定環化反応

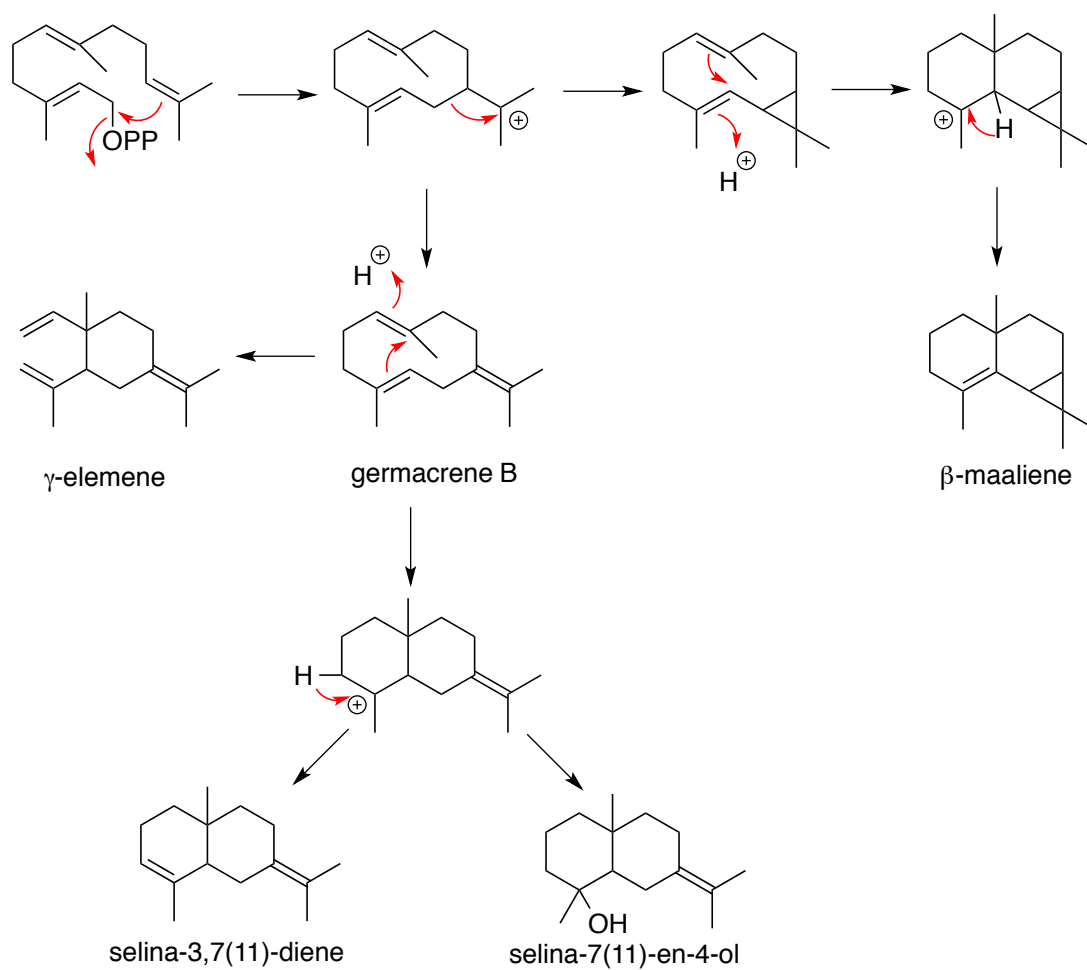


図2-56. SspSK_3051が触媒する推定環化反応

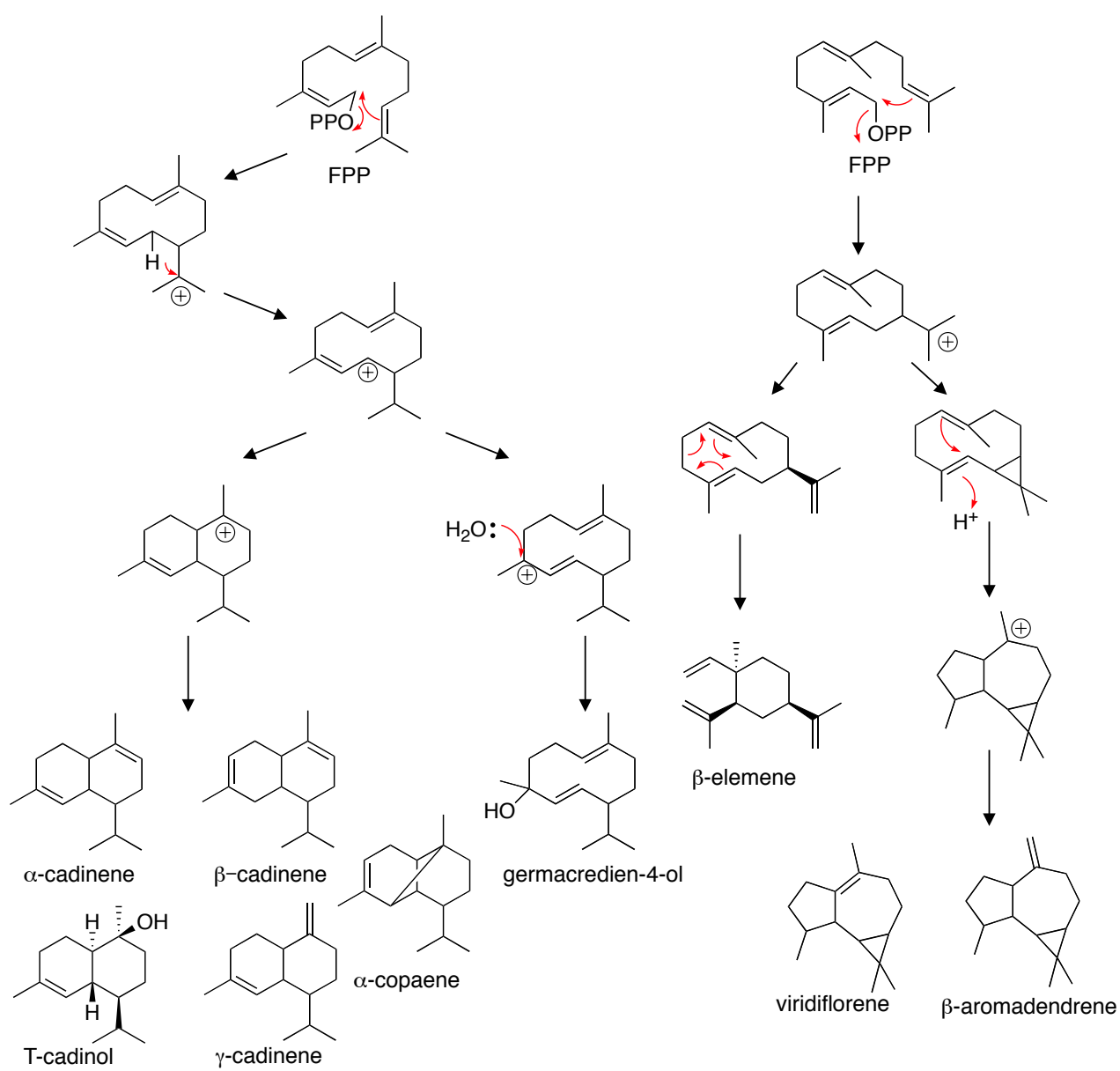
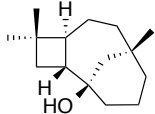
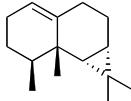
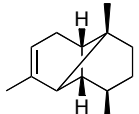
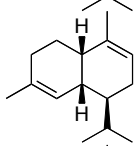
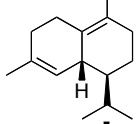
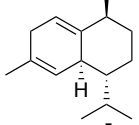
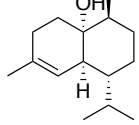
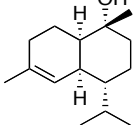
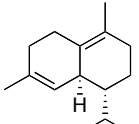
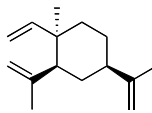
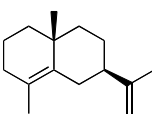
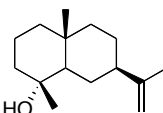
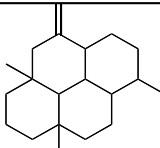
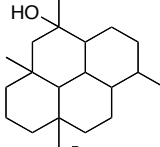
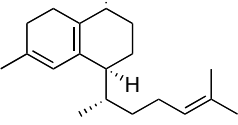
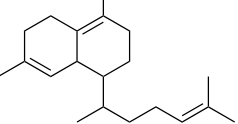

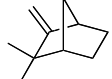

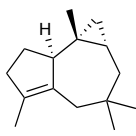
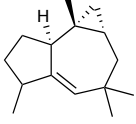
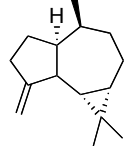
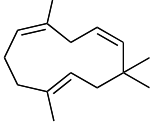
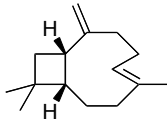
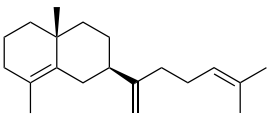
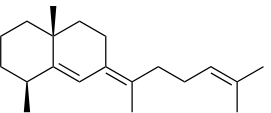
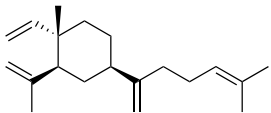
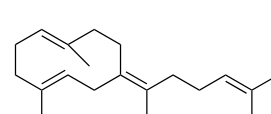
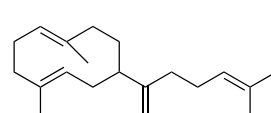
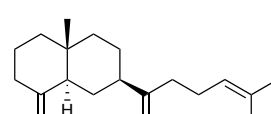
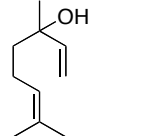
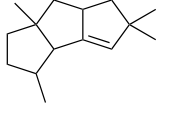
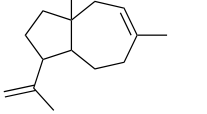
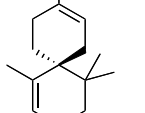


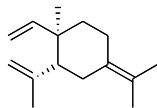
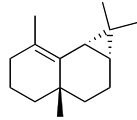
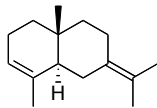
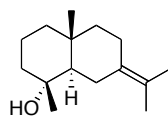
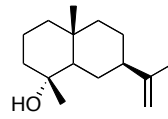
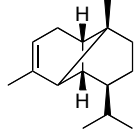
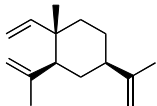
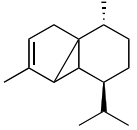
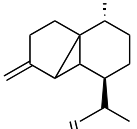
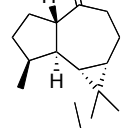
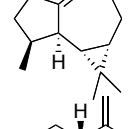
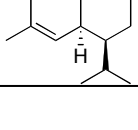
図2-57. SLT18_1246が触媒する推定環化反応

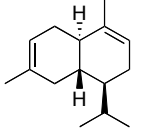
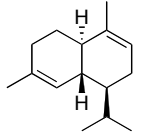
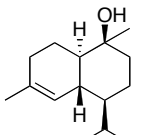
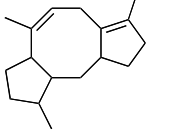
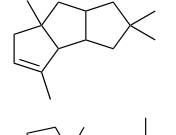
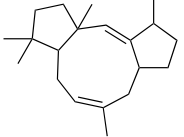
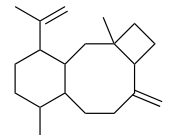
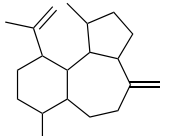
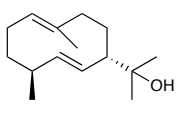
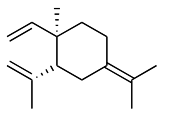
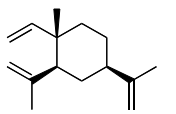
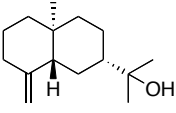
表 2-1. 細菌由来テルペン合成酵素遺伝子の代謝産物の一覧

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>S. griseus</i>	<i>sgr2079</i>	sesqui-	<i>fps</i>	222	caryolan-1-ol		62
	<i>sgr6065</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	calarene		65
				204	α -copaene		
				204	α -muurolene		
				204	cadinal(10),4-diene		
				204	cadinal,4-diene		
				222	<i>epi</i> -cubenol		
<i>S. clavuligerus</i>	<i>sclav_p0068</i>	sesqui-	<i>fps</i>	222	(+)-T-muurolol		66
	<i>sclav_p0328</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	(-)- δ -cadinene		68
	<i>sclav_p0635</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	β -elemene		69
				204	selina-4,11-diene		
				222	selina-11-en-4 α -ol		

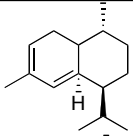
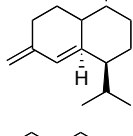
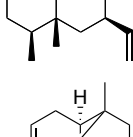
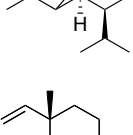
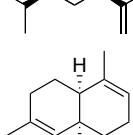
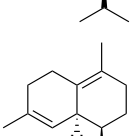
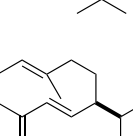
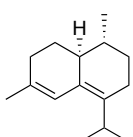
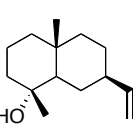

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>S. clavuligerus</i>	<i>sclav_p0765</i>	di-	<i>ggs</i>	272	hydropyrene 第3章 P.122で 構造解析を記載		71
				290	hydropyrenol 第3章 P.123で 構造解析を記載		
				272	isoelisabethatriene 第3章 P.124で 構造解析を記載		
				272	isoelisabethatriene B 第3章 P.123で 構造解析を記載		
	<i>sclav_p0982</i>	sesqui-	<i>gps</i>	154	1,8-cineol		73
				136	camphene		
				136	β -pinene		
	<i>sclav_p0985</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	african-2-ene 第3章 P.125で 構造解析を記載		75
				204	african-1-ene 第3章 P.125で 構造解析を記載		
				204	α -gurjunene		
				204	α -humulene		
				204	9- <i>epi</i> -caryophyllene		

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>S. clavuligerus</i>	<i>sclav_p1169</i>	di-	<i>ggs</i>	272	clavulatriene A 第3章 P.127で 構造解析を記載		77
				272	clavulatriene B 第3章 P.127で 構造解析を記載		
				272	prenyl-β-elemene 第3章 P.128で 構造解析を記載		
				272	prenylgermacrene B 第3章 P.129で 構造解析を記載		
				272	prenylgermacrene 第3章 P.130で 構造解析を記載		
<i>S. venezuelae</i>	<i>sclav_p1185</i>	sesqui-	<i>gps</i>	272	lobophytumin C 第3章 P.130で 構造解析を記載		
				136	linalool		79
				204	isohirsut-1-ene 第3章 P.131で 構造解析を記載		80
<i>S. venezuelae</i>	<i>sven_0552</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	dauca-8,11-diene 第3章 P.133で 構造解析を記載		82
				204	α-chamigrene		

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>Streptomyces</i> sp. SK1894	<i>sspSK_3051</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	γ -elemene		83
				204	β -maaliene		
				204	selina-3,7(11)-diene		
				222	selina-7(11)-ene-4-ol		
<i>S. lactacystinaeus</i>	<i>slt17_1246</i>	sesqui-	<i>fps</i>	222	germacradien-4-ol		85
				204	α -copaene		
				204	β -elemene		
				204	α -cubebene		
				204	β -cubebene		
				204	β -aromadendrene		
				204	viridiflorene		
				204	γ -cadinene		

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>S. lactacystinaeus</i>	<i>slt17_1246</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	β -cadinene		85
				204	α -cadinene		
				222	T-cadinol		
	<i>slt18_1078</i>	di-	<i>ggs</i>	272	cycloocta-7(8),10(14)-diene 第3章 P.134で 構造解析を記載		90
	<i>slt18_1880</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	isohirsut-4-ene 第3章 P.135で 構造解析を記載		91
<i>S. tsukubaensis</i>	<i>stsu_20912</i>	di-	<i>ggs</i>	272	tsukubadiene 第3章 P.136で 構造解析を記載		92
<i>Streptomyces</i> sp. ND90	nd90_0354	di-	<i>ggs</i>	272	odyverdiene A 第3章 P.138で 構造解析を記載		94
				272	odyverdiene B 第3章 P.138で 構造解析を記載		
<i>Mycobacterium</i> <i>marium</i>	<i>mmar_3220</i>	sesqui-	<i>fps</i>	222	allohedycariol 第3章 P.140で 構造解析を記載		95
				204	γ -elemene		
				204	β -elemene		
				222	β -eudesmol		

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>ava_1982</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	germacrene A		98
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	<i>haur_2987</i>	sesqui-	<i>ggs</i>	272	obscuronatin 第3章 P.142で 構造解析を記載		100
	<i>haur_2988</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	α -selinene		102
				204	β -elemene		
<i>Nostoc punctiforme</i>	<i>npun_R3832</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	8a- <i>epi</i> - α -selinene		103
				204	selina-4,11-diene		
<i>Nostoc</i> sp. PCC7120	<i>alr_4655</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	germacrene A		105
<i>Roseiflexus castenholzii</i>	<i>rcas_06223</i>	sesqui-	<i>fps</i>	222	T-muurolol		106
<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	<i>roseRS_3509</i>	sesqui-	<i>fps</i>	222	T-muurolol		107
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	<i>rxyl_0493</i>	sesqui-	<i>ggs</i>	272	cembrene C 第3章 P.141で 構造解析を記載		108
<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56'	<i>sce6369</i>	sesqui-	<i>fps</i>	204	α -cubebene		109
				204	β -cubebene		

origin	gene ID	phylogeny	polyprenyl pyro-phosphate gene used	$m/z[M^+]$	compounds predicted	structure	page
<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56'	sce6369	sesqui-	fps	204	cadina-3,5-diene		109
				204	bicyclosesqui-phellandrene		
	sce8552	sesqui-	fps	204	eremophilene		111
<i>Waddlia chondrophia</i>	wcw_0522	sesqui-	fps	204	α -ylangene		112
				204	β -elemene		
				204	α -amorphene		
				204	δ -amorphene		
				204	germacrene D		
				204	epizonarene		
				222	germacredien-4-ol		

第三章 テルペン化合物の構造解析

第二章においてマスフラグメンテーションパターンがデータベースと一致しないテルペン化合物が多数見出された。これらは新規のテルペン骨格を有する化合物であることが強く示唆された。そこで、本章ではこれら化合物について各形質転換株を大量培養行ない、単離精製し各種スペクトル測定による構造解析を行なった。

3-1 テルペン化合物の構造解析

・ 使用菌株

SUKA22/pKU1021::*ggs-sclav_p0765*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p0985*

SUKA22/pKU1021::*ggs-sclav_p1169*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p1407*

SUKA22/pKU1021::*sclav_p0067-sclav_p0068*

SUKA22/pKU1021::*fps-sven_0552*

SUKA22/pKU1021::*ggs-slt18_1078*

SUKA22/pKU1021::*fps-slt18_1880*

SUKA22/pKU1021::*ggs-stsu_20912*

SUKA22/pKU1021::*ggs-nd90_0354*

SUKA22/pKU1021::*fps-mmarr_3220*

SUKA22/pKU1021::*ggs-rxyl_0493*

SUKA22/pKU1021::*ggs-haur_2987*

・ 培地

巻末に記載

【実験方法】

3-1-1 テルペン化合物を生産する形質転換体の大量培養

種培地をスプリングコイル入り大試験管に分注し、各孢子懸濁液を接種し、30°Cで2日間振とう培養した。生産用半合成培地を 500 ml 容のポリカーボネート製三角フラ

スコに 100 ml ずつ分注し、種培養液を 1 ml (1%) 植菌し、28°C, 200 rpm で 7 日間振とう培養した。5-liter 以上の培養を行なう場合、ジャーファーマンターを用いた。種培地を 500 ml 容のガラス製三角フラスコに 100 ml ずつ分注し、孢子懸濁液を接種し、30°C, 200 rpm で 2 日間振とう培養した。10-liter 容のジャーファーマンターに 7.5 liter の生産用半合成培地を分注し、種培養液を 75 ml (1%) 植菌し、28°C, 200 rpm, 通気量 7-liter/min で培養を行った。

3-1-2 テルペン化合物の検出

各抽出段階のテルペン化合物の検出および分析は GC-MS で行なった。

3-1-3 各種機器分析方法

- ・ NMR 日本電子 (JEOL) JNM-ECP500FT NMR SYSTEM (^1H -NMR : 500 MHz、 ^{13}C -NMR : 125 MHz)
- ・ HR-MS JEOL JMS-700 Mstation (electron ionization mode (EI))
- ・ IR Horiba FT-720
- ・ 比旋光度 JASCO DIP-1000 polarimeter

3-2 【実験結果】

3-2-1 *slav_p0765* 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析

1-1) 抽出、単離

40-liter から得た培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離し、上清と菌体に分けた。菌体に 10-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液をエバポレーターにより濃縮した。濃縮物を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。*n*-ヘキサン層 (上層) を回収し、この操作を 2 回繰り返した。得られたヘキサン抽出物から遊離脂肪酸等の酸性物質を除くため、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ろ紙を用いてろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (35 g) 量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶出溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 5、1 : 10 および 0 : 10 の組成で 20 ml (2 ml × 10) ずつに分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。フラクション 3 から 6 を集め、濃縮乾固した。同様に、目的化合物を多く含むフラクション 7 から 12、12 から 22、48 から 65 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、デシケーター内で一晩乾燥させた。その後、重クロロホルムに溶解し、NMR による構造解析を行なった。

1-2) 化合物 1 の構造解析

ピーク 5 (hydropyrene; **1**, 51.7 mg) は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} -60.7$ (*c* 0.1, CHCl₃) を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。HR-MS (EI) において *m/z* 272.2506 [M⁺] の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₂₀H₃₂ であると決定し、不飽和度が 5 を算出した。¹H-NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され、それらの DEPT スペクトル解析より 3 個のメチル炭素、9 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった (図 3-1)。またそれらのうち低磁場にシフトした 2 つのシグナル (δ_C 106.7 および 151.8 ppm) から 1 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**1** は 4 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは HMQC (図 3-3) によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 3-6 に示した。¹H-¹H COSY (図 3-2) によって 1 位から 11 位までの部分構造が明らかになった。さらに ¹H-¹³C HMBC 解析 (図 3-4) により以下の部分構造が示された。11 位の CH₃ (δ_H 0.83) から 1-CH (δ_C 28.2), 2-CH₂ (δ_C 35.9) およ

び 10a-CH (δ_c 44.0)に、12 位の CH₂ (δ_H 4.42, 4.65)から 3a-CH (δ_c 47.6), 4-C (δ_c 151.8)および 5-CH₂ (δ_c 49.8)に、13 位の CH₃ (δ_H 0.77)から 5-CH₂, 5a-C (δ_c 36.2), 6-CH₂ (δ_c 42.4)および 10c-CH (δ_c 45.8)に、そして 14 位の CH₃ (δ_H 0.90)から 8-CH₂ (δ_c 42.3), 8a-C (δ_c 34.6), 9-CH₂ (δ_c 39.8)および 10c-CH に相関が観測された。しかしながら、7-CH₂ (1.44 ppm, 18.9 ppm : ¹H NMR, ¹³C NMR)が ¹H-¹H COSY および H-¹³C HMBC より相関が観測されなかった。以上の結果から、図 3-6 に示す 6-6-6-6 員環を有するジテルペン化合物であることが推定された。この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、hydropyrene と命名した。

1-3) 化合物 2 の構造解析

ピーク 10 (hydropyrenol; 2, 22.8 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24}$ -124.7 (c 0.1, CHCl₃)を示した。IR スペクトルは 3434, 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示し、水酸基の存在が示唆された。HR-MS (EI)において m/z 290.2610 [M⁺]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₂₀H₃₄O であると決定し、不飽和度が 4 と明らかになった。またマスフラグメンテーションパターンが 1 と類似していることから、1 の水酸化体であることが推測された。¹H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-7)、それらの DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、8 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。1 で観測された低磁場にシフトされたシグナルが消失し、新たにメチル炭素ならびに酸素原子と直接結合した 4 級炭素が観測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは HMQC (図 3-9)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 3-5 に示した。¹H-¹H COSY (図 3-8)によって 1 位から 11 位までの部分構造が明らかになった。さらに ¹H-¹³C HMBC 解析(図 3-10)により以下の部分構造が示された。11 位の CH₃ (δ_H 0.82)から 1-CH (δ_c 28.3), 2-CH₂ (δ_c 36.1)および 10a-CH (δ_c 44.1)に、12 位の CH₃ (δ_H 1.08)から 3a-CH (δ_c 49.9), 4-C (δ_c 73.8)および 5-CH₂ (δ_c 52.3)に、13 位の CH₃ (δ_H 1.13)から 5-CH₂, 5a-C (δ_c 34.9), 6-CH₂ (δ_c 43.2)および 10c-CH (δ_c 45.2)に、そして 14 位の CH₃ (δ_H 0.99)から 8-CH₂ (δ_c 42.6), 8a-C (δ_c 42.6), 9-CH₂ (δ_c 34.6)および 10c-CH に相関が観測された。しかしながら、1 と同様に 7 位の CH₂ (1.41 ppm, 18.2 ppm : ¹H NMR, ¹³C NMR)との相関が観測されなかったため、図 3-6 に示す 6-6-6-6 員環を有する構造まで推定し、1 の水酸化体であることを推定した。この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、hydropyrenol と命名した。

1-4) 化合物 3 の構造解析

ピーク 2 (isoelisabethatriene B, 3, 4.8 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度

は $[\alpha]_D^{24} +9.9$ (c 0.1, CHCl_3)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm^{-1} に吸収を示した。HR-MS (EI)において m/z 272.2506 $[\text{M}^+]$ の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ であると決定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 ^1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され、それらの DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、6 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった(図 3-12)。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル(δ_{C} 124.4, 124.5, 124.9, 130.0, 131.2 および 134.2 ppm)から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、3 は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ^1H - ^{13}C HMQC(図 3-14)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 3-17 に示した。 ^1H - ^1H COSY(図 3-13)によって 2 位から 14 位までおよび 7 位と 8 位が連結した部分構造が明らかになった。 ^1H - ^{13}C HMBC 解析(図 3-15)により以下の相関が示された。16 位の CH_3 (δ_{H} 1.60)から 14-CH (δ_{C} 124.9), 15- CH_2 (δ_{C} 131.2)および 17- CH_3 (δ_{C} 25.7)に、17 位の CH_3 (δ_{H} 1.69)から 14-CH, 15- CH_2 および 16- CH_3 (δ_{C} 18.0)に、18 位の CH_3 (δ_{H} 0.77)から 4-CH (δ_{C} 43.2), 11-CH (δ_{C} 31.5)および 12- CH_2 (δ_{C} 35.8)に、19 位の CH_3 (δ_{H} 1.66)から 5-CH (δ_{C} 124.4), 6-C (δ_{C} 134.2)および 7- CH_2 (δ_{C} 31.9)に、20 位の CH_3 (δ_{H} 1.64)から 1-C (δ_{C} 130.0), 2- CH_2 (δ_{C} 32.4)および 9-C (δ_{C} 124.5)に相関が観測された。以上データから 3 の平面構造が、isoelisabethatriene⁶⁰⁾の異性体であることが明らかになった。この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、isoelisabethatriene B と命名した。

1-5) 化合物 4 の構造解析

ピーク 3 (isoelisabethatriene, 4, 8.0 mg)は、無色の油状物質として得られた。EI-MS において m/z 272 $[\text{M}^+]$ の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ であると決定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 ^1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され、それらの DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、6 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった (図 3-18)。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル (δ_{C} 122.0, 125.1, 129.7, 131.1, 132.6 および 133.2 ppm)から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、4 は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ^1H - ^{13}C HMQC(図 3-20)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 3-15 に示した。 ^1H - ^1H COSY(図 3-19) および ^1H - ^{13}C HMBC スペクトル(図 3-21)から ^1H - ^{13}C の相関を詳細に解析した結果、6-6 員環を有する珊瑚から単離された既知のジテルペン化合物である isoelisabethatriene⁶⁰⁾であることが明らかになった。

3-2-2 sclav_p0985 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析

2-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0 L のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。さらに、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶出溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン =100：0、20：1、10：1、5：1、2：1 および 1：1 の組成で 20 ml (2 ml × 10)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 5 から 9 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、さらに 10%硝酸銀含浸シリカゲルカラムによる精製を行なった。溶出溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン =100：0、100：1、50：1、25：1、10：1 および 1：1 の組成で 20 ml (2 ml × 10)ずつ分画した。目的化合物を多く含む画分を集め濃縮乾固した。

2-2) 化合物 5 の構造解析

ピーク 1 (african-2-ene, **5**, 3.0 mg)は、無色の油状物質として得られた。**5** は、EI-MS において m/z 204 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{15}H_{24}$ であると決定し、不飽和度が 4 と明らかになった。 1H NMR から 24 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測され、それらの DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、5 個のメチレン炭素、2 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった(図 3-22)。またそれらのうち低磁場にシフトした 2 つのシグナル(δ_C 132.1 および 136.2 ppm)から 1 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、化合物 **1** は 3 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC(図 3-24)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 3-26 に示した。 1H - 1H COSY(図 3-23)および 1H - ^{13}C HMBC スペクトル(図 3-25)から 1H - ^{13}C の相関を詳細に解析することによって、5-7-3 員環を有する既知化合物の african-2-ene であることが明らかになった⁶¹⁾。

2-3) 化合物 6 の構造解析

ピーク 2 (african-1-ene, **6**, 3.2 mg)は、無色の油状物質として得られた。**6** は、EI-MS

において m/z 204 $[M^+]$ の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{15}H_{24}$ であると決定し、不飽和度が 4 と明らかになった。 1H NMR から 24 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測され、それらの DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、4 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった(図 3-27)。またそれらのうち低磁場にシフトした 2 つのシグナル(δ_C 129.6 および 146.2 ppm)から 1 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、化合物 2 は 3 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC(図 3-29)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 3-26 に示した。 1H - 1H COSY(図 3-28)および 1H - ^{13}C HMBC スペクトル(図 3-30)から 1H - ^{13}C の相関を詳細に解析することによって、5-7-3 員環を有する植物から単離された african-1-ene であることが明らかになった^{62,63}。

3-2-3 *sclav_p1169* 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析

3-1) 抽出、単離

7.5-liter の培養液を 5000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 2.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (15 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は *n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100: 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、1 : 1 および 0 : 100 の組成で 20 ml (5 ml × 4)ずつ分画した。化合物 7, 8, 11 および 12 を含むフラクション 1 は *n*-ペンタンで溶出された。化合物 9 および 10 を含むフラクション 2 は *n*-ペンタン / ジクロロメタン = 20 : 1 で溶出された。フラクション 1 は濃縮を行なった後、10 v/w %硝酸銀含浸シリカゲルカラムによる精製(*n*-ペンタン / ジクロロメタン、ジクロロメタン / メタノール)を行なった。化合物 8 は、*n*-ペンタン / ジクロロメタン = 1 : 1 で、化合物 11 は *n*-ペンタン / ジクロロメタン = 1 : 20 で、化合物 7 および 11 は *n*-ペンタン / メタノール = 10 : 1 で溶出された。化合物 7 および 11 を含むフラクションを再度 10 v/w %硝酸銀含浸シリカゲルカラムによる精製(ジクロロメタン / メタノール = 50 : 1)を行なった。化合物 7 を含むフラクションは化合物 11 より早く溶出された。化合物 9 および 10 を含むフラクション 2 は濃縮後、

10%硝酸銀含浸シリカゲルカラムによる精製（ジクロロメタン / メタノール）を行なった。化合物 9 は、ジクロロメタン / メタノール = 20 : 1 で、化合物 10 はジクロロメタン / メタノール = 1 : 1 で溶出した。

3-2) 化合物 7 の構造解析

ピーク 4 (clavulatriene A, 7, 22.3 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} +42.0$ (c 0.1, CHCl_3)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm^{-1} に吸収を示した。7 は、HR-MS (EI)において m/z 272.2506 $[\text{M}^+]$ の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ であると決定された。また、不飽和度が 5 であることが明らかになった。 ^1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 3-31)。また、DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、9 個のメチレン炭素、2 個のメチン炭素および 5 個の 4 級炭素が存在することが予想された。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル (δ_{C} 106.8, 124.3, 124.5, 131.5, 135.1 および 154.8 ppm)から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、7 は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ^1H - ^{13}C HMQC 解析によってその相関関係が明らかになった(図 3-33)。それらのケミカルシフト値を図 3-37 に示した。 ^1H - ^1H COSY により 1 位から 4 位まで、6 位から 9 位までおよび 12 位から 14 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-32)。さらに ^1H - ^{13}C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-34)。16 位の CH_3 (δ_{H} 1.69)から 14-CH (δ_{C} 124.3), 15-C (δ_{C} 131.5)および 17- CH_3 (δ_{C} 17.7)に、17 位の CH_3 (δ_{H} 1.62)から 14-CH, 15-C および 16- CH_3 (δ_{C} 25.7)に、18 位の CH_2 (δ_{H} 4.74, 4.80)から 7-CH (δ_{C} 45.6)および 12- CH_2 (δ_{C} 35.0)に、19 位の CH_3 (δ_{H} 1.04)から 1- CH_2 (δ_{C} 42.4), 5-C (δ_{C} 135.1), 9- CH_2 (δ_{C} 40.3)および 10-C (δ_{C} 34.5)に、そして 20 位の CH_3 (δ_{H} 1.60)から 3- CH_2 (δ_{C} 33.2), 4-C (δ_{C} 124.5)および 5-C に相関が観測された。以上のデータから、4-5 位、10-11 位および 14-15 位間に二重結合を有する prenyleudesmane 骨格の平面構造を決定した。これら NMR 解析の結果、この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、clavulatriene A と命名した。

3-3) 化合物 8 の構造解析

ピーク 7 (clavulatriene B, 8, 4.2 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} -88.3$ (c 0.1, CHCl_3)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm^{-1} に吸収を示した。8 は HR-MS (EI)において m/z 272.2506 $[\text{M}^+]$ の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ であると決定された。また、不飽和度が 5 であることが明らかになった。 ^1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 3-38)。また、DEPT スペクトル解析より 5 個のメチ

ル炭素、7 個のメチレン炭素、3 個のメチン炭素および 5 個の 4 級炭素が存在することが予想された。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル (δ_C 120.8, 124.5, 128.4, 128.5, 131.7 および 148.5 ppm) から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、8 は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは HMQC 解析によってその相関関係が明らかになった(図 3-40)。それらのケミカルシフト値を図 3-37 に示した。 ^1H - ^1H COSY により 1 位から 20 位まで、8 位から 9 位までおよび 12 位から 14 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-39)。さらに ^1H - ^{13}C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-41)。6 位の CH (δ_H 6.12) から 4-CH (δ_C 38.2), 8-CH₂ (δ_C 22.9, 10-C (δ_C 34.6) および 11-C (δ_C 128.4) に、16 位の CH₃ (δ_H 1.67) から 14-CH (δ_C 124.5), 15-C (δ_C 131.7) および 17-CH₃ (δ_C 17.6) に、17 位の CH₃ (δ_H 1.60) から 14-CH, 15-C および 16-CH₃ (δ_C 25.7) に、18 位の CH₃ (δ_H 1.78) から 7-C (δ_C 128.5), 11-C (δ_C 128.4) および 12-CH₂ (δ_C 34.9) に、19 位の CH₃ (δ_H 1.13) から 1-CH₂ (δ_C 41.7), 5-C (δ_C 148.5), 9-CH₂ (δ_C 41.5) および 10-C (δ_C 34.6) に、そして 20 位の CH₃ (δ_H 1.15) から 3-CH₂ (δ_C 33.2), 4-C (δ_C 38.2) および 5-C に相関が観測された。 ^1H - ^{13}C の相関を詳細に解析することによって、5-6 位, 7-11 位および 14-15 位間に二重結合を有する平面構造を決定した。以上のデータから、clavulatriene の類似体であることが判明し、clavulatriene B と命名した。

3-4) 化合物 9 の構造解析

ピーク 1 (prenyl- β -elemene, 9, 0.9 mg) は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} +15.1$ (c 0.1, CHCl₃) を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。9 は、HR-MS において m/z 272.2504 [M^+] の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₂₀H₃₂ であると決定された。また、不飽和度が 5 であることが明らかになった。 ^1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 3-44)。また、DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、8 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが予想された。またそれらのうち低磁場にシフトした 8 つのシグナル (δ_C 107.0, 109.7, 112.0, 124.2, 131.6, 147.8, 150.1 および 154.5 ppm) から 4 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、9 は 1 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ^1H - ^{13}C HMQC 解析によってその相関関係が明らかになった(図 3-46)。それらのケミカルシフト値を図 3-50 に示した。 ^1H - ^1H COSY により 1 位から 2 位まで、6 位から 9 位までおよび 12 位から 14 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-45)。さらに ^1H - ^{13}C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-47)。2 位の CH₂ (δ_H 4.89, 4.91) から 10-C (δ_C 40.0) に、3 位の CH₂ (δ_H 4.59, 4.81) から 5-C (δ_C 52.8) に、16 位の CH₃ (δ_H 1.68) から 14-CH (δ_C 124.2), 15-C (δ_C 131.6) および

17-CH₃ (δ_C 17.7)に、17 位の CH₃ (δ_H 1.61)から 14-CH, 15-C および 16-CH₃ (δ_C 25.7)に、18 位の CH₂ (δ_H 4.72, 4.79)から 7-CH (δ_C 44.4), 11-C (δ_C 154.5)および 12-CH₂ (δ_C 34.9)に、19 位の CH₃ (δ_H 0.99)から 1-CH (δ_C 150.1), 5-C, 9-CH₂ (δ_C 40.1)および 10-C に、そして 20 位の CH₃ (δ_H 1.69)から 3-CH₂ (δ_C 112.0), 4-C (δ_C 147.8)および 5-C に相関が観測された。以上のデータから、1-2 位, 3-4 位, 11-18 位および 14-15 位間に二重結合を有する平面構造を決定した。これら NMR 解析の結果、この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、prenyl- β -elemene と命名した。

3-5) 化合物 10 の構造解析

ピーク 2 (prenylgermacrene B, **10**, 1.2 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24}$ -110.2 (c 0.1, CHCl₃)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。**10** は、EI-MS において m/z 272.2504 [M⁺]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₂₀H₃₂ であると決定された。また、不飽和度が 5 であることが明らかになった。¹H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 3-51)。また、DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、7 個のメチレン炭素、3 個のメチン炭素および 5 個の 4 級炭素が存在することが予想された。またそれらのうち低磁場にシフトした 8 つのシグナル (δ_C 124.6, 124.6, 124.7, 128.4, 131.4, 131.6, 131.7 および 135.8 ppm)から 4 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**10** は 1 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ¹H-¹³C HMQC 解析によってその相関関係が明らかになった(図 3-53)。それらのケミカルシフト値を図 3-50 に示した。¹H-¹H COSY により 1 位から 3 位まで、5 位から 6 位まで、8 位から 9 位までおよび 12 位から 14 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-52)。さらに ¹H-¹³C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-54)。16 位の CH₃ (δ_H 1.69)から 14-CH (δ_C 124.6), 15-C (δ_C 131.6)および 17-CH₃ (δ_C 17.7)に、17 位の CH₃ (δ_H 1.62)から 14-CH, 15-C および 16-CH₃ (δ_C 25.8)に、18 位の CH₃ (δ_H 1.68)から 7-CH (δ_C 124.7), 11-C (δ_C 131.7)および 12-CH₂ (δ_C 34.7)に、19 位の CH₃ (δ_H 1.58)から 1-CH (δ_C 128.4), 9-CH₂ (δ_C 40.0)および 10-C (δ_C 131.4)に、そして 20 位の CH₃ (δ_H 1.53)から 3-CH₂ (δ_C 39.0), 4-C (δ_C 135.8)および 5-CH (δ_C 124.6)に相関が観測された。¹H-¹³C の相関を詳細に解析することによって、1-10 位, 4-5 位, 7-11 位および 14-15 位間に二重結合を有する平面構造を決定した。これら NMR 解析の結果、prenylgermacrene と類似した新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、prenylgermacrene B と命名した。

3-6) 化合物 11 の構造解析

ピーク 3 (prenylgermacrene, **11**, 1.2 mg)は、無色の油状物質として得られた。**11** は、EI-MS において m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると決定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-56)、それらの DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、8 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 8 つのシグナル (δ_c 109.8, 124.1, 126.0, 126.8, 131.2, 134.1, 135.2 および 154.0 ppm)から 4 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**11** は 1 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC によって帰属し(図 3-58)、それらのケミカルシフト値を図 3-60 に示した。 1H - 1H COSY(図 3-57)および 1H - ^{13}C HMBC スペクトル(図 3-59)から 1H - ^{13}C の相関を詳細に解析した結果、10 員環を有するムギワラギク属の植物である *Helichrysum* から単離された報告のある既知のジテルペン化合物である prenylgermacrene であることが明らかになった⁶⁴⁾。

3-7) 化合物 12 の構造解析

ピーク 5 (lobophytumin C, **12**, 4.8 mg)は、無色の油状物質として得られた。**12** は、EI-MS において m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると決定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-61)、それらの DEPT スペクトル解析より 3 個のメチル炭素、10 個のメチレン炭素、3 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル (δ_c 105.4, 107.1, 124.4, 131.5, 151.3 および 155.0 ppm)から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**12** は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC によって帰属し(図 3-63)、それらのケミカルシフト値を図 3-60 に示した。 1H - 1H COSY (図 3-62)および 1H - ^{13}C HMBC スペクトル(図 3-64)から 1H - ^{13}C の相関を詳細に解析した結果、6-6 員環を有する珊瑚である *Lobophytum cristatm* から単離された報告のある既知のジテルペン化合物である lobophytumin C であることが明らかになった⁶⁵⁾。

3-2-4 sclav_p1407 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析

4-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh) を抽出物の 30 倍量 (10 g) 量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10) ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 4 から 7 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

4-2) 化合物 13 の構造解析

ピーク 1 (isohirsut-1-ene, **13**, 1.7 mg) は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} -162.0$ (*c* 0.1, CHCl₃) を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。**13** は、HR-MS (EI) において *m/z* 204.1878 [M⁺] の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₁₅H₂₄ であると決定された。また、不飽和度が 4 であることが明らかになった。¹H NMR から 24 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測された(図 3-65)。また、DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、4 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが予想された。またそれらのうち低磁場にシフトした 2 つのシグナル (δ_C 127.4 および 154.1 ppm) から 1 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**13** は 3 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ¹H-¹³C HMQC 解析によってその相関関係が明らかになった(図 3-67)。それらのケミカルシフト値を図 3-70 に示した。¹H-¹H COSY により 8 位から 10 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-66)。さらに ¹H-¹³C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-68)。1 位の CH (δ_H 5.01) から 2-C (δ_C 154.1) および 9-CH (δ_C 47.9) に、3 位の CH (δ_H 1.69) から 1-CH (δ_C 127.4) および 2-C に、6 位の CH₂ (δ_H 1.50) から 4-CH (δ_C 43.7) に、8 位の CH₂ (δ_H 1.82) から 2-C および 3-CH (δ_C 57.7) に、9 位の CH (δ_H 3.16) から 1-CH, 2-C に、10 位の CH₂ (δ_H 1.76) から 1-CH, 2-C に、12 位の CH₃ (δ_H 1.08) から 1-CH, 10-CH₂ (δ_C 47.7), 11-C (δ_C 50.8) および 13-CH₃ (δ_C 28.1) に、13 位の CH₃ (δ_H 1.02) から 1-CH,

10-CH₂, 11-C および 12-CH₃ (δ_C 30.1)に, 14 位の CH₃ (δ_H 1.06)から 3-CH, 6-CH₂ (δ_C 41.2), 7-C (δ_C 55.3)および 8-CH₂ (δ_C 47.8)そして 15 位の CH₃ (δ_H 1.03)から 3-CH, 4-CH および 5-CH₂ (δ_C 35.1)に相関が観測された。¹H-¹³C の相関を詳細に解析することによって、1-2 位間に二重結合を有する平面構造を決定した。これら NMR 解析の結果、この化合物はこれまでに報告されていない新奇な直鎖状 triquinane 骨格を有したセスキテルペン化合物であることが明らかになり、本化合物を isohirsut-1-ene と命名した。

3-2-5 sclav_p0067-sclav_p0068 形質転換株が生産するセスキテルペン化合物の解析

5-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン =100：0、10：1、5：1、1：1、1：5、1：10 および 0：100 の組成で 20 ml (4 ml x5)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクションを回収し、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

5-2) 化合物 14 の構造解析

ピーク 1 (drimenol, 14, 1.8 mg)は無色の油状物質として得られた。14 は、EI-MS において m/z 222 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₁₅H₂₆O であると決定し、不飽和度が 3 と明らかになった。¹H NMR から 25 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測され(図 3-71)、それらの DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、5 個のメチレン炭素、3 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 2 つのシグナル (δ_C 124.3 および 133.0 ppm)から 1 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、14 は 2 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。1 次元 NMR を既知化合物と比較した結果、6-6 員環を有する植物でから単離された報

告のある既知のセスキテルペン化合物である(-)-drimenol であることが明らかになった⁶⁶⁾(図 3-72)。

3-2-6 sven_0552 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析

6-1) 抽出、単離

2 L の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0 L のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 5 から 7 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

6-2) 化合物 15 の構造解析

ピーク 2 (dauca-8,11-diene, **15**, 1.3 mg)は無色の油状物質として得られた。**15** は、EI-MS において m/z 204 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{15}H_{24}$ であると決定し、不飽和度が 4 と明らかになった。¹H NMR から 24 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測され(図 3-73)、それらの DEPT スペクトル解析より 3 個のメチル炭素、6 個のメチレン炭素、3 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 4 つのシグナル(δ_C 112.7, 122.8, 138.9 および 148.2 ppm)から 2 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**15** は 2 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ¹H-¹³C HMQC によって帰属し(図 3-75)、それらのケミカルシフト値を図 3-77 に示した。¹H-¹H COSY(図 3-74)および ¹H-¹³C HMBC スペクトル(図 3-76)から ¹H-¹³C の相関を詳細に解析することによって、5-7 員環を有する既知化合物の(+)-dauca-8,11-diene であることが明らかになった^{67, 68)}。

3-2-7 *slt18_1078* 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析

7-1) 抽出、単離

7.5-liter の培養液を 5000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 2.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh) を抽出物の 30 倍量 (15 g) 量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン：酢酸エチル=10：0、9：1、8：2、7：3、6：4、5：5、4：6、3：7、2：8、1：9 および 0：10 の組成で 20 ml (5 ml × 4) ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含む画分をまとめロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

7-2) 化合物 16 の構造解析

ピーク 1 (cyclooctat-7(8),10(14)-diene, **16**, 24.0 mg) は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} +70.7$ (*c* 0.1, CHCl₃) を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。**16** は、HR-MS (EI) において *m/z* 272.2505 [M⁺] の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₂₀H₃₂ であると決定した。¹H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-78)、それらの DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、6 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在する。またそれらのうち低磁場にシフトした 4 つのシグナル (δ_C 124.0, 139.8, 140.1 および 141.9 ppm) から 2 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**16** は 3 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ¹H-¹³C HMQC によって帰属し(図 3-80)、それらのケミカルシフト値を図 3-83 に示した。¹H-¹H COSY により 1 位から 18 位まで、8 位から 9 位まで、12 位から 13 位までおよび 15 位から 17 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-79)。さらに ¹H-¹³C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-81)。1 位の CH₂ (δ_H 1.60) から 3-CH (δ_C 43.0), 6-CH (δ_C 49.1) および 12-CH₂ (δ_C 37.3) に、1 位の CH₂ (δ_H 1.73) から 2-CH (δ_C 53.5), 6-CH, 12-CH₂ および 20-CH₃ (δ_C 26.0) に、8 位の CH₃ (δ_H 5.44) から 7-C (δ_C 139.6), 9-CH₂ (δ_C 23.4) および 19-CH₃ (δ_C 20.6) に、9 位の CH₂ (δ_H 2.45) から 7-C, 8-CH (δ_C 123.8), 10-C (δ_C 141.9) および 11-C (δ_C 51.3) に、12 位の CH₂ (δ_H 1.40, 1.51) から 10-C および 13-CH₂ (δ_C 26.3) に、13 位の CH₂ (δ_H 1.99, 2.11) から

10-C に、15 位の CH (δ_{H} 2.63) から 10-C および 13-CH₂ に、16 位の CH₃ (δ_{H} 0.90) から 14-C (δ_{C} 140.0), 15-CH (δ_{C} 27.8) および 17-CH₃ (δ_{C} 21.5) に、17 位の CH₃ (δ_{H} 0.97) から 14-C, 15-CH および 16-CH₃ (δ_{C} 20.9) に、18 位の CH₃ (δ_{H} 0.93) から 2-CH, 3-CH および 4-CH₂ (δ_{C} 35.9) に、19 位の CH₃ (δ_{H} 1.65) から 6-CH, 7-C および 8-CH に、そして 20 位の CH₃ (δ_{H} 0.92) から 1-CH₂ (δ_{C} 48.2), 10-C, 11-C および 12-CH₂ に相関が観測された。以上のデータから 7-8 位および 10-14 位に二重結合を有する 5-8-5 員環の平面構造を決定した。この化合物は新奇なジテルペン化合物であることが判明し、cycloocta-7(8),10(14)-diene と命名した。

3-2-8 *slt18_1880* 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析

8-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh) を抽出物の 30 倍量 (10 g) 量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10) ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 4 から 8 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

8-2) 化合物 17 の構造解析

ピーク 2 (isohirsut-4-ene, **17**, 1.8 mg) は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -188.0 (*c* 0.1, CHCl₃) を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。**17** は、HR-MS (EI) において *m/z* 204.1878 [M⁺] の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₁₅H₂₄ であると決定された。また、不飽和度が 4 であることが明らかになった。¹H NMR から 24 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測された(図 3-84)。また、DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、4 個のメチレン炭素、4 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが予想された。またそれらのうち低磁場にシフトした 2 つのシグナル (δ_{C} 121.8

および 142.8 ppm)から 1 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、17 は 3 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ^1H - ^{13}C HMQC 解析によってその相関関係が明らかになった(図 3-86)。それらのケミカルシフト値を図 3-89 に示した。 ^1H - ^1H COSY により 1 位から 10 位までおよび 5 位から 6 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-85)。さらに ^1H - ^{13}C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-87)。12 位の CH_3 (δ_{H} 0.92)から 1- CH_2 (δ_{C} 48.8), 10- CH_2 (δ_{C} 47.4), 11-C (δ_{C} 41.6)および 13- CH_3 (δ_{C} 30.5)に、13 位の CH_3 (δ_{H} 1.06)から 1- CH , 10- CH_2 , 11-C および 12- CH_3 (δ_{C} 29.2)に、14 位の CH_3 (δ_{H} 1.17)から 3- CH (δ_{C} 66.7), 6- CH_2 (δ_{C} 47.5), 7-C (δ_{C} 52.9)および 8- CH_2 (δ_{C} 48.9)そして 15 位の CH_3 (δ_{H} 1.68)から 3- CH , 4-C (δ_{C} 142.8)および 5- CH (δ_{C} 121.8)に相関が観測された。以上のデータから、4-5 位間に二重結合を有する平面構造を決定した。これら NMR 解析の結果、*sclav_p1407* 形質転換株から単離された isohirsut-1-ene と同様な新奇な直鎖状 triquinane 骨格を有したセスキテルペン化合物であることが明らかになり、本化合物を isohirsut-4-ene と命名した。

3-2-9 *stsu_20912* 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析

9-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン =100：0、20：1、10：1、5：1、2：1 および 1：1 の組成で 20 ml (2 ml × 10)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 9 から 13 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

9-2) 化合物 18 の構造解析

ピーク 3 (tsukubadiene, **18**, 9.4 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -120.3 (*c* 0.1, CHCl_3)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm^{-1} に吸収を示した。**18** は、EI-MS において m/z 272.2506 [M^+]の分子イオンピークを示したこと

から、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると決定した。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-90)、それらの DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、6 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在する。またそれらのうち低磁場にシフトした 4 つのシグナル (δ_C 124.7, 132.4, 137.5 および 143.7 ppm)から 2 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、18 は 3 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC によって帰属し(図 3-92)、それらのケミカルシフト値を図 3-96 に示した。 1H - 1H COSY により 1 位から 16 位まで、7 位から 9 位までおよび 11 位から 12 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-91)。さらに 1H - ^{13}C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-93)。5 位の CH_2 (δ_H 2.01, 2.25) から 3- CH_2 (δ_C 37.0), 6-C (δ_C 137.5), 7-CH (δ_C 124.7), 15-C (δ_C 143.7)および 17- CH_3 (δ_C 25.3)に、7 位の CH (δ_H 5.49)から 5- CH_2 (δ_C 41.3), 17- CH_3 に、9 位の CH (δ_H 2.34)から 18- CH_3 (δ_C 32.1)および 19- CH_3 (δ_C 25.7)に、11 位の CH_2 (δ_H 1.37, 1.48)から 19- CH_3 に、12 位の CH_2 (δ_H 1.47)から 20- CH_3 (δ_C 25.4)に、14 位の CH (δ_H 5.11)から 9-CH (δ_C 53.3), 12- CH_2 (δ_C 40.7)および 20- CH_3 に、16 位の CH_3 (δ_H 1.05)から 1-CH (δ_C 41.7), 2- CH_2 (δ_C 31.9)および 15-C に、18 位の CH_3 (δ_H 1.00)から 9-CH, 10-C (δ_C 40.8), 11- CH_2 (δ_C 39.9)および 19- CH_3 に、19 位の CH_3 (δ_H 0.93)から 9-CH, 10-C, 11- CH_2 および 18- CH_3 に、そして 20 位の CH_3 (δ_H 0.96)から 9-CH, 12- CH_2 , 13-C (δ_C 48.1)および 14-CH (δ_C 132.4)に相関が観測された。以上のデータから、6-7 位および 14-15 位に二重結合を有する 5-9-5 員環の平面構造を決定した。この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、tsukubadiene と命名した。

3-2-10 nd90_0354 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析

10-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン/ジクロロメタン = 100 : 0, 20 : 1, 10 : 1、

5 : 1、2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10) ずつ分画した。*n*-ペンタンで溶出されたフラクションを濃縮後、さらに 10%硝酸銀含浸シリカゲルカラムによる精製(*n*-ペンタン / ジクロロメタン)を行なった。化合物 19 は、*n*-ペンタン/ジクロロメタン = 10 : 1 で溶出された。化合物 20 は、*n*-ペンタン/ジクロロメタン = 1 : 1 で溶出された。目的化合物を多く含む各フラクションを集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

10-2) 化合物 19 の構造解析

ピーク 1 (odyverdiene A, 19, 1.2 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} -18.7$ (*c* 0.1, CHCl₃)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を示した。19 は、HR-MS (EI)において *m/z* 272.2506 [M⁺]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は C₂₀H₃₂ であると決定した。¹H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。¹³C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-97)、それらの DEPT スペクトル解析より 3 個のメチル炭素、9 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在する。またそれらのうち低磁場にシフトした 4 つのシグナル (δ_C 108.1, 110.8, 150.3 および 150.5 ppm)から 2 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、19 は 3 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ¹H-¹³C HMQC によって帰属し(図 3-99)、それらのケミカルシフト値を図 3-102 に示した。¹H-¹H COSY により 1 位から 3 位までおよび 5 位から 19 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-98)。さらに ¹H-¹³C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-100)。1 位の CH₂ (δ_H 1.57)から 13-CH₂ (δ_C 44.9)および 20-CH₃ (δ_C 26.8)に、2 位の CH₂ (δ_H 2.07)から 1-CH₂ (δ_C 33.8)および 4-C (δ_C 150.5)に、3 位の CH (δ_H 2.36)から 20-CH₃ に、9 位の CH₂ (δ_H 1.62)から 10-CH₂ (δ_C 32.4)に、13 位の CH₂ (δ_H 1.36)から 1-CH₂, 3-CH (δ_C 47.8)および 7-CH (δ_C 49.9)に、16 位の CH₃ (δ_H 1.58)から 11-CH (δ_C 52.9), 15-C (δ_C 150.3)および 17-CH₂ (δ_C 110.8)に、17 位の CH₂ (δ_H 4.63, 4.66)から 11-CH および 16-CH₃ (δ_C 19.1)に、18 位の CH₂ (δ_H 4.85, 4.96)から 3-CH および 5-CH₂ (δ_C 40.6)に、19 位の CH₃ (δ_H 0.90)から 7-CH, 8-CH (δ_C 39.2)および 9-CH₂ (δ_C 35.1)に、そして 20 位の CH₃ (δ_H 1.29)から 1-CH₂, 3-CH, 13-CH₂ (δ_C 44.9)および 14-C (δ_C 41.2)に相関が観測された。以上のデータから、15-17 位および 4-18 位に二重結合を有する 6-8-4 員環の平面構造を決定した。この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、odyverdiene A と命名した。

10-3) 化合物 20 の構造解析

ピーク 2 (odyverdiene B, 20, 1.2 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} -44.2$ (*c* 0.1, CHCl₃)を示した。IR スペクトルは 2921, 1440, 1382, 890 cm⁻¹ に吸収を

示した。20 は、HR-MS (EI)において m/z 272.2506 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると決定した。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-103)、それらの DEPT スペクトル解析より 3 個のメチル炭素、8 個のメチレン炭素、7 個のメチン炭素および 2 個の 4 級炭素が存在する。またそれらのうち低磁場にシフトした 4 つのシグナル (δ_C 107.0, 110.0, 150.7 および 151.6 ppm)から 2 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、20 は 3 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC によって帰属し(図 3-105)、それらのケミカルシフト値を図 3-102 に示した。 1H - 1H COSY により 1 位から 20 位まで連結した部分構造が明らかになった(図 3-104)。さらに 1H - ^{13}C HMBC 解析により以下の部分構造が示された(図 3-106)。16 位の CH_3 (δ_H 1.64)から 12-CH (δ_C 56.0), 15-C (δ_C 150.7)および 17- CH_2 (δ_C 107.0)に、17 位の CH_2 (δ_H 4.58, 4.70)から 12-CH および 16- CH_3 (δ_C 20.1)に、18 位の CH_3 (δ_H 0.83)から 1-CH(δ_C 35.1), 2- CH_2 (δ_C 29.5)および 14-CH (δ_C 59.6)に、19 位の CH_2 (δ_H 4.75, 4.89)から 4-CH (δ_C 42.4)および 6- CH_2 (δ_C 38.1)に、そして 20 位の CH_3 (δ_H 0.90)から 8-CH (δ_C 46.0), 9-CH (δ_C 37.5)および 10- CH_2 (δ_C 35.4)に相関が観測された。以上のデータから、15-17 位および 5-19 位に二重結合を有する 6-7-5 員環の平面構造を決定した。この化合物はこれまでに報告されていない新奇なジテルペン骨格を有していることが判明し、odyverdiene B と命名した。

3-2-11 *mmar*_3220 形質転換体が生産するセスキテルペン化合物の解析

11-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0、10 : 1、5 : 1、1 : 1、1 : 5、1 : 10 および 0 : 100 の組成で 20 ml (4 ml x 5)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 22 から 27 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

11-2) 化合物 21 の構造解析

ピーク 6 (allohedycariol, **21**, 3.7 mg)は無色の油状物質として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D^{24} +150.7$ (c 1.0, CHCl_3)を示した。**21** は、EI-MS において m/z 222 $[\text{M}^+]$ の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ であると決定し、不飽和度が3と明らかになった。 ^1H NMR から 25 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 15 個の炭素シグナルが観測され(図 3-108)、それらの DEPT スペクトル解析より 4 個のメチル炭素、4 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 2 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 4 つのシグナル(δ_{C} 127.1, 130.4, 132.1 および 144.0 ppm)から 2 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**21** は 1 環性セスキテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは ^1H - ^{13}C HMQC によって帰属し(図 3-110)、それらのケミカルシフト値を図 3-113 に示した。 ^1H - ^1H COSY(図 3-109)および ^1H - ^{13}C HMBC スペクトル(図 3-111)から ^1H - ^{13}C の相関を詳細に解析することによって、10 員環を有する既知化合物の germacradienol であることが明らかになった。 ^{13}C NMR の結果を germacradienol と比較すると、15- CH_3 (δ_{C} 22.7)が文献値と大きく異なっていた¹⁴⁾。さらに GC-MS 解析より、*S. avermitilis* ATCC 31267 や *S. coelicolor* A3(2)らが生産する germacradienol と GC-MS での保持時間が異なる事から **21** は germacradienol のジアステレオマーであることが強く示唆された。また germacradienol の比旋光度は、 $[\alpha]_D -153.3$ (c 1.5, CHCl_3)を示されたことが報告されているが、**21** は $[\alpha]_D^{24} +150.7$ (c 1.0, CHCl_3)を示した。また NOESY 解析(図 3-112)および文献値⁶⁹⁾より、既に SCO6073 を用いた酵素反応により解析された (4*S*, 7*R*)-germacradienol のジアステレオマーである allohedycariol であることが明らかになった。

3-2-12 rxml_0493 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析

12-1). 抽出、単離

40-liter から得た培養液を 5,000 x g で遠心分離し、上清と菌体に分けた。菌体に 10-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液をエバポレーターにより濃縮した。濃縮物を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。*n*-ヘキサン層 (上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。得られたヘキサン抽出物から遊離脂肪酸等の酸性物質を除くため、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ろ紙を用いてろ過した後、ろ液をエバポレーター

により濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (35 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン =100：0、10：1、5：1、1：1、1：5、1：10 および 0：100 の組成で 20 ml (4 ml × 5)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション(*n*-ペンタン：ジクロロメタン = 20：1)を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

12-2) 化合物 22 の構造解析

ピーク 1 (cembrene C, **22**, 3.3 mg)は無色の油状物質として得られた。**22** は、EI-MS において m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると決定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-114)、それらの DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、6 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 4 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 8 つのシグナル (δ_C 118.2, 122.0, 124.1, 125.0, 134.2, 134.3, 134.5 および 147.0 ppm)から 4 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**22** は 1 環性ジテルペン化合物であることが推測された。1 次元 NMR を既知化合物と比較した結果、14 員環を有する珊瑚から単離された報告のある既知のジテルペン化合物である cembrene C であることが明らかになった ⁷⁰⁾(図 3-115)。

13) *haur_2987* 形質転換体が生産するジテルペン化合物の解析

13-1). 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 × g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。次に、200 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル (230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン =100：0、10：1、5：1、1：1、1：5、1：10 および 0：100 の組成で 20 ml (4 ml × 5)ずつ分画した。得られた

各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション(*n*-ペンタン：ジクロロメタン = 1 : 20)を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

13-2) 化合物 23 の構造解析

ピーク 4 (obscuronatin, **23**, 5.8 mg)は無色の油状物質として得られた。**23** は、EI-MS において m/z 290 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{34}O$ であると決定し、不飽和度が 4 と明らかになった。 1H NMR から 33 個の水素シグナルが観測された。 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測され(図 3-116)、それらの DEPT スペクトル解析より 5 個のメチル炭素、7 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素および 3 個の 4 級炭素が存在することが明らかになった。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル (δ_c 125.7, 126.1, 129.4, 130.2, 132.4 および 140.0 ppm)から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**23** は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。1 次元 NMR を既知化合物と比較した結果、6-6 員環を有する珊瑚でから単離された報告のある既知のジテルペン化合物である obscuronatin であることが明らかになった⁷¹⁾(図 3-115)。

3-3 化合物 1 (hydropyrene)の X 線結晶解析

sclav_p0765 形質転換体が生産した 1 および 2 の構造は、NMR により 6-6-6-6 員環を有するジテルペン化合物であることが推定された。しかしながら、1 の 7-CH₂ (δ_{H} 1.44, δ_{C} 18.9) および 2 の 7-CH₂ (δ_{H} 1.41, δ_{C} 18.2) が ¹H-¹H COSY および ¹H-¹³C HMBC において相関が観測されなかったため、各構造を決定できなかった。そこで、油状物質である 1 を用いて誘導体を調製し、結晶の取得を試みた。

【実験方法】

3-3-1 1-epoxide の調製

単離した 1 5.2 mg (0.019 mmol) を窒素気流下 0°C で 1 ml のジクロロメタンに溶解した。m-クロロ過安息香酸 4.9 mg (0.023 mmol) を添加し、0°C で 1 時間攪拌して酸化した。反応終了後、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1 ml 加えて反応を停止させた。生成物を 5 ml のジクロロメタンを加え、抽出操作を行なった。ジクロロメタン層を回収し、この操作を 2 回行なった後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。無水硫酸ナトリウムをろ過して除去した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。抽出物を少量の *n*-ヘキサンに溶解させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離した。*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 50 : 1 の画分を回収し、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。得られたエポキシ体を MS ならびに NMR により構造の確認を行なった(図 3-116)。

3-3-2) X-線結晶解析

酸化反応で得た hydropyrene-4,12-epoxide をクロロホルムに溶解し、さらに冷却することによって 3.5 mg の微粉末結晶を得た。X 線結晶解析は Rigaku R-Axis Varimax RAPID-II を用いて行った。得られた X-線回折データからの結晶構造解析の計算は *SHELXL-2014*⁷²⁾ を用いて行った。

【実験結果】

6-6-6-6 員環を有すると推定されたジテルペン化合物の構造は、7-CH₂ (δ_{H} 1.44, δ_{C} 18.9) の 2 次元 NMR の相関が観測されなかったため、NMR 解析では決定できなかった。そこで、構造を明らかにするため X 線結晶解析を試みた。1 および 2 のいずれも結晶が形成されなかったため、1 のエポキシ体を作製し、わずかな単斜晶系の結晶を形成した。X 線結晶解析を行なった結果、1-epoxide の結晶の結果は、Empirical formula; C₂₀H₃₂O; Molecular weight: 288.46; Crystal system: monoclinic; Space group: P2₁; Unit cell dimensions: *a* = 6.2239(1) Å, *b* = 8.9584(2) Å, *c* = 14.6575(3) Å, β = 93.696(1)°, *V* =

815.55(3)Å³; Z value = 2; D_{calc} = 1.175 g/cm³; T = 173(2) K, no. of unique reflections = 2924, R_{int} = 0.0357, no. of parameters = 193, no. of restraints = 1, R₁ = 0.0398, wR₂ = 0.1091, S = 1.091 for 2402 reflections, max/min. residual density 0.16/-0.15 eÅ⁻³であった。1 および 2 は、6-6-6-6 員環を有する新奇なテルペン骨格を有するジテルペン化合物であることが明らかになり、それぞれ hydropyrene および hydropyrenol と命名した (図 3-116)。1-epoxide の構造の結晶のデータは、ケンブリッジ結晶構造センターに登録された(登録番号 CCDC-1022903)。

3-4 考察

本章では、第二章で見出された新奇のテルペン骨格を有する化合物の構造を明らかにした。その結果、*sclav_p0765* 発現株から hydropyrene, hydropyrenol および isoelisabethatriene B、*sclav_p1407* 発現株からは isohirsut-1-ene、*sclav_p1169* 発現株からは clavulatriene A, B および prenyl- β -elemene, prenylgermacrene B、*slt18_1078* 発現株からは cyclooctat-7(8),10(14)-diene、*slt18_1880* 発現株からは isohirsut-4-ene、*stsu_20912* 発現株からは tsukubadiene、そして *nd90_0354* 発現株では odyverdiene A, B の新規テルペン骨格を有するジテルペン化合物の生産が確認された。また、*sclav_p0985* 発現株から african-1-ene および african-2-ene、*sven_0552* 発現株から dauca-8,11-diene、*mmar_3220* 発現株から allohedycariol、*rxyl_0493* 発現株からは cembrene C、そして *haur_2987* 発現株からは obscuronatin のテルペン化合物の生産が確認された。これら化合物は既に植物や珊瑚から報告のある化合物であるが、細菌から見出された報告はなく今回初めて報告する。

Hydropyrene (1) および hydropyrenol (2) は *sclav_p0765* を発現させた株で生産したが、親株である *S. clavuligerus* ATCC 26074 ではいかなる培養条件においても生産が確認されなかった。6 員環が 4 個連結した特徴的な構造を有する化合物は、これまでに報告されておらず新奇な骨格を有する事が明らかになった。

sclav_p0985 発現株が生産した 5-7-3 員環を有する african-2-ene (5) および african-1-ene (6) の推定される環化反応は、ファルネシル 2 リン酸の 1 位と 11 位間で閉環反応が進行し、humulyl カチオンが生成することが推測された。さらに脱プロトン化し、humulene が生成する。さらに閉環反応が進行し、5-7-3 員環を有するカルボカチオンを生成され、脱プロトン化によって african-2-ene ならびに african-1-ene が生成すると推測された。

sclav_p1169 形質転換株が生産した clavulatriene A (7), clavulatriene (8), prenyl- β -elemene (9), prenylgermacrene B (10), prenylgermacrene (11) および lobophytumin C (12) は、prenylgermacrene カチオンを経由した共通した環化反応によって生成すると推測した (図 3-118)。

これまでに細菌由来 triquinane 骨格を有するセスキテルペン化合物の生産は報告されていない。系統樹において SCLAV_p1407 および SLT18_1880 はそれぞれ異なる分岐群に属しているが、興味深いことに *sclav_p1407* 発現株から isohirsut-1-ene (13) および *slt18_1880* 発現株から isohirsut-4-ene (17) がそれぞれ生産したことが明らかになった。また SLT18_1880 の隣接した分岐群にはモノテルペン合成酵素である SCLAV_p0982 が位置していた。SLT18_1880 (325 aa) は、SCLAV_p1407 (367 aa) と 32 % の identity および 47 % の similarity を示した。同様に、SLT18_1880 は SCLAV_p0982 (330 aa) に対

しても 31 %の identity および 48 %の similarity を示した。SCLAV_p0068 はこれまでに T-muurolol 合成酵素であることが明らかにされ、また第二章の解析によって *sclav_p0068* 形質転換株においても同一の化合物の生産が確認された。

sclav_p0068 の上流に位置している cytochrome P450 をコードする *sclav_p0067* も共発現させることによって、興味深いことに T-muurolol と構造的および生成される環化反応機構も異なる drimenol の新たな蓄積が確認された。この結果より、SCLAV_p0067 が SCLAV_p0068 を介して T-muurolol とは異なる環化反応を触媒していることが考えられた。

slt18_1078 発現株が生産した細菌由来の 5-8-5 員環を有するジテルペン化合物は、これまでに cyclooctatene 生産菌の *S. melanosporofaciens* MI614-43F2 由来の CotB2 により生成される cycloocta-9-ene-7-ol が報告されている⁴⁵⁾。5-8-5 員環を有するジテルペン化合物の生成を触媒するジテルペン合成酵素である SLT18_1078 および CotB2 は、興味深いことに系統樹において互いに非常に離れて位置しており、さらにアミノ酸配列の相同性も高くない(identity 11%, similarity 28%)。

mmar_3220 発現株は、germacradienol のジアステレオマーである allohedycariol (21) を生産したことが明らかになった。Germacradienol は geosmin 合成酵素の N 末側のドメインにより中間体として生成することが明らかになっている¹⁴⁾。そこで、MMAR_3220 と種々の geosmin 合成酵素の N 末側の機能ドメインを抽出して alignment を行なった結果、興味深いことに SCO6073 と 28 %の identity および 43 %の similarity を、SAV_2163 と 29 %の identity および 43 %の similarity と相同性が低いこと明らかになった (図 3-121)。MMAR_3220, SCO6073 および SAV_2163 は同一の平面構造を有するセスキテルペン化合物を生成するにも関わらず、Kaa が約 0.6 遠いことが明らかになった。このことは、生成する化合物の立体が異なるだけで細菌由来のテルペン合成酵素は、系統的に大きく異なることが考えられる。

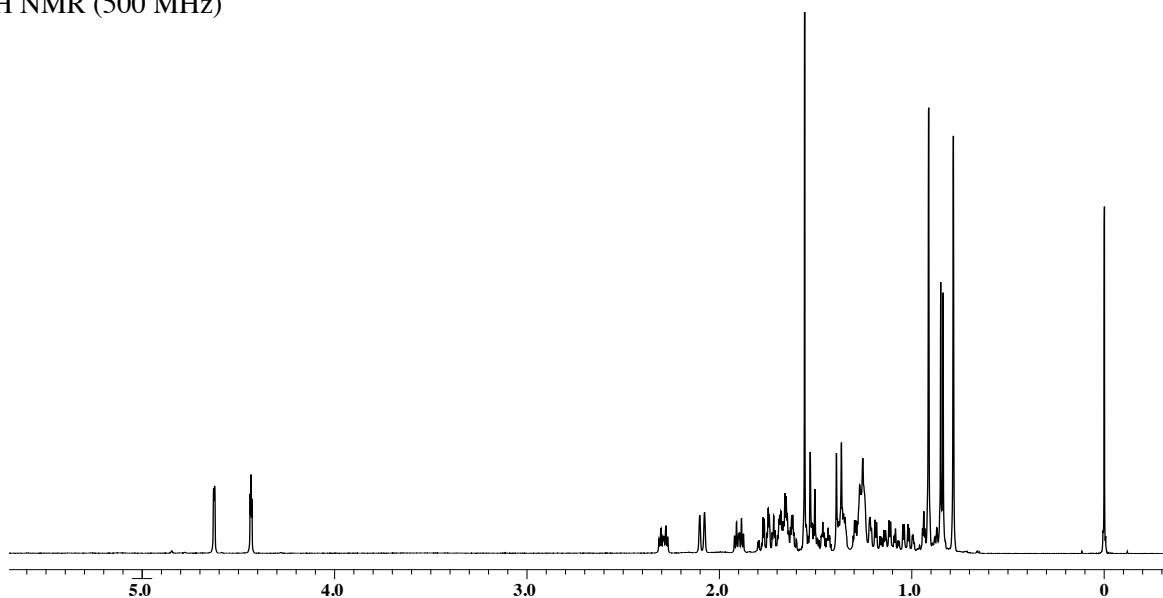
rxyl_0493 発現株は 14 員環の cembrene 骨格を有する cembrene C (22)の生産が明らかになった。これまでに *Streptomyces* sp. SANK 60404 由来の DtcycA および DtcycB が cembrene 骨格を有するジテルペン化合物を生成することが明らかになっている⁷³⁾。DtcycA は cembrene C のイソプロリデン異性体と nephthenol を、DtcycB は naphthenol, cembrene A および 15 員環を有するジテルペン炭化水素化合物を生成する。そこで、RXYL_0493 と DtcycA および DtcycB についてそれぞれ alignment を行なった結果、DtcycA と 26 %の identity および 42 %の similarity を、DtcycB と 22 %の identity および 36 %の similarity を示し、各酵素のアミノ酸配列と相同性が低いこと明らかになった。

5-8-5 員環ジテルペン化合物を生成する SLT18_1078 の例も含めて、同一あるいは類似した化合物であるにも関わらず、系統的に離れており一次構造も大きく異なる例があることを明らかにした。このことは細菌由来テルペン合成酵素の多様性が示唆され、

系統樹の型に当てはまらないことが推測された。

本手法を用いることによって多くの新規テルペン化合物を明らかにすることができた。今回の解析によって細菌由来テルペン化合物も植物や糸状菌と同様に様々な骨格を有し、天然物の探索研究において非常に魅力的な資源であることが証明されたと考えられる。

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

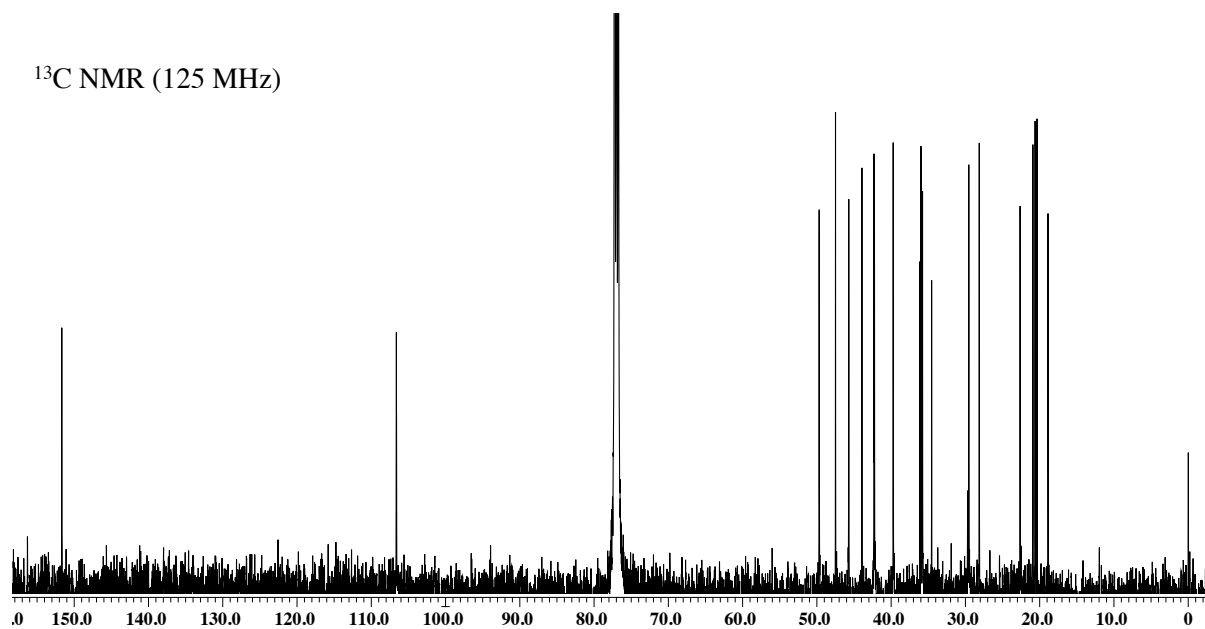


図3-1. Hydropyreneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

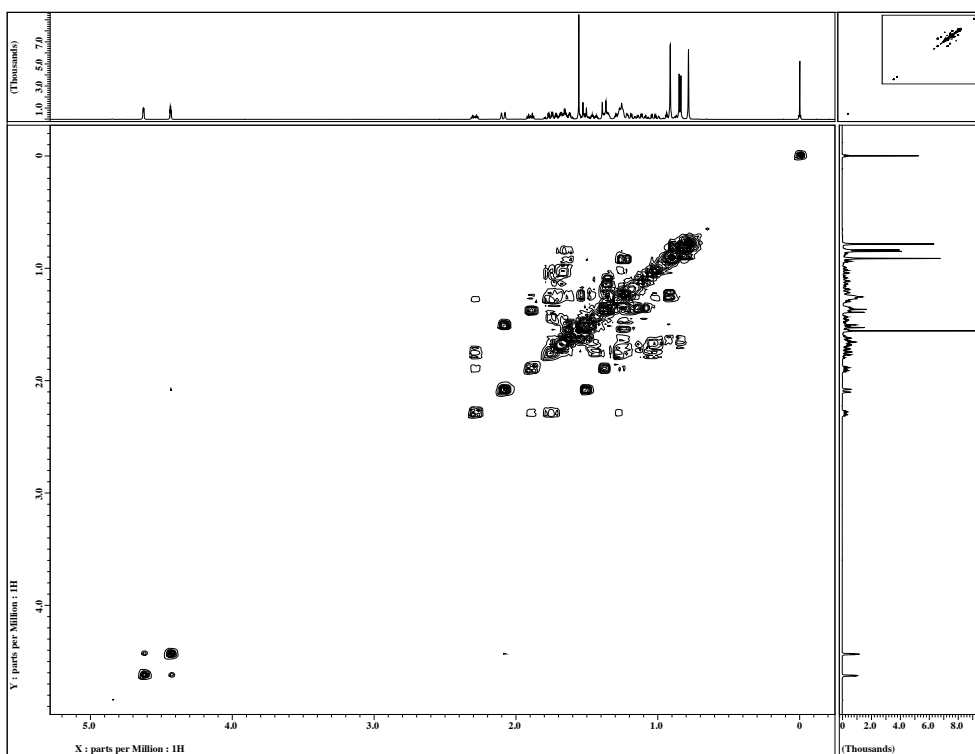


図3-2. Hydropyrene の ^1H - ^1H COSYデータ

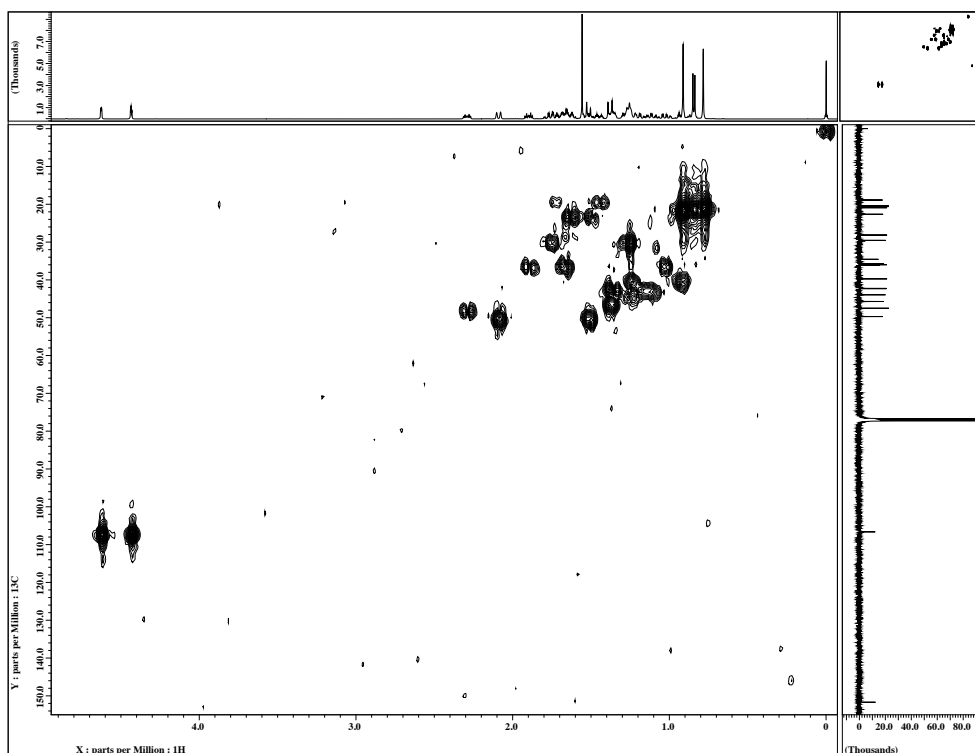


図3-3. Hydropyrene の ^1H - ^{13}C HMQCデータ

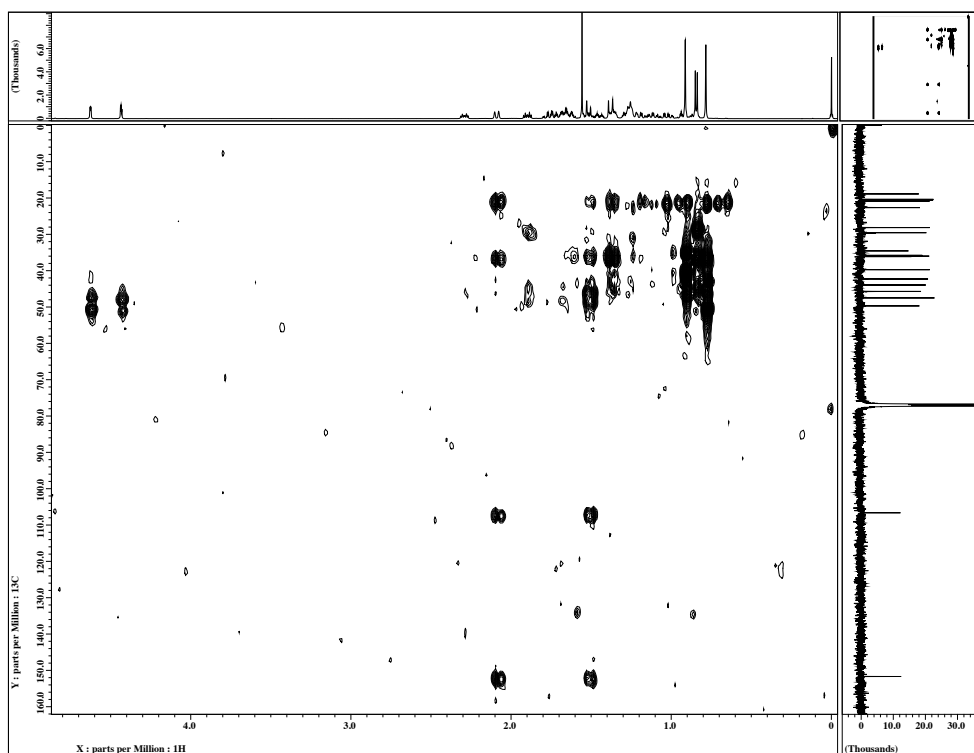


図3-4. Hydropyrene の ^1H - ^{13}C HMBCデータ

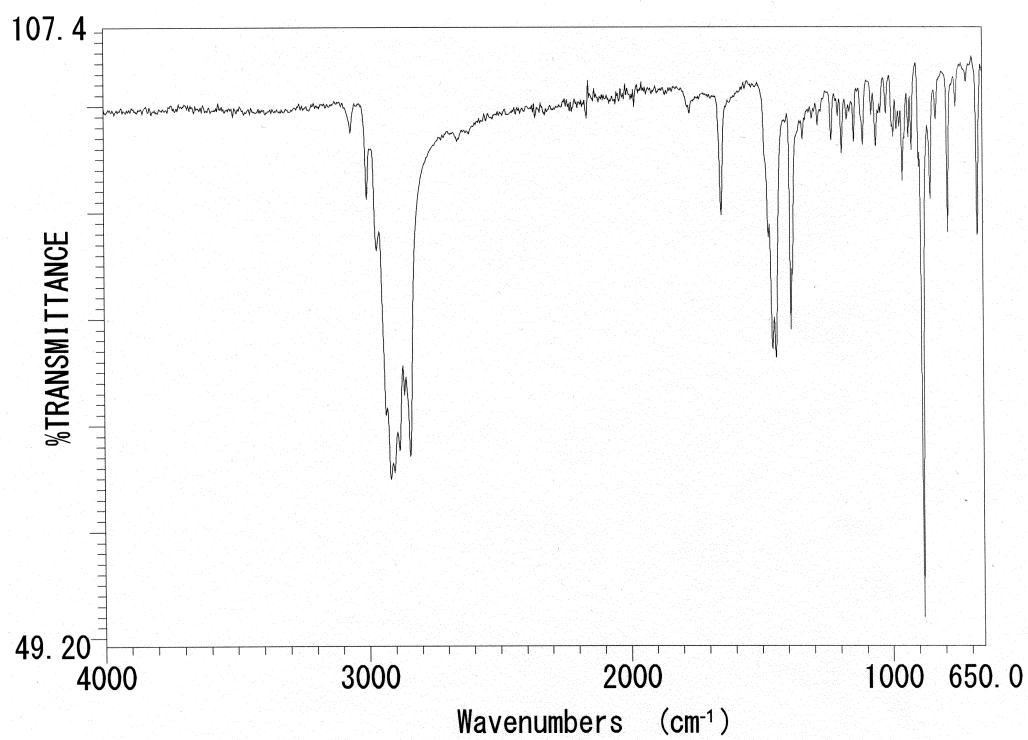
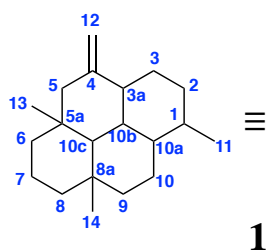
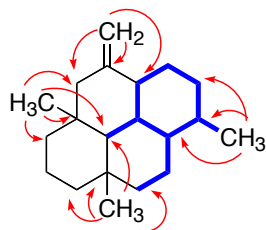
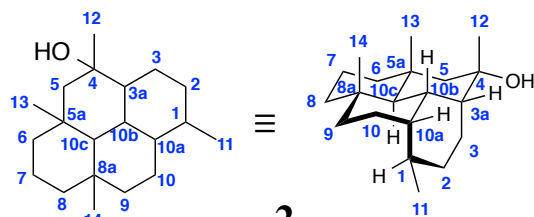
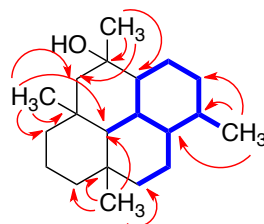


図3-5. Hydropyrene のIRデータ

(A)

**1**

(B)

**2**NMR chemical shifts in CDCl₃**1****2**

No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)
1	28.2	1.66 (1H, m)	28.3	1.67 (1H, m)
2	35.9	1.02 (1H, m), 1.66 (1H, m)	36.1	0.97 (1H, m), 1.68 (1H, m)
3	29.6	1.26 (1H, m), 1.74 (1H, m)	25.1	1.24 (1H, m), 1.49 (1H, m)
3a	47.6	2.27 (1H, m)	49.9	1.47 (1H, m)
4	151.8	-	73.8	-
5	49.8	1.50 (1H, m), 2.06 (1H, m)	52.3	1.14 (1H, m), 1.33 (1H, m)
5a	36.2	-	34.9	-
6	42.4	1.17 (1H, m), 1.33 (1H, m)	43.2	1.02 (2H, m)
7	18.9	1.44 (2H, m)	18.2	1.41 (2H, m)
8	42.3	1.15 (1H, m), 1.33 (1H, m)	42.6	1.11 (1H, m), 1.36 (1H, m)
8a	34.6	-	34.6	-
9	39.8	0.91 (1H, m), 1.24 (1H, m)	39.8	0.92 (1H, m), 1.29 (1H, m)
10	22.7	1.51 (1H, m), 1.63 (1H, m)	22.8	1.55 (2H, m)
10a	44.0	1.23 (1H, m)	44.1	1.25 (1H, m)
10b	36.1	1.89 (1H, m)	31.6	2.17 (1H, m)
10c	45.8	1.37 (1H, m)	45.2	1.26 (1H, m)
11	20.7	0.83 (3H, d, $J=7.6$)	20.6	0.82 (3H, d, $J=7.6$)
12	106.7	4.42 (1H, d, $J=2.0$), 4.65 (1H, t, $J=2.0$)	31.1	1.08 (3H, s)
13	20.4	0.77 (3H, s)	24.1	1.13 (3H, s)
14	21	0.90 (3H, s)	22.0	0.99 (3H, s)

図3-6. *sclav_p0765*形質転換株が生産したhydrophyrene (A; **1**)およびhydrophyrenol (B; **2**)の構造

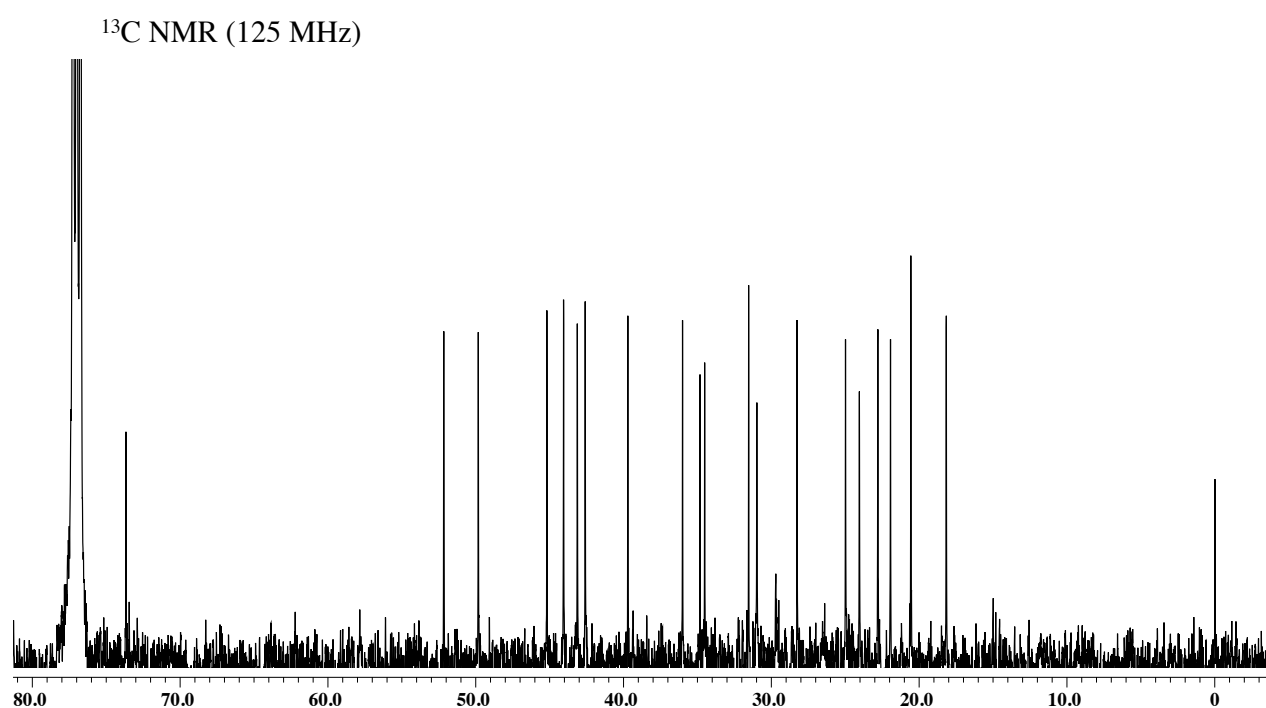
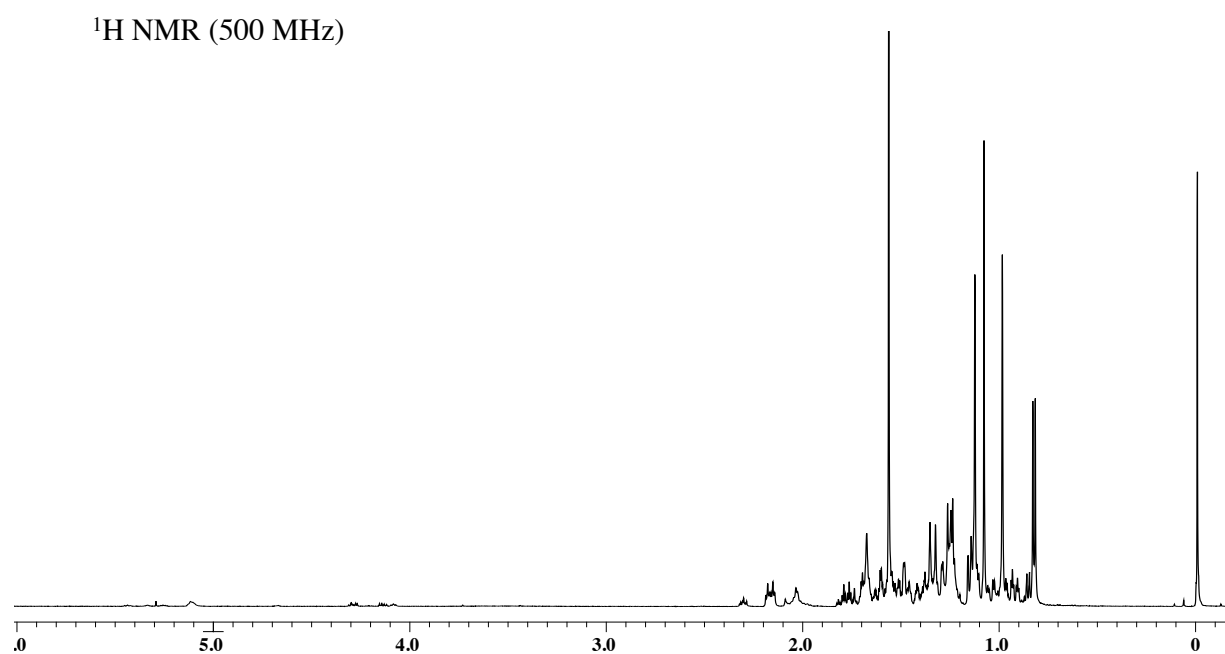


図3-7. Hydropyrenolの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

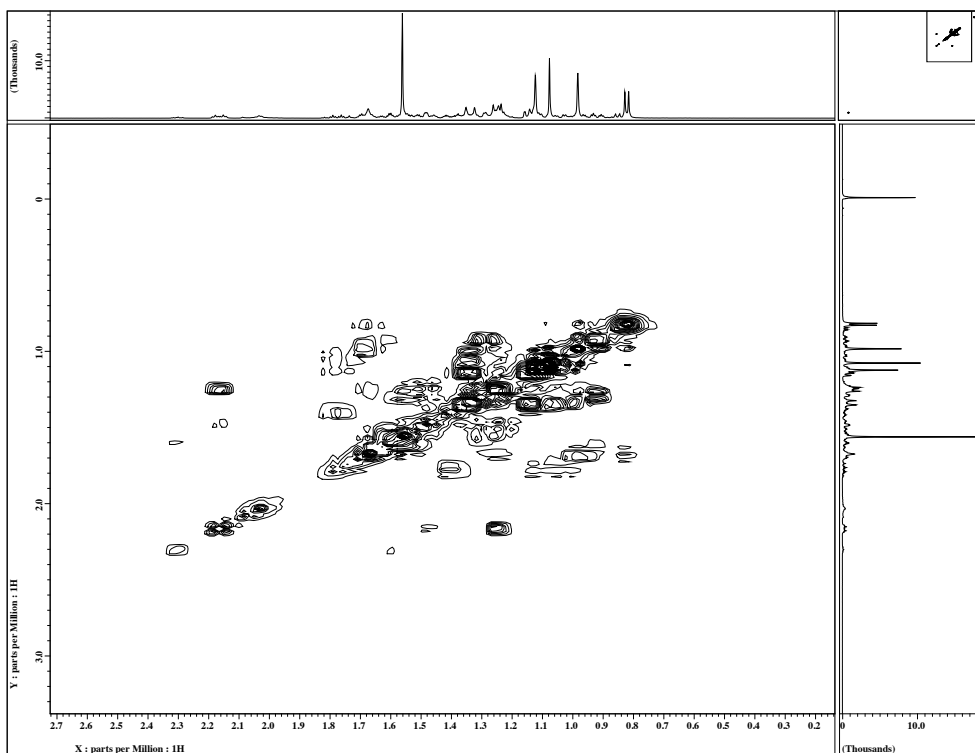


図3-8. Hydropyrenol の ^1H - ^1H COSYデータ

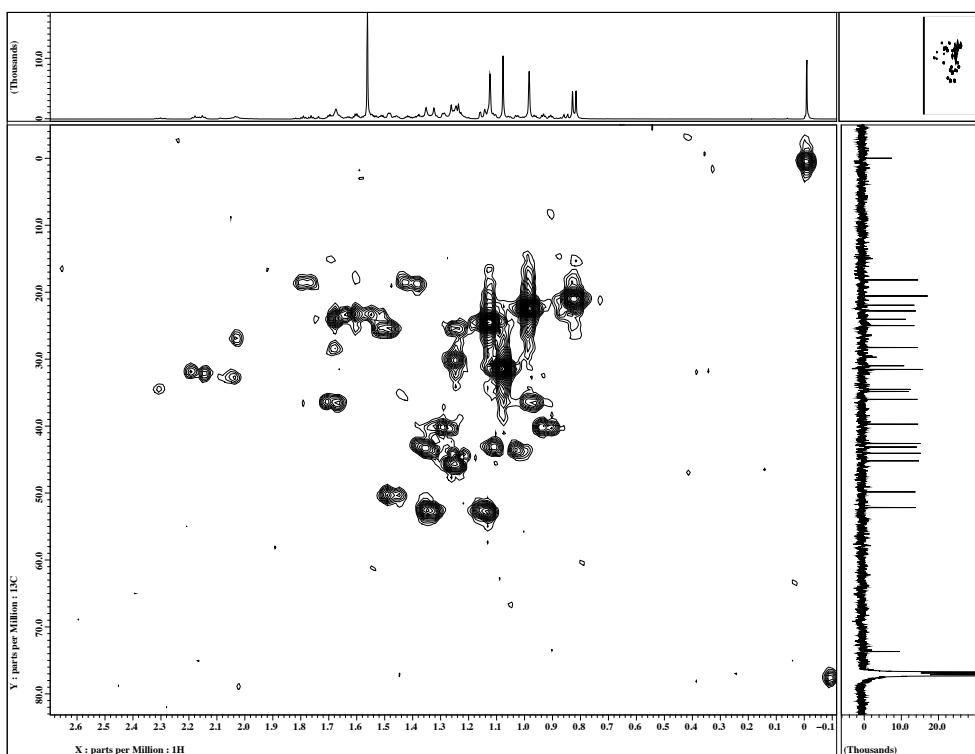


図3-9. Hydropyrenol の ^1H - ^{13}C HMQCデータ

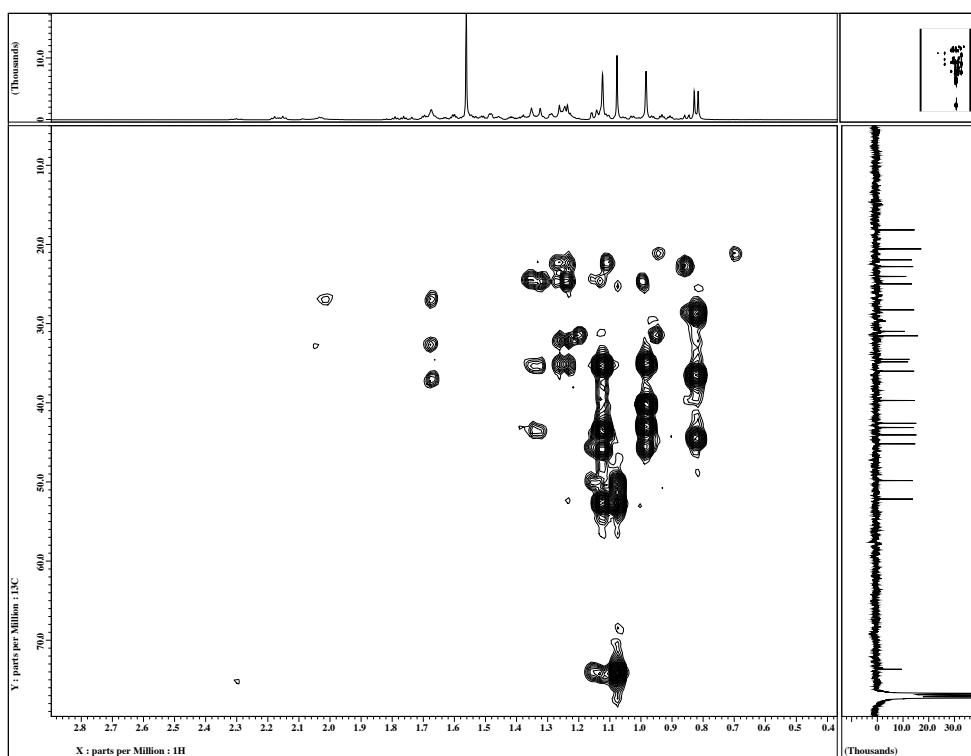


図3-10. Hydropyrenol の ^1H - ^{13}C HMBCデータ

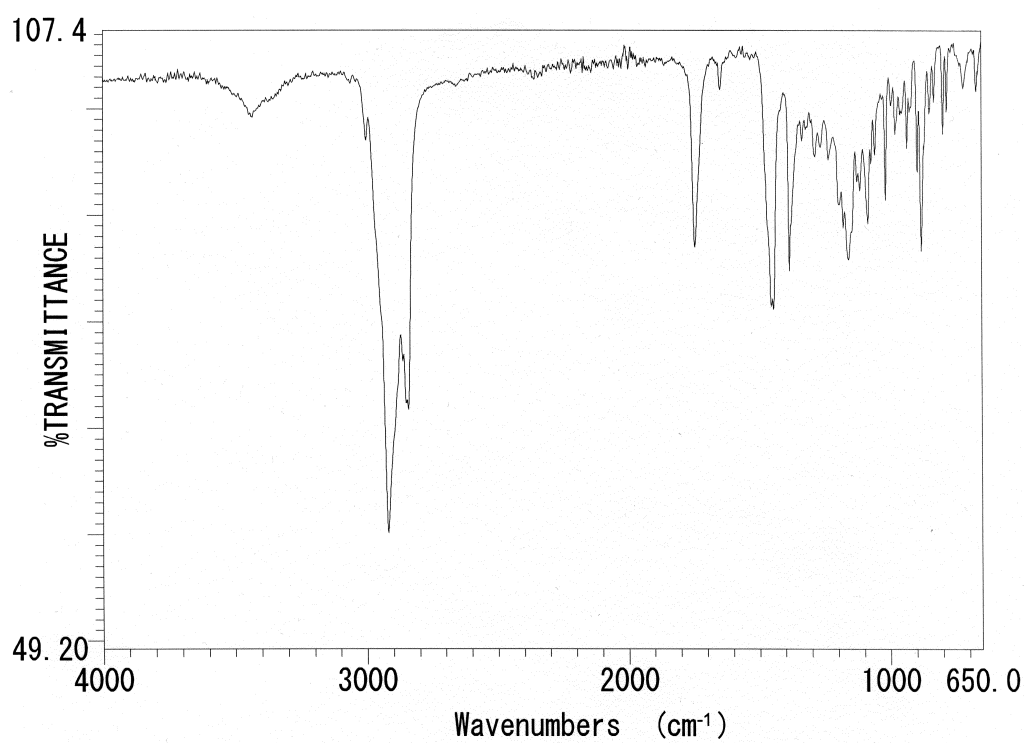


図3-11. Hydropyrenol のIRデータ

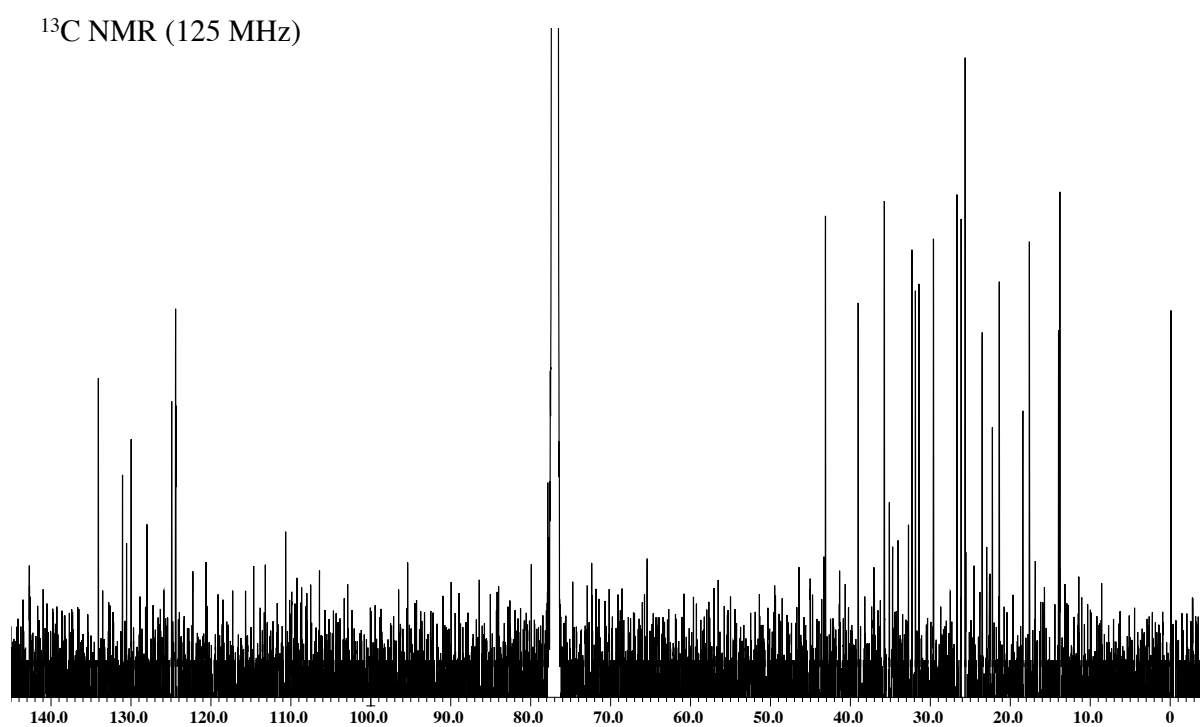
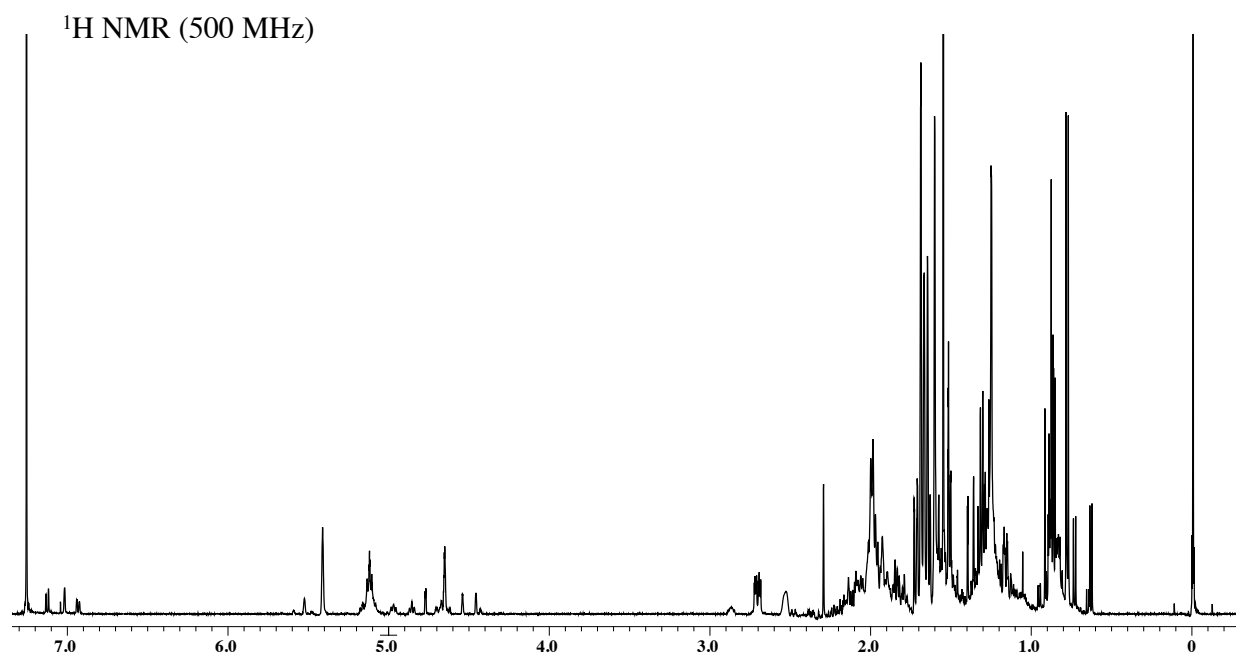


図3-12. Isoelisabethatriene Bの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

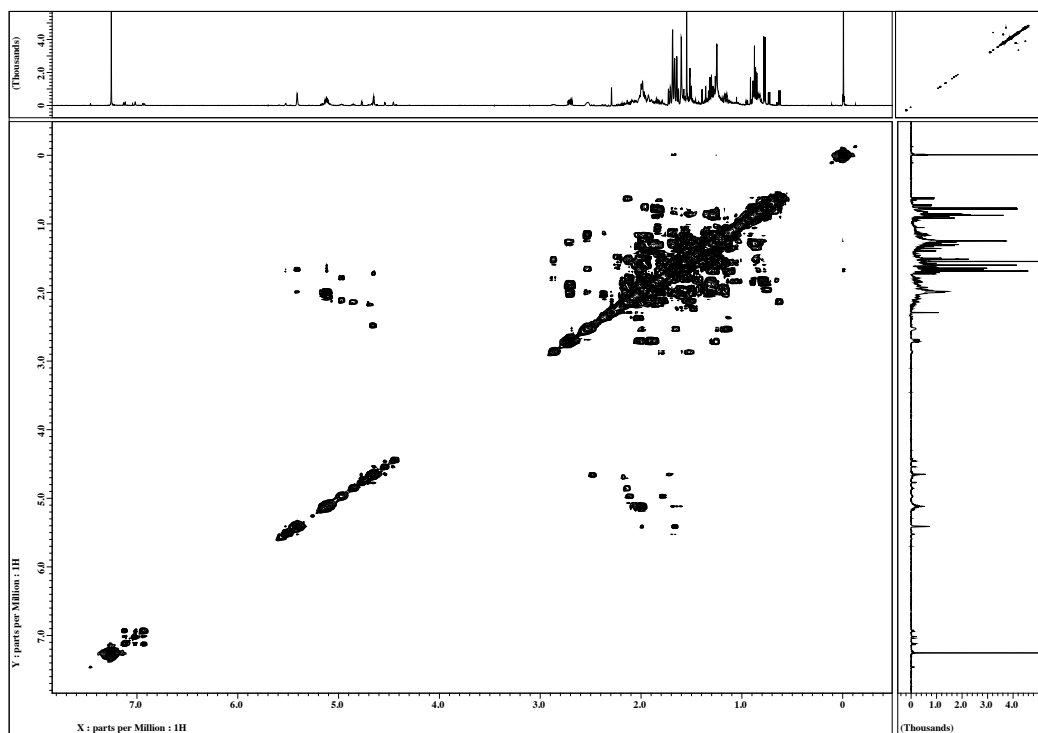


図3-13. Isoelisabethatriene Bの ^1H - ^1H COSYデータ

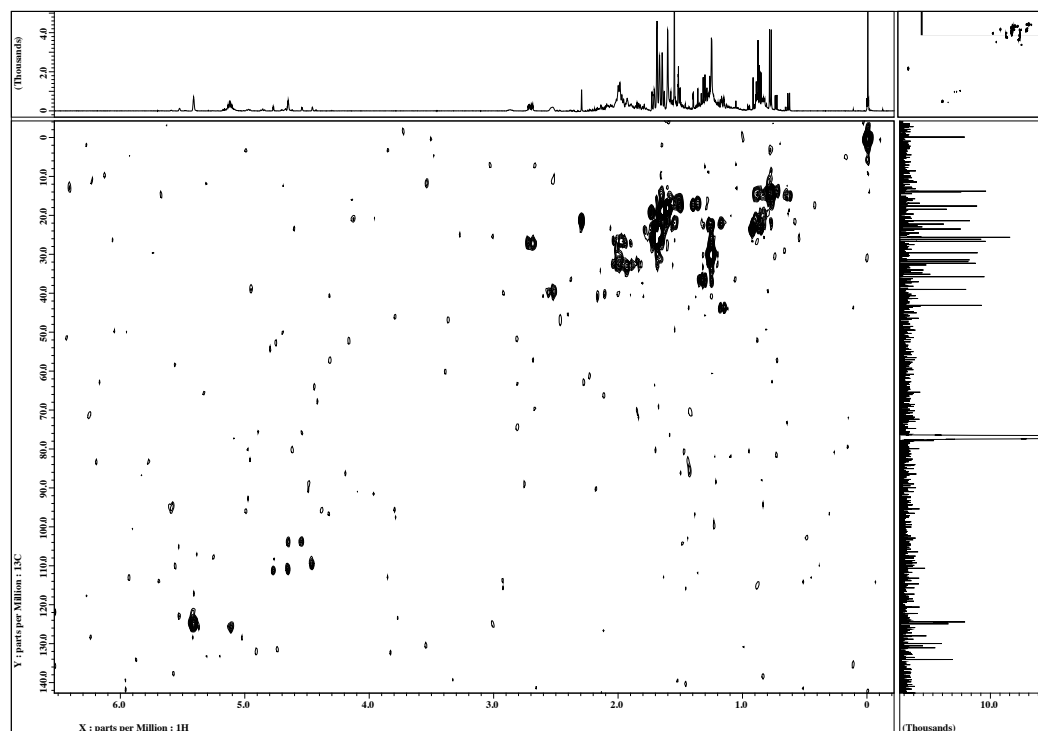


図3-14. Isoelisabethatriene Bの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

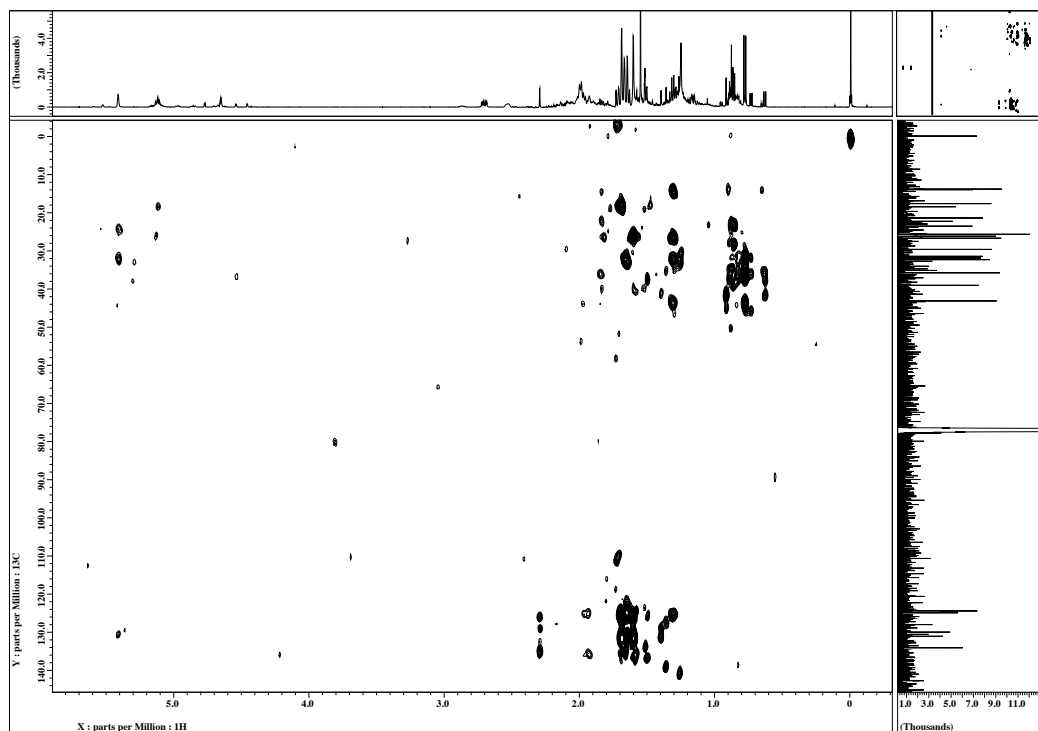


図3-15. Isoelisabethatriene Bの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

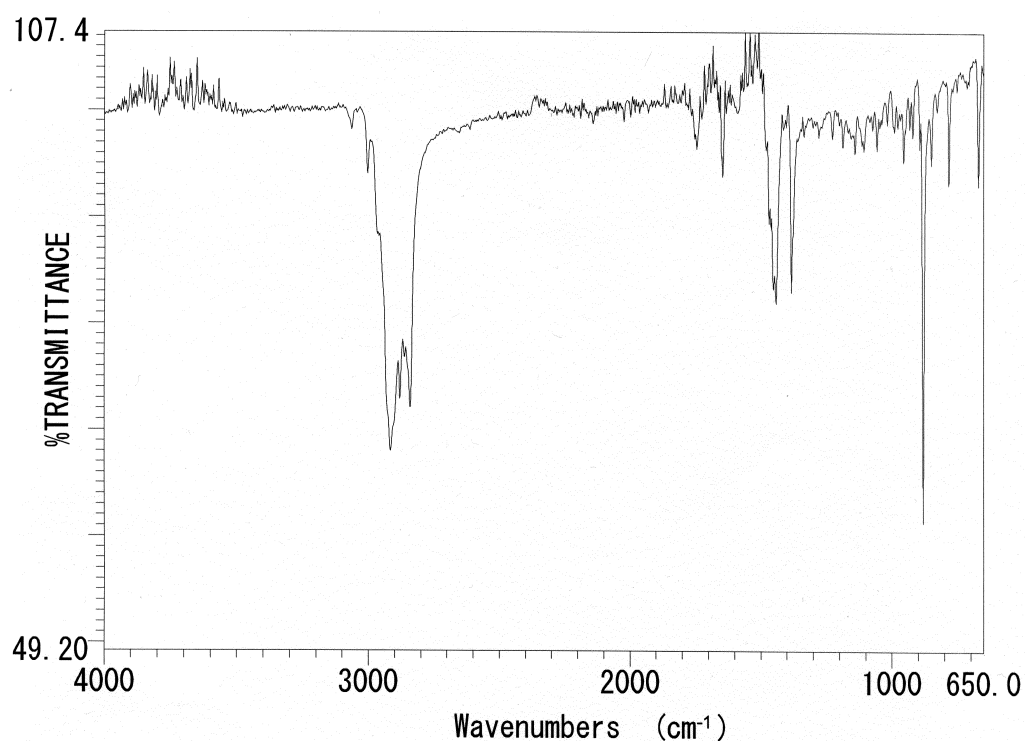
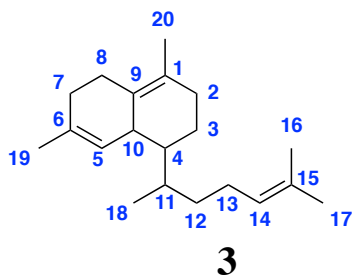
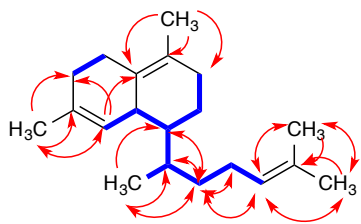
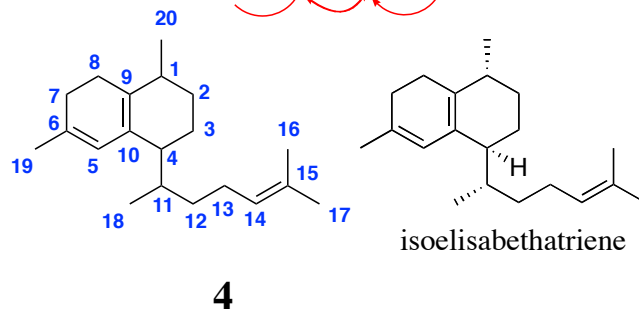
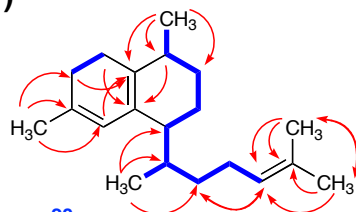


図3-16. Isoelisabethatriene BのIRデータ

(C)



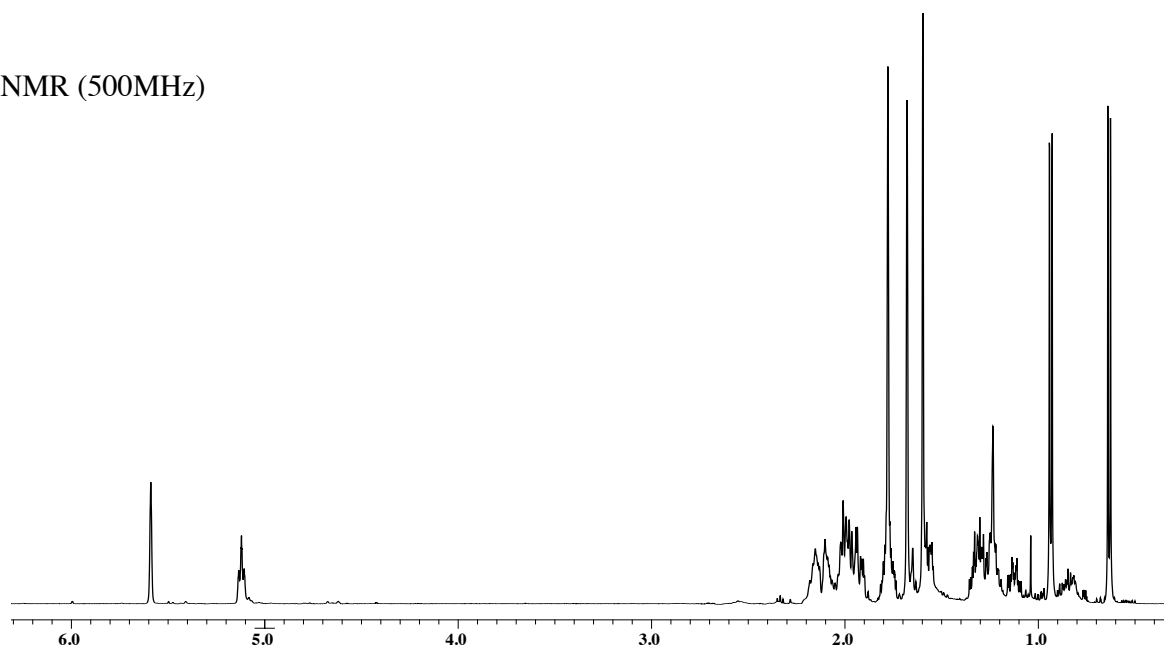
(D)

NMR chemical shifts in CDCl₃

3			4	
No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)
1	124.5	-	33.7	2.15 (1H, m)
2	32.4	1.92 (1H, m), 1.89 (1H, m)	31.1	1.13 (1H, m), 1.80 (1H, m)
3	21.5	1.53 (1H, m), 1.17 (1H, m)	20.6	1.31 (1H, m), 1.58 (1H, m)
4	43.2	1.16 (1H, m)	40.5	2.10 (1H, m)
5	124.4	5.40 (1H, d, $J = 5.5$ Hz))	122.0	5.59 (1H, s)
6	134.2	-	132.6	-
7	31.9	1.98 (1H, m), 1.83 (1H, m)	28.8	1.91 (2H, m)
8	26.7	2.70 (2H, ddd, $J = 12.9, 4.5, 2.5$)	26.5	2.02 (1H, m), 2.17 (1H, m)
9	130.0	-	133.2	-
10	39.2	2.53 (1H, m)	129.7	-
11	31.5	1.94 (1H, m)	34.1	1.79 (1H, m)
12	35.8	1.30 (2H, m)	35.3	1.24 (1H, m), 1.32 (1H, m)
13	26.2	2.01 (1H, m), 1.96 (1H, m)	27.0	1.96 (2H, m)
14	124.9	5.11 (1H, t, $J = 7.0$)	125.1	5.12 (1H, t, $J = 7.1$)
15	131.2	-	131.1	-
16	18.0	1.60 (3H, s)	17.8	1.61 (3H, s)
17	25.7	1.69 (3H, s)	25.9	1.68 (3H, s)
18	13.9	0.77 (3H, d, $J = 6.8$)	14.7	0.64 (3H, d, $J = 7.8$)
19	23.5	1.66 (3H, s)	23.2	1.79 (3H, s)
20	18.5	1.64 (3H, s)	19.1	0.94 (3H, d, $J = 7.8$)

図3-17. *sclav_p0765*形質転換株が生産したisobethatriene B (C; **3**)およびisobethatriene (D; **4**)の構造

^1H NMR (500MHz)



^{13}C NMR (125MHz)

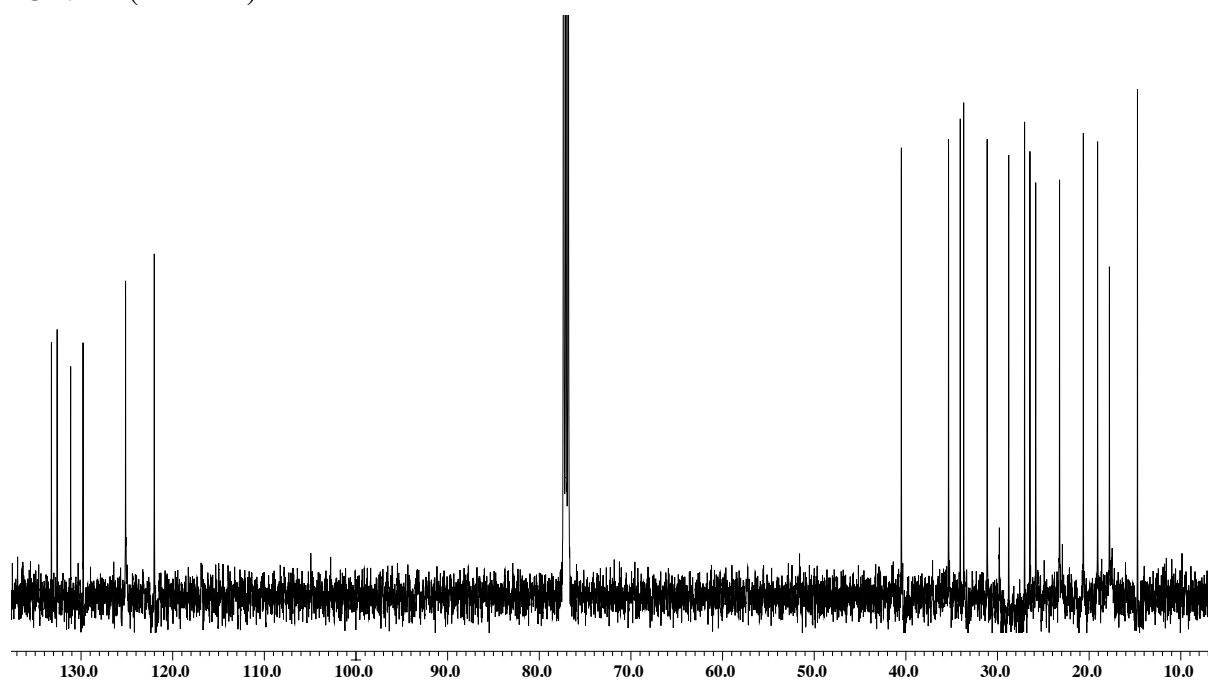


図3-18. Isoelisabethatrieneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

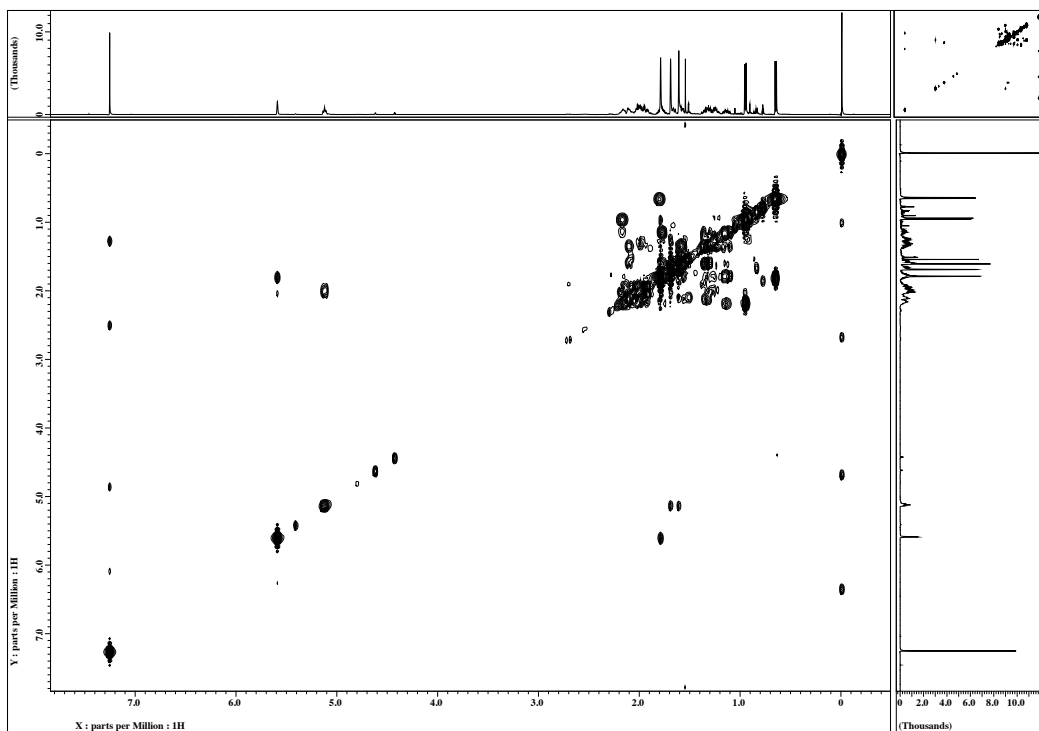


図3-19. Isoelisabethatrieneの ^1H - ^1H COSYデータ

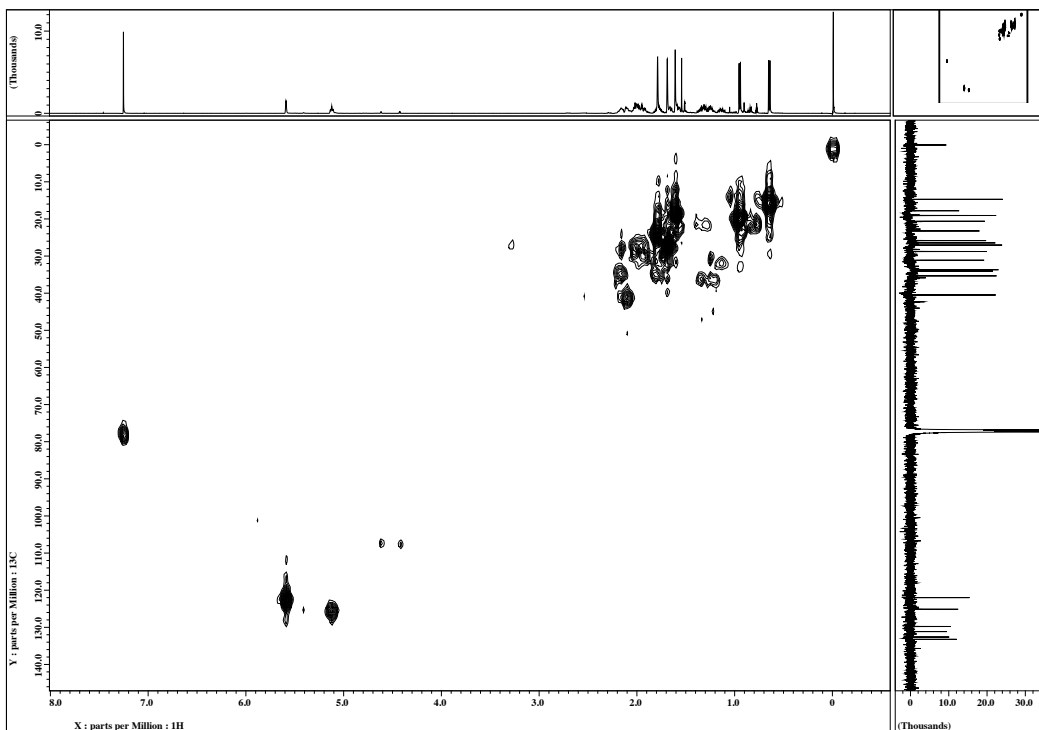


図3-20. Isoelisabethatrieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

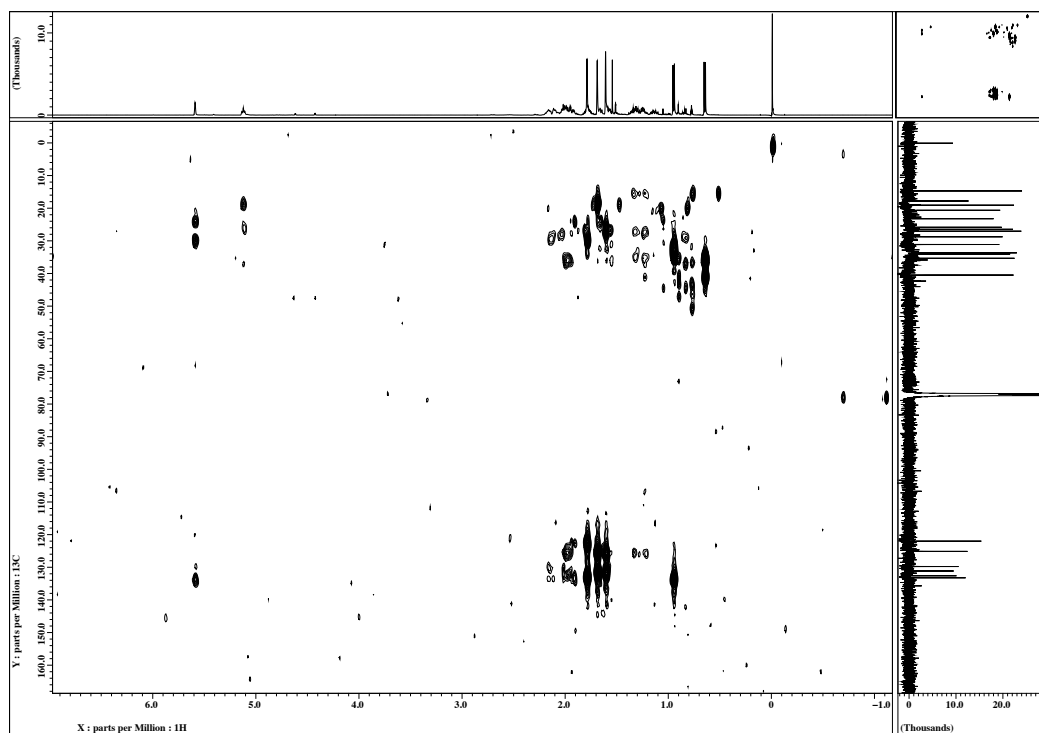
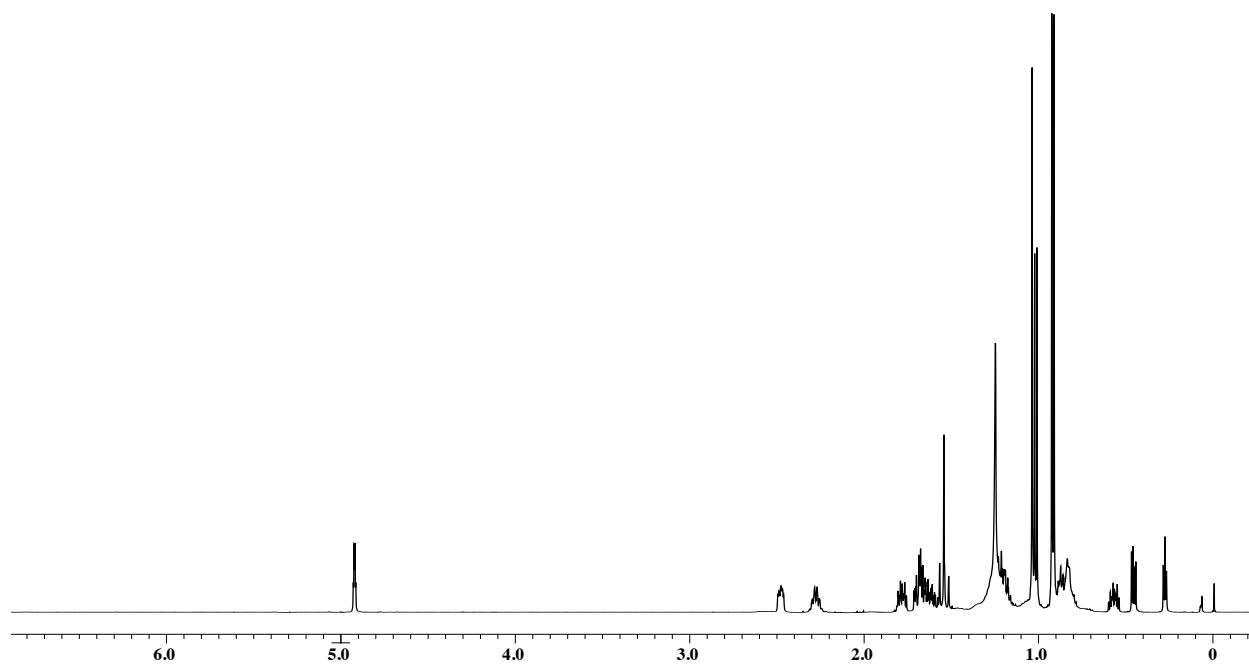


図3-21. Isoelisabethatrieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

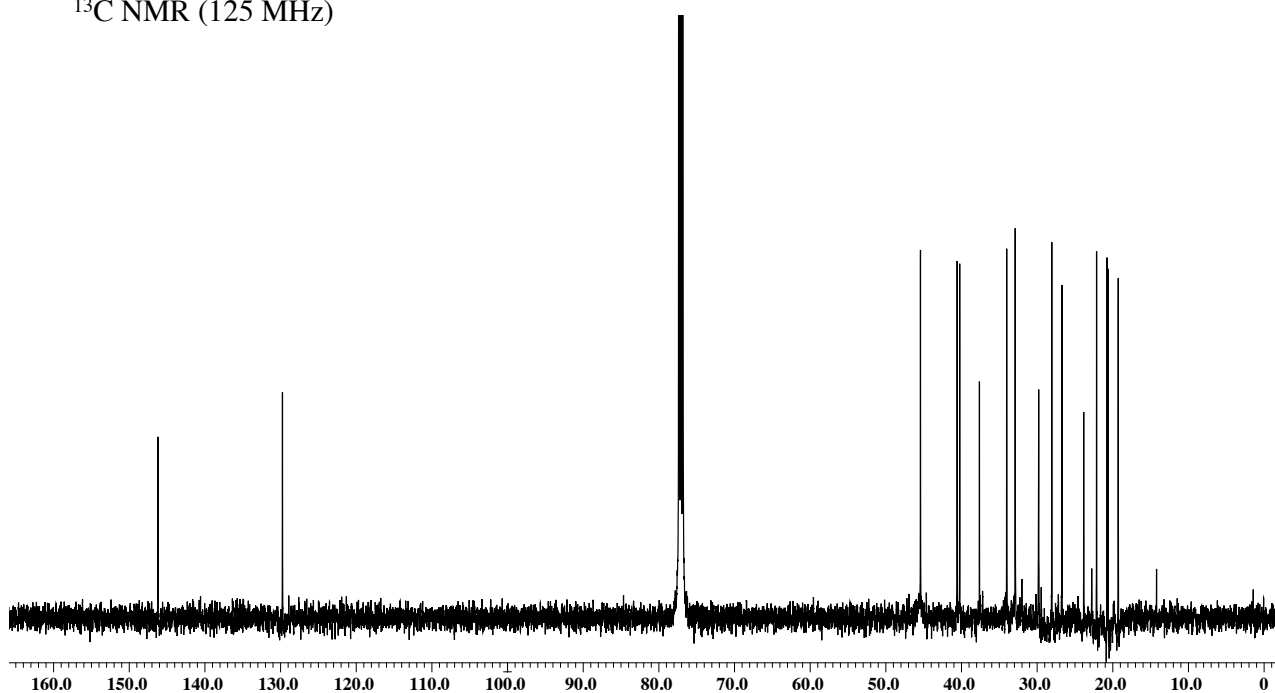


図3-22. African-2-eneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

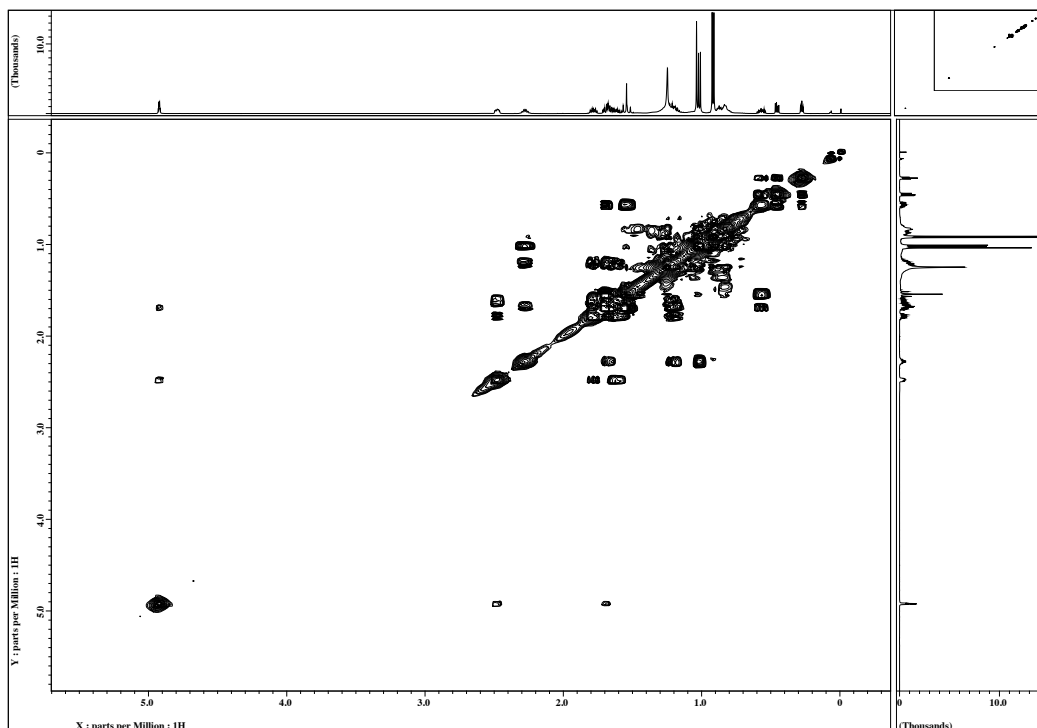


図3-23. African-2-eneの ^1H - ^1H COSYデータ

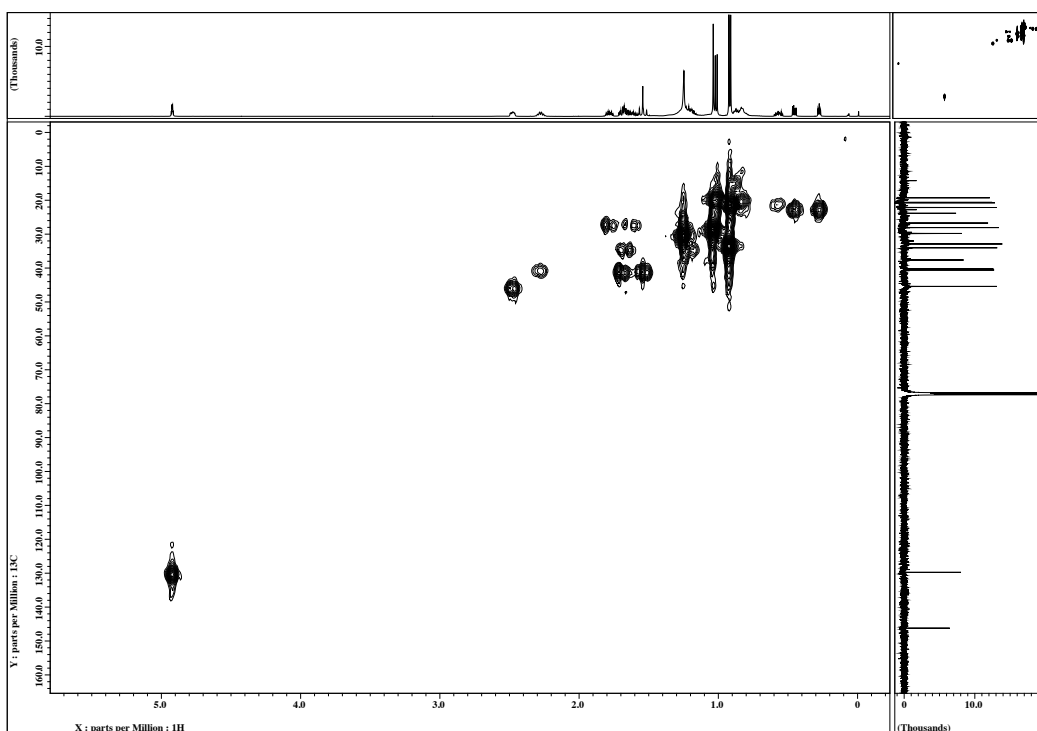


図3-24. African-2-eneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

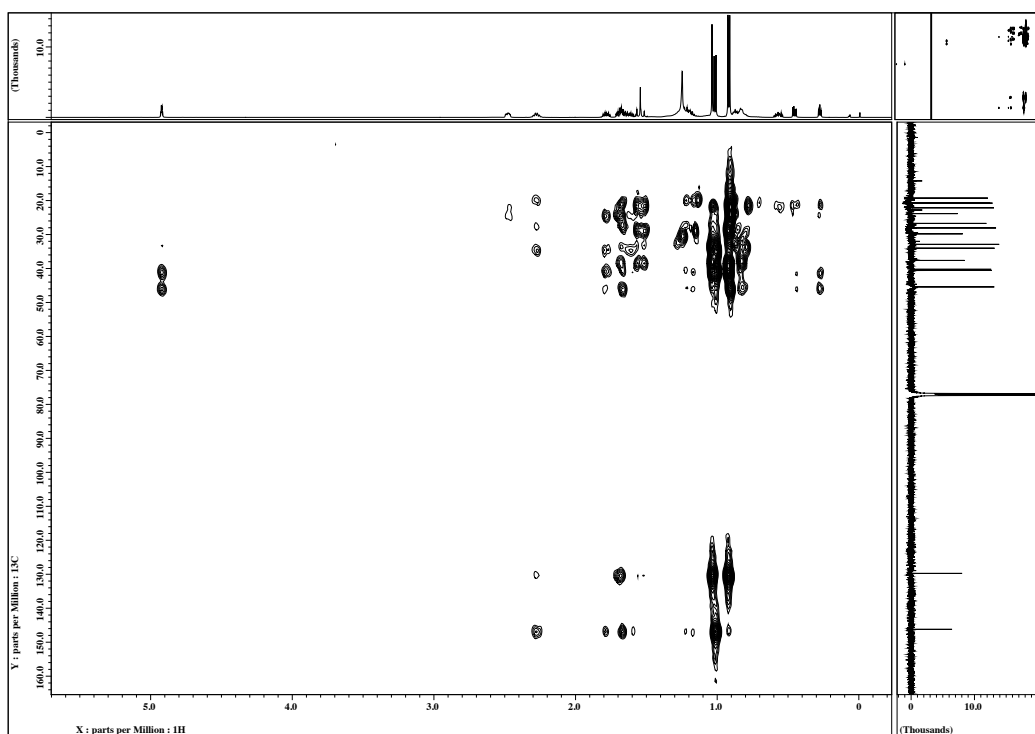
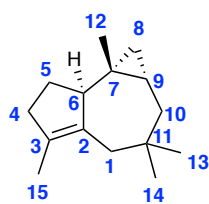
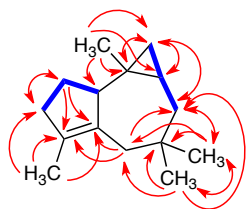
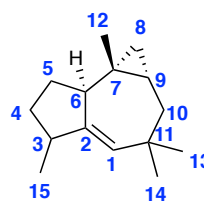
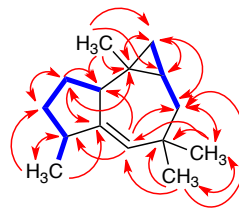


図3-25. African-2-eneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

(A)

**5**

(B)

**6**NMR chemical shifts in CDCl₃

5			6		
No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)	
1	43.0	2.23 (1H, s), 1.80 (1H, s)	129.6	4.93 (1H, quin, $J=2.4$)	
2	136.2	—	146.2	—	
3	132.1	—	40.1	2.27 (1H, m)	
4	37.7	2.33 (1H, m), 2.09 (1H, m)	33.9	1.67 (1H, m), 1.20 (1H, m)	
5	26.4	1.82 (2H, m)	26.7	1.78 (1H, m), 1.60 (1H, m)	
6	53.5	2.12 (1H, m)	45.4	2.48 (1H, m)	
7	20.5	—	23.8	—	
8	22.7	0.49 (dd, 1H, $J=8.0, 4.5$), 0.15 (1H, t, $J=4.4$)	22.1	0.45 (dd, 1H, $J=8.0, 4.5$), 0.27 (1H, t, $J=4.5$)	
9	21.9	0.45 (1H, m)	20.6	0.57 (1H, m)	
10	42.5	1.72 (1H, brd, $J=13.7$), 1.09 (1H, dd, $J=13.7, 10.8$)	40.5	1.68 (1H, m), 1.54 (1H, m)	
11	34.6	—	37.5	—	
12	20.5	0.86 (3H, s)	20.7	0.91 (3H, s)	
13	32.2	0.88 (3H, s)	32.9	0.92 (3H, s)	
14	26.3	0.91 (3H, s)	28.0	1.04 (3H, s)	
15	13.7	1.62 (3H, s)	19.2	1.01 (3H, d, $J=7.0$)	

図3-26. *sclav_p0985*形質転換株が生産したafrican-2-ene (A; **5**)およびafrican-1-ene (B; **6**)の構造

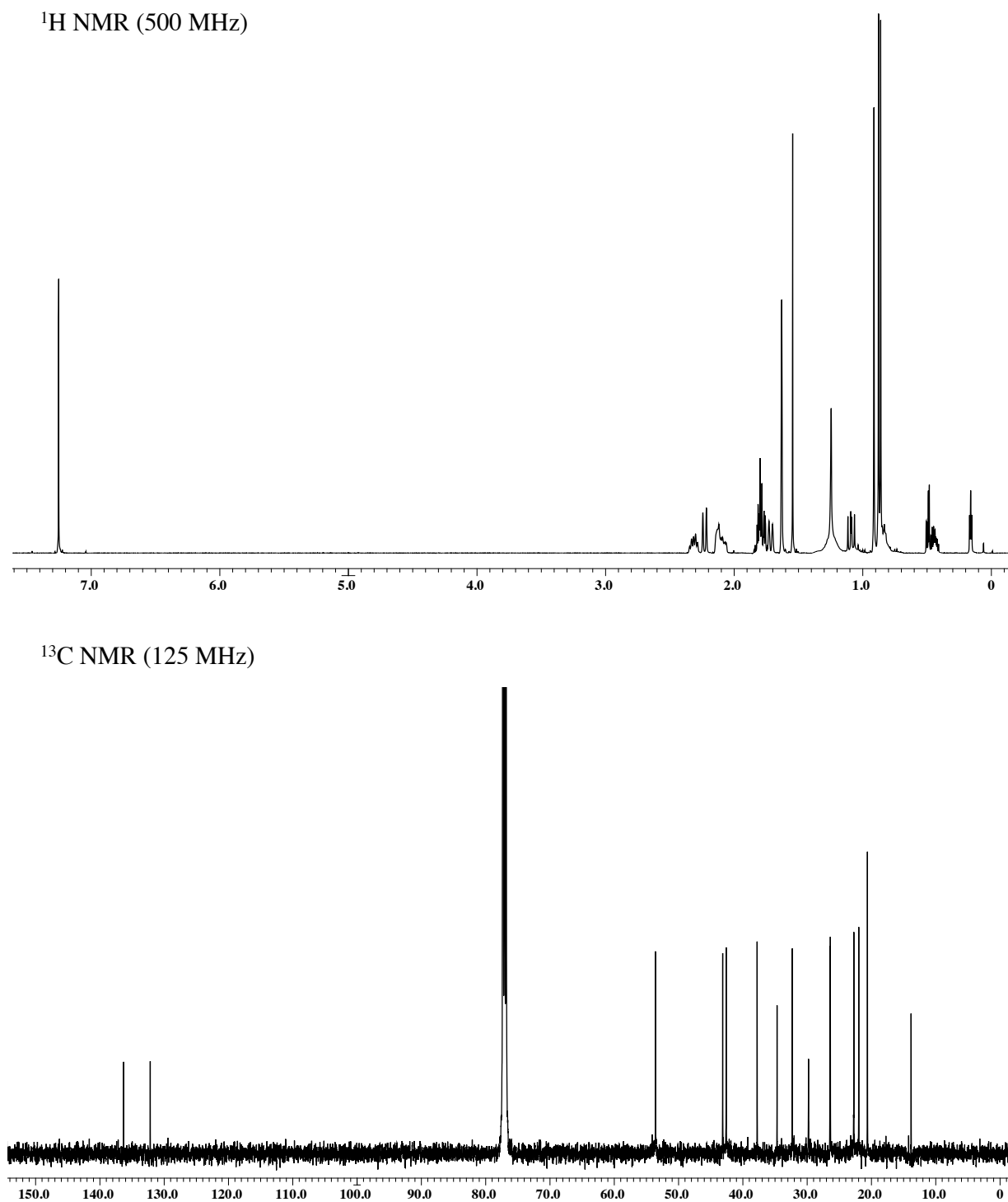


図3-27. African-1-eneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

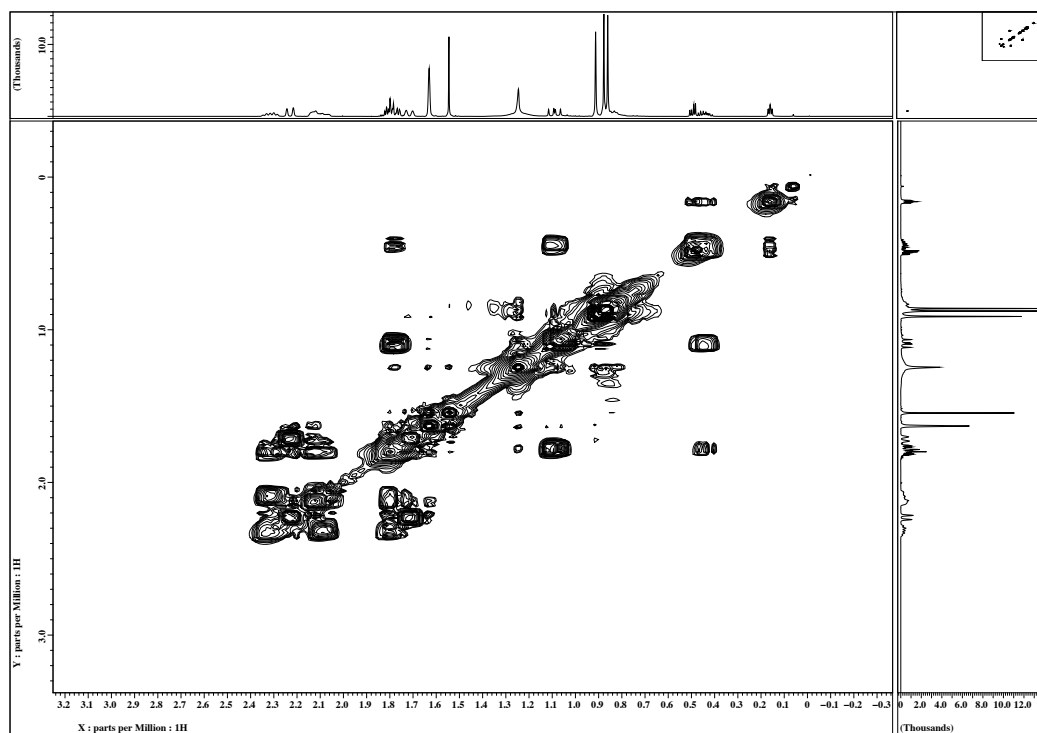


図3-28. African-1-eneの ^1H - ^1H COSYデータ

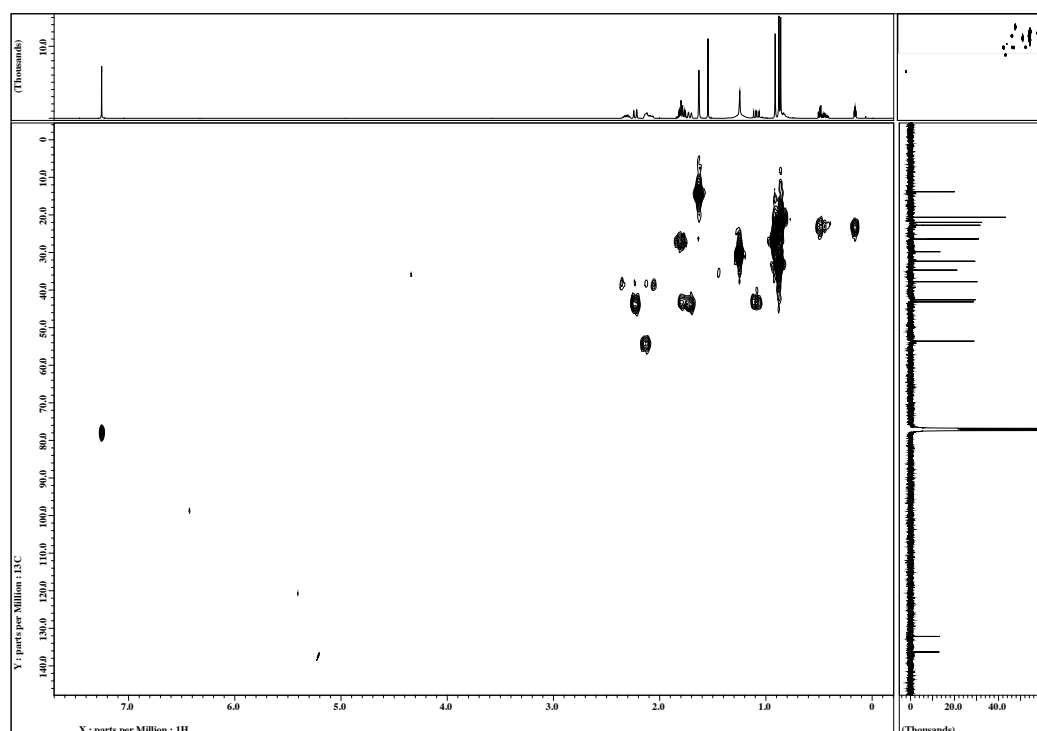


図3-29. African-1-eneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

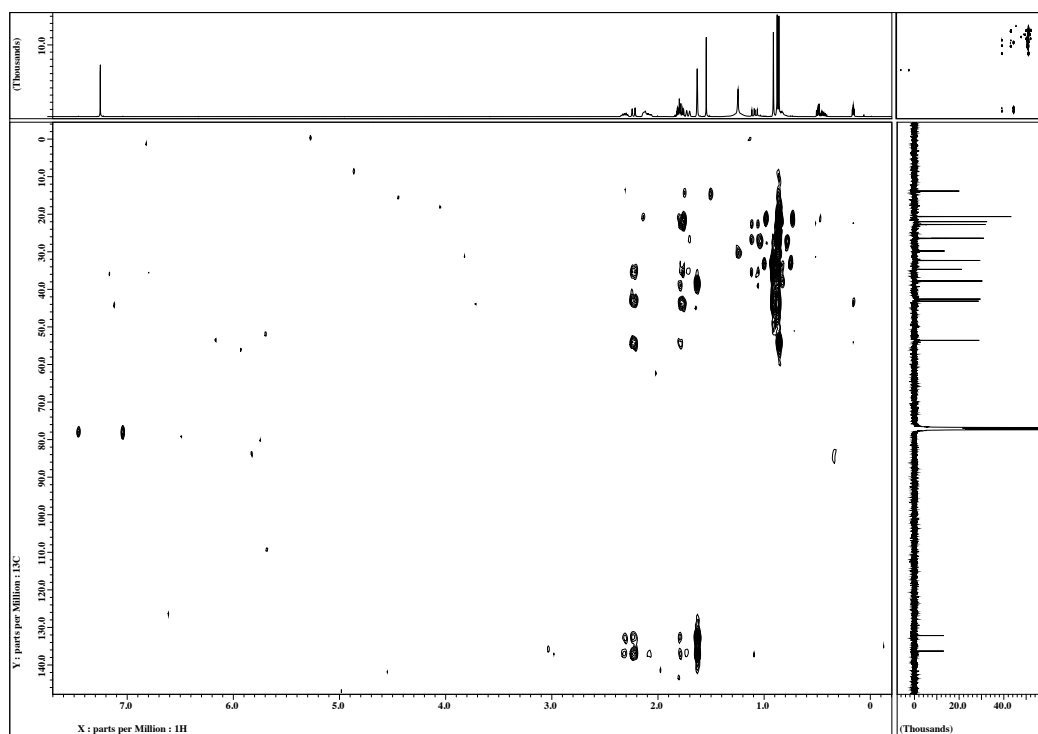
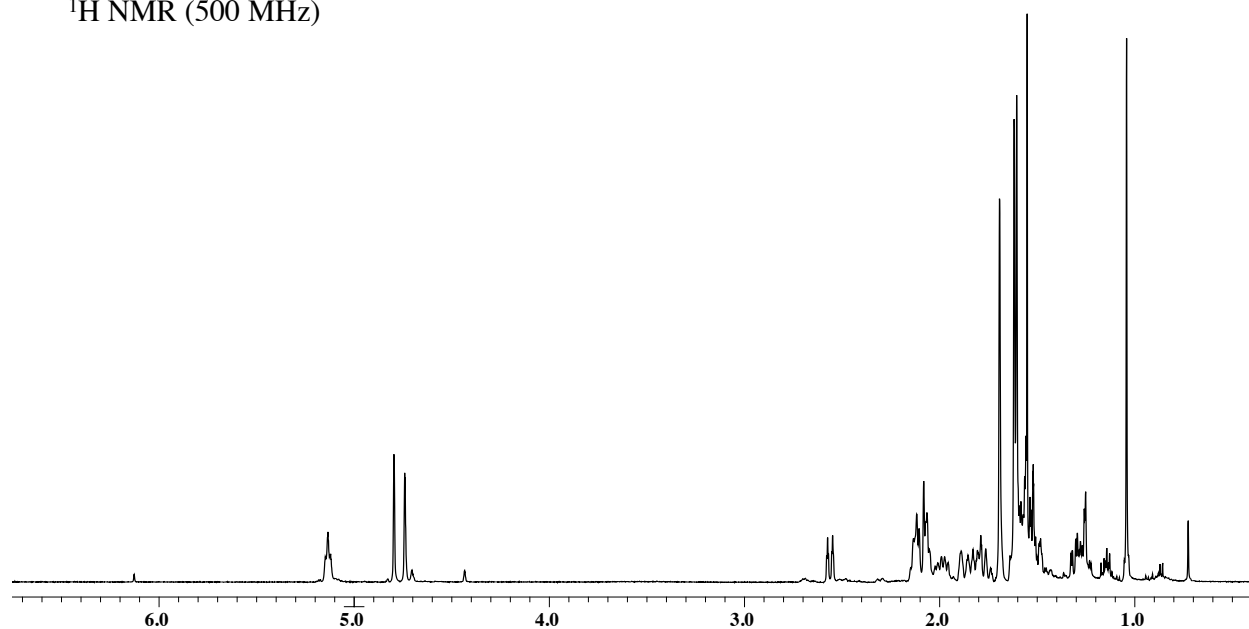


図3-30. African-1-eneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

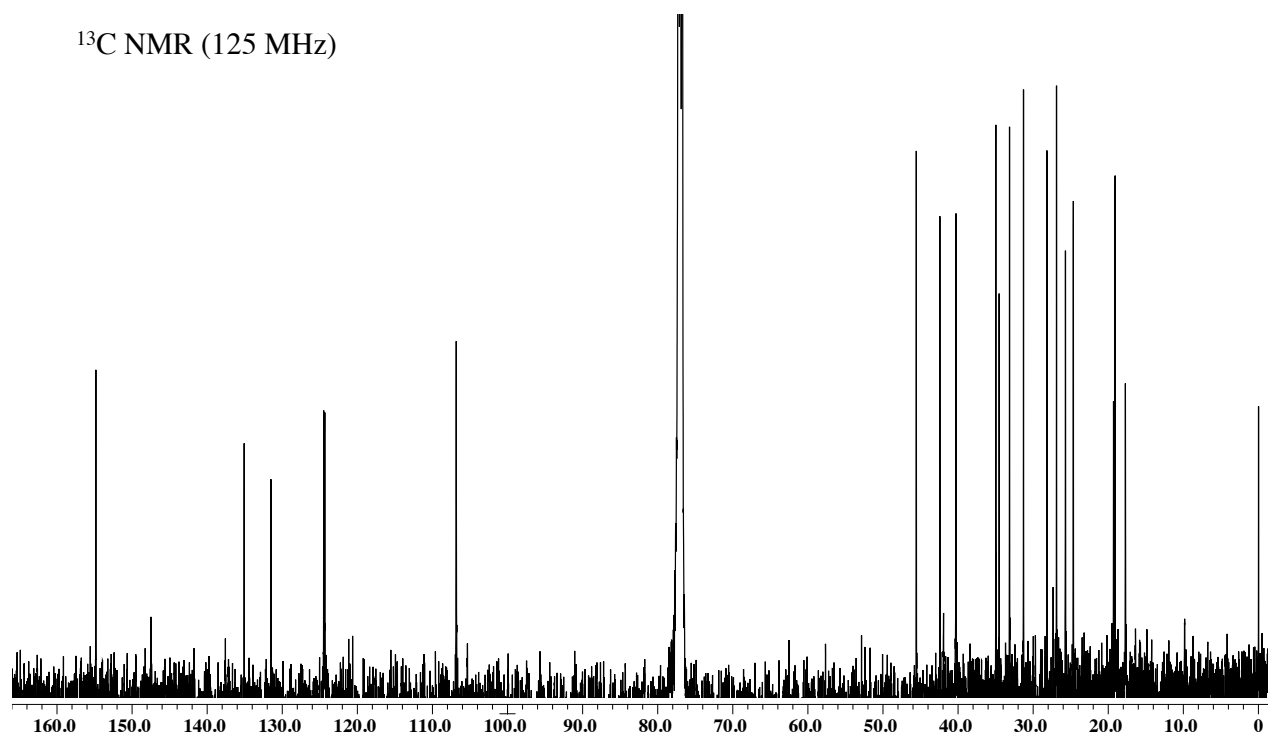


図3-31. Clavulatriene Aの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

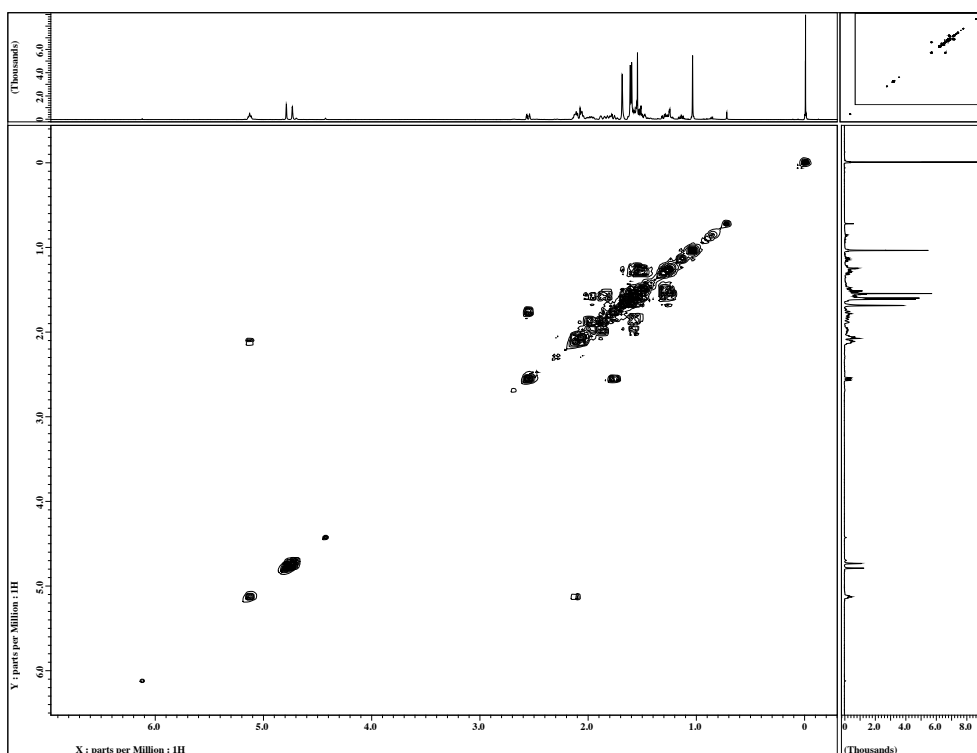


図3-32. Clavulatriene Aの ^1H - ^1H COSYデータ

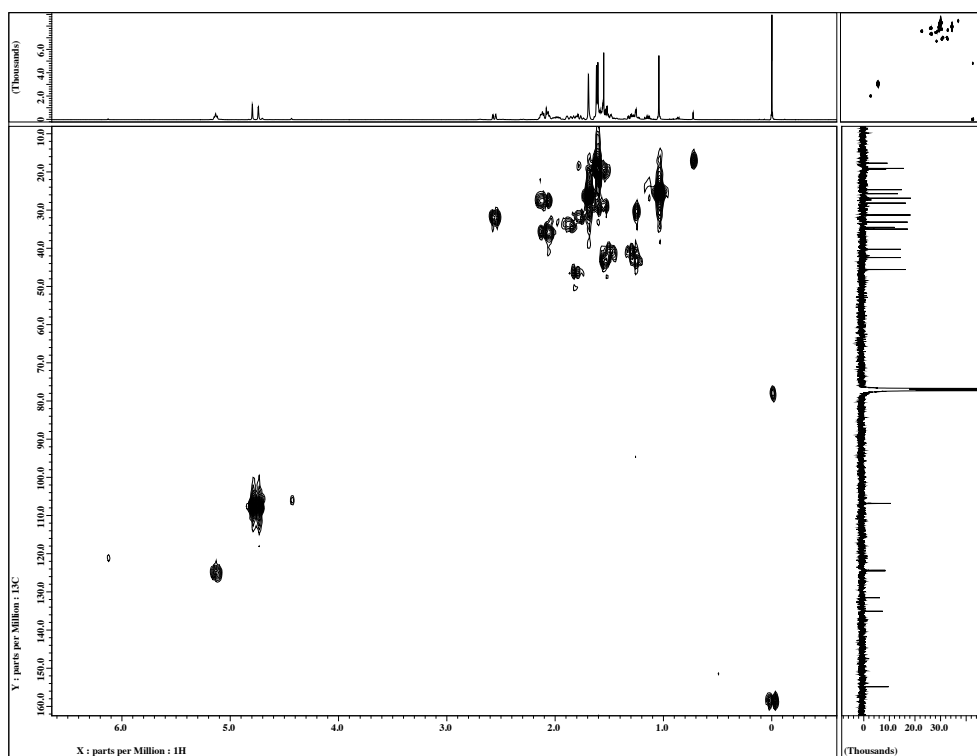


図3-33. Clavulatriene Aの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

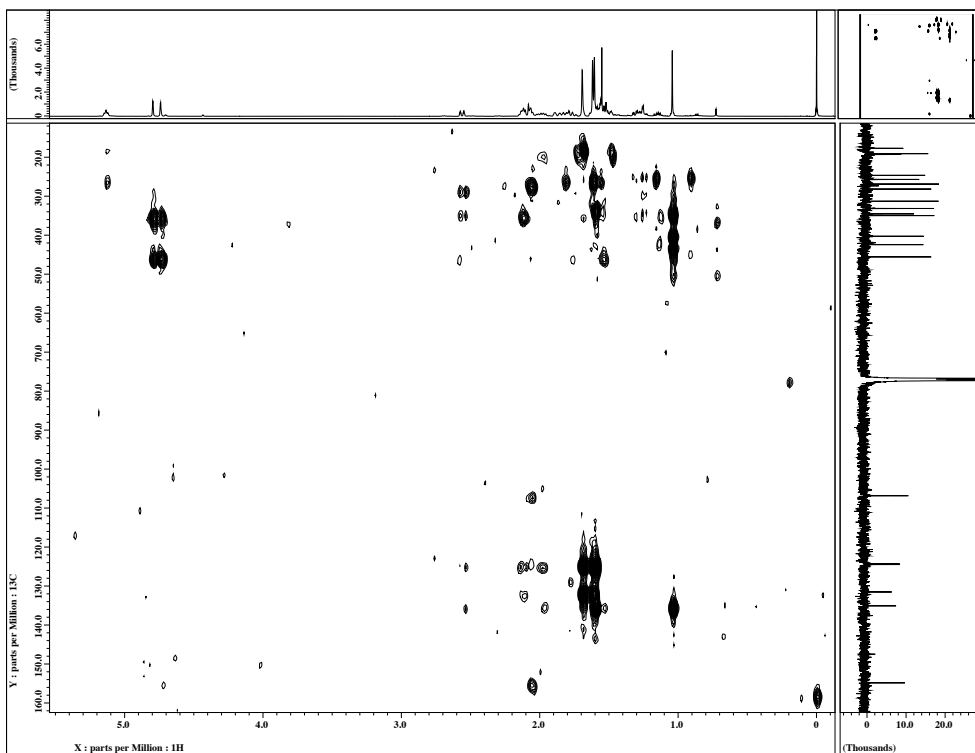


図3-34. Clavulatriene Aの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

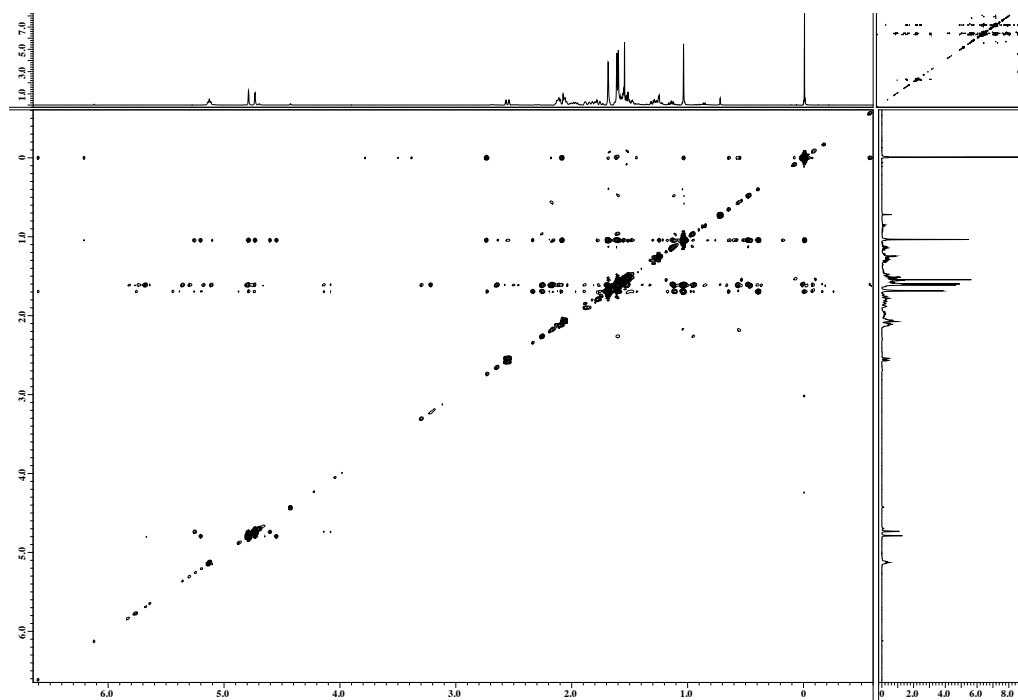


図3-35. Clavulatriene Aの ^1H - ^1H NOESYデータ

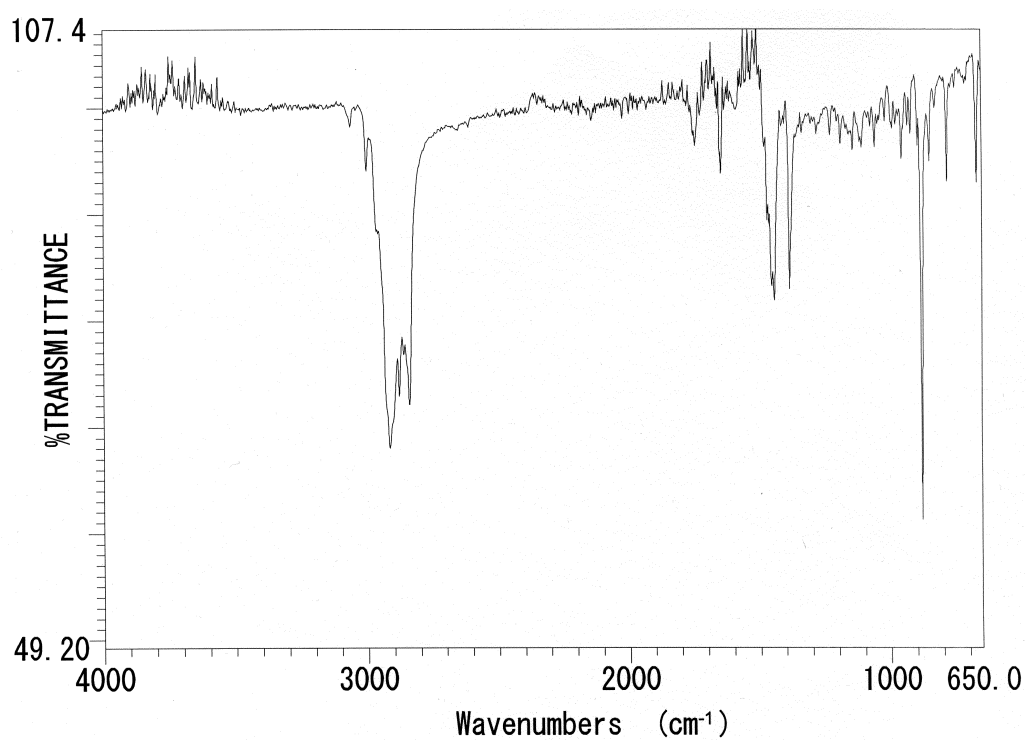
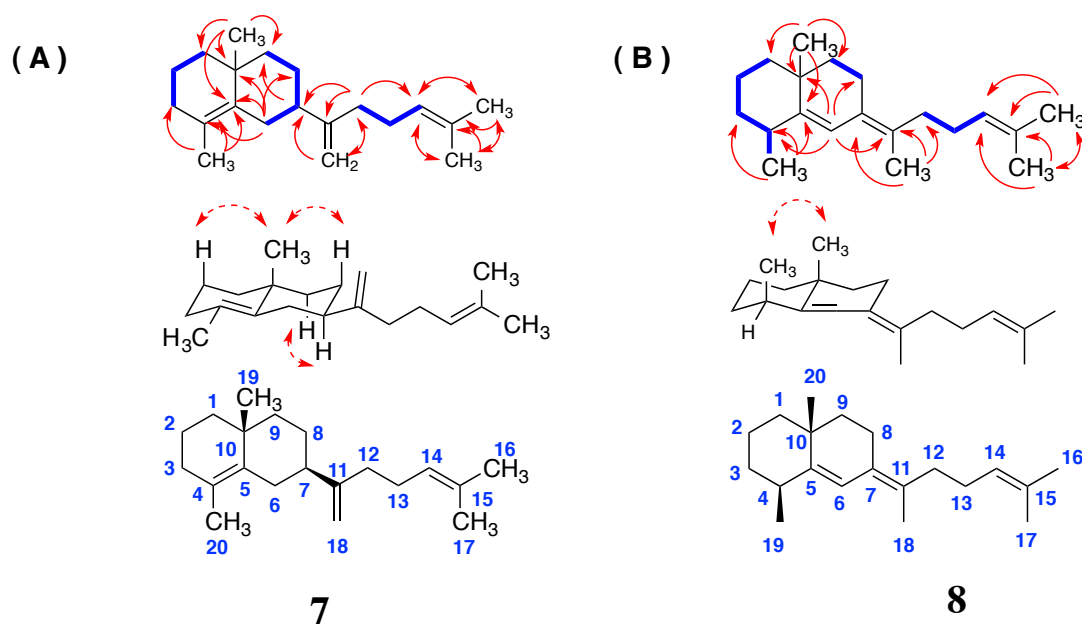


図3-36. Clavulatriene AのIRデータ



NMR chemical shifts in CDCl_3

7			8		
No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)	
1	42.4	1.26 (1H, m), 1.55 (1H, m)	41.7	1.15 (1H, m), 1.53 (1H, m)	
2	19.1	1.55 (2H, m)	17.5	1.47 (1H, m), 1.54 (1H, m)	
3	33.2	33.2 (2H, m)	33.2	1.55 (2H, m)	
4	124.5	-	38.2	2.50 (1H, m)	
5	135.1	-	148.5	-	
6	31.3	2.55 (2H, d, $J=7.4$), 1.74 (1H, m)	120.8	6.12 (1H, s)	
7	45.6	1.80 (1H, m)	128.5	-	
8	28.2	1.54 (1H, m), 1.63 (1H, m)	22.9	2.20 (1H, m), 2.48 (1H, m)	
9	40.3	1.28 (1H, m), 1.50 (1H, m)	41.5	1.35 (1H, m), 1.45 (1H, m)	
10	34.5	-	34.6	-	
11	154.8	-	128.4	-	
12	35.0	2.07 (2H, m)	34.9	2.01 (1H, m), 2.15 (1H, m)	
13	26.9	2.11 (2H, m)	26.7	2.02 (1H, m), 2.13 (1H, m)	
14	124.3	5.14 (1H, m)	124.5	5.14 (1H, m)	
15	131.5	-	131.7	-	
16	19.3	1.60 (3H, s)	25.7	1.67 (3H, s)	
17	24.7	1.04 (3H, s)	17.6	1.60 (3H, s)	
18	106.8	4.74 (1H, d, $J=1.6$), 4.80 (1H, brs)	17.7	1.78 (3H, d, $J=2.1$)	
19	25.7	1.69 (3H, s)	26.2	1.13 (3H, s)	
20	17.7	1.62 (3H, s)	23.3	1.15 (3H, d, $J=12.2$)	

図3-37. *sclav_p1169*形質転換株が生産したclavulatriene A (A; **7**)およびclavulatriene B (B; **8**)の構造

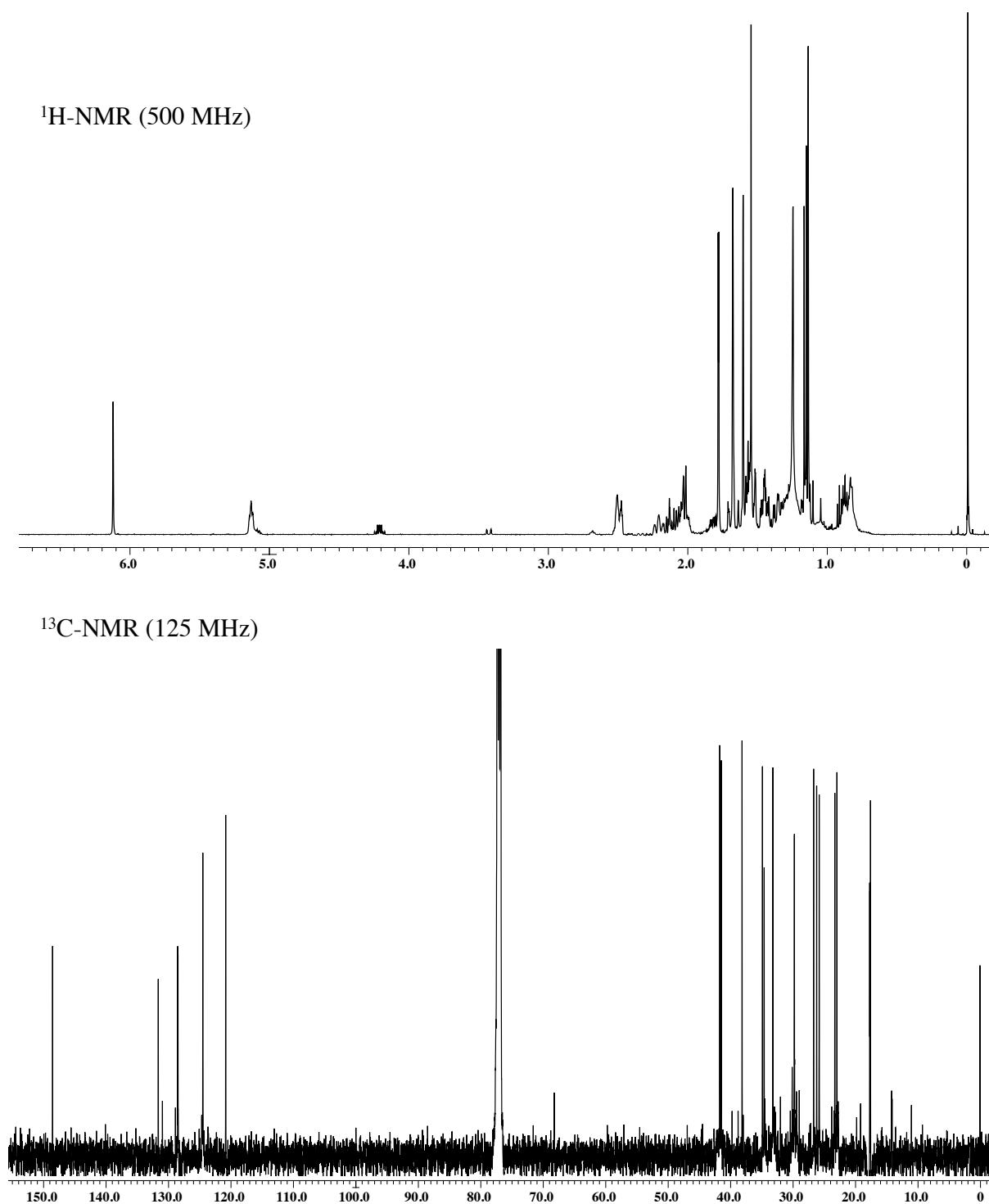


図3-38. Clavulatriene Bの重クロロホルム中における ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

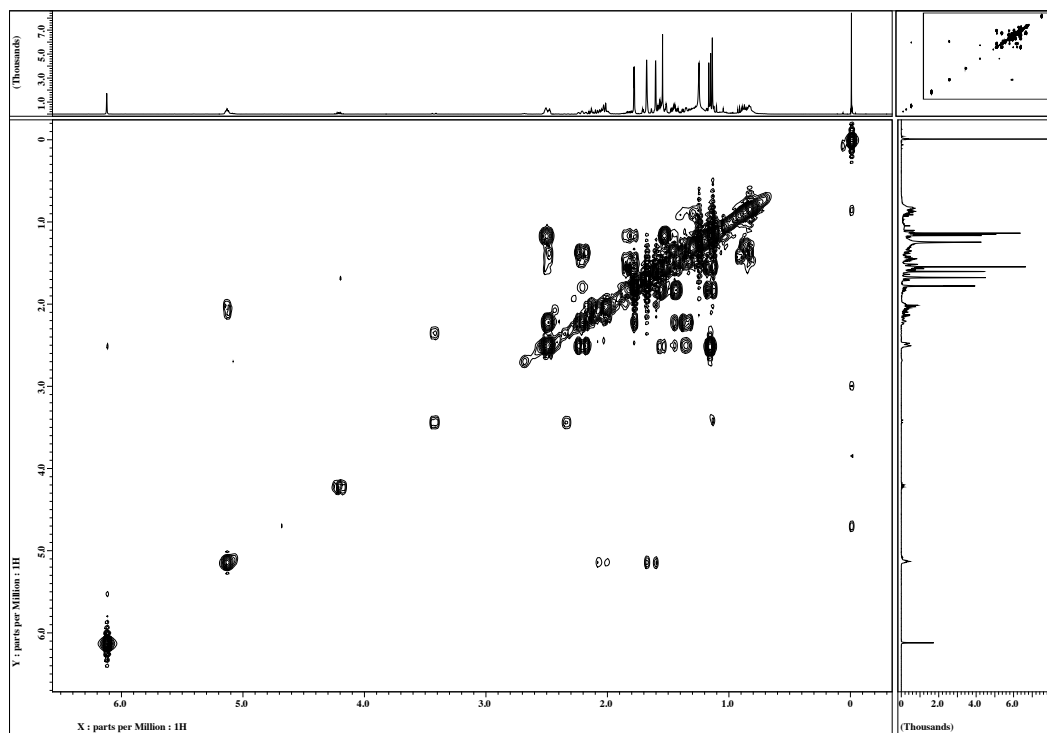


図3-39. Clavulatriene Bの ^1H - ^1H COSYデータ

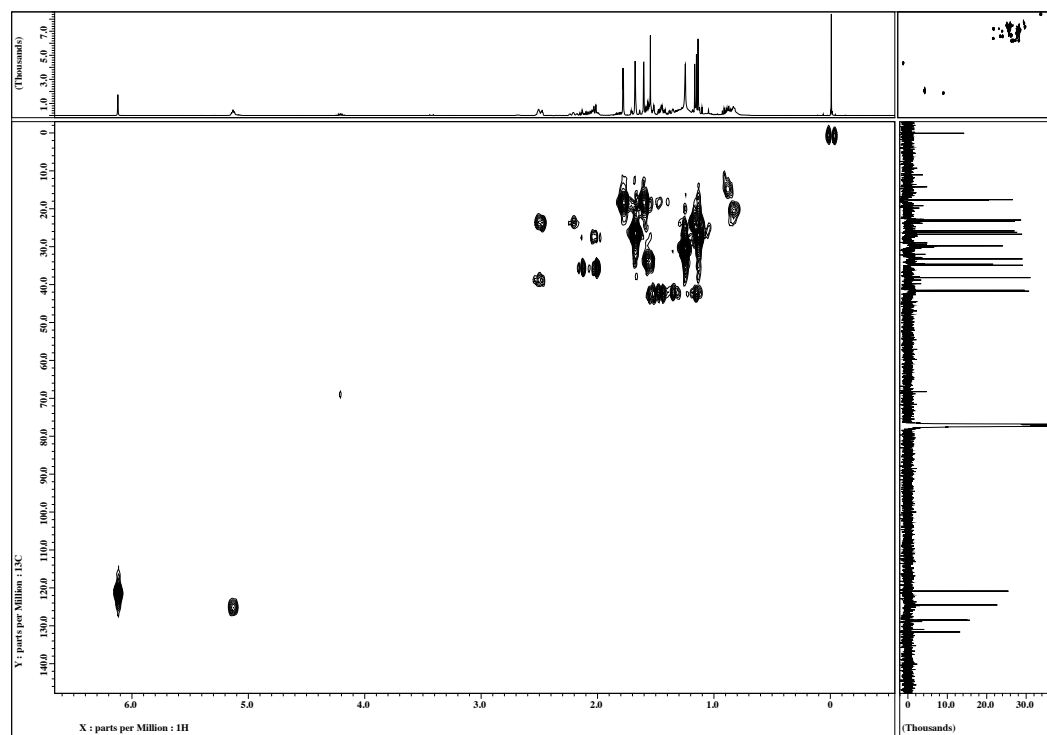


図3-40. Clavulatriene Bの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

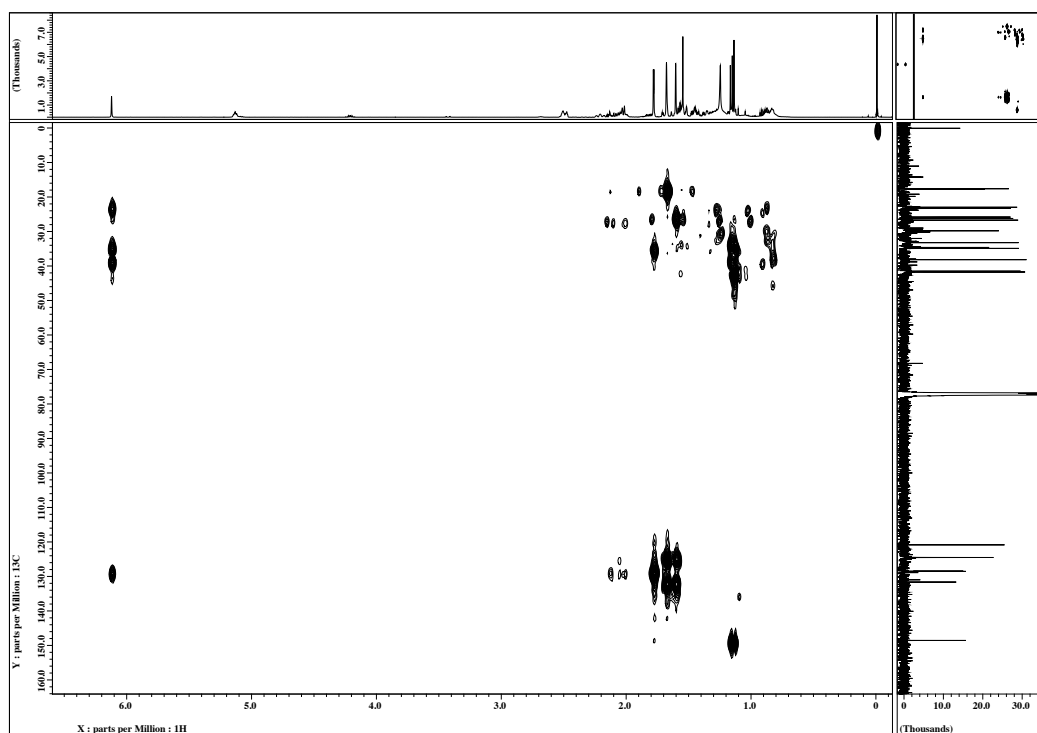


図3-41. Clavulatriene Bの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

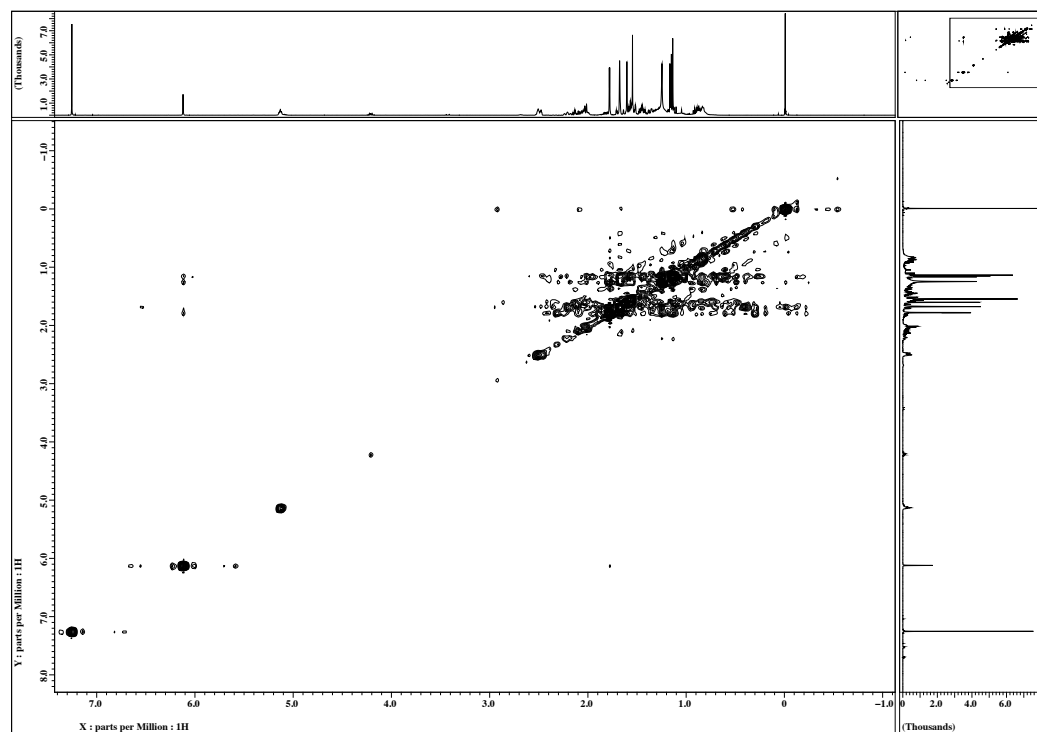


図3-42. Clavulatriene Bの ^1H - ^1H NOESYデータ

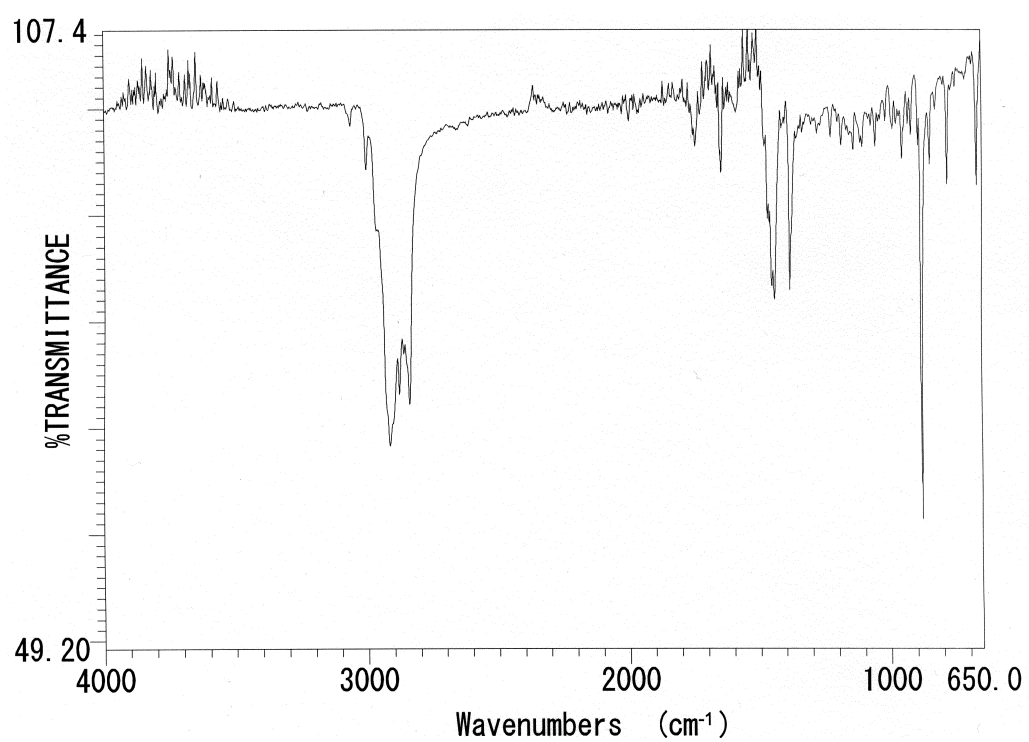
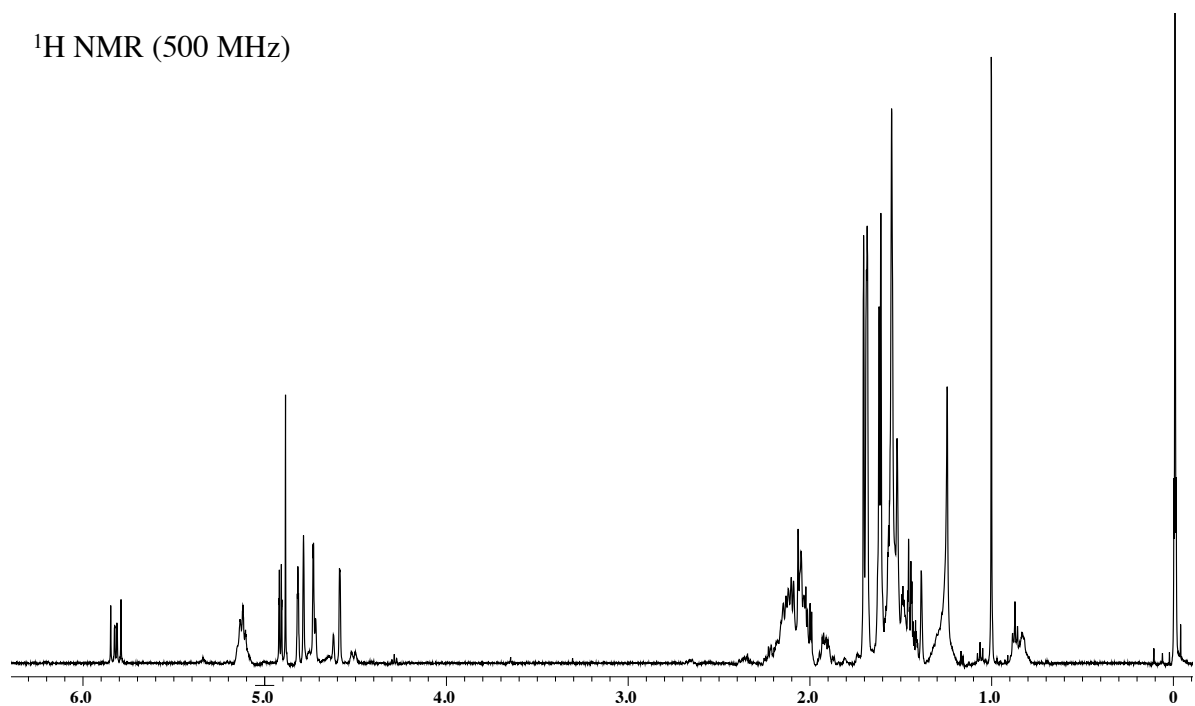


図3-43. Clavulatriene BのIRデータ

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

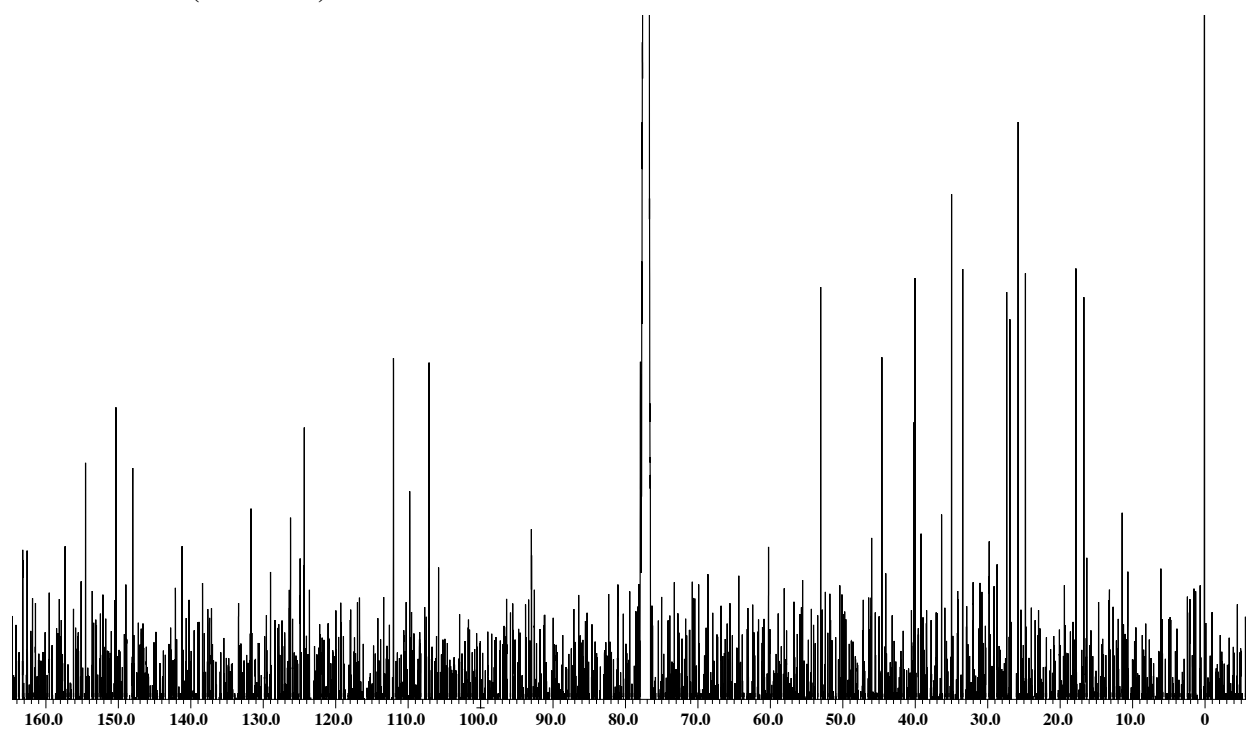


図3-44. Prenyl- β -elemeneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

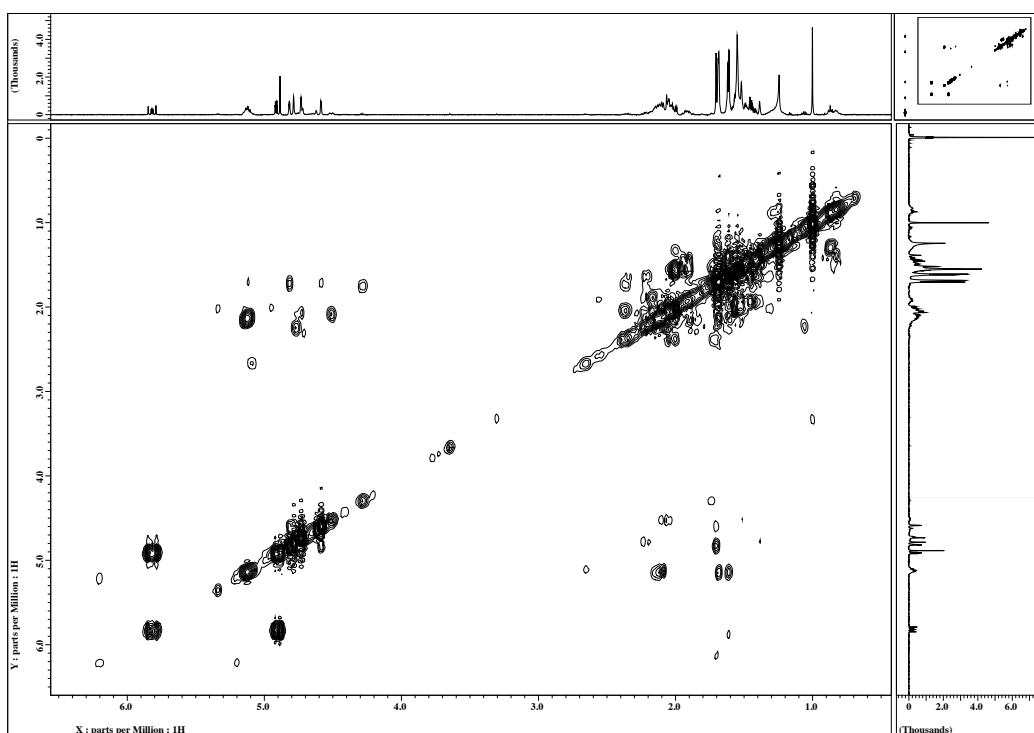


図3-45. Prenyl- β -elemeneの ^1H - ^1H COSYデータ

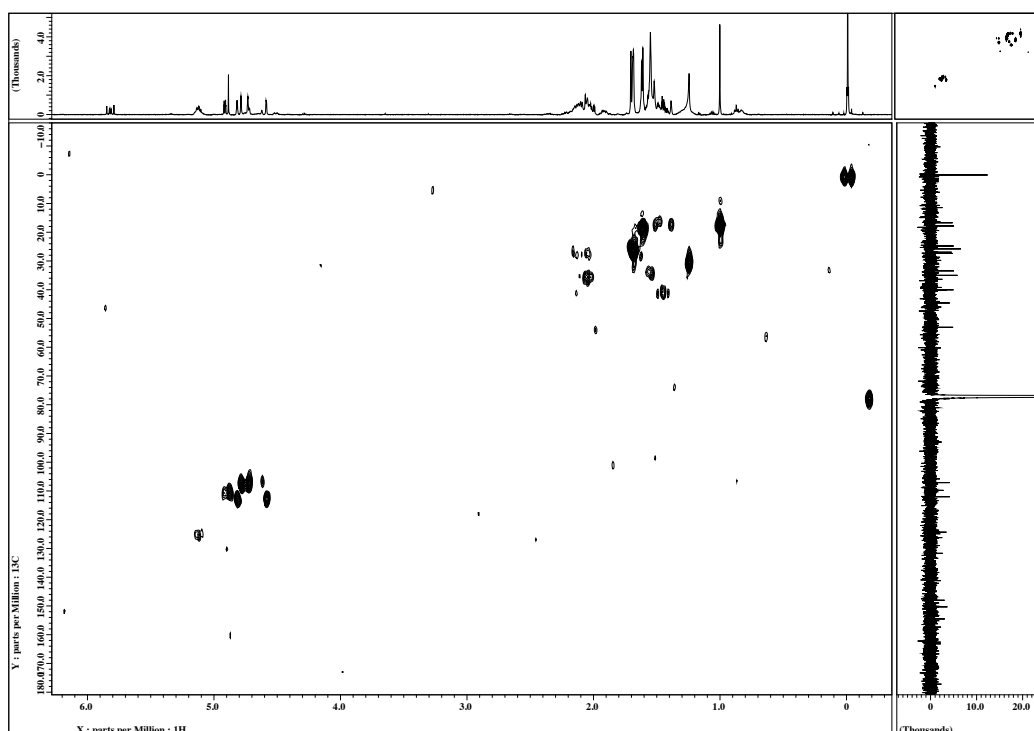


図3-46. Prenyl- β -elemeneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

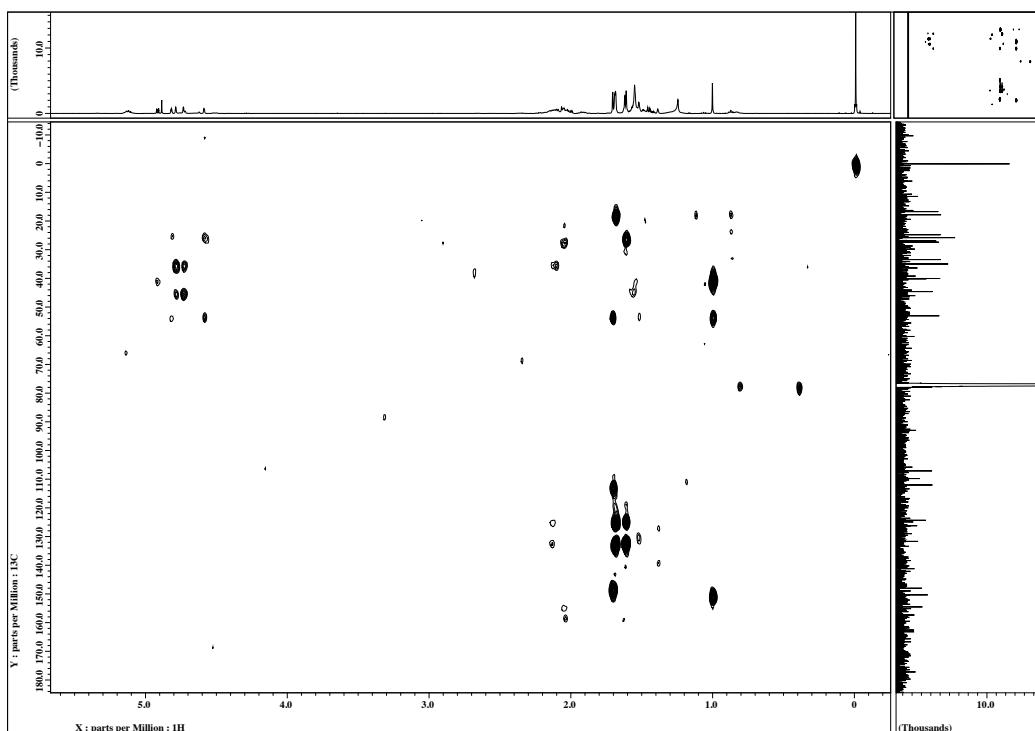


図3-47. Prenyl-β-elemeneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

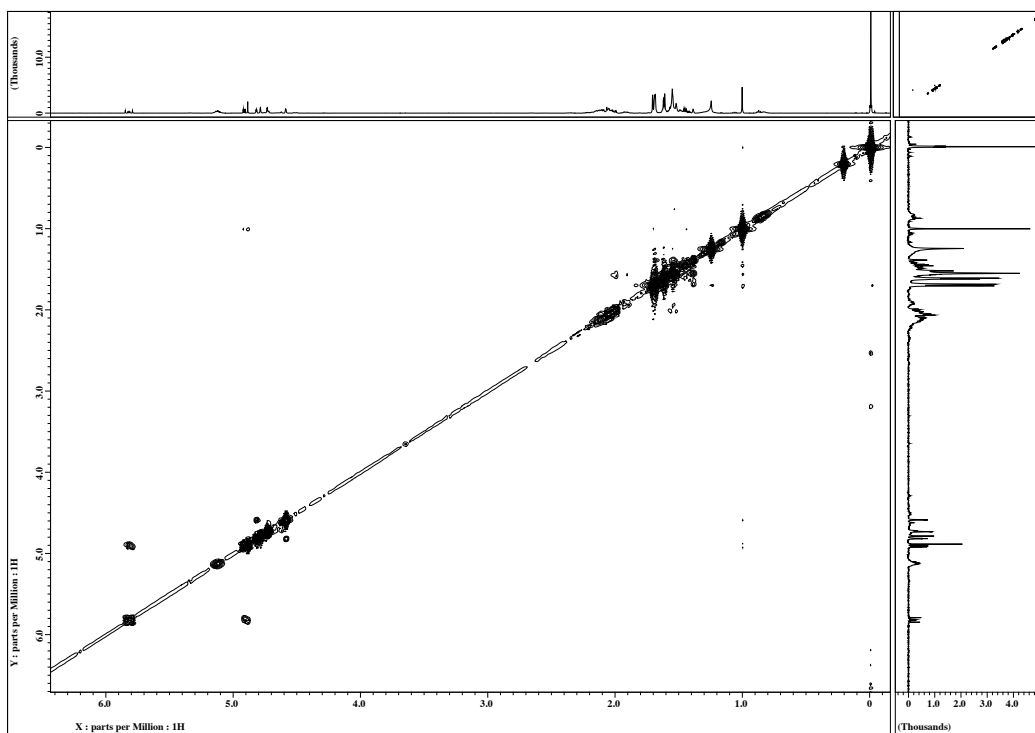


図3-48. Prenyl-β-elemeneの ^1H - ^1H NOESYデータ

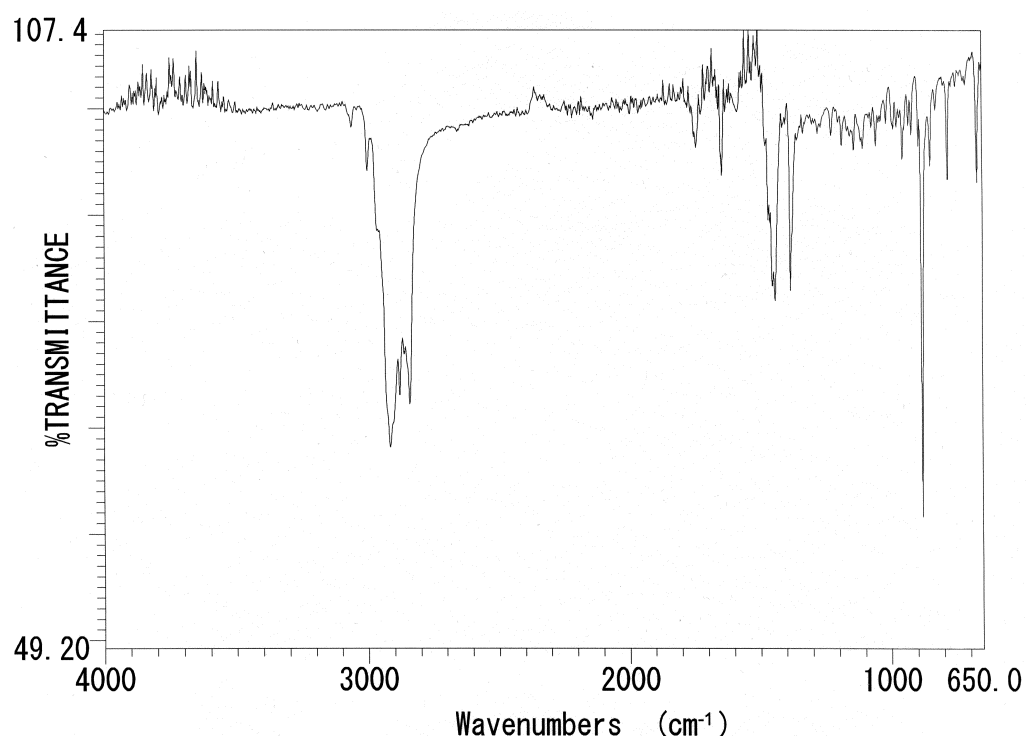
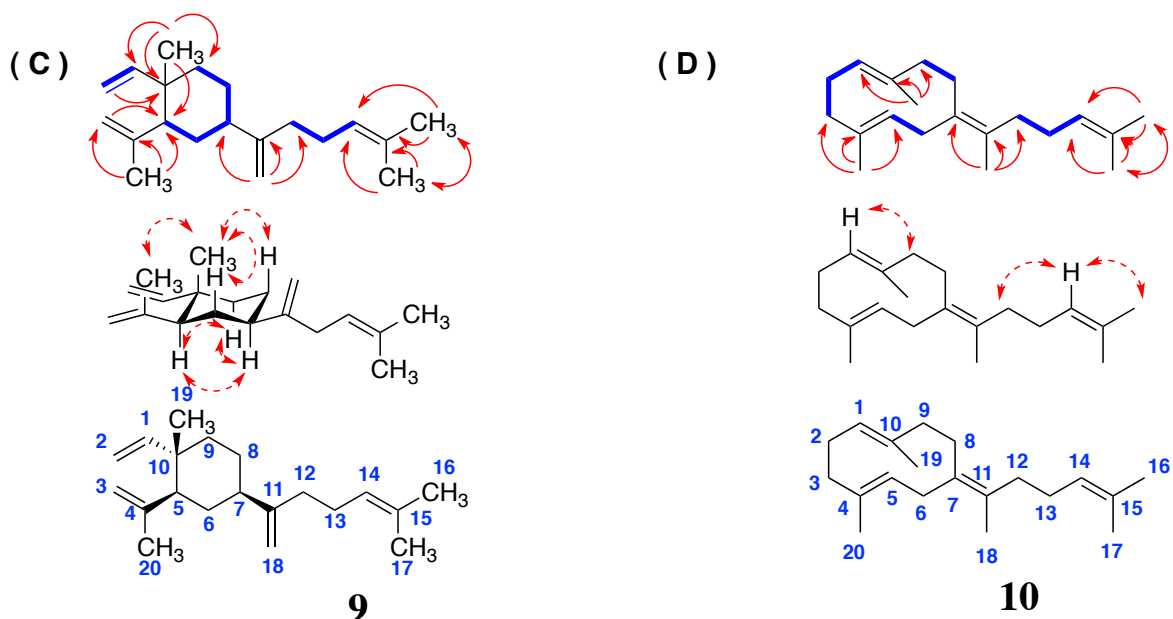


図3-49. Prenyl-β-elemeneのIRデータ

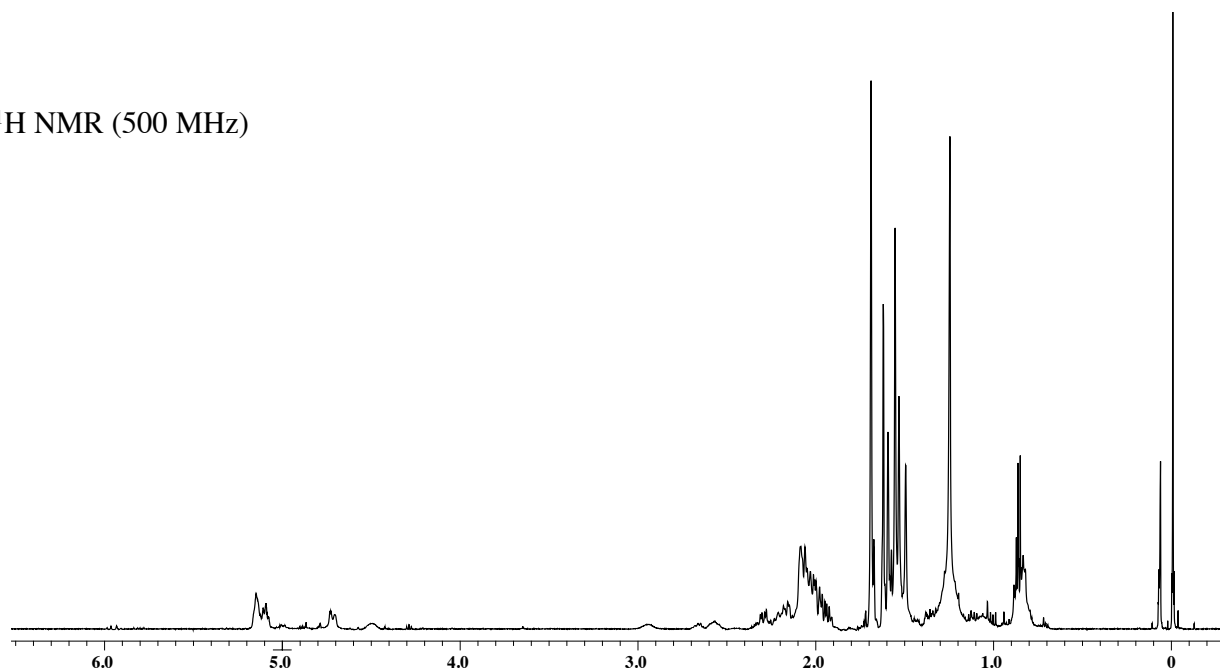


NMR chemical shifts in CDCl₃

9			10	
No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)
1	150.1	5.81 (1H, dd, $J=10.7, 17.7$)	128.4	4.71 (1H, m)
2	109.7	4.91 (1H, d, $J=17.5$), 4.89 (1H, s)	26.9	2.30 (1H, m), 2.08 (1H, m)
3	112.0	4.81 (1H, brs), 4.59 (1H, d, $J=1.2$)	39.0	2.18 (1H, m), 2.13 (1H, m)
4	147.8	-	135.8	-
5	52.8	1.99 (1H, m)	124.6	4.51 (1H, m)
6	33.3	1.57 (1H, m), 1.53 (1H, m)	28.4	2.00 (2H, m)
7	44.4	1.95 (1H, m)	124.7	-
8	26.8	1.62 (1H, m), 1.41 (1H, m)	39.8	1.90 - 2.00 (2H, m)
9	40.1	1.44 (1H, m), 1.41 (1H, m)	40.0	1.90 - 2.00 (2H, m)
10	40.0	-	131.4	-
11	154.5	-	131.7	-
12	34.9	2.06 (1H, m), 2.03 (1H, m)	34.7	2.08 (1H, m), 2.02 (1H, m)
13	27.3	2.11 (2H, m)	26.0	2.02 (2H, m)
14	124.2	5.13 (1H, m)	124.6	5.04 (1H, m)
15	131.6	-	131.6	-
16	25.7	1.68 (3H, s)	25.8	1.69 (3H, s)
17	17.7	1.61 (3H, s)	17.7	1.62 (3H, s)
18	107.0	4.79 (1H, brs), 4.72 (1H, brs)	18.0	1.68 (3H, s)
19	16.6	0.99 (3H, s)	16.4	1.58 (3H, s)
20	24.7	1.69 (3H, s)	16.1	1.53 (3H, s)

図3-50. *sclav_p1169*形質転換株が生産したprenyl- β -elemene (C; **9**)
およびprenylgermacrene B (D; **10**)の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

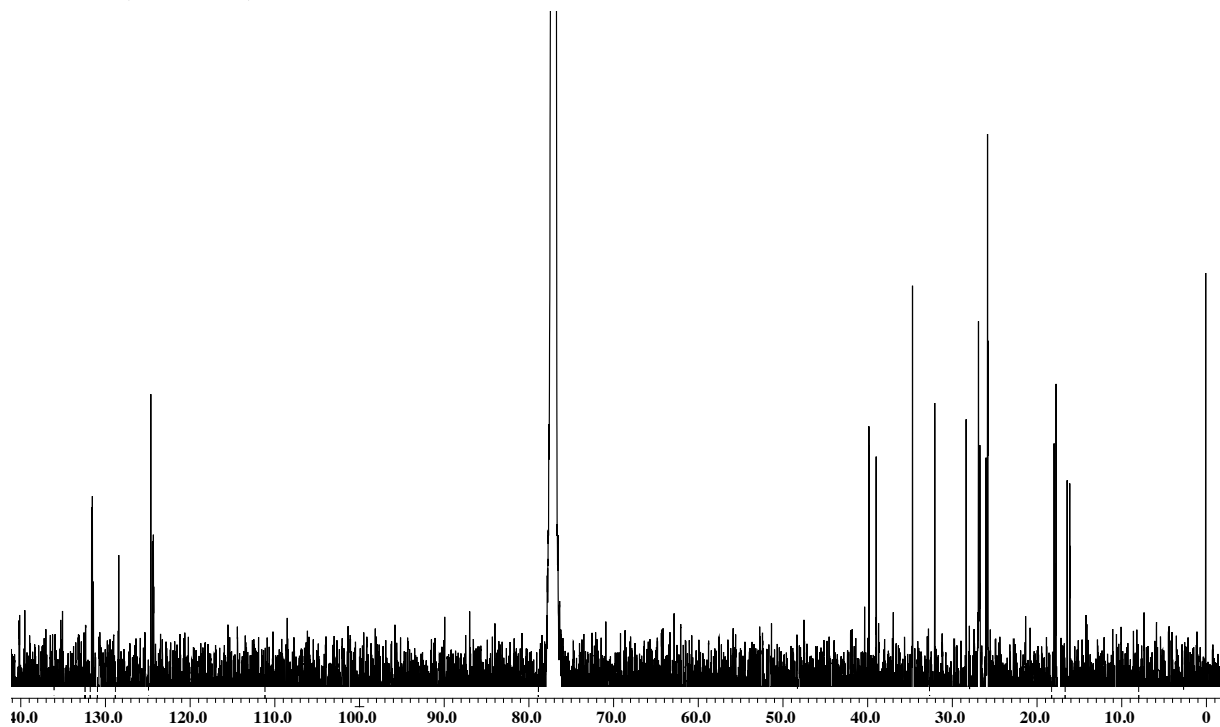


図3-51. Prenylgermacrene Bの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

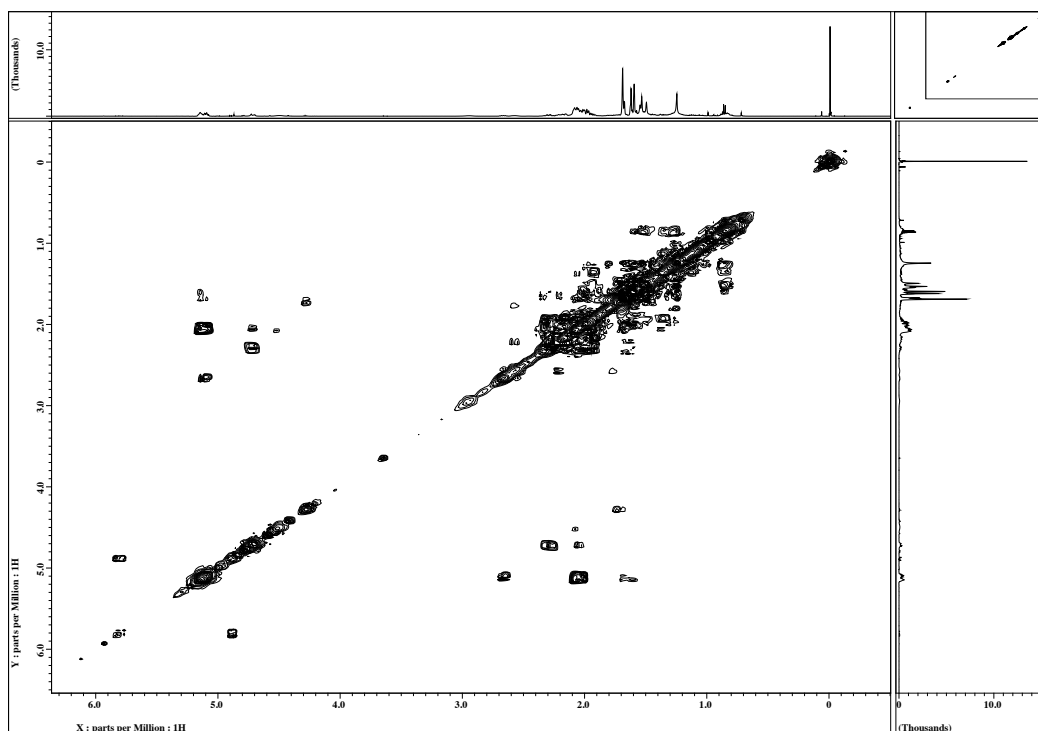


図3-52. Prenylgermacrene Bの ^1H - ^1H COSYデータ

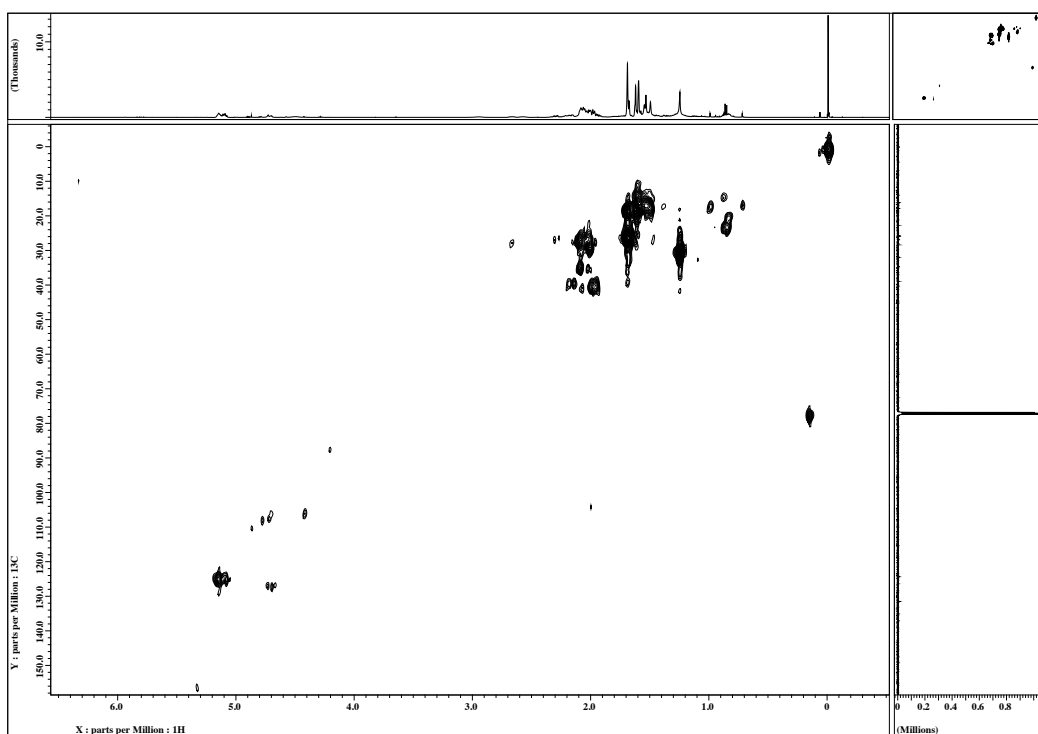


図3-53. Prenylgermacrene Bの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

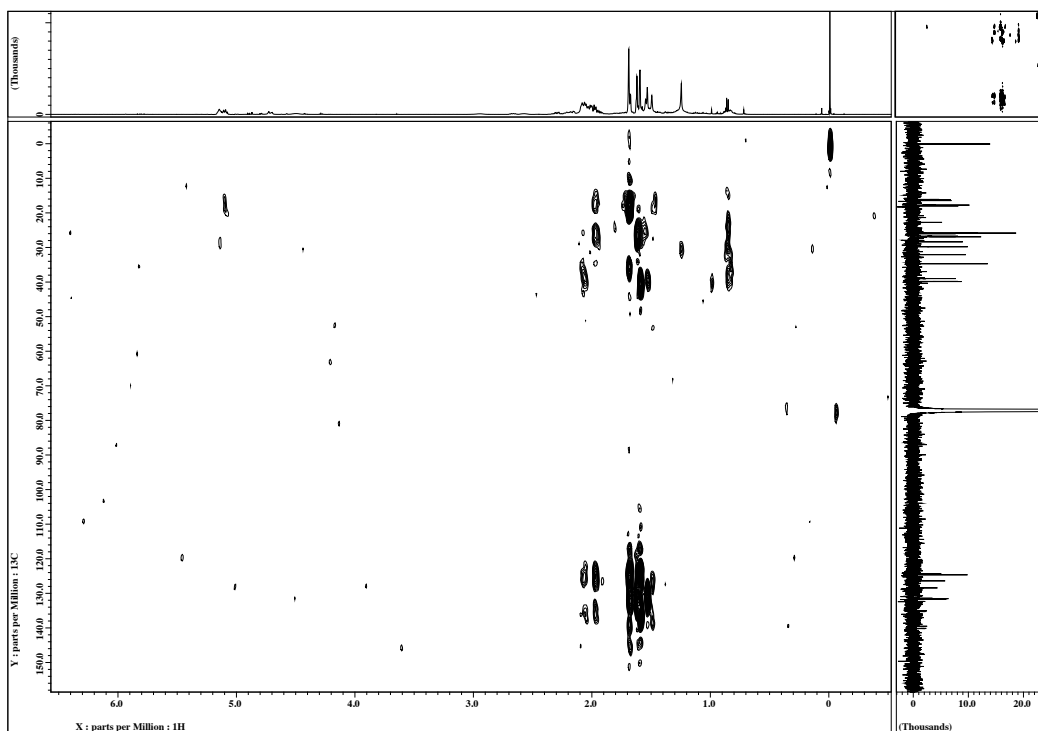


図3-54. Prenylgermacrene Bの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

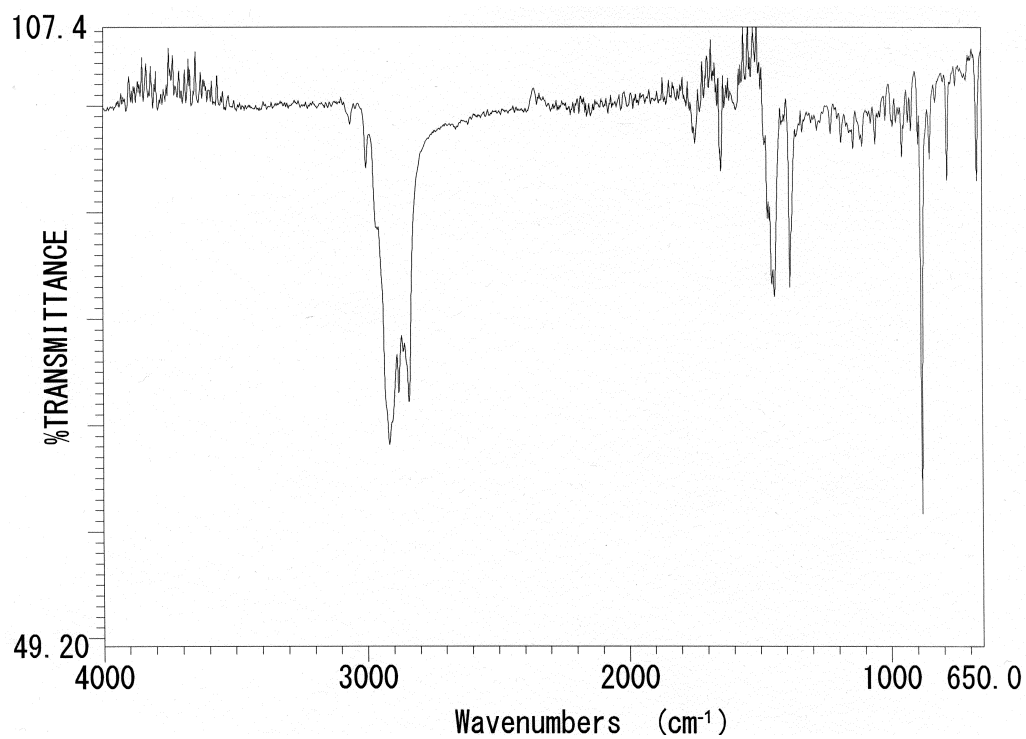


図3-55. Prenylgermacrene BのIRデータ

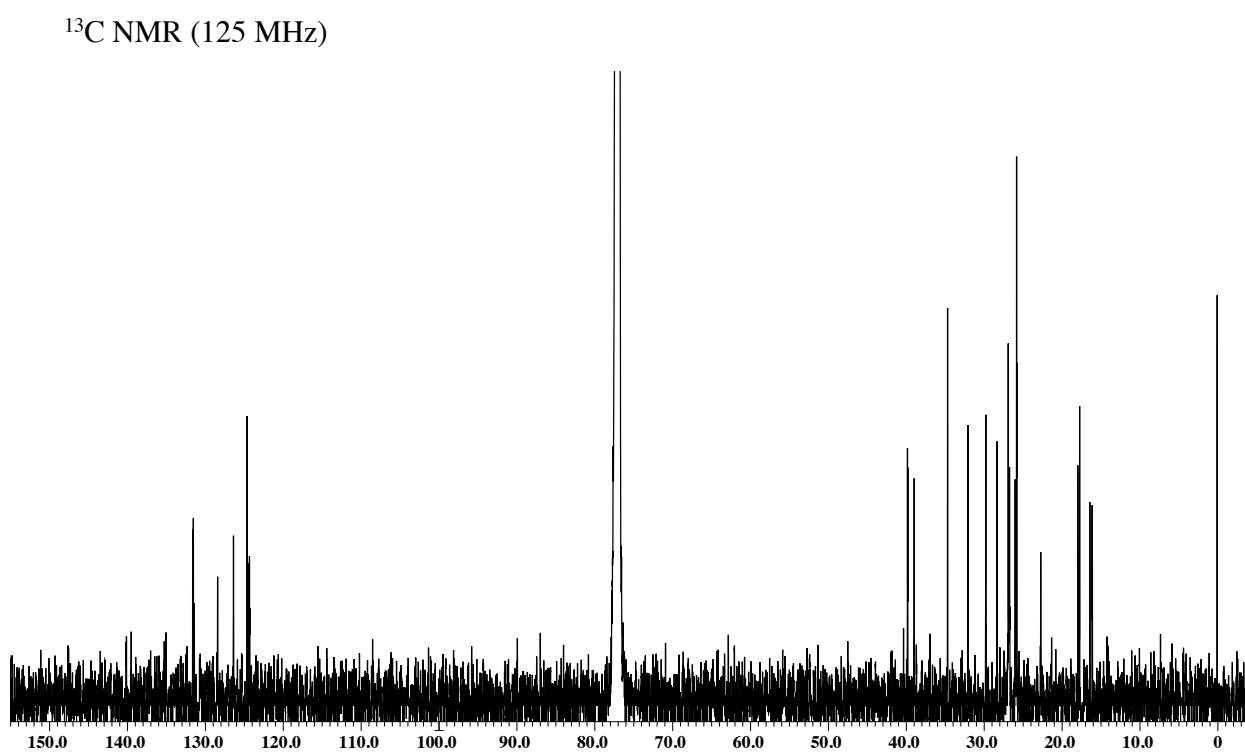
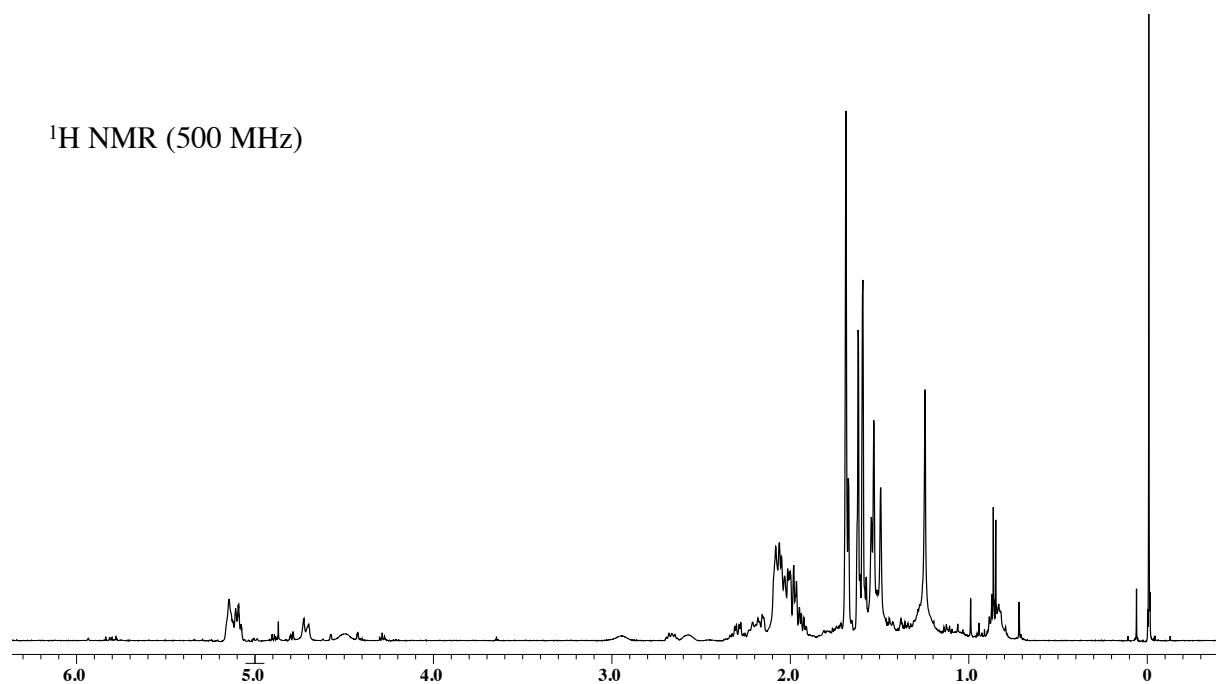


図3-56. Prenylgermacreneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

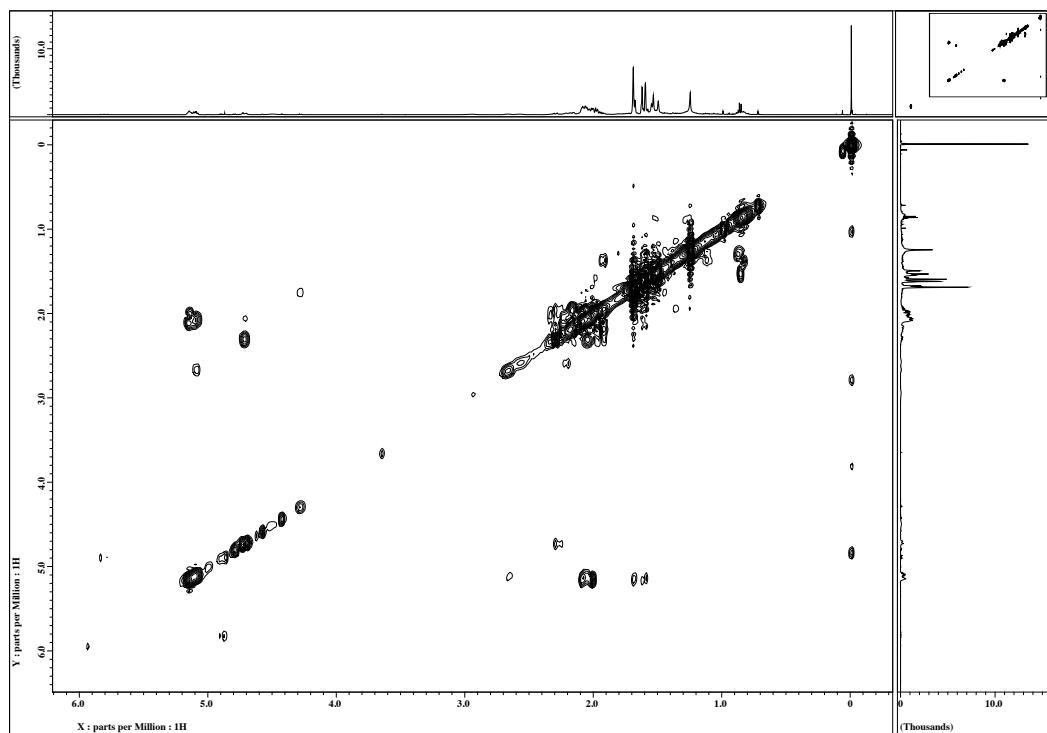


図3-57. Prenylgermacreneの ^1H - ^1H COSYデータ

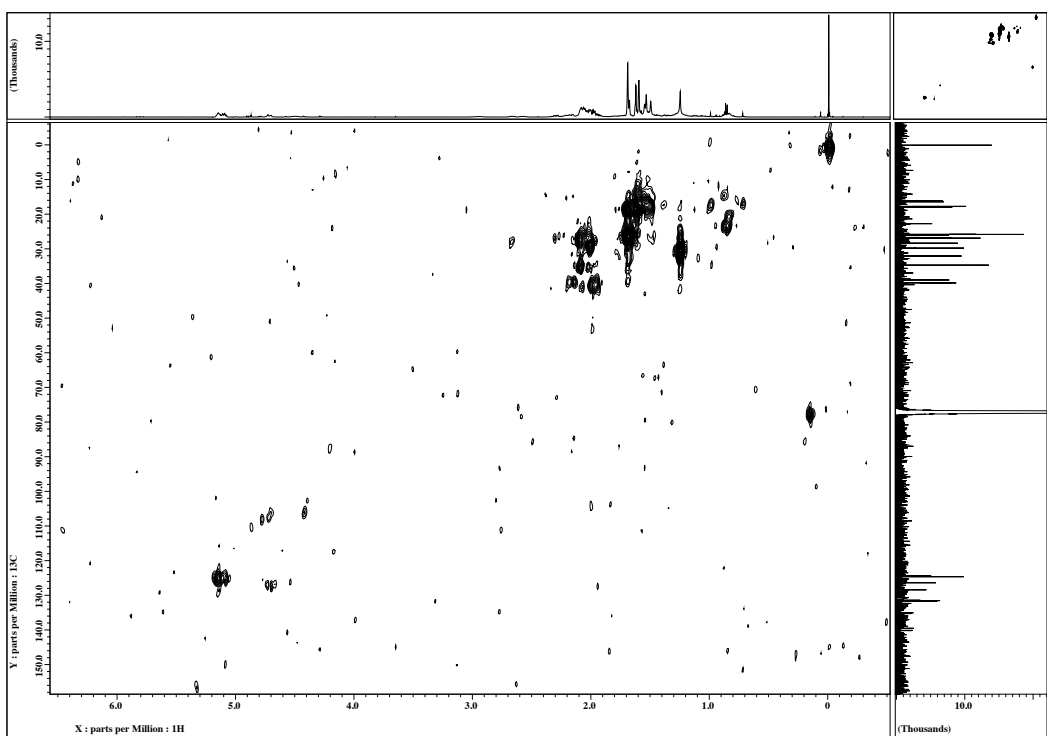


図3-58. Prenylgermacreneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

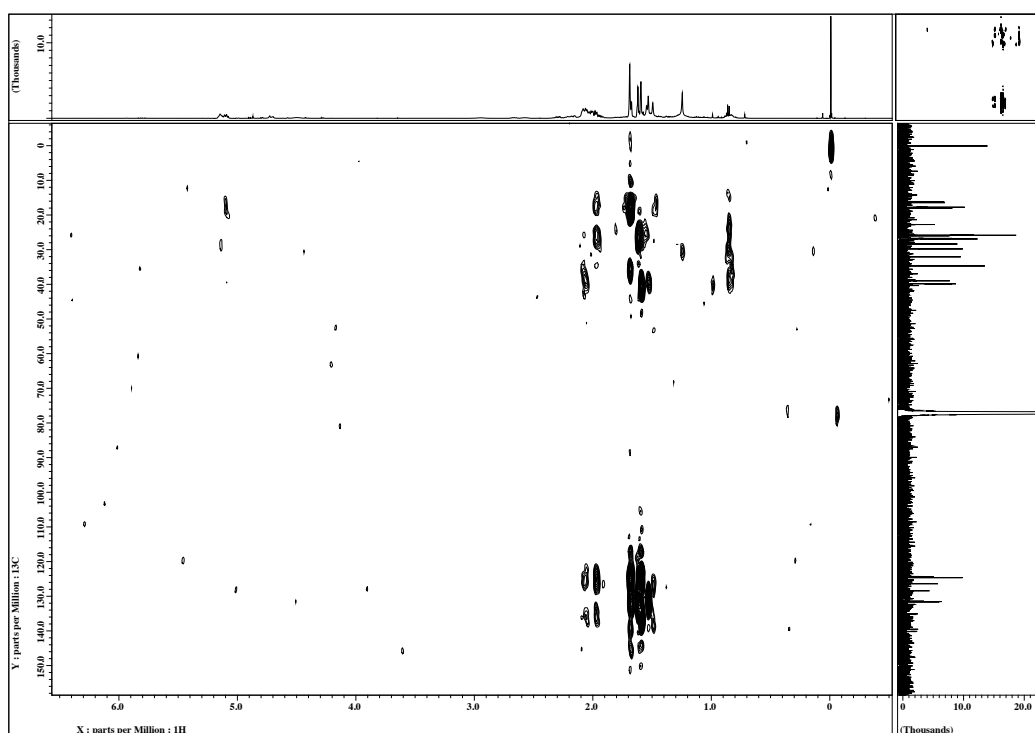
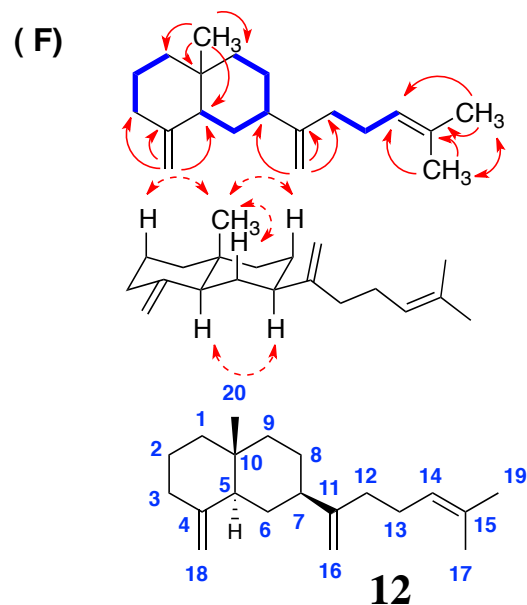
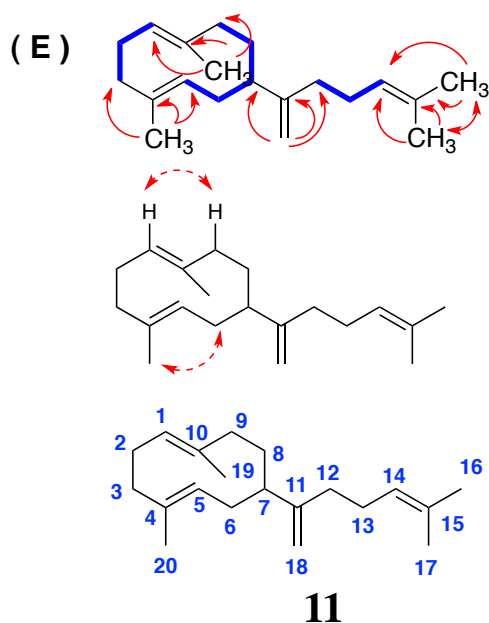


図3-59. Prenylgermacreneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

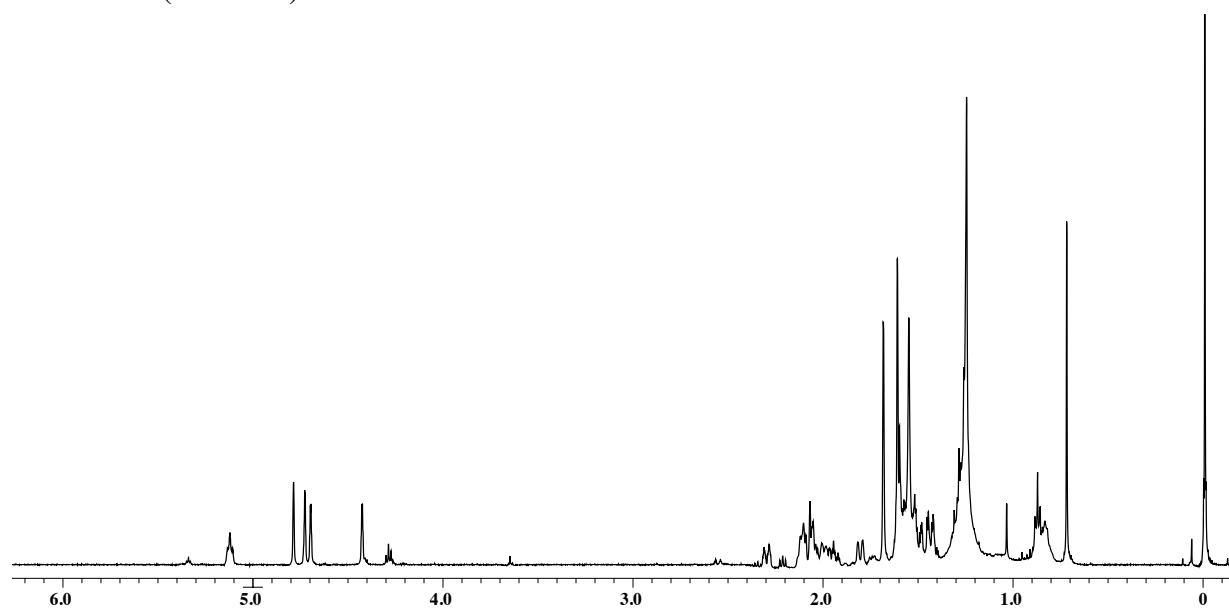


NMR chemical shifts in CDCl₃

11			12	
No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)
1	126.8	4.74 (1H, brd, $J=11.0$)	42.0	1.45 (1H, m), 1.26 (1H, m)
2	31.7	2.18 (1H, m), 2.04 (1H, m)	23.5	1.58 (2H, m)
3	38.2	2.01 (2H, m)	37.0	2.31 (1H, m), 2.01 (1H, m)
4	134.1	-	151.3	-
5	126.0	4.52 (1H, brd, $J=10.0$)	50.2	1.81 (1H, d, $J=10.2$)
6	29.8	2.07 (1H, m), 1.86 (1H, m)	29.8	1.59 (1H, m), 1.27 (1H, m)
7	47.2	2.23 (1H, m)	44.7	1.95 (1H, m)
8	30.3	1.44 (1H, m), 1.36 (1H, m)	27.4	1.61 (2H, m)
9	39.9	2.11 (1H, m), 1.97 (1H, m)	41.4	1.53 (1H, m), 1.51 (1H, m)
10	135.2	-	36.1	-
11	154.3	-	155.0	-
12	35.1	2.07 (2H, m)	35.0	2.08 (2H, m)
13	26.0	2.13 (2H, m)	26.9	2.13 (2H, m)
14	124.1	5.13 (1H, m)	124.4	5.13 (1H, m)
15	131.2	-	131.5	-
16	26.0	2.13 (2H, m)	107.1	4.80 (1H, brs), 4.74 (1H, d, $J=1.5$)
17	17.8	1.61 (3H, s)	17.8	0.76 (3H, s)
18	107.3	-	105.4	4.71 (1H, d, $J=1.5$)
19	16.5	1.40 (3H, s)	25.7	1.69 (3H, s)
20	16.8	1.49 (3H, s)	16.5	1.62 (3H, s)

図3-60. *sclav_p1169*形質転換株が生産したprenylgermacrene (E; **10**) およびlobophytumin C (F; **11**)の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

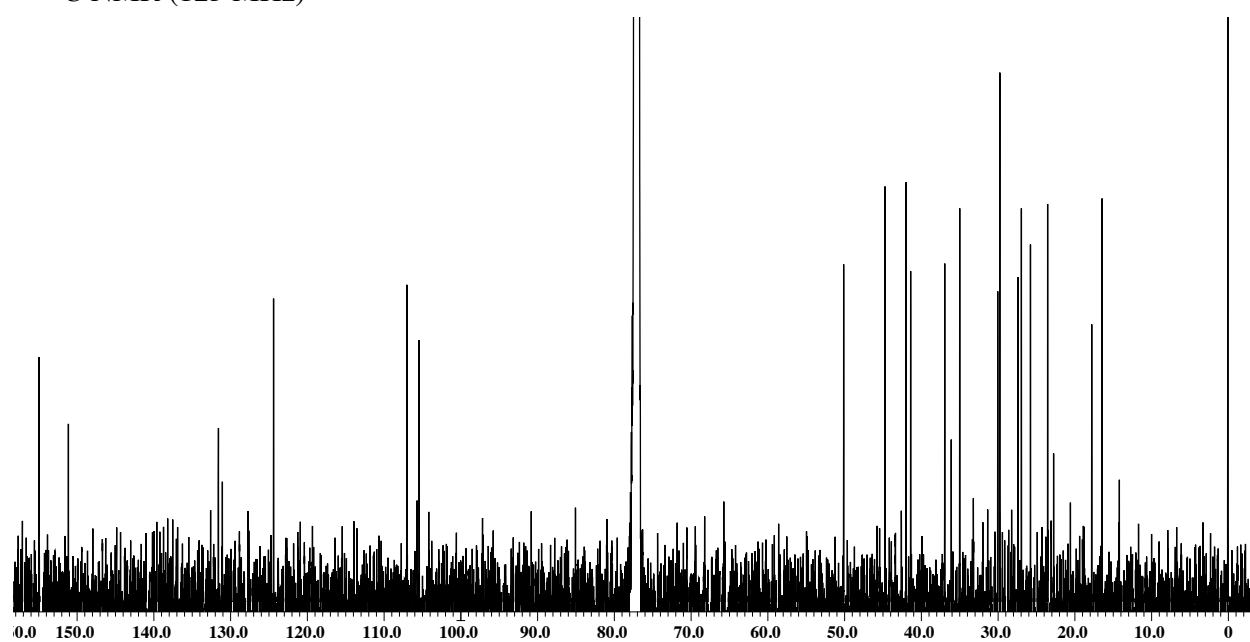


図3-61. Lobophytumin Cの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

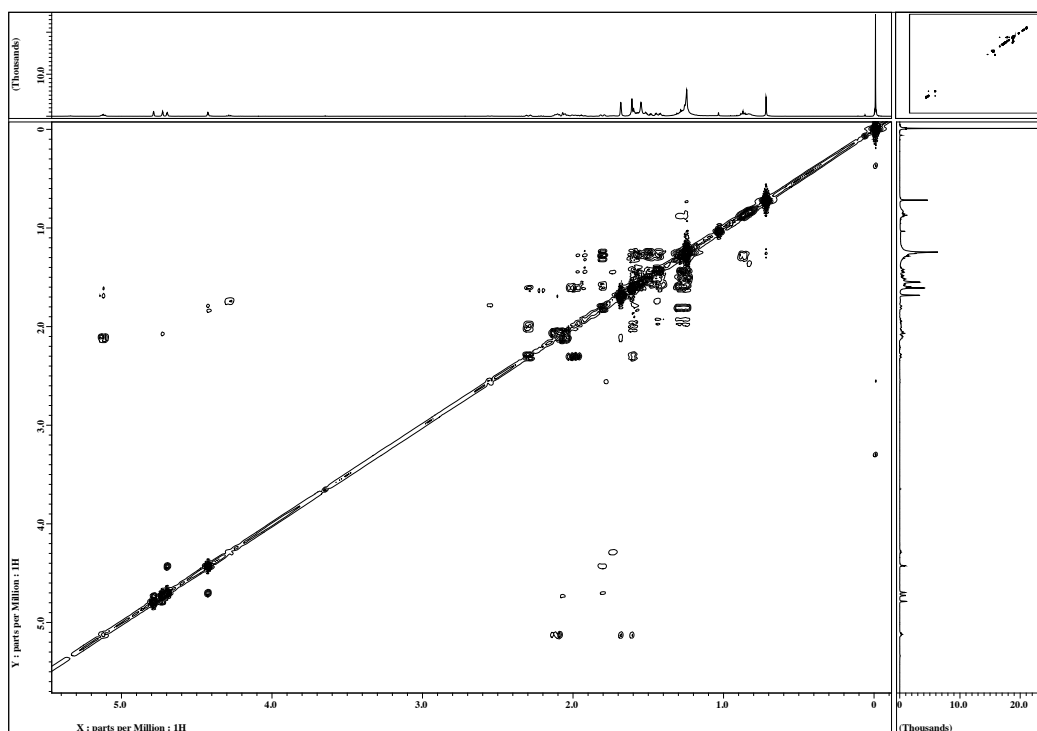


図3-62. Lobophytumin Cの ^1H - ^1H COSYデータ

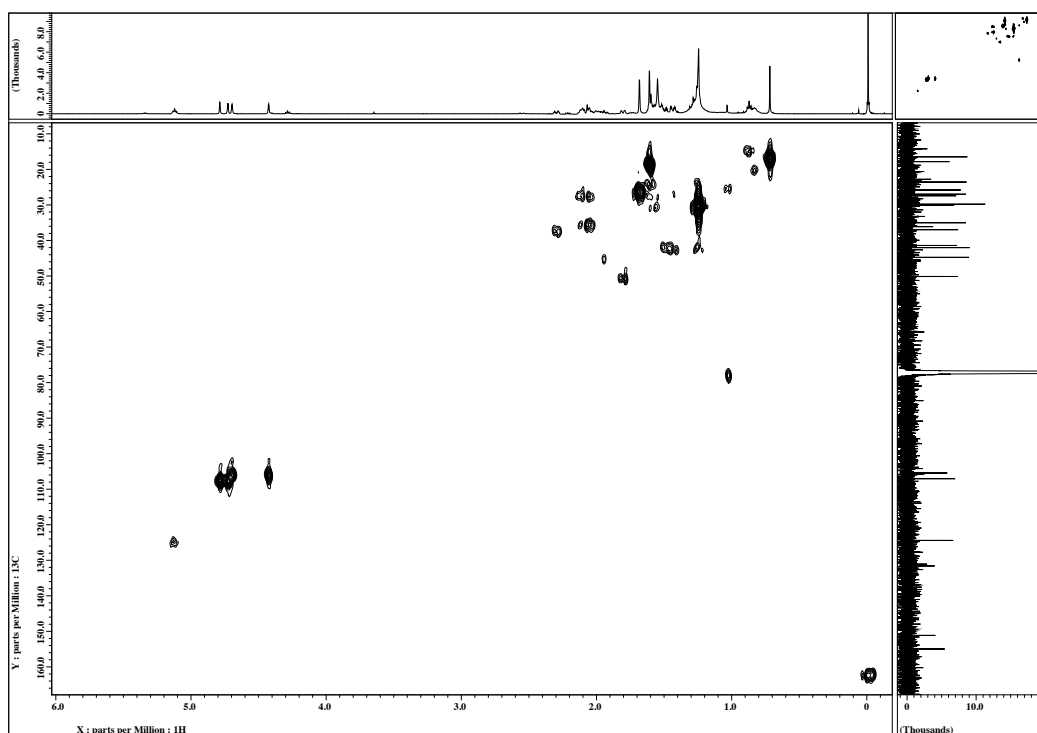


図3-63. Lobophytumin Cの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

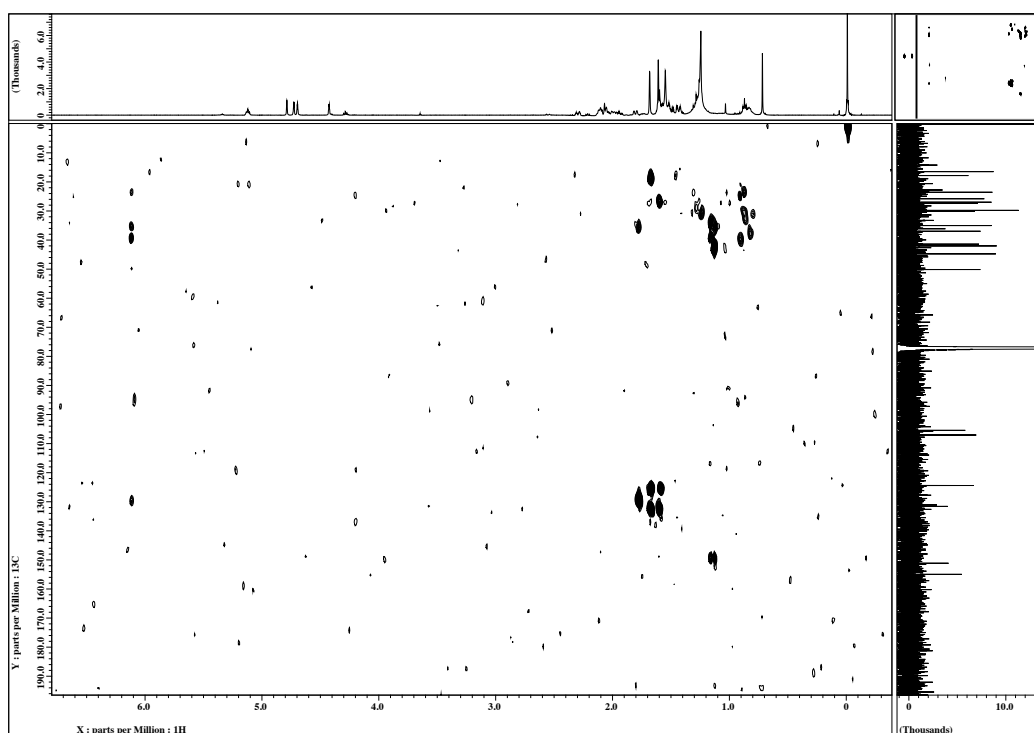


図3-64. Lobophytumin Cの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

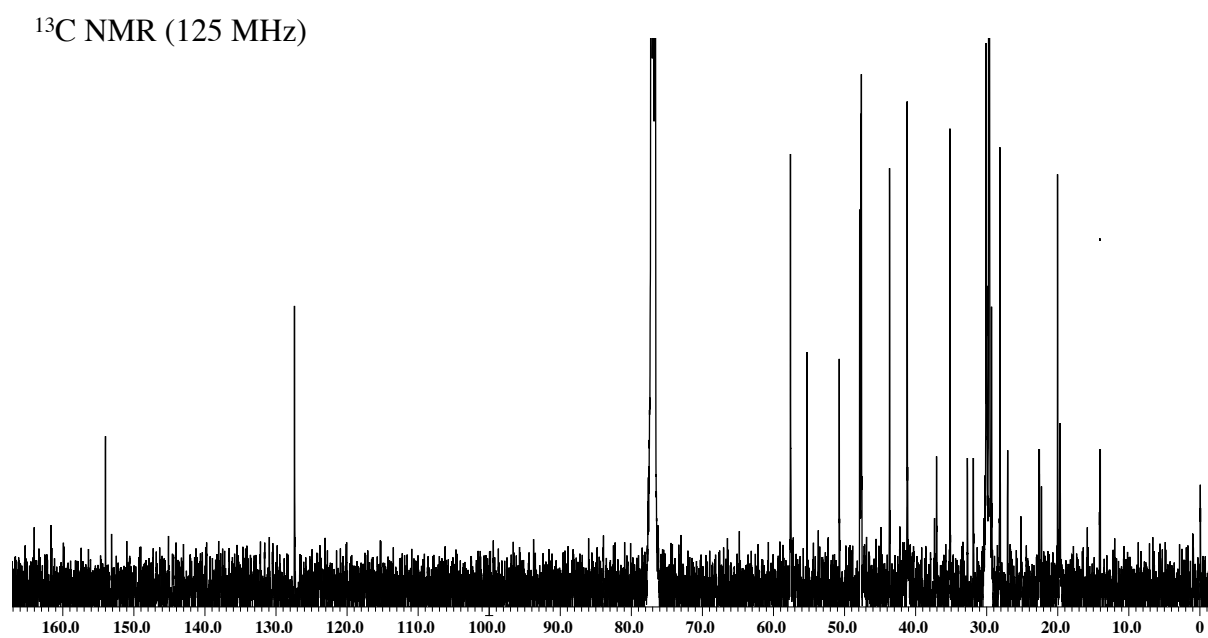
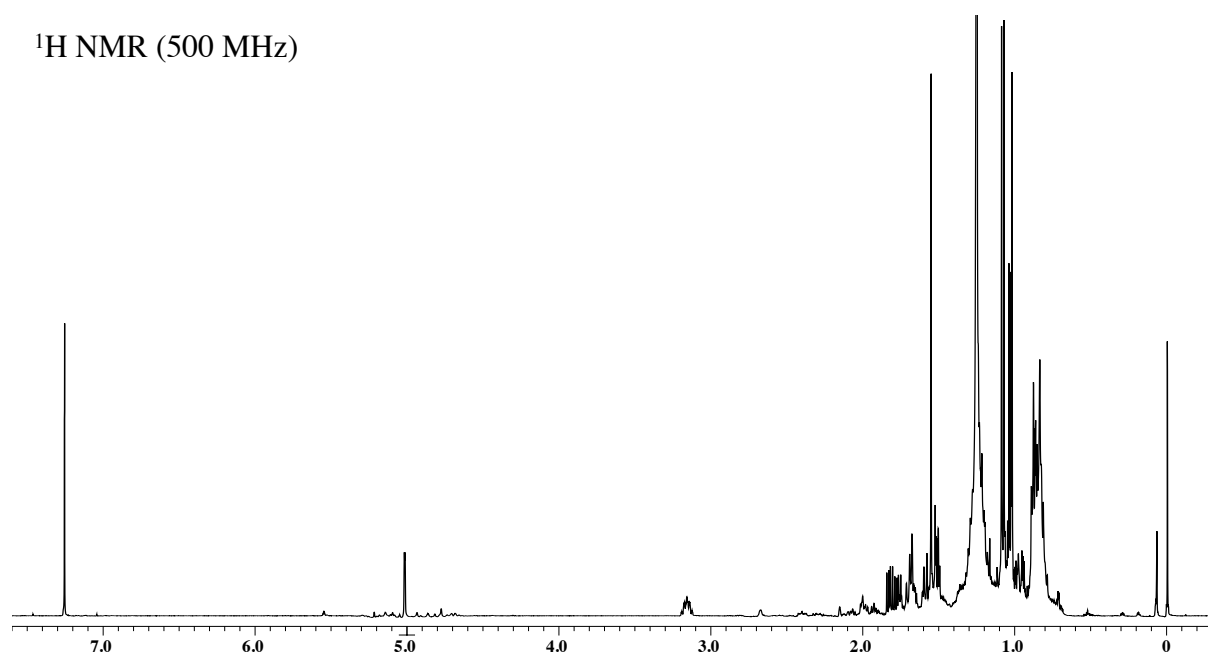


図3-65. Isohirsut-1-eneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

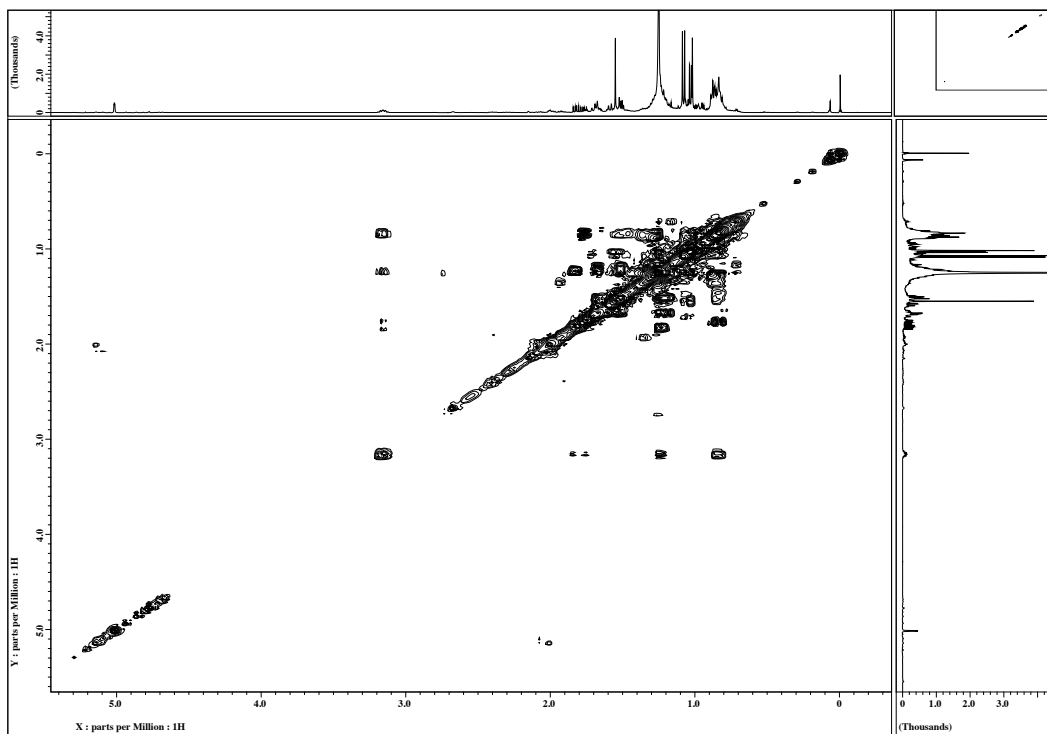


図3-66. Isohirsut-1-eneの ^1H - ^1H COSYデータ

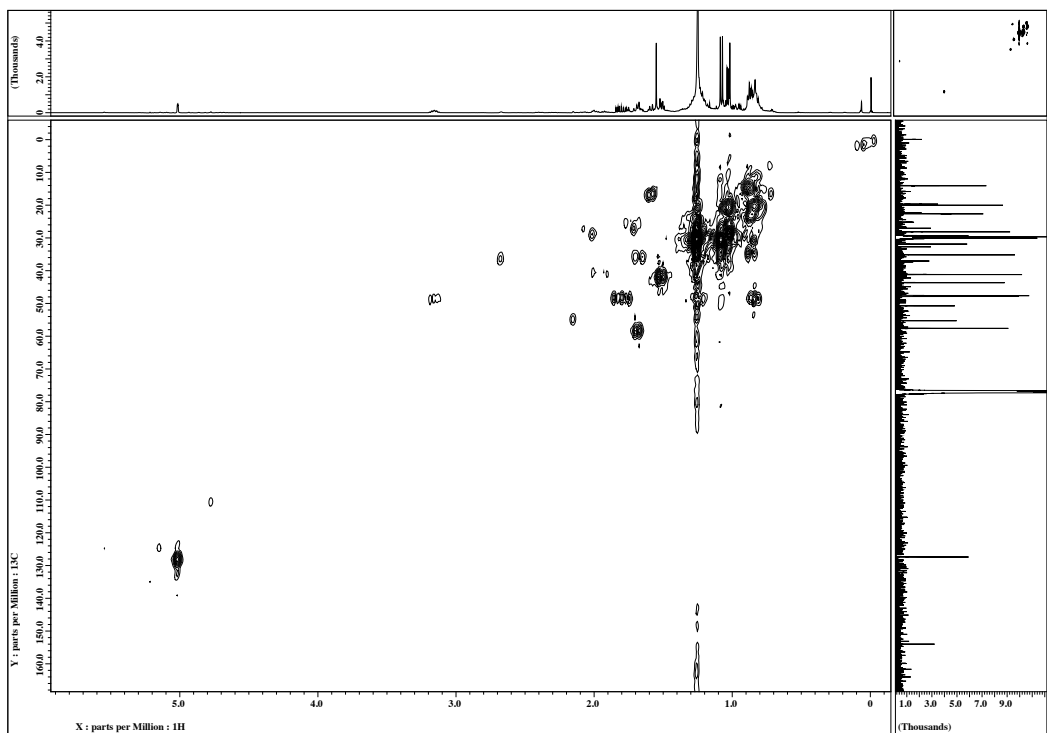


図3-67. Isohirsut-1-eneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

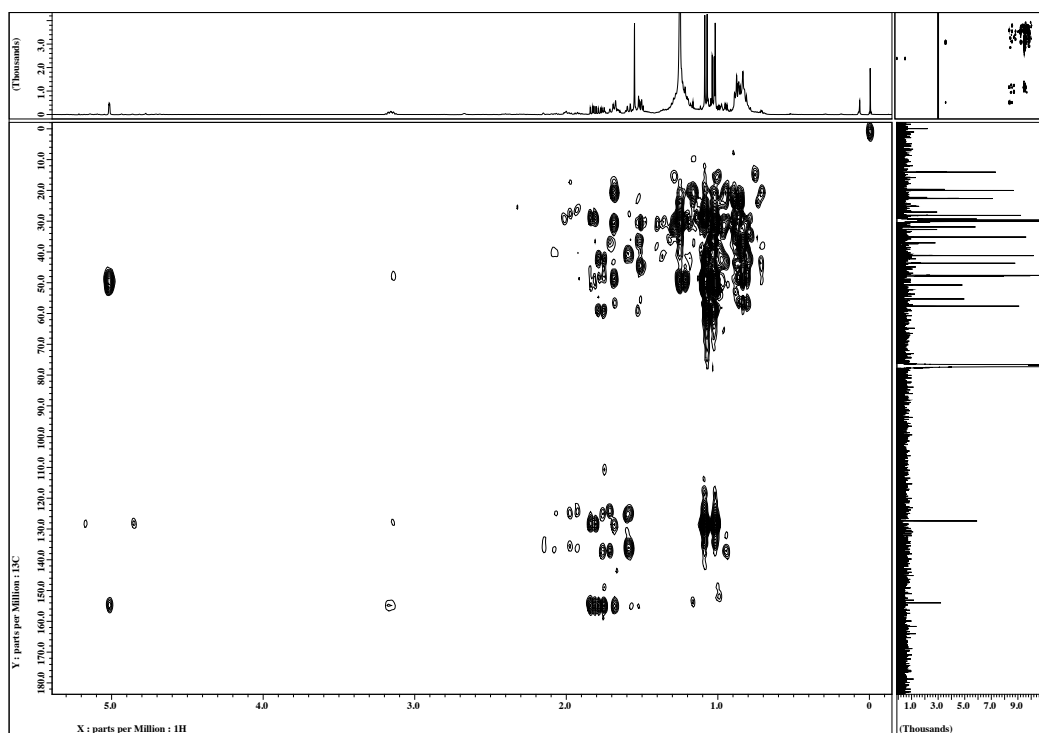


図3-68. Isohirsut-1-eneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

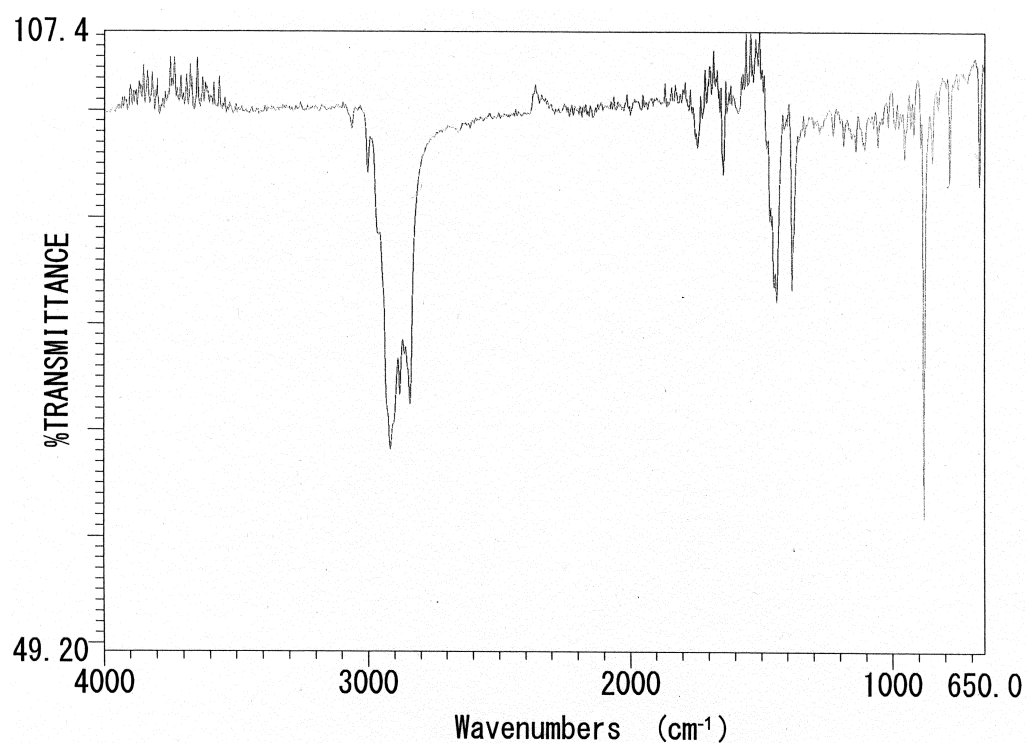
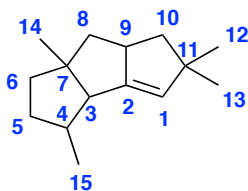
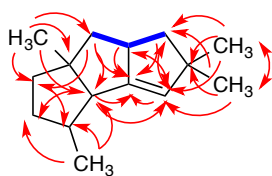


図3-69. Isohirsut-1-eneのIRデータ



13

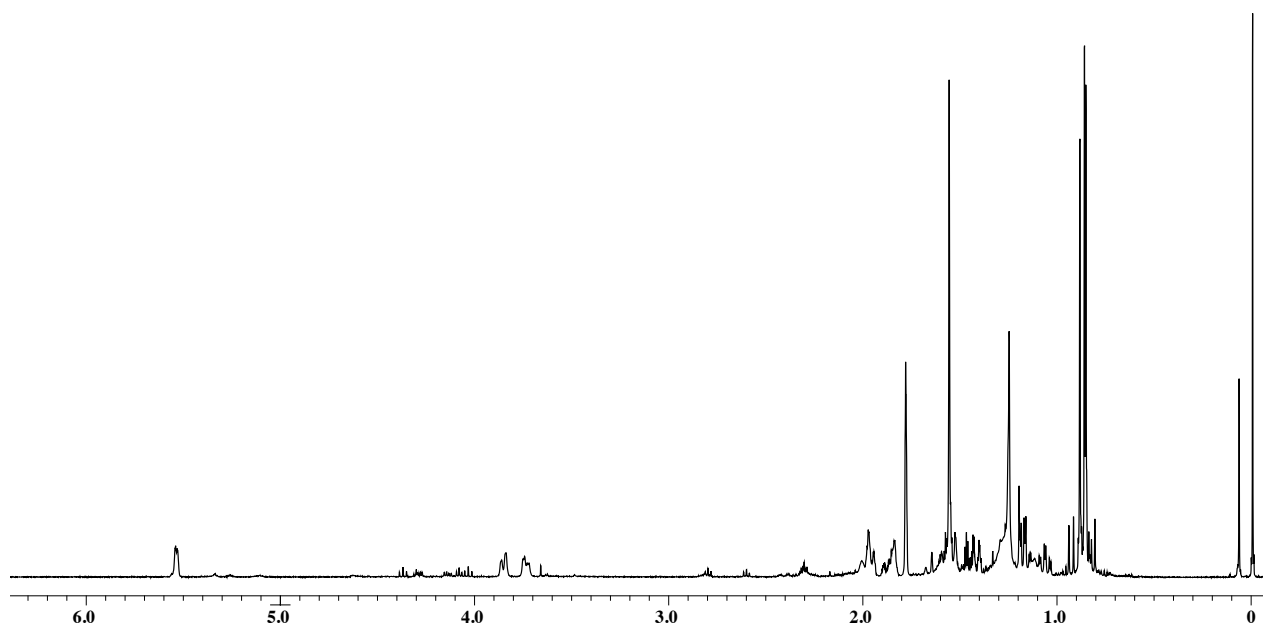
NMR chemical shifts in CDCl_3

13

No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)
1	127.4	5.01 (1H, s)
2	154.1	-
3	57.7	1.69 (1H, m)
4	43.7	1.52 (1H, m)
5	35.1	1.67 (1H, m), 1.20 (1H, m)
6	41.2	1.50 (2H, m)
7	55.3	-
8	47.8	1.22 (1H, m), 1.82 (1H, dd, $J=7.0, 11.5$)
9	47.9	3.16 (1H, quin, $J=8.3$)
10	47.7	0.84 (1H, m), 1.76 (1H, dd, $J=7.1, 11.5$)
11	50.8	-
12	30.1	1.08 (3H, s)
13	28.1	1.02 (3H, s)
14	30.1	1.06 (3H, s)
15	20.1	1.03 (3H, d, $J=6.8$)

図3-70. *sclav_p1407*形質転換株が生産したisohirsut-1-ene (**13**)の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

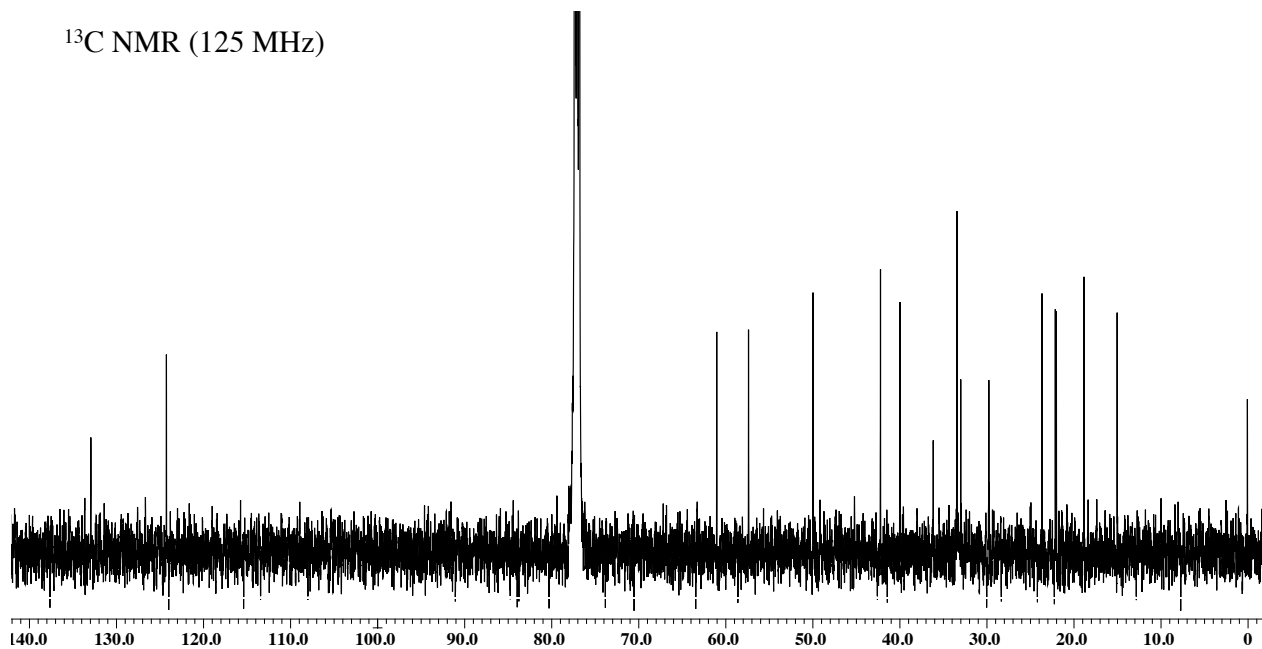
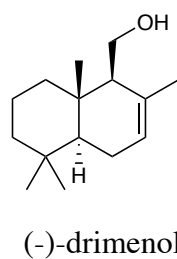
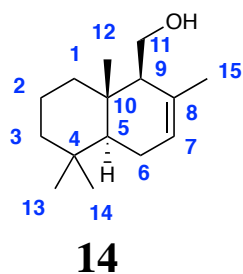


図3-71. Drimenolの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

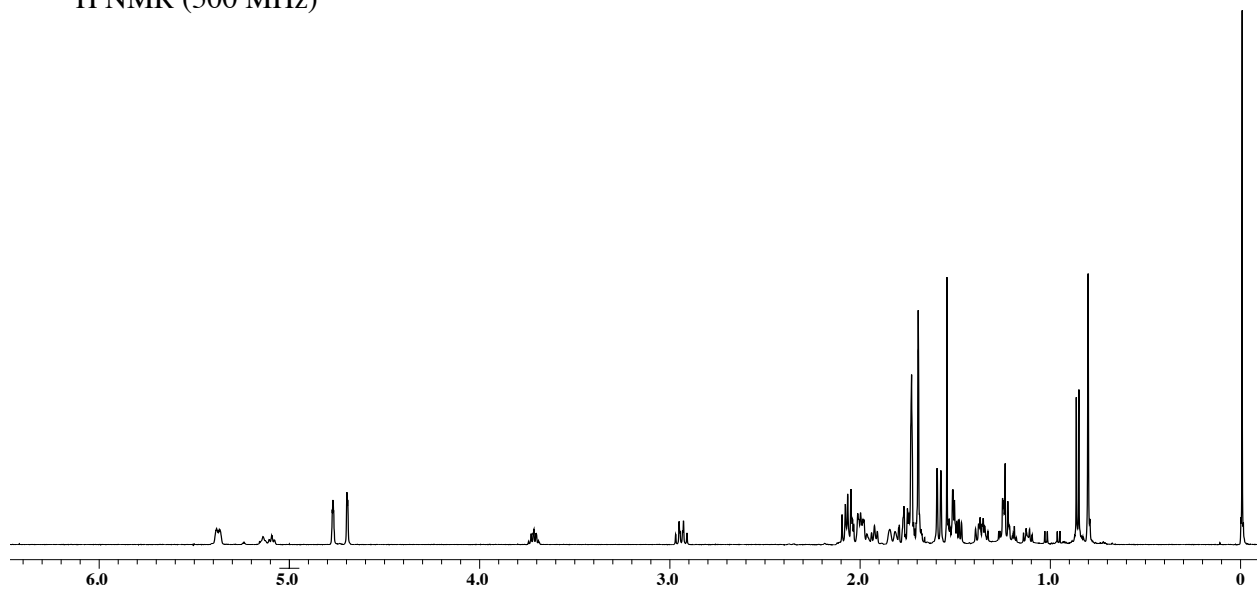


NMR chemical shifts in CDCl₃

14			(-)-drimenol
No.	δ_C	δ_H (multi, <i>J</i> in Hz)	δ_C
1	40.2	1.06 (1H, m), 1.98 (1H, m)	39.9
2	18.8	1.21 (1H, m), 1.46 (1H, m)	19.1
3	42.4	1.22 (1H, m), 1.44 (1H, m)	42.1
4	33.2	-	32.9
5	50.1	1.24 (1H, m)	49.9
6	23.9	1.95 (1H, m), 2.02 (1H, m)	23.6
7	124.3	5.54 (1H, m)	124.2
8	133.0	-	133.0
9	57.5	1.84 (1H, m)	57.3
10	36.4	-	36.5
11	61.2	3.75 (1H, m), 3.84 (1H, m)	60.9
12	33.6	0.86 (3H, s)	33.4
13	21.9	0.89 (3H, s)	22.4
14	15.9	0.85 (3H, s)	15.0
15	22.1	1.79 (3H, s)	22.4

図3-72. *sclav_p0067-sclav_p0068*形質転換株が生産したdrimenol (**14**)の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

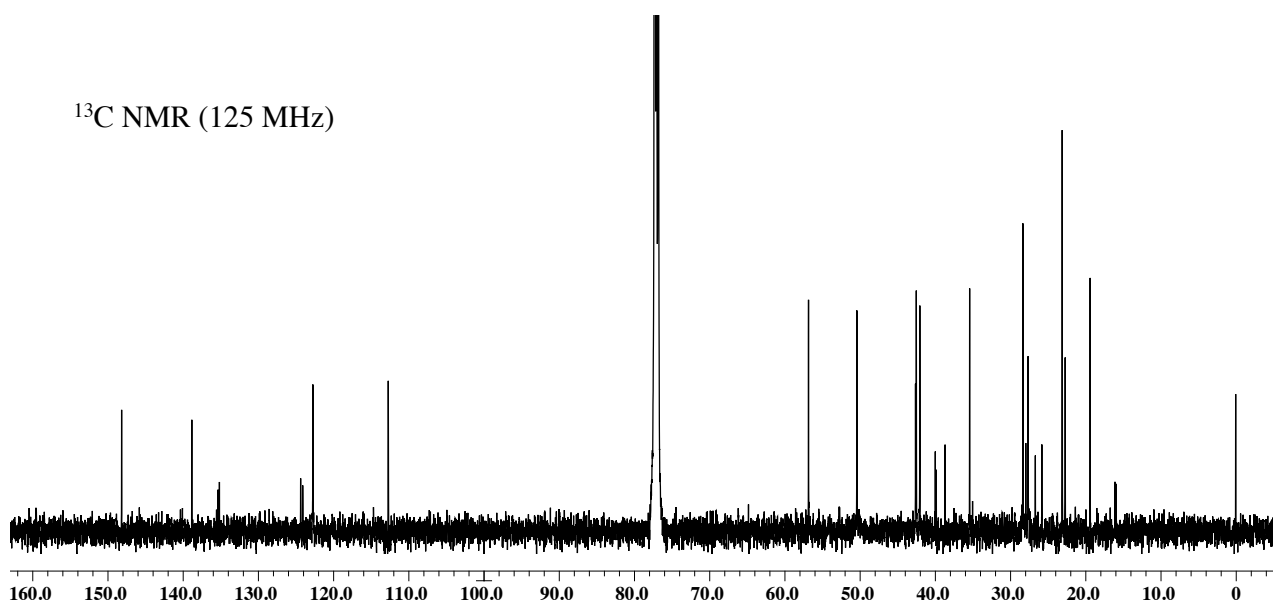


図3-73. Dauca-8,11-dieneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

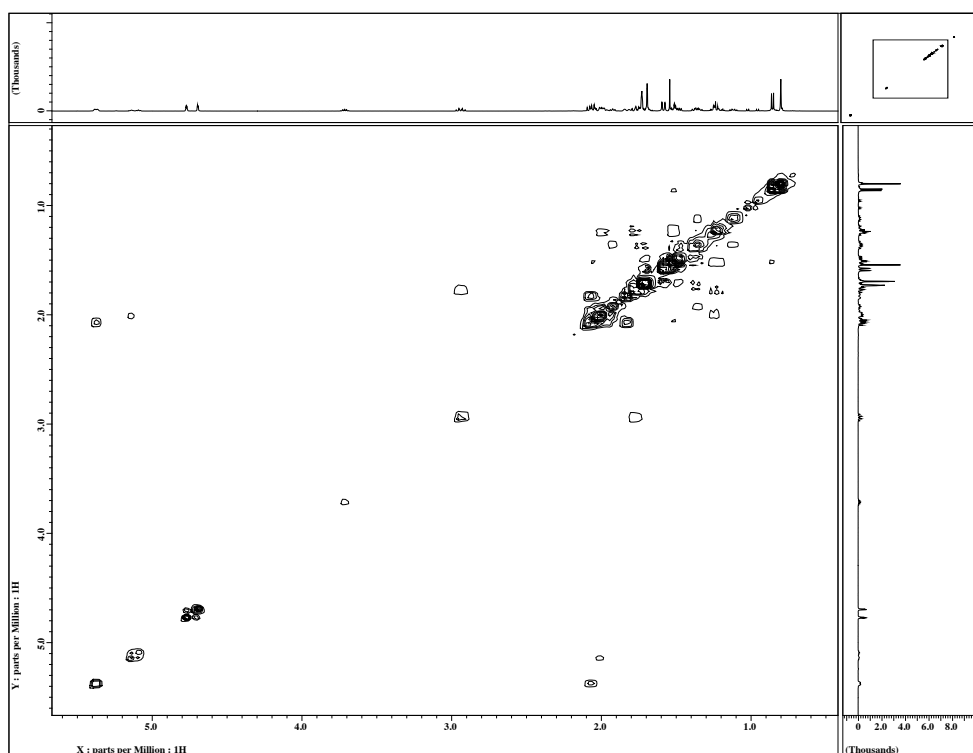


図3-74. Dauca-8,11-dieneの ^1H - ^1H COSYデータ

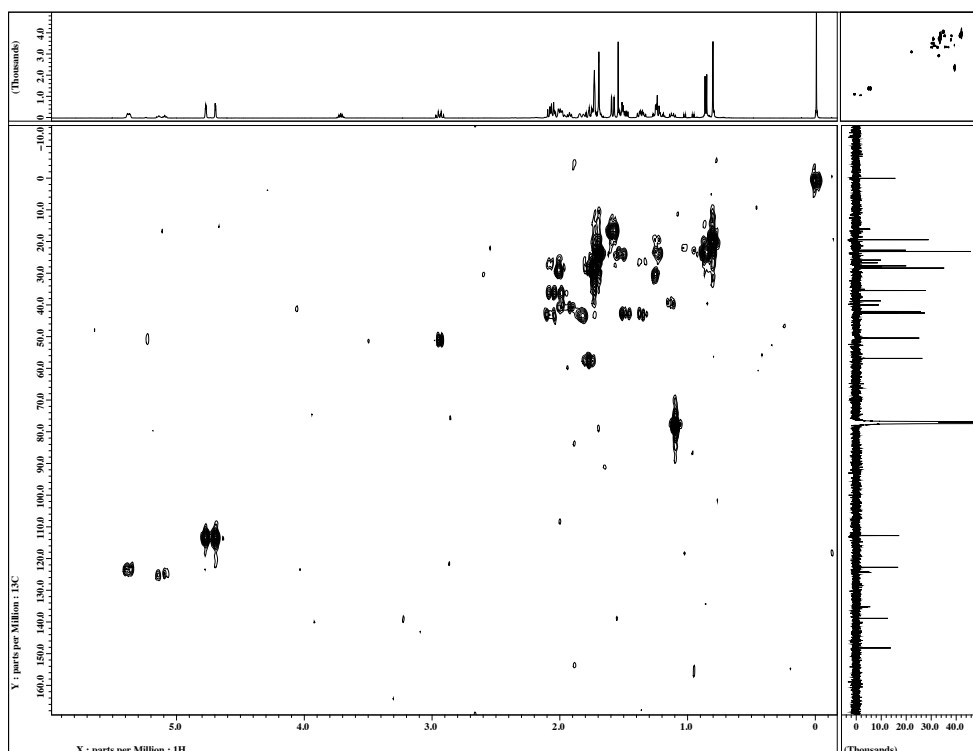


図3-75. Dauca-8,11-dieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

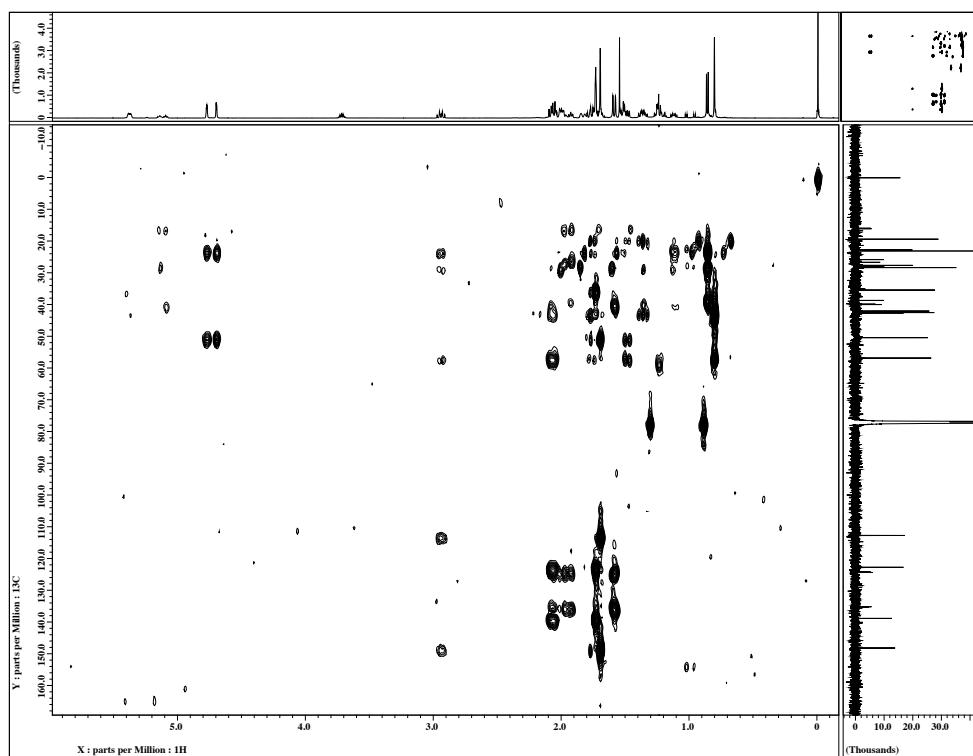
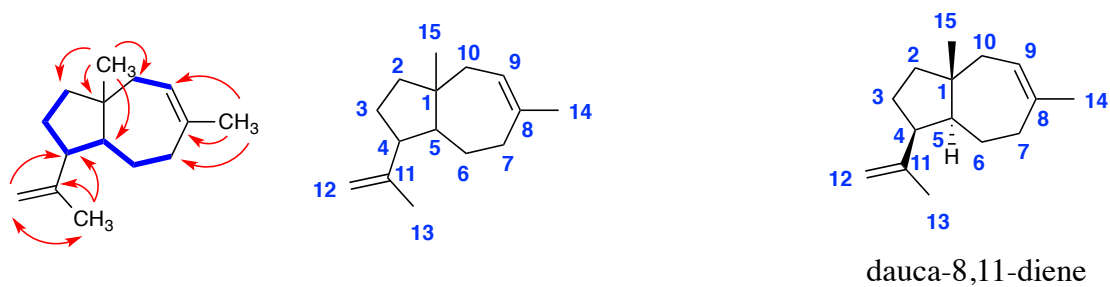


図3-76. Dauca-8,11-dieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

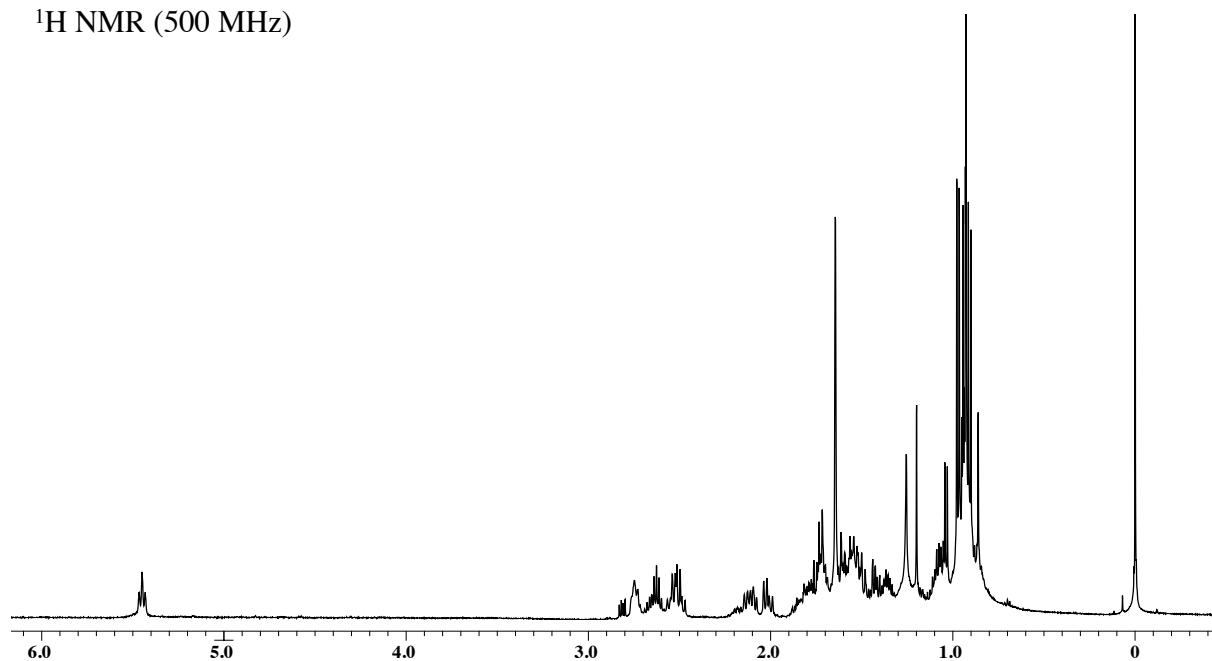


NMR chemical shifts in CDCl_3

15			dauca-8,11-diene
No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)	δ_{C}
1	42.6	-	42.6
2	42.1	1.45 (1H, m), 1.50 (1H, m)	42.2
3	28.4	1.25 (1H, m), 1.54 (1H, m)	28.4
4	50.4	2.93 (q, 1H, $J=8.8$)	50.5
5	56.9	1.77 (m, 1H)	56.9
6	23.0	1.23 (1H, m), 1.51 (1H, m)	23.4
7	35.4	1.99 (1H, m), 2.06 (1H, m)	35.5
8	138.9	-	138.5
9	122.8	5.36 (br t, 1H, $J=6.3$)	123.1
10	42.5	1.82 (1H, m), 2.07 (1H, m)	42.6
11	148.2	-	147.7
12	112.7	4.69 (br d, 1H, $J=2.0$), 4.76 (br d, 1H, $J=2.0$)	113.0
13	23.1	1.69 (3H, s)	23.1
14	27.7	1.72 (3H, s)	27.5
15	19.4	0.79 (3H, s)	19.4

図3-77. *sven_0552*形質転換株が生産したdauca-8,11-diene (**15**)の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

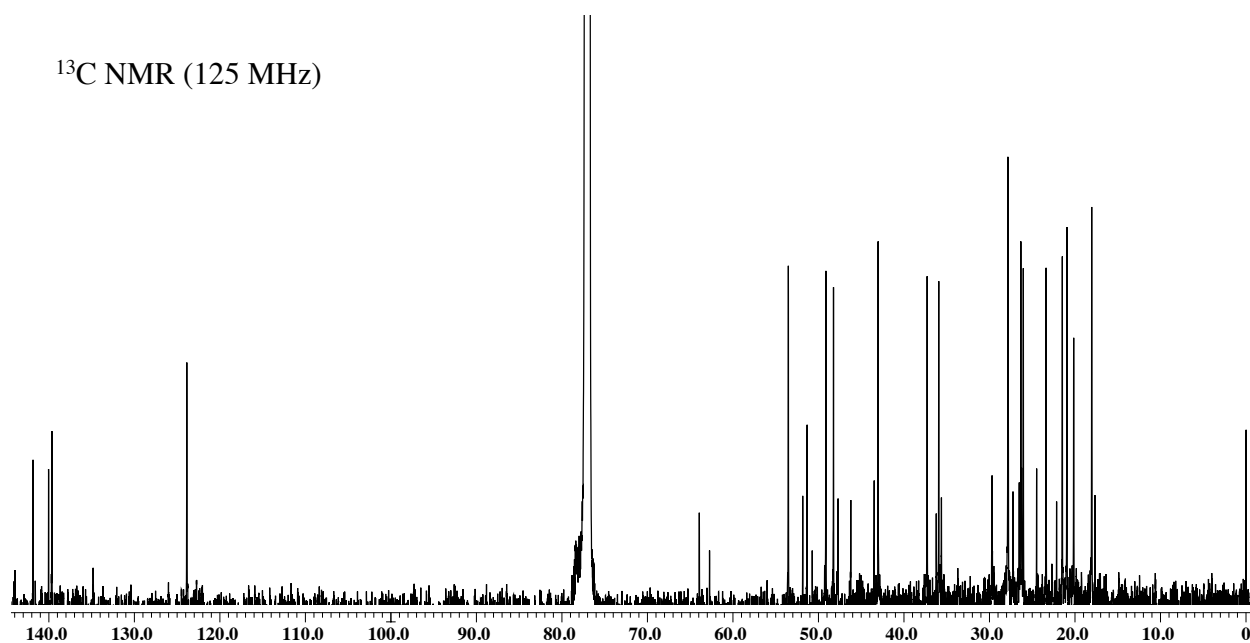


図3-78. Cyclooctat-7(8),10(14)-dieneの重クロロホルム中における ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

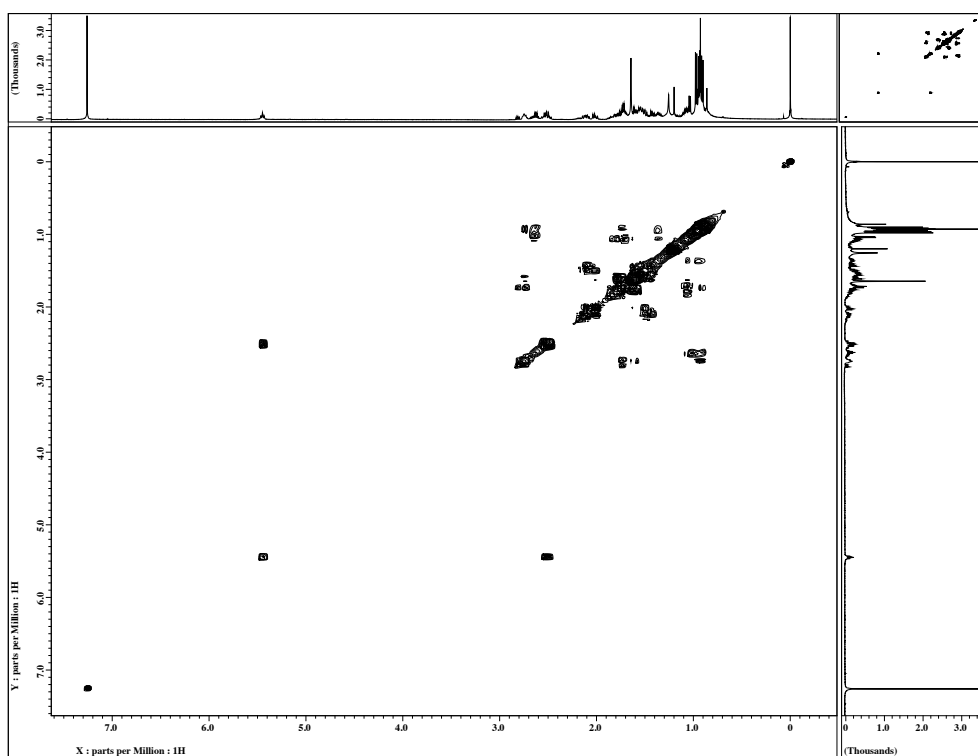


図3-79. Cyclooctat-7(8),10(14)-dieneの ^1H - ^1H COSYデータ

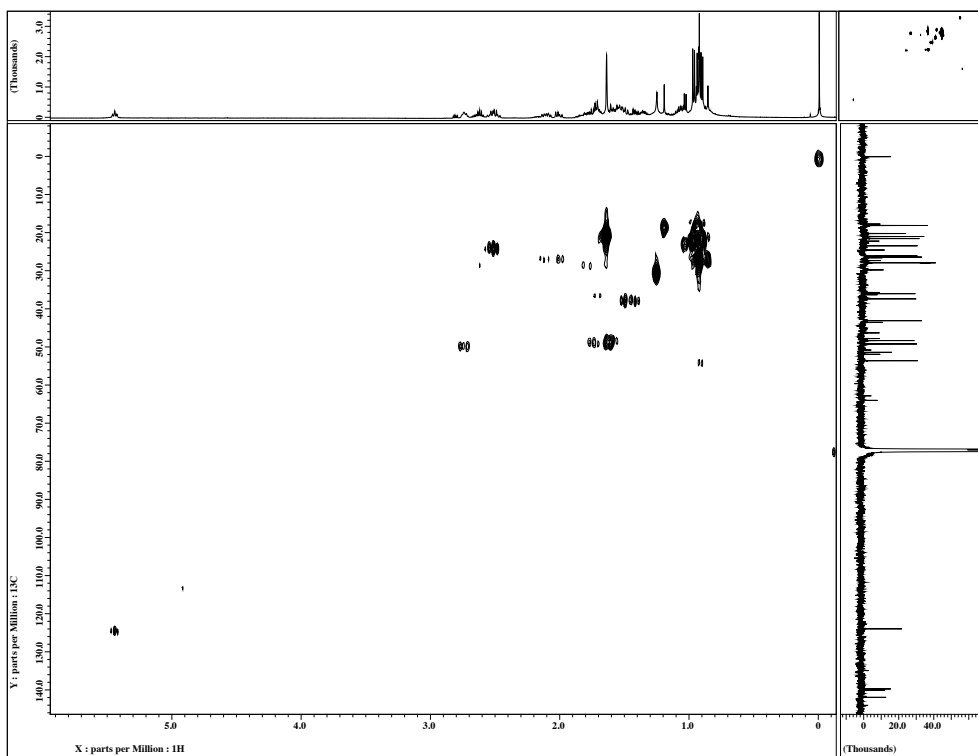


図3-80. Cyclooctat-7(8),10(14)-dieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

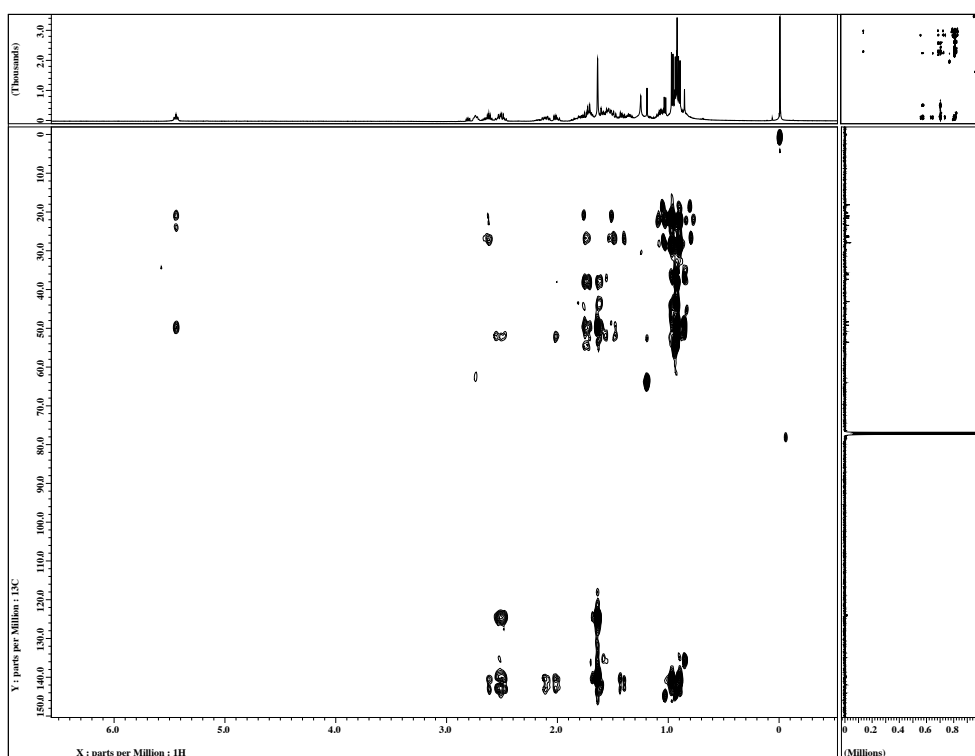


図3-81. Cyclooctat-7(8),10(14)-dieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

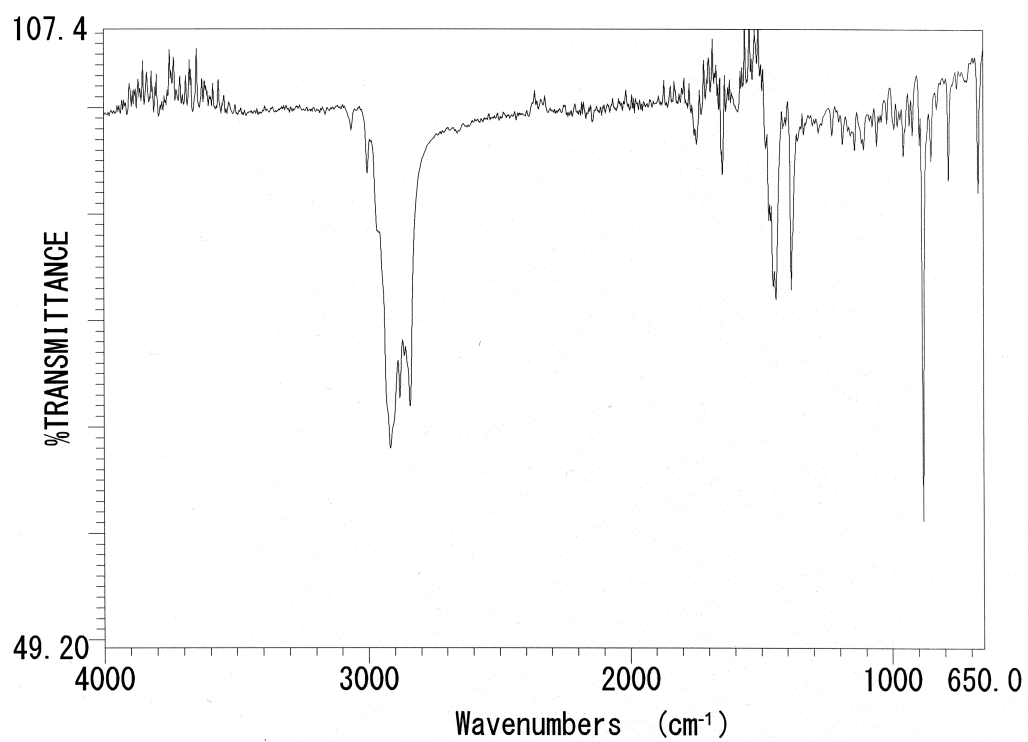
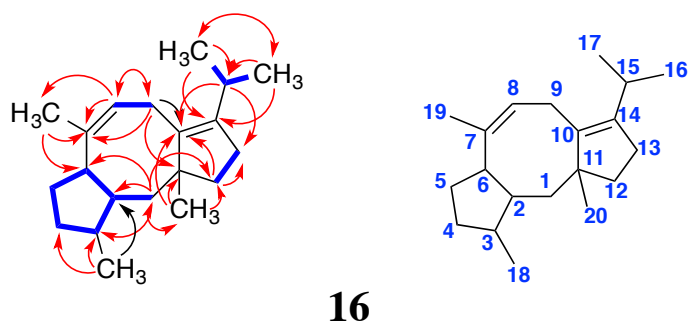


図3-82. Cyclooctat-7(8),10(14)-dieneのIRデータ



NMR chemical shifts in CDCl₃

16

No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)
1	48.2	1.60 (1H, m), 1.73 (1H, m)
2	53.5	0.91 (1H, m)
3	43.0	1.36 (1H, m)
4	35.9	1.05 (1H, m), 1.69 (1H, m)
5	29.7	1.24 (1H, m), 1.62 (1H, m)
6	49.1	2.73 (1H, dd, $J=5.5, 8.3$)
7	139.6	-
8	123.8	5.44 (1H, dd, $J=12.8, 7.7$)
9	23.4	2.45 (2H, m)
10	141.9	-
11	51.3	-
12	37.3	1.40 (1H, m), 1.51 (1H, m)
13	26.3	1.99 (1H, m), 2.11 (1H, m)
14	140.0	-
15	27.8	2.63 (1H, m)
16	20.9	0.90 (3H, d, $J=7.6$)
17	21.5	0.97 (3H, d, $J=7.6$)
18	18.0	0.93 (3H, d, $J=7.6$)
19	20.6	1.65 (3H, s)
20	26.0	0.92 (3H, s)

図3-83. *slt18_1078*形質転換株が生産したcyclooctat-7(8),10(14)-diene (**16**)の構造

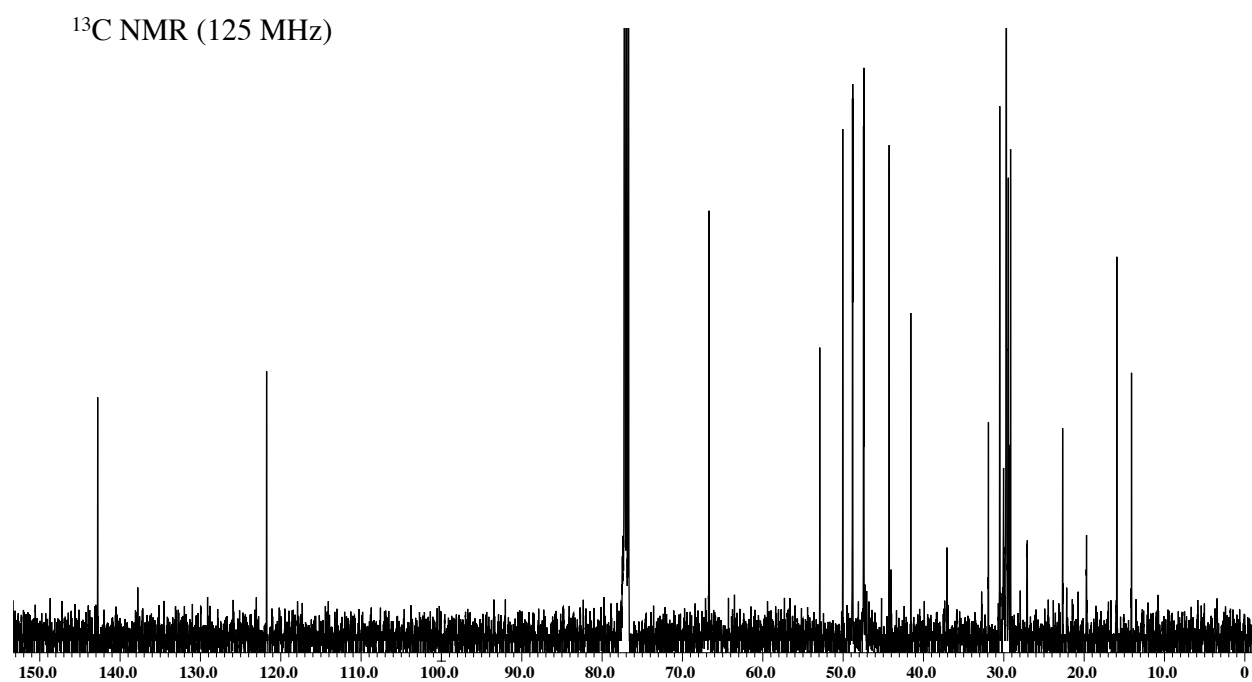
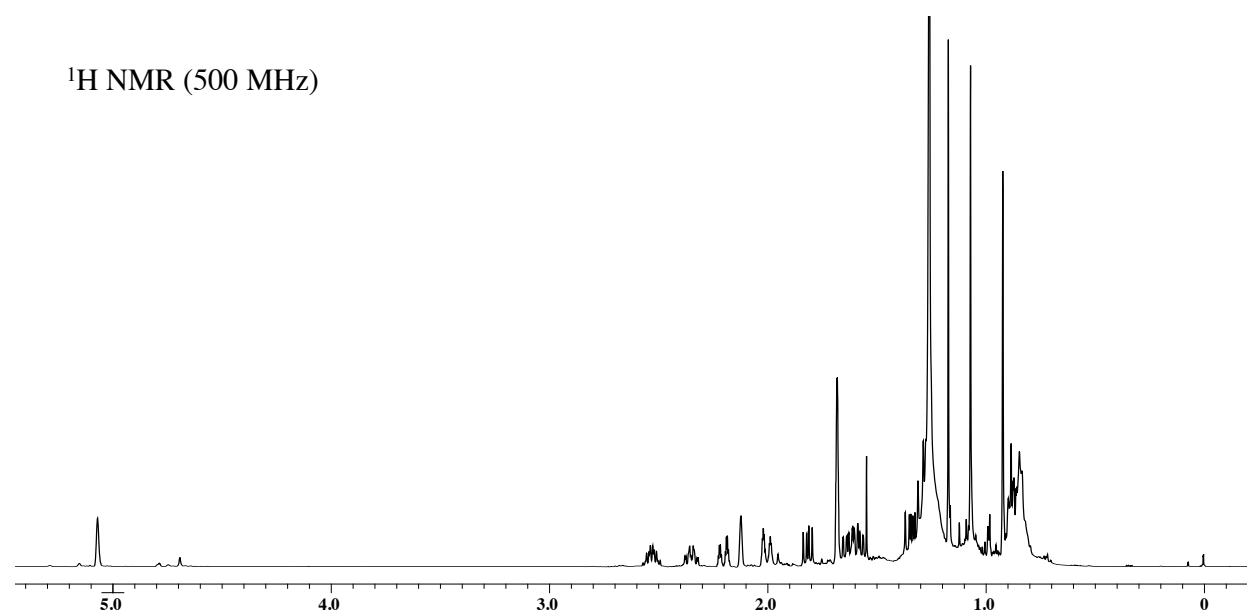


図3-84. Isohirsut-4-eneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

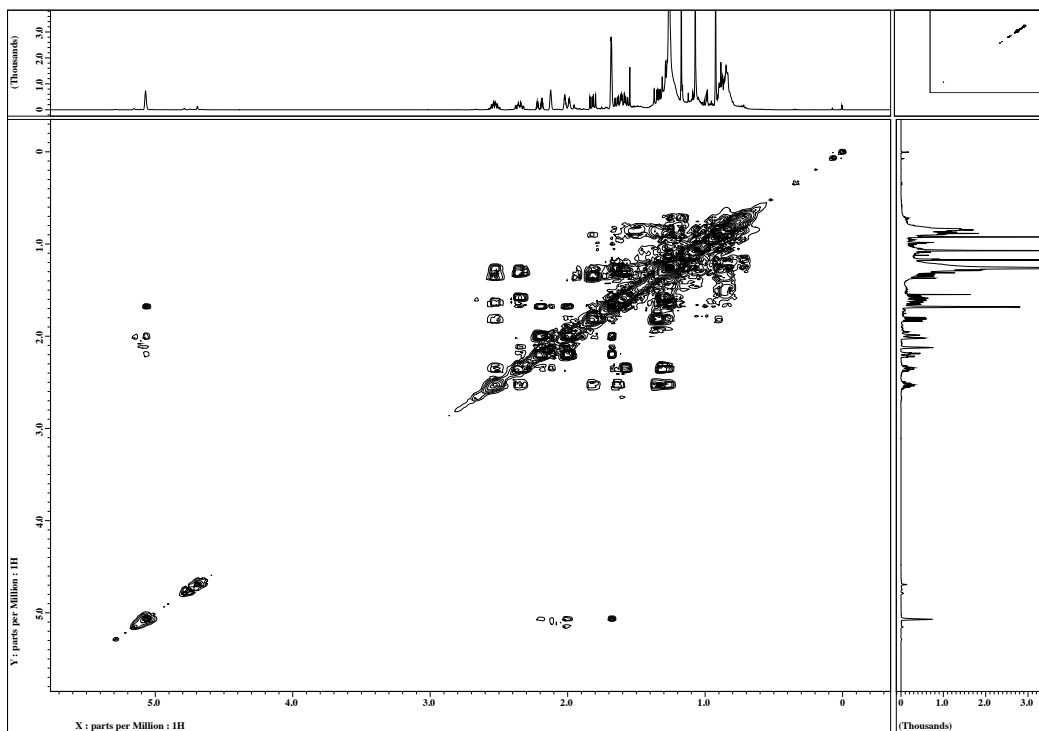


図3-85. Isohirsut-4-eneの ^1H - ^1H COSYデータ

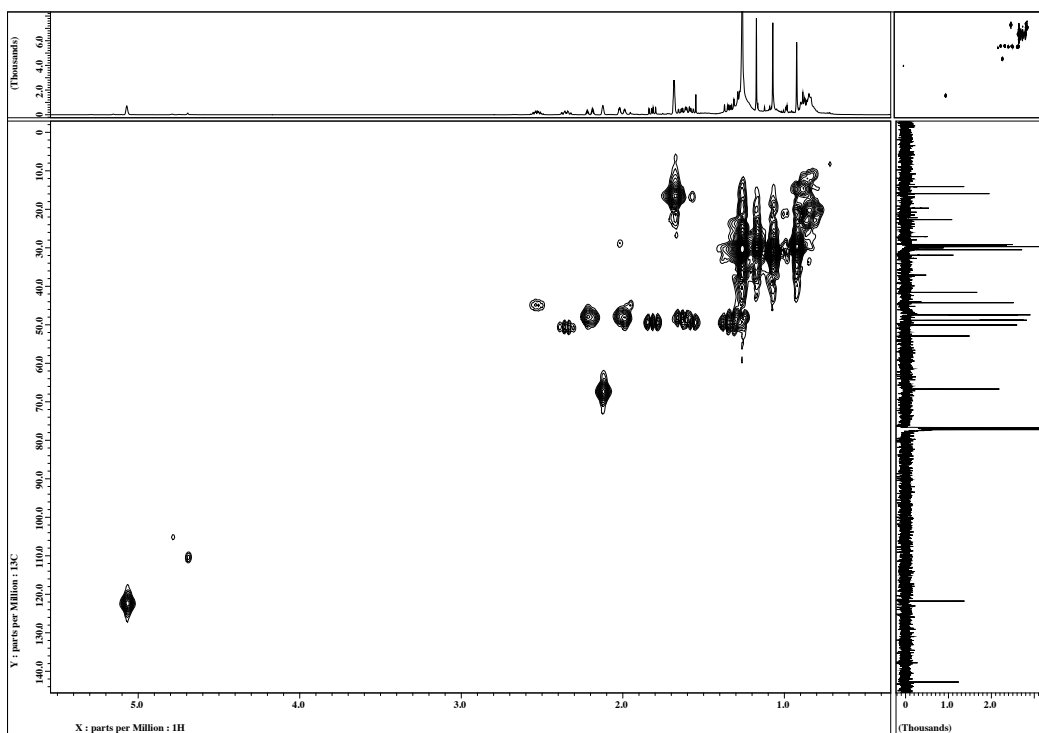


図3-86. Isohirsut-4-eneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

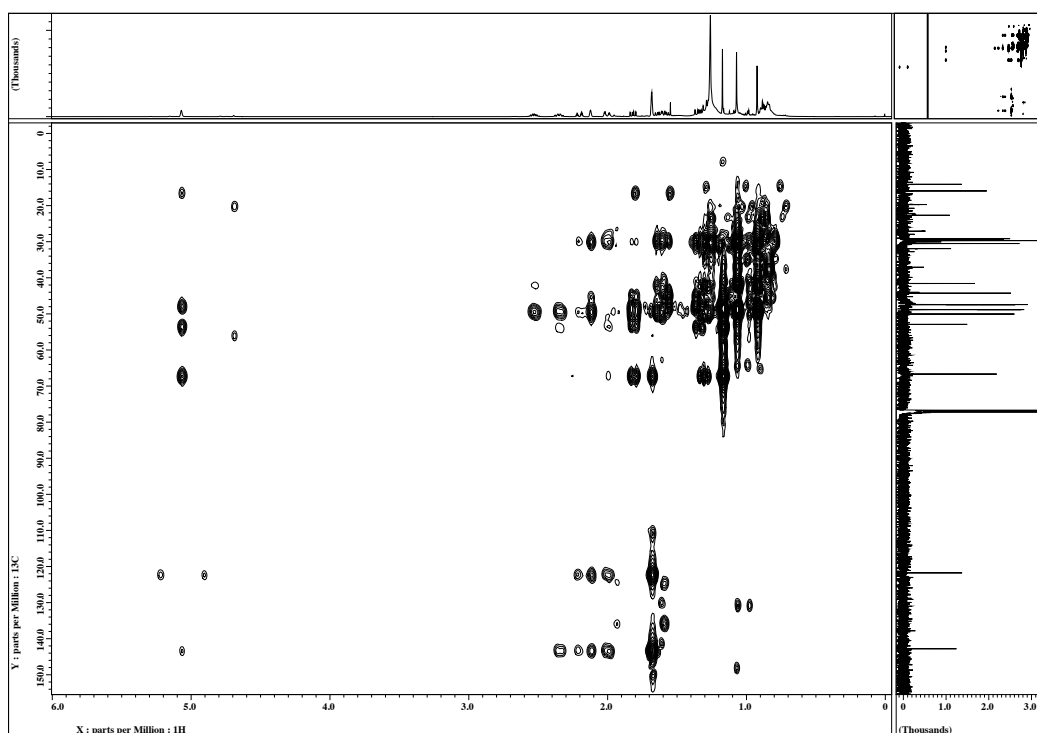


図3-87. Isohirsut-4-eneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

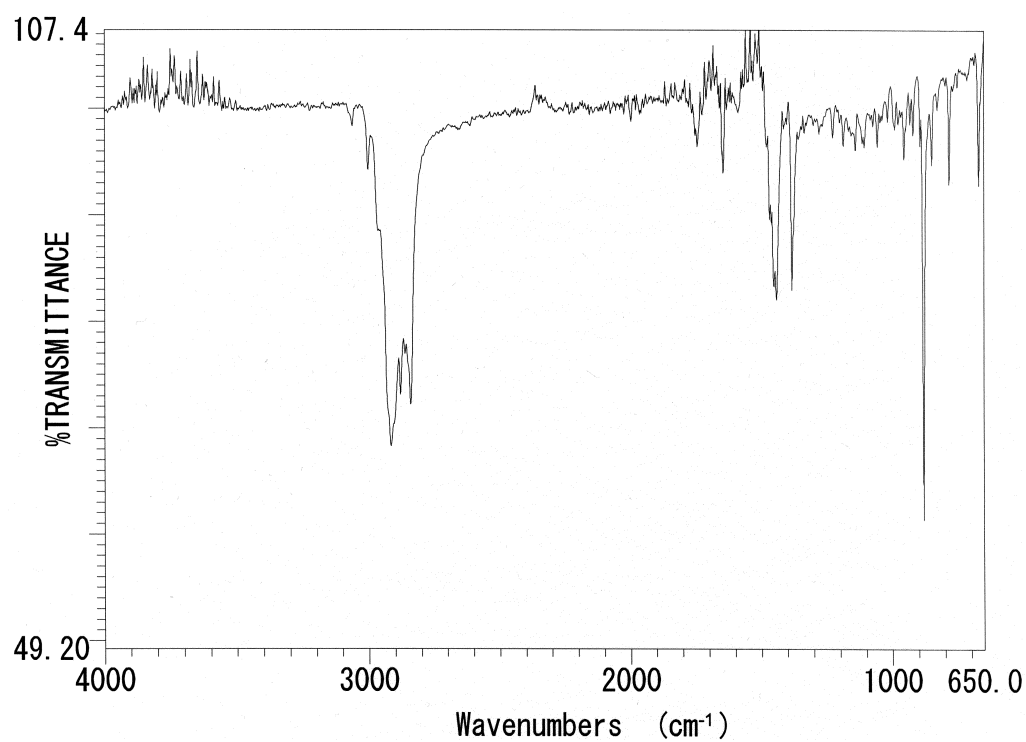
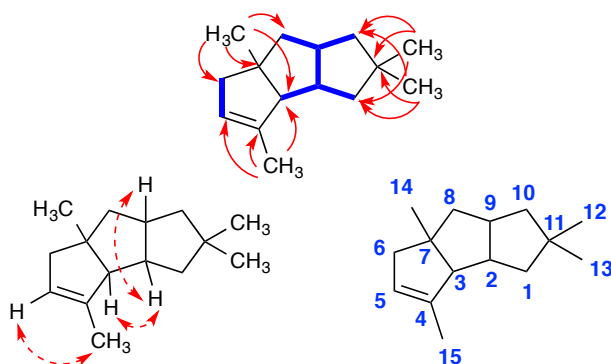


図3-88. Isohirsut-4-eneのIRデータ



17

NMR chemical shifts in CDCl₃

17

No.	δ_C	δ_H (multi, J in Hz)
1	48.8	1.58 (1H, dd, $J=13.0, 8.6$), 1.30 (1H, m)
2	50.1	2.34 (1H, q, $J=10.0$)
3	66.7	2.11 (1H, brs)
4	142.8	-
5	121.8	5.06 (1H, brs)
6	47.5	2.19 (1H, dq, $J=15.7, 2.2$), 2.01 (1H, dt, $J=15.7, 2.1$)
7	52.9	-
8	48.9	1.81 (1H, dd, $J=13.0, 7.8$), 1.32 (1H, dd, $J=13.0, 7.7$)
9	44.3	2.52 (1H, m)
10	47.4	1.64 (1H, ddd, $J=11.6, 8.7, 1.1$), 1.27 (1H, m)
11	41.6	-
12	29.2	0.92 (3H, s)
13	30.5	1.06 (3H, s)
14	29.4	1.17 (3H, s)
15	15.9	1.68 (3H, s)

図3-89. *slt18_1880*形質転換株が生産したisohirsut-4-ene (17)の構造

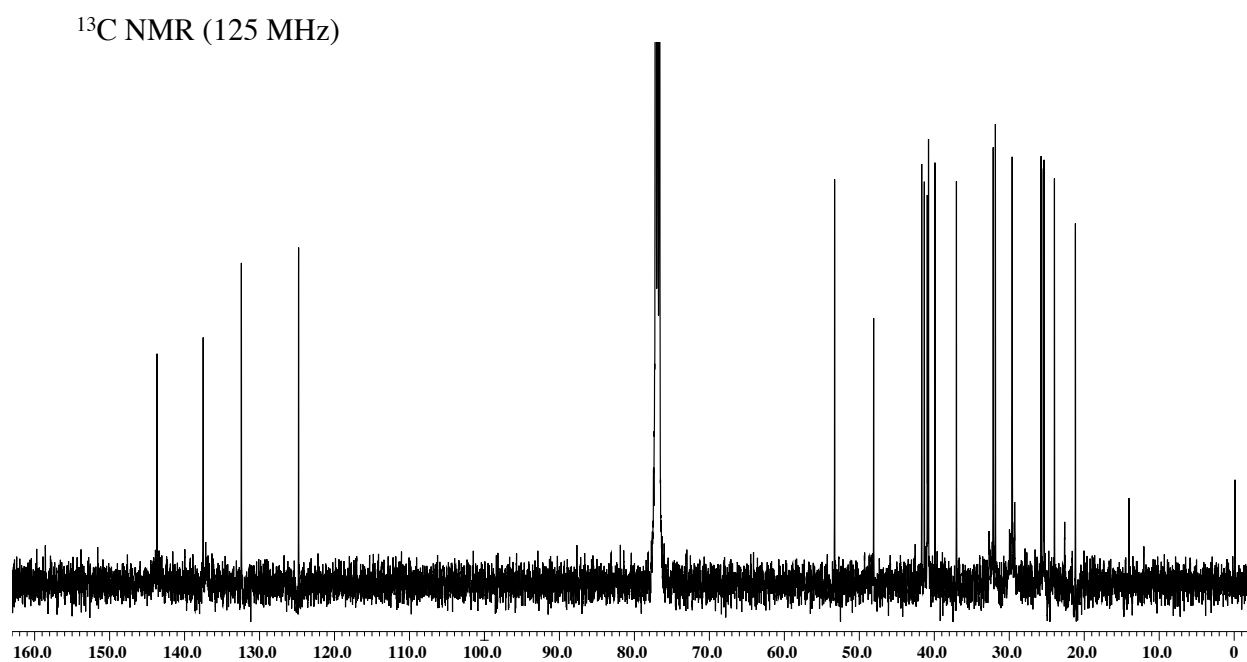
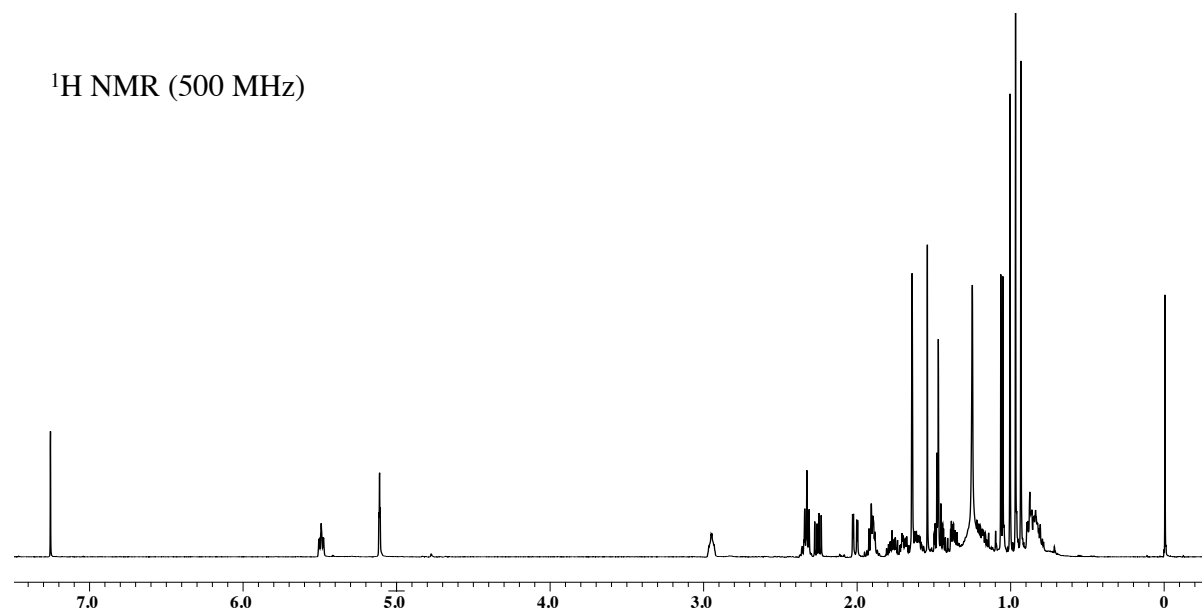


図3-90. Tsukubadieneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

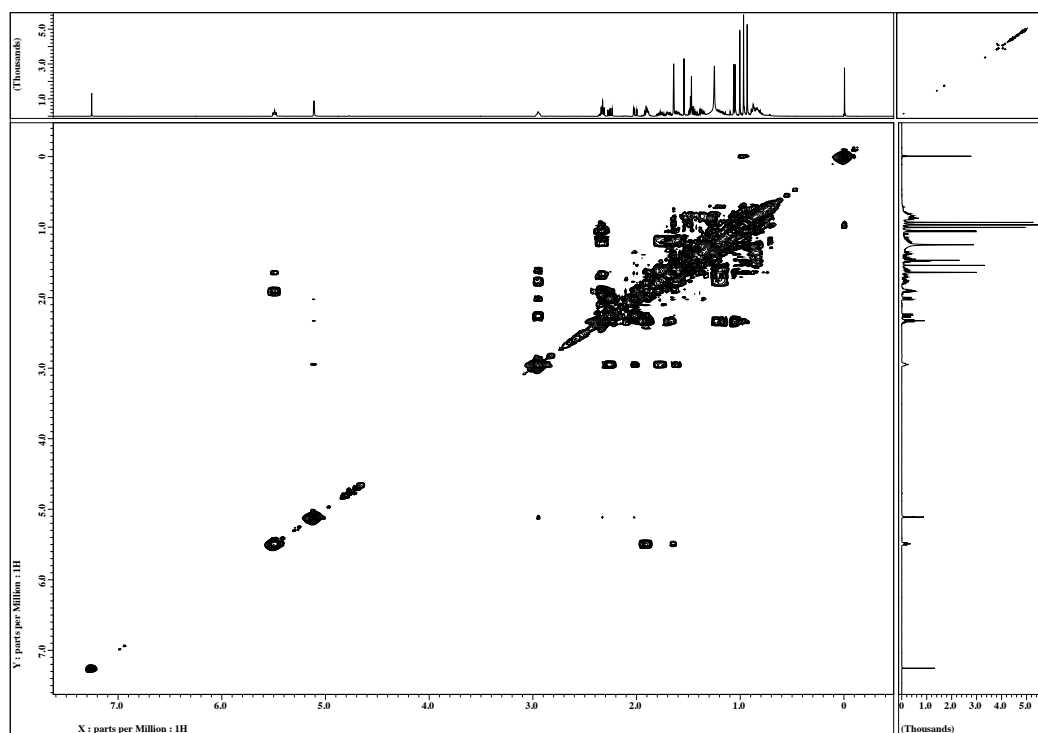


図3-91. Tsukubadieneの ^1H - ^1H COSYデータ

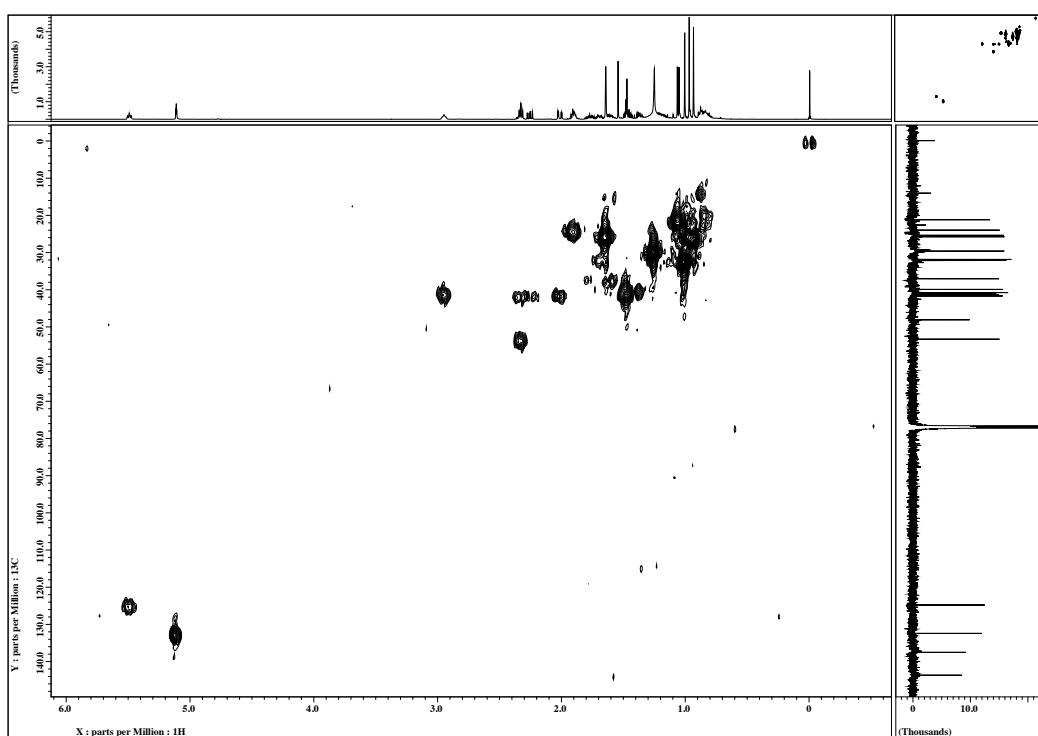


図3-92. Tsukubadieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

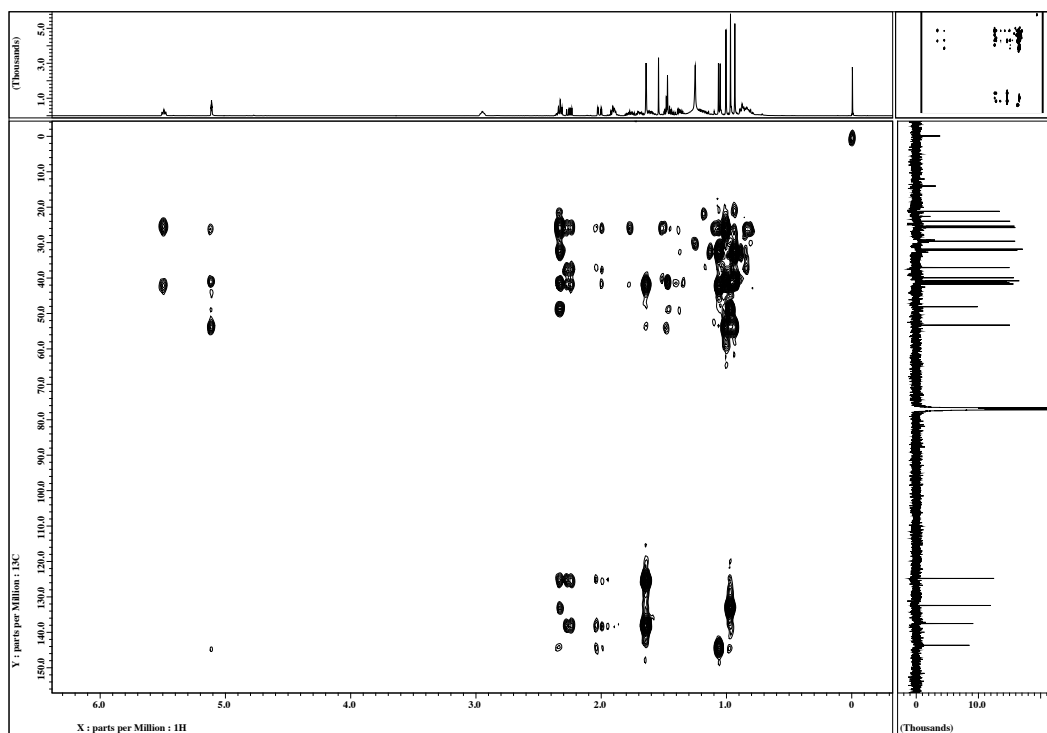


図3-93. Tsukubadieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

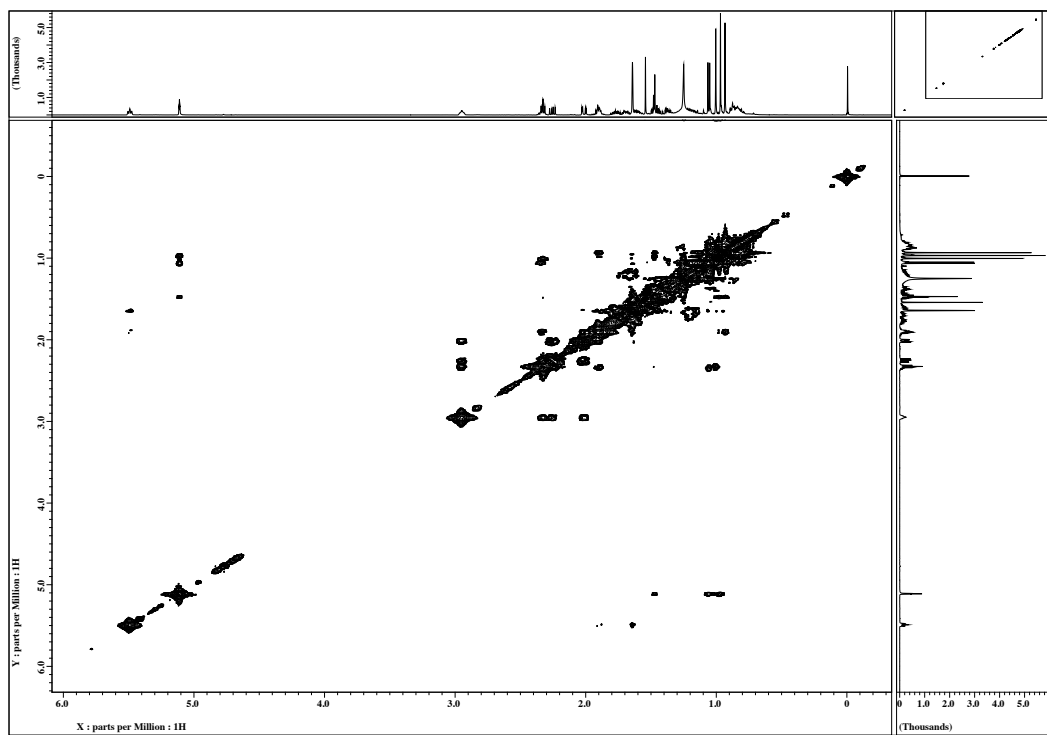


図3-94. Tsukubadieneの ^1H - ^1H NOESYデータ

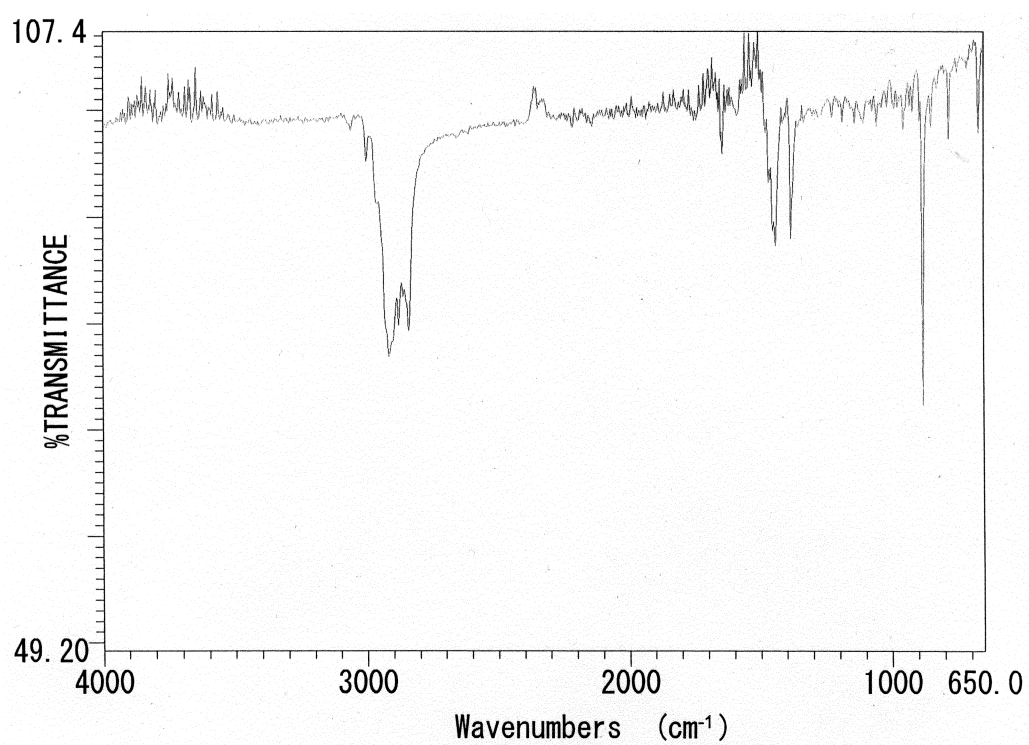
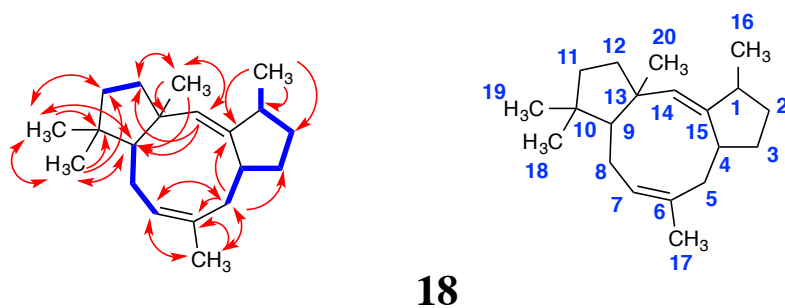


図3-95. TsukubadieneのIRデータ



18

NMR chemical shifts in CDCl_3

18

No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)
1	41.7	2.32 (1H, m)
2	31.9	1.70 (1H, m), 1.13 (1H, m)
3	37.0	1.78 (1H, m), 1.58 (1H, m)
4	40.9	2.96 (1H, m)
5	41.3	2.25 (1H, dd, $J=13.5, 7.7$), 2.01 (1H, dd, $J=13.5, 2.8$)
6	137.5	-
7	124.7	5.49 (1H, t, $J=7.3$)
8	24.0	1.90 (2H, m)
9	53.3	2.34 (1H, t, $J=7.0$)
10	40.8	-
11	39.9	1.48 (1H, m), 1.37 (1H, m)
12	40.7	1.47 (2H, m)
13	48.1	-
14	132.4	5.11 (1H, t, $J=2.0$)
15	143.7	-
16	21.7	1.05 (3H, d, $J=7.0$)
17	25.3	1.64 (3H, s)
18	32.1	1.00 (3H, s)
19	25.7	0.93 (3H, s)
20	25.4	0.96 (3H, s)

図3-96. *stsu_20912*形質転換株が生産したtsukubadiene (**18**)の構造

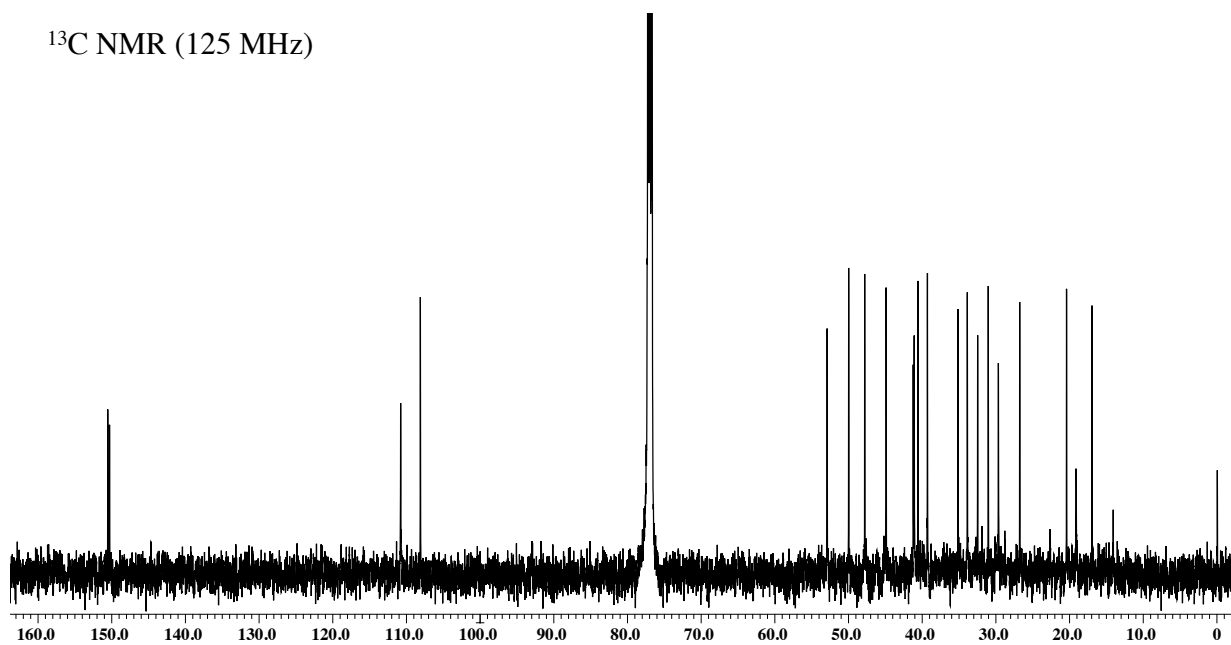
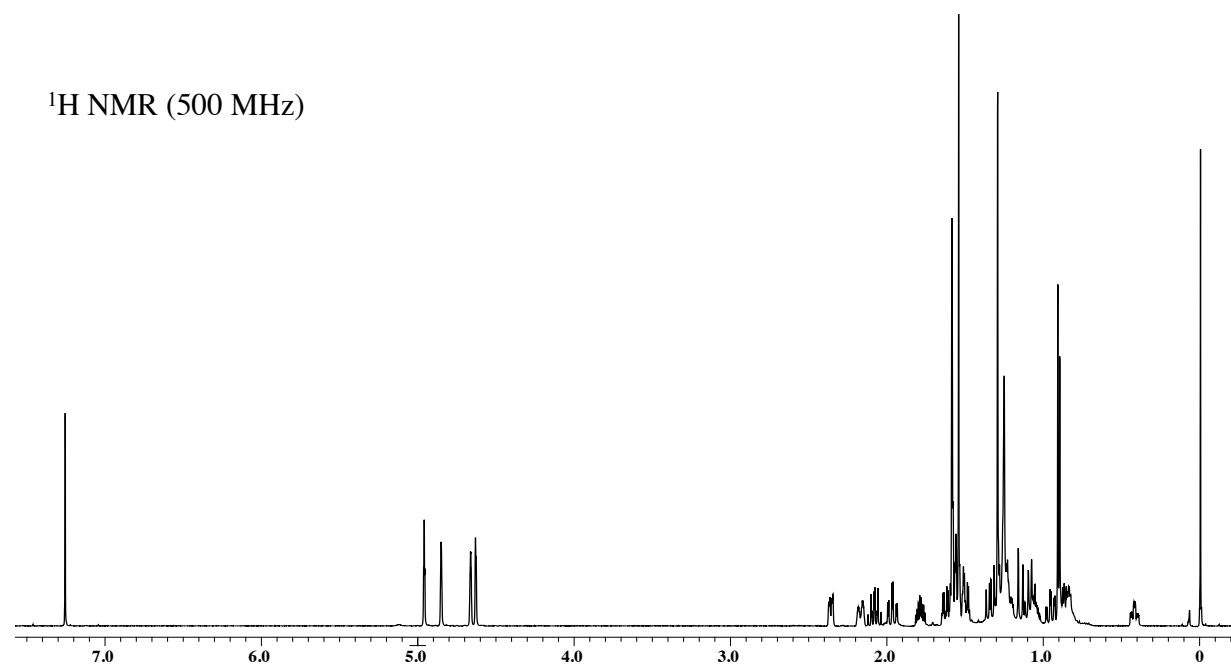


図3-97. Odyverdiene Aの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

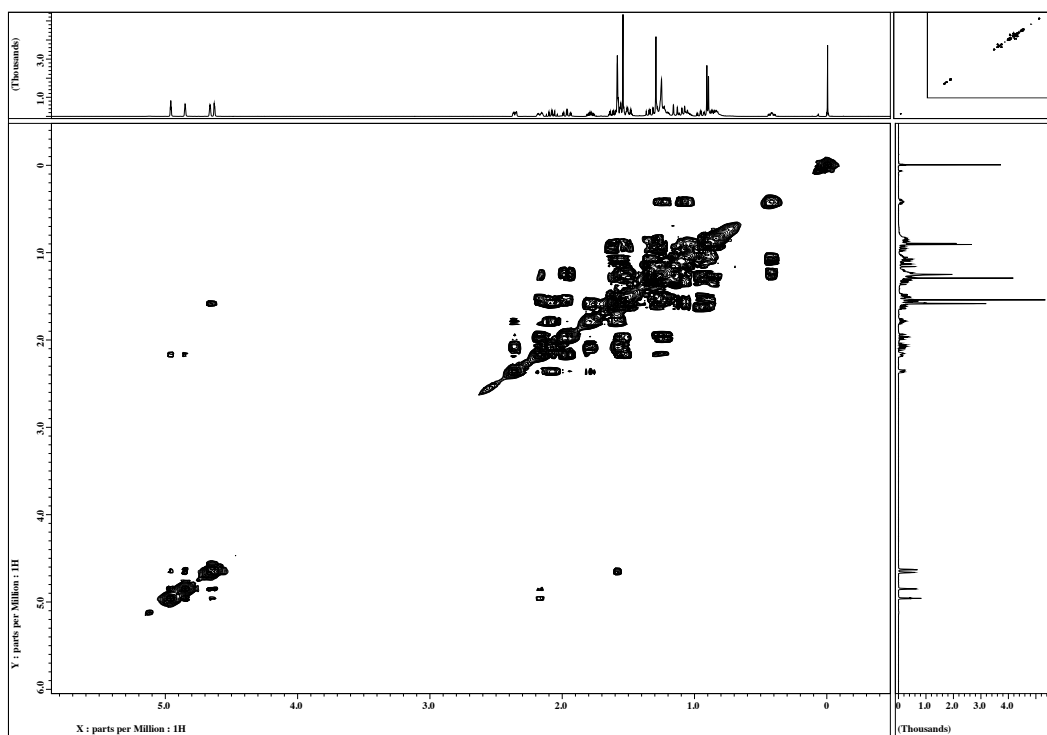


図3-98. Odyverdiene Aの ^1H - ^1H COSYデータ

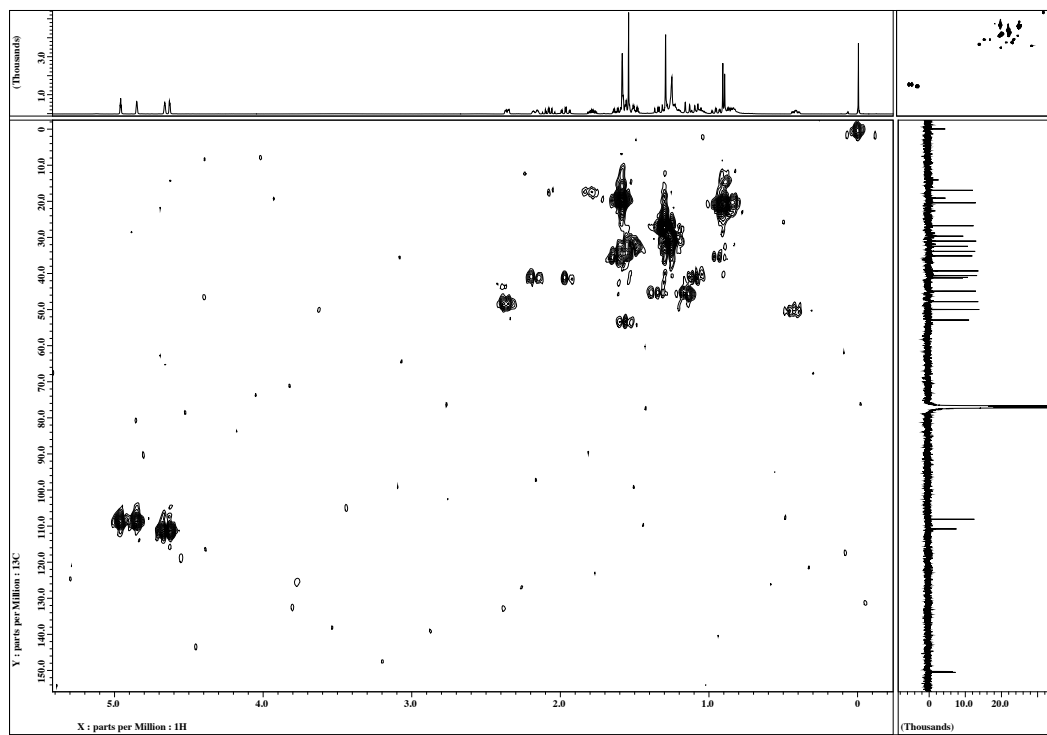


図3-99. Odyverdiene Aの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

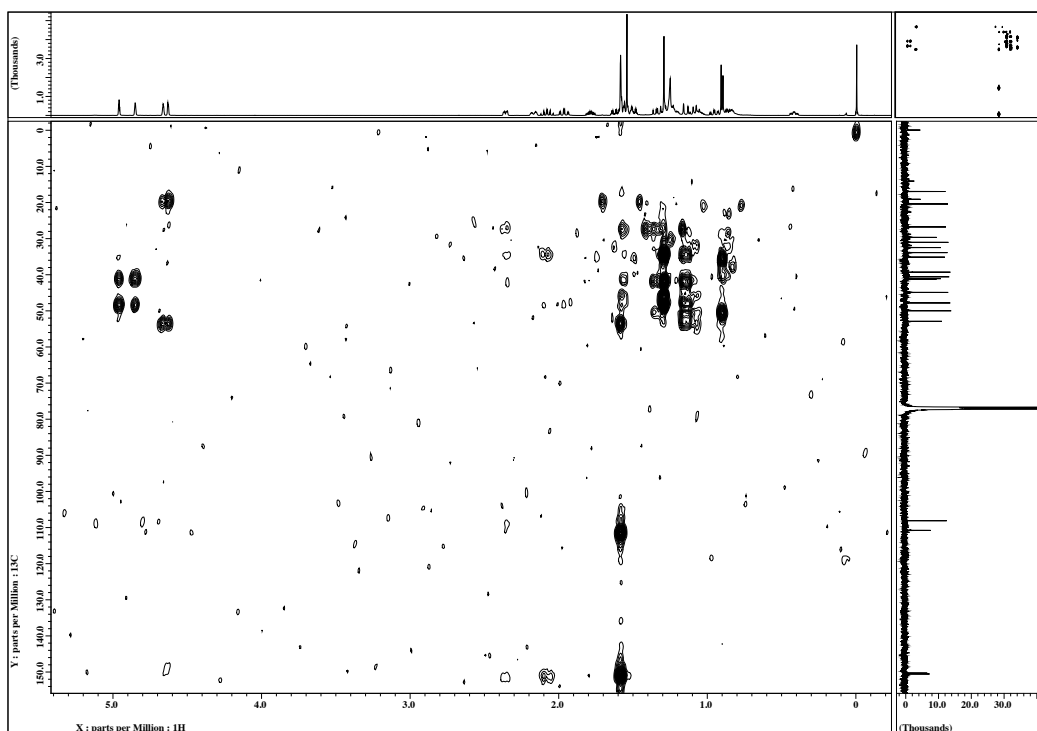


図3-100. Odyverdiene Aの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

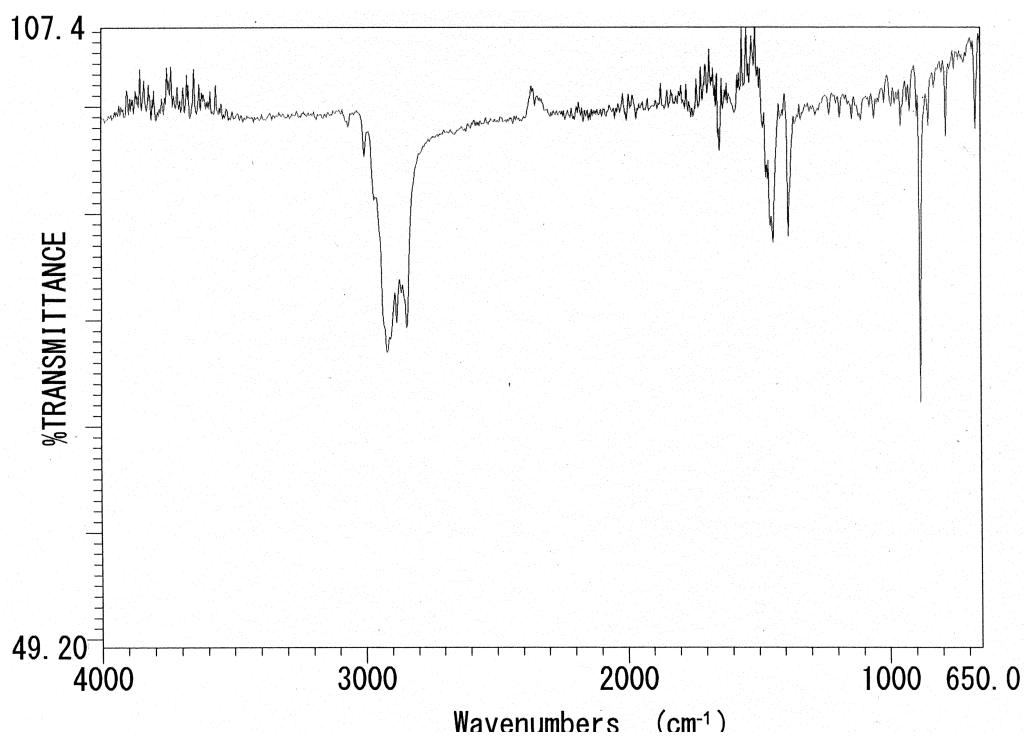
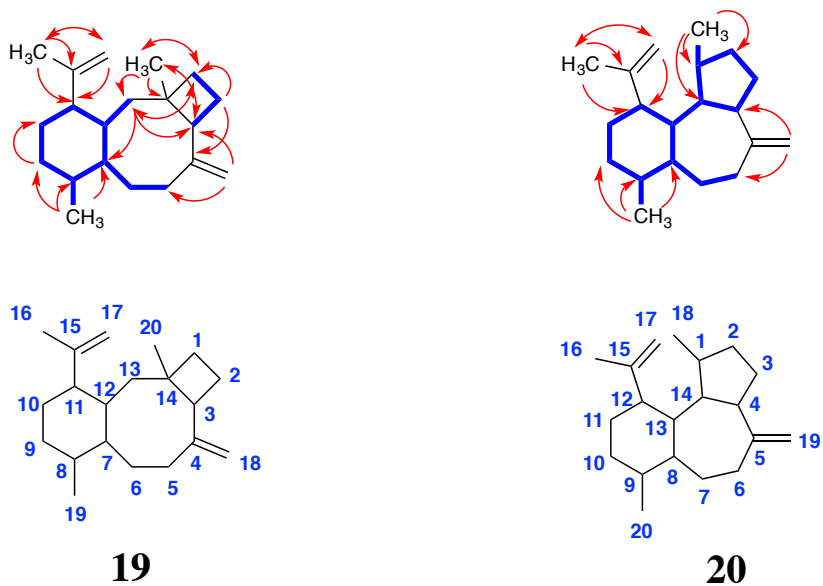


図3-101. Odyverdiene AのIRデータ



NMR chemical shifts in CDCl_3

19			20		
No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)	
1	33.8	1.57 (2H, m)	35.1	2.29 (1H, m)	
2	16.9	2.07 (1H, m), 1.79 (1H, m)	29.5	1.80(1H, m), 1.24(1H, m)	
3	47.8	2.36 (1H, dd, $J=9.8, 3.5$)	27.0	1.58 (2H, m)	
4	150.5	-	42.4	2.52 (1H, m)	
5	40.6	2.17 (1H, m), 1.96 (1H, ddd, $J=14.0, 14.0, 3.0$)	151.6	-	
6	31.0	1.53 (1H, m), 1.22 (1H, m)	38.1	2.36 (1H, m), 2.11 (1H, ddd, $J=13.4, 13.4, 5.8$)	
7	49.9	0.42 (1H, m)	28.3	1.70 (1H, m), 1.44(1H, m)	
8	39.2	1.06 (1H, m)	46.0	0.75 (1H, m)	
9	35.1	1.62 (1H, m), 0.96 (1H, m)	37.5	1.14 (1H, m)	
10	32.4	1.49 (1H, m), 1.29 (1H, m)	35.4	1.67 (1H, m), 0.98 (1H, m)	
11	52.9	1.55 (1H, m)	32.9	1.43 (1H, m), 1.35 (1H, m)	
12	41.1	1.10 (1H, m)	56.0	1.64 (1H, m)	
13	44.9	1.36(1H, m), 1.14(1H, m)	45.7	1.28 (1H, m)	
14	41.2	-	59.6	1.11 (1H, m)	
15	150.3	-	150.7	-	
16	19.1	1.58 (3H, s)	20.1	1.64 (3H, s)	
17	110.8	4.66 (1H, s), 4.63 (1H, s)	107.0	4.70 (1H, s), 4.58 (1H, s)	
18	108.1	4.96 (1H, s), 4.85 (1H, s)	19.8	0.83 (3H, d, $J=12.0$)	
19	20.4	0.90 (3H, d, $J=12.0$)	110.0	4.89 (1H, s), 4.75 (1H, s)	
20	26.8	1.29 (3H, s)	20.6	0.90 (3H, d, $J=12.0$)	

図3-102. *nd90_0354*形質転換株が生産したodyverdiene A (**19**)およびodyverdiene B (**20**)の構造

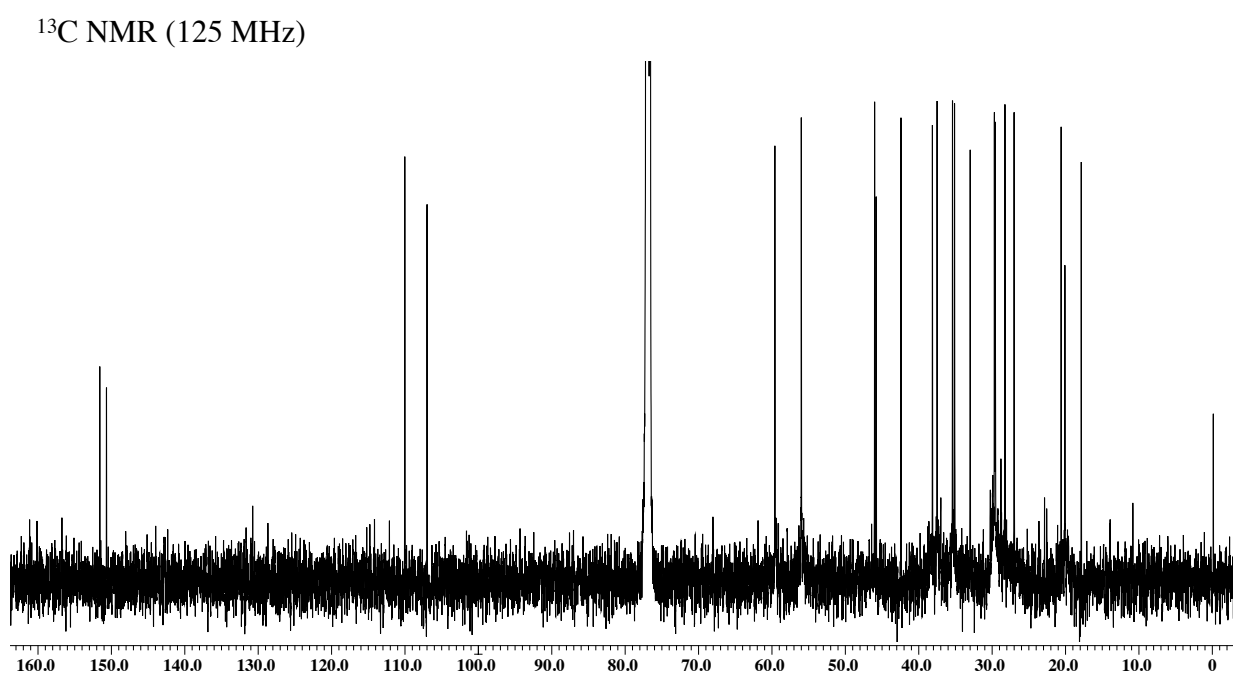
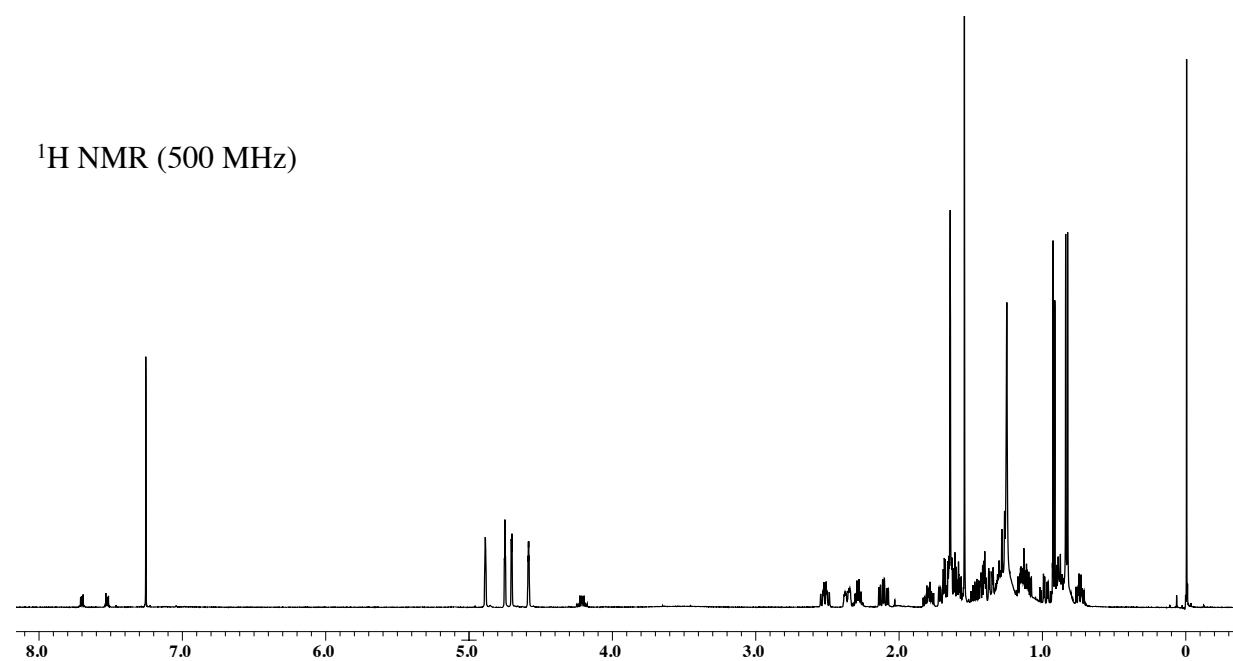


図3-103. Odyverdiene Bの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

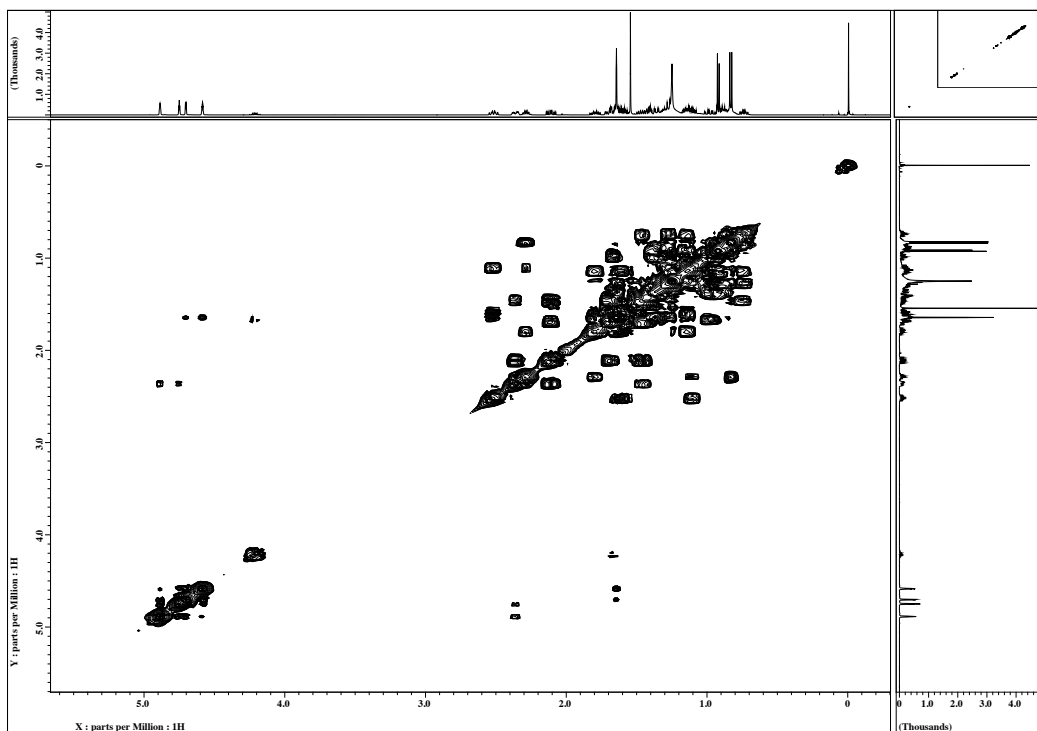


図3-104. Odyverdiene Bの ^1H - ^1H COSYデータ

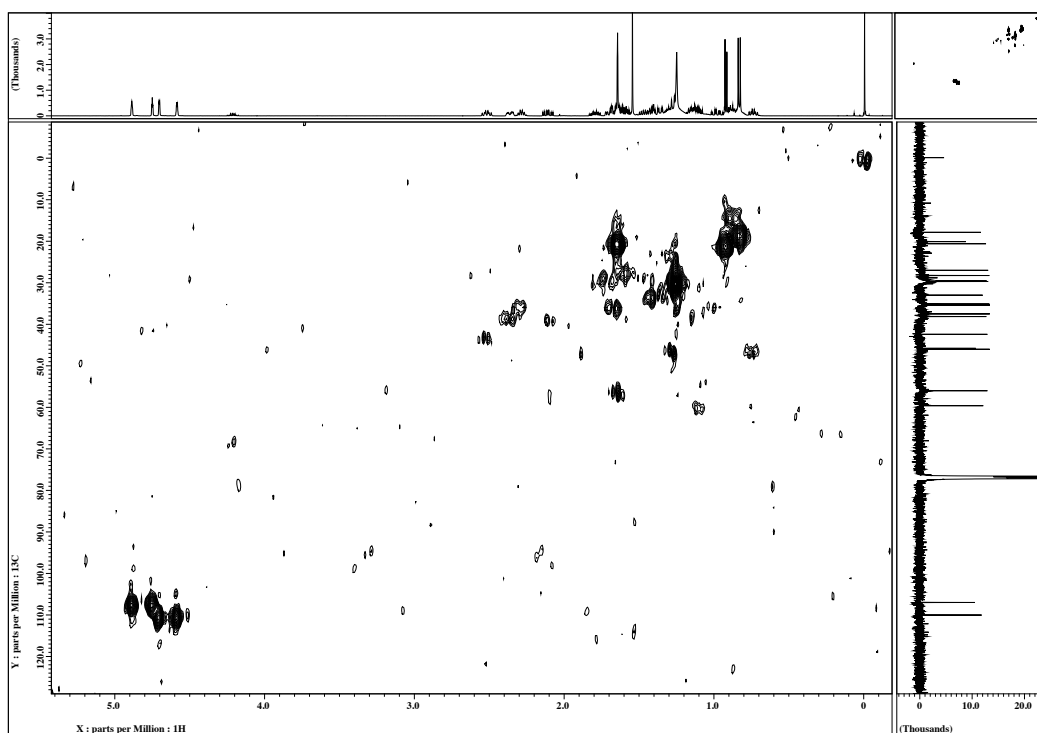


図3-105. Odyverdiene Bの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

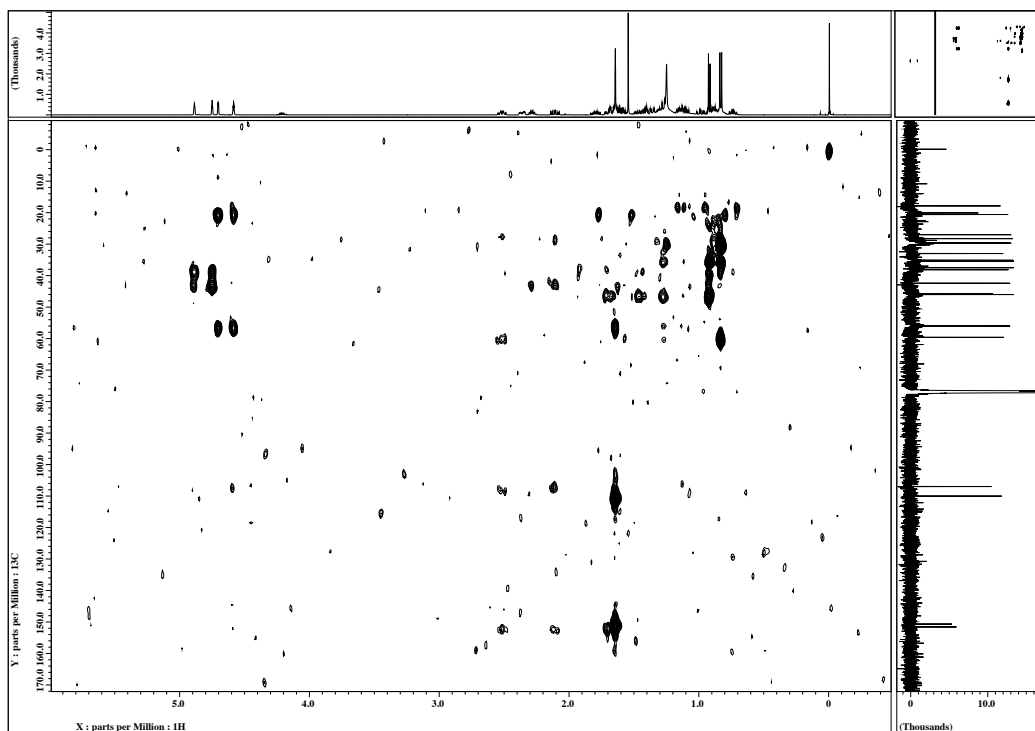


図3-106. Odyverdiene Bの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

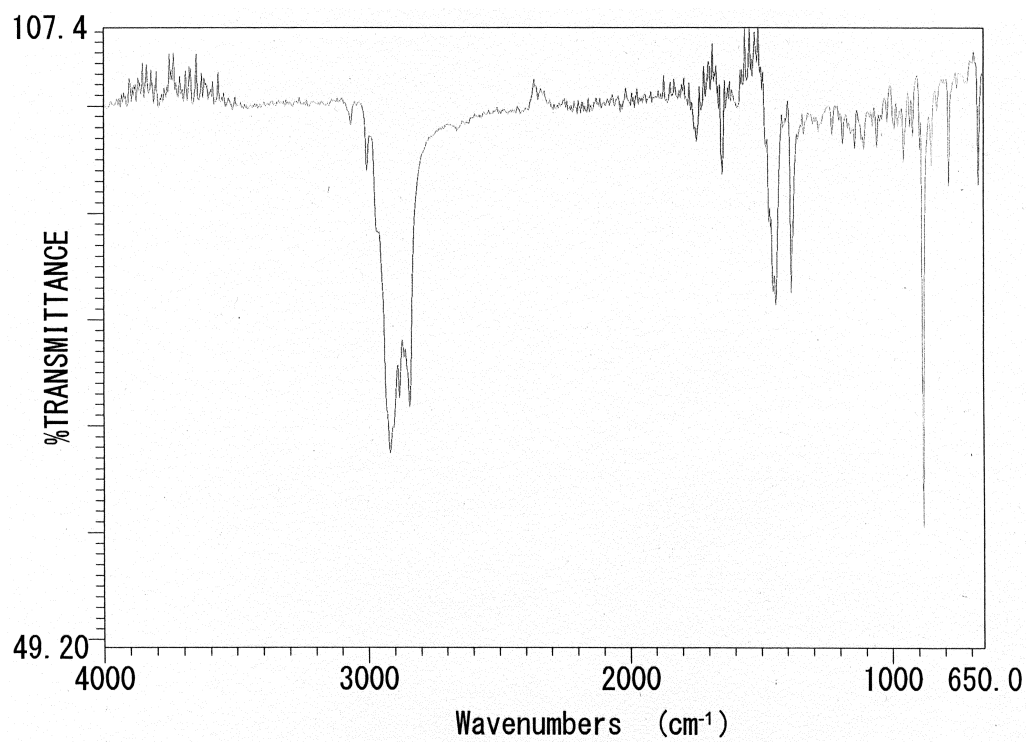


図3-107. Odyverdiene BのIRデータ

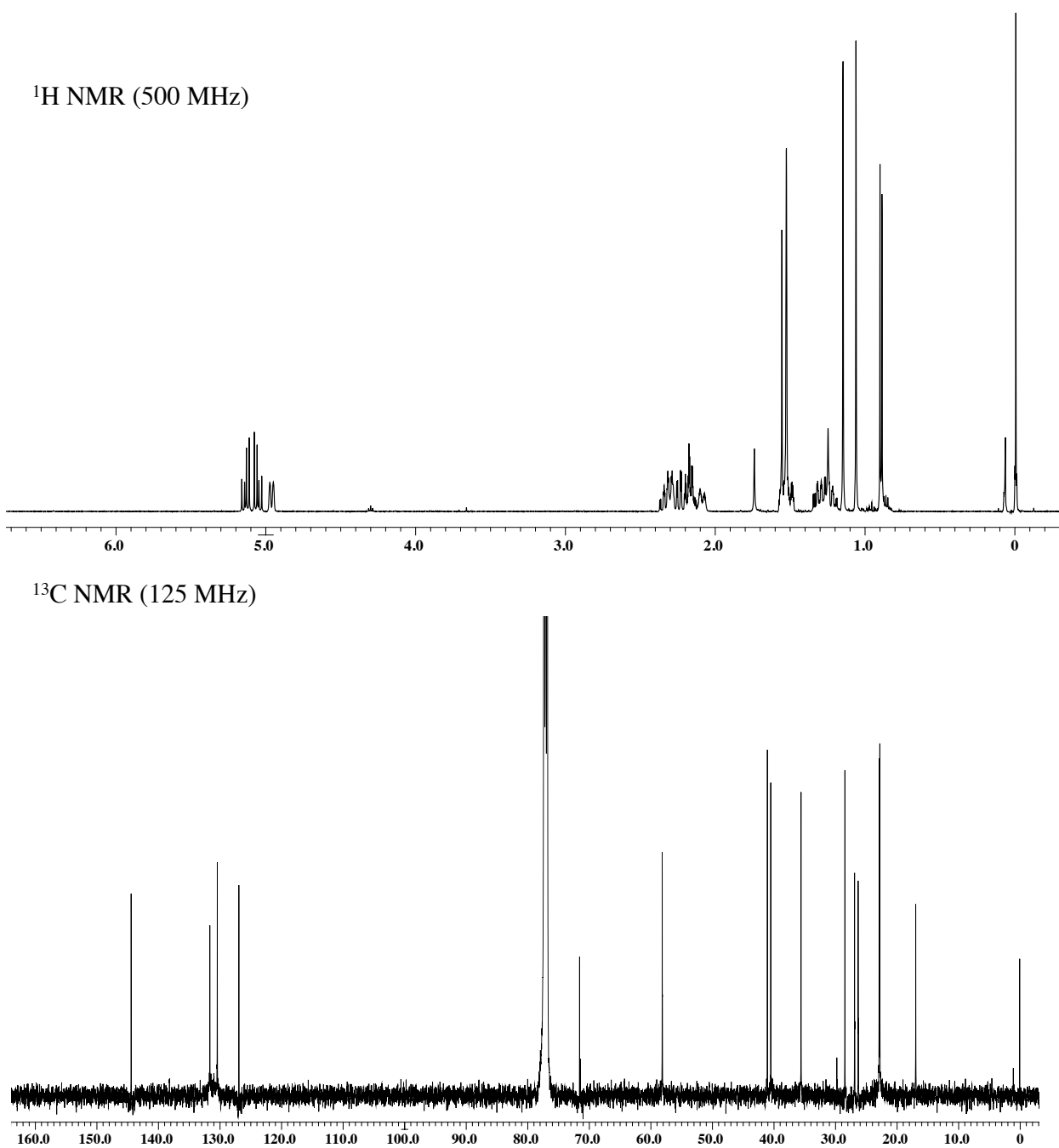


図3-108. Allohedycariolの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

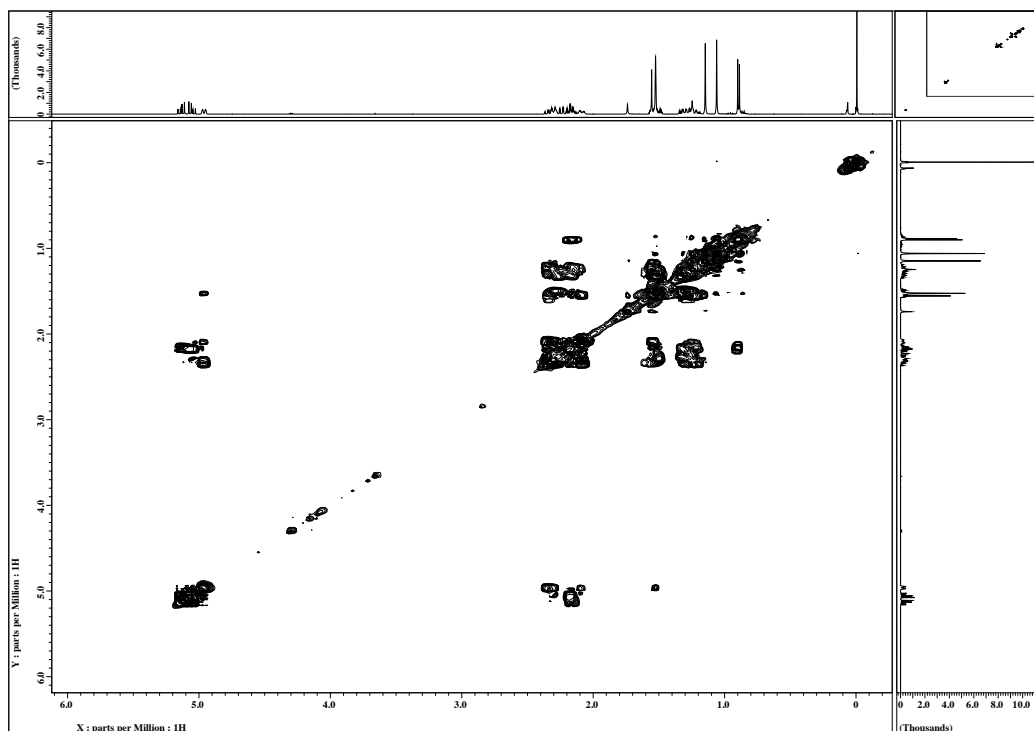


図3-109. Allohedycariolの ^1H - ^1H COSYデータ

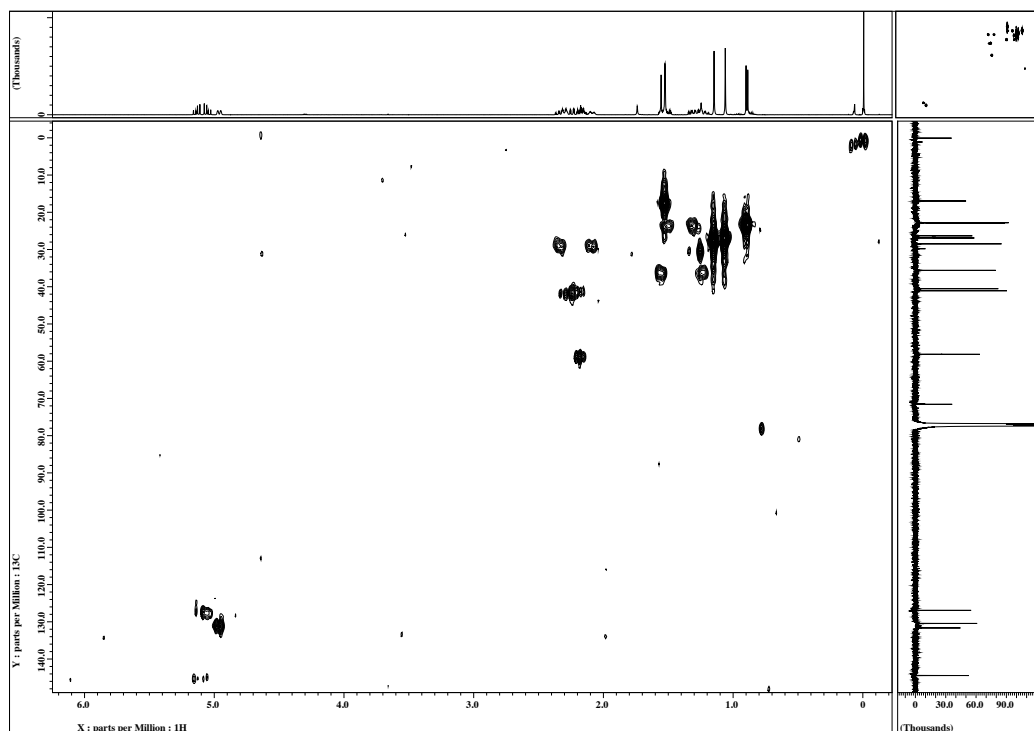


図3-110. Allohedycariolの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

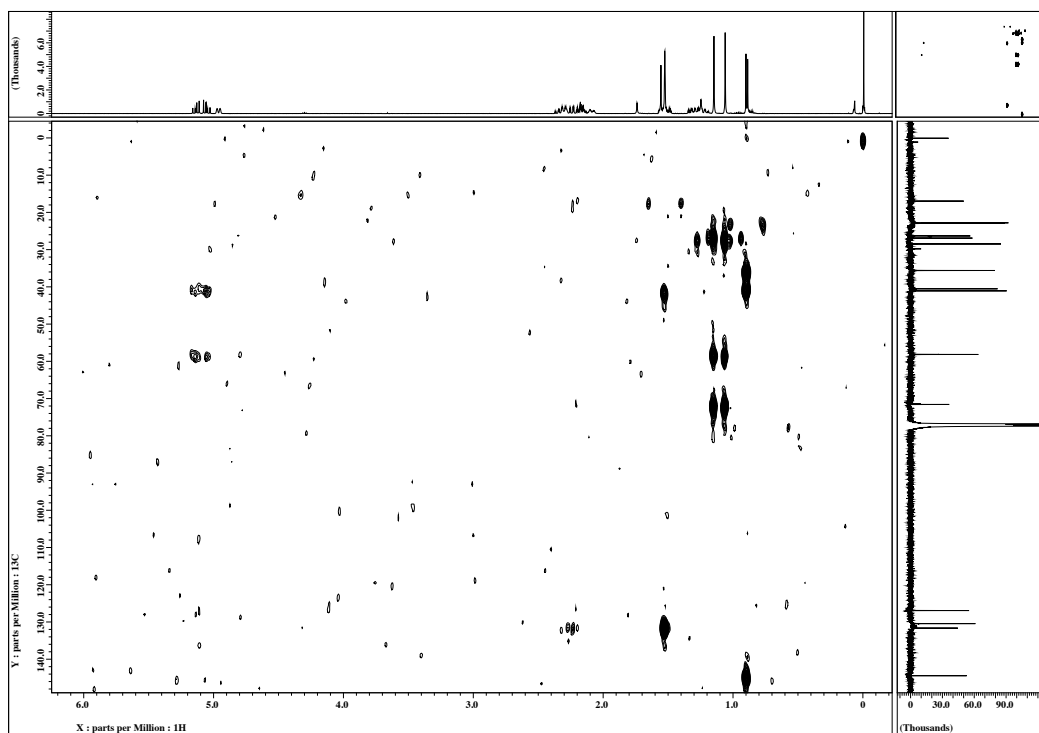


図3-111. Allohedycariolの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

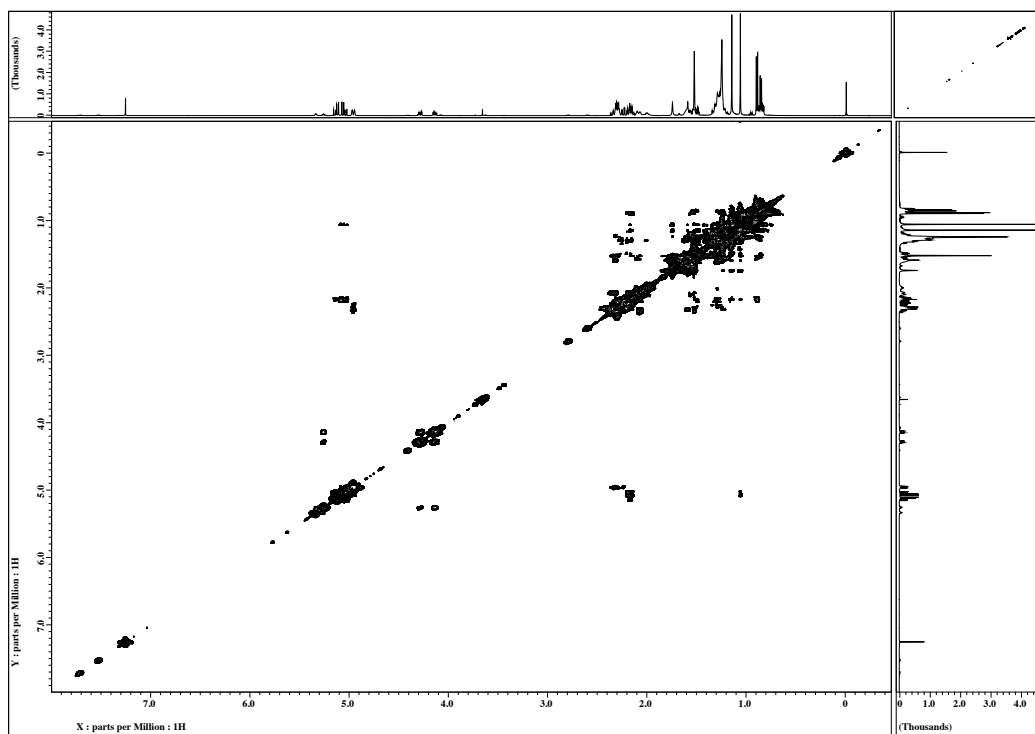
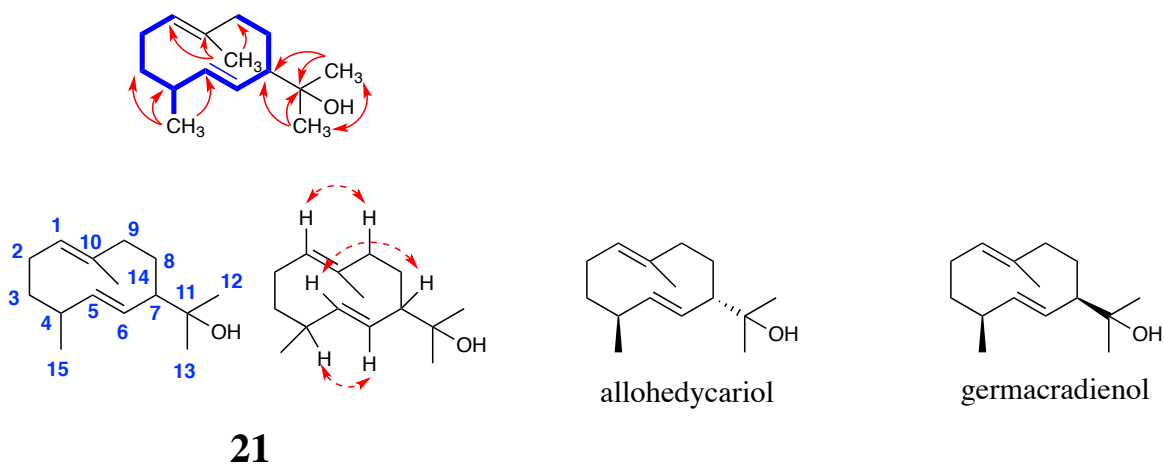


図3-112. Allohedycariolの ^1H - ^1H NOESYデータ



NMR chemical shifts in CDCl_3

21			allohedycariol	germacradienol	
No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)
1	130.4	4.96 (1H, br d, $J=11.0$)	130.2	131.0	5.06 (1H, br d, $J=11.5$)
2	28.4	2.38 (1H, m), 2.10 (1H, m)	28.4	22.1	2.43 (1H, m), 1.91 (1H, br d, $J=14.1$)
3	35.6	1.56 (1H, m), 1.25 (1H, m)	35.6	33.2	1.71 (1H, m), 1.55 (1H, m)
4	40.5	2.17 (1H, m)	40.4	34.2	2.42 (1H, m)
5	144.0	5.10 (1H, dd, $J=15.0, 9.4$)	143.9	143.6	5.67 (1H, dd, $J=16.0, 3.55$)
6	127.1	5.09 (1H, dd, $J=15.0, 9.4$)	127.1	124.1	4.99 (1H, ddd, $J=16.0, 9.8, 1.9$)
7	58.8	2.18 (1H, m)	58.0	59.3	2.24 (1H, m)
8	22.8	1.49 (1H, m), 1.32 (1H, m)	22.7	22.5	1.49 (1H, m), 1.28 (1H, m)
9	41.2	2.27 (2H, m)	41.0	41.7	2.22 (2H, m)
10	132.1	-	131.5	131.6	-
11	71.5	-	71.5	72.1	-
12	26.2	1.06 (3H, s)	26.5	26.6	1.10 (3H, s)
13	26.8	1.15 (3H, s)	26.7	27.3	1.18 (3H, s)
14	16.8	1.55 (3H, s)	16.8	17.2	1.57 (3H, br s)
15	22.7	0.90 (3H, d, $J=6.60$)	22.6	15.1	1.13 (3H, d, $J=6.9$)

図3-113. *mmar_3220*形質転換株が生産したallohedycariol (**21**)の構造

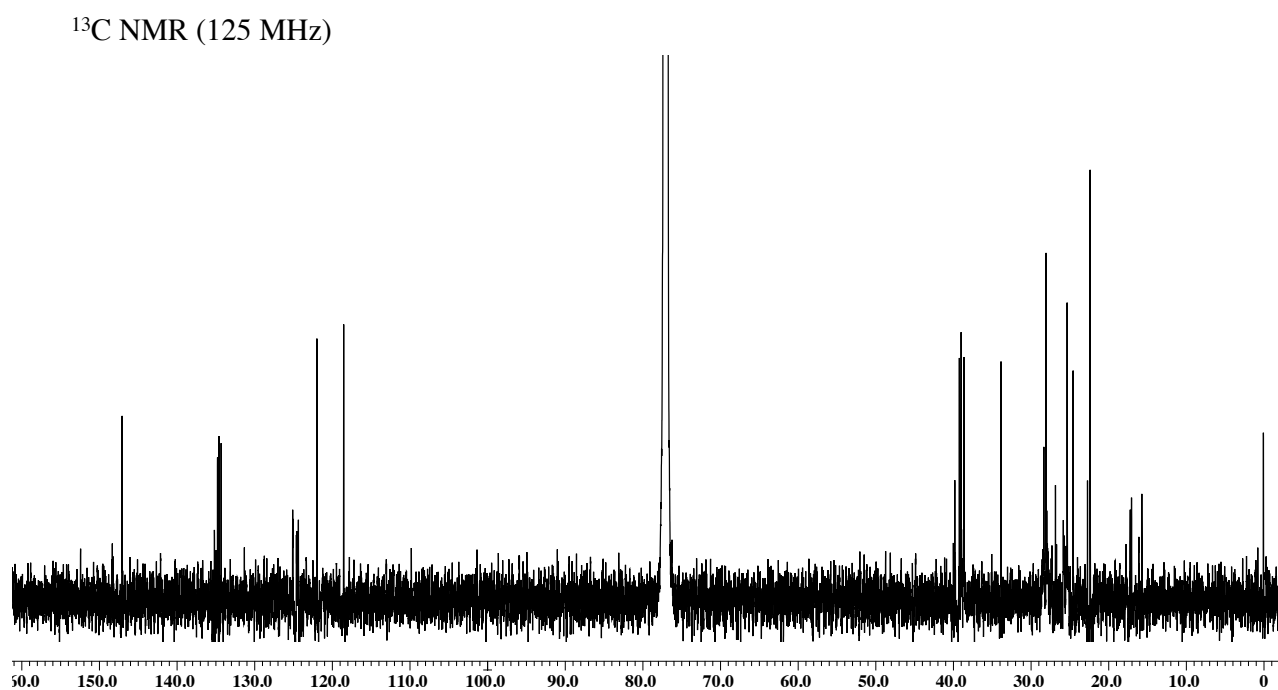
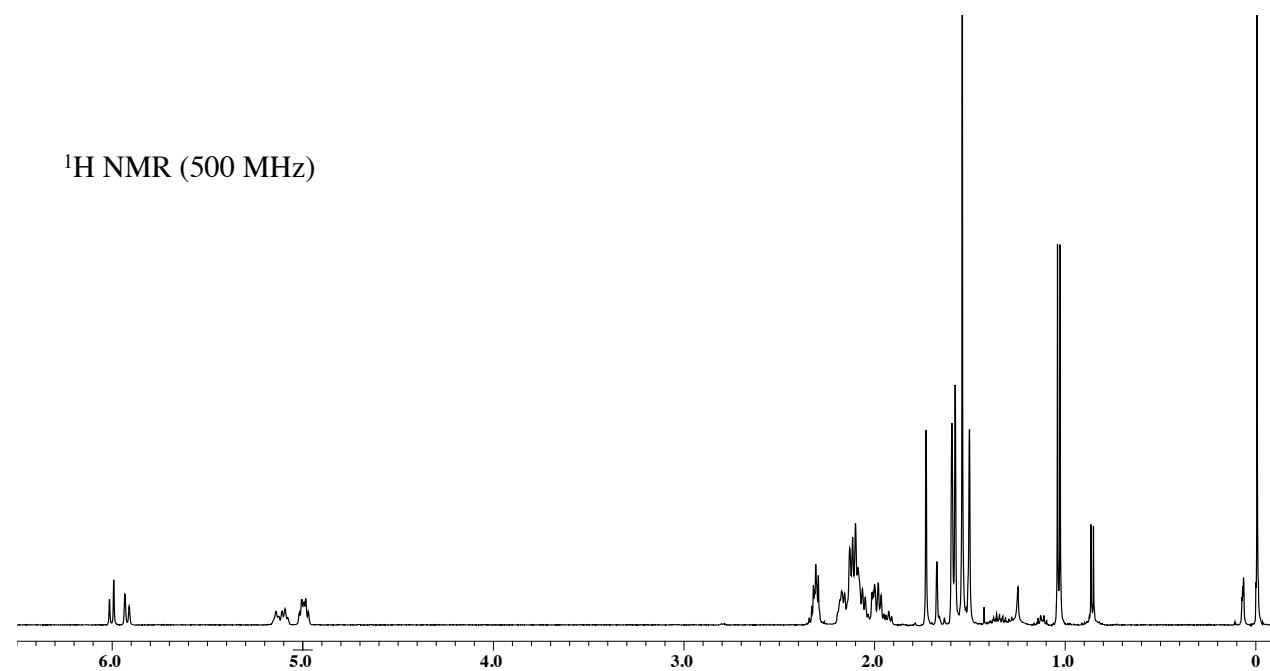
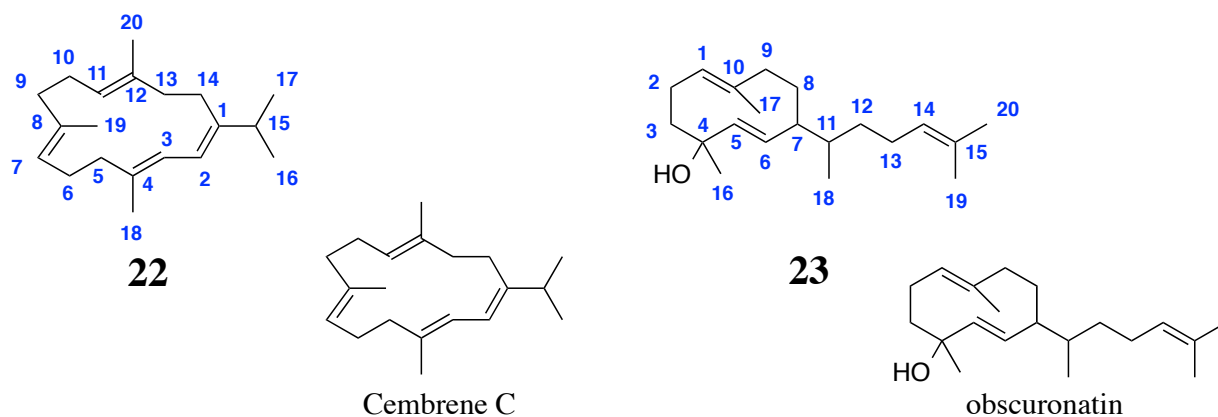


図3-114. Cembrene Cの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)



NMR chemical shifts in CDCl₃

22			Cembrene C	23			obscuronatin
No.	δ_c	δ_H (multi, J in Hz)	δ_c	δ_c	δ_H (multi, J in Hz)	δ_c	δ_c
1	147.0	-	147.2	126.1	4.99 (1H, d, $J=10.5$)	126.4	
2	118.2	6.09 (1H, d, $J=11.0$)	118.6	23.7	1.95 (1H, m), 2.48 (1H, m)	23.9	
3	122.0	5.99 (1H, dd, $J=1.5, 10.0$)	122.3	40.0	1.58 (1H, m), 1.63 (1H, m)	39.8	
4	134.5	-	134.7	73.0	-	72.9	
5	38.9	2.21 (2H, m)	39.0	140.0	5.24 (1H, d, $J=15.0$)	140.1	
6	25.7	2.22 (2H, m)	25.0	129.4	5.19 (1H, dd, $J=9.5, 16.0$)	129.1	
7	125.0	5.09 (1H, m)	125.4	51.8	2.04 (1H, m)	52.1	
8	134.3	-	134.1	33.5	1.39 (2H, m)	33.4	
9	38.5	2.20 (2H, m)	38.9	41.8	2.26 (2H, m)	41.5	
10	24.4	2.18 (2H, m)	24.2	132.4	-	132.4	
11	124.1	5.08 (1H, m)	124.1	26.0	1.50 (1H, m), 1.66 (1H, m)	25.9	
12	134.2	-	135.0	38.1	1.14 (1H, m), 1.34 (1H, m)	38.2	
13	39.0	2.14 (2H, m)	38.4	25.6	2.14 (2H, m)	25.5	
14	28.0	2.35 (2H, m)	27.7	125.7	5.09 (1H, m)	125.2	
15	33.5	2.36 (1H, m)	33.4	130.2	-	130.6	
16	22.4	1.10 (3H, d, $J=6.8$)	22.3	31.0	1.20 (3H, s)	31.0	
17	22.3	1.09 (3H, d, $J=3.5$)	22.2	16.5	1.55 (3H, s)	16.8	
18	17.1	1.63 (3H, s)	17.2	17.1	0.83 (3H, d, $J=6.5$)	17.2	
19	15.5	1.54 (3H, d, $J=3.5$)	15.6	17.8	1.59 (3H, s)	17.7	
20	17.0	1.79 (3H, s)	17.1	25.9	1.68 (3H, s)	25.8	

図3-115. *rxyl_0493*形質転換株が生産したcembrene C (22)および
*haur_2987*形質転換株が生産したobscuronatin (23)の構造

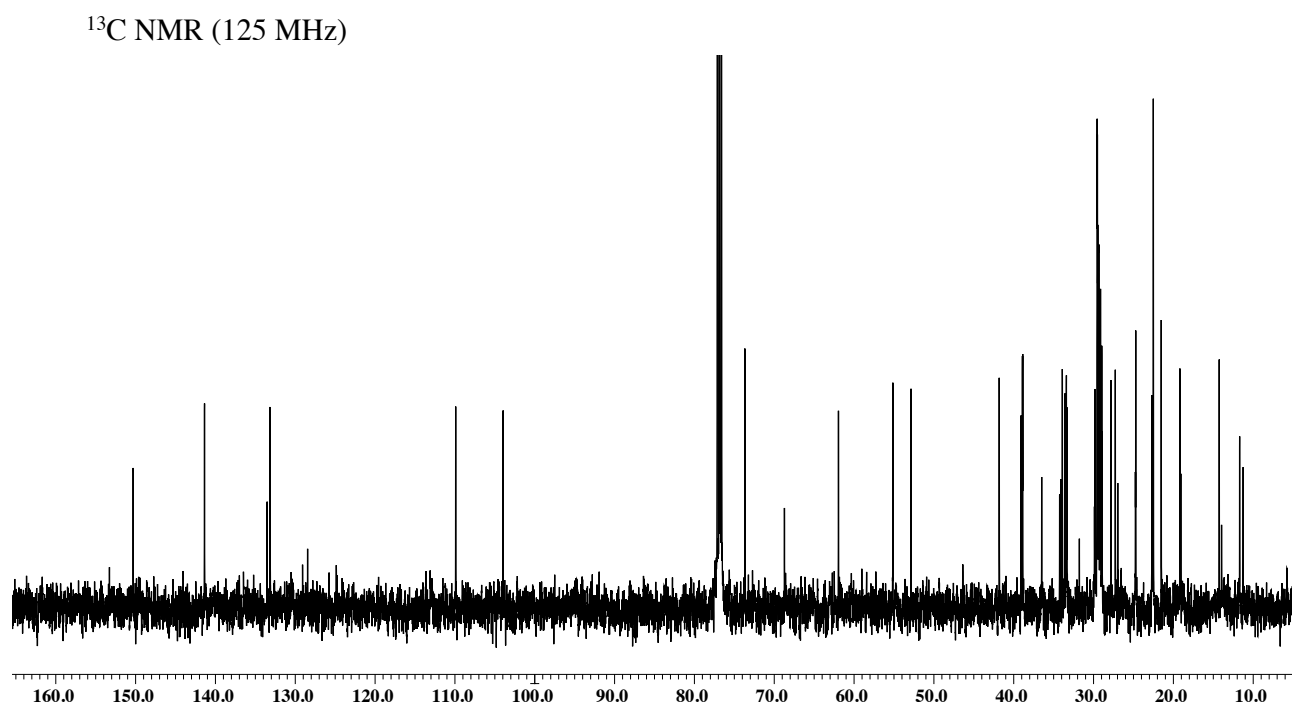
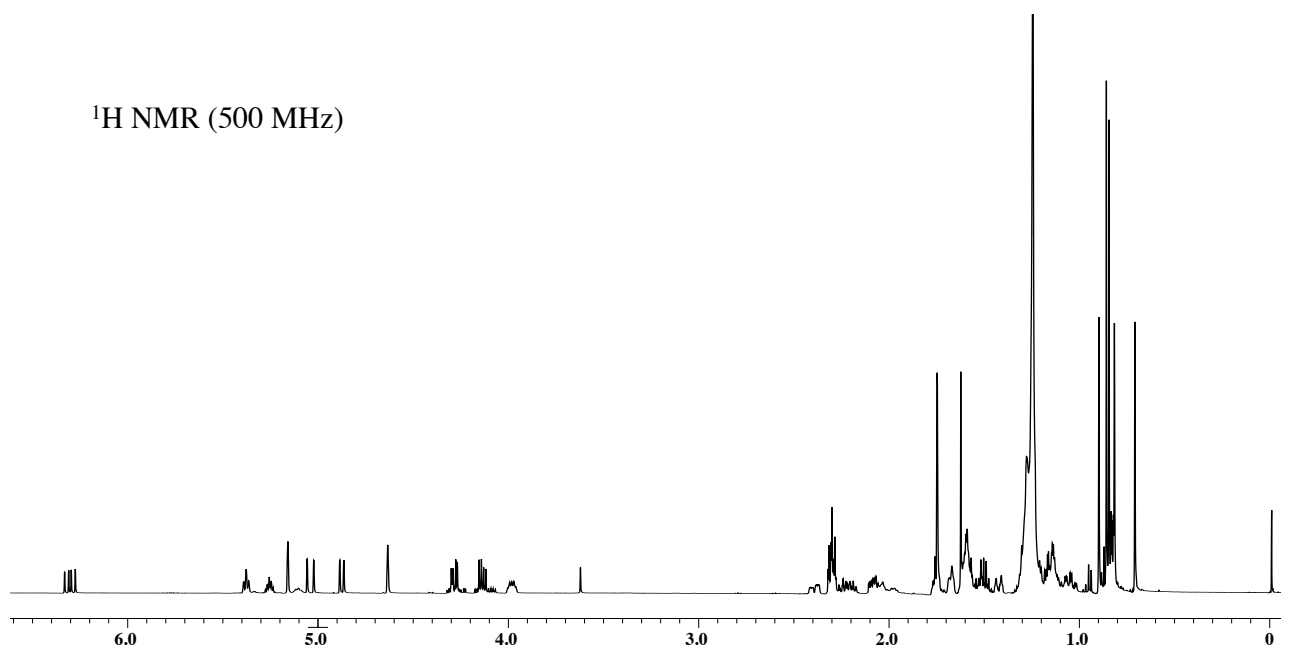
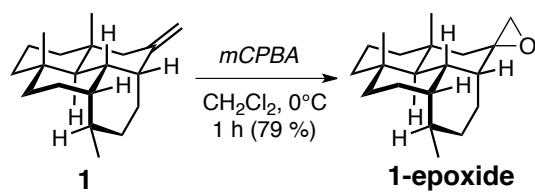
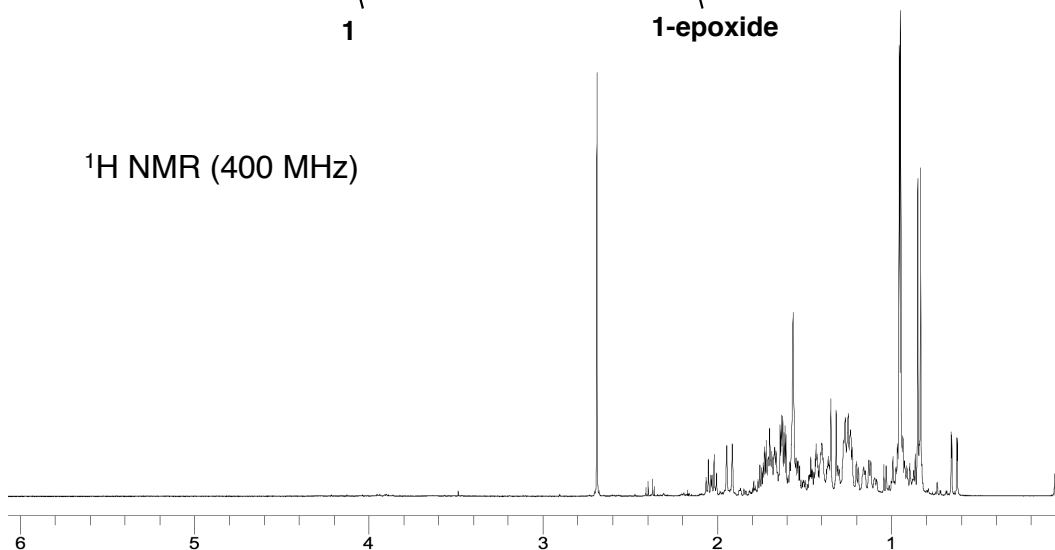


図3-116. Obscuronatinの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

(A)



^1H NMR (400 MHz)



(B)

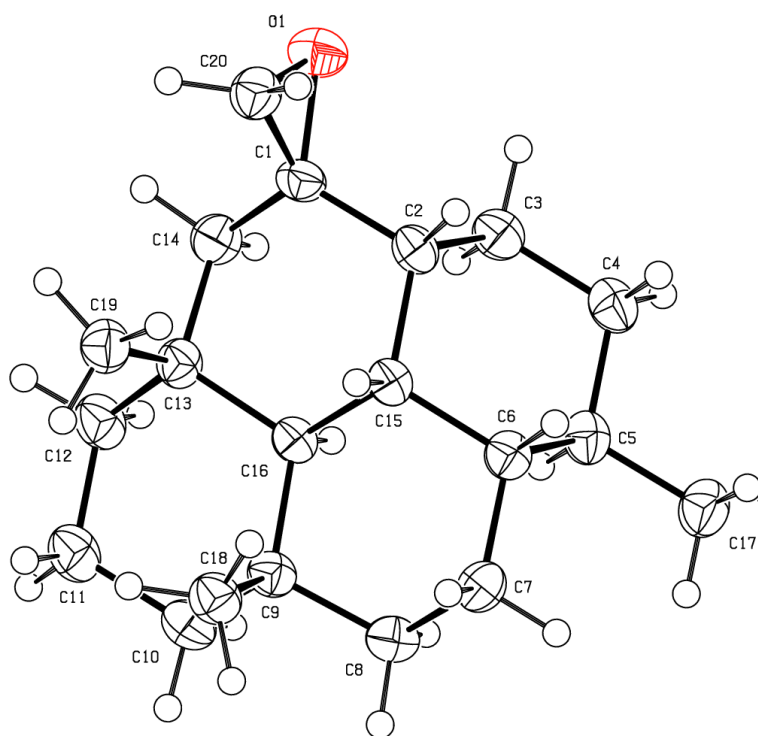


図3-116. Hydropyrene-4,12-epoxideの ^1H NMRデータ (A)およびX線結晶解析 (B)

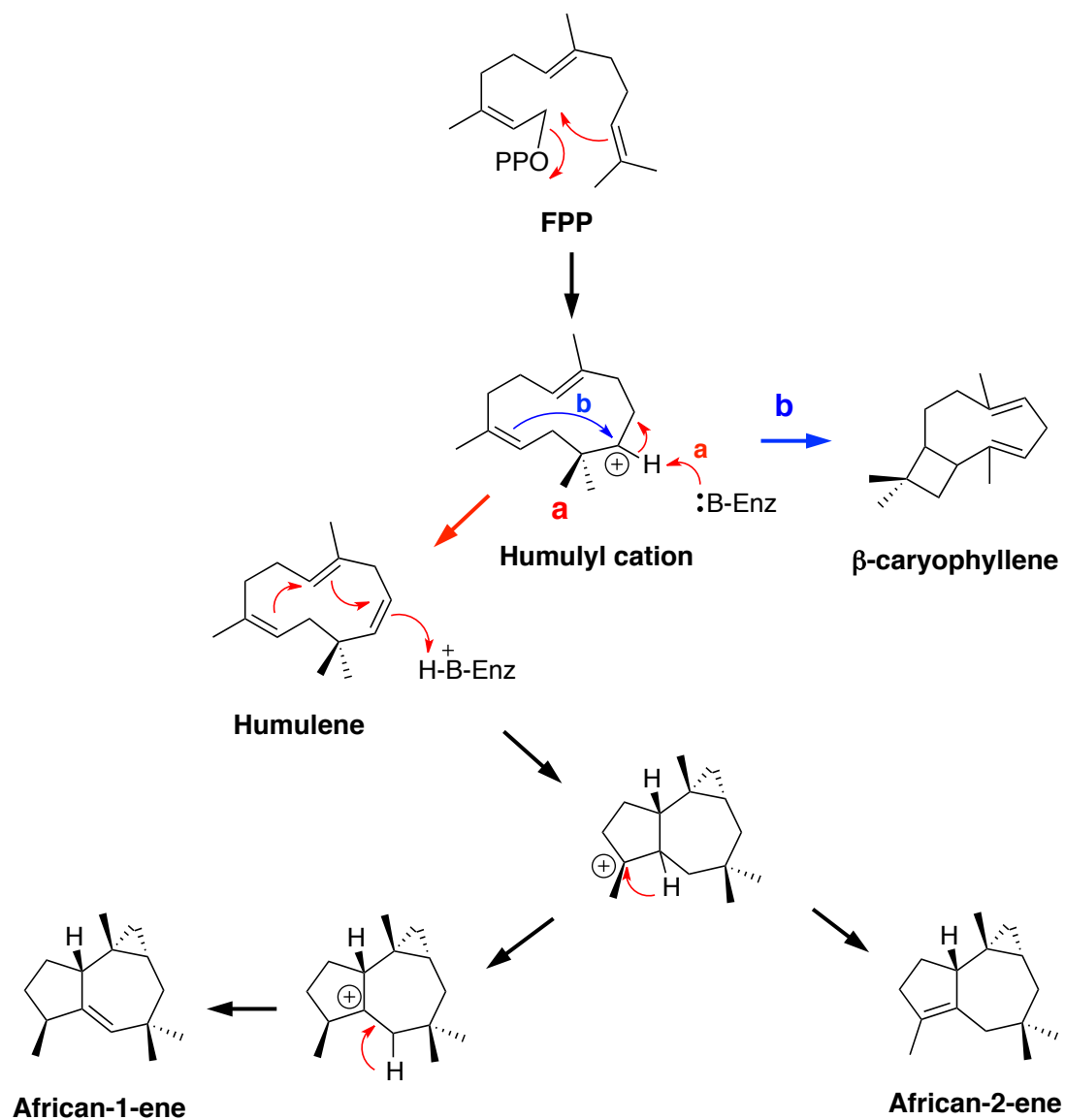


図3-117. SCLAV_p0985が触媒するafrican-1-eneおよびafrican-2-eneの推定環化反応

SAV_geo	16	-----ARLNPHLDEARAHSTRWARGMGMLEGSGIWEQSDLDADHDYGLLCAYTHPDCD	67
SCO_geo	12	YLPHPARLNPHLDEARAHSTTWAREMGMLEGSGVWEQSDLEAHDYGLLCAYTHPDCD	68
SGR_geo	16	-----ARLNPHVEAARTHTRAWARAMGMLEGSGIWEKDLAHDYALLCAYTHPDCS	67
SVEN_geo	16	-----ARLNPHLEAARTHTRDWARAMGMLEGSGVWEQHDLDSHDYALLCSYTHPDCD	67
MMAR_3220	26	-----EHLKTWSRATGIVLDGPNDAFDALAQHR--LAAWTYPAAT	63
SAV_geo	68	GPALSLITDWYVWVFFFDDHFL E TFKRTQDREGGKAYLDRLPLFMPLDLSAPVPEPE	124
SCO_geo	69	GPALSLITDWYVWVFFFDDHFL E KYKRSQDRLAGKAHLDRPLFMPLDDAAGMPEPR	125
SGR_geo	68	AEALSLVTDWYVWVFFFDDHFL E LFKRTPDREGGKRYLDRLPAFMPMGRGAPTPEPE	124
SVEN_geo	68	EEALNLVTDWYTWVFFFDDHFL E IYKRPQDRSGGKAYLDRLPLFMPADPAAGMPEPT	124
MMAR_3220	64	GAELDLMAWIGWLF AF DDV FE SIDG-CDQDFAIATAAATNTVYTGLPSAPSPVV	119
SAV_geo	125	NPVEAGLADLWARTVPAMSADWRKRFAVSTEHLNLSWELSNINEGRIANPVEYIE	181
SCO_geo	126	NPVEAGLADLWTRTPAMSADWRRRFAVATEHLNLSMWELSNINEGRVANPVEYIE	182
SGR_geo	125	NPVEAGLADLWARTVPSMSDAWRARFAEATEALLNESLWELANIHEGRVANPVEYIE	181
SVEN_geo	125	NPVEAGLADLWLRTVPSMSEGWVRFAEATEHLLYESLWELDNINDGRVANPVEYIE	181
MMAR_3220	120	RPYVVALEDLWERTTQGM PAY WCRRLANDMVDYVNSYRSHALINASRIALDEQSYRA	176
SAV_geo	182	MRRKVGAPWSAGLVEYAT-AEVPAAVAGSRPLRVLMETFS DGVHLR NDLFSYQRE V	237
SCO_geo	183	MRRKVGAPWSAGLVEYAT-AEVPAAVAGTRPLRVLMETFS DAVHLR NDLFSYQRE V	236
SGR_geo	182	MRRKVGAPWSAGLVEYAAGAEVPASVADARPLRVLRDAFSDAVHLRNDLFSYQRE V	238
SVEN_geo	182	MRRKVGAPWSAGLVEYAAGAEVPAQVAYSRLRVLRDAFSDAVHLRNDLFSYQRE V	238
MMAR_3220	177	HRLISSAVFITLDLGEAAARRALSESLLVHPYIRAAREAANNIVSWSNDLYSAPKEL	233
SAV_geo	238	EEEGELSGVLVLETFFGCTTQEA AE TVNDILTSRLHQF	276
SCO_geo	237	EDEGELSGVLVLETFFGCTTQEA AD LVNDVLTSLRHQ-	277
SGR_geo	239	EDEGENSGVLVLEKFLGCSTQEA AE AVNDLLTSRLQQF	277
SVEN_geo	239	EDEGENSGVLVLEKFLGCTTQEA AN AVNDLLTSRLQQF	277
MMAR_3220	234	S-LGDL CNY IAVLQSQDDLTTAQAADRV SQYL -----	265

図3-119. MMAR_3220および種々のgeosmin合成酵素N末ドメインとのalignment結果
 SAV_geo, SAV_2163; SCO_geo, SCO6073; SGR_geo; SGR_6839; SVEN_geo,,
 SVEN_0269を表す。赤字で表記したモチーフ配列のDD~~xxx~~Eは、Mg²⁺結合モチーフ、
 ND~~xx~~S~~xxx~~Eは、2リン酸結合モチーフを示す。

第四章 安定同位体取り込みによる環化反応機構の推定

第3章において13種の新奇のテルペン化合物の構造を明らかにした。その中で、特に構造的にユニークな6-6-6-6員環を有するhydropyreneおよびhydropyrenol, 5-5-5員環を有するisohirsut-1-eneおよびisohirsut-4-ene, 5-9-5員環を有するtsukubadiene, 6-8-4員環を有するodyverdiene A、そして6-7-5員環を有するodyverdiene Bについて安定同位体標識前駆体取り込みによる環化反応機構の推定を行なった。

・使用菌株

SUKA22/pKU1021::*ggps-sclav_p0765*

SUKA22/pKU1021::*fps-sclav_p1407*

SUKA22/pKU1021::*fps-slt18_1880*

SUKA22/pKU1021::*ggps-stsu_20912*

SUKA22/pKU1021::*ggps-nd90_0354*

・培地

巻末に記載

4-1 【実験方法】

4-1-1 安定同位体標識グルコースの取り込み

10 ml の種培地をスプリングコイル入り大試験管に分注し、各孢子懸濁液を接種し、30°Cで2日間振とう培養した。既に500 mlの1% [1-¹³C]-D-グルコース (5% D-グルコース)あるいは0.4% [2-¹³C]-D-グルコース (5.6% D-グルコース)を含む生産用半合成培地 (D-グルコース 6.0%, CaCO₃ 0.5%, NaCl 0.2%, yeast extract 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄・7H₂O 0.01%, FeSO₄・7H₂O 0.005%, MnSO₄・4H₂O 0.005%, ZnSO₄・7H₂O 0.005%)を500 ml容のポリカーボネート製三角フラスコに100 mlずつ分注し、種培養液を0.5 ml (1%) 接種し、28°C, 200 rpmで7日間振とう培養した。培養終了後、培養液を第3章と同様な方法によって各化合物を単離した。

4-2-2 各種機器分析方法

同位体比 (%)は、非標識体の¹³C NMRの結果に基づく外部校正を用いて決定した。

- ・ NMR 日本電子 (JEOL) JNM-ECP500FT NMR SYSTEM (¹³C-NMR : 125 MHz)

4-2 【実験結果】

4-2-1 *sclav_p0765* 形質転換株が生産する hydrophyrene(1)および hydrophyrenol(2)の解析

[1-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって hydrophyrene は、非標識体と比較して C-3 (7.1%), C-5 (7.5%), C-7 (7.1%), C-10 (7.1%), C-10b (6.4%), C-11 (6.8%), C-13 (8.1%)および C-14 位 (6.8%)の 8 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 1a であることが明らかになった(図 4-1)。hydrophyrenol は、非標識体と比較して C-3 (6.2%), C-5 (7.6%), C-7 (7.1%), C-10 (6.3%), C-10b (6.9%), C-11 (7.4%), C-13 (7.1%)および C-14 位 (7.8%)の 8 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 2a であることが明らかになった(図 4-2)。

4-2-2 *sclav_p1407* 形質転換株が生産する isohirsut-1-ene (13)の解析

[1-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって isohirsut-1-ene は、非標識体と比較して C-1 (8.5%), C-6 (8.3%), C-9(7.6%), C-13(7.4%), C-14 (8.8%)および C-15 位 (8.1%)の 6 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 13a であることが明らかになった(図 4-3)。

4-2-3 *slt18_1880* 形質転換株が生産する isohirsut-4-ene (17)の解析

[1-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって isohirsut-4-ene は、非標識体と比較して C-1, C-6, C-9, C-13, C-14 および C-15 位の 6 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 17a であることが明らかになった(図 4-4)。

4-2-4 *stsu_20912* 形質転換株が生産する tsukubadiene (18)の解析

[1-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって tsukubadiene は、非標識体と比較して C-3 (8.8%), C-7 (9.9%), C-11 (9.6%), C-14 (8.1%), C-16 (8.3%), C-17 (9.3%), C-19 (9.5%)および C-20 (8.9%)位の 8 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 18a であることが明らかになった(図 4-5)。また[2-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって、C-1 (3.5%), C-4 (3.0%), C-6 (3.2%), C-8 (3.6%), C-9 (3.4%), C-10 (2.7%), C-13 (2.5%)および C-15 位 (3.2%)の 8 箇所の炭素がラベル化された 18b であることが明らかになった(図 4-6)。

4-2-5 *nd90_0354* 形質転換体が生産する odyverdiene A (19)および odyverdiene B (20)の解析

Odyverdiene A は[1-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって、非標識体と比較して C-2 (7.2%), C-6 (6.4%), C-10 (6.3%), C-12 (6.4%), C-16 (3.2%), C-18 (6.5%), C-19 (5.7%)および C-20 位 (6.8%)の 8 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 19a であることが明らかになった(図 4-7)。また odyverdiene B は[1-¹³C]-D-グルコースの取り込みによって、非標識体と比較して C-3 (5.5%), C-7 (5.8%), C-11 (5.7%), C-13 (5.6%), C-16 (5.5%), C-18

(5.6%), C-19 (5.5%)および C-20 位 (5.6%)の 8 箇所の炭素で同位体濃縮が観測された 20a であることが明らかになった(図 4-8)。

4-3 【考察】

S. avermitilis SUKA 株はゲノム情報より MEP 経路に関わる生合成遺伝子群を保持していることが明らかになっている。一方、メバロン酸経路の生合成遺伝子群を保持していないため、*S. avermitilis* SUKA 株が生産するテルペン化合物は MEP 経路を経て生成された IPP や DMAPP を原料にして生成される事が強く示唆された。したがって、 $[1-^{13}\text{C}]$ および $[2-^{13}\text{C}]$ グルコースを用いた場合、 ^{13}C 標識はそれぞれ IPP の 1 位と 5 位および 2 位と 3 位にそれぞれ取り込まれることが期待された(図 4-9)。

Hydropyrene および hydropyrenol は $[1-^{13}\text{C}]$ -D-グルコースの取り込み実験より、以下のように環化反応が進行すると推定された。前駆体であるゲラニルゲラニルニリン酸の脱 2 リン酸化によってカルボカチオン 1 を生成し、C-10a と C-10b 間で閉環反応が進行する。さらに C-3a と C-10b 間で閉環反応が進行し、5 位の脱プロトン化により中間体 2 が生成される。中間体 2 から二重結合のプロトン化により生成されたカルボカチオンにより順次閉環反応が進行し、カルボカチオン 3 が生成する。最終的にカルボカチオン 3 の 12 位の脱プロトン化により hydropyrene が生成する。また水分子によりカルボカチオンが捕捉されると hydropyrenol が生成するものと推測された(図 4-10)。以上のように、hydropyrene および hydropyrenol は生成されたカルボカチオンを消化し、中間体 2 を経て、再度カルボカチオンを生成する新規性の高い環化反応によって生成することが推測された。

Triquinane 骨格を有するセスキテルペン化合物の isohirsut-1-ene および isohirsut-4-ene は $[1-^{13}\text{C}]$ -D-グルコースの取り込み実験より、以下のように環化反応が進行すると推定された。前駆体であるファルネシルニリン酸の C-1 と C-10 位間で閉環反応が進行し、humulyl cation が生成する。Humulyl cation の C-3 と C-6 位間および C-2 と C-9 位間でさらに閉環反応が進行し、4-6-5 員環を有するカルボカチオン 4 が生成される。2 回の連続した炭素結合転位が進行し、5-5-5 員環を有するカルボカチオン 5 が生成する。カルボカチオン 5 の 1,3-hydride シフトによりカチオンが転位し、カルボカチオン 6 を経て 1 位の脱プロトン化により isohirsut-1-ene が生成する。またカルボカチオン 5 の 5 位の脱プロトン化により isohirsut-4-ene が生成することものと推定した(図 4-11)。

Tsukubadiene は $[1-^{13}\text{C}]$ -D-グルコースおよび $[2-^{13}\text{C}]$ -D-グルコースの取り込み実験より、以下のように環化反応が進行するものと推定した。前駆体のゲラニルゲラニルニリン酸の C-1 と C-11 位間および C-10 と C-14 位間で順次閉環反応が進行し、5-11 員

環を有するカルボカチオン 7 を生成する。また炭素結合転位により 5-12 員環を有するカルボカチオン 8 に変換される。また C-4 と C-15 位間で閉環反応が進行し、カルボカチオン 9 が生成する。次いで 2 回の連続した 1,2-hydride シフトによって 14-15 位間に二重結合が形成され、中間体 10 が生成される。さらに 5 位がプロトン化され、カルボカチオン 11 を生成する。カルボカチオン 11 と tsukubadiene を比較すると、メチル基転位のみが進行すると予想された。しかしながら[2-¹³C]-D-グルコースの取り込み実験の結果より、5 位と 6 位の炭素-炭素間の組換えが起こっていることが考えられた。カルボカチオン 11 の 4 位と 6 位間で炭素結合の転位を生じ縮環し、再度炭素結合転位が進行して増環する。最終的に 1,2-hydride シフトおよび脱プロトン化により tsukubadiene が生成するものと推定した(図 4-12)。以上のように環化反応において 5 位と 6 位の炭素-炭素間に組換えが起こったことが考えられた。これまでにこのような環化反応を触媒するテルペン合成酵素は報告されておらず、新規性の高い環化反応機構が強く示唆された。これらの結果を確認するため、今後[U-¹³C]-D-グルコースの取り込みを行うことが必要である。

Odyverdiene A および odyverdiene B は[1-¹³C]-D-グルコースの取り込み実験より、以下のように環化反応が進行するものと推定した。前駆体のゲラニルゲラニルニリン酸の C-1 と C-10 位間で閉環反応が進行し、prenylgermacryl cation を生成する。1,3-hydride シフトによりカルボカチオンが転位し、カルボカチオン 12 を生成する。次いで C-1 と C-14 位間でさらに閉環反応が進行し、17 位が脱プロトン化し中間体 13 を生成する。中間体 13 の C-3 と C-6 位間の閉環反応により 6-8-4 員環のカルボカチオンが生成され、18 位の脱プロトン化により odyverdiene A が生成する。また中間体 13 から C-2 と C-6 位間の閉環反応により 6-7-5 員環のカルボカチオンが生成され、19 位の脱プロトン化により odyverdiene B が生成すると推測した (図 4-13)。形質転換体が生成する odyverdiene A と B との混合比は 1:1 であるため、最終段階の C-3 と C-6 位間の閉環反応および C-2 と C-6 位間の閉環反応は互いに同程度進行していると思われる。

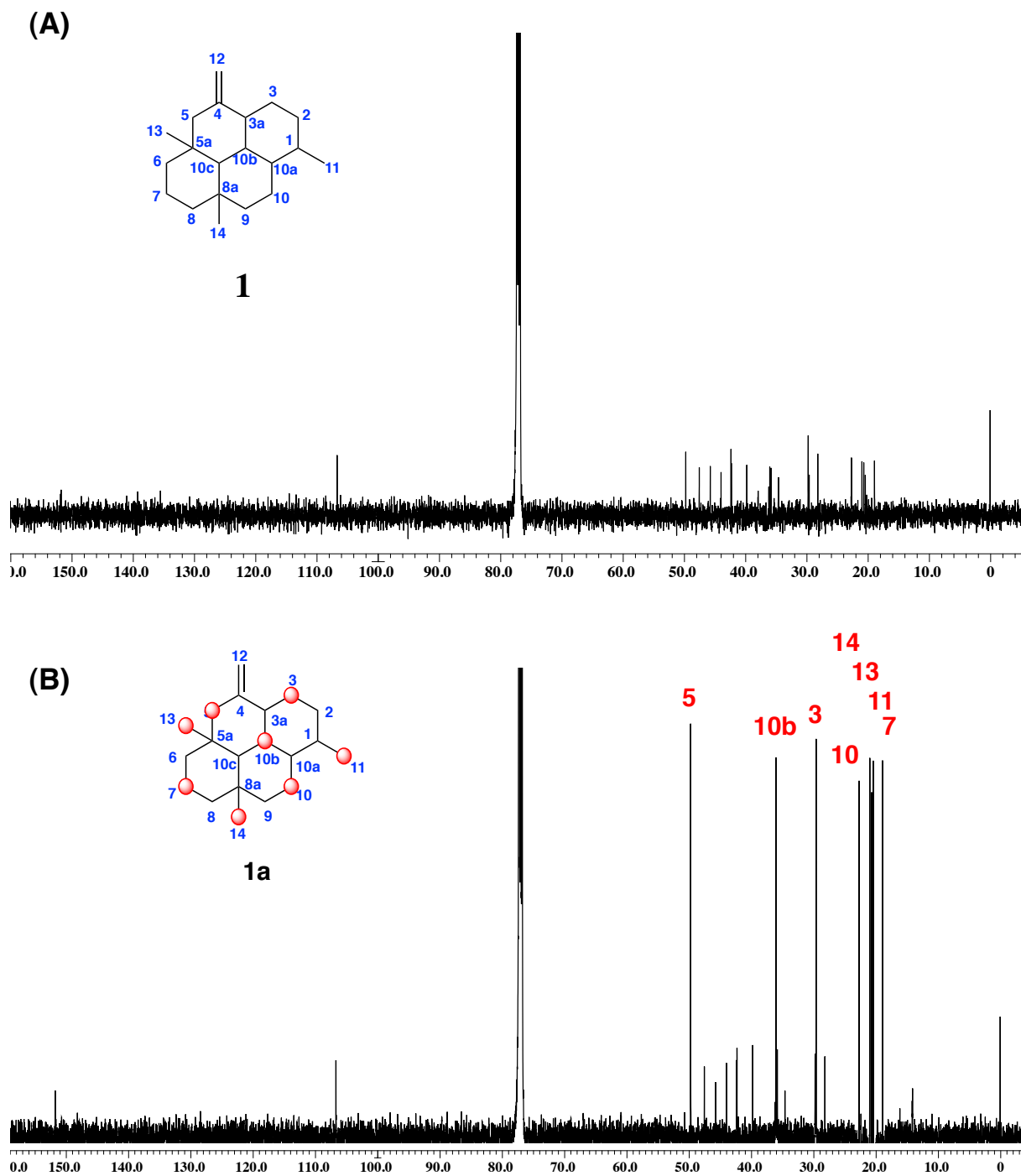
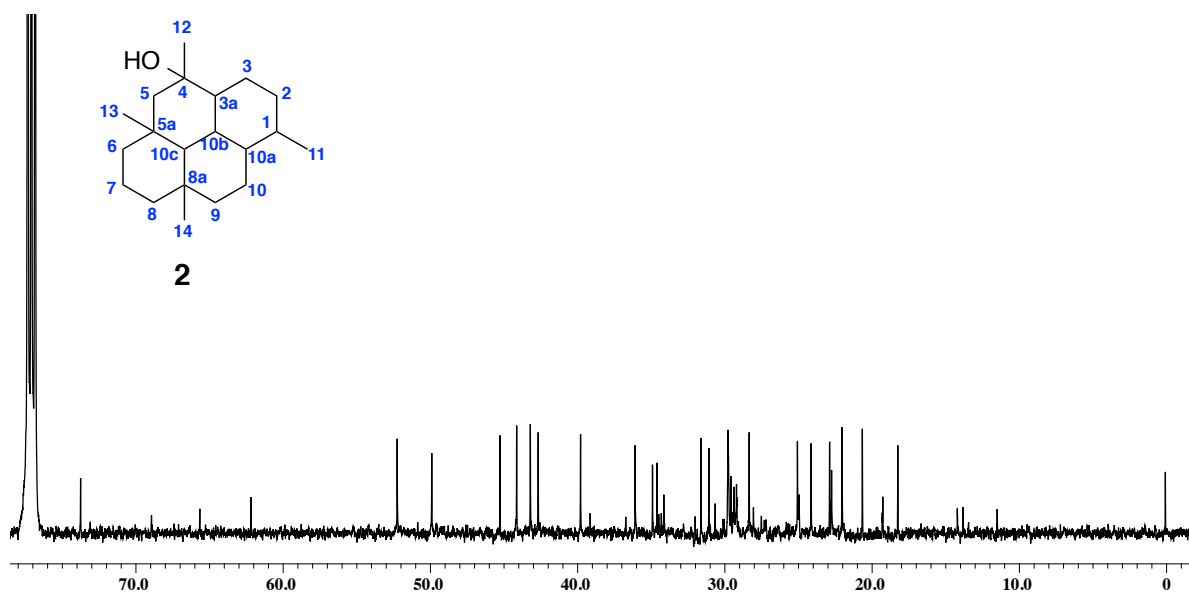


図4-1 (A)非標識および(B)標識hydrophyreneの
重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

(A)



(B)

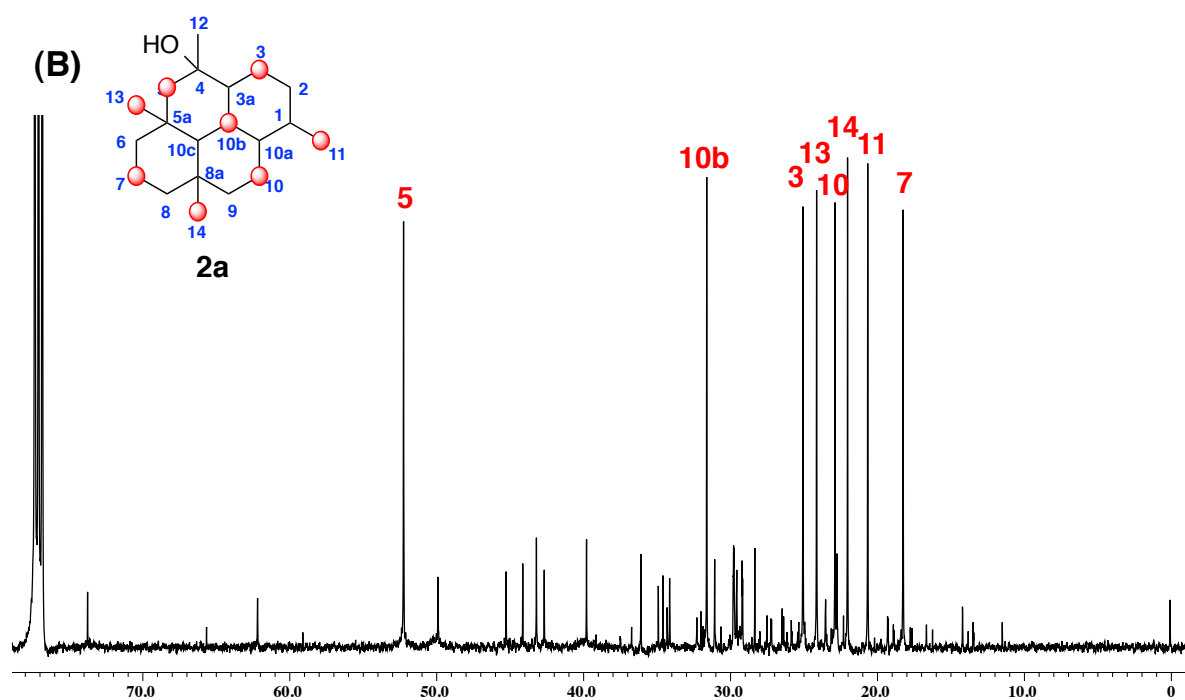


図4-2 (A)非標識および(B)標識hydroxyphenolの
重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

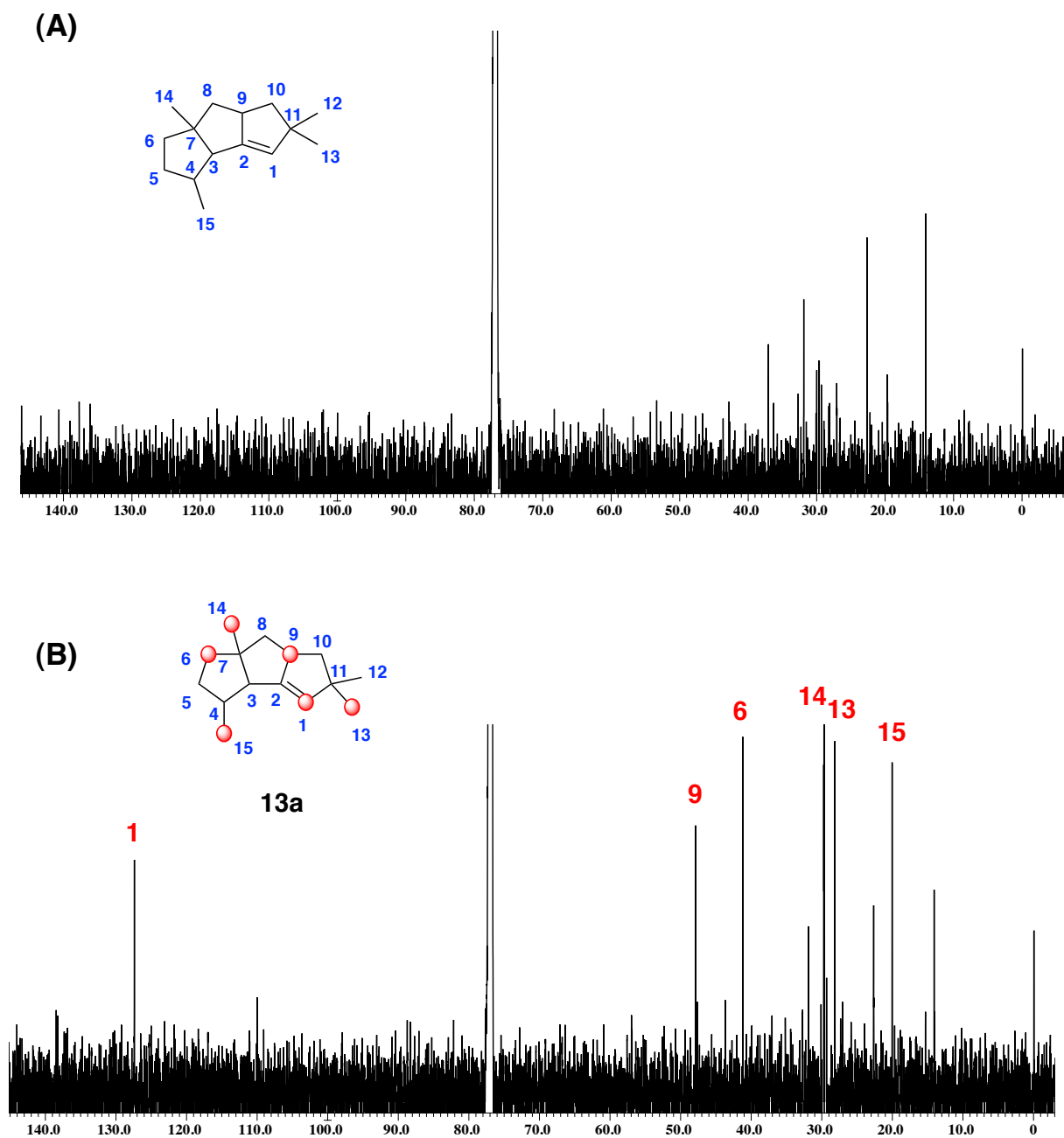


図4-3. (A)非標識および(B)標識isohirsut-1-eneの
重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

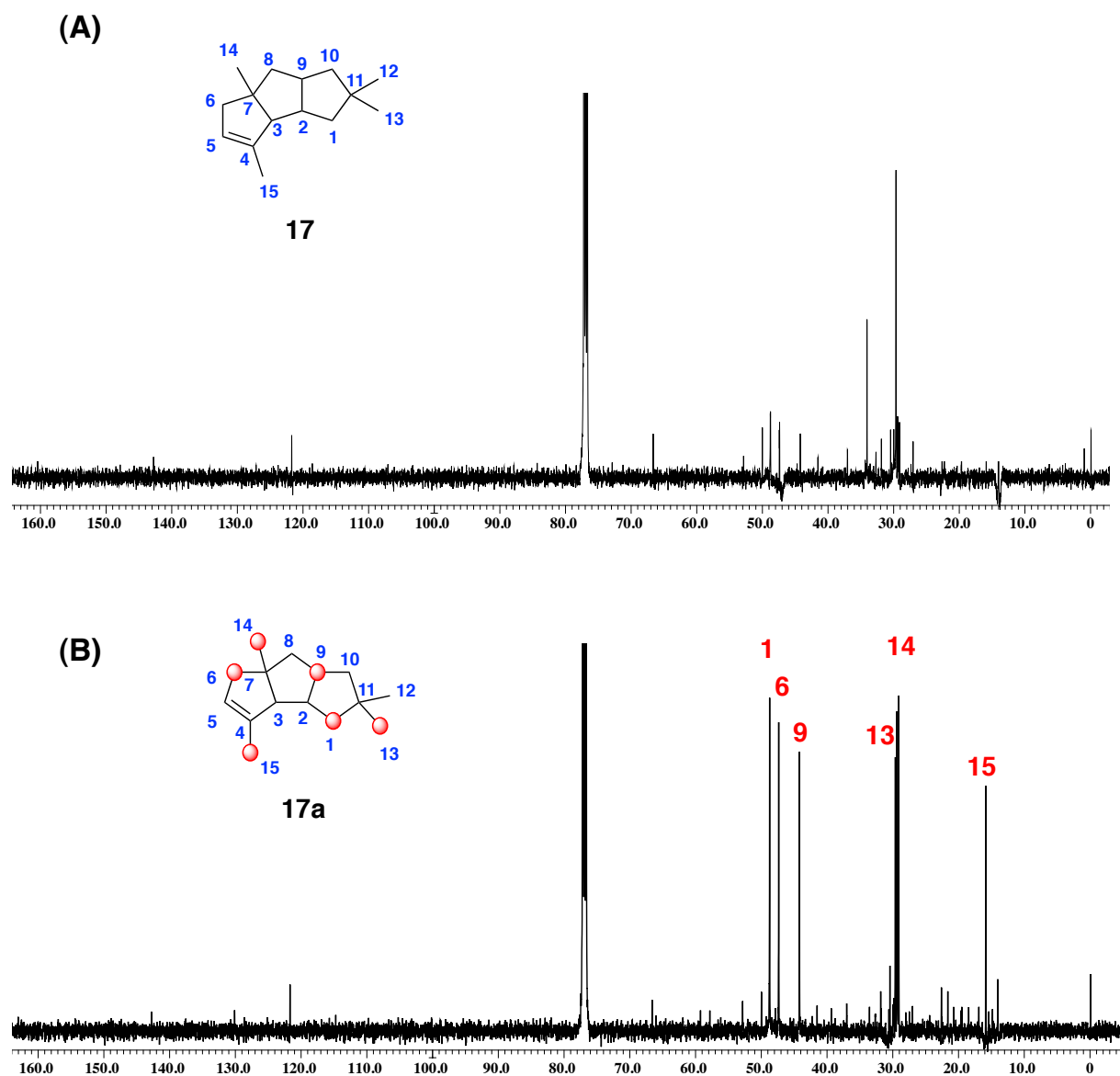


図4-4. (A)非標識および(B)標識isohirsut-4-eneの
重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

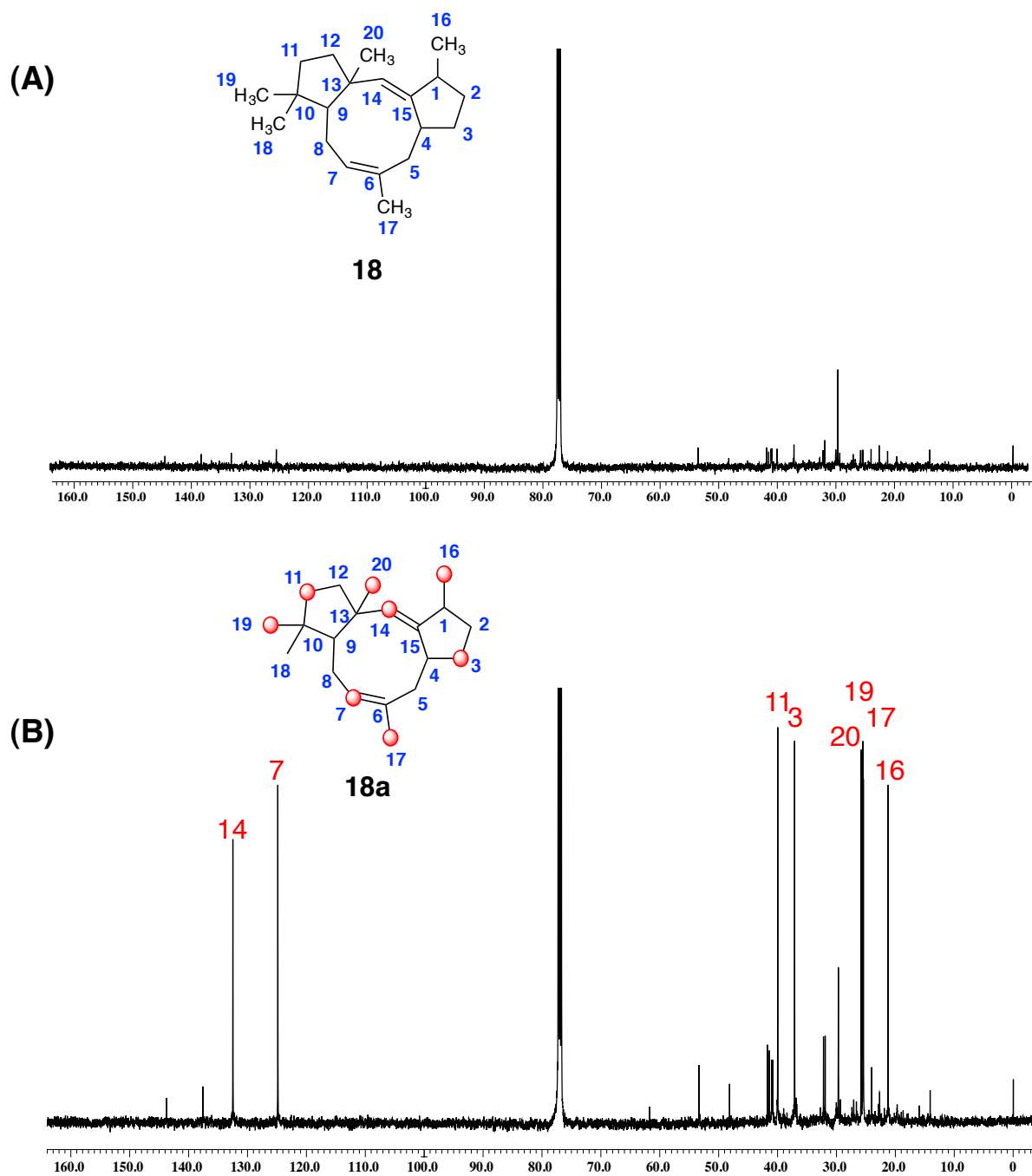


図4-5. (A)非標識および(B)標識 ([1- ^{13}C]-D-グルコース)tsukubadieneの重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

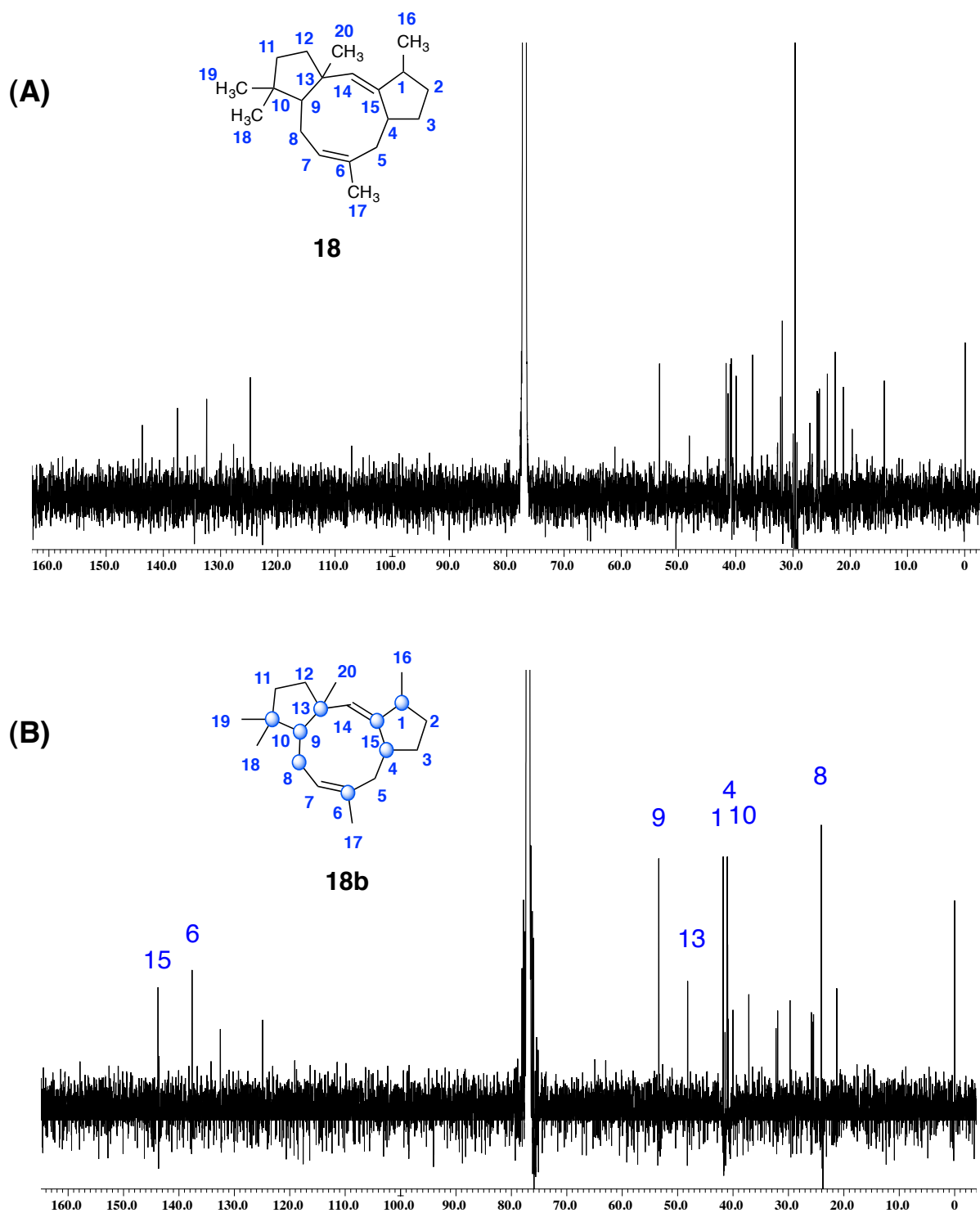
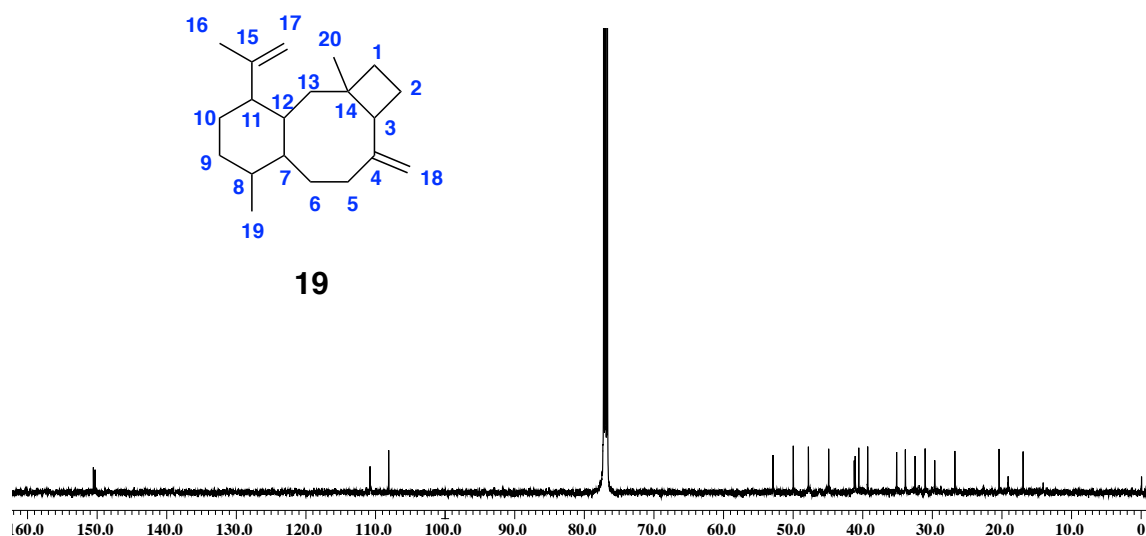


図4-6. (A)非標識および(B)標識 ([2- ^{13}C]-D-グルコース)tsukubadieneの重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

(A)



(B)

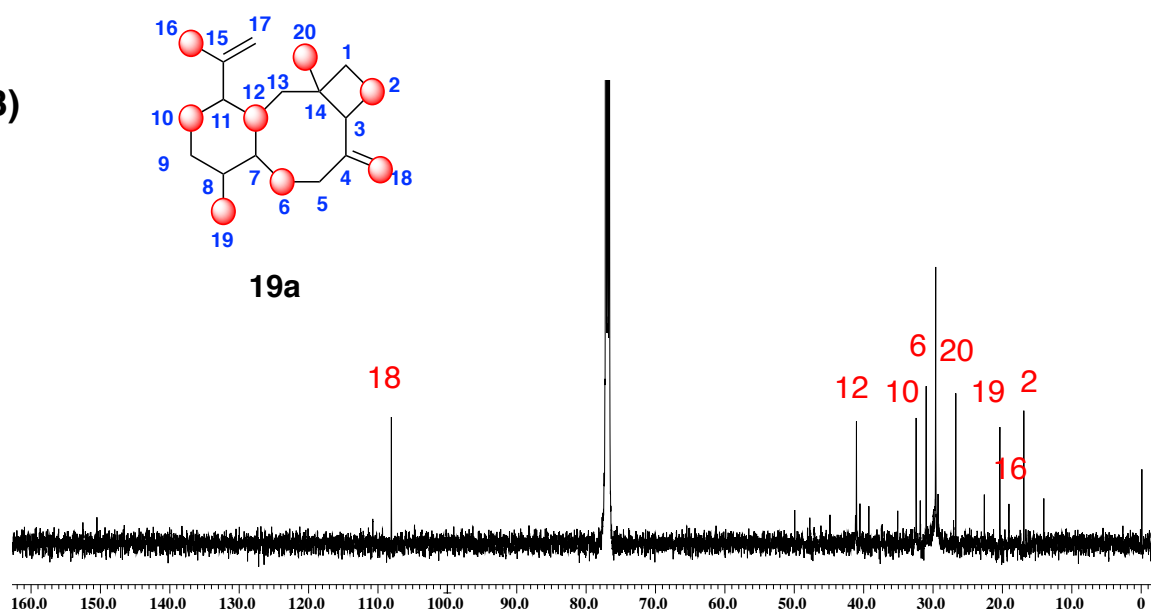


図4-7. (A)非標識および(B)標識odyverdiene Aの
重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

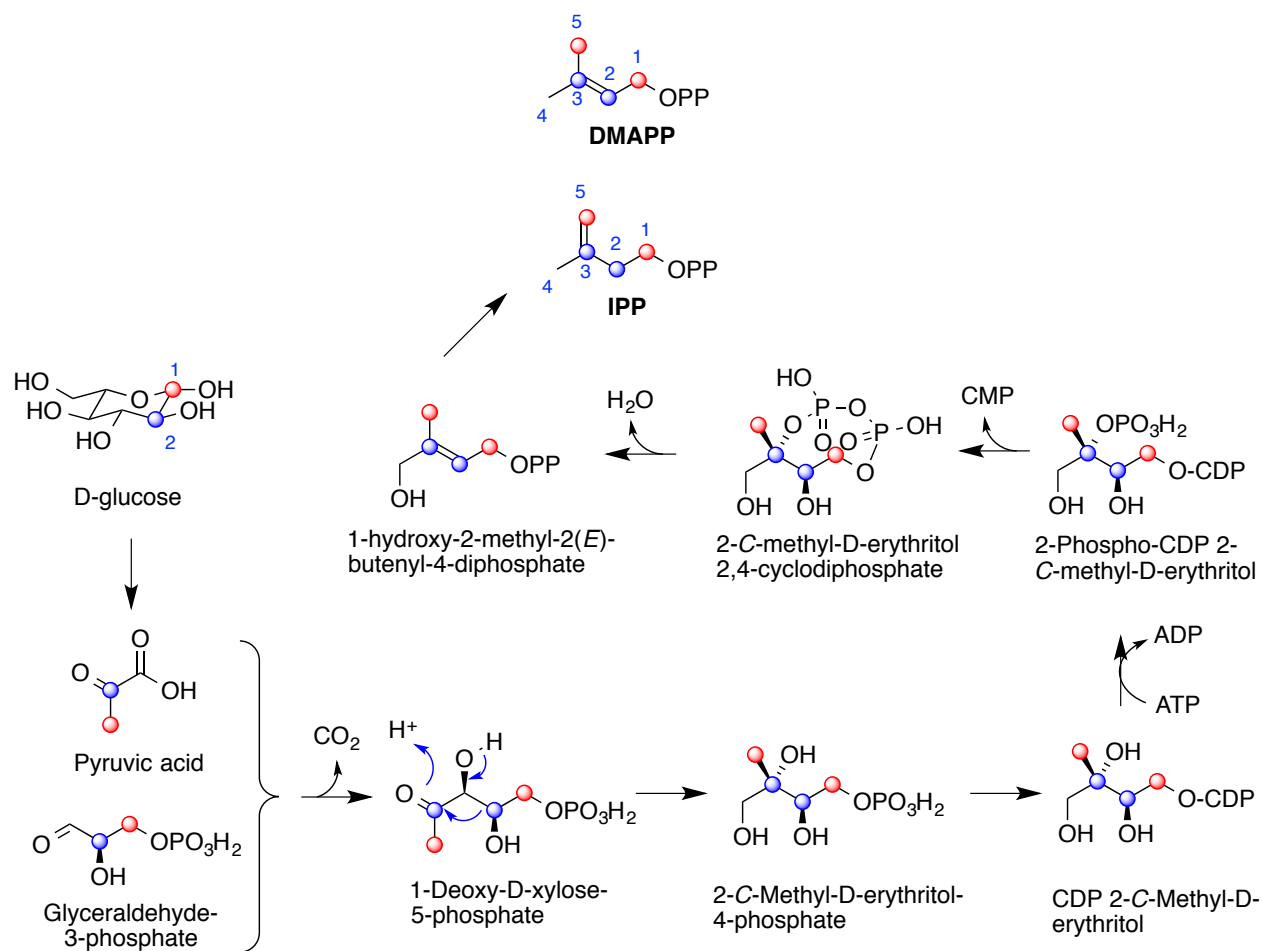
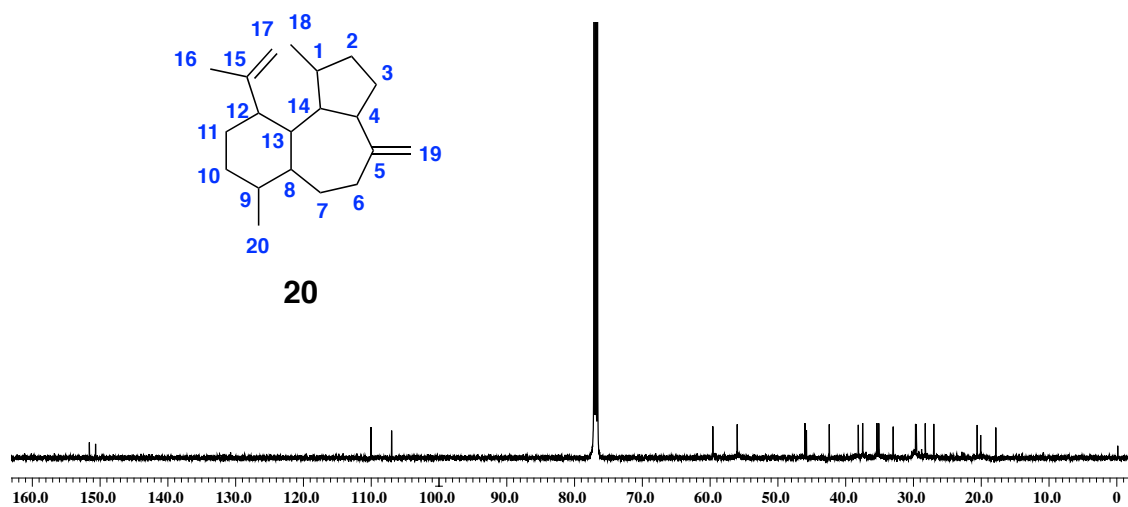


図4-9. MEP経路

(赤) $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースの取り込み、(青) $[2-^{13}\text{C}]$ グルコースの取り込みをそれぞれ示す。

(A)



(B)

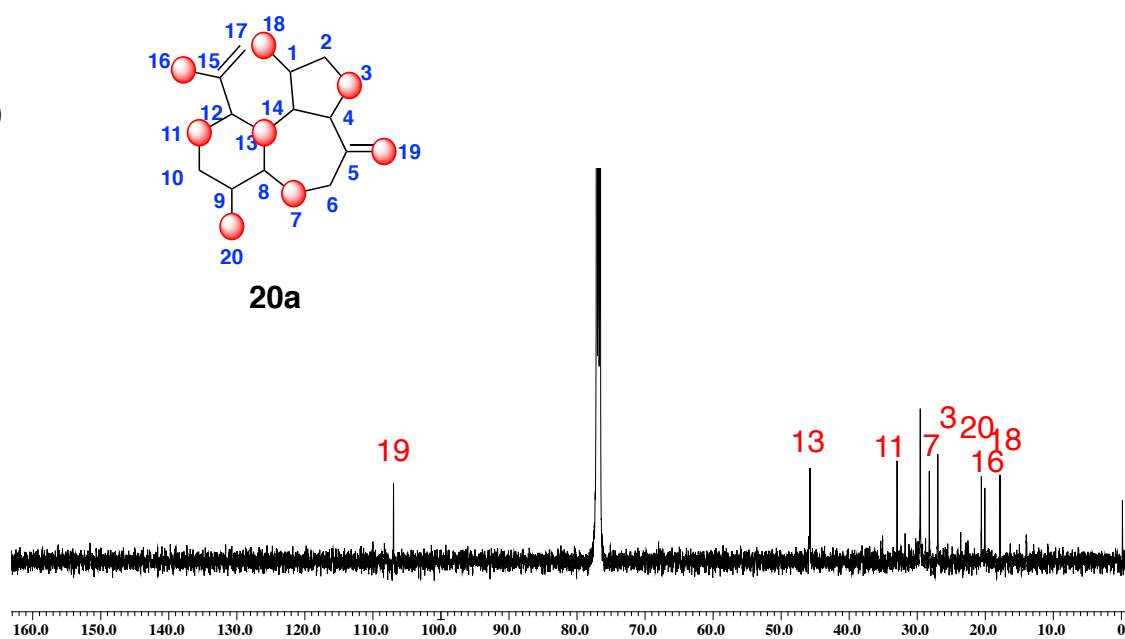


図4-8. (A)非標識および(B)標識odyverdiene Bの
重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

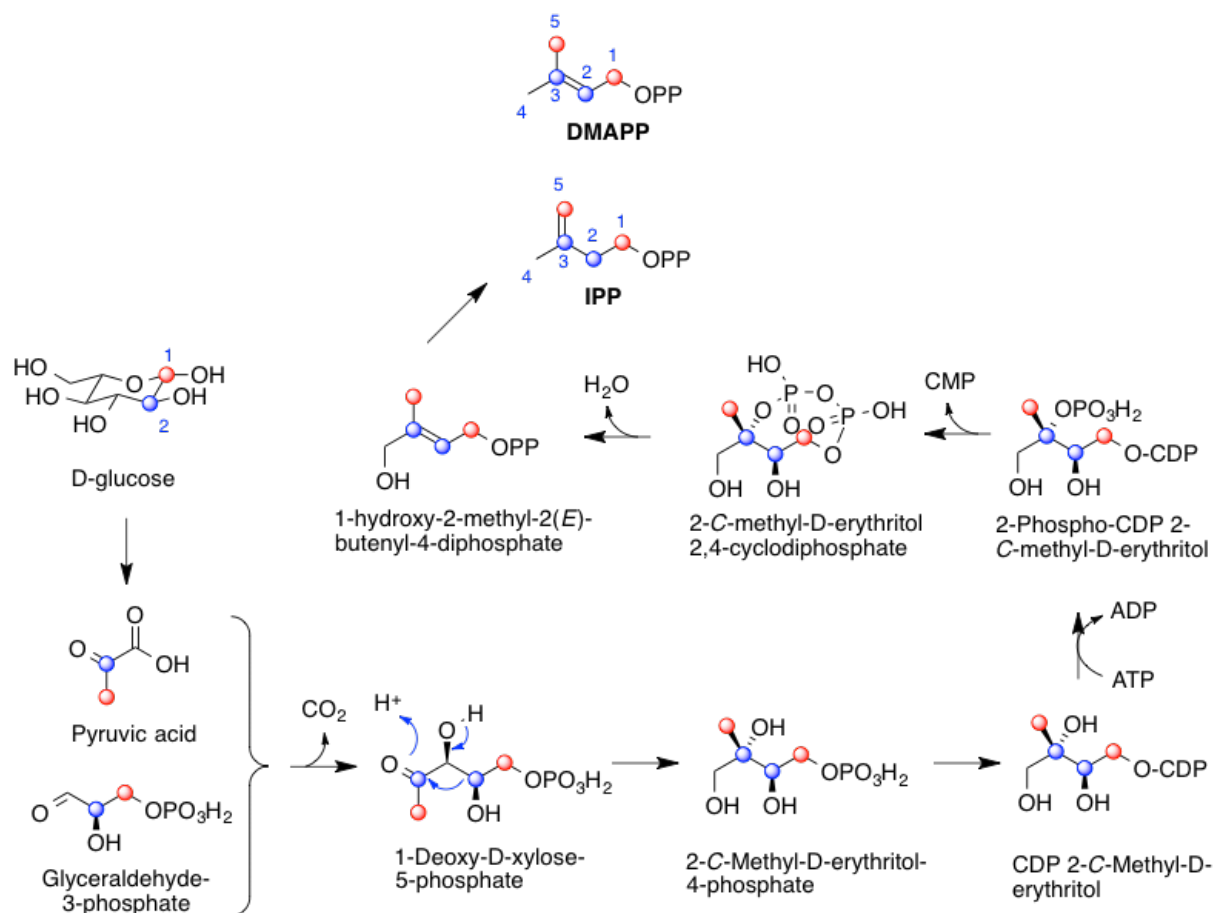


図4-9. MEP経路

(赤) $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースの取り込み、(青) $[2-^{13}\text{C}]$ グルコースの取り込みをそれぞれ示す。

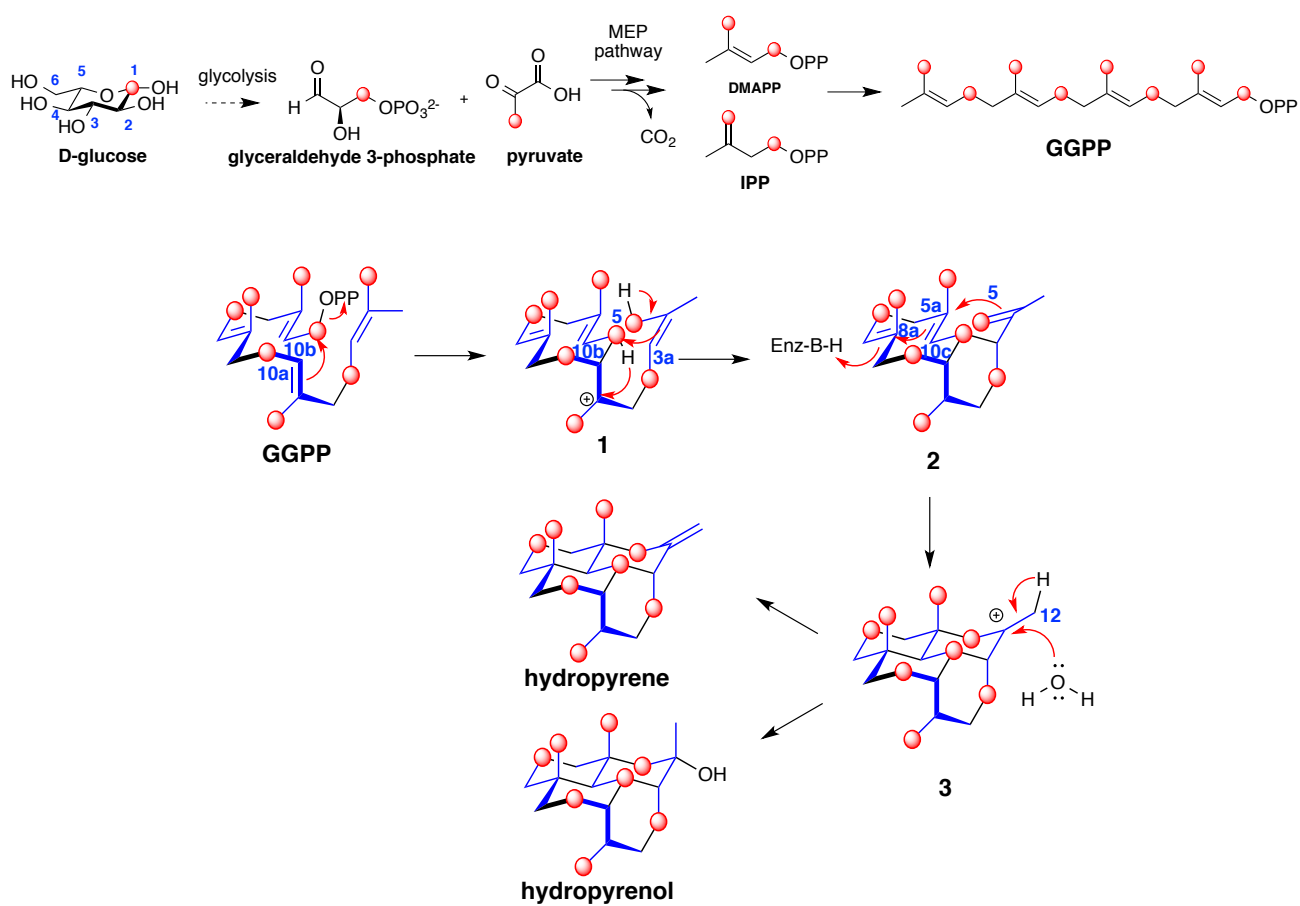


図4-10. SCLAV_p0765が触媒するhydrophyreneおよびhydrophyrenolの推定環化反応

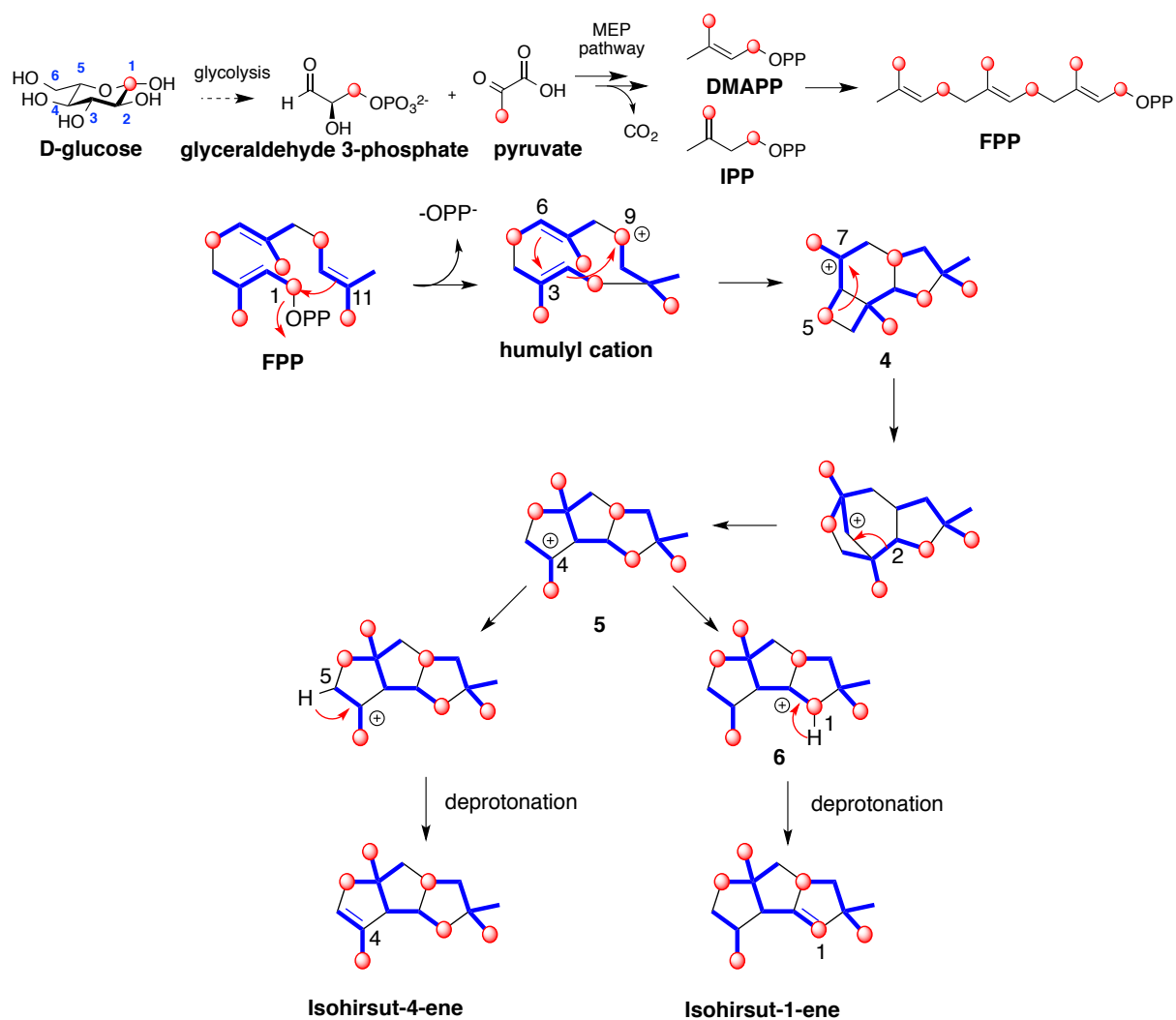


図4-11. Isohirsutane骨格を有するセスキテルペン化合物の推定環化反応

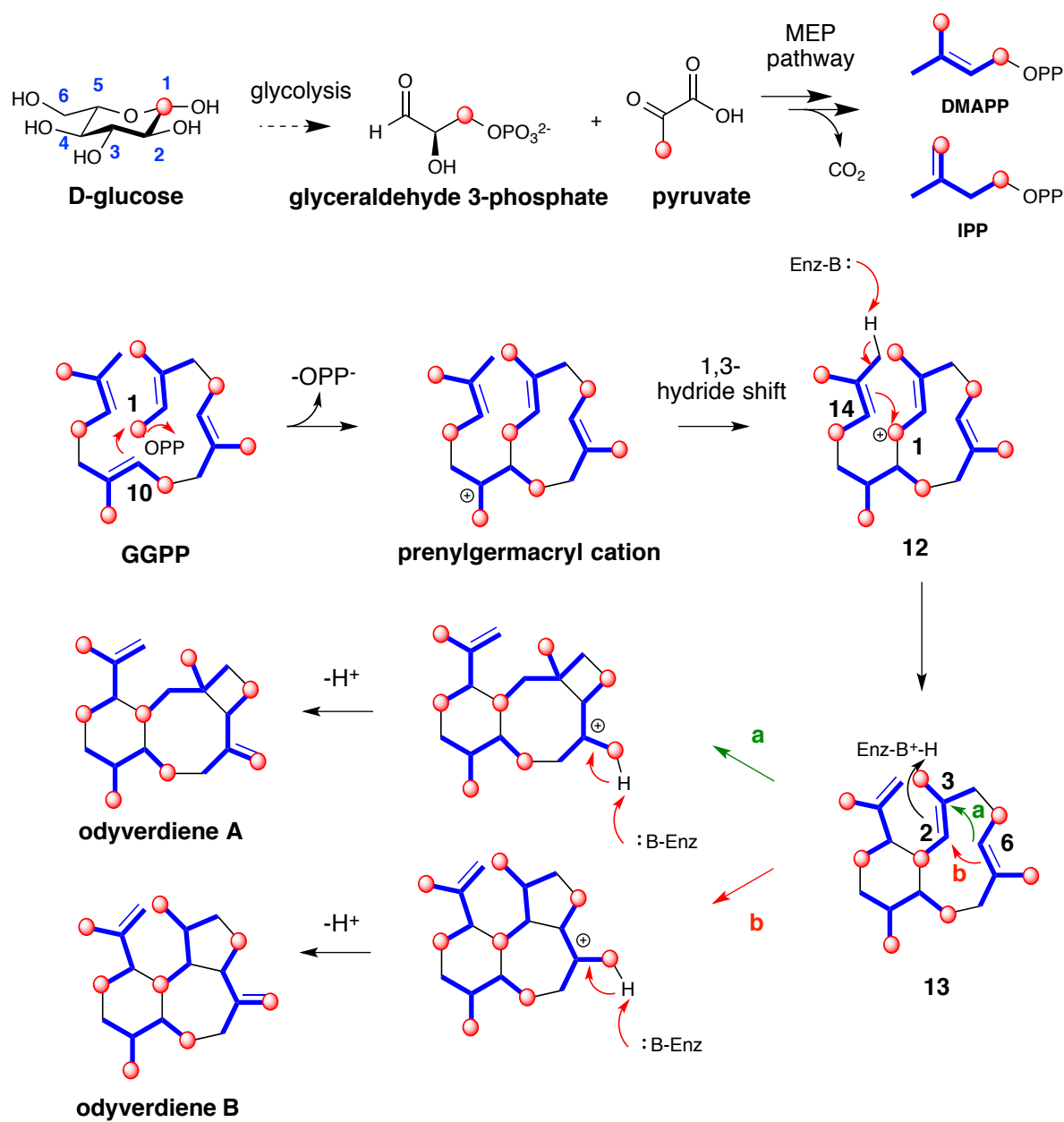


図4-13. ND90_0354が触媒するodyverdiene AおよびBの推定環化反応

第五章 Labdane 型ジテルペン合成酵素の交換による新規なジテルペン骨格の創製

5-1 序論

Cyslabdan は供田らにより、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対して、イミペネムの抗菌活性を増強する物質として、放線菌 *Streptomyces* sp. K04-0144 の培養液より見いだされたジテルペン化合物である^{74, 75)}(図 5-1)。Cyslabdan の構造はトランスデカリン環を含む labdane 骨格に *N*-アセチルシステインが硫黄原子を介して結合した特徴的な構造を有している。筆者が所属する研究室では cyslabdan の生合成遺伝子群(*cldA*, *cldB*, *cldC* および *cldD*)を単離している。これまでの解析から、CldA はゲラニルゲラニル 合成酵素、CldB は labdadienyl diphosphate 合成酵素、CldC はシトクロム P450、そして CldD は labdatriene 合成酵素であることを明らかにし、2 種類のテルペン合成酵素によって母格の labdane 骨格を形成することも明らかにしている(図 5-1)。

これまでにジテルペン合成酵素の多くが、植物や真菌等の真核生物から単離、解析されている。この酵素群の環化様式は、1) A 型および 2) B 型に分類される。A 型反応では、ゲラニルゲラニルニリン酸のニリン酸の脱離により、一方、B 型反応では GGPP の末端二重結合のプロトン化によってそれぞれ環化反応が進行する。これまでに 2 種類のテルペン合成酵素によって生成されるジテルペン化合物として、*Kitasatospora griseola* および *Streptomyces* sp. KO-3988 からそれぞれ terpentecin⁷⁶⁾ および viguiepinol⁷⁷⁾ が報告されている。一方、*S. clavuligerus* ATCC 27064 のゲノム情報より SCLAV_p0490 (Scla_lds) および SCLAV_p0491 (Scla_lts) が、それぞれ CldB および CldD のアミノ酸配列とそれぞれ 49% および 34% の相同性を示すことを見出した(図 5-2)。よって SCLAV_p0490 および SCLAV_p0491 が labdane 骨格形成に関与することが示唆された。

そこで、本研究では *Streptomyces* sp. K04-0144 と *S. clavuligerus* ATCC 27064 由来のそれぞれの環化酵素および脱ニリン酸化酵素の組み合わせることによって、新たなテルペン骨格を有する化合物を創製することを目的に解析を行った。

5-2 酵素タンパク質の精製

【実験材料】

・ 使用菌株

E. coli DH5 α

E. coli Rosetta (pLysS)

・ プラスミド

pKU1021::*cldABCD*, pET28a(+), Scla_11H9

・ 培地

巻末に記載

【実験方法】

5-2-1 PCR による DNA 断片の増幅

以下の反応液を調製し、PCR を行なった。上流および下流領域の増幅では、pKU1021::*cldABCD* および *S. clavuligerus* ATCC 27064 のコスミドクローンを鋳型として用いた。

鋳型 DNA (0.5 μ g/ml の 20 倍希釈)	1 μ l
Phusion HF buffer (5x)	4 μ l
DMSO	1 μ l
dNTP mixture (2.5 mM each)	1 μ l
Forward primer (10 mM)	1 μ l
Reverse primer (10 mM)	1 μ l
Expand High Fidelity DNA Taq polymerase	0.7 U
滅菌水 (D.W.)	up to 20 μ l

増幅条件

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 30 sec return to 2, 29 cycles
5. 72°C 5 min
6. 4°C ∞

プライマーの塩基配列（下線は制限酵素サイト、太字は開始コドンおよび終止コドンを示す）

CldB_fwd_NdeI : 5'-gaaaggcacatatgAGCTCCATATCCCACCAGGCGGCC-3'

CldB_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttGGAACGGTTCAGGGCCGACGG-3'

CldD_fwd_NdeI : 5'-caggaggccatatgACCCGCACCGGCGATGCGGTG-3'

CldD_rev_HindIII : 5'-ggctccaagcttGGTTCAACGACTGGTTGGGGCCGCGC-3'

Scla_lts_fwd_NdeI : 5'-ggctcgagcatatgAGGTCTGGGGACCGTGGCGAG-3'

Scla_lts_rev_HindIII : 5'-ctcgagaagcttGCCATCGTCAGGGCGGAAGTCCTGT-3'

Scla_lds_fwd_NdeI : 5'-ggctcgagcatatgCCCGTCGACGTCGGCACCCCTT-3'

Scla_lds_HindIII_rev : 5'-ctcgagaagcttTGAGCGACCGCTGGCGGGAGGAGTA-3'

反応終了後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70 v/v % エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、20 μ l の 0.1 x TE 緩衝液に溶解した。1%アガロース電気泳動を用いて増幅産物の確認を行った後、*DpnI* により鋳型 DNA を完全に消化（分解）した。

5-2-2 増幅断片の制限酵素消化および連結

cldB, *cldD*, *scla_lds*, *scla_lts* および pET28a(+) の DNA 溶液 3 μ l に 2 μ l の 10 x NEBuffer 4 を加え、滅菌水で全量 20 μ l とした。0.25 μ l の *NdeI* および *HindIII* を加え、37°C で 2 時間制限酵素反応を行った。反応終了後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70% エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、5 μ l の TE 緩衝液に溶解した。アガロース電気泳動により DNA 断片を精製し、各 PCR 断片およびベクターのモル比が 2 : 1 となるように調製し連結した。その後、*E. coli* DH5 α へ形質転換し、50 μ g/ml の KM を含む LB 培地で培養した。プラスミド抽出を行い、pET28a(+>::*cldB*, pET28a(+>::*cldD*, pET28a(+>::*scla_lds* および pET28a(+>::*scla_lts* を構築した。

5-2-3 組換えタンパク質の発現

pET28a(+>::*cldB*, pET28a(+>::*cldD*, pET28a(+>::*scla_lds* および pET28a(+>::*scla_lts* をエレクトロポレーション法により *E. coli* Rosetta (pLysS) へ導入した。得られた形質転換体を、30 μ g/ml の CP および 50 μ g/ml の KM を含む LB 培地で一晚培養した。その後、プラスミド抽出を行い、目的のプラスミドが正しく保持されていることを確認した。正しく目的のプラスミドを保持している形質転換体の培養液を遠心分離し、培養上清

を除いた。滅菌した25 % グリセロール溶液を添加し、 -80°C で保存した。この凍結保存菌体懸濁液をタンパク質発現実験に用いた。L 字型試験管に添加した KM ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$)、CP ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$)を含む 10 ml の LB 培地に、植菌し、 30°C で一晩の前培養を行った。L 字型試験管に添加した、KM ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$)、CP ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$)を含む LB 培地 10 ml に、0.1 ml の前培養液を植菌し、 37°C で OD_{600} が 0.6 になるまで培養した。濁度はサーモフィッシャー社製の分光光度計を用いて測定した。 OD_{600} が 0.6 になったことを確認した後、タンパク質発現誘導を行うため、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。この時、その濃度を、0.1 mM、0.05 mM、0.01 mM となるように条件を振り、加えて、培養温度を 37°C 、 24°C 、 16°C の各条件で培養することによって各タンパク質の最適な誘導条件を詳細に検討した。培養時間は、 37°C で培養した場合は 4 時間、その他の培養温度では 16 時間程度の培養を行った。培養液を 4°C 、3,300 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去した。1 mL の洗浄緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH7.5))を加えて菌体を洗浄後、 4°C 、6,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去した。0.5 ml の Lysis 緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH7.5), 1 mg/ml リゾチーム, 1 mM DTT, 0.1 mM APMSF (*p*-アミジノフェニルメタンスルフォニルフルオリド)を加えて菌体を懸濁し、30 分間氷上で静置した。超音波によって菌体を破碎し、 4°C 、15,000 rpm で 30 分間遠心分離を行った後、上清を回収した。一方、沈殿物には 1 % SDS を含む洗浄緩衝液を 0.5 ml 加えて溶解した。

5-2-4 Ni^{2+} アフィニティーカラムによる精製

1-3)で調製した菌体破碎後の可溶性画分を用いた。1 ml の 50 % Ni-NTA (ニッケル-ニトリロ三酢酸)をカラムに充填し、冷却した 5 ml の蒸留水を添加し、通液 (1 ml/min)することによって、樹脂を洗浄した。カラムに 5 ml の洗浄緩衝液 (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM イミダゾール, 20 % グリセロール)を流し (1 ml/min)、Ni-NTA の平衡化を行った。菌体破碎後の可溶性画分を添加し、1 ml/min の流速で通塔し、目的タンパク質を Ni-NTA 樹脂に吸着させた。5 ml の洗浄緩衝液を再度通液し、非吸着タンパク質を除去した。さらに溶出緩衝液 (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.0), 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 20 % グリセロール)を添加し、溶出液を 0.5 ml 毎に計 10 本分取した。各溶出画分の $6\text{ }\mu\text{l}$ に対して、 $2\text{ }\mu\text{l}$ の 4 × SDS 試料緩衝液 (40%グリセロール, 125 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8% SDS, 0.02%ブromoフェノールブルー, 2% 2-メルカプトエタノール)を加え、 65°C で 30 分間加熱した。室温となるまで静置した後、13,200 rpm で 5 分間遠心分離を行った。その内の $5\text{ }\mu\text{l}$ を、12.5 % SDS-PAGE を行った。泳動像を確認し、目的タンパク質を含む画分を透析膜 (Seamless Cellulose Tubing, Size: 20/32)に移し、透析緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 % グリセロール, pH 7.5) 1-liter を用いて一晩透析を行った。透析緩衝液を捨

てた後、再度新しい緩衝液を交換してさらに2時間透析を行った。この操作を再度繰り返した。

5-2-5 CldB の可溶化

CldB は、IPTG の終濃度を、0.1 mM、0.05 mM、0.01 mM となるように条件を振り、加えて、培養温度を 37°C、24°C、16°C の各条件で培養し、タンパク質発現誘導を試みた。しかしながら如何なる誘導条件においても、封入体を形成した。

得られた封入体に、Triton X-100 を含む 1 ml 洗浄緩衝液を加えて超音波(30 秒処理し、30 秒氷上で冷却を 10 回繰り返す) 処理を行い、封入体を良く懸濁した。3,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を 3 回繰り返すことにより、封入体と混在する膜蛋白質などの夾雑タンパク質を除去した。1 ml の洗浄緩衝液を加えて超音波処理をし、13,200 rpm で 1 分間遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を 3 回行い Triton X-100 を除去した。Triton X-100 で洗浄した封入体に対し、8 M 尿素緩衝液 (8 M 尿素、50 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 7.5) または 6 M 塩酸グアニジン緩衝液 (6 M グアニジン塩酸塩、50 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 7.5) を 10 ml 加えて封入体を完全に溶解した。37°C で 20 時間程度保温し、DTT による還元を行った。3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清を透析膜に移し入れ、透析緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 20 % グリセロール, pH 7.5) で一晩透析を行った。その後、透析緩衝液を交換して更に 2 時間透析を行った。この操作を再度繰り返した。透析した粗酵素液を 4°C、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。4 μ l の試料に、4 \times SDS sample 緩衝液を 1 μ l 加え、65°C で 30 分間加熱処理し、室温となるまで静置した後、13,200 rpm で 5 分間遠心分離を行った。その後、12.5 % SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。可溶化したことを確認した後、1-4) で述べた Ni-NTA カラムを用いた方法によって組換え酵素を得た。

【実験結果】

大量発現させた CldD, Scla_lds および Scla_lts 遺伝子産物は、検討した各 IPTG 濃度に関わらず、効果的に可溶性タンパク質として発現させることができた(図 5-3)。しかしながら、CldB は本実験で検討した IPTG および培養温度の如何なる組み合わせにおいても、封入体を形成した。そこで、尿素あるいは塩酸グアニジンを変性剤として用いた可溶化法により、CldB を可溶化することを試みた。Rosseta (pLysS) / pET28a(+):cldB から発現した CldB 封入体を 5 mM の DTT を含む 8 M 尿素あるいは 6 M 塩酸グアニジン溶液を用いて溶解した後、37°C で 20 時間程度保温することによって、CldB 分子間で不正確に形成されたジスルフィド結合を還元した。その後、透析

法により、変性剤を穏やかに除去することにより、CldB の巻き戻し操作を行った。その結果、CldB は可溶化タンパク質として回収することができた (図 5-4)。

各可溶性タンパク質を Ni-NTA カラムによる溶出を行い、不要なタンパク質を除去し、イミダゾールを高濃度で添加することで、6 x His を持つタンパク質を特異的に精製することができた(図 5-5)。また SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、CldB, CldD, Scla_lds および Scla_lts の推定アミノ酸分子量に相当する分子量であるそれぞれ約 61 kDa, 38 kDa, 60 kDa および 37kDa を示した。

5-3 テルペン合成酵素の機能解析

1-5)で調製した各組換えタンパク質を用いた試験管内反応系の構築を試みた。同様に、*S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の Scla_Lds と Scla_Lts についても同様に検討した。また、cyslabdan 生合成酵素群と Scla_Lds と Scla_Lts を組み合わせた反応系を作成し、そこから得られる、反応生成物についても解析を行った。

5-3-1 試験管内反応系の構築

2 ml 容量のガラス製チューブを用いて、以下に示す反応系を用いて酵素反応を行った。

Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
MgCl ₂	2 mM
2-mercaptoethanol	0.2 mM
glycerol	20 %
CldA (ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素)	1 μ M
CldB または Scla_Lds	1 μ M
CldD または Scla_Lts	1 μ M
IPP	0.1 mM
DMAPP	0.3 mM
Water	up to 0.2 mL

30°Cの湯浴の中で、2 時間または 20 時間反応を行った。反応液と等量の *n*-ペンタンを加え、攪拌することにより反応生成物の抽出を行った。遠心分離後、上層の *n*-ペンタン層を新しいガラスチューブに移した。この操作を再度繰り返した。ロータリーエバポレーターで *n*-ペンタンを留去し、反応生成物を乾固した後、メタノールを 15 μ l 加え、その内の 1 μ l を GC-MS 解析に使用した。

[分析条件]

・ GC-MS 島津製作所製 GCMS-QP5050A

カラム : Neutral Bond-5 capillary column (30 m x 0.25 mm) (GL サイエンス社製)

温度 : 開始温度 50°C、昇温 50-250°C (25°C/min)

測定時間 : 12 分

【実験結果】

酵素反応生成物の GC-MS 解析の結果、cyslabdan を生産する *Streptomyces* sp. K04-0144 由来の CldB と CldD の共存下での反応系では、GC-MS 解析により保持時間 10.75 min で、 m/z 272 [M^+]に分子イオンピークを示した。Labda-8(17),12,14-triene の標準品と比較したところ、保持時間とマスフラグメンテーションパターンがまったく一致したことから、labda-8(17),12,14-triene の生成が確認された(図 5-6)。一方、*S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の Scla_Lds と Scla_Lts の共存下での反応系では、GC-MS 解析で分子量 m/z 272 [M^+]は同じであるが、labda-8(17),12,14-triene のそれとは明らかに異なる保持時間 10.43 min とフラグメントパターンを示す生成物 1 が得られた。また、*Streptomyces* sp. K04-0144 由来の CldB、CldD と *S. clavuligerus* 由来の Scla_Lds、Scla_Lts を組み合わせて反応生成物の解析を試みた。CldB と Scla_Lts の組み合わせからは保持時間 10.10 min、分子量 m/z 272 [M^+]の生成物 2 が、また Scla_Lds と CldD の組み合わせからは保持時間 10.90 min、分子量 m/z 272 [M^+]の生成物 3 がそれぞれ得られた(図 5-7)。

5-4 Labdane 型ジテルペン化合物の生産

Cyslabdan 生合成に関与する CldB および CldD と、*S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の Scla_lds および Scla_lts のそれぞれの環化および脱二リン酸化酵素を組み合わせることによって、新たなジテルペン化合物が生成した。そこで *cldB* と *scla_lds* および *cldD* と *scla_lts* をそれぞれ組換えた人工オペロンを作製し、SUKA22 を宿主とする異種発現系に供することによって、生成するテルペン化合物の解析を行った。

5-4-1) A 型および B 型テルペン合成酵素遺伝子共発現カセットの構築

【実験材料】

・使用菌株

E. coli DH5 α

E. coli GM2929 *hsdS*::Tn10

S. avermitilis SUKA22

・プラスミド

pKU1021::ggs, Scla_11H9, pKU1021::cldABCD

・ 培地
巻末に記載

【実験方法】

1-1). PCR による DNA 断片の増幅

以下の反応液を調製し、PCR を行なった。上流および下流領域の増幅では、pKU1021::cldABCD および *S. clavuligerus* ATCC 27064 のコスミドクローン Scla_11H9 を鋳型として用いた。

鋳型 DNA (0.5 µg/ml を 50 倍希釈)	1 µl
Expand High Fidelity Taq Buffer (10x)	2 µl
DMSO	1 µl
dNTP mixture (2.5 mM each)	1 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
Expand High Fidelity DNA Taq polymerase	0.7 U
滅菌水 (D.W.)	up to 20 µl

増幅条件

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min 30sec return to 2, 24 cycles
5. 72°C 5 min
6. 4°C ∞

プライマーの塩基配列（下線は制限酵素サイト、太字は開始コドンおよび終止コドンを示す）

cldB_fwd_XbaI : 5'-cgctcgggtctagacggaaggcagtcATGAGCTCCATATCCC-3'

cldB_rev_BstAPI : 5'-ttaattaagcaaccttgcTCAGGGCCGACGGGCCTGCAGCAG-3'

cldD_fwd_BstAPI : 5'-tgctgccgcaaaggttgaggccgcATGACCCGCACC-3'

cldD_rev_HindIII : 5'-cccgagaagcttTCAACGACTGGTTGGGGCCGCGCCGCG-3'

scla_lds_fwd_XbaI : 5'-cctctagagagaaaggcagtcATGCCCGTCGACGTCGGCAC-3'

scla_lds_rev_BstAPI : 5'-ttaattaagcaacctttgcTCAGTCGGCGGGCCCCGGTCCGAGC-3'

scla_lts_fwd BstAPI : 5'-tgcctgccgcaaagggttgcgaggaGTGTCCGTGAGGTCTGGGG-3'

scla_lts_rev_HindIII: 5'-ccctcgagaagcttgCTACTCCTCCCGCCAGCGGTCTGC-3'

反応終了後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、20 μ l の 0.1xTE 緩衝液に溶解した。1%アガロース電気泳動を用いて増幅産物の確認を行った後、*DpnI* により鋳型 DNA を完全に消化（分解）した。

1-2). 増幅断片の制限酵素消化および連結

各 PCR 産物溶液 18 μ L に対し 2 μ l の NE 緩衝液 4 を加えた。後 0.25 μ l の *DpnI* を加え、37°Cのインキュベーターで一晩静置し、鋳型 DNA を消化した。各反応液に対し、*BstAPI* および BSA をそれぞれ加え、60°Cの湯浴中で 1 時間の制限酵素処理を行った。フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿、エタノール洗浄を行った後、4 μ L の TE 緩衝液に溶解した。DNA 断片のモル比が 1 : 1 : 1 となるように調製し連結した。その後、アガロース電気泳動により DNA 断片を精製し、*cldB-cldD*, *cldB-scla_lts*, *scla_lds-cldD* および *scla_lds-scla_lts* を得た。

1-3). 4 種類の組み合わせのテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミドの作製

pKU1021::*ggs* および各 4 種類の組み合わせの遺伝子断片を *XbaI* および *HindIII* で消化した。反応終了後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70%エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、5 μ l の TE 緩衝液に溶解した。アガロース電気泳動により DNA 断片を精製し、4 種類の組み合わせの遺伝子断片および pKU1021::*ggs* のモル比が 2:1 となるように調製し連結した。その後、*E. coli* DH5 α へ形質転換し、50 μ g/ml の KM を含む LB 培地で培養した。プラスミド抽出を行い、pKU1021::*ggs-cldB-cldD*、pKU1021::*ggs-scla_lds-cldD*、pKU1021::*ggs-cldB-scla_lts* および pKU1021::*ggs-scla_lds-scla_lts* を得た。その後、目的とするプラスミドを 1%アガロース電気泳動で確認した。

1-4) SUKA22 への各発現プラスミドの導入

3-3)で構築した各プラスミドをエレクトロポレーション法により *E. coli* GM2929 *hsdS::Tn10* へ導入した。得られた形質転換体を、30 μ g/ml の CP および 50 μ g/ml の KM を含む LB 培地で一晩培養した。その後、プラスミド抽出を行い、その後、プラスミド抽出を行い、得られた組換えプラスミド DNA を第二章で述べたポリエチレングリコールを用いた方法によって *S. avermitilis* SUKA22 のプロトプラストに導入した。形

質転換体は第二章の 4-3)に記載した方法によって選択した。

1-5) 4 種類の組み合わせのテルペン合成酵素遺伝子発現プラスミド形質転換体の解析

10 ml の種培地をスプリングコイル入り大試験管に分注し、ネガティブコントロール株(SUKA22/pKU460)および各形質転換体の孢子懸濁液を接種し、30°Cで 2 日間振とう培養したものを種培養液とした。10 ml の生産用培地を 125 ml 容量のポリカーボネート三角フラスコに分注し、種培養液を 0.1 ml (1%)植菌し、28°C、200 rpm で 5 日間振とう培養した。培養終了後、培養液を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行ない、培養上清と菌体を分離した。培養上清に 1 ml の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ない、ヘキサン抽出物を得た。また菌体は 10 ml のメタノールを加え 30 分間攪拌し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行ない、上清を得た。上清に 1 ml の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ない、ヘキサン抽出物を得た。それぞれのヘキサン抽出物を直接 GC-MS で解析した。

[分析条件]

・ GC-MS 島津製作所製 GCMS-QP5050A

カラム：Neutral Bond-5 capillary column (30 m x 0.25 mm) (GL サイエンス社製)

温度：開始温度 50°C、昇温 50-250°C (25°C/min)

測定時間：12 分

【実験結果】

Streptomyces sp. K04-0144 由来の *cldB* ならびに *cldD*、そして *S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の *scla_lds* ならびに *scla_lts* を組み合わせた人工オペロン発現プラスミドを構築し、SUKA22 株を形質転換した。GC-MS 解析の結果、*cldB* と *cldD*、*cldB* と *scla_lts* および *scla_lds* と *cldD* で組み合わせた形質転換株の培養抽出液からは、試験管内反応時と同一の分子量ならびにフラグメントパターンを示す化合物を生産した。一方、*scla_lds* と *scla_lts* を組み合わせた株では、生産物は全く確認されなかった(図 5-8)。

5-5 *scla_lds* の強制発現株の構築

3-5)の結果より、*scla_lds-scla_lts* の組み合わせの形質転換株は、テルペン化合物の生産が確認されなかった。*scla_lds* の発現量が少ないことが示唆されたことから、*scla_lds* を *rpsJp* の直下に連結したプラスミドを構築し、その遺伝子産物の解析を行っ

た。

【実験材料】

・ 使用菌株

E. coli DH5 α

E. coli GM2929 *hsdS*::Tn10

S. avermitilis SUKA22/pKU1021::*ggs-scla_lds-scla_lts*

・ プラスミド

pKU492A-*aac(3)IV*::*rpsJp-aac(3)I*, Scla_11H9

・ 培地

巻末に記載

【実験方法】

5-1). PCR による DNA 断片の増幅

以下の反応液を調製し、PCR を行なった。上流および下流領域の増幅では、*S. clavuligerus* ATCC 27064 のコスミドクローン Scla_11H9 を鋳型として用いた。

鋳型 DNA (0.5 μ g/ml を 50 倍希釈)	1 μ l
Expand High Fidelity Taq Buffer (10x)	2 μ l
DMSO	1 μ l
dNTP mixture (2.5 mM each)	1 μ l
Forward primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1 μ l
Expand High Fidelity DNA Taq polymerase	0.7 U
滅菌水 (D.W.)	up to 20 μ l

増幅条件

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min 30sec return to 2, 24 cycles
5. 72°C 5 min
6. 4°C ∞

プライマーの塩基配列（下線は制限酵素サイト、太字は開始コドンおよび終止コドンを示す）

scla_lds_NdeI_fwd: 5'-gaaaggcacat**ATG**CCCGTCGACGTCGGCACCCCTTC-3'

scla_lts_HindIII_rev: 5'-ccgcataagctttgcgggtcatgcggcctgcaacct-3'

反応終了後、フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70 v/v % エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、20 μ l の 0.1 x TE 緩衝液に溶解した。1%アガロース電気泳動を用いて増幅産物の確認を行った後、*DpnI* により鋳型 DNA を完全に消化（分解）した。

5-2). 増幅断片の制限酵素消化および連結

各 PCR 産物および pKU492*Aaac(3)IV* を *NdeI* および *HindIII* で消化した。反応終了後、65°C で 5 分間加温し、氷水中で急冷した。フェノール/クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿および 70% v/v エタノール洗浄を行い、しばらく風乾させた後、10 μ l の TE 緩衝液に溶解した。アガロース電気泳動後、DNA 断片をゲル中から精製し、目的テルペン合成酵素遺伝子断片およびベクターの断片のモル比が 2 : 1 となるように調製し連結した。その後、*E. coli* DH5 α へ導入した後、25 μ g/ml の APM を含む LB 培地で培養した。プラスミド抽出を行ない、pKU492*Aaac(3)IV::rpsJp-scla_lds* を得た。

5-3). SUKA22 への発現プラスミドの導入

4-2)で構築したプラスミドをエレクトロポレーション法により *E. coli* GM2929 *hsdS::Tn10* へ導入した。得られた形質転換体を、30 μ g/ml の CP および 25 μ g/ml の APM を含む LB 培地で一晩培養した。その後、プラスミド抽出を行い、得られたプラスミド DNA を第二章で述べた方法で *S. avermitilis* SUKA22/pKU1021::*ggs-scla_lds-scla_lts* へ導入した。

5-4). 形質転換体の生産物の解析

10 ml の種培地をスプリングコイル入り大試験管に分注し、ネガティブコントロール株(SUKA22/pKU460)および形質転換体の孢子懸濁液を接種し、30°C で 2 日間振とう培養したものを種培養液とした。10 ml の AVM 半合成培地を 125 ml 容量のポリカーボネート三角フラスコに分注し、種培養液を 0.1 ml (1%)植菌し、28°C、200 rpm で 5 日間振とう培養した。培養終了後、培養液を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行ない、培養上清と菌体を分離した。培養上清に 1 ml の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ない、ヘキサン抽出物を得た。また菌体は 10 ml のメタノールを加え 30 分間攪拌し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行ない、上清を得た。上清に 1 ml

の *n*-ヘキサンを加えて攪拌し、遠心分離を行ない、ヘキサン抽出物を得た。それぞれのヘキサン抽出物を直接 GC-MS で解析した。

〔分析条件〕

・ GC-MS 島津製作所製 GCMS-QP5050A

カラム：Neutral Bond-5 capillary column (30 m x 0.25 mm) (GL サイエンス社製)

温度：開始温度 50°C、昇温 50-250°C (25°C/min)

測定時間：12 分

【実験結果】

4)より *scla_lds* と *scla_lts* を組み合わせた株は、テルペン化合物の生産が確認できなかったため、*scla_lds* の発現量の向上を図るため *rpsJp* の直下に *scla_lds* を連結したプラスミドを構築し、SUKA22/pKU1021::*ggs-scla_lds-scla_lts* に導入し、解析を行った。得られた形質転換体の菌体抽出液を GC-MS 解析を行った結果、保持時間 10.5 分に特異的なピークが検出され、試験管内反応時と同一の分子量ならびにフラグメントパターンを示すジテルペン化合物が生産することが確認された(図 5-9)

5-6 Labdane 型ジテルペン化合物の構造解析

・ 使用菌株

SUKA22/pKU1021::*ggs-scla_lds-scla_lts*/pKU492A-*aac(3)IV::rpsJp-scla_lds*

SUKA22/pKU1021::*ggs-cldB-scla_lts*

SUKA22/pKU1021::*ggs-scla_lds-cldD*

・ 培地

巻末に記載

【実験方法】

6-1) テルペン化合物を生産する形質転換体の大量培養

種培地をスプリングコイル入り大試験管に分注し、各孢子懸濁液を接種し、30°C で 2 日間振とう培養した。半合成培地を 500 ml 容のポリカーボネート製三角フラスコに 100 ml ずつ分注し、種培養液を 1 ml (1%) 接種し、28°C, 200 rpm で 7 日間振とう培

養した。

6-2) テルペン化合物の抽出

培養液を遠心分離し、上清と菌体に分けた。菌体にメタノールを加え攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。メタノール抽出物を *n*-ヘキサンを用いて抽出し、その一部を GC-MS 分析を行なった。さらにシリカゲルクロマトグラフィーにより得られた各画分を GC-MS により確認を行ない、各テルペン化合物を単離した。

6-3) 各種機器分析方法

- ・ NMR 日本電子 (JEOL) JNM-ECP500FT NMR SYSTEM (^1H -NMR : 500 MHz、 ^{13}C -NMR : 125 MHz)

【実験結果】

5-6-1 *scla_lds-scla_lts* 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析

1-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。さらに、200 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶出溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10) ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 5 から 9 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

1-2) 化合物 1 の構造決定

化合物 1 (*labda*-7.13(16),14-triene, **1**, 1.9 mg)は、無色の油状物質として得られた。EI-MS において m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ であると推定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 ^1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測され、 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 5-10)。DEPT スペクトルより 4 つのメチル炭素、6 つの sp^3 メチレン炭素、2 つの sp^2 メチレン炭素、

2つの sp^3 メチン炭素、2つの sp^2 メチン炭素、2つの sp^3 4級炭素ならびに2つの sp^2 4級炭素に分類された。またそれらのうち低磁場にシフトした6つのシグナル(δ_C 113.3, 115.9, 122.4, 135.4, 139.0 および 147.1 ppm)から3つの二重結合の存在が示唆された。このことから、1は2環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC(図 5-12)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 5-15 に示した。 1H - 1H COSY(図 5-11)によって1位から3位まで、5位から7位、9位から12位までおよび14位と15位が連結した部分構造が明らかになった。 1H - ^{13}C HMBC 解析(図 5-13)により以下の相関が示された。15位の CH_2 (δ_H 5.05, 5.23)から14-CH (δ_C 139.0)および13-C (δ_C 147.1)に、16位の CH_2 (δ_H 4.99, 5.00)から12- CH_2 (δ_C 54.9), 13-C および 14-CH に、17位の CH_3 (δ_H 1.72)から7-CH (δ_C 122.4), 8-C (δ_C 135.4) および 9-CH (δ_C 54.9)に、18位の CH_3 (δ_H 0.86)から3- CH_2 (δ_C 42.4), 4-C (δ_C 33.3), 5-CH (δ_C 50.3)および19- CH_3 (δ_C 33.1)に、19位の CH_3 (δ_H 0.85)から3- CH_2 , 4-C, 5-CH および18- CH_3 (δ_C 21.9)、そして20位の CH_3 (δ_H 0.73)から1- CH_2 (δ_C 39.2), 5-CH, 9-CH, および10-C (δ_C 50.3)に相関が観測された。以上データから1の平面構造を、7-8位間、13-16位間および14-15位間に二重結合が存在する λ -7,13(16),14-triene であることが明らかになった。 1H - 1H NOESY 解析から5位の CH (δ_H 1.19)と1位の CH_2 のアキシアル位のプロトン (δ_H 1.81)および9位の CH (δ_H 1.68)に、19位の CH_3 (δ_H 0.85)と20位の CH_3 (δ_H 0.73)に相関が観測されたことから、H-5 と H-9、H-19 と H-20 はそれぞれ同一平面側にあることが推定された(図 5-14)。

5-6-2 *cldB-scla_lts* 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析

2-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。さらに、200 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の 30 倍量 (10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の *n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶出溶媒は、*n*-ペンタン : ジクロロメタン = 100 : 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10)ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 5 から 9 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

2-2) 化合物 2 の構造決定

化合物 2 (labda-8(17),13(16),14-triene, 2, 3.1 mg)は、無色の油状物質として得られた。EI-MS において m/z 272 [M^+]の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると推定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測され、 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 5-16)。DEPT スペクトルより 3 つのメチル炭素、7 つの sp^3 メチレン炭素、3 つの sp^2 メチレン炭素、2 つの sp^3 メチン炭素、1 つの sp^2 メチン炭素、2 つの sp^3 4 級炭素ならびに 2 つの sp^2 4 級炭素に分類された。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル(δ_C 106.3, 113.6, 115.2, 139.2, 147.3 および 148.8 ppm)から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、2 は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC(図 5-18)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 5-21 に示した。 1H - 1H COSY(図 5-17)によって 1 位から 3 位まで、5 位から 7 位、9 位から 12 位までおよび 14 位と 15 位が連結した部分構造が明らかになった。 1H - ^{13}C HMBC 解析(図 5-19)により以下の相関が示された。15 位の CH_2 (δ_H 5.04, 5.20) から 14-CH (δ_C 139.2)および 13-C (δ_C 147.3)に、16 位の CH_2 (δ_H 4.96)から 12- CH_2 (δ_C 30.3), 13-C および 14-CH に、17 位の CH_2 (δ_H 4.54, 4.82)から 7- CH_2 (δ_C 56.7), 8-C (δ_C 148.8)および 9-CH (δ_C 56.7)に、18 位の CH_3 (δ_H 0.86)から 3- CH_2 (δ_C 42.7), 4-C (δ_C 33.6), 5-CH (δ_C 55.6)および 19- CH_3 (δ_C 21.8)に、19 位の CH_3 (δ_H 0.78)から 3- CH_2 , 4-C, 5-CH および 18- CH_3 (δ_C 33.7)、そして 20 位の CH_3 (δ_H 0.66)から 1- CH_2 (δ_C 39.1), 5-CH, 9-CH, および 10-C (δ_C 39.7)に相関が観測された。以上データから 2 の平面構造を、8-17 位間、13-16 位間および 14-15 位間に二重結合が存在する labda-8(17),13(16),14-triene であることが明らかになった。 1H - 1H NOESY 解析から 5 位の CH (δ_H 1.08)と 1 位の CH_2 のアキシアル位のプロトン (δ_H 1.72)および 9 位の CH (δ_H 1.64)に、19 位の CH_3 (δ_H 0.86)と 20 位の CH_3 (δ_H 0.66)に相関が観測されたことから、H-5 と H-9、H-19 と H-20 はそれぞれ同一平面側にあることが推定された(図 5-20)。

5-6-3 *scla_lds-cldD* 形質転換株が生産するジテルペン化合物の解析

3-1) 抽出、単離

2-liter の培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離を行い、上清と菌体を分離した。菌体に 1.0-liter のメタノールを加え 1 時間攪拌し、吸引ろ過を行ない、菌体残渣を除去した。ろ液を分液ロートに移し、200 ml の *n*-ヘキサンを添加し、抽出操作を行なった。ヘキサン層(上層)を回収し、この操作を 2 回繰り返した。さらに、200 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、無水硫酸ナトリウ

ムを加えて脱水し、ろ過した後、ろ液をエバポレーターにより濃縮乾固した。シリカゲル(230-400 mesh)を抽出物の30倍量(10 g)量りとり、*n*-ペンタンで膨潤させた後カラムに充填した。少量の*n*-ペンタンに溶解した抽出物をカラムに通液し、さらにけい砂を充填し分画を開始した。溶出溶媒は、*n*-ペンタン：ジクロロメタン = 100 : 0、20 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1 および 1 : 1 の組成で 20 ml (2 ml × 10) ずつ分画した。得られた各画分は GC-MS により確認を行なった。目的化合物を多く含むフラクション 5 から 9 を集め、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。

3-2) 化合物 3 の構造決定

化合物 3 (labda-7,12,14-triene, **3**, 1.2 mg) は、無色の油状物質として得られた。EI-MS において m/z 272 [M^+] の分子イオンピークを示したことから、その分子式は $C_{20}H_{32}$ であると推定し、不飽和度が 5 と明らかになった。 1H NMR から 32 個の水素シグナルが観測され、 ^{13}C NMR から 20 個の炭素シグナルが観測された(図 5-22)。DEPT スペクトルより 5 つのメチル炭素、5 つの sp^3 メチレン炭素、1 つの sp^2 メチレン炭素、2 つの sp^3 メチン炭素、3 つの sp^2 メチン炭素、2 つの sp^3 4 級炭素ならびに 2 つの sp^2 4 級炭素に分類された。またそれらのうち低磁場にシフトした 6 つのシグナル(δ_C 109.7, 122.9, 132.8, 135.2, 136.1 および 141.8 ppm) から 3 つの二重結合の存在が示唆された。このことから、**3** は 2 環性ジテルペン化合物であることが推測された。各炭素とそれに結合しているプロトンは 1H - ^{13}C HMQC(図 5-24)によって帰属し、それらのケミカルシフト値を図 5-27 に示した。 1H - 1H COSY(図 5-23)によって 1 位から 3 位まで、5 位から 7 位、9 位から 12 位までおよび 14 位と 15 位が連結した部分構造が明らかになった。 1H - ^{13}C HMBC 解析(図 5-25)により以下の相関が示された。15 位の CH_2 (δ_H 4.87, 5.03) から 13-C (δ_C 132.8) に、16 位の CH_3 (δ_H 1.73) から 12-CH (δ_C 136.1), 13-C および 14-CH (δ_C 141.8) に、17 位の CH_3 (δ_H 1.60) から 7-CH (δ_C 122.9), 8-C (δ_C 135.2) および 9-CH (δ_C 55.3) に、18 位の CH_3 (δ_H 0.85) から 3- CH_2 (δ_C 42.2), 4-C (δ_C 33.0), 5-CH (δ_C 50.2) および 19- CH_3 (δ_C 22.0) に、19 位の CH_3 (δ_H 0.87) から 3- CH_2 , 4-C, 5-CH および 18- CH_3 (δ_C 33.4)、そして 20 位の CH_3 (δ_H 0.78) から 1- CH_2 (δ_C 39.7), 5-CH, 9-CH, および 10-C (δ_C 36.8) に相関が観測された。以上データから 2 の平面構造を、7-8 位間、12-13 位間および 14-15 位間に二重結合が存在する labda-7,12,14-triene であることが明らかになった。 1H - 1H NOESY 解析から 5 位の CH (δ_H 1.18) と 1 位の CH_2 のアキシアル位のプロトン (δ_H 1.86) および 9 位の CH (δ_H 1.87) に、12 位の CH (δ_H 5.51) と 14 位の CH (δ_H 6.34) に、そして 19 位の CH_3 (δ_H 0.85) と 20 位の CH_3 (δ_H 0.78) に相関が観測されたことから、H-5 と H-9、H-19 と H-20 はそれぞれ同一平面側にあること、ならびに 12-13 位間の二重結合がトランスであることが推定された(図 5-20)。

5-7 【考察】

本章では、labdane 骨格形成に關与する *Streptomyces* sp. K04-0144 由来の CldB および CldD と、*S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の SCLAV_p0490 (Scla_lds) および SCLAV_p0491 (Scla_lts) を組み合わせることにより、labdane 骨格を有する新たなジテルペン化合物が生成することが明らかになった。さらに *scla_lds-scla_lts* 発現株からは新規化合物である labda-7,13(16),14-triene、*cldB-scla_lts* 発現株からは植物から既に単離された報告のある labda-8(17),13(16),14-triene⁷⁸⁾、そして *scla_lds-cldD* 発現株からは植物から既に単離された報告のある labda-7,12,14-triene をそれぞれ生成することを明らかにした⁷⁹⁾。各化合物の化学構造から、図 5-28 のように環化反応の反応機構によって生成すると推定した。B 型反応を触媒する CldB および Scla_lds は、GGPP の末端二重結合のプロトン化によって生成されたカルボカチオンによって順次閉環反応が進行する。CldB は 17 位の脱プロトン化、一方で Scla_lds は 7 位の脱プロトン化によって、それぞれ labda-8(17),13(14)-dienyl diphosphate および labda-7,13(14)-dienyl diphosphate を生成する。さらに A 型反応を触媒する CldD および Scla_lts は、二リン酸部分の引き抜きによって生成したカルボカチオンをそれぞれ 12 位および 16 位の脱プロトン化によって 12-13 位間および 13-16 位間に二重結合を形成することを推定した。CldD ならびに Scla_lts が、labda-8(17),13(14)-dienyl diphosphate および labda-7,13(14)-dienyl diphosphate の両方の基質を受け入れて反応が進行したことから、2 リン酸部位から遠い所の構造に対しては基質特異性が低いことが推定された。

以上の結果から、A 型反応および B 型反応を触媒するテルペン合成酵素を組み合わせることによって様々な骨格のテルペン化合物が創出可能なことを明らかにした。また他の骨格を有するテルペン化合物についても同様の方法を用いることによって、構造多様性に富んだテルペン化合物を人工的に創出することが期待される。

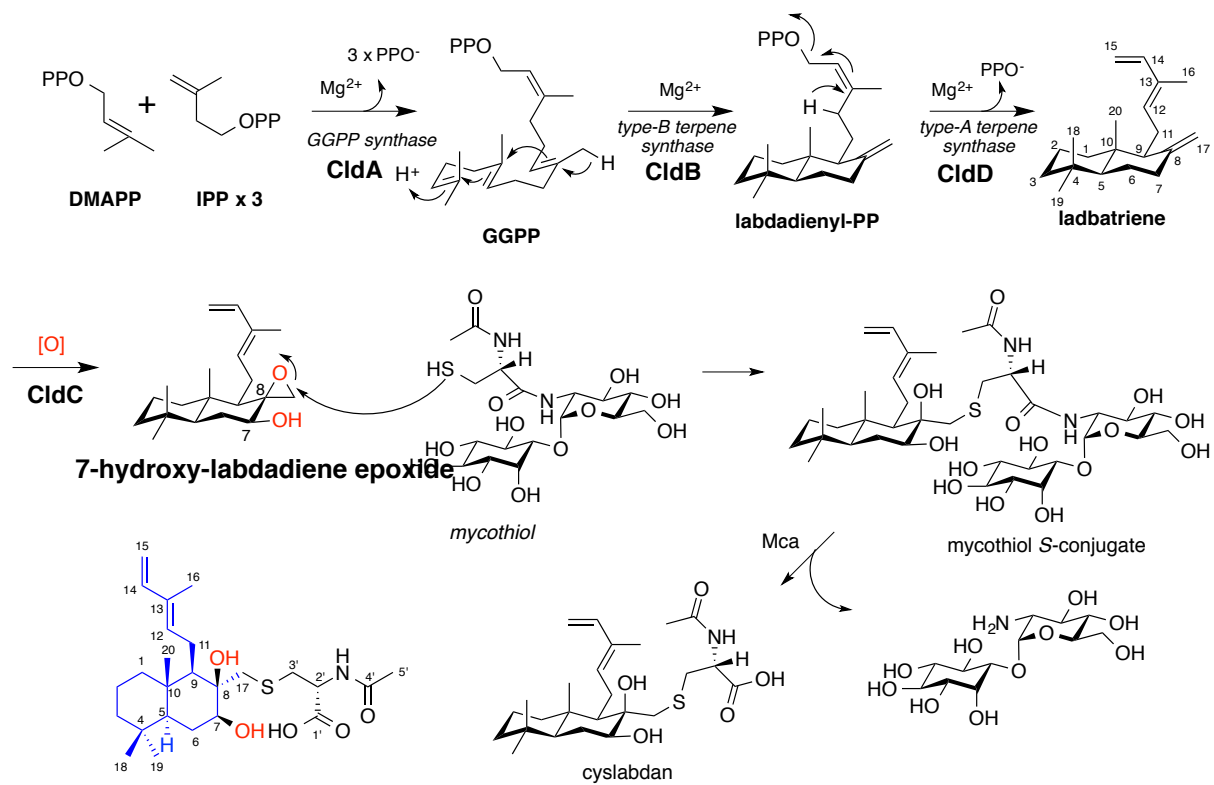


図5-1. Cyslabdanの推定生合成経路

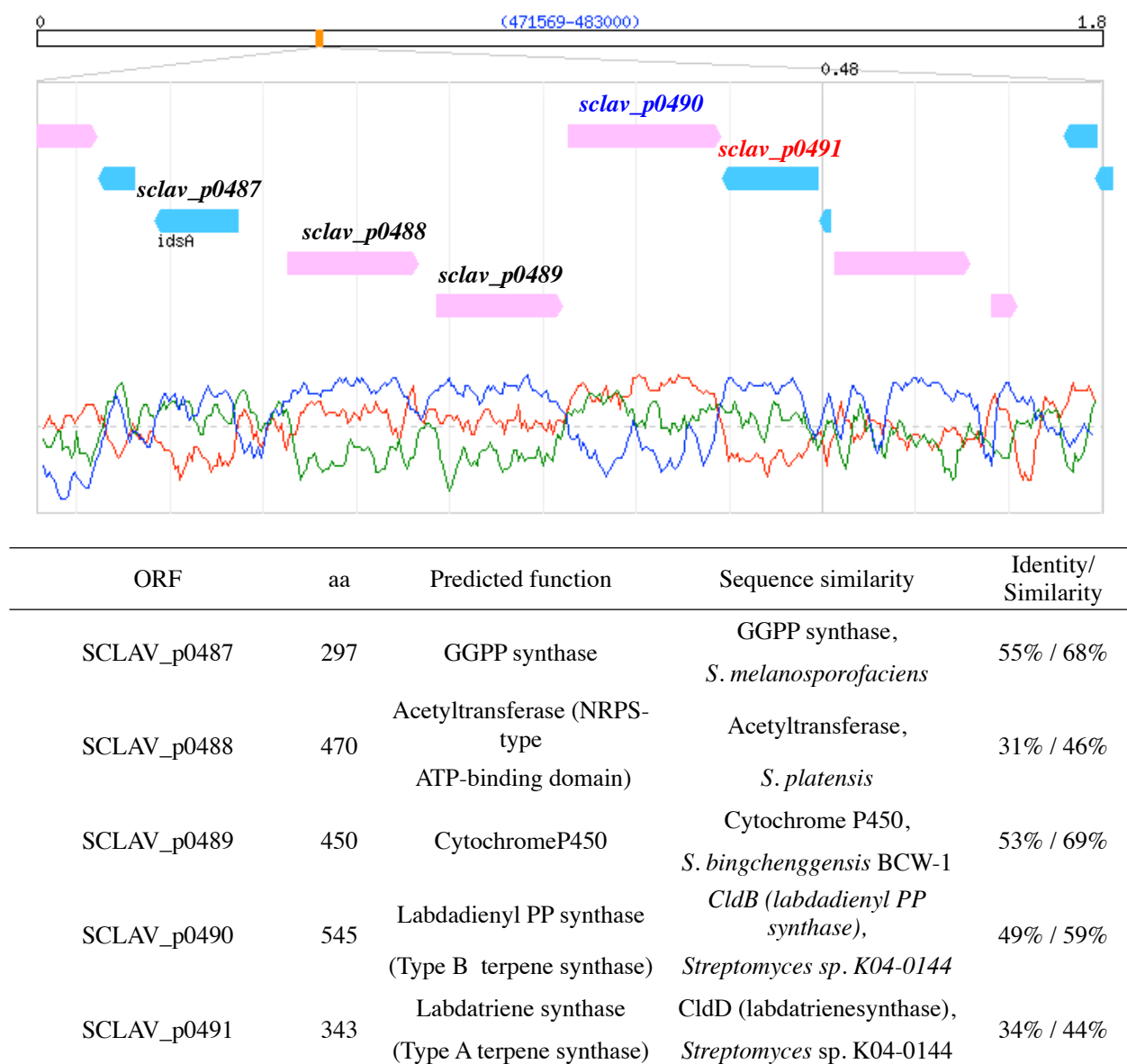


図5-2. *S. clavuligerus* ATCC 27064由来の*sclav_p0490*および*sclav_p0491* 周辺遺伝子およびその推定機能

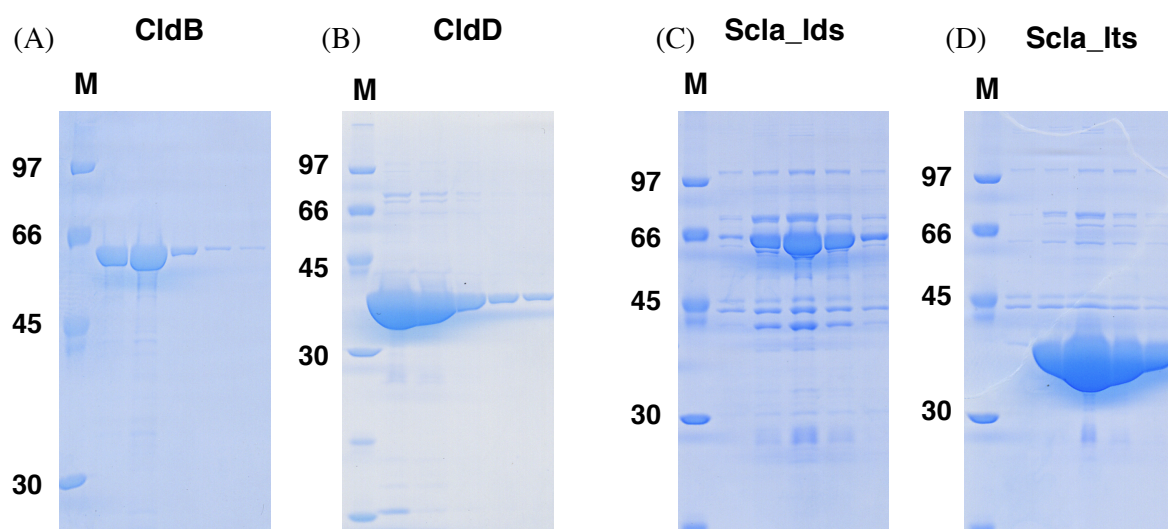
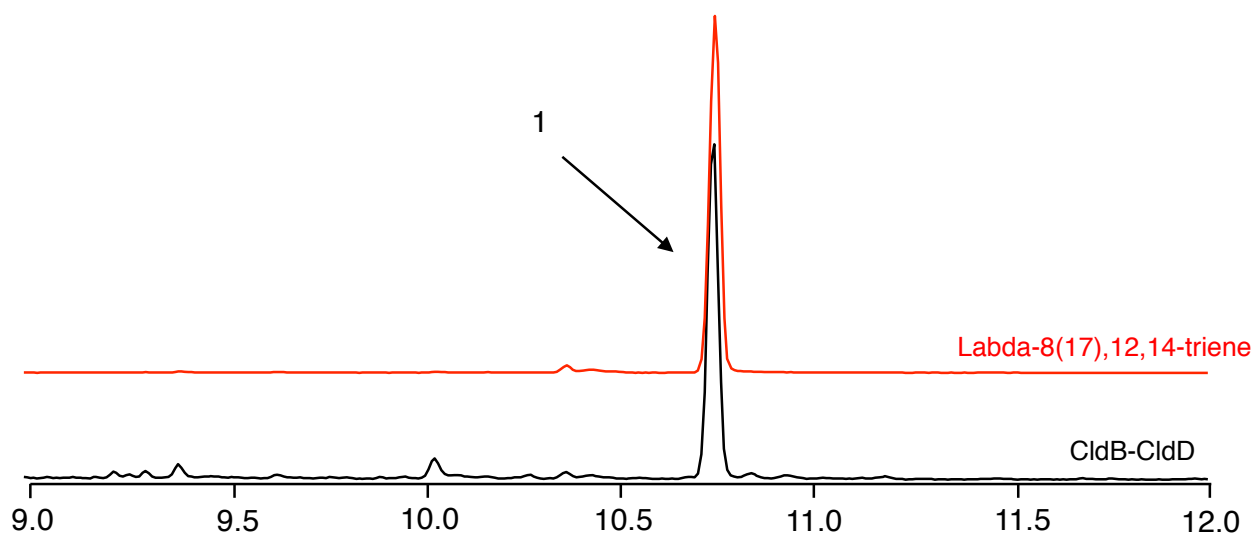


図5-5. SDS-PAGEによるNi-NTAによる精製後の各フラクションに含まれるCldB (A), CldD (B), Scla_lds (C)およびScla_lts (D)の確認



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

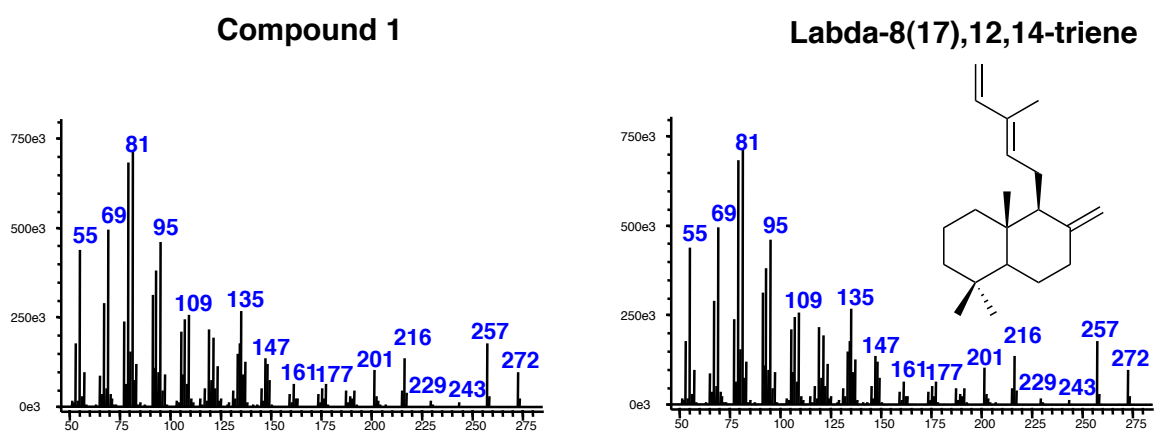


図5-6. CldB-CldDによる酵素反応生成物およびlabda-8(17),12,14-trieneのGC-MS解析

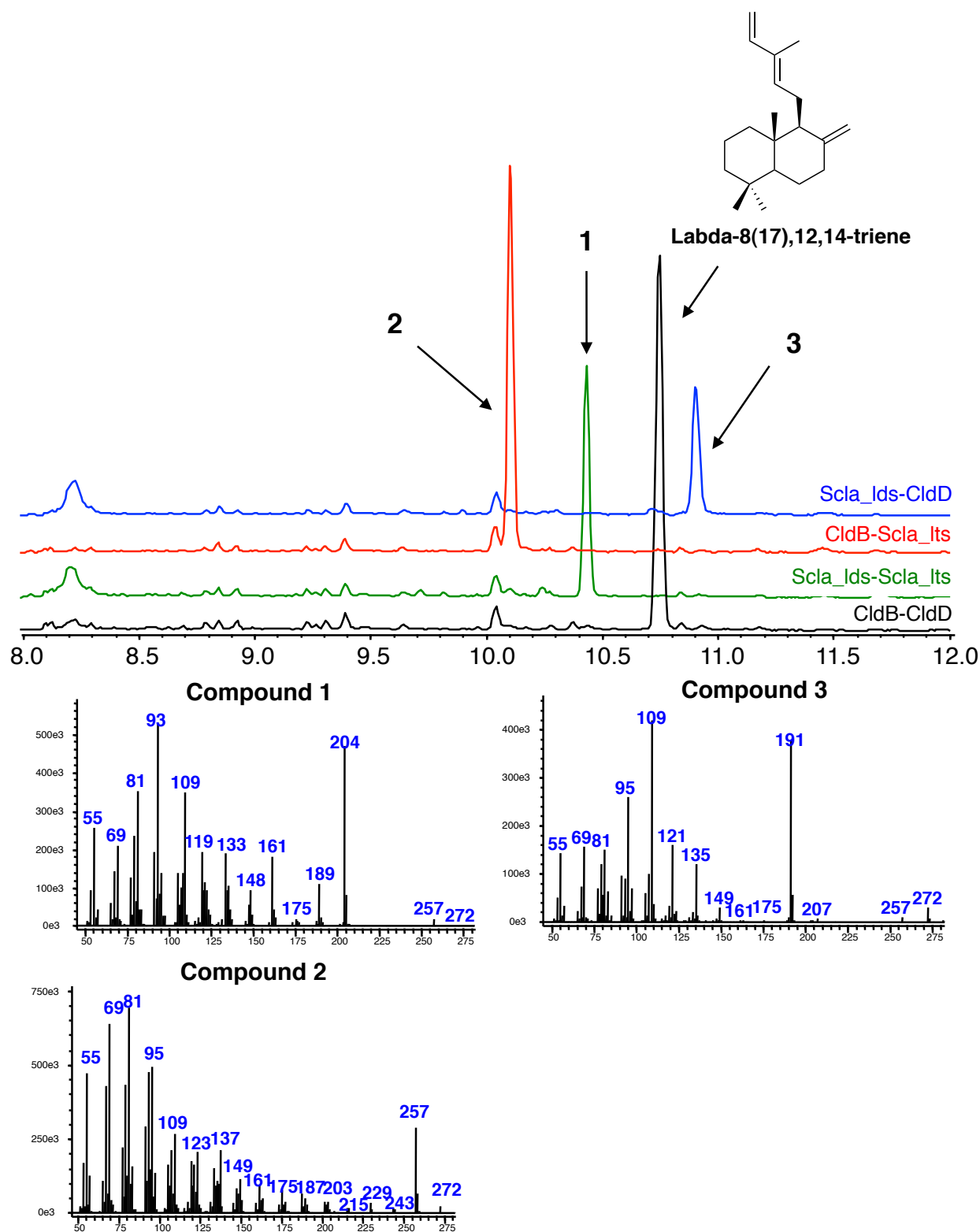
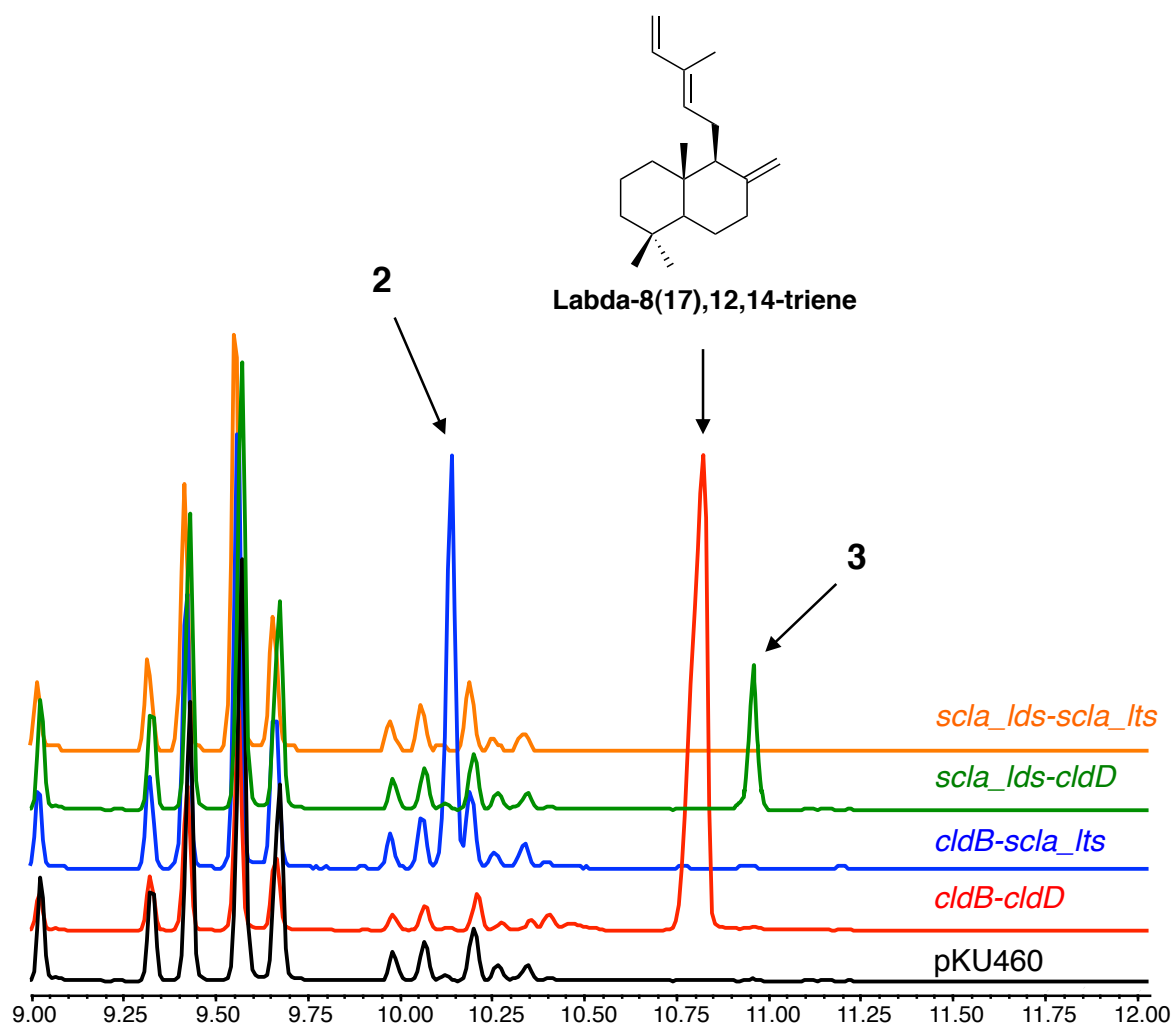
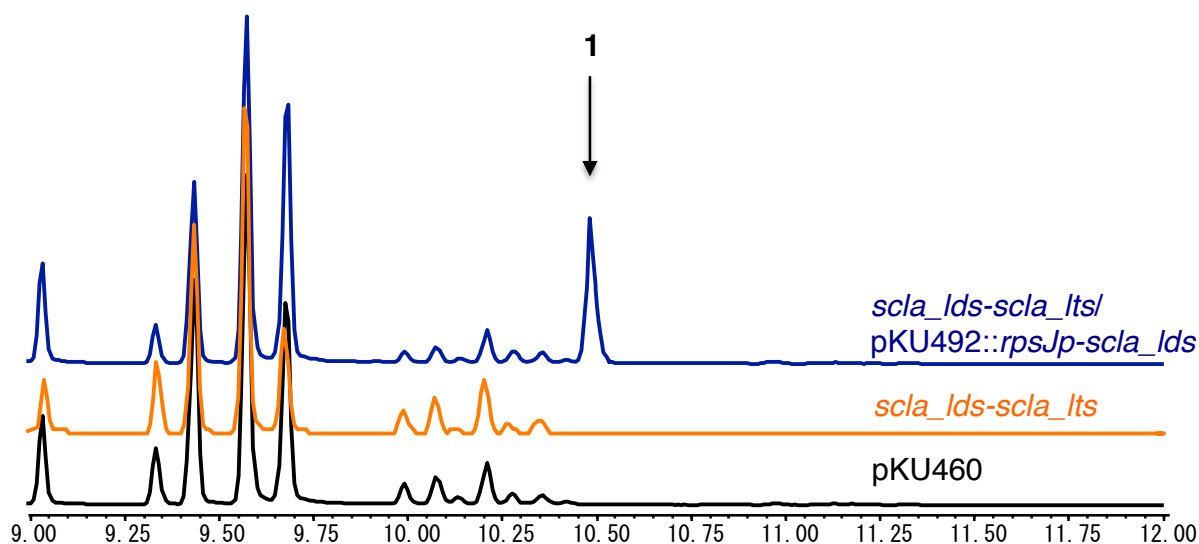


図5-7. Scla_lds-Scla_Its, CldB-Scla_ItsおよびScla_lds-CldDによる
酵素反応生成物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

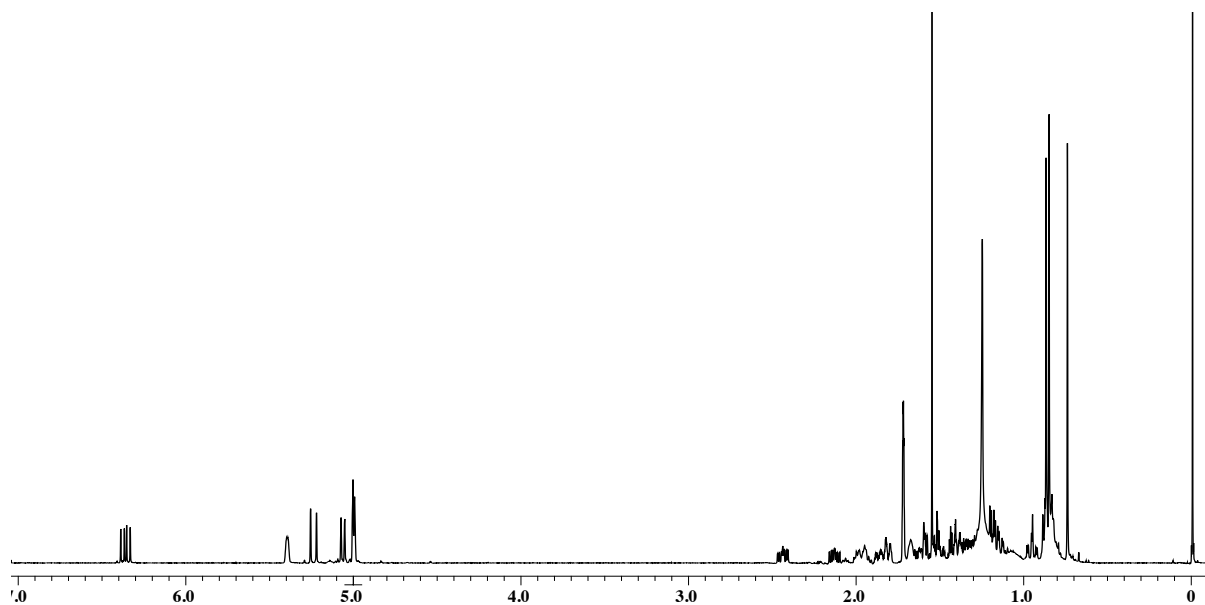
図5-8. SUKA22株および*cldB-cldD*, *scla_lds-scla_lts*, *cldB-scla_lts*および*scla_lds-cldD*導入株のヘキサン抽出物のGC-MS解析



A five- μ l portion of the extract was analyzed by GC-MS (Shimadzu GC-17A, 70 eV, EI, positive ion mode; 30 m x 0.25 mm neutral bond-5 capillary column (5% phenylmethylsilicon), using a temperature program of 50 - 250°C, temperature gradient of 25°C/minute)

図5-9. SUKA22株および*scla_lds-scla_lts/pKU492A::rpsJp-scla_lds*導入株の
ヘキサン抽出物のGC-MS解析

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

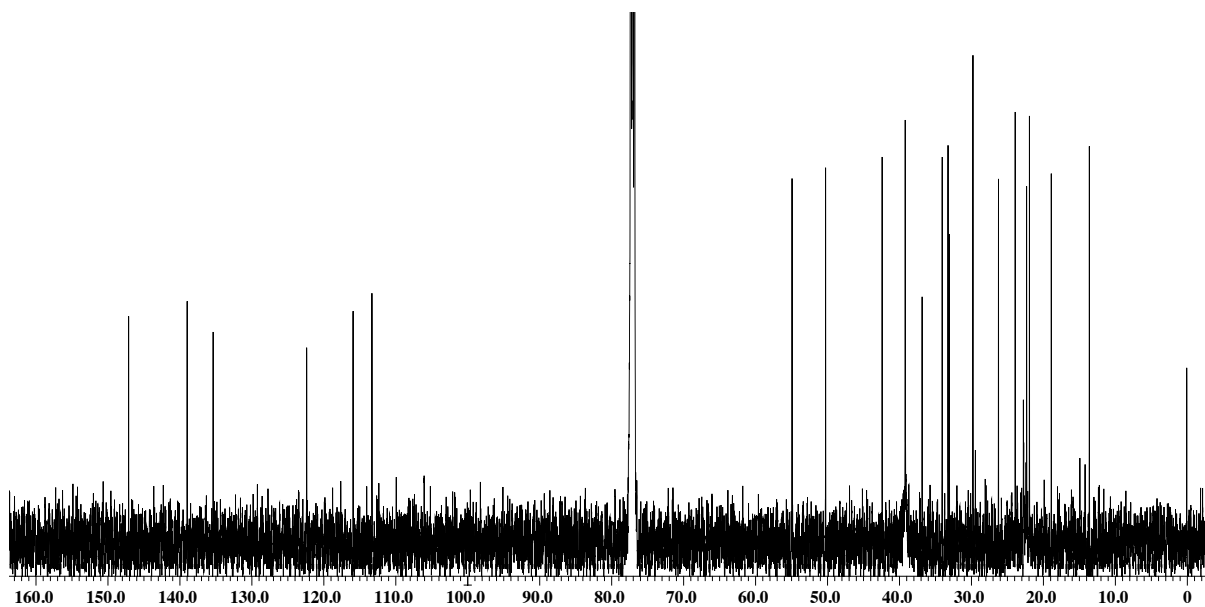


図5-10. Labda-7,13(16),14-trieneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMR スペクトル (ppm)

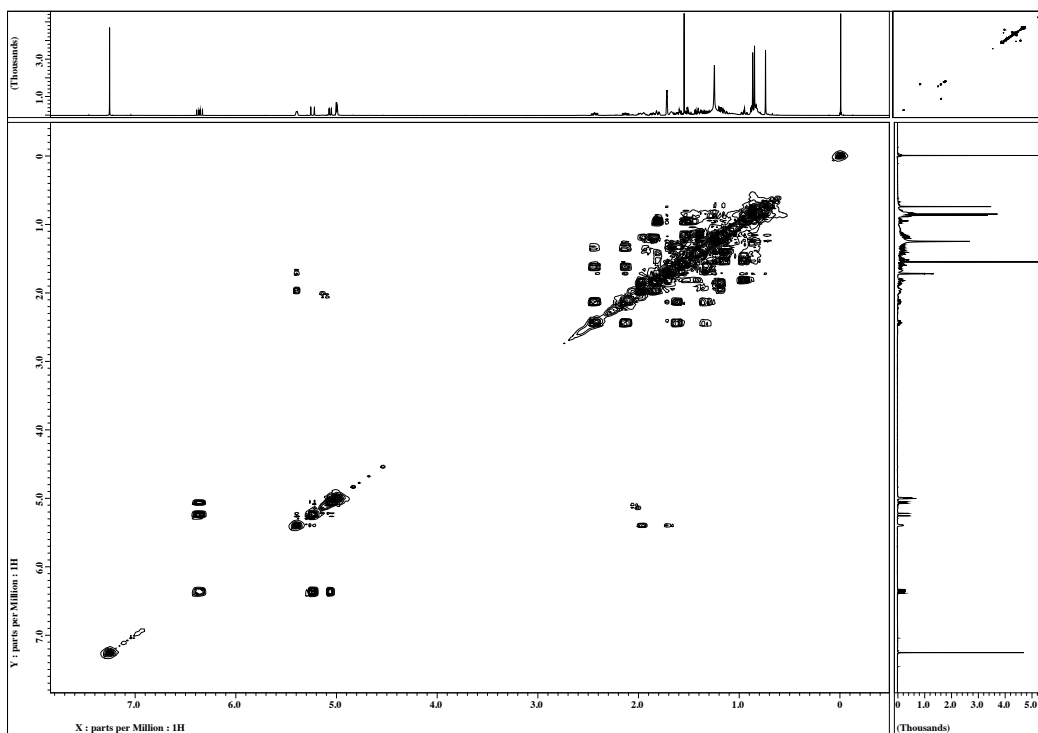


図5-11. Labda-7,13(16),14-triene の ^1H - ^1H COSYデータ

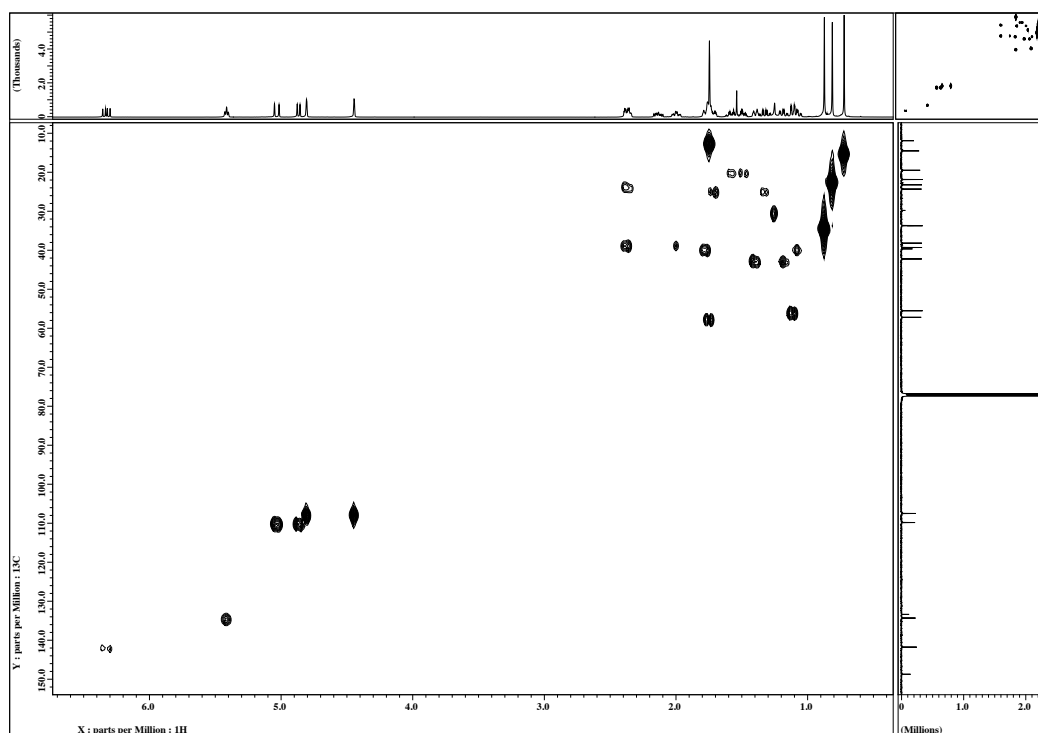


図5-12. Labda-7,13(16),14-trieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

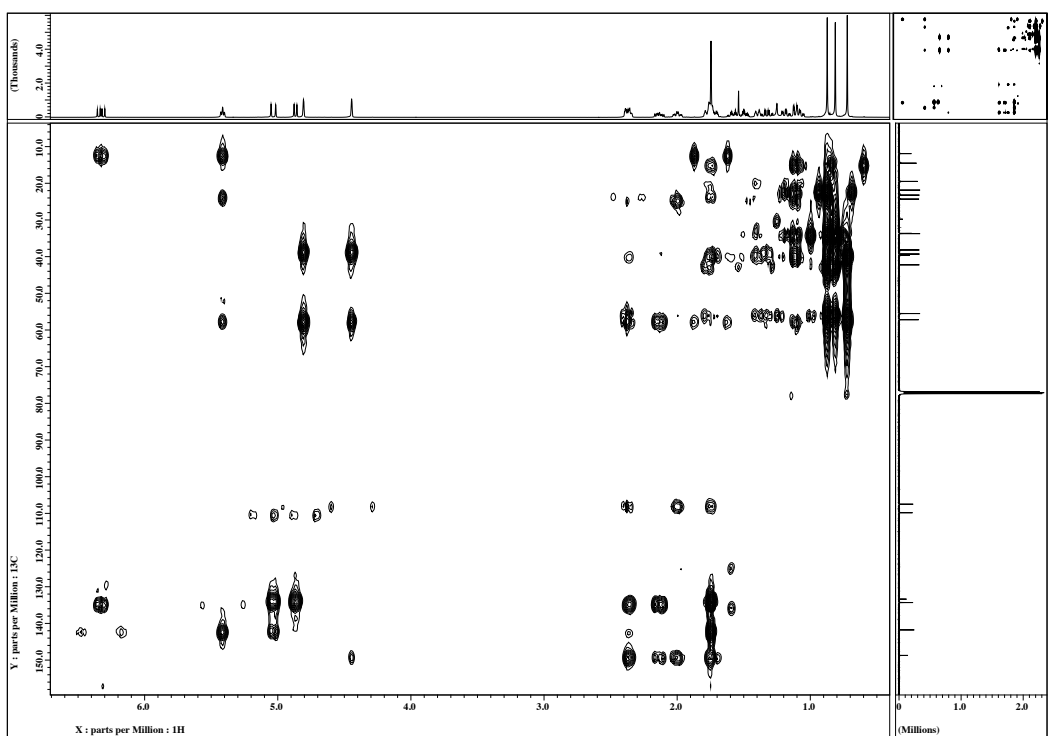


図5-13. Labda-7,13(16),14-trieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

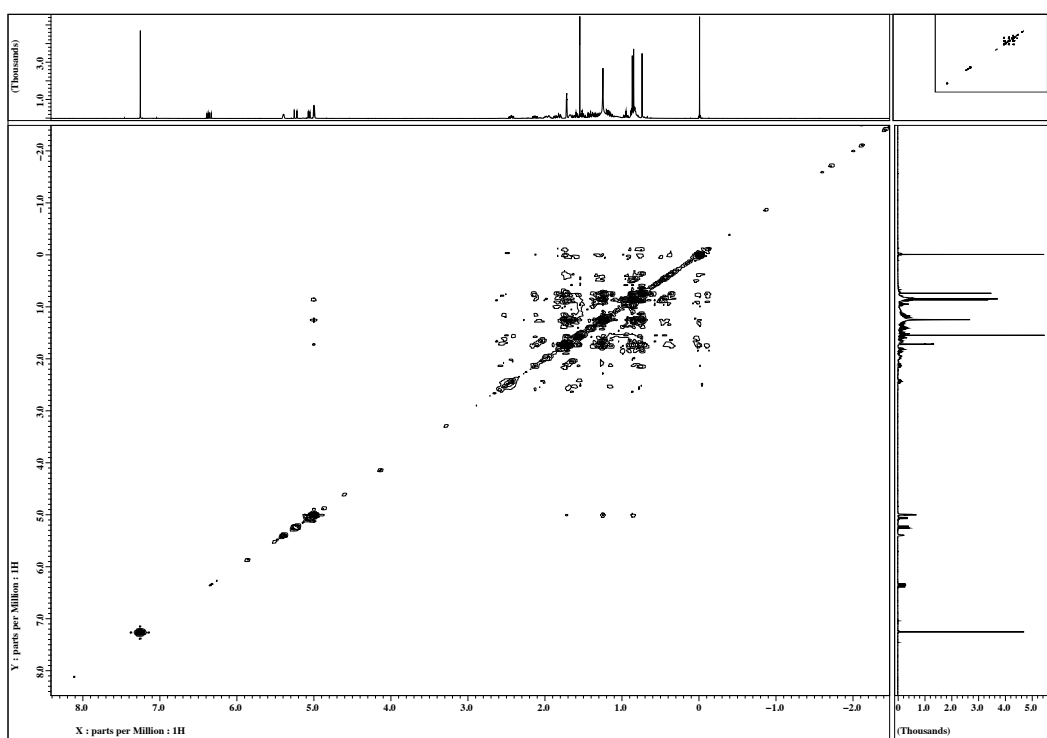
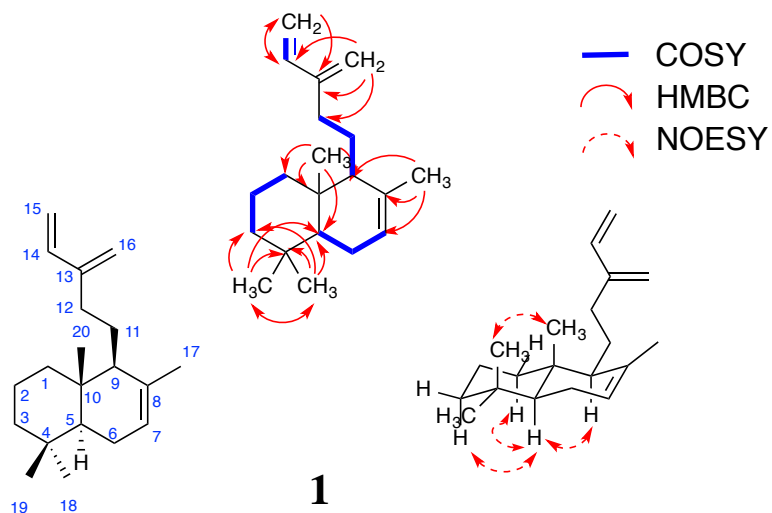


図5-14. Labda-7,13(16),14-triene の ^1H - ^1H NOESYデータ



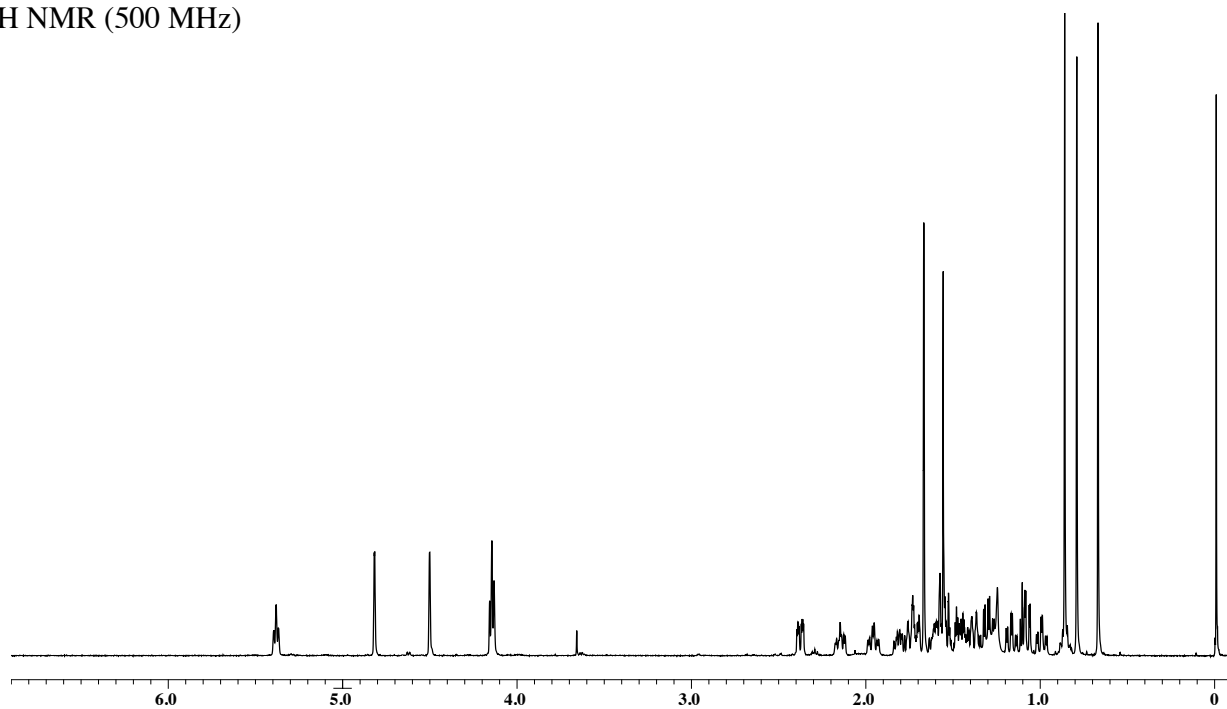
NMR chemical shifts in CDCl_3

1

No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)
1	39.2	1.81 (1H, m), 0.96 (1H, m)
2	18.9	1.58 (1H, m), 1.42 (1H, m)
3	42.4	1.38 (1H, m), 1.15 (1H, m)
4	33.3	-
5	50.3	1.19 (1H, ddd, $J=2.2, 8.2, 13.8$)
6	23.9	1.98 (1H, m), 1.72 (1H, m)
7	122.4	5.36 (1H, ddd, $J=2.5, 2.5, 5.2$)
8	135.4	-
9	54.9	1.68 (1H, m)
10	36.9	-
11	29.8	1.98 (1H, m), 1.70 (1H, m)
12	54.9	1.68 (2H, m)
13	147.1	-
14	139.0	6.36 (1H, dd, $J=6.9, 10.5$)
15	113.3	5.05 (1H, d, $J=7.4$), 5.23 (1H, d, $J=10.6$)
16	115.9	4.99 (1H, s), 5.00 (1H, s)
17	22.3	1.72 (3H, s)
18	21.9	0.86 (3H, s)
19	33.1	0.85 (3H, s)
20	13.6	0.73 (3H, s)

図5-15. Labda-7,13(16),14-triene の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

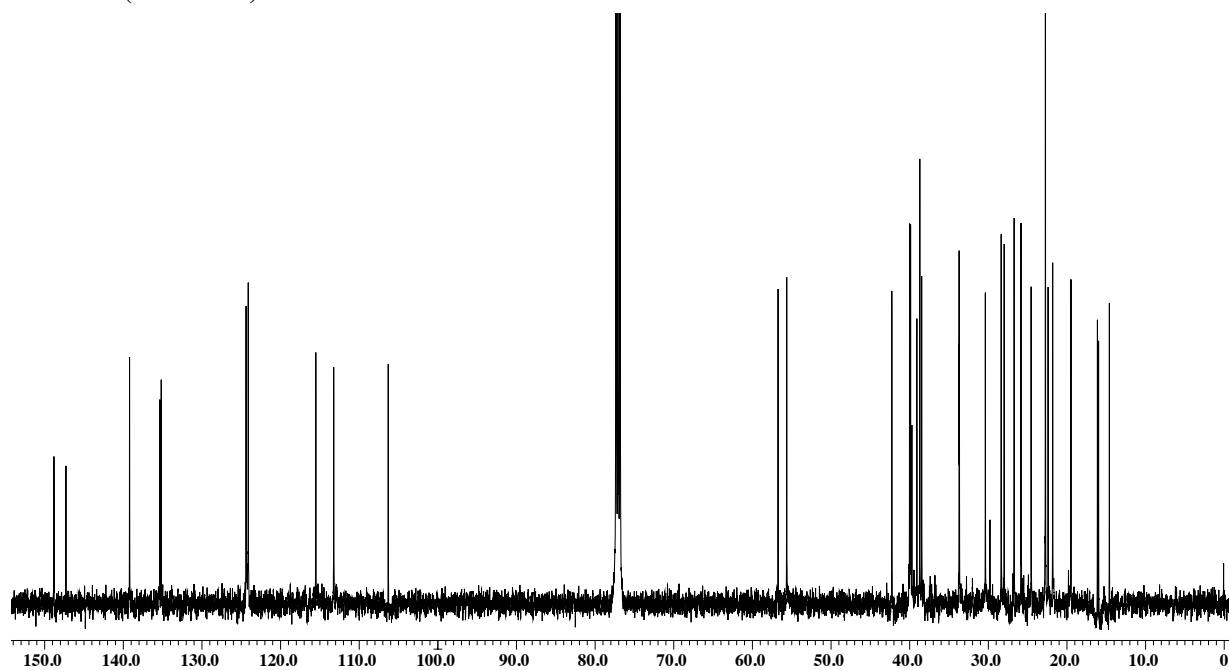


図5-16. Labda-8(17),13(16),14-trieneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

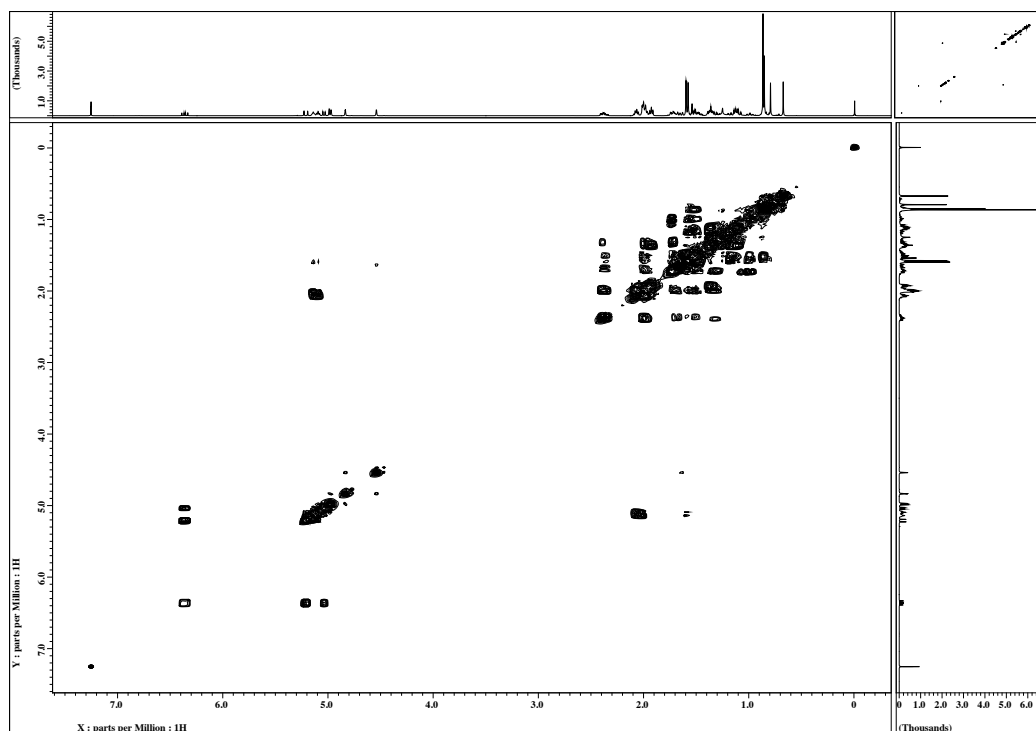


図5-17. Labda-8(17),13(16),14-triene の ^1H - ^1H COSYデータ

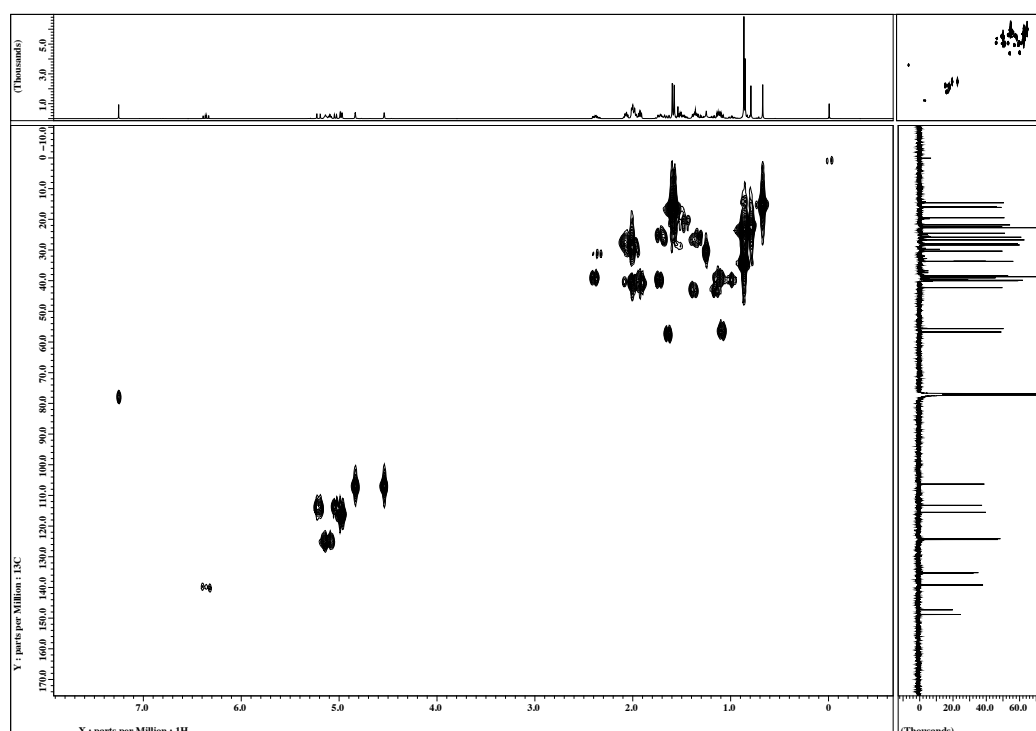


図5-18. Labda-8(17),13(16),14-trieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

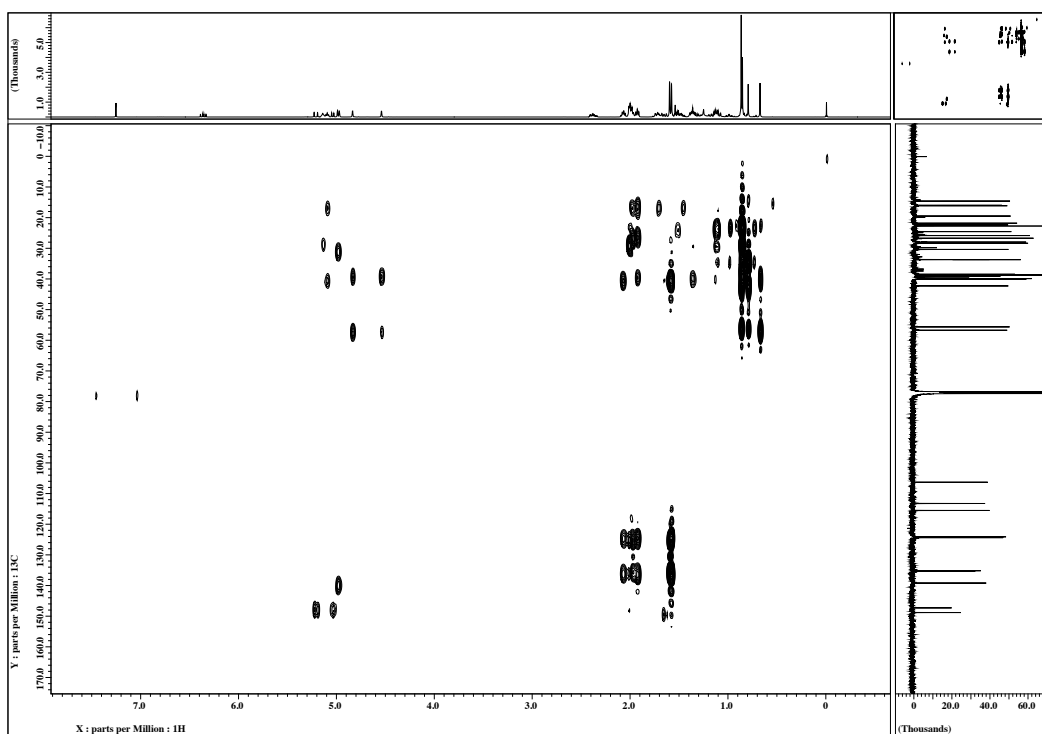


図5-19. Labda-8(17),13(16),14-trieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

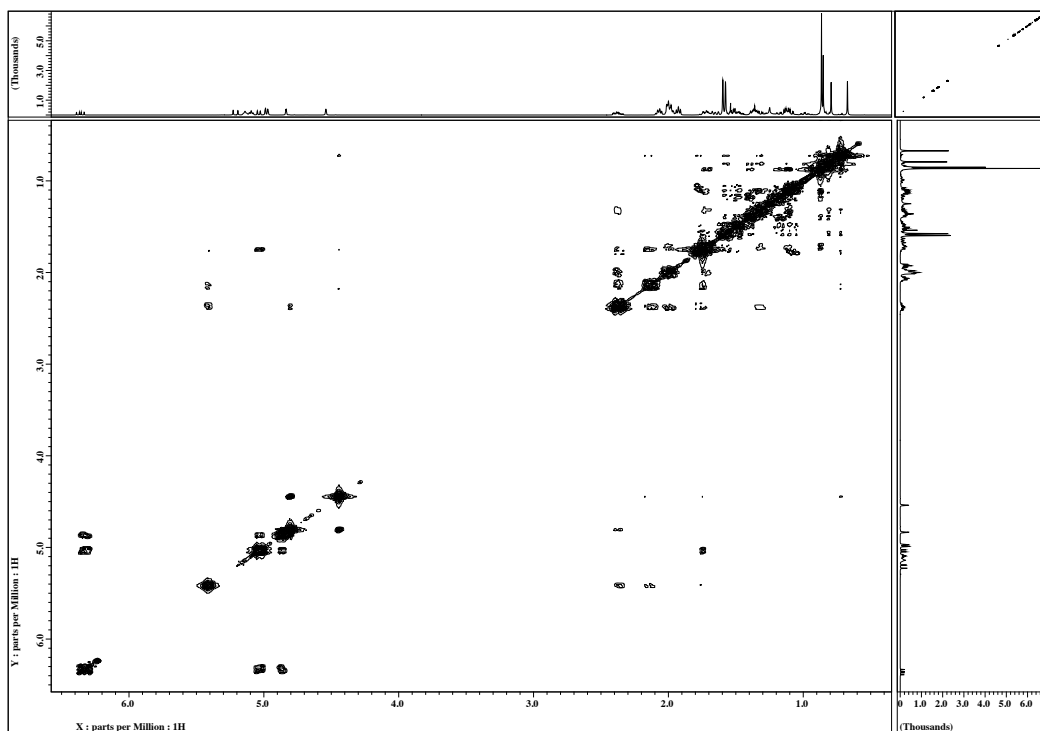
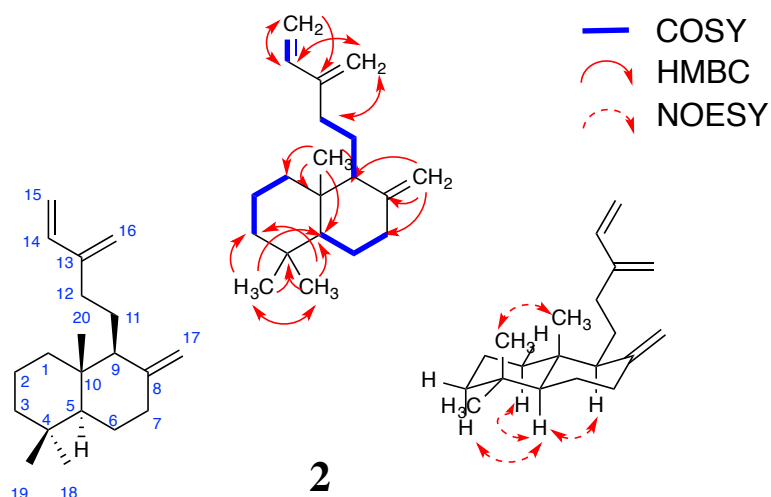


図5-20. Labda-8(17),13(16),14-triene の ^1H - ^1H NOESYデータ



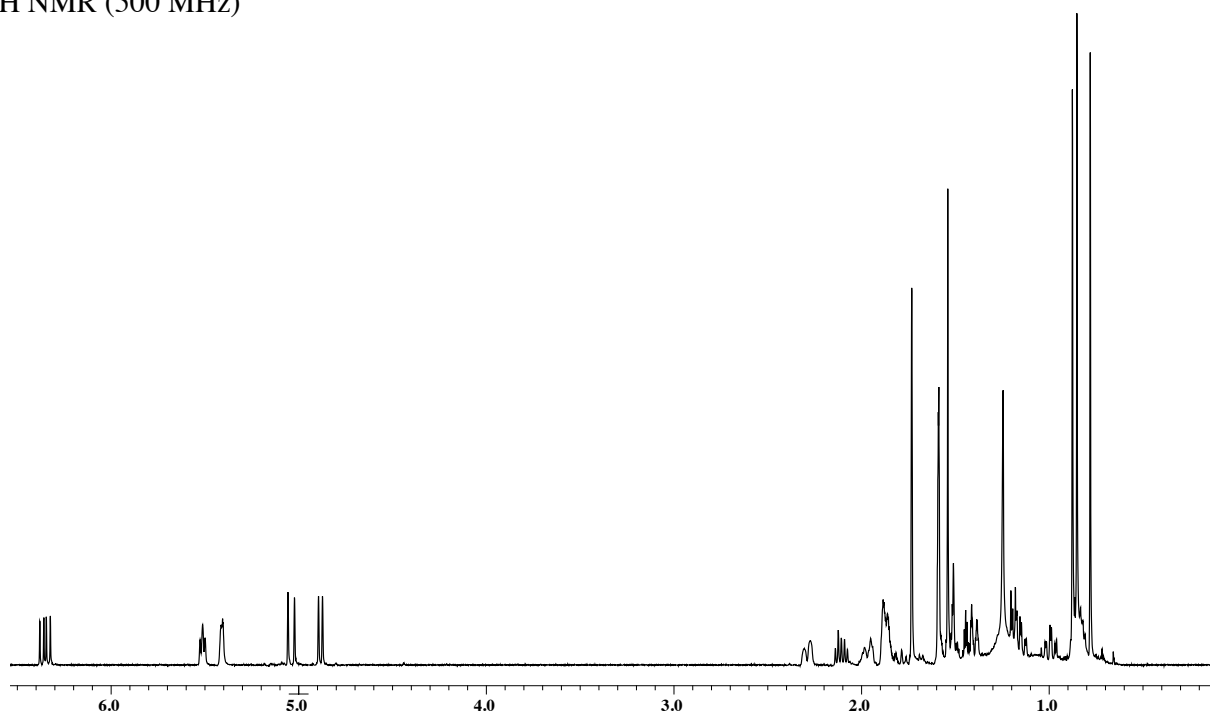
NMR chemical shifts in CDCl_3

2

No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)
1	39.1	1.72 (1H, m), 0.98 (1H, m)
2	19.5	1.55 (1H, m), 1.47 (1H, m)
3	42.7	1.37 (1H, m), 1.16 (1H, m)
4	33.6	-
5	55.6	1.08 (1H, m)
6	24.5	1.70 (1H, m), 1.32 (1H, m)
7	38.5	2.38 (1H, m), 1.98 (1H, m)
8	148.8	-
9	56.7	1.64 (1H, m)
10	39.7	-
11	22.4	1.47 (2H, m)
12	30.3	2.35 (1H, m), 1.98 (1H, m)
13	147.3	-
14	139.2	6.35 (1H, dd, $J=7.0, 10.5$)
15	113.6	5.20 (1H, d, $J=7.5$), 5.04 (1H, d, $J=7.5$)
16	115.2	4.95 (1H, s), 4.97 (1H, s)
17	106.3	4.82 (1H, s), 4.54 (1H, s)
18	21.8	0.78 (3H, s)
19	33.7	0.86 (3H, s)
20	14.6	0.66 (3H, s)

図5-21. Labda-8(17),13(16),14-triene の構造

^1H NMR (500 MHz)



^{13}C NMR (125 MHz)

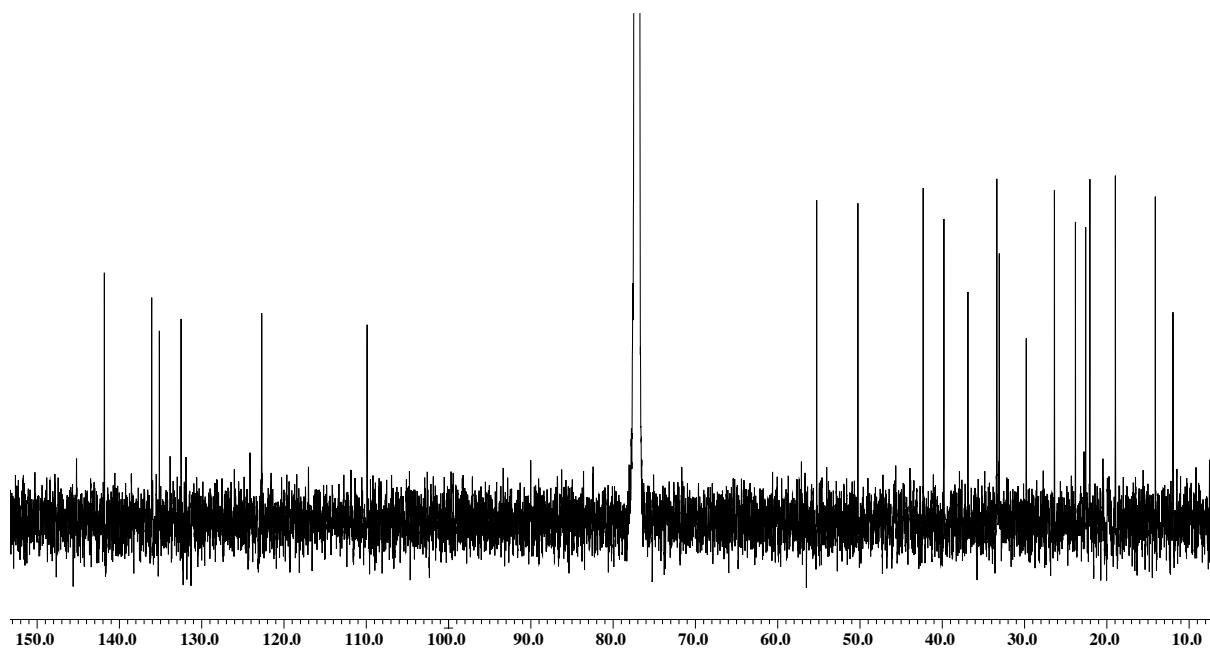


図5-22. Labda-7,12,14-trieneの重クロロホルム中における
 ^1H および ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

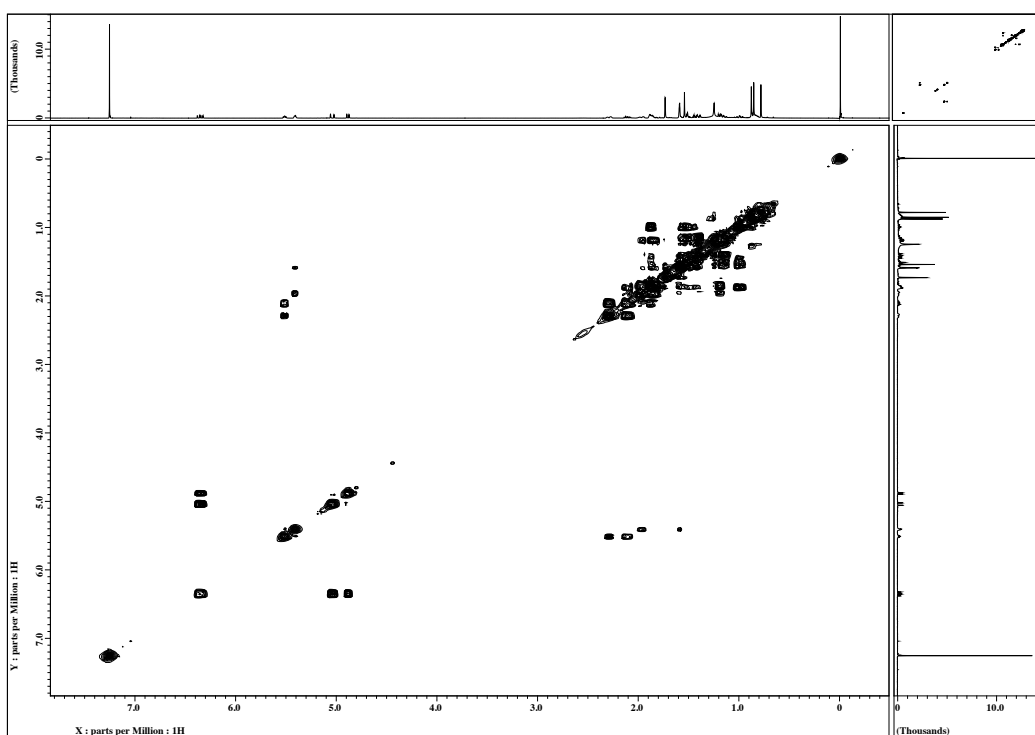


図5-23. Labda-7,12,14-triene の ^1H - ^1H COSYデータ

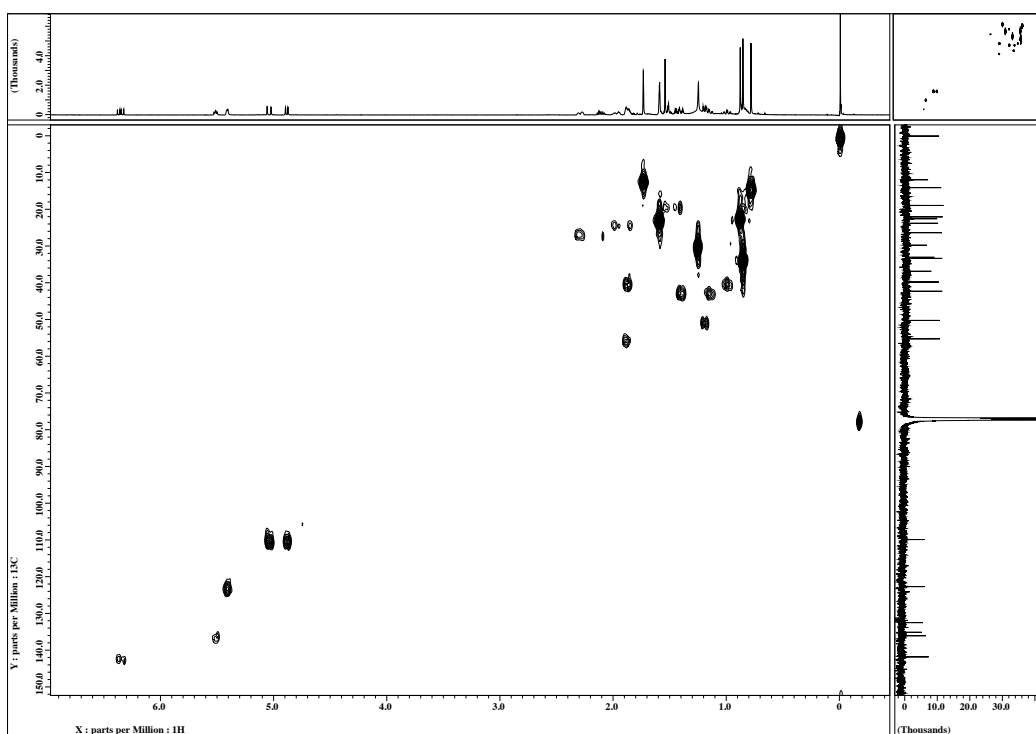


図5-24. Labda-7,12,14-trieneの ^1H - ^{13}C HMQCデータ

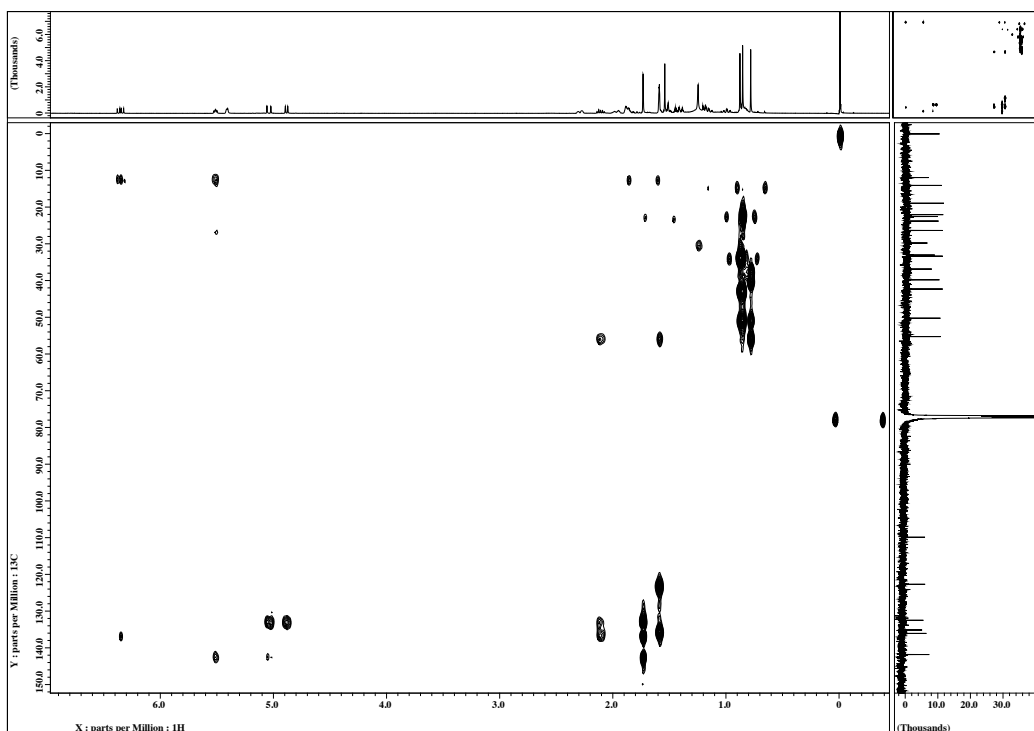


図5-25. Labda-7,12,14-trieneの ^1H - ^{13}C HMBCデータ

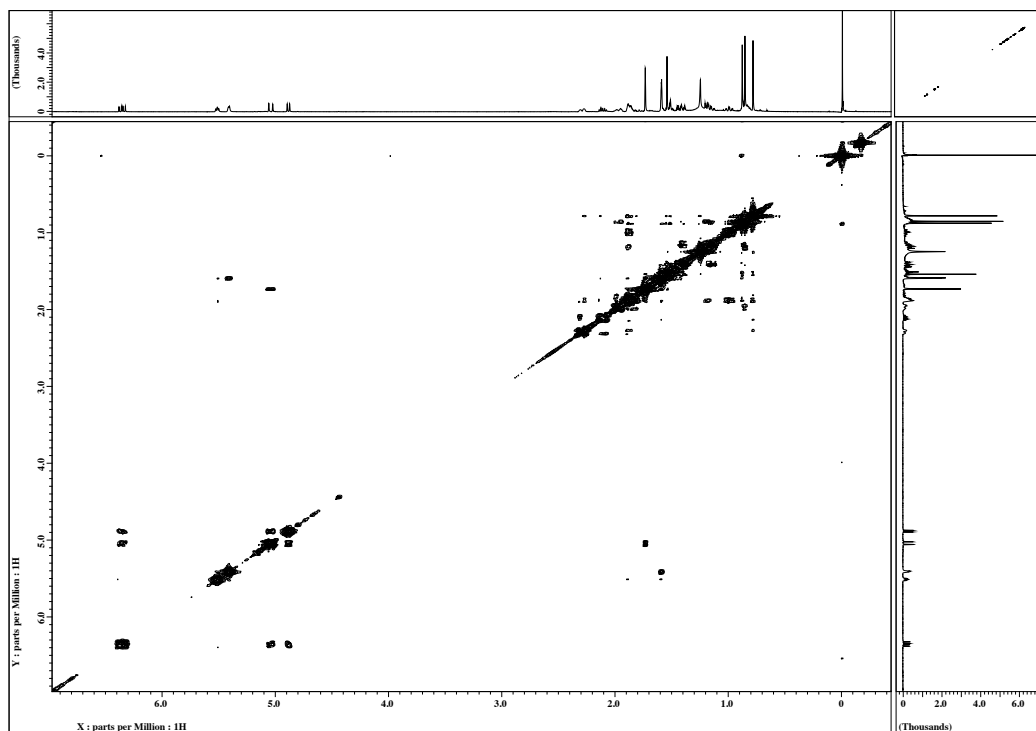
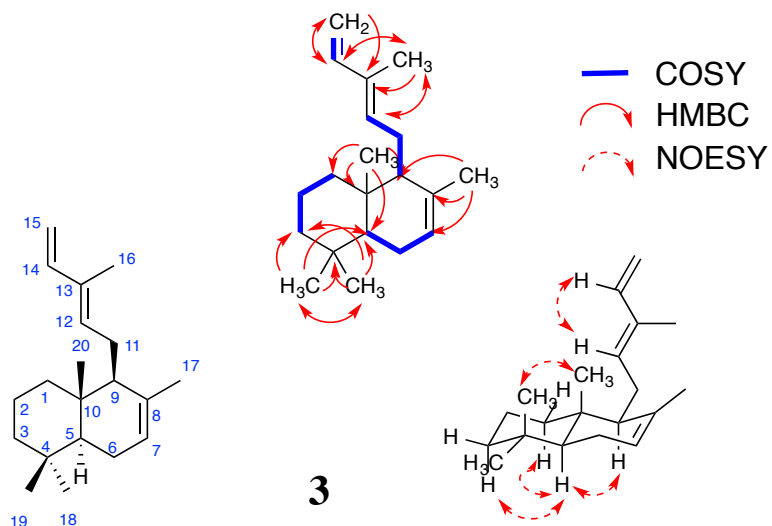


図5-26. Labda-7,12,14-triene の ^1H - ^1H NOESYデータ



NMR chemical shifts in CDCl_3

3

No.	δ_{C}	δ_{H} (multi, J in Hz)
1	39.7	1.86 (1H, m), 0.98 (1H, m)
2	19.0	1.59 (1H, m), 1.41 (1H, m)
3	42.2	1.38 (1H, m), 1.16 (1H, m)
4	33.0	-
5	50.2	1.18 (1H, m)
6	23.7	1.96 (1H, m), 1.85 (1H, m)
7	122.9	5.40 (1H, t, $J=5.0, 10.0$)
8	135.2	-
9	55.3	1.87 (1H, m)
10	36.8	-
11	26.3	2.28 (m, 1H), 2.09 (m, 1H)
12	136.1	5.51 (1H, t, $J=6.5$)
13	132.8	-
14	141.8	6.34 (1H, dd, $J=7.0, 10.0$)
15	109.7	5.03 (1H, d, $J=7.5$), 4.87 (1H, d, $J=10.0$)
16	11.9	1.73 (3H, s)
17	22.5	1.60 (3H, s)
18	22.0	0.87 (3H, s)
19	33.4	0.85 (3H, s)
20	14.1	0.78 (3H, s)

図5-27. Labda-7,12,14-triene の構造

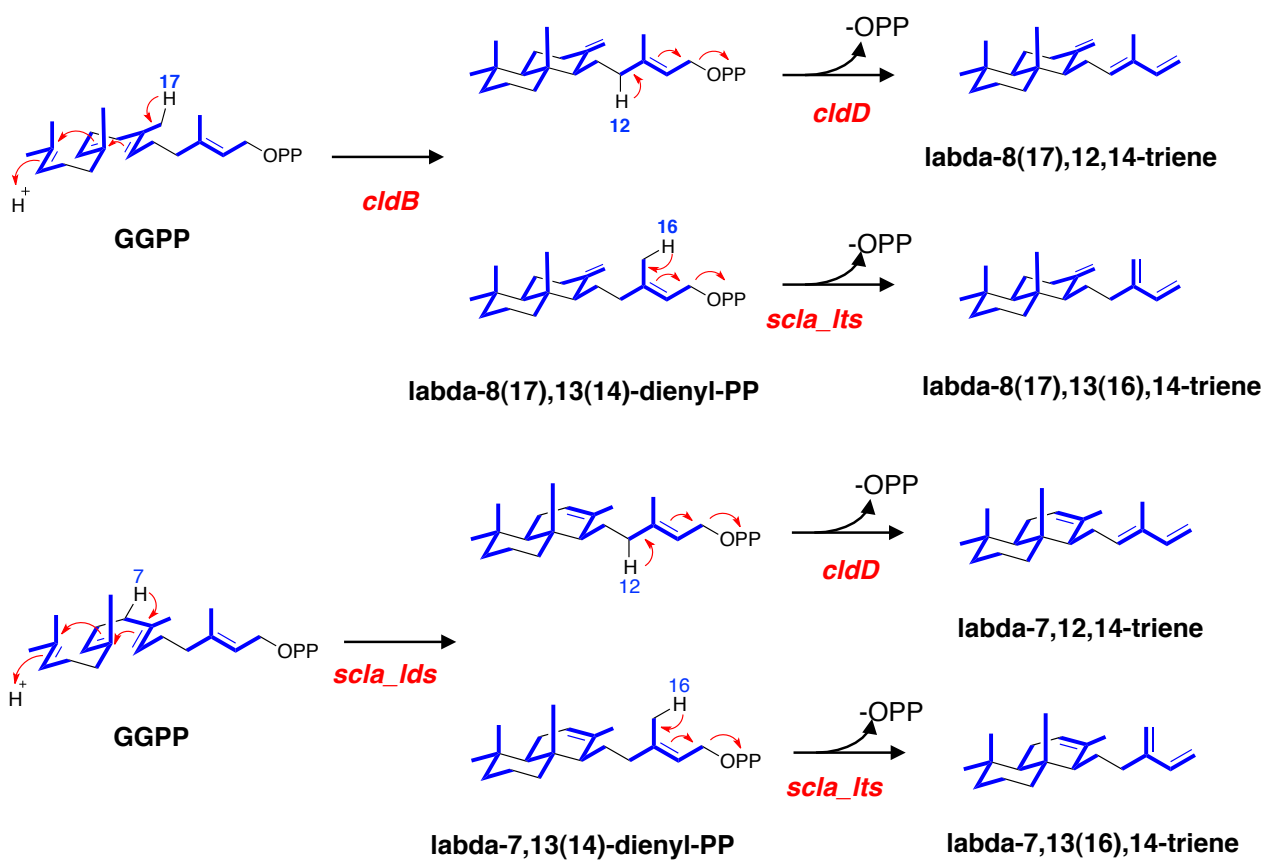


図5-28. Labdane型ジテルペン化合物の推定環化反応機構

総括

テルペン化合物は植物や糸状菌等の真核細胞生物の代表的な代謝産物として考えられ、細菌では極めて稀な代謝産物として認識されてきた。原核細胞生物が生産する代表的なテルペン化合物は geosmin や 2-methylisoborneol などの揮発性異臭物質が知られており、これらは放線菌、藍藻および粘液細菌の代謝産物として見出されている。環状テルペン化合物の母核構造の形成はテルペン合成酵素によって行われる。その反応は、前駆体である鎖状のプレニル 2 リン酸が脱二リン酸化によってイオン化し、生じたカチオンの分子内 2 重結合への求核反応によって縦続的な環化が生じる。さらにカルボカチオンの転移等が生じる場合もあり、最終段階でこれらのカルボカチオンは脱プロトン化あるいは水分子の捕捉によって環状テルペン炭化水素あるいはアルコールを生成する。

テルペン合成酵素の一次配列には生物種また生成する骨格に関わらず、特徴的な金属イオン結合に関与するモチーフ配列を見出される。テルペン合成酵素の N 末端側から 80~120 アミノ酸残基（細菌および糸状菌由来）あるいは 230~270 アミノ酸残基（植物由来）には酸性アミノ酸に富む領域 D/NDxx[D/E]あるいは DDxxxE と、さらに 140 アミノ酸残基程度 C 末側に NSE triad が配置している(PF03936: Terpene synthase family, metal binding domain)。植物由来のテルペン合成酵素では N 末端側に α -barrel 構造に関与すると推定される 252 アミノ酸残基のモチーフ(PF01397: Terpene synthase, N-terminal domain)が存在する。植物由来のテルペン合成酵素では見出される、特徴的な後者のモチーフ(PF01397)は他の植物由来のテルペン合成酵素とアミノ酸配列に高い相同性が見出されるため、この領域を基に BLAST 検索で検出することができる。一方、糸状菌や細菌由来のテルペン合成酵素には植物のそれらで見出される PF01397 のモチーフ配列は存在せず、PF03936 モチーフのみが存在する。さらに細菌由来のテルペン合成酵素ではこの領域のアミノ酸配列の相同性が互いに低いことが特徴的である。このことは、植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列を利用して、BLAST 解析による細菌のタンパク質データベースからテルペン合成酵素を探索することが極めて困難であり、細菌のテルペン合成酵素の研究が進展しなかった理由でもある。

2008 年、PF03936 のモチーフ配列を使用して、統計モデル(HMM)を使用したモチーフ解析を行ない、放線菌から 2-methylisoborneol 合成酵素遺伝子の存在を明らかにした。しかしながら、PF03936 は植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から作製したモデルであるため、細菌全般からテルペン合成酵素の探索が可能であるか不明であった。

本研究では、新たに統計モデルを作製し、原核細胞生物におけるテルペン合成酵素遺伝子の分布、およびそれらの遺伝子産物の機能および反応生成物の包括的な解析を目的として行なった。また、見出された新奇なテルペン骨格を有する化合物の環化反応機構の推定も目的として行なった。

第一章 細菌由来データベースからのテルペン合成酵素の探索

第一章では、2nd-HMM で得た 140 種のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から新たに作製した 3rd-HMM を用いて最新の公的データベース (2014.6) および筆者が所属する研究室で解析したゲノムデータから細菌由来テルペン合成酵素の探索を行なった。

3rd-HMM を用いて解析を行なった結果、細菌由来のゲノムデータ(総数 8,759,463 タンパク質、5152 菌種)から 262 個のテルペン合成酵素を得ることができた(E-value $5.3 \times 10^{-7} \sim 6.9 \times 10^{-207}$)。推定されたテルペン合成酵素の多くは *Actinomycetales* の菌株から見出された。一方、グラム陰性菌に属する *Myxococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Burkholderiales*, *Herpetosiphonales*, *Rhizobiales*, *Chlamydiales*, *Flavobacteriales*, *Chromatiales*, *Ktedonobacterales*, *Sphingobacteriales* や *Pseudomonadales* から候補の合成酵素が見出された。また、推定された 262 のテルペン合成酵素のアミノ酸配列の alignment 及び、その結果の bootstrap 法による系統的な解析から、これらの合成酵素は主に 3 つの分岐群が存在することが明らかになった(図 1)。

HMM 解析の結果、多くの細菌特に放線菌由来のテルペン合成酵素が見出されたため、放線菌が生成するテルペン化合物とゲノム上にコードされていると予想されるテルペン合成酵素との関係を明らかにする目的として、実際にゲノム解析が行なわれた放線菌の培養を行ない、テルペン化合物の生産の確認を行った。その結果、ほとんどの菌種が geosmin やその中間体である germacradienol や germacrene D といった揮発性のテルペン化合物を生産していることが明らかになった。また生産物のパターンによって、少なくとも 3 つのグループに分けられた。すなわち、(A) 主として geosmin、2-methylisoborneol あるいは germacradienol を生産、(B) geosmin, 2-methylisoborneol あるいは germacradienol は全く生産しないか、あるいは極少量もしくは他の培養条件で少量生産するが、セスキテルペンである(+)-caryolan-1-ol および *epi*-cubenol を主代謝産物として生産した、そして (C) あらゆる培養方法によってもテルペン化合物を生産しないに分類された。Geosmin や 2-methylisoborneol の蓄積が確認されなかったグループ(B)および(C)の菌株のゲノムからは geosmin 合成酵素および 2-methylisoborneol 合成酵素と推定される遺伝子が見出される。また、グループ(A)の菌株のゲノムにおいても geosmin 合成酵素, 2-methylisoborneol 合成酵素以外に、さらに(B)および(C)の菌株

からも多数のテルペン合成酵素と推定される合成酵素遺伝子が見出される。このことは少なくとも *Streptomycetaceae* の放線菌では多くのテルペン合成酵素遺伝子は休眠状態であることが推定された。

また、2008 の解析では、モノ、セスキ、ジテルペン合成酵素それぞれに系統樹が形成したけれども、2nd HMM による解析からそのような炭素数での分類ができなくなってきた。これは植物の合成酵素でも同じようなことが見出されることから、細菌由来の合成酵素も植物などと同様に多様性が高いことが強く示唆された。

第二章 原核細胞生物由来テルペン合成酵素遺伝子の解析

第二章では、第一章で見出された細菌由来テルペン合成酵素遺伝子から系統的に独立した候補を選択し、それらの遺伝子産物の機能および反応生成物の包括的な解析を行った。

多くのテルペン合成酵素遺伝子について包括的に解析を行なうために、*S. avermitilis* 大規模染色体欠失株 SUKA22 を用いた強制発現系に供した。各形質転換体の菌体由来ヘキササン抽出物を GC-MS 分析を行なった。

sgr2079 形質転換体の菌体抽出液の GC-MS 解析から、セスキテルペンアルコールである caryolan-1-ol の生産が推定された。また *sgr6065* 形質転換体は、 α -copaene, α -muurolene, cadin-1(10),4-diene, cadin-1,4-diene および *epi*-cubenol といった cadinane 骨格を有するセスキテルペン化合物を合成する酵素遺伝子であることが示唆された。*sclav_p0068* 形質転換体は、セスキテルペンアルコールである T-muurolol の生産が推定された。*sclav_p0328* 形質転換体は、 δ -cadinene の生産が示唆された。*sclav_p0635* 形質転換体は、セスキテルペン化合物の β -elemene, selina-4,11-diene および selina-11-ene-4 α -ol の生産が推定された。*sclav_p0982* 形質転換体は、*fps* と共発現させた株ではテルペン化合物は検出されなかったが、*gps* と共発現させた形質転換体ではモノテルペン化合物の 1,8-cineol、camphene および β -pinene の生産が確認された。*sclav_p1185* 形質転換体も同様に *gps* と共発現させた形質転換体のみモノテルペン化合物の linalool の生産が確認された。*sspSK_3051* 形質転換体では、セスキテルペン化合物の γ -elemene, β -maaliene, selina-3,7(11)-diene および selina-7(11)-ene-4-ol の生産が推定された。*slt17_1246* 形質転換体は 18 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認された。主代謝産物は germacredien-4-ol であることが示唆され、その他に copaene, β -elemene, α -cubebene, β -cubebene, β -aromadendrene, viridiflorene, γ -cadinene, β -cadinene, α -cadinene および T-cadinol も蓄積していることが示唆された。

Mycobacterium 属, *Rubrobacter* 属やグラム陰性菌由来のテルペン合成酵素遺伝子の

解析では、各テルペン合成酵素遺伝子を *S. avermitilis* のコドン使用頻度に合わせて変換した人工遺伝子を設計した。*ava_1982* ならびに *alr_4655* からは、germacrene A 合成酵素遺伝子であることが示唆された。次に *haur_2988* 形質転換体は、GC-MS 解析より α -selinene と示唆されるセスキテルペン化合物を生産した。また *npun_R3832* 形質転換体は、8a-*epi*- α -selinene を生産した。*rcas_06223* 形質転換体および *roseRS_3509* 形質転換体は、共にセスキテルペンアルコールである T-muurolol を生産した。また *sce6369* 形質転換体は、セスキテルペン化合物である α -cubebene、 β -cubebene、cadina-3,5-diene および bicyclosquisphellandrene を生産した。*sce8552* 形質転換体の培養抽出物 GC-MS 解析を行なった結果、eremophilene と推測されるセスキテルペン化合物が検出された。*wcw_0522* 形質転換体は、9 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認され、 α -ylangene、 β -elemene、 α -amorphene、 δ -amorphene、germacrene D、*epi*-zonarene および germacradienol の生産が推定された。

また *sclav_p0985*、*sclav_p1407*、*sven_0552* および *slt18_1880* をそれぞれ発現させた形質転換株が生産するセスキテルペン化合物はマスフラグメンテーションパターンがデータベースと一致しなかったことから、新規なセスキテルペン化合物であることが示唆された。さらに *sclav_p0765*、*sclav_p1169*、*slt18_1078*、*stsu_20912*、*nd90_0354*、*haur_2987* および *rxyl_0493* は、同様な理由で新規なジテルペン化合物であることが示唆された。

第三章 テルペン化合物の構造解析

第三章では、第二章において見出されたマスフラグメンテーションパターンがデータベースと一致しないテルペン化合物の構造解析を行った。

sclav_p0765 形質転換体は 10 種類のジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知ジテルペン化合物 1, 2, 3 および 4 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析および X 線結晶解析を行った結果、化合物 1 および 2 は 6-6-6 員環構造を有する新奇なジテルペン化合物である hydropyrene および hydropyrenol であることが判明した。また化合物 3 および 4 は、6-6-員環構造を有する isoelisabethatriene B および isoelisabethatriene であることが明らかになった。

sclav_p0985 形質転換体は 8 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知セスキテルペン化合物 5 および 6 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 5 および 6 は、5-7-3 員環の africanane 骨格を有するそれぞれ african-2-ene および african-1-ene であることが判明した。

sclav_p1169 形質転換体は 7 種類のジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知ジテルペン化合物 7, 8, 9, 10, 11 および 12 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析および X 線結晶解析を行った結果、化合物 7 および 8 は 6-6 員環構造を有する新奇なジテルペン化合物である clavulatriene A および clavulatriene B であることが判明した。また化合物 9 は、6 員環を有する新奇ジテルペン化合物の prenyl- β -elemene であることが明らかになった。化合物 10 は、10 員環の新奇なジテルペン化合物の prenylgermacrene B であることが判明した。化合物 11 および 12 は、それぞれ既知ジテルペン化合物である prenylgermacrene および lobophytumin C であることが明らかになった。

sclav_p1407 形質転換体は 8 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知セスキテルペン化合物 13 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 13 は 5-5-5 員環の新奇な triquinane 骨格を有する isohirsut-1-ene であることが判明した。

sclav_p0067-sclav_p0068 形質転換体は、*sclav_p0068* 形質転換体が生産した T-muurolol とは異なる新たなセスキテルペン化合物 14 の蓄積が確認された。そこで、未知セスキテルペン化合物 14 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 14 は 6-6 員環の既知化合物の drimenol であることが判明した。

sven_0552 形質転換体は 2 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知セスキテルペン化合物 15 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 15 は 5-7 員環の既知化合物の dauca-8,11-diene であることが判明した。

slt18_1078 形質転換体はジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知ジテルペン化合物 16 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 16 は 5-8-5 員環の新奇なジテルペン化合物の cyclooctat-7(8),10(14)-diene であることが判明した。

slt18_1880 形質転換体は 4 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知セスキテルペン化合物 17 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 17 は 5-5-5 員環の新奇な triquinane 骨格を有する isohirsut-4-ene であることが判明した。

tsu_20912 形質転換体は 8 種類のジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知ジテルペン化合物 18 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 18 は 5-9-5 員環の新奇なジテルペン化合物の tsukubadiene であることが判明した。

nd90_0354 形質転換体は 3 種類のジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、

未知ジテルペン化合物 19 および 20 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 19 は 6-8-4 員環の新奇なジテルペン化合物の odyverdiene A、化合物 20 は 6-7-5 員環の新奇なジテルペン化合物である odyverdiene B であることが判明した。

mmar_3220 形質転換体は 11 種類のセスキテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知セスキテルペン化合物 21 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 21 は germacradienol のジアステレオマーである allohedycariol であることが判明した。

rxyl 形質転換体はジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知ジテルペン化合物 22 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 22 は珊瑚から単離された報告のある 14 員環ジテルペン化合物の cembrene C であることが判明した。

haur_2987 形質転換体は 5 種類ジテルペン化合物の生産が確認された。そこで、未知ジテルペン化合物 23 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その精製物質の各種 NMR スペクトル解析を行った結果、化合物 23 は珊瑚から単離された報告のある 6-6 員環ジテルペン化合物の obscuronatin であることが判明した。

第四章 安定同位体取り込みによる環化反応機構の推定

第四章では、第三章で明らかにされた新奇なテルペン骨格を有する化合物について標識ラベル化体を用いて、各化合物の推定される環化反応機構の解析を行なった。

6-6-6 員環を有する hydrophyrene および hydrophyrenol は $[1-^{13}\text{C}]$ -D-グルコースの取り込み実験より、図 4-10 のように環化反応が進行すると推定された。ゲラニルゲラニルニリン酸のイオン化により脱 2 リン酸化しカルボカチオン 1 を生成し、C-10a と C-10b 間で閉環反応が進行する。さらに C-3a と C-10b 間で閉環反応が進行し、5 位の脱プロトン化により中間体 2 が生成される。中間体 2 から二重結合のプロトン化により生成されたカルボカチオンにより順次閉環反応が進行し、カルボカチオン 3 が生成する。カルボカチオン 3 から 12 位の脱プロトン化により hydrophyrene が生成する。また水分子によりカルボカチオンが捕捉されると hydrophyrenol が生成するとそれぞれ推測された。

セスキテルペン化合物の isohirsut-1-ene および isohirsut-4-ene は $[1-^{13}\text{C}]$ -D-グルコースの取り込み実験より、図 4-11 のように環化反応が進行すると推定された。ファルネシルニリン酸の C-1 と C-10 位間で閉環反応が進行し、humulyl cation が生成される。Humulyl cation から C-3 と C-6 位間および C-2 と C-9 位間でさらに閉環反応が進行し、

4-6-5 員環を有するカルボカチオン 4 が生成される。2 回の連続した炭素結合転位が進行し、5-5-5 員環を有するカルボカチオン 5 が生成される。カルボカチオン 2 から 1,3-hydride シフトによりカチオンが転位し、カルボカチオン 6 を経て 1 位の脱プロトン化により isohirsut-1-ene が生成する。またカルボカチオン 5 の 5 位の脱プロトン化により isohirsut-4-ene が生成するとそれぞれ推定された。

5-9-5 員環を有する tsukubadiene は[1-¹³C]-D-グルコースおよび[2-¹³C]-D-グルコースの取り込み実験より、図 4-12 のように環化反応が進行すると推定された。ゲラニルゲラニルニリン酸の C-1 と C-11 位間および C-10 と C-14 位間で順次閉環反応が進行し、5-11 員環を有するカルボカチオン 7 が生成される。また炭素結合転位により 5-12 員環を有するカルボカチオン 8 に変換される。また C-4 と C-15 位間で閉環反応が進行し、カルボカチオン 9 が生成する。次いで 2 回の連続した 1,2-hydride シフトによって 14-15 位間に二重結合が形成され、中間体 10 が生成される。さらに 5 位のプロトン化され、カルボカチオン 11 が生成される。カルボカチオン 11 と tsukubadiene を比較すると、メチル基転位のみが進行すると予想された。しかしながら[2-¹³C]-D-グルコースの取り込み実験の結果より、5 位と 6 位の炭素-炭素間の組換えが起こっていることが考えられた。カルボカチオン 11 より 4 位と 6 位間に炭素結合転位し縮環し、再度炭素結合転位が進行して増環する。最終的に 1,2-hydride シフトおよび脱プロトン化により tsukubadiene が生成すると推定した。

Odyverdiene A および odyverdiene B は[1-¹³C]-D-グルコースの取り込み実験より、図 4-13 のように環化反応が進行すると推定された。ゲラニルゲラニルニリン酸の C-1 と C-10 位間で閉環反応が進行し、prenylgermacryl cation が生成する。1,3-hydride シフトによりカルボカチオンが転位し、カルボカチオン 12 を生成する。次いで C-1 と C-14 位間でさらに閉環反応が進行し、17 位の脱プロトン化し中間体 13 を生成する。中間体 27 から C-3 と C-6 位間の閉環反応により 6-8-4 員環のカルボカチオンが生成され、18 位の脱プロトン化により odyverdiene A が生成する。また中間体 13 から C-2 と C-6 位間の閉環反応により 6-7-5 員環のカルボカチオンが生成され、19 位の脱プロトン化により odyverdiene B が生成するとそれぞれ推測した。

第五章 Labdane 型ジテルペン合成酵素の交換による新規なジテルペン骨格の創製

第五章では、labdane 骨格形成に関与する *Streptomyces* sp. K04-0144 由来の CldB および CldD と、*S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の SCLAV_p0490 (Scla_lds) および SCLAV_p0491 (Scla_lts) を組み合わせることにより、labdane 骨格を有する新たなジテルペン化合物を創製することを目的に解析を行った。

A 型の様式で環化反応を触媒する CldD および Scla_lts と、B 型の様式で環化反応を

触媒する CldB および Scla_lds の 4 種類の組換えタンパク質を取得し、試験管内反応系で生成される化合物の解析を行った。GC-MS 解析の結果、CldB と CldD の共存下での反応系では、cyslabdan 中間体である m/z 272 $[M^+]$ を示す labda-8(17),12,14-triene の生成が確認された。一方、*S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の Scla_Lds と Scla_Lts の共存下での反応系では、GC-MS 解析で分子量 m/z 272 $[M^+]$ は同じであるが、labda-8(17),12,14-triene のそれとは明らかに異なる保持時間とフラグメントパターンを示す生成物 (2)が得られた。また、CldB と Scla_Lts および Scla_lds と CldD の組み合わせからはそれぞれ保持時間と labda-8(17),12,14-triene および 1 と異なる保持時間ならびにフラグメントパターンを示す分子量 m/z 272 $[M^+]$ の生成物 2 および 3 がそれぞれ得られた。

次にこれら 3 つのジテルペン化合物の構造を解析するために、テルペン合成酵素遺伝子カセットに上記 4 つの組み合わせになるようにテルペン合成酵素遺伝子を連結し、*S. avermitilis* SUKA22 に導入し、酵素反応と同一の化合物の生成が確認された。そこで、*scla_lds-scla_lts* 発現株が生成する 1 をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、各種 NMR を解析したところ、1 は新規化合物である labda-7,13(16),14-triene であることが判明した。同様に、*cldB-scla_lts* 発現株からは既知化合物である labda-8(17),13(16),14-triene、そして *scla_lds-cldD* 発現株からは既知化合物である labda-7,12,14-triene をそれぞれ生成することを明らかにした。各化合物の化学構造から、図 5-28 のように環化反応の反応機構によって生成すると推定した。B 型反応を触媒する CldB および Scla_lds は、GGPP の末端二重結合のプロトン化によって生成されたカルボカチオンによって順次閉環反応が進行する。CldB は 17 位の脱プロトン化、一方で Scla_lds は 7 位の脱プロトン化によって、それぞれ labda-8(17),13(14)-dienyl diphosphate および labda-7,13(14)-dienyl diphosphate を生成する。さらに A 型反応を触媒する CldD および Scla_lts は、ニリン酸部分の引き抜きによって生成したカルボカチオンをそれぞれ 12 位および 16 位の脱プロトン化によって 12-13 位間および 13-16 位間に二重結合を形成することを推定した。

以上、本研究では新たに作製した統計モデルを用いることにより、公的データベースを含む細菌のタンパク質 8,759,463 から 262 個のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質を見出すことができた。さらに、*S. avermitilis* 大規模染色体欠失株 SUKA22 を用いた強制発現系を用いることによって、細菌由来の新奇なテルペン化合物ならびに多数のテルペン化合物の生成が確認された。したがって隠れマルコフモデルを用いた統計学的解析によるテルペン合成酵素の探索はこれまでにない新たな方法論として有用である。本解析で見出された新奇テルペン化合物を生成するテルペン合成酵素を表す系統樹を図 1 に示した。本解析のように系統的に独立した候補を選択し、発現

させることにより多くの新奇な骨格を有するテルペン化合物を取得できることが期待される。また細菌由来のテルペン合成酵素遺伝子のほとんどは休眠状態であることが明らかにされるとともに、細菌においても多くのテルペン合成酵素遺伝子を有していると明らかになった。今後、ゲノム情報を有効活用し眠っている遺伝子を発現させることにより、微生物を単に培養するだけでは得られない化合物を効率的に探索することが可能であるとともに、A 型と B 型の更なる組み合わせによりさらにテルペン化合物の多様性を拡大できると考えられる。また今回見出された化合物の様々な生物活性に興味を持たれるとともに、医薬品原料の新奇骨格の提供などに大きな期待が持たれる。

培地

・ISP#2 培地：酵母エキス（Difco 社製）4 g、麦芽エキス（Difco 社製）10 g、グルコース 4 g、寒天 20 g を 1000 ml の水に溶解し、pH7.3 に調整後、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

・SFM 培地：マンニトール（ナカライテスク）20 g、脱脂大豆粉 20 g、寒天 20 g を 1000 ml の水に溶解し、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

・LB 培地：トリプトン（OXOID 社製）10 g、酵母エキス（OXOID 社製）5 g、塩化ナトリウム 5 g を 1000 ml の水に溶解し、2 N の水酸化カリウムで pH 7.2 に調整後、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

・LA 培地：LB 培地に寒天を 1.5%になるように添加し、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

・SOC 培地：トリプトン（Difco 社製）20 g、酵母エキス（Difco 社製）5 g、塩化ナトリウム 0.58 g、塩化カリウム 0.19 g を 1000 ml の水に溶解し、2 N の水酸化ナトリウムで pH 7.0 に調整後、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。その後、別滅菌した 50%グルコースを 0.36%になるように添加した。また、別滅菌した 1 M 硫酸マグネシウムおよび 1 M 塩化マグネシウムを終濃度が 10 mM となるように添加した。

・P10 培地：スクロース 103 g、硫酸カリウム 0.25 g、塩化マグネシウム 2.03 g、微量元素溶液（塩化亜鉛 6 水和物 40 mg、塩化第二鉄 6 水和物 200 mg、塩化第二銅 2 水和物 10 mg、塩化マンガン 4 水和物 10 mg、ホウ酸ナトリウム 10 水和物 10 mg、モリブデン酸アンモニウム 4 水和物 10 mg を 1000 ml の水に溶かしてフィルターろ過滅菌したもの）2 ml を水 800 ml に溶解し、高圧蒸気滅菌した。用時、0.5%リン酸一カリウム 10 ml、3.68%塩化カルシウム 2 水和物 100 ml、0.25 M MES（2-モルホリノエタンスルホン酸 pH 6.5）100 ml を添加した。

・P20 培地：スクロース 200 g、硫酸カリウム 0.25 g、塩化マグネシウム 2.03 g、微量元素溶液 2 ml を水 800 ml に溶解し、高圧蒸気滅菌した。用時、0.5%リン酸二カリウム 10 ml、3.68%塩化カルシウム 2 水和物 100 ml、0.25 M MES 100 ml を添加した。

・RM14 培地：スクロース 200 g、硫酸二カリウム 0.25 g、塩化マグネシウム 6 水和物

10.12 g、グルコース 10 g、カザミノ酸 (Difco 社製) 0.1 g、L-プロリン 3 g、酵母エキス (Difco 社製) 2 g、微量元素溶液 2 ml を水 870 ml に溶解し、オートミール寒天培地 (Difco 社製) 3 g、寒天 20 g を加え高圧蒸気滅菌した。用時、0.5%リン酸一カリウム 10 ml、3.68%塩化カルシウム 2 水和物 80 ml、0.25 M MES 40 ml を添加した。

・RM14 軟寒天培地：スクロース 200 g、硫酸二カリウム 0.25 g、塩化マグネシウム 6 水和物 10.12 g、グルコース 10 g、カザミノ酸 (Difco 社製) 0.1 g、L-プロリン 3 g、酵母エキス (Difco 社製) 2 g、微量元素溶液 2 ml を水 870 ml に溶解し、オートミール寒天培地 (Difco 社製) 3 g、寒天 5 g を加え高圧蒸気滅菌した。用時、0.5%リン酸一カリウム 10 ml、3.68%塩化カルシウム 2 水和物 80 ml、0.25 M MES 40 ml を添加した。

・TSB 培地：トリプトソーヤブイヨン (日水製薬株式会社製) 30g を 1000ml の水に溶解し、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

・YMS⁺⁺培地：酵母エキス (Difco 社製) 4 g、麦芽エキス (Difco 社製) 10 g、可溶性デンプン 4 g を 1000 ml の水に溶解し、2 N の水酸化カリウムで pH 7.4 に調整後、寒天を 2%になるように添加し、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。。用時、別滅菌した 1 M 塩化マグネシウムおよび 1 M 硝酸カリウムを終濃度がそれぞれ 10 mM、8 mM となるように添加した。

・種培地：グルコース 5 g、脱脂大豆粉 15 g、酵母エキス (Difco 社製) 5 g を 1000 ml の水に溶解し、2 N 水酸化カリウムで pH 7.4 に調整後、121℃で 15 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

・生産用半合成培地：グルコース 60 g、炭酸カルシウム 5 g、塩化ナトリウム 2 g、リン酸水素二カリウム 0.5 g、0.5%硫酸鉄七水和物 10 ml、0.5%硫酸亜鉛七水和物 10 ml、0.5%硫酸マンガン四水和物 10 ml、1%硫酸マグネシウム七水和物 10 ml、硫酸アンモニウム 2 g、酵母エキス 2 g を 1000 ml の水に溶解し、2 N 水酸化カリウムで pH 7.0 に調整後、110℃で 10 分間の高圧蒸気滅菌を行った。

参考文献

1. Dickschat JS. (2011) Isoprenoids in three-dimensional space: the stereochemistry of terpene biosynthesis. *Nat Prod Rep.* **28**:1917-36.
2. Christianson DW. (2006) Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem Rev.* **106**:3412-3442.
3. Smanski MJ, Peterson RM, Huang SX, Shen B. (2012) Bacterial diterpene synthases: new opportunities for mechanistic enzymology and engineered biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* **16**:132-141.
4. Baunach M, Franke J, Hertweck C. (2015) Terpenoid Biosynthesis Off the Beaten Track: Unconventional Cyclases and their Impact on Biomimetic Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* **54**:2604-2626.
5. Berthelot M, André G (1891) Sur l'odeur proper de la terre, *Compt Rend Acad Sci* **112**:598-599.
6. Gerber NN, Lechevalier HA (1965) Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol* **13**:935-938.
7. Gerber NN, (1967) Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Biotechnol Bioeng* **IX**:321-327.
8. Gerber NN, (1969) A volatile metabolite of actinomycetes, 2-methylisoborneol. *J Antibiot.* **22**:508-509.
9. Gerber NN, (1971) Sesquiterpenoids from Actinomycetes: cadin-4en-1-ol. *Phytochemistry* **10**:185-189.
10. Gerber NN, (1972) Sesquiterpenoids from actinomycetes. *Phytochemistry* **11**:385-388.
11. Gerber NN, (1973) Volatile lactones from *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett* 771-774.
12. Cane DE, Abell C, Tillman AM (1984) Pentalenene biosynthesis and the enzymatic cyclization of farnesyl pyrophosphate. Proof that the cyclization is catalyzed by a single enzyme. *Bioorg Chem* **12**:312-328.
13. Lesburg CA, Zhai G, Cane DE, Christianson DW (1997) Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* **277**:1820-1824.
14. Cane DE, Watt RM (2003) Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:1547-1551.

15. Lin X, Hopson R, Cane DE (2006) Genome mining in *Streptomyces coelicolor*: molecular cloning and characterization of a new sesquiterpene synthase. *J Am Chem Soc* **128**:6022-6023.
16. Komatsu M, Tsuda M, Omura S, Oikawa H, Ikeda H (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:7422-7427.
17. Whittington DA *et al.* (2002) Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15375–15380.
18. Yamada Y, Cane DE, Ikeda H (2012) Diversity and Analysis of Bacterial Terpene Synthases. In Chapter seven, Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, PartA, *Methods in Enzymology*, Volume 515 (D.A. Hopwood ed.), pp. 123-166, Elsevier Inc. Academic Press, NewYork.
19. Bohlmann J., Steele CL., Croteau R. (1997) Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *J Biol Chem.* **272** (35):21784-21792.
20. Chen F, Ro DK, Petri J, Gershenzon J, Bohlmann J, Pichersky E, Tholl D. (2004) Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiol.* **135** (4):1956-1966.
21. Chang YJ, Song SH, Park SH, Kim SU. (2000) Amorpha-4,11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* **383** (2):178-184.
22. Tan XP, Liang WQ, Liu CJ, Luo P, Heinstein P, Chen XY. (2000) Expression pattern of (+)-delta-cadinene synthase genes and biosynthesis of sesquiterpene aldehydes in plants of *Gossypium arboreum* L. *Planta.* **210** (4):644-651.
23. Keeling CI, Weisshaar S, Ralph SG, Jancsik S, Hamberger B, Dullat HK, Bohlmann J. (2011) Transcriptome mining, functional characterization, and phylogeny of a large terpene synthase gene family in spruce (*Picea* spp.). *BMC Plant Biol.* doi : 10.1186 / 1471-2229-11-43.
24. Mau CJ, West CA. (1994) Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:8497-8501.
25. Martin DM, Faldt J, Bohlmann J. (2004) Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d

- subfamily. *Plant Physiol.* **135** (4):1908-1927.
26. Schepmann HG, Pang J, Matsuda SP. (2001) Cloning and characterization of Ginkgo biloba levopimaradiene synthase which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* **392** (2):263-269.
27. Wildung MR, Croteau R. (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem.* **271** (16):9201-9204.
28. Pinedo C *et al.* (2008) Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem Biol.* **3** (12):791-801.
29. Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnell K. (2002) Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:9278-9283.
30. Cane DE, Kang I. (2000) Aristolochene synthase: purification, molecular cloning, high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase. *Arch Biochem Biophys.* **376** (2):354-364.
31. Engels B, Heinig U, Grothe T, Stadler M, Jennewein S. (2011) Cloning and characterization of an *Armillaria gallica* cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides. *J Biol Chem.* **286** (9):6871-6878.
32. Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C. (2009) Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Microbiol.* **72** (5):1181-1195.
33. Jones CG, Keeling CI, Ghisalberti EL, Barbour EL, Plummer JA, Bohlmann J. (2008) Isolation of cDNAs and functional characterisation of two multi-product terpene synthase enzymes from sandalwood, *Santalum album* L. *Arch Biochem Biophys.* **477** (1):121-130.
34. Lopez-Gallego F, Agger SA, Abate-Pella D, Distefano MD, Schmidt-Dannert C. (2010) Sesquiterpene synthases Cop4 and Cop6 from *Coprinus cinereus*: catalytic promiscuity and cyclization of farnesyl pyrophosphate geometric isomers. *Chembiochem.* **11**:1093–1106.
35. Toyomasu T, Tsukahara M, Kaneko A, Niida R, Mitsunashi W, Dairi T, Kato N, Sassa T. (2007) Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:3084-3088.
36. Nakano C, Kim HK, Ohnishi Y (2011) Identification of the first bacterial monoterpene cyclase, a 1,8-cineole synthase, that catalyzes the direct conversion of geranyl diphosphate. *Chembiochem* **12**:1988-1991.
37. Giglio S, Chou WKW, Ikeda H, Cane DE, Monis T (2011) Biosynthesis of

- 2-methylisoborneol in Cyanobacteria. *Environ Sci Technol* **45**:992-998.
38. Tetzlaff, CN, You, Z, Cane DE, Takamatsu S, Omura S, Ikeda H. (2006) A gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpenoid antibiotic pentalenolactone in *Streptomyces avermitilis*. *Biochemistry* **45**:6179–6186.
 39. Takamatsu S *et al.* (2011) Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling *epi*-isozizaene albaflavenone biosynthesis and isolation of a new oxidized *epi*-isozizaene metabolite. *Microb Biotechnol* **4**:184-191.
 40. Chou WK, Fanizza I, Uchiyama T, Komatsu M, Ikeda H, Cane DE. (2010) Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: cloning and characterization of SAV_76, the synthase for a new sesquiterpene, avermitilol. *J Am Chem Soc.* **132**:8850-8851.
 41. Nakano C, Tezuka T, Horinouchi S, Ohnishi Y (2012) Identification of the SGR6065 gene product as a sesquiterpene cyclase involved in (+)-epicubenol biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Antibiot* **65**:551-558.
 42. Ikeda H, Shin-ya K, Omura S (2014) Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**:233-250.
 43. Kawasaki T, Kuzuyama T, Kuwamori Y, Matsuura N, Itoh N, Furihata K, Seto H, Dairi T. (2004) Presence of copalyl diphosphate synthase gene in an actinomycete possessing the mevalonate pathway. *J Antibiot.* **57**:739-747.
 44. Dairi T, Hamano Y, Kuzuyama T, Itoh N, Furihata K, Seto H. (2001) Eubacterial diterpene cyclase genes essential for production of the isoprenoid antibiotic terpentecin. *J Bacteriol.* **183**:6085-6094.
 45. Kim SY, Zhao P, Igarashi M, Sawa R, Tomita T, Nishiyama M, Kuzuyama T. (2011) Cloning and heterologous expression of the cyclooctatin biosynthetic gene cluster afford a diterpene cyclase and two P450 hydroxylases. *Chem Biol.* **16**:736–743.
 46. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**(14): 3059–3066.
 47. Larkin MA, *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21): 2947–2948.
 48. Jiang J, He X, Cane DE (2006) Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germa-cradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin. *J Am Chem Soc* **128**:8128-8129.
 49. Cane DE, He X, Kobayashi S, Omura S, Ikeda H. (2006) Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot* **59**:471–479.

50. Zhu D, Seo M-J, Ikeda H, Cane DE (2011) Genome mining in *Streptomyces*. Discovery of an unprecedented P450-catalyzed oxidative rearrangement that is the final step in the biosynthesis of pentalenolactone. *J Am Chem Soc* **133**:2128-2131.
51. Nakano C, Horinouchi S, Ohnishi Y (2011) Characterization of a novel sesquiterpene cyclase involved in (+)-caryolan-1-ol biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem* **286**:27980–27987.
52. Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H (2010) Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:2646-2651.
53. Komatsu K *et al.* (2013) Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol* **2**:384-396.
54. Hu Y, Chou WKW, Hopson R, Cane DE (2011) Genome Mining in *Streptomyces clavuligerus*: Expression and biochemical characterization of two new cryptic sesquiterpene synthases. *Chem Biol* **18**:32-37
55. Nakano C, Kim HK, Ohnishi Y (2011) Identification and characterization of the linalool/nerolidol synthase from *Streptomyces clavuligerus*. *Chembiochem* **12**: 2403-2407.
56. Nakano C, Kudo F, Eguchi T, Ohnishi Y (2011) Genome mining reveals two novel bacterial sesquiterpene cyclases: (-)-Germacradien-4-ol and (-)-*epi*- α -bisabolol synthases from *Streptomyces citricolor*. *ChemBioChem* **12**:2271–2275.
57. Adio AM, Paul C, Tesso H, Kolth P, König WA (2004) Absolute configuration of helminthogermacrene. *Tetrahedron Asymmetry* **15**:1631–1635.
58. de Kraker JW, Franssen MC, Dalm MC, de Groot A, Bouwmeester HJ (2001) Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene A hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiol* **125**: 1930–1940.
59. Křepinský J, Motl O, Dolejš L, Novotný L, Herout V, Bates RB (1968) The structure of elemophilene, the sesquiterpenic hydrocarbon from *Petasites* genus. *Phytochemistry* **9**: 3315-3318.
60. Kohl AC, Kerr RG (2003) Pseudopterosin biosynthesis: Aromatization of the diterpene cyclase product, elisabethatriene. *Mar Drugs* **1**(1):54–65.
61. Richter R, Basar S, Koch A, König WA (2005) Three sesquiterpene hydrocarbons from the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae). *Phytochemistry* **66**(23):2708–2713.
62. Fricke C, *et al.* (1999) Sesquiterpenes from *lippia integrifolia* essential Oil. *J Nat Prod*

62(5):694–696.

63. Mao S-C, Gavagnin M, Mollo E, Guo Y-W (2011) A new rare asteriscane sesquiterpene and other related derivatives from the Hainan aeolid nudibranch *Phyllodesmium magnum*. *Biochem Syst Ecol* **39**(4-6):408–411.
64. Jakupovic J, *et al.* (1989) Twenty-one acylphloroglucinol derivatives and further constituents from south African *Helichrysum* species. *Phytochemistry* **28**(4):1119–1131.
65. Li L, *et al.* (2011) Diterpenes from the Hainan soft coral *Lobophytum cristatum* Tixier-Durivault. *J Nat Prod* **74**(10):2089–2094.
66. Hoshino T, Kumai Y, Kudo I, Nakano S, Ohashi S (2004) Enzymatic cyclization reactions of geraniol, farnesol and geranylgeraniol, and those of truncated squalene analogs having C20 and C25 by recombinant squalene cyclase. *Org Biomol Chem* **2**(18):2650–2657
67. Bohlmann F, Zdero C (1982) Glaucolides and other constituents from south african *Vernonia* species. *Phytochemistry* **21**(9):2263–2267.
68. Cool LG (2001) ent-Daucane and acorane sesquiterpenes from *Cupressocypariss leylandii* foliage. *Phytochemistry* **58**(6):969–972.
69. Valle MG, Appendino G, Nano GM, Picci V (1987) Prenylated coumarins and sesquiterpenoids from *Ferula communis*. *Phytochemistry* **26**(1):253–256.
70. Vanderah DJ, Rutledge N, Schmitz FJ, Ciereszko LS (1978) Marine natural products: Cembrene-A and cembrene-C from a soft coral, *Nephthea* sp. *J Org Chem* **43**(8):1614–1616
71. Kashman Y, Groweiss A (1980) New diterpenoids from the soft corals *Xenia macrospiculata* and *Xenia obscuronata*. *J Org Chem* **45**(19):3814–3824.
72. Sheldrick AC (2008) A short history of *SHELX*. *Acta Cryst* **A64**:112–122.
73. Meguro A, Tomita T, Nishiyama M, Kuzuyama T. (2013) Identification and characterization of bacterial diterpene cyclases that synthesize the cembrane skeleton. *Chembiochem*. **14**:316–321.
74. Fukumoto A, Kim YP, Matsumoto A, Takahashi, Y, Shiomi K, Tomoda H, Omura S (2008) Cyslabdan, a new potentiator of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Streptomyces* sp. K04-0144. I. Taxonomy, fermentation, isolation and structural elucidation. *J Antibiot* **61**:1–6.
75. Fukumoto A, Kim YP, Hanaki H, Shiomi K, Tomoda H, Omura S (2008) Cyslabdan, a new potentiator of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Streptomyces* sp. K04-0144. II. Biological activities. *J Antibiot* **61**:7–10.
76. Hamano Y, Kuzuyama T, Itoh N, Furihata K, Seto H, Dairi T (2002) Functional analysis of eubacterial diterpene cyclases responsible for biosynthesis of a diterpene antibiotic,

terpentecin. *J Biol Chem* **277**:37098-37104.

77. Kawasaki T, Hayashi Y, Kuzuyama T, Furihata K, Itoh N, Seto H, Dairi T (2006) Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster. *J Bacteriol* **188**:1236-1244
78. Appleton RA, McCrindle R, Overton KH (1970) The diterpenes from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 9(3):581-583.
79. Roengsumran S, Petsom A, Sommit D, Vilaivan T (1998) Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* 50(3):449-453.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました北里大学生命科学研究所微生物制御工学研究室 池田治生教授に厚く御礼申し上げます。また、有益かつ的確な御指導と御助言を賜りました小松護講師に心より厚く御礼申し上げます。

また副査である北里大学大学院薬学研究科の供田洋教授、東京大学大学院農学研究科の大西康夫教授、並びに東京大学生物生産工学研究センターの葛山智久准教授には、本報の作成および博士論文公聴会での発表内容について、丁寧な御指導を賜りました。心より感謝致します。

北里大学大学院薬学研究科の長光亨教授、並びに有馬志保助教には hydropyrene の誘導体を提供して頂きました。また、hydropyrene-1,4-epoxide の X 線結晶解析を行って頂いた、東京工業大学の江口正教授、植草秀裕准教授並びに上本紘平博士に厚く御礼申し上げます。

本研究において多くのゲノムデータを提供して頂いた産業総合研究所の新家一男上級主任研究員に厚く御礼申し上げます。また構造解析に際しての細やか御指導や御助言を賜りました、北里生命科学研究所の岩月正人講師、並びに北里大学大学院薬学研究科の福田隆志助教に厚く御礼申し上げます。

そして、本研究を進めるにあたり、日々の生活において様々な形でご協力、ご援助を頂きました微生物制御工学研究室の皆様に深く感謝致します。