【解説】

最大の天然物 ポリセオナミドの構造決定

濱田季之

ポリセオナミド類は海綿から単離された強力な細胞毒性を示すポリペプチドであり、構造決定された二次代謝産物の中では最大の分子量を有する。多くの異常（非天然型）アミノ酸を含むこと、D体とL体のアミノ酸残基が交互に並んでいること、有機溶媒中において6残基で一回転する β ヘリックス構造をとることなど、これまでに類を見ない天然有機化合物である。ここでは、ポリセオナミドBの化学構造および三次元構造の決定法について解説しながら、天然有機化合物の構造決定の意義や魅力について紹介する。

『神農本草経』は、後漢（西暦25～220年）の時代にまとめられた中国最古の本草書であるとともに、世界最古の天然物化学の書籍でもある。その書には、1年の日数に合わせた365種の薬効成分が収載されており、食すことで薬や毒になる動植物の情報が事細かに書かれた、現代でも有用な文献の一つである。天然物化学の約2000年の歴史における9割の期間、天然物は主に植物の花、葉、根などを乾燥させたり、煎じたり、粉末にしたりして利用する、いわゆる生薬としての利用に限られてきた。19世紀初頭になり、アヘンからモルヒネが単離され

たり（1806年、F. W. Sertürner）、マラリアの特効薬キニーネがキナの木の新皮から単離される（1820年、P. J. Pelletier & J. B. Caventou）などして、薬を「化合物（モノ）」として取り出す、いわゆる「モノ取り」研究文化が芽生えた。一方、海の生物からの「モノ取り」研究が本格的に進展したのは1980年代初頭である。クロマトグラフなどの分離技術や核磁気共鳴（NMR）などを用いた分光光学が革命的に発展を遂げ、その恩恵により世界中で新規有用化合物の発見ラッシュが始まった。また、アクアラングの開発により海洋生物資源の確保も容易になり、陸・海の両方から「モノ取り」は飛躍的に進展した。そこから約20数年間は、イチイの木の新皮からのタキソール[®]（paclitaxel）⁽¹⁾や群体ホヤ *Ecteinascidia turbinata* からのエクチナサイジン743⁽²⁾など、抗ガン剤のリード化合物が単離・構造決定され、また細胞毒性を指標にした活性物質の探索研究に潤沢な予算もつくといったぐあい、まさにモノ取り研究の全盛期であった。

ところが、2000年代に入り、ちょうど社会経済においてバブルがはじけた頃、モノ取り研究にも危機が訪れた。手間をかけて目的物質を単離しても、なかなか新規物質がとれなくなってきたことはもちろんであるが、新規細胞毒性物質がとれて構造決定したとしても、そこか

Structure of the Largest Natural Organic Compound, Polytheonamide B
Toshiyuki HAMADA, 鹿児島大学大学院理工学研究科

ら抗ガン剤への道筋は遠く、またそのモノと相互作用しているであろう生体高分子の構造情報や相互作用に関する知見も乏しいので、モノ取り研究の意義も疑われ始めた。ちょうどその時期に細胞毒性物質の探索をしていた筆者の耳にも「ガンを殺すモノが見つかった、結局、正常細胞も殺してしまうから、意味を成さないのでは」といった研究意欲を減少させる声も聞こえ始め、そして、モノ取り研究は一時元気をなくしたのである。

21世紀に入り、生体高分子の研究が爆発的に進展した。リボソーム⁽³⁾やロドプシン⁽⁴⁾といった超巨大分子の三次元構造が次々に発表され、それまで大まかにしかわかっていなかった酵素や高分子の形や役割が原子レベルで詳細にわかるようになった。また、2002年にはヒトゲノムの全容が明らかになり⁽⁵⁾、ガンをはじめ、多くの病気の発症メカニズムも様々な角度から詳細に調べられた。そのような生体分子研究の発展に触発され、天然物化学研究も息を吹き返した。モノ取り分野においても、これまでの細胞毒性主体から大きく方向転換し、ガン細胞や病気の原因遺伝子などに選択的に作用する物質が探索され始めた。また、メタゲノム法⁽⁶⁾を応用し、培養が難しい微生物や海洋無脊椎動物から有用物質の生合成遺伝子を取り出し、新薬を開発する試みも行なわれるようになってきた。

さらに、NMRによる構造決定についても、ナノプローブやクライオプローブなどの登場により、ここ十数年でNMR測定感度が飛躍的(10~20倍)に向上し、わずか0.1 mgの化合物でも構造決定できる時代になった。また、DOSY解析やNMRデータベースの充実により、以前に比べて非常に敏速に化合物の構造決定ができるようになり、場合によっては混合物の状態からの解析も可能となってきた。

近頃は、SciFinderなどの検索ソフトを利用し、目的の化合物の分子量や部分構造がわかると既知物質がどうか瞬時にわかり、新規物質であっても構造の予想が容易にできるようになってきた。そのような意味で、NMRを主体とした天然有機化合物の構造決定はルーチンワークとなったかのような錯覚を覚える。しかし、増加し続ける新規化合物の中に新しいタイプの化合物が見いだされる割合が減少してきているとしても、天然有機化合物の構造研究においては、決してルーチンで片づけることのできない数々の要素がある。

ルーチンでは構造解明できなかった化合物の一例として、ポリセオナミドB (polytheonamide B, pTB) がある。pTBは、内部が黄色い海綿 *Theonella swinhoei* から単離された強力な細胞毒性 (p388 マウス白血病細胞

に対して IC₅₀ 68 pg/ml) を示す脂溶性ポリペプチドである。このペプチドは分子量 5,032 と、構造決定された二次代謝産物の中では最大クラスである。多くの異常アミノ酸を含み、しかも構成アミノ酸の D/L 比が約 1:1 というこれまでの天然有機化合物にない性質を示す。今回は、この化合物の構造決定を例にとり、天然有機化合物の複雑さ、構造決定の難しさ、そしてモノ取り研究の面白さについて解説したい。なお、本節で述べられなかったポリセオナミドBの単離や構造決定の詳細については、同様のテーマの原著論文などを参照されたい^(7,8)。

構成アミノ酸の決定

pTBは、分子量と一次元 ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルから考えて、50 残基程度のアミノ酸で構成されていることが予想された。一般的な生体分子由来のペプチドや小型タンパク質の配列解析では、次に、ペプチドシーケンサーによる配列分析、あるいは COSY, HOHAHA および NOESY などの二次元 NMR スペクトルの解析による平面構造の決定に進む。しかし、pTBはN末端がブロックされていてエドマン分解反応は進行しない。また、二次元 NMR スペクトルは、多数のシグナルが重なり合った複雑なチャートを与えるのみならず、4 級炭素をもつ「異常アミノ酸」を多数含むため、タンパク質の構造決定に用いられる NMR 解析法もうまく適用できなかった。いくつかの条件で結晶化も試みてはみたが、いずれも不成功に終わった。

そこで、まず、このペプチドを構成するアミノ酸の種類を明らかにすることにした (図1)。最初に pTB の酸加水分解物のアミノ酸分析を行なったところ、標準アミノ酸としてアスパラギン酸 (7.9 残基分)、スレオニン (3.9)、セリン (1.5)、グルタミン酸 (2.0)、グリシン (10.0)、アラニン (8.9)、バリン (4.3)、およびイソロイシン (2.3) を同定することができた。アミノ酸分析のクロマトグラム上には、それら標準アミノ酸に加え、異常アミノ酸と考えられる数個のピーク、そしてアンモニアとメチルアミン (CH₃NH₂) 由来のピークも観測された。

異常アミノ酸 (未同定アミノ酸) がペプチド中に含まれる場合、酸加水分解後、各アミノ酸を単離し、それぞれの構造決定を行なうのが常道であろう。しかし、本研究では加水分解によって得られる混合物のまま構造解析を行なうことを企図した。すなわち、pTB 10 mg を 6N HCl, 110°C で加水分解し、加水分解物についてそのまま二次元 NMR 解析を行なった。ペプチドの状態で

図 1 ■ ポリセオナミド B の構成アミノ酸および N 末端保護基の化学構造の決定

は、同種のアミノ酸であってもそれぞれのおかれた環境の違いによって異なるケミカルシフト値を与えるため、スペクトルが複雑になる。一方、加水分解されると同種のアミノ酸が 1 組のシグナルを与えるため、解析がかなり容易になる。この結果、上記アミノ酸分析で同定した標準アミノ酸に加えて、*allo*-スレオニン (*α*Th), *threo*-β-ヒドロキシアスパラギン (Ham), *tert*-ロイシン (Tle), β-メチルグルタミン (Mgn), β-ヒドロキシバリン (Mth), β-メチルイソロイシン (Mil) を帰属した。Mil については、¹H-NMR 上でシグナルが密集した脂肪酸側鎖部分 (0.7~1.0 ppm) の構造を確認するために、加水分解混合物からこのアミノ酸を単離し、NMR スペクトルで構造決定した。

加水分解物のアミノ酸分析および NMR 構造解析で明らかになった構成アミノ酸をもとにして、pTB 自身の NMR 構造解析を行なった。詳細な NOESY 解析の結果、酸性アミノ酸残基のすべてのカルボキシ側鎖は、アミド化もしくは *N*-メチルアミド化されていることがわかった。つまり、標準アミノ酸のアスパラギン酸はアスパラギン (Asn) および δ-*N*-メチルアスパラギン (Asm) として、グルタミン酸はグルタミン (Gln) として、異常アミノ酸の *threo*-β-ヒドロキシアスパラギン酸は *threo*-β-ヒドロキシ-δ-*N*-メチルアスパラギン (Ham) として、β-メチルグルタミン酸は β-メチルグルタミン (Mgn) としてペプチド鎖中に含まれていることがわかった。ま

た、加水分解すると容易に分解してしまい同定することができなかった 44 残基目の未同定アミノ酸残基については、ポリペプチドそのものの NMR 構造解析を試みた。図 1 に示すように、この残基の γ 位のメチレンの化学シフト値は (δ_C 63.3, δ_H 2.70, 2.98) であり、隣接原子が酸素ではあまりにも高磁場側であり、窒素では逆にあまりにも低磁場側であった。慎重に解析を進めたところ、その γ 位炭素 (δ_C 63.3) と δ_H 2.52 の化学シフト値を示す ε-メチルプロトンとの間に HMBC 相関が観測されていることがわかった。さらに、元素分析で硫黄が検出されたことや最終的な分子量を考慮に入れ、44 残基目のアミノ酸を β,β-ジメチルメチオニンスルホキシド (Mms) と決定した。

N 末端保護基については、1 残基目の Gly のアミドプロトンが 161 ppm の炭素と HMBC 相関を示し、この炭素が他の水素とまったく相関を示していなかったことから、当初カルバモイル基と考えた。ところが、pTB を NaBH₄ で還元したデヒドロキシポリセオナミド B において、新しく生じたオキシメチンプロトンが Gly-1 のアミドプロトンと ROESY 相関を示し、さらにそのオキシメチン炭素がネオペンチルメチル基に HMBC 相関を示すことがわかった。これらのことに加え、199 ppm の炭素の存在を考慮し、N 末端の修飾基の化学構造を 5,5-ジメチル-2-オキソヘキサノイル基⁽⁹⁾ と決定した。

アミノ酸配列解析

ポリセオナミドは脂溶性であるものの、重メタノール、重アセトンといったよく使われる重溶媒には溶け難い。もちろん、重水にはまったく溶けなかった。このポリペプチドを溶解しNMR測定に使える溶媒は、DMSO- d_6 もしくは重メタノール/重クロロホルム(CD₃OH/CDCl₃) 混合溶媒のみであった。配列解析には、三次元構造に起因するNOEのないDMSO- d_6 中のデータを用いて解析を進めた。まず、COSYとHOHAHAデータから標準アミノ酸の残基数を明らかにし、次いでNOESYデータから側鎖に4級sp³炭素をもつアミノ酸の種類と残基数を決定した。さらに、隣接するアミノ酸のアミドプロトンどうしのNOEをもとにして、ほとんどのアミノ酸残基のつながりを決定した。また、アミドプロトンとC α プロトンの相関から未決定部分の配列も決定し、48個のアミノ酸の主鎖のつながりを確定した。

立体化学

アミノ酸などの不斉中心を有する化合物には、右手と左手の関係のように、D体とL体の対掌体が存在する。人間を含めて陸上に生息する生物に含まれるペプチ

ドやタンパク質のほとんどはL体の標準アミノ酸で構成される。しかし、6億年前に誕生した、最も古い多細胞動物である海綿の場合、異常アミノ酸が含まれていたり、D体のアミノ酸を含むペプチドも高頻度で含まれている。同じ平面構造をもつアミノ酸であっても、D体とL体が違うだけで三次元構造や活性に大きな違いが出てくる。そのため、立体化学を決めることは非常に重要である。

pTBの構成アミノ酸の立体化学については、まずその酸加水分解物をGC-MS法⁽¹⁰⁾やMarfey法⁽¹¹⁾に適用することで検討した(図2)。その結果、D体のアミノ酸としては α Th, Asp(AsmおよびAsn), HamおよびSer, L体のアミノ酸としてはThr, Ile, Glu, ValおよびMilが決定された。また、2個所の不斉中心をもつMgnは、4種すべての異性体を化学合成⁽¹²⁾した後、それらを標品にしてGC-MS分析することでL-*erythro*体と決定した。残りのアミノ酸, Ala(D/L=2:5), Tle(4:4), およびMth(2:1)は、D体とL体の混合物であることから、各アミノ酸残基ごとに絶対配置を検討した。

4N HCl/エタノール(1:1)中、70℃、2時間加熱することで得られた部分加水分解物を逆相HPLCで分取した。得られたフラグメントペプチドのアミノ酸配列は、タンデムFABマスペクトルにより決定した後、構成アミ

図2 ■ ポリセオナミド B の構成アミノ酸の絶対配置の決定

ノ酸残基の絶対配置を検討した。各フラグメントペプチドをダンシル誘導体とし、完全加水分解後 FDAA 誘導化し、HPLC 分析することで、絶対配置を決定した。つまり、N 末端のダンシル化アミノ酸はキラルな担体を用いた HPLC (Sumichiral OA-3200) 分析に、それ以外の FDAA 誘導化されたアミノ酸は ODS-HPLC 分析 (Marfey 法) に供した。また、N 末端から 2 番目のアミノ酸残基の絶対配置については、ペプチドに 1 サイクルの手動エドマン分解を行ない、上記と同じくダンシル化誘導体の Marfey 分析を行なうことで、各フラグメントに含まれるアミノ酸残基の絶対立体配置を決定した。pTB の 47 および 48 残基目は、L-Thr あるいは D- α Th のいずれかであった。両者は NMR データのみでは区別することができなかったが、pTB を NaBH₄ 還元した際に副生成物として還元生成物より 101 マスユニット少ない、つまり Thr または α Th が C 末端から 1 個切れた生成物が得られた。このペプチドの加水分解物をキラル GC 分析したところ、D- α Th のみが検出された。したがって、C 末端の第 48 残基目は L-Thr であると結論できた。

酸加水分解により容易に分解されてしまう 44 残基目の Mms については、酸耐性の誘導体に導く必要があった。そこで、pTB をまず NH₄I 存在下で Me₂S 還元⁽¹³⁾した後、CNBr で処理し、 β , β -ジメチルホモセリンラクトン誘導体に導いた。その誘導体の加水分解物のキラル GC 分析を行ない、L 体の β , β -ジメチルホモセリンラクトンの存在を確認した。以上のようにして、すべてのアミノ酸の絶対配置を決定した。pTB のアミノ酸配列は、奇数残基目に D 体、偶数残基目に L 体のアミノ酸が並んでいた。なお、井上らによる pTB の全合成⁽¹⁴⁾により、絶対配置を含めた pTB の化学構造が正しいことは確認されている。

三次元構造

pTB は、DMSO-*d*₆ 中と同様に、重メタノール (CD₃OH)/重クロロホルム (CDCl₃) 混合溶媒中でも良好な NMR スペクトルを与える。しかし、両者の間でアミドプロトン (NH) および α 位プロトン (C α H) の化学シフトの領域と NOESY クロスピークの分布が大きく異なっていた。これは、これらの溶媒中で pTB のとる三次元構造が大きく異なることを意味する。CD₃OH/CDCl₃ (1:1) 中では、5~7 残基離れたアミノ酸どうしで NOESY 相関が観測されるなど、高度な三次元構造をとっていることが示唆されたので、その溶媒中での三次元構造解析を行なっ

た。

DMSO-*d*₆ 中の NMR データから決定された化学構造をもとにして、CD₃OH/CDCl₃ (1:1) 中の pTB の ¹H および ¹³C-NMR シグナルを帰属した後、二次元 NMR データを詳細に解析することで三次元構造情報を抽出した。まず、¹H-NMR と DQF-COSY のクロスピークから求めた、アミノ酸の NH プロトンと C α H プロトン間のカップリング定数は、N 末端の Gly 以外のすべての残基で 8 Hz 以上の値を示し、 β -シート様のコンフォメーションをとることが示唆された。 β -シート様構造は、この重溶媒中の NOESY スペクトルでは、C α H プロトンと次の残基の NH プロトンとに強い NOE、隣接残基間 NH プロトンどうしに弱い NOE が観測されたことからわかる。また、pTB を CD₃OD/CDCl₃ に溶解後、30 分毎に HOHAHA スペクトルを測定することで重水素置換実験を行なった。Gly-1, Gly-25, Tle-30, Gly-32 の NH/C α H のクロスピークは 10 時間後には完全に消失していたが、その他の NH シグナルは 10 時間以降もはっきり観測され、分子内で強い水素結合を形成していることが確認された。NOE データを詳細に検討した結果、NH プロトンは 5 残基または 7 残基離れたアミノ酸のカルボニル酸素と水素結合していた。また、偶数残基の C α H プロトンとそこから C 末端側方向に 6 残基目アミノ酸の NH プロトン、奇数残基の C α H プロトンとそこから N 末端側方向に 6 残基目アミノ酸の NH プロトンの NOE が観測されたことにより、6 残基で一回転する右巻きのらせん構造をとることがわかった。

247 個のロングレンジの情報を含む 501 個の距離制約条件と 48 個の二面角制約条件をもとに、日本電子 JMS-S1000 MolSkop システム⁽¹⁵⁾ を用いて三次元構造の初期座標を構築し、DADAS90⁽¹⁶⁾, CYANA⁽¹⁷⁾ を使って構造計算を行ない、得られた最適構造を OPALp⁽¹⁸⁾ でエネルギー安定化することで最終構造を求めた。その結果、pTB が CD₃OH/CDCl₃ 混合溶媒中で β ヘリックス構造 (right-handed $\beta^{6.3}$ helix) をとっていることが決定された (図 3-A)。pTB の三次元構造の座標は、PDB (Protein Data Bank) に登録されている (PDB ID code 2RQO)。

β ヘリックス構造ではアミノ酸の側鎖がすべて外側に突き出ているので、ヘリックス筒は内径 3~4 Å 程度の大きな孔を形成する (図 3-B)。また、pTB は疎水性アミノ酸を多く含み、N 末端もブロックされていることから、脂溶性 (疎水性) が高く膜タンパク質のような性質を備えている。これらのことから、このペプチドは生体中で細胞を貫通するチャンネル (図 3-C) を形成し、そして細胞内部のイオンバランスを破壊し、細胞を死へと導

図3 ■ pTB の三次元構造

(A) ヘリックス軸に対して横から見た図. ball-and-stick で描かれた部分は、*N*-メチルアスパラギン残基の縦並びを示す. (B) ヘリックス軸に対してC末端側から見た図. (C) pTBが細胞膜に突き刺さった模式図.

くのではないかという仮説が容易に立てられた. この仮説については, pTBと同じく D 体と L 体のアミノ酸残基が交互に配列するグラミシジン A (gramicidin A, 図2) が脂質二重膜中で $\beta^{6.3}$ ヘリックス構造をとること⁽¹⁹⁾, また, 実際に pTB は脂質平面膜法により 1 価カチオンを特異的に透過するという老木らの実験結果⁽²⁰⁾ から証明された. グラミシジン A は, $\beta^{6.3}$ ヘリックス構造をとった 2 分子が N 末端どうして直列に結合し, 二重膜を貫通するチャンネルを形成する. $\beta^{6.3}$ ヘリックス構造は脂質二重膜中でのみ観察されていて, 溶液中では認められていない. これに対して, pTB は軸方向の長さが約 45 Å (45×10^{-10} m) であり, 1 分子で膜貫通可能なチャンネルを形成する. また, Asm が配列上 6 個おきに存在し, それらの側鎖どうしが水素結合を形成することで, ヘリックス構造を安定化している. その結果, 生体膜環境に近い有機溶媒 (メタノール/クロロホルム混合溶媒など) 中でも β ヘリックス構造をとる. このような性質の違いが, pTB において認められる, グラミシジン A より 1,000 倍強い細胞毒性をもたらしているものと推察される.

pTB 構造決定の意義

pTB は, 生体タンパク質のアミノ酸配列などに使われるルーチンの構造決定法では解明できないような化学

構造を有していた. 具体的には, ①前例のない 5,5-ジメチル-2-オキソヘキサノイル基によって N 末端がブロックされていたこと, ②分子に含まれるアミノ酸の半数以上が異常アミノ酸であり, そのうち 1 種については新規アミノ酸 (Mms) であったこと, ③分子全体を通して, D 体と L 体のアミノ酸が交互に配列していたことであり, これら 3 つのポイントは, これまで報告されているペプチドに類を見ない特徴である. この“超天然物” pTB の化学構造の解明には多くの時間と労力を割くことにはなったが, 試行錯誤の末に完全に決定することができた. また, 構造のバラエティーもさることながら, pTB はこれまで主に NMR を使って構造決定された二次代謝産物の中ではおそらく最大の分子量 (5,032) を有している. pTB の研究を通し, 構造決定可能な天然有機化合物の大きさの上限を引き上げたことで, 天然有機化合物研究の幅が広がったと確信する. さらに pTB については, 化学構造のみならず, 分子のカタチ (三次元構造) を決めることができた. そのカタチをもとにして, チャンネルとしての機能, そして自身のもつ強い細胞毒性の作用メカニズムを議論できたことは大変意義深い.

pTB はイオンチャンネル能をもつ (現時点で) 世界最小の分子である. これまで知られている Na チャンネルや K チャンネルなどは数百個のアミノ酸で構成されているのに対し, pTB はわずか 48 個の最小のパーツ (アミノ酸) で安定なチャンネルを形成しているのである.

このような孔形成毒素はこれまで前例がない。今後も、分子プローブや人工チャンネルなど様々なバイオナノテクノロジー分野へますます応用されていくことが期待できる。

モノ取り研究の将来にむけて

モノ取り研究が元気を取り戻したとはいえ、今後のさらなる発展・ブレイクスルーは不可欠である。生物試料から生物活性物質を単離し、化学構造を決めるだけの時代ではなくなったが、モノ取り研究が必要でなくなったわけではなく、これからも私たちの予測を超えた特異な化合物を探索し続けなければならない。筆者ら「モノ取り屋」の研究が医学・薬学分野やライフサイエンス分野においてますます貢献できること、そして、モノ取り研究の延長として、新たな研究分野が生まれることを期待している。

謝辞：pTBの研究を遂行するに当たり、お世話になりました多くの方々に、この場をもちまして御礼申し上げます。

文献

- 1) M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon & A. T. McPhail: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325 (1971).
- 2) K. L. Rinehart, T. G. Holt, N. L. Fregeau, J. G. Stroh, P. A. Keifer, F. Sun, L. H. Li & D. G. Martin: *J. Org. Chem.*, **55**, 4512 (1990).
- 3) (a) F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi & A. Yonath: *Cell*, **102**, 615 (2000); (b) N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore & T. A. Steitz: *Science*, **289**, 905 (2000).
- 4) K. Palczewski *et al.*: *Science*, **289**, 739 (2000).
- 5) International Human Genome Sequencing Consortium: *Nature*, **431**, 931 (2004).
- 6) *Nature Rev. Microbiol.*, **3**, No. 6 (2005).
- 7) (a) T. Hamada, S. Matsunaga, G. Yano & N. Fusetani: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 110 (2005); (b) T. Hamada, T. Sugawara, S. Matsunaga & N. Fusetani: *Tetrahedron Lett.*, **35**, 719 (1994). (c) T. Hamada, T. Sugawara, S. Matsunaga & N. Fusetani: *Tetrahedron Lett.*, **35**, 609 (1994).
- 8) T. Hamada, S. Matsunaga, M. Fujiwara, K. Fujita, H. Hirota, R. Schmucki, P. Güntert & N. Fusetani: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12941 (2010).
- 9) G. Krix, A. S. bommarius, K. Drauz, M. Kottenhahn, M. Schwarm & M.-R. Kula: *J. Biotechnol.*, **53**, 29 (1997).
- 10) H. Frank, G. J. Nicholson & E. Bayer: *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 174 (1977).
- 11) P. Marfey: *Carlsberg Res. Commun.*, **49**, 591 (1984).
- 12) A. B. Mauger: *J. Org. Chem.*, **46**, 1032 (1981).
- 13) (a) H. Yajima, N. Fujii, S. Funakoshi, T. Watanabe, E. Murayama & A. Otake: *Tetrahedron*, **44**, 805 (1988); (b) E. Nicolas, M. Vilaseca & E. Giralt: *Tetrahedron*, **51**, 5701 (1995).
- 14) M. Inoue, N. Shinohara, S. Tanabe, T. Takahashi, K. Okura, H. Itoh, Y. Mizoguchi, M. Iida, N. Lee & S. Matsuoka: *Nature Chem.*, **2**, 280 (2010).
- 15) S. Endo, H. Wako, K. Nagayama & N. Go: "Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Plenum, New York, 1991, p. 233.
- 16) S. Kumazawa, S. Endo, T. Yamazaki, K. Fujita & K. Nagayama: "Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Plenum, New York, 1991, p. 439.
- 17) P. Güntert, C. Mumenthaler & K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.*, **273**, 283 (1997).
- 18) (a) R. Koradi, M. Billeter & P. Güntert: *Comput. Phys. Commun.*, **124**, 139 (2000); (b) P. Luginbühl, P. Güntert, M. Billeter & K. Wüthrich: *J. Biomol. NMR*, **8**, 136 (1996).
- 19) (a) R. Sarges & B. Witkop: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2011 (1965); (b) S. Oiki, R. E. Koeppe II & O. S. Andersen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2121 (1995).
- 20) (a) S. Oiki, I. Muramatsu, S. Matsunaga & N. Fusetani: *Folia Pharmacol. Japon.*, **110**, 195 (1997); (b) M. Iwamoto, H. Shimizu, I. Muramatsu & S. Oiki: *FEBS Lett.*, **584**, 3995 (2010).